8-ヒドロキシキノリンによるヒドロキシウレアの比色測定

大村 浩久*, 鳥巢 隆雄**, 篠原 和毅*, 飯尾 雅嘉*

* 九州大学農学部食糧化学教室

**大日本インキ化学工業株式会社

Colorimetric Determination of Hydroxyurea with 8-Hydroxyquinoline

Hirohisa Omura*, Takao Tosu**, Kazuki Shinohara*, Masayoshi Iio*

*Food Chemistry Institute, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka

**Dainippon Ink Chem. Eng. Co., Ichihara, Chiba

J. Jap. Soc. Food and Nutr., 24(7), 382~387 (1971)

Hydroxyurea is tentatively suggested to be one of the most reasonable reaction product from urea by urea dehydrogenase. Because hydroxyurea has been colorimetrically estimated with *p*-dimethylamino-benzaldehyde as urea or its derivatives, a procedure for independent estimation of the former from the latter has been required. It was observed that hydroxyurea turns yellowish green with 8-hydroxyquinoline similar to hydroxylamine, while urea and its derivatives not. In the absorption spectrum of the colored solution of hydroxyurea, a peak is observed at 425 m μ and no absorption over about 600 m μ . On the other hand, in the case of hydroxylamine, the main peak at 710 m μ and the second one at 425 m μ are determined. By discussing some conditions such as buffers, sodium carbonate, coloring temperature and time, the method was established as follows for colorimetry of hydroxyurea, by which urea and its derivatives can not be determined. A mixture of 1 ml hydroxyurea, 1 ml 0.2 M Tris buffer (pH 7.5), 1 ml 1% 8-hydroxyquinoline, 1 ml 1 M Na₂CO₃ and H₂O to be 5 ml of total volume was incubated at 40°C for 3 hours and the optical density was estimated at 425 m μ . The absorbancy is proportional to concentration of hydroxyurea in a range between 5×10^{-5} M and 10^{-3} M.

However, because similar and much intensive coloration was brought about by hydroxylamine, estimation of hydroxyurea was disturbed, although the colorimetry of hydroxylamine was not interfered by hydroxyurea. In addition, similar coloration was observed with several substances such as phenylhydrazine, semicarbazide and others, which also disturb the estimation of hydroxyurea.

(Received June 28, 1971)

近年ヒドロキシウレアがたとえば DNA の合成を特異的に阻害するものとしてその機能が注目され、ウイルスや癌に関連してそれらの研究に広く利用されるようになってきた^{1)~3)}。このヒドロキシウレアが食糧成分として存在しているか否かは確められていないが、それが生物組織に含まれるという可能性を全く無視することはできない。すなわちヒドロキシウレアは著者ら⁴⁾が発見した尿素脱水素酵素の反応生成物の有力な一つであるということは理論的に推定される。著者らは前報⁵⁾においてこのような観点からヒドロキシウレアの諸性質について検討し、とくにカタラーゼやウレアーゼに対する阻害作用やその化学構造などとも関連して無機窒素代謝系におけ

るヒドロキシルアミンに相当するものと推定した。このヒドロキシルアミンは食糧の無機窒素成分の一つとして確認され、さらにウイルスや突然変異の誘発をはじめ種々の興味ある機能が著者らの研究室において広く研究されてきた⁶⁾。しかし現在までの所ヒドロキシルアミンは主としてオキシムのような結合型として生体組織中に存在し、しかもその量も少ないのでほとんど問題にはなっていない⁷⁾。いずれにしてもヒドロキシウレアがヒドロキシルアミンと同じような位置にあるとすれば、同様な問題は十分に検討しておく必要があり、食糧成分であるか否かを確認する目的ともあわせてすぐれた測定法の確立が望まれるのは当然である。

前報⁵⁾でも述べたようにこのヒドロキシウレアは

-ジメチルアミノベンズアルデヒドと反応して黄色を呈するので 420m μ の吸光度を求めることによって測定される。しかしこの呈色反応は広く尿素誘導体に共通して示されるので⁸⁾⁹⁾、これらとの分離定量には利用できず、従って食糧成分としての確認および、とくに尿素脱水素酵素の反応液などには適用されない。

