

博士論文

新しい発蛍光反応を利用した  
HPLCによる蛍光微量分析  
法の開発に関する研究

昭和62年度

東北大学大学院農学研究科  
食糧化学専攻

赤坂 和昭

## 目 次

第 I 章	序 論	5
第 I I 章	9 - ブロモメチルアクリジン ( 9 - B r · M a ) を用いた H P L C によ る 脂 肪 酸 の 分 析	
I I - 1	緒 言	7
I I - 2	9 - ブロモメチルアクリジン ( 9 - B r · M a ) の 合 成、 及 び、 反 応 性	1 0
I I - 3	9 - アクリジニルメチル誘導体 の H P L C に よ る 分 離 ・ 定 量、 及 び、 そ の 血 漿 中 脂 肪 酸 分 析 へ の 応 用	3 2
I I - 4	9 - ブロモメチルアクリジンに	

		よる誘導体化のためのトリアシ	
		ルグリセロールの加水分解と油	
		脂の脂肪酸組成分析	
		. . .	52
第	I I I	章	過酸化脂質の蛍光分析試薬
		の開発とその応用	
I I I	- 1	緒言	. . . 66
I I I	- 2	ホスフィン試薬の合成とその特 性	. . . 69
I I I	- 3	ジフェニル-1-ピレニルホス フィン(DPPP)を用いたヒ ドロペルオキシドの定量	. . . 89
I I I	- 4	ジフェニル-1-ピレニルホス フィン(DPPP)を用いたH PLCポストカラム法によるヒ ドロペルオキシドの分析	. . . 100

第	I V	章	N - ( 9 - アクリジニル )	
			マレイミド ( N A M ) を用いた亜硫酸の分析	
	I V - 1	緒	言	1 2 5
	I V - 2	N - ( 9 - アクリジニル ) マレ	イミド ( N A M ) と亜硫酸の反	
		応機構、及び、反応性		
			・ ・ ・	1 2 8
	I V - 3	ワイン中の亜硫酸の定量		
			・ ・ ・	1 5 8
	I V - 4	雨水中の亜硫酸の定量		
			・ ・ ・	1 7 1
	I V - 5	グルタミン酸：オキサロ酢酸ア		
		ミノ基転移酵素 ( E C 2. 6.		
		1. 1 ) の活性測定法		
			・ ・ ・	1 8 6
第	V	章	総	
			括	
			・ ・ ・	2 0 1



謝 辭

..... 2 0 5

引 用 文 獻

..... 2 0 7

## 第 I 章 序 論

最近の高速液体クロマトグラフィー（HPLC）の急速な発展、特に、カラムの分離能と検出感度の向上により、従来では分析できなかった多くの化合物の、高感度で精度良い分析が可能となってきた。特に、感度、及び、選択性に優れた蛍光検出法、電気化学的検出法、生物・化学発光法などのHPLCへの応用は、生体試料や食品のような複雑な系の中に極微量に含まれる成分の高感度・高選択的な分析に適した方法である（1）。また、最近、GC法では広く用いられるようになってきた質量分析計（MS）をHPLCの検出器として用いる方法についても研究が進められており、近い将来実用化するものと期待される（1）。しかし、分析対象となる化合物がLC-MS法を除く上記の検出法では検出されない場合、プレ、或はポストカラム法によるラベル化が必要となることから、これまで

にもこの目的のため多くの試薬の開発・応用がなされてきている(2~5)。

本論文では、HPLCを用いた新しい蛍光分析法の開発を目的とし、新しい発蛍光化反応の開発とその分析への応用を行った。まず、第2章では、カルボン酸の蛍光ラベル化試薬(9-ブロモメチルアクリジン)の開発と脂肪酸分析への応用について、第3章では、過酸化脂質分析のための蛍光検出試薬(ジフェニル-1-ピレニルホスフィン)の開発とその応用について、更に、第4章では、最近明らかになったN-(9-アクリジニル)マレイミドと亜硫酸の反応を用いた亜硫酸の微量分析法の開発についてそれぞれ検討した。

第 I I 章 9 - ブロモメチルアクリジ  
ン ( 9 - B r · M a ) を用いた H P L C によ  
る 脂 肪 酸 の 分 析

【 I I - 1 】 緒 言

脂 肪 酸 類 は、自 然 界 に お い て 遊 離、或 は、  
エ ス テ ル 体 と し て 広 く 存 在 し、脂 肪 酸、及 び、  
そ の エ ス テ ル 体 は、エ ネ ル ギ ー 源 と し て だ け  
で は な く 生 体 の 構 成 成 分、貯 蔵 物 質、或 は、  
そ の 他 の 重 要 な 生 理 活 性 成 分 と し て 生 体 内 で  
重 要 な 機 能 を 果 し て い る ( 6 ~ 1 2 )。ま た、  
そ の 代 謝 物 も、プ ロ ス タ グ ラ ン ジ ン に 代 表 さ  
れ る よ う に 非 常 に 多 様 な 生 理 活 性 を 有 し て る  
( 1 3 ~ 1 8 )。こ れ ら 脂 質 関 連 物 質 の 生 体  
内 に お け る 機 能 ・ 役 割 を 明 ら か と す る こ と に  
よ り 疾 病 の 診 断 や 治 療 法 の 解 明、或 は 治 療 薬  
と し て の 利 用 な ど が 臨 床 化 学 ・ 医 学 及 び 薬 学

の分野での期待されている。また近年、健康と食餌、特に摂取する脂質との関係が注目されてきている。例えばイコサペンタエン酸（I P A）の摂取による高血圧症の予防や、比較的不飽和度の高い植物性油脂の食品への利用など、食品中に含まれる脂肪酸組成の体に対する影響が栄養学的に興味を持たれている。また、菜種油中に多く含まれているエルカ酸は、その低栄養性のため低エルカ酸の菜種油が品種改良により作り出されている。脂質に関する研究は、この様に医学、薬学、臨床化学、生化学、食品学、及び、農学など広い分野でなされており、その主要構成成分である脂肪酸の分析は非常に重要な意味を持っている。脂肪酸の分析は、主にガスクロマトグラフィー法によって行われている。一方、最近の、H P L Cにおける分離能の向上と蛍光検出法の導入によりH P L Cを用いた高感度で精度良い脂肪酸類の分析が可能となってきた。特に、揮発性の低い高級脂肪酸や熱に

不安定な高度不飽和脂肪酸の分析に H P L C 法は適しており、様々な試薬の開発が試みられている ( 1 9、 2 0 )。最近、山口・大倉らは、非常に高感度な分析試薬として 3 - ブロモメチル - 6, 7 - ジメトキシ - 3 - メチル - 2 ( 1 H ) - キノキサリノン ( B r - D M E Q ) を報告している ( 2 1、 2 2 )。この試薬と脂肪酸の反応はアセトニトリル中 5 0 ° C、 2 0 分間行い H P L C により分離・定量することにより、各脂肪酸を 0. 3 ~ 1 f m o l のオーダーで検出している。本研究は、更に経済性、操作の簡便性に優れ、反応条件のより穏和な試薬の開発を目的とし、蛍光発色団としてアクリジン環を有したベンジルブロマイド型の新しい蛍光試薬 9 - ブロモメチルアクリジン ( 9 - B r · M a ) を開発し、その分析への応用について検討した。まず、I I - 2 では、9 - B r · M a の合成と反応性及び定量性について検討した。I I - 3 では、蛍光性誘導体の H P L C による分離と定

量性、及び、血漿中の脂肪酸分析への応用について検討した。更に、I I - 4では、油脂の脂肪酸組成分析への応用について検討した。

【 I I - 2 】 9 - ブロモメチルアクリジン  
( 9 - B r · M a ) の合成、及び、反応性

本研究は、高感度・高選択性のカルボキシ  
ル基の蛍光ラベル化試薬の開発、及び、その  
分析への応用を目的とし、ベンジルブロマイ  
ド型の9 - ブロモメチルアクリジン ( 9 -  
B r · M a ) を合成した。また、その脂肪酸  
との反応生成物の構造、物理特性、及び、反  
応性についても検討した。

## 第 1 節 実 験

試薬及び装置： ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、エライジン酸は和光純薬工業（株）製試薬を用いた。その他の脂肪酸はSigma Chem. Co.製の試薬を用いた。その他の試薬は、和光純薬工業（株）の特級、或は分析用試薬を用いた。

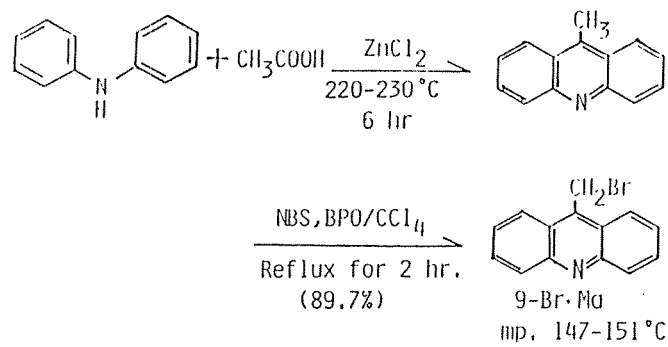
恒温槽は、東洋科学産業（株）製TC-1を用いた。UV、IR、NMR、及びMSの各スペクトル測定には、それぞれ日立200-10型ダブルビーム分光光度計、日本分光A202赤外分光光度計、日本電子k. k. JEOL FX-100 NMR装置、及び、日立質量分析装置M-80を使用した。蛍光は日立204型蛍光分光光度計により測定した。

HPLC装置： ポンプは、JASCO model FLC-100（日本分光工業（株））を使用した。インジェクターは、J



A S C O m o d e l V L - 6 1 1 ルー  
 プタイプサンプルインジェクターを用いた。  
 分離カラムは、T S K - g e l O D S -  
 1 2 0 A ( 5  $\mu$  m、4.6 m m i. d. x  
 1 5 0 m m: 東洋曹達工業(株))を使用し、  
 検出器は、J A S C O F P - 1 1 0 分光螢  
 光光度計、及び、東洋曹達工業 U V - 8  
 m o d e l I I 分光光度計を使用した。  
 また、J u l a b o P a r a t h e r m  
 U - 2 ( J u c h h e i m l a b o r t -  
 e c h n i k ) をカラム恒温槽として用いた。

9-ブロモメチルアクリジンの調製 (   
 F i g. 1 ) : ジフェニルアミンと酢酸よ  
 り、柘植らの方法 ( 2 3 ) により調製した9  
 -メチルアクリジンの粗結晶 ( m p. 1 0 5  
 ~ 1 0 9  $^{\circ}$ C、収率 9 3.6 % ) を原料として、  
 この 5 6 0 m g ( 約 2.9 m m o l ) と N - ブ  
 ロモスクシイミド ( N B S ) 4 4 5 m g ( 約  
 2.5 m m o l ) を四塩化炭素 ( 或は、ベンゼ



Elemental analysis

Calcd. C 61.78%; H 3.70%; N 5.14%; Br 29.36%

Found C 61.91%; H 3.57%; N 5.12%; Br 29.30%

Fig. 1: Synthesis scheme of 9-Bromomethylacridine  
(9-Br·Ma)

ン) 20 ml に加え、更に 10 mg の過酸化ベンゾイルを加えた後、還流下反応させた。反応の進行は TLC により追跡した。反応後、放冷しシリカゲルカラムクロマトグラフィにより目的化合物である 9-Br·Ma を分離し (ベンゼン: 酢酸エチル = 30: 1)、更に再結晶化させることにより、黄色結晶として 9-Br·Ma を 610 mg 得た (mp.

147 ~ 151 °C : 収率は N B S に対し  
 89.7 % )。 元素分析 ( % )、 理論値: C;  
 61.78、 H; 3.70、 N; 5.14、 B r;  
 29.36、 測定値: C; 61.91、 H;  
 3.57、 N; 5.12、 B r; 29.30。 I R  
 $\nu_{\text{max}}$  ( K B r 法 ) 560 ( C - B r )、<sup>1</sup>H -  
 N M R ( C D C l<sub>3</sub>、 T M S ) 5.4 p p m ( 2  
 H、 s )、 7.4 ~ 8.4 p p m ( 8 H、 m )。

テトラエチルアンモニウム炭酸塩 ( T E A  
 C ) の調製: 市販のテトラエチルアンモニ  
 ウムヒドロキシドをそのまま、或は臭化テト  
 ラエチルアンモニウムの水溶液を D o w e x  
 1 x 8 ( O H - 型 ) で処理し、臭素イ  
 オンを除いた後、二酸化炭素を吹き込み ( ま  
 たは、ドライアイスを加え ) 炭酸塩溶液とし、  
 溶媒を減圧留去し、白色固体を砕いて粉末状  
 にした。更に、これを五酸化リン上、56 °C  
 で減圧乾燥させ白色の粉末を得た。この粉末  
 は非常に吸湿性が強いためデシケーター中に

保存した。調製した T E A C ( m p. 284  
 ~ 288、 $(C_2H_5)_4N)_2 \cdot CO_3$ ) は、  
 これ以上の精製をせずに使用した。

9 - アクリジニルメチルエステル ( 9 - A  
 M e s t e r s ) の調製: 4種の飽和脂  
 肪酸 ( C 12、14、16、18 ) を 9 -  
 B r · M a と反応させその生成物を単離した。  
 脂肪酸 ( 約 100 m g ) に、100 m g の  
 9 - B r · M a、及び、63 m g の T E A C  
 を加え、アセトン中で室温1時間以上反応さ  
 せた。溶媒を留去した後、シリカゲルカラム  
 クロマトグラフィー (ヘキサン: エチルアセ  
 テート = 5: 1) により分離し、更に、アセ  
 トン中からアセトニトリルで再結晶させるこ  
 とにより、黄色結晶を得た。また、同様にし  
 て不飽和脂肪酸数種についても単離を行い M  
 S の測定を行った。

反応溶媒の検討: ラウリン酸のジメチル

ホルムアミド (DMF)、ジメチルスルホキシド (DMSO)、アセトン、アセトニトリル、及び、メタノール溶液 (全て 0.5 mM) 50  $\mu$ l を試料として、250  $\mu$ l の 9-Br·Ma (0.6 mM)、及び、50  $\mu$ l の TEAC (1.5 mM) 溶液 (何れも試料と同一溶媒に溶解した) を加え、室温で反応させた。反応液の 10  $\mu$ l を経時的に HPLC に導入し、ピーク高の変化を追跡した。HPLC の条件は、移動相としてメタノールを用い、0.8 ml / min の流速で溶出した。分離カラムは、TSK-gel ODS-120A を使用した。

塩基成分の効果: ラウリン酸 (0.5 mM)、9-Br·Ma (0.6 mM) の各 DMF 溶液 50  $\mu$ l、及び、250  $\mu$ l に、TEAC の DMF 溶液 (1.5 mM)、トリエチルアミン、或はピリジン 50  $\mu$ l を加え室温で反応させた。その 10  $\mu$ l を経時的に HPLC

C に導入し、ピーク高の変化を追跡した。HPLC の条件は、前述の通り。

試薬の混合比の影響： ラウリン酸の DMF 溶液 ( 0.76 mM、及び、0.03 mM ) 100  $\mu$  l に、9-Br-Ma、及び、TEAC の各 DMF 溶液を、試料に対するモル比を変えて加え、室温で 10 分以上反応させてから、その 10  $\mu$  l を HPLC に導入した。HPLC の条件は、前述の通り。

## 第 2 節 結果及び考察

試薬の合成と反応生成物の構造： カルボン酸の蛍光ラベル化試薬の反応基としてベンジルブロマイド基を選び、蛍光発色基としてアクリジニル基を導入した。これは、安価なジフェニルアミンと酢酸より柘植らの方法 ( 23 ) により高収率で得られる 9-メチルア

ク リ ジ ン を 原 料 と し て、 N B S を 用 い て 臭 素 化 す る こ と に よ り 容 易 に 高 収 率 で 試 薬 の 調 製 が 可 能 で あ っ た か ら で あ る。 N B S に よ る 臭 素 化 は、 過 剰 の 臭 素 の 導 入 を 避 け る た め、 N B S に 対 し て 少 過 剰 の 原 料 を 加 え て 四 塩 化 炭 素、 或 は ベ ン ゼ ン 中 で 反 応 さ せ た。 反 応 溶 媒 と し て は、 N B S が 四 塩 化 炭 素 に 対 し て 溶 解 性 が 悪 く 反 応 に 多 少 時 間 を 要 し た が、 最 終 的 に カ ラ ム で 精 製 し た 精 製 物 の 結 晶 は ベ ン ゼ ン を 用 い た 場 合 よ り も き れ い な も の を 得 る こ と が 出 来 た ( ベ ン ゼ ン 中 で 反 応 さ せ る こ と に よ り 得 ら れ た 結 晶 を 使 用 し て も 分 析 に は 支 障 無 か っ た )。 尚、 四 塩 化 炭 素 を 溶 媒 と し た 場 合、 反 応 の 進 行 と 共 に 上 層 に 不 溶 物 が 浮 か び 上 が っ て く る こ と か ら、 こ れ に よ り 反 応 の 進 み 具 合 い を 知 る こ と が で き た。 反 応 に よ り、 N B S に 対 し 8 9 . 7 % の 高 収 率 で 目 的 化 合 物 で あ る 9 - B r · M a を 調 製 す る こ と が 出 来 た。 ベ ン ジ ル プ ロ マ イ ド 基 を 有 す る U V、 或 は 蛍 光 ラ ベ ル 化 試 薬 は、 カ ル ボ ン 酸 と の 反 応 に

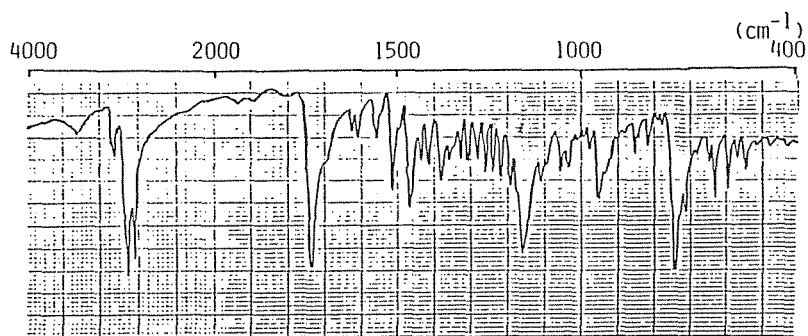
よりエステルを生成することが知られている  
( 1 9 )。本ラベル化反応も同様に進行する  
ものと考えられたが、本反応によるラベル化  
生成物の構造を確認するため、4種の飽和脂  
肪酸のラベル体を単離し、その I R、<sup>1</sup>H -  
N M R、及び M S の各スペクトルを測定し、  
また、元素分析を行った。更に、不飽和脂肪  
酸数種についても M S スペクトルの測定を行  
った。ここではその 1 例として、パルミチン  
酸の誘導体の構造解析の結果を T a b l e 1  
に示した。

F i g. 2 に、I R スペクトルを示した。  
1 7 2 5 c m<sup>-1</sup> にエステルの吸収が観察され  
たがカルボン酸の吸収は認めることは出来な  
かった。このことから、反応生成物はエステ  
ル結合を有することが示唆された。F i g.  
3 に<sup>1</sup>H - N M R を示した。低磁場側からの  
プロトンの積分比は、8 : 2 : 2 : 2 : 2 4  
: 3 であった。各プロトンは、0.9 p p m ( 3  
H、t ) が末端メチル基、1.6 p p m ( 2



Table 1  $^1\text{H-NMR}$ , IR, Mass and elemental analysis data of 9-acridinylmethyl palmitate

	Data	Assignment
$^1\text{H-NMR}$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , TMS)	0.9 ( t, 3 )	$-\text{CH}_3$
	1-2 ( m, 26 )	$-\text{CH}_2-$
	2.3 ( t, 2 )	$-\text{CO}-\text{CH}_2-$
	6.2 ( s, 2 )	Ar- $\text{CH}_2$ -O-
	7-8 ( m, 8 )	Acridine ring
IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) (KBr method)	1738, 1160	Ester group
	745, 715	Acridine ring
Mass (m/z)	447	$\text{M}^+$ as $\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{NO}_2$
Elemental Analysis (%)	Calcd. C;80.49 H;9.23 N;3.12 O;7.14	
	Found. C;79.93 H;9.29 N;3.06	



KBr method

Fig.2: Infra red spectrum of 9-Acridinylmethyl palmitate



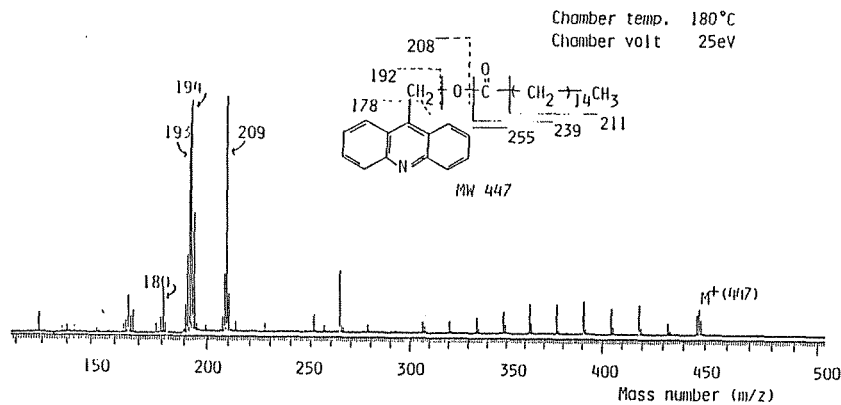
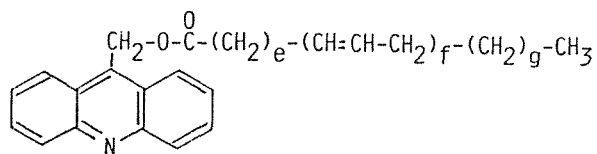


Fig. 4: Mass spectrum of 9-Acridinylmethyl palmitate

結果を得た。また、不飽和脂肪酸誘導体については、MSの測定のみを行い、各々の分子イオンピーク、及び、フラグメントイオンピークより同様な9-アクリジニルメチルエステルであることを確認した (Table 2)。9-Br・Maとカルボン酸の反応をFig. 5に示した。

Table 3に各誘導体のUV、及び、蛍光特性を示した。蛍光は、メタノール溶液中で励起波長360nm、蛍光波長425nmにそれぞれ最大波長を示した (Fig. 6)。また、252nmにおけるモル吸光係数は約

Table 2: Molecular ion peak of 9-AM derivatives of unsaturated fatty acids



Fatty acid	Molecular Structure			Molecular formula				FW	Molecular ion (m/z)
	e	f	g	C	H	N	O		
18:1	7	1	6	32	43	1	2	473.70	473
18:2	7	2	3	32	41	1	2	471.68	471
18:3	7	3	0	32	39	1	2	469.67	469
20:3	6	3	3	34	43	1	2	497.72	497
20:4	3	4	3	34	41	1	2	495.70	495
20:5	3	5	0	34	39	1	2	493.69	493
22:6	2	6	0	36	41	1	2	519.73	519

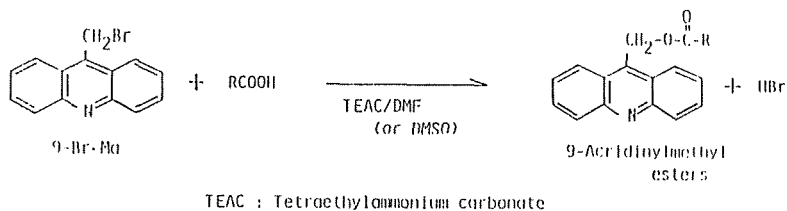


Fig. 5: Reaction of 9-Bromomethylacridine with carboxylic acids

Table 3: UV absorption, relative quantum yield and melting point data of 9-acridinyl esters

Fatty acid esters	Molar Absorption coefficient ( $\times 10^4$ )		Fluorescence Relative quantum yield (in methanol)*	melting point ( °C )
	252nm	361nm		
9-AM Laurate	19.0	1.36	0.01	58.0-58.5
9-AM Myristate	22.4	1.53	0.01	65.5-67.0
9-AM Palmitate	24.2	1.58	0.01	71.5-72.5
9-AM Stearate	25.7	1.73	0.01	76.0-76.5

\* Relative to quinine which has a quantum yeild of 0.55 in 0.5N sulfuric acid solution.

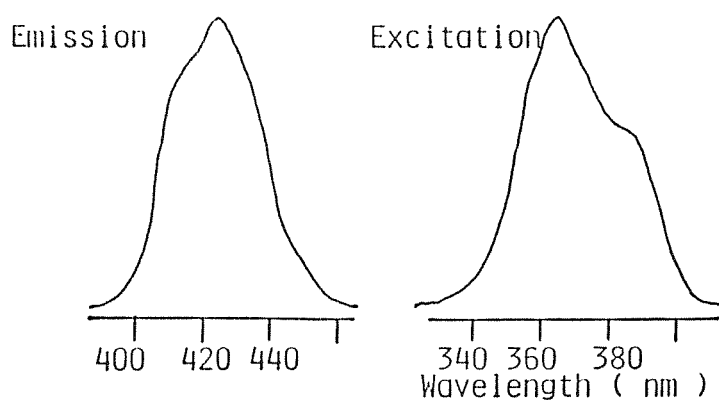


Fig.6: Fluorescence spectrum of 9-Acridinylmethyl palmitate

20万と非常に大きく、蛍光法のみならずUV法によっても高感度の検出が可能であることが示された。

反応条件の設定: ラウリン酸を標準試料として、反応をDMF、DMSO、アセトン、アセトニトリル、及び、メタノール中で行い、反応性に与える反応溶媒の影響について検討した (Fig. 7)。反応は、室温で行い、

塩基成分としてTEACを加えHPLCにより反応の追跡を行った。反応溶媒としてDMF、及び、DMSOを用いた場合、反応は10分以内に完了しその後24時間以

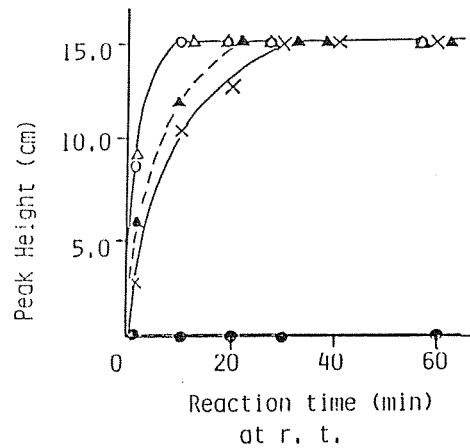


Fig. 7: Effect of reaction solvents on the labeling reaction

Reactions were performed in DMF(○), DMSO(△), acetone(▲), acetonitrile(×) and methanol(●) at room temp. in the presence of TEAC as a base.

上一定のピーク高を保った。アセトン、及び、アセトニトリル中では反応性の低下が認められた。また、メタノール中では反応はほとんど進行しなかった。岩本らは、5-フルオロウラシルと4-ブromoメチル-7-メトキシクマリンの反応性について同様の結果を得ている(24)。メタノールのような溶媒は、陽イオンとも陰イオンとも複合体を作ることが出来る。その水酸基の酸素はルイス塩基として作用し陽イオンと複合体を形成し、また、その水酸基の水素原子は、水素結合によって陰イオンと複合体を形成する。陽イオン或は陰イオンは数多くの溶媒分子と接近し、会合しており溶媒和している。メタノールのようなプロテイクな溶媒中で $S_n2$ 型の求核置換反応を行くと求核体は水素結合を形成し溶媒和する。このため、本反応においても反応性が著しく低下したものと考えられた。一方、アプロテイクな溶媒として知られるDMFやDMSOは、陽イオンに溶媒和する能力を有

するが、陰イオン及び他のルイス塩基と水素結合を形成する能力は小さく、求核体は、溶媒和の影響を受けることが無いため高い反応性を示したものと考えられた。更に、 $S_n2$ 反応で生成した生成イオンに対する溶媒和の効果も大きく反応性に影響を与える(25)。アニオンに対する溶媒和、即ち安定化の度合はアセトン、アセトニトリル、及びDMF、DMSOで大きな差は認められない(26)。しかし、カチオンに対する溶媒和の効果はDMF、DMSOでより大きく、 $S_n2$ 型の本反応において、これらDMF、及び、DMSO中で高い反応性を示したものと考えられた。従って反応溶媒としては、DMF、或はDMSOが適当と考えられたが、DMSOの凝固点が $18^{\circ}\text{C}$ と室温付近であるため使用に注意が必要であったため、DMFが最適であると考えられた。

DMFを反応溶媒として、加える塩基成分の効果について検討した。一般には、塩基と



して炭酸カリウムをクラウンエーテルで有機溶媒に可溶化させて用いている(27)。しかし、本実験では、可溶化させるためにクラウンエーテルを使用せず、有機塩基を使用する方法について検討した。塩基として、TEAC、トリエチルアミン、及びピリジンを用いた。Fig. 8にその結果を示した。TEACを用いた

場合反応は室温10分以内に完了したが、他の塩基を用いた場合、反応性は著しく低くなった。

TEACは、4級アンモニウムの炭酸塩であり、各種有機溶媒に

対する溶解性は非常に高い。その効果は炭酸カリウムと同様であると考えられ、クラウン

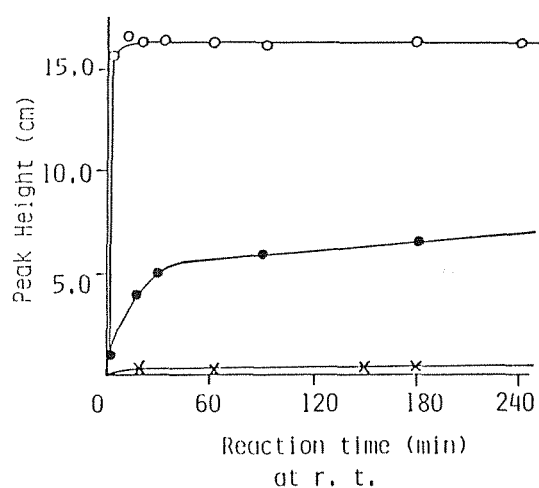


Fig. 8: Effect of bases on the labeling reaction  
Reaction was carried out in DMF at room temp. in the presence of TEAC(○), triethylamine(●) and pyridine(x).

エーテルを用いなくとも充分使用可能であった。T E A C のは、市販の臭素塩を脱 B r - 後、或は市販のテトラエチルアンモニウムヒドロキシドより容易に調製することができた。固体状の T E A C は非常に吸湿性が高く、その取り扱いには注意が必要であった。しかし、溶液中では、非常に安定で調製後 1 年以上使用することが出来た。

ラウリン酸を標準試料として、加える 9 - B r · M a、及び、T E A C の濃度について検討した。T a b l e 4 に示したように、試料のラウリン酸の濃度が高い場合には脂肪酸量に対し 9 - B r · M a、及び、T E A C が 2、及び、1 倍（テトラエチルアンモニウムイオンとして 2 倍）モル以上の添加でピーク高はほぼ一定の高さとなった。また、脂肪酸濃度の低い場合においてはそれぞれ、2.5、及び、12.5 倍モル以上の添加が必要であった。但し、何れの場合も一定のピーク高を得るためには 9 - B r · M a と T E A C のモル

Table 4: The influence of molar ratio of 9-Br-Ma and TEAC to lauric acid  
 Concentrations of lauric acid solutions were 0.76mM(a) and 0.03  
 mM(b). To the 100 $\mu$ l of lauric acid solution, 2 to 100 times  
 molar excess of 9-Br-Ma and 1 to 50 times molar excess of TEAC  
 were added, respectively. The total volume of the solution was  
 300 $\mu$ l. The reaction was carried out for more than 10 min at  
 room temp. Then, 10 $\mu$ l of its aliquot was injected into HPLC.

