

# ニンヒドリン発色に及ぼす糖類, 酢酸, およびシリカゲル-Gの影響\*

江川宏\*\*\* · 山田尊士\*\*\* · 古川雅教\*\*\* · 山本広基\*\*\* · 達山和紀\*\*\*

Hiroshi EGAWA, Takashi YAMADA, Masanori FURUKAWA,  
Hiroki YAMAMOTO, and Kadzunori TATSUYAMA :

Effect of Sugars, Acetic Acid, and Silica  
Gel-G on the Coloration of Ninhydrin  
Butanol Solution

## 緒 言

さきに筆者らは薄層クロマトグラフィーによってシリカゲル上で展開されたフラクトースなどの糖類が酢酸酸性条件下でニンヒドリンによって発色することを報告した<sup>1)</sup>。

今回はニンヒドリンによる糖類の発色がブタノール溶液中でも、薄層クロマトグラフィーでのシリカゲル上での発色と同様に発色することが明らかになったので、ニンヒドリンの発色に関係する糖類、酢酸、シリカゲル-Gの影響を定量的に把握する目的で、ブタノール溶液中でのニンヒドリン、糖類、酢酸、シリカゲル-Gの反応による発色を検討したところ、興味ある2、3の結果が得られたのでここに報告する。

## 実 験 材 料

供試したニンヒドリン、酢酸、硫酸カルシウム、フラクトース、グルコース、イノシトール、マンニトール、キシロース、塩酸などは市販特級品(半井化学製)を使用した。シリカゲル-Gはメルク社製薄層クロマトグラフィー用のものを、フロリジールは血清トリグリセライド定量用試薬(半井化学製)を、セルロース粉末は Carl Schleicher & Schüll 社製を、珪酸は Mallinckrodt 社製 Silicic acid を使用した。セライトは市販品(半井化学製)をアセトン、メタノール、水などで洗浄して用い

た。

## 実験方法および結果

ニンヒドリン-ブタノール溶液に糖類、酢酸、シリカゲル-Gを加え、オイルバス中で120°C、10分間加熱発色させ、濾紙で濾過してから発色の程度をスペクトロフォトメーター(日立製、100-10型)を用いて、505nmにおける透過率(%)を測定した。

1. ニンヒドリンの発色に及ぼすフラクトース、酢酸、シリカゲル-Gの影響

ニンヒドリンの発色に及ぼすフラクトース、酢酸、シリカゲル-Gの影響を調査する目的で、0.2%ニンヒドリン-ブタノール溶液 5ml、フラクトース 5mg、酢酸 0.02 ml、シリカゲル-G 160mg の混合物の8種の組合せ(第1図)についてその発色の程度を比較した。

第1図にその結果を示したが、フラクトース、酢酸、シリカゲル-Gが存在するとニンヒドリンの発色はもともと良く、つづいて、フラクトース、シリカゲル-Gの存在する場合も良かった。しかしフラクトースが存在しても、シリカゲル-Gが同時に存在しないと発色が認められなかった。又、フラクトースが存在しなくても、酢酸とシリカゲル-G、シリカゲル-Gだけ存在する場合も発色が認められた。

2. ニンヒドリンの発色に及ぼすシリカゲル-Gの影響

0.2%ニンヒドリン-ブタノール溶液 5ml にフラクトース 5mg、酢酸 0.02ml を加用し、これにシリカゲル-G 5, 10, 20, 40, 80, 160mg をそれぞれ加え、加熱発色させて調査した。この結果を第2図に示した。シリ

\* Studies on the nitrogen utilization by plant pathogenic fungi (15).

\*\* 島根大学農学部, Fac. of Agric., Shimane Univ., Matsue 690, JAPAN.

