

カルシウムの新定量法 I : (血清Caと血清Caイオン型の定量)

柳澤, 文正
東京都立衛生研究所

<https://doi.org/10.15017/21223>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 13 (1/4), pp.198-204, 1951-11. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :



カルシウムの新定量法 I

(血清 Ca と血清 Ca イオン型の定量)

柳 澤 文 正

The determination of serum calcium and
serum calcium ion by new method

Fumimasa Yanagisawa

血清カルシウムの定量法については、既に古くから Kramer & Tisdall, Roe & Kahn, Clark & Collip, Sobel & Skersky, Sendroy 法等が知られている。此等の方法は間接的定量法で Ca を蓚酸塩又は 磷酸塩として沈澱させる方法で、操作が複雑でその上多量の血清を用い、長時間を要する方法であつた。特に血清中の透折性 Ca (広義の Ca イオン) と不透折性の Ca の測定法は、Toksoy & Eser 法と、理論的に求める McLean & Fastings 法のみで、これらは實際医化学に應用するには多くの難点があり、殆んど利用されていなかった。

余はここに迅速、簡易、微量にしてしかも直接測定する定量法を考えた。即ち最近古畑氏が「ベリリウムの新呈色試薬」の報告中 Sunchromine Fast Blue MB (クロールフェノールアゾデオキシナフタリンチズルホン酸ナトリウム) が Be に特有の発色をすることとを述べ、Ca も亦赤色に変色することを示している。余は血清中に Be の存在を認めないので Ca 定量の可能なることを考え、研究の結果、茲に新しい定量法を確立した。

方 法

1. 試 薬

- * 0.004 % Sunchromine Fast Blue MB 溶液 (S. F. B. と以下省略) 正確に S. F. B. を 0.1 gm 秤り 1/100 N-HCl 溶液 100 ml に溶解する。(貯蔵溶液) この溶液 10 ml を蒸溜水 250 ml に稀釈する。これは使用前なるべく作成した方がよい。
- * 2 N-NaOH 溶液
- * 4 % 蓚酸安門液
- * 標準溶液及び盲検液

炭酸カルシウム 0.2496 gm を正確に秤り 5 % 三塩化醋酸 100 ml に溶解せしめる。この溶液 10 ml を採り、蒸溜水を加えて 100 ml に稀釈する。この溶液 1 ml 中には Ca を 100 γ 含む。

実 施 1. 血清カルシウム

試験管に蒸溜水 0.8 ml を取りこれに血清 0.2 ml を加える。これに 0.004 % S.F.B. 試薬 4 ml を加え、さらに 2 N-NaOH 溶液 5 ml を加える。盲検液としては標準液 1 ml

(Transmission 100 %) 又は蒸留水 1 ml (Transmission 40 %) を用い同様に 0.004 % S.F.B. 試薬 4 ml, 2 N-NaOH 溶液 5 ml を加えたものを用いる。これを光電比色計で 620 m μ のフイルターを使用し10分後に測定する。

計 算

標準溶液 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1 ml を各試験管に取りこれに水を加えて各々が 1 ml になるとくにし、これに 0.004 % S. F. B. 試薬 4 ml, 2 N-NaOH 溶液 5 ml を加えて標準曲線を作る。(Semi-log graph 紙でも曲線である。) これを用いて容易に計算し得る。

2. 血清カルシウムイオン

この場合には 0.8 ml の水のかはりに 4 % 蔘酸安門液 0.8 ml を用いる。この場合は蔘酸安門液を加えて1～3分間の中に 0.004 % S.F.B. 試薬を加えるべきである。

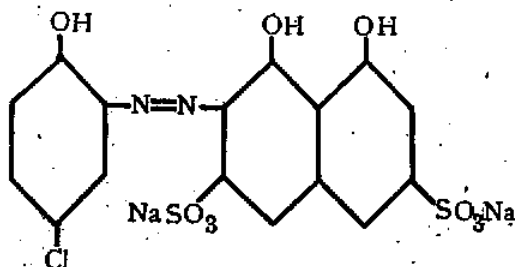
これにより得られた値を総 Ca から引いたものが求める Ca イオン量である。

Sunchromine Fast Blue MB

これはクロールフェノールアゾチオキシナフタリンチスルホン酸ナトリウムで日新化学での商品名である。

これは紫赤色の粉末で白紙にすりつけると紫色の條痕を残す。水、アルコール、アセトン、塩酸等で赤色を呈し、ベンゼン、エーテルでは不溶である。苛性ソーダ溶液で強鹼性になると紫色を呈するが、この場合 Be, Ca の存在があると赤色を呈す。Fe, Mn, Ni は青色を呈す。

