#

のち、ただちに沸騰水浴中に入れ 15 分間加温する。加温反応後試験管を碎氷水中に入れ 10 分以上冷却したのち、常温水で室温 (15~20°C) にもどし、励起波長 465 nm, けい光波長 505 nm で 0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウラニン標準溶液を対照にけい光強度を測定する。

3.2 アンスロン・フルフラールの励起、けい光スペクトル

アンスロンけい光反応は糖より生成するフルフラール体がアンスロンと結合しけい光性化合物を形成するものと考えられる。したがって糖類のアンスロンけい光反応の最適条件を検討するため、基礎過程としてフルフラールのアンスロンけい光反応について詳細に検討した。

8×10^{-5} mol のフルフラール 1 ml を用い 3.1 の標準操作に従って得られた溶液の励起、けい光スペクトルを Fig. 1 に示した。

Fig. 1 Excitation and emission spectrum of furfural-anthrone reaction

(1) Excitation spectrum; (2) Emission spectrum;
Furfural : $7.3 \times 10^{-6} M$; Excitation slit : 30 nm;
Emission slit : 4.0 nm; Sample sensitivity : 2

フルフラール・アンスロンは 460~470 nm の光で効果的に励起され、460~600 nm にけい光波長帯を有する緑黄色のけい光を示し、そのけい光中心波長は 505 nm にある。

3.3 硫酸濃度の影響

アンスロン試薬は比較的低濃度の硫酸には溶解しにくく、少なくとも 60% 以上の硫酸に溶解させる必要がある。この際硫酸の濃度はけい光強度に大きい影響を及ぼす。硫酸濃度のけい光強度に及ぼす影響について検討し

Fig. 2 Effect of sulfuric acid concentration

Fluorometer readings was set at 50 div. with 0.15 μg uranine/ml standard solution. Furfural : $7.3 \times 10^{-6} M$; Anthrone : 1 mg/11 ml; Measured 465 nm/505 nm; Excitation slit : 30 nm; Emission slit : 3.5 nm; Sample sensitivity : 2

た結果を Fig. 2 に示す。

フルフラール・アンスロンのけい光は 65% (v/v) 硫酸中で最もけい光強度が大きく、それ以上酸濃度が大きくなるとかえってけい光強度の減少をきたす。65% 硫酸濃度ではアンスロン自身の溶解性も大きく好つごうである。

3.4 アンスロン試薬量の影響

アンスロン試薬量とけい光強度との関係を調べた結果を Fig. 3 に示した。Fig. 3 は 8×10^{-5} mol のフルフラールについての結果を示したが、 1×10^{-4} mol までのフルフラールに対しては 1~1.5 mg {0.01~0.015% (w/v%)} のアンスロンを添加すればじゅうぶんであること

Fig. 3 Effect of anthrone reagent

Fluorometer readings was set at 50 div. with 0.15 μg uranine/ml standard solution. Furfural : $7.3 \times 10^{-6} M$; H_2SO_4 : 65% (v/v); Measured 465 nm/505 nm; Excitation slit : 30 nm; Emission slit : 3.5 nm; Sample sensitivity : 2

を知った。

3.5 加熱, 氷冷時間の影響

強硫酸中でアンスロン反応を進行させる際の温度については多くの研究者により検討されているが, 反応をすみやかに完結させるために沸騰水中での加熱時間とけい光強度との関係を調査した結果を Fig. 4 に示した。Fig. 4 よりわかるように, 沸騰水中で 10 分以上加熱すれば一定の最大けい光強度を示す。また加熱反応後, 反応を停止させるため碎氷水中に試験管を入れ冷却するが, その冷却時間とけい光強度との関係を調べた結果を Fig. 5 に示した。

Fig. 5 よりわかるように, 10 分以上冷却すればじ

Fig. 4 Effect of heating time

Fluorometer readings was set as 50 div. with $0.15 \mu\text{g}$ uranine/ml standard solution. Furfural: $7.3 \times 10^{-6} M$; Anthrone: $1 \text{ mg}/65\% \text{-H}_2\text{SO}_4$ 11 ml; Measured at 465 nm/505 nm; Excitation slit: 30 nm; Emission slit: 3.5 nm; Sample sensitivity: 2

