

キチンの脱アセチル化反応—I*

アルカリ性ヒドロキシルアミンとの反応

武 田 道 夫

The Deacetylation of Chitin-I.
Alkaline Hydroxylaminolysis of *N*-Acetylglucosamine and Chitin

By

Michio TAKEDA

The alkaline hydroxylaminolysis of *N*-acetylglucosamine and chitin were investigated with the aim of finding the preparation of aminopolysaccharide without the extensive degradation of molecule.

The alkaline hydroxylaminolysis of *N*-acetylglucosamine was catalyzed by hydroxide ion, accompanied with decomposition of hydroxylamine and a little alkaline hydrolysis.

The catalytic action of hydroxide ion decreased with the concentration of hydroxylamine within pH 13 at 50°C, and converged to the constant rate, 2.8×10^{-2} ($\text{min.}^{-1} \cdot \text{M}^{-2}$), independent of the concentration of hydroxylamine at pH 13.5, while the rate constant for alkaline hydrolysis of *N*-acetylglucosamine was approximately 5.7×10^{-6} ($\text{min.}^{-1} \cdot \text{M}$) at the same temperature.

During alkaline hydroxylaminolysis of chitin with saturated solution at pH 13 and 50°, about half the acetyl groups were readily removed, whereas, on prolonged treatment, the remaining acetyl groups were slowly removed. This result offers additional evidence in support of suggestion of MARCHESSAUIT *et al* (6) (26) (27) that this behaviour may be attributable to the acetamido groups having different degrees of accessibility as a result of rotational isomerism.

Chitin was deacetylated about 70 % of *N*-acetyl groups with hydroxylamine solution of pH 13 at a temperature close to 100° for 10~20 hours, but the increase in reducing-group concentration to measure the number of glycoside linkages hydrolyzed, appeared with treatment for about 20 hours.

* 水産大学校研究業績 第467号, 1966年1月24日 受理
Contribution from the Shimonoseki University of Fisheries, No. 467
Received Jan. 24, 1966

* 日本化学会九州・中国四国支部昭和40年度合同常会(昭和40年12月3日, 於大分大学)にて発表

1. 緒 言

キチンおよびキチン誘導体についての研究^{1) 2)}には、キチンが各種溶媒に対して不溶性であるため、キチンを強アルカリ溶液で長時間加熱処理して得られるキトサンを出発物質とするものが多い^{3) 4) 5)}。このキトサンは生成法の相違により、脱アセチル化度を異にする種々の重合度の混合物であって、複雑な物性を示している。

MARCHESSAULT 等^{6) 26)}および DARMON 等²⁷⁾は赤外分光スペクトルの解析により、キチンのアセトアミド基の加水分解反応が、その微細構造の accessibility の違いにより、比較的容易に進む部分と、徐々に進む部分とに分れていることを見出している。この反応の遅延の間に、副反応として相当量の解重合を伴い、不均一な生成物を生ずるものと考えられる。

一方、カルボン酸誘導体の加水分解試剤として、ヒドロキシルアミンが多く研究に使用され^{7) 8) 9)}、特に分析化学^{9) 10)}および生物化学^{11) 12)}の方面で副反応を伴わない試薬および糖類の定量法^{13) 14)}として興味を持たれている。

そこで、できるだけ解重合を伴わない脱アセチル化剤としてヒドロキシルアミンを用い、キチンから重合度の大きいアミノ多糖類の生成を目的として本研究を行なった。まずキチンの構成単位である *N*-アセチルグルコサミン (2-acetoamido-2-deoxy-D-glucose) について、その加ヒドロキシルアミン分解の反応機構に関する実験を試み、次にその結果をキチンに応用した場合の効果について報告する。

2. 実験方法および試薬

2-1. キ チ ン

既報^{15) 16)}によって精製し、250メッシュ以下のものを用いた。

2-2. *N*-アセチルグルコサミン

前記のキチンを濃塩酸で加熱分解した後、脱色、精製した D-グルコサミン塩酸塩を ROSEMAN および LUDOWIEG¹⁷⁾の方法によってアセチル化した。すなわち触媒として炭酸塩型にした強塩基性イオン交換樹脂を用い、無水酢酸と共に処理した後、再結晶を3回くり返した。

2-3. *N*-アセチルグルコサミンのヒドロキシルアミンによる分解

所定濃度の塩酸ヒドロキシルアミン溶液を種々濃度の水酸化カリウム溶液で一定 pH に調整し、等容量の *N*-アセチルグルコサミン溶液に加え、密栓をした容器中で 50°C の恒温水槽上で反応させた。所定時間に生成したアセトヒドロキサム酸を 10% 塩化第二鉄—塩酸 (0.3M) 溶液により発色させ、光電比色計 (日立 F P W-4 型) にて、550m μ で比色定量^{7) 18)}した。