一方著者らの研究室において無機窒素代謝の研究に際し8-ヒドロキシキノリンによるヒドロキシルアミンの比色定量法を確立した¹⁰⁾¹¹⁾。これはヒドロキシルアミンが8-ヒドロキシキノリンと反応して緑色のインドキシンを生成する反応¹²⁾を利用したものであって、亜硝酸や次亜硝酸が共存してもそれらに影響されずしかも鋭敏なすぐれた方法である。著者らはヒドロキシウレアもこの試薬と反応して黄緑色を呈するが尿素は発色しないことをみいだしたので、この反応をヒドロキシウレアの測定に利用するためその条件を検討した。

実験方法

1. 吸収スペクトルおよび吸光度の測定

吸収スペクトルは既述の方法¹³⁾に従い島津マルチパス自記分光光度計 MPS-50 型で測定し、一方吸光度は主として日立分光光度計 EPU-2 型で常法により求めた。

2. 試薬

1) ヒドロキシウレア 前報⁵⁾記載の方法によってヒドロキシルアミンから合成し5~6回再結した。これにはヒドロシルアミンの混在は認められなかった。

2) 8-ヒドロキシキノリン溶液 8-ヒドロキシキノリン 1g をアルコール 100ml に溶解した。

3) トリス緩衝液 0.2M, pH 7.5 のトリス塩酸溶液

4) 炭酸ナトリウム溶液 1M 水溶液

3. 呈色法

試料 1~2 ml にトリス緩衝液 1 ml, 8-ヒドロキシキノリン溶液 1 ml および炭酸ナトリウム溶液 1 ml を加え(水により全量 5 ml とし)よく振盪混合して発色させたのちその吸光度を測定する。なお対照には試料を加えないものを用いる。この際ヒドロキシルアミン¹⁰⁾¹¹⁾については室温に60分間放置して発色させ、700m μ で吸光度を求めた。

実験結果および考察

1. 呈色液の吸収スペクトル

5 $\times 10^{-3}$ M ヒドロキシウレア溶液を原法によって発色させその可視部における吸収スペクトルを図1に示す。これから明らかなように呈色液の吸収スペクトルは 425m μ ~430m μ 付近に吸収極大を示し、これより長波長側

Fig. 1. Absorption spectra of the colored solution of hydroxyurea, urea and hydroxylamine with 8-hydroxyquinoline.

A mixture of 1 ml 5 $\times 10^{-3}$ M hydroxyurea (HU), 5 $\times 10^{-4}$ M hydroxylamine (HA) or 10 $^{-1}$ M urea (U), 1 ml 0.2M Tris buffer (pH 7.5), 1 ml 1% 8-hydroxyquinoline, 1 ml 1M Na₂CO₃ and 1 ml H₂O was incubated at room temperature for 60 minutes.

に移るに従って吸光度は減少し 600m μ 付近以上ではほとんど吸収を示さない。これに対して尿素ではほとんど発色せず、0.1M溶液においても 430m μ 付近にわずかに極大がある傾向は認められるにしても、その吸光値は無視して差支えない。従ってこの呈色反応によってヒドロキシウレアは尿素が共存しても測定できる可能性は考えられる。

元来本法はヒドロキシルアミンの測定のために改良されたものである。しかもヒドロキシウレアは一般に不安定であってヒドロキシルアミンを生成するといわれている。しかし同じ試薬によるヒドロキシルアミン呈色液の吸収スペクトルには 710m μ 付近に強い極大があり、さらに 425m μ 付近にも第2の吸収が観察され、ヒドロキシウレアの発色機構は明らかでないが少なくともヒドロキシルアミンを経て発色するという推定は否定される。しかもヒドロキシルアミンの呈色は鋭敏であって発色度はヒドロキシウレアのほぼ10倍にも達し、前者による 425m μ の吸収は無視できない。図1の吸収スペクトルは 5 $\times 10^{-4}$ M ヒドロキシルアミンを呈色させたものである。従ってこの両者が共存する場合にはヒドロキシウレアの測定はさらに検討しなければならない。これに対して上述のようにヒドロキシウレア呈色液の吸光度は 600m μ 付近以上ではほとんど認められないので 700m μ で吸光度を測定するヒドロキシルアミンの定量には支障はな

Table 1. Effect of some buffers on coloration

Buffer	None	Tris-HCl			Phosphate			Acetate	Veronal
pH		7.0	7.5	8.0	7.0	7.5	8.0	7.5	7.5
OD ₄₂₅	0.770	0.790	0.850	0.770	0.595	0.680	0.660	0.680	0.720

The same as in Fig. 1 with different buffer and the optical density was estimated at 425 m μ .

