

— Review —

キサントン系色素を用いる金属イオン及び 関連化合物の光分析法の開発に関する研究

星野 満^{a*}, 藤田芳一^b

Studies on Development of Photometry for Metal ions and Related Compounds by Using Xanthene dyes

Mitsuru HOSHINO and Yoshikazu FUJITA

^aSenju Pharmaceutical Co., Ltd., 2-5-8 Hiranomachi, Chuo-ku, Osaka 541-0046, Japan^bOsaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1 Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan

(Received November 22, 2012; Accepted December 14, 2012)

Metal ions are utilized as architectural materials, metal alloys, and clinical instruments. Further, they play an important function related to nutrition. On the other hand, they aid in the manifestation of toxicity and induce symptoms of systemic toxicity. Since the various roles of metal ions are not clear in a lot of cases, the high sensitivity, high selectivity, and simple determination of metal ions are needed.

In this report, five photometric methods—four spectrophotometric methods and one spectrofluorometric method—are introduced. The spectrophotometry target for three metal ions (iron, titanium, and cobalt ions) is a metal-related substance (ascorbic acid). Each measurement range obeyed Beer's law with an effective molar absorptivity and a relative standard deviation of 20–670 ng mL⁻¹, 1.3×10⁵ L mol⁻¹ cm⁻¹, and 0.77% (n=8) for iron; 24–340 ng mL⁻¹, 2.24×10⁵ L mol⁻¹ cm⁻¹ and 0.64% (n=8) for titanium; 20–470 ng mL⁻¹, 1.35×10⁵ L mol⁻¹ cm⁻¹, and 0.66% (n=5) for cobalt; and 20–120 ng mL⁻¹, 2.1×10⁶ L mol⁻¹ cm⁻¹, and 2.2% (n=5) for ascorbic acid. Their sensitivity were higher than those of conventional methods, and good reproducibility was achieved. On the other hand, the spectrofluorometry target for one metal ion (aluminum). The measurement range of this method was found to be 0.03–1.50 ng mL⁻¹, which is over 10 times higher than that for spectrophotometry measurements that were previously performed in our laboratory. In addition, we considered the composition of colored complexes, performed characterizations, and analyzed the crystal structures of xanthene dyes.

Key words —Spectrophotometry, Spectrofluorometry, Xanthene dye, Metal ions, Metal-related compounds

1. はじめに

金属は生体にとって欠かすことのできない必須元素である。一方、その毒性によってイタイイタイ病や水俣病のような中毒症状や種々の過剰症なども惹起することも知られており、金属は生体にとって非常に有益である一方で毒性を示す両面性がある。近年、メタロミクス (metallomics) が生体金属に関連した研究分野の総合化をはかるため

の新しい科学領域として提唱されている。しかしながら、これらの多岐にわたる金属イオンの生体内の役割については未解明な部分も多く、金属イオンをより高感度に、より高選択性に、また、より簡便に定量できる分析法の開発が熱望されている。分析化学は、医薬品分析、環境分析、食品分析等あらゆる分野に汎用されている必要不可欠な基盤技術のひとつであり、この分析化学の発展には分析機器の発展に代表されるハード面での進

*^a 千寿製薬株式会社 開発本部 レギュラトリーサイエンス部, 541-0046 大阪市中央区平野町2丁目5番8号,
e-mail: mitsuru-hoshino@senju.co.jp

^b 大阪薬科大学 臨床化学研究室
本論考は、星野満の博士論文をもとに再構成したものである。

歩、分析試薬とその利用法の開発に代表されるソフト面での進歩がその両輪である。今回、ハード面では吸光光度法、蛍光光度法を、ソフト面ではキサントゲン系色素を用いて新規定量法を開発した。

光分析法の代表である吸光光度法は、簡便、迅速、再現性に優れた方法として金属あるいは非金属イオン、さらには医薬品、生体関連物質などの分析に汎用されるなど、応用範囲は極めて広い分析法であるが、近年では新しい反応原理の探索や有機試薬の開発も含め、以前ほど活発には行われていないのが現状である。しかしながら、吸光光度法は「 $A = \epsilon c l$ で示されるように、測定値が ϵ によって一義的に定義されるので、吸光度を再現性よく測定できる」、 「安価な機器を用いて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」などの特徴を有していることに変わりはない。次に、蛍光光度法であるが、吸光光度法に比べて高感度である場合が多い。さらに、すべての物質が光照射によって蛍光を生じるわけではなく、励起光と蛍光の波長が蛍光物質によって異なるため、目的とする蛍光物質が他の物質と識別されるので高選択性である。次に、今回の新規定量法の開発にあたって用いたキサントゲン系色素は、「モル吸光係数が大きい」、 「吸収極大波長が長波長域にある」といった吸光光度法に適した特徴、「強い蛍光性を示す」、 「発光量子収率が大きい」、 「蛍光極大が長波長域である」といった蛍光光度法に適した特徴、さらには「合成、精製、誘導化などが容易」、 「生体毒性が少ない」などの優れた特性を有している¹⁾。

本研究では呈色反応及び蛍光反応両面の追跡が可能で、優れた特性を有するキサントゲン系色素を用いる金属イオン及び関連化合物の分析法の開発を目的として検討することとした。被分析金属イオンとしては、(O, O) 配位しやすい鉄イオン、チタンイオン、アルミニウムイオン、コバルトイオンを取り上げ、また有機化合物として鉄イオンとの関連性が深いアスコルビン酸の分析について検索した。更に、先に記載した吸光光度法の特長を考察しつつ、呈色錯体のキャラクタリゼーシ

ョン、色素と金属イオンの反応様式（生成定数と反応速度など）、界面活性剤の併用効果、キサントゲン系色素の構造などについても一部探索した。

2. キサントゲン系色素を用いる金属イオンの分析法

2-1. *o*-カルボキシフェニルフルオロンを用いる全鉄及び鉄(III)の吸光光度定量法並びに呈色錯体のキャラクタリゼーション

鉄はクラーク数 4.70 で元素中 4 番目に多い存在比を示し、生物圏においてもほとんど全ての生物に必須であり、酸素運搬や DNA 合成などの酸化還元を担う酵素の活性中心として利用されている微量金属である。一方、過剰鉄はその高い反応性ゆえにフリーラジカルの主たる産生源として、蛋白質・核酸・脂質等の生体高分子にダメージを与えるため、C 型肝炎ウイルスによる肝細胞癌、アルツハイマー病、パーキンソン病、心筋梗塞、脳卒中、高血圧、糖尿病、腎不全などの多くの疾患の発症・病態形成に深く関与していることが知られている。しかしながら、標準酸化還元電位が +0.77V と中程度のため、大部分が鉄(III)及び鉄(II)の形で常時共存しており、環境中だけでなく、生体内での挙動、分布、役割等について未だ不明な点が多く、臨床検査の現場においても遊離鉄や不飽和結合能を簡便、正確に測定する満足な方法は現状においてもほとんどない。

