

ヒドロキシウレアの安定性およびその比色測定に及ぼす2,3の物質の影響

大村, 浩久
九州大学農学部食糧化学教室

鳥巢, 隆雄
大日本インキ化学工業株式会社

井上, 義人
久留米大学医学部公衆衛生学教室

篠原, 和毅
九州大学農学部食糧化学教室

他

<https://doi.org/10.15017/23148>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 28 (1), pp.31-36, 1973-10. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

ヒドロキシウレアの安定性およびその 比色測定に及ぼす 2, 3 の物質の影響

大村 浩久・鳥巢 隆雄*・井上 義人**

篠原 和毅・飯尾 雅嘉

九州大学農学部食糧化学教室

(1973年4月18日受理)

Stability of Hydroxyurea and Effect of Some Substances on Its Colorimetry

HIROHISA OMURA, TAKAO TOSU, YOSHITO INOUE,
KAZUKI SHINOHARA and MASAYOSHI IIO

Food Chemistry Institute, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka

近年ウイルスや癌に関連してヒドロキシウレアの生理的機能が注目されている。しかしヒドロキシウレアは比較的に不安定であるといわれているので、その機能は分解物による二次的作用ということも考えられる。そのためその性質とくに安定性を明確にする必要があるが、それには定量法が確立されなければならない。前報(大村ら, 1971)において8-ヒドロキシキノリンによるヒドロキシウレアの比色測定法を設定することができたので、まずこの方法により安定性を求めた。しかし他方方法によって種々の類似物質も呈色することが認められ、これらによる妨害も無視されないので前報に引き続いて測定法をも検討した。

実験材料および方法

1. 試薬

a. ヒドロキシウレア 既述(大村ら, 1970)のようにヒドロキシルアミンとウレタンとから合成し5~6回再結した。これにはヒドロキシルアミンの混在は認められない。

b. その他 主に市販特級品をそのまま使用した。

2. 吸収スペクトルおよび吸光度の測定

前報(大村ら, 1971)通り鳥津マルチパーパス自記分光光度計 MPS-50 型で吸収スペクトルを測定し、

一方吸光度は主として日立分光光度計 EPU-2 型で求めた。

3. 測定法

前報で確立した方法に従い次のように行なった。試料 1 ml に 0.2 M トリス緩衝液 (pH 7.5) 1 ml, 1% 8-ヒドロキシキノリン溶液 1 ml, 1 M 炭酸ナトリウム溶液 1 ml および水を加えて全量 5 ml とし, 40°C に 3 時間保持したのち 425 m μ の吸光度を測定した。この値から Fig. 1 に従って被検液の濃度を求めた。Fig. 1 から明らかなように, 5 $\times 10^{-5}$ M ないし 1 $\times 10^{-3}$ M の範囲にわたって直線関係が認められるので, 式(1)によって吸光度から概略の濃度を計算により求めることもできる。

$$C = 2.35 \times O.D._{425} \quad (1)$$

C: 被検液の濃度, (10⁻³M)

O.D.₄₂₅: 吸光度(光度計の読み)

ヒドロキシルアミンについては箴島(1961)の方法に従い, 同一の試薬で室温に 60 分間放置して発色させ 700 m μ での吸光度から求めた。

結果および考察

1. ヒドロキシウレアの安定性

ヒドロキシウレアは一般に不安定であってヒドロキ

* 大日本インキ化学工業株式会社

** 久留米大学医学部公衆衛生学教室

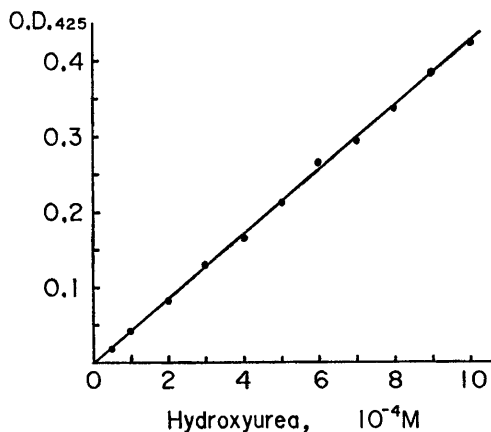


Fig. 1. Standard curve of hydroxyurea. A mixture of 1 ml 0.2 M Tris buffer (pH 7.5), 1 ml 1% 8-hydroxyquinoline, 1 ml 1 M Na_2CO_3 and H_2O to be 5 ml total volume was incubated at 40°C for 3 hours and the optical density was estimated at $425\text{ m}\mu$. Approximate concentration of hydroxyurea could be alternatively calculated according to the equation (1).

