

## 糖の定量法

北村 進一\*・中屋 慎

研究室に学生が配属されたときに最初に課す課題が、糖の代表的な定量法である、フェノール-硫酸法とSomogyi-Nelson法の習得である。前者は全糖量を後者は還元糖を定量する方法である。ここではこれらの基礎原理やその技術の裏側にある苦労話を紹介するとともに、酵素法や、最新のHPLCによる定量法についての基礎知識も学ぶことができるようにした。

### フェノール-硫酸法

硫酸処理を基本とする糖の定量法でM. Duboisらにより考案され、現在でも広く使われている<sup>1-3)</sup>。用意する試薬は濃硫酸と5%フェノール水溶液である。ここでまず学生が困るのはフェノールが常温で固体であり、試薬ビンの中で“凍っている”のでどのようにして秤量すればよいか、ということである。フェノールの融点は41°Cなので湯浴中で融かし、温めておいたパスツールピペットでビーカーに秤量しながら取ったのち、5% (w/w) フェノール水溶液になるように水で希釈すればよい。

フェノール-硫酸法の操作は簡単である。まず1.0 mlの試料水溶液に5%のフェノール液を1.0 ml加え混ぜる。次に濃硫酸5.0 mlを速やかに直接滴下するように加え混合する。10分放置後、黄色から褐色に呈色するので、常温の水浴中で10分以上冷却した後、490 nmでの吸光度を測定する。グルコース溶液を標準試料に用いた場合、200 μg/mlまでは良好な直線を与える。測定法は簡単であるが、濃硫酸を用いるので、木綿製の実験着やジーンズに穴が開いたり、実験ノートがぼろぼろになったり、というようなことが多々起る。ちなみに、筆者の持っている「還元糖の定量法(福井作蔵著、東京大学出版会)」の本のカバーの一部に穴があいているが、これは間違いなく濃硫酸によるものである。また、手にかかった場合、すぐには痛くならないが、しばらくすると発熱してやけどを負う、という濃硫酸の作用を実体験した学生もいた。

### Somogyi-Nelson法

Somogyi-Nelson法は銅試薬による還元糖の定量法である。Nelsonの発色試薬を用いて、最終的には比色計(分光光度計)で吸光度を測定する。

前出の「還元糖の定量法(福井作蔵著、東京大学出版会)」の本によると、この方法は、比色法として考案された糖定量法の最初のもので、糖-銅試薬の反応で生じたCu<sub>2</sub>Oを硫酸酸性下で、リンモリブデン酸と反応させて、モリブデン青として比色する(Somogyi 1938)<sup>3,4)</sup>。

Nelson法はリンモリブデン酸の代わりにヒ素モリブデン酸塩を用いたアルカリ性銅試薬との反応を利用するので、Somogyiの滴定法と同様にアルカリ度と加熱時間との間に密接な関係がある<sup>5)</sup>。

#### 《基本反応》

- ①  $2\text{Cu}^{2+} + \text{還元糖} \rightarrow \text{Cu}_2\text{O}$
- ②  $\text{Cu}_2\text{O} + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow 2\text{Cu}^+$
- ③  $2\text{Cu}^+ + \text{MoO}_4^{2-} + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2\text{Cu}^{2+} + \text{モリブデン青}$

#### 《試薬》

#### Somogyi 試薬

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (anhyd)	24 g
Rochelle salt	12 g
(酒石酸カリウムナトリウム)	
10% CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O (※1)	40 ml
NaHCO <sub>3</sub>	16 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (anhyd) (※2)	18 g
Total	1 l

(※1) 原法では使用直前に混ぜるよう注意してあるが、出てくる沈殿をろ過してから使用する。

(※2) 原法では180 gであるが、1/10にする。25°Cに冷却したときに塩が析出するので、数日放置しCu<sub>2</sub>Oを除去。

#### Nelson 試薬

以下を、順に入れる

- ① Ammonium molybdate 50 g in 900 ml water  
(完全に溶かす)
- ② conc H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 42 ml
- ③ Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 6 g in 50 ml
| Total | 1 l |

着色瓶に35°Cで48~72時間放置後使用する(黄金色となる)

\* 著者紹介 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科(教授) E-mail:skita@bioinfo.osakafu-u.ac.jp

