- (12) 河本正彦等 : 精糖技研誌, No. 4, 1(1955); 兵庫農大研報, 1, No. 2, 63, 66 (1954); 同上, 4, No. 1, 43 (1959).
- (13) S. M. Partridge : *Nature*, **164**, 443 (1949).
- (14) R. H. Horrocks : *ibid.*, **164**, 444 (1949).
- (15) 佐竹一夫 : クロマトグラフ, 共立出版, p. 85 (1952).
- (16) H. S. Isbell : *U. S. Atomic Energy NBS-5325*, 39 (1957); *C. A.*, **52**, 15432 (1958).
- (17) B. M. Ames et al. : *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 252 (1952).
- (18) V. Prey et al. : *Z. für Zuckerind.*, **9**, 452 (1959).
- (19) 生化学の領域における光電比色法, 各論 1, p. 105 (1958).
- (20) L. Hough : *J. Chem. Soc.*, **1958**, 1212.
- (21) J. F. O'Dea : *Biochem. J.*, **55**, 580 (1953).
- (22) 渡辺長男等 : 農産加工技研誌, **5**, 137 (1958); 食研報, **12**, 99 (1957).
- (23) 生化学領域における光電比色法, 各論 2, p. 36 (1958).
- (24) 同上, 各論 2, p. 46 (1958).
- (25) 同上, 各論 1, p. 67 (1958).
- (26) J. C. Speck : *Advances in Carbohydrate Chem.*, **13**, 63 (1958).
- (27) W. Pigman : "The Carbohydrates," Academic Press, 1957, p. 67.
- (28) K. Bernhauer et al. : *Biochem. Z.*, **221**, 11 (1930).

〔農化 第 36 卷, 第 4 号, p. 310~313, 1962〕

グルコースとアンモニアの反応生成物に 関する化学的研究 (第2報)*

グルコシルアミン, グルコース及びアンモニアの分別定量法

河 本 正 彦 (兵庫農科大学)

昭和 36 年 7 月 31 日 受 理

グルコース-アンモニア反応水溶液 (以下 G-A 反応液とする) 中にグルコシルアミンが生成することを前報⁽¹⁾に記した. この反応溶液中のグルコシルアミン, グルコース及びアンモニアの消長を検討するためには, 三者の分別定量法を確立する必要がある. しかし反応溶液中で直接三者を定量することは, グルコース及びグルコシルアミンが共に還元力を有するため困難である. グルコースが中性物質であるのに対し, グルコシルアミンは塩基性物質であることから, 陽イオン交換樹脂により両者の分別を行い, その後それぞれを定量することが好都合と考えられた.

従来ヘキソサミン (グルコサミン及びガラクトサミン) の定量に関し, 陽イオン交換樹脂を用いる Boas⁽²⁾の方法があるので, 著者はこの方法を準用してまずグルコース及びグルコシルアミンの分別を行い, ついでそれぞれをアンスロン法⁽³⁾により定量した. Boas の方法によれば, 吸着されたヘキソサミンを Dowex 50 から溶出後, Elson-Morgan 法により定量を行っている. しかし著者の問題としている交換樹脂からの溶出液はグルコシルアミン以外に, もともと存在していたアンモニアと溶出に用いた塩酸とが反応して生じた塩化アンモンを含むために, 溶出液中のグルコシルアミンを Elson-Morgan 法⁽⁴⁾で定量するとき (+) の誤差を与えることがわかった. よって本実験においては溶出液中のグルコシルアミンはアンスロン法により定量した. アンモニアは, グルコシルアミンと共に一旦交換樹脂に吸着せしめた後, 塩酸により塩化アンモンとして溶出し, インドフェノール法⁽⁵⁾により定量した.

種々検討の結果, Boas 法に準じた分離操作を行った後, 上記の各比色法を応用すると, グルコース, グルコシルアミン及びアンモニアの分別定量法は非常に好結果を与えることが確められた.

