

## ノート

## 重窒素標識窒素ガス簡易作成装置の試作\*

大山卓爾\*\*・熊沢喜久雄\*\*

生物的窒素固定の研究に際しては、重窒素標識窒素ガス ( $^{15}\text{N}_2$ ) を用いることがしばしば重要になることがある。窒素固定量の測定はもとより、窒素固定における窒素代謝の特殊性の研究、固定された窒素の移動、集積などの研究は  $^{15}\text{N}_2$  の使用を不可欠とするものである。近年、生体内に取り込まれた  $^{15}\text{N}$  濃度の測定については、発光分光分析法による簡易測定技術が開発されて来ている<sup>3)</sup>。しかし、 $^{15}\text{N}_2$  を用いた窒素固定の研究に必須な  $^{15}\text{N}_2$  の発生、精製、貯蔵に関する実験室レベルでの簡便な方法は必ずしも確立していない。そのため、筆者らは容易に、かつ低廉な価格で必要量の  $^{15}\text{N}_2$  を発生、精製、貯蔵する装置を作製した。

## 1. 概要

従来、 $^{15}\text{N}_2$  はガラス密封容器、もしくは金属ポンベに充填して市販されているが、ガス状であること、空気中に多量に含まれる窒素ガスによる汚染とそれに伴う  $^{15}\text{N}$  濃度の低下が起りやすいこと、比較的高価格であることなどの理由により、少量のガスが随時必要とされるような実験には使用しにくいものであった。また、市販のガスであっても微量に混入している窒素酸化物が生物的窒素固定を阻害するため、普通は精製する必要がある。そのためここでは、もっとも一般的で取り扱いやすい  $^{15}\text{N}$  標識硫酸アンモニウムより、第1図に示すような装置を用いて  $^{15}\text{N}_2$  を発生させる方法を工夫した。発生させたガスは水置換法により移動させ、二つのトラップ中を通過させることによりガス中の窒素酸化物、アンモニアなどを除去した後、貯蔵ビンに貯えられる。なお、第1図において、 $^{15}\text{N}_2$  発生部分(X)、およびトラップ(Y, Z)の体積は、発生させるガス量に応じて異なる体積のナス型フラスコを用いることにより調節できる。

## 2. 反応試薬の調製およびガス中の不純物の除去

アンモニアから窒素ガスを発生させる際に使用した試薬は以下のようにして調製した。

NaOBr 液<sup>1)</sup>: 水酸化ナトリウム 200 g を再蒸留水 300 ml に溶かし氷冷する。そのうち約半分を 500 ml エー

レンマイヤーフラスコに移し、氷冷下で 60 ml の臭素を 30分以上かけて滴下する。この間、激しく攪拌し、溶液の温度を  $5^\circ\text{C}$  以下に保つように滴下速度を調節する。滴下終了後、残りの水酸化ナトリウム水溶液を加え、混合液をさらに数分間攪拌する。調製直後の試薬は酸素を発生させやすいため、密閉して冷蔵庫に 4~6 日間保存する。その間に生成する臭化ナトリウムの沈澱をグラスファイバーフィルターで吸引濾過して除去する。濾液を等容量の 0.2% ヨウ化カリウム水溶液と混合し、低温で保存する。本試薬は 1 ml につき N として約 4 mg のアンモニアを窒素ガスに変換し、6 カ月程度は活性を保つことができる。

KMnO<sub>4</sub>・KOH 液<sup>2)</sup>: 2.5% 水酸化カリウム + 5% 過マンガン酸カリウム水溶液

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>・H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 液: 20% 硫酸ナトリウム + 5% 硫酸

