

ヨウ素デンプン反応の安定性

小山 彰*

この研究は、分光学的な方法を用いて、ヨウ素デンプン反応の基本的なしくみを調べ、温度やPH又は塩濃度変化による呈色の安定性について検討を加えたものである。その結果、この反応は可逆反応であり、溶媒条件によってアミロースの高次構造やアミロース・ヨウ素複合体中の I_3^- が変化して、呈色が消失したり、安定化したりするという知見を得た。このしくみを考察し、さらに、ヨウ素デンプン反応を用いる際の留意点を明確にした。

1. はじめに

ヨウ素デンプン反応は、デンプンとヨウ素によって美しい青色又は紫色を呈する現象である。この反応は、19世紀の初めに発見され、小・中学校でも光合成デンプンの検出やデンプンの糖化、微生物によるデンプンの分解を調べる場面等で広く用いられている。また、きわめて鋭敏な呈色反応の一つで、微量のヨウ素またはデンプンの検出に分析化学の方面でも活用されている。

ヨウ素デンプン反応の機構は、デンプン中のアミロースがヨウ素と複合体を形成するものと考えられ、1943年 Rundle¹⁾らの研究によって図1に示す複合体の模式図が提案された。しかし、まだ不明な点が多く、最近では、田仲²⁾、酒井³⁾などの報告が続いている。

一方、この反応による呈色は温度やPHなどによって消失するが、教科書や実験書などに詳しい記述がほとんどなく、授業の際には実験条件について注意が払われていない。

筆者は、アルミロース・ヨウ素複合体は弱い結合で形成されており、温度やPH又は塩濃度等により容易に生成したり、分解したりするために呈色の変化が生じるのではないかと考えた。そこで、この研究は、電子スペクトルを用いて、ヨウ素デンプン反応における結合比や平衡定数を求めると共に、溶媒条件による呈色の変化と複合体の生成や分解の機構について検討を加えたものである。また、この結果に基づき、ヨウ素デンプン反応を用いる際の留意点を明らかにする。

2. ヨウ素デンプン反応

ヨウ素デンプン反応は、ヨウ素イオン (I^-)だけ、または、ヨウ素分子 (I_2)だけでは起こらず、この両者が共存するとき呈色を示す。従って、この反応を調べる際には、ヨウ素ヨウ化カリウム液 (I_2-KI 液)が用いられており、この液中では、 $I_2 + I^- \rightleftharpoons I_3^-$ なる化学平衡が成立している。この平衡定数は、常温において約800であり²⁾、右に片

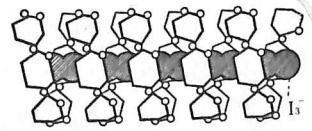


図1 デンプン・ヨウ素複合体模式図¹⁾

* 理科長期研修員 (頸北・頸城・中部地区理科教育センター、柿崎町立柿崎小学校)

寄っている。従って、 I^- が大過剰の状態では、 I_2 はほとんど三ヨウ化物イオン(I_3^-)の形態で存在する一方、デンプン分子は、ブドウ糖残基6個で一巻きするら旋構造をつくとされ、このら旋構造中の空洞に I_3^- が入り込み複合体が形成されるために、ヨウ素デンプン反応の呈色が生ずると言われている¹⁾(図1)。また、またこの呈色は、ブドウ糖残基数に関係していて、6以下では無色、8~12では短い複合体ができ赤、15~30では紫、30以上では長い複合体ができ青となることが知られている。

3. ヨウ素デンプン反応の基本的なしくみ

(1) ねらいと方法

水溶液中でのヨウ素デンプン反応の基本的なしくみを明らかにするために、分子量既知のアミロースA(平均分子量2900・半井化学)、アミロースB(平均分子量16000・半井化学)、溶性デンプンそれぞれに対して、 I_2 -KI液(I_2 : 5×10^{-5} mol/l, I^- : 1×10^{-2} mol/l)を反応させ、これらの電子スペクトルから吸光特性を解析する。電子スペクトルの測定は、ダブルビーム分光光度計(日立200-10形)を用いる。次に連続変化法により、アミロースとヨウ素の結合比を求め、複合体の組成を明らかにする。さらに、アミロース濃度を変化させた際のヨウ素アミロース反応液の電子スペクトル図から、平衡定数を求め、ヨウ素デンプン反応の可逆性について考察する。