2-4. キチンのヒドロキシルアミンによる分解

前記 2-1 のキチン 1~2 g に、固形水酸化カリウムにて pH 13 に調整した塩酸ヒドロキシルアミン飽和液 (約 7.5 M) (析出した塩化カリウムの結晶は別) 25~50 ml を加え、かきまぜながら、50°C または沸騰水浴上で 4 時間以内還流加熱して反応を行なった。その後キチンを反応液から別し、数回水洗した後、更に新しいアルカリ性ヒドロキシルアミン溶液を加えて、次回の反応を行ない、このような操作のくり返しにより所定時間分解した。

なお 50°C における反応の場合は、ろ液および洗液を合わせて一定容量に希釈し、前記 2-3 の方法で各処理中に生成したアセトヒドロキサム酸を定量した。

2-5. ヒドロキシルアミンの定量

試料溶液に過剰の無水酢酸を加え、50°C で 15 分間還流加熱し、生成したアセトヒドロキサム酸を 2-3 の方法で鉄錯化合物として定量した。

2-6. *N*-アセチルグルコサミンの定量

REISSIG, STROMINGER および LELOIR²⁰⁾による *p*-ジメチルアミノベンツアルデヒド—塩酸溶液を用

いる比色法で行なった。

2-7. キチン中の遊離アミノ基の検出²¹⁾

試料を氷冷しながら少量の濃塩酸に溶解し、5M 酢酸ナトリウム溶液によって適当な濃度に調整した溶液を、YEMM 等のニンヒドリン法²²⁾によって比色した。

2-8. キチン中の還元性末端基の検出

前記の遊離アミノ基の検出に用いたのと同じ溶液について、DISCHE のフェローフェリシアン化物法²³⁾にて比色した。

2-9. キチン中のアセチル基の定量

WIESENBERGER²⁴⁾ および小野江²⁵⁾による装置を用いて、50%硫酸にてキチンおよび脱アセチル化キチンを3時間半加熱分解した後、水蒸気蒸留して、留出した酢酸を標準アルカリ溶液で標定した。

3. 実験結果および考察

3-1. アセトヒドロキサム酸の加熱による分解

予備試験の結果、*N*-アセチルグルコサミンの加ヒドロキシルアミン分解は、ホルムアミドの場合⁷⁾に比較して、反応速度が遅いので、反応温度の上昇により反応速度の促進を計ったが、この間に生成したアセトヒドロキサム酸の熱分解が考えられる。そこで、アセトアミドを試料として、加熱温度の影響をまず調べた。すなわち 5 mM アセトアミド溶液と 1 M ヒドロキシルアミン溶液を pH 12.5 に調整して、30°, 50°, 70°, および 95° の各温度にて反応させ、反応時間によるアセトヒドロキサム酸の生成量の変化を求めた。その結果を第 1 図に示した。図より 70° および 95° の場合はそれぞれ 100 分および 30 分以後吸光度の低下が見られ、明らかにアセトヒドロキサム酸の分解を示している。また 30° と 50° の場合を比較すると著しい反応速度の差があり、なお 50° の場合は 5 時間反応後、反応液を一夜室温に放置した後も退色は見られなかった。図中の破線で示した 50° の曲線は、ヒドロキシルアミン溶液の pH を調整後、一夜放置して、使用した場合の反応速度を示し、この pH においてはヒドロキシルアミン自体の分解がおり、その濃度が低下したものと考えられる（このことについては更に後記する）。

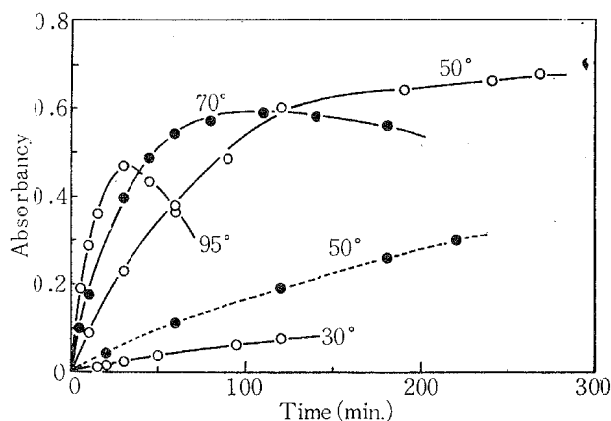


Fig. 1. Dependence on temperature of the rate of acetohydroxamic acid formation from acetamide with 2.5 M of hydroxylamine solution at pH 12.5.

The rate of formation of acetohydroxamic acid was measured by incubating the mixture of equal volumes of 5 mM acetamide solution and the alkaline hydroxylamine reagent, prepared by mixing hydroxylamine hydrochloride solution and potassium hydroxide solution, at various temperatures in a water bath. The absorbancy was measured at 550 mμ after the addition of aliquots of the reaction mixture to 10% ferric chloride in 0.3 M hydrochloric acid with photo-electric colorimeter⁷⁾.

