九州大学学術情報リポジトリ Kyushu University Institutional Repository

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

筬島,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:九州大學農學部學藝雜誌. 22 (1), pp.35-44, 1965-10. 九州大學農學部

バージョン: 権利関係:

ペクチンの比色定量法

古谷貞治、筬島 豊

Colorimetric estimation of pectin

Sadaji Furutani and Yutaka Osajima

ペクチン質は細胞膜の充塡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。動物組織のヒヤルロン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-ガラクッ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。

ベ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ドアルコールで 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。--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 0.2g 以上の試料と4~8時間を要す る、光学的方法はガラクッロン酸の 295 mu における **| 敷光度を測定し,ベクチン量を求めるものであり,試** 料の高度の純化とベクチンのガラクッロン酸への定量 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一量色法の設定が要求され、多くの検討が試みられている。しかしベクチンを構成するガラクッ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い。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引色反応〔Tollens 等(1908)、Hanson 等(1944)、町田(1953)」、システィン一硫酸反応〔Dische(1948)」、カルバゾール一硫酸反応〔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一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盤を試みた結果、ベクチン 5~80 μg 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

カルバソール: 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給の必要なく便利である。

ベクチン: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60%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、洗浄を繰り返えして脱水し、最後にエーテルで洗い乾燥する。

ベクチン酸: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11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=15 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-ガラクッロン酸: 市阪一級品(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℃ 以下で減圧濃縮する、温度が高いと 着色する、数滴のアルコールを加えて冷蔵庫中に放置する、得られたD-ガラクッロン酸一水加物 CoH10OでH20 は美麗な針状結晶であり、105~110℃で軟化融解し 153℃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電光 度計 10 mm の セルを 用いて 525 ma の 吸光度を求 めた。

結果および考察

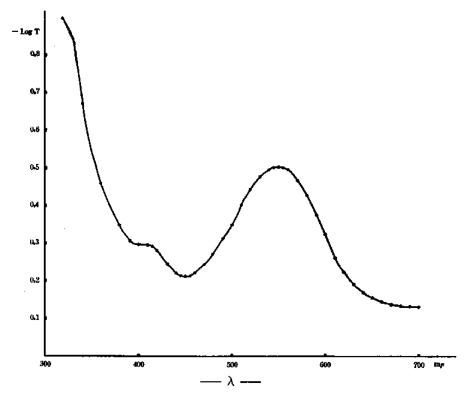
i) ベクチン一硫酸一カルパソールの吸収スペクトル

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# に存在する。

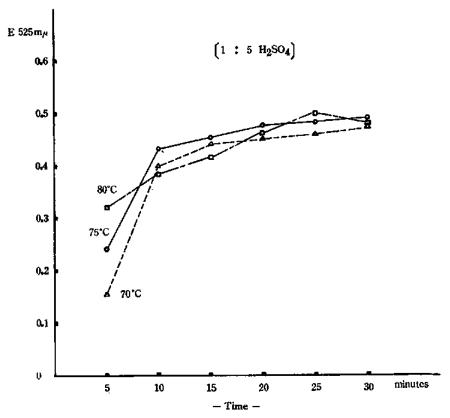
11) 硫酸濃度と発色温度および反応時間

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を調べた。

第2図から第6図までに示したようにベクチンから カルバゾール感受性物質の生成、続いてのカルバゾー ルとの量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量色値を示し再 現性にも欠けるようになる。一方温度が低いと一定の



第1四、 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良い 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℃ で最も安定した量色線を与え、1:6 硫酸では20分後に一定値に速し、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分で一定値に速し、その後25分間加熱を続けても変化しない。70℃ ではこの一定値(一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℃では30分間の加熱を必要とする。温度を80℃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℃ の湯煎中で20分間発色させることが好ましい。

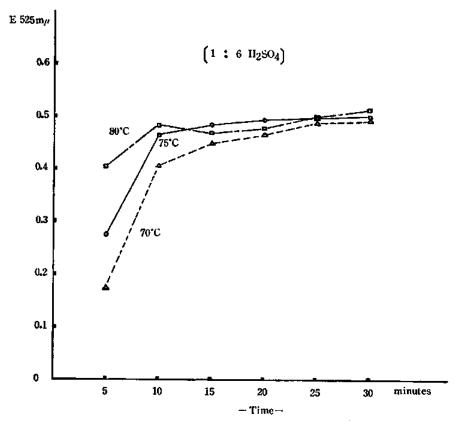
第2~6図の実験には供試液0.5 ml (ペクチン 50 µg 含有)を用い総液量 6.7 ml とした、実験操作上供試液量としては 0.5 ml よりも 1.0 ml の方が有利の場合も考えられる、第1表は供試液量を 0.5 ml または 1.0 ml とし、各濃度の希硫酸 6 ml, 0.2 % カルバゾール 0.2 ml を加えて 75°C, 20 分間発色させた後, 0.5 ml の区のみ各濃度の硫酸 0.5 ml を加えて 最終液量を 7.2

第1表. 硫酸設度および供試液量.

