[農化 第 39 卷, 第 6 号, p.227~231, 1965]

Monofluoroacetanilides の毒性発現機構に 関する生化学的研究 (第1報)*

生体内のアニリンおよび *p*-ハロアニリンの微量定量

中 村 利 家 (三共株式会社野洲川工場)

昭和 40 年 2 月 3 日 受 理

ま え が き

先に報告した⁽¹⁾ monofluoroacetanilides の生体内加水分解を研究する目的で, アニリン (An), *p*-ブロムアニリン (*p*BA), および *p*-クロルアニリン (*p*CA) の生体組織からの微量定量法を検討した。

Lowenら⁽²⁾が 3-(*p*-chlorophenyl) 1,1-dimethyl urea の定量に, 酸分解により生じる *p*CA をジアゾ化し, N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NED) とカップリングさせ比色する方法を用いてから, 同様の原理を応用した例⁽³⁻⁷⁾が多く, クロルアニリン類の微量定量法はほぼ確立されている。しかし An の場合は Montogomery ら⁽⁸⁾が isopropyl-N-phenyl carbamate のアルカリ分解後の定量に應用しているが, 比色条件の検討は不十分のように思われた。

また丸山ら⁽⁹⁾は生体内クロラムフェニコールの微量定量で, メタ燐酸除蛋白後の上澄液について, ニトロ基を還元後ジアゾ化し β -diethylaminoethyl- α -naphthylamine oxalate (TSUDA 試薬) とカップリングさせる方法を取り好結果をえている。

本報では, まずカップリング試薬として NED と TSUDA 試薬を比較し, 特に呈色への pH の影響を追求し比色条件を決定したのち, 生体組織からの定量法として, (1) 水蒸気蒸留により分別後比色する方法 (水蒸気蒸留法) と, (2) 塩酸酸性下で遠心分離し上澄液について比色する方法 (酸性遠沈法) を試み, 2~3 の知見を得たので報告する。

カップリング試薬としては NED がすぐれているが,

いずれの場合も呈色時 pH の影響があり, とくに An では呈色の安定化速度への pH の影響が著しかった。生体組織からの定量法としては, 蒸留法は monofluoroacetanilides の共存する場合には問題があり, 酸性遠沈法がすぐれた結果を示した。

実 験 方 法

A. 比色条件の検討

試薬および機器 (1) 4N, 1N および 1/4N 塩酸溶液。 (2) 2% 亜硝酸ソーダ溶液; 使用当日に調製する。 (3) 10% スルファミン酸溶液; 3日ごとに新たに調製し直す。 (4) 1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NED) 溶液; 使用当日に調製する。 (5) 1% N-diethylaminoethyl- α -naphthylamine oxalate (TSUDA 試薬) 溶液; 6日ごとに調製し直す。 (6) アニリン (An), *p*-ブロムアニリン (*p*BA) および *p*-クロルアニリン (*p*CA) 標準液; いずれも精製品を用い 1ml 当り 50 γ を含む液とする。 *p*BA, *p*CA は濃塩酸数滴を加え, 加温して溶解するとよい。 (7) 分光光度計; 日立 EPU 2 型。

なお特に断らない限り試薬類は特級品を使用した。

pH の影響の検討 50 ml メスフラスコに An または *p*BA 標準液 1.5 ml または 3 ml をとり, 蒸留水で 35 ml としたのち, 1/4N, 1N または 4N 塩酸の一定量を加え, 以下検量線の作成の項でのべるごとく操作し, カップリング試薬添加後 30 分おきに吸光度を測定した。最後に pH を測定し, 翌日もう一度吸光度をチェックした。

検量線の作成 50 ml メスフラスコに An, *p*BA または *p*CA 標準液を 1, 2, 3 および 4 ml とり, それぞれ蒸留水で約 35 ml とする。An の場合は 1N 塩酸 1 ml, *p*BA および *p*CA では 4N 塩酸 1~2 ml と 2% 亜硝酸ソーダ溶液 1 ml を加えふりまぜる。5分後に 10% ス

* Studies on the Mechanisms of the Monofluoroacetanilides Poisoning to Mammals. Part I. Microdetermination of Aniline and *p*-Haloanilines in Biological Materials.
By Toshiie NAKAMURA (Yasugawa Factory, Sankyo Co., Ltd.)

