フェノール硫酸法によるカキ中のグリコーゲン，グルコースの定量

石原　忠・児玉龍平・保田正人

Quantitative Analysis of Glycogen and Glucose in Oyster through Use of Phenol-Sulfuric Acid Reaction.

Tadashi Ishihara, Ryuhei Kodama* and Masato Yasuda

The quantitative analysis of carbohydrate through use of phenol-sulfuric acid reaction was reported by M. Duvois et al. (1956). However no paper on the quantitative analysis of glycogen and glucose has been found so far in spite of considerable attention.

This paper is to deal with the quantitative analysis of glycogen and glucose in oyster as the whole and in each organ of oyster.

Experiments show that as the whole the oyster contains 5.2% of glycogen and 1.1% of glucose. It contains 20% of glycogen in the tissue for carbohydrate storage and 9.5% in the genital duct, and 2.8% of glucose in the adductor and 2.6% in the tissue for carbohydrate storage.

In this connection, it would be interesting to study the reaction of glycosidase and seasonal variation of glycogen and glucose.

グリコーゲンの定量法を大別すると (1)グリコーゲンを酸加水分解してブドウ糖とし，その還元力で測定する方法と，(2)抽出液をそのままで定量する方法とがある．(1)の方法はベルトラン法の如く比較的多量の試料を必要とし，定量操作も複雑で長時間を要する．(2)には直接重量法と比色定量法がある．比色定量法は 100mg 内外の微量の試料を短時間内に，簡単な操作でもって定量が可能である．フェノール硫酸法はその1方法であるが，アンスロン法等に比較して，試薬の取扱いが簡単で，呈色もかなり長時間安定である．また定量操作も硫酸の添加方法に若干の条件がつけられているのみで，反応温度等の定量に及ぼす影響はほとんどない．

著者等は本法を用いてカキ中のグリコーゲン及びグルコースを分離定量したので，その結果を定量方法と共に報告する．

実　験　方　法

1　試薬及び器具

1　濃硫酸（試薬特級 Sp. Gr. 1.84）

2　80% (wt/wt) 精製フェノール

3　島津光電分光度計 (QV-50 型)

* Kwassui Women's Junior Ccllege

2　測定方法

10～100μg の糖を含む試料 2ml を直径 16～18mm の試験管にとり，80％ (wt/wt) フェノール 0.12ml を加え，濃硫酸 5ml をすみやかに，器壁をつたわらせることなく液に直接加えて10分間放置後ふりまぜ，室温に10～20分間放置し，波長 480mμ における吸光度を測定する．糖量は検量線より求める．

空試験には糖液の代りに蒸留水 2ml を用いる．

3　検量線の作製

100, 80, 60, …… 20μg の糖を含む溶液 2ml に，80% (wt/wt) フェノール 0.12ml，濃硫酸 5ml を加えて発色させ，波長 480mμ における吸光度を測定する．

糖量が 100μg までは Lambert-Beer の法則に良く一致した．

4　グリコーゲン，グルコースの分離法

精秤した試料中の糖質を熱湯で抽出し，その一定量を蒸発乾固した後，少量のアルコール (99.％以上) を加え，10分間静かに加熱する．加熱後濾過し，濾液をグルコース抽出液とする．残渣には更に熱湯を注ぎその濾液をグリコーゲン抽出液とする．

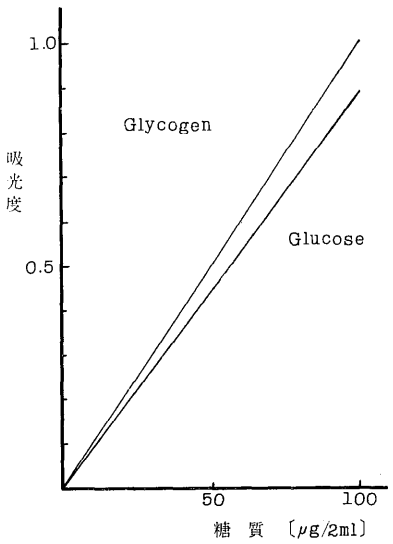


Fig. 1　糖質の検量線

例えばカキ全体のグリコーゲン，グルコースの分離定量を行なう場合の操作法は次の通りである．

試料約20 g を精秤し，これに水約 200ml を加え充分ホモゲナイズした後 5～10分間静かに加熱する．これを濾過し残渣は熱湯抽出をくり返して得られる濾液を合せ，水で 1000 ml とする．その 10ml を更に10倍稀釈し分析試液とした．

