

小瀬洋喜, 池田 坦; 濾紙電気泳動法の衛生化学への応用研究 (第3報)\*  
 ウロン酸類の分離について

Yōki Ose and Taira Ikeda: Hygenic Chemical Analysis by Paper  
 Electrophoresis. III. Separation of Uronic acids.

Glucuronic acid, galactouronic acid and glucosamine were separated by paper electrophoresis in borax solution (M/20) mixed with M/5 boric acid (11:9). But galactouronic acid and chondroitin-sulfuric acid could not be separated in this condition.

### 1. 緒 言

ウロン酸類は植物成分として各種の植物に含まれ、食品中にもこれを比較的少量に含むものがある。ウロン酸類は体内代謝において重要な役割を果すことが知られて以来、その生化学的意義が重視されるようになってきた。ウロン酸類に共通する検出反応はあるが、ウロン酸の各々のもの、例えばグルクロン酸に特有の化学反応で、容易に行えるものはない。またイオン交換樹脂、パーパークロマトグラフィー<sup>1)</sup>による分離は行われているが、これらの方法はかなり長時間を必要とする。濾紙電気泳動は一般に目的物質を迅速に分離、確認するのに用いられるが、濾紙電気泳動をウロン酸類の分離に応用した例はまだ報告されていない。そこで筆者らは濾紙電気泳動法によってウロン酸類を分離、確認する目的で本研究に着手した。

濾紙電気泳動による糖類の分離においては泳動液としてホウ酸溶液またはホウ砂溶液<sup>3)</sup>が使われているので、これをウロン酸類の分離に用いてみた。使用したウロン酸類はグルクロン酸、ガラクトロン酸、グルコサミン、コンドロイチン硫酸の4種である。その結果ホウ酸、ホウ砂をそれぞれ単独に用いての泳動では分離能がよくなかったが、ホウ酸ホウ砂混合液による各種 pH での分離実験を行った結果、M/20 ホウ砂 11 容、M/5 ホウ酸 9 容、pH9.2 の混合液を使うと明確な分離の可能であることが判明した。

### 2. 実験方法及び実験材料

#### (1) ウロン酸の顕色法

グルクロン酸、ガラクトロン酸、グルコサミンにはアニリンフタル酸混合物<sup>4)</sup> (Aniline hydrogen phthalate) を顕色試薬として用いた。本試薬は 100cc の水飽和 *m*-ブタノール 930mg のアニリンおよび 1.6g のフタル酸を加えたものである。試薬噴霧後 105° で 5 分間加熱する。硫酸コンドロイチンは顕色試薬としてベンチジン試薬<sup>5)</sup>を用いた。

#### (2) 濾紙電気泳動

装置は第1報に報告した氷冷式装置を用いた。電極は白金、電解液は1%塩化カリウム、寒天ブリッジは1%塩化カリウムを含む3%寒天、濾紙は東洋濾紙 No.50 を 12.5×40cm としたものを、試料に用いたグルクロン酸は中外製薬の注射液、D-Glucosamine Hydrochloride は石津製薬、ガラクトロン酸および硫酸コンドロイチン

\*小瀬, 池田: 日本薬学会東海支部 1958年 9月例会講演.

