

三元錯体生成反応系を利用する 生体関連物質の吸光光度法の開発に関する研究

山口 敬子*, 藤田 芳一

Development of Spectrophotometric Determination for Bioactive Substance Utilizing the Ternary Complex Reaction

Takako YAMAGUCHI* and Yoshikazu FUJITA

Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1 Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan

(Received October 29, 2010; Accepted November 26, 2010)

The development of simpler, more convenient, rapid, highly sensitive, and reliable determination has been strongly desired to achieved early disease detection and early treatment. Our laboratory conducted research to develop a spectrophotometry that uses ternary complexes that are made of 3 components: the analyzed substance, a xanthene dye, and a metallic ion.

In this report, we introduce a total of 3 methods. First, the determination of human serum albumin, which uses *o*-sulfophenylfluorone and [niobium (V) + bismuth (III)], achieved sufficient sensitivity in detecting various types of low sensitivity proteins by using the pyrogallol red-molybdenum method (the PR method). Next, for the determination of adenine using silver (I) and eosin, which is focused on the new behavior of silver ion (I), determination of adenine at concentrations ranging between 0.1 and 1.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ by spectrophotometry was achieved with a sensitivity of as high as $\epsilon = 1.1 \times 10^5 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; reproducibility was also very good, with a relative standard deviation (RSD) of 0.87% ($n = 8$). Thirdly, a simple and highly sensitive spectrophotometric method for uric acid was established based on complexes on fading of the *o*-hydroxyhydro quinonephthalein - palladium(II) - hexadecyltrimethyl ammonium (HTA) complex. In the determination of uric acid, Beer's law is obeyed in the range of 0.01 - 0.20 $\mu\text{g ml}^{-1}$, with an effective molar absorptivity at 635 nm, the RSD being $\epsilon = 6.5 \times 10^5 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and 1.5% ($n = 5$). This method is about 20-times more sensitive than the conventional methods. The method was successfully applied to assay of uric acid in human urine.

Key words—Xanthene dyes; spectrophotometry; albumin; adenine; ternary complex; uric acid; palladium(II)

1. はじめに

従来から疾患の有無の鑑別やその重症度の判定, 治療効果の判定, 合併症出現の有無の検索の

ための臨床検査が, 医学の進歩を担う重要な柱となっている. さらに臨床分析現場においては, 予防医学の立場からの早期発見, 早期治療を目的とする集団検診時のスクリーニング検査, あるいは

* 大阪薬科大学 臨床化学研究室, e-mail: yamaguti@gly.oups.ac.jp

本論考は, 山口敬子の博士論文をもとに再構成したものである.

セルフケア、セルフメディケーションのためのセルフチェックあるいはまたベットサイドなど必要に応じてリアルタイムに得られる POCT (Point of Care Testing) 等への適応範囲の拡大など簡易分析法の重要性が著しく増加している。

さらに治療効果や副作用に関する様々な因子をモニタリングしながらそれぞれの患者に個別化した薬物投与を行う TDM (Therapeutic drug monitoring) のための体液中薬物濃度の測定や毒物検査、ドーピング検査もまた不可欠になってきており、より簡便、迅速、高感度で信頼性のある測定法の開発が熱望されている。また、最近では、多数検体を同時に測定できるマイクロプレート計測法やナノテクノロジーを活用した分離、計測技術であるマイクロチップ計測法が著しく発達してきており、さらに簡便性、迅速性、経済性などの面で優れたスポットテスト試験紙法などの目視分析も数多く登場しているが、これらを達成するための方法として次のような優れた特徴を有している吸光光度法の活用が大いに期待される。

- ① $A = \epsilon c l$ で示されるように測定値が一義的に定義できる
- ② 安価な機器、簡易な操作で信頼しうるデータが比較的高感度に得られる
- ③ 吸光度 0.001 を再現性よく測定できる
- ④ フローインジェクション法 (FIA) や自動分析に適用されやすい
- ⑤ 測定結果を目視で確認できる
- ⑥ 化学平衡論的に考察しやすい
- ⑦ 干渉に対して対処しやすい
- ⑧ スペシエーション分析が可能である

これらの特長に加え、新しい呈色反応系を設計し、可能な限り定量感度を上昇させるための分析化学的考案を行うことは、臨床化学分野においても、極めて有意義なことである。

一般に、吸光光度法の感度 ϵ は Braude の経験則 $\epsilon = \kappa P a$ ($\kappa: 10^{20}$ 程度の定数, P: 遷移確率, a: 呈色化学種の吸収断面積) より、a に依存する。

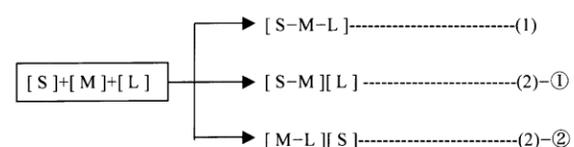
従って、高感度分析法を設定するためには、この a が大きく、かさの高い呈色錯体を生成させればよく、錯体生成反応においては、単なる二元錯体よりも三元錯体、すなわち被分析物質、錯生成剤並びに金属イオン三者で生成する錯体を利用する方が有利である。さらに三元錯体を生成させ、これを界面活性剤のミセル溶液中で反応させると、

- (a) 高次化錯体生成に伴う高感度化と呈色体の安定性
- (b) 生成する呈色錯体のミセル界面への濃縮効果による感度の上昇と安定性の増大
- (c) 選択性の向上

などの効果が現れる。また、錯生成剤と金属イオンとの間の呈色錯体生成反応液中に、その金属イオンと錯体生成能を有する被分析物質を共存させることにより、競合的錯体生成反応をさせ、その結果としての呈色錯体の退色を利用する分析法の考案も有効と考えられる。

三元錯体としては、一般に混合配位子型錯体、混合金属型錯体、混合原子価型錯体、イオン会合型錯体などに分類されるが、化学分析に広く利用されているのは、

- (1) 混合配位子型錯体：第一の配位子が中心金属の配位全部を占めない場合、第二の配位子が残った配位座の一部または全部を占めることにより生成する錯体
- (2) イオン会合型錯体：第一の配位子と配位飽和の二元錯体を生成するが、中心金属の電荷が中和されず、第二の有機または無機イオンとの会合によって電荷が中和されて生成する錯体である。この (2) はさらに (2)-①被分析物質 [S], 金属イオン [M] 間で生成した二元錯体と有機試薬 [L] との間でのイオン会合型三元錯体を利用するもの: [S-M][L] 型 (2)-②金属イオン [M], 有機試薬 [L] 間で生成した二元錯体と被分析物質 [S] との間でのイオン会合型三元錯体を利用するもの [M-L][S] 型に分類される。これらを簡単にまとめると次のように表される。