Fig. 5 Effect of cooling time

Fluorometer readings was set at 50 div. with $0.15 \mu\text{g}$ uranine/ml standard solution. Furfural: $7.3 \times 10^{-6} M$; Anthrone: $1 \text{ mg}/65\% \text{-H}_2\text{SO}_4$ 11 ml; Measured at 465 nm/505 nm; Excitation slit: 30 nm; Emission slit: 3.5 nm; Sample sensitivity: 2

うぶんである。

3.6 けい光の安定性

氷冷した試料管は室温の水中 ($15 \sim 20^\circ\text{C}$) に約 5 分間静置し常温としたのち, けい光強度を測定する。このようにして得られたフルフラール・アンスロン化合物のけい光の経時変化を調べた効果を Fig. 6 に示した。このけい光はきわめて安定で溶液調製後少なくとも 120 分は安定であった。

Fig. 6 Stability of fluorescence intensity of furfural-anthrone reaction

(1) Furfural $7.3 \times 10^{-5} M$; (2) Furfural $3.6 \times 10^{-6} M$; Fluorometer readings was set at 50 div. with $0.15 \mu\text{g}$ uranine/ml standard solution. Anthrone: $1 \text{ mg}/65\% \text{-H}_2\text{SO}_4$ 11 ml; Measured at 465 nm/505 nm; Excitation slit: 30 nm; Emission slit: 3.5 nm; Sample sensitivity: 2

Fig. 7 Calibration curve for furfural

Fluorometer readings was set as 50 div. with $0.15 \mu\text{g}$ uranine/ml standard solution. Anthrone: $1 \text{ mg}/65\% \text{-H}_2\text{SO}_4$ 11 ml; Measured at 465 nm/505 nm; Excitation slit: 30 nm; Emission slit: 3.5 nm; Sample sensitivity: 2

3.7 検量線

以上のような諸条件の検討結果をもとにして最適条件下でのフルフラールの定量法を組み立てたのが3.1に示す標準操作法である。本操作法により求めた検量線の1例をFig. 7に示した。

この結果よりわかるように、 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-5}$ mol ($0.96 \sim 9.6 \mu\text{g}/11 \text{ ml}$) 水溶液を誤差 2% 以内で定量できる。

4 糖類の定量

4.1 ペントースの定量

五単糖として D-キシロース, L-アラビノースおよび D-リボースを用い, 3.1 と同一条件でアンスロン反応を行ない, 糖類のフルフラールへの変化に基づくけい光反応ならびにこれらの糖類の定量法について検討した。

いずれの糖も 8×10^{-5} mol 溶液 1 ml を用い, 3.1 の条件で反応させ, 反応物の励起, けい光スペクトルを求めた結果を Fig. 8 に示した。

Fig. 8 Excitation and emission spectra of pentose-anthrone reaction

(2), (3) Xylose-anthrone complex; (1), (4) Arabinose and ribose-anthrone complex; Broken line: Excitation spectrum (Emission wavelength set at 505 nm); Solid line: Emission spectrum (Excitation wavelength set at 465 nm); Sugars: $7.3 \times 10^{-6} M$; Anthrone: 1 mg/65% H_2SO_4 11 ml; Excitation slit: 30 nm; Emission slit: 4 nm; Sample sensitivity: 2

キシロース, アラビノース, リボースはフルフラールの場合と異なり, そのアンスロンとの反応物の励起スペクトルは 390~410 nm および 460~470 nm に二つの最大励起波長が認められ, 460~470 nm 励起における 505 nm のけい光のピークがフルフラールのそれと一致

する。これらペントースのアンスロン反応物の 390~410 nm 励起によるけい光スペクトルは Fig. 9 に示すように各ペントースによりそのけい光中心波長が異なる。したがって, 390~410 nm 励起による 450~470 nm のけい光ピークを利用するペントースのけい光定量法は条件が複雑化するのが興味深い問題である。

Fig. 9 Emission spectra of pentose-anthrone reaction

(1) Xylose; (2) Ribose; (3) Arabinose; Excitation: 405 nm; Pentose: $7.3 \times 10^{-6} M$; Anthrone: 1 mg/65% H_2SO_4 11 ml; Excitation slit: 30 nm; Emission slit: 4 nm; Sample sensitivity: 2

