

無機窒素化合物およびオキシムの測定

大村, 浩久
九州大学農学部

箴島, 豊
九州大学農学部

波多野, 昌二
九州大学農学部

吉原, 典子
九州大学農学部

他

<https://doi.org/10.15017/21616>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 20 (2), pp.179-198, 1963-01. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

無機窒素化合物及びオキシムの測定

大村浩久・箴島 豊・波多野昌二・吉原典子
渡辺健治・山藤一雄

On the estimation of inorganic nitrogenous compounds and oximes

H. Omura, Y. Osajima, S. Hatano, F. Yoshihara,
K. Watanabe and K. Yamafuji

ヒドロキシルアミンによる家蚕バイラスの誘発成功³⁸⁾に引続いてその酸化生成物である亜硝酸⁴¹⁾や次亜硝酸⁴⁷⁾或はカルボニル化合物との結合物であるオキシム⁴¹⁾も同様に誘発能を持つことが確められ、更にこれ等の代謝とバイラス生成との間には密接な関係があることが認められた³⁹⁾。又ヒドロキシルアミンの生体内での特異的な生理機能の追及からオキシマーゼ^{35,44)}トランスオキシマーゼ^{24,35)}の両酵素が発見された。最近これ等に関連してアンモニアと硝酸との間の酸化還元を触媒する酵素循環系が存在しヒドロキシルアミン、次亜硝酸及び亜硝酸が中間体であることも確められた⁴⁸⁾。こうしてアミノ酸生成機構に関する知見は更にオキシム系を包含するものに拡張され、しかも無機窒素とはアンモニア及びヒドロキシルアミンの両段階で結び付けられ、従来の概念は著しく発展した³⁷⁾。特に無機窒素循環系の4種の脱水素酵素は生体外に初めて証明された酵素であり、又硝酸よりアンモニアに至る還元系の4酵素も動物組織では初めて確認されたものであつて、同じく我々が発見したオキシマーゼ、トランスオキシマーゼ両酵素とともに、これ等10種の酵素について詳細な研究を行なっているが、これに伴つて基質若くは反応生成物である無機窒素化合物及びオキシム類のより正確で精密な測定法ならびに特に完全な分離定量法の確立が要求される。

これ等結化合物の測定にはジアゾ反応に基づく Griess 試薬による亜硝酸の鋭敏な呈色反応を基本とし、その応用手段が従来専ら利用されてきた。即ち 1926 年 Blom^{3,4)} はこの試薬を用いる亜硝酸の定性試験について詳細に検討しヒドロキシルアミン及び硝酸塩にも及ぼしたが、引続いて Endress,^{10,11)} Novak, Wilson,¹⁹⁾ Csaky,⁷⁾ 近藤・秋田,¹⁴⁾ 江上等,⁹⁾ 大村,²⁰⁾ 山藤・秋

田,⁴³⁾ 秋田,¹⁾ 山田,³⁴⁾ 箴島²¹⁾ の諸氏等によつて多年に亘つて更に検討、改良及び拡張され、Virtanen,²⁹⁾ Wikon,³¹⁾ 谷口等,²⁵⁾ Nason¹⁷⁾ 等の無機窒素代謝に関する優れた研究もこれ等の方法を利用して遂行されたものであつて、多くの新知見が明らかにされたが、測定法そのものは未だ研究上の要求を完全にみたすには至っていない。

我々も上述のように無機窒素及びオキシム代謝について特にこれ等とバイラスの関係を中心とする研究から発して種々発展させてきたが、測定法も必要に応じて適宜改良ないし補足した。特に研究の初期に於ては Duboscq 比色計による直視比較によつて比色測定したが、^{14,20)} その後光電比色計或は分光光度計の発達普及に伴つてこれ等を利用し得るようになったので視覚誤差が避けられ、又測定の精度も更に向上した。しかも標準曲線を調製すれば Duboscq 比色計の場合のように測定のたびに標準液を作つて比較の基準とする煩雑さからも免れることが出来る。それと共に標準曲線から試料中の含量を吸光度の函数として求める計算式も算出することが出来た。これまで我々が報告した測定法に関するものは一部を除いて Duboscq 比色計による初期のものにとどまつているが、その後の補足及び改良したものは専ら日立光電比色計 EPO-A 型及び日立分光光度計 EPU-2 型を用いて行なつたものであつて、測定は総て 10 mm のセルを利用した。ここに取纏めて報告するとともに若干の考察を加えた。

実 験

A. 硝 酸 塩

一般に NO_3^- の比色定量に用いる呈色試薬としては

フェノールジスルホン酸、ブルシンないしキシレン-1-ol 等が推奨されており、それぞれ 5~100 r, 10~100 r, 2~20 r NO₂-N の範囲で測定出来ると記載されている。¹⁰⁾ Dittrich⁹⁾ は植物組織中の NO₂ の検出にジフェニルアミン・硫酸反応を用い、更に Burrell, Philips⁶⁾ により報告されたフェノールジスルホン酸反応を多少改良して NO₂ の定量を企てたが、同氏の目的には十分には合致しなかつたので最終的にはデバルダ合金を用いて NH₃ に還元してこれを測定する方法を利用した。Blom⁵⁾ は Griess 試薬による NO₂ の呈色反応を NH₂OH だけでなく NO₂ の検出にも利用しようと試みた。この場合は NH₂OH に対する酸化とは逆に NO₂ を NO₃ に還元して発色させるものであつて還元剤の選択が問題となるが、Blom は亜鉛小片ないし粉末を加えて生ずる水素ガスを利用した。即ち試料に NO₂ が混在しない場合 Griess 試薬を加え、更に亜鉛を加えるとガス発生に伴つて NO₂ は NO₃ に還元され試薬と反応して特有の赤い色を徐々に現わす。Blom は本法により 1mg/ml までは確実に検出出来ると報告した。しかしこのようにして生じたアゾ色素は亜鉛及び試薬の溶媒として用いた醋酸のために引続いて還元されるので 0.1 mg/l まで検出した Hahn の方法よりは感度が低いことを認めた。Endress¹¹⁾ は Blom の報告に基いてジアゾ反応を定量に利用した際 NO₂ のみはブルシンを用い試料 5ml 中 2~14 r NO₂-N が測定出来ることを報告した。しかし何れの場合にも NO₂ が混在すれば同様の色を呈するので予め NO₂ を除くか NO₂ と NO₃ との量として求め、他の方法で NO₂ の量だけを求めて控除する補正操作が必要となる。しかしこれ等の試薬による NO₂ と NO₃ との感度については何等の検討も行なわれていない。

無機窒素代謝に関する我々の研究に於て各中間体の測定に試薬が共用出来れば甚だ好都合である。これまで用いてきた方法の中心となるものは Griess 試薬であるので、特に定量を目的として Blom の報告を追試したが、還元条件が安定しないために呈色率も一定せず定量には全く使用出来なかつた。しかも NO₂ は NO₃ の約 1000 倍の高い呈色度を示すので NO₂ が混在する場合、後述するような NO₂ 除去操作を行なつたとしても、若し痕跡程度でも残存すればそれによる発色はかなりの量の NO₃ に相当するわけで、NO₂ の混在を常に考慮しなければならぬ我々の研究には到底使用出来ない。Endress が NO₂ にだけ Griess 試薬を避けてブルシンを利用したのも同様の理由に基づくもの

と推定される。そのため他の試薬ないし方法を用いる必要があるが、微量の NO₂ を測定しなければならないので矢張り比色法を用いることが望ましい。Dittrich に従つてジフェニルアミン・硫酸反応、Endress に従つてブルシン法を検討したが Griess 試薬ほどではないが何れも不十分であつたので、最後にキシレノール法を検討し現段階では最も良く一応使用出来ることを明らかにした。

山田¹⁰⁾ は Holler, Huch¹⁰⁾ の 3,4-キシレノール法を説明している。本法は試料を蒸発乾酒後 2% 3,4-キシレノールアセトン溶液 1ml と 85% H₂SO₄ 15ml とを添加混合して反応させた後、100ml の蒸溜フラスコ中に洗い込み蒸溜して 5ml の 2% NaOH 中に溜出させ溜出液の呈した黄色を比色するものであるが、蒸発乾酒と蒸溜操作とを合むため酵素反応のように多くの試料を測定するには適当しない。しかも初めの液量はやや少ないが蒸溜を完全に行なうためには 70 ないし 80ml の溜出を要するので最終溶液は通常 100ml としている。こうして 100 ないし 600 r の NO₂ が測定可能範囲であるといわれているが、比色には 4ml で十分であるので蒸溜操作のために呈色液は過度に稀釈されていることになるわけで、若しこの点を改良出来れば測定可能限界も更に低くなる筈である。

これに対して Buckett⁹⁾ は蒸溜の代りにトルエンで抽出し NaOH に転溶する方法を確立した。即ち土壤の NO₂ を測定するために 10% 醋酸による土壤抽出液 5ml に 1% 2,4-キシレノール 1ml 及び 85% H₂SO₄ 15ml を加えて 34°C に 30 分反応させる。次いで分液漏斗中でトルエン 10ml と振盪、更にトルエン層を蒸溜水で洗つた後 0.4N NaOH 10ml と混合してアルカリ層に移し生じた黄色の強さについて青色フィルターを用いて吸光度を求めた。こうして 5~50 r NO₂-N について十分測定出来た。本法はさきに指摘したように蒸発乾酒及び蒸溜操作を用いず、しかも最終液量は NaOH の添加量によつて調節され途中で加える試薬等の容量は色の強さには殆ど影響しないので Holler, Huch のものよりはすぐれているように思われる。

試 薬

(1) 2,4-キシレノール溶液：1g 2,4-キシレノールを 100ml 氷醋酸に溶かす。

Holler, Huch は 3,4-キシレノールをアセトンに 2% に溶かしたが Buckett 等は 2,4-キシレノールを氷醋酸に溶かした。3,4- 及び 2,4- 両異性体については

特別に記載はないが、恐らく特別に顕著な相違はないと思われる。また溶媒についても同様に考えられるが Buckett 等は試料が土壤の醋酸抽出液であるので水醋酸を用いたものと推定される。我々の場合に於ても本測定法は主として酵素反応に利用し、その際通常水醋酸または醋酸ウラニウムによつて除蛋白しているので Buckett 等に従つた。

(2) 85% H₂SO₄：市販一級試薬（比重 1.84）46.2 ml を水 15 ml と混合した。

(3) トルエン：市販一級試薬をそのまま使用した。

(4) 0.4 N NaOH：3.2g を水に溶かし 200ml とする。

(5) 尿素：10g を水に溶かし 100 ml とする。

方 法

後述するような諸検討に基いて Buckett 等の方法を改め最終的には次のように行つた。

試料 5 ml に 85% H₂SO₄ 15 ml を加え冷却後 1% 2,4-キシレノールを 1 ml 添加する。室温で 30 分放置後 200 ml 容分液漏斗に蒸留水で洗い込み最終液量を 100~150 ml にする。トルエン 10 ml を加えて十分に振盪後静置して 2 層に分ける。水層を除きトルエン層だけを残す。水 50 ml を加えて再び振盪してトルエン層を洗い静置後水層を除く。この洗滌操作を更に一回繰り返す。次に 0.4 N NaOH 5 ml を加え分液漏斗を静かに 2~3 回反転して両層を接触させるとアルカリ層は黄色を呈する。これを分離し分光光度計を用いて 410 mμ でその吸光度を求める。こうして種々の濃度の NaNO₂ 溶液について吸光度と濃度との関係を求め第 1 図に示す。NaNO₂ の濃度 5×10⁻⁵ より 2×10⁻⁴M に亘つて吸光度は直線関係を示すことが認められたが、分光光度計の目盛の精度からは 10⁻⁵M 程度までに限定することが望ましい。更に、この直線から試料 5 ml 中に含まれる NO₂-N を求める計算式 (a) が得られた。

$$\text{NO}_2\text{-N } \mu = 21.3 \text{ E} - 2.13 \dots\dots\dots(a)$$

試料の除蛋白が不十分な場合にはトルエンと NaOH との振盪によつて発泡し、アルカリ層は濁りを生じて吸光度の測定を妨害するが、我々の酵素反応の場合 10 ml 反応液に 0.1 ml 水醋酸を加えて加熱するか醋酸ウラニウムで除蛋白し遠心分離する程度で差支えなかつた。また烈しく振盪すると乳化し呈色液に濁りを生ずるので特に注意しなければならない。Buckett 等の原報によるとおだやかに振盪すべきであり、もし乳化して 1 時間以上も静置して透明にならない場合は濾化

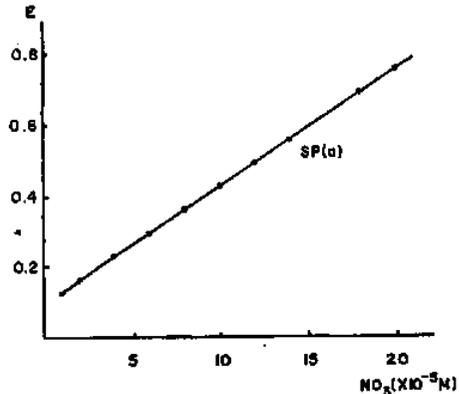


Fig. 1. Standard curve of NO₂.

