(昭和34年11月10日受理)

グルキユロン酸およびガラクチュロン酸の微量分析^(注)

国策パルプ工業株式会社 戸 田 久 昭
中 央 研 究 所

MICROANALYSIS OF GLUCURONIC ACID AND GALACTURONIC ACID

By Hisaaki Toda

(The Research Laboratory of the Kokusaku Pulp Industry
Co. Ltd., Kami-Ochiai, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan)

Qualitative and quantitative determinations of uronic acids and uronides were carried out by conductometric and potentiometric titrations and paper chromatography.

1. The dissociation of glucuronic acid lactone is very slow in neutral and acidic solutions. In titrating by $\text{Ba}(\text{OH})_2$ solution, pH increases rapidly and becomes alkaline before active dissociation of the lactone commences.

On the other hand, uronic acids (acidic form) react immediately with $\text{Ba}(\text{OH})_2$ and completely turn to the barium uronates below pH 7 (see Fig. 1). Therefore, the proportion of uronic acids and their lactones can be determined by combination of conductometric and potentiometric titrations.

2. A paper chromatographic determination of uronic acids and their lactones in the presence of other sugars was carried out by means of multiple developments of their barium salts with *n*-butanol-benzene-pyridine-water (10:2:5:5) and ethyl acetate-acetic acid-formic acid-water (18:3:1:4), followed by colorimetric determination of the uronic fractions separated clearly from the other neutral sugars.

Uronides in gum arabic and pectin resist considerably against hydrolysis, but large amount of them were hydrolyzed to monomers by elongation of the secondary hydrolysis to 10~12 hrs. (see Fig. 2 and Table. 1).

Decomposition of uronic acids during acid hydrolysis was investigated (see Fig. 3 and 4), and then the uronic acid contents of gum arabic and pectin were determined by means of paper chromatography.

The values of these uronides obtained by this method agreed closely with those obtained by the CO_2 method.

(Received November 10, 1959)

I 緒 言

ウロン酸およびウロナイドの定量に関しては従来からいろいろと研究されており、その方法はウロン酸含有試料を通常 12%^(1~4)あるいはそれ以上の濃度の塩酸⁽⁵⁾と共に加熱し、発生する炭酸ガス量を測定してウロン酸含量を求めている。なお、共存する他の糖類などから発生する炭酸ガス^(6,7)の量を補正するためには、一定時間毎に発生する炭酸ガス量を順次測定する方法⁽⁸⁾、およびあらかじめ 72% 硫酸に溶解してから脱炭酸反応を行なう方法⁽⁹⁾などが提案されている。

しかしながら、以上の方法ではかなり多量の試料を必要とし (ウロン酸として 200 mg 以上)、また、複雑な

装置や処理を必要とする。ウロン酸のセミマイクロ定量法もいろいろと研究されており^(10~12)、特に最近 Johansson, Lindberg らにより発表された方法⁽¹³⁾では、比較的簡単な装置でしかも 10~70 mg のウロン酸を含む試料で定量できるが、原理的には従来の炭酸ガス発生による方法^(1~4)と同じであるため、共存する他の糖類などの影響を完全に除くことはできない。

また、更に簡単な方法として、naphthoresorcinol 反応^(14,15)、carbazole 反応^(16,17)などウロン酸特有の呈色反応を利用した定量分析法も試みられている。しかしこれらは、木材あるいはパルプなどのように他の多糖類が多量に共存する場合には定量法としてほとんど用いることができない。

ペーパークロマトグラフィーは木材炭水化物の研究分野において定量法として、あるいは組成および構造決定の手段として非常に広く用いられているが、ウロン酸およびウロナイドに関しては、ガラクトキロン酸¹⁸⁾以外の定量を行なったという報告はほとんど見当たらない。これはウロン酸およびウロナイドが他の糖類とかなり異った性質を持っているためであり、例えば著者の行なった予備実験からもその性質のいくつかを指摘することができる。すなわち