NH₄Cl, NaCl, NaNO₃, NaSO₃, CuSO₄, MgSO₄, Sr(NO₃)₂, BaCl₂, ZnSO₄, Al₂(SO₄)₃ 等についても変色に対し妨害しない。但し純粋のものでないと日光による褪色が著しい。



結 果

この方法を Tisdall 法と比較した結果は第1表に示す如く Tisdall 法より多少高い値を示す。このことは次の理論及び実験より正確に示される。

1. 蔘酸 Ca の溶解度に就いて、Tisdall 法は蔘酸 Ca として沈澱せしめるのであるが、完全に全部が沈澱せず、理論的に 4 % 内外溶解している。そのために低値を示す。

2. 時間的観察、Tisdall 法、Sobel 法は蔘酸を加えて放置するが、時間的に沈澱する量が異なる。第2表は Sobel 法の時間的観察で、24 時間経過しても尙 (1) の理由で全部沈澱していない。

尙沈澱した Ca 量と沈澱しない上澄液を余の方法で測定した結果は第3表に示す。

第 1 表：血清 100 ml 中の mg.

血 清 番 号	新 定 量 法 (mg)	Tisdall 法 (mg)
1	10.12	10.01
2	9.85	9.80
3	8.45	8.31
4	10.35	10.05
5	10.25	10.12
6	8.88	8.80
7	10.35	10.11
8	9.45	9.32
9	9.81	9.68
10	11.23	10.98
11	10.01	9.87
12	9.97	9.65
13	11.38	11.01
14	10.54	10.13
15	9.42	9.40

第 2 表：Sobel 法を用いた場合に於ける時間との関係.

血 清 番 号	1	2	3	4	5	平 均
総 Ca の量	9.50 mg.	9.63 mg	10.13 mg	10.00 mg	10.50 mg	9.95 mg
1 時 間	7.89	8.39	7.63	5.00	6.10	7.00
2 時 間	5.50	5.70	5.90	4.36	5.50	5.47
3 時 間	3.20	4.00	5.50	4.00	4.72	4.34
4 時 間	2.50	1.25	3.40	2.80	2.15	2.42
24 時 間	0.80	0.50	0.25	0.30	0.40	0.45

第 3 表：血清 2 ml + 飽和醋酸安門液 1 ml + H_2O 1 ml を加えた (Tisdall 法)

を 24 時間放置した場合の沈澱及び上澄 Ca 量との比較.

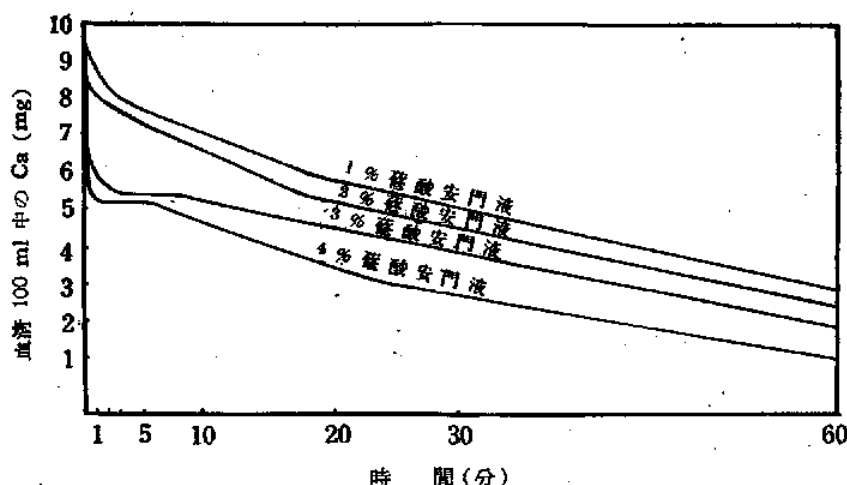
(血清 100 ml 中の Ca mg)

