

# 高濃度多糖存在下で測定可能な 高感度鉄試薬還元糖比色定量法

池浦真奈美・波川 啓士・高橋 裕司・勾坂 慶子・高澤 俊英

High sensitive colorimetric method for reducing sugar using ferric iron reagent not affected by the presence of high quantities of polysaccharide derivatives.

Manami IKEURA, Yoshitada NAMIKAWA, Yuji TAKAHASHI

Keiko SAGISAKA, and Toshihide TAKASAWA

(受理: 2003年4月30日)

## 要　旨

以前我々は、鉄 ( $\text{Fe}^{3+}$ ) 試薬フェリシアナيدイオンの還元を基にした還元糖比色定量法である Park and Johnson (Park, J. T. and Johnson, M. J. 1949. J. Biol. Chem. 181: 149-151) の試薬を改良し、約 2 倍高感度化した。しかし、この高感度鉄試薬還元糖定量法 (Ikuma, T., Takeuchi, K., Takahashi, Y., Sagisaka, K., and Takasawa, T. 2001. Res. Bull. Obihiro Univ. Nat. Sci. 22: 109-116) は、発色系に酵素活性測定用基質であるポリガラクトロン酸が高濃度存在する場合にはペルリン青沈殿を生じ易く、吸光度測定が不可能であった。そのため、沈殿を生じにくい発色試薬の改良を行った。高感度鉄試薬還元糖定量法・発色試薬 3 (0.15% (w/v) 鉄ミョウバン, 0.2% (w/v) SDS, 0.14% (v/v) 硫酸) の SDS 濃度を 0.3% (w/v) に増加し、鉄ミョウバン濃度を半分 (0.075% (w/v)) に減少させた。その結果、ポリガラクトロン酸約 200  $\mu\text{g}$  存在下においてさえも、4 時間以上ペルリン青沈殿を生じなかった。還元糖と酸化剤フェリシアナيدとの酸化還元反応は高い比例性を有するが、定量性は見られなかった。

キーワード: 還元糖定量法, 高感度定量法, 鉄試薬比色定量法

## 緒　論

還元糖の定量法としては銅試薬を用いる Somogyi 法 (滴定法) (Shaffer and Somogyi 1933), Somogyi-Nelson 法 (比色法) (Nelson 1944; Somogyi 1938; 1945; 1952; Hagedon and Jensen 1923) が開発した鉄試薬 (フェリシアナ化カリウム) を用いる滴定法 (Hanes 1929) 及び比色定量法 (Folin and Malmros 1929; Park and Johnson 1949) などがある。

我々は滴定法に比べ操作がより簡便な比色法のうち、試薬の調製が容易で安価な鉄試薬法を行っている。鉄試薬法はアルカリ条件下で還元糖の還元基がフェリシアナ化カリウム ( $\text{Fe}^{3+}$ ) をフェロシアナ化カリウム ( $\text{Fe}^{2+}$ ) に還元する反応を基本にしている。そして、この方法は生じ

たフェロシアナ化カリウムと  $\text{Fe}^{3+}$  を反応させ、生成したペルリン青錯体を比色 (690nm) 定量する方法である。

最近、我々 (Ikuma et al. 2001) は、Park-Johnson (1949) 法を改良し、より感度の高い安定な高感度定量法を開発した。この方法では還元糖量 (D-ガラクトロン酸 (以下 D-GA) 量) について 1-18  $\mu\text{g}$  まで定量可能である。しかし、発色系に酵素活性の測定に使用するポリガラクトロン酸が高物質量 (約 200  $\mu\text{g}$ ) 共存する場合即ち多糖が高濃度存在する場合にはペルリン青沈殿が生じやすく、還元糖量にして約 5  $\mu\text{g}$  で吸光度測定時にペルリン青沈殿が生じ還元糖の比色定量が不可能になった。

