キリンサイ *Eucheuma muricatum* (GMEL.) WEBER VAN BOSSE

粘質物に関する研究—V.

グルクロン酸の確認

中 村 武 彦

(宮崎大学農学部)

Studies on Mucilage from the Seaweed, *Eucheuma muricatum*

(GMEL.) WEBER VAN BOSSE—V.

Identification of Glucuronic Acid

Takehiko NAKAMURA

Glucuronic acid or its lactone (glucurone) is nowadays recognized as one of the sugar components of mucilages from seaweed.^{(1),(2)} The detection of glucurone by paper chromatography was very difficult as reported in the previous paper.⁽³⁾ In the present paper, several color reactions for glucuronic acid were applied to the acidic fraction separated with ion-exchangers from the hydrolysates of Basalt of the mucilage. The following results were obtained:

(1) The most reliable and sensitive test was found to be the WILLIAMS reaction.⁽⁵⁾ The color formed showed a characteristic absorption maximum at 600m μ . (Fig. 2).

(2) DISCHE's thioglycolic acid⁽⁶⁾ and cysteine reactions⁽⁷⁾ were also useful for detection, but not for determination, because the color intensity was markedly affected by the conditions in treating with conc. H₂SO₄ (Fig. 3, 4).

(3) The original naphthoresorcinol reaction (TOLLENS)⁽⁴⁾ gave a characteristic absorption curve which has a maximum peak at 559m μ , but it was less sensitive than the WILLIAMS reaction. This reaction seems to be inapplicable for the determination, because the extraction of the color substance was not quantitative. (Fig. 1).

(4) The JARRIGE's reaction⁽⁵⁾ seemed to be inadequate for spectrophotometric investigation due to the formation of turbid coloration.

(5) The carbazol reaction⁽⁸⁾ was found to be not specific for glucuronic acid and the similar absorption curves were obtained on xylose, glucose and galactose (Fig. 5).

Thus, glucuronic acid or glucurone in the acidic fraction of *Eucheuma muricatum* was clearly identified by the WILLIAMS, DISCHE's and original naphthoresorcinol reactions, and its content was 3.27 % on the dry basis of the hydrolysates, when determined by the WILLIAMS reaction.

緒 言

紅藻粘質物中のグルクロン酸又はそのラクトン即ちグルクロンの存在に関しては、荒木⁽¹⁾が寒天質中にその存在を確め、最近勝浦等⁽²⁾は高周波滴定法を応用して各種の紅藻粘質物中の硫酸基とカルボキシル基との組成比とゼリー形成能との関係を研究している。著者は前報⁽³⁾に於てイオン交換樹脂を用いて粘質物水解液から酸性糖を分ち、この区分中の成分を濾紙クロマト法で調べたがグルクロン酸又はグルクロンの存在は明らかでなかつた。これらの酸性糖が濾紙クロマト法で検出困難な原因は、アニシジン塩酸塩などの発色剤に対し他のガラクトーズ或はキシロースに較べて鋭敏でないことによることも一応考えられるが、他に何等かの原因があるかも知れない。酸性糖区分には硫酸エステルが認められるので、グルクロン酸がもし存在すればこの区分に出てくる筈であるのでこの区分について種々のグルクロン酸確認反応を試みた。その結果このものの存在がほぼ確められたのでここに報告する。

実験及び成績

ウロン酸の微量検出法の主なものとしては次のようなものがある。即ち (1) Naphthoresorcinol 反応⁽⁴⁾ (TOLLENS), (2) JARRIGE の反応⁽⁵⁾, (3) WILLIAMS の反応⁽⁵⁾, (4) DISCHE の Thioglycolic acid⁽⁶⁾ 及び Cysteine 反応⁽⁷⁾, (5) Carbazol 反応⁽⁸⁾, 以上の6種の反応について、数種の糖標品を用いて(糖濃度は各図参照)比較検討するとともに、キリンサイ粘質物の水解中和液からイオン交換樹脂で分離した酸性糖区分(濃度は図参照。但し WILLIAMS 及び Thioglycolic acid 両反応の分は WILLIAMS 法で、他は WILLSTÄTTER SCHUDEL 法でグルクロンとして測定せる定量値である)及び寒天、フノリ粘質物からの酸性糖区分或は帯状に展開した濾紙クロマトからキシロース部(グルクロンが混在すると考えられる区分)を切取つて温浸した区分(Ep, Fig. 4)等についても多少研究した。(濃度は何れも WILLSTÄTTER SCHUDEL 法で測定)。