$$\text{Conc. of hydroxyurea (} 10^{-3}\text{M)} \\ = 2.35 \times \text{O.D.}_{425} \dots \dots \dots (1)$$

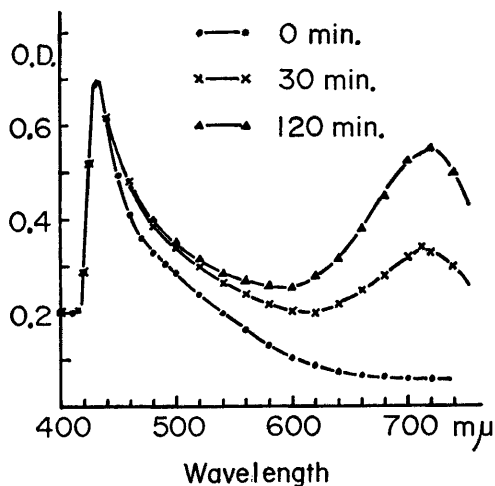


Fig. 2. Variation of absorption spectrum by heating. Hydroxyurea ($1 \times 10^{-3}\text{M}$) was heated in a boiling water bath for 30 or 120 minutes and the spectrum was estimated after coloration as in Fig. 1.

シルアミンを生ずるといわれている。 $1 \times 10^{-3}\text{M}$ ヒドロキシウレアを 30 分ないし 2 時間沸騰水に浸漬したのち、その 1 ml について常法により発色させその吸収スペクトルを求めた。 Fig. 2 から明らかなように、呈色液の吸収スペクトルは $425\text{ m}\mu$ の極大値にはほ

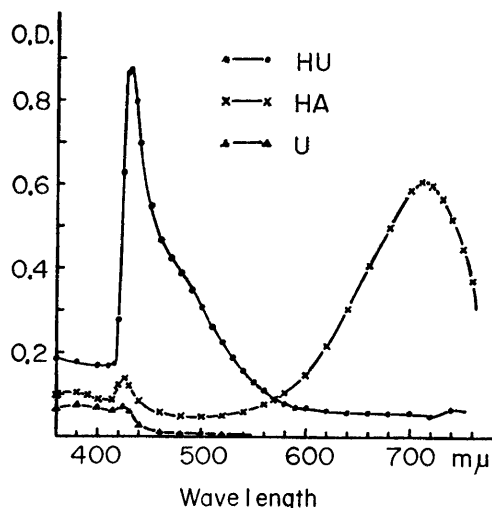


Fig. 3. Absorption spectra of the colored solution of hydroxyurea, urea and hydroxylamine with 8-hydroxyquinoline.

HU: $5 \times 10^{-3}\text{M}$ hydroxyurea; HA: $5 \times 10^{-4}\text{M}$ hydroxylamine; U: $1 \times 10^{-1}\text{M}$ urea

とんど変化はないが、 $700 \sim 710\text{ m}\mu$ にも極大を生じその吸光値は加熱時間に応じて増加した。 Fig. 3 に示すように、ヒドロキシウレア呈色液の吸収スペクトルは $425\text{ m}\mu$ に極大を示した。これに対してヒドロキシルアミンのものは $700 \sim 710\text{ m}\mu$ に強い吸収極大があり、さらに $425\text{ m}\mu$ 付近にも第二の吸収が観察される。しかもアミンの呈色は極めて鋭敏であって発色度はヒドロキシウレアの数倍から 10 倍にも達する。一方尿素による呈色は微弱であって、同じく $425\text{ m}\mu$ に一応の極大が認められるがほとんど問題にならない。従ってヒドロキシウレアを加熱したのち呈色させた場合、生じた $700 \sim 710\text{ m}\mu$ 付近の吸収極大はヒドロキシルアミンのものと一致する。しかも後述するように、他の物質により発色もこの長波長域では吸収極大を示さないで、ヒドロキシウレアが加熱により分解してヒドロキシルアミンを生ずることが推定される。これに伴ってヒドロキシウレアは減少する筈であるが、 $425\text{ m}\mu$ の極大値にはほとんど変化はない。これはヒドロキシウレアそのものに基づく吸光度は低下するが、これに伴って生じたヒドロキシルアミンによる $425\text{ m}\mu$ の吸収が加わるために顕著な変動が認められないと考えられる。従って本法によりヒドロキシウレアを測定しその安定性を検討する場合、とくにヒドロキシルアミンの共存ないし生成が予想される時には、 $425\text{ m}\mu$ だけでなく $700\text{ m}\mu$ の吸光度も求めなければならない。

