チオセミカルバゾンを経標準物質とするピルビン酸塩の純度検定

西村 民男, 土井 播人, 今井 利夫, 逸見 一穂*

(1968 年 12 月 30 日受理)

ピルビン酸のチオセミカルバゾンを経標準物質とするピルビン酸塩の純度検定の定量条件について検討を行なった。この方法によって得られる定量値とセリメトリーおよびヨウ素法(肝機能研究班法および Wield 法)によって得られる定量値とを比較したところ肝機能研究班法以外はすべて同一の定量値を与えた。

これらの方法のうちチオセミカルバゾン法は最も簡便であり、誤差も少なく、感度も高い方法であることを明らかにした。

1 緒 言

血清トランスアミナーゼ活性の測定は Reitman ら¹⁾による比色分析法の開発とその簡便な測定キットの製品化により臨床検査において広く利用されるようになったが、得られたデータにかなりのばらつきのあることが漸次明らかになってきた。その原因の一つとして市販キットのピルビン酸(PA)基準液の濃度の不統一なことがあげられる²⁾。したがって PA 濃度をなるべく早く統一することが必要であり、それには PA の純度を測定するのに最も適した方法を確立し、基準化することが急務であり、またこの方法は臨床検査室でも実施できる簡便なものであることが望ましいことが日本分析学会臨床検査薬研究懇談会において指摘された。本研究はこの主旨に沿い、同会の活動の一環として行なわれたものである。

従来 PA の定量法としては亜鉛-銅で還元して生成した乳酸をアセトアルデヒドに酸化して亜硫酸水素結合能により定量する方法^{3,4)}、乳酸デヒドロゲナーゼ-NADH 系紫外外部吸収法⁵⁾、ポーラログラフ法⁶⁾、過マンガン酸塩⁷⁾、硫酸セリウム⁸⁾、カルボキシラーゼ⁹⁾を用いる検圧法、ヨウ素滴定法¹⁰⁾、セミカルバジド法¹¹⁾、チオセミカルバジド法¹²⁾、4-ニトロフェニルヒドラジン法¹³⁾、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン法¹⁴⁾、ジアゾニウム塩法¹⁵⁾、 α -メチルインドール法¹⁶⁾などがあるが、その大部分は PA を標準物質とするものである。しかし PA 塩の純品は得がたく、また PA 塩を再結晶により純化することも困難であるとされている。そこで著者らは合成が容易であり、精製も簡単であり、また安定性もよい物質を標準

物質とし、またなるべく単純な定量系を選ぶという観点からチオセミカルバゾン(TSO)を経標準物質とする PA の定量法を検討してみることにした。

なお、一般には PA 塩の純度検定には肝機能研究班ヨウ素法¹⁷⁾が標準法として使用されているので、この方法による定量値との比較、またセリメトリーによる定量値との比較検討も行なった。

2 標準物質および試薬

2.1 ピルビン酸チオセミカルバゾンの合成

エタノール水溶液(1:1) 60 ml にチオセミカルバジド(mp 175~177°C) 2.7 g を加温溶解後、暖かいうちに PA-Na 3.3 g を加えて溶解する。次に濃塩酸 2.8 ml を加えて溶液の pH を 2.5 にしたのち、水浴上で 30 分間加熱する。一晚冷蔵庫に放置後、結晶を濾別し、エタノール水溶液(1:1)で 2 回洗い風乾する。mp 188°C(分解)の無色柱晶 4.2 g (87%) が得られる。これをエタノール水溶液(1:1) 20 ml から再結晶する。mp 189°C(分解){文献値 mp 189°C(分解)¹⁸⁾, mp 201°C¹⁹⁾}、赤外スペクトル: 3430, 3310, 3200 (N-H)(文献値¹⁹⁾. 3430, 3310, 3200)。

数回の合成試料につき炭素、水素、窒素の元素分析を行なったところ計算値に一致し、また後述の PA 塩の純度検定法(4.2)に準じて測定した分子吸光係数も一致した。分子吸光係数は 290 m μ において 1.93×10^4 ** であった。T. L. C. は吸着相にシリカゲルを用い、展開溶媒としてエタノール: 水(1:1)を用いたところ単一なスポットを与えた。

