

フェノール・硫酸法による炭水化物の比色定量法の検討(Ⅰ)

キシロースの比色定量並びに混合物中のキシロースとグルコースの迅速分析

松尾 義之・南波 章 (広島大学工学部醸酵工学科)

著者等は前報¹⁾においてフェノール・硫酸法によるグルコース及び澱粉の比色定量法を設定しアンスロン法より優れている点を挙げたが、本報ではキシロースの比色定量条件を新しく設定した。更にこのキシロース定量法と前のグルコース定量法を組合せて混合物中のキシロースとグルコースの迅速分析を試験したのでこれらの結果を報告する。

器具：試験管、湯煎及び金網かご、プルフリツヒ光度計、島津光電分光光度計その他。

試薬：5%フェノール溶液は市販フェノールを再溜して作り硫酸は一級試薬、標準糖液はグルコース(カールバウム製、水分なし、純度100%)、キシロース(片山製品を再結、ベルトラン法による純度97.88%)を安息香酸飽和液を用いて1,000%(v/w)濃度に調製し低温に保存し、使用の度に希釈して用いた。

方法：糖液(0.01%以下のもの、0.004%以下でBEERの法則に従う)2ml、及び5%フェノール水溶液を試験管にとり充分混合し、冷水を入れた器中に傾けて静置し硫酸5mlを器壁に沿って静かに注入する。これを流水中で冷却しながらできるだけ徐々に振盪し、長時間かけて充分に混合し、はげしく振盪しても発熱しなくなると沸騰湯煎中に一定時間加熱反応せしめて後速かに流水中で冷却し1cmの比色用液槽に入れ光電分光光度計(又はプルフリツヒ光度計)により吸光度を測定する。

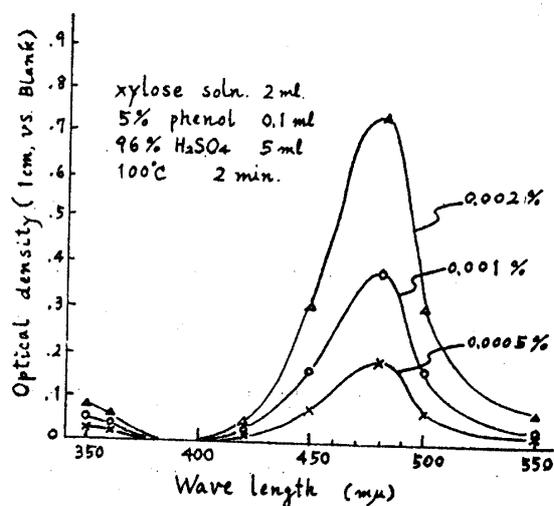


Fig. 1. Absorption spectra of xylose by the phenol H_2SO_4 method

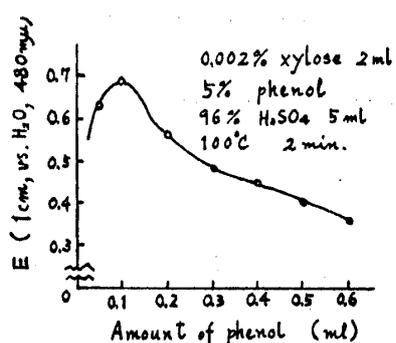


Fig. 2. Optical density versus amount of phenol.

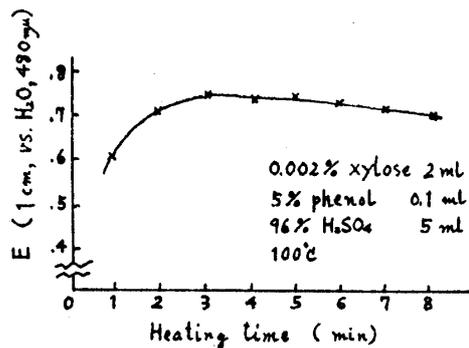


Fig. 3. Optical density versus heating time.

A. キシロース定量条件の決定

1. 測定波長の選択

前報¹⁾で決定したグルコース及び澱粉の定量条件にもとづき、プルフリツヒ光度計を用い0.008%のキシロースの吸収曲線をとると、最大吸収は濾光板S.47の吸収波長範囲にあるので更に光電分光光度計により再検討を行い、0.0005%, 0.001%, 0.002%キシロース溶液について最大吸収位置は480m μ である事を認めた。Fig 1に示す。

2. 5%フェノール溶液添加量の影響

プルフリツヒ光度計による試験後分光光度計を用いて0.002%キシロース2ml、96%硫酸5ml、100°C 2min加熱の条件で5%フェノール添加量と吸光度の関係を再検討して、プルフリツヒ光度計でS.47を用いる時及び光電分光光度計で480m μ で測定する場合共に5%フェノール

