

## Fe<sup>3+</sup>鉄試薬を用いた高感度還元糖定量法

井熊 武志・竹内 宏治・高橋 裕司・匂坂 慶子・高澤 俊英

(受理：2000年11月30日)

High sensitive colorimetric method of reducing sugar using ferric iron reagent

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

### 要 旨

鉄 (Fe<sup>3+</sup>) 試薬フェリシアナイドイオンの還元を基にした還元糖定量法はHagedorn and Jensen[Hagedorn, H. C. and Jensen, B. N. 1923. Biochem. Z. **135**:46-58]により最初に考案され、Folin and Malmros[Folin, O. and Malmros, H. 1929. J. Biol. Chem. **83**:115-120]によって比色定量法に改良され、更にこれはPark and Johnson[Park, J. T. and Johnson, M. J. 1949. J. Biol. Chem. **181**:149-151]によって高感度分析法に改良された。我々はPark and Johnson (1949) における試薬を改良し、更に約2倍高感度化し精度を高めた。測定可能範囲は0.5-20  $\mu$ g ガラクツロン酸である。

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 言

還元糖の定量は還元糖に存在する還元剤としての還元基と酸化剤との酸化還元反応を基本にして行うのが一般的である。還元糖によって生じた物質の定量には滴定法及び比色法が用いられている。

滴定法では滴定試薬である濃度の正確にわかっていない標準溶液が必要であるのに対して、比色法では試薬濃度の高い厳密性を要しない発色試薬を必要とするのみである。時間の経済性では明らかに比色法が勝り、呈色が安定であれば、感度及び精度の点か

らも比色法が良いと結論できる。

還元糖の還元基と反応する酸化剤としては、銅試薬(Somogyi 1952)、銅及びキレート試薬(McFeeters 1980)、鉄試薬(Folin and Malmros 1929; Horvath and Kuehr 1941; Park and Johnson 1949)、及びニトロ試薬(Borel et al. 1952; Borel and Deuel 1953)等が広く用いられてきた。

銅試薬を用いる場合には、還元糖によって生じたCu<sup>+</sup>は空気酸化及び溶存酸素による酸化を受けやすく、更に銅試薬中の硫酸ナトリウムの濃度が高いために保存中に結晶が析出しないように注意を払わな

ければならず、また再現性の点から銅試薬の調製の度に標準曲線を作成する必要がある等の煩雑さが伴う。

ニトロ試薬としては3, 5-ジニトロサリチル酸 (Borel et al. 1952) 及び3, 4-ジニトロ安息香酸 (Borel and Deuel 1953) が用いられているが、3, 5-ジニトロサリチル酸の場合には試薬そのものの測定波長における吸光光度が高く、従ってブランク値が高くなる欠点がある。3, 4-ジニトロ安息香酸 (Borel and Deuel 1953) を用いた方法では、発色操作が複雑で、抽出操作が必要なため煩雑で、更に呈色も不安定なために多数のサンプルを処理する場合には大きな欠点となる。

鉄試薬法はアルカリ性条件下でフェリシアナイド ( $Fe^{3+}$ ) が糖の還元基により還元されてフェロシアナイド ( $Fe^{2+}$ ) になる反応を基本反応としたもので、滴定法 (Hagedorn and Jensen 1923; Hanes 1929) では、測定可能範囲 (Hanes 1929) は0.2 - 3.8 mg グルコースで、感度は低いが、実験結果の再現性は非常に高い。しかしながら、反応後残存するフェリシアナイド ( $Fe^{3+}$ ) を定量する逆滴定法であるため実験操作が煩雑なのが欠点である。一方、比色定量法では、還元糖により生じたフェロシアナイドを直接測定するので原理的に優れている。又、測定可能範囲 (Park and Johnson 1949) は1 - 9  $\mu$  g グルコースで、従って感度は  $\mu$  g レベルで非常に良く、なおかつ試薬も安価である。

