

Fiske-Subbarow 法における リンの発色条件についての検討

江 口 瞳

A Study on the Conditions in which Phosphorus colors
by Fiske-Subbarow's Method.

Hitomi Eguchi

This is the report on the conditions in which phosphorus colors by Fiske-Subbarow's method with spectrophotometer.

諸 言

本研究室においては、無機縮合りん酸分解酵素について研究を行なってきた。試料中の縮合りん酸量や酵素活性の測定は、オルトリん酸の定量によって得られる。従ってオルトリん酸の定量操作は、この研究上きわめて重要である。

オルトリん酸の定量法の中で最もよく使われている方法は、オルトリん酸を酸性溶液中でモリブデン酸と反応させ、リン・モリブデン酸をつくり、これを適当な還元剤で還元して得られる青色錯体（モリブデン・ブルー）を比色する方法である。

色の強度および安定度は還元剤の種類によって異なるため、これまで種々の還元剤を用いた定量方法が提示されてきたが、1, 2, 4-アミノナフ¹⁾トルスルファン酸を用いたFiske-Subbarow法が現在最も多く採用されている。

著者は、Fiske-Subbarowの原法にもとづいてオルトリん酸の定量を行ない、発色が実験条件によって敏感に影響されることを認めたので、その測定条件について検討した。

実験方法

1. 試 薬

- i) 3 N硫酸
- ii) 2.5%モリブデン酸溶液
- iii) 還元剤：再結晶して精製した1, 2, 4-アミノナフトールスルファン酸0.1gを、15%NaHSO₄水溶液39mlに溶解し、これに20%Na₂SO₃水溶液1mlを

加える。溶けない場合は更に少量ずつ追加し、完全に透明になるまで加え、不溶物質を除くためにロ過する。ロ液を褐色ビンに貯え冷暗所に保存する。2週間は使用できる。

iv) KH₂PO₄水溶液：30γP/ml

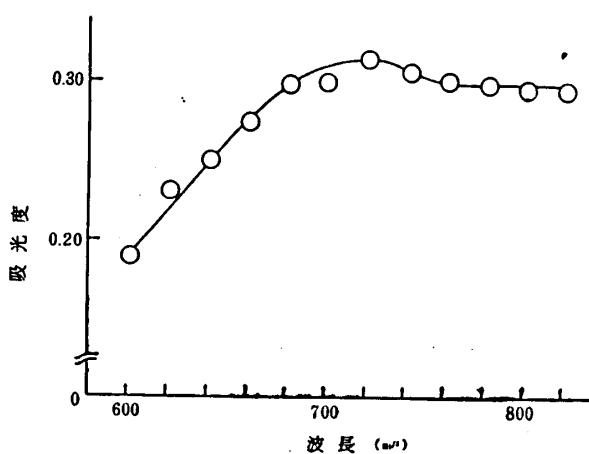
2 操作

KH₂PO₄水溶液0.5mlに、3N硫酸0.5ml、2.5%モリブデン酸溶液0.5ml、還元剤0.2mlをこの順に加え、水で5.0mlとしてよく混和し、20°Cに15分間保ち、ただちに吸光度を測定する。（日立101形分光光度計を使用）

結果と考察

1. 吸収スペクトル

KH₂PO₄水溶液を前述の操作に従い、発色させ、室温(10°C)に15分間放置したのち、各波長における吸光度を測定した。その結果は第1図に示した。

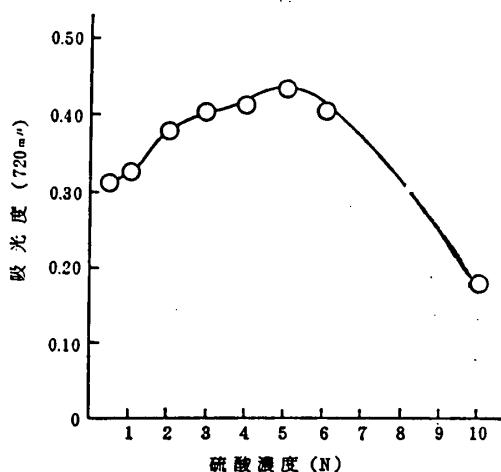


第1図 吸収スペクトル

最大吸収の波長を $700\sim740\text{m}\mu$ の範囲にある。Colemann's spectrophotometer²⁾で測定した古川らは $740\sim780\text{m}\mu$ と報告しているが、日立101形分光光度計では $720\text{m}\mu$ が妥当であると考え以下の実験はこの波長で行った。

2. 酸 度

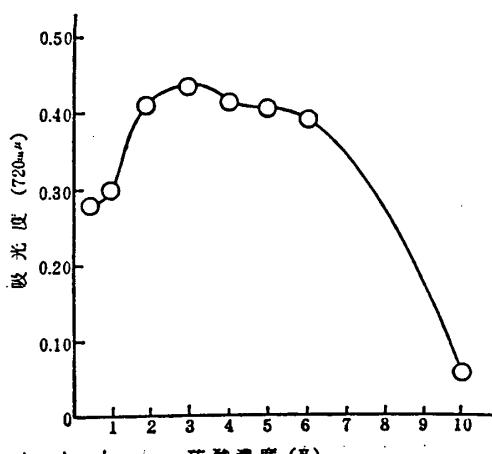
硫酸濃度を $0.5\sim10\text{N}$ に変化させ、その他の条件は全て同一にして吸光度を測定した。