当研究室においても、キサントゲン色素のうち種々の金属イオンと鋭敏に反応するフェニルフルオロンの *o*-位にカルボキシル基を導入した *o*-カルボキシフェニルフルオロン (OCPF, *o*-ヒドロキシヒドロキノンフタレイン) を用いた鉄(III)の吸光光度定量法について報告しているが^{2)~4)}、鉄(III)および鉄(II)を考慮したスペシエーション分析については考察していない。今回、鉄(III)あるいは鉄(II)との反応性を詳細に検討し、ピシン/水酸化ナトリウム緩衝液とポリビニルピロリドン (PVP) 共存下、OCPF を用いる全鉄及び両イオンの簡便、高感度な分別定量法を開発した (Fig. 1)。更に、その反応様式や呈色錯体の特性を分光光度法、電子スピン共鳴法 (ESR) を用

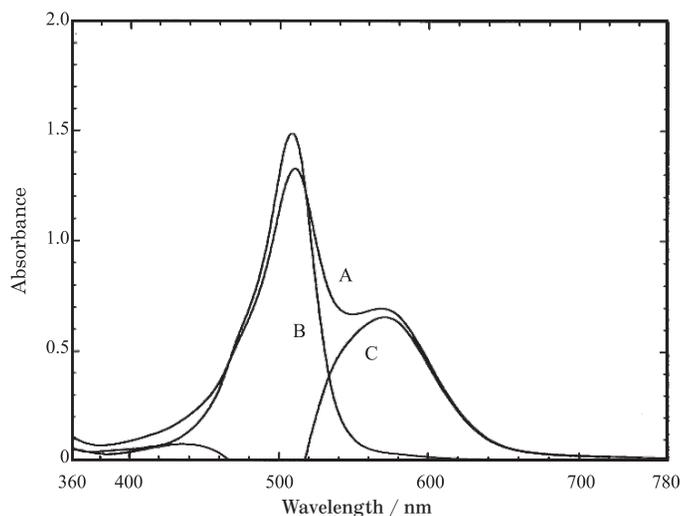


Fig. 1 Absorption spectra. Fe (II), Fe (III): 5.0×10^{-6} mol L $^{-1}$, PVP: 0.4%, pH: 9.0, KCN: 1.0×10^{-3} mol L $^{-1}$, OCPF: 1.0×10^{-4} mol L $^{-1}$, Curve A: Fe (II)-OCPF and Fe (III)-OCPF solutions in the absence of KCN, Curve B: OCPF solution and Fe (II)-OCPF solution in the presence of KCN, Curve C: Curve A minus Curve B, Reference: water.

いて精査した。加えて、本呈色反応を利用するフローインジェクション法 (FIA) への適用についても検討を加えた。

本法の定量操作に従って検量線を作成したところ、 $20 \sim 670$ ng mL $^{-1}$ の鉄濃度で良好な直線を得ることができた。OCPF に対する {鉄(III)-OCPF} 溶液, {鉄(II)-OCPF} 溶液, 及びシアン化カリウムを用いた場合の {鉄(III)-OCPF} 溶液の見かけのモル吸光係数 (ϵ) はいずれも 1.3×10^5 L mol $^{-1}$ cm $^{-1}$ であり, 吸光度 0.001 を示す Sandell 表示感度は 0.430 ng cm $^{-2}$ であり, α -フェナントロリン (phen) 法の 10 倍以上, チオシアン酸塩法の約 10 倍, ピピリジン (byp) 法の 15 倍以上を示した。また, 相対標準偏差 (RSD) は 167 ng mL $^{-1}$ において 0.77% ($n=8$) であり, 極めて再現性にも優れていた。また, 本法及び phen 法を製剤中の鉄 (III) 及び鉄 (II) の定量に応用し, その分析値, 回収率を求めた。その結果, Table 1 に示すように, 各試料とも phen 法と同等あるいはそれ以上の良好な分析値及び回収率が得られ, 実用分析法として十分利用し得ることを認めた。

次に, 鉄 (III) あるいは鉄 (II) と OCPF との組成比について PVP の共存, 非共存下でそれぞれ連続変化法及びモル比法を用いて精査した。その結果, ビシン/水酸化ナトリウム緩衝液を用い

たとき, PVP 非併用下では鉄 (III): OCPF, 及び鉄 (II): OCPF はともに 1:1 であるのに対し, PVP を併用する場合には鉄 (III) と OCPF, 及び鉄 (II) と OCPF のモル比がいずれも鉄: OCPF = 1:3 であり高次化現象が観察された。また, 種々の緩衝液を用いて同様に PVP の共存, 非共存下それぞれについて組成を検討した結果, 用いる緩衝液によって, 鉄 (III) あるいは鉄 (II) と OCPF との組成比が大きく相違するという興味ある結果を得ることができた。さらに, {鉄(III)-OCPF} 錯体の存在を確認するため, ESR を用いて検討した。その結果, Fig. 2 に示すように {鉄(III)-OCPF} 錯体を 77k で測定したとき, ESR シグナルが 150mT 付近に, g 値が 4.4 付近の単一のシグナルとして現れた。一方, 本シグナルは {鉄(II)-OCPF} 錯体では現れなかった。このことから, 鉄 (III) と OCPF を混和したとき {鉄(III)-OCPF} 錯体として存在することが確認できた。

本呈色反応が非常に速やかに進行することが認められたので, FIA による全鉄の開発を目的として, 流量, 試料注入量, 測定波長, 溶液類の組成などについて若干検討を加えた。その結果, $60 \sim 280$ ng mL $^{-1}$ の鉄を感度良く定量することができ, 硫酸鉄製剤に応用したところ, 通常の吸光度法と類似した分析結果を得ることができ, 実用分析法としても十分利用できることを認めた。

Table 1 Total iron and iron (III) in pharmaceutical preparations.

Sample	Amount of total iron (mg) ^{a)}				Amount of iron (III) (mg) ^{a)}	
	Nominal	Found ^{b)} (Recovery(%) ^{c)}		Found ^{b)} (Recovery(%) ^{c)}		
		This method	Phen method	This method	Phen method ^{d)}	
A	50	50.1 (102.3)	49.7 (101.5)	9.6 (102.1)	8.6	
B	100	99.3 (101.2)	99.0 (100.3)	14.5 (101.6)	9.7	
C	50	49.0 (99.0)	50.8 (101.2)	10.6 (103.1)	8.1	
D	105	105.4 (96.2)	104.4 (100.3)	2.7 (101.1)	2.7	
E	100	102.6 (100.5)	103.2 (100.6)	5.4 (101.5)	7.0	
F	40	41.9 (99.3)	40.4 (101.4)	41.6 (102.1)	37.8	
G	2	1.7 (102.8)	1.7 (102.2)	1.6 (99.6)	1.5	

Sample A: Sodium Ferrous Citrate (tablet), Sample B: Sodium Ferrous Citrate (granule), Sample C: Sodium Ferrous Citrate (tablet), Sample D: Ferrous Sulfate (tablet), Sample E: Ferrous Fumarate (capsule), Sample F: Chondroitin Sulfate-Iron Colloid (ampule), Sample G: Iron (III) Pyrophosphate (tablet, food). a) mg for 1 tablet, 1 package, 1 capsule, and 1 ampule, b) The average of 5 determinations, c) Iron taken, 16.7 μg , d) Total iron minus iron (II) by phen method.

