[農化 第 40 卷, 第 1 号, p.13~19, 1966]

Monofluoroacetanilides の毒性発現機構に 関する生化学的研究 (第 4 報)

生体内の置換アニリン類の微量定量について

中村利家, 上田隆之, 田中久一 (三共株式会社農薬研究所)

昭和 40 年 7 月 22 日 受理

Studies on the Mechanisms of the Monofluoroacetanilides Poisoning to Mammals Part IV. On the Microdetermination of Substituted Anilines in Biological Materials

By Toshiie NAKAMURA, Takayuki UEDA and Kyuichi TANAKA
Agricultural Chemicals Research Laboratories, Sankyo Co., Ltd.

In order to study the enzymatic hydrolysis of monofluoroacetanilides, the simplified microdetermination methods of substituted anilines in biological materials were examined.

(1) In case of the nuclear substituted anilines, *p*-iodo, *p*-nitro, *p*-nitro-*o*-chloro, and *p*-methyl anilines and *p*-aminobenzoates, the diazotization and coupling method using *N*-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride as coupling reagent was employed. The maximal development and the stability of the color were remarkably affected by pH of the reaction medium. The optimal pH and the stable period in each compound were determined. The analytical results in mouse liver homogenate were satisfactory with this procedure. (2) When the above method was applied to *p*-aminobenzoic acid and its esters, ethyl, *n*-butyl, and isobutyl esters, it was found that their molar absorptivities were extremely identical. The analytical procedure was able to be simplified, since the hydrolysis of the esters in biological materials was able to be ignored. (3) In case of the *N*-substituted anilines, *N*-methyl and *N*-ethyl anilines, the ultraviolet absorption method (each $\lambda_{\max}$, 238 m μ) was employed. Although the effect on the end-absorbance of *N*-alkyl fluoroacetanilides as substrate was not able to be ignored in this method, a simplified determination method in the hydrolysis system was established, since the total moles of the substrate plus product are always constant. The recoveries of *N*-alkyl anilines in the substrate-product mixture were almost 100%. (σ =about 4) (Received July 22, 1965)

先報^(1,2)につづき種々の fluoroacetanilides の生体における酵素的加水分解を研究する目的で, 分解により生ずる置換アニリン類の微量定量法を検討した。

先に⁽¹⁾アニリン, *p*-ブロムアニリンおよび *p*-クロルアニリンの微量定量にジアゾ化カップリング比色法を応用し, カップリング試薬としては *N*-(1-naphtyl) ethylenediamine dihydrochloride (NED) がすぐれていることを示した。しかし化合物によっては呈色に対する pH の影響が大きかった。

本報では, 核置換アニリン類に対しては先報に準じた

ジアゾ化カップリング法を適用し, 一方これの適用できない *N*-置換アニリン類に対しては紫外外部吸収法を応用しそれぞれすぐれた結果をえた。

p-Aminobenzoates (free acid および低級アルキルエステル) に対するジアゾ化カップリング比色法において, 呈色物の分子吸光係数は非常によく一致することを見出し, 測定を簡便化した。

紫外外部吸収法では, 共存基質としての fluoroaceto-*N*-alkylanilide もまた紫外部に吸収を有するので二成分系の定量になる。本報では, 研究目的にそった, 基質-生

成物共存系における生成物としての N-alkylaniline の簡易決定法をこころみ, すぐれた結果をえた。

実験方法

(1) 定量操作

ジアゾ化カップリング法 試薬および機器: 以下試薬類は特級品をそのまま, または精製して用いた。(1) 1N および 4N 塩酸溶液, (2) 2% 亜硝酸ナトリウム水溶液, (3) 10% スルファミン酸水溶液, (4) 1% N-(1-naphtyl) ethylenediamine dihydrochloride (NED) 水溶液, (5) アニリン類標準溶液; Table I に示した核置換アニリン類(精製品)を 1 ml あたり 50 μ g ふくむ水溶液とする。(6) 分光光電光度計; 日立 EPU 2 型。なお (2)~(4) はいずれも使用の都度あらたに調製して用いる。

