electrical data acquisition, estimation of sensitivities, correction and calculation of the percentages of the elements are automatically carried out.

The computer configuration used in this system is 4K words of 16-bit length with a 8-bit analog-to-digital converter and output to a teletypewriter.

The C. H. N. analyzer employed is not modified at all to connect with the computer. The electrical signal is brought into the A-D converter through an amplifier from the output of the C. H. N. analyzer to the recorder. In order to eliminate the effect of electrical noise, a lot of points for one peak are sampled and averaged.

The C. H. N. analyzer adopted in this system is designed for two types of measurements, that is a high speed analysis, 7.5 min per one sample and a low speed precise analysis, 15 min per one sample. The data processing program is made to be suitable for both types of measurements. In the case when the computer is on-lined with another instrument and not available for the C. H. N. analyzer, the program is made to be possible to get the result by off-line

calculation.

The off-line calculation needs to measure the lengths of the bargrams on strip chart recorder and to enter them from the teletypewriter into the computer.

In order to save the core memory, functions which give the same correction factors as the conventional tables for manual calculation are adopted instead of storing the tables.

Before the on-line measurement is started, the amplifier is adjusted and the weight of the samples, atmospheric pressure and other necessary parameters are entered from the teletypewriter. Data acquisition is initiated by pushing the start key and analysis is fully automatically processed up to 12 samples. Namely, as the bargrams for an unknown sample are detected the result of the data reduction is printed out on a teletypewriter in real time.

The result of on-line data reduction is compared with that of manual calculations and the standard deviations are both less than 0.5% and seem to be satisfactory.

(Received Apr. 20, 1971)

グルクロノラクトンおよびグルクロン酸の同時けい光定量と 強酸性陽イオン交換樹脂を触媒に用いたグルクロン酸からグ ルクロノラクトンへの転換

海東 常敏， 粕谷 浩次， 内田 文子*

(1971 年 4 月 27 日受理)

ヒドラジンおよびオキシ塩化ジルコニウムによるけい光分析を用いて、グルクロン酸とグルクロノラクトンとの同時分別定量を検討した。両者のけい光強度の差を利用し、操作法を変えた 1 法および 2 法で定量し、それぞれの検量線から、2 成分混合物の同時定量を行なった。さらにこの定量法を用いて、強酸性陽イオン交換樹脂を触媒とした、グルクロン酸からグルクロノラクトンへの転換を検討し、特に酢酸溶液中において、転換がかなり促進されることがわかり、量的解析を行なって、樹脂による効果を明らかにした。

1 緒 言

グルクロノラクトン（以下 GL と略記）およびグルクロン酸（以下 GA と略記）の分別定量法については、アルカリによる滴定法¹⁾、ヒドロキサム酸による比色法^{2)~6)}などが報告されているが、これらは特異性に欠けるうえに感度もよくない。そこでヒドラジンおよびオキ

シ塩化ジルコニウムを用いた総 GA のけい光定量法⁷⁾を詳細に検討して、GL および GA の分別定量を試みた。

一方、水溶液中における GA から GL への平衡移動に関しては、特に高温で顕著であると報告されており、GL の合成にも、高温処理が行なわれている。また Goebel ら⁸⁾は、両者の混合物を沸騰酢酸中で処理して、GL の生成を行なっている。著者らは分別定量法を用いて酢酸溶液中の平衡移動を調べるうちに、強酸性陽

* 大正製薬株式会社研究部：東京都豊島区高田 3 丁目

イオン交換樹脂を添加すると、室温でも GA から GL にかなり転換することが認められたので、酢酸-水 (9:1) と (2:1) の溶液を選んで、各温度における両者の消長を追跡した。また樹脂を添加しない場合も比較して、それぞれの速度定数からも検討したので、以下これらの実験について報告する。

2 試薬および装置

2.1 試薬

強酸性陽イオン交換樹脂: Dowex 50W-X4, Amberlite XE-100, Amberlyst 15 の 3 種類を常法どおり精製して、H 型にして風乾して用いた。

