

Title	ペントースの比色定量(第1報) : 定量法の比較と改良
Sub Title	Colorimetric determination of pentoses. I. : comparative studies and improvement of various methods.
Author	友田, 正司(Tomoda, Masashi) 神谷, 智子(Kamiya, Satoko) 木村, 正子(Kimura, Masako)
Publisher	共立薬科大学
Publication year	1962
Jtitle	共立薬科大学研究年報 (The annual report of the Kyoritsu College of Pharmacy). No.6(1961)/7(1962) ,p.9- 14
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	
Genre	Technical Report
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000006-0009">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000006-0009</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

ペントースの比色定量 (第1報)\* 定量法の比較と改良

友田正司, 神谷智子, 木村正子

Colorimetric Determination of Pentoses. I.

Comparative Studies and Improvement of Various Methods.

Masashi TOMODA, Satoko KAMIYA, and Masako KIMURA

現行の衛生試験法にペントザンおよびペントースの定量法として記載されている方法は<sup>1)</sup> 試料を塩酸とともに加熱蒸留し, 得られたフルフラールにフロログルシン液を加えて混合放置し生じたフロログルシドの重量をはかり, 表によつて係数を求めてペントースの量を算出するものであるが, この方法は比較的多量の試料が必要で操作に長時間を要し, メチルペントースおよびウロン酸もフロログルシドの沈澱を生じペントースのみを用いて測定した場合もかなり誤差を生じ易い。著者等の実験によるとキシロースを用いた場合5~10%の誤差があり, 同量のキシロースに対してグルクロン酸は25%の沈澱生成度を示した。著者等はこの方法に代るペントース定量法として比色法の適用を考え, 既知比色定量法について特にそのペントース特異性について検討し一応の結論を得たので, それ等の一部の改良とペントザン定量の場合の研究結果を併せて報告する。

ペントースの比色定量の目的にアンスロン試薬を用いる方法が数種発表されているが<sup>2~5)</sup>, これ等の方法は程度の差はあるがいずれもヘキソースもかなり呈色しヘキソース共存時のペントース定量法として使用できないことが明らかとなつた。アンスロン試薬を用いる方法の検討結果は続報で詳細を報告する予定である。Dische<sup>6)</sup> は検液に濃硫酸を加え短時間激しくふりまぜたのち冷却し, システイン塩酸塩水溶液を加える方法を発表している。

この方法は特異性において優れているが発熱の条件が変動し易いために再現性に乏しい欠点がある。また極大波長が390 m $\mu$  であり, ヘキソースの呈色による影響を除くためにこれに対応して吸光度を測定する波長も時によつて変動する。したがつて分光光電光度計の使用によらなくては測定は不可能である。硫酸と混合し湯浴中で短時間加熱後チオナリド試薬を加えて発色させる方法<sup>7)</sup> も報告されているが, 著者等の追試結果では呈色が弱く原報記載のような好結果を得られなかつた。

以上の方法の他にペントースの比色定量に対してオルシン試薬を用いた例が多く, Miller等<sup>8)</sup> はそれまでに報告された数種の類似の方法について試薬量や加熱時間について検討し最も呈色の強い条件を選んでいる。また動物組織中のリボ核酸の定量に塩化鉄-フロログルシン試薬を用いた例<sup>9)</sup> や, ヘキソースおよびウロン酸共存時のペントース定量法としてアニリン-酢酸試薬を用いた報告<sup>10)</sup> がある。これ等の方法はその鋭敏度, 特異性, 再現性において優れた点を認めたので試薬の構成や反応条件について検討した。文献は特定のフィルター名をあげて吸光度測定結果を記しているので各原法記載の条件によつて糖を呈色させその吸収曲線を測定した結果が Fig. 1 で,

\* 薬学雑誌 82巻1号に発表

1) 日本薬学会編: 衛生試験法注解 36(1956).

2) R. R. Bridges: Anal. Chem. 24, 2004(1952).

3) N. D. Gary, R. E. Klausmeier: Ibid. 26, 1958(1954).

4) 山本: 日薬理誌 52, 602(1956).

5) R. W. Bailey: Biochem. J. 68, 669(1958).

6) Z. Dische: J. Biol. Chem. 181, 379(1949).

7) H. Masamune, K. Ogawa: Tohoku J. Exptl. Med. 60, 23(1954).