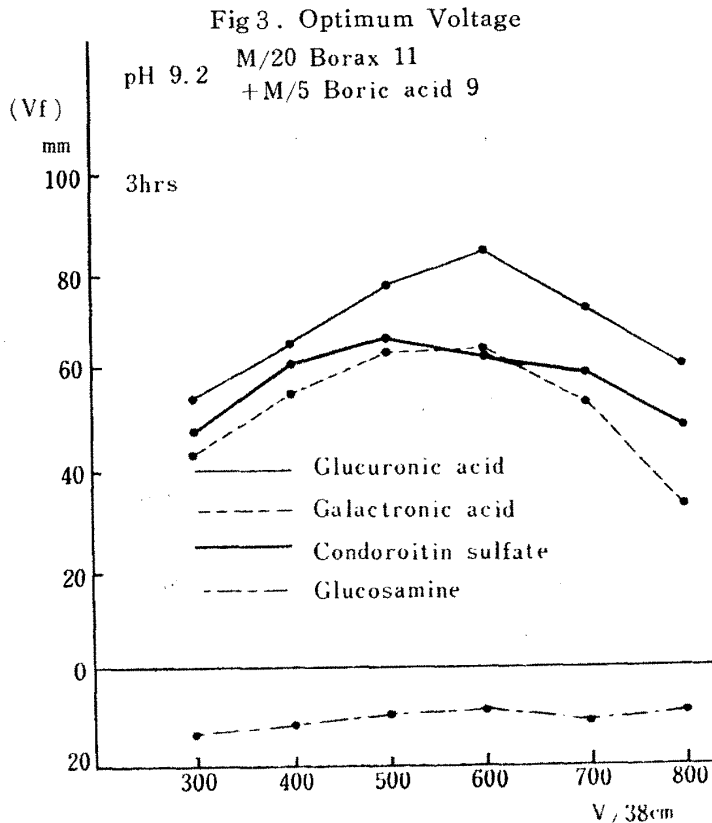
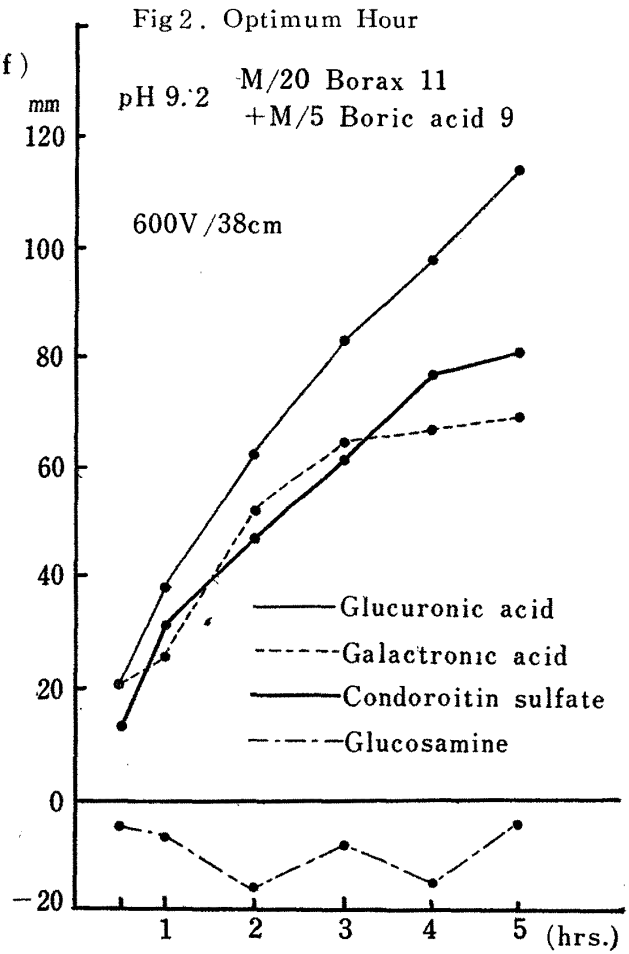
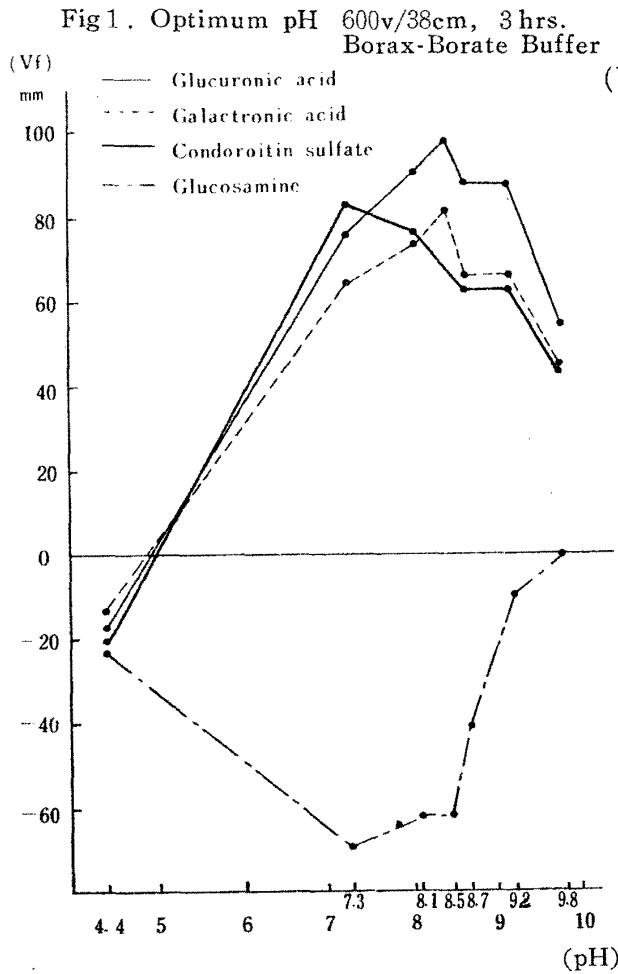
1) “第3回グルクロン酸研究会報告集講演内容抄録”1 (1957).