検量線の作成: 50 ml メスフラスコにアニリン類標準溶液 1, 2 および 3 ml をとり, それぞれ蒸留水で約 30 ml としたのち塩酸溶液* 1 ml および亜硝酸ナトリウム水溶液 1 ml を加えふりまぜる。5 分後にスルファミン酸水溶液 1 ml を加えふりまぜ 10 分間放置後 NED 水溶液 1 ml を加える。標線までみだし, 一定時間* 後に吸光度(それぞれの $\lambda_{\max}$ *) を測定する。(*: Table II 参照)

生体よりの定量操作: ホモジネートの場合, 先報⁽¹⁾の酸性遠沈法でのべたごとく塩酸(1N または 4N)の適量を加え酵素反応を停止せしめると共に, 凝集蛋白等を遠沈(4,000 r. p. m., 10 min.) で除いた上澄液について検量線作成の場合のごとく操作する。ただし塩酸添加量はジアゾ化時の塩酸添加を省けるように設定した。比色対照液は無処理の対照ホモジネートについて同様に操作したブランクを用いた。

紫外外部吸収法 試薬および機器: (1) アニリン類標準溶液; N-methylaniline (NMA) および N-ethylaniline (NEA) をそれぞれ 15 ml あたり 0.5, 1.0, 1.5 および 2.0 μ mol ふくむ水溶液とする。(2) 基質標準溶液; N-methyl-fluoroacetanilide (NMFA) および N-ethyl-fluoroacetanilide (NEFA) をそれぞれ 15 ml あたり 0.5, 1.0, 1.5 および 2.0 μ mol ふくむ水溶液とする。(3) 分光光電光度計; 日立 EPU 2 型。

検量線の作成: 各標準溶液の 238 m μ (NMA, NEA の $\lambda_{\max}$, Fig. 6 参照)における吸光度を測定し, それぞれの検量線を決定する。ついで後記の要領で実際の酵素反応条件に応じた基質-生成物共存系 (NMFA-NMA

または NEFA-NEA) に対する検量線を作成する。

生体よりの定量操作: ホモジネートにおける場合は前法と同様に塩酸添加により酵素反応を停止せしめ, 凝集蛋白を除き, 上澄液について吸光度を測定し, 共存系検量線によりアニリン量を決定する。この場合の比色対照液は基質無添加のホモジネートについて同様に操作したブランクを用いる。

(2) 定量条件の検討

ジアゾ化カップリング法 ジアゾ化条件は先報⁽¹⁾に準じ, 本実験では室温におけるカップリング時 pH の影響を検討して定量条件をさだめた。すなわち, ジアゾ化時に加える塩酸量を, 1N 塩酸 1 ml (最終 pH $\approx$ 1.45) および 4N 塩酸 1 ml (最終 pH $\approx$ 1.15) とした場合のアニリン類の一定濃度における吸光度を 30 分ごとに測定 ($\lambda_{\max}$ における) し, 時間-吸光度曲線を作成した。さらに問題の残る化合物については, 4N 塩酸 1 ml, 2 ml (最終 pH $\approx$ 0.9) および 4 ml (最終 pH $\approx$ 0.65) 添加の場合, または 1N 塩酸 1 ml, 0.5 ml (最終 pH $\approx$ 1.5) および 0.25 ml (最終 pH $\approx$ 1.6) 添加の場合について検討した。

定量条件決定後, 実際に ddY 系マウス肝ホモジネート (リン酸緩衝液, pH 7.4, 1 ml 中に組織 0.01 g を含む) にアニリン類を添加し, 約 30 分放置後の回収率を求めた。

紫外外部吸収法 まず 220~300 m μ における NMA, NMFA, NEA および NEFA 水溶液の吸収スペクトルをとり, 238 m μ における吸光度から 4 化合物の検量線を作成した。ついで後記のごとく, 理論的にみちびかれる NMA-NMFA および NEA-NEFA 共存系に対する合成検量線を求めた。さらに基質, 生成物の和が前者では 2 μ mol/15 ml, 後者では 1 μ mol/15 ml となる混合液について, NMA または NEA の定量精度を検討した。なお以上の各検討はいずれも室温 (20° 前後) でおこなった。

実験結果

A. ジアゾ化カップリング法

(1) 呈色に対する pH の影響: 核置換アニリン類 (Table I), すなわち *p*-iodoaniline (*p*IA), *p*-nitroaniline (*p*NA), *p*-nitro-*o*-chloro-aniline (*p*NoCA), *p*-toluidine (*p*-methylaniline: *p*MA), および *p*-aminobenzoic acid ethyl ester (*p*ABE) をジアゾ化後 NED とカップリングせしめた場合の吸光度曲線は Fig. 1 の

