HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	グリコーゲンの各種方法に依る定量について
Author(s)	元廣, 輝重
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 1(1), 44-50
Issue Date	1950-12
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/22675
Type	bulletin (article)
File Information	1(1)_P44-50.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

グリコーゲンの各種方法に依る定量について

元　廣　輝　重　(水産食品製造學教室)

ESTIMATION OF GLYCOGEN BY VARIOUS METHODS.

Terushige MOTOHIRO

(Faculty of Fisheries, Hokkaido University.)

The writer has estimated the quantities of glycogen in the solutions of glycogen (for example 0.025%, 0.05%, 0.10%) by the Gravimetric method, the Bertrand's and Hagedorn-Jensen's methods. The results obtained by methods as above stated, were compared and discussed with eath other. For the precipitation of glycogen, Simonovits' method was used.

1) In the case of addition of saturated sodium chloride solution, the values of glycogen estimated by Gravimetric method have a loss of 3.25%, of the sample when the concentration of the sample was 0.025%, a loss of 1.32% at 0.05% concentration of the sample, and a loss of 0.45% at 0.10% concentration of the sample respectively. But in the case of non-addition of saturated sodium chloride solution, the results showed the rate of the loss of 3.64% at 0.025% concentration of the solution of the sample, 1.32% at 0.05% conc., and 0.74% at 0.10 % conc. respectively. The results by the addition of saturated sodium chioride solution showed less loss than the result without the addition of saturated sodium chloride solution.
The greater the concentration of the sample, the lower was the loss according to the gravimetric method.

2) The results of the estimation of glycogen by Bertraud's method shows that the rate of increase obtained is 0.04% at 0.05% concentration of the sample and the rate of loss is 0.07% at 0.10% concentration respectively.

The distribution of these errors are 2.54% at 0.05% concentration of the sample and 1.0 % at 0.10% concentration of the sample.

3) The results of the estimation of glycogen by Hagedorn-Jensen's method shows that the rate of loss is 0.19% at 0.025% concentration of the sample and the rate of loss is 0.07% at 0.10% concentration of the sample.

There was little error in low concentration and in high concentration of the sample, and the accuracy of this method was very high.

4) From those facts, the writer has recognized that Hagedorn-Jensen's method was more suitable than the Gravimetric and Bertrand's methods for the estimation of glycogen from the low concentration to high concentration of the sample. Gravimetric method is next best to the Hagedorn-Jensen's method, and the Bertrand's method is the least accurate.

In proportion to the increase in the concentration of the sample, the rate of the loss of the sample obtained in the gravimetric method decreased.

1 緒 言

從來グリコーゲンの定量法には Pflüger[1] の macro 法があり Sahyun[2] によつて micro 法にまで應用せられたが、此の方法はグリコーゲンを吸着沈澱させるのに動物炭を使用するために沈澱の損失を來し、實驗値として可成り低い値しか得られないことを Simonovits[3] によつて認められた 而して Simonovits は組織を濃苛性カリ中で煮沸溶解し、次いで食鹽と酒精を以てグリコーゲンを沈澱せしめた。又 Th. v. Brand[4] は塩酸で溶解せしめ、アルカリ及び酒精に依つてグリコーゲンを沈澱させる方法を考案した。又 S. Seifter[5] 等は anthrone を用い比色法によりてグリコーゲンの定量を行つている。生成したグリコーゲンは之を再三同一操作を反覆することにより精製し最後に鏡酸を以て加水分解しグリコーゲンを葡萄糖に變化せしめ、この糖の量を各種方法により定量する。

而して糖の定量法としては Soxhelt 法、Bertrand 法、Lane-Eynon 法、Munson-Walker 法、Schoar-Rengenbogen 法、Hagedorn-Jensen 法、Povy 法、Kolthoff 法、Bogert-Kolthoff 等の容量法があり又 Allihn 法、Munson-Walker 法、Herzfeld 法等の重量法があげられるが著者は此の中一般に廣く用いられる Bertrand[12] 及び Hagedorn-Jensen[9),10),11)] の方法により糖の量を求め、又直接に酒精に依つて沈澱したグリコーゲンを秤量して定量を行う重量法[12] の 3方法を比較したのでその結果についてこゝに報告する。

