ヘキソン酸類の新しい定量法

ペントース経由でフルフラール化し比色定量する方法

長尾 稔, 鈴木町子, 丸山峰夫, 刈米和夫

(藤沢薬品工業株式会社中央研究所)

昭和 51 年 6 月 9 日 受理

A New Determination Method of Hexonic Acids Conversion to Furfural through Pentoses and Determination by Colorimetric Method

By Minoru NAGAO, Machiko SUZUKI, Mineo MARUYAMA and Kazuo KARIYONE
Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.

Procedures for the determination and detection of hexonic acids in the presence of Ca and borate ions are described.

Hexonic acids are oxidized with HOCl at pH 4~5 to aldopentoses followed by cyclization to furfural which is subjected to colorimetric determination.

This method is very sensitive and has high specificity for hexonic acids without interference except hexuronic acids.
(Received June 9, 1976)

緒 言

ヘキソン酸類, なかでもグルコン酸は歴史も古く, 清酒, ワイン等発酵製品⁽¹⁾や麦芽, 蜂蜜等, 天然物中にも広く存在することが知られている。

工業的にも重要で, その塩類とラク톤を合せると年間に数千トンが国内で製造され, 食品工業, 金属工業, 繊維工業, コンクリート等々, 多方面にわたって使用されている。グルコン酸以外のヘキソン酸類は原料面での制約があり, 工業的には全く生産されていない。

このように, ヘキソン酸類は広く使用されているにもかかわらず, それに対して特異的で確実な定量法が, 現在のところ見あたらない。

グルコン酸, グルコノ- δ -ラク톤, グルコン酸カルシウムは食品添加物として使用されているが, その定量法として食品添加物公定書(注解)や米国の *Food Chemicals Codex* には, そのアニオンを滴定する方法が採用されている。そのほか, 定量法の報告としては旋光度に基づく方法, 特殊な金属塩とのコンプレックスを比色する方法, クロマトグラフィーを併用する方法, 等々数多く見られるが, 追試の結果はいずれの方法も類似的

有機酸が共存している場合には, 問題が多く満足できるものではなかった。

従来, われわれが最も繁用していた Alt⁽²⁾ の銅とグルコン酸のコンプレックスを比色する方法も, その報文中に the method is not specific for gluconic acid と記されているように, 還元糖, 糖アルコール, キレート性化合物, カルシウム, ホウ酸等によって著しく妨害される。

われわれは, ホウ酸およびカルシウム共存下に, グルコン酸を定量することの必要性を生じ, 従来とは異なった角度より検討を試みた。ヘキソン酸をアルドペントースを経由して, フルフラールに導く経路により, ヘキソン酸に対して高い特異性を有する定量法を確立することができた。グルコン酸の例を式で示すと, 下のようになる。

本方法の特徴は

1. ヘキソン酸類が次亜塩素酸によって酸化, 脱炭素されてアルドペントースに導かれる事実⁽³⁾
2. アルドペントースは鉍酸と加熱することによって脱水, 環化してフルフラールに導かれる事実⁽⁴⁾
3. フルフラールに関しては, すでに感度の高い定量法が確立されている事実

に基づき, これらを組み合わせることにより, α -オキシ酸構造と炭素数に対して, 二重に特異性をもたせることに成功した. この方法は感度, 特異性ともにすぐれているため, ヘキソン酸類の定性, 検出法としても応用できるものである.

実験の部

(1) 定量方法の詳細

a. 試薬

希次亜塩素酸ナトリウム溶液: 市販の次亜塩素酸ナトリウム溶液 (有効塩素 5%) の 10ml にあらかじめ, 約 50ml の水を加えてから 10% 程度の塩酸で pH 4.6 に調整し, 水を加えて全量を 200ml とする. 冷暗所に保存する. 長期保存はできない.

酢酸緩衝液 (pH 4.6): 氷酢酸 6g を約 800ml の水でうすめ, これに結晶酢酸ナトリウム 13.6g を溶解し, 希酢酸または酢酸ナトリウム水溶液で pH を 4.6 に調整したのち, 水を加えて全量を 1000ml とする.

