3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾンによる糖類の比色定量

内藤多喜夫, 永納秀男, 安井照代, 石原知子

名城大学薬学部¹⁾

The Colorimetric Determination of Sugars with 3-Methyl-2-benzothiazolinone Hydrazone

TAKIO NAITO, HIDEO NAGANO, TERUYO YASUI
and TOMOKO ISHIHARA

Faculty of Pharmacy, Meijo University¹⁾

(Received March 31, 1969)

The reaction of 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH) with sugars resulted in the development of green to blue coloration, which has an absorption maximum at about 635 m μ . Therefore, the colorimetric determination of sugars using MBTH was examined.

To 1 ml of sample, 1 ml of 0.4 % MBTH solution and 2 ml of 0.05N NaOH are added, and the mixture is heated in a boiling water bath for 10 minutes, then cooled under cold tap water to room temperature. Five ml of 1 % ferric chloride solution are added. Following about 10 minute waiting period, the mixture is extracted with *n*-butyl alcohol, then the absorbance at 635 m μ is measured. The concentration range of glucose determinable by this method is 5–70 μ g/ml, and the determined value agree with Somogyi-Nelson's method within the largest deviation of $\pm 3\%$.

Sawicki等は3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン (MBTH) によるアルデヒド類²⁾の呈色反応について報告している。

著者等はこの試薬を用いて糖類の比色定量について検討し、さらに本定量法を用いて血糖を定量したところ好結果を得たので報告する。

Sawicki 等は反応呈色物をアセトンで希釈しているが著者等はこの反応呈色物の溶媒抽出について検討した結果 *n*-ブタノールが最もよいことがわかった。定量条件を種々検討した結果、グルコースでは5–70 μ g/mlの濃度範囲で直線性を示し、同様にL-アラビノース、D-アラビノース、D-キシロース、D-リボース、ガラクトース、マンノース、フルクトース、L-ソルボース、ラムノース、マルトース、ラクトース、D-グルクロン酸も呈色することがわかった (Table I)。

実験の部

装置 日立パーキンエルマー 139 形分光光電光度計および島津マルチパーパス自記分光光度計 MPS-50L 形。

試薬 1) 3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン塩酸塩 (MBTH) 試薬——MBTH 0.4 g を水に溶解

して 100 ml とする。

2) アルカリ液——0.05 N 水酸化ナトリウム液 (試薬特級)。

3) 塩化第二鉄液——塩化第二鉄 1 g を水に溶かして 100 ml とする。

4) *n*-ブタノール——試薬特級

5) 硫酸ナトリウム——試薬特級

定量法 共栓試験管に試料溶液 1 ml を正確に量って加え、0.4 % MBTH 液 1 ml, アルカリ液 2 ml を順に加え、沸騰水浴上で正確に10分間加温した後、流水で3–5分冷却する。1 % 塩化第二鉄液 5 ml を加え、ふりまぜた後、5–10分間放置後 *n*-ブタノール 10 ml で1回抽出する。緑–青色の色は *n*-ブタノール層にほとんど完全に移行する。ブタノール層を試験管に移し、硫酸ナトリウム約 1 g を加え、同様に操作した液を対照として層長 10 mm, 波長 635 m μ における吸光度を測定する。

検量線の作成 D-グルコース 5–70 μ g/ml 含有の水溶液を調製し、おのおの 1 ml をとり 定量法にしたがって操作し、検量線を作成した (Fig. 1)。

1) Location : Tenpaku-cho, Yagoto, Showa-ku, Nagoya (名古屋市昭和区天白町八事裏山15)。

2) E. Sawicki, T. R. Hauser, T. W. Stanley, W. Elbret, *Anal. Chem.*, **33**, 93 (1961)。

Fig. 1. Calibration Curve of the Colored Solution produced from D-Glucose and MBTH Reagent