2 實 驗 の 部

(1) 試 料 の 調 製

精製せるグリコーゲンを 90°C の水浴乾燥器中において 5時間乾燥し、このもの一定量を正確に秤量して溫湯に溶解せしめ一定量に稀釋して約 0.5% の溶液としたものを試料に供した。

(2) 重量法に依るグリコーゲンの定量結果並びにその考察

グリコーゲンを沈澱せしめるには Simonovits 法によつた 即ち上記の試料 5c.c. に 96% アルコール 15c.c., 飽和食塩水 2c.c., 60% 苛性カリ液 5c.c. を 3本宛 50c.c. 容の硬質遠心沈澱管に採りグリコーゲンを沈澱せしめ、後 30 分間遠心沈澱器 (3500 r. p. m) にかけてグリコーゲンを沈澱管底部に固着せしめ傾斜法により上澄液を去り、再び同一操作を繰返して後豫め秤量してあるグーチ坩堝に沈澱を移しアルコールで洗滌し、95°C乾燥器内に於いて約 3 時間乾燥し乾燥後デシケーター中に放冷し秤量して沈澱の恒量値を常法により求めた。その結果は第 1 表の如くである。

Table 1. Analytical results of Glycogen by Gravimetric method
(Added with satulated NaCl sol.)

Concentration (%)		Exp. results (gm) A	Theoretical results (gm) B.	B−A	B−A/B×100.
0.025	I	0.0249	0.02584	−0.00094	−3.67
	II	0.0252	0.02584	−0.00064	2.48
	III	0.0250	0.02584	−0.00084	−3.25
	Average	0.0250	0.02584	−0.00084	−3.25
0.05	I	0.0508	0.05168	−0.00088	−1.70
	II	0.0510	0.05168	−0.00068	−1.32
	III	0.0512	0.05168	−0.00048	−0.93
	Average	0.0510	0.05168	−0.00068	−0.32
0.10	I	0.1028	0.10336	−0.00056	−0.54
	II	0.1028	0.10336	−0.00056	−0.54
	III	0.1030	0.10336	−0.00036	−0.35
	Average	0.1029	0.10336	−0.00046	−0.45

〔註〕 損失百分率 (B− A)B/100 の數値の一は理論値より小なることを示す。

第1表よりみるに濃度0.05% の場合は理論値0.02584gm に對して 0.0249～0.0252gmであり相當量の減少を示している。今實驗値及び理論値の差即ち沈澱の損失量を理論値で除した損失百分率をみれば、約 3% 前後である。又 0.05% 濃度の供試溶液に於いては理論値 0.05168gm に對して 0.0508～0.0512gm であつてその損失百分率は約 1.3% である。0.10% の供試液に就いても理論値 0.10336gm に對して實測値は 0.1028～0.1030gm でありその損失百分率は約 0.5% である。此の三者を比較した場合、實驗操作中に於ける沈澱の損失は各溶液に就いて大體同一である。それ故高濃度になるにつれ損失百分率は減少する。0.025% 濃度の溶液中損失率が約3% もあることはグリコーゲンの定量法としては決して好ましいものとは思はれず、又 0.05%濃度の場合に就いても同樣である。0.10% の場合は損失率は 0.45% であるから可成り良好なのであるが、之も許容誤差（0.2%）の範圍を超過して居り、グリコーゲンの定量としては重量法は不適當であるか、若しくは0.10% より以上の濃度を有する試料に就いて適用しなければならないと考えられる。

次に Galachowa[6] 及び Gentin[7] 等はグリコーゲンの定量に當つて食塩水及び硫酸カリ等の塩類添加の影響を檢しているが著者も全然飽和食塩水を添加せぬ場合のグリコーゲンの沈澱の狀態を檢し重量法に依つて定量した。その結果は第2表の如くである。

Table 2. Analytical results of Glycogen by Gravimeteric method
(Added with no NaCl sol.)