以上の点から、我々は還元糖の定量法として鉄試薬を用いる方法を採用し、更に糖質分解酵素の酵素活性を感度良くひいては高い精度で決定するために、又、カラムクロマトグラフィーからの多数の分画画分にも応用するために、Park and Johnson (1949) の鉄試薬法を改良し、更に高感度化するために検討を行った。

## 試薬及び実験方法

### 試薬

D-ガラクトロン酸 (以下D-GA) 1水和物 (Sigma)、無水炭酸ナトリウム (関東化学 特級)、フェリシアン化カリウム (和光純薬工業 特級)、硫酸鉄 (Ⅲ) アンモニウム12水和物 (以下鉄ミョウバン) (和光純薬工業 特級)、ドデシル硫酸ナトリウム

(以下SDS) (和光純薬工業 生化学用)、硫酸 (和光純薬工業 精密分析用)。

### 試薬の調製

**D-GA標準溶液** D-GA1水和物約5.5 mg (デシケータ保存、マイクロ天秤) を正確に秤取り、メスフラスコ (250又は50 mL) に入れ、溶解させ、イオン交換蒸留水 (以下純水) でメスアップした。D-GA標準溶液の濃度は約20又は100  $\mu$  g/mLである。

**0.05 M 炭酸ナトリウム - 0.01 M シアン化カリウム試薬 (以下試薬1)** 無水炭酸ナトリウム 5.3 g (オートバランス) を秤取り、純水 (約500 mL) を入れたメートルグラス (1 L) に入れ、攪拌溶解させた。次に、シアン化カリウム 0.65 g (オートバランス) を秤取り加え、引き続き溶解させた。溶解後、純水で1 Lにメスアップした。これを一部は室温保存し、ストックは5℃で保存した。

**0.0015 M フェリシアン化カリウム試薬 (以下試薬2)** メートルグラス (1 L) に純水 (約500 mL) を入れ、フェリシアン化カリウム 0.5 g を秤取り加え、攪拌溶解させた。溶解後、純水で1 Lにメスアップした。これを5℃で保存した。

**0.15% (w/v) 鉄ミョウバン - 0.1% (w/v) SDS - 0.03 N 硫酸試薬 (以下試薬3)** メートルグラス (2 L) に純水 (約1.6 L) を入れ、硫酸2.74 mL (メスピペット) を加え攪拌し、鉄ミョウバン3.0 gを加え、約21時間攪拌し、溶解させた。更にSDS 2 gを加え攪拌した。溶解後、純水で2 Lにメスアップした。この試薬は室温で保存した。

**0.15% (w/v) 鉄ミョウバン - 0.2% (w/v) SDS - 0.03 N 硫酸試薬 (以下改良試薬3)** この試薬は、SDS 4 gを加える以外は試薬3と同様に調製した。但し、この試薬は同時に4 L調製した。

**D-GA含量既知溶液の調製 (Park and Johnson (1949) に従った場合)** D-GA標準溶液と純水とを用いて1 mL中に約1 - 9  $\mu$  g の範囲のD-GAになるように17.5 x 130 mmの試験管中に、フィンピペットを用いてD-GA含量既知溶液を調製した。

**D-GA含量既知溶液の調製 (高感度改良法)** D-GA標準溶液と純水とを用いて0.5 mL中に約1 - 9  $\mu$  g の範囲のD-GAになるように13 x 100 mmの試験管中に調製した。

### 発色操作1 (Park and Johnson法)

試薬1は一部室温に静置している溶液を、試薬2は冷蔵庫内(5℃)に保管されているものを、試薬3は室温静置のものを用いた。各々の必要量をメートルグラスに取り、試薬2は室温(25-27℃)に約30分間暴露し、室温と平衡化した。D-GA既知量(1-9 $\mu$ g)1 mLが入っている試験管(17.5 x 130 mm)中に、試薬1、2の順に各々1 mL(フィンピペット)ずつ添加し、攪拌(タッチミキサー)後、100℃で15分間加熱(アルミキャップ及びアルミドライバス使用)して、酸化還元反応を行わせた。その後、-20℃フリーザー中に5分間暴露し、溶液を室温に戻した。次に、試薬3を5 mL(フィンピペット)に加え、攪拌(タッチミキサー)した後30℃(アルミドライバス)で15分間インキュベートして完全に発色させた。

