

Title	ペントースの比色定量(第2報) : 塩酸・酢酸混液を溶媒とする多価フェノール試薬の研究
Sub Title	Colorimetric determination of pentoses. II. : studies on the polyphenol reagents dissolved in hydrochloric acid-acetic acid mixture.
Author	友田, 正司(Tomod, Masashi) 神谷, 智子(Kamiya, Satoko)
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.15- 20
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000006-0015

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2報^{*1})* 塩酸・酢酸混液を溶媒とする多
価フェノール試薬の研究

友田正司, 神谷智子

Colorimetric Determination of Pentoses. II. Studies on the
Polyphenol Reagents dissolved in Hydrochloric Acid-Acetic Acid Mixture.

Masashi TOMODA and Satoko KAMIYA :

前報^{*1} において各種のペントース比色定量法を検討し, 塩化鉄-フロログルシン試薬およびアニリン-酢酸試薬が適当であるとの結論を得たが, これらの試薬についてもなお特異性の向上や測定時間の短縮が望ましい。

オルシンおよびフロログルシンを用いたペントース比色定量法についてはすでに多くの報告があるが, いずれもペントースとともにウロン酸がかなり呈色することが認められる。アンスロン試薬によるペントース比色定量法は一般にウロン酸による呈色は認められないが, 著者等の検討の結果ではいずれもヘキソースによる呈色はかなり認められ, 特異性の点で大きな欠点をもつ。すなわち Bridges,¹⁾ Gary, Klausmeier,²⁾ 山本,³⁾ Bailey⁴⁾ の各方法によりペントースとグルコースによる呈色の吸収曲線を測定したが, いずれもペントースとともにグルコースがかなり呈色している。最近沢村等⁵⁾ はアンスロン試薬による興味ある新定量法を発表しているが, ペントース特異性は満足されていない。また著者等の経験ではアンスロン試薬による方法は再現性に難点があり, 特に Bridges の方法は湯浴中で加熱せず室温で試薬を速やかに混合して発熱呈色させる操作であるため再現性に乏しい。また中村等⁶⁾ の報告でも明らかなように, アンスロン反応はタンパク質の共存で影響を受け易い欠点もある。

従来塩酸・酢酸混液を用いた多価フェノール試薬によるペントース比色定量法について系統的な研究はないので, 著者等は試薬の組成, 加熱時間などを変えてペントースの呈色度, 特異性などについて検討した。実験はすべて検液 1 ml に試薬 4 ml を加え振り混ぜて沸騰湯浴中で加熱呈色させた。2価フェノールではピロカテコールおよびヒドロキノンを用いた場合は全く呈色せず, レゾルシンおよびオルシンは呈色試薬としての作用が認められる。また3価フェノールでは各異性体はそれぞれ呈色試薬として有効である。キシロースを検体として, これらの物質をそれぞれ 0.1% 濃度に塩酸・酢酸混液に溶かした試薬を用いて 10 分間加熱した場合の溶媒組成と呈色度の関係を Fig. 1 に示す。ただしオキシンヒドロキノン溶液は不安定で直ちに青色となるので, アセチル化体の 0.13% 溶液を使用した。Fig. 1 は試薬の濃塩酸と氷酢酸の容量比を 1:7 から 2:1 まで変えた場合の各試薬の極大吸収波長における吸光度を測定したものであり, オル

* 薬学雑誌 82, 1447(1962) に発表

*¹ 第1報: 薬誌 82, 126(1962)。

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

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

3) 山本: 日薬理誌 52, 602(1956).

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

5) 沢村, 小山: 薬誌 81, 1689(1961).

6) 中村: 薬誌 81, 846(1961).