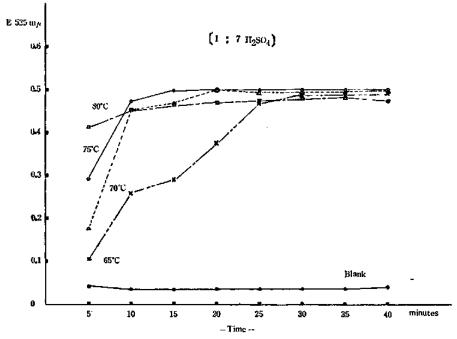
供試剂 硫 酸	ē量 0.5 ml	1.0 ml
(水)1 : 4(硫酸		0.248
1:5	0.412 0.428	0,327 0,367
1 : 7	0.428	0.398
1:8	0.427	0.410
1 : 9 0 : 10	0.431 0.280	0.420 0.336

ml と しその 吸光度 (-LogT) を比較した 結果である。

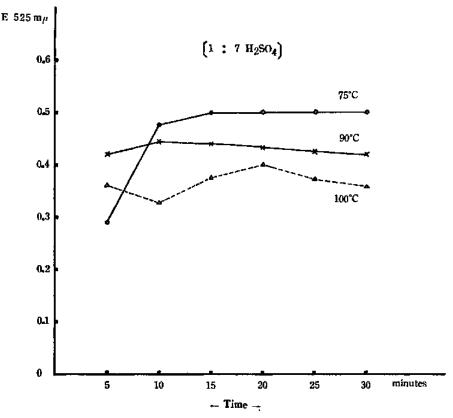
表から明らかなように 供試液 0.5 ml の区では硫酸 濃度が高くなるにつれて 吸光値も 増大し、1:6 硫酸 で一定値に達し 1:8 硫酸まで変化しない、1:9 硫酸 では若干増大するが、0:10 硫酸(濃硫酸)では 大幅に減退する。他方供試液 1.0 ml の区では硫酸濃度の増大につれて値も増大し、1:9 硫酸を使用の時 その発色値は 0.5 ml 区の一定値 (一LogT=0.428) の98 %に達するが濃硫酸の使用によって は同じく大幅に減退する。このことは 0.5 ml 区の一定値が反応時の硫酸濃度 79% (1:6 硫酸)~82% (1:8 硫酸使用)



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、ベクチン一硫酸一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。

道) カルパソールの濃度

ペクチン一硫酸一カルバゾール最色反応においては 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 育検値 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 m/4 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 % 誠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

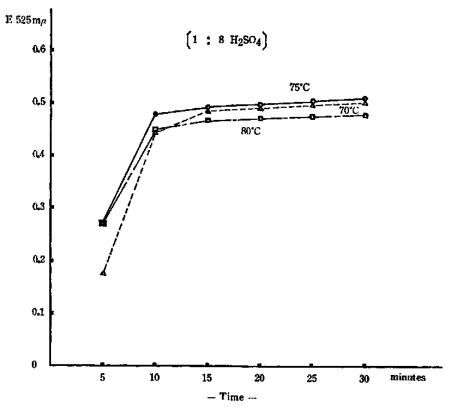
に設定した. 供試溶液 (ペクチン 5~80 mg) 0.5 ml を含む試験管を氷槽に浸し、予め 氷 冷 した 1:7 硫酸 6 ml を加え振盪する. ついで 0.2 % カルパゾール溶液 0.2 ml を加えはげしく振盪する. 75℃ で 20 分間加温した後、流水で冷却し、525 m の 吸光値を測定する. 宿検区は供試液の代りに水 0.5 ml を加えて行なう. 供試液が着色している場合には供試液を用い、カルパゾール溶液の かわりに アルコール 0.2 ml を加えた区を使用することが好ましい.

