

分光光度法によるアミロース・ヨウ素
錯体の研究

歯学部 宮坂 平
佐藤 正紀

Taira MIYASAKA and Masanori SATO
Spectrophotometric Analysis of Amylose-Iodine Complex

(1980年11月7日受理)

分光光度法によるアミロース・ヨウ素 錯体の研究

緒 言

ヨウ素分子がデンプンに作用して青紫あるいは赤紫に呈色することは、ヨウ素デンプン反応という名称で良く知られており相互の検出に古くから利用されてきた。この呈色反応機構はデンプンの化学構造と密接な関係があることが知られている。デンプンに関する多くの研究報告があるが、その中で特に Meyer 一門による研究はデンプンの化学構造に関する多くの知見を与えた¹⁾。その研究によるとデンプンは D-グルコースを繰り返し単位とする長い直鎖状分子からなるアミロースと枝分れ分子状のアミロペクチンとの2種類の高分子化合物の混合物から成り立っている。天然デンプンはその種類により構成成分であるアミロースとアミロペクチンの組成比に違いがあるが、一般に前者を約20%、後者を約80%の組成比をもつといわれている。そしてこれらアミロースとアミロペクチン両成分の分離精製としては、1942年 Schoch²⁾によりアミロースと α -D-グルコースとの複合体が結晶として沈殿することを利用した分離法が知られ、現在でもすぐれた分離法として利用されている。一方ヨウ素は各種有機溶媒に溶け紫色あるいは褐色を呈する。この呈色の違いは紫色溶液ではヨウ素分子の形で溶解しているとみなされている、これに対し褐色溶液ではヨウ素分子と溶媒分子との間になんらかの相互作用があるものとされている³⁾。ところでヨウ素デンプン反応においてはデンプンの種類により色調が多少異なる、これはアミロースとアミロペクチンとの組成比および、アミロースあるいはアミロペクチンの分子量がデンプンの種類により違いがありそのために生ずるものと考えられている。そこで第一報として、コーンデンプン中のアミロース分子量 2,900 と 16,000 について、ヨウ素水溶液との反応を次の観点について考察した。アミロースは先に述べたように直鎖状高分子で結晶構造としてはらせん構造をとることが知られていて、ヨウ素と反応しヨウ素分子をらせん内部に取り入れ、このヨウ素分子間で電荷移動錯化合物を形成すると考えられている。この錯化合物の可視吸収スペクトルを用いてアミロースとヨウ素分子との反応モル比および反応の平衡定数を決定し、アミロース・ヨウ素錯体の構造について考察する。

実 験

試料のアミロースは、市販の分子量 (M_w) 2,900 および 16,000 のものを用いた。アミロース水溶液の調整は、 $M_w=2,900$ のものは、熱水に溶解後、濃度を $7.5 \times 10^{-5} \sim 4.5 \times 10^{-4} \text{mol/l}$ に調整した。 $M_w=16,000$ のアミロースは、熱水だけでは溶解しないため、4～5ml のジメチルスルホキシドに溶解し、この溶液を熱水に加え室温まで冷却した後、グラスフィルター (G3) で口過したものを全容 200ml に調整した。このとき濃度は、 $8.0 \times 10^{-5} \text{mol/l}$ とした。ヨウ素溶液は、一定量を秤り取ったヨウ素を 2～3ml のエチルアルコールに溶解させ、すばやく多量の水を加え全容を 250ml とした。濃度は、 $1.0 \times 10^{-4} \sim 8.4 \times 10^{-4} \text{mol/l}$ とした。

可視スペクトルの測定は、室温にて Hitachi model 101 スペクトルフォトメーターおよび Hitachi 124 スペクトルフォトメーターを用いて、波長 300～900nm にわたって行った。セルは、光路長 1cm および 2cm のガラスセルを用いた。

理 論 お よ び 結 果

可視スペクトルは、有色の金属錯塩の平衡状態の研究⁴⁾に広く用いられて来ている。アミロース・ヨウ素錯体の場合においても、錯体の形成にともない青色を示すことから同様の取り扱いが可能と思われる。従って、可視スペクトルを用いた平衡状態の理論について考察する。