### 発色操作2 (高感度改良法)

D-GA既知量(1-9 $\mu$ g)0.5 mLが入っている試験管(13 x 100 mm)中に、試薬1、2の順に各々500 $\mu$ Lずつ添加し、攪拌後、100℃で15分間加熱した。-20℃に5分間暴露後、改良試薬3を2.5 mL(フィンピペット)に加え、30℃で15分間インキュベートして発色させた。

### 吸光光度測定

30℃で15分間インキュベート後、光路長1 cmのマイクロセル(ブラックフェイス)を使用して690 nmにおける吸光光度を測定した。その際、ブランク4試験管のうち、最初の1本をセル内の測定溶液による平衡化に使用し、その吸光光度データは無条件で棄却した。測定後、得られたデータについて再現性(C.V.値)を調べ、標準曲線の傾きを最小自乗法によって求め、相関係数から一次回帰式の信頼性を考察した。

## 結果及び考察

### Park and Johnson (1949) に従った還元糖の定量

Park and Johnson (1949) に従い発色操作1を行ったときの結果を表1に示す。

表1. Park and Johnsonに従った発色操作.

D-GA( $\mu$ g)	データ	平均値	C.V.値(%)
0	0.014	0.015	7.87
	0.014		
	0.016		
1	0.044	0.044	1.30
	0.045		
	0.044		
	0.044		
3	0.140	0.145	2.88
	0.146		
	0.148		
	0.148		
5	0.256	0.263	2.37
	0.268		
	0.265		
	0.265		
7	0.346	0.350	2.14
	0.359		
	0.346		
	0.346		
9	0.422	0.419	0.63
	0.417		
	0.418		
	0.418		

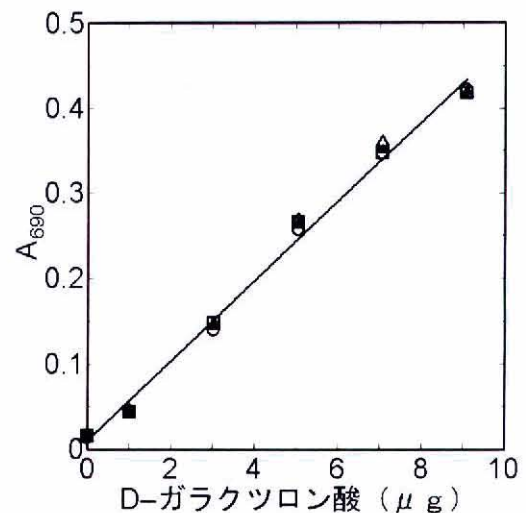


図1. Park and Johnsonに従って作成した標準曲線.

標準曲線の1次回帰式は $y = 0.0472x + 0.009$ となった。

1次回帰式の相関係数は $R = 0.9965$ となった。

○、Data1；△、Data2；□、Data3；▲、平均値。

表から明らかなように、ブランクにおける吸光光度のばらつきは、吸光光度値が非常に低いため、

C.V.値は7.87%になり、他に比べてC.V.値が高く、再現性は低かった。しかしD-GA含有サンプルに対する吸光光度のC.V.値は約3 $\mu$ gの場合には、2.88%と若干悪かったが、それ以外の場合では0.63 - 2.37%で、データの再現性は高かった。発色の安定性すなわち可溶性の維持は約9 $\mu$ gの多量のD-GAの存在下においても試薬3添加後ベルリン青沈殿が約4時間は生じず、1 - 7 $\mu$ gの範囲のD-GAでは可溶化されたままであったので、安定な発色操作であると考えられる。

