

ノート

カルボキシメチル化多糖類の分析法

松 本 弘 二 桑 田 信 一 郎

1. ま え が き

でんぷんをはじめとして、植物多糖類本来の糊性能を変化させる目的で、局部的にカルボキシメチル化を行って、その糊性を改良したものが、しばしば輸入される。

このカルボキシメチル化（以下 CM 化と略す）は、その度が増すと、冷水中で容易に透明度の高い高粘度の糊液をつくる性質が増して来る。輸入される製品には CM 化の非常に低度なものが、他の成分と共存してある場合が多く、殊に他の多糖類の混合されたもの、或はメチル化、アセチル化物等と共存する場合もあり得るのでわれわれをなやますことが多い。以下は、それぞれの分析に於て、処理された結果をまとめたものである。従って、試験段階の部分もあるが、敢えて参考に供する次第である。

2. 異種多糖類相互の分離

輸入製品には、2 通りの場合が考えられる。そのひとつは、全体が低置換体の均一なものと、低或は高置換体が、同種の多糖類或は異種の多糖類と混合されている場合である。後者の場合には、それぞれ分離する必要がある。

2. - 1 水及アルコールによる分離

検体に、上記のような混合が予想される場合に、ごく大まかではあるが、次のような方法を用いている。

図 1

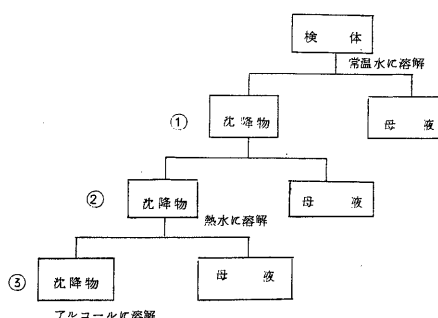


図 1 に於て、母液 には、加水分解された少糖類、（故意に加水分解されたものでなく、CM 化の過程でどうしても加水分解を受けるものも含む）低置換 CM 化物等が多く集まる。この部分は、でんぷん系では、ヨード呈色で、暗褐色を呈するものが多い。母液 には天然多糖類が多く含まれる。母液 には比較的高分子の多糖類、メチル化、アセチル化等の他の誘導体等が含まれる。

図 2 は、全部が水にとける場合に用いた。これはアルコール濃度による溶解差により、大別分離を行うもので殆んどが、加水分解物や CM 化物である場合に有効である。ロカストビーンガムの分析実例によると、図中 ~

の各部分を比較して、分子量の大はばに異ったものが分離された。

図 2

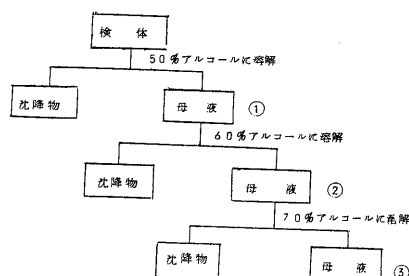


表 1

	次酢酸鉛 (希)	酢酸鉛 (希)
でんぷん	—	殆んど沈でんなし
可溶性でんぷん	殆んど沈でんなし	殆んど沈でんなし
Locust Bean Gum	白沈	沈でんしない
Guar Gum	—	—
アラビアゴム	すぐに綿状沈でん	徐々に少量の白沈
Agar Agar	徐々に少量の白沈	直ちに綿状沈でん
CM化でんぷん	直ちに綿状沈	徐々に少量の沈でん
CM化 L.B.G.	雲状沈でん	— に綿状沈でん

2. - 2 次酢酸鉛、酢酸鉛による分離

希次酢酸鉛、酢酸鉛による沈でん挙動は、日局 7 に於ても採用されている。本稿では之を利用して異種多糖類間の分別に応用している。主な沈でんは表 1 にあげた。

2. - 3 イオン交換樹脂による分離

強塩基性陰イオン交換樹脂 (ほう酸塩型カラム) 糖類及びこれに類縁のポリヒドロキシ化合物は、ほう酸とほう酸錯化合物を作る。この錯化合物は負の電荷を持ち Dowex 1, 2 など、強塩基陰イオン交換樹脂のほう酸型カラムを用いて、ほう酸緩衝液で溶離すれば、分離が可能である 注 1)

