報 文

エオシンと銀(I) を用いるアデニン及び関連化合物の定量

西村美智子^{®1}, 中 島 桂¹, 藤 本 剛¹, 山口 敬子¹, 藤田 芳一¹

Determination of Adenine and Its Related Compounds Using Eosine and Silver(I)

Michiko NISHIMURA¹, Katsura NAKASHIMA¹, Tsuyoshi FUJIMOTO¹,
Takako YAMAGUCHI¹ and Yoshikazu FUJITA¹

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

(Received 18 April 2005, Accepted 24 June 2005)

A spectrophotometric method for the determination of adenine and its related compounds based on an association complex between [silver-adenine] and Eosine was established. The standard procedure is as follows: The following components were mixed in a 10 ml volumetric flask: a solution containing of adenine, 0.8 ml of a 5.0×10^{-4} mol dm⁻³ silver(I) solution, 2.0 ml of the buffer solution, 1.0 ml of a 0.5% MC(1000~1800 cps) solution and 0.8 ml of a 5.0×10^{-4} mol dm⁻³ Eosine solution. The mixture was diluted to 10 ml with water, transferred into a test tube, mixed well and kept at 60°C for 20 min. After cooling for 5 min in water, the absorbance of the resultant solution was measured at 560 nm against a reagent blank prepared under the same conditions. This method can be used to determine 0.1~1.5 µg/ml adenine; the molar absorptivity is 1.1×10^5 dm³ mol⁻¹ cm⁻¹ at 560 nm. This procedure is much more sensitive than the method using the Bratton-Marshall reagent. The relative standard deviation for 8 runs of 0.68 µg/ml adenine was 0.87%. No metal ion interfered in an equimolar ratio of adenine among the examined metal ions. A sensitive preconcentration method for the spectrophotometry of trace adenine that involves the filtration of an association complex on a membrane filter followed by its redissolution or by tristimulus colorimetry, is described. The thermodynamic parameters suggest that the colored complex formed in this reaction system is an association complex between [silver-adenine] and Eosine.

Keywords : adenine and its related compounds determination; spectrophotometry; association complex; eosine and silver(I); preconcentration using a membrane filter.

1 緒 言

アデニンは、核酸を構成する塩基の一つであり、また、アデノシン、アデノシンリン酸 (ATP, cAMP, ADP, AMP), フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD), ニコチンアデニンジヌクレオチド (NAD), 補酵素 A など生体機能物質の構成成分として広く生体中に存在しており、多様な生理作用や病態と密接に関連している。近年、このアデニンの生体内分布、生体内濃度とその変化量、生体内動

態、生理機能などが種々の点で注目されており、それらの解明のために、より簡便な高感度定量法が熱望されている。

一方、分析化学の分野において、1,10-フェナントロリン (Phen) のような錯生成剤と金属イオンとの間で生成する陽イオン性の錯体を、陰イオン会合錯生成剤と反応させイオン会合呈色錯体とし、目的の金属イオンや非金属イオンを定量する方法^{1)~5)}が従来より数多く報告され、広範囲に利用されている。しかしながら、本反応系を利用する生体機能関連化合物の定量法は、ほとんど報告されてない⁶⁾。

¹ 大阪薬科大学薬学部: 569-1094 大阪府高槻市奈佐原 4-20-1

アデニンはプリン塩基に属し、環内に多くの窒素原子を含有しており、マンガン(II)、鉄(II)、コバルト(II)、亜鉛(II)、銅(II)、銀(I)など多くの金属イオンと錯体生成することが知られている^{7)~9)}。今回、アデニン-金属錯体の金属イオンとして銀(I)を用い、アデニン-銀(I)錯体にフルオレセイン系色素のエオシンを共存させるとき、新たな呈色錯体が生成することを見いだした。したがって、今回、銀(I)とエオシンを用いるアデニンの簡便で高感度な吸光光度定量法の開発を目的として検討した。また、本法を、より高感度化することを目的として、メンブランフィルター前濃縮法¹⁰⁾、すなわち、捕集・濃縮した凝集体を再度溶解させ吸光度を測定する方法¹⁰⁾(凝集体溶解法)及び捕集・濃縮した凝集体をメンブランフィルターごとに乾燥させ、色彩色差計を用いてその色差を測定・比較する方法¹¹⁾¹²⁾(凝集体色差法)の2方法についても検討した。