しかし, 本報では 460~470 nm 励起による 505 nm のけい光を利用するペントースの定量法について検討した。

すなわち, $2 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-4}$ mol の糖類溶液 1 ml を用い, フルフラールと同条件下でアンスロン反応を行ない, フルフラールへの転移について検討した。その結果得られた検量線の1例を Fig. 10 に示した。

同一モル濃度あたり D-キシロースはフルフラールとまったく同一のけい光強度を示し, また L-アラビノースと D-リボースのけい光強度は互いに等しい。しかし, キシロース, フルフラールとアラビノース, リボースのけい光強度比は大約 3:2 である。しかしこれらキシロース, アラビノース, およびリボースのけい光反応の最適条件についても詳細に検討したところ, いずれもフルフラールについて得られた結果と同じく 65% 硫酸を用いた場合最もけい光強度が大きく, アンスロン試薬も 1 mg の添加でじゅうぶんであり, 加熱時間, 冷却時間においてもおのおの 10 分でけい光強度が最大になることを知った。

Fig. 10 Calibration curves for pentose and hexose

(1) Xylose; (2) Arabinose and ribose; (3) Rhamnose and fucose; (4) Glucose, galactose, mannose, fructose and sorbose; Fluorometer readings was set at 50 div. with $0.15 \mu\text{g}$ uranine/ml standard solution. Anthrone: $1 \text{ mg}/65\% \text{ H}_2\text{SO}_4$ 11 ml ; Measured at $465 \text{ nm}/505 \text{ nm}$; Excitation slit: 30 nm ; Emission slit: 3.5 nm ; Sample sensitivity: 2

4.2 メチルペントースとアンスロンのけい光反応

メチルペントースとして L-ラムノース, L-フコースを用いアンスロンけい光反応をフルフラールの定量条件で検討した。その結果, これらのメチルペントースは4.1で記したペントースと同様の励起, けい光スペクトルを示すが, そのけい光強度はきわめて弱く, フルフラール, キシロース, アラビノース, リボースのそれに比べほとんど無視小であり, 前者のアンスロンによるけい光定量にほとんど影響を与えない。ちなみにその検量線を Fig. 10, (3) に示した。

4.3 ヘキソースの影響

アンスロンによるペントースのけい光定量時におけるヘキソースの影響を調べた。D-グルコース, D-ガラクトース, D-マンノース, D-フラクトースおよび L-ソルボースについて検討したところ, Fig. 11 に示すような励起, けい光スペクトルを示し, フルフラール, ペントースの定量条件下ではそのけい光はきわめて弱く, メチルペントースと同様そのけい光の影響はほとんど無視できる。ヘキソースの検量線の1例を Fig. 10, (4) に示す。

Fig. 11 Excitation and emission spectra of hexose-anthrone reaction

(1) Excitation spectra (Emission wavelength set at 505 nm); (2) Emission spectra (Excitation wavelength set at 405 nm); (3) Emission spectra (Excitation wavelength set at 465 nm); Hexose: $8 \times 10^{-5} \text{ mol}$; Anthrone: $1 \text{ mg}/65\% \text{ H}_2\text{SO}_4$ 11 ml ; Excitation slit: 30 nm ; Emission slit: 5 nm ; Sample sensitivity: 2

4.4 フルフラール, 糖類のアンスロンけい光反応の比較

以上のように 65% 硫酸酸性下におけるフルフラール, 糖類のアンスロンけい光反応は, フルフラール, ペントースに特異的であり, メチルペントース, ヘキソースについてもその反応は認められるが, ペントースに比べほとんど無視できる。Table I にフルフラール, 各種糖類のアンスロンけい光特性を表示した。

Table I Fluorescence properties of sugars-anthrone reaction

Sugars	Excitation spectra		Emission spectra		Relative fluorescence intensity ratio (%)
	λE_x	(nm)	λE_m	(nm)	
Furfural	—	465	—	505	100
D-Xylose	400	465	445	505	98
L-Arabinose	405	465	470	507	66
D-Ribose	405	465	455	507	67
L-Rhamnose	402	465	458	507	3
L-Fucose	405	467	455	508	4
D-Glucose	405	465	480	505	12
D-Galactose	405	465	457	508	10
D-Mannose	405	465	460	508	10
D-Fructose	405	465	455	508	11
L-Sorbose	405	465	458	507	11