* 北里大学衛生学部化学科: 東京都港区白金 5 丁目

** JIS K 8005 に従いセルの補正を行なった。

2.2 試薬および試料

チオセミカルバジドは自製のチオセミカルバジド{mp 180~181°C (分解)}を使用した。市販品を蒸留水で再結晶して使用してもよい。

他の試薬は和光純薬製特級品を使用した。

ビルビン酸ナトリウムおよびリチウムは和光純薬、第一化学、ヤトロンの製品を使用した。これらは経時変化によりわずかではあるが純度の低下をきたすことがあるので、定量値の比較は短期間に同一試料を用いて行なった。

3 装 置

吸収スペクトルの測定には日立自記分光光度計 EPS-3 型、紫外部の吸光度測定には島津分光光度計 QR-50 型を使用した。

4 実験結果

4.1 定量条件の検討

PA-TSO およびチオセミカルバジド (TSI) 溶液の吸収曲線を Fig. 1 に示す。PA-TSO は水溶液中では 282 m μ に 0.01N 酸溶液中では 290 m μ に吸収極大を示すが、PA-TSO 単独の溶液では PA と TSI への解離が起こるため吸光度は B, B' のように低くなる。この解離を防ぐため種々の濃度の TSI の存在下に吸光度を測定してみると酸溶液では PA 塩と TSI のモル比が 90 以上で一定となることがわかる (Table I)。このモル比が 100 のときの吸収曲線は A, A' のようになり TSI 単独の吸収曲線は C のようになる。

Fig. 1 Ultraviolet absorption spectra of PA-TSO and TSI

A, A': PA-TSO (0.015 mM) + TSI (1.5 mM); B, B': PA-TSO (0.015 mM); A, B: Aqueous solution; A', B': 0.01N HCl solution; C: TSI (1.5 mM)

そこで PA-TSO 形成に際して TSI が消費されることも考慮に入れて 100 倍の濃度の TSI の存在下に定量を行なうことにした。この際中性条件下では Table II に示すように縮合が完了するのに約 6 時間を必要とする

が、酸性条件下では Table III に示すように 10 分で縮合が完結して 120 分まで吸光度は一定であった。

Table I Effect of TSI concentration on absorbance in 0.01N H₂SO₄ solution

Molar ratio (TSI/PA)	20	50	75	90	100	120
Absorbance† (%)	95.3	98.6	98.6	100.0	99.0	99.6

† Percent of maximum absorbance

Table II Effect of standing time on absorbance in aqueous solution

Time (hr)	2	4	6	8
Absorbance† (%)	98.7	99.4	100.0	99.7

† Percent of maximum absorbance

Table III Effect of standing time on absorbance in 0.01N HCl solution

Time (min)	10	20	30	60	120
Absorbance† (%)	99.3	99.3	99.6	99.6	100.0

† Percent of maximum absorbance

4.2 定量方法

ビルビン酸チオセミカルバジド溶液: PA-TSO (MW 161.2) a mg (約 48 mg) を正確にはかり取り蒸留水に溶解し 200 ml とし、さらにこの 2 ml を 100 ml に希釈する (約 3×10^{-2} mM)。

ビルビン酸塩溶液: PA-Na (MW 110.1), または PA-Li (MW 112.0) b mg (約 33 mg) を蒸留水に溶解して 200 ml とし、さらにこの 2 ml を 100 ml に希釈する (約 3×10^{-2} mM)。

チオセミカルバジド溶液: TSI (MW 91.14) 約 27 mg を 0.02N 硫酸または塩酸 100 ml に溶解する (約 3 mM)。

定量操作は Table IV に記載のように行ない次式により純度を求める。

Table IV Procedure of TSO method

	(1)	(2)	Blank
TSI	10 ml	10 ml	10 ml
PA-TSO	10 ml		
PA		10 ml	
H ₂ O			10 ml
	For more than 10 min at room temp.		
Absorbance at 290 m μ	A ₁	A ₂	

TSI: Thiosemicarbazide solution in 0.02N H₂SO₄ or HCl (ca. 3 mM); PA-TSO: Pyruvic acid solution (ca. 3×10^{-2} mM); PA: Pyruvate solution (ca. 3×10^{-2} mM)

$$\text{純度 (\%)} = \frac{f}{161.2} \times \frac{A_2}{A_1} \times \frac{a}{b} \times 100$$

