

糖試験などに用いる銅試薬の考察 (1)

— Fehling 液¹⁾を中心に —

理学科研究室 山 本 英 十

(1970年10月30日受理)

1. は じ め に

還元性を有する糖類などの定性的あるいは定量的な試験については、これまでに多くの報告がある。その方法、内容は多様であるがおよそ次のように大別し、分類することができよう。本文は銅塩を主薬として用い、還元糖を酸化してその検出、検量をするという化学的方法の一分野について考えてみる。ことにフェーリング液は専門分野は勿論、中学校理科、高校理科化学でもあつかっているので、銅試薬の一つの中心としてあらためて検討を加えることは意義あるものと考えらる。

(1) 化学的な方法

- (i) 金属塩を還元する (ii) オサゾン²⁾を生成する (iii) 呈色反応による
(iv) 色素の還元脱色による (v) 過ヨウ素酸による酸化 (vi) クロマトグラフィーの利用

(2) 物理的な方法

- (i) 偏光度の測定 (ii) 屈折率の測定 (iii) 光電比色計の利用 (iv) ろ紙電気泳動法

(3) 生化学的な方法

- (i) 醱酵試験法 (ii) 酵素試験紙法

還元糖により還元される金属塩で従来用いられたものは、Cu, Bi, Ag, Fe, Pb, Ni, Sn, Hg などの塩類である。これらの試薬は糖以外の還元性物質によっても、それぞれ特異的な反応を呈する。また調合する成分は同じでも組成や実験方法のちがいによって定性的にも定量的にも応用されうる。銅塩を主薬とするいわゆる銅試薬を論ずるにあたり、ほかの金属塩試薬で重要なもの二、三をあげて比較してみる。

ビスマス塩——Nylander³⁾ 試薬は次硝酸ビスマス (塩基性硝酸ビスマス) とロシエル塩をうすい水酸化ナトリウム溶液にとかしたものである。還元糖試料に本試薬を加えて熱すると、糖量により褐色から黒色の沈殿を生ずる。広い分野で定性実験に用いられている。Dudley³⁾ (次硝酸ビスマス, 硝酸, 酢酸を用いる), Brücke⁴⁾ (次硝酸ビスマス, 塩酸, ヨウ化カリウムを用う), Böttiger⁵⁾ (次硝酸ビスマス, 炭酸ナトリウムを用う) などの試薬も古くから用いられたもので同じような反応をする。

銀塩 ——Tollens⁶⁾ 試薬は多くの実験書に書かれた衆知のものである。硝酸銀溶液にアンモニア水を滴下し、始めにできた褐色沈殿が再び溶けるまで加える。この透明液はアンモニア性硝酸銀液ともよばれる。還元糖を入れて熱すると灰褐色の沈殿を生ずる。還元剤の

種類や濃度によっては黒色の沈殿または試験管壁に銀鏡ができる。

鉄塩——Hagedorn⁷⁾—Jensen⁸⁾ 法およびそれを改良した Hanes⁸⁾ 法がある。

ある基準につくったアルカリ性赤血カ리를一定量とり、還元糖でその一部を還元して黄血カリにする。これを硫酸亜鉛で $K_2Zn_3[Fe(CN)_6]_2$ として沈殿させ、余分の赤血カ리를ヨウ素滴定法で調べて間接的に糖量を求める。

Park—Johnson⁹⁾ 達はアルカリ性赤血カ리를還元してできる黄血カ리를硫酸第二鉄に反応させ、生成するプロシヤンブリュウを比色法で測定し糖量を求めた。鉄塩試薬は実用的に広く利用されている。

そのほか Rubner¹⁰⁾ は塩基性酢酸鉛とアンモニア水を用い、Schmidt¹¹⁾ は酢酸鉛のアンモニア性溶液を用いている。また Duyk¹²⁾ は硫酸ニッケル、水酸化ナトリウム、酒石酸からなる試薬をのべている。Hg, Sn などの塩類を用いた試薬もあるが歴史的なものである。

以上の諸試薬のうちで Bi, Ag, Fe の塩類を用いるものは今日も広く利用されている。しかし試薬の種類からみると銅塩を用いたものが最も数多い。どの金属試薬にも、正確度、感度、保存性、操作の容易煩雑さ、経済性などの点でそれぞれ長短がある。定性的か定量的かということと、求める結果の要求度に応じ習熟した方法が実際には選ばれる。

2. 銅試薬一般について

銅塩を Oxidant として用い、還元性試料を酸化して定性的または定量的に検査確認をする。銅試薬は鉄試薬に比べると、その酸化還元電圧が低いため基本的に有効であるという長所がある。鉄試薬の場合は還元糖以外の物質も容易に酸化することがあるので、諸種の物質を混有している試料の場合は特に注意を要する。数多い銅試薬を次のように分類してみる。

2-1 アルカリ性銅試薬による定性試験

(1) Trommer¹³⁾ 液——うすい硫酸銅液に水酸化ナトリウム液を加えて生じる水酸化第二銅を利用する。ブドウ糖を入れてよくふると $Cu(OH)_2$ の青白色沈殿は溶解する。これを熱すると赤色の酸化第一銅 Cu_2O が沈殿する。

