

2,2'-ジピリジルケトンアミノエチルイミンによる 鉄(II)の吸光光度定量

加藤 武[®], 加納 清, 佐々木洋明*

(1983 年 5 月 9 日受理)

2,2'-ジピリジルケトン 1 モルとエチレンジアミン 1 モルとから得られた Schiff 塩基, すなわち 2,2'-ジピリジルケトンアミノエチルイミン (DPAI と略記) が, L-アスコルビン酸塩の存在で鉄(II)と反応して青色の錯体を生成することを認めたので, この DPAI を用いる鉄(II)の吸光光度定量法について検討した. 鉄(II)を含む試料溶液に L-アスコルビン酸ナトリウム, エチレンジアミン水溶液を加え, 溶液の pH を 7.0~10.1 に調整し, これに DPAI のメタノール溶液を加えて煮沸し, 冷却後, 呈色した溶液の 608 nm における吸光度を測定する. 検量線は鉄(II)の (0.1~5.0) $\mu\text{g/ml}$ の範囲で Beer の法則に従い, 検量線より算出した錯体のモル吸光係数は $1.71 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ である. 生成した錯体は, 連続変化法, モル比法及び単離した錯体の元素分析値より, 鉄(II)と Schiff 塩基が 1:2 の組成比を有することを認めた. 又 2,2'-ジピリジルケトン 2 モルとエチレンジアミン 1 モルとから得られた Schiff 塩基を用いても同様の結果が得られた.

1 緒 言

鉄(II)の吸光光度定量法は多数報告されているが, 2,2'-ジピリジル法¹⁾, 1,10-フェナントロリン法²⁾が, その呈色の安定性, 操作の簡便性などのためよく使用されている. しかしこれらの方法は感度がやや小さい. 一方感度の大きな定量法として 2-ニトロソ-5-(N-プロピル-N-スルホプロピルアミノ)フェノール³⁾, テトラフェニルボルフォントリスルホン酸塩⁴⁾, パソフェナントロリン⁵⁾などを用いる方法が報告されているが, 日常の分析にはやや不便さがある.

著者らは比較的操作が簡単でしかも 1,10-フェナントロリン法よりも感度の大きな鉄(II)の吸光光度法を見い出そうと試み, 各種の Schiff 塩基を試薬とする方法について調べた. その結果, 等モルの 2,2'-ジピリジルケトンとエチレンジアミンとから得られた Schiff 塩基, すなわち 2,2'-ジピリジルケトンアミノエチルイミン (DPAI と略記) が L-アスコルビン酸ナトリウムの存在下で, 中性から微アルカリ性溶液中で鉄(II)と反応して青色の錯体を生成することを認めたので, この DPAI を用いる鉄(II)の吸光光度定量法について検討した. この方法は比較的操作が容易で, 呈色溶液も安定であ

り, 測定波長の 608 nm において試薬空試験値も小さく, 測定感度も 1,10-フェナントロリン法の約 1.5 倍有するなど良好な結果を得たので報告する.

2 実 験

2.1 試薬及び標準溶液の調製

2.1.1 DPAI の合成 2,2'-ジピリジルケトン 3.7 g をメタノール 50 ml に溶解し, これにエチレンジアミン 1.2 g を加え, 還流下で約 1 時間加熱する. この溶液を減圧濃縮し, 冷却後生成した結晶をメタノールより再結晶して白色の結晶を得た. この結晶は m. p. 109 °C であり, 元素分析の結果は C, H, N の分析値と計算値がよく一致した. $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_4$ としての計算値 (分析値): C % 69.00 (69.15), H % 6.24 (6.23), N % 24.76 (24.85).

2.1.2 DPAI 溶液の調製 2.1.1 で合成した DPAI の結晶 0.23 g をメタノール 1 l に溶解して 10^{-3} M 溶液を調製した.

2.1.3 鉄(II)標準溶液の調製 特級硫酸鉄(II)アンモニウム $\{(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}\}$ 0.1755 g を採り, これを 0.1 N 塩酸 500 ml に溶かして鉄(II)の濃度が 50 $\mu\text{g/ml}$ の原液を調製し, この原液を使用直前に適宜水で希釈して用いた.