血 清 番 号	新定量法による Ca 量	Tisdall 法	
		沈澱を H_2SO_4 で 溶 解 し た Ca 量	上 澄 の Ca 量
1	10.20	9.81	0.35
2	9.00	8.82	0.25
3	9.39	9.00	0.40
4	8.70	8.13	0.50
5	10.06	9.58	0.45
6	9.76	9.43	0.35
7	9.95	9.62	0.20
8	9.20	8.92	0.15
9	9.95	9.45	0.38
10	10.75	10.25	0.50

以上の結果から余の Ca 定量法の測定値が正しいと考えられる。

血清 Ca イオン

上述の Tisdall 法の蓚酸安門液の沈澱速度と濃度との関係を吟味してみた。その結果は第4表の如くである。新定量法では蓚酸 Ca として沈澱したものは変色しないので、この点を利用した。



第1図. 血清 0.2 ml + 4% 蓚酸安門液 0.8 ml (或は 3%, 2%, 1%,) を 1 分, 2 分, 3 分, 5 分, 10 分, 20 分, 60 分のときに 0.004 % S.F.B. 試薬を加えて比色した場合の Ca 量 (血清 100 ml 中の Ca 量 mg).

この表に示す如く 4% 蓚酸安門液を加えた場合 1 分～5 分の間に一つの段階を生ずる。この段階が透析性 Ca (Ca イオン) と不透析性 Ca との境で、不透析性の Ca が蛋白質より離れ、蓚酸と結合する時間的ずれではなからうか。この場合を応用して測定した Ca 量と他の方法とを比較してみた。

McLean & Fastings 法との比較

上述の方法より得られた Ca イオン値と McLean & Fastings 法より得た理論値とを比較してみた。その結果は第4表に示す如くである。即ち殆んど近似値を得た。

第4表：健康人血清 100 ml 中の Ca イオン量 mg.

血清 番号	新 定 量 法 Ca イオン量 mg	McLean & Fastings 理 論 値 Ca イオン量 mg
1	3.25	3.75
2	4.10	4.25
3	4.38	4.10
4	4.48	4.55
5	4.45	4.45
6	5.45	5.30
7	5.39	5.50
8	4.75	4.80
9	4.45	4.60
10	5.30	4.95
11	4.20	4.60
12	4.08	4.60
13	5.00	4.75
14	4.73	4.80
15	5.00	4.90
16	5.05	4.60
17	4.55	4.75
18	5.05	5.25
19	4.80	4.30
20	3.63	4.20

Toksoy & Eser 法との比較

透析膜を用いる Toksoy & Eser 法と比較した結果は第6表の如し。表に示す如く近似値を示した。

第5表：血清 100 mg 中の Ca 量及び Ca イオン量 mg.

血清 番号	新 定 量 法 総 Ca 量 mg	新 定 量 法 Ca イオン量 mg	Toksoy & Eser 法	
			透析性 Ca 量 mg	不透析性 Ca 量 mg
1	9.25	4.10	4.05	5.20
2	10.85	4.78	4.55	6.15
3	8.91	3.98	3.89	5.02
4	10.05	4.58	4.54	5.45
5	11.24	5.02	4.90	6.25

脊髄液中の Ca 量との比較

さらに脊髄液中の Ca 量は同一人の血清 Ca イオン量と近似値をとるといはれるので、この両者を比較して見た。(第6表) この場合脊髄液の Ca 量も新定量法を用い測定した。

第6表：

番 号	血清 総 Ca 量 mg	新 定 量 法 に 依 る 血清 Ca イオン量 mg	脊髄液中の Ca 量 mg
1	8.13	4.73	4.89
2	10.05	3.55	3.48
3	12.00	6.00	6.20
4	8.60	4.10	4.24
5	9.80	4.35	4.60

この表に示すとくこの両者も近似値を示す。即ち McLean & Fastings 法, Toksoy & Eser 法, さらに脊髄液 Ca 量と比較し良好なる成績を得たことからして一応血清 Ca イオンが測定出来るものと考えている。

