

Isomaltose と Gentiobiose の分離および定量*

瀬野 信子

Separation and Determination of Isomaltose and Gentiobiose

Nobuko Seno

Department of Chemistry, Faculty of Science,
Ochanomizu University, Tokyo

Isomaltose はデキストラン¹⁾, グリコーゲン²⁾およびアミロペクチン³⁾の分枝構造の分岐点を示す二糖類として, これら多糖類の水解物中から結晶状のアセチル誘導体として分離確認された。

しかし, これら多糖類を酸で加水分解する時は, 一旦生じた *D*-glucose から逆反応⁴⁾⁻⁸⁾によつて二次的に多くの二糖類を生じ, その中最も多量に生成する gentiobiose と isomaltose の分離, 定量は非常に困難で, 未だ適当な方法が見出されていない。従つて α -1, 6 結合の isomaltose と β -1, 6 結合の gentiobiose との分離, 定量は多糖類の化学構造研究上ならびに澱粉糖化工業における澱粉糖の分析上重要な問題と考えられる。

著者は種々の chromatography を用いて, これら二糖類の微量を分離, 定量する方法を検討したので報告する。

実験および考察

1. 試料

Isomaltose および gentiobiose は Hydrol (結晶葡萄糖の母液) から carbon-Celite chromatography および Magnesol-Celite chromatography により Wolfson ら⁹⁾の方法を改良して先ずアセチル誘導体として単離し, これをナトリウムメチラートで脱アセチル¹⁰⁾して用いた。

β -isomaltose octaacetate,	mp. 144.5~145°C: $[\alpha]_D^{18} + 94.6^\circ$ (c 1.9, CHCl ₃)
β -gentiobiose octaacetate,	mp. 196~197°C: $[\alpha]_D^{18} - 5.3^\circ$ (c 3.9, CHCl ₃)

2. Paper Chromatography

方法: 展開剤としては pyridine-*n*-BuOH-H₂O (2:3:1.5)¹¹⁾, acetic acid-*n*-BuOH-H₂O (1:4:1), acetone-*n*-BuOH-H₂O (7:5:2) (v/v) の 3 種; 濾紙としては Whatman No. 1, 東洋濾紙 No. 2, No. 50, No. 53 の 4 種; 展開方法としては上昇法および連続下降法を試みた。

検出は aniline hydrogen phthalate を噴霧し, 120~125° で 5 分間加熱発色させた。

結果: 上昇法では multiple 4 回行つても何れの場合も分離しなかつた。しかし, 下降法で東洋濾紙 No. 53 を用い, acetone-*n*-BuOH-H₂O で連続 2 日以上展開を行うと

* 本研究の要旨は日本化学会第 10 年会 (1957 年 4 月, 東京) において発表した。

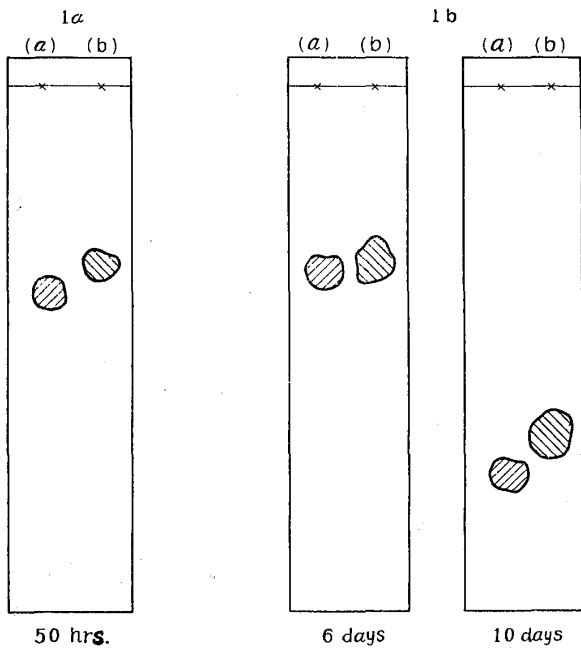


Fig. 1. Paper Chromatograms of Isomaltose (a) and Gentiobiose (b).