ルファミン酸溶液 1 ml を加えときどき強くふりまぜる。さらに 10 分後に 1% NED 溶液 1 ml を加え、An の場合は 90 分以上、*p*BA と *p*CA では 30 分以上たってから、ブランクを対照液として 565 m μ における吸光度を測定する。

なお *p*BA と *p*CA の場合には 1% NED 溶液のかわりに 1% TSUDA 試薬を用いてもよい。

B. 生体内アニリン定量法の検討

試薬および装置 (1) 試薬類; A 項に準じた。ただしカップリング試薬は 1% NED 溶液を用いた。(2) monofluoroacetanilide (FAn) 溶液; 再結品 (純度 F⁻ 値換算 99.0%, m. p. 74~74.5°) を用い 1 ml 中に 200 γ を含む溶液とする。加温して溶解した。(3) monofluoroaceto-*p*-bromoanilide (FBA) 溶液; 再結品 (純度 F⁻ 値換算 99.2%, m. p. 136.5~137°) を用い同様に 1 ml 中に 200 γ を含む溶液とする。(4) マウス組織ホモジネート; ddY 系マウス (♂) の肝臓、腎臓、脾臓、筋肉、脳および血液を分離して、1/10 M-リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用い、1 ml 当り各組織 100 mg を含むホモジネートとした。(5) イースト懸濁液; オリエンタル圧搾酵母を用い同じく 1 ml 当り 50 mg を懸濁させた。(6) ナタマメ粉末およびウレアーゼ液; それぞれ第一化学および Merk 品を用い同じく 1 ml 当り 25 mg を加えた。(7) 水蒸気蒸留装置; 全すり合わせ、容器は 50 ml ナス型コルベン。冷却管下端にガラス管を接続し、受器底部に垂直に達せしめた。(8) 高速遠心機; 15 ml, 12 本架 (佐久間, 15,000 r. p. m., 1/3 HP)。

水蒸気蒸留法 コルベンに An または *p*BA の 100 γ /ml 液 1~4 ml をとり、蒸留水で約 5 ml とし、NaOH

でフェノールフタレン微アルカリ性にしたのち常法どおり水蒸気蒸留した。受器は 4N 塩酸 2 ml を入れたメスフラスコとし、滴下管先端は常に液中においた。約 35 ml または 50 ml を蒸留し、An の場合は一たんフェノールフタレン中性としたのち 1N 塩酸 1 ml を加え、*p*BA の場合はそのまま、検量線作成の項でのべたごとく比色定量した。

なおホモジネート添加の場合は、つねに 1 ml を加え、直ちに蒸留をおこなった。

酸性遠沈法 共栓試験管に An または *p*BA 標準液 1~4 ml をとり、蒸留水で 6 ml とし、1/2 M-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 1 ml, ホモジネートまたは懸濁液 1 ml, および 1N または 4N 塩酸 2 ml を加えしばらく放置した。大部分の液を遠心管にとり、3,500~4,000 r. p. m., 10~15 分間遠心分離し、上澄液 5 ml をメスフラスコにとり、以下前述のごとく比色定量をおこなった。

結果および考察

A. 比色条件の検討

本分析法は、塩酸と亜硝酸ソーダによるジアゾ化、スルファミン酸による過剰の亜硝酸の分解、カップリングおよび比色の各操作からなる。ジアゾ化および過剰の亜硝酸の分解過程にはさして問題はなく、文献例および若干の予備検討のうえ、検量線の作成の項でのべたとおりとした。アニリン類のジアゾ化合物は概して不安定であり長く放置すれば発色が低下するが、室温付近 (20° 前後) ならば低下度はほとんど変わらず、後藤ら⁽⁷⁾が 3,4-dichloroaniline について示したと同様であった。しかし反応時間はできるだけ一定にする必要がある。

呈色物質の最大吸収はいずれの場合にも 565 m μ 付近

第 1 図 Aniline-NED 呈色に対する pH の影響

にみとめられた。

呈色に対する pH の影響 ジアゾ化時の塩酸添加量は呈色にかなり影響するので、カップリング時の pH と

呈色速度および吸光度の関係を検討した。

まず An と NED のカップリングにおいて第 1 図の結果をえた。すなわち呈色が最大に達し安定するには pH

第 2 図 Aniline-TSUDA 呈色に対する pH の影響

第 1 表 *p*-Bromoaniline-NED および TSUDA 試薬呈色に対する pH の影響

カップリング 試 薬	HCl 添加量		吸 光 度				pH
	conc.	ml	30 min	60 min	90 min	16 hrs	
NED	1 N	0.5	0.517	0.511	—	0.480	1.90
	"	1.0	0.527	0.526	—	0.510	1.80
	"	2.0	0.529	0.528	0.528	0.510	1.50
	4 N	2.0	0.530	0.529	0.529	0.512	1.05
	"	3.0	0.528	0.528	0.523	0.511	0.90
TSUDA 試 薬	1 N	1.0	0.526	0.523	0.523	0.510	1.90
	"	2.0	0.538	0.538	0.537	0.523	1.75
	4 N	2.0	0.538	0.538	0.535	0.523	1.00
	"	3.0	0.539	0.538	0.537	0.524	0.90

