り除き、残余のストリップから 35% HClO_4 溶液でアミロース区分を流下捕集し沃素で呈色せしめて吸光度を測定した。別にアミロースについて同様クロマトグラフィーを行って、回収アミロースの沃素呈色度の標準曲線を求めて、これを基準として澱粉のアミロース含量を算出した。この方法で 10 種の澱粉のアミロースの定量を行って、従来行われている沃素呈色度による比色法、沃素電圧滴定法で得た定量値と比較した。一般にこの方法で求めた値は他の 2 方法で求めた値より高かった。更に Schoch 法に準じて n -ブタノールを使用して澱粉より分別したアミロペクチン中に沃素で青色に呈色する区分の混在を認めて、この区分の分離を行ってアミロースと推定して定量した。

本研究の研究費の一部は総合研究：澱粉の利用に関する基礎的研究（代表：大阪大学産業科学研究所二国二郎教授）によるもので、終始御指導を賜った二国教授に深謝する。試料をいただいた滝野澱粉工場当局に感謝する。本研究の要旨は 1955 年 3 月 31 日、日本農芸化学会大会で発表した。

(1) 滝 基次：本誌，33，245 (1959)。	(7) F. L. Bates, D. French, R. E. Rundle：
<i>J. Am. Chem. Soc.</i> ，65，142 (1943)。
(2) 佐藤静一：米澱粉に関する研究，p. 12，大
雅堂 (1944)	(8) 小林恒夫：澱粉化学，339 (1951)，二国二
郎編。
(3) 滝 基次：本誌，33，216 (1959)。	(9) E. Pacsu, J. W. Mullen： <i>J. Am. Chem.</i>
<i>Soc.</i> ，63，1168 (1941)；K. H. Meyer, G. C.
Gibbons： <i>Helv. Chim. Acta</i> ，33，210
(1950)。
(4) A. L. Potter, V. Silveira, R. M. Mc
Creedy, H. S. Owens： <i>J. Am. Chem.</i>
<i>Soc.</i> ，75，1335 (1953)。	(10) G. A. Gilbert, C. T. Greenwood, F. J.
Hybart： <i>J. Chem. Soc.</i> ，1954，4454。
(5) K. G. Krishnaswamy, A. Sreenivasan：
<i>J. Biol. Chem.</i> ，176，1253 (1948)。	
(6) S. Lansky, M. Kooi, T. J. Schoch： <i>J.</i>
<i>Am. Chem. Soc.</i> ，71，4066 (1949)。	

澱粉のクロマトグラフィーに関する研究 (第 5 報)*

澱粉のペーパークロマトグラフィーの新方法について

滝 基 次 (三重大学農学部)

昭和 33 年 9 月 22 日 受 理

緒 言

第 3 報⁽¹⁾で設定した 35% HClO_4 溶液を展開剤とする澱粉のペーパークロマトグラフィー (下降法) では澱粉溶液をストリップにつけて風乾した後、1 次展開でアミロペクチン区分を原帯に残留させ、アミロース区分を展開前線部に下降させる。この際僅かであるがアミロース区分が原帯に残留し、アミロペクチン区分の僅かの部分が下降してアミロース区分に混在する。1 次展開を終えたストリップを沃素蒸気中で 2 次展開すると、アミロース区分は沃素で青色に呈色して、下降しなくてストリップに保留されるが、アミロース区分に混在したアミロペクチンは赤紫色に呈色したまま流下して、遂にストリップから流出する。このことからストリップを予め展開剤 HClO_4 で湿しておいて澱粉溶液をつけ、直に沃素蒸気中で展開すれば、アミロース区分を沃素-複合体としてストリップ上に保留し、アミロペクチン区分を流下させることが出来ると考えて、澱粉のペーパークロマトグラフィーを試み、更にその定量化を行ったので其の結果を報告する。

