九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

硝酸還元酵素に関する研究（第2報）：亜硝酸根の呈色に就て

大村, 浩久
九州大学農学部

https://doi.org/10.15017/21177

出版情報：九州大學農學部學藝雑誌. 12 (4), pp.327-333, 1952-09. 九州大學農學部
バージョン：
権利関係：

KYUSHU UNIVERSITY

硝酸還元酵素に関する研究 (第2報)

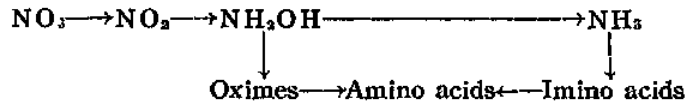
亜硝酸根の呈色に就て

大村浩久

Studies on the reductase of nitrate. Part 2.
On the coloration of NO_2-radical

Hirohisa Omura

生体内に於ける Amino acid の生成に就ては



なる経路が考へられる. 硝酸還元酵素も此の一部を担当するものであつて, その還元生成物 NO_2 の測定には専ら Griess 試薬による極めて鋭敏な呈色反応が用ひられる. 本法は特に Blom[1] 氏により NO_3 及他の重要な中間体である NH_2OH の測定に拡張されたが, NO_3 は水素ガスにより還元, NH_2OH は沃度により酸化し何れも NO_2 に変じた後呈色する. 当研究室に於ても近藤, 秋田両氏[2] は更に之を acetoxime に適用し NH_2OH 並びに該 oxime の測定に就て詳細に検討した. 使用試薬は Endres 氏[3] の記載に従ひ, NH_2OH は溶液 10 cc に sulfanilic acid 1 cc 沃度醋酸 0.2 cc を加へ室温に 10 分放置して酸化し過剰の沃度を除去した後 α-naphthylamine 1 cc を加へて呈色 (以下室温法), acetoxime は 90°45 秒加熱して酸化する方法 (以下加熱法) を採つてゐるが, 著者は例へば両者の分離呈色は困難であつて acetoxime は室温法によつても約 30% の呈色を見る事, NH_2OH を室温法により 100% 呈色させる事は難しく特に冬季に於て著しいので支障ない限り加熱法を可とする事. 色の強さは 2×10^{-5}M-NO_2 附近を最良とし濃厚に過ぎれば仮令沈澱を生じなくても安定度は短く又比色にも困難を来す事等を屢々経験した. 更に酵素作用に於ては緩衝液の使用, 加温下に於ける反応, 加熱による反応停止等の諸操作を実施するため, 之等諸因子の本法に及ぼす影響を検討する必要を生じた.

之と共に実際生体内に於ては pyruvic-, α-ketoglutaric- 及び oxaloacetic-acid の各 oxime が生理的に重要な役割を演ずる事は Virtanen[4], Euler[5] 氏等の研究よりも容易に推測されるので, 本法による之等 oxime の測定をも試みた.

I. 緩衝液の影響

先づ純粋溶液に就て之等一聯の化合物に及ぼす緩衝液の影響を検討した. 測定法の中で pyruvic acid-oxime (P-oxime) に就ては次項に記載する.

Sörensen 氏の M/10- phosphate 及び glycocol 緩衝液を使用したが記載値と若干異るので本試験に用ひた pH（試験紙で測定）及びそれに応ずる組成を第1表に掲げる.

第　1　表

pH	<1.0	1.2	1.6	2.4	3.4	4.4	5.8	6.1	6.4	6.8	7.4	8.2	8.6	9.1	9.5
M/10 KH_2PO_4	—	—	—	—	—	5.0	4.5	3.5	2.5	1.5	0.5	0	—	—	—
M/10 Na_2HPO_4	—	—	—	—	—	0	0.5	1.5	2.5	3.5	4.5	5.0	—	—	—
M/10 Glycocol	0.5	1.5	2.5	3.5	4.5	—	—	—	—	—	—	—	4.5	4.0	3.5
M/10 HCl	4.5	3.5	2.5	1.5	0.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
M/10 NaOH	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.5	1.0	1.5

通常 $NaNO_2$, NH_2OH（硫酸塩）, acetoxime 各々 4×10^{-5} M 溶液及び 1×10^{-4} M P-oxime 夫々 5 cc と上記緩衝液 5 cc の混合液を試験液とし 2×10^{-5}M-$NaNO_2$ を比色基準とした.

a）呈色に及ぼす影響：混合直後に呈色して得られた結果を第2表に示す.