溶液中での平衡を一般に次のように考えると、



平衡定数 K は、定温では A の初濃度を a , B の初濃度を b , 錯体 $A_m B_n$ の濃度を x とおくと

$$K = \frac{x}{(a - mx)^m (b - nx)^n} \dots\dots\dots (2)$$

で与えられる。このとき、溶液中の各成分について Beer の法則の成立と、加成性の成立を仮定すると、各成分の波長 λ での分子吸光係数 k_A, k_B, k_C を用いて、単位吸光度 d および単位増加吸光度 \bar{d} は、次式で与えられる。

$$d = D/l = k_A(a - mx) + k_B(b - nx) + k_C x \dots\dots\dots (3)$$

$$\bar{d} = d - d_0 = d - (k_A a + k_B b) = (k_C - m k_A - n k_B) x = \bar{k} x \dots\dots\dots (4)$$

ここで、 D は吸光度、 l はセルの光路長 (cm) である。(1)～(4) 式を用いて平衡定数

K , 反応式の係数 m, n , 又は k_c に関する知見をうることができる。本研究で用いた方法を以下に示す。(但し, (1) 式において A はアミロース, B はヨウ素を示す)

(1) 連続変化法⁵⁾

m, n に関する知見を得るのを目的とする方法である。(1) 式において A, B の濃度 $a+b=c_0$ を一定とすると, $db/da=-1$ より (2) 式を a で微分し整理すると

$$\frac{dx}{da} = K(a-mx)^{m-1}(b-nx)^{n-1}[(nb-na) - \{m^2(b-nx) + n^2(a-mx)\} \frac{dx}{da}] \dots \dots \dots (5)$$

をうる。(5) 式より, $\frac{dx}{da}=0$ のとき $b/a=n/m$ が得られる。従って, $a+b=c_0$ の条件下で x に比例する \bar{d} を a/c_0 に対しプロットして得た曲線が極大値を取るときは, $d\bar{d}/da=0$ であり, これは (4) 式より $dx/da=0$ と同一である。よってこの極大値を与える a の値より, 比 $b/a=m/n$ が得られる。多段階平衡が存在する場合には, この方法をいくつかの波長に対して適用することによって, 各段階での錯体の形成についての知見を得ることができる⁶⁾。

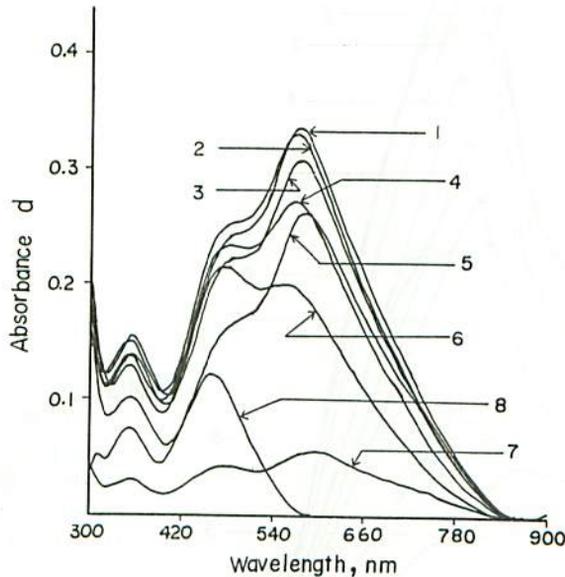


図-1 アミロース-ヨウ素錯体の可視スペクトル

図中の数字はアミロース ($M_w=2,900$) の濃度比 ($[Amylose]/([Amylose]+[I_2])$) を示す。

1: 0.35, 2: 0.30, 3: 0.40, 4: 0.20, 5: 0.60, 6: 0.10, 7: 0.80, 8: 0.00

但し, $[Amylose]+[I_2]=4.9 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ は一定。

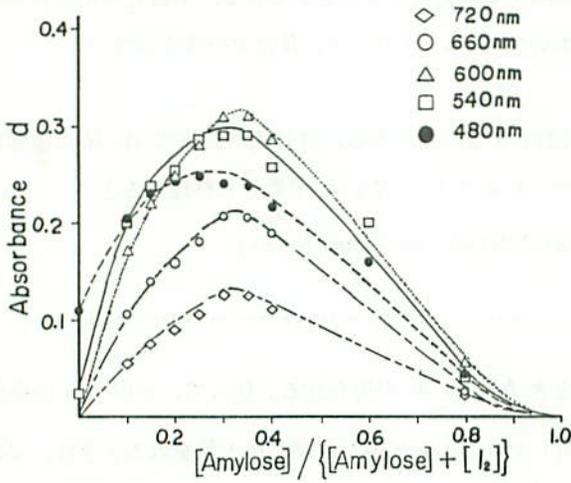


図-2 連続変化法による
プロット

アミロースの分子量 (M_w) は
2,900, 濃度の和 ($[Amylose] +$
 $[I_2] = 4.9 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$) は一定。

