

高感度フェノール - 硫酸法

竹内 宏治・井熊 武志・高橋 裕司・匂坂 慶子・高澤 俊英

(受理：2000年11月30日)

High sensitive phenol-sulfuric acid colorimetric method

Kouji TAKEUCHI, Takeshi IKUMA, Yuji TAKAHASHI,
Keiko SAGISAKA, and Toshihide TAKASAWA

要 旨

フェノール - 硫酸法 (80% (w/w) フェノール試薬使用) は、ペーパークロマトグラフィーによって分離された少量の糖類を定量するために Dubois 等 [Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F. 1956. *Anal. Chem.* **28**: 350-356] によって開発されたが、最近では5% (w/v) フェノール試薬を使用する改良法 [Hodge, J. E. and Hofreiter, B. T. 1962. *Methods in Carbohydrate Chemistry* **vol. 1**, pp.380-394] が広く用いられている。我々は、カラムクロマトグラフィーによって分離されたごく少量の糖類を定量するために Hodge and Hofreiter (1962) の方法を高感度定量法に改良した。Hodge and Hofreiter法と比較すると、我々の高感度定量法は、再現性はほぼ同程度であるが、約10倍感度が良くなり、マイクログラムレベルの糖を定量でき、非常に優れた方法である。更に、フェノール - 硫酸法において、濃硫酸の添加は注意深く行わなければならない、そして又時間を要する操作であるが、我々の改良法では、硫酸の使用体積を大幅に減少させたために、多数のサンプルを同時に処理でき、硫酸添加後の操作の危険性が減少し、実験操作性が大きく向上した。

キーワード：フェノール - 硫酸法、高感度フェノール - 硫酸法、全糖定量法

緒 言

溶液中の全糖量を定量する方法は、糖類に共通な呈色反応を利用して行われている。この方法には、酸の存在が不可欠であり、塩酸 (Ceriotte 1955)、硫酸 (Dreywood 1946; Dubois et al. 1956; Hodge and Hofreiter 1962; Blumenkrantz and Asboe-Hansen 1973)、酢酸 (Dische and Schwarz 1937) 等を用いる定量法が良く知られているが、硫酸処理を基本とした定量法が広く用いられている。

硫酸を用いる方法では、糖が硫酸の作用によってフルフラール誘導体に変化し、これが各種の試薬と反応して呈色する。

硫酸を用いる方法としては、アンスロン-硫酸法 (Dreywood 1946) は代表的なものの一つであるが、これは加熱処理が必要で、発色に用いるアンスロン試薬は調製が容易であるが、不安定であり、発色能が低下するため測定前にその都度調製しなければならず、実験操作に煩雑性が伴う。

しかしながら、Dubois等 (1956) によって考案されたフェノール-硫酸反応を基にして、Hodge and Hofreiter (1962) により改良されたフェノール-硫酸法では、ほとんどの単糖、オリゴ糖、多糖及びそれらのメチル化物が硫酸中でフェノールと反応して橙黄色 (吸収極大480-490 nm) を呈し、加水分解することなしに多糖の構成糖を測定可能である。この方法は操作が簡単で迅速であり、鋭敏な上、再現性が高いので、糖の有力な比色定量法として広く用いられている。更に、この定量法は加熱処理を必要とせず非常に扱い易い定量法である。又、タンパク質による影響も少ないので糖蛋白質中の糖含量の決定にも利用されている。しかし、Dubois等 (1956) の方法及びHodge and Hofreiter (1962) の改良法は、感度がサブマイクログラムレベルと低く、反応終体積も7 mLと多量であり、濃硫酸の添加後溶液の発熱により試験管が高温になり、攪拌しずらく、又、攪拌の際に濃硫酸が跳ねるなどして非常に危険であり、これらの理由から、実験結果にばらつきがでる可能性もある。