第 2 表. 理論値; NO_2 2.0; NH_2OH 2.0; acetoxime 2.0; P-oxime 5.0.

	水	Glycocol-HCl					KH_2PO_4-NO_2HPO_4							Glycocol-NaOH		
pH		<1.0	1.2	1.6	2.4	3.4	4.4	5.8	6.1	6.4	6.8	7.4	8.2	8.6	9.1	9.5
NO_2	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
NH_2OH 室温法	1.85	0.4	0.7	1.3	1.7	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.75	1.75	1.75
NH_2OH 加熱法	2.0	1.2	1.6	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
acetoxime	1.65	1.0	1.35	1.7	1.7	1.7	1.65	1.65	1.55	1.25	1.1	1.05	0.95	1.65	1.65	1.65
P-oxime	2.7	2.15	2.5	2.7	2.7	2.7	2.55	2.5	1.2	0.3	0.3	0.3	0.3	2.7	2.7	2.5

Glycocol-HCl 緩衝液は NO_2 を除き何れも強酸性側に於て阻害し NO_2 に於ても発色が緩漫となり最少限 10 分経過した後に比色しなければならない. Glycocol-NaOH は P-oxime に於て若干低下させる傾向を示すが, 両者共に影響するのは酵素反応に使用する pH 範囲外である. 然るに最も頻繁に用ふる Phosphate に於て両 oxime の呈色がアルカリ側に行くに伴ひ著しく低下する事は注意を要する. 之等の影響は緩衝液の濃度に依存し M/5 Phosphate を用ふれば第3表に示す様に NO_2 の呈色も抑制され, 又.

第3表. $4\times10^{-5}NO_2$ 5 cc; M/5-Phosphate 5 cc.

pH	4.4	5.8	6.1	6.4	6.8	7.4	8.2
$\times10^{-5}$	2.0	2.0	2.0	1.99	1.85	1.70	1.65

第4表. Oxime 5 cc; Phosphate 5 cc.

	acetoxime			P-oxime		
緩衝液濃度 \ pH	6.4	6.8	7.4	6.4	6.8	7.4
M/15	1.4	1.1	1.0	0.85	0.40	0.35
M/30	1.4	1.3	1.2	2.8	2.45	2.1
M/50	1.4	1.35	1.3	2.85	2.85	2.85
M/100	1.4	1.4	1.4	2.85	2.85	2.85

oxime 呈色阻害も緩衝液の稀釈により克服される（第4表）.

b）安定性：酵素反応に於ては通常 40°, 24 時間反応後 10 分間沸騰水に浸漬して反応を停止するが，此の条件に於ける上記諸物質の安定性は夫々第5，6表に示される.

第 5 表. 40° 24 時間.

	水	Glycocol-HCl					KH_2PO_4–Na_2HPO_4							Glycocol-NaOH		
pH		<1.0	1.2	1.6	2.4	3.4	4.4	5.8	6.1	6.4	6.8	7.4	8.2	8.6	9.1	9.5
NO_2	1.85	0.6	0.15	0.05	0.05	0.4	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
NH_2OH	0.4	1.2	1.6	1.8	1.8	1.6	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.3	0.3	0.3
acetoxime	1.5	1.2	1.7	1.9	1.9	1.95	1.1	1.1	1.05	1.0	0.9	0.85	0.85	1.15	1.15	1.15
P-oxime	2.6	2.15	2.6	2.8	2.8	2.8	2.5	2.3	1.6	0.35	0.3	0.3	0.3	2.6	2.5	2.3

第 6 表. 100° 10 分.

