

4-ニトロ-*o*-アニシジンのジアゾニウム塩を発色試薬として用いる 吸光光度法による血清ビリルビンの定量

鈴木 優治^{®*}, 坂岸 良克^{**}

(1991 年 9 月 7 日受理)

血清ビリルビンのジアゾカップリング反応ではジピロールである反応中間体が生成する。常用されているスルファニル酸のジアゾニウム塩のこの物質に対する反応速度は小さく、スルファニル酸のジアゾニウム塩を用いた定量法では、定量が不完全になる可能性がある。4-ニトロ-*o*-アニシジンのジアゾニウム塩は反応中間体にも反応速度が大きく、これを用いた血清ビリルビンの定量法を設定し検討した。又、本法は従来法であるミカエルソン法及び酵素法とは良好な相関を示したが、定量値は本法のほうが高値となった。

1 緒 言

血清ビリルビンの定量にはビリルビンのジアゾカップリング反応に基づく吸光光度法が広く用いられている。

この方法では、反応中にビリルビンそのものと同様にジアゾニウム塩と反応する反応中間体が生成する¹⁾。この物質のジアゾカップリング反応速度はビリルビンそのものの反応に比べて小さく、反応の完結までには時間が必要である²⁾³⁾。このことから、Malloy-Evelyn 法⁴⁾を基盤とした方法では、全反応の完結には時間がかかり、測定が不完全になる可能性がある。血清ビリルビンの定量をより正確に行うためには、反応中間体とも速やかに反応するジアゾニウム塩の選定が必須である。

このような理由から、著者らは血清ビリルビンの定量に適するジアゾニウム塩の選定を目的として、38 種類のジアゾニウム塩とビリルビン及び反応中間体とのジアゾカップリング反応について検討し、報告した³⁾。本論文では、ビリルビンのカップリング剤として有望と考えられた 4-ニトロ-*o*-アニシジンのジアゾニウム塩を血清ビリルビンの定量に適用した結果について報告する。

2 実験方法

2・1 試 薬

1) 5 mmol/l 4-ニトロ-*o*-アニシジン塩酸溶液

4-ニトロ-*o*-アニシジン 5 mmol を 0.176 mol/l 塩酸 (和光純薬工業製特級) 溶液に溶かし、1 l とした。

2) 72 mmol/l 亜硝酸ナトリウム溶液

亜硝酸ナトリウム (和光純薬工業製特級) 0.50 g を精製水に溶かし、100 ml とした。

3) ジアゾニウム塩溶液

5 mmol/l 4-ニトロ-*o*-アニシジン溶液 10 ml に 72 mmol/l 亜硝酸ナトリウム溶液 0.6 ml を加え、混和し、5 分以内に用いた。

4) 170 μmol/l ビリルビン溶液

ビリルビン (シグマ) 10.0 mg をクロロホルムに溶かし、100 ml とした。

5) 120 μmol/l ジタウロビリルビン溶液

ジタウロビリルビン (フナコシ) 10.0 mg を水に溶かし、100 ml とした。

2・2 反応中間体の調製³⁾

1) ビリルビンを試料とした場合

分液漏斗に 10 mg/dl ビリルビン溶液 5 ml とメタノール 45 ml をとり、これにスルファニル酸のジアゾニウム塩溶液 6 ml を加え、よく混和し、25°C で約 4 分間反応させた。反応後、水及びクロロホルムを 30 ml ずつ加え、よく混和し、水相とクロロホルム相が完全に分離するまで静置した。クロロホルム相を分取し、再び分液漏斗に取り、水を適量加え、よく洗浄し、クロロホルム相を分取した。この洗浄操作を上層の水相が無色透明になるまで繰り返した。反応中間体を含むクロロホルム相は 420 nm 付近に吸収ピークを示した。