発色試薬: チオ尿素を飽和させた氷酢酸 186ml に 14ml の水を加え, これに 4.0g の *p*-ブロムアニリンを溶解し, 冷暗所に保存する.

25%ギ酸

キシレン

濃塩酸

無水酢酸ソーダ

b. 定量操作

われわれが日常行なっているグルコン酸溶液 (0.5~4 mg/ml) の場合について記す.

イ. 酸化過程 (ヘキソン酸→アルドペントース)

グルコン酸 (ヘキソン酸) として 0.5~4 mg/ml を含有する, はほぼ中性の試料液 5ml を褐色の定容容器 (100 ml 容) にとり, 上記調整した酢酸緩衝液 3ml と希次亜

塩素酸ナトリウム溶液 2.5ml を加え, よく振り混ぜたのち, 浴温 60°C の水浴中で 2 時間加温する. 25%ギ酸 1ml を加えたのち水冷し, 水を加えて 100ml とする.

ロ. 閉環過程 (アルドペントース→フルフラール)

酸化終了後, 定容とした反応液 5ml をナス型フラスコ (100ml 容) にとり, 2.5ml のキシレンと 3ml の濃塩酸, 沸石としてヤシガラ炭素を加え, 還流冷却器を付して油浴上 (浴温 120°C) で 1.5 時間加熱還流させる. 冷後, キシレン層を傾瀉, または分液ロートを用いて分離する. 約 2g の無水酢酸ナトリウムを加えて脱水, 脱塩酸を行なう.

ハ. 発色, 定量過程

脱水したキシレン溶液の 1ml を試験管にとり, *p*-ブロムアニリン発色試薬の 5ml を加えよく混合したのち, 暗所に 30 分間放置し充分に発色させる. グルコン酸 (ヘキソン酸) を含まない試料について同様に操作したものを対照として, 波長 530nm における吸光度を測定し, 標準試料によりあらかじめ準備しておいた検量線に基づいて, グルコン酸 (ヘキソン酸) 濃度を求める.

(2) 定量法の考察

ヘキソン酸をアルドペントースに変換する酸化過程は, Whistler ら⁽⁸⁾の報告している条件をわずかに変更して操作時間の短縮を図り, アルドペントースをフルフラールに導き比色定量する過程は, Rice⁽⁴⁾ のキシレン重層, *p*-ブロムアニリン発色法を採用し, これについても操作時間を短縮するために, 一部条件を変更した.

感度は, 従来のヘキソン酸定量法に比較して大きく改善されている.

上記の例では, 便宜上, 最初の試料の 1/20 を用いて閉環, 定量しているが, 酸化反応液の全量を用いるように操作すれば, さらに低濃度のヘキソン酸が定量できることはいうまでもない.

本定量法の特徴は, 先にも触れたように, 酸化過程において α -オキシ酸構造に, 閉環過程においてアルドペントース構造にと, 2 点において特異性の向上を図っているために適当な前処理を施せば, ヘキスロン酸類以外には, 實際上定量を妨害するものはない.

しかし, 後に妨害物質の項で詳しく記すが, 酸化および閉環の条件で, ヘキソン酸やアルドペントースを遊離するような化合物, たとえば, ラクトビオン酸, マルトビオン酸のように, その分子内にヘキソン酸残基を有する化合物も発色する. 共存する場合には, 妨害になるが

逆にそれらの定量法としても応用できる。

酸化反応を微酸性下で行なうために、この条件下で加水分解の遅い、ヘキソン酸のラク톤を定量する場合には、前もってアルカリで加水分解しておく必要がある。

以下に、検討結果の概要を項目別に記す。

a. 検量線

Fig. 1 に、上記定量法による試料中のグルコン酸ナトリウム濃度と、530 nm における吸光度の関係を示す。原点を通る直線で、変動も小さく再現性も非常によい。

b. 酸化過程の pH と緩衝液

pH 3.5~5.5 の範囲内であれば目的とする酸化反応は

Fig. 1. Calibration Curve for Sodium Gluconate.

Exp. I —●—, Exp. II —▲—.

Fig. 2. Oxidation Time and Temperature.

At 50°C ---▲---, at 60°C —●—.

