HANES 法による數種の糖の定量に就て

軒 原 榮 三 , 角 祐 一 郎 (財団法人農林科學研究所)

昭和 25 年 2 月 14 日 受 理

On the Determination of Reducing Sugars by HANES' Method.

By Eizō NOKIHARA and Yûichirô SUMI (Agricultural and Forestal Science Laboratory)

筆者等は Glucose, Galactose, Mannose 及び Xylose を定量する必要を生じ, その方法として簡易・正確な HANES⁽¹⁾ 法を用いる事にしたが, 従來の定量値はまちまちであるので, 先ず標準定量値を求める必要がある. 先ず各糖に對し沸騰湯浴中で加熱すべき時間を定め, 次で定量の標準曲線を求めたが, その結果は従來の文献記載の data とは些か異なる値が得られたので報告する.

従來 HANES 法乃至その改良法, 若くは HANES 法の原法である HAGEDORN-JENSEN 法を用いて各種の糖につき定量した文献は相當あるが, それらを纏めると第 1 表の如くなる. 此表から判るように試薬量其の他の條件によつて可成り値に差がある.

Table 1. Disagreement in Reducing Power of Each Sugar in $K_3Fe(CN)_6$ Oxidation in Literatures

Anhydrous Sugar		Moles of $K_3Fe(CN)_6$ reduced per Mole Sugar	Author	Method
Hexose	<i>d</i> -Glucose	5.36	NOKIHARA	H
		5.40	ARIYAMA (2)	H
		5.46	HANES (1)	H
		5.31	SOBOTKA (3)	H
		5.04	HULME (4)	H*
		5.00	HAGEDORN-JENSEN	H-J
		5.09	WEISE (5)	H-J
		4.8—5.6	WOOD (6)	P. T.
		5.9	BRITTON (7)	P. T.
		6.0	NITROSLAWSKA (8)	Unknown
	<i>d</i> -Galactose	4.35	NOKIHARA	H
		4.04	SOBOTKA (3)	H
		3.95	WEISE (5)	H-J
		3.60	GALE (9)	H-J
	<i>d</i> -Mannose	6.34	NOKIHARA	H
		5.24	SOBOTKA (3)	H
		5.09	WEISE (5)	H-J
	<i>d</i> -Fructose	5.62	SOBOTKA (3)	H
		5.03	HULME (4)	H*
		5.15	WEISE (5)	H-J
	Invert Sugar	5.07	HULME (4)	H*
		5.18	CALLOW (10)	H*
Pentose	<i>d</i> -Xylose	4.75	NOKIHARA	H
		4.56	SOBOTKA (3)	H
		3.95	WEISE (5)	H-J

Pentose	γ -Arabinose	4.18 3.72	SOBOTKA (3) WEISE (5)	H H-J
	<i>d</i> -Ribose	3.58	SOBOTKA (3)	H
	<i>l</i> -Rhamnose	5.02	SOBOTKA (3)	H
Disaccharide	Maltose	7.94	HANES (1)	H
		8.44	SOBOTKA (3)	H
		7.18	HULME (4)	H*
		7.35	WEISE (5)	H-J
	Lactose	7.92	SOBOTKA (3)	H
		6.77	WEISE (5)	H-J

Note 1. H: HANES' method

H-J: HAGEDORN-JENSEN's method

H*: Modified HANES' method

P.T.: Potentiometric titration

Note 2. Since the amounts of sugar and $K_3Fe(CN)_6$ reduced are not precisely proportional in the range of determinations, the above values are approximate.

W.B. WOOD⁽⁶⁾ は glucose について pH, 温度その他の条件を変えて赤血鹽による酸化の挙動を電圧滴定を用い研究したが, それによると, 先ず Sørensen の 0.1M glycol-NaOH 緩衝液を用い pH を変えた次の 6 種につき行つた.