(2) 結果と考察

(a) ヨウ素デンプン反応の電子スペクトル

デンプン液だけでは、全く吸収がない(図2 a)。 I_2 -KI液は、600~800nmに吸収がなく、290nm付近と350nm付近に二つの強い吸収ピークがある(図2 b)。これらは I_3^- の特性吸収を表わしている。ヨウ素デンプン呈色液は、550~600nmにピークをもつ幅の広い吸収帯があり、一方、 I_3^- の特性吸収は減少している。(図2 c, d, e)これらの結果から、幅の広い吸収帯は、生成したアミロース・ヨウ素複合体によるものと言える。

同量の溶性デンプン、アミロースA、アミロースBに対して、各複合体の吸光度や吸収ピーク的位置、さらに I_3^- の吸光度が異なっている(図2c, d, e)。この原因は、

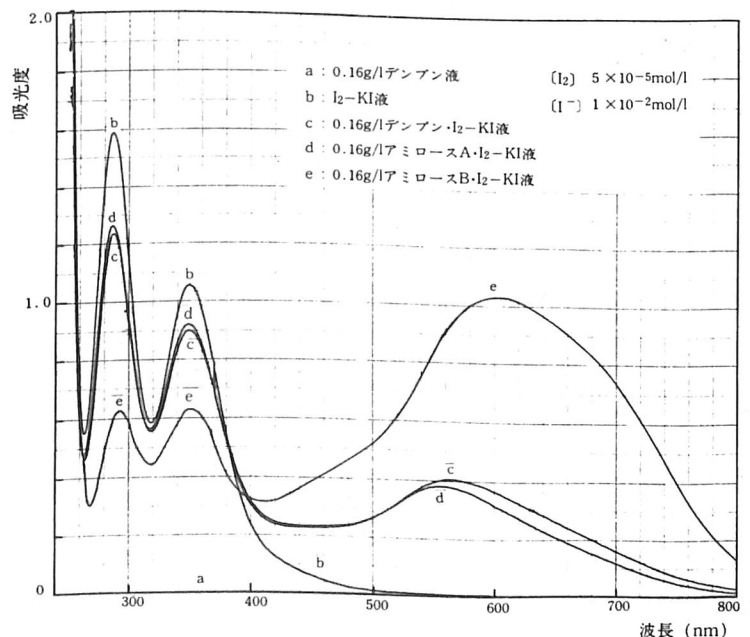


図2 ヨウ素デンプン反応の電子スペクトル

複合体を形成するアミロース分子中のブドウ糖残基数が、アミロースAでは16個、アミロースBでは約90個と異なっており、らせん構造に取り込まれる I_3^- の数にも違いが生ずるためと考えられる。また、溶性デンプンは、分子量不明であるが、複合体の吸光度やピークの位置がアミロースAの場合にはほぼ等しいことから (図2c)、ブドウ糖残基数は16に近いものと推定される。

(b) デンプン濃度の検討

図3によれば、デンプン濃度 0.2 g/l 以上では、濃度と複合体吸光度の間に直線関係が成立しない。この現象は、デンプンの分子会合や糊化の影響によるものと思われる。従って、吸光度から複合体の量を測定する場合には、両者が比例関係にある $0 \sim 0.2 \text{ g/l}$ の範囲を適正濃度と定める。なお、肉眼で 0.04 g/l まで呈色が確認でき、ヨウ素デンプン反応は、かなり鋭敏な反応とすることができる。

(c) 連続変化法による結合比の決定

上記濃度範囲内で、連続変化法を用いて複合体の吸光度を測定した (図4)。吸光度がピークを示す当量点での濃度は、アミロースA $3.45 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ 、 I_3^- $7.50 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ であった。従って、両者の結合比 (モル比) は、

$$\text{アミロースA分子} : I_3^- \doteq 1 : 2$$

である。この結果は、16個のブドウ糖残基がつくるアミロースAのらせん構造の中に2個の I_3^- が入り込んで複合体が形成されることを示している。この結合比は、田仲らがおこなった、複合体の元素分析の結果とも一致する。

