

リン化合物の
フローインジェクション分析法

与座 範政*, 横田 篤宜*
A. SJODIN**, J. MOLLER**

*九州大学理学部化学教室

〒812 福岡市東区箱崎6-10-1

**Tecator AB, Box 70, A-26301 Hoganas, Sweden

Flow Injection Analysis of Phosphorus Compounds

Norimasa YOZA,* Tokunori YOKOTA,* Annika SJÖDIN,** and Jürgen MÖLLER**

*Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyushu University Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan

**Tecator AB, Box70, A-26301, Högånas, Sweden

This review gives the brief description of phosphorus chemistry which deals with inorganic and biochemical phosphorus compounds to be analyzed by flow injection analysis and high-performance liquid chromatography. Various molybdenum reagents useful for the determination of phosphorus compounds are surveyed. The design of a flow system is shown which can be convertibly used for both modes of FIA and HPLC. Both modes with complementary functions are applied to kinetic experiments concerned with inorganic pyrophosphatase (EC3.6.1.1). With the FIA mode the time course of rapid hydrolysis of inorganic pyrophosphate is monitored by the selective detection of orthophosphate to evaluate kinetic parameters. The HPLC mode with a separation column is powerful for characterizing a relatively slow reaction which includes more than one phosphorus compounds to be simultaneously determined.

1. はじめに

RuzickaとHansenのFIAに関する第1報¹⁾は、はからずもオルトリン酸を対象としたものでした。それ以来約12年の間にリン化合物を対象としたFIAの報文は基礎研究から応用まで含めて約100編に達しています。リンは生命維持に不可欠の元素であるから、生体と深く関連する環境分析、臨床分析、食品、肥料、土壌の分析等に需要が大きいようです。そのうち本報では数編のみを素材としてとりあげて解説し、リン化合物のFIAを設計する上で配慮すべき問題点、特にFIAとHPLCの接点をさぐってみたい。その他のリン関係の資料については、1975年以來の論文が検索できる索引付きの文献集²⁻³⁾や折々の研究動向を概観できる総説⁴⁻⁷⁾を参照していただきたい。また最新の情報については本誌のFIA Bibliography欄が役にたちます。

ふりかえてみると、Ruzickaらの報文はリン化合物の研究を専業とする我々にとっては、改暦をつげる号砲でした。単にリン化合物の分析法の迅速化だけでなく、その波及効果は極めて大きいものです。FIA開発の当初においては、「HPLCから分離カラムをとりはずしたものがFIAである」と先輩格のHPLC研究者は表現し、FIAは時代遅れの発想であるとする傾向が強かったと思います。しかし結果的には、FIAの研究成果が高速液体クロマトグラフィ（ポストカラム反応法）の開発を活性化して飛躍的に発展させ、むしろ現時点では「FIAに前処理用として分離カラムをつけたのがHPLCである」と後発組（1975-）のFIA研究者は定義し、存在意義を強く主張できるようになりました。FIAとHPLCでは発想の起点において微妙な差異はあるが、いずれも流れにサンプルを注入する方法であり、設計基盤は大部分共通しているから、互換性のあるシステムの設計は容易です（Fig. 1）。目的に応じてFIAモードにするかHPLCモードにするかは、分離カラムの装着—脱着だけで選択できます。このような相補的多機能性の分析システムを用いることにより、生体中や環境水中の短寿命リン化合物の計測を可能にし、複雑な反応の速度論的解析ができるようになりましたので、リン化学の発展に対するFIAの寄与を高く評価したいと思います。

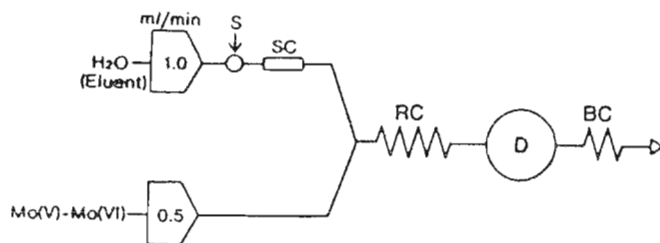


Fig. 1. A flow system with functional modes of FIA and HPLC⁹⁾. S, sample; SC, separation column; RC, reaction coil; D, detector, BC, back-pressure coil.

