

# キチン分解生成物の薄層クロマト グラフィーによる分離—Ⅰ.

キチンオリゴ糖の薄層クロマトグラフィーによる分離\*

武田道夫・冨田輝雄

Thin-Layer Chromatography of Saccharides Obtained  
by Degradation of Chitin-II.  
Separation of Chitin-oligosaccharides

By

Michio TAKEDA and Teruo TOMIDA

It has previously been reported that glucosamine, N-acetyl-glucosamine, and chito-oligosaccharides (oligosaccharides of 2-amino-2-deoxy-D-glucose) were fractionated effectively by thin-layer chromatography with solvent mixture of *n*-propanol/water/ammonia and silica-gel.<sup>2)</sup> The present investigation was undertaken to find a method of separation of chitin-oligosaccharides (oligosaccharides of 2-acetamide-2-deoxy-D-glucose) with thin-layer chromatography.

The sample for thin-layer chromatography was prepared by degradation of chitin with hydrochloric acid in the manner described by RUPLEY<sup>2)</sup> except that ion-exchanger used for desalting.

Solvent systems of *n*-butanol/pyridine/water, methanol/*n*-butanol/water, and *n*-propanol/*n*-butanol/hydrochloric acid were found to be suitable for the separation of the sample on silica-gel. Especially, eleven spots were fractionated effectively with the solvent mixture of methanol/*n*-butanol/water (50+30+10).

A plot of  $\log(R_f/1-R_f)$  against the order of spot yielded a line consisted of two straight linear portions that differ in slope. These two linear portions can be assumed correspond to the homologous series of chito- and chitin-oligosaccharides, respectively.

The addition of kieselguhr to silica-gel for absorbent resulted in a considerable separability.

---

\*水産大学校研究業績 第566号, 1969年1月10日 受理.

Contribution from the Shimonoseki University of Fisheries, No. 566.

Received Jan. 10, 1969.

日本化学会九州・中国四国支部合同常会 (昭和40年12月3日, 大分大学) にて発表.

## 1. 緒 言

天然の動植物中に広く存在するキチンに関する化学的な研究は古くから行なわれているが、その定量的分析法が困難であるために、他の多糖類に比べて研究が遅れている。現在まで分析法に關して幾つかの報文が<sup>1)</sup>あるが、大部分はアミノ糖の性質を利用したもので、他のアミノ糖またはタンパク質が共存するときは、その区別が困難な場合が多い。TRACEY<sup>1)</sup>は酵素によるキチン分解生成物を検討することが、現在のところ最も確実な方法であると報告している。生成したキチン分解生成物の分離確認には、種々のクロマトグラフィーが利用されているが、ペーパークロマトグラフィーは特にオリゴ糖の分離が悪く、スポットの確認が困難であり、また活性炭とケイソウ土によるカラムクロマトグラフィーは多量の溶媒と長時間の操作を必要とする。

そこで薄層クロマトグラフィーによる分離確認を試み、前報<sup>2)</sup>においてグルコサミン(2-アミノ-2-デオキシ-D-グルコース)を単位とする5糖類までのキトオリゴ糖の分離ができたことを報告した。今回はキチンオリゴ糖(2-アセトアミド-2-デオキシ-D-グルコースのオリゴ糖)の薄層クロマトグラフィーによる分離結果およびキトオリゴ糖に対するその後の改良法もあわせて報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1. キチン

北洋漁場のカニ工船より送られたカニ殻を、希塩酸および希アルカリによりカルシウムおよびタンパク質を除き、砕砕したものの中から、100~200メッシュの大きさにふるい分けた。