(d) アミロース・ヨウ素複合体の化学平衡

結合比から、複合体生成反応式は次のように表わせる。
 アミロースA + $2 I_3^- \rightleftharpoons$ アミロースA (I_3^-)₂ — ①
 ①式から、平衡定数 K を求める式は下記ようになる。

$$K = \frac{[A (I_3^-)_2]}{[A] [I_3^-]^2}$$

また、図5は、 K の値を求めるために測定したヨウ素アミロースA反応液の電子スペクトルである。アミロースAの濃度が高まるにつれて、複合体の吸収が増加し、反対に I_3^- の特性吸収が減少しており、さらに、 390 nm 付近に等吸収点があることから、実験的にも化学平衡が成立していると言える。

図5を用いて、 25°C の各濃度での平衡定数 K を求めると、

$$\begin{aligned} \text{b} : K &= 8.15 \times 10^7 & \text{c} : K &= 8.56 \times 10^7 \\ \text{d} : K &= 8.67 \times 10^7 & \text{e} : K &= 8.49 \times 10^7 \end{aligned}$$

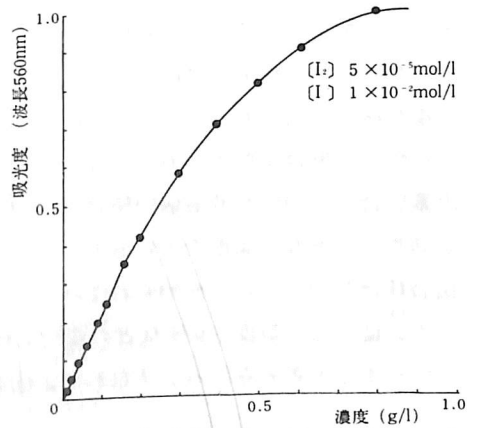


図3 デンプン濃度による吸光度変化

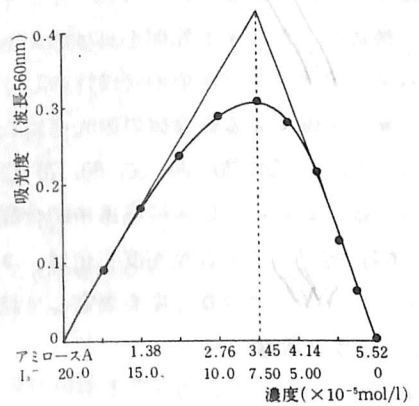


図4 アミロースAと I_3^- の当量点

となり、平均値として、 $K = 8.46 \times 10^7$ の値が得られる。

つぎに、この平衡定数から複合体生成反応の自由エネルギー変化 ΔG を求めた。

$$\Delta G = -RT \ln K$$

$$= -10.9 \text{ kcal/mol (25}^\circ\text{C)}$$

この値は、田仲らが求めた $-11.9 \pm 2^2)$ とほぼ一致する。

平衡定数がたいへん大きい値であることから、アミロースAは、 I_3^- が大過剰の状態ではほぼ完全に複合体に変化していると言える。

しかし、複合体形成においては、水素結合などのいわゆる弱い結合が関与しており、温度を上げると複合体がこわれることが知られている⁵⁾。従って、温度やpHなどの変化に伴い、 ΔG の符号が正負に逆転したり、 K の値そのものも大きく変化すると考えられる。すなわち、①の平衡は、簡単に生成又は分解の方向に移動すると推察される。

4. ヨウ素デンプン反応の可逆性

(1) ねらいと方法

前節では、ヨウ素デンプン反応の基本的なしくみを明らかにするとともに、アミロース・ヨウ素複合体が不安定であることを考察した。そこで、温度やpHなどを変化させて、複合体の呈色が消失したり、鋭敏になったりする範囲を具体的に調べることにする。さらに、この結果に基づき、平衡移動の観点からヨウ素デンプン反応の可逆性のしくみを検討する。

熱可逆性による複合体の吸光度変化は、デンプン濃度 0.16 g/l のヨウ素デンプン反応液を用い、一方は、5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 $^\circ\text{C}$ の各恒温槽に20分間入れてから、他方は70 $^\circ\text{C}$ の恒温槽に20分間入れた後、さらに上記各恒温槽に20分間放置してから、吸光度を測定して調べる。

pH 可逆性による吸光度変化は、ヨウ素デンプン反応液のpHを塩酸又は水酸化ナトリウムで変化させて、10分間放置後吸光度を測定して調べる。pH測定には、pHメーター(日立一堀場F5)を用いる。