本研究では、全糖量を定量するためのフェノール-硫酸法を更に簡便で感度の高い定量法へ改良するために検討を行った。

試薬及び実験方法

試薬

標準物質として用いたD-ガラクトロン酸 (以下D-GA) はSigma社製のもの (1水和物) を使用した。D-GA標準溶液 (0.1 mg/mL) は、D-GA・1水和物5.46 mg (直示天秤使用) をメスフラスコ (50 mL) に正確に秤り取り、純水でメスアップし、調製した。これを試薬ビンに入れて5℃で保存した。

フェノールは和光純薬工業製のアミノ酸分析用のものを使用した。これは常温で固体であるので、電子レンジで加熱して液体に戻してから、その25.0 g (オートバランス使用) をメートルガラス (500 mL) に秤り取り、純水でメスアップし、5% (w/v) フェノール試薬を調製した。これを5℃で保存した。

濃硫酸は和光純薬工業製の精密分析用のものをそのまま使用した。

発色操作

Hodge and Hofreiter (1962) のフェノール-硫酸法においては、D-GA (0.1 mg/mL) 標準溶液と純水とを用いて1 mL中に10-90 μ gの範囲 (10、30、50、70、及び90 μ g) のD-GAが含まれるように、D-GA標準溶液を17.5×130 mmの試験管 (クロム酸混液洗浄) 中に取り、フィンピペットを用いて純水で1 mLにメスアップした。5% (w/v) フェノール試薬は、実験開始前に必要量をメートルガラスに取り、室温 (25~27℃) に静置し、試薬を室温に平衡化させた。これを含量既知のD-GA標準溶液が入った試験管中に1 mLをフィンピペットで加え、攪拌した。次に、濃硫酸5 mL (フィンピペット使用) を再現性良く、一定の高さから勢いよく加え、タッチミキサーで10秒間の攪拌を3回繰り返した。このとき試験管中の溶液が高い熱を出すので、タッチミキサーの試験管に触れる部分は厚さ約2mmのビニール板で保護しながら攪拌を行った。その後、30℃で (アルミドライバス) 30分間静置して、完全に発色させた。

高感度定量法においては、ペーパーダスト及びセルロースリントによる汚染に注意して、D-GA標準溶液と純水とを用いて0.1 mL中に1~9 μ gの範囲 (1、3、5、7、及び9 μ g) のD-GAになるように、D-GA

標準溶液 (0.1 mg/mL) を13×100 mmのディスプレイ試験管に取り、フィンピペットを用いて純水で0.1 mLにメスアップした。5% (w/v) フェノール試薬はHodge and Hofreiter (1962) のフェノール-硫酸法で用いたものと同じものを使用し、含量既知のD-GAが入っている試験管中に100 μ Lを加え、タッチミキサーで10秒間の攪拌を3回繰り返した。その後、硫酸500 μ Lを再現性良く、一定の高さから勢いよく添加し、10秒間の攪拌を3回繰り返した。このときの攪拌は、タッチミキサーのパット部分をビニール板で保護しながら行った。その後、30℃で30分間静置して、完全に発色させた。

吸光光度測定

30℃ (アルミドライバス) で30分間静置後、試験管をドライバスから取り出し、480 nmでの吸光光度を測定した。測定用セルは、光路長1cmのマイクロセル (ブラックフェイス) を使用した。その際、ブランク4本の試験管のうち、最初の1本はセル内を測定溶液で平衡化するために使用し、その吸光光度データは無条件で棄却した。

結果及び考察

Hodge and Hofreiter (1962) によって改良された方法に従い発色し、吸光光度を測定した結果を表1に示す。

表1. Hodge and Hofreiter のフェノール-硫酸法。

D-GA(μ g)	データ	平均値	C.V.値(%)
0	0.012	0.013	31
	0.010		
	0.018		
10	0.055	0.056	5.5
	0.059		
	0.053		
30	0.139	0.141	4.04
	0.136		
	0.147		
	0.227		
50	0.225	0.227	0.67
	0.228		
	0.307		
	0.307		
70	0.309	0.308	0.38
	0.383		
	0.384		
	0.391		