## バイオよもやま話

上記の試薬の組成は原法と異なっているが、これは筆者が考案したものでなく、筆者が学生時代に指導教官から直伝されたものである。これまでに不都合なことは起こっていないので、30年以上変更せずに使っている。

操作はまず試料溶液1.0 mlにSomogyi試薬を1.0 ml加え、よく混ぜた後、100°Cで20分間煮沸する。このとき、加熱による蒸発を防ぐために、ビー玉を試験管の上に置いておくのは、面白い工夫である。この時点でCu<sub>2</sub>Oの褐色の沈殿を確認することができる(基本反応①)。次に、Nelson試薬を加え30分放置後、25 mlにfill upする。特製の試験管があり、25 mlのところ目盛を入れてある。また、この実験ではヒ素廃液が出るので、この廃液の処理法なども同時に学生に教えている。

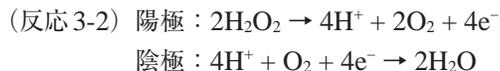
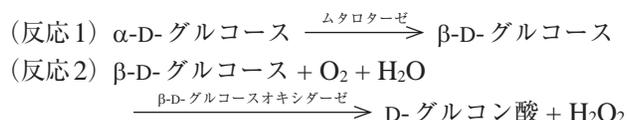
以上2種類の比色法ではいろいろな基本的な器具や試薬の扱い方、標準曲線の引き方などを学ぶことができるので、筆者の研究室では30年以上、教育・実用ともに重要な測定方法となっている。

また高感度な還元糖の定量法としてPark-Johnson法もよく用いられる<sup>6)</sup>。中村らはSomogyi-Nelson法に比べ感度を20倍程度高めたPark-Johnson変法を報告している<sup>7)</sup>。参考にさせていただければと思う。

### 酵素法

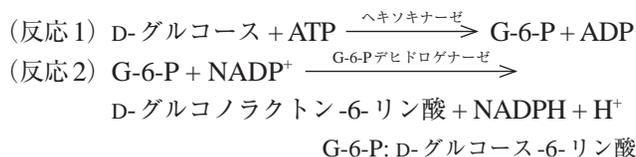
さて、比色法では糖の種類を特定することはできないし、夾雑物質の影響を大きく受けるので、最近では酵素の特異的な反応を利用した酵素法が血中のグルコースの定量にはよく用いられている。ここでは、グルコースを特異的に定量できるグルコースオキシダーゼ法とヘキソキナーゼ法を紹介する。

グルコースオキシダーゼ法は酵素としてβ-D-グルコースオキシダーゼを用いる。この酵素はβ-D-グルコースを基質としてD-グルコン酸とH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を生成する(反応2)。生成したH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>量をペルオキシダーゼと*o*-ジアニシジンなどの呈色試薬を用いた呈色法(反応3-1)<sup>8)</sup>により、あるいは過酸化水素電極による電流の検出(反応3-2)<sup>9)</sup>により測定する。反応2を含めて前者はGOPOD法、後者は酵素電極法と呼ばれる。さらに、水溶液中ではα型、開環型、β型の平衡状態にあるグルコースを効率良く反応させるために、ムタローターゼを加えるなど工夫されているものもある(反応1)。



ヘキソキナーゼ法ではヘキソキナーゼによりグルコースをグルコース-6-リン酸(G-6-P)へと変換する。

NADP<sup>+</sup>存在下でG-6-PはG-6-Pデヒドロゲナーゼによりグルコノラクトン-6-リン酸へと変換され、NADP<sup>+</sup>はH<sup>+</sup>を受け取りNADPHとなる。NADPHは340 nm付近に吸収極大を持つので反応液の吸光度を直接測定する。あるいはテトラゾリウムなどの呈色試薬と反応させ、その吸光度を測定してもよい<sup>10)</sup>。



さて、これら二法の測定原理を比較すると、グルコースオキシダーゼ法は溶液(血液)中の酸素濃度の影響を受けることから、ヘキソキナーゼ法に幾分か優位性があるように感じる。事実、血中グルコースの日本臨床化学会勧告法もヘキソキナーゼ法であり、多くの医療機関でも標準法として採用されている。酵素電極法を用いたグルコース測定器は、吸光度計といった特別な装置を必要としないため、医療従事者でない人にも使いやすく、手のひらサイズの血糖値測定器として広く普及している。