ほう酸緩衝液	ほう酸	0.4Mol	} Per Litre
	グリセロール	1.0Mol	
	トルエン	0.5ml	

3. CM 化多糖類の分析

前項までに、CM 化の多糖類を取り出し、加水分解の上、単糖類とし、以下の方法により定性を行う。

3. - 1

糖類の加熱下での酸に対する安定性は、その種類により著しい相違が見られる。Guar Gum や Locust Bean Gum のマンノースやガラクトースのようなヘキソースはかなり不安定で、 $2N \cdot HCl$ 中 100 で 5 時間加水分解すれば、D マンノースはその 20% 以上が破壊される。

このことを考えに入れて、CM 化糖の場合は、1~2N メタノール塩酸、1~2 N 硫酸で 100 で、10~16 時間行うことにした。CM 化物の加水分解に当っては、上述の破壊に加えて、脱 CM や酸化分解が起り、条件が悪いと、単糖誘導体が全く検出されないことがあるから注意を要する。このような障害に対して、アルカリによる加水分解も試みてみた、アルカリに対しては、酸の場合より抵抗性はあるが、条件によっては徐々に切断される。この場合、酸素により、酸化をともなうことを防ぐ意味で窒素気流中で行えば、良い結果が得られる。

(注 5)

この場合も、強アルカリは用いず、通常 1~0.5N 炭ソーダ或は石灰水を用いて、比較的良い結果を得た。

3. - 2 加水分解単糖の薄層クロマトグラフィー

酸加水分解物はクロマトグラフィーに先立ち、酸を除去しておく必要がある。酸の除去には弱塩基性イオン交換樹脂 (OH-型 Ambirlite IR-45 或は 4B) 強塩基性陰イオン交換樹脂の炭酸塩、重炭酸塩、あるいは酢酸塩型がよい 注 2)

薄層クロマトグラフィーの条件は次の通りである。

展開液 n-ブタノール アセトン 水(4:5:1)

吸着剤 シリカゲル

発色剤 20%硫酸と 0.2% ナフトレゾルシン

(エタノール溶液) 等容混合物

100 ~ 105 で 5 ~ 10 時間加熱

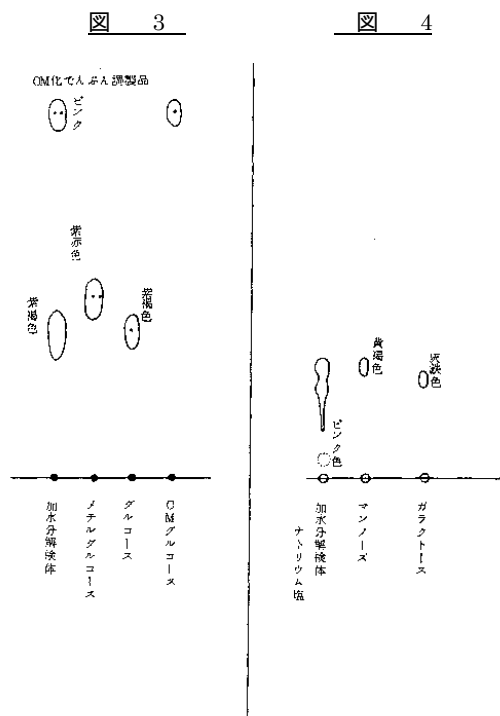
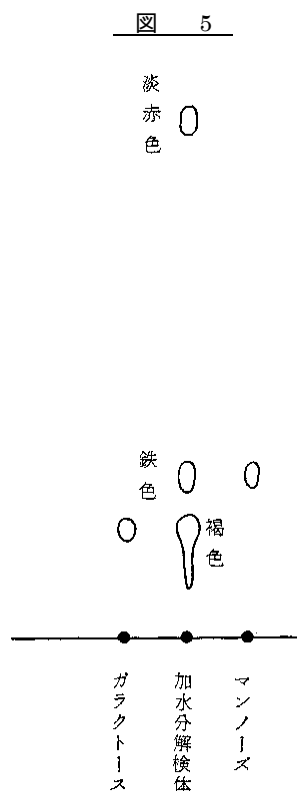


