ピリジン-酢酸によるヘミンの呈色反応¹⁾

大熊誠一

科学警察研究所²⁾

Color Reaction of Hemin with Pyridine-Acetic Acid

SEIICHI OHKUMA

National Research Institute of Police Science²⁾

(Received May 31, 1975)

Color reaction between hemin and pyridine in acetic acid was spectrochemically studied. Hemin sensitively reacts with pyridine in acetic acid to form pyridine hemichrome. A hemin solution in a mixture of pyridine and acetic acid (15:85, by vol.) shows a stable red orange color which gives an absorption maximum at 407 nm. A linear relationship was observed between the hemin concentration in the range of 0—8.5 $\mu\text{g/ml}$ and the absorbance at 410 nm in the solution. This color reaction can be used as a simple and rapid technique for the qualitative and quantitative analysis of hemin.

ヘミンの定性定量分析には試料のヘミンを水酸化ナトリウム・アルカリ性下、ジチオナイト・ナトリウムで処理してヘムに還元したのち、ピリジンと反応させてピリジン・ヘモクロームを形成させる呈色反応³⁻⁵⁾が用いられている。この反応は特異性が高く鋭敏であるが、アルカリ性溶液中でヘミンが急速に分解すること、還元剤のジチオナイト・ナトリウムの品質が一定していないことなどが原因して定量精度が低下しやすく、また、空気によるヘムの自動酸化が起りやすいので、これを避けるため呈色操作を素早く行なわなければならないという不便さがある。⁵⁾ さて、上記のようにヘムはピリジンと反応してピリジン・ヘモクロームを形成するが、ヘミンも2分子のピリジンと反応してピリジン・ヘミクロームを形成する。³⁻⁵⁾ このピリジン・ヘミクロームは強アルカリ性下では不安定であるが、塩酸酸性下では安定である。⁴⁾ そこで著者はこのヘミクローム形成反応をヘミンの比色分析法に応用する目的で酢酸⁶⁾中でのヘミンとピリジンとの反応を検討したところ、この反応は比較的鋭敏で安定性が高いうえ、呈色操作が極めて簡単であり、ヘミンの呈色反応として利用できることが明らかとなったので報告する。

実 験 の 部

試薬 溶媒：氷酢酸（酢酸と略す）、ピリジンは市販特級品を蒸留して使用した。

ヘミン：和光純薬株式会社製品の Hemin を H. Fischer の方法⁷⁾にしたがって精製した。

吸収スペクトルおよび吸光度の測定 ヘミン溶液の吸収スペクトル測定には日立自記分光光度計 EPS 3T を用い、吸光度の測定には日立分光光度計 101 を用いた。いずれの測定にも 10 mm の石英セルを用いた。

1) 第1回生体成分の分析化学シンポジウム（東京、1973年11月）で発表した研究の1部である。

2) Location: 6, Sanban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo.

3) R. Lemberg, J.W. Legge, "Haematin Compounds and Bile Pigments," Interscience Publishers, Inc., New York, N.Y., 1949, pp. 174—184.

4) 津島慶三, "血色素の生理と臨床," 上代皓三, 中尾喜久監修, 医学書院, 東京, 1958, pp. 40—47, pp. 178—179.

5) J.E. Falk, "Porphyrins and Metalloporphyrins," B.B.A. Library, Vol. 2, Elsevier Publishing Co., Amsterdam, 1964, pp. 181—184.

6) ヘミンの溶剤としては酢酸をはじめとする酸性系の溶剤が用いられている。⁵⁾ 安定性, 不揮発性, 溶解力などの点を考慮して酢酸をヘミンの溶剤に用いた。

7) H. Fischer, "Organic Synthesis," Coll. Vol. 3, ed. by E.C. Horning, John Wiley and Sons, Inc., New York, N. Y., 1955, p. 442.

結 果

ヘミン溶液の吸収スペクトル

ヘミンの酢酸溶液はやや暗い橙色を呈するが、その吸収スペクトルは Fig. 1 に示すように 377 nm に吸収極大をもつ。つぎに 0.1%⁸⁾ の比率でピリジンを含む酢酸にヘミンを溶解した溶液の吸収スペクトルはかなり変化した (Fig. 1), その吸収極大は 400 nm に移動する。ピリジン濃度をさらに 5%, 10%, 15%, 20% の順に増加した

Fig. 1. Absorption Spectra of Hemin Solutions

—: acetic acid (3.36 $\mu\text{g/ml}$)
 - - - : pyridine-acetic acid (0.1:99.9, v/v) (3.36 $\mu\text{g/ml}$)
 ·····: pyridine-acetic acid (15:85, v/v) (3.36 $\mu\text{g/ml}$)
 —·—·: pyridine (3.36 $\mu\text{g/ml}$)
 - - - : pyridine (15 v/v%) in 0.1N NaOH (3.36 $\mu\text{g/ml}$)

Fig. 3. Stability of Color of Hemin Solutions in Pyridine-Acetic Acid (15:85, by vol.) Mixture

○: 405 nm, ●: 410 nm
 —: 6.47 $\mu\text{g/ml}$ concentration
 - - - : 2.88 $\mu\text{g/ml}$ concentration

Fig. 2. Relationship between Pyridine Concentration and Absorbance of Hemin Solutions (3.36 $\mu\text{g/ml}$) in Pyridine-Acetic Acid Mixtures