この報告では、発色系に於ける沈殿生成を回避し吸光度分析を可能にするために発色試薬を改良し検討を行った。

## 実験方法

### 試薬

無水炭酸ナトリウム（関東化学、特級）；シアノ化カリウム 特級，フェリシアン化カリウム 特級，硫酸鉄（Ⅲ）アンモニウム・12水和物 純度99.0%，硫酸鉄（Ⅲ）アンモニウム・12水和物 純度99.9% 特級，ラウリル硫酸ナトリウム（以下 SDS）生化学用，硫酸 精密分析用（和光純薬工業）；D-GA・1水和物，ポリガラクツロン酸（Sigma）。

### D-GA 標準溶液

#### 試薬の調製

約0.1mg/mL D-GA 溶液を調整し，使用まで 5 °C で保存した。

#### 試薬 1

メートルグラスに純水（約880mL）を入れ，無水炭酸ナトリウム5.31g を秤り，メートルグラスに加え完全に溶解後，シアノ化カリウム0.65g を溶解させた。その後純水で1L にメスアップした。これをポリボトルに入れ 5 °C で保存した。終濃度は0.531% (w/v) 無水炭酸ナトリウム，0.065% (w/v) シアノ化カリウムである。

#### 試薬 2

メートルグラスに純水（約1900mL）を入れ，フェリシアン化カリウム1.00g を加え完全に溶解後，純水で2L にメスアップした。これを褐色のポリボトルに入れ 5 °C で保存した。終濃度は0.05% (w/v) フェリシアン化カリウムである。

#### 試薬 3

メートルグラスに純水（約1900mL）を入れ，硫酸2.8 mL（メスピペット）を加え，硫酸鉄（Ⅲ）アンモニウム12水和物（以下鉄ミョウバン）3.0g を加えて，12時間以上攪拌し完全に溶解させた。次に SDS 4.0g を加え攪拌し，溶解後純水で2L にメスアップした。これを室温で遮光保存した。終濃度は0.15% (w/v) 鉄ミョウバン，0.2% (w/v) SDS，0.14% (v/v) 硫酸である。

#### 改良試薬 3

試薬 3 と同じ手順で以下の様に変更・調製し，室温で遮光保存した。

試薬 3 - 1 : 0.15% (w/v) 鉄ミョウバン（高純度99.9% (w/w)），0.2% (w/v) SDS，0.14% (v/v) 硫酸。

試薬 3 - 2 : 0.15% (w/v) 鉄ミョウバン（99.0% (w/w)），0.3% (w/v) SDS，0.14% (v/v) 硫酸。

試薬 3 - 3 : 0.15% (w/v) 鉄ミョウバン（高純度99.9% (w/w)），0.3% (w/v) SDS，0.14% (v/v) 硫酸。

試薬 3 - 4 : 0.15% (w/v) 鉄ミョウバン（高純度99.9% (w/w)），0.4% (w/v) SDS，0.14% (v/v) 硫酸。

試薬 3 - 5 : 0.1% (w/v) 鉄ミョウバン，0.3% (w/v)

SDS，0.14% (v/v) 硫酸。

試薬 3 - 6 : 0.075% (w/v) 鉄ミョウバン，0.3% (w/v)

SDS，0.14% (v/v) 硫酸。

試薬 3 - 7 : 0.050% (w/v) 鉄ミョウバン，0.3% (w/v)

SDS，0.14% (v/v) 硫酸。

#### 発色操作

試薬 1，2 及び D-GA 標準溶液の必要量をメートルグラスにとり，室温と平衡化している水浴中に30分以上浸し，室温（24-28°C）に平衡化した。なお D-GA 標準溶液については溶液温度が一定（30°C）になるように留意した。約0.1mg/mL D-GA 標準溶液を0-90μL (D-GA を0-9 μg 含むように) をそれぞれの試験管にとり試料体積500μL に純水でメスアップした。

次に試薬 1 を500μL 加え，攪拌し，試薬 2 を500μL 加え攪拌した。試験管を100°Cで15分間静置し，酸化還元反応を行わせ，その後-20°Cの冷凍庫で5分間静置し室温に戻した。