(2) Fehling 液——硫酸銅とロシエル塩（酒石酸カリウムナトリウム）および水酸化ナトリウムからできた溶液である。あとに詳記する。

(3) Müller 試薬¹⁴⁾——フェーリング液の水酸化ナトリウムのかわりに炭酸ナトリウムを用いたものである。結晶硫酸銅 35.0g, ロシエル塩 173g, 無水炭酸ナトリウム 68g を水にとかして全容を 1 l としたもので一液として調製する。保存性、感度もかなり良好である。

(4) Benedict 定性試薬¹⁵⁾——硫酸銅、クエン酸ナトリウム、炭酸ナトリウムからなる溶液である。次報に詳記する。

(5) Haines 試薬¹⁶⁾——結晶硫酸銅 3g, 水酸化カリウム 9g, グリセリン 100g を水 600 cc とかした溶液である。ブドウ糖を加えて熱すると赤色の Cu_2O を沈殿する。Criswell¹⁷⁾ 試薬もまたグリセリンを用いた同ような溶液である。

(6) Lehmann 試薬¹⁸⁾——アルコール性水酸化ナトリウムと硫酸銅液を混合してつくる。

2-2 アルカリ性銅試薬による定量試験

(1) 重量法——銅試薬が還元されてできる酸化第一銅 Cu_2O を秤量する。一定濃度の糖液であらかじめ銅試薬の力価を調べておけば本試験の際にできた Cu_2O の重量から試料溶液中の糖量は直ちに分る。古くから行なわれたが今日でも食品化学、製糖工業方面で用いられている。米国糖業界の標準法である Munson—Walker 法¹⁹⁾や Brown et al 法²⁰⁾では銅試薬として、それぞれ一定基準のフェーリング液を用いている。Allihn 法²¹⁾、Striegler 法²²⁾、Soldaini 法²³⁾などでは、それぞれ成分と組成が少し異った銅試薬を用いているが原理は同じである。また Nyns' selective method²⁴⁾は硫酸銅と炭酸カリウムおよび炭酸水素カリウムからなる Ost 溶液²⁵⁾を用いる。この試薬ではブドウ糖の還元力は果糖の12分の1である。本試薬はブドウ糖と果糖の混合物中の果糖の定量に利用される。

(2) 滴定法——実験操作が割合に煩雑な重量法に比べると、本法は容易且つ迅速で正確度も良く広く利用されている。

(2)—(a) 直接に滴定する方法として Fehling—Soxhlet 法²⁶⁾がある。まずブドウ糖標準液で新調製したフェーリング液の力価を調べておく。次に濃度未知の還元糖試料溶液について滴定を行い、消費されたフェーリング液の量から糖量を知る。滴定の終点は溶液の青色が消える点をとるが場合によっては終点近くで、反応液の一滴をとり黄血カリ溶液に加えて、赤色のフェロシアン化銅ができなくなる点できめるという方法もある。Lane—Eynon 法²⁷⁾では終点近くになったら、1%メチレンブルー液を数滴加え、その青色が消える点を終点とする。Benedict 定量試薬も同じような操作で実験し、白色沈殿を生じて溶液の青色が全く消えるところを終点とする。藤井、阿久津法は Benedict 定量試薬のクエン酸ナトリウムのかわりにロシエル塩を用いている。その試薬の銅イオン濃度は Benedict 定量試薬の半分程度である。尿中の Creatinin の影響が小さいので尿糖定量にはすぐれていると述べている。

(2)—(b) 食品化学、生化学、農芸化学方面で今日もよく用いられる Bertrand 法²⁸⁾ではアルカリ性銅試薬(A液は結晶硫酸銅 20g を水にとかして 500cc とし、B液はロシエル塩 100g と水酸化ナトリウム 75g を水にとかして 500cc とする。使用の時 A、B を等量混合する)に試料糖液を入れて加熱する。生じた酸化第一銅 Cu_2O で硫酸第二鉄を還元して第一鉄イオンに変え、これを濃度既知の過マンガン酸カリウムで滴定し間接的に糖量を知る。

Sichert and Bleyer 法³⁰⁾は試薬の組成が少しちがうが原理は同じである。

(2)—(c) ヨウ素滴定法として古くから用いられているものに Somogyi のヨウ素法³¹⁾がある。この場合の試薬は硫酸銅、ロシエル塩、炭酸ナトリウム、水酸化ナトリウム、硫酸ナトリウム、ヨウ化ナトリウム、ヨウ素酸カリウムのそれぞれ一定量をとかした水溶液である。還元糖により生成する第一銅イオンを KI と KIO_3 から生ずるヨウ素で酸化する。消費された残余のヨウ素を $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ で滴定し間接的に糖量を知る。Berlin Institute 法³²⁾は前述の Müller 溶液に酢酸とヨウ素溶液を入れ、試料を加えて処理し Somogyi 法と同様にヨウ素滴定で、糖量を調べる。Schoorl 法³³⁾ではフェーリング液³⁴⁾を試薬に用いている。ヨウ素滴定を利用したものとして、このほか Ofner 法³⁵⁾、Harding 法³⁶⁾、Luff—Schoorl 法などがある。

(3) 比色法——(a) 還元糖による試薬の還元生成物または、(b) 還元糖を適当な酸、アルカリ、酸化剤、酵素などで分解して生じた物質を有色化合物に誘導し、それらを比色