8) G. L. Miller, R. H. Golder, E. E. Miller: Anal. Chem. 23, 903(1951).

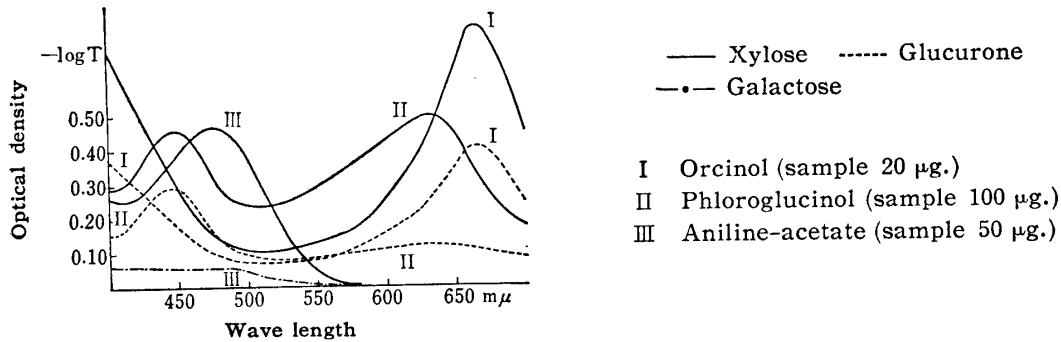


Fig. 1. Absorption Curves for the Color produced by Various Reagents

ペントースとしてキシロースを用い、弱いがペントースと同様に呈色する他の糖としてオルシン試薬および塩化鉄-フロログルシン試薬使用の場合はグルクロン酸を、アニリン-酢酸試薬使用の場合はガラクトースを用いてそれ等の吸収曲線を測定した。図のようにオルシン試薬使用の場合はペントースとウロン酸は同形の吸収曲線を示し、塩化鉄-フロログルシン試薬では可視部に2個の極大をもつが 630 mμ ではペントースに比べてウロン酸の吸光度は低い。アニリン-酢酸試薬の場合ペントースの吸収極大波長は 475 mμ であるがガラクトースは明瞭な極大が認められない。Fig. 2 はオルシン試薬使用の場合に試薬のオルシンと鉄明ばんの量をかえてキシロース、グ

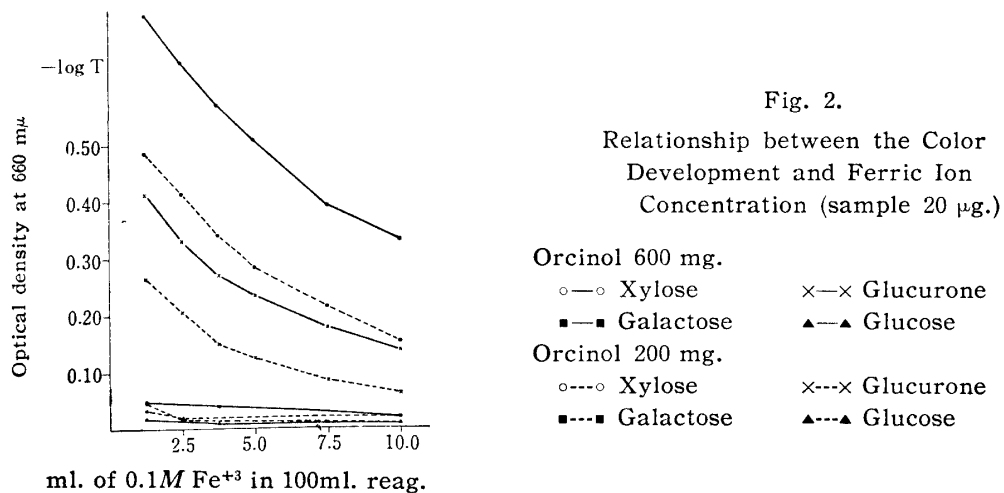


Fig. 2.

