

# ビンドシェドラーズグリーンロイコ塩基を用いる フローインジェクション分析法による過酸化水素の 吸光光度定量

秋庭 正典<sup>Ⓐ</sup>, 本水 昌二<sup>\*</sup>, 桐栄 恭二<sup>\*\*</sup>

(1987年5月6日受理)

ビンドシェドラーズグリーンロイコ塩基 (LBG) を色原体とし, Fe(II) を触媒とした FIA 系による過酸化水素の定量法について検討した. 弱酸性溶液中, Fe(II) が存在すると LBG は過酸化水素によって 725 nm に吸収極大を持つ緑色のビンドシェドラーズグリーン (BG<sup>+</sup>) に酸化され, この波長での吸光度の増加を利用して過酸化水素を定量した. pH 及び共存させる塩酸ヒドロキシルアミンの濃度を調節することにより, 過酸化水素が 0~1 ppm の範囲で検量線は直線性を示す. 過酸化水素 0.58 ppm での 10 回繰り返し測定 of 相対標準偏差は 0.4% で, 検出限界は 5 ppb (S/N=2) であった. 1 時間当たりの分析速度は 30 検体であった. 市販の各種水あめ中のグルコース (3~96%) を, グルコースオキシダーゼで反応させた後, FIA で測定した.

## 1 緒 言

臨床検査, 環境分析, 食品分析において糖をはじめとする生体成分, 代謝成分の正確で, 迅速, 簡便な方法の開発が現在要求されている. 最近, 酵素を用いた分析法が, その特異性から特に注目されている. なかでも酵素反応により生成する過酸化水素がペルオキシダーゼ (POD) の触媒作用により, 有機化合物を酸化する反応を利用した例が多い. 更に近年, FIA への応用例も多く, 触媒として固定化 POD カラムを用いる方法<sup>1)2)</sup> も用いられている. 又, POD と同様の作用を持つ Mn(III)-ポルフィリン担体樹脂カラムを用いる方法<sup>3)</sup> あるいは Ti(IV)<sup>4)</sup>, Mn(II)<sup>5)</sup> を用いる方法も報告されている. Fenton 試薬として知られているように, Fe(II) の共存下で過酸化水素は強力な酸化剤となり, この際ジフェニルアミン誘導体であるビンドシェドラーズグリーンロイコ塩基 [4,4'-bis(dimethylamino)diphenylamine] (以下 LBG と略記) が存在すると, 酸化されてビンドシェドラーズグリーン (BG<sup>+</sup>) となる. LBG は酸性溶液ではほとんど無色であるが, BG<sup>+</sup> は酸性で濃青色, 弱酸性では濃緑色を発する. この反応を用いて超微量鉄の接触分析を行った報告<sup>6)</sup> もある. 著者らは, この反応

を用いる FIA で過酸化水素の定量法を検討し, 良好な結果を得たので報告する.

## 2 実 験

### 2.1 試 薬

過酸化水素標準溶液: 30% 過酸化水素水 (特級, 三菱瓦斯化学製) を水で希釈して 0.1% 溶液とした. 正確な濃度はヨウ素滴定法により決定した. 使用に際し正確に希釈して用いた.

LBG 溶液: ドータイト BG (同仁化学研究所製) を 1 M 塩酸に溶解した後, 水で 100 倍に希釈して,  $1 \times 10^{-3}$  M 溶液とした. 0.22  $\mu$ m メンブランフィルターで濾過した後用いた.

鉄(II) 溶液: 硫酸鉄(II) アンモニウムを  $6.5 \times 10^{-1}$  M 塩酸ヒドロキシルアミン溶液に溶かして  $5 \times 10^{-2}$  M とした. 使用に際し, 同量の酢酸緩衝液 (pH 4.6, 1 M) と混合したものを正確に 5 倍に希釈して用いた.

グルコースオキシダーゼ溶液 (GOD 溶液): GOD {ナガセ生化学製 NK-106(5),  $100 \times 10^4$  単位/g, カタラーゼを含まない} 15 mg を pH 4.6 の  $1 \times 10^{-2}$  M 酢酸緩衝液に溶かして 100 ml とした.

