196. 平坂義信, 助川満男: グルクロン酸とグルコースとの α (1, 4) 重合体に関する
研究 (第5報^{*1}) ポリウロン酸中のウロン酸残基の新定量法と
その硝酸酸化デンプンへの応用

Yoshinobu Hirasaka and Mitsuo Sukegawa: Studies on the α (1, 4) Polysaccharides
of Glucuronic Acid and Glucose. V. A New Method to Determine the
Uronic Acid Residues in Polyuronic Acids and its Application
to the Nitric Acid Oxidized Starches.

(Research Laboratory, Ukima Plant, Chūgai Pharmaceutical Co., Ltd.*2)

A new method for the determination of uronic acid residues in polyuronic acids and apparatus for this determination are proposed. It has been found that acid hydrolysis of uronic acids with 14% hydrochloric acid produced a definite quantity of furfural and the fact was utilized for the present determination. In this method, polyuronic acid is decomposed with acid and furfural formed is continually extracted with xylene. The amount of uronic acid residues is calculated from the total amount of furfural formed. Satisfactory results were obtained by the application of this method to alginic acid, pectic acid, 4-O-(α -D-glucopyranosiduronyl)-D-glucose, and 4-O-(α -D-glucopyranosiduronyl)-D-glucuronic acid.

The hitherto used method of this determination requires complicated apparatus for carbon dioxide generation and 500 mg. of the sample. This method could not be applied to nitric acid-oxidized starch because it contained an oxo structure which tended to undergo decarboxylation. The present proposed method requires only a simple apparatus and only 5~10 mg. of the sample, and can also determine glucuronic acid residues in the nitric acid-oxidized starch. This has enabled calculation of the amount of glucuronic acid residues in the oxidized starch which could not be determined in the past.

(Received June 19, 1963)

従来, ポリウロン酸中のウロン酸残基の測定に, ウロン酸が酸分解で定量的に炭酸ガスを発生する性質を利用した炭酸ガス発生法が広く応用されてきた。¹⁻⁵⁾

しかしこの定量法は, 一般に精度を期するほど精巧な装置を必要とし, また測定誤差が大きいので通常試料を約 500 mg. も必要とするという欠点がある。

さらに重合体が分子内に, 酸分解によって酸性ガスを放出する構造部分を有するときは, この定量法は適用できない。とくに酸化デンプンや酸化セルロースは分子内に, 脱炭酸性を有するカルボニル構造を多く含んでいるために炭酸ガス発生法は適用できず,⁶⁾ グルクロン酸残基の定量法としてこれにかわるべき定量法はいまだ全く提出されていない。

そこで著者等はウロン酸を酸分解するときに生成するフルフラールを定量に应用し得る可能性を吟味した。

まず, 石舘, 尾張等⁷⁾ はグルクロン酸の定量法として, 試料を常に一定条件で酸分解して生成するフルフラールを測定する方法を報告した。もちろんフルフラールは同じ酸分解条件下でさらに崩壊する性質があるから, この方法の適用範囲は, グルクロン酸自体あるいは加水分解を容易に受けてグルクロン酸になり得る誘導体に限ら

*1 第4報: 本誌, 83, 976 (1963).

*2 Ukima-cho, Kita-ku, Tokyo.

1) R. W. Kerr: J. Am. Chem. Soc., 72, 816 (1950).

2) J. W. Mensh, E. F. Degering: Proc. Indiana Acad. Sci., 55, 69 (1945).

3) K. U. Lefèvre, B. Tollens: Ber., 40, 4513 (1907).

4) Whistler: J. Research Natl. Bur. Standards, 24, 13 (1940).

5) T. P. Nevell: J. Textile Inst., 42, T91 (1951).

6) 今井: 本誌, 81, 1109 (1961).

7) 石舘, 尾張, 木下: 本誌, 80, 1433 (1960).

れていて、加水分解に抵抗するポリウロン酸には一律に適用できない。

また Reeves 等⁸⁾ はキシロースの定量に際し、酸分解液にキシレンを層積すると、生成するフルフラールがキシレン層に移行するので崩壊を防止できると報告した。しかし追試の結果 Fig. 1 に示すように、14% 塩酸使用の場合比較的良好な結果を得たが、4 時間以上の加熱では明らかに無視できないフルフラールの崩壊を示した。このことはフルフラールがキシレンと塩酸間での分配係数にしたがって溶解し、かつ塩酸中のフルフラールが経時的に崩壊するから当然のことである。

そこで著者等は酸分解で生成するフルフラールを連続的に抽出して反応系外へ移行させ崩壊を防止するために Fig. 2 の装置を考案した。すなわち、試料の酸分解と同時にキシレンを適度の速度で流し、生成フルフラールを含んだキシレン溶液を一定時間ごとにサイフォンを利用して受器内で捕捉した。

まず盲検としてフルフラール一定量を含んだ 14% 塩酸を用いてこの装置でキシレンによる抽出効果を調べたところ、Fig. 5 に示すように極めて良好な抽出率を示した。

つぎにグルクロン酸、マンニユロン酸、ガラクトロン酸を酸分解してフルフラール生成率を求めたところ (Fig. 6)、理論値に対して常にはば一定した値を示し、平均としてそれぞれ 33.7, 30.1, 35.4% であった。キシレン溶液中のフルフラールの定量には、Rice の試薬⁹⁾ を用いた。

Fig. 1.