SC is off-line for FIA by the valve-switching (bypass).

以下にFIAとHPLCの両機能を有する分析システムの設計法と利用法を記述しますが、まず分析対象となるべきリン化合物の性質と検出法について概説し

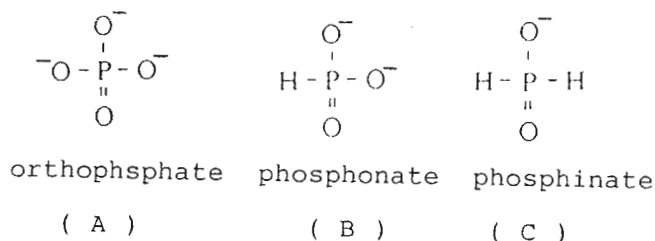
2. 分析すべき対象

J I Sの工場排水試験方法 (K O 1 0 2 - 1 9 8 1) によれば, "りん酸イオン及びりん化合物はオルトリン酸, ポリりん酸, 動植物質中のりんなど, 水中に存在するりん化合物のりんを意味し, りん酸イオン, 加水分解性りん, 全りに区分し, いずれもりん酸イオン (PO_4^{3-}) に換算して表示する" となっています (注: J I Sの術語に用いるかなは, 外来語の場合を除きひらがな書きである。従ってリン→りん)。ASTM Standards (D 5 1 5 - 7 8) でもほぼ同様に, orthophosphate, hydrolyzable phosphorus, total phosphorus に区分されています。

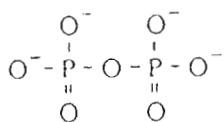
これらの公定分析法におけるリン化合物の区分法は, あまりにも大ざっぱな感がしますが, 制定当時の分析技術のレベルを勘案すれば, 妥当な設定でしょう。その後 F I A や H P L C によるリン化合物の迅速分析法が開発され, 30種類のリン化合物の同時分析や短寿命リン化合物の経時変化の追跡も可能になってきました。分析法の高機能化にともなって, より精細な形態別分析にもとづく公定分析法の制定が要望される時代へ移りつつあります。またリン化合物は生体内で非常に重要な役割をするので, 密接に関連する臨床分析やバイオサイエンスの基礎研究の分野でも, 水質分析の場合と同様に, 分析法の高機能化が強く要望されています。このような課題に対応するためには, 分析すべき対象が何であるかの認識が従来よりも重要になるので, まず分析法を設計するのに最低限必要なリン化学の要点を記述します。

3. 無機リン化合物

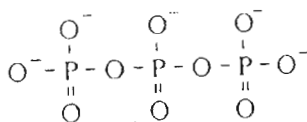
リンの酸化状態は極めて多様であり, 酸化数は +5 (H_3PO_4) から -3 (PH_3) まで9段階に変化します。例えば, リンのオキソ酸の単量体をあげると, 次に示す +5, +3, +1 の3種が知られています (便宜上以下のリン化合物はすべて解離状態で示し, 酸と塩を区別しない)。オルトリン酸 (化合物 A) は, これから詳述するように, 最もよく知られている化合物で, 用途は非常に広い。P-H結合をもつホスホン酸 (化合物 B, 慣用名 亜リン酸) と ホスフィン酸 (C, 次亜リン酸) は比較的用途は少ないが, 化合物 B の二量体である二ホスホン酸が生体物質のホスホニル化剤として最近着目されていますので, 用途が広がりそうです。



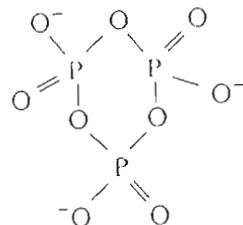
さて、オルトリン酸塩（A）を加熱または化学的に脱水縮合させると、二量体の二リン酸（D、ピロリン酸）、三量体の三リン酸（E、トリポリリン酸）、環状の cyclo三リン酸（F、トリメタリン酸）等のポリリン酸を生成します。さらに重合度の高いポリリン酸も知られており、Fig. 2に示すように、FIAシステムを検出系とするHPLCで分離できます（Fig. 2の星印は環状リン酸塩）⁸⁾。市販品として“ヘキサメタリン酸ナトリウム”がありますが、Fig. 2に準じて分析すると、単一成分ではなく、重合度が1から20位までの多数のポリリン酸の混合物です。



diphosphate
(D)



triphosphate
(E)



cyclo-triphosphate
(F)