第 3 図 呈色速度と安定性

1.65~1.95 の範囲において少なくとも 90 分を要する。

時間とともにこの pH 範囲は若干ひろがるが、pH 1.4 以下では 3 時間後においてまだ完全に安定せず、かつ吸光度が低かった。

An と TSUDA 試薬の場合は第 2 図のとおりであり、いずれの pH においても 3 時間後でも呈色が

安定せず、反応速度がおそい。

一方、*p*BA の場合は第 1 表に示したように NED でも TSUDA 試薬でも呈色が非常に速やかであり、いずれも pH 0.9~1.8 の範囲で 30 分後には安定に達した。*p*CA については Young ら⁽⁹⁾が pH 0.6~1.6 で速やかに呈色が最大となることを示しているので追試しなかった。

以上からカップリング試薬としては NED の方がすぐれているが、ジアゾ化時の塩酸添加量は An では 1 N 塩酸 1 ml、*p*BA と *p*CA では 4 N 塩酸 1~2 ml とするのが適当であると思われる。

呈色の安定性 最適 pH における呈色の安定度を第 3 図に示した。An と NED の場合の呈色は非常に安定しており、16 時間後でもほとんど変化しないが、*p*BA と NED または TSUDA 試薬の場合は時間と共にわずかに吸光度が減少する。An と TSUDA 試薬は実用に適しない。

第4図 検量線 (NED)

検量線および測定範囲 カップリング試薬として NED を用いた場合の検量線を第4図に例示した。

An, *p*BA, *p*CA とともに少なくとも 3 p.p.m. 濃度までは Beer の法則にしたがい直線となった。しかし測定の精度上からは吸光度 0.8 程度までの比色とするのが望ましく、測定範囲は An ; 130 γ /50 ml, *p*BA ; 150 γ /50 ml, *p*CA ; 110 γ /50 ml 程度までとするのが妥当と思われる。

ただしこれ以上の場合に希釈して比色し直しても実質的には支障なかった。

B. 生体内アニリン類の定量法

生体内アニリン類の分離定量法としては、抽出法、水蒸気蒸留法⁽⁸⁻⁹⁾、除蛋白処理後上澄比色法⁽⁶⁾などが考えられる。

まず、丸山らの用いた 5% メタ磷酸を加え除蛋白後上澄比色法を試みたが、著しい呈色障害がみとめられた。ついで一般的な水蒸気蒸留法を検討して好結果をえたが、基質としての FAn, FBA 共存の場合には操作がはなはだ面倒になってくると思われた。

よって最も簡便な方法として酸性遠沈法を試み、すぐれた結果をうる事ができた。

水蒸気蒸留法 An および *p*BA の 100~400 γ 量についての水蒸気蒸留による回収率結果は第2表のとおりであった。

An は留出速度がおそく 50 ml 以上蒸留しなければならないが、*p*BA では 35 ml 蒸留で好結果を示した。しかし添加量の増大につれて回収率が若干減少する。実際にマウス組織ホモジネートについての測定結果も同様に良好であった。

しかし FAn, FBA などが共存する場合はそのアルカリ分解を無視できない。マウス組織ホモジネートに FBA

第2表 水蒸気蒸留による回収率 (%)

添加量 (γ)	Aniline				<i>p</i> -Bromoaniline	
	(蒸 留 液 量)				35 ml	
	35 ml	50 ml	50 ml	50 ml	35 ml	35 ml
100	73	80	98	97	99	100
200	80	70	95	95	94	96
300	70	70	93	92	95	95
400	64	65	88	90	90	92

第3表 水蒸気蒸留時の基質加水分解
(FBA 1000 γ , 35 ml 蒸留)

	実 測 値 (γ)					
	肝 臓	腎 臓	脾 臓	筋肉	脳	血液
1	53	47	52	50	50	53
2	45	52	48	51	46	50
Av. 50.0 $\pm$ 1.7 (5%)						$\sigma = 2.94$
± 2.4 (1%)						

1000 γ を添加した場合の加水分解量は第3表のとおりであった。本結果は蒸留条件を厳重に規正しさえすればアルカリ分解(蒸留時)はほぼ一定値におさえうることを示している。しかし当然、基質濃度の変化による影響も考えられるので、基質共存の場合の分析法としては適当でないと思われる。実験の都度、ブランクを測定する必要がある。

酸性遠沈法 強酸による蛋白凝固反応を利用して生体組織や蛋白を遠心分離し、上澄液を比色する方法を試みた。

本研究の目的である amidase は一般に強酸性下ではほとんど活性を失うので、塩酸添加は酵素反応停止剤として用いることができ、しかもそのままジアゾ化時に利用されるので、一連の操作が最も簡便化される。