(2) 結果と考察

(a) 熱可逆性のしくみ

図6より、複合体の吸光度は、温度上昇に伴って減少し、55 $^\circ\text{C}$ で完全に0になる。また、図7中eの70 $^\circ\text{C}$ のヨウ素デンプン反応液の電子スペクトルによると、複合体の吸収は完全に消失しているが、 I_3^- の

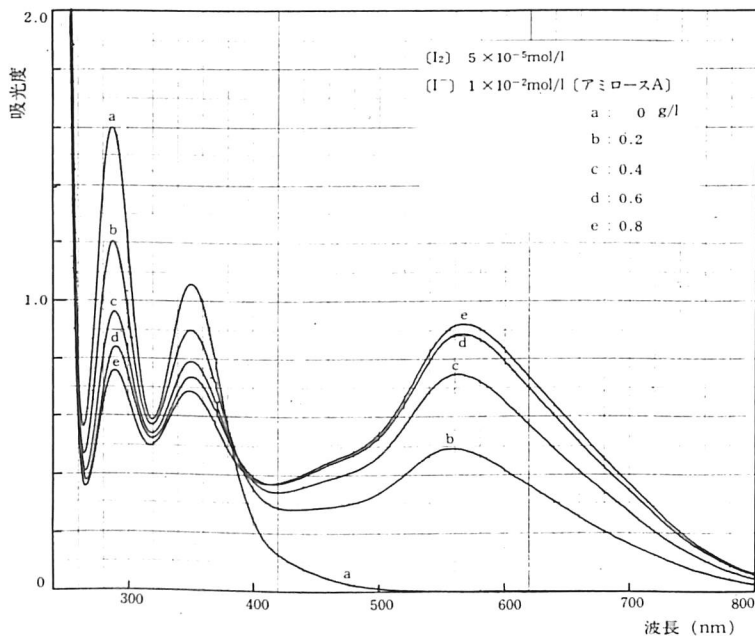


図5 ヨウ素アミロースA反応液の電子スペクトル

吸収は残っている。この現象は、高温状態の反応液中では熱運動によって複合体がこわれ、 I_3^- が溶媒中に出てくるとを示している。

一方、70°Cから冷却すると、約45°Cから再び呈色が現われ、吸光度は温度降下に伴って増加する(図6)。従って冷却するとアミロースは再びらせん構造をつくり、 I_3^- を取り込んで複合体を形成して発色してくるものと考えられる。なお、高温でのアミロースのらせん構造変化については、5で検討する。

図6において、複合体の吸光度は完全には回復していない。この現象は、 I_2-KI 液は単独でも温度上昇によって吸光度が減少していること(図7c,d) やその減少割合が、複合体の場合(図7 a,b)とほぼ一致していることから、ヨウ素の一部が昇華して反応系から失われたことを示している。

以上の結果から、温度変化によって複合体の生成や分解が起こり、熱可逆性が成立していると言える。

また、温度を下げると複合体の吸光度が増加することは、①の平衡が右に片寄ることを示しており、ヨウ素デンプン反応は、発熱反応であると言える。従って、低温では、複合体の生成がより安定化して、低分子のアミロースも複合体を形成することが可能になったものと考えられる。

(b) pH可逆性のしくみ

図8によれば、pH 9 以上では、複合体の吸光度は減少し、pH 11 付近で完全に0になる。この状態の液に塩酸を加え、pHを酸性側

にもどしていくと、再び吸収が現われてくる。この結果から、pH可逆性が成立していると言える。

また、 I_2-KI 液の吸収も複合体の変化とよく似たpH可逆性を示している。しかし、熱可逆性の場合とは異なり、pH 11以上では I_3^- 自身の吸収も消失しているのが特徴である。この現象は、複合体中にある

