塩化鉄法によるコレステロールの比色定量に対するハイドロサルファイトの効果について

鈴 木 康 策

(1962 年 12 月 5 日受理)

EFFECT OF HYDROSULFITE ON THE COLORIMETRIC DETERMINATION OF CHOLESTEROL BY FERRIC CHLORIDE METHOD

Kōsaku SUZUKI*

When a ferric chloride reagent was impure for colorimetric determination of cholesterol, the working line did not pass on its original point and thus had to be corrected suitably for the determination. This correction has been achieved by addition of hydrosulfite to the reagent without further purification. One milligram of hydrosulfite was added as a 15% water solution to 1 cc of the reagent. The reagent was found ready for use as a color reagent by keeping it for one day at 25°C and also found stable at least for six days after the preparation. Whereas a reagent, if unstabilized, sometimes yields a turbid solution in the color reaction to render colorimetric measurement impossible.

The time required to develop the maximum absorbancy of a color reaction mixture varies depending on preparations and therefore must be examined before drawing a working line.

塩化第二鉄によるコレステロールの呈色は Liebermann-Burchard 反応による呈色より安定で，1954 年，Zak[1] らによつて血清コレステロールの定量に使用されて以来，操作法が比較的簡単であるため，コレステロールの定量法として注目されるようになつた。その後 Zak[2]，北村[3]，吉川[4]，小松[5]，大山[6]，北村，有松[7] らは血清を研究対象として広く検討を行なつた。北村，有松[7] は不純硫酸を用いて試薬を調整した場合におけるハイドロサルファイトの効果について報告している。本報ではコレステロール濃度と呈色液の吸光度との関係から求められる検量線が使用する硫酸の不純のゆえに原点を通らない場合でも，ハイドロサルファイトの使用によつて検量線が原点を通るようになることについて報告する。

実 験

(1) 呈色反応について 操作法は小松の報告[5] による。すなわち，特級塩化第二鉄 2.5 g を濃リン酸 25 cc に溶かしたものを貯蔵液（黄色透明，白色沈殿を生じたら捨てる）とし，使用にあたり，濃硫酸で 100 倍容にうすめて呈色試薬とする。コレステロールの酢酸溶液 3 cc に呈色試薬 2 cc を静かに加え，激しく振盪し，20 分放置後（室温まで冷却する），波長 570 mμ において盲検に対し吸光度を測定する。ただし，本実験においてはコレステロール酢酸溶液を 4.5 cc，呈色試薬を 3 cc 使用した。北村によれば，両液の混合割合が一定でも混合量の多少は混合時の発熱量に関係し，呈色度にも影響する[3] というから，一連の実験では同一量を使用しなければならない。また本実験では試薬も被検液も反応混合液もすべて 25°C の恒温室内に置いた。

北村，有松[7] によれば純度不良の硫酸は呈色度の減少を来たすというので，濃度 96.5 % の硫酸と，これをうすめて濃度 90.0 % にしたものとを用いて呈色試薬をつくり，同一被検液について呈色液の吸光度を測

* 東京水産大学沼津実習場 (Numazu Fish. Lab., Tokyo Univ. Fish., Numazu, Shizuoka Pref.)

定してみると，Table 1 のとおり，90％硫酸のほうの吸光度は約 11％も低下している。ゆえに一連の測定には同一硫酸を使用すべきである。

呈色度と反応時間との関係は Fig. 1 のとおりである。図の中で A, B は同一試薬を使用したもので，被検液のコレステロール濃度が違うから吸光度の違いはあるが，最大吸光度に達するまでの時間は両方とも 60 分である。前記の小松[5]，北村[8]，Zak[1] によれば，反応液の温度が室温まで下がるのを待つて比色することになつていて，この時間は 20～30 分で十分であり，その後1時間は呈色度が安定しているというが，Fig. 1 によれば，吸光度の安定するのは 60 分後であり，反応液の温度が室温まで下つても吸光度は増大した。ゆえに吸光度の測定は 60 分以上経過後にしなければならない。一旦安定した呈色度は少なくとも2時間は変らない。2時間以上は測定しなかつた。図のCは試薬にハイドロサルファイトを添加した場合（後述）で，最大吸光度に達するまでにやはり同じく 60 分かかる。盲検液の吸光度は 25℃に放置した場合 Table 2 のように2週間にわたつてほとんど変化しない。この表の数値は毎日新調した盲検液の吸光度を比色計目盛の 0.01 に合わし，貯蔵した盲検液の吸光度を比較測定したものである。

Table 1. Comparison of absorbancy of reaction mixtures dependent on concentration of sulfuric acid of the reagent

Concentration of sulsuric acid	96.5%	90.0%
Absorbdncy	0.658 0.650 0.648 0.655	0.580 0.570 0.588 0.588
Average	0.653	0.582

Concentration of the cholesterol solution is 5.5 mg/100 cc.