2.1.4 エチレンジアミン溶液の調製 エチレンジア

* 近畿大学理工学部応用化学科: 大阪府東大阪市小若江 3-4-1

ミン 20 g に水 20 ml を加え、濃塩酸 40 ml を加えてエチレンジアミンの一部を中和し、25 % 溶液として用いた。

2.1.5 L-アスコルビン酸ナトリウム溶液の調製

L-アスコルビン酸ナトリウム 10 g を水 100 ml に溶解し、10 % 溶液として用いた。

2.2 装置

吸収スペクトルの測定には日立製 323 型自記分光光度計を、吸光度の測定には島津製 QV 50 型分光光度計を用い、実験にはすべて光路長 1 cm の石英セルを用いた。

pH 測定には柳本製 pH-66A 型 pH メーターを使用した。

2.3 定量操作

鉄(II)を含む試料溶液一定量を採り、これに L-アスコルビン酸ナトリウム溶液 1 ml、エチレンジアミン溶液 2 ml、DPAI 溶液 10 ml を加え、更に緩衝液を加えて溶液の pH を 7.0~10.1 に調整した後この溶液を約 1 分間煮沸する。冷却後 50 ml メスフラスコに移し、標線まで水で希釈する。この溶液の 608 nm における吸光度を試薬空試験液を対照として測定し、検量線より鉄(II)の濃度を求める。

3 結果

3.1 吸収スペクトル

鉄(II) 2 μ g/ml の溶液について 2.3 の定量操作に従って操作し、得られた錯体溶液の吸収スペクトルを測定した。その結果を Fig. 1 に示す。生成した錯体は可視部に 2 個の吸収帯を有しているが、608 nm に極大を有する吸収帯は吸光度も大であり、かつ、この波長では試

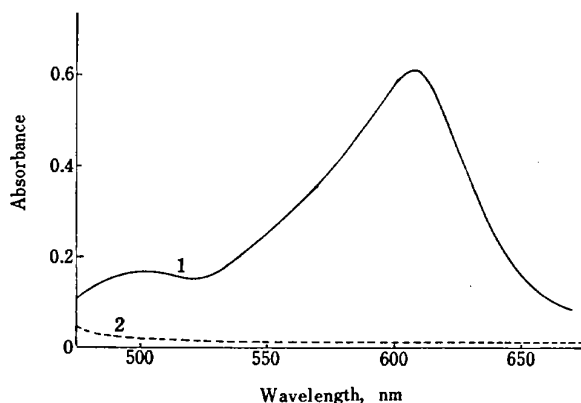


Fig. 1 Absorption spectra of 2,2'-dipyridylketone aminoethylimine (DPAI)-iron(II) complex
[Fe(II)]: 2 μ g/ml; pH: 9.1; 1: DPAI-Fe(II) complex against reagent blank; 2: Reagent blank

薬空試験値も小さいため、定量には 608 nm を測定波長と定めた。

3.2 pH の影響

鉄(II) 2 μ g/ml の溶液に緩衝液を加えて各種 pH の溶液を調製し、2.3 の定量操作に従って操作し、反応溶液の pH が吸光度に及ぼす影響について検討した。その結果、Fig. 2 に示すように pH 7.0~10.1 の範囲で一定の吸光度が得られた。pH 6.9 以下では錯形成が不完全であり、pH 10.2 以上では他の化合物を生成するためか色調がやや異なる。従って定量には溶液の pH を 7.0~10.1 に調整する。

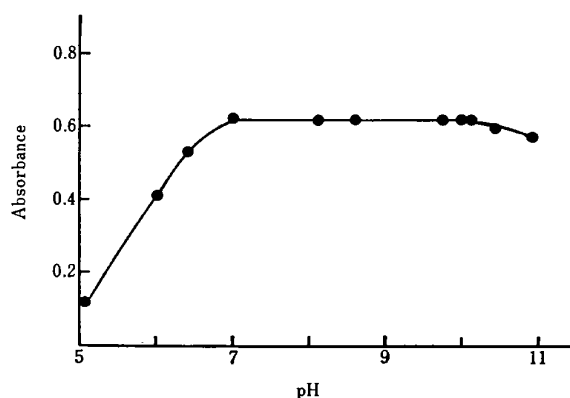


Fig. 2 Effect of pH on the absorbance
[Fe(II)]: 2 μ g/ml; [DPAI]: 2×10^{-4} M

3.3 放置時間の影響

鉄(II) 2 μ g/ml の溶液について 2.3 の定量操作に従って操作し、反応溶液の放置時間が吸光度に及ぼす影響について検討した。Fig. 3 に示すように反応溶液を室温で放置すると溶液の吸光度は時間の経過とともに上昇