ただし, f は Na 塩では 110.1, Li 塩では 112.0 である。

この方法を用い PA-Na を 7 回分析したところ純度は 96.3%, 標準偏差は 0.75 であった。

4.3 各種方法の定量値の比較

TSO 法で求めた PA-Na および PA-Li の純度を肝機能研究ヨウ素法およびセリメトリー²⁰⁾による定量値と比較すると Table V に示すとおりであり, 肝機能ヨウ素法がやや低い定量値を与え, TSO 法とセリメトリーによる定量値は一致した。ヨウ素法で定量した場合, アセトアルデヒドは 2% 程度低い定量値が得られ²¹⁾, アセトンは 2% 程度高い定量値を与える²²⁾ことが知られている。また Haag ら²³⁾はピルビン酸に対しヨウ素が大過剰にないと反応は定量的に進行しないことを明らかにしており, 肝機能ヨウ素法では正しい定量値を与える条件が選ばれていないのではないかと考えられる。そ

Table V Comparison between various method in purity determination

Methods	Purity (%)	
	PA-Na	PA-Li
TSO	97.1	98.6
Cerimetry	98.4	98.9
Indometry†	94.4	95.3

†Kankino method

Table VI Comparison between TSO and Wieland methods

Methods	Purity (%)	
	PA-Na	PA-Li
TSO	96.1	96.4
Wieland	96.9	96.6

Table VII Difference between Kankino and Wieland methods in purity determination

Kankino method		Wieland method	
PA (1 mg/dl)	10 ml	PA (1 mg/dl)	10 ml
H ₂ O	40 ml	H ₂ O	10 ml
0.1N I ₂	20 ml	0.1N I ₂	20 ml
7.5N NaOH	5 ml	1N NaOH	5 ml
For 5 min. at room temp.		For 90 min. at room temp.	
10N H ₂ SO ₄	10 ml	1N H ₂ SO ₄	10 ml
0.1N Na ₂ S ₂ O ₃		0.1N Na ₂ S ₂ O ₃	

こでヨウ素法の原法である Wieland 法²⁴⁾を用い TSO 法による定量値との比較を行なったところ Table VI に示すように両者の値は一致した。肝機能研究法と Wieland 法との差異は Table VII に示すとおりであり, おもな違いはアルカリ濃度と反応時間であるが, 前者が低い定量値を与える原因については今後の検討にまたなければならない。

5 考 察

TSO 法は標準物質の精製が容易であり, 定量系には水と無機酸のみが用いられ, 操作も簡単で感度も非常によい。ピルビン酸塩そのものの純度検定にはヨウ素法, セリメトリーが用いられるとしてもトランスアミナーゼ活性測定キットに付属した 2mM のピルビン酸標準液の純度検定にはあまりにも多くの試料を必要とし, まったく実用的ではない。したがってきわめて微量の試料で済む TSO 法は紫外部で測定しなければならない欠点はあるにしても, 安価な分光光度計が市販されるようになりつつある現在では検査室にも取り入れることのできる方法であると思われる。

最後に, 有益な助言を賜った臨床検査薬研究懇談会の委員長田村善蔵教授をはじめ委員および会員のかたがた, ならびにピルビン酸塩を提供してくださった和光純薬, 第一化学薬品, ヤトロンの各社に対して謝意を表す。

(昭和 43 年 10 月 8 日, 日本分析
化学会第 17 年会において発表)

文 献

- 1) S. Reitman, S. Frankel: *Am. J. Clin. Path.*, **28**, 56 (1957).
- 2) 北村元任, 手嶋典江, 中山年正: 医学のあゆみ, **63**, 210 (1967).
- 3) W. B. Wendel: *J. Biol. Chem.*, **94**, 717 (1932).
- 4) T. E. Friedemann, M. Cottonio, P. A. Shaffer: *ibid.*, **73**, 335 (1927).
- 5) F. Kubowitz, P. Ott: *Biochem. Z.*, **314**, 94 (1943).
T. Bücher, R. Czck, W. Lamprecht, E. Latzko (H. U. Bergmeyer, Ed.): "Pyruvate in Method of Enzymatic Analysis", p. 253, 324 (1963).
- 6) F. Santavy: *Bull. soc. chem. biol.*, **31**, 1211 (1949).
- 7) C. Long: *Biochem. J.*, **36**, 807 (1942).
- 8) J. K. Palmer, C. O. Jensen: *Anal. Chem.*, **26**, 1049 (1954).
- 9) A. Meister: *J. Biol. Chem.*, **197**, 309 (1952).
- 10) F. P. Clift, R. P. Cook: *Biochem. J.*, **26**, 1788 (1932).
- 11) J. MacGee, M. Doudoroff: *J. Biol. Chem.*, **210**, 617 (1954).
- 12) J. L. Demare, E. Bisagni: *Bull. soc. chem. biol.*, **48**, 992 (1966).

