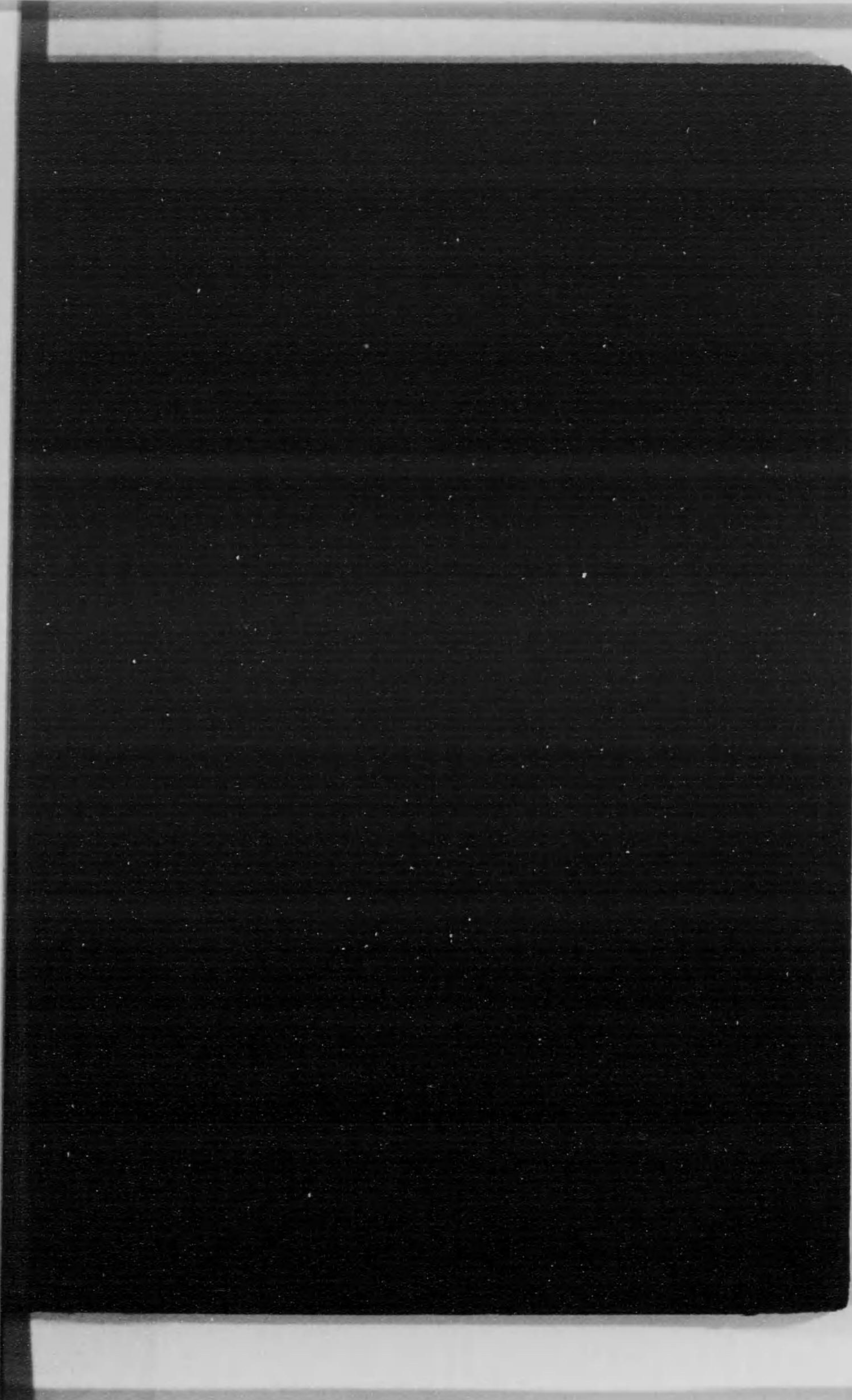


始





生化學的微量定量法

醫學博士 小金井良一

纂著



47  
286



生 化 學 的 微 量 定 量 法



醫 學 博 士

小 金 井 良 一 纂 著

1924

大 正

13. 7 26

內 交



47-256

## 自 序

萬般の科學の中歐洲大戰後特に著しき進歩の跡を認め得るものとしては先づ指を生化學に屈す可きであらう。従つて此方面の研究は輒近著しく諸學者の注意を喚起し、其研究者の數も近來夥しく増加する傾向を示してゐる。又我國に於ける斯學の進歩の程度も歐米に比し殆ど遜色なきまでに至つたのである。以前に生化學が生理學の一部位にしか考へられなかつた時代に比すると實に今昔の感がある。一方に生化學は應用廣汎なる醫化學の基礎であるから此方面の研究にも一般生化學的素養の必要な事は云ふ迄もない。

然し乍ら此種の研究に當つて吾々が常に不便を感じる點がはまだ決して些くない。即ち我國に於ける生化學研究者が悉く常に各種の新しい文獻に眼を觸れ得ると云ふ事は甚だ困難であるのが其第一である。第二に文獻にあらはれたる検査法定量法等が昨今益



益微に進み細を極め、實に多種多様であるが爲に研究者が實地に當つて選擇に苦しむ場合が誠に多い、尙折角此方法ならば申し分がないと思はれても注文通りの装置藥品等が急に調はない時は新に製造するか歐米へ注文しなくてはならぬ、之がため又非常な時日を空費することとなるのが其第三である、是等の障礙の爲に折角吾人がヒントを得プランを樹てた研究が其進捗を阻まれ解決を遅延する事が多い、殊に過般の震災によつて東京を中心として生化學文獻の焼失したるもの夥しく斯る方面の研究に不便を感ずる事が益々甚しくなつたのである、是れ則ち編者が不敏を顧ず先づ微量定量法に筆を取つた所以である。

微量定量法(*micro determining method*, Mikromethodik)が近來益々應用の範圍を擴めたのは、小動物が盛に諸種の實驗材料に供せられ殊に逐時的検査(*serial examination*, Reihenuntersuchng)の必要に迫られたる際充分の材料を得られないのと尙臨牀的には材料の甚乏しいのを例とするための必然の結果に外ならない、然るに微量定量法は一般に非常に錯雜し且種々の技巧熟練を要し且應用を誤ると50%位の誤

差を來す事は決して稀でなく従て微細な増減を以て推論する事となると往々推理の基礎を誤るに至るのである、編者は此點に深く留意し自己の經驗若くは實際其方法を吾國に於て實施したる諸家の意見を徴し理論に走らぬ様勉めて實施上の要點を指摘し且諸法に必然的な誤差の範圍を明記して立論を危くする事が無い様に勉めたのである。

故に何れの方法も字義通り最新とは限らぬが高價にして複雑なる器械を必要とするものは成る可く之を避け普通の設備を有する研究室で實施し得るを限度として定評ある代表的のもののみを採用した譯である、然し乍ら是等のものと雖日進月歩の知識に伴つて今後如何に改良せられないとも限らぬから絶えず諸方面の注意を怠らず頻々と改訂する積りである、此際斯る意味に於て諸賢の御教示を給はるを得ば編者の之に勝る幸はないのである。

1924年4月

纂著者しるす



## 凡 例

1. 本書に記載する諸定量法は読者が既に生化学(或は醫化学)の實習を終了し一般の化学的操作に經驗があると云ふ前提のもとに記述した。又實際斯る豫備知識なくして微量定量法を實施する事は困難なるのみならず徒勞であるからである。
2. 本文中必要に應じ外國語を使用した。尙参考に資せんため挿入した個所もある。何れも英語には「イタリック」を採用し獨逸語との區別を明らかならしめた。
3. 長さ、容積、重量の單位は糶、立方糶、立、瓦、厩等の漢字を用ひず *cm.*, *cc.*, *l.*, *gm.*, *mg.*, 等の英米式略字を用ひた。
4. 人名を片假名で書くと読み憎いのみか往々錯誤を來す事があるので原字の儘を記入し且參照を便にせんため文献は勉めて多數に引證する事とした。
5. 藥品名は最普通に行はれてゐる日本名を用ふるを



例とし特に混同し易いものは分子式乃至英語名を挿入した。其他物品の名稱等で外國名の方が普通に行はれてゐるものは強いて譯名を使用しなかつた。

6. 微量定量法を行ふには正確を期するため自然装置の複雑になるのは當然である。然し乍ら吾人が研究を行ふに當つて止むを得ないものゝ外なるべく普通の器具で手軽に迅速に實施するのが捷徑である。故に微量原素分析(*micro elemental analysis*)等特殊の目的を有する方法は之を避ける事にした。依つて必要の人は E. Abderhalden の *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden* か或は F. Pregl の *Die quantitative organische Mikroanalyse* 等の如き書を参照せられん事を望む。
7. 此書の稿を終るに先だち Leipzig より L. Pincussen の *Mikromethodik* なる書が到着した。非常によい参考書であるが普通の定量法の規模を縮小した所謂 *Halbmikromethode* なるものが多く最近米國で發達した實際の *mikro methods* に比すると猶其核心を捕へ得ない憾がある。

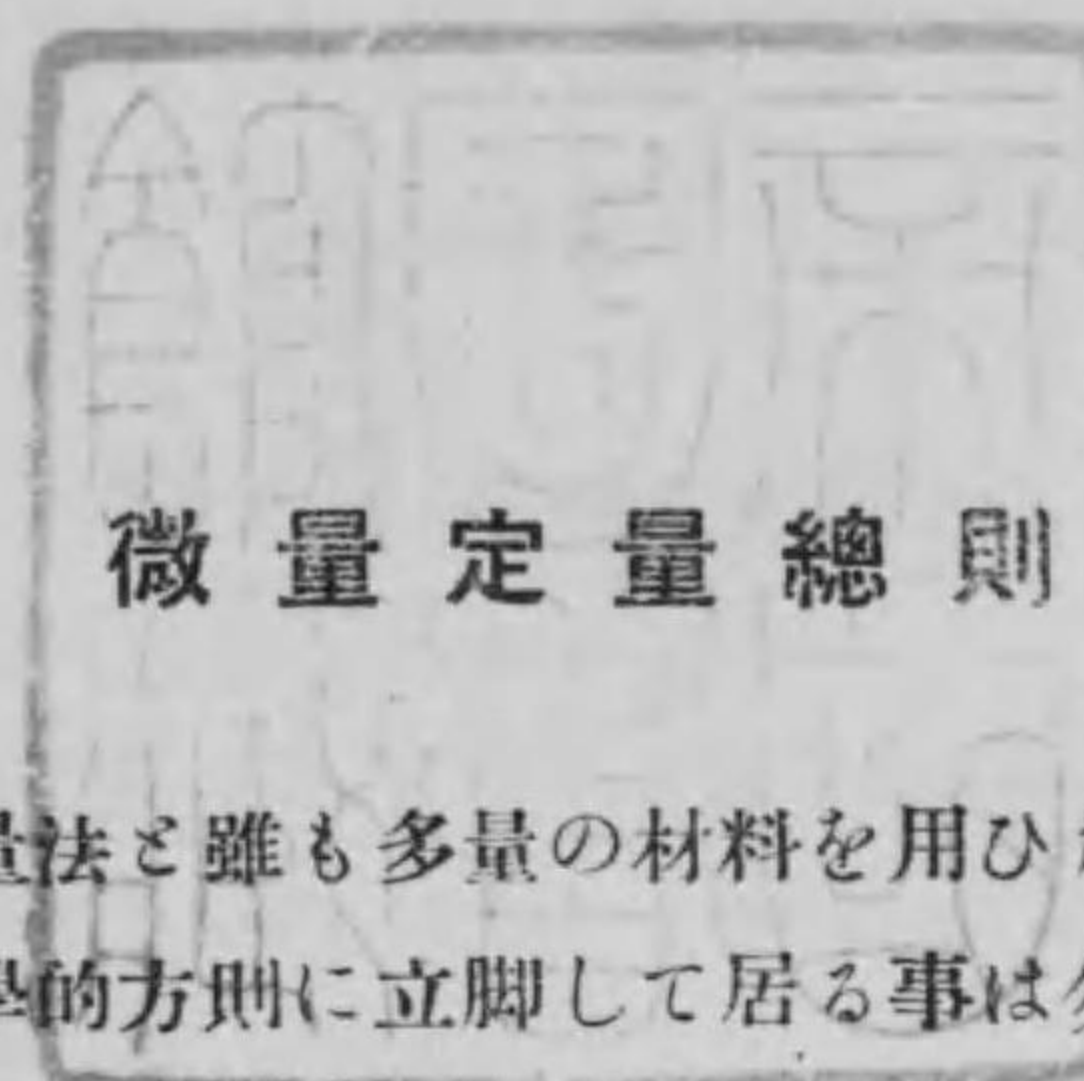
目 次

自序	i
凡例	iv
微量定量總則	1
器具及機械	6
鹽素微量定量法	17
磷微量定量法	23
比色法に據る磷微量定量法	32
比濁法に據る磷微量定量法	40
「カルシウム」微量定量法	46
少量血液中の Na, K, Ca 及 Mg 定量法	52
鐵微量定量法	66
「アムモニア」微量定量法	69
血液非蛋白窒素微量定量法	81
總窒素微量定量法 ( <i>micro Kjeldahl</i> )	85
尿素微量定量法	98
尿酸微量定量法	104



目 次

「クレアチニン」微量定量法……………112  
「クレアチン」微量定量法……………120  
糖微量定量法……………123  
「アセトン」體微量定量法……………134  
「コレステリン」微量定量法……………147  
比濁法に據る脂酸及「コレステリン」微量定  
量法……………151  
**附録**  
瓦斯分析に據る血液検査法  
    少量血漿中の炭酸瓦斯含有量測定法……………159  
    Barcroft の血液瓦斯分析法……………167  
  
索引(英語)……………189



微量定量總則

微量定量法と雖も多量の材料を用ひた時と同じく一般の化學的方冊に立脚して居る事は勿論であるが、其意義に至つては兩者稍其趣を異にして居る。微量定量は如何に記載通りに行ふも方法其物に附帶した或る程度の誤差即實施者の責に任せざる誤差は免れぬものである。故に實驗者の勉む可きは如何にしたらば誤差を最少限度に局限し得るか、換言すれば豫期の範圍を超へざらしめ得るかといふにあつて、容易に實際と違はぬ價を得るものと速斷するが如きはむしろ無謀と見做さなければならぬ。

故に微量定量法を行ふに當つては連續定量を行ふ場合でも同一の材料に付て少くも三つの定量を行ふ。何となれば内一つを失敗するも他の二つに近似の結果を得た場合には其實験が無効とならぬからである。最初より二つの定量を行つた際兩者の結果の間に懸隔がある時は何れを真に近いものとしてよいか取捨



に迷ふことゝなるのである。

尙微量定量法に最必要なるは盲驗 (*blank test*, *Blindversuch*) である。時間、溫度(或る場合には氣壓)、計量器等一つとして絶對不變のものはない、夫々幾分の誤差を來し得る可能性を持つて居る。然も是等は微量定量法に取つてはかなり重大な意義を有して居る。

盲驗の方法は夫々特殊の順序を以て行ふのであるが夏行つた盲驗が冬役に立たぬこともあるし、同じ商標の藥品を以てしても定量に及ぼす影響が必ず一定して居るとは限らぬ。故に新らしい藥品の封を切つた時試薬を新調した時等はいちいち之を繰り返し、其量を以て得た結果を補正することを忘れてはならぬ。

世の人は黄昏時になつて電燈がつかぬと誰も其原因を確めやうと努力するものであるが夜が全く明け放れてから終夜燈が何時までもついて居る時之を注意する者は少なからう。けれども之は餘りに實用本位の考であつて大きな眼で見れば何れも放置して置く事は出来ない。微量定量とても同様餘りに實用本位に傾かず目的以外の方面にも絶えず細かい行届い

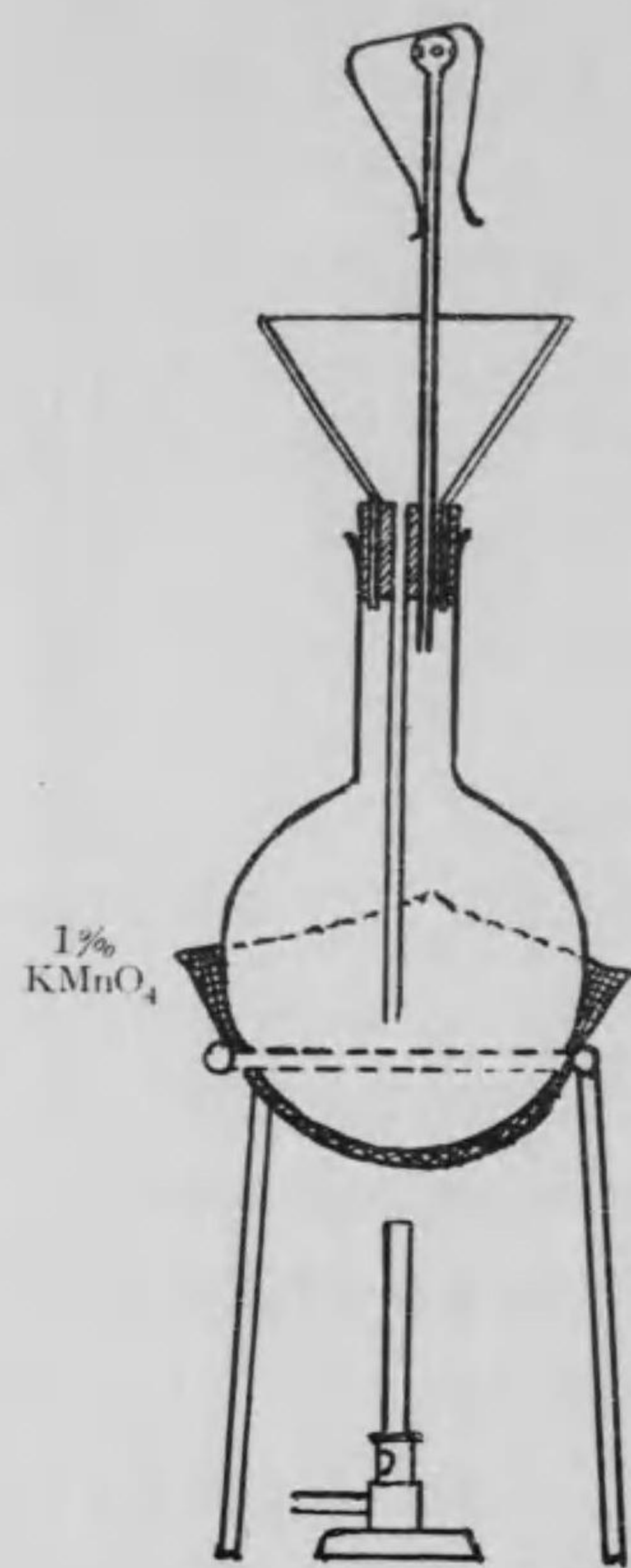
た注意を以て施行せぬと往々つまらぬ誤謬に陥る事があるのである。

以下微量定量を實施するのに根本となる可き二三の事項を附記しやう。

1. 微量定量を行ふ室は清潔でなければならぬ。鹽酸、「アムモニア」等の瓦斯は勿論發生してゐてはならぬ。
2. 使用藥品は可及的純粹でなければならぬ。標準液 (*standard solution*) の調製に用ふるものは勿論最純を要するが一般に使用する酸、滴の類からも意外の誤謬を招致することがある。
3. 微量定量に應用せらるゝ化學反應は(例へば比濁法) 一般に繊細であるから總ての要約を適確に遵守する必要がある。殊に試薬の量的關係に支配せらるゝ事が多いから之れは常に「ピペット」を用ひて測るのを例とする。
4. 「ガラス」器具は總て硬質「ガラス」を使用す可きである。

普通「ガラス」(*soft glass*) から出る滴の量は意外に多量なものである。





第 1 圖

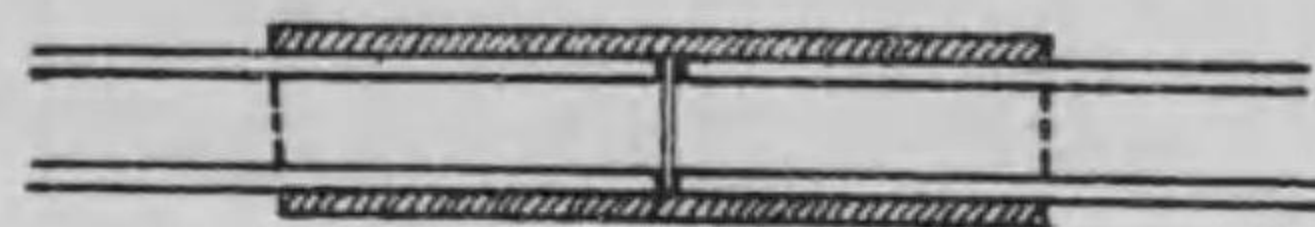
「ガラス」器の清浄法：

a. 新しい器具は二三日粗製濃鹽酸に浸して置いた後よく水洗し第 1 圖の様な装置で約 5 分間水蒸氣を通ずる。

b. 次回からは大體石鹼で洗つた後「クロム」硫酸 ( $K_2Cr_2O_7$  の飽和溶液に 3-5 倍容量の粗製濃硫酸を混じたもの) で處理し水洗する、尙稀薄なる定規液を用ひて滴定する等特殊の目的に向つては毎回水蒸氣を通ずる必要がある。

5. 「ゴム」管及栓、「コルク」栓等に常に多少溶解性物質を含有し不純物を混入する恐れがあるから成

る可く「ガラス」接續(擦り合せ)を選む可きである。唯直接試薬に接觸せぬ「ゴム」類は 3-5 % の炭酸曹達で暫時煮沸したものならば差支ない。尙「ガラス」管を「ゴム」管を以て接續せしむるには圖の如く管端を接觸せしむる等の注意が肝要である。



第 2 圖

6. 血液採取上注意す可き事項：

血液は粘度大にして且凝固性あるがために秤量に據る場合は別であるが「ピペット」を用ひ正確に測ることは甚困難なるのみか注意せぬと誤差を來し易い。故に操作に手間取れぬ時の外は其凝固を阻止し Ostwald の「ピペット」を用ひ丁寧に測る必要がある。

血液の凝固を阻止する方法は様々あつて目的により一様ではないが次に普通用ひられる二三を列記しよう。

i. 靜脈穿刺に用ふる注射器或は受器をよく乾燥してこの中に所要血液量の 2-3 % の蔞酸加里 (potas-



*sium oxalate* の純良品を乳鉢でなる可く微細なる粉末となせるものを容れ置き採血後直ちに混合する。斯る血液は Ca 定量には用ひられぬが容積を變せず且  $P_{H}$  に變化がないから便利である。遠心沈澱すれば蓚酸血漿 (*oxalate plasma*) を得る。

- ii. 枸橼酸曹達 (*sodium citrate*) を血液の 5% の割合に加へても略同様の結果を齎し得る。
- iii. 纖維素 (*fibrine*) の析出を絶対に防ぐには 1-2% の蓚酸加里或は 4% の枸橼酸曹達溶液 1 に 9 倍容量の血液を混合する。

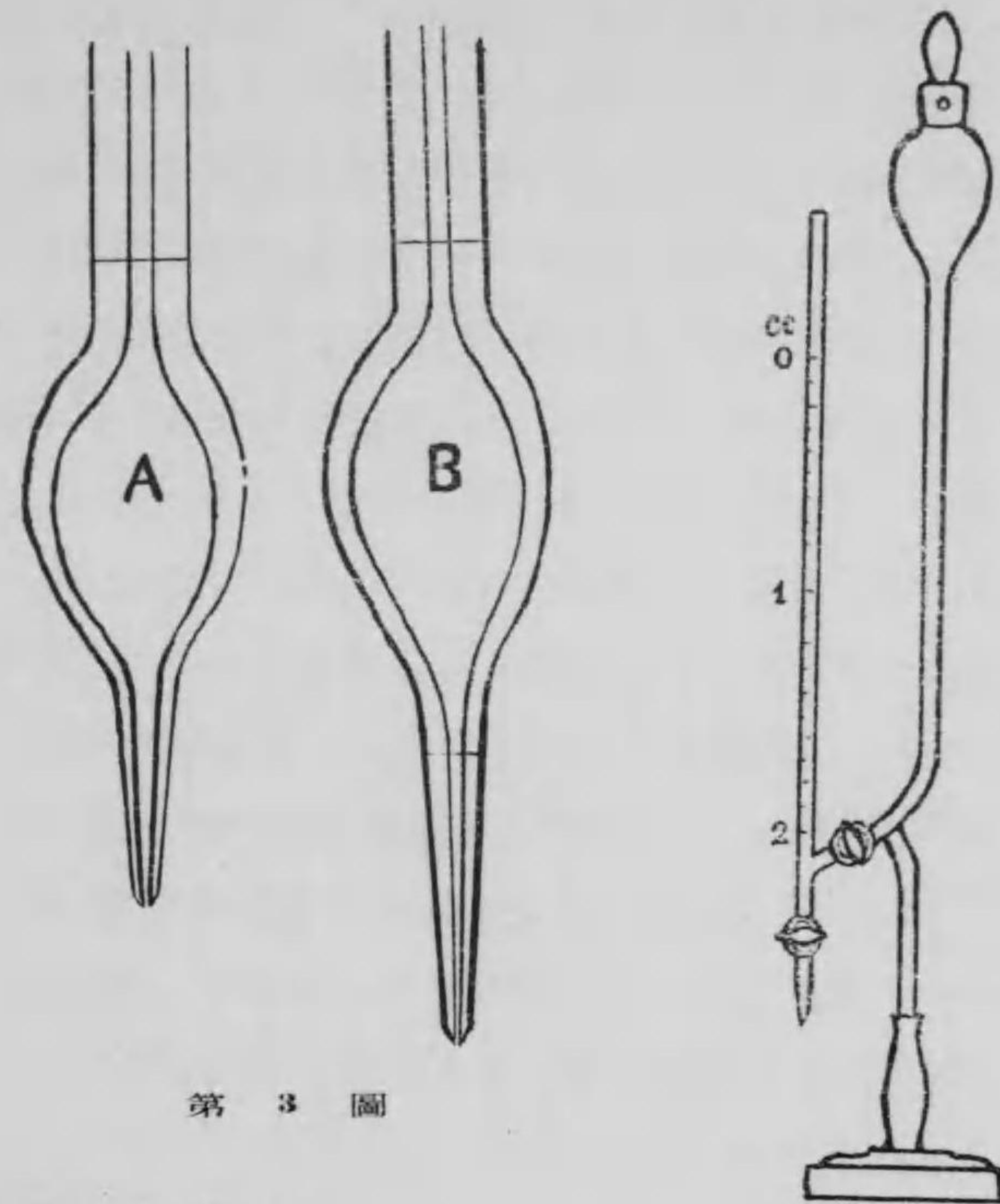
### 器具及機械

以下微量定量を行ふに當つて是非備へ付けねばならぬ數個の器具及機械に就て簡単に解説を記す事としよう。

#### 1. Ostwald の「ピペット」

少量の粘度 (*viscosity*) 大なる液體は到底普通の「ピペット」(「ホールピペット」, 「メスピペット」等) では正確に測る事が出来ぬ。斯る目的に考案されたものは此 Ostwald *pipette* であつて 0.2-3.0 cc. 位まで種々ある。

市販のものは勿論檢定 (*calibration*) することが必要であるが A 型に於ては檢定の時に單に流出せしむるか噴出するか定めて置かねばならぬ。血液には普



第 3 圖

第 4 圖

通 B 型を用ひる。

#### 2. ミクロビューレット (*micro burette*)

構造及使用法は第 4 圖を一見すれば明白である。



目盛りの部分の全量 2 cc. - 5 cc. であつて稀薄な定規液を入れるには硬質「ガラス」を以て作る必要があるし、過「マンガン」酸加里、沃度酸等の定規液に用ふるには著色を可とする。

最小の目盛りは  $\frac{1}{20}$  -  $\frac{1}{100}$  cc. までのものがあるが検定を爲すに特に注意すべきは管の内径が細いため大量を一時に急速に流出せしめ直後に讀取するのと數十秒待つて讀むのと  $\frac{1}{50}$  cc. 内外の差を生ずる。少量宛流出せしめた場合と一致せしむるため常に後者に絶つて目盛りを讀まねばならぬ。

### 3. 水流「ポンプ」(aspirator)

構造は種々あるが逆流止めの装置のあるものがよい。吾々の實驗室で試みに検査した五個のポンプの一分間の吸引量は夏期水道の餘り強くない時 1.5 l., 3 l., 4.2 l., 7.0 l. 及び 8.5 l. 吸引による最小氣壓は 15-20 mm. Hg であつた。故に購求に際してよく選擇し劣等品に當らぬ様に注意する必要がある。

### 4. 「パラフィン」鑷

「ガラス」の「アルカリ」の影響を絶対に忌避する必要がある試薬を貯藏するには内面に薄き「パラフィン」の被膜を有する共口鑷を使用する。之を作るには先

づ純良「パラフィン」(熔融點が餘り高くない方がよい)を多量の蒸留水と共に時々振盪しつゝ煮沸し水溶性のものを全然除去する。蒸留水を變換し 2-3 回同操作を反復したる後冷却細削し真空除濕器中で乾燥する。前記の方法(第 4 頁参照)を以て清淨にした共口鑷を高温乾燥器中で 100°-110° C に加熱し中に大きに應じ適當量の「パラフィン」を投入し熔融するを待つて之を靜かに横に回轉しつゝ薄き被膜を形成せしめ徐々に放冷する。

### 5. 比色計 (colorimeter)

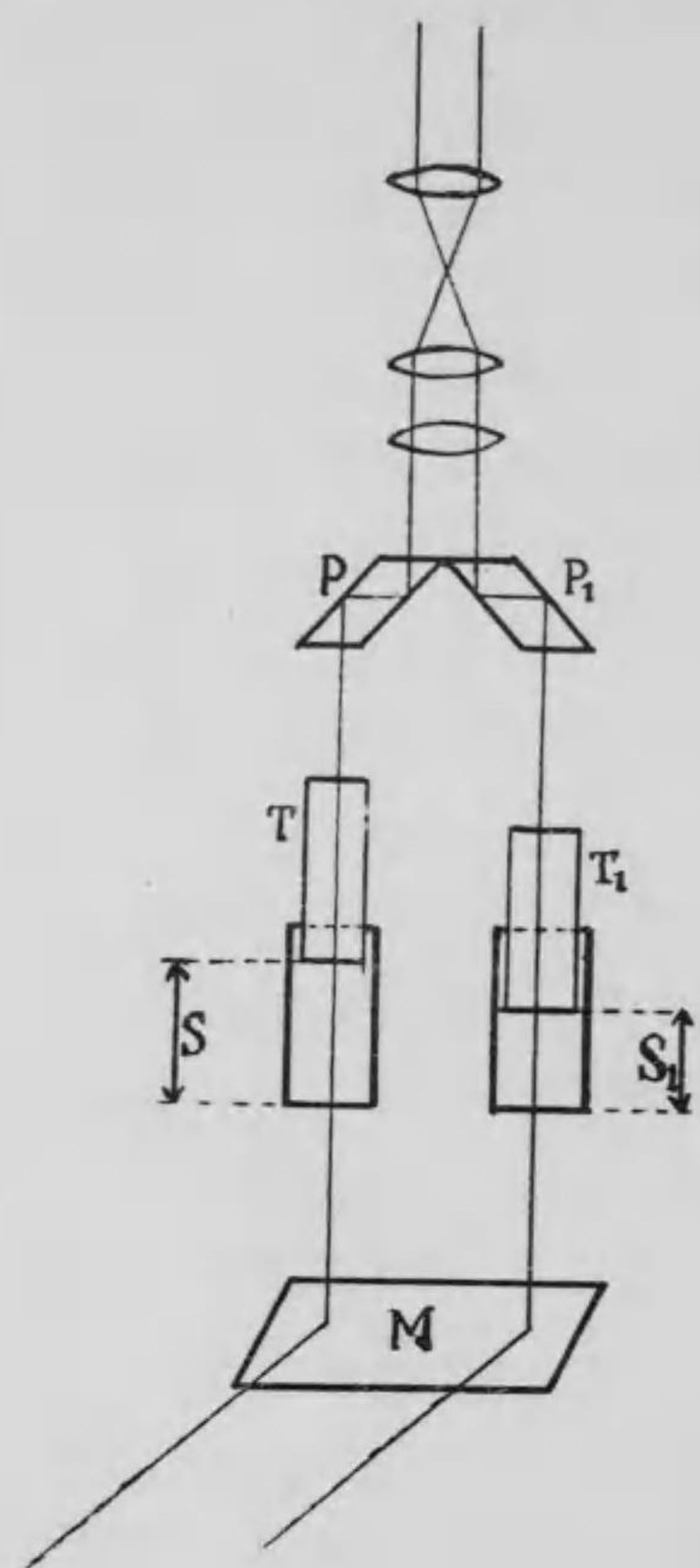
比色的定量は現今の微量定量には重大なる意義を有するもので比色其物に多少の缺點(色覺の個人的差異、比色計の機械的誤差等)ありとするも容量乃至重量分析で到底正確を期し得ない程の微量でも比較的簡單に定量し得る利點がある。

比色計には Dubosq, Pellin, E. Leitz, Jobin, Kober, Bausch & Lomb 等種々あるが比濁計を共用し得るものが便利であらう。

原理——比色計は或る物質が其量と比例した現色反應を呈する時其濃度  $C$  を同様に著色した濃度既知 ( $C_1$ ) の溶液と比色し夫々の液層 ( $S$  及  $S_1$ ) を種々に



變化して兩者の同濃度に見ゆる點を定め  $C:C_1$   
 $=S_1:S$ ,  $C = \frac{C_1 S_1}{S}$  に據つて  $C$  を求むるのである。



第 5 圖

使用法——著色  
 した被験液及標準液を容れた圓筒形容器に  $T, T_1$  なる「ガラス」圓柱を上  
 下して此處に  $S$  及  $S_1$  なる厚さを有する液層を生ぜしむる事が出来る反射鏡  $M$  で反射された光線は是等の液層及  $T, T_1$  を通して夫々「プリズム」 $P$  及  $P_1$  に入り集まつて擴大「レンズ」を通じて眼に入る。此兩種の光線は各互に相接する半圓形をなして

居る (Dubosq, E. Leiz.) Plesch 式では橢圓形  $\odot$  Kober 式のものゝは兩視野を區劃する線が全然見えぬ様な構造を有して居る。

使用に當つて先最初に  $T$  及  $T_1$  を器底に達せしめた時 ( $S=0, S_1=0$ ) 「ノニウス」の零點と合致する尺度の點を零點とすれば兩容器へ標準液を容れて覗き同濃度に調節した時果して同一の讀みを得るや否やを確める。次に標準液層 ( $S_1$ ) を 3.0-4.0 cm. に固定し置き被験液側の  $T$  を上下し (色彩濃厚の方よりと色彩稀薄な方よりと各少くも三回) 同濃度に見ゆる點 ( $S$ ) を定めそれ等の平均を取り計算に用ふ。

光源は日光でもよいが直射光線はいけない。Mazda 瓦斯入電球 (晝間燭光, 50 W., 擦り「ガラス」) を用ひ暗室で測定するのが最萬全の策である。

同種の實驗を多數に行ふ場合には其間光源は勿論其他の條件も常に一定にして置く必要がある。

著色した溶液に濁濁があつてはならぬ。又之を濾過しても決して正しい結果を得るものでない。須らく最初より定量をやり直す可きである。

標準液は同色調を有する他の種の溶液 (例へば窒素定量に  $K_2Cr_2O_7$  溶液) を用ひらるゝ事もあるが同



一物質の溶液を同様に処理して得たものに若くはない。(従つて有機物によりては常に新鮮な標準溶液を調製する必要がある。)

$\frac{S_2 - S_1}{S_1}$  が 30% より小さければよいが 50% より大きい時には絶対に信頼出来ぬ。依つて標準液の濃度を加減して著色液を作り直さねばならぬ。

#### 6. 比濁計 (nephelometer)<sup>(1)</sup>

比濁法 (nephelometry) はある溶液に一定の試薬を加へて比較的安定 (20分-30分間不変) な濁濁 (turbidity or precipitate) を生ぜしめ得る時、同物質の濃度既知の溶液を同様に処理して得た濁濁と比較し前者の濃度を推知するものであつて重量分析に依つて測定し能はざる微量の脂肪 (脂酸)、磷酸鹽、鹽化物、蛋白質、核酸等の定量に昨今盛に應用せられ亦其範圍も次第に擴大せんとして居る。

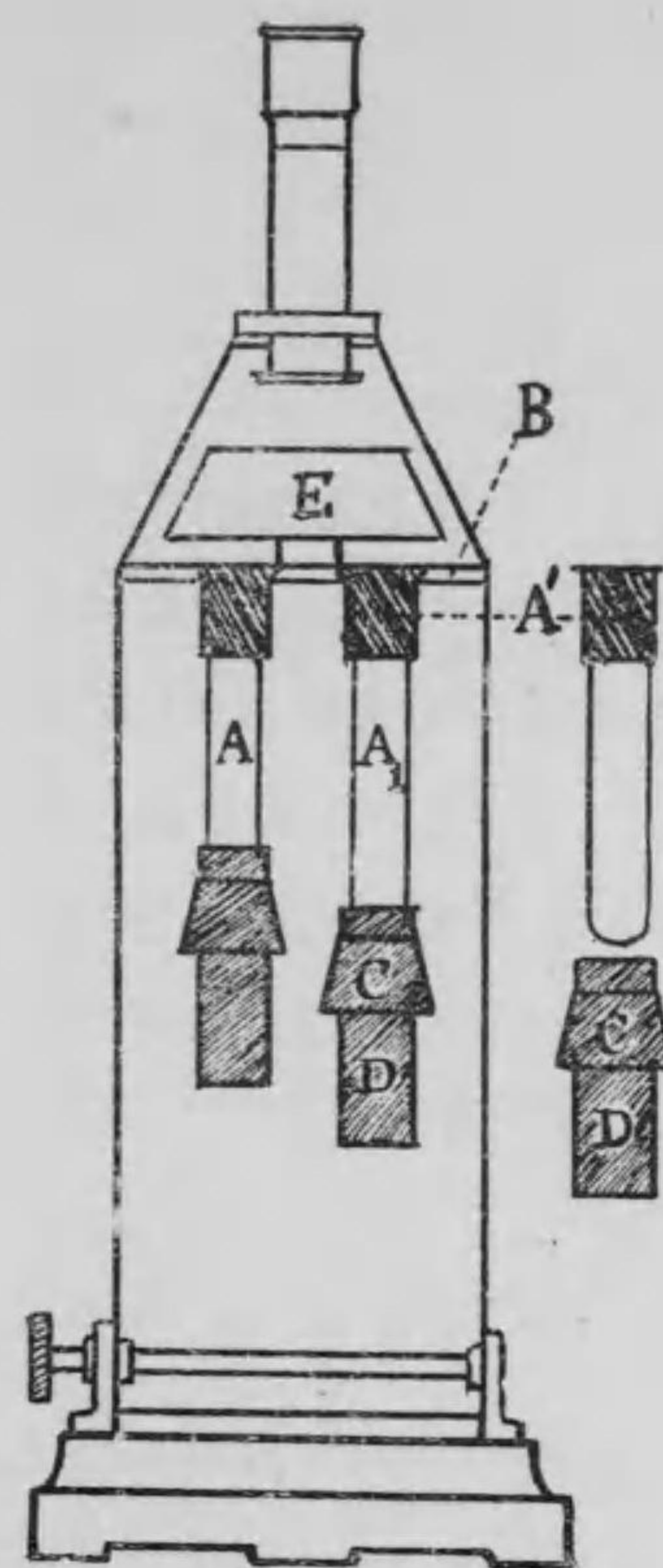
原理-Nephelometer は側方より投射する光線が浮游體の表面より反射せらるゝ現象 (Tyndall's phenomenon) を應用し明暗の度に依つて其密度を比較し得るが如き構造を有して居る。然れども此定量には今日尙極

(1) Marriott: Journ. biol. chem., 16, 281, 1913-14.

