

Title	薄層クロマトグラフィと直接ケイ光定量法による微量分析(IV) : 還元糖類(グルコース, ガラクトースおよびラムノース)のダンシルヒドラジンとポリアミド薄層を用いた微量定量法
Sub Title	Microanalysis with thin-layer chromatography and direct scanning fluorometry (IV) : microdetermination of reducing sugars (glucose, galactose and rhamnose) using polyamide thin-layer
Author	村上, 文子(Murakami, Ayako) 大谷, 悦子(Otani, Etsuko) 山村, 文子(Yamamura, Fumiko) 広田, 恵子(Hirota, Keiko) 前田, 喜久江(Maeda, Kikue) 西沢, 秀幸(Nishizawa, Hideyuki)
Publisher	共立薬科大学
Publication year	1982
Jtitle	共立薬科大学研究年報 (The annual report of the Kyoritsu College of Pharmacy). No.27 (1982.) ,p.27- 31
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	原報
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000027-0027

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

薄層クロマトグラフィと直接ケイ光定定量法による微量分析 (IV)

還元糖類 (グルコース, ガラクトースおよびラムノース) のダンシルヒドラジンとポリアミド薄層を用いた微量定量法

村上文子, 大谷悦子, 山村文子, 広田恵子, 前田喜久江, 西沢秀幸

Microanalysis with thin-layer chromatography and direct scanning fluorometry (IV) Microdetermination of reducing sugars (glucose, galactose and rhamnose) using polyamide thin-layer

Ayako MURAKAMI, Etsuko OTANI, Fumiko YAMAMURA, Keiko HIROTA,
Kikue MAEDA, and Hideyuki NISHIZAWA

A fluorometric method for the determination of reducing sugars (glucose, galactose and rhamnose) using polyamide thin-layer is described. Reducing sugars were reacted with dansyl-hydrazine at 40°C for 1 hr and dansylated reducing sugars were extracted into water. An aliquot of the extract was spotted on the polyamide thin-layer plate, and developed with a solvent of dichloromethane : acetone : iso-propyl alcohol (60 : 3 : 2). The spots were measured with a scanning fluorometer. The fluorescence intensity of dansylated reducing sugars was stable on the plate at least 5 hours. The relative standard deviation of fluorescence intensity on the same thin-layer plate was (5~6) % at 1 nmol/spot, and the lowest limit of determination was 20, 50 and 100 pmol/spot with dansyl-glucose, dansyl-galactose and dansyl-rhamnose, respectively.

1. 緒 言

著者らは試料をケイ光性誘導体とした後薄層クロマトグラフィで分離し薄層上で直接測定して定量する方法で各種の生体内成分・医薬品等を分析しており, 今般, 1-ジメチルアミノナフタレン-5-スルフォニル-ヒドラジン (ダンシルヒドラジン) を用いて還元糖類の微量定量を検討した。

ダンシルヒドラジンを発ケイ光化剤に用いた還元糖類の分析法は, すでに薄層クロマトグラフィによるもの¹⁾, 高速液体クロマトグラフィによるもの²⁻³⁾等, 多くの研究がなされているが, 薄層クロマトグラフィは一度に数多くの試料を分析するのには適しているものの定量限界が高く, 一方, 高速液体クロマトグラフィは感度は高いが数多くの試料を分析するのに適当とは言えない。そこで薄層クロマトグラフィで高速液体クロマトグラフィ並の感度を得るために, ダンシル誘導体に対して高い分解能を有するポリアミド薄層を用いて再検討してみたところ, 良い結果が得られたので, 報告する。