カゲル-Gの加用量が増加するにつれて発色の程度が高くなった。

3. ニンヒドリンの発色に及ぼすフラクトースの影響

0.2% ニンヒドリン-ブタノール溶液 5ml に酢酸 0.02ml, シリカゲル-G 160mg を加え, 更にこれにフラクトース 5, 10, 20, 40, 80mg をそれぞれ加えて加熱発色させた (第3図)。この実験の範囲内では, 5mg の加用区がもっとも発色の程度が高く, 5mg よりも多量のフラクトースの加用で発色の程度が低くなった。

4. ニンヒドリンの発色に及ぼす酢酸の影響

0.2% ニンヒドリン-ブタノール溶液

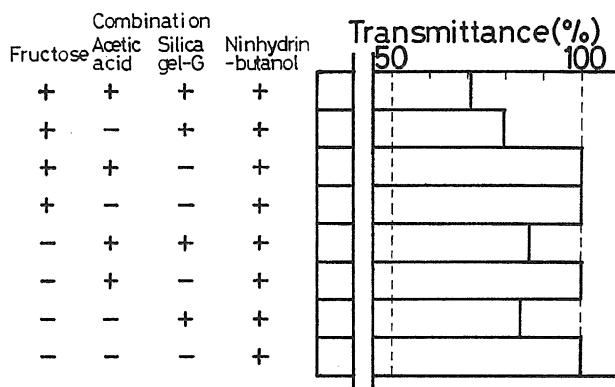


Figure 1. Coloration of mixture of 5 ml ninhydrin-butanol\*, 5 mg fructose, 0.02 ml acetic acid and 160 mg silica gel-G in various combinations.

\* 0.2 % solution of ninhydrin in n-butanol was used.

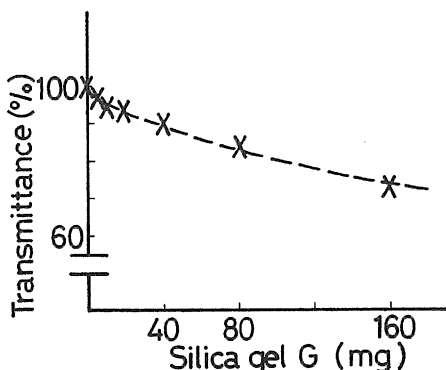


Figure 2. Relationship between coloration of the mixture and amount of silica gel-G in the mixture. The mixture was composed of 5 ml ninhydrin-butanol, 5 mg fructose, 0.02 ml acetic acid and silica gel-G.

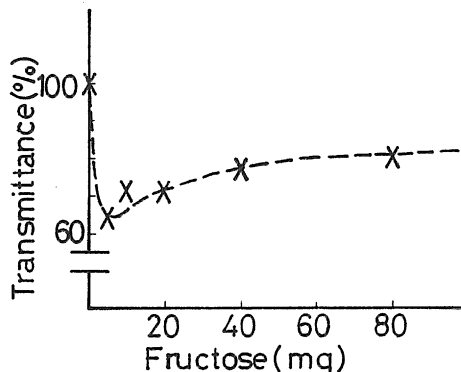


Figure 3. Relationship between coloration of the mixture and amount of fructose in the mixture. The mixture was composed of 5 ml ninhydrin-butanol, fructose, 0.02 ml acetic acid and 160 mg silica gel-G.

5ml に, フラクトース 5mg, シリカゲル-G 160mg を加え, さらに酢酸 0.02, 0.04, 0.08, 0.15, 0.30ml をそれぞれ加え加熱発色させた。この結果を第4図に示した。この実験の範囲では酢酸 0.02ml 加用区がもっとも発色が良く, 酢酸の加用量が多くなると発色の程度も低くなった。

5. ニンヒドリンの発色に及ぼすニンヒドリン濃度の影響

0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8% のニンヒドリン-ブタノール溶液 5ml のそれぞれに, フラクトース 5mg, 酢酸 0.02ml, シリカゲル-G 160mg を加え加熱

発色させて, ニンヒドリンの濃度と発色の良否について検討した結果が第5図である。ニンヒドリンの濃度が高くなるにつれて発色の程度も高くなった。

6. ニンヒドリンの発色に及ぼす糖の種類の影響

0.2% ニンヒドリン-ブタノール溶液 5ml に, 酢酸 0.02ml, シリカゲル-G 160mg を加え, 更にフラクトース, グルコース, イノシトール, ラクトース, マンニトール, キシロース各 5mg をそれぞれに加用し加熱発色させた。この結果を第6図に示した。フラクトース, グルコース, ラクトース, キシロースでの発色は良く, イノシトール, マンニトールでも淡い発色が認められ