(a)

Peak height (cm) 9-Br-Ma	TEAC				
	1	2	4	10	25
2	17.4	15.9	15.5	10.1	7.7
4	16.6	16.8	16.1	14.0	10.5
8	16.1	16.6	17.4	17.2	14.6
20	15.9	15.2	16.1	17.8	17.6
50	15.9	13.7	14.7	16.3	17.4

(b)

Peak height (cm) 9-Br-Ma	TEAC				
	2.5	5	12.5	25	50
5	0.0	0.5	0.9	1.0	0.8
10	0.0	2.4	13.1	8.1	6.6
25	0.0	0.4	17.9	16.7	12.5
50	0.0	3.2	17.4	17.9	16.5
100	0.0	0.4	6.8	17.1	18.9

比が 2: 1 ( 9 - B r · M a : テ ト ラ エ チ ル  
 ア ン モ ニ ウ ム イ オ ン = 1: 1 ) と 成 る よ う に  
 加 え る 必 要 を 認 め た。 本 実 験 で は、 9 - B r

・ M a と T E A C はそれぞれ、5 m M, 及び、2.5 m M の D M F 溶液を用い、試料 ( D M F 溶液 ) に対してそれぞれ 1 : 1 の割合で加え、室温で 10 分以上反応させた。試料、及び、試薬を溶解させた D M F は、市販品を乾燥させることなくそのまま使用しても結果に影響は与えなかった。

### 第 3 節 結 論

9 - ブロモメチルアクリジンは、安価な原料より短行程で収率よく調製することが可能であった。9 - B r · M a と脂肪酸の反応により 9 - アクリジニルメチルエステルが生成した。生成物は、励起波長 360 n m、蛍光波長 425 n m にそれぞれ極大波長を有する蛍光を示した。また、252 n m にモル吸光係数が約 20 万の強い U V 吸収を示し U V ラベル化試薬としての有効性も期待された。反

応は、D M F 中、T E A C の存在下、室温で 10 分以内に完了し、反応生成物は冷暗所に保存することにより 1 週間以上安定であった。反応は試薬の混合だけで室温で迅速に進行することから非常に不安定な化合物のラベル化も可能であると考えられた。

【 I I - 3 】 9 - アクリジニルメチル誘導体の H P L C による分離・定量、及び、その血漿中脂肪酸分析への応用

9 - ブロモメチルアクリジン ( 9 - B r · M a ) と脂肪酸との反応により生成した 9 - アクリジニルメチル誘導体を H P L C を用いて分離し、蛍光法、或は U V 吸収により検出・定量する条件について検討した。逆相系の

カラムを用い、分離に与える溶媒、及び、温度の影響を明かとし、15種の脂肪酸誘導体の分離・定量条件を設定した。更に、血漿中の遊離脂肪酸の定量に応用した。血清（或は血漿）中の遊離脂肪酸濃度は運動により減少し、飢餓・寒冷・恐怖・喫煙等により上昇する。また、臨床的には糖尿病・肝疾患のほか各種内分泌疾患で増減がみられ、疾病の診断や治療に重要な意味を持っている。

#### 第 1 節 実 験

試薬及び装置： 使用した試薬、及び、装置は I I - 2 で用いたものと同じ物を用いた。H P L C のグラジエントプログラマーは、J A S C O G P - A 3 0（低圧グラジエント）を使用した。各脂肪酸の誘導体化は、I I - 2 の方法に従った。

分離溶媒組成の影響: H P L C の移動相溶媒の組成 (メタノール: H<sub>2</sub>O) を 92.5 : 7.5 ~ 100 : 0 に変えて、溶媒組成の変化による脂肪酸の 9-A M 誘導体 15 種 (飽和 7 種、不飽和 8 種) の保持時間に与える影響について検討した。

カラムは T S K - g e l O D S 1 2 0 A ( 5 μ m, 4.6 m m i. d. x 1 5 0 m m )、流速は 0.8 m l / m i n であった。カラム温度は 25℃ とした。

分離温度の影響: カラム温度を 25 ~ 40℃ まで変化させ、各誘導体 ( 1 4 種 ) の保持時間に与える影響について検討した。移動相は、95%メタノール - 5% H<sub>2</sub>O で、0.8 m l / m i n の流速で溶出した。

分離・定量条件: 15 種 (飽和 7 種、不飽和 8 種) の脂肪酸の 9-A M 誘導体を H P L C により分離、定量するために設定した条

件を示す。この条件を用いて各誘導体の検量線を作成した。

HPLC conditions

Column: TSK-gel ODS 120A (4.6mm i.d. x 150mm)

Column temperature: 25°C

Sample volume: 10  $\mu$ l

Mobile phase: 90% Methanol-Water

Concave 2 gradient mode, 32 min <sup>\*1</sup>

97% Methanol-Water

Flow rate: 0.8 ml/min

Detection: Fluorometry ( Ex. 360nm, Em. 425nm )

\* 1: このグラジエントモードにより  
Fig. 14 に示したように溶媒組成は変化  
する。

血漿中の遊離脂肪酸の定量: 試料として、  
健康な成人よりヘパリン処理して採血した血  
液を用い、速やかに1000gで30分間遠  
心分離し血漿を得た。この血漿をスクリー  
ンキャップ付き試験管に100 $\mu$ l採取し、こ  
れに0.1Mリン酸1カリウム溶液100 $\mu$ l、  
クロロホルム20ml、及び、内部標準とし



て 0.4 mM ヘプタデカン酸のエタノール溶  
 液 10  $\mu$ l を加え、密栓後激しく振とうし、  
 1000 g で 10 分間遠心分離した。クロロ  
 ホルム層を注意して取り、水層に更にクロロ  
 ホルム 10 ml を加え、同様の操作を 2 度繰  
 り返した。採取したクロロホルム層を集めて、  
 これに 2.5 mM TEACメタノール溶液を  
 100  $\mu$ l 加え減圧濃縮し、残留物に 5 mM  
 9-Br・Ma の DMF 溶液 100  $\mu$ l を加  
 えて溶解させ 10 分以上室温で反応させた。  
 反応後その 10  $\mu$ l を HPLC に導入した。  
 HPLC の条件は上述の通りであった。

## 第 2 節 結果及び考察

分離溶媒の影響: Fig. 9 に結果を示  
 した。各誘導体について、水の組成比 (%)  
 と保持時間 (RT) の対数值 ( $\log RT$ )  
 の関係を調べたところ何れの脂肪酸において

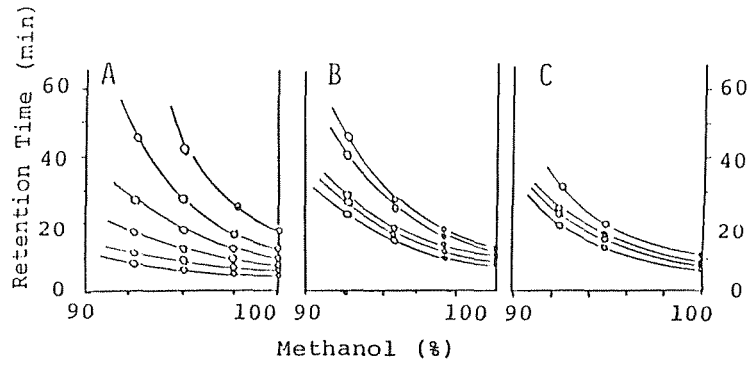


Fig. 9: Effect of separation solvents on retention times of 9-AM esters

Separation was performed at 25 °C.

Group A	Group B	Group C
18:0	18:1(trans)	20:3
17:0	18:1(cis)	20:4
16:0	18:2	22:6
14:0	16:1	20:5
12:0	18:3	
10:0		
8:0		

も比較的良好的な相関性が認められた（相関係数： $r > 0.99$ ）。Table 5には各誘導体の相関係数と関係式（ $Y = \alpha X + b$ ：Yは $\log RT$ 、Xは水の組成比（%）、bは比例定数）を示した。一般に保持時間が長いもの程関係式の傾きは大きくなった（つまり影響を大きく受けた）が、溶媒組成変化の影響を比較するためには、不飽和酸誘導体に対

Table 5: Relationship between log RT and H<sub>2</sub>O contents of mobile phase

$$Y = \alpha X + b$$

Y: log RT (min)

X: H<sub>2</sub>O contents(%) of mobile phase

Fatty Acids	Slope( $\alpha$ ) ( $\times 10^{-2}$ )	Constant ( $b$ )	Coefficient of correlation
8:0	2.5	0.68	0.993
10:0	3.4	0.76	0.994
12:0	4.9	0.85	0.992
14:0	6.2	0.95	0.991
16:0	7.6	1.08	0.992
17:0	8.2	1.15	0.993
18:0	8.9	1.21	0.995
18:3	6.2	0.87	0.999
16:1	6.3	0.92	0.998
18:2	6.8	0.93	0.999
18:1	7.7	1.02	0.999
20:5	5.9	0.82	0.997
22:6	6.7	0.84	0.998
20:4	6.7	0.87	0.998
20:3	7.4	0.94	0.997

し、ある溶媒組成で同じ保持時間を与える飽和酸誘導体を想定し、この両者の関係式の傾きを比較し、その関係を明らかにすることにより不飽和結合による影響を明かすことが出来ると考えられた。飽和脂肪酸の誘導体における水が0%（つまりメタノール100%）の場合のlog RT値（y軸切片値： $b$ ）と傾き（ $\alpha$ ）の関係は、Fig. 10に示

したように、両者  
 の間に良好な相関  
 性を認めることが  
 出来た（相関係数  
 $r = 0.9966$ ）。  
 つまり、飽和脂肪  
 酸誘導体について  
 は、メタノール  
 100%で溶出し  
 た時の保持時間よ  
 り、任意のメタノール： $H_2O$ の成比にお  
 ける保持時間の予測が可能であり、更に飽和  
 脂肪酸について、 $\alpha$ とbの値から得られた関  
 係式より保持時間の影響を補正した傾き $\alpha'$   
 （100%メタノールで溶出した時の保持時  
 間（b）を任意に選び、その保持時間を与え  
 る飽和脂肪酸を想定したときの傾き $\alpha$ ）を算  
 出することができる。従って、不飽和脂肪酸  
 において、この飽和脂肪酸から得られた関係  
 式（ $\alpha = 1.085 + 0.0621b$ ）に100

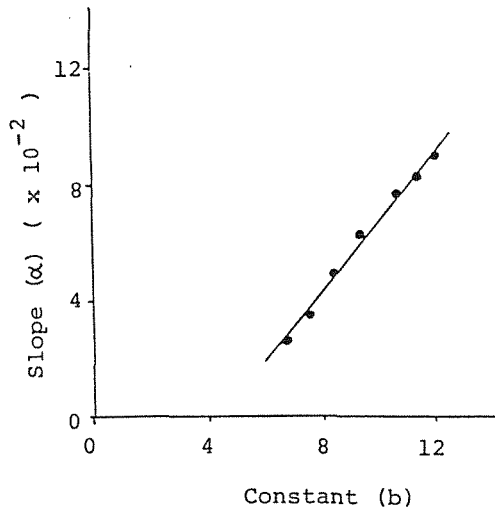


Fig.10: Relationship between constants(b)  
 and slopes( $\alpha$ ) of saturated fatty  
 acid derivatives

%メタノールで溶出した時の保持時間 ( b :  
 y 軸切片 ) を代入して求めた傾き ( 計算値 :  
 C ) と実測値 ( F ) の比較を行うことにより、  
 飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の差、つまり不飽  
 和結合の影響を明かとすることが可能と考  
 えられた。 T a b l e 6 に不飽和脂肪酸誘導体  
 の傾きの実測値 ( F ) と計算値 ( C ) との比  
 ( F / C ) を示した。また、不飽和度と F /  
 C 値の関係を F i g. 1 1 に示した。 F / C  
 値が大きいことは、飽和脂肪酸誘導体に比  
 溶媒組成の変化により、保持時間が大きく変  
 動する ( 水の組成比が多くなることにより、  
 保持時間の遅くなる程度がより大きい ) こと  
 を示していると考えられた。 F i g. 1 1 より、  
 F / C 値は炭素数には関係なく不飽和度との  
 間に良好な相関性が成立しており (  $r =$   
 $0.9934$  )、このことより、不飽和度が増  
 すに連れてより大きく溶媒組成変化に影響さ  
 れる ( 水の組成比の増加にともない不飽和度  
 が増すことにより、保持時間の遅れる程度が

Table 6: The slopes of unsaturated fatty acid derivatives  
 Calcd. (C): Calculated values by the equation (I)  
 which was obtained by the data in saturated  
 fatty acid derivatives.

$$\alpha = 0.062b + 1.085 \quad \dots(I)$$

$\alpha$ : Slope,  $b$ : Constant

Found(F): Found values

Fatty acids	Slopes ( x 10 <sup>-2</sup> )		Ratio F / C
	Calcd(C)	Found(F)	
18:3	4.9	6.2	1.27
16:1	5.5	6.3	1.15
18:2	5.7	6.8	1.20
18:1	6.8	7.7	1.13
20:5	4.3	5.9	1.37
22:6	4.6	6.7	1.46
20:4	4.9	6.7	1.37
20:3	5.8	7.4	1.28

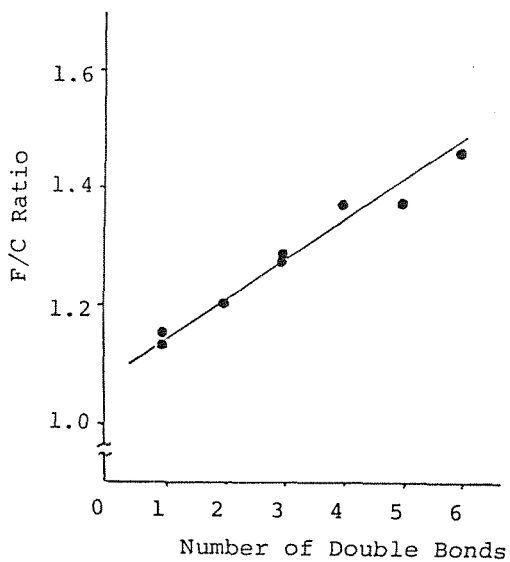


Fig. 11: Relationship between the number of double bonds of unsaturated fatty acids and F/C ratio

大きくなる) ことが明らかとなった。

分離温度の影響: Fig. 12 に測定結果を示した。温度の影響を明らかにするため上述と同じ手法により各誘導体の比較を試みた。各誘導体について、分離温度と保持時間 ( R T ) の対数值 (  $\log R T$  ) の関係は、飽

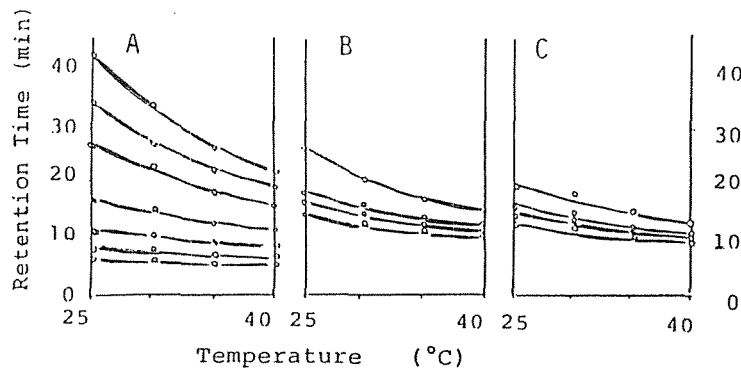


Fig. 12: Effect of separation temperatures on retention times of 9-AM esters

Separation was performed by 95% methanol-water.

Group A	Group B	Group C
18:0	18:1	20:3
17:0	18:2	20:4
16:0	16:1	22:6
14:0	18:3	20:5
12:0		
10:0		
8:0		

和脂肪酸誘導体については非常に良好な相関性を認められた ( $r > 0.99$ )。また、不飽和脂肪酸誘導体についても同様の相関性を認められた ( $r > 0.982$ )。Table 7 に分離温度と保持時間の対数值 ( $\log RT$ ) 間の相関係数と関係式を示した。飽和脂肪酸の誘導体については、y 軸切片値 ( $0^\circ\text{C}$  における保持時間 =  $b$ ) と式の傾き ( $\alpha$ ) の間に非常に良好な相関性を認められた (Fig. 13,  $\alpha = -0.676 - 0.0122b$ ,  $r = 0.998$ )。不飽和脂肪酸誘導体の y 軸切片値を式に代入し得られた傾き ( $C$ ) と実測値 ( $F$ ) の比 ( $F/C$ ) は、分離温度に対する飽和酸と不飽和酸の影響の受け安さの違いを反映していると考えられる。つまり、 $F/C < 1$  の場合、飽和酸に比べ温度の影響を受け難く、逆に  $F/C > 1$  の場合はより大きく影響を受けると考えられる。Table 8 に不飽和脂肪酸の  $F/C$  値をまとめた。モノエン酸のパルミトオレイン酸とオレイン酸のみが  $F/C > 1$  で、



Table 7: Relationship between log RT and separation temperature

$$Y = -\alpha X + b$$

Y: log RT (min)

X: Column temperature (°C)

Fatty Acids	Slope ( $\alpha$ ) ( $\times 10^{-3}$ )	Constant ( b )	Coefficient of correlation
8:0	4.6	0.92	-0.991
10:0	6.6	1.08	-0.993
12:0	8.6	1.28	-1.000
14:0	11.4	1.52	-0.997
16:0	15.1	1.80	-0.998
17:0	16.7	1.94	-0.997
18:0	19.7	2.13	-0.995
18:3	9.6	1.40	-0.996
16:1	13.0	1.55	-0.994
18:2	11.0	1.54	-0.998
18:1	16.5	1.84	-0.982
20:5	9.3	1.34	-0.987
22:6	10.3	1.42	-0.991
20:4	10.5	1.46	-0.987
20:3	12.2	1.60	-0.991

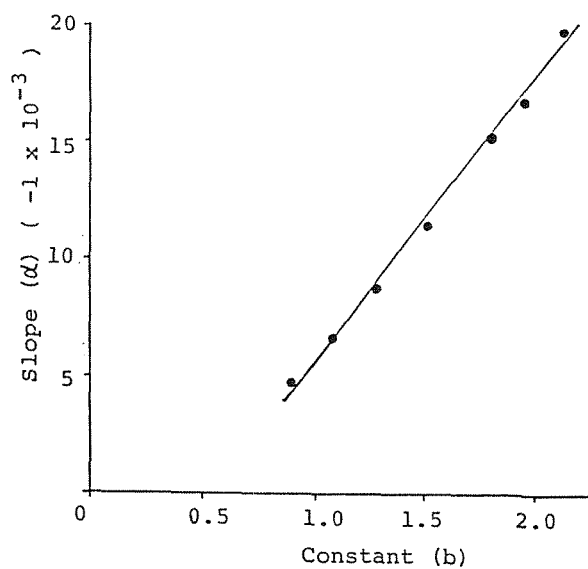


Fig.13: Relationship between constants(b) and slopes( $\alpha$ ) of saturated fatty acid derivatives

Table 8: The slopes of unsaturated fatty acid derivatives  
 Calcd.(C): Calculated values by the equation (II)  
 which was obtained by the data in saturated  
 fatty acid derivatives.

$$\alpha = -1.22 \times 10^{-2} b - 0.676 \dots (II)$$

$\alpha$ : Slope, b: Constant

Found(F): Found values

Fatty acids	Slopes. ( $-1 \times 10^{-2}$ )		Ratio F / C
	Calcd(C)	Found(F)	
18:3	0.96	1.04	0.92
16:1	1.30	1.22	1.07
18:2	1.11	1.20	0.93
18:1	1.65	1.56	1.06
20:5	0.93	0.96	0.97
22:6	1.03	1.06	0.97
20:4	1.05	1.10	0.95
20:3	1.22	1.28	0.95

他の脂肪酸は  $F/C < 1$  であった。また、ジエン酸以上では炭素数が等しい場合ほとんど同じ値を示したが、C18と20ではC18の方がやや小さい値を示した。以上より、溶媒組成の影響とは異なり、温度の影響については不飽和数と影響の受け安さとの間には相関性は認められず、不飽和度(0、1、及び2以上の3つのグループ)と炭素数の影響を受けると考えられた。

分離条件の設定: 以上の結果より、メタノール:  $H_2O$ 系溶媒を分離溶媒として用いた場合、単一溶媒による溶出では高度不飽和脂肪酸を含む脂肪酸誘導体の良好な分離は期待できなかつたため Fig. 14 に示した様なグラジエント法により溶出することとした。リニアグラジエント法では、クリティカルペアーであるリノレン酸 ( e )、ドコサヘキサエン酸 ( f )、アラキドン酸 ( g )、パルミトオレイン酸 ( h )、ミリスチン酸 ( i ) 及び、リノール酸 ( j ) の分離が不十分であったためグラジエントは、90%メタノールから32分間で97%メタノールまで *Concave 2* のモードでかけ、その後97%メタノールで30分間溶出した。 Fig. 15 に15種類の脂肪酸誘導体の分離を示したクロマトグラムを示した。この溶出法でも e と f、g と h、及び、i と j の分離は不完全であったがピーク高の測定により定量は可能であった。ここで分離温度の制御 ( 25 ±

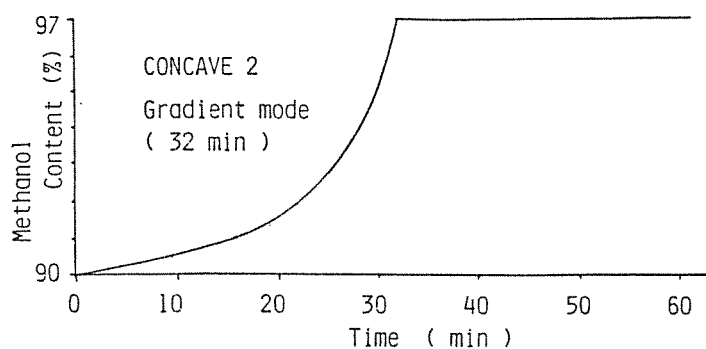


Fig.14: Gradient pattern of CONCAVE 2 mode  
At initial to 32 min, 90% methanol-water solution which was initial solvent was changed to 97% methanol-water (final solution) by concave 2 mode, and at 32 min to final, 97% methanol-water was used as elution solvent.

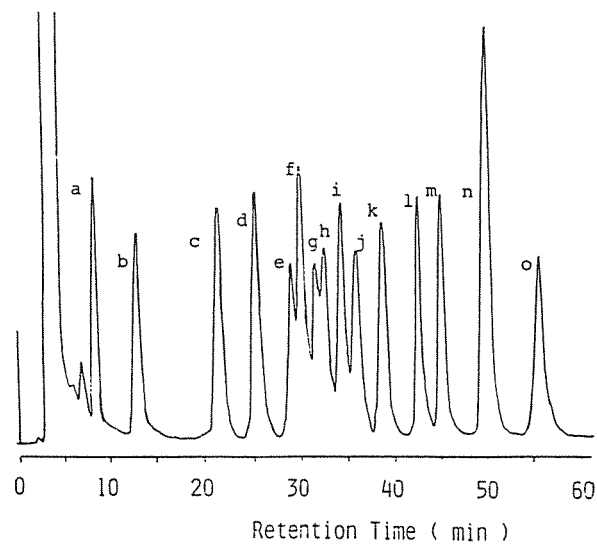


Fig.15: Separation pattern of 15 kinds of 9-AM esters on HPLC  
9-Acridinylmethyl esters separated were (a)8:0, (b)10:0, (c)12:0, (d)20:5, (e)18:3, (f)22:6, (g)20:4, (h)10:1, (i)14:0, (j)18:2, (k)20:3, (l)18:1, (m)16:0, (n)17:0 and (o)18:0 derivatives.

1℃)は非常に重要である。分離温度がこれよりも高くなると全体に分離が悪くなったが、特にiとjの分離が更に不完全と成り定量が不可能となった。また、これよりも低くなるとiとhの分離が悪くなった。定量は、蛍光法で1 ppm o l、UV法で10 ppm o lまで可能であった。

分離には、残存シラノール基を保護していないODSシリカゲルカラム(TSK-  
gel ODS 120A)を使用した。エンドキャッピングが施されたTSK-gel  
ODS-80Tmを用いた場合全体に溶出は速まり、様々なグラジエントモードでの分離を試みたが各脂肪酸誘導体の分離は非常に不完全なものであった。このことは、これら誘導体の分離には残存シラノール基も関与しているものと考えられた。

血漿中の遊離脂肪酸の定量: Fig.

16に血漿中の脂肪酸のクロマトグラムを示

した。また、  
 T a b l e 9  
 に添加回収実  
 験の結果を示  
 した。添加回  
 収率は何れの  
 脂肪酸につい  
 ても95%～  
 106%の範  
 囲内であった。

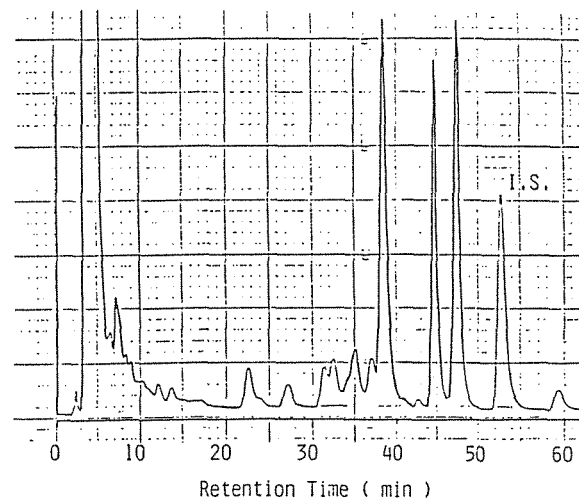


Fig. 16: HPLC chromatogram of free fatty acid derivatives in human plasma

Table 9: Recovery of fatty acids in human plasma

Fatty Acids	Total	Found ( n mol / ml )	Added	Recovery ( % )
20:5	16.46	1.95	13.9	104.4
18:3	24.96	3.80	20.1	105.3
22:6	19.52	3.46	15.2	105.7
20:4	19.56	2.50	16.4	104.1
16:1	21.19	1.87	18.9	102.2
14:0	24.32	4.39	19.9	100.2
18:2	49.37	23.98	23.9	106.2
18:1	49.45	32.11	17.5	99.1
16:0	49.60	30.25	20.3	95.3
18:0	30.19	10.20	20.7	96.6

また、T a b l e 1 0 に健康な成人男女の  
 血漿中の遊離脂肪酸を分析した結果を示した。

Table 10: Free fatty acids in human plasma  
 M: Male, F: Female ( ): Age

Fatty Acids ( nmol/ml )	M1 (23)	M2 (23)	M3 (27)	M4 (28)	M5 (30)	M6 (45)	F1 (21)	F2 (22)
12:0	2.61	1.43	2.52	1.31	2.82	1.31	3.54	1.76
20:5	0.61	0.35	1.95	1.95	2.35	1.69	0.84	1.09
18:3	5.52	2.03	4.37	3.80	3.93	5.65	8.70	7.69
22:6	3.27	1.51	5.21	3.46	2.38	5.67	4.42	3.91
20:4	4.04	1.54	4.20	2.50	1.75	4.95	-	3.91
16:1	12.08	1.42	3.97	1.87	2.29	7.56	19.26	8.04
14:0	12.72	4.39	6.25	4.39	6.08	6.94	13.45	8.50
18:2	54.51	23.82	36.34	23.98	27.20	51.61	83.39	54.55
20:3	4.49	1.68	1.84	1.84	1.41	1.62	1.84	1.57
18:1	109.03	33.76	57.53	32.11	45.36	86.82	150.50	85.81
16:0	99.98	41.38	61.51	30.25	54.20	81.23	122.20	84.01
18:0	30.09	16.76	23.12	10.20	15.30	24.59	31.00	28.27
Total	339.22	130.07	208.81	117.66	165.07	279.66	439.17	289.11

測定値の変動係数は5%以内であった。分析には、100 $\mu$ lの血漿を用いたが、この量は更に50 $\mu$ l以下まで減らすことが可能であり、実用的には充分の感度であると考えられた。

### 第3節 結論

逆相系のカラム ( O D S ) における分離条

件と各種脂肪酸の9-アクリジニルメチル誘導体の保持時間との関係について明かとした。その結果、溶媒組成の変化は、不飽和度の高いもののほど大きく影響を受けることが明かとなった。また、分離温度の保持時間に与える影響は、飽和酸、モノエン酸、多価不飽和酸で異なり、これら3グループに分類できた。各誘導体(15種)の分離は、曲線的なグラジエント(Concave 2モード)を用いることにより可能であった。これにより、蛍光法により1 pmolの脂肪酸の検出が可能であった。また、本法をヒト血漿中の遊離脂肪酸分析に応用し良好な結果を得ることができた。



【 I I - 4 】 9 - ブロモメチルアクリジ  
ンによる誘導体化のためのトリアシルグリセ  
ロールの加水分解と油脂の脂肪酸組成分析

脂肪酸の多くはグリセロールやその他の化合  
物とのエステル体として存在している。そ  
こでそれらの構成脂肪酸を分析するためには  
エステルを加水分解（ケン化）する必要があ  
る。木原らはUVラベル化試薬のための簡単  
なケン化の方法（28）を報告している。予  
備実験で、この方法をそのまま本ラベル化法  
に用いたところ、リノレン酸の異性化が認め  
られた（尚、木原らはリノレン酸については  
何も触れていない）。そこで、木原らの加水  
分解法を基に検討を加え、簡単な加水分解法  
と本ラベル化法を組み合わせることにより、  
高感度な脂肪酸組成分析法を確立した。

## 第 1 節 実 験

試薬及び装置： トリオレイン酸は S i -  
g m a C h e m. C o. より購入した。  
オリーブ油は関東化学（株）、綿実油、亜麻  
仁油、及び大豆油は林市次商店（合）（東  
京）製のものをそれぞれ使用した。バター、  
及びマーガリンは市内のスーパーマーケット  
トより購入した。その他の試薬、及び装置  
は I I - 2 に示したものと同一ものを使用し  
た。

トリアシルグリセロールの加水分解： 試  
料油脂 20 ~ 40 m g を正確に秤量し、クロ  
ロホルムで 25 m l に定容した。この溶液  
100  $\mu$  l を栓付き試験管にとり、25 m M  
T E A C ・メタノール溶液を 1.5 m l 加え、  
密栓後 70  $^{\circ}$ C で 5 分間加熱し、開栓後、更に  
30 分間 70  $^{\circ}$ C で加熱を続けた。窒素気流下  
で溶媒を完全に除いた後、1 m l の D M F を

加え完全に溶解させ、その100 $\mu$ lに5 mMの9-Br-Maを200 $\mu$ l加え室温で10分以上反応させた後、10 $\mu$ lをHPLCに導入した (Fig. 17)。

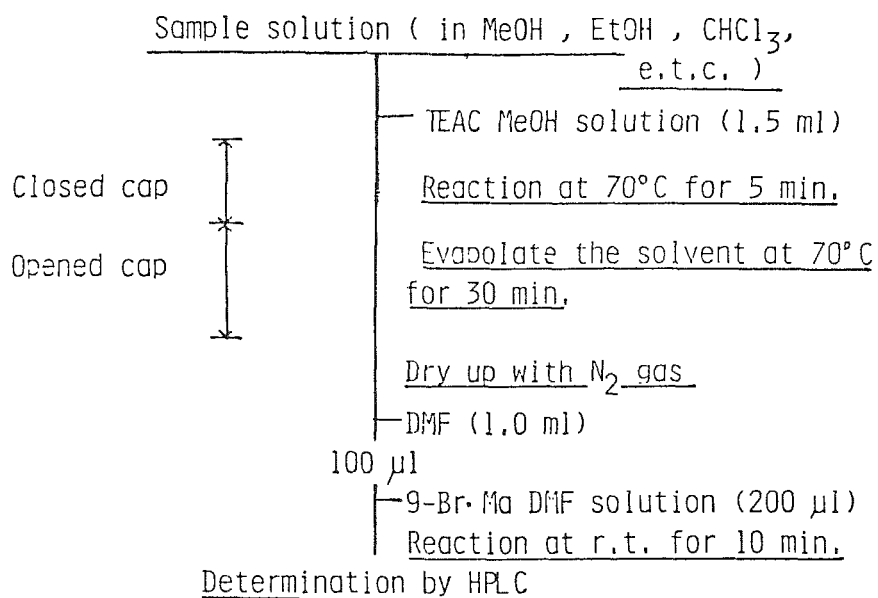


Fig.17: Saponification and labeling procedure of triacylglycerols

H P L C の 条 件: 本 実 験 に 用 い た H P L C の 条 件 を 以 下 に 示 し た。

HPLC conditions

Column: TSK-gel ODS 120A(4.6mm i.d. x 150mm)

Mobile phase: 98% methanol-Water

Column temperature: 25°C

Flow rate: 0.6 ml/min(0 to 20 min) →

0.8 ml/min(20 min to final)

Detection: Fluorometry ( Ex. 360nm, Em. 425nm )

加水分解温度の影響: トリオレインの2-プロパノール溶液 ( 3.4 mM ) を栓付き試験管に 100  $\mu$ l 採取し、これに 25 mM TEAC-メタノール溶液を 1 ml 加え密栓後 70 °C で 0 ~ 30 分間加熱した。その後、開栓し、更に 70 °C で 30 分間加熱を続けた。以下の操作は、上述の方法に従った。同様の操作を 90 °C でも行い、70 °C の場合と比較した。

水酸化カリウムによる加水分解: 亜麻仁油 213.28 mg をクロロホルムで 25 ml に定容し、その 100  $\mu$ l に水酸化カリウムの 0.1 N メタノール溶液を 1 ml 加え、密栓

後 70℃で5分間加熱し、更に開栓後30分間加熱を続けた。窒素気流下で溶媒を完全に除去した後、0.2N塩酸1mlを加え、更に1mlのヘキサンの抽出した。この抽出液100μlを窒素気流下で乾固させDMFに溶解させ、200μlの9-Br·Ma-DMF溶液(5mM)、及び、TEAC-DMF溶液(5mM)100μlを加えて室温で10分以上反応させ、HPLCにより分析した。同一試料について、TEACを用いた前述の加水分解法(70℃)に従って処理したものと比較を行った。

リノレン酸への影響: リノレン酸のクロロホルム溶液(4.42mM)を栓付き試験管に100μl採取し、TEACメタノール溶液(25mM)1mlを加え密栓し5分間加熱(60、70、80、或は、90℃)した。その後、開栓し更に30分間同じ温度で加熱を続けた。以下の操作は上述の方法に従った。

添加回収実験: バター 36.62 mg をクロロホルムで 25 ml に定容し、これに脂肪酸 (ミリスチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、及び、リノレン酸) を添加し、上述の方法 (温度は 70℃) により加水分解、及びラベル化した後、HPLC により添加回収率を求めた。

## 第 2 節 結果と考察

トリアシルグリセロールの加水分解とラベル化反応: 油脂の構成脂肪酸組成分析を行うためのエステルの加水分解と脂肪酸のラベル化条件について検討した。木原らは、高速液体クロマトグラフィーによる構成脂肪酸分析のためのケン化とフェナシル化の方法について報告している (28)。つまり、油脂 0.01 ~ 1 mg を反応瓶にとり、0.1 M 水酸化カリウムのメタノール溶液 0.2 ml を加え、

密栓後、90℃で10分間加熱し、更に開栓して30分間加熱を続け、溶媒を除去した後、エステル化試薬1mlを加え再び密栓して90℃で10分間加熱し、反応液を冷却後、開栓して直接分析に供する方法である。この方法を改良し、TEACを用いたトリアシルグリセロールの加水分解、及び、蛍光ラベル化を行った。

トリオレインを試料として加熱温度を70℃、及び、90℃とした場合の密栓時間とオレイン酸誘導体のピーク高の関係をFig.