度の精密を期待する事が出来ない。殊に微分子の大きさが一定せる均等な浮游體を生ぜしむる事は至難の業だからである。

比濁計には Kleinmann (Schmidt & Haensch), Kober (N.Y.) 等種々あるが原理に於ては大差ない。此處には Dubosq の比色計を Kober<sup>(1)</sup> Bloor<sup>(2)</sup> が改造したものに就て圖解する。

構造-等しい直径を有する試験管 A, A<sub>1</sub> (無色「ガラス」, 100



第 6 圖

(1) Kober: Journ. biol. chem., 13, 485, 1913 and J. Am. ch. soc. 35, 1585, 1913.

(2) Bloor: Journ. biol. chem. 22, 145, 1915.



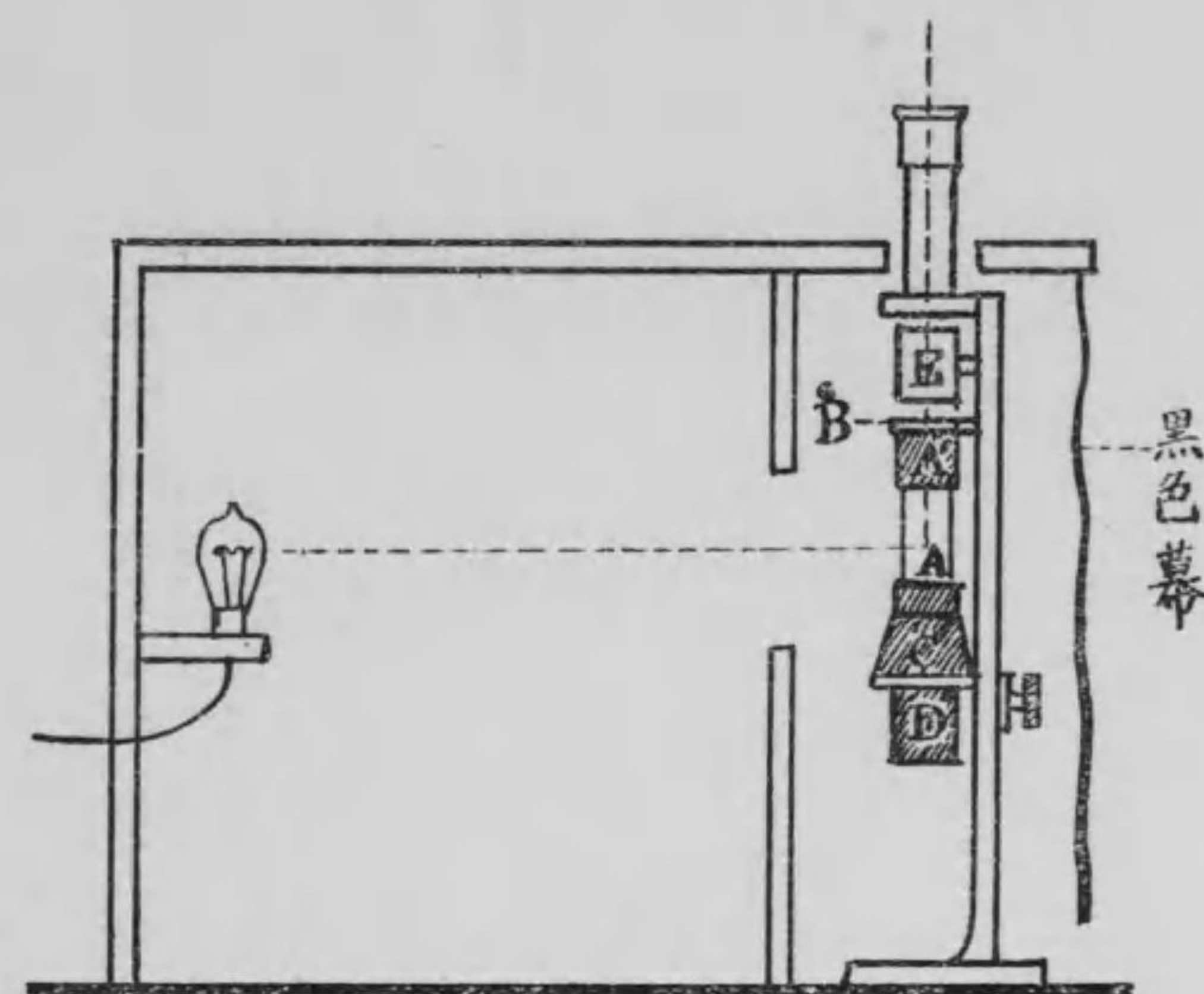
×15 mm.)に濁濁液を盈たし金屬製板 B (比色計の「ガラス」圓柱を固定するもの)にて支持する。管の中心は「プリズム」を入れたる箱の下面に存する窓の中心と一致する事が必要である。

C, D は黑色金屬製の外套管(底を有す)で A, A<sub>1</sub> を下より蔽ひ螺旋により上下せしめて之を照射する光線の量を精細に加減し得る様になつて居る。使用に先立ち外套管を揚げ目盛の零點を合致せしめた時外套管の上縁に一致する A, A<sub>1</sub> 兩管の部に印を附し之より上(A')を黑色の紙或は塗料で覆ひ光線を全然遮る様にする。之に依つて同時に内に容れたる液の表面に光線が直射せぬ様にする事が出来る。

A, A<sub>1</sub> の兩者に標準液を盈たした時同じ讀みを得るのを以て理想とするが若し之に誤差ある時は之を恒數として測定し置き定量に當つて常に補正に用ひなければならぬ。試験管, 外套管には左右の印を附し置き混用せぬ方がよい。

外套管が固定し A, A<sub>1</sub> が移動性の比濁計は實用に適せぬ。

光線は規則正しく前方より來り決して下方或は側方より來てはならぬ, 故に光源には必ず人工光線



第 7 圖

(比色の項参照)を用ひ(電球は A 管と同じ高さで前方 30 cm.)内面を黒く塗つた箱内に裝備するか或は暗室で行はなければならぬ。

計算 標準液層(S)を約 50 mm. とし被驗液層を加減して明暗の度を同一ならしめし時

S……標準溶液の高さ

Y……未知溶液の高さ

X……被驗液と標準溶液の濃度の比とすれば



注意:

- (1)  $\frac{S \sim Y}{S} < \frac{10}{100}$  なる時 (或は  $50 \text{ mm.} < S$  及  $Y < 60$   
 $\text{mm.}$  なる際は  $\frac{S \sim Y}{S} < \frac{20}{100}$  まで)  $X = \frac{S}{Y}$
- (2) 若し  $\frac{S \sim Y}{S} > \frac{10}{100}$  なる時は次の Kober の式に依  
 つて計算する.

$$Y = \frac{S}{X} - \frac{(1-X)Sk}{X^2}$$

$$X = \frac{S+Sk + \sqrt{(S+Sk)^2 - 4SkY}}{2Y}$$

但し  $k = \frac{K}{S}$  であつて  $K$  は一個の比濁計に對して  
 常に不變である. 此常數は濃度既知の溶液を用ひ  
 て施行したる豫備試験に據て得た  $S, Y, X$  を上式  
 に置換して求むればよい.

- (3) 一般に濃度の差が 25-50 % の時被驗液が標準液  
 より濃厚ならば 3-5 % 過大に稀薄ならば過小の値  
 を得るのである.

## 鹽素微量定量法

蛋白質を含有せぬ尿の如きものならば Volhard-  
 Salkowski 法に依つて簡単に定量出来るが蛋白尿,  
 血液等では其儘では定量出来ない. Bang 氏法は一  
 見簡便であるが濾紙が絶対に鹽素を含まぬことは保  
 證し難く且常に精密に 92 % の酒精を得ることが困  
 難であるから推奨出来ぬ. 而して Oppler<sup>(1)</sup> 等の蛋白  
 沈澱除去法を行ふときは一見遊離鹽素を定量し得る  
 様であるが斯る膠質の理化學的性狀は到底沈澱法に  
 より之を完全に分離し得ざらしむるのは明らかであ  
 つてむしろ蛋白質を全然破壊し結合鹽素をも併せ定  
 量する方が一般に合理的である.

以下述べる所は Ruzsnyak<sup>(2)</sup> が Koranyi<sup>(3)</sup> 法を改良  
 し案出した血液鹽素の微量定量法であるが蛋白尿其

(1) Oppler : Abderharden, Handb. d. biolog. Arbeitsmeth. 7, 1913.

(2) Ruzsnyak : Biochem. Zeitschr., 114, 23, 1921.

(3) Koranyi : Zeitschr. f. kl. Med., 33, 1, 1897.



他あらゆるものに應用出来る。

**原理** 血液に濃硝酸と一定量の硝酸銀を加へ過「マンガン」酸加里を添加しながら加熱灰化した後過剰の銀を「ロダナムモニウム」液に依り鐵明礬飽和溶液を標示薬として滴定するのであつて終反應は明瞭である。

**試薬**

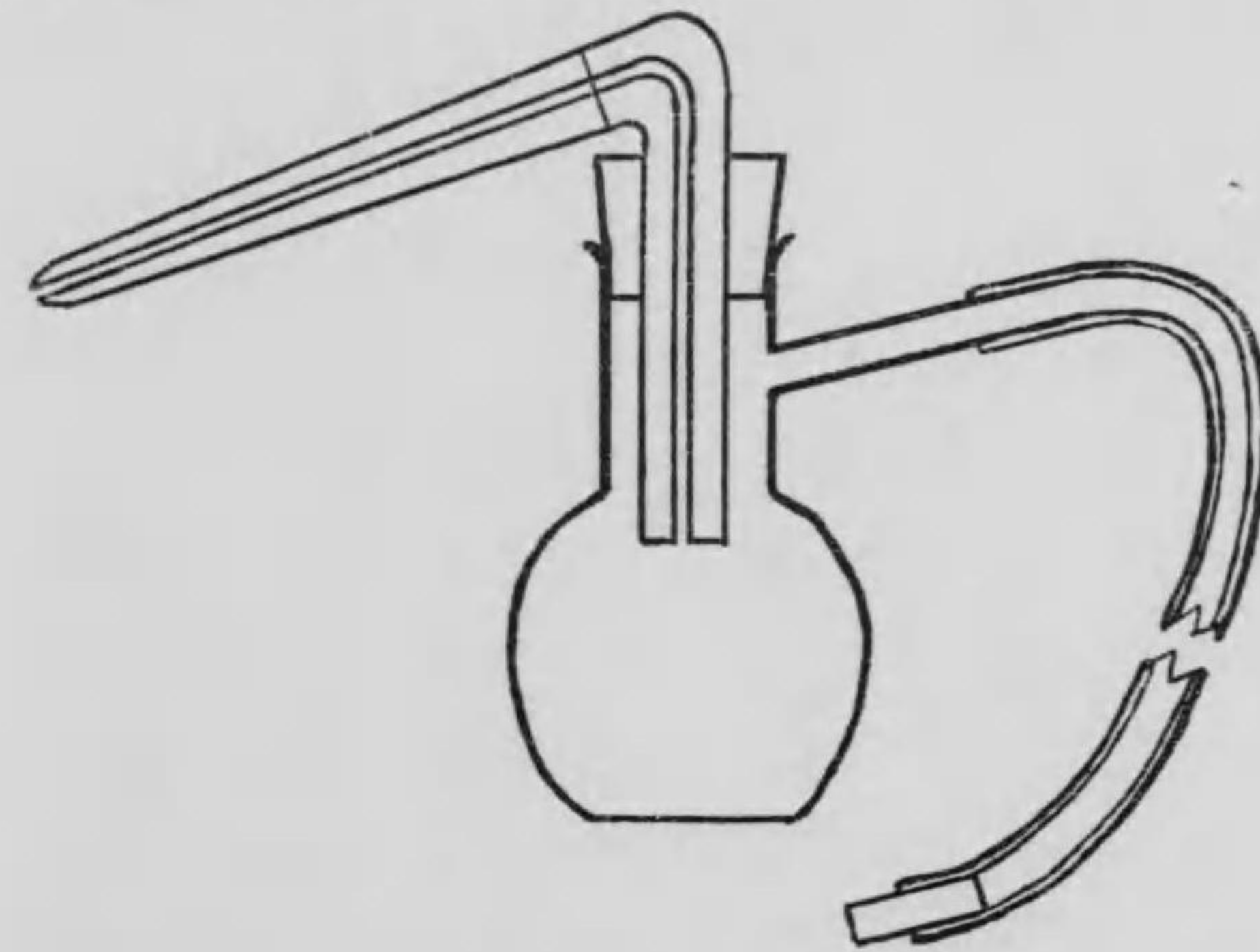
1. 濃硝酸  $D=1.5-1.52$  (60%以上)  
鹽素を夾雜してゐてはならぬ。
2. 過「マンガン」酸加里飽和溶液
3. 葡萄糖, 少量。
4. 0.01 n NaCl 液, 食鹽 (Kahlbaum 或は之に相當するもの) 0.5846 gm. を 1 l. に溶解する。
5. 0.01 n  $AgNO_3$  液, 純硝酸銀 1.7 gm. を 1 l. に溶解し此一定量を「ピペット」で採り同量の 0.01 n NaCl (4) を加へ銀「イオン」の過剰の有無を驗し(試薬 7 の調製法參照) 少し宛水を以て稀釋して經驗的に 0.01 n に調製する。勿論著色縷に貯藏する。尿の場合には 0.04 n, 0.02 n 等を調製して置く方が便利である。
6. 鐵明礬 (*ferric ammonium alum*  $Fe_2(SO_4)_3 \cdot (NH_4)_2$

$SO_4 \cdot 24H_2O$ ) 飽和溶液。

7. 0.01 n 「ロダナムモニウム」液 ( $NH_4CNS$ )  
既製の銀液(5)を標準として調製する。即銀液 5.0 cc. に稀硝酸 1-2 cc. 水 10 cc. 鐵明礬液約 1 cc. を加へ約 0.77% の「ロダナム」液を以て滴定し銚色の出現を以て終反應とする。此濃度に従ひ次第に稀釋して 0.01 n とする。

**装置** i. *Ernst's capillar pipette*:

第 8 圖の様な彎曲した厚壁毛細管であつて先端から劃線まで約 8 cm. 其内容を約 0.13 cc. にする。勿論



第 8 圖



之は水銀で檢定する必要がある。

ii. 小形枝付「コルベン」(第8圖參照)

硬質「ガラス」製, 内容約 15 cc. のもの數個

iii. 「マイクロビューレット」 二臺

**實施 採血:** 「ゴム」管の一端を口に啣へ清淨にした上記の毛細管「ピペット」で被驗液を靜かに劃線まで吸ひ上げ(耳朶から血液を採取する場合には斷續せぬ様に注意せねばならぬ)先端の外側に附着した液を拭ひ取り更に吸引して内容を「コルベン」中に移す、尚 1-2 cc. の蒸餾水を用ひ數回「ピペット」の内面を洗ひ之を被驗液に合併し然る後「ゴム」栓と「ゴム」管を取り去る。

**酸化:** 「マイクロビューレット」から硝酸銀液 (5) の一定量(血液, 血清の場合には 1.6 cc. で足りる, 尿の場合には更に多量を要する)を流入せしめ 0.5-1.0 cc. の濃硝酸 (1) を加へ金網上で小さい「ブンゼン」燈を用ひ極く靜かに加熱する。(排氣室内で行ふ必要がある。)此間に  $\text{KMnO}_4$  液 (2) を一滴宛添加する, 急激に泡立ち溢出する恐れがあるときは絶えず靜かに動かす方がよい, 内容は最初暗褐色を呈するが數分後には次第に淡黄色となり遂に無色となる, 蛋白質の量

に伴ひ  $\text{KMnO}_4$  は多量を要するのであるが若し過剰に入つた場合には少量の葡萄糖 (3) を加へ容易に其著色を消すことが出来る。

酸化が完全に行はれた場合には冷却後鹽化銀の沈澱を除く他の部分は無色透明でなければならぬ。

**滴定:** 過剰の硝酸銀を「ロダン」液 (7) で滴定する, 標示薬 (6) は數滴で充分である, 銻色の終反應は 1 滴の差で明瞭に認めることが出来るが長く放置すると消失するから最初の出現を見逃さぬ様にせねばならぬ。

場合によつては「ロダン」液を過剰に加へ「マイクロビューレット」から更に銀液を追加して其著色を消失せしめ再「ロダン」液を 1 滴宛加へれば確實な結果を得る。

**計算:** 
$$\frac{\text{銀液の全量 (cc.)} - \text{「ロダン」液使用量 (cc.)}}{\text{毛細管「ピペット」の内容 (cc.)}} \times 0.0585$$
  
= 被驗液 100 cc. 内の鹽素を  $\text{NaCl}$  (gm.) に換算したるもの。

**追記:** I) 此方法は Koranyi の macro 法と精密の度に於て大差なく誤差は熟練すれば 2% 内外に止め得る。

II) 一回の定量には十數分以上を要しない。

III) Ernst の「ピペット」の代りに血球算定用の「ピペット」の如きものを用ひてもよい。



IV) 上原學士<sup>(1)</sup>は毛細管「ピペット」で中斷せぬ様耳朶の血液を吸ひ上げる事の困難なところから小「ピペット」で採つた血液を蓋を有する重量既知の小「コルベン」に移し精密に秤量することを推奨して居るが手數稍煩雜なものと答が重量 per cent が出る不便がある。尙同氏は酸化に當り硝酸の不足は  $\text{KMnO}_4$  で補足することが出來ぬから血液 0.13 cc. には少くも 1 cc. の、血漿或は血清 0.13 cc. には 0.5 cc. の濃硝酸を要すると報告して居る。

(1) 上原：日本消化機病學會雜誌，22, 1, 1923.

### 磷微量定量法

磷定量法の中で目下最信頼するに足ると思はれるものは有機物を Neumann<sup>(1)</sup>の方法で酸化 (*digestion, feuchte Veraschung*) して得た無機磷酸鹽を定量的に磷「モリブデン」酸「アンモニウム」 (*ammonium phosphomolybdate*) の形とし此量を定量するのである。

此定量に當つて之を一定量の定規滴液に溶解して其過剰を定規酸で滴定するものと沈澱を全部「ピロ」磷酸「マグネシウム」 (*magnesium pyrophosphate*) の形に導き焼灼して秤量するものとの二通りある。何れも手數に於ては大差ないが一回 1 mg. 以下の磷量になると後者は種々の點から誤差を生じ易い。其點で微量定量法としては前者の方が優れて居る。

該法は原理に於ては Neumann の記載の通りであるが Gregersen,<sup>(2)</sup> Iversen<sup>(3)</sup> の改良により稍完全なも

(1) Neumann, Zeitschr. physiol. Chem., 37, 1902 and 43, 1904.  
 (2) Gregersen, I bid. 53, 453, 1920.  
 (3) Iversen, Biochem. Zeitschr. 104, 22, 1920.



のとなつたのである。

Iversen 法

**材料：**此定量に最適な量は0.015—0.12 mg. の磷量であるから尿、血液等ならば0.3—0.5 cc. 位で宜しい。之を Ostwald の「ピペット」か或は他の方法で出来得る丈に正確に100 cc. 大の Erlenmeyer 「コルベン」に移す。此方法では5—10 個の定量を同時に行ひ得る。

所要器具：

1. Erlenmeyer 「コルベン」5—10 個  
底面直径約 6.2—6.5 cm. 高さ 10 cm. 以上(丈高き方が酸化に際し内容が突沸飛散した際に安全である。)硬質。
2. 100 cc. 大硬質「ビーカー」5—10 個
3. 直径約 3 mm. 長さ 15 cm. 位の硬質「ガラス」棒の一端に 1 cm. 位の「ゴム」管を嵌めたもの 10 本  
同様の「ガラス」棒の 8—9 cm. のもの 10 本
4. 角度適當なる小形漏斗(直径 4—5 cm.) 5—10 個
5. 窒素定量に用ふると同様の刺戟性瓦斯吸引装置(第 9 圖参照、排氣室で酸化を行へばこの必要はない)

6. 精密なる「ビューレット」(micro burette ならば更に可)二具。
7. 駒込「ピペット」(「ゴム」帽「ピペット」)  
2—3 cc. の度盛あるもの數本。

試薬

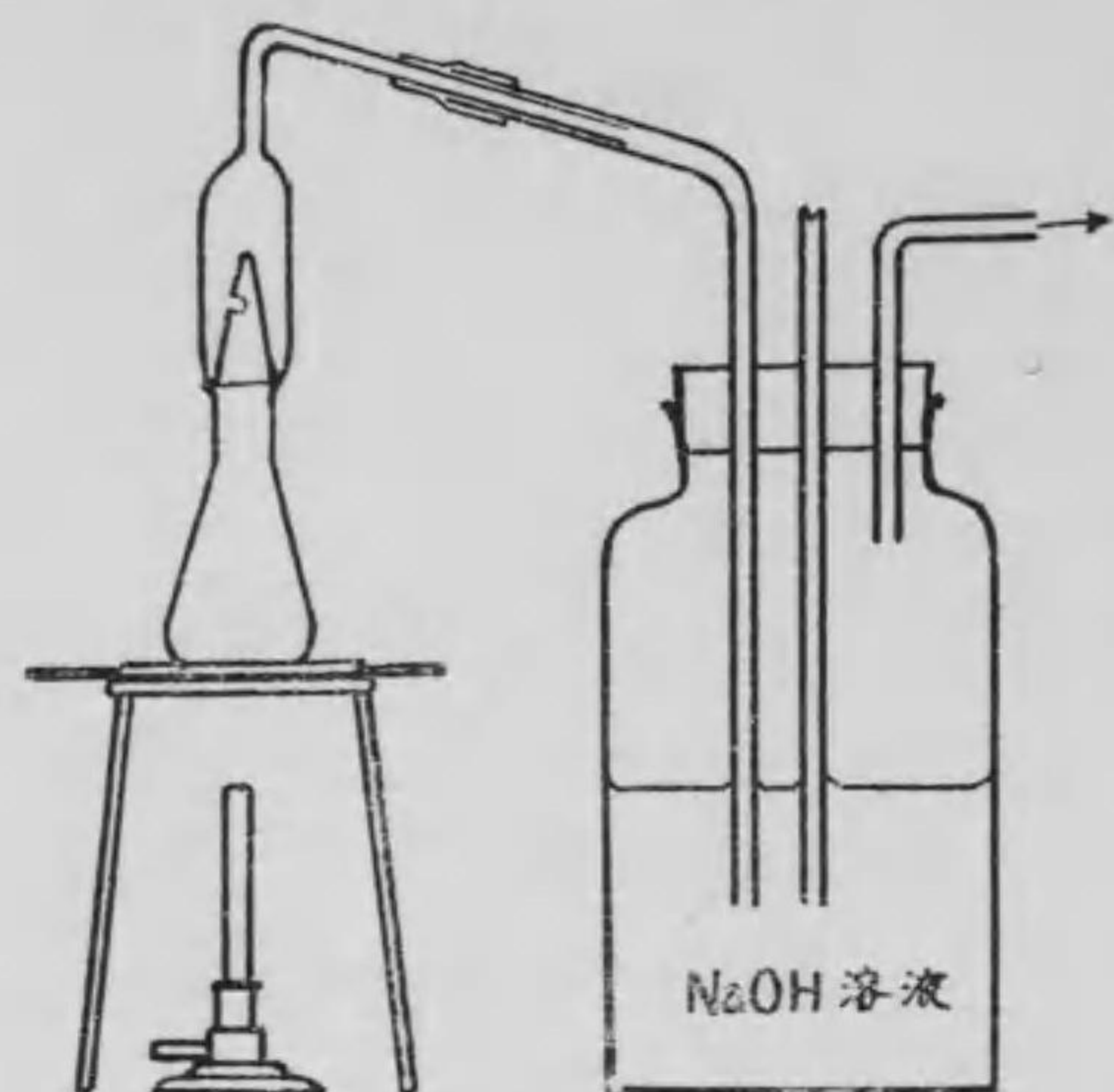
- 1.) 濃硫酸 D=1.84 純品
- 2.) 濃硝酸 D=1.5
- 3.) 50 g/dl 硝酸「アムモニウム」,  $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$   
100 cc. に結晶 50 gm. の割合に含まる。
- 4.) 10 % 「モリブデン」酸「アムモニウム」, 白色の「モリブデン」酸が析出したら上澄を使つて差支ない。
- 5.) 0.04n NaOH, なる可く炭酸を含まぬ様に調製する。
- 6.) 0.04n  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 硬質「ガラス」罎或は内面に「パラフィン」を塗つた罎(第 8 頁参照)に蓄藏する必要がある。

實施

**灰化：**材料を容れた Erlenmeyer 「コルベン」に 0.7 cc. の濃硫酸, 1 cc. の濃硝酸を加へ(何れも駒込「ピペット」を用ふ)銅網或は「アスベスト」の上で飛散せぬ



様注意して徐々に加熱する。排氣室をやつてもよい



第 9 圖

が左圖の如く装置すれば一層便利である。

褐色の瓦斯の發生が止むと白色の亞硫酸瓦斯が發生し始める。之は硝酸の驅除せられた

證據であるから火を遠け少しく冷却(「コルベン」を破損せしめぬため)して更に 1 cc. の硝酸を駒込「ピペット」で追加して酸化を繰り返す。特に酸化しにくいものでは尙内容が褐色乃至黒色に着色して居るから濃硝酸を添加して上記の操作を更に一二回繰り返す必要がある。斯くて無色透明になつたら冷却し少量の水を加へ振盪しながら褐色の瓦斯が發生しなくなるまで煮沸して酸化を終るのである。

沈澱の成生： 磷酸が定量的に磷「モリブデン」酸「アンモニウム」として沈澱するに否とは硫酸、硝酸「アンモニウム」及「モリブデン」酸「アンモニウム」夫々の適當の濃度と混合液の全量が磷酸量に適應する事が絶対に必要である。故に此定量は豫め大凡の磷量が見當が付いてゐないと非常に不確實になるのである。依て次に一定の磷量に相應する適當な試薬の量を表示して参考に資する。

次表の第一列は Iversen の微量定量法に従つたもので其他の列は比較的少量を定量する Gregersen の式に則つたものである。

磷量	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> O	50 g/dl NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ψ	10 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 液全量	液全量
mg.	cc.	cc.	cc.	cc.	cc.
0.015-0.12	0.7	5	3	1	10
0.12-2.0	1.0	11	6	2	20
2.0-9.0	5.0	10	15	20	50
9.0-20.0	10.0	20	30	40	100
20.0-60.0	15.0	90	75	70	250
60.0-95.0	20.0	45	75	160	250

ψ 此量は全混合液内に於ける濃度が常に 15 % となる様になつて居る。

酸化を終つた Erlenmeyer 「コルベン」に所定の水を加へ重湯煎上に載せて温め之に温めた試薬 3) 及 4) を所定の量駒込「ピペット」で加へ一二分間激しく振盪するのである。沈澱の成生に適當な温度は



70°-80° であるから是等を合併した時温度が之以下に下らぬ様に注意する必要がある。

\* 試薬(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> の量に関する注意。

1. 磷量に比して少な過ぎる時は其濾液を温め該試薬を加へると再黄色の沈澱を生ずる。
  2. 反対に該試薬に比し磷量が非常に少ないと「モリブデン」酸を遊離して白色に濁濁し磷「モリブデン」酸「アンモニウム」の分離が困難となることがある。
- 何れの場合も試薬を加減して実験をやり直す必要がある。

沈澱の分離：緻密な無灰濾紙 (Schleicher u. Schüll, R. F. P. 575, IV. & R. Balston, Ltd. Whatman No. 44; 或は Tokyo Filter Paper Co. No. 5, C) の直径 7-9cm. 位のものを寒冷な蒸留水で湿し「ガラス」棒の先で破らぬ様に漏斗に密着させる。此際漏斗の縁が 0.5-1.0 cm. 餘る方がよい。(漏斗の角度の悪いものは濾紙の落ち付きが悪く使用に堪へぬ)。

Erlenmeyer 「コルベン」の内容物が冷却するを待つて (約 30 分) 沈澱を「ゴム」附「ガラス」棒でよく攪き交せ静かに漏斗に移す。「コルベン」中に残つた沈澱は更に 0°-5° C に冷却した蒸留水で洗ひ尚残つて居つたら数回同操作を繰り返して沈澱を全部濾紙上に集める。

「コルベン」を黒色の紙上に翳すと沈澱の有無は容易に判別出来る。

沈澱の漏出の鑑別も亦同様である。

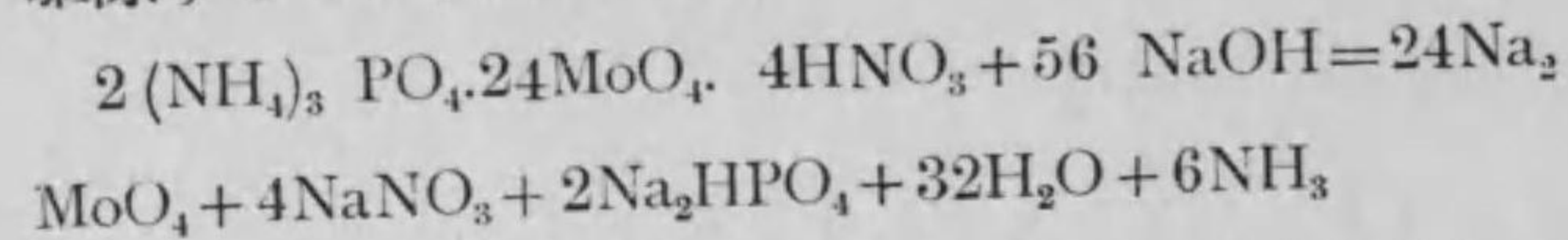
次に濾紙に吸著されてゐる硫酸を除去するのである。之には濾紙の上縁に近い處から噴出縁でもつて冷却した蒸留水の細流を、沈澱を下方に洗ひ流しながら滌ぎかけるのである。是等の操作の間濾紙の上に水を絶やさぬ様にするがよい。何となれば水の温まらぬ内になる可く早く酸を除去する必要があるからである。

洗滌液の分量が 100 cc. 餘に達すると多くの場合に漏斗の下の滴は試験紙で中性となるが濾紙の上縁殊に其三重部は未だ容易に酸性反應を失はないから特に注意して洗滌を繰り返して試験紙で反應を検する必要がある。冬期は夏期よりも多量の洗滌液を要し 160-170 cc. に達する。酸が完全に除去せられたらば濾紙を注意して「ピンセット」にて剝離し折り疊み尙漏斗に沈澱が附着して居つたならば之を拭ひ取り之を容量 100-150 cc. の硬質「ビーカー」に移す。

定量：濾紙を容れた「ビーカー」に 50 cc. の蒸留水を加へ硬質「ガラス」棒で濾紙を突き崩す。之に「ミクロビューレット」で 0.04 n NaOH を少し宛加へながら攪き混ぜると黄色の沈澱は次第に溶解して行く。



完全に溶解してから更に 2 cc. を注加し此滴液使用  
 總量を記載し置く(之を a cc. とする). 次に之を砂浴  
 或は金網上に載せて其容内が半量に至るまで徐々に  
 蒸發する. 之は次式によつて生ずる「アムモニア」を  
 驅除するのが目的である.



蒸發後「フェノールフタレイン」で尙滴性を呈して  
 居ればよいが若し酸性になつて居れば更に 0.04 n  
 NaOH を追加して少時間煮沸する必要がある.

「アムモニア」の驅除が終つたら 0.04 n  $\text{H}_2\text{SO}_4$  を添  
 加する.

「フェノールフタレイン」の色が消えてから約 0.4  
 cc. を過剰に加へる必要がある. 之を前と同様煮沸  
 して  $\text{CO}_2$  を驅除するのであるが途中で赤く著色す  
 ることがあつたら更に 0.04 n  $\text{H}_2\text{SO}_4$  を追加しなくて  
 はならぬ. 此硫酸使用總量を記載し置く(之を b cc.  
 とする).

「ピーカー」を平たき水槽に入れ流水で冷却する.  
 冷めたら過剰の酸を 0.04 n NaOH で滴定する. 此滴  
 液使用量を c cc. とすれば  $(a+c-b) \times 0.0445$  が求む

る磷量 (mg.) である.

追記

1. 一回の定量 0.01-0.1 mg. が測り得る最小量であつて此際  
 0.003 mg. 内外の誤差は免れぬ.
2. 微量定量法の時 0.04 n 定規液を用ふるのであるが 1-5 mg.  
 の時は 0.1 n, それ以上の時は 0.5 n の定規液を使用する方が便  
 利である. 其他の操作は殆ど同様である.

従つて使用する constant は

	P (mg.)	$\text{P}_2\text{O}_5$ (mg.)
0.04 n (cc.)	0.0444*	0.2035
0.1 n (,,)	0.1110	0.508
0.2 n (,,)	0.2220	1.016
0.5 n (,,)	0.5550	2.540

\* Iversen は經驗的に 0.0445 といふ係數の方が微量定量に際して  
 は眞に近い價を得ると主張して居る.



### 比色法に據る磷微量定量法

Bell and Doisy 法<sup>(1)</sup>は充分の精密を期し難いが磷の極微量を比較的簡單なる操作によつて測定し得る特徴を持つて居るから好んで逐次的検査に應用せられる。

**原理** 磷酸を磷「モリブデン」酸の形に導き之を「ハイドロキノン」で還元して青色に着色せしめる。尙比色定量をなすに先立つて滴によつて色調を強め「キノン」に依り起る不純の綠色味 (*greenish shade*) を亞硫酸鹽 (*sulfite*) によつて除去するのである。此際「ハイドロキノン」は過剰の「モリブデン」酸を還元する恐れがないから磷を特に磷「モリブデン」酸「アンモニウム」として分離するが如き煩錯なる手数を要しない。

#### 試薬

##### (1). 「モリブデン」酸液

(1) Bell and Doisy : Journ. biol. chem., 44, 55, 1120.

50 gm. の純「モリブデン」酸「アンモニウム」 $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$  を 1 l. の 1 n  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (室温) に溶解する。此溶液は持久性であつて沈澱が出来たら上澄を傾注して用ひて差支ない。

検査：此 5 cc. を同容量の「ハイドロキノン」液 (2) 及 25 cc. の滴性亞硫酸鹽液 (3) で處理しても着色してはならぬ。又若し磷が夾雜せられて居る時は次の方法で精製する必要がある。即 150 gm. の「モリブデン」酸「アンモニウム」を 1 l. の水に溶解し之に 375 cc. の濃硝酸 ( $D=1.42$ ) を 1 l. に稀釋したものを添加する。此混合液に 200 gm. の硝酸「アンモニウム」を溶解して温室中に數日間放置する。生成した磷「モリブデン」酸「アンモニウム」を無灰濾紙で濾過した後濾液に 2 倍量の酒精を加へ強「アンモニア」で弱酸性まで中和する。析出した「モリブデン」酸「アンモニウム」を「ヌッチェ」 (*Buchner funnel*) で分離し 50 % の酒精で洗ひ乾燥する。

##### (2). 「ハイドロキノン」液

純  $\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2$  (*hydroquinone*, p-Dioxybenzol) 20 gm. を 1 l. の蒸餾水に溶解し 1 cc. の濃硫酸を添加する。多少の着色は差支ない。空氣の酸化を避けるため



密栓して保存する必要がある。

(3). 鹼性亞硫酸鹽溶液

$\text{Na}_2\text{SO}_3$  (sodium sulfite) 75 gm.

蒸餾水 500 cc.

溶解せる後 20% の  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2 l. を添加し濾過して保存する。

(4). 磷酸基本液

酸性磷酸加里  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Kahlbaum 或は相當品) を粉碎し數日間硫酸除濕器中で乾燥する。此 4.394 gm. を 1 l. の「メスコルベン」中で水に溶解して割度まで盈たす。此 1 cc. は 1 mg. の P を含有する數滴の「クロ・フォルム」を加へ震盪し密栓して保存する。

a. 尿標準液：之を正確に 1:10 に稀釋したもので、5 cc. 中に 0.5 mg. の P を含有する。

b. 血液標準液：1:200 (例へば 5 cc. を 1 l. に稀釋する) 此 5 cc. は 0.025 mg. の P を含有する。

是等の標準液は何れも沈澱を生じたらば使用に堪へぬ。

實施

第一. 尿

i 無機磷酸

濃度に従つて 1-5 cc. の尿を「ピペット」で 100 cc. の「メスコルベン」に移し 25 cc. の蒸餾水を添加する。第二の「メスコルベン」にも磷酸標準液 (4 a) 5 cc. 及び水 25 cc. を容れて置く。兩「メスコルベン」に 5 cc. の「モリブデン」酸液 (1) 及 5 cc. の「ハイドロキノ」液 (2) を加へ、5 分後各に 25 cc. の鹼性亞硫酸鹽溶液 (3) を加へ水を以て割度まで盈たしてよく混合する、5-10 分の間に比色定量を行ふ。

計算：標準液を 20 mm. の高さに置けば

$$\frac{10}{\text{被檢液層の讀み(mm.)} \times \text{尿の容積(cc.)}} = 1 \text{ l. 中の無機磷量(gm.)}$$

注意：尿の著色は此際稀釋せらるゝから一般に障礙を來すことはないが黄疸尿の如き場合には磷酸を含まない動物炭を用ひ容易に著色を除くことが出来る。

ii 總磷酸

1 cc. の尿を Ostwald の「ピペット」で硬質「グラス」製大型試験管に採り濃硫酸 6-8 滴硝酸 1 cc. を加へて加熱酸化する。(第 26 頁参照) 此際内容が無色透明となつたならばそれ以上無用の加熱は避ける方がよい。内容を 25 cc. の水の媒介により



100cc. の「メスホルベン」に移す。他方に標準液(4a)の適量(2-5 cc.)を同大の「メスホルベン」に採り25 cc. の水で稀釋し無機磷酸と同様にして定量するのである。此際條件を同じくするため標準液の方にも前以て4-6滴の濃硫酸を添加して置くのを忘れてはならぬ。

計算：標準液層 20 mm. の時

$$\frac{2 \times \text{標準液の使用量(cc.)}}{\text{被験液層の読み(mm.)}} = 1 \text{ l. 中の總磷量(gm.)}$$

### iii 有機磷

尿中の有機磷量は非常に微量であるがために總磷量と無機の磷量の差を以てすることが出来ない。依つて尿の無機磷酸を「バリウム」で沈澱せしめ其濾液に於て直接有機磷を定量するのである。即新鮮なる尿(時を経たものに於ては有機の磷化合物が分解減少する)20 cc. を25 cc. の「メスホルベン」中に移し Ba(OH)<sub>2</sub> の粉末を弱鹼性となる點まで添加し割度まで盈たして濾過する(沈澱は硫酸「バリウム」及磷酸「バリウム」である)「バリウム」の過剰を除くために濾液20 cc. を再25 cc. の「メスホルベン」に採り稀硫酸を加へ弱酸性迄持來す(此際硫酸は過剰に加へぬ様に注意せねばならぬ)此濾

液1cc. は尿0.64 cc. に相當することとなる。

第二の濾液10 cc. (尿6.4 cc.) を8-10滴の濃硫酸と共に濃縮して約2 cc. とし之に2 cc. 濃硝酸を添加する。酸化操作は總磷の場合と同様である。内容を約10 cc. の水の媒介によつて定量的に25 cc. の「メスホルベン」に移す。第二の25 cc. の「メスホルベン」に磷酸標準液(4b)5 cc. (0.025 mg. のP を含有する)4-6滴の濃硫酸及5 cc. の水を容れる。次で兩「メスホルベン」に1 cc. の「モリブデン」酸液(1)及2 cc. の「ハイドロキノ」液(2)を加へ5分間後10 cc. の鹵性亞硫酸鹽溶液(3)を加へ割度まで盈たし混合し5分後比色する。

計算：標準液層を40 mm. とすれば(色調が稀薄であるから30 mm. 以上にせねばならぬ)

$$\frac{1000}{\text{被験液層の読み} \times 6.4} = 1 \text{ l. 中の有機磷(mg.)}$$

## 第二. 血液

蛋白除去には硫酸「アンモニウム」(Bloor)「タングステン」酸鹽(Folin and Wu)醋酸「ピクリン」酸混合液(Greenwald)の何れをも用ふる事が出来ぬので三鹽素醋酸(Kramer and Tisdall: 第52頁参照)を用



ふる外はない。

血漿 5 cc. を豫め水 15 cc. を容れた 25 cc. の「メスコルベン」中に滴下し (20% 三鹽素醋酸 5 cc. を震盪しながら徐々に加へ水で割度まで盈たしよく混じ 1 分後無灰濾紙で濾過する。

全血の場合には其 5 cc. を水 35 cc. を容れた 50 cc. の「メスコルベン」中に滴下溶血せしめ 20% の三鹽素醋酸 5 cc. を滴加しよく混合し割度まで盈たし 10 分後濾過する。

#### i 無機磷

濾液 10 cc. を 25 cc. の「メスコルベン」に移し 1 cc. の「モリブデン」酸液 (1) 2 cc. の「ハイドロキノ」液 (2) を添加する。同時に同大の「メスコルベン」中の磷標準液 (4b) 10 cc. (0.05 mg. P) 及 2 cc. の 20% 三鹽素醋酸 (1:10 の稀釋を用ひた時は 1 cc.) を加へたものを同様に處理して著色せしむる。5 分後各に鹵性亞硫酸鹽溶液 (3) 10 cc. を加へ割度まで盈たし混合して 5-10 分の間に比色する。

計算：標準液層 20 mm. の時

$$\frac{50^*}{\text{被驗液層の讀み (mm.)}} = \text{血漿 100 cc. 中の磷量 (mg.)}$$

\* 1:10 の稀釋の時は 100 を置換して全血 100 cc. 中の磷量を mg.