2. 実 験

2.1 試薬および器具

糖溶液：グルコース，ガラクトースおよびラムノースをそれぞれ 6 mM メタノール溶液とし，用時適宜希釈した。

ダンシルヒドラジン溶液：ダンシルヒドラジン 1 g を 100 ml のメタノールに溶かした（約 40 mM 溶液）。

水はイオン交換水，試薬はすべて市販の特級品をそのまま用いた。

ポリアミド薄層：6-ナイロンをプロピレングリコール中で加熱して溶かし，ガラス板上に塗布して作った⁴⁾。

スポット：5 μ l のマイクロキャップ（ドラumont）を用いて行った。

pH 測定には HM-5 B 型 pH 計（東亜電波），反応水浴にはマグスターバス（井内盛栄堂，TMB-8），ケイ光測定にはスキャニングケイ光光度計（ヤマト科学，SFR-21，光源：低圧水銀灯）をそれぞれ使用した。

2.2 操作法

15 ml の共栓付試験管に糖溶液 0.5 ml とダンシルヒドラジン溶液 0.5 ml を入れ，さらに氷酢酸 0.1 ml を加えて 40°C の水浴中で 1 時間加熱したのちロータリーエバポレーターを用いて溶媒を減圧留去する。残滓にジクロロエタンと水を加えて共栓をし，激しく振盪して糖のケイ光誘導体（以後簡単のために DNS-糖とよぶ）を水層に，過剰のダンシルヒドラジンおよびその分解物をジクロロエタン層に振り分ける。水層の 5 μ l をポリアミド薄層上にスポットし，ジクロロエタン：アセトン：イソプロパノール（60：3：2）で約 40 分間展開し，室温で 30 分間程度扇風機の風を当てて薄層を充分乾かした後ケイ光強度を測定する。記録紙にはピーク形と積分図形とが描かれるが，積分図形の方から積分値を読み取ってケイ光強度の読みとした。

3. 結果および考察

3.1 DNS 誘導体の薄層クロマトグラム

各DNS-糖とダンシルヒドラジンの薄層クロマトグラムを Fig. 1 に示す。それぞれの R_f 値は，DNS-グルコース，DNS-ガラクトース，DNS-ラムノース，ダンシルヒドラジンの順に 0.35, 0.55, 0.70, 0.95 である。

DNS-糖の薄層上での安定性を調べるために，展開後の薄層に扇風機の風を当てて乾かした後ケイ光強度を経時的に測定してみたところ，測定開始後から少なくとも 5 時間の間はほぼ一定の値を示し（Fig. 2），DNS-糖はポリアミド薄層上でかなり安定であることがわかった。また，翌日再度測定したが，ケイ光強度に有意の差は見られなかった。

3.2 薄層上での定量範囲と測定の精度

DNS-糖量とケイ光強度の比例する濃度範囲を調べるために，高濃度の DNS-糖を調製し，水で順次希釈して標準溶液列を作った。それぞれの 5 μ l を一枚の薄層板上にスポットし，展開・測定して両対数グラフ用紙の横軸に DNS-糖量，縦軸にケイ光強度をとってグラフを描いたところ，グルコースでは 20 ピコモル～2 ナノモル，ガラクトースでは 50 ピコモル～2 ナノモル，ラムノースでは 100 ピコモル～5 ナノモルの間が直線上に載った（Fig. 3）。この測定下限は，高速液体クロマトグラフィによるもの³⁾に匹敵する。

