

ノート

多糖の糖組成と赤外線吸収スペクトル*

出来三男, 佐藤宗衛, 小口盛重**

1. 緒 言

天然植物多糖はでん粉及びセルロースを除くと粘質多糖が主なものであり, その工業的用途は広範囲にわたっている。特に食品工業での添加剤としての利用, 繊維工業での糊剤及び染色助剤としての用途が広く, 最近では離型剤としての利用も開発されている。粘質多糖の天然資源に不足しているわが国では, そのほとんどが輸入にたよっている現状である。

これらの天然多糖は, 関税率表上の取扱いとして, 第 11 類 (でん粉), 第 13 類 (粘質多糖), 第 38 類 (微生物多糖) 及び第 39 類 (セルロースその他の天然高分子化合物) に主として分類されている。このうち, 第 13 類及び第 39 類に分類される天然多糖は糖質組成の近似したものが多く, 相互の判別が困難なものが多い。特に粘質多糖のうち, 微生物によって産生される多糖は本質的には植物多糖と顕著な相違はないが物理的性質が良好なため繊維工業への利用が進められている。しかし, これらの微生物多糖は関税率表では天然多糖と区別して取扱われている。したがって, 植物多糖, 微生物多糖及び多糖誘導体との相互鑑別が要求されることになるが, 分析のうえからこれらの判別は非常に困難なものである。

多糖の分析法として, これまで多くの報告が行なわれているが, 化学的な方法による構成糖の分析及び酵素化学的方法によるアノマー分析が主なものであり, このほか電気泳動法, 免疫化学的方法による種類判別なども行なわれている。また, 物理化学的方法としては赤外線吸収スペクトルによる結合様式の分析,^{1) 2) ORD, 1), 2) CD, 1), 2) NMR^{1), 2)} 及び X 線回折^{3) 4)}による立体配座解析などが多糖分析の主体をなしている。}

ここでは多糖の相互判別を目的として, 各種の粘質多糖について糖組成及び赤外線吸収スペクトルによるタイプ吸収の挙動について比較検討した結果を報告する。

2. 実験方法

2・1 試料

アミロース, アミロペクチン, アルギン酸ソーダ (以上は和光純薬社製のもの), カラゲニン, ローカストビーンガム, グアーガム, カラヤガム, トラガカントガム, ゼンタンガム, アラビアガム, ケルザンガム (以上はシグマ化学社製のもの)。

2・2 多糖の加水分解条件及び試料の調製

試料約 2g を 200ml 容の三角フラスコにとり, これに 2 規定塩酸又は 2 規定硫酸 100ml を加え, 空気冷却管を付して沸騰浴中でときどきかく拌しながら 2 時間又は 4 時間加熱分解する。加水分解後, 分解液はそれぞれ水酸化ナトリウム水溶液又は水酸化バリウム水溶液を用いて中和した。中和後分解液はろ過し, ろ液は沸騰水浴上で蒸発乾固した。更に, この乾固物を 90% メタノール溶液又は塩酸酸性の 95% メタノール溶液 (2 規定塩酸 5 ml を 99% メタノールの 95ml に加えたもの) を用いて抽出し, 抽出液から溶媒を留去したものをペーパークロマトグラフィー用の試料とした。

2・3 ペーパークロマトグラフィーの条件

展開剤: n-ブタノール: 酢酸: 水 (4 : 1 : 1 v/v), 顕色剤: アニリン 0.93g とフタル酸 1.66g を水飽和ブタノール 100ml に溶かしたもの。

東洋ろ紙 No.50 (40×40cm) を用い上昇法により展開した。展開は 3 回の多重展開を行ない, 同時に展開した標準糖質のスポットの位置から同定した。顕色温度は 140℃である。

2・4 赤外線吸収スペクトルの測定

装置: 日立 225 型回折格子赤外分光光度計。

試料約 2mg を臭化カリウム粉末約 100mg と混合し錠剤として 4000~200cm⁻¹ の範囲を測定した。

* 本報を「多糖の分析化学的研究 (第 1 報)」とする。

** 大蔵省関税中央分析所 千葉県松戸市岩瀬 531

3. 実験結果及び考察

3・1 赤外線吸収スペクトルによる解析

天然多糖は構成単糖質に数個のOH基と少なくとも1個のC—O—C結合を持っており、これらの吸収帯が重なるため指紋領域にそれほど明瞭な吸収帯を示さない。したがって、指紋領域の吸収帯を直接多糖の構造に対応させることはできない。Bakerら¹⁾は主としてホモポリグルカンについて結合様式、置換基の種類などによるピラノース環の環振動及びC₁—Hの配向による変角振動について詳細な考察を行っており、1000cm⁻¹から700cm⁻¹までの範囲に現われるこれらの吸収帯をタイプ別に比較検討している。

