

# DOJIN NEWS

ドージンニュース

## Review

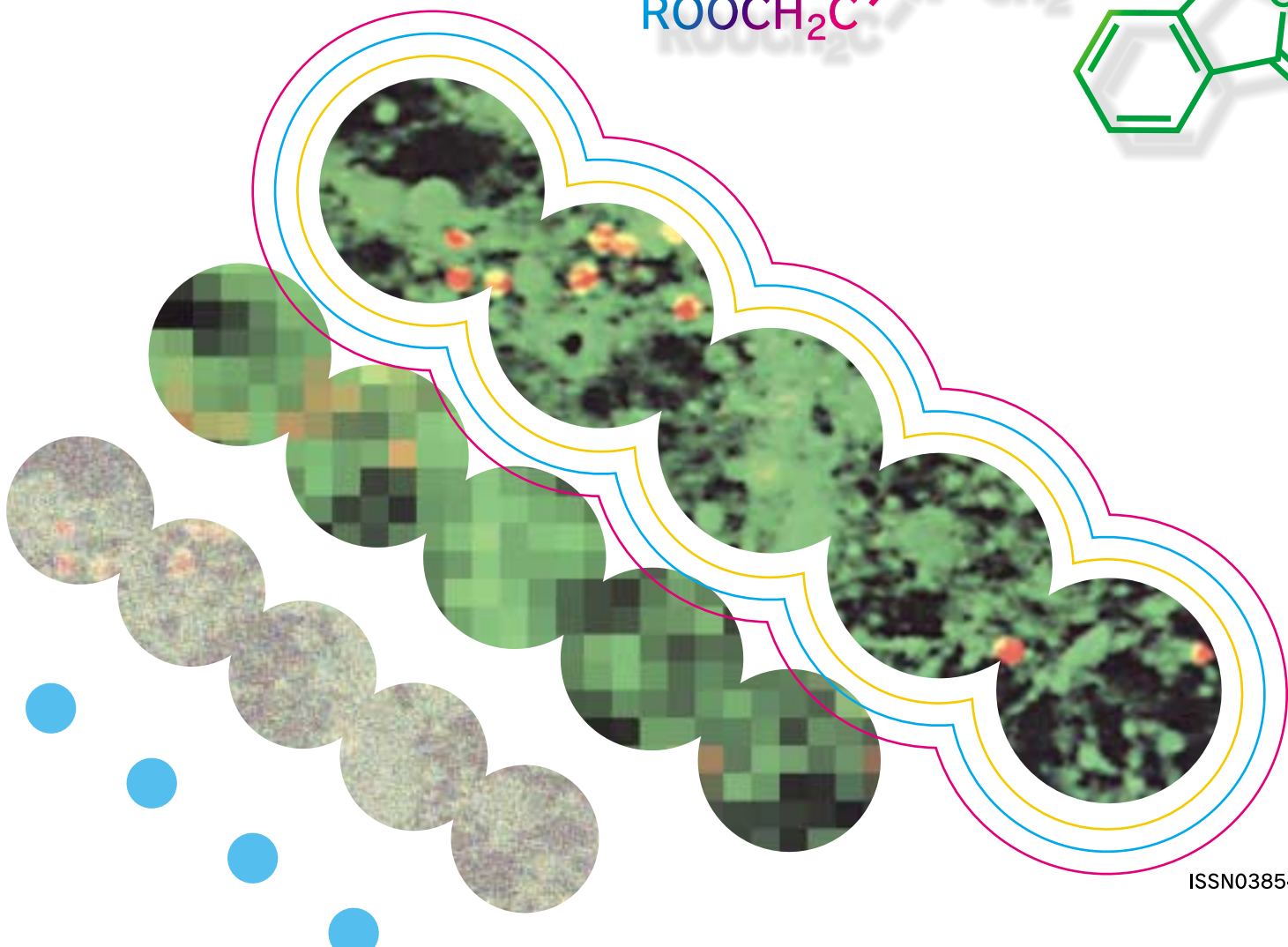
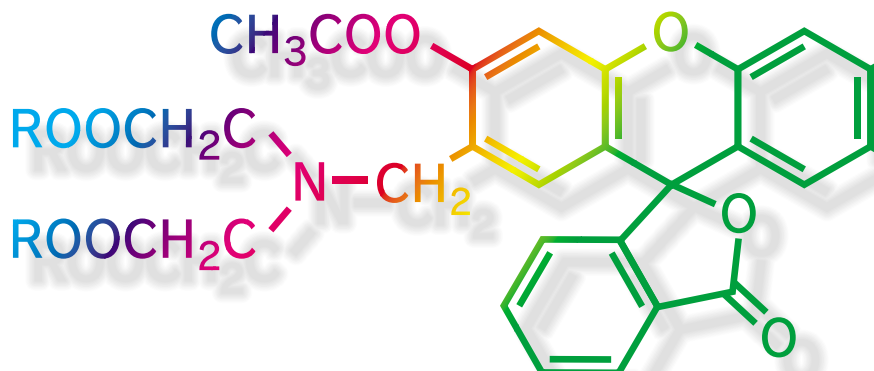
界面活性剤水溶液物質  
研究のための化学熱力学  
杉原剛介

## Topics on Chemistry

新しい酸化還元補酵素：PQQ  
鍋島哲二

## 連載

実用的蛍光誘導体化5  
山口政俊・能田 均



## 目次

### Review

界面活性剤水溶液物質研究のための化学熱力学 福岡大学理学部 杉原 剛介	1
実用的蛍光誘導体化 5 福岡大学薬学部 山口 政俊、能田 均	10

### Topics on Chemistry

新しい酸化還元補酵素 : PQQ	12
------------------	----

### Commercial

#### Q&A

NO 測定キット	14
----------	----

#### 新製品案内

Biotinylation Kit (Sulfo-OSu)	13
タンパク質定量キット	16
TMPyP	19
Self-Assembled Monolayers (SAMs)研究用試薬	20

#### 近日発売予定

SOD Kit, GSH Kit	22
試作品案内	15
BMC	15

### コラム

生体内糖化産物、AGE 生成物質としての 3-DG およびその検出定量	18
-------------------------------------	----

### お知らせ

第 11 回フォーラム・イン・ドージン開催ご案内	15
秋の学会展示ご案内	19

## 新製品案内

容量、価格は下記ページをご覧ください。

Biotinylation Kit (Sulfo-OSu)	13
タンパク質定量キット	16
TMPyP	19
Self-Assembled Monolayers (SAMs)研究用試薬	20



### MolTech 社屋

Dojindo Molecular Technologies, Inc. ( MolTech )は1996年設立された弊社のアメリカ現地法人です。ワシントンDC郊外のメリーランド州ゲイザースバーグは、多くの研究機関が集中する研究都市です。この地にオフィス、ラボを備えたMolTechは、各分野の最先端の研究に欠かせない試薬づくりのために活動しています。

# 界面活性剤水溶液物質研究のための化学熱力学

## - Chemical Thermodynamics of Micellization of Surfactants in Water -



福岡大・理 杉原剛介

### [ Summary ]

Chemical thermodynamic studies on micelle formation of various types of surfactants such as anionic, cationic and nonionic surfactants were overviewed paying special attention to the solution properties as functions of concentration  $C$ , temperature,  $T$  and pressure  $P$ . The correlation between the critical solution pressure (CSP, Tanaka pressure) and the critical solution temperature (CST, Krafft temperature) was indicated in the three dimensional phase diagram of  $C$ ,  $P$  and  $T$  for ionic surfactants. Chemical thermodynamic equations of the Gibbs free energy  $\Delta G_m^\circ$ , enthalpy  $\Delta H_m^\circ$ , entropy  $\Delta S_m^\circ$  and volume changes  $\Delta V_m^\circ$  upon micelle formation from singly dispersed as well as hydrated solid states were introduced and how to determine these thermodynamic parameter was demonstrated for different surfactants on the basis of the both models of micelle formation, i.e., the mass action model (MAM) and the phase separation model (PSM).

キーワード：イオン性 / ノイオン性界面活性剤、ミセル形成の熱力学、臨界ミセル濃度 (CMC)、臨界溶解温度 (CST, Krafft Temperature)、臨界溶解圧力 (CSP, Tanaka Pressure)

### 序 . ミセルとは

一つの分子に、疎水基 hydrophobic group と親水基 hydrophilic group を併せ持つと、その分子は油に対しても、水に対しても溶解性を増すことが考えられる。したがって、このような物質が、水に溶存する場合、食塩やショ糖が溶存する状態とは異なるであろうことが当然予想される。すなわちそれが溶けて行くと、元来、水に溶け難い疎水基の部分を、気-液界面につきだして、その界面にびっしりと並ぶようになる。この界面に集合する現象を吸着 adsorption と呼ぶ。吸着が起こると、その水溶液の表面張力は著しく下げられる (図1参照)。少量の添加で液体の表面張力を著しく低下させる物質を界面活性剤 surfactant と呼び、その機能を界面活性 surface active であるという。一般に、同一分子内に極性基と非極性基を有する場合、多かれ少なかれ、界面活性となる。

さて、さらに活性剤 (界面活性剤を簡単にこう呼ぶことにする) の濃度を増して行くと界面が飽和吸着状態に近づき、一方、液相中の活性剤は、数個ないし数十、あるいは数百個の分子が、疎水基と水との接触を最小限にするように、疎水基を内側にして集合し、エネルギー的に安定な状態を取り始めるようになる。この集合によって、一つの粒子を形成することを、活性剤のミセル形成 micellization、または micelle formation と呼び、その粒子を

ミセル micelle と呼ぶ。界面活性剤の代表的なものは、石鹸 soap や洗剤 detergent であり、これらのミセルは数十～数百程度のものが会合 association して作られるのが普通である。しかし、生体の活性剤である胆汁酸塩などは、洗剤とは異なり、2個、3個、……のオリゴマー的自己会合 self-association から始まるものが多く、通常のミセルとは区別しようとする考えもある。ここでは、ミセルを広義に解釈して、二量体、三量体 (dimer, trimer) 程度の自己会合体も含ませることにする。もし、適当な活性剤の水溶液中に、微小な油滴をつくると、その油滴表面にも活性剤の吸着が起こり、その油滴を水溶液中に分散 dispersion させることができる。油滴を活性剤が分散させている状態を乳化 emulsion といい、これは活性剤の重要な機能の一つである。乳化の状態は、エネルギー的 (熱力学的) には安定ではない。これとよく似た状態で、ミセル中に疎水性物質が少量溶解して活性剤と共に安定な集合状態をとっていることを可溶化 solubilization しているという。可溶化状態は熱力学的に安定な状態であるために、活性剤の性質を議論する上で重要である。

濃度が増加して、ミセルができ始める臨界濃度を臨界ミセル濃度 critical micellization concentration (CMC) と呼ぶ。この CMC は、普通の洗剤では鋭敏に観測できるものであるが、胆汁酸塩のようにオリゴマー oligomer から徐々に会合数 aggregation または association number を濃度と共に増していく性質のあるものは、CMC の決定が困難であり、測定法によって著しく異なった値がでてくるおそれがある。しかし、CMC を決定することは、界面活性物質を調べる上で、最も基本的なことから、欠くことのできないものである。なぜなら、CMC は熱力学に直接関係づけられる、最も重要なパラミターであるからである。

ミセルを論じるとき、CMC 以外にミセルの形状 (形と大きさ)、表面の状態及び内部の状態を含めて、ミセルの構造を知らねばならない。後でこれらについて述べて行くことにして、ここでは、ミセル形成に直接関係のある因子を列挙すると、

疎水基の大きさとその化学構造

(炭化水素部分の炭素数はいくつか、鎖状かあるいはステロイドのような面構造かなど)

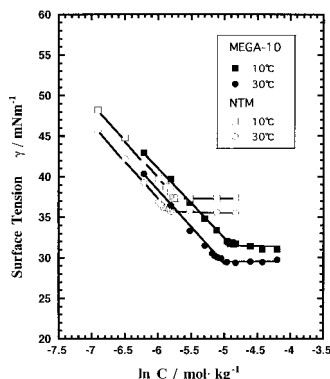


図.1 Surface tension vs logarithmic concentration for MEGA-10 and NTM in water.

親水基の種類

(非イオン性がイオン性か、イオン性であれば、カチオンかアニオンか、解離基や反対イオンは何かなど)

添加物の有無

(添加塩の種類と濃度、アルコール類の種類と濃度など)

温度と圧力

などである<sup>1)</sup>。

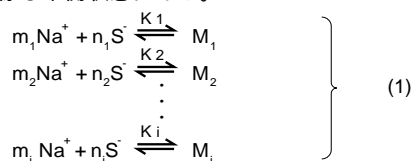
この総説記事においては、同仁化学研究所が製造している膜蛋白質可溶化剤としての活性剤各種を含めて、いろいろなタイプの活性剤の水におけるミセル形成について論じよう。

1. 界面活性剤水溶液物性における化学熱力学の概要

具体的な事例に基づいてミセル形成を論じる前に、ここでは先ずその熱力学の骨子を述べておこう。理論を詳細に論じたものとして、古くより Shinoda による Colloidal Surfactants と題する成書がよく引用されて来た<sup>2)</sup>。また、日本語で書かれたものに、田中が分担執筆した「応用コロイド科学」なる成書<sup>3)</sup>や総説<sup>4)</sup>がある。今ではさらに完成度を高め、参照にも極めて有用な成書 "Micelles" が Moroi によって著されている<sup>5)</sup>。本節は、Moroi が極めて厳密に一般化して議論したものに基づいた著者らの総説<sup>6)</sup>などを、さらに単純化して紹介する。

1.1. イオン性活性剤のミセル形成 Mass Action Model

先ずイオン性活性剤としては、活性剤イオンを S<sup>-</sup> で表し、反対イオンを Na<sup>+</sup> とするナトリウム塩 NaS を考える。会合数 n<sub>i</sub> 個が集まってできたミセルを M<sub>i</sub> で表し、これに m<sub>i</sub> 個の反対イオンがミセル表面に吸着して、ミセルに対して静電的安定化をもたらしているとする。ミセルの会合数は多分散であることが知られており、水中では次の様な平衡状態にある。



また、溶液全体は電氣的に中性であるから、ミセルと平衡にあって単分散状態にある Na<sup>+</sup> と S<sup>-</sup> の濃度を [Na<sup>+</sup>] と [S<sup>-</sup>] でそれぞれ表し、これらと平衡にあるミセル濃度を [M<sub>i</sub>] で表すと次式が成立たねばならない。

$$[\text{Na}^+] + [\text{S}^-] + \sum_i (m_i + n_i)[M_i] = 0 \quad (2)$$

式(1)からミセル化定数 K<sub>i</sub> は次式で表される。

$$K_i = [M_i] / [\text{Na}^+]^{m_i} [\text{S}^-]^{n_i} \quad (3)$$

ここで議論を簡単にするため、ミセル会合数の分散は考えないで n に固定されたもの (n を会合数の平均値とみなしてよい) とする。したがって会合数 n のミセル濃度 [M<sub>n</sub>] は次式で与えられる。

$$[M_n] = K_n [\text{S}^-]^n [\text{Na}^+]^m \quad (4)$$

さらに活性剤の総濃度を C<sub>t</sub> で表すと式(1)と(4)より次式を得る。

$$[M_n] = (C_t - [\text{Na}^+]) / m = (C_t - [\text{S}^-]) / n \quad (5)$$

この式(5)からミセル1個につき吸着した反対イオンの結合度 (β でしばしば表される) m/n は次のようになる。

$$\frac{m}{n} \equiv \beta = (C_t - [\text{Na}^+]) / (C_t - [\text{S}^-]) \quad (6)$$

一方、式(4)の対数をとると

$$\ln [M_n] = -\beta \ln [\text{Na}^+] - (1/n) \ln K_n + (1/n) \ln [M_n] \quad (7)$$

この式から β = m/n の値は ln [S<sup>-</sup>] を CMC 以上で ln [Na<sup>+</sup>] に対して plot するとその勾配そのものが β であることがわかる。何故なら ln K<sub>n</sub> に比べて ln [M<sub>n</sub>] は無視できるほど小さいからである。

式(7)は(5)を用いれば次のように書き換えられる。

$$\ln [S^-] = -\beta \ln \{(1-\beta)C_t + \beta[S^-]\} - \frac{1}{n} \ln K_n + \frac{1}{n} \ln \{(C_t - [S^-])/n\} \quad (8)$$

ここで Moroi は Sodium dodecylsulfate (SDS) に対する実験で、ln [S<sup>-</sup>] 対 ln [Na<sup>+</sup>] の plot で直線関係が成立つことを示し、式(7)や(8)に現れる三つのパラミターの値を決めることが出来た。すなわち、K<sub>n</sub> = 230, n = 64 及び m = 46.7 (β = 0.73) を得、さらに、bulk 濃度 [S<sup>-</sup>] と [Na<sup>+</sup>] が、ある与えられた活性剤濃度で式(8)を使って求められることを示した。<sup>5), 7)</sup> また、実験に基づいて、CMC においては、[S<sup>-</sup>] や [Na<sup>+</sup>] の値が活性剤総濃度の 99% 以上であることや、ln [M] の値が ln K<sub>n</sub> の値の 3% 以下であることなどを結論づけている。これらのことから CMC 値の対数値を反対イオン濃度の対数値に対して plot すると、よい直線関係が得られ、その勾配から β = m/n の値が良い近似で求められることを示した。

$$\ln \text{CMC} = -\beta \ln [\text{Na}^+] + \text{constant} \quad (9)$$

ここで [Na<sup>+</sup>] は添加塩が NaCl であればその濃度と活性剤由来の Na<sup>+</sup> との和であるので、[Na<sup>+</sup>] = CMC + [NaCl] で表されるものである。式(9)が直線関係で表されることは多くの文献で報告されており<sup>8-15)</sup>、なかでも最初の発見者の名をとって ln CMC vs ln [Na<sup>+</sup>] の plot を Corrin - Harkins Plot と呼んでいる。この方法による反対イオン結合度 β の決定は今も盛んに応用されている<sup>15-19)</sup>。