Table 2 Effect of pH for Reducing Power of *d*-Glucose in $K_3Fe(CN)_6$ Oxidation (dy Wood)

	0.1M Glycol	0.1M NaOH	Final oxidant reduced (after 20 mins.) (Moles $K_3Fe(CN)_6$ reduced per Mole glucose)
I	0 parts	10 parts	ca. 4.8
II	1 "	9 "	" 4.95
III	2 "	8 "	" 5.05
IV	2.5 "	7.5 "	" 5.19
V	3. "	7 "	" 5.35
VI	3.5 "	6.5	" >5.5

その酸化の様子はアルカリ性が強くなる程最初の反応速度は速いが, 速に一定値に達し還元された最終赤血鹽量は少い. 之に對しアルカリ性が弱くなるに従い反応速度は遅くなり, 徐々に赤血鹽を消費してゆくが, その最終消費量はアルカリ性の強い場合より多くなる. 温度については第 2 表 II の条件で 100° と 95° について行つていますが, pH 変化の場合と同様な効果が認められ, 温度が低い時は反応速度は遅いが最終還元赤血鹽量は 100° の場合

より多くなり, 両温度では最終値に於て一致が見られないと云う.

HANES 法では一定組成の A 液 [$K_3Fe(CN)_6 + Na_2CO_3$] を用いて酸化するのであるから pH の条件は同一であるが, 温度については沸騰湯浴を用いるので, その沸騰状態により温度は 92°~99° に互に變化する事は吾々の経験している事であり, 若し WOOD の言う様な効果があるとすると, 定量には常に恒温槽を用いねばならぬ事となる. 以下の吾々の實驗結果から HANES 法では温度によつて此様な効果はなく, 低温度では酸化に時間を要するが最終酸化程度は同じである事を知つた.

實驗方法及び實驗結果

(1) 使用供試糖

d-Glucose: 市販の純品を P_2O_5 上數時間眞空乾燥, mp. 145° (補正), 精製の必要を認めなかつた.

d-Galactose: メルク製 (純) を少量の溫湯に溶かし浴温 50° で減壓濃縮してシラップとし, 之に多量のメタノールを加え氷室に放置, 10 日後生成した結晶を濾別しメタノールで洗滌後 P_2O_5 上 50° にて減壓乾燥, mp. 166° (補正)

d-Xylose: メルク製を少量の溫湯に溶かし活性炭で脱色, 減壓濃縮してシラップにする. 之に大量の無水酒

精を加え氷室に放置, 3 日後生じた白色沈澱を濾別し, 更に氷室に 15 日放置後生成せる結晶を濾別し無水酒精で洗滌後 P_2O_5 上減壓乾燥する (50°) mp. 144° (補正).

d-Mannose : メルク製を荒木氏の方法⁽¹¹⁾により hydrazone を経て benzaldehyde で mannose を再生し活性炭で 2 回脱色し減壓濃縮せる液を作り, 此濃度を BERTRAND 法で定量し mannose の供試液とした. 減壓濃縮を続けシラップとし methylmannoside を経て mannose の結晶とするのは HUSON-JACKSON の方法⁽¹²⁾

Fig. 1 Determination of heating period adopted for each sugars

により目下製造中である。

(2) 各糖に対する標準加熱時間の決定 : 恒温槽を用い温度は 98°, 92° の 2 種を選んだ (Glucose については 95° も施行) 其の他定量法は HANES の原報に従った. 標準加熱時間決定の爲の糖濃度は可及的高い方がよいので, 0.01 N $Na_2S_2O_3$ 約 9 cc に相當する糖濃度で行った. 結果は第 1 圖の如くである. これから判る如く温度が低い時は酸化速度は遅いが最終段階は 98°, 92° いずれも一定となり, WOOD の云うような効果は認められない. 従つて定量に際しては大體沸騰していれば Glucose, Xylose に対しては 20 分, Galactose, Mannose に対しては 25 分加熱すれば良い.

