

ノート

レゾルシン・塩酸法によるはちみつ中の果糖の定量についての考察

入 江 隆 夫

出 来 三 男

1. 緒 言

Roe¹⁾よつて開発され、その後多くの研究者^{2) 3) 4)}によつて改良されたレゾルシン・塩酸法による果糖の定量法は、動物の血液・尿等に存在する微量の果糖の定量に応用され、優れた方法とされている。

税関においては、はちみつ中の果糖の定量法にレゾルシン・塩酸法が応用されている。^{5) 6)}これは、この方法が他の定量法に較べて迅速、簡易であり、時間的制約を受ける税関分析法として適しているためである。しかし、精度、正確さの面から見れば、問題となる点がある。即ち、定量値がばらつくことと、はちみつ中に存在する果糖以外の糖類、特に果糖と共にはちみつの主成分であるぶどう糖の発色による妨害である。

既に、Gray³⁾は発色に影響を与える因子として、エタノールの純度、塩酸の純度及び濃度、第二鉄イオンの濃度、加熱時間及び加熱温度について言及していて、これらの諸条件を厳格に守らねばならないとしている。筆者は、塩酸添加量、加熱時間及び加熱温度の変化に対する吸収曲線の変化を測定して、通常測定波長とされている 485m μ 附近では塩酸添加量、温度条件が吸光度に影響を与え、これらの条件を等しくしなければ誤差の原因となることを知るとともに、一方、これらの条件に影響を受けない 533m μ 附近の等吸収点の存在することを知つた。

又、発色液の安定性については、24 時間安定であるとされているが、発色後放置しておくと、次第に変色していくことは肉眼でも認められるので、検討した結果、通常の測定波長である 485m μ 附近よりも短波長側で吸光度の減少が小さいことが判明した。

更に、共存する糖類、特にぶどう糖の発色による妨害については、既に Roe は果糖の 3 倍量のぶどう糖の添加により +1% の誤差を、Gray は 100ml 中に 600mg のぶどう糖が 100ml 中 7.5mg の果糖に相当する発色をすることを、Kulka は果糖と同量のぶどう糖が 1% の誤差を生ずることを記述していて、夫々に差がみられるので、税関で採用している方法により検討を加えた。その結果、485m μ での測定では果糖と同量のぶどう糖の存在では、+1% の誤差を生ずることが判明した。

2. 実験および結果

2.1 試薬および装置

本実験で使用した塩酸、レゾルシン、塩化第二鉄、ぶどう糖は試薬特級、エタノールは試薬一級、果糖は純正化学社内規格特製試薬である。

吸光度の測定は島津 MPS-50 自記分光光度計、及び日立 139 分光光度計により 10mm のセルを使用して行なつた。

2.2 実験方法

本実験においては、税関で採用している方法^{5) 6)}によつた。即ち、実験目的に応じて条件を変更した以外は、果糖溶液 2ml、0.1% レゾルシン・エタノール溶液 2ml、100ml 中に 0.75mg の塩化第二鉄を含むように調製された塩酸 6ml を試験管にとり、よく混合したのち 80° の湯煎中で 8 分間加熱発色させ、のち流水中で冷却し、吸光度を測定した。

2.3 塩酸添加量の発色に与える影響

塩酸添加量が異なれば、当然反応生成物の量に影響を与えるとともに、反応液の総量も異つてくるので、吸光度に差を生ずることは予測される。塩酸添加量を 5.2、5.6、6.0、6.4、6.8ml としたときの吸収スペクトルを Fig 1 に示す。このスペクトルによれば、塩酸量が 5.2ml より次第に多くなるにつれて 485m μ の極大波長の吸光度は減じてゆき、逆に 557m μ に新しい極大吸収が生じてくるが、どの吸収スペクトルも 533m μ 附近で等しい吸光度を示す。したがつて、533m μ 附近の等吸収点で測定する場合には、厳密に 6ml の塩酸を添加する必要はないが、485m μ その他の波

