

報 文

ジアゾ化合物を発色試薬として用いる糖類の検出

鈴木 優治^{①*}, 坂岸 良克^{**}

(1994年12月16日受付)

(1995年2月21日審査終了)

6種類の糖とジアゾ化合物との反応について検討した。還元糖のグルコース、フルクトース、キシロース、マルトース及びラクトースは、アルカリ性下でジアゾ化合物と反応し、発色体を生成したが、非還元糖のシュクロースは反応しなかった。発色強度が高い発色体を生成する4-アミノ安息香酸のジアゾ化合物の反応では、各糖は吸収極大波長が530~540 nm、モル吸光係数が216~649 l mol⁻¹ cm⁻¹の範囲にある発色体を生成した。これらの反応では、発色反応が開始するまでに3~18分のラグタイムが必要であり、発色反応の開始から完結までの時間はフルクトースが約60分、他の還元糖が約140分であった。この発色反応にはアルカリ性下で還元糖鎖状分子に形成されるアルデヒド基あるいはケト基が関与するものと考えられた。糖とジアゾ化合物との反応は室温で進行するため、還元糖の検出に応用できると考えられた。

1 緒 言

糖類は生命体の構成成分である多糖類、タンパク質、脂質の材料として、あるいは生命活動に必要なエネルギー源として極めて重要な、生命体に必須の物質である。

糖類の検出反応には、銅化合物、鉄化合物、ニトロ化合物などを用いる還元法^{1)~3)}、過ヨウ素酸による酸化で生じるアルデヒドを2-チオバルビツール酸、p-ヒドロキシジフェニル、フェニルヒドラジンで発色させる過ヨウ素酸化法^{4)~6)}、硫酸や塩酸などが存在する強酸性下で糖から生成するフルフラールあるいはその誘導体とフェノール、ジフェニルアミンなどとの縮合反応による方法^{7)~10)}、p-ジメチルアミノベンゼアルデヒド(エールリッヒ試薬)を用いる方法¹¹⁾、酵素による糖の酸化で生成する過酸化水素の分解を種々の水素供与体と4-アミノアンチピリンの酸化縮合に導くトリンドラー反応などで発色させる酵素法^{12)~14)}など、極めて多くの反応が知られている。

著者らは血清ビリルビンのジアゾカップリング反応に関して検討を続けてきたが、共存物質であるグルコース

もジアゾ化合物と反応し、発色体を生成することを見いだした¹⁵⁾。糖分子あるいはその誘導体分子そのものの発色は、酵素法を除き、多くの反応で加熱操作を必要とするが、グルコースをはじめとする還元糖と多くのジアゾ化合物との反応は室温で進行するため、この反応は糖類の検出反応として有用と考えられた。糖類の検出反応に関しては極めて多くの報告があるが、ジアゾ化合物との反応については、これまでに報告されていない。そこで、本論文では、ジアゾ化合物と6種類の糖類との反応について検討した結果を報告する。

2 実験方法

2・1 試薬

試薬は和光純薬工業製を用いて次のように調製した。

100 mg/dl 糖溶液: グルコース、ラクトース、マルトース、フルクトース、キシロース及びシュクロース各100 mgを精製水に溶かし100 mlとした。

ジアゾ化合物溶液: スルファニル酸、4-アミノ安息香酸、3-アミノ安息香酸、4-ヨードアニリン、4-クロロアニリン及び4-アミノアセトフェノンのジアゾ化合物は文献¹⁶⁾に従って用時調製した。