### 2.2. キチンの分解

**2.2.1. 加酢酸分解:** 無水酢酸の存在下で、キチンを硫酸で分解し、クロロホルムで抽出する BARKER<sup>3)</sup>の方法によった。

**2.2.2. 塩酸による分解:** 氷冷しながら濃塩酸を加えて、キチンをゼラチン状に溶解した後、11, 6および5・5Nの塩酸で、40°Cで所定時間分解した。反応後、水酸化ナトリウムで中和し、析出した塩化ナトリウムおよび未反応のキチンをろ別した液を減圧下で濃縮した。この濃縮液はさらにイオン交換樹脂(AMBERLITE-IR-120, または RETERDION 11-A-8)で脱塩処理するか、エチルアルコールまたはクロロホルムで抽出した後、濃縮を行ない、薄層クロマトグラフィー用の試料とした。この方法は RUPLEY<sup>4)</sup>の方法を改良したものである。

### 2.3. 薄層クロマトグラフィー

吸着剤としては、MERK製のシリカゲル-Gおよびケイソウ土(Kieselguhr-G)を用いた。なおアルミナも試みたが、発色に難点があるなどで、良い結果は得られなかった。薄層は厚さ約0.25 mm, 150°Cで30分活性化し、BROCKMANによる活性度Ⅱ~Ⅲに相当するものを使用した。

展開溶媒としては、一応ある程度の結果が得られたものについては第1表に示したが、そのほか酢酸エチル、酢酸ブチル、ジメチルスルホキシド、エタノール、およびイソプロパノールなども種々の組合せで試みた。

発色にはアニスアルデヒド・硫酸法を主として用い、遊離のアミノ基を有するキトオリゴ糖同属体の確認にはニンヒドリン法を併用した。このほか過マンガン酸カリウム法およびヨウ素法も試みた。

### 3. 実験結果

#### 3.1. キトオリゴ糖の分離

前報<sup>2)</sup>においてグルコサミンからキトオリゴ糖の5種類までに相当すると考えられるスポットが、*n*-ブタノール/ピリジン/水 (5+3+2) および *n*-プロパノール/水/アンモニア (70+30+) の各溶媒系