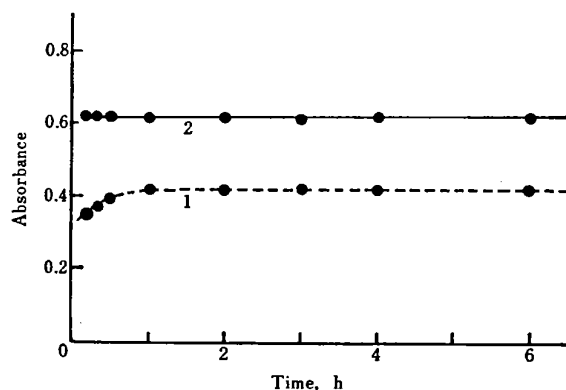


Fig. 3 Effect of standing time after addition of reagent
1: Left at room temperature (25 °C); 2: Boiled gently for one minute

し, 一定の吸光度を示すのに 1 時間を要した. 一方反応溶液を 1 分程度煮沸したものは, 室温まで冷却した後直ちに測定しても一定の吸光度が得られ, かつ, 室温で放置したものよりもかなり吸光度が高い. 反応溶液を室温で放置した場合, 鉄(II)は多量に存在するエチレンジアミンと反応して一部エチレンジアミン-鉄(II)錯体を生成し, これが鉄(II)と DPAI との反応を妨げて吸光度が低くなるものと思われる. しかし溶液を煮沸すれば鉄(II)と DPAI の反応がほぼ完全に進行するため, 吸光度は大となり, かつ一定の値を示すようになると考えられる. このことは得られた吸光度より算出した DPAI-鉄(II)錯体のモル吸光係数が, 4 に示すように単離した錯体のモル吸光係数とほぼ一致することから明らかである. なお煮沸を 10 分程度続けても, 緩衝液の一部の成分の蒸発による溶液の pH の大きな変化がなければ吸光度の変化は認められなかった.

3.4 試薬量の影響

鉄(II) 2 $\mu\text{g/ml}$ の溶液に種々の量の DPAI 溶液を加えて 2.3 に従って操作し, 試薬量が吸光度に及ぼす影響について検討した. Fig. 4 に示すように試薬量 4.5 ml 以上で一定の吸光度が得られた. この値はモル比で鉄(II)の約 2.4 倍に相当する. 従って定量には試薬量は鉄(II)の 2.4 倍以上加えればよい. 又試薬の大過剰は何ら妨害しなかった.

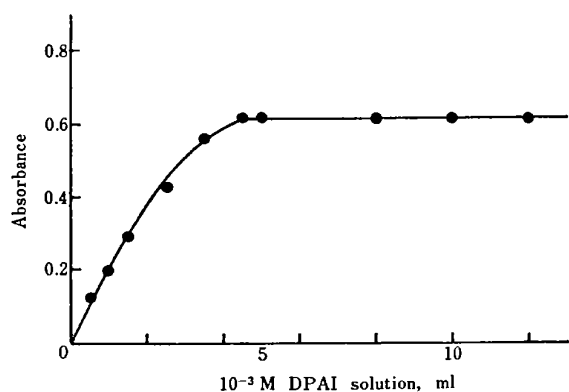


Fig. 4 Effect of amount of DPAI

[Fe(II)]: 2 $\mu\text{g/ml}$; pH: 9.1; Total volume: 50 ml

3.5 還元剤の影響

鉄(II)の吸光光度定量において還元剤として L-アスコルビン酸, ヒドロキシルアミンなどがしばしば用いられる. 本定量法においては L-アスコルビン酸の存在が必要である. 鉄(II) 2 $\mu\text{g/ml}$ の溶液に種々の量の L-アスコルビン酸ナトリウムを加えて 2.3 に従って操作し,

L-アスコルビン酸ナトリウム量が吸光度に及ぼす影響について検討した. その結果 10% L-アスコルビン酸ナトリウムを 0.2 ml (溶液全体として 0.04%) 以上加えることにより一定の吸光度が得られた. 又 L-アスコルビン酸ナトリウムの大過剰は妨害しなかった.