Formation of Furfural from Glucuronolactone and its Stability in Xylene—various Concentrations of Hydrochloric Acid

① 15.3%	② 14.0%
③ 13.2%	④ 10.0% HCl

Fig. 2.

Apparatus for Continuous Extraction of Furfural formed from Polyuronic Acid by Acid-Decomposition

① reaction mixture
② oil-bath
③ heater
④ xylene
⑤ 14% HCl
⑥ glass-tube with a branch
⑦ siphon
⑧ cooler
⑨ receiver
⑩ ice-water

Fig. 3 は、すでに合成した 4-O-(α -D-glucopyranosiduronil)-D-glucose, 4-O-(α -D-glucopyranosiduronil)-D-glucuronic acid, およびグルクロン酸とグルコースとの α (1, 4) 多糖類、アルギン酸、ペクチン酸などの中

8) R.E. Reeves, J. Munro : Ind. Eng. Chem., 12, 551 (1940).

9) E.W. Rice : Anal. Chem., 23, 1501 (1951).

ウロン酸残基量を Fig. 2 の装置を用いて測定した結果を示したものである。

このうちアルギン酸の場合もっとも長時間を要し(16 時間), 対照的にペクチン酸では短時間(4 時間)でフルフラール生成量が一定して, グルクロン酸の重合体はその中間の値を示した。このフルフラールの経時的生成速度はある程度重合体の(1, 4)結合の加水分解に対する性質の相異をあらわしているものと考えることができる。

Fig. 3.
Recovery Test of Uronic Acid Residues in Polyuronides by our Method

- alginic acid
- △—△— pectic acid
- 4-O-(α -D-glucopyranosiduronyl)-D-glucuronic acid
- 4-O-(α -D-glucopyranosiduronyl)-D-glucose
- ×—×— α (1, 4) polysaccharide containing about 50% glucuronic acid residue

とくに Table I に示すように, 第4報で合成したグルクロン酸とグルコースとの α (1, 4) 多糖類中のグルクロン酸残基量は, 本定量法による場合とアルカリ滴定法による場合とで測定値がよく一致した。

つぎに本定量法を硝酸酸化デンプンに応用した結果, Table I に示すように, 従来実施されてきた炭酸ガス発生法ならびにアルカリ滴定法はともに本法による定量値よりはるかに大きな値を示した。

この事は第1報でも触れたように,¹⁰⁾ 炭酸ガス発生法では分子内カルボニル基の存在による誤差, アルカリ滴定法には非ウロン酸性カルボン酸による誤差が含まれるため当然考えられることである。

また本定量法は装置も小さく, 簡単に操作し易く, 試料も炭酸ガス発生法の約 1/50 の 5~10 mg. で十分である。

Table I. Determination of Glucuronic Acid Residues in various Kinds of Oxidized Starches (Values show the weight percentage of anhydro-glucuronic acid)

Oxidized starches	CO ₂ evolution method	Alkali-titration method	This proposed method
1	25.7	26.6	26.1
2	41.2	40.3	40.9
3	50.7	50.6	49.8
4	73.0	52.1	47.5
5	84.6	61.3	49.2
6	96.7	72.4	49.0

1~3 were prepared by KMnO₄ or CrO₃-KMnO₄ oxidation of (poly 2,3-acetyl)amylose.

4, 5 were prepared by Heyn's method.

6 was prepared by NO₂ oxidation of amylose.

実 験 の 部

装置および操作 装置中 furfural の通路はすべて濃褐色にし, 摺り合わせ部分は大成化学のエーテル摺りによった。

Fig. 2 の ① に試料 5~10 mg. を精秤し, 14% HCl*³ 2 ml. を加えて溶解し, xylene を約 10 ml. 層積させて油浴 ② を 110~115° に加熱する。同時に ④ の分液ロートから xylene を通常 40 ml./60 min. の速度で落下させる。furfural を溶解した xylene は一定時間ごとに siphon ⑦ によって受器 ⑨ に捕捉される。

Xylene 溶液中の furfural の比色定量 Rice⁹⁾ の報告に準拠する。furfural 0.9~6 γ /ml. を含む xylene

*³ 市販特級濃 HCl 100 ml. と水 180 ml. とを混合する。

10) 平坂: 本誌, 83, 960 (1963).

