The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ポーラログラフイーによる糖類分析法の研究
Author(s)	小泉, 京子
Citation	大阪大学, 1960, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28345
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【3】

氏　名・(本籍)	小　泉　京　子（こいずみきょうこ）
学位の種類	薬　学　博　士
学位記番号	第　144　号
学位授与の日付	昭和35年11月17日
学位授与の要件	薬学研究科薬品化学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**ポーラログラフイーによる糖類分析法の研究**
論文審査委員	(主　査) 教授 滝浦　潔　教授 川崎近太郎　教授 吉岡　一郎

論文内容の要旨

過ヨウ素酸及びその塩類による α- グリコールの開裂反応 (Malaprade, 1928) は，簡単な鎖状ポリアルコールでは次式の様に進行し，第1級アルコール基からはホルムアルデヒド，第2級アルコール基からは義酸を生成する。

$$CH_2OH(CHOH)_nCH_2OH+(n+1)HIO_4 \rightarrow 2\,HCHO+nHCOOH+H_2O+(n+1)HIO_3$$

1933年にいたり，Fleury，Lange が糖類も同様に規則正しく酸化されることを見出したので，それ以来この方面の研究が盛んになり，現在では，炭水化物化学において最も広く用いられる反応の一つとなっている。

一般にこの反応は室温において容易におこり，比較的短時間に定量的かつ選択的に反応し，又反応が水溶液中で行われるため，水溶性の糖類及びその誘導体の分析ならびに構造研究にとっては，すこぶる有用な方法といえる。

分析法としては大別して二つの方法が考えられている。その一つは開裂により生じた反応生成物，主としてホルムアルデヒド及び義酸を定量する方法，他の一つは反応後の過ヨウ素酸イオンの消費量を測定する方法である。後者の場合，即ち過ヨウ素酸の消費量の測定は，従来主にヨードメトリーによっていたが，滴定法では微量域の定量が困難である。実際問題として，炭水化物化学で，特に天然物を扱う場合には，検体量をできるだけ微量にすることが要求される。そこで筆者は，ヨードメトリーの代りにポーラログラフィーを採用して微量化をはかった。

IO_4^- のポーラログラフィーに関しては Souchay 等の研究があり，第1波：$IO_4^- + 2\,H^+ + 2\,e \rightleftarrows IO_3^- + H_2O$，第2波：$IO_3^- + 6\,H^+ + 6\,e \rightleftarrows I^- + 3\,H_2O$ の2段波を与えることが知られている。第1波は IO_4^- から IO_3^- へで2電子還元，第2波は IO_3^- から I^- へで6電子還元であるから第2波は第1波の3倍の波高を持つ。(Fig 1) Coe 等によれば，この第1波はオルト過ヨウ素酸イオンとメタ過ヨウ素酸イオ

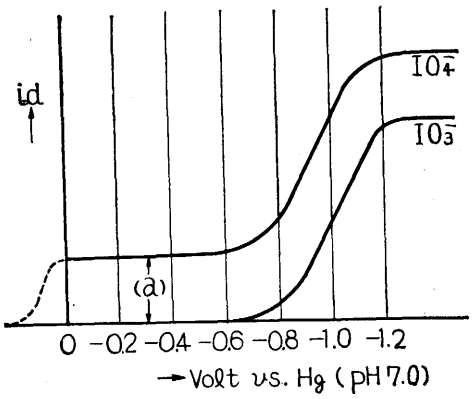


Fig.1.IO_4^- 及び IO_3^- のポーラログラム IO_4^- が共存しているわけであるが，IO_4^- と IO_3^- の共存時のポーラログラムは第1波が IO_4^- の濃度を示し，第2波は IO_4^- と IO_3^- の和を示す。

ンにより挙動を異にし，メタは id/c が一定しているのに対して，オルトの場合には濃度により変化し，従って波高との比例性が得られないという実験結果になっている。

これらの従来の知見を基にして，微量の糖類の分析法を確立する目的で，以下の研究を行った。

第一章　ポーラログラフィーによるグリコール類の定量法

過ヨウ素酸々化反応を利用してグリコール類の定量を行なおうとする場合，反応液中には生成した IO_3^- と残余の IO_4^- 量と反応後の残余の IO_4^- 量とをそれぞれ第1波を以て測定し，両者の差として消費量を算出し，この IO_4^- 消費量から計算によりグリコール量を求めようとした。実際に滴下水銀電極で条件を種々に変えてポーラログラムをとってみると，IO_4^- の第1波の前に残余電流があらわれないので，第1波の id を測ることができない。しかし Souchay も指摘しているように適当な条件を選ぶと，ガルバ零線から第2波の残余電流の位置までの高さ (a) が第2波の波高の1/3となり，正確に第1波の拡散電流に一致するので，この高さ (a) を第1波の波高とみなすことにした。試薬としては，メタ型で且つ安定なカリウム塩 (KIO_4) を使用した。