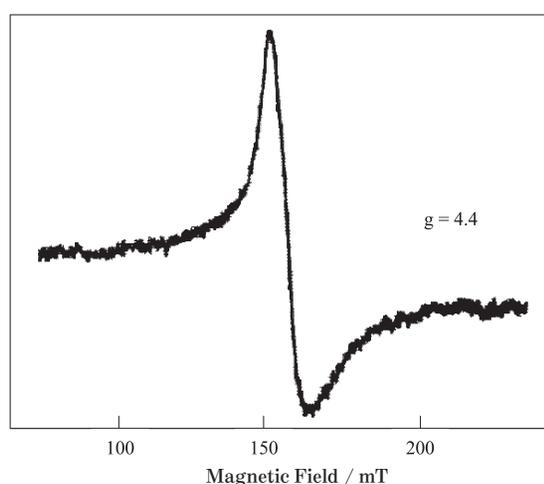


Fig. 2 ESR spectrum. OCPF:Fe = 20:1 (Fe 100 μM), Temperature: 77 K, Power: 5 mW, Field: 150 \pm 100 mT, Sweep time: 8 min/200 mT, Mod.: 0.63 mT, Receiver gain: 5 \times 100, Time constant: 0.1 s.

2-2. *o*-カルボキシフェニルフルオロンを用いるチタン(IV)の吸光度定量法

チタンはクラーク数が0.46で元素中第10位と比較的豊富に存在し、近年では、工業、あるいは生物医学分野での使用が増加している。特に生物医学分野では抗がん剤、インプラント、造影剤で用いられ、生体内で生化学的経路中に多く存在していることから生物学的視点からも大いに関心が持たれている。しかしながら、チタン(IV)の生化学的挙動についてはほとんど知られていないのが現状であり、チタン(IV)化合物には難溶解性のものもあることから、蓄積により局所的な毒性を示す可能性がある。そのため、今後、生体に対

する疾患の誘因、地球環境汚染などの問題を引き起こす可能性を有しており、チタン(IV)の生物学的な役割の解明のためには微量分析法の開発が必須である。今回、強酸性域での陽イオン性界面活性剤である塩化セチルトリメチルアンモニウム(CTAC)共存下、OCPFを用いるチタン(IV)の簡便な吸光度定量法を開発した (Fig. 3)。

本法の定量操作に従って検量線を作成したところ、24~340 ng mL^{-1} のチタン(IV)濃度範囲で良好な直線を得ることができた。見かけのモル吸光係数(ϵ)は $2.24 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、Sandell表示感度は 0.217 ng cm^{-2} 、RSDは0.64% ($n=8$)であり再現性にも優れていた。本定量法の感度はタイ

ロン法⁸⁾の15倍、クロムアズロール S-CTAC 法⁹⁾の3倍の定量感度を示した。本法をヒト尿、子牛血清、廃水を用いて回収率を求めるところ、Table 2に示すように、99.0~100.9%と非常に良好な回収率が得られ、実用分析法として十分利用し得ることを認めた。

次に、チタン(IV)とOCPF、及びOCPFとCTACの組成比を連続変化法、モル比法を用いて検討した。その結果、それぞれ1:4及び1:1であることが確認でき、CTACの共存下で $\{\text{Ti}(\text{OCPF})_4(\text{CTAC})_4\}$ の三元錯体を生成していることが示唆された。これは、チタン(IV)の配位数は一般的に6である場合が多いのに対し本呈色体では8を取っている可能性があり、非常に興味ある金属錯体であることが示された。

2-3. *o*-カルボキシフェニルフルオロンを用いたチタン(IV)の定量条件下における化学平衡及び反応速度の解析

キサンテン系色素は、種々の金属イオンや生体物質などと錯生成するため、優れた呈色色素として広く用いられ^{5)~7)}、分析への応用報告が数多くあるが、本色素と金属イオン間の反応メカニズムについては、ほとんど報告されていない。そこで、OCPFを用いたチタン(IV)の定量条件下における反応メカニズムについて化学平衡論及び反応速度論の観点から検討を加えた。

OCPFの pK_{a1} の算出：

OCPFは水溶液中でpH依存的に、1価の陽イオン種、中性種、1価の陰イオン種、2価陰イオン種など、様々な化学種を示すことが予想され

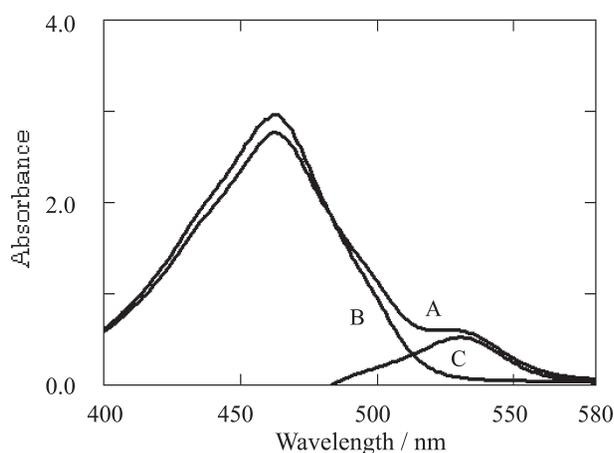


Fig. 3 Absorption Spectra.
OCPF: $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, Ti(IV): $2.5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, CTAC: $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH 0.8
Curve A, Ti(IV)-OCPF solution; Curve B, OCPF solution; Curve C, Curve A minus Curve B.

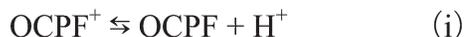
Table 2 Recovery tests of titanium spiked in biological and water sample.

Sample	Recovery(%)	RSD(%)
Urine	99.0	1.5 ($n=4$)
Calf serum	100.9	6.0 ($n=4$)
Wastewater*	100.2	1.3 ($n=4$)

*not pretreated

Ti(IV): 120 ng mL^{-1} , CTAC: $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH 0.8, OCPF: $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, Reference: OCPF solution.

