アルカリホスファターゼによる -ニトロフェニルリン酸の加水分解を利用した均一溶液からのコバルト共存下でのリン酸マグネシウムアンモニウムの沈殿生成

田口 茂，多賀 光彦，吉田 仁志，墓目清一郎*

(1973 年 8 月 13 日受理)

アルカリホスファターゼを利用する均一溶液からの沈殿生成法 (PFHS 法) により，マグネシウムをリン酸マグネシウムアンモニウムとして沈殿させる際の共存コバルトの挙動を追跡するとともに，コバルト共存下でマグネシウムを重量分析するための諸条件について検討した。コバルトはリン酸マグネシウムアンモニウムの結晶表面にリン酸塩として誘発的に析出し，マグネシウムの沈殿を汚染する傾向がある。しかし，アンモニア緩衝溶液を多量に共存させることにより，マグネシウムの定量値に影響を与えない程度にコバルトによる汚染を減少させることができた。多量のアンモニアの共存によるホスファターゼの触媒能の減少は，酵素の添加量を増加することによって補うことができる。

同量までのコバルトの共存下でマグネシウムを定量するためには試料溶液に pH 9.5 のアンモニア緩衝溶液を 20 ml, 0.4M *p*-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムをマグネシウムに対して 3 倍当量を添加，ついで 0.1% ホスファターゼを 6 ml 加え，水で 50 ml とし，30°C の恒温水そう中で 8 時間以上反応後，生成した沈殿を濾過，洗浄し，50°C で恒量が得られるまで乾燥する。本法によれば 10 mg のマグネシウムを 2.5~10 mg のコバルト共存下で 0.7% 以内の誤差で定量できる。

1 緒 言

酵素を用いる PFHS 法がいくつかの金属イオンの定量法として有用であることについてはすでに報告した^{1)~4)}。

マグネシウムについては，リン酸エステルの加水分解酵素であるアルカリホスファターゼによる *p*-ニトロフェニルリン酸の加水分解反応を利用し，リン酸マグネシウムアンモニウムとして重量分析する方法を提案した⁵⁾。その際コバルトやニッケルなどの共存がマグネシウムの定量値に著しい正の誤差を与えることについても述べたが，その沈殿の汚染に関する詳細については検討されなかった。

一般に沈殿の汚染は，沈殿生成過程中的他種イオンによる置換，吸蔵，主沈殿完成後のその表面への吸着，あるいは誘発沈殿などが原因として考えられる。

本報告においては，酵素を利用する PFHS 法によりリン酸マグネシウムアンモニウムの沈殿を生成させる際のコバルトによる沈殿の汚染状況，ならびにコバルトによる汚染を除去し，マグネシウムを精度よく定量するた

めの諸条件について検討した。

2 試薬および装置

2.1 試 薬

マグネシウムおよびコバルトの標準溶液：いずれも特級品の塩酸塩から調製し，EDTA 滴定によって標定した。

p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム (NPP)：特級品を水に溶解し，0.4M 溶液とした。

アルカリホスファターゼ溶液：牛の小腸から得られた Miles-Seravac 社製のものを使用時に水に溶解して 0.1% 溶液を調製した。

pH 9.5 緩衝溶液：5M アンモニア水と 5M 塩化アンモニウム溶液を混合調製した。

その他試薬はいずれも特級品を用いた。

2.2 装 置

分光光度計：日立 124 型分光光度計。

原子吸光度計：日立 208 型原子吸光度計。

3 定量操作

3.1 コバルト共存下のマグネシウムの定量操作

100 ml ビーカーにマグネシウムおよびコバルトのそれぞれ 10 mg 以下を含む試料をとる。これに緩衝溶液

* 北海道大学理学部化学教室：北海道札幌市北区北10条西4丁目

20 ml, 0.4M NPP 溶液をマグネシウムに対して 3 倍当量加える. よくかき混ぜながら 0.1% ホスファターゼ溶液 6 ml を加え, 水で 50 ml とする. 溶液の蒸発による減少を防ぐためにパラフィルムでビーカーをカバーし, 30°C の恒温水そうに 8 時間以上静置する. 生成した沈殿を G4 のガラスフィルターで濾過し, 洗浄のうち 50°C で乾燥し, ひょう量する. 重量分析係数は, 0.099065 である.