本実験では、実際の酵素反応液組成に準じ、マウス組織ホモジネート 1 ml を、An または *p*BA 50~200 γ をふくむ約 0.1 M-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 7 ml に加え、1 N または 4 N 塩酸 2 ml 添加後遠心分離し、上澄液をそのまま比色する方法をとった。

結果は第4表に示すごとく、マウス組織ホモジネート、イースト懸濁液、ナタマメ粉末およびウレアーゼ液のいずれにおいても良好な結果であり、平均回収率はほとんど 100% ($\sigma = 1.5 \sim 2.0$) を示した。

本法における塩酸添加量は、前述の比色時 pH の関係から、An では 1 N, *p*BA では 4 N 塩酸 2 ml とするのが望ましい。

第 4 表 酸性遠心分離法による回収率

ホモジネート	回 収 率 (%)			
	アニリン		p-ブロムアニリン	
	(100r)	(200r)	(100r)	(200r)
マウス 肝臓	100.5	99.5	104.0	99.0
マウス 腎臓	101.0	98.5	97.0	100.0
	(50r)	(100r)	(50r)	(100r)
マウス 血液	96.0	99.5	102.0	103.0
イースト	102.0	99.0	100.0	100.5
ナタマメ粉末	100.0	98.0	100.5	99.5
ウレアーゼ	102.0	99.0	102.0	99.5
	Av. 99.6 ($\sigma=1.48$)		Av. 100.6 ($\sigma=2.00$)	

この意味で, An について 1N 塩酸添加の場合と, 4N 塩酸を用い比色前に一度中性にしてから再び 1N 塩酸を加え比色する場合を比較したがほとんど差がなかった,

4N 塩酸添加により上澄液はほとんど完全に澄明になるが, 1N 塩酸添加では組織によってはわずかに白濁がのこり, 血液では暗褐色がぬけない。しかし常にブランクを対照液として比色すれば, 結果には影響がない。

また本条件では, たとえば塩基性蛋白質など完全に除去することはできないと考えられる。しかし残存蛋白質による呈色阻害はほとんどみとめられなかった。

本法の場合, スルファミン酸による過剰亜硝酸の分解時に著しい発泡を見ることが多い。これはカップリング試薬添加後に標線近くまで蒸留水を加えたのち, エタノール数滴を滴下すれば容易に消泡することができる。

なお念のために比色操作中における monofluoroacetanilides の酸分解による影響の有無を, FAn と FBA について検討したが, いずれも吸光度として 0.007 以下であり完全に無視しえた。

以上から生体内アニリン類の微量定量法としては, 酸性遠沈後ジアゾ化カップリング比色法は最も簡便であり, かつ精度も高く, アニライド類などの酵素的加水分解反応の研究にひろく応用しうるものと考えられる。

要 約

Monofluoroacetanilides の生体内加水分解を研究す

る目的で, アニリン (An), p-ブロムアニリン (pBA) および p-クロルアニリン (pCA) の生体組織からの微量定量法を検討した。

分析法としては, ジアゾ化後カップリング試薬と反応させ比色定量する方法を応用し, カップリング試薬としては N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride (NED) と β -diethylaminoethyl- α -naphthylamine oxalate (TSUDA 試薬) の比較をおこなった。いずれの場合にも呈色時 pH の影響があるが, とくに An では呈色安定化速度への pH の影響が著しかった。ジアゾ化時に加える塩酸量と呈色の関係を追求しそれぞれの比色条件を決定した。カップリング試薬としては NED がすぐれている。

生体組織からの分離定量法としては, マウス組織ホモジネートなどを用い, (1) 水蒸気蒸留により分別後比色する方法と, (2) 塩酸酸性下で遠心分離し上澄液について比色する方法を試み, それぞれすぐれた結果をえた。

前者は基質として monofluoroacetanilides が共存する場合の定量には注意を要する。後者は操作も簡便であり, かつ精度が高く, アニライド類の酵素的分解反応の研究には最も適当であると思われる。

本報告は昭和 39 年 12 月 12 日, 日本農芸化学会関西支部第 212 回例会で講演した。

- (1) 中村利家, 伊集院忠正: 本誌, **38**, 401 (1964).
- (2) W. K. Lowen, H. M. Baker: *Anal. Chem.*, **24**, 1475 (1952).
- (3) H. Y. Young, W. A. Gortner: *ibid.*, **25**, 800 (1953).
- (4) W. E. Bleidner et al.: *J. Agr. Food Chem.*, **2**, 476 (1954).
- (5) M. Montgomery, V. H. Freed: *ibid.*, **7**, 617 (1959).
- (6) H. L. Pease: *ibid.*, **10**, 279 (1962).
- (7) 後藤真康, 佐藤二郎: 農薬生産技術, No. **10**, 16 (1964).
- (8) 丸山素弘, 鈴木芳男: 高峰研究所年報, **10**, 158 (1958).