(3) 各糖に対する定量標準値 : 98° 恒温槽を用い (2) で定めた加熱時間で行った. 定量は各に對し 3~4 回

宛施行しその平均をとつた。結果は第 3 表及び第 2 圖の如くである。此の結果から Glucose, Galactose, Xylose は原點を通る直線と見做し得る。滴定の $0.01N Na_2S_2O_3$ の cc 数 (t) から糖量 mg(S) を求める計算式 $S = a \cdot t$ の a を最小自乗法により求めると

$$d\text{-Glucose } S = (0.3364 \pm 0.0006) t, \quad d\text{-Galactose } S = (0.4135 \pm 0.0004) t$$

$$d\text{-Xylose } S = (0.3160 \pm 0.0001) t$$

である。Mannose は厳密には直線ではなく中凸であるが直線と見做して計算すると

$$d\text{-Mannose } S = (0.2836 \pm 0.0015) t$$

である。

Table 3 Standardization Values for Each Sugars

d-Glucose		d-Galactose		d-Xylose		d-Mannose	
S	t	S	t	S	t	S	t
0.40	1.15	0.435	1.20	0.374	1.19	0.375	1.305
0.80	2.34	0.87	2.08	0.748	2.35	0.749	2.57
1.20	3.58	1.30	3.17	1.122	3.56	1.124	3.92
1.60	4.68	1.74	4.24	1.496	4.74	1.498	5.26
2.00	5.93	2.17	5.24	1.870	5.94	1.873	6.66
2.40	7.16	2.61	6.37	2.244	7.10	2.247	8.10
2.80	8.37	3.04	7.36	2.618	8.27	2.622	9.48
3.20	9.51	3.47	8.35	2.992	9.46		
		3.91	9.45				
		4.35	10.50				

S : mg of sugar in 5 cc solution

t : cc of $0.01 N Na_2S_2O_3$ for reduced $K_3Fe(CN)_6$

考 察 : W. B. WOOD が 100° , 95° と加熱温度を変えた時上述の如き効果を認めたのは(II)の条件即ち $0.1 M$ Glycocol 1 部, $0.1 M$ NaOH 9 部の緩衝液でアルカリ性が極めて強い場合である。且その Glucose 1 Mol の赤血鹽消費量は $4.95 Mol$ である。HANES 法では Na_2CO_3 でアルカリ性とする爲(II)の条件より弱い。若し WOOD が此程度のアルカリ性で同様の實驗を行へば、吾々と同じ結果を得ていたかも知れぬ。吾々は Glucose 1 Mol に對する赤血鹽量は $5.36 Mol$ と得たが、之は WOOD の實驗では(V)に相當する。HANES 法に於ける Na_2CO_3 のアルカリ性は此の(V)の程度ではなからうか。

次に Glucose, Xylose では從來の文献と大差ない結果を得たが、Galactose, Mannose については SOBOTKA⁽³⁾ 等のものに比し、同糖量に對する赤血鹽消費量が相當大である。SOBOTKA は加熱時間を此等の糖に對しても一樣に 15 分としたと思える(筆者推定)。Glucose, Xylose の場合は 15 分でも大體一定値に達するが、Galactose, Xylose では 15 分では極めて不充分である。赤血鹽消費量の少いのは此の加熱時間の不足が原因であると思う。又 15 分近邊では曲線が未だ上昇しつつある故、僅かの加熱時間の差違が滴定値に相當の差を起させる。事實 SOBOTKA の data を plot すると點の位置がかなり振れる事が判る。

HULME⁽⁴⁾ 等は HANES 法では糖量と $Na_2S_2O_3$ が直線的關係がないが、被檢糖液を 5cc の代りに 10cc とすれば(他の條件は凡て同じで)次の如き直線關係が得られるとし

$$S = b(T + a)$$

S : mg. of sugar in 10 cc solution

T : Observed $0.01 N$ -thiosulfate cc

例えば Glucose に對する a, b の値は夫々 0.05, 0.340 であるとした。併し吾々は 5 cc を用いても Glucose, Galactose, Xylose に對しては原點を通る直線關係 $S = a \cdot t$ を得た。a の値は既述の通りである。

