

ペクチンの比色定量法

古谷, 貞治
九州大学農学部食品分析学教室

箴島, 豊
九州大学農学部食品分析学教室

<https://doi.org/10.15017/22953>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 22 (1), pp. 35-44, 1965-10. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :

ペクチンの比色定量法

古谷 貞治, 箴 島 豊

Colorimetric estimation of pectin

Sadaji Furutani and Yutaka Osajima

ペクチン質は細胞膜の充填物質あるいは接合物質として植物界に普遍的に存在し、果実、根のような柔組織に特に多い。動物組織のヒyaluron酸と同じような役割を果たすものと考えられ、果実等の品質、味、鮮度等に大きな影響を及ぼすものと推定される。化学的には、D-ガラクトロン酸の高度脱水縮合物であり、そのカルボキシル基は部分的にメチル基とエステルを形成している。

ペクチンは一般的にはゼリー形成剤として古くから知られ、食品化学工業上重要な地位を占めるばかりでなく、糖酸化物の直鎖状ポリマーとして糖化学の上からもその研究はきわめて重要な意味を有している。定量法としてはカルシウム塩法 [Lawrence 等 (1954), Cultrera 等 (1954)], ペクチン酸沈澱法 [A. O. A. C. (1960)], 炭酸ガス発生法 [Tracey (1948), Taylor 等 (1947), Ogston 等 (1951), 町田 (1953)], 光学的方法 [McCready 等 (1951)] 等が知られている。カルシウム塩法はペクチンをアルカリ処理した後、塩化カルシウムを加えて沈澱させ数日間乾燥して秤量するか、あるいは沈澱に過剰の EDTA を加え、その消費量を滴定する。A. O. A. C. 法は同じくアルカリ処理して得られたペクチン酸を酸性下アルコールで沈澱させ、乾燥、秤量する。これら二法は多量の試料を要する上に秤量までに数日間を要する。一般にウロン酸は無機酸の存在下 100°C 以上に加熱すると炭酸ガスを発生する。この炭酸ガスを適当な方法で秤量しウロン酸量を求めるのが炭酸ガス発生法である。この方法は多くの研究者によつて検討され種々の改良法が報告されているが、空気中の炭酸ガスによる汚染を除くため、およびウロン酸から発生する炭酸ガスを水蒸気、塩酸ガス等と分けて捕捉するための装置を必要とする。定量には 0.2 g 以上の試料と 4~8 時間を要する。光学的方法はガラクトロン酸の 295 m μ における吸光度を測定し、ペクチン量を求めるものであり、試料の高度の純化とペクチンのガラクトロン酸への定量的加水分解を必要とする。上述のような理由から容

易、迅速かつ多量の試料を要しない方法—呈色法の設定が要求され、多くの検討が試みられている。しかしペクチンを構成するガラクトロン酸を含めてウロン酸の示す反応には機構不明のものが多く、定量法もまた未確立のものが多く、ウロン酸の比色定量法としてはナフトレゾルシノールによる呈色反応 [Tollens 等 (1908), Hanson 等 (1944), 町田 (1953)], システイン—硫酸反応 [Dische (1948)], カルバゾール—硫酸反応 [Dische (1947), (1950)] 等が知られているが、いずれもポリウロン酸、なかんずくペクチンの定量法としては使用し得ない。

著者等はカルバゾール—硫酸反応に基礎を置き、ペクチンの分解—カルバゾール感受性物質の生成とカルバゾールの呈色反応を同時に行なう、特殊法を用いてペクチンの定量を試みた結果、ペクチン 5~80 μ g の範囲で直線を与える比色法を設定することができたので報告する。

試薬および方法

カルバゾール：市販一級品をトルオール（特級）より 2 回再結した結晶 0.2 g を特級アルコール 100 ml に溶解する。褐色ビンに入れ冷蔵庫中に保存すれば長く使用に堪える。

1:7 硫酸：水 10 ml に特級硫酸 70 ml を加える。冷蔵庫に保存すれば予冷の必要なく便利である。

ペクチン：市販ペクチン（レモン製）を乳鉢にとり少しずつ水を加えて均一に溶かし、吸引濾過により不溶物、固まりを除く。70%濃度となるよう精製メタノールを加え、生じたゲルを遠心分離（10,000 rpm×10 分）によつて集める。この操作をさらに 2 回繰り返した後、沈澱を熱 70%メタノールで 4 回、続いて熱 80%エタノールで 2 回、70%エタノールで 2 回洗う。これらの操作により混在するアラバンその他の不純炭水化物を除く。アルコール濃度を 80%, 85%, 90%, 95%, 無水と徐々に上げ、洗浄を繰り返して脱水し、最後にエーテルで洗い乾燥する。

ペクチン酸：市販ペクチン 10g を乳鉢にとり、0.1 N 苛性ソーダを少量あて加えて磨砕溶解し 0.1 N 苛性ソーダを加えて 1ℓ とする。40°C に 30 分間温めて脱エステル後、塩酸を加えて pH=1 とし生じたゲル状沈澱を遠心分離 (6,000 rpm×10 分) して集める。pH=1.5 塩酸溶液で 2 回、60% アルコールで 1 回、70% アルコールで 2 回洗浄する。最後にアルコール、エーテルで脱水乾燥する。

