

〈原著〉

尿ビリルビン測定のためのジアゾカップリング反応のpH依存性

鈴木 優治、菊地 愛美

pH dependence of diazo reaction for measuring urine bilirubin

Yuji Suzuki and Manami Kikuchi

Summary The diazotized 2,4-dichloroaniline is used for measuring urine bilirubin by a test strip. It is known that the diazo reaction is influenced by pH. Since urine pH varies from pH 5 to pH 8, The influence of urine pH on the diazo reaction was investigated using ditaur bilirubin. The color development decreased in the presence of buffer solutions of pH 7 and pH 8. In addition, at these pH levels, coloring of dizonium salt solution itself and color development of coexisting substances occurred.

Key words: Urine bilirubin, Test strip, Diazo reaction, Effect of pH, 2,4-dichloroaniline

I. 緒言

尿に排泄される抱合型ビリルビンの測定は、閉塞性黄疸、肝実質性黄疸などのスクリーニングに有用である。試験紙法による尿ビリルビンの測定には、ジアゾカップリング反応が応用されている^{1,2)}。この反応は、ジアゾニウム塩が種々の物質と求電子置換反応し³⁾、発色体を生成するため、臨床検査においてもビリルビンをはじめとしてバニルマンデル酸、亜硝酸、ウロビリノゲン、白血球エステラーゼなどの測定に応用されている。しかし、この反応にはpH依存性がある³⁻⁶⁾。尿のpHは、食事や運動などの生理的要因によりpH5~8の範囲で変動する。そのた

め、試験紙を尿に浸漬すると、検出試薬中のpHが変化し、反応は尿pHの妨害を受ける可能性がある。そこで、試験紙法によるビリルビン測定におけるpHの影響の特性について、血清ビリルビン代用標準物質として評価されている水溶性のジタウロビリルビン⁷⁾および臨床応用されている2,4-ジクロロアニリンのジアゾニウム塩^{1,2)}を用いて分光学的に検討した。

II. 方法

1. 試薬

測定試薬は和光純薬社製の試薬を用いて文献⁸⁾に従い次のように調製した。

埼玉県立大学保健医療福祉学部健康開発学科
〒343-8540 埼玉県越谷市三野宮820
受領日 平成25年12月13日
受理日 平成25年12月19日

Department of Health Sciences, School of Health and Social Services, Saitama Prefectural University,
820 Sannomiya, Koshigaya, Saitama 343-8540, Japan

1.5%塩酸溶液：5 mol/L HCl 7.5 mLを精製水に溶かし、500 mLにした。

5 mmol/L芳香族第一アミン溶液：2,4-ジクロロアニリン（和光純薬工業 046-28142）を2.5 mmolとり、1.5%塩酸に溶かし、500 mLにした。

5 g/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 195-02562）0.5 gを精製水に溶かし、100 mLにした。

ジアゾニウム塩溶液：5 mmol/L 2,4-ジクロロアニリン溶液10 mLに5 g/L亜硝酸ナトリウム溶液を0.6 mL加え、ジアゾ化が完了したと考えられる時間が経過した後、使用した。

100 mg/Lジタウロビリルビン溶液：ジタウロビリルビン2ナトリウム（和光純薬工業 554-64251）10 mgを精製水に溶かし、100 mLにした。

クエン酸- Na_2HPO_4 緩衝溶液（pH5~8）：0.1 mol/Lクエン酸溶液と0.2 mol/L Na_2HPO_4 溶液を混合し、pH5~8の緩衝溶液を調製した。

0.1 mol/L尿中成分溶液：クレアチニン、馬尿酸ナトリウム、アスコルビン酸をそれぞれ0.01

molとり別々に精製水に溶かし、100 mLにした。

1 g/Lアミノ酸溶液：トリプトファン、フェニルアラニン、ヒドロキシプロリンをそれぞれ100 mgとり別々に精製水に溶かし、100 mLにした。

2. 測定操作

緩衝溶液存在下の反応：100 mg/Lジタウロビリルビン溶液0.2 mLに精製水2.0 mL、緩衝溶液（pH5~8）2.0 mL、ジアゾニウム塩溶液0.5 mLの順に加え反応させ、水を対照に吸収スペクトルとタイムコースを測定した。0.1 mol/Lクレアチニン、0.1 mol/L馬尿酸ナトリウム、0.1 mol/Lアスコルビン酸共存物質、1 g/Lトリプトファン、1 g/Lフェニルアラニン、1 g/Lヒドロキシプロリンも100 mg/Lジタウロビリルビン溶液と同様に操作し吸収スペクトルを測定した。