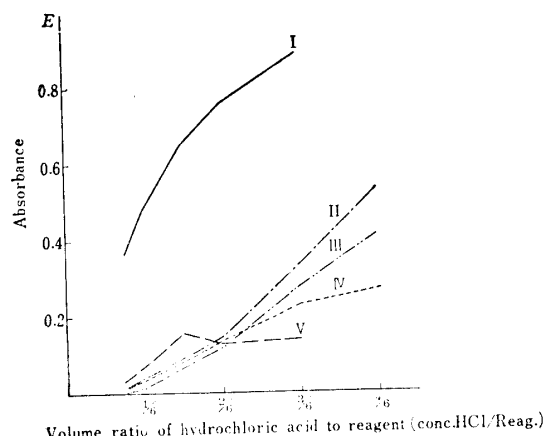


Fig. 1.
Relationship between the Color Development
with Hydrochloric Acid Concentration

- I : Phloroglucinol, 550 m μ , xylose 50 μ g.
 II : Pyrogallol, 490 m μ , xylose 50 μ g.
 III : Hydroxyhydroquinone triacetate,
 545 m μ , xylose 50 μ g.
 IV : Resorcinol, 555 m μ , xylose 100 μ g.
 V : Orcinol, 605 m μ , xylose 100 μ g.

シン以外の多価フェノール試薬はいずれも塩酸量の増加に伴って吸光度が増大する。Fig.1の横軸は試薬の塩酸・酢酸混液中に濃塩酸が占める容量比を表わしている。しかし塩酸量をこの範囲以上に増加すると発煙のため使用に適さない。またこの範囲では塩酸と酢酸の量比を変えても呈色の色調は変わらず、極大吸収波長の変化は認められない。オルシンは塩酸と酢酸の量比が1:3の場合に吸光度が最大で、フロログルシンは試薬の塩酸量が少ない時はグルコースによる呈色は認められないが、塩酸量が増加するとグルコースの存在でやや呈色するので、以下この両試薬はいずれも試薬中の塩酸と酢酸の量比は1:3として実験を行なった。

つぎにキシロースを検体として加熱時間を変えた場合の各試薬の極大吸収波長における吸光度の変化をFig.2に示す。ピロガロール試薬は20分、オキシハイドロキノニアセテート試薬は

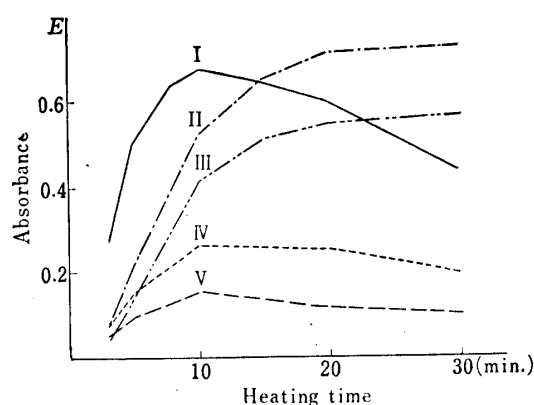


Fig. 2. Relationship between the Color
Development with Heating Time

- I : Phloroglucinol, 550 m μ , xylose 50 μ g.
 II : Pyrogallol, 490 m μ , xylose 50 μ g.
 III : Hydroxyhydroquinone triacetate,
 545 m μ , xylose 50 μ g.
 IV : Resorcinol, 555 m μ , xylose 100 μ g.
 V : Orcinol, 605 m μ , xylose 100 μ g.