長での測定では、正確に 6ml 加えなければ、誤差の原因となる。

2.4 加熱条件の発色に与える影響

加熱温度を 77° より 83° の間に種々変えて吸収スペクトルを測定した結果を Fig 2 に、加熱時間を 6 分より 10 分の間で変えて得た吸収スペクトルを Fig 3 に示す。既に、Roe⁷⁾ は発色が加熱時の反応速度によつて異なるので、どの試験管にも同じ熱効果を与えないべならないとしているが、これら 2 つの実験結果が証明している。熱効果を大にするにつれて、塩酸添加量による影響の場合と同じように、485m μ の吸光度は減少し、557m μ に新たに極大吸収点を生ずる。この場合でも、533m μ に等吸収点が存在し、533m μ での測定では加熱条件に影響を受けないこととなる。485m μ その他の波長で測定する場合には、どの試験管にも熱効果が等しくなるよう同質同形の試験管を使用するとともに、湯煎に攪拌機を付け、試験管の湯せんへの出し入れを同時にすること等の注意を守らなければ、吸光度にばらつきを生じ誤差の原因となる。太さの異つた試験管を用いて発色させ吸光度を測定した結果を Table 1 に示す。

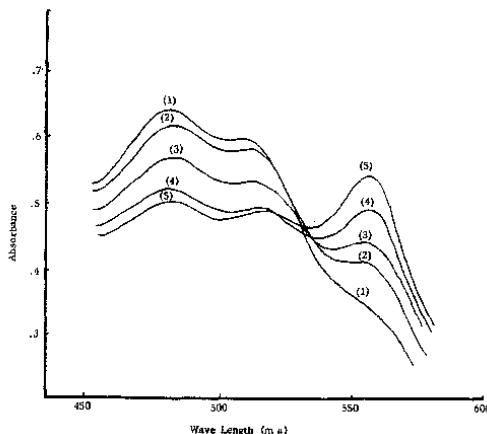


Figure 1.

Absorption spectra of the reaction products of the fructose solution (50 μg/ml) treated with 0.1% resorcinol-ethanol solution and

- (1) 5.2 ml
- (2) 5.6 ml
- (3) 6.0 ml
- (4) 6.4 ml
- (5) 6.8 ml

of hydrochloric acid for 8 min. at 80°C.

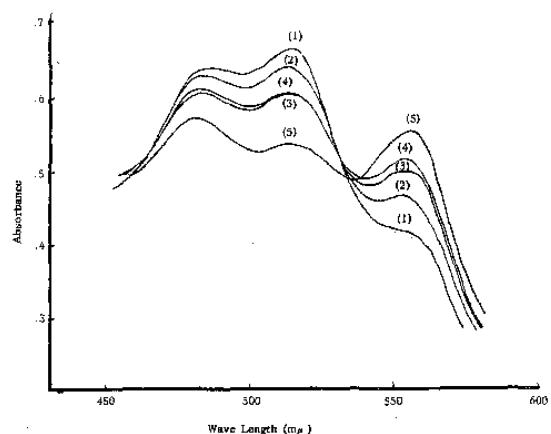


Figure 2.

Absorption spectra of the reaction products of the fructose solution (50 μg/ml) treated with the resorcinol-hydrochloric reagent for 8 min. at

- (1) 77.0 ~ 77.5°C
- (2) 78.5 ~ 79.0°C
- (3) 79.5 ~ 80.0°C
- (4) 80.5 ~ 81.0°C
- (5) 82.5 ~ 83.0°C

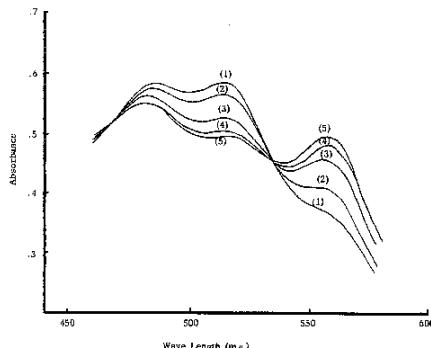


Figure 3.

Absorption spectra of the reaction products of the fructose solution (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) treated with the resorcinol-hydrochloric acid reagent at 80°C for
 (1) 6 min.
 (2) 7 "
 (3) 8 "
 (4) 9 "
 (5) 10 "

Table 1. Change in absorbance by diameter of the test tubes.

Solutions of fructose (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were treated with resorcinol-hydrochloric acid reagent at 80°C for 8 minutes.

