

ノート

ジフェニルアミン・エタノール塩酸試液による果糖の比色定量について

渋 谷 進

1 諸 言

はちみつの分析試験法（関税中央分析所所定分析法No.2）が制定され、はちみつ中の果糖の定量については、従来より実施されていたレゾルシーン塩酸法による比色定量が、正式に決定されたわけであるが、グルコースのような、アルドヘキソース共存下のケトースの比色定量法については、他にp-アニシン法、システィン・カルバゾール・硫酸法等と多数の比色定量法が知られ、近くは、尿素・硫酸試液による果糖の比色定量法（出来、入江、所報4号）の詳細な報告がなされており要するに、両者の試薬に対する、反応速度の遅速を利用して、定量するものが多く、そのための温度加熱時間等、反応条件の設定に厳密さが要求され、僅かの条件の相違により、吸光度が変動するきらいがある。ケトースの定性試験の一つであるジフェニル・アミン反応（IhI - Pech man 反応）は果糖の溶液に、ジフェニル・アミンのアルコール溶液と濃塩酸を加えて、沸騰水浴中で加熱すると、強い青色を呈する反応であり、アルドヘキソースに対しては、より長時間加熱の後呈色する。そこで、この呈色反応を、果糖の比色定量に応用できるか、検討したので報告する。

2 方 法

試料 5ml（0.5mg 果糖）に 1%ジフェニルアミン・エタノール溶液（W/V）2ml、濃塩酸 5ml を加えてよく振盪し、沸騰水浴中に 10 分間加熱後、流水にて冷却し、610m μ で吸光度を測定する。フラクトース濃度と吸光度は直線関係を示すので、作製した検量線より、フラクトースを求める。

3 実験及び考察

3・1 装置及び試薬

日立光電光度計 FPW-3型により 10mm のセルを用いて吸光度を測定した。

神戸税関分析室 神戸市生田区加納町 6

試薬特級：ジフェニルアミン、果糖、葡萄糖、麦芽糖
乳糖、ガラクトース、キシロース

試薬 1 級：濃塩酸（35.0%以上）

局方アルコール（95.5% V/V）

1%（W/V）ジフェニルアミン・エタノール溶液：ジフェニルアミン 1g を局方アルコールにとかし全量を 100ml とした。

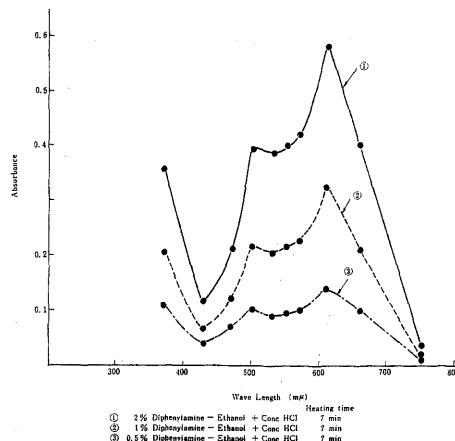


Fig. 1 Absorption curves

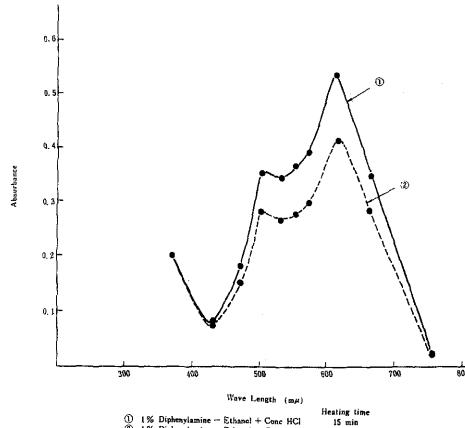


Fig. 2 Absorption curves

3・2 測定波長の選定

標準果糖溶液 5ml（0.5m 果糖）にジフェニルアミン・エタノール溶液 2ml（0.5%，1%，2%）濃塩酸 5ml

を加えて、沸騰水浴中に 7 分間加熱、流水で冷却し、各波長に対する吸光度を測定し、吸光度曲線を描いた。Fig. 1 に見られる如く、ジフェニルアミン・エタノール溶液の濃度の如何に拘らず、 $610\text{m}\mu$ に極大吸光度を示すことが知られ、次にジフェニルアミン・エタノール溶液 1% 濃度のものについて、それぞれ 10 分間、15 分間加熱後冷却し、各波長に対する吸光度曲線を描いたものも同じく、 $610\text{m}\mu$ に極大吸光度を示すことが知られる。(Fig. 2 参照)

3・3 塩酸及びジフェニルアミン・エタノール溶液濃度と呈色の関係

塩酸とジフェニルアミン・エタノール溶液(以下 DA・エタノールと称す)の濃度の相違が呈色の色調に影響することが、知られたので、この点について更に検討を加えた。即ち標準溶液 5ml(0.5mg 果糖)に 1%, 2%, DA・エタノール溶液、10%, 20%, 25%, Conc 各塩酸溶液、加熱時間、10 分、15 分間の色々な組合せによる、吸光度の変動を示したもののが、Fig. 3, Fig. 4 である。