以上の結果から 50° において反応を行なう限りにおいては、やや反応速度の遅いきらいはあるが、アセトヒドロキサム酸の鉄錯化合物による比色法で、その反応機構を定量的に検討することは可能であると考えた。

3-2. *N*-アセチルグルコサミンの加ヒドロキシルアミン分解

N-アセチルグルコサミンの濃度 5 mM に対し、ヒドロキシルアミンの濃度を 2.25, 1.25, 0.75 および

0.05 M, 各反応溶液の pH を 11.5 より 13.5 まで変化させ, 50° の恒温槽で反応を行ない, 各条件で生成したアセトヒドロキサム酸の量から反応速度を求めた。ヒドロキシルアミンの濃度 1.25 M の場合を例として第 2 図に示したが, いずれの条件でも pH の大きいほどアセトヒドロキサム酸生成速度は大きく, 特に pH 12.5 以上において著しい。また第 2 図に示すように, pH 13.5 の場合でも平衡に達するには 5 時間以上の加熱を必要とした。

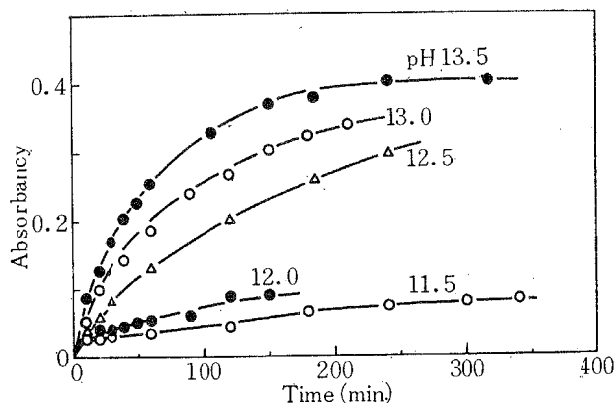


Fig. 2. Examples of formation of acetohydroxamic acid from *N*-acetylglucosamine (5 mM) with various pH of hydroxylamine solution (1.25 M) at 50°.

The broken line indicates the result by use of a hydroxylamine solution stored for about one day after preparation.

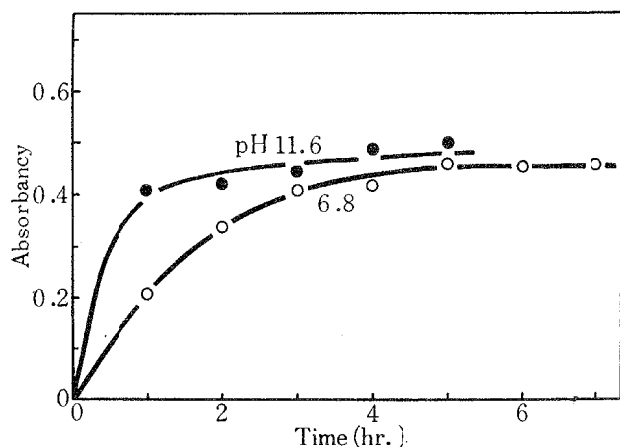


Fig. 3. Comparison of rate of acetohydroxamic acid formation for alkaline and neutral hydroxylaminolysis of *N*-acetylglucosamine (23 mM) at 50°.

の一次反応速度定数 k_{obs} を求め, ヒドロキシルアミン濃度および pH との関係を示した。

この結果から分解に用いたヒドロキシルアミンの各濃度において, k_{obs} は pH への依存性が大きく, 水酸イオンの触媒としての効果が推察できる。しかし各曲線共ヒドロキシルアミン濃度の大きいほど, 直線からの外れが大きく, 下向きの曲線となっている。このことはヒドロキシルアミンの全濃度が増大しても, 反応に直接関与するヒドロキシルアミンの割合はそれに比例しないことを示し, 特に pH 12 以下においては, ほとんどヒドロキシルアミン濃度に関係なく平行な直線となって来ている。以上の結果を更に詳細に検討す

JENKS 等⁷⁾ によるホルムアミドの加ヒドロキシルアミン分解の場合, 酸性側では pH 6.5 付近で反応速度が最高になっているので, *N*-アセチルグルコサミン濃度を 23 mM に高め, ヒドロキシルアミン濃度 1 M で, pH 6.8 および 11.6 の場合の反応速度を比較した。その結果は第 3 図に示すようである。この結果初期反応速度および平衡到達速度, いずれもアルカリ側の方が大きく, 特に前者の差が著しいことが明らかとなった。JENKS 等は酸アミドの加ヒドロキシルアミン分解においては, 酸性側ではヒドロキシルアンモニウムイオンの, アルカリ側では水酸イオンの触媒効果が存在することを論じており, *N*-アセチルグルコサミンの場合でも同じ反応機構で分解が行なわれると考えられるが, 第 3 図に示す結果から水酸イオンの効果の方がより大きいことが期待できる。

第 2 図にその 1 例として示した各条件下におけるアセトヒドロキサム酸生成量と時間との関係を更に, みかけの一次反応としての反応速度 $\log(A_{\infty}/A_{\infty}-A_t)$ を計算し, 反応時間との関係をグラフに描くと, 反応初期において直線関係が得られた。ただし A_{∞} は平衡に達した時の吸光度, A_t は時間 t における吸光度である。第 2 図に示した例についての計算結果を第 4 図に示した。この図でも明らかなように, 反応時間 100 ~ 150 分までは, 各条件共直線関係が得られたので, この傾斜から, みかけ