会合数にばらつきのないイオン性活性剤のミセルに対しては、CMC 近傍で次の二つの式が成立つことが示された<sup>5)</sup>。

$$C_t = [\text{S}^-] + n K_n [\text{S}^-]^{n+m} \quad (10)$$

$$1/K_n = 2n(n+m)(\text{CMC})^{n+m} \quad (n \gg 1 \text{ のとき}) \quad (11)$$

この平衡定数から活性剤イオン 1mol あたりの標準 Gibbs エネルギー変化は、それぞれの標準化学ポテンシャル (無限希釈を基準とする) で示せば、

$$\Delta G^\circ = (\mu_{\text{M}}^\circ - n\mu_{\text{S}}^\circ - m\mu_{\text{Na}}^\circ) / n$$

であるが、 $n\Delta G^\circ = -RT\ln K_n$  でもあることから、次式で示される。ただし、式中の  $X_{CMC}$  はモル分率で表した CMC 値である。

$$\Delta G^\circ = \left(1 + \frac{m}{n}\right) RT \ln X_{cmc} + \left(\frac{RT}{n}\right) \ln [2n(n+m)] \quad (12)$$

ここで  $m/n = \beta$  であることを思い出して、 $\Delta G^\circ$  に対応するエンタルピーおよびエントロピー変化はそれぞれ

$$\Delta H^\circ / RT^2 = - (1 + \beta) (\partial \ln X_{cmc} / \partial T)_P - (\partial \beta / \partial T)_P \ln X_{cmc} - \left\{ \partial (1/n) \ln [2n(n+m)] / \partial T \right\}_P \quad (13)$$

$$\Delta S^\circ = - (1 + \beta) (\partial RT \ln X_{cmc} / \partial T)_P - RT \ln X_{cmc} (\partial \beta / \partial T)_P - R \left\{ \partial (T/n) \ln [2n(n+m)] / \partial T \right\}_P \quad (14)$$

で表される<sup>5)</sup>。ミセル形成の熱力学的パラメータには、 $\Delta S^\circ$  や  $\Delta H^\circ$  のほかに体積変化  $\Delta V^\circ$  がある。これは体積  $V$  が圧力  $P$  と共役関係であることから、すなわち  $(\partial \Delta G / \partial P)_T = \Delta V$  であることより、式(12)を  $T = \text{const.}$  の条件で圧力  $P$  で偏微分すれば得られる。(ここで  $\Delta S^\circ$  や  $\Delta H^\circ$  の関係式の中に反対イオン結合度  $\beta$  と会合数  $n$  の温度変化に対応する項が第2項と第3項としてそれぞれ含まれていることに注目しておく。)  $\Delta V^\circ$  については CMC の圧力依存性のところでも述べる。以上は 1-1 電解質型の活性剤について述べたものである。

## 1.2. 非イオン性活性剤のミセル形成 Mass Action Model

では非イオン性の活性剤ではどうかというと、上と同様に会合数  $n$  に分布がないものとし、非イオン性活性剤分子を  $S$  で表すと  $nS \rightleftharpoons M$  の平衡が成立している。この状況に対して、ミセル形成の標準 Gibbs エネルギー変化は

$$\Delta G^\circ = (\mu_M^\circ - n\mu_S^\circ) / n$$

である。Moroi の厳密な表現から出発して、 $n > 50$  の範囲(実際のミセルの会合数はこの範囲のものが多い)で成立つ  $\Delta G^\circ$  は、次式のように近似的な表現ができる<sup>5)</sup>。

$$\Delta G^\circ = RT \ln X_{cmc} + \left(\frac{RT}{n}\right) \ln [2n^2] \quad (15)$$

この式をもとに、 $\Delta S^\circ$  や  $\Delta H^\circ$  が次のように表されることを記しておく。(以下の式の中にも、CMC の温度変化だけでなく、会合数の温度変化を示す微係数の項があるが、後に述べる相分離モデルの  $\Delta S^\circ$  や  $\Delta H^\circ$  にはこの項がないので、留意しておくことがのぞましい。)

$$\Delta H^\circ = -RT^2 \left[ (\partial \ln X_{cmc} / \partial T)_P - 2(\partial n / \partial T)_P (1 - \ln 2n^2 / 2) / n^2 \right] \quad (16)$$

$$\Delta S^\circ = -(\partial RT \ln X_{cmc} / \partial T)_P - (R/n) \ln 2n^2 - 2RT (\partial n / \partial T)_P (1 - \ln 2n^2 / 2) / n^2 \quad (17)$$

以上、会合数  $n$  が加わった項が複雑な姿で現れた式であるため、ここまで読み進まれた読者はいささかうんざりさせられたかもしれない。これまで論じて来たミセル形成の理論は、 $n$  個の活性剤分子が集合して出来たミセル  $M$  なるものをあたかも一つの化学種が生じたものとみなす立場に立っている。すなわち、化学平衡論か

らみた '生成物としてのミセル' を取扱っているので、このモデルを質量作用モデル(Mass Action Model, MAM)という。

## 1.3. ミセルを相(phase)とみなすときのミセル形成論

### Phase Separation Model

MAM に対して、ミセルを一種の相(phase)とみなす考え方がある。もっともミセル形成を相の発現とすると Gibbs の相律に矛盾するので、偽(擬)相(pseudo phase)と呼んでいる。まず非イオン性の活性剤の方から述べよう。これによると、溶液相(Bulk 相とも言う)とミセル相の成分  $i$  (溶媒である水を 1 とし、非イオン性の活性剤種を  $i = 2, 3, \dots$  とする)の化学ポテンシャルが  $\mu_i^s$  と  $\mu_i^m$  で表されるとすると、定温・定圧の相平衡の状態では次式の関係が成立つはずである<sup>3)</sup>。

$$d\mu(T, P, x_2^s, x_3^s, \dots) = d\mu(T, P, x_2^m, x_3^m, \dots) \quad (18)$$

簡単のため、単一成分 2 だけからなる系を考える。その場合には、ミセル相中の化学ポテンシャルは一定であるから、ミセルの化学ポテンシャルを表す式:  $\mu_2^m = \mu_2^{m,0}(T, P) + RT \ln a_2^m$  において、ミセルの活量を  $a_2^m = 1$  とおけるので、 $\mu_2^m = \mu_2^{m,0}(T, P)$  となる。単分散状態の溶液相では  $\mu_2^s = \mu_2^{s,0}(T, P) + RT \ln a_2^s$  で表せる。(ただし活性剤の活量  $a_2^s$  はモル分率  $x_2^s$  と活量係数  $f_2^s$  の積である。)

活性剤 2 の 1 mol がミセル形成するときの Gibbs エネルギー変化をここでは  $\Delta G_m$  とし、標準自由エネルギー変化を  $\Delta G_m^\circ$  とする。

$$\Delta G_m = \mu_2^m - \mu_2^s = \mu_2^{m,0} - \mu_2^{s,0} - RT \ln a_2^s \quad (19)$$

平衡状態では  $\Delta G_m = 0$  であるから、結局、次式が得られる。

$$\Delta G_m^\circ = \mu_2^{m,0} - \mu_2^{s,0} = RT \ln a_2^s \quad (20)$$

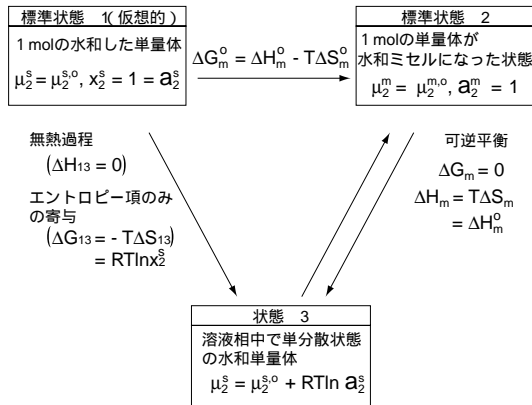
ここで  $a_2^s$  が const. ( $T, P$ ) であることがわかる。

一方 Gibbs エネルギー変化は、 $\Delta G_m = \Delta H_m - T\Delta S_m$  及び  $\Delta G_m^\circ = \Delta H_m^\circ - T\Delta S_m^\circ$  で表現できる。 $\Delta H_m$  と  $\Delta H_m^\circ$  及び  $\Delta S_m$  と  $\Delta S_m^\circ$  との相違について以下述べてみよう。

ここでミセル形成に関して、下に示すようなエネルギーサイクルを考えることにする。与えられた  $T$  と  $P$  のもとで、まず完全に水和した単量体だけが 100% 存在する状態 ( $x_2^s = 1$ ) を仮想的に標準状態 1 ( $\mu_2^s = \mu_2^{s,0}$ ) とする。Bulk 相中で水和している単分散状態の単量体が状態 3 ( $\mu_2^s = \mu_2^s + RT \ln a_2^s$ ) を経て、ミセルを形成し、ミセル(標準状態 2 とする)と単分散の水和活性剤分子が平衡状態に達するものとする。したがって、標準状態 1 から標準状態 2 へ移行する熱力学量  $\Delta G_m^\circ$ 、 $\Delta H_m^\circ$  および  $\Delta S_m^\circ$  は仮想的なものを含んでいる。(次のダイアグラム参照)。標準状態 1 から状態 3 への移行はエントロピー項だけの寄与によると考えてよい<sup>3)</sup>。

さて、式(20)の  $\Delta G_m^\circ$  に戻ってみると、CMC 以上の濃度においても、 $a_2^s$  が一定であるということを示している。また、CMC 前後の濃度は一般に希薄であり、理想性を仮定することが許されるので、 $a_2^s = x_2^s = [\text{CMC}]$  とおける。ここで、前節まで用いて来たように問題にしている非イオン性活性剤の CMC をモル分率  $X_{cmc}$  で表すと、式(20)は

$$\Delta G_m^\circ = RT \ln X_{cmc} \quad (21)$$



ここで、この(擬)相分離モデル (Phase Separation Model, PSM)における CMC とは即ち、「ミセルの溶解度」とみなしてよいことがわかるであろう。

式(21)をもとに各熱力学量は次のように与えられる<sup>3)</sup>。

$$\Delta H_m^{\circ} = \left[ \frac{\partial(\Delta G_m^{\circ}/T)}{\partial(1/T)} \right]_P = -RT^2 \left[ \frac{\partial \ln X_{cmc}}{\partial T} \right]_P = \Delta H_m \quad (22)$$

$$\begin{aligned} \Delta S_m^{\circ} &= (\Delta H_m^{\circ} - \Delta G_m^{\circ})/T \\ &= -R \ln X_{cmc} - RT \left[ \frac{\partial \ln X_{cmc}}{\partial T} \right]_P \\ &= \Delta S_m - R \ln X_{cmc} \end{aligned} \quad (23)$$

$$\Delta V_m^{\circ} = \left[ \frac{\partial \Delta G_m^{\circ}}{\partial P} \right]_T = RT \left[ \frac{\partial \ln X_{cmc}}{\partial P} \right]_T = \Delta V_m \quad (24)$$

ここで $\Delta S_m^{\circ}$ と $\Delta V_m^{\circ}$ は $\Delta G_m^{\circ} = \Delta G_m^{\circ} - RT \ln X_{cmc}$ の全微分をとって、 $(\partial \Delta G_m^{\circ} / \partial P)_T = \Delta V_m^{\circ}$ 及び、 $(\partial \Delta G_m^{\circ} / \partial T)_P = -\Delta S_m^{\circ}$ であること、及び $\Delta H_m^{\circ} = T\Delta S_m^{\circ}$ であることから上式の関係が導かれる。(注意すべきは、式(24)において相分離モデルでは $\Delta V_m^{\circ} = \Delta V_m$ が上記の様に成立つが、質量作用モデルでは $\Delta V_m^{\circ} \neq \Delta V_m$ である。特に圧力が高くなるほどその差は大きくなる<sup>20)</sup>。)

以上はPSMにおける非イオン性活性剤に関する熱力学量の関係を示した。

次にイオン性活性剤を以前と同様に1-1電解質 $Na^+$ 、 $S^-$ についてPSMの立場から各熱力学量は、簡単に次のように示すことができる。ここでも1個のミセルはn個の活性剤分子の集合体であり、ミセル表面には $n \cdot \beta$ 個の反対イオンが結合しているものとする。標準 Gibbs エネルギー変化は式(25)で示される。

$$\Delta G_m^{\circ} = RT \ln X_{cmc} + \beta RT \ln X_{Na^+} \quad (25)$$

この式から二つのことが言える。一つはCMCの対数値を反対イオン濃度の対数値に対してplotする。すなわちCorrin-Harkins Plotをすると、その直線関係の傾きが反対イオン結合度 $\beta$ に対応するという、式(9)と同じものであることである。他の一つは、CMC近傍においてミセルの数は少ないので式(25)は $\Delta G_m^{\circ} / RT = \ln X_{cmc} X_{Na^+}^{\beta}$ とおけること、即ち、 $[CMC][CMC + \text{添加塩}]^{\beta}$ の積が添加塩濃度に依ることなく一定である。これは「CMCをミセ

ルの溶解度とみなせる」と上でも述べたが、溶解度積一定の法則に相当することがらである<sup>3)</sup>。

著者らはかつて、ナトリウム石鹸のような弱酸(脂肪酸)と強塩基(NaOH)からなる活性剤のミセル形成には、CMCがpHにも強く依存し、 $Na^+$ ばかりでなく $H^+$ もまた反対イオンとして結合(すなわち水分解度は単分散状態よりもミセル形成状態の分子の方が大きい)することを見出し、それぞれの反対イオン結合度を $\beta_{Na}$ 及び $\beta_H$ で表し、 $-\log[Na^+] = pNa$ とすると

$$\log[CMC] = \text{const}(T, P) + \beta_{Na} pNa + \beta_H pH$$

の関係が成立つことを胆汁酸塩の例で実験的に示した<sup>21)</sup>。

添加塩がないとき、式(25)の $X_{Na^+}$ は $X_{cmc}$ に等しいから次式が得られる。

$$\Delta G_m^{\circ} = (1 + \beta)RT \ln X_{cmc} \quad (26)$$

この式は、イオン性活性剤のミセル形成を熱力学的に論じるときに必ず登場してくる。

$\Delta H_m$ 、 $\Delta S_m$ について添加塩のないときは：

$$\Delta S_m = \frac{\Delta H_m}{T} - (1 + \beta)RT \left( \frac{\partial \ln X_{cmc}}{\partial T} \right)_P \quad (27)$$

であり、また、添加塩があるときは：

$$\Delta S_m = \frac{\Delta H_m}{T} - RT \left[ \left( \frac{\partial \ln X_{cmc}}{\partial T} \right)_P + \beta \left( \frac{\partial \ln X_{Na^+}}{\partial T} \right)_P \right] \quad (28)$$

である<sup>3)</sup>。

#### 1.4. 両モデルの比較

ミセルを一種の生成物とみて取扱うMAMと、擬(偽)相とみなして取扱うPSMについて熱力学量を比較しながら考えてみよう。

イオン性活性剤について両モデルの式、すなわち式(12)と式(26)を比べると、MAMには会合数の項があるが、PSMにはそれがなく、極めて簡単である。非イオン性については、ある程度会合数が大きいものと仮定した場合でさえ、MAMには会合数の項が残っているが、PSMでは式(21)でみるように、nに関係した項がない。

次に非イオン性活性剤の $\Delta H^{\circ}$ や $\Delta S^{\circ}$ に到ってはMAMでは会合数の温度依存性の項があるが[式(16)と式(17)]、PSMには、nの温度依存性は無視したかたちになっている[式(22)と式(23)]。これは、nの値そのものがさほど小さくないが、温度変化 $(\partial n / \partial T)_P$ が無視できない系では、両モデルから見積られるそれらの値にかなりの相違が出て来よう。体積変化 $\Delta V^{\circ}$ については $(\partial n / \partial P)_T$ の項が含まれる<sup>5)</sup>。

イオン性の界面活性剤の $\Delta H^{\circ}$ ( $\Delta H_m$ )、 $\Delta S^{\circ}$ ( $\Delta S_m$ )及び $\Delta V^{\circ}$ ( $\Delta V_m$ )などでは、MAMの場合には、会合数関連の項に加えて $(\partial \beta / \partial T)_P$ 項がエンタルピーとエントロピーに含まれる[式(13)と式(14)]<sup>5)</sup>。 $\Delta V^{\circ}$ には $(\partial \beta / \partial P)_T$ が無視できない量で加って来ることが議論されている<sup>20)</sup>。

以上にみて来たように、MAMの方がPSMよりも精度の高いものと判断できる。PSMはミセルを擬相として簡便に扱える代わりに、熱力学的厳密さに欠けるものである<sup>3-5)</sup>。しかし、実際場面で

は、会合数  $n$  を各温度で求めたり、反対イオン結合度の温度変化や圧力変化をいちいち決めて行くには苦勞を伴う。

ここで、MAMの各熱力学式をよく観てみよう。 $n$ が十分に大きいとき(数十以上) $n$ に関わる項は第一項に比べて無視しうほどに小さいものとなる。

したがって、会合数の大きい場合のGibbs エネルギー値は、MAM、PSM共によく一致するようになる。しかし、 $\Delta H^\circ$ や $\Delta S^\circ$ の見積りにあたっては $(\partial n / \partial T)_p$ や $(\partial \beta / \partial T)_p$ の項を、無視できないのと同様に $\Delta V^\circ$ についても、先に述べたように $(\partial \beta / \partial P)_T$ の項の他に、会合数の圧力変化 $(\partial n / \partial P)_T$ の項も無視できないこと<sup>20)</sup>を繰返し注意しておく。