SP(a)：Color intensity was estimated by the spectrophotometer (at 410 mμ) and the relation obtained corresponds to the equation (a).

している。しかしアルカリへの転溶は甚だ容易であつて、分液漏斗を数回静かに反転する程度の混合で十分であつた。

NO₂ の除去

比色法による NO₂ の測定では NO₂ も同様に呈色する場合が多い。2,4-キシレノールでも同様であつて NO₂ の NO₃ への自動酸化のためか類似の黄色を呈す。そのためには先に述べたように (NO₂+NO₃) 量を求め Griess 試薬等他の方法によつて求めた NO₂ 量を控除するか、或は夾雑する NO₂ を測定に先立つて除去しなければならない。一般に NO₂ と NO₃ との呈色率は異なり、特に 2,4-キシレノールでは NO₂ による呈色は定量的でもないので前者は好ましくない。我々は²⁰⁾ 動植物組織中のオキシム 含量の測定に際しては H₂SO₄ と尿素とを用いたが、0.02 N H₂SO₄、3% 尿素の場合 10⁻⁵ M NO₂ は 30°C 1.5 時間を要した。また Blom²¹⁾ は H₂SO₄ 尿素併用のほかにスルファニル酸と NO₂ とから生じた P-ジアゾベンゼンスルホン酸を数分間煮沸して破壊する方法も試みた。この場合、スルファニル酸を加えなければならない上に処理液は黄色を呈した。しかも我々が試みた範囲では十分な効果は期待されなかつた。また Endress はアザイドの使用を記載し Holler, Huch はキシレノール添加前に試料に数滴の 20% アミノスルホン酸を加えて加熱し NO₂ を N₂ として除いた。しかし、この場合は NO₂ 破壊後 NaOH で改めて中和し殆ど乾涸するまで加熱を続けなければならない。これに対して Buckett 等は

Table 1. Removing of nitrite.

Temperature, (°C)		60			70		100	
Time, (min.)		10	20	30	10	20	5	10
Griess reagent	-log T	ppt	0.730	0.015	0.331	0.017	0.105	0.010
	Conc. of NO ₂ ,* 10 ⁻⁵ M	10	2.5	0.02	1.1	0.02	0.35	0.01
Xylenol reagent	-log T	0.632	—	0	0.098	0	0.053	0
	Conc. of NO ₂ ,* 10 ⁻⁵ M	16.1	—	0	trace	0	trace	0

* Concentration refers to the one of NO₂ or NO₃ corresponding to -log T.
The values were obtained from the standard curves.

A mixture of 5 ml of 10⁻³ M NaNO₂, 1 ml of glacial acetic acid and 1 ml of 10% urea solution was heated under the conditions indicated. The solutions were allowed to develop the color with Griess' reagent for NO₂ or with xylenol reagent for NO₃. Then -log T of the colored solutions was estimated.

試料が醋酸抽出液であるので、その 5 ml に 10% 尿素溶液 0.5 ml を加え 60°C に 2~3 分加熱して NO₂ を除去した。我々の場合も反応除蛋白液は醋酸溶液であるので本法による破壊手段を探ることとし、その条件を追試した。

10⁻³M NaNO₂ 5 ml に氷醋酸 1 ml 及び 10% 尿素溶液 1 ml を加え、種々の温度で加熱し冷却後 Griess 試薬及び 2,4-キシレノールによる NO₂ 及び NO₃ 呈色操作を行ない、その吸光度を測定した。

10⁻³M という異常に高い NO₂ 濃度は我々の場合、勿論例外的なものであるが、少なくともこの場合 60°C 2~3 分という原報の条件は甚だ不十分なことは第 1 表から明らかである。60°C 30 分、70°C 20 分或は 100°C 10 分加熱した場合にはキシレノール法によつては全く呈色しなくなるまで分解されたが、60°C 10 分ではかなりの呈色が認められた。また 70°C 10 分或は 100°C 5 分でも若干発色したが殆ど影響はない。しかし NO₂ に特異的であり、かつキシレノールよりも鋭敏な Griess 試薬によるとかなりの量の NO₂ が残っている。70°C 20 分或は 100°C 10 分でも多少の発色が認められたが残存率は 0.01% に過ぎず、またその吸光度に対応する NO₂ 量も勿論問題とするには及ばない。これは上述のように我々が使用する場合に比べると異常に高い NO₂ 含量であるので、更に温和な条件でも差支えないが我々は 100°C 10 分の条件を用いることとした。

このように呈色に先立つて尿素処理を行なうので検液に加えられた尿素が NO₂ の発色に影響するか否かを確かめなければならない。10⁻³M NaNO₂ 5 ml, 氷醋

酸 1 ml に種々の濃度の尿素水溶液各 1 ml を加えた混液を 100°C 10 分加熱後常法に従い発色させ、その吸光度を測定した。

Table 2. Effect of urea on the coloration.

Conc. of urea added, (%)	0	10	20	30
-log T	0.130	0.130	0.129	0.129

A mixture of 5 ml of 10⁻⁵ M NaNO₂, 1 ml of glacial acetic acid and 1 ml of urea solution of various concentrations indicated was allowed to develop the color by the usual procedure.

30% の尿素を用いても呈色には影響しないことが第 2 表から認められた。従つて NO₂ の除去に用いる 10% 尿素溶液でも勿論影響なく、より多量の尿素を使用し得る余地を残している。

NO₂ が混在する場合に行ない得る他の方法として NO₃ を NO₂ に還元するか、或は逆に NO₂ を NO₃ に酸化させた後に呈色させて両者の量を求め、別の方法で得た一方の値を控除して他方の量を得ることが出来る。このうち前者については既に述べたように NO₃ の NO₂ への定量的な還元が困難であり、しかも引続き変化を受けるため特異的な還元剤が得られない限り不可能である。これに対して後者については Buckett 等が同時に試験してかなりの好結果を得ている。勿論、このためには強力な酸化剤が必要であり、しかも 2,4-キシレノールを加える前に過剰の酸化剤を除かなければならない。彼等によると過酸化水素が有効であつたが、この場合に必要濃硫酸の存在下に過酸化水素を

除く操作は同時に NO_2 の損失も来した。我々も先にブルシン法を検討した際、過酸化水素で NO_2 を酸化し蒸発乾燥して過剰の酸化剤を除く方法を試みたが、同様に定量的な結果は得られなかつた。しかし Buckett 等はむしろ KMnO_4 がより有効なことを見出した。即ち 10% 醋酸に溶かした試料 5 ml と 0.1 N KMnO_4 溶液 1 ml とを 85% H_2SO_4 2 ml と混合し、60°C に 2 分間加熱した後 0.1 N 醋酸で過剰の KMnO_4 を除く。次いで 13 ml H_2SO_4 と 1 ml 2,4-キシレノールとを加え以下常法に従つて発色させた。こうして Buckett 等は試料 5 ml 中 10 ないし 40 r NO_2 、或は 5 ないし 20 r 宛の NO_2 及び NO を含むものについて定量することが出来た。本法も勿論有効な方法であると思われるが、第 1 表に示したように Griess 試薬による NO_2 の呈色度はキシレノールのものよりも若しく高く、またかなり烈しい酸化処理は窒素化合物の損失を来すおそれもあるので、尿素による温和な NO_2 除去法が望ましい。

NH_2OH の影響

無機窒素代謝の中間体として混在する可能性のあるものは NO_2 のほかに N_2O_2 及び NH_2OH であるが、 N_2O_2 は後述するように極めて不安定であつて殆ど検出されない。従つて NH_2OH が混在する場合について試験した。10⁻⁵M NaNO_2 5 ml, 10⁻⁹M $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 1 ml の混液に 10% 尿素液 1 ml を加え、そのまま或は 100°C 10 分処理後常法により発色させた。

Table 3. Effect of NH_2OH on the coloration.

Heating, 100°C 10 min.	+	-
-log T	0.128	0.138

A mixture of 5-ml of 10⁻⁵ M NaNO_2 , 1 ml of 10⁻⁹ M $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ and 1 ml of 10% urea was allowed to develop the color after heating at 100°C for 10 min. or without heating.

加熱処理をしない場合、吸光度は多少大きく現われた。これは恐らく操作中に NH_2OH が自動的に酸化されることに基づくものと思われる。しかしながら試験した NH_2OH は異常に高い濃度であつて 10⁻⁵M 以下という通常の状態では殆ど影響しないと云つてよい。100°C 10 分加熱すれば全く影響なく、従つて常に NO_2 除去操作を行なうと NH_2OH の影響も全く考慮する必要はない。

反応温度

Buckett 等は試薬添加後 34°C に 30 分間反応させ

た。この温度が重要な因子をなしているか否かについては説明がないが、厳密な温度保持を要するならば甚だ面倒である。10⁻⁵ M NaNO_2 5 ml について常法通り発色させたが、この場合試薬添加後 35°C の恒温器、室温 (22°C) 及び冷水 (17°C) 中にそれぞれ 30 分間放置した。こうして第 4 表に示すように試薬との反応温度は厳密である必要はなく、少なくとも 17°C 以上で一定であり室温で差しつかえないことが認められた。

Table 4. Effect of temperature on the coloration.

Temperature, (°C)	35*	22 †	17 ‡
-log T	0.130	0.133	0.130

* Thermostatt, † Room temperature, ‡ Water.

Five ml of 10⁻⁵ M NaNO_2 was mixed with 15 ml of 85% H_2SO_4 and 1 ml of 2,4-xenolol. The mixture was maintained for 30 min. at 35°, 22° or 17°C respectively. Then the color was estimated by the usual procedure.

抽出 NaOH

トルエン層から NaOH 層に転溶するとアルカリで黄色を生ずる。この色の強さがアルカリの濃度に支配されるか否かを最後に試験した。即ち 10⁻⁵ M NaNO_2 5 ml を常法により処理し、種々の濃度の NaOH 及び水それぞれ 5 ml にトルエン層から転溶させてその吸光度を測定した。

Table 5. Effect of concentration of NaOH on the coloration.

Final conc. of NaOH, N	0*	0.4	0.5	1.0
-log T	0	0.130	0.132	0.128

* H_2O

Five ml of 10⁻⁵ M NaNO_2 were allowed to develop the color by the usual procedure except that various final concentrations of NaOH were employed.