3.2 コバルトの挙動を探索するための操作

リン酸マグネシウムアンモニウム沈殿の生成過程におけるコバルトの挙動に関しては次の操作に基づいて検討した.

3.1 に準じ, 20 ml の目盛り付き共せん試験管にマグネシウム溶液, コバルト溶液, pH 9.5 緩衝溶液, NPP 溶液およびホスファターゼ溶液を順次加え, よく混ぜながら, 水で全液量を 20 ml とする. 同一初期条件で試料を数本調製し, 30°C の恒温水そう中に静置し, 一定時間ごとに一試料ずつ取り出し, 生成した沈殿を濾過, 洗浄する. 沈殿は塩酸に溶解し, 一定容量とする. 濾液には塩酸を加え酸性とする. 両溶液に含まれるマグネシウムおよびコバルトの量を原子吸光光度法により測定した.

4 実験結果および考察

4.1 コバルトの共沈殿現象

リン酸マグネシウムアンモニウムの生成に対するコバルトの挙動を知るために 11.8 mg のコバルトと 4.89 mg のマグネシウムを含む溶液を試料とし 3.2 の操作に従って沈殿中のマグネシウムおよびコバルトの量を求めた.

その結果を Fig. 1 の曲線 a に示した. 比較のために常法つまり, リン酸水素二ナトリウムを直接添加してリン酸マグネシウムアンモニウムを生成させた場合の結果を曲線 b に示した. 曲線 b 上の①はマグネシウムに対し 2 倍当量, ②は 3 倍当量となるようにリン酸水素二ナトリウムを加えた場合に得られたコバルト量を示してある.

Fig. 1 から明らかなように, PFHS 法によれば常法に比べ, コバルトによる汚染の程度はかなり低い. しかし, 両法に共通していることはマグネシウム塩の沈殿完成後, その沈殿を過剰のリン酸イオンが共存する溶液中に長時間放置することは新たな汚染を促す結果となることである. したがって, この場合には通常よく利用される熟成の操作は好ましくない.

マグネシウムを含まず, コバルトのみ存在する条件下

Fig. 1 Coprecipitation of cobalt

a : PFHS method; b : Conventional method with Na_2HPO_4 ; ① Two fold equivalent of Na_2HPO_4 to magnesium was added; ② Three fold equivalent of Na_2HPO_4 to magnesium was added; Mg : 4.89 mg; Co : 11.8 mg

で 3.2 に示した PFHS 法の操作を行なってもならコバルト塩の沈殿を生じなかった. このことから, 前記実験におけるコバルトによるマグネシウムの沈殿の汚染はリン酸マグネシウムアンモニウムの生成に伴う現象であることは明らかである. リン酸マグネシウムアンモニウムの沈殿完成後においてもコバルトによる汚染が増大するということを考えるなら誘発沈殿が起こっていることが予想される. これを確かめるために以下の実験を行なった. すなわち, コバルトについて $9.83 \times 10^{-3}M$, リン酸水素二ナトリウムについて $1.0 \times 10^{-2}M$, pH 9.5 のアンモニア緩衝溶液については液量 20 ml あたり 4 ml を含む溶液を調製し, これにあらかじめ PFHS 法によって生成し, 純水に分散させたリン酸マグネシウムアンモニウムの沈殿を添加する. 2 時間後に母液のコバルト濃度を測定し, リン酸マグネシウム塩共存の効果を検討した. 結果を Fig. 2 に示す.

Fig. 2 から明らかなように, 沈殿の添加量の増加とともに, 母液中のコバルト濃度は大きく減少する傾向がある.

