

ウミホタルルシフェリン誘導体を用いる有機過酸化物の 化学発光定量法

沢田英夫[®], 増山和代, 三谷元宏, 中山雅陽*

(1990年6月13日受理)

発光物質としてウミホタルルシフェリン誘導体, 金属触媒としてセリウムアセチルアセトナートを用いた化学発光法により, ヒドロペルオキシド, ペルオキシエステル, ジアシルペルオキシド, ペルオキシケタール及びサイクリックペルオキシド構造を有する種々の有機過酸化物の微量定量について検討を行った。これら有機過酸化物は, 本化学発光法を用いることにより, ナノモル~ピコモルレベルで簡易に定量できることが明らかとなった。過酸化物の発光強度はウミホタルルシフェリン誘導体の構造により著しく影響され, 発光強度は2-メチル-3,7-ジヒドロイミダゾ[1,2-a]ピラジン-3-オン(MI) < 2-メチル-6-フェニル-3,7-ジヒドロイミダゾ[1,2-a]ピラジン-3-オン(MPI) < 2-メチル-6-(*p*-メトキシフェニル)-3,7-ジヒドロイミダゾ[1,2-a]ピラジン-3-オン(MMPI)の順であった。MPIを用いたヒドロペルオキシド類の定量においては, 以下に示すように三級ヒドロペルオキシド類の発光強度が最も低くなる傾向が得られた: 三級ヒドロペルオキシド ($R_1R_2R_3COOH$) < 二級ヒドロペルオキシド (R_1R_2HCOOH) < H_2O_2 。

1 緒 言

最近, 生体内の過酸化脂質の微量定量において, 主にヒドロペルオキシ型過酸化脂質の定量に関する報告が数多くなされている。例えば, チオバルビツール酸を用いた比色定量法(TBA法)¹⁾, 電位差滴定を利用した過酸化物価(POV)法²⁾, 発光物質としてルミノール³⁾及びイソルミノール⁴⁾を用いた化学発光法がそれぞれ報告されている。

一般に, 生体内の過酸化脂質においては, ヒドロペルオキシド型過酸化脂質以外に, エンドペルオキシドや環状ペルオキシドなどの過酸化脂質が生成することが知られている⁵⁾。従って生体内の過酸化脂質の量をより精度よく測定するためには, ヒドロペルオキシド以外の構造を有する過酸化物の量を定量することも重要な課題である。しかし従来の過酸化脂質の定量方法においては, 一般にヒドロペルオキシド以外の構造を有する過酸化物の微量定量は困難であり⁶⁾, 特に発光物質としてイソルミノールを用いた化学発光法によっても, プロスタグラン

ジン H_2 のようなエンドペルオキシドタイプの過酸化物の定量は困難であることが報告されている⁴⁾。

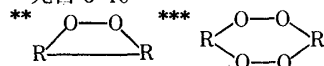
最近, 著者らは化学発光法による過酸化脂質の定量方法として, 発光物質としてウミホタルルシフェリン誘導体を用いる方法によりリノール酸ヒドロペルオキシドがピコモルレベルで定量できることに関して報告を行った⁷⁾。そこで今回, 発光物質としてウミホタルルシフェリン誘導体: 2-メチル-3,7-ジヒドロイミダゾ[1,2-a]ピラジン-3-オン(MI), 2-メチル-6-フェニル-3,7-ジヒドロイミダゾ[1,2-a]ピラジン-3-オン(MPI), 2-メチル-6-(*p*-メトキシフェニル)-3,7-ジヒドロイミダゾ[1,2-a]ピラジン-3-オン(MMPI), 触媒としてセリウムアセチルアセトナートを用い, ヒドロペルオキシド(ROOH)ペルオキシエステル(RCO₂OR), ジアシルペルオキシド(RCO₂O₂CR), ジアルキルペルオキシド(ROOR), ペルオキシケタール(ROO-R-OOR), エンドペルオキシド**及びサイクリックペルオキシド***構造を有する各種有機過酸化物の化学発光法による微量定量について検討を行ったので以下報告する。

2 実 験

2.1 測定機器

化学発光測定器はアロカルミネッセンスリーダー,

* 日本油脂(株)筑波研究所: 300-26 茨城県つくば市東光台 5-10



BLD-201 (アロカ) を使用し, 25°C にて測定を行った.