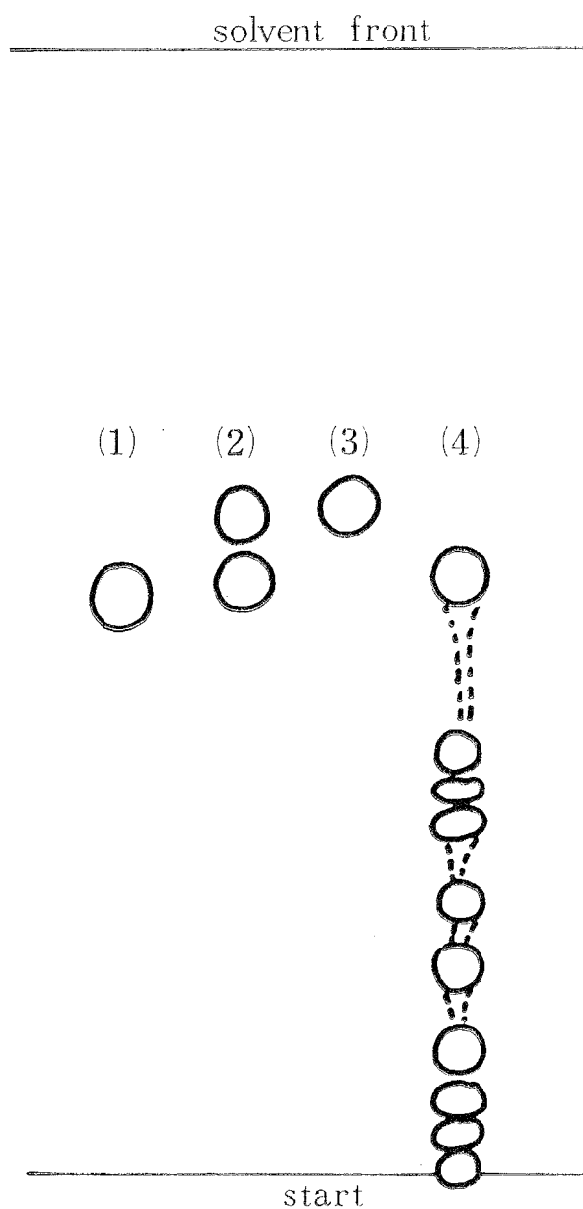


Fig. 1. Thin-layer chromatogram of chito-oligosaccharides with *n*-propanol/*n*-butanol/0.1N HCl (2+1+1) and silica-gel  
 Length of run : 15×2 cm,  
 (1) Glucosamine, (2) glucosamine+N-acetylglucosamine,  
 (3) N-acetylglucosamine, and (4) chito-oligosaccharides.

で分離されたことを報告したが、さらにその後の実験において、*n*-プロパノール/*n*-ブタノール/0.1N塩酸(2+1+1)の溶媒によって、第1図に示したように10個のスポットに分離することができた。展開は2回(15cm)行なった。しかし、N-アセチルグルコサミンとグルコサミンとの $R_f$ 値が近いことから、キチンオリゴ糖が混在する時には、その分離判定は困難ではないかと考えられる。

### 3.2. キチンオリゴ糖の分離

各種溶媒を用いての薄層クロマトグラフィーの結果を第1表に示した。N-アセチルグルコサミンとグル

Table 1. Fractionation of degraded products of chitin with thin-layer chromatography on silica-gel

Developer	Length of run (cm)	$\Delta R_f^*$	Number of spot separated	
			Chito-oligo-saccharides	Chitin-oligo-saccharides
BuOH/Py/W/Am (50+30+20+1)	15	+	4~5	3
" " (50+25+20+1)	15×2	++	4	3~5
BuOH/Py/Am (40+60+1)	15×2	++++	tailing	
BuOH/Py/W/DMSO (50+30+20+0.5)	15	+++	tailing	
BuOH/2,6-Lu/W (3+2+1)	15	++	4	2
BuOH/AcOH/W (2+1+1)	15×2	+	4~6	2
MeOH/BuOH/Am (70+30+1)	15	++	tailing	
MeOH/BuOH/AcOH (50+50+1)	15×2		tailing	
MeOH/BuOH/W (50+30+10)	15	+++	6	4
PrOH/BuOH/W/Am (60+25+30+1)	15×2	++	5	1
PrOH/BuOH/0.1N HCl (2+1+1)	15×2	++	5	1

Abbreviation for solvents: AcOH=acetic acid, Am=ammonia water, BuOH=*n*-butanol, DMSO=dimethylsulfoxide, 2,6-Lu=2,6-lutidine, PrOH=*n*-propanol, Py=pyridine, W=water.

Color reagent: anisaldehyde-sulfuric acid for chito- and chitin-oligosaccharides, and ninhydrin for chito-oligosaccharides.

\*  $\Delta R_f$ : Difference in  $R_f$  between N-acetylglucosamine and glucosamine, and the more number of symbol (+), the larger  $\Delta R_f$  value is.

コサミンの $R_f$ 値の差を $\Delta R_f$ として表中に示し、+の数の多いもの程その差が大きいことを表わした。*n*-ブタノール/ピリジン系溶媒ではピリジンの割合が多くなると $\Delta R_f$ は大きくなるが、各スポットの分離は悪くテーリングがはなはだしくなり、確認が困難となった。なおジメチルスルホキシドの混入は各スポットが広がり、良い分離は得られなかった。*n*-ブタノール/ピリジン/水/アンモニア(50+30+25+1)(二重展開)の結果の1例を第2図に示した。この結果でも明らかなようにキトオリゴ糖の分離には効果があるが、キチンオリゴ糖の分離に対しては、あまり効果がなかった。