る。従って、CTAC 共存下で OCPF の酸解離定数 (pK_{a1}) を (i) 及び (ii) 式を用いて検討した。



$$K_{a1} = \frac{[\text{H}^+][\text{OCPF}]}{[\text{OCPF}^+]} \quad (\text{ii})$$

(ii) 式は次のように表すことができる。

$$\text{pH} = \text{p}K_{a1} - \log \frac{[\text{OCPF}^+]}{[\text{OCPF}]} \quad (\text{iii})$$

Fig. 4 に見られる pH 0~2.5 の領域での吸収スペクトルから、OCPF の第一段解離は pH 1.5 以下であることが示唆されたので、pH 0.12 では 1 価の陽イオン種すなわち OCPF^+ 、pH 0.86 では中性

種すなわち OCPF と仮定し、それぞれの 460 nm における吸光度を A_{OCPF^+} 及び A_{OCPF} 、さらに、pH 0.12~0.86 で OCPF^+ と OCPF の混和状態での吸光度を A とすると、 $[\text{OCPF}^+]$ と $[\text{OCPF}]$ が平衡であるとき、(iii) は次のように置き換えることができる。

$$\text{pH} = \text{p}K_{a1} - \log \frac{[A - A_{\text{OCPF}}]}{[A_{\text{OCPF}^+} - A]} \quad (\text{iv})$$

したがって、pH 0.12 から 0.86 の吸光度を測定した結果、Fig. 5 に示すように、CTAC 共存下 pK_{a1} が 0.52 ± 0.05 であることが示唆された。

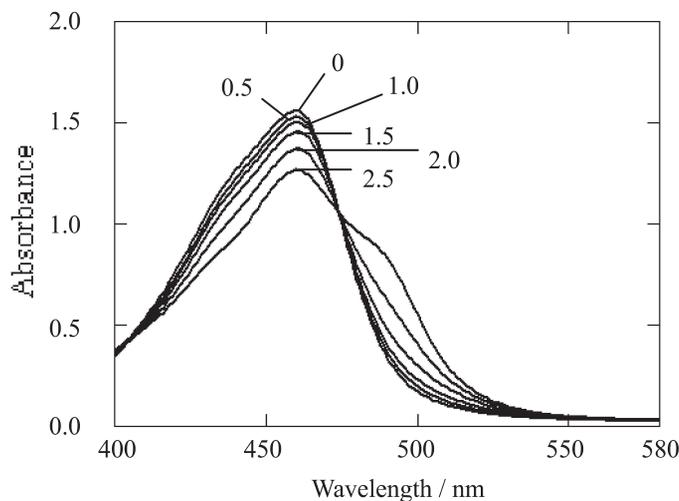


Fig. 4 Absorption spectra of OCPF.

The pH values of solutions are given on the peaks. The final concentration is $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. The wavelength of the absorption maxima are $\lambda_{\text{max}} = 460 \text{ nm}$.

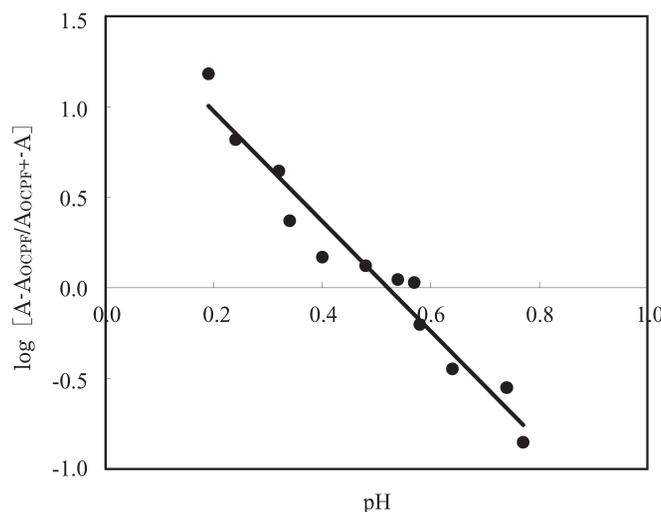
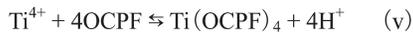


Fig. 5 Determination of the pK_{a1} of OCPF.

Ti (IV): $2.5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, CTAC: $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

呈色体の安定度定数の算出：

本チタン(IV) 定量条件下でのチタン(IV) と OCPF との結合モル比が 1 : 4 とすると、平衡状態は (v) に示す式で表され、さらに (vi), (vii), (viii) 式より安定度定数 (K_f) を算出することが可能である。



$$K_f = \frac{[\text{Ti}(\text{OCPF})_4][\text{H}^+]^4}{[\text{Ti}^{4+}][\text{OCPF}]^4} \quad (\text{iv})$$

$$(\text{Ti})_t = [\text{Ti}^{4+}] + [\text{Ti}(\text{OCPF})_4] \quad (\text{vii})$$

$$(\text{OCPF})_t = [\text{OCPF}^+] + [\text{OCPF}] + 4[\text{Ti}(\text{OCPF})_4] \quad (\text{viii})$$

ここで、 $(\text{Ti})_t$ と $(\text{OCPF})_t$ はそれぞれの総濃度を示すことから、(vi) は次のように示すことができる。

$$K_f = \frac{[\text{Ti}(\text{OCPF})_4][\text{H}^+]^4 \left\{ 1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_a} \right\}}{\{(\text{Ti})_t - [\text{Ti}(\text{OCPF})_4]\} \{(\text{OCPF})_t - 4[\text{Ti}(\text{OCPF})_4]\}^4} \quad (\text{ix})$$

次に、チタン(IV) に対して 4 倍過剰量の OCPF を加え、18°C で塩化ナトリウムを用いてイオン強度を 1.5 に調整したときの 530 nm における吸光度を測定し、(ix) 式より K_f を算出したところ、 $\text{Ti}(\text{OCPF})_4$ の $\log K_f$ の平均値は 16.88 であった。これらのことから、本チタン(IV) 定量条件下では $\text{Ti}(\text{OCPF})_4$ が主要な化学種であり、 $\text{Ti}(\text{OCPF})^{3+}$, $\text{Ti}(\text{OCPF})^{2+}$, $\text{Ti}(\text{OCPF})^{3+}$ は存在しても、極めてわずかであることが示唆された。

反応速度の検討：

化学反応を定量的に解析する場合、平衡論と速度論とは互いに相補的な関係にあるので本反応を反応速度の面より検討した。先に示したようにチタン(IV) と OCPF との反応は (x) で示す通りであり、反応速度式は微分形の (xi) で示すことができる。ここで、 k は反応速度定数とする。



$$-\frac{d[\text{Ti}^{4+}]}{dt} = k[\text{Ti}^{4+}][\text{OCPF}] \quad (\text{xi})$$

CTAC 共存下でチタン(IV) に対し OCPF 過剰の場合、この速度式は擬一次反応と見なせることから、速度定数は (xii) から求めることが可能で

ある。ここで、 k_{obs} は擬一次反応速度定数とする。

$$-\frac{d[\text{Ti}^{4+}]}{dt} = k_{obs}[\text{Ti}^{4+}] \quad (\text{xii})$$

まず、OCPF の pK_{a1} の算出の結果より、 pK_{a1} が 0.5 付近であることを考慮して pH 0.76, pH 0.13 での k_{obs} を求めたところ、pH 0.76 では $1.65 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, pH 0.13 では $3.20 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ と算出され、チタン(IV) との反応速度が $[\text{OCPF}^+]$ と $[\text{OCPF}]$ では異なり、 $[\text{OCPF}]$ の化学種での反応が $[\text{OCPF}^+]$ のそれに比べ、ほぼ 5 倍加速していることを認めた。さらに、半減期は $t_{1/2} = 0.693/k$ で表すことができるので、本チタン(IV) 定量条件下では、 $t_{1/2} = 0.693/(1.65 \times 10^{-2} \text{ s}) = 42 \text{ s}$ と算出される。この $t_{1/2}$ の 10 倍の時間、すなわち $10t_{1/2}$ の時、反応は 99.9% 進むと考えられるので、 $t = 10t_{1/2} = 7 \text{ min}$ で、本反応はほとんど完結していると見なせる。また、補足的に陽イオン性界面活性剤の CTAC を非イオン性界面活性剤の Brij 35 に変更して OCPF の pK_{a1} と反応速度の関連性を同様の操作で検討したところ、 $pK_{a1} = 1.51 \pm 0.05$ (Brij 35 共存下) 及び pH 1.52 付近からの反応速度の上昇が見られ、これは CTAC 共存下の場合と同様、 $[\text{OCPF}]$ の化学種での反応速度が速くなる結果が得られた。