緩衝溶液非存在下の反応：100 mg/Lジタウロビリルビン0.2 mLに精製水2.0 mLを加え、これにジアゾニウム塩0.5 mLを加え反応させた後、緩衝溶液（pH5~8）2.0 mLを加え、水を対照と

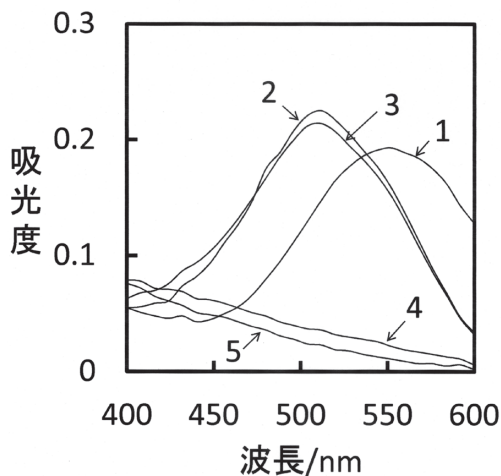


図1 pHの異なる緩衝溶液存在下におけるジタウロビリルビンの反応
吸収スペクトルは精製水を対照として測定した。

1：精製水存在下の反応、2：pH5緩衝溶液、3：pH6緩衝溶液、4：pH7緩衝溶液、5：pH8緩衝溶液、ジタウロビリルビン濃度：100 mg/L

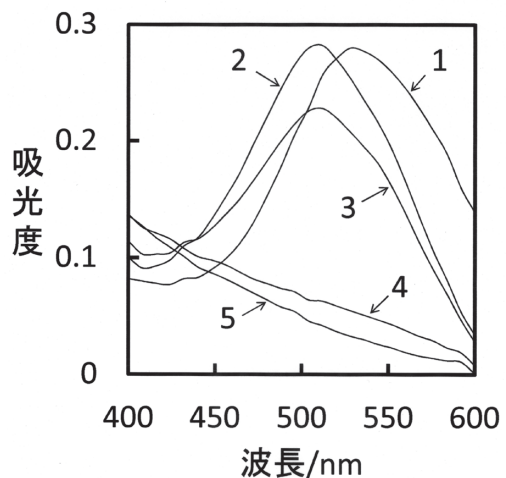


図2 発色の安定性とpHとの関係

精製水存在下でジタウロビリルビンを発色させた後にpHの異なる緩衝溶液を加え、精製水を対照に吸収スペクトルを測定した。

1：精製水を加えた場合、2：pH5緩衝溶液、3：pH6緩衝溶液、4：pH7緩衝溶液、5：pH8緩衝溶液、ジタウロビリルビン濃度：100 mg/L

して吸収スペクトルを測定した。

Ⅲ. 結果

1. pHの異なる緩衝溶液存在下におけるジタウロビリルビンの反応

図1は緩衝溶液存在下でジタウロビリルビンとジアゾニウム塩を反応させたときの吸収スペクトルと緩衝溶液pHとの関係を示している。pH5~6では512 nmに吸収極大波長を有する赤色の発色体が生成した。しかし、pH7~8では発色体の生成は著しく低下した。

2. 発色体の安定性とpHとの関係

ジタウロビリルビンとジアゾニウム塩を緩衝溶液非存在下で反応させた後に、緩衝溶液を加え吸収スペクトルを測定し、生成した発色体に対する緩衝溶液pHの影響を調べた。図2のようにpH5~6緩衝溶液の添加では発色体の吸収極大波長は短波長側に移動したが、吸光度はpH5では変化なく、pH6ではやや低下するにすぎなかった。しかし、pH7~8ではpH5~6の反応で認められた発色体の吸収ピークは消失した。

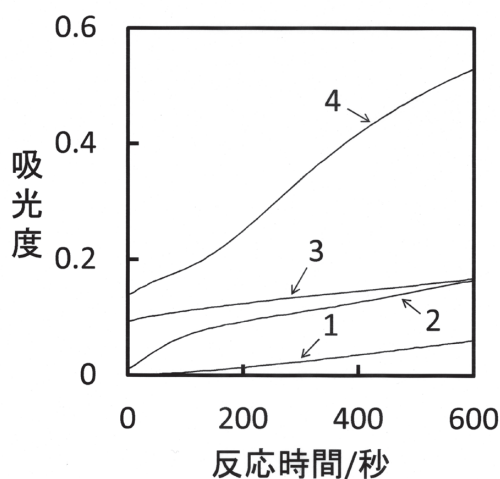


図3 試薬盲検のタイムコース
試薬盲検の吸光度は精製水を対照として室温において520 nmで測定した。
1 : pH5緩衝溶液、2 : pH6緩衝溶液、3 : pH7緩衝溶液、4 : pH8緩衝溶液

