

報文

尿素 - 硫酸試液による果糖の比色定量法

出 来 三 男 ・ 入 江 隆 夫

ケトヘキソースを尿素を含む硫酸試液と加熱すると青色を呈する。この呈色反応を利用して果糖の定量法を検討した。試料 2ml (0.4mg 果糖) に 40% の尿素を含む 40% 硫酸水溶液 5ml を加えて振盪しよく混合した後、沸騰水浴中で 15 分間加熱後冷却して 90 分室温に放置した後 605m μ で吸光度を測定した。果糖 0.4mg / 2ml , 或はショ糖 0.8mg / 2ml の範囲においては直線となり、糖量と吸光度との間の回帰は 5% 水準において直線関係が成立した。ブドウ糖、麦芽糖、乳糖は 20 倍の存在で呈色に影響を与えなかった。

1 緒 言

ぶどう糖のようなアルドヘキソースの共存下における果糖の定量法は、Willstätter - Schudel 法に代表されるように、アルドースとケトースの試薬に対する反応速度の遅速を利用して定量するものが多い。そのため、反応条件の設定に厳密さが要求されている。Hadi¹⁾ および松尾ら²⁾ は Camphor - 硫酸により果糖を定量しているが、呈色試薬に対する反応速度は、果糖の場合がぶどう糖より速いことから両者の分離定量の可能性を報告している。しかし、反応条件として加熱温度と硫酸濃度にきびしい制限が定められている。

輸入天然はちみつに含まれる果糖の定量として、従来各税関で行なっているレゾルシン - 塩酸による比色法は、微量定量法として優れた方法であるが、この場合も、反応条件の僅かの相違により吸光度が著しく変動し、結果の再現性に乏しい欠点がある。

Foulger³⁾ は、ケトヘキソースを塩化第一錫を含む尿素 - 硫酸試液と加熱すると青色に呈色し、アルドヘキソースに対しては長時間の加熱の場合にのみ赤色を呈することを報告している。Feigl⁴⁾ は、この方法をケトヘキソースとアルドヘキソースの定性分析に応用している。最近、前田⁵⁾ は尿素 - 硫酸試液を用いて果糖とぶどう糖の同時定量を試みているが詳細な報告はない。

筆者らは、ある条件のもとで尿素を含む硫酸試液と果糖を加熱すると青色を呈するが、果糖の数倍量のぶどう糖では全く呈色しないことを知ったので、この呈色反応をアルドヘキソースの存在下における果糖の定量に利用するため、定量に対する諸因子について検討した。

2 実験および結果

2.1 試薬および装置

硫酸 (特級, 比重 1.84), 尿素, 塩化第一錫, 果糖, ぶどう糖, 乳糖および麦芽糖はいずれも特級品を使用し、しょ糖は精製したものをを用いた。

呈色試薬の調整: 各濃度の硫酸水溶液に所定の濃度になるように尿素を加えて調整した。

吸光度の測定: 日立分光光度計 139 により 10 mm のセルを用いて測定した。

2.2 測定波長の選定

測定波長を選定するために、果糖 0.2mg/ml を含む標準糖液 2ml を試験管にとり、40% の尿素を含む 40% 硫酸試液 5ml を加えてよく混合し、15 分間沸騰水浴中で加熱後流水で冷却し、90 分間室温 (24) に放置して、各波長に対して吸光度を測定して吸収曲線を描いた。その結果を Fig.1 に示した。Fig.1 からわかるように、可視領域における極大吸収は 605m μ にある。465m μ の吸収極大は 605m μ と比較して著しく弱い。呈色試液の硫酸濃度を 60% として尿素添加量を 10% にした呈色試液を用いると青色の呈色は全くみられず、反応液は淡褐色を呈してくる。この呈色の吸収曲線を求めると 605m μ の吸収極大は全く現われず、これに対して 465m μ の吸収のみが現われる。尿素と硫酸の濃度を共に高くすると反応液は青緑色に呈色し、605m μ の吸収に対して 465m μ の吸収が相対的に大きくなっている。