### 2.2 装 置

FIA 装置の流路を Fig. 1 に示す. ポンプはサヌキ工業製ダブルプランジャー型マイクロポンプ (DM2M-1026 型) を用い, 送液は流量 0.8 ml/min で行った. 吸光度の測定は島津 UV-140-02 型分光光度計を使用し, 協和精密製の 18  $\mu$ l フローセル (光路長 10 mm)

\* 岡山大学理学部: 700 岡山県岡山市津島中 3-1-1

\*\* 岡山理科大学教養部: 700 岡山県岡山市理大町 1-1

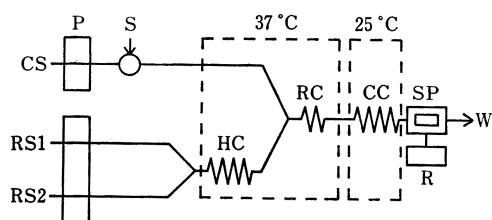


Fig. 1 Schematic diagram of flow system

CS: carrier solution (deionized water), RS1: LBG solution, RS2: Fe(II) solution, P: pump (flow rate 0.8 ml/min), S: sample injector (50  $\mu$ l), HC: preheating coil (0.5 mm i. d.  $\times$  1 m), RC: reaction coil (0.5 mm i. d.  $\times$  0.5 m), CC: cooling coil (0.5 mm i. d.  $\times$  1 m), SP: spectrophotometer ( $\lambda$  = 725 nm), R: recorder, W: waste

を用いた。

恒温槽は大洋科学工業製 Thermo Minder Dx-80 型を使用した。サンプルインジェクターはサヌキ工業製五方ループインジェクター SV1-5Y7 型を使用した。

全系のチューブは内径 0.5 mm, 外径 2.0 mm のポリテトラフルオロエチレンチューブを用いた。

## 2.3 操作

**2.3.1 過酸化水素の測定** 試料溶液を五方ループインジェクターバルブによりキャリア流れに注入し、あらかじめ LBG 溶液と Fe(II) 溶液を混合し、予熱した反応試薬の流れと合流させる。混合された試料は反応コイルを通過し、冷却コイルで冷却された後、検出部のフローセルに達し、そのときの吸光度を波長 725 nm で測定し記録する。

**2.3.2 グルコースの測定** 約 10 ppm の濃度の糖溶液 2 ml に GOD 溶液 2 ml を加え、37  $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、酵素を失活させることなく、生成した過酸化水素を 2.3.1 の操作に従って測定する。

## 3 結果及び考察

### 3.1 反応試薬の検討

過酸化水素の酸化力は Fe(II) が存在すると非常に強くなる。この際無色の LBG が存在すると、酸化されて緑色の BG<sup>+</sup> となる。この反応はラジカル的であり、又 Fe(II) は酸化を受けやすく、定量性に欠け、検量線は少し直線性から外れやすくなる。この際、Fe(II) 溶液に塩酸ヒドロキシルアミンを加えておくことと酸化が防止されるだけでなく、BG<sup>+</sup> の生成も定量的になり検量線も良好な直線性を示すことが分かった。しかしこれらの試薬をあらかじめ混合しておくこと、ヒドロキシルアミンの存在

にもかかわらず時間と共に着色が増し、LBG の酸化を完全に防止することはできなかった。従って、これらの試薬溶液は別々に調製し、流路で混合することにした。

LBG の濃度はピーク高さにあまり影響しないが、濃度が高いほどピークの半値幅は小さくなるが、バックグラウンドの吸光度は高くなり、ベースラインが不安定となる。このため  $1 \times 10^{-3}$  M (塩酸 0.01 M) として用いた。この溶液は時間と共に空気酸化を受け、青色を発してベースラインのドリフトの原因となるが、窒素を常時少しずつ吹き込むことにより、着色を完全に防ぐことができた。