い。

2. 測定条件の検討

1) 緩衝液 8-ヒドロキシキノリンによるヒドロキシルアミンの定量法は元来 Magee および Burris¹⁴⁾ によって報告されたものであるが、飯島¹⁵⁾はこの呈色がトリス緩衝液の添加によって著しく増大しそれとともなって精度も向上するが、酵素反応などに通常利用されている酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、ペロナル緩衝液などによっては何ら影響されないことを認めた。そこでヒドロキシウレアの呈色についてもこれら緩衝液の影響をまず同様に検討した。

表1から明らかなようにヒドロキシウレアの呈色もヒドロキシルアミンの場合と同様にトリス緩衝液によって増強された。しかしリン酸または酢酸緩衝液によってはかえって発色は低下し、これらによってはほとんど影響されないヒドロキシルアミンとは異なった。また pH の影響もヒドロキシルアミンではそれほど著しくはなく 7.0ないし 7.5でほぼ同一の吸光度を示すが、ヒドロキシウレアでは pH 7.5 で最も大きい値を示し pH の条件もかなりきびしかった。その機構は明らかでないが、いずれにしてもトリス緩衝液の添加によって呈色度が高められ、しかも pH 7.5 のものが最も望ましいことが明らかになった。

この緩衝液を呈色試薬の一種として使用する時の添加量について検討した。その結果図2に示すようにヒドロキシウレアの呈色もヒドロキシルアミンの場合と同様に 0.2Mトリス緩衝液を 0.75ml加えた時には最高に達しそれ以上では一定であった。従って多少の余裕をみて 1 ml 加えれば十分である。

2) 炭酸ナトリウム つぎに炭酸ナトリウムの所要量を求めた。図3から明らかなようにトリス緩衝液の他に炭酸ナトリウムの添加も必要であり、しかも 1 M溶液 0.75ml 以上加えた場合に吸光度は一定となった。従ってこの場合にもヒドロキシルアミンの際と同様に多少の安全度を見込んで 1 ml 加えることとした。

3) 温度および時間 また種々の温度での発色を図4に示す。これからわかるように 50°C 以上であれば呈色はほとんど一定となり、しかも時間の影響もほとんど認められない。しかし盲検値も大きくなるし、また温度保持上にも好ましいものではない。従って精度は多少劣っ

Fig. 2. Effect of Tris buffer on coloration. Reaction mixture: 5×10^{-3} M hydroxyurea 1 ml, 0.2 M Tris buffer 0~1.5 ml, 1 M Na_2CO_3 1 ml, 8-hydroxyquinoline 1 ml, H_2O 2~0.5 ml. The optical density was estimated at 425 m μ after 60 minutes at room temperature.

Fig. 3. Effect of sodium carbonate on coloration. Reaction mixture: 5×10^{-3} M hydroxyurea 1 ml, 0.2 M Tris buffer 1 ml, 1 M Na_2CO_3 0~2 ml, 8-hydroxyquinoline 1 ml, H_2O 2~0 ml. The same as in Fig. 2.

ても 40°C で発色させた方が実際上都合がよいように思われた。ヒドロキシルアミンの場合呈色は 15°C 以上で一定であって厳寒期以外は室温で差支えないのにくらべると操作上の不利は免れない。

Fig. 4. Coloration at various temperature. The same as in Fig. 1, but the optical density was estimated at $425\text{ m}\mu$ after incubation at $25^{\circ}\sim 60^{\circ}\text{C}$ for 1, 2 or 3 hours.

Fig. 5. Coloration for different time. The same as in Fig. 1, but the optical density was estimated at $425\text{ m}\mu$ after incubation at 30° , 40° or 50°C for 15 min. $\sim$ 3 hours.

また試薬添加後 30°C 、 40°C および 50°C での時間による吸光度の増加を図5に示す。これから明らかなように 50°C では呈色は1時間後に最大となり以後はほとんど変化しなかった。これに対して 40°C では2時間後にはほぼ安定したが、 30°C ではさらに緩慢であって3時間後もなお増加する傾向を示した。従って呈色度は 40°C 3時間後に求めることとした。これに対してヒドロキシルアミンでは上述のように室温でしかも反応時間は1時間で十分である。

こうして最終的にヒドロキシウレアの場合には試験液 1 ml に 0.2 M トリス緩衝液 ($\text{pH } 7.5$) 1 ml 、 1% 8-ヒドロキシキノリン溶液 1 ml 、 1 M 炭酸ナトリウム溶液 1 ml を加え水で全量 5 ml とし、 40°C に3時間放置して呈色

Fig. 6. Standard curve of hydroxyurea. A mixture of 1 ml hydroxyurea, 1 ml 0.2 M Tris buffer ($\text{pH } 7.5$), 1 ml 1% 8-hydroxyquinoline, 1 ml 1 M Na_2CO_3 and H_2O to be 5 ml total volume was incubated at 40°C for 3 hours and the optical density was estimated at $425\text{ m}\mu$ (under condition established for hydroxyurea).