表1の結果から作成した標準曲線を図1に示す。標準曲線の一次回帰式は、 $y=0.0472x+0.009$ となり、感受性(傾き)すなわちD-GA 1 $\mu$ gあたりの690 nmにおける吸光光度は0.0472であった。相関係数は0.9965となり、相関係数から評価される標準曲線の信頼性は概ね良好であった。3回実験を繰り返した結果、D-GA 1 $\mu$ gあたりの690 nmでの吸光光度は、各々0.0472、0.0470、及び0.0456となった。これらのC.V.値は1.87%となり、高い再現性が確認された。しかしながら、感度の点では約9 $\mu$ gのD-GAに対してさえも690 nmにおける吸光光度が約0.42程度と低く、より正確な結果を得るためには不十分で、この点については改良する必要があると結論した。

試薬3は室温で保存したが、安定な長期的保存は低温の方が好ましいと考えられる。そこで長期間低温で保存してみたところ、鉄ミョウバンと思われる結晶が析出したので、その試薬3を吸引ろ過(ADVANTEC 5B定量用ろ紙)後、Park and Johnson (1949)に従って発色操作1を行ってみた。結果は示さないが、データのばらつきは許容されるもので、標準曲線の一次回帰式の傾きすなわち感受性もほとんど変化しなかった(2.5%未満)。しかしながら、ベルリン青沈殿の可溶性は著しく低下し、30℃で15分間のインキュベーション中に沈殿を生じる場合もあり、操作性に大いに問題があり、試薬3の低温での長期保存は不適切であると判断した。

上記の結果より、ベルリン青沈殿生成を回避する目的で、低温で長期間保存した試薬3の吸引ろ過後の溶液にSDSを0.2% (w/v)迄追加添加した後の試薬を使い、Park and Johnson (1949)に従い発色操作1を行った。結果は示さないが、得られた標準曲線の一次回帰式における感受性は極僅か(2.5%程度)

ではあるが改良され、ベルリン青沈殿の生成は試薬3添加後約2.5時間は起きなかつたので、試薬3添加後吸光光度測定終了までの時間は約1時間であることを考えると操作上の問題点は解決できた。以上の点からSDS濃度を高めると、試薬3の低温保存による鉄ミョウバン濃度の減少によって起こるベルリン青沈殿の生成は抑制されると考えられる。

### Park and Johnson (1949) に従った改良試薬3を用いた還元糖の定量

低温長期保存試薬3へのSDS追加添加によりベルリン青沈殿生成の抑制効果が観察され、改良試薬3は試薬3に較べてSDS濃度が2倍なので、ベルリン青沈殿のSDSによる可溶化効果の促進によって発色の持続時間がどの程度改善されるかを更に詳しく調べるために改良試薬3を用いて行った。発色操作1を行った時の結果を表2に示す。

表2. 改良試薬3を用いてPark and Johnsonに従った発色操作.

D-GA( $\mu$ g)	データ	平均値	C.V.値(%)
0	0.012	0.016	48.81
	0.025		
	0.011		
1	0.058	0.068	17.63
	0.081		
	0.064		
3	0.149	0.156	4.20
	0.162		
	0.157		
5	0.244	0.249	1.75
	0.252		
	0.251		
7	0.350	0.346	0.93
	0.345		
	0.344		
9	0.426	0.430	0.94
	0.429		
	0.434		

ブランクデータ及びD-GA 1 $\mu$ gの場合のC.V.値は吸光光度値が低いので再現性は低かったが、それ以外は概ね良好であった。発色の安定性については、D-GA 9 $\mu$ g存在下においてさえも約7時間以上もベ

ルリン青沈殿が生じず、SDS濃度を上昇させた効果が顕著に観察された。又、操作性についても、SDS濃度を2倍に高めた事による吸光光度測定に対する影響はほとんどなく、そして攪拌における溶液の発泡性も大きく変化せず、操作性には何の問題もなかった。