D-ガラクツロン酸：市販一級品 (茶褐色) を水に溶かし活性炭を加えて脱色濾過する。無色透明な濾液に僅かな濁りを生ずる程度にアルコール (特級) を加え 50°C 以下で減圧濃縮する。温度が高いと着色する。数滴のアルコールの添加で白濁するようになるまで濃縮後アルコールを加えて冷蔵庫中に放置する。得られた D-ガラクツロン酸一水加物 $C_6H_{10}O_7 \cdot H_2O$ は美麗な針状結晶であり、105~110°C で軟化融解し 153°C で茶褐色カラメル化して分解する。

その他の試薬は市販品を特別に精製することなく使用した。

測定法：供試液 0.5 ml に予め氷冷した希硫酸 6 ml とカルバゾール溶液 0.2 ml を氷冷しながら加えよく

振盪する。加温発色後、流水で冷却し日立分光光度計 10 mm のセルを用いて 525 m μ の吸光度を求めた。

結果および考察

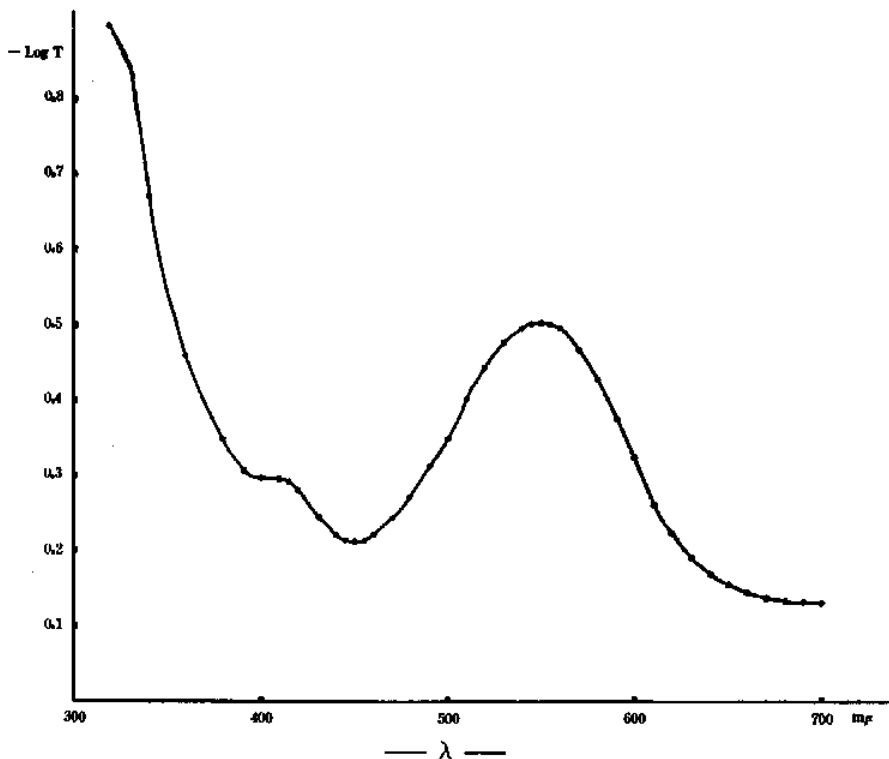
I) ペクチン—硫酸—カルバゾールの吸収スペクトル

第 1 図に木比色法による発色物の可視部吸収スペクトルを示す。吸収極大値は 525 m μ に存在する。

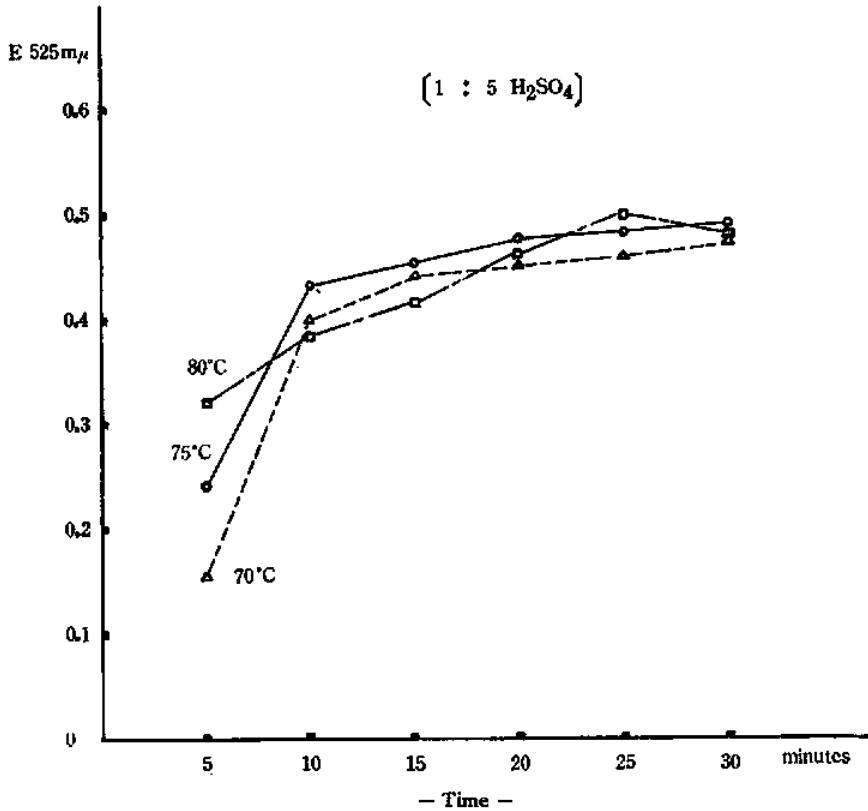
II) 硫酸濃度と発色温度および反応時間

1:5, 1:6, 1:7, 1:8 硫酸を用いた場合の反応温度と発色に要する時間の関係調べた。

第 2 図から第 6 図までに示したようにペクチンからカルバゾール感受性物質の生成、続いてのカルバゾールとの呈色反応には硫酸の濃度、反応温度、加温時間の三者がそれぞれ因子となる。すなわち硫酸濃度が高い程一定値に達するに要する時間は短縮される。しかし硫酸濃度がより高くなり 1:8 となると一定の発色値を示さなくなり (漸次増大)、1:9 および 0:10 (濃硫酸) を使用すると逆により低い呈色値を示し再現性にも欠けるようになる。一方温度が低いと一定の