図 3 は上の条件により、CM でんぷんを加水分解した 1 例である。

図 4 は Locust Bean Gum の CM 化物を加水分解したもので、アルカリ分解の後、アルカリ塩をはずさずに行ったものである。

図 5 は図 4 のナトリウム塩と比較し、遊離酸について実施したものである。

ると、大部分はグルコース(Rf 0.13)であるが、それ以外のスポット(Rf 0.04 0.68)も認められる。加水分解の度合は生じた還元糖の量を Somogyi 法(法 3)に準じ定量して測定した。



3. - 3 酵素による加水分解

酵素の基質特異性による天然でんぷんと、加工でんぷんとの間の加水分解速度の差を測定した。

1) 方法

酵素として入手しやすい同方ジアスターゼを、基準の天然でんぷんとして、タピオカでんぷんを試料として、Starch HI Band(Penick & Ford 製)を用いた。Starch HI Band は少量の少糖類を含み加水分解物をペーパークロマトグラフィーにより分離す

i i) 結果及考察

図 6 は横軸に反応時間、たて軸に糖化率を示す。糖化率は加水分解後生じた還元糖の量をグルコースとして計算し、はじめに採取したでんぷんの量に対する百分率として示した。

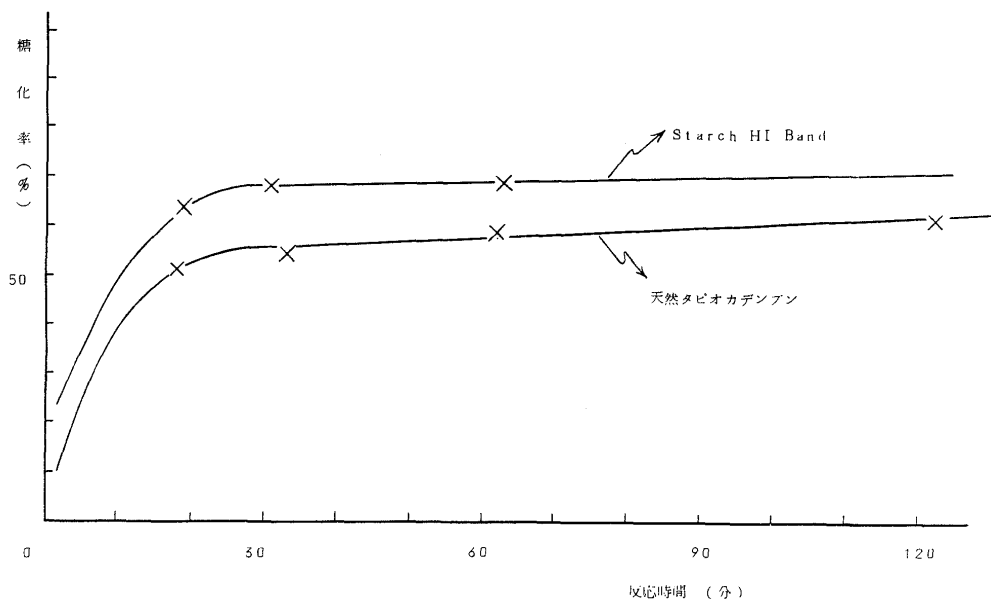
この結果、予想した酵素の基質特異性とは逆に、天然タピチオカでんぷんの加水分解速度の方が小さいことがわかった。これは Starch HI Band がすでに何らかの加工に際し、部分的に加水分解されているものと推定される。

カルボキシメチル化多糖類分析法

図 6 ジアスターゼによるデンプンの加水分解速度

(酵素の濃度: 28.9mg / 50ml)

(acetate buffer pH 4.8 使用、反応温度 40 °C)