るために、第5図に示した k_{obs} を、更にヒドロキシルアミンの濃度を考慮に入れて、みかけの二次反応として速度定数を計算し、その結果と pH との関係を図6に示した。すなわち pH 12.5 以上では、ヒドロキシルアミンの各濃度に関係なく速度定数 k_2 は大体一致して来たが pH 12.5 以下では一定 pH に対する k_2 の値はヒドロキシルアミン濃度の小さいほど大きく、0.05 M と 2.25 M では約 10 倍の差が見られる。しかし各濃度共 pH が高いほど k_2 の値は大きくなり水酸イオンの触媒効果が相当大きいことを示しているが、

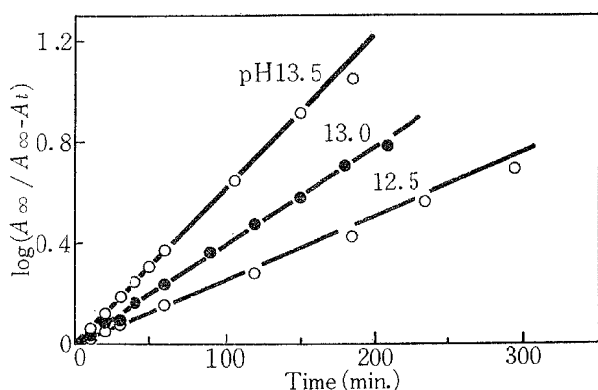


Fig. 4. Examples of first-order rate plots for acetohydroxamic acid formation from *N*-acetylglucosamine (5 mM) with various pH of 1.25 M hydroxylamine solution at 50°.

A_{∞} : Absorbancy at the infinite reaction time,
 A_t : absorbancy at time t .

pH 12.5 以下ではその効果もヒドロキシルアミンの濃度によって著しく違っていることを示している。先に第5図に示す結果から反応にあずかるヒドロキシルアミンの割合は必ずしも全ヒドロキシルアミンの濃度に比例しないことを予測したが、第6図から更に、pH 12.5 以上ではその比が一定となり、pH 12.5 以下ではある一定濃度以上のヒドロキシルアミンが増加しても、有効に反応に関与せず反応生成物を増加することはできないようである。

水酸イオンの触媒効果を検討するために、更に反応の pH を考慮したみかけの三次反応として求めた速度定数 k_3 と pH との関係を図7に示した。なお水酸イオン濃度としては、加えた水酸化カリウムの濃度からではなく、pH メーターの読みから計算した値を用いた。この結果ヒドロキシルアミン濃度 2.25 M では各 pH にわたってほぼ、一定の k' 、(2.8×10^{-2} , $\text{min.}^{-1} \cdot \text{M}^{-2}$) となったが、0.05 M の場合 pH 11.5 と 13.5 では約 10 倍の差があり、1.25 M ではその中間的な変化を示している。しかしいずれの場合も pH 13.5 ではほぼ一致した k' の値に集束している。すなわちヒドロキシルアミンの濃度が大きい場合には、水酸イオンの触媒効果はその水酸イオンの濃度に比例しているが、ヒドロキシルアミンの濃度が小さいほど、水酸イオンの触媒としての効果がより大きく作用することを示している。

以上 *N*-アセチルグルコサミンのアルカリ性ヒドロキシルアミンによる脱アセチル化反応は、水酸イオンによる触媒効果が大きく、特にヒドロキシルアミンの濃度の低いほど有効に作用することが判明した。しかしこの実験においては、ヒドロキシルアミンの塩酸塩を水酸化カリウムによって pH を調整しているため、その中和によって生成した塩化カリウムの濃度がそれぞれの条件で一定でないために、イオン強度の反応速

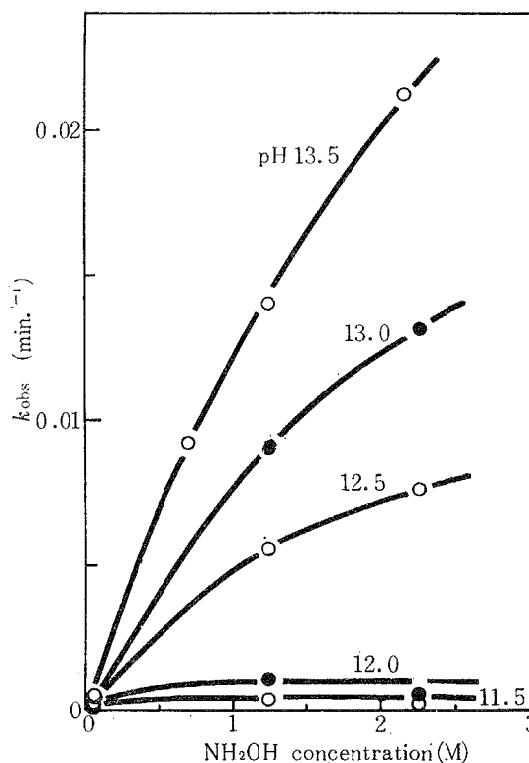


Fig. 5. Dependence on pH of the rate constant of acetohydroxamic acid formation from *N*-acetylglucosamine (5 mM) at various concentrations of hydroxylamine at 50°.

k_{obs} : Apparent initial first-order rate constant.