さて、酵素の特異性を利用して、現在ではグルコース以外にキシロース、ガラクトース、フラクトースなどの単糖やスクロース、マルトース、ラクトースなどの2糖類、さらにはマルトデキストリンやデンプンなども酵素電極法により定量できる。フローインジェクション分析法と組み合わせた装置も市販されており、微生物や動物細胞の培養液中の糖質のモニタリングなどに利用されている<sup>11)</sup>。

### HPLC法

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法も糖質の定量に広く用いられている。この方法ではカラムによる分離ののち、ディテクターで検出しクロマトグラムを作成する。このクロマトグラムの溶出位置により分子種を特定し、ピークの面積から濃度を計算するのである。糖質のHPLCでは示差屈折率(RI)検出器が広く使われている。この理由は糖質には紫外、可視領域に吸収バンド

がないこと、RIのレスポンスが濃度に対して比例することがあげられる。しかしながらRI検出器は感度が低く、溶出溶媒のグラジエントができないことなどの問題点がある。実際、RI検出器の安定的な性能維持に苦労した読者も多いと思う。そこで、HPAEC-PAD (high performance anion exchange chromatography - pulsed amperometric detection) 法、蒸発光散乱検出器、蛍光色素をラベルしたのちに蛍光検出器を用いる方法などが開発されてきた<sup>12)</sup>。ここでは、最近注目されている荷電化粒子検出法 (Charged Aerosol Detection, 略してCAD) を用いた糖質及びその類縁体のHPLC分析例を示し、CADの利点と注意点について述べる。

CADについてまずその測定原理を簡単に説明する<sup>13,14)</sup>。検出方法は噴霧・粒子化・荷電化・検出の4つの課程からなる。まず、噴霧課程では、カラムからの溶出液がネブライザーに入り、窒素ガスにより噴霧され液滴となる。液滴はドライイングチューブに入る。ここで、移動相溶媒は蒸発し除かれ、不揮発性成分は中性微粒子を形成する。この中性微粒子の大きさはカラムに注入した試料の重量に比例する。次に、荷電化過程では、中性微粒子はミキシングチャンバーに入る。ミキシングチャンバー内で、荷電化された窒素と中性微粒子が衝突し、電荷は中性微粒子に移行する。電荷量は、微粒子の表面積に応じて増加する。最後に、荷電化した微粒子はイオントラップを通過し、コレクターで電流量が測定され、その信号が増幅され検出器の出力となる。

この検出法の原理から、糖質とその類縁体は一般的に不揮発性であるので分析可能であることがわかる。またCADの特徴としての検出応答性は分子種の化学構造に依存しないこと、高感度で広範囲なダイナミックレンジをもつことなどが挙げられ、これまでの糖質のHPLC分析法の多くの問題点を解決できる。

実際の測定例を図1に示す。検出感度としては、RIのおおよそ100倍程度であると考えている。CADは数 ng on column から定量可能であり、おおよそ1 µg/ml からその1000倍量の範囲で分子種に寄らず定量可能である (図1.A)。HPAEC-PADもCADに匹敵する感度を持つが、分子種の電気化学的性質により検出応答性が異なるため、定量には分子種ごとの検量線が必要であり、高濃度の試料に対しては定量性が低下する (図1.B)。

次に、CADの特徴のひとつである広い濃度範囲での定量性を利用した例を示す。植物の葉は太陽の光を浴びて光合成を行う。光合成により生合成された同化デンプンは葉でスクロースとなり、根や種子へと転流される。この時、葉にはスクロース以外にグルコース (Glc) や

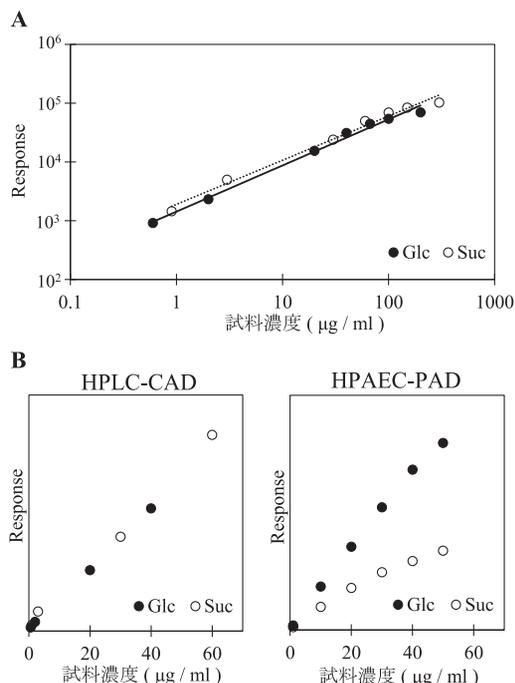


図1. A: グルコース (Glc) とスクロース (Suc) のCADによる標準曲線. インジェクションボリューム: 20 µl, カラムサイズ: 4.6 × 250 mm. B: HPLC-CADとHPAEC-PADの検出応答性の比較.