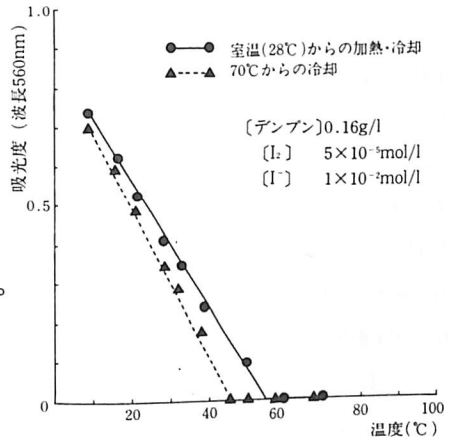


図6 温度による複合体の吸光度変化

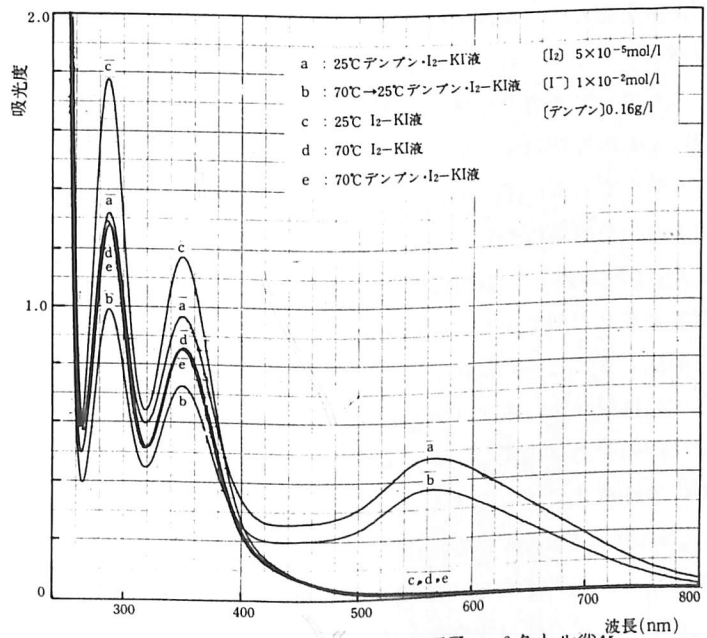
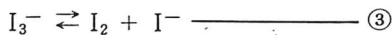
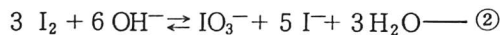


図7 温度による複合体の電子スペクトル変化

た I_3^- が, OH^- と反応して, IO_3^- の形では存在し得ないことを示している。

そこで, ヨウ素と水酸化物イオンの反応について検討した。なお, この反応に関しては, 次の②式が知られている。⁶⁾ 一方, ヨウ素デンプン反応に関係する反応式は, 次の③, ④のとおりである。



アミロース A (I_3^-)₂



ヨウ素デンプン反応液にアルカリを加え

ると, ②, ③, ④の平衡式がそれぞれ右方向に進行して, 最終的には複合体の分解が起こり, 呈色が消失するものと考えられる。アルカリ域でのヨウ素デンプン液中で②の反応が生じていることは, バリウムイオン (Ba^{2+}) によって特有の難溶性沈殿 ($Ba(IO_3)_2$) が生ずることで確認できた。また, ②式の右辺から出発して, 塩酸で酸性液とし, デンプン液を加えると, 通常のヨウ素デンプン反応液と等しい吸収パターンが得られた。以上の結果から, ②③④の一連の反応は, 確かに可逆的に進行すると言える。

ところで, アルカリ処理した後, pHをもどしても複合体や I_3^- の吸光度は, 完全には回復していない (図8)。この原因は, 反応系に②の平衡が新たに加わり, ヨウ素の一部が依然として IO_3^- の状態で存在するからである。 IO_3^- の存在は, アルカリ処理した I_2 -KI液を酸性にもどして Ba^{2+} を加えると, 予想どおり白色難溶性沈殿が生じたことで確認できた。

また, pH 4 以下では複合体中の吸光度が増加し, 色調も赤味を増してくる。この現象は, (a)で述べた低温での変化と似ており, ④の反応が複合体生成の方向に進行し, さらに, 低分子のアミロースも複合体を形成することが可能になったためと思われる。

以上の結果から, 高アルカリ域では複合体の I_3^- が OH^- によって IO_3^- に変化するため, ヨウ素デンプン反応の呈色は消失し, 逆に酸性にもどすと I_3^- ができ複合体が形成されて呈色してくると言える。なお, pH変化に伴ってアミロース分子の高次構造も変化すると思われるが, このことは 5 で検討する。