溶液0.1mlで吸光度は最高値を示した。その前後において吸光度は急に下るのでこの条件は厳密に守る必要がある。Fig. 2に示す。

3. 加熱時間の影響

プルフリツヒ光度計により酸濃度、加熱温度及び時間と吸光度との関係を試験し、それぞれについて検量線をつくり、キシロース溶液2ml、5

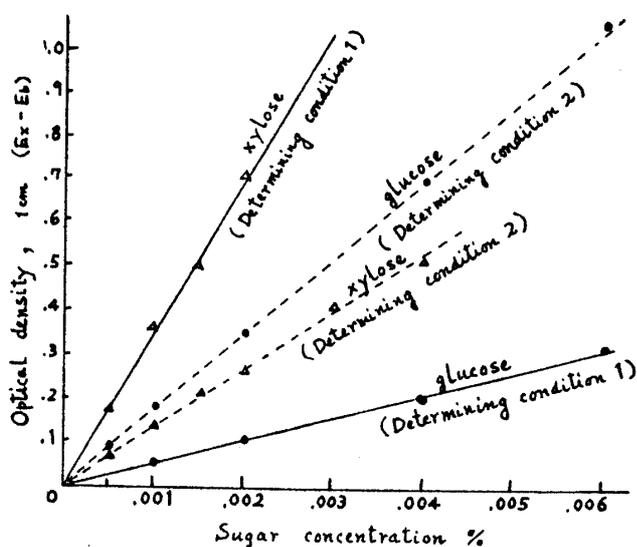


Fig.4. Standard curves of xylose and glucose.

%フェノール溶液0.1ml, 96%硫酸5ml, 100°Cが最もよいと云う結果を得たので光電分光光度計を用いて加熱時間の影響を調べた結果は 3.5 minが最も適当であつた。Fig. 3 に示す。

4. 検量線

0.0005%から0.004%までのキシロース溶液2ml, 5%フェノール溶液0.1ml, 96%硫酸5ml, 100°C 3.5min. 加熱し急冷後1cmの液槽に入れ光電分光光度計により480mμで吸光度を測定し, 別に盲験を行つてこれとの差を求め検量線を作つた。Fig. 4中実線で示す。

5. DUBOIS 呈色法と本呈色法の標準偏差の比較

この実験の終了に近いころ DUBOIS 等²⁾の研究発表を見たので, 彼等の方法と本法について

同程度の吸光度 E に
おける標準偏差を比
較した結果は下表に
示す様に DUBOIS 法
の方が僅かに標準偏

| | Concentration of xylose | Optical density, E (mean value) | Standard deviation, μ | μ/E × 100 |
|--------------------|-------------------------|---------------------------------|-----------------------|-----------|
| DUBOIS's method | 0.002 % | 0.413 | 0.0086 | 2.10% |
| The present method | 0.0013% | 0.431 | 0.0111 | 2.55% |

差で小であつた。しかし呈色の感度は本法の方が大きい。

B. キシロース, グルコース混液中のキシロース, グルコースの迅速分析

一般的に言つてペントーズとヘキソーズの正確な分別定量には, 塩酸蒸溜法か酵母による選択醗酵法が応用されるが何れも長時間を要する欠点がある。又最近盛んに行われるペーパークロマトグラフ法による定量も十分精確を期し難い。著者等はキシロースとグルコースの混液をフェノール・硫酸反応を用い異つた条件で呈色せしめ, そのスペクトラムの差に従い 480mμ 及び 490mμ において吸光度を測定し, 計算により夫々をきわめて迅速に分別定量した。しかも分析に用いる試料の量は少量で足りる。

方法: 前報¹⁾におけるグルコースの定量条件を分光光度計を用いて再検討し, グルコース溶液 2ml, 5%フェノール溶液 0.7ml (前報では 0.6ml であつた), 96%硫酸 5ml, 100°C 5ml, 加熱して 490mμ で吸光度を測定することとし, (検量線は Fig. 4 中破線で示した。なおプルフリツヒ光度計を用いる場合は S.50 の濾光板を用いた) これと本報の前記 A におけるキシロースの定量条件との 2 つの条件 (前者を定量条件 2 とし後者を定量条件 1 とする) に従つて吸光度を測り, それぞれの吸光係数により下記の如くして導いた(1), (2)式からキシロース及びグルコースの量を算出する。

Table 1. Determining conditions and extinction coefficients.