被分析物質と金属イオンとの反応性を考える場合、殆どの生体成分、医薬品などは、その構造中に窒素原子、酸素原子、硫黄原子を含むので、それらの原子の非共有電子対を通して被分析物質の構造を考慮した上、錯生成能、錯体の安定度における Pearson の HSAB 則および Irving-Williams 序列、Mellor-Maley 序列などを十分加味して金属イオンを選択することが必要である。

また、三元錯体生成反応に適している有機試薬としては、キノイド構造を形成させる高度に発達した π 電子系 (発色団) を持ち、その有効面積が大きく、五、六員環キレートを形成できる位置に塩基性官能基 (錯生成基) 及び電子吸引基、供与基 (助色団) を持ち、さらには高次錯体が生成しやすいなどの特徴を有するイオン会合色

素、キレート色素が有効であり必然的に金属イオンに対して高感度を示す錯体を形成するものが有利と考えられる。

これらの観点より界面活性剤共存下、被分析物質、色素、金属イオン間での錯生成反応を利用する生体関連化合物の実用的な吸光光度法¹⁻⁵⁾を考案し、次いでこれら新規方法の各種市販製剤あるいは生体試料への適用、さらには反応機構の解明などについて検討した。

今回著者は、紙面の都合上、三元錯体生成反応、競合的錯生成反応に極めて有効であると考えられる Fig. 1 に示す 3 種のキサンテン系色素を取り上げ、三元錯体生成反応を利用する *o*-スルホフェニルフルオロンと [ニオブ (V) + ビスマス (III)] を用いるヒト血清アルブミンの定量と銀 (I) イオンの新しい挙動に着目したエオシンと銀 (I) を用いるアデニンの定量、さらに競合的錯体生成反応を用いる *o*-ヒドロキシヒドロキノンフタレイン (QP) とパラジウム (II) を用いる尿酸の定量の 3 方法について紹介する。

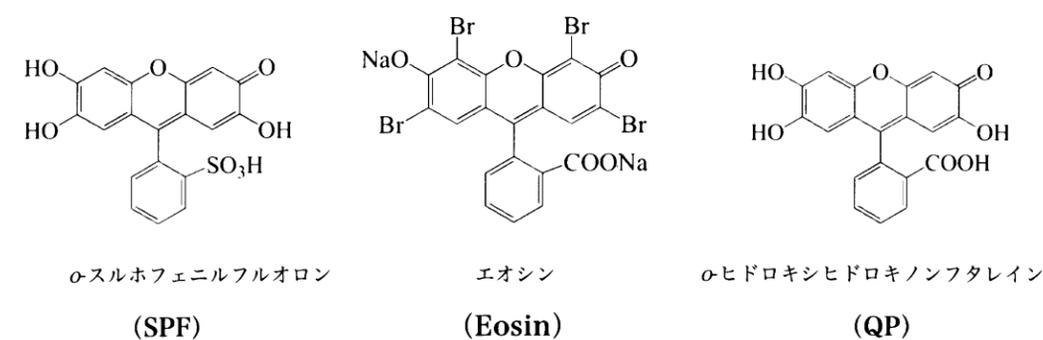


Fig. 1 Structures of xanthene dyes

2. *o*-スルホフェニルフルオロンと [ニオブ (V) + ビスマス (III)] を用いるアルブミンの定量

近年、慢性腎臓病 (Chronic Kidney disease, CKD) の概念が提唱され、腎障害のみならず、心疾患、高血圧、糖尿病のようなメタボリックシンドロームと密接に関連づけられてきているが、その早期発見、早期治療には、ミクロアルブミン尿の存在が重要な所見であることが提唱されている。従来より、尿タンパク質定量法として多くの方法が開発されているが、当研究室ではこれまでに {色素-金属} 錯体とタンパク質間で生成する三元錯体生成反応を利用する尿タンパク質測定法を数多く開発してきた。その中でピロガロールレッド-モリブデン (VI) 錯体法 (PR 法) は、現在本邦における尿タンパク質測定法のうち約 80% 以上を占め、汎用されている。しかしながら、その PR 法にも、①反応時間がやや長い、②低濃度のタンパク質に対して再現性が劣る、③目視検出に適用されにくい、④タンパク質間での反応性が相違する、などの難点を有している。

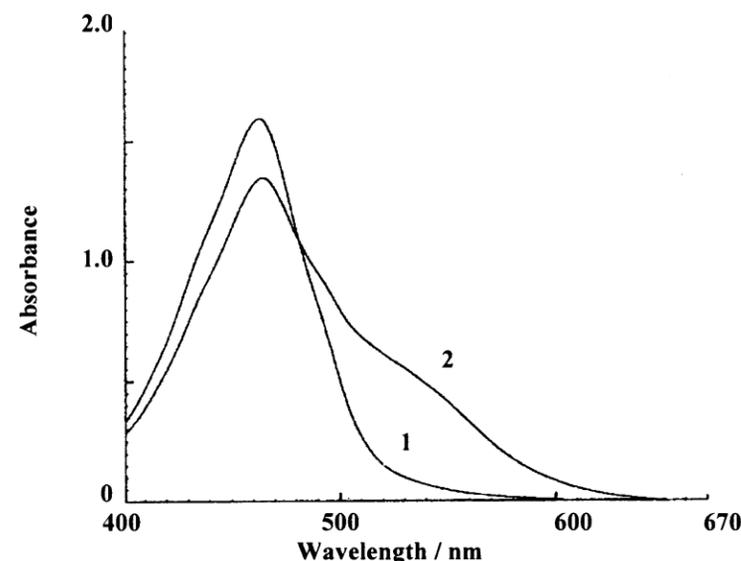


Fig. 2 Absorption spectra of HSA-SPF-metal and SPF-metal solutions.

HSA; $10 \mu\text{g ml}^{-1}$; metal ion: $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; SPF: $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; surfactant: 0.1 %; pH: 2.0; Curve 1: SPF-[Nb(V)+Bi(III)] solution; Curve 2: HSA-SPF-[Nb(V)+Bi(III)] solution; Reference: water.