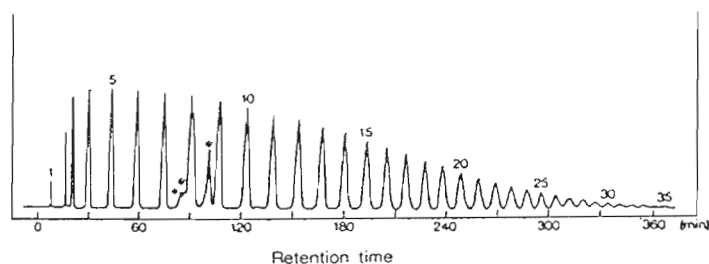


Fig. 2. High-performance liquid chromatographic separation of inorganic polyphosphates⁸⁾

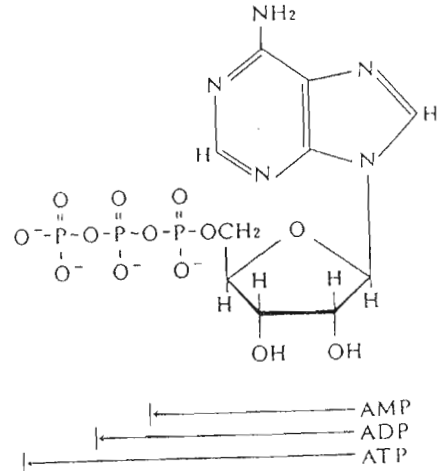
ポリリン酸は用途が非常に広く、食品や生活用品にも添加されています。環境汚染物質として悪名高かった含リン合成洗剤中の主犯格は化合物DとEでした。すべてのポリリン酸は水溶液中で加水分解されて、最終的には単量体のオルトリン酸へ変わります。しかし分解速度は酸、金属イオン、生体触媒等に著しく影響されます。例えば、ピロリン酸（D）は常温、中性の条件下で、触媒がないと非常に安定ですが（一次反応、半減期約3年）、無機ピロホスファターゼ（パン酵母に豊富に含まれている）をくわえると、瞬時（たとえば1秒以下、ゼロ次反応）に分解します。また海中ではかなり安定であるが、河川中では速く分解されるので⁹⁾、河川へ流入したピロリン酸は事実上残存できないと考えてよいほどです。

4. 生体関連リン化合物

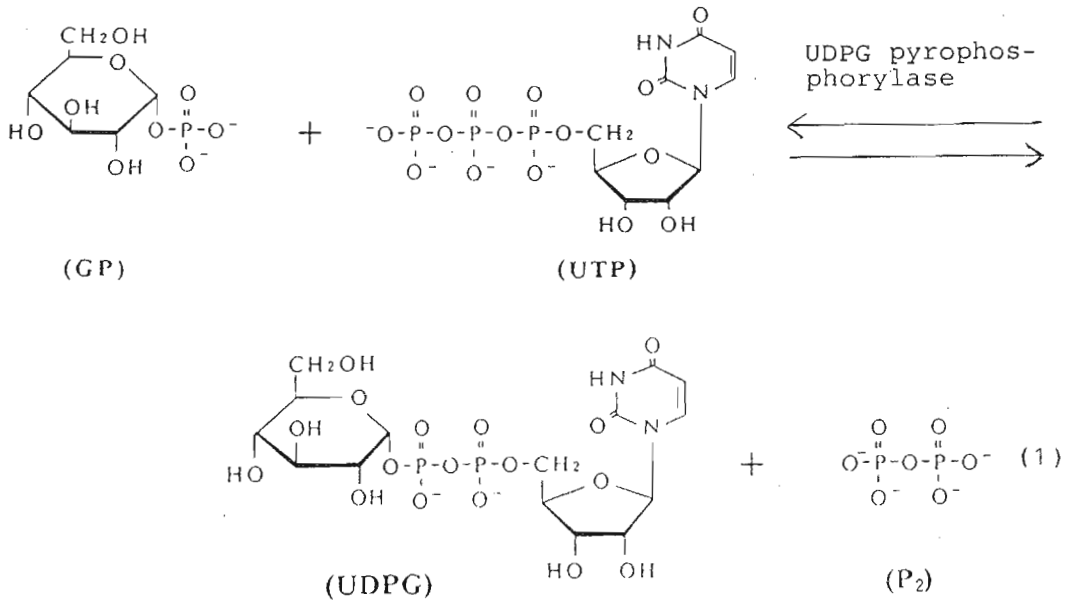
本来リンは“無機元素”であると考えられがちであるが、無機化学の教科書では比較的狭いシェアを占めているだけである。ところが生物化学関連の教科書