こうして水の場合は全く発色しなかつたが、0.4 N ないし 1 N NaOH では影響なかつた。

酵素, DPN, 緩衝液の影響

上記方法が実際酵素試験に適用出来るか否かを確かめるために酵素反応液を調製して試験した。酵素液 (3.25 mg 蛋白/ml) 2~5 ml, 磷酸またはトリス緩衝液 (M/5, pH 7.5) 1 ml, DPN (2 mg/ml) 1 ml, NaNO_2 0.5 ml, NaNO_3 3 ml, 全量 10 ml の反応液を 100°C

Table 6. Application of the method to the enzyme reaction.

Sample	1	2	3	4	5	6
Enzyme, (ml)	—	—	2.0	5.0	2.0	2.0
Phosphate buffer, (ml)	—	—	1.0	1.0	1.0	—
Tris buffer, (ml)	—	—	—	—	—	1.0
DPN (mg/ml), (ml)	—	—	1.0	1.0	1.0	1.0
Final conc. of NaNO ₂ , 10 ⁻⁵ M	—	50.0	—	—	50.0	50.0
Final conc. of NaNO ₃ , 10 ⁻⁵ M	7.5	7.5	2.0	7.5	7.5	7.5
-log T estimated	0.350	0.345	0.159	0.348	0.350	0.342
Conc. of NO ₃ estimated, 10 ⁻⁵ M	7.6	7.4	1.9	7.5	7.6	7.3

Total volume 10 ml. Enzyme: 3.25mg Protein-N/ml.

Reaction mixture was heated at 100°C for 5 min, and centrifuged after adding 0.1 ml of glacial acetic acid. Five ml of supernatant were developed the color by usual procedure after removing NO₂ by urea-heating method.

5分間煮沸し、水醃 0.1 ml を加えて遠沈して除蛋白した上澄液 5 ml について、10% 尿素 1 ml を加えて 100°C 10 分加熱分解後常法に従つて NO₂ 濃度を測定した。

酵素液、DPN、緩衝液を加えた反応液でも NO₂ 夾雑の有無に拘らず NO₃ 溶液のもと殆ど相違がないことが見られる。しかも酵素の量も使用した範囲内では影響なく、また緩衝液も問題ないことが認められ、本法は十分に利用出来ることを示した。

B. 亜硝酸塩

ジアゾ反応は NO₂ の特異的でしかも非常に鋭敏な呈色反応であつて、その検出及び微量定量に於ては精度、特異性、簡便さ等で、これに勝るものは見出されておらず、現在でも専らこの方法が利用されている。

1926年 Blom⁹⁾ がこれを詳細に検討して Griess 試薬が最も好ましいことを確め、1 l 中 0.001 mg の NO₂ まで十分に検出し得ることを報告した。引続いて Endress¹¹⁾ は 1937 年に、これを定量に用いるための諸条件を試験しプルフリッヒ比色計、緑色フィルター S53 を用いた場合、吸光度は Lambert-Beer の法則に従つて溶液の色の強さ、若くは NO₂ 含量と直線関係を示し試料 10 ml 中 1.4r NO₂-N まで十分に測定出来ることを確めた。江上や Nason 等も本質的には本法をそのまま使用して硝酸還元酵素に関する研究を發展させた。我々も Blom や Endress の報告に準拠して Griess 試薬を利用したが、特に酵素反応に用いるための補足実験を行つた。即ち近藤・秋田¹⁴⁾ は本試薬によつて NO₂ の呈する赤色の強さは発色後 5 分ないし 20 分は一定であることを認め、また我々²⁰⁾ は特

に緩衝液の影響について試験し、更に NO₂ の 40°C 24 時間及び 100°C 10 分間の安定性をも試験した。しかし、これ等の場合既に述べたように Duboscq 比色計による比色実験であつて、標準としては 2×10⁻⁵M NaNO₂ 溶液を用いた。その後、日立光電比色計 EPO-A 型及び分光光度計 EPU-2 型が購入されたので、これに対する標準曲線を作製した。測定には勿論単一波長で行なう後者が最もよいが、使用の簡便なことから前者も屢々利用した。

試 薬

Blom は多数のアゾ色素を調製試験してその効果を検討した結果 Griess-Illosvay 試薬、即ちスルファニル酸と α-ナフチルアミンを選び Endress その他も継承利用しているが、スルファニルアミドと N¹-(1-ナフチル)エチレンジアミン塩酸、或はジメチル-α-ナフチルアミン等も用いられている。¹⁶⁾ 更に試薬の調製法にも若干の差異はあるが本質的なものではなく、我々は Blom に従い下記要領で調製した。

(1) スルファニル酸溶液：10 g のスルファニル酸を 750 ml の加熱蒸溜水に溶かし冷却後 250 ml の氷醋酸を添加した。(註。Blom は 30% 醋酸溶液とした醋酸ソーダを加えた報告もある¹⁹⁾)

(2) α-ナフチルアミン溶液：4 g の α-ナフチルアミンを 1 l の加熱蒸溜水に加え、更に 2~3 分間沸騰させる。溶液を温いうちに速やかに濾過し冷却後濃 HCl 1 ml を加え褐色瓶に保存する。Blom, Endress は氷醋酸を用いているが HCl で差支えない。試薬は完全には溶けず一部は油状に浮遊するが、そのまま濾過する。また濾過後冷却すると白濁するが酸の添加によつて透明となる。

測 定

両試薬を添加すれば NO_2 溶液は赤色を呈する。使用直前に 1:1 の割合に混合して添加する場合もあるが、我々は別々に加えた。即ち NO_2 含有試料 10 ml にスルフェニル酸、引続いて α -ナフチルアミン溶液をそれぞれ 1 ml 宛添加、よく混合した後室温に放置し 5 分ないし 20 分後に色の強さを測定した。

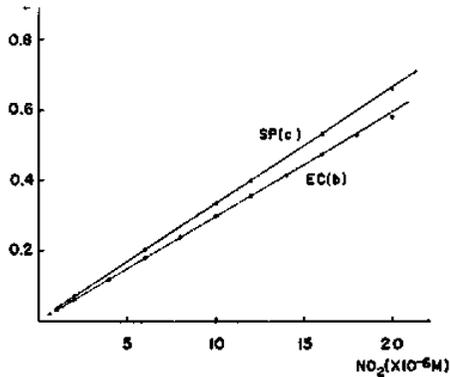


Fig. 2. Standard curves of NO_2 .

EC(b): Color intensity was estimated by the electric colorimeter (green filter) and the relation obtained corresponds to the equation (b).

SP(c): Color intensity was estimated by the spectrophotometer (at 525 $m\mu$) and the relation obtained corresponds to the equation (c).

光電比色計の場合緑色フィルターを用いる。日立 EPO-A 型には液層の厚さ 3 mm, 10 mm, 25 mm の 3 種のセルがあるが、最もよく利用されるものは 10 mm のものであつて我々も通常これを用いた。Endress は試料 10 ml に 2 ml 宛の試薬を添加し Pulfrich 比色計、液層 30 mm のセルを用いているが、我々の場合 Duboscq 計を用いた初期の研究から引続いて上記条件で支障はなかつた。こうして種々の濃度の NaNO_2 溶液で求めた標準曲線を第 2 図に示すが、 10^{-7} ないし $2 \times 10^{-5} \text{M}$ 以上に亘つて試料の NO_2 濃度と吸光度とは直線関係にあることが示される。また試料中の N 含量を吸光値から計算する式 (b) は次の通りであつた。

$$\text{NO}_2\text{-N} r = 4.9 \text{E} - 0.05 \dots\dots\dots(b)$$

Duboscq 比色計による直視比較の場合 $2 \times 10^{-5} \text{M}$ 程度の NO_2 で発色した色調が最も測定し易いため、比色の標準にはこの濃度のもを使用したが、更に濃度が高いと直線関係から逸脱し、また色素が沈澱として析出するために Endress は $2 \times 10^{-5} \text{M}$ より高い濃

度で用いてはならないと注意している。しかし我々の比色計では特にその吸光度目盛の精度から 10^{-5}M 程度に限定することが望ましい。そのため反応液については予めその一部について予備的に発色させて試験した後、適当に稀釈して用いた。液層 30 mm のセルを使用した Endress の場合のように 25 mm の大セルを用いるとすれば、更に濃度を低くしなければならないが、その反面溶液の量を多くする必要があり、酵素試験等に通常用いている反応液の量では不足する。一方 3 mm の小セルでは逆に液量は少量で足りるが NO_2 濃度を高くする必要を生じ、これに伴つて直線関係の上限を越え、或は色素沈澱を生ずるので使用出来ない。

これに対して単波長の分光光度計を用いるのが最も好ましいのは当然であつて、525 $m\mu$ で液層 10 mm のセルを用いて測定した。その吸光度と濃度との関係を同じく第 2 図に示すが、光電比色計に比べて更に精度も高く正しく直線関係を示した。このことは、吸光値から N 含量を求める計算式 (c) から明らかである。

$$\text{NO}_2\text{-N} r = 4.2 \text{E} \dots\dots\dots(c)$$

C. 次亜硝酸

NO_3 から NH_3 に至る還元反応系に於て NO_2 及び NH_2OH が中間体であることは既に確められている。ここで各段階の反応系での N 原子の酸化レベルを検討し、且つ NO_3 が 2 電子階程に NH_3 に還元されると考えると、N の酸化状態 +3 の NO_3 と -1 の NH_2OH との間には +1 の中間体が存在するわけで、これは N_2O_2 であると推定されていた。しかしこれは極めて不安定なために明瞭な証明は得られず、谷口等²⁷⁾ は彼等の酵素系では反応に関与しないと報告したが、Medina, Nicholas¹⁶⁾ は Neurospora に N_2O_2 還元酵素が存在することを認め N_2O_2 から NH_3 の生成を確めた。我々⁴⁶⁾ も無機窒素循環系に於て N_2O_2 が他の中間体と同様に NO_3 還元系に於ける DPNH からの電子受容体、 NH_3 酸化系に於ける DPN への供与体として作用し、これに伴つて前者では NH_2OH 及び NH_3 、後者では NO_2 及び NO を生ずることを明らかにした。更に特異的酵素阻害剤を用いて反応液中に N_2O_2 を集積させることにも成功し、反応系の中間体であることを確認した。^{21, 22)} このように N_2O_2 については漸く手掛りが得られたばかりであつて、その測定法についても殆ど知られていなかった。我々²¹⁾ は Griess 試薬を

用いる方法を検討し Medina, Nicholas のようにヨードで酸化する場合アルカリ性で行わねばならないことを明らかにし、 10^{-6} ないし $10^{-5}M$ に亘る微量定量法を確立して既に報告したが、更に多少の補足を行なつた。

試 薬

(1) スルファニル酸ソーダ溶液：スルファニル酸 1g を熱水 80 ml に溶かし NaOH で中和した後 100 ml とする。

(2) α -ナフチルアミン溶液： NO_2 の項のものと同じ。

(3) ヨード溶液：1.3g のヨードをヨード加里 2g と水 5 ml との溶液に加えて溶解後水で 100 ml とする。

(4) チオ硫酸ソーダ溶液：0.1 N, 2.5g チオ硫酸ソーダを水に溶かし 100 ml とする。

(5) NaOH 溶液：0.5 N 水溶液。

(6) 醋酸溶液：30% 水溶液。

(7) HCl 溶液：0.5 N 水溶液。

測 定

試料 10 ml にスルファニル酸ソーダ 1 ml, ヨード溶液 0.3 ml, 0.5 N NaOH 0.15 ml を加えて混合し 30 分間放置後、30% 醋酸 1 ml 及び 0.5 N HCl 0.15 ml を加えて酸性にもどし、更にチオ硫酸ソーダで過剰のヨードを除き、最後に α -ナフチルアミン 1 ml を加えて発色、15 ないし 20 分後光電比色計（緑色フィルター）または分光光度計（525 m μ ）でその赤色の強さを測定する。こうして種々の濃度で求めた標準曲線を

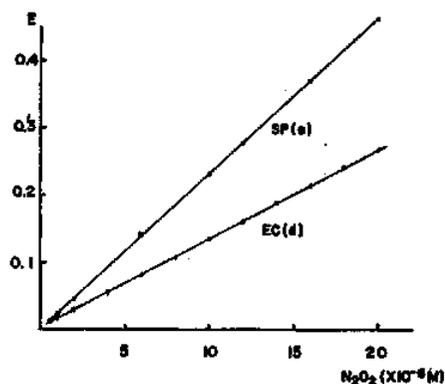


Fig. 3. Standard curves of N_2O_2 .