TABLE I. THE SUBSTITUTED ANILINES EXAMINED AND THEIR ABBREVIATIONS

Compounds	Abbreviations	M. W.	m. p.
Diazotization and Coupling Method			
<i>p</i> -Iodoaniline	<i>p</i> IA	219.04	67~68°
<i>p</i> -Nitroaniline	<i>p</i> NA	138.12	146~148°
<i>p</i> -Nitro- <i>o</i> -chloroaniline	<i>p</i> NoCA	172.58	103~104°
<i>p</i> -Methylaniline (<i>p</i> -Toluidine)	<i>p</i> MA	107.17	44~45°
<i>p</i> -Aminobenzoic acid	<i>p</i> AB	137.17	186~187°
" ethyl ester	<i>p</i> ABE	165.19	88~90°
" <i>n</i> -butyl ester	<i>p</i> ABnB	193.24	57~59°
" isobutyl ester	<i>p</i> ABiB	193.24	65°
<i>p</i> -Hydroxyaniline (<i>p</i> -Aminophenol)	<i>p</i> HA	109.12	189~190°
U. V.-Absorption Method			
<i>N</i> -Methylaniline	NMA	107.15	b. p. 194~196°
<i>N</i> -Ethylaniline (as substrate)	NEA	121.18	b. p. 204°
<i>N</i> -Methyl-fluoroacetanilide	NMFA	165.18	83~84°
<i>N</i> -Ethyl-fluoroacetanilide	NEFA	181.21	—

Fig. 1. Absorption Spectra of the Coupling Compounds of the Substituted Anilines.

(1) <i>p</i> NA	$\lambda_{\max}$ 550 $m\mu$	(4) <i>p</i> IA	$\lambda_{\max}$ 565 $m\mu$
(2) <i>p</i> ABE	550	(5) <i>p</i> NoCA	535
(3) <i>p</i> MA	570	(6) <i>p</i> HA	590

とおりであった。*p*IA の $\lambda_{\max}$ は、アニリンおよび他の *p*-ハロアニリンの $\lambda_{\max}$ ⁽¹⁾ と完全に一致した。しかし他の化合物の $\lambda_{\max}$ は、それぞれ若干ずれてくることを示す。

各アニリン類の室温での最終 pH 1.1 および 1.4 付近における時間-吸光度関係を Fig. 2 に示した。すなわち *p*NA および *p*ABE は pH 1.15 で速やかに最大呈色に達し、安定している。しかし pH 1.45 でも測定時間を

限定すればよく、pH の影響は比較的すくない。

p-Aminophenol (*p*-hydroxyaniline: *p*HA) は呈色が非常に弱く、本法の適用は困難である。

*p*IA および *p*NoCA に対してはより強酸性の場合、*p*MA ではより弱酸性の場合を検討し、Fig. 3 の結果をえた。すなわち *p*IA は pH 1.1 付近に呈色および安定性のピークがあり、*p*NoCA は pH 1.1 以下で 30 分以内における呈色が安定している。*p*MA の場合は pH 1.4 以上で、pH の呈色への影響は無視できるが、吸光度は時間とともに漸増を示し安定しない。

Fig. 2. Influence of pH on the Color Developments and the Color Stabilities in the Diazotization and Coupling Method. (A)

The solid lines show the absorbance of the colored solution at final pH 1.16 to 1.17, and the dotted lines at final pH 1.46 to 1.49.

Fig. 3. Influence of pH on the Color Developments and the Color Stabilities in the Diazotization and Coupling Method. (B)

The parentized figures show the final pH in the colored solution.

(2) 定量条件について

以上の結果から一応最適と考えられる定量条件(室温における)を決定すると Table II のように要約される. 本実験条件では最終 pH=1.1 とするには, ジアゾ化時の塩酸添加量を, 4N 塩酸 1ml, pH=1.4 とするには 1N 塩酸 1ml とすればよい.