	水	Glycocol-HCl					KH_2PO_4–Na_2HPO_4							Glycocol-NaOH		
pH		<1.0	1.2	1.6	2.4	3.4	4.4	5.8	6.1	6.4	6.8	7.4	8.2	8.6	9.1	9.5
NO_2	2.0	0.3	0.01	0	0.04	0.75	2.0	2.0	2.0	1.95	1.95	1.9	1.85	2.1	2.1	2.1
NH_2OH	0.3	1.3	1.6	1.8	1.8	1.8	0.5	0.65	0.75	0.75	0.8	0.8	1.0	0.9	0.9	0.9
acetoxime	1.15	1.1	1.5	1.85	1.9	1.95	0.8	1.15	1.0	—	0.9	0.8	0.75	1.4	1.4	1.4
P-oxime	2.8	2.2	2.45	2.7	2.7	2.75	2.5	2.6	1.5	0.45	0.45	0.3	0.4	2.75	2.7	2.35

NO_2 は Glycocol-HCl 中に於て不安定であり稀釈により安定性を増す事は呈色に於ける第3，4表と同様第7表より判る. 此の場合，液の pH は稀釈により例へば M/10 1.2 より M/100 3.8, 3.4 より 5.4 と中性に近接するが便宜上 M/10 に於ける pH を記載する. 然も此の作用に極値があり稀釈により pH が変化しても移動しない事は，pH の影響よりは寧ろ緩衝液の組成に依存すると考へられる. NO_2 の濃度大なる時は反応停止の為の加熱後稀釈して呈色するよりは，稀釈後加熱する方が好ましい事が予想されるが第8表からも明かである. 即ち 8×10^{-4} M-NO_2 5 cc と M/10 Glycocol-HCl 5 cc 混合溶液とその 10 倍稀釈液とを同時に 10 分間沸騰水に浸漬後前者を 10 倍に稀釈して呈色し，前表との比較のためその 1/2 値を示す.

第7表. 4×10^{-5} NO_2 5cc. Glycocol-HCl 5cc. 100° 10分.

緩衝液濃度 ＼ pH	<1.0	1.2	1.6	2.4	3.4
M/15	0.9	0.45	0.25	0.5	1.3
M/30	1.4	0.95	0.8	1.0	1.65
M/50	1.55	1.2	1.1	1.2	1.65
M/100	1.8	1.65	1.55	1.7	2.0

第　8　表

	原液加熱			稀釈後加熱		
pH	1.2	1.6	2.4	1.2	1.6	2.4
$\times10^{-5}$	0.4	0.2	0.8	1.4	1.4	1.4

供試 NH_2OH は硫酸塩であるが，高度に稀釈された際は水溶液並びに Phosphate 及び Glycocol-NaOH 緩

衝液中で著しく不安定であり Glycocol-HCl によつては H_2SO_4（第21表）同様抵抗性を獲得する．又水溶液も濃度の増加に伴つて安定性を増し塩類溶液中では一部分解され，NH_2OH 溶液の安定性に対する酸の効果が観察される．第9表に 2×10^{-3}，2×10^{-1} M $NH_2OH\cdot\frac{1}{2}H_2SO_4$ 5 cc と M/10 Phosphate（pH 6.4）5 cc 混合液の 40° 24 時間後の残存%を示す．

第 9 表

濃 度	10^{-3}		10^{-1}	
溶 液	H_2O	Phosphate	H_2O	Phosphate
残存%	100	34.6	100	93.8

acetoxime, P-oxime は第2表の呈色度と併せ考へる時は分解される事は無い様であるが，Glycocol-NaOH に於て加熱により色調が黄色を帯び比色を困難にする．