2) 桑田智: “続クロマトグラフィー”(I) 147 (1957) (広川書店).

3) 小林, 森: “濾紙電気泳動法の実際”(1956) (南江堂).

4) Partridge: Nature, 164, 443 (1949).

5) Horrocks: Nature, 164, 444 (1949).



は和光純薬の市販品である。これらの10mg/ccの水溶液を0.01ccずつマイクロピペットで点滴し、泳動液はM/20 ホウ砂X容にM/5 ホウ酸Y容を加えてそのpHをpHメーターで測定した。泳動液は1回毎に新製して用いた。

所定条件で30分空泳動をさせてから泳動試料を濾紙上に点滴して泳動させ、泳動終了後直ちに赤外線乾燥器中で乾燥してから顕色させた。

### 3. 実験結果

1) 至適 pH: 15.8V/cm (600V/38cm), 3時間の泳動をさせた結果は Fig. 1 のように pH4.4 (M/5 ホウ酸) では泳動値が小さく、いずれも (-) 側へ移動する。また pH 9.8 (M/20 ホウ砂) では pH4.4 より泳動値

Fig 4. Optimum Current

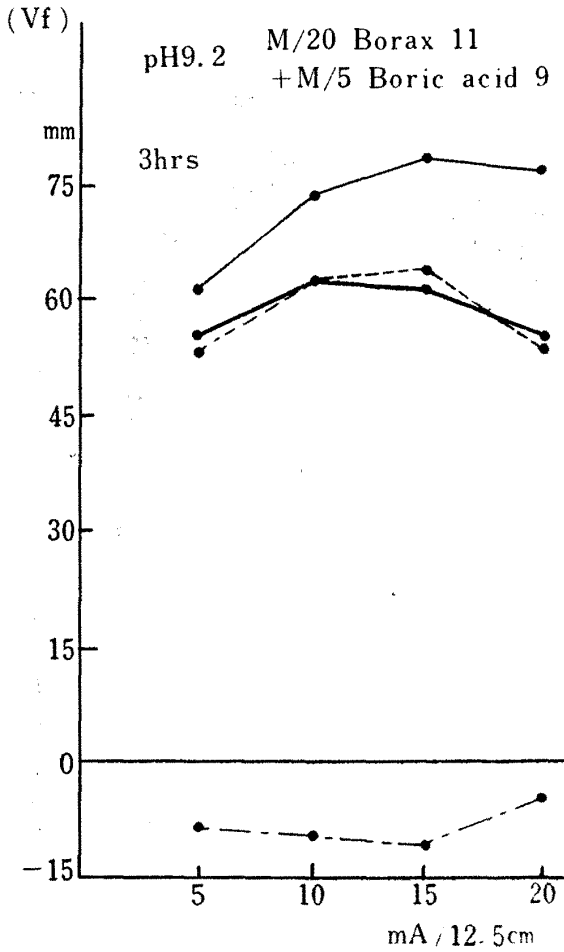
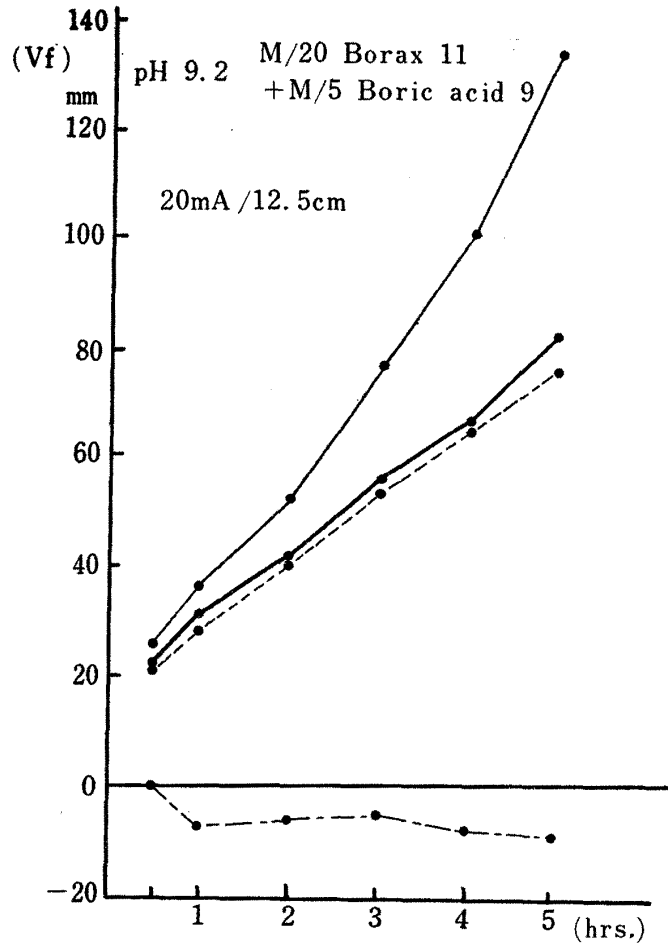