18に示した。この結果、何れの温度においても密栓の時間に関係なく一定のピーク高が得られた。これは、

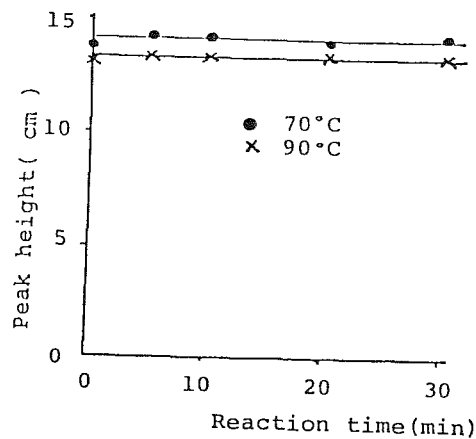


Fig.18: The time courses of saponification of triolein at 70 °C and 90 °C

開栓して30分間加熱することによって溶媒を除去すると共に、十分に加水分解が進行

したためと考えられた。試料として、リノレン酸（約20%のリノール酸を含む）を用い加水分解操作による影響について検討した（Fig. 19）。90℃で加熱した場合リノレン酸、及び、リノール酸の何れも70℃の場合よりピーク高は低くリノレン酸誘導体よりも1分遅れた所に未知のピークが認められた。これは、高温での加熱処理による二重結合の異性化（シス→トランスの幾何、或は、二重結合の共役化による構造異性化）によ

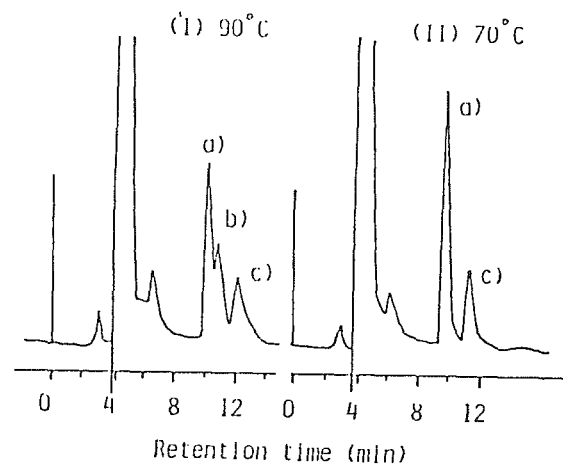


Fig. 19: HPLC chromatograms of linolenic acid and linoleic acid After saponification at 70 °C (II) and 90 °C (I). The peak a) and c) were linolenic acid and linoleic acid derivatives, respectively. Peak b) was unknown by-product.



考えられた。しかし70℃ではピーク高の減少及び、未知のピークは認められなかった。従って、加熱温度は70℃と設定した。尚、同様の現象は、TEACの代わりに水酸化カリウムを用い、加水分解後ヘキサソールで抽出した場合も観察された。また、亜麻仁油を試料として70℃で加水分解した場合、水酸化カリウムとTEACを用いた場合ではHPLCのパターンに違いは認められなかった。

次に、加水分解において、TEACの添加量とピーク高の関係について検討した。試料としてバター(30.93 mg / 20 ml in クロロホルム)を使用し、TEAC溶液の濃度を5 ~ 25 mMとして、加水分解を行い、生成したミリスチン酸とオレイン酸をHPLCにより分析した。その結果をTable 11に示した。TEAC濃度が20 mM以下ではTEAC濃度の上昇に伴いピーク高の増加が認められたが、20 mMと25 mMにおいては、ほぼ等しいピーク高が得られた。25

m M の T E A C

溶 液 を 使 用 す る

こ と に よ り、 最

終 的 に ラ ベ ル 化

に 供 す る 試 料 溶

液 は 3 7. 5 m M

の T E A C を 含

む こ と に な る が、

加 水 分 解 操 作 中 に か な り 消 費、 及 び、 分 解 さ

れ て し ま う と 考 え ら れ、 そ の た め に 大 過 剰 の

T E A C の 添 加 が 必 要 で あ っ た と 考 え ら れ た。

そ こ で、 本 法 で は 2 5 m M の T E A C 溶 液 を

用 い た。

Table 11: Effect of TEAC concentration on saponification reaction  
Sample solution( 30.93mg of butter/ 20ml in  $\text{CHCl}_3$  ) 100 $\mu$ l was hydrolyzed and labeled by 9-Br-Mr.

Conc. of TEAC ( mM )	Peak height ( cm )	
	14:0	18:1
5	3.5	2.1
10	5.4	3.6
15	7.6	5.9
20	8.3	6.3
25	8.4	6.4

植 物 性 油、 及 び、 バ タ ー、 マ ー ガ リ ン の 構

成 脂 肪 酸 分 析: 植 物 性 油 4 種 ( 大 豆 油、 綿

実 油、 亜 麻 仁 油、 及 び、 オ リ ー ブ 油 ) 及 び 市

販 の バ タ ー、 マ ー ガ リ ン の 構 成 脂 肪 酸 分 析 を

行 っ た。 4 種 の 脂 肪 酸 を バ タ ー に 添 加 し そ れ

ら の 回 収 率 を 求 め た 結 果 を T a b l e 1 2 に

Table 12: Recoveries of fatty acids in a butter

Fatty acid	( p mol , on column )				Recovery ( % )
	Total	Sample	Difference	Added	
Lauric acid	462	100	362	392	92.3
Stearic acid	395	52	343	344	99.7
oleic acid	667	250	417	414	100.7
Linolenic acid	413	0	413	407	101.5

示した。これら脂肪酸の添加回収率は92～101%であった。また、本法によるミリスチン酸の変動係数は2.5% (42.8 pmol, n=6)であった。

Fig. 20に本実験に用いたHPLC条件下での各脂肪酸の分離パターンを示した。

この条件は、I I - 3で設定した条件と異なる

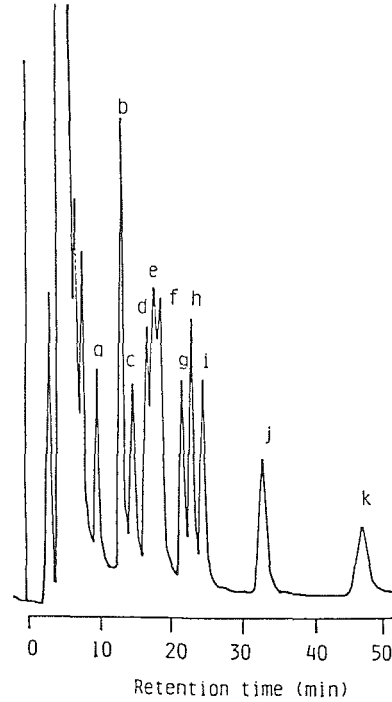


Fig. 20: Separation pattern of 9-AM esters on HPLC. Column used was TSK-gel ODS 120A and mobile phase was 98% methanol-water. Flow rate were 0.6 ml/min (initial to 20 min) and 0.8 ml/min (20 min to final). 9-AM esters were (a) 10:0, (b) 12:0, (c) 18:3, (d) 16:1, (e) 18:2, (f) 14:0, (g) 18:1(cis), (h) 18:1(trans), (i) 16:0, (j) 18:0 and (k) 20:0 derivatives.

っているが、これは使用した試料中には高度不飽和脂肪酸が含まれず、本条件下で分析が不可能であったためであったが、I I - 3 に示した条件を用いることにより更に多くの試料への応用が可能と考えられた。尚、この条件ではオレイン酸とそのトランス異性体であるエライジン酸の分離定量も可能であった。

T a b l e 1 3 に各試料の分析結果を示した。( ) 内には各油脂の脂肪酸組成の文献値を示した( 2 9、3 0 )。植物油中の脂肪酸組成は、品種、収穫地、採取部位、生育ステージ、環境等により変動することが知られており( 3 1 )、これらの値は目安として掲載した。バター、及び、マーガリンでは植物油中には認められなかったイソオレイン酸が検出された。これは、分析操作中の異性化に起因するものではなく食品の製造過程での異性化によるものと考えられた。これにより本法は、食品中におけるトランス酸の分析にも応用可能であることが示唆された。

Table 13: Fatty acid compositions of oils and foods

In the parentheses, reference data were shown. The margarine used was made from 100% sunflower oil and fatty acid composition of sunflower oil was shown as the reference datum.

Sample Fatty acids	Olive oil	Cotton- seed oil	Soybean oil ( % )	linseed oil	Butter	Sunflower oil Margarine
12:0					4.4 (3.5)	
14:0					12.1 (12.9)	
16:0	10.5 (12)	24.3 (27)	11.3 (12)	3.1 (6)	30.7 (32.5)	8.3 (6)
16:1					1.0 (1.7)	
18:0	1.7 (2)	1.1 (3)	1.9 (4)	1.5 (4)	10.5 (11.6)	7.0 (3)
18:1 cis	87.3 (76)	27.9 (17)	29.8 (25)	20.1 (22)	30.8 (25.0)	26.5 (27)
18:1 trans					2.9	4.7
18:2	4.1 (8)	46.7 (52)	41.5 (51)	11.2 (15)	t (0.5)	53.5 (64)
18:3			15.6 (8)	64.0 (52)		
Total	100 (98)	100 (99)	100 (92)	100 (99)	100 (87)	100 (100)
Reference	29	29	29	29	30	29

## 第 3 節 結 論

トリアシルグリセロールの簡単なケン化とそれに続く 9 - B r · M a による蛍光ラベル化により、不飽和脂肪酸の異性化を伴わずに脂肪酸組成分析が可能であった。脂肪酸の添加による回収率は 92 ~ 101 % と良好であり、また再現性もよかった。分析に必要な試料量は更に減らすことが可能であり、生体試料中に含まれる脂質の構成脂肪酸分析への応用も可能と考えられた。更に、本法は食品製造中に生成すると考えられるトランス酸の分析にも応用可能であると期待できた。

尚、バター中には低・中級脂肪酸が含まれているが、用いた H P L C 条件下ではこれらの検出は困難であった。しかし、適当な分離条件を用いることによりそれらの脂肪酸の検出も可能と考えられた。

# 第 I I I 章 過酸化脂質の蛍光分析試薬 の開発とその応用

## 【 I I I - 1 】 緒 言

脂質を構成している高度不飽和脂肪酸は、酵素的、或は非酵素的に酸化を受け、非常に不安定な化合物であるヒドロペルオキシドを一次生成物として与え、更に分解、或は重合して様々な分解物（アルデヒド、ケトン、アルコール、カルボン酸、及び、炭化水素等）、或は重合物を与える。これら脂質過酸化物は、食品に於てその呈味性、風味、或は栄養価を低下させることが知られている（32～34）。特に、酸化の二次分解生成物であるヒドロペルオキシアルケナールは非常に強い毒性を示し、脂質酸化を防止することは食品化学上非常に重要な問題の一つである（35、36）。一方、近年生体内における過酸化脂

質の生成は、ある種の疾患や老化と関係があるのではないかと注目されてきている(37~40)。生体膜の構成成分であるリン脂質の2位は不飽和脂肪酸にとみ、このリン脂質の酸化が膜の透過性、強度等に影響を与え、これが疾病や老化の原因となることは充分考えられることである。また、脂質過酸化の過程で生ずるラジカルが生体に直接損傷を与え、これが修復しきれず蓄積することにより老化が進行するとも考えることが出来る。ラジカル連鎖反応で進行する過酸化反応は、酵素的、化学的及び物理的に制御され毒性の強い過酸化物の蓄積は防がれているが(41)、このような防御機構の機能低下が脂質過酸化物を蓄積させ、疾病・老化の引金となる可能性も考えられる。一方、生体内で非酵素的に起こる脂質過酸化とは別に、酵素により制御された脂質過酸化反応は、生体内で非常に重要な生理的役割を果していることが知られている。炎症、免疫反応、動脈硬化、癌などに関連し



非常に多様で強力な生理活性を示す一連の化合物群であるプロスタグランジンの生合成の最初のステップはシクロオキシゲナーゼによる過酸化脂質の生成である。抗炎症薬として用いられるアスピリンはこの反応を阻害する化合物であり、炎症の原因となるプロスタグランジンの生成を阻害するものである。また、SRS (slow reaction substances) の本体であることが最近明らかとされてきたロイコトリエンの生合成は5-リポキシゲナーゼによる5位の酸化により始まる(16)。この外にも興味ある生理活性を有する脂質過酸化物が数多く報告されている(17、18)。

過酸化脂質の研究に於て、その生理活性と共に非常に重要なことは分布と量を正確に知ることである。過酸化脂質の定量法としてこれまでにも、ヨウ素法(42~44)、チオバルビツール酸価法(TBA法、45、46)、酵素法(47~49)、化学発光法(50)、GC法による呼気中の炭化水素の分

析 ( 5 1 )、紫外部 ( U V ) 吸収 ( 5 2 )、赤外 ( I R ) 吸収 ( 5 3 )、E S R 法 ( 5 4 )、H P L C 法 ( 5 5 ) など様々な分析法が報告されているが、感度、再現性、選択性、共存物質影響、反応溶媒の選択、或は操作の簡便性等に問題を残すものが多く、これらを充分満足できる分析法の開発が望まれている。

本研究では、過酸化脂質の新しい分析法の確立を目的とし、特にヒドロペルオキシドの蛍光分析試薬の開発とその特性 ( I I I - 2 )、液相法による定量法 ( I I I - 3 )、及び、H P L C ポストカラム法への応用 ( I I I - 4 ) について検討した。

#### 【 I I I - 2 】 ホスフィン試薬の合成とその特性

脂質過酸化における第 1 次生成物であるヒ

ドロペルオキシドの定量的還元法のひとつとしてトリフェニルホスフィン (T P P) が広く用いられている。リン化合物による還元は、還元剤として3価のリン化合物を用い、脱酸素反応、脱硫黄反応を行うものに限られる。3価のリン化合物は、 $n$  供与体として求核反応を行うと同時に、リン原子の3d空軌道が $\pi$ 受容体となり、 $d\pi - p\pi$ 相互作用を可能とする。即ち、3価のリン化合物が、リン原子の非共有電子 ( $3s$ )<sup>2</sup> を用いて酸素、或は硫黄原子と結合を作ると同時に、リン原子の電子殻拡大が起こり、10電子を共有する化合物が生成する。これが、3価リン化合物の還元力をもたらしている。T P Pによるヒドロペルオキシドの還元はイオンの進行し、3価のリン化合物が、リン原子上の非共有電子対を用いてヒドロペルオキシドの-O-O-Hの酸素原子に求核的に攻撃しP=O結合を生成すると同時にヒドロペルオキシドをアルコールに還元する (56、Fig. 21)。こ

の反応によるリン原子上の電子殻の拡大は分子中のπ電子系に変化をもたらし、その結果がUV

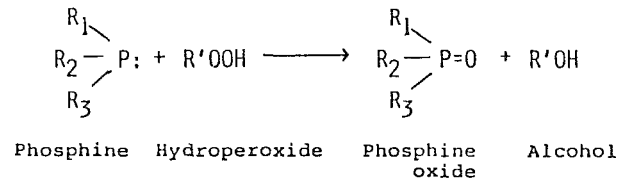


Fig. 21: Reaction of phosphines with hydroperoxides

スペクトル上に反映され生成物であるTPPオキシドはTPPと異なったスペクトルを与えることが予備実験より明らかとなった。このことから、TPPのフェニル基の一つを蛍光性の基で置き換えた化合物ではリン原子の電子殻拡大に伴い蛍光の特性に変化が生じるものと期待できた。そこで、本研究では、蛍光発色基を導入したホスフィン化合物を合成しその特性について検討した。

## 第1節 実験

試薬及び装置: 1-ナフチルジフェニル

ホスフィン (NDPP; II)、及び、その  
 オキシド (II') はトリフェニルホスフィン  
 (TPP; I)、及び、1-ブロムナフタ  
 レンより Zornらの方法に従って調製した  
 (57)。9-アントリルジフェニルホスフ  
 イン (ADPP; III)、及び、ジフェニ  
 ル-1-ピレニルホスフィン (DPPP;  
 IV)、及び、それらのオキシド (それぞれ  
 III' 及び IV') も同様の方法で調製し  
 た。それらの合成スキームを Fig. 22 に  
 示した。尚、9-ブロモアントラセン、及び、  
 1-ブロモピレンは Nonhebelの方法  
 により調製した (58)。

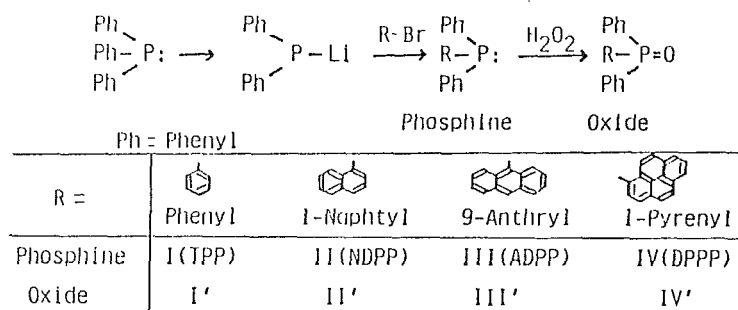


Fig. 22: Synthesis scheme of aryl phosphines and their oxides

N D P P ( I I ): m p. 1 2 1 °C. 元素  
 分析: 理論値 ( %、 $C_{22}H_{17}P$  ); C: 8 4.5 9、  
 H: 5.4 8. 実測値 ( % ); C: 8 4.1 7、  
 H: 5.4 9. F D M a s s ( M + 1 ) 3 1 3. I R (  $cm^{-1}$ 、K B r )  
 1 5 8 0、1 4 7 0 ( A r o m. ) 1 4 3 0、  
 1 0 2 0、1 0 0 0 ( P - C a r o m. ). U V  
 ( n m、ク ロ コ ホ ル Δ )  $\lambda_{max} = 2 4 4$  (  $\epsilon = 1 7 4 0 0$  ).

N D P P o x i d e ( I I ' ): m p.  
 1 7 2 ~ 1 7 5 °C. 元素分析: 理論値 ( %、 $C_{22}H_{17}PO$  );  
 C: 8 0.4 7、H: 5.1 2. 実測値 ( % );  
 C: 7 9.7 0、H: 5.4 7. F D M a s s ( M + 1 ) 3 2 9. I R (  $cm^{-1}$ 、  
 K B r ) 1 5 8 0、1 4 7 0 ( A r o m. ) 1 4 3 0、  
 1 0 2 0、9 8 0 ( P - C a r o m. ) 1 1 4 0 ( P = O ). U V ( n m、  
 ク ロ コ ホ ル Δ )  $\lambda_{max} = 2 4 2$  (  $\epsilon = 1 1 6 0 0$  ).

A D P P ( I I I ): トリフェニルホスフ

イン ( 5.09 g )、及び、金属リチウム ( 410 mg ) を無水の THF 200 ml に加え、窒素気流下、室温で3時間攪はんした。これにより反応液は徐々に赤褐色となった。反応後、生成したフェニルリチウムを壊すために、塩化tert-ブチル ( 1.8 g / 20 ml in THF ) を加え10分間還流した。室温まで冷やした後、この液を窒素気流下で、グラスウールを緩く詰めたガラス管の中を通すことにより過剰のリチウムを除くと共に、予め9-アントリルブロミド ( 5.0 g ) を入れた三口フラスコに注ぎ加えた。3.5時間還流したのち、反応液を水中に注ぎ、150 ml のクロロホルムで抽出した。ADPPの精製は、シリカゲルカラムクロマトグラフィ (ヘキサン: ベンゼン = 8: 2) 及び酢酸エチルからの再結晶により行った (淡黄色結晶、0.627 g ( 8.9% ) )。m.p. 203.5℃。元素分析: 理論値 ( %、C<sub>26</sub>H<sub>19</sub>P ) ; C: 86.16、H: 5.28。実測値 ( % ) ; C:

8 6 . 0 0、 H: 5 . 5 7。 F D M a s s ( M + 1 ) 3 6 3。 I R ( c m <sup>-1</sup>、 K B r ) 1 5 9 0、 1 4 7 0 ( A r o m。 )、 1 4 2 5、 1 0 1 0、 9 9 0 ( P - C a r o m。 )、 U V ( n m、 クロロホルム )  $\lambda_{max} = 258$  (  $\epsilon = 75000$  )。

A D P P o x i d e ( I I I ' ): 6 6 m g の A D P P を クロロホルム - メタノール混液 ( 1 : 1 ) 中に溶解させ数滴の過酸化水素水 ( 約 3 0 % 溶液 ) を加えた。シリカゲルのショートコラム ( クロロホルム ) を通した後、再結晶により精製した ( 3 5 m g、 5 1 . 6 % )。 m p. 1 8 4 - 1 8 5 ° C。 元素分析: 理論値 ( %、 C<sub>26</sub>H<sub>19</sub>P<sub>2</sub>O ) ; C:

8 2 . 5 2、 H: 5 . 0 6。 実測値 ( % ) ; C:

8 2 . 1 2、 H: 5 . 0 7。 F D M a s s ( M + 1 ) 3 7 9。 I R ( c m <sup>-1</sup>、 K B r ) 1 6 1 0、 1 5 0 0 ( A r o m。 ) 1 4 3 0、 1 0 1 0、 9 9 0 ( P - C a r o m。 ) 1 1 6 5 ( P = O )。 U V ( n m、 クロロホルム )  $\lambda$



$\lambda_{\max} = 260$  ( $\epsilon = 78000$ ).

D P P P ( I V ): D P P P は、トリフェニルホスフィンと1-ブロモピレンよりADPPと同様の方法で調製した。生成したホスフィンは、クロロホルムで抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィ(ヘキサン:ベンゼン = 7:3)及び再結晶により行い13.6%の収率で淡黄色結晶を得た。m.p. 171~174°C。元素分析: 理論値(%、C<sub>28</sub>H<sub>19</sub>P); C: 87.02、H: 4.95。実測値(%); C: 86.36、H: 5.14。F D

M a s s ( M + 1 ) 3 8 7。 I R ( c m<sup>-1</sup>, K B r ) 1 5 8 0、 1 4 7 0 ( A r o m. ) 1 4 3 9、 1 0 2 5、 9 9 0 ( P - C a r o m. )。 U V ( n m, C H C l<sub>3</sub> : M e O H = 1: 1 )  $\lambda_{\max} = 244$  ( $\epsilon = 43000$ ).

D P P P o x i d e ( I V ' ): D P P P オキシドは、ADPPオキシドと同様の方法で調製した(収率53.8%)。m.p. 245°C。元素分析: 理論値(%、C<sub>28</sub>H<sub>19</sub>

P O ) ; C : 8 3 . 5 6 、 H : 4 . 7 5 実 測 値  
 ( % ) ; C : 8 2 . 5 0 、 H : 4 . 9 9 。 F D  
 M a s s ( M + 1 ) 4 0 3 。 I R ( c m <sup>-1</sup> 、  
 K B r ) 1 5 8 0 、 1 4 7 0 ( A r o m . )  
 1 4 3 9 、 1 0 2 5 、 9 9 0 ( P - C a r o m . )  
 1 1 6 0 ( P = O ) 。 U V ( n m 、 C H  
 C l <sub>3</sub> : M e O H = 1 : 1 ) λ <sub>m a x</sub> = 2 4 4  
 ( ε = 4 6 0 0 0 ) 。

そ の 他 の 試 薬 : そ の 他 の 試 薬 は 和 光 純 薬  
 工 業 ( 株 ) 製 の 特 級 或 は 分 析 用 試 薬 を 用 いた。  
 リ ノ ー ル 酸 は 乾 燥 空 気 を 吹 き 込 む こ と に よ り  
 自 動 酸 化 さ せ 、 ヨ ウ 素 法 ( 4 3 ) に よ り P O  
 V 値 を 求 め た ( P O V = 3 . 0 0 ) 。

装 置 : 蛍 光 分 光 光 度 計 は 日 立 モ デ ル 2 0  
 4 を 用 いた。 I R 及 び U V ス ペ ク ト ル は 、 そ  
 れ ぞ れ 日 本 分 光 モ デ ル A - 2 0 2 赤 外 分 光 光  
 度 計、 及 び、 日 立 モ デ ル 2 0 0 - 1 0 分 光  
 光 度 計 を 使 用 し た。 H P L C シ ス テ ム は、 送

液系として東洋曹達 ( T S K ) C C P M マルチポンプを用い、分離カラムとして T S K - g e l O D S 8 0 T m ( 4 . 6 m m i . d . x 1 5 0 m m , 5  $\mu$  m ) を使用した。また、カラムオーブン、及び、検出器として T S K C O - 8 0 0 0 カラムオーブン、及び、U V - 8 モデル I I 分光光度計をそれぞれ用いた。

蛍光スペクトルの測定: N D P P、 A D P P、 D P P P、及び、それらのオキシドの蛍光スペクトルをメタノール、エタノール、及び、クロロホルム中で測定した ( 2 0  $^{\circ}$  C )。また、同時に比較のためナフタレン、アントラセン、及び、ピレンのエタノール中での蛍光スペクトルを測定した。これらのスペクトル及び蛍光強度は波長による補正は行わなかった。

ホスフィン類の酸化安定性: 合成したホスフィンの安定性を H P L C によりホスフィ

ンの経時的減少を追跡することにより行った。  
 TPP (1.14 mM)、NDPP (1.10  
 mM)、ADPP (1.07 mM)、及び、D  
 PPP (1.20 mM) のそれぞれクロロホル  
 ム溶液を室温 (20 °C)、光照射下 (30 w  
 蛍光灯ランプの真下 30 cm)、或は、遮光  
 して保存し、その 10  $\mu$  l を経時的に HPL  
 C に導入した。HPLC のカラムは逆相系の  
 ODS カラムを用い、メタノールを移動相と  
 して 0.8 ml / min の流速で溶出した。検  
 出は各々の UV 吸収 (それぞれ 260、  
 242、258、及び、244 nm) をモニ  
 ターすることにより行った。

ホスフィンのヒドロペルオキシドとの反応  
 性: ホスフィンとヒドロペルオキシドとの  
 混合液の一部を経時的に HPLC に導入し、  
 ホスフィンの減少を追跡することにより調べ  
 た。それぞれ 100  $\mu$  l のホスフィンのクロ  
 ホルム溶液 (TPP: 1.14 mM、NDP

P: 1.10 mM、ADPP: 1.07 mM、或  
 は、DPPP: 1.20 mM) に 100  $\mu$ l の  
 自動酸化リノール酸 (POV = 300) のク  
 ロロホルム溶液 (18 mg / 10 ml) を加  
 え、遮光下室温 (20  $^{\circ}$ C) で反応させた。反  
 応開始から 0、30、及び、60 分後にそれ  
 ぞれの 10  $\mu$ l を HPLC に導入し反応率を  
 求めた。HPLC の条件は上述の条件と同じ  
 であった。

## 第 2 節 結果及び考察

蛍光スペクトル: NDPP、ADPP、  
 及び、DPPP、及び、それらのオキシドの  
 蛍光スペクトルを Fig. 23 に示した。こ  
 れらのホスフィンには蛍光性を示さなかったが、  
 酸化生成物のオキシドは何れも青色の蛍光を  
 有していた。これは、ナフチル、アンスリル、  
 及び、ピレニル等の蛍光発色基が 3 価のリン

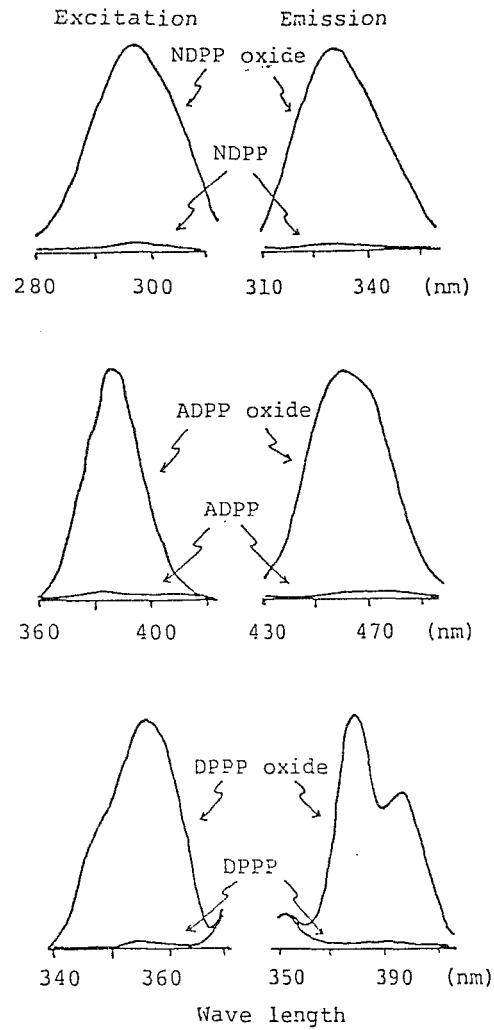


Fig. 23: Fluorescence spectra of aryl phosphines and their oxides

Fluorescence spectra were measured in methanol.