2 実 験

2.1 試 薬

アデニン溶液: アデニン(キシダ化学製)の一定量を 0.1 mol dm^{-3} 硫酸1 mlに溶解後、水を加えて $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ 溶液とした。

Ag(I)溶液: 金属銀(99.99%, 三洋化学製)を硝酸で加熱溶解後、水を用いて $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ 溶液とし、褐色瓶に入れ、保存した。

エオシン: Eosine Y(和光純薬製)を量り、水を加えて $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ 溶液を調製した。

界面活性剤溶液: メチルセルロース(MC, 1000~1800 cps, 東京化成製)約0.5 gを量り、水を加え全量100 mlの0.5% MC溶液を調製し、これを通常の吸光光度法(以下、通常法とする)の分散剤とした。また、メンブランフィルター前濃縮法(MF法)で用いる界面活性剤には、メチルセルロース(MC, 350~550 cps, 東京化成製)約0.05 gを量り、水を加え全量100 mlの0.05% MC溶液を調製した。

緩衝液: 通常法では 0.1 mol dm^{-3} 酢酸- 0.05 mol dm^{-3} エチレンジアミン四酢酸(EDTA)・3Na(pH 5.4)を調製した。MF法では 0.1 mol dm^{-3} 酢酸- 0.05 mol dm^{-3} EDTA・3Na(pH 5.1)を調製した。

その他の試薬は市販の特級品を精製せずそのまま用いた。また、本実験ではミリボア製Academic A 10型Milli-Qによる精製水を使用した。

2.2 装 置

吸収スペクトル及び吸光度の測定: 島津製UV-160型分光光電光度計を用い、セルは層長10 mmの石英製セルを使用した。

pHの測定: 堀場製F-11型ガラス複合電極pHメーター

を用いた。

汙過装置及びメンブランフィルター: 東洋KSG-25型吸引汙過装置及びADVANTEC製メンブランフィルター(複合セルロースエステル製, 孔径 $0.3 \mu\text{m}$, 直径25 mm)を用いた。

色差の測定: CR-400型コニカミノルタ製色彩色差計を用いた。

2.3 定量操作

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

2.3.2 凝集体溶解法による定量操作 10 mlのメスフラスコに、 $0.05 \sim 0.70 \mu\text{g/ml}$ アデニン含有液を加え、次いで $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ 銀(I)液1.0 ml, 0.05 mol dm^{-3} EDTA・3Na- 0.1 mol dm^{-3} 酢酸緩衝液(pH 5.1)1.5 ml, 0.05% MC(350~550 cps)液0.1 ml, $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ エオシン1.0 mlを加え、水で全量10 mlとする。別にアデニンのみを除いて同様に処理して得た試薬空試験液とともに、 60°C で、20分加温、5分水冷し、この溶液を孔径 $0.30 \mu\text{m}$ のメンブランフィルターを用いて吸引汙過し、水で十分洗浄する。捕集した会合体をジメチルスルホキシド2 mlに溶解後の本溶液の吸光度を試薬空試験液を対照に542 nmで測定する。

2.3.3 凝集体色差法による定量操作 捕集した凝集体を直接色差計で測定する場合の凝集体捕集過程操作は、凝集体溶解法に準拠した。メンブランフィルター上に凝集体を捕集した後、十分に自然乾燥させ、色彩色差計を用いて色差を測定する。色の数値化はJISにおいて採用されている $L^*a^*b^*$ 表色系¹³⁾を用い、色差¹⁴⁾を下記に示すように、 ΔE^*ab の数値で表す。

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

3 結果及び考察

3.1 通常法での定量条件の設定

イオン会合錯体生成反応に対する液性の影響を検討したところ、最終的にpH 5.1~5.8に液性調整したとき、560 nmにおける吸光度は最大で一定値を示した。なお、緩衝液の組成としては、共存する金属イオンのマスキング効果

Fig. 1 Absorption spectra obtained under the standard procedure

Adenine taken: 1.36 μg ; Curve 1: Adenine-Ag(I)-Eosine against water; Curve 2: Ag(I)-Eosine against water

Table 1 Color reaction of adenine and its related compounds with Ag(I)-Eosine solution