また，一枚の薄層板上に同濃度（1 ナノモル/スポット）の DNS-糖を 8 点スポットして展開・

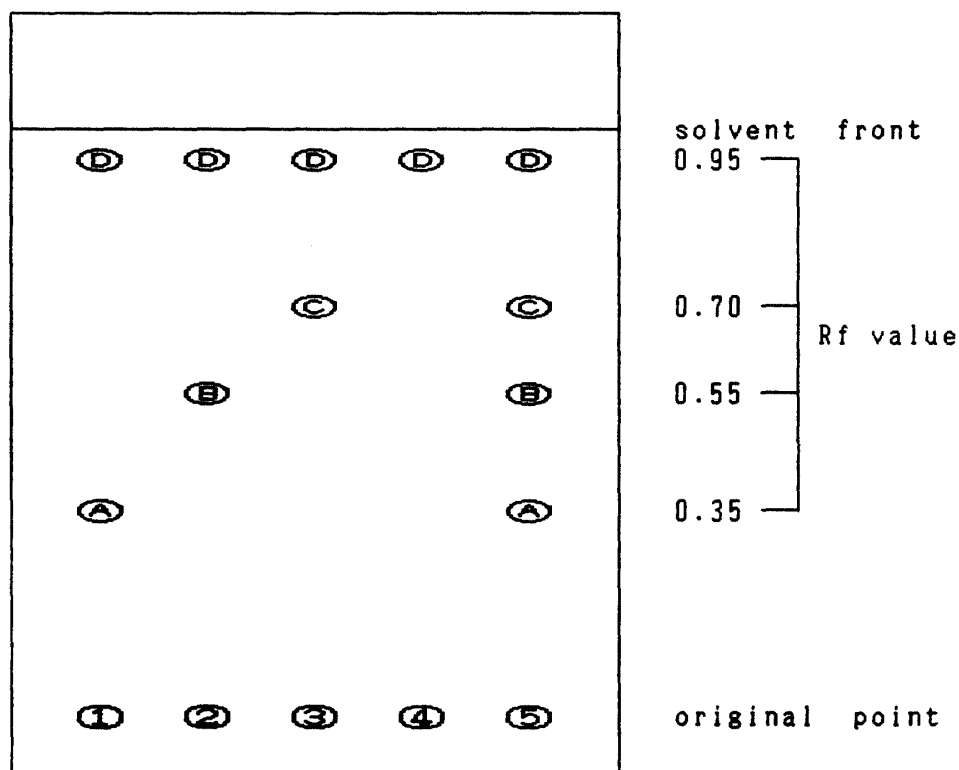


Fig. 1. Thin-layer chromatogram of dansyl-derivatives
 1: DNS-glucose extract, 2: DNS-galactose extract,
 3: DNS-rhamnose extract, 4: DNS-hydrazine,
 5: DNS-reducing sugars extract (mixture)
 A: DNS-glucose, B: DNS-galactose,
 C: DNS-rhamnose, D: DNS-hydrazine;
 developer: dichloromethane: acetone: iso-propyl alcohol =60: 3: 2

R. F. I.

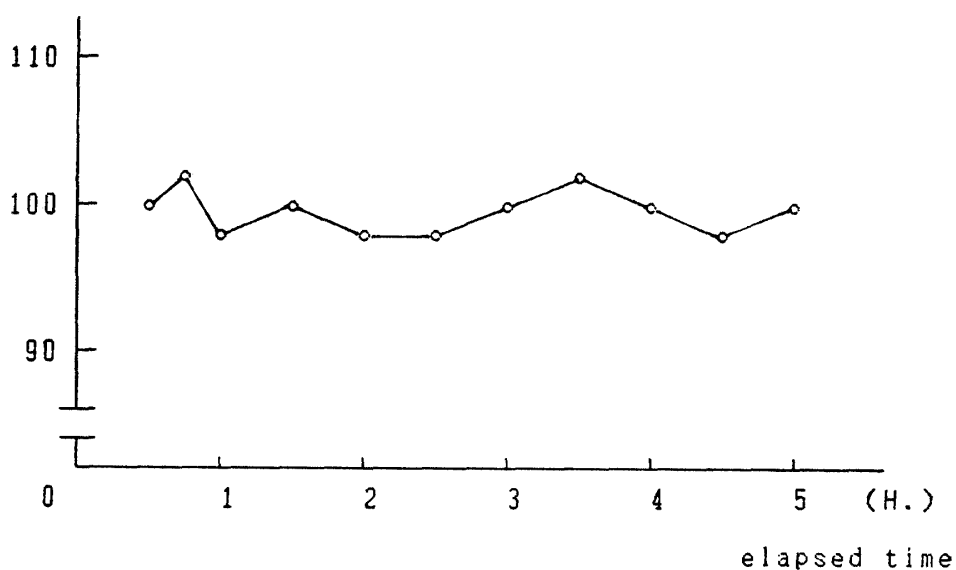


Fig. 2. Stability of DNS-reducing sugars on polyamide thin-layer
 (R.F.I.=relative fluorescence intensity(%))