溶液 1 ml. を褐色試験管にとり、*p*-bromoaniline 試薬^{*4} 5 ml. を加えて室温 40 min.^{*5} 放置後、520 m μ で吸光度を測定する。Rice によれば、等間隔目盛にとった % transmittance と対数目盛にとった濃度との間において furfural 濃度が上記範囲内にあるとき直線関係が成立し、その間では比色定量の相対誤差はすべて一定であって、比色計の読みの誤差 1% に対して 3.2% である。

Furfural 生成量の計算法 比色定量の相対誤差を一定にするために xylene 抽出液中の furfural 濃度が各 fraction とも上記 0.9~6 γ /ml. に調製できるように、Fig. 2 の受器 ⑨ で捕捉された xylene 溶液をつぎのように処理した。まずほぼ一定時間ごとに受器に捕捉される xylene 溶液の fraction 1, 2, ..., *i* (*i* は正の整数) の体積を $V_1, V_2, \dots, V_i$ (ml.) とし、そのなかの furfural 濃度を $f'_1, f'_2, \dots, f'_i$ (γ /ml.) とする。一方、fraction 1, 2, ..., *i* から一定量ずつを分取して Fig. 4 に示すように累積して $T_1, T_2, \dots, T_i$ の各混液を作り、このなかの furfural の濃度 $f_1, f_2, \dots, f_i$ (γ /ml.) を実測する。すると一般に

$$f'_i = if_i - (i-1)f_{i-1}$$

なる関係が成立し、fraction *i* までに抽出された furfural 全量 $\sum F_i$ は

$$\sum F_i = \sum F_{i-1} + V_i[if_i - (i-1)f_{i-1}]$$

であらわされる。また

$$\sum F_1 = V_1 f_1$$

であるから、こうして furfural 生成量を求めることができる。

Fig. 4.

Fig. 5. Extraction of Furfural in 14% Hydrochloric Acid Solution with Xylene

Furfural の連続抽出試験 furfural 865.0 γ を溶解した 14% HCl 2 ml. を Fig. 2 の装置の ① に入れ、xylene を毎分 24 滴の速度で滴下して furfural の抽出を試験した。Fig. 5 はその回収率である。また Table II 中の a) 印は実測をあらわす。

Table II.

Fraction No.	V_i (ml.) ^{a)}	f_i (γ /ml.) ^{a)}	if_i	$if_i - (i-1)f_{i-1}$	$V_i[if_i - (i-1)f_{i-1}]$	F_i
1	37.5	1.70	1.70		637.0 (γ)	637.0 (γ)
2	33.5	3.35	6.70	5.00	167.5	804.5
3	31.0	2.60	7.80	1.10	34.2	838.7
4	31.0	2.07	8.28	0.48	14.9	853.6
5	30.5	1.69	8.45	0.17	5.2	858.6
6	31.5	1.41	8.46	0.11	3.5	862.1
7	33.0	1.21	8.47	0.01	0.3	862.4

a) found.

各 Uronic acids からの furfural 生成率 glucuronic, mannuronic, galacturonic acid 約 4 mg. を精秤して 14% HCl 溶液 2 ml. に溶解し、xylene の滴下速度を 40~50 ml./hr. とした。結果を Fig. 6 に示す。どの uronic acid の場合も約 4 hr. の加熱で furfural の生成量は一定し、5 回の平均値はそれぞれ 33.7, 30.1, 35.4% であった。

^{*4} 特級 AcOH 1 L. に thiourea 50 g. を加えて室温 3 hr. 攪拌後一夜静置して、その上澄液 950 ml. に *p*-bromoaniline 20 g. および水を加え、全量を 1 L. とする。

^{*5} 40 min. のとき最高の吸光度を示した。

Fig. 6.
Rate of Formation of Furfural from
Uronic Acids

I : glucuronic acid
II : mannuronic acid
III : galacturonic acid

合成した $\alpha(1, 4)$ 多糖類中の glucuronic acid 残基量の測定 (poly 2,3-acetyl)amylose の $\text{CrO}_3\text{-KMnO}_4$ 酸化によって合成した glucuronic acid と glucose との $\alpha(1, 4)$ 多糖類 8.685 mg. を精秤して 14% HCl 2 ml. に溶解し, xylene の滴下速度を 30~40 ml./hr. とした. 得られた結果を Table III に示す. furfural の全生成量は 805.2 γ であった. glucuronic acid からの furfural 生成率を 33.7% として計算すると, glucuronic acid 量は

$$8.685 \times \frac{96.08}{176.13} \times 0.337 \times x = 805.2 \times 10^{-3}$$

$$x = 0.5043$$

50.4% である.

Table III.

Fraction No.	V_i (ml.) ^{a)}	f_i (γ /ml.) ^{a)}	if_i	$if_i - (i-1)f_{i-1}$	$V_i[if_i - (i-1)f_{i-1}]$	F_i
1	25.0	10.0	10.00		250.0	250.0
2	27.0	8.35	16.75	6.74	181.8	431.8
3	27.5	7.99	23.97	7.27	199.8	631.6
4	27.5	6.74	26.96	3.00	82.4	721.0
5	26.0	5.71	28.55	1.55	40.3	761.3
6	25.5	4.92	29.52	0.99	25.3	786.6
7	28.0	4.31	30.17	0.65	18.2	804.8
8	25.5	3.79	30.32	0.16	0.4	805.2

a) found.

本研究に際し, 終始御懇篤なる御指導を賜った東京大学薬学部 石館守三名誉教授, 田村善蔵教授, 多くの御助言を賜った南原利夫助教授, 常に御激励を賜った弊社 林 茂常務取締役, 今井祐次工場次長に厚くお礼を申し上げます.

中外製薬株式会社浮間工場