法で測定して糖量を求めるのである。適切な試薬および発色物質と光度計を用い、操法の熟練によって微量糖量の測定が可能である。銅試薬を用いる比色法の一つに **Somogyi** 比色法³⁷⁾がある。**Somogyi—Nelson** 法または **Nelson** 法ともよばれる。正確な定量法として各分野で広く利用されている。**Somogyi** 旧法³⁸⁾で用いた発色剤のリンモリブデン酸のかわりに新法では **Nelson** 試薬³⁹⁾(モリブデン酸アンモニウムとヒ酸二ナトリウムの希硫酸溶液)を用いる。一定基準につくったアルカリ性銅試薬に試料糖液を入れて加熱し、 Cu_2O ができたら急冷して **Nelson** 試薬を加える。生成するモリブデン青の呈色を比色計で測り、ブドウ糖標準液の場合と比較して試料中の糖量を求める。正確鋭敏で $0.005\sim 0.01\text{mg}$ の糖量も測定しうる微量法である。**D. B. Tonks**⁴⁰⁾ は **Folin—Wu** 法⁴¹⁾を改良したものである。発色試薬にはモリブデン酸とタングステン酸ナトリウムに水酸化ナトリウムを加え、煮沸後放冷しリン酸を加えた水溶液を用いる。**Hobbs** 達はフェーリング液と還元糖でできた酸化第一銅をろ過したのち、硝酸にとかしエチレンジアミンを加えて生ずる銅エチレンジアミン錯塩を比色することをのべている。また **Brown**⁴²⁾ は還元生成する第一銅イオン Cu^+ が **Neocuproin** と反応して、モリブデン青よりも色が30倍濃く且つ安定な錯イオンをつくることを知り、糖定量に利用している。

de Whalley⁴⁴⁾ 法は前記の諸法と異なる簡単な原理の比色法である。一定濃度の (a) 硫酸銅溶液と (b) アンモニア水をつくり、a 液と b 液を所定表に従って11組の割合に混合し少しずつ色調の異なる銅アンモニアイオンの青色溶液を順にならべる。試料糖液に 0.2% メチレンブリュウ溶液と水酸化ナトリウム溶液を入れて加熱すると、メチレンブリュウは還元されてロイコ塩となり脱色される。褪色した液の色調を標準色調列と比べあわせて試料中の糖量を知る。本法では $0.001\sim 0.015\%$ の濃度の測定に用いられる。濃厚な糖液の場合は盲試験でおよその値を知り、前記程度にうすめてから正確に実験する。

2—3 酸性銅試薬による定性試験法⁴⁵⁾

Barfoed 法がよく知られている。酢酸銅と酢酸の水溶液であるが、いろんな調製法が用いられている。ブドウ糖は常温でも反応するが、加熱するとなお速やかに反応して Cu_2O の赤色沈殿を生ずる。本試薬は単糖類には反応するが、**dextrin**, **maltose**, **lactose**, **sucrose** などの二糖類とは反応し難い。しかし長時間加熱すると酢酸で加水分解をおこすので反応は陽性に出るようになる。

試料に塩化物が多く含まれているときは、塩基性塩化銅の沈殿ができて試験を阻害するから、前以て塩素イオンを除去してから実験する。古い方法であるが **Campani** 法⁴⁶⁾は酢酸鉛の濃溶液と硫酸銅の希薄溶液を混合したものを用いる。還元糖と熱すると糖量が少いときは黄色溶液となり、時間が経つと黄色沈殿になる。糖量が 1% 以上の濃度をもつときは液は橙赤色になり、同色の沈殿ができる。

2—4 酸性銅試薬による定量試験

前記の **Barfoed** 法を改変した **Tauber and Kleiner** 法⁴⁷⁾がある。**Barfoed** 試薬の酢酸のかわりに乳酸を用いる。還元糖の試料溶液に本試薬を入れて数分間加熱し、酸化第一銅の赤色沈殿ができたら急冷する。発色試薬(リンモリブデン酸溶液を用う)を加え、生成するモリブデン青の色調を比色計で測定して糖量を求める。