EC(d): The same with Fig. 2, but the equation (d).

SP(e): The same with Fig. 2, but the equation (e).

第3図、吸光値Eから試料 10 ml 中の N_2O_2 -N 量を求める計算式を (d) 及び (e) で示す。

$$N_2O_2-N \tau = 21E - 0.06 \dots \dots \dots (d) \text{ [光電比色計]}$$

$$N_2O_2-N \tau = 12.12E \dots \dots \dots (e) \text{ [分光光度計]}$$

ここで N_2O_2 は非常に不安定であつて、中性室温に於ても著しく分解されることに常に留意しなければならない。

また上記方法は元来 NH_2OH ならびにオキシムの測定法であるので NO_2 , NH_2OH 及びオキシムが混在すれば、これ等も勿論同様に発色する。しかしこの場合 N_2O_2 は熱処理によつて完全に分解されるので、 $100^\circ C$ 5 分間加熱した試料の呈色値を未処理試料の呈色値から控除すれば N_2O_2 に相当する値が得られる。

D. ヒドロキシルアミン

NH_2OH の定量については $10^{-3}M$ 程度の濃度の場合には滴定法も可能であつて秋田¹⁾はオキシムの生成速度の研究に利用し、我々も不成功に終つたがオキシム加水分解酵素の検索に用いた。しかし周知のように木アミンは特にカタラーゼを強く阻害する生物毒であり、またかなり不安定な物質であつて特にカルボニル化合物と極めて容易に結合してオキシムを形成するが、何れにしても生物組織中の木物質の含量は遊離のものとは勿論結合型ですら著しく低く、従つてその測定には更に鋭敏な比色法を用いなければならない。

NH_2OH の比色法についてはニトロプルシッドソーダ (100 mg/l), ベンジルクロライド・ $FeCl_2$ (5 mg/l), ジアセチルモノオキシム・ニッケル (2 mg/l), Ball 反応 (2 mg/l), $MnS \cdot Ball$ 反応 (0.47 mg/l), ニトロベンゾール・フェノール (0.1 mg/l) 等の諸反応が知られていたが、Blom²⁾はヨードによる NO_2 への酸化を組合わせて Griess 試薬によるジアゾ反応を検討し 0.01 mg/l までは確実に検出、その上に練習すれば 0.003 mg/l までは可能であると報告した。Endress³⁾は NO_2 の場合と同様に Blom の報告に基づいて Pulfrich 比色計, S 53 のフィルターを用いた場合 10 ml 当り 0.1~0.2 τ までは数%の誤差限界で十分測定出来る条件を確立し Wilson 等⁴⁾もこれを踏襲した。近藤・秋田⁵⁾は特にヨード酸化の条件を検討し、スルファニル酸醋酸液の存在下に室温 10 分で十分なことを報告した。しかし我々²⁰⁾は酵素反応に利用するために NO_2 の場合と同じ諸条件を試験し、上記酸化条件は特に温度の低い冬には不十分であつて加熱することが望ましいことを認め、その条件として近藤・秋田がアセトオキ

シムについて定めた 90°C 45 秒の加熱酸化で十分であった。更に、この原理はオキシムの定量法にも利用し得ることは後述する通りであつて若干の方法が提案されているが、これ等の何れの場合にも NH_2OH も勿論発色するためこれを控除しなければならない。従つてその各々の場合についても、一応本アミンの呈色を試験し補正の参考に供した。

(I) 酸性ヨード酸化法

Blom, Endress, 更に近藤・秋田によつて報告された方法であつて、醋酸酸性に於てスルフェニル酸の存在下に NH_2OH をヨードで NO_2 に酸化するものである。

試 薬

- (1) スルフェニル酸溶液： NO_2 のものに同じ。
- (2) α -ナフチルアミン溶液： NO_2 のものに同じ。
- (3) ヨード醋酸溶液：1.3 g ヨードを 100 ml の水醋酸に溶かす。
- (4) チオ硫酸ソーダ溶液： N_2O_2 のものに同じ。

測 定

試料 10 ml に 1 ml スルフェニル酸醋酸溶液及び 0.3 ml ヨード醋酸溶液を加え 90°C の熱湯に 45 秒浸漬して加熱酸化し、急冷後 0.3 ml チオ硫酸ソーダを滴加して過剰のヨードを除き、最後に 1 ml α -ナフチルアミンを加えて発色させる。温度が特に低くない場合には加熱することなく室温に 10 分間放置して酸化しても差支えない。以下 NO_2 の場合と同様に光電比色計、または分光光度計で赤色の強さを求める。第 4 図に示す標準曲線から 10^{-6} ないし $2 \times 10^{-5} \text{M}$ に亘つて直線関係が認められ、また分光光度計による場合が精度が高いことは NO_2 , N_2O_2 と同様であつた。一方吸光度から試料中の N 量を求める計算式は (f) 及び (g) で示される。

$$\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{N} r = 6.2 E + 0.05 \dots \dots \dots (f) \text{ [光電比色計]}$$

$$\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{N} r = 4.75 E \dots \dots \dots (g) \text{ [分光光度計]}$$

Endress は NH_2OH の場合にも 10 ml の試料に 2 ml スルフェニル酸、0.2 ml ヨード醋酸溶液、数滴のチオ硫酸ソーダ、2 ml α -ナフチルアミンを用い 30 mm セルで吸光度を測定しているが、我々の条件で十分である。何れにしても濃度と吸光度に直線関係が認められるならば、その範囲内で測定には支障なく実験に最も適した条件を採用すればよい。例えば Novak, Wilson¹⁹⁾ は 1~5 ml の試料にスルフェニル酸 (醋酸ソーダ含有)、0.5 ml ヨード醋酸溶液、1 ml α -ナフチルアミン、全量 9 ml とし、Csaky²⁰⁾ も同様の条件、全量 10

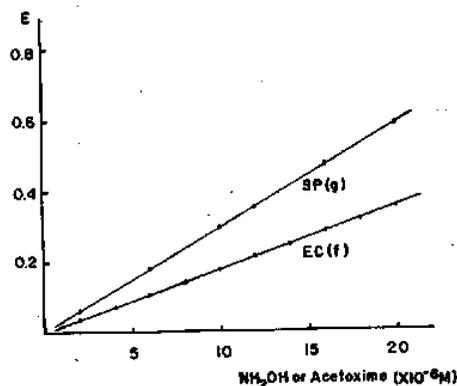


Fig. 4. Standard curves of NH_2OH and acetoxime by acidic iodine oxidation method.

EC(f): The same with Fig. 2, but the equation (f).

SP(g): The same with Fig. 2, but the equation (g).

ml で測定している。唯何れの場合にも呈色が NO_2 に基くアゾ色素であるため、供試液の濃度に関する制限も NO_2 の場合の注意がそのまま適用されるとともに比色計の目盛にも支配される。

酸化条件については Endress は室温 10~15 分、Novak, Wilson は 2 分間振盪、Csaky は 3~5 分間放置しているが、近藤・秋田は完全に酸化するためには少くも 10 分間は作用させなければならないことを指摘した。しかし冬季のように低温の場合にはこれでも不十分であつて加熱酸化することが望ましく、更に試料が酸性の場合に特に好ましいことは既に報告した通りである。また多量のヨード消費物質を含む家蚕組織のようなものが混在する場合には、室温での酸化は不十分であつて加熱によらなければならない。しかし、これとともにチオ硫酸ソーダによつて脱色されない黄色物質を生じ、Duboscq 比色計を用いる直視比較にはかなり影響を及ぼした。

光電比色計や分光光度計のような吸光度の測定によつて比色を行う場合には、溶液は透明でなければならないことは当然であつて、濁りを生ずる場合には吸光度は濃度を正しく表わすことは出来ない。Csaky は過剰のヨードを除くために用いるチオ硫酸ソーダは、醋酸メジウム中で濁りを生ずるために使用することは出来ないが、亜硫酸を用いればこれを避けることが出来ると報告している。しかし少なくとも我々が経験した限りではチオ硫酸ソーダで何等不都合は起こらなかつ

た。むしろ酵素反応に於ては除蛋白に注意しなければならない。中性付近で沈澱剤を加えて除蛋白した透明液について測定する場合は、スルファニル酸添加により液は酸性となり、再び沈澱を生ずることがあるので、除蛋白に際しては氷醋酸を加えて酸性とした後に沈澱剤を加えなければならない。

(II) アルカリ性ヨード酸化法

後述するよう秋田¹¹⁾はオキシム類がアルカリ性に於て、ヨードによつて直接酸化されて定量的に NO_2 を生ずる事実を利用してオキシムの定量法を確立した。しかしこの場合 NH_2OH も同様に発色し、また上述のように N_2O_2 も定量される。

試 薬

すべて N_2O_2 の項のものと同じ。

測 定

N_2O_2 の場合と全く同様に測定する。吸光度と濃度との関係を第5図に示し、またN含量を求める計算式は次の通りである。

$$\text{NH}_2\text{OH-N } \tau = 8.0 \text{ E} \cdots \cdots \text{(h)} \quad \text{〔光電比色計〕}$$

$$\text{NH}_2\text{OH-N } \tau = 5.6 \text{ E} \cdots \cdots \text{(i)} \quad \text{〔分光光度計〕}$$

ここで同一濃度の場合、酸性で酸化した方がアルカリ法よりも強く発色するようになると思われるが、試料 10 ml について呈色液の全量は前者で 12.6 ml、後者では 13.9 ml となつてゐることに基づくものと思われる。逆に後者の方が呈色した場合に稀釈されているために、前者の場合よりも多少高い濃度の試料まで測定さ

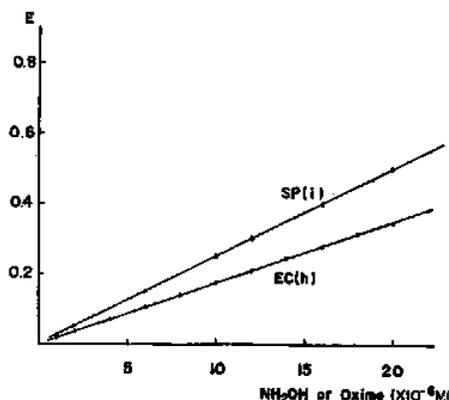


Fig. 5. Standard curves of NH_2OH and some oximes by alkaline iodine oxidation method.

EC(h): The same with Fig. 2, but the equation (h).

SP(i): The same with Fig. 2, but the equation (i).