更に酵素剤として混入する生物物質によつても種々影響される．例へば液の清澄化に当り蛋白沈澱への吸着等による呈色率の低下は免れない．又家蚕組織中には沃度消費性物質が存在するため沃度不足とならない程度に適宜添加量を増加しなければならない事は第10表の例からも明らかである．然も液は黄色を帯び特に加熱した場合に著しい．又蚕体アセトン剤の場合は沃度除去後復色するため α-naphthylamine を直ちに添加する事が必要である．長時間加熱後 Griess 試薬により赤色を呈する物質による妨害は既に報じた[6]が，之は廿日鼠肝臓アセトン剤に就ても観察される．

第10表．家蚕生体 0.5 gr; 1×10^{-4} P-oxime.

沃度酸 cc.	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	純 oxime
$\times10^{-5}$	痕跡 遊離沃度なし	2.4	3.2	3.4	3.4	4.8

II. Pyruvic acid- 及び α-Ketoglutaric acid-oxime 測定

使用したサンプルは当研究室に於て合成したものであり前者（P-oxime）は純度100%として理論濃度 2×10^{-5}M. 溶液，後者（K-oxime）に於ては合成が困難で得られた少量の湿潤粗製品（全-N 測定よりの純度 26.3%）より 1.77×10^{-5}M 溶液を調製，何れも NaOH で中和し，比色基準は 2×10^{-5}M NH_2OH を使用した．

P-oxime, K-oxime 共に室温法加熱法何れによつても $0.02\sim0.05\times10^{-5}$ 程度に僅に呈色するが比色は勿論不可能であつて無視し得る．併し之が oxime より由来するものか夾雑の懸念ある遊離 NH_2OH による呈色かは現在の所本法によつて断定する事は不可能であつて，10^{-3}M 等の濃厚液に室温法を適用して夾雑 NH_2OH とする事は無意味である．

P-oxime 10 cc に N/10 H_2SO_4，IN-H_2SO_4 及び N/10 HCl を夫々 0.2 cc 宛添加

第 11 表

	P-oxime				NH_2OH
添 加 酸	無 添 加	N/10 H_2SO_4	N-H_2SO_4	N/10 HCl	無 添 加
$\times10^{-5}$	0.02	0.4	0.45	0.4	0.45

し対照としてNH_2OH, P-oxime に酸を加へる事なく同時に1分間沸騰水に浸漬し冷却後加熱法により呈色させた結果を第 11 表に示す．即ち酸で加水分解すれば呈色可能である事，NH_2OH は加熱により著しく分解される事，P-oxime は加熱のみでは NH_2OH 若くは NO_2 を生じない事等が知られるが，操作の簡略化のため酸による加水分解と生成する NH_2OH の酸化を同時に行ふため，P-oxime に酸を加へ更に sulfanilic acid 1 cc, 沃度醋酸 0.5 cc を混入し 1分間加熱後呈色したが何れも痕跡程度であつて一旦酸で加水分解した後遊離されたNH_2OH を測定する二段操作が必要である．

P-oxime の測定に就て，添加酸量の関係は第12表，加熱温度は第13表，加熱時間は第 14 表より夫々示されるが，第 12 表に於て添加酸量の差も考へられるので同様に処理した 0.2 cc H_2SO_4 添加サンプルに H_2O 0.8 cc を加へて呈色させた結果も併記する．即ち P-oxime はサンプル 10 cc に IN-H_2SO_4 0.2 cc 添加 100° に4分30秒加熱加水分解後に呈色させる事が妥当である．

K-oxime に於てはサンプル 10 cc に 5N- 及び IN-H_2SO_4 0.2 cc 宛添加 2分 30 秒加熱して中和後呈色させた第15表及び IN-H_2SO_4 0.2 cc 添加し加熱時間を求めた第 16 表より，IN-H_2SO_4 0.2 cc, 4 分加熱の値が得られた．