今度の実験では、用いた酵素及び試料が適当であるとはいえない。そこで基質特異性のより一層強いでんぷん加水分解酵素を用いて行なうことを計画している。

3. - 4 X線回折による試み

天然のでんぷん粒が X 線によって、明瞭な Debye-Scherrer 図を与えることにより結晶質であることは、すでに 1920 年 Scherrer によってみいだされた。

(注 4)

今回 X 線デフラクトメーターを用いて、天然でんぷんと加工でんぷんの回折曲線を比べてみた。

1) 試料

天然バレイショでんぷん

天然タピオカでんぷん

Solvitose C5 (W.A.Scholten's Chemische):

淡褐色フレーク状、水溶液はアルカリ性、ヨード呈色青紫色、灰分多量、発光分析により Na^+ , Ca^{++} 等、ナトリウム試験により S, Cl を認める。カルボキシメチル

でんぷんのナトリウム塩と思われる。

Solvitose HDF (W.A.Scholten's Chemische):

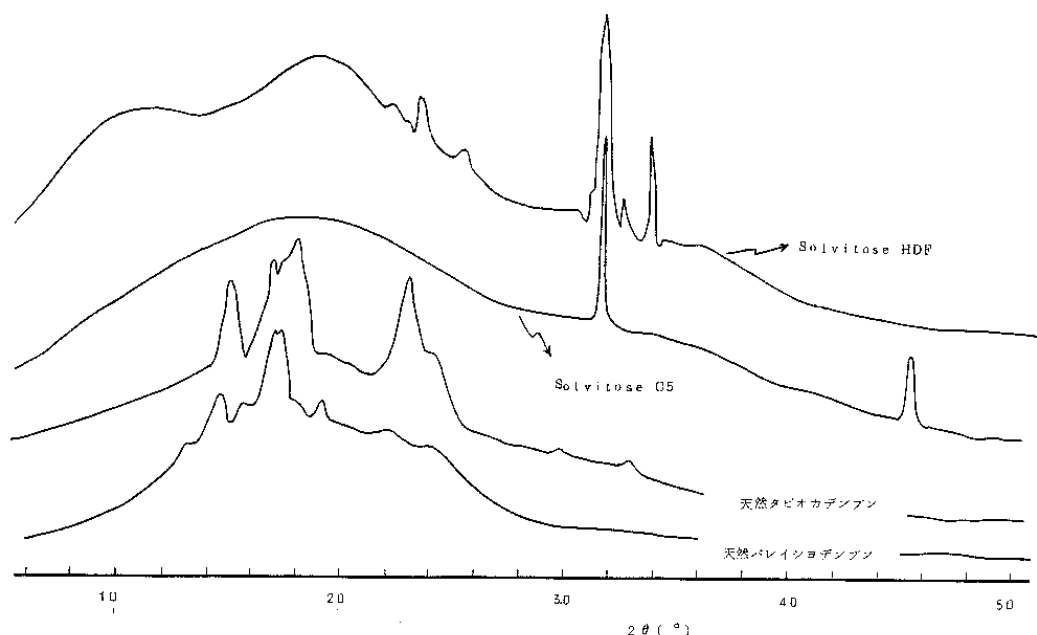
白色フレーク状、水にとけやすく水溶液は無色透明、ヨード呈色暗褐色、灰分ごく少量、発光分析により Ca^{++} , Na^+ , Mg^{++} , P^+ , ナトリウム試験により S を認める。

ii) 結果及考察

それぞれの回折曲線を図 7 に示す。図より天然バレイショでんぷんは B 図形を与え、天然タピオカでんぷんは、A 図形にきわめて近い C 図形を示している。一方 Solvitose は両方ともこれらの回折線が現われていない。これは加工に際し、結晶性がくずれたためと考えられる。Solvitose C5 の回折曲線における $31.6^\circ 45.4^\circ$ (いずれも 2θ の値) の回折線は NaCl によることがわかった。この NaCl はカルボキシメチルでんぷん生成の際の副生成物であろう。SolvitoseHDF の $31.6^\circ 33.9^\circ$ の回折線はでんぷんそ