Fig 5. Optimum Hour



は大きい、各々の分離が不十分である。pH8.1~9.2の間では著しい差異を認めることはできなかったが、pH9.2が最も良好であった。

Table 1  
pH9.2, 600V/38cm, 4 hrs.

	Glucuro- nic acid	Galactro- nic acid	Condoroi- tin Sulfate	Glucos- amine
n	10	10	5	10
S	8.37mm	6.15	9.18	-3.82
Vf	101.7 ±2.8mm	70.3 ±2.1	73.6 ±4.6	-16.7 ±1.3

Table 2  
pH9.2, 20mA/12.5cm, 4hrs.

	Glucuro- nic acid	Galactro- nic acid	Condoroi- tin Sulfate	Glucos- amine
n	10	10	9	10
S	8.98mm	5.72	99.9	-9.11
Vf	104.8 ±3.0mm	65.9 ±1.9	65.2 ±3.5	-8.8 ±3.0

2) 至適時間 (定電圧) : 600V/38cm で pH9.2 について時間と泳動値との関係を検討した結果, Fig. 2 のようであった。pH9.2, 4 時間でグルクロン酸, ガラクトロン酸, グルコサミンの分離が完全であることがみとめられた。いずれの場合でもガラクトロン酸と硫酸コンドロイチンの分離は不完全であった。

3) 至適電圧: pH9.2, 3 時間で泳動させたところ Fig. 3 のように, 600V/38cm が至適電圧であった。800V/38cm は図で見ると分離がよいように見えるが, 再現性がよくない。

4) 至適電流: pH9.2, 3 時間で泳動させたところ Fig. 4 のように, 20mA/12.5cm における分離が最もよかった。

5) 至適時間 (定電流): 20mA/12.5cm, pH9.2 に

ついて時間と泳動値との関係を検討した結果, Fig. 5のように4時間で完全に分離した. この場合もガラクトロン酸と硫酸コンドロイチンの分離は悪い.

6) 再現性: 以上によって求めた分離の至適条件につきくり返して実験を行った結果は, Table 1, 2のごとくでその再現性は大きいと考えられる.

#### 4. 考察および要約

1. ウロン酸類を迅速に分離, 確認するために, 検体を濾紙電気泳動にかけ, 適当な試薬で発色させることを行った.

2. 分離の至適条件は泳動液が M/20 ホウ砂11容, M/5 ホウ酸9容の混合液 (pH9.2) であって, 泳動条件が 600V/38cm, または 20mA/12.5cm で4時間の場合である. この際の泳動値を Table 1, 2に示す.

3. 分離の至適条件ではグルクロン酸, ガラクトロン酸, グルコサミンの三者の分離は完全であるが, しかしガラクトロン酸と硫酸コンドロイチンの分離は不完全である.

4. ガラクトロン酸と硫酸コンドロイチンの分離を完全にすることが今後に残された問題と考えられる.

本研究に対して終始御鞭撻を賜った学長宮道悦男博士, pH測定に便宜を与えられた本学分析化学教室に厚く御礼申し上げる.