Fig. 1に示したように、グルコースを構成単位とするアミロースではピラノース環の環振動による非対称伸縮振動が930cm⁻¹に現われており、850cm⁻¹のType 2吸収帯からその結合様式はα型であることがわかる。アミロペクチンの場合もほとんどアミロースと同様な挙動を示しておりα-1, 4及びα-1, 6結合を区別する顕著なピークはないがアミロペクチンでは860cm⁻¹の吸収がかなり幅広いピークとなっている。

数種の粘質多糖について測定した糖質のType吸収を

Table 1に示した。

Fig. 2及びTable 1に示したようにローカストビーンガムでは810cm⁻¹に強い吸収帯があり、この吸収帯はホモポリグルカンでは現われていない。870cm⁻¹の吸収帯はType 2bに属するものであり、更に、900cm⁻¹付近にショルダーピークが観察されType 2aの吸収帯がないことからβ結合の存在がわかる。グアーガムも類似したスペクトルを示すが900cm⁻¹の吸収帯が比較的明瞭に現われており、更に、795cm⁻¹にType吸収に帰属されない吸収帯が現われている。810cm⁻¹の吸収はローカストビーンガムでみられる吸収帯と全く同一であり、マンノースやガラクトースを含む糖質に特徴的である。これらの吸収帯はエカトリアル配向のC₁—H結合の変角振動に属するものであり、Type 2aと考えられる。したがって、これらの吸収帯はα-コンフィグレーションを示唆している。

糖酸を構成糖質に含む多糖は、糖酸塩の吸収が現われる。植物組織中でこれらの糖酸は遊離のほか、塩としても存在するためと考える。

トラガカントガムでは、Fig. 3に示すように1620cm⁻¹に糖酸塩のCOO⁻と1740cm⁻¹付近に—COOHのC=O伸縮振動が現われている。Type吸収はそれほど顕著でないが810cm⁻¹830cm⁻¹865cm⁻¹にType 2及びType 2b,

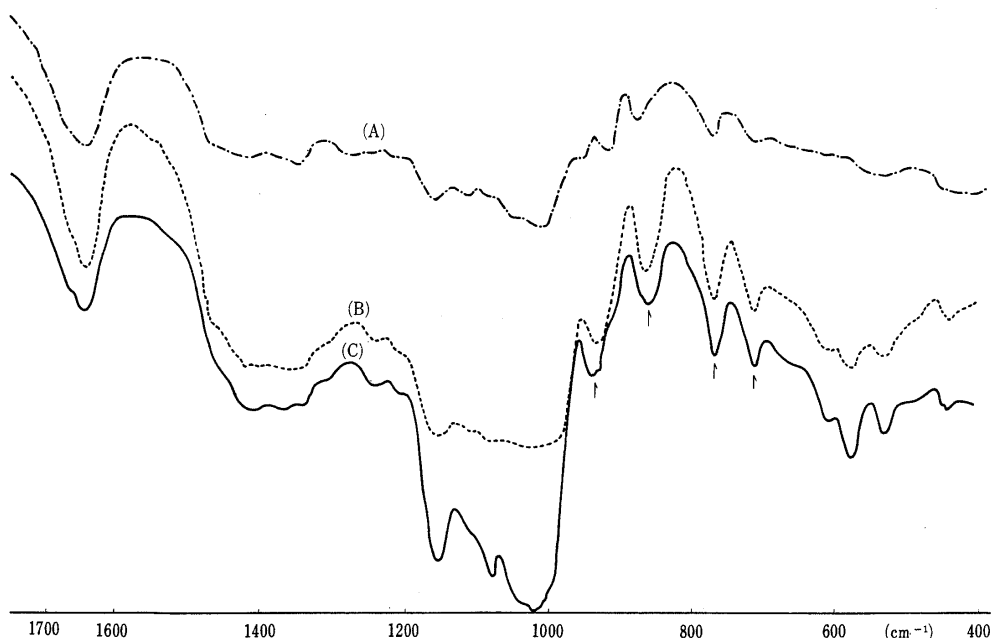


Fig. 1 Infrared spectra of polyglucan

(A)Dextran, (B)Amylopectine, (C)Amylose

Table 1 Characteristic absorption band of polysaccharide

Polysaccharide	Type 1	Type 2		Type 3
		Type 2 a	Type 2 b	
		(cm^{-1})	(cm^{-1})	
Locust bean gum	955	—	870	810
Guar gum	960	—	870	815
Tragacanth gum	900	830	865	770
Karaya gum	905	845	890	785
Gum arabic	910	820	885	780
Sodiumalginate	955	—	900	820
Xanthane gum	905	820	890	790
Kelzan	—	815	890	740
Carrageenan	970	815	890	770
	930	845	—	735