以上に述べた事に基ずきグリコール類の定量法を組み立てるために，詳細に条件調査を行ない，次の結論に達した。

(1) 緩衝液の種類と pH：pH7のSφrensen 緩衝液が最適である。

(2) 支持塩：緩衝液で代用し得る為，特に添加する必要がない。

(3) 陽極の種類：静止水銀電極（但しH型電解槽を用いて外部陽極とする）を採用し得る。

(4) 試薬の量：反応完結に要する理論量の2～2.5倍が適量である。

(5) 検体量：5×10^{-7}mol/5cc前後が最適である。

(6) 反応時間：15分乃至1時間半（室温）で完結する。

これらの条件を総合して，次に述べる様な定量法を定めた。

定量法：検液（10^{-3}M 前後）1cc に，KIO_4 を pH 7 の Sφrensen 緩衝液に溶かした溶液（10^{-3}M 前後）10ccを加え，一定時間放置して開裂反応を完結させた後，極大波抑制剤として1％ゼラチン溶液0.1ccを加え，直ちにH型電解槽中でポーラログラフィーを行ない，第1波の波高（X）を測り，KIO_4の残存量を求める。別に検液の代りに蒸溜水1ccを用いて，同一条件で盲検値（Y）を測定し，KIO_4の初量を求め，次式により検体量を計算する。

$$\text{検体量}=KIO_4\text{使用量}\times\frac{\text{検体の分子量}}{KIO_4\text{の分子量}\times(n+1)}\times\frac{Y-X}{Y}$$

この方法により数種の鎖状ポリアルコール，ペントース及びヘキソースを定量したところ，すべて満足

な結果を得た。

第二章 血 糖 の 定 量

第一章に述べた糖の微量定量法の実用化を計り，応用面を開拓するために，血糖の定量を試み，家兎の血液を用いて定量条件を調査し，新しい血糖定量法を考案した。グリコール開裂反応は当量的に完結するから，測定値の計算の際に，従来の血糖定量法に必要であった実験的係数が本法では不要である。又この反応は甚だ選択的で，血液中の蛋白質は実際上本定量法の障害にならず，従って本法では除蛋白操作を必要としない。しかし血球中に存在する多糖類及び糖の燐酸エステル類がグリコール開裂反応に関与し，血糖の定量を障害するから，血液から血球を除いた血漿検液を用いねばならない。定量法は次の通りである。

血糖定量法：血液に等張又はやや高張の燐酸緩衝液（pH7.0）を加え，血球を遠心分離して得た血漿溶液を検液とする。この血漿検液1cc（血液0.1ccに相当する）に 10^{-3}MKIO$_4$ 試液10ccを加え，25±0.1°Cで一定時間（0.5～2時間）反応させ，直ちにポーラログラフィーにより前述の通りに糖量を測定する。血糖量は Glucose 量として算出する。

この定量法を用いて，(1)家兎の全血，血漿及び血球中の正常血糖値，(2)薬剤投与時の家兎血糖値の経時変化，(3)薬剤投与時の家兎血球中の還元糖値，(4)人の正常血糖値等につき測定を行い，Hagedorn-Jensen 法及び Anthron 法と対照した結果，ここに定めた条件が血糖定量の目的に完全に適い，しかも従来の方法より簡便且つ鋭敏であることを証明し得た。

尚，比較の為，全血中の糖量の測定実験もあわせて行った。

第三章 2糖類の結合位決定法（2糖類の結合位と過ヨウ素酸々化速度との関係）

過ヨウ素酸々化は，古くから糖の構造研究に利用されて効果をあげている。又最近は特に，少糖及び多糖類の研究に大きく寄与している。単糖類は Sφrensen の燐酸緩衝液中で非常にすみやかに過ヨウ素酸を消費するので，上述の定量法による単糖類相互の分別定量は困難である。2糖類は同一条件下で一般に比較的徐々に過ヨウ素酸々化され，その反応速度がかなり正確に測定できる。そこで12種の2糖類について反応速度をしらべてみたところ，結合位との間に興味ある関係を見出した。即ち，(1) 2糖類の過ヨウ素酸々化速度を決定する最大のファクターは，結合の位置であって，結合位置の配位（α又はβ）及び分子全体の立体配位（Cis-glycol 基の有無）はほとんど影響しない。(2) 結合位の異なる2糖類はそれぞれ個性的な反応曲線を示すが，結合位が同じ場合は非常によく似た，又は全く等しい反応曲線を示す。