(1) グルキロン酸(マンニユロン酸は木材中に存在しないため除く)はラクトンを作りやすく、精製、濃縮すると大部分がラクトン化し、また、このラクトンを水あるいは酸性溶液に溶解して長時間放置するか、または加熱することによつて、かなりの量が酸型に移行するが、多くの溶液中にはこの両者が共存した状態になっている。

この酸型とラクトン型とはペーパークロマトグラフィーの展開の際の R_f 値が異り、しかも展開操作中にラクトン→酸、場合によつては酸→ラクトンへの移行が行なわれる。例えば、グルキロンラクトンを n -ブタノール：ベンゼン：ピリジン：水 (10：2：5：5) で展開すると、展開中にラクトン→酸へと移行するため、溶媒との接触時間の延長に伴つてグルキロンラクトンは漸減していちじるしい tailing 現象を起こし、または多段展開によつて3ヶ以上のスポットが生成するようになる¹⁹⁾。したがって定量的にグルキロン酸の単一スポットを得ることは比較的困難である。

(2) ペーパークロマトグラフィーによる定量の際、多糖類は単糖種にまであらかじめ加水分解するが、ウロナイドは他の多糖類に比べて加水分解に対して比較的抵抗性である。

(3) 一方、加水分解中に生成したウロン酸モノマーは他の単糖類よりも崩壊され易い¹⁹⁾。

以上のようにウロン酸に関してはペーパークロマトグラフィーに不適当ないくつもの要素があり、一応定量の対象から外されてしまつていようである。しかしながら、近頃では多糖類の分別物の定量を行なうことが多く、したがって非常に小さい規模で分析を行なわねばならないことが多いので、ペーパークロマトグラフィーによつてウロン酸およびウロナイドの定量がどの程度可能であるかを検討した。

II 実験 法

1. 電導度滴定および電圧滴定

試料 0.5 mmol を水に溶かしてから、 $\frac{N}{10}$ Ba(OH)₂ を 0.5 ml ずつビュレットから滴下し、コンダクタンスお

よび pH の測定を行なつた。一試料についての全滴定所要時間は約 40 分間であつた。

2. ペーパークロマトグラフィー

東洋濾紙 No. 50 (2×40 cm) および Whatman No. 1 (18 $\frac{1}{4}$ ×22 $\frac{1}{2}$ in) を用い、展開溶媒には n -ブタノール：ベンゼン：ピリジン：水 10：2：5：5 v/v (溶媒 A)、酢酸エチル：酢酸：ギ酸：水 18：3：1：4 v/v (溶媒 B) および酢酸エチル：酢酸：水 9：2：2 v/v (溶媒 C) および 10：5：6 v/v (溶媒 D) を用いた。呈色試薬としてアニリンフタル酸および修酸アニリンを用い、同時に展開を行なつた他の呈色させない濾紙から、呈色部分に相当する箇所を切り取つて水で溶出した後、Somogyi 氏の比色定量法²⁰⁾を用いて定量した¹⁹⁾。

III 実験 結果

1. グルキロン酸およびガラクトキロン酸の電導度滴定および電圧滴定

木材およびパルプ中のウロン酸はグルキロン酸およびこれのメチル化物またはガラクトキロン酸から成る^{21~23)}が、前2者は一部ラクトン型として存在しているらしく、これらを含む多糖類の酸加水分解液中には遊離のウロン酸と共にそのラクトンも認められたため(後述)、これらのウロン酸の一般的性質を知る上から、また、加水分解後の Ba(OH)₂ または BaCO₃ による中和の際の挙動を調べるために、これらの酸の電導度および電圧滴定を行なつた。

まず、グルキロン酸ラクトン(市販品をエタノール溶液から再結したもので、m. p. 173°C) 0.5 mmol を水

Fig. 1 Conductometric and potentiometric titrations of uronic acid.