で得る。

- 注意：1. 血液中の無機磷量は一定して居らぬから常に標準液量を加減してなる可く被驗液に近い色調を得る様に勉めればならぬ。  
2. 無蛋白濾液は放置すると有機の磷化合物が酸で水解せられ無機磷の増量を來す。

#### ii 酸に可溶性の總磷

三鹽素醋酸濾液 10 cc. を用ひて尿の總磷と全然同様の方法で定量する。即之を硬質試験管中で 6-8 滴の濃硫酸と共に約 2 cc. に濃縮し 1 cc. の濃硝酸を加へて酸化する。著色液は 25 cc. の「メスコルベン」中で調製する方が比色に便利である。

一般に關する注意：

1. 該法に用ふる著色液は持久性ではないが標準液と相並行して褪色するのであるから 5 分後より 1 時間位までに比色を終れば結果に著しい影響はない、尤比色計の圓筒中では速やかに變化を受け易いから長く置くことは避けねばならぬ。
2. 此比色定量による結果は重量分析に依り得たものより稍大きく出る。原著者等は之をむしろ後者の損失に歸す可きだと主張して居るが未だにわかに信じ難い。



### 比濁法による磷酸微量定量法

Bloor<sup>(1)</sup>が血液中の磷酸測定のために考案したもので、比濁計(第12頁参照)を用ふるために0.03-0.2 mg.位の微量の磷酸を定量し得るのである。

**原理** 有機物を全く酸化して得た磷酸に「モリブデン」酸「ストリヒニン」液を加へ之を「モリブデン」酸「ストリヒニン」(strychnine phosphomolybdate)として沈澱せしめて全然同様の方法で磷酸基本液より生ぜしめた沈澱と比濁して定量するのである。

**試薬** (1). 「モリブデン」酸「ストリヒニン」。

先最初に「モリブデン」酸曹達を作る。

「モリブデン」酸(著色して居らぬもの) 72 gm.

蒸餾水 300 cc.

を40% NaOHで中和する。「モリブデン」酸が純粹ならば大凡100 cc.を要する。此透明な溶液を静かに30分煮沸する。此間水を加へながらたへす容

(1) Bloor: Journ. biol. chem., 36, 33, 1918.

積を一定にして濁濁\*することがあつたら NaOH を追加する。滑石粉を1 gm. 加へ更に5分間煮沸し濾過する。濾紙を一回少量の熱湯で洗ひ濾液を前者に合併する。此中には約100 gm. の「モリブデン」酸曹達を含有する。此溶液の1/3量(約135 cc.: 「モリブデン」酸曹達の30-35 gm. を含有する)を2 l. の「ビーカー」に移し250 cc. の濃鹽酸と同量の水との混合液を攪拌しながら加へたものを「モリブデン」酸「ストリヒニン」の調製に用ふる。

即ち500 cc. の水に40-50 cc. の硫酸「ストリヒニン」の飽和水溶液を少量宛混ぜながら添加したるものに200 cc. 強の前記鹽酸性「モリブデン」酸曹達溶液及500 cc. 餘の水を加へよく攪き混ぜて1-2日間静置する。此透明な部分を傾注或は濾過して分離する。定量には一回にこの25 cc. を其儘用ふるのである。

- (2). 濃硫酸。(磷を含む可からず)
- (3). 濃硝酸。(同上)
- (4). 10% NaOH

\* 市販の「モリブデン」酸は多く「アンモニア」を含有し之が煮沸中に驅逐せらるゝから NaOH の追加を要するのである



Kahlbaum 製の NaOH か Na 金属より作つたものを用ふる。

- (5). 稀硫酸, 濃硫酸(2)を四倍に稀釋したもの。  
 (6). 磷酸標準液

酸性磷酸加里 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 最純を要す) 0.0834 gm. を蒸餾水にぞかし正確に 100 cc. としたものは持久性で基本液として保存出来る。

此 25 cc. を「ピペット」で取り 500 cc. に稀釋した標準液は 5 cc. に 0.15 mg. の  $\text{H}_3\text{PO}_4$  即 0.0474 mg. の P を含む

一ヶ月に一度新らしく調製する必要がある。

#### 所要器具

1. 硬質大型試験管 長さ 20 cm. 直径 2.5 cm. のもの約 10 本
2. 25 cc. 及 50 cc. の「メスコルペン」各數個
3. 3 cc. の「ピペット」
4. 0.5 cc. の Ostwald 「ピペット」

**實施** 血液 3 cc. を Ostwald の「ピペット」で 25 cc. の「メスコルペン」に移し水で割度まで盈たしよく混合する。此 1 cc. (0.12 cc. の血液に相當する。血漿ならば直接 0.5 cc. を Ostwald の「ピペット」で採る) を

大型試験管に移し 1.5 cc. の濃硫酸及濃硝酸の等量混合液及數個の沸騰核\*を加へ小形の「ブンセン」燈で熱する。(装置方法は *micro Kjeldahl* に同じ)

沸騰し始めたらば焰を小さくし赤褐色の煙の止むまで加熱を繼續する(此間凡 15 分間)次に 8-10 分間焰を大きくして水の大部分を蒸發せしむると亞硫酸の蒸氣が出初める, 若し此時尚着色してゐたらば火を遠ざけ硝酸を一二滴追加して更に無色となるまで加熱する。

再火を遠ざけ 1% の蔗糖液を 2-3 滴添加して前と同様無色となるまで熱し酸化を終る。半ば冷却した所で試験管壁を洗ひ流しながら 10 cc. の水を加へる。試験管内の酸は 10% の NaOH で一滴の 0.3% の「フェノールフタレイン」を標示薬として中和する(此量は後に必要であるから書き留めて置く)之に 25% の硫酸一滴を加へ弱酸性にする。

内容が冷却せる後之を定量的に 25 cc. の「メスコルペン」に移し試験管の洗滌液も皆一所に流し込み割度まで盈たす。

\* 直径 3 mm. 位の硬質「ガラス」球或は柘榴石の小片を前以て硫酸で煮沸したもの。



標準液：一方に標準液 5 cc. を 25 cc. の「メスコルベン」に採り先に酸化に用ひた硫酸を中和したと同量の NaOH を加へ「フェノールフタレイン」を標示薬として 25 % の硫酸で中和し一滴を過剰に加へ冷後割度まで盈たし混和する。

沈澱：50 cc. の「メスコルベン」二個を取り各に 25 cc. の「モリブデン」酸「ストリヒニン」液を移し一方に前記「メスコルベン」から検査す可き溶液 5 cc. 他方に上記の標準液 5 cc. を「ピペット」で加へる。其間静かに廻轉しながら混和する必要がある。三分後割度まで盈たし逆さに振る。

比濁：管中に同じ高さまで兩液を容れ且目盛の零點に合せた時液面に直接光線の當らぬ様に加減する。標準液の方の外套管の高さは最比濁し易い程度（光線を受ける液）にする。  
層約 25 mm.

s を標準溶液の高さ

y を未知濃度溶液の高さ

x を未知溶液の標準液に對する濃度の比とすれば

$$x = \frac{s}{y} \quad x \times 0.15 = 0.12 \text{ cc. 血液内の磷酸量 (mg.)}$$

$x < 0.9$  或は  $x > 1.1$  の時は Kober の補正式を用ふ

可きであるが餘り適確でないから略す（注意 2 参照）

注意：

1. 被験液 50 cc. に 0.03 mg. 以下の磷酸量となると定量は不確實である。
2. 潤濁を生ぜしめた際被験液の濃度が標準液と 50 % 以上の差がある時は比濁は甚不正確となるからより近き濃度の標準液を作り直さなくてはならぬ。  
25-50 % 位の差ならば濃厚の時は 3-5 % を減じ稀薄の時は 3-5 % を増加し補正すれば稍真に近い價を得る。25 % 以内の差ならば補正の必要はない (Bloor)。
3. 比濁は浮游體の分子の大きさが同大なければならぬ。此爲には溶液中に含まれて居る鹽類の濃度、沈澱を生ずる時の温度等の條件を可及的同一にしなければならぬ。  
比濁に當り兩方に標準液を入れれば高さは同一とならばならぬ。  
沈澱を生じてから 3 分より 20 分以内に比濁する必要がある。
4. 蔗糖溶液を加へて酸化する手数を省くと磷酸のある種の化合物(硝酸化合物?)を生じて磷酸の一部が試薬に反應しない虞れがある。
5. 實驗に用ふる試薬を其使用する割合に混合したものは潤濁してはならぬ。
6. 「ガラス」器具は「クローム」硫酸で處理した後 30 分以上水蒸氣を通ずれば更に安全である。(第 4 頁参照)



## 「カルシウム」微量定量法

血液中の Ca の定量法は非常に種類が多い。理論上は有機物を焼灼灰化<sup>(1)</sup>(酸化)して Ca を全部 CaO に導き秤量するのが最よいが之を突沸飛散等による不慮の損失が全然ない様に行ふのは容易の業でない。而して Kramer and Tisdall<sup>(2)</sup> の蛋白沈澱除去法は Ca が幾分凝固蛋白中に包含されるのを免れ難い。最近 Clark<sup>(3)</sup> は多数の方法を反復比較研究した結果蛋白質を除去することなく直接蓚酸「カルシウム」<sup>(4)</sup>として沈澱せしむる方法を推奨して居る。元來直接沈澱法之最懸念さるゝ所は血液中の Ca の四分の一以上は蛋白質と結合して居ると考へらるゝ點であるが稀釋して蓚酸「アンモニウム」を加へる時は Ca は次第に解離して遂には定量的に  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  に導き得る事が立證

(1) de Waard: Biochem. Zeitschr., 97, 176, 1919.

(2) Kramer and Tisdall: Journ. biol. chem., 48, 223, 1921.

(3) Clark: Ibid., 49, 487, 1921.

せられた。且同法は僅かに 5 cc. の血液にて足り比較的簡易なるに拘はらず他法と比べて正確度が敢て遜色がない。依て以下同法を其儘記載することゝする。

**原理** 血液を稀釋し蓚酸「アンモニウム」を加へて Ca を全部  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  として沈澱せしめ洗滌して有機物を除いた結晶を硫酸に溶解して中に含有せらるゝ蓚酸を過「マンガン」酸加里で滴定し間接に Ca の量を計算するのである。

**試薬** (1). 枸橼酸曹達 (*sodium citrate*) 飽和溶液

(2). 1% 鹽化「アンモニウム」溶液

此結晶 10 gm. を白金皿で加熱昇華せしめもし残渣あらば之を温めた 6 n HCl に溶解し Ca の有無を検査する。

(3). 蓚酸「アンモニウム」

再結晶したるものを用ふ。

(4). 定規硫酸液

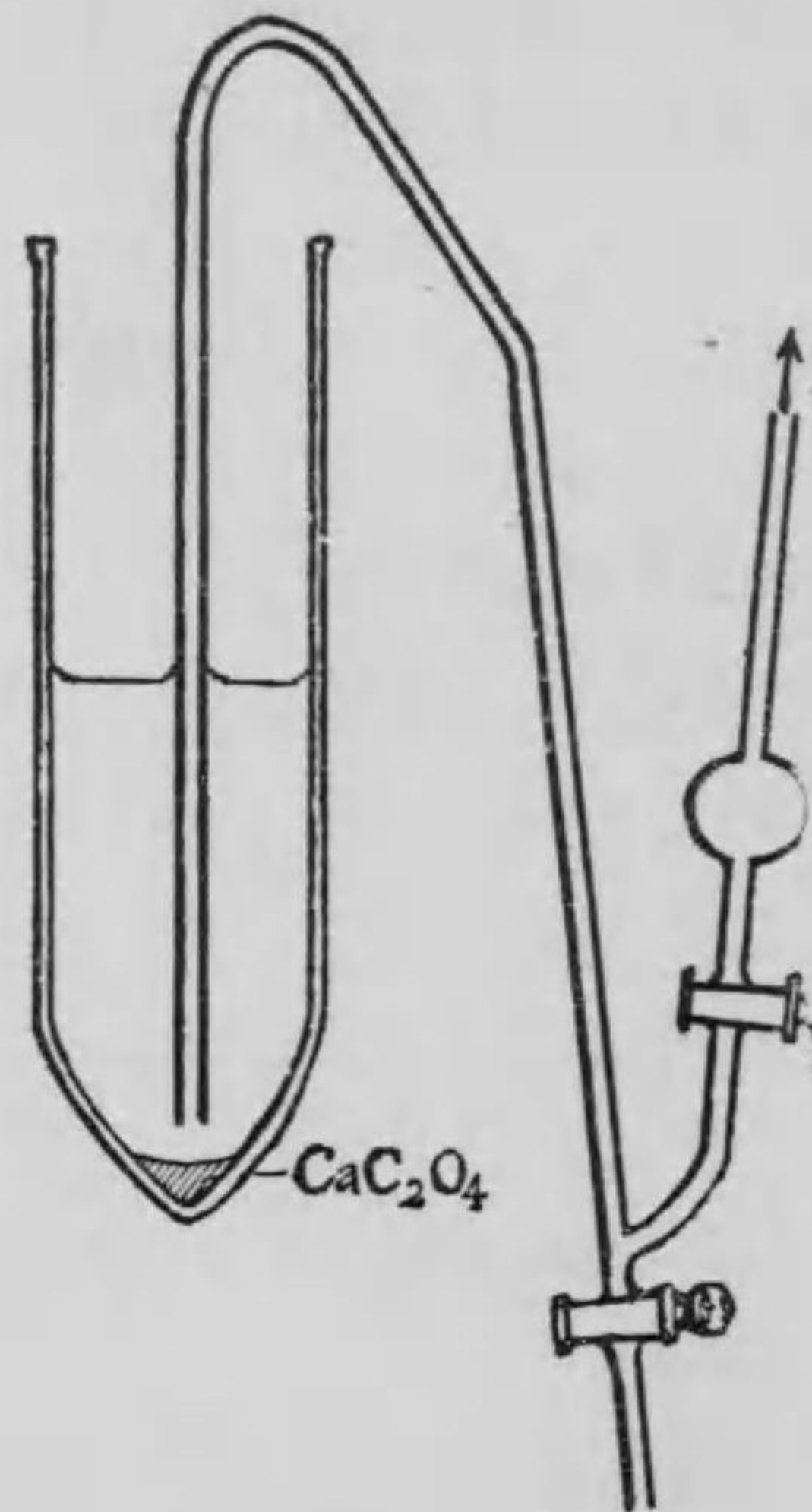
28 cc. の濃硫酸を 970 cc. の蒸留水に徐々に加へるときは略 1 n  $\text{H}_2\text{SO}_4$  を得

(5). 0.01 n 過「マンガン」酸加里

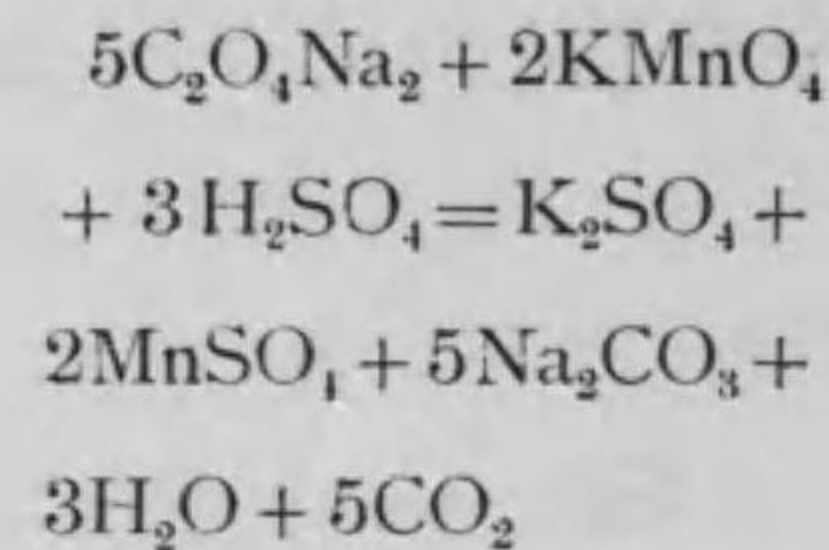
Kahlbaum の  $\text{KMnO}_4$  0.32 gm. を 1 l. の再餾蒸餾



水に溶解し重湯煎(或は蒸氣浴)で二日間加熱し十日餘放置し之を精製石綿で濾過して著色共口樽中に保存する。之を評價するには 0.01 n  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  を用ふ(Sørensen),この時の  $\text{P}_H$  は 1 n  $\text{H}_2\text{SO}_4$  の酸度,  $t=75^\circ\text{C}$  が最よい。斯る方法で調製したものは數ヶ月の保存に堪える。



第 10 圖



所要器具

- 1, 5 cc. の Ostwald 「ピペット」
- 2, 25 cc. の「メスコルベン」
- 3, 電氣遠心沈澱器  
沈澱管一本に 50cc. を容れ得るもの、沈澱管は圖の様な形状で硬質「グラス」で作る。

- 4, 15 或は 20 cc. の「ホールピペット」
- 5, 「サイフォン」(第10圖参照, 或は更に簡単なものでもよし)
- 6, 著色「グラス」製「マイクロビューレット」一臺 0.02 cc.迄の目盛りあるもの

實施 枸橼酸血(血液 100 cc. に枸橼酸曹達の飽和溶液 1) 1 cc. の割合に混じ凝固を阻止したもの) 5.0 cc. を「ピペット」で採り 25 cc. の「メスコルベン」に移す。更に同一の「ピペット」で温湯(約  $65^\circ\text{C}$ )を二回加へてよく混ぜ 20 分間以上放置する。次で 1% の鹽化「アンモニウム」(2) 5 cc. を加へ蒸留水で割度まで盈たしてよく混合し全部を遠心沈澱管に移す(「メスコルベン」に附着し残つた部分は其儘)沈澱管の口を「ゴム」膜或は「パラフィン」紙で覆ひ蒸發を防ぎ 20 分間全力を用ゐて遠心沈澱する。(靜止せしむる時は可及的徐々にせぬと軽い Stroma [血球膜等] の浮き上る恐れがある。)

上層の暗紅色を呈する部分が透明となつたらば此 15.0cc. (出來得可くば 20.0 cc.) を「ピペット」で第二の遠心沈澱管に移し靜かに動かしながら 3% の蓚酸「アンモニウム」溶液(3) 4 cc. を滴下し一夜放置する(16時間以上)。



翌日細い「ガラス」管の先端に小「ゴム」管を附けたもので管壁の沈澱をよく摩り落とし其先端を少量の蒸留水で洗ひ流す。約5分間中等度(1800廻轉)の速力で沈澱せしめて、上澄を出來得るだけ「サイフォン」で除去する(第10圖参照)。

冷水(10°C以下)を容れたる噴出縷の細流で管壁及管底の沈澱を洗ひ其總量を凡35cc.に達せしめてよく攪き混ぜる。直ちに遠心沈澱して洗滌水を「サイフォン」で除く。

この部分は該法の最注意を要する點で有機物或は $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ が後まで残れば終反應を曖昧ならしめるからよく洗滌する必要があるが一方に $\text{CaC}_2\text{O}_4$ は多少水に溶解して損失を來す恐れがあるから可及的寒冷の水で手早く(15分以内)操作する必要がある。

沈澱を5cc.の1n  $\text{H}_2\text{SO}_4$ に解かし、75°Cに温め0.01n  $\text{KMnO}_4$  (5)で滴定する。

### 計算

$$\frac{0.01 \text{ n } \text{KMnO}_4 \text{ の容積(cc.)}}{v} \times 0.2005 \times 100$$

$$= \text{被檢液 } 100 \text{ cc. 中の Ca(mg.)}$$

v は被檢血液の容積(cc.)、稀釋血液を15cc.採れば3、20cc.採れば4であるが尙精密を要するならば枸橼酸曹達溶液によ

る稀釋を計算に入れる。

### 附記

1. 枸橼酸血漿或は血清のCa定量の際には一般に5cc.以下で足りる。Tisdall(1)は多數の経験から血清の場合には次の様な簡便法を行ひ得ることを報告して居る。即 Ostwald の「ピペット」を用ひ2.0cc.の新鮮な血清を豫め2cc.の水を容れた15cc.の目盛りある遠心沈澱管に移し(沈澱管の下部0.1cc.までは外徑6-7mm.位でなければならぬ)1cc.の稀酸「アンモニウム」飽和溶液を加へてよく混じ(沈澱管の上端を保持し廻轉しながら下端を叩く)30分間放置し(此時間には $\text{CaC}_2\text{O}_4$ が完全に生成するに充分である)再び混合する。

遠心沈澱は1500廻轉5分間位で足りる。上澄は「サイフォン」を用ひず單に傾けても沈澱の浮遊することは少ない(もし沈澱が浮き上り初めたら止めて再遠心沈澱する)巧みに傾注出來ると殘存液は0.1cc.内外(「サイフォン」を用ひると0.3cc.は殘る)であるから後に沈澱の洗滌を甚しく節約出來る即2%の「アンモニア」4cc.で二回洗へば充分である。この目的は過剰の $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ を除くためであるから沈澱を毎回攪拌する必要はない。以下全然同様の操作で定量すれば正確な結果を得る。

2. 過「マンガ」酸加里で滴定するに當つて多少有機物の痕跡があるため無機物のみの場合と異り終反應が多少の差があり且持續的でない。依つて各自多數の豫備試験及盲驗(稀酸を加へぬもの)をやつて見てある常數を得て補正せればならぬ。

例へば 血液……………に對し	0.01 n $\text{KMnO}_4$	0.1 cc.
血漿……………	”	0.08 cc.
5 cc. の 1 n $\text{H}_2\text{SO}_4$	”	0.05 cc.

3. 此方法の誤差は±5%以内である。(Clark)

(1) Tisdall; Journ. biol. chem., 56, 459. 1923.



## 少量血液中の Na, K, Ca 及 Mg 定量法

(Kramer and Tisdall)<sup>(1)</sup>

血液中の無機成分を定量するに當つて三鹽素醋酸 (*trichloroacetic acid*) で蛋白質を沈澱除去する方法<sup>(2)</sup> には疑義を挟む可き點が無いでもないが (第 46 頁 参照) 僅々 7 cc. の血液中で大體ではあるが Na, K, Ca, Mg 等を相竝行して定量し得る特徴があるので便宜上此處に記載することにした。即三鹽素醋酸で蛋白質を沈澱せしめた血液濾液の同等分に於て是等の無機成分を定量するのであるが尙無機磷酸 (酸に可溶性のもの) をも同時に定量することが出来る。

### 蛋白除去法:

50 cc. の「メスコルベン」中に 25 cc. の蒸餾水を移し精密に秤量する。静脈穿刺によつて  $7-8\frac{1}{2}$  cc.

(1) Kramer and Tisdall: Journ. biol. chem., 48, 223, 1921.

(2) Greenwald: Journ. pharm. and exp. therap., 11, 281, 1918 and Proc. soc. exp. biol. and med., 17, 50, 1919-20.

の血液を採取し之を徐々に注加する。此の間絶えず「コルベン」を動かし溶血作用を完全ならしめる。

再び秤量して採取した血液の重量を正確に知ることが出来る。

1-2 滴の「オクテールアルコール」及 12-13 cc. の 12% の三鹽素醋酸溶液を「コルベン」を振りながら少し宛加へ、内容をよく混和した後約 10 分間静置する。水で割度まで盈たし内容を大型沈澱管に移し遠心沈澱する。(約 1000 廻轉, 5-10 分間) 上澄の一定量 (多くの場合に 35 cc.) を「ピペット」を以て測り「ピーカー」に移し蒸發する。

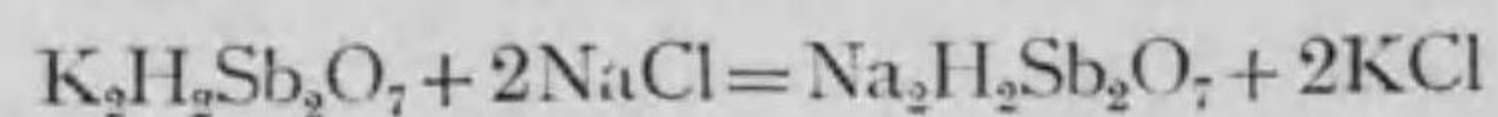
此際多少の沈澱が浮游することがあるが後の定量に大した影響はない。非常に多量の沈澱を生ずる時は氷室内に藏置して沈澱分離せしめて後蒸發を繼續する。

蒸發殘渣は乾燥せしめたる後 0.1 n HCl に溶解して 10 cc. の「メスコルベン」に移し割度まで盈たす。此淡黄色透明の液 (濁濁あらば遠心沈澱せしめ上澄を使用する) は其儘 Na, K, Ca の定量に用ひられ Mg の定量には Ca 定量の際得らるゝ最初の上澄液を用ひる。



## 「ナトリウム」の定量

**原理** 水に可溶性である「ピロアンチモン」酸「カリウム」(二水素)が Na「イオン」に遭つて殆んど水に不溶性の「ピロアンチモン」酸「ナトリウム」(二水素)を成生する性質を應用したものである。



酒精はこの際沈澱の析出を完全ならしめる。

**試薬** (1) 「フェノールスルホンフタレイン」(標示薬)

(2) 10% KOH (酒精を以て精製した Na を含有せぬもの)「パラフィン」罎中に貯蔵する。

(3) 「ピロアンチモン」酸「カリウム」(*potassium pyroantimonate*)液

500 cc. の蒸餾水を硬質「ガラス」の「コルベン」中で沸騰せしめて此中に  $K_2H_2Sb_2O_7$  (J. T. Baker) を約 10 gm. 投入する。尚 3-5 分間煮沸した後「コルベン」を流水中で冷却し全く冷却するを待つて 10% の KOH (2) を 15 cc. 添加する。之を無灰濾紙で「パラフィン」瓶中に濾過するのであるが若し全然透明とならぬ時は放置して濁濁を沈降せしめ上澄を使用して差支ない。

該試薬は室温で少くも一ヶ月の使用に堪へ此 10 cc. は 11 mg. の Na を沈澱せしめ得る。

此試薬の 10 cc. に 2 cc. の蒸餾水, 3cc. の 95% 酒精を加へたものが潤濁してはならぬ。

(4) 95% 酒精  $D=0.81$

**装置** 1. 4.0 cc. の「ホールピペット」

2. 白金皿 (約 20 cc. 大)

3. 乾燥器 (110°C)

4. 「エキシカートル」,  $CaCl_2$  或は「アドソール」入

5. 「グーチ」坩堝 (*Gooch crucible*) は Whatman 濾紙 No. 40 (或は之に相當する緻密な無灰濾紙) の上に精製石綿の薄層を置き更に第二の濾紙及石綿の層を重ねたものを用ひる。此處が該法の最技巧を要する點であつて如述の注意を以てしても沈澱が微細なために最初は 3-10% の損失は免れないが、定量を繰返す中に終りには 1-2% 以内の損失となる。故に新しい「グーチ」は前以て

「ピロアンチモン」酸「カリウム」液 (3) 10 cc.

NaCl 溶液 2 cc. (中に約 3-5 mg. の Na を含むもの) 95% の酒精 3cc.

の混合液を濾過し次で 30% の酒精で洗滌する操



作を十数回繰り返して目を細かくした上必要の實驗に取りかゝる方が安全である。

斯る「グーチ」は更に25回以上の定量を行つても吸引濾過するの  
に左程手間がかゝらない。

**實施** 前述の如くに調製した被檢液 4.0 cc.\* を「ピ  
ペット」を用ひて白金皿に採り約 2 cc. に濃縮する。

*phenolsulfonephthalein* を標示薬として 10 % の KOH  
(2) を一滴宛加へ弱鹵性反應に持ち來す(多くの場合  
10-12 滴以内で足りる)。之に 10 cc. の「ピロアンチ  
モン」酸「カリウム」(3) を加へ内容を「ゴム」帽付の  
細い「ガラス」棒で攪き混ぜながら 3 cc. の 95 % 酒精  
(4) を滴下する。30-40 分後「ピロアンチモン」酸「ナ  
トリウム」の沈澱の析出した處で前記の「ガラス」棒  
の媒介で豫め乾燥秤量した「グーチ」に移し液の浸み  
渡つた頃を見計らつて靜かに吸引する(一分間に 10  
-15 滴位を適度とする)然る後白金皿「ガラス」棒次で  
「グーチ」中の沈澱を數回 30 % の酒精で洗ひ(總量 8-  
12 cc. を用ふ)吸引し 110°C 1 時間乾燥し除濕器内で  
放冷(30 分以上)秤量する。最初の「グーチ」の重量と

\* 最初蛋白除去を行つた血液の重量を  $x$  gm. とすればこの中に  
 $\frac{7 \times 4}{10^2} \times gm.$  の血液を含有することゝなる。

の差即沈澱の目方を 11.08 で除したものは被檢物中  
の Na 量を mg. で表はすことゝなる。

### 「カリウム」の定量

**原理** 「コバルチ」亞硝酸「ナトリウム」溶液を用ひ  
「カリウム」を「コバルチ」亞硝酸「カリウム」として沈  
澱せしめて分離し之に過「マンガン」酸「カリウム」定  
規液の過剰を加へ其幾分を環元せしめ剩餘の  $KMnO_4$   
の幾何なるかを知つて間接に「カリウム」の量を計算  
する。

**試薬** (1) 亞硝酸「ナトリウム」(*sodium nitrite*,  
Merck), K を夾雜してゐてはならぬ。粉末 15 gm.  
を 30 cc. の水に溶解する。

(2) 「コバルチ」亞硝酸「ナトリウム」[*sodium cobalti  
nitrite*,  $Na_3Co(NO_2)_6$ ] 液

第一液: 亞硝酸「コバルト」(*cobalt nitrite*,

J. T. Baker) 25 gm. } 溶

蒸餾水 50 cc. } 解

氷醋酸 12.5 cc. を添加する。

第二液 亞硝酸「ナトリウム」(*sodium nitrite*, Merck),

K を含有せぬもの 120 gm.

蒸餾水 180 cc.



溶解すれば総量 220 cc. となる。

第一液の全量に第二液の 210 cc. を混合するとき  
は五酸化窒素 (nitric oxide,  $N_2O_5$ ) 瓦斯が発生する  
此發生の止むまで空氣を通ずる氷室に貯藏し使用に  
先立つて濾過する。使用期限約一ヶ月間。

(3) 4 n  $H_2SO_4$  100 cc. の蒸留水に濃硫酸 20 cc. を注加する。

(4) 0.02 n  $KMnO_4$

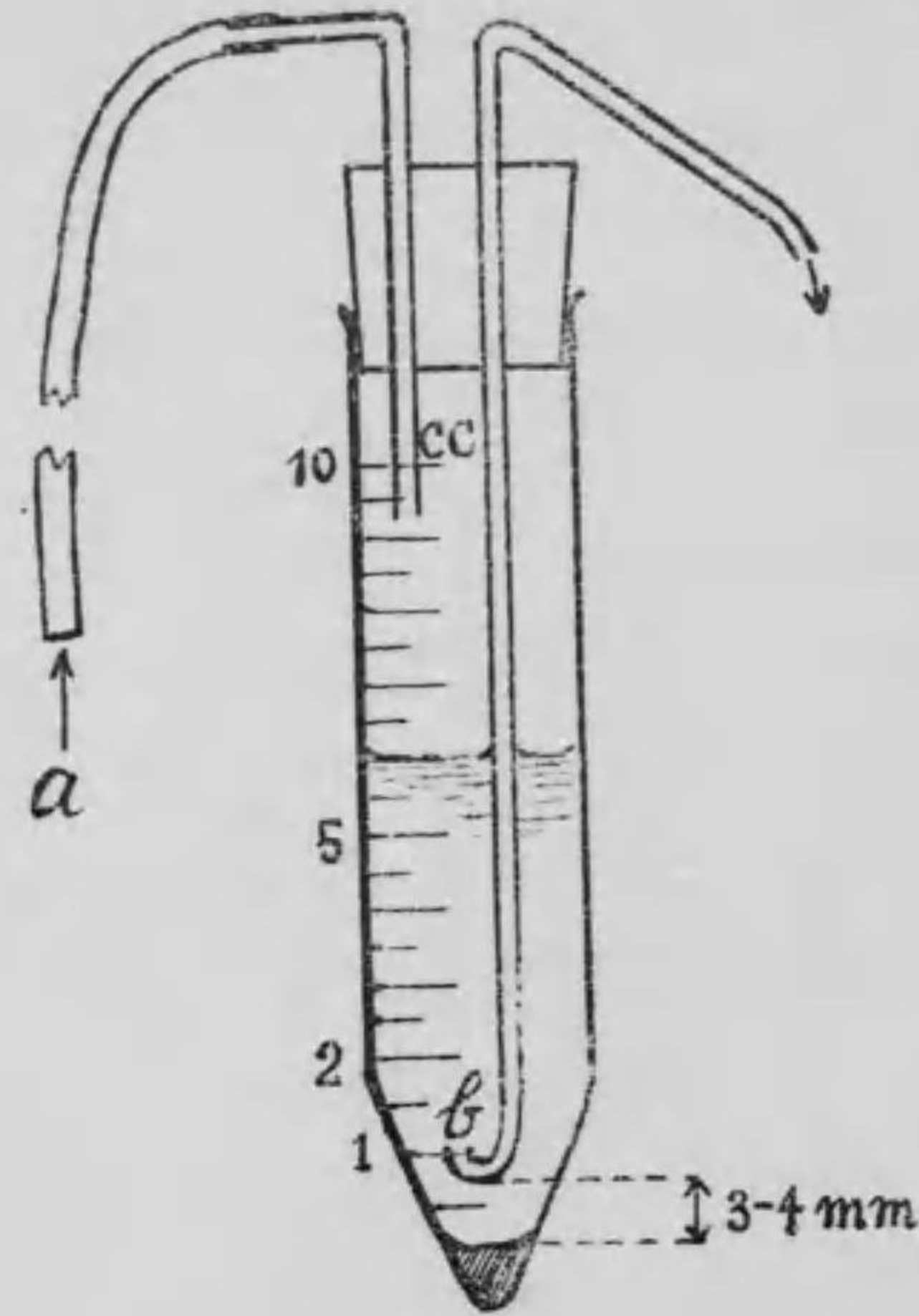
第 48 頁に倣ひ  
Sørensen の方法で  
調製する。

(5) 0.01 n  $Na_2C_2O_4$

0.67 gm. の  $Na_2C_2O_4$   
を 5 cc. の濃硫酸  
を含む 1 l. の蒸  
留水に溶解し十倍  
に稀釋する。

**装置**

1. Ostwald の「ピ  
ペット」 0.2 cc.
2. 遠心沈澱管  
(第 11 圖参照)
3. 「マイクロピ  
ペット」



第 11 圖

總量 5 cc., 最小目盛 0.02 cc.

**實施** 前記材料の 0.2-0.5 cc. を Ostwald の「ピペ  
ット」で圖の如き目盛りある遠心沈澱管に移す(沈澱管  
は豫め「クローム」硫酸で處理しよく水洗して置かぬ  
と後に沈澱が壁に癒著する恐れがある)蒸留水及亞  
硝酸「ナトリウム」液(1)各 0.5 cc. を加へ内容をよく  
混じり 5 分間放置する。蒸留水で總量を 4 cc. としよく  
混ぜ更に 2 cc. の「コバルチ」亞硝酸「ナトリウム」液(2)  
を一滴宛加へる。再内容をよく混合し 1/2 時間放置  
した後遠心沈澱する(1300 廻轉, 約 7 分間)沈澱が全  
然沈降したならば上澄を 0.2-0.3 cc. 残して全部捨て去  
る。この目的に向つては圖の様な装置を用ひ a 端を  
口で軽く吹くのであるが b 端と沈澱表面との距離は  
少くも 3-4 mm. に保たぬと沈澱を攪亂する恐れがあ  
る。5 cc. の水を壁に添ふて流し込み残存せる液と静  
かに混ぜる。此際沈澱管を垂直に保ち廻轉しながら  
下端を軽く叩いて、沈澱を浮き上らすことは可及的  
避けねばならぬ。5 分間遠心沈澱して先と同様にし  
て上澄を捨てる。此操作は更に三回繰り返す(沈澱  
は合計四回洗滌されることとなる)と上澄は全然透  
明となる。最後に上澄を捨てたらば滴定を行ふ。

過剰の 0.02 n  $KMnO_4$  (4) (普通の血液ならば 1.6-2



cc. で足りる) 及 1 cc. の 4 n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(3) を沈澱に加へる。

「ガラス」棒で沈澱をよく攪き混ぜ重湯煎上で加熱する。

45-60 秒後には沈澱は全く溶解して全體が透明な淡紅色(石竹色)を呈す可きである(酸化されずに残つて居る沈澱があると尙濁してゐて紅色は次第に褪色するから加熱を繼續せねばならぬし加熱が過ぎると再濁して褐色となり定量不能となるのである)次に「ピペット」を用ひ、淡紅色を消失せしむるに充分な蔘酸曹達液(5)(普通 2 cc. で足りるが色が消失しなければ更に 2 cc. を添加する)を加へ其過剰を 0.02 n KMnO<sub>4</sub> で滴定する。終反應は石竹色が 1 分間消失しない程度を標準とする。

計算: 0.01 n KMnO<sub>4</sub> の 1 cc. は, 0.071 mg. の K を含有する「コバルチ」亞硝酸「カリウム」の沈澱を酸化溶解する。故に

V<sub>1</sub> …… 最初に加へた 0.02 n KMnO<sub>4</sub> の量 …… cc.