TABLE II. CONDITIONS FOR THE MAXIMAL COLOR DEVELOPMENT IN THE DIAZOTIZATION AND COUPLING METHOD

Compounds	$\lambda_{\max}$	Optimal pH	Stable period
<i>p</i> IA	565m μ	ca. 1.1	30 to 180 min.
<i>p</i> NA	550	below 1.1	60 to 120 min.
<i>p</i> NoCA	540	below 1.1	less than 30 min.
<i>p</i> MA	575	more 1.4	*
<i>p</i> ABE	550	below 1.1	more than 30 min.

* The measurement was taken after 90 min. in this experiments, since the absorbance in *p*MA had no plateau.

ただし *p*MA の場合は, 測定時間を正しく一定にする必要があり, 本実験では 90 分後の測定とした. その都度検量線を修正すれば最善となる. 第 2 表の定量条件に従っておこなった場合の検量線を Fig. 4 に例示した.

Fig. 4. Calibration curves for the Substituted Anilines in the Diazotization and Coupling Method.

	K* in p.p.m	K* in mm
(1) <i>p</i> NA	0.405	56.0
(2) <i>p</i> ABE	0.313	51.7
(3) <i>p</i> NoCA	0.235	40.6
(4) <i>p</i> IA	0.205	44.9
(5) <i>p</i> MA	0.150	16.1

* K shows the inclination of the calibration curve: i. e. the absorbance per p.p.m. or mm of the compounds.

(3) *p*-Aminobenzoates の定量

p-Aminobenzoic acid およびその低級アルキルエステル; ethyl ester (*p*ABE), *n*-butyl ester (*p*ABnB),

および isobutyl ester (*p*ABiB) のジアゾ化カップリング法による検量線を求め, Fig. 5 の結果をえた. これを mM (μ mol/ml) あたりの吸光度に換算すると, その値は非常によく一致した (Fig. 5 の説明参照). すなわち, 以上の *p*-aminobenzoates の呈色物の分子吸光係数は同一であることを示しており, 生体反応時におけるエステル加水分解を考慮せずとも定量が可能となる.

Fig. 5. Calibration Curves for the Amino-benzoates in the Diazotization and Coupling Method.

	K* in p.p.m	K* in mm
(1) <i>p</i> AB	0.378	51.9
(2) <i>p</i> ABE	0.313	51.7
(3) <i>p</i> ABnB	0.265	51.3
(4) <i>p</i> ABiB	0.267	51.6
		Av. 51.6

* cf. Fig. 4

(4) 回収率の検討

マウス肝ホモジネート中にアニリン類 100 μ g および 200 μ g を添加した場合の, 定量精度を検討した結果は Table III のとおりであった.

*p*NoCA および *p*MA の回収率が若干低く出ているが, 微量定量法としては十分の精度を有すると思われる. 概して低濃度側において回収率が高かった.

TABLE III. RECOVERIES OF THE SUBSTITUTED ANILINES IN MOUSE LIVER HOMOGENATE IN THE DIAZOTIZATION AND COUPLING METHOD.

Compounds	Added	Found	Recoveries
<i>p</i> IA	100 μ g	99 μ g	99%
	200	190	95
<i>p</i> NA	100	100	100
	200	190	95
<i>p</i> NoCA	100	90	90
	200	162	81
<i>p</i> MA	100	93	93
	200	174	87
<i>p</i> ABE	100	100	100
	200	190	95

Fig. 6. U. V.-Absorption Spectra of the N-Alkylanilines and the N-Alkylfluoroacetanilides.

(A) NMA (A') NEA
(B) NMFA (B') NEFA

Mesurements were taken at the concentration of $0.5 \mu\text{mol}/15\text{ml}$ in all cases.

B. 紫外外部吸収法

(1) 紫外外部吸収スペクトル

NMA, NEA および基質としての NMFA, NEFA 水溶液の紫外外部吸収スペクトルは Fig. 6 のとおりであった。

NMA および NEA の λ_{max} $238 \text{ m}\mu$ において, 共存基質 NMFA および NEFA もまたかなりの吸収を有し, 明らかに定量を阻害する。ただし加水分解反応における一方の生成物である fluoroacetic acid は紫外外部吸収を無視できる。

(2) 基質-生成物共存系における定量

まず $238 \text{ m}\mu$ における NMA およびその基質である

Fig. 7. Calibration Curves for the N-Alkylanilines and the N-Alkylfluoroacetanilides.