実 験 及 び 結 果

I] イオン交換樹脂による分離 ほぼ Boas⁽²⁾の方法に準じた. 250~350 me の Dowex 50 を使用前に 2N-NaOH 水溶液で数回浸漬処理した後, 水洗, 次に 2N-HCl 水溶液で浸漬処理し, 塩素イオンの消失するまで

* Chemical Studies on the Reaction Products of Glucose and Ammonia. Part II. Fractional Determination of Glucose, Glucosylamine and Ammonia.

By Masahiko KŌMOTO (The Hyogo University of Agriculture)

第 1 図 グルコシルアミンの
Elson-Morgan 反応
(グルコシルアミン 1.5 mg/ml)

第 2 図 グルコシルアミンの
Elson-Morgan 反応後の
放置時間と吸光度
(グルコシルアミン 1.3 mg/ml)

第 3 図 Elson-Morgan 法における
グルコシルアミンの検量線

第 4 図 グルコシルアミンのアンソ
ロン法による吸光曲線

第 5 図 グルコシルアミンのアンソ
ロン法後の放置時間と吸光度

第 6 図 アンソロン法におけるグル
コシルアミンの検量線

第 1 表 Elson-Morgan 法によるグルコシルアミンの
発色に及ぼす NH_4Cl 及び HCl の影響

試 料	発色時の 吸 光 度
グルコシルアミン 1mg	0.110
グルコシルアミン 1mg+ NH_4Cl 1.7mg	0.157
グルコシルアミン 1mg+ NH_4Cl 0.85mg	0.134
グルコシルアミン 1mg+ NH_4Cl 0.51mg	0.125
NH_4Cl 1.7mg	0.044
NH_4Cl 0.85mg	0.020
グルコシルアミン 1mg+ HCl 1mg	0.108
グルコシルアミン 1mg+ HCl 2mg	0.112
HCl 1.4mg	0.000

第 2 表 アンソロン法によるグルコシルアミンの発色
に及ぼす NH_4Cl 及び HCl の影響

試 料	発色時の 吸 光 度
グルコシルアミン 1mg	0.380
グルコシルアミン 1mg+ NH_4Cl 1mg	0.377
NH_4Cl 11mg	0.000
グルコシルアミン 1mg+ HCl 14mg	0.400
グルコシルアミン 1mg+ HCl 7mg	0.390
グルコシルアミン 1mg+ HCl 1.4mg	0.381
グルコシルアミン 1mg+ HCl 0.014mg	0.378
HCl 36.5mg	0.015
HCl 14mg	0.005

水洗し乾燥する。樹脂用カラムは内径 1 cm, 高さ 30 cm のガラス管の先端を細くしたものを用いた。樹脂用カラムの下端にガラスウールをつめ、その上に砂を平に置き、さらにその上に丸い濾紙片を置いた。使用に際し樹脂と水の 1:1 (w/v) 懸濁液を作り、その 5 ml をカラムに注ぎ入れ、吸引して充填した。これに予め 2 N-HCl で中和したグルコシルアミン水溶液 1 ml (5~20 mg のグルコシルアミンを含む) を加え、さらにその上に水 4 ml を加えた。流下速度は 5 ml/45 分を維持するよう調節した。通過液及び水による洗滌後、計 15 ml を合してグルコースの定量に供した。ついで 2 N-HCl を加えてグルコシルアミン及びアンモニアを溶出し、その溶出液 15 ml についてグルコシルアミン及びアンモニアの定量を行った。試料溶液が着色している場合、着色物質は樹脂に吸着されたままで 2 N-HCl により溶出されない。

II] グルコシルアミン定量法の検討

A) 標準のグルコシルアミン 前報⁽¹⁾に記した Isbell の方法により調製した. m. p. 128~130°, $[\alpha]_D^{25} = +20.0^\circ$ ($c=7$, H_2O).