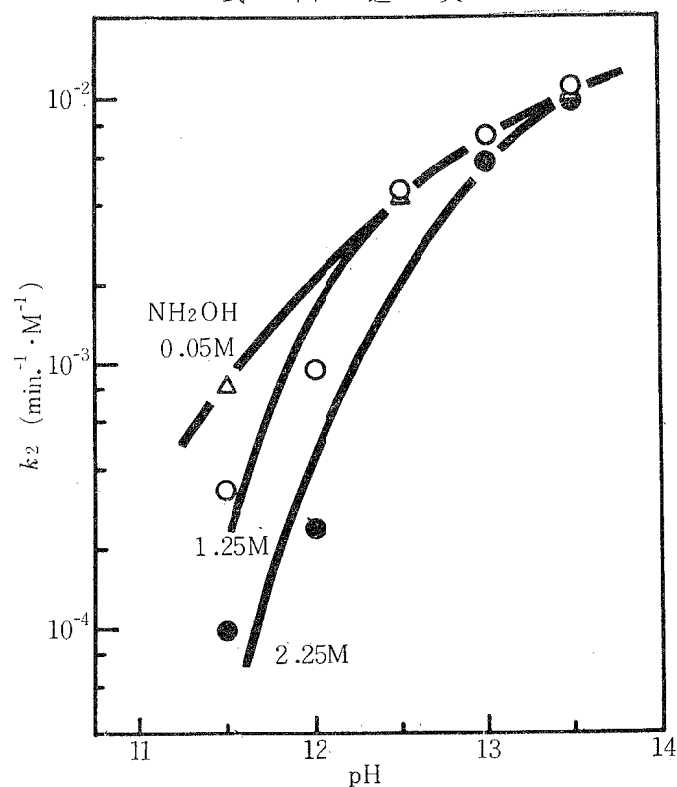


Fig. 6. Dependence of the second-order rate constant for acetoxyhydroxamic acid formation from *N*-acetylglucosamine on pH at different concentration of hydroxylamine at 50°.

k_2 : Pseudo second-order rate constant were obtained by dividing k_{obs} by the concentration of hydroxylamine.

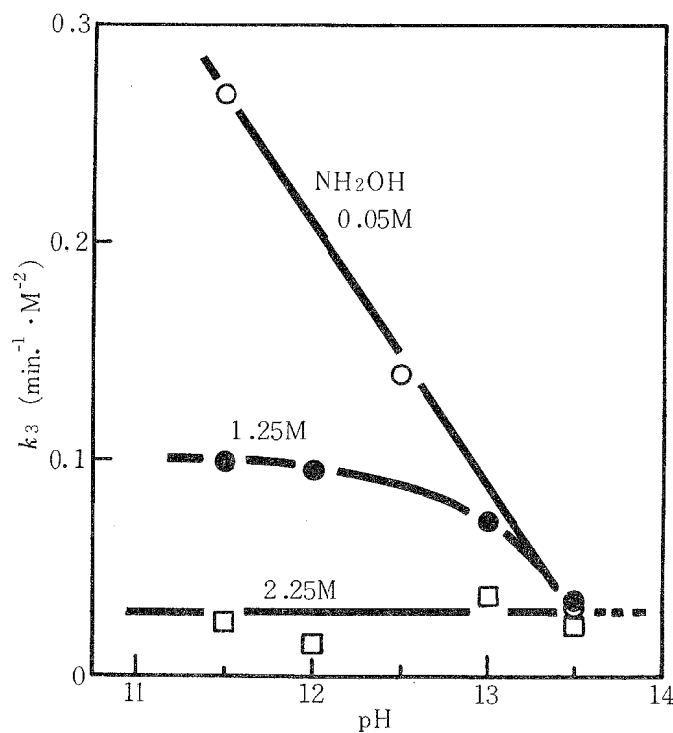


Fig. 7. Dependence of the third-order rate constant for base-catalyzed hydroxylaminolysis of *N*-acetylglucosamine (5 mM) on pH at different concentration of hydroxylamine at 50°.

k_3 : Pseudo third-order constant were obtained by dividing k_2 by the concentration of hydroxide ion based on observed pH.