や生化学試薬のカタログをめくってみると、いたるところにPの記号が目につく。リンは生体骨格の構成成分であり、また核酸、ATP、リン脂質、グルコースリン酸、イノシトールリン酸、種々の補酵素等のリン化合物が遺伝情報の授受や代謝過程の主役として働いているからである。最も代表的なリン化合物としてATP等(G)があげられる。

adenosine triphosphate (ATP)
adenosine diphosphate (ADP)
adenosine monophosphate (AMP)
(G)



生体内でリンは転移反応をくりかえして、化学形が刻々変化しているから、分析対象として常に複数のリン化合物の共存を考えねばならない。たとえばグルコースをグリコーゲンとして貯蔵する過程で次のような4種のリン化合物を含む酵素反応があります。この反応のHPLC(FIA)による解析例については後で述べます。(26)



5. オルトリン酸の検出法

F I AやH P L Cなど流れを利用する検出法として、電導度、¹⁰⁾原子発光^{11)・12)}を利用する方法もあるが、モリブデン試薬を用いる吸光光度法が圧倒的多数である。F I Aで実用されているもの、J I S (K 0 1 0 2 - 1 9 8 1) またはA S T M (D 5 1 5 - 7 8) で採用されている方法 (バッチ法) を列挙してみると、

- (a) M o (VI)
- (b) M o (VI) - vanadate (A S T M)
- (c) M o (VI) - malachite green
- (d) M o (VI) - stannous chloride (J I S)
- (e) M o (VI) - stannous chloride
hydrazine sulfate
- (f) M o (VI) - ascorbic acid (J I S)
- (g) M o (VI) - ascorbic acid (A S T M)
antimony tartrate
- (h) M o (VI) - amino-naphthol-sulfonic acid (A S T M)
- (i) M o (VI) - M o (V)
- (j) (c) method + solvent extraction
- (k) (d) method + solvent extraction (J I S)

J I S または A S T M で採用されている方法は、原理的なことも一般によく知られており、F I A への適用例も多い¹⁻⁷⁾。たとえば (b) 法^{13)・14)}、(f) 法^{15)・16)}、(g) 法^{17)・18)} などがある。ここでは比較的なじみの薄い方法を重点的に紹介します。

オルトリン酸 (P_i) は 6 価のモリブデン試薬、M o (VI)、と反応して黄色錯体、P_i-M o (VI)、を生成する。



3 8 0 n m 付近 (極大ではない) で測定する。M o (VI) 試薬自体の吸収が 2 0 0 - 4 0 0 n m で強いことや、感度が低いなどの欠点はあるが、反応速度が非常に速いので、分解して P_i を生成しやすい不安定リン化合物の共存下における P_i の選択的検出には好都合である¹⁹⁾。

上記の黄色錯体とマラカイトグリーン (M G) を会合させると緑色を呈する。会合体、P_i-M o (VI) - M G、の 6 5 0 n m でのモル吸光係数 (M⁻¹ c m⁻¹) は約 8 万で非常に高感度で測定できる²⁰⁾。この反応も比較的速く、2 式と同様に P_i の選択的検出が可能である。なお、この系による溶媒抽出法も報告されている²¹⁾。