40 mg/dl アスコルビン酸溶液: アスコルビン酸40 mgを精製水に溶かし100 mlとした。

4 mol/l 水酸化ナトリウム溶液: 水酸化ナトリウム16 gを精製水に溶解し100 mlとした。

* 埼玉県立衛生短期大学: 338 埼玉県浦和市上大久保519

** 埼玉医科大学第一生化学講座: 350-04 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷 38

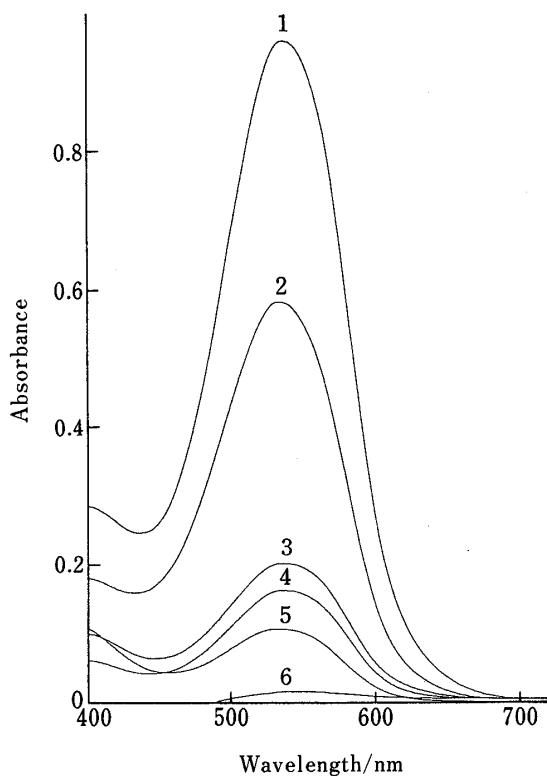


Fig. 1 Reaction of six sugars with diazo-4-aminobenzoic acid

Each absorption spectrum indicates the colored product produced from glucose (1), xylose (2), maltose (3), lactose (4), fructose (5), respectively. The five reduced sugars reacted with a diazo-compound, while the nonreduced sugar, sucrose (6), did not.

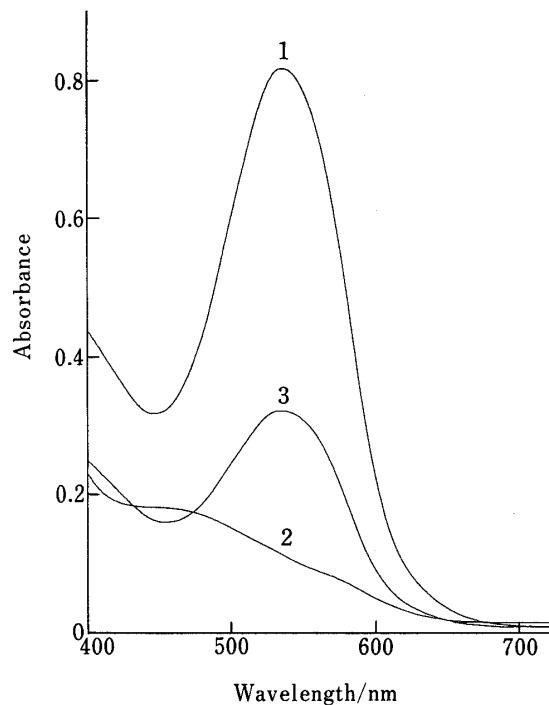


Fig. 2 Changes in the absorption spectrum of the colored product of the sugar with pH

Absorption spectrum of the colored product of the sugar (glucose) showed reversible change on addition of acid or alkali: 1, colored product produced under alkaline condition; 2, colored product obtained upon addition of hydrochloric acid to 1; 3, colored product obtained upon addition of sodium hydroxide to 2. Diazo-compound of 4-amino-benzoic acid was used as the color reagent.

2・2 測定操作

糖溶液 1.0 ml に水酸化ナトリウム溶液 0.8 ml, 精製水 0.2 ml 及びジアゾ化合物溶液 1.0 ml を加え, 室温で 60~140 分間反応させた後, アスコルビン酸溶液 1.0 ml を加えた。数分間放置した後, 試薬空試験液を対照として吸光度を測定した。試薬空試験液は精製水 1.2 ml に水酸化ナトリウム溶液 0.8 ml, ジアゾ化合物溶液 1.0 ml 及びアスコルビン酸溶液 1.0 ml を加え調製した。