Fig 2に異った結合位をもつ代表的な2糖類の反応曲線を示した。

従って，この過ヨウ素酸々化曲線の特異性を利用して2糖類の結合位を推定し得る。

第三章 補遺 2 糖 類 の 定 量

第三章の実験を始めた当初の目的は，2糖類の分別定量であった。種々の結合をもつ2糖類の反応速度曲線を解析し，糖混合物の分別定量の手がかりを得ようとしたのであるが，反応速度が高次のため，所期の目的は達せられなかった。しかし，単一検体の場合は単糖類と同じく，2糖類も上述のポーラログラフ

法で十分微量定量し得ることを証明しえた。定量法は，単糖類のそれに準ずるが，定量条件がやや複雑で（検体採取量，反応時間等を個々別々に選ばねばならない），一般に反応完結に長時間を要する。しかし従来行われている過ヨウ素酸々化による定量法に比べれば相当短時間で反応が完結し，検体量も微量ですむ故にこの方法は，従来の過ヨウ素酸々化法の改良法という意味で，意義をもつものと思う。

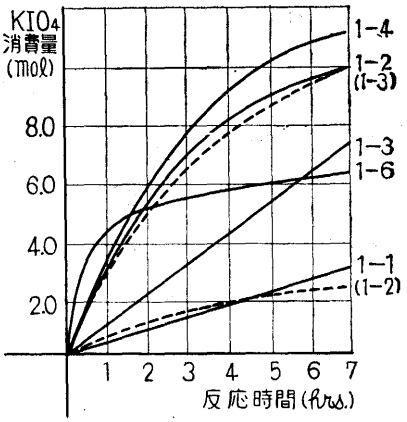


Fig 2　2糖類の過ヨウ素酸々化曲線
—— Aldosyl-Aldose
…… Aldosyl-Ketose

第四章　同系列に属する少糖類の分子量測定法（Amylose 系列の少糖類の過ヨウ素酸々化）

前章で同じ結合を有する2糖類が，過ヨウ素酸々化の際に非常に似た，又は全く同じ酸化曲線を与えるという事実を述べたが，これに関連して，同じ結合が重なった場合，即ち同系列に属する糖類において，酸化経過と構造との間にどの様な関係が存在するかを明らかにしようとした。その為に，すべての結合が1－4α型である Amylose 系列の少糖類(Maltose，Maltotriose，-tetraose 及び-pentaose)を馬鈴薯澱粉 Amylose から分離精製し，それぞれの過ヨウ素酸々化の経過について検討した。その結果，それらの酸化速度曲線の間に規則性を認めた。即ち，(1) 各糖の過ヨウ素酸消費速度は初濃度に比例する。($\frac{dx}{dt}=kA$ 但しx：過ヨウ素酸消費量，t：反応時間，A：糖の初濃度，k：反応速度恒数) (2) 検液が単一物であっても混合物であっても，そのモル濃度さえ等しければ，初期の段階における反応曲線は全く等しい。

以上の事実に基ずいて，Amylose 系列の少糖及び多糖類の分子量又は平均鎖長を測定する方法を考案した。即ち，分子量（又は平均鎖長）未知の検体を一定量採り，その過ヨウ素酸消費量を時間に対して plot して反応曲線を描く。この反応曲線を既知濃度の Maltose の標準曲線と対照し，例えば Maltose 何モル濃度の反応曲線と一致するかを知れば，検体のモル濃度が求められるから，計算によりその分子量（又は平均鎖長）を決定できる。

この方法を用いて馬鈴薯澱粉より得た Amylose，及び粉飴の構成少糖類の平均鎖長を求めた結果は，従来の常用法である過ヨウ素酸による末端基定量法で求めた結果とよく一致し，しかも本法が従来の方法よりも遙かに簡便で，その上検体量も微量ですむことがわかった。