混在する NO_2 は H_2SO_4 と尿素により分解除去する．之等 oxime にあつては加水分解のため IN-H_2SO_4 0.2 cc を加へるので混在量の多くない場合は之をその儘利用し尿素を加へて破壊した後に加水分解すればよいが酸量の少いため稍長時間を要する．10^{-5} $NaNO_2$ 10 cc に IN-H_2SO_4 0.2 cc と尿素 0.3 gr を加へ 30° に放置して残存量を求めた第17表，P-oxime 測定への尿素の影響を検した第 18 表の結果より供試程度の NO_2 量の除去には 30° 1.5 時間を必要とするが尿素は

第12表．100°　2.5 分．

1N-H_2SO_4 cc.	0.2		0.4	0.6	0.8	1.0
		H_2O 0.8				
×10^{-5}	1.04	1.00	0.81	0.51	0.32	0.26

第13表．1N-H_2SO_4 0.2 cc．2.5 分．

温　度	50	60	70	80	90	100
×10^{-5}	痕跡	0.23	0.35	0.66	0.76	0.86

第14表．1N-H_2SO_4 0.2 cc．100°．

加熱時間(分)	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0
×10^{-5}	0.24	0.48	0.50	0.95	1.00	1.05	1.12	1.16	1.12

第　15　表

添　加　酸	5N-H_2SO_4	1N-H_2SO_4
×10^{-5}	0.89	1.03

第　16　表

加熱時間(分)	2.5	4.0	4.5	5.0	5.5
×10^{-5}	0.56	0.94	0.79	0.78	0.73

第17表．$10^{-5}$$NO_2$ 10cc. 1N-H_2SO_4 0.2 cc. 尿素 0.3 gr.

時　間	0.5	1.0	1.5
×10^{-5}	0.24	0.06	0

第18表．P-oxime 10 cc.

	無　添　加	尿　素　添　加
×10^{-5}	0.96	0.94

P-oxime の測定には殆ど影響しない事が判る.

第 19 表

処理	無処理	室温 10分		100° 1分	
	P-oxime	NH_2OH	P-oxime	NH_2OH	P-oxime
×10⁻⁵	1.05	0.2	0.79	痕跡	0.47

NH_2OH が混在する際は先づ沃度で NO_2 に酸化後破壊し加水分解呈色する方法を検討したが満足な結果は得られなかつた. 2×10^{-5}P-oxime 及び NH_2OH 10 cc に沃度醋酸 0.2 cc を加へ夫々室温（約 10°）10 分並びに 100° 1分処理後過剰の沃度を除き上法で NO_2 除去後呈色した結果は第19表の様に NH_2OH の除去は不十分であり oxime の呈色度も減少する.

oxime の測定に使用した酸は中和する事なく呈色させてゐるが, $2\times10^{-5}NaNO_2$ 及び NH_2OH 夫々 10 cc に H_2SO_4 0.2 cc 添加直後及び 10分加熱後に呈色させた第 20, 21 表の結果より見られる様に oxime 測定に使用した程度で NO_2 は著しく発色遅延するが呈色度は殆ど低下しない. NH_2OH は室温法に於てかなり阻害されるが加熱法では之が克服され, 又加熱により NO_2 は若干分解されるが NH_2OH は却て熱への抵抗性を増す事は Glycocol-HCl 緩衝液に於けると同様である. 第 15 表に示す酸濃度の増大による oxime 測定度の低下は加水分解より寧ろ生成 NO_2 の呈色を阻害するためと考へられる. 事実第22表に示す様に NO_2 への酸除去の効果は酸濃度の高い場合に認められる. 即ち $1.0\times10^{-5}NaNO_2$ 10 cc に 5 N- 及び 1N-H_2SO_4 0.2 cc 加へ前者に更に醋酸ソーダ 0.5 gr を加へて呈色させた.

第 20 表. 2×10^{-5} $NaNO_2$ 10 cc. H_2SO_4 0.2 cc.