定量条件の検討 無水ブドウ糖（試薬特級）を用いて以下の検討を行なった。

1. 呈色液の吸収曲線——グルコース（20 μg/ml）1 ml をとり定量法にしたがって操作し、吸収スペクトルを測定した。Fig. 2 に示すとおり 635 mμ に吸収極大を示した。同様の操作でD-キシロース、ガラクトース、フルクトース、L-ソルボース、ラムノース、マルトースは同じ吸収曲線をえがき 635 mμ に吸収極大を示し、L-アラビノース、D-アラビノース、D-リボース、D-マンノース、D-グルクロン酸は同じ吸収曲線を示すが 630 mμ に吸収極大を示した。

Fig. 2. Absorption Spectrum of the Colored Solution produced from D-Glucose and MBTH Reagent

..... : blank solution

— : 20 μg/ml of D-glucose

2. アルカリの影響——糖液、MBTH を加えたものにアルカリを加えて加温すると著しく鋭敏になる。グルコース 10 μg/ml, 20 μg/ml のそれぞれ 1 ml をとりアルカリ液を Fig. 3 に示すように量をかえて加え、定量法にしたがって操作し吸光度を測定した。その結果はFig. 3 に示すとおりである。アルカリ液 1.6 ml 以上では一

定の吸光度を与えたのでアルカリ液 2.0 ml を用いることにした。

Fig. 3. Effect of 0.05 N-NaOH on the Absorbance of the Colored Solution

—●— : D-glucose 10 μg/ml
—○— : D-glucose 20 μg/ml

3. 試薬の濃度による影響——グルコース 10 μg/ml, 20 μg/ml, 30 μg/ml に MBTH の 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0 % 溶液を加え定量法にしたがって操作し、反応呈色液の吸光度を測定して Fig. 4 の結果を得た。Fig. 4 に示すとおり 0.3—0.5 % ではほぼ一定の吸光度を与えるので 0.4 % MBTH 液を用いることにした。

Fig. 4. Effect of the Concentration of 3-Methyl-2-benzothiazolinone Hydrazone (MBTH) on the Absorbance of the Colored Solution

—●— : D-glucose 10 μg/ml
—×— : D-glucose 20 μg/ml
—○— : D-glucose 30 μg/ml

4. 反応時間の影響——グルコース 10 μg/ml について沸騰水浴中 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 60min と加温時間を変化させ、他は定量法にしたがって操作した結果は Fig. 5 に示すとおりである。反応時間 10—20min ではほぼ一定の値が得られるが、ブランクは加温時間が長くなるにしたがって増大するので正確に10分間沸騰水浴上で加温することにした。

Fig. 5. Effect of the Heating Time on the Absorbance of the Colored Solution
D-glucose 10 μ g/ml

5. 発色時間の検討——グルコース 10 μ g/ml で 1% 塩化第二鉄液を加えた後 3 min から 30 min 放置し、他は定量法にしたがって操作し、吸光度を測定した結果 3 min から 15 min の間では一定の値が得られた。そこで塩化第二鉄液を加えた後 5—10 min 放置することにした。

6. 塩化第二鉄濃度の影響——グルコース 20 mg/ml を用いて塩化第二鉄濃度を 0.25, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0% に変化し、他は定量法にしたがって操作し反応呈色液の吸光度を測定したところ Fig. 6 の結果を得た。0.8% 以上では一定の吸光度を与えたので 1% 塩化第二鉄を使用することにした。

Fig. 6. Effect of the Concentration of FeCl₃ Solution on the Absorbance of the Colored Solution
D-glucose 20 μ g/ml

7. *n*-ブタノールの抽出について——グルコース 10 μ g/ml, 20 μ g/ml, 30 μ g/ml を用い定量法にしたがって操作し *n*-ブタノール 10 μ g/ml の抽出回数について検討した。10 μ g/ml, 20 μ g/ml, 30 μ g/ml ではそれぞれ第 1 回抽出で 96.4%, 96.5%, 96.3% 抽出され、第 2 回抽出で 98.6%, 99.5%, 99.2% であった。操作を迅速に行なうため *n*-ブタノール 10 ml で 1 回抽出することにした。