2・2 試 薬

セリウム(III)アセチルアセトナート, 鉄(III)アセチルアセトナート, 酸化バナジウムアセチルアセトナート, 硝酸セリウムアンモニウム, 硝酸鉄は市販特級品(和光純薬工業)を用いた. プロスタグランジン H_2 , プロスタグランジン G_2 は フナコシ薬品製のものを用い, 他の有機過酸化物は日本油脂製のものをそれぞれ用いた.

2・3 MI, MPI, MMPI の合成

MI, MPI 及び MMPI は後藤らの方法に従い⁸⁾, 対応するアミノピラジン類とメチルグリオキサールとを塩酸触媒下反応させることにより合成した.

2・4 セリウムアセチルアセトナートを触媒とした MPI によるプロスタグランジン H_2 の化学発光

0.1 M 酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液 (pH 4.5) 中に MPI 33 μ l (10 nmol/ml), プロスタグランジン H_2 を既知濃度 (メタノール希釈溶液, 20~150 μ l) 加えた. 次いでセリウムアセチルアセトナート 37 μ l (4.2 nmol/ml, メタノール希釈溶液) を加え, 化学発光を 25°C にて測定した. なおセリウムアセチルアセトナートを加えた後の最終体積は 1000 μ l になるように調製した. 他の金属触媒更には他の有機過酸化物においても同様な条件下にて測定を行った.

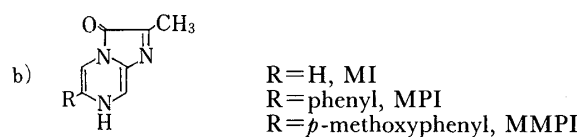
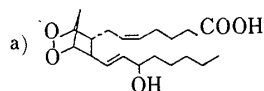
3 結果及び考察

3・1 ウミホタルルシフェリン誘導体の構造と発光量との関係

エンドペルオキシド構造を有する有機過酸化物として, プロスタグランジン H_2 に注目し, プロスタグランジン H_2 のナノモルレベルでの化学発光法による定量を, 金属触媒としてセリウムアセチルアセトナート, 発光物質としてウミホタルルシフェリン誘導体: MI, MPI, MMPI を用い検討を行った. なお発光物質, 金属触媒のモル比は最適発光強度との関係から求めた. その結果, 発光物質として MI を用いた場合は化学発光量が著しく低い, MPI 及び MMPI を用いた場合は, Table 1 に示すようにそれぞれ高い発光量を示した. これは無置換の MI に比べ, MPI, MMPI がフェニル基や *p*-メトキシフェニル基のような電子供与性の比較的高い置換基を有しているため, MI より発光収率

Table 1 Detection of prostaglandin H_2 ^{a)} by chemiluminescence emitted by *Cypridina* luciferin derivatives

<i>Cypridina</i> luciferin derivative	Counts, $\times 10^{-5}$ cpm
MI ^{b)}	0.03
MPI ^{b)}	0.56
MMPI ^{b)}	2.58



Final concentrations were as follows: MI (MPI, MMPI), 10 nmol/ml; Buffer, 0.1 M AcONa-AcOH pH 4.5; Ce(AcAc)₃, 4.2 nmol/ml; Prostaglandin H_2 , 5.2 nmol/ml.

が高くなるためと考えられる^{7b)}*. この傾向は有機過酸化物としてジアシルペルオキシド構造を有するベンゾイルペルオキシドにおいても同様に確認され, MPI 及び MMPI においてそれぞれ高い化学発光量が観測され, MMPI のほうが MPI より発光量が高いことが明らかとなった. すなわち発光強度は, MPI: 1.14×10^5 counts (cpm) < MMPI: 3.02×10^5 count (cpm) の順であった (ベンゾイルペルオキシド濃度: 5.2 nmol/ml).