第 1 図. 吸収スペクトル。



第 2 図。 硫酸濃度と発色温度および反応時間 (1)。

発色値を得るためにはより長い加温時間を必要とする。図から明らかなように発色温度 75°C で最も安定した呈色線を与え、1:6 硫酸では 20 分後に一定値に達し、その後 10 分を過ぎても変化しない。1:7 硫酸を使用した場合にはこれよりも 5 分間早やく、加温時間 15 分で一定値に達し、その後 25 分間加熱を続けても変化しない。70°C ではこの一定値 (-LogT=0.498) に達するには 20 分 (1:7 硫酸) ないし 25 分間 (1:6 硫酸) を要し、65°C では 30 分間の加熱を必要とする。温度を 80°C 以上にすると値に振れを生じ、発色率も低く一定しない。以上の結果から硫酸は 1:7 (水:硫酸) を用い、75°C の湯煎中で 20 分間発色させることが好ましい。

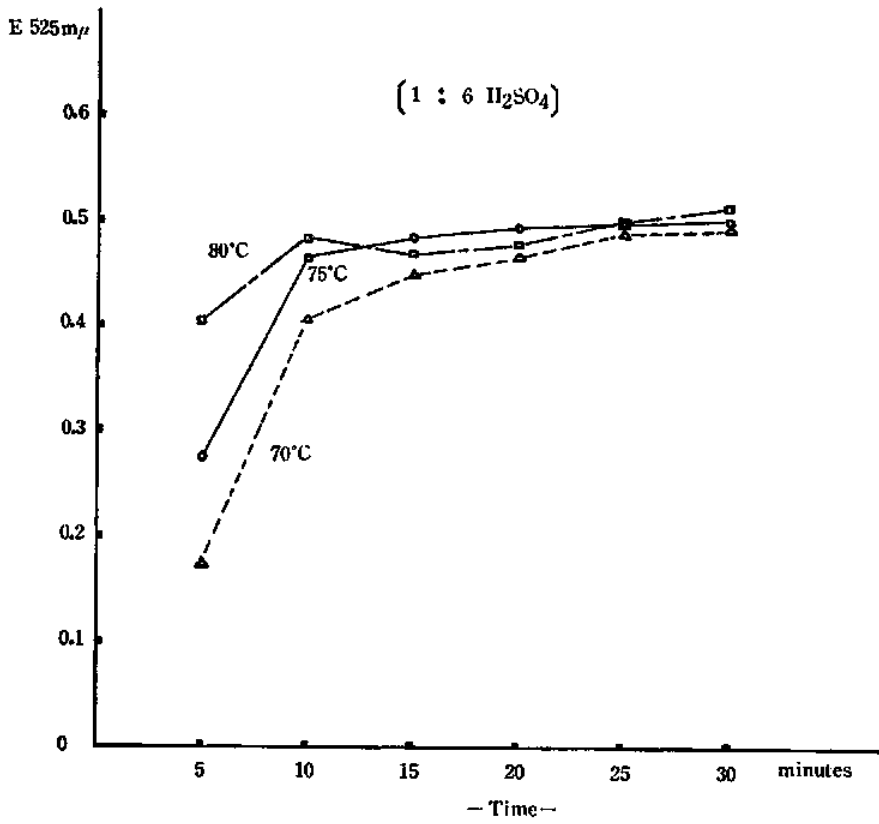
第 2~6 図の実験には供試液 0.5 ml (ペクチン 50 μg 含有) を用い総液量 6.7 ml とした。実験操作上供試液量としては 0.5 ml よりも 1.0 ml の方が有利の場合も考えられる。第 1 表は供試液量を 0.5 ml または 1.0 ml とし、各濃度の希硫酸 6 ml, 0.2 ml カルバゾール 0.2 ml を加えて 75°C, 20 分間発色させた後、0.5 ml の区のみ各濃度の硫酸 0.5 ml を加えて最終液量を 7.2