れるということも出来る。

(III) 中性ヨード酸化法

NH_2OH もオキシム類も呈色度は異なるが Griess 試薬により同一条件で何れも発色するため、その分別定量は甚だ困難であつて正確な値は求められなかつた。

近藤・秋田¹⁴⁾はヨードで 90°C 45 秒加熱酸化すれば NH_2OH 及びアセトオキシムから定量的に NO_2 を生ずるが、室温で 10 分間作用させた場合は NH_2OH だけが完全に酸化され、アセトオキシムからは NO_2 を生じないので、両条件での発色値を求めることにより両者の分別測定が可能であるとした。しかし我々¹⁵⁾はピルビン酸や α -ケトグルタル酸オキシムは 90°C 45 秒でも僅かしか呈色せず、一方室温 10 分処理でアセトオキシムも 30% 程度発色するので、近藤・秋田の条件は不十分であることを認めた。その後、秋田¹¹⁾は更に詳細に検討し Rupp の滴定法と Blom のジアゾ法とを組合わせた定量法を確立した。即ちヨード酸化を中性付近で行わせると NH_2OH は比較的短時間に NO_2 に酸化されるが、オキシム類は殆ど酸化されないことを認め、これに基づいて定量条件を定めた。特に pH を中性付近に保つために比較的多量の醋酸ソーダを利用した。しかし、この場合 N_2O 、 NO 等の酸化呈色も免れないが、不安定なため測定に先立つて加熱分解すれば差支えない、また NO_2 の発色は当然起つた。

試 薬

- (1) スルファニル酸ソーダ溶液： N_2O_2 のものと同じ。
- (2) ヨード溶液： N_2O_2 のものと同じ。
- (3) 醋酸ソーダ溶液：1.5M 水溶液。
- (4) チオ硫酸ソーダ溶液： N_2O_2 のものと同じ。
- (5) HCl 溶液： N_2O_2 のものと同じ。(0.5N)
- (6) 醋酸溶液： N_2O_2 のものと同じ。(30%)
- (7) α -ナフチルアミン溶液： NO_2 のものと同じ。

測 定

醋酸ソーダ溶液 1 ml, スルファニル酸ソーダ溶液 1 ml, ヨード溶液 0.3 ml の混合液に試料 5 ml を加えて振盪混合した後、直ちにチオ硫酸ソーダ溶液 0.3 ml を加えて過剰のヨードを除き HCl 3 ml, 醋酸 1 ml, 最後に α -ナフチルアミン溶液 1 ml を加えて発色させ、以下同様に比色する。

第6図に示すように吸光度は $0.5 \sim 16 \times 10^{-6} \text{M}$ の範囲に於て NH_2OH の濃度に比例し、試料中の N 量は次の計算式から求められる。

$$\text{NH}_2\text{OH-N } \tau = 12.5 \text{ E} - 0.125 \cdots \cdots \text{(j)} \quad \text{〔光電比色計〕}$$

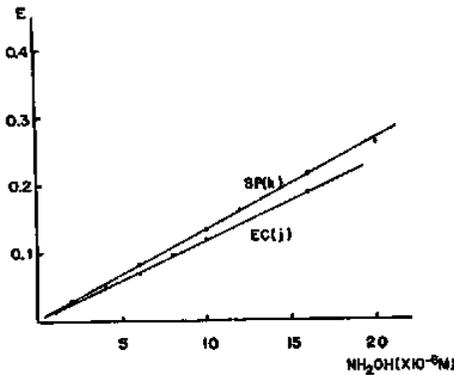


Fig. 6. Standard curves of NH_2OH by neutral iodine oxidation method.

EC(j): The same with Fig. 2, but the equation (j).

SP(k): The same with Fig. 2, but the equation (k).

$\text{NH}_2\text{OH-N} \tau = 10 E \dots \dots \dots (k)$ (分光光度計)

ただこの場合、試料 5 ml を用い発色液の全量は酸性法の場合と同容であるので、最終的には試料が 2 倍に希釈された形になり、それに応じて吸光値も低い。

(IV) 8-ヒドロキシキノリン法

これまで述べてきたヨード酸化法はジアゾ反応による NO_2 の呈色に基づいているため、 N_2O_2 及び NO_2 は勿論一部のオキシム類も発色する。しかもその呈色率はそれぞれ異なるため、その分別定量は甚だ困難であつて、特に微量測定の場合極めて厄介なものである。そのためには、それぞれに特有な微量定量法が用いられることが望ましいわけである。勿論 NO_2 はそのまま Griess 試薬により特異的に呈色する。一方 N_2O_2 は極めて不安定であつて、他の化合物が全く影響されないような温和な条件でも完全に分解することが出来るので比較的処理し易い。従つて NH_2OH について NO_2 に対する Griess 試薬のような特異的で、しかも鋭敏な呈色試薬が見出されるならば、種々の代謝中間体の混合液について分別定量する我々の目的は観ね達成される。Magee, Burris¹⁵⁾ は NH_2OH が 8-ヒドロキシキノリンと反応して緑色のインドキシンを生ずる反応を利用して定量に用いた。本法は NO_2 , N_2O_2 或はオキシム等によつては全く影響されないのを検討し、トリス緩衝液を用いることによつて呈色度を高めるとともに、色調を安定化することを見出し、 10^{-5}M 付近でやや困難であつた原法から 5×10^{-6} ないし 10^{-4}M の範囲で測定し得るように改良した。

試 薬

(1) トリス緩衝液: 0.2 M, pH 7.5.

(2) 8-ヒドロキシキノリン溶液: 1 g 8-ヒドロキシキノリンを 100 ml アルコールに溶解する。

(3) Na_2CO_3 溶液: 2N 水溶液。

測 定

試料 2 ml にトリス緩衝液 1 ml, 8-ヒドロキシキノリン溶液 1 ml 及び Na_2CO_3 溶液 1 ml を加え振盪混合し、 15°C 以上の室温に 60 分間放置した後、分光光度計により $700\text{m}\mu$ で吸光度を測定する。蛋白液については発色に先立つて常法に従い除蛋白する。

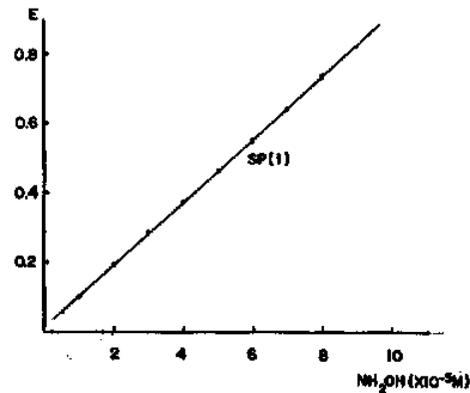


Fig. 7. Standard curve of NH_2OH by 8-hydroxyquinoline method.

SP(1): Color intensity was estimated by the spectrophotometer (at $700\text{m}\mu$) and the relation obtained corresponds to equation (1).

こうして NH_2OH 濃度 $5 \times 10^{-6} \sim 10^{-4}\text{M}$ に亘つて吸光度と正比例する関係を第 7 図に示し、また N 含量算出式を (1) に示す。

$\text{NH}_2\text{OH-N} \tau = 3.0 E - 0.02 \dots \dots \dots (1)$

ここでトリス緩衝液だけが呈色率を高め、しかもこの効果は他の緩衝液によつては影響されないこと、原報に使用された HCl は何等好結果を来さないこと、トリスの添加量は上記条件では 0.7 ml で最高になり、以後少くも 1.5 ml まで添加量を増しても変化しないこと、発色は 15°C から 30°C に亘つて一定であるが、 15°C 以下では呈色率を多少低下すること、色調は 45 分頃から 105 分まで安定し 120 分頃から僅かに褪色すること、酵素蛋白量は我々の肝臓酵素の場合 2 ml 中 300 τ 蛋白態-N までは全く影響しないこと及びヨード酸化法の欠点であつたオキシム、 N_2O_2 , NO_2 等は全く呈色せず、また $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ も影響しないこと等の特

性については既に報告した²⁰⁾

E. オキシム

NH_2OH は上述のように窒素代謝の中間体として生成されるが、その検出は甚だ困難である。Blom⁹⁾ は微生物の NO_3^- の還元の際に、反応液中にアセトンを加えて NH_2OH を捕え生成したアセトオキシムを蒸留して HCl 中に溜出し加熱加水分解した後、ヨード酸化法による NH_2OH 反応を試みて非常に強い陽性反応を示すことによつて NH_2OH の生成を証明した。また Endress¹⁰⁾ はアゾトバクターの培養液中に NH_2OH はオキシム等結合型のものとして含まれることを証明したが、この場合オキシムは醋酸^ナ性でヨードにより加熱酸化して NO_2^- を生ずることにより確められた。更に Virtanen 等²⁰⁾ は葎科植物による空中窒素の固定に関する詳細な研究に於て、その水耕液からオキザロ醋酸オキシムを分離したが、オキシム態 N は Endress 法により証明した。こうして空中窒素固定に関する NH_2OH 説を提出し、窒素代謝の研究に大きな刺激を与えた。 NH_2OH は生物毒であるがカルボニル化合物と極めて容易に結合するため、生体内では一般にオキシムとして存在することは Endress の報告でも明らかにされたところであるが、我々²⁰⁾ も種々の動植物組織に広く分布することを認めた。 NO_3^- 還元系だけではなく、土壤中で広く行なわれる NO_3^- 化成に於ても解毒のためのオキシム形成を含む反応機構を Quastel 等²²⁾ は主張したが、この場合 NO_2^- への酸化は彼等の発見したオキシム酸化酵素により行なわれる。我々の研究室に於てもバイラス生成との関連から、更にオキシム還元酵素ならびに転移酵素を証明し、生体内でのアミノ酸生成に関する知見が拡大された。このように無機窒素代謝に於ける中間体としての NH_2OH の役割が明らかにされるに従つてオキシムについても関心が広われ、更にまたオキシムに関する諸酵素の発見とともにオキシム代謝の概念を生むに至つたが、それに伴つてその定量法の確立も要求された。

Blom は上述のようにしてアセトオキシムを検出したが、Endress はアゾトバクター培養液中のオキシム濃度を測定するため、試料をヨード醋酸とともに加熱分解した後 NH_2OH の発色を行ない、既知濃度の NO_2^- の呈色液と比較した。しかし、この場合酸化条件については詳細には明らかにされておらず、オキシムの 1/6 が発色するものと仮定した。Novak, Wilson¹⁹⁾ は Endress 法の場合、オキザロ醋酸及び α -ケトグルタ

ル酸のオキシムはスルフェニル酸で加水分解した時のみ、ヨード酸化で呈色可能となることを報告した。こうして適当な濃度の試料 4 ml とスルフェニル酸 4 ml とを 15 分間沸騰水中で加熱した後生じた NH_2OH を常法により測定した。こうしてアセトオキシムは Endress 法では 22% が測定されたが、加水分解により更に 70% が回収された。また α -ケトグルタル酸オキシムの場合、その測定感度はアセトオキシムに劣るが、ピルビン酸やオキザロ醋酸のオキシムの呈色率よりは高く、何れにしても Endress が仮定した呈色率 1/6 よりは大いことを認めた。こうして彼等の方法は半定量的な不十分なるものであることを自認しながらも、従来の方法よりは好ましいものとして彼等の研究に利用した。

これに対して Csaky⁷⁾ は NO_2^- , N_2O_4 が濃 H_2SO_4 中で加熱分解されるにも拘らず、 NH_2OH は比較的に安定なことから H_2SO_4 分解を適用した。即ち試料 1 ml と 6 N H_2SO_4 1 ml とを混合して 6 時間沸騰水中で加水分解した後 NH_2OH を測定したが、この場合多量の鉱酸は発色を好げるために除去しなければならない。そのため加水分解液に 35% 醋酸ソーダ溶液 3 ml を加えて、過剰の H_2SO_4 を緩衝化した後遊離した NH_2OH をヨード酸化法により発色させた。

近藤・秋田は上述のようにヨード酸化法による条件を詳細に検討してアセトオキシムの定量法を確立した。しかし本法はアセトオキシムのほかアセトアルドキシム及び NH_2OH にも適用されるものであつて、ピルビン酸、 α -ケトグルタル酸、オキザロ醋酸の各オキシムについては利用出来ず、その呈色率は約 30% に過ぎなかつた。そこで我々²⁰⁾ は H_2SO_4 分解法と組合せて後述するような条件を確立したが、秋田⁷⁾ は極めて鋭敏で、しかも安定した所謂アルカリ法を設定した。しかし本法は上記ケト酸オキシムのほかアセトアルデヒドやベンズアルデヒドのオキシム類には利用されるが、アセトオキシムや糖オキシムには適用されない。