図 7

デンプンの X 線回折曲線



のものに起因するのか不純物によるものかは現在追究中である。

以上の結果、天然でんぷん又は結晶性を保持している程度の加工ででんぷんは回折曲線からもとの植物の見当がつけられる。又加工でんぷんでは $15^{\circ} \sim 25^{\circ}$ の範囲の回折曲線のするどさが欠けてくる様である。このことは加工しているか否かの目安になるであろう。

3. - 5 トリメチルシリル化法によるガスクロマトグラフィーの試み

3. - 2 に於いての処理と同様に、加水分解による塩類無機質は完全に除き、検体はよく乾燥した後 TMC 化を用いた。

〔実施〕乾燥検体 0.01 ~ 1mg をピリジン 0.14ml にとかし、HMS 0.04 ml 及び TMS (Trimethylchlorosilane) 0.02ml を加えゆるく振りまぜ 30 分間放置、 $30^{\circ} \sim 40^{\circ}$ で減圧乾燥 (N 気流中) し、残渣を n-Hexane で抽出し、n-Hexane を注意して適当に留去し、ガスクロ試料に適する濃度とした。(注 6) (注 7) (注 8)

この祭 TMS 化が困難であれば、上記ピリジンのかわりとして、ジメチルホルムアミドで試みることも出来るようである。

以上にしがたい得られたガスクロマトグラフィーチャートを図 8 に示した。

カラムは Silicon DC550、同温度 180° 、キャリアーガス He、柳本 GCG2 型

対象サンプルにより、確認したピークは、2 が - グルコースで 7 が - グルコース、CM グルコースは不確定ながら、1 のピーク、或は A のピークにも関係があるが、之は目下追試中である。

尚使用したガスクロ機は、定温型であるため、実際のピークは、もつとブロードなものであったが、位置的關係を示すため、シャープなピークに書き直した。

4. 赤外吸収スペクトル

多糖類は一般に、ブロードな吸収を持ち、赤外吸収だけでは、判定に不安な場合が多い。

図 8

Pearl Starch の加水分解産物の TMS 化物
(CM 化されたと称するもの)