第 1 表。硫酸濃度および供試液量。

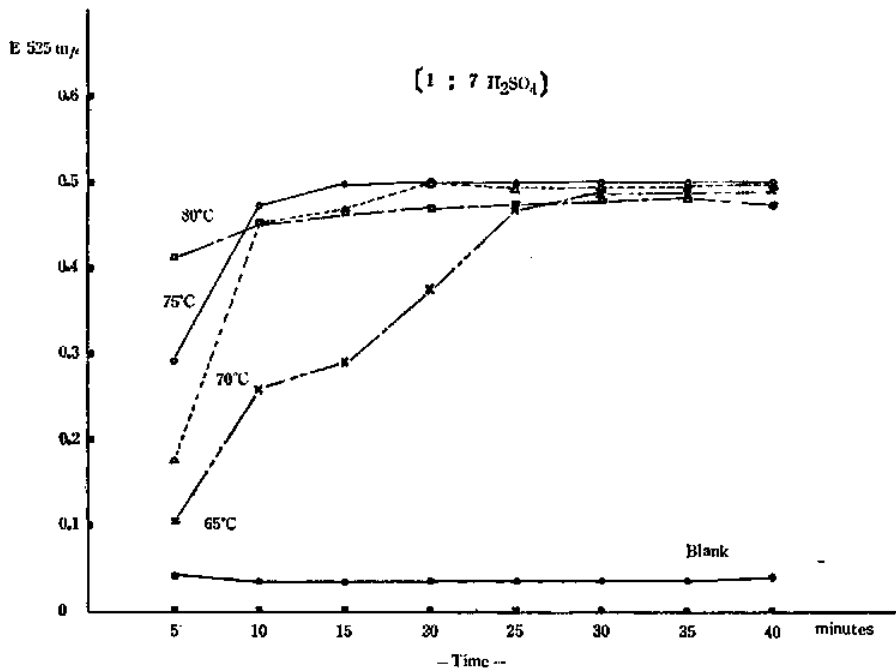
硫酸	供試液量	
	0.5 ml	1.0 ml
(水)1 : 4(硫酸)	0.398	0.248
1 : 5	0.412	0.327
1 : 6	0.428	0.367
1 : 7	0.428	0.398
1 : 8	0.427	0.410
1 : 9	0.431	0.420
0 : 10	0.280	0.336

ml としその吸光度 (-LogT) を比較した結果である。

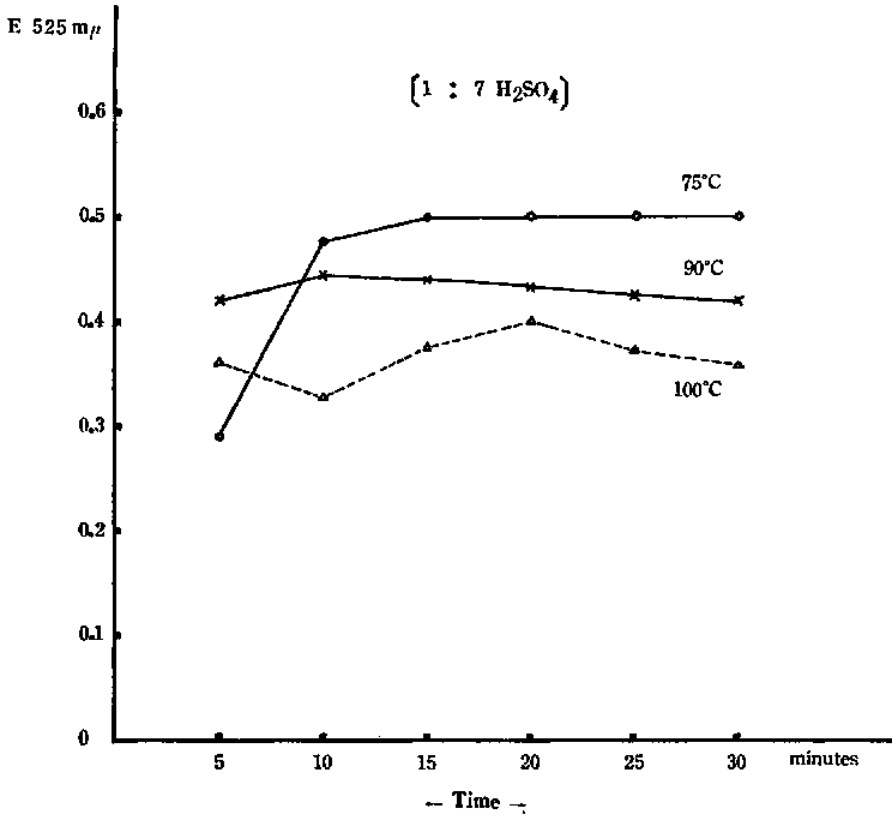
表から明らかなように供試液 0.5 ml の区では硫酸濃度が高くなるにつれて吸光度も増大し、1:6 硫酸で一定値に達し 1:8 硫酸まで変化しない。1:9 硫酸では若干増大するが、0:10 硫酸 (濃硫酸) では大幅に減退する。他方供試液 1.0 ml の区では硫酸濃度の増大につれて値も増大し、1:9 硫酸を使用の時その発色値は 0.5 ml 区の一定値 (-LogT=0.428) の 98% に達するが濃硫酸の使用によつては同じく大幅に減退する。このことは 0.5 ml 区の一定値が反応時の硫酸濃度 79% (1:6 硫酸)~82% (1:8 硫酸使用)



第 3 図. 硫酸濃度と発色温度および反応時間 (2).



第 4 図. 硫酸濃度と発色温度および反応時間 (3).