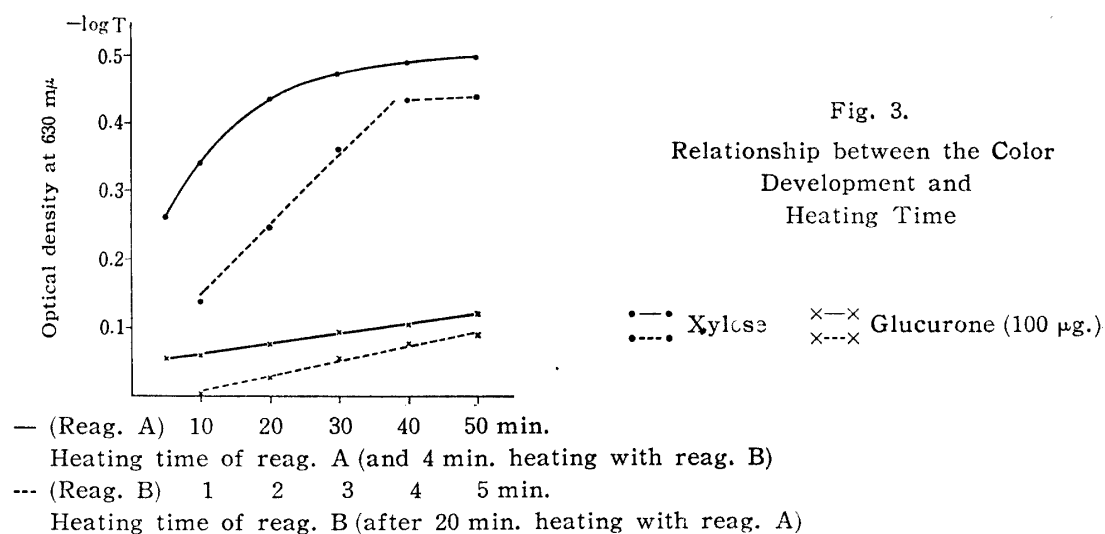
Relationship between the Color Development and Ferric Ion Concentration (sample 20 μg.)

ルクロン酸, ガラクトース, グルコースについて呈色度の変化をみたもので, 最小の場合でもキシロースに対しウロン酸は 50%, ヘキソースは 5% 程度の呈色を示す。

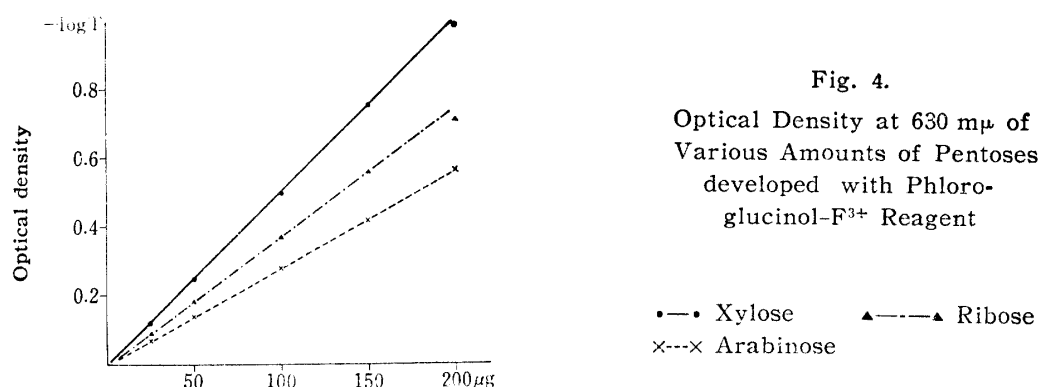
つぎに塩化鉄-フロログルシン試薬による方法についてその加熱時間などについて検討した。原法は塩化鉄液 (A 試薬) を加え 50 分沸騰湯浴中で加熱後フロログルシン液 (B 試薬) を加えさらに 4 分間加熱するものであるが, Fig. 3 のようにペントースは A 試薬添加後 20 分以上の加

9) H. v. Euler, L. Hahn : Svensk Kem. Tid. 58, 251(1946) (C.A. 41, 2108f(1947)).

10) M.V. Tracey : Biochem.J. 47, 433(1950).