吸光度は日立 101 型分光光度計及び島津ダブルビーム UV200 分光光度計により測定した。

3 実験結果

3・1 糖とジアゾ化合物との反応

Fig. 1 はアルカリ性条件下でグルコース, ラクトース, フルクトース, キシロース, マルトース及びシュクロースと 4-アミノ安息香酸のジアゾ化合物との反応で

生成した発色体の吸収スペクトルを示している。図のように非還元糖であるシュクロースは反応しなかったが、他の 5 種類の還元糖はジアゾ化合物と徐々に反応し、530~540 nm の波長域に吸収ピークを示す赤色~赤紫色の発色体を生成した。この発色体は Fig. 2 のように濃塩酸の添加により吸収ピークが短波長域にシフトし、黄色発色体に変化したが、再び水酸化ナトリウムを添加すると、濃塩酸添加前と同じ波長域に吸収ピークを有する発色体に戻った。このように、糖類とジアゾ化合物との反応で生成した発色体は pH により可逆的な色調変化を示し、アゾ化合物に一般的に見られる pH 指示薬類似の化学特性が認められた。なお、この発色反応はアルカリ性条件下で行った還元糖と 4-アミノ安息香酸そのものとの反応では観察されなかった。

Table 1 Absorption maximum and molar absorptivity of the colored product produced in reactions of five sugars with the diazo-compound of 4-aminobenzoic acid

Sugar	Absorption maximum/nm	Molar absorptivity/ $1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
Glucose	540	591
Xylose	535	459
Maltose	534	618
Lactose	535	649
Fructose	530	216

3・2 生成した発色体の分光学的性質

Table 1 は Fig. 1 に示した 4-アミノ安息香酸のジアゾ化合物と糖類との反応で生成した発色体の吸収ピーク波長とモル吸光係数を示している。モル吸光係数はアルドヘキソースのグルコースとアルドヘキソース 2 分子から成るマルトース及びラクトースが近似し、アルドペントースのキシロースはこれらよりもやや小さい値を示した。ケトースであるフルクトースのモル吸光係数は他の糖類の $1/3 \sim 1/2$ であった。グルコース、マルトース、ラクトース及びキシロースの発色体の吸収スペクトルは極めて近似し、吸収ピーク波長に差はほとんどなかった。しかし、ケトースであるフルクトースの発色体は他の糖類とは吸収ピーク波長と 400 nm 前後の波長領域の吸収に若干の違いを示した。又、Table 2 はジアゾ化合物の種類を変え、グルコースとの反応を検討した結果を示している。生成する発色体の吸収ピーク波長及びモル吸光係数はジアゾ化合物により異なったが、吸収ピーク波長は芳香族第一アミン分子の芳香核に結合する置換基の電子吸引性が大きいほど長波長になる傾向が認められた。4-アミノ安息香酸のジアゾ化合物はモル吸光係数の最も大きい発色体を生成した。

3・3 水酸化ナトリウム濃度の発色に及ぼす影響

糖類とジアゾ化合物との反応は酸性下では進行せず、アルカリ性条件下のみで起こった。Fig. 3 は水酸化ナトリウム濃度（最終濃度）を $0.133 \sim 1.33 \text{ mol/l}$ の範囲で変え、モル吸光係数が最も大きい発色体を生成する 4-アミノ安息香酸のジアゾ化合物と 5 種類の糖との反応について検討した結果を示している。図のように水酸化ナトリウムの至適濃度は糖により異なり、グルコース $0.3 \sim 1.0$ 、マルトース 0.5 、キシロース $0.5 \sim 1.2$ 、ラクトース $0.8 \sim 1.2$ 、フルクトース $0.6 \sim 1.2 \text{ mol/l}$ であった。又、Fig. 4 はグルコースと 6 種類のジアゾ化合物と

Table 2 Absorption maximum and molar absorptivity of the colored product produced in the reaction of glucose with six diazo-compounds

Diazo-Compound	Absorption maximum/nm	Molar absorptivity/ $1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
4-Aminobenzoic acid	540	591
3-Aminobenzoic acid	522	495
4-Iodoaniline	520	311
4-Chloroaniline	510	303
Sulfanilic acid	524	179
4-Aminoacetophenone	560	177