## 2. 濃度・圧力・温度の三変数で示す界面活性剤 / 水系の状態図

上の節で界面活性剤分子が集合してミセル形成をする際の熱力学的側面の骨子を述べて来た。しかし、活性剤は濃度(C)のみならず、温度(T)や圧力(P)によってその溶存状態は変わってくる(一般の物質が固・気・液体の三態をとると同様に)状態を記述するこれらC, T, Pを関数として活性剤水溶液系の全体像を眺めることも重要である。

### 2.1. 曇点、Krafft点及びCMCの決定法

この問題に立入る前に、非イオン性活性剤の多くにみられる曇点(cloud point)現象やイオン性活性剤にみられるKrafft点(Krafft point)などの簡単な説明や、CMCの決定法などについて触れておこう。

非イオン性活性剤の代表的なものとしてpolyoxyethylene alcohol類(炭化水素鎖長を $C_n$ 、オキシエチレン鎖長を $E_m$ で示し、 $C_nE_m$ と略表記される)が挙げられる。これらは温度の上昇と共にCMCは低下して行く一方<sup>22)</sup>、会合数が増大して行き<sup>22-24)</sup>、ついには二相に分離して溶液は急濁する。この温度を曇点という。曇点は温度を徐々に上昇させながら、目視によって検知できる。一旦濁った溶液を冷却しながら透明になる温度も観測して、両者を平均して表示するのが普通である。

曇点は濃度に若干依存性があるので、測定時の濃度を示しておくことが必要である。ここで注意しておくべきこととして、曇点現象は非イオン性活性剤すべてに共通な性質ではないことである。MEGA-8, -9, -10等のN-methyl-glucamine系やn-nonyl- $\beta$ -D-thiomaltoside(これらはいずれも膜蛋白可溶化剤として利用されている)など、図2(a)に示すように糖由来の水酸基が多数含まれる親水基を持つ非イオン性活性剤は、100 近くまで熱しても曇点現象は観察されない。むしろ、CMCの温度依存性を調べてみると、温度の上昇と共にCMC値は低下するが、ある温度で極小を経て増大する現象がみられる<sup>25), 26)</sup>(MEGA-10については、CMC-温度曲線に極小がみられず、わずかながら単調に減少するだけであったとする、現著者との共同研究の報告もある<sup>27)</sup>)面白いことに、 $C_nE_m$ 型の活性剤( $m=10, n=10, 16$ )とMEGA-10を混合すると曇点が著しく高くなり、ミセル溶液の温度領域が大きく広げられることが分かった<sup>27)</sup>。

イオン性活性剤の固体からミセル溶液へ転移する温度の観測は、曇点と同様に目視でも可能な場合もあるが、電気伝導度法による

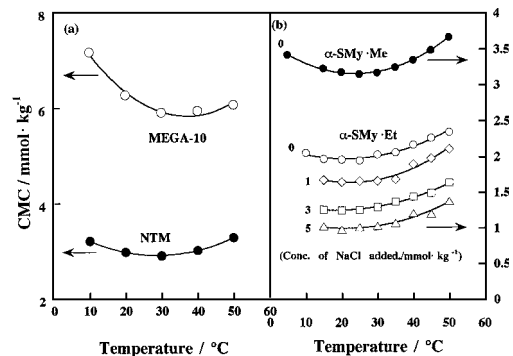


図.2 Temperature changes of CMCs for pure systems of MEGA-10, NTM and  $\alpha$ -SMy·Me, and  $\alpha$ -SMy·Et with and without added NaCl in water.

ものが一番確実である。これには、所定量の活性剤が投入された溶液の温度を徐々に上昇、または降下させながら、電気伝導度の変化を追跡して行き、伝導度の急変を生じる温度をもって、逆にその温度に於ける溶解度は仕込んだ活性剤の濃度とする方法がある。一方設定温度ごとに、濃度対伝導度の関係を求めて、描く曲線の屈折を与える濃度を、その設定温度における溶解度とする方法の二つがある。前者は固体 $\rightleftharpoons$ ミセル溶液間の溶解度決定に、後者は固体 $\rightleftharpoons$ 単分散間の溶解度決定にそれぞれ適している<sup>28), 29)</sup>。温度一定のもとで圧力を変数としてイオン性活性剤の溶解度(及びCMC, 後述)を調べたTanakaら<sup>30-32)</sup>やIkawaraら<sup>33)</sup>の研究があるが、これも電気伝導度法を応用している。

次にCMCの決定法についてそのあらましを述べる。

イオン性、非イオン性を問わず、最も広く応用されているのが、表面張力法で、図1に示すような表面張力対対数濃度の屈曲点を与える濃度をCMCとする。表面張力測定法にはDu Nouy式円環法、Wilhelmy式平板法のほか液滴の体積を測る滴容法や、質量を測る滴重法がある。滴容法による精密な表面張力測定を基に、Aratono<sup>34)</sup>やMotomura<sup>35)</sup>らが厳密な熱力学を、活性剤の界面吸着やミセル形成について単独系ばかりでなく混合系に関してまで深く広く展開している。ここでは詳述を避けるが、参照に値する研究例が多数みられる。

イオン性活性剤のCMC決定に最も好都合なものは電気伝導度法である。比電導度法( )対濃度(C)のplotをすると、CMC以上で勾配が急変するので、低濃度側から引いた直線と高濃度から引いた直線の交点を与える濃度をCMCとする(図3参照)。ここで得られる2直線の勾配の比を反対イオン結合度 $\beta$ と関係ある量として<sup>36)</sup>、あるいはそのものに等しい<sup>37-39)</sup>とみなしている報告がある。また、モル電導度(=K/C)対 $\sqrt{C}$ のplotでもCMC以上で値が急激に低下するので、その低下開始点の濃度をCMCとすることができる。さらに微分電導度 $dk/dC$ をCに対して<sup>40)</sup>、あるいは $\sqrt{C}$ に対してplotしてCMCを直接に決められる<sup>18), 40), 41)</sup>。また $dk/dC$ 対 $\sqrt{C}$ のデータからミセルの解離度 $\alpha$ ( $\approx 1-\beta$ )を見積もる議論をしている<sup>18), 42)</sup>。その他のCMC決定法<sup>5)</sup>としては、吸光度(適当な吸収があるとき)濁度法又は光散乱法<sup>43)</sup>可溶化法<sup>44)</sup>、屈折率法、電位差法、蒸気圧法、音速法及び粘度法などがある。

ここで注意すべきは、同じ条件下の同じ溶液についても得られ

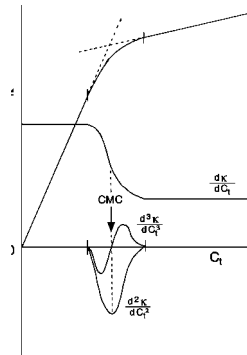


図.3 Schematic illustration of CMC based on the definition of Phillips.

る CMC 値が用いる方法によって異なる (例えば 対  $c$  と 対  $\sqrt{c}$  は多少異なる結果を導く) ということである。一般に単分散種に由来する物性 (例、表面張力降下) から求めた CMC 値は、活性剤ミセルに由来する物性 (例、濁度) から得た値に比べて小さめに出ることが知られている<sup>5)</sup>。正確に CMC を定義した上で、正しく CMC を決定するためには、Phillips の定義<sup>45)</sup> に従うのが最良であると Moroi は強調している<sup>5), 46)</sup>。ここで Phillips の定義とは、溶液のある物理化学的性質  $\phi$  が、活性剤濃度  $[S]$  とミセル濃度  $[M]$  と関係づけられ、

$$\phi = \alpha[S] + \beta[M] \quad (29)$$

で表されるとして、 $\phi$  を活性剤総濃度  $C_t$  に対して plot したとき、得られる曲線の勾配が最も大きく変化するときの濃度を CMC とする。すなわち、次の関係が得られるところとする。

$$(d^3\phi/dC_t^3) = 0 \quad (30)$$

たとえば、比電導度  $\kappa$  が  $\phi$  に相当する例については、図 3 に示すように  $d^2\kappa/dC_t^2$  が極小となり、 $d^3\kappa/dC_t^3$  が 0 となる濃度が CMC であるとする<sup>5)</sup>。ちなみに  $\kappa$  vs  $C_t$  関係の交点付近で曲率のある曲線が現れるのは、CMC 近くより単分散種のうち一部がミセル形成し始めて、CMC に於てその値 100% が単分散種ではなく、ほんの一部はすでにミセルとして存在しているため、期待される単分散の寄与分 (延長破線) より下に出る。その湾曲部分の曲率半径は、会合数の小さいものほど大きい。CMC では、会合数 20 のミセルで約 2%、50 のミセルで約 1% がミセル化しており、それぞれ 98% 及び 99% が単分散状態にある<sup>5), 47)</sup> と計算されている。

2.2. 圧力と温度の関数としての物性 イオン性活性剤における Krafft 温度 (臨界溶解温度) と Tanaka 圧力 (臨界溶解圧力) の関係 イオン性界面活性剤の CMC を温度に対して plot すると、ある温度で極小を示すことはよく知られている<sup>3), 5), 15), 16), 18), 41), 42)</sup>。図 2 (b) に例を示した。これに溶解度曲線を重ね合わせると、図 4 (a) に見られるような二つの曲線の交叉がみられる。この系は Sodium Perfluorodecyl Sulfate (SPFDe) の 400atm 下における状態図である。二つの曲線の交点を与える温度が 400atm における Krafft 温度である。この温度を臨界溶解温度 (Critical Solution Temperature, CST) とも言う。

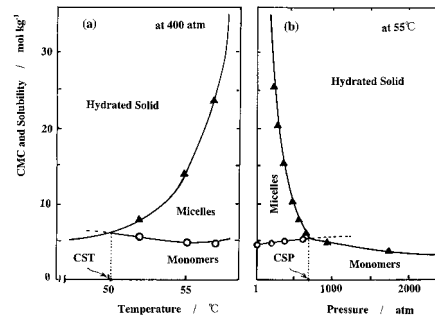


図.4 Phase diagrams of CMC / Solubility vs temperature at 400 atm (a) and CMC / Solubility vs pressure at 55 °C (b) for sodium perfluorodecanoate in water.

一方、図 4 (b)も、定温 55 °C における SPFDe 水溶液の状態図で、これは圧力  $P$  を関数としている。圧力と共に上昇傾向にある  $P$ -CMC 曲線と、水和固体からミセルへ転じる融解曲線 (固 ⇄ 液の融解圧曲線に似ている) と水和固体から直接単分散状態へ転じる溶解度曲線の交点で  $P$ -CMC 曲線も重なり、あたかも三重点のようにみえる (Krafft 点に対応する交点もあたかも三重点のようにみえる)。この交点を与える圧力は臨界溶解圧 (Critical Solution Pressure, CSP) であり、Tanaka 圧力とも呼ばれる<sup>33), 49)</sup>。この二つの相図を温度  $T$ 、圧力  $P$  及び濃度  $C$  の関数として一つの立体図にして表したものが図 5 である。

図 5 はイオン性界面活性剤水溶液の相状態を一般的に示したもので、圧力一定下の  $T$ - $C$  相図では、下にトツの CMC 曲線と溶解度曲線の交点  $k$  を与える温度が Krafft 温度を示している。また、温度一定下での断面では、上にトツの CMC 曲線と溶解度曲線の交点  $t$  が Tanaka 圧力を示している。点  $k$  から  $t$  へかけて臨界溶解曲線 (critical solution curve) に沿って  $t$  に達し、さらに  $t - s - k$  の曲線で囲まれる曲面が、 $T$  と  $P$  を関数とした CMC 曲面に相当する。水和固体相と単分散相を除く部分がミセル溶液相ということになる。ともあれ、図 5 はイオン性界面活性剤水溶液の三次元状態図である。

Krafft 温度と Tanaka 圧力との間の関係が色々な活性剤について求められており、その例を文献<sup>4), 30), 31), 32), 33)</sup> から引用して図 6 に示す。Krafft 温度は、圧力と共に高くなるとも言えるし、Tanaka 圧力は温度と共に上昇するとも言える。

### 3. 熱力学パラメーター $\Delta H_m^\circ$ 、 $\Delta S_m^\circ$ 、 $\Delta V_m^\circ$ などの見積り

第 1 節ではミセル形成の化学熱力学式を示し、第 2 節では活性剤水溶液物性を濃度、温度及び圧力の 3 示量変数の関数としてその概観を眺めて来た。ここでは、熱力学の式に基づいてミセル形成に伴う種々の示量変数の変化、即ちエンタルピー、エントロピー及び体積などの変化量について例を示しながら簡単に述べてみよう。これらは、すべて第 1 節で述べた Gibbs エネルギー変化の  $\Delta G_m^\circ$  を基に解析して行くものである。

#### 3.1. $\Delta H_m^\circ$ と $\Delta S_m^\circ$ 及び $\Delta H - \Delta S$ 補償則

$\Delta H_m^\circ$  の見積りの基礎となる熱力学式は、Gibbs-Helmholtz の式で与えられるものであり、第 1 節の式 (13)、(16) 及び (22) で示



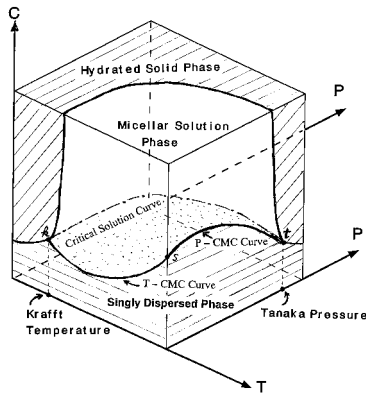


図.5 Schematic illustration of phase diagram of an ionic surfactant as functions of concentration C, temperature T and pressure P.

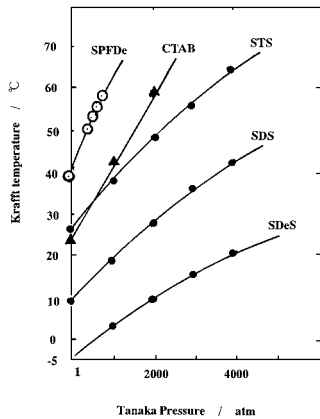


図.6 The plot of Krafft temperature vs. Tanaka pressure for various surfactants.

した。上の 1.5 節で注意したように、厳密には非イオン性活性剤については会合数の温度変化を、またイオン性については会合数のほか反対イオン結合度  $\beta$  の温度依存性を無視できない。相分離モデルに基づいて、イオン性活性剤の  $\beta$  を一温度でのみ決めた値を使って、式(26)に各温度の CMC 値を代入して  $\Delta G_m^\circ$  を計算することに問題がある。この  $\Delta G_m^\circ$  値からミセル化熱  $\Delta H_m^\circ (= \Delta H_m^\circ)$  を求めること、いいかえれば、 $\ln X_{cmc}$  対  $1/T$  の van't Hoff Plot から得られる関係を直線とみなして  $\Delta H_m^\circ$  を決めることは芳しくない。van't Hoff Plot から推定した  $\Delta H_m^\circ$  と微量熱量測定から求めるミセル化熱は大きく異なることを Kreshech<sup>50)</sup> らや Pestman<sup>51)</sup> が警告して来ている。彼らは溶液の熱容量 ( $\Delta C_p$ ) の温度変化に並行して、ミセル化熱の温度変化が著しいことを示している。 $\Delta C_p$  の変化は会合数  $n$  や反対イオン結合度  $\beta$  の変化に並行するものであるから、 $\Delta G_m^\circ / RT$  対  $1/T$  の plot が単純な直線を与えるものではない。

図 7 に  $\alpha$ -Sulfonatomyristic Acid の Methyl と Ethyl のエステル ( $\alpha$ -SMy · Me & Et) の例を示す。この活性剤は生物分解が容易で対硬水性にすぐれている<sup>16), 18), 52)</sup>。アルキル基の鎖長をいろいろ変えてつくられており、 $\alpha$ -SF シリーズの名で総称されている<sup>52)</sup>。 $\alpha$ -SFe · Me も Et も図 2 (b) に示したように、各温度下で CMC と、

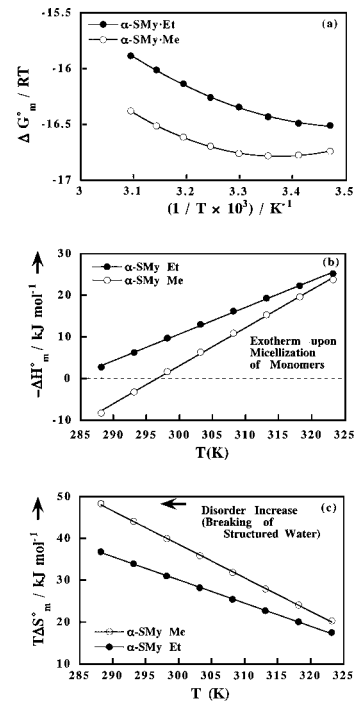


図.7 Thermodynamic parameters as a function of temperature for  $\alpha$ -SMy · Me and  $\alpha$ -SMy · Et in water.