- a: glucuronolactone (in water)
 b: glucuronolactone + glucuronic acid (in dil. H₂SO₄)
 c: " " (")
     heated at 80°C
 d: glucuronic acid or galacturonic acid

に溶かして直ちに $N/10 \text{ Ba(OH)}_2$ で滴定し始めると、第1図a曲線のように pH は急激に上昇してアルカリ性となり、pH 10 以上になつてはじめて全試料を Ba 塩とすることができた。

グルキユロン酸ラクトンに対して、木材またはパルプの組成分析の際に用いるような加水分解処理をほどこすか、あるいは希硫酸に溶解して数日放置後 $N/10 \text{ Ba(OH)}_2$ で滴定すると、b 曲線のように硫酸の中和が終了した後も、初めの間は滴定の進行に伴う pH の上昇は緩慢であるが、ある程度までグルキユロン酸バリウムが生成した後、急激な pH の上昇が認められ、pH 9 以上に達してようやく全試料が Ba 塩に移行した。なお、滴定前の試料をペーパークロマトグラフィーによつて分析した結果、グルキユロン酸とそのラクトンとの混合物から成ることが定性的に認められた。

次に、上と同じ試料を同様に順次滴定して行き、pH 5~6 に達してから液温を $80 \sim 90^\circ\text{C}$ に高め、更に滴定を続行すると、c 曲線のように pH 7 以下で完全に Ba 塩になつた。

これらの方法で得られた Ba 塩を $N/10 \text{ H}_2\text{SO}_4$ で逆滴定すると、d 曲線のようにグルキユロン酸バリウムからグルキユロン酸が遊離し始める時に急激に pH が低下して酸性となつた。この酸性に戻した試料を再び $N/10 \text{ Ba(OH)}_2$ で滴定すると、d 曲線と全く同じ経過をたどつた。

ガラクトユロン酸の場合には、初めから d 曲線の経過をたどつた。

以上のことから、酸型のグルキユロン酸は Ba(OH)_2 の添加によつて直ちに Ba 塩となり、したがつて pH 7 以下で完全に Ba 塩に移行するが、ラクトンが混在している場合にはラクトン型から酸型への移行が pH 7 以下、特に常温では緩慢なため、比較的短時間で完全に Ba 塩を得るためには pH を 10 程度に高めるか、あるいは中性付近でしばらく加熱する必要がある。

実際の処理の場合には、 BaCO_3 で中和するか、あるいは中和に要するよりも、やや少量の Ba(OH)_2 を加えてから BaCO_3 で中和すれば pH 7 付近に保つことは容易であり、この際熱水中に数分間浸せきすればラクトン型も完全に Ba 塩となる。なおこの処理の前後のウロン酸並びに他の糖類の量を全還元力測定並びにペーパークロマトグラフィーにより分析した結果、いずれの試料でも崩壊はほとんど認められなかつた。

更に以上の電導度および電圧滴定の結果、ウロン酸バリウムは pH 7 以上の溶液中においては完全に塩類の形で存在し、pH 約 2.5 以下の溶液中においては完全に遊離酸の型になることがわかつた。

また、以上のように電導度および電圧滴定を比較的迅速に行なうことにより、溶液中のウロン酸のラクトン型と酸型との割合をほぼ定量的に求めることができる。

2. ウロン酸バリウムのペーパークロマトグラフィー

前述の実験により、グルキユロン酸およびそのラクトン完全に Ba 塩にすることができたが、次にペーパークロマトグラフィーによつてこの物質を単一のスポットとして他の糖と分離する必要がある。

(1) 先ず溶媒 A (pH 8.0) を用いてグルキユロン酸バリウムの展開を行なつたが、この種の塩基性溶媒では長時間展開を行なつても、Ba 塩の形のまま定量的に原点付近に留まる。

従つて、ウロン酸と他の単糖類とだけから成る試料中のウロン酸を定量する場合には、前述のように中和後の試料を塩基性溶媒で展開し、原点付近のウロン酸バリウムの還元力を測定することにより求め得る。しかしながら他の還元性物質も原点付近に留まつている場合があり、たとえば、未さらし亜硫酸パルプの加水分解濾液中には酸処理を受けたリグニンスルホン酸が混入しており、これの Ba 塩は塩基性溶媒では原点付近に留まり、また若干の還元力を有している。このような場合には亜硫酸パルプ蒸解廃液の精製¹⁹⁾と同様、aniline formaldehyde 樹脂によつてこの夾雑物を除くことができる。この処理の際に、ウロン酸並びに他の糖類が全く吸着されないことは以前¹⁹⁾に報告した。