3. フェーリング液の名称と組成について

Trommer 試薬の成分である水酸化第二銅はアルカリ溶液中で還元糖を酸化するが、溶解度が小さいのでしたがって反応速度も小さい。

またこの試薬のアルカリ度が強く、そのため $\text{Cu}(\text{OH})_2$ の青白色沈殿および分解生成する酸化第二銅 Cu_2O の黒色沈殿が、還元糖を加えて熱してからできる酸化第一銅 Cu_2O の赤色沈殿の色を暗く不鮮明にするという欠陥がある。1848年 Hermann von Fehling (1811~1885) はトロネル試薬に酒石酸塩を加えてその欠陥が改良できることを発表した。トロネル試薬の場合 Cu^{2+} は高アルカリ度のもとで溶解度の小さい $\text{Cu}(\text{OH})_2$ と CuO が生成し平衡状態にあるが、フェーリング液では Cu^{2+} は酒石酸イオンと反応して可溶性の錯塩 Sodium cupritartrate をつくっている。したがって溶液内には水酸化第二銅を生成するほどには、単独の Cu^{2+} は存在しないので、 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ や CuO の沈殿もなく、トロネル試薬の欠陥が除かれたのである。Fehling が最初に示した試薬は、結晶硫酸銅 34.65g、ロシエル塩(酒石酸カリウムナトリウム) 173g、水酸化カリウム 125g を水にとかして溶液 1 ℓ としたものである。The methods of the Assoc. of Official Agricultural Chemists として KOH 125g のかわりに NaOH 50g を用いたものが、今日ではフェーリング液として広く利用されている。一液にしたこの溶液はアルカリ度が高く、そのため保存性が悪いというので多くの改良が試みられた。1880年 F. Soxhlet²⁶⁾ は硫酸銅溶液だけを A 液とし、ロシエル塩と水酸化ナトリウムと一緒にとくしたものを B 液と二液に分け、使用直前に A B 両液を等量混合することの効果ののべた。Soxhlet の示した A 液は結晶硫酸銅 34.639g を水にとかして 500cc にしたもので、B 液はロシエル塩 173g と水酸化ナトリウム 50g を水にとかして 500cc としたものである。Soxhlet の二液法もふつうにはフェーリング液といわれるが、人によっては Soxhlet modification of Fehling's solution または単に Soxhlet's solution とよび、一液法だけをフェーリング液とよんで区別していることもある。

本文では二液法を通例にしたがって、フェーリング液とよぶことにする。

わが国ではフェーリング液、フェーリング溶液、フェーリング試薬、フェーリング試液などによばれている。手近の専門和書38冊のうち18冊はフェーリング溶液とし、12冊が液と書き、試薬、試液と書いたものは医学関係の8冊であった。ほぼ5割は溶液とよんでいる。文部省学術用語集化学編はフェーリング液となっているが、多年の慣習上から溶液という語が親しまれているようである。英米の専門書でも Fehling solution, Fehling's solution, Fehling reagent, Fehling's reagent と書かれているが、専門洋書42冊のうち34冊は、Fehling's solution と書き、残りが他の3種のよび名をとっている。

和書、洋書いずれにも1冊の書物の中で混用したものが若干ある。本文では学術用語集に従ってフェーリング液とよぶ。

組成——実験関係の専門書42冊(和書25冊、洋書17冊)を調べた結果、フェーリング液の調製には第1表に示すように23種のちがった書表わし方が見られる。フェーリング液の組成の多様なことは百余年に亘り、広い分野の非常に多数の人に主として定性的に利用されながら、感度、正確度などの点で少しずつ改良が試みられたためとも思われる。

1932年までに発表されたフェーリング変法は90以上だといわれる。⁴⁸⁾しかし一部の書籍には誤って記載したふしのものも見受けられる。

A 液調製において、たとえば結晶硫酸銅 34.64 g を水にとかして 500cc にするという第1表の1の表現と、水 500cc にとかすという第1表の2の表現がある。後者の場合結晶水の量を考えた計算値と実測値は等しく約 513cc であった。また B 液調製においてロシエル塩 173g と水酸化ナトリウム 50g を水にとかして 500cc とする第1表の1に対して水 500cc を加えてとかす第1表の2の場合は溶液の体積を実測すると約 600cc であった。したがって後者のように、水 500cc ずつ用いて A, B 両液をつくるときは、フェーリング液として前者の方法で 1000cc のところが、後者の方法では 1113cc となり、銅イオンおよびアルカリの濃度が約10%低くなっているわけである。そのため感度、正確度、安定度の点で幾分の低下はまぬがれない。フェーリング液を定量的に用いる場合は、とくに組成を一定にしておく方が必要である。前にのべた Munson—Walker 法, Brown, Morris and Millar 法, Allihn 法などでは一定の基準で調製したフェーリング液を常につかうことをのべている。

第1表の1からみて一応基準的な組成として、A 液は特級品を使うかまたは一級品を再結晶した結晶硫酸銅 34.64g を蒸留水にとかし、全容 500cc とする。この際に硫酸数滴を加えることをすすめる人もある。また B 液は特級または一級のロシエル塩 173g と水酸化ナトリウム 50g を、約 300cc の蒸留水に入れ温めてとかす。このあと冷えてから 500 cc 秤量フラスコにうつし、蒸留水を標線まで加える。

この基準フェーリング液をブドウ糖標準液で滴定すると、溶液 1 cc はブドウ糖 0.0050 g で正確に還元されることが分る。

第1表の1

A : 結晶硫酸銅の量 (g) ……水にとかして溶液 500cc とする。

B : 上段はロシエル塩の量 (g), 下段は水酸化ナトリウムの量 (g) ……水にとかして溶液 500cc とする。

引用書 番号 溶 液	3	42	16	4;6 10;12 31;33 40	15 26	29	9;17 18;32 36;38	13	19
A	34.6	34.6	34.6	34.639	34.639	34.639	34.64	34.64	34.64
B	173	173	173	173	173	173	173	173	173
	50	60	70	50	51.6	60	50	51.6	52
引用書 番号 溶 液	34 35	14 27 28	21	2	1 20	24	25 30	41	
A	34.64	34.64	34.64	34.645	34.65	34.657	34.66	34.65	
B	173	173	180	173	173	174.5	173	173	
	60	65	70	65	65	50	50	KOH 125	