硫酸鉄(II) アンモニウム濃度を、 $1 \times 10^{-3}$  M から  $6 \times 10^{-3}$  M までの範囲で調べたところ、 $3 \times 10^{-3}$  M 以上で最高で一定のピーク高さを得たので  $5 \times 10^{-3}$  M を用いることとした。

塩酸ヒドロキシルアミンは Fe(II) の酸化防止のために加えたが、濃度が低いと検量線が上向きの曲線となり、高濃度では下向きの曲線となった。 $6.5 \times 10^{-2}$  M の濃度でピーク高さは無添加の場合と比べて約 1/3 と低くなるが、直線性の良い検量線が得られた。pH が高いと長期間の保存で Fe(III) への酸化が認められたので、硫酸鉄(II) アンモニウムを  $6.5 \times 10^{-1}$  M 塩酸ヒドロキシルアミン溶液に溶かして  $5 \times 10^{-2}$  M として保存し、使用時に pH 4.6 の酢酸緩衝液を同量加えたものを正確に 5 倍希釈して用いた。

### 3.2 pH の影響

BG<sup>+</sup> は pH 4 以上で 725 nm に吸収極大を持ち緑色を発する。pH は低いほうがピーク高さは高いが、検量線の直線性が悪くなる。反応の pH と検量線の関係を Fig. 2 に示す。pH 4.6 で最も直線性の良い検量線が得られた。

### 3.3 予熱コイル、反応コイル、試料注入量及流量

反応速度を増すために、ミキシングジョイントで混合された反応試薬溶液は予熱コイルで加熱してから、キャリアの流れと合流し、反応コイル中で反応を進行させることとした。予熱コイルの長さについて調べた結果、1 m の長さで最高ピーク高さが得られた。又、反応コイルの長さは、0.5 m のとき最高ピーク高さを得た。Fig. 3 に示すように、反応温度は高いほどピーク高さはわずかに高くなるがバックグラウンドも高くなりベースラインは不安定となり、好ましくない。本実験では 37  $^{\circ}$ C の恒温槽にコイルを漬けて用いることとした。

試料注入量とピーク高さの関係について検討した結果

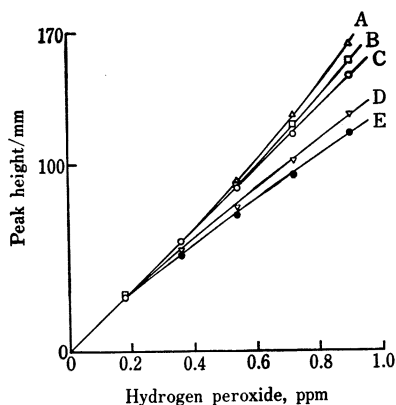


Fig. 2 Calibration curves for hydrogen peroxide obtained with various pHs  
pH of acetate buffer solution : A, 4.2; B, 4.4; C, 4.6; D, 4.8; E, 5.0

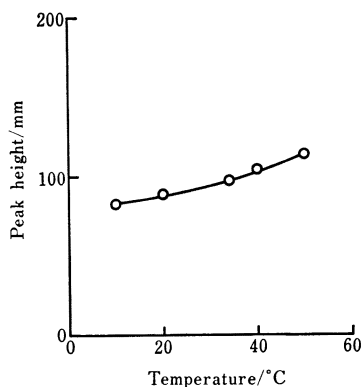


Fig. 3 Effect of reaction temperature on peak height  
Hydrogen peroxide : 0.55 ppm

を Fig. 4 に示す。注入量が増すと、ピーク高さも増すがピーク幅も増し、テイリングも大きくなった。迅速性を考慮して注入量は 50  $\mu$ l とした。又、冷却コイルはピーク高さに影響をあまり与えないが、ベースラインの安定性を増すために 1 m の長さのチューブを水浴に漬けて用いた。

流量を 0.4 から 1.0 ml/min の範囲で変えて検討したが、この範囲ではピーク高さにあまり影響を与えなかったため、迅速性を考えて 0.8 ml/min とした。