Diameter of the test tubes	Absorbance at 485 μm
14 mm	0.583
16 mm	0.573
16.5 mm	0.569
23 mm	0.546

又、Roe やその他の研究者によって用いられている 80 、 8 分間という加熱条件が必須のものであるかどうかについて検討したところ、発色の安定性、果糖濃度と吸光度の関係の直線性には何んら差異はみられず、同一の熱効果を与える限り、 80 、 8 分間の条件を厳密に守る必要のないことが判明した。

2.5 退 色

レゾルシン・塩酸法による果糖の発色では、時間の経過とともに、次第に変色することが認められるので、室内(蛍光灯)に放置してそのスペクトルの変化を測定した。Fig.4 は、発色直後、 30 分後、 1 時間後、 1 時

間半後の吸収スペクトルの変化を示したもので、これによると、吸光度の減少はどの波長でも一定割合で行なわれるものではなく、短波長側で小さく、長波長側にいくに従って大きくなることがわかる。 470m μ 、 485m μ 、 533m μ における吸光度が時間の経過とともに減少していく状態を示したのが、 Fig.5 である。試料溶液中の果糖を定量する場合には、必ず検量線作成のための標準果糖溶液も同時に発色させ吸光度を測定するため、測定にかなりの時間を要し、特に、多量の試料を一度に処理する場合には、測定中の退色による誤差も生ずることが考えられる。この場合、 470m μ の吸光度の減少は 485m μ に比して小さいので、精度において優れているといえる。反対に、 533m μ では等吸収点が存在し、塩酸添加量、加熱条件に影響を受けないと述べたが、この 533m μ では吸光度の減少は前の 2 つの波長における減少に較べて著しいので、退色による精度に問題がある。一般に、発色直後の退色は著しいので、少なくとも 20 分放置したのも測定するのが望ましい。

暗室内に放置して吸収スペクトルの経時変化を測定したが、 2 時間以内であれば、蛍光灯下の退色と殆んど差は認められなかった。ただ、発色した果糖溶液に 253.7m μ 、 360m μ の紫外線を照射すれば、著しい変色をなし、その吸収スペクトルの変化は Fig.6 のようであった。

2.6 ぶどう糖の妨害

ぶどう糖溶液(2.5mg/ml)を果糖溶液(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)と同時に発色させて得た吸収スペクトルを Fig.7 に示す。ぶどう糖の吸収スペクトルも果糖の吸収スペクトルに類似した波形を示す。はちみつのように果糖対ぶどう糖比が 1 対 1 であるような試料でぶどう糖が何% 発色するかを調べるために、 0.5 、 1.0 、 1.5 、 2.0 、 2.5 、 3.0 、 3.5 、 4.0 、 4.5mg/ml のぶどう糖溶液をつくり、 485m μ での吸光度を測定して検量線を作成した。 Fig.8 はその検量線と 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までの果糖溶液の検量線を示した。果糖

レゾルシン・塩酸法によるはちみつ中の果糖の定量についての考察

の検量線が直線であるのに、ぶどう糖の検量線は低濃度では $1/100$ の濃度の果糖の検量線と重なるが、高濃度にいくに従つてわん曲するのが認められた。したがつて、はちみつ中の果糖を定量する場合の果糖の濃度 $30 \sim 40 \mu\text{g}/\text{ml}$ 即ち、ぶどう糖の濃度も $30 \sim 40 \mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲ではぶどう糖は果糖の 1% の発色をなし、得られた定量値を補正する必要がある。

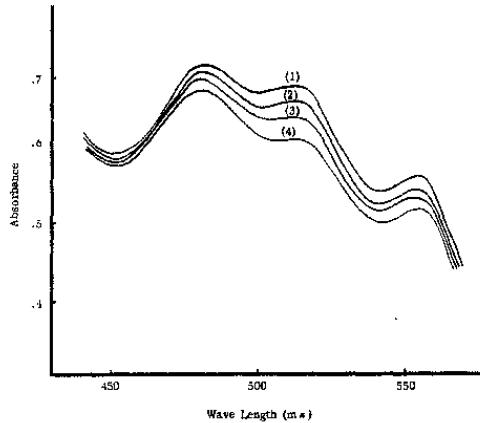


Figure 4. Color stability of the reaction products of the fructose solution ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) treated with resorcinol-hydrochloric acid reagent.