	添加直後				100° 10分加熱			
添加酸濃度	無添加	N/10	1N	5N	無添加	N/10	1N	5N
×10⁻⁵	2.0	1.96	1.94	1.85	1.99	1.74	1.74	1.39

第 21 表. 2×10^{-5} NH_2OH 10 cc. H_2SO_4 0.2 cc.

	添加直後				100° 10分加熱			
添加酸濃度	無添加	N/10	1N	5N	無添加	N/10	1N	5N
室温法	1.85	1.80	0.99	0.10	—	—	—	—
加熱法	2.00	2.01	1.95	0.78	0.50	1.93	1.84	0.76

第 22 表

添加酸	5N-H_2SO_4		1N-H_2SO_4
	無添加	醋酸ソーダ 0.5gr	無添加
×10⁻⁵	0.6	0.9	1.0

アルカリを用ひての中和は K-oxime 10 cc を加水分解後一方はその儘他方は弱アルカリ迄 NaOH で中和後呈色した第23表の様に中和過剰の際は再結合する事を示し H_2SO_4 除去には醋酸ソーダ使用が好ましい.

得られた条件は oxime の定性には使用出来ないが酵素試験の様に対称の明瞭な場合の P- 及び K-oxime の測定に適用せられるのであつて，概略 60 % の呈色率を示し NO_2, NH_2OH, acetoxime には及ばないが NO_3 の 10^{-3}M 程度迄しか測定し得ないのに比すれば遙にまさつてゐる．oxaloacetic acid-oxime に就ては特に該酸の合成困難と その著しい不安定性のため正確な条件を求め得なかつたが，二三の予備実験によると略々同様の測定条件で可能な様に思はれる．

第　23　表

	中　和	非 中 和
$\times 10^{-5}$	1.0	1.35

総　括

1）Griess 試薬による NH_2OH, acetoxime 及び pyruvic acid-oxime の比色測定は Glycocol-HCl 緩衝液によつて阻害されるが NO_2 は発色遅延するのみである．然るに緩衝液中 40° 24 時間及び 100° 10 分処理には前3者は安定であり NO_2 は破壊される．

2）Glycocol-NaOH は呈色へは影響しないが，稀薄 NH_2OH は大部分，acetoxime も一部本緩衝液中上記処理で分解される．

3）Phosphate は acetoxime 及び pyruvic acid-oxime の呈色を特にアルカリ側に於て阻害する．稀 NH_2OH は同様に不安定である．

4）之等の影響は緩衝液の濃度の減少に従つて緩和されるが NH_2OH の安定性のみは酸度の増加に依る．

5）Pyruvic acid-oxime 並びに α-ketoglutaric acid-oxime の測定は夫々サンプル 10 cc に IN-H_2SO_4 0.2 cc 添加し 4 分乃至 4 分 30 秒 100° に加熱加水分解して生成した NH_2OH を呈色比較する．呈色率は約 60% である．

文　献

（1）J. Blom, Ber. **59**, 121 (1926).
（2）近藤弘，秋田利彦，農化 **23**, 373 (昭 25).
（3）G. Endres, Lieb. Ann. Chem., **518**, 109 (1935).
（4）A. I. Virtanen and T. Laine, Biochem. J., **33**, 412 (1939).
（5）H. v. Euler, E. Adler, G. Günther and N. B. Das, Z. physiol. Chem, **254**, 61 (1938).
（6）大村浩久，農化 **24**, 380 (昭 26).

Summary

The influences of the phosphate and glycocol buffers on the Griess's coloration which we employed to estimate NO_2, NH_2OH, acetoxime and pyruvic acid-oxime, and the stabilities of these substances in the buffer solutions at 100° for 10 minutes and at 40° for 24 hours were studied. Some unfavourable effects were observed but found to be avoided by dilution of the buffers.

And, the best condition for the estimation of pyruvic acid- and α-ketoglutaric acid-oximes by this colour reaction were determined.