実 験 方 法

1. 供試澱粉の調製

- (1) 粳米澱粉：粳白米 (本学農場産) から第 1 報⁽²⁾の方法で分離した。減圧乾燥 (70°) した。
- (2) 馬鈴薯澱粉：局方品を再沈澱して精製した。減圧乾燥 (70°) した。

2. アミロース、アミロペクチンの分別 前報⁽³⁾で指摘したように、澱粉から分別したアミロペクチン中に沃素で青色に呈色する区分 (アミロースと推定した) の混在することがあるので、この点に留意し 1% 澱粉糊液

* Studies on the Chromatography of Starches. Part V. On the New Method for the Paper Chromatography of Starches.

By Motoji TAKI (Faculty of Agriculture, Mie University)

第 1 図 粳米澱粉のペーパークロマトグラム

1. 濾紙ストリップ
2. アミロース
3. アミロペクチン
4. アミロース、アミロペクチン混合物
5. 澱粉

について第 3 報⁽¹⁾と同様に操作してアミロースを *n*-ブタノール-複合体として分離し、*n*-ブタノール飽和水より 5 回再結した。アミロペクチン区分を含む母液は煮沸して *n*-ブタノールを補給し、定温器 (35°) 中に 1 夜放置し徐冷し、翌日室温に至らしめる。更に 3 日間冷库 (5°) に放置した⁽⁴⁾。これを遠心分離し沈澱物を除去した。以下第 3 報と同様に操作してアミロペクチンを分離した。両区分とも減圧乾燥 (70°) した。

3. 濾紙ストリップの前処理 東洋濾紙 No. 52 (4×30 cm) について、第 3 報と同様に 15% KOH, 40% HClO₄ で前処理して 2×24 cm に切った。第 1 図-1 の様に 3 cm ごとに A, B, C, D, E, F, G の 7 本の線を鉛筆でかく引いておく。

4. 澱粉溶液の調製 澱粉の 20 mg を秤量瓶に秤取し氷水中に冷却しておいて、これに予め氷水にて冷却しておいた 40% HClO₄ 溶液 (市販 60% HClO₄ 2 容に水 1 容を加える) の 4 ml を加えて攪拌して完全に分散させた。稀釈する場合は 40% HClO₄ 溶液でした。アミロース、アミロペクチンの場合も同様に調製した。

5. 展開方法 アミロース、アミロペクチン、澱粉について、それぞれ 1 mg/ml, 5 mg/ml, 5 mg/ml 溶液を調製した。まず開放で濾紙ストリップを A で折りまげて、下降法にて 40% HClO₄ 溶液を C まで流下させたとき、ストリップを指間に水平に持って AB 間にそれぞれの溶液の 0.05 ml をバンド状につけ、うわ水の消失するまでそのまま保持した。次にこのストリップを沃素蒸気を含んだ密閉器中で自然に展開させた。即ち展開容器 (直径 20 cm, 高さ 25 cm の円筒型デシケーター) の底部に 0.2 N I₂-1 N KI 溶液を 50 ml 入れて、予め冷库 (5°) 中に冷却しておいて、試料をつけたストリップを A で折りまげ、下降法によって展開剤容器 (展開剤は入れない) にかかけ、密閉して冷库 (5°) 中に 1 夜放置した。展開はストリップに保有されている過剰の 40% HClO₄ で進行し、展開前線は G 附近に至った。

6. ストリップの呈色方法 展開中にすでに沃素蒸気でアミロースは青色に、アミロペクチンは紫色に呈色して識別されるが、充分な呈色にはストリップを沃素アルコール溶液⁽¹⁾又は 0.001 N I₂-KI 溶液に浸漬することによった。