- (1) After the reaction
- (2) " 30min.
- (3) " 1 hour
- (4) " 1 hour & a half

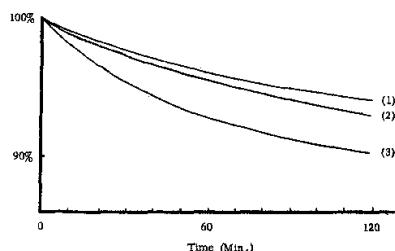


Figure 5. Color stability at

- (1) $470\text{m}\mu$
- (2) $483\text{m}\mu$
- (3) $533\text{m}\mu$

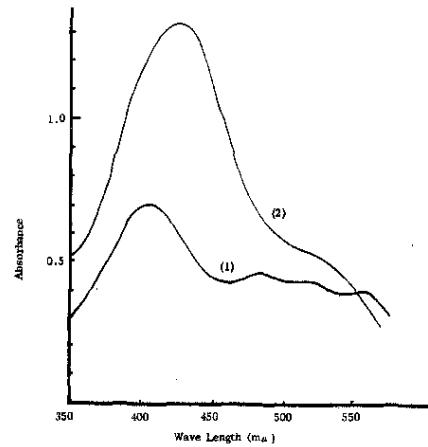


Figure 6.
Change of absorption spectrum by the radiation of ultraviolet light.
(1) After the reaction
(2) " the 3 hour's radiation

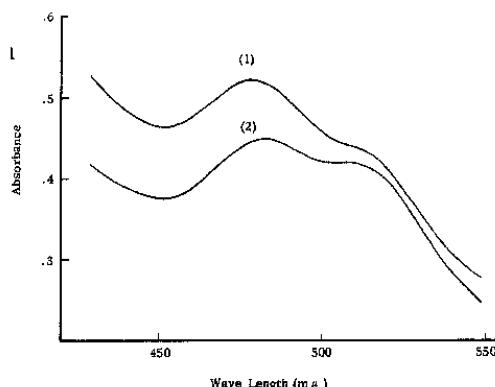


Figure 7 Absorption spectra of the reaction products of the fructose solution ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) and, that of the glucose solution ($2.5 \text{mg}/\text{ml}$).
(1) fructose
(2) glucose

文 献

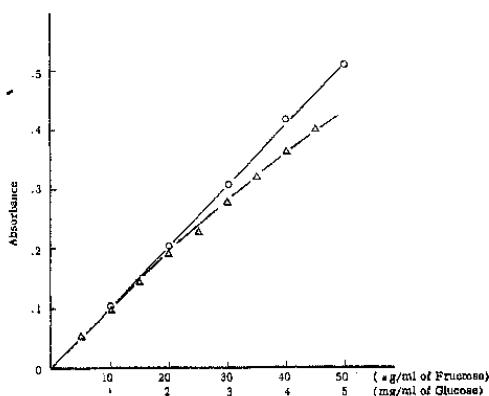


Figure 8.

Calibration curves for
fructose - ○ -
glucose - △ -

3. 結 論

1. レゾルシン・塩酸法により果糖を定量する場合の塩酸添加量、加熱条件が吸光度に影響を与えるので、塩酸添加量目を正確に 6ml 加え、加熱にはどの試験管にも等しい熱効果を与えるような配慮を必要とする。

2. $533\text{m}\mu$ に塩酸添加量、加熱条件に影響を受けない等吸光点が存在し、この波長での測定が精度を上げることを示しているが、退色が著しい欠点がある。

3. 退色は発色直後が著しいので、冷却後しばらく放置して測定するのが望ましい。

4. はちみつ中の果糖を定量する場合には、略同量のぶどう糖も発色して常に 1% の誤差を生ずるので、補正しなければならない。

この研究は税関統一分析法制定のための基礎研究の 1 部として行なつた。

- (1) J.H.Roe, J.Biol.Chem., 107, 15 (1934)
- (2) J.S.D.Bacon & D.J.Bell, Biochem. J., 42, 397 (1948)
- (3) D.J.S.Gray, Analyst, 75, 314 (1950)
- (4) R.G.Kulka, Biochem.J., 63, 542 (1956)
- (5) 葉山良子・出石 積・阿部邦夫、税關監査資料 第 13 号
- (6) Snell & Snell, Colorimetric methods of Analysis 3rd Edition Vol.

Observation on
Determination of Fructose
in Honey by Resorcinol-Hy-
drochloric acid Reagent

TAKAO IRIE and MITSUO DEKI
Central Customs Laboratory,
Iwase-531, Mtsudo City ciba
Pref.

(Received 31.Jan 1968)