第 5 図。 硫酸濃度と発色温度および反応時間 (3)。

で得られることと相まつて、ペクチン—硫酸—カルバゾール反応には硫酸の一定濃度を必要とすることを示すものである。供試液 1.0 ml に 1:9 硫酸 6 ml を加えた場合その硫酸濃度は 77% である。したがつて、供試液 1.0 ml を用いるためには 1:7 硫酸を 6 ml ではなく 10 ml 加えなければならない。

iii) カルバゾールの濃度

ペクチン—硫酸—カルバゾール呈色反応においてはカルバゾールの量も一因子である。カルバゾールはペクチン量にはあまり関係せず 0.15% 溶液 0.2 ml 以上を必要とする。0.4% 以上の溶液を使用すると盲検値が増大するので好ましくない。

iv) 経時安定性

発色処理後 5 分から 120 分までの色調の経時変化を測定し、第 8 図の結果を得た。525 mμ における吸光値は発色後 30 分間変動せず、60 分後で 1%, 120 分後でも 1.5% 減に止まりきわめて安定であつた。

v) 定量法

以上の結果にもとづきペクチンの定量法を次のよう

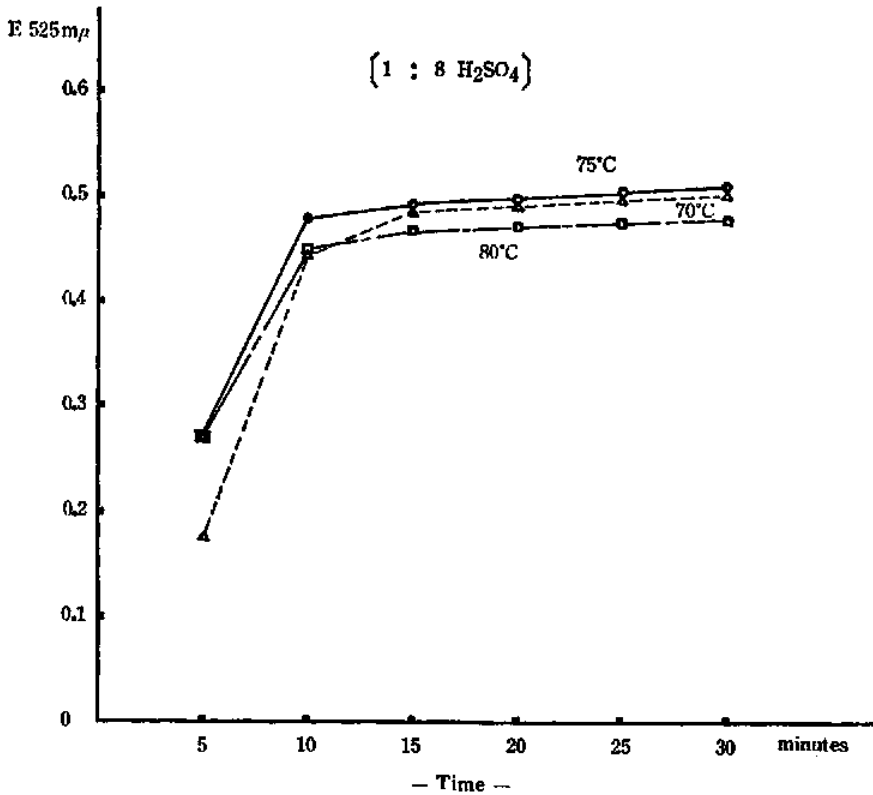
に設定した。供試溶液 (ペクチン 5~80 μg) 0.5 ml を含む試験管を氷槽に浸し、予め氷冷した 1:7 硫酸 6 ml を加え振盪する。ついで 0.2% カルバゾール溶液 0.2 ml を加えはげしく振盪する。75°C で 20 分間加熱した後、流水で冷却し、525 mμ の吸光値を測定する。盲検区は供試液の代りに水 0.5 ml を加えて行なう。供試液が着色している場合には供試液を用い、カルバゾール溶液のかわりにアルコール 0.2 ml を加えた区を使用することが好ましい。

本定量法はペクチンのほかペクチン酸、D-ガラクトロン酸の定量にも使用し得る。

vi) 関連物質の呈色

カルバゾール—硫酸反応は一般の糖にも用いられる呈色法である。本定量法による糖の呈色割合を求め第 2, 3 表の結果を得た。

単糖類、寡糖類の発色はきわめてわずかであるため試料 1,000 μg を含む供試液について試験し、D-ガラクトロン酸に対する発色比を求めた。第 2 表に示したように試験した単糖類、寡糖類の発色率はガラクッ



第6図. 硫酸濃度と発色温度および反応時間 (4).

第2表. 単糖類, 寡糖類の呈色.

名 称	呈色比	名 称	呈色比
Ribose	1.5%	Maltose	3.2%
Arabinose	1.9	Lactose	2.8
Xylose	3.9	Saccharose	6.4
Rhamnose	0.9	Raffinose	4.8
Galactose	2.2	Fructose	6.9
Glucose	3.8	Glucuronolactone	35.4
Mannose	2.1	Glucuronic acid	41.6
Sorbose	3.8	Galacturonic acid	100.0
Mannitol	0		