きは, Fig. 1a がえられ, Bacon ら¹²⁾の方法, Fig. 1b, によるよりも容易に分離が行われた。

3. Paper Electrophoresis

方法: 濾紙—

Whatman No. 1,
東洋濾紙 No. 2, No. 53 } 40×14.5 cm

緩衝溶液—

0.05 M borax-0.1 N NaOH (6:4)(v/v),
pH 9.8

を用い, 硝子板にはさみ, 650~700 V,
(15~20 mA) で約 2 時間泳動させた。

結果: 泳動結果を M_G で表わし, Foster¹³⁾ (Whatman No. 3, 0.2 M boraxにより 900 V) および麻生ら¹⁴⁾ (東洋濾紙 No. 2, 0.05 M borax-0.1 N NaOH により 600 V, 3 時間) の結果と比較すると Table 1 がえられた。

Table 1. Paper Electrophoresis of Isomaltose and Gentiobiose.

sugar	M_G				
	著 者			Foster ¹³⁾	麻 生 ¹⁴⁾
	(i)	(ii)	(iii)		
isomaltose	0.65	0.55	0.58	0.69	0.68
gentiobiose	0.73	0.72	0.76	0.75	0.71

(i) 東洋濾紙 No. 2 (ii) 東洋濾紙 No. 53 (iii) Whatman No. 1

以上の結果から, 同一条件の下でも濾紙の種類により M_G が異なることが知られる。即ち東洋濾紙 No. 53 または Whatman No. 1 を用いて上記の条件の下で泳動させれば短時間で両者を分離確認することができる。

4. Ion Exchange Chromatography

分離定量法としては, Khym¹⁵⁾¹⁶⁾ らの ion exchange chromatography を応用して次のように行つた。

方法: 陰イオン交換樹脂 Dowex 1 (X-4 または X-8) 250~300 mesh を硼酸塩型とし, 0.9×12.5 cm カラムとする。試料は isomaltose および gentiobiose を夫々 5 mg/2 ml 硼酸塩溶液とし, 1 ml/min. の流速で溶出し, 溶出液は 30 ml づつフラクションコレクターで分割採取し, anthrone 法¹⁷⁾により EPO-B 型日立光電光度計 (フィルター No. 61) で比色定量した。

結果: 溶離液を変えることによつて Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4 の溶出曲線がえられた。即ち

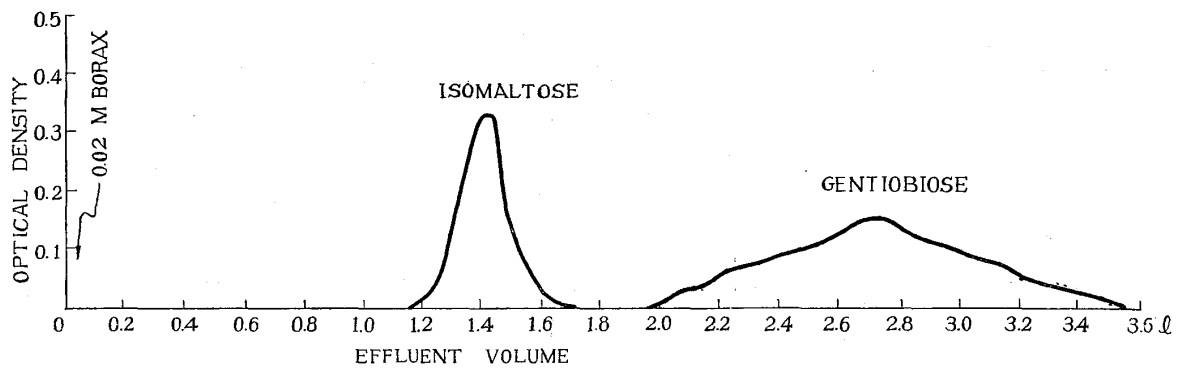


Fig. 2. Ion Exchange Chromatography of Isomaltose and Gentiobiose (i).

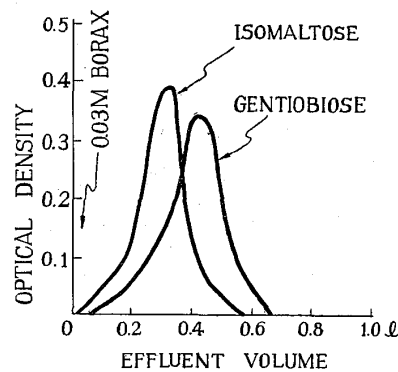


Fig. 3. Ion Exchange Chromatography of Isomaltose and Gentiobiose (ii).

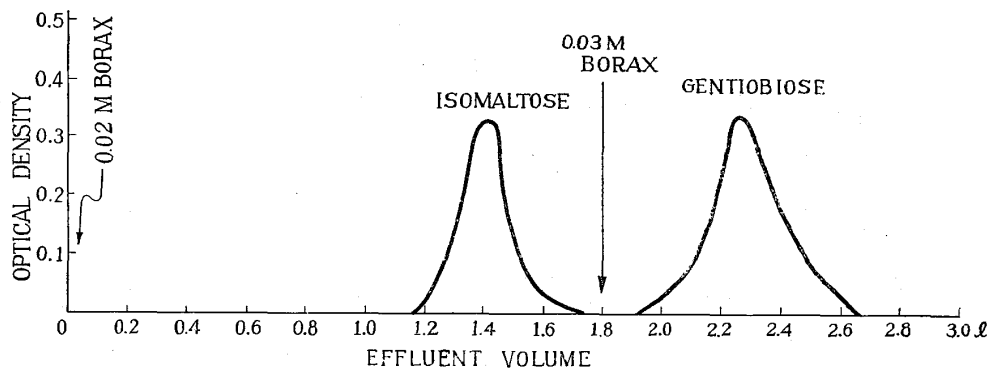


Fig. 4. Ion Exchange Chromatography of Isomaltose and Gentiobiose (iii).