Concentration (%)		Exp. results (gm) A	Theoretical results (gm) B.	A−B	A−B/B×100.
0.025	I	0.0250	0.02584	−0.00084	−3.25
	II	0.0248	0.02584	−0.00104	−4.02
	III	0.0248	0.02584	−0.00104	−4.02
	Average	0.0249	0.02584	−0.00094	−3.64
0.05	I	0.0506	0.05168	−0.00008	−2.09
	II	0.0508	0.05168	−0.00088	−1.70
	III	0.0509	0.05168	−0.00078	−1.51
	Average	0.0508	0.05168	−0.00088	−1.70
0.10	I	0.1026	0.01336	−0.00076	−0.74
	II	0.1025	0.01336	−0.00086	−0.83
	III	0.1026	0.01336	−0.00076	−0.74
	Average	0.1026	0.01336	−0.00076	−0.74

但し−は理論値より小なることを示す。

第2表をみるに濃度 0.025% の場合は理論値 0.02584gm に對して實測値は 0.0248～0.0250gm であり、平均損失率は 3.64% である。又 0.05% の場合は理論値 0.05168gm に對して 0.0506～0.050gm であり、平均損失率は 1.70% である。0.10% の濃度の溶液に於いては理論値 0.10336gm に對して實測値は 0.1025～0.1026gm であり平均損失率は 0.74% である。飽和食塩水を添加しない場合に於いても添加時と同樣略々同量の損失量を示しているが、食塩水添加の方が若干多量に沈澱することが認められ、從つて損失率も第2表にみる如く增加している。

即ち第1表及び第2表を比較してみるに稀薄溶液 0.025% のものにあつては飽和食塩水を添加した時の方が不添加時に比べて平均損失率は 0.39% 增加している。又 0.05% の溶液では 0.38%、0.10% に於いては同樣に前者は 0.29% 後者より增加している。之等より明かな如く低濃度より高濃度になるにつれて平均損失率は增加し、その範圍は 0.1% であり飽和食塩水を添加しない場合にあつては添加したものに比べて高濃度になるにつれて兩者の損失率の差が增加する。又逆に低濃度に於いては兩者の差が減少することが判つた。

（3） Bertrand 法によるグリコーゲンの定量及びその考察

此の方法は重量法の場合と同じくSimonovits法によつてグリコーゲンを沈澱させ、その後2N-H_2SO_4

を添加し錫箔を以つて容器の口を覆い重湯煎中に2時間浸漬し、放置して加水分解を行い、冷却して2N-NaOH で中和してメスフラスコに移して一定量となし、此の溶液を使用して糖の分析を實施した。即ち20c.c. の Fehling solution A液（$CuSO_4$溶液）と20c.c. の B液（Rochelle Salt 溶液）を加え、その混合液をアスベスト付金網上で加熱し3分間正確に沸騰した後、靜置して酸化銅を沈澱せしめ上澄液をアリン管を用い傾斜し、次いでフラスコ中の沈澱に水を加え洗滌し、その洗液をアリン管中に傾斜して吸引濾過する。洗滌後フラスコ及びアリン管中に附着している亞酸化銅の沈澱を溶解するために20c.c. の酸性硫酸第二鐵溶液をアリン管中に加え石綿上に沈積している亞酸化銅を溶解せしめる。この操作を反覆し最後にこの溶解液を $KMnO_4$（D液）の1滴で微紅色となるまで滴定する。その結果は第3表の如くである。