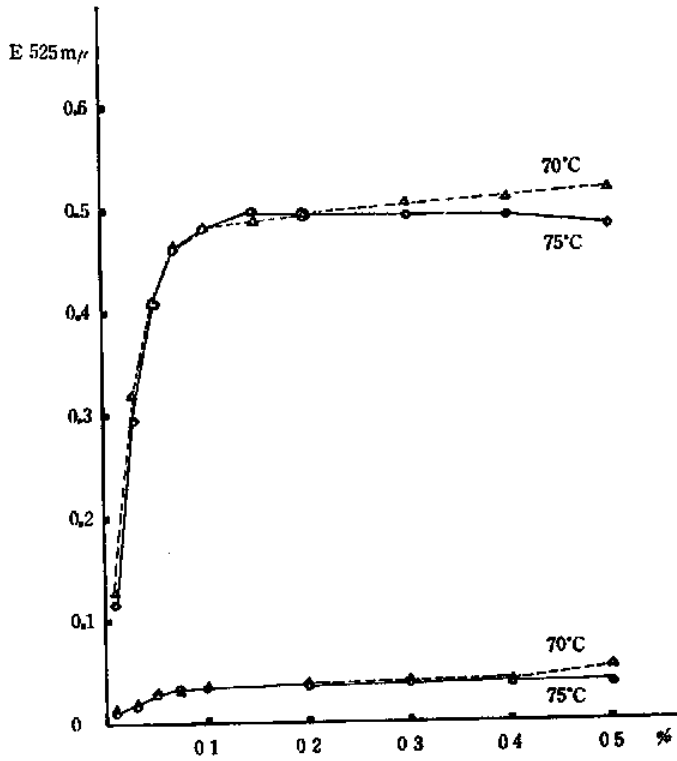
第3表. 多糖類の呈色.

名 称	呈色比	名 称	呈色比
Starch	5.5%	DNA	61.6%
Dextran	5.5	RNA	2.0
Inulin	8.9	Heparin	36.1
Araban	4.7	Chondroitin sulfate	15.8
Xylan	0	Alginic acid	23.1
Hemicellulose	2.1	Pectic acid	136.5
Glycogen	5.7	Pectin	100.0

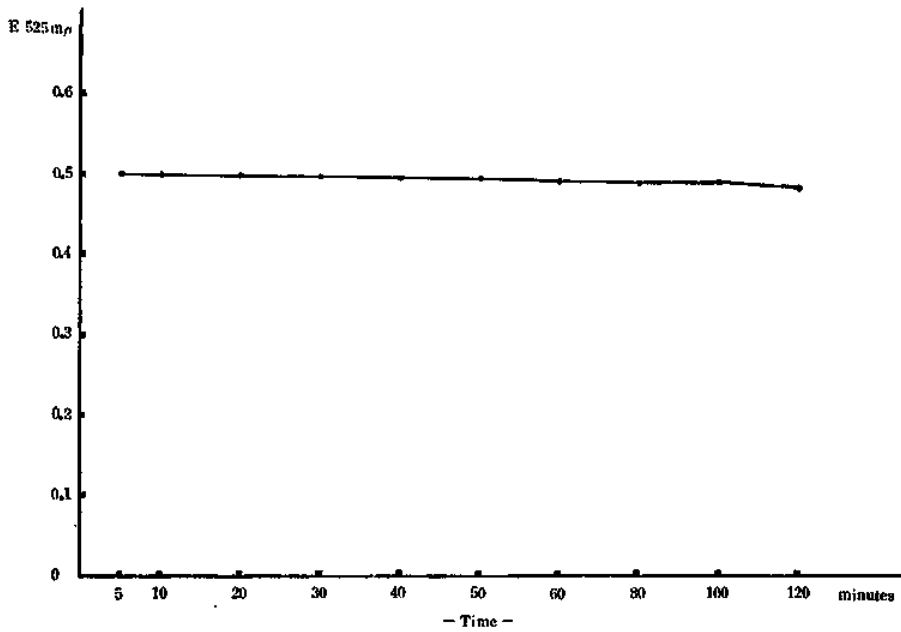
ロン酸の7%以下であり, これら妨害物濃度がいちじるしく高い場合を除いては問題とならない. 特に六員糖は茶褐色を呈し, ガラクッロン酸の美しい赤色と

は区別される. 同じウロン酸類でもグルクロン酸の発色率はガラクッロン酸の50%以下である.