これに対して山田²⁴⁾ はオキシムの酸分解法が定量的結果を与えない原因の一つは反応の可逆性にあつて生じた NH_2OH がケト酸と再結合するためであるとし、2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを加える酸分解法を考案した。本法は加水分解して生じたケト酸をヒドラゾンとし、残存ヒドラゾンとともに醋酸エチルで抽出除去し NH_2OH だけを残して発色させるものである。即ち 2% 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを含む 6 N

H₂SO₄ 1 ml と、試料 2 ml とを 2 時間沸騰水中で加熱分解する。冷却後適量の水を加え、ベンゼンに溶した 10% 酢酸エチルで 3 ml 宛 3 回、次いで同じく 3 ml 宛 2 回ベンゼンだけで抽出して生じたヒドラゾン及び未反応のヒドラジンを除く。水層をベンゼン層から分離した後 5 ml の水層について過剰の H₂SO₄ を中和するために 2 ml の 35% 酢酸ソーダと混合し、再び 3 ml ベンゼンで 3 回抽出した。こうして得られた水層 5 ml について NH₂OH をヨード酸化発色して色の強さを測定、10⁻⁷M のオーダーのアセトオキシム、ピルビン酸オキシム、 α -ケトグルタル酸オキシム及び葡萄糖オキシムを 95% 以上の回収率で測定出来ることを示した。本法はアルカリ法に比べてより広い適用範囲を持ち、しかも Csaky の酸分解法よりは正確であるが、Csaky 法を含めてこの両者は非常に長時間の加水分解を行ない、その上に繰り返し抽出処理を行なうため、酵業反応のように多くの試料について短時間で測定しなければならないものには適当しないように思われる。この点我々の常用するアルカリ法及び酸分解法が望ましいと思われる。

(I) 直接酸化法

アルカリ法

秋田によつて考案された本法は現在のところ最もすぐれたオキシム定量法であつて、我々は専らこれを利用してゐるが、また Seaman⁹⁾ は本法を用いてピルビン酸オキシム加水分解酵素を発見し、Bheemeswar 等^{2,12)} も家蚕のオキシム代謝を研究している。

本法は上述のように NH₂OH も同様に発色するため、試薬方法については既に NH₂OH の項 (II. アルカリ性ヨード酸化法) に記載した。

総てのオキシム類に用いられるわけではなく、アセトオキシムや糖オキシムには適用出来ない欠点を持つが、一般に生化学的に重要だと考えられるピルビン酸、 α -ケトグルタル酸、オキザロ酢酸の各オキシムやアセトアルデヒドやベンズアルデヒドのオキシムは NH₂OH と同様に発色する。しかもその呈色率も NH₂OH と同様 100% を示すので、これ等オキシムについては NH₂OH で得られた標準曲線第 5 図ならびに N 含量を求める計算式 (h) 及び (i) がそのまま適用出来る。

酸 法

近藤・秋田によつて確定された方法であつて、アセトオキシムについては専ら本法が利用される。これもアルカリ法同様 NH₂OH の測定にも利用されるため、方法、試薬等は同じく NH₂OH の項 (I. 酸性ヨード

化法) に記載した通りである。また発色率も NH₂OH と同一であるので、アルカリ法の場合と同様に標準曲線第 4 図及び計算式 (f), (g) がともに用いられる。

(II) 酸加水分解法

Csaky 或は山田はオキシムをまつ酸で加水分解した後にヨードで NH₂OH を NO₂ に酸化して発色したが、加水分解は濃 H₂SO₄ 中で長時間加熱して行なつた。我々²⁰⁾ はそれだけ強い条件で分解する必要があるか否かに疑問を抱きピルビン酸、 α -ケトグルタル酸、オキザロ酢酸の各オキシムについて分解条件を検討し、比較的低濃度の H₂SO₄ で 5 分間程度の加熱分解でよいことを明らかにした。しかし、この場合その呈色度は同濃度の NO₂ 或は NH₂OH のものの約 60% にすぎず、また加熱分解操作に多少の熟練を要した。その後、秋田によつてアルカリ法が考案されたため、これ等ケト酸のオキシムは専ら同法を用いて測定した。しかし糖オキシムについてはアルカリ法は利用出来ないため、加水分解法によらなければならないが、山田法は既述のように煩雑であるので、さきに我々が設定した酸分解法を改めて採り上げ、葡萄糖オキシムについて検討し一応利用出来ることを明らかにした。

試 薬

- (1) スルファニル酸溶液：NO₂ のものに同じ。
- (2) α -ナフチルアミン溶液：NO₂ のものに同じ。
- (3) ヨード酢酸溶液：NH₂OH のものに同じ。
- (4) チオ硫酸ソーダ溶液：N₂O₂ のものに同じ。
- (5) H₂SO₄：1N 水溶液。

測 定

試料 10 ml に 1N H₂SO₄ 0.2 ml を加え 100°C に 5 分間加熱した後 NH₂OH 酸性ヨード酸化法に従いスルファニル酸溶液 1 ml、ヨード酢酸溶液 0.2 ml を加えて 90°C に 45 秒加熱酸化し、冷却後 0.2 ml チオ硫酸ソーダで過剰のヨードを除き、最後に α -ナフチルアミン溶液を加えて発色させた後比色する。

種々の濃度での葡萄糖オキシムについての吸光度 (光電比色計) を第 8 図に示すが、 5×10^{-7} ないし 10^{-8} M に互つて直線関係が認められ、その N 含量計算式は (m) で示される。

オキシム-N τ =5.9 E.....(m) (光電比色計)

呈色率は NO₂ 或は NH₂OH のものに劣るが、オキシムで求めた標準曲線或は計算式を利用すれば少なくとも 10^{-8} M と他の化合物と同じ程度の濃度のものについて測定出来る、こうして比較的低濃度の H₂SO₄ で、

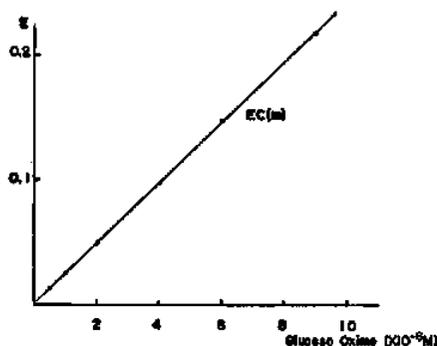


Fig. 8. Standard curve of glucose oxime by acid hydrolysis method.

EC(m): The same with Fig. 2, but the equation (m).

しかもごく短時間の加熱によつて測定に十分利用出来ることは明らかであつて、酵素反応に使用する等我々の目的には適している。H₂SO₄は発色を抑えるためCsaky法、山田法等高濃度のH₂SO₄を用いた場合は、醋酸ソーダを加えてH₂SO₄の影響を除かなければならないが、我々の条件ではその必要はないことは既に認めたとこである。しかし分解後のNH₂OH発色は特に室温で酸化する場合、著しく遅延するので必ず加熱酸化法を採らなければならない。分解物の再結合の問題については詳しくは検討していないし、またその可能性を否定することは出来ないが、発色操作が短時間に行われ、また色が濃度に比例することから一応無視しても差支えないように思われる。特に山田法のようにヒドラジンを加えた場合、醋酸エチル抽出を反復しなければならぬことは測定操作としては望ましいことではなく、これ等の長短を考慮すれば我々の方法でよいと思われる。

こうして少なくとも酸分解法は葡萄糖オキシムについて検討されたが、更にマンノース、ガラクトース等他の糖類のオキシムについても同一条件で概略同じ程度の発色が認められたが、この他種々のオキシム類についても条件を検討すれば、この酸分解法は広く利用され得るものと考えられる。しかし、何れの場合にも個々の試料について標準曲線を求めなければならないことは当然である。尚、第8図及び(m)式は光電比色計、緑色フィルターを用いての測定値であつて、分光光度計を用い単一波長で測定すれば、更に精度が高まることは他の化合物の場合と同様である。

F. アンモニア

NH₃が無機態窒素代謝に於ける最も重要な物質であることは周知の通りであつて、我々の研究でも論外ではないが、更に種々の生体内代謝にも関与していることが知られている。従つて、その測定法は生化学の領域に於ける最も重要な定量法の一つであつて、古くから多くの報告が行なわれてきた。この中顕著なものはKjeldahl法であつて種々の改良法も考案されているが、比較的多くの試料を必要とするので微量な測定にはあまり望ましくない。しかし同じ原理に基づくConwayの微量拡散法が考案されて広く利用されるに至つたが、最終的な測定には滴定法よりも比色法が専ら利用されている。この場合をも含めてアンモニアの比色定量に最もよく用いられるのはNessler試薬であつて、NH₃-N 10 μ 程度までは測定可能であると云われているが、この感度や再現性の問題等の点から決して十分であるとはいえない。しかもNH₂OHも同様に発色するため、我々の場合には望ましい方法とは考えられない。

八木等²²⁾は0.1~1 μ NH₃-Nでも十分に測定出来るインドフェノール法を推奨し、二、三の検討成績をつけ加えて紹介した。本法はNessler法に比べて感度が更にすぐれていることから、我々の目的をも十分に満足させることが推定されるので、若干の追試補足実験を行なつた後専らこれを利用することとした。

試 薬

インドフェノール法では微量のニトロプルシッドによつて感度がほぼ5倍も高められるので、八木等は試料のNH₃含量に応じてニトロプルシッドを加えた場合と、加えない場合とについて記載した。しかし我々は専ら高感度の方法を用いることとし、試薬は同じく八木等に従つて調製した。

(1) アルカリ性フェノール溶液：再溜したフェノール(着色しなければそのまま使用出来る)5gにNaOH 2gを加え水で100mlにする。極めて着色し易いので使用直前に必要量だけ調製し褐色瓶に入れる。

(2) ニトロプルシッド溶液：ニトロプルシッドソーダ(Na₂[Fe(CN)₅NO]·2H₂O) 50mgを100mlの水に溶かし0.05%とする。

(3) 磷酸緩衝液：0.1M Na₂HPO₄溶液 200mlに1N NaOH 1mlを加えpH 9.8に調製する。

(4) アンチホルミン溶液：市販アンチホルミン(有効塩素10%または5%)を稀釈して有効塩素4%とする。

(5) (NH₄)₂SO₄標準液：(NH₄)₂SO₄ 23.6mgを

水に溶かし 1000 ml とする。これは 1 ml 当り 5r-N を含む。

測定

本質的には八木等の記載に従ったが、後述するような補足実験の結果も考慮して次のように行なつた。

試料 1 ml にアルカリ性フェノール溶液 1 ml, 磷酸緩衝液 7 ml, ニトロプルシッドソーダ溶液 0.5 ml 及びアンチホルミン溶液 0.5 ml を加えて全量を 10 ml とし 20°C 以上に 30 分放置後、光電比色計、赤色フィルターを用いて吸光度を測定する。

この操作により水だけでも多少呈色するのでこれを補正しなければならない。イオン交換樹脂により脱イオンした蒸留水を使用し、また試薬もすべてこれで再結精製したものを用いれば殆ど発色しないが、実用的には便宜上検液の代りに普通の蒸留水を用いて、平行操作して比色計のブランクに用いこれに対する吸光度を測定する。

このように蒸留水中ごく微量の物質によつても多少の影響を受けるし、またアンチホルミンの有効塩素含量の変動等も無視出来ないで、これまでの各項で得たような計算式を求めることは無理である。それよりも 1 ml 当り 4r-N 以下の標準溶液を用いて同時に平行発色させて、標準曲線をその都度求める方が望ましい。標準曲線は 3 点で十分であつて、何れの場合にもほぼ直線関係が得られた。

NH₂OH の影響

上述のように NH₃ の呈色に Nessler 試薬の使用を避けた原因として、その感度がインドフェノール法に比べて低いことのほかに NH₂OH も、NH₃ とほぼ同様に発色することが指摘される。そこでインドフェノール

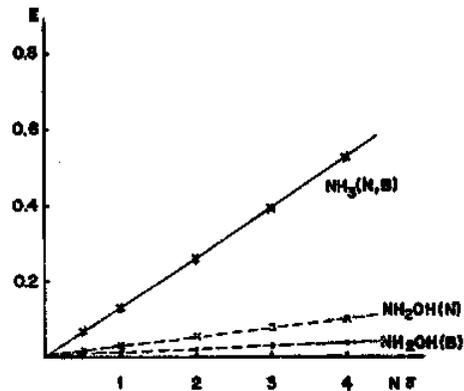


Fig. 9. Coloration of NH₃ and NH₂OH.

