

Title	ペントースの比色定量(第3報) : ピロガロール試薬による定量法
Sub Title	Colorimetric determination of pentoses. III. : determination with pyrogallol reagent.
Author	友田, 正司(Tomodara, Masashi)
Publisher	共立薬科大学
Publication year	1964
Jtitle	共立薬科大学研究年報 (The annual report of the Kyoritsu College of Pharmacy). No.8(1963)/9(1964) ,p.25- 28
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000008-0025

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.

- 13) 林：腸内細菌確認ならびに鑑別用培地，特願 昭 36-33679 公告決定 昭 38 年
 14) Edwards, P. R. et al. : Publ. Health. Lab, 19, (5) 85~87 (1961); In : Biol. Abstract, 38, 1783 (1963)

Summary

Proteus, Morganella, Rettgerella and Providencia act on dl-phenyl alanine and produce phenyl pyruvic acid. (PPA). From the culture filtrate of above microorganisms, crystalline phenyl pyruvic acid was detected.

The authors intended to utilize this PPA production of the microorganisms above described for the differentiation of the family Enterobacteriaceae and investigated into the composition of a new medium.

The iron which participates in PPA-reaction is a ferric salt. A ferrous salt has no effect on it.

From results obtained, a new confirmatory medium which can also serve as differential medium was devised. By the use of this medium it is possible to observe PPA-reaction, acid and gas production by fermentation of glucose or lactose and hydrogen sulphide production simultaneously.

Proteus, Morganella, Rettgerella and Providencia produce a dark red-purple color on the slant surface of this medium. Hence, the differentiation of Salmonella and Shigella from Proteus, Morganella, Rettgerella or Providencia which was impossible on Kligler's medium became possible.

Use of this new medium alone, therefore, will enable confirmation and differentiation of the family Enterobacteriaceae and it is considered useful as a routine clinical test.

ペントースの比色定量 (第 3 報)* ピロガロール試薬による定量法

友田正司

Colorimetric Determination of Pentoses. III.

Determination with Pyrogallol Reagent.

Masashi TOMODA

塩酸・酢酸混液を溶媒とする多価フェノール試薬によるペントースの比色定量を検討した結果、ピロガロール試薬は呈色度が大で定量に用いる可能性があることを前報¹⁾で報告した。しかしながらこの試薬を用いて同時操作による呈色の吸光度を比較すると、キシロース 20 $\mu\text{g/ml}$ の 5 検液による場合、標準偏差 $\sigma=0.0216$, 吸光度の平均値 0.383, 変異係数 5.7% であり、正確度が低いことが判つた。著者はこの場合に試薬に微量の鉄塩を加えると測定値のばらつきはほとんどなく、ペントース定量試薬として用いることを知つた。

* Chem. Pharm. Bull. 11, 806 (1963) に発表

1) 第 2 報：薬誌 82, 1447 (1962).

すでにオルシン塩酸溶液をペントース定量試薬とする場合に鉄塩の共存が著しく呈色度を高めることが知られており、多くの方法が発表されている。^{2~4)} ピロガロール試薬の場合には鉄塩の付加による呈色度の増大は少なく、また $(0.1\sim 5)\times 10^{-3}$ モルの範囲で鉄塩の濃度を変えた場合に、呈色度、精度ともにほとんど変化が認められなかつた。また鉄塩として塩化第2鉄を用いた場合と硫酸鉄アンモニウムを用いた場合の差もほとんどない。鉄塩の代わりに塩化コバルトまたは塩化ニッケルを用いた場合には鉄塩の示す効果は全く認められない。

新方法によつてキシロース 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の5検液を用いて極大吸収波長における吸光度を測定した場合の吸光度の平均値 0.398, 標準偏差 $\sigma=0.0025$, 変異係数 0.6% である。キシロース, フルクトース, ラムノース, グルコース, N-アセチルノイラミン酸, グルクロン酸, およびデオキシリボ核酸ナトリウム塩の各水溶液による吸収曲線を Fig. 1 に示す。ペントースおよびヘキサロン酸はいずれも 500 $\text{m}\mu$ に吸収極大をもつが、ウロン酸の呈色度は低い。他の糖質も若干呈色し、とくにフルクトースは 475 $\text{m}\mu$ に極大をもつかなり強い呈色が認められるが、ペントースとウロン酸以外の物質は 500 $\text{m}\mu$ と 430 $\text{m}\mu$ における吸光度が等しいので、これらの物質とペントースが共存しても 500 $\text{m}\mu$ における吸光度と 430 $\text{m}\mu$ における吸光度の差を求めれば、共存物質による影響を除くことができる。