B) 測定法

a. Elson-Morgan 法 : Boas⁽²⁾ の記載している方法に準じ, Elson-Morgan 法によりグルコシルアミンを発色させた. その吸収曲線は第 1 図の如くで, 521 $m\mu$ 及び 558 $m\mu$ に λ_{max} . を有す. この色は第 2 図の如く反応後 70~95 分で最高値に達し, その間は安定である. 検量線は第 3 図の如く, グルコシルアミン量 0.5~1.5 mg の範囲内で直線性がある. 従って被験溶液中のグルコシルアミン濃度をこの範囲内に調整し, 反応後 70~95 分の間に 521 $m\mu$ における吸光度を測定すれば満足な結果が得られる. しかし上記交換樹脂法により, G-A 反応液中のグルコシルアミンを定量する場合は, 共存している塩化アンモンの影響を考慮に入れねばならぬ. Elson-Morgan 法によりグルコシルアミンを定量する場合は塩化アンモンの影響は第 1 表の如くで, 塩化アンモンの存在はグルコシルアミンの定量値を実際より高めに与える. よって G-A 反応液から交換樹脂により分離したグルコシルアミンの定量法として, Elson-Morgan 法は不適当である.

b. アンスロン法⁽³⁾ : あらかじめ水中で共栓付試験管を冷却し, これに冷却しておいたアンスロン試薬 (濃硫酸 300 ml と水 100 ml との混合液に 0.2% (w/v) 濃度になるようにアンスロンを加えたもの) 5 ml を加える. ついで 0.1~2.0 mg のグルコシルアミンを含む水溶液を静かに壁を伝わらせて加え, 直ちに混和し, 沸騰水浴中で 10 分加熱後比色を行う. 反応液の吸収曲線安定度及び検量線はそれぞれ第 4, 5 及び 6 図に示す. 比色は反応後 30~100 分に 625 $m\mu$ で行うと満足すべき結果が得られる.

本法における塩化アンモン及び塩酸の影響は第 2 表の如くで, 塩化アンモンの影響はほとんどない. しかし塩酸は, その量が多くなるとやや (+) の誤差を与える傾向がある. 樹脂からの溶出液中に含まれる遊離の塩酸濃度は約 1.5 N であるから, 本法を溶出液中のグルコシルアミンの定量に用いるときには, 比色の対照液として水 0.5 ml を用いる代りに, 1.5 N-HCl を 0.5 ml 加えて同様の発色操作を行ったものを使用する.

第 7 図 アンスロン法におけるグルコースの検量線

第 8 図 インドフェノール法におけるアンモニアの検量線

III] グルコースの定量法 グルコースは前記の交換樹脂による分離操作では吸着されずに通過するから, 通過液と洗滌液とを合したものをグルコース量に応じ適当に稀釈し, アンスロン法により測定した. 被験溶液中には塩酸はほとんど含まれず, 比色の対照液として水を用い, 満足すべき結果が得られた. 検量線は第 7 図の如くである.

IV] アンモニアの定量 樹脂からの溶出液 0.5 ml を共栓付き試験管にとり, インドフェノール法によりアンモニアの定量を行った.

第 3 表 本分別定量法による各成分の回収率

試 料	グルコース	グルコシルアミン	アンモニア
グルコシルアミン 0.455 mg	—	0.460 mg (101.1%)	—
グルコシルアミン 0.910 mg	—	0.880 mg (96.7%)	—
NH ₄ Cl, NH ₃ として 0.017 mg	—	—	0.0166 mg (97.0%)
NH ₄ Cl, NH ₃ として 0.033 mg	—	—	0.033 mg (100.0%)
NH ₄ Cl, NH ₃ として 0.067 mg	—	—	0.0665 mg (99.3%)
グルコース 5.5 mg + グルコシルアミン 0.91 mg	5.5 mg (100.0%)	0.94 mg (103.3%)	—
グルコース 5.5 mg + グルコシルアミン 1.80 mg	5.7 mg (103.6%)	1.80 mg (98.9%)	—
グルコース 6.3 mg + グルコシルアミン 15.0 mg + NH ₄ Cl, NH ₃ として 2.1 mg	6.6 mg (104.8%)	15.3 mg (102.0%)	2.064 mg (98.3%)
グルコース 3.15 mg + グルコシルアミン 7.5 mg + NH ₄ Cl, NH ₃ として 1.05 mg	3.105 mg (98.6%)	7.2 mg (96.0%)	1.032 mg (98.3%)