V<sub>2</sub> …… 滴定に用ひた „ „ „ „ „ „ „ „ …… cc.

0.03 …… 同量の水を著色するに要する „ …… cc.

V<sub>3</sub> …… 褪色に用ひた 0.01 n Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> の量 …… cc.

なるときは

$[(v_1 + v_2 - 0.03) \times 2 - v_3] \times 0.071 = \text{被験液中の K(mg.)}$

### カルシウムの定量

清淨な目盛りのある遠心沈澱管に前記材料の 4.0 cc. を採り 1 cc. の蔘酸「アンモニウム」飽和溶液及 2 cc. の醋酸曹達飽和溶液(濾過して用ふ)を加へる。よく混合し一時間放置した後總量を水で 8 cc. としよく混ぜ遠心沈澱する(1300 廻轉 15 分間)。

此上澄は Mg 定量に用ふるのだから「サイフォン」で別の器に移し保存する又蔘酸「カルシウム」の沈澱は洗滌して後定量するのであるが前記(第 50 頁)の Clark 氏法と大同小異であるから省略することとする。

### マグネシウムの定量

原理 「マグネシウムイオン」を「アンモニア」鹼性液中で磷酸「マグネシウムアンモニウム」とし沈澱せしめて分離し酸に溶解し「チオチアン」酸第二鐵液に依る現色反應を應用して之を比色的に定量するのである。

試薬 (1). 磷酸「アンモニウム」液(ammonium phosphate)

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25 gm.



蒸留水 250 cc.

強「アンモニア」水 25 cc.

一夜放置して翌日煮沸して過剰の「アンモニア」を揮散せしめ冷却後總量を 250 cc. とする、之を 5 倍に稀釋して使用する。

## (2). 10% 「アンモニア」

100 cc. の強「アンモニア」水を 1 l. に稀釋する。

## (3). 0.1n HCl (精密を要さぬ)

(4). 「チオチアン」酸第二鐵 (*ferric thiocyanate*) 液

第一液 「チオチアン」酸「アンモニウム」(或は「ロダンアンモニウム」 $\text{NH}_4\text{SCN}$ ) の 0.3% 液

第二液 鹽化第二鐵 ( $\text{FeCl}_2$ ) (結晶水を含む) の 0.3% 液で透明に溶解せぬ時は HCl を少量に加へる。

使用前一時間に各液 5 cc. を採りて混合し 40 cc. に水で稀釋する。

(5). 磷酸「マグネシウムアンモニウム」(*magnesium-ammonium phosphate*) 標準液

$\text{Mg NH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (大氣中で乾燥したもの) 0.102 gm. を 100 cc. の 0.1nHCl に溶解し蒸留水で 1 l. と

する。此 1 cc. は 0.01 mg. の Mg に相當する。

該鹽の精製に關する詳細は Jones, W.<sup>(1)</sup> を参照せられたい。

**實施** 30 cc. 大の「ビーカー」に「ビベット」で前記 Ca 定量の上澄液 5 cc. を移し  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  液 (1) の 1 cc. 及強「アンモニア」2 cc. を添加し翌日になつて豫め用意して置いた完全な「グーチ」坩堝 (第 55 頁参照) で之を濾過し沈澱を 5 cc. の「アンモニア」水 (2) で 10 回洗滌する。此「グーチ」坩堝を前記の「ビーカー」に容れたまゝ 80°C で乾燥する。

0.1 n HCl (3) 10 cc. を坩堝に加へ二三時間の後沈澱の大體溶解した處で之を沈澱管に移して遠心沈澱し上澄 5 cc. を「ビベット」で比色計の圓筒 (10 cc. の度盛りあるものに前以て 2 cc. の「チオチアン」酸第二鐵液 (4) を容れて置く) に移す全量を 0.1nHCl で 10 cc. の目盛りまで盈たし「ゴム」栓を施して内容をよく混合する。一方に  $\text{MgNH}_4\text{PO}_4$  (5) の一定量 (なる可く被檢液の Mg 量に接近せる分量を採る) を 0.1 n HCl で「チオチアン」酸液の 2 cc. と共に稀釋して 10 cc. としたものと比色する。今かりに兩液が同濃度の現色

(1) Jones : Journ. biol. chem., 25, 87, 1916.



反応を起したとすれば

$$\text{標準液量 (cc.)} \times 0.01 \times 2 \times \frac{8}{5} \times \frac{100}{\text{Ca 定量に用いた血液濾液量}} \\ = 100 \text{ cc. の血液濾液中の Mg 量 (mg.)}$$

此現色反応には幾多の缺點があるから次に Denis 法を附記する。

「マグネシウム」微量定量法(別法)-Denis<sup>(1)</sup>法

**原理**  $\text{MgNH}_4\text{PO}_4$  として沈澱せしめた Mg の量はこの中の P を定量しても間接に知ることが出来る譯である。而して P の量は Bloor の *nephelometry* (第 40 頁参照) 或は Bell and Doisy の *colorimetry* (第 32 頁参照) に據て定量することが出来る。

**試薬** 1. 磷酸「アンモニウム」液

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	5 gm.
強「アンモニア」	0.5 cc.
蒸餾水	100 cc.

2. 洗滌用「アンモニア」水

比重 0.9 の「アンモニア」水を三倍に稀釋する。

3. 洗滌用酒精

強「アンモニア」 10 cc. を

75 % の酒精で 1 l. としたものを。

(1) Denis: Journ. biol. chem., 52, 411, 1922.

**實施** 2.0 cc. の血清に 3 % の  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$  1 cc. を加へて翌朝遠心沈澱した上澄(Tisdall の Ca 定量の際生ずる最初の上澄, 第 51 頁参照) 2 cc. を 15 cc. 大の遠心沈澱管に採り之に磷酸「アンモニウム」液(1) 0.5 cc. を加へて混じ翌朝遠心沈澱する。上澄を「サイフォン」で除き之を 5 cc. の「アンモニア」水(2) で二回洗ふ。次で 5 cc. の酒精(3) を用ひて一回洗滌し温めて「アンモニア」を驅除し之を 5 cc. の 0.1 n HCl に溶解して 25 cc. の「メスコルベン」に移す。

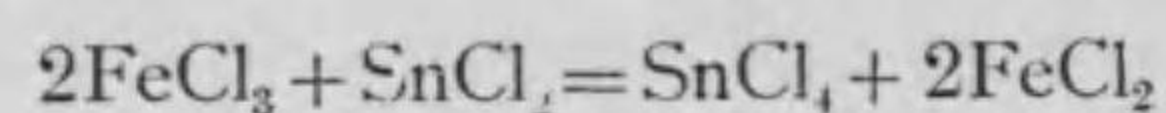
以下 Bell and Doisy 法で磷を比色的に定量することが出来る。

附記: 0.02-0.1 mg. の既知の mg. 量でこの方法を試みると平均 96 % を回収することが出来る。



## 鐵微量定量法

**原理** 有機物を焼灼灰化し鹽酸を加へ加熱して中に含まれて居る鐵を鹽化第二鐵(過「クロール」鐵, *ferric chloride*)の形となし之を鹽化錫によつて全部鹽化第一鐵(*ferrous chloride*)の形に導く



之を Zimmermann<sup>(1)</sup>-Reinhardt<sup>(2)</sup>の方法で過「マンガン」酸加里定規液で滴定するのである。(此際二價の鐵は酸化されて再 *ferric ion* となる。)

**試薬** 1. 純鹽酸 (比重 1.12)

2. 鹽化錫溶液

SnCl<sub>2</sub> 50 gm.

濃鹽酸 100 cc.

水を加へて 1 l. とする。

3. 昇汞溶液 (*mercuric chloride*)

(1) Zimmermann : Ann. Chem., Pharm., 213, 302, 1881.

(2) Reinhardt : Chem., Ztg., 13, 323.

純 HgCl<sub>2</sub> の飽和水溶液

4. 硫酸「マンガン」液 MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 67 gm.

蒸留水 500-600 cc.

此溶液に 磷酸(比重 1.7) 138 cc.

濃硫酸(比重 1.82) 130 cc.

を混和して之を 1 l. とする。

5. 0.1 n 過「マンガン」酸加里溶液

純 KMnO<sub>4</sub> 3.2 gm. (理論上は  $\frac{1}{50}$  gm. mol ならば 3.161 gm.) を全く有機物を含有せぬ蒸留水 1 l. に溶解して十數日後砒酸定規液で評價する。

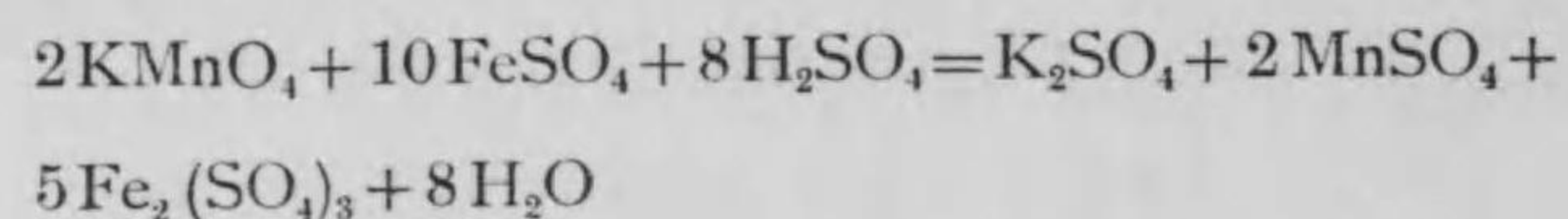
**實施** 液體ならば蒸發乾固し稍々強く加熱して炭塊状になつたらば之を碎き粉末にして坩堝に移す。(最初から白金皿を用ゐたならば此移す手数を省くことが出来る。) 固形物ならば直接坩堝で焼灼する。

斯くて紅熾して有機物の大部分がなくなつたならば二三滴の濃鹽酸を加へて飛散せぬ様に蒸發し再紅熾する。之を 20-25 cc. の鹽酸(1) で定量的に圓底「コルベン」に移し煮沸する。

消火後鹽化錫液(2)を少し宛加へ Fe<sup>+++</sup>の褐色が消えた處で止める。冷後昇汞液(3) 10 cc. を一時に加へよく攪拌する。然る時は白色の Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> の沈澱が出



来る。10分後之を700-800 cc. 大の「ビーカー」に移し尙「コルベン」を數回水で洗つて其洗滌液を合併し此内容を約500 cc. とする。之に20-25 cc. の硫酸「マンガ」液(4)を加へて過「マンガ」酸加里定規液で滴定する。此際注意して前の一滴の色が消えるのを待つて次の一滴を加へる様にし過剰に加へぬ様にせねばならぬ。



計算:

0.1 n $\text{KMnO}_4$ の 1 cc.	=0.005585 gm. Fe
„	=0.007185 „ FeO
„	=0.007985 „ $\text{Fe}_2\text{O}_3$

## 「アンモニア」微量定量法

無機(遊離)「アンモニア」の定量方法は尿、血液夫夫操作を異にするから別々に記述することとする。

### 第一. 尿

最簡便と思はれるのは「バームチット」法であるが先 Folin and MacCallum<sup>(1)</sup> 法に就て記す。是れ「バームチット」の手に入らぬ場合に代用せんためである。

#### a. Folin and MacCallum 法

原理 反應を鹼性にした尿に空氣を通じて「アンモニア」を驅出し之を稀薄な酸液に捕集して比色的に定量する。

#### 試薬 (1) 炭酸曹達液

炭酸曹達	10 gm.
蓆酸加里	15 gm.

水を加へて100 cc. とする。

(1) Folin and MacCallum: Journ. biol. chem., **11**, 523, 1912.



(2) 石油 少量

(3) Nessler 試薬(第86頁参照)

**装置及器具** 1. Ostwald の「ピペット」 (2 cc.)

2. 装置は大型硬質試験管 (2.5 × 20 cm.) 其他 *micro Kjeldahl* のものに同じ(第88頁参照)

3. 比色計

**実施** Ostwald の「ピペット」で 1-5 cc. の新鮮な尿 (普通 2 cc.) を大型試験管に移し 2-3 滴の石油 (*kerosene*) 或は流動「パラフィン」(泡立つのを防ぐ爲) 及 1 滴の「フェノールフタレイン」を添加し捕集管の方には蒸留水 20 cc. 及 0.1 n HCl 2 cc. を容れて置き *micro Kjeldahl* と全然同様の方法 (第92頁参照) で空気を通じ「アンモニア」の轉移を行ふ。尿を鹼性にするために加へる炭酸曹達液は接続して静かに吸引をはじめてから注入すべきである。

捕集管には 100 cc. の目盛りあるものを用ひるか或は 100 cc. の「メスコルベン」(第95頁参照) を使用する。

標準液には 100 cc. に 1 mg. の N を含有する  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  溶液を用ひ同時に *Nesslerize* して比色定量する。

**附記:**

1. 該定量に最適當な「アンモニア」窒素量 0.75-1.5 mg. を含有する尿は普通 2 cc. であるが稀薄な尿では 5 cc. を要することがあり糖尿では 1 cc. で充分なことがある。
2. 吸引の時間は室温に關係あるが寒冷でなければ 10 分間で充分である。

**b. Folin and Bell<sup>(1)</sup> の「パームチット」法**

**原理** 稀釋した尿中の  $\text{NH}_4\text{OH}$  を全部「パームチット」に結合せしめて分離した後之に NaOH を加へて再之を遊離の状態に持ち來して比色的に定量する。

**試薬** (1). 10 % NaOH

(2). *Permutit* の精製法

60°C の 1 % の NaOH 中に約一時間浸して置き次で水で鹼性の無くなるまで洗ひ次に 2 % の醋酸で洗ひ再水洗して乾燥保存する。

- 器具及器械**
1. 1 或は 2 cc. の Ostwald 「ピペット」
  2. 200 cc. 「メスコルベン」
  3. 比色計

**実施** 2 gm. の *permutit* を 200 cc. の「メスコルベン」に容れ 5 cc. の水を加へ之に「ピペット」で 2.0 cc. の尿を添加する。(當初に於て 2.5 倍に稀釋した尿を 5 cc. 加へても差支ない) 少量の水 (1-5 cc.) で「メスコ

(1) Folin and Bell : Journ. biol. chem., 29, 329, 1917.



ルベン」の壁の尿を洗ひ落とし5分間静かに絶え間なく震盪する。25-40 cc.の水で「バームチット」を底に流し込み上澄を傾注する。

「バームチット」を少量の蒸留水で洗ひ上澄を捨てる(著色の甚しい尿では尙一回洗滌を繰り返す方が安全である)「バームチット」に少量の水と5 cc.の10%のNaOH(2)を加へ混じて後更に100-150 cc.の水を添加する。

2-3秒震盪して後10 cc.のNessler 試薬を加へ10分以上経過して比色する。(第93頁参照)

標準液は大凡1.0 mg.のN(尿の「アンモニア」量に應じて増減する)を含む $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を水で稀釋し10% NaOH 5 cc. Nessler 試薬10 cc.を加へて全量を200 cc.とする。

**附記** 1. *Permutit*は *aluminate silicate* であつて水溶液中で「アンモニア」を吸着するのではなく水に不溶性のNa鹽を作るのである。油により2-3分で全「アンモニア」の95%を遊離するが全量が分解されるには10-15分待たなければならぬ。

2. 本法で *permutit* の「アンモニア」を分解せしめるのに10%のNaOHは1 cc.位で充分であるが多量に加へるのは比較的高價なNessler 試薬を節約せん爲である。

3. *Permutit* を有するため此「メスコルベン」の液體の容積は200 cc.以下であるが實際は *permutit* 中の $\text{NH}_3$ の濃度は溶液の夫れより

稍大であつて方法を簡便にするため「メスコルベン」中に残して置くのである。

## 第二. 血液

血液の遊離「アンモニア」は其含有量が非常に少ないと含窒素化合物が分解して「アンモニア」を生じ易いので定量が一般に困難であるとせられて居る。Folin 法<sup>(1)</sup>及 Barnett 法<sup>(2)</sup>は一回に5-10 cc.の血液を要し且酒精で蛋白除去を行つて居るが蛋白の残るために過大の値を得る傾がある。(Hara<sup>(3)</sup>)

Morgulis and Jahr<sup>(4)</sup>は一回に20 gm.以上の血液を用ひ *permutit* 法を行つて居るが微量定量の目的に添はない。

元來血液の尿素窒素定量(第98頁参照)にあつて最初遊離「アンモニア」をも併せ定量し別に減壓により無機「アンモニア」を除いた血液に於て同様の定量を行つて尿素窒素の量を知り其差を以て無機「アンモニア」の量を推定し得可きであるが100 cc.の血

(1) Folin and Denis: Journ. biol. chem., 11, 527, 1912.

(2) Barnett: Ibid., 29, 459, 1917.

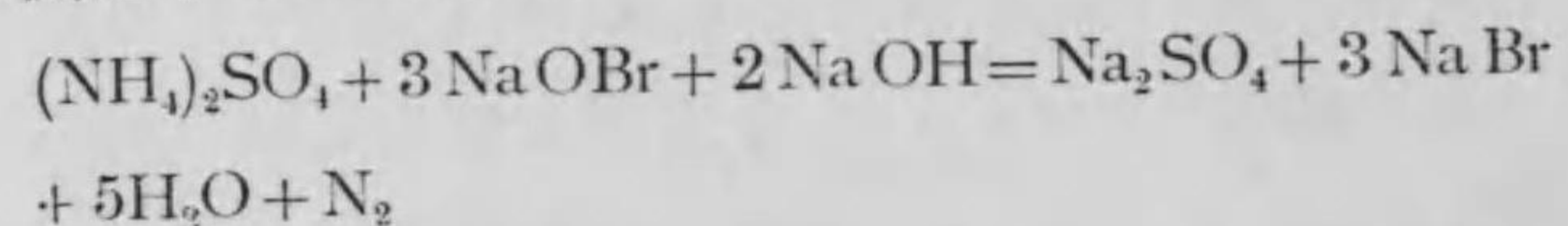
(3) Hara: Journ. biochem., 2, 473, 1923.

(4) Morgulis and Jahr: Journ. biol. chem., 38, 435, 1919.



液に 0.25 mg. 内外の微量であるから到底正確を期し得ない、依つて若し直接に且正確に無機「アンモニア」の量を知り得れば尿素定量の豫備試験としても非常に有意義のものとなるのである。以下記載するのは Gad-Andresen<sup>(1)</sup> の方法であつて装置稍々煩雜の嫌はあるが目下之を用ふるの外はない。

**原理** 血液に緩衝劑(buffer)として硼酸鹽液を加へ特殊の圓筒内で空氣を通じながら乾燥し驅出せられた「アンモニア」を稀薄な硫酸を容れたる小罫に捕集し之を NaOBr (sodium hypobromite) で分解して發生する窒素の容積を Krogh<sup>(2)</sup> の micro respirometer を以て測定するのである。



**試薬** (1). 硼酸緩衝劑 (Sørensen)

(Clark: *The determination of hydrogen ions*, Baltimore, 1920, p. 112 参照)

(1) Gad-Andresen: *Biochem. Zeitschr.*, **99**, 1919.  
*Journ. biol. chem.*, **51**, 367, 1922.

(2) Krogh: *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, **84**, 379, 1913.

硼酸鹽溶液 9 cc.

NaOH 溶液 1 cc.  $P_H = 9.39$  (14°C) - 9.36 (18°C)

(2). 0.2n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 精密を要せず

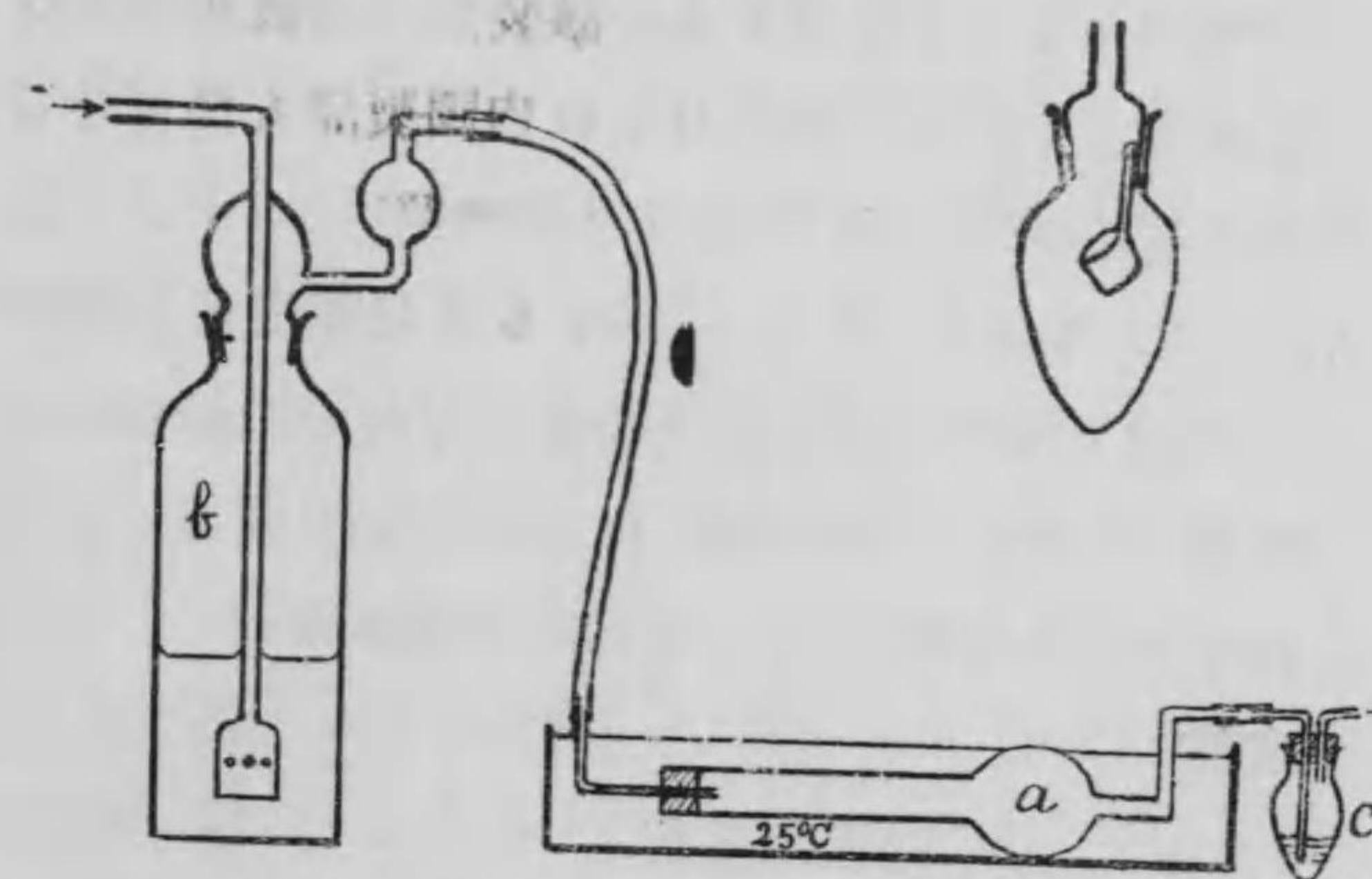
(3). NaO Br 溶液

100 cc. の 2n NaOH に 1 cc. の液状臭素を添加したるもの

(4). NaOH 溶液

#### 器具及装置

1. 1 cc. の Ostwald「ビベット」



第 12 圖

2. 蒸發圓筒 a (上圖参照) は一端に近く 5-6 cc. 大の球狀部を有し長さ 25 cm. 直径 1.1 cm. 25°C の水



浴中に横へる。

3. 濃硫酸を容れたる完全なる共口洗滌瓶 b (通常 Drechsel's gas washing bottle として知られて居る) は大氣の「アンモニア」を吸収し且空氣を乾燥する目的である。
4. 「アンモニア」の捕集瓶 C は元來 Krogh<sup>(1)</sup> の micro respirometer に附屬せるものであるが Krogh の装置は目下我が國にては手に入り憎い。依つて編者は Barcroft<sup>(2)</sup> の differential manometer を之に代用せんことを推奨する。該装置は血液瓦斯分析器械として一般に使用せられ内國製品も發賣せられて居るからである (第 168 頁參照)。

C は内容 10-15 cc. を有する下端稍尖れる倒卵形の罫であつて之と擦り合せとなれる manometer 附屬の「ガラス」栓内側には NaOBr を容るゝための小容器を裝備せしむる (第 12 圖參照)

#### 實施

「アンモニア」の低温蒸餾:

- (1) Krogh: Skand. Arch. Physiol. **20**, 279, 1908.
- (2) Barcroft: Journ. of physiol. **37**, 12, 1908.  
Barcroft and Roberts: Ibid. **39**, 429, 1910.

圓筒 a の球狀部に硼酸緩衝劑 (1) を 0.1 cc. 容れ置き之に Ostwald の「ピペット」にて 1 cc. の血液を添加し一端に「ゴム」栓を施して靜かに廻轉して内容をよく混合せしむる。尙一部の血液は圓筒の空氣の流入する方の側に流し込み (決して細き管の方に入らしめてはならぬ) 回轉して圓筒の内面に一様に擴げて薄き層とする。

之を 20°-25°C の恒温槽に浸し 0.5 cc. の 0.2 n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2) を容れたる罫 C と接續する。斯くて洗滌罫 C を通じ靜かに空氣を送る (加減をせぬと H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> が罫の外に跳ね出す恐れがある。) 通氣 30 分後には血液は完全に乾燥して「アンモニア」の移行は終る。之に蒸留水 2 cc. 餘を加へ總量を 2.5 cc. とする。 (罫に目盛りなきときは豫め C の重量を知り置き秤量的に内容を 2.5 cc. とする事が出来る) 他方の罫 (Kontrolbehälter) には「ピペット」を用ひ 2.5 cc. の水を探り夫々「ワゼリン」を用ひて differential manometer に附著せしめ震盪器に固定する。

水槽は室温に保つてもよいが 17°C に調節して絶えず空氣を通じて溫度の均一を保たしめ得れば更に好都合である。



両方の活栓を閉づる前に先づ「モーター」を動かして15-20分激しく震盪する。之は罎中の液體を空氣を以て飽和せしむる事及其溫度を水槽と均一にするのが目的である。然る後被檢液を容れたる側の罎を取り外づし小容器内にNaOBr溶液(3)數滴を容れ舊の如く *manometer* に取り附ける。爾後は注意して震盪を調節し NaOBr 溶液が器の外に跳ね出すことなからしめる。次で括栓を捻ぢて外界との交通を絶ち(罎と *manometer* とは交通する)2-3分間震盪して丁字油面の位置に變動なきかを確認する。(若し多少其變動ある時は再括栓を開き油柱面を平均せしめて同操作を繰返す)油柱面に變化を來さぬ様にならば *differential manometer* を震盪器より取り外づし傾斜せしめて NaOBr 液を完全に罎中に流入せしめ震盪機に取り付け2分間震盪して壓力の變化を讀取し更に1-2分間震盪して窒素の發生、油柱の移動が終つたか否かを確認する。此壓力の變化幾 *mm.* が發生した「ガス」體の幾 *mm.* に相當するかは器械に依り一定して居る常數であつて之を油柱の高さに乗じたるものが即發生した窒素の容積を *mm.* で表はすこととなる。尙此器械の使用法の詳細は第170頁の外

Barcroft: *Journ. of physiol.*, **37**, 12, 1908. and **39**, 429, 1910

" *The respiratory function of the blood.* Cambridge, 1914.

Hoffmann: *Journ. of physiol.*, **47**, 272, 1913.

等を参照せられたい。

V... 發生した窒素の容積(0°C, 1氣壓) *mm.*

v... 使用した血液の容積 *cc.*

1.256... 1 *cc.* の窒素の重量 *mg.*

1.09... (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> が Na OBr にて定量的に分解

されぬために用ふる經驗的に得た補正數

$$V \times \frac{1.256 \times 1.09 \times 10^2}{v \times 10^3} = 100 \text{ cc. の血液中の「アンモニア」窒素量 } mg.$$

注意:

1. 定量に用ふる血液量は 0.1-0.15 *cc.* 位でも「アンモニア」量が普通(100 *cc.* の血液中に 0.25-0.5 *mg.*)であるか異常(0.8 *mg.* を超ゆることは稀である)であるか判定は容易である。
2. 恒溫槽の溫度が 30°C に達する時は尿素が分解し初めるから注意しなくてはならぬ。
3. 震盪機の振動は激しい程よい譯であるが平衡状態に持ち來す以前に NaO Br 液が罎の内容に混入すれば全然定量は失敗に歸するから注意しなくて



はならぬ。

4. 誤差は 100 cc. の血液に對し  $\pm 0.03-0.05$  mg. である。
5. Gad-Andresen 法は他の滲出液, 分泌液等にも應用出来ること勿論である。

### 血液非蛋白窒素 (Non-protein nitrogen, Reststickstoff) 微量定量法

Bang<sup>(1)</sup> は血液を吸取らしめた濾紙片を燐「モリブデン」酸溶液 (之は「アルブモーゼ」「ペプトン」を溶解する恐れがない) で浸出して之を灰化し此水蒸汽蒸餾に依つて驅出せらるゝ「アンモニア」を捕集して「ヨード」法 (Iodometry, Jodometrie) に依つて測定して居る, 極少量の血液 (約 0.1 gm.) で單に「アンモニア」だけを逐次的に定量するには都合がよいが「ゼンマイ」秤を要するし實施方法もかなり面倒である。殊に同時に他の無機成分を定量する時には Folin and Wu<sup>(2)</sup> 法に依つた方がよい。

**原理** Folin-Wu の方法に従つて血液の無蛋白溶液を作つて (尿酸定量, 第 104 頁参照) 此同等分に於て窒素を定量する。此總窒素の定量は勿論 *micro*

(1) Bang: Mikromethode zur Blutuntersuchung, 23, 1920.

(2) Folin and Wu: Journ. biol. chem., 38, 87, 1919.



Kjeldahl (第 85 頁参照) で差支ないが灰化物に直接「ネッセル」試薬を加へる方法(*direct Nesslerization*)を用ふれば非常に手数を省略し得る。

### 試薬 (1) 硫酸磷酸混合液

純濃硫酸(Nを夾雑せぬもの) 100 cc.

磷酸( $H_3PO_4$ の85%を含有し舍利別状を呈す) 300 cc. を混じ圓筒形の器に入れて密閉し一週間放置すると夾雑した  $CaSO_4$  は沈降する。此上層の透明な部分を探り同容量の水及 $\frac{1}{10}$ 容量の6%  $CuSO_4$  を添加する。血液濾液 5 cc. を酸化するには此 1 cc. で充分である。

### (2) Nessler 試薬の簡便な調製法(第 86 頁参照)

KI 結晶 (*mercuric iodide*) 7.5 gm. を 50 cc. の温湯に溶解し之に 100 gm. の Hg I (沃化第一水銀) を攪き混ぜながら加へて溶解する。全量を先づ約 500 cc. とし(必要あらば濾過し)更に全量を 1 l. に稀釋する(以上基本液)。一方に NaOH 飽和溶液(約 55 gm/dl)の上層の透明なる部分を稀釋して 10% (濃度はなる可く滴定して定めた方がよい)の溶液を調製して次の處方に依て混合する。

基本液 150 cc.

10% NaOH 700 cc.

蒸留水 150 cc. (全量 1 l.)

(中性溶液を *Nesslerize* する時には全量 100 cc. の中にこの 10 cc. を加へれば充分である。)

純粹な沃度加里水銀の製法(原著第 89 頁参照)

所要器具 1. 硬質大型試験管(20×2.5 cm.) 35 及 50 cc. の二つの目盛りあるもの

2. 50 及 100 cc. の「メスコルペン」

3. 比色計

實施 血液の無蛋白濾液(第 105 頁参照) 5.0 cc. を乾燥した硬質試験管に移し酸混合液(1) 1 cc. 及沸騰核(石英片)を加へ初め小さい焰を用ひ沸騰しはじめたらば焰を大きくして強く熱し亞硫酸の白煙を發生するまで繼續する(3-7分)白煙が著しくなつたらば試験管口を小さい時計皿で覆ふか又は吸煙装置(第 89 頁参照)を接續する。燃は再小さくして試験管の内容が僅かに沸騰する程度の加熱を約 2 分間繼續する。此時期迄には内容は殆無色透明となる可き筈であるが若し酸化が終つて居らねば更に 1-2 分間加熱を續けなければならぬ。

暫時放冷して後先(15-25 cc.)の水を加へ全體が略



室温になるのを待つて 35 cc. の割度まで盈たす。前以て中和を要せず直ちに 15 cc. の「ホールピペット」で Nessler 試薬を加へ試験管に「ゴム」栓を施して内容を混せる。此著色液の一部を取り(もし濁濁があつたならば遠心沈澱して)比色を行ふ。

標準液は 100 cc. の「メスコルペン」に 0.3 mg. の N に相當する  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  液を採り 2 cc. の酸混合液、約 50 cc. の水及 30 cc. の Nessler 試薬を加へ(被験液となる可く同時に添加する)割度まで稀釋したものを使用する。

標準液の高さ 20 mm. で未知液 X mm. とすれば

$$\frac{20}{X} \times 30 = \text{無蛋白濾液 } 100 \text{ cc. に相當する血液}$$

中の非蛋白窒素量 (mg.)

## 總窒素微量定量法

(*micro Kjeldahl, Mikrokjeldahlmethode*)

普通の *Kjeldahl* 法に於ては一回に定量する被験物中の窒素量は 10-50 mg. を以て適量とするが該法の目的とするところは 0.5-2.0 mg. の窒素量にある。應用の範圍が廣いために其方法も多數にあるが主なるものは Folin<sup>(1)</sup> Abderhalden<sup>(2)</sup> Bang<sup>(3)</sup> 等であらう。いづれも酸化の順序は同様であるが Folin は「アンモニア」の定量に比色法 (*colorimetry*) を用ふるに後二者は酸度滴定 (*acidometry*) を應用して居る。唯 Bang 法は装置が徒らに複雑なる嫌があるから之を略し前二者に就て詳述する。

### 比色的定量法 (Folin 法)

原理 有機物を濃硫酸を以て酸化すると同時に酸

(1) Folin and Farmer: Journ. biol. chem., **11**, 491 and **21**, 195.

(2) Abderhalden: Zeitschr. f. physiol. Chem., **98**, 190, 1917.

(3) Bang: Mikromethoden zur Blutuntersuchung, s. 192, 1920.