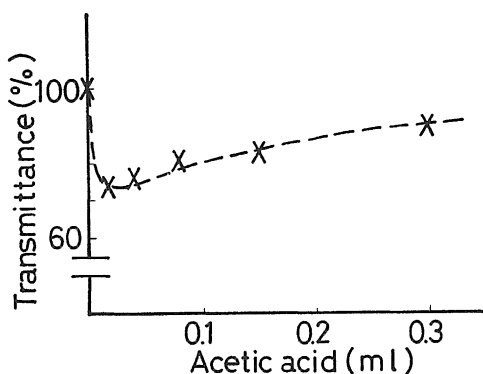


Figure 4. Relationship between coloration of the mixture and amount of acetic acid in the mixture. The mixture was composed of 5 mg fructose, acetic acid and 160 mg silica gel-G.

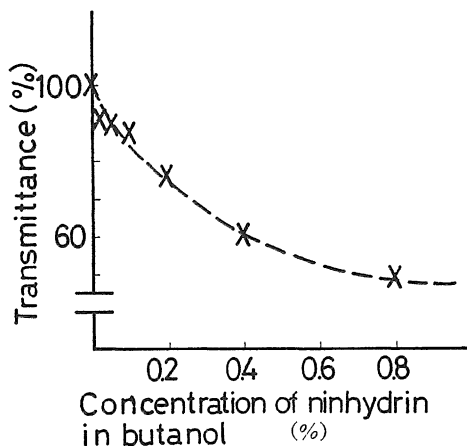


Figure 5. Relationship between coloration of the mixture and concentration of ninhydrin in butanol. The mixture was composed of 5 ml ninhydrin-butanol, 5 mg fructose, 0.02 ml acetic acid, and 160 mg silica gel-G.

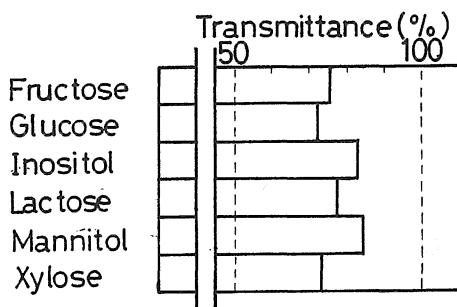


Figure 6. Relationship between coloration of the mixture and kinds of sugar used. The mixture was composed of 5 ml ninhydrin-butanol, 0.02 ml acetic acid, 160 mg silica gel-G and 5 mg sugar.

た。

7. ニンヒドリンの発色に及ぼす硫酸カルシウムの影響

第1図に示すとおり、ニンヒドリンの発色にシリカゲル-Gが関与することが明らかになったので、シリカゲル-Gに含まれる硫酸カルシウムが関係するのか、シリカゲル-Gそのものが関係するのかを検討する目的で、シリカゲル-Gを4Nの塩酸で充分洗浄し、その後流水水洗してから加熱乾燥したシリカゲル-Gを用いてニンヒドリン発色の実験を行った。0.2%ニンヒドリン-ブタノール溶液 5ml, フラクトース 5mg, 酢酸 0.02mlに上記のシリカゲル-Gを 160mg 加用して発色させたが発色は認められなかった。

更に市販の硫酸カルシウム 5, 10, 20, 40, 80mg を

0.2%ニンヒドリン-ブタノール溶液 5ml, 酢酸 0.02 ml, フラクトース 5mg にそれぞれ加え発色させたが、いずれの場合も発色が認められなかった。

8. ニンヒドリンの発色に及ぼすセライト、セルロース、フロリジール、珪酸の影響

シリカゲル-Gがニンヒドリンの発色に関係していることが明らかになったので、シリカゲル-Gと同様にカラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーでよく用いられているセライト、セルロース、フロリジール、珪酸を用いてシリカゲル-Gと同様にニンヒドリンの発色に関係しているかどうかを検討した。0.2%ニンヒドリン-ブタノール溶液 5ml, フラクトース 5mg, 酢酸 0.02ml にセライト、セルロース、フロリジール、珪酸の各々 160mg を加えて加熱発色させたが、フロリジール加用区のみわずかな発色が認められた以外の区はすべて発色が認められなかった。