させたのち $425\text{ m}\mu$ における吸光度を測定することとした。種々の濃度のヒドロキシウレアの呈色を図6に示すが $5\times 10^{-5}\text{ M}$ ないし 10^{-3} M の範囲にわたって直線関係があることが確かめられた。

従ってこの方法はヒドロキシルアミンの場合と同一の試薬を同一の割合で用いることができる利点がある。しかし高温長時間の発色条件はアミンより不利である。いずれにしても、この両者が共存する場合大きな欠点は免れないが、ヒドロキシルアミンについては上述のように問題はなく、一方ヒドロキシウレアについても次報¹⁶⁾に示すように実験的に解決することができた。

3. 影響物質

このようにして一応ヒドロキシウレアの比色定量のための条件が確立されたが他の物質の影響などもあらかじめ検討しておかなければならない。

1) 酵素タン白 この研究の目的の一つは生物組織あるいは酵素反応液中のヒドロキシウレアの定量法を確立することにある。そこで尿素脱水素酵素の反応液について試験した。窒素代謝の研究におけるこれまでの経験から植物性酵素標品よりも動物性標品の影響が大きいのので常用してきた鶏肝臓酵素を用いた。すなわち鶏の肝臓抽出液からアセトン分画によって粗酵素を調製した¹⁵⁾。種々の濃度に溶かした酵素液 1 ml に 0.1% NAD 0.5 ml 、 0.2 M トリス緩衝液 ($\text{pH } 7.5$) 0.5 ml 、 10^{-3} M 尿素 1 ml および水 1 ml を加えた反応液にヒドロキシウレア 1 ml を加え直ちに 10% トリクロール酢酸 1 ml を加えて除タン白した溶液について呈色度を求めた。その結果図7に

Fig. 7. Effect of the enzyme preparation on the coloration.

One ml of hydroxyurea was added to the reaction mixture of 1ml fowl liver enzyme solution, 0.5 ml 0.1% NAD solution, 0.5 ml 0.2M Tris buffer (pH 7.5), 1 ml 10^{-3} M urea and 1ml H_2O (for assay of urea dehydrogenase), and 1ml 10% trichloroacetic acid was added at once and centrifuged. For the supernatant, hydroxyurea was assayed as in Fig. 6.

示すようにタン白含量 1.5mg/ml 以内の酵素液では上記条件においてはその共存ならびに除タン白操作の影響は無視される。しかしそれ以上の濃度のものではタン白含量に従って、たとえば吸着などのために呈色度の低下が認められた。

2) 尿素関連物質およびオキシム 尿素脱水素酵素が尿素の同化に関与すると推定されること、ならびに前報⁵⁾で論じたようにヒドロキシウレアの機能に $=N-OH$ 基の役割が考えられることから、尿素ならびにアルギニン、オルニチン、チトルリンなど尿素サイクルの構成成分および $=N-OH$ 基を含むものとしてピルビン酸オキシムおよび α -ケトグルタル酸オキシムの影響を試験したが、いずれも単独では 10^{-2} M でも発色しなかった。またこれらをヒドロキシウレアに加えた混合液の呈色度はヒドロキシウレア単独のものと同じ発色には影響しなかった。従ってこの方法は尿素の同化に関する研究にはそのまま利用できることが推定される。

3) 妨害物質 上述のように本法は元来ヒドロキシルアミンの定量法として開発されたものであって、ヒドロキシウレアの呈色はヒドロキシルアミンの測定には差支えないが逆にヒドロキシルアミンの呈色はヒドロキシウレアの測定に大きく影響することは吸収スペクトルの比較から既に指摘した。

さらにこの呈色法によりアンモニア、アルカリ、アルコール、ヒドラジンなども程度の差はあるがそれぞれ単

Table 2. Coloration by several substances

Compound	Conc. M	OD ₄₂₅
Hydroxyurea	10^{-3}	0.560
NH_4OH	10^{-2}	0.680
NaOH	10^{-2}	0.265
KOH	10^{-2}	0.120
CH_3OH	99%	0.360
C_2H_5OH	99%	0.540
Phenylhydrazine	10^{-4}	0.210
Hydrazine	10^{-2}	0.080
Semicarbazide	10^{-4}	0.100
Isonicotinic acid hydrazide	10^{-3}	0.170
Uric acid	10^{-2}	0.210
Guanidine	10^{-2}	0.000
Methylisourea	10^{-2}	0.000
Phenylthiourea	2.5×10^{-2}	0.025

The same as in Fig. 6.