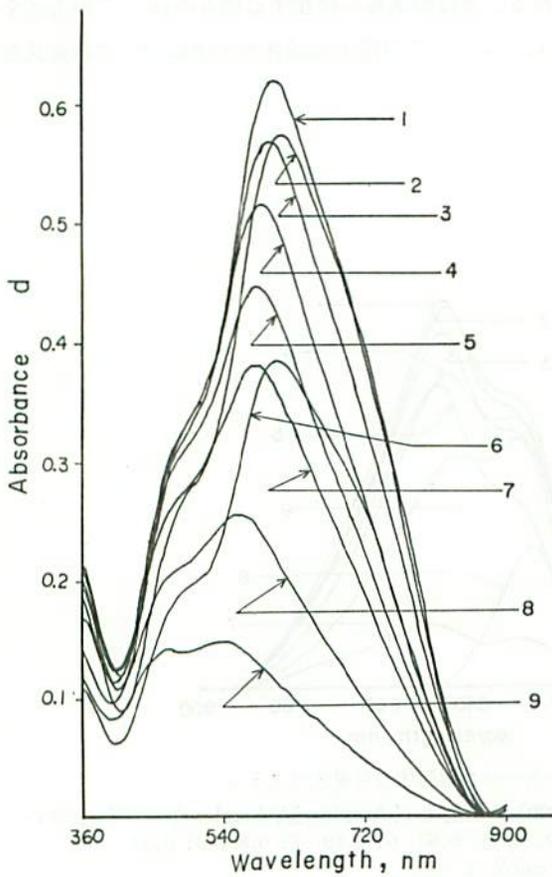


図-3 アミロース-ヨウ素錯体
の可視スペクトル

図中の数字はアミロース (M_w
 $= 16,000$) の濃度比を示す。

1: 0.025, 2: 0.05, 3: 0.1,
4: 0.2, 5: 0.3, 6: 0.4,
7: 0.5, 8: 0.6, 9: 0.7
但し, $[Amylose] + [I_2] = 8.0 \times$
 10^{-5} mol/l

分子量 2,900 のアミロースおよびヨウ素の水溶液の濃度とを $4.9 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ に保ち、全濃度に対するアミロースの濃度比を 0~1.0 まで変化させたときの可視スペクトルを図 1 に示した。図 1 において、350nm および 460nm の吸収はヨウ素自身の吸収であり、560~570nm に極大をもつ幅広い吸収帯が、アミロース・ヨウ素電荷移動錯体の吸収である。図 2 にアミロースの濃度比に対して、いくつかの波長の吸光度をプロットしたものを示した。図 2 より、560nm 以上の波長に対する吸収は、横軸を 1:2 に内分する所で、極大値を得ている。従って、この波長の吸収を示すアミロース・ヨウ素錯体の組成比は、アミロース 1 分子に対し、ヨウ素 2 分子となる。480nm 以下の波長に対する吸収は、ヨウ素自身の吸収が存在するため、この吸収をさし引いて考えなくてはならないが、1 部に 1:3~1:4 等の組成の錯体が形成されている痕跡が認められるようである。しかし、この領域での吸光度が比較的小さいことを考慮すれば、測定誤差の範囲内である。

より高分子量のアミロース ($M_w=16,000$) について、ヨウ素との濃度とを $8.0 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ に保ちつつ、全濃度に対するアミロースの濃度比を 0~1.0 にまで変化させて測定