7. 澱粉のアミロース区分の分離、流下捕集 アミロース区分の分離、流下捕集は氷庫 (5°) 中で行った。澱粉の 5 mg/ml 溶液 (40% HClO₄) の 0.05 ml について、沃素蒸気中でペーパークロマトグラフィーの展開が終了したとき展開容器の上部の小孔から、展開剤容器に 40% HClO₄ 溶液を入れて流下を開始すると、アミロース区分は流下しなく青色に呈色したまま残り、アミロペクチン区分は紫色に呈色したままストリップから流出した。この流出は約 4 時間で終了した。次いでストリップを展開容器からとり出して E にて斜めに切断した。これはアミロペクチン区分がストリップの先端に残存する恐れがあるからである。切断はゴム製の指サックをつけた指頭で行った。次にこのアミロース区分のみを保有するストリップを A で折りまげて、別の開放容器中に装置した流下剤容器 (流下剤は入れない) にかかけ、他端を 5 ml の標線を有する小試験管 (水 3 ml を入れておく) に達させて放置した。アミロースの青色の呈色がほぼ消失したとき、40% HClO₄ 溶液で流下を始めて流出液をほぼ 5 ml の標線まで捕集した。これを 40% HClO₄ 溶液で 5 ml として、0.01 N I₂-KI 溶液 0.1 ml を加えて、直に波長 620 mμ における吸光度を測定した。液層は 1 cm。対照液は水 5 ml に 0.01 N I₂-KI 溶液 0.1 ml を加えた。アミロース区分の流下捕集に流出量が 1.5 ml で充分であることは予備実験でたしかめた。濾紙ストリップに関する blank の吸光度は 0 であった (伊藤: B-1 型スペクトロホトメーター)。

8. アミロースの検量曲線 アミロースの 1 mg/ml 溶液 (40% HClO₄) を水で稀釈して 0.025 mg/ml 溶液として、この 0.5~3.0 ml に 40% HClO₄ 溶液の 2 ml を加えて、水で 5 ml とした。これに 0.01 N I₂-KI 溶液 0.1 ml を加え、直に上記と同様に波長 620 mμ における吸光度を測定して、アミロースの検量曲線を作製した (第 2 図)。これを基準として先に求めた澱粉の展開ストリップから流下捕集したアミロース区分の沃素呈色

第2図 粳米澱粉アミロースの沃素呈色液の吸光度とアミロース量

1. アミロース水溶液
2. 40% HClO_4 溶液の 2ml を加えたアミロース溶液

アミロース 2mg/ml 溶液, アミロペクチン 10mg/ml 溶液の同量の混合液の 0.05 ml のクロマトグラムを第1図-4に示した. BD 間に青色のバンド, 展開前線部に紫色のバンドが見られ, 両バンドの中間部は呈色しなかった. 即ちアミロース, アミロペクチンが混合している場合でも, 両区分が明確に分離されることが分る. アミロペクチン中に混在する微量のアミロースは, 添加したアミロースと重さなって分離は見られない.

(4) 澱粉の場合: 第1図-5に示す様に原帯から全部下降して BD 間にバンド状の青色に呈色する区分と, 展開前線部にバンド状の紫色に呈色する区分が見られ, 其の中間部分は呈色しなかった. 即ち澱粉がアミロースとアミロペクチンの両区分に分離されるものと考えられる.

2. 馬鈴薯澱粉, アミロース, アミロペクチンのクロマトグラム アミロース, アミロースとアミロペクチンの混合物, 澱粉のクロマトグラムは粳米の場合と同じであったが, アミロペクチンのみの場合は粳米の場合とはことなって, 混在しているアミロースによる青色の呈色は見られなかった.

第3図 粳米澱粉アミロースの沃素呈色液の吸収スペクトル

1. アミロースの水溶液 (0.05 mg/5 ml)
2. 40% HClO_4 の 2ml を加えたアミロース溶液 (0.05mg/5ml)
3. 澱粉 0.25mg より分離, 捕集したアミロース区分 (5 ml)
4. アミロペクチン 0.25mg より分離, 捕集した混在アミロース区分 (5 ml)

液の吸光度より澱粉のアミロース含量を算出した.

