ガスクロマトグラフィーによるアミロペクチンの平均鎖長の測定

山田哲也, 久松 真, 滝 基次*
(三重大学農学部, *松阪女子短期大学)

昭和 49 年 9 月 30 日 受 理

A Gas Chromatographic Method for the Estimation of the Chain Length of Amylopectin

By Tetuya YAMADA, Makoto HISAMATSU and Motoji TAKI*
*Faculty of Agriculture, Mie University; *Matsusaka Women's Junior College*

A gas chromatographic method was developed for the estimation of the average degree of polymerization ($\overline{DP}$) of a short-chain amylose released from amylopectin with isoamylase.

Few mg of the amylose was reduced with sodium borohydride, and sodium ion and boric acid was removed with Amberlite IR-120 (H^+) and methanol, respectively. The reduced amylose ("Amylitol") was hydrolyzed with 0.2 N-hydrochloric acid (3 ml) at 120°C for 75 min. After deionization with Amberlite IR-400 (carbonate form), the solution containing glucose and sorbitol was concentrated in vacuum, and acetylated with pyridine and acetic anhydride. The acetyl derivatives were measured with GLC on the column of silicone OV-17. From the area ratio of glucose and sorbitol and the calibration curve, $\overline{DP}$ of amylose was estimated.

The average chain length of amylopectin separated from waxy maize starch was determined by this method.

(Received September 30, 1974)

緒 言

アミロペクチンやグリコーゲンに α -1,6-結合分解酵素を作用させて得られる α -1,4-グルカン (以後, 短鎖アミロースという) の重合度測定には, 種々の方法^(1~5)が考案されている。しかし, 還元末端基を還元後, 加水分解してグルコース (以後, Glc と略記) とソルビトール (以後, Sor と略記) にし, アセチル化して GLC⁽⁶⁾ に供し, 両者のピーク面積比より重合度を求める方法は, 報告されていない。さらに, 多数の試料を取扱わなければならない場合, 技術的に容易で, かつ経済的な方法が要請される。そこで, GLC による重合度測定方法を確立したので, 報告する。

実験ならびに結果

1. カラムの選択と GLC 条件

重合度が大きくなると, Glc の Sor に対するピーク面

積比は極端に大きくなるため, GLC の場合には両者のピーク分離程度が最も重要な鍵である。そこで, アセチル誘導体における分離程度を, Silicone DC QF-1, Silicone OV-17, Silicone OV-1, Silicone GE SE-30, ECNSS-M などの各液相について検討した。その結果, 1.5% の Silicone OV-17 が最も優れていることが分かった。さらに, カラムの長さを 1m と 2m について検討

Table I. Instrument and Operating Condition

Instrument	Yanagimoto Model G-80
Column	1m×2 mm stainless steel column, 1.5% Silicone OV-17 on Chromosorb W AW 60~80 mesh
Column temp.	170°C
Detector temp.	250°C
Injection temp.	250°C
Nitrogen flow rate	25 ml/min
Hydrogen flow rate	30 ml/min
Air flow rate	1 l/min

したところ, 両者の分離能に相違はなかった. 従って, 1m カラムの方が低いカラム温度で操作できるため, 充填剤の耐久性を考慮に入れて1m カラムを使用することにした. Table I に, GLC 測定条件, GC 装置を示した.

2. 酸加水分解後の塩酸除去

加水分解後の塩酸は, アンバーライト IR-400 を使用して除去した. しかし, アンバーライト IR-400 の OH 型では, Glc の選択的吸着が著しいため, Glc と Sor の比が変化した. これは常法に従い, ドライアイスを使用して炭酸ガスを吹き込み, アンバーライト IR-400 を炭酸型とすることによって防止した.

Glc と Sor を各 5mg 溶解した混合液に, アンバーライト IR-400 (炭酸型) を 0g, 2g, 4g, 6g, 8g と変えて加え, 攪拌後1昼夜放置し, 先の GLC 条件で両者のピーク面積比を求め, その変化を調べた (Fig. 1). その結果, アンバーライト IR-400 (炭酸型) を圧倒的少量添加しても, Glc と Sor の比に変化は見られなかった. しかも, その値がほぼ1に等しいことから, Glc, Sor ともに量的変化は起らなかったと考えた. なお, $[A_{\text{Sor}}/A_{\text{Glc}}]^*$ の値を, 後述する補正係数**として用いた.