次に，試薬 3 又は改良試薬 3 を2.5mL 加え，攪拌し，30°Cで15分間静置した後，A<sub>690</sub>を測定した。この実験を3重に3回以上行い再現性を調べた。

## 結果及び考察

### 試薬 3 の改良

低温性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia nivalis* の產生するポリガラクツロナーゼ酵素活性が他の菌核病菌（好冷性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia borealis* 及び常温性菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum*）に比べて低かったため，鉄試薬高感度還元糖定量法（Ikuma et al. 2001）に供する酵素反応混液（1% (w/v) ポリガラクツロン酸基質溶液2.0mL+酵素液0.1mL）から発色系にピッティングする体積を10μL から 2 倍（20μL）にした（還元糖量 5-14 μg）。

その結果，試薬 3 添加後45分でベルリン青沈殿を生じ，吸光光度測定が不可能になった。この沈殿生成には酵素反応基質ポリガラクツロン酸が関与していると推定された。それ故，高濃度多糖存在下で長時間沈殿を生ず感度に違いがない改良試薬 3 の調製を試みた。試薬 3 の改良は発色系におけるベルリン青複合体の沈殿生成までの時間即ち発色の安定性及び発色における感度即ち標準曲線において傾きに相当する D-GA 1 μg 当たりの吸光度（表 1）を指標として行った。

最初に試薬 3 を用いて D-GA 量 0-15 μg（通常 0-9 μg）について標準曲線を作成し沈殿の生じ易さを調べた。D-GA 量 9-15 μg においても約 2 時間はベルリン青の沈殿を生じることはなく，D-GA 量を増加させることによる標準曲線作成への影響はなかった。以上の結果，標準曲線作成に於ける D-GA 相当量の還元末端が存在

する場合、単糖であるD-GAよりも多糖であるポリガラクツロン酸の方がはるかに沈殿生成を促進することが明らかになった。

D-GA量0-15 $\mu\text{g}$ におけるD-GA1 $\mu\text{g}$ 当たりの吸光度(Factor)は0.0893であり相関係数は0.9998となり、このD-GA範囲での直線性は非常に高いと考えられる。D-GA量を0-9 $\mu\text{g}$ (Factor:0.0883-0.0895)から0-15 $\mu\text{g}$ へ増加させたことによってD-GA1 $\mu\text{g}$ 当たりの吸光度は0.2-1.1%異なっていたがこれは実験のばらつきの範囲内であった。我々の以前の報告(Ikuma et al. 2001)と同様に、D-GA量を増加したことによるD-GA1 $\mu\text{g}$ 当たりの吸光度への影響はないと結論した。

以上の結果、ポリガラクツロン酸約200 $\mu\text{g}$ 共存下において還元糖D-GA量15 $\mu\text{g}$ まで、ベルリン青沈殿生成を長時間抑えることが可能になれば、酵素活性系において鉄試薬高感度定量法を利用できることがわかった。以後の標準曲線は全てD-GA0-15 $\mu\text{g}$ の範囲で作成した。

まず、試薬3に使用している鉄ミョウバン試薬(特級、純度99.0%(w/w)以上)に含まれる不純物が沈殿生成の原因かどうかを調べるために、高純度鉄ミョウバン(純度99.9%(w/w)以上)を使用した試薬3-1で酵素活性を測定し、ベルリン青沈殿が生成するかどうかを調べた。その結果、試薬3-1添加後35分で沈殿を生じ、試薬3添加後に較べて若干早くなり、この試薬での吸光度測定は不可能であった。従って、ベルリン青沈殿生成の原因は鉄ミョウバン試薬に含まれる不純物によるものでなかった。