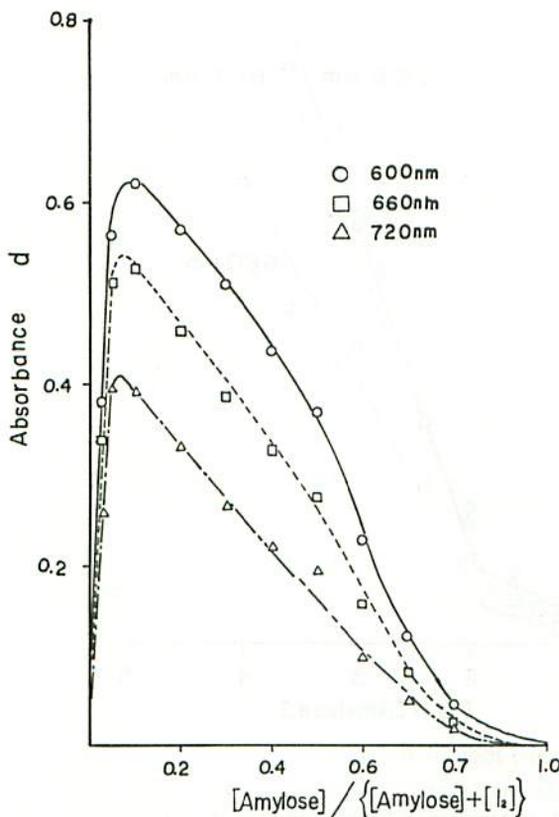


図-4 連続変化法によるプロット
アミロースの分子量 (M_w) は 16,000。
但し、濃度の和 ($[\text{Amylose}] + [\text{I}_2] = 8.0 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$) は一定。

した可視スペクトルを図3に示した。いくつかの波長についての吸光度を、アミロースの濃度比に対してプロットしたものを図4に示した。図3より、錯体の吸光度の極大波長は、より低分子量 ($M_w=2,900$) のアミロースとの錯体の極大波長に比べ、長波長 ($\lambda_{max}=620\text{nm}$) にシフトしていることが認められる。また、図4のプロットより得られる組成比は1:10~1:15であるが、高分子量アミロースは溶解しにくく、溶液が完全に求める濃度に均質に調整されていたか否かに、多少の疑問があるためこの値は参考程度にとどめるべきであろう。

(2) 分子比法⁷⁾

m, n に関する知見を得ることを目的とする方法である。(1)式において A の濃度 a を一定とし、 B の濃度 b を変化させるとき、 $0 < b/a < n/m$ の範囲では、 K がかなり大

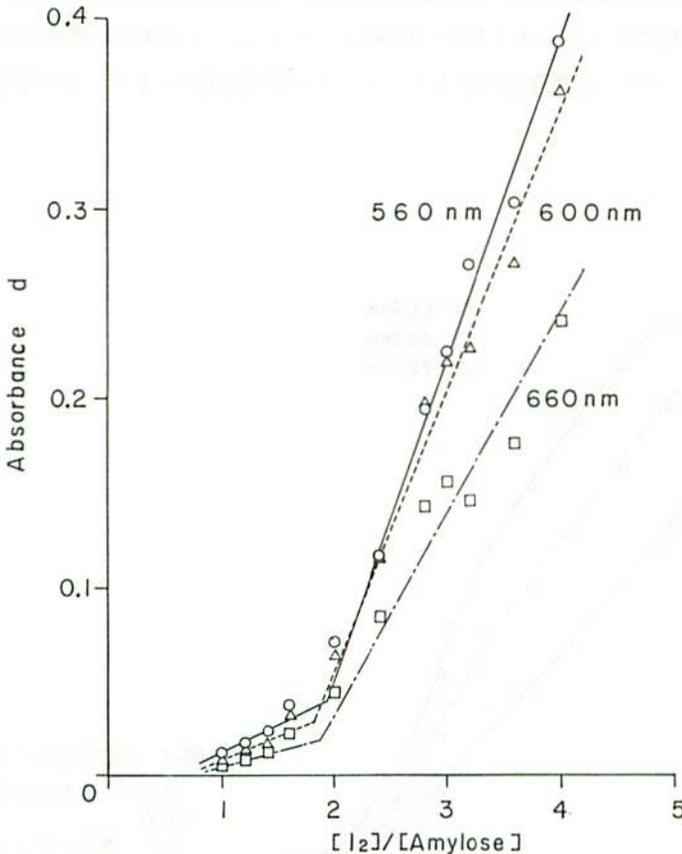


図-5 分子比法によるプロット

アミロースの分子量 (M_w) は 2,900。

但し、アミロースの濃度 ($[\text{Amylose}] = 7.5 \times 10^{-5} \text{mol/l}$) は一定。

きいと仮定すれば、 B はほとんど A_mB_n に変わるから、 $x=b/n$ 。これを (4) 式に代入すると $\bar{d}=\bar{k}b/n$ となる。よって、 \bar{d} を b/a に対しプロットすれば一定の傾斜を示すことになる。他方、 $n/m < b/a$ の範囲では、傾斜は別の値をもつことになる。従って、 \bar{d} に対しモル比 b/a をプロットしたグラフの折れ目より n/m が得られる。