3. 試薬盲検のタイムコース

図3は試薬盲検のタイムコースと緩衝溶液pHとの関係を示している。時間の経過とともにジアゾニウム塩溶液自体も着色する特性が認められた。吸光度の上昇はpHが高いほど大きくなった。

4. 発色のタイムコースとpHとの関係

図4はジタウロビリルビンとジアゾニウム塩との反応のタイムコースと緩衝溶液pHとの関係を示している。発色は反応開始直後に最大となり、時間の経過とともにpH5~6ではわずかに低下し、pH7~8では急激に低下した。

5. 共存物質の反応

ジアゾニウム塩は種々の物質と反応し発色体を生成する。そこで、尿中に存在するいくつかの共存物質の反応について検討した。

図5はクレアチニンとジアゾニウム塩との反応の吸収スペクトルと緩衝溶液pHとの関係を示している。クレアチニンもジアゾニウム塩と反応し発色体を生成した。発色体の生成はpHが高

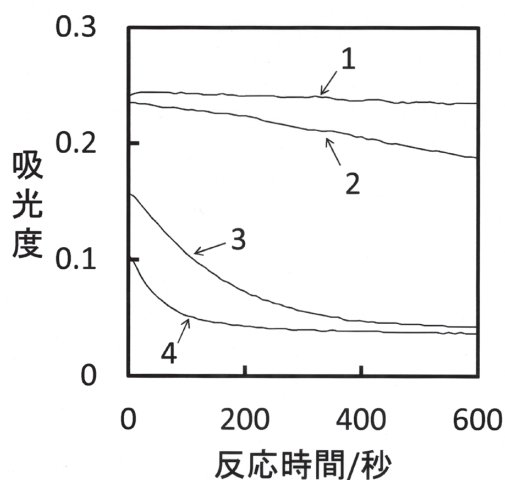


図4 ジタウロビリルビンの発色のタイムコース
吸光度は精製水を対照として室温において520 nmで測定した。
1 : pH5緩衝溶液、2 : pH6緩衝溶液、3 : pH7緩衝溶液、4 : pH8緩衝溶液、ジタウロビリルビン濃度 : 100 mg/L

いほど増加した。図6はトリプトファンとジアゾニウム塩との反応の吸収スペクトルと緩衝溶液pHとの関係を示している。トリプトファンもジアゾニウム塩と反応し発色体を生成した。クレアチニンと同様に、pHが高いほど、発色体の生成は増加した。両物質から生成した発色体はジタウロビリルビンから生成した発色体の吸収に重なる色調を示した。一方、馬尿酸ナトリウム、フェニルアラニン、ヒドロキシプロリンでは発色体は生成しにくいと判断された。還元物質であるアスコルビン酸はジタウロビリルビンの発色体の生成を阻害した。

6. 発色反応が起こるpH領域の比較

図7は、512 nmにおけるジタウロビリルビン、クレアチニンおよびトリプトファンの反応溶液の吸光度とジアゾニウム塩溶液添加後にpHメータにより測定された実際の反応溶液pHとの関係を示している。ジタウロビリルビンはpH2~6で発色体を生成した。一方、クレアチニンはpH3から、トリプトファンはpH6付近から発色体を生成し始めた。このように共存物質の発色はpH

の上昇により起こり、pHが高いほど大きくなった。ジタウロビリルビンのみの発色はpH2付近に限定されていた。

Ⅳ. 考察

ビリルビンは種々のジアゾニウム塩と反応し、モル吸光係数や吸収極大波長などの分光学的特性が異なるアゾビリルビンを生成することが報告されている⁸⁾。2,4-ジクロロアニリンのジアゾニウム塩は非抱合型ビリルビンと反応し、メタノール存在下では526 nmに吸収極大波長を示すモル吸光係数54,700 L.mol⁻¹cm⁻¹の発色体を生成する。2,4-ジクロロアニリンのジアゾニウム塩が尿ビリルビンのカップリング剤に選択されている理由は、ビリルビンのジアゾカップリング反応で生成する反応中間体との反応の半減期⁹⁾が56 sと短く、短時間で反応が完結することによるものと考えられる。ちなみに血清ビリルビン定量に用いられるスルファニル酸のジアゾニウム塩⁹⁾の反応における半減期581 sと比較すると、2,4-ジクロロアニリンのジアゾニウム塩の反応