900 cm^{-1} に Type3 がみられる。1420 cm^{-1} , 1240 cm^{-1} は OH 面内変角と $\nu\text{C}-\text{O}$ によるものであり, 1740 cm^{-1} の吸収と対応する吸収帯である。また, 構成糖質としてガラクトツロン酸を含むカラヤガムでも 1720 cm^{-1} にカルボン酸の $\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動と 1610 cm^{-1} に糖酸塩の $\nu\text{C}=\text{O}$ 吸収帯がみとめられる。一方, アラビアガムは 1610 cm^{-1} 付近に糖酸塩の $\nu\text{C}=\text{O}$ がみられるが 1700 cm^{-1} 付近の吸収が現われていないので構成糖酸は塩として存在していることがわかる。

910 cm^{-1} (Type 1), 880 cm^{-1} (Type 2b), 840 cm^{-1} (Type 2 a), 840 cm^{-1} (Type 2b), 800 cm^{-1} (Type 2 a), 780 cm^{-1} (Type 3) の各吸収帯からアラビアガムの立体配座は

α と β のコンフィグレーションが混在しているものと推定される。アルギン酸ソーダの場合もアラビアガムと挙動がよく類似している。これらの酸性多糖によるカルボキシレートの吸収帯は塩酸性メタノールで処理すると 1720~1740 cm^{-1} に $\text{C}=\text{O}$ が現われることから確認できる。一般に糖酸は分子間での強い水素結合によりダイマーを形成しているので $\text{C}=\text{O}$ が 1740 cm^{-1} 付近に現われる。エステルの $\nu\text{C}=\text{O}$ との区別は, アルカリ処理したものがカルボキシレートの吸収を示すかどうかで容易に確認できる。

ザンタンガムは Fig. 4 に示すように 1730 cm^{-1} と 1610 cm^{-1} に糖酸及びその塩によるカルボニル吸収帯が顕著に現われており, 糖酸を構成成分とすることは赤外線吸収スペクトルから確認できる。ザンタンと同様に細菌多糖であるケルザンも類似したスペクトルを示すがピラノース環のタイプ吸収は明瞭に他の植物多糖と区別できる。すなわち, 890 cm^{-1} と 820 cm^{-1} に顕著な吸収帯があり, これらの吸収帯がそれぞれ Type 1, Type 2 に帰属されるものであるかどうかは明らかでない。糖酸による $\nu\text{C}=\text{O}$ 吸収帯はガラクトツロン酸ではグルクロン酸よりも高波数に現われる。糖質の硫酸エステルでは 1240 cm^{-1} の νSO_2 が特徴的であるがこの吸収帯は酸性多糖でも顕著に認められるので, 単独にそれほど重要な吸収帯とはいえないが, 酸性多糖でみられる 1700 cm^{-1} 付近の吸収帯を考慮すれば硫酸エステル型多糖であるかどうかの識別は可能と考えられる。カラゲニンでは Fig. 5 に示したように 1240 cm^{-1} に νSO_2 が認められ, 930 cm^{-1} (Type 1), 890 cm^{-1}