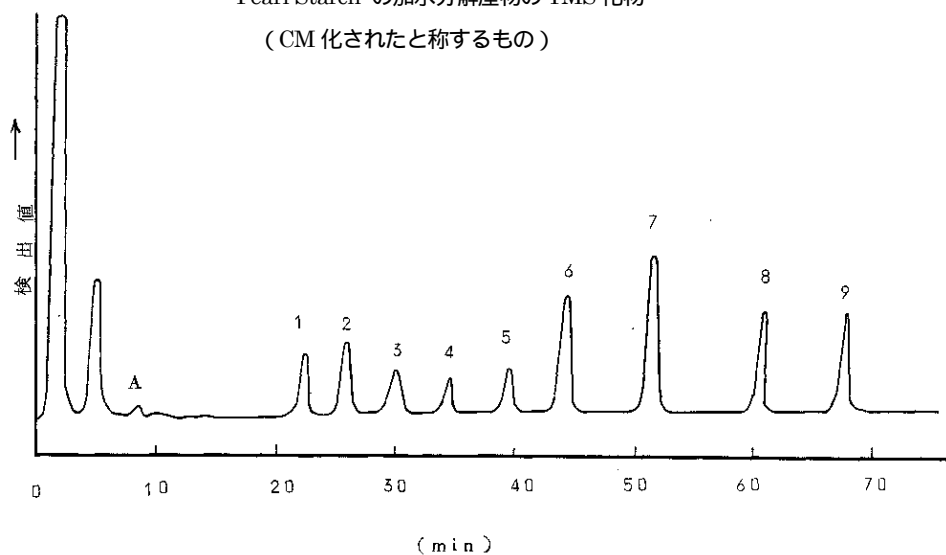


図 9

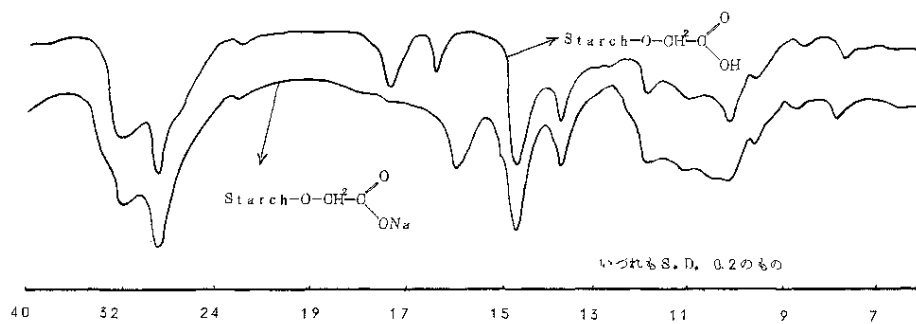


図 10

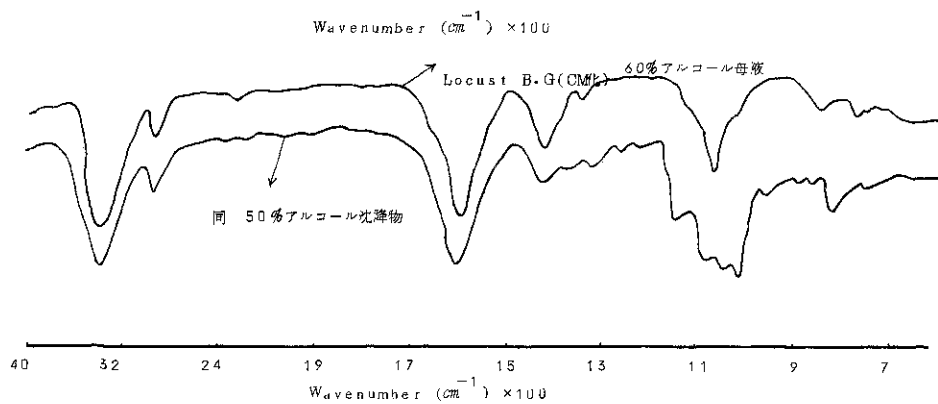


図 9 は CM 化でんぷんに見られたもので、Na 塩の場合との $\epsilon = 0$ の差は、他のカルボン酸型のものと同じである。

図 10 は 2 . 1 図 2 でのべた分離法により分別した 2 つの部分の比較で $1200\text{cm}^{-1} \sim 1000\text{cm}^{-1}$ 附近に変化が見られる。勿論 Na 塩型である。

5 . ま と め

CM 誘導体について、日常分析データーを集めたのでまとまりのないものになったが、本稿をふりかえて、結局言えることは、天然物に基因した物質は、そのつかまえ所がむずかしいと言うことであった。我々は今後ともこの種懸案を確かなものとするよう努力を重ねるつもりである。

尚、本稿の作成に御協力を頂いた梅村分析官、X 線に関して稲田副分析官、酵素分解に関し、小口技官に御指導を頂いたことを感謝いたします。

6 . 引 用 注

- 1) Khym, J. X. J. Am. Chem. Soc. 74
2090 (1952).
- 2) 石川正幸他 薄層クロマトグラフィー P.168
- 3) Somogyi M., J. Biol. Chem., 160
61 (1945).
" " 195
19 (1952).
- 4) P. Scherrer. "Anhang der 3 Aufl
von R. Zsigmondys Kolloidchem-
ie "Leipzig (1920).
- 5) Kenner J. Chem Ind 727 (1955).
- 6) C. C. Sweeley ら J. Am. Chem. Soc 85
2497 (1963).
- 7) Schiller. S ら J. Biol. Chem 983
(1961).
- 8) Charles C. Sweeley 島津科学機器ニュ
ース 9 10 の 2

Note

Analysis Of Polysaccharide

Hirozi Matsumoto

Shin-ichiro Kuwata

Kobe Customs Laboratory

6 Kanō-cho, Ikutaku Kobe

(Recieved 29. Jan. 1968)