Color intensity was estimated by electric colorimeter with red filter.

- N: The reagents were added in the normal way as follows, sample, alkaline phenol, phosphate buffer, Na-nitroprusside, and antiformin.
B: Phosphate buffer was added prior to phenol. The order of addition of reagents is as follows, sample, phosphate buffer, alkaline phenol, Na-nitroprusside, and antiformin.

ール試薬による NH₂OH の呈色を試験したが、第 9 図及び第 7 表に示すようにならかなり発色することが認められた。しかし被検液にまづ磷酸緩衝液、次いでフェノール溶液と試薬の添加順序を入れかえると、NH₃ による呈色度には変化がないが、NH₂OH による発色は強く抑制され少なくとも 4r NH₂OH-N 程度までは無視されるようになった。

勿論 Conway の微量拡散法と組み合わせると、NH₂OH は全く発色しないので NH₃ との分離測定は完全に行なうことが出来る。第 8 表は Conway 装置中で試料 2 ml

Table 7. Coloration of ammonia and hydroxylamine.

Sample, Nr in 1.0 ml	Ammonia		Hydroxylamine	
	Phenol-buffer -Log T	Buffer-phenol -Log T	Phenol-buffer -Log T	Buffer-phenol -Log T
0.5	0.058	0.056	0.016	0.007
1.0	0.123	0.120	0.046	0.010
2.0	0.260	0.250	0.061	0.017
3.0	0.370	—	0.078	0.028
4.0	0.520	0.520	0.096	0.036

Reagents were added as follows.

Phenol-buffer: Sample 1 ml, phenol soln. 1 ml, phosphat buffer 7 ml, Na-nitroprusside soln. 0.5 ml, antiformin soln. 0.5 ml.

Buffer-phenol: Sample 1 ml, phosphate buffer 7 ml, phenol soln. 1 ml, Na-nitroprusside soln. 0.5 ml, antiformin soln. 0.5 ml.

Both solutions were estimated by colorimeter with red filter after 30 min. at or over 20°C.

に飽和 K_2CO_3 2 ml を加え、 $37^\circ C$ に2時間放置して 0.01 N HCl 2 ml 中に拡散させた後、その 1 ml について発色させた結果である。

Table 8. Coloration of ammonia and hydroxylamine after treatment in Conway's unit.

Sample, Nr in ml	Ammonia -Log T	Hydroxylamine -Log T
0.28	0.020	0
0.70	0.065	0
1.40	0.143	0

発色の至適 pH については既に八木等が詳細に検討している、反応液の pH の変動によって吸光度もかなり異なることが知られている。しかし Conway 法で用いた 0.01 N HCl 程度では特別に中和することなく、そのまま使用しても差しつかえない。

温度

呈色反応は外的条件によつてかなり鋭敏に変動し、本法でも pH については既に検討されているが温度については記載されていないので、種々の温度に 30 分放置した後、色の強さを測定し第 9 表に示す。

Table 9. Effect of temperature on the coloration.

Sample, Nr in ml	Temperature				
	0	10	20	30	37
1.0	0.020	0.043	0.128	0.127	0.130
2.0	0.020	0.090	0.267	0.263	0.270
3.0	0.035	0.120	0.376	0.378	0.376

こうして少なくとも測定に用いた試料含量では $20^\circ C$ 以上で発色させなければならない。従つて夏季では室温に放置しても差支えないが、冬季には温めなければならないことが明らかである。

次に発色時間との関係を第 10 表及び第 10 図に示す。

Table 10. Effect of time on the coloration.

Temperature	Sample, Nr in ml	Time min.								
		5	15	25	30	40	60	75	110	130
37°	1.0	0.007	0.026	0.094	0.140	0.137	0.141	0.140	0.139	0.140
	2.0	0.010	0.060	0.210	0.267	0.267	0.265	0.266	0.266	0.265
	3.0	0.027	0.103	0.341	0.391	0.391	0.390	0.392	0.392	0.390
15°	1.0	0.000	0.011	0.031	0.041	0.062	0.087	0.098	0.111	0.118
	2.0	0.008	0.027	0.058	0.074	0.125	0.162	0.197	0.230	0.235
	3.0	0.014	0.044	0.090	0.130	0.193	0.256	0.299	0.329	0.348

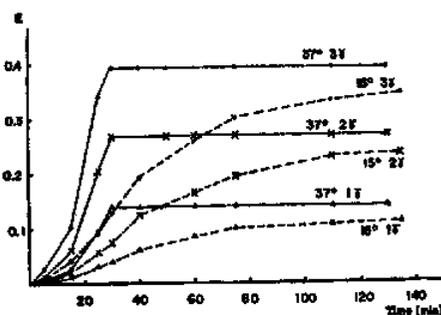


Fig. 10. Effect of temperature and time on coloration.

$37^\circ C$ では 30 分で一定に達し 130 分に及んでも尚色の強さに低下は認められないが、第 9 表に示したような $20^\circ C$ 以下の好ましくない低温では $15^\circ C$ の例が示すように発色が著しく遅延するものであつて、130 分になつても吸光度は尚増加する傾向を保っている。

考 察

ここに報告した方法は、10年に亘る我々の窒素代謝に関する研究に於て逐次改良ないし拡張してきた各成分の測定法についての一応の結論であつて、肝臓酵素等比活的活性の弱い反応系に於ても十分に利用し得ることは、既に発表した多くの研究報告が示す通りである。即ち各無機窒素化合物やオキシムはその終濃度 $10^{-6} M$ 程度であればその測定は可能である。従つて、更に強力な酵素系を持つ微生物等に於ては勿論満足な方法といつてよい。

NO_3 については常にその感度が低く、しかも NO_2 夾雑の場合その顕著な妨害のために従来の方法は何れも不満足なものであつたが、我々の検討は 2,4-キシレノール法が十分な精度を持ち、しかも検討された条件によつて NO_2 も完全に除去されることが確かめられ、これまでの欠陥は克服された。

NO_2 については Griess 試薬がその特異性の点からも、また精度の点からも今更検討の必要もない良好な試薬であつて、広く NH_2OH やオキシム類の測定にも応用出来ることは、これまでもしばしば指摘したところである。しかしこの場合 NO_2 のすぐれた発色性のために、これ等が混合する場合の分離定量は困難であつた。ここで 8-ヒドロキシキノリン法は NH_2OH をのみ発色し、 NO_2 やオキシムの妨害を受けない点で極めてすぐれたものであるが、更にトリス緩衝液の使用によつて Griess 試薬と同じ程度にまでその精度も高められた。従つてこの両者を適当に組み合わせることによつて、各々の分離定量も可能となり、特にオキシム代謝の研究にこれまで困難を感じていたが一挙に解決を見た。

また N_2O_2 についてはヨード酸化と組合わせた Griess 試薬による発色が知られていたが、定量法については明確なものはなく、特に NO_2 や NH_2OH と混在する場合には全く方法がなかつた。しかし N_2O_2 の安定性を詳細に検討することによつて定量法が初めて確立された。

オキシム類については何れも半定量の域を出ず、しかも長時間複雑な操作を要することは詳述した通りであつて、我々の方法が少なくともすぐれたものに属することは明らかである。一部のオキシムはアルカリ酸化法によつて NH_2OH と完全に一致する発色率を示したが、糖オキシム等はアルカリ法が適用出来ないために酸分解法を用いなければならない。この場合、その呈色率はオキシムの種類によつて異なるので、原理的には記載の方法に従い各オキシムについて最もよい条件を予め確立し、それに基づいて標準曲線を求めなければならない。

また NH_3 は既に八木等によつて紹介された方法が精度の点からも、ニンヒドリン発色法に比べて遙かにすぐれているが、実験室で常用している蒸留水だけによつても若干呈色するので、これを補正することを忘れてはならない。しかし、これは比色計の盲験として使用することにより容易に達成される。更に NH_2OH も発色するが試薬の添加順序を変えることにより、 NH_3 の発色度には影響することなく低下させることが出来た。本法は他の方法と組合わせることによつて他の化合物の測定にも利用出来る。例えば高木²⁰⁾はウレアーゼと組合わせて尿素の定量に十分使用出来ることを報告した。

以上本法に述べた方法は特に無機窒素代謝の研究に我々が利用しているものであつて、各標準曲線から認

められるようにある一定の濃度範囲に於ては、吸光度との間に直線関係が存在する。従つて、この直線から算出した計算式を用いれば溶液中の N 含量を直ちに求めることが出来る。直線は理論的には原点を通るべきであるが多少の誤差は免れなかつた。しかし、これは補正項によつて出来るだけ誤差を少なくすることにとめた。本報に述べた各計算式は何れも小数点以下第 3 位に於て若干の誤差を生ずるものであつて、実際上は殆ど問題とするに及ばない。

測定そのものは分光光度計により或る特定の波長を使用すれば、フィルターを用いた光電比色計による場合よりも精度は向上した。しかし簡便さもあつて光電比色計でも差しつかえないことは本報の結果から明らかである。

総 括

種々の無機窒素化合物及びオキシムの比色測定法について検討ならびに補足実験を行ない、現在に於て一応最良と考えられる方法を設定記載した。これとともに各化合物についての標準曲線及び吸光度から N 含量を算出する計算式を求めた。

文 献

- 1) 秋田利彦, 1954. 九大農芸誌, **14**, 399.
- 2) Bheemeswar, B. and Faulkner, P., 1959. *J. Insect Physiol.*, **3**, 349.
- 3) Blom, J., 1926. *Ber.*, **59**, 121.
- 4) Blom, J., 1928. *Biochem. Z.*, **194**, 385.
- 5) Buckett, J., Duffield, W. D. and Milton, R. F., 1955. *Analyst*, **80**, 141.
- 6) Burrell and Phillips, 1925. *J. Biol. Chem.* **65**,
- 7) Csaky, T. Z., 1948. *Acta Chem. Scand.*, **2**, 450.
- 8) Ditttrich, W., 1931. *Planta Arch. Wissenschaft. Botanik*, **12**, 69.
- 9) Egami, F., Iida, K., Doke, T. and Taniguchi, S., 1954. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **27**, 619.
- 10) Endress, G., 1935. *Lieb. Ann.* **518**, 109.
- 11) Endress, G. and Kaufmann, L., 1937. *Lieb. Ann.*, **530**, 184.
- 12) Faulkner, P. and Bheemeswar, B., 1960. *J. Insect Physiol.*, **4**, 14.
- 13) Holler, A. C. and Huch, R. V., 1949. *Anal. Chem.*, **21**, 1385.
- 14) 近藤 弘・秋田利彦, 1950. 農化, **23**, 373.
- 15) Magee, W. E. and Burris, R. H., 1954. *Am. J. Bot.*, **41**, 777.
- 16) Medina, A. and Nicholas, D. J. D., 1957. *Na-*