それに加えて CMC に対する添加塩効果を調べ、Corrin-Harkins Plot によって  $\beta$  を求めた上で  $\Delta G_m^\circ$  をそれぞれの温度下で決めたものである。これに Gibbs-Helmholtz Plot (我々はこの plot を van't Hoff Plot と呼ばないことにしている) を施したのが図 7 (a) である。 $\beta$  の温度変化を含んでいるのでこの plot は単純な直線になっていない。この接線勾配から  $\Delta H_m^\circ$  を求めたものが (b) に示してあり、さらに  $\Delta S_m^\circ = (\Delta G_m^\circ - \Delta H_m^\circ) / T$  の関係から計算したミセル化のエントロピー変化が (c) に示してある。ここで求めた  $\Delta H_m^\circ$  と  $\Delta S_m^\circ$  は、式(13)と(14)に於けるそれぞれの第三項、すなわち会合数に関する項のみを除外した、第一項と第二項をそれぞれの内容として包含しているものと考えられる。

さて、図 7 (b) と (c) のエンタルピーとエントロピーの両方を見比べると、 $\Delta G_m^\circ$  を負にする(ミセル形成の自発性を高める)ためには不利となる  $\Delta H_m^\circ > 0$  のところでは、 $\Delta S_m^\circ$  が大きな正となっていることがみられる。言い換えれば、エンタルピー項が不利なとき、エントロピー項がこれをかばい(低温側)、逆にエントロピー項の寄与が小さい場合、エンタルピー項がこれを補っている(高温側)ことがはっきりと認められる。これはエンタルピー・エントロピー補償則又は現象(Enthalpy-Entropy Compensation Rule or Phenomenon)と呼ばれるもので、水溶液系で生じる様々な変化・過程(生体系の諸過程を含めて)が観察されている<sup>53)</sup>。種々相異なる系に対して  $\Delta H$  を  $\Delta S$  に対して plot すると、一本の直線上に乗り、その勾配が温度の次元をもつので補償温度と呼ばれている<sup>53)</sup>。数多くの界面活性剤のミセル形成のこれらについても補償則が成立つことが報告されている<sup>50), 54), 56)</sup>。著者らは  $\Delta S_m^\circ$  を  $\Delta H_m^\circ$  に対して plot し、次の式で各活性剤にあてはまることを示した(図 8)。

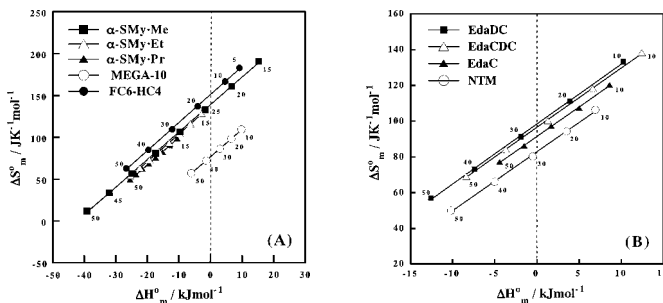


図.8 Enthalpy-entropy compensation phenomena observed in micelle formation of different surfactants in water.

$$\Delta S_m^0 = \frac{1}{T_C} \Delta H_m^0 - R \ln X_{cmc}^* \quad (\text{非イオン性}) \quad (31)$$

$$\Delta S_m^0 = \frac{1}{T_C} \Delta H_m^0 - (1 + \beta) R \ln X_{cmc}^* \quad (\text{イオン性}) \quad (32)$$

ここで  $T_C$  は補償温度で  $307 \pm 8K$  の範囲にすべての活性剤が含まれることがわかっている<sup>56), 57)</sup>。また、 $-R \ln X_{cmc}^*$  や  $-(1 + \beta) R \ln X_{cmc}^*$  は  $\Delta H_m = 0$  におけるエントロピー値に相当し、活性剤の種類によって異なる。図8はそれぞれの化学種における各温度の  $\Delta S$ - $\Delta H$  データが直線関係を成立させているもので、このときの  $T_C$  を自家補償温度 (Self-compensation Temperature) と呼び、同一温度において相異なる化学種同士について一本の直線関係が得られるときの  $T_C$  を他家補償温度 (Cross-compensation Temperature) とし、補償温度に関する詳細な議論を行っている<sup>57)</sup>。

### 3.2. $\Delta V_m$ 又は $\Delta V_m^0$ の見積り

着目する活性剤の状態変化にどの程度の部分モル体積の変化を伴うか、それを知ることは物性を論じる上で不可欠である。CMCの圧力変化を調べれば、ミセル形成に伴う体積変化  $\Delta V_m$  又は  $\Delta V_m^0$  が求められることを、第1節で、PSMの立場から式(24)で示した。MAMでは、非イオン性及びイオン性活性剤についてそれぞれ次式で表される<sup>5)</sup>。

$$\Delta V^0 = RT \left[ \left( \frac{\partial \ln X_{CMC}}{\partial P} \right)_T - 2 \left( \frac{\partial n}{\partial P} \right)_T \left( \frac{1 - \ln n_2}{2} \right) / n^2 \right] \quad (33)$$

$$\Delta V^0 = (1 + \beta) RT \left( \frac{\partial \ln X_{CMC}}{\partial P} \right)_T + RT \ln X_{CMC} \left( \frac{\partial \beta}{\partial P} \right)_T + RT \left\{ \frac{\partial (1/n) \ln [2n(n+m)]}{\partial P} \right\}_T \quad (34)$$

これらの式も既に述べて来たように、会合数  $n$  の圧力変化を求めることを要求しており、またイオン性については、たとえ  $n$  が大きくて  $n$  に関する項を無視出来るとしても、 $\beta$  の圧力依存性を知らねばならぬことを示している。

Kaneshinaらは、種々の Sodium alkylsulfate (octyl, decyl, dodecyl, tetradecyl, それぞれ SOS, SDeS, SDS, STS) について CMC の圧力変化を 35 で求め、さらに SDS については反対イオン結合度を Corrin - Harkins Plot より決め、Evansの式<sup>36)</sup> に電気伝導度のデータを代入して会合数  $n$  を各圧力で求めている<sup>58)</sup>。ここでイオン性活性剤の部分モル体積変化の見積りに基本となる CMC - 圧力曲線を Kaneshina らの alkylsulfate 系活性剤に加えて、著者らの Sodium perfluorooctanoate (SPFO) の

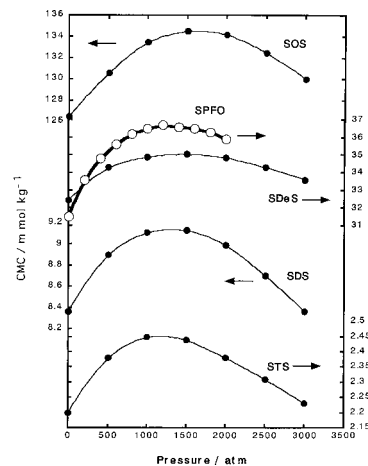


図.9 CMC changes with pressure of anionic surfactants in water at constant temperatures.

測定値<sup>20)</sup>をまとめて図9に示す。イオン性活性剤のミセル形成は常圧 ~ 約 1000atm 付近まで体積増 (即ち、1mol あたりのモル体積はミセルとなって集合した状態の方が単分散状態より大きい)  $\Delta V_m > 0$  を伴うので、Le Chaterier の原理により CMC は高くなる。同時に、会合数が減少し、また反対イオン結合度  $\beta$  も減少 (ミセルの解離度  $\alpha$  が増大) をすることが確かめられている<sup>58)</sup>。CMC がある圧力で極大をとり、そこで  $\Delta V_m = 0$  となり、これより高い圧力下では  $\Delta V_m < 0$  であることが、次の Kaneshina らが用いた式をみれば理解できよう。

$$\Delta V_m = V_m - V_s = (1 + \beta) \left( \frac{\partial \ln X_{CMC}}{\partial P} \right)_T \quad (35)$$

$C_n E_m$  型の非イオン性活性剤の CMC も千 ~ 数千気圧で極大をとり、一方で会合数が圧力と共に減少することや  $\Delta V_m$  が正から負に転ずることなどを、Laser 光散乱法によって Nishikido らが確かめている<sup>59)</sup>。図9は、炭化弗素系活性剤の SPFO が群を抜いて  $\Delta V_m$  が大きいことを示唆している。

Ikawa ら<sup>33)</sup> は、図4(a)に示す溶解度 - 圧力及び CMC - 圧力曲線を解析して SPFO の単分散状態からミセル化に伴う部分モル体積変化  $\Delta V_m$  と、単分散と水和固体状態の差、すなわち結晶化の部分モル体積変化  $\Delta V_c = V_c - V_s$  を次式を適用して求めた (図10)。

ここで  $C_s$  は溶解度である。図10には比較のために、Tanaka らの SDS のデータ<sup>33)</sup> と Mukerjee らの SPFO のデータ<sup>20)</sup> を加えている。炭化弗素系活性剤と炭化弗素系の体積変化挙動を比較すると、後者の方がはるかに顕著である。SPFO と SDeS とは CMC 値はほぼ同じであるにも拘らず、1atm における  $\Delta V_m$  値は前者の方が倍近く大きい理由を疎水性水和の強さやミセル形成の定圧熱容量変化  $\Delta C_p$  の大きさをを用いてうまく説明している<sup>20)</sup>。

### 終りに

以上、ミセル形成のみに絞って、その基礎的な熱力学を論

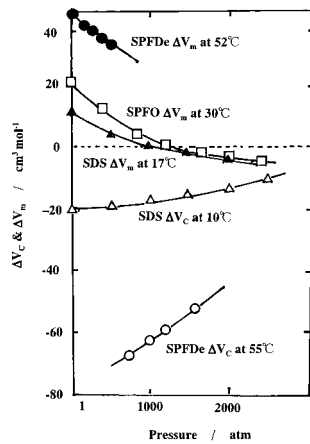


図.10 Partial molal volume changes upon micell formation  $\Delta V_m$  and crystallization  $\Delta V_c$  as function of pressure.

$$\Delta V_c = V_c - V_s = 2RT \left( \frac{\partial \ln C_s}{\partial P} \right)_T \quad (36)$$

じて来た。界面活性剤の他のもう一つの重要な性能は、界面吸着とそれに伴う界面張力の降下であり、可溶化や乳化の特異な機能が挙げられるが、ここでは論じることを控えた。また、濃度領域によって、会合状態が変り複雑な相挙動をする様子も深く研究されているが、この紹介も省略した。

さらに重大な着目点は、界面活性剤の混合効果である。活性剤混合系は、異分子間の相互作用のあり方に興味深い挙動をみせ、混合による相乗効果によって、それぞれ純系とは大いに異なる性能を示すことがみられるので、多数の研究がなされている。混合系を研究してみると、尽きることのない興味が湧いて来るものである。本総説では紹介しなかったが、最近 Tsujii によって “Surface Activity” なる著書が刊行された<sup>60)</sup>。基礎事項を判り易く説明し、最新の重要知見を織り混ぜたこの良書を参照するのも有益であろう。

著者らの研究に対し、惜しみなく支援を賜ったライオン(株)塩野義製薬(株)、三菱東京製薬(元東京田辺製薬)(株)、三栄源 FFI(株)ならびに、(株)同仁化学研究所に深い感謝の意を表します。

#### 参考文献

- 1) 嶋林三郎・寺田弘・岡林博文編集, 「生態コロイド」, 廣川書店, 東京, (1990), 2章2節
- 2) K. Shinoda, T. Nakagawa, B. Tamamushi and T. Isemura, "Colloidal Surfactants", Academic Press, New York and London (1963).
- 3) 松浦良平・近藤保編集 「応用コロイド科学」 廣川書店, 東京, (1969), 8章 (田中満分担執筆)
- 4) 田中満 (a) 油化学, 34, 206 (1985)(b) 油化学, 34, 296 (1985).
- 5) Y. Moroi, "Micelles", Plenum, New York (1992)
- 6) G. Sugihara and M. Hisatomi, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **47**, 661 (1998).
- 7) Y. Moroi, *J. Colloid Interface Sci.*, **122**, 308 (1988).
- 8) M. L. Corrin, W. D. Harkins, *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 683 (1947).
- 9) M. E. Hobbs, *J. Phys. Chem.*, **55**, 675 (1951).
- 10) M. J. Schick, *J. Phys. Chem.*, **68**, 3585 (1964).
- 11) M. F. Emerson, A. Holtzer, *J. Phys. Chem.*, **71**, 1898 (1967).
- 12) E. J. R. Sudholter, J. B. F. N. Engberts, *J. Phys. Chem.*, **83**, 1854 (1979).
- 13) H. N. Singh, S. Swarup, S. M. Saleem, *J. Colloid Interface Sci.*, **68**, 128 (1979).
- 14) Y. Moroi, Y. Sakamoto, *J. Phys. Chem.*, **92**, 5189 (1988).
- 15) G. Sugihara, Y. Arakawa, S. Lee, Y. Moroi, *J. Colloid Interface Sci.*, **170**, 399 (1995).
- 16) M. Fujiwara, T. Okano, T.-H. Nakashima, A.A. Nakamura, G. Sugihara, *Colloid Polym. Sci.*, **275**, 474 (1997).
- 17) Y.-I. Araki, T. Yanagida, M. Hisatomi, T. Kiyota, S. Lee, and G. Sugihara, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* **48**, 307 (1999).
- 18) A.A. Nakamura, M. Hisatomi, G. Sugihara, M. Fujiwara, and T. Okano, *J. Surf. Sci. Technol.*, **14**, 23 (1998).
- 19) M. Hisatomi, M. Abe, N. Yoshino, S. Lee, S. Nagadome, and G. Sugihara, *Langmuir*,

- 16, 1515 (2000).
- 20) G. Sugihara, and P. Mukerjee, *J. Phys. Chem.* **85**, 1612 (1981).
- 21) G. Sugihara and M. Tanaka, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **49**, 3457 (1976).
- 22) A. Malliaris, J. L. Moigne, J. Sturm and R. Zana, *J. Phys. Chem.* **89**, 2709 (1985).
- 23) M. J. Schick, "Nonionic Surfactants", Dekker, New York (1964).
- 24) W. Brown, R. Johnson, P. Stilbs, and B. Lindman, *J. Phys. Chem.* **87**, 4548 (1983).
- 25) M. Okawauchi, M. Hagio, Y. Ikawa, G. Sugihara, Y. Murata and M. Tanaka, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **60**, 2718 (1987).
- 26) H. Oda, S. Nagadome, S. Lee, F. Ohseto, Y. Sasaki and G. Sugihara, *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (Nippon Yukagaku kaishi)*, **46**, 559 (1997).
- 27) S.B. Sulthana, P. V. C. Rao, S. G. T. Bhat, T. Y. Nakano, G. Sugihara, and A. K. Rakshit, *Langmuir*, **16**, 980 (2000).
- 28) H. Furuya, Y. Moroi and G. Sugihara, *Langmuir*, **11**, 774 (1995).
- 29) G. Sugihara, S. Nagadome, T. Yamashita, N. Kawachi, H. Takagi and Y. Moroi, *Colloids Surfaces*, **61**, 111 (1991).
- 30) M. Tanaka, S. Kaneshina, T. Tomida, K. Noda and K. Aoki, *J. Colloid Interface Sci.*, **44**, 525 (1973).
- 31) M. Tanaka, S. Kaneshina, G. Sugihara, N. Nishikido and Y. Murata in "Solution Behavior of Surfactants" Eds. K. L. Mittal and E. J. Fendler, Vol. 1, Plenum, New York (1982).
- 32) N. Nishikido, H. Kobayashi and M. Tanaka, *J. Phys. Chem.* **86**, 3170 (1982)
- 33) Y. Ikawa, S. Tsuru, Y. Murata, M. Okawauchi, M. Shigematsu and G. Sugihara, *J. Solution Chem.*, **17**, 1251 (1988).
- 34) (a)M. Aratono, A. Ohta, H. Minamizawa, N. Ikeda, H. Iyota and T. Takiue, *J. Colloid Interface Sci.*, **217**, 128 (1999).
- (b)H. Iyota, N. Todoroki, N. Ikeda, K. Motomura, A. Ohta, and M. Aratono, *J. Colloid Interface Sci.*, **216**, 41 (1999).
- (c)M. Aratono, M. Villeneuve, T. Takiue, N. Ikeda and H. Iyota, *J. Colloid Interface Sci.*, **200**, 161(1998).
- 35) (a)K. Motomura, S.-I. Iwanaga, M. Yamanaka, M. Aratono, and R. Matumura, *J. Colloid Interface Sci.*, **86**, 151 (1982).
- (b) K. Motomura, Y. Yamanaka, and M. Aratono, *Colloid Polym. Sci.*, **262**, 948(1984).
- 36) H. C. Evans, *J. Chem. Soc.*, 579 (1956).
- 37) P. Lianos and J. Lang, *J. Colloid Interface Sci.*, **96**, 222 (1983).
- 38) K. Tamaki, K. Kobayashi, T. Nomura, M. Iijima, and M. Shimoi, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **46**, 209 (1997).
- 39) (a) I. Satake, T. Fukunaga, T. Maeda, and K. Hayakawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **66**, 1618 (1993).
- (b) I. Satake, T. Morita, T. Maeda, and K. Hayakawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **70**, 761 (1997).
- 40) M. Manabe, H. Kawamura, A. Yamashita and S. Tokunaga, *J. Colloid Interface Sci.*, **115**, 147 (1987).
- 41) M. Fujiwara, T. Okano, T.-H. Nakashima, and G. Sugihara, *Colloid Polym. Sci.*, **275**, 474 (1997).
- 42) G. Sugihara, A.A. Nakamura, T.-H. Nakashima, Y.-I. Araki, T. Okano, and M. Fujiwara, *Colloid Polym. Sci.*, **275**, 790 (1997).
- 43) M. Okawauchi, M. Hagio, Y. Ikawa, G. Sugihara, Y. Murata, and M. Tanaka, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **60**, 2718 (1987).
- 44) G. Sugihara, K. Yamakawa, Y. Murata, and M. Tanaka, *J. phys. Chem.*, **86**, 2784 (1982).
- 45) J. N. Philips, *Trans Faraday Soc.*, **51**, 561 (1955).
- 46) Y. Moroi and R. Matuura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **61**, 333 (1988).
- 47) J. E. Denoyers, G. Caron, R. Delisi, D. Roberts, A. Raux, and G. Perron, *J. Phys. Chem.*, **87**, 1397 (1983).
- 48) P. Mukerjee, K. Korematsu, M. Okawauchi, and G. Sugihara, *J. phys. Chem.*, **89**, 5308 (1985).
- 49) E. Kissa, in "Fluorinated Surfactants", Sarfactant. Sci. Ser. Vol. 50, Marcel Dekker, New York, 1994.
- 50) G. C. Krescheck and W. A. Hargraves, *J. Colloid Interface Sci.*, **48**, 481 (1974).
- 51) J. M. Pestman, J. Kavelam, M. J. Blandamer, and H. A. van Doren, *Langmuir*, **15**, 2009 (1999).
- 52) Y. Yoneyama, *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (Yukagaku)*, **44**, 2 (1995).
- 53) R. Lumry and S. Rajender, *Biopolymers*, **9**, 1125 (1970).
- 54) V.C. Krishnan and L. H. Friedman, *J. Solution Chem.*, **2**, 37 (1974).
- 55) L. J. Chen, S.-Y. Lin and C.-C. Huang, *J. Phys. Chem. B*, **102**, 4350 (1998).
- 56) G. Sugihara, and M. Hisatomi, *J. Colloid Interface Sci.*, **219**, 31 (1999).
- 57) G. Sugihara, T.-Y. Nakano, S. B. Sulthana and A. K. Rakshit, Submitted for publication in *J. Oleo. Sci.*
- 58) S. Kaneshina, M. Tanaka, T. Tomida and R. Matumura, *J. Colloid Interface Sci.*, **48**, 450 (1974).
- 59) N. Nishikido, M. Shinozaki, G. Sugihara, and M. Tanaka, *J. Colloid Interface Sci.*, **82**, 352 (1981).
- 60) K.Tsujii, "Surface Activity", Academic Press, San Diego.London(1998)