* 埼玉県立衛生短期大学: 338 埼玉県浦和市上大久保 519

** 埼玉医科大学化学教室: 350-04 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷 38

2) ジタウロビリルビンを試料とした場合

分液漏斗に 10 mg/dl ジタウロビリルビン溶液 5 ml と水 45 ml をとり、アニリンのジアゾニウム塩溶液 6 ml を加え、よく混和し、25°C で約 1 分間反応させた。反応後、クロロホルムを 30 ml 加え、よく混和し、水相とクロロホルム相が完全に分離するまで静置した。水相を分取し、再び分液漏斗に取り、クロロホルムを適量加え、よく洗浄し、水相を分取した。この洗浄操作を下層のクロロホルム相が無色透明になるまで繰り返した。反応中間体を含む水相は 400 nm 付近に吸収ピークを示した。

2・3 測定方法

1) 血清総ビリルビンの測定操作

血清 0.1 ml に水 1.9 ml とメタノール 2.0 ml を加え、混和後、ジアゾニウム塩溶液 1.0 ml を加え、25°C で 30 分間反応させた。反応後、吸光度は試薬から試験液を対照に測定した。試薬から試験液は水 2.0 ml にメタノール 2.0 ml 及びジアゾニウム塩溶液 1.0 ml を加え、調製し、検体と同様に操作した。又、検体から試験液は血清 0.1 ml に水 1.9 ml, メタノール 2.0 ml 及び 0.176 mol/l 塩酸溶液 1.0 ml を加え、調製し、水を対照に吸光度を測定した。測定は日立 101 型分光光度計で行った。

2) 直接反応性ビリルビンの測定操作

血清 0.1 ml に水 3.9 ml を加え、混和後、ジアゾニウム塩溶液 1.0 ml を加え、25°C で 30 分間反応させた。反応後、吸光度は試薬から試験液を対照に 545 nm で測定した。試薬から試験液は水 4.0 ml にジアゾニウム塩溶液 1.0 ml を加え、調製し、検体と同様に操作した。検体から試験液は血清 0.1 ml に水 3.9 ml と 0.176 mol/l 塩酸溶液 1.0 ml を加え、調製し、水を対照に吸光度を測定した。

3) 検量線の作製

ビリルビン溶液を 0.05~0.30 ml とり、それぞれにメタノールを加えて 4 ml とし、更に、ジアゾニウム塩溶液 1.0 ml を加え、よく混和し、25°C で 10 分間反応させた。反応後、吸光度は試薬から試験液を対照に 545 nm で測定した。試薬から試験液はメタノール 4.0 ml にジアゾニウム塩溶液 1.0 ml を加え、調製し、検体と同様に操作した。

4) 血清ビリルビン濃度の算出

検体中のビリルビン濃度は検体の吸光度と検体から試験液の吸光度との吸光度差を検量線に照合させ、求めた。

3 実験結果

3・1 定量に用いるジアゾニウム塩の選定

Fig. 1 はビリルビンのジアゾカップリング反応の反応機構について示している。この反応では、ビリルビン 1 分子からアゾビリルビン 2 分子が生成するが、反応は 2 段階で進行する⁵⁾。第一反応では、ビリルビンとジアゾニウム塩との反応でアゾビリルビン 1 分子とジピロールである反応中間体が生成する。反応中間体はビリルビンのジアゾカップリング反応が進行中の反応溶液にクロロホルムと水を添加することによりクロロホルムに抽出される^{1)~3)}。この物質はビリルビンそのものと同様にジアゾニウム塩と反応し、アゾビリルビンを生成するが、その反応速度は小さい。Table 1 は 38 種類のジアゾニウム塩を用い、反応中間体のジアゾカップリング反応速度及びビリルビンのジアゾカップリング反応で生成した発色体の分光学的特性について検討し、報告した結果の一部³⁾を示している。臨床検査で常用されているスルファニル酸のジアゾニウム塩⁴⁾は反応中間体に対する反応速度が小さいジアゾニウム塩のグループに属していた。反応速度の大きいジアゾニウム塩を生成する芳香族第一アミンは Table 1 では 4-ニトロアニリン、2,4-ジクロロアニリン、及び 4-ニトロ-*o*-アニシジンである。4-ニトロ-*o*-アニシジンのジアゾニウム塩はモル吸光係数が高く、しかも吸収極大波長が長波長域にある発色体を生成する点から、ビリルビンのカップリング剤として最も有望と考えられた。