(i) 溶離液として 0.02 M borax を用い, isomaltose と gentiobiose を夫々単独に行つた場合, Fig. 2 に示すように isomaltose は満足すべき溶出曲線を示したが, gentiobiose は tailing して不適當であつた。

(ii) 溶離液として 0.03 M borax を用い, 夫々単独に行つた場合, Fig. 3 に示すように両者の溶出曲線は重なつた。

(iii) 以上の結果から考え, isomaltose と gentiobiose の混合試料に対し, 溶離液として初め 0.02 M borax を用い, ついで 0.03 M borax に切り替えると, Fig. 4 に示すように両者が明らかに分離し, 夫々回収率は $100 \pm 4\%$, 再現性は ± 30 ml (1 フラクション) の範囲で定量出来ることが分つた。

結 論

1) α -1, 6 結合の isomaltose と β -1, 6 結合の gentiobiose は acetone-n-BuOH-H₂O (7:5:2) (v/v) を展開剤として下降法連続 2 日以上 paper chromatography を行えば分離可能であるが, 短時間で分離確認する方法としては, Whatman No. 1 または東洋濾紙 No. 53 を用い, pH 9.8 の硼酸塩緩衝溶液により 650~700 V, 2 時間 paper electrophoresis を行う方法がより適当である。

2) 微量の分離定量には Dowex 1 を用いる ion exchange chromatography により, 0.02 M ついで 0.03 M borax で溶出し, anthron 法で比色定量することにより, 両者を 100 \pm 4% の回収率で定量でき, かつ再現性は \pm 30 ml (1 フラクション) であつた。

本研究に当り, 御指導いただいた阿武教授ならびに実験に御協力いただいた若山安, 星玲子両氏に深く感謝の意を表する。なお, 研究費の一部は文部省科学研究費によつた。

Summary

The separation and identification of isomaltose (α -1, 6) and gentiobiose (β -1, 6) have been studied by paper chromatography and paper electrophoresis. Electrophoresis on Whatman No. 1 or Tôyô-roshi No. 53 filter paper in borate buffer, pH 9.8, of these disaccharides is more suitable than paper chromatography.

The quantitative determination of these disaccharides have been achieved by ion exchange chromatography of their borate complexes on strong base anion exchanger, Dowex 1.

文 献

- 1) M. L. Wolfrom, L. W. Georges and I. L. Miller, J. Am. Chem. Soc. 71, 125 (1949).
- 2) M. L. Wolfrom, E. N. Lassettre and A. N. O'Neill, J. Am. Chem. Soc. 73, 595 (1951).
- 3) M. L. Wolfrom, J. T. Tyree, T. T. Galkowski and A. N. O'Neill, J. Am. Chem. Soc., 73, 4927 (1951).
- 4) H. Berlin, J. Am. Chem. Soc., 48, 1107 (1926).
- 5) W. R. Fetzer, E. K. Crosby, C. E. Engel and L. C. Kirst, Ind. Eng. Chem., 45, 1075 (1953).
- 6) A. Thompson, M. L. Wolfrom and E. J. Quinn, J. Am. Chem. Soc., 75, 3003 (1953).
- 7) A. Thompson, K. Anno, M. L. Wolfrom and M. Inatome, J. Am. Chem. Soc., 76, 1309 (1954).
- 8) J. C. Sowden and A. S. Spriggs, J. Am. Chem. Soc., 78, 2503 (1956).
- 9) M. L. Wolfrom, A. Thompson, A. N. O'Neill and T. T. Galkowski, J. Am. Chem. Soc., 74, 1062 (1952).
- 10) A. Thompson and M. L. Wolfrom, J. Am. Chem. Soc., 75, 3605 (1953).
- 11) 麻生 清, 山内文男, 醸工, 33, 194 (1955).
- 12) E. E. Bacon and J. S. D. Bacon, Biochem. J., 58, 396 (1954).
- 13) A. B. Foster, J. Chem. Soc., 1953, 982.
- 14) 麻生 清, 浜田茂穂, 醸工, 33, 45 (1955).
- 15) J. X. Khym and L. P. Zill, J. Am. Chem. Soc., 74, 2090 (1952).
- 16) L. P. Zill, J. X. Khym and G. M. Cheniae, J. Am. Chem. Soc., 75, 1339 (1953).
- 17) T. E. Treveryan and J. S. Harrison, Biochem. J., 50, 298 (1952).

(Received September 1, 1958)