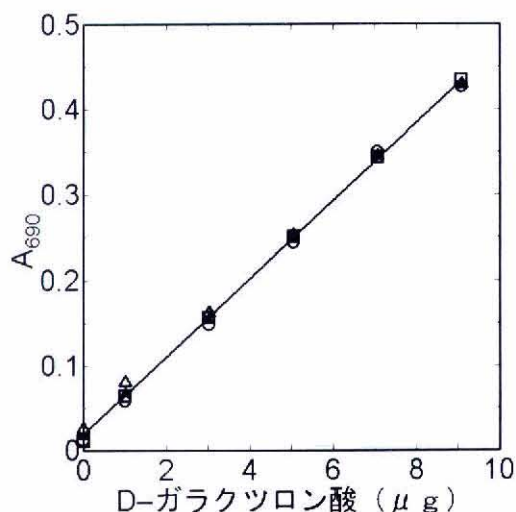


図2. 改良試薬3を用いPark and Johnsonに従って作成した標準曲線。

標準曲線の1次回帰式は  $y=0.0441x+0.013$  となった。

1次回帰式の相関係数は  $R=0.9982$  となった。

○、Data1；△、Data2；□、Data3；▲、平均値。

表2の結果から作成した標準曲線を図2に示す。標準曲線の1次回帰式は、 $y=0.0441x+0.013$  となり、感受性はPark and Johnson法に較べ減少したが、相関係数は0.9982であり、信頼性は良好であった。3回実験を繰り返した結果、感受性はD-GA  $1\mu\text{g}$  あたりについて各々0.0441、0.0438、及び0.0456となり、C.V.値は2.15%で、高い再現性が確認できた。

#### 試薬1、2、及び3を用いたPark and Johnson (1949) の1/2スケールでの発色操作1

次に我々はこの還元糖定量法を用いて酵素活性を精度良く求める目的で高感度化を試みた。まずPark and Johnson (1949) の反応系の終体積を8 mLから4 mLに減少させ、糖量 ( $1-9\mu\text{g}$ ) を変え

ずに行うことを考えた。これにより、反応系では2倍の糖濃度を得たことになり、感度が上昇するものと思われる。又、使用する試薬類を半分量に減らしたことでピペット操作はより行いやすくなり、試薬の使用量も半減し、経済的でもある。改良試薬3ではなく試薬3を用いて、発色操作2を行ったときの結果を表3に示す。

表3. Park and Johnsonの1/2スケールでの発色操作。

D-GA( $\mu\text{g}$ )	データ	平均値	C.V.値(%)
0	0.007	0.007	0.00
	0.007		
	0.007		
1	0.113	0.116	2.28
	0.118		
	0.117		
3	0.315	0.319	1.19
	0.322		
	0.321		
5	0.521	0.522	0.33
	0.524		
	0.521		
7	0.718	0.718	0.08
	0.719		
	0.718		
9	0.906	0.909	0.46
	0.908		
	0.914		

ブランク値は低下し、データのばらつきはC.V.値で0.08 - 2.28%となり、非常に高い再現性が得られた。しかしながら、発色の安定性については、Park and Johnson (1949) に従い実験を行った場合に較べて大きく減少し、約1時間でベルリン青の沈殿を生じた。これはSDSの量すなわち試薬3の量が半分量に減少しSDS濃度が十分でないために起こったものと考えられる。試薬3の添加後、吸光光度測定終了までの時間は約1時間必要とするため、操作性において大きな問題で、改良を要すると判断された。

表3の結果から作成した標準曲線を図3に示す。標準曲線の1次回帰式は、 $y=0.0992x+0.0014$  となり、感受性はPark and Johnson (1949) に従った場合の0.0472に対して (図1参照) 0.0992となり、約2.1倍