(2) 以上のように処理しても、なお原点付近に他の還元性物質の残留しているおそれのある場合、または2種以上のウロン酸を分離する必要のある時には、更に他の溶媒でそれぞれのウロン酸バリウムを定量的に移動させねばならない。

このためには、溶媒 B (pH 1.8), C (pH 2.3) または D (pH 2.0) など pH 2.5 以下の溶媒を用いて更に展開を行なえば、酸型ウロン酸の単一スポットとして移動させることができた。なお、この移動は全く定量的であつて、酸性溶媒で展開前のウロン酸バリウムと展開後のウロン酸部分の還元力とは全く等しかつた。したがつて、この方法によつて分離した個々のウロン酸を定量すれ

ば、一層正確な値が得られる。

3. グルキュロナイドおよびガラクトクロロナイドの加水分解及びその生成物

多糖類の構成糖の組成および含量をペーパークロマトグラフィーにより測定するためには、あらかじめこれらを単糖類にまで加水分解する必要がある。この際の加水分解条件を検討するため、試料としてアラビアゴム粉末（日本薬局方）およびペクチン（市販最純品）を用いて実験を行なった。

加水分解は著者が従来用いて来た方法²⁴⁾により、試料に対して15倍量の72% H_2SO_4 を加え、充分に混和してから30°Cに1時間放置し、次いで水を加えて H_2SO_4 濃度を4%とし、沸騰湯浴中で6時間加熱した。これを $\text{Ba}(\text{OH})_2$ と BaCO_3 とで中和・加熱・濃縮および濃縮した試料についてペーパークロマトグラフィーによる分析を行なった。

Fig. 2 Paper chromatograms of hydrolysates.
solvent A: *n*-butanol-benzen-pyridine-water
(10:2:5:5 v/v)

solvent B: ethyl acetate-acetic acid-formic
acid-water (18:3:1:4 v/v)

* The numbers in the parenthesis indicate time
of developing.

濃縮試料はまず、溶媒Aで2段展開を行ない、次いで溶媒B（またはCあるいはD）で展開を行なうと、第2図のように塩基性溶媒Aでは原点付近に留まっていたウロン酸グループ（*f* 及び *f'*）が、酸性性溶媒で展開を行なうことによつて2ヶのスポットに分離するのが認められた。

既知標準試料から調製したウロン酸バリウムのクロマトグラムと比較した結果、アラビアゴム加水分解物中の

*f*₁ スポットはグルキュロン酸、ペクチンの *f*₁' はガラクトクロン酸に相当した。なお、 BaCO_3 中和後の加熱処理を行なわなかつたアラビアゴム試料では、クロマトグラム上の *R_f* の高い部分に、明らかなグルキュロン酸ラクトンのスポットが検出された。

それぞれの試料の中の *R_f* の最も小さい *f*₂ および *f*₂' 物質はウロン酸含有の少糖類であるらしく、例えばペクチンの場合、更に2段目の加水分解時間を2時間延長することによつてこのスポットは消失した。

アラビアゴムの *f*₂ 物質は酸加水分解に対してかなり抵抗性で、更に加熱時間を6時間延長したが、まだ1/3程度の量が残存していた。なおこの処理により、*f*₁ の減少に伴なつてグルキュロン酸とガラクトースの量の増加するのが認められた（第1表）。また、*f*₁ 物質を水で溶出し、更に加水分解後ペーパークロマトグラフィーを行なった結果、ガラクトースとグルキュロン酸とがほぼ等量ずつ新たに生成した、したがつて、この物質はガラクトースとグルキュロン酸とから成るアルドビウロン酸であると思われる。

以上のようにアラビアゴムのウロナイドはペクチンのに比べてかなり加水分解抵抗性であるが、2段目の加水分解時間を10~12時間に延長すれば大部分が単糖にまで加水分解されるため、まだ若干残存しているアルドビウロン酸のモル当りの還元力を、グルキュロン酸のモル当りの還元力と等しいとすれば、大略のグルキュロン酸の含量を求めることができる。アラビアゴム加水分解の際の糖の生成状況は第1表の通りである。