Compounds ^{a)}	Absorbance at 560 nm	% ^{b)}
Adenine	0.440	100
2,6-Diaminopurine	0.282	64.1
6-Methylaminopurine	0.217	49.3
6-Benzylaminopurine	0.144	32.7
6-Methylmercaptapurine	0.072	16.4
Azathiopurine	0.041	9.3
2-Amino-6-choropurine	0.036	8.2
Theophylline	0.033	7.5
Theobromine	0	0
Caffeine	0	0
Guanine	0	0
Adenosine	0	0
ATP	0	0
Thymine	0	0
Cytosine	0	0

Ag(I): $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; Eosine: $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; 1.0 ml of 1.0% MC (1000~1800 cps); pH 5.4; reference: Ag(I)-Eosine solution; a) Adenine and its related compounds taken, $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; b) Percent with respect to adenine

を期待して, $0.05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ EDTA} \cdot 3\text{Na} - 0.1 \text{ mol dm}^{-3}$ 酢酸緩衝液を用いることとした。

分散剤が共存しないときには生成する会合体はしばらく静置すると沈殿する。したがって、会合体の水溶性化、安定化及び定量感度の上昇を目的として錯体生成反応に関与しにくい非イオン性界面活性剤 (MC, ポリビニルピロリドン, ベクテン, ヒドロキシプロピルセルロース, イヌリン, プラン, カルボキシメチルセルロース, グルテン, コンドロイチン硫酸) を検討したところ, MC (1000~1800 cps) を用いたとき, 安定性及び感度の面で優れていた。MC 量としては, 全量 10 ml に対し 0.5% MC 液 1.0 ml 用いることにした。

次に, イオン会合性錯生成剤の種類とその濃度を検討した。イオン会合性色素としてはエオシン, フルオレセイン, エチルエオシン, エリスロシンなどを検討したところ, $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ エオシン 0.4~1.8 ml を加えたとき, 吸光度は最大で一定値を示した。また, 用いる金属イオンとしては, Ag(I), マンガン(II), 鉄(II), コバルト(II), 亜鉛(II), 銅(II) などのうち, EDTA の共存, 非共存にかかわらず, Ag(I) 以外では錯体を形成し難く, Ag(I) のみが有効であった。用いる Ag(I) の濃度としては, $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ Ag(I) 液を 0.6~1.0 ml を加えたとき, 吸光度は一定値を示した。したがって, 本操作においては, $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ エオシン, $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ 銀(I) 液を各々 0.8 ml 加え, 全量 10 ml にした。

本呈色体の吸光度が一定値を示すまでには, 3 時間以上の室温静置を要したので, 反応時間の短縮を目的として加温温度 (40, 50, 60 $^{\circ}\text{C}$) 及び加温時間について検討した。その結果, 60 $^{\circ}\text{C}$, 20 分以上加温反応させたとき, ほぼ一

定の吸光度を示した。なお, 試薬添加順序の変更による吸光度変化は認められなかった。通常法による吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。

3.2 検量線の作成

2.2.1 の定量操作に従ってアデニンの検量線を作成したところ, 0.1~1.5 μg のアデニン濃度において良好な直線を得ることができた。本操作法による定量感度はモル吸光係数 (ϵ) が $1.1 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を示し, 従来の Bratton-Marshall 試薬を用いる方法の 7 倍以上の感度を示した。また, 相対標準偏差は, 0.87% ($n=8$, 0.68 μg アデニン) であり, 再現性にも非常に優れていた。また, アデニン以外の塩基の反応性を検討した結果を Table 1 に示す。ピリミジン塩基のチミン, ウラシルやプリン塩基のカフェイン, アデノシン, ATP では全く呈色体は生成しなかった。

次に, アデノシン, ATP のようにアデニンを含む化合物について, 加水分解処理操作後の呈色反応について検討したところ, 0.2 mol dm^{-3} 硫酸酸性下, これらの化合物を加熱処理した後, 最終的に液性が pH 5.1~5.8 になるように pH 調整し, 2.3.1 の定量操作を行ったとき, アデニンとほぼ同感度で定量することができた。

3.3 共存物質の影響

本操作法における共存物質の影響をアデニン 0.68 $\mu\text{g/ml}$ を用いて, 検討したところ, Table 2 に示すように, 共存物質の影響が極めて少ないことを認めた。金属イオンの共存の影響は全く見られなかった。陰イオンとしては,