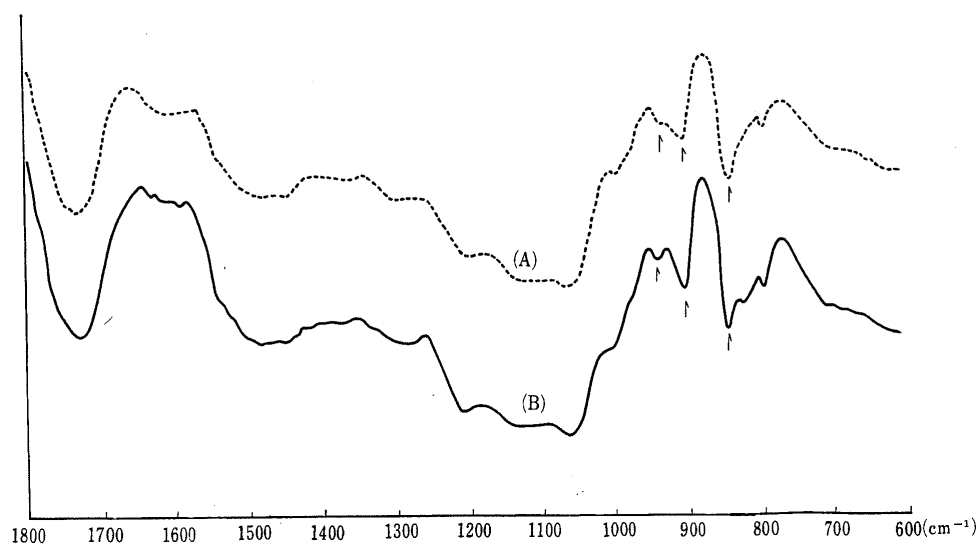




Fig. 3 Infrared spectra of polysaccharides

(A) : Sodium alginate, (B) : Gum arabic, (C) : Karaya gum,
(D) : Tragacanth gum

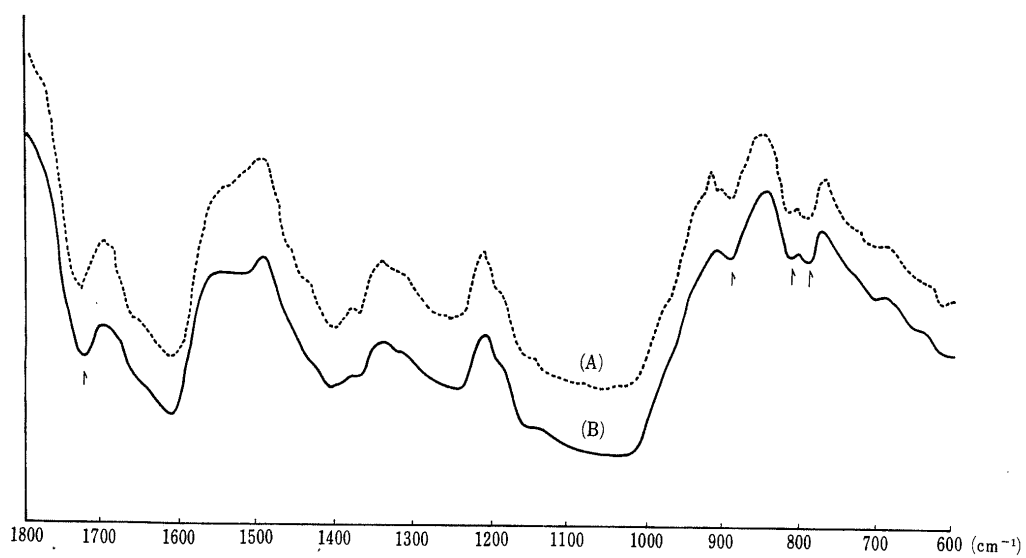


Fig. 4 Infrared spectra of xanthane (A) and kelzan (B)

(Type2b), 847cm^{-1} (Type2 a) などの特徴的な吸収が観察される。

3・2 糖組成の分析

多糖の構成糖を知るにはあらかじめ酸又は酵素により単糖にまで分解しなければならない。酵素による加水分解は選択的であり特殊な酵素を必要とする。この酵素分解はアノマー分析の一つの方法として有効であるが、未知試料については実用的でない。これに対して酸分解は多糖の結合様式には無関係に加水分解されることになるので、一般的な方法として用いられている。しかし、加水分解の難易が結合様式の違いによってみられるので適当な分解条件を選択しなければならない。

ここでは塩酸と硫酸を用いて多糖を加水分解し、分解生成物の挙動を比較検討した。

塩酸又は硫酸のいずれを加水分解に用いても生成糖質にそれほど著しい差はないが、Fig. 6 に示したようにローカストビーンガムでは硫酸分解の場合、マンノースとガラクトースが顕著に検出される。塩酸分解のものではガラクトースのスポットが明瞭であり、かなりテーリングしたスポットとなっている。しかし、硫酸分解の場合、オリゴ糖と思われる数個の微小スポットが検出されることなどからローカストビーンガムでは塩酸分解が適していると考えられる。グアーガムについても同様な挙動が観察されることからガラクトマンナン系中性多糖の加水分解に硫酸の使用は不適当であるといえる。

