mercuric phosphate, and the complexes obtained were extractable with ethyl ether.

A new method of spectrophotometric determination of organomercuric compounds based on the above results was established, where 2~20 μg as Hg of organomercury could be satisfactorily

determined.

Although Cu, Zn, Co and Fe were found to give almost no influence on the determination, Ag and Hg (inorganic) disturbed by forming the precipitates partially soluble in ether.

(Received Oct. 11, 1961)

Ruhemann 紫の水銀錯塩を利用する SH 基の光度定量法

小沢 恭一, 江頭 暁*

Ruhemann 紫 [2-(1,3-dioxindan-2-yl) imino-1,3-indandione] の水銀錯塩が SH 化合物と定量的に反応して Ruhemann 紫を遊離することを見出し, SH 化合物の光度定量に応用した. この方法により 5~50 μM の濃度 (あるいは絶対量として 15~150 $\text{m}\mu$ モル) の SH を定量することができた.

1 緒 論

SH 基の光度定量法としては, 従来, nitroprusside を用いる方法, *p*-chloromercuribenzoate を用いる方法, SH 基の還元力を利用する方法などがあるが¹⁾, 著者らは Ruhemann 紫の水銀錯塩が SH 化合物と反応して, もとの Ruhemann 紫を遊離する現象を利用して, 微量の SH 化合物を比較的簡単に光度定量できることを見出した.

Ruhemann 紫は, α -アミノ酸その他の第一級アミノ化合物が, ニンヒドリン (2,2-dihydroxy-1,3-indandione) と反応して生成する青紫色の色素で種々の遷移金属と錯塩を形成する性質をもっている²⁾. この色素の水銀錯塩は赤色をしていて, 種々の有機溶媒で抽出されるが, これに SH 化合物を添加するときは直ちに分解して色素を遊離し, 遊離した色素は水層に移る.

この反応はほとんど定量的に行なわれるゆえ, これを利用して, SH 化合物の定量が可能である.

2 試薬および装置

Ruhemann 紫水銀錯塩試薬: Moore, Stein の方法³⁾ によって調製した Ruhemann 紫ナトリウム塩の 0.005 % 水溶液に 1/1000M 塩化第二水銀を少過剰に加えたのち試験管型の分液ロート²⁾に約 5 ml ずつ分取し, イソプロピルエーテル 約 3 ml をそれぞれ加え水層が無色になるまで十分に振りまぜた. この操作により, 生じた錯塩はほとんど全部沈殿となって両液層の界面に析出した.

* 京都大学理学部化学教室: 京都市左京区吉田本町

そこで水層を捨て, 沈殿およびエーテル層を数回水で洗浄した. この沈殿およびエーテル溶液とともに試薬として使用した. この試薬は古くなると測定値が変動するので新しいものを使用する必要があるが, 1 回調製した試薬は, 錯塩がなくなるまで数回の分析に用いることができる.

試験管型分液ロート: 別報²⁾ 参照.

分光光度計: ベックマン DU 型分光光度計を使用した.

3 実験 法

試料は SH 基の濃度を 5~50 μM , pH を 5 に調節しておく. これを, 上記方法で調製した試薬の入った分液ロートに 3~5 ml 加えて振りまぜ, 水層に遊離して来た色素を蒸留水を対照として, 570 $\text{m}\mu$ で測定した.

この実験に際し, 水層の容積の変化は無視できる程度であるから, 測定値から直ちに試料溶液の SH 基の規定濃度を知ることができ, 用いた試料の液量がわかっていれば, 改めて定容操作を行なわなくても定量を行なうことができる.

4 結果および考察

4.1 検量曲線

本法による SH 化合物 (システイン) の検量曲線は Fig. 1 のようになった. 大体において直線になっているが, 原点付近で水平に曲り, 縦軸を切っている. これは Ruhemann 紫の水銀錯塩が若干解離して色素を遊離するためと考えられる. したがって, SH 濃度の低いところでは検量曲線を用いて定量を行なう必要がある.

Fig. 1 Standard curve for the determination of SH group†

† The blank value was not subtracted in the experiment

なお、システインの代わりに、チオ尿素や、チオ硫酸ナトリウムを用いた場合にも全く同様な結果が得られた。

4.2 pH の影響

pH 4 以下では Ruhemann 紫の分解が起り、pH 7 以上では錯塩が解離してしまう。したがって、この分析には pH 5 を選んだ。

4.3 タン白質の SH の定量

遊離の SH 基を持つタン白質の溶液を試料として上記の操作を行なうときは、低分子の SH 化合物の場合と同様に Ruhemann 紫の遊離が起ることが認められた。したがってその吸光度から、水銀何原子がタン白質と結合したかを知ることができるが、しかし、タン白質の性質

から考えて、その全部の SH 基が水銀と結合するとは考えられない。一般にタン白質の SH 基の数は定量の方法によって種々の値が得られるものであるが、本法による場合も、また他のどの方法による値とも異なった値が得られることがわかった。したがって、他の方法の場合と同様、本法によって得られた値も、それが何を意味するかは現在のところ全く不明である。

なお、この方法をタン白質の SH 基の定量に用いる場合、時として、錯塩の沈殿が水溶液層に分散してしまうなどの障害が起ることがあり、まだ種々の点で今後の検討が必要である。

終りにのぞみ、本研究に際し、懇切な御指導をいただいた京都大学理学部田中正三教授に感謝の意を表します。

文 献

- 1) F. P. Chinard, L. Hellerman: "Methods of Biochemical Analysis", 3rd Ed., Vol. 1, p. 1(1954), (Interscience Publishers Inc., New York).
- 2) 小沢恭一, 江頭 暁: 本誌, 11, 506 (1962).
- 3) S. Moore, W. H. Stein: *J. Biol. Chem.*, 176, 367 (1948).

☆

Spectrophotometric determination of sulfhydryl group with Ruhemann's purple complex. Kyoichi OZAWA and Satoru EGASHIRA (Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyoto University)

It was found that mercury complex of Ruhemann's purple [2-(1,3-dioxindan-2-yl)imino-1,3-indandione] reacted quantitatively with sulfhydryl group in several compounds such as thioglycolic acid, cysteine, thiourea, thiosulfate and protein, and liberated the free pigment.

15~150 mμ moles of sulfhydryl group (in concentration, 5~50 μM) were determined by the proposed spectrophotometry based on the above result.

(Received Oct. 11, 1961)

☆

☆