実験結果及び考察

1. 粳米澱粉, アミロース, アミロペクチンのクロマトグラム

(1) アミロースの場合: 第1図-2に示す様に原帯(試料溶液をつけた場所)から全部下降して BD 間にバンド状に青色に呈色してとどまり, 展開前線には呈色を見なかった.

(2) アミロペクチンの場合: 第1図-3に示す様に殆んど全部展開前線まで下降してやや tailing し, バンド状に紫色に呈色したが, アミロースに相当する場所に微量の青色の呈色が見られた. これは分別アミロペクチンに混在する微量のアミロースによるものと推定される. このことは前報⁽³⁾でも指摘した所である. n -ブタノールをアミロース沈澱剤として澱粉を分別する際, アミロースが重合度によっては n -ブタノールと複合体を形成して遠心分離で沈澱分離されなく, アミロペクチン区分に混入して, これがストリップ上で分離されたものと考えられる.

(3) アミロースとアミロペクチンの混合の場合:

3. アミロースの沃素呈色液の吸収スペクトルに及ぼす HClO_4 の影響 粳米澱粉アミロースの 5mg/ml 溶液 (40% HClO_4) を水で稀釈して 0.025mg/ml 溶液とし, この 2ml に一方は水で 5ml とし, 他方は 40% HClO_4 溶液の 2ml を加え水で 5ml とした. 両者を沃素で呈色させて, 直に吸収スペクトルをとってそれぞれ第3図-1, -2に示した. これによると 40% HClO_4 溶液の添加は吸収スペクトルに影響を及ぼしてその吸光度は波長 590 mμ より長波長の領域で低下し, 吸収極大は 630 mμ から 620 mμ に移った.

4. 展開ストリップからアミロースの回収 粳米澱粉アミロースの 1mg/ml 溶液 (40% HClO_4) の 0.025, 0.050, 0.075 ml について, 実験方法-7 と同

第 1 表 展開ストリップからアミロースの回収

ストリップにつけた アミロース (mg)	0.025	0.050	0.075
回収アミロースの沃素 呈色液の吸光度	0.160	0.302	0.460
回収アミロース (mg)	0.026	0.049	0.073
アミロース回収率 (%)	104	98	97

様にして回収実験をした。第 2 図-2 を基準として、回収アミロース量を求めて第 1 表に示した。これによると回収は定量的と考えられる。

5. 澱粉の展開ストリップから流下捕集したアミロース区分の沃素呈色液の吸収スペクトル 梗米澱粉の 5 mg/ml 溶液 (40% HClO_4) の 0.05 ml について、

実験方法-7 の方法で流下捕集したアミロース区分の沃素呈色液の吸収スペクトルをとって第 3 図-3 に示した。この場合の沃素呈色液中には 40% HClO_4 溶液の 2 ml が混入されているので吸収スペクトル-2 と比較するに、長波長の部分でやや異っているが吸収極大は何れも $620\text{m}\mu$ に見られる。この長波長の部分における相違は、標品のアミロースは澱粉から分別される際重合度の比較的低い部分が除かれているのに対して、ペーパークロマト法で澱粉から分離捕集したアミロース区分はこの重合度の低い部分をも含んでいるためであろう。

6. 梗米澱粉から分別したアミロペクチン中に混在するアミロースの分離 梗米澱粉アミロペクチンの 5 mg/ml 溶液 (40% HClO_4) の 0.05 ml について、実験方法-7 の方法で混在する沃素で青色に呈色する区分 (アミロースと推定した) を分離捕集した。この区分の沃素呈色液の吸収スペクトルをとって第 3 図-4 に示した。対照として吸収スペクトル-2 をとって比較するに、全体としてやや短波長の方に移っていて、吸収極大は $600\text{m}\mu$ に見られる。この区分は沃素呈色が青色であり、ペーパークロマトグラフィーにおいて標品のアミロースと同じ態度を示すことからアミロースと推定したが、その沃素呈色液の吸収スペクトルから判断してやや重合度の低いものであろう。