トラガカントガムでは L-フコース、キシロース、L-アラビノース及びガラクトースなどの構成糖質が明瞭に

検出できる。これらの糖質のほか、ガラクトツロン酸に類似するスポット及び Rf 値の高い位置に未同定の顕著なスポットが検出された。このスポットは硫酸又は塩酸のいずれの加水分解物からも検出され、クロマトグラムは両者の間にそれほど著しい差はない。硫酸を用いた場合、マルトースより低い位置に現われるスポットは未分解のオリゴ糖である。

カラヤガムでは塩酸分解物からアラビノース、キシロース、マンノース及びガラクトツロン酸に相当するスポットが確認できるが硫酸分解物からはキシロースとマンノースのスポットが現われていない。Rf 値の高い位置に検出されるスポットはトラガカントガムの場合と全く類似しており、この成分が過分解生成物であるかどうかは確認できなかった。

アラビアガムでは Fig. 7 に示したようにアラビノースとガラクトースが検出されるが、Rf 値の高い位置に微小スポットが検出される。このスポットは塩酸又は硫酸いずれの分解物からも確認される。また、硫酸分解物ではアラビノースとガラクトース以外に多数の微小スポットが現われるが、これらのスポットは過分解生成物と考えられる。しかし、オリゴ糖に相当するスポットも塩酸分解物よりも顕著であることからアラビアガムの加水分解に硫酸は適していないものとする。

アルギン酸ソーダではガラクトツロン酸とマンノウロン酸に相当する顕著なスポットが検出される。しかし、硫酸分解物ではガラクトースに相当するスポットのほか、オリゴ糖のスポットも検出される。アルギン酸ソーダの場合も塩酸加水分解が適している。



Fig. 5 Infrared spectrum of carrageenan

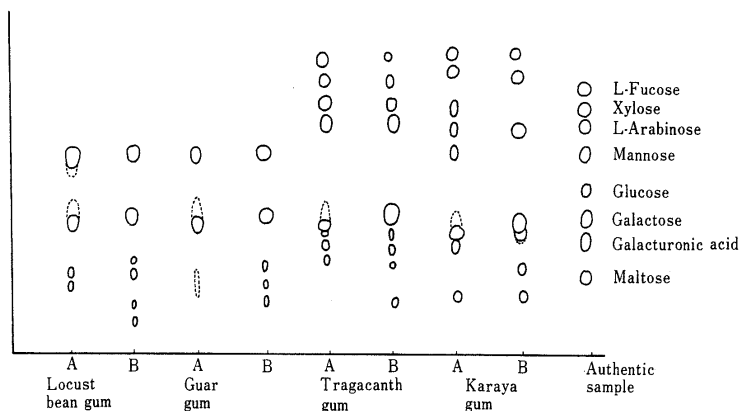


Fig. 6 Paper chromatograms of polysaccharide hydrolyzate by acid

A : with 2 N HCl for 4 hrs. , B : with 2 N H₂SO₄ for 4 hrs.

90%methanol solution used for extraction of sugar mixture from hydrolyzate

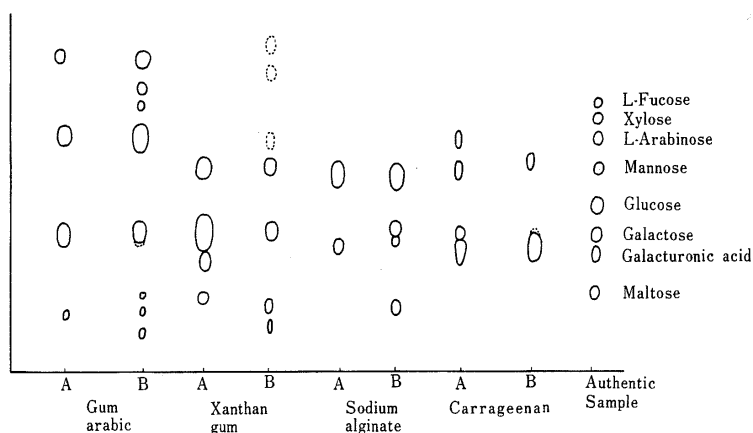


Fig. 7 Paper chromatograms of polysaccharide hydrolyzate by acid

A : with 2 N HCl for 4 hrs. , B : with 2 N H₂SO₄ for 4 hrs.