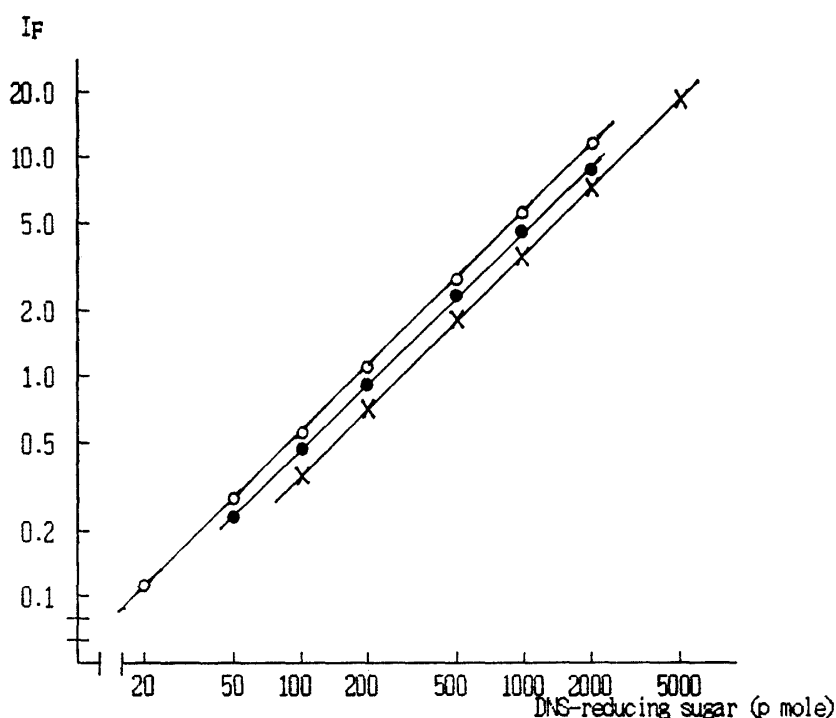


Fig. 3. Calibration curves of DNS-reducing sugars
○: DNS-glucose, ●: DNS-galactose, ×: DNS-rhamnose (IF: arbitrary units)

測定したところ、ケイ光強度の変動係数は、DNS-グルコースでは6%、DNS-ガラクトースとDNS-ラムノースでは5%であった。

3.3 ケイ光誘導体調製の各条件

糖の全量を3マイクロモルとして、ケイ光化に必要なダンシルヒドラジン量、酢酸量、および加温温度・時間について検討した。まず加温温度・時間であるが、文献¹⁾の75°C 10分間に比べ、40°C 1時間の方が、再現性に優れていた。次にダンシルヒドラジン量は、5mgあれば充分であり、酢酸量は(0.01~0.1)mlの間であればよいことがわかったので、5mgのダンシルヒドラジンと酢酸0.1mlを加えて40°Cで1時間加温することにした。

3.4 反応の定量性

以上の条件で、どのくらいの量の糖類が定量できるかを調べてみた。糖類は6mMのものを順次希釈してそれぞれの0.5mlを5mgのダンシルヒドラジンと反応させた。抽出時の水は5ml使用し、糖の量によりそれぞれの液量を変えて1枚の薄層板上にスポットして展開・測定し、両対数グラフ用紙の横軸に糖量、縦軸に(ケイ光強度測定値×5000/スポット量(μl))をとってグラフを描いたところ、グルコースでは10ナノモルから1マイクロモル、ガラクトースでは5ナノモルから2マイクロモル、ラムノースでは20ナノモルから5マイクロモルの間で直線上に載った(Fig. 4)。

4. 結 語

(0.005~5)マイクロモルのグルコース、ガラクトースおよびラムノースの混合物が5mgのダンシルヒドラジンと氷酢酸0.1mlの存在下で40°Cで1時間加温することにより定量的にケイ光