試液の 10ml を水浴上で蒸発乾固し，蒸発残渣にアルコール 10ml を加えて，少時水浴上で加熱抽出後濾過する（残渣は後述のグリコーゲン定量に用いる）濾液は更に加熱して大部分のアルコールを蒸発させる．その残渣を水 100ml に溶解し，その 2ml を発色させグルコースの定量を行なった．一方アルコール抽出残渣は熱湯で 10ml ずつ 5 回程度抽出を行ない，抽出液を合せて 100ml とする．

この 2ml について発色させグリコーゲン定量を行なった．

肝臓その他の器官については稀釈倍率を調整して糖の最終濃度を 100μg/2ml 以下にする必要がある．

実験結果及び考察

1.　発色液の吸収曲線

100μg 程度の糖を含む溶液 2ml に80% (wt/wt) フェノール 0.12ml，濃硫酸 5ml を加えて発色させ，波長 300～510mμ 間の吸光度を測定した結果は Fig. 2 に示す如くで

Table 1.　グリコーゲン，グルコースの分離定量

試　料
- 秤　量
- 熱湯抽出（ホモゲナイズ）
- 蒸発乾固
- ＋アルコール（99.5%）
- ロ　過

残　渣
- 熱湯に溶解

フエノール，硫酸で発色させ吸光度を測定し検量線よりグリコーゲン量を求める
対照：蒸留水

ロ　液
- 大部分のアルコールを蒸発した後水に溶解

フエノール，硫酸で発色させ吸光度を測定し検量線よりグルコース量を求める
対照：蒸留水

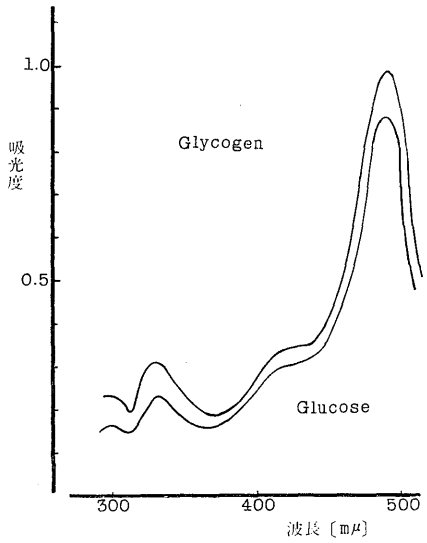


Fig. 2　糖質の吸収曲線

ある．Glycogen, Glucose 共に 488mμに極大吸収がある．

2.　夾雑物の影響

試料中に当然含まれると予想される蛋白質（カゼインを使用），脂肪（ダイズ油），その他の物質を 100μg/2ml に調製し，80% (wt/wt) フェノール 0.12ml，濃硫酸 5ml を加えて発色させ，波長 480mμ における吸光度を測定した．結果を Table 1. に示す．

この結果よりみて夾雑物濃度が 5mg % 以下であれば比色に対してほとんど影響はみとめられなかった．従って試料採取する場合は水分等を換算して試料溶液の終濃度を 100μg/2ml 以下に調節すれば夾雑物による影響を無視する事が可能である．

Table 2.　夾　雑　物　の　影　響

100μg/2mlの各種成分の480mμに於ける吸光度及びグルコース吸光度との比較

夾　雑　物	吸　光　度	グルコース吸光度に対する割合
蛋　白　質（ゼ　ラ　チ　ン）	0.004	0.45%
ア　ミ　ノ　酸（トリプトファン）	0.005	0.56
酒　石　酸	0.005	0.56
ク　エ　ン　酸	0.005	0.56
乳　酸	0.004	0.45
酢　酸	0.002	0.22
脂　質（ダ　イ　ズ　油）	0.007	0.77
グリコーゲン	1.000	
グルコース	0.900	

3.　カキ中のグリコーゲン，グルコースの定量

以上の定量法を使用して1965年10月に長崎市の店頭で入手した殻付のカキについてグリコーゲン及びグルコースの全量と器官別の分布量を測定した．測定した器官の名称部位の概略は Fig. 3 に示す．測定結果は Table 3 に示す如く，カキ全体に含まれるグリコーゲ

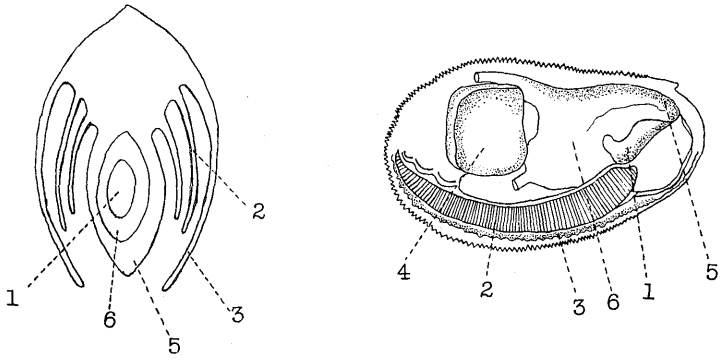


Fig. 3　カ キ 器 官 の 名 称

1　肝臓 (liver)　　4　閉殻筋 (adductor)
2　鰓 (branchiae)　　5　貯蔵組織〔内臓塊週辺部〕(Ristology of Preservation)
3　外套膜 (mantte)　　6　生殖巣 (reproductive organ)