尚上記呈色試薬の添加 ml 数即ち、DA・エタノール 2ml, 塩酸 5ml 等、反応条件は特別の記入のない限り、2 の通りであり、3・4 以下の実験についても、それによっている。Fig. 3, 4 から明らかなように、DA・エタノール、塩酸の濃度の高くなるに従って、吸光度も増加していくことが知られる。尚 Fig. 4 に於て、線の欠けた部分が見られるのは 10% 塩酸と、2% DA・エタノール、組合せによる、呈色試液では、冷後白濁し(結晶の折出)吸光度の測定不能のためである。

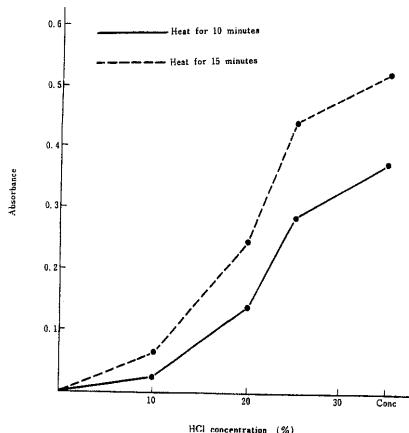


Fig. 3 Absorbance at $610\text{m}\mu$ with 1% Diphenylamine · Ethanol Solution

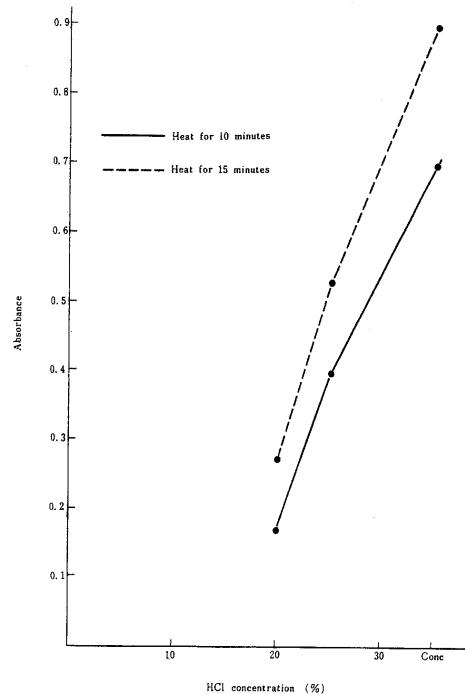


Fig. 4 Absorbance at $610\text{m}\mu$ with 2% Diphenylamine · Ethanol Solution

3・4 加熱時間による呈色の変化

加熱時間の長短が呈色に影響することは、3・3 でも明らかであり、その検討を前に、先づ加熱温度の相違による呈色の変化を調べたが、65 では 30 分間、加熱しても、殆んど発色せず、80 30 分間で、沸騰水浴中で 7 分間、加熱した場合と、ほぼ同様の吸光度を示した

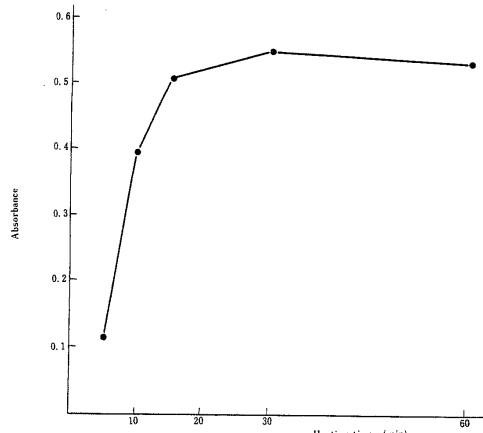


Fig. 5 Effect of heating times on coloration.

にすぎない。そこで沸騰水浴中で加熱時間の相違による吸光度の強さを測定し、その結果を Fig. 5 に示した。Fig. 5 から明らかなように 15 分間の加熱で最大発色のほぼ、100%に達しており（30 分間で最大の吸光度）15 分間、加熱が最もだ当なようであるが、次の 3.6 の項に述べているように、他の糖類の呈色の影響を考慮するならば、加熱時間はできるだけ短かくするのに、こしたことはなく、いろいろ総合的に勘案して、沸騰水浴中の、10 分間加熱を採用した。

3・5 呈色の経時的变化

2 で述べた反応条件に従い、呈色させた液について流水で冷却後、室温に放置し経時的な呈色の変化について調べたが、(Fig. 6 に示す) 呈色後 30 分間は吸光度の変化は殆んど見られず 1 乃至 2 時間後、僅かに増加しており、更に、3 時間、4 時間後と漸増の傾向が見られるが呈色は非常に安定であることを知った。

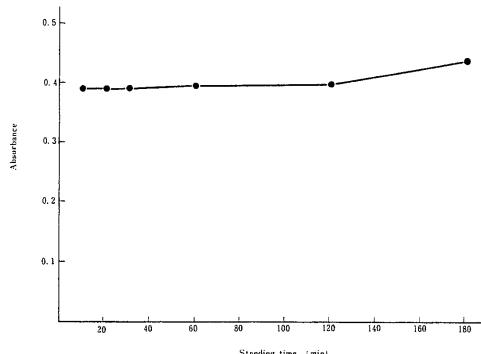


Fig. 6 Color stability.