考 察

天然物などからの糖類やアミノ酸などの分離は比較的に困難な場合が多く、とくに薄層クロマトグラフィー、ペーパークロマトグラフィーなどによる分離においてはRf値が近似する場合が多い。一方、ニンヒドリン試薬ではアミノ酸の発色は認められるが、糖類は発色しないとされており、アミノ酸と糖との分離の検出に利用され、その発色の機構も明らかにされている<sup>2)</sup>。しかし、すでに報告したように、アミノ酸の場合と比較して発色の

感度は良くないが，フラクトース，グルコースなどがニンヒドリンによって発色することが明らかになった。

従って，薄層クロマトグラフィーやペーパークロマトグラフィーなどでのニンヒドリンの発色によるアミノ酸の同定において，とくにアミノ酸量が微量で糖類が比較的多い場合，糖類の発色をアミノ酸の発色と誤ることも考えられる。

今回は前回の薄層クロマトグラフィーでの発色がブタノール溶液中でも同様に認められることが明らかになったので，ブタノール溶液中でのニンヒドリンの発色に関係する糖類，酢酸，シリカゲル-Gの影響を定量的に調査した。

前回の実験では，薄層クロマトグラフィーのシリカゲル-G上において糖類のニンヒドリンによる発色にとくに酢酸が影響していることを報告したが，今回の実験では，糖類，酢酸，シリカゲル-Gのうちシリカゲル-Gの影響がもっとも高く，フラクトースと酢酸はある範囲内の量の時にのみ発色の程度が高くなった。又，ニンヒドリン-ブタノール溶液中のニンヒドリンの濃度が高い程発色が良かった。しかし，フラクトースも酢酸もニンヒドリンの発色には関係していることは明らかであった。

シリカゲル-Gがニンヒドリンの発色に関与しているからシリカゲルそのものか，又はシリカゲル-Gに含まれている硫酸カルシウムによって発色されるのかどうかを検討したが，硫酸カルシウムをとり去ったシリカゲルも市販の硫酸カルシウムもシリカゲル-Gのようにニンヒドリン発色に影響しなかった。したがってシリカゲル-Gに含まれるものは硫酸カルシウムだけではなく，別の発色に関係する微量元素の存在も考えられる。

更にシリカゲルと同様に薄層クロマトグラフィーやカラムクロマトグラフィーに用いられるセライト，セルロース，フロリジール，珪酸などもニンヒドリンの発色に

関与するかどうか検討したが，フロリジールのみによってわずかな発色が認められた。

以上の今回の実験の結果から，ニンヒドリン-ブタノール溶液，糖類，酢酸，シリカゲル-Gの混合物が加熱するとどうして発色するのか今回も明確な結論を出すことは出来なかった。

## 摘 要

ブタノール中におけるニンヒドリンの発色に関係する糖類，酢酸，シリカゲル-Gの影響について検討した。0.2% ニンヒドリン-ブタノール溶液 5ml にフラクトース 5~80mg 加用した実験の範囲内では 5mg の加用区がもっとも発色がよく，フラクトース量が増加するとかえって発色がよくなかった。同様の傾向は酢酸の加用によっても認められ，0.02ml の加用区でもっとも発色がよかった。シリカゲル-Gは加用量が多い程発色が良くなり，ニンヒドリンもその濃度が高くなる程発色が良くなった。フラクトース以外の糖類，グルコース，キシロース，ラクトースなどもニンヒドリンの発色に関係することも明らかになった。結局ニンヒドリンの発色には糖類，酢酸，シリカゲル-Gが関与し，とくにシリカゲル-Gの影響が大きく，糖類や酢酸も或る加用量の範囲内で影響を与えることが明らかになった。

## 引用文献

1. 江川宏・関塚彰・達山和紀：島根大農研報 11：23-27, 1977.
2. WHITE, A., HANDLER, P., and SMITH, E. M.: Principles of Biochemistry. McGraw-Hill Book Co., New York. 1973. 107pp.

## Summary

Effect of fructose, acetic acid, and silica gel-G on the coloration of ninhydrin butanol solution was tested using the mixture of these components. There was the optimum amount of fructose or acetic acid in the mixture for the coloration. The amount of fructose was 5 mg per 5 ml of the mixture and acetic acid was 0.02 ml per the mixture. Glucose, xylose, or lactose used in place of fructose gave the color, too. On the contrary, the coloration of the mixture was developed with the amount of silica gel-G. Judging from these experimental results, it is likely that the coloration is closely connected with silica gel-G in the mixture over others.