#### プロフィール

杉原 剛介 (Gohsuke Sugihara)

福岡大学理学部教授・理学博士

〒814-0180 福岡県福岡市城南区七隈1-19-8福岡大学理学部化学科基礎化学研究室

TEL 092(871)6631 ext.6215 FAX 092(865)6030

[e-mail] sugihara@cis.fukuoka-u.ac.jp

昭和11年11月18日広島市にて出生。昭和35年防衛大学校応用物理学卒業。陸上自衛隊勤務を経て昭和45年九州大学大学院理学研究科化学専攻修士課程修了。同年4月から福岡大学勤務。昭和57年より現職。その間、ウィスコンシン大学客員教授。

#### [主な著書]

『改訂増補化学熱力学中心の基礎物理化学』(学術図書、共著)

『21世紀の大学基礎化学実験』(学術図書、共著)

『三島由紀夫と自衛隊』(並木書房、共著)

# 実用的蛍光誘導体化

## 5

福岡大学薬学部  
山口政俊・能田 均

### 4.3. α-ケト酸用ラベル化試薬とその特性

α-ケト酸分析用の蛍光性 HPLC プレラベル化試薬として (Fig. 1) 1,2-ジアミノベンゼン誘導体 (DDB : a ; DMB : b) が開発されている<sup>1-3</sup>。これらの試薬は希塩酸中で α-ケト酸と反応 (DDB : 100 μmol, 2時間 ; DMB : 100 μmol, 45 - 50min) し, 強蛍光性のキノキサリン誘導体を与える。いずれの試薬も、逆相 HPLCにより α-ケト酸類を数十fmolレベルで分離・検出できる。

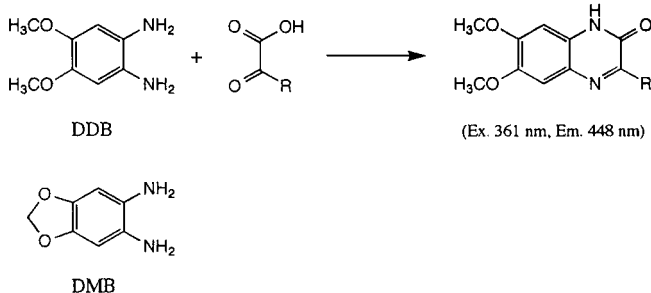


Fig.1 Fluorogenic reaction of α-keto acids with DDB (or DMB).

### 4.4. 1,2-ジアミノ-4,5-ジメトキシベンゼン (DDB) 及び 1,2-ジアミノ-4,5-メチレンジオキシベンゼン (DMB) の実用例

#### (1) α-ケト酸

α-ケト酸はアミノ酸、カルボン酸、糖などの重要な生合成中間代謝物である。ヒト生体中には、十数種の α-ケト酸が存在し、この中で特に分岐 α-ケト酸やフェニルピルビン酸の分析は臨床で極めて重要である。尿や血清中のこれらケト酸類の測定は、楓糖尿症、フェニルケトン尿症等の新生児の先天性代謝異常症の診断に有効である。操作法を Chart 1 に、得られるクロマトグラムを Fig.2 に示す<sup>4</sup>。

アメリカにおいて、成人男性が先の新生児における先天性代謝異常症と同様の症状で、死に至る病気 (Primary biliary Cirrhosis) が報告された。この血漿を本法により測定した結果、ピルビン酸及びフェニルピルビン酸の異常な上昇が観測された。他の臨床データと併せて、この病気が自己免疫疾患の一種と断定された<sup>5</sup>。

Chart 1. Determination of α-keto acids in serum and urine  
Serum sample soln. :

Serum	5μL
40 μM α-Ketovaleic acid (IS)	5μL
0.8 M HClO <sub>4</sub>	80μL
↓	
Centrifuge (1000 g, 10 min)	
Supernatant	

Urine sample soln. :

Urine	5μL
40 μM α-Ketovaleic acid (IS)	5μL
↓	
H <sub>2</sub> O	90μL
Mixture	

Sample soln.	50μL
50 mM DDB in 0.5 M HCl	50μL
containing 0.7 M β-mercaptoethanol	
Heat (100°C, 2h)	
↓	
Cool in ice-water	
Reaction mixture (10μL)	
Apply onto RP-HPLC	

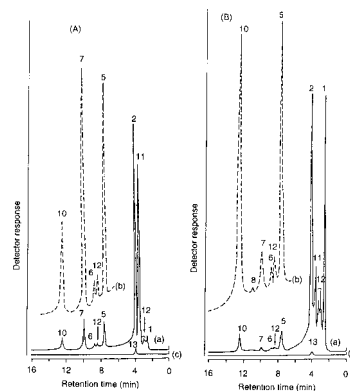


Fig.2 Chromatograms of the DDB derivatives in normal human: (A) serum and (B) urine. Peaks: 1=α-ketoglutaric acid; 2=pyruvic acid; 3=p-hydroxyphenylpyruvic acid; 4=α-ketobutyric acid; 5=α-ketovaleic acid; 6=α-ketoisovaleric acid; 7=α-ketocaproic acid; 8=phenylpyruvic acid; 9=α-ketocaproic acid; 10=α-keto-β-methylvaleric acid; 11=glyoxylic acid; 12=unidentified; 13=DDB. Column: Radial-Pak C18 (5 μm ; 100 x 8 mm I.D.). Mobile phase: methanol-acetonitrile-40 mM phosphate buffer (pH 7.0) (60:40:95, v/v). Flow-rate:1.2 ml/min.

#### (2) シアル酸

シアル糖蛋白質やシアル糖脂質は生体内で様々な機能を有し、免疫にも深く関与している。主としてこれらの糖鎖末端にはシアル酸(ノイラミン酸の総称)が結合しており、N-アセチル(NANA)、N-グリコシルノイラミン酸(NGNA)及びそれらのO-アセチル体などが知られている (Fig. 3)。これらの測定はシアル酸の生理的意義の解明や、癌、炎症性疾患の診断に役立つ。

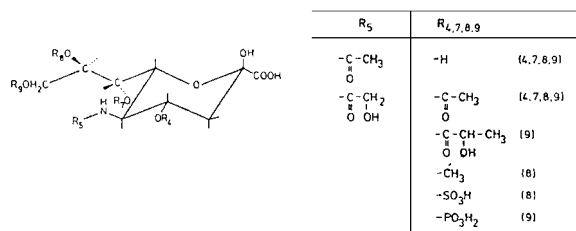


Fig.3 Structure of natural sialic acids. N- and O-Substituents together with their position (in parentheses) in the neuraminic acid molecule are indicated. Several combinations of these substituents are known and up to three O-acetyl residues have been found in one sialic acid molecule. N-Acetylneuraminic acid 9-Phosphate is an intermediate in sialic acid biosynthesis and has been found so far only as free sugar.

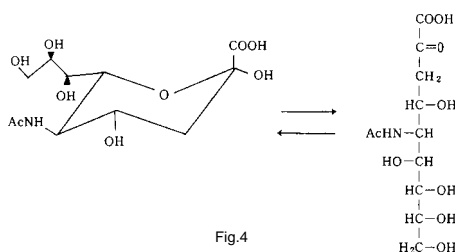


Fig.4

シアル酸は  $\alpha$ -ケト酸構造 (Fig. 4) を有しているため、DMB により蛍光誘導体化される。血清、尿、組織を酢酸で加水分解し、遊離するシアル酸を DMB で蛍光誘導体化し、逆相 HPLC により分離、検出する (Chart 2)。本法は、従来法では検出できなかった NA や NG の  $\alpha$ -アセチル体を含む 4 種のシアル酸の一斉分析が可能である (Fig. 5)。検出限度は、オンカラムで 25 fmol である<sup>6,8)</sup>。

Chart 2. Determination of N-acetyl (NANA) and N-glycolylneuraminic (NGNA) acids in human and animal sera

Human (or animal) serum 5 $\mu$ L  
 25 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 200 $\mu$ L  
 Heat (80 $^{\circ}$ C, 1h)  
 7 mM DMB in water 200 $\mu$ L  
 containing 1.0 M  $\beta$ -mercaptoethanol  
 and 18 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  
 Heat (60 $^{\circ}$ C, 2.5 h)  
 Cool in ice-water  
 Reaction mixture (10 $\mu$ L)  
 Apply onto RP-HPLC

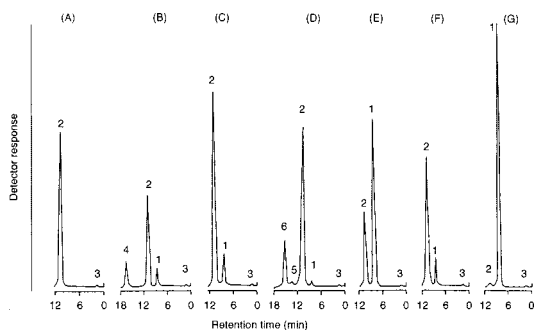


Fig.5 Chromatograms obtained with sera from (A) human; (B) horse; (C) swine; (D) rat; (E) bovine; (F) sheep; and (G) mouse. Peaks: 1=NGNA; 2=NANA; 3=DMB; 4-6=unknown. Column: Radial-Pak C18(5 $\mu$ m; 100 x 8 mm I.D.). Mobile phase: methanol-acetonitrile-water(25:4:91, v/v). Flowrate: 1.2 ml/min.

### (3) デヒドロアスコルビン酸

デヒドロアスコルビン酸は DDB と比較的緩和な条件 (37 $^{\circ}$ C, 30min) で蛍光反応する。この反応を利用し、ヒト血清中の総アスコルビン酸 HPLC 定量法が開発された。本法では、アスコルビン酸を予めヨウ素酸化によりデヒドロアスコルビン酸に導き、これを DDB により誘導体化後、逆相 HPLC 蛍光検出することに基づいている (Chart 3)。検出限度は、オンカラムで 45 fmol である<sup>9,10)</sup>。

Chart 3. Determination of total ascorbic acid in human serum

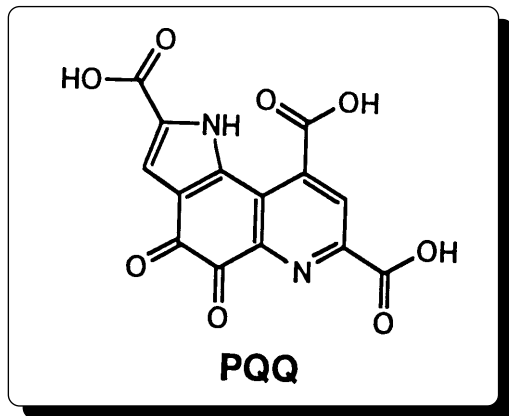
Human serum 2 $\mu$ L  
 10 mM 6,7-Dimethoxy-3-propyl-2(1H)-quinoxalinone (IS) in CH<sub>3</sub>OH 5 $\mu$ L  
 0.6 M TCA 100 $\mu$ L  
 Stand, 0 $^{\circ}$ C, ca. 5 min  
 Centrifuge (1000g, 5 min)  
 Supernatant (50 $\mu$ L)  
 0.3 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in acetate buffer (0.1 M, pH4.5) 50 $\mu$ L  
 1.0 mM I<sub>2</sub> in 1.5mM KI 10 $\mu$ L  
 Stand (room temperature, 10-20 s)  
 50 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 10 $\mu$ L  
 DDB soln. 50 $\mu$ L  
 (prepared in 0.1 M acetate buffer (pH 4.5) containing 0.1 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)  
 Warm (37 $^{\circ}$ C, 30 min)  
 Reaction mixture  
 Apply onto RP-HPLC (10 $\mu$ L)

### 参考文献

- 1) S.Hara, Y.Takemori, T.Iwata, M.Yamaguchi, M.Nakamura and Y.Ohkura, *Anal. Chim.Acta*, **72**, 167(1985).
- 2) S.Hara, M.Yamaguchi, M.Nakamura and Y.Ohkura, *Chem.Pharm.Bull.*, **33**, 3483(1985).
- 3) M.Nakamura, S.Hara, M.Yamaguchi, Y.Takemori and Y.Ohkura, *Chem.Pharm.Bull.*, **35**, 687(1987).
- 4) S.Hara, Y.Takemori, T.Iwata, M.Yamaguchi, M.Nakamura and Y.Ohkura, *J.Chromatogr.*, **344**, 33(1985).
- 5) J.M.Turchany, P.S.C.Leung, T.Iwayama, D.M.Jefferson, J.Ishida, M.Yamaguchi, S.Munoz, D.J.Danner, E.R.Dickson and M.E.Gershwin, *J.Autoimmunity*, **6**, 459(1993).
- 6) S.Hara, M.Yamaguchi, Y.Takemori, M.Nakamura and Y.Ohkura, *J.Chromatogr.*, **377**, 11(1986).
- 7) S.Hara, Y.Takemori, M.Yamaguchi, M.Nakamura and Y.Ohkura, *Anal.Biochem.*, **164**, 138(1987).
- 8) S.Hara, M.Yamaguchi, Y.Takemori, K.Furuhata, H.Ogura and M.Nakamura, *Anal.Biochem.*, **179**, 162 (1989).
- 9) T.Iwata, S.Hara, M.Yamaguchi, M.Nakamura and Y.Ohkura, *Chem.Pharm.Bull.*, **344**, 33 (1985).
- 10) T.Iwata, M.Yamaguchi and M.Nakamura, *J.Chromatogr.*, **344**, 351 (1985).