() 内は回収率

塩酸及びグルコシルアミンの影響はなく、満足すべき結果を与えた。検量線は第 8 図の如くである。

V] 本法によるグルコシルアミン、グルコース及びアンモニアの回収率 第 3 表に示す如く既知量のグルコシルアミン、グルコースまたは塩化アンモンを含む水溶液、或いはそれらの二者または三者の混合水溶液をそれぞれ I] の方法に従い交換樹脂により分離した後、グルコース及びグルコシルアミンはアンスロン法によりアンモニアはインドフェノール法により比色定量した。第 3 表に明らかな如く、それぞれの回収率は極めて高い。よって本法がグルコース、グルコシルアミン及びアンモニアの分別定量法として採用できることが確められた。

考 察

(a) グルコシルアミンは水溶液中では、かなり不安定な物質である。よって約 4.5 時間にわたる分離操作中に分解することが懸念された。しかし第 3 表に示した如く、分離及び測定に必要とされる時間内では検知し得ていどの分解の起らぬことが判明した。

(b) アンスロン法によるグルコシルアミン及びグルコースの分子吸光係数をそれぞれの検量線の直線部分から算出すると、グルコシルアミンの 67 に対しグルコースは 1742 である。すなわちグルコースの発色率を 100 とすれば、グルコシルアミンのそれは約 4 である。従ってアンスロン法によりグルコースを定量する場合は、少量のグルコシルアミンが存在してもたいした影響はないが、グルコシルアミンを定量する場合は、微量のグルコースの混在によっても大きな影響をうける。また、グルコシルアミンの発色率の小さなことは、グルコシルアミンの濃度変化に伴う吸光度の変化の小さなことを示すもので、微小の差を検知しにくい。

(c) 本法では交換樹脂通過液中の アンスロン試薬陽性の物質は、すべてグルコースとみなして定量した。しかし G-A 反応液中にはフラクトース及びマンノースがそれぞれ少量生成する。これらの糖のアンスロン法による発色率はグルコースと若干異っているから、わずかの誤差はまぬがれない。また、同じく G-A 反応液に生成するジグルコシルアミンの発色率は、グルコースを 100 とすると 23 である。ジグルコシルアミンは交換樹脂により吸着されず、グルコースと共に通過液中に移行する。その発色率は小さく、その生成量も小さいと考えられるから、グルコースの定量値には余り影響を及ぼさないと考えられるが、この場合グルコースの定量値は近似的なものになることは避けられない。

要 約

グルコース、グルコシルアミン及びアンモニアを分別定量する方法を検討したが、ほぼ満足すべき結果を得た。すなわち既知量の三者の混合溶液を Boas の方法に準じ、Dowex 50 によりグルコースと、グルコシルアミン及びアンモニアを含む二区分に分別した。グルコース及びグルコシルアミンをアンスロン法により、アンモニアをインドフェノール法により定量して各ほぼ 100% に近い回収率を得た。

本研究に当り終始御懇篤な指導、鞭撻を賜った当大学名誉教授浜口栄次郎先生、九州大学教授大島康義先生、名古屋大学教授田村悌一先生に深甚の謝意を表す。また研究遂行中御援助を受けた当大学藤井聰氏に感謝する。

(1) 河本正彦：本誌，36，305 (1962).	p.36 (1958).
(2) N. F. Boas；J. Biol. Chem., 204, 553 (1953).	(4) 同上，各論 1, p.42 (1958).
(3) 生化学領域における光電比色法，各論 2,	(5) 同上，各論 2, p.46 (1958).