このジアゾニウム塩を用い、血清総ビリルビン及び血清直接反応性ビリルビンの定量法の設定を引き続き行った。

3・2 ジアゾニウム塩溶液の調製条件

血清ビリルビンの定量に用いるジアゾニウム塩の調製

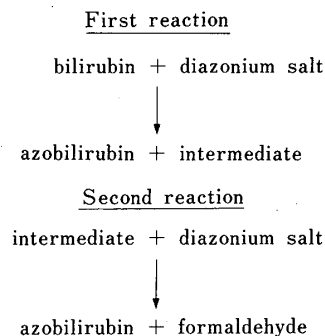


Fig. 1 Proposed reaction mechanism of the diazo coupling reaction of bilirubin

Table 1 The characteristic of the reaction between nine kinds of the diazonium salts and bilirubin or intermediate produced from the reaction of bilirubin

Aromatic primary amine	Rate constant ^{a)} / s ⁻¹	Absorption maximum ^{b)} / nm	Apparent molar absorptivity ^{b)} / l mol ⁻¹ cm ⁻¹
4-Chloroaniline	8.75×10^4	536	5.30×10^4
4-Nitroaniline	1.82×10^2	516	5.47×10^4
4-Aminobenzoic acid	6.86×10^3	528	5.82×10^4
Sulfanilic acid	1.19×10^3	546	5.95×10^4
4-Aminoacetophenone	8.25×10^3	526	6.23×10^4
2,4-Dichloroaniline	1.23×10^2	526	5.47×10^4
4-Nitro- <i>o</i> -anisidine	1.19×10^2	546	6.25×10^4
5-Nitro- <i>o</i> -anisidine	1.44×10^3	542	4.04×10^4
4-Nitroaniline-2-sulfonic acid	7.21×10^3	516	5.67×10^4
Aniline	1.49×10^4	552	3.29×10^4

a) rate constant of the reaction between the intermediate and the diazonium salt at 25°C. b) absorption maximum and apparent molar absorptivity of the colored product produced from the diazo coupling reaction of bilirubin.

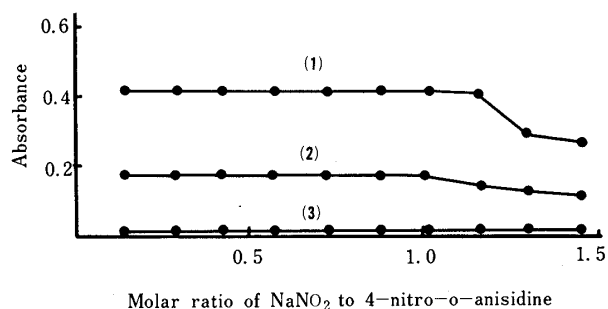


Fig. 2 Effect of the molar ratio of sodium nitrite to 4-nitro-*o*-anisidine in the diazonium salt solution on the color reaction of bilirubin

(1) 20 mg/dl bilirubin; (2) jaundice serum; (3) reagent blank

においては、芳香族第一アミンと亜硝酸ナトリウムの混合モル比がビリルビンの酸化物を生成させないために重要であることを標準物質を用いての検討から指摘した⁶⁾。そこで、患者検体の測定にあたり 4-ニトロ-*o*-アニシジンに対して反応させる亜硝酸ナトリウム量について再度検討した。Fig. 2 は 5 mmol/l 4-ニトロ-*o*-アニシジン溶液 10 ml に 72 mmol/l 亜硝酸ナトリウム溶液を加え、両物質のモル比 (NaNO₂/4-ニトロ-*o*-アニシジン) を 0.144~1.44 の範囲で変え、調製したジアゾニウム塩溶液とビリルビン及び黄疸血清との反応で生成した発色体の吸光度を示している。図のように、発色体の生成は亜硝酸ナトリウム/4-ニトロ-*o*-アニシジンのモル比が 1 程度までは一定であるが、それ以上になると、発色体の生成は減少した。この結果から、ジアゾニウム塩溶液

Table 2 Effect of water-soluble organic solvent on the reaction rate of the diazo coupling reaction of the intermediate

Organic solvent	Half-life/s	
	Sulfanilic acid	4-Nitro- <i>o</i> -anisidine
Acetone	62	2
Ethanol	269	11
Methanol	484	43

The reaction rate was measured at 26°C.