4.5 糖類とアンスロンの結合比

フルフラール・アンスロンおよびリボース・アンスロン反応物の結合比を決定するためモル比法を用いてけい

光法的に検討した結果を Fig. 12 および Fig. 13 に示した。

Fig. 12 Mole ratio method for furfural-sugar reaction

Anthrone reagent : 1×10^{-4} mol; Furfural : 1×10^{-4} mol; Measured at 465 nm/505 nm; Excitation slit : 30 nm; Emission slit : 10 nm; Sample sensitivity : 2

Fig. 13 Mole ratio method for furfural-ribose reaction

Anthrone reagent : 1×10^{-4} mol; Ribose : 1×10^{-4} mol; Measured at 465 nm/505 nm; Excitation slit : 30 nm; Emission slit : 10 nm; Sample sensitivity : 2

これよりわかるように、両者いずれの場合も 1 : 1 の結合比を示し、沢村、小山¹³⁾らの実験結果とよい一致を示した。

5 結 語

アンスロン試薬を用いるフルフラール、ペントースのけい光定量を検討した結果、従来の吸光度法よりペン

ースに選択的であり、メチルペントース、アルドヘキソースおよびケトヘキソースはペントースのけい光定量にほとんど影響を与えない。したがって本法は自然物中のアラビノース、リボースおよびキシロースのけい光定量法としてすぐれている。本法により試料濃度 $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-4}$ mol ($1.5 \sim 15 \mu\text{g}$) のペントースが精度よく定量できる。さらにまた、390~410 nm の励起波長を用い 450 nm 付近のけい光を利用するとかなり多種類の糖類が定量可能であると考えられる。

(1971 年 4 月 3 日、日本化学会第 24 年会において発表)

文 献

- 1) G. Bertrand : *Soc. Chim. Paris.*, **35**, 1285 (1906).
- 2) J. H. Lane, L. Eynon : *J. Soc. Chem. Ind.*, **42**, 32 T (1923); **44**, 150 T (1925).
- 3) M. Somogyi : *J. Biol. Chem.*, **195**, 19 (1952).
- 4) M. Dybois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. S. Mith : *Nature*, **168**, 167 (1951).
- 5) T. A. Scott, E. H. Melvin : *Anal. Chem.*, **25**, 1656 (1953).
- 6) 沢村良二, 小山 隆 : 薬誌, **81**, 1689 (1961).
- 7) T. E. Timell, C. P. J. Glandemans, A. L. Currie : *Anal. Chem.*, **28**, 1916 (1956).
- 8) F. B. Seibert : *J. Biol. Chem.*, **163**, 511 (1946).
- 9) S. S. Cohen : *ibid.*, **201**, 71 (1953).
- 10) R. Sawamura, T. Koyama : *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **12**, 706 (1964).
- 11) T. Momose, Y. Ohkura : *ibid.*, **4**, 209 (1956).
- 12) 辻 章夫, 前田昌子 : 日本分析化学会第 19 年会講演要旨集, p. B285 (1970).
- 13) 沢村良二, 小山 隆 : 薬誌, **84**, 82 (1964).

☆

Fluorometric determination of pentose with anthrone. Hiroshi HIRAYAMA, Keizō HIRAKI and Yasuharu NISHIKAWA (Department of Chemistry, Faculty of Science and Engineering, Kinki University, Kowakae, Higashiosaka-shi, Osaka-fu)

Furfural and pentose (D-xylose, L-arabinose and D-ribose) gave a specific fluorescence with anthrone in strong sulfuric acid.

In this paper, anthrone was used as a reagent for fluorometric determinations of furfural and pentose. Several conditions for the determination, such as excitation and emission spectra of anthrone-complexes, the concentration of anthrone, the acidity of sulfuric acid, the effect of reaction time and standing time, and the composition of fluorescent complex were investigated.

The maximum excitation and emission wavelengths of furfural and pentose are at 465 nm and 505~507 nm respectively. The recommended procedures for quantitative determination were as follows. Ten milliliter of anthrone reagent (containing 0.01 w/v% of anthrone in 65 v/v% sulfuric acid) was added to 1 ml of pentose solution ($2 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-4}$ mol),

with continuous cooling in crushed ice water. The mixture was heated for 15 minutes in boiling water, then cooled for 10 minutes in crushed ice water, and it was reduced to room temperature.