	K^*		K^*
(A) NMA	0.488	(A') NEA	0.450
(B) NMFA	0.170	(B') NEFA	0.175

* cf. Fig. 4

Fig. 8. Calibration Curve for the Substrate-Product (NMFA-NMA) Mixture.

Figures show the calibration curves for NMA (A), NMFA (B), and NMA-NMFA mixture (C) respectively, in the hydrolysis system containing $2 \mu\text{mol}/15\text{ml}$ of NMFA as substrate at the beginning of the reaction.

(A) and (B) were obtained from the results in Fig. 7, and pooled into (C).

NMFA の, 同じく NEA および NEFA の検量線を決定し, Fig. 7 の結果をえた。NEA は $1.5 \mu\text{mol}/15\text{ml}$ まで, 他は $2.0 \mu\text{mol}/\text{ml}$ で完全な直線を示し, Beer の法則にしたがう。加水分解反応における基質-生成物共存系中の生成物の決定法は次のようにおこなった。NMFA の場合, その分解と共に同モルの NMA が生成し, 反応系における $[\text{NMFA}]$ と $[\text{NMA}]$ の和は常に一定である。たとえば NMFA $2 \mu\text{mol}/15\text{ml}$ から出発する加水分解反応系における, 基質-生成物混合溶液に対する検量線は, Fig. 7 の結果から Fig. 8 のように示すことができる。すなわち混合溶液に対する検量線 (C) は, Fig. 7 から決定することのできる NMA 増加に対する検量線 (A) と NMFA 減少に対する検量線 (B) の和として求めることができる。

$$(A) \quad y = 0.488x$$

$$(B) \quad y = -0.170x + 0.340$$

$$(C) \quad y = 0.318x + 0.340 \dots\dots\dots (1)$$

[ただし x は NMFA 加水分解モル数 (すなわち NMA 生成モル数 $\dots\dots \mu\text{mol}/15\text{ml}$), y はこの系において想定される NMA, NMFA, およびその混合溶液における吸光度を示す。0.340 の値は $2 \mu\text{mol}/15\text{ml}$ における NMFA の吸光度に相当する。]

同様にして NEFA $1 \mu\text{mol}/15\text{ml}$ から出発する加水分解反応系に対し次式が求められる。

$$(C') \quad y = 0.275x + 0.175 \dots\dots\dots (2)$$

以上の要領で任意の基質濃度から出発する反応系に対する検量線が Fig. 7 より容易に決定しうる。

(3) 回収率の検討

NMFA-NMA および NEFA-NEA の混合系についての定量精度の検討結果を Table IV に示した。前者は式 (1), 後者は式 (2) に従って実測値から計算したものであるが, それぞれ平均回収率 99.5% ($\sigma=4.4$) および 100.5% ($\sigma=3.8$) であり十分満足できるものであると考えられた。

TABLE IV. RECOVERIES OF N-ALKYLANILINES IN THE MIXTURE OF N-ALKYLANILINES AND N-ALKYLFLUOROACETANILIDES

Added*		Found		Recoveries
NMA	NMFA	Absorbance**	NMA*	%
0.200	1.800	0.401	0.192	95.9
0.400	1.600	0.475	0.425	106.3
0.600	1.400	0.522	0.574	95.6
0.800	1.200	0.581	0.758	94.7
1.000	1.000	0.666	1.025	102.5
1.200	0.800	0.731	1.230	102.5
1.600	0.400	0.845	1.589	99.3
Av.				99.5
				($\sigma=4.4$)
NEA	NEFA	Absorbance**	NEA*	%
0.200	0.800	0.230	0.200	100.0
0.400	0.600	0.290	0.419	104.8
0.500	0.500	0.316	0.513	102.6
0.600	0.400	0.332	0.572	95.3
0.800	0.200	0.403	0.828	103.5
0.900	0.100	0.412	0.863	97.0
Av.				100.5
				($\sigma=3.8$)

* $\mu\text{mol}/15\text{ml}$

** at $238\text{m}\mu$

考 察

生化学実験において, 基質または生成物に対する簡便な微量定量法の決定は重要な意義を有している。本研究は monofluoroacetanilides の酵素的加水分解を測定するための簡便かつ精度のたかい方法の確立を目的としたものである。先報⁽¹⁾における知見で, ジアゾ化カップリング法は非常にすぐれているが, 核置換基の種類により, カップリング時における pH の影響が著しく大きいことが推定された。