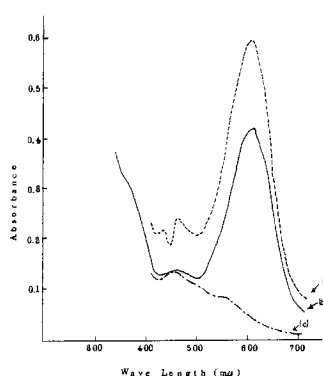


Figure 1. Absorption curves

Reaction condition : heat in boiling water for 15 minutes

Absorption with reagent of 40% urea - 40% H_2SO_4 (a)

60% urea - 60% H_2SO_4 (b) and 10% urea - 60% H_2SO_4 (c) solution

respectively.

2.3 呈色に対する尿素含量と硫酸濃度の相関

2.2 で明らかにしたように, 呈色試液の硫酸濃度と尿素有含量が呈色の色調にかなり影響を与えるのでこの点についてさらに検討した。反応条件は 2.2 に従った。

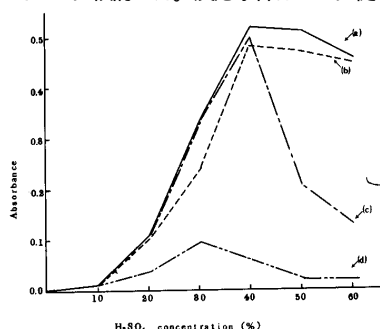


Figure 2. Effect of concentration of sulfuric

acid and urea.

Reaction condition : legend to under the figure 1.

Absorbance at 605m μ with reagent containing

40% urea(a), 50% urea(b), 30% urea(c), and 10% urea(d) in respected sulfuric acid concentration.

Fig.2 は硫酸濃度と尿素含量の色々な組合せによる吸光度の変動を示したものである。Fig.2 から, 硫酸の濃度が 10% 以下ではほとんど呈色せず, またこの条件では尿素量を多くしても吸光度は増加しない。しかし, 硫酸の濃度を高めていくと, 吸光度は次第に増加し, 40% の硫酸を用いた場合吸光度は最高となる。ところが 50% 以上の硫酸を用いると吸光度は却って減少してくる。この減少割合は尿素含量が少ない場合に顕著であり, しかも尿素含量が 20% 以下では反応液は淡褐色となり

青色の呈色は認められない。さらに, 尿素含量と硫酸濃度が共に高くなると反応液は緑色を帯びた青色になり, 605m μ における吸光度も僅かに減少する傾向がみられる。

2.4 加熱温度及び加熱時間による呈色の変化

ケトヘキソースを高濃度の硫酸中で反応させるため, 加熱温度と時間は呈色に影響を与えと考えられる。そこで, まず加熱温度の相違による呈色の変化を調べた。反応条件は 2.2 で述べた方法に従い, 加熱温度を 70, 80, 90 および沸騰水浴中の 4 種について検討した。その結果, 70 15 分間の加熱では全く発色せず, 加熱温度を 80 にして 15 分間加熱すると僅かに呈色が認められた。さらに反応温度を高くして 90 で加熱しても沸騰水浴中で 15 分間加熱した場合の約 80% の吸光度を示すにすぎない。そこで, 沸騰水浴中で加熱時間を変えた場合の吸光度の強さを比較した。Fig.3 に加熱時間による吸光度の変化を示す。Fig.3 に示したように 5 分間の加熱では呈色が充分でなく, また 20 分以上の加熱は呈色の色調が緑色を帯びて吸光度は減少する結果を得た。これらの結果から, 沸騰水浴中で 15 分間加熱する方法が最も適していると言える。

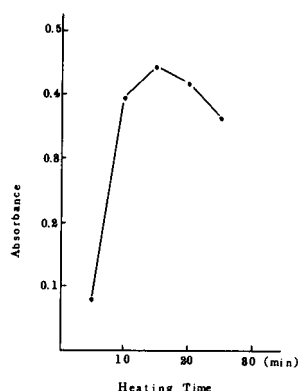


Figure 3. Effect of heating time.

Reaction conditions ; legend to under the

Figure 4.