次にベルリン青沈殿生成を長時間抑えるために、Ikuma et al. (2001)の改良に従ってSDS濃度を0.2%(w/v)から0.3%(w/v)に増加した試薬3-2を用いて酵素活性を測定した結果、試薬3-2を添加後1時間はベルリン青沈殿を生じず、操作上の点からは酵素活性の測定がぎりぎりではあるが可能になった。標準曲線作成を行った結果(表1参照)、D-GA1 $\mu\text{g}$ 当たりの吸光度の平均値は0.0902±0.000325(SE)(CV値0.721%)となり、0.2%(w/v)SDSでの値0.0890±0.000318(SE)(CV値0.619%)との差は1.35%で実験のばらつきの範囲内であった。従ってSDS濃度を0.3%(w/v)にしたことによるFactorへの影響はなかった。

更にSDS濃度を増加させることによってベルリン青沈殿生成までの時間を延長するために0.4%(w/v)SDS濃度の試薬3-4を調製し、酵素活性測定を行ったが、後述する試薬3-3と比較して、ベルリン青沈殿生成までの時間に改善は見られなかった。SDS濃度を増加させたことによって、発色の安定性は全く改善されなかつたので、SDS濃度は0.3%(w/v)で改良方法を模索した。

標準曲線作成実験において、鉄試薬高感度定量法試薬

3の鉄ミョウバン濃度を上昇させた場合、ベルリン青沈殿生成が促進される事実(Ikuma et al. 2001)を考慮して、試薬3中の鉄ミョウバンの濃度を逆に下げることについて検討した。鉄ミョウバン濃度の異なる以下の4種類の改良試薬3を調製した。

試薬3-3: 0.15%(w/v)鉄ミョウバン酸化剤試薬に対してmol換算10倍過剰。

試薬3-5: 0.1%(w/v)鉄ミョウバン酸化剤試薬に対してmol換算6.7倍過剰。

試薬3-6: 0.075%(w/v)鉄ミョウバン酸化剤試薬に対してmol換算5倍過剰。

試薬3-7: 0.05%(w/v)鉄ミョウバン酸化剤試薬に対してmol換算3.3倍過剰。

改良試薬3を用いて酵素活性測定条件(1%(w/v)ポリガラクツロン酸-0.1M酢酸ナトリウム/酢酸緩衝液(pH4.5)基質溶液20 $\mu\text{L}$ を還元糖サンプルとして発色)で発色し、吸光度を測定した後、沈殿生成までの時間を調べた。その結果、それぞれの改良試薬に於いて吸光度の間に差はなかったが、試薬3-3及び3-5では添加後約40分で沈殿が生成し、試薬3-6及び3-7ではベルリン青の沈殿が生成せず、少なくとも4時間は安定だった。しかしながら、これらの試薬は鉄ミョウバン濃度が通常の1/2及び1/3であるので、試薬を加えてから発色するまでの時間が試薬3-3及び3-5に比べて若干長かった。広い還元糖量範囲での発色への影響を調べるために試薬3-6及び3-7についてそれぞれ標準曲線作成実験を行った。結果はそれぞれ図1及び2に示す。

試薬3-6を用いた標準曲線(図1)においては、D-GA1 $\mu\text{g}$ 当たりの吸光度は0.0897であり、相関係数は0.9996と高い直線性を示した。改良前の値(試薬3, D-GA: 0-15 $\mu\text{g}$ )0.0890±0.000318(SE)(CV値0.619%)と比べ0.8%高かったが(表1参照)、これは実験のばらつきの範囲内と考えられる。これらの結果から、鉄ミョウバンの濃度を1/2にしても標準曲線の傾き(Factor)には影響しないことがわかった。

試薬3-7を用いて作成した標準曲線(図2)においては、D-GA1 $\mu\text{g}$ 当たりの吸光度は0.0917であり相関係数は0.9996となり、この試薬を用いた場合でも標準曲線の直線性は良好であった。この試薬についても標準曲線作成実験は3重に3回行った。その結果(表1参照)D-GA1 $\mu\text{g}$ 当たりの吸光度の平均値は0.0917±0.000289(SE)(CV値0.545%)であり、試薬3での値0.0890±0.000318(SE)(CV値0.619%)と比べるとその差は3.0%と若干大きかった。しかしこの違いは試薬3の違いによるものではなく、実験中の室温(24°C)が通常(26°C)より低かったので、これは標準物質D-GA量( $\mu\text{g}$ )の変化によるものと考えられる。このことは、室温20°Cの実験では