熱では呈色度の増加は弱く、またB試薬添加後の加熱で4分間までは直線的に呈色が增大するがそれ以上では増加度は低いのに対しウロン酸はいずれの場合も加熱時間に比例してほぼ直線的に呈色は増大する。なお原法はB試薬を加えて20分間放置することが必要であるとしているが著者等の実験結果では直ちに加熱した時と差が認められなかつた。各ペントースについて原法の条件により630 mμで吸光度を測定するとFig. 4のように160 μg以下では濃度と直線的に比例



し比色定量できるが、キシロースと比較した呈色度はリボース74%、アラビノース56%であり、グルクロン酸はFig. 3で示されるように20分加熱では17%、50分加熱では23%の呈色度となる。ヘキソースおよびメチルペントースは2%以下で、グルコサミンは呈色せず、食品分析などで問題となる点を考えてペントースと同量のアルブミンおよび塩化ナトリウムを加えてみた結果は影響が認められなかつた。原法はリボ核酸の定量を目的としているが、いわゆるペントザンについては触れていない。著者等はWheat xylanおよび*Caulerpa brachypus*より抽出精製されたxylan<sup>\*2,11)</sup>を用いてキシロースと呈色度を比較した。前者はβ-1,4結合のxylanで少量のグルコースおよびウロン酸を含み、後者はβ-1,3結合のxylanで少量のグルコースを含むものである。結果はFig. 5のようにA試薬添加後10分以内の加熱ですでにxylanは完全に加水

\*2 東京教育大学理学部植物学教室より分与された。

11) Y. Iriki, T. Suzuki, T. Miwa, K. Nisizawa: Nature 187, 82(1960).

分解されたと考えられ、またこれはA試薬の酢酸を水で置き換え、塩酸の濃度は等しくした液と加熱した場合の還元力測定結果でも、Fig. 6のようにすでに10分の加熱で80%以上加水分解さ

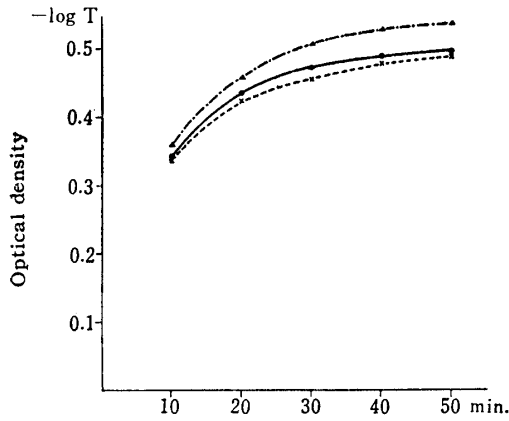


Fig. 5. Relationship between the Optical Density at 630 m $\mu$  and Heating Time, developed by Phloroglucinol-Fe<sup>3+</sup> Reagent

●—● Xylose    ▲---▲ Caulerpa xylan  
x---x Wheat xylan (100  $\mu$ g.)

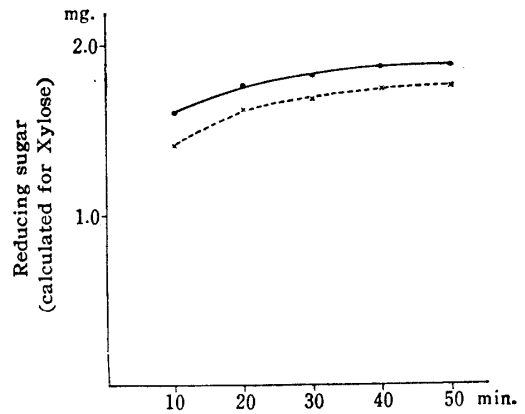


Fig. 6. Relationship between the Reducing Value and Heating Time, developed by 1.6N Hydrochloric Acid

— Caulerpa xylan (2 mg.)  
----- Wheat xylan (2 mg.)

れ40分ではほぼ完全に加水分解されたとみられる点からも首肯でき、これらの結果から本法は一般にペントザンの比色定量法として用い得ると考える。

つぎにアニリン-酢酸試薬を用いた方法は原法では試薬添加後暗所に室温で20~24時間放置後測定すると記載されているが、著者等の実験結果ではFig. 7のように温度による影響がかなり

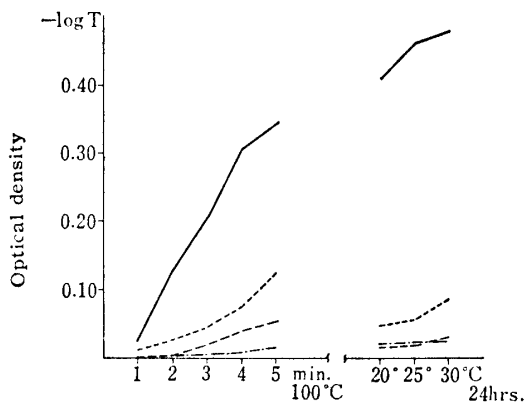


Fig. 7. Relationship between the Optical Density at 475 m $\mu$  and Heating Time and Temperature, developed by Aniline-Acetic Acid Standard Reagent (sample 50  $\mu$ g.)