第1表の 2

A : 結晶硫酸銅の量 (g) ……水 500cc にとかす。

B : 上段はロシエル塩の量 (g), 下段は水酸化ナトリウムの量 (g); ……水 500cc にとかす。

引用書 番号 溶 液	5 23 37	39	8	22	7	11
A	34.6	34.639	34.64	34.64	34.64	35
B	173	173	173	173	173	175
	70	50	51.6	60	65	70

註： 第1表の 1, 2 に引用した書籍名

- (1) 安藤鋭郎ほか；生化学研究法 (I), 1970, P. 411. (2) 石川清一ほか；有機化学実験法, 1953, P. 85. (3) 石坂音治ほか；衛生化学および試験法, 1969, P. 310. (4) 石橋雅義；定量分析実験法, 1969, P. 523. (5) 梅沢純夫；実験有機化学, 1965, P. 292. (6) 大塚好二；分析化学実験, 1968, P. 417. (7) 柿内三郎；実験生化学, 1937, P. 7. (8) 亀山猶一；化学分析試薬の調製法, 1958, P. 285. (9) 京大農学部食品工学教室；食品工学実験書, 1970, P. 389. (10) 京大農学部農芸化学教室；農芸化学実験書 (II), 1970, P. 680. (11) 杉山登；有機化合物の微量確認法, 1969, P. 156. (12) 精糖技術研究会；製糖便覧, 1956, P. 7. (13) 東大農学部農芸化学教室；実験農芸化学下巻, 1970, P. 408. (14) 東京農工大学食糧化学教室；食品化学実験法, 1970, P. 50. (15) 友田宜彦ほか；炭水化物実験法, 1955, P. 42. (16) 中崎昌雄；有機化学実験法, 1970, P. 133. (17) 日本化学会；実験化学講座, 23巻, 生物化学 (I), 1957, P. 369. (18) 日本薬学会；衛生試験法注解, 1966, P. 1091. (19) 平野四蔵；工業分析化学実験上巻, 1970, P. 250. (20) 藤井暢三；生化学実験法定性篇, 1970, P. 58. (21) 藤田穆ほか；系統的有機定性分析, 1970, P. 131. (22) 船久保英一；有機化合物確認法, 1967, P. 193. (23) 水野義久；有機定性分析法, 1956, P. 71. (24) 宮道悦男；最新植物成分研究法, 1967, P. 116. (25) 百瀬勉；有機定性分析, 1970, P. 225. (26) A. Classen; Qualitative Analyse, 1922, s. 327. (27) L. F. Fieser and M. Fieser; Reagents for organic synthesis, 1967, P. 390. (28) L. F. Fieser; Experiments in organic chemistry 1955, P. 112. (29) J. Grant; Hackh's chemical dictionary, 4th edition, 1969, P. 262. (30) C. D. Hodgman et al; Handbook of chemistry and physics, 44th, 1962, P. 1651. (31) P. Honig; Principles of sugar technology, vol. 1, 1964, P. 118. (32) M. A. Joslyn; Methods in Food Analysis, 1970, P. 483. (33) N. A. Lange; Handbook of Chemistry, 1967, P. 1011. (34) F. G. Mann and B. C. Saunders; Practical organic chemistry, 1954, P. 365. (35) H. Middleton; Systematic qualitative organic analysis, 1939, P. 267. (36) R. W. Plews; Analytical methods used in sugar refining, 1970, P. 483. (37) R. L. Shrine et al; Systematic identification of organic compounds, 1964, P. 118. (38) T. O. Soine and C. O. Wilson; Roger's Inorganic Pharmaceutical Chemistry, 1961, P. 333. (39) E. Tognoli; Reagents and reactions, 1918, P. 99. (40) H. O. Triebold and L. W. Aurand; Food composition and analysis, 1963, P. 224. (41) N. Welcher; Chemical solutions, 1966, P. 129. (42) R. L. Whistler; Methods in carbohydrate chemistry, Vol. V, 1965, P. 37.

4. フェーリング液の特性について

本試薬は溶液 1 ℓ 中に水酸化ナトリウム 50 g を含んでいるのでアルカリ度はかなり高く還元糖以外の物質で酸化されて Cu_2O の沈殿を生成するものも多い。したがって糖試験のとき単純な試料は差支えないが、酸化され易い物質を含んでいる場合は注意せねばならない。フェーリング試験で陽性反応を示す物質として、還元糖類、脂肪族アルデヒド、抱水クロラル、ギ酸およびギ酸塩、乳酸および乳酸塩、クロロホルム、ヨードホルム、尿酸および尿酸塩、カテコール、ハイドロキノン、ピロガロールなどのフェノール類、タンニン酸、没食子酸などの多価 O, p-オキシ酸、フェニールピルビン酸、クマリン酸、マルトール、クレアチニン、アスコルビン酸、ヒドロキシルアミン、ヒドラジンなどがある。またシュウ酸、エチレンクロルヒドリンも完全に陽性反応を呈することを実験確認した。

液の安定度——フェーリング液は使用の直前に A, B 両液を混合するように指示されている。混合液は久しく保存できないといわれるが、その程度について簡単な実験を試みた。基準的な調製をしたフェーリング液の混合液を 3 本の試験管 a, b, c にとる。