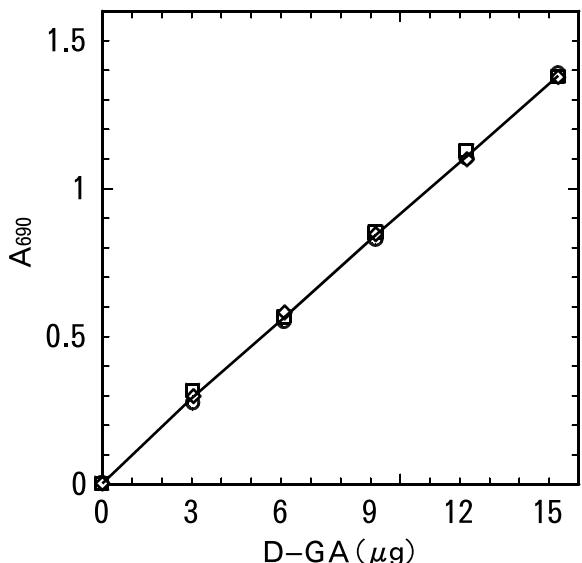


図1. 鉄試薬高感度還元糖量定量法による標準曲線。試薬3-6(0.075% (w/v) 鉄ミヨウバン, 0.3% (w/v) SDS, 0.14% (v/v) 硫酸) 使用。一次回帰式は  $y=0.0897x+0.138$  であり、相関係数は  $r=0.9996$  であった。

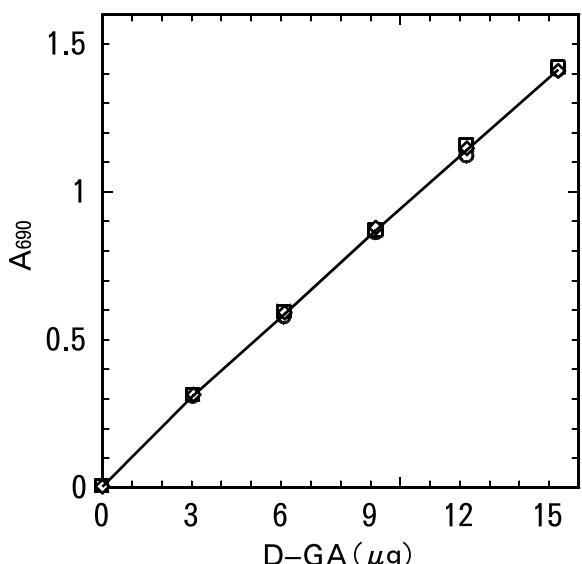


図2. 鉄試薬高感度還元糖量定量法による標準曲線。試薬3-7 (0.050% (w/v) 鉄ミョウバン, 0.3% (w/v) SDS, 0.14% (v/v) 硫酸) 使用。一次回帰式は  $y=0.0917x+0.0199$  であり、相関係数は  $r=0.9996$  であった。

Factor が更に高くなった(0.0920以上)事実からも裏付けられる。従ってこの試薬を用いた標準曲線の Factor も実験ばらつきの範囲内に収まっていると結論できる。

試薬 3-6 及び 3-7 を用いた場合、標準物質 D-GA 3-15 $\mu$ g での標準曲線作成には全く影響が見られなかつたが、D-GA 量が特に少ない (1 $\mu$ g) 場合には、ベルリン青複合体形成までに若干時間を要する傾向が観察された。従って、高濃度多糖存在下での還元糖定量用改良試薬 3 としてベルリン青複合体を生じやすく且つベルリン青沈殿を生成しにくい条件に合致する試薬 3-6 (0.075% (w/v) 鉄ミョウバン) を採用した。

表1. 鉄試葉高感度還元糖定量法のFactor. ただし Factor は D-GA 1 $\mu$ g当たりの吸光度 ( $A_{690}$ ) である.