3. 短鎖アミロースの酸加水分解条件

試料として, 市販マルチトールと市販オリゴ糖還元

Fig. 1. Influence on Ratio (Sor/Glc) with Amberlite IR-400 (carbonate form)-Treatment

The solutions containing same amount of glucose and sorbitol were treated with various amounts of Amberlite IR-400 (carbonate form). After acetylation of the mixture, areas of glucose and sorbitol were measured on the condition of Table I.

* $A_{\text{Sor}}, A_{\text{Glc}}$: アセテート誘導体にした, Sor, Glc のピーク面積.

** 補正係数: 1.11 の値を用いた.

物*** (以後, RO**** と略記) を用いた. 完全加水分解を低濃度塩酸で, しかも短時間で終了させるために, 蒸気殺菌用オートクレーブを用いて, 120°C の反応条件を設定した. その後の反応操作の便宜上, 50ml のナス型フラスコを反応容器として用いた. フラスコの口は, アルミホイルでおおう程度にした.

(1) 塩酸濃度の決定: 各試料 5mg に, 0.01N, 0.05N, 0.25N 塩酸 3ml 加えた. 120°C, 2時間加水分解反応を行なった後, アンバーライト IR-400 (炭酸型) で脱イオンした. 反応生成物の PPC を, ブタノール:ピリジン:水 (6:4:3) を溶媒とする下降法で展開し, 分解程度を調べた (Fig. 2). 発色は, 1% メタ過ヨウ素酸ナトリウム 50% アセトン水溶液を噴霧後, 硝酸銀, アルカリを噴霧する方法⁽⁶⁾で行なった. その結果, 塩酸濃度が 0.05N 以下のものは, 不完全分解物である二糖類以上のスポットが認められた. しかし, 0.25N では, それらを全く認めることができなかった.

(2) 加水分解時間: 試料に RO を用いた. 約 5mg の試料を, 0.2N 塩酸 3ml, 120°C で, 20分から90分まで時間を変えて加水分解を行なった. (1) と同じ条件で PPC に供し, 分解程度を調べた (Fig. 3). その結果, 20分と30分では不完全分解物が認められ, 40

Fig. 2. Paper Chromatogram of Hydrolyzate.

Maltitol and RO (reduced oligosaccharide) were hydrolyzed with each acid concentration at 120°C for 2 hr. After neutralization, the reaction products were developed with *n*-butanol-pyridine-water (6:4:3 v/v). The spots were detected by spraying $\text{NaIO}_4\text{-AgNO}_3\text{-NaOH}$ reagent.

*** 市販名: エスイー 100 (日研化学).

**** RO: reduced oligosaccharide.

Fig. 3. Paper Chromatogram of Hydrolyzate.

RO (reduced oligosaccharide) was hydrolyzed with 3 ml of 0.2 N HCl for each reaction time at 120°C. After neutralization, the reaction products were developed and detected by same method of Fig. 2.

Fig. 4. Gas Chromatogram of Acetyl Derivative of Hydrolyzate of Maltitol and RO (reduced oligosaccharide).

The GLC condition is shown in Table I.

分と 50 分でも微量だが存在しているように思われた。これに対し、60 分と 90 分では完全に分解されていた。

以上の結果、塩酸加水分解条件は、試料 5 mg に対し、0.2 N 塩酸 3 ml, 120°C, 75 分間と設定した。

4. 試 測

試料として市販マルチトール, RO を用い, 先に設定した条件で重合度測定を行なった (Fig. 4)。重合度として, $[A_{Glc}/A_{Sor}] \times (\text{補正係数}) + 1$ の式より求めた計算値は, それぞれ 1.95, 5.67 であった。

5. 精度の検討

RO を PPC で多重复展開後, Fig. 5 の各スポット相当部を抽出し試料として用いた。本法に従って求めた重合

Fig. 5. Estimation of DP of Each Fraction of RO.