(1) Naphthoresorcinol 反応 試料を同容の濃塩酸で酸性にしたのち Naphthoresorcinol 約0.1gを加え約1分間煮沸し、50°C附近に冷却し、ここに生成せる色素を Benzol を以て抽出しその色調から検出する方法である。グルクロンではこの際美しい紫色を帯びるが、他の糖では赤紫色を呈する。しかし色調による判定は極めて困難を感じる。Benzol 液の吸収曲線を求めると Fig. 1 の如くで、グルクロンは 559 m μ に最大吸収を有する山形曲線をえがき他の糖と明らかに区別出来た。しかし、この反応では反応生成物を完全に Benzol 層に移行せしめることは困難で且不完全である。又移行した色調は長くおくと変色するので定量に供することは困難であつた。キリンサイ、寒天から分離した酸性糖部の吸収曲線はグルクロンのそれにあまりよくは似ていないが 559 m μ に小さいピークが認められた。

(2) JARRIGE の反応 試料に Naphthoresorcinol と濃硫酸を加え、かつ加熱して反応せしめるのであつて、純グルクロンの場合は紺色を呈し、キシロースは帯赤紫色となり、ガラクトースでは灰白色で色素を殆ど生成しない。故に色調で区別出来ないことはない筈であるが、いずれも沈澱を生じる。これを濾過すると濾液は無色となる。故に吸光度の測定は不可能であつた。

(3) WILLIAMS の反応 試料に Naphthoresorcinol と濃塩酸とを加え湯浴中 2 時間処理して生ずる反応生成物を Amyl alcohol で抽出し、この層に更に Ethanol を加えて色調を濃厚ならしめたのち吸光度を測定する方法である。本法では、TOLLENS の Naphthoresorcinol 反応における Benzol 抽出の場合とちがつて直ちに かつ完全に色素が Amyl alcohol に移行する。色は透過光線で観察するとグルクロンでは鮮青色を呈し且強い緑色螢光を有す。キシロースでは緑色螢光を帯びた緑色で多少グルクロンの場合と異なる。ガラクトースではこの反応によつてやはりキシロースとほぼ同一色調のものを得るが同じ濃度からのものを比較するとキシロースよりも淡い。次に Amyl alcohol 層を分取して、これに Ethanol を加えたと何れの糖もその色の濃さと緑色螢光を増しほぼ同一色調となるが、各糖濃度を同じくした場合を比較すると色の濃さは区別出来る。即ちグルクロンの場合は最も濃くガラクトース最も薄い。本反応は極めて鋭敏でグルクロンでは 2.1 mg/100 ml の如き低濃度でも比較的安定でかつ吸光度の測定が可能であつた。標品とキリンサイの酸性糖区分について測定した結果は Fig. 2 の通りである。

即ちグルクロンでは 600 m μ に最大吸収を有する山形曲線をえがき、キシロースの場合と趣きを異にする。ガラクトースでは盲検の吸光度より小さいため負の吸光度を示した。又キリンサイから分離した酸性糖区分の吸収曲線は殆ど全くグルクロンのそれに一致した。本反応はまた濃度と吸光度(600 m μ に於ける)との間

Fig. 1. Naphthoresorcinol reaction
Authentic specimen: I: glucurone, II: galactose, III: glucose, IV: xylose.
Acidic sugar fraction: E: *Eucommia muricatum*, A: agar-agar, G: Xylose fraction of *Gloiopeltis furcata* separated from paper chromatogram.

Fig. 2. WILLIAMS reaction

I: glucurone, II: galactose
IV: xylose, E: *Eucheuma*

には、直線の関係が認められるので定量にも応用できることを知った。詳細は続報にゆずるが、キリンサイ粘質物からの酸性糖区分中に、その水解中和原液中の乾物に対し 3.27% を検出できた。

Fig. 4. DISCHE's cysteine reaction

IV: glucurone, II: galactose,
III: glucose, III: xylose,
E: *Eucheuma*, Ep: xylose fraction of *Eucheuma*

Fig. 3. DISCHE's thioglycolic acid reaction

I: glucurone, II: galactose
III: glucose, IV: xylose,
E: *Eucheuma*

Fig. 5. Carbazol reaction

I: glucurone, II: galactose,
III: glucose, IV: xylose

(4) DISCHE の Thioglycolic acid 反応

マンノースの存在のもとに濃硫酸処理後 Thioglycolic acid

を加え、生成する色（グルクロン：ピンク，キシロース：黄色を帯びたピンク，グルコース：やゝ淡いピンク，ガラクトース：緑色，酸性糖区分：黄緑色）の吸収曲線から検出する方法である。本法については既に第Ⅲ報⁽⁹⁾に於て一部を発表したが、その後更に追試した結果は Fig. 3 に示す如くである。即ち純グルクロン及びキシロースは何れも山形曲線をえがくが最大吸収波長を異にし、前者は $510\text{m}\mu$ にあるが、後者は $470\text{m}\mu$ に認められた。ガラクトース、グルコースなどは特異性のある曲線をえがかない。又酸性糖区分は他の糖の影響を受けるためかグルクロンの曲線とかなりちがっているが $510\text{m}\mu$ に弱いピークを持つていた。