2.5 呈色の安定性

2.1 に述べた反応条件に従って呈色させた反応液について, 経時的な吸光度の変化をしらべた。Fig.4 に示したように, 15 分間加熱後室温に放置すると, 吸光度は徐々に増加し, 60 分後には最大の呈色を示し, この呈色は 60 分間ほとんど変化しない。また, 140 分後の褪色は極めて僅少であり, 呈色は非常に安定であることを知った。Feigle は, 尿素 - 硫酸試液によるケト

ヘキソースの定性分析において塩化第一錫を添加しているが、呈色試液に3%までの濃度範囲で塩化第一錫を加えた試液を用いて加熱しても、呈色に影響はみられなかった。塩化第一錫の効果については、呈色に影響する金属イオンの妨害を排除するためと考えられるがこれについては検討しなかった。

2.6 アルドヘキソースの影響

ケトヘキソースに種々の濃度のアルドヘキソースを加えてその呈色に及ぼす影響を調べた。ぶどう糖、麦芽糖、乳糖のいずれも 10mg / 2ml の濃度までは果糖の呈色に影響を与えなかった。アルドヘキソースのみを、この呈色試薬と長時間加熱すると淡褐色を呈するが、この呈色は 465m μ に極大吸収を示すので上記濃度範囲においてはこれらの糖類は果糖の定量を妨害しない。

2.7 定量操作

以上の実験結果から、ケトヘキソースの定量法を次のように定めた。すなわち、呈色試薬として40%の硫酸水溶液に尿素を溶解して尿素含量が40%になるように調整したものを使用した。試料2mlを試験管にとり、5mlの尿素-硫酸試液を加えて振盪してよく混和し、試験管口に小型ロートをはめて液の蒸発を防ぎ沸騰水浴中で正確に15分間加熱する。反応液は流水で急冷後室温に90分間放置して十分に発色させ、試料の代りに水を用いて同様に処理したものを対照として605m μ で吸光度を測定する。測定セルは10mmのものを使用した。

2.8 検量線

果糖およびしょ糖の一定量を秤量して標準糖液を調整する。すなわち、試料2ml中に果糖1.0mg(しょ糖の場合は2.0mg)までの範囲に含まれるように各種の糖標準液を調整する。この標準液を用いて2.7の方法に従って検量線を作成した。Fig.5にその結果を示す。

Fig.5で明らかなように、果糖0.4mgまでは吸光度と糖濃度との間には直線関係がみられ、ペールの法則によく従っている。これは、しょ糖を標準糖液として用いた場合も全く同様な結果を与え、しょ糖0.8mgまでの範囲で直線関係が成立した。

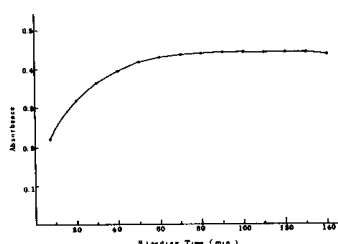


Figure 4. Color stability.

Reacting condition legend to under Figure 5.

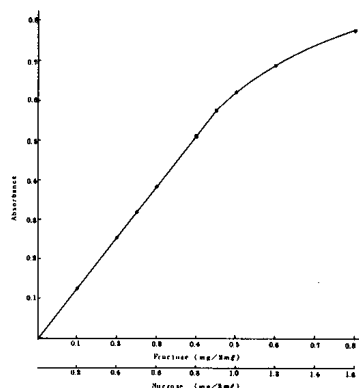


Figure 5. Calibration curves for fructose and sucrose.

Reagent 5ml + Sample 2ml; heat in boiling water for 15 minutes, after standing for 90 minutes, measure at 605m μ .