鉄(II)の酸化を防ぐために反応溶液中に各種還元剤を加えた場合と, 加えない場合の吸光度を比較した. その結果 Table 1 に示すように L-アスコルビン酸ナトリウムを含んだものが最高の吸光度を示した. なお, ヒドロキシルアミン, ヒドラジンの存在は DPAI を分解してオキシム, アジンなどを形成するため特に吸光度が低くなったものと思われる.

Table 1 Effect of reductants on the determination of iron(II)

Reductant	Concentration	Absorbance
None		0.125
Hydroxylamine hydrochloride	1 %	0.079
Hydrazine sulfate	1 %	0.005
Sodium hyposulfite	1 %	0.409
Sodium L-ascorbate	1 %	0.615

Iron(II) concentration: 2 $\mu\text{g/ml}$

3.6 エチレンジアミン量の影響

鉄(II) 2 $\mu\text{g/ml}$ の溶液に種々の量のエチレンジアミンを加えて 2.3 の定量操作に従って操作し, エチレンジアミン量が吸光度に及ぼす影響について検討した. その結果エチレンジアミンが存在しない場合はやや低い吸光度を示すが, 0.5 ml 以上加えれば一定の吸光度が得られた. エチレンジアミンの大過剰は妨害しない. エチレンジアミン添加の場合, 室温ではエチレンジアミン-鉄(II)錯体を生成するため, 無添加のときよりかえって吸光度が低い. しかし加熱すればこのエチレンジアミン-鉄(II)錯体は分解して, 3.3 に示すように DPAI-鉄(II)錯体をほぼ完全に生成して一定の吸光度を示す. 一方無添加の場合はこれより吸光度が (5~10)% 程度低い. このことはエチレンジアミンが存在しない場合は生成した錯体の一部が解離するが, エチレンジアミンの存在がこの解離を抑制するためと考える.

なおエチレンジアミン水溶液をそのまま使用すると反応溶液の pH を変化させるおそれがあるため, エチレンジアミンを一部中和したものをを用いた.

3.7 検量線

以上の基礎的諸条件の検討結果から 2.3 の定量操作を定め, 検量線を作成した. 検量線は鉄(II)の (0.1~

5.0 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で原点を通る直線となった。検量線より算出した錯体の 608 nm におけるモル吸光係数は $1.71 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であり、通常よく用いられる 1,10-フェナントロリン法の約 1.5 倍の感度がある。又鉄(II) 2 $\mu\text{g/ml}$ の溶液について 10 回繰り返し実験を行い、得られた吸光度の変動係数は 0.57 % であった。

3.8 共存イオンの影響

鉄(II) 2 $\mu\text{g/ml}$ の溶液に種々の塩類を共存させ、本定量法における共存イオンの影響について検討した。共存イオンが存在しない場合の吸光度 0.615 に対して誤差が $\pm 2\%$ 以内のものを共存イオンの許容量とした。カルシウム(II)、マグネシウム(II)、亜鉛(II)、硝酸イオン、硫酸イオン、ヨウ化物イオン、臭化物イオン、酢酸イオン、リン酸イオン、炭酸イオン、シュウ酸イオン、及びクエン酸イオンの共存は 500 $\mu\text{g/ml}$ でも許容されたため、これらが妨害しないものと考えてそれ以上の濃度では測定しなかった。Table 2 に見られるようにクロム(III)、銅(II)、コバルト(II)などは許容量が特に小さい。しかしマスキング剤としてクエン酸アンモニウムを用いると、これら妨害イオンの許容量を大きくすることができる。なおシアン化物イオン、硫化物イオンの存在は妨害する。

Table 2 Effect of diverse ions

Ion	Tolerance limit ($\mu\text{g/ml}$)
Ni(II)	50 (100)
Pb(II)	50 (200)
Mn(II)	20 (100)
Al(III)	10 (300)
Co(II)	5 (20)
Cu(II)	2 (20)
Cr(III)	1 (10)
NO_2^-	300
SO_3^{2-}	200

Values in parenthesis are those obtained in the presence of ammonium citrate (ca. 1 %) as a masking reagent; $[\text{Fe}]$: 2 $\mu\text{g/ml}$