独で発色することが認められそれらの妨害が予想される。表2から明らかなようにフェニルヒドラジンおよびセミカルバチドの呈色は顕著であってヒドロキシウレアのものよりも大きいことも本法の欠点といえることができる。とくにフェニルヒドラジンの呈色は著しく、しかも次報¹⁰⁾に示すように $490m\mu$ 付近にさらに大きい吸収が観察された。一方イソニコチン酸ヒドラチドの呈色もヒドロキシウレアによるものよりは低いが無視されない。しかしヒドラジンの呈色は微弱であった。また尿酸のほかアンモニアやアルカリさらにはアルコールによっても呈色しヒドロキシウレアの測定にあたってはその妨害を考慮しなければならない。

こうして本定量法が尿素脱水素酵素の研究に適用できることは一応確められたが、天然物の場合抽出法などの検討がさらに必要であることは当然である。この場合これらの影響物質も考慮されなければならない。しかし現在までのところ天然物あるいは加工食品中にヒドロキシウレアの存在は確認されていないので、それが先決であろう。

要 約

8-ヒドロキシキノリンによりヒドロキシウレアは発色し $425m\mu$ に極大を示す吸収スペクトルが観察された。この呈色反応に及ぼす諸条件を検討しヒドロキシウレアの比色定量法を確立した。すなわち試料 1ml に 0.2M トリス緩衝液 (pH 7.5) 1ml, 1% 8-ヒドロキシキノリン 1ml, 1M 炭酸ナトリウム 1ml を加え水で全量 5ml とし、 $40^\circ C$ 3 時間反応させたのち $425m\mu$ における吸光度を測定する。これによって吸光度は 5×10^{-5} M ないし 10^{-3} M の範囲にわたって濃度と直線関係が認められた。

さらに尿素およびその誘導体は本法によって呈色せずこれらとヒドロキシウレアとの分別定量が可能であることが示された。しかしヒドロキシルアミンをはじめフェニルヒドラジン、セミカルバチド、その他の物質による妨害は免れなかった。

文 献

- 1) Young, C. W. and Hodas, S.: *Science*, **146**, 1172 (1964)
- 2) Bendich, A., Borenfreund, E., Korngold, G. C., Krim, M. and Balis, M. E.: *Acidi nucleici e loro funzione biologica*, Instituto Lombardo Fondazione Basselli, p. 214 (1964)
- 3) Yarbrow, J. W.: *Cancer Res.*, **28**, 1082 (1968)
- 4) Omura, H. and Osajima, Y.: *Nature*, **190**, 345 (1961)
- 5) 大村浩久, 塚本 徹, 篠原和毅, 鳥巢隆雄: *栄養と食糧*, **23**, 344 (1970)
- 6) Yamafuji, K.: *Nutritional Factors in Virus*

- Formation, Crosby Lockwood, London (1964)
- 7) Yamafuji, K., Kondo, H. and Omura, H.: *Enzymologia*, **14**, 153 (1950)
 - 8) 足立 達: *科学*, **23**, 582 (1953)
 - 9) 大村浩久, 小野泰道, 水上浩明: *九大農学芸誌*, **22**, 325 (1966)
 - 10) 飯島 豊: *九大農学芸誌*, **18**, 271 (1961)
 - 11) 大村浩久, 飯島 豊, 波多野昌二, 吉原典子, 渡辺健治, 山藤一雄: *九大農学芸誌*, **20**, 179 (1963)
 - 12) Berg, R. and Becker, E.: *Ber. Deutsch. Chem. Ges.*, **73 B**, 172 (1940)
 - 13) 大村浩久, 内田 泰, 尊田民喜: *九大農学芸誌*, **23**, 33 (1967)
 - 14) Magee, W. E. and Burris, R. H.: *Am. J. Bot.*, **41**, 777 (1954)
 - 15) Omura, H. and Osajima, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, **25**, 487 (1961)
 - 16) 大村浩久, 鳥巢隆雄, 篠原和毅, 飯尾雅嘉, 井上義人: 未発表

(昭和46年6月28日受理)