度に対する影響の差があるものと考えられる。

この外、先のアセトアミドに関する実験（第1図の破線）で見られたように、アルカリ性ではヒドロキシルアミン自体の分解が考えられるので、その分解速度の違いによる見掛けの濃度と真の濃度との差、あるいは水酸イオンが直接作用する *N*-アセチルグルコサミンの加水分解に消費される水酸イオンの濃度の減少等も考慮しなければならない。

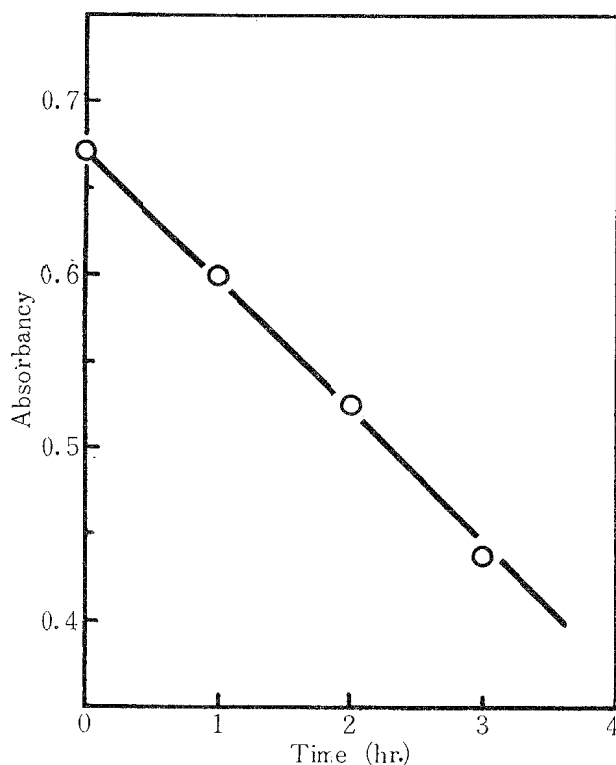


Fig. 8. Disappearance of hydroxylamine for its alkaline decomposition at pH 12.5 and 50°.

Rate of decomposition of hydroxylamine with hydroxide ion was measured by the formation of the ferric aceto-hydroxamate complex. The alkaline hydroxylamine solution (2.5 M), prepared by mixing hydroxylamine hydrochloride solution with potassium hydroxide, was refluxed in a water bath at 50°. The formation of aceto-hydroxamic acid was carried out by incubating alkaline hydroxylamine solution with excess of acetic anhydride for 15 min. at 50° and diluted with the addition of enough water. The absorbancy was measured for the diluted reaction mixture.

これらの点を確かめるために、pH 12.5に調整した2.5 Mアルカリ性ヒドロキシルアミン溶液を50°に加熱した時のヒドロキシルアミンの減少の速度を求めた。その結果は第8図に示した。すなわち4時間後に最初の濃度の約半分に低下するようである。

また同じように、0.5 Mアルカリ性 *N*-アセチルグルコサミン溶液の50°における加水分解の速度を比色

法で求めると、見掛け上0次反応を示したので、各 pH における速度定数を計算した結果を第1表に示し

Table 1. Zero-order rate constant for alkaline deacetylation of *N*-acetylglucosamine (0.5 M) at 50°. Rate of disappearance of *N*-acetylglucosamine for its alkaline deacetylation was measured by colorimetric method of REISSIG *et al*²⁰).

Apparent pH	Zero-order rate constant for alkaline hydrolysis of <i>N</i> -acetylglucosamine, k_{hyd} (M • min ⁻¹)
11.70	5.87×10^{-6}
12.55	5.49×10^{-6}
13.48	5.83×10^{-6}

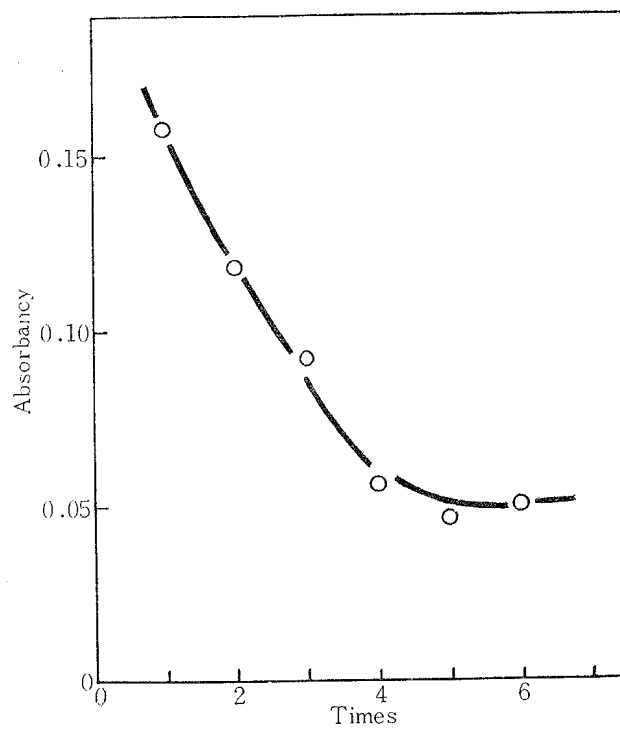


Fig. 9. Dependence of the extent of acetohydroxamic acid formation from chitin on number of times of alkaline hydroxylaminolysis for 4-hour period at pH 13 and 50°.

The mixture of chitin and 25-fold of saturated hydroxylamine hydrochloride solution, prepared to pH 13 with solid potassium hydroxide, was refluxed under stirring for 4 hours and the extent of acetohydroxamic acid in each filtrate was measured with colorimetric method.