3.  $^{15}\text{N}_2$  調製方法

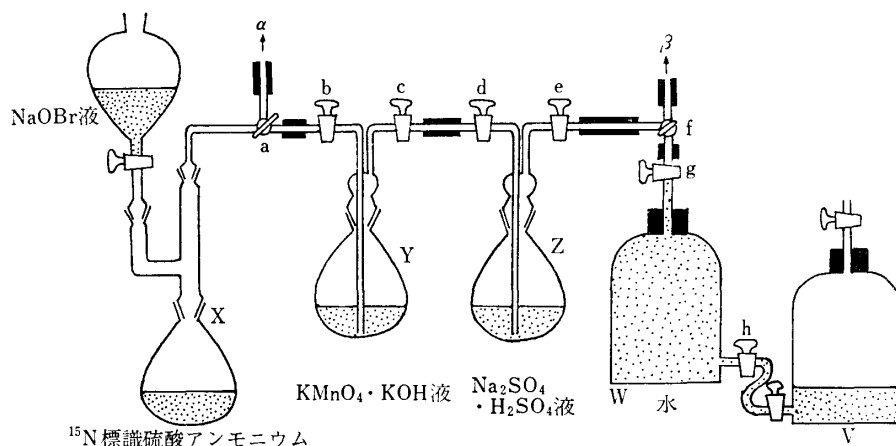
第1図に示す装置の接続部分はすべてガラスのすり合わせを用いており、真空グリースを用いて密着させる。Xは  $^{15}\text{N}_2$  発生部位で、分液ロートとナス型フラスコを組み合わせてある。Xの全容積は、発生させるガスの容積とそれに必要な反応試薬の容積を加えたものより若干大きくなるように適当な大きさのナス型フラスコを用い、内部が過圧になるのを防ぐ。ガス発生は以下のごとく行う。まずはじめに、必要とするガス量に相応する  $^{15}\text{N}$  標識硫酸アンモニウムをフラスコ部分に入れておき、分液ロート中に NaOBr 液をいれておく。真空ポンプを用いて  $\alpha$  より吸引することにより X 内を  $10^{-2}$ ~ $10^{-3}$  torr 程度の真空にした後にコック a を閉じる。分液ロートのコックを開き試薬を滴下し、 $^{15}\text{N}_2$  を発生させる。ガス発生が終了したならば、分液ロート上部より再蒸留水を入れ、さらに滴下する。内部圧が大気圧と等しくなると液は滴下しなくなるので、分液ロートのコックを閉じる。コック b, c, d, e, f を開き、 $\beta$  より Y, Z 内の空気を十分に除去する。この後、c を閉じ、分液ロートのコックおよび a を開け、b を調節し X 内のガスをすべて Y に導入する。導入されたガスの体積だけ水が分液ロートから X に滴下する。X 内がすべて水で満たされ、液が b まで来たならばコック b を閉じる。同様にして、Y 内に水を導入しながらガスを Z 内に移し、さらには e, f, g, h のコックを操作して水を満たした貯蔵ビン W 内に移し貯蔵する。W 内の水は V に導かれ、水を排除する際に W 内へ h 部分から空気が逆流するのを防ぐ。ガスの使用に際しては、g, f 間をとりはずした後、コック h を通して再蒸留水を V から W 内に導入し g よりガスを取り出せる。それぞれのガス置換には再留水を用い、各

\* 1977年4月日本土壌肥料学会で発表した。

\*\* 東京大学農学部(東京都文京区弥生 1-1-1)

昭和53年3月2日受理

日本土壌肥料学雑誌 第49巻 第5号 p: 424~425(1978)



第1図 重窒素標識窒素ガス簡易作成装置

V：大気逆流防止ビン，W：ガス貯蔵ビン，X： $^{15}\text{N}_2$ ガス発生部分，Y，Z： $^{15}\text{N}_2$ 精製部分。  
太い実線は耐圧ゴム管による接続を表わしている。

試薬は互いに混合しないようにする。

#### 4. 結果および考察

$^{15}\text{N}_2$ の $^{15}\text{N}$ 濃度は $^{15}\text{N}$ 発光分光分析用放電管作製用真空装置にガスの一部を導入し、放電管を作製することにより容易に測定しうる<sup>3)</sup>。本装置により、30.0 atom%の $^{15}\text{N}$ 標識硫酸アンモニウムから29.6 atom%の $^{15}\text{N}_2$ を得た。水溶液中に溶存していた窒素ガスや大気中から混入した窒素ガスにより、わずかに $^{15}\text{N}$ 濃度が低下するが、 $^{15}\text{N}_2$ 調製後貯蔵中および $^{15}\text{N}_2$ 供与実験後において $^{15}\text{N}$ 濃度の低下は起こらなかったため、実際上はこの程度の濃度低下は問題にならないと考えられる。またガス貯蔵ビンをいくつか用意し、酸素ガス、ヘリウムガスな

どをポンペよりこれらに導入した後に、 $^{15}\text{N}_2$ と混合することにより、自由な組成の混合ガスを調製することができる。

#### 文 献

- 1) BREMNER, J. M.: Isotope-ratio Analysis of Nitrogen-15 Tracer Investigation. Method of Soil Analysis. Part II, p.1256~1286, American Society of Agronomy, Wisconsin, U. S. A.
- 2) BURRIS, R. H.: Nitrogen Fixation-Assay Methods and Techniques, *Methods Enzymol.*, **XXIV**, 415~431 (1972)
- 3) 狩野広美・米山忠克・熊沢喜久雄：発光分光分析法による重窒素の定量について，土肥誌，45，549~559(1974)