RO (reduced oligosaccharide) was developed with same system of Fig. 2. The values of DP were calculated from the areas of the GLC.

Fig. 6. Gas Chromatogram of Hydrolyzate of Reduced Short Chain Amylose.

The area of sorbitol was measured as the part enclosed with peak and oblique line. The sensitivity of sorbitol was changed 16 times that of glucose. The GLC condition is shown in Table I.

度の値を, Fig. 5 に示した。PPC で分離できた No. 2 から No. 5 までは, 理論値と非常に近い値が得られた。

6. 重合度が 10 から 100 の場合

重合度が大きくなると, Fig. 6 のように感度を変え, Glc と Sor のピークがチャート内に入るよう操作する必要がある。Glc の出現後, 感度を 8~16 倍に上げるため, Sor のピークは Glc のテーリング部分に乗った状態で現れた (Fig. 6)。Fig. 6 の破線部分は相互に感度を切り換えて求め, 点 B, C を同時に求めた。線分 AB をベースラインとする部分を Glc の面積, 線分 CD をペー

Fig. 7. The Calibration Curve for Estimating DP.

This curve shows the relation between molar ratio and area ratio of GLC. The value of molar ratio plus 1 is DP value.

スラインとする部分を Sor の面積とした。このため、両者のピーク面積比より直接に重合度を求めることは困難であると考えたので、補正を行なった。

7. 補正曲線の作成

Glc と Sor のモル比を変えて混合した溶液を作り、同一条件で GLC を行なった。ここで求めたピーク面積比と、混合比より補正曲線 (Fig. 7) を作成した。

8. 短鎖アミロースの平均重合度測定

試料として市販のアミロース*を用いた。F. Smith らの方法⁽⁶⁾に従い、試料 5 mg を水酸化ナトリウムで溶解後、水素化ホウ素ナトリウムで還元した。還元後、アンバーライト IR-120 を添加して、過剰の還元剤の分解と、Na⁺の除去を行なった。還元剤の分解物であるホウ酸は、その後の操作の悪影響を与えるため、大過剰のメタノールを添加、乾固することで除去した。実験 3 の条件で加水分解を行ない、アンバーライト IR-400 (炭酸型) で処理し、アセチル化して GLC に供し、ピーク面積比を測定した。補正曲線より重合度を求めたところ、23 であった。過ヨウ素酸酸化を用いる原田らの方法⁽¹⁾に従って測定したところ、20 であった。

9. アミロペクチンの平均鎖長測定

試料として、当研究室で栽培し調製したモチトウモロコシデンプンのアミロペクチンを用いた。短鎖アミロースの調製は、アミロペクチンに debranching 酵素を作

Amylopectin
Treated with isoamylase
Amylose (5 mg)
Dissolved in 0.25 ml of 1 N NaOH at 0°C
Added into 10 ml of H₂O containing 10 mg of NaBH₄
Reduced polysaccharide (amylitol)
Treated with Amberlite IR-120 (H⁺) and MeOH
Dissolved in 3 ml of 0.2 N HCl
Hydrolyzed at 120°C for 75 min
Hydrolyzate
Treated with Amberlite IR-400 (carbonate form)
Concentrated in vacuum
Acetylated with pyridine and acetic anhydride at 30°C
Acetyl derivative
GLC

Scheme 1. Estimation Scheme of Average Chain Length of Amylopectin.

用させる原田らの方法^(1,7)に従って行なった。すなわち、試料 5 mg を 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 3.5) に溶解後、*Pseudomonas* isoamylase** (138 U) を加え、30°C、48 時間作用させた。中和後濃縮乾固し、実験 8 の操作を行なって重合度を求めたところ、24 となった。一方、原田らによる測定値⁽⁹⁾は 23 である。実験 8、9 の操作を Scheme 1 にまとめた。