リン酸マグネシウムアンモニウムは無色の沈殿であるが, この実験後の沈殿は淡紅色を呈しており, 沈殿の表

Fig. 2 Effect of magnesium ammonium phosphate on the induced precipitation of cobalt

Fig. 3 Photomicrographs of the precipitates
A: 0 hr; B: 2 hrs

面がコバルトによって汚染されていることは明らかである。この沈殿の光学顕微鏡写真を Fig. 3 に示した。

この淡紅色の沈殿を純水で洗浄を行なっても変化がなかったが、pH 9.5 の緩衝溶液にしばらく浸しておくとう色無色の沈殿が残留した。すなわち、リン酸マグネシウムアンモニウムの沈殿表面上に新たに析出したコバルト塩は沈殿を pH 9.5 の緩衝溶液に浸せきすることにより容易に溶出除去できた。以上のことから表面吸着以外に、コバルトの沈殿析出に対してリン酸マグネシウムアンモニウムが一種の誘発剤の働きをしていると推論できよう。

4.2 浸せきによる溶出効果

4.1 からわかるように、コバルトによる沈殿の汚染はマグネシウムの沈殿生成過程に起こるものと、沈殿の完成後に起こるものの二つが考えられる。沈殿完成後に誘発的に析出したコバルトの沈殿は濃いアンモニア緩衝溶液に浸せきすることにより容易に溶出できた。生成過程に混入したコバルトの汚染に対してこの操作が有効であるかどうかについて検討した。

3.1 の操作において、アンモニア緩衝溶液の添加量を 5 ml とした以外は条件を同一として生成させた沈殿を、一方は汙過、洗浄後乾燥し、また他方は一度汉過、洗浄したもの、5M のアンモニアと 5M の塩化アンモニウムを混合した緩衝溶液 (pH 9.5) に 1 日浸し、汉過、洗浄後乾燥し、それぞれの重量を測定して、マグネシウムを定量した。

Table I に示した結果からわかるように、浸せきの操作を行なっても定量値の正誤差の減少への効果は小さい。これは浸せきによる溶出効果がマグネシウムの沈殿表面に析出したコバルトの部分にしか及ばず、沈殿の内部に組み込まれた部分については効果を有しないためと考えられる。

Table I Effect of digestion on the determination of magnesium

	Mg taken (mg)	Mg found (mg)	Mg error (mg)
a	10.12	11.95	+1.83
b	10.12	11.43	+1.31

a: Without digestion; b: After digestion in conc. buffer soln. for one day

4.3 アンモニア緩衝溶液の添加による汚染の除去

沈殿生成過程におけるコバルトの汚染を除去するためにマスキング剤の添加を試みた。

EDTA, シアン化カリウムなどはマグネシウムの沈殿生成を不完全にしたり,あるいは酵素の活性を阻害するなど好ましくなかった. アンモニアと塩化アンモニウムの緩衝溶液はリン酸マグネシウムアンモニウムの溶解度を減少させるとともに, コバルトのマスキング剤としても有効であることが認められた.

Fig. 4 は, マグネシウム 4.89 mg に対してコバルト 11.8 mg が共存する溶液について 3.2 の操作に従い, 緩衝溶液の添加量を種々変化させ, このことがコバルトによる汚染の除去に与える効果を検討した結果である.

Fig. 4 Effect of amounts of buffer solution on the coprecipitation of cobalt

Mg : 4.89 mg; Co : 11.8 mg; a : 2 hrs; b : 8 hrs

全液量を 20 ml とするとき緩衝溶液を 8.0 ml 添加すればコバルトによる汚染はほとんど除去できる. 全液量を 50 ml としたマグネシウムの定量操作に対して 20 ml の緩衝溶液添加が適当であった.

4.4 コバルト塩の組成

コバルトがどのような形で存在しているかを知るために沈殿の組成を検討した. すなわち, 3.2 の操作によって生成させた沈殿中のマグネシウムとコバルトを原子吸光法で, アンモニウムイオンをネスラー試薬による吸光光度法で定量した. またリン酸イオンは濃アンモニア緩衝溶液中より, リン酸マグネシウムアンモニウムとして再沈殿し, 塩酸で溶解のち原子吸光法によりマグネシ

ウムを測定することから求めた.

それらの結果, 沈殿の組成は $(\text{Mg} + \text{Co}) : \text{NH}_4^+ : \text{PO}_4^{3-} = 1 : 1 : 1$ であった.

4.5 反応時間

多量のアンモニアの共存は一方ではマスキング剤としての効果を示すが, 他方マグネシウム塩の見かけの生成速度を小さくする. たとえば, 3.2 の操作において緩衝溶液の添加量を 2~8 ml まで増加させると 2 時間後の沈殿の生成率は 90~32% まで減少した.