そこで、色素として PR の構造異性体であり、金属イオンとの錯生成能が高い *o*-スルホフェニルフルオロン (SPF) を合成、精製^{9,10)}して用い、本色素と金属イオンを用いるタンパク質の測定法の開発を目的として検討した。また、実試料として本法と PR 法の比較検討を行った。

2-1 定量操作

10 ml のメスフラスコに $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ {ニオブ (V) + ビスマス (III)} 金属溶液、界面活性剤溶液 1.0 ml、緩衝液 (pH 2.0) 1.0 ml、 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ SPF 液 1.0 ml を加え、次いで厳密に希釈した HSA 溶液を加え、水で全量 10 ml とする。この溶液を攪拌しながら試験管に移し、室温で 10 分間静置後、HSA のみを除いて同様に処理して得た試薬ブランクを対照として 530 nm での吸光度を測定する。本定量操作によって調製した HSA-SPF-{ニオブ (V)+ ビスマス (III)} 溶液と SPF-{ニオブ (V)+ ビスマス (III)} 溶液の吸収スペクトルを Fig. 2 に示す。

2-2 検量線

2-1 の定量操作に従って検量線を作成したところ、 $1 \sim 15 \mu\text{g ml}^{-1}$ HSA の濃度範囲で原点を通る良好な直線を得ることができた。本操作法における HSA 定量時の感度は $2.77 \times 10^6 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ と高感度で、相対標準偏差 (RSD) は 0.88% ($n = 5$) と再現性にも優れていた。本定量法の感度は、PR 法の 2 倍、BPR-インジウム (III) 法¹¹⁾の 2 倍、クマシーブリリアントブルー G (CBB) 法¹²⁾の 4 倍を示し、また、HSA 低濃度領域での RSD を PR 法と比較すると Table 1 のように PR

法と比較しても優れた再現性を示す結果が得られた。

次に HSA 以外のタンパク質との反応性についても検討した。その結果 Table 2 にみられるように PR 法に比べて、どのタンパク質においても反応性が良く、比較的タンパク質間の反応性の相違が少ないことが認められた。例えば、PR 法では、低感度であったベンスジョーンズタンパクや α_1 -アンチトリプシンについて、本法では、測定することができた。PR 法に比べて本法は、どのタンパクにおいても反応性が良いという利点を有していた。

Table 1 Comparison of RSD between this method and PR method

HSA ($\mu\text{g/ml}$)	RSD (%)	
	This method	PR method
1.0	3.93	9.13
2.5	1.82	2.53
10.0	0.88	1.23

Table 2 Reaction between several proteins and the SPF-metal complex

Protein ^{a)}	This method (%) ^{b)}	PR method (%) ^{b)}
HSA	100	100
Hemoglobin	87	38
Myoglobin	112	53
Transferrin	83	115
γ -Globulin	86	85
β -Globulin	87	68
α_1 -Acid glycoprotein	52	35
Fibrinogen	63	58
Bence Jones protein	62	30
α_1 -Antitrypsin	89	28
Lactoferrin	76	73

a) Protein taken, $5 \mu\text{g/ml}$.

b) Percent with respect to HSA.

2-3 共存物質の影響

尿中タンパク質定量への有用性を評価するため様々な共存物質の影響について検討した結果、多量の鉄(II)、シュウ酸、尿酸以外の妨害は殆どなく、PR法にくらべても共存物質の影響がきわめて少ないということが認められた。

2-4 実試料への応用

ヒト尿試料における本法とPR法(和光純薬製総タンパク質定量キット Micro TP-Test Wako® 使用)を比較検討した。Fig. 3に本法とPR法で測定した尿中タンパク質量との間には、相関係数 $r = 0.945$, $Y = 1.174X + 0.418$ ($n = 21$) のように良好な相関が得られ、著しい差は見られなかった。本法での平均値 $\bar{y} = 4.74$ は、PR法での平均値 $\bar{x} = 3.71$ より若干高かった。この理由は、ア

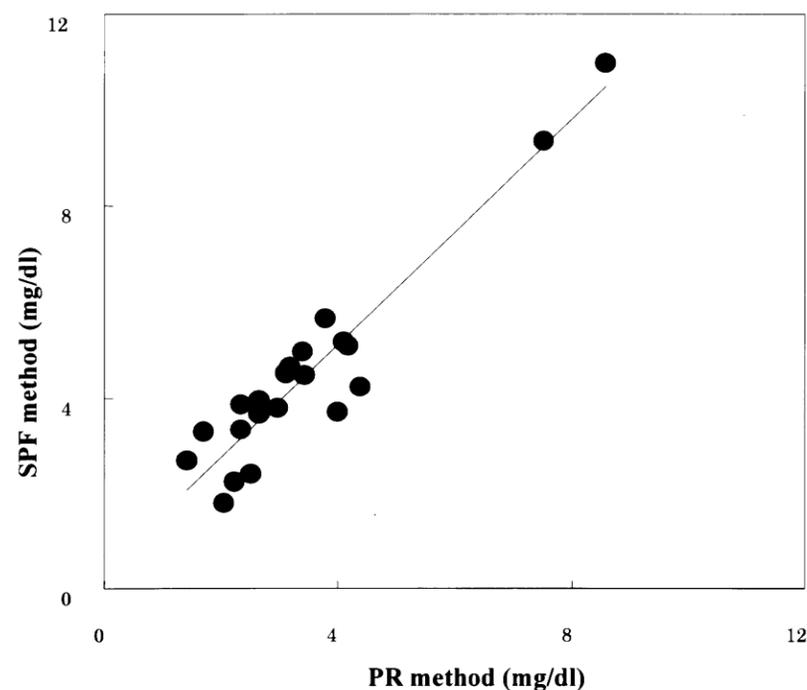


Fig. 3 Correlation between the urinary protein concentrations determined by the PR method (X) and the present method (Y)

ルブミン以外のタンパクに対して感度が高いことと、共存物質の影響が少ないことが反映していると考えられる。

2-5 結合様式についての検討

HSAと[SPF-{ニオブ(V)+ビスマス(III)}]錯体間で生成する会合体の結合サイト数(n)および結合定数(生成定数, K)の算出を試みたところ、22°Cにおける結合サイト数 $n = 64.5$, 結合定数 $K = 8.38 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ の値を算出することができた。

次に、van't Hoffプロット¹³⁾を用いて熱力学的パラメーター(ΔG , ΔH , ΔS)を求めた。一般に会合体の標準エネルギー変化は、生成定数(K)を用いて次のように表される。

$$\Delta G = -RT \ln K = \Delta H - T\Delta S \quad \dots (1)$$

$$\ln K = -\Delta H / RT + \Delta S / R \quad \dots (2)$$

ΔG , ΔH , ΔS はそれぞれGibbsの自由エネルギー変化、エンタルピー変化、エントロピー変化を示し、 R , T は定数である。

従って、 $\ln K$ を T^{-1} に対してプロットすると、Fig. 4のような直線が得られ、その直線部分の勾配が $-\Delta H/R$ 、切片が $\Delta S/R$ となり、これより ΔH , ΔS 及び ΔG を求めることができる。Table 3に最小二乗法処理によって得られた熱力学的パラメーターを表示する。この反応系での結合過程は、吸熱的($\Delta H > 0$)であるが、 ΔS の値が大きいので ΔG は負の値をとっている。従って、{SPF-金属}錯体とHSA間で生成する呈色体は、定性的には、