これによって酸性ならびにアルカリ性におけるヒドロキシウレアの熱安定性を試験した。1×10⁻²Mヒドロキシウレア 1ml と 0.01N あるいは 1N 塩酸または水酸化カリウム 1ml とを混合し 2時間沸騰水中で加熱したのち、この反応液を中和し水を加えて全量 50 ml とする。その各 1ml について発色させ、425 mμ および 700 mμ の吸光度を求め Table 1 に示した。

Table 1. Heat stability of hydroxyurea.

Solvent	Conc. N	O.D. ₄₂₅	O.D. ₇₀₀
H ₂ O		0.095	0.115
HCl	0.01	0.125	0.410
	1.0	0.150	0.595
KOH	0.01	0.055	0.095
	1.0	0.025	0.045

A mixture of 1 ml 1×10⁻²M hydroxyurea and 1 ml H₂O, HCl (0.01 or 1.0 H) or KOH (0.01 or 1.0 N) was heated for 2 hours, neutralized and filled up to 50 ml. The optical densities at 425 mμ (for hydroxyurea) and 700 mμ (for hydroxylamine) were estimated after coloration as in Fig. 1.

2時間の加熱によってヒドロキシウレアは分解し、ある程度のヒドロキシルアミンを生成することは 700 mμ の吸光度から推定された。しかもその生成は塩酸の添加によって促進された。それに対してアルカリ性においてはかなり異なる。すなわちヒドロキシルアミンが生成することは一応認められるが、その量は水溶液におけるよりもさらに少ない。これはヒドロキシウレアないしアミンが引き続いて分解されるものであって、425 mμ および 700 mμ の吸光度がアルカリの添加により低下し、しかもアルカリ濃度の上昇に伴って促進されることから示唆される。

Table 1 においてヒドロキシウレアをアルカリ性で加熱した場合、700 mμ の吸光度はもちろん 425 mμ の吸光度も低下したが、酸性ではかえって上昇することが認められた。このような現象が水溶液では明らかでないので、1×10⁻²M ヒドロキシウレア水溶液を 95°C で 15分ないし 30分加熱したのち発色させ、700 mμ および後述する関係から 500 mμ の吸光度を測定した。

Table 2 の結果は、ヒドロキシウレア水溶液の場合呈色液の 500 mμ における吸光度も加熱に応じて減少したが、700 mμ の値は 15分で著しく増加し以後漸減の傾向を示し、同じくヒドロキシルアミンの生成を示

唆する。

このヒドロキシウレアからヒドロキシルアミンの生成は温度が高いほど促進されることは当然考えられるが、一方アミンの分解に影響することも予測され、従って 700 mμ の吸光度はアミンの生成量と分解量との差を示すものと思われる。Table 3 に 1×10⁻¹M ヒドロキシウレア水溶液を 37°C、1×10⁻²M 溶液を 50°C に 1ないし 3時間放置した結果を示す。

Table 2. Change of the optical density by heating hydroxyurea aq. solution.

Heating time, minutes	0	15	30
O.D. ₇₀₀	0.020	1.500	1.400
O.D. ₅₀₀	0.225	0.115	0.105

Hydroxyurea aq. solution (1×10⁻²M) was heated at 95°C and the optical density of the solution was estimated after coloration as in Table 1.

Table 3. Formation of hydroxylamine from hydroxyurea by heating.

Temperature		37°	50°
Conc. of hydroxyurea		1×10 ⁻¹ M	1×10 ⁻² M
O.D. ₇₀₀	0 hour	0.045	0.003
	1 "	0.065	0.008
	2 "	0.120	0.055
	3 "		0.077

Hydroxyurea (1×10⁻¹M or 1×10⁻²M) was incubated at 37° or 50°C for a few hours and hydroxylamine formed was estimated by determining O.D.₇₀₀ after coloration.