素と結合せざる總ての窒素を分解して  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  に變じた後之に過剰の苛性曹達を加へ急激に空氣を通じ、定量的に遊離の「アンモニア」となして驅出し之を過剰の酸に結合捕集せしめ之に Nessler-Winkler の試薬を加へ其著色の度を標準液の著色度と比色し窒素量を測定する。

試薬

- (1). 濃硫酸, Merck の濃硫酸を用ふる, 本邦製化學用純強硫酸なれば  $\text{NH}_3$  検査を行はなくてはならぬ。
- (2). 苛性曹達飽和水溶液  
100 cc. に NaOH 約 55 gm. を含有する。
- (3). 10% 硫酸銅溶液 滴管に貯ふ。
- (4). 硫酸加里 ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) 一回再結晶すれば宜しい。
- (5). Nessler-Winkler の試薬

沃化第一水銀 (赤色沃度汞, <i>mercuric iodide</i> )	100 gm. . . . . (1)
沃度加里	50-75 „ . . . . . (2)
苛性曹達	200 „ . . . . . (3)
水	1000 cc. . . . . (4)

(2) を約 500 cc. の微温湯に溶解し之に (1) を添加攪拌し殘餘の水に (3) を溶解冷却したるものを合併し一夜静置し透明なる上澄を著色管に移し密栓

して蓄藏する。

同上別法:

- 6.25 gm. の KI を 250 cc. の蒸留水に溶解す (此内 2-3 cc. を別の小「ビーカー」に移して置く) 之に昇汞飽和溶液を攪拌しながら加へ僅微の赤色濁濁が溶解しなくなる程度で止める (約 500 cc. を要す) 取除け置きたる KI 溶液を加へ之に昇汞水を滴加する前同様の操作を繰り返す, 150 gm. の KOH を 150 cc. の蒸留水に溶解し冷却後前記の溶液と合併し總量を 1 l. として上澄を著色共口管に移す。
- (6). 0.1 n HCl (精密を要せず)
- (7). 純硫酸「アンモニウム」

Kahlbaum の製品を得らるればよいが普通の市販品は *pyridine base* を含有し且之は Nessler 試薬に反應せぬものであるから精製しなくてはならぬ即  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  結晶に苛性曹達の濃厚なる溶液を滴加して (必要に應じ温める) 純粹なる  $\text{NH}_3$  を發生せしめ之を純濃硫酸中を通じて得たる  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  を酒精を以て二回再結晶し除濕器内で重量不變まで乾燥する。此際充分に  $\text{NH}_3$  を通じ硫酸を完全に結合せしむる様に勉めないで硫酸が往々にして殘

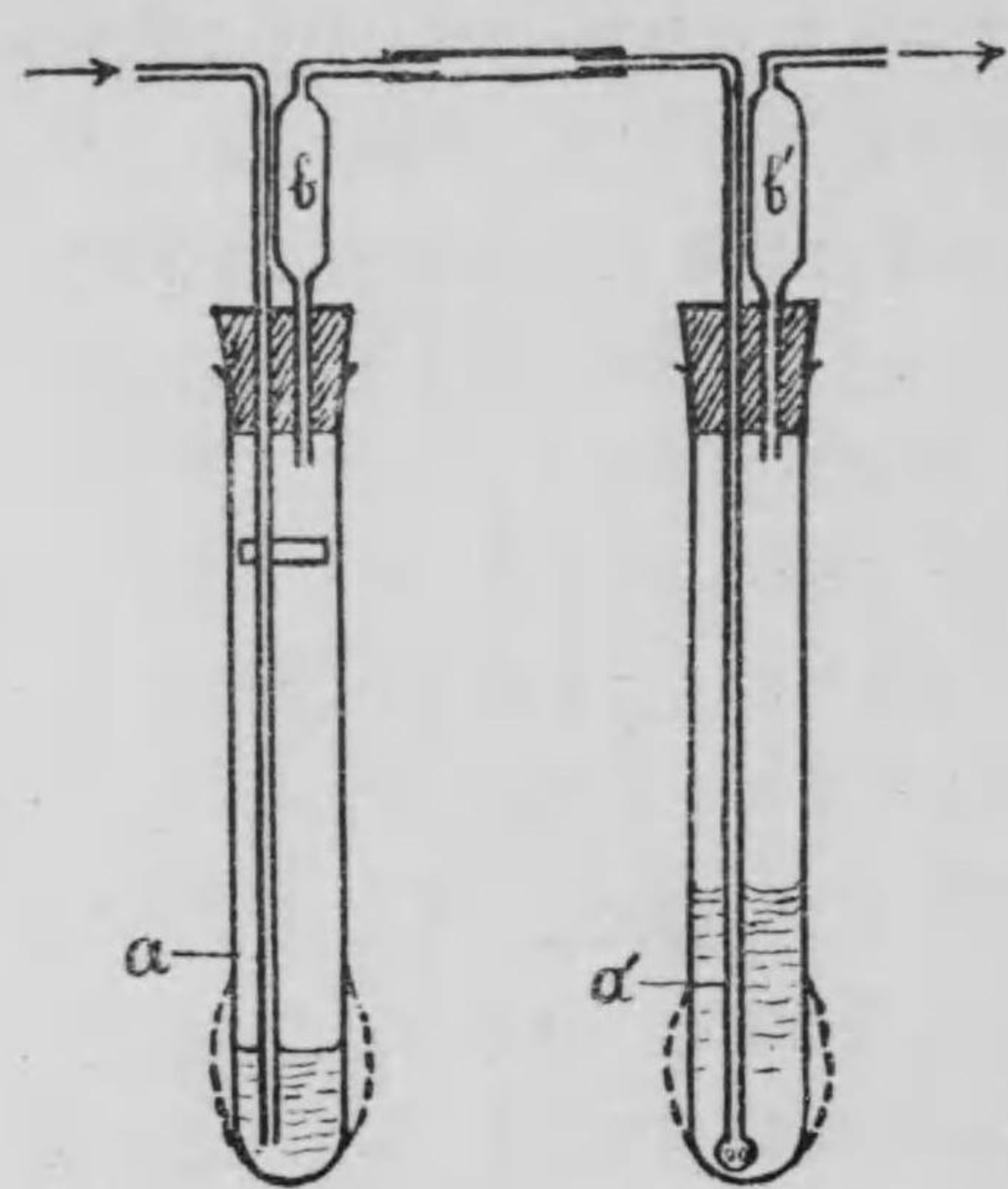


ることがある。

0.9429 gm. を 1 l に溶解したものゝ 5 cc. は 1 mg. の N を含有する。

装置 1. 硬質「ガラス」大型試験管。

直徑 2.0-2.5 cm. 長さ 20 cm. 下部を圖の如く稍太くすれば空氣を通ずる (aeration) に際して飛沫



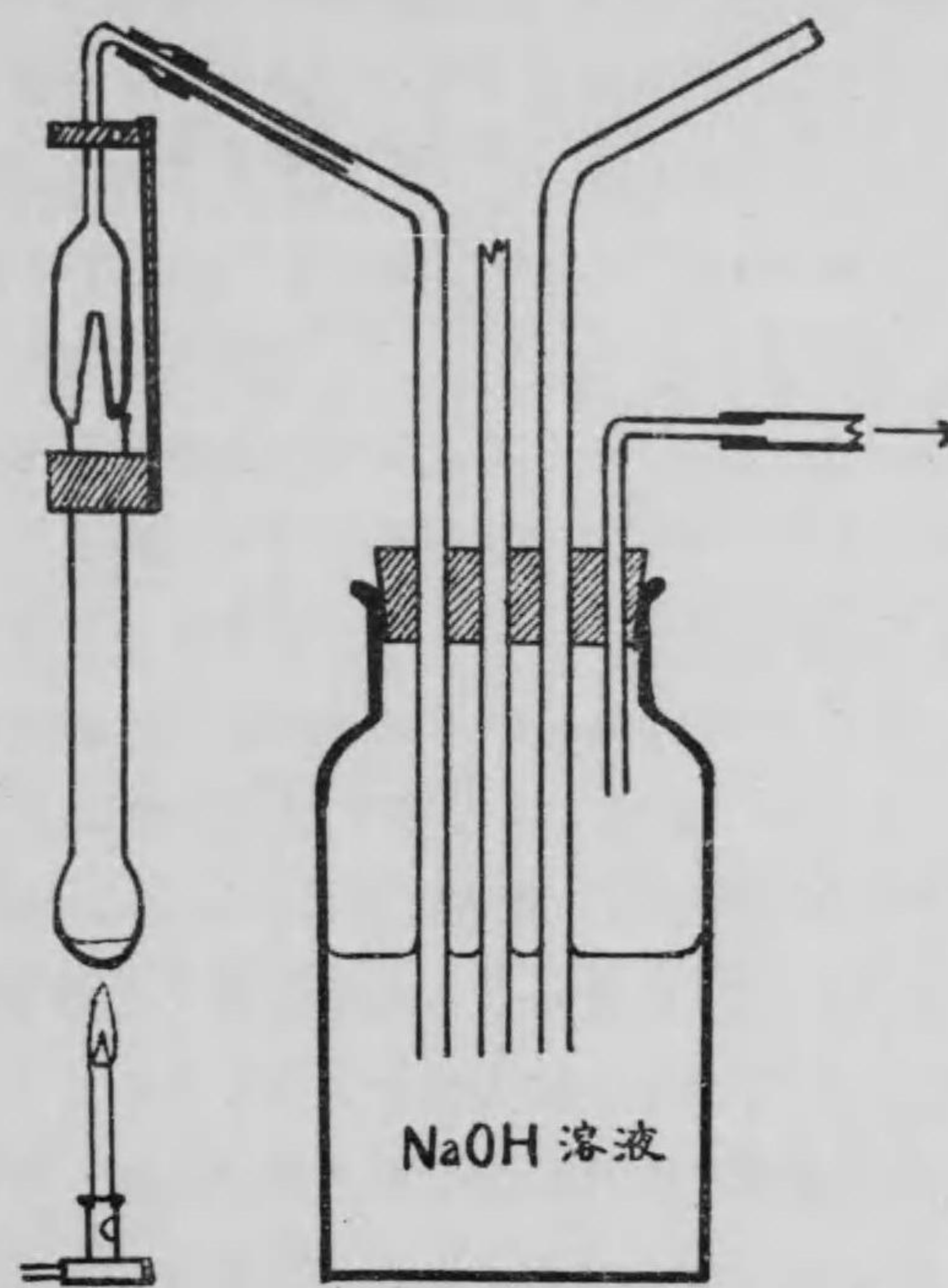
第 13 圖

の高く跳ね上らぬ利益がある。

2. 「ガラス」管は直徑 6 mm. を下らぬ方がよい。a' は下端を閉ぢ數個の小孔を穿ち氣泡を小さくして NH<sub>3</sub> の捕集を完全に

する。b, b' の部の容量は 5 cc. 内外で足りる a に圖の如く「ゴム」板を裝備する。之は酸化管の内容が b に入るを恐るゝためである。

3. 刺戟性瓦斯吸收装置 (下圖参照) は酸化を落ち付いて實驗室内で行ひ得る爲には是非共必要である且同時に數本の酸化を行ひ得る。酸化管を固定するには針金でもよいが圖の如き特殊の止め金を用ゑる方が安全である。



第 14 圖



4. 瓦斯洗滌綫。稀硫酸を以て其半ばを盈たす、空氣中の「アンモニア」を除去するに用ふる。

實施

材料：尿の總窒素定量に際しては5 cc.の尿を比重 1018 以上ならば 50 cc. の以下ならば 25 cc. の「メスコルベン」に移し水を以て割度まで盈たしこの 1 cc. を採ればこの中には通常 0.75-1.5 mg. の窒素を含有することゝなる。即一回に定量する窒素の量が 2 mg. 以下でなければならぬ。而して 1 cc. 内外の液量を測るには Ostwald の「ピペット」を用ふる方がよい。

酸化：水分の多量なるときは豫め蒸發濃縮して置く方が便利である。之に濃硫酸(1) 1 cc. (駒込「ピペット」を用ふ) 硫酸加里(4) 0.5-1.0 g (沸點を上昇せしむるため) 10%の硫酸銅(3) 1-2 滴(觸媒) 2-3 個の沸騰核(此 Siedekörner は必しも必要でない)を加へ瓦斯吸收装置に附著せしめる。加熱は小型「ブンゼン」燈(micro burner)を用ひ最初小さき火焰を以てし飛散或は泡立つ恐れがなくなれば火焰を大きくする。

内容が流動性を失ひ黒塊となる時は硫酸が缺乏して居るのであるから火焰を遠ざけて管を少しく冷却せしめ 0.3-0.5 cc. の硫酸を追加して加熱を繼續する。

特に酸化しにくきもの(澱粉脂肪を多量に含む場合)に對しては始めより 2-2.5 cc. の硫酸を加へて置く方が酸化試験管を破壊するすることが少ない。酸化の終るまでには物質により遲速はあるが 5 分-20 分位を要する。酸化管の内容が淡綠色透明となれば酸化の終つた證據である。

酸化を行ふに當つて内容が突沸(bumping, Stossen)飛散する時は大切なる材料を失敗に終る。之を豫防するために多數の學者が苦心を重ね沸騰核として「ガラス」玉(Glass beads)浮石(pumice stone)磁器の破片、石英片(quartz pebbles)花崗岩(granite)等が試みられたが何れも確實でなく時には沸騰核が管の上端に近く跳ね上ることさへある。Langstroth<sup>(1)</sup>の酸化管を傾斜せしむる試みも餘り效を奏しない。

要之「ガラス」器具で水を沸騰せしめても暫時の後には突沸は起るのであつて恐らく最初「ガラス」器或は沸騰核が乾燥してゐる間は表面の微細なる孔に空氣を保留し之が蒸氣發生を促し沸騰を圓滑にするものであつて之が一度液體を以て置き換へられるや突沸は免れぬらしい。故に常に多數の試験管を乾燥準備して置き濡れたものを使用せぬ様にするのが最好適の處置であらう。

「アンモニア」の低溫蒸餾：酸化試験管を 1-2 分間冷却し内容の凝固せざる内之を廻轉しながら上縁に近くより 6 cc. の水を靜かに流し込む。

(K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を析出することがあるが熱を生ずるため再溶解する)

(1) Langstroth : Journ. biol. chem., 36, 377, 1918.



一方に 0.1 n HCl 2 cc. (「アンモニア」窒素を 2 mg. 迄捕集し得る) 水 20 cc. を容れたる試験管を用意し何れも「ゴム」栓を施して「ゴム」管を以て b と a' を連結する(第13圖参照) 次で b' を水流「ポンプ」に連結し静かに吸引しながら a の上端から駒込「ピペット」を用ひ苛性曹達飽和溶液 3cc. を少し宛注入し酸化管の内容が紫色或は暗褐色に變色するを認めたらば直ちに之を瓦斯洗滌管に連結する.\* (1 cc. 以上の硫酸を用ひた場合には尙多量の NaOH を要す可きは勿論である.) 「ポンプ」の吸引(aeration) ははじめ 2-3 分はなる可く静かに次で約 10 分間出來得る限り急激に吸引する。

此際最注意を要する事は酸化管内の「アンモニア」が果して定量的に洗滌管に轉移せられたか否かと云ふ點であるが原則としては中和熱を利用し「アンモニア」を驅出するのであるから之が全く冷却したる時は最早吸引の必要を認めない理である。然れども約 10 分で轉移が終るのは極めて條件の良好の時即室温高く「ポンプ」の吸引力強き際(1 分間に 8 l. 以上)であつて室温低きか「ポンプ」の吸引力微弱なる時は吸引の時間を 30 分-1 時間に延長しなくてはならぬ、而も豫め既知量の「アンモニア」鹽類を用ひて盲驗を行つて置かぬと往々にして思はぬ誤謬に陥ることがある。「アンモニア」轉移後酸化管の内容に少量の稀釋した Nessler 試薬を加へて見れば多量の「アンモニ

\* 此操作を相繼いで繰り返し數個の「アンモニア」低温蒸餾を同時に行ひ得る。

ア」が残存せるときは容易に發見出来る。

**比色試験:** 2 個の 100 cc. の「メスコルベン」の一方に  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  溶液の一定量(通常 1 mg. の N を含有す) 及水 50 cc. を容れ他方に小なる漏斗を用ひ注意して前記の捕集し得たる「アンモニア」溶液を流し込み更に a' 管内及試験管内壁を數回噴出管の水を以て洗ひ此洗滌液を同じく「メスコルベン」中に流し込む(全量 50-70 cc.) 次に兩「メスコルベン」の各々に 5 cc. の Nessler 試薬を 6 倍に稀釋したるものを添加し割度まで水を以て盈たす(5 cc. の Nessler 試薬は 1-2 mg. の「アンモニア」に對し最大色調を呈し決して溷濁することはない) 斯くて約一時間放置せる後(colour maximum) 比色を行ふのであるが尙暫時經過するも別に障礙はない様である。

比色は暗室で行ふ方がよい、光源は天然光線でもよいが人工光線の方が光度が一定してゐて便利である但し後の場合には晝間燭光の電球を使用せねばならぬ、尙比色計使用法の詳細は總則(第 8 頁)を参照せられたい。

**計算:** 1 mg. の標準液を用ひ其液層 20 mm. の時之と同色調を呈する被驗液の液層 21.5 mm. の時は



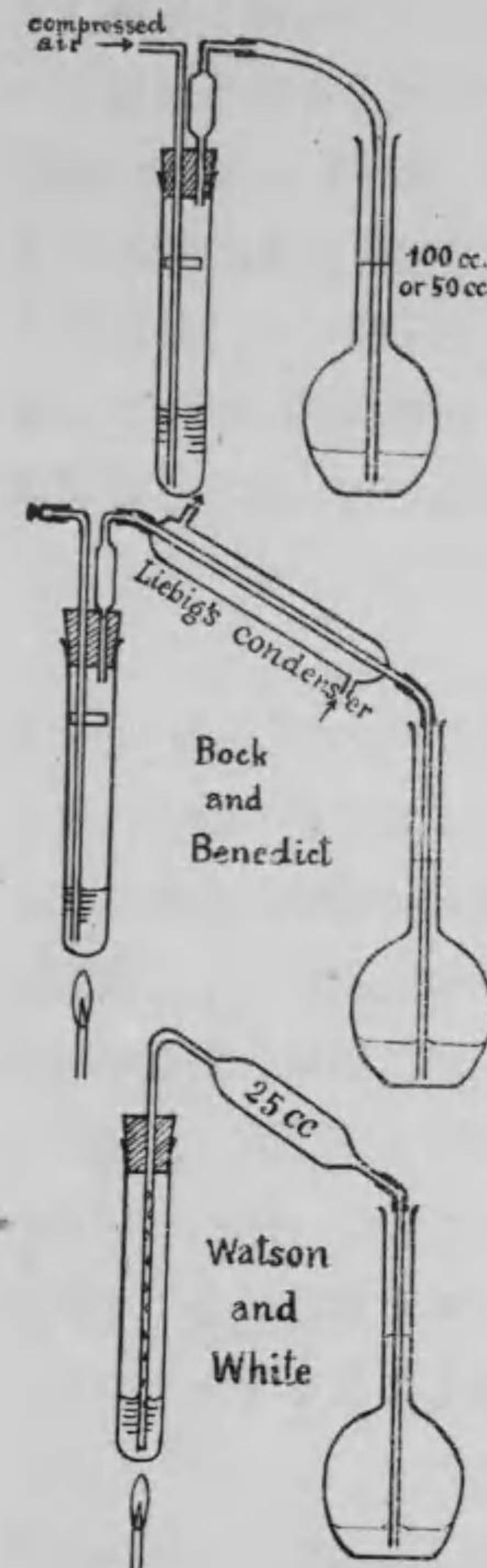
$$1 \times \frac{20}{21.5} = 0.93 \text{ mg. が求むる窒素量である.}$$

注意:

1. 定量せらるゝ「アンモニア」量が非常に多い時或は少い時は5 cc. のメスレル試薬で濁濁を來すことがある, 斯かる時は材料を加減して定量をやり直す必要がある.
2. 一回の「アンモニア」量 0.25-0.75 mg. の時は被験液を 50 cc. の「メスレル」内に移して 2.5 cc. の Nessler 試薬を稀釋して加へ定量を遂行し得る.
3. 此方法の正確度としては 95 % 以上を望むことは多くの場合に困難である, 比色計より少くも 1% の誤差は免れぬから, 尙經驗に徴するに此方法は實際より内輪の値を得ることが多い, 即同じ驗體より得たる値に出入ある時は大きいものが真に近いと見て差支ない.
4. 壓搾空氣の準備ある實驗室に於ては第15圖の如く直接「メスレル」中に NH<sub>3</sub> を捕集し得る.
5. Bock and Benedict<sup>(1)</sup> Watson and White<sup>(2)</sup>等は吸引より蒸餾の方が正確であると主張し圖の如き装

(1) Bock and Benedict: Journ. biol. chem., 20, 47, 1915.

(2) Watson and White: Ibid. 45, 465, 1920.



第 15 圖

置を考案して居る, けれども手際よく蒸餾するには多少の熟練を要すること勿論である.

酸度滴定法

Allen-Davisson<sup>(1)</sup> 氏等は之を比色法と比較して多少面倒ではあるが酸度滴定法の方が 1-5 mg. 内外の窒素量に對しては十倍も正確である事を立證して居る, 一方に此方法は比色計のない場合に實施し得るから此處に Mitscherlich<sup>(2)</sup> Abderhalden<sup>(3)</sup>

(1) Allen and Davisson: Journ. biol. chem., 40, 182, 1919.

(2) Mitscherlich und Herz: Landw. Jahrb. 38, 279, 1909.

(3) Abderhalden und Fodor: Zeitschr. f. physiol. Chem., 98, 190, 1916-17.



兩氏の方法を折衷して記載する。有機物の酸化、「アンモニア」の轉移操作は Folin と少しも變る所はないが最後に「アンモニア」を精密に檢定せる 0.01 n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> に捕集し過剰の酸を 0.01 n NaOH で 2-3 滴の 1 % Alizarin sulfosaures Natron を標示薬として滴定するのである。故に多數の定量を短時間内に行ふには便利であるが次の諸點に深く注意せぬと非常なる誤謬を來す。

定規液の調製法：

之は該法の最難事とする點であつて一般の「グラス」器具は斯る稀薄 (0.01 n) なる定規液の貯藏に堪へない。依つて常に精密に調製し硬質縵に蓄藏したる 0.1 n 定規液 (硫酸を基本として調製する) を其都度 10 倍に稀釋し相互の關係を檢定して使用するのである。稀釋に用ふる蒸餾水は常に 1 % の Alizarin sulfosaures Natron を用ひて全く中性なるや否やを檢査して置く可きである。



第 16 圖

「グラス」器具：

定規液に接觸する「グラス」器具は常に硬質のものを用ひ數日間鹽酸中に浸

たる後よく水洗乾燥して用ふ著者は「ゴム」栓を使用する事を避くるため第 16 圖の如き「アンモニア」捕集縵を推奨して居る。之は使用の都度 10-20 分間蒸氣を通すれば更に安全である (第 1 圖參照)

計算：

$$0.01n \text{ 定規液 } 1 \text{ cc.} = 0.00014 \text{ gm. N}$$



## 尿素微量定量法

**原理** 尿素酵素 (*urease*) を以て尿素を分解し生じた「アムモニア」を Nessler 試薬で着色して比色的に定量するのであるが尿に於ては前以て無機の「アムモニア」を除去してから尿素酵素を加へねばならぬし血液に於ては多量の蛋白質を含有するため直接 Nessler 試薬を加へる事 (*direct Nesslerisation*) が出来ぬ<sup>(1)</sup> 爲「アムモニア」の分離操作を行はねばならぬから各に就て別々に記載する事とする。

### 第一. 血液

**試薬** (1). 尿素酵素: 黄大豆 (*Soja or Soy bean, Glycine hispida*) 越幾斯<sup>U.S.A.</sup>に於ては同地産の *canavalia* の豆 *Jack beans* を好んで用ひる。

200 cc. 大の「コルベン」に 3 gm. の *permutit* 粉末を採り之を一度 2% の醋酸で洗ひ傾注し次で二

(1) Folin and Wu: Journ. biol. chem., 38, 91, 1919.

回水洗傾注し此濕つた儘の *permutit* に 30% の酒精 100 cc. (95% 酒精 35 cc. + 水 70 cc.) 及 5 gm. の黄大豆の粉末を加へ十分間震盪して無灰濾紙で濾過する。斯る豆「エキス」は「アムモニア」を含まず日光を遮断して保存すれば室温で一週間氷室で 3-5 週間效力を失はない。

### (2). 磷酸曹達液

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  を  $\frac{2}{3}$  mol,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  を  $\frac{1}{3}$  mol の割合

に含む溶液 或は

「ピロ」磷酸曹達 (*sodium pyro phosphate*) 140 gm.

無水磷酸 20 "

水を加へて 1 l. とする。

**装置** 硬質大型試験管 (*micro Kjeldahl* と同様のもの) 但其半数は 25 cc. の割度を有すること。

**實施** 一定量の血液を 8 倍に稀釋し之に血液と同容量の 10% の「タングステン」酸曹達液 ( $\text{Na}_2\text{WO}_4$ ) を加へ之に同容量の 2/3 n- $\text{H}_2\text{SO}_4$  を震盪しながら加へる等總て血液の尿酸定量の場合に於けると同様である。(第105頁参照)

凝固物が次第に褐色に變色する様な場合は分離が完全に行はれた證據である。砒酸鹽或は枸橼酸鹽



が多量にある時は硫酸の量を増加せぬと凝固が完全に行かぬ。

上記の各試薬の分量から血液の稀釋倍數は計算出来る。之を濾過し此透明な濾液 5 cc. を清淨な大型試験管に採り磷酸液 2 滴及 0.5-1 cc. の酵素「エキス」を加へ微温湯 (20°-50°C) に 5-10 分浸せば尿素は全然「アムモニア」に分解される。以下は全く *micro Kjeldahl* と同様に「アムモニア」窒素の定量 (第90頁参照) を行ふのであるが吸引によるも蒸餾によるも實驗者の隨意である。

但し「アムモニア」を低温蒸餾する際第一の試験管に 10% の NaOH を 1-2 cc. 加へ又「アムモニア」を捕集する試験管の内容は 2 cc. の 0.1 n HCl に水を加へて約 20 cc. とし Nessler 試薬 2.5 cc. を加へ總量を 25 cc. の割度まで盈たす。標準液は前記の血液量に對しては 100 cc. の「メスコルペン」中に (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 基本液 1.5 cc. (0.3 mg. N に相當する) を容れたるものを用ふれば適當である。

計算 20.....標準液層の讀み mm.  
 R.....未知.....mm.  
 15..... $(0.3 \times \frac{25}{0.5})$ .....血液 0.5 cc. が丁度 25

cc. に稀釋せられた場合の常數とすれば

$$\frac{20 \times 15}{R} = 100 \text{ cc. の血液中の尿素窒素量 } gm.$$

**追記** Gad-Andresen<sup>(1)</sup> は血液の蛋白を除去することなく直接 *mease* で分解し *borate* を加へ特殊の装置のもとに壓搾空氣を通じて乾燥しながら遊離せらるゝ「アンモニア」を稀硫酸に捕集し此中の窒素瓦斯の容量を測定して居る。尙血液中の遊離「アンモニア」量を別に測定し (普通 100 cc. 中に約 0.25 mg. 位であるから多くの場合に此量を其儘用ひてもよい) 差引いておるがかなり手数を要するから普通の目的に向つては Folin-Wu の方法で足りるであらう。

## 第二. 尿

Sumner<sup>(2)</sup> は遠心沈澱を應用する簡単な方法を發表して居るが Youngburg<sup>(3)</sup> の豫め無機の「アムモニア」を除いてから尿素定量を行ふ方法の方が合理的の様であるから以下之に就て述べることにする。

### 試薬 1. 「バームチット」

大阪で製造販賣して居る。最初 2% の醋酸でよく洗ひ次で酸性の消失するまで水洗する。

### 2. 尿素酵素「エキス」(Folin and Youngburg<sup>(4)</sup>)

「バームチット」3 gm. に黄大豆或は *Jack bean*

- (1) Gad-Andresen : Journ. biol. chem., 51, 367 and 373, 1922.  
 (2) Sumner : Journ. biol. chem., 38, 57, 1919.  
 (3) Youngburg : Ibid. 45, 391, 1920-21.  
 (4) Folin and Youngburg : Ibid. 38, 111, 1919.



の粉末 5 gm., 30 % の酒精 100 cc. を加へ 10-15 分間震盪して濾過する (この浸出液は「アムモニア」を含有しない).

3. 磷酸緩衝劑

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  142 gm.

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$  120 gm.

蒸餾水に溶解し 1 l. とする.

實施

5 cc. の尿 (非常に稀薄な尿ならば 10 cc.) を 50 cc. の「メスコルベン」に採り割度まで稀釋する.

200-250 cc. 大の Erlenmeyer 「コルベン」に 3-4 gm. の乾燥した *permutit* を採り之に稀釋した尿 20 cc. を加へ 5 分間震盪する. 暫時の後上澄を傾注する (溷濁して居れば乾いた無灰濾紙で濾過する.) 該液は完全に無機「アムモニア」を除去せられて居る. 此濾液 5 cc. (尿 0.5 cc. を含む) を採り之に 2 cc. の酵素「エキス」及磷酸緩衝劑 2 滴を加へ室温に 15 分間 (40° に温むれば 5 分間) 放置すれば尿素は定量的に「アムモニア」に分解する.

以下原著通りに行へば Van Slyke 及 Cullen<sup>(1)</sup> の

(1) Van Slyke and Cullen: Journ. biol. chem., 19, 211, 1914.

の方法に従ひ通氣法 [Folin の *Micro Kjeldahl* (第 85 頁参照) と同様である] を行ふのであるが「アムモニア」を驅出するには炭酸加里の粉末 4-5 gm. を加へ  $\text{NH}_3$  を捕集する試験管には 0.02 n の酸 25 cc. を用ひ終りに滴定法 (*titrimetry*) を行つて居る (第 96 頁参照)

計算

0.02 n 酸量 (cc.)  $\times$  0.056 = 100 cc. の尿中の尿素窒素量 gm.

尙 Folin の法通りに通氣法に次いで比色法 (*colorimetry*) を行ふには上記操作の最初より尿, 試薬等の量を總て  $\frac{1}{3} - \frac{1}{5}$  にして定量を行ふ方がよい. 此場合に於ては終りに尿素窒素量より尿素量を計算するのである.



## 尿酸微量定量法

**原理** 尿酸が「タングステン」酸 (*phosphotungstic acid*) 及鹼 (*alkali*) によつて其濃度が尿酸の量に比例する暗青色を呈する性質を應用したものである。最初 Folin 及 Macallum<sup>(1)</sup> により報告せられたが其後 Folin<sup>(2)</sup> を中心とし Denis,<sup>(3)</sup> Wu<sup>(4)</sup> 等によつて數回に互り修正改良せられ稍複雑にはなつたが尿酸の微量定量法として目下最上のものとなつた。

材料となるものは主として尿及血液であるが前者は他に前記の尿酸試薬で青色を呈するものを含み後者は多量の蛋白質を含有して居るから兩者共先づ尿酸を分離しなければならぬ。何れも結局は銀鹽として沈澱せしむるのであるが操作が異なるから別々に記載する事とする。

(1) Folin and Macallum: Journ. biol. chem., **13**, 363, 1912.

(2) Folin and Denis: Ibid, **13**, 469 and **14**, 95, 1913.

(3) Folin and Wu: Ibid, **38**, 100 and 459, 1919.

(4) Folin: Ibid, **54**, 153, 1922.

## 尿酸の分離法

## 第一. 血液

Folin 及 Denis は最初尿酸加里で凝固を阻止した血液を五倍量の 0.01 n 醋酸と共に煮沸して蛋白質を沈澱せしめたが尿酸が幾分蛋白に吸著されるので其後次の様に改良した。

**試薬**: 1. 10% の「タングステン」酸曹達 ( $\text{Na}_2\text{WO}_4$ , *sod. orthotungstate*)

2.  $\frac{2}{3}$  n  $\text{H}_2\text{SO}_4$

3. 乳酸銀液, 乳酸銀 100 gm. を 700 cc. の温湯に解かし一方に 85% の乳酸, 10% NaOH 各 100 cc. を混合したものを前者と合併して 1% に稀釋する。

暫時放置して沈澱せしめた後上澄を使用する。

血液或は尿酸血漿\* (第 6 頁参照) 5-10 cc. に 7 倍量の水, 血液と同量の「タングステン」酸曹達 (1) を加へ絶えず震盪しながら  $\frac{2}{3}$  n  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (2) を一滴宛加へる。此量は血液を 5 cc. 使用したら 4 cc. (10 cc. ならば 8 cc. の割合) であるが最初  $\frac{4}{5}$  を加へたらば 20-30 分放置して後残りの  $\frac{1}{5}$  を同様の注意の許に加へるのであ

\* なる可く新鮮の方がよい。「ビューレット」から滴下する。



る。Pucher の云ふ様に加熱の必要はないが震盪操作が不手際だと3-5%の損失がある。此液を其儘(9.8倍)或は水を加へて正確に血液の10倍容量とし乾いた無灰濾紙で濾過する。

濾液5cc.を遠心沈澱管に移し「ピペット」で7cc.の乳酸銀液(3)を加へる。以下の操作はなるべく日光をさへぎつてやる必要がある。[Rogers<sup>(1)</sup>]

混合液を軽く震盪し1-2分後遠心沈澱すれば尿酸は定量的に沈澱に移行して居る。上澄をなるべくよく傾注して捨て尚約1分間沈澱管を逆さに保ち沈澱管の縁の滴をよく拭ひ取る。

之に0.1nのHClに10%の割にNaClを解かした液1cc.を加へ細い「ガラス」棒でよく混ぜ4cc.の水を加へて再攪拌し遠心沈澱する。此上澄(全く透明とならぬことがある)を25cc.の度盛りある試験管に移す。

## 第二. 尿

尿酸の量が0.35-0.7mg.を含む尿即其1-2cc.を「ピペット」で遠心沈澱管に採り2-3cc.の水で稀釋し血液

(1) Rogers: Journ. biol. chem., 55, 325, 1923.

の「タングステン」酸濾液と同様の順序に従て乳酸銀を以て分離する。(材料が多量にある時には2-4cc.を使用してもよいが此際は後に尿酸標準液の5cc.に1mg.を含有するものを使用する。)

乳酸銀液は常に過剰に加へなくてはならぬ。此際光線を防ぐ必要のある事は前と同様である。

## 尿酸の定量

試薬(1). 亞硫酸「リチウム」(*lithium sulphite*)液  
亞硫酸「リチウム」20gm.を80cc.の蒸餾水に解かし100cc.に稀釋し濾過する。

(2). 青化曹達(*sodium cyanide*)

分解して居らぬ白色の「チアン」曹達を15%の割合に0.1n NaOHに溶解し2-3週間後に使用する。(新らしいものは尿酸試薬に反應する他の物質を含むことがある。)

(3). 尿酸試薬(Folin-Denisの試薬)

「タングステン」酸曹達	100 gm.
85% 燐酸	30 cc.
濃鹽酸	20 cc.
蒸餾水	750 cc.

逆流冷却装置をつけて1.5時間煮沸し冷後總量



を 1 L. にする。(Benedict の砒素を用いた試薬に比して確かに遜色はない)

## (4). 尿酸標準液

1 L. の「メスコルペン」に小漏斗を備へ之に小「ビーカー」で秤量した正確に 1 gm. の純粋な尿酸を移す。別に約 300 cc. の「ビーカー」に 0.45-0.5 gm. の炭酸「リチウム」を秤り 150 cc. の水を加へ 60°C に温め溶解したもので小「ビーカー」及漏斗上の尿酸を「メスコルペン」中に丁寧に洗ひ流し震盪する。尿酸が透明に溶解したら直ちに冷水で冷す。小「ビーカー」及漏斗を水で洗ひながら内容を約 500 cc. にする。40% の「フォルマリン」を 25 cc. 加へてよく震盪し 3 cc. の氷醋酸を加へ酸性にする。尙震盪すると炭酸は次第に驅出せられる。水で以て割度まで盈たす。之を小さな多くの罫に分注して密封して暗所に貯藏する。必要に應じ一個宛取り出して稀釋する。

被 驗 液	基本液の稀釋倍数	標準液 5 cc. 中の尿酸量
a 血 液	250	0.02 mg.
b 尿	10 (5)	0.50 mg. (1.00 mg.)

斯る標準液は絶対に細菌發生の恐れなく尿酸試薬

に對しての着色度は新しい尿酸溶液と變りがない。稀釋したのも暫時は保存出来るが確實ではない。

## 實施

## 第一. 血液

1 L. 大の「ビーカー」に半ば水を容れて沸騰させておく。前記の血液濾過液を 5 cc. 「ビベット」で 25 cc. の目盛のある試験管に移し第二の試験管に尿酸標準液 (4a) 5 cc. を容れ各に 2 cc. の水 (後に溷濁する恐れのない時は必要はない) 及 2-3 滴の炭酸「リチウム」液 (「オキサレートプラズマ」を使用した時は 4 滴) を加へ「ビューレット」から各に 2 cc. の 15% の「チアン」曹達液 (2) を滴下する。而して「ビベット」で各に 1 cc. の Folin-Denis の尿酸試薬 (3) を加へる。軽く震盪して 2 分間の後兩試験管を沸騰してゐる湯の中に 60-80 秒浸す。(着色を最大にするため) 冷めた後割度まで水を盈たし普通の方法で比色する。標準液の液層の厚さは 15 mm. 位がよい。

兩液の層の厚さの比を千倍すれば 100 cc. の血液中の尿酸量を mg. で得ることになる。

## 第二. 尿

量的關係が数十倍になつて居る丈前で前記と全然



同様の方法で定量出来るが便宜上ここに Benedict 及 Hitchcock の改良法<sup>(1)</sup>を記す。

遠心沈澱管中の乳酸銀の沈澱に 5%「チアン」加里液 2 滴を加へて之を小「ガラス」棒で攪拌溶解する。之に 0.5-1.0 cc. の水を加へよく混ぜ(此時少し位の濁りはあつても差支はない。)尿酸試薬 2 cc. を加へれば透明な青色液を得る。之を 50 cc. の「メスコルベン」に移し沈澱管を尚 2-3 回水で洗つて最初の液に合併する。次で前の炭酸「リチウム」の代りに 20% の炭酸曹達を 10 cc. 加へ濁りを防ぐ<sup>(2)</sup> 1-2 分の後割度迄蒸餾水で満たす。

一方に	尿酸標準液 (4b)	5 cc.	(正確に 0.5 或は 1.0 mg. の尿酸を含む)
	KCN 液	2 滴	
	尿酸試薬	20 cc.	
	炭酸曹達液	10 cc.	

を同様に 50 cc. の「メスコルベン」中に混合したものと比較する。標準液の液層 15 mm. の時未知の液層 Xmm. ならば  $\frac{15}{(2)X} = \text{尿酸量 (mg.)}$

(1) Benedict and Hitchcock: Journ. biol. chem., **13**, 469 and **14**, 95, 1913. **20**, 619 and 629, 1915.

(2) Borgert: Journ. biol. chem., **31**, 165, 1917.

因みに尿中の尿酸排泄量は 24 時間に 0.6-0.7 mg. 位である。

#### 附記:

1. 実験の誤差を少なからしめるために豫め尿酸標準液を用ゐ之を此乳酸銀液で定量して手を馴らす必要がある。
2. 血液の時は尿酸標準液一定量を血液に添加したものと血液だけのもを定量した結果の差が添加した尿酸と等しくなることを豫備試験でたしかめて置く必要がある。
3. 天氣のよい日に明るい室で尿酸の分離を行ふと 21% 位の損失がある。暗室でやれば 2-3% の誤差に止まる。故に沈澱管はたへず何かで包んでおく方がよい (Rogers)



## クレアチニン (preformed creatinine) 微量定量法

**原理** Jaffe の発見にかゝる「クレアチニン」が鹼性液中で「ピクリン」酸を還元し「ピクラミン」とする現色反応を應用したもので尿に於ては直接現色反応を起さしむる事が出来るが血液、臓器浸出液等では前以て蛋白除去 (deproteinisation) を行はなくてはならぬ。

### 第一 尿 (Folin<sup>(1)</sup>法)

**試薬** 1. 「ピクリン」酸飽和溶液(後述「ピクリン」酸の精製参照)

2. 10% NaOH

3. 「クレアチニン」基本液. 1 cc. に純「クレアチニン」1 mg. を含有する(後述純粹なる「クレアチニン」の製法参照)

**所要器具** 100 cc. 「メスコルベン」數個, 「ピペット」

(1) Folin: Journ. biol. chem., 17, 469, 1914.

比色計等。

**實施** 驗體を一定量(大凡 0.7-1.3 mg. を含む様に採る。尿ならば正確に 1 cc. 「ピペット」で測る)を 100 cc. の「メスコルベン」に移す。第二の「メスコルベン」に基本液 1 cc. を正確に採る。各に「ピクリン」酸飽和溶液 20 cc. 及 NaOH 液 1.5 cc. を加へる。約 10 分の後水で以て割度まで盈たし比色試験を行ふ。

基本液層の厚さを驗體の液層で除したものが其中に含まれて居る「クレアチニン」量を mg. で表はす。

### Shaffer の改良法<sup>(1)</sup>

100 cc. 中の「クレアチニン」が 20 mg. 以下 (1 mg. 内外まで定量出来る) の時は此方法を用ふる方がよい。即ち驗體に同容積の「ピクリン」酸飽和溶液、及び  $\frac{1}{10}$  容量の 10% NaOH 液を加へて 10 分後其著色の濃度に従つて一定容積に稀釋し、一方に之となる可く同濃度の標準液を以て作つた著色液と比較する。尿が甚稀薄な時は「ピクリン」酸の粉末を用ふる方が便利なきところがある。即ち驗體に粉末を凡 0.6% となる様に加へ全量の  $\frac{1}{20}$  量の NaOH 液を追加するのである。

### 注意:

(1) Shaffer: Journ. biol. chem., 18, 525, 1914.



1. 「クレアチニン」の排泄量は略一定してゐて24時間に1.25 gm. 位である。
2. 「クレアチニン」定量法は糖尿には其儘施行することが出来ぬ。Morris<sup>(1)</sup>は之を「ピクリン」酸で沈澱分離する方法を擧げて居る。Blau<sup>(2)</sup>は「アセトン」, 「アセト」醋酸, 重醋酸 ( $C_4H_6O_8$ , *diacetic acid*) 何れもこの比色定量を妨ぐる事を實驗して居る。

## 第二. 血液及臓器浸出液

蛋白除去法としては「ピクリン」酸を用ひる Folin の原法<sup>(3)</sup>の外に種々の方法が試みられた。Hammet<sup>(4)</sup>は Folin and Wu (第105頁参照)の「タングステン」酸曹達及硫酸を以てする蛋白除去法を原法と比較研究して何れも「クレアチニン」定量に適するが敢て原法を改める理由を認めないとの結論に達した。依つて此處には便宜上原著の儘を記載する。

**試薬** 尿に同じ, 外に「ピクリン」酸の粉末を要する。

- (1) Morris: Journ. biol. chem., **21**, 201, 1915.
- (2) Blau: Ibid., **48**, 105, 1921.
- (3) Folin: Journ. biol. chem., **17**, 475, 1914.
- (4) Hammet: Ibid., **48**, 127, 1921.