第2図 発色におよぼす酸度の影響

第2図に示すように、発色の強さは酸度に強く影響される。硫酸濃度 5N のとき最大吸収が得られた。

酸素反応液中のオルトリん酸の定量は、反応液に4倍量の冷10%トリクロル酢酸を加え、ロ過し、そのロ液について行なう。従ってこの場合は、硫酸の酸度に更にトリクロル酢酸の酸度が加わる。そこでこのトリクロル酢酸の酸度の影響を調べた。



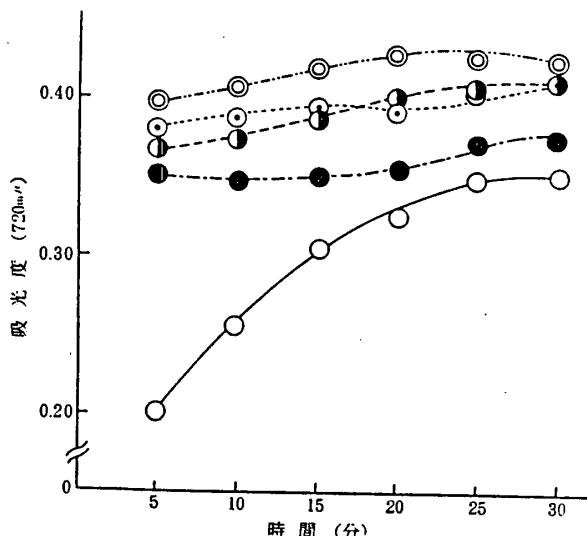
第3図 発色におよぼす酸度の影響
(トリクロル酢酸処理した場合)

実験は、前述のとおりトリクロル酢酸処理をしたりん酸溶液について行なった。すなわち $150\gamma/\text{P}/\text{ml}$ の KH_2PO_4 水溶液 0.5ml に冷10%トリクロル酢酸4倍量を加えたものについて吸光度を測定した。

第3図に示すように、硫酸濃度 3N のとき最大吸光度が得られた。トリクロル酢酸の酸度の影響は明らかに認められた。トリクロル酢酸処理したものについては硫酸酸度を減ずる必要がある。

3. 温度および発色時間が発色の強さにおよぼす影響

第4図は、還元剤を加えてからそれぞれの温度に保持したものについて発色の経時的变化を調べた結果である。



第4図 温度と発色時間の影響

○—○ 10°C ◎---◎ 25°C
 ●—● 15°C ○---○ 30°C
 ◎.....◎ 20°C

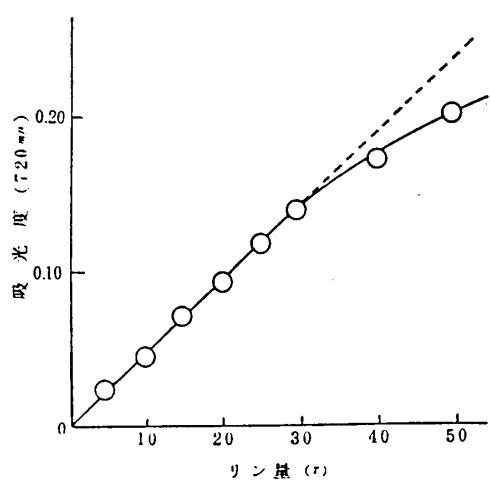
図からわかるように、温度によって発色の強さが異なる。20°C前後の湯浴中で、15~20分間放置したとき発色は最も安定である。20分以後は発色が増大し不安定となるので、数多くの試料を一時に測定する場合は、20分以内に測定が終了するようにするのが望ましい。

4. 測定可能濃度

以上のように測定条件について検討してきた結果、波長 $720\text{m}\mu$ 、温度 20°C 、発色時間 15 分、酸度 5N 硫酸またはトリクロル酢酸処理した場合は 3N 硫酸が最適であることが明らかになった。そこでこれらの条件下で測定可能濃度を調べた。

リン濃度 $10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100\gamma$ の各 KH_2PO_4 水溶液について吸光度を求めた。

リン量 60γ までは吸光度はリン量に比例する。従って



第5図 リンの標準曲線

測定にあたってはリン濃度を60γ程度にとどめるべきである。

要 約

オルトリん酸の定量にあたり Fiske-Subbarow 法の

測定条件を検討した。

- (1) 吸収スペクトルは $720\text{m}\mu$ において最大を示した。
- (2) 酸度は、硫酸濃度 5N のとき最大吸収を示し、冷10%トリクロル酢酸で処理した場合は 3N 硫酸を用いたとき最もよい結果が得られた。
- (3) 発色の強さは、還元剤を加えてから 20°C に 15 分間保持したものが最も安定である。
- (4) リン量は、 $60\gamma/\text{ml}$ までは吸光度との関係は直線的であった。

おわりに本研究にあたり終始、懇切なる御指導をいただきました本学講師桑野安子先生に厚く感謝の意を表します。
(昭和 年月日受理)

文 献

- 1) C. H. Fiske and Y. Subbarow; *J. Biol. Chem.*, **66**, 375 (1925)
- 2) 古川美採, 種田雅子, 中村康吉, 春日誠次, 吉川春寿; 生化学, **24**, 76 (1952)