		Factor	相関係数
試葉 3 標準法 D-GA: 0 - 9 $\mu\text{g}$	1 2 3 4 5 6 mean SSD CV SE	0.0885 0.0883 0.0890 0.0885 0.0884 0.0895 0.0887 0.000460 0.519% 0.000188	0.9995 0.9997 0.9995 0.9998 0.9997 0.9996
試葉 3 D-GA: 0 - 15 $\mu\text{g}$	1 2 3 mean SSD CV SE	0.0884 0.0893 0.0894 0.0890 0.000551 0.619% 0.000318	0.9998 0.9998 0.9991
試葉 3 - 1 D-GA: 0 - 15 $\mu\text{g}$	1 2 3 4 5 mean SSD CV SE	0.0899 0.0890 0.0882 0.0888 0.0894 0.0891 0.000639 0.717% 0.000286	0.9997 0.9997 0.9997 0.9996 0.9998
試葉 3 - 2 D-GA: 0 - 15 $\mu\text{g}$	1 2 3 mean SSD CV SE	0.0896 0.0902 0.0909 0.0902 0.000651 0.721% 0.000325	0.9998 0.9997 0.9995
試葉 3 - 3 D-GA: 0 - 15 $\mu\text{g}$	1 2 3 mean SSD CV SE	0.0887 0.0883 0.0879 0.0883 0.000400 0.453% 0.000231	0.9998 0.9996 0.9997
試葉 3 - 4 D-GA: 0 - 15 $\mu\text{g}$	1 2 3 mean SSD CV SE	0.0911 0.0915 0.0907 0.0911 0.000400 0.439% 0.000231	0.9993 0.9995 0.9994
試葉 3 - 6 D-GA: 0 - 15 $\mu\text{g}$	1 2 3 mean SSD CV SE	0.0894 0.0897 0.0899 0.0897 0.000252 0.281% 0.000145	0.9997 0.9996 0.9994
試葉 3 - 7 D-GA: 0 - 15 $\mu\text{g}$	1 2 3 mean SSD CV SE	0.0922 0.0917 0.0912 0.0917 0.000500 0.545% 0.000289	0.9996 0.9996 0.9993

発色法の定量性

最後に、還元糖の還元基であるアルデヒド基と酸化剤フェリシアナイドとの酸化還元反応が定量的に行われているかどうかを調べた。即ち D-GA と酸化剤フェリシアナイドとの酸化還元反応を 15 分 - 2 時間行い、D-GA 1 $\mu$ g 当たりのベルリン青発色率がどのように変化するかを調べた。D-GA と酸化剤の反応が定量的に進行している場合には反応時間に依存せず発色率は一定値になると推定された。しかしながら、図 3 に示す様に、発色率は時間の増加と共に増加し、一定値を与えたかった。