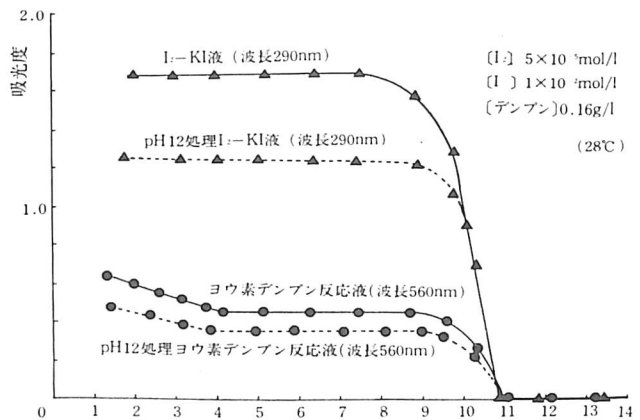


図8 pHによる複合体及び I_3^- の吸光度変化

(c) 塩濃度による複合体の安定化
前項から, 水素イオン (H^+) により複合体は安定化することが示された。そこで, H^+ を金属イオンに代えても, 複合体は安定化するのではないかと考え, ヨウ素デンプン反応液に無機塩を加えてみた。図9によれば, ヨウ素デンプン反応の生じている液に $NaCl$ 液を加えていくと, 複合体の吸光度は増加する。また, 表1のように, 種々の無機塩によっても, 複合体の吸光度は, 20%~80%増加し, さらに色調も赤味をおびてくる。ヨウ素デンプン反応液に $1mol/l$ の $NaCl$ を加えると, 通常の状態では $55^\circ C$ であった呈色の消失温度が, 約 $80^\circ C$ にまで上昇している。これらの結果は, 無機塩を加えることによって, アミロース分子のつくるら旋構造が一層安定化して, さらに, 低分子のアミロースも複合体を形成するこ

とが可能になったことを示唆している。

5. 温度, pH, 無機塩によるアミロースの高次構造変化

(1) ねらいと方法

これまでは、平衡移動の観点で I_3^- の変化に着目して、ヨウ素デンプン反応の安定性の原因を考察してきた。一方、複合体の形成には、アミロースの高分子鎖がどのような形態で存在するかという高次構造も関与していると思われる。ところで、高分子の高次構造変化を追跡する方法の一つとして、旋光度の測定⁷⁾がある。一般に光学活性をもつ高分子の場合、高次構造が変われば、旋光度も変化するとされている⁸⁾。

アミロース・ヨウ素複合体は、強い呈色のためナトリウムD線による旋光度の測定は不可能である。そこで、0.6g/100 ml のアミロースA液の温度や溶媒条件を変化させたときの旋光度を測定し、高次構造変化を検討する。旋光度は、偏光計(アタゴポラックス)を用いて測定する。比旋光度 α_D は、3回の測定値を平均して求める。

(2) 結果と考察

表2より、アミロースは、16個のブドウ糖分子が縮合し、さらに、高次構造を形成するために同濃度のブドウ糖単量体よりはるかに高い α_D を示してと考えられる。

また、温度や pH を高めたときの α_D が共に減少していることから、アミロースAの高次構造がこわれているのではないかと推察される。従って、高温の場合は、 I_3^- が存在するにもかかわらず、アミロースの高次構造が変化するために、複合体が形成されないのであろう。また、アルカリ域では、 I_3^- が OH^- によって IO_3^- に変化すると共に、アミロースそのものも高次構造がこわれて、複合体の形成が不可能になると考えられる。

一方、NaClを加えた場合には、 α_D が上昇して高次構造はより安定化するものと思われる。従って、複合体も安定化し、呈色の消失温度が上昇したり、低分子のアミロースが複合体を形成したりする現象が、生じてくるものと推定される。

6. ヨウ素デンプン反応利用上の留意点

(1) この反応の呈色は、温度上昇に伴って不安定になり、約60

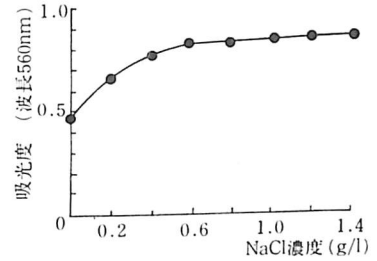


図9 NaCl 濃度による複合体の吸光度変化

表1 無機塩添加による複合体の吸光度増加割合

塩の種類 1 mol/l	吸光度増加割合
Na ₂ SO ₄	1.86
KCl	1.65
NaCl	1.63
BaCl ₂	1.60
Ba(NO ₃) ₂	1.56
MgSO ₄	1.53
NaNO ₃	1.51
CaCl ₂	1.51
MgCl ₂	1.34
Mg(NO ₃) ₂	1.24