$M_w=2,900$ のアミロースの溶液の初濃度を $7.5 \times 10^{-5} \text{mol/l}$ で一定に保ち、 I_2 の水溶液の初濃度を $7.5 \times 10^{-5} \sim 3.0 \times 10^{-4} \text{mol/l}$ まで変化させた。このとき、ヨウ素とアミロースの濃度比は、1~4 まで変化したことになり、この濃度比といくつかの波長の吸光度 d をプロットしたものを図5に示した。図5においては、はっきりした屈曲点は得られないが、比較的低濃度比の部分および、高濃度比の部分を延長して得られる直線の交点として屈曲点が得られる。このとき、組成比はどの波長においてもヨウ素2に対しアミロース1である。この組成比は、連続変化法によって求められたものと一致する。従って、 $M_w=2,900$ のアミロースにおいては、この波長域で吸収を示すアミロース・ヨウ素錯体は、アミロース1分子当りヨウ素2分子を含む組成を持つと考えられる。

(3) 平衡濃度法⁸⁾

平衡定数 K および分子吸光係数 kc を求める事を目的とする方法である。(2) 式において $m=1$ とおいて、 $b \gg a$, $b \gg x$ とすると、

$$K = \frac{x}{(a-x)b^n}$$

$$\therefore x = \frac{Kab^n}{1+Kb^n}$$

ここで、(4) 式より $x=\bar{d}/\bar{k}$ を代入すると

$$a/\bar{d} = 1/\bar{k} + 1/(\bar{k}K) \cdot 1/b^n \dots\dots\dots(6)$$

をうる。よって、 n を適当に選んで a/\bar{d} を $1/b^n$ に対してプロットすれば、直線となり、その切片の逆数より \bar{k} 、傾斜より、平衡定数 K が得られる。

アミロース ($M_w=2,900$) の溶液の初濃度 a を $8.3 \times 10^{-5} \text{mol/l}$ で一定に保ち、 I_2 の濃度 b を $1.7 \times 10^{-4} \sim 6.8 \times 10^{-4} \text{mol/l}$ まで変化させた時の吸光度 d を測定した。このデータと、連続変化法および分子比より求めた $n=2$ を用いて、 $1/b^2$ に対していくつかの波長に関する a/d をプロットしたものを図6に示す。図6のプロットは直線によく乗っているが、 $1/b$ および $1/b^3$ に対して a/d をプロットしたものは、大きくわん曲してしまうことが認められた。従ってこの事実もまた、組成比の $n/m=2$ を支持する。図6の直線の傾きおよび切片より求めた分子吸光係数 k および平衡定数 K を表1に示した。この錯体の分子吸光係数は非常に大きく、この大きな分子吸光係数がヨウ素デンプン反応の鋭敏さの原因と考えられる。相川ら⁹⁾ は、アミロースとヨウ素分子との間に1:1

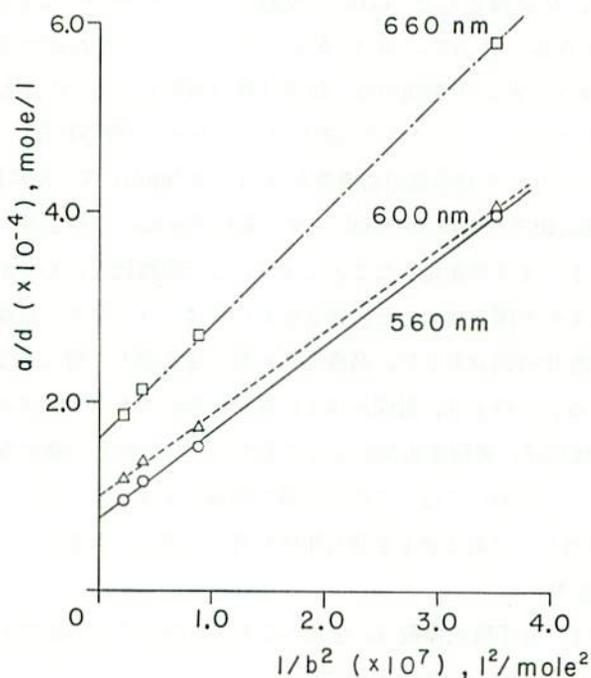


図-6 平衡濃度法によるプロット

アミロースの分子量 (M_w) は 2,900。
 但し、アミロースの濃度 ($[Amylose]=8.3 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$) は一定。

表-1 アミロース-ヨウ素錯体の分子吸光係数および平衡定数
 (アミロースの分子量 $M_w=2,900$)

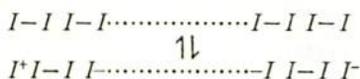
λ (nm)	K ($l/[\text{mole} \cdot \text{cm}]$)	K (l^2/mole^2)
560	13300	8.19×10^6
600	10300	1.11×10^7
660	6100	1.37×10^7