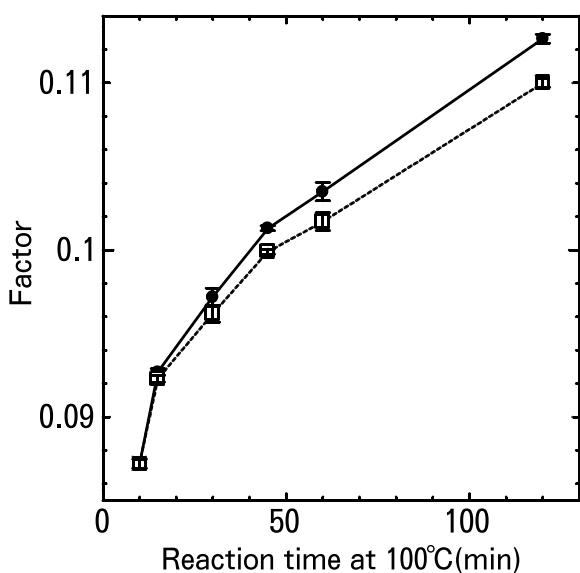


図3. D-GAと酸化剤フェリシアナイドとの酸化還元反応時間に対するベルリン青複合体生成量。

発色操作に於いて、D-GA既知量(1-9 μg: 0.5mL)に試薬1及び2(各0.5mL)を添加後、100°Cでの反応を15分-2時間行って、改良試薬3-6によるD-GA 1 μg当たりのベルリン青複合体発色率(Factor)を反応時間に対してプロットした。又、100°C加熱処理に於ける反応混液の蒸発量に対して補正した発色率も同時に示す。●、各反応時間に於けるFactor; □、各反応時間に於ける反応混液の蒸発量で換算したFactor。

一方、各反応時間に於ける標準曲線(D-GA: 1-9 μg)についての一次回帰式の相関係数(r:0.9995)は高く、比例性は非常に良好であった。

以上の結果、鉄試薬高感度還元糖定量法はD-GAに対して非常に高い比例性を有するが、D-GAと酸化剤の反応及びその後のベルリン青複合体生成については定量性はないと結論される。

## 参考文献

- Folin, O. and Malmros, H. 1929. An improved form of Folin's micro method for blood sugar determinations. *J. Biol. Chem.* **83**:115-120.
- Hagedorn, H. C. and Jensen, B. N. 1923. Zur Microbestimmung des Blutzuckers mittels Ferricyanid. *Biochem. Z.* **135**: 46-58.
- Hanes, C. S. 1929. XIV. An application of the method of Hagedorn and Jensen to the determination of larger quantities. *Biochem. J.* **23**:99-106.
- Ikuma, T., Takeuchi, K., Takahashi, Y., Sagisaka, K., and Takasawa, T. 2001. High sensitive colorimetric method of reducing sugar using ferric iron reagent. *Res. Bull. Obihiro Univ. Nat. Sci.* **22**:109-116. [In Japanese]

- Park, J.T. and Johnson, M.J. 1949. A submicrodetermination of glucose. *J. Biol. Chem.* **181**:147-157.
- Shaffer, P. A. and Somogyi, M. 1933. *J. Biol. Chem.* **100**:195.
- Somogyi, M. 1938. Micromethods for the estimation of diastase. *J. Biol. Chem.* **125**:399-414.
- Somogyi, M. 1945. A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.* **160**:61-68.
- Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**:19-23.

## summary

Park and Johnson method (Park, J. T. and Johnson, M. J. 1949. *J. Biol. Chem.* **181**: 149-151) is a colorimetric quantitative determination method for reducing sugars based upon a reduction of ferricyanide ions, Fe<sup>3+</sup>reagent. In the previous work, we had modified the reagent of the Park and Johnson method in order to estimate reducing sugars with approximately twice sensitivity. However, this high sensitive determination of reducing sugars with iron reagent (Ikuma, T., Takeuchi, K., Takahashi, Y., Sagisaka, K., and Takasawa, T. 2001. *Res. Bull. Obihiro Univ. Nat. Sci.* **22**: 109-116), when the polygalacturonic acid exists in high-dense for the coloration system, would produce the Berlin blue precipitation, and the absorbancy measurement was impossible. Polygalacturonic acid is a substrate for the enzymatic activity measurement. Therefore, we improve the color reagent which hardly produces the precipitation. SDS concentration of reagent 3 (0.15% (w/v) iron alum, 0.2% (w/v) SDS, 0.14% (v/v) sulfuric acid) for high sensitive determination was increased to 0.3% (w/v), and the iron alum concentration was decreased in half (0.075% (w/v)). As the result, the Berlin blue precipitation was not produced over 4 hours even under the presence of the polygalacturonic acid about 200 μg. Though there is a high linearity in oxidation-reduction reaction between reducing sugar and oxidizing agent ferricyanide, the quantitatitvity could not be observed.

**Key words :** reducing sugar determination;  
high sensitive determination;  
colorimetric determination.