4 生成した錯体についての検討

本定量法で生成した錯体について検討するため連続変化法、錯体の単離及びその元素分析、その他の実験を行った。

鉄(II) 溶液及び DPAI 溶液のそれぞれ所定量を採って 2.3 の定量操作に準じて操作し、連続変化法を行った。その結果 Fig. 5 に示すように、鉄(II) と DPAI が 1:2 の組成比のところでピークを示した。又 Fig. 4 はモル比法に相当するものであり、やはり錯体が 1:2

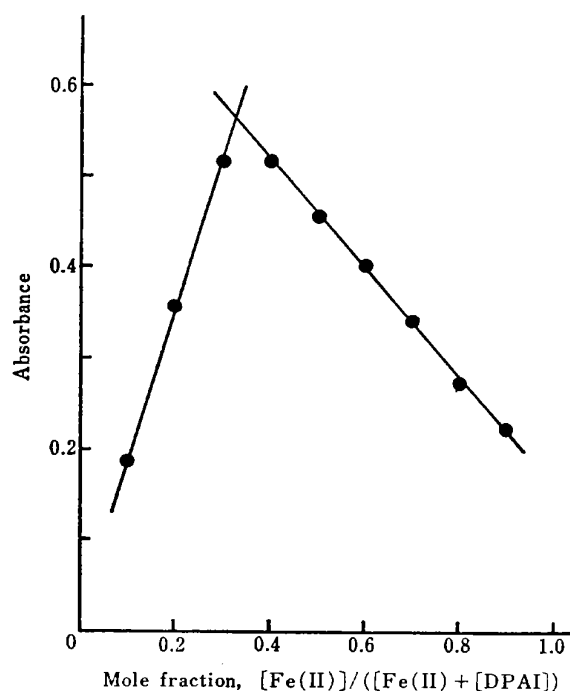


Fig. 5 Continuous variation method

$[\text{Fe(II)}] + [\text{DPAI}] = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$; pH 9.1

の組成比を有することを示している。更にこの組成比を確認するため錯体を単離した。すなわちやや濃厚な鉄(II) 溶液及び DPAI 溶液を 1:2 の割合で混合し、L-アスコルビン酸ナトリウム溶液、エチレンジアミン溶液を加えて定量操作に準じて反応させる。この溶液に過塩素酸ナトリウムを加えて減圧濃縮し、紫青色の結晶を析出させた。この結晶を水から再結晶して DPAI-鉄(II) 錯体を過塩素酸塩として単離した。この錯体の C, H, N を分析した結果、錯体中の鉄と DPAI との組成比は 1:2 であり、連続変化法、モル比法の結果と一致した。 $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_8\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$ としての計算値(分析値): C % 44.15 (44.11), H % 3.99 (4.07), N % 15.84 (15.71)。

又この単離した錯体を水に溶かし、これにエチレンジアミン溶液、L-アスコルビン酸ナトリウム溶液を加えたものについて、608 nm における吸光度を空試験溶液を対照として測定してモル吸光係数を求めた。その結果、単離錯体のモル吸光係数は $1.75 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であり、検量線から算出したモル吸光係数よりやや高い。単離した錯体は DPAI と鉄(II) との反応が完結しているのに対し、本定量法では鉄(II) の濃度が非常に小さいため DPAI との反応が厳密には完結せず、ある平衡状態でとどまっているものと考えられ、その結果両者のモル吸光係数に 2 % 程度の差を生じたものであろう。

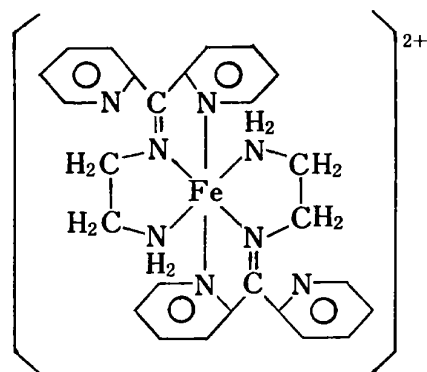
2,2'-ジピリジルケトンとエチレンジアミンとのシッ

フ塩基は, 本実験で使用した DPAI 以外に 2 モルの 2, 2'-ジピリジルケトンと 1 モルの エチレンジアミンとから得られた 2, 2'-ジピリジルケトンエチレンジイミン (DPEI と略記) も当然考えられる. この DPEI を本実験の DPAI と類似の方法で合成し, 得られた結晶の C, H, N の分析値は計算値とよく一致した. $C_{24}H_{20}N_6$ としての計算値 (分析値): C % 73.45 (73.55), H % 5.13 (5.07), N % 21.42 (21.61).