90%methanol solution used for extraction of sugar mixture from hydrolyzate

カラゲニンの塩酸分解物からはガラクトース、ガラクトuron酸のスポットとラムノースに相当するスポットが検出されるが、硫酸分解物からは明瞭なスポットは検出できなかった。

細菌多糖のザンタンガムではマンノースの顕著なスポットのほか、グルクロン酸に相当するスポットも認められる。硫酸分解物と塩酸分解物とではグルクロン酸に相当するスポットの相対的な大きさに差があり硫酸分解物では糖質の過分解生成物によると思われる数個のスポットが検出された。

加水分解物を直接ペーパークロマトグラフィーで分離

すると塩類の影響が顕著に現われスポットのテーリングが起る。この塩類の影響を除くために分解物を中和後濃縮したものについて 90%メタノール溶液又は塩酸性にした 95%メタノールを用いて糖質の抽出挙動を比較した。

Fig. 8 に示したように両者の間にはほとんど差がなく加水分解物から糖質を抽出することができた。この方法によると中和によって生成した塩類の影響を消去できることを知った。

数種の粘質多糖について塩酸又は硫酸による加水分解物をペーパークロマトグラフィーにより比較したが、分解生成物から構成糖を定性的に知るにはいずれの酸も使

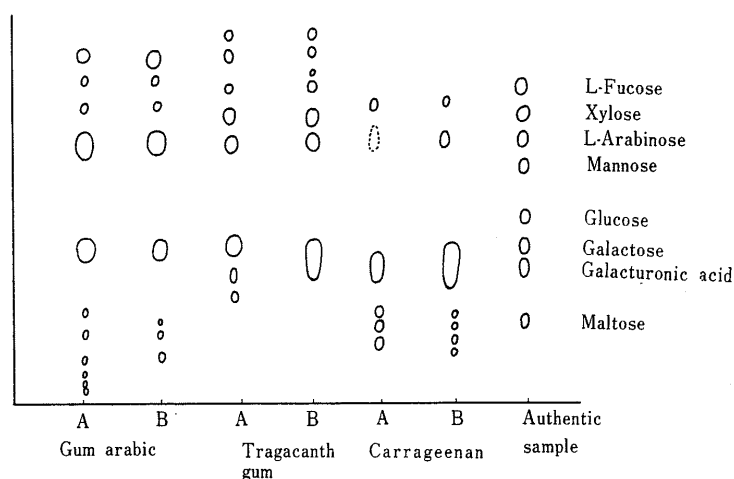


Fig. 8 Behaviour of hydrolyzate by solvent extraction

A : Extraction with acidic methanol solution

B : Extraction with 90% methanol solution

Concentration of acid used for hydrolysis : $4 \text{ NH}_2\text{SO}_4$

用できる。しかし、硫酸分解物からは過分解によると思われるスポットが検出される場合が多く、したがって、これらの粘質多糖については塩酸分解法が好ましいといえる。

4. 要 約

植物多糖及び微生物多糖の赤外線吸収スペクトルは、主として 1000cm^{-1} 以下の領域にタイプ吸収が現われており、これにより結合様式の推定ができる。しかし、微生物多糖ではグルクロン酸を含むので赤外線吸収スペクトルにおける 1700cm^{-1} 付近の吸収帯から中性糖との区別は

可能であるが、カラヤガム、トラガカントガム及びアラビアガムなどの酸性多糖との区別は赤外線吸収スペクトルのみからはできない。一方、これらの多糖は構成単糖の種類及び組成が異なるので加水分解物の構成糖を検出することによってその種類を推定することができる。定性的に糖組成を知る目的では多糖の加水分解に用いる酸としては塩酸が適している。また、加水分解生成物から糖質を抽出する方法として 90%メタノール又は塩酸性 95%メタノールのいずれも使用できる。この溶媒抽出によってペーパークロマトグラフィーにおける塩類の妨害を消去できる。

文 献

- 1) C. A. Baker, H. Bourne, C. H. Whiffen : "Method of Biochemical Analysis", Vol. 3, P. 213, Interscience, New York. (1967).
- 2) 江上不二夫監修 : "多種生化学", Vol. 1, 共立出版 (1970).
- 3) 蛋白・酵素・核酸編 : "糖質実験法", 共立出版 (1968).

Studies on Analysis of Polysaccharide (1)

Sugar Components and Infrared Spectra of Polysaccharide

Mitsuo DEKI, Soei SATO, Morishige OGUCHI

Central Customs Laboratory, Ministry of Finance, 531, Iwase, Matsudo-shi, Chiba-Ken, Japan

—Received. Sept. 30, 1972—