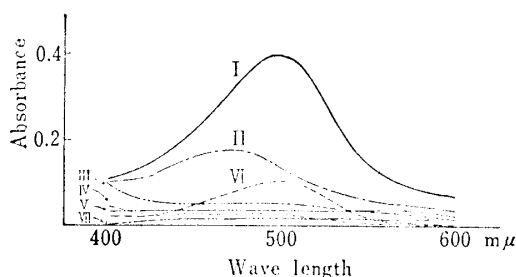


Fig. 1. Absorption curves for the colours produced by pyrogallol- Fe^{3+} reagent

I : xylose (sample=20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
 II : fructose V : sialic acid
 III : rhamnose VI : glucuronic acid
 IV : glucose VII : DNA

キシロース, リボース, およびアラビノースを検体として 500 $\text{m}\mu$ における吸光度を測定し、また 500 $\text{m}\mu$ における吸光度と 430 $\text{m}\mu$ における吸光度の差を求めると、いずれも 10~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲内で濃度と直線的に比例することが認められた (Figs. 2, 3). またリボ核酸ナトリウム塩を検体としてペントースの場合と同様に測定した結果では Fig. 4 のごとく 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以内で定量可能であつた。第1報⁵⁾ に述べた実験結果から本法の条件でペントザンの定量を行なうことも明らかである。500 $\text{m}\mu$ においてキシロースに対する呈色度はリボース 90%, アラビノース 54% である。本法によつてペントース, ペントザン, および核酸中のリボースの定量を行なうことができる。グルコサミンおよび血清アルブミンは呈色せず、これらの物質または塩化ナトリウムをペントースと同量共存せしめても全く影響は認められない。

従来の代表的なペントースの比色定量法であるオルシン法²⁾ およびフロログルシン法⁶⁾ の変異係数は 0.7% および 1.2% であつて、ピロガロール法は精度が優れており、現在までの他の方法

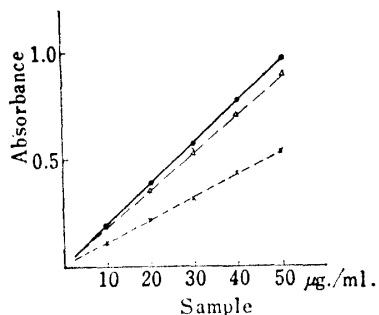
2) G. L. Miller, R. H. Golder, E. E. Miller : Anal. Chem., 23, 903 (1951).

3) W. R. Fernell, H. K. King : Analyst, 78, 80 (1953).

4) Z. Dische : "Methods of Biochemical Analysis," 2, 349 (1955).

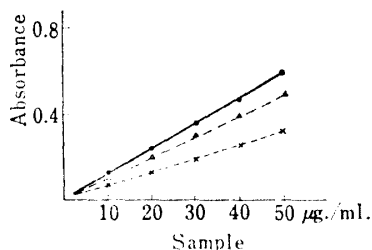
5) 友田, 神谷, 木村 : 薬誌, 58, 251 (1962).

6) H. V. Euler, L. Hahn : Svensk Kem. Tid., 58, 251 (1946) [C. A. 41, 2108 f (1947)].



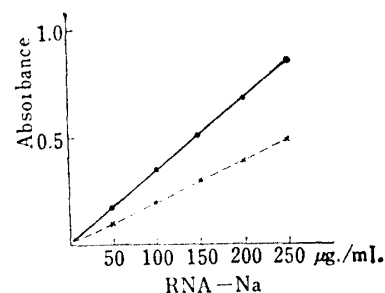
○—○ xylose △—△ ribose
 ×—× arabinose

Fig. 2. Optical Density at 500 $m\mu$ of Various Amounts of Pentoses



○—○ xylose △—△ ribose
 ×—× arabinose

Fig. 3. Difference between the Optical Density at 500 $m\mu$ and at 430 $m\mu$ of Various Amounts of Pentoses



●—● E (500 $m\mu$)
 ×—× ΔE (500~430 $m\mu$)

Fig. 4. Optical Density of Various Amount of RNA-Na

で呈色を避けられたかつたところの、ペントースおよびヘキスロン酸以外の物質の影響を除くことができる。

実 験 の 部

ピロガロール試薬 濃塩酸：氷酢酸 (2:1, v/v) の混液にピロガロールを 0.6% に溶解し、この溶液 99 部に 0.01M $FeCl_3$ 1 部を加え混合。この液はほとんど無色であり、用時調製するのがよい。

吸光度および吸収曲線の測定 検液 1 ml を 25×200 mm の共栓付試験管にとり試薬 4 ml を加えて混合し、沸騰水浴中に 20 分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した。検体の中、N-アセチルノイラミン酸は東京大学伝染病研究所山川教授より分与されたもので、他は東京化成の特級試薬を用いた。