第五章　3糖類及び4糖類の過ヨウ素酸々化

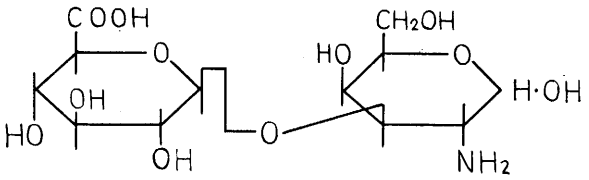
第三章及び第四章で得た知見をもとにし，更に複雑な3糖類及び4糖類の構造と過ヨウ素酸々化反応との関係を確かめようとした。その為 Manninotriose (Gal-(1→6)-Gal-(1→6)-Glu) Panose (Glu-(1→6)-Glu-(1→4)-Glu)，Raffinose (Gal-(1→6)-Glu-(1→2)-Fru.)，Melezitose (Glu-(1→3)-Fru(2→1)-Glu) 及び Stachyose (Gal-(1→6)-Gal-(1→6)-Glu-(1→2)-Fru) の過ヨウ素酸々化反応を検討したが，Manninotriose について，1－4結合の場合と同様に，1－6結合の同系列の糖が，重合度の如何にかかわ

らず反応の初期の段階において，等しい過ヨウ素酸消費速度を示す，という事実を明らかにできた。その他の実験は例数が少ないため，ここに述べるべき結論に達しなかった。

第六章　過ヨウ素酸々化による微量構造決定法

多糖類化学において，過ヨウ素酸々化は構造決定にしばしば用いられる。構造未知の糖を過ヨウ素酸々化して，その時の過ヨウ素酸消費量又は義酸及びホルムアルデヒドの生成量から構造を推定しうるのである。しかし構造未知の糖を扱う場合，反応の完結時間がわからないからどうしても経時変化をしらべてみなければならない。従来の滴定法では1回の実験に相当量の検体を要するので，経時変化をみようとすれば非常に多くの検体を要することになり，貴重な検体の場合，往々実施不能となる。そこで筆者は微量の糖の構造決定にポーラログラフ法が役立つものと考え，二，三の実験を試みた。ポーラログラフ法では1回の測定に 5×10^{-7}mol もあればたいていの糖は正確に測定出来るのであるから，経時変化をみる為に10検体を調製するとしても，5×10^{-6}mol という微量の糖で十分まにあう。

筆者の測定法により Chondrosine の構造が下式の様に決定され，又丹参から抽出された3糖類がManninotriose に，朝鮮人参から得られた2種の3糖類が Panose 及び 1 F Fructosyl Sucrose に夫々一致することを証明できた。



Chondrosine

論文の審査結果の要旨

過ヨウ素酸及びその塩類によるグリコール開裂反応は一般に水溶液中で室温にて速かに当量的，定量的に進行し，アルファーグリコール基に対して選択的に行われるため，ポリアルコールの定性定量に利用せられ又最近糖類の構造研究に広く応用されている。一方において過ヨウ素酸イオン並びにその還元成績体であるヨウ素酸イオンのポーラログラフィーについては Souchay らの研究があり，濃度と波高との間に比例関係が成立することが知られている。本論文は，上記の二つの事実に着目し両者を関連せしめて，糖類の新微量分析法を開拓することを目的としている。

最初に過ヨウ素酸イオンのポーラログラフィーの諸条件を綿密に検討し，緩衝液の種類，pH，支持塩の効果，陽極の種類，試薬量，検体量，反応時間等定量の目的に適する条件を決定し，定量法を立案試行した結果，鎖状ポリアルコール及び単糖類につき満足すべき定量成績を得ている。

次にこれを血糖の定量に応用し，家兎の全血，血漿及び血球中の正常血糖値の測定，血糖値を上昇或は

下降せしめる薬剤を投与したときの家兎血糖値の経時変化の追跡，人の正常血糖値の測定等を，Hagedorn-Jensen 法及び Anthron 比色法を併用して試行し，上記のポーラログラフ法が従来の方法に遜色なく，むしろ簡便且つ鋭敏であって血糖定量の目的に適うことを明かにしている。

小泉はさらにこの測定法を少糖類の分析に応用し，二糖類の過ヨウ素酸々化速度を決定する主要フアクターが糖単位間の結合位であって，結合の配位，及び立体配置に殆ど無関係であることから，二糖類における結合様式の判定に反応速度曲線の形状が有力な手掛りとなることを確め，二糖類，三糖類，四糖類の研究にポーラログラフ法を利用して，従来分析不能であった微量糖の定量或は構造決定に成果を上げている。アミロース系列の少糖頻の分子量測定に速度曲線を用いる方法は甚だ独創的であり，従来の分子量測定法に比べ遙かに簡便であり，精度も高い。

以上に述べたように，本論文は Malaprade の反応における過ヨウ素酸イオンの消費量及び消費速度をポーラログラフ法に基き測定する分析法を確立し，これを糖類分析に応用して見るべき成果を収めたもので薬品分析学上貢献するところ多大であって，薬学博士の学位を授与するに十分価値あるものと認める。