原子に直接結合することにより本来の蛍光性を失い無蛍光性となったものが、ホスフィン

の酸化と同時にリン原子の電子殻の拡大が起  
こり5価のホスフィンオキシドとなることに  
より $\pi$ 電子の流れに変化が生じ、本来発色基  
が持っていた蛍光性を回復したためと考えら  
れた。この様な現象は、他の蛍光発色基を導  
入した場合についても期待されるものであり、  
このタイプの新しい発蛍光試薬の分子設計の  
基本となるものであると考えられた。

Table 14 にこれらホスフィンオキシ  
ドの相対蛍光強度を示した（同一濃度のアン

Table 14: Relative fluorescence intensities of aryl phosphines, their oxides, naphthalene, anthracene and pyrene

Solvent Sample	Chloroform	Ethanol	Methanol
	II' NDPP oxide	0.17 (300, 335)	0.37 (300, 335)
III' ADPP oxide	1.76 (385, 450)	0.97 (385, 460)	0.56 (385, 460)
IV' DPPP oxide	9.60 (355, 380)	12.22 (352, 380)	9.66 (352, 380)
Naphthalene		0.04 (300, 330)	
Anthracene		1.00 (356, 400)	
Pyrene		0.74 (334, 388)	

ト ラ セ ン の エ タ ノ ー ル 溶 液 中 で の 蛍 光 強 度 を  
1 0 0 と し た ) 。 ( ) 内 に 蛍 光 の 極 大 波 長  
( 励 起 発 光 ) を 示 し た 。 蛍 光 の 極 大 波 長、  
及 び 強 度 は 溶 媒 の 種 類 に よ り 若 干 変 動 し た  
が、 何 れ の 溶 媒 に お い て も D P P P オ キ シ ド  
が こ れ ら オ キ シ ド の 中 で 最 も 強 い 蛍 光 強 度 を  
示 し た 。 ま た、 比 較 の た め に こ れ ら ホ ス フ ィ  
ン の 蛍 光 発 色 基 と し て 導 入 し た ナ フ タ レ ン、  
ア ン ト ラ セ ン、 及 び、 ピ レ ン の エ タ ノ ー ル 中  
で の 相 対 蛍 光 強 度 を 測 定 し た 。 そ の 結 果、 エ  
タ ノ ー ル 中 で は、 A D P P オ キ シ ド は ア ン ト  
ラ セ ン と ほ ぼ 同 じ 蛍 光 強 度 を 示 し た が、 N D  
P P オ キ シ ド、 及 び、 D P P P オ キ シ ド は 何  
れ も 元 の 蛍 光 発 色 団 の 蛍 光 よ り も 1 0 倍 以 上  
蛍 光 強 度 が 強 く な っ た 。 特 に、 D P P P オ キ  
シ ド は 標 準 と し た ア ン ト ラ セ ン の 1 2 倍 の 蛍  
光 強 度 を 示 し た 。

ホ ス フ ィ ン の 安 定 性: ホ ス フ ィ ン の ク ロ  
ロ ホ ル ム 溶 液 中 で の 安 定 性 に つ い て 検 討 し た



結果を Fig. 24 に示した。いずれのホスフィンについても、遮光下ではホスフィンは非常に安定であったが、強い光照射下においては徐々にオキシドへと酸化され減少した。例えば、ADPP は、3 時間以内でほぼ全てが酸化されてオキシドとなった。TPP、及び DPPP は 3 時間で 45 ~ 50 %、NDPP は最も安定で 14 % 程度がそれぞれ酸化

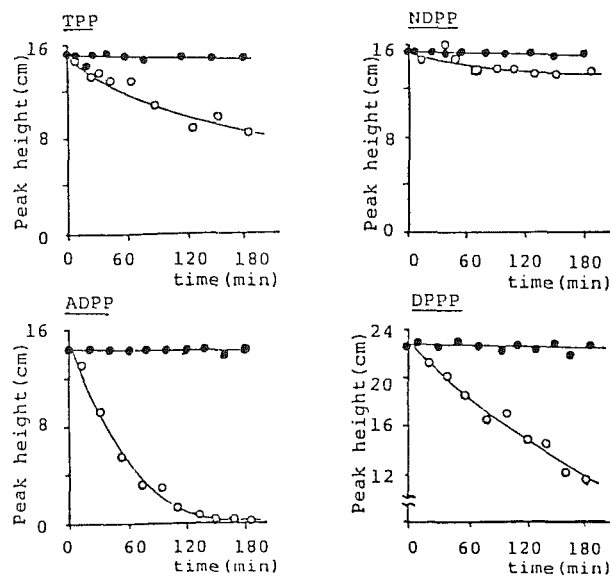


Fig. 24: Stabilities of phosphines to oxidation  
These phosphine solutions were stored in  
the dark(●) and in the light(○).

された。この原因ははっきりしていないが、光照射下における活性酸素（ $\text{O}_2$ 等）の生成により酸化を受けたものと考えられた。従って、本試薬の使用に際しては出来るだけ強い光の照射を避け、暗所での操作を行う必要を認めた。また、DPPP溶液は、褐色瓶中で $-25^\circ\text{C}$ に保つことにより、3～7日間保存可能であったが若干のバックグラウンドの上昇は認められた。このため、試薬溶液は、出来るだけ使用直前に調製したものを使用すべきであると考えられた。一方、結晶状のホスフィンハイドライド等に対して非常に安定であり、褐色瓶中で冷蔵保存により20ヵ月以上変化を認めなかった。

ホスフィンのヒドロペルオキシドとの反応性： Fig. 25に $20^\circ\text{C}$ におけるTPPとヒドロペルオキシドの反応の経時変化を示した。TPPは30分まで徐々に減少したが、その後ほぼ一定のピーク高与えた。ここで減

少した TPP の濃度は 0.276 mM に相当し、添加したヒドロペルオキシドの濃度 0.27 mM と非常によく一致した ( 1.02 : 1.00 )。

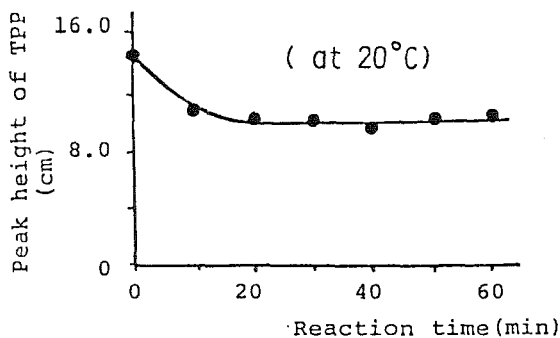


Fig. 25: Reaction time course of triphenylphosphine with linoleic acid hydroperoxides  
Reaction was performed in chloroform-methanol (1:1) at room temp.

各ホスフィンとヒドロペルオキシドとの反応性について Table 15 に示した。TPP はこれらホスフィンの中で最も反応性が高く ADPP が最も低い反応性を示した。この条件下では何れのホスフィンも 60 分以内に反

Table 15: Reactivities of phosphines with hydroperoxides with DPPP

Phosphines	Reactivity (%)		
	0 min	30 min	60 min
I TPP	0	84.3	102.4
II NDPP	0	75.6	97.8
III ADPP	0	67.7	97.6
IV DPPP	0	74.7	94.9

応は完了したが、より希薄な溶液では、反応が完了するまでに非常に長時間を要した。ホスフィンのヒドロペルオキシドとの反応性の差は、これらの反応の機構より次のように説明することが出来た。Fig. 26に反応機構の式を示した。この反応は、3価のリン原子上の非共有電子対がヒドロペルオキシドの-OH基の酸素原子を求核的に攻撃し、ここに示したような中間体を経て、オキシドとアルコールを生成する反応である。反応の律速段階はホスフィンのリン原子の酸素原子への求核攻撃であると考えられるが、リン原子、或は-O-O-H基の回りの立体障害は、この求

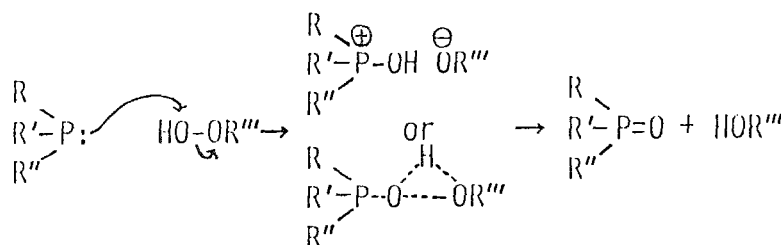


Fig. 26: Reaction mechanism of phosphines with hydroperoxides

核的攻撃の障害となり、その結果反応性の低下を引き起こしたものと考えられた。各ホスフインのリン原子の周りの立体障害は  $ADP > DPP \geq NDP > TPP$  の順であるため、反応性はこの逆の順、つまり  $TPP > NDP \geq DPP > ADP$  となったと考えられた。

### 第 3 節 結 論

蛍光発色基を有するアリルホスフインは蛍光性を示さなかったが、その酸化生成物であるオキシドは何れも蛍光性を示した。特に、ピレン誘導体である  $DPP$  はアントラセンの 1.2 倍の蛍光強度を示した。ホスフインは、溶液中では、光照射下不安定で容易にオキシドに酸化されたが、遮光下では非常に安定であった。また、結晶は非常に安定であり 20 カ月以上変化を認めず使用可能であった。ヒ

ドロペルオキシドとの反応はほぼ定量的に進行し、相当するオキシドとアルコールを与えた。反応性は、 $TPP > NDP \cong DPP > ADPP$ の順であった。以上から、感度、安定性、反応性を考慮してDPPが最も分析試薬として有望であると考えられた。

【 I I I - 3 】 ジフェニル - 1 - ピレニル  
ホスフィン ( DPP ) を用いたヒドロペル  
オキシドの定量

新しく開発したヒドロペルオキシドの蛍光  
検出試薬ジフェニル - 1 - ピレニルホスフィ  
ン ( DPP ) を用いた高感度分析・定量法  
の確立を目的とし、液相法による定量条件に

ついて検討し、ヨウ素法との比較を行った。

## 第 1 節 実 験

試 薬: D P P P は I I I - 2 に示した方法で調製した。リノール酸、トリオレイン、過酸化ベンゾイルは和光純薬工業(株)より購入した。綿実油、亜麻仁油、及び大豆油は林一次商店(東京)より購入した。オリーブ油は関東化学(株)より購入した。これらの油は自動酸化により P O V は 1 0 ~ 1 0 0 のものを使用した。また、4種の食用油(サラダ油、及びてんぷら油)は仙台市内のスーパーマーケットより購入した(P O V 0.5 ~ 2)。tert-ブチルヒドロペルオキシド、ジ-tert-ブチルペルオキシド、及びtert-ブチルパーベンゾエートは、半井化学(株)より購入した。ブチルヒドロキシトルエン(B H T)は東京化成(株)よ

り購入した。脂肪酸、及び、油の P O V 値は、ヨウ素法 ( 4 3 ) により求めた。

装置： 蛍光検出器は日本分光 ( 株 ) ( J A S C O ) F P - 5 5 0 A 分光蛍光光度計を使用した。この装置には、フローセルとポンプシステム ( J A S C O F P - 2 0 5 0 クイックサンプラー ) を装着させ、このシステムを用いて蛍光強度を測定した。

測定法： 試料 5 ~ 2 0 0 m g ( P O V 0.5 ~ 1 0 0 ) をメタノール-クロロホルム混液 ( 1 : 2, 3 m g / 1 0 m l の B H T を含む ) で 5 m l に定容した。この溶液 1 0 0  $\mu$  l をスクリューキャップ付き試験管に採り、氷冷下 5 0  $\mu$  l の D P P P 溶液 ( 1 m g / 1 0 m l メタノール : クロロホルム = 1 : 1 ) を加え密栓後、遮光し 6 0  $^{\circ}$ C で 6 0 分間反応させた。反応後、溶液を氷冷し 3 0 m l のメタノールを加えて激しく攪はん後、 3 8 0



n m ( 励起波長 3 5 2 n m ) の蛍光強度を測定した。以上の操作中は出来るだけ強い光の照射を避けて行った。試料は P O V が 0.5 程度のものでも試験管中に 3 m g あれば充分測定可能であった。

## 第 2 節 結果及び考察

I I - 2 で述べたように合成したホスフィン試薬の中で D P P P が最も有望と考えられたので、この D P P P を用いた分析法について検討した。D P P P の酸化により生成したオキシドは、メタノール中で励起波長 3 5 2 n m、発光波長 3 8 0 n m にそれぞれ極大波長を有した強い蛍光性を示した。そのため蛍光の測定はこれらの波長に設定して行った。

D P P P と過酸化物の反応性: F i g. 2 7 に D P P P とリノール酸のヒドロペルオ

キシドとの反応の経時変化を示した。反応は60℃で行った。60℃においては、反応はいずれの濃度においても40分以内に完了し、以後60分以上一定の蛍光強度を与えた。このとき蛍光強度とヒ

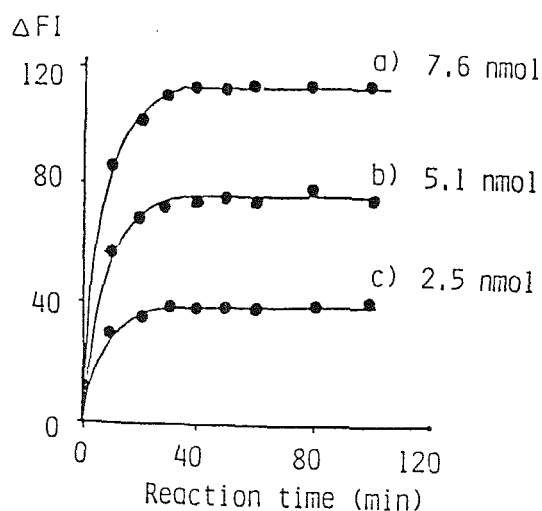


Fig. 27: Reaction time course of DPPP with linoleic acid hydroperoxides. The reaction mixture contained 7.6, 5.1 and 2.5 nmol of hydroperoxides. The reactions were carried out at 60 °C.

ドロペルオキシドの濃度との間には良好な直線性が成立した。反応温度を20℃とした場合は、反応の完了まで120分以上要し実用的でなかった。60℃の反応条件下ではヒドロペルオキシドが分解する可能性が考えられたため、反応に用いた条件と同じ条件下（遮光下、60℃で加熱）でヒドロペルオキシドを処理し、その後DPPPを用いて残存したヒドロペルオキシドを測定した（Fig. 28）。その結果、60分の処理でヒドロペ

ルオキシドは約7%減少した。しかし、反応は40分以内にほぼ完了し、またそれまでにもヒドロペルオキシドの多くはDPPPにより還元されていることから加熱によるヒドロペルオキシド損失はもっと少なく、

無視し得る程度のものと考えられた。

Table 16に反応性に対する各種有機溶媒の影響を示した。反応は60℃で60分間行い、メタノール：クロロホルム混液（1：1）中での蛍光強度を100%として比較した。メタノール、クロロホルム中では反応は60分以内に完了したが、その他の溶媒中では若干反応性の低下が認められた（70～

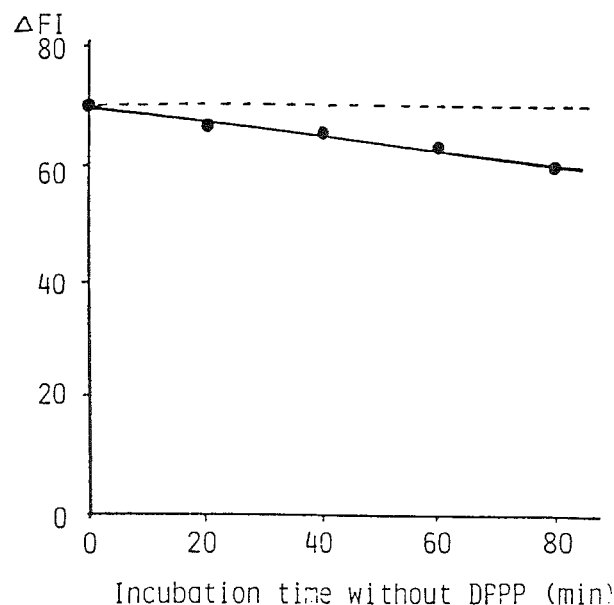


Fig. 28: The decrease of hydroperoxides under the reaction condition  
Autoxidized linoleic acid solution (POV=100, 9.4mg/20ml in chloroform and methanol(1:1)) was kept at 60 °C for several minutes, then the hydroperoxides were determined by the fluorometry.

Table 16: Effect of reaction solvent on reactivity of hydroperoxides with DPPP

Reaction solvent	ΔFI	Reactivity (%)
Acetonitrile	66.9	73.8
Methanol	90.8	100.1
Ethanol	85.4	94.2
Ethyl acetate	73.3	80.8
Chloroform	95.1	104.9
Benzene	84.3	92.2
Hexane	81.8	90.2
Chloroform Methanol mixed solution(1:1)	90.7	100.0

95%)。試料の溶解性、及び、反応性を考慮してメタノール：クロロホルム混液を反応溶媒として使用することとした。

数種過酸化物とDPPPの反応性についてTable 17に示した。自動酸化リノール酸、及び、トリオレインは60分以内にDPPPと反応したが、過酸化ベンゾイル、及び、tert-ブチルヒドロペルオキシドでは若干反応性の低下が認められた(80%)。また、tert-ブチルパーベンゾエート、及び、ジ-tert-ブチルペルオキシドはD

Table 17: Reactivities of peroxides with DPPP

Peroxides	Reactivity(%)
Linoleic acid hydroperoxides	100
Triolein hydroperoxides	100
Benzoyl peroxide	80
<u>tert</u> -Butyl hydroperoxide	80
<u>tert</u> -Butyl perbenzoate	13
Di- <u>tert</u> -butyl peroxide	1
1-Bromobutane	0
Butyl hydroxy toluene (BHT)	0

P P P に対して非常に低い反応性しか示さな  
 かった。これは I I I - 2 のホスフィン類と  
 ヒドロペルオキシドとの反応性でも述べたよ  
 うに、この反応において - O - O - 結合の回  
 りの立体障害が大きく反応性に影響を与えた  
 ためであると考えられた。このことは、この  
 試薬が - O - O - 結合の周りの立体障害の小  
 さいヒドロペルオキシドに対して高い選択性  
 を有することを示唆するものであった。一方、  
 ホスフィン類は Wittig 反応等で知られ  
 ている様に、アルキルハライドと反応しホス  
 ホニウム塩を与える。そこで本反応に与え

るアルキルハライドの影響を調べるため1-プロモブタンを加えて反応させたところ蛍光強度の増加は認められなかった。更に、リノール酸ヒドロペルオキシドを共存させて測定したところ何の影響もなく、リノール酸ヒドロペルオキシドの定量が可能であった。また、分析操作中の酸化を避けるため、試料はBHT溶液に溶解したが、BHTは本反応に対して全く影響を与えないことも確認した。

ヒドロペルオキシドの定量： 本法により求めたPOV値とヨウ素法により求めた値を比較した結果をFig. 29に示した。本法では、測定結果は濃度で表されるためPOVに換算するため次式を用いた。

$$POV = (\text{油脂 } 1 \text{ g 当りのヒドロペルオキシドのモル数}) \times 2 \times 10^6$$

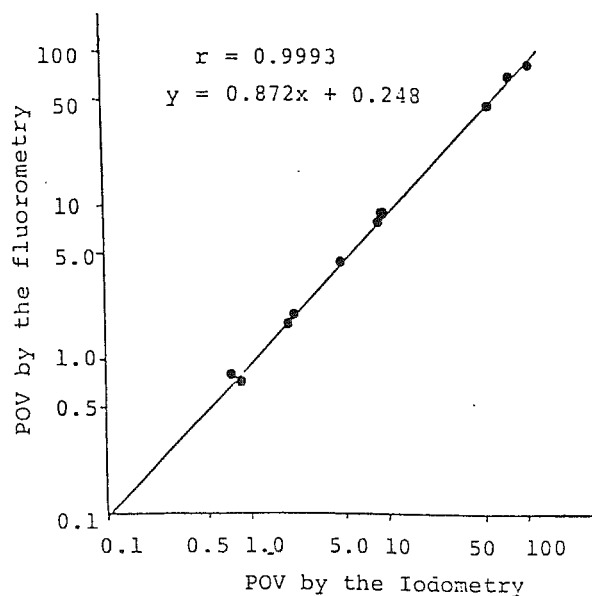


Fig. 29: Relationship between the POVs determined by the iodometry and the fluorometry

油脂 10 検体について測定した結果、両方法間には非常に良好な相関性を認めた ( $r = 0.9993$ )。また、リノール酸 (POV = 330) 溶液 (4.84 mg / 10 ml) を試料とした場合の変動係数は 1.7% ( $n = 6$ ) であった。本法では、POV 0.5 ~ 100 の試料に対して反応溶液中 0.08 ~ 3.2 mg の油脂を用いることにより分析が可能であった。本法の検出限界は反応溶液中のヒドロペルオキシド量として、約 200 ppm 程度で、

従来のヨウ素法と比較して感度は10000倍程度高く、簡便で、また、多検体の測定では迅速性においても優れていた。

### 第3節 結論

ジフェニル-1-ピレニルホスフィンを用いた蛍光法により高感度でヒドロペルオキシドの定量が可能であった。本法とヨウ素法の間には非常に良好な相関性を認めた。反応は、各種有機溶媒中で進行したが、特に、脂質の抽出に広く用いられているクロロホルム、メタノール系の溶媒がもっとも反応に適しており、抽出後そのまま、或は、濃縮後分析することが出来る。抗酸化剤であるBHTは反応に影響を与えず反応系への添加が可能であった。



【 I I I - 4 】 ジフエニル - 1 - ピレニル  
 ホスフィン ( D P P P ) を用いた H P L C ポ  
 ストカラム法によるヒドロペルオキシドの分  
 析

脂質の過酸化は、非酵素的、或は酵素的に  
 進行し、食品の品質低下や、生体内において  
 は、ある種の疾患、或は老化と関係している  
 と考えられており、食品中、或は生体内での  
 過酸化脂質の生成量を知ることは非常に重要  
 なことである。特に、脂質クラス、或は分子  
 種別の過酸化脂質生成量は、酸化のメカニズ  
 ム、その影響、及び、程度を知る上で非常に  
 有用な情報をもたらしてくれるものと期待さ  
 れる。この様な目的のため、近年、ヒドロペ  
 ルオキシドを H P L C を用いて分離し、ルミ  
 ノール、或はイソルミノールによる化学発光  
 法により検出・定量する方法が報告されてい  
 る ( 5 9 - a, b )。

ここでは、H P L C により過酸化脂質を分

離し、新しく開発したヒドロペルオキシド（H P O）の蛍光検出試薬ジフェニル-1-ピレニルホスフィン（D P P P）を用いて検出・定量する方法について検討した。更に、様々な H P O の中から目的とする H P O を分析するための H P L C の分離モードについていくつか検討した。また、本法をヒト血漿を試料としてホスファチジルコリンのヒドロペルオキシドの分析に応用した。

## 第 1 節 実 験

試薬及び装置：ジフェニル-1-ピレニルホスフィン（D P P P）は、I I I - 2 に示した方法で調製した。他の試薬は、特級、或は分析用の試薬を使用した。リノール酸、リノレン酸、トリリノレイン、トリオレイン、ホスファチジルコリン（卵黄製）、ホスファチジルエタノールアミン（卵黄製）、及び、

リポキシゲナーゼ (大豆製) は S i g m a  
C h e m. C o. ( S t. L o u i s.,  
U. S. A. ) より購入した。移動相溶媒に  
は H P L C 用の溶媒を使用した。

H P L C 装置を以下に示す。ポンプは、東  
洋曹達工業 (株) 製の C C P M マルチポンプ  
(1台) により移動相及び試薬溶液の両方を  
送液した。また、反応恒温槽は R E - 8 0 0  
0、検出器は U V - 8 0 0 0 ( U V 検出器 )、  
及び、F S - 8 0 0 0 ( 蛍光検出器 ) ( 何れ  
も東洋曹達工業 ) を使用した。分析用カラム  
は、T S K - g e l S i l i c a 6 0 ( 5  
 $\mu$  m, 4.6 m m i. d. x 2.5 0 m m )、  
T S K - g e l O D S - 8 0 T m ( 5  $\mu$  m,  
4.6 m m i. d. x 1.5 0 m m ) ( 何れも  
東洋曹達工業 )、及び、D e v e l o s i l  
O D S 5 - k ( 4.6 m m i. d. x 1.5 0  
m m、野村化学 ) を用いた。

ヒドロペルオキシドの調製: リポキシゲ

ナーゼにより酸化して得られたリノール酸ヒドロペルオキシドをD P P Pによる検出条件を設定するための標準試料として用いた。リノール酸の0.2 M ホウ酸緩衝液溶液 ( 1 g / 1250 ml, pH 10 ) 200  $\mu$  l に2 ml のリポキシゲナーゼ (大豆製) の0.2 M ホウ酸緩衝液溶液 ( 1 mg / 10 ml ) を加え室温で20分間反応させた後、生成したヒドロペルオキシドをエーテル ( 10 ml x 3 ) で抽出し、30  $^{\circ}$ C以下で減圧濃縮し2 ml のメタノールに溶解して、-25  $^{\circ}$ Cに保存した。この溶液中に含まれるヒドロペルオキシド量は、I I I - 3で述べた蛍光法により測定した ( 307 ppm o l /  $\mu$  l )。

リノレン酸、リノール酸、及び、トリリノレインをそれぞれナス型フラスコに採り、回転させながら乾燥空気を12 ~ 24時間吹き込むことにより、各々の自動酸化ヒドロペルオキシドを調製した。自動酸化物はメタノール：クロロホルム混合溶液中に溶解させた。

トリリノレインの自動酸化物は更に逆相カラムクロマトグラフィにより精製した。分離には、ODSシリカゲル ODS-Q3 (30~50  $\mu$ m、和光純薬工業) の充填されたガラスカラム (24 mm i. d. x 325 mm) を使用し、メタノールで溶出した。ヒドロペルオキシドの画分を集め、30℃以下で減圧濃縮した。この濃縮物をメタノール:クロロホルム混合溶液に溶解後、-25℃に保存した。蛍光法により測定した結果、この溶液は415 ppm o.l /  $\mu$ l のヒドロペルオキシドを含んでいた。

ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン及び、トリオレインは0.1~0.3 mM のメチレンブルーのメタノール、或はエタノール溶液中で光照射することにより光増感酸化を行った。これらの溶液中に含まれるヒドロペルオキシド量は蛍光法により求めた。

ヒドロペルオキシドの検出: カラムから溶出した溶出液を、先ず 205 nm、或は 232 ~ 235 nm の UV 吸収をモニターすることにより C = O、或は共役ジエン結合の検出を行った。更に、UV 検出器から出てきた溶出液中のヒドロペルオキシドは、DPPP を用いた蛍光法により検出した。溶出液 (流速 0.6 ml / min) に 0.3 ml / min の流速で DPPP のアセトン: メタノール (1: 3) 溶液 (3 mg / 400 ml) を加え、70 °C に保ったステンレスコイル (0.25 m m i. d. x 10 m) 中で反応させた。その後、反応液を冷却するため、0.5 m のステンレスコイル (20 °C に冷却) を通し、励起波長 352 nm における 380 nm の蛍光強度を測定した。尚、DPPP 溶液は、送液及び、ベースラインの安定性を保つため、使用前に充分に脱気すると共に、氷冷下、暗所に保存した。

血漿中のヒドロペルオキシドの分析 ( Fig. 30 ): 血漿 0.5 ml に対して、氷冷しながら 0.5 ml のメタノール、及び 1 ml のクロロホルム ( 0.003 %、W / W の BHT を含む ) を加え、窒素ガスで置換し密栓後激しく振とうした。4 °C、1000 g で 10 分間遠心分離を行い、下層のクロロホルムを取り氷冷下、暗所に保存した。上層に更に 1 ml のクロロホルム ( BHT を含む ) を加えて窒素置換した後、振とうし同様に遠心分離後クロロホルム層を取った。この操作を 2 度繰り返して得られたクロロホルム層を集めて、20 °C 以下で減圧濃縮した。破圧は窒素ガスを用いて行い、残留物に 15  $\mu$ l のクロロホルムを加えて完

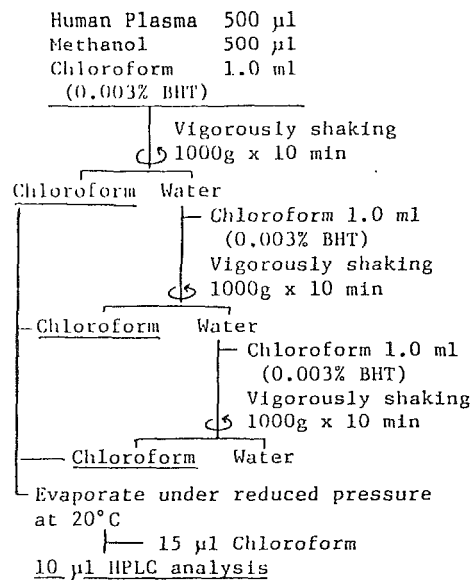


Fig. 30: Sample preparation procedure of PC-HPO in human plasma

全に溶解させ、その 10  $\mu$  l を H P L C に導入し、U V、及び、蛍光法により検出を行った。また、同時にホスファチジルコリンヒドロペルオキシドの溶液 ( 9.48 p m o l /  $\mu$  l ) を 5  $\mu$  l 添加して同様に血漿より抽出操作を行ったものについても分析した。H P L C の分離条件として T a b l e 19 の条件 I V を用いた。ホスファチジルコリンヒドロペルオキシドの定量は、標準添加法により行なった。

## 第 2 節 結果及び考察

F i g. 31 に H P L C ポストカラム装置の概略を示した。ヒドロペルオキシドは分離カラム ( c ) により分子種レベル、或はクラスレベルで分離された後、U V 検出器 ( d ) を経て D P P P 溶液 ( e ) と混合される。10 m の反応コイル ( f ) 中、70  $^{\circ}$ C で D P



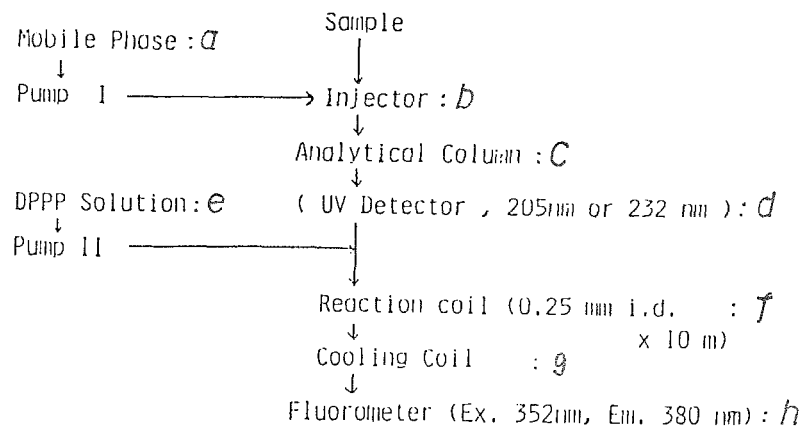


Fig.31: HPLC system diagram

P P と 反 応 さ せ る こ と に よ り 生 成 し た オ キ シ  
 ド を 蛍 光 検 出 器 ( h ) で 検 出 す る こ と に よ り、  
 ヒ ド ロ ペ ル オ キ シ ド の 検 出 ・ 定 量 が 可 能 で あ  
 る。

D P P P と ヒ ド ロ ペ ル オ キ シ ド と の 反 応 に  
 つ い て は 既 に I I I - 2 及 び - 3 で 述 べ た 様  
 に、 反 応 は 様 々 な 有 機 溶 媒 中 で 進 行 し、 こ の  
 こ と は H P L C の 移 動 相 と し て 広 範 囲 の 種 類  
 の 溶 媒 が 使 用 可 能 で あ る こ と を 示 唆 す る も の  
 で あ っ た。 ま た、 D P P P は ヒ ド ロ ペ ル オ キ  
 シ ド に 対 し て 高 選 択 的 に 反 応 し、 蛍 光 性 の オ  
 キ シ ド を 与 え る こ と に つ い て も 前 述 し た く

I I I - 3 )。 Fig. 3 2 に示したように未酸化のトリアシルグリセロール ( T G ) ( i )、及び、トリフェニルホスフィンで還元した自動酸化 T G ( O H 型 ) ( i i i ) は U V 法 ( 2 0 5 n m または、 2 3 2 n m ) では検出されたが、蛍光法では検出されなかった。これに対し、未還元の自動酸化 T G において、ヒドロペルオキシドは、U V 法のみならず蛍光法によってもピークとして検出することが出来た ( i i )。更に、( i i ) においては、U V ( 2 3 2 n m ) 法で検出されなかったピークが蛍光法では検出されており、これは、自動酸化において生成した共役二重結合を持たないヒドロペルオキシドのピークと考えられた。従って、本法は従来の共役ジエン結合の生成に基づく 2 3 2 ~ 2 3 5 n m の U V 吸収を測定する方法に比べヒドロペルオキシドに対し高い選択性を有しているものと考えることが出来た。尚、自動酸化による非共役型のヒドロペルオキシドの生成に関しては、

G r o s c h ら の 報 告 が あ る ( 6 0 ) 。

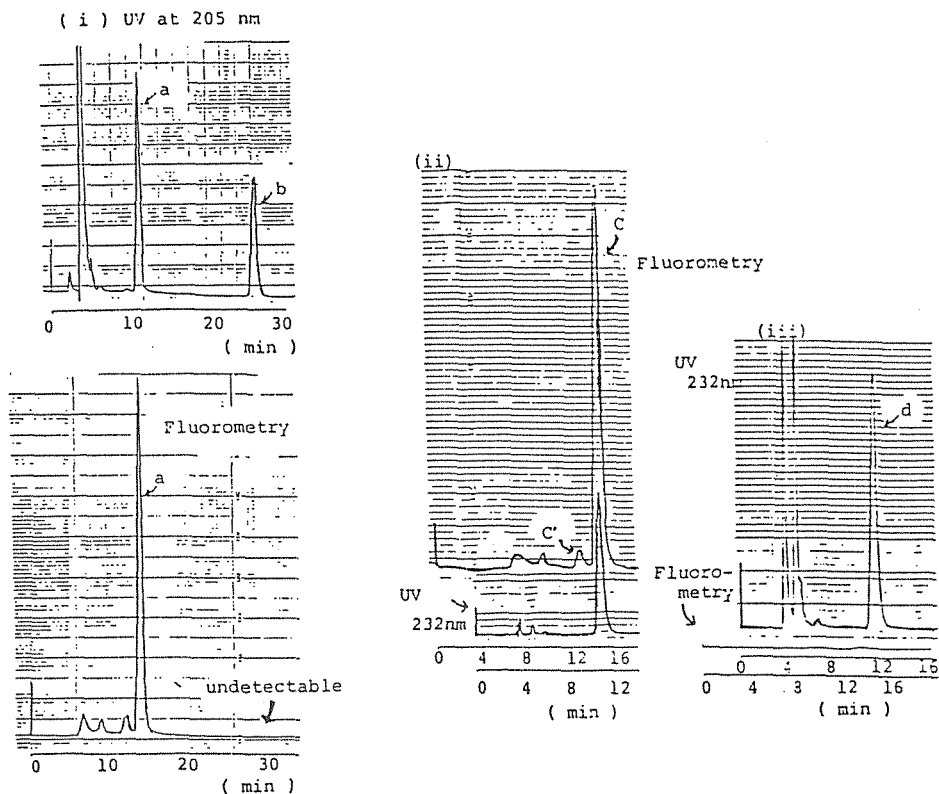


Fig.32: HPLC chromatograms of unoxidized and oxidized trilinolein  
 Column was TSKgel ODS 80Tm(4.6 mm x 150 mm) and mobile phase was 20%  
 2-propanol-methanol at flow rate of 0.6 ml/min. Detection were  
 carried out by UV(205 or 232nm) and fluorometry.