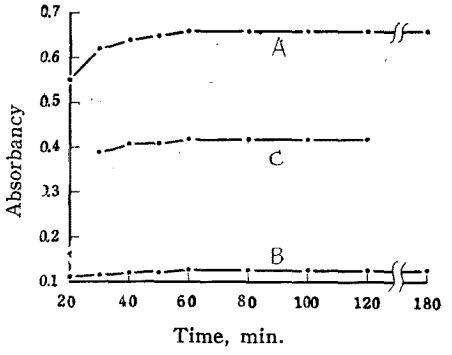

Fig. 1. Relation between absorbancy of a reaction mixture and reaction time.
Concentractions of the cholesteral solution are;
A....5.5 mg/100 cc
B....1.0 〃
C....3.5 〃
In A and B hydrosulfite was not used, but in C it was used for preparing the reagent.

Table 2. Variation in absorbdncy of a blank test solution during storage at 25℃.

Days of storage	0	1	2	3	7	14
Absorbancy	0.01	0.01	0.01	0.01	0.008	0.008

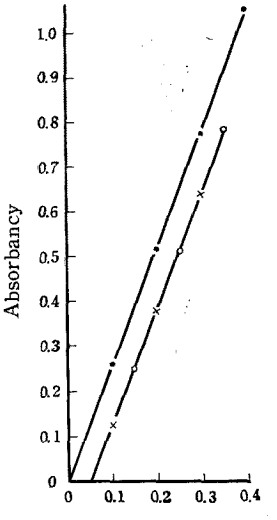

Fig. 2. Working line for the colorimetric determination
-●-●- Hydrosulfite was added to the reagent.
-○-○- Hydrosulfite was added to the cholesterol solution.
-×-×- Hydrosulfite was not added to either of the above.

(2) 検量線について　前項の予備実験の結果を参考にして，コレステロールの濃度と吸光度との関係を求めるならば，つまり検量線を求めるならば，これは原点を通るものと期待される。なぜなら，従来の文献によればすべて原点を通つているからである。しかし，実験の結果は Fig. 2 の×印で示されるように原点を通らず，検量線として適当でない。原点を通らない原因として試薬の不純であることが考えられる。試薬のうち多量に使用されるのは酢酸と硫酸である。被検液が血清抽出液ならば，トリプトファンを含むために酢酸中のグリオギザル酸と Hopkins-Cole 反応を起し，比色定量の妨害[2]となるが，Fig. 2 の実験の被検液はコレステロール結晶の酢酸溶液であるから，もとよりトリプトファンの存在は考えられない。したがつてこの種の妨害は起り得ない。他方，硫酸中の不純物については北村，有松[7] は硝酸塩が定量妨害となることを指摘し，ハイドロサルファイトの添加使用により妨害を排除できることを見出した。しかし，不純硫酸を使用した場合，検量線が原点を通らないということはこれまでの報告に見当らない。それは従来硫酸の純度が特級品であるものを使用されたためとも思われるが，本実験では試薬一級のものを使用した。しかし，一級品の硫酸を用いて調製した呈色試薬でもハイドロサルファイトを添加してから使用すれば，検量線は Fig. 2 の●印のように原点を通る。ハイドロサルファイトは 15 % 水溶液とし，呈色試薬 1 cc につき 1 mg の割合になるように加える。ハイドロサルファイトの添加によつて試薬は白濁する。これを被検液と混合振盪すれば透明な呈色液となるが，操作のわずかな違いで時には呈色液が透明にならず，吸光度の測定が不可能になる。すなわち分析操作法として適当でない。ゆえに，ハイドロサルファイトを試薬でなしに，被検液に添加すれば，透明に溶解するし，これに試薬を加え振盪したとき，つねに透明な呈色液が得られたので，吸光度の測定に支障はない。このようにして検量線を求めてみたが，結果は Fig. 2 の○印のとおり，ハイドロサルファイトを使用しない（×印）時と同じく，原点を通らない。ハイドロサルファイトはあらかじめ試薬に加えておかなければ効果がないのである。ハイドロサルファイトの添加によつて試薬は白濁しても支障はないが，被検液と混合振盪して得られる呈色液はつねにかならず透明でなければ，吸光度測定の意味はない。安全な分析法とはいえないのである。ゆえに，試薬の安定性について検討した。

(3) 呈色試薬の安定性　呈色液が透明になつたり，不透明になつたりするのは試薬が不安定であるためと考えられるし，逆にいつも一定の呈色効力を持つような試薬は安定した試薬とみられる。ゆえに呈色効力の変化を見れば，安定な試薬か否かを判断することができる。Zak[1] は呈色用貯蔵液として塩化第二鉄の氷酢酸溶液を調製し，凍結室に貯蔵するよう報告している。北村[3] によれば，これは 1～2 ケ月効力を減じないが，硫酸で 100 倍容にうすめた試薬は常温 1 週間放置で約 10 % 呈色を減少させるという。本実験の貯蔵液は塩化第二鉄の濃リン酸溶液であり，7～15℃ 暗所放置で 4 ケ月は安定であつた。これを濃硫酸で 100 倍容にうすめ，さらにハイドロサルファイトを加えて調製した試薬を 25℃ の恒温器内に保管し，ある濃度のコレステロール被検液につき，呈色効力の変化の状態を調べた。呈色反応液は 25℃ 80 分放置してから吸光度を測定し，Fig. 3 の A の結果を得た。試薬の効力が安定するのは 1 日後であり，以後少なくとも 6 日間は安定していることがわかる。またこのよう