以上、化学平衡論及び反応速度論の両観点から検討を加えたところ、呈色錯体の安定度定数 $\log K_f$ 、チタン(IV) と OCPF との反応速度定数 k_{obs} は、それぞれ 16.88 及び $1.65 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ であることが、吸光光度法より算出され、本呈色反応が pH に依存した OCPF のイオン種と深く関係していることが確認できた。更に、非イオン性界面活性剤の Brij35 共存下での OCPF の第一段解離定数 pK_{a1} が 1.51 に対し、陽イオン性界面活性剤 CTAC 共存下での pK_{a1} が 0.52 と、陽イオン性界面活性剤での OCPF の酸解離平衡の促進現象が認められ、このことが本定量法の選択性の向上に寄与している一因であると推測された。

2-4. バニリルフルオロンを用いるコバルト (II) 及びシアノコバラミンの吸光光度定量法

コバルト (II) はクラーク数 0.004 で、銅亜鉛鉱などの中にも微量含有されている。そのため、精錬中間物に随伴するほか、鉄鋼、合金鋼中にも不純物として混入し、これら製品金属の純度あるいは製造工程の管理などの面で、また、中性子の吸収断面積が大きく、核燃料、原子炉材料でもっとも忌避される不純物である。一方、コバルトは必須微量元素の一つで血液中には $0.2\sim 2\mu\text{g L}^{-1}$ 存在し、このコバルトを構造中に含むビタミン B_{12} (シアノコバラミン) は、DNA やヘモグロビンの合成、アミノ酸代謝、水素転位あるいはメチル基転位など、極めて広範な生物学的反応に関与している。しかしながら、このように生態にとって重要な役割を示す一方で、コバルトの過剰摂取による多血症や甲状腺腫が見られることがある。このような背景があるにもかかわらず、近年のセルフメディケーション時代においても、シアノコバラミンを含む OTC 医薬品に関して、明確な含量規定のガイドラインがないのが現状である。以上のことを踏まえれば、生体中、医薬品中、環境中のコバルトの簡便で高感度な測定法の構築は非常に有意義であると考えられる。今回、キサントン系

色素のバニリルフルオロン (VF) を合成し、ホウ砂溶液を用いる弱塩基性域において、陽イオン性界面活性剤のゼフィラミン (Zep) を用いるコバルト (II) の簡便で高感度な吸光光度定量法を開発した (Fig. 6)。また、呈色体の組成について検討を加えた。

本法の定量操作に従って検量線を作成したところ、 $20\sim 470\text{ ng mL}^{-1}$ のコバルト (II) 濃度範囲で良好な直線を得ることができた。見かけのモル吸光係数 (ϵ) は $1.35\times 10^5\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ 、Sandell 表示感度が 0.440 ng cm^{-2} と高感度であり、ニトロソ R 法^{10)~12)} の約 4 倍、1-ニトロソ-2-ナフトール法¹³⁾ の約 3 倍、2-ニトロソ-1-ナフトール法¹⁴⁾ の約 8 倍を示し、迅速性、簡便性の面からも優れた方法であると考えられた。また、5 回での RSD はコバルト (II) 240 ng mL^{-1} を用いるとき 0.66% と、再現性も優れていることが示された。本法の実試料への応用として、環境試料 (水道水及び雨水) 中のコバルト (II) の添加回収実験を行った結果、Table 3 に示すように、添加回収率は 99.5% 及び 98.2% と非常に良好であり、本法の実用分析法への応用が十分可能なことが示唆された。さらに、設定したコバルト (II) の定量操作で、コバルトを含むビタミンであるシアノコバラ

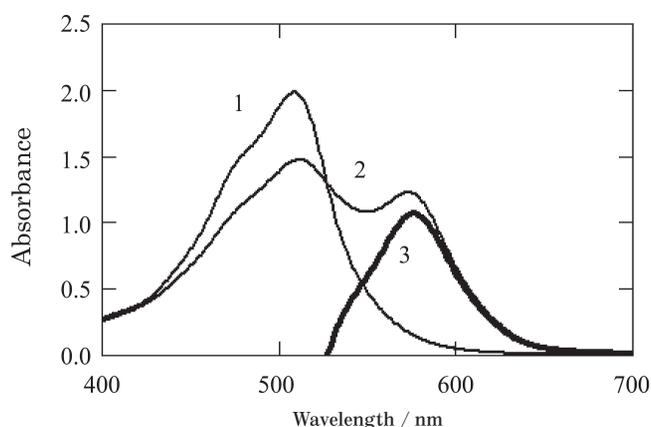


Fig. 6 Absorption spectra obtained by standard procedure. Co (II) : $8.0\times 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$, VF: $5.0\times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$, Zep: 0.1%, pH: 9.2, Reference: water, 1: VF solution against water, 2: VF-Co (II) solution against water, 3: VF-Co (II) solution against VF solution.

Table 3. Recovery tests on tap water and rain water.

Sample	Recovery (%)
Tap water	99.5
Rain water	98.2

Co(II) taken: 240 ng mL^{-1} , VF: $5.0\times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$, Zep: 0.1%, pH: 9.2, Reference: reagent solution.