M G



黄色錯体中のMo(VI)をアスコルビン酸やスズなどで部分的にMo(V)へ還元すると、青色錯体、 $P1-Mo(V)-Mo(VI)$ 、を生成する。

還元剤



還元過程は比較的小さい反応である。還元剤の種類や反応時間により呈色錯体の吸収極大が変化するが、820 nm付近に極大を有する錯体が安定で、感度(モル吸光係数、約3万)も良好である¹⁹⁾。

さて、式4の青色錯体には $Mo(V)-Mo(VI)$ が含まれている(組成ははっきりしてない)。あらかじめ $Mo(V)-Mo(VI)$ 混合試薬を調製しておき、 $P1$ と反応させれば、特に還元過程を設けなくても、一挙に青色錯体を生成する。



この青色錯体も820-830 nmに吸収極大をもち、モル吸光係数は約3万である^{9) 22)}。

6. ポリリン酸および有機系リン化合物の検出

ATPやNADのように塩基をもつリン化合物はUV検出器で測定できるが、グルコースリン酸、イノシトールリン酸、無機ポリリン酸はUV吸収を示さない。またこれらの化合物と直接反応する呈色試薬も開発されていない。したがって酸やペルオキシ二硫酸、臭素や亜硫酸塩などの酸化剤、酵素、紫外線などで分解して、生成するオルトリン酸を前節で述べたモリブデン試薬で検出するのが一般的である。分解反応と発色反応をオンラインで行うが、2段階方式¹⁷⁾と同時に進行させる⁹⁾方法がある。同時に進行させるためには、強酸性の $Mo(V)-Mo(VI)$ 試薬が有効である。

原子発光でリンを測定する方法^{11) 12)}も有用である。またリン化合物の錯形成能を利用して、銅電極を用いる方法²²⁾、マグネシウム錯体を原子吸光で測定する方法、有色錯体との置換反応を利用する方法²³⁾が検討されている。

7. 無機ピロリン酸を加水分解する酵素反応への応用

前節までにFIAおよびHPLCによるリン化合物の迅速分析法を設計するのに必要なソフト的な素材を提示した。リン化合物をオンラインで加水分解するために、反応コイルを高温(140℃)に保持する必要があるが、それ以外のハード面では、極めてありふれた機器を利用するので特記することはない。本節では特定の課題「無機ピロリン酸を加水分解する酵素反応」を研究するのに、FIAとHPLCを使い分けて、それぞれの特徴をどのように有効利用できたかを

例示します。

市販のパン酵母（生）をホモジナイザーで破碎し、抽出液をピロリン酸の溶液（pH 7.2, 30℃）に加えると、6式に従ってに分解します。反応液を1分毎にFIAシステムへ注入して、生成するオルトリン酸を選択的に検出すると（5節 試薬（a）を用いる）、Fig. 3に示すように、生成物はほぼ直線的に増大し、反応が終結すると一定値になります。

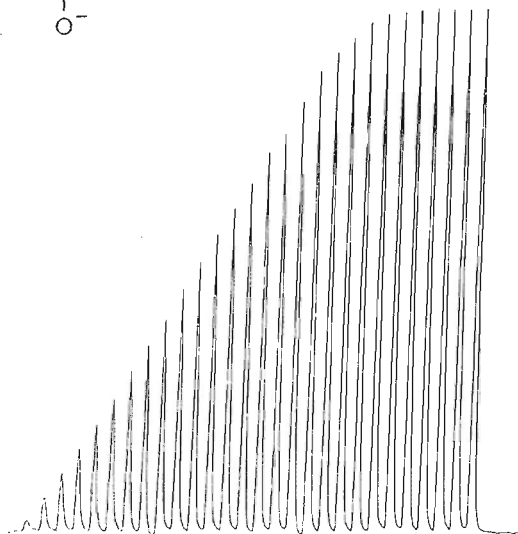
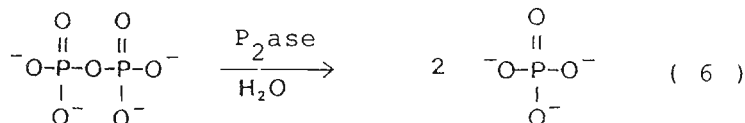


Fig.3. Kinetic FIA profile for hydrolysis of pyrophosphate by homogenized baker's yeast
 10^{-4} M pyrophosphate; 10^{-3} M Mg^{2+} ; 50 mg yeast in 100 ml; Mo(VI) reagent (Ref.19): Incubated mixture was injected every 1 min to determine orthophosphate.