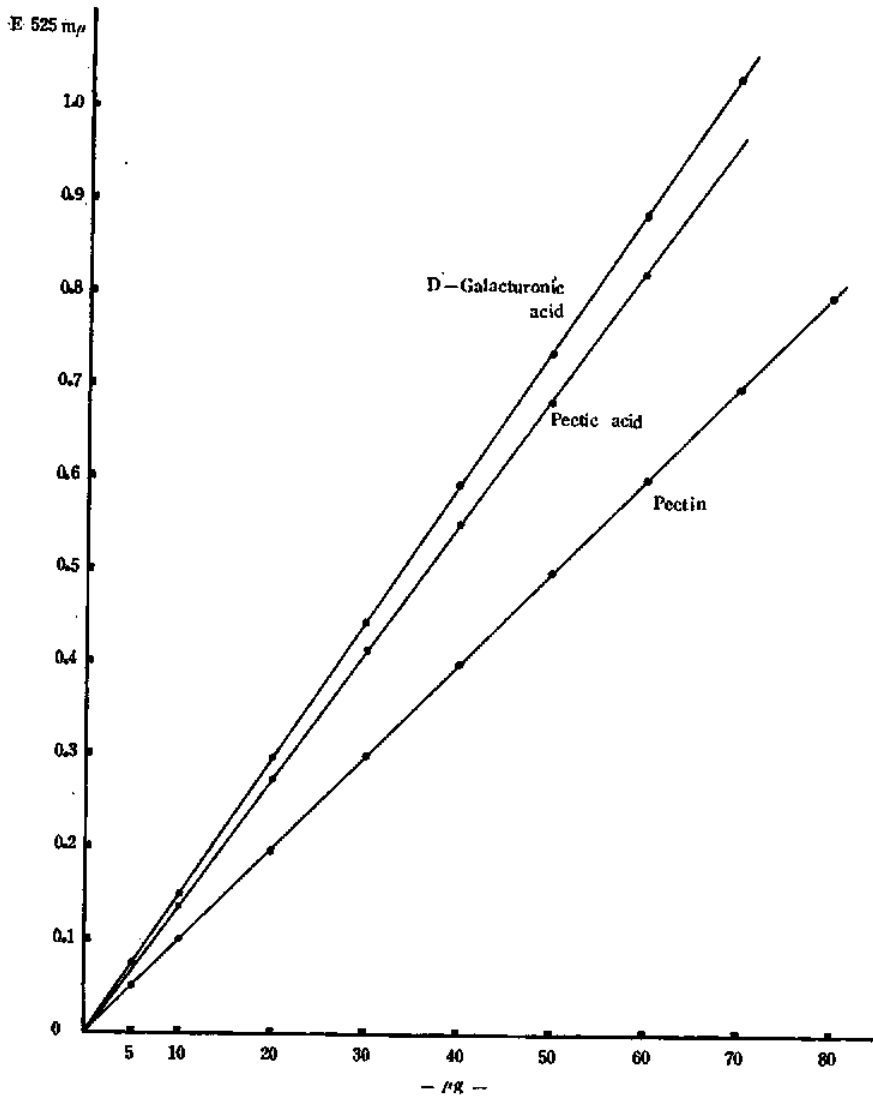
第3表に多糖類について検討した結果を示した. 表の左側のもの(澱粉, デキストラン, イヌリン, アラバン, キシラン, ヘミセルロース)については発色率が低いため試料 1,000 μg について試験した値からペクチンに対する発色比を求めた. イヌリンは8.9%とかなり高い発色率を示したが, ペクチンの赤色とは明瞭に異なる茶褐色を呈する. このような場合には盲検区としてカルバゾールの代わりにアルコールを加えて同じように発色させた区を用いると良い. 一般に多糖類の発色率は単糖類の場合と大差なく, 定量に際して特にその妨害を考慮する必要はないと考えられる. 使用したヘミセルロースはかなりウロン酸単位を含んでいると考えられるが, このペクチン定量条件ではほとんど発色しない. リボ核酸は500 μg 程度では痕跡程度しか発色しないがデオキシリボ核酸は本法によつて強く発色する. ペクチンと同じポリウロン酸であるヘパリン(D-グルクロン酸とD-コンドロサミンから成る), コンドロイチン硫酸(D-グルクロン酸とN-アセチル



第7図、濃度と吸光度との関係。



第8図、経時安定性。



第9図. 検量曲線.

コンドロサミン), アルギン酸 (D-マンヌロン酸と L-グルロン酸) 等の発色比はペクチンの40%以下である。しかもこれらのポリウロン酸は動物、褐藻類に含まれるものであり、ペクチンの定量に際して妨害物として考慮する必要はないと考える。

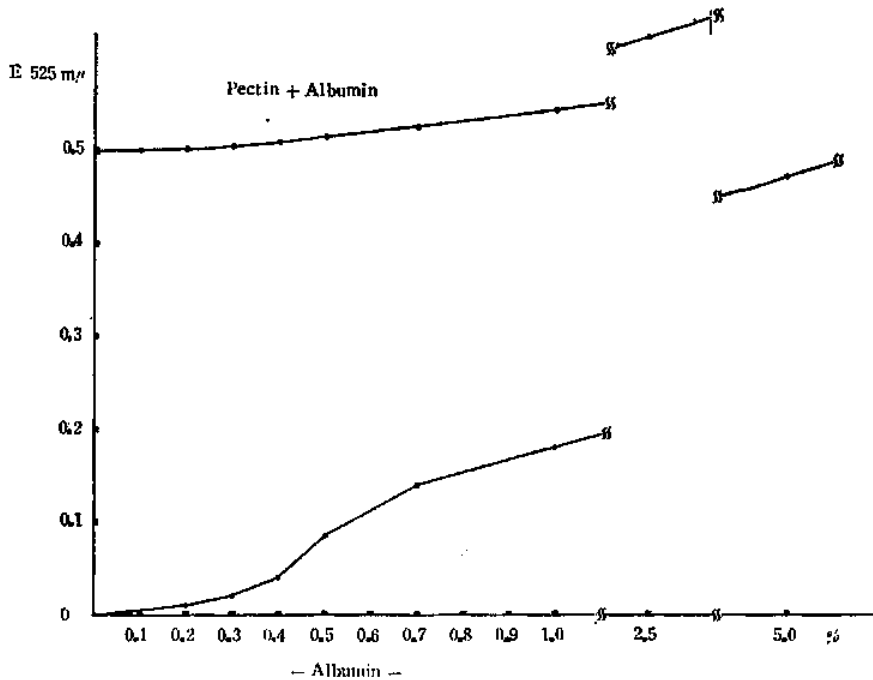
vii) 蛋白質の影響

一般に精定量法は蛋白質の存在によつて妨害される。本定量法に対する蛋白質の影響を調べて第9図の結果を得た。蛋白質としては卵白アルブミンを使用した。アルブミン溶液にペクチンを加えた区については盲検値としてカルバゾールの代わりにアルコールを加えて同様発色させた値を用いた。