中の亜硝酸ナトリウム/4-ニトロ-*o*-アニシジンのモル比は 0.864 (5 mmol/l 4-ニトロ-*o*-アニシジン溶液 10 ml に 72 mmol/l 亜硝酸ナトリウム溶液 0.6 ml を加えることに相当する) とした。

3.3 反応促進剤の選定

総ビリルビンの測定では、間接ビリルビンを反応させるため、反応促進剤の添加が必要である。

一般に反応溶液の極性は反応速度に影響を及ぼすことが知られている⁷⁾。そこで、反応溶液の極性を変化させると考えられるメタノール (誘電率 32.6, 25°C), エタノール (24.3, 25°C), アセトン (20.7, 25°C), ジメチルスルホキシド及び Brij 35 を反応溶液に加え、反応速度を比較した。Table 2 はスルファニル酸及び 4-ニトロ-*o*-アニシジンのジアゾニウム塩を用い、メタノール、エタノール及びアセトンを添加したときの反応中間体のジアゾカップリング反応速度 (半減期で表示した) を示し

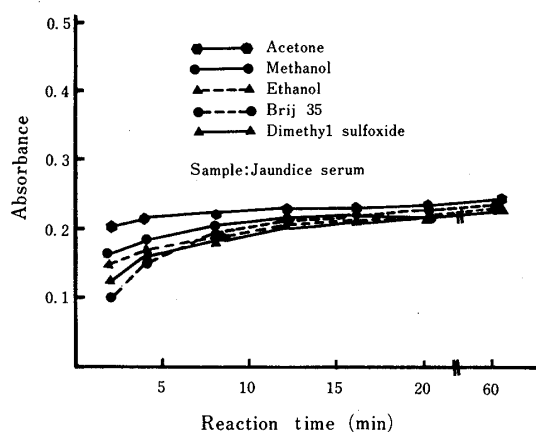


Fig. 3 Time course of the color reaction in the presence of five different organic compounds

ている。反応は添加溶媒としてアセトンを用いたときに最も速くなった。

又、Fig. 3 は黄だん血清を試料にした場合の反応の経時変化を示しているが、反応速度は純粋物質と同様に検体でもアセトン添加で最も大きくなった。反応速度は極性の低いアセトンで大きくなったが、発色体の安定性は小さくなる傾向を示した。特に標準物質、反応中間体から生成した発色体はアセトンでは反応数分後から退色を始めた。自動分析法の設定においては、添加溶媒はアセトンが良いと考えられるが、著者らの検討は用手法で行ったため、発色体により安定なメタノールを添加溶媒に選定した。

3・4 反応時間

総ビリルビンの反応時間はビリルビン標準液、市販ビリルビン標準血清（ネスコート BIL 標準血清）、黄だん血清及び反応中間体（ビリルビンから調製）を試料として、25°C と 37°C の温度下で検討した。その結果、37°C では、反応速度は大きいものの、生成した発色体の吸光度は短時間のうちに低下し始めた。25°C の反応条件下では、黄疸血清を除くすべての試料の反応は 10 分以内に完了し、発色は 37°C のときに比べ安定であった。しかし、黄だん血清の反応は完了するまでに少なくとも 30 分は必要であった。以上の検討結果から、総ビリルビン測定は 25°C 30 分で行うこととした（Fig. 4）。

直接反応性ビリルビンの反応時間は市販ビリルビン標準血清、黄だん血清及び反応中間体（ジタウロビリルビンから調製）を試料として検討した。その結果、市販ビリルビン標準血清及び反応中間体の反応は 10 分以内に