*n*-ブタノール系の溶媒ではこのほか、酢酸酸性のものが有効であった。*n*-ブタノール/酢酸/水(2+1+1)の溶媒系を用い、キチンの塩酸分解生成物の抽出法による成分および薄層クロマトグラムの結果の相違を、第3図に示した。すなわちクロロホルムによる抽出法およびイオン交換樹脂による脱塩処理が、エタノールによる抽出法より、すぐれていることが明らかとなった。このほかにもゲルろ過およびRETERDION 11-A-8による脱塩処理も試みたが、期待するほどの結果が得られなかった。しかしこの方法は、実験回数も少なく、さらに検討すべき処理方法であると考えられる。なおキチンの分解はいずれも、9N

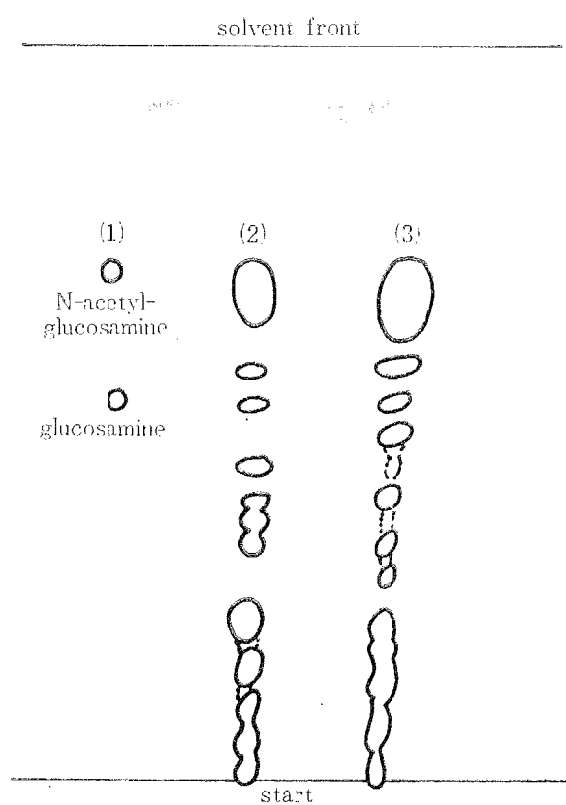


Fig. 2. Thin-layer chromatogram of degraded product of chitin with *n*-butanol/pyridine/water/ammonia water (50+30+25+1) and silica-gel

Length of run : 15×2 cm.

(1) Authentic samples, (2) extract with CH<sub>3</sub>Cl, and  
(3) desalted product with IR-120.

塩酸を用いて、40°C で 2 時間処理したものである。なお第 3 図は展開は 15 cm を 2 回行なった結果であるが、同一試料を、同じ溶媒で 1 回だけの展開をした結果は第 4 図に示したようである。 $R_f$  は小さくこれだけでは分離の判定は困難である。

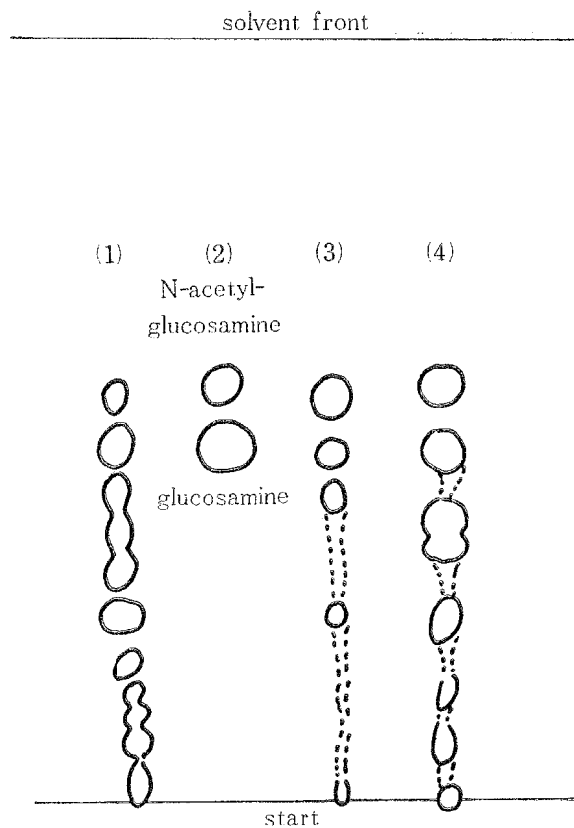


Fig. 3. Comparison of extractability for degraded product of chitin on thin-layer chromatogram