ヒドラジン溶液: 硫酸ヒドラジン 2 g と酢酸ナトリウム (3 結晶水) 16.5 g を水に溶かして 100 ml とする。

オキシ塩化ジルコニウム溶液: オキシ塩化ジルコニウム (8 結晶水) 6 g を水に溶かして 100 ml とする。

クエン酸緩衝溶液: pH 5 の Sørensen の第二クエン酸ナトリウム溶液を使用した。そしてこの緩衝溶液を GL の試料溶液中に 10% v/v 添加した。

酢酸: 試薬特級を使用した。

2.2 装置

日立 MPF-2A 型のけい光分光光度計を使用した。

3 実験および結果

3.1 定量操作法 1

GL および GA の混合物 1~80 μg を含む 10% v/v クエン酸緩衝溶液 1 ml を 20 ml のメスフラスコにとり、ヒドラジン溶液 1 ml を加え、70°C で 30 分間加温する。冷後酢酸 15 ml, オキシ塩化ジルコニウム溶液 1 ml を加え、ふたたび 70°C で 60 分間加温し、冷後水を加えて全量を 20 ml にし、励起波長 382 $\text{m}\mu$, けい光波長 457 $\text{m}\mu$ でけい光強度を測定する。

3.2 定量操作法 2

ヒドラジン溶液 1 ml および酢酸 15 ml を 20 ml のメスフラスコにとり、定量操作法 1 の試料溶液 1 ml, 続いてオキシ塩化ジルコニウム溶液 1 ml を加え、70°C で 60 分間加温し、冷後水を加えて全量を 20 ml にし、定量操作法 1 と同一波長でけい光強度を測定する。

3.3 樹脂を用いた実験方法

よく粉碎した GA 約 120 mg をあらかじめ各温度に加温した酢酸-水 (9:1) および (2:1) の溶液 100 ml 中にできるだけすみやかに溶かす ($6.2 \times 10^{-3} \text{M}$)。低温で溶けにくい場合には、さきに水を加えて溶かしておいてから上記の比率になるよう酢酸を加える。これに樹脂

5 g をすばやく加えて、かき混ぜて反応を開始する。一定時間ごとに試料を取り、残存する GA および生成した GL を定量する。

3.4 ヒドラジン溶液と GL および GA との反応

すでに既報⁹⁾で記したように GL とヒドラジン溶液との反応は 70°C で 30 分間加熱して行なったが、今回さらに GA についても検討し、ヒドラジン溶液添加後の室温における放置時間と 70°C における加熱時間について比較した。その結果、Fig. 1 に示すように GL および GA の間ではかなり反応性に違いのあることが判明した。

GL の場合、室温で行なうと、加熱したときに比べてけい光強度は約 1/20 であって、放置時間 80 分までは変化は認められなかったが、それ以上になると徐々にけい光強度の増加が観察された。一方 GA を 70°C で 30 分間反応させたときの強度は GL に対し 1/2 であったが、室温で行なっても強いけい光を示し、しかもヒドラジン溶液を添加した直後から一定した強度が得られた。かつ、さらに酢酸を加えて室温で反応を行なうと、GL, GA とともにけい光強度はまったく安定となり数時間のちも変化は見られなかった。試薬の添加順序を逆にし、定量操作法 2 に記したように、加熱操作を省いて行ない、1 および 2 の操作を組み合わせて、2 成分系の分別定量を 3.5 に示すように行なった。

Fig. 1 Effect of standing period on the reaction of hydrazine solution and GL or GA

Test solution 1 ml, hydrazine solution 1 ml, (1) GA, 70°C, (2) GA 25°C, (4) GL 25°C; Test solution 1 ml, hydrazine solution 1 ml, acetic acid 15 ml, (3) GA 25°C, (5) GL 25°C; GL, GA: 2 $\mu\text{g/ml}$

3.5 GL および GA の分別定量

定量操作法 1 および 2 において、GL, GA はまったく同一の励起波長 (382 $\text{m}\mu$) とけい光波長 (457 $\text{m}\mu$) を示し、GL は最終濃度 4 $\mu\text{g/ml}$ まで、GA は 8 $\mu\text{g/ml}$