- (i) Trilinolein hydroperoxides (a) and unoxidized trilinolein (b).
- (ii) Trilinolein hydroperoxides (c and c'). Peak c' might be hydroperoxides which have no conjugated diene.
- (iii) Hydroxy trilinolein (d) which was prepared by reduction of trilinolein hydroperoxides with triphenylphosphine.

反応の最適化: リポキシゲナーゼを用いて調製したリノール酸ヒドロペルオキシドを用いてポストカラム法における反応条件について検討した。Fig. 33には逆相ODSカラムを用いて溶出した時のHPLCクロマトグラムを示した。Fig. 34には、DPP溶液の溶媒組成のピーク高に与える影響について示している。メタノールを溶媒として用いた場合のにもっとも高いピーク高が得られ、これにアセトンを添加すると、添加量にほぼ比例してピーク高は低くなった。しかし、メタノールのみを溶媒として用いた場合にはベースラインのドリフトが観察された。

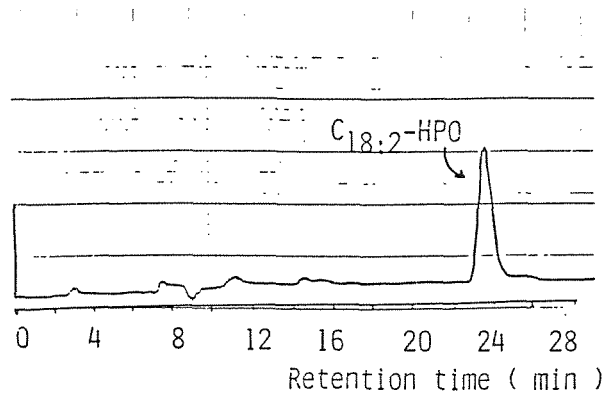


Fig. 33: HPLC Chromatogram of linolenic acid hydroperoxides prepared with lipoxygenase

これに対し、アセトンを25%および50%添加した場合にはこのドリフトは観察されなかった。

そのため、ピーク高の若干の低下は認められるもののベースラインの安定するメタノール：アセトン（3：1）混液をDPPPの溶媒として用いた。

DPPP溶液の送液量とピーク高の関係についてFig.

35示した。送液速

度が小さいほどピークは高くなった。これは、(a)流速の低下により反応混合液が反応コイル中に留まる時間（反応時間）が長くなる

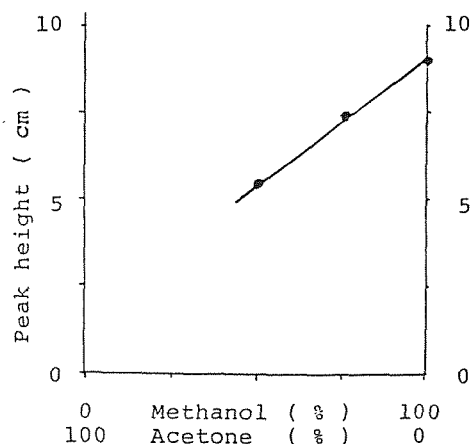


Fig. 34: Effect of solvent of DPPP solution

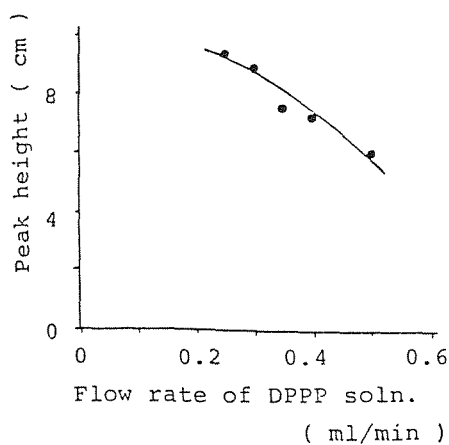


Fig. 35: Effect of flow rate of DPPP solution

こと、及び、( b ) カラムからの溶出液と D P P P 溶液の液量の比の変化は反応混合液中のアセトン比の変化を引き起こす、つまり D P P P 溶液の送液量の減少は反応液中のアセトン含量を低下させ、そのためピーク高が高くなったものと考えられた。しかし、D P P P 溶液の送液量の低下は、反応液中の試薬濃度も低下させるため、F i g. 3 5 の様な曲線となったものと考えられた。以上のことに加え送液の安定性を考慮し D P P P 溶液の流速は 0.3 ml / min と設定した。

D P P P 溶液の濃度とピーク高の関係について T a b l e 1 8 に示した。D P P P 溶液の濃度が高い程ピークは高くなったが、ベースラインのノイズも同時に大きくなり S / N 比の向上はそれほど

Table 18: Effect of concentration of DPPP solution

Conc. of DPPP soln. ( mg/200ml )	Peak height (cm)
1.0	11.0
1.5	14.4
2.0	19.4

認められなかった。従って、本法では D P P  
P 溶液の濃度を 3 m g / 4 0 0 m l と設定し  
た。

F i g. 3 6 に反応  
温度のピーク高に与え  
る影響について示した。  
反応温度が高くなるに  
従って、ピーク高は指  
数関数的に増加したが、  
温度を 4 0 ~ 7 0 ° C ま  
で変化させてもベース  
ラインノイズの増加は

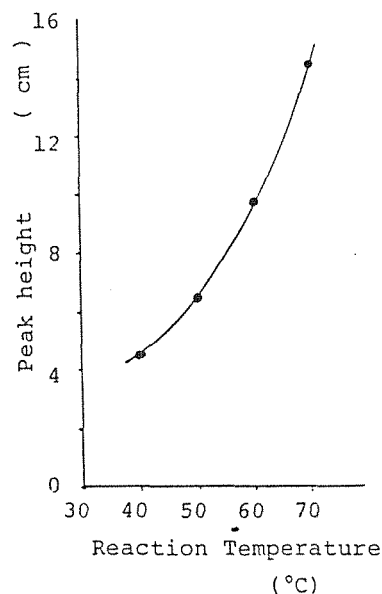


Fig. 36: Effect of reaction temperature

ほとんど認められなかった。メタノールの沸  
点は 7 6 0 m H g で 6 4 . 7 ° C であるが、反応  
コイル中では圧力がかかっているため 7 0 ° C  
に加熱しても気化しない。しかし、検出器中  
では圧力が減少し、出口付近で気包が発生す  
るため、反応コイルから出てきた反応液を冷  
却するため 2 0 ° C のコイル中を通過させてか  
ら検出器に導いた。尚、8 0 ° C ではベースラ

インが非常に乱れ測定は出来なかった。従って、反応温度は70℃と設定した。

ヒドロペルオキシドの分離：一つのHPLC条件で数多くあるヒドロペルオキシドの分離・分析を行うことは非常に困難であるため、いくつかの分離条件について検討した。

Fig. 32、及び 37 に代表的なHPLC

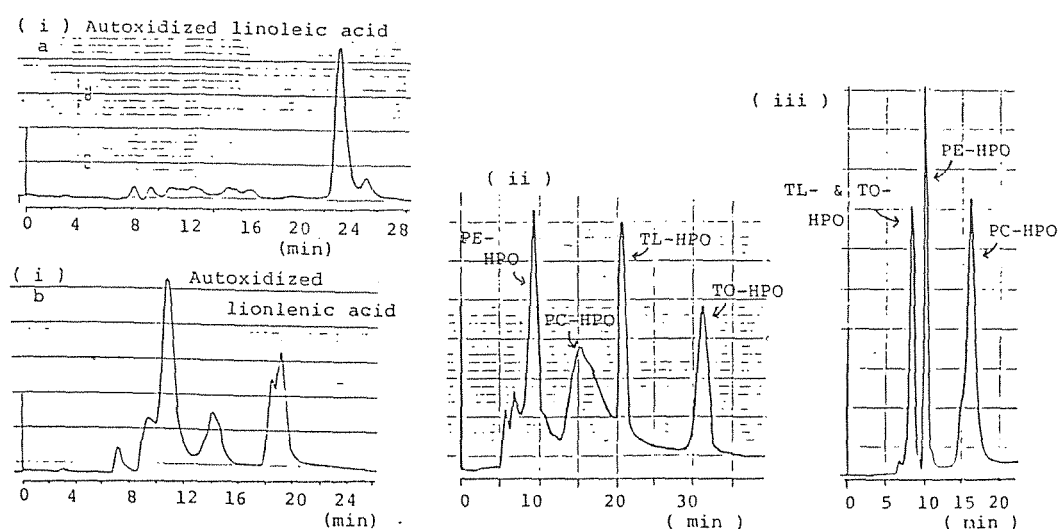


Fig.37: HPLC chromatograms of hydroperoxides

HPLC conditions were condition I(i), II(ii) and III(iii) in table 18.

- (i): Hydroperoxides of autoxidized linoleic acid (a) and linolenic acid (b).  
(ii) and (iii): Hydroperoxides(HPO) of phosphatidylethanolamine(PE), phosphatidylcholine(PC), trilinolein(TL) and triolein(TO).



C の ク ロ マ ト グ ラ ム を 示 し た。 こ れ ら の H P  
L C 条 件、 ヒ ド ロ ペ ル オ キ シ ド の 保 持 時 間、  
及 び、 検 出 限 界 を T a b l e 1 9 に ま と め た。  
条 件 I は 遊 離 脂 肪 酸 の ヒ ド ロ ペ ル オ キ シ ド の  
分 析 に 適 し て お り、 ト リ ア シ ル グ リ セ ロ ー ル  
の ヒ ド ロ ペ ル オ キ シ ド は 条 件 I I を、 ま た、  
リ ン 脂 質 の ヒ ド ロ ペ ル オ キ シ ド は 条 件 I I I  
を そ れ ぞ れ 用 い て 高 感 度 分 析 が 可 能 で あ っ た。  
条 件 I I に よ り リ ン 脂 質 の ヒ ド ロ ペ ル オ キ シ  
ド の 検 出 も 可 能 で あ っ た が、 そ れ ら の 構 成 脂  
肪 酸 種 に よ り 保 持 時 間 が 若 干 異 な る た め 全 体  
と し て ピ ー ク は ブ ロ ー ド と な り 定 量 に は 適 さ  
な か っ た。 し か し、 こ の こ と か ら O D S カ ラ  
ム を 用 い る こ と に よ り 構 成 脂 肪 酸 種 の 違 い に  
よ り リ ン 脂 質 の ヒ ド ロ ペ ル オ キ シ ド を あ る 程  
度 分 離 す る こ と の 可 能 性 が 示 唆 さ れ た。 こ れ  
ら の 条 件 を 用 い る こ と に よ り ヒ ド ロ ペ ル オ キ  
シ ド は 数 p m o l の オ ー ダ ー で 検 出 可 能 で あ  
っ た。

Table 19: Retention times and detection limits of hydroperoxides

HPLC Condition	HPO	Retention Time (min)	Detection Limit (pmol)
I	C <sub>18:2</sub> -L	23.5	2
	C <sub>18:3</sub> -L	19.6	
	C <sub>18:2</sub> -A	23.5, 25.5	
	C <sub>18:3</sub> -A	9.5, 11.0 14.5, 18.8 19.6	
II	Trilinolein	20.5	5
	Triolein	31.0	10
	PE	10.0	30
	PC	15.0 Broad	60
III	Trilinolein	} Front	4 4.5
	Triolein		
	PE	10.0	
	PC	15.0	
IV	Trilinolein	} Front	5
	Triolein		
	PE	25.0	
	PC		

HPLC condition: Column, Mobile phase

I: Develosil ODS-5k, 5mM CTMA Br-85% MeOH-

15% 5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

II: TSK-gel ODS 80Tm, MeOH:n-BuOH(9:1)

III: TSK-silica60, CHCl<sub>3</sub>:MeOH:MeCN:H<sub>2</sub>O(6:5:8:2)

IV: TSK-silica60, CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O(9:21:1)

C<sub>18:2</sub>; linoleic acid, C<sub>18:3</sub>; linolenic acid,

L; Lipoxigenase, A; Autoxidation, PE; Phosphatidyl

ethanolamine, PC; Phosphatidyl choline

血漿中のホスファチジルコリンヒドロペルオキシドの分析：血漿中に含まれる脂質、特にリン脂質の酸化と老化、或は各種疾患との関連が注目されている。本実験では血漿から脂質をクロロホルム：メタノールで抽出し、HPLCポストラベル法によりホスファチジルコリンヒドロペルオキシド（PC-HPO）を分析・定量した。抽出操作中のヒドロペルオキシドの生成、或は分解を防ぐため、抽出溶媒のクロロホルムは0.003% BHT溶液として用い、全操作は氷冷、窒素気流下、出来るだけ光照射を避けて行った。Fig. 38に代表的なHPLCクロマトグラムを示した。標準試料を用いた場合よりもPC-HPOの保持時間は小さくなり、このためピークは非常にシャープになった。これは、高濃度に濃縮された脂質画分をHPLCに導入したため、分離に対して大量に共存する未酸化の脂質が影響を与えたためと考えられた。そのため、本実験では定量は検量線法ではなく

標準添加法により行  
 った。また、試料の  
 HPLCへの導入量  
 の補正は、UV法（  
 235nm）により  
 未酸化のホスファチ  
 ジルコリン（PC）  
 のピークをモニター  
 し（この吸収はPC  
 の210nm付近の  
 吸収のすそに当た  
 るが、HPLCへの  
 導入量が非常に多  
 いため比較的低い感  
 度で検出された）、こ  
 のピーク高とPC-  
 HPOのピーク高の  
 比（相対ピーク高：  
 $PC-HPO / PC$ ）をとることにより行っ  
 た。血漿由来のPCのピークは、添加したP

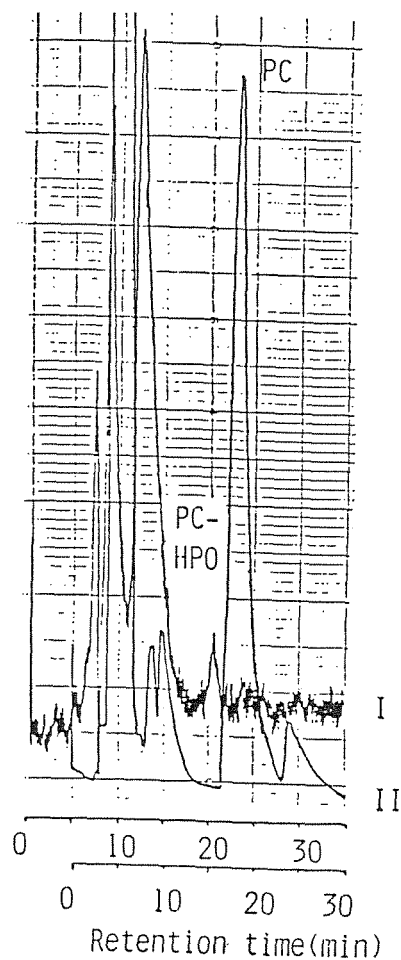


Fig. 38: HPLC chromatogram of  
 PC-HPO in human plasma  
 Detection were carried  
 out by fluorometry(I) and  
 UV (at 235nm)(II).

C - H P O が測定に用いた感度ではその位置にピークを示さなかつたことから、無添加、添加の何れの場合も血漿から抽出され、H P L C に導入された P C の量に比例すると考えられた。従つて、同一試料においては、このピーク高と蛍光法による P C - H P O のピーク高の比（相対ピーク高）は、抽出効率が一定の場合には、H P L C への導入量に関係なく、一定の値をとるものと考えられた。また、P C - H P O を添加した場合の相対ピーク高と無添加時の相対ピーク高の差は P C - H P O の添加量に比例すると考えられた。そこで、血漿に対して標準 P C - H P O の添加量を 0 ~ 6 0 p m o l / 5 0 0 μ l 血漿まで 4 段階に変化させて添加した場合、添加量と相対ピーク高の間に良好な直線関係が成立した（F i g. 3 9 ）。このことは、本法により一連の抽出操作による P C - H P O 損失の補正、保持時間のずれによるピーク高の補正が充分であり、この範囲での定量性を保証するもの

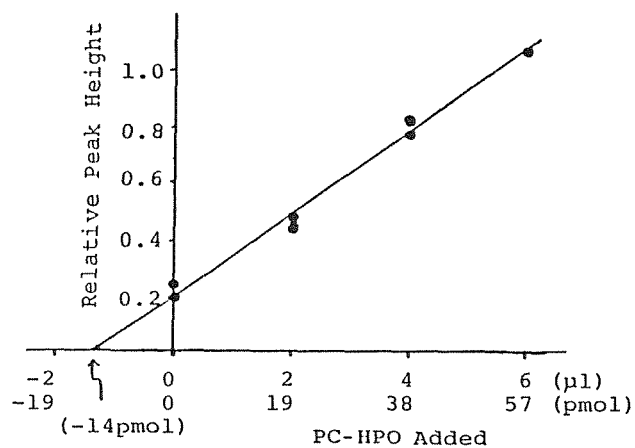


Fig. 39: Relationship between the additional amounts of PC-HPO and relative peak heights of PC-HPO

であつた。本法では、ヒト血漿 500 μl に約 50 pmol の標準 PC-HPO を添加し、未添加の試料と同時に測定し、この 2 点を用いた標準添加法により血漿中の PC-HPO の定量を行った。この計算式を以下に示した。

$$Y = 2 a X / (b - a)$$

但し、

Y は試料中の PC-HPO 量

( pmol / ml )

X は 添 加 し た P C - H P O 量  
( p m o l / t u b e )

a は 無 添 加 時 の 相 対 ピ ーク 高  
( 又 は 相 対 ピ ーク 面 積 )

b は P C - H P O 添 加 時 の 相 対 ピ ーク 高  
( 又 は 相 対 ピ ーク 面 積 )

同 一 試 料 か ら 抽 出 し た 試 料 の 相 対 ピ ーク 高  
の 変 動 係 数 は 5 % ( n = 5 ) で あ っ た。 ま た、  
抽 出 操 作 を 各 段 階 で 2 回 ず つ 繰 り 返 し 行 い、  
操 作 中 の P C の 酸 化 に つ い て 検 討 し た 結 果、  
測 定 値 は 1 回 ず つ 行 っ た 場 合 と ほ と ん ど 同 じ  
で あ っ た こ と か ら、 操 作 中 の 酸 化 は ほ と ん ど  
無 い も の と 考 え ら れ、 検 出 さ れ た P C - H P  
O は 血 漿 由 来 の も の で あ る と 考 え ら れ た。 本  
法 に よ り、 健 常 な 成 人 男 女 よ り 採 取 し た 新 鮮  
な 血 漿 を 試 料 と し て 分 析 し た 結 果、 血 漿 1  
m l 当 り 2 0 ~ 4 0 p m o l の P C - H P O  
が 検 出 さ れ た ( F i g. 4 0 )。

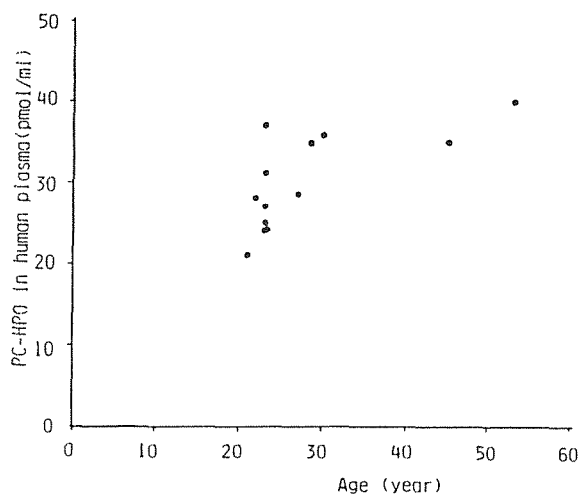


Fig. 40: PC-HPO in human plasma

## 第 3 節

## 結

## 論

ヒドロペルオキシドに対する新蛍光試薬ジフェニル-1-ピレニルホスフィンを用いた HPLC ポストカラム法に適用することにより、高選択的に、非常に高感度でヒドロペルオキシドの分析が可能であった。いくつかの HPLC の分離モードについて検討し、それらの中から適当な条件を選択して用いることによる、様々なヒドロペルオキシドの高感度な分析の



可能性が示唆された。

本法をヒト血漿中のホスファチジルコリン  
ヒドロペルオキシドの分析に応用し、500  
 $\mu$ lの血漿を用いることにより分析・定量が  
可能であった。また、実際のヒト血漿13検  
体について測定した結果20～40 pmol  
/ mlのPC-HPOを検出した。

## 第 I V 章 N - ( 9 - ア ク リ ジ ニ ル ) マ レ イ ミ ド ( N A M ) を 用 い た 亜 硫 酸 の 分 析

### 【 I V - 1 】 緒 言

亜硫酸、及び、その塩は、その還元力の故に、漂白作用・酸化防止による保存効果などを有することから、多くの食品の加工処理に食品添加物として広く使用されている。現在、わが国では、亜硫酸は、胡麻・豆類、及び、野菜以外の全ての食品にその使用が認められているが、食品中の亜硫酸残存量は、その毒性の為食品衛生法により規定されている。しかし、亜硫酸は、非常に不安定な化合物であり、分析操作中に分解する傾向が強く食品添加物中でも難しい分析項目の一つとなっている(61、62)。

従来の方法として最も一般的なものは、改訂衛生試験法で採用している改良ランキン法

である ( 6 3 )。この方法は、試料にリン酸を加え通気しながら加熱し、発生したガスを過酸化水素に吸収させ、中和滴定を行うもので、適用範囲が  $7 \times 10^{-4}$  M 以上である。その外の方法としては、酸化法、ヨウ素法、微量拡散法、蒸留比色法等があるが、何れも簡便性、或は、感度に於て十分満足できる方法とは言えない。

一方、亜硫酸は環境汚染の原因物質としても注目されてきている。亜硫酸の発生源として、火山などの天然現象を除くと、石油石炭の燃焼、硫酸の製造、金属の精錬などがあり、これらはいずれも人間の生活・生産活動ともなっていて排出されるものである ( 6 4 )。亜硫酸の影響は、直接人体に作用するのみならず、植物、金属及び、建築材料への影響 ( 6 5 ) など広範に渡っており、その量を正確に知ることは、非常に重要なことである。亜硫酸は、また、大気中で容易に酸化され硫酸となる。この硫酸は、酸性の雨滴 ( 酸性雨 )

として地上に落ち、動植物や建築物に被害を与えており、近年、非常に大きな社会問題となっている(66)。この亜硫酸の硫酸への酸化機構の解明のためにも、この様な雨滴中の正確な亜硫酸濃度の測定法の開発が要求されている。

N-(9-アクルジニル)マレイイミド(NAM)は、奈良らにより合成されたSH基に対する蛍光ラベル化試薬で(67)、これまで様々なSH化合物の分析に応用されてきた(68~70)。近年、松井らは、ビール中のSH化合物の定量にNAMを用いた際、NAMが亜硫酸とも反応し蛍光性の誘導体を与えることを見いだした(71、72)。しかしながら、このNAMと亜硫酸の反応については、詳細な検討はなされておらず、本反応の分析への応用にとって反応のメカニズム、及び、反応特性を解明することは重要な意味を持つものである。

本研究では、I V - 2で、亜硫酸とNAM

の反応メカニズム、及び、反応性について詳細な検討を加え、更に、I V - 3 ~ - 5 でこの亜硫酸の発蛍光反応を用いた分析法について検討した。つまり、I V - 3 では、ワイン中の亜硫酸の定量法に、また、I V - 4 では、雨水中の亜硫酸分析に、I V - 5 では、グルタミン酸 - オキサロ酢酸アミノ基転移酵素 ( G O T ) の活性測定法へそれぞれ応用した。

【 I V - 2 】 N - ( 9 - アクリジニル ) マレイミド ( N A M ) と亜硫酸の反応機構、及び、反応性

近年、松井らにより、S H 基の蛍光ラベル化試薬である N - ( 9 - アクリジニル ) マレ

イミド ( N A M ) と 亜 硫 酸 が 反 応 し 強 い 蛍 光 性 の 誘 導 体 を 与 え る こ と が 明 か に さ れ た ( 7 1、 7 2 )。 し か し、 こ の 反 応 の 機 構 や 反 応 条 件 に つ い て は 殆 ど 検 討 さ れ て い な か っ た。 そ こ で、 本 章 で は、 N A M と 亜 硫 酸 の 反 応 に つ い て、 H P L C、 及 び、 各 種 機 器 分 析 法 を 用 い、 そ の 機 構 と 反 応 条 件 に 付 い て 検 討 し た。

## 第 1 節 実 験

試 薬 及 び 装 置: S o d i u m m e t - a b i s u l f i t e (  $N a S_2 O_5$  ) は、 S i g m a C h e m i c a l. C o. 製、 N A M は、 奈 良 ら の 方 法 を 用 い て 合 成 し ( 6 7 )、 使 用 直 前 に ア セ ト ン 或 は ア セ ト ニ ト リ ル に 溶 解 し て 用 い た。 ア セ ト ニ ト リ ル は 和 光 純 薬 工 業 ( 株 ) 製 の 一 級 試 薬 を 蒸 留 後、 メ ン ブ ラ ン フ ィ ル タ ー ( 東 洋 伊 紙 ( 株 )、 C e l l u l o s e N i t r a t e

T y p e T M - 2 ) を用いてろ過してから  
用いた。その他の試薬は、和光純薬工業(株)  
の特級或は分析用試薬を使用した。実験を通  
して水は蒸留水を用いた。

陽イオン交換樹脂は、D o w e x 5 0 w  
x 8 (米国ダウ・ケミカル社製、50～  
100メッシュ)。球状シリカゲル O D S  
Q - 3 (30～50 μm; 富士ゲル販売(株))  
は、内径9 mm、長さ250 mmのガラス  
製カラムに充填して用いた。低圧定流量ポン  
プは、ケムコモデル81-M-2を使用した。  
恒温インキュベーターは、東洋科学工業  
(株) T C - 1。p H の調整には、H i t -  
a c h i - H o r i b a p H m e t e r  
m o d e l F - 7 を使用した。I R スペク  
トルは、日本分光(株)(J A S C O )  
m o d e l A - 2 0 2。プロトン、及び、  
<sup>13</sup>C - N M R は、日本電子(株) J N M - F  
x - 1 0 0 を使用した。蛍光スペクトルの測  
定には、日立製作所(株) 204型蛍光分光

光度計を使用した。

H P L C 装置: ポンプは、J A S C O  
 m o d e l F L C - 1 0 0、インジェクター  
 は J A S C O m o d e l V L - 6 1 1  
 ループタイプサンプルインジェクター。プレ  
 カラムとして、W h a t m a n C o: P -  
 e l l O D S ( 4.6 m m i. d. x  
 5 0 m m )、分離カラムとして、M E R C K  
 L i C h r o s o r b R P - 8 ( 1 0 μ m  
 : 4.0 m m i. d. x 2 5 0 m m ) を使  
 用した。検出は、J A S C O m o d e l  
 F P - 1 0 0 蛍光分光光度計を用いた。

反応緩衝液の調製: ホウ酸 3 0.9 2、及  
 び、塩化カリウム 3 7.2 8 g を蒸留水で 1 l  
 に定容した ( A 液 )。炭酸ナトリウム 5 3.0  
 g を蒸留水で 1 l に定容した ( B 液 )。B 液  
 に A 液を加え p H を 6.0、7.0、8.0、8.8、  
 9.0、及び、1 0.0 に調整した。p H 5.0 の



緩衝液は、0.05 M リン酸緩衝液を用いた。

高速液体クロマトグラフィー ( H P L C )  
による反応の追跡: 300  $\mu$  l の亜硫酸水  
溶液 ( 0.84 m M ) に 100  $\mu$  l の N A M -  
アセトニトリル溶液 ( 3.6 m M ) 及び 600  
 $\mu$  l のホウ酸緩衝液 ( p H 8.8 ) を加え、室  
温で反応させた。反応開始直後から 20 ~  
30 分毎にその 10  $\mu$  l を H P L C に導入し  
た。用いた H P L C の条件は以下の通りであ  
った。分離カラムは、L i C h r o s o r b  
R P - 8。18% アセトニトリル - 0.2 M  
酢酸アンモニウム溶液 ( v / v ) を移動相と  
して用いた。流速は、1.0 m l / m i n で、  
検出は、455 n m の蛍光強度 ( 励起波長  
360 n m ) をモニターした。

N A M - 亜硫酸反応付加物の単離、及び、  
それらの構造決定: N A M - アセトン溶液  
( 100 m g / 20 m l ) を N A M に対して

大過剰の亜硫酸溶液 (  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  2.5 g / 20 ml ) に少量ずつ攪はんしながら加えた。TLCにより反応の終了したことを確認した後、強酸性イオン交換樹脂 Dowex 50 wx 8 (  $\text{H}^+$  型 ) で処理し、 $\text{Na}^+$  を除き、溶出液を減圧濃縮した。黄色結晶が析出するまで濃縮を続け、その後、冷却してから結晶を回収した ( 結晶 I )。得られた結晶 I は、その IR ( KBr 法 )、及び  $^1\text{H-NMR}$  ( 溶媒: ピリジン- $d_6$  ) を測定した。一方、母液を濃縮乾固後、更に結晶 I を加え、100 mM トリス塩酸緩衝液 ( pH 9.3 ) に溶解後、室温で24時間攪はんした。この液を約 1 ml まで濃縮し、分取用 ODS カラム ( ODS-Q3 ) により2種の蛍光性化合物を単離した。溶離液は、25% アセトニトリル - 0.1 M 塩化カリウム溶液を用い、254 nm の UV 吸収をモニターし、二つのピークの部分をそれぞれ分取した ( Fig. 41 )。分取した2成分はそれぞれ Dowex 50 w

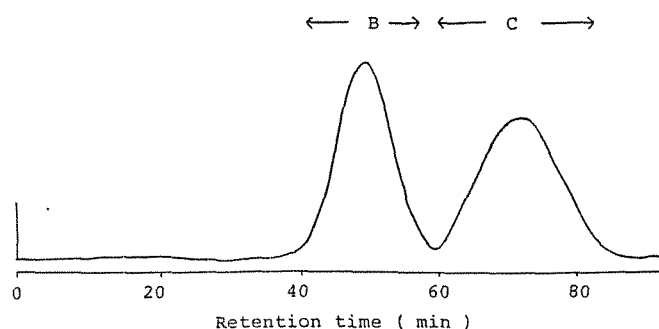


Fig. 41: Reversed phase column chromatogram of NAM-Sulfite adducts

Peak B and C were isolated, respectively. They were final products of NAM sulfite reaction.

x 8 ( H + 型 ) により陽イオンを除いた後、濃縮乾固した。得られた結晶について、IR ( K. B. r 法 )、<sup>1</sup>H - 及び <sup>13</sup>C - N. M. R. ( 溶媒: ジメチルスルホキシド - d 6 ) を測定しその構造の推定を行った。

反応条件と反応速度、及び、生成比: 反応緩衝液 ( p H 5. 0 ~ 1 0. 0 ) 6 0 0 μ l、及び、N A M - アセトン溶液 ( 3. 6 m M ) 1 0 0 μ l を亜硫酸水溶液 ( 0. 3 m M ) 3 0 0 μ l に加え 3 0 ° C で反応させた。それぞれ、その 1 0 μ l を経時的に H P L C に

導入し、そのときの溶出パターン、及び、ピーク高の変化を調べた。

また、反応緩衝液 ( pH 8.8 ) 600  $\mu$  l、及び、NAM-アセトン溶液 ( 3.6 mM ) 100  $\mu$  l を亜硫酸水溶液 ( 0.2 mM ) 300  $\mu$  l に加え、30、45、及び、60  $^{\circ}$ C で反応させ、経時的に HPLC に導入しそのときの溶出パターン、及び、ピーク高の変化を追跡した。

HPLC の条件を以下に示す。分離カラムは、Lichrosorb RP-8 を使用し、20% アセトニトリル - 0.2 M 酢酸アンモニウム溶液で流速 1.0 ml / min で溶出した。検出は、455 nm の蛍光強度 ( 励起波長 360 nm ) をモニターして行った。

## 第 2 節 結果、及び、考察

反応生成物の構造と蛍光スペクトル:

Fig. 4.2 に反応の経時的変化を示す HPLC クロマトグラムを示した。反応開始直後は、ピーク A の急激な増加が観察された。しかし、このピークは、時間の経過と共に徐々に減少し、代わってピーク B、及び、C が増加した。この二つのピーク高は、ほぼ一定の比を保ち、93 分でほぼ一定値に達した後、24 時間以上このピーク高を保った。このことから、本反応は、Fig. 4.3 に示した反応経路に従って反応が進行したものと考えられた。つまり、NAM に対して亜硫酸がマイ

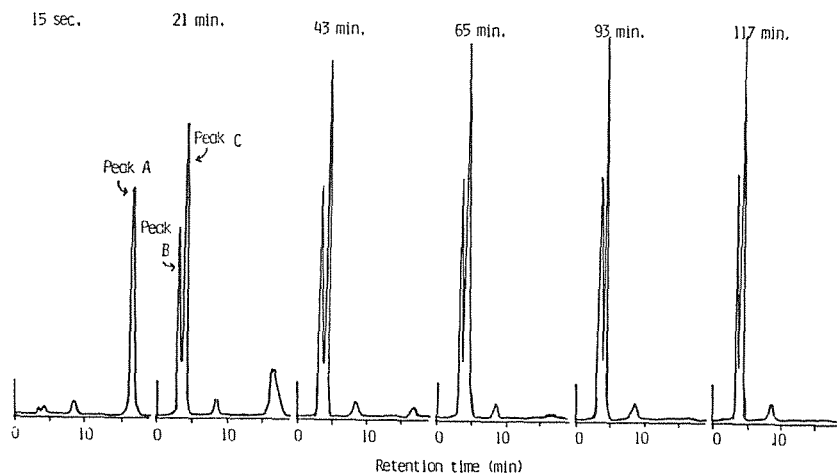


Fig.42: Reaction time course of sulfite with NAM

The analytical column was Lichrosorb RP-8, and mobile phase was 16% acetonitrile- 0.2M ammonium acetate at flow rate of 1.0 ml/min.