Developer : *n*-butanol/acetic acid water (2+1+1), length of run : 15×2 cm, absorbent : silica-gel.

(1) Extract with  $\text{CH}_3\text{Cl}$ , (2) authentic mixture, (3) extract with ethanol, and (4) desalted product with IR-120.

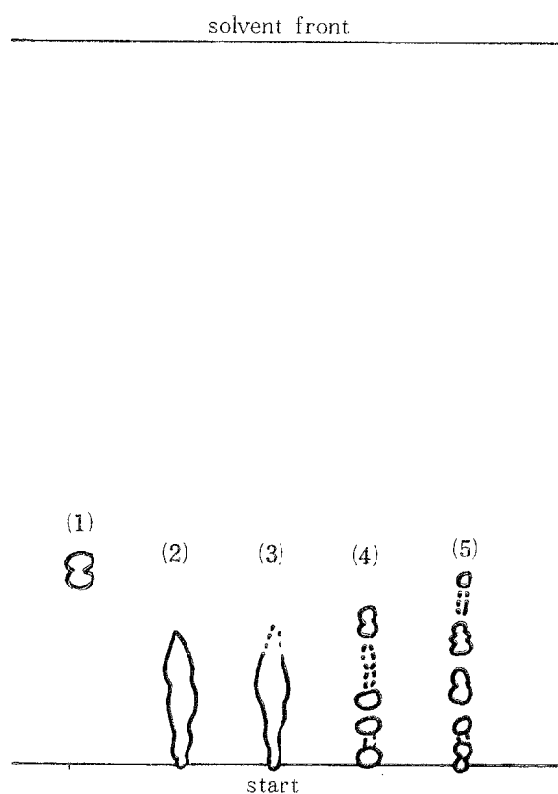


Fig. 4. Thin-layer chromatogram of degraded product of chitin with only one developing

Developer : *n*-butanol/acetic acid/water (2+1+1), length of run: 15 cm, absorbent : silica-gel.

(1) Authentic samples (N-acetylglucosamine + glucosamine), (2) (3) extract with ethanol, (4) extract with CH<sub>3</sub>Cl, and (5) desalted product with IR-120.

しかし、メタノール/*n*-ブタノール/水 (50+30+10) の溶媒では、第5図に示したように、1回の展開で  $\Delta R_f$  が大きく、10個のスポットを確認することができた。この溶媒系に、他の溶媒系で効果のあったアンモニアまたは酢酸を加えることは、テーリングがおこり、かえって分離は悪かった。