このような沈殿生成率の減少は多量のアンモニアの存在が, 酵素の作用を阻害するためと考えられる. このことを確かめるためにアンモニア緩衝溶液の添加量を変えた $8 \times 10^{-4} M$ の NPP 溶液に, ホスファターゼ 0.1 mg を加え, 加水分解により生成した *p*-ニトロフェノールの量を 400 nm で吸光度測定した.

Fig. 5 Effect of buffer solution on the activity of alkaline phosphatase

Reaction time : 2 hrs

Fig. 5 の結果が示すように, アンモニア緩衝溶液の添加量の増大とともに明らかに酵素の作用が阻害されている.

これはホスファターゼ中にあるアポ酵素に含まれる亜鉛が, 多量に存在するアンモニアの作用を受けるためと推定される⁶⁾. そこで, 一定時間以内で沈殿を完成させるために, 緩衝溶液を多量に添加した場合に, ホスファターゼも多量に添加することを試みた. 3.1 の定量操作に従い, 種々条件を変え, リン酸マグネシウムアンモニウムの沈殿生成率を求めた結果を Fig. 6 に示した.

Fig. 6 Precipitation of magnesium ammonium phosphate

	0.4M NPP	Buffer solution	Enzyme	Mg
a	3 ml	20 ml	6 mg	10.12 mg
b	3	20	5	"
c	3	16	3	"
d	6	20	3	"

緩衝溶液を 20 ml 添加したときでも, 酵素を 6 mg 以上加えると, 反応時間 8 時間以上でリン酸マグネシウムアンモニウムが定量的に沈殿した。

4.6 コバルト共存下におけるマグネシウムの定量

種々の条件下でのマグネシウムの定量結果の 1 例を Table II に示す。

Table II Determination of magnesium in the presence of cobalt

Sample No.	Buffer soln. (ml)	Enzyme (mg)	Reaction time (hr)	Mg found (mg)	Mg error (mg)	Error (%)
1 ⁵⁾	10	3	8	12.04	+1.92	+19.0
2 ¹⁾	20	3	8	8.80	-1.32	-13.0
3 ⁴⁾	20	3	24	10.32	+0.20	+1.98
4 ³⁾	15	3	24	10.47	+0.35	+3.46
5 ³⁾	15	5	10	10.58	+0.46	+4.55
6 ⁴⁾	20	5	8	10.10	-0.02	-0.19 _s
7 ³⁾	20	5	10	10.14	+0.02	+0.19 _s
8 ³⁾	20	6	8	10.19	+0.07	+0.69 ₂

† Figure in parenthesis is the number of experiments. Mg : 10.12 mg; Co : 10.0 mg; 0.4M NPP : 3 ml; Reaction temp. : 30°C

これまでの検討結果から 3・1 の操作に従ってマグネシウムを定量した。その結果をコバルトの共沈殿量とともに Table III に示す。

また, コバルト量を変化させた場合の結果を Table IV に示す。マグネシウムに対し半量以下のコバルトが

Table III Determination of magnesium in the presence of cobalt

Mg taken (mg)	Mg found (mg)	Mg error (mg)	Mg in filtrate (mg)	Co in ppt (mg)
10.12	10.17	+0.05	0.01	0.12
	10.21	+0.09	0.03	0.10
	10.16	+0.04	0.01	0.14
	10.24	+0.12	0.01	0.12
	10.17	+0.05	0.02	0.14
Mean	10.19	+0.07	0.01 ₆	0.12 ₄
		Std. dev. : 0.034 mg		
		C. V. : 0.33		

Table IV Determination of magnesium in the presence of cobalt

Mg taken (mg)	Co added (mg)	Mg found (mg)	Mg error (mg)	Co in ppt (mg)
10.06	5.0	10.06	0.00	0.06
		10.10	+0.04	0.07
		10.11	+0.05	0.06
10.06	2.5	10.03	-0.03	0.02
		10.03	-0.03	0.04