ミンの定量を試みた。その結果、0.5~11.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ のシアノコバラミン濃度範囲でコバルト(II)と同様、 $\epsilon=1.35 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ の感度で定量することができた。なお、シアノコバラミンとしては直接VFとは呈色反応しなかったため、前処理として日本薬局方記載の方法に準拠し、硫酸水素カリウムを加え、ろつばを用いて強熱融解した後、水溶液として定量を行った。

次に、Zep共存下での本呈色錯体の組成を、連続変化法及びモル比法で検討した。その結果、コバルト(II):VF=1:2という結果が得られた。一方、非イオン性界面活性剤であるTween 80共存下における呈色体の組成は、コバルト(II):VF=1:1という結果であり、陽イオン性界面活性剤であるZepを用いることにより、呈色錯体の高次化が認められた。また、Tween 80共存下におけるZepと{コバルト(II)-VF}錯体との結合をモル比法で検討したところ、コバルト(II):VF:Zep=1:2:4の三元錯体の生成が推定される結果を得ることができた。

2-5. *m*-カルボキシフェニルフルオロンを用いる微量アルミニウム(III)の蛍光光度定量法

アルミニウムはクラーク数7.56で元素中第3位であり地殻中に非常に多く含まれる元素で、その製造・加工の容易さから、食器、調理器具、清涼飲料の容器、医薬品、食品添加物など、直接口に触れるものだけでも非常に多くの製品に使われ、我々の日常生活に深く浸透している。一方、アルミニウムの体内への摂取蓄積により引き起こされる疾患には、アルミニウム脳症、神経毒性や骨軟化症などが報告されており、また、アルツハイマー型老年期認知症とアルミニウムの関連性が数多く議論され、更に、最近では肺癌の発生率の増加にアルミニウム含有の化粧品が影響しているとの報告もされている。当研究室では神野らによりキサンテン系色素の*m*-カルボキシフェニルフルオロン(MCPF)を用いるAl(III)の高感度な吸光光度定量法($\epsilon=1.7 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)を報告しているが⁶⁾、臨床検査における血清アルミニウム(III)の基準値は10 $\mu\text{g L}^{-1}$ 以下であり、この基準

値以下のアルミニウム(III)を測定する際には、吸光光度法では若干感度において不十分であり、更に高感度分析法の開発が必要である。MCPFはフルオレセインと同様、平面構造を持つナフタレン部位とそれとは独立して回転するベンゼン部位が存在すると推定され、分子は平面構造を有し電荷共鳴構造上安定で発蛍光性を示すので、蛍光反応面での追跡であると考えた。今回、このMCPFの蛍光試薬として、弱塩基性域でCHES/水酸化ナトリウム緩衝液とPVP共存下、アルミニウム(III)の高感度で選択的な蛍光光度定量法を開発した(Fig. 7)。

本法の定量操作に従って検量線を作成したところ、0.03~1.50 ng mL^{-1} のアルミニウム(III)濃度範囲において原点を通る良好な直線性を示す検量線を得ることができた。本法は先に報告した吸光光度法の約10倍以上の感度であり、検量線の相関係数は $r=0.999$ 、検出限界は0.02 ng mL^{-1} であった。また、アルミニウム(III)0.35 ng mL^{-1} におけるRSDは2.70% ($n=6$)と再現性にも比較的優れていた。本法を缶飲料中のアルミニウム(III)定量に応用し、その分析値及び添加回収率を求めた。その結果、Table 4に示すように分析値及び回収率とも良好であり、実サンプル分析法として十分満足できるものであった。なお、比較分析法としては、缶飲料のアルミニウム濃度分析に用いられるルモガリオン法^{15), 16)}を用いた。また、ルモガリオン法を用いる場合はマトリックスからの干渉を受けるため前処理が必要となるが、本法では前処理なしで缶飲料中のアルミニウム(III)定量が可能である利点が認められた。さらに、大容量輸液製剤(Large Volume Parenteral: LVP)、及び健康成人から得られたヒト尿を用いて本法におけるアルミニウム(III)の添加回収率を検討した。その結果、前処理なしのLVPを用いた場合の添加回収率は101.6%、健康成人から得られたヒト尿での添加回収率は102.7%であった。以上のことから、本法により医療分野でのアルミニウム定量法の新しい手法を提供できる可能性が認められた。

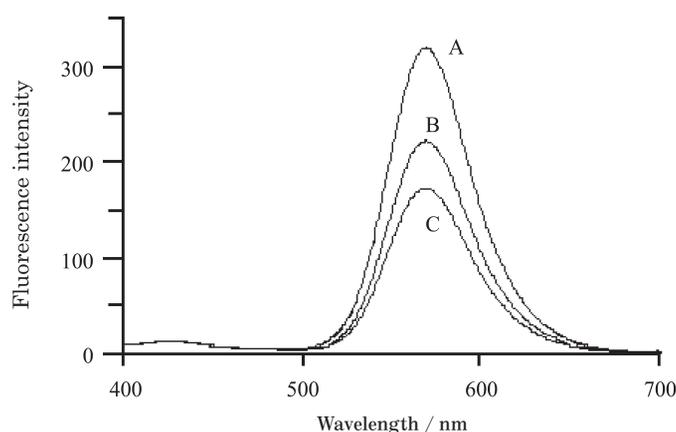


Fig. 7 Fluorescence emission spectra. MCPF: 5.0×10^{-6} mol L⁻¹, PVP: 0.1%, pH: 9.0, Excitation wavelength: 530 nm, A: MCPF solution (blank), Sample solutions with Al (III) concentration B: 0.70 ng mL⁻¹, C: 1.05 ng mL⁻¹.

Table 4 Analysis of aluminium in canned beverages.

Sample	Proposed method Al Found / ng mL ⁻¹	Lumogallion method Al Found / ng mL ⁻¹	Recovery (%) ^a
Beer A	68.54	60.46	97.7
Beer B	61.57	not detected	102.2
Muscat	6.39	not detected	110.4

a: 0.34 ng mL⁻¹ Al(III) was used.

3. キサンテン系色素を用いる金属イオン関連化合物の分析法

3-1. 陽イオン界面活性剤存在下, 鉄(III)及びp-カルボキシフェニルフルオロンを用いるアスコルビン酸の吸光光度定量法

アスコルビン酸(AA)は, その欠乏症として壊血病が知られているように, 生体中ではコラーゲン線維に必須で, また, 抗酸化作用などをはじめ多様な生理作用を有している水溶性ビタミンである。従来から報告されている吸光光度法の多くはAAと鉄(III)との酸化還元反応の結果, 生成した鉄(II)とphenあるいはbypなどのような有機試薬との発色反応を用いる間接分析法に基づいている。一方, AAは(O, O)配位子を有するので, 亜鉛(II), マンガン(II), カドミウム(II), アルカリ土類金属(II)などと錯生成することも知られている^{17), 18)}。一方, 錯生成しやすい被験物質に対し{被分析物質・金属・有機試薬}の三元錯体生成反応を利用する方法^{19), 20)}が{被分析物質・金属}あるいは{被分析物質・有機試薬}の二元

錯体反応を用いる方法に比べ, 感度, 選択性, 簡便性など種々の点で優れていることが認められている。したがって, AAあるいはその酸化体であるデヒドロアスコルビン酸(DHAA)の錯生成能に着眼すれば, 三元錯体生成反応に基づく, より高感度, 高選択的なAAの定量法が構築できると推察される。この観点より今回は, キサンテン系色素と金属イオンとして種々の三元錯体生成反応が可能な鉄(III)を用いるAAの高感度定量法について検討した。その結果, Tris/塩酸緩衝液を用いた弱塩基性域において, 陽イオン界面活性剤である塩化テトラデシルトリメチルアンモニウム(TTAC)共存下, p-カルボキシフェニルフルオロン(PCPF)及び鉄(III)を併用するAAの高感度吸光光度定量法を開発した(Fig. 8)。