(1) a を窓側の陽のさすところにおいたら、2 日目に青色溶液の底に赤褐色沈殿が少しでき、また 5 日目にはその量が少し増えているのが分った。7 日後からその増量の変化は肉眼的には分らない。(2) b を室内の陽の当たらないところにおいた場合 5 日目にわずかに赤褐色沈殿ができ、その量は 7 日目になっても肉眼では増量が分らず、15 日目にやや増加が認められる程度であった。(3) c を室内の暗箱に入れておいた場合、その青紫色溶液は 15 日目になっても肉眼で、少しの沈殿も生ずるのが認められなかった。しかし、溶液の色は少しくすくなった。

それらの変化を少し定量的に調べるため、ブドウ糖標準液で測定した結果が第 2 表である。

混合液の青紫色を見るだけでは溶液の実質変化がはっきり分らないが、ブドウ糖試験により明白に変化する程度が分った。

フェーリング液 A, B の混合溶液は室内で 1 日また、暗箱に入れておけば数日はほとんど変化はないものとして使用できる。

第 2 表 基準的フェーリング液 10cc に対するブドウ糖標準液 (1 g/dℓ) の消費量 (cc)

おいた時間, 日	1 時間	2 時間	4 時間	6 時間	2 日	7 日	15 日	25 日
おいた場所								
(a) 南 窓 ぎ わ	4.90	4.80	4.65	4.50	4.45	3.90	2.82	2.40
(b) 室 の 奥	5.00	5.00	5.00	4.85	4.60	4.40	4.15	3.85
(c) 暗 箱	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	4.85	4.65	4.60

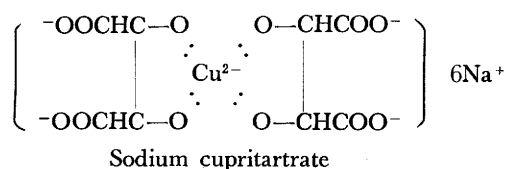
反応温度——フェーリング液とブドウ糖の反応は温度が低い時は黄色沈殿を生ずるが、さらに加熱すると赤色沈殿に変わる。黄色沈殿は粒子の小さいコロイド状態の酸化第一銅 Cu_2O で、加熱によって coagulate して粒子が大きくなり赤色を呈するものと考えられる。

黄色沈殿は水酸化第一銅 CuOH が生成したとのべる人もあるが、フェーリング液がブ

ドウ糖で還元される場合は CuOH は存在しないという。^(49), 50) 試料糖液中に保護コロイドがあるときは、沈殿の色は黄色乃至赤色と変化する。またブドウ糖の量が多い時は Cu_2O がさらに還元されて、遊離の銅が析出する。

ふつうフェーリング試験は、反応容器を沸騰している水浴の中で時々ふりながら数分間で終了するようにする。比較実験する場合は、3分または4分ときめて実施するが、直火を使用するときは約2分間しずかに煮沸しながら実験を行う。⁽⁵¹⁾ フェーリング液の **maximum reduction** は 75°C で起るといわれている。

酸化反応——フェーリング液は銅酒石酸ナトリウム錯塩と水酸化ナトリウムの混合水溶液で、緩やかな酸化剤である。この錯塩に **Noller**⁽⁵²⁾ は次の式を示している。

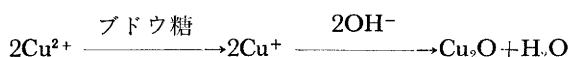


フェーリング液でアルデヒドが還元される場合を例にとると、複雑な反応であるが便宜上簡素化して次の式で表わす。



この式からみればアルデヒド 1 mole に対して、銅塩の 2 mole が当量関係になっている。前ののべたように、ふつう基準通りに調製したフェーリング液の 1 cc は、ブドウ糖の 0.0050 g (0.000028 mole に当る) で定量的に還元される。その 1 cc のうちに Cu^{2+} は 0.00013856 mole 含まれているから、還元される銅塩とブドウ糖の **mole ratio** は 5:1 となる。すなわちブドウ糖は mole 数で 5 倍量の銅塩を還元しうるのである。この数値は反応温度や試薬の組成のちがいなどによって幅があるが、およそ 5~6 倍である。

上記の反応式における Cu^{2+} は錯イオンの中心原子となっている銅が、還元糖との間の **redox** 反応の進行中に錯塩の分解でたえず供給されるものである。この第二銅イオン Cu^{2+} は直ちに還元されて第一銅イオン Cu^+ になるが、これは酒石酸イオンと錯イオンをつくらないので、アルカリ溶液中で Cu_2O となって沈殿する。



水酸化第二銅 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ の不溶性に比べると、銅酒石酸ナトリウムは可溶性であるので錯イオンからの Cu^{2+} の供給は、トロロンメル試薬の場合よりはるかに大きい。したがってフェーリング反応では青白色の水酸化第二銅や黒色酸化第二銅の生成が防止されるだけでなく、ブドウ糖酸化の反応速度もまた大きい。