要 旨 : 1) d-Glucose, d-Galactose, d-Xylose, d-Mannose の 4 種の還元糖につき HANES 法で定量する際の標準加熱時間, 標準定量曲線, 定量式を求めた。

2) 加熱に用いる沸騰湯浴の温度は 92° 以上であれば次の加熱時間で充分で一定値に對し W. B. WOOD の

Fig. 2. Standard Graph for Determination of Each Sugars

I : Anhydrous <i>d</i> -Glucose	IV : Anhydrous <i>d</i> -Mannose
II : " <i>d</i> -Galactose	V : <i>d</i> -Galactose (SOBOTKA)
III : " <i>d</i> -Xylose	VI : <i>d</i> -Mannose (")

言う如き温度変化の影響は認められなかつた。

Glucose, Xylose....20 分, Galactose, Mannose....25 分

3) 定量の標準は第3表及び第2圖の通りであるが, 次の計算式を用いても糖量を求めうる。

$$d\text{-Glucose} \quad S = (0.3364 \pm 0.0006)t, \quad d\text{-Xylose} \quad S = (0.3160 \pm 0.0001)t$$

$$d\text{-Galactose} \quad S = (0.4135 \pm 0.0004)t, \quad d\text{-Mannose} \quad S = (0.2836 \pm 0.0015)t$$

S : 溶液 5cc 中糖量 mg

t : 還元された赤血鹽に相當する 0.01N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ cc

此研究に當り種々御指導・御助言を戴いた, 東大農藝化學生物化學教室丸尾文治氏, 當研究所岡田元博士, 末弘女史, 三川禮氏始め其の他の所員に感謝の意を表す。

- (1) C. S. HANES : *Biochem. J.*, 23, 99 (1929)
- (2) 有山登 : 化學實驗學, 第 II 部 12, P.296
- (3) H. SOBOTKA and M. REINER : *Biochem. J.*, 24, 394 (1930)
- (4) A. C. HULME and R. NARAIN : *ibid.*, 25, 1051 (1931)
- (5) W. WEISE and Th. v. BRAND : *Biochem. Z.*, 264 357 (1933)
- (6) W. B. WOOD : *J. Biol. Chem.*, 110, 219 (1935)
- (7) H. T. S. BRITTON and L. PHILLIPS : *C. A.* 34, 2734 ; *Analyst*, 65, 149 (1940)
- (8) W. NITROSLAWSKA : *C. A.*, 23, 5206

- (9) E. F. GALE : *Biochem. J.*, 31, 234 (1930)
 (10) E. H. CALLOW : *ibid.*, 24, 57 (1930)
 (11) 荒木 : 化學實驗學, 第 II 部 11, P.154
 (12) C. S. HUDSON and E. L. JACKSON : *J. Amer. Chem. Soc.*, 56, 958 (1934)

Summary

In the determination of *d*-glucose (I), *d*-galactose (II), *d*-mannose (III) and *d*-xylose (IV) (all sugars are anhydrous) by the Hanes' method, reducing value of each sugar for ferricyanide reaches a constant value after the following heating period, if the temperature of boiling water-bath is above 92°: (I) and (IV)....20 min., (II) and (III)....25 min. Hence, this period of heating must be used as standard in the determination. W. B. WOOD's result, that lowering of temperature of boiling water-bath causes an increase in the final amount of oxidizing agent reduced, was not ascertained in our present investigation. The formula $s = a \cdot t$, where s and t are mg of sugar in 5 cc solution and cc of 0.01 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, respectively, was established for each sugar; values of a for (I), (II), (III) and (IV) are 0.3364 ± 0.0006 , 0.4135 ± 0.0004 , 0.2836 ± 0.0015 and 0.3160 ± 0.0001 , respectively.