表1から明らかのように、ブランクにおける吸光光度のばらつきは、吸光光度が非常に低いため、C.V.値は31%になり、C.V.値が高く、再現性が低いのは回避できなかった。しかし、それ以外のD-GA含量に対する吸光光度のC.V.値は、10及び30 μ gの場合には、5~4%と若干悪かったが、50 μ g以上の範囲では約1%以下を与え、データの再現性は高かった。表1の結果から作成したD-GAの標準曲線を図1に示す。

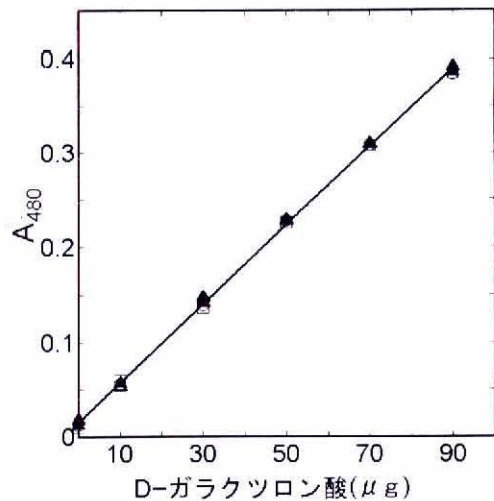


図1. Hodge and Hofreiterのフェノール硫酸法に従って作成した標準曲線。

標準曲線の一次回帰式は、 $y=0.00392x+0.015$ 。

相関係数は $R=0.9995$ 。標準曲線の作成は発色操作に従った。○,Data 1;△,Data 2;□,Data 3;▲,平均値。

標準曲線の一次回帰式は、 $y=0.00392x+0.015$ となり、感受性 (傾き) すなわちD-GA1 μ gあたりの480 nmにおける吸光光度は0.00392であった。相関係数は0.9995となり、相関係数から評価される標準曲線の信頼性は非常に良好であった。3回実験を繰り返した結果、D-GA 1 μ gあたりの480 nmでの吸光光度は、各々0.00393、0.00392、及び0.00379となった。これらのC.V.値は2.01%となり、高い再現性が確認された。しかしながら、Hodge and Hofreiter 法では、多量の硫酸 (5mL) を添加するために溶液の発熱によって試験管が非常に高温になり、攪拌する際の危険性の高さから必要以上の注意を払わねばならず、操作性の点で非常に問題があり、改良を要する

と思われた。

我々が改良した方法では、Hodge and Hofreiter (1962) のフェノール-硫酸法と比べて糖サンプル体積及び各試薬の使用量を1/10にスケールダウンすることによって、感受性が向上し、サンプル中の糖定量のための所要量 (μg) が約10倍圧縮出来、更に試薬の節約が可能になった。高感度定量法でのD-GA標準曲線作成のための実験結果は表2に示すとおりである。

表2. 高感度フェノール-硫酸法.

D-GA(μg)	データ	平均値	C.V.値(%)
0	0.018	0.016	20.5
	0.017		
	0.012		
1	0.053	0.054	1.9
	0.054		
	0.055		
3	0.140	0.142	2.04
	0.140		
	0.145		
5	0.234	0.234	0.246
	0.234		
	0.235		
7	0.322	0.325	0.814
	0.326		
	0.327		
9	0.420	0.426	1.21
	0.427		
	0.430		

表2に示したように、高感度定量法は、Hodge and Hofreiter法に比べ感度を約10倍に上げたにもかかわらず、データはHodge and Hofreiter法と同様に再現性が非常に高かった。ブランク吸光光度のばらつきはHodge and Hofreiter法よりかなり低かったが、C.V.値が20.5%と高く、再現性の悪さは我々の高感度改良法においてもやはり回避できなかった。1~9 μg のD-GA含量の範囲では再現性は極端には変化せず、C.V.値0.246~2.04%を与え、データのばらつきの程度は安定しており、データの再現性は非常に高かった。表2の結果から作成した高感度定量法によるD-GAの標準曲線を図2に示す。