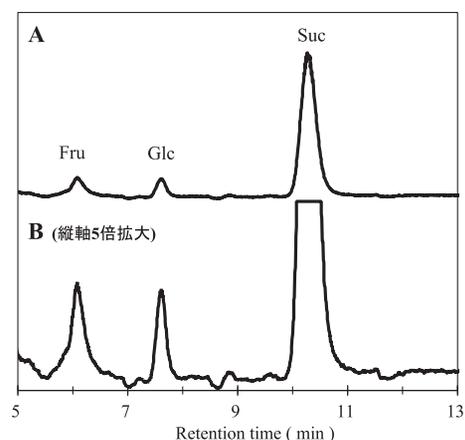


図2. イネ葉身に含まれる主要な小糖のHPLC-CADクロマトグラム

フルクトース (Fru) がわずかに存在する。葉に存在するこれらの糖を定量する場合、HPAEC-PADでは、糖のピーク面積がそれぞれの定量範囲に収まるように、分析に供する試料の濃度を物質ごとに設定して行う。一方、CADでは定量範囲がおおよそ1 µg/mlから1 mg/ml程度までと広範囲であるため、含量が大きく異なる糖が含まれていても、多くの場合、一度に定量できる (図2)。

CADでは不揮発性の物質は何でもほぼ同じ感度で検出できるので純度を検定するのも有効である。この特長故、気をつけなければならない点もいくつかある。まずは使用するカラムである。カラムから常に不揮発物質が溶出しているような場合、ベースラインが大きく上がり、検出感度は極端に下がる。RIで検出できたから同じカラムでもよいかと思って使用しても、まったくその性能が出なかったことがあった。すなわち、不揮発物質の溶出しないカラムを使用しないといけないのである。

この経験はあるピークを分取したい時の分取カラムの選択に重要な情報を与えてくれる。すなわち、分離することが必要ではあるけれども、同時に溶媒の不純物やカラムからの溶出物を含んでしまっただけでは分取の意味はなくなってしまう。

使用する溶出溶媒は不揮発物質の含有量が少ないものを選択する必要がある。ラベルにHPLC用溶媒と書いてあっても、まったくCADでは使用できない市販品もあった。また、緩衝液を用いたい場合は、揮発性のギ酸アンモニウムや酢酸アンモニウムを使用する必要がある。

LC-MS分析との併用により、物質同定と定量が可能になることは言うまでもない。最大の欠点は、RI検出器と比べて、高価であることであり、今後、CADの普及とともに価格が手ごろなものになることを願っている。

## 文 献

- 1) Dubois, M. *et al.*: *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
- 2) Whistler, R. L. *et al.*: *Methods in carbohydrate chemistry I*, p.388, Academic press (1962).
- 3) 福井作蔵：還元糖の定量法，東京大学出版会 (1969).
- 4) Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.*, **125**, 399 (1938).
- 5) Nelson, N.: *J. Biol. Chem.*, **153**, 375 (1944).
- 6) Park, J. T. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **181**, 149 (1949).
- 7) Utsumi, Y. *et al.*: *J. Appl. Glycosci.*, **56**, 215 (2009).
- 8) Miwa, I. *et al.*: *Clin. Chim. Acta*, **37**, 538 (1972).
- 9) Zhang, Z. *et al.*: *Anal. Chem.*, **68**, 1632 (1996).
- 10) 門脇 孝ら：基礎と臨床，**27**, 985 (1993)
- 11) 林 隆造ら：バイオ電気化学の実際，シーエムシー出版 (2007).
- 12) 深溝 慶ら：化学と生物，**47**, 404 (2009).
- 13) Dixon, R. W. *et al.*: *Anal. Chem.*, **74**, 2930 (2002).
- 14) 福島景子ら：*Chromatography*, **32**, 161 (2011).