— Xylose    ---- Glucose  
----- Galactose    -·-·- Glucuronic

認められ低温ではペントースの呈色が著しく弱まるが高温になるとガラクトースの呈色度が強くなる。放置温度は25°が適当と考える。また沸騰湯浴中で短時間加熱する方法も試みたがヘキソースの呈色が強くなって不適當であつた。試薬の組成についてはアニリンは原法記載の量を最適と認めたが、修酸はより少量で有効なことを知つた。この関係をFig. 8に示す。原法ではガラクトースの呈色度をキシロースの5%以下としているが原試薬の使用では10%以上にも呈色度が達する。Fig. 9のように酢酸の量を減少させるとグルクロン酸については殆んど呈色に影響がみられないがペントースとガラクトースは呈色度が減り、ペントースに対するガラクトースお

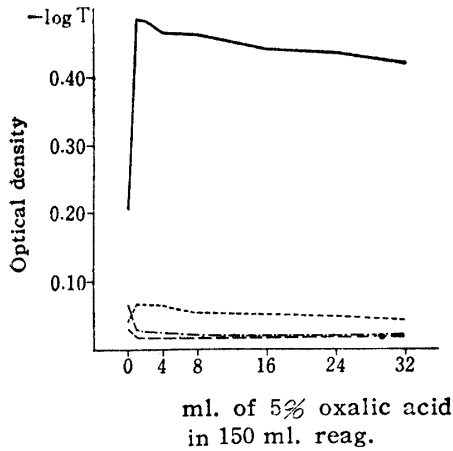


Fig. 8.  
Relationship between the Optical Density  
at 475  $m\mu$  and Concentration of  
Oxalic Acid  
Sample 50  $\mu\text{g.}$ , acetic acid 100 ml.,  
and Aniline 16 ml., in  
150 ml. reagent

— Xylose            ····· Galactose  
- - - Glucose       - · - - Glucurone

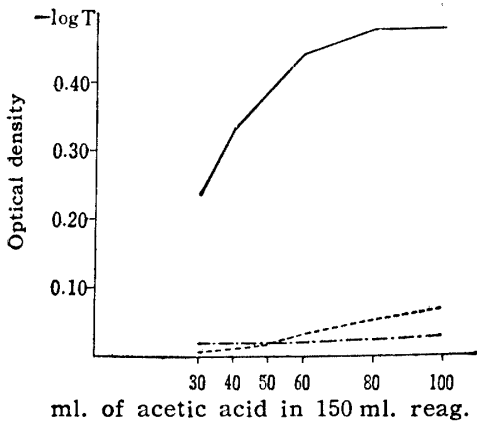


Fig. 9.  
Relationship between the Optical Density  
at 475  $m\mu$  and Concentration of  
Acetic Acid  
Sample 50  $\mu\text{g.}$ , aniline 16 ml.,  
and 5% oxalic acid 1 ml., in  
150 ml. reagent

— Xylose            ····· Galactose  
- - - Glucurone

よびグルクロン酸の呈色度を5%以下に抑えるには氷酢酸50 cc, アニリン16 cc, 5%修酸1 cc, 水83 ccの混液を試薬として使用するのがよい。他のヘキソース、メチルペントースの場合はキシロースの2%以下の呈色度で、グルコサミンは呈色せず、ペントースと同量のアルプミンおよび塩化ナトリウムを加えた場合の影響は認められない。また wheat xylan および Caulerpa xylan を用いた場合には殆んど呈色を認めなかつた。各ペントースについて改良試薬を用い475  $m\mu$  で吸光度を測定すると Fig. 10 のように 80  $\mu\text{g}$  以下では濃度と直線的に比例して比色定量

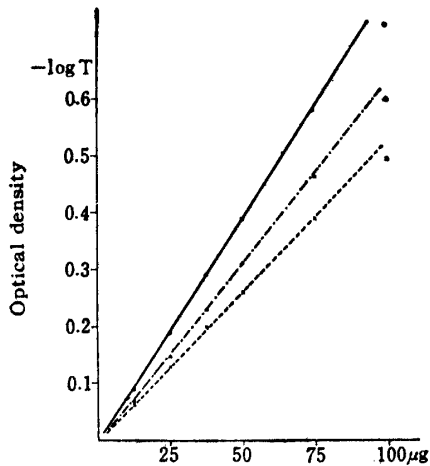


Fig. 10.  
Optical Density at 475  $m\mu$  of Various  
Amounts of Pentoses developed  
with Improved Aniline-Acetic Acid  
Reagent