本法の定量操作に従って検量線を作成したところ, AA量が20~120 ng mL⁻¹の濃度範囲で良好な直線性を示した。本定量操作における{鉄(III)-PCPF}に対する{AA-鉄(III)-PCPF}の見かけのモル吸光係数(ϵ)は 2.1×10^6 L mol⁻¹ cm⁻¹, Sandell表示感度は0.140 ng cm⁻²であり, 他の吸

光光度法^{21)~24)}に比べて著しく高感度であった。また、RSDは2.2% (n=5)であり再現性にも優れていた。本定量法の検量線は原点を通らないが、(1)簡便で高感度である(2)広い範囲で直線性を示すといった利点を有している。次に、本法を医薬品製剤中のAA定量に応用した。錠剤の場合、まず、錠剤の質量を正確に測定し、乳鉢を用いて粉碎した後、その一定量を精秤し、水に溶解し一定容量とした。濾過した濾液の一定量の試料溶液について、標準定量操作にしたがいAA含量を求めた。その結果、Table 5に示すように本

法の分析値は、第十三改正日本薬局方のAA定量法と同等の分析値が得られた。

3-2. *p*-カルボキシフェニルフルオロン及び鉄(Ⅲ)を用いるアスコルビン酸の定量条件下における呈色体の組成と反応メカニズム

AAは強い還元性を有するため、鉄(Ⅲ)を鉄(Ⅱ)に還元し、自身は酸化されDHAAに変化する。試料溶液中においてはAA<鉄(Ⅲ)なので、鉄(Ⅱ)、鉄(Ⅲ)、DHAA、PCPFの4者が共存しており、複数の呈色体の生成が考えられる。した

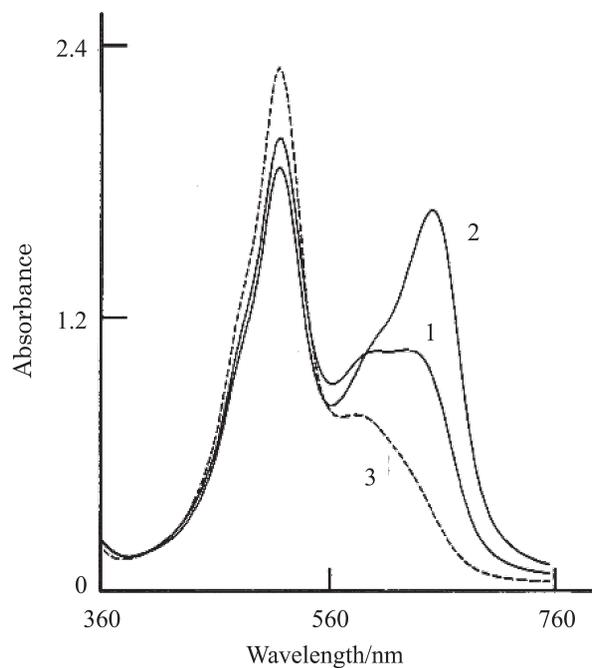


Fig. 8 Absorption spectra.

AA: $4.0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (Curve 1); $8.0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (Curve 2); Fe (Ⅲ): $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, F^- : $1.5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, PCPF: $6.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, TTAC: $2.5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH 8.5; Curves 1 and 2: AA-Fe(Ⅲ)-PCPF solution; Curve 3: Fe(Ⅲ)-PCPF solution; Reference: water.

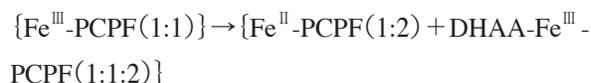
Table 5 Determination of ascorbic acid in pharmaceutical preparations.

Sample		Nominal amount	Content (mg) ^{a),b)}		RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{b)} (%)
			Present method	Other method ^{c)}		
Powder	A	50	52.1	52.5	2.3	98.6
Granule	A	250	256.2	255.8	2.7	96.5
	B	667	648.8	650.5	2.3	101.0
Tablet	A	100	101.5	- ^{d)}	2.8	103.4
	B	250	248.6	- ^{d)}	2.6	97.2
	C	100	97.6	- ^{d)}	3.2	103.5
	D	200	513.4	- ^{d)}	2.4	102.2

a) Drug content, mg per 1 powder, mg per 1 granule or mg per 1 tablet. b) Mean of 5 determinations.

c) The JP XIII method. d) Undetermined.

がって、本反応における反応メカニズムを明確にするため、生成する呈色体の組成を連続変化法あるいはモル比法を用いて詳細に検討した。その結果、AA 非共存下での {鉄(III):PCPF (λ_{\max} :600 nm)} 及び {鉄(II):PCPF (λ_{\max} :640 nm)} の組成モル比はそれぞれ 1:1 及び 1:2 であり、鉄の価数の違いにより生成する錯体の組成が相違するという結果を得た。また、鉄(II)とPCPFとの反応速度を定性的に観察したところ、鉄(III)とPCPFのそれよりも大きかった。同様にDHAA共存下における {鉄(III):PCPF (λ_{\max} :640 nm)} の組成モル比は 1:2 であり、また、{鉄(III):DHAA} のモル比は 1:1 であることを認めた。一方、鉄(II)とAA及びDHAAとの結合は認められなかった。したがって、今回の実験結果から以下の反応が考えられる。すなわち、下記の式に示すように、第1段階として鉄(III)がAAにより還元され鉄(II)となり、その鉄(II)がPCPFと1:2の錯体を生成する。それと同時に、余剰の鉄(III)がPCPF及び生成したDHAAと錯生成し、{DHAA:鉄(III):PCPF} = 1:1:2の三元錯体が生成することが示唆された。



4. キサンテン系色素の結晶構造

4-1. OCPF の結晶構造

今回の検討で用いたOCPFについて、その結晶構造をFig. 9に示す。その結果、過去に報告されているキサンテン系色素のひとつである *o*-sulfophenylfluorone²⁵⁾と同様に、平面構造であるキサンテン環とベンゼン環がC9-C2'で単結合した二平面構造を有しており、二平面の角度は69.22(5)°であった。次に、キサンテン環に結合している4つのC-O距離は全て等価であることが確認できた。また、COOH基のC-O、C=O距離は区別できず、解離してCOO⁻型であると推定された。

4-2. MCPF の結晶構造

今回の検討で用いたMCPFについて、その結晶構造をFig. 10に示す。その結果、過去に報告されている *o*-sulfophenylfluorone²⁵⁾と同様に、平面構造であるキサンテン環とベンゼン環がC9-C6'で単結合した二平面構造を有していた。また、Fig. 10では安息香酸部分のCOOH基が2つ存在するように見えるが、これはC9-C6'結合の回転によりCOOH基が左側のコンホマーと右側にあるコンホマーが共存しているためである。

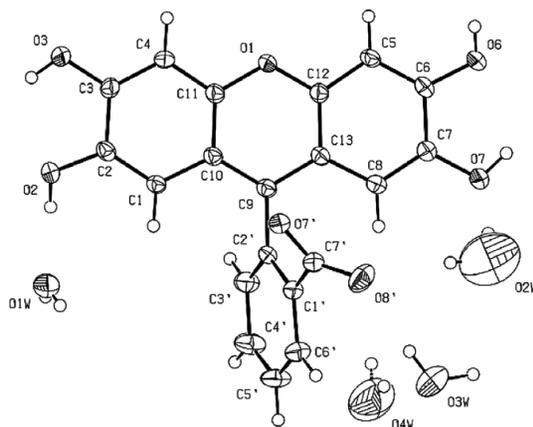


Fig. 9 Crystal structure of OCPF.