この DPEI をメタノールに溶かして 10^{-3} M 溶液を作り, これを試薬として鉄(II) 試料溶液について 2.3 の定量操作に従って操作したところ, DPAI を使用した場合と全く同じ結果を得た. この DPEI と鉄(II) とから合成, 単離した錯体は DPAI-鉄(II) 錯体と同様紫色の結晶であり, その C, H, N の分析値は前記の DPAI-鉄(II) 錯体の分析値と一致した. 又この DPEI の赤外吸収スペクトルはアミノ基に基づく吸収帯を有しないが DPAI は 3275 cm^{-1} 付近に鋭い吸収帯を有している. 又 DPAI-鉄(II) 錯体, DPEI より合成した鉄(II) 錯体はいずれも 3260 cm^{-1} 付近に小さい吸収帯, 3170 cm^{-1} に中程度の強度の吸収帯を有し, ($4000\sim 650$) cm^{-1} にわたる赤外吸収スペクトルは両錯体が一致した. 従って DPEI を本定量法で使用しても, これが過剰のエチレンジアミンと反応して分解し, 2 モルの DPAI が生成してこれが鉄(II) と反応するものと考えられる.

更に生成した錯体の構造について検討するため, DPAI と類似の構造を有する Schiff 塩基を合成し, これらを用いて本定量法と同じ操作で鉄(II) との反応について調べた. すなわち, フェニルピリジルケトンアミノエチルイミン及びピリジン-2-アルデヒドアミノエチルイミンはいずれも錯体を生成して青色溶液を与えた. 一方ジフェニルケトンアミノエチルイミンは呈色せず錯体を生成しない. 又 DPAI の 2 個のピリジン環の錯体形成能を調べるため, 2, 2'-ジピリジルケトンについてエチレンジアミンを除いて同様に操作したが呈色しなかった. 従って本定量法で生成した錯体は DPAI の 1 個のピリジン環の窒素が反応に関与していることは明らかである. 更に先の赤外吸収スペクトルにおいて, DPAI-鉄(II) 錯体には 3170 cm^{-1} 付近に DPAI に存在しない吸収帯があり, これは DPAI の 3275 cm^{-1} 付近のアミノ基に基づく吸収帯が錯体形成によりシフトしたものと考えられる.

これらのことから本定量法で使用した DPAI は 3 座配位子として作用し, その生成した錯体は次のような構造を有するものと考えられる.



終わりに, 元素分析について御援助いただいた大阪大学工学部プロセス工学科庄野利之教授及び同研究室の方々に感謝する.

(1981 年 10 月, 第 12 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会において一部講演)

文 献

- 1) 無機応用比色分析編集委員会編: “無機応用比色分析”, 第 2 巻, p. 338 (1974), (共立出版).
- 2) 無機応用比色分析編集委員会編: “無機応用比色分析”, 第 2 巻, p. 334 (1974), (共立出版).
- 3) 斎藤幹彦, 堀口大吉, 喜納兼勇: 分化, **30**, 635 (1981).
- 4) 野村俊明, 織田雅信: 分化, **28**, 377 (1979).
- 5) G. F. Smith, W. H. McCurdy, Jr., H. Diehl: *Analyst* (London), **77**, 4181 (1952).