| | Determining condition | | |
|----------------------------------|------------------------------------|--------|-------|
| | 1 | 2 | |
| Color developing condition | Sugar soln. | 2 ml | 2 ml |
| | 5% phenol soln. | 0.1ml | 0.7ml |
| | 96% H ₂ SO ₄ | 5 ml | 5 ml |
| | Heating time at 100° | 3.5min | 6 min |
| Wave length of spectrophotometer | 480mμ | 490mμ | |
| E _{cm} % | glucose | 55 | 177 |
| | xylose | 352 | 140 |

今キシロースの濃度を x%,
グルコースの濃度を g% とし,
定量条件 1 によつて得た吸光
度を E₁, 定量条件 2 のそれを
E₂ とすれば

$$E_1 = 352x + 55g$$

$$E_2 = 177g + 140x$$

従つてこの連立方程式をと
きキシロース及びグルコース
の濃度は次式により算出でき
る。

(70) (松尾, 南波) フェノール硫酸法による炭水化物の比色定量法の検討(Ⅱ)

キシロースの $\text{mg}\% = 3.24E_1 - 1.01E_2$ (1)

グルコースの $\text{mg}\% = 6.45E_2 - 2.57E_1$ (2)

2つの定量条件と吸光係数は第1表にまとめた。

結果：標準糖液を種々の割合に希釈混合して（全糖は何れも4mg%）実験した結果は第2表に示す。

Table 2. Rapid analyses of xylose and glucose in mixtures.

| Sample taken | | | Observed | | Calculated | | | | | |
|------------------------|-----------------|------------------|----------------|----------------|------------|----------------|---------|----------------|-------|----------------|
| Xylose % in mix. | Xylose, mg % | Glucose, mg % | E ₁ | E ₂ | Xylose | | Glucose | | Total | |
| | | | | | mg % | % in Sample | mg % | % in Sample | mg % | % in Sample |
| 10% | 0.4 | 3.6 | 0.344 | 0.693 | 0.41 | 102 | 3.59 | 99.5 | 4.00 | 100 |
| | | | 0.360 | 0.703 | 0.45 | 112 | 3.60 | 100 | 4.05 | 101 |
| | | | 0.348 | 0.683 | 0.44 | 118 | 3.51 | 97.5 | 3.95 | 99 |
| | | | Average | | | 108 | | 99 | | 100 |
| 15% | 0.6 | 3.4 | 0.405 | 0.683 | 0.62 | 103 | 3.36 | 99.0 | 3.98 | 99.5 |
| | | | 0.426 | 0.687 | 0.68 | 113 | 3.34 | 98.3 | 4.02 | 100.5 |
| | | | 0.401 | 0.681 | 0.61 | 102 | 3.36 | 99.0 | 3.97 | 99.4 |
| | | | Average | | | 106 | | 98.7 | | 100 |
| 20% | 0.8 | 3.2 | 0.472 | 0.676 | 0.85 | 106 | 3.15 | 98.5 | 4.00 | 100 |
| | | | 0.422 | 0.681 | 0.68 | 85 | 3.31 | 103.1 | 3.99 | 100 |
| | | | 0.459 | 0.665 | 0.81 | 101 | 3.11 | 97.3 | 3.92 | 98 |
| | | | Average | | | 97 | | 99.6 | | 99 |

第2表に見る様に同一試料でもかなり大きいふれがあるが、キシロースは0.4~0.8mg%の濃度において平均8%の誤差範囲内で、グルコースは3.2~3.6mg%の濃度において1.3%の誤差範囲内で迅速に定量できる。

要 約

1) フェノール・硫酸反応をキシロースに応用すれば、着色物の最大吸収は480m μ である。

フェノール・硫酸法によるキシロース定量の最適条件は次の如くである。キシロース溶液2mlと5%フェノール溶液0.1mlを試験管中で混合し、次に96%硫酸5mlを管壁に沿って温度上昇をさけるため冷水中で注意深く振盪しながら徐々に加えその後沸騰湯煎中で3.5min加熱する。直ちに冷却後溶液の吸光度を光電分光光度計で1cmの液槽で波長480m μ で測定する。

キシロースについては0.004%以下でBEERの法則に従い、本呈色法の標準偏差は2.5%である。

2) フェノール・硫酸反応を用いキシロースとグルコースの混液を迅速簡単に分別定量した。

キシロースは0.4~0.8mg%の濃度において平均8%の誤差範囲内で、グルコースは3.2~3.6mg%の濃度において1.3%の誤差範囲内で定量できる。

(本稿は松尾：糖の定量に関する第12報とする。昭和31年10月大阪醸造学会で発表した)。

御指導を賜った佐藤静一教授に感謝致します。

文 献

1) 松尾, 南波: 広大工研究報告, 5, 19-24 (1956).

2) DUBOIS et al: Anal. Chem., 28, 350 (1956).

(昭和32, 12, 2受理)