Table.1 Reducing sugars produced by acid
hydrolysis of gum arabic

Retention time in the secondary hydrolysis hrs		6	9	12
rhamnose	%/gum arabic	9.7	9.9	9.7
arabinose	"	25.0	24.8	24.1
galactose	"	36.0	37.6	39.0
glucuronic acid	"	6.5	7.5	8.3
aldobiuronic acid	"	11.5	6.6	3.9

4. ウロン酸の加水分解残存率

以上のような加水分解処理をする場合には、処理中に生成したウロン酸モノマーは他の単糖よりも一層崩壊作用を受け易いものと思われる。

(1) 試料としてグルキュロン酸ラクトンとガラクトクロン酸とを用い、木材パルプまたは多糖類に用いるのと同じ加水分解処理をしてから、ウロン酸の残存量をペーパークロマトグラフィーによつて定量した。

結果は第3図の実線で示すようにいずれのウロン酸も他の中性糖の場合²⁴⁾に比べて残存率が低く、殊にガラ

Fig. 3 Effect of time of the secondary hydrolysis on the decomposition of uronic acids.

グルコンの崩壊はいちじるしかつた。なお2段目の加水分解の初期に残存糖量が、非常に低下しているが、この現象はグルコースやキシロースなどの中性糖の時に認められたもので、1段目の加水分解処理によって糖が濃硫酸と付加化合物²⁵⁾を作るためと思う(中性糖の場合には、2段目の加水分解を1~2時間行なうことによって付加化合物は消失した)。

同時にCO₂発生法によるセミマイクロ定量法¹³⁾によって測定した結果(第3図点線)、2段目加水分解の初め数時間の両法の測定値にかなりの差が認められたのは、上記の付加化合物の生成していることを示している。

(2) 水溶性多糖類の加水分解には、72% H₂SO₄処理を省略して4% H₂SO₄による加水分解処理だけによつ

Fig. 4 Effect of time of hydrolysis (4% H₂SO₄) on the decomposition of uronic acids.

ても単糖類にまで加水分解し得る²⁴⁾ので、この場合のウロン酸の残存率も測定した。結果は第4図の通りである。

5. 定量に影響するその他の要因

(1) 他の糖による影響

加水分解処理中に他の糖が崩壊して、ウロン酸またはウロン酸類似のR_fを有する物質に変化することもあると考えられるので、グルコース、ガラクトースおよびキシロースに対して全加水分解処理を施し、BaCO₃で中和後、クロマトグラムの原点付近(ウロン酸バリウムに相当)の還元力を測定したが、何らの還元力をも示さなかった。

(2) 中和の際の選択吸着

加水分解液をBa(OH)₂およびBaCO₃で中和する際、沈殿(BaSO₄+BaCO₃)に対してウロン酸バリウムが他の中性糖よりも吸着され易いのではないかと考え、グルコース、キシロースおよびグルクuron酸各1%を含む希硫酸溶液を上記のBa化合物で中和・濾過後、少量の水で沈殿を洗って各糖の割合を測定した。

グルコースの溶出量に対するグルクuron酸の溶出量は平均99%であり、従つて後者の選択的吸着は認められなかった。

6. CO₂発生による定量法とペーパークロマトグラフィーとのウロン酸定量値の比較

CO₂発生法によれば、ウロン酸以外の糖類あるいは有機酸などからも少量ながらCO₂を放出するといわれており、また、多数の試料についての実験が行なわれている²⁶⁾が、Johansson, Lindbergらのセミマイクロ定量法の場合に他の糖類などから発生するCO₂量、およびアラビアゴムとペクチンについてのペーパークロマトグラフィーによる定量値との比較を行なつた。

結果は第2表のようにCO₂法では単糖類または糖のカルボン酸などからもかなりのCO₂の発生が認められたが、セルロースの場合にはCO₂の発生は非常に僅かであつた。アラビアゴムおよびペクチンのようにウロン酸含有量の多い試料では、両法による値はかなり近似して