Table 2 Effect of foreign substances

Substances	Molar ratio sub/adenine	Absorbance at 560 nm	Recovery
None	—	0.440	100.0
Ca(II)	20	0.440	100.0
Fe(II)	20	0.440	100.0
Cu(II)	20	0.440	100.0
Mn(II)	20	0.440	100.0
Co(II)	20	0.440	100.0
Zn(II)	1	0.440	100.0
Al(III)	20	0.440	100.0
NaCl	20	0.440	100.0
NaH ₂ PO ₄	100	0.440	100.0
NaI	1	0.440	100.0
Na ₂ SO ₄	100	0.440	100.0
KNO ₃	100	0.440	100.0
Citric acid	100	0.440	100.0
Oxalic acid	100	0.440	100.0
Glucose	100	0.440	100.0
Thymine	20	0.440	100.0
ATP	2	0.497	113.0
	1	0.440	100.0
Guanine	1/10	0.343	78.0
	1/20	0.440	100.0

Adenine taken, 0.68 $\mu\text{g/ml}$; Ag(I): $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$;
Eosine: $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; 1.0 ml of 1.0% MC (1000 ~
1800 cps); pH 5.4; reference: Ag(I)-Eosine solutions

HSAB (hard and soft acids and bases) 則における軟らかい塩基に属するヨウ化物イオンの共存は、多量共存で妨害することを認めた。一方、単独では呈色反応しなかったプリン塩基のグアニンは微量共存下でも負の誤差を示した。

3.4 MF 法での定量条件の設定と検量線

液性の影響を検討したところ、最終的に pH 4.3 ~ 5.4 に液性を調整したとき、542 nm における吸光度は最大で一定値を示した。また、非イオン性界面活性剤を検討したところ、0.5% MC (350 ~ 550 cps) 液を全量 10 ml に対し 0.1 ml を用いたとき、安全性及び感度の面で優れていた。また、エオシン及び Ag(I) 量を検索したところ、各々 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ 1.0 ml を用いたとき、542 nm での吸光度は最大であった。次に、会合体の捕集、濃縮に用いる溶解剤及び MF の材質と孔径について検討した。まず、MF ごと溶解させる溶媒としてジメチルスルホキシド、メチルセロソルブ、アセトン、*N,N*-ジメチルホルムアミドなどの有機溶媒を検討した結果、ジメチルスルホキシドを用いたときが吸光度は最大であった。次に材質について、セルロース混合エステル、親水性ポリビニリデンジフロライド (PVDF)、疎水性 PVDF、ポリカーボネートを検討した結果、セルロース混合エステルが最適であった。また、孔径については、0.3 μm のセルロース混合エステルを用いたときが最も効率よく、また再現性よく凝集体を捕集することができた。本操作法により検量線を作成したとこ

Fig. 2 Absorption spectra of Adenine-Ag(I)-Eosine DMSO solution (Curve 1) and Adenine-Ag(I) DMSO solution (Curve 2) after membrane filter preconcentration technique

Adenine taken: 0.40 μg ; Reference: water

Fig. 3 Pictures of aggregates collected on membrane filters

ろ、0.05 ~ 0.70 μg のアデニン濃度範囲で良好な直線が得られ、定量感度は通常法のほぼ 3 倍上昇することを認めた。0.27 μg 定量時における相対標準偏差 (RSD) は 2.57% ($n = 6$) であった。凝集体溶解法での吸収スペクトルを Fig. 2 に示す。

また、凝集体色差法により検量線を作成したところ、0.03 ~ 0.30 μg のアデニン濃度範囲で良好な直線が得られ、0.14 μg 定量時における RSD は 3.55% ($n = 6$) であった。参考までに捕集した凝集体の写真及び電子顕微鏡写真を Fig. 3 及び 4 に示す。

3.5 呈色体のキャラクタリゼーション

本反応系すなわち [Ag-アデニン] とエオシン間で生成する会合体の結合パラメーターをモル比法、連続変化法及び複両逆数プロット¹⁵⁾¹⁶⁾を用いて算出した。その結果、呈色体のモル比としては、Ag(I): アデニン = 1:1 及び、[Ag-アデニン]: エオシン = 1:1 で、また、結合サイト数 $n = 1.02$, 結合定数 $K = 4.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ の値が得られた。次に、van't Hoff プロットを用いて熱力学的パラメーター

Fig. 4 Scanning electron microscope (SEM) pictures of the aggregates collected on membrane filters
(a) Reagent blank {Ag(I)-Eosine}; (b) Sample {adenine-Ag(I)-Eosine}

を求めた. 一般的に会合体の標準エネルギー変化は, 生成定数 (K) を用いて次のように表される.