まで, それぞれの検量線は直線関係が得られた。

今, 硫酸キニーネの 0.1*N* 硫酸溶液を基準として, その 0.5 $\mu\text{g/ml}$ のけい光強度を 100 とし, GL および GA の純物質の相対けい光強度から, それぞれのけい光係数を求め, 1 法 のときを $f_{\text{GLI}}, f_{\text{GAI}}$, 2 法 のときを $f_{\text{GLII}}, f_{\text{GAII}}$ とし, また 両者の 混合溶液 のけい光強度が, 1 法 で E_1 , 2 法 で E_2 が得られたとすると, 次の式によって GL の濃度 [GL] および GA の濃度 [GA] を計算することができる。

$$[\text{GL}] = \frac{E_1 f_{\text{GAII}} - E_2 f_{\text{GAI}}}{f_{\text{GLI}} f_{\text{GAII}} - f_{\text{GLII}} f_{\text{GAI}}} \quad \dots\dots\dots (1)$$

$$[\text{GA}] = \frac{E_2 f_{\text{GLI}} - E_1 f_{\text{GLII}}}{f_{\text{GLI}} f_{\text{GAII}} - f_{\text{GLII}} f_{\text{GAI}}} \quad \dots\dots\dots (2)$$

一方, 本実験に 適した 条件下において, GL および GA とも最終濃度が 0.2~4 $\mu\text{g/ml}$ の間で, 最小自乗法によって求めた各検量線の方程式は 1 法, 2 法で求めた [GL] のけい光強度を e_1, e_2 とし, [GA] のけい光強度を e_1', e_2' とすると, 式 (3)~(6) で示される。

$$[\text{GL}] = 1.96 \times 10^{-2} e_1 + 0.028 \quad \dots\dots\dots (3)$$

$$[\text{GL}] = 3.92 \times 10^{-1} e_2 - 0.026 \quad \dots\dots\dots (4)$$

$$[\text{GA}] = 5.47 \times 10^{-2} e_1' - 0.045 \quad \dots\dots\dots (5)$$

$$[\text{GA}] = 7.40 \times 10^{-2} e_2' - 0.025 \quad \dots\dots\dots (6)$$

次に本定量法によって, GL および GA の混合試料について定量した結果を Table I に示す。

3.6 樹脂触媒による GA から GL への転換

3.3 の方法に従って Dowex 50W-X4, Amberlite XE-100, Amberlyst 15 の 3 種類の樹脂を用い, 酢酸-水

Table I Recovery of the known mixtures of GL and GA

No.	GL		GA	
	Expected (mg)	Found (mg)	Expected (mg)	Found (mg)
1	60.5	60.2	16.5	16.3
2	18.5	18.3	60.4	60.0
3	25.3	24.9	40.2	39.9
4	16.6	16.9	50.1	50.4
5	30.5	30.0	31.4	31.9

(9:1) および (2:1) の溶液中で 25°C でかき混ぜて, 一定時間ごとに定量して得た GL の生成量をプロットして Fig. 2 の結果を得た。酢酸-水 (9:1) 溶液では樹脂による転換効果は大きく, また樹脂間の差もほとんど見

Fig. 2 Plots of the formation of GL vs. the reaction time at 25°C

—●— Dowex 50W-X4, —○— Amberlite XE-100, —○— Amberlyst 15; (1), (2), (3): In $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{H}_2\text{O}$ (9:1) medium; (4), (5), (6): In $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{H}_2\text{O}$ (2:1) medium

Table II Transformation of GA to GL in the $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{H}_2\text{O}$ (9:1) medium using Dowex 50W-X4 at various temperatures

Time (min)	80°C		60°C		40°C		25°C		20°C	
	GA (%)	GL (%)	GA (%)	GL (%)	GA (%)	GL (%)	GA (%)	GL (%)	GA (%)	GL (%)
5	35.0	64.3	61.0	35.0	87.0	12.5				
10	14.4	84.8	42.0	56.9	73.9	24.5	89.0	12.0	94.0	6.7
15	8.9	91.7	29.6	71.2	64.9	36.0	83.1	16.5		
20	5.5	94.9	22.0	79.3	54.0	46.5	78.0	22.4	88.0	13.0
30			12.0	88.5	37.7	62.6	67.0	31.8	83.0	19.1
40			10.2	90.7	29.2	71.8	60.0	40.5	76.5	24.2
50					22.0	77.7	53.2	46.0	69.2	30.3
60					17.5	82.8	46.0	53.5	65.0	35.2
90					9.5	90.8	33.7	66.5	51.0	48.0
120					7.8	93.0	22.8	76.8	43.5	56.5
180							11.0	88.1	29.5	69.5
E	5.5	94.9	5.2	94.4	5.3	95.0	6.0	95.0	6.1	94.5