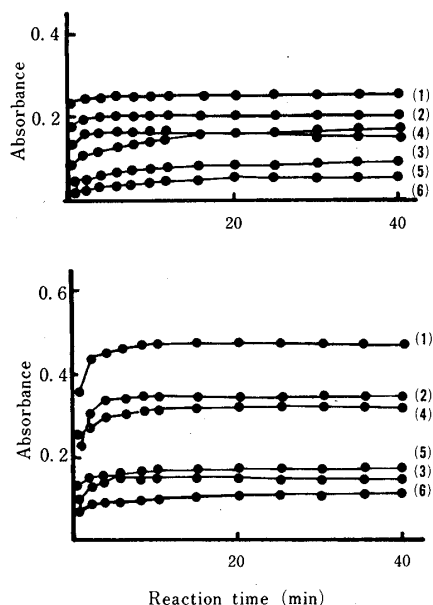


Fig. 4 Time course of the color reaction in the determination of total and direct reacting bilirubin

Upper panel (direct reacting bilirubin): (1) 10 mg/dl ditaurobilirubin, (2) bilirubin standard, (3) intermediate, (4)~(6) serum; Lower panel (total bilirubin): (1) 20 mg/dl bilirubin, (2) bilirubin standard, (3) intermediate, (4)~(6) serum

完了したが、黄だん血清の反応は完了するまでに少なくとも 30 分が必要であった。以上の検討結果から、直接反応性ビリルビン測定は 25°C、30 分で行うこととした（Fig. 4）。

3・5 吸収スペクトル

4-ニトロ-*o*-アニシジンのジアゾニウム塩とビリルビン標準液、市販ビリルビン標準血清、黄だん血清及び反応中間体（ビリルビンから調製）との反応で生成する発色体の吸収スペクトルを検討した。その結果、生成した発色体の吸収極大波長はいずれの試料の場合にも 546 nm 付近に認められた。この結果から、測定波長は 545 nm とした。

3・6 検量線

ビリルビン及び市販ビリルビン標準血清を用いて作成した検量線は 30 mg/dl まで原点を通る直線となった。

3・7 精度

20 mg/dl ビリルビン標準液及び 3 種類の黄だん血清（総ビリルビン濃度 2.7~13.0 mg/dl）を用いて本法の精密度 ($n=10$) を調べた。その結果、RSD はビリルビン

標準液 0.5%, 黄だん血清 0.5~1.5% であった。

3・8 回収率

4 種類の血清にジタウロビリルビン 4.1 mg/dl を添加し, 本法の回収率を検討した。その結果, 平均回収率は 98.5% であった。

3・9 共存物質の影響

本法における共存物質の影響は 3 種類の黄だん血清に塩化ナトリウム (添加濃度 1 g/dl), 尿素 (1 g/dl), グルコース (1 g/dl), アスコルビン酸 (1 g/dl), L-トリプトファン (1 g/dl), 塩化カルシウム (1 g/dl), 塩化カリウム (1 g/dl), 塩化マグネシウム (1 g/dl), クレアチニン (1 g/dl), アルブミン (2 g/dl) 及びヘモグロビン (0.5 g/dl) を添加して検討した。その結果, アス

コルビン酸及びヘモグロビンは負誤差を示し, 他の物質は妨害を示さなかった。黄だん血清の定量値は添加前の 4.12, 9.09, 2.46 mg/dl からアスコルビン酸の添加で 2.22, 6.96, 1.42 mg/dl, ヘモグロビンの添加で 4.07, 8.00, 2.00 mg/dl に低下した。

3・10 相 関

本法とミカエルソン法⁸⁾及び酵素法⁹⁾との相関関係について検討した (Fig. 5)。

総ビリルビン測定では, 本法の測定平均値 (4.6 mg/dl) はミカエルソン法 (3.8 mg/dl) 及び酵素法 (3.9 mg/dl) に比べ高値であった。回帰式及び相関係数はミカエルソン法 $y=1.095x+0.45$, $r=0.998$, 酵素法 $y=0.945x+0.90$, $r=0.994$ であった。