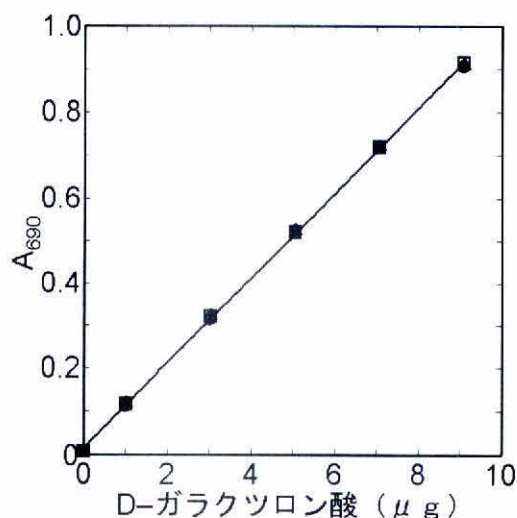


図3. Park and Johnsonの1/2スケールで作成した標準曲線。

標準曲線の1次回帰式は $y=0.0992x+0.0014$ となった。

1次回帰式の相関係数は $R=0.9998$ となった。

○、Data1；△、Data2；□、Data3；▲、平均値。

に上昇した。相関係数も0.9998となり、一次回帰式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-GA  $1\mu\text{g}$ あたりの吸光光度は各々0.0969、0.0984、及び0.0992で、C.V.値は1.19%となり高い再現性が得られた。しかしながら前述したように、吸光光度測定中又は後にベルリン青沈殿を生じるため、ベルリン青沈殿の可溶性時間を改善しなければならないと考えられる。

#### 改良試薬3を用いての高感度改良法による還元糖の定量

Park and Johnson (1949)に従った発色操作1を終体積4 mL系で(1/2スケールダウンして)標準曲線作成実験を行った場合、ベルリン青沈殿が短時間で析出する点以外は、高い再現性・感度・相関係数が得られた。既に述べたようにSDSにはベルリン青沈殿生成の抑制効果が認められたので、試薬3のSDS濃度を0.1% (w/v) から0.2% (w/v) に増加させた改良試薬3を用いて標準曲線を作成した。発色操作2(高感度改良法)に従って行ったときの結果を表4に示す。

表4. 高感度改良法による発色操作。

D-GA( $\mu\text{g}$ )	データ	平均値	C.V.値(%)
0	0.015	0.016	6.25
	0.016		
	0.017		
1	0.125	0.126	1.21
	0.126		
	0.128		
3	0.323	0.325	0.64
	0.327		
	0.326		
5	0.549	0.545	2.47
	0.530		
	0.556		
7	0.728	0.738	3.00
	0.722		
	0.763		
9	0.926	0.921	1.40
	0.906		
	0.930		

ブランクにおいてはC.V.値は6.25%となり若干再現性は低かったが、それ以外のD-GA含有サンプルにおいてはC.V.値0.64 - 3.00%で、データの再現性については全く問題はなかった。ベルリン青沈殿の生成については、改良試薬3添加後140分でD-GAの約7及び $9\mu\text{g}$ において沈殿が析出しはじめた。吸光光度測定終了までに改良試薬3添加後約1時間要することを考えると、実用上ベルリン青沈殿析出問題は克服された。

ベルリン青沈殿の抑制のためにSDS濃度ではなく鉄ミョウバン濃度を0.15% (w/v) から0.272% (w/v) すなわち無水硫酸鉄(Ⅲ)アンモニウム濃度を0.15% (w/v) に増加させた試薬3を調製し標準曲線作成実験を行ってみたが(結果は示さない)、この場合には試薬3添加後、30℃で15分間インキュベーター中にベルリン青沈殿を生じてしまい、鉄ミョウバン濃度には最適範囲が存在することが明らかになった。

表4の結果から作成した標準曲線を図4に示す。標準曲線の一次回帰式は、 $y=0.100x+0.024$ となり、感度すなわちD-GA  $1\mu\text{g}$ あたりの吸光光度は0.100となり、Park and Johnson (1949)に従った場合