3・2 化学発光用金属触媒の検討

ウミホタルルシフェリン誘導体: MPI によるベンゾイルペルオキシドの化学発光における金属触媒の影響について検討を行った. Table 2 に示すように金属触媒としてセリウムアセチルアセトナートを用いることにより最も高い化学発光量が得られることが分かった. 更にセリウムアセチルアセトナート系においては, 化学発光における発光時間 (金属触媒を添加し, 測定を開始してから時間) が 1 分程度と他の金属触媒の系 (約 20 分) に比べ著しく短く, 測定操作上からも有用であると考えられる. これはセリウムアセチルアセトナートによる有機過酸化物のレドックス分解能が, 他の金属触媒より高

* MMPI 及び MPI の緩衝溶液中における化学発光において, 電子供与性の置換基を有する MMPI のほうが MPI に比べ発光量が高くなることが知られている. 文献 7b) 及び後藤俊夫: 有機合成化学協会誌, **37**, 275 (1979) を参照.

Table 2 Effect of transition metal salts on MPI-dependent chemiluminescence in the presence of benzoyl peroxide

Metal salt	Counts, $\times 10^{-5}$ cpm
Ce (AcAc) ₃	1.14
Fe (AcAc) ₃	0.84
VO (AcAc) ₂	0.67
Ce (NO ₃) ₃	0.53
Fe (NO ₃) ₃	0.47

AcAc = CH₃COCHCOCH₃. Final concentrations were as follows: Buffer, 0.1 M AcONa-AcOH pH 4.5; MPI, 10 nmol/ml; Metal salt, 4.2 nmol/ml; Benzoyl peroxide, 5.2 nmol/ml.

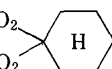
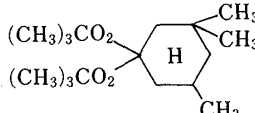
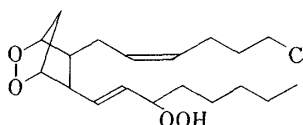
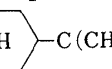
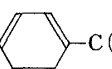
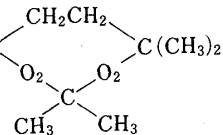
いことに起因するものと推定される. なお, 本測定系における化学発光は, 金属触媒により有機過酸化物 (ROOR) がレドックス分解を受け, このレドックス分解により生成すると考えられるラジカル種, 例えばアルコキシラジカル (RO $\cdot$), ペルオキシラジカル (ROO $\cdot$), スーパーオキシドアニオン, 更には一重項酸素などの化学種がウミホタルルシフェリン誘導体と反応することにより観測されるものと推定される*.

Tables 1, 2 に示したように, 有機過酸化物のウミホタルルシフェリン誘導体による化学発光の定量において, 発光物質として MPI, MMPI, 金属触媒としてセリウムアセチルアセトナートを用いる系が最適であることが分かった. そこで以下において発光物質として, MPI, MMPI, 金属触媒としてセリウムアセチルアセトナートを用い, プロスタグランジン H₂ 及びベンゾイルペルオキシド以外の各種有機過酸化物の化学発光法による定量について検討を行った.

3.3 各種有機過酸化物の定量

Table 3 に示すようにエンドペルオキシド更にはジアシルペルオキシド構造を有する有機過酸化物以外にも, ヒドロペルオキシド, ペルオキシエステル, ジアルキルペルオキシド, ペルオキシケタル及びサイクリックペルオキシド構造を有する有機過酸化物においてもそれぞれ化学発光が観測されることが分かった. 特に MPI を

Table 3 MPI-dependent chemiluminescence catalyzed by Ce (AcAc)₃ in the presence of various organic peroxides (5.2 nmol/ml)