Table 3. Analytical results of Glycogen by Bertrand's method

Concentration (%)		Exp. results (gm) A	Theoretical results (gm) B.	A−B	A−B/B×100.
0.05	I	0.05077	0.05168	−0.00091	−1.76
	II	0.05260	0.05168	+0.00092	+1.78
	III	0.05174	0.05168	+0.00006	+0.12
	Average	0.05170	0.05168	+0.00002	+0.04
0.10	I	0.10342	0.10336	+0.00006	+0.06
	II	0.10248	0.10336	−0.00088	−0.85
	III	0.10233	0.10336	−0.00103	−1.00
	Average	0.10274	0.10336	−0.00072	−0.70

〔註〕 +は理論値より大なることを示す。

第3表をみるに0.05%の濃度の供試液にあつては、第1回目の實驗では1.76%の損失率を示し、第2回目の實驗では1.78% の增加率を、又第3回目の實驗では0.12%の增加率を示した。之等3回の結果を平均すれば實驗値は 0.05170gm となり理論値 0.10336gm に對して 0.00002gm の增加であつて0.04% の增加率を示している。此の平均より見た結果は相當に良い値であるが、分布の狀態を檢討してみると 0.00183gm の相差があり 3.54% ものひろがりを有している。このことは Bertrand 法自身が既に多くの研究により指摘された如く、實驗的に非常に多くの條件を持つて居り、從つて誤差の生じ易いことに起因するものであり、例えば時間的變化に伴う亞酸化銅の生成量の相違等があげられるが、0.05% 程度の濃度の溶液に於いてグリコーゲンの定量法として Bertrand 法を使用することは適當でないと思はれる。又 0.10%の濃度を有する溶液に就いての實驗結果は第1回目に於いては增加率は 0.05% である。又第2回目は 0.85% の損失率を示し、第3回目は 1.00% の損失率である。之等3回の實驗の平均をとれば理論値 0.10336gm に對して實驗値0.10274gm を得、その損失量は 0.00072gm であつて損失率は 0.70% となつた。此の濃度に於ける誤差の分布をみるに 0.00109gm で 1.06% である。而して 0.05%及び 0.10%の濃度をもつ溶液に就いて誤差の範圍よりみた場合 Bertrand 法は高濃度の方が低濃度よりも著しくその範圍を狹少にしているから一般的に低濃度より高濃度になるに從つて理論値に接近するものと思はれる。然し乍ら以上の結果よりしても 0.10% 程度の濃度に於いては Bertrand 法もグリコーゲンの定量にはさして有効な方法であるとは思はれない。

（4） Hagedorn-Jensen 法によるグリコーゲンの定量及びその考察

Bang[8] の方法は今迄廣く用いられて生物體內に於ける糖の代謝研究等に大いに貢獻をなしたが、之等の方法を詳細に檢討すると尙幾多の缺陷を有していることが判明した。アルカリ性銅溶液が糖に依つて還元せられて生成する亞酸化銅を一定量の沃素酸の過剩を定量するに際して空氣中の酸素による酸化作用を防止するために蒸氣で煮沸しながら硫酸を注加する。此の際先に糖浸出液として使用し

た鹽化カリが多量に存在している故、同時に塩酸が生成する。此のものが高溫度に於いては殘存する沃素酸カリを分解することは容易に證明せられ、これに伴う誤差は加熱時間の長い程顯著である。而して其の誤差が僅少であつても是等の實驗上に於ける理論的缺陷は看過し難い。[9),10),11)]

Hagedorn-Jensen の方法は糖の還元性を利用すること及び最後に沃度滴度法に依る點は Bang法と變りないが、一度糖によつて還元されてしまえば空氣中に放置してあつても酸化することのない赤血塩を使用するものである。即ち $K_3Fe(CN)_6$ の既知量とアルカリ溶液中に於いて糖と共に加熱すれば其の一部は糖が存在する限り還元されて黄血塩となる。過剰の Ferri-ion は醋酸酸性溶液中に於いて沃度滴定法により定量することが出來る故、其の差によつて葡萄糖の量を知り得るのである。