# Topics on Chemistry

## 新しい酸化還元補酵素：PQQ



PQQ (pyrroloquinoline quinone) は次のような2段階の2電子酸化還元挙動をとるユニークな化合物である。

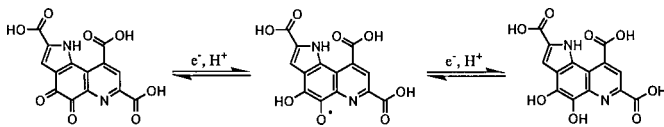


Fig. 1 PQQの酸化還元反応

1964年、Haugeらはグルコース脱水素酵素(GDH)中にNADHやフラビンとは異なる新たな補酵素が含まれることを報告した<sup>1)</sup>。これが、PQQに関する最初の報告といわれている。1979年にこの補酵素のX線解析がなされ、その構造が決定された<sup>2)</sup>。NADH、フラビンに次ぐ「第3の補酵素」といわれるPQQの発見である。

PQQの研究は初期にはDuineらのグループによって精力的に研究がなされ、GDH<sup>3)</sup>、メタノール脱水素酵素(MDH)<sup>4)</sup>をはじめ様々な脱水素酵素、酸化酵素の活性中心となっていることが明らかとなった<sup>5)</sup>。当時は、グラム陰性細菌などの微生物にしか存在しない特殊な酵素に含まれるものと思われていたが、その後、哺乳類のアミノ酸化酵素にも存在することが明らかとなるなど<sup>6)</sup>、広く一般的な生物に存在していることが分かった。

このような、PQQを活性中心とする一連の酵素のなかの一つにグルコース脱水素酵素(GDH)がある。GDHはグルコースの1位の水酸基を脱水素化しグルコノ- $\delta$ -ラク톤を生成するため、糖尿病のスクリーニング用のセンサーとして用いる研究が進められている。同様な機能をもつ酵素にグルコース酸化酵素(GOD)があり、酵素法を用いたグルコースの測定には酵素の安定性といった扱いやすさの面からGODを用いたセンサーが汎用されている。しかしながら、このセンサーは溶存酸素に影響されるという問題点をもっている。

(株)同仁化学研究所 鍋島哲二

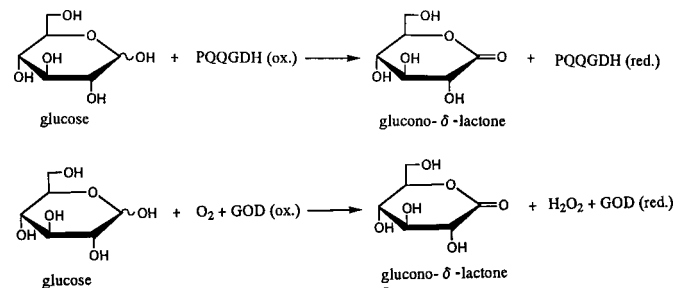


Fig. 2 GDHとGODによるグルコースの酸化

1984年にCassらはGODを用いてフェロセンをメディエーターとするグルコースセンサーを報告し<sup>7)</sup>、その2年後にD'CostaらはGDHを用いて、Cassらが作製したものと同様なフェロセンをメディエーターとする電極を作製して比較した。その結果、GODを用いたセンサーのレスポンスが60~90秒であるのに対しGDHの場合では10~20秒と速く、かつ溶存酸素に影響されない利点をもっていることが示された<sup>8)</sup>。グルコースセンサーとしては正確さ、速度の面から有利なGDHであるが、酵素が熱的に不安定だという問題点がある。早出らはGDHのアミノ酸配列を変異させることで熱安定性を増す検討を行っている<sup>9,10)</sup>。

PQQはセンサーとしての利用のほかに、酢酸を醸造する際に発酵の誘導期間を短縮するなど、微生物の生育に関して有用であることが知られていたが<sup>11,12)</sup>、哺乳類など高等生物の生理活性物質としても興味深い現象が知られるようになった。1989年にPQQ欠乏マウスが報告され、生理活性物質としてのPQQの研究が盛んになった。Killgoreらは、PQQを食餌に含むマウスと含まないマウスを比較し成長過程を調べたところPQQをほとんど含まない食餌で生育させたマウスでは正常の2/3程度しか体重の増加がなく、皮膚のコラーゲンの架橋が少なくなるなど、生育に大きな差があることを示した<sup>13)</sup>。

このことからPQQは哺乳類の必須栄養素であると考えられるようになった。

熊沢らは、PQQをフェニルトリメチルアンモニウム(PTMA)で誘導体化し、GC/MSにより存在量を測定した<sup>14)</sup>。その結果、ヒトの臓器では脾臓(5.9 ± 3.4 ng/g)や膀胱(4.1 ± 3.6 ng/g)など、多い部分でも数ng/gであり、一方、食物ではパセリで34.2 ± 11.6 ng/gとその桁高い値である<sup>15)</sup>。このことから、哺乳類は食物よりPQQを得ているのではないかと述べている。

PQQは他の生理活性についても様々な研究がなされている。ヘム鉄が、Fe(IV)、Fe(V)等の高酸化状態になることを防ぐことや<sup>16)</sup>、活性酸素と反応することなど<sup>17,18)</sup>、酸化状態の制御、ラジカルの生成を抑える等の働きをもつことが示されている。

Aizenmanらはラットの脳皮質神経細胞のN-メチルアスパラギン酸(NMDA)レセプターをDTTで還元して、開いたCaチャンネルがPQQの添加によって正常に戻ることを示した<sup>19)</sup>。これはPQQが還元されたレセプターを酸化して保護する機能をもつ事を示している。

PQQは、このようにラジカルスカベンジャーとしての生理活性を有していると報告されている。一方で、Kawanishiらは銅イオン存在下で、PQQがDNAに損傷を与えることを報告している<sup>20)</sup>。彼等はPQQとCu(II)、NADHの存在する系でDNAのシトシンとチミンが損傷を受けることを示した。パソクブロン(Cu(I)と特異的に反応する試薬)がある場合は、Cu(I)がマスクングされDNAの損傷が起きない。これは、NADHがPQQにより酸化される際に発生する活性酸素と、Cu(II)が発生したPQQラジカルにより還元されて生じるCu(I)が反応して、生成する活性種によりDNAが損傷されると考えられている。

PQQの研究は、特異な酸化還元機構から酵素の活性中心としてのみならず、生理活性物質としても興味深い一面をもっている。また最近、金基板に固定化し電子伝達のメディエーターとする電極も報告される<sup>21)</sup>など、その利用はますます広がり、今後の研究が期待される。

#### 参考文献

- 1) J.G.Hauge, *J.Biol.Chem.*, **239**,3630 (1964).
- 2) S.A.Salisbury, J.S.Forrest, W.B.T.Cruse, O.Kennard, *Nature*, **280**,843(1979).
- 3) J.A.Duine, J.Frank, J.K.van Zeeland, *FEBS Lett.*, **108**,443 (1979).
- 4) J.A.Duine, J.Frank, P.E.J.Verwiell, *Eur.J.Chem.*, **108**,187 (1980).
- 5) M.Ameyama, K.Matsushita, Y.Ohno, E.Shinagawa, O.Adachi, *FEBS Lett.*, **130**,179(1981).
- 6) C.L.Lovenstein-Verbeek, J.A.Jongejan, J.Frank, J.A. Duine, *FEBS Lett.*, **170**,305(1984).
- 7) A.E.G.Cass, G.Davis, G.D.Francis, H.A.O.Hill, W.J.Aston, I.J.Higgins, E.V.Plotkin, L.D.L.Scott, A.P.E.Turner, *Anal.Chem.*, **56**,667(1984).
- 8) E.J.D'Costa, I.J.Higgins, A.P.F.Turner, *Biosensors*, **2**,71 (1986).
- 9) K.Sode, T.Ootera, M.Shirahane, A.B.Witarto, S.Igarashi, H.Yoshida, *Enzyme Microb. Technol.*, **26**,491(2000).
- 10) K.Sode, K.Ito, A.B.Witarto, K.Watanabe, H.Yoshida, P.Postma, *J.Biotechnol.*, **49**,239(1996).
- 11) 船山 寛, 現代化学, 7月号, p.46(1985).
- 12) 船山 寛, 松田 泰樹, 久保田 昭正, 瀧本 晃一, 足立 収生, 日本醸造協会誌, **82**,587(1987).
- 13) J.Killgore, C.Smidt, L.Duich, N.R.Chapman, D.Tinker, K.Reiser, M.Melko, D.Hyde, R.B.Rucker, *Science*, **245**,850 (1989).
- 14) T.Kumazawa, H.Seno, T.Urakami, T.Matsumoto, O.Suzuki, *Biochim.Biophys.Acta*, **1156**,62 (1992).
- 15) T.Kumazawa, K.Sato, H.Seno, A.Ishii, O.Suzuki, *Biochem. J.*, **307**,331(1995).
- 16) F.Xu, C.P.Mark, K.S.Quandt, M.Schlafer, V.Massey, D.E.Hultquist, *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **193**,434 (1993).
- 17) P.M.Gallop, M.A.Paz, R.Fluckiger, E.Henson, *Connect. Tissue Res.*, **29**,153(1993).
- 18) S.Itoh, Y.Ohshiro, T.Agawa, *Bull.Chem.Soc.Jpn.*, **59**, 1911(1986).
- 19) E.Aizenman, F.E.Jensen, P.M.Gallop, P.A.Rosenberg, L.H.Tang, *Neurosci.Lett.*, **168**,189(1994).
- 20) Y.Hikaru, S.Kawanishi, *FEBS Lett.*, **393**,317(1996).
- 21) E.Katz, V.Heleg-Shabtai, A.Bardea, I.Willner, H.K.Rau, W.Haehnel, *Biosens.Bioelectron.*, **13**,741(1998).

## 新製品

### Biotinylation Kit ( Sulfo-OSu )

#### <特長>

- ・このキットだけで、タンパク質のビオチンラベル化と精製が可能です。
- ・1ショットタイプ(10mg × 4本)なので、それぞれ異なった4種類のタンパクラベル化が可能です。
- ・ビオチン試薬である Biotin-(AC<sub>5</sub>)<sub>2</sub> Sulfo-OSu の秤量等の手間がかかりません。
- ・用時調製タイプなので、開封を繰り返すことによるビオチン試薬の劣化がありません。
- ・水溶性のビオチン試薬のため、DMFやDMSOなどの有機溶媒を使用する必要がありません。
- ・ビオチン試薬の添加量を変えることで、ラベル化率のコントロールが可能です。
- ・ビオチン試薬1本当たり、1～5mgまでのタンパク質のラベル化と精製が可能です。

アビジン - ビオチン複合体を用いたシステムは、EIA(エンザイム免疫アッセイ)などの免疫学的測定や組織染色の分野で広く利用されています。ビオチンはタンパク質、抗体、酵素の活性を消失することなく標識することが可能であり、アビジンはビオチンに対して強い親和性(K<sub>d</sub> ~ 10<sup>15</sup> l/mol)をもっています。ビオチンは、それ自身に化学修飾を施すことにより、タンパク質の各種の官能基に結合させることが可能です。ビオチンラベル化は、抗IgG抗体などの二次抗体に対して行われ、一次抗体をビオチンラベル化した二次抗体で認識し、このビオチンを酵素ラベル化或いは蛍光ラベル化されたアビジンやストレプトアビジンで、発色、蛍光または蛍光検出するものです。また一次抗体のラベル化にも使用される場合もあります。

ここに紹介する Biotinylation Kit( Sulfo-OSu )は、水溶性の活性エステルタイプのビオチン化試薬: Biotin-(AC<sub>5</sub>)<sub>2</sub> Sulfo-OSuを用いて、簡単にタンパク質の遊離のアミノ基をビオチンラベル化するキットです。さらに本キットでは、ラベル化用のNaHCO<sub>3</sub> 緩衝液用粉末、ゲルろ過用カラム及びカラム溶離用PBS錠剤を付属しており、ラベル化したタンパク質を精製できます。

#### <キット内容>

- |  |           |
|--|-----------|
| ・ Biotin-(AC <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> Sulfo-OSu | 10mg × 4本 |
| ・ NaHCO <sub>3</sub> 緩衝液用粉末 (ラベル化用)                | 4本        |
| ・ ゲルろ過用カラム   | 4本        |
| ・ カラム溶離用PBS錠剤                                      | 4錠        |
| ・ サンプルチューブ   | 8本        |

品名	容量	価格( ¥ )
Biotinylation Kit (Sulfo-OSu)	set	34,000

## Q &amp; A

## NO 測定キット

NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> Assay Kit-C II (Colorimetric)

~ Griess Reagent Kit ~

NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> Assay Kit-F II (Fluorometric)

~ 2,3-Diaminonaphthalene Kit ~

Q1. 測定対象は？

A1. NO<sub>2</sub><sup>-</sup>とNO<sub>3</sub><sup>-</sup>の濃度を測り分けできます。還元酵素なしでNO<sub>2</sub><sup>-</sup>のみが、還元酵素を使えばNO<sub>2</sub><sup>-</sup>とNO<sub>3</sub><sup>-</sup>の総量がわかります。2つのデータの差からNO<sub>3</sub><sup>-</sup>の濃度がわかります。

Q2. 測定範囲は？

A2. Kit-C II は10 ~ 100 μmol/lの[NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>]の測定に、Kit-F II は1 ~ 10 μmol/lの[NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>]の測定に適しています。それぞれ測定範囲を超える濃度のサンプルは希釈して測定します。また、サンプル量が80 μl以下の場合には添付の緩衝溶液で80 μlにあわせて測定して下さい。

Q3. 測定に必要な機器は？

A3. (Kit-F II)

蛍光のマイクロプレートリーダーを使用してください。励起波長365 nm、蛍光波長450 nmのフィルターを使用して蛍光強度を測定します。この波長のフィルターが無い場合には最も近い波長のフィルターを使用してください。また、プレートリーダーが無い場合には発色させたサンプル100 μlを純水で40倍に希釈して蛍光分光光度計で測定することも可能です。

(Kit-C II)

UV/Visマイクロプレートリーダーを使用してください。540 nmのフィルターを使用して吸光度を測定します。この波長のフィルターが無い場合は530 ~ 580 nmの範囲で適当なフィルターを使用してください。

Q4. Kit-C,FとKit-C II,F IIの違いは何ですか？

A4. これまでKit-C,及びFでは、サンプルに血清や培地をそのまま用いて測定すると、酵素反応に障害を受けるため1/2 ~ 1/3程度に希釈する必要がありました。

しかしKit-C II,及びF IIでは酵素・補酵素に工夫を凝らし、血清や培地をそのままサンプルに用いて測定しても酵素反応に対する影響をほぼ回避することができました。希釈によって測定範囲をはずれるということもなくなり、操作もさらに簡便になりました。

Q5. 血清などのサンプルも測定できますか？

A5. 血清の場合、除蛋白が必要です。Centricon10 ( amicon 社 ) で限外ろ過 ( 5000g, 4 , 1hr ) を行うか、トリクロロ酢酸や有機溶媒等で蛋白を沈殿させて除きます。ただし酸やアルカ

リで除蛋白した場合は、測定前に必ずpHを中性に戻してから測定して下さい。酵素反応が障害を受ける可能性があります。また、ラットやマウス等の小動物でも血清中にはNO<sub>3</sub><sup>-</sup>が10 ~ 20 μmol/l含まれていますので、そのまま測定されるとKit-F IIの測定範囲である1 ~ 10 μmol/lを超える可能性があります。Kit-F IIで血清をサンプルとして測定される際は除蛋白後、更に1/2 ~ 1/3程度に希釈してから測定して下さい。尿の場合、含まれる[NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>]が高いので、5 ~ 10倍程度に純水で希釈し、測定には弊社Kit-C IIをお使いください。細胞培養液は遠心分離 (例えば1000g, 15min, RT) し、上澄みをサンプルとしてください。

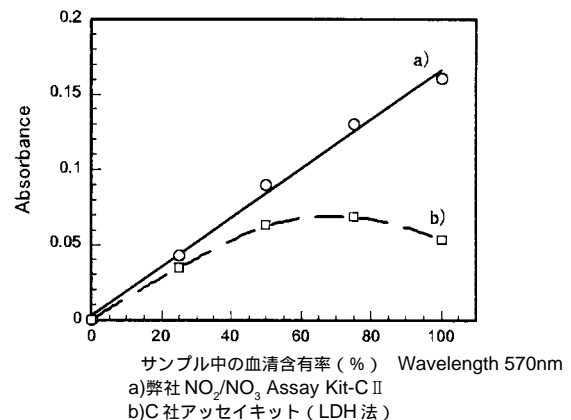
Q6. 培地にRPMI1640を使用していますが、測定に問題はありますか？また、どの培地ならば問題無く使用できますか？

A6. RPMI1640はNO<sub>3</sub><sup>-</sup>が数百μmol/lの濃度で含まれているため、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>のみの測定はできますが、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>とNO<sub>3</sub><sup>-</sup>の総量の測定はできません。DMEMやMEMであればNO<sub>3</sub><sup>-</sup>不含のものがありますのでこれらを使用していただけると問題無く測定できます。

Q7. 他社から出ているキットとはどのように違うのでしょうか？

A7. 弊社Kit-C IIと同様な他社の製品を比較しますと、他社品は血清を希釈せずに測定すると測定試料中の血清の含有率が50%以上の場合、血清中の成分による障害を受け、増加するはずの[NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>]が逆に減少してしまいます。弊社Kit-C IIは血清の含有率の上昇に伴い検出される[NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>]も増加しています。

このように、他社品では血清を希釈しないと正確な値は得られませんが、弊社Kit-C IIは除蛋白した血清をそのまま測定試料に用いても正確な値を得ることができます。



#### ラット血清を用いた希釈直線性試験

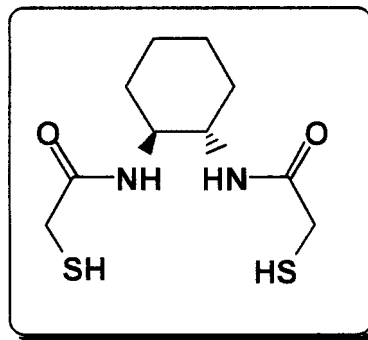
弊社Kit-C IIと他社のアッセイキットを用いてラット血清中のNO<sub>2</sub><sup>-</sup>とNO<sub>3</sub><sup>-</sup>を検出し比較した



## 試作品案内

### 新規ジチオール化合物

#### BMC



BMC は 1986 年 Kasina ら<sup>1)</sup>によって報告されたテクネチウム ( $^{99m}\text{Tc}$ ) のキレート剤で、腎尿細管の機能解析に有用であることが示されています。彼等は、種々の類似ジチオール化合物を合成し、それらの  $^{99m}\text{Tc}$  キレートの腎排泄の効率を比較しています。

また最近では Raines ら<sup>2)</sup>によって、誤って形成されたタンパク質のジスルフィド結合を解き、正しい対を再形成するリフォールディング反応を触媒することが報告されています<sup>3)</sup>。BMC は細胞膜を透過した後、小胞体内でタンパク質のリフォールディングを触媒すると考えられ、生体中でリフォールディングを担っている酵素 protein disulfide isomerase (PDI) と同様の触媒作用をもつことが分かりました。細胞培養系へ添加することによって組換えタンパク質の発現量や活性を向上させることも可能性で、また低分子であるため安定で、容易に系から除去することもできます。

#### 参考文献および特許情報

- 1) S. Kasina, A. R. Fritzberg, D. L. Johnson and D. Eshima, *J. Med. Chem.*, **29**, 1933 - 1940 (1986).
- 2) K. J. Woycechowsky, K. D. Wittrup and R. T. Raines, *Chemistry & Biology*, **6**, 871 - 879 (1999).
- 3) BMC を用いるリフォールディングの手法については、Wisconsin Alumni Research Foundation から用途特許が出願されています (US5910435 / 特表平 11-514017)。