直接反応性ビリルビン測定では, 本法の測定平均値

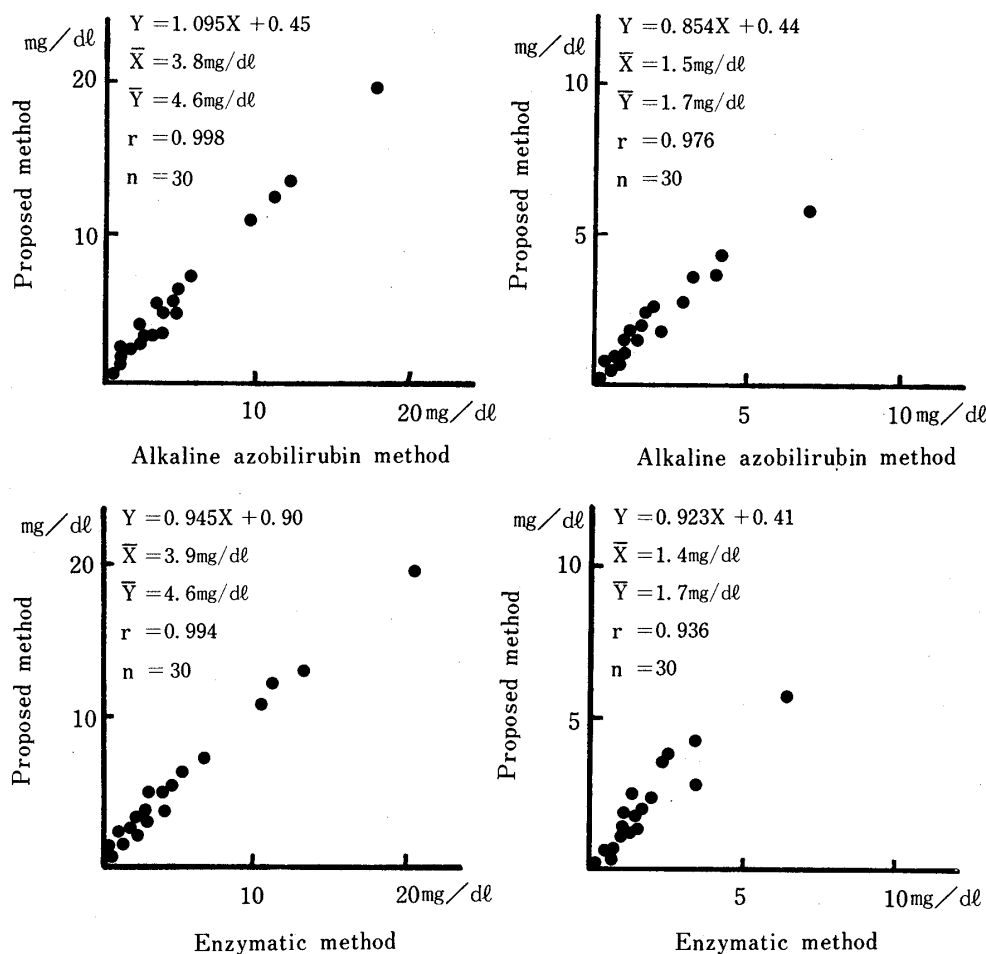


Fig. 5 Correlation of the proposed method with alkaline azobilirubin method and enzymatic method

Left panel: total bilirubin; Right panel: direct reacting bilirubin

(1.7 mg/dl) はミカエルソン法 (1.5 mg/dl) 及び酵素法 (1.4 mg/dl) に比べ高値であった。回帰式及び相関係数はミカエルソン法 $y=0.854x+0.44$, $r=0.976$, 酵素法 $y=0.923x+0.41$, $r=0.936$ であった。