1×10⁻²M ヒドロキシウレアを 95°C に 15分間加熱した値 (Table 2) にくらべて、50°C の場合には 3時間後においてもヒドロキシルアミンに基づく 700 mμ の値は著しく低かった。37°C においてはさらに 10倍の濃度のヒドロキシウレアを用いたにもかかわらずそれ程著しい相違は認められず、高温の場合ヒドロキシルアミンの生成量は大きいことを示している。

2. ヒドロキシルアミンの影響

本法は元来ヒドロキシルアミンの定量法として開発されたものであって (Berg und Becker 1940; 箴島, 1961), 本法によるヒドロキシウレアの呈色はヒドロキシルアミンの測定には差し支えないが、逆にヒドロキシルアミンがヒドロキシウレアの測定に大きく影響することは Fig. 3 に示すように、それらの吸収スペクトルから明白である。しかも上述のようにヒドロキシウレアは比較的に不安定であって、とくに加熱によ

りヒドロキシルアミンを生じる。従ってアミンが共存する可能性はかなり大きいものと考えなければならない。そのためにヒドロキシウレアの測定についてはとくにヒドロキシルアミンの共存に留意し、またその分別定量について検討することが必要である。

理論的には両者ともに同一の試薬で発色するが、ヒドロキシウレアの呈色液はヒドロキシルアミンの場合の極大値である 700 m μ 付近にはほとんど吸収を示さない。さらにヒドロキシルアミンはヒドロキシウレアよりも低温、短時間で発色することから、まずこの条件で発色させ、しかも 700 m μ で吸光度を測定しヒドロキシルアミンの濃度を求めることができる。ついでこの濃度のヒドロキシルアミン単独の溶液についてヒドロキシウレア呈色条件で発色させて 425 m μ の吸光度を求めこの値を供試液（ヒドロキシウレア・ヒドロキシルアミン混液）の 425 m μ の値から控除すれば、供試液中のヒドロキシウレアによる値が得られ、これからその濃度が求められると思われる。このような考察に基づいて種々の濃度の混合液について試験したが、満足な結果は得られなかった。これはたとえばヒドロキシルアミンは室温、60分で吸光値は一定に達するが、ヒドロキシウレアは 40°C 3時間を要するといった発色条件の相違などもあって単純なものではなく、また発色にそれぞれ影響することも考えられることなどに基づくものと推定される。

こうしてヒドロキシルアミン共存下におけるヒドロキシウレアの測定については現在まで種々検討を加えてきたが、まだ完全に満足する方法は確立されるまでに至らなかった。

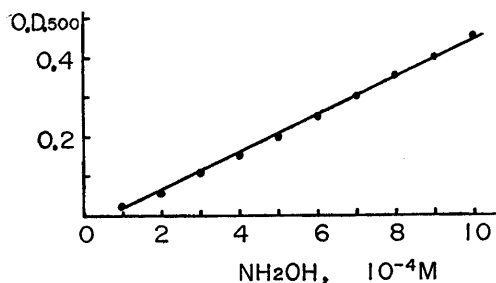


Fig. 4. Optical density at 500 m μ of colored hydroxylamine solution. Hydroxylamine was colored as in Fig. 1, but at room temperature for 1 hour (standard method for hydroxylamine). Approximate concentration of hydroxylamine could be alternatively calculated according to equation (3).

$$\text{Conc. of hydroxylamine (10}^{-3}\text{M)} \\ = 2.1 \times (\text{O.D.}_{500} + 0.03) \dots (3)$$

わずかに種々の濃度における単独ないし混合液を発色させて求めた吸光値から、実験的に得られた式 (2) が比較的に近い関係を示し、概略の濃度を求めるのに利用し得ると考えられるに過ぎなかった。

$$A = (C/1.1 - B) \times 2.5 \quad (2)$$

A: 425 m μ におけるヒドロキシウレアの吸光度

B: 500 m μ におけるヒドロキシルアミンの吸光度。ただしこの値は混液中の濃度（室温、60分発色させ 700 m μ の吸光度から求める）から逆に Fig. 4 によって得られたものである。なおこの関係は次式によっても示される。

$$\text{濃度 (10}^{-3}\text{M)} = 2.1 \times (\text{O.D.}_{500} + 0.03) \quad (3)$$