3・6 他の糖類の影響

他の糖類の果糖の呈色に及ぼす影響を調べるため、種々の濃度の、葡萄糖、ガラクトース、麦芽糖、乳糖、キシロースについて呈色の強さを検討したが、10 分間加熱では、いづれも 0.5mg / 5ml 存在に於て、殆んど呈色せず、果糖溶液に、アルドヘキソースを加えての呈色に及ぼす影響も 0.3mg / 5ml 迄の濃度に於て果糖の定量を妨害しない、このようなことから、はちみつのようにグリコースとフラクトースがほぼ同じ割合で含まれているものの果糖の定量に、この方法が利用できることを知った。

3・7 検量線の作成

果糖 0.5g を精秤して、蒸溜水に溶かし、500ml に定容する。その溶液を用いて、1l 中 20, 40, 60, ..., 200mg 含むような標準溶液を調製し、その標準液を用いて、2 の反応条件に従って、各濃度の吸光度を測定し、検

量線を作成する (Fig. 7)

Fig. 7 で明らかのように、果糖濃度と吸光度は直線関係を示した。これは、しょ糖を標準溶液として用いた場合も同様の結果をえた。

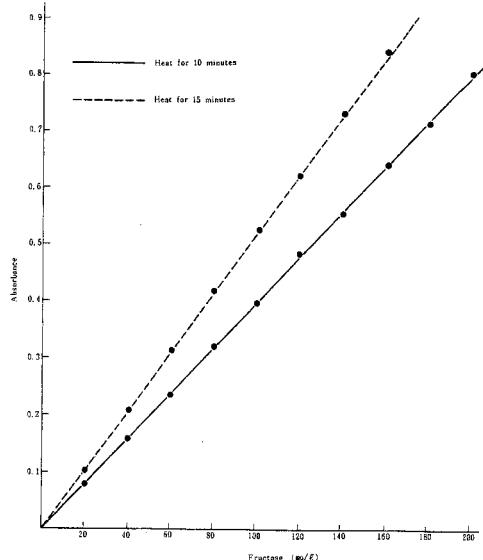


Fig. 7 Calibration curves.

3・8 定量方法

2 の所で大体述べたが試料 5ml を 18m/m 硬質試験管にとり 1%, D.A.・エタノール溶液 2ml, 濃塩酸 5ml を加え、よく振盪し、沸騰水浴中に正確に 10 分間加熱後、流水にて冷却し、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、610m μ で吸光度を測定し、そのつど作成した検量線より果糖を求める。次にこの方法によるはちみつ中の果糖の定量値と、レゾルシン塩酸法による比較結果を表 1 に記す。

両法とも強酸性で処理するため、しょ糖の加水分解によって生成した果糖の呈色が当然考えられるので結果は、総果糖分として求めてある。

Table 1 Fructose (%) in Honey

Exp. No	Diphenylamine·ethanol-HCl method	Resorcinol HCl method
1	41.8	42.7
2	41.3	39.4
3	44.4	45.9
4	39.8	40.2
5	42.0	41.5

4 ま と め

ジフェニルアミン・エタノール・濃塩酸試液による、ケトースの呈色反応を用いて、果糖の比色定量を検討したが $\lambda 10m\mu$ の波長を用いて、果糖 0.1~1.0mg /5ml の範囲に於て糖濃度と吸光度の間に直線関係が得られ、果糖を定量し得た。アルドヘキソースの存在は、5倍以上では呈色にやや影響する難はまぬがれないが、3倍まで呈色に影響を与えたかった。

本実験を行うにあたり種々御鞭撻をいただいた増田分析官並びに西浦、桂藤両技官の御協力に感謝します。

文 献

- 1 . “ 実験化学講座 ” Vol. 23
- 2 . 農芸化学実験書 (京都大学) 第 2 卷
- 3 . 出来、入江、関税中央分析所報 第 4 号
- 4 . Thorpe's Dictionary of Applied chemistry

**Colorimetric Determination of Fructose by
Diphenylamine ethanol-Hydrochloric Reagent**

Susumu Shibuya

(Kobe Customs Laboratory 6 Kancho
Ikutaku Kobe City)

Received July 30, 1968