相関の検討において、3 方法間に著しく解離する測定例及び総ビリルビン値と直接反応性ビリルビン値が逆転する測定例はなかった。

3・11 基準値

150 例の患者データから、本法の基準値を反復切断補正法により計算した¹⁰⁾。その結果、基準値は総ビリルビン 0.5~1.6 mg/dl, 直接反応性ビリルビン 0.3~0.6 mg/dl であった。

4 考 察

ビリルビンのジアゾカップリング反応がスルファニル酸のジアゾニウム塩に比べ著しく速い 4-ニトロ-*o*-アニシジンのジアゾニウム塩を血清ビリルビンの定量に適用した結果について述べた。

4-ニトロ-*o*-アニシジンのジアゾニウム塩はビリルビン標準液及び反応中間体とは速やかに反応したが、患者血清ビリルビンとの反応時間は標準物質及び反応中間体に比べ長くなった。この原因は明確ではないが、血清ビリルビンがタンパクと結合していることに関係すると思われる。いずれにしても、総ビリルビン及び直接反応性ビリルビンの反応時間は少なくとも 25°C で 30 分が必要と考えられた。

このような反応条件下で得られた本法の測定値はミカ

エルソン法及び酵素法に比べ高値であった。測定値はいずれの方法でも同一標準物質を用いて算出した。従って、本法が高値となる原因はキャリブレーションに基づくものではないと考えられる。又、本法では、血清ビリルビン値は試薬から試験を対照として測定した検体吸光度から、水を対照として測定した検体から試験液の吸光度を差し引き、算出した。このことから、ジアゾニウム塩自身の着色、検体の濁り、溶血の影響はほとんどないと考えられた。更に、共存物質の干渉に関する検討では、プラス誤差を示す物質は見いだせなかった。

(1990 年 9 月, 第 63 回日本生化学大会において一部発表¹¹⁾)

文 献

- 1) 鈴木優治, 坂岸良克: 生化学, **60**, 695 (1988).
- 2) 坂岸良克, 鈴木優治: 第 5 回肝代謝研究会報告集, p. 93 (1988), (アサヒメディカル).
- 3) 鈴木優治, 坂岸良克: 臨床化学, **19**, 365 (1990).
- 4) H. T. Malloy, K. A. Evelyn: *J. Biol. Chem.*, **119**, 481 (1937).
- 5) J. T. H. G. Overbeek, C. L. J. Vink, H. Deenstra: *Rec. Trav. Chim.*, **74**, 85 (1955).
- 6) 鈴木優治, 入野 勤, 坂岸良克: 臨床化学, **17**, 160 (1988).
- 7) 戸倉仁一郎: 溶媒和, p. 41 (1975), (化学同人).
- 8) M. Michaëlsson: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **13**, Suppl. 56, 1 (1961).
- 9) 高坂 彰: 生物試料分析, **9** (3), 15 (1986).
- 10) 臼井敏明: 臨床病理, **29**, 319 (1981).
- 11) 鈴木優治, 坂岸良克: 生化学, **62**, 785 (1990).



Spectrophotometric determination of serum bilirubin using diazonium salt of 4-nitro-*o*-anisidine as color reagent. Yuji SUZUKI* and Yoshikatsu SAKAGISHI**
(*Saitama College of Health, 519, Kamiokubo, Urawa-shi, Saitama 338; **Department of Biochemistry, Saitama Medical School, 38, Morohongo, Moroyama-cho, Iruma-gun, Saitama 350-04)

We present an assay for serum bilirubin using a new diazonium salt of 4-nitro-*o*-anisidine which reacts readily with intermediate formed in the diazo coupling reaction of bilirubin. The values of the present method correlated well with the values obtained by Michaëlsson method and enzymatic method. However, in the determination of total and direct bilirubin in serum, the values by the present method were significantly higher than those of the Michaëlsson method and the enzymatic method. Thus obtained laboratory data were 0.3~0.6 mg/dl for the direct bilirubin and 0.5~1.6 mg/dl for the total bilirubin.

(Received September 7, 1991)

Keyword phrases

determination of serum bilirubin; 4-nitro-*o*-anisidine.