本報ではこの知見にしたがって主として *p*-置換アニリン類に対する定量条件を決定したものであり, この他

の核置換アニリン類に対しても同様手法により, 容易に定量条件が定めうるものと思われた。

ただ $\text{FCH}_2\text{CONH}-\text{C}_6\text{H}_5-\text{COOR}$ 系化合物の場合には, 種々の酵素系をふくむ生体実験において, 当然エステル加水分解の可能性を否定できない。化合物の一部分がエステル分解をうけた場合の定量は非常に複雑になってくると考えられる。しかし *p*-aminobenzoic acid および少なくともその低級アルキルエステルにおいては, 呈色物に対する分子吸光係数が非常によく一致することを見出した。これにより定量操作は著しく単純化され, その意義は大きい。

N-Alkylanilines の場合は, 亜硝酸ナトリウムによりジアゾ化されずニトロソ化合物を生ずるので前法は適用できない。これらに対してはまず紫外吸収法の適用が考えられるが, 本研究目的の場合は, 共存基質としての N-alkylfluoroacetanilides の影響が無視できないので, 2成分系の定量法になってくる。

しかし両者は基質-生成物の関係により, 反応系における両者のモル数の和は常に一定であることから, 簡単な考察により反応系に対する検量線を決定した。

(3) において, 任意の時間 t における [s] および [p] を $[s]_t$, $[p]_t$ とすると, つねに $[s]_t + [p]_t = \text{constant}$ であり, かつ [p'] の吸光度への影響は全く無視できる。

$238\text{m}\mu$ における, 吸光度 (y)-濃度 (x) 関係は次のように示しうるはずである。

$$[p]_t \dots\dots y_t = k_p x_t$$

$$[s]_t \dots\dots y_t = -k_s x_t + b$$

ただし k_p , k_s はそれぞれ p , s の検量線勾配, b は $t=0$ における [s] の吸光度。

$$[s+p]_t \dots\dots y_t = (k_p - k_s) x_t + b \dots\dots\dots (4)$$

すなわち, あらかじめ p と s の検量線を決定しておけば, 任意の濃度の反応系に対する検量線が簡単に求められる。

生体ホモジネートでの定量では, 検液中の蛋白などの影響はブランクを対照液として比色することで消去する。したがって除蛋白処理を必要とすることがあろう。

本法を用いての実験的分析結果は, 回収率はほとんど 100% ($\sigma=4$) であり, 十分に実用しうる精度であった。

要 約

Monofluoroacetanilides の酵素的加水分解を研究する目的で, その生成物としてのアニリン類の微量定量法を検討した.

(1) 核置換アニリン類 (*p*-I, *p*-NO₂, *p*-NO₂-*o*-Cl, *p*-CH₃, および *p*-COOR) に対しては, ジアゾ化カップリング比色法を適用した. それぞれの $\lambda_{\max}$ における吸光度で定量したが, 呈色とその安定性に対する pH の影響が大きかった. それぞれに対し適当な pH および測定時間の範囲を設定し, 安定な定量条件を決定した.

(2) *p*-Aminobenzoates (free acid, ethyl, *n*-butyl, および isobutyl ester) に対しジアゾ化カップリング比色法を適用した場合, それぞれの分子吸光係数が非常によく一致する (K in mM=Av 51.6) ことを見出

し測定を簡便化した.

(3) N-Alkylaniline (alkyl: methyl および ethyl) の場合は前法は適用できないので紫外部吸収 ($\lambda_{\max}$: 238 m μ) を利用する方法を試みた. ただし本法では基質として共存してくる N-alkylfluoroacetanilides の紫外部吸収の影響が無視できず, 2 成分系の定量になる. しかし両者は基質-生成物の関係にあり, 両者のモル数の和は常に一定であることから, 簡単な考察により加水分解反応系に対する検量線を決定した. 混合溶液における定量結果は, 回収率ほぼ 100% ($\sigma \approx 4$) であり, 十分満足しうるものであった.

(1) 中村利家: 本誌, **39**, 227 (1965).

(2) 中村利家: 本誌, **39**, 232 (1965).