**實施** 10.0 cc. の凝固を阻止した血液を50 cc. の「メスコルベン」或は「ミッシュチリンデル」に採り「ピクリン」酸飽和溶液を割度まで盈たし2-3分震盪し更に1 gm. の「ピクリン」酸の粉末を加へて5分間程震盪する。此全量を遠心沈澱して上澄を乾いた無灰濾紙で濾過する。

註: 同時に「クレアチン」の定量を要さぬ時は濾液20 cc. で足りるのであるから最初5 cc. の血液を取つて之が5倍に稀釋せらるゝ様にすればよい。

尿の場合と同様の「クレアチニン」基本液を5倍に稀釋したものを1 cc. (「クレアチニン」0.2 mg. を含有する)を「ピクリン」酸飽和溶液で100 cc. に稀釋したものを標準液とする。

前記濾液と此標準液各20 cc. を採り各に「ピペット」を用ひて1 cc. の10% NaOH を加へ(血液濾液は此際溷濁することがあるから其時は濾過する必要がある。)10分以上経過した後比色する。

## 計算

標準液層の讀みを被験液のもので除すれば直ちに100 cc. 血液中の「クレアチニン」量を mg. で得る。

## 附記



i 「ピクリン」酸の精製法 (Folin and Doisy<sup>(1)</sup>):

「ピクリン」酸が不純であると NaOH によつて著しく着色し「クレアチニン」其物に對しては反對に敏感でないから全く定量に役立つぬ、故に次の方法に依て精製しなくてはならぬ。

濕氣ある粗製「ピクリン」酸 600 gm. (乾燥せるものならば約 1 lb) を 4 l. 大の「ビーカー」に容れ 3-3.5 l. の熱湯を注いで之を溶解し之に 50% の NaOH 200 cc. を添加する。もしよく溶解せぬ時は更に加熱攪拌して一様の暗紅色の溶液とする。冷却せぬ中に 200 gm. の NaCl を少し宛加へ混合攪拌する。

流水で冷却しながら尙時々攪き混ぜ「ピクリン」酸曹達を析出せしめる。充分析出した處で大型の「ヌッチェ」(Buchner funnel) で濾過し 5% の食鹽水で 2-3 回結晶を洗滌しよく箆で壓して母液を除く。次で此「ピクリン」酸鹽を再大型「ビーカー」に移し熱湯に溶解し攪き混ぜながら 10% の NaOH 50 cc. 及 100 gm. の NaCl を添加する等前と同様の操作を繰り返す。攪拌冷却後「ヌッチェ」で濾過し 5% の NaCl 溶液で洗ふことも同様である。斯る操

(1) Folin and Doisy: Journ. biol. chem., 28, 349, 1916-17.

作を更に 2 回程繰り返し終りに食鹽水で洗ふ代りに蒸餾水を使用する。此稍純なる「ピクリン」酸鹽を熱湯に溶解し飽和溶液となし折り畳み濾紙 (folded filter, Faltenfilter) で大型「コルベン」中に濾過し直ちに之に 3 倍に稀釋した濃硫酸 300 cc. を添加する。然る時は「ピクリン」酸は忽ち針狀の結晶となつて析出しはじめる。

「コルベン」の口を覆ひ流水で冷却し「ヌッチェ」(硬化濾紙を用ふ) で結晶を分離し蒸餾水で  $H_2SO_4$  を洗ひ去り乾燥する。

検査法—此「ピクリン」酸飽和溶液 (1.2%) 20 cc. に 10% NaOH 10 cc. の割合に加へ 15 分以上放置したるものを原液と比色する時其著色度が 2 倍以上になつてはならぬ。最純良品なれば 1.5 倍以内に止るものである。

ii 純「クレアチニン」の製法 (Folin-Benedict<sup>(1)</sup>):

10 l. の新鮮な尿に、450 cc. の温酒精に 180 gm. の「ピクリン」酸を溶解したるものを添加する。一夜放置して上澄を除き沈澱を「ヌッチェ」に移し吸引し 1-2 回「ピクリン」酸の飽和溶液で洗滌して乾燥する。

(1) Folin and Benedict: Journ. biol. chem., 18, 182, 1914.



此「ピクリン」酸鹽の粉末を蒸發皿に移し少量(約 $\frac{7}{10}$ 重量)の濃鹽酸を加へて泥状となし3-5分間よく攪き混ぜ硬化濾紙を用ひ「ヌッチェ」で濾過する。沈渣を少量の水で2回洗滌する毎回殆ど乾く位まで「ポンプ」で吸引する方がよい。此「クレアチニン」濾液を大型「フラスコ」に移し煨性「マグネシア」(MgO)を加へて鹽酸を中和する。此煨性「マグネシア」は絶えず流水で冷却しながら少量宛添加しなくてはならぬ。反應の中性になつたのは全體が鮮黄色になるのを標準としてもよいが試験紙を用ひれば更に明瞭である。中和後再「ヌッチェ」で濾過し沈渣を2度水洗する。かくて合併したる濾液に直ちに2-3 cc. の氷醋酸を加へ強酸性にする。此際沈澱が生じても關はぬ。この溶液を4倍容量の95%の酒精で稀釋して15分の後濾過する。濾液に20%の鹽化亞鉛溶液30-40 cc. を加へ攪拌し冷處に一夜放置する。上澄は傾瀉して捨て「クレアチニン」鹽化亞鉛の沈澱を「ヌッチェ」の上に集める。最初水、次で50%の酒精最後に95%の酒精で洗つて乾燥する。之は略白色の結晶性粉末で1 l. の尿に對し1.5-1.8 gm. の yield である。此粉末10 gm. に對

し水100 cc., 1 n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 60 cc. の割合に加へ加熱溶解する。約4 gm. の動物炭を加へ1分間温めて脱色する。濾液が尙着色して居る時は今一度之を濾紙上に戻し濾過して遂に無色透明の液を得るに至る。動物炭は一度熱湯で洗ひ全濾液を「ビーカー」に集めて冷めない中に鹽化亞鉛の飽和溶液3 cc. 及少量の水に溶解した醋酸加里約7 gm. を添加する。10分後酒精で倍量に稀釋し冷所に數時間放置する。析出した沈澱は既に「クレアチニン」鹽化亞鉛の定型的の結晶をなして居る。尙硫酸加里を除くために2倍量の水及酒精で洗ふ。然る時は雪白の粉末を得る。之より「クレアチニン」を分離するには次の方法に據る。即ち之に7倍量の強「アンモニア」を加へ少し温めて攪き混ぜ透明に溶解せしめ密栓を施し氷室に貯藏すれば「クレアチニン」は純粹の結晶になつて析出する。

之は温酒精で再結晶することが出来るが多くの場合は其必要を認めない。其儘乾燥して着色纒に貯へる。此0.1 gm. を100 cc. の蒸餾水に溶解し標準液を調製する。



## 「クレアチン」(Creatine) 微量定量法

「クレアチン」は酸性溶液で煮沸されると失水作用 (dehydration) に依つて定量的に「クレアチニン」となる。故に今先 creatinine を定量し次で creatine + creatinine を定量すれば其差より「クレアチン」量を求めることが出来る。

## 第一、尿中の creatine + creatinine 定量法

尿 0.5-1.0 cc. (兩者併せて 0.7-1.5 mg. を含む様に採るのが最適である) を 200 cc. 大の重量既知の Erlenmeyer 「コルベン」に採り 20 cc. の「ピクリン」酸飽和溶液及 130 cc. の水を加へ 1-2 の沸騰核を投じて最初 1 時間は小さき焔で極く静かに加熱し然る後焔を大きくして、蒸發せしめて内容を 20 cc. 以内 (秤量に據て知る) にする。之を流水で冷し 20 cc. の「メスコルベン」に移し割度まで盈たす。10% の NaOH 1.5 cc. を添加して比色試験を行ふ。

標準液は 1 mg. の「クレアチニン」を含む基本液を

100 cc. の「メスコルベン」に採り「ピクリン」酸飽和溶液で割度まで盈たし此 20 cc. に 10% の NaOH 1.5 cc. を加へる。

計算  $v$  を採取した尿の容積 (cc.) とすれば

$$\frac{\text{標準液の読み}(mm.)}{\text{被験液の読み}(mm.)} \times \frac{20}{v} = \frac{\text{尿 100 cc. 中の creatine} + \text{creatinine 量}(mg.)}{100}$$

附記：常尿の「クレアチン」は一般に少量であるが小児では稍多い。饑餓、熱性病、痛腫等に著しく増量することがある。

## 第二、血液中の creatine + creatinine 定量法

「ピクリン」酸で蛋白除去を行つた血液濾液は加熱せらるゝと「クレアチニン」が一種の變化を受けて比色に際し過大の値を得る恐れがあるとせられて居るが注意して行へば著しい誤差は来さぬ (Hammet)。

實施 Folin (第 114 頁参照) に従つて調製した無蛋白濾液の同等分 (aliquot) 10 cc. (血液 2 cc. に相當す) を小 Erlenmeyer 「コルベン」に採り錫箔或は「ガラス」蓋を以て蓋ひ Autoclave (Müncke's digester) で 120°C 20 分間加熱する。Autoclave が 100° 以下に冷へたらば蓋を開き内容を 25 cc. の「メスコルベン」に移す\* 容器

\* 或は最初より 25 cc. の硬質「メスコルベン」に容れ Autoclave で加熱してもよい。

Hammet: Journ. biol. chem., 48, 127, 1921.



の内壁を少量の「ピクリン」酸飽和溶液で洗ひながら之を「メスホルベン」に注ぐ、此操作を2-3回繰り返して劃線迄盈たす、現色 (develop) に用ふる 10 cc. NaOH は「ビューレット」で正確に 1.25 cc. を加へる、

標準液は血液中の總「クレアチニン」量(「クレアチン」を併せたもの)が一定して居らぬため 100 cc. 中の含有量 0.5-1.0-2.0 mg. の三種類を調製して置く方が便利である、この 20 cc. の現色には 10 % NaOH 1 cc. を使用する、比色は 10 分以上経過してから行ふ、

計算、

$$\frac{\text{標準液の読み(mm.)} \times 12.5 \times \text{標準液 100 cc. 中の「クレアチニン」量(mg.)}}{\text{被験液の読み(mm.)}}$$

= 血液 100 cc. 中の  $\frac{\text{Creatinine} + \text{Creatine}}{\text{Creatine}}$  (「クレアチニン」を以てあらはす) を mg. で示す、

糖微量定量法

糖の微量定量法が今日の程度に發達したのは殆 Bang の研究の賜物であること云つて差支ない、而して同氏の舊法は熟練すれば正確度に於ては大差ない様であるが、滴性銅液と糖液の混合物を加熱する手加減が結果に非常な影響を及ぼす事と成生した亞酸化銅を空氣に觸れしめない様にするために煩錯な操作を要する點から煮沸度が自由で終反應の明瞭な新法と到底比較にならぬ、故に斯る歴史的方法は省略して新法に就て詳述することとする、

Bang 氏新法<sup>(1)</sup>

他の微量定量法よりも一層器物の清淨及要約を適確に遵守すること等が必要である、

原理 滴性銅液 (cupri 鹽を含む) が糖に依つて還元されて出來た亞酸化銅 (cupro oxyde) を一定の沃

(1) Bang: Mikromethode zur Blutuntersuchung, S. 35.



度酸 (*iodic acid*) で酸化する ( $\text{KIO}_3 \rightarrow \text{KI}$ )。沃度酸の過剰は沃度加里を加へ沃度を遊離せしめ「チオ」硫酸曹達で滴定して間接に糖量を計算するのである。此際沃度酸の酸化作用は酸性液内でのみ起るからして途中で反応を酸性に爲なくてはならぬ。而して該溶液に他の血液成分があつても此際沃度酸で酸化される懸念はないのである。

## 試薬

## (1) 鹽化加里飽和溶液

普通品を水で1回再結晶する。結晶再出は約半量である。15°C 1 l. の水に 300 gm. 強溶解する。

## (2) 醋酸「ウラン」液

純醋酸「ウラン」は Kahlbaum, Merck 或は中村純薬のを用ふるが宜しい。若し是等が手に入らなければ鹽酸に溶解して「アムモニア」で沈澱せしめて精製する。(1)

純醋酸「ウラン」	3 gm.	} 溶解
蒸餾水	200 cc.	
KCl 飽和溶液	1300 cc.	
25 % HCl	1.5 cc.	

(1) Hollböhl, Biochem. Zeitschr., 113, 200, 1921.

蒸餾水を加へて總量を 2 l. とする。

## (3) 鹵性液

炭酸加里 ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ )	75 gm.
酒石酸加里曹達 ( <i>Rechelle salt</i> , <i>Seignette salt</i> )	20 "
蒸餾水	1000 cc.

鹽類は何れも普通品を水で以て再結晶すればよいのであるが後者は注意して行はねばならぬ。

(4) 0.01 n  $\text{KIO}_3$  液

市販品は殆ど使用に堪へぬから次の方法で調製しなくてはならぬ。

a. 沃度加里 20 gm. 出来る丈少量の水に溶解する。

b. 過「マンガン」酸加里	40 gm.	} 加温溶解
蒸餾水	1000 cc.	

a, b を合併して水浴上で 30 分間温め之が全く褪色するまで酒精を 2—3 滴宛加へる。褐色沈澱物を濾過して除き醋酸で酸性とし全體を徐々に蒸發して總量が約 50 cc. になる様にする。冷却して出来た結晶は一度再結晶し時計皿の上に薄い層にして擴げ(濾紙は用ゐてはいけない) 200° で乾燥して除濕器に保存する。



此 0.1 n 液を作るには次の處方による、

沃度加里 3.5667 gm.

20 % 硫酸 20 cc.

蒸留水で以て正確に 1 l. とす。此液は長時間の保存に堪へる、

0.1 n  $\text{KIO}_3$  液 100 cc.

硫酸銅 2.5 gm.

之に水を加へて正確に 1 l. にする、

(5). 20 % の  $\text{H}_2\text{SO}_4$

Merck の硫酸 (*pro analysi*) 20 cc. を 80 cc. の水に  
徐々に添加する、

(6). 5 % KI 液

局方沃度加里を用ひて差支ない、

(7). 1 % 澱粉溶液

溶解性の澱粉(なる可く Kahlbaum 製品)を水に浮遊せしめながら重湯煎で温めて作る。其都度新しく作る必要がある、

(8). 0.01 n 「チオ」硫酸曹達液

普通の次亜硫酸曹達を水で以て 1 回再結晶する。此 10 gm. を 4 l. の水に溶解する。此價は空氣中の炭酸で變化するから特別の装置を施した罫に

容れて置く必要がある(第 17 圖参照)。而も最初 2 週間位は價が減弱するから前記の時日を経過した後堀内氏<sup>(1)</sup>の方法に従つて評價する即 0.2-0.25 gm. の沃度加里と約 0.15 cc. の蒸留水を容れた小秤量罫に昇華精製せる沃度を約 0.05 gm. を加へ再精密に秤量して沃度の實際の重量を知る。此秤量罫を其儘 0.1 gm. の KI, 水 20 cc. を容れたる廣口大型の Erlenmeyer 「コルベン」中に器壁に添ひて入りしめ上記の 0.01 n 次亜硫酸曹達液で滴定する。今

沃度の量 0.0508 gm.

定規液消費量 40.227 cc. とすれば

此 1 cc. は 0.0012628 gm. の沃度に相當する、

故に  $\frac{0.0012628}{0.0012692} = 0.99606$

即眞の 0.01 n の「チオ」硫酸曹達量を得るには 0.99606 を乗ず可きこととなる、

檢定は三回行へば之から後は餘り繰り返す必要がない、

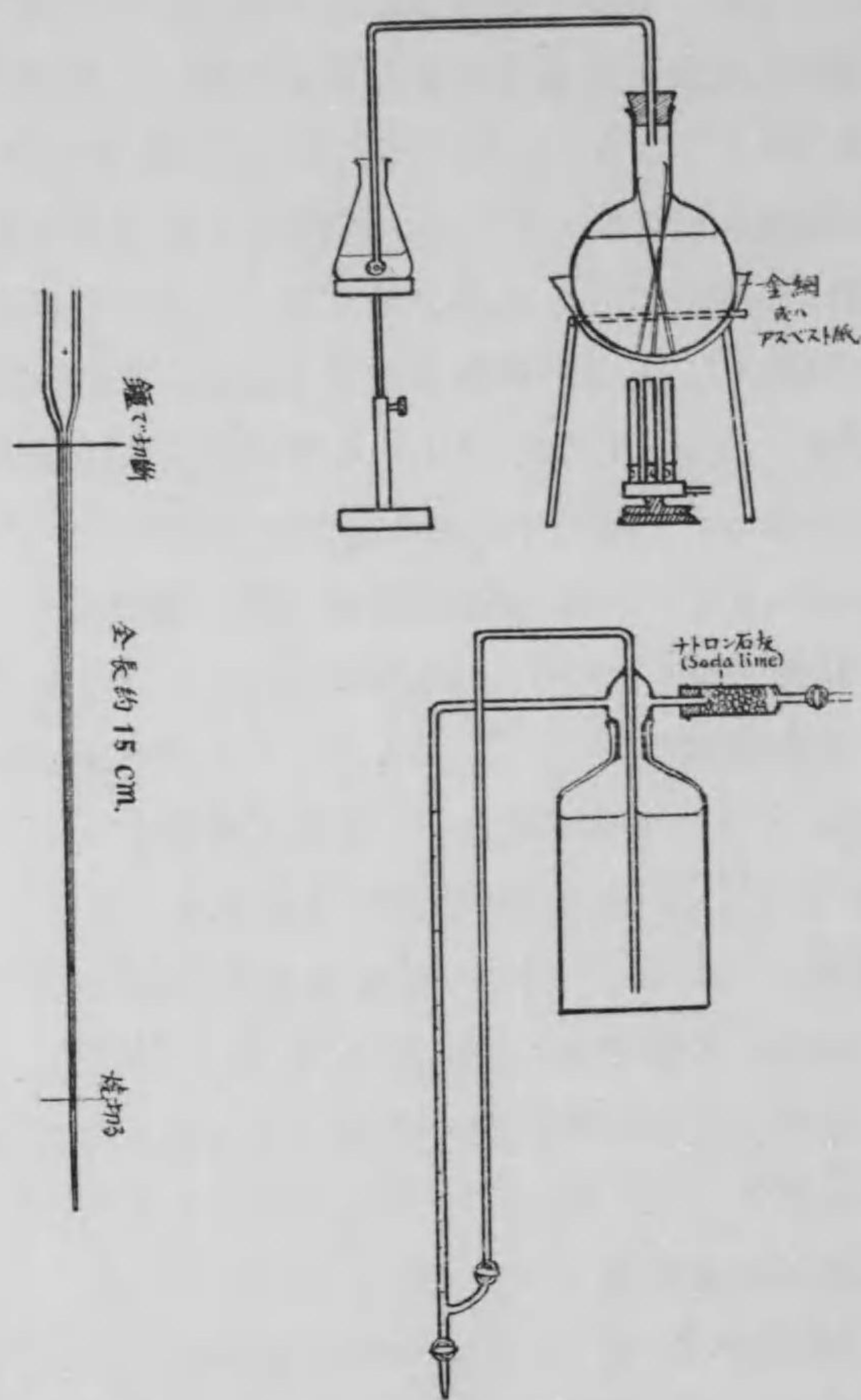
#### 所要器械及装置

1. 「ゼンマイ」秤 (*torsion balance*, *Torsionswage*)

構造及使用法に關しては Bang の原著を参照して

(1) 堀内樂, 東京醫學會雜誌 38, 1, 1924.





第 17 圖

戴きたい。

2. 糖浸出器 (第 18 圖参照)
3. 煮沸装置 (第 17 圖上参照)

圓底「コルベン」は 1 L 以上の水を容れる可く尚沸騰を圓滑にするため附圖の様な「ガラス」管を 2-3 本立て、置く (閉じた一端は上方に向ける)。

4. 「チオ」硫酸曹達器 2-4 L 大 (第 17 圖下参照)。
5. 120-150 cc. 大の硬質 Erlenmeyer「コルベン」多数
6. 2 cc. の「ホールピペット」数本
7. 6.5 cc. の「ピペット」(若しあれば便利であるが必しも必要でない)

**實施** Bang 氏法の最廣く用ひらるゝ血糖定量に就て記す。其他の場合は適宜變化して應用することが出来る。

**吸取紙**: Emil Jensen の E. J. K. 或は英製百斤の様な地質の厚い白色のものを選び 16 × 26 mm. 位の大きさに切斷する。各々の目方が 200 mg. 内外が適當である。之を精製するには先 5% の醋酸の中で 1 時間餘煮沸 (重湯煎上) し次に蒸留水で以て酸性のなくなるまで煮沸洗滌して乾燥する。此操作の間紙片が互に密著しない様に注意する必要がある。



**血液採取：**豫め「ゼンマイ」秤で秤量した吸取紙片に血液をなるべく平等に2-3滴附着せしめて秤量し直ちに醋酸「ウラン」液(2)(前半6.5 cc.)内に投入する。

10-15の定量を同時に行ふのはさまで困難でないから必要に應じ多数の採血を一時に行ふ方がよい。

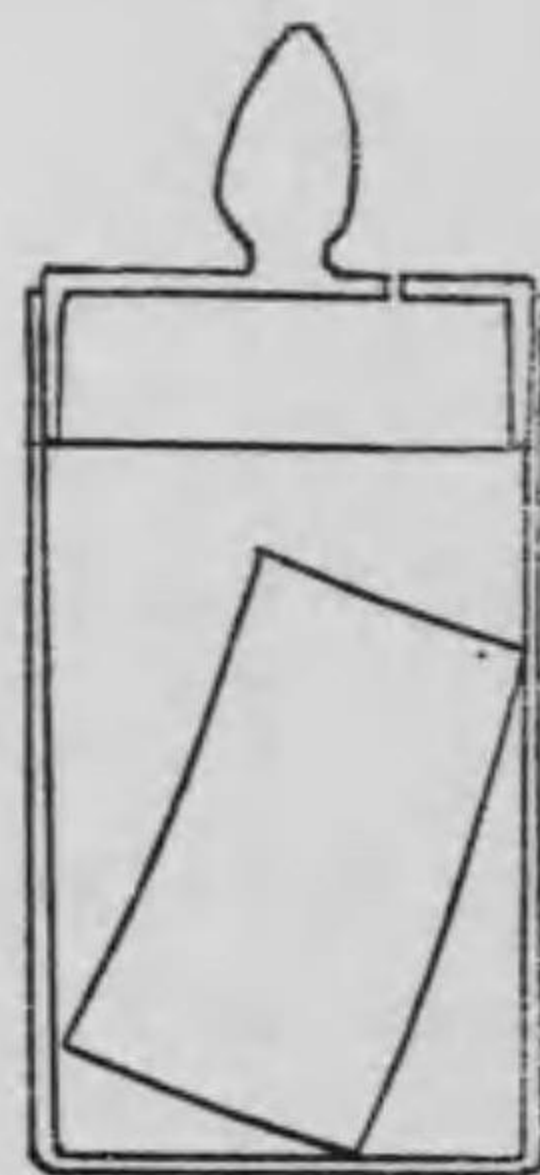
**注意：**(1) 1回の定量に最適糖量は0.05-0.5 mg.の間にあるから血液量を大凡90-100 mg.の範囲内にある様に加減する方がよい。

(2) *Torsion balance* のない場合は豫め乾燥した吸取紙を一枚宛容れた小秤量罫を多数用意して置き採

血後なるべく速かに再秤量して醋酸「ウラン」液の前半を加へる。尙此罫は其儘糖浸出の際に使用することが出来るから甚便利である。

**糖浸出：**醋酸「ウラン」液は一回に13 cc. 使用するが之を2度に分ち(6.5+6.5 或は 10+3) 最初は室温で30分以上放置する必要がある。

毎回なるべく小さい濾紙で120-150 cc. 容量の硬質 Erlenmeyer「コ



實物大

第18圖

ルベン」中に濾過する。

**定量：**各に  $KIO_3$  液(4) 2.0 cc., 鹵性液(3) 2cc. を加へる。次で圖の如くに「コルベン」の内容を間接に加熱するのであるが水が勢よく沸騰してから十數分を経過(水に溶解せる酸素が完全に驅除される)してから實驗を開始するのである。「ガラス」棒の球状となつてゐる一端は「コルベン」の底に近接する方がよい。

加熱時間は6分間以上を要する。(原著に4分間とあるが不足である, Holböll.)。煮沸6-10分の後「ピペット」で以て2 cc. の20%硫酸(5)を加へて「コルベン」を下方に數 cm. 下げ噴出罫の細流を用ひ少量の水で「ガラス」棒を洗ひ流す。斯くて數分静置せる後25 cc. の水を加へて放冷する。

之に5%の沃度加里液(6) 0.5 cc. 澱粉液(7) 2滴を加へ黄綠色が消失するのを終反應として「チオ」硫酸曹達液で滴定する(沃度加里は滴定の直前に加へる)。

此使用量を a (次亞硫酸曹達液が丁度 0.01 n になつて居らぬ時は沃度に據る評價に基いて換算すること勿論である) とすれば

$$\frac{2.00-n-a}{p \times 10} = x \text{ (mg. を單位とした葡萄糖量)}$$

最初に採取した血液量を b gm. とすれば



$$\frac{x}{b \times 10} = \% (\text{血糖量は普通の場合 } 0.06-0.15\%)$$

茲に  $n \dots$  は血液(糖液)を加へぬ際  $KIO_3$  がいくらか還元せられるものであるから之に對する補正である。之は前以て實驗的に確定して置く必要がある。

$p \dots$  は  $0.01 n KIO_3$  が  $0.1 \text{ mg.}$  の葡萄糖でどれだけ還元せられるかを示す係数であつて Bang は  $0.28$  であると報告してゐるが Holböll は多數の實驗の結果  $0.265$  を用ふる方が妥當であると主張してゐる。堀内氏の實驗によると  $0.264$  の方が真に近い結果を得るとの事である。

- 注意** 1. 蒸氣の發生する「コルベン」を加熱する瓦斯の強さは1時間に  $150-300 \text{ gm.}$  の水が蒸化する位がよいと Holböll は云つて居るが堀内氏も  $200 \text{ gm.}$  より  $300 \text{ gm.}$  を越へぬ範圍ならば自由であつて結果に影響がないとの事を確めた。
2. 蒸氣の發生は努めて圓滑に行はしめなくてはならぬ。斷續することは絶対に禁物である。
3. 正確度は熟練すれば次第に増すことが出来る、一般に誤差  $2-3 \%$  以内まで定量し得るが1回の糖

量  $0.02 \text{ mg.}$  以下或は  $0.5 \text{ mg.}$  以上の場合には  $10 \%$  以上に達するものと覺悟しなくてはならぬ。

4. 盲驗に據つて  $n$  を求むる傍、純葡萄糖の溶液を作つて  $p$  を計算して見るのは手を馴らす上に非常によい。



### 「アセトン」微量定量法

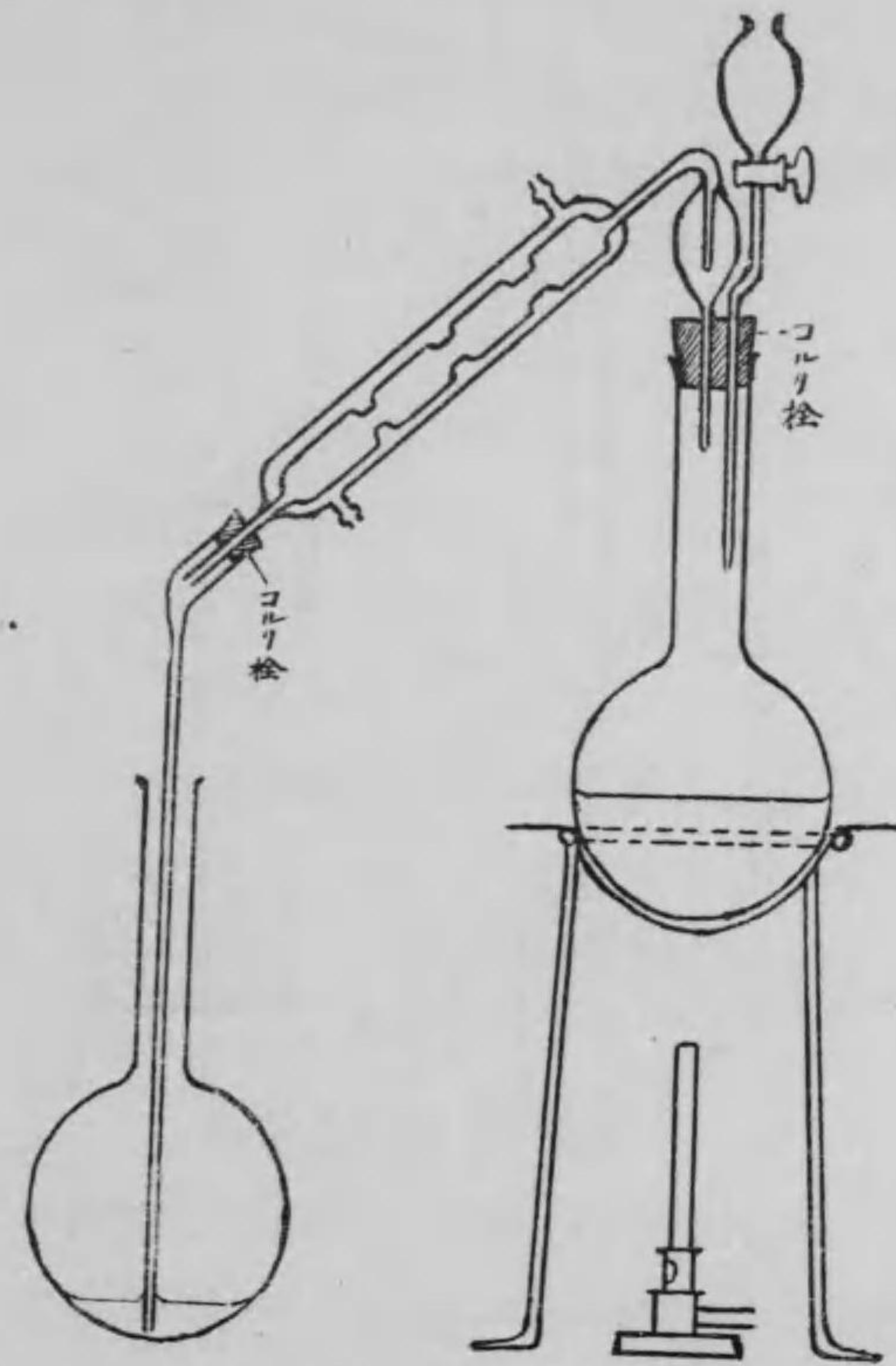
Marriott<sup>(1)</sup>の比濁的定量法及 Van Slyke and Fitz<sup>(2)</sup>法を Short<sup>(3)</sup>の改良した重量分析法よりも滴定法の方が実施上遙かに簡便である。尤 *biiodate* を用ひて滴定する Widmark<sup>(4)</sup>法は既存の「アセトン」及「アセト」醋酸より生ずる全「アセトン」量を正確に表示せぬし Pincussen u. Moniferratos-Flores 法<sup>(5)</sup>は機械が破壊し易く諸種の缺點を伴ふ。原理に於て Lublin<sup>(6)</sup>或は Hubbard<sup>(7)</sup>の方法が最優れて居る。但し Lublin 法は比較的少量の時（例へば糖尿病患者の尿或は血液）に應用し簡便なる利點はあるが微量定量法とし

- (1) Marriott: Journ. biol. chem., **16**, 289, 1913-14.
- (2) Van Slyke and Fitz: Ibid. **32**, 475, 1917.
- (3) Short: Ibid. **41**, 503, 1920.
- (4) Widmark: Biochem. Journ., **13**, 430, 1919.
- (5) Pincussen u. Moniferratos-Flores: Biochem. Zeitschr., **125**, 46, 1922.
- (6) Lublin: Klin. Wochenschr., I Jahrgang. **18**, 894, 1922.
- (7) Hubbard: Journ. biol. chem., **43**, 43, 1920.

ては Hubbard の右に出るものがない。

**原理** 蒸餾により分離した「アセトン」體を Messinger-Huppert法に従ひアルカリ性の沃度定規液内で定量的に「ヨードフォルム」(*iodoform*,  $\text{CHI}_3$ )の形とし過

剰の沃度を、之を酸性反應となせる後「チオ」硫酸曹達の定規液で滴定し「ヨードフォルム」の成生に與りし「アセトン」量を知るのである。

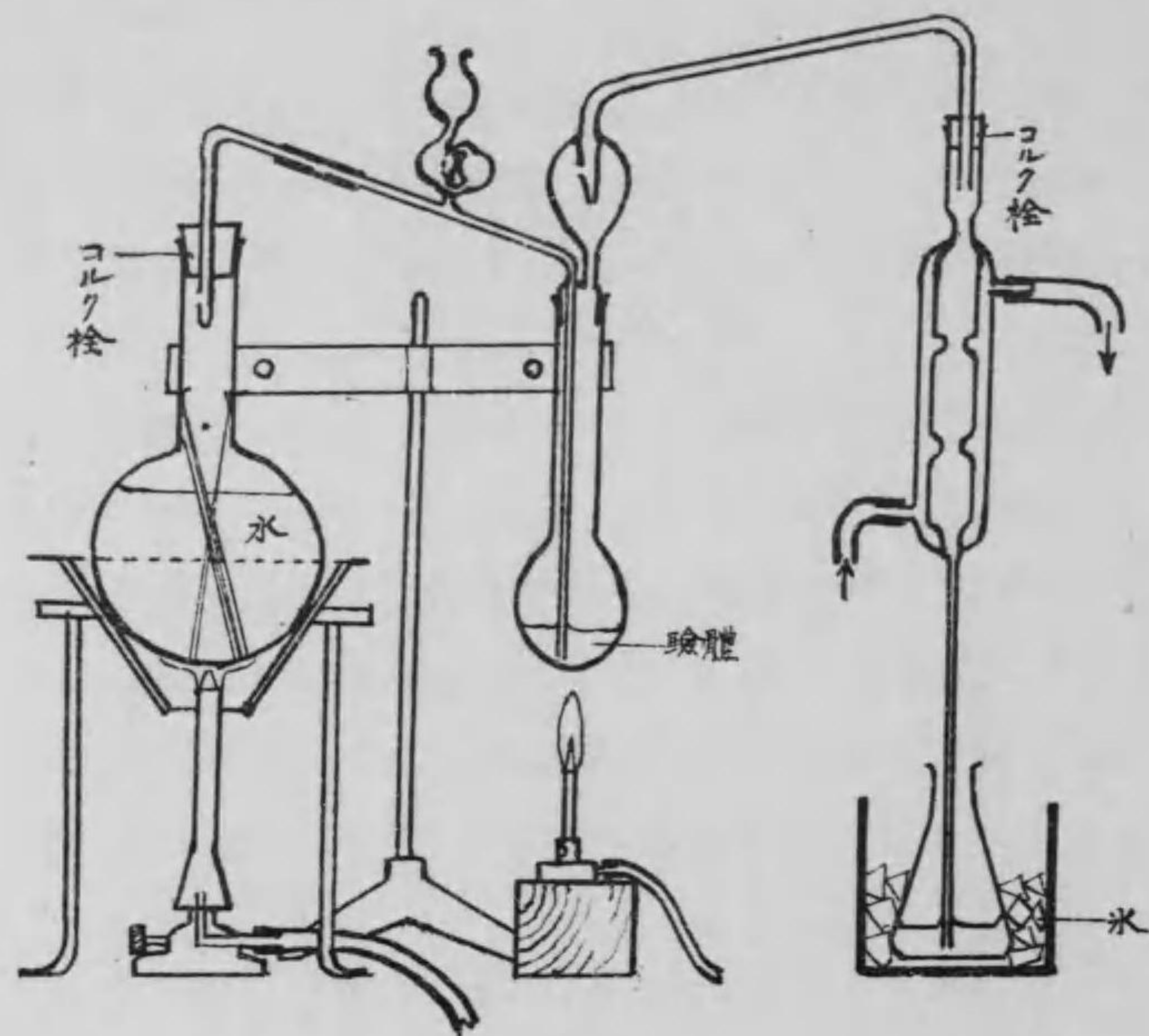


第 19 圖

装置



Hubbard の装置としては單に普通の *Kjeldahl* に用ひらるゝ蒸餾「コルベン」及冷却器に過ぎない。唯蒸餾しつゝ試薬を添加せんための装置 (*dropping funnel*) を有する點が異て居るのみである。(第19圖)



第 20 圖

蒸餾「コルベン」は硬質 300-500 cc. 大のもの數個外に 100-200 cc. 大の Erlenmeyer 「コルベン」を要する。唯此装置は加熱が一樣でないと逆流する恐れがある

ので Lublin に倣つて蒸氣發生「コルベン」を附し蒸氣蒸餾をする方を賞揚する人がある。該装置 (第20圖参照) は大體に於て Bang の *micro Kjeldahl* と同様である。

蒸餾「コルベン」には他の *Iodometry* に於けるが如く「ゴム」栓は禁物であつて「コルク」栓を用ふ可きである。尙是等より來る夾雜物を恐るゝ時は Widmark の提唱せる如く全然「グラス」接續を用ふるに若くはない。

「チオ」硫酸曹達定規液を貯藏する罫は第 128 頁下圖を参照せられたい。

**試薬** 尿及血液の豫備處理に要するもの

(i) *Goulard's extract*

$Pb_2O(CH_3COO)_2$  290 gm. を水 710 gm. に溶解する。

(ii) 20%  $CuSO_4$  液

(iii) 2 n NaOH

(iv) 鐵膠質溶液 (Merck)

自から調製せんとすれば  $FeCl_3$  の飽和溶液を沈澱の出來ぬ様に NaOH (約 5%) で中和し數日間透析して  $Fe^{+++}$  反應なきに至らしむ。



「アセトン」定量に要するもの

- (1) 電解或は金属「ナトリウム」より製せる

NaOH 200 gm.

蒸留水 300 cc.

- (2) 硫酸, 純濃硫酸を同容量の水を以て稀釋したるもの

- (3) 沃度基本液

昇華精製せる沃度 13.13 gm. 及 25 gm. の純 KI を 1 l. の水に溶解する. 着色縵に容れ暗所に貯藏するも僅少なる値の減弱は免れない.

- (4) 「チオ」硫酸曹達基本液

純良品 25.65 gm. を 1 l. に溶解し特殊の縵に貯藏して曹達石灰 (soda lime) に依つて大氣中の  $\text{CO}_2$  を遮斷する. 最初 1 週間は値が低下するも其後不變となる. 3.362 gm. の重沃素酸加里 (potassium biiodate  $\text{KJ}\text{O}_3 \cdot \text{HJ}\text{O}_3 = 390.09$ , 無色微細なる結晶にして 20 倍の水に溶解する) を 1 l. に溶解したもので檢定する必要がある (或は第 124 頁に倣つて沃度で評價してもよい).