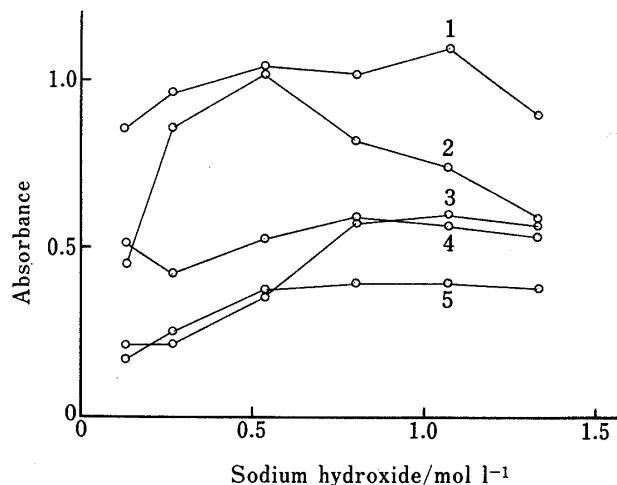


Fig. 3 Effect of sodium hydroxide concentration on the color development of the sugar.

The five sugars were reacted with the diazo-compound of 4-aminobenzoic acid. Color intensity of the formed colored product varied with sodium hydroxide concentration. 1, glucose; 2, xylose; 3, maltose; 4, lactose; 5, fructose

の反応について検討した結果を示している。図のように水酸化ナトリウムの至適濃度はジアゾ化合物の種類で異なり、スルファニル酸 $0.1 \sim 0.5$ 、4-アミノ安息香酸 $0.3 \sim 1.0$ 、3-アミノ安息香酸 $0.5 \sim 1.0$ 、4-ヨードアニリン $0.3 \sim 0.5$ 、4-アミノアセトフェノン $0.1 \sim 0.3$ 、4-クロロアニリン $0.1 \sim 0.5 \text{ mol/l}$ であった。

3・4 アスコルビン酸による発色の安定化

糖とジアゾ化合物との反応で生成した発色体はかき混ぜによる空気との接触で退色する、不安定な化学特性を示した。しかし、発色体は還元作用を有するアスコルビ

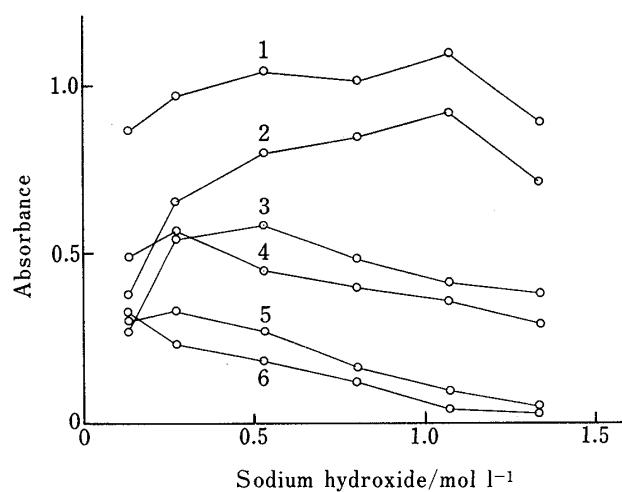


Fig. 4 Effect of sodium hydroxide concentration on the color development of the sugar.

Glucose reacted with six diazo-compounds. Color intensity of the colored product of the sugar varied with sodium hydroxide concentration. Diazo-compound of each curve was 1, 4-aminobenzoic acid; 2, 3-aminobenzoic acid; 3, 4-iodoaniline; 4, 4-chloroaniline; 5, sulfanilic acid; 6, 4-aminoacetophenone, respectively.