進行するが、pH 4.6 近辺においてグルコース等の妨害が最も少ない。緩衝液としては、以後の閉環、定量の過程において、不都合を生じるおそれのない酢酸緩衝液を選んだ。

c. 酸化の条件

Whistler ら⁽³⁾の報告における条件は、室温で1夜放置であるが、定量時間の短縮を目的として検討し、Fig. 2 に示すような結果を得たので、60°C、2時間の加温を採用した。

d. 閉環の条件

Rice の報告⁽⁴⁾では 150 分の加熱、還流という条件が採られているが、これも定量時間の短縮を図るために予備的に D-アラビノースを用いて、還流時間と吸光度の関係を検討し、Fig. 3 に示すような結果を得た。これによって、加熱還流時間を 90 分に短縮することにした。

e. 発色試薬と発色条件

発色試薬溶液中の水分含量と発色度およびその発色経過は、Fig. 4 に示すような関係にあり、水分含量 7 ml/100 ml のチオ尿素飽和酢酸を用いて *p*-ブロムアニリンを溶解することにし、発色試薬の添加後 30 分経過したときに比色する方法を採った。文献⁽⁴⁾にも記されているように、本発色法におけるピンク色の色素は、光線に対してやや安定性を欠くので、発色試薬を添加、混合後は暗所に 30 分間放置して発色させたのち、手ばやく吸光度を測定することが望ましい。

Fig. 3. Cyclization Condition.

D-Arabinose was boiled with HCl and measured the absorbance at intervals of 0.5 hr.

Fig. 4. Effects of Water and Reaction Time on the Absorbance.

Seven ml of water was contained in 100 ml of *p*-bromoaniline reagent O—O. Five ml of water was contained in 100 ml of *p*-bromoaniline reagent Δ---Δ.

Table I. Effect of Alkali Hydrolysis on Lactones

Samples	Absorbance at 530 nm/mmmole	
	direct	after hydrolysis
Sodium gluconate	3.905	
Glucono- δ -lactone	3.109	3.860
Glucono- γ -lactone	2.572	3.838
Galactono- γ -lactone	0.329	3.128

f. 試料の前処理

ヘキソン酸類はその化学構造上、ラクトンを非常に形成しやすく、遊離の酸はラクトンと平衡を保って存在している。

本定量法では微酸性下で酸化過程を行なうために、加水分解の遅い γ -ラクトンをもそのまま定量に供した場合、その塩の場合に比較して低い定量値を示し、再現性も非常に悪い。これらの場合には、前処理としてアルカリで加水分解を行ない、ヘキソン酸イオンとしたのち定量に供することにより、定量値、再現性ともに改善される (Table I)。

g. 特異性と妨害物質

定量における反応経路より推測されるように、酸化過程での還元性物質の共存は酸化剤の浪費を招き、閉環過程でのペントース、ペントーザンの共存が障害となることは避けられない。ブドウ糖、麦芽糖、ショ糖は、同重量のグルコン酸ナトリウムの 1/15 以下の呈色を示すにすぎず、グルコヘプトン酸、アラボン酸、エリスロン酸、

Fig. 5. Calibration Curves for Galactonolactone and Lactobionate.

D-galactono- γ -lactone O—O, Ca lactobionate Δ---Δ.

糖酸、粘液酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、等の類似オキシ酸は全く呈色しない。果糖やソルビトール、マンニトールのようなケトースや糖アルコールも呈色しない。ホウ酸やカルシウムの共存も全く影響を示さず、当初の目的を達することができた。

ペントースやペントーザンのような中性の妨害物質はイオン交換樹脂を用いて前処理することにより、その妨害を排除することができる。

最も都合の悪い妨害物質はヘキスロン酸類であって、グルコン酸の定量法の 1 つに、フルフラール化して定量する方法も報告⁽⁶⁾されている。その化学的性質がヘキソン酸と酷似しているために、前処理によって除くことも困難である。ヘキスロン酸類の混入は、極力避けなければならない。

h. 類似化合物の定量への応用

ヘキソン酸残基を分子内に有するラクトビオン酸、マルトビオン酸等の定量にも応用することが可能であり、Fig. 5 にラクトビオン酸カルシウムの例と、グルコン酸以外のヘキソン酸の代表として、D-ガラクトノ- γ -ラクトンの例をその検量線で示す。