- ture, **179**, 533; *Biochim. Biophys. Acta*, **25**, 138.
- 17) Nason, A., 1956. *A Symp. Morg. Nitrogen Metabolism*, p. 109.
- 18) Nicholas, D. J. D. and Nason, A., 1957. *Method in Enzymology*, Vol. 3, p. 981.
- 19) Novak, R. and Wilson, P. W., 1948. *J. Bact.* **55**, 517.
- 20) 大村浩久, 1952. *九大農学芸誌*, **12**, 327.
- 21) 箴島 豊, 1961. *九大農学芸誌*, **18**, 271.
- 22) Osajima, Y. and Yamafuji, K., 1961. *Enzymologia*, **22**, 634.
- 23) Quastel, J. H., Scholefield, P. G. and Stevenson, J. W., 1950. *Nature*, **166**, 940.
- 24) Quastel, J. H., Scholefield, P. G. and Stevenson, J. W., 1952. *Biochem. J.*, **51**, 278.
- 25) Seaman, G. R. 1957. *Biochim., Biophys. Acta*, **26**, 313.
- 26) 高木茂明, 1962. *農化西日本支部例会 (第85回) 発表*.
- 27) Taniguchi, S., Mitsui, H., Toyoda, J., Yamada, T. and Egami, F., 1953. *J. Biochem.*, **40**, 175.
- 28) Taniguchi, S., Sato, R. and Egami, F., 1956. *A Symp. Morg. Nitrogen Metabolism*, p. 87.
- 29) Virtanen, A. I., 1953. *Ann. Rev. Microbiol.* **2**, 485.
- 30) Virtanen, A. I. and Laine, T., 1939. *Biochem. J.*, **33**, 412.
- 31) Wilson, P. W. and Burris, R. H., 1947. *Bact. Rev.* **11**, 41.
- 32) 八木国夫, 奥田 潤, 1959. *蛋白質・核酸・酵素*, **4**, 139.
- 33) 山田敏郎, 1953. *標準生化学実験*, p. 342.
- 34) Yamada, T., 1955. *Acta Chem. Scand.* **9**, 349.
- 35) Yamafuji, K., 1951. *Nature*, **167**, 770.
- 36) Yamafuji, K., 1953. *Nature*, **171**, 745.
- 37) Yamafuji, K., 1959. *Agr. Biochem. Kyushu Univ.*, **19**, 1.
- 38) Yamafuji, K. and Shirozu, Y., 1944. *Biochem. Z.*, **317**, 94.
- 39) Yamafuji, K., Kondo, H. and Omura, H., 1950. *Enzymologia*, **14**, 153.
- 40) 山藤一雄, 大村浩久, 1950. *農化*, **23**, 321.
- 41) Yamafuji, K. and Omura, H., 1950. *Enzymol.*, **14**, 120.
- 42) Yamafuji, K. and Yoshihara, F., 1950. *Enzymol.*, **14**, 124.
- 43) Yamafuji, K. and Akita, T., 1952. *Enzymol.*, **15**, 313.
- 44) Yamafuji, K., Kawakami, T. and Shinohara, K., 1952. *Enzymol.*, **15**, 199.
- 45) Yamafuji, K., Omura, H. and Miura, M., 1953. *Enzymol.*, **16**, 75.
- 46) Yamafuji, K., Osajima, Y. and Omura, H., 1960. *Nature*, **185**, 162.
- 47) Yamafuji, K. and Yoshihara, F., 1960. *Enzymol.*, **22**, 89.
- 48) Yamafuji, K. and Osajima, Y., 1961. *Enzymol.*, **22**, 344.

Summary

Methods of colorimetric estimation of inorganic nitrogenous compounds and some oximes so far used in our laboratory were discussed and some supplementary experiments were carried out. At present the methods described seemed to be the best. Standard curves and calibrating equations were also determined by means of a Hitachi electric colorimeter, type EPO-A, with filter and cells of 10 mm light pass or a Hitachi spectrophotometer, type EPU-2, with cells of 10 mm light pass. Outlines are as follows.

Nitrate

Five ml of sample solution were mixed with 15 ml of 85% H_2SO_4 and cooled. Then 1 ml of 1% 2,4-xyleneol (in glacial acetic acid) was added. After 30 min. at room temperature, the mixture was transferred into a separate funnel of 200 ml with aid of H_2O making 100 to 150 ml of final volumes. Ten ml of toluene were added, shaken vigorously and H_2O layer was discarded. Into remaining toluene, 50 ml of H_2O were added, shaken and removed. Washing was repeated once more. Finally 5 ml of 0.4 N NaOH were added to toluene and mixed gently. NaOH layer become yellow was separated from toluene. Intensity of color of alkaline solution was estimated with a spectrophotometer at 410 m μ . Relation between extinction and concentration of NO_3 was shown in Fig. 1. From this Fig. 1, the equation (a) was obtained to calibrate the amounts of NO_3 -N in sample.

$$NO_3-N r = 21.3 E - 2.13 \dots \dots (a)$$

Since NO_2 also develops yellow color, it should be removed beforehand if sample is contaminated by NO_2 . Prior to coloration, 5 ml of sample solution were mixed with 1 ml of glacial acetic acid and 1 ml of 10% urea solution and the mixture was heated at 100°C for 10 min.

Nitrite

Routine Griess' reagent was employed. Into 10 ml of NO_2 solution, 1 ml of 1% sulfanilic acid (in 25% acetic acid) and 1 ml of 0.4% α -naphthylamine (in dil. HCl) were added. After 5 to 20 min. at room temperature, red color developed was estimated with electric colorimeter using green filter or with spectrophotometer at 525 $m\mu$. Extinction is proportional to the concentration of NO_2 as shown in Fig. 2. Calibrating equations (b) and (c) were obtained from Fig. 2.

$$\text{NO}_2\text{-N } r=4.9 E-0.05 \dots\dots(b) \text{ (electric colorimeter)}$$

$$\text{NO}_2\text{-N } r=4.2 E \dots\dots(c) \text{ (spectrophotometer)}$$

Hyponitrite

One ml of 1% Na-sulfanilate, 0.3 ml of 1.3% iodine solution (in 2% KI) and 0.15 ml of 0.5 N NaOH were added into 10 ml of hyponitrite solution. After standing at room temperature for 30 min., 1 ml of 30% acetic acid, 0.15 ml of 0.5 N HCl, 0.3 ml of 0.1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ and 1 ml of α -naphthylamine were added. As in the case of NO_2 , color intensity was determined. Extinction was shown in Fig. 3 and calibrating equations (d) and (e).

$$\text{N}_2\text{O}_2\text{-N } r=21.0 E-0.06 \dots\dots(d) \text{ (electric colorimeter)}$$

$$\text{N}_2\text{O}_2\text{-N } r=12.12 E \dots\dots(e) \text{ (spectrophotometer)}$$

Red color develops with NO_2 , NH_2OH and some oximes by this procedure. When sample contains all or one of substances cited above too, another aliquot of sample was heated at 100°C for 5 min. to destroy N_2O_2 before coloration. Difference between color intensities by both samples with and without heating corresponds to N_2O_2 .

Hydroxylamine

Two kinds of methods were used with Griess' reagent or 8-hydroxyquinoline. Procedure with former was connected with iodine oxidation in acidic, alkaline or neutral media.

(I) **Acidic iodine oxidation method.** Ten ml of sample were mixed with 1 ml of 1% sulfanilic acid and 0.3 ml of 1.3% iodine solution (in glacial acetic acid). The mixture was heated by immersing it into hot water at 90°C for 45 sec. and rapidly cooled with running tap water. To remove excess iodine, 0.3 ml of 0.1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ was added. Finally 1 ml of α -naphthylamine was added to develop red color. Fig. 4 shows the direct relation between extinction and concentration of NH_2OH and equations (f) and (g) give the amounts $\text{NH}_2\text{OH-N}$ in sample solution.

$$\text{NH}_2\text{OH-N } r=6.2 E-0.05 \dots\dots(f) \text{ (electric colorimeter)}$$

$$\text{NH}_2\text{OH-N } r=4.75 E \dots\dots(g) \text{ (spectrophotometer)}$$

(II) **Alkaline iodine oxidation method.** The procedure is same as that for N_2O_2 estimation described above. Fig. 5 and equations (h) and (i) were obtained.

$$\text{NH}_2\text{OH-N } r=8.0 E \dots\dots(h) \text{ (electric colorimeter)}$$

$$\text{NH}_2\text{OH-N } r=5.6 E \dots\dots(i) \text{ (spectrophotometer)}$$

(III) **Neutral iodine oxidation method.** This method was devised to assay NH_2OH contaminated with some oximes, since both substances develop red color by means of the acidic or alkaline iodine oxidation method cited above.

To a mixture of 1 ml of 1.5 M Na-acetate, 1 ml of 1% Na-sulfanilate and 0.3 ml of 1.3% iodine (in KI) solution, 5 ml of NH_2OH solution were added. After shaking quickly, 0.3 ml of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ were added at once to remove excess iodine. Then 3 ml of 0.5 N HCl, 1 ml of 30% acetic acid and 1 ml of α -naphthylamine were added. Fig. 6 is relation between extinction and concentration of NH_2OH and (j) and (k) are calibrating equations.

$$\text{NH}_2\text{OH-N } r=12.5 E-0.125 \dots\dots(j) \text{ (electric colorimeter)}$$

$$\text{NH}_2\text{OH-N } r=10 E \dots\dots(k) \text{ (spectrophotometer)}$$

(IV) **8-Hydroxyquinoline method.** Since NO_2 , N_2O_2 and oximes do not develop the color differing from the procedures with Griess' reagent, this method is most suitable for estimation of NH_2OH .

Two ml of sample solution were mixed with each 1 ml of 0.2 M Tris buffer of pH 7.5, 1% 8-hydroxyquinoline (in alcohol) and 2 N Na_2CO_3 solution. Green color developed was determined with spectrophotometer at 700 $m\mu$, after standing at room temperature over 15°C for 60 min. Result is shown in Fig. 7 or equation (l).

$$\text{NH}_2\text{OH-N } r=3.0 E-0.02 \dots\dots(l) \text{ (spectrophotometer)}$$

Oximes

Oximes can be oxidized into NO_2 with iodine directly or indirectly connected with acid hydrolysis.

(I) **Direct oxidation method.** Acetoxime was estimated by acid iodine oxidation method of NH_2OH . Alkaline iodine oxidation method of NH_2OH also can be applied to the estimation of some oximes such as pyruvic acid-, α -ketoglutaric acid-, oxalacetic acid-, acetaldehyde- and benzaldehyde-oxime, but not to acetoxime or sugar oximes. Standard curves and calibrating equations of NH_2OH with iodine oxidation methods can be used for the assay of oximes by the same procedures.

(II) **Acid hydrolysis method.** This method is mostly employed in order to estimate sugar oximes.

A mixture of 10 ml of oxime solution and 0.2 ml of 1 N H_2SO_4 were heated at 100°C for 5 min. to hydrolyse oximes. Then NH_2OH formed was estimated by means of acidic iodine oxidation method. Since rates of color development vary with kinds of oximes, standard curves or calibrating equation should be determined on each oxime. A example for glucose oxime is shown in Fig. 8 or equation (m).

$$\text{Oxime-N} r=5.9 E \dots\dots(m) \text{ (electric colorimeter)}$$

Ammonia

Coloration of ammonia with indophenol method is more sensitive than that with Nessler's reagent. Into 1 ml of sample solution, 1 ml of 5% alkaline phenol (in 2% NaOH), 7 ml of 0.1 M Na_2HPO_4 (pH 9.8 adjusted with 1 N NaOH), 0.5 ml of 0.05% Na-nitroprusside and 0.5 ml of antiformalin (4% effective Cl) solution were added. After 30 min. at or over 20°C , blue color developed was determined by electric colorimeter with red filter. Since routine laboratory distilled water also develops pale blue color by this procedure, color intensity must be corrected. Furthermore, color intensities are fluctuated with some other factors, it is more suitable to make a standard curve with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ of known concentrations on the same time. Blue color develops with NH_2OH too. However, the color intensity was reduced to negligible without effecting on the coloration of ammonia, when buffer was first mixed with sample prior to addition of phenol. Of course, no color develops with NH_2OH after treatment of sample in a Conway's unit.