### 3.4 検量線

検量線用シグナルを Fig. 5 に示す。過酸化水素 0~

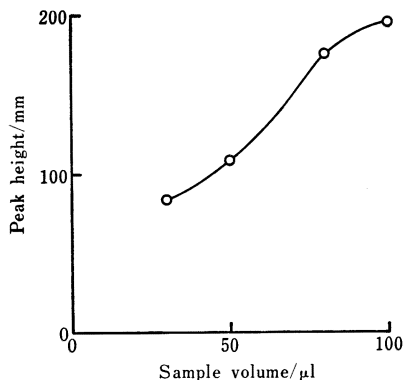


Fig. 4 Effect of sample volume on peak height  
Hydrogen peroxide : 0.61 ppm

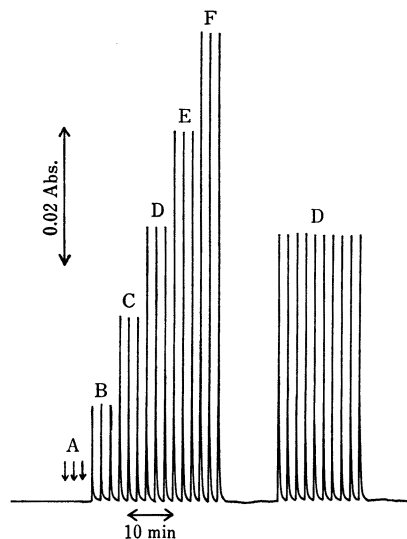


Fig. 5 Flow signals for standard solutions of hydrogen peroxide  
Hydrogen peroxide (ppm) : A, 0; B, 0.19; C, 0.39; D, 0.58; E, 0.77; F, 0.96

1 ppm の範囲で得られた検量線は良好な直線性を示した。又、0.58 ppm の過酸化水素を 10 回繰り返し注入したときの相対標準偏差は 0.4% であり、精度も良好である。又、検出限界は 5 ppb ( $S/N=2$ ) であった。

### 3.5 共存イオンの影響

実試料分析のために通常存在すると思われる共存物質の影響について調べた。結果を Table 1 に示す。ほとんどのイオンは過酸化水素の定量を妨害しないが、酸化

Table 1 Effect of foreign ions

Ion†	Added as	Peak height/mm
None		111.0
K <sup>+</sup>	KCl	111.4
Ca <sup>2+</sup>	CaCl <sub>2</sub>	111.4
Mg <sup>2+</sup>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	111.1
Fe <sup>3+</sup>	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	>200
Cl <sup>-</sup>	NaCl	111.2
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	KNO <sub>3</sub>	110.6
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	NaHCO <sub>3</sub>	110.6
SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	4.0
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	127.0

Hydrogen peroxide taken : 0.69 ppm; † 1×10<sup>-8</sup> M

力、還元力を有するイオンは微量存在しても妨害を示す。アスコルビン酸や塩素の共存は大きな負の妨害が見られた。鉄と強い錯体を形成する EDTA も妨害した。

#### 4 実試料への応用

実試料への応用例としてグルコースの定量を行った。10 ppm のグルコースに 300 単位の GOD を 37°C で一定時間作用させた後、直ちに本法で生成した過酸化水素を定量した。作用時間と共に過酸化水素の生成は増加するが、100 分の作用でも 80% の反応率であった。作用時間を 60 分とし、0~10 ppm のグルコース溶液で得られた検量線は良好な直線性を示した。市販の各種水あめ中のグルコース含量の測定を行った結果を Table 2 に示す。HPLC<sup>7)</sup>の結果と比較して、グルコース含量の高い試料と、フラクトース含量の高い試料は良く一致したが、マルトース以上のオリゴ糖の多い試料では FIA のほうが高い値となった。この原因は、GOD に残存する微量のグルコンダーゼの影響と考えられる。既知量のグルコースを添加した場合の回収実験はどの試料につい