梗米澱粉アミロペクチン中に混在するアミロースと推定される区分の含量を、波長 $620\text{m}\mu$ における吸光度から第 2 図-2 を基準として求めると、アミロペクチン中 4.4% となる。

7. ペーパークロマト法と比色法との比較 梗米澱粉の 5 mg/ml 溶液の 0.05 ml について、実験方法-7 によってアミロース含量を求めた。別に McCready 等⁽⁶⁾ の比色法に準じて同じ澱粉のアミロース含量を求め、更にこの数値を先に求めたアミロペクチン中に混在するアミロース含量にもとづいて補正した (第 2 表)。

第 2 表 ペーパークロマト法と比色法の比較

	ペーパー クロマト法	比色法	補正值
アミロース (%)	22.8	16.0	19.7

第 2 表によるとペーパークロマト法で求めた数値と比色法で求めた数値とはかなり相違しているが、これは比色法ではアミロースと推定される区分の混在するアミロペクチンを標品として使用するためであろう。

よってこの混在するアミロースと推定される区分の含量を考慮して、比色法で求めた数値を補正すればペーパークロマト法で求めた数値に接近してくるが、まだ一致は見られない。

以上の諸実験の結果から、40% HClO_4 溶液を展開剤とする澱粉のペーパークロマトグラフィーを沃素蒸気中に行って、アミロース区分のみをストリップ上に残し、この区分を定量的に流下捕集することが出来ると考えられる。従ってこの方法にもとづくアミロース定量法は標品としてアミロースのみを必要とし、アミロペクチンを必要としないので、標品として使用するアミロペクチン中に混在するアミロースと考えられる区分にもとづく誤差をさけることが出来ると考えられる。

要 約

40% HClO_4 溶液を展開剤とする澱粉のペーパークロマトグラフィーを沃素蒸気中に行って、アミロペクチン区分を流出させてアミロース区分をストリップ上に残し、これを流下捕集し純度及び回収率を検討した結果、この流下捕集したアミロース区分は純度よく、且つ回収も定量的であることを認めた。よってこの方法にもとづく澱粉のアミロース定量法を設定した。次いでこの方法によって n -ブタノールを分別剤として澱粉から分別したアミロペクチン中に混在するアミロースと推定される区分の分離を試み、この区分は重合度の低いアミロースと推定した。更にこの方法によって求めた澱粉のアミロースの定量値と澱粉の沃素呈色度の比色による定量法によって求めたアミロースの定量値との比較検討をした。

本研究の研究費の一部は総合研究：澱粉の利用に関する基礎的研究 (代表：大阪大学産業科学研究所二国二郎教授) によるもので、終始御指導を賜った二国教授に深謝する。本研究の経過の概要の一部は文部省：総合研究報告集録 (農学編) (1955) に発表した。

(1) 滝 基次 : 本誌, 33, 245 (1959).

(2) 滝 基次 : 本誌, 33, 216 (1959).

(3) 滝 基次 : 本誌, 33, 445 (1959).

(4) A. L. Potter, V. Silveira, R. M. McCready,
H. S. Owens : *J. Am. Chem. Soc.*, 75,

1335 (1953).

(5) R. M. McCready, J. Guggolz, V. Silveira,
H. S. Owens : *Anal. Chem.*, 22, 1156
(1950).