表2 溶媒条件変化によるアミロースA比旋光度

溶媒条件	比旋光度(α_D)
20°C ブドウ糖	+51.5
20°C アミロースA	+175
60°C アミロースA	+154
pH12 アミロースA	+154
1mol/l NaCl "	+185

℃で消失する。逆に、低温ほど呈色は鋭敏となり、液温を20℃から10℃に低下させた場合、複合体の吸光度は、約50%も増加する。従って、この反応の呈色を見る際には、十分冷却することが大切である。

(2) 加温状態でこの反応を用いる際には、少量の無機塩を加えると、約80℃までは呈色が十分調べられる。

(3) アルカリ域では呈色が不安定で、pH11以上では消失する。従って、酵素作用のpH範囲を調べる際には、酵素は、アルカリ域では働かないとは言い切れない場合があるので注意を要する。

(4) 表3に示したように、この反応の呈色はデンプン材料によっても異なる。この原因は、それぞれの材料によって、デンプン成分をなすアミロースと分子鎖が短い赤色を呈するアミロペクチンとの含有率が違うためである。従ってテスト等で、ヨウ素デンプン反応の色は、「紫色」が正答で「青色」は誤答と一方的に決めてはならない。

(5) 葉の光合成デンプンを「すりつぶし法」によって調べる場合(小・4年)、呈色が数秒で消失することがある。そのしくみは不明だが、酸を加えてpH4以下にすると安定した呈色が観察できる。

(6) 熱可逆性を利用して、対流現象と温度変化が同時に観察できる実験方法を開発した⁹⁾。「冷却時の対流」や「熱源より下層部では対流がほとんど生じないこと」が、視覚的にとらえられて、効果的である。

7. おわりに

ヨウ素デンプン反応の呈色は、高温や高pH域では消失し、低温や低pH域又は無機塩添加の条件下では鋭敏になる。この原因は、複合体が弱い結合で形成されており、溶媒条件によって、この反応の平衡が容易に複合体の生成又は分解の方向に移動するためであることがわかった。また、 I_3^- の変化やアミロースの高次構造変化も関与していることが裏づけられた。従って、この反応を用いる際には、溶媒条件を検討し、顕著な呈色を示す状態で実験することが大切である。

今後は、溶媒条件による複合体の高次構造変化を多様な方法で調べたり、複合体の構造模型を検討したりすることによって、ヨウ素デンプン反応の安定性のしくみをさらに解明していく必要がある。

参考文献

- 1) Rundle.R. E, Foster. J. F and R. R. Baldwin : On the Nature of the Starch-Iodine Complex, J. Am. Chem. Soc., 66, 2116~2120 (1944)
- 2) 田仲二郎: ヨウ素-デンプン反応の色, 化学教育, 28, 257~263 (1980)
- 3) 酒井 宏: デンプン-ヨウ素複合体の構造と電子状態, 化学と工業, 34(9), 708~709 (1981)
- 4) 長島利三・富田功: 分析化学, 231~233, 裳華房 (1969)
- 5) 竹本喜一: 包接化合物の化学, 66~83, 東京化学同人 (1969)
- 6) 千谷利三: 無機化学, 下巻, 1144, 産業図書 (1963)
- 7) 山本大二郎: 化学実験事典, 562, 講談社 (1968)
- 8) 近藤 保: 現代コロイド科学, 130~146, 三共出版 (1980)
- 9) 小山 彰: ヨウ素デンプン反応の熱可逆性を利用した対流現象の視覚化, 新潟県立教育センター理科長期研修報告 8~9 (1982)

表3 デンプン材料と複合体の色調

デンプン材料	吸収ピーク(nm)	色 調
ジャガイモ	620	青
小麦	610	青
うるち米	580	紫
もち米	530	赤
溶性デンプン	560	紫
アミロースA	550	紫
アミロースB	660	青