ピロリン酸は純粋な無機化合物であり、また非常に安定なリン化合物（半減期約3年）として知られていますので、大部分の無機リン化学者にとっては非常に不思議な現象です。実は無機ピロリン酸を分解する無機ピロホスファターゼ（EC 3.6.1.1, PPaseまたはP2ase）がパン酵母に豊富に含まれていることが知られており、1978年には結晶解析とアミノ酸配列も決定され（分子量64000）、市販品（Sigma）も入手できます。基質が無機化合物であり、また広く知られているアルカリホスファターゼ等と混同されていることもあって、生物化学の分野ではこの酵素に対する認識と関心は比較的うすいようです。しかし、無機リン化合物を専門的に分解する酵素は存在しないだろうと考えていた我々にとっては、P2aseは非常に興味のある珍客です。この酵素の特性の解明と生体内における役割をしらべることにしました。Fig. 3の勾配が活性の尺度になりますので、この種の速度論的解析をするのに、FIAやHPLCは非

常に威力を発揮します。

さて、6式の基質 (P_2) の分解速度またはオルトリン酸 (P_1) の生成速度は次のミカエリス-メンテンの式で与えられる。

$$-\frac{d[P_2]}{dt} = \frac{1}{2} \frac{d[P_1]}{dt} = \frac{k_2[P_2ase][P_2]}{K_m + [P_2]} = \frac{V_{max}[P_2]}{K_m + [P_2]} \quad (7)$$

基質濃度がミカエリス定数 (K_m) よりも非常に大きいときには、分解速度は最大速度 (V_m) に等しくなり、Fig. 3のように生成物は直線的に変化する。他方、基質濃度を低くすると、Fig. 4のように曲線的に変化する。Fig. 3は市販の P_2ase (Sigma) と5節の試薬 (e) を用いて、1分毎に注入した場合の結果であるが、この図のコンピューター解析 (馬場嘉信, 私信) により得られた K_m 値 ($3.4 \mu M$) は文献値とよく一致した^{25,26)}。

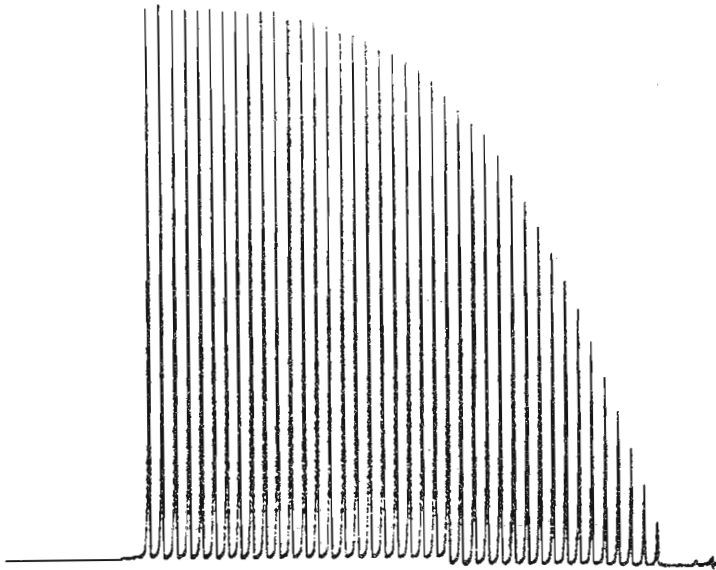


Fig.4. Kinetic FIA profile for the enzymatic hydrolysis of pyrophosphate by inorganic pyrophosphatase (EC3.6.1.1) at pH 7.2. $10^{-5} M P_2$; $5 \times 10^{-4} M Mg^{2+}$; ca. 0.25 U P_2ase (Sigma) in 100 ml; The incubated mixture was injected every minute (from right to left) to monitor P_1 (Tecator FIAstar 5020; application note AN 60/83, Mo(VI)-stannous chloride reagent). K_m value was estimated from this result by the computer analysis (Y. Baba) to be $3.4 \mu M$.