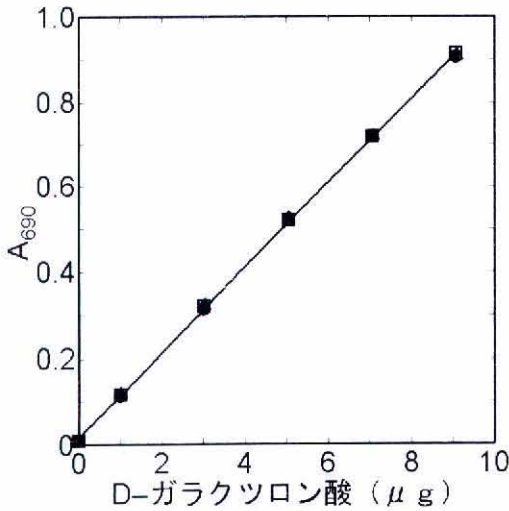


図4. 高感度改良法を用い作成した標準曲線.

標準曲線の1次回帰式は  $y=0.100x+0.024$  となった.

1次回帰式の相関係数は  $R=0.9991$  となった.

○、Data1；△、Data2；□、Data3；▲、平均値.

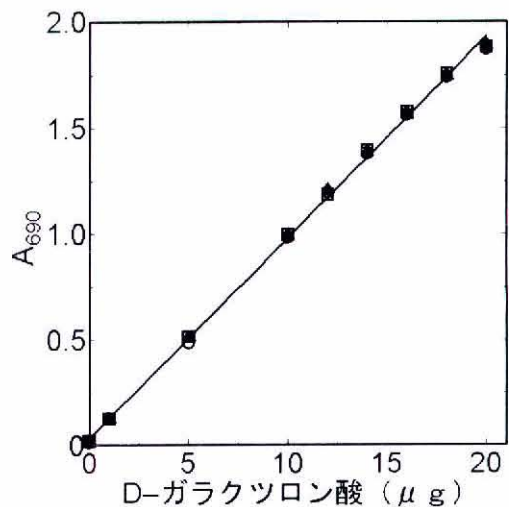
(0.0472:図1) の2.1倍となり、ベルリン青沈殿析出までの時間も大きく延長できた。相関係数は0.9991となり、1/2スケールダウンの場合(図3)と同様に高く、一次回帰式の信頼性は高い。3回実験を繰り返した結果、D-GA1  $\mu$ gあたりの吸光光度は各々0.100、0.0972、及び0.0981で、C.V.値は1.45%となり、高い再現性が得られた。

#### 高感度定量法での糖含有量上限値の決定

高感度定量法において、D-GAの最小検出量は約0.5  $\mu$ gであることは前述のように明らかであるが、還元糖定量による酵素活性の測定の場合には、還元糖上限値いくらまで酵素活性の比例性が確保されるかは非常に重要である。そこで糖含有量を増加させて、690 nmにおける吸光光度範囲2.0迄において、何処まで正確に定量可能かを調べた。D-GA 20  $\mu$ gまでで発色操作2に従ったときの結果を表5に示す。表から明らかなように、ブランクのC.V.値は高かったが1-20  $\mu$ gの範囲で安定したC.V.値が得られた。表5の結果から作成した標準曲線を図5に示す。20  $\mu$ g D-GA迄の範囲での標準曲線の1次回帰式は、

表5. 糖含有量の上限值決定のための発色操作.

D-GA( $\mu$ g)	データ	平均値	C.V.値(%)
0	0.009	0.012	43.30
	0.009		
	0.018		
1	0.124	0.123	1.25
	0.121		
	0.123		
5	0.485	0.504	3.23
	0.511		
	0.515		
10	0.985	0.992	0.63
	0.994		
	0.997		
12	1.198	1.197	0.88
	1.207		
	1.186		
14	1.382	1.388	0.41
	1.390		
	1.393		
16	1.564	1.569	0.50
	1.565		
	1.578		
18	1.744	1.748	0.38
	1.745		
	1.756		
20	1.870	1.879	0.44
	1.886		
	1.881		



### 図5. 高感度改良法による糖含有量の上限值決定.

20 $\mu$ gまでの糖量では標準曲線の1次回帰式は

$$y = 0.0951x + 0.031 \text{ となった.}$$

1次回帰式の相関係数はR=0.9993となった.