斯くの如くして調製した (3) と (4) は何れも約  $0.1 \text{ n} \times 103.47$  % の價を有して各の 1 cc. は夫々 1 mg. の「アセトン」に相當する.

實用に當つては是等の基本液を稀釋して用ふる必要があるが器具の清淨は勿論蒸留水も煮沸したものを用ふる様になくなくてはならぬ.

- (5) 沃度定規液

「アセトン」量に應じ 10, 50 或は 100 倍に稀釋する必要があるが此際 KI 濃度が 3 % 以下に降らぬ様にするがために 2.5 % の KI 溶液を用ひなければならぬ. 此 1 cc. は夫々 0.1, 0.02, 0.01 mg. の「アセトン」に相當する. 稀釋液は 3 日間位不變であるが以後は KI の分解のために幾分値を高むる傾きがある.

- (6) 「チオ」硫酸曹達定規液は使用の都度基本液を稀釋す可きである. 而して (4) に於ける値は稀釋倍數にて除し其儘こゝに適用出来るが沃度定規液は變化し易いから之に對する關係は毎回檢査しなくてはならぬ.

此際注意すべきは同時に添加せらるゝ NaOH 及  $\text{H}_2\text{SO}_4$  が多少の影響を有する (後述注意 1 b 参照) ことであつて其度は「アルカリ」性沃度溶液を 10-20 分放置し之を酸性となすに當り最終酸度は 0.25 n 以下にして, 酸性反應となしてより 15 分以内に滴定すれば最少限度に止め得るのである. 又著しく稀薄なる定規液を用ふるに當つて滴定せらるゝ液の全容量 (通常約 50 cc.) にも餘り増減なき様にする方がよい.

- (7) 1 % 澱粉溶液: 可溶性澱粉 (Kahlbaum 製なら



ば更に可)を1%の割合に水に浮遊せしめ重湯煎で加熱し濁濁あらば濾過する。使用の都度新たに調製する。

- (8) 外に酸化劑として  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{N}_2\text{O}_2$  (何れも粉末),  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  の 0.1-0.2% 溶液を要する。

### 實施

#### 豫備處理

第一 尿, <sup>(1)</sup> 尿の「アセトン」體の微量定量に當つては種々の還元性物質が蒸餾液に移行する時は著しき誤差を來す, 其主なるものは糖である。是等を除去せんために 10 cc. の尿を「ピペット」を用ひて 250 cc. の「メスコルベン」に採り 100-150 cc. の水を加へ Goulard の「エキス」(i) 及 20% の  $\text{CuSO}_4$  (ii) 各 10 cc. を添加する。之に 10 cc. の 2 n NaOH (iii) (糖量 10% 以上の時は 15 cc.) を加へ水を以て割度迄盈たし 30 分後濾過する。此濾液 150 cc. は 6 cc. の尿に相當する。

第二 血液, <sup>(2)</sup> 3-4 cc. の血液を「ピペット」を用ひて正確に測り豫め 20-25 cc. の水を容れたる 100 cc. の「ミッシュチリンデル」或は「メスコルベン」中に滴下し 50 cc. の鐵膠質溶液 (iv) を加へよく震盪する。次で 10 cc. の Goulard 「エキス」(i) 及鉛を沈澱せしむるに充

(1) Hubbard: Journ. biol. chem., 49, 357 and (2) 375, 1921.

分なる n NaOH (iii) を添加し其都度よく混合する。

NaOH の量は液中の鉛量に應じ増減す可きで豫備試験に依り定むる外はないが濾液が弱「アルカリ」性で且之に鉛が移行せぬ範圍なる可く少量を用ふる必要がある。Goulard 「エキス」10 cc. を用ひた場合には 5.9 cc. 位が適當である。

1 時間放置した後割度迄盈たし「アセトン」の損失を防がんとため「ゴム」膜を以て覆ふた遠心沈澱管を以て上澄を分離し之を濾過して濾液の同等分 (普通 50 cc.) を定量に用ふる。

該液は透明で稀硫酸(鉛の驗出)或は「スルフォサリチル」酸(蛋白の驗出)により沈澱を起してはならぬ。最初に 5-6 cc. の血液を採れば全量を 150 cc. とし稀に 100 cc. の濾液を得て 2 回の定量を行ふ事が出来ることとなる。

既存「アセトン」(preformed acetone) を「アセト」醋酸と共に定量する蒸餾方法:

以下主として尿の場合に就て記述するが血液の場合も全然同様であつて唯液量が少ないから小型の蒸餾「コルベン」を用ひ小規模に行ふ迄である。

前記尿濾液 150 cc. を 300 cc. 大の蒸餾「コルベン」に移し 10 cc. の硫酸 (2) を加へ 10 分間に約 50 cc. の速度で蒸餾する。受器は 500 cc. 大の「コルベン」に豫め少量の水を容れ置き管端はなる可く深く器底に近接せしむる。蒸餾液 150 cc. を得たらば之に 5 cc. の



硫酸(2)及 0.2 gm. の  $\text{KMnO}_4$  を加へ再蒸餾して之を他の蒸餾「コルベン」に捕集する。火力は 10 分間に約 100 cc. の蒸餾液を得る程度にして差支ない。第二の蒸餾液に 0.5 gm. の  $\text{N}_2\text{O}_2$  を添加し 3 回目の蒸餾を行ひ Erlenmeyer 「コルベン」中に約 100 cc. の蒸餾液を得る。

斯くの如く酸化剤を加へ 2 回の蒸餾を繰り返せば酸化作用の不足すること絶對になく又此程度にては「アセトン」の酸化せらるゝ恐れもない。

上記の操作は常尿或は血液の場合にのみ必要なるものであつて「アセトン」量が稍々多量 [ $\text{FeCl}_3$  か「ニトロプルシドナトリウム」(*sodium nitroprussid*) 及「アルカリ」で明らかに陽性] なる時は斯く煩錯な蒸餾を繰返す要なく一度  $\text{NaOH}$  より蒸餾すれば充分である。

#### $\beta$ 「オキシ」酪酸を定量せんための蒸餾:

100 cc. に大凡 0.1-25 mg.  $\beta$ -hydroxybutylic acid を含有する溶液(前記「アセトン」定量の最初の蒸餾残渣を使用し得る)を蒸餾「コルベン」中に採り  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (2) 20 cc. 及 0.1-0.2 % の  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  溶液 (8) 20-30 cc. を dropping funnel から滴下しつゝ加熱蒸餾する。其速度は 10 分間に 50 cc. を以て適度とする。斯くて蒸餾

約 10 分後更に  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  溶液 50 cc. を添加し蒸餾を繼續し 10 分後再  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  50 cc. (總計 120 cc.) を追加し尙 10 分間蒸餾する。煮沸時間は合計 30 分に達する譯である。全蒸餾液は之を第二の蒸餾「コルベン」中に捕集し  $\beta$ 「オキシ」酪酸量微量の時は一度  $\text{KMnO}_4$  (0.2 gm.) +  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (10 cc.) より蒸餾し次で  $\text{N}_2\text{O}_2$  (0.5 gm.) より蒸餾(各約 10 分間)し最後の蒸餾液を Erlenmeyer 「コルベン」中に捕集する等上述の場合と全然同様である。

上記の操作は最短時間に  $\beta$ 「オキシ」酪酸を分解して最大量の「アセトン」を得る方法であつてしかも其回收量は盲驗に於て潜在性である 0.01 mg. を加算する時は略一定で 85-86 % である。

#### 「アセトン」の定量:

「アセトン」を含有する最後の蒸餾液(容量 50-100 cc.) に一定量の沃度定規液 (5) 及  $\text{NaOH}$  溶液 (1) 2 cc. を加へ少時間靜かに震盪する。

沃度定規液の量: 健康血液(2-3 cc.) 或は常尿の 6 cc. より得たる蒸餾液の「アセトン」含量は普通極少量であつて基本液(3)を 50 倍に稀釋したもの(1 cc. = 0.02 mg.) 10-25 cc. (「アセトン」0.2-0.5 mg. に充分である)を使用すれば足りる。acetonemia, acetouria に於ては其量に伴ひ 1 cc. が 0.1-1.0 mg. に相當する定規液 20-25 cc. を添加するの



であるが其適應量は勿論大體の量を豫備検査に依つて知つた上でなくては決定出来ぬ。

10分間以上経過した後 1-2 cc. の硫酸(2)を加へて酸性とし5分後沃度定規液に相應する「チオ」硫酸曹達定規液(6)で滴定する。終反應が近づいた時(沃度の色が稀薄になつた時)標示薬として1%の澱粉溶液(7)を數滴添加し定規液の消費量を決定するのである。「アセトン」量(mg.)は「チオ」硫酸曹達液使用量(cc.)を盲驗の夫れより差引きたる數で其儘表はし得る。又「アセト」醋酸は斯くして「アセトン」の項を以て表はされる。β「オキシ」酪酸は得たる「アセトン」量を86%で除し「アセトン」を以て表はされたる其全量を得る。

**注意** 1. 盲驗には種々方法があるが最初に於ては何れも一通り實施する必要がある。而も之は正確に定量を行はんとすの自然の道程に外ならぬ。

a. 50 cc. の蒸餾水に自己の使用せんとする沃度定規液 25 cc. を加へ基本液を同倍數に稀釋した「チオ」硫酸曹達定規液で滴定する。之は毎回實施しなくてはならぬ盲驗である。

b. 上記と同様の検査を NaOH 液(1)2 cc., 硫酸(2)

2 cc. を添加して行ふのであつて之は是等の試薬に就て一回實施すればよい。

c. 水を  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,  $\text{N}_2\text{O}_2$ , (特に注意を要す)等と共に蒸餾し蒸餾液に就て盲驗を行ふ。又被蒸餾液に種々の揮發性の有機物が存する時は是等に就て検査をしなくてはならぬ。CHCl<sub>3</sub>, 「ベンチン」, 「ガソリン」, 「メチール」及「エチール」酒精等は普通定量に影響はないが「エーテル」を酸化劑と共に蒸餾すると定量に著しき誤差を來すのである (Short).<sup>(1)</sup>

2. 豫備試験を次の三者に就て行ふは萬全の策である。

a. 再度蒸餾して正確に 56°C で沸騰する無水「アセトン」の一定量を密閉器中で稀釋し其同等分に於て定量を行ふ。

b. 「アセト」醋酸は *acetoacetic ethyl ester* を NaOH で加水分解し空氣を通じて遊離した「アセトン」を驅除し酸性にして作る。

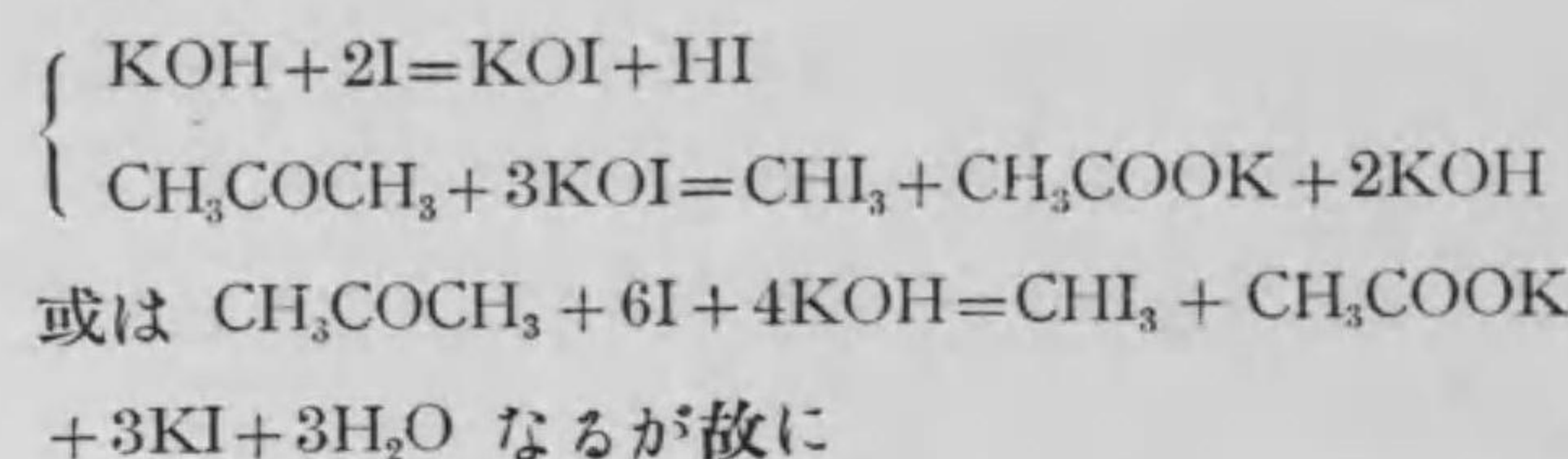
c. β「オキシ」酪酸, *calcium zinc β-hydroxybutyrate* を先づ旋光度により純粹度を檢し酸性にして石

(1) Short: Journ. biol. chem., 41, 503, 1920.



膏と混和し10時間「エーテル」にて浸出し蒸發残渣を水に溶解して少量の動物炭で脱色し旋光度により其含量を定める。之を用ひて自己の操作によりβ-「オキシ」酪酸の分解により生ずる理論的「アセトン」量の何%を回収し得るかを決定する事は此場合是非實施し置く必要がある。

3. 沃度及「チオ」硫酸曹達の普通の定規液を使用する時は



$$\frac{\text{CH}_3\text{COCH}_3}{6} = \frac{58.04}{6} = 9.673 \text{ である}$$

従つて 0.1 n 定規液 1 cc. は 0.9673 mg. の「アセトン」に相當し 0.01 n の 1 cc. は 0.0967 mg. の「アセトン」に相當する。又  $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H} = 104.1$  であるから「アセトン」の回収量 85% とすれば  $\frac{104.1 \times 100}{6 \times 85} = 20.4$ , Lublin 法の如く 69.2% とすれば  $\frac{104.1 \times 100}{6 \times 69.2} = 25$  となる、據て 0.01 n 定規液 1 cc. は 0.2 mg. (或は 0.25 mg., Lublin) の β「オキシ」牛酪酸に相當することとなる。

## 「コレステリン」微量定量法

**原理** Bloor<sup>(1)</sup>の方法では一定の結果を得る事が困難であるので Bernhard<sup>(2)</sup>は Weston 及 Kent<sup>(3)</sup>の方法に従つて「コレステリン」を浸出し Grigaut<sup>(4)</sup>に範つて比色を行ふ Henes<sup>(5)</sup>の方法を更に改良し簡單にして略信賴す可き結果を得るに至つた。其原理は血液中の「コレステリン」を酒精及「エーテル」で浸出し分離して之を Liebermann-Burchard の方法で著色し標準液のものと比色定量するのである。

- 試薬** 1. 95%酒精及「エーテル」多量  
2. 棒状苛性曹達  
3. 水酸化「カルシウム」(Ca(OH)<sub>2</sub>)の飽和水溶液、3週間毎に新たに調製する必要がある。

(1) Bloor: Journ. biol. chem., 24, 227, 1916 and 29, 437, 1917.

(2) Bernhard: Ibid. 35, 15, 1918.

(3) Weston and Kent: Journ. med. res., 26, 531, 1912.

(4) Grigaut: Compt. rend. Soc. Biol., 68, 827, 1910.

(5) Henes: Jr. Proc. N. Y. Path. Soc., 13, 155, 1913.



4. 「クロ、フォルム」, 蒸餾して使用する。
5. 失水醋酸, 純良品, 少しでも著色してゐたら蒸餾しなくてはならぬ。
6. 純硫酸, 水を含まぬもの (Merck製 pro analysi 中村純薬製或は其他の特別製品)
7. 0.3 gm. の純「コレステリン」(Kahlbaum) を「メスコルベン」を用ひて 500 cc. の「クロ、フォルム」(4) に溶解し著色縲に容れ密栓して暗所に貯蔵する。場合によつては之を更に「クロ、フォルム」で稀釋して使用する。

**實施** 血液或は血清 2 cc. (臓器ならば細碎する必要がある) を Ostwald の「ピペット」で 250 cc. 大の Erlenmeyer 「コルベン」に採る。95% の酒精 25 cc. を温めて加へ混和し更に 100 cc. の酒精と「エーテル」の等量混合液を追加する。重湯煎上で暫時静かに沸騰せしめてから之を第二の Erlenmeyer 「コルベン」中に濾過する。最初の「コルベン」に酒精 25 cc. を容れ温めて之で以て沈澱を洗ふ。合併した濾液に棒状 NaOH を 1 gm. 加へ重湯煎上で 2 時間煮沸して「エステル」を鹼化する。「コルベン」の内容は次第に蒸發して此時は大凡最初の 1/5 容量位となる。之に 100 cc. の Ca

(OH)<sub>2</sub> の飽和溶液を加へ出來た沈澱を濾紙上に集める。濾紙 (漏斗に載せた儘) 及「コルベン」を電氣乾燥器 (水を用ひた普通の乾燥器でもよい) で乾燥する。この間 90°C 以上にならぬ様にする。

沈澱を濾紙と共に「コルベン」中に戻し 100 cc. の「エーテル」を加へて 30 分間室温で浸出する。「エーテル」を 150 cc. 大の「コルベン」中に濾過し尙殘渣を 1—2 回「エーテル」で洗滌して濾過し全濾液を合して重湯煎上で蒸發する。

殘渣は「コレステリン」の全量であるから之に「クロロフォルム」5 cc. を「ピペット」で加へて溶解し乾燥した試験管に移す。之に 2 cc. の失水醋酸 (5) 及純硫酸 (6) 4 滴\*を加へてよく混じ 30 分間暗所に放置する。上記操作と同時に標準液 5 cc. (3 mg. の「コレステリン」を含む) を全然同様の方法で處理し 30 分間放置し該時間經過後直ちに比色計を用ひて比色する。

今標準液層 10 mm. の時に未知液層 R mm. とすれば血液 100 cc. 中の「コレステリン」量は

$$\frac{10 \times 3}{R} \times 50 = \frac{1500}{R} \text{ mg. である。}$$

**注意**

\* 「ピペット」で 0.1 cc. 測れば尙確實である。



1. 「グラス」器具は清潔であるばかりでなく絶対に乾燥して居ることが必要である。
2. 試薬は純粹でなければ現色反応が充分に行かぬ恐れがある。
3. 現色反応には 20-22°C が最適 (Bloor) であるから冬期は標準液と共に微温湯に浸す方がよいこの説もあるが室温に放置しても差支ない様である。
4. 誤差 4-5 % (Bloor)
5. Meyers 及 Wardell<sup>(1)</sup> は 1 cc. の血液を *plaster* と共に混和し乾燥して直接「クロ、フォルム」で温浸出をなし此同等分 (*aliquot part*) で同様の方法で定量を行つて居る。

(1) Meyers and Wardell, Journ. biol. chem., **36**, 147, 1918.

### 比濁法による脂酸(及「コレステリン」)微量定量法

Bloor<sup>(1)</sup>の血液中の脂酸を「コレステリン」と共に浸出し比濁的に定量し別に「コレステリン」を比色的に定量して差引く方法は Csonka<sup>(2)</sup>が兩者の比濁値が同一でない事を主張して以來一般に不確實であると認めらるゝに至つた。それで最近 Bloor, Pelkan 及 Allen<sup>(3)</sup>は兩者を分離し定量する方法を案出したのであるが之とても比較的少量で(血漿 5 cc.) 定量し得るといふ迄で 5 % 内外の誤差は避け難いものとせねばならぬ。(血液中の脂酸を秤量的に定量するには少くも 100 cc. の血液を要する)

**原理** 血漿の全脂質を多量の温めた酒精「エーテル」混合液で浸出し脂質中の脂酸を分離するために

(1) Bloor: Journ. biol. chem., **17**, 337, 1914.

(2) Csonka: Ibid. **34**, 577, 1918.

(3) Bloor, Pelkan and Allen: Ibid. **52**, 191, 1922.



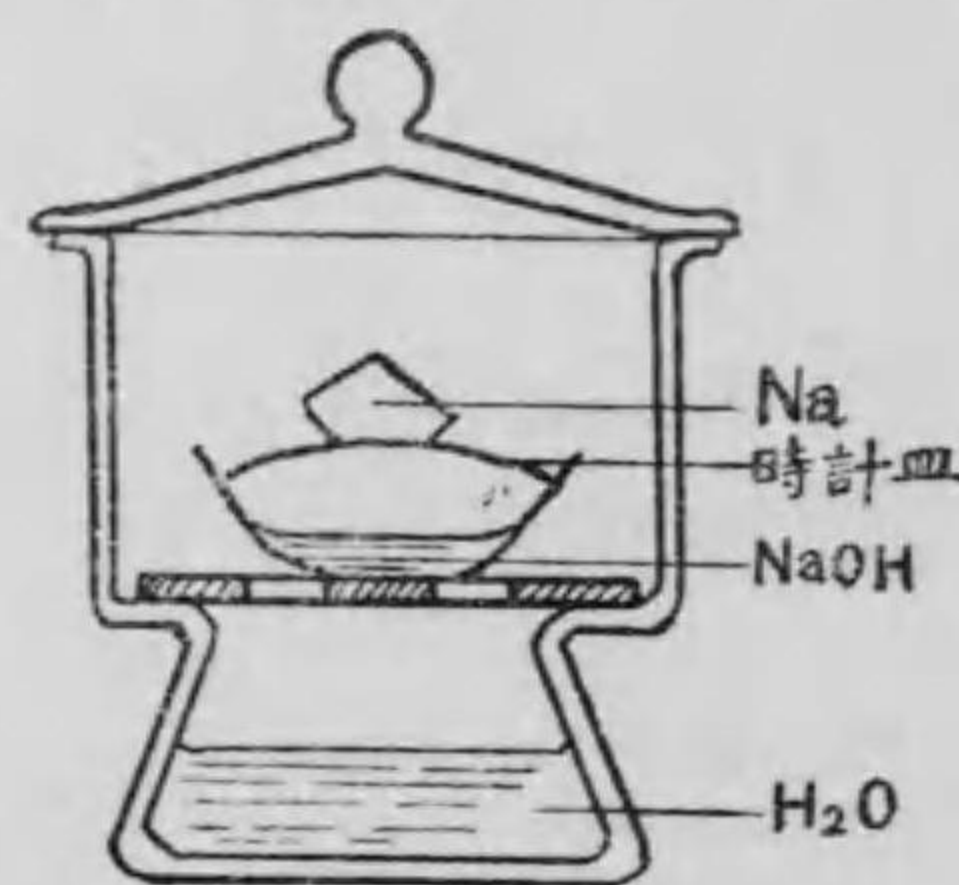
之を鹼化し蒸發した残渣を冷「クロ、フォルム」で處理する。然る時は「コレステリン」のみが溶解してあつたに脂酸石鹼を遺す。

此残渣を温酒精で處理して溶解し之に水及び酸を加へて脂酸を析出せしめ其量を比濁的に定量するのである。

石鹼溶液を Ca で沈澱せしむる方法は純脂酸石鹼の場合には却つて優つて居るが血液浸出物の際に適用出来ぬ。「コレステリン」の「クロ、フォルム」溶液は適當の濃度に濃縮し Liebermann-Burchard の方法で比色的に定量し得る。(149頁参照)

試薬 a. 酒精「エーテル」混合液

酒精 3 容量, 「エーテル」 1 容量(何れも再蒸餾したるもの)を混合する。



第 21 圖

b. 苛性曹達溶液

金屬「ナトリウム」の變色せる表面を削り無水酒精で洗ひ酒精を濾紙でよく吸取らしめて時計皿に載せる。全部 NaOH となるには氣候

溫暖なれば數日、寒冷ならば數週間を要する。

c. 稀硫酸

濃硫酸を 4 倍容量の水で稀釋したもの。

d. 「クロ、フォルム」

藥局方のものを再蒸餾して用ふ。反應中性、水及酒精を含有して居てはならぬ。

e. 純「アルコール」

f. 稀鹽酸, 濃鹽酸を 4 倍容量の水で稀釋したもの。

g. 脂酸標準液

「パルミチン」酸「オレイン」酸(共に純粹なるもの)各 0.2 gm. を小型「ビーカー」に正確に秤量し 95 % の酒精に溶解して 2 個の 500 cc. の「メスコルベン」に別々に流し込み割度まで盈たす。使用に當つて「パルミチン」酸溶液 40 cc. 「オレイン」酸溶液 60 cc. を混合し此 5 cc. を 1 回に使用する。此 5 cc. 中には「パルミチン」酸 40 % 「オレイン」酸 60 % の混合物 2 mg を含有することゝなる。

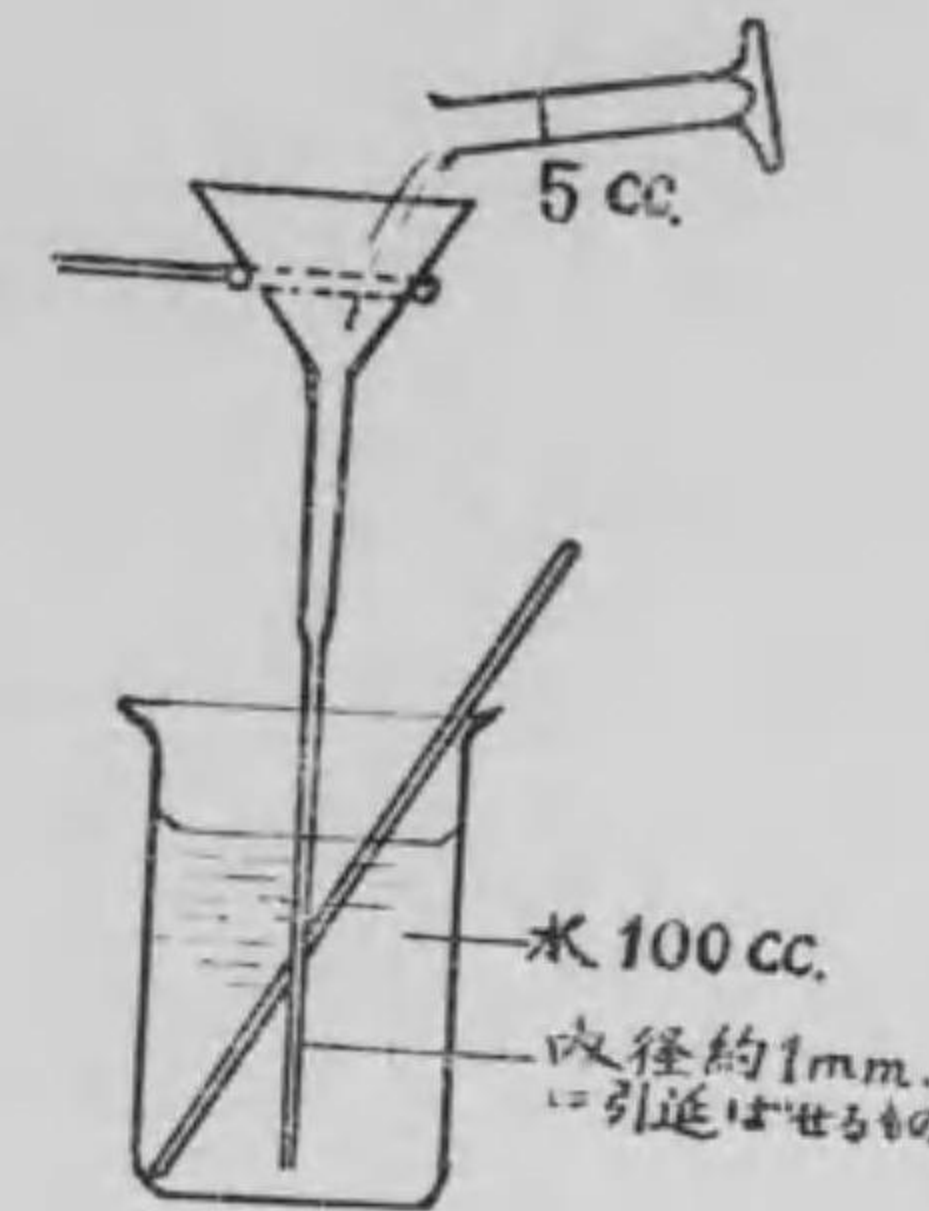
前記の脂酸の割合は血液の脂酸定量で經驗的に最も真に近き價を得る様に定めたのであつて他の種々の脂酸定量には臨機に變更す可きは勿論である。



「クロ、フォルム」の合併した濾液は2-3 cc. に蒸發し10 cc. の「メスホルベン」に移し割度まで盈たした後、其5 cc. を採れば其儘「コレステリン」の定量に用立つ。此際失水醋酸1.0 cc. 硫酸0.1 cc. 標準液は5 cc. に0.5 mg. の「コレステリン」を含むものが適當である(149頁参照)。

### 3. 脂酸の定量

「コレステリン」分離後の Erlenmeyer「ホルベン」に酒精(c)を10 cc. 加へ重湯煎で靜かに沸騰せしめながら10分間浸出する。冷却せぬ中に先に「クロフォルム」を濾過した濾紙を其儘用ひて100 cc. 大の Erlenmeyer「ホルベン」中に濾過する。同様の浸出を再5 cc. の酒精を用ひて繰り返して濾過する。合併した濾液を蒸發して2-3 cc. とし注意して小型の「ガラス」圓筒(内容5 cc.) 中に移す。「ホルベン」は尙少量の酒精を以て洗ひ圓筒に移し全量が丁度5 cc. となる様にする。別に100 cc. の蒸餾水を200 cc. 大の「ビーカー」に「ピペット」を以て採り之に脂酸の酒精浸出液を第22圖の様な装置で流込む。其間絶えず攪拌する必要がある。圓筒は「ビーカー」中の水の一部で2-3回洗ひ漏斗を通して洗ひなが



第 22 圖

ら流し込む(左圖参照)。同時に他の「ビーカー」の水100 cc. 中に同様にして標準液5 cc. を流込み各々10 cc. の稀鹽酸を攪拌しながら加へると脂酸が析出して濁する。3分以上10分内に普通の方法に従つて兩液を比濁する。(第149頁参照)

標準液層30 mm. 位が適當である。今標準液層30 mm. のときに被験液層x mm. で明暗の度が同一になつたとすれば

$$2 \times \frac{30}{x} \times 100 \text{ (mg.) は血漿 100 cc. 中の脂酸量である。}$$

#### 附記

1. 材料に依つては最初の計畫を縮小して2-3 cc. の血漿を50 cc. の「メスホルベン」に採つてもよい。
2. 比濁に際し標準液との差30%以上の時は材料を加減して採るか標準液を2-4 cc. 採り之を酒精で5 cc. に稀釋して用ふればよい。



所要器具 *Nephelometer* 一臺

250 cc. 大 Erlenmeyer「コルベン」 十數個

100 cc. 大 " " 數個

200 cc. 大「ビーカー」 數個

5 cc. の度盛りある小型「ガラス」圓筒

其他小漏斗, 「ガラス」棒等.

實施

1. 浸出及鹼化

100 cc. の「メスコルベン」中に 75 cc. の酒精「エーテル」混合液 (a) を採る. 血漿を 5 cc. Ostwald の「ピペット」で測り之を 1 滴宛落下せしめ其間絶えず激しく震盪して大きな凝塊が出来ぬ様にする. 然る後之を重湯煎に浸し内容の沸騰し始めるまで絶えず動かして居る.

暫時の後室溫に冷却し割度まで前記混合液で盈たし共口縁中に濾過する.

1 回の定量には此濾液 20 cc. (乳糜血ならば 10 cc. 脂酸含量大凡 2 mg.) を小型の Erlenmeyer 「コルベン」(豫め濃鹼液を以て處理したもの) 中に「ピペット」で採り苛性「ソーダ」飽和溶液 (b) 0.1 cc. を加へ重湯煎上で蒸發する. 大凡蒸發したらば「コルベ

ン」を静かに廻轉して内容を底面に萬遍なく擴がらしめ尙酒精の臭氣の消失するまで乾かす. 次で稀硫酸 (c) 0.1 cc. を加へてよく混じ(場合によつては内容を均等に混合するため水を 1-2 滴追加する必要がある) 更に乾燥を繼續する. 全く乾燥した場合には「コルベン」の側壁にも濕氣が残つて居らぬから鑑別することが出来る.

此處が此方法の最手加減を要する點であつて乾燥し過ぐれば「コレステリン」は室溫では完全に浸出されぬし乾燥不足ならば脂酸の一部は冷「クロロフォルム」に移行する. 尙硫酸が過剰なるか或は平等に混じて居らぬと脂酸の一部が遊離せられて「ク、ロフォルム」に移行することがある.

2. 「コレステリン」の分離

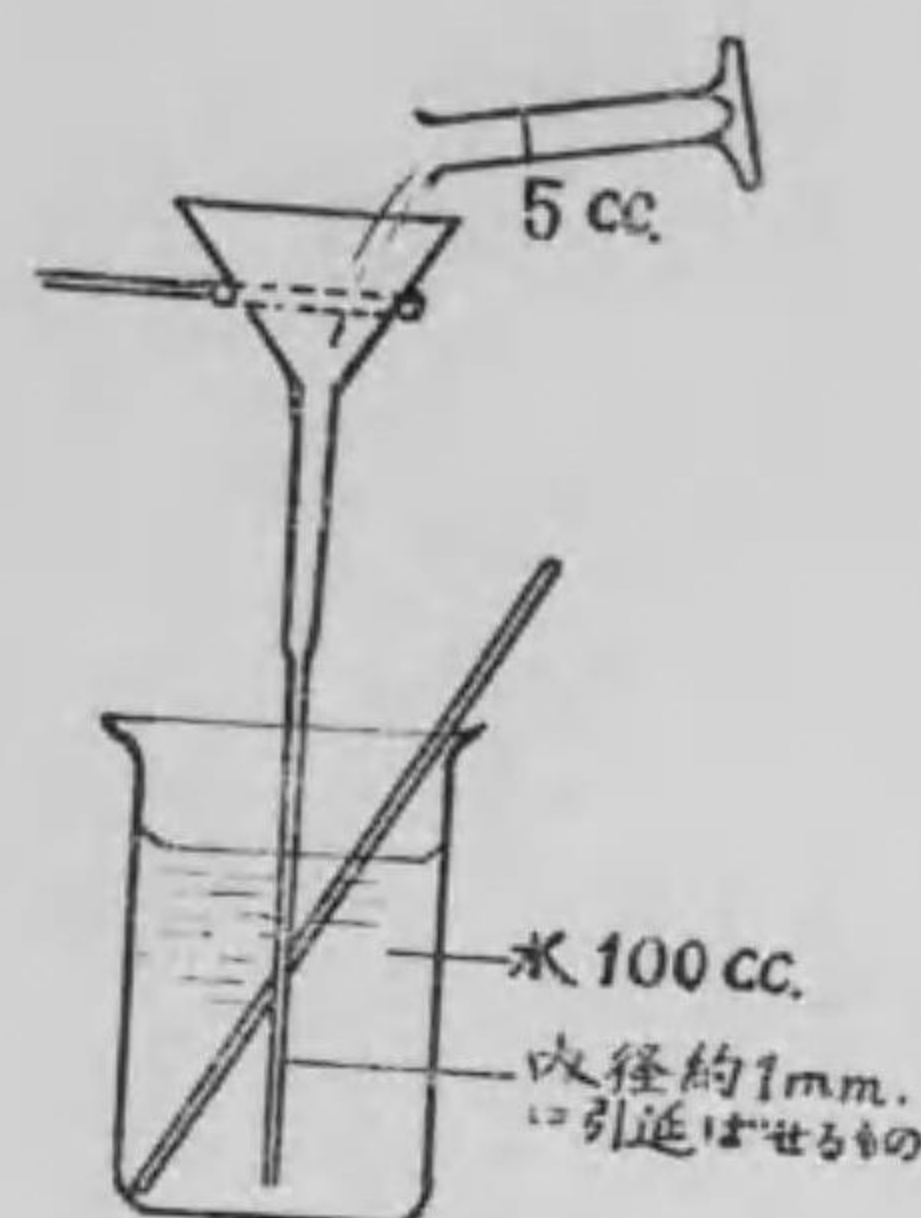
内容が冷却したならば 10 cc. の「クロ、フォルム」(d) を加へ約 10 分間時々静かに震盪しながら浸出する. 而して直徑約  $5\frac{1}{2}$  cm. の硬質濾紙で第二の小型 Erlenmeyer 「コルベン」中に濾過する. 尙 1 回 5 cc. の「クロ、フォルム」で同様の浸出を繰り返す(乾燥の度が適當ならば  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  と石鹼の混合物は壁に密著し殆ど剝離することがない).



「クロ、フォルム」の合併した濾液は2-3 cc. に蒸發し10 cc. の「メスコルベン」に移し割度まで盈たした後、其5 cc. を採れば其儘「コレステリン」の定量に用立つ。此際失水醋酸1.0 cc. 硫酸0.1 cc. 標準液は5 cc. に0.5 mg. の「コレステリン」を含むものが適當である(149頁参照)。

### 3. 脂酸の定量

「コレステリン」分離後の Erlenmeyer「コルベン」に酒精(e)を10 cc. 加へ重湯煎で静かに沸騰せしめながら10分間浸出する。冷却せぬ中に先に「クロ、フォルム」を濾過した濾紙を其儘用ひて100 cc. 大の Erlenmeyer「コルベン」中に濾過する。同様の浸出を再5 cc. の酒精を用ひて繰り返して濾過する。合併した濾液を蒸發して2-3 cc. とし注意して小型の「ガラス」圓筒(内容5 cc.) 中に移す。「コルベン」は尙少量の酒精を以て洗ひ圓筒に移し全量が丁度5 cc. となる様にする。別に100 cc. の蒸餾水を200 cc. 大の「ビーカー」に「ピペット」を以て採り之に脂酸の酒精浸出液を第22圖の様な装置で流込む。其間絶えず攪拌する必要がある。圓筒は「ビーカー」中の水の一部で2-3回洗ひ漏斗を通して洗ひなが



第 22 圖

ら流し込む(左圖参照)。同時に他の「ビーカー」の水100 cc. 中に同様にして標準液5 cc. を流込み各々10 cc. の稀鹽酸を攪拌しながら加へると脂酸が析出して濁濁する。3分以上10分内に普通の方法に従つて兩液を比濁する。(第149頁参照)

標準液層30 mm. 位が適當である。今標準液層30 mm. のときに被験液層x mm. で明暗の度が同一になつたとすれば

$2 \times \frac{30}{x} \times 100$  (mg.) は血漿100 cc. 中の脂酸量である。

#### 附記

1. 材料に依つては最初の計畫を縮小して2-3 cc. の血漿を50 cc. の「メスコルベン」に採つてもよい。
2. 比濁に際し標準液との差30%以上の時は材料を加減して採るか標準液を2-4 cc. 採り之を酒精で5 cc. に稀釋して用ふればよい。



附 錄

瓦斯分析に據る血液検査法



### 少量血漿中の炭酸瓦斯含有量 測定法 (Van Slyke and Cullen<sup>1</sup>)

体内に於ける貯藏「アルカリ」量 (*alkaline reserve of the body*) は血漿中の炭酸瓦斯量 (*CO<sub>2</sub> capacity*) を此方法に據て測定して推定するのが最も捷徑である。

**原理** 静脈穿刺によつて採取した血液を空氣に觸れしめぬ様に碳酸加里末と混合して凝固を阻止し遠心沈澱して血漿を分離し之を動脈血内に於ける炭酸瓦斯の張度 (*Partiardruck*) と同様なる瓦斯 (呼氣) 内に於て同張状態 (*Equilibrium*) に來らしめて動脈血と同様の炭酸瓦斯を含有する様にする。此血漿を Van Slyke の装置を用ひて酸を加へ真空中で震盪して炭酸瓦斯を定量的に遊離せしめ其容積を測定し 100 cc. の血液より幾何 cc. (0°C, 1 氣壓に於て) の CO<sub>2</sub> を得たるかを知り以て間接に「アルカリ」貯藏量を表示

(1) Van Slyke and Cullen: Journ. biol. chem., **30**, 305, 1917.