た。測定した pH 範囲では *N*-アセチルグルコサミン濃度と水酸イオンの濃度比は 1 ~ 100 倍であるが、大

体一致した反応速度定数となった。しかしながら同一 pH のヒドロキシルアミンによる分解速度に比べると非常に小さいものである。

3-5. キチンのアルカリ性加ヒドロキシルアミン分解

先に検討した *N*-アセチルグルコサミンのアルカリ性ヒドロキシルアミンによる分解の結果を、2-4で述べた方法でキチンに適用した。反応温度 40° におけるアセトヒドロキサム酸の生成量と操作回数との関係を求め第9図に示した。4時間×4回目までは処理回数に比例してアセトヒドロキサム酸生成量は減少しているが、4回目以後は一定となって来た。

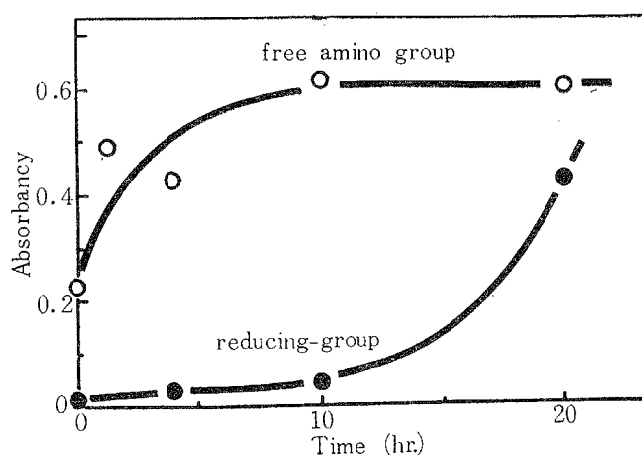


Fig. 10. Changes of the concentration of free amino group and saccharide reducing-group in chitin during alkaline hydroxylaminolysis at pH 13 in a boiling water bath.

The amount of deacetylated free amino sugar present and of glycoside linkages hydrolyzed in chitin was analyzed by the ninhydrin color-method²²⁾ and the ferro-ferricyanide method²³⁾, respectively.

Table 2. Analytical data for the deacetylated chitin by alkaline hydroxylaminolysis.

Analyses of residual *N*-acetyl group in chitin were performed by sulfuric acid procedure of WIESENBERGER²⁴⁾.

Substance or sample No.	pH	Temperature,	Duration,	Extent of de-acetylation,
		°C		
Chitin	—	—	—	19.3
1	5	100	13	34.0
2	13	50	24	58.9
3	13	100	10	67.0
4	13	100	20	71.0

第10図に沸騰水浴上で処理したキチンの還元性末端基および遊離アミノ基の含有量の変化と処理時間との関係を示した。すなわち遊離アミノ基は脱アセチル化度の目安とすることができるが、大体処理時間10時間以後は一定となっている。これに対し糖グリコシド結合の加水分解の度合の目安となる還元性基の検出量は、10時間以上の処理で急激に大きくなって来ている。この結果ヒドロキシルアミンによる脱アセチル化は10時間の処理で大体平衡に達し、それ以上処理時間を延長することは重合度の低下をきたすものと考え

ることができる。

以上の各処理を行なったキチンのアセチル基定量の結果を第2表に示した。試料に用いたキチンは脱カルシウム、脱タンパク、脱色素および粉碎（ボールミルによる）等の操作過程に約19%の脱アセチル化が行なわれていた。また酸性ヒドロキシルアミンによる処理はアルカリ性の場合に比較して約半分の効果しか示さず、むしろ温度を下げてアルカリ性溶液によって長時間処理する方が有利と考えられる。いずれにしてもヒドロキシルアミン処理によってキチンはそのN-アセチル基の約70%を除くことができるが、それ以上反応を進めることは解重合を伴うだけで、それほど脱アセチル化率の向上は期待できないのではないかと考えられる。

第9図および第2表の試料番号2の分析値から、50°におけるおだやかな分解では、4時間×4回まではアセトヒドロキサム酸の生成量が直線的に低下しているが、それ以後の処理では各回における生成量が平行線上をたどっている。しかも計24時間の処理で約50%のアセチル基しか除かれていないことは、この条件のもとで残りの50%を分解するには、非常に長時間の処理を必要とすることになる。このことはMARCHESSAULT等⁶⁾およびDARMON等²⁷⁾がキチンのアルカリ処理によってキトサンを作る際に、そのaccessibilityの相違により、アセトアミド基の約半分は比較的容易に分解されるが、残りの半分は徐々にしか除くことができないと考えている点に一致するものである。このことに関しては更に赤外線スペクトルによって確認したいと思っている。