SPFの疎水性部分(芳香環部分)とHSAの疎水性部分(炭化水素側鎖部分)との相互作用、すなわち疎水性相互作用の結果であると考えられる。

一方、HSAの等電点は4.8なので、HSAはpH 2.0においては、陽性分子[HSA]⁺として存在しているので、[SPF-{ニオブ(V)+ビスマス(III)}]錯体とHSA間の結合は一次的には、主として、HSAの陽性部分とSPFの陰性部分の間での静電的作用が起り、次にSPFの芳香族部分とHSAの組み合わせの炭化水素鎖との疎水性相互作用が本呈色反応に関与していることが推察された。

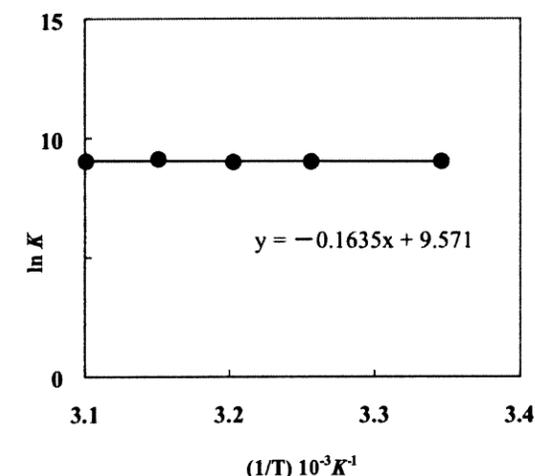


Fig. 4 van't Hoff plot of HSA-SPF-metal solution

Table 3 Thermodynamic parameter of HSA-SPF-metal binding

	ΔG (kJ mol ⁻¹)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	$-\Delta S$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	n	K (mol ⁻¹ dm ³)
HSA	-1.27	0.07	-4.57	64.5	0.84×10^4

2-6 小括

色素として SPF, 金属として {ニオブ (V) + ビスマス (III)} を用いる本法は, PR 法に比べ, 次の諸点での優位性が認められた. PR 法では感度の低かった多様なタンパクにおいても十分な感度を得られ, PR 法に比べて高感度で, 低濃度タンパクにおいても優れた再現性を有し, 共存物質の影響が顕著に改善され, 反応が迅速に進み, ミクロアルブミン尿症の簡便で高感度な検出方法になりうる可能性が示唆された.

3. エオシンと銀 (I) を用いるアデニンの定量

アデニン (6-アミノ-9H-プリン) (Fig. 5) は, 種々の生体分子の構成成分として生体内に広く分布し, 多くの生理活性作用を持つ含窒素化合物であるが, このアデニン中の窒素原子の非共有電子対を通じて, 銅 (II), 鉄 (II), 銀 (I) などと (N, N) 配位しやすい金属イオンと錯生成し, 三元錯体を生成すると考えられる. [金属-アデニン] 錯体と有機試薬とのイオン会合錯体を利用するアデニンの定量法について検索した結果, 金属イオンとして銀 (I), イオン会合性色素としてエオシンを用いるとき, アデニンとの間に鮮明な呈色体が生成することを認めた.

分析化学において, 定量感度の増大, 選択性の向上などを目的とした前処理操作が併用されるが, 水溶液中で沈殿しやすい反応系を利用すると

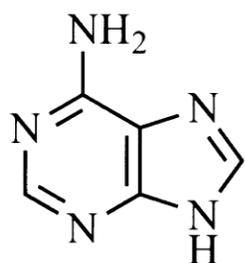


Fig. 5 Structure of Adenine

ときには, 溶媒抽出法や起泡分離法¹⁷⁾の他, メンブタン前濃縮操作法¹⁸⁾を用いることが多い. 近年は有機溶媒や界面活性剤の使用をできるだけ避けた分析法が推奨されており, 沈殿物をメンブタンフィルターで捕集後, 適当な溶媒に再溶解して測定するメンブタンフィルター利用法が, 活用されている. また, 再溶解操作の煩雑さを省略する目的でメンブタンフィルター捕集後の凝集体の色差を直接測定する方法^{19, 20)}も登場してきた. このような膜捕集を利用する分析法の設計は, 試料, 試薬, 廃液の少量化などの分析化学におけるダウンサイジングの面からも非常に有効な手法であると考えられ, 化学物質による汚染を防ぎ, 環境問題を解決するグリーンケミストリーの面からも有用な方法である.²¹⁾

[アデニン-銀 (I)-エオシン] 三元錯体は, 界面活性剤の共存しないとき, あるいは用いる界面活性剤の種類によっては, この三元錯体が容易に凝集し, 沈殿の生成が観察される. 従って, 本凝集体を捕集し, 測定することにより高感度なアデニン定量法が設定できると推察されるので, 本章では, メンブタンフィルターを用いて凝集体を捕集・濃縮する前処理操作法について検討した. その際, メンブタンフィルター捕集後, (1) 捕集した凝集体を溶解する方法 (凝集体溶解法) と (2) 捕集した凝集体の色差を比較する方法 (凝集体色差法) の2つの方法について検討した.

3-1 通常法による定量

10 ml のメスフラスコに 0.1 ~ 1.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ のアデニン含有液を加え, 次いで $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ 銀 (I) 液 1.0 ml, 0.1 mol dm^{-3} 酢酸 / 0.05 mol dm^{-3} EDTA · 3Na 緩衝液 (pH 5.4) 2.0 ml, 0.5 % MC (1000 ~ 1800 cps) 液 1.0 ml, $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ エオシン 0.8 ml を加え, 水で全量 10 ml とする. 別にアデニンのみを除いて同様に処理して得た試薬空試験液とともに 60°C で, 20 分間加温, 5 分水冷後の吸光度を試薬空試験液を対照に 560

nm で測定した.

検量線を作成したところ, 0.1 ~ 1.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ のアデニン濃度において良好な直線を得ることができ, 定量感度は, $\epsilon = 1.1 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を示し, 従来の Bratton-Marshall 試薬を用いる方法の7倍以上の感度を示した. また, RSDは, 0.87% ($n = 8$, 0.68 $\mu\text{g/ml}$ アデニン) であり, 再現性にも非常に優れていた.