8. 反応呈色液の経時変化——グルコース 20 μ g/ml, 30 μ g/ml を用い定量法にしたがって操作し、反応呈色液を *n*-ブタノールを加えてから 7 min から 60 min 経過し

たのち吸光度を測定した。その結果は Fig. 7 に示すとおりで、わずかに退色しているが、一定時間後に測定すれば吸光度にあまり変化はないと思われる。

Fig. 7. Stability of the Colored Solution in *n*-Butanol

—○— : D-glucose 30 μ g/ml
—●— : D-glucose 20 μ g/ml
.....▲..... : blank solution

定量法にしたがって操作し、他の糖類を定量した結果 Table I に示すような値が得られた。3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン塩酸塩を用いて十分に糖類が分析されることがわかったので本定量法を用いて血糖の定量を行なった。

TABLE I. Characteristics of the Color Reaction Products of Various Sugars with 3-Methyl-2-benzothiazolinone Hydrazone (MBTH)

Sugars	Concn. (μ g/ml)	$\lambda_{\max}$ (m μ)	Absorbance
L-Arabinose	20	630	0.539
D-Arabinose	30	630	0.544
D-Xylose	20	635	0.545
D-Ribose	20	630	0.505
D-Glucose	20	635	0.477
D-Galactose	20	635	0.414
D-Mannose	20	630	0.440
D-Fructose	20	635	0.474
L-Sorbose	20	635	0.464
L-Rhamnose	20	635	0.403
Maltose	20	635	0.313
Lactose	20	635	0.321
D-Glucuronic acid	20	630	0.353

血液中のグルコースの定量 ノーマル臨床用標準血清 (Hyland 製) を用いて血清中のグルコースの定量を行なった。この血清を硫酸亜鉛-水酸化バリウムで除蛋白して遠心分離する。本定量法ではすでに 20 倍希釈液となっている除蛋白液をさらに 5 倍希釈し定量法にしたがっ

て操作し、吸光度を測定した。20倍希釈の除蛋白液を Somogyi-Nelson 法で定量し比較したところ Table II に示すような結果が得られた。

TABLE II. Comparison between the Present Method and Somogyi-Nelson's Method in the Recovery of D-Glucose in Normal Clinical Chemistry Control Serum

No.	Present method (glucose mg/100ml)	Somogyi-Nelson method (glucose mg/100ml)	Deviation (%)
1	102.5	105.0	-2.4
2	107.0	106.8	+0.2
3	99.0	101.4	-2.4
4	113.5	114.0	-0.4
5	109.0	108.4	-0.6
6	108.0	106.6	+1.3

つぎにこの血清に既知濃度のグルコースを加え硫酸亜鉛-水酸化バリウムで除蛋白し、遠心分離した 20 倍希釈の除蛋白液をさらに 5 倍にうすめ定量法にしたがって操作し、回収率を求めた結果 Table III に示すように良好な回収率が得られた。

むすび

グルコースを用いて種々検討してきたが、その他の糖類も MBTH と同様に反応して定量できる。この反応呈色物はエーテル、クロロホルム、ベンゼン、酢酸エチルにはほとんど転溶せず、イソアミルアルコール、イソブチルアルコールにはある程度転溶するが、*n*-ブチルアルコールが最もよかった。

TABLE III. Analysis of D-Glucose in Normal Clinical Chemistry Control Serum by the Present Method

No.	Initial glucose (mg/100ml)	Glucose added (mg/100ml)	Total Calcd.	Glucose (mg/100ml) Found	Recovery (%)
1	113.5	{ 50	163.5	160.0	97.9
		{ 100	213.5	212.5	99.5
2	109.0	{ 50	159.0	162.0	101.9
		{ 100	209.0	213.5	102.2
3	118.5	{ 50	168.5	168.5	99.7
		{ 100	218.5	222.5	101.8
4	107.5	{ 50	157.5	157.0	99.7
		{ 100	207.5	204.0	98.3