·-· Xylose            ▲- - -▲ Ribose  
x- - -x Arabinose

可能で、呈色度はキシロースに対してリボース 80%, アラビノース 67%である。

結論として塩化鉄-フロログルシン試薬およびアニリン-酢酸改良試薬を用いる方法がペントースの比色定量法として優れており、前者はあらかじめ加水分解せずにペントザンの定量が可能であるがウロン酸がかなり呈色し、後者はガラクトース、ウロン酸の弱い呈色をみるが、両法ともに他の糖類、蛋白質、塩の影響は僅かで、ペントザンおよびペントースの定量法として従来の重量法にかわり得るものと考えられる。

### 実 験 の 部

**オルシン試薬による方法**  $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  60 mg およびオルシン (Merck 製) 600 mg を 8 N HCl に溶解し全量 100 ml としたものを原試薬とした。検液 1 ml を 25×200 mm の共栓付試験管にとり試薬 4 ml を加え混合し沸騰水浴中に 30 min 加熱後直ちに冷水で室温に冷却し吸光度を日立 EPU 2 型分光光度計を用いて測定。吸収曲線は日立 EPS 2 型自記分光光度計を用いて測定した。

**$\text{FeCl}_3$ -フロログルシン試薬による方法**  $\text{HCl}$  (sp. gr. 1.18) · AcOH = 1 : 6 の混液に 0.1% 濃度に  $\text{FeCl}_3$  を溶解した液を A 試薬,  $\text{HCl}$  (sp. gr. 1.18) · 水 · AcOH = 1 : 1 : 2 の混液に 0.25% の濃度にフロログルシン (第一化学薬品特級試薬) を溶解した B 液を試薬とし、同様の共栓試験管に検液 1 ml をとり A 試薬 8 ml を加え沸騰水浴中で加熱後冷水で室温迄冷却し、これに B 試薬 1 ml を加え沸騰水浴中で再び加熱し室温に冷却後吸光度を測定。

**アニリン-AcOH 試薬による方法** 同様の共栓付試験管に検液 2 ml および試薬 6 ml を入れて混合し、暗所で 25°, 24 hr 放置後吸光度を測定。原試薬は AcOH 100 ml, アニリン 16 ml, 5% 酢酸 10 ml, 水 24 ml の混液, 改良試薬は AcOH 50 ml, アニリン 16 ml, 5% 酢酸 1 ml, 水 83 ml の混液。

**Xylan の定量** xylan 20 mg に 1% NaOH 2 ml を加え水を加えて 10 ml とした溶液を原液とし適当濃度に水で希釈して比色法の検液とした。還元力測定は原液 1 ml に水 1.6 ml および  $\text{HCl}$  (sp. gr. 1.18) 0.4 ml を加え沸騰水浴中に加熱し室温に冷却後 30% NaOH を加えて中和し次亜ヨウ素酸法<sup>12)</sup> により測定を行なった。本研究に用いた xylan を御手与下さった東京教育大学西沢一俊教授に深く感謝します。

### Summary

For the determination of pentose by colorimetry, specificity and reproducibility of various methods were examined. It was concluded from these experiments that the methods using ferric chloride-phloroglucinol reagent and aniline-acetic acid reagent were the most suitable. When using pentosan as the sample, determination can be made by the method using ferric chloride-phloroglucinol reagent. Coloration by this method, in comparison with D-xylose, was 74% in D-ribose, 56% in L-arabinose, and 23% in D-glucurone, hexose and methylpentose being below 2%. Pentose can be determined up to 20~160  $\mu\text{g./ml}$ .

The known composition of the aniline-acetic acid reagent was modified and the degree of coloration by this method, in comparison with D-xylose, was 80% in D-ribose, 67% in L-arabinose, and 5% in D-galactose and D-glucurone, other hexoses and methylpentose being below 2%. Pentose can be determined up to 10~80  $\mu\text{g./2 ml}$ . In both cases, the presence of glucosamine, albumin, and sodium chloride do not interfere in the coloration.

12) 友田：薬誌 80, 1696(1960).