[ERRATA]

J. Agr. Chem. Soc. Vol. 23

Page	Line	For	Read
56	2	protains	proteins
"	4	content are	contents are
"	18	tcientific	Scientific
60	Sum. 7	qualities	quantities
"	" 8	Starch	Starches
"	" 12	stump	strain
"	" "	micrologically	microbiologically
65	Sum. -1	3.25%	8.25%
68	-4	Renort	Report
80	-5	by malt saccharified	malt-saccharified
85	Sum. 2	<i>koi</i> j	<i>ko</i> ji
"	" 4	are	were
89	Sum. -3	shaked	shaken
"	" "	atomosphere	atmosphere
91	" 5	Few	A few
"	" 9	acts	acted
95	" -1	is indirubin	was indirubin
"	" "	is indigo	was indigo
101	" 1~2	pointed out that	pointed out
"	" 2	orwinding	or winding
107	7	Shoihi	Shoichi
110	Sum. 4	and next putrescible, corn	and the transparent starch and <i>ukiko</i> are putrescible in the next degree

N. B. Line number with the sign—should be calculated from beneath. Sum. is for the part of Summary.

Analysis of Quercetin and Its 3-Glycosides by Paper Partition Chromatography

Sir :

Owing to the resemblance of the chemical structure, solubility, and spectrum, it is difficult to separate and determine quercetrin, isoquercitrin (quercetin-3-glucoside prepared from leaves of mulberry), quercitrin (quercetin-3-rhamnoside), and rutin (quercetin-3-rhamno-glucoside from buckwheat).

But we have obtained good results in the analysis of these flavonoid pigments by paper partition chromatography.

The method employed is as follows :

1) In the one-dimensional descending chromatography, strips of filter paper "Toyo No.4" (2×40 cm.) were used.

2) The best developing solvent was the water-rich layer of the three component system, consisting of 50 parts ethyl acetate, 2 parts glacial acetic acid, and 50 parts distilled water.

3) The saturated aqueous solution of basic lead acetate was used as the colouring reagent and the spots were observed under ordinary and ultraviolet lights.

The R_f values of these flavonoid pigments obtained in this experiment were as follows : quercetin 0.80, quercitrin 0.67, isoquercitrin 0.43, and rutin 0.10.

When yellow precipitates obtained by decomposition of these glycosides with dilute H₂SO₄ were chromatographed, the spot of quercetin, the aglycone of these glycosides, was detected.

The solution obtained by filtering off the yellow precipitates was neutralized and concentrated in vacuo, and the sugars in this concentrate were chromatographically analysed. We detected glucose from isoquercitrin, rhamnose from quercitrin and both of these sugars from rutin on chromatograms by PARTRIDGE's method [*Nature*, 164, 443, (1949)].

An alcoholic solution of rutin was incompletely decomposed by dilute H₂SO₄ and neutralized. By the chromatographic analysis of this solution, isoquercitrin was detected. From this fact, it was proved that the disaccharide combined at 3-position of rutin was rhamno-glucoside.

These flavonoid pigments extracted from 10 to 20 spots of chromatograms were identified with original flavonoids by spectral analysis.

It was an interesting fact that the R_f values of these glycosides were parallel to those of the corresponding sugars.

Flavonoids	R _f value	Sugars	R _f value
Rutin	0.10	Disaccharide Lactose Maltose	0.10 0.12
Isoquercitrin	0.43	Glucose	0.21
Quercitrin	0.67	Rhamnose	0.39

In other words, solubilities of these flavonoid pigments depend on the nature of sugars combined at 3-position.

Biochemical Laboratory,
Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka

Yasuyoshi OSHIMA
Toshio NAKABAYASHI

Received September 16, 1950