$$2K_3Fe(CN)_6+2KI=2K_4Fe(CN)_6+I_2$$

而して之等の反應を定量的に進行せしめる爲めに硫酸亞鉛を加え、$K_4Fe(CN)_6$ を $K_2Zn_3[Fe(CN)_6]_2$ として沈澱せしめる。

$$2K_4Fe(CN)_6+3ZnSO_4=3K_2SO_4+K_2Zn_3[Fe(CN)_6]_2$$

又硫酸亞鉛の添加によつて滴度滴定法に支障を來すことはなく、この際生ずる黄血塩の黄色がend-poin を不明瞭にすることはない。

$$3H_2SO_4+KIO_3+5KI=3H_2O+3K_2SO_4+3I_2$$

$$I_2+2Na_2S_2O_3=2NaI+Na_2S_4O_6$$

以上の原理に從い定量した結果を示せば第4表の如くである。

Table 4. Analytical results of Glycogen by Hagedorn-Jensen's method.

Concentration (%)		Exp. results (gm) A	Theoretical results (gm) B.	A−B	A−B/B×100.
0.025	I	0.02577	0.02584	−0.00007	−0.27
	II	0.02579	0.02584	−0.00005	−0.19
	III	0.02580	0.02584	−0.00004	−0.11
	Average	0.02579	0.02584	−0.00005	−0.19
0.10	I	0.10330	0.10336	−0.00006	−0.06
	II	0.10330	0.10336	−0.00006	−0.06
	III	0.10325	0.10336	−0.00011	−0.11
	Average	0.10329	0.10336	−0.00007	−0.07

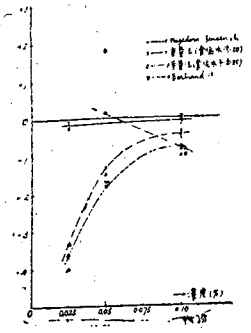
第4表よりみるに 0.025% の濃度を有する溶液に就いては第1回目は 0.7% の損失率であり、第2回目の實驗に於いては 0.19% の損失率を示し、更に第3回目に於いて損失率は 0.11% であつた。之等3回の實驗を平均すると理論値 0.02584gm に對して實驗は0.02579gm であり平均損失量は 0.00006gm で損失率は 0.19% であつた。又 0.10% の濃度を有する場合の實驗結果は第1回目にあつては損失率は 0.06% であつた。

第2回目の實驗に於いても第1回目と全く同樣な結果を收めた。第3回目の實驗は若干增加し0.11% の損失率となつている。之等の平均をとつてみると理論値 0.10336gm に對して實驗値は 0.10329gm で損失量は 0.00007gm であり、損失率は 0.07% であつた。又誤差の分布よりみると 0.025% の溶液にあつては 0.6% であり、0.10% の溶液では 0.05% に過ぎない。而して濃度の變化による實驗誤差の範圍も極めて狹少であることより、容量法によるグリコーゲンの定量には Hagedorn-Jensen 法が適當であると思はれる。

（5） 各種方法に依るグリコーゲンの定量結果並に比較

以上の如き定量結果より得られた損失率（又は增加率）の濃度による變化を次の第1圖に示したがこれより明らかな如く濃度による增加率の變化の最も少ないものは Hagedorn-Jensen 法であり、次

Fig. 1 Relation between the concentration of glycogen and the loss by various methods.