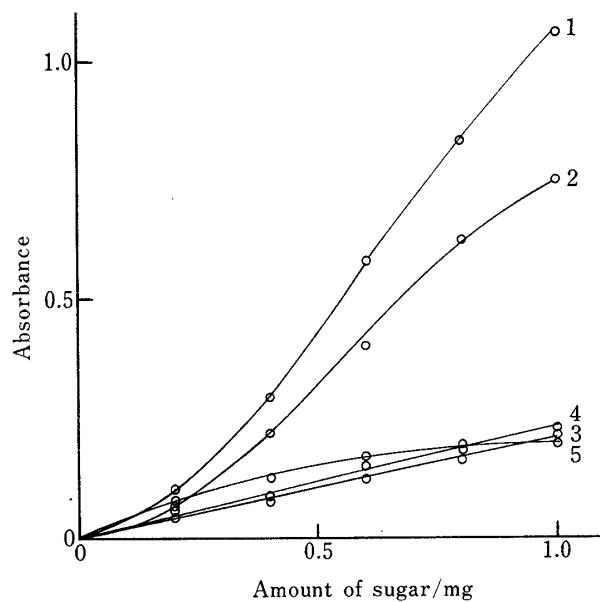


Fig. 5 Proportional reaction of five sugars with diazo-compound of 4-aminobenzoic acid

The lines 1~5 represent glucose, xylose, maltose, lactose, fructose, respectively.

ン酸の添加により安定化された。この物質の最適添加濃度（最終濃度）は 10 mg/dl であったが、過剰の添加は吸光度を低下させた。

3・5 糖類とジアゾ化合物との反応特性

糖類とジアゾ化合物との反応はジアゾ化合物溶液の添加後、一定のラグタイムを経た後から始まった。ラグタイムは糖とジアゾ化合物の種類により異なり、4-アミノ安息香酸のジアゾ化合物の場合、グルコース 15.2, フルクトース 3.0, キシロース 18.4, ラクトース 13.6, マルトース 14.4 分であった。又、発色反応開始から反応完結までの反応時間はケトースであるフルクトースが最も短く（約 60 分）、他のアルドースはケトースの 2 倍以上（約 140 分）であった。

3・6 糖量と発色強度との関係

モル吸光係数が最も大きい発色体を生成する 4-アミノ安息香酸のジアゾ化合物と 5 種類の糖との反応の比例性について検討した。生成する発色体の吸光度はいずれの糖においても Fig. 5 のように糖量と比例関係にあった。

3・7 糖類とジアゾ化合物との反応機構

糖はジアゾ化合物と酸性下では反応しなかったが、アルカリ性下では一定のラグタイムを経た後から反応した。糖は pH により分子構造が異なり、中性付近では大部分が環状構造のピラノースあるいはフラノースであるが、アルカリ性下ではアルデヒド基あるいはケト基を分子中に有する鎖状構造に異性化する。検討した 6 種類の糖類のうち、アルカリ性条件下でもアルデヒド基を形成しないシュクロースだけが発色反応を起こさないところから、この発色反応にはアルカリ性下で生成するアルデヒド基あるいはケト基が関与していると考えられる。この反応機構によれば、発色反応は糖が環状構造から鎖状構造に転移するまで開始しないことになり、還元糖の種類によらず 3~18 分間のラグタイムを経て反応が開始したことの解釈につながる。

ジアゾ化合物は pH の上昇とともにジアゾ化合物 → ジアゾヒドロキシド → ジアゾタートイオンと分子構造を変化させることが知られている。アルカリ性下で生成するジアゾヒドロキシド及びジアゾタートイオンにはジアゾカップリング能はない。これらの物質のうち、ジアゾ化合物は求電子化合物、ジアゾタートイオンは求核化合物である。一方、アルカリ性下で糖分子に形成されるカルボニル基は求電子基としての化学特性を示す。

この発色反応で生成した物質は前述のように酸・アルカリに対し pH 指示薬と類似する可逆的な色調変化を示した。このような化学特性はアゾ色素類に一般的に見られるものであるが、求電子化合物のジアゾ化合物と求電子基であるカルボニル基との反応は考えにくい。カルボニル基に見られる最も一般的な反応は求電子化合物との求核付加反応である。この点からは、糖の発色はアルカリ性下で生成した糖分子のカルボニル基とジアゾタリオノンとの求核付加反応による可能性があるが、反応機構については更に検討する必要がある。

以上のようにジアゾ化合物と還元糖は室温下で反応し、赤色～赤紫色のアゾ色素を生成した。この反応は発色体がアスコルビン酸の存在下で安定であるため、還元糖の検出反応として利用できると考えられた。

(1994年10月、日本分析化学会)
(第43年会において一部発表)

文 献

- 1) N. Nelson: *J. Biol. Chem.*, **153**, 375 (1946).