Initial concentration of GA: 6.2×10^{-3} M; E: The percent of GA or GL when the reaction reached to equilibrium

られなかったが、(2:1) 溶液では、転換量は減少し、特に非水溶媒系の Amberlyst 15 を用いたときには、他の樹脂に比べて GL の生成量は約 1/2 であった。そこで、樹脂による触媒作用が強く現われた酢酸-水 (9:1) 溶液を用いて、また樹脂には Dowex 50W-X4 を選んで、温度条件の変化に対する GA から GL への平衡移動を検討し、Table II の結果を得た。

Fig. 3 First order plots for the reaction between GA and GL in the $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{H}_2\text{O}$ (9:1) medium

A: Treatment with using Dowex 50W-X4; B: Treatment without using resin; x_e : Concentration of GL when reached to equilibrium; x : Concentration of GL in arbitrary reaction time

さらに樹脂の効果を明らかにするため、Dowex 50W-X4 を添加しない場合についても同様に処理し、酢酸-水溶液中の反応を、一次可逆反応として、正逆両反応の速度定数 k_1 および k_{-1} を求めて比較した。すなわち反応開始時の GA の量を a 、各時間における GL の生成量を x 、また平衡時の GL の量を x_e とし、各時間に対して $\log\{x_e/(x_e-x)\}$ をプロットして Fig. 3 のように直線関係が得られたことから、積分式 $k_1 = x_e/at \{\ln x_e/(x_e-x)\}$ より求めた k_1 および可逆反応における $K = k_1/k_{-1} = x_e/a - x_e$ の関係から求めた K と k_{-1} とを Table III に示した。

速度定数 k_1 から、樹脂を用いた触媒効果は、用いない場合と比べて 10~40 倍と大きく、特に低温において強く現われた。一方平衡に達したときの GL および GA の比は、酢酸溶液に含まれる水の量が少ないとき、たとえば酢酸-水 (9:1) の場合では、温度に依存せずに、ほぼ一定になることがわかり、そのときの GL の含量は約 94~95% であった。酢酸中の水の量がふえると、水溶液中の平衡に関する多くの報告¹⁾²⁾⁴⁾に見られるように、高温ほど GL の量は大きくなる温度依存性が現われた。いずれの場合も、酢酸-水の比率が同じであれば、樹脂を用いたときと、用いないときにおける平衡時に生

Fig. 4 Arrhenius type plots of each rate constants (k_1 , k_{-1}) in $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{H}_2\text{O}$ medium

$\text{CH}_3\text{COOH}-\text{H}_2\text{O}$ (9:1) medium—(1) k_1 , (5) k_{-1} : when used Dowex 50W-X4; (2) k_1 , (6) k_{-1} : when unused Dowex 50W-X4; $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{H}_2\text{O}$ (2:1) medium—(3) k_1 , (7) k_{-1} : when used Dowex 50W-X4; (4) k_1 , (8) k_{-1} : when unused Dowex 50W-X4

Table III First order rate constants k_1 and k_{-1} , and equilibrium constants K

Temperature (°C)	CH ₃ COOH-H ₂ O (9:1)						CH ₃ COOH-H ₂ O (2:1)					
	A			B			A			B		
	K	$k_1 \times 10^{-3}$ (min ⁻¹)	$k_{-1} \times 10^{-3}$ (min ⁻¹)	K	$k_1 \times 10^{-3}$ (min ⁻¹)	$k_{-1} \times 10^{-3}$ (min ⁻¹)	K	$k_1 \times 10^{-3}$ (min ⁻¹)	$k_{-1} \times 10^{-3}$ (min ⁻¹)	K	$k_1 \times 10^{-3}$ (min ⁻¹)	$k_{-1} \times 10^{-3}$ (min ⁻¹)
20	15.5	8.3	0.5	16.4	0.1	0.01	2.7	2.5	0.9			
25	15.8	13.1	0.8				3.1	3.7	1.2			
40	17.9	32.3	1.8	17.5	1.1	0.06	3.6	10.7	3.1	2.5	0.5	0.2
60	18.2	87.0	5.3	18.2	6.0	0.3	5.0	38.0	7.5	4.0	3.0	0.8
80	17.3	214.3	12.4	17.5	28.5	1.6	6.2	112.0	18.1	6.1	12.5	2.1
100				19.0	87.5	4.6				9.0	42.1	4.7