考 察

化学的手段による α -1,4-グルカンの重合度測定には、還元または非還元末端基の定量に基づくものがほとんどである。このうち、末端基に対して酸化還元反応⁽⁸⁾、過ヨウ素酸酸化反応^(10,11)、酵素反応⁽²⁾を行ない末端の糖量を求める方法は、別に全糖量を求める必要がある。これに対し、GLC 法は、Sor 残基量と Glc 残基量を同時に求めることができる。さらに、全段階において定量的操作をほとんど必要としないことから、簡便な重合度測定と考えられる。Park-Johnson 法⁽⁶⁾による重合度測定は、簡便さにおいては優るが、その精度は重合度が 20 以上と大きくなるに従い、不確実なものとなり問題が多い。

また、還元末端基より生じた Sor を直接定量する酵素法⁽²⁾や、NAD を用いる方法⁽¹¹⁾では、多数の試料を扱う場合にはやや経済的負担が大きい。GLC 法は、多数の試料を扱うのに経済的である。

一般に試料の鎖長が長くなると、沈殿しやすく、その不溶化が測定上問題となる。この点、GLC 法はきわめて優れている。すなわち、還元することにより溶解性が

* Amylose EX-1 Lot 10-26 (林原株式会社)。

** 林原株式会社。

著しく上昇すること, さらに, 濃度上濃縮を必要とする希薄溶液でも還元後は濃縮乾固して固体状態で取扱うため, 上記の測定中の試料の不溶化に対する心配はない。その結果, 平均重合度が 40 のもので, 0.01% 溶液が 20 ml (Sor 量として 50 μ g) あれば十分測定できる。

Fig. 7 の補正曲線より, 重合度が 10 から 50 の範囲では, ピーク面積比とモル比の値は比較的一致しており, 概算値でよい場合には, 補正曲線は不必要である。

本法は, 短鎖アミロースの重合度測定だけに止らず, 従来の多糖類構造決定法と併用するなど, 利用方法いかんによっては, 構造解析にも役立つものと考えている。

要 約

アミロペクチンの平均鎖長測定を行なうために, α -1,4-グルカン (短鎖アミロース) の重合度を, GLC を用いて測定する方法を検討した。その結果, 次のような測定方法を定めた。

- (1) 短鎖アミロースを氷中で 1 N NaOH に溶解後, 希釈。
- (2) NaBH_4 で還元後, アンバーライト IR-120(H^+), MeOH で処理して, Na^+ と H_3BO_3 を除去。
- (3) 濃縮乾固後, 0.2 N HCl を加え, 120°C, 75 分間加水分解。
- (4) アンバーライト IR-400 (炭酸型) を加え, Cl^- を除去し, アセチル化。

- (5) Silicone OV-17 (1 m) カラムで GLC。
- (6) Glc と Sor の面積比を求め, 補正曲線より重合度の算定。
- (7) 本法による, モチトウモロコシデンプンのアミロペクチンの平均鎖長は, 24 であった。

- (1) H. Akai, K. Yokobayashi, A. Misaki and T. Harada : *Biochim. Biophys. Acta*, **237**, 422 (1971).
- (2) D. J. Manners, A. J. Masson and R. J. Sturgeon : *Carbohydr. Res.*, **17**, 109 (1971).
- (3) E. Y. C. Lee, C. Mercier and W. J. Whelan : *Arch. Biochem. Biophys.*, **125**, 1028 (1968).
- (4) W. J. A. VandenHeuvel and E. C. Horning : *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **4**, 399 (1961).
- (5) T. Yamada, M. Hisamatsu and M. Taki : *J. Chromatogr.*, in print.
- (6) M. Abdel-Akher, J. K. Hamilton and F. Smith : *J. Amer. Chem. Soc.*, **73**, 4691 (1951).
- (7) T. Harada, A. Misaki, H. Akai, K. Yokobayashi and K. Sugimoto : *Biochim. Biophys. Acta*, **268**, 497 (1972).
- (8) J. T. Park and M. J. Johnson : *J. Biol. Chem.*, **181**, 149 (1949).
- (9) H. Akai, K. Yokobayashi, A. Misaki and T. Harada : *Biochim. Biophys. Acta*, **252**, 422 (1971).
- (10) S. K. Chanda, E. L. Hirst, J. K. N. Jones and E. G. V. Percival : *J. Chem. Soc.*, **1950**, 1289.
- (11) D. W. Noble and R. J. Sturgeon : *Carbohydr. Res.*, **12**, 448 (1970).