図から明らかなようにアルブミンはその濃度が高くなると発色値に影響を及ぼす。しかし0.2%以下ではまったく関係なく、1%に達してもその妨害は10%以下である。

考 察

ペクチンは酸の触媒作用によつて脱メチル、グルコシド結合の開裂、脱炭酸等種々の変化を受ける。ペクチンの酸加水分解による D-ガラクトン酸の生成は多くの副反応によつて妨げられてその収率はきわめて低い。同時生成物としてはメタノール、酢酸、炭酸ガス、フルフラール等が検出される〔Deuel 等



第10図。蛋白質の影響。

(1958)]。したがってペクチンを予めガラクッロン酸へ加水分解することは余り得策ではない。

カルバゾール—硫酸反応によつてカルバゾールと反応するのは糖から生成したフルフラールおよびその誘導体であると考えられている。D-ガラクッロン酸を濃硫酸と加熱すると5-カルボキシ-2-フルフラールが生成し、このものはカルバゾールの添加によつて赤色を呈する [Stutz 等 (1956)]。この物質またはその誘導体が本定量法においても呈色物として作用しているものと推定される。これらフルフラールおよびその誘導体は強酸との加熱によりさらに分解することは第5図の結果からも明らかであろう。本定量法はカルバゾールが硫酸中で安定なことを利用して生成するフルフラール類を逐次捕捉した点に特徴がある。カルバゾールと反応して発色する物質の生成が酸濃度、加温温度、時間に大きく影響されることはペクチン以外の炭水化物の場合でも同じと考えられる。

従来カルバゾール法の欠点は蛋白質によつて強く妨害されること [Dische (1950)] および吸光値が時間とともに変動する点にあるとされている。本定量法によると0.2%蛋白質溶液まで影響を受けない。また発色60分後でもその吸光値変化は僅か1%であり従来の方法 [例えば Dietz 等 (1954)] のように変動する吸

光度を時間を区切つて測定するような不便はない。

第3表が明示するように本法によると10倍量のリボ核酸の存在時にデオキシリボ核酸を比色することも可能である。

総 括

ペクチンのカルバゾール—硫酸法による比色定量法を設定した。定量法は次のように略述される。供試溶液 (ペクチン 5~80 μg) 0.5 ml を含む試験管を水槽に浸し、予め氷冷した 1:7 硫酸 6 ml を加え振盪する。ついで 0.2%カルバゾール溶液 0.2 ml を加え激しく振盪する。75°C、20 分間加温後、流水で冷却し 525 mμ の吸光値を求める。

本定量法はペクチン酸、D-ガラクッロン酸の定量法にも使用し得る。

文 献

- Association of Official Agricultural Chemists, Official Method of Analysis, 1960. p. 150, p. 271.
 Cultrera, R. and Luca, G., 1954. Ann. Chim. (Rome), 41, 608.
 Deuel, H. and Stutz, E., 1958. Advance in Enzymology, vol. 20, p. 341 (New York).

- Dietz, J. H. and Rouse, A. H., 1954. *Food Res.*, **18**, 169.
- Dische, Z., 1947. *J. Biol. Chem.*, **167**, 189.
- Dische, Z., 1948. *Arch. Biochem.*, **10**, 409.
- Dische, Z., 1950. *J. Biol. Chem.*, **183**, 489.
- Hanson, S. W. F. and *al.*, 1944. *Biochem. J.*, **38**, 274.
- 実験化学講座, 23巻, 1957. p. 370 (丸善).
- Lawrence, J. M. and Groves, K., 1954. *J. Agr. Food Chem.*, **2**, 882.
- McCready, R. M. and *al.*, 1951. *Anal. Chem.*, **23**, 957.
- 町田誠之, 1953. 化学の領域, **7**, 634.
- 町田誠之, 1953. 化学の領域, **7**, 698.
- Ogston, A. G. and Stanier, J. E., 1951. *Biochem. J.*, **49**, 591.
- Stutz, E. and Deuel, H., 1956. *Helv. Chim. Acta*, **39**, 2126.
- Taylor, E. W. and *al.*, 1947. *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 342.
- Tollens, B. and Rorive, F., 1908. *Ber. Deutsch. Chem. Ges.*, **41**, 1783.
- Tracey, M. V., 1948. *Biochem. J.*, **43**, 185.

Summary

A rapid and new specific colorimetric method of pectin with carbazole-sulfuric acid is established. The procedure is as follows: A test tube containing 0.5 ml of pectin solution (5 to 80 μ g) is placed in an ice bath, six ml of a cold mixture of 1 part of water and 7 parts of concentrated sulfuric acid of special grade are pipetted into the tube and mixed, then, 0.2 ml of 0.1% alcoholic carbazole is added to the mixture in the ice bath. After shaken vigorously, the test tube is immersed in a water bath at 75°C for 20 minutes and cooled in running tap water. A red color is estimated at 525 m μ with a spectrophotometer.

It is proper that the colorimetry is available for estimation of pectic acid and D-galacturonic acid.