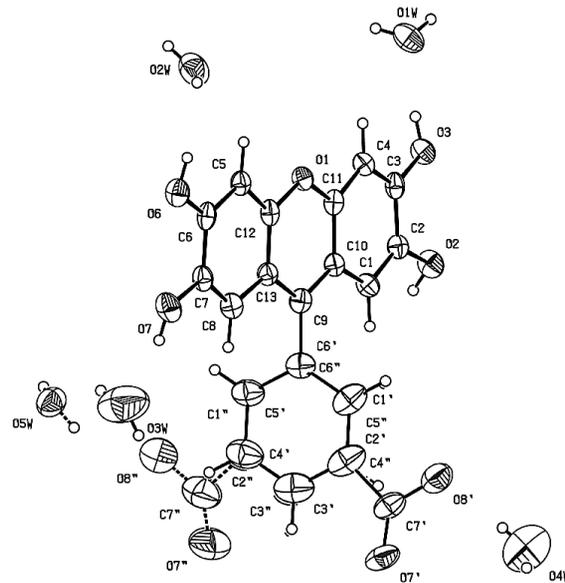


Fig. 10 Crystal structure of MCPF.

5. 結語

キサントゲン系色素を用いて4種の金属イオン、及び1種の関連化合物の簡便、高感度な光分析法を開発することができた。吸光光度法では鉄、チタン、コバルト、及びアスコルビン酸を従来法以上の感度、再現性で定量することが可能であった。蛍光光度法ではアルミニウムを吸光光度法の10倍以上の感度で定量することが可能であった。さらに、各定量法における呈色錯体について、色素と金属イオン、あるいは色素、金属イオン及び被分析物質の結合モル比を検討したとともに、ESRによる反応様式の検討、化学平衡及び反応速度の解析等を行い、種々の知見を得ることができた。また、キサントゲン系色素の一つであるOCPF及びMCPFについての結晶構造についても明らかとすることができた。

以上、本研究結果からキサントゲン系色素を用いることにより金属イオン、及び関連化合物を従来法を上回る感度で定量できることが明らかとなり、キサントゲン系色素の分析分野への利用における重要性を改めて示すことができた。

謝辞

本研究に際し、ご指導、ご鞭撻を賜りました大阪薬科大学 故 森逸男 名誉教授に深謝なる意を表します。また、本研究を進めるにあたり、多岐にわたる有益なご助言、ご協力をいただきました大阪薬科大学 臨床化学研究室 山口敬子 講師、神野伸一郎 博士、柘下ももか 修士をはじめとする、大阪薬科大学 第二分析化学教室、臨床化学研究室諸氏に心より感謝の意を表します。

X線結晶構造解析の測定、及び種々のご指導をいただきました大阪薬科大学 分子構造化学研究室 土井光暢 教授に深く感謝いたします。また、ESRスペクトルの測定並びにご指導をいただきました京都薬科大学 櫻井弘 名誉教授、京都薬科大学 代謝分析学教室 安井裕之 教授、さらに、NMRを測定いただきました大阪薬科大学 箕浦克彦 講師、MSを測定いただきました大阪薬科大学 藤嶽美穂代 助教に感謝いたします。

最後に、本研究の機会を与えていただきました千寿製薬株式会社 諸氏に心より感謝いたします。

References

- 1) 神野伸一郎, 藤田芳一, 大阪薬科大学紀要, **4**, 117-132 (2010).
- 2) Fujita Y., Mori I., Fujita K., Nakahashi Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **1**, 254-262 (1988).
- 3) Mori I., Fujita Y., Toyoda M., Kashiwagi M., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **340**, 57-59 (1991).
- 4) 藤田芳一, 森 逸男, 榎 健寿, 分析化学, **24**, 253-256 (1975).
- 5) Yamaguchi T., Hasegawa K., Kamino S., Miyachi K., Tominaga H., Fujita Y., *Anal. Sci.*, **23**, 223-226 (2007).
- 6) Kamino S., Yamaguchi T., Mori T., Miyamoto M., Kusumi Y., Fujita Y., *Anal. Sci.*, **21**, 1549-1552 (2005).
- 7) Kadobayashi H., Nakamori T., Yamaguchi T., Fujita Y., *Chem. Lett.*, **33**, 610-611 (2004).
- 8) Clark L. J., *Anal. Chem.*, **42**, 694-698 (1970).
- 9) Marczenko Z., Kalowska H., *Microchem. J.*, **27**, 174-181 (1982).
- 10) McNaught K. J., *Analyst (London)*, **67**, 97-98 (1942).
- 11) 若松茂雄, 分析化学, **8**, 830-832 (1959).
- 12) 桂 鉄雄, 分析化学, **4**, 574-577 (1955).
- 13) Kentner E., Zeitlin H., *Anal. Chim. Acta*, **49**, 587-590 (1970).
- 14) Ssekaalo H., *Anal. Chim. Acta*, **51**, 503-508 (1970).
- 15) Hoch R. L., *Analyst*, **124**, 793-796 (1999).
- 16) 清原孝雄, 津曲喜雍, 橋本晶夫, 森田 収, 山崎憲一, 医薬品研究 (*Iyakuhin Kenkyu*), **34**, 649-657 (2003).
- 17) Tajimir-Riahi H. A., *J. Inorg. Biochem.*, **40**, 181-188 (1990).
- 18) Tajimir-Riahi H. A., *J. Inorg. Biochem.*, **42**, 47-55 (1991).
- 19) Fujita Y., Mori I., Matsuo T., *Anal. Sci.*, **12**, 115-118 (1996).
- 20) 中川幸代, 森 逸男, 松尾敬子, 重村康之, 藤田芳一, 分析化学, **48**, 935-938 (1999).
- 21) Schmall M., Pifer C. W., Wallish E. G., *Anal. Chem.*, **25**, 1486-1490 (1953).
- 22) Arya S. P., Mahajan M., Jain P., *Indian J. Chem., Sect. A: Inorg., Bio-inorg., Phys., Theor. Anal. Chem.*, **38**, 1303-1306 (1999).
- 23) Srividya K., Balasubramanian N., *Chem. Anal. [Warsow]*, **44**, 689-696 (1999).
- 24) Das J. V., Gupta V. L., Rai M. K., *Chem. Anal. [Warsow]*, **43**, 85-92 (1998).
- 25) Kamino S., Doi M., Yamaguchi T., Tominaga H., Amano E., Umehara S., Naito M., Yamazaki C., Fujita Y., *Anal. Sci.*, **22**, x35-x36 (2006).