共存しても, 緩衝溶液の添加量を増大することによってマグネシウムを定量的に沈殿させることができた。

5 結 語

酵素反応を利用する PFHS 法によればリン酸マグネシウムアンモニウムに対するコバルトの汚染は, 常法による場合と比べはるかに小さい。

PFHS 法におけるマグネシウム塩に対するコバルトの汚染は沈殿の生成過程に起こるものと, 完成後に起こるものとの二つの型がある。沈殿の完成後におけるコバルトによる汚染はマグネシウム塩によって誘発的にコバルトリン酸塩が析出するのが原因と考えられる。このコバルト塩は濃いアンモニア緩衝溶液に浸せきすることにより容易に除去される。しかし, 沈殿生成過程においてリン酸マグネシウムアンモニウムの結晶内に組み込まれたコバルトについてはこの操作では除去されない。沈殿生成を濃いアンモニア緩衝溶液存在下で行なわせることにより, コバルトの汚染を減少させうる。

本法によれば同量程度のコバルトを含む 10 mg のマグネシウムを 0.7% 程度の誤差で, 半量以下なら実験誤差内で定量が可能である。

文 献

- 1) S. Hikime, H. Yoshida, M. Taga : *Talanta*, **14**, 1417 (1967).
- 2) 多賀光彦, 吉田仁志, 墓目清一郎 : 本誌, **17**, 1252 (1968).

- 3) 田口 茂, 多賀光彦, 吉田仁志, 藁目清一郎: 同上, **20**, 570 (1971).
- 4) S. Hikime, H. Yoshida, M. Taga, S. Taguchi: *Talanta*, **19**, 569 (1972).
- 5) S. Hikime, H. Yoshida, M. Taga, S. Taguchi: *ibid.*, in press.
- 6) A. Townshend, A. Vaughan: *ibid.*, **17**, 289 (1970).

Precipitation of magnesium ammonium phosphate from homogeneous solution by means of hydrolysis of *p*-nitrophenylphosphate with an alkaline phosphatase in the presence of cobalt.
Shigeru TAGUCHI, Mitsuhiko TAGA, Hitoshi YOSHIDA and Seiichiro HIKIME (Department of Chemistry, Faculty of Science, Hokkaido University, Nishi 8-chome, Kita 10-jo, Kita-ku, Sapporo-shi, Hokkaido)

In the course of precipitation of magnesium ammonium phosphate from homogeneous solution by means of hydrolysis of *p*-nitrophenylphosphate with an alkaline phosphatase in the presence of cobalt, the behavior of cobalt and the conditions for the quantitative precipitation of magnesium in the presence of cobalt were studied.

Precipitates of magnesium ammonium phosphate are contaminated with a considerable amount of cobalt under such conditions that cobalt does not precipitate in the absence of magnesium. When a certain amounts of precipitates of magnesium ammonium phosphate, which was prepared separately, was added to a solution containing cobalt (II) ions, phosphate ions, and ammonia-ammonium chloride, the concentration of cobalt in the mother liquid was decreased after two hours and cobalt phosphates were precipitated on the surfaces

of the magnesium ammonium phosphates. This fact suggests that precipitation of cobalt phosphates is induced by the magnesium salt.

When magnesium ammonium phosphates were precipitated from homogeneous solution in the presence of cobalt, two types of contamination with cobalt were observed; contamination due to inclusion of cobalt ion in the lattice of magnesium ammonium phosphate and that due to secondary precipitation of cobalt phosphate on the surface of the magnesium precipitate. The contamination of the first type is not removed easily by digestion of the precipitate in concentrated ammonia-ammonium chloride buffer solution, while the contamination of the second type can be almost removed.

The effects of EDTA and potassium cyanide as masking reagent were studied; but both agents prevented quantitative precipitation of the magnesium ammonium phosphate and inhibited the enzyme action.

Addition of concentrated ammonia-ammonium chloride buffer solution is very effective to decrease the contamination. Although it inhibits the enzyme action slightly, quantitative precipitation of magnesium ammonium phosphate can be satisfactorily achieved by using a suitable excess amount of the enzyme.

The following procedure is recommended for determining 10 mg of magnesium in the presence of less than 10 mg of cobalt. Add 20 ml of ammonia-ammonium chloride buffer solution (pH 9.5), 3 ml of 0.4 *M* disodium *p*-nitrophenylphosphate solution, and 6 ml of 0.1% alkaline phosphatase solution to the sample solution, and dilute to 50 ml with water. Keep the solution at 30°C for more than 8 hours. Filter the precipitate, dry it at 50°C, and weigh as $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. The relative error is less than 0.7%.

(Received Aug. 13, 1973)