するのである。

**装置** 1回の定量に1 cc.の血漿を要するものと0.2 cc.にて足るものとの二種あるが此處には微量量の目的に添はんため後者に就てのみ記述する。構造の詳細は実施の項に譲るが大型のものでは50 cc.の「ビペット」状のものが一本から成立つて居る處を小型のもの(第23圖参照)では10 cc.大の「ビペット」に並行し更に一本の「ガラス」管を備へCO<sub>2</sub>分離後之を計測するにあつて操作を簡便ならしむる。又厚肉「ゴム」管の内面が粗糙のため之に附着せる氣泡が非常に除去しにくく、ために Torricelli の真空を生ぜず定量に誤差を來すことがあるが小型のものでは少數の氣泡はgに集まる様な装置(*the trap of gas bubbles*)があるから安全である。然し是等のために注意して製作せぬと器械全體を破壊し易く取扱ひにくくする缺點がある。

この器械の檢定はNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>の純品を正確に1%に溶解してこの0.2 cc.を以て血漿と同様に處理し之より遊離せらるるCO<sub>2</sub>を測定するのである。

目下此器械を比較的完全に製造するのは日本橋區本町4の9宮川卯一商店、本郷區追分町60藤原四郎商店等であらう。

- 試薬** 1. 1%「アムモニア」溶液(CO<sub>2</sub>を含有せざるもの)、もしCO<sub>2</sub>を夾雜して居る時には「アムモニア」水に水酸化「バリウム」Ba(OH)<sub>2</sub>の飽和溶液を加へてCO<sub>2</sub>を全部炭酸「バリウム」として沈澱せしめ其濾液に於て過剰の「バリウム」を硫酸「アムモニウム」を添加沈澱せしめて除去する。
2. 5%の硫酸  
水95 cc.に濃硫酸5 cc.を添加稀釋する。
3. *Capric alcohol* (Kaprylalkohol C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>OH)  
或は「アミールアルコール」と精製石油の等分混合液。

#### 實施 1. 採血

採血前一時間以内には勞働を避けねば乳酸發生のために正しき結果を得られぬ。上膊を「ゴム」管にて軽く縛し前膊に於て靜脈穿刺を行ひ縛を解き鬱血の去るを待つて血液約5 cc.を直接K<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>粉末(血液量の約0.5%)及少量の流動「パラフィン」を容れたる遠心沈澱管内に吸引する。其装置は大體第11圖に於けると同様であるが一端に注射針を附し他端aの小「ガラス」管を口に啣へて吸引する。血液を導く「ガラス」管は眞直で下端は沈澱管の底



に近接する方がよい。

全血は酸素と結合し易き不便あるのみならず結局血漿と同様の結果を與ふるより、通常臨牀的には血漿を用ふる。

即之を遠心沈澱し約 0.5 cc. の血漿を得る。

2. 血漿を CO<sub>2</sub> を以て飽和すること。

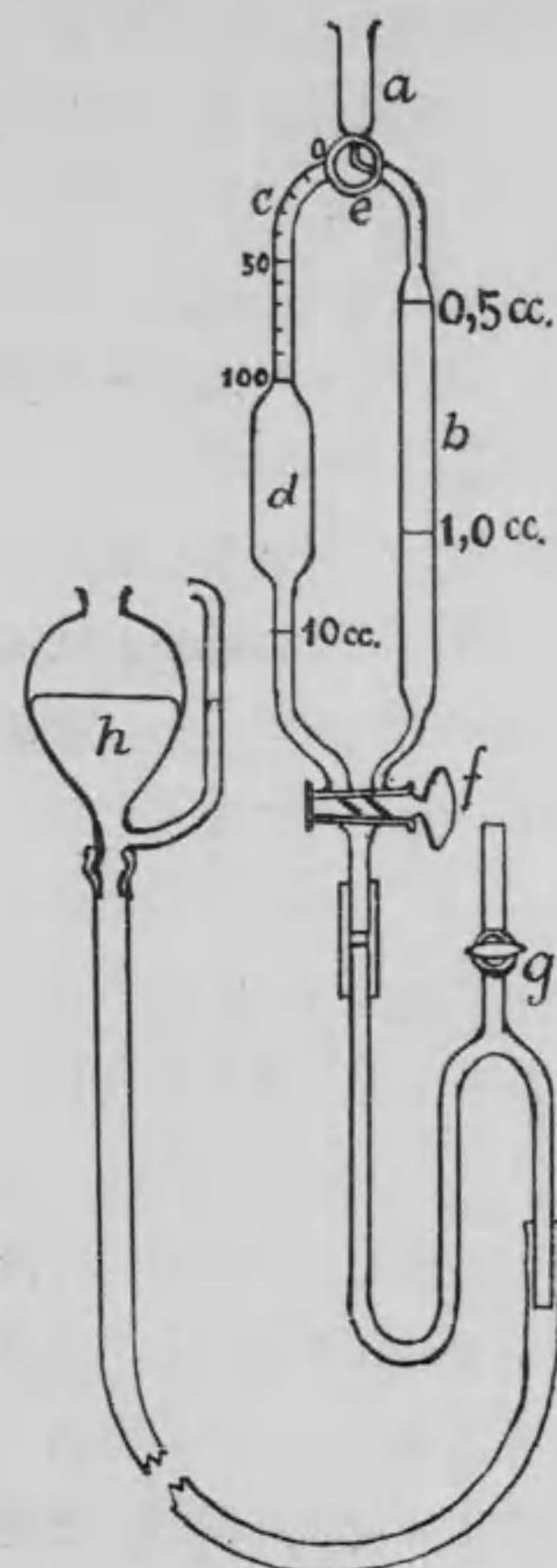
血漿を tonometer (或は約 50 cc. 大の分液漏斗) に移し横たへたまゝ栓を取り去つて活栓を開き一端に「ゴム」管を連結して「ガラス」玉の層を通じて濕氣を除去した呼氣を靜かに通ずる。2-3 回吹き込み最終の呼氣の終らぬ中に「ガラス」栓を閉ち活栓を捻ちて全體を 2-3 分間靜かに廻轉し血漿が薄層となつて萬遍なく全面に擴がる様にする。

此操作は貯藏「アルカリ」をなるべく CO<sub>2</sub> と結合せしめ自然の動脈血の状態にせんためであるが一部の研究者の説によると前記の順序で採取した血漿は必しも此操作を必要とせぬとのことである暫く記して今後の研究に俟つこととする。(追記4参照)

3. CO<sub>2</sub> 含有量の測定

清淨にしたる器械はよく乾燥して各活栓には豫め黄蠟「ワゼリン」(第 170 頁参照)を塗布して密著せしめる。而して先づ g の活栓を閉ち a b g 次で a c d g を連絡せしめ h を上下して管中の空氣を完全を驅逐する。終りに活栓 e を閉ち h を 80-90

cm. 下方に下げ Torricelli の真空を生ずるか否かを検査し始めて實驗に取りかゝることが出来る。



第 23 圖

空氣の驅除が完全ならば h を再舉上した時に金屬性音響 sharp click を發する。同時に之を以て活栓の氣密なるか否かを檢することが出来る。

最初 f は b, g を通ずる様な位置に置き a b を連絡して b の内部を全部水銀で盈たし a の底部に僅少の水銀が現はれる様な位置で e を閉ちる。「ゴム」帽「ピペット」を用ひ a の中に少量の「アンモニア」水 (1) で 2-3 回洗ひ洗滌液を捨てる。Ostwald の「ピペット」を用ひ a に殘留せる「アンモニア」液層の下に正確に 0.2 cc. の血漿を注加し



(CO<sub>2</sub> が散逸する恐れがあるから血漿を空氣に接觸せしめぬ様にしなくてはならぬ) c を靜かに廻轉して a, b を通じ之を b 中に流し込む。此際 b に空氣が入る恐れがあるから非常に注意して徐々に h を下げなくてはならぬ。a を少量 (約 0.1 cc.) の水で 2 回洗滌して毎回之を b に送り込む。

次に a に 5% の硫酸 (2) を容れ b に流し込み若し泡立つ恐れある時は極少量の「カブリックアルコール」(3) を添加し全體が 0.5 cc. の目盛りに達するまで水銀を下げ e を何れの方面にも相通せぬ様な位置に廻轉し固定する。次で h を 80-90 cm. 下げれば b 中の水銀は大部分 f を通じ g に流入し b には真空を生ずる。

水銀の表面が 1 cc. の目盛に達した處で活栓 f を閉ぢ全體を固定器より取外づして兩手で支持し十數回横に倒す然る時は CO<sub>2</sub> は完全に血漿から遊離する器械全體を再垂直に固定してから f を圖の如き位置に廻轉し h を下げ c を真空にし e を廻轉し b c 圖交通せしむると CO<sub>2</sub> は c 中に流入する。稀釋した血漿が e に接するに至れば再 e を廻轉し a c を通じ a に残れる水銀を以て CO<sub>2</sub> を完

全に c 中に送り込む。空氣を入れぬ様に注意す可きはこの場合も同様である。e を閉ぢ h を舉げて其管狀部にある水銀面と c 中の水銀面と同じ *niveau* にある位置にて c の目盛を精密によむ。

#### 計算：

斯くて得た結果を 500 倍し v を得たとする。測定時の室溫 t°C, p mm. とすれば血漿 100 cc. に含有せらるゝ炭酸含有量 V は 0°C, 1 氣壓に於て

$$V = v \times \frac{273}{273+t} \times \frac{p-4^*}{760} \quad \text{となる}$$

\* 4 mm. は大氣の壓より水蒸氣壓として控除するのである

此計算を省略せんため種々の成書には氣壓溫度の換算表を載せてある。多數の定量を行つた場合には之を利用する方がよい。

#### 附記：

1. 此炭酸測定法は 1% 近くまで正確に實施し得る。
2. 盲驗としては血漿 0.2 cc. の代りに同量の水を用ひて同様の操作を以て定量を行ひ、得たる結果を毎回 CO<sub>2</sub> 量より差引く。此盲驗は毎日實驗開始前に一回施行する。
3. 本邦健康體の血漿 100 cc. 中の平均 CO<sub>2</sub> 含有量は 0°C, 1 氣壓に於て 58-75 cc. 今少しく範圍を狭くする時は 60-70 容量% の間に在る。
4. 體液 (*body fluids*, Körperflüssigkeit) 中の CO<sub>2</sub> は他の酸



により結合せられざる剩餘の滴 (*base*) を容易く結合して重炭酸 (*bicarbonate*) を成生するを考へられて居る。故に重炭酸の分量は即更に他の種々なる酸と結合し得る過剰の滴の量を示す。換言すれば貯蔵「アルカリ」 (*alkaline reserve of the body*) である。従つて之を體中の酸滴の平衡状態 (*acid-base balance*) の目標として用ふるこゝが出来るのである。

而して *stadie* は靜脈血を穿刺に據つて「パラフィン」油層の下に採り其儘遠心沈澱して得た血漿の分析の結果は  $\text{CO}_2$  含有量 ( $\text{CO}_2$ -content) 即自然の「アルカリ」貯蔵量を示すものであつて、前記の如く血漿を呼氣に接觸せしめたものゝ  $\text{CO}_2$  は一種の炭酸瓦斯結合力 ( $\text{CO}_2$ -capacity) を示すを説いて居る。

兎に角血液中の  $\text{CO}_2$  量が異常の減少 (50容量%以下) を示せば是則「アシドーシス」 (*acidosis*) である。40-30容量%ならば中等度の「アシドーシス」であるが30容量%以下なる時は重篤で臨牀的症候も著明となる。

學者により血中の「アセトン」體の増量或は  $\text{C}_{\text{H}}$  の増加 (即  $\text{P}_{\text{H}}$  が7.45以下となる場合) を以て *acidosis* と呼ぶ人があるから混同してはならぬ。

## Barcroft の血液瓦斯分析法

**原理** 一定容積を有する罐中にて血液を震盪し之より遊離せられ或は之に吸収せらるゝ瓦斯の量をそれに接續せる壓力計 (*manometer*) の壓力の變化に基き計算するのである。Barcroft<sup>(1)</sup> が *differential method* (*Differentialverfahren*) を採用し瓦斯容積の溫度及壓力に對する補正を要せざるに至らしめたのは非常なる改良である。従つて僅々 1.0 cc. (大型器械) 或は 0.1 cc. (小型器械) の如き少量の血液を用ゐて高價にして最信頼するに足るをせられた血液「ポンプ」による瓦斯分析 (*Blutpumpenanalyse*) に對し敢て遜色なき結果を齎し (Abderhalden<sup>(2)</sup>) 且手輕に簡單に行ひ得る爲血液の如き容易に變化し易き物質に對しても連續實驗 (*Reihenuntersuchung*) を施行するを可能ならしめたの

(1) Barcroft: Journ. of physiol., 37, 12, 1908.

Barcroft: The respiratory function of the blood, Cambridge, 1914.

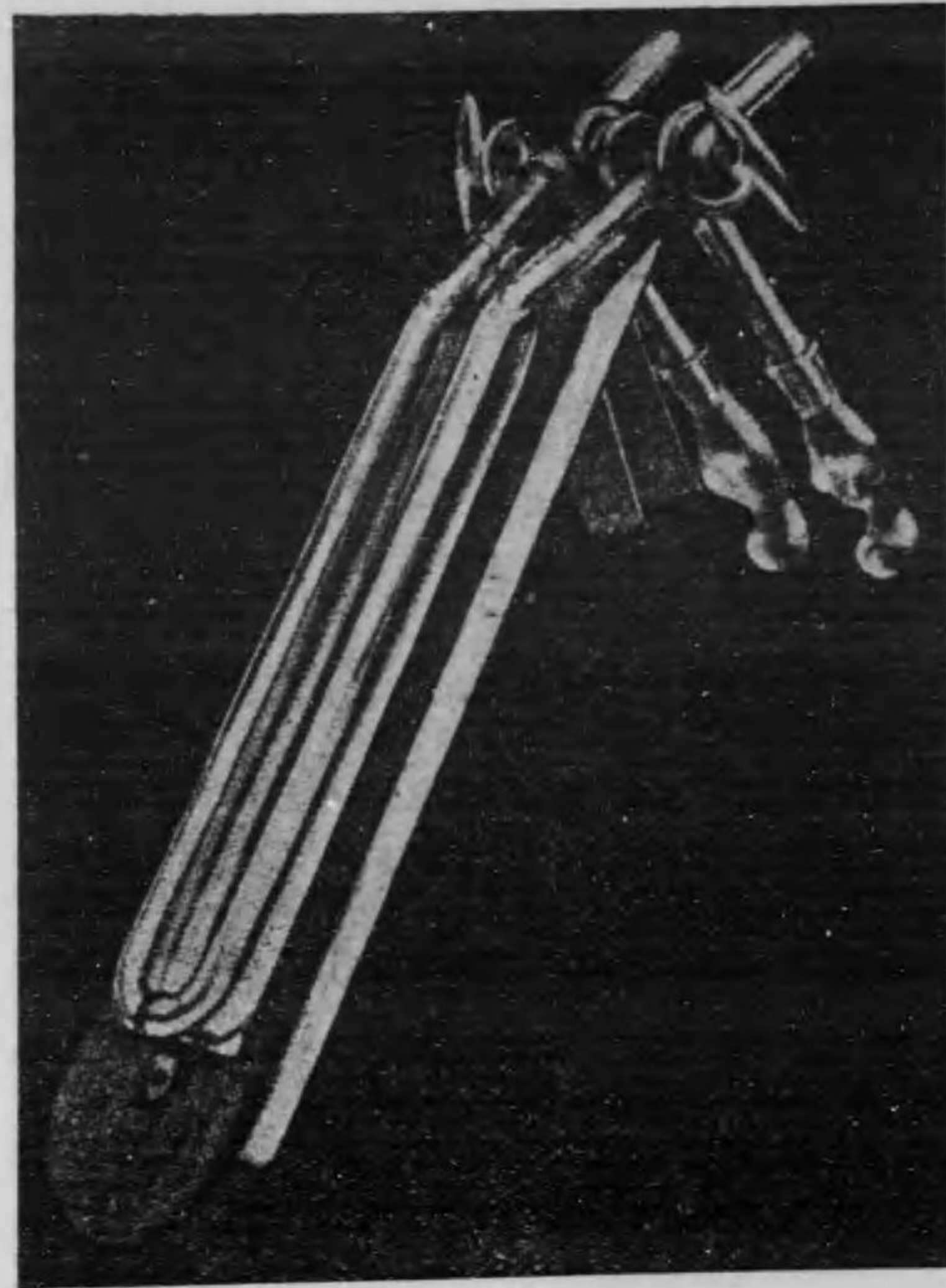
(2) Abderhalden. Handb. d. biolog. Arbeitsm. Abt. IV. Teil 10, Heft 1, 214.



である。

**装置：Differential manometer.**

丁字油を容れたるU字形の毛細管の両端に同容積を有する二個の震盪管を接続し(第24圖参照)一方



第 24 圖

に驗體一方 (Kontrollgefäss) に之と同容積の同性質の液體を容れ同一の水槽 (或は恒溫槽) 中で震盪するときは大氣の壓力、水槽の溫度、

水槽の溫度、

管中の水の蒸氣張力等に據る影響は全然相殺せられ *manometer* には眞の驗體と管中の瓦斯との間の代謝

の狀況のみ現はるゝことゝなるのである。但此際最注意すべきは兩管中に密閉せられたる瓦斯の容積は全然同一で且管の「ガラス」壁は薄く水槽の溫度と直ちに平衡し得るものなる事が必要である。

**大型器械：**血液 1 cc. を用ふるものは卵形をなせる内容約 25 cc. の管(第27圖)を備へ其容積の公差は 0.1 cc. である。之と擦り合はせとなれる栓の下部に第27圖Bに示すが如き液體 0.3 cc. を容るゝに足る小容器を裝備する。之を通じてT字形の穿孔を有する活栓により一方外氣と一方 *manometer* と通ずる(第25圖) *manometer* の内徑は約 1 mm. 水銀を用ひて一樣の直徑を存するか否かを檢定する必要がある。

**小型器械：**又 0.1 cc. の血液に用ふるものは製作上更に周到なる注意を要する。 *manometer* の内徑は前者に比し稍細く且つ一樣で 0.5 mm. 以下を以て適當とする。震盪管は第28圖の如き形狀を有し最初別々に容れある二種の液體が a 圖の如き位置では絶體に混合することなく又之を b 圖の位置に回轉すれば上部のものは下部のものゝ完全に混合する必要がある。即ち夾搾部に於ける内徑の加減が大切である。



全内容約 3 cc. で左右一組は全く同大でなければならぬ。

何れも *manometer* を垂直にして震盪器に取り付ける時は兩邊は充分水槽中に浸る必要がある。U字形 *manometer* は左右同高小型 14 mm. 大型 20 mm. 位で止め金を以て mm. 尺度を有する板に固定してある。*manometer* の間に反射鏡を備へてあれば更に完全である。多数の實驗を連続實施せんとするには多数の震盪器を要する。故に左右混同せぬため又組み合せを間違へぬため各に符牒を付けておく方がよい。

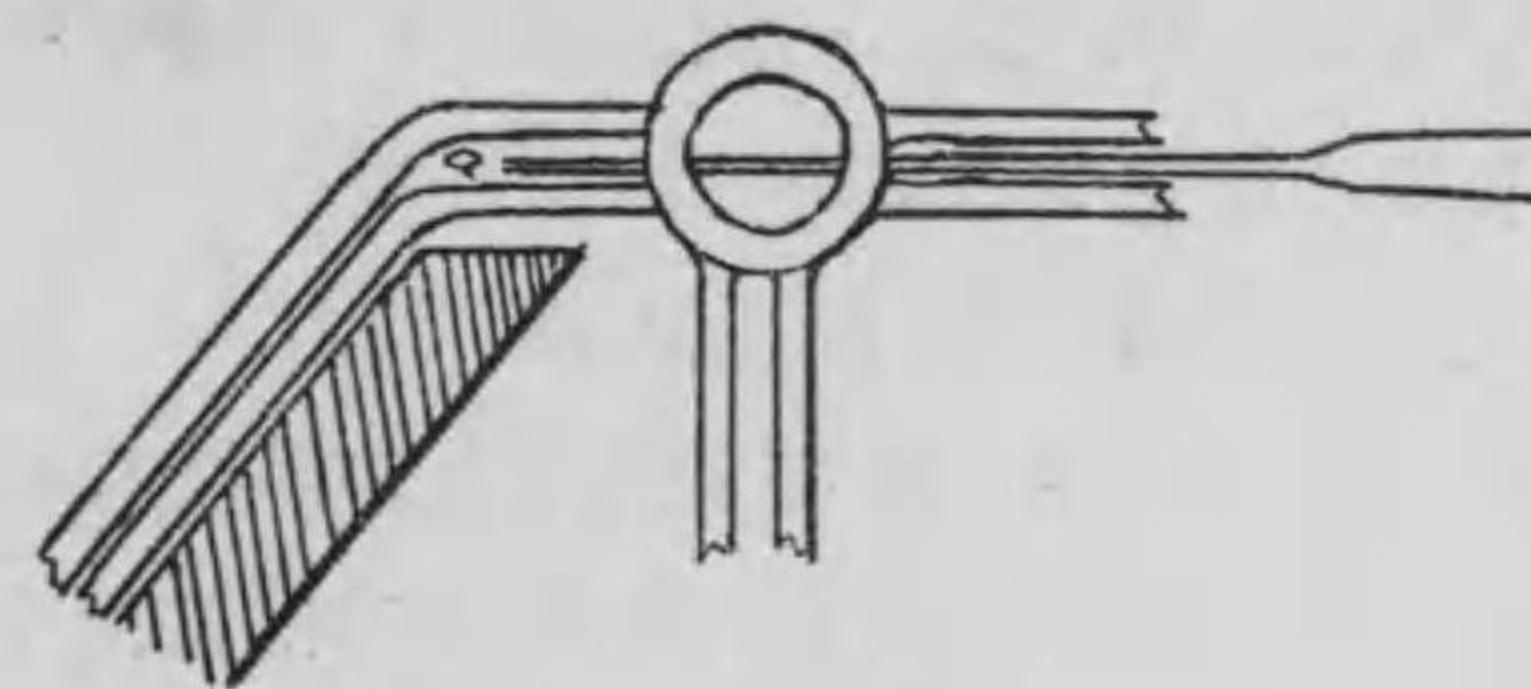
是等の器械は震盪器械水槽と共に仙臺市國分町成瀬商店で度量衡局の檢定を受けて發賣してゐる。

#### 實驗の準備

*manometer* を固定板より取はずし全部新しい「クローム」硫酸中に浸し翌日之を取り出して水洗し毛細管の内面は水流「ポンプ」で吸引しつゝ蒸留水で洗滌し次で濃硫酸を通じて乾燥せる空氣を通じて完全に乾燥する。酒精、「エーテル」によつて乾燥することは絶対に禁物である。

清淨となつた *manometer* は再び板に取りつけ一方の活栓に少量の黄蠟「ワゼリン」。(純良の「ワゼリ

ン」*Vaselinum americanum flavum* に少量の黄蠟 *Cera flava* を混合し研和したもので氣温高き程比較的少量の黄蠟の混入を要する)を塗布して半回轉し *manometer* と外界及纒との交通を絶つ。他方の活栓は之を取り除き「ゴム」帽を附した乾燥せる毛細管「ピペット」を毛細管の最初の部まで差し込み第 25 圖に於ける位置にて丁字油 (*clove oil*, *Nelkenöl*) の適量を注入す



第 25 圖

る。然る後他方の活栓を注意して少し宛開けば丁字油

は連続して *manometer* に流入する。此際氣泡の入らぬ様に注意しなくてはならぬ。油の一端がU字状部の下端に達したらば再び活栓を閉ち過剰の丁字油を紙縆の先端を以て丁寧に拭取り活栓を開けば丁字油の兩表面 (*meniscus*) は平均する。取り除けて置いた活栓にも黄蠟「ワゼリン」を塗布し原位置に嵌める。

震盪器を裝備する時にも常に黄蠟「ワゼリン」の少量を以て密著せしめなくてはならぬ。如何に精巧な



「ガラス」擦り合せでも其儘では決して氣密とは云へないのである。

「コンスタント」の測定

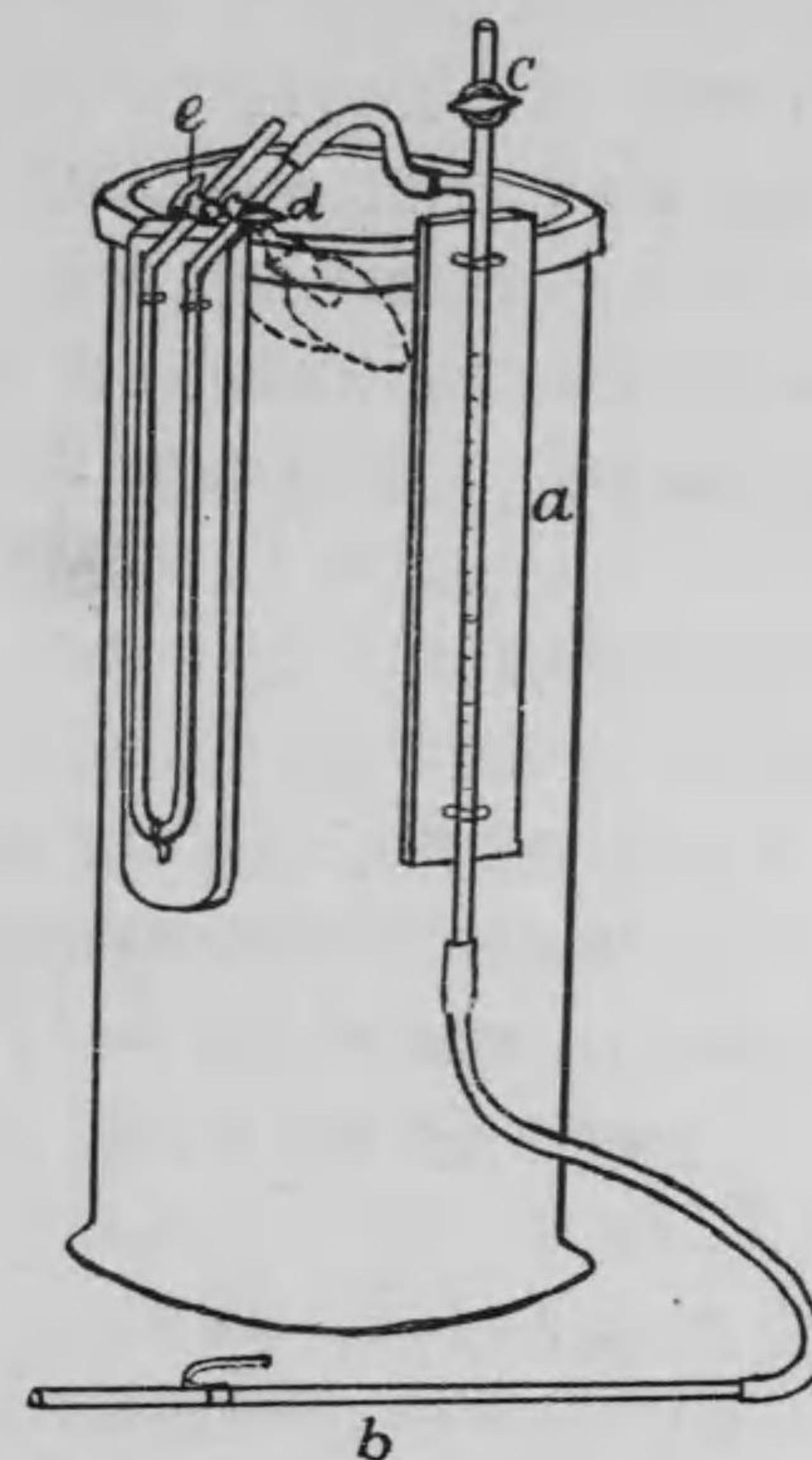
罐中に於ける一定量の「ガス」容積の變化に對し丁字油壓の變化、何 mm. なるかを確定し得て始めて *differential manometer* が其用をなす譯であつて此「コンスタント」は各機械に於て又各個の震盪罐に就て測定しなくてはならぬ。尤も一度測定すれば罐の變せざる限り永久に用立つのである。

Barcroft の最初記載した方法<sup>(1)</sup> は  $H_2O_2$  の一定量より  $KMnO_4$  によつて  $O_2$  を發生せしめ其量に基き計算するものであるが兩試薬の純粹度が信頼出來ぬため不確實なる方法たるを免れぬ。Hoffmann<sup>(2)</sup> の操作を Münzer u. Neumann<sup>(3)</sup> の改良したものゝ方が理論的にも實際的にも遙かに優れて居る。

此装置は大體第26圖の如きものであつて a は 0.01 cc. まで目盛りせる 1 cc. の「ピペット」(小型器械の「コンスタント」測定には更に細密なる目盛りを要する)

- (1) Barcroft: The respiratory function of the blood, Cambridge, 1914.
- (2) Hoffmann: Journ. of physiol, 47, 272, 1913.
- (3) Münzer u. Neumann: Biochem. Zeitschr., 81, 319, 1917.

で破壊せぬ様に板に取り付けてある。上端に活栓



第 26 圖

c を有し其少し下部に一個の分岐を持つて居る。

b は「ゴム」管を以て a に接続せる一本の「ガラス」管 (Niveauruhr) に過ぎない。この中に蒸餾水を容れて其量を加減し b を大型「ガラス」圓筒 (直徑一尺前後) の縁に懸けた時

に水面 (niveau) が「ピペット」 a の略中央に位する様にする。

今 *differential manometer* を此圓筒の縁に懸け d



の側の震盪線の「コンスタント」を求めんと欲せば d と a の枝を厚肉の「ゴム」管或は彎曲せる「ガラス」管の両端になる可く短かき「ゴム」管を附したものを以て接続する。(黄蠟「ワゼリン」を用ひぬと接続が氣密に行かぬことがある) 以下大型器械に於て著者が行つた實驗例を擧げて測定法の概略を説明しよう。

1. d より一定量の空氣を送入し其油柱に及ぼす影響を測定すること

活栓 d は T 状孔が各方に通ずる様な位置に置き b を圓筒の縁に懸け e, c を開きて各部を平均せしめ活栓 c (氣密にするため豫め黄蠟「ワゼリン」を塗布する) を靜かに閉ぢ e を回轉して外界との交通を絶ち纒と *manometer* のみ相通ずる様にする。丁字油及水の *niveau* を精密に讀み記註して置く。

例へば

e に接続する <i>manometer</i> の 讀み <i>mm.</i>	d に接続する <i>manometer</i> の 讀み <i>mm.</i>	c の水面 <i>cc.</i>
105.2	105.1	0.510

今 b を取り外づし之を圓筒上に横たへたとすれば a に於ける水面 (0.510) は多少昇り、0.207 に達する。然る時は 0.303 *cc.* (303 *cmm.*) の空氣が d を

通じて送入せられたこととなる。それがため丁字油面にも變化を來し次の如くなる。

e 側 <i>manometer</i> <i>mm.</i>	d 側 <i>manometer</i> <i>mm.</i>
105.2	105.0
135.9	74.8

依つて油柱の壓の變化は  $30.7 + 30.2 = 60.9$  *mm.* である。故に 1 *mm.* に相當する瓦斯容積は

$\frac{303}{60.9} = 4.98$  *cmm.* である。同様の操作を 5 回繰り返し送入せる空氣の容積 (*cmm.*) と壓の變化 (*mm.*)

との比を求めれば次の表を得る。即

e 側の變化 <i>mm.</i>	d 側の變化 <i>mm.</i>	合計 <i>mm.</i>	C <i>cmm.</i>	比
30.2	30.8	61.0	301	4.93
30.7	30.9	61.6	308	5.00
30.2	30.7	60.9	306	5.02
30.8	30.1	61.5	306	4.97
30.7	31.0	61.7	307	4.98

以上 6 回の平均値 k として 4.98 を得たのであるがこの場合に得た係数は實際の實驗に當つて使用し得可きものより、a に於ける水面より活栓 d に至る空間に由來するもの丈け過大である。

2. 由て次の方法に據り之を求めて差引かなくては



ならぬ。

今 b を圓筒縁に懸けたる儘にて活栓 d を半廻轉して震盪縷及 *manometer* との交通を全然絶ち c にて大氣との交通を絶つ、b を取り外づし圓筒上に横たへ或は圓筒を据へある机の上に置き其兩位置にて夫々 a 中の水面の静止せる點を精密に讀取すれば次の表を得。

實驗回数	b を下に置きたる時 <i>mm.</i>	b を圓筒上に横たへたる時 <i>mm.</i>	差 <i>mm.</i>
1	729	450	279
2	739	460	279
3	729	450	279
4	733	455	278
5	743	464	279
6	730	452	278

平均 279 *mm.*

今此圓筒の高さ  $h = 669.3 \text{ mm.}$  なりとすれば控除す可き空間は之れ丈の水壓に對して 279 *mm.* (v) だけの容積の變化をなしたことになる故

$$\text{に一般に } k' = \frac{v}{h \times \frac{10000}{13.595 \times 760}} *$$

$$\text{に従ひ } \frac{279 \times 13.595 \times 760}{669.3 \times 10000} = 0.43$$

\* は h に乗じて水柱壓を丁字油の壓に換算せんための項であつて Barcroft は一氣壓即 760 *mm. Hg.* を丁字油を以て表はせば 10000 *mm.* となると云つて居るが Münzer 及 Neumann は 10765 *mm.* を用ふる方が妥當だと主張して居る。

$k - k' = 4.98 - 0.43 = 4.55$  が即震盪縷が兩方空虛の時の「コンスタント」である。

3. 縷中に何 *cc.* かの液體が存する時は斯る状態のもとに之と同様の操作を行つて「コンスタント」を計測し正確なる値を得可きは勿論であるが大體は次の計算により求むることが出来る、即 v を縷中の液體の容積とすれば

$$K = k - k' - \frac{v}{10000}$$

$v = 2 \text{ cc.}$  ならば  $K = 4.35$  である。

斯くして得た「コンスタント」は温度の變化に對しては無關係であつて氣壓には多少の影響がないでもないが約 760 *mm.* の氣壓の時に計測したものならば他の總ての場合に適用して實際上の誤差は極めて僅少である。

又縷中に發生する一定量の瓦斯により壓が高まるま譯であるから此「コンスタント」は如何なる場合にも絶対に不變であるとは云へない、然しながら其壓の變化たるや一氣壓に比して極めて僅微のものであるから一個の「コンスタント」を以て *manometer* 尺度の何處の部分に適用しても大過ないのである。

I. 酸素を以て飽和せる血液の酸素含有總量 C (*total oxygen capacity, die gesamte Sauerstoffkapazität*)



を求むるこ

**原理:** 血液に赤色赤滴鹽 (Ferricyankalium) の飽和溶液の少量を添加震盪すれば「オキシヘモグロビン」は全部「メトヘモグロビン」に變じ其全酸素を遊離する。(Hüfner u. Zeynek<sup>(1)</sup> 及 Haldane<sup>(2)</sup>) 而してこの方法は F. Müller<sup>(3)</sup> が Pumpenanalyse と比較した所によると結果が非常によく一致して居る。

**試薬** 1. 「アムモニア」溶液, 4 cc. の強「アムモニア」を 1 l. の蒸留水にて稀釋せるもの

2. 赤色血滴鹽飽和水溶液

**所要器具** Ostwald の「ビベット」 B 型 (第 3 圖参照) 1 cc. 及 0.1 cc. のもの, 外に「ビューレット」「ゴム」帽を有する毛細管「ビベット」等

**實施** a. 大型器械

大型器械に於ては各震盪縷に「ビューレット」から 2 cc. 宛の「アムモニア」溶液 (1) を容れ Ostwald の「ビベット」を用ひ酸素を以て飽和せる血液 1 cc. を第 27 圖 A に於けるが如く「ビベット」の先端を深くさし込

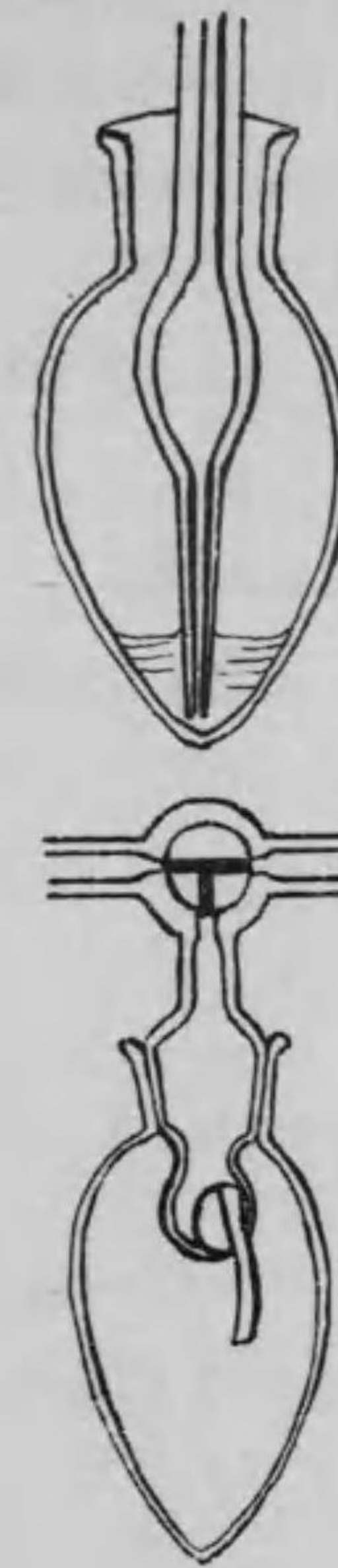
(1) Hüfner u. Zeynek: Arch. f. Physiol., 46<sup>o</sup>, 1899.

(2) Haldane: Journ. of physiol., 25, 295, 1900.

(3) Müller: Pflügers Arch., 103, 557, 1904.

みて注加し (unterschichten) 溶血せしめる。

實驗に使用する血液は可及的新鮮で細菌等が混入して居てはならない。脱纖維素血液, 舊酸血液, Hirudin 血液の何れでもよい, 使用の直前に空氣中でよく震盪することが必要である。



他方の縷には同様の血液 (或は他の種類の飽和血でもよい) 1 cc. を加へて置く。赤色血滴鹽溶液を 0.2 cc. 毛細管「ビベット」を用ひて測り被験血液を容れたる側に於てのみ栓の下部に連る小容器に容れる。尙後に此流出を容易ならしめんために細き短冊形の濾紙を水で潤ほし第 27 圖 B の如く穴の中に挿入して置く。

**B** Manometer が垂直なる位置に於ては多少震盪するも血滴鹽溶液が此紙片を濕ほすことがない様に注意せねばならぬ。

擦り合せには注意して黄蠟

「ワゼリン」を塗布し縷を嵌め

第 27 圖