Organic peroxide	Counts, $\times 10^{-5}$ cpm
Peroxy ester	
CH ₃ COO ₂ C(CH ₃) ₃	49.15
<i>n</i> -C ₁₁ H ₂₃ COO ₂ C(CH ₃) ₃	1.02
(CH ₃) ₂ CHOCO ₂ C(CH ₃) ₃	0.42(0.64) ^{a)}
PhCOO ₂ C(CH ₃) ₃	0.39(0.90)
Peroxy ketal	
(CH ₃) ₃ CO ₂ 	4.06
(CH ₃) ₃ CO ₂ 	1.79
(CH ₃) ₃ COOC(CH ₃) ₂ O ₂ C(CH ₃) ₃	0.94
Dialkyl peroxide	
PhC(CH ₃) ₂ O ₂ C(CH ₃) ₂ Ph	2.45
(CH ₃) ₃ COOC(CH ₃) ₃	0.32(2.14)
Dialkyl peroxide	
<i>n</i> -C ₁₁ H ₂₃ CO ₂ O ₂ CC ₁₁ H ₂₃ - <i>n</i>	1.53
Endo peroxide	
	0.38(1.91)
Hydroperoxide	
HO ₂ H	12.23
PhCH(CH ₃)O ₂ H	0.61(1.21)
PhC(CH ₃) ₂ O ₂ H	0.56(0.76)
(CH ₃) ₃ CO ₂ H	0.33(1.66)
CH ₃  C(CH ₃) ₂ O ₂ H	0.30(1.66)
(CH ₃) ₂ CH  C(CH ₃) ₂ O ₂ H	0.29(2.96)
HO ₂ C(CH ₃) ₂ CH ₂ CH ₂ C(CH ₃) ₂ O ₂ H	0.24(0.68)
(CH ₃) ₃ CCH ₂ C(CH ₃) ₂ O ₂ H	0.23(0.45)
Cyclic peroxide	
(CH ₃) ₂ C  C(CH ₃) ₂	0.93

a) MMPI was used instead of MPI.

* *t*-ブチルヒドロペルオキシドの Fe³⁺ イオン存在下における MPI の化学発光において *t*-ブチルペルオキシラジカル及び一重項酸素が発光に寄与することが報告されている. a) T. Goto: "The Role of Oxygen in Chemistry and Biochemistry", Edited by W. Ando and Y. Moro-oka, Vol. 33, p. 367 (1988), (Elsevier, Amsterdam). b) 沢田英夫, 中山雅陽: 化学と工業, **41**, 1163 (1988).

用いたヒドロペルオキシド類の化学発光においては, 一級ヒドロペルオキシド (過酸化水素) 更には二級ヒドロペルオキシド (例えばエチルベンゼンヒドロペルオキシド) が三級ヒドロペルオキシド (例えばクメンヒドロペ

ルオキシド, *t*-ブチルヒドロペルオキシド) より発光量が高くなる傾向が得られた。すなわち, 三級ヒドロペルオキシド ($R_1R_2R_3COOH$) < 二級ヒドロペルオキシド (R_1R_2HCOOH) < H_2O_2 の順の発光強度であった。このような傾向は, 過酸化水素あるいは二級ヒドロペルオキシドが三級のものに比べ, セリウムアセチルアセトナートによるレドックス分解をより受けやすくなるためと考えられる。

ペルオキシエステル構造を有する有機過酸化物の化学発光において, *t*-ブチルペルオキシアセテートが他のペルオキシエステル類更には他の構造を有する有機過酸化物より発光量が著しく高まる結果が得られた。これは, *t*-ブチルペルオキシアセテートのセリウムアセチルアセトナートによるレドックス分解能が他の有機過酸化物よりも高いためと考えられる。更に *t*-ブチルペルオキシアセテートは, 緩衝液 (AcOH-AcONa) と構造が類似したアセチル基を有しているため, 他の過酸化物より緩衝液との親和性がより高まり, 金属触媒存在下でのウミホタルルシフェリン誘導体との反応がより起こりやすくなることにも起因すると推定される。