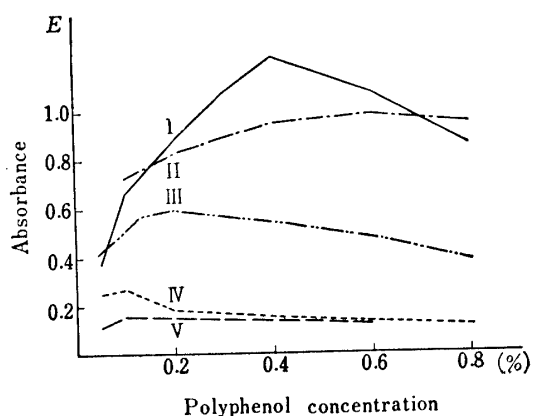


Fig. 3. Relationship between the Color
Development with Polyphenol
Concentration

- I : Phloroglucinol, 550 m μ , xylose 50 μ g.,
 10 min. heat
 II : Pyrogallol, 490 m μ , xylose 50 μ g.,
 20 min. heat
 III : Hydroxyhydroquinone triacetate,
 545 m μ , xylose 50 μ g., 30 min. heat
 IV : Resorcinol, 555 m μ , xylose 100 μ g.,
 10 min. heat
 V : Orcinol, 605 m μ , xylose 100 μ g.,
 10 min. heat

30分加熱でほぼ最大値に達するが、他の試薬はいずれも10分加熱の場合に最大値が得られた。各試薬ともグルコースおよびグルクロン酸を検体とした時は加熱時間の増加に伴って呈色が強くなる。

Fig. 3はキシロースを検体として各試薬の多価フェノールの量を変えた場合の極大吸収波長における吸光度の変化を示す。レゾルシンおよびオルシン試薬はいずれも0.1%の場合に最大値が得られるが呈色度は低く、ピロガロールは0.6%、フロログルシンは0.4%、オキシハイドロキノンアセテートは0.2%の場合にそれぞれ最大値が得られた。グルコースを検体とした場合についても各試薬組成の影響を検討し、ペントース特異性も考慮して Table I に示す条件が各多価フェノール試薬について適当と認めた。

Table I. Constitutions of Polyphenol Reagents

Polyphenol	Constitution of solvent	Concentration of solute	Heating time
	(HCl : AcOH)	(%)	(min., in boiling water bath)
Resorcinol	2 : 1	0.1	10
Orcinol	1 : 3	0.1	10
Phloroglucinol	1 : 3	0.1	10
Pyrogallol	2 : 1	0.6	20
Hydroxyhydroquinone triacetate	2 : 1	0.2	30

Table I の各試薬を用いた場合のキシロース、グルコースおよびグルクロン酸による呈色の吸収曲線を Fig. 4~8 に示す。また各試薬によるキシロースの呈色の極大吸収波長における吸光度を、加熱終了後室温に放置して経時的に測定した結果を Fig. 9 に示す。

レゾルシン試薬はキシロースに対する呈色度が弱く、グルコースおよびグルクロン酸もかなり呈色し、キシロースによる呈色は加熱終了後30分以内では安定であるが以後徐々に呈色度は減少する。オルシン試薬はキシロースに対する呈色度は弱いが特異性は大き、グルコースは全く呈色せず、グルクロン酸による呈色もキシロースに比して非常に弱い。呈色度は加熱終了後徐々に増大するが1時間半から2時間では安定である。フロログルシン試薬はキシロースによる呈色が強く、かつグルコースおよびグルクロン酸による呈色が弱い利点をもつが、呈色が不安定で Fig. 9 に示すように氷冷下でも時間の経過とともにかなり呈色度が減少する。試薬量を変えた場合にも同様に呈色は不安定で、また試薬量の減少に伴って呈色度は急激に減少する。有機溶媒による転

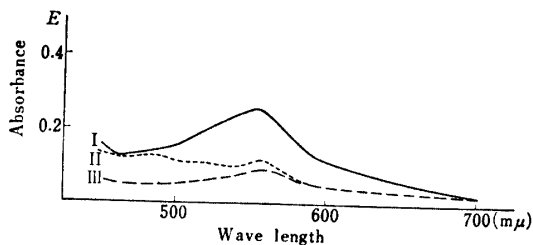


Fig. 4. Absorption Curves for the Colors produced by Resorcinol Reagent

- I : Xylose 100 μg.
- II : Glucose 100 μg.
- III : Glucurone 100 μg.