メタノールをプロパノールまたはイソプロパノールに置き代えた溶媒は、メタノールを使用した場合より効果が悪かった。

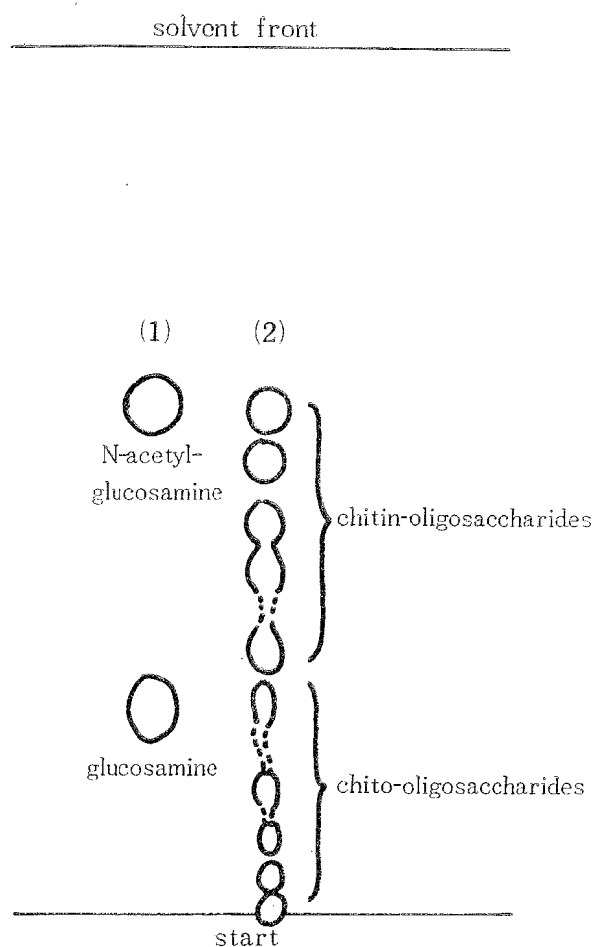


Fig. 5. Thin-layer chromatogram of degraded product of chitin with methanol/*n*-butanol/water (50+30+1) and silica-gel  
(1) Authentic mixture, and (2) degraded product.  
Length of run : 15.5 cm.



FRENCH ら<sup>5)</sup>および山内ら<sup>6)</sup>は、マルトース系オリゴ糖のペーパークロマトグラフィーの結果を、その重合度との間に関係づけて、重合度の小さい間は移動率  $\log(R_f/1-R_f)$  と重合度との間に直線関係が成り立ち、同じ展開溶媒のもとでは、その得られた直線の傾斜は、その構成単糖単位の結合様式に関係していることを報告している。また前報<sup>2)</sup>において、キトオリゴ糖の薄層クロマトグラフィーの分離結果を、上記の方法で処理すると、そのスポットの順序と移動率との間に直線関係が成立したことを報告した。そこで第5

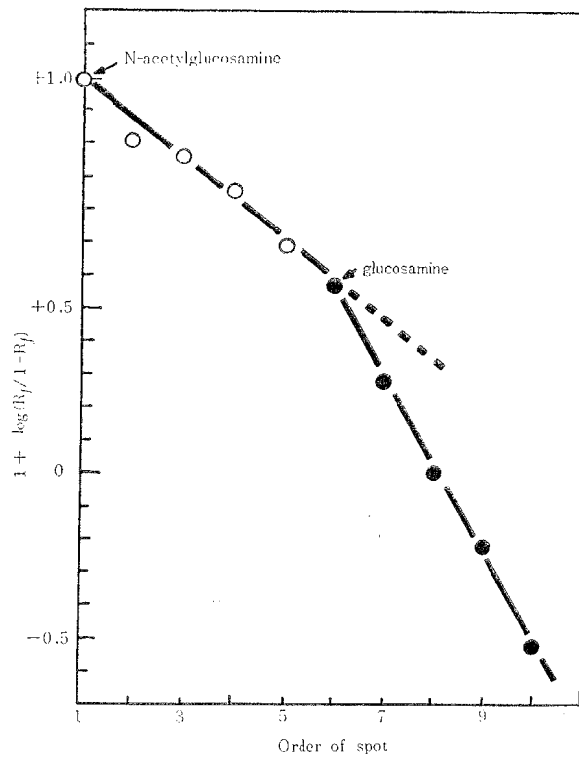


Fig. 6. Thin-layer chromatogram mobilities of degraded products of chitin on silica-gel  
Developer : methanol/*n*-butanol/water (50+30+1).