考 察

以上は血清 Ca と血清中の Ca イオン型との新定量法であるが、この方法を応用して飲料水、工業用水、或は牛乳その他の食品中の Ca 量も測定出来る。但しこの場合には妨害する物質例えば Fe, Co, Ni, Mn を除去することが必要である。但し Ca 量より少ない場合には殆んど影響がない。

主なる文献

- 1) Sobel & Sklersky; J. Biol. Chem., 122: 665 (1938).
- 2) Kramer & Tisdall; J. Biol. Chem., 47: 475, (1921).
- 3) McLean & Fastings; Amer. J. Med. Sci., 189: 601, (1935).
- 4) Toksoy & Eser; Helvet. Med. Acta (Suppl. 7), 8: 77, (1941).
- 5) 古畑 威; 科学研究所報告, 第26輯4. 5号, 139 (25), (1950).
- 6) 柳澤文正; 新潟医学会雑誌 (昭和26年発表予定).

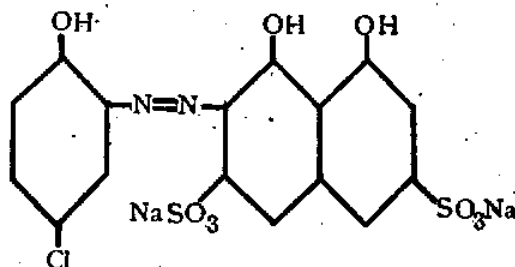
(東京都立衛生研究所)

R é s u m é

As the determination method of serum calcium and calcium ion which have been generally used are very complicated and indirect methods, they are very inconvenient for clinical uses.

We are now working on a method which we hope will prove more direct, easy, exact and speedy.

J. Furuhata in Japan reported that he found the color reaction of Belirium using a new reagent. The reagent is Sunchromine Fast Blue MB, and its chemical formula is as follows:



It is powder of purple color. It becomes red solution when it is dissolved in absolute alcohol, acetone and water, but it is not dissolved in benzene and ether. When sulfuric acid or hydrochloride is added to the solution, the color change can not be seen, but in the case of added sodium hydroxide solution, the color reaction is purple and added calcium and Belirium, the color reaction is red.

Using this phenomenon we found the following determination method.

M e t h o d

Reagent:-

1. 0.004 % Sunchromine Fast Blue MB solution.

(In a 100 ml volumetric flask, place 0.1 gm Sunchromine Fast Blue MB,

add 100 ml 1/100 N-HCl solution (Stock solution). This solution 10 ml to make exactly 250 ml with distilled water. This reagent solution is made newly in every case).

2. Sodium hydroxide, 2N.
3. Ammonium oxalate, 4 % Aqueous.
4. Standard solution.

Calcium carbonate 0.2496 gm is dissolved in 100 ml with 5 % Trichloro-
ratic acid, and 10 ml of this solution is added water to make 100 ml.
(100 γ /1 ml).

Technic:-

1. Take 0.2 ml clear serum into test tube and add the water 0.8 ml and add 0.004 % Sunchromine Fast Blue MB solution 4 ml and again add 2 N sodium hydroxide solution 5 ml and mix them slowly to make exactly 10 ml. Blank is water 1 ml or 0.004 % Sunchromine Fast Blue MB solution 4 ml and add 2 N sodium hydroxide 5 ml.

Reading the density of the color developed at 10 minutes intervals to obtain the maximum reading by Evelyn photoelectric colorimeter, filter 620 m μ . Using the same project 1-0.2 ml standard solution is added water to make 1 ml and 0.004 % reagent solution 4 ml. This is added 2 N sodium hydroxide solution 5 ml to make exactly 10 ml, mix them well and read the density of the color.

2. For the serum calcium ion, substitute 4 % ammonium oxalate solution 0.8 ml for water 0.8 ml and between 1 to 3 minutes add 0.004 % Sunchromine Fast Blue MB solution.

Calculation:-

The concentration of calcium in the unknown serum can be estimated by the standard curve. The concentration of calcium ion (mg per 100 ml) is obtained by reducing the value obtained in technic 2 from the value of serum calcium.

(Tokyo-To Laboratories for Medical Sciences)