Table 3.　カキ中のグリコーゲン及びグルコース量

組織名	グリコーゲン (平均値)			グルコース (平均値)		
平均重量(g)	含有比率(%)	絶対量(mg)	分布比率(%)	含有比率(%)	絶対量(mg)	分布比率(%)
肝臓 0.326	6.42	20.97	22.0	0.84	0.27	0.3
えら 0.163	0.92	1.58	1.6	1.55	1.88	2.0
外套膜 0.098	1.65	1.62	1.7	1.29	1.26	1.3
閉殻筋 0.186	1.70	3.18	3.3	1.41	2.66	2.8
貯蔵組織 0.190	20.42	38.88	40.8	1.33	2.49	2.6
生殖巣 0.200	9.54	19.16	20.1	0.70	1.41	1.5
全組織 20.625	5.25	1083.35	89.5	1.15	238.85	10.5

ンは平均5.2%，グルコースは平均1.1%であった．又器官別平均含量はグリコーゲンについては貯蔵組織（内臓塊周辺部）の20.4%が最も多く，次いで生殖巣の 9.5% であった．グルコース量ではえら，閉殻筋に 1.4～1.6 %見出された．

結　　論

フェノール硫酸法によりカキ中のグリコーゲン及びグルコースを分離定量したところ，グリコーゲンは貯蔵組織，次いで生殖巣に多く，グルコースは閉殻筋に，次いで貯蔵組織に多かった．この事は Glycolysis の経路から考えてみても興味深い事である．又貯蔵組織に多量（平均20%）のグリコーゲンを蓄積している事は人間にみられるグリコーゲン蓄積症と比較して興味深いが，その生理的な意義や代謝機構については全く不明である．

以上の様にカキのグリコーゲン含量は貝肉全量については月別消長が論ぜられているが，器官別の詳細な消長は全く判っていないのでこの方面の研究も続ける予定である．尚本定量法は従来用いられている方法に比較すると非常に簡便なもので，単にカキの生化学的研究のみならず，カキの品質判定の一手段としても良方法ではないかと考える．

この研究の要旨は水産学会九州支部会（1965年12月3日）において発表した．

文　　献

1) 日本化学会編：実験化学講座，23，丸善，P. 416～423
2) Dudois, M., Gilles. K. A., Hamiiton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F., *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956)
3) Nature, **168**, 167 (1951).
4) 江上不二夫，左右田徳郎：多糖類化学　共立出版　東京　P. 147～177
5) 赤堀四郎編：酵素研究法　3，朝倉書店，P. 1～20
6) 福井作蔵：化学と生物，**3**，432 (1965).
7) 福井作蔵：化学と生物，**3**，488 (1965).

場　　所	誤	正
111頁　Fig. 8　英文説明	densityɨnsituin	density in situ in
115　表題	その被害—VI.	その被害—IV
〃　下から　1行目	*Anadrana broughtoii*	*Anadara broughtonii*
116　〃　4 〃	東岸千綿	東岸千綿
〃　〃　3 〃	(Fig. 6)	(Fig. 5)
117　上から　3 〃	(Fig. 6)	(Fig. 5)
119　〃　6 〃	曳網距離 95 ㎝	曳網距離 95 m
125　下から　6 〃	残存率 0 %	残存率 *9 0 %
140　上から　1行目	**材料の方法**	**材料と方法**
144　文献下から　2行目	ISHIDA	ISHIDA
150　右下	余白部	Fig. 10 欠（本誌22号で補遺致します—著者）
181　和文上から　2行目	Holthus	Holthuis
194　文献上から　1 〃	〃	〃
〃　〃 下から　1 〃	56～82	195～221
196　上から　6行目	Holthus	Holthuis
197　〃　5 〃	〃	〃
218　文献下から　1行目	42～55	181～194
〃　Plate II　Fig. 3　英文説明	*I. novemdeutatus*	*I. novemdentatus*
235　上から　3行目	Table 2	Table 1
237　下から　7 〃	大豆に	大豆ステロイド中に
254　Fig. 3	Ristology of Preservation	histology of preservation
265　英文表題	Studies no……	Studies on……
270　Fig. 10	30と90°の間の余白	60を入れる
274　上から　5行目	sesults	results
〃　〃　8 〃	disolved	dissolved
〃　〃　18 〃	Table. 5.	Table 5.