☆

Spectrophotometric determination of iron(II) with 2, 2'-dipyridylketone aminoethylimine. Takeshi KATO, Kiyoshi KANO, and Hiroaki SASAKI (Department of Applied Chemistry, Faculty of Science and Technology, Kinki University, 3-4-1, Kowakae, Higashi-Osaka-shi, Osaka)

Use of 2, 2'-dipyridylketone aminoethylimine (DPAI), which is prepared by refluxing an equimolar mixture of 2, 2'-dipyridylketone and ethylenediamine, in the presence of sodium L-ascorbate is proposed for a spectrophotometric determination of iron(II). DPAI reacts with iron(II) to form a water soluble complex, which has an absorption maximum at 608 nm. The calibration curve obeys Beer's law over the concentration range from 0.1 $\mu\text{g/ml}$ to 5 $\mu\text{g/ml}$ of iron(II) at 608 nm in a range of pH 7.0~10.1. The apparent molar absorption coefficient of the complex is $1.71 \times 10^4\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. The combining ratio of iron and DPAI in the complex was confirmed to be 1:2 by both the continuous variation method and elementary analysis on the isolated DPAI-iron(II) complex. Following procedure are recommended for the determination of iron(II); To a sample solution, 1 ml of 10 % sodium L-ascorbate, 2 ml of 25 % ethylenediamine, 10 ml of 10^{-3} M DPAI are added, and pH is adjusted to 7.0~10.1 with acetate or ammonia buffer solution. Being boiled gently for one minute, and then cooled down to room temperature, the solution is made up

to 50 ml with water. The absorbance is measured at 608 nm against reagent blank.

(Received May 9, 1983)

Keyword phrases

spectrophotometry of iron(II) with 2,2'-dipyridylketone aminoethylimine; 2,2'-dipyridylketone aminoethylimine-iron(II) complex.

ジエチルアミノエチル-セファデックスを用いた尿素存在下におけるたん白質のイオン交換クロマトグラフィー

門屋 利彦[®], 奥山 典生*

(1983 年 6 月 4 日受理)

イオン交換樹脂としてジエチルアミノエチル (DEAE)-セファデックス A-50 を用いてたん白質のイオン交換クロマトグラフィーにおける尿素の影響, 特にたん白質の高次構造にあまり変化を及ぼさない程度の尿素の存在による影響についての検討を行った. ウシ血清アルブミンを試料として検討を行った結果, 尿素の存在によってたん白質と DEAE-セファデックスとの相互作用は低下し, 尿素濃度 0 から 4 M の間では, 尿素 1 M 当たり塩化ナトリウム 0.02 M に相当した. 又ヒト血清を試料として 2 M 尿素存在下でのイオン交換クロマトグラフィーを行った結果, 大きな影響はみられず, 未変性の血清と同様のイオン交換クロマトグラフィー像を与えることが分かった. 更に 2 M 尿素によって抽出されるグリア繊維性酸性たん白質などの脳の繊維性たん白質について, 2 M 尿素存在下におけるイオン交換クロマトグラフィーを適用した.

1 はじめに

Paléus ら¹⁾がイオン交換クロマトグラフィーを初めてたん白質に適用してチトクローム c を精製して以来, イオン交換クロマトグラフィーはたん白質の分離・精製において最も重要かつ有効な方法として用いられてきた. 近年では構造たん白質などの不溶性たん白質を尿素を用いて抽出した後, 尿素存在下におけるイオン交換クロマトグラフィーを用いて分離・精製することが試みられている^{2)~5)}. しかし, たん白質のイオン交換クロマトグラフィーにおける尿素の存在による影響についての基礎的な検討は, ほとんど行われていない. そこでイオン交換樹脂としてジエチルアミノエチル (DEAE)-セファデックス A-50 を用い, 免疫グロブリン G と血清アルブミンについて尿素の存在による影響について検討した. 更に血清のたん白質と 2 M 尿素によって初めて抽出される

脳内に存在するグリア繊維性酸性たん白質 (GFA) などの繊維性たん白質について 2 M 尿素存在下での DEAE-セファデックス A-50 クロマトグラフィーを適用した.

2 実験

2.1 試薬

リン酸第一カリウム, リン酸第二カリウム, 尿素, 塩化ナトリウム, エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 (EDTA) は和光純薬製特級を用いた. 電気泳動には, 市販特級あるいは電気泳動用特製試薬を使用した. ウシ血清アルブミン (BSA) は ICN Pharmaceuticals 社製, ヒト免疫グロブリン G (IgG) はミドリ十字社製のものを用いた.

2.2 血清たん白質試料の調製

ヒト血清は正常人血液を 3000×g で遠心分離した上清に等容の 2 M 尿素を含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.1, 0.1 mM EDTA を含む) を加え, 更に 25000×g で遠心して得られた上清を用いた.

* 東京都立大学理学部化学科: 東京都世田谷区深沢2-1-1