正確な重合度の変化についても、現在のところ可溶性の誘導体にする方法を見出していないので、更に今後の問題として研究を進める予定である。

4. 結 言

アルカリ性ヒドロキシルアミンによるN-アセチルグルコサミンおよびキチンの脱アセチル化反応について検討して、次のような結果を得た。

1. ヒドロキシルアミンによる分解によって生成するアセトヒドロキサム酸は、50°以上の加熱では加水分解されるので、この生成によって脱アセチル化を定量するには50°以下でなければならない。
2. N-アセチルグルコサミンのアルカリ性加ヒドロキシルアミン分解には、水酸イオンの触媒効果があり、ヒドロキシルアミンの濃度の小さいほどその効果は大きかった。しかしpH 13.5では一定の三次反応としての速度定数 2.8×10^{-2} ($\text{min.}^{-1} \cdot \text{M}^{-2}$) が得られた。
3. またこの反応には、ヒドロキシルアミン自身の分解および水酸イオンによるN-アセチルグルコサミンの加水分解が伴われたが、後者の反応速度定数は 5.8×10^{-6} ($\text{M} \cdot \text{min.}^{-1}$) で非常に小さかった。
4. キチンの50°、pH 13、4時間のアルカリ性加ヒドロキシルアミン分解処理では、処理回数4回までと4回以後のアセトヒドロキサム酸の生成量曲線に変曲点が見られ、キチンのaccessibilityの相違による脱アセチル化の難易が分れる点ではないかと考えた。
5. キチンの100°におけるアルカリ性ヒドロキシルアミンによる脱アセチル化は20時間の処理（ただし4時間毎に分解液を更新）によって、そのN-アセチル基の約70%を除くことができた。しかし10時間以上の処理では解重合を伴うものと考えられた。

生成されたアミノ多糖類の化学的性質および重合度等については、更に検討中である。

実験の一部を担当した富岡悠爾氏、種々実験の便を計って下さった当大学校 富田輝雄教官、研究費の援助を賜った参松工業株式会社および試料を供せられた北洋水産株式会社 手塚久雄氏に厚くお礼申しあげます。

文 献

- 1) BRIMACOMBE, J. S., and J. M. WEBBER, 1964: "Mucopolysaccharides" Elsevier, Amsterdam, p. 36.
- 2) FOSTER, A. B., and J. M. Webber, 1960: "Advances in Carbohydrate Chemistry" **15**, Academic Press, New York, p. 371.
- 3) HOROWITZ, S. T., S. ROSEMAN, and H. J. BLUMENTHAL, 1957: *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 5046.
- 4) BARKER, S. A., A. B. FOSTER, M. STACEY, and J. M. WEBBER, 1958: *J. Chem. Soc.*, 2218.
- 5) 野口順蔵・戸倉精一・猪俣素子・浅野千尋, 1965: 工化, **68**, 904.
- 6) MARCHESSAULT, R. H., F. G. PEARSON, and C. Y. LIANG, 1960: *Biochim. Biophys. Acta*, **45**, 499.
- 7) JENCKS, W. P., and M. GILCHRIST, 1964: *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 5616.
- 8) COHEN, T., and J. LIPOWITZ, 1964: *ibid.*, **86**, 5611.
- 9) GOLDENBERG, V., 1958: *Anal. Chem.*, **30**, 1327.
- 10) GODDU, R. F., N. F. LEBLANC, and C. M. WRICHT, 1955: *ibid.*, **27**, 1251.
- 11) BRAUNITZER, G., 1956: *Biochim. Biophys. Acta*, **19**, 574.
- 12) RAMACHANDRAN, L. K., and K. NARITA, 1958: *ibid.*, **30**, 616.
- 13) HILF, R., and F. F. CASTANO, 1958: *Anal. Chem.*, **30**, 1538.
- 14) MCCOMB, E. A., and R. M. MCCREADY, 1957: *ibid.*, **29**, 819.
- 15) 武田道夫・阿部栄喜, 1962: 本報告, **11**, 9.
- 16) ———・勝浦 洋, 1964: ———**13**, 35.
- 17) ROSEMAN, S., and J. LUDEIG, 1954: *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 301.
阿武喜美子, 瀬野信子, 1957: "実験化学講座(第23巻)生物化学—I", 丸善, p. 408.
- 18) CHERONIS, N. D., and T. S. Ma, 1964: "Organic Functional Group Analysis by Micro and Semimicro Methods", Interscience Pub., New York.
- 19) BERGMANN, F., 1952: *Anal. Chem.*, **24**, 1367.
- 20) REISSIG, J. L., J. L. STROMINGER, and L. F. LELOIR, 1955: *J. Biol. Chem.*, **217**, 959.
- 21) RUPLEY, J. A., 1964: *Biochim. Biophys. Acta*, **83**, 245.
- 22) 石井信一, 1957: "実験化学講座(第23巻)生物化学—I", 丸善, p. 126.
- 23) DISCHE, Z., 1962: "Method in Carbohydrate Chemistry" **1**, Academic Press, New York, p. 513.
- 24) WIESENBERGER, E., 1948: *Microchemie ver Mikrochim. Acta*, **33**, 51.
- 25) 小野江敏浩, 1960: 分化, **9**, 479.
- 26) PEARSON, F. G., R. H. MARCHESSAULT, and C. Y. Liang, 1960: *J. Polymer Sci.*, **43**, 101.
- 27) Darmon, S. E., and K. M. RUDALL, 1950: *Discussion Faraday Soc.*, **9**, 251.