図の結果を同じようにグラフにしたのが、第6図である。すなわち得られたグラフは、N-アセチルグルコサミンおよびグルコサミンを出発点とする二つの傾斜の違う直線部分より構成されている。このことから、それぞれの直線部分はN-アセチルグルコサミンまたはグルコサミンを単糖単位とするキチンオリゴ糖およびキトオリゴ糖の同属列に相当するものと考えて良いのではないかと思う。

またケイソウ土をシリカゲルに混入した吸着剤による薄層クロマトグラフィーの結果を第2表に示した。糖類のように、分子中に有機性と無機性との両性がかかなり強く存在する分子では、そのクロマトグラフィーも複雑な様相を示すと考えられる。そこで吸着力の弱いケイソウ土を混入して、その分離能を高めようとし

Table 2. Thin-layer chromatography of degraded products of chitin with the mixture of kieselguhr and silica-gel for absorbent

Absorbent		Developer		Number of spot separated	
Silicagel + Kieselguhr				Chito-oligo-saccharides	Chitin-oligo-saccharides
0	10	BuOH/2,6-Lu/W	(6+3+1)	tailing	
7	3	BuOH/AcOH/W	(2+1+1)	5	1
7	3	BuOH/2,6-Lu/W	(3+2+1)	4	
7	3	PrOH/BuOH/0.1N HCl	(2+1+1)	9	1
6	4	BuOH/2,6-Lu/W	(6+3+1)	tailing	
6	4	MeOH/BuOH/W	(5+3+1)	2	2
6	4	BuOH/Py/W	(5+3+1)	5~3	1
3	7	BuOH/2,6-Lu/W	(3+2+1)	4~3	4~1
3	7	BuOH/Py/W/Am	(5+3+2+0.1)	6~3	3
3	7	PrOH/BuOH/0.1N HCl	(2+1+1)	6~1	2~1

Abbreviations for solvent are identical in table 1.

た試みは、第2表の結果からでは、かならずしも達成されてはいない。しかしより極性が強いと考えられるキトオリゴ糖の分離には、吸着力の弱いケイソウ土の混入はかなりの効果があると思われる。

なおキチンオリゴ糖の生成には、加酢酸分解およびキトオリゴ糖のアセチル化による方法<sup>3)</sup>よりも、RUPLEY<sup>4)</sup>の直接塩酸による分解のほうが好結果を示した。

#### 4. 結 言

キチン分解生成物の薄層クロマトグラフィーによる分離に関する研究により、つぎのような結果を得た。

1. キトオリゴ糖の分離には、前報の方法以外に *n*-プロパノール/*n*-ブタノール/0.1N塩酸(2+1+1)も適当であることがわかった。
2. キチンオリゴ糖の分離には、メタノール/*n*-ブタノール/水(50+30+1)の溶媒が1回の展開ですぐれた効果を示した。
3. 2の結果から、スポットの順序と移動率  $\log(R_f/1-R_f)$  の関係をグラフに書くと、傾斜の違う二つの直線部分から成り、それぞれはキトオリゴ糖およびキチンオリゴ糖の同属列に相当するものと考えた。
3. 吸着剤としてシリカゲルにケイソウ土を混入することは、キトオリゴ糖の分離にはかなりの効果があった。

終わりに、試料の調製に用いたカニ殻は北洋水産株式会社手塚久雄、飯田 仁の両氏より供せられたもので、厚くお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) BRIMACOMBE, J. S., and J. M. WEBBER, 1964 : "Mucopolysaccharides", Elsevier, Amsterdam, p. 22
- 2) 武井道夫・富田輝雄・大村隆重・勝浦洋, 1965 : 本報告, **14**, 1
- 3) BARKER, S. A., A. B. FORSTER, M. STACEY and J. M. WEBBER, 1958 : *J. Chem. Soc.*, 2218
- 4) RUPLEY, J. A., 1964 : *Biochim. Biophys. Acta*, **83**, 245
- 5) FRENCH, D., and G. M. WILD, 1952 : *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 2642
- 6) 麻生清・山内文男, 1955 : 醸酵工, **33**, 194