\* 弊社からの購入は、上記特許実施を認めたものではございません。  
ご使用に際しては、ご注意下さい。  
\* 本品は、試験・研究用途に限ります。

Q8. 測定を阻害する要因となるものにはどのようなものがありますか？

A8. 蛋白質・金属が含まれると測定に影響が出ます。

蛋白質：上記 Q5. のように除蛋白を行ってください。

金属：銅や亜鉛が数十  $\mu\text{mol/l}$  以上含まれると酵素反応が阻害を受けます。金属に対して同量が過剰量の EDTA を添加することで影響は回避できます。

Kit-F II の場合は、培地に含まれているフェノールレッドによっても影響を受けますので、不含のものをお使いください。

Q9. 酵素・補酵素は溶解した後は何 で保存すればいいでしょうか？

A9. 酵素・補酵素は溶解後は長期保存することができません。後日再度使用する場合には 0 ~ 5 程度の冷蔵で保存し、二週間以内に使用するようにして下さい。凍結すると酵素が失活する可能性があるため、必ず冷蔵で保存してください。

Q10.  $\text{NO}_3^-$  を酵素で還元して  $\text{NO}_2^-$  にしていますが、100%還元されたという保証はあるのでしょうか？

A10.  $\text{NO}_2^-$  の標準液と  $\text{NO}_3^-$  の標準液にそれぞれに酵素・補酵素を加えて引いた検量線が重なることを確認していますので、ほぼ 100%還元されていると考えています。

品名	容量	価格(¥)	コード番号
$\text{NO}_2/\text{NO}_3$ Assay Kit-C II (Colorimetric)	100 回用	24,800	344-07991
$\text{NO}_2/\text{NO}_3$ Assay Kit-F II (Fluorometric)	100 回用	23,000	347-07981

#### お知らせ

### 第 11 回 フォーラム・イン・ドージン 開催ご案内

下記要項で開催を予定しております。  
詳細は次号にてご案内いたします。

テーマ：「自然免疫の分子基盤」

日時：平成 12 年 11 月 24 日(金) 9:40 ~ 17:50

開場：9:10 開演：9:40

会場：熊本県立劇場

(熊本市大江 2 丁目 7 番 1 号)

参加費：無料

## 新製品

### -Proteostain- Protein Quantification Kit - Rapid

#### 特長

- 96穴マイクロプレートアッセイキットである
- 高感度である (10 µg/ml ~ 2,000 µg/ml, BSA)
- 短時間 (30 秒) で測定できる
- 重金属を全く使用しない

タンパク質濃度の定量はこれまでいくつかの方法が報告され、また実用化されています。例えば Lowry 法、Bicinchoninate 法 (BCA法)、Biuret法、Bradford法等です。その中でも Coomassie Brilliant Blue G (Fig.1) は高感度で反応が速いタンパク検出用試薬として用いられており、Bradford 法で用いられています。

Coomassie Brilliant Blue G はタンパク質に作用し、酸性条件で青色に呈色します ( $\lambda_{max}=595 \text{ nm}$ )。しかも呈色反応は1分以内に終了し、生じた色素は30分以上安定です。従ってこの方法を使うことにより数分でのタンパク質定量を行うことができます。本キットにはマイクロプレートアッセイに対応するため、ready-to-use の状態にした Coomassie Brilliant Blue G 溶液と検量線用の BSA 溶液が含まれています。

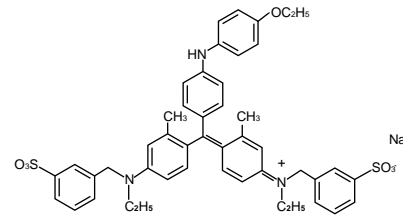


Fig.1 Coomassie Brilliant Blue G

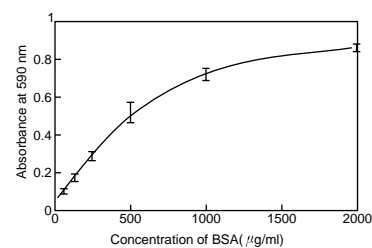
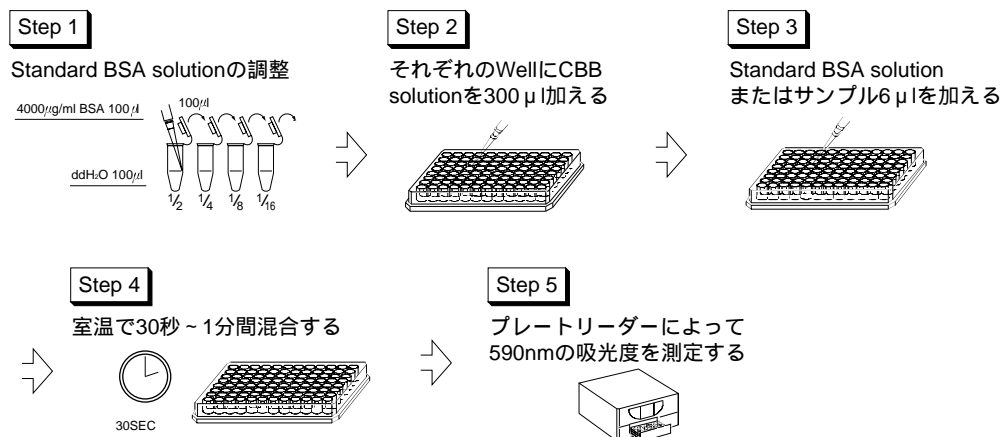


Fig.2 BSA Standard solution で作成した検量線の例

#### キット内容

[ 500回用 ]			[ 2,500回用 ]		
CBB solution	100ml	2ボトル	CBB solution	1,000ml	1ボトル
Standard BSA solution(4000 µg/ml)	1.5ml	1ボトル	Standard BSA solution(4000 µg/ml)	1.5ml	2ボトル

#### 操作方法



#### 注意事項

- 本キットは 0-5 °C で保存して下さい。
- CBB solution は酸性ですので取扱いには充分注意して下さい。

品名	容量	価格 ( ¥ )
-Proteostain- Protein Quantification Kit-Rapid	500 回用	4,000
	2,500 回用	11,000

## 新製品

### -Proteostain- Protein Quantification Kit - Wide Range

#### 特長

- 96穴マイクロプレートアッセイキットである
- 直線性がよい (50 µg/ml ~ 5,000 µg/ml BSA)
- 重金属を全く使用しない
- 界面活性剤は測定に影響しない

タンパク質の検出においてLowry法とBCA法は最もポピュラーなタンパク質量法です。これらの方法は一価の銅イオン特異的キレートによる一価銅イオンの検出に基づいたものです。よって測定時に高濃度の二価の銅イオンを必要とします。Protein Quantification Kit-Wide Rangeは塩基性条件でのtetrazolium saltの還元反応を利用したものです。tetrazolium saltは、タンパク質により容易に還元されformazan dyeを生成します(Fig.3)。WST-8のformazan dyeは中性域では黄色を示しますが、高pH域では青色を示します。

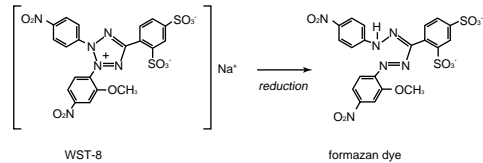


Fig.3 WST-8とそのformazan dyeの構造式

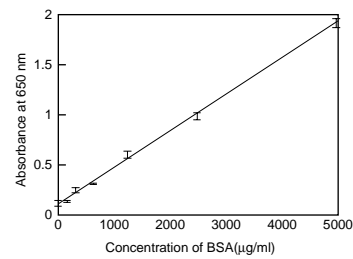
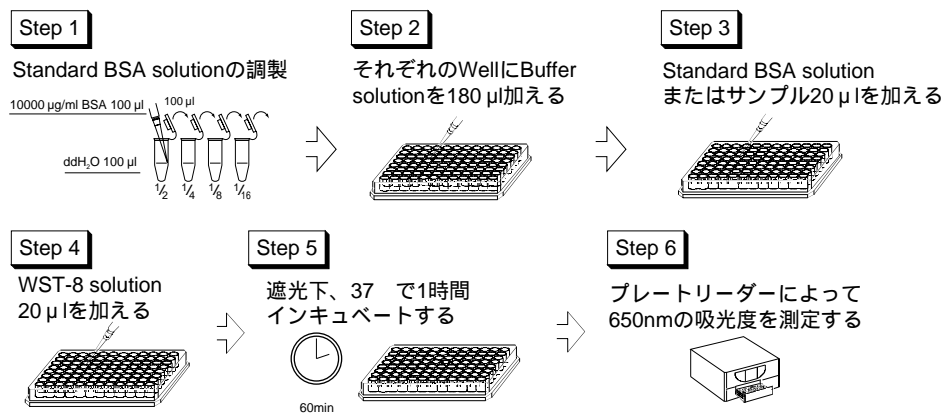


Fig.4 Standard BSA solutionで作成した検量線の例

#### キット内容

[ 500回用 ]			[ 2,500回用 ]		
WST- 8 solution	10ml	1ボトル	WST- 8 solution	50ml	1ボトル
Buffer solution	100ml	1ボトル	Buffer solution	500ml	1ボトル
Standard BSA solution(10,000 µg/ml)	1.5ml	1ボトル	Standard BSA solution(10,000 µg/ml)	1.5ml	2ボトル

#### 操作方法



#### 注意事項

- 本キットは0 ~ 5 °C で保存してください。
- Buffer solutionはアルカリ性ですので取扱いには充分注意して下さい。
- Buffer solutionのpHは炭酸ガスを吸収してpHが下がる恐れがあるので、使用後はしっかりとキャップを締めてください。

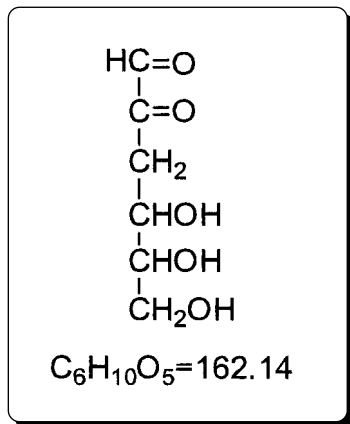
- WST-8はBuffer solutionとの混合後は、光安定性が低下しバックグラウンドの吸光度が上昇する恐れがあるので、インキュベーションの間は遮光して下さい。

品名	容量	価格(¥)
-Proteostain- Protein Quantification Kit-Wide Range		
	500回用	4,000
	2,500回用	11,000

## コラム

### 生体内糖化産物、AGE 生成物質としての 3-DG およびその検出定量

糖尿病合併症の成因の一つとして蛋白糖化反応の後期生成物である AGE (Advanced Glycation End Products) が注目されています。AGE は、蛋白質のアミノ基と還元糖のアルデヒド基が反応して、 Schiff 塩基、アマドリ転位生成物（前期生成物）を經由して、脱水、酸化、縮合などの反応を経て得られる後期生成物です。この過程においてアマドリ生成物から生じる 3-Deoxyglucosone (3-DG) は、グルコース由来の反応活性の高いジカルボニル化合物であり、さらに蛋白と反応することでピラリン<sup>1,2)</sup>、ペントシジン<sup>3,4)</sup>、ピロピリジン<sup>5)</sup>、イミダゾロン<sup>6)</sup>といった AGE を生じるため、AGE の前駆体として重要な位置を占めています。また蛋白と糖との反応物であるアマドリ生成物を経るルート以外にもフルクトースの自己酸化によって生じるという報告もあり、この場合は蛋白質は必要としません。フルクトースは糖尿病で亢進しているポリオール経路の最終産物であり、合併症の成因を考える上で興味深く、近年その生体内存在を確認する研究が行われています。



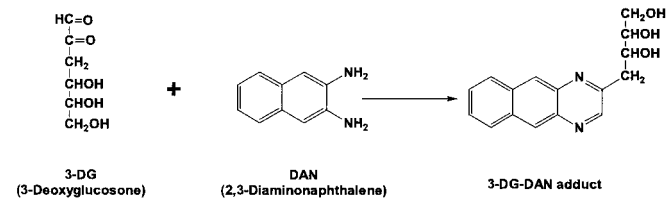
3-DG (3-Deoxyglucosone)

ラットの血漿中の 3-DG は糖尿病によって有意に増加しており、丹羽らは尿毒症患者で有意に高く、糖尿病を合併した場合にはさらに高値であることを報告しています<sup>7)</sup>。これらは糖尿病以外の疾患にも 3-DG が関わっている可能性が考えられます。浜田らによれば<sup>8,9)</sup>、血漿 3-DG レベルは血漿グルコース及び HbA<sub>1c</sub> のレベルと良い相関を示しています。また培養細胞系では DNA 合成阻害を介して細胞増殖を抑制するという報告もあり生体内での作用については未知な部分が多いようです<sup>10)</sup>。

また宮田らは糖尿病モデルラットに蛋白糖化反応を阻害するアミノグアニジンを投与する (50mg/kg/day) と、3 週間後の血漿 3-DG 値は非投与群が 918 nmol/l と正常群 379 nmol/l に対して有意に高値となっていました。投与群では 695 nmol/l と増加が抑制されていました。3-DG はアミノ基と速やかに反応するため、*in vitro* で 3-DG 溶液にアミノグアニジンを添加すると 3-DG は消失することから、上記のラットではアミノグアニジンが 3-DG を消去した結果と考えられ、蛋白糖化反応阻害薬の作用点としての可

能性が示されました<sup>8)</sup>。

3-DG 以外にも生体内にはグリオキサール、メチルグリオキサールといった同様の反応活性の高いジカルボニル化合物が存在し、これらはグルコースの自己酸化によって生じ、3-DG と並んで AGE 生成の前駆体とされています<sup>11)</sup>。



生体内 3-DG の検出法は現在、MS による方法<sup>12-15)</sup> と HPLC による方法<sup>8,9)</sup> が用いられています<sup>16)</sup>。特に HPLC 法は 3-DG の反応性を利用して 2,3-Diaminonaphthalene を用いて反応させ生じた蛍光付加体を検出する方法が知られています。2,3-Diaminonaphthalene (DAN) の他、1,2-Diamino-4,5-dimethoxybenzene (DDB)<sup>17)</sup>、2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzene (MDB) も応用でき、これらを用いてグリオキサール、メチルグリオキサールの検出に適用した例もあります。

このように 3-DG は潜在患者を含めると 690 万人にともしられる糖尿病に関連しており、生体内の糖化反応あるいは、ジカルボニル化合物による酸化ストレス物質として近年注目されており、現在その作用機序、定量などの研究がおこなわれておりますが、HbA<sub>1c</sub>、1,5-アンヒドロ-D-グルシトール (1,5-AG)、グリコアルブミン (GA) などとならば病態の指標となりうるのか、今後の発展が期待される分野と考えられます。

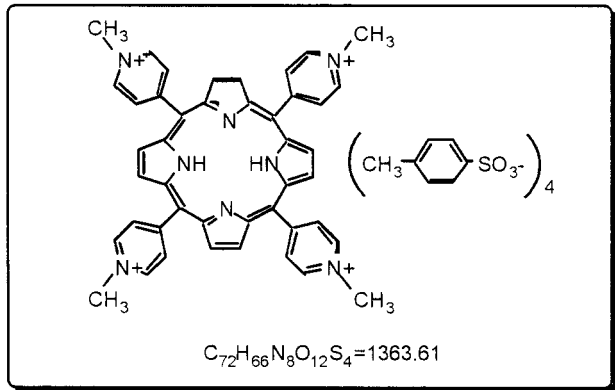
#### 参考文献

- 1) F. Hayase *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **264**, 3758(1989).
- 2) S. Miyta *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **89**, 1102(1992).
- 3) S. Taneda *et al.*, *Clin. Chem.*, **40**, 1766(1994).
- 4) D. G. Dyer *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **266**, 11654(1991).
- 5) F. Hayase *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 1936(1994).
- 6) F. Hayase *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 1407(1995).
- 7) T. Niwa *et al.*, *Nephron*, **69**, 438(1995).
- 8) H. Yamada *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **269**(32), 20275(1994).
- 9) Y. Hamada *et al.*, *Diabetes Care*, **20**, 1466(1997).
- 10) T. Shinoda *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 2215(1994).
- 11) P. J. Thornally *et al.*, *Biochem. J.*, **344**(pt.1), 109(1999).
- 12) T. Niwa *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **196**, 837(1993).
- 13) K. J. Knecht *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **294**, 130(1992).
- 14) T. Niwa *et al.*, *Kidney Int.*, **51**, 187(1997).
- 15) S. Lal *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **342**, 254(1997).
- 16) T. Niwa *et al.*, *J. Chromatogr. B*, **731**, 23(1999).
- 17) E. Fujii *et al.*, *J. Chromatogr. B*, **660**, 265(1994).