Table 3 に示すような各種構造を有する有機過酸化物が, 本測定系を用いることによりナノモルレベルで測定できることが明らかとなった。更に Table 3 に示したそれぞれの有機過酸化物の濃度と発光量との間には, 一次相関性のあることが明らかとなり, Fig. 1 に示すようにナノモルレベルで相関性のあるプロットが描けることが分かった。又本測定系における発光時間 (金属触媒を添加し, 測定を開始してから時間) は, すべての有機過酸化物において 1 分程度であることが確認された。

本測定系の検出限界について検討するため, ベンゾイルペルオキシドの MPI, セリウムアセチルアセトナート系によるピコモルレベルでの化学発光について検討を行った。Fig. 2 に示すように本測定系を用いることによりベンゾイルペルオキシドがピコモルレベルで定量できることが明らかとなった。特に 50 ピコモル以下においてはコントロール系との発光における有意差が認められないことから, 本測定系の検出限界は 50 ピコモルレベルであると考えられる。

以上示したように本測定系を用いることによりヒドロペルオキシド類更にはそれ以外の構造を有する各種有機過酸化物を短時間で, かつ簡易に微量定量できることが明らかとなった。特にクロロホルム-メタノール混合溶媒にてウシ血清の抽出を行うことにより, 抽出物の化学発光が同様な条件下にて測定されることが確認された。

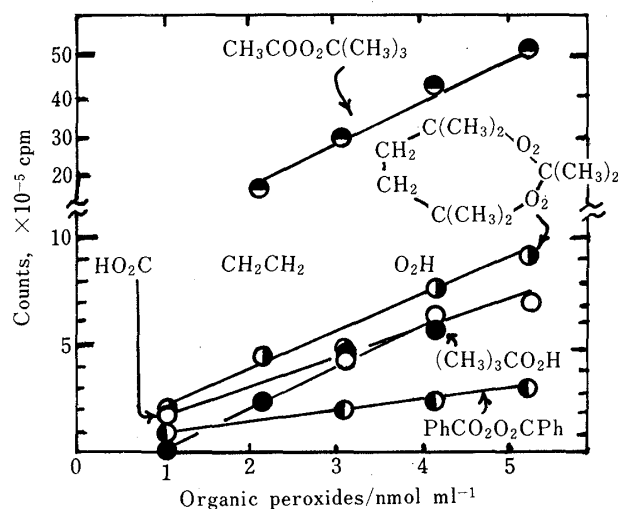


Fig. 1 Relationship between the amount of organic peroxides and chemiluminescent intensities

Final concentrations: MPI, 10 nmol/ml; Ce (AcAc)₃, 4.25 nmol/ml; Buffer: 0.1 M AcONa-AcOH buffer, pH 4.5

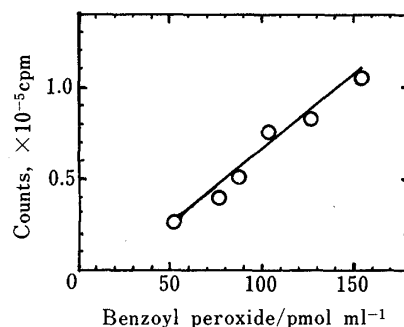


Fig. 2 Relationship between the amount of benzoyl peroxide and chemiluminescent intensity

Final concentrations: MPI, 1200 pmol/ml; Ce(AcAc)₃, 850 pmol/ml; Buffer: 0.1 M AcONa-AcOH buffer, pH 4.5

従って, 本化学発光法による有機過酸化物の測定方法は, 今まで測定が困難であったヒドロペルオキシド類以外の構造を有する有機過酸化物の測定が可能であるため, 今後生体内のヒドロペルオキシド類以外の構造を有する過酸化脂質の微量定量への応用に有効であると考えられる。一方, ポリ塩化ビニルなどのはん用樹脂中に残存している微量有機過酸化物が, 樹脂の初期着色に対して問題化されていることから⁹⁾, 本測定方法はこれら樹脂中の微量有機過酸化物の定量にも有効であると考えられる。