C: 500 m μ における被検液（ヒドロキシウレア・ヒドロキシルアミン混液）の吸光度。

3. その他の不純物の影響

前報（大村ら, 1971）においてこの測定法によりヒドロキシウレア、ヒドロキシルアミンのほかアンモニア、アルカリ、アルコール、ヒドラジンなども、それぞれ程度の差はあるが発色し妨害の可能性があることを指摘した。大村ら（1963）は無機窒素代謝系とウイルス誘発との関係を追及してきた過程において、それぞれの構成成分の分別定量法の確立に苦心し、とくにヒドロキシルアミンの定量には本法が最もすぐれていることを確認した。しかし上述のように種々の物質により発色するならば、ヒドロキシウレアだけでなくヒドロキシルアミンの測定についてもさらに検討を要する。Fig. 3 に示すように 8-ヒドロキシキノリンによるヒドロキシウレアとヒドロキシルアミンとの発色が、その吸収スペクトルにおいて異なるので、他の妨害物質についても吸収スペクトルを検討した。

メタノールおよびエタノールについては Fig. 5 に明らかなように、いずれも 425 m μ に極大値を示すが、450 m μ 付近より長波長側では吸収は認められない。他方アンモニア、水酸化ナトリウムおよび水酸化カルシウムの場合も同じく 425 m μ に吸収極大を示すが、450 m μ 付近より長波長側においてはほとんど問題にならない（Fig. 6）。なおこのとき 425 m μ の吸収はアンモニアが最も大きい、ヒドロキシウレアのほぼ 1/10 に過ぎないことは前報に示した通りである。従ってこれらの場合 Fig. 3 との比較からヒドロキシルアミンの測定に影響しないことはもちろん、ヒドロキシウレアにおいても、若し 450 ないし 500 m μ 付

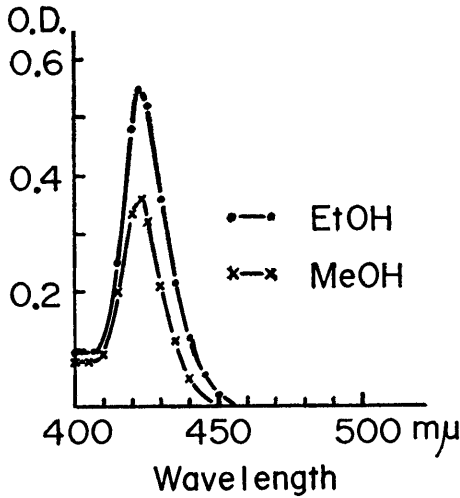


Fig. 5. Coloration of alcohols. CH₃OH: 99%; C₂H₅OH: 99%

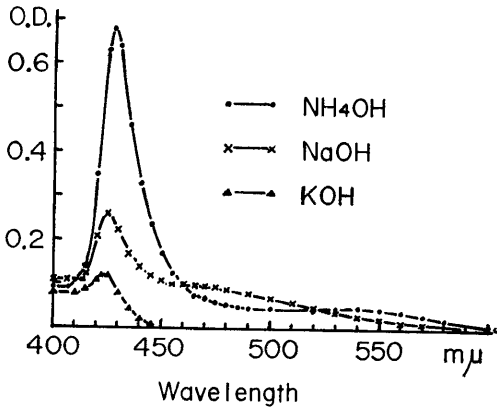


Fig. 6. Coloration of some alkaline solutions. NH₄OH: 1×10⁻²M; NaOH: 1×10⁻²M; KOH: 1×10⁻²M

近で吸光度を測定するならばほとんど問題にするには及ばない。¹⁾

これに対してフェニルヒドラジンは Fig. 7 に示すように最も強く呈色し、しかも 490 mμ に吸収極大があるのでヒドロキシウレアの測定が妨害されることは免れない。イソニコチン酸ヒドラジドあるいは尿酸も 425~430 mμ 付近に極大を示すが、その呈色度からほとんど問題はなく、またフェニルチオ尿素は全く影響しない。さらにこれらはフェニルヒドラジンも含めていずれも 550 mμ 付近より長波長側では全く吸収は