次にアデノシン, ATP のようにアデニンを含む化合物について加水分解処理後の呈色反応について検討したところ, 0.2 mol dm^{-3} 硫酸酸性下, これらの化合物を加熱処理した後, 最終的に液性を pH 5.1 ~ 5.8 になるように調整し, 通常法の定量操作を行ったとき, アデニンとほぼ同感度で定量することができた.

アデニン以外の塩基の反応性について検討した結果, ピリミジン塩基のチミン, ウラシルやプリン塩基のグアニン, カフェイン, アデノシン,

ATP では全く呈色体は生成しなかった. 設定した標準操作に従って, 吸収スペクトルを測定したところ, Fig.6 に見られるようにアデニン-銀 (I)-エオシン錯体は 560 nm 付近で明瞭な吸収極大を示した.

3-2 共存物質の影響

本操作法における共存物質の影響をアデニン 0.68 $\mu\text{g ml}^{-1}$ を用いて, 検討した.

銀以外の金属イオン並びに塩化物イオン, リン酸イオン, 硫酸イオン, 硝酸イオンなどの陰イオン, ケエン酸, グルコースなどの有機物は, 共存の影響が極めて少ないことを認めた. 一方, 陰イオンとしては, HSAB (hard and soft acids and bases) 則²²⁻²⁴⁾における軟らかい塩基に属するヨウ化物イオンの共存は, 妨害することを認めた. 更に単独では, 呈色反応しなかったプリン塩基のグアニンは, 微量共存でも負の誤差を示した.

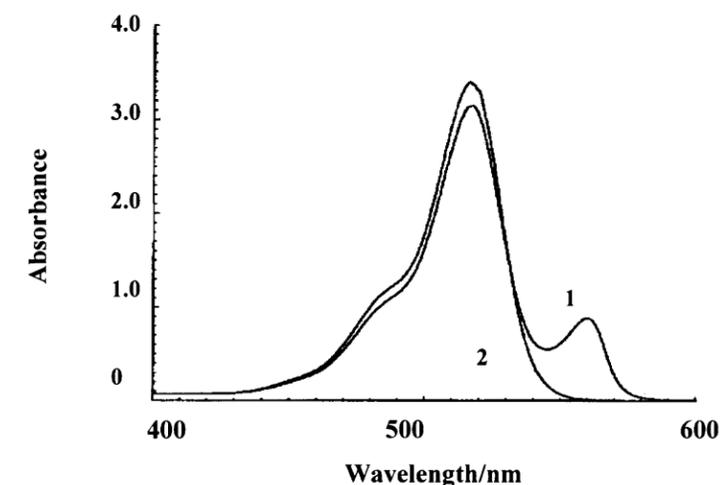


Fig. 6 Absorption spectra of Adenine-Ag(I) solution and Adenine-Ag(I)-Eosine solution

Adenine taken: 1.36 $\mu\text{g ml}^{-1}$; Ag(I): $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; Eosin: $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; 0.05% MC solution; Curve 1: Adenine-Ag(I)-Eosin; Curve 2: Ag(I)-Eosin; Referene: water

3-3 凝集体色差法による定量

捕集した凝集体を直接色差計で測定する場合の凝集体捕集過程操作は、凝集体捕集溶解法に準拠した。メンブランフィルター (MF) 上に凝集体を捕集した後、十分に乾燥させ、色彩色差計を用いて色差を測定する。色の数値化は JIS において採用されている $L^*a^*b^*$ 表示系を用い、色差を下記に示すように ΔE^*ab の数値で表す。

$$\Delta E^*ab = \{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2\}^{1/2}$$

L^* : 明度, 色相と彩度 (a^* : 赤方向, b^* : 黄方向)

3-4 会合体溶解法による定量

会合体溶解法は、反応で沈殿した生成物を再溶解させる方法であり、沈殿物の量が感度に影響を与えると考えられるので、第一段階での錯生成反応条件を検討した。最終的に pH 4.3 ~ 5.4 に液性を調整したとき 542 nm における吸光度は、最大で一定値を示した。次に界面活性剤の影響について検討したところ、非イオン性界面活性剤 0.05% MC(350 ~ 550 cps) 液を全量 10 ml に対し 0.1 ml を用いたとき、感度の面で優れていた。会合体の捕集、濃縮に用いる溶解剤及び MF の材質と

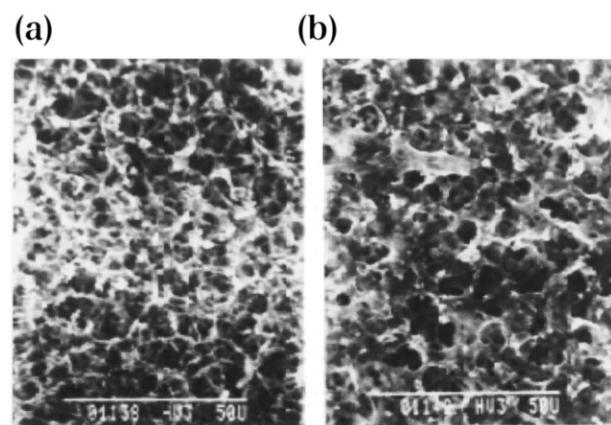


Fig. 7 Scanning electron microscope (SEM) pictures of the associate collected in membrane filters

Reagent blank {Ag (I) – Eosine}; (b) Sample [adenine–Ag (I)–Eosin]

孔径について検討したところ、セルロース混合エステル材質について、孔径 0.30 μm を用いたときが最も効率よく、また再現性よく会合体を捕集することができた。MF ごと溶解させる溶媒を検討した結果、DMSO を用いたときが吸光度は最大であった。本操作法により検量線を作成したところ、0.05 ~ 0.70 $\mu\text{g ml}^{-1}$ のアデニン濃度範囲で良好な直線が得られ、定量感度は通常法のほぼ 3 倍上昇することを認めた。0.27 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 定量時における RSD は、2.57% ($n = 6$) であった。

3-5 会合体色差法による定量

捕集した会合体を直接、色彩色差計^{25, 26)}で測定する場合の定量感度は、3-4 の会合体溶解法と同様に沈殿量に依存すると考えられるので、捕集過程操作は、会合体溶解法に準拠した。会合体色差法により作製した検量線は、0.03 ~ 0.3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ のアデニン濃度範囲で良好な直線が得られ、0.14 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 定量時における RSD は、3.55%, ($n=6$) であった。参考にメンブランフィルター上に捕集された会合体の写真および走査型電子顕微鏡写真を Fig. 7 および 8 に示す。