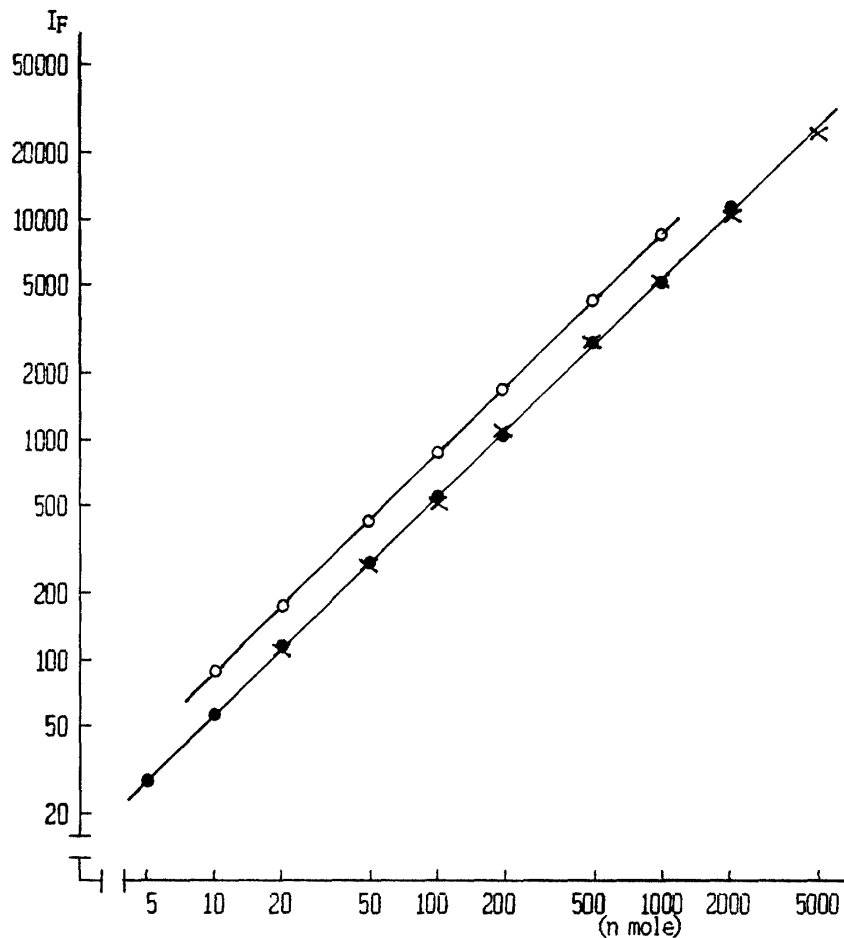


Fig. 4. Calibration curves of reducing sugars
 ○: glucose, ●: galactose, ×: rhamnose.
 (If: arbitrary units)

誘導体となった。これらの DNS-糖類をポリアミド薄層上にスポットしてジクロルメタン：アセトン：イソプロピルアルコール (60 : 3 : 2) で展開したのち室温で乾かしてからケイ光強度を薄層板上で直接測定した。3種の DNS-糖はよく分離し、また、これらのポリアミド薄層上で非常に安定であり、DNS-グルコースでは (0.02~2) ナノモル、DNS-ガラクトースでは (0.05~2) ナノモル、DNS-ラムノースでは (0.1~5) ナノモルの間でスポット量とケイ光強度が比例した。一枚の薄層板上でのケイ光強度の変動係数は 1 ナノモル/スポットの時で (5~6)% であった。

Literature

- 1) G. Avigad : *Journal of Chromatography*, **139**, 343 (1977).
- 2) W.F. Alpenfels : *Analytical Biochemistry*, **114**, 153 (1981).
- 3) M. Takeda, M. Maeda, A. Tsuji : *Journal of Chromatography*, **244**, 347 (1982).
- 4) 村上文子, 中込操子, 永倉真理子, 西沢秀幸, 石原政雄 : 共立薬科大学研究年報, Vol. 27, p. 15, (1983).