1) 500 mμ の吸光度もヒドロキシウレアの濃度と直線関係があることを確認した。

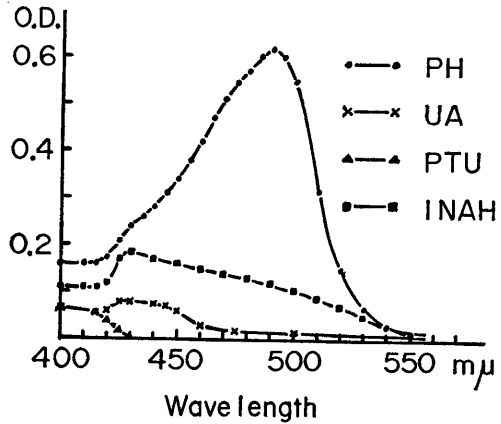


Fig. 7. Coloration of phenylhydrazine, uric acid, phenylthiourea and isonicotinic acid hydrazide. PH: 1×10⁻⁴M phenylhydrazine; UA: 1×10⁻²M uric acid; PTU: 2.5×10⁻²M phenylthiourea; INAH: 1×10⁻³M isonicotinic acid hydrazide.

認められない。

こうして 8-ヒドロキシキノリンによるヒドロキシウレアの測定には、ヒドロキシルアミンやフェニルヒドラジンによる妨害など若干の問題点があるが、同じ試薬によるヒドロキシルアミンの定量には全く支障がないことが確認された。

要 約

ヒドロキシウレアを加熱すると、ヒドロキシルアミンを生成することが 8-ヒドロキシキノリンによる呈色反応から認められた。しかもこのヒドロキシルアミンの生成は高温ないし塩酸酸性で顕著であったが、アルカリ性においてはヒドロキシウレアならびに生成したヒドロキシルアミンはいずれも減少した。

ヒドロキシウレア、ヒドロキシルアミンのほか尿素、メタノール、エタノール、アンモニア、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、フェニルヒドラジン、尿酸、フェニルチオ尿素およびイソニコチン酸ヒドラジドについても 8-ヒドロキシキノリンによって発色させ、その吸収スペクトルを検討した。その結果この試薬によるヒドロキシウレアの比色定量はヒドロキシルアミンおよびフェニルヒドラジンによる妨害は免れないが、他のものによる顕著な影響は考えられない。一方ヒドロキシルアミンの定量はヒドロキシウレア、フ

ニルヒドラジンを含み、試験したいずれの物質によっても妨害されないことが確かめられた。

文 献

Berg, R. und E. Becker 1940 Ein neuer Nachweis von Hydroxylamin durch Bildung von Chinolinchinon-(5,8)-[8-oxychinoly]-5-imid]-(5), genannt "Indo-oxin". *Chem. Ber.* 73(3): 172~173.

大村 浩久・箴島 豊・波多野 昌二・吉原 典子・渡辺

健治・山藤一雄 1963 無機窒素化合物およびオキシムの測定法. 九大農学芸誌, 20(2): 179-198

大村浩久・塚本徹・篠原和毅・鳥巢隆雄 1970 緑藻の尿素脱水素酵素 (VI) ヒドロキシウレアについて. 栄養と食糧, 23(5): 344-350

大村浩久・鳥巢隆雄・篠原和毅・飯尾雅嘉 1971 8-ヒドロキシキノリンによるヒドロキシウレアの比色測定. 栄養と食糧, 24(7): 382-387

箴島豊 1961 ヒドロキシルアミンおよび次亜硝酸の定量. 九大農学芸誌, 18(3): 271-283

Summary

By colorimetry of hydroxyurea and hydroxylamine with 8-hydroxyquinoline, it was found that hydroxylamine was formed from hydroxyurea by heating. The formation was enhanced at higher temperature and by addition of hydrochloric acid. On the other hand, hydroxylamine as well as hydroxyurea was remarkably decreased by heating in alkaline media.

Coloration of several substances with the same reagent was also examined. Substances examined were urea, methyl alcohol, ethyl alcohol, ammonium hydroxide, sodium hydroxide, potassium hydroxide, phenylhydrazine, uric acid, phenylthiourea and isonicotinic acid hydrazide besides hydroxylamine and hydroxyurea. All they had no effect on colorimetry of hydroxylamine, while hydroxylamine and phenylhydrazine disturbed the estimation of hydroxyurea.