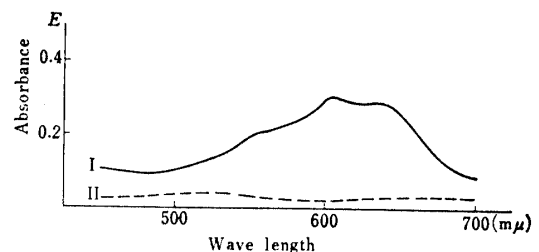


Fig. 5. Absorption Curves for the Colors produced by Orcinol Reagent

- I : Xylose 200 μg.
- II : Glucurone 200 μg.

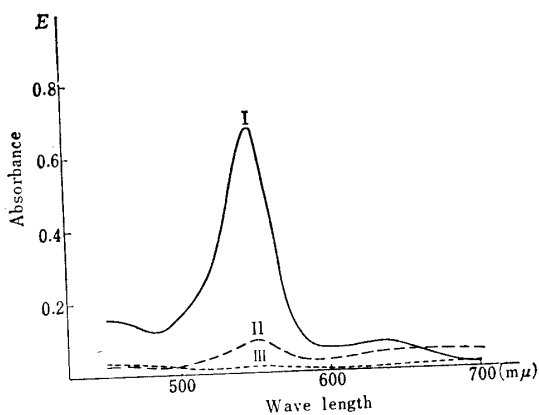


Fig. 6. Absorption Curves for the Colors produced by Phloroglucinol Reagent

- I : Xylose 50 μg.
- II : Glucurone 50 μg.
- III : Glucose 50 μg.

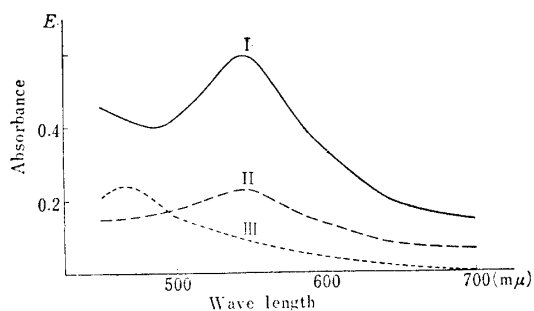


Fig. 8. Absorption Curves for the Colors produced by Hydroxyhydroquinone Triacetate Reagent

- I : Xylose 50 μg.
- II : Glucurone 50 μg.
- III : Glucose 50 μg.

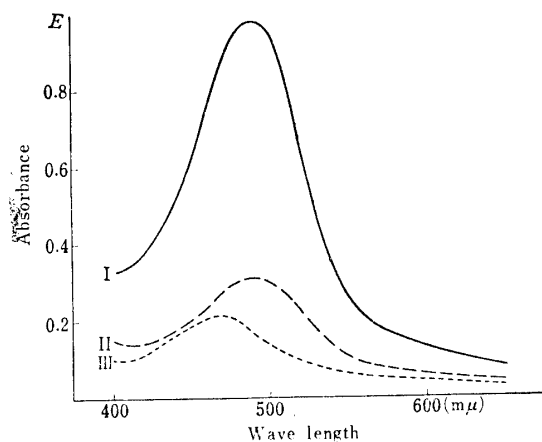


Fig. 7. Absorption Curves for the Colors produced by Pyrogallol Reagent

- I : Xylose 50 μg.
- II : Glucurone 50 μg.
- III : Glucose 50 μg.

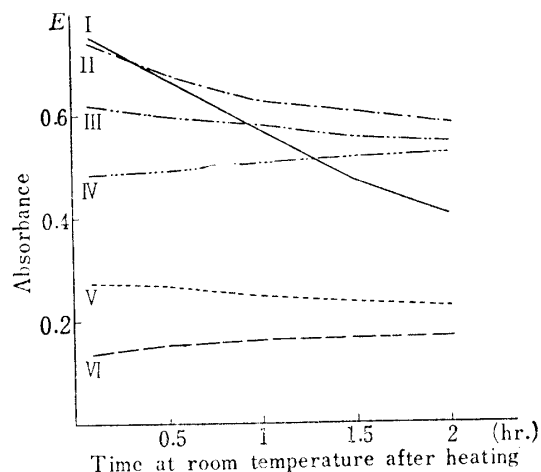


Fig. 9. Stability of the developed Color

- I : Phloroglucinol, xylose 50 μg. (30°C)
- II : Phloroglucinol, xylose 50 μg. (in ice water)
- III : Hydroxyhydroquinone triacetate, xylose 50 μg.
- IV : Pyrogallol, xylose 25 μg.
- V : Resorcinol, xylose 100 μg.
- VI : Orcinol, xylose 100 μg.