グリセリドのクロマトグラフ分析 (第1報)*

水銀付加法による合成ならびに天然グリセリドのペーパークロマトグラフィ

井上吉之 (京都大学農学部生物化学研究室)

野田万次郎 (京都府立大学農学部生物化学研究室)

昭和33年9月22日受理

天然油脂は普通、構造や性質の近似した多種類のトリグリセリドの混合物であるので、クロマトグラフィによってもこれら構成トリグリセリドを完全に相互分離して研究することは甚だ困難である。現在までに報告されたグリセリドのクロマトグラフィはグリセリドと他の脂質との分離、またはモノ-, ジ-, トリグリセリド3者間の分離を可能としたが、トリグリセリドの相互分離に対しては極めて不満足な結果しかえられていない。ただ僅かに二、三の方法⁽¹⁻³⁾にある程度分離効果が期待されるにすぎない。著者らはさきに不飽和脂肪酸メチルエステル^(4,5)やレシチン⁽⁶⁾を酢酸第2水銀付加物として逆相ペーパークロマトグラフィで分離する方法を考案し、実用性のある優れた方法であることを認めたが、この方法を合成及び天然グリセリドの分離にも適用した結果、下記のような興味ある結果がえられ、今後種類のグリセリド研究に応用できる方法であることが判明した。

実 験

1. 合成不飽和グリセリド 1-モノグリセリドはアセトングリセリンに相当する酸塩化物を縮合させ、えられたアシル-アセトングリセリンを塩酸で分解する Fischer 法^(7,8)によって合成した。1,3-ジグリセリドは1-モノグリセリドに計算量の酸塩化物を加えて縮合させる方法か、または1-アシル-3-トリチルグリセリンあるいは3-トリチルグリセリンに上記同様酸塩化物を縮合させ1,2-ジアシル-3-トリチルグリセリンとし、これに塩酸ガスを通じて脱トリチルと同時にアシル転位も起させて1,3-ジグリセリドとする方法⁽⁹⁻¹¹⁾かの何れかの方法によった。トリグリセリドのうちトリオレインはグリセリンと過剰のオレイン酸塩化物とを縮合させる方法、及びグリセリンと過剰のオレイン酸とを高温で加熱脱水縮合させる方法の両法で合成した。トリリノレインはグリセリンと過剰のテトラブロムステアリン酸塩化物とを縮合させてえたトリ-(9, 10, 12, 13-テトラブロム)-ステアリンを脱臭素して調製した⁽¹²⁾。1-パルミト-2,3-ジオレインと1-ステアロ-2,3-ジオレインとはそれぞれ1-モノパルミチン及び1-モノステアリンに過剰のオレイン酸塩化物を反応させて合成した⁽¹³⁾。その他の二酸基または三酸基トリグリセリドはそれぞれ相当する1,3-ジグリセリドに更に酸塩化物を縮合させて合成した^(10,14)。

これらの不飽和グリセリドに溶剤分別、分別結晶、クロマトグラフィなどの諸方法を更に適用して精製を重ねた結果、第2表のような分析値を示し、また後記の酢酸水銀付加法によるペーパークロマトグラフィにおいても単一スポットを与える純粋物と認められる物質をえたので、これらの製品を試料とした。

2. 試料天然油脂 同一種の油脂でも数個の異った試料について実験を行い、油脂の種類によるクロマトグラムの特異性について確めたが、そのうち第2図の吸光度測定に用いた試料の性状を次に示す(括弧内は酸価、ケン化価、ヨウ素価〔ウィイス法〕の順)。

ヤン油 (4.1, 258.5, 8.3), カカオ脂 (1.3, 194.5, 38.1), オリーブ油 (3.7, 195.2, 81.3), ヒマシ油 (0.4, 179.2, 84.9), 落花生油 (0.6, 190.3, 98.4), ナタネ油 (1.7, 173.9, 100.2), 綿実油 (0.4, 194.6, 106.8), ゴマ油 (2.0, 191.4, 111.0), 大豆油 (0.1, 192.8, 124.2), アマニ油 (1.1, 193.9, 178.6), キリ油 (0.5,

* Chromatographic Analysis of Glycerides. Part I. Paper Chromatography of Synthetic and Natural Glycerides as Their Mercury Addition Compounds.

By Yoshiyuki INOUE (Biochemical Laboratory, College of Agriculture, Kyoto University) and Manjiro NODA (Biochemical Laboratory, College of Agriculture, Kyoto Prefectural University)