反応の諸例——フェーリング液は脂肪族アルデヒドと容易に反応する。芳香族アルデヒドは反応しがないがそのうちベンズアルデヒドは不鮮明ながら非常におそく反応する。

また還元糖類と反応する場合、その種類によってフェーリング液の反応量および反応速度は異なる。基準的に調製したフェーリング液の 1 cc に対する数種の糖の相当量は次のようである。

mannose 0.00431g

glucose 0.0050g

galactose0.00511g

fructose0.00514g

lactose0.00678

maltose 0.00807

フェーリング液は尿酸と反応すると、白色の尿酸銅塩を沈殿するがその反応速度は、ブドウ糖の場合に比べるとおそい。尿酸銅の沈殿ができてからさらに加熱続けると、赤色の酸化第一銅の沈殿を生成する。試薬の水酸化ナトリウムのかわりに炭酸ナトリウムを用いた場合は、酸化第一銅の沈殿は生じない。尿糖試験にフェーリング液が用いられない理由の一つである。

なお試料に NH_4^+ が多量に含まれている場合は、フェーリング液のアルカリの作用で分解生成したアンモニアが酸化第一銅と反応し、無色の錯イオン $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_n]^+$ を生じて溶解するため、酸化第一銅の沈殿生成が妨害される。

したがってそのような試料をフェーリング試験する際は、あらかじめアルカリを加えて数分間熱し、アンモニアとして排除することが必要である。

またフェーリング液は次のような医薬品の確認試験に用いられる。⁽⁵³⁾ ルチン、ヒドロコルチゾン、酢酸ヒドロコルチゾン、酢酸コルチゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン、酢酸プレドニゾロン、酢酸デスオキシコルトン、スルホキシソナトリウム、G-ーストロファンチンなどがある。

植物色素のアントシアニジンはその種類によって冷時または熱時に、フェーリング液と陽性反応を示すことが知られている。⁽⁵⁴⁾

5. 中学校理科および高等学校理科化学の教科書におけるフェーリング液の取扱い

中学校理科ではブドウ糖をしらべる試薬としてのべている。高校理科の化学教科書ではホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、ブドウ糖、転化糖、麦芽糖などの還元性をしらべる試薬としてとりあげている。

中学、高校両方の教科書19冊を調査した結果、フェーリング液とよぶものが14冊、フェーリング溶液とよぶものが5冊で、約70%が学術用語集にしたがっていることになる。専門和書でフェーリング液とよぶものが約30%であることと比較すれば、なんとなく対照的な数字に目をひかれる。

本試薬の調製法については第3表に示す通り実に多様で、19冊の教科書に10種の異なる組成が記されている。定性的試薬であるという安易な考えから軽視され、やかましくとり上げる必要がないといえればそれまでである。しかし理科の教科書という立場でみれば、最も適当と思われる調製法を、なるべく一定して記載してほしいものである。

第3表の1

A：結晶硫酸銅の量(g)……水にとかして溶液 500cc とする。

B：上段はロシエル塩の量(g)，下段は水酸化ナトリウムの量(g)，……水にとかして溶液 500cc とする。

教科書 番号 溶 液	14	6 10 11 12	16	1 2	4 5 9	13	7 8 18
A	30	34.5	34.65	34.66	35	35	35
B	170	173	173	173	173	175	173
	50	50	50	50	50	50	65

第3表の2

A：結晶硫酸銅の量(g)……水 500cc にとかす。

B：上段はロシエル塩の量(g)，下段は水酸化ナトリウムの量(g)……水 500cc にとかす。

教科書 番号 溶 液	3	17 19	15
A	34.66	35	35
B	173	173	175
	50	50	50

註：第3表の1，2に引用した教科書名

- (1) 飯島俊一郎ほか；改訂化学，大原出版，昭和38年，P. 386. (2) 飯島俊一郎ほか；化学A，大原出版，昭和44年，P. 213. (3) 伊勢村寿三ほか；化学B，啓林館，昭和42年，P. 366. (4) 稲村耕雄ほか；新編化学，開隆堂，昭和42年，P. 裏見返し。(5) 稲村耕雄ほか；化学A，開隆堂，昭和44年，P. 裏見返し。(6) 岩崎岩次ほか；化学B，講談社，昭和44年，P. 244. (7) 江上不二夫ほか；新編化学，清水書院，昭和34年，P. 267. (8) 江上不二夫ほか；化学B，改訂版清水書院，昭和42年，P. 271. (9) 江上不二夫ほか；化学A，清水書院，昭和45年，P. 206. (10) 岡田 要ほか；中学校理科2年，大日本図書，昭和40年，P. 52. (11) 柴田雄次ほか；化学，大日本図書，昭和34年，P. 231. (12) 柴田雄次ほか；化学B，大日本図書，昭和43年，P. 295. (13) 白井俊明ほか；化学B，実教出版，昭和43年，P. 付 11. (14) 玉虫文一ほか；化学B，中教出版，昭和45年，P. 349. (15) 千谷利三ほか；化学B，三省堂，昭和43年，P. 337. (16) 都築洋次郎ほか；化学B，好学社，昭和40年，P. 348. (17) 内藤卯三郎ほか；中学新理科，啓林館，昭和44年，P. 269. (18) 長倉三郎ほか；化学B，東京書籍，昭和44年，P. 361. (19) 山村 等ほか；新編化学，第一学習社，昭和44年，P. 340.