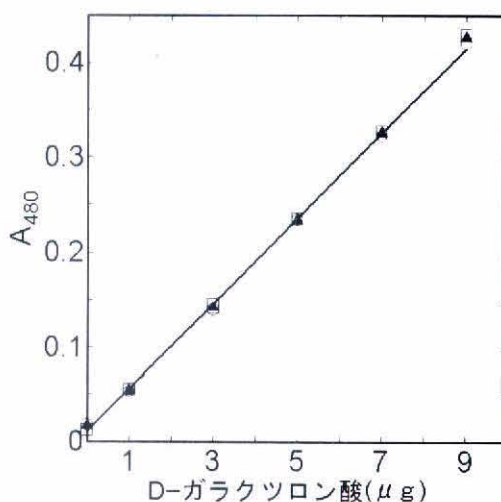


図2. 高感度フェノール硫酸法に従って作成した標準曲線.

標準曲線の一次回帰式は、 $y=0.0446x+0.012$.

相関係数は $R=0.9994$.標準曲線の作成は発色操作に従った。
○:Data 1;△:Data 2;□:Data 3;▲:平均値.

標準曲線の一次回帰式は $y=0.0446x+0.012$ となり、ブランク値はHodge and Hofreiter法とほぼ同じであったが、感受性(傾き)すなわちD-GA1 μg あたりの480 nmにおける吸光光度は0.0446であった。相関係数は0.9994であり、これもHodge and Hofreiter法と同程度であり、相関係数から評価される標準曲線の信頼性は非常に高かった。3回実験を繰り返した結果、D-GA1 μg あたりの吸光光度は各々0.0446、0.0435、及び0.0428となり、このときのC.V.値は平均値0.0436に対して2.12%を与え、高い再現性が得られた。

この我々の高感度改良法(図2)をHodge and Hofreiter法(図1)と比較すると、感受性が0.00393に対して0.0446となり、10倍以上の感度の向上が達成された。更にサンプル体積及び各試薬の使用量を1/10にスケールダウンし、特にHodge and Hofreiter法では5 mL使用する濃硫酸の使用体積を500 μL と1/10にしたことにより、感受性が飛躍的に向上し、更に実験時における操作の安全性が大幅に改善された。

参考文献

- Blumenkrantz, N. and Asboe-Hansen, G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* **54**:484-489.
- Cerriotti, G. 1955. Determination of nucleic acids in animal tissues. *J. Biol. Chem.* **214**:59-70.
- Dische, Z. and Schwarz, K. 1937. Mikromethode zur Bestimmung verschiedener Pentosen nebeneinander bei Gegenwart von Hexosen. *Mikrochim. Acta.* **2**:13-19.
- Dreywood, R. 1946. Qualitative test for carbohydrate material. *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.* **18**:499.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**:350-356.
- Hodge, J. E. and Hofreiter, B. T. 1962. Determination of reducing sugars and carbohydrates. In *Methods in carbohydrate chemistry*. Edited by R. L. Whistler and M. L. Wolfrom. Academic press, New York, **vol.1**, pp.380-394.

Summary

Phenol-sulfuric acid method using 80% (w/w) phenol reagent was developed by M. Dubois et al. [Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F. 1956. *Anal. Chem.* **28**: 350-356] in order to determine quantitatively a small amount of saccharides that were separated by a paper chromatography. Recently the improved method using 5% (w/v) phenol reagent [Hodge, J. E. and Hofreiter, B. T. 1962. *Methods in Carbohydrate Chemistry vol.1*, pp. 380-394] is widely used.

We improved the Hodge and Hofreiter method into a high sensitive method in order to determine quantitatively a very small amount of saccharides separated by a column chromatography. Though the reproducibility of our method is almost equivalent to that of the Hodge and Hofreiter method, our method has an excellent sensitivity about 10 times higher so that the very small amount of saccharides at the level of

microgram could be determined. In addition, in the phenol-sulfuric acid method, concentrated sulfuric acid should be carefully added, and the operation required time. On the other hand, our method can decrease the volume of sulfuric acid drastically, therefore a large number of samples will be dealt with simultaneously, and the danger associated with the sulfuric acid addition can be reduced with resulting great improvement in the experimental procedure.

Keywords:phenol-sulfuric acid method; high sensitive colorimetric method; total sugar determination.