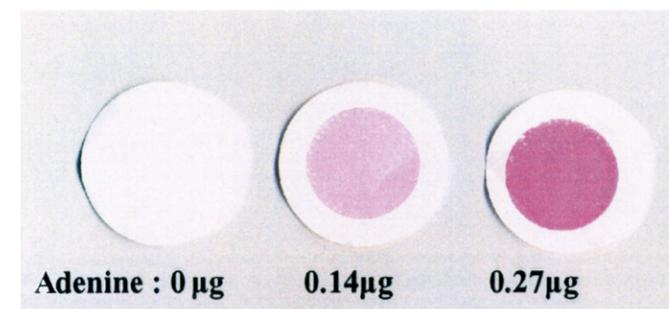


Fig. 8 Pictures of associate collected on membrane filters

3-6 会合体のキャラクタリゼーション

本反応系すなわち [銀 (I)–アデニン] とエオシン間で生成する会合体の結合モル比をモル比法及び連続変化法を用いて検討した。

その結果、呈色体のモル比は、銀 (I) : アデニン = 1 : 1 および [銀 (I)–アデニン] : エオシン = 1 : 1, すなわち銀 (I) : [銀 (I)–アデニン] : エオシン = 1 : 1 : 1 であることがわかった。次に呈色体の結合様式を複両逆数プロットを用いて算出したところ、25°C において結合サイト数 $n = 1.02$, 結合定数 $K = 4.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ の値が得られた。更により詳細なキャラクタリゼーションの解明を目的として van't Hoff プロットを用いて熱力学的パラメーターを求めた。

会合体の標準エネルギー変化は、生成定数 (K) を用いて次のように示される。

$$\Delta G^0 = -RT \ln K = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

$$\ln K = -\Delta H^0/RT + \Delta S^0/R$$

ΔG^0 , ΔH^0 , ΔS^0 は、それぞれ Gibbs の標準自由エネルギー変化、エンタルピー変化、エントロピー変化を示し、 R , T は定数である。したがって $\ln K$ を T^{-1} に対してプロットする (van't Hoff プロット) と直線が得られる。直線部分の勾配が $-\Delta H^0/R$, 切片が $\Delta S^0/R$ となり、これより ΔH^0 , ΔS^0 , ΔG^0

を求めることができる。その結果 $\Delta G^0 = -6.05 \text{ k J mol}^{-1}$, $\Delta H^0 = -26.42 \text{ k J mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = -68.35 \text{ J K}^{-1}$ であった。結合過程は発熱反応 (負の ΔH^0) であるが ΔS^0 値が ΔG^0 をほぼ支配しているため、エンタルピー駆動の典型的な静電的相互作用と考えられるパターンを示している。一方、エオシンの酸解離定数 pKa_2 , pKa_3 はそれぞれ、2.85, 4.95 と算出され²⁷⁾、また、アデニンの pKa_1 , pKa_2 はそれぞれ 4.25, 9.83 と算出されている²⁸⁾。したがって、強酸性域でのエオシン (H_3R) は、pH 5 付近で、約 60% が三個のプロトンの解離した型 R^{2-} で存在すると考えられる。従って [アデニン–銀 (I)] 錯体とエオシン間で生成する会合体は、正の電荷を帯びた [(アデニン–銀 (I))]⁺ と負の電荷を帯びたエオシンとの静電的相互作用によるイオン会合型三元錯体であると推察された。

3-7 小括

金属イオンとして銀 (I), 錯生成剤として、吸光および蛍光の両面から追跡が可能であり、大きなモル吸光度係数を持つなど、多くの優れた特性を持つフルオレセイン系色素のエオシンを用いるアデニン及びアデニンの簡便、高感度な分析法を開発した。更に生成した [アデニン–銀 (I)–エ

オシン]三元錯体のキャラクタリゼーションについても精査し、下記の知見を得た。

(1) 非イオン性界面活性剤のメチルセルロース共存下、 0.1 mol dm^{-3} 酢酸 / 0.05 mol dm^{-3} EDTA・3Na 緩衝液、色素としてエオシン、金属イオンとして Ag(I) を用いて、 $0.1 \sim 1.5 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ 濃度範囲のアデニンを、 $\epsilon = 1.1 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ の高感度で吸光度定量することができた。また、アデニン $0.68 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ における 8 回での相対標準偏差 (RSD) は 0.87% と再現性も極めて優れていた。更に、酸加水分解前処理することにより、アデノシン、ATP のようなアデニン含有化合物を同程度の感度で定量することができた。

(2) 少量の非イオン性界面活性剤のメチルセルロース共存下で生成した呈色体を凝集・濃縮することにより、(1) 凝集体溶解法、(2) 凝集体色差法、の二方法のメンブランフィルター前濃縮法を構築することができた。それぞれ $0.05 \sim 0.70 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ 、 $0.03 \sim 0.30 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ 濃度範囲のアデニンが定量可能で、(1) の吸光度法の約 3 倍の感度を示した。本法はダウンサイジング及びグリーンケミストリーの面でも評価できる方法である。

(3) 本反応系の結合サイト数及び結合定数は、 $n = 1.02$ 、 $K = 4.0 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ であり、熱力学パラメータはそれぞれ、 $\Delta G^0 = -25.33 \text{ kJ mol}^{-1}$ 、 $\Delta H^0 = -110.62 \text{ kJ mol}^{-1}$ 、 $\Delta S^0 = -286.17 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ であった。また、上記の定量法において生成した呈色体の組成は、アデニン:銀 (I) = 1:1 及び、[アデニン-銀 (I)]:エオシン = 1:1 であり、[アデニン-銀 (I)] 錯体とエオシンとの静電的相互作用によるイオン会合型錯体であると考えられる。

4. *o*-ヒドロキシヒドロキノンフタレイン-パラジウム (II) を用いる尿酸の定量

尿酸 (Fig. 9) は、プリン塩基の最終代謝分解産物で尿中に排泄されるが、ヒトは、尿酸を可溶性

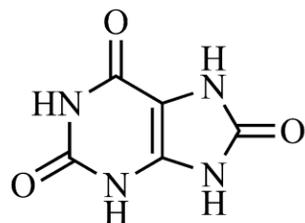


Fig. 9 Structure of uric acid

型に変換する酵素を所有していないことからさまざまな問題がおこっている。尿酸のほとんどは尿中に排泄され、血清中や尿中の尿酸の定量は高尿酸血症、悪性リンパ腫、貧血、糖尿病、腎不全、Lesch-Nyhan (レッシュナイハン) 症候群²⁸⁾などの治療や診断においても大変重要であると考えられ、メタボリックシンドローム^{29,30)}の有用な指標であるということも知られている。