新製品

テロメラーゼ阻害剤

TMPyP



特長

テロメラーゼの強力 (IC<sub>50</sub>=6.5 ± 1.4 μmol/l) な阻害剤である。

テロメア (telomere) は、染色体の両末端に存在する繰返し配列であり、ダイセントリック染色体の形成から染色体を守る役割を果たしていると言われています。染色体複製の際RNAプライマー結合のために複製されない部分が生じることから、複製が繰返される毎にテロメア長は短くなります。正常な体細胞においてはテロメア伸長の機構は存在せず、テロメア長が細胞の分裂可能回数、即ち細胞寿命の指標になっていると言われています。一方、癌細胞や、生殖系・造血系の細胞にはテロメラーゼ (telomerase) が存在し、テロメア伸長を行っているため、これらの細胞は、無限に細胞分裂することが可能になると言われています。

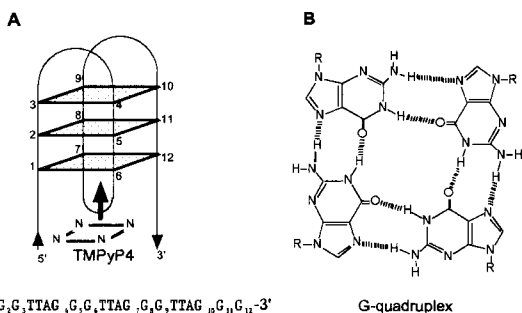


図1 G-quadruplex 構造

ヒトのテロメアの一次配列は、TTAGGGの繰返し配列です。3'末端側には、塩基対を形成しない一本鎖部分がはみ出しており<sup>1)</sup>、その長さはヒトで150塩基以上といわれています。この一本鎖は折り畳まれて安定な4本鎖構造 (G-quadruplex、図1A) を形成<sup>2)</sup>していることが明らかになりました。グアニン間の結合は、Hoogsteen型塩基対 (図1B) を形成しています。図ではG-quadruplexを正方形で表していますが、この時の1辺の長さは10

~ 11 です。

G-quadruplex に特異的に結合する化合物の存在は知られており、TMPyP (5,10,15,20-tetra-(N-methyl-4-pyridyl) porphine) もそのような化合物の一つです。分子は平面構造をとっており、隣接するピリジル基窒素間の距離 (約9 Å) は、G-quadruplex の1辺の長さ近くに、またカチオン性窒素はDNAのリン酸基と静電的相互作用をすると考えられています。そのような性質から、TMPyPはG-quadruplexに結合し、その構造を安定化します。最近では、より積極的にG-quadruplexの形成に関与していることも示されています。

TMPyPがG-quadruplexに結合することによって、テロメラーゼはテロメアへの結合を妨げられ、その酵素活性自体も阻害されます<sup>3,4)</sup>。TMPyPのテロメラーゼに対するIC<sub>50</sub>値は6.5 ± 1.4 μmol/lです。テロメラーゼ自体はもとより、発癌や細胞寿命の研究に活用されることが期待されます。

参考文献

- 1) E. H. Blackburn and C. W. Greider, *Telomerase*, Cold Spring Harbor Press, New York., (1995).
- 2) W. I. Sundquist and A. Klug, *Nature*, **342**, 825 (1989).
- 3) R. T. Wheelhouse and L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 3261 (1998).
- 4) F. X. Han, R. T. Wheelhouse and L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 3561 (1999).

品名	容量	価格(¥)	コード番号
TMPyP	100mg	3,350	345-03881
	1g	20,400	341-03883

お知らせ

秋の学会展示ご案内

下記学会において、試薬新製品の展示を行います。皆様のご来場をお待ち致します。

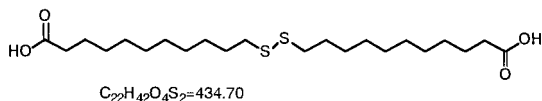
- ・第59回日本癌学会  
10月4日(水)~6日(金) パシフィコ横浜 (横浜)
- ・第73回日本生化学会  
10月12日(木)~14日(土) パシフィコ横浜 (横浜)
- ・第23回日本分子生物学会  
12月13日(水)~16日(土) 神戸国際会議場 (神戸)

## 新製品

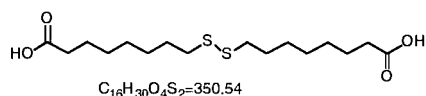
## Self-Assembled Monolayers (SAMs) 研究用試薬

## Carboxy disulfide

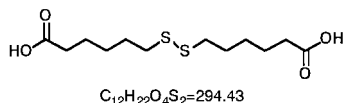
## 10-Carboxydecyl disulfide (10-CDD)



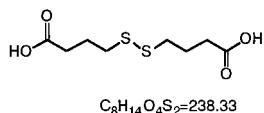
## 7-Carboxyheptyl disulfide (7-CHD)



## 5-Carboxypentyl disulfide (5-CPD)



## 4,4'-Dithiodibutyric acid (DDA)



## &lt; 特長 &gt;

- ・自己組織化単分子膜(SAM)を形成する試薬であり、SAMに様々な分子認識サイトを導入する際に有用である。
- ・チオール臭気がなく、取扱いが容易である。

近年、ジスルフィド化合物をチオール化合物と同様に、金表面に吸着させ自己組織化単分子膜(Self-Assembled Monolayer; SAM)を形成する方法は、欠陥の少ない高密度・高配向な単分子膜を容易に作製できるため、金修飾電極や表面プラズモン共鳴(SPR)、水晶発振子マイクロバランス(QCM)等への利用が盛んに進められています。いずれの手法においても、基板上にジスルフィド化合物やチオール化合物を用いてプローブ分子を固定化し、ターゲット分子との相互作用を検出しています。

また、金コロイドなどの超微粒子をジスルフィド化合物やチオール化合物を用いて修飾し、生体機能の解明や検出に用いる研究も行われています。

今回発売するアルカンジスルフィド化合物は、末端にカルボキシル基を有し、様々なペプチドやタンパク質、その他の分子認識サイトを導入する際に有用です。また、チオール臭気がなく、取扱いが容易です。

N. Kanayamaらは、DDAのSAMで修飾した金コロイド表面や金電極に3-アミノフェニルホウ酸を結合させ、糖の分子認識デバイスへの応用を試みています<sup>1)</sup>。

R. D. Vaughanらは、3,3'-Dithiodipropionic acidのSAMで修飾したQCMの金電極をEDCとNHSにより活性化し、抗原(mouse IgG)抗体(rabbit anti-mouse IgG)反応を振動数変化から検出できたことを報告しています<sup>2)</sup>。

H. Tairaらは10-CDDのSAMで修飾した金電極に2,4-ジニトロフェニルアミンを結合させ、インピーダンス変化からアンチDNAモノクローナル抗体を用いて抗原抗体によるセンサーへの応用を試みています<sup>3)</sup>。

E. Delamarchらは、10-CDDのSAMで修飾した金基盤にNHSとベンゾフェノン誘導体を結合させ、光活性表面をもつSAM金基盤を構築し、光照射によりSAM表面を活性化し、IgGを固定化しています<sup>4)</sup>。

弊社カルボキシジスルフィドを用いてSAM修飾電極を作製し、電気化学的に評価(CV法)した結果を図1に示します。

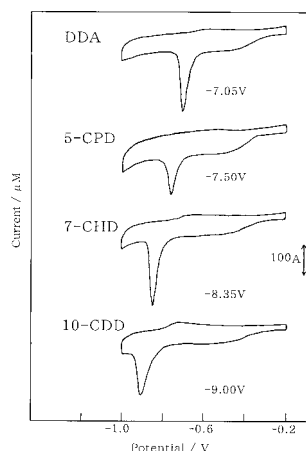


図1

金基板を弊社カルボキシジスルフィドの100mmol/lメタノール溶液に10分間浸漬させて作製したSAM修飾電極の0.1mol/l KOH溶液中のCV。掃引速度50mV/S。

10-CDD、7-CHD、5-CPD、DDAの各エタノール溶液(100 μmol/l)に45秒間水素炎アニールした金電極(2000 μm<sup>2</sup>)を10分間浸漬し修飾電極を作製した。強アルカリ条件下におけるチオール単分子膜の金表面からの脱離挙動をCV法にて評価した。

## &lt; 測定条件 &gt;

作用電極: 上記修飾電極、対極: Pt Plate、参照電極: Ag / AgCl、  
開始電圧: -200mV、最大掃引電圧: -200mV、  
最小掃引電圧: -1000mV、掃引速度: 50mV / sec  
0.1mol/l KOH水溶液中、窒素雰囲気下でCV測定。

金表面からのチオレートアニオンの脱離に由来する不可逆なカソード電流が各修飾電極で観測され、アルキル鎖長が長くなるにつれて、還元脱離の起こる電位が高くなることが確認されました。

また図2に示したように、弊社のDDAは他社品に比べ、不純物が少ない高純度品です。

弊社では、これらの自己組織化単分子膜の研究及び機能開発に関して有用な試薬の開発を進めています。既に、種々の化学修飾が可能なアミノ基、カルボキシル基及びヒドロキシル基を末端に持つアルカンチオール(C5~11)、電気化学活性部位であるフェロセニル基を末端に持つアルカンチオール(C6~11)を発売しています。これらの試薬に関するパンフレットを新しく作成いたしました。どうぞご利用ください。

参考文献

- 1) N. Kanayama, H. Kitano, *Langmuir*, **16**, 577 (2000).
- 2) R. D. Vaughan, C. K. O'Sullivan, G. G. Guilbault, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **364**, 54 (1999).
- 3) H. Taira, K. Nakano, M. Maeda, M. Takagi, *Anal. Sci.*, **9**, 199 (1993).
- 4) E. Delamarche, G. Sundarababu, H. Biebuyck, B. Michel, Ch. Gerber, H. Sigrist, H. Wolf, H. Ringsdorf, N. Xanthopoulos, H. J. Mathieu, *Langmuir*, **12**, 1997 (1996).

品名	容量	価格(¥)
10-Carboxydecyl disulfide		
7-Carboxyheptyl disulfide		
5-Carboxypentyl disulfide		
(上記三品目)	10mg	11,300
	100mg	33,000
4,4'-Dithiodibutyric acid	500mg	14,000

関連商品

品名	容量	価格(¥)
11-Amino-1-undecanethiol, hydrochloride		
8-Amino-1-octanethiol, hydrochloride		
6-Amino-1-hexanethiol, hydrochloride		
(上記三品目)	10mg	12,800
	100mg	38,500
10-Carboxy-1-decanethiol		
7-Carboxy-1-heptanethiol		
5-Carboxy-1-pentanethiol		
(上記三品目)	10mg	11,000
	100mg	30,000
11-Hydroxy-1-undecanethiol		
8-Hydroxy-1-octanethiol		
6-Hydroxy-1-hexanethiol		
(上記三品目)	10mg	11,000
	100mg	30,000
11-Ferrocenyl-1-undecanethiol		
8-Ferrocenyl-1-octanethiol		
6-Ferrocenyl-1-hexanethiol		
(上記三品目)	10mg	11,500
	100mg	34,000

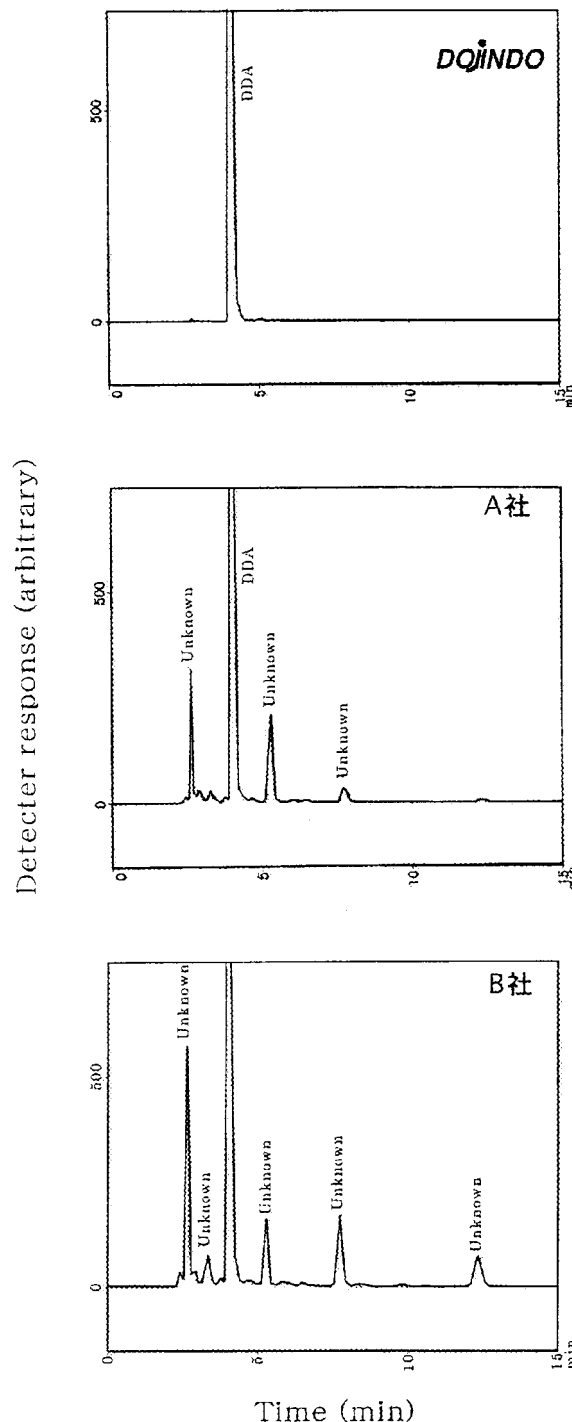


図2 弊社品と他社品のDDAのHPLC純度測定データ

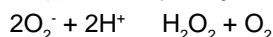
## 8月中旬発売予定

### SOD Activity Detection Kit-WST

#### <特長>

1. 100%SOD 阻害率を測定できます。
2. ホルマザンの溶解操作を必要とせず、操作が簡単です。
3. 一度に多検体の測定が可能です。

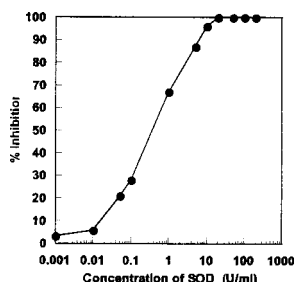
近年、活性酸素と老化および発癌との関わりが活発に研究され、その真相が解明されつつあります。中でも活性酸素の一つであるスーパーオキシドを消去する、superoxide dismutase (SOD)およびSOD様物質が注目されています。SODは以下のスーパーオキシドの不均化反応を触媒する酵素です。



SOD活性を測定する方法として、チトクロム法、NBT法、エビネフリン法および亜硝酸法などが知られています。xanthine/xanthine oxidaseをスーパーオキシド生成系とし、テトラゾリウム塩の還元反応を利用したNBT法は操作が簡便であることから汎用されていますが、生成するホルマザンが不溶性の沈殿物であることや、NBTがxanthine oxidaseと直接反応し100%SOD阻害率を測定することができない等の問題をかかえています。

SOD Activity Detection Kit-WSTは高水溶性ホルマザンを生成するテトラゾリウム塩WST-1を使用しているため、ホルマザンの溶解操作を必要としません。またWST-1はxanthine oxidaseと直接反応しないため、100%SOD阻害率を測定できます。また96穴マイクロプレート対応ですので、一度に多検体の測定が可能です。

#### SOD inhibition curve



#### 参考文献

- 1) H.Ukeda, D.Kawana, S.Maeda and M.Sawamura, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 485(1999).
- 2) H.Ukeda, A.K.Sarker, D.Kawana and M.Sawamura, *Anal. Sci.*, **15**, 353(1999).

## 8月中旬発売予定

### Total Glutathione Quantification Kit

#### <特長>

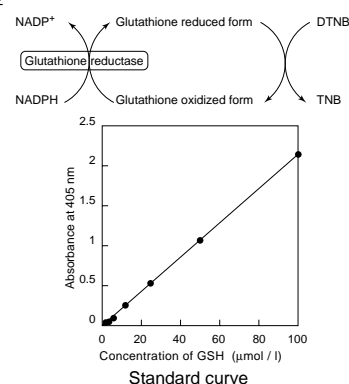
1. 高感度に Total Glutathione を定量できます(検出限界: 1 μmol/l)。
2. 短時間(30分以内)で測定ができます。
3. 一度に多検体の測定が可能です。

Glutathione (L-γ-Glutamyl-L-cysteinylglycine)は哺乳動物に存在するトリペプチドで、glutathione peroxidase, glutathione S-transferase および thiol transferase 等の酵素基質として関与しています。また Glutathione は酸素ラジカル捕捉能があり、アスコルビン酸と同様の抗酸化作用が認められています。

Glutathioneは下記の酵素リサイクリング法によって高感度に検出されます。5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)はジスルフィドを分子内に含有し、Glutathioneを酸化すると同時に自身は5-Mercapto-2-nitrobenzoic acidに還元されます。このチオール吸光度( $\lambda_{\text{max}}=412 \text{ nm}$ )より Glutathione を定量することができます。

Total Glutathione Quantification Kitはこの酵素リサイクリング法を利用した96穴マイクロプレート用キットです。短時間(30分以内)で、高感度に Total Glutathione(GSH+GSSG)を定量することが可能です。

#### 反応スキーム



#### 参考文献

- 1) O. W. Griffith, *Anal. Biochem.*, **106**, 207 (1980).
- 2) M. E. Anderson, *Methods in Enzymology*, **113**, 548 (1985).
- 3) M. A. Baker, G. J. Cerniglia and A. Zaman, *Anal. Biochem.*, **190**, 360 (1990).
- 4) C. Vandeputte, I. Guizon, I. Genestie-Denis, B. Vannier and G. Lorenzon, *Cell Biology and Toxicology*, **10**, 415 (1994).

ホームページアドレス

URL : [http:// www.dojindo.co.jp/](http://www.dojindo.co.jp/)

E-mail : [info@dojindo.co.jp](mailto:info@dojindo.co.jp)

フリーファックス 0120-021557

フリーダイヤル 0120-489548

**DOJIN** News No.95

ドージンニュース No.95平成12年7月25日発行

株式会社同仁化学研究所 DOJINDO LABORATORIES

熊本県上益城郡益城町田原2025-5〒861-2202

発行責任者 石田和彦 編集責任者 斉藤素子 年4回発行 許可なくコピーを禁ず