- 2) J. T. Park, M. G. Johnson: *J. Biol. Chem.*, **181**, 149 (1949).
- 3) J. B. Summer: *J. Biol. Chem.*, **47**, 5 (1921).
- 4) V. S. Waravdekar, L. D. Saslaw: *J. Biol. Chem.*, **234**, 1945 (1959).
- 5) T. Winnick: *J. Biol. Chem.*, **142**, 461 (1942).
- 6) M. Ishidate, M. Matsui, M. Okada: *Anal. Biochem.*, **11**, 176 (1965).
- 7) M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith: *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
- 8) D. L. Morris: *Science* (Washington, D.C.), **107**, 254 (1948).
- 9) Z. Dische: *Biochem. Z.*, **189**, 77 (1927).
- 10) J. H. Roe: *J. Biol. Chem.*, **107**, 15 (1934).
- 11) L. A. Elson, W. T. L. Morgan: *Biochem. J.*, **27**, 1824 (1933).
- 12) P. Trinder: *Ann. Clin. Biochem.*, **6**, 24 (1969).
- 13) N. Gochman, J. M. Schmith: *Clin. Chem.*, **18**, 943 (1972).
- 14) M. Sugiura, K. Hirano: *Clin. Chim. Acta*, **75**, 387 (1977).
- 15) 鈴木優治, 坂岸良克: 生物試料分析, **17**, 268 (1994).
- 16) Y. Suzuki, Y. Sakagishi: *Jpn. J. Clin. Chem.*, **23**, 158 (1994).



Detection of saccharides using diazo-compound as a color reagent. Yuji SUZUKI* and Yoshikatsu SAKAGISHI** (*Saitama College of Health, 519, Kamiokubo, Urawa-shi, Saitama 338; **First Department of Biochemistry, Saitama Medical School, 38, Morohongo, Moroyama-cho, Iruma-gun, Saitama 350-04)

We investigated the reaction of saccharides with six diazo-compounds: sulfanilic acid, 4-aminobenzoic acid, 3-aminobenzoic acid, 4-iodoaniline, 4-chloroaniline and 4-aminoacetophenone. Five reduced sugars, glucose, fructose, xylose, maltose and lactose, reacted with various diazo-compound to form colored products under alkaline conditions; a nonreduced sugar, sucrose, did not react. The absorption maximum of the colored product varied with the diazo-compound, correlating with the Hammett substituent constant of the substituent attached to the benzene ring on the aromatic primary amine, but there was little difference in the absorption spectra of the five sugars reacted with the same diazo-compound. Their absorption maxima ranged from 530 to 540 nm and their molar absorptivities from 216 to 649 l mol⁻¹ cm⁻¹ in the case of the reaction of diazotized 4-aminobenzoic acid, which gave the colored product with the largest color intensity. The absorption spectrum of the colored product indicated a reversible change when hydrochloric acid or sodium hydroxide were added, like that of a pH indicator. In the color reaction of the reduced sugars, a lag time of 3~18 min was required before the color reaction began. The reaction rate of the ketose, fructose, was higher than that of glucose, xylose, maltose and lactose, the reaction time being about 60 min for fructose and about 140 min for the other reduced sugars. The colored product was easily oxidized by air after completion of the reaction, but was stabilized by addition of ascorbic acid. Since nonreduced sugar did not react with diazo-compound, it seems that the carbonyl groups formed in the reduced sugars under alkaline conditions take part in this color reaction. As this color reaction of the sugars occurred at room temperature, it may be of

use for their detection.

(Received December 16, 1994)

(Accepted February 21, 1995)

Keyword phrases

color reaction; reduced sugar; diazo-compound; 4-aminobenzoic acid.