尿酸の分析方法としては、分光光度法³¹⁻³⁵⁾、電気分析³⁶⁻⁴⁰⁾、高速液体クロマトグラフィー⁴¹⁾、蛍光光度法⁴²⁻⁴⁴⁾、化学発光法⁴⁵⁻⁴⁷⁾などがあげられる。比色法^{48,49)}では、低感度、低再現性、操作の煩雑さ、アスコルビン酸などの共存物質の影響などが問題とされ、満足の方法とはいえない。ヘキサデシルトリメチルアンモニウム (HTA) 共存下、*o*-ヒドロキシヒドロキノンフタレイン (QP) とパラジウム (II) を用いることにより QP-パラジウム (II)-HTA 複合体の呈色が、痕跡量の尿酸を加えることにより、退色することに着目し、尿酸の新規定量法の開発についての開発とヒト尿中での分析について検討した。

4-1 標準操作

10 ml のメスフラスコに緩衝液 3.0ml、 $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ HTA 水溶液 0.4 ml、 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ パラジウム (II) 0.4 ml、尿酸を含む水溶液、 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ QP 溶液を 1.0 ml を加え、試験管に移す。ついでこれらを 60°C 、30 分間加温、5 分水冷した後の吸光度を試薬空試験液を対照に 635 nm で測定する。

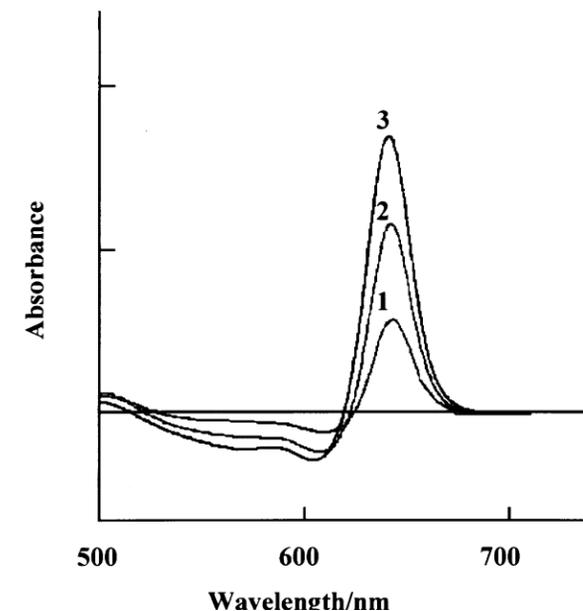


Fig. 10 Difference spectra of Pd(II)-QP solution and UA-Pd (II) -QP solution.

UA: Curve 1, $0.067 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$; Curve 2, $0.13 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$; Curve 3, $0.20 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$.
Pd(II): $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; QP: $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; CTAB: $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$;
pH 8.2.

Fig. 10 は、標準操作で得られた吸収スペクトルを示す。 635 nm における吸光度差は、尿酸の濃度に比例して増加している。

標準操作における検量線を作成したところ、尿酸 $0.01 \sim 0.20 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ の範囲において良好な直線性が得られた。見かけのモル吸光係数 (ϵ) は検量線の勾配より、 $6.5 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ と算出された。 $0.10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ の尿酸測定 ($n = 5$) 時の相対標準偏差 (RSD) は 1.5% であり、既存の方法^{48,49)}よりも 20 倍の感度を示し、優れた再現性を示した。

4-2 共存物質の影響

標準定量条件下、種々の物質の共存による影響を検討したところ、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、塩化物イオン、硝酸イオン、硫酸イオン、リン酸イオン、グルコース、カフェイン、グリシン、ビリルビン、尿素の共存に関して大過剰量の添加にもかかわらずまったく影響を示さなかった。また、還元剤であるアスコルビン

酸、シュウ酸の共存でも影響はなかった。鉄 (III)、クレアチニン、ヒト血清アルブミンでは大過剰の添加の際に影響を示したが、 635 nm における吸光度差においては、実際通常の試料濃度において全く影響を及ぼさないことがわかった。

4-3 実試料の適用

尿中の尿酸定量について試みたところ、前処理なしで 100 倍希釈するのみで共存物質の影響を除去することができた。同条件での尿酸の添加回収率は、98~104% で相対標準偏差 (RSD) は、3.1% であった。ウリカーゼ / N-(3-スルホフェニル)-3-メトキシ-5-メチルアニリン法 (L タイプワコー UA-M クリニカルキット、和光純薬) と本法との結果について T 検定を行った結果、95% の信頼区間で危険率 ($p = 0.05$, $n = 4$) $t = 0.159$ 2.776 と有意差は認められず、よい一致を示した。これらの結果を Table 4 に示す。

Table 4 Determination of UA in human urine samples

Sample ^a	Found, $\mu\text{g ml}^{-1}$		RSD ^b (%)	Recovery ^c (%)
	Present method	Other method ^a		
A	155 \pm 4.8 ^d	146	3.1	101.5
B	224 \pm 5.6	230	2.5	98.2
C	224 \pm 5.6	182	2.8	103.6

The calculated $t = 0.159$ was lower than critical t value ($p = 0.05, n = 4$) of 2.776. a. Other method: the uricase N-(3-sulfopropyl)-3-methoxy-5-methylaniline method (a. clinical kit, L type Wako UA-M, Wako Pure Chem.) b. Average of 5 determination c. UA taken, $5.0 \times 10^{-2} \mu\text{g ml}^{-1}$. d. Average \pm standard deviation.

4-4 小括

反応機構を明らかにするため、呈色錯体の組成比を連続変化法とモル比法で検討したところ、[パラジウム(II)]:[QP]は、[1:1]であり界面活性剤共存下でも同様に[パラジウム(II)]:[QP-HTA]は、1:1であった。実験結果よりパラジウム(II):QP:HTAの三元錯体の組成比は、[1:1:1]であることが推定され、尿酸はパラジウム(II)と[1:1]で錯体を形成していると考えられた。さらにパラジウム(II)-QP-HTA三元錯体の組成比などの反応機構について明らかにするためには詳細な検討が必要であるが、QPとパラジウム(II)とHTAを用いる簡便高感度な尿酸の定量法が、高感度($\epsilon = 6.5 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)であり、既存のキットを用いた方法との比較では測定値は良い一致を示し、感度、回収率ともに優れた結果を得ることができた。また、共存物質とくにアスコルビン酸の妨害を受け難いという点においても非常に優れている方法といえる。本法は、抽出操作を全く必要とせず実試料においても簡便高感度な尿酸の定量法であるといえる。

5. まとめ

本研究により、一般に普及している分光光度計を用いて簡便な操作で生体関連物質が高感度で測定することができた。また、従来ほとんど注目されていなかった銀(I)とアデニンや尿酸とパラジウムのように生体関連物質の金属イオンに対する挙動が明らかになり、生体中の金属に関する生命科学の領域であるメタロミクス分野の進展にも十分寄与できたものと考えられる。

謝辞 本研究に際し、御指導と御鞭撻を賜りました大阪薬科大学 故森逸男名誉教授に深甚なる謝意を表します。また、種々の御激励および御助言を賜りました大阪薬科大学 千熊正彦学長に謹んで感謝の意を表します。さらに本実験に際し、御協力いただきました大阪薬科大学第二分析化学教室、臨床化学研究室諸氏に深く感謝致します。

REFERENCES

- 1) Fujita Y., Mori I., Kitano S., *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 1289-1295 (1983).