溶も試みたが成功しなかつた。ピロガロール試薬はグルコースおよびグルクロン酸が若干呈色するが、キシロースによる呈色は多価フェノール試薬中で最も強く、呈色度は加熱終了後経時的にやや増大するが1時間半から2時間では安定である。オキシハイドロキノンアセテート試薬によつてもキシロースはかなり呈色し、グルコースおよびグルクロン酸の呈色もみられるが、呈色は不安定で時間の経過とともに徐々に減少する。本試薬は加熱により淡黄色に、またフロログルシ

ン試薬は加熱により淡赤色に着色し、糖による呈色の不安定もこのような試薬の不安定によるところが大きいと考えられる。

以上のように塩酸・酢酸混液を溶媒として多価フェノールをペントースに対する呈色試薬として用いた場合に、2価フェノールではレゾルシンおよびオルシンが有効で、また3価フェノールはいずれも有効であつた。これらの物質の共通点としてメタ位の2つの水酸基の存在があり、これと呈色反応との関係が考えられる。メタ位の2つの水酸基中の1個をメチル基、カルボキシ基、アミノ基で置換した物質 (*m*-クレゾール, *m*-ヒドロオキシ安息香酸, *m*-アミノフェノール) ではないずれも反応陰性である。

多価フェノール試薬中ではピロガロール試薬はペントース特異性は低いが生色度が大で一定時間内では呈色が安定であり、オルシル試薬は呈色度は低いが通常用いられる塩化鉄-オルシン-塩酸試薬より特異性が優れており呈色も一定時間内は安定なので、いずれもペントースの比色定量への応用が可能であり有意義なものとする。これらの試薬を用いる比色定量法の詳細は続報で報告する。

実験の部

吸光度および吸収曲線の測定 検液 1 ml を 25×200 mm の栓付試験管にとり試薬 4 ml を加え混合し沸騰湯浴中に一定時間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。多価フェノールは orcinol, pyrocatechol, resorcinol は東京化成工業, hydroquinone, pyrogallol は小宗化学薬品, phloroglucinol は第一化学薬品の各特級試薬, hydroxyhydroquinone triacetate は文献⁷⁾記載の方法により合成して使用。白色針状晶, mp

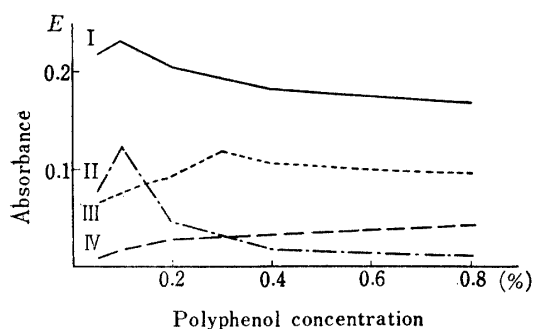


Fig. 10. Relationship between the Color Development with Polyphenol Concentration

- I : Pyrogallol, 490 m μ , glucose 50 μ g., 20 min. heat
- II : Resorcinol, 555 m μ , glucose 100 μ g., 10 min. heat
- III : Hydroxyhydroquinone triacetate, 545 m μ , glucose 50 μ g., 30 min. heat
- IV : Phloroglucinol, 550 m μ , glucose 50 μ g., 10 min. heat