10 $\mu$ gまでの糖量では標準曲線の1次回帰式は

$$y = 0.0974x + 0.018 \text{ となった.}$$

1次回帰式の相関係数はR=0.9997となった.

○、Data1；△、Data2；□、Data3；▲、平均値.

$y = 0.0951x + 0.031$ で、相関係数は0.9993であった。一方、10 $\mu$ gまでの範囲での標準曲線の一次回帰式は、 $y = 0.0974x + 0.018$ で、相関係数は0.9997であった。いずれの場合の一次回帰式も信頼性は非常に高く、D-GA 1 $\mu$ gあたりの吸光光度は0.0951 (~20 $\mu$ g)と0.0974 (~10 $\mu$ g)で、その差は2.4%であり、実験のばらつきの範囲内に収まった。これらの結果から、通常の標準曲線(図4)の吸光光度の範囲を超えても690 nmの吸光光度で1.9程度まで、D-GA量にして20 $\mu$ g程度まで正確な定量が可能であることが明らかになった。又、21 $\mu$ g以上(<25 $\mu$ g)のD-GAを含む濃度既知サンプルの場合には、吸光光度実験値が標準曲線の一次回帰式上に乗らずに下方にずれた。これは酸化剤である $Fe^{3+}$ 試薬(フェリシアナイドイオン:試薬2)の濃度が不足し、その結果ベルリン青可溶性複合体の濃度が減少し、D-GA濃度に比例しなくなったためと考えられる。

### 参考文献

- Borel, E. and Deuel, H. 1953. Quantitative Zuckerbestimmung mit 3, 4-Dinitrobenzoesäure. *Helv. Chim. Acta*, **36**:801-807.
- Borel, E., Hostettler, F., and Deuel, H. 1952. Quantitative Zuckerbestimmung mit 3,5-Dinitrosalicylsäure und Phenol. *Helv. Chim. Acta*, **35**:115-120.
- 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 Mikrobestimmung des Blutzuckers mittels Ferricyanid. *Biochem. Z.* **135**:46-58.
- Hanes, C.S. 1929. X IV. An application of the method of Hagedorn and Jensen to the determination of larger quantities of reducing sugars. *Biochem. J.* **23**:99-106.
- Horvath, S. M. and Knehr, C. A. 1941. Adaptation of the Folin-Malmros micro blood sugar method to the photoelectric colorimeter. *J. Biol. Chem.* **140**:869-877.
- McFeters, R. F. 1980. A manual method for reducing sugar determinations with 2, 2'-bichinchoninate reagent. *Anal. Biochem.* **103**:302-306.
- Park, J. T. and Johnson, M. J. 1949. A submicrodetermination of glucose. *J. Biol. Chem.* **181**:149-151.
- Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**:19-23.

### Summary

A quantitative determination method of reducing sugars based upon a reduction of ferricyanide ions,  $Fe^{3+}$  reagent, had been devised by Hagedorn and Jensen[Hagedorn, H. C. and Jensen, B. N. 1923. *Biochem. Z.* **135**:46-58]. Then a colorimetric method using  $Fe^{3+}$  reagent was developed by Folin and Malmros[Folin, O. and Malmros, H. 1929. *J. Biol. Chem.* **83**:115-120], and this was further improved to a sensitive method by Park and Johnson[Park, J. T. and Johnson, M. J. 1949. *J. Biol. Chem.* **181**:149-151]. We modified the reagent used in the Park and Johnson method to be able to estimate reducing sugars with approximately twice sensitivity. The detectable range of our improved method is 0.5 to 20 $\mu$ g of galacturonic acid.

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