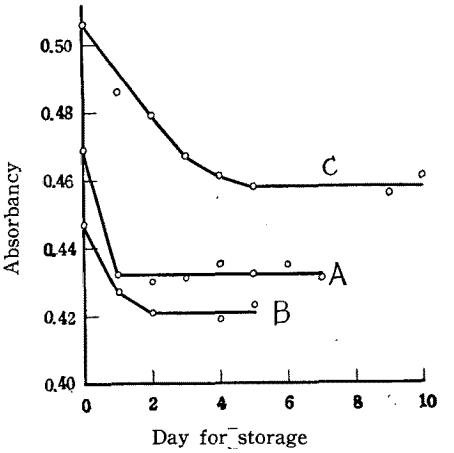

Fig. 3. Change in efficiency of the reagent during storage at 25℃.

	Reagent	Solvent for stock solution
A	Prepared by directly adding hydrosulfite	Phosphoric acid
B	Prepared from sulferic acid to which hydrosulfite was added	〃
C	〃	Acetic acid

に効力の一旦安定した試薬を用いれば，呈色反応液はつねに透明であるから，吸光度の測定に支障はない。呈色効力がまだ安定しないうちに，試薬を使うと呈色液が白濁することがわかつた。したがつて試薬はハイドロサルファイト添加後 25℃ 1日放置してから使用すればよい。ただし，試薬そのものは呈色効力が安定しても，やはり白濁した状態にある。

さて，北村[7] らによれば，ハイドロサルファイトは硫酸中の硝酸塩にもとづく呈色妨害を除くために添加されるものであるから，まず試薬調製用の硫酸にハイドロサルファイトを添加し，25℃ 1日放置すれば，Fig. 3 の A の結果から見て，硝酸塩による妨害は除かれるものと推定される。この硫酸を用いて呈色試薬を調製すれば，試薬の効力は調製の当日から安定するのではないかと想像される。実験してみると，Fig. 3 の B のように効力の安定したのは調製の2日後であつた。不純物としての硝酸塩は硫酸ばかりでなく，貯蔵液に使用したリン酸中にも含まれると考えられる。したがつて，Zak[1]，北村[3] のようにリン酸を用いず，氷酢酸を溶媒として貯蔵液をつくり，これをうすめる硫酸は図のBのときのように，あらかじめハイドロサルファイトで処理したものを用いれば，呈色試薬は調製の日から安定した効力を示すものと考えたが，実験によれば Fig. 3 C のとおり，効力安定するまでは5日もかかり，A, B の場合より長かつた。Fig. 3 の三つの実験によると，ハイドロサルファイトは試薬を構成する各成分に対し個別的に添加しても効果なく，貯蔵液を濃硫酸でうすめたものに添加し，さらにこれを 25℃ 1日放置してから呈色試薬として使用すれば，試薬一級の硫酸でも比色定量用として十分使用できる。

結　　論

塩化鉄法によるコレステロールの比色定量において，試薬の純度不十分のために検量線が原点を通らない場合，試薬にハイドロサルファイトを添加して使用すれば，原点を通る検量線を得ることができる。ゆえに試薬調製用の硫酸の純度は特級でなくても一級のもので十分である。ただし，試薬の効力が安定するのは 25℃ 1日放置後であり，また透明な呈色反応液を得るためにも試薬は1日放置しなければならない。試薬の効力はその後少なくとも6日間は安定しているし，盲検液の吸光度は3日間はまつたく変らず，2週間後もほとんど変らないから，試薬も盲検液も測定のつど調製しなければならないという煩雑さはない。また吸光度の測定にあたつては最大吸光度に達するまでの時間，および最大吸光度の持続する時間をその試薬について確かめておく必要がある。これらの時間は被検液のコレステロール濃度には影響されない。

文　　献

1) Zak, B. et al: American Journal of Clinical Pathology, **24**, 1307 (1954).
2) Zak, B.: ibid. **27**, 583 (1957).
3) 北村元仕: 臨床病理, **6**, 200 (1958).
4) 吉川春樹・その他: 医学のあゆみ, **33**, 375 (1960).
5) 小松節子: 日新医学, **47**, 389 (1960).
6) 大山ハルミ・その他: 日新医学, **47**, 464 (1960).
7) 北村元仕・有松芳子: ――――, **48**, 456 (1961).