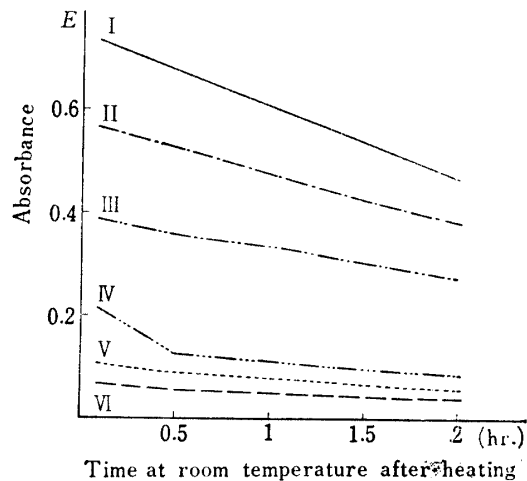


Fig. 11. Stability of the developed Color by Phloroglucinol Reagent

- I : Sample 1 ml. + Reagent 4 ml.
- II : Sample 1.2 ml. + Reagent 3.8 ml.
- III : Sample 1.4 ml. + Reagent 3.6 ml.
- IV : Sample 1.6 ml. + Reagent 3.4 ml.
- V : Sample 1.8 ml. + Reagent 3.2 ml.
- VI : Sample 2 ml. + Reagent 3 ml.

7) Org. Synth. Col. Vol. 1, 310.

96~97°。

試薬濃度と glucose による呈色度の関係 glucose を検体として各試薬の多価フェノールの量を変えた場合の極大吸収波長における吸光度の変化を Fig. 10 に示す。

Phloroglucinol 試薬量と呈色度の関係 phloroglucinol 試薬を用いた場合に試薬と検液の量比を変えた場合の極大吸収波長における吸光度を、加熱終了後室温に放置して経時的に測定し比較した結果を Fig. 11 に示す。

実験に協力された木村正子氏に深謝致します。

Summary

The degree of coloration, specificity and stability of pentose with various compositions in different heating period of the various polyphenol reagents in the mixed solvent of hydrochloric acid and acetic acid have been investigated. The activity of resorcinol and orcinol in diphenol group has been observed as a coloration reagent and the isomers of triphenol were found to be effective for coloration reagent. Because of the instability of hydroxyhydroquinone, its triacetate was used for the test. All of the compounds examined possess two hydroxyl groups commonly at *meta* position, which were considered to be related closely to the coloration reaction. An optimal condition of polyphenols for the colorations is: resorcinol reagent showed a low degree of coloration; phloroglucinol and hydroxyhydroquinone reagent showed unstable coloration; orcinol reagent was superior to the specificity, though the degree of coloration was low; and pyrogallol reagent had a high degree of coloration, being inferior to the specificity. It was concluded that the phenolic compounds mentioned above were available to the quantitative colorimetry of pentose.

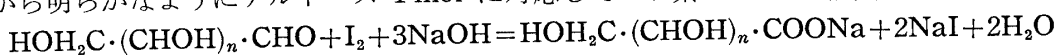
次亜ヨウ素酸法による還元糖定量の検討*

友田正司

Studies on the Determination of Reducing Sugars by Hypiodite Method.

Masashi TOMODA

アルカリ性ヨウ素溶液を還元糖に作用させた場合に次亜ヨウ素酸塩の生成によりアルドースがアルドン酸に酸化されることを利用した次亜ヨウ素酸法は、ケトースがこの条件で反応しないので Willstätter 等¹⁾ がグルコース定量に用いて以来アルドースの定量法として知られている。反応式から明らかのようにアルドース 1 mol に対応してヨウ素 1 mol が消費される。



Kline 等²⁾ は過剰酸化を防ぐためにヨウ素とアルカリを分割して交互に加える方法を発表し、検体と試薬量の関係や作用時間についてもかなり厳密に規定しているが、著者の追試結果では原法のように検体量を規定する意義は認められず、ヨウ素とアルカリを分割使用する効果も認

* 薬学雑誌 80巻12号に発表