これらの直線について回帰による分析を行なった。その結果をTable 1および2に示した。すなわち、この実験において、七種の異なる糖量について三回の繰返し測定により独立に得られた値をもとに分散分析表を作り、更に三つの測定値の平均値について回帰を求め、吸光度と糖量の二変量間の直線性を検定した。平均値の回帰直線からのずれに対して $\chi^2_d = 0$ の帰無仮説をたてF検定した。第二種の誤差を避けるため5%の有意水準におけるF値を求めると、果糖でF=2.99、しょ糖でF=1.51となり、これらの値はF分布表の値 $F_{3,10} = 3.71$ (P=0.05)より小さく有意性が認められないことから、吸光度と糖濃度との間には、果糖0.4mg / 2mlまでの範囲において直線関係が成立することが明らかにされた。果糖が0.5mg以上の濃度範囲ではFの値は著しく大きくなり、果糖でF=210、しょ糖でF=36という値となり明らかに有意性が認められ直線関係は得られないことを知った。

尿素 - 硫酸試液による果糖の比色定量法

Table 1. Regression for Calibration Curve of Fructose

	Degree of Freedom	Sum of Square	Mean Square
Total	14	0.245326	
Within Classes	10	0.000361	0.0000361
Regress	1	0.244993	
Residual	3	0.000433	0.000108
F		2.99	

Table 2. Regression for Calibration Curve of Sucrose

	Degree of Freedom	Sum of Square	Mean Square
Total	14	0.246361	
Within Classes	10	0.000055	0.0000055
Regress	1	0.246336	
Residual	3	0.000025	0.0000083
F		1.51	

2.9 応用

この定量法を輸入天然はちみつ中の果糖の定量に応用した。Table 3 にその結果を示す。

Table 3. Analytical Results of Fructose in honey

Exp. NO	Fructose(%) in Honey	
	Urea-Sulfuric acid method	Resorcinol HCl method
1	41.6	38.9
2	40.1	40.2
3	39.7	41.2
4	40.1	39.3
5	41.6	39.9
6	40.1	41.6
7	41.9	40.3
σ	0.92	0.97

はちみつ中の糖類は、果糖とぶどう糖が主な成分であ

り、その含有量は両者ともほぼ同量で約 40%程度である。しょ糖の含有量は少なく約 2~3%であるがこの定量法ではしょ糖も同時に定量されるので、結果は総果糖分として算出したものである。Table 3 から、定量値の標準偏差は 0.92 となり、注意深く行なったレゾルシン - 塩酸法で得られた値との間には有意の差はない。

3 総括

1. 尿素 - 硫酸試液を用いて果糖およびしょ糖の定量におよぼす諸因子について検討した。
2. 605m μ を測定波長として、0.4mg / 2ml までの果糖および 0.8mg / 2ml までのしょ糖を定量することができる。
3. 回帰分析により検量線の直線性を F 検定した。
4. アルドヘキソースの共存は 20 倍まで呈色に影響を与えなかった。
5. この方法を天然はちみつ中の果糖定量に応用しよい精度で定量できた。

本実験にあたり種々御鞭撻を賜った木谷所長並びに終始御指導を戴いた天満分析官に深謝する。

文 献

- 1) J.Hadi, L.Pauz; C.A. **53** 2655(1959)
- 2) 松尾義之, 南波章一; 醗工 **28**, 118(1960)
- 3) J.H.Foulger; J.Biol.Chem., **99**, 207(1932)
- 4) F.Feigl; Spot test in Organic Chemistry P425(1960)
- 5) 前田宏; 第1回税関分析研究発表会口演 昭和 40 年 1 月

Colorimetric Determination of Fructose by Urea - Sulfuric Reagent

出 来 三 男*・ 入 江 隆 夫*

MITSUO DEKI and TAKAO IRIE

Central Laboratory of Customs

(Iwase - 531,Matsudo City Chiba Pref.)

A method was described for the colorimetric determination by the use of the color reaction for ketohexose with urea - sulfuric reagent. The procedure was as follows : measured 2ml of a solution containing 0 to 0.2mg of fructose per ml. into a test tube. 5ml of 40% sulfuric acid containing 40% urea was added to a sample solution. After the mixture was shaken vigorously, and heated in boiling water for 15 minutes. Cooling in running water, the absorbance was measured at 605m μ used 10mm cell.

In the concentration range of 0 to 0.4mg of fructose in 2ml, the calibration curve obeyed the Beer's law. 20 times of glucose, maltose and lactose did not affect the color reaction, respectively.

Fructose in natural honey was determined by this method, and the standard deviation was 0.51.

(Received Feb.1,1967)