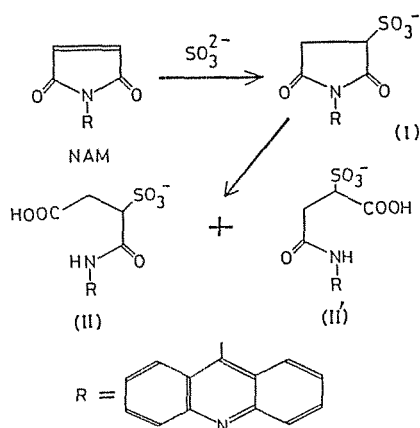


Fig. 43: Reaction scheme of sulfite with NAM  
 (I): Fluorescent intermediate of NAM sulfite reaction. (II) and (II'): Fluorescent products of NAM sulfite reaction.

ケル型の付加反応をし、化合物 I が最初に生成した。この化合物 I は、クロマトグラム上においてはピーク A に相当すると考えられた。更に、この化合物 I は、スクシイミド環が加水分解を受けて、その切れ方により 2 種類の化合物 I I、及び、I I' が最終的に生成したものと考えられた。これら、化合物 I I、及び、I I' は、ピーク B、及び、C の何れか一方にそれぞれ相当するものと考えられた。そこで、それらの構造を確認するためピーク A、B、及び、C を与える化合物を単離し、

構造の確認を行った。

結晶 I (クロマトグラム上ではピーク A を与えた) の IR スペクトルを Fig. 44 に示した。1790、及び、1725  $\text{cm}^{-1}$  に五員環イミドに由来する吸収が観察された。また、1150 ~ 1260  $\text{cm}^{-1}$ 、及び、1030  $\text{cm}^{-1}$  にスルホン酸、或は、その塩に由来する吸収が認められた。更に、 $^1\text{H}$  - NMR (Fig. 45、内部標準として DSS (Sodium 2, 2-dimethyl-5-sulfonate) を使用) において、3.7 ~ 4.6 ppm (m, 2H) 及び 5.2 ~ 5.4 ppm (dd, 1H) にシグナルが観察された。これらのシグナルの帰属を Fig. 46 に示した。各プロトン間のカップリング定数  $J_{i-j}$  は、 $J_{a-b} = 18.55$  Hz、 $J_{b-c} = 2.93$  Hz、 $J_{a-c} = 7.82$  Hz であった。Ha ~ Hc の各プロトンは全て不等価で、いずれもダブルダブレットを与

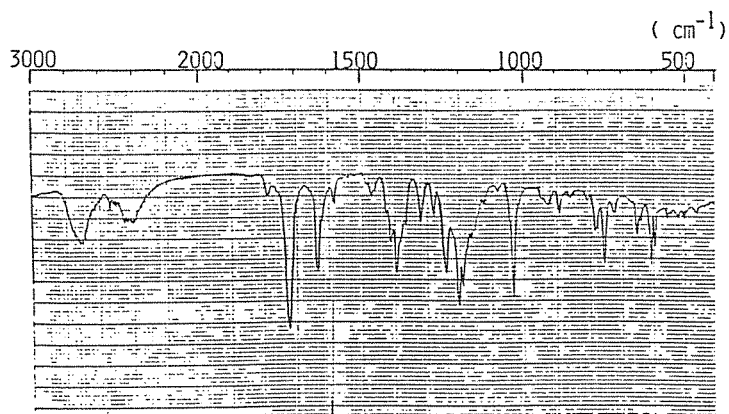


Fig. 44: Infra red spectrum of I (peak A)

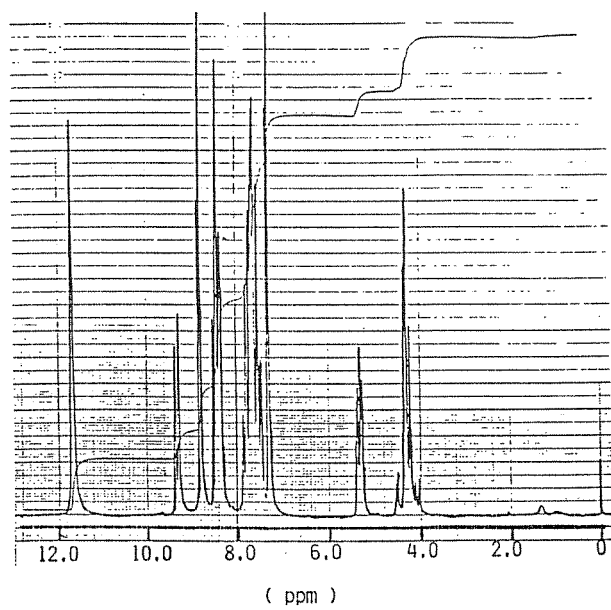
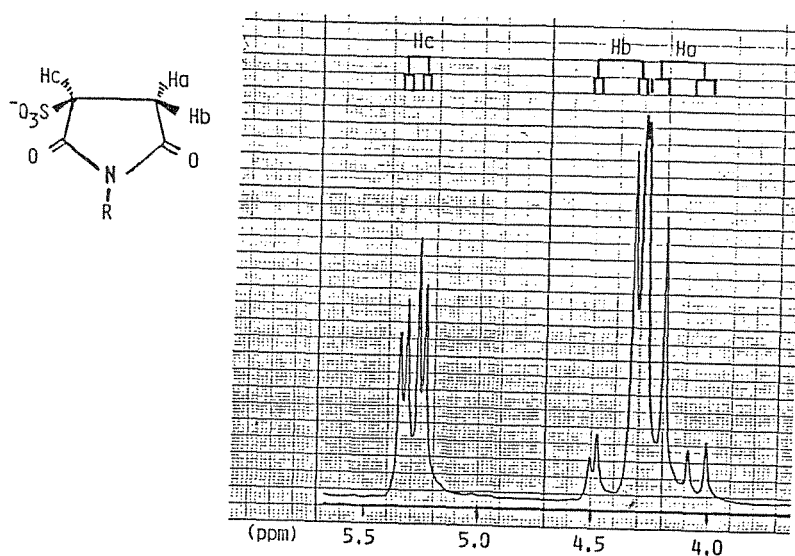


Fig. 45:  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of I (peak A)



Fig. 46:  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of I (peak A)

え、それらのケミカルシフトは、H a: 4.16 ppm、H b: 4.41 ppm、H c: 5.31 ppmであった。この化合物の各種溶媒に対する溶解性は非常に低く、測定が困難であったことから溶媒としてピリジン-d<sub>6</sub>を用いた。このためアクリジン環のシグナルは溶媒のシグナルと重なり解釈できなかった。

以上、IR及び $^1\text{H-NMR}$ より、結晶I (ピークA)は、NAMに対する亜硫酸のマイケル型の付加反応により生成した化合物I (Fig. 43)であることを確認した。

Fig. 47 に、  
 ピーク B、及び、C  
 を与える化合物の IR  
 スペクトルを示し  
 た。両者の特徴的な  
 吸収はほぼ一致して  
 おりこのことから、  
 B、及び、C は構造  
 が非常に類似してい  
 ることが推察された。  
 これらのスペクトル

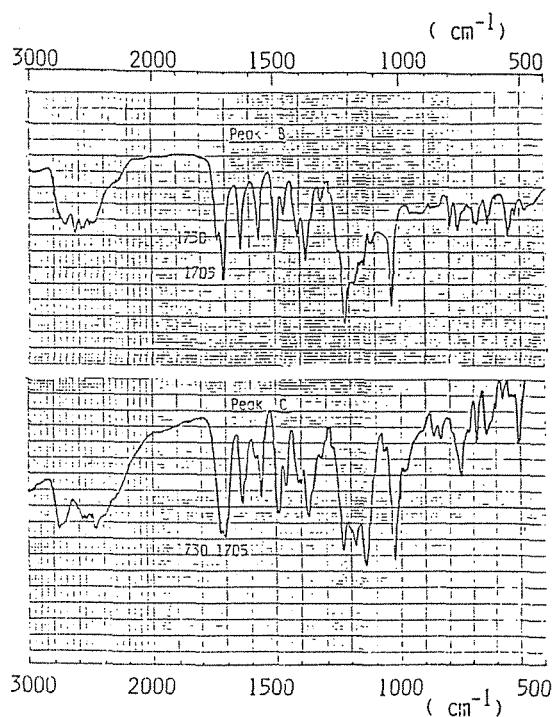


Fig. 47: Infra red spectra of peak B and C

上には結晶 I で見られたイミド由来の吸収は  
 消失し、代わって 1730、及び、1560  
 $\text{cm}^{-1}$  付近に、アミド I 及び II の吸収が認  
 められた。更に、1735  $\text{cm}^{-1}$  付近にもう  
 一つのカルボニル基の吸収が認められた。ま  
 た、スルホン酸及びその塩に由来する吸収も  
 1150 ~ 1260、及び、1030  $\text{cm}^{-1}$   
 付近に認められた。

ピーク B、及び、C の  $^1\text{H}$ -NMR スペク

トルを Fig. 48 に示した。B は、3 ~ 5 ppm (内部標準として TMS を使用) 付近に H<sub>2</sub>O のシグナルが大きく出現し、このため十分な知見を得ることは出来なかった。このシグナルは同様に調製した C では殆ど認められなかった。両者共に、7 ~ 8 ppm に

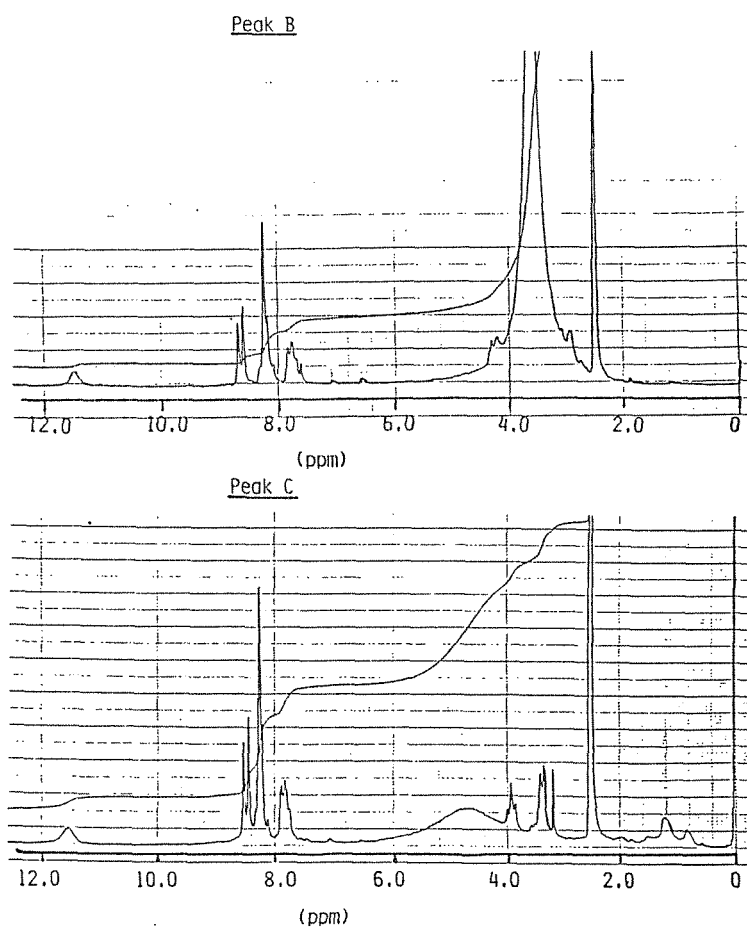


Fig. 48: <sup>1</sup>H-NMR spectrum of peak B and C

アクリジンに由来するシグナルが観察された。また、11.5 ppmに1プロトン分（アクリジン環を8プロトンとする）のシグナルが観察された。このシグナルは、D<sub>2</sub>Oの添加で消失したことからカルボン酸に由来するものであると考えられた。

Table 20は、<sup>13</sup>C-NMRの測定結果を示したものである。170～200 ppmの領域に2本のシグナルが認められ、IRから得られた結果（アミドとカルボン酸が存在する）と一致した。また、61 ppm、及び、35 ppm付近のシグナルは、それぞれ

Table 20: <sup>13</sup>C-NMR shifts of NAM sulfite Adducts from B and C  
Spectra were obtained in dimethylsulfoxide-d<sub>6</sub> solutions.

Sample	Chemical shifts (ppm) from TMS
B	33.97, 61.54, 121.39, 126.42, 126.72 135.90, 148.77, 171.12, 196.92
C	35.92, 61.54, 121.45, 126.42, 126.72 135.90, 141.64, 169.78, 171.12

亜硫酸の付加した炭素原子とその $\alpha$ 位に存在するメチレン基の炭素原子と帰属できた。120～150 ppmの5本のシグナルは、アクリジン環の炭素原子と帰属された。この領域に5本（アクリジン環は7種の炭素原子を有する）のシグナルしか現れなかったのは、シグナルが偶然重なったためと考えられた。従って、B、及び、Cは、Aから生成したことから、及び、カルボン酸とアミドを有することから、Aの加水分解により生成した2種の構造異性体であると考えられた。更に、BとCのメチレン基及びメチン基の $^{13}\text{C}-\text{NMR}$ のケミカルシフトからB、及び、Cの構造は、それぞれII、及び、II'であると推察された。つまり、カルボン酸の常磁性効果は、解離型の方がより大きく、強い酸ほど、隣接する炭素原子を低磁場側にシフトさせる。加水分解物II、及び、II'のカルボン酸を比較すると、スルホン酸基により近いII'の解離はIIに比べ抑えられ低磁場側へのシ

フト効果は解離型と非解離型の中間となり、  
 アミドの効果とあまり変わらなくなる（—  
 $\text{C O O} - > - \text{C O N H} - > - \text{C O O H}$ ）。その  
 の結果、スルホン酸に隣接した炭素（メチン  
 基）にカルボン酸が付いた I I' とアミド基  
 が付いた I I では、そのメチン基のケミカル  
 シフトは殆ど同じ値を取るものと考えられた。  
 一方、I I では、カルボン酸のシフト効果は  
 アミドより大きくメチレン基のケミカルシフ  
 トはアミドが隣接した I I' より僅かに低磁  
 場側にシフトすると考えられた。従って、メ  
 チレン基のケミカルシフトがより低磁場側に  
 ある C は、I I の構造であると考えられた。  
 B 及び C の確実な構造の決定には、更に詳細  
 な検討が必要と考えられたが、分析化学的に  
 はこれ以上の構造解析は必要ないと考えられ  
 たため検討しなかった。

以上から、NAM と亜硫酸の反応は、  
 Fig. 43 に示した経路をたどって進行す  
 ることを明かとした。

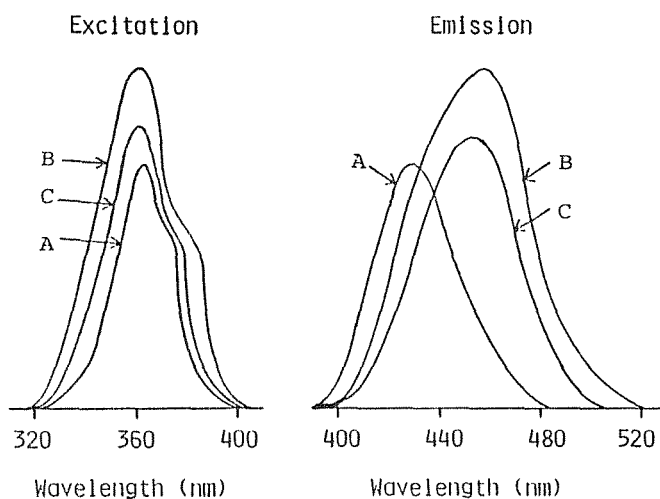


Fig. 49: Fluorescence spectra of peak A, B and C  
in 0.1M phosphate buffer (pH 6.0)

Fig. 49 に A、B 及び C のリン酸緩衝液中での蛍光スペクトルを示した。測定中に、A の加水分解は認められなかった。各々の相対蛍光量子収率は、硫酸キニーネの 0.5 M 硫酸溶液（励起波長 365 nm）を 0.55（73）とした場合、A（励起波長 362 nm）、B、及び、C（何れも 360 nm）はそれぞれ 0.26、0.50、及び、0.40 であった。このことは、スクシイミド構造を有する A は、加水分解を受けて生成したアミド構造を有する B、及び、C よりも蛍光が弱い事を意味し

ており、このことは、反応開始直後、蛍光強度が急激に上昇し、その後もゆっくりと上昇を続けたという事実(72)の大きな原因の一つと考えられた。Table 21に、4種類の溶媒中におけるB、及び、Cの蛍光の極大波長を示した。蛍光極大波長は、溶媒により若干シフトすることが認められ、測定溶媒と波長の選択に注意を必要とした。

Table 21: Fluorescence spectra of NAM sulfite adducts B and C

Solvent	Adducts	Maximum Wavelength(nm)	
		Excitation	Emission
0.5M Borate Buffer (pH 8.8)	B	360	437
	C	360	437
0.5M Borate Buffer (pH 10.0)	B	360	440
	C	360	440
20% CH <sub>3</sub> CN-0.2M Ammonium acetate	B	360	455
	C	360	455
16% CH <sub>3</sub> CN-0.01M K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - 0.05M Potassium phosphate Buffer (pH 6.0)	B	360	438
	C	360	438

反応条件と反応速度及び生成比:

反応条



件 ( 温度及び pH ) を変化させ、反応が完了するまでに要する時間、及び、その時の B と C の生成比について H P L C を用いて検討した。反応温度及び pH の影響を検討した時に用いた H P L C の条件下では、2 種の加水分解物、B 及び C は 1 本のピークを与えたが、A とは完全に分離した。これにより、反応の最初の生成物とその加水分解物の経時的変化を追跡することが出来た。

F i g. 5 0 に、p H 8. 8 のホウ酸緩衝液を用い、温度を変えて反応させた反応液を経時的に H P L C に導入することにより得られた結果を示した。反応が完了するまでに要する時間は、温度が高いほど短くなったが、ピーク A の生成速度にはそれほど大きな違いは認められず、この pH での律速反応はスクシイミド環の加水分解であると考えられた。更に、F i g. 5 1 から pH 7 以上では、ピーク A の生成速度にそれほど大きな差は認められなかったが、A の加水分解速度は pH が高

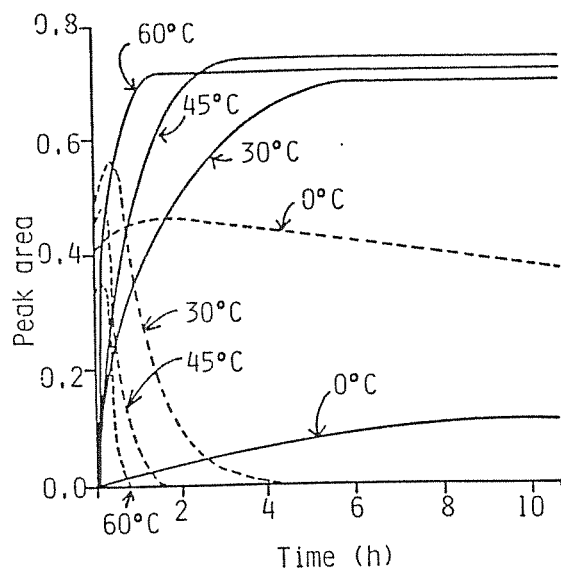


Fig.50: Effect of reaction temperature on the reactivity  
The reactions were performed in borate buffer (pH8.8). The broken and full lines showed peak areas of Peak A (---) and (Peak B + C) (—), respectively.

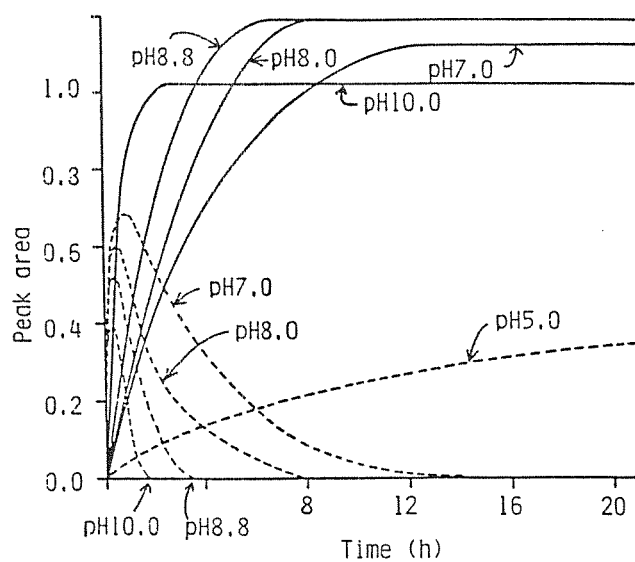


Fig.51: Effect of reaction pH on the reactivity  
The reactions were performed at 30°C. The broken and full lines showed peak areas of Peak A (---) and (Peak B + C) (—), respectively.

い程大きく、このため反応のpHが高いほど全反応の完了までに要する時間が短くなった。また、ピークAの生成速度はpH7以上であり差は認められなかったが、それ以下では非常に遅かったことは、NAMとの反応種が $\text{SO}_3^{2-}$ （亜硫酸の第2解離の $\text{pK}_a = 7.0$ ）であることを示すものであった。以上から、低温、かつ、比較的低いpHで反応させることにより、短時間でラベル化し、しかも、長時間A(I)の加水分解を抑えことが可能と考えられた。

Fig. 52  
に、反応温度を  
0℃とし、0.1  
Mホウ酸緩衝液  
(pH 8.8)中  
で反応させた時  
の反応液中に添  
加するアセトン  
量の影響を示し

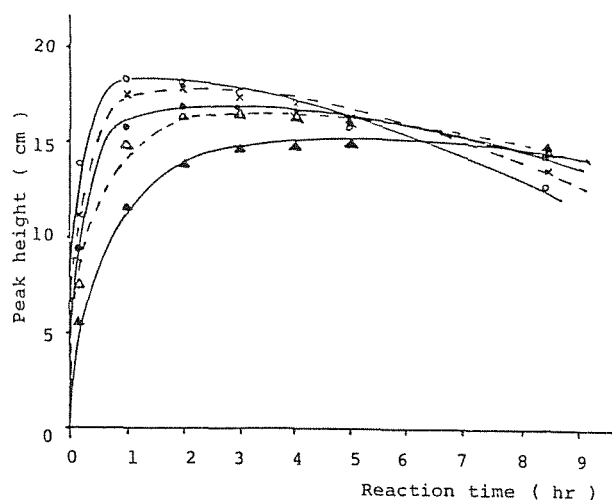


Fig. 52: Effect of acetone contents on the reactivity  
The acetone contents were 5(○), 10(×), 15(●),  
20(△) and 30%(▲) in the reaction mixtures.

た。アセトンは、反応全体を遅くしたが、反応速度は、NAMの添加量によりコントロール出来ることから、加水分解を避けるため20%アセトンを加えた。一方、NAMの添加量は反応速度に大きく影響を与え、大過剰に加えることにより反応は迅速化した。そこで、0.5 mg / mlのNAM溶液を用い試料に対し50倍モル以上となるように加えた。反応は、迅速性と加水分解を防ぐためpH 8.4のホウ酸緩衝液中、0℃で反応させた。その結果、50分以内に付加反応は完了し、8時間以上一定のピーク高を与え、その間ほとんどB、及び、Cの生成は認められなかった ( Fig. 53 )。また、この条件により10 ~ 100 pmolで非常に良好な定量性を得た (  $r = 0.9994$ , 測定可能な範囲はより広範囲に渡ると考えられる )。しかし、亜硫酸はアルデヒドやケト酸の様な化合物と結合し安定化することが知られている。結合型の亜硫酸はNAMとの反応性がなく、この

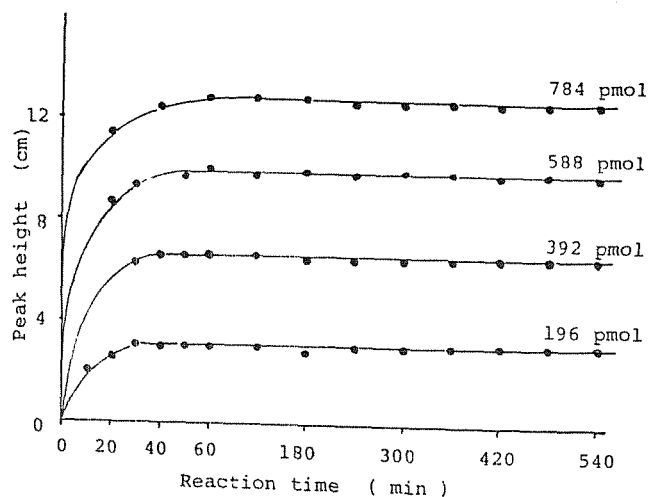


Fig. 53: Reaction time course of sulfite with NAM at 0°C

様 な 化 合 物 の 共 存 す る 系 に 於 て 結 合 型 の ま ま  
 で 全 亜 硫 酸 の 分 析 を 行 う こ と は 出 来 な い。 亜  
 硫 酸 と ア ル デ ヒ ド や ケ ト 酸 の 結 合 反 応 は 可 逆  
 反 応 で あ り、 酸 性、 或 は、 ア ル カ リ 性 溶 液 中  
 で 加 熱 す る こ と に よ り 容 易 に 壊 れ 亜 硫 酸 が 遊  
 離 す る こ と か ら、 そ れ ら の 影 響 は 高 p H、 高  
 温 で 反 応 さ せ 蛍 光 性 誘 導 体 I I 及 び、 I I '   
 に 導 い て か ら 分 析 す る こ と に よ り 防 ぐ こ と が  
 出 来 る と 考 え ら れ た。 し か し、 p H 8.4、 0  
 °C の 条 件 で は 逆 反 応 の 速 度 は 非 常 に 小 さ く、  
 そ の た め ピ ーク A に よ り 定 量 す る 分 析 法 の 利  
 用 は 期 待 で き な か っ た。

ピーク B、及び、C より亜硫酸の定量を行うために、反応条件とピークの面積比 ( B / C ) の関係について検討した ( Table 22 )。反応温度が高いほど、また、pH は低いほど B / C 値が大きい値をとった。これは、スクシイミド環が加水分解を受ける際、スルホン基の存在によりカルボニル炭素原子への  $\text{OH}^-$  の反応性が pH、及び、温度の影響を受けたためと考えられた。従って、加水分解物により定量するためには、反応が完了するまで反応条件を一定にコントロールする必要を認めた。

Table 22: The ratio of peak area of B and C ( B/C )

Reaction Temp. ( °C )	5	20	30	40	60
Reaction pH					
7.0	1.19	1.24	1.28	1.30	1.49
8.0	1.05	1.14	1.20	1.21	1.41
8.8	0.94	1.09	1.08	1.13	1.28
9.0	0.88	1.07	1.09	1.14	1.25
10.0	0.67	0.73	0.80	0.86	0.92

亜硫酸の定量性: NAMと亜硫酸の付加物の中で加水分解していないピークAにより亜硫酸分析を行うために設定したHPLC条件を用いたときの分離の例をFig. 54に示した。本法によりグルタチオンやシステインの様なNAMと反応性を有するSH化合物との蛍光性誘導体との分離が可能であった。また、10～100 pmolの範囲でピーク高と濃度の間に良好な相関性が認められた。

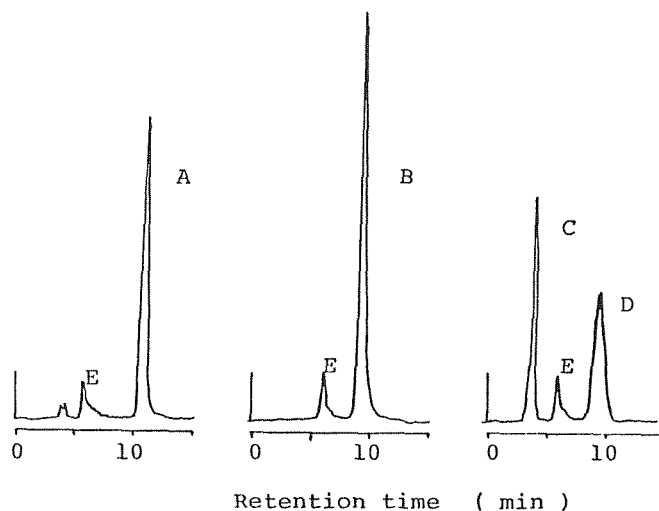


Fig. 54: HPLC chromatograms of NAM adducts on ODS column  
 Column was SC-02(ODS, 4.6mm x 250mm) and mobile phase was 0.1M ammonium acetate-20% acetonitrile at flow rate of 1.0 ml/min. NAM adducts were (A) sulfite(NAM-sulfite adduct I), cysteine(B) and glutathione(C and D). Peak E was a NAM decomposed product.

一方、二つの加水分解物を検出に用いた場合の H P L C 条件として、( 1 ) O D S カラムを用い、2種の加水分解物を1本のピークとして検出・定量する方法 ( F i g. 5 5 )、及び、( 2 ) アミノプロピル ( N H <sub>2</sub> ) カラムを用いグルタチオン、システインの反応物と分離し、2種の蛍光性誘導体の何れか一方、或は両方により検出・定量する方法 ( F i g. 5 6 ) が考えられた。何れの方法によっても亜硫酸は数百 f m o l まで検出・定量することが可能であった。前者は、グルタチオン誘導体との分離が不十分であったが、試料中にグルタチオンを含まない場合、後者に比べ迅速性に優れているため有効な分析法と考えられた。また、後者は共存する S H 化合物の影響を避けて高感度で定量が可能であることから食品や生体試料中の亜硫酸分析に有効であろうと考えられた。



Fig. 55: HPLC chromatogram of NAM sulfite adducts on ODS column

Column was SC-02 (ODS, 4.6mm x 250 mm) and mobile phase was 0.1M ammonium acetate-25% acetonitrile at flow rate of 1.0 ml/min. Peak (a) was NAM-sulfite adducts (II and II') and peak (b) was NAM decomposed products.

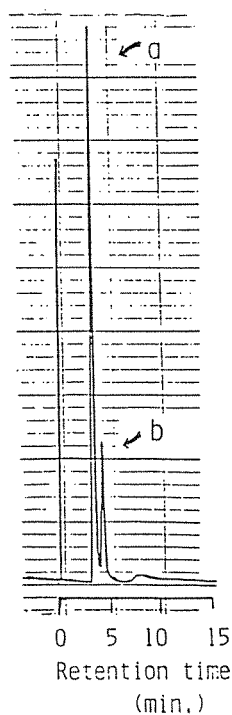
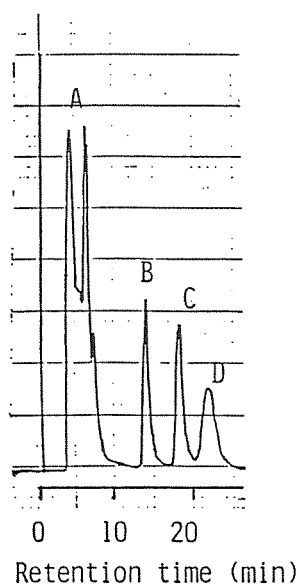


Fig. 56: HPLC chromatogram of NAM adducts on aminopropyl column

Column was JASCO Finepak SIL NH<sub>2</sub> (4.6mm x 250 mm) and elution was carried out with 30% acetonitrile-50mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> at flow rate of 1.0 ml/min. Peak As were NAM decomposed products and NAM cysteine adduct. Peak B and C were NAM sulfite adducts. Peak D were NAM glutathione adducts.