文 献

- 1) K. Yagi: *Biochem. Med.*, **15**, 212 (1976).
- 2) a) 原 節子, 鷺巣 治, 戸谷洋一郎: 油化学, **31**, 1004 (1982); b) 原 節子, 鈴木和久, 戸谷洋一郎: 油化学, **32**, 680 (1983); c) 原 節子, 長谷川誠司, 鈴木裕史, 戸谷洋一郎: 油化学, **34**, 283 (1985); d) 原 節子, 志田真紀, 戸谷洋一郎: 油化学, **37**, 119 (1988); e) 原 節子, 志田真紀, 戸谷洋一郎: 油化学, **37**, 427 (1988); 原 節子, 清水勝彦, 戸谷洋一郎: 油化学, **37**, 1153 (1988).
- 3) T. Miyazawa, K. Yasuda, K. Fujimoto, T. Kaneda: *Anal. Lett.*, **20**, 915 (1987); *J. Biochem.*, **103**, 744 (1988).
- 4) Y. Yamamoto, M. H. Brodsky, J. C. Baker, B. N. Ames: *Anal. Biochem.*, **160**, 7 (1987).
- 5) a) W. A. Pryor, J. P. Stanley: *J. Org. Chem.*, **40**, 3615 (1975); b) W. A. Pryor, J. P. Stanley, E. Blair: *Lipid.*, **11**, 370 (1976); c) 島崎弘幸: 医学のあゆみ, **130**, 720, (1984).
- 6) 宮沢陽夫: “過酸化脂質と栄養”, p. 39 (1986), (光生館).
- 7) a) 沢田英夫, 中山雅陽: 油化学, **38**, 103 (1989); b) 沢田英夫, 増山和代, 中山雅陽: 油化学, **39**, 47 (1989).
- 8) S. Inoue, S. Sugiura, H. Kakoi, T. Goto: *Tetrahedron Lett.*, **1969**, 1609.
- 9) H. Hagii, T. Arai, T. Yamamoto: *J. Appl. Polym. Sci.*, **27**, 4879 (1982).



Chemiluminescent determination of organic peroxides using *Cypridina* luciferin derivatives. Hideo

SAWADA, Kazuyo MASUYAMA, Motohiro MITANI and Masaharu NAKAYAMA (Tsukuba Research Laboratory, Nippon Oil & Fats Co., Ltd., 5-10, Tokodai, Tsukuba-shi, Ibaraki 300-26)

A chemiluminescent trace determination for organic peroxides having hydroperoxides, peroxy esters, diacyl peroxides, peroxyketals, endoperoxides, and cyclic peroxide structures was investigated using *Cypridina* luciferin derivatives and cerium(III) acetylacetonate as a luminescent material and a metal catalyst, respectively. These peroxides in concentration from nanomole to picomole levels were found to be easily determined by this method. The chemiluminescent intensities of these peroxides were remarkably affected by the structures of the *Cypridina* luciferin derivatives and the intensities became stronger in the order; 2-methyl-3,7-dihydroimidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-one(MI) $\ll$ 2-methyl-6-phenyl-3,7-dihydroimidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-one(MPI) $<$ 2-methyl-6-(*p*-methoxyphenyl)-3,7-dihydroimidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-one (MMPI). Especially, for the determination of hydroperoxides using MPI, a following relationships between the chemiluminescent intensities and the structures of the hydroperoxides were obtained; *tertiary*-hydroperoxides ($R_1R_2R_3COOH$) $<$ *secondary*-hydroperoxides (R_1R_2HCOOH) $<$ hydrogen peroxide (*primary*-hydroperoxide).

(Received June 13, 1990)

Keyword phrases

chemiluminescent determination of organic peroxides;
chemiluminescence of *Cypridina* luciferin derivatives.