○: 405 nm, ●: 410 nm

Fig. 4. Calibration Curves for Hemin^{a)}

a) hemin solutions in pyridine-acetic acid (15:85, by vol.) mixture

○: 405 nm ●: 410 nm

8) %はすべて容量%を示す。

ピリジンと酢酸の混液にヘミンを溶解するとそれらの溶液の色調は深色的になり、やや暗みを帯びた赤橙色となる。吸収スペクトルは鋭い形をとるようになり、吸収極大は 405 nm, 406 nm, 407 nm, 407 nm へと変化する。これらの吸収スペクトルはたがいに極めてよく類似しているので、その 1 例としてピリジン濃度が 15% の場合 (ピリジン-酢酸,⁹⁾ 15:85, v/v) のヘミン溶液の吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。また、ヘミンのピリジン溶液¹⁰⁾ とピリジンを 15% 含有する 0.1N NaOH にヘミンを溶解した溶液¹¹⁾ の吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。

ヘミンのピリジン-酢酸溶液におけるピリジン濃度と吸光度との関係

ヘミンのピリジン-酢酸溶液におけるピリジン濃度 (5—20%) と 405 nm, 410 nm の吸光度との関係を検討したところ、Fig. 2 に示すようにピリジン濃度の増加にしたがっていずれの波長の吸光度も順次、増加した。ピリジン濃度が 15% と 20% の場合にはそれらヘミン溶液の吸光度には著しい差がなく、そのうえ、それらヘミン溶液の吸収極大はいずれも 407 nm で同一なので、以後使用するピリジン-酢酸の混合容量比は 15:85 とした。

ヘミンのピリジン-酢酸溶液の呈色の安定性

高濃度 (6.47 $\mu\text{g/ml}$) と低濃度 (2.88 $\mu\text{g/ml}$) におけるヘミンのピリジン-酢酸 (15:85) 溶液の呈色の安定性を検討した。両溶液は 90 分間放置しても Fig. 3 に示すようにそれらの 405 nm と 410 nm の吸光度は変化しなかった。

ピリジン-酢酸溶液におけるヘミン濃度と吸光度との関係

ヘミンの各種濃度のピリジン-酢酸 (15:85) 溶液を調製し、それらの 405 nm と 410 nm における吸光度を測定したところ、前者の波長では 0—6.5 $\mu\text{g/ml}$ 、後者の波長では 0—8.5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度の範囲内でヘミン濃度と吸光度がベールの法則にしたがい、Fig. 4 に示すようにそれらの検量線は原点をとる直線になることが認められた。

考 察

ヘミンの酢酸溶液にピリジンを少量 (0.1%) 存在させるとその吸収スペクトルは変化し、吸収極大は 377 nm から 400 nm に移動する。これはヘミンが酢酸中で低濃度のピリジンと容易に反応することを示すものである。ピリジン濃度を 5% から 20% に増加して反応させると吸収スペクトルは著しく変化する。吸収極大は長波長側に移行して 407 nm になって安定化し、色調はやや暗みを帯びた赤橙色になる。明らかにヘミンが酢酸中で比較的に高濃度のピリジンと反応して赤橙色化合物を形成することを示している。この呈色反応において吸収極大波長付近における呈色強度 (吸光度) は反応のはじめから 90 分間をへても変化しないので、この反応は瞬間的に一定の呈色強度まで進み、つぎにそのまま安定化する性質をもつものと判断できる。

すでに緒言で述べたようにヘミンはピリジンと反応してピリジン・ヘミクロームを形成するが、このヘミクロームは塩酸酸性溶液中で安定なことが知られている。⁴⁾ 酢酸は塩酸より遙かに弱い酸である、したがって、酢酸中でヘミンとピリジンとが反応してピリジン・ヘミクロームを形成する可能性は強い。この可能性とヘミンがピリジン-酢酸中で安定な赤橙色化合物を形成するという上記の実験結果とを併せて考えると、この赤橙色化合物はピリジン・ヘミクロームではなかろうかという推測が成立する。一方、この赤橙色溶液の吸収スペクトル、吸収極大波長などはヘミンのピリジン溶液のそれらと類似している。¹²⁾ ヘミンのピリジン溶液の吸収スペクトルはピリジン・ヘミクロームの形成^{3,4)} に原因しているので、ピリジン-酢酸中でヘミンから形成される赤橙色化合物はピリジン・ヘミクロームである可能性は高いものと考えられる。この可能性と前記の推測とを併せて判断するとヘミンは酢酸中でピリジンと鋭敏に反応して配位子置換反応と配位子付加反応とを同時に起こして安定なピリジン・ヘミクロームを形成し、赤橙色に呈色するものと結論することができよう。

酢酸中でのピリジン・ヘミクローム形成に基づくヘミンの呈色反応は前記のように安定であり、405 nm または 410 nm における吸光度とヘミン濃度はベールの法則にしたがうので、試料をピリジン-酢酸 (15:85) に溶解し、そのやや暗い赤橙色溶液の吸収スペクトルと 405 nm または 410 nm の吸光度を測定することによりヘミンの定性定量分析を同時に行なうことができる。

9) ピリジンと酢酸との混液であることを示す。

10) やや暗みを帯びた赤橙色 (吸収極大 410 nm) を呈する。

11) 黄色 (吸収極大 394 nm) を呈する。この結果は強アルカリ性溶液中で、ピリジン・ヘミクロームは不安定であるという成績⁴⁾ に一致している。

12) 吸収極大位置の多少の差異は溶剤の酢酸が原因しているものと考えられる。