GA $\xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1}$ GL; A: Treatments with using Dowex 50W-X4; B: Treatments without using resin

Table IV Data of activation energies (E) and frequency factors (A) obtained from the slopes of Arrhenius plots in Fig. 4

	E (kcal/mol)		A (min ⁻¹)	
	k_1	k_{-1}	k_1	k_{-1}
CH ₃ COOH-H ₂ O (9:1)+Dowex 50W-X4	10.5	10.9	5.7×10^5	9.7×10^4
CH ₃ COOH-H ₂ O (9:1)	15.3	16.4	8.1×10^7	3.5×10^7
CH ₃ COOH-H ₂ O (2:1)+Dowex 50W-X4	13.3	10.5	1.9×10^7	4.9×10^4
CH ₃ COOH-H ₂ O (2:1)	16.7	11.9	2.3×10^8	3.7×10^4

成している GL, GA の量は, ほぼ同一であった.

さらに Table III に示した速度定数から, 温度変化に対するアレーニウスのプロットを Fig. 4 に示した.

Fig. 4 のこの配から得られた活性化エネルギーとひん度因子は, Table IV のとおりである. 酢酸-水 (9:1) 溶液中で樹脂を使用したときの k_1 および k_{-1} の活性化エネルギーは, ほぼ同程度であった.

4 結 語

本定量法による GL および GA の分別定量は, 特異性が高く, 他の共存する物質の影響を受けにくい利点をもっているため, 種々の医薬品および混合試料の定量にも応用することができる. 酢酸-水溶液中, 樹脂を加えて GL および GA の平衡移動の消長を定量した結果, GL の生成促進には強酸性陽イオン交換樹脂 (H型) のみが触媒効果を有し, 他のタイプの樹脂にはその作用は見いだせなかった. 実際に, 樹脂を用いて酢酸-水 (9:1) 溶液中で, 室温で5時間反応させた液から, 結晶 GL を収率 60~75% で回収できた.

おわりに, 有益なご助言を賜った昭和大学薬学部辻章夫教授に感謝します. また本研究発表の機会を与えられた上原昭二副社長, 終始ご激励をいただいた井川俊一常務取締役, 田中一郎研究部長に感謝します.

(1970年7月, 第90年会日本薬学会大会において発表)

文 献

- 1) 今井祐次, 平坂義信: 薬誌, **80**, 1139 (1960).
- 2) 山名月中, 水上勇三, 旭 新一: 同上, **84**, 696 (1964).
- 3) F. Bergmann: *Anal. Chem.*, **24**, 1367 (1952).
- 4) 山名月中, 水上勇三, 市村藤雄: 薬誌, **83**, 1504 (1968).
- 5) 山名月中, 旭 新一, 青木治郎: 薬剤学, **22**, 60 (1962).
- 6) 海東常敏, 粕谷浩次, 井上俊広, 横田美弥子: 本誌, **20**, 1387 (1971).
- 7) W. Pauli, A. Linsker: *Kolloid Z.*, **73**, 273 (1939).
- 8) W. F. Goebel, H. Babers: *J. Biol. Chem.*, **100**, 573 (1939).