の錯体の形成を仮定して、 $k_{640}=1.0 \times 10^5$, $K=5,000$ を得ている。この値は表1の値とはかなり異なっているが、これは、アミロース・ヨウ素錯体の組成比を1:1と仮定していることに起因している。

ま と め

図1, 3でも知られるように、アミロースの分子量により、アミロース・ヨウ素錯体は

異なった極大吸収波長を持つ。これを説明するためにアミロース分子中に取り込まれたヨウ素分子や対して、次のような共鳴構造を考えアミロースの重合度が大きくなった場合、取り込まれるヨウ素分子の数も大きくなるとして、この共鳴部分の長さにより異なった波長の光の吸収が起こるとする説¹⁰⁾がある。



このような構造を考えた場合、ヨウ素原子間の結合に対して、ポリエチンやカルボシアニオン色素等に適用され良い結果を得ている π 電子に対する一次元の自由電子模型による取り扱い¹¹⁾を適用することができる。村上ら¹²⁾はアミロース・ヨウ素錯体中のヨウ素に対して、一次元自由電子モデルによる計算を行い、実測の最大吸収波長を再現する構造として、 I_4^{2-} を得た。それ以上の系 (I_6^{3-} , I_8^{4-} 等) では、実測の極大波長に比べて計算値が長波長になってしまうため、 I_4^{2-} で表わされる構造がポリヨウ素鎖の単位構造と結論した。しかしこの計算によってもアミロース鎖長と極大吸収波長との関係は説明できないため、これは一つのモデルとしての意味しか持たない、取り込まれているのがヨウ素分子 I_2 の型なのか、 I_3^- 又は I_4^{2-} といったイオン型なのかおよびそのアミロースと取り込まれた種との間の当量関係については、議論がわかれているが、アミロース・ヨウ素錯体の構造は今迄の研究により、ヨウ素分子 I_2 又はヨウ素イオン I_3^- が、アミロースのヘリックスの中に取り込まれた構造であることは間違いない。今回の実験結果においては、ヨウ素イオンの存在比は非常に小さく、従ってこの錯体を構成する成分は、ヨウ素分子そのものであると考えられる。また、この時の当量関係に関しては、 $M_w=2,900$ のアミロース 1 分子に対し、ヨウ素 2 分子、 $M_w=16,000$ のアミロース 1 分子に対してはヨウ素 10~15 分子であることが明らかになった。このときヨウ素 1 分子当りのグルコース残基の数を求めると、 $M_w=2,900$ については 9 残基、 $M_w=16,000$ に対しては 7~10 残基となる。この値は、Charles 等¹³⁾ によって重合度 800 のアミロースに対して、ヨウ素-ヨウ素イオンの等温吸着に関する研究より得られた飽和吸着量から求められた、8 グルコース単位当りヨウ素 1 分子とよく一致する。

本研究を実施するにあたり、種々の御援助をいただいた当教室の薩摩林教授をはじめ、測定器の使用に際して多大な便宜をはかっていただいた当大学の生化学研究室の方々に厚く感謝いたします。

References

- 1) 大有機化学, 天然高分子化合物Ⅱ, 朝倉書店 (1959); K.H. Meyer, M. Fuld, *Helv. Chim. Acta.*, **24**, 375 (1941).
- 2) T.J. Schoch, *J. Am. Chem. Soc.*, **64**, 2957 (1942).
- 3) 早川久雄, *Chemical Education*, **18**, 3, 230 (1970).
- 4) 実験化学講座〔続7〕, 分析化学の反応と新技術, 丸善 (1966).
- 5) R. Tsuchida, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **10**, 27 (1935).
- 6) L.I. Katzin, E. Gebert, *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 5455, 5464, 5659 (1950).
- 7) J.H. Yoe, A.L. Tones, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **16**, 111 (1944).
- 8) H.A. Benesi, J.H. Hildebrand, *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 2703 (1949).
- 9) 半田 隆, 相川秀夫, 紫外・可視部吸収スペクトル, p. 226, 南江堂 (1968).
- 10) 安積 宏, 量子化学, p. 288, 培風館 (1967).
- 11) H. Kuhn, *J. Chem. Phys.*, **16**, 840 (1948); **17**, 1198 (1949).
- 12) H. Murakami, *J. Chem. Phys.*, **22**, 367 (1954).
- 13) Charles L. Cronan, F.W. Schneider, *J. Phys. Chem.*, **73**, 11, 3990 (1969).