本定量法は ペクチンの ほか ペクチン酸, D-ガラクッロン酸の定量にも使用し得る.

vi) 関連物質の呈色

カルバゾール一硫酸反応は一般の糖にも用いられる 量色法である。木定量法による糖の量色割合を求め第 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 ラクッ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、寡糖類の星色、

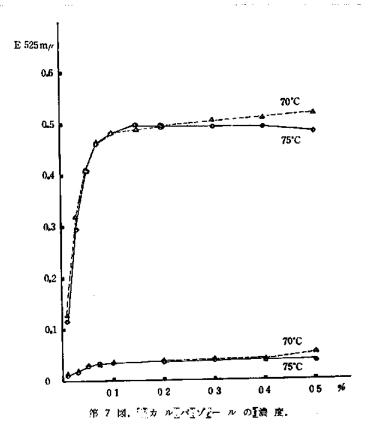
名 称	呈色比	名 称	显色比
Ribose Arabinose Xylose Rhamnose Galactose Glucose Mannose Sorbose Mannitol	1.5% 1.9 3.9 0.9 2.2 3.8 2.1 3.8	Maltose Lactose Saccharose Raffinose Fructose Glucuronolactone Glucuronic acid Galacturonic acid	3.2% 2.8 6.4 4.8 6.9 35.4 41.6 100.0

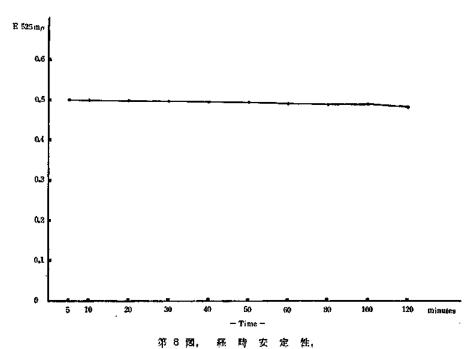
第3表. 多糖類の星色.

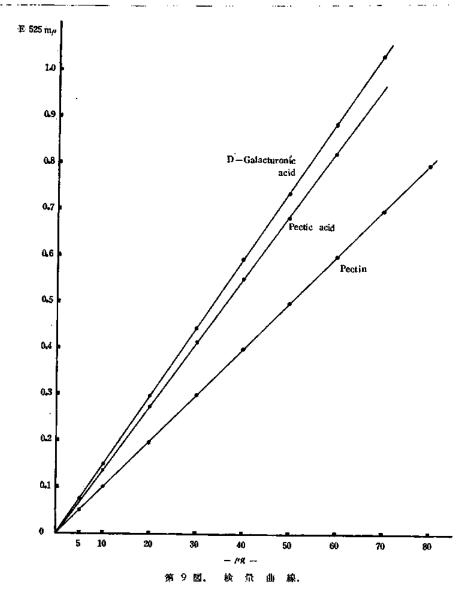
名	称	呈色比	名	称	星色比
Starch Dextran Inulin Araban Xylan Hemicell Glycoger		5.5 8.9 4.7 0 2.1	DNA RNA Heparin Chondroitin Alginic acid Pectic acid Pectin		61.6% 2.0 36.1 15.8 28.1 136.5 100.0

ロン酸の7 光以下であり、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 具糖は茶褐色を最し、ガラクッロン酸の美麗な赤色と 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8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 パン、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 mg 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。ベ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







コンドロサミン), アルギン酸 (D-マンヌロン酸 と L-ギュルロン酸) 等の 発色比はペクチンの 40 光以下である。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。

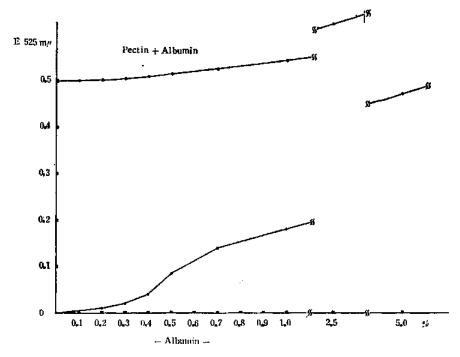
vii) 蛋白質の影響

一般に朝定量法は 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%以下ではまつたく関係なく、1%に達してもその妨害は10%以下である。

考 絮

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-ガラクッロン酸の生成は多くの副次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 鬱。

(1958) J. したがつ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。

カルパゾールー硫酸反応によつてカルパゾールと反応するのは糖から住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-カルボキシー2ー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量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中のの結果からも明らかであろう。本定量法はカルパゾールが硫酸中で安定なことを利用して生成するフルブラール類を逐次補提した点に特徴がある。カルパ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 木法に 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。

経 括

ペクチンのカルバゾールー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 μ g) 0.5 μ l を含む 試験管を氷槽に没し、予め氷冷 した 1:7 硫酸 6 μ l を加え振盪する。ついで 0.2 μ l ルバゾール溶液 0.2 μ l 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 μ l 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。

鶭 文

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). 957.

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 (丸溶).
Lawrence, J. M. and Groves, K., 1954. J. Agr. Food Chem., 2, 882.
McCready, R. M. and al., 1951. Anal. Chem., 23,

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.

町田誠之, 1953. 化学の領域, 7, 634.

町田誠之, 1953. 化学の領域, 7, 698.

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,