お わ り に

とくにフェーリング液を中心とする銅試薬の改良進展のあとと，その特異的化学的性質に対して一応理論的考察を試みえたと考える。

フェーリング液の感度，正確度，安定度につき，若干の具体的実験結果をのべたが，さ

らに他試薬との間の比較については次報に取上げる。また相当数の内外の化学関係の参考書およびわが国の中学理科、高校化学の教科書を調査した結果は、フェーリング液の名称と組成の取扱いが予想以上に多種多様であることを知った。

文 献

- 1) H. V. Fehling; Arch. Physiol. Heil. **7**, 64 (1848). Ann., **72**, 106 (1849). *ibid.*, **106**, 75 (1858).
- 2) E. Nylander; Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. **8**, 175 (1883).
- 3) E. Tognoli; Reagents and reactions, 1918, P. 92, 4) P. 70, 5) P. 67, 10) P. 163, 11) P. 170, 12) P. 93, 17) P. 80, 18) P. 135.
- 6) B. C. G. Tollens; Ber., **15**, 1950 (1882).
- 7) H. C. Hagedorn and B. N. Jensen; Biochem. Z. **135**, 46; **137**, 92 (1923); **140**, 538 (1924).
- 8) 福井作蔵; 還元糖の定量法, 昭和44年, P. 15.
- 9) J. T. Park and M. J. Johnson; J. Biol. Chem. **181**, 149 (1949).
- 13) C. A. Trommer; Ann. Chem. Pharm. **39**, 360 (1841).
- 14) P. Honig; Principles of Sugar Technology, 1964, P. 106, 22) P. 110, 24) P. 122, 25) P. 122, 36) P. 109, 51) P. 105.
- 15) S. R. Benedict; J. Biol. Chem. **3**, 101 (1907), *ibid.*, **5**, 485 (1909), J. Am. Med. Ass. **57**, 1193 (1911).
- 16) 金井 泉, 金井正光; 臨床検査法提要, 昭和43年, P. II—21, E. Tognoli; Reagents and reactions, 1918, P. 112.
- 19) L. S. Munson and P. H. Walker; J. Am. Chem. Soc. **28**, 663 (1906), **34**, 202 (1912).
- 20) H. T. Brown, G. H. Morris and J. H. Millar, J. Chem. Soc. **71**, 94 (1897).
- 21) F. Allihn; J. prakt. Chem. [2] **22**, 55 (1880).
- 23) E. Soldaini; Z. Ver. deut. Zucker-Ind, **39**, 933 (1889), **40**, 792 (1890).
- 26) F. Soxhlet; J. prakt. Chem. **21**, 227 (1880).
- 27) J. H. Lanes and L. Eynon; J. Soc. Chem. Ind. **42**, 32T (1923).
- 28) N. Fujii and N. Akutsu; J. Biochem. **25**, 237 (1937).
- 29) G. Bertrand; Ann. Inst. Pasteur, **18**, 116, (1904).
- 30) K. Sichert and B. Bleyer, Z. anal. Chem. **107**, 328 (1936).
- 31) P. A. Shaffer and M. Somogyi; J. Biol. Chem. **100**, 195 (1933).
- 32) 精糖技術研究会; 製糖便覧, 昭和31年, P. 44; P. Honig; Principles of Sugar Technology, 1964, P. 106.
- 33) N. Schoorl; Chem. Weekblad **9** (1929).
- 34) Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists, 1950, P. 509.
- 35) V. J. Harding and C. E. Downs; J. Biol. Chem. **101**, 487 (1933).
- 37) M. Somogyi; J. Biol. Chem. **195**, 19 (1952).
- 38) M. Somogyi; *ibid.*, **125**, 399 (1938).
- 39) N. Nelson; J. Biol. Chem. **153**, 375 (1944).
- 40) D. B. Tonks; Am. J. Clin. Pathol. **22**, 1009 (1952).
- 41) O. Folin and H. Wu; J. Biol. Chem. **41**, 367 (1920).

- 42) M. E. Hobbs and M. Stackowiak; *Anal. chem.* **26**, 585 (1954).
- 43) M. E. Brown; *Diabetes*, **10**, 60 (1961).
- 44) H. C. S. de Whalley; *Inter. Sugar J.* **39**, 300 (1937).
- 45) C. Barfoed; *Z. anal. Chem.* **12**, 27 (1873).
- 46) A. Classen; *Qualitative Analyse*, 1922, S. 328.
- 47) H. Tauber and I. S. Kleiner; *J. Biol. Chem.* **99**, 249 (1932).
- 48) R. J. Henry; *Clinical Chemistry*, 1964, P. 642.
- 49) 千谷利三 ; 無機化学上巻, 昭和44年, P. 144.
- 50) F. Ephraim; *Inorganic chemistry*, English edition, 1934, P. 385.
- 52) C. R. Noller; *Chemistry of organic compounds*, 1965, P. 888.
- 53) 平岩通夫ほか ; 医薬品試験法, 昭和44年
- 54) L. H. Meyer; *Food chemistry*, 1960, P. 246.

Abstract

Studies on the copper reagents used for sugar test and so on (1)

—Focussing treatise on the Fehling's solution mainly—

Eiju Yamamoto

Numerous copper reagents used commonly and Fehling's solution especially were discussed historically and systematically upon the naming, composition of these solutions. So it was found the variety on the naming and composition of the Fehling's solution written on the textbooks in a middle and high school in our country and on the professional reference books of chemistry.

Some experiments was practised concerning a sensibility, accuracy and stability of the Fehling's solution.