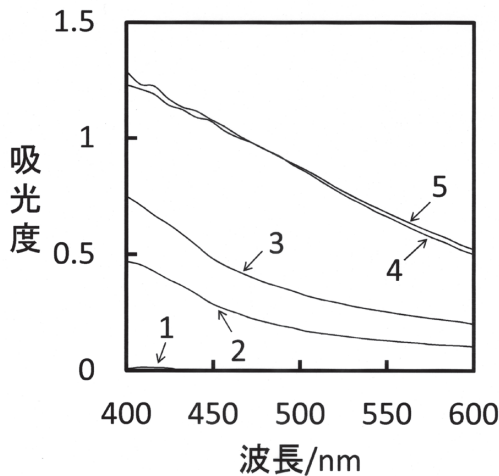


図5 クレアチニンの反応
吸収スペクトルは精製水を対照として測定した。
1：精製水存在下の反応、2：pH5緩衝溶液、3：pH6緩衝溶液、4：pH7緩衝溶液、5：pH8緩衝溶液、クレアチニン濃度：0.1 mol/L

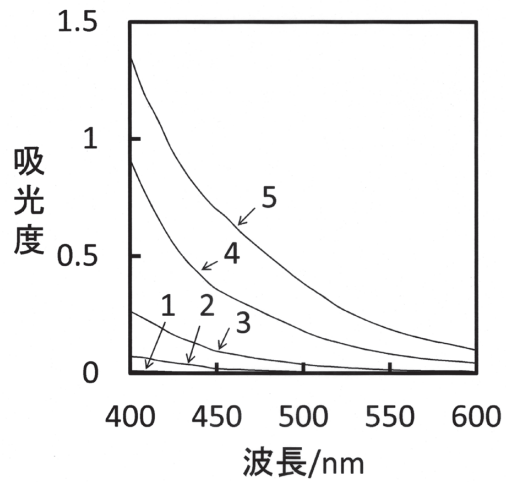


図6 トリプトファンの反応
吸収スペクトルは精製水を対照として測定した。
1：精製水存在下の反応、2：H5緩衝溶液、3：pH6緩衝溶液、4：pH7緩衝溶液、5：pH8緩衝溶液、トリプトファン濃度：1 g/L

は格段に速いことがわかる。

ジタウロビリルビンとジアゾニウム塩との反応では、緩衝溶液pHが高いほど発色が低下し、退色も起こることから、pHが高くなると試験紙法では偽陰性になる可能性がある。さらに、pH7~8緩衝溶液では時間の経過とともに急激に発色が低下することから、結果の判読時間の厳守も重要である。また、クレアチニンやトリプトファンなどの共存物質では、緩衝溶液pHが上昇するにつれて発色体の生成が始まった。ジアゾニウム塩はpHが上昇すると、求電子置換反応しないジアゾヒドロキシドを経てジアゾタートイオンに変化する⁹⁾。血清ビリルビンの測定に用いられているスルファニル酸のジアゾニウム塩^{9,10)}の場合、アルカリ性下では酸性下では反応しない多くの物質がこのジアゾニウム塩と反応し、黄色~紅色物質を生成する⁹⁾。2,4-ジクロロアニリンのジアゾニウム塩においてもpH7~8緩衝溶液存在下では酸性下では反応しない物質が発色体を生成した。したがって、共存物質の発色に