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

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

ΔG^0 , ΔH^0 , ΔS^0 , はそれぞれ Gibbs の自由エネルギー変化, エンタルピー変化, エントロピー変化を示し, R , T は定数である. したがって, $\ln K$ を T^{-1} に対してプロットする (van't Hoff プロット) と直線が得られる. 直線部分の勾配が $-\Delta H^0/R$, 切片が $\Delta S^0/R$ となり, これより ΔH^0 , ΔS^0 及び ΔG^0 を求めることができる. その結果, $\Delta G^0 = -6.05 \text{ kcal mol}^{-1}$, $\Delta H^0 = -26.42 \text{ kcal mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = -68.35 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ の値が得られた.

したがって, [Ag-アデニン]錯体とエオシン間で生成する会合体は, 正の電荷を帯びた [Ag-アデニン] と負

の電荷を帯びたエオシンとの静電相互作用によるイオン会合錯体であると考えられる.

本研究は, 平成 16 年度文部科学省ハイテク・リサーチ補助金による助成を一部受けた. 記して謝意を表する.

(2005 年 5 月, 第 66 回分析化学討論会において一部発表)

文 献

- 1) A. K. Babko: *Talanta*, **15**, 721 (1968).
- 2) A. T. Pilipenko, M. M. Tananaiko: *Talanta*, **21**, 501 (1974).
- 3) P. R. Haddad: *Talanta*, **24**, 1 (1997).
- 4) Z. Marczenko: *Chem. Anal. (Warsaw)*, **24**, 551 (1979).
- 5) 本水昌二, 岩知道正, 桐栄恭二: *ぶんせき (Bunseki)*, **1980**, 234.
- 6) Y. Fujita, I. Mori, K. Fujita, Y. Nakahashi, T. Tanaka: *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 5004 (1987).
- 7) T. Beringhelli, M. Freni, F. Morazzoni, P. Romiti, R. Servida: *Spectrochim. Acta*, **37A**, 763 (1981).
- 8) A. N. Apeca, C. M. Mikulski, F. J. Iaconianni, L. L. Pytlewski, N. M. karayannis: *J. Inorg. Chem.*, **43**, 2771 (1981).
- 9) C. M. Mikulski, S. Cocco, N. de Franco, T. Moore: *Inorg. Chim. Acta*, **106**, 89 (1985).
- 10) 田口 茂, 笠原一世, 波多宣子: *分析化学 (Bunseki Kagaku)*, **7**, 505 (1995).
- 11) 横田文彦, 阿部重喜: *分析化学 (Bunseki Kagaku)*, **46**, 689 (1997).
- 12) 遠藤昌敏, 横田文彦, 水口仁志: *ぶんせき (Bunseki)*, **2002**, 9.
- 13) JIS Z 8729, 色の表示方法 - $L^*a^*b^*$ 表色系及び $L^*u^*v^*$ 表色系 (2004).
- 14) JIS Z 8730, 色の表示方法 - 物体色の色差 (2004).
- 15) 関口慶二, 岩鶴素治: *薬理学*, **39**, 43 (1979).
- 16) 藤田芳一, 森 逸男, 松尾敬子: *分析化学 (Bunseki Kagaku)*, **44**, 733 (1995).

要 旨

プリン塩基のアデニンが環内に多くの窒素原子を有しているため, 銅(II), 鉄(II), 銀(I) などの金属イオンと錯体生成することに着目し, [金属-アデニン]錯体と有機試薬とのイオン会合錯体を利用するアデニンの定量法について検索した結果, 金属イオンとして銀(I) を, イオン会合性色素としてエオシンをそれぞれ用いるとき, アデニンとの間に鮮明な呈色体が生成することを認め, 本反応を利用する簡便, 高感度なアデニンの吸光光度定量法を開発した. 本操作法による定量感度はモル吸光係数 (ϵ) が $1.1 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ と, 従来の Bratton-Marshall 試薬を用いる方法の 7 倍以上の感度を示し, 相対標準偏差は, 0.87% ($n = 8$, $0.68 \text{ } \mu\text{g/ml}$ アデニン) であり, 再現性にも非常に優れていた. また, 本法のより高感度化を目的としてメンブランフィルター前濃縮法を利用した, (1) 凝集体溶解法, (2) 凝集体色差法, の 2 方法について検討を加えた. 呈色体のキャラクタリゼーションについても一部検討した.