- 13) H. D. Dakin, H. W. Dudley: *J. Biol. Chem.*, **15**, 127 (1913).
- 14) D. J. D. Hockenhull, G. D. Floodgate: *Biochem. J.*, **52**, 38 (1952).
- 15) G. Leonhardi, I. V. Glasenapp, K. Felix: *Z. Physiol. Chem.*, **286**, 28 (1950).
- 16) Z. Dische, R. Weil, E. Landsberg: *J. Biol. Chem.*, **208**, 23 (1954).
- 17) 柴田 進, 北村元任: “日常臨床生化学定量法”, p. 414 (1963), (中山書店).
- 18) J. Gut: *Chem. Listy*, **51**, 1947 (1957).
- 19) B. A. Gingras, R. W. Hernal, C. H. Bayley: *Can. J. Chem.*, **38**, 714 (1960).
- 20) C. Fromageot, P. Densuelle: *Biochem. Z.*, **279**, 174 (1935).
- 21) 船久保英一: “有機化合物確認法”, I, p. 381 (1967), (養賢堂).
- 22) S. Bose, G. E. Goltz, D. N. Glen: *Anal. Chem.*, **29**, 816 (1957).
- 23) E. Haag, C. Dalphin: *Helv. Chim. Acta*, **26**, 246 (1943).
- 24) H. Wieland: *Ann.*, **436**, 233 (1924).

☆

Purity determination of pyruvate by spectrophotometric method with its thiosemicarbazone

as a standard substance. Tamio NISHIMURA, Makito DOI, Toshio IMAI and Kazuho HENMI (Department of Chemistry, School of Hygienic Sciences, Kitasato University, Minato-ku, Tokyo)

In connection with the determination of transaminase activity by the method of Reitman and Frankel, a simple and reliable method for determining the purity of pyruvate is demanded.

A spectrophotometric method has been studied with pyruvic acid thiosemicarbazone as a standard substance because of its stability and easiness of preparation. However, the dissociation of the thiosemicarbazone to pyruvic acid and thiosemicarbazide occurred in aqueous solution, resulting in reduced absorbance (Fig. 1). The dissociation was completely counteracted by the presence of large excess of thiosemicarbazide (Table I), and the time required for complete condensation of thiosemicarbazide with pyruvic acid was shorter in acidic medium than in neutral medium (Tables II and III).

In due consideration of these results, the procedure for purity determination was decided as shown in Table IV. For a pyruvate sample it gave the result in close agreement with that by cerimetry or Wieland's iodometry (Tables V and VI). The thiosemicarbazone method was very simple and sensitive. The standard deviation was 0.75%.

(Received Dec. 30, 1968)

化成肥料中の 4-アミノ-1,2,4- トリアゾールの吸光光度定量

武内 次夫, 鈴木 義仁, 塗師 若子*

(1969 年 1 月 13 日受理)

4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩 (以下 ATC と略記) を含む化成肥料を水で抽出し, この抽出溶液に水酸化ナトリウムを加えて, 強アルカリ性にしたのち, メタニトロベンゼンスルホンクロライド (以下 *m*-NBC と略記) のメタノール溶液を加え, 加温反応させると顕著な黄色溶液となる. この溶液の発色はきわめて安定であり, 420 m μ 付近に吸収極大を示す. この波長で ATC の濃度とその溶液の吸光度はベールの法則に従い, 水溶液中 2 μ g/ml 以上の ATC の定量が可能である. この黄色を呈する溶液中の生成物については, 連続変化法による検討の結果, その組成は $[\text{O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{Cl}][\text{C}_2\text{H}_4\text{N}_4]$ と推定された.

1 緒 言

化成肥料に配合される尿素などの窒素成分は, 速効性であって, 土壤に施用したとき, 土壤微生物により硝酸

態に酸化されやすく, 土壤粒子に吸着されないため, 溶脱されたときに, 窒素ガスとなって揮散してしまい, 作物に有効に利用されにくく化成肥料としての効果がじゅうぶんでない. そこで化成肥料にアンモニア態窒素の硝酸化成作用を抑制する ATC を加えることは, 窒素成分の有効利用ならびに肥効を持続させるうえに, きわめて

* 名古屋大学工学部合成化学科: 名古屋市千種区不老町