鉄塩添加による影響 キシロース (20 $\mu g/ml$) を検体として、試薬中の鉄濃度を変えた場合の 500 $m\mu$ における吸光度の変化を Fig. 5 に示す。

加熱時間の影響 キシロース、グルコース (20 $\mu g/ml$)、およびリボ核酸ナトリウム (100 $\mu g/ml$) を検体として、沸騰水浴中の加熱時間を変えた場合の 500 $m\mu$ における吸光度の変化を Fig. 6 に示す。キシロースは加熱時間 20 分でもつとも呈色が強く、リボ核酸ナトリウムは 20 分で呈色度がほぼ極大に達するが、グル

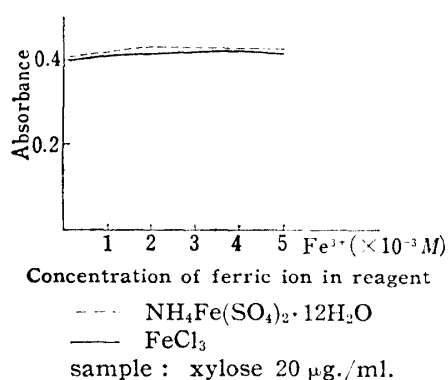


Fig. 5. Relationship between the Optical Density at 500 $m\mu$ and Ferric Ion Concentration

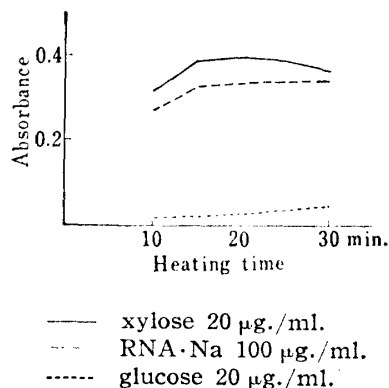


Fig. 6. Relationship between the Optical Density at 500 $m\mu$ and Heating Time

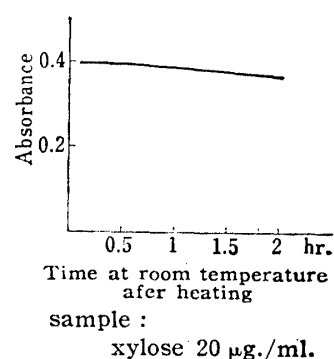


Fig. 7. Stability of Colour Development

コースは加熱時間の増大に伴なつて呈色が強くなる。

呈色の安定度 キシロース (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を検体として、加熱終了後室温に放置した場合の 500 $\text{m}\mu$ における吸光度の変化を Fig. 7 に示す。

N-アセチルノイラミン酸を分与された東京大学山田民夫教授、ならびに実験に協力された木村正子氏に深く感謝致します。

Summary

A method using pyrogallol-ferric chloride-hydrochloric acid-acetic acid reagent was described for the colorimetric determination of pentose, pantoan, or ribonucleic acid. Coloration by this method was 90% in D-ribose and 54% in L-arabinose of that of D-xylose. Pentoses can be determined up to 10~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Hexuronic acid showed an absorption curve similar to that of pentoses but its coloration was much lower than that of pentoses. It is possible to eliminate the influence of other carbohydrates by estimating the difference in absorbances between 500 and 430 $\text{m}\mu$. The presence of D-glucosamine, serum albumin, and sodium chloride does not interfere in this coloration.

ペントースの比色定量 (第4報^{*1})^{*} オルシン試薬による定量法

友田 正司

Colorimetric Determination of Pentoses. IV.

Determination with Orcinol Reagent.

Masashi TOMODA

オルシンの鉄塩含有塩酸溶液はペントースに対する定性および定量用試薬として広く知られている。¹⁻³⁾ この試薬を用いた多くの方法が発表されているが、ペントース以外にヘキソース、ヘキサロン酸、シアリン酸、およびデスオキシペントース等が呈色し、特異性に問題が残っている。⁴⁾⁶⁾ 著者等は第2報⁵⁾において、塩酸・酢酸混液を溶媒とするオルシン試薬が呈色度は弱いの特異性が優れていることを報告した。この試薬に鉄塩を共存せしめると非常に呈色度が高くなり、しかも栄養分析等でもつとも問題になるグルコースや、核酸の分析で問題となるデスオキシ

* Chem. Pharm. Bull. **11**, 809 (1963) に発表

^{*1} 第3報: Chem. Pharm. Bull. **11**, 806 (1963).

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

2) W. R. Fernell, H. K. King: Analyst, **78**, 80 (1953).

3) 友田: 分析化学, **5**, 249 (1956).

4) Z. Dische: Methods of Biochemical Analysis, **2**, 349 (1955).

5) 友田, 神谷, 木村: 薬誌, **82**, 126 (1962).

6) 友田, 神谷: 薬誌 **82**, 1447 (1962).