## 第 3 節 結 論

N A M と 亜 硫 酸 の 反 応 は 2 段 階 反 応 で、そ  
の 最 終 生 成 物 は 2 種 の 構 造 異 性 体 で あ っ た。  
こ の 発 蛍 光 反 応 を H P L C プ レ ラ ベ ル 法 に 応  
用 し て 亜 硫 酸 を 分 析 す る 方 法 と し て、

1 ) 反 応 中 間 体 で あ る 非 加 水 分 解 物 ( ピ ー ク  
A ) を 加 水 分 解 し な い 条 件 で 反 応 さ せ 定 量 す  
る。

2 ) 反 応 の 最 終 生 成 物 で あ る 2 種 の 化 合 物 の  
ど ち ら か 一 方、 或 は、 両 方 に よ り 定 量 す る。

が 考 え ら れ る。 1 ) の 方 法 に つ い て は、 ア ル  
デ ヒ ド 等 の 共 存 に よ り 反 応 に 影 響 を 受 け る な  
ど の 問 題 点 が 認 め ら れ、 そ の 応 用 に は 注 意 が  
必 要 と 考 え ら れ た。 一 方、 2 ) の 方 法 に つ い  
て は、 ア ル デ ヒ ド 等 の 影 響 を 除 く こ と が 可 能  
で あ る が、 2 種 の 化 合 物 が 生 成 し、 そ れ ら の  
比 は 反 応 条 件 に よ っ て 異 な る こ と な ど か ら、

定量に際しては、反応条件を一定に保つ必要を認められた。この方法では、蛍光性の共存物質の影響がない場合に限り、2種の生成物を1本のピークとして定量出来るようなHPLCの条件の選択も可能であり、これによる高感度分析が期待できる。尚、亜硫酸の標準溶液を用いた実験では、1)、及び、2)の方法により、それぞれ10 ppm、及び、150 ppmまでの亜硫酸の検出・定量が可能であった。

### 【 I V - 3 】 ワイン中の亜硫酸の定量

亜硫酸、及び、その塩は抗酸化、漂白、及び、保存の目的で食品に添加されている。特

に、ワインにおいては、他の醸造法と異なり、原料処理において蒸煮など殺菌操作をせずに直接生葡萄を破碎し、白ワインは直ちに压榨した果汁の発酵、また赤ワインは数日間醪発酵をすのがオーストリアな製造法であるため、原料に付着している有害微生物が発酵槽に持ち込まれる。そのため初期の段階でそれらの繁殖を防止する他、貯蔵中の有害微生物の汚染や色素、タンニン等の被酸化物質の酸化防止、及び、熟成を正常に行わせる効果をも有することなどから、ワイン醸造において古くから亜硫酸が常用されている。ワインに添加された亜硫酸は、種々の結合成分と結合し、逐次遊離型から結成型へかわり、その効果は次第に減少する(74)のでワインを正常に管理するには適時亜硫酸を補添し、遊離型亜硫酸を有効レベルに保つ必要がある。一方、亜硫酸の経口毒性については、いくつかの報告があり、例えば、Schanderl (75)、Lanteaume (76、77)

による安全性の試験結果がある。また、FAO ( 78 ) では、1日当り 0.35 ~ 15 mg / kg の亜硫酸を許容している。しかしながら、一方では、ワイン醸造において亜硫酸の節減、或は代替使用する風潮が強くなってきている ( 79 ~ 82 )。

ワイン中の亜硫酸の分析法としては、ランキン法 ( またはその改良法 ) がもっとも一般的に用いられている ( 63 )。しかしながら、その方法は、簡便性、感度、及び、迅速性に欠け、より優れた分析法の開発が待たれていた。

IV - 2 で示したように、N - ( 9 - アクリジニル ) マレイミド ( NAM ) は、亜硫酸と反応し、強い蛍光性の誘導体を与えることから、この発蛍光反応を用いたワイン中の亜硫酸の分析法について検討した。

## 第 1 節 実 験

試薬及び装置: 使用した試薬、及び、装置は I V - 2 で用いたものと同じものを使用した。但し、H P L C の分離カラムは J A S C O (日本分光) S C - 0 2 ( O D S、1 0  $\mu$  m、4.6 m m i. d. x 2 5 0 m m ) を用いた。また、試料として用いたワインは仙台市内の酒店から購入した。

反応緩衝液の調製: 3 0.9 2 g のホウ酸、及び、3 7.2 8 g の塩化カリウムを 0.0 2 M エチレンジアミン四酢酸ナトリウム ( E D T A ) 溶液で 1 l に定容した ( A 液 )。一方、5 3.0 0 g の炭酸ナトリウムを 0.0 2 M E D T A 溶液で 1 l に定容した ( B 液 )。A 液と B 液を混合し、p H を 1 0.0 に調整した。

亜硫酸の定量: 亜硫酸の分析のため、ワインは 0.0 2 M E D T A 溶液で 1 0 0 倍に希釈してから用いた。この試料溶液 5 0  $\mu$  l に 1 5 0  $\mu$  l の反応緩衝液、及び、5 0  $\mu$  l

の N A M - アセトン溶液 ( 3.65 mM ) を加え、50℃で30分間反応させた。反応後、その10μlをHPLCに導入し、ピーク高より定量した。

HPLCの条件を以下に示した。分離カラムはJASCO SC-02を用い、25%アセトニトリル - 0.1 M 酢酸アンモニウム溶液を用いて1.0 ml / minの流速で溶出した。検出は、455 nmの蛍光強度 ( 励起波長365 nm ) をモニターすることにより行った。

また、同時に改良ランキン法により測定し、測定値の比較を行った。

## 第 2 節 結 果 及 び 考 察

N A M と 亜 硫 酸 の 反 応: 本 法 で は、ワ イ  
ン 中 の 亜 硫 酸 を 定 量 す る た め に、反 応 を P H  
1 0.0 の 緩 衝 液 中、5 0 ℃ で 行 い、す べ て 加

水分解型に導いた後分析する方法を用いた。これは、ワイン中には、アルデヒドやケト酸と結合している結合型亜硫酸と遊離型亜硫酸が存在し、総亜硫酸量を求めるには結合型を遊離型にする必要を認めためである。

非加水分解型の亜硫酸誘導体を検出・定量に用いるための反応条件 ( I V - 2 ) を用いた場合、Fig. 57 に示したように、反応開始直後は、急激に反応が進行したが、あるところから急に反応がゆっくり進むようになり、ピーク高は微増し続けた。同様の現象は、

標準の亜硫酸溶液にアセトアルデヒドを加えた系でも観察された。これは、最初遊離の亜硫酸が NAM と反応し、そのため急激なピーク高の増加が認められたが、溶液中の遊離型亜硫酸

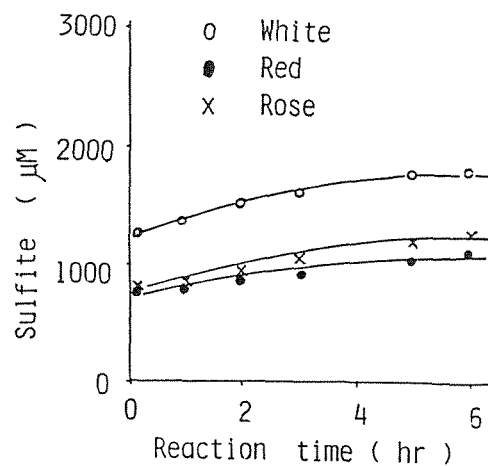


Fig. 57: Reaction time course of sulfite with NAM in wines at 0 °C.  
 (○): White wine, (●): Red wine,  
 (×): Rose wine.



酸の減少、及び、アルカリ条件のため平衡が遊離型の方にずれ、徐々に亜硫酸が遊離してきたため、ピーク高の微増が認められたものと考えられた。このため、総亜硫酸量の定量には何等かの方法で、前もって亜硫酸を遊離させておく必要があった。一方、加水分解型の亜硫酸誘導体を定量に用いる場合、反応は高pH、高温で行うことが出来るため、平衡を遊離型に早くずらすと同時にNAMによる蛍光ラベル化が可能であった。そのため、本法では、後者の方法を用いることにした。Fig. 58に反応の経時変化を示した。標

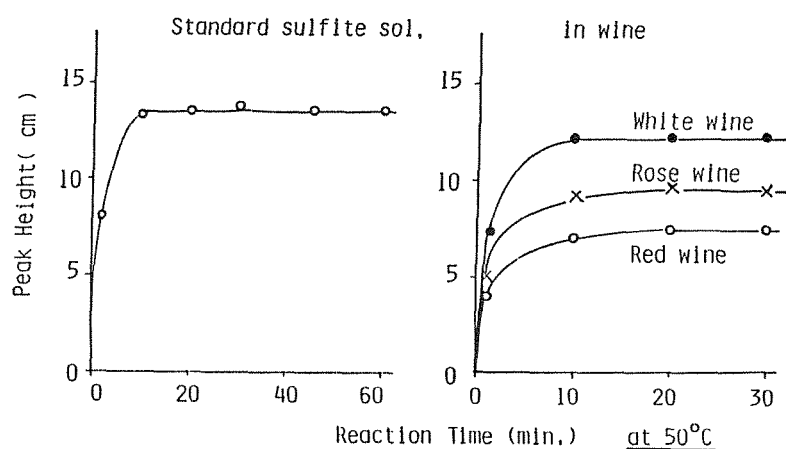


Fig. 58: Reaction time course of sulfite with NAM at 50°C

準溶液では10分以内に反応は完了したが、ワイン中では、反応が完了するまで約20分を要した。これは、前述の結合型が遊離されるのに多少時間を要したためと考えられた。そこで、反応時間は、安全性を見込み30分間行うものとした。反応生成物は、反応後冷暗所に保存することにより24時間以上安定であった。

H P L Cによる分離：本反応は、比較的高温・高pHで行ったためN A Mの分解物による対照の蛍光値が高かった。そこで本法では、H P L Cを用いて亜硫酸誘導体とN A Mの蛍光性分解物を分離し定量した。Fig. 59に代表的なH P L Cクロマトグラムを示した。2種類の加水分解型誘導体は、1本のピーク(A)を与え、N A Mの分解物のピーク(B)と完全に分離した。この条件下では亜硫酸付加物とN A M-グルタチオン付加物の分離が不完全であったが、ワイン中に含ま

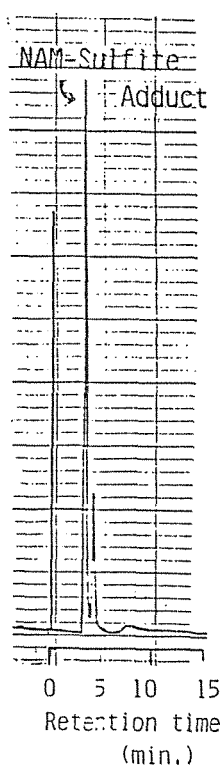


Fig. 59: HPLC chromatogram of NAM adducts in wine on ODS column

れるグルタチオンは亜硫酸量に比べ無視できない程しか含まれていなかった。Fig. 60は、NAMと反応する主なSH化合物であるシステイン及びグルタチオンと亜硫酸の各NAM付加物が分離可能な条件で分析したときのワインのクロマトグラムを示したものである（この条件では亜硫酸は数百fmolまで定量可能であった）。何れのワイン中にもグルタチオンはほとんど認められなかった。従って、分析の迅速性を考えてカラムはODSを用い1本のピークとして測定することとした。この条件では、一回の定量は10分以内に行うことが出来た。また、この条件により亜硫酸は、1～1000pmolの範囲で良

好な定量性を認めた。

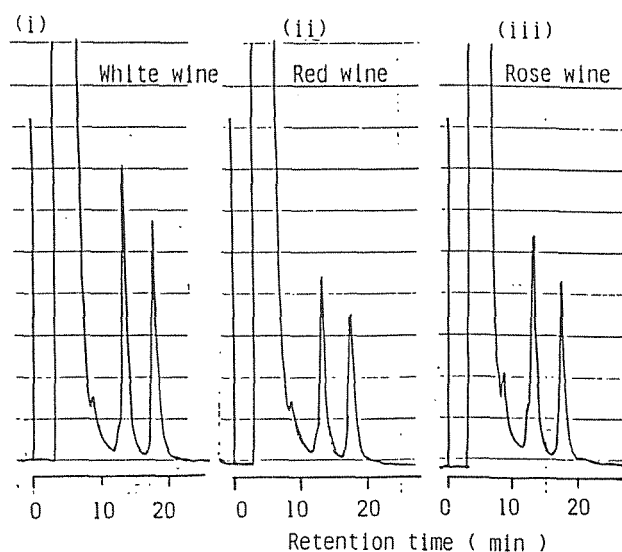


Fig. 60: HPLC chromatograms of NAM adducts on aminopropyl column  
 (i): White wine, (ii): Red wine, (iii): Rose wine.  
 Column was JASCO Finepak SIL NH<sub>2</sub> (4.6mm x 250 mm) and  
 elution was carried out with 30% acetonitrile- 50mM  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> at flow rate of 1.0 ml/min.

ワイン中の亜硫酸の定量: 亜硫酸は非常に不安定な化合物であり、分析操作中に酸化される傾向がある。この酸化反応は、微量の金属イオンにより触媒されることから、EDTAによりそれら金属をマスクし、反応操作中の酸化を防ぐことができた。そのため、ワインの希釈、及び、反応緩衝液には 0.02 M

の EDTA を含む溶液を用いた。

Table 23: Concentration of sulfite in wine

Wine	HPLC method ( $\mu\text{mol/l}$ )	Recovery (%)	Modified Rankin method( $\mu\text{mol/kg}$ )*
A White	2279	100.1	2122
B White	3165	102.0	2960
C White	3150	113.4	2900
D White	3255	100.4	2845
E Rose	1467	104.8	1467
F Rose	3466	99.4	3060
G Rose	1363	100.8	1190
H Rose	2769	102.4	2329
I Red	1464	99.1	1422
J Red	1985	102.1	1950
K Red	1936	100.0	1792
L Red	2107	104.6	1824
M Red	2557	102.4	2308

K.Fujita et.al.:Z.Lebensm. Unters. Forsch., 168,  
206(1979)

Table 23 に改良ランキン法、及び、  
 本法により 13 種類のワイン中に含まれる亜  
 硫酸量を測定した結果を示した。その結果、  
 両方法間には、良好な相関性が認められた (   
 Fig. 61:  $r = 0.989$  )。本法による  
 測定値は改良ランキン法による値より若干高  
 かった。これは、ランキン法において、分析  
 操作中における亜硫酸の酸化、及び、蒸留に

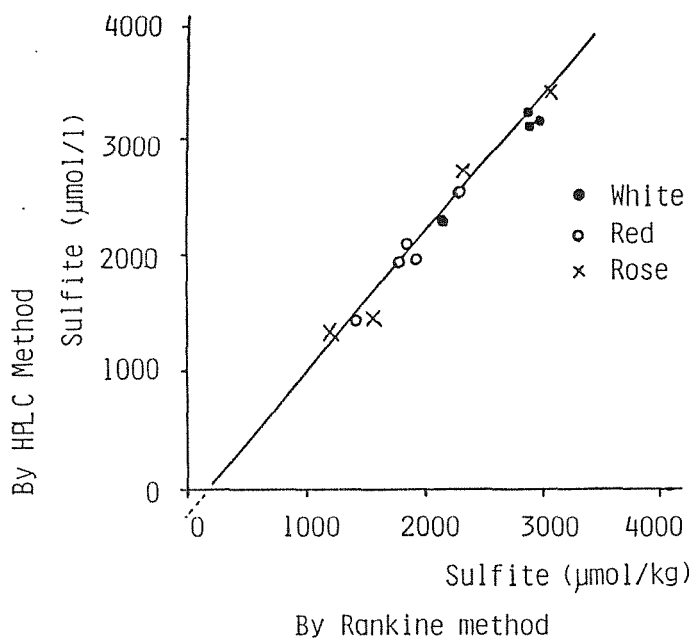


Fig. 61: Relationship between sulfite contents determined by modified Rankin method and NAM-HPLC method

よる亜硫酸の減少、及び、共存するアルデヒドやケト酸の影響などが原因となつて負の誤差を与えたものと考へられた。本法によるワイン中への添加回収率は、1例を除き99～105%であつた。また、測定値の変動係数は、3%以内であつた。

### 第3節 結論

本法は、感度、簡便性、及び、迅速性において他の方法に比べ優れていた。ラベル化反応は、30分で完了し、1回のHPLCによる分析も7分以内に完了した。測定に使用した試料量は、ランキン法に比べ10000分の1であった。本法により得られた測定値は、ランキン法による値と良好な相関性を示し、本分析法の有効性を認められた。

本法で用いた分析条件下では、NAMのグルタチオン誘導体との分離が不完全であったが、アミノプロピルカラムを用いた実験 ( Fig. 60、この条件下でのグルタチオン、及び、システイン誘導体との分離は Fig. 56 参照 ) よりグルタチオンは亜硫酸に比較し、無視し得るほどしか含まれていなかった。また、グルタチオンや他のチオールを含む食品や生体試料中の亜硫酸の分析には、このアミノプロピルカラムを用いて分析することが可能である。

## 【 I V - 4 】 雨 水 中 の 亜 硫 酸 の 定 量

$\text{SO}_2$  は、火山活動などの天然現象を除くと、石油・石炭の燃焼、硫酸の製造、金属の精錬など人間の生活・生産活動にともなって、大気中に排出され、大気汚染を引き起こす最も主要な原因物質の一つとなっている。この $\text{SO}_2$  は、一部、大気中で硫酸ミスト、または硫酸塩に変換され、 $\text{SO}_2$ 、硫酸ミスト、硫酸塩粒子が単独で、複合して、或は他の粒子状物質との相乗効果により人体や動植物に被害を与える。ミューズ溪谷（1930年、ベルギー）、ドノラ（1948年、米国、ペンシルバニア）、ロンドン（1952年）では、大気汚染により多数の死者が出るという事件が起きているが、 $\text{SO}_x$  がその他の粒子状物質とならんで最も大きな原因であったと考えられている。

$\text{SO}_x$  は、さらに慢性疾患、例えば、慢性



気管支炎や肺気腫の発生原因の一つと考えられている。SO<sub>2</sub>は、通常ppmオーダーでもって植物に被害を与えられているが、更に低濃度でも不可視障害を与える可能性も示唆されている。また、SO<sub>x</sub>は、単独で、或は、他の物質と協働して金属や建築材料等の物質を犯しそれらに大きな被害を与えている。

大気中のSO<sub>x</sub>は、凝縮した水に取り込まれ、この水が酸性雨として地上に降ることになる。その結果、金属、建築物のみならず動植物に対しても非常に大きな被害を与えている。特に、酸性雨の被害の大きいドイツでは、森林に対する被害が大きな社会問題となっている(66-a)。また、湖沼の酸性化により特殊なプランクトンしか生息できなくなり、生体系を大きく乱す原因ともなっている。

酸性雨の大きな原因の一つは、SO<sub>x</sub>であることは疑いのないところであるが、特に、SO<sub>2</sub>の酸化により生成した硫酸がその最大

の原因であると考えられている ( 6 6 - b ~ e )。この  $\text{SO}_2$  の酸化のメカニズム、及び、亜硫酸の直接的影響を知る上で最も問題となることは、正確な雨水中の亜硫酸濃度を知ることであった。これは、亜硫酸が非常に不安定であることと微量しか含まれないことに起因する。本研究は、雨水を EDTA 溶液で捕集し、NAM により亜硫酸を定量することによりこれらの問題を解決し、雨水中の亜硫酸を定量することを目的とした。

## 第 1 節 実 験

試薬及び装置： 使用した試薬、及び、装置は IV - 2 で用いたものと同じものを使用した。但し、HPLC の分離カラムは JASCO ( 日本分光 ) SC - 02 ( ODS、10  $\mu\text{m}$ 、4.6 mm i. d. x 125 mm ) を使用した。雨水は、仙台市内の建築物の屋

上で採取した。

捕集緩衝液の調製: I V - 3 で用いた反応緩衝液と同じ。

雨水の捕集: 捕集緩衝液 5 0 m l を 2 0 m l 容の試料瓶に加え、その重量を測定した ( A g )。この試料瓶に雨水を、内径 1 5 0 m m のプラスチック製のロートを用いて 3 0 ~ 1 2 0 分間 ( 2 ~ 8 m l ) 捕集した。捕集後、再びその全重量を測定し ( B g )、捕集した雨水量を、その比重を 1.0 0 とし ( B - A ) g より算出した。捕集量が、8 ~ 1 2 m l の場合は、更に 3 m l の捕集緩衝液を加えてから N A M によるラベル化反応に供した。

N A M による亜硫酸のラベル化反応:

5 5 0  $\mu$  l の捕集液に 5 0  $\mu$  l の N A M - アセトニトリル溶液 ( 1 m g / 2 m l ) を加え、その混合液を 4 0  $^{\circ}$ C に保ち 3 0 分間以上反応

させた。反応液は、HPLC分析するまで冷暗所に保存した。

HPLC分析: NAMによりラベル化された試料は、HPLCにより分析・定量した。移動相は、18% - アセトニトリル - 0.05 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を用い、1.0 ml / min の流速で溶出した。カラムは、逆相系のODSカラムを用い、10  $\mu$  l の試料を導入した。検出は、440 nm の蛍光強度 (励起波長 365 nm) をモニターすることにより行い、ピーク高より定量を行った。

## 第 2 節 結果及び考察

NAM と 亜硫酸の反応: Table 24 に NAM 添加量とピーク高の関係を示した。NAM 添加量が多い程、ピークは高くなった。

Table 24: Effect of NAM concentration on the peak-height of sulfite

A 200  $\mu$ l of sulfite solution (30.6  $\mu$ l) and 50  $\mu$ l of NAM acetonitrile solution were added to the 350  $\mu$ l of trapping buffer. The mixture was kept at 40 °C for 30 min. Ten  $\mu$ l of the aliquote was injected to HPLC system.

NAM concentration ( mM )	Peak-height ( cm )	Molar ratio (NAM/sulfite)
0.61	11.5	5.0/1
0.91	13.9	7.5/1
1.22	14.9	10.0/1
1.82	16.2	15.0/1
3.65	16.6	30.0/1

が、1.82 mM 以上の濃度の溶液の添加ではピーク高に大きな差は認められなかった。NAM 濃度の増加にともない、NAM の分解物によるピークが大きくなることから本実験では 1.82 mM 溶液を用いた。Table 25 には、捕集緩衝液（この液は同時に反応緩衝液でもある）の希釈によるピーク高への影響について示した。実験は、反応液の全量、NAM 溶液添加量、及び、添加亜硫酸量を一定に保ち、捕集緩衝液と 0.02 M EDTA（2 Na 塩）溶液の比を変化させた。この実験

Table 25: Influence of trapping buffer to sample solution ratio on the peak-height of sulfite  
 The mixture of trapping buffer and sample solution contains the same concentration of sulfite (0.02M EDTA solution was used as a sample solution model). A 50  $\mu$ l of NAM solution(1.82mM) was added to the 550  $\mu$ l of mixture. Reaction was performed at 40 °C for 30 min and 10  $\mu$ l of aliquot was injected to HPLC system.

Ratio (v/v) Trapping buffer/Sample solution	Peak height ( cm )
10/1	18.6
8/3	18.5
7/4	18.7
6/5	18.5
4/7	18.6
1/10	17.8

は、雨水の捕集による緩衝力への影響を検討したものである。雨水の代わりに用いたEDTA(2Na塩)溶液は、pHが4.6であり、また若干の緩衝力を有することから酸性雨のモデルとして用いた。緩衝液とEDTA溶液の比が500:50~200:350まではピーク高に有意の差は認められなかったが、50:500では、緩衝効果が低下しpHが下がったために反応に時間がかかり、30分の反応ではピーク高が他に比べて低くなった。

そこで、雨水の捕集後のラベル化反応には、捕集緩衝液と雨水量の比が 500:50 ~ 200:350 の範囲内にあることが望ましいと考えられたことから、雨水の捕集量は 2 ~ 8 ml とした。この量を越えた場合には更に緩衝液を加え、適正な範囲としてから反応させた。実際の雨水では、モデルとして用いた EDTA 溶液よりもこの様な影響は小さいと考えられた。また、反応の経時的変化を追跡した結果、ピークは 30 分以内で一定となった。

HPLC による定量: NAM と亜硫酸の反応により生成した蛍光誘導体は、HPLC を用いて分析・定量した。Fig. 62 にラベル化した試料の HPLC クロマトグラムを示した。この条件では、最終生成物である 2 種の蛍光性誘導体は 1 本のピーク (A) を与え、亜硫酸の定量の障害となる NAM の分解物によるピーク B と分離し、この影響を除く

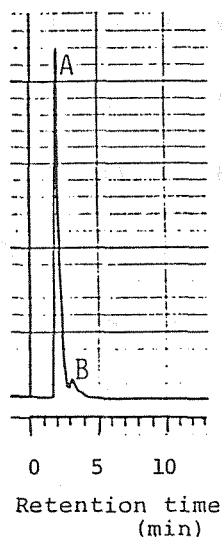


Fig. 62: HPLC chromatogram of NAM sulfite in rain water on ODS column  
Peak A was NAM-sulfite adducts and peak B was a NAM decomposed product.

ことができ、亜硫酸の高感度の分析・定量が可能となった。1回の分析は、5分以内に終わり、次の試料の導入が可能であった。亜硫酸量とピーク高の間には1～1000 p m o l の間で非常に良好

な直線性を認めた。尚、環境試料中に存在する、NAM反応性化合物とし

て硫化水素、及び、メタンチオール等が考えられた。しかしながら、硫化水素は本条件下では蛍光性の誘導体を与えず、また、メタンチオールは、本HPLC条件下で分離可能であることから、それらの影響は全く受けなかった。

雨水中の亜硫酸の酸化安定性: 亜硫酸は水中の溶存酸素により酸化を受け硫酸となる。



この酸化反応は、 $Fe^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ などの金属イオンにより触媒され、雨水中の亜硫酸は速やかに硫酸に酸化される。本法では、このような金属イオンによる影響を防ぐため、雨水をEDTAを含む緩衝液に捕集し金属イオンのマスクを行った。捕集緩衝液を用いた場合と、そうでない場合の雨水中の亜硫酸測定値を比較した結果、用いた場合は、用いなかった場合に比べ有意に低い値を示した(52.7%)。このことは、捕集緩衝液の有効性を支持するものと考えられた。

金属イオンの触媒作用は、EDTAによるマスク効果により防ぐことが出来た。しかし、雨水中に含まれる溶存酸素により、亜硫酸は徐々に酸化される。Fig. 63に捕集後の溶液中の亜硫酸の経時的変化を追跡した結果を示した。Fig. 63-aより、12時間後にはかなり酸化が進んでいることが明かとなった。Fig. 63-bには、捕集後10時間までの変化を示したが、この結果、酸化

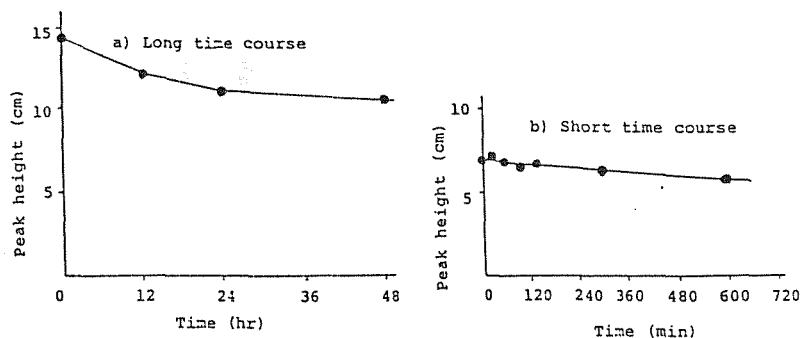


Fig.63: The time course of the decrease of sulfite in the trapped solution

a) Sample: rain water (5.5ml, containing 0.336ppm sulfite) collected in 5.0ml of trapping buffer, and kept at 20 °C for 0, 12, 24 and 48 h, and labeled with NAM. b) Sample: rain water (4.4ml, containing 0.155ppm sulfite) collected in 5.0ml of trapping buffer, and kept at 20 °C for 0, 20, 60, 100, 140, 300 and 600 min, and labeled with NAM.

は採取直後から徐々に進行し、捕集液中の亜硫酸量は60分後には97.5%、300分後には91.5%まで減少した。そのためラベル化を捕集後出来るだけ速やかに行う必要があった。後述する添加回収実験の結果より、捕集中の酸化は比較的防がれていると考えられたが、捕集の時間は2時間以内が望ましいと考えられた。

本法では、亜硫酸の酸化を防ぐためEDTA溶液を用いたが、捕集溶液にアセトアルデ

ヒド等のアルデヒドを用いることにより、安定な結合型亜硫酸として捕集することも可能であり(83)、これにより比較的長時間の捕集が可能となると考えられた。NAMとの反応は、アルデヒドの存在下でも同様の条件で充分進行し、定量も可能である。

添加回収及び再現性: 捕集緩衝液に亜硫酸を添加し、雨水を捕集した後その回収率を測定した。その結果をTable 26に示した。回収率は、91~107%であった。(a)は総亜硫酸量(雨水中の亜硫酸+添加し

Table 26: Recovery of sulfite in rain water

The 5.0 ml of trapping buffers which contained various concentrations of sulfite(3.0 ~ 30  $\mu$ M) were used and 4.80 ~ 9.10 ml of rainwaters were collected on them.

Sample	Sulfite in trapped solution(ppm)			Added (ppm)	Recovery (%)
	Total	in rainwater	Difference		
A	0.365	0.076	0.289	0.269	107.4
B	0.213	0.076	0.137	0.133	103.0
C	0.232	0.088	0.144	0.135	106.7
D	0.425	0.353	0.072	0.079	91.1
E	0.779	0.184	0.595	0.564	105.5
F	0.775	0.235	0.540	0.531	101.7

た亜硫酸)を捕集した雨水中に含まれたものとして換算した濃度、(b)は雨水中の亜硫酸濃度、(c)は添加した亜硫酸を捕集した雨水中に含まれたものとしたときの濃度に換算した値をそれぞれ示している。

ラベル化反応の再現性は非常に良好であった(変動係数は、1.06%、 $n = 5$ )。仙台市内で実際の雨水を捕集し、亜硫酸の定量を行った結果をTable 27示した。雨水中の亜硫酸濃度は0.17~2.54 ppmであった。測定は、2~3連で行った。測定値間に若干のばらつきが認められた。これは、試料の不安定性、微量性、及び、捕集量のばらつき等によるものと考えられた。従って、測定の信頼性を高めるためには3連以上で測定することが望ましいと考えられた。

Table 27: Concentration of sulfite in rainwater

Sample	Volume of rain/ ml	Sulfite, ppm	Average, ppm
A	5.38	0.179	0.175
	5.87	0.171	
B	1.65	2.69	2.54
	2.33	2.53	
C	2.69	2.39	0.607
	6.58	0.609	
	7.17	0.560	
D	6.91	0.652	0.366
	8.59	0.350	
E	8.10	0.381	0.293
	5.18	0.286	
F	4.73	0.299	0.477
	2.93	0.471	
G	3.10	0.483	0.777
	6.31	0.767	
	6.04	0.782	
H	6.74	0.783	0.542
	6.80	0.550	
	6.91	0.553	
I	7.89	0.524	0.442
	8.69	0.444	
	8.33	0.426	
	9.41	0.455	

Sampling performed in Sendai, Miyagi Pref. Japan from November 10 to 24, 1985.