- 2) Fujita Y., Mori I., Fujita K., Nakahashi Y., Tanaka T., *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 5004-5009 (1987).
- 3) Fujita Y., Mori I., Toyoda M., *Ana. Sci.*, **6**, 807-811 (1990).
- 4) Fujita Y., Mori I., Toyoda M., *Ana. Sci.*, **8**, 693-694 (1992).
- 5) Fujita Y., Mori I., Kitano S., *Bunseki Kagaku*, **32**, E327-333 (1983).
- 6) Hishida A., *Kidney and Dialysis*, **62**, 859-863 (2007).
- 7) Yamagata K. *Clinical and Experimental Med. (IGAKU NO AYUMI)*, **222**, 779-783 (2007).
- 8) Odagiri R., *Rinsyo-kensa*, **33**, 921-927 (1989).
- 9) Liebermann C., *Chem. Ber.*, 1901, **34**, 2299-2303 (1901).
- 10) Sano H., *Bull Chem. Soc. Jpn.*, **31**, 974-980 (1958).
- 11) Kosaka H., Doi K., Okamoto K., Fujita Y., *J. Clin. Lab. Inst. Reag.*, **23**, 9-16 (2000).
- 12) Bradford M.M., *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
- 13) Sekiguchi K., Iwatsuru M., *Yakuzaigaku*, **39**, 43-48 (1979).
- 14) Beringhelli T., Freni M., Morazzoni F., Romiti P., Servida R., *Spectrochim. Acta* 37A, 763-771 (1981).
- 15) Apeca A. N., Mikulski C. M., Iaconianni F. J., Iaconianni, L. L. Pytlewski, Karayannis N. M., *J. Inorg. Chem.*, **43**, 2771-2776 (1981).
- 16) Mikulski C. M., Cocco S., de Franco N., Moore T., *Inorg. Chim. Acta*, **106** 89-95 (1985).
- 17) 平出正孝, 水池敦: ぶんせき (*Bunseki*), **4**, 284-288 (1992).
- 18) Taguchi S., Kasahara K., Hata N., *Bunseki Kagaku*, **7**, 505-520 (1995).
- 19) Yokota H., Abe S., *Bunseki Kagaku*, **46**, 689-693 (1997).
- 20) 遠藤昌敏, 横田文彦, 水口仁志, ぶんせき (*Bunseki*), **1**, 9-16 (2002).
- 21) 柘植秀樹, 荻野和子, 竹内茂彌, “環境と化学”, 東京化学同人 (2002).
- 22) R. G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3533-3539 (1963).
- 23) R. G. Pearson, *Science*, **151**, 172-177 (1966).
- 24) R. G. Pearson, *J. Chem. Educ.*, **45**, 581-586 (1968).
- 25) JIS Z 8729, 色の表示方法 - L*a*b* 表色系及び L*u*v* 表色系 (2004).
- 26) JIS Z 8730, 色の表示方法 - 物体色の色差 (2004).
- 27) Fujita Y., Mori I., Toyoda M., Matsuo T., *Anal. Sci.*, **9**, 829-834 (1993).
- 28) Shaw G., “*Comprehensive Heterocyclic Chemistry, vol. 5*”, 1984, p. 523 (Pergamon Press Ltd., London).
- 29) Fujimori S., *Diagnosis and Treatment*, 7-14 (2006).
- 30) Ichida K., Hosoya T., *Sogo Rinsho*, **56**, 2148-2153, (2005).
- 31) Dutt V. S. E., Mottola H. A., *Anal. Chem.*, **46**, 1777 (1974).
- 32) Matsuo S., Omiya C., Ota M., *Eisei Kensa*, **21**, 1068-1071 (1972).
- 33) Kageyama N., *Clin. Chim. Acta*, **31**, 421-426 (1971).
- 34) Dubois H., Dulcoux M., Greiling V., *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **27**, 151-156 (1989).
- 35) Maehata E., Irino T., *Eisei Kensa*, **21**, 1080-1084 (1979).
- 36) Wang Z., Zhang D., Zhang Y., Zhou S., *Anal. Lett.*, **35**, 1453-1464 (2002).
- 37) Wang Z., Wang Y., Luo G., *Analyst (London)*, **127**, 1353 - 1358 (2002).
- 38) Khoo S. B., Chen F., *Anal. Chem.*, **74**, 5734-5741 (2002).
- 39) Ye J-S., Zhang W. D., Gan L. M., Xu G. Q., Sheu F-S., *Electroanalysis*, **21**, 1693-1698 (2003).
- 40) Wang J., Yang S., Cai R., Lin Z., Liu Z., *Talanta*, **65**, 799-805 (2005).
- 41) Jen J-F., Hsia S-L., Liu K-H., *Talanta*, **58**, 711-717 (2002).
- 42) Amunson D. M., Zhou M., *J. Biochem. Biophys. Methods*, **38**, 43-52 (1999).

- 43) Palamakumbura A. H., Trackman P. C., *Anal. Biochem.*, **300**, 245-251 (2002).
- 44) Galbán J., Andreu Y., M. Almenara J., de Marcos S., Castillo J. R., *Talanta*, **54**, 847-854 (2001).
- 45) Kubo H., Toriba A., *Anal. Chim. Acta*, **353**, 345-349 (1997).
- 46) Zhang D. J., Huang Y. M., Zhang Z. J., *Chin. J. Anal. Chem.*, **29**, 446-449 (2001).
- 47) Han S., Liu E., Li H., *Anal. Sci.*, **21**, 111-114 (2005).
- 48) Bhargava A. K., Lal H., Pundir C. S., *J. Biochem. Biophys. Methods*, **39**, 125-136 (1999).
- 49) Suzuki M., Takayanagi M., Yashiro T., *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 2745-2747 (1991).