いで重量法、Bertrand 法の順となつている。これを同一濃度の場合につき比較してみれば、0.025% の濃度を有する供試液に就いては重量法の場合、飽和食鹽水を添加したものは 3.25%の損失、飽和食鹽水を添加しない時は 3.64% の損失、又 Hagedorn-Jensen 法の場合には 0.19% の損失であつて 3.45%前後の相違が認められ、後者の方がはるかに優れていることが判明する。0.05% の濃度を有する供試液の場合は重量法で飽和食塩水を添加した時は 1.32%、飽和食塩水を添加しない場合は 1.70%の損失、Bertrand 法では 0.04% の増加を認めたが、3 回の實驗の結果の損失率の差からみれば前 2 者が 0.48～0.77% であるに反し、後者は 2.54%であり、此の事は Bertrand 法が實驗操作上頗る不定な結果を與えることが判る。然し乍ら兩者共に此の濃度に於けるグリコーゲン定量の場合、適當な方法であるとは思はれない。0.10% の濃度に於ける場合は飽和食塩水を添加したものの重量法は 0.45%、添加しない時は 0.74% の減少、Bertrand 法では 0.70%の減少、Hagedorn-Jensen 法では 0.07% の減少となつている。而して 0.10% の濃度に於いても Hagedorn-Jensen 法が最も正確であり、重量法及び Bertrand 法の順となつている。又高濃度になるに從つてグリコーゲンの沈澱も多量に析出する故、重量法も比較的誤差が少なくなることが認められる。

3 要　　約

以上を要約すれば次の如くなる。

0.025%、0.05%、0.10%の濃度を有するグリコーゲン溶液の試料について重量法、Bertrand法、及び Hagedorn-Jensen の方法によりグリコーゲンの定量を行い、その結果を比較檢討した。グリコーゲンの沈澱生成には Simonovits の方法によつた。

(1) 重量法によるグリコーゲンの定量を行つた結果、飽和食鹽水を添加したものは 0.025% の濃度では 3.25%、0.05% の濃度では 1.32%、0.10% の濃度では 0.45% の損失率を示し、飽和食鹽水を添加せぬものは 0.025% の濃度では 3.64%、0.05% の濃度では 1.70%、0.10% の濃度では 0.74% の損失率を示した。而して飽和食塩水を添加したものは添加せぬものよりよい結果を收めた。又試料の低濃度より高濃度になるに從つて損失率が減少するのを認めた。

(2) Bertrand 法によりグリコーゲンの定量を行つた結果、0.05% の濃度では 0.04% の増加、0.10% の濃度では 0.70% の損失を認めた。又その誤差の分布狀態を檢した結果は 0.05% 濃度では 2.54%、0.10% の濃度では 1.06% であり、極めて不定な結果が得られた。

(3) Hagedorn-Jensen 法による場合は 0.025% の濃度では 0.19%、0.10% の濃度では 0.07% の損失率を示し、低濃度及び高濃度に依る誤差は左程認められず、又正確度も高いことを認めた。

(4) 以上の結果を比較して各濃度を通じて Hagedorn-Jensen 法がグリコーゲン定量に際して最も適當な方法であり、次いで重量法及び Bertrand 法の順となり、又重量法は高濃度になれば可成り正確度を増加することを認めた。

終に臨み本實驗を遂行するに當り、終始御懇篤なる御指導を賜つた本學部谷川教授、水專秋場助教授、並びに研究室諸氏に對し深甚の謝意を表する。

5 文 献

(1) Pflüger : Arch. f. d. ges. Physiol., 103, 169 (1904)
(2) Sahyun : J. biol. chem., 93, 227 (1931)
(3) Simonovits : Biochem. Z., 265, 437 (1933)
(4) Th. v. Brand : Skand. arch. Physiol., 75, 195 (1936)
(5) S. Seifter, S. Dayton. B, Novic & E. Muntwyler Arch : Biochem., 25 (1950) [61
(6) Galachowa : Biochem. J., 14. 289, (1939)
(7) Genkin : Biokhimiya., 3, 47 (1938)
(8) Bang : Mikromethodeu zur Blutunterschung.
(9) Hagedorn u. Jensen : Biochem Z., 135, 47 (1923)
(10) 小金井：東京醫事新誌 2521, 1 (1928)
(11) Hagedorn, Halstron, Jensen : Hospitalstidende 78, 1193 (1935)
(12) 東京大學農藝化學教室：農藝化學分析書上卷 207. 昭和24年版

(水產科學研究所業績第44號)