Fig. 4ではFIAで選択的に検出する例を示したが、多数のリン化合物を含む系を解析するにはHPLCモードの方がよい。生体内で生成物として無機ピロリン酸を含む $A + B \rightleftharpoons C + P_2$ 型の反応が知られている。式(1)を略記した次式について、各成分のリンをHPLCで検出し、酵素反応の経時変化を追跡した²⁷⁾。

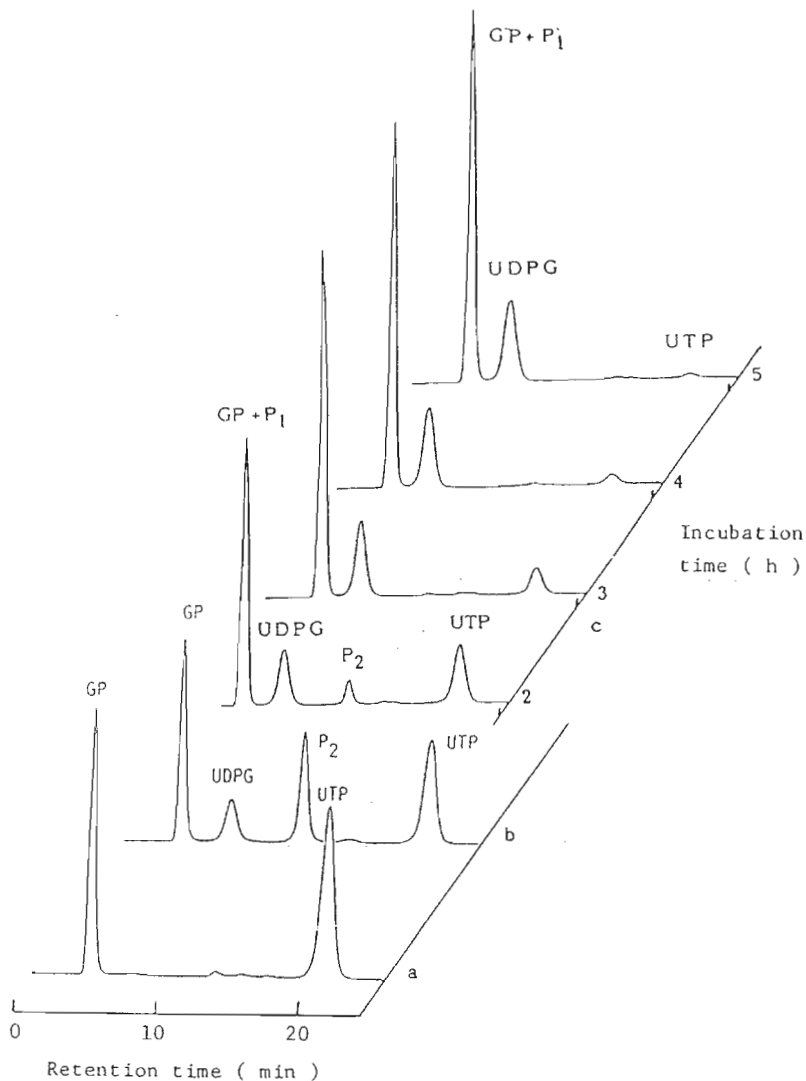
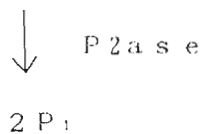


Fig.5. HPLC profile for the reaction products between UTP and GP. (a) without enzyme, (b) with UDPG pyrophosphorylase(E), and (c) with subsequent addition of P₂ase to (b). (Ref.26).

出発物質のG PとU T Pを混合しただけでは(以下の実験はp H 7.2, マグネシウムイオンの存在), F i g. 5 aのように変化はないが, U D P Gホスホリラーゼ(E)を加えると, F i g. 5 bのようにU D P GとP₂が生成し, 1時間以内に平衡に達する(平衡定数 0.23). この平衡系にP 2 a s eを加えると, F i g. 5 cに示すように, 次第にP₂とU T Pが減少する. G Pも減少することが期待されたが, P₂の生成物であるP₁のピークと重なって, この図だけからは直接的な証明はできなかった.