測定例

A) ホウ酸およびカルシウム共存下のグルコン酸

測定例

当初の目的であった、ホウ酸およびカルシウム共存下にグルコン酸を定量することは、次の例に示すように可能となり、一応の目的は達成することができた。

試料の組成

Table II. Determination of Gluconate in the Presence of Ca and Borate Ions

Samples	Absorbance at 530 nm
A) Sodium gluconate 2 mg/ml	0.323
B) A+Borax 0.15 mg/ml	0.331
C) B+CaCl ₂ 2 H ₂ O 4 mg/ml	0.335
Blank (water)	0.002

A. グルコン酸ナトリウム (GNA) 2 mg/ml

B. GNA 2 mg/ml+ホウ砂 0.15 mg/ml

C. GNA 2 mg/ml+ホウ砂 0.15 mg/ml

+CaCl₂·2 H₂O 4 mg/ml

(各試料の pH は, あらかじめ 4.6 に調整した)

上記試料を各 5 ml ずつ用いて, 前記の定量操作に従って処理し, その吸光度を求め Table II に表示した.

その結果, 本定量法においては, ホウ酸およびカルシウムの影響を受けることなく, 目的とするグルコン酸の定量が可能であることが確かめられた.

B) 特異性に関して Alt の方法⁽²⁾との比較

ヘキソン酸に対する特異性を確認するために, グルコン酸ナトリウムと結晶として同重量の類似化合物が共存する際の測定例を次に示す. 比較のために従来, われわれが最も繁用していた Alt の方法による測定例を併記する.

試料の組成

A. グルコン酸ナトリウム (GNA) 5 mg/ml

B. GNA 5 mg/ml+ソルビトール 5 mg/ml

C. GNA 5 mg/ml+アラボン酸ナトリウム 5 mg/ml

D. GNA 5 mg/ml+グルコヘプトン酸ナトリウム 5 mg/ml

E. GNA 5 mg/ml+糖酸モノカリウム塩 5 mg/ml

両方法間の感度の違いのためにサンプリング量で調節を行ない, 本法では試料の 1 ml を, Alt の方法では試料の 5 ml を用いて操作を行なった.

Table III に, 各々の吸光度を示した.

この結果により, Alt の方法に比較して本法は, 炭素数の異なる類似酸, および同じ炭素数で酸化程度の異なる

Table III. Influence of Hexonic Acid Analogs on Absorbance

Samples	This method abs. at 530 nm	Alt's method abs. at 660 nm
A) Sodium gluconate 5 mg/ml	0.160	0.185
B) A+Sorbitol 5 mg/ml	0.157	0.487
C) A+Na arabonate 5 mg/ml	0.159	0.341
D) A+Na glucoheptonate 5 mg/ml	0.163	0.363
E) A+K saccharate 5 mg/ml	0.161	0.381

る化合物等による影響を受けることがきわめて少なく, ヘキソン酸に対し高い特異性を有することが確認できた.

要 約

ホウ酸とカルシウム共存下にグルコン酸を定量することの必要性に端を発し, 検討を重ねた結果, ヘキソン酸類をアルドペントースを経てフルフラールに導き, 比色定量する方法を確立した.

本定量法は感度的にもすぐれており, α-オキソ酸構造と炭素数の 2 点において, 特異性向上を織り込んである.

実際上は, ヘキソン酸以外には妨害されることなく, 天然物や食品中のヘキソン酸類の検出定量法として, 広く適用されることが期待できる.

本稿をまとめるに当り, 当社中央研究所長中野浩博士, ならびに副所長箕形政之博士に謝意を表する.

- (1) 箕形政之, 今中 宏: 日醸協誌, **52**, 71 (1958).
- (2) Leslie L. Alt: *Anal. Chem.*, **27**, 749 (1955).
- (3) Roy L. Whistler and Richard Shweiger: *J. Amer. Chem. Soc.*, **81**, 5190 (1959).
- (4) Eugene W. Rice: *Anal. Chem.*, **23**, 1501 (1951).
- (5) 石館守三, 尾張栄彦, 木下俊夫: 薬誌, **80**, 1433 (1960).