よる偽陽性を抑制することがジアゾカップリング反応に基づく尿ビリルビン測定において重要であり、これには尿pHを低下させる酸性化が有効と考えられる。

ジタウロビリルビンとジアゾニウム塩との反応を緩衝溶液非存在下と緩衝溶液存在下で比較した結果では、pH5~6緩衝溶液存在下では512 nm付近に吸収極大波長を有する発色体が生成したが、pH7~8緩衝溶液存在下ではpH5~6緩衝溶液存在下の反応で生成した発色体は認められなかった。一方、緩衝溶液非存在下で2,4-ジクロロアニリンのジアゾニウム塩により生成した発色体はpH7~8緩衝溶液の添加により急激に退色した。これらの結果から、pH7~8緩衝溶液存在下で発色体が認められなかった理由が、①発色体の生成が低下するためか、あるいは、②いったん生成した発色体が分解し退色するためかのいずれであるかを決定することはできない。この点についてアルカリ性下でも安定で退色しない発色体を生成する4-ニトロアニリン-2-スルホン酸のジアゾニウム塩を用いて検討した報告によれば⁹⁾、アルカリ性下では発色体の生成が低下することが見出されている。2,4-ジクロロアニリンのジアゾニウム塩の反応も4-ニトロアニリン-2-スルホン酸のジアゾニウム塩の反応も求電子置換反応であることで共通していることから、2,4-ジクロロアニリンのジアゾニウム塩の場合にも4-ニトロアニリン-2-スルホン酸のジアゾニウム塩の結果が当てはまるものと考えられる。

以上の結果から、ジアゾカップリング反応に基づく尿ビリルビン測定では尿pHが高まり検出系pHが上昇する場合、ビリルビンの発色の低下やアゾビリルビンの退色による偽陰性、ジアゾニウム塩自体の着色や共存物質の発色による偽陽性が生じる可能性がある。

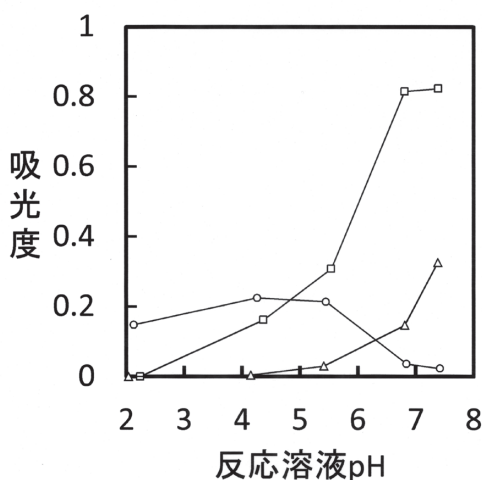


図7 発色反応が起こるpH領域の比較
 反応溶液pHはpHの異なる緩衝溶液を含む試料溶液にジアゾニウム塩溶液を加えたのちに電極法により測定した実際の溶液pHを示す。吸光度は試薬盲検を対照として520 nmで測定した。
 ○：100 mg/Lジタウロビリルビン、△：100 mg/Lトリプトファン、□：0.1 mol/Lクレアチニン

V. 結語

ジアゾカップリング反応に基づく尿ビリルビン測定では、尿pHの上昇は、アゾビリルビンの生成量の低下や分解による偽陰性やジアゾニウム塩自体の着色や共存物質の発色による偽陽性を生じさせる可能性が認められた。

謝辞

本研究は埼玉県立大学奨励研究費の助成を受けたものである。

(本論文の一部は2013年12月開催の第42回埼玉県医学検査学会において報告した)

文 献

- 1) 金井 泉原著, 金井正光編著: 臨床検査法提要第31版, 金原出版, pp165-167, 1998.
- 2) 横山 宏, 清水英一, 藤巻町子: 尿定量法のすべて8ビリルビン. 臨床検査(臨時増刊号), 12: 1088-1094, 1978.
- 3) 稲本直樹: 有機化学の基礎—親電子反応, 初版第3刷, 培風館, pp35-40, 1970.
- 4) Morrison RT, Boyd RN: 有機化学(中), 中西香爾ほか訳, 第3版第3刷, 東京化学同人, pp951-954, 1978.
- 5) 鈴木優治, 坂岸良克: 血清成分のジアゾカップリング反応—酸性下反応とアルカリ性下反応との比較—. 生物試料分析, 17: 268-273, 1994.
- 6) 鈴木優治: メタノール及びカフェイン・安息香酸ナトリウム存在下におけるビリルビンのジアゾカップリング反応の相違に関する研究. 生物試料分析, 22: 277-282, 1999.
- 7) 鈴木優治: 血清ビリルビン代用標準物質としてのジタウロビリルビンの化学特性. 分析化学, 49: 901-905, 2000.
- 8) 鈴木優治, 坂岸良克: 血清ビリルビン定量法としての各種ジアゾニウム塩を用いたジアゾカップリング反応の研究. 臨床化学, 19: 365-373, 1990.
- 9) Malloy HT, Evelyn KA: The determination of bilirubin with photoelectric colorimeter. J Biol Chem, 119: 481-490, 1937.
- 10) Michaëlsson M: Bilirubin determination in serum and urine. J Lab Invest, 13: Suppl 56: 1-80, 1961.