ヌクレオチド, グルコースリン酸, 無機リン酸が混在する場合に, 従来の検出法では全化学種の迅速同時定量は不可能であった. 高圧(高温)F I AシステムをH P L C用検出器として採用することにより, 全化学種のリンの定量が可能になり, 複雑な反応過程も視覚的に表示できるようになった. これにより, 純粋な無機化合物であるP₂と, それを分解するP 2 a s eの生体内における存在理由と役割, すなわちP 2 a s eがP₂の濃度を調節し, U D P Gの生成を制御していることが, 図をながめただけで直感的に理解できると思います. さらに実験操作的に難度が高いが, $A + B \rightleftharpoons C + P_2$ 型の反応; 核酸やc A M Pの生成過程についても, 追跡してみたいと考えている.

なお, グルタルアルデヒド法によるP 2 a s eの固定化とF I A用バイオリアクターとしての利用が報告されていますが, 本稿では割愛した.

References

- 1) J.Ruzicka and E.H.Hansen, *Anal.Chim.Acta*, 78,145(1975)
- 2) "Flow Injection Analysis Bibliography",1985,
Tecator AB,Sweden
- 3) J.Ruzicka and E.H.Hansen,*Anal.Chim.Acta*, 179,1(1986)
- 4) M.Valcarcel and M.Dolores Luque de Castro,
J.Chromatogr., 393,3(1987)
- 5) N.Yoza,*Bunseki*,1984,513
- 6) Y.Hirai,*Bunseki*,1985,891
- 7) T.Korenaga,*Bunseki*,1987,245
- 8) Y.Baba,N.Yoza and S.Ohashi,*J.Chromatogr.*, 350,119(1985)
- 9) N.Yoza,Y.Sagara,H.Morioka,T.Handa,H.Hirano,Y.Baba and
S.Ohashi,*J.Flow Injection Anal.*, 3,37(1986)
- 10) P.R.Haddad and A.L.Heckenberg,*J.Chromatogr.*, 300,357(84)
- 11) C.W.Mcleod,I.G.Cook,P.J.Worsfold,J.E.Davies and J.Queay,
Spectrochim Acta, 40B,57(1985)
- 12) W.R.Biggs,J.T.Gano and R.J.Brown,*Anal.Chem.*, 56,2653(1984)
- 13) O.Royset,*Anal.Chim.Acta.*, 178,217,(1985)
- 14) U.Forsman,M.Andersson and H.Tornros,*J.Chromatogr.*,

- 369,151(1986)
- 15) Y.Narusawa and T.Hashimoto,Chem.Lett.,1987,1367
 - 16) R.Kuroda,I.Ida and K.Oguma,Mikrochim.Acta I,1984,377
 - 17) T.Korenaga and K.Okada,Bunseki-Kagaku,33,683(1984)
 - 18) T.G.Towns,Anal.Chem.,58,223,(1986)
 - 19) N.Yoza,H.Hirano,Y.Baba and S.Ohashi,J.Chromatogr.,325,
385(1985)
 - 20) S.Motomizu,T.Wakimoto and K.Toei,Talanta,30,333(1983)
 - 21) S.Motomizu and M.Oshima,Analyst,112,295(87)
 - 22) P.W.Alexander,P.R.Haddad and M.Trojanowicz,
Anal.Chem.,56, 2417(1984)
 - 23) N.Yoza,T.Shuto,Y.Baba,A.Tanaka and S.Ohashi,
J.Chromatogr.,298,419(1984)
 - 24) Y.Hirai,T.Hasegawa and K.Tomokuni,Jpn.J.Hyg.,41,723(1986)
 - 25) H.Hirano,Y.Baba,N.Yoza and S.Ohashi, Anal.Chim.Acta,179,209(1986)
 - 26) N.Yoza,H.Hirano,Y.Baba and S.Ohashi,Phosphorus and Sulfur,
30,605(1987)