Simultaneous fluorometric determination of glucuronolactone and glucuronic acid, and transformation of glucuronic acid to glucuronolactone catalyzed by strongly acidic cation resin. Tsunetoshi KAITO, Koji KASUYA and Fumiko UCHIDA (Research Laboratory, Taisho Pharmaceutical Co., Ltd., Toshima-ku, Tokyo)

In the previous paper⁶⁾, a highly specific fluorometric determination of total glucuronic acid was established. In this paper, a newly developed assay which slightly converted previous procedure was given and combined with the former, and the determination of glucuronolactone (GL) and glucuronic acid (GA) was carried out by both procedures. Quinine sulfate as an external standard is employed and when the fluorescence intensity of the quinine sulfate of 0.5 μg/

ml in 0.1N H_2SO_4 is 100 value, the corresponding fluorescence coefficients of pure GL and GA are arbitrarily fixed. From these coefficients, the two compounds have been analyzed. Procedure 1 was described in the previous paper. Procedure 2 is as follows.

Transfer 1 ml of 2% hydrazine sulfate in 16.5% sodium acetate ($3\text{H}_2\text{O}$) and 15 ml of acetic acid into a 20 ml of volumetric flask. Add 1 ml of the same test solution using in procedure 1 containing 1 to 80 μg of the mixture of GL and GA and, 1 ml of 6% zirconyl chloride. Heat in a water bath at 70°C for one hour, cool to room temperature and then adjust the volume by water. Measure the fluorescence at 457 m μ by an excitation at 382 m μ .

Employing these procedures, transformation of GA to GL treated with strongly acidic cation resin as catalyst in the acetic acid solution was studied. When

the resin was added to GA in $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{H}_2\text{O}$ (9 : 1) medium with stirring, the formation of GL was about 95% in less than 5 hours at room temperature. On the contrary, the lack of the resin in the same condition made the reaction very slow and, took several days to reach the same value. Among resins of different types, the strongly acidic cation resin was only effective and led to increases the formation of GL. By comparison of the kinetic data for each point in arbitrary reaction time, and at various temperatures, the results proved that the resin was distinctly playing the catalytic activity as promoter through this reaction. The ratio of GA and GL when reached to equilibrium in acetic acid solution at various temperatures was constant if its water content was a small.

(Received Apr. 27, 1971)

沈殿滴定の終点指示に pH メーターの利用

——ハロゲン化物イオン・ヨウ素酸イオン・クロム酸イオン・

リン酸水素イオンの硝酸銀または硝酸バリウム溶液による滴定——

発 田 裏*

(1971 年 5 月 7 日受理)

溶液中にアセトンを加え、ハロゲン化物イオン、ヨウ素酸イオン、クロム酸イオン、リン酸水素イオンの沈殿滴定を行なうと、当量点近くで溶液の pH 計指示値 (ガラス電極電位) が急変することがわかったので、pH メーター (ガラス電極) を終点指示に利用できる。適当な混合比 (アセトン/溶液, %) は銀滴定の場合 Cl^- : 80~95, Br^- : 70~90, I^- , IO_3^- : 50~90, CrO_4^{2-} : 20~70 であり、限界濃度は $2 \times 10^{-3}M$ 程度である。終点における pH 計指示値の急変は電極の非水素イオンに対する見かけの pH 応答によって説明される。特に鉛イオンに対する pH 応答が著しいので、滴定液として硝酸銀-硝酸鉛混合液を用いると、見かけの pH 応答が一段と大きくなることも確かめた。

ガラス電極を指示電極として滴定曲線から終点を決定する本法は、銀電極による従来の電位差滴定法に比べ電極の事前洗浄操作などいっさい不要であり、適用可能な試料イオンの範囲も広く、また銀滴定のみならずバリウム塩、鉛塩溶液を滴定液とするときにも用いられるなど数々の特色を有することが認められた。

1 緒 言

著者はさきに、市販のガラス電極を指示電極として硫酸塩溶液を硝酸バリウム-硝酸鉛混合標準溶液で滴定するとき、試料溶液中にあらかじめアセトンの適当量を混

合しておく、当量点近くで溶液の pH 計指示値 (見かけの pH 値, ガラス電極電位) が著しく変化すること、これによって終点指示のできることを報告した¹⁾。

その後ハロゲン化物イオン、ヨウ素酸イオン、クロム酸イオン、リン酸水素イオンの各溶液を硝酸銀標準溶液あるいは硝酸バリウム標準溶液で滴定するとき、アセト

* 富山工業高等専門学校：富山市本郷町