Table 2 Determination of glucose in syrups

No.	HPLC, %					FIA, %	
	F	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	G <sub>3</sub>	≥G <sub>4</sub>	G <sub>1</sub>	Rec.
1	0.0	3.0	47.7	23.4	25.9	5.1	101.8
2	0.0	4.0	88.4	5.4	2.2	6.1	100.4
3	0.1	5.2	55.2	17.6	21.9	7.1	100.3
4	87.0	10.1	1.4	0.5	1.0	10.9	98.5
5	0.2	13.0	13.6	19.1	54.1	16.2	101.3
6	0.2	20.5	12.7	17.5	49.1	23.6	100.4
7	55.8	40.2	2.2	0.6	1.2	39.2	99.5
8	0.2	44.5	28.0	12.9	14.4	44.6	100.6
9	42.8	52.3	2.9	0.8	1.2	50.9	100.4
10	0.1	95.7	2.3	0.5	1.4	95.5	99.4

F, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub> and G<sub>4</sub> are abbreviations for fructose, glucose, maltose, maltotriose and maltotetraose, respectively.

ても良い値が得られた。

HPLC は分離分析を目的とし糖組成まで測定できるが、定量に関しては感度が低く、分析所要時間も数分から数十分を要する。一方、グルコースのみを測定する必要がある場合も多く、本法はそのような場合には高感度で迅速な方法として実用性が高い。

(1986年10月、日本分析化学会)  
第35年会において一部発表

#### 文 献

- 1) B. Olsson : *Mikrochim. Acta*, **2**, 211 (1985).
- 2) Y. Hayashi, K. Zaitzu, Y. Ohkura : *Anal. Sci.*, **1**, 65 (1985).
- 3) 斎藤 寛, 松尾久美子, 田井孝明, 御船正樹, 田中善正, 千熊正彦, 田中 久 : 日本分析化学会第35年会講演要旨集, p. 559 (1986).
- 4) C. Matsubara, K. Kudo, T. Kawashita, K. Takamura : *Anal. Chem.*, **57**, 1107 (1985).
- 5) T. Yamane : *Bunseki Kagaku*, **33**, E203 (1984).
- 6) 平山和雄, 沢谷次男 : 日化, **1976**, 1401.
- 7) 日本分析化学会関東支部編 : “高速液体クロマトグラフィーハンドブック”, p. 395 (1985), (丸善).

☆

**Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide by FIA with Bindschedler's Green leuco base as color reagent.** Masanori AKIBA, Shoji MOROMIZU\* and Kyoji TÔBE\*\* (\*Department of Chemistry, Faculty of Science, Okayama University, 3-1-1, Tsushima-naka, Okayama-shi, Okayama 700; \*\*Faculty of Liberal Arts and Science, Okayama University of Science, 1-1, Ridai-cho, Okayama-shi, Okayama 700)

A FIA method for the determination of hydrogen peroxide with a Bindschedler's Green leuco base (LBG) as color reagent and iron(II) as catalyst is described. LBG was oxidized by hydrogen peroxide to Bindschedler's Green (BG<sup>+</sup>) which showed a maximum absorbance at 725 nm. The increase in the absorbance at 725 nm was measured for the determination of hydrogen peroxide. The reagent solution (1) consisted of 10 mM hydrochloric acid containing 1 mM LBG, and the reagent solution (2) consisted of 0.1 M acetate buffer (pH 4.6) containing 50 mM ammonium iron(II) sulfate and 0.65 M hydroxylamine hydrochloride. Reagent solutions (1) and (2), and a carrier solution (deionized water) were propelled by two double plunger pumps (flow rate : 0.8 ml/min), and a sample solution (50 μl) was injected into the carrier stream. After mixing the reagent solution (1) and (2) in the preheating coil, the mixture stream was mixed with the carrier stream in the reaction coil (37°C). The linear relationship between the peak height and the concentration of hydrogen peroxide was obtained in the range of 0 to 1 ppm. The relative standard deviation of 0.58 ppm hydrogen peroxide was 0.4% (n=10). The detection limit was 5 ppb (S/N=2). The sampling rate was 30 samples per hour. The glucose in the range of 0 to

10 ppm was determined by the FIA method after the reaction with glucose oxidase.

(Received May 6, 1987)

***Keyword phrases***

spectrophotometry of hydrogen peroxide; Bindschedler's Green leuco base; FIA.

---