Table 2 Results of determination of uronic acids content (%)

sample	method	CO ₂ -method	Paper chromatography
standard cellulose		0.06	—
glucose		0.6	0
xylose		0.6	0
saccharic acid		2.2	—
gluconic acid		4.9	—
gum arabic		15.4	14.1 (as glucuronic acid)
pectin		56.4	50.3 (as galacturonic acid)

いた。

IV 総 括

電導度滴定と電圧滴定およびペーパークロマトグラフィーによりウロン酸およびウロナイドの定性および定量分析を試みた。結果は次の通りである。

(1) ウロン酸溶液の電導度滴定および電圧滴定を行なうことにより、その中に含まれているウロン酸の酸型とラクトン型との割合を知ることができた。

(2) ラクトン型と酸型とから成るウロン酸試料でもバリウム塩にすることにより、ペーパークロマトグラフィーでの単一スポットとして定量的に他の糖と分離することができた。

(3) ウロナイドを酸加水分解後、ペーパークロマトグラフィーによつてウロン酸含量を定量した結果、通常の CO₂ 発生法によつて求めたものと近似した値が得られた。

本研究に際し御指導賜わつた東京大学農学部右田伸彦教授、並びに国策パルプ工業株式会社軒原栄三博士に深く感謝する。

本報告は 1958 年 5 月繊維学会講演会で発表した。

文 献

- 1) K. U. Lefevre, B. Tollens; *Ber.*, 40, 4513 (1907)
- 2) D. R. Nanji, F. J. Paton, A. R. Ling; *J. Soc. Chem. Ind.*, 4, 253 T (1925)
- 3) A. D. Dickson, H. Otterson, K. P. Link; *J. Am. Chem. Soc.*, 52, 775 (1930)
- 4) M. Phillips, M. J. Goss, C. A. Browne; *J. Assoc. Official Agr. Chem.*, 16, 286 (1933)
- 5) G. Lunde, E. Öy; *Kolloid Z.*, 83, 196 (1938)
- 6) W. G. Campell, E. L. Hirst, G. T. Young; *Nature*, 142, 912 (1938)
- 7) A. G. Normann; *Nature*, 143, 284 (1939)
- 8) R. L. Whistler, A. R. Martin, M. Harris; *J. Res. Natl. Bur. Standards*, 24, 13 (1940)
- 9) A. Meller; *Svensk Papperstidn.*, 57, 741 (1954)
- 10) H. W. Buston; *Anatyst*, 57, 220 (1932)
- 11) B. Burkhart, H. L. Baur, K. P. Link; *J. Biol. Chem.*, 104, 171 (1934)
- 12) W. Voss, J. Pfirschke; *Ber.*, 70, 631 (1937)
- 13) A. Johansson, B. Lindberg, O. Theander; *Svensk Papperstidn.*, 57, 41 (1954)
- 14) B. Tollens, F. Rorive; *Ber.*, 41, 1783 (1908)
- 15) H. D. Ratish, J. G. M. Bullowa; *Arch. Biochem.*, 2, 381 (1943)
- 16) Z. Dische; *Biochem. Z.*, 189, 77 (1927)
- 17) Z. Dische; *J. Biol. Chem.*, 171, 725 (1947)
- 18) R. M. McCready, E. A. McComb; *Anal. Chem.*, 26, 1645 (1954)
- 19) 戸田久昭, 浜田忠平; 紙パ技協誌, 11, 429 (1957)
- 20) M. Somogyi; *J. Biol. Chem.*, 195, 19 (1952)
- 21) J. K. N. Jones, L. E. Wise; *J. Chem. Soc.*, 2750, 3389 (1952)
- 22) J. Saarnio, K. Wathén, C. Gustafsson; *Acta Chem. Scand.*, 8, 825 (1954)
- 23) A. Roudier, L. Eberhard; *Tappi*, 38, No. 9, 156 A (1955)
- 24) 戸田久昭, 浜田忠平; 紙パ技協誌, 12, 324 (1958)
- 25) E. Hägglund; *Chemistry of Wood*, p. 87 (1951)
- 26) 町田誠之; 化学の領域, 7, No. 11, 32 (1953)

(注) 本研究を“木材およびパルプ中の多糖類に関する研究第3報”とする。