### 第 3 節 結 論

雨 水 中 の 亜 硫 酸 を E D T A を 含 む 捕 集 緩 衝 液 に よ り 捕 集 す る こ と に よ り、 不 安 定 な 亜 硫

酸を比較的安定な状態で集め、直ちにNAM  
と反応させることにより、安定な蛍光性誘導  
体として固定化することができた。また、H  
PLCを用いることにより1 pmolまでの  
亜硫酸を定量することができた。これは、5  
mlの雨水を捕集した場合、14 ppbの亜  
硫酸の検出・定量が可能であることを意味し  
ている。捕集のスケールを小さくすること  
により、試料の採取量は更に少量化(100  
μl以下)することも可能である。本法は、  
雨水中に含まれる微量の亜硫酸を選択的に定  
量することを可能とし、分析に要する時間も  
短く、操作も非常に簡便であった。

【 I V - 5 】 グルタミン酸： オキサロ酢酸  
 アミノ基転移酵素 ( E C 2. 6. 1. 1 ) の  
 活性測定法

グルタミン酸： オキサロ酢酸 アミノ基転移  
 酵素 ( E C 2. 6. 1. 1 ; G O T ) は、  
 自然界に広く存在するアミノ基転移酵素で、  
 L - アスパラギン酸と 2 - オキソグルタル酸  
 から L - グルタミン酸とオキサロ酢酸を生成  
 する反応、及び、その逆反応を触媒する酵素  
 である。この酵素の活性測定法として最も一  
 般的な方法は、リンゴ酸脱水素酵素の系と組  
 み合わせて吸光度の変化を測定するカルメン  
 法 ( 8 4 )、或は、その改良法である。

G O T には、2種のアイソザイム ( s - G  
 O T 及び m - G O T ) が存在する ( 8 5 )。  
 正常時のヒト血漿 ( 或は血清 ) 中には、ほと  
 んど s - G O T のみが認められ、m - G O T  
 は認められない。しかし、肝炎や肝癌などの

各種肝疾患、及び、心筋梗塞や筋ジストロフィーなどの患者では、組織の破壊により、血中に m-GOT が遊離され、総 GOT レベルの上昇が観察され、臨床分析中でも最も重要な分析項目のひとつとなっている。

一方、L-アスパラギン酸の構造類似体で、タウリンの生合成過程の重要な中間体である L-システインスルフィン酸 (CSA) も GOT の良い基質となり、酵素反応により  $\beta$ -スルフィニルピルビン酸を経て、ピルビン酸と亜硫酸を与える (86~90)。この反応により生成した亜硫酸を NAM を用いて定量することにより、GOT 活性を測定する方法について検討した (Fig. 64)。

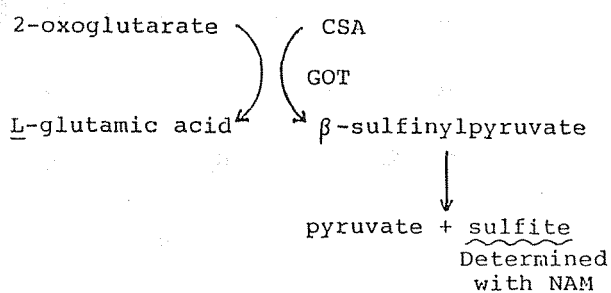


Fig. 64: Principle of assay for GOT activity



## 第 1 節 実 験

試薬及び装置: L-システインスルフィ  
ン酸 (CSA) は、Sigma Chem-  
ical Co. 製の試薬を使用した。GOT  
は、Boehringer Mannheim-  
eim GmbH 製の酵素を使用した。また、  
標準血清として、同社のコントロール血清  
プレチパス E、及び、プレチノルム E (GOT  
活性値は 141、及び、73.3 U/l; ド  
イツ臨床化学会の勧告に基づいた GSSC 法  
による値、37℃) を用いた。ヒト血漿は、  
福島県立医科大学付属病院より恵与を受けた。  
尚、ヒト血漿については、日本臨床化学会の  
勧告に基づいた JSSC 法 (91) により G  
OT 値を測定したものを用了。NAM は、  
奈良らの方法を用いて調製した。その他の試  
薬は、和光純薬工業 (株) より試薬特級、或  
は、分析用の試薬を購入して用了。  
HPLC 装置、恒温インキュベーター、

p Hメーター、及び、蛍光分光光度計は、  
 I V - 2 で使用したものと同じものを使用した。  
 カラムは、日本分光(株) S C - 0 2 ( O D S、  
 1 0  $\mu$  m、4.6 m m i. d. x 2 5 0 m m ) を使用した。

基質溶液の調製: 1 0 0 m M T r i s  
 - 塩酸緩衝液を室温で p H 9.3 に調製し、C  
 S A、2 - オキソグルタル酸、及び、ピリド  
 キサルリン酸をそれぞれ、4 0 m M、1 0  
 m M、及び、5 0  $\mu$  M とするよう溶解させ  
 た。この基質溶液は使用直前に調製した。

N A M - 反応緩衝液の調製: I V - 3 と  
 同じ。

酵素反応条件の検討: 基質溶液の p H を  
 9.1 ~ 9.5 に調製し、基質 4 0  $\mu$  l、及び、  
 プレチパス E 1 0  $\mu$  l を氷冷下に加え、パラ  
 フィルムをした後、3 7  $^{\circ}$  C で 6 分間酵素反応

を行つた。反応後、再び氷冷することにより反応を停止させ、NAM-アセトン溶液 ( 1 mg / 5 ml ) 100  $\mu$  l、及び、反応緩衝液 10 ml を加えて再びパラフィルムをし、37  $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。反応後、室温まで戻し 435 nm の蛍光強度 ( 励起波長 360 nm ) を測定し、反応 pH の影響を調べた。

また、基質溶液 ( pH 9.3 ) 40  $\mu$  l にプレチパス E 10  $\mu$  l を氷冷下に加え、パラフィルムをした後、37  $^{\circ}$ C で 0 ~ 10 分間反応させた。反応後直ちに氷冷し NAM-アセトン溶液 ( 1 mg / 5 ml ) 100  $\mu$  l、及び、反応緩衝液 10 ml を加え、再びパラフィルムを行つた後、37  $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。反応後、その 10  $\mu$  l を HPLC に導入し生成した亜硫酸量をピーク高より求めた。尚、HPLC の条件は、次項に示した。

亜硫酸分析条件の検討: 基質溶液 40

μ l、及び、プレチパス E 10 μ l を加え、6 分間酵素反応を行った後、NAM-アセトン溶液、及び、反応緩衝液をそれぞれ 100 μ l、及び、10 ml 加え、パラフィルムをした後、37℃で反応させ、その 10 μ l を経時的に HPLC に導入した。

用いた HPLC の条件は、以下の通りであった。カラムは、JASCO SC-02 (ODS) を使用し、移動相は 18.5% - アセトニトリル - 0.1 M 硫酸カリウム - 0.1 M リン酸カリウム (pH 7.0) を用い、1.0 ml / min の流速で溶出した。検出は、435 nm における蛍光強度 (励起波長 365 nm) の測定により行った。

活性測定: プレチパス E を 0.9% 食塩水で適宜希釈し、4 ~ 141 U / l の標準血清を調製した。この血清を用い、GOT 活性の検量線を作成した。更に、プレチノルム E、及び、ヒト血漿 10 検体についても活性測定

を 行 っ た。 ヒ ト 血 漿  
 に お い て、 G O T 活  
 性 値 が 1 6 0 を 越 え  
 る 試 料 に つ い て は  
 0.9 % 食 塩 水 に よ り  
 1 / 1 0 に 希 釈 し て  
 か ら 測 定 し た。 活 性  
 測 定、 及 び、 亜 硫 酸  
 の 分 析 法 を F i g. 6 5 に 示 し た。 調 製 し た  
 試 料 は、 そ の 1 0  $\mu$  l を H P L C に 導 入 し、  
 生 成 し た 亜 硫 酸 量 を 定 量 し た。

Sample	10 $\mu$ l
Substrate	40 $\mu$ l
	Incubate at 37°C for 6 min
Cooling on ice bath	NAM-Acetone solution (100 $\mu$ l, 1 mg/ 5ml) Reaction buffer (pH 10, 1.0 ml) Reaction of sulfite with NAM at 37°C for 30 min
	10 $\mu$ l for HPLC analysis

Fig. 65: Determination procedure of GOT activity  
 Substrate solution used was 40mM CSA, 10  
 mM 2-oxo-glutaric acid and 50 $\mu$ M PLP in  
 100mM tris-HCl buffer (pH 9.3).

## 第 2 節 結 果 及 び 考 察

酵 素 反 応 条 件: F i g. 6 6 に 酵 素 反 応  
 の p H と 一 定 時 間 ( 6 分 間 ) 反 応 さ せ た 後 の  
 亜 硫 酸 生 成 量 と の 関 係 に つ い て 示 し た。 亜 硫 酸  
 生 成 量 は、 N A M 法 に よ り 求 め 蛍 光 強 度 で  
 示 し た。 通 常、 こ の 反 応 は、 p H 7.2 ~ 8.6

の範囲で行われている(89、90、92)が、本法では至適pHを9.3に認めた。従って、酵素反応をpH9.3の緩衝液中で行うこととし、その時の反応の経時的变化について検討した。その結果をFig. 67に示した。反応開始から6分間は、反応は直線的に進行したが、それ以降亜硫酸の生成効率は徐々に低下した。これは、反応による基質量の減少によるものと考えられた。そこで、酵素反応時間は、活性測定のため反応が37℃で直線的に進行する範囲内の6分間とした。尚、本実験に用いた標準血清の酵素活性は141U/1であったが、これ以下の酵素活性の試料の場合、基質は本実験で用いた量で十分であり、反応は少なくとも6分間は直線的に進行するものと考えられた。

本法において、酵素反応は、氷冷することにより一時的に停止し、次いで、NAM-アセトン溶液、及び、ホウ酸緩衝液(pH10)を加えることで反応を完全に停止させるとと

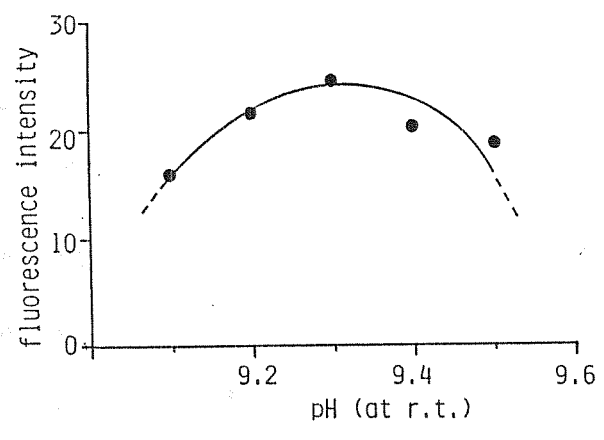


Fig.66: Effect of pH on enzyme reaction

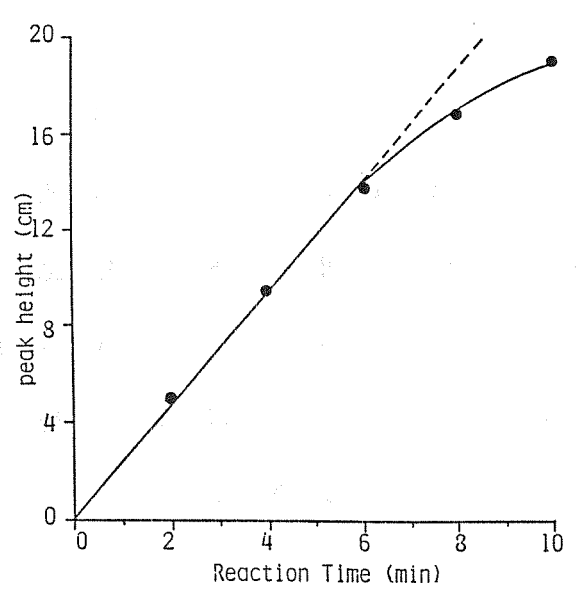


Fig.67: The time course of the enzyme reaction at 37 °C

もに、亜硫酸のラベル化反応を行うことが出来た。

亜硫酸の定量：亜硫酸とNAMの反応は、I V - 2で述べたように、高温・高pHでより早く進行した。本法では、反応の迅速性及び、酵素反応を停止させる目的で、pHが10.0の反応緩衝液を用い、37℃で反応を行った。反応は、ほぼ20分以内で完了したが、安全性を見込み30分間反応させることとした。

亜硫酸の検出にはHPLCを用いた。これは、生体内のNAM反応性化合物、NAMの分解物、及び、その他の蛍光性化合物による影響を避けるためであった。NAMと亜硫酸の反応最終生成物は、2種の異性体であることは既にI V - 2で述べた。この2種の異性体のHPLCによる分離は検出感度を低下させ、クロマトグラムを複雑にし、分析時間を長くすることと、これらを分離・検出するこ



とによる利点の無いこと  
 から、一本のピーク  
 となるようなHPLC  
 条件を用いた ( Fig.  
 68 )。この条件下で  
 は、定量に妨害となる  
 成分と分離し、また、  
 ピークの再現性、及び、  
 定量性も非常に良好で  
 あった。定量は、ピーク高より行った。

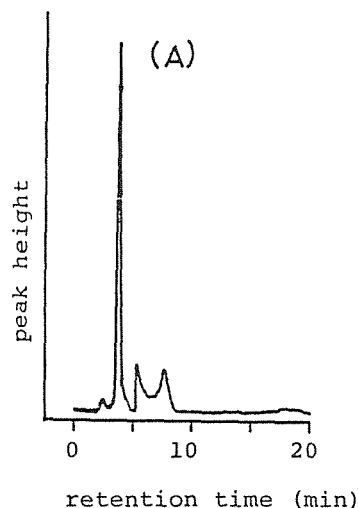


Fig. 68: HPLC chromatogram of NAM sulfite adducts

Peak A was NAM sulfite adducts.

活性測定: 試料溶液、及び、基質溶液に  
 由来する亜硫酸、及び、非酵素反応的に生成  
 する亜硫酸による測定誤差を除くために、以  
 下のような補正を行った。

$$\text{GOT 活性値} = \text{実測値} - (\text{Blank 1} - \text{Blank 2} + \text{Blank 3})$$

但し、Blank 1 ~ 3 は次の通り

B l a n k 1 :

試料と基質を加え酵素反応を行わずに亜硫酸のラベル化反応を行った時の値。

B l a n k 2 :

試料の代わりに蒸留水を用い、基質溶液を加えた後、酵素反応を行わずに、亜硫酸のラベル化反応を行った時の値。

B l a n k 3 :

試料の代わりに蒸留水を用い、基質溶液を加えた後、酵素反応を6分間行い、その後亜硫酸のラベル化を行った時の値。

B l a n k 1 は、最初から試料、及び、基質中に含まれていた亜硫酸量を示す項であり、

B l a n k 2 は、最初から基質に含まれていた亜硫酸量を示す項である。従って、(

B l a n k 1 - B l a n k 2 ) は、試料中に含まれる亜硫酸を補正する項となる。また、

B l a n k 3 は、基質に最初から含まれていた亜硫酸、及び、反応中非酵素的に生成した

亜硫酸量を示し、それによる誤差を補正する項である。(Blank 1 - Blank 2) の項はそれほど大きくななく、従って実際の補正には Blank 3 だけで十分であった。

プレチパス E を希釈して調製した試料を用いて、酵素活性とピーク高との関係について検討した結果、両者の間に非常に良好な直線性を認めた (Fig. 69; 相関係数  $r = 0.9994$ ;  $y = 0.13x - 0.18$ )。また、同時に測定したプレチノルム E (73.3 U / 1) の活性測定値は 72.2 U / 1 であった。測定による変動係数は、何れも 5% 以内であった。試料の採取の精度を向上させることにより更に再現性が改善されるものと考えられる。

また、実際のヒト血漿 10 検体について、本法と改良カルメン法 (JSSC 法) により求めた値を比較した結果、Fig. 70 に示したように両者間に良好な相関性が認められた ( $r = 0.9853$ )。このことから、本法

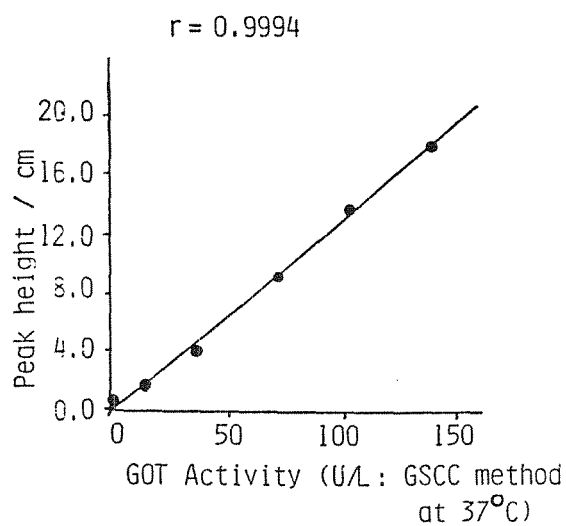


Fig. 69: Calibration curve of GOT activity

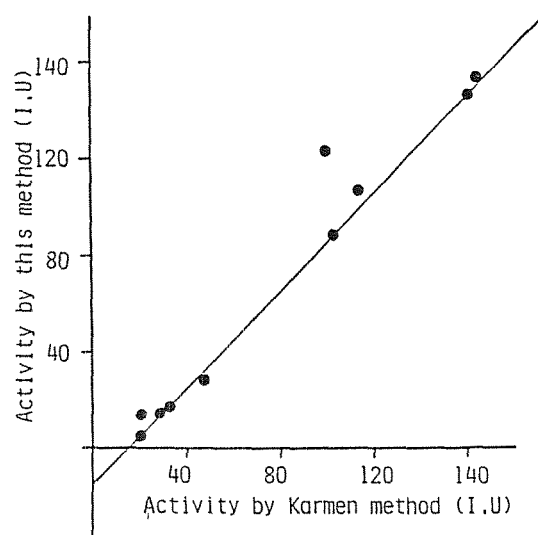


Fig. 70: Relationship between the GOT activities determined by modified Karmen method (JSSC method) and NAM-HPLC method

が、実際の血漿、或は血清中のGOT活性測定に應用可能であることが示された。

### 第 3 節 結 論

本法では、従来のカルメン法に比べ50分の1の試料量で分析が可能であった。更に、理論的には、試料量を100分の1に減らすことが可能である。本法は、定量にHPLCを用いているため、測定に時間を要することや、測定可能な範囲が狭いなど今後検討課題を残しているが、NAMにより高感度検出を可能にしたことから、更に、これを改良した優れた分析法の開発が期待できる。

## 第 V 章 総 括

新しい蛍光試薬の開発とその分析への応用により、これまで分析が困難であったいくつかの化合物の微量分析法を確立した。

1) カルボン酸の新しいラベル化試薬として 9-ブロモメチルアクリジンを合成した。この試薬は比較的安価な原料より高収率で調製することができた。この試薬と脂肪酸の反応は、DMF中、TEACの存在下、室温で10分以内に完了し、生成物は冷暗所に保存することにより1週間以上安定であった。HPLCにより15種類の脂肪酸誘導体を分離し、それぞれをpmolレベルで検出・定量することができ、また、血漿中の遊離脂肪酸の分析にも応用が可能であった。更に、簡単なケン化法と組み合わせることにより、油脂の脂肪酸組成分析にも応用が可能であった。

本試薬は、感度的には山口・大倉らの試薬（  
B r - D M E Q ）等には劣るが、反応条件が  
穏和なこと等から、不安定な化合物のラベル  
化に適していると考えられた。

2 ) ヒドロペルオキシドの新しい蛍光検出試  
薬として3種のホスフィン型試薬を合成した。  
これら合成した試薬は何れも無蛍光性であっ  
たが、オキシドに酸化されることにより強い  
蛍光性を示し、特にジフェニル-1-ピレニ  
ルホスフィン（D P P P）オキシドは最も強  
い蛍光性を示したことから、D P P P が蛍光  
試薬として最も有望と期待できた。D P P P  
はヒドロペルオキシドに高い選択性を示し、  
反応は様々な有機溶媒中で進行した。また、  
ヒドロペルオキシドとの反応は60℃で40  
分以内に完了し、ヒドロペルオキシドの濃度  
と蛍光強度の間に良好な直線性を認めた。更  
に、ヨウ素法と比較した結果、両方法間に良  
好な相関性を認めた。本法は、ヨウ素法に比

ベ  $1 \times 10^4$  倍感度が高く、操作の簡便性や多検体の分析においては迅速性においても優れていた。この D P P P は H P L C ポストカラム法における検出試薬としても使用可能であり、 $p m o l$  レベルのヒドロペルオキシドの検出・定量が可能であった。また、ヒト血漿より抽出した脂質を分析した結果、 $20 \sim 40 p m o l / m l$  のホスファチジルコリンのヒドロペルオキシドを検出した。本法は、非常に高感度で、しかも H P L C と組み合わせることにより選択性も更に向上し、今後、この方法の様々な応用が期待できた。

3) N A M と 亜硫酸の発蛍光反応は、2段階反応で進行し、最終的に安定な2種の異性体を与えた。反応生成物を H P L C により分析することにより、数  $100 f m o l$  レベルで亜硫酸の定量が可能であった。この方法を応用することにより、ワイン中の亜硫酸分析法、雨水中の亜硫酸分析法、及び、G O T の活性



測定法を確立することができた。これらの方法は、高感度で簡便性に優れており、また、一般的な分析方法と比較した結果、両方法間に良好な相関性を認めた。

## 謝

## 辞

終わりに臨み、本研究は目黒熙教授の御指導のもとになされたことを記すと共に、ここにその御指導、御校閲、並びに御配慮に謹んで深謝の意を表します。

また、本研究を進めるに当たり、多大なる御助言、御鞭撻を頂きました大類洋助教授に深く感謝致します。

本論文の審査に当たり副査の労をとっていただいた食品衛生学講座・安元健教授、並びに食品学講座・藤本健四郎教授を始め、食糧化学科の教授、助教授の皆様、及び、御退官なされた先生方には、学部、大学院を通して御指導、御鞭撻を賜り心から感謝致します。

更に、本実験を進めるに当り、共に研究活動を援助して下さった松田恒、新藤義之、伊地知節、岩倉毅各氏、並びに色々と御世話になりました元技官の千葉千佳子氏、武山則方氏、丹野裕之氏、高橋裕明博士、西田芳弘

博士、堀浩博士、高山英子氏を始めとする本  
研究室、並びに、食糧化学科の教職員、学友、  
並びに卒業生の皆様に深く謝意を表します。

本研究室で助手を勤められ、現在は農林水  
産省・食品総合研究所に御勤務なされている  
鈴木建夫博士、並びに奥様には、公私に渡り  
色々と御指導、御助言、及び、御配慮を賜り  
心から深謝致しますと共に、今後の更なる御  
発展をお祈り致します。

最後に、長年にわたり暖かく見守り、研究  
生活を支えてくれた両親に対し心から深謝の  
意を表しますと共に末長い健康をお祈り致し  
ます。

## 引用文献

## 第1章

- 1) 今井一洋、沢田嗣朗、渡辺訓行、渡辺秀夫編、超高感度高速液体クロマトグラフィー (学会出版センター、1985)。
- 2) 今井一洋、薬学雑誌、103、1225 (1983)。
- 3) 辻章夫、前田昌子、バイオメディカルクロマトグラフィー II (化学の領域 No. 133) p. 203 (1981)。
- 4) 金岡祐一、薬学雑誌、100、973 (1980)。

## 第2章

- 5) 中村洋、分析化学、34、423 (1985)。
- 6) 裏出令子、鬼頭誠、化学と生物、25、77 (1987)。
- 7) U. M. T. Houtsmuller, Prog. Lipid Res., 20, 889 (1981)。
- 8) 横山信治、生化学、58、153 (1986)。
- 9) 坂田完三、化学と生物、23、557 (1985)。
- 10) 大西正男、藤野安彦、ibid., 25、148 (1987)。
- 11) 油脂化学便覧 (日本油脂化学協会編、丸善) P49。
- 12) 野沢義則、蛋白質・核酸・酵素、31、483 (1986)。

- 13) 鹿取信、油化学、34、911 (1985)。
- 14) 室田逸編、プロスタグランジンの生化学 (東京化学同人)。
- 15) 福島雅典、化学と生物、22、748 (1986)。
- 16-a) 清水孝雄、生化学、58、92 (1986)。
- b) 清水孝雄、化学と生物、25、146 (1986)。
- 17) 加藤忠弘、山口仁宏、上原忠夫、生井恒雄、化学と生物、24、183  
(1986)。
- 18) 小澤高将、*ibid.*、24、418 (1986)。
- 19) 二村典行、木下俊夫、ぶんせき、305 (1982)。
- 20) 中村洋、*ibid.*、561 (1980)。
- 21) M. Yamaguchi, S. Hara, R. Matsunaga, M. Nakamura, Y. Ohkura, *Anal. Sci.*, 1, 295 (1985)。
- 22) M. Yamaguchi, S. Hara, R. Matsunaga, M. Nakamura, Y. Ohkura, *J. Chromatogr.*, 346, 227 (1985)。
- 23) O. Tsuge, M. Nishinohara, M. Tashiro, *Bull. Chem. Japan*, 36, 1477  
(1963)。
- 24) 岩本真樹、吉田滋、廣瀬信吾、薬学雑誌、104、1251 (1984)。
- 25) A. Hulshoff, A. D. Forch, *J. Chromatogr.*, 220, 275 (1981)。
- 26) V. Gutmann 著、ドナーとアクセプター (学会出版センター) p. 22、  
32、150 (1983)。

- 27) S. Lam, E. Grushlza, J. Chromatogr., 158, 207(1974).
- 28) 木原和子、六鹿宗谷、波多野博行、分析化学、33、647(1984).
- 29) F.H. Mattson, R.A. Volpenhein, J. Lipid Res., 4, 329(1963).
- 30) M.J. McCarty, A. Kuksis, J.M.R. Bereridge, *ibid.*, 5, 609(1964).
- 31) 山崎恵、日本食品工業学会誌、34、336(1987).

### 第3章

- 32) R. Usuki, T. Kaneda, Agric. Biol. Chem., 44, 2277(1980).
- 33) 金田尚志、石井清之助、日水誌、19、171(1953).
- 34) T. Kaneda, S. Ishii, H. Sakai, J. Biochem., 41, 327(1954), 42, 561  
(1955).
- 35) 吉岡倭子、金田尚志、油化学、21、361、881(1972).
- 36) R.G. Tovar, T. Kaneda, Yukagaku, 26, 169(1977).
- 37) T. Yamaguchi, Y. Yamaguchi, Agric. Biol. Chem., 43, 2225(1979).
- 38) M. Yoshikawa, S. Hirai, J. Gerontol., 22, 162(1967).
- 39) 内山充、松尾光芳、嵯峨井勝 編著、過酸化脂質と生体(学会出版センター、1985).
- 40) H. Sies 著、井上正康 監訳、活性酸素と疾患(学会出版センター、1987).
- 41) 福沢健治、過酸化脂質と生体(内山充、松尾光芳、嵯峨井勝 編著、学会

出版センター) p. 45 (1985).

- 42) C.H. Lea, *Pro. Royal. Soc. London Ser. B.*, 108, 175(1931).
- 43) 日本油脂化学協会編、基準油脂分析試験法 2. 4. 12-71.
- 44) 渡辺隆夫、米山智、飯村和夫、川口良成、高辻征夫、竹下安日児、高橋弘憲、田中章夫、無類井建夫、川崎恵、*油化学*、36、46 (1987).
- 45) K.Yagi, *Biochem. Med.*, 15, 212(1976).
- 46) 内藤周幸、山中健、*日本老年医学雑誌*、15、187 (1978).
- 47) R.L.Heath, A.L.Tappel, *Anal. Biochem.*, 76, 184(1976).
- 48) K.Kohda, K.Arisue, A.Maki, C.Hayashi, *Japan J. Clin. Chem.*, 11, 306(1982).
- 49) P.J.Marshall, M.A.Warso, W.E.Lands, *Anal. Biochem.*, 145, 192 (1985).
- 50) 宮沢陽夫、金田尚志、過酸化脂質実験法 (金田尚志、植田伸夫 編集、医歯薬出版) p. 109 (1983).
- 51) 嵯峨井勝、過酸化脂質実験法 (金田尚志、植田伸夫 編集、医歯薬出版) p. 98 (1983).
- 52) M.J.Fishwick, D.A.T.Swoboda, *J. Sci. Food Agr.*, 28, 387(1977).
- 53) K.Fukuzumi, E.Kobayashi, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 49, 162(1972).
- 54) E.Bascetta, F.D.Gunstone, C.M.Scrimgeour, J.D.Walton, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 110(1982).

- 55) H. Aoshima, *Anal. Biochem.*, 87, 49(1978).
- 56) 新実験化学講座 15-酸化と還元 I I (丸善)、p 272.
- 57) H. Zorn, H. Schindlbauer, H. Hagen, *Monatsh.*, 95, 422(1964).
- 58) D. C. Nohebel, *Proc. Chem. Soc.*, 307(1961).
- 59-a) Y. Yamamoto, M. H. Brodsky, J. C. Baker, B. N. Ames, *Anal. Biochem.*,  
160, 7(1987).
- b) T. Miyazawa, K. Yasuda, K. Fujimoto, *Anal. Lett.*, 20, 915(1987).
- 60) P. Schierberle, W. Grosh, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 173, 199  
(1981).

#### 第4章

- 61) 原田基夫、神蔵美枝子、谷村顕雄、*ぶんせき*、36 (1980).
- 62) 宮崎元一、*ぶんせき*、888 (1980).
- 63) 日本薬学会編・衛生試験法注解、p. 313 (1980).
- 64) 山懸登、大喜多敏一編、大喜多敏一著、*環境汚染分析法6* (大日本図書)  
p. 8 (1980).
- 65) 山懸登、大喜多敏一編、大喜多敏一著、*環境汚染分析法6* (大日本図書)  
p. 17 (1980).
- 66-a) Dermot A. O'Sullivan, *Chemistry and Engineering News*, January  
28, p. 12(1985).



- b ) 指宿堯嗣、ふんせき、16 ( 1986 ).
  - c ) 村野健太郎、ibid.、635 ( 1985 ).
  - d ) 金野隆光、化学と生物、24 ( 9 )、591 ( 1986 ).
  - e ) 指宿堯嗣、化学、41、12 ( 1985 ).
- 67 ) 奈良安規、辻村克良、分析化学、22、451 ( 1973 ).
- 68 ) H. Takahashi, Y. Nara, K. Tuzimura, Agric. Biol. Chem., 40,  
2493 ( 1976 ).
- 69 ) H. Takahashi, Y. Nara, K. Tuzimura, Agric. Biol. Chem., 42,  
769 ( 1978 ).
- 70 ) 高橋裕明、吉田隆典、目黒熙、分析化学、30、339 ( 1981 ).
- 71 ) S. Matui, K. Kitabatake, H. Takahashi, H. Meguro, J. Inst. Brew., 90,  
20 ( 1984 ).
- 72 ) H. Meguro, C. Takahashi, S. Matui, H. Ohru, Anal. Lett., 16, 1625  
( 1983 ).
- 73 ) W. H. Melhuish, J. Phys. Chem., 64, 762 ( 1960 ).
- 74 ) 渡辺正平、乙黒親男、J. Soc. Brew. Japan、75、818  
( 1980 ).
- 75 ) H. Schanderl, Hanptbibliothek Hess. Forsch. F. Wein-Obst-und  
Gaelenbau, 68、385 ( 1965 ).

- 76) M. T. Lanteaume, P. Ramel, P. Girard, P. Jaumles, M. Gaso, J. Ranan,  
Ann. Eals. Chim., 665, 375(1965).
- 77) M. T. Lanteaume, P. Ramel, P. Jaumles, D. Manin, *ibid.*, 669, 231  
(1969).
- 78) F A O / W H O : Evaluation of the Toxicity of a Number of  
Antioxidants, 6th Report, 12(1969).
- 79) M. Vieira, L. Lepadatu, G. Wurudig, Bull, L'OIV, 488, 926(1971).
- 80) P. Jaulues, *ibid.*, 478, 1321(1970).
- 81) 大塚謙一、戸塚昭、伊藤政光、宮崎光二郎、川松政孝、清水伸一、白上公  
久、佐野英二、J. Soc. Brew. Japan, 68、455(1973)。
- 82) 大塚謙一、戸塚昭、伊藤政光、宮崎光二郎、久能幸二、錢林裕、川松政孝、  
向山治人、*ibid.*、68、460(1973)。
- 83) K. Takeuchi, T. Ibusuki, Bunseki Kagaku, 33, E107(1984).
- 84) A. Karmen, J. Chim. Invest., 34, 13(1955).
- 85) H. Wada, Y. Morino, Vitamins and Hormones, 22, 441(1964).
- 86) E. B. Kearney, T. P. Singer, Biochim. Biophys. Acta., 11, 276(1953).
- 87) T. P. Singer, E. B. Kearney, Arch. Biochem. Biohys., 61, 397(1973).
- 88) A. E. Braustein, The Enzyme, 3rd. ed., 9, 379(1973).
- 89) T. Yagi, H. Kagamiyama, M. Nozaki, Biochem. Biophys. Res. Comm., 90,  
447(1979).

9 0 ) M. Rercasens, M. M. Gabellec, L. Austin, P. Mandel, *ibid.*, 83, 449  
(1978).

9 1 ) 金井泉原著、金井正光編著、臨床検査法提要 (金原出版)、p 5 1 9.

9 2 ) A. Baba, S. Yamagami, H. Iwata, *Anal. Biochem.*, 101, 288(1980).