なお本法は生成する色調はほぼ一定であるが濃硫酸処理のため濃さの調整がむずかしいので定量には不向きであると考えられる。

(5) **DISCHE の Cysteine 反応** 本法は元来ガラクトース酸検出反応である。濃硫酸処理後 Cysteine を加えて生成する色の吸収曲線から検定する方法である。その一部は既に報告⁽¹⁰⁾したが更に追試をしたのでその結果を示す。即ち Fig. 4 の如くである。即ちグルクロン及びグルコースは特異の曲線を示さない。吸光度も極めて弱い。然るにキシロースは $510\text{m}\mu$ に最大吸収を有する山形曲線をえがいている。ガラクトースは $600\text{m}\mu$ 附近に小さいピークを持つているが波長の増大とともに減少する曲線をえがく。キリンサイ粘質物水解中和原液からの酸性糖区分及び原液の濾紙クロマト（帯状展開）から得られたキシロース、グルロン混合区分の温浸液即ちいわゆるキシロース部は何れも特異の曲線をえがかなかつた。

(6) **Carbazol 反応** 濃硫酸溶液に試料を加え（氷水中で）次に Carbazol の Alcohol 溶液を加えて発色せしめこれを比色する方法であるが、その吸収曲線は Fig. 5 に示す如くである。色は濃淡はあるが何れも赤紫色を呈する。即ち何れも $540\text{m}\mu$ 附近に最大吸収を有する山形曲線で、同一濃度ではグルクロンの吸光度が最も大きく、グルコース、ガラクトース、キシロースの順に小さい。しかし糖混合液から本法によるグルクロンの同定は不可能と考えられる。

要 約

キリンサイ粘質物の Ba 塩の硫酸水解液から得られた糖原液中の酸性糖区分をイオン交換樹脂を用いて分離し、この区分中のグルクロン又はその遊離酸を確認するため、グルクロン酸呈色反応の主なものについて純品と比較しながら検討した。結果は次の如くであつた。

(1) 糖混合液からグルクロンの微量検出及び定量に最も有効な反応は WILLIAMS の反応であつた。この反応を応用してキリンサイ粘質物からの酸性糖区分にはグルクロン又はその遊離酸が存在しその量は水解中和原液中の乾物に対し 3.27% という結果を得た。

(2) DISCHE の Thioglycolic acid 反応も亦グルクロンの検出に有効であつたが、濃硫酸処理をするためあらわれる色調に変動を生じやすいので定量には不向きであつた。Cysteine 反応は明らかに陰性であつた。

(3) TOLLENS の Naphthoresorcinol 反応は Benzol 抽出が困難でかつ完全に行われないので定量には不向きであるがグルクロンの吸収曲線は $559\text{m}\mu$ に最大吸収を有する特異曲線をえがくので、このことからグルクロンの検出は可能であるが鋭敏度は WILLIAMS 反応より劣る。

(4) JARRIGE の反応は反応生成物が濁濁するので吸光度の測定ができなかつた。

(5) Carbazol 反応は同一濃度でその吸光度に差はあるが、何れの糖も同一曲線をえがくので混合糖液からのグルクロン検出は困難と思われる。

結局、WILLIAMS, DISCHE, 及び TOLLENS の Naphthoresorcinol 反応から、キリンサイ粘質物中にグルクロン（又はグルクロン酸）が少量存在することを確認することを得た。

文 献

- 1) 荒木長次：日化誌，**58**，1214 (1937)。
- 2) 勝浦嘉久次，鈴木昭三郎：工化誌，**59**，1067 (1956)。
- 3) 中村武彦：日水会誌 **23**，647 (1958)。
- 4) 東京大学：“実験農芸化学”下巻，初版，朝倉書店，東京 (1932)，p. 393。
- 5) 赤堀四郎：“酵素研究法”第Ⅲ巻，初版，朝倉書店，東京 (1957) p. 658。
- 6) Z. DISCHE: *J. Biol. Chem.*, **171**, 725 (1947)。
- 7) Z. DISCHE: *Arch. Biochem.*, **16**, 409 (1948)。
- 8) G. GURIN and D. B. HOOD: *J. Biol. Chem.*, **131**, 211 (1939)。
- 9) 中村武彦：日水会誌 **21**，1057 (1956)。