The fluorescence intensity of the solution was measured at 505 nm by using a uranine solution (0.15 μg uranine/ml) as the reference standard.

The calibration curve was linear for $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-5}$ mol ($1.5 \sim 15 \mu\text{g}/\text{ml}$) of furfural and pentose in 11 ml of final solution. The compositions of fluorescent complexes of anthrone-furfural and anthrone-ribose were determined by mole ratio method, and it was found that the 1:1 complexes were formed in both cases at above mentioned conditions.

This fluorescence reaction was specific for furfural and pentose. The relative fluorescence intensities

(excitation; 465 nm, emission; 505 nm) of furfural, pentose, methyl-pentose and hexose were determined. The results obtained were as follows; furfural; 100, D-xylose; 98, L-arabinose; 66, D-ribose; 67, L-rhamnose; 3, L-fucose; 4, D-glucose; 12, D-galactose; 10, D-mannose; 10, D-fructose; 11, L-sorbose; 11. The fluorescence intensities of L-fucose, D-glucose, D-galactose, D-mannose, D-fructose and L-sorbose were far weaker than that of pentose (D-xylose, L-arabinose and D-ribose), and they were negligible for fluorometric determination of pentose. Therefore, this method was recommended for the determination of furfural, xylose, arabinose and ribose in methyl-pentose, aldo-hexose and keto-hexose.

(Received June 12, 1971)

電量的フッ素イオン発生法によるランタンの定量

李 龍 根, 黄 圭 子*, 野 崎 健**, 武 藤 義一*

(1971 年 6 月 12 日受理)

フッ化ランタン膜を用いたフッ素イオン発生極を利用して, 0.4~1.4 mg のランタンを相対標準偏差 1.6~2.5% で電量滴定した. 電解液には 0.3M 硝酸カリウムの 50% エタノール水溶液を用い, 電流密度 $15 \text{ mA}/\text{cm}^2$ では電流効率 $100.7 \pm 1.6\%$ であった. この方法によれば, ランタンなどのフッ素イオンと安定な錯体を形成する金属イオンを, 比較的精度よく定量できるものと考えられる. しかし, 本法の実用化には高い電流を流しうるフッ化ランタン膜の開発が必要である.

1 緒 言

フッ化ランタン単結晶膜を用いたフッ素イオン電極が開発されて以来, フッ素の簡易定量法として広く用いられている. フッ素イオン電極を指示電極とするフッ素イオンの測定法にはランタン, アルミニウム, チタンなどを滴定試薬にする電位差滴定法^{2)~4)}があり, 電量滴定法としてもフッ素イオン電極を直接指示電極として用いる⁵⁾ほかに, アルミニウム⁶⁾, ジルコニウム⁷⁾およびベリリウム⁸⁾を終点指示電極として用いる方法, トリウムイオン⁹⁾を電量的に発生させてフッ素イオンを測定する方法など数多く報告されている. このほかに, フッ素イオン電極はフッ素と安定な錯体をつくる物質の定量にも利用されている¹⁰⁾. 最近著者らは, フッ素イオン電極

を用いて, シリカ, アルミニウム, 鉄, カルシウムおよびマグネシウムを間接的に定量する方法を確立した¹¹⁾.

このように, フッ化ランタン膜はフッ素イオン電極として多方面に用いられているが, Ross ら¹²⁾により, このフッ化ランタン膜を通してフッ素イオンを発生させる方法が報告されている.

フッ素は多くの金属と安定な錯体を形成するが, これらの金属イオンは他の陰イオン錯体を作りにくい. したがって, フッ素錯体をつくりうる金属を定量するために, フッ素イオンの電量的発生は興味があると考えられる. しかし, Ross らの報告では実際に金属イオンを滴定しておらず, フッ素イオンの電量的発生条件の詳細および問題点もあまり明らかでなかった. 本法ではその検討を行なった. これより電解液に 50% エタノールを添加すると終点が明りょうとなるが, 発生極に高電流を流すと電極が熱的に破壊し, また発生極の電場効果な

* 東京大学生産技術研究所: 東京都港区六本木 7 丁目

** 電子技術総合研究所: 東京都田無市向台町