

過酸化水素のフローインジェクション分析の 環境水への応用

岩藤章正¹⁾, 棕野 貴¹⁾, 秋澤宏行²⁾, 御船正樹³⁾, 齋藤 寛³⁾

要 旨

先に開発した過酸化水素のフローインジェクション分析法 (FLA) のシステムや触媒カラムに詳細な検討を加え, ppb レベルの過酸化水素の定量法を開発した。また, 本研究で得られた FLA を用いて, 57~944ppb になるように過酸化水素を雨水に添加し, 回収実験を行った。その結果, 回収率と再現性とも良好で, 化学発光法より優れていた。なお, FLA での検出下限は, 約10ppb であった。

緒 言

環境に存在する水, とくに雨水には, オキシダント由来の過酸化水素が含まれている可能性がある。そこで, 本研究では, 雨水中に含まれる可能性のある低濃度の過酸化水素を簡便かつ高感度に定量分析するため, フローインジェクション分析法 (FLA) について検討を加えることにした。一方, 著者らは, 金属ポルフィリン (M-P) を担持したイオン交換樹脂 (M-P_r) が種々の酵素様機能を持ち^{4, 5)}, とくにそのペルオキシダーゼ様機能を利用すれば, 過酸化水素を吸光光度定量できることを既に明らかにした⁶⁾。さらに, 最近, M-P_r のペルオキシダーゼ様機能を利用し, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用ポンプを組み込んだ FLA システムを用いれば, 過酸化水素を簡便に FLA 分析できることを報告した⁷⁾。その際, 開発した FLA を用いれば, 過酸化水素

の微量定量の可能性を示唆したが, 実際に雨水などの環境水に予想される ppb レベルの過酸化水素の定量についての検討は行わなかった。そこで, 本研究では, FLA のシステムや触媒カラムにさらに詳細な検討を加えるとともに, FLA による ppb レベルの過酸化水素の定量を試み, 環境水中に予想される程度の過酸化水素の FLA による微量定量の可能性を検討することにした。

実 験

1) 試薬および金属ポルフィリン (M-P)

関東化学社製のポルフィリンをそのまま使用し, 常法にしたがって, 対応するマンガン-, コバルト-および鉄-ポルフィリン錯体 (M-P) へと変換した。Phenol や 4-aminoantipyrine などの色原体は, 関東化学(株), 和光純薬(株)およびナカライテスク(株)製の試薬特級を使用した。緩衝液用の試薬としては, 原則として JIS 特級や標準試薬を, その他の試薬や溶媒も原則として試薬特級または HPLC 用特殊試薬を使用した。

2) イオン交換樹脂

検討に用いたアニオン交換樹脂は, Dowex SBR-P, 1-X8, MSA-1 や MSA-2, および Amberlite IRA400, IRA900 や CG400 など計16種, また, カチオン交換樹脂としては, Dowex MSC-1 や MSC-50W および Amberlite IR120-B など計6種である。これらは,

いずれも、1 mol/l 硝酸と水酸化ナトリウムで交互に数回洗浄した後、酸または塩基が流出しなくなるまで、逆浸透イオン交換水で洗浄した。さらに、樹脂を完全に乾燥するため、アセトンで数回洗浄した後、風乾した。

3) 金属ポルフィリン担持イオン交換樹脂 (M-P) の調製

Mn³⁺-tetrakis(4-sulfophenyl)porphine 担持樹脂 (Mn-TSPPr) を調製する場合を例にあげると、Mn³⁺-tetrakis(4-sulfophenyl)porphine (Mn-TSP) 水溶液 (1.0 mol/l) に硝酸型の陰イオン交換樹脂 Dowex MSA-1 (100-200 mesh) を入れ、約 35℃ で、液が透明になるまで (2-3 時間) 振とうし、完全に Mn-TSP を MSA-1 に担持させた。次いで、担持樹脂をろ別し、アセトンで洗浄した後、風乾させた。このようにして得られた樹脂は、乾燥樹脂 1 g あたり 25 μmol の Mn-TSP が担持されている。同様に他の M-P もイオン交換樹脂に担持した。なお、カチオン性金属ポルフィリンを担持するには、MSC-1 などの陽イオン交換樹脂を用いた。

4) 触媒カラムとその調製

先に開発した方法⁷⁾では、2.6×50mm の液体クロマト用ステンレスカラムを使用した。本研究では、微量の過酸化水素を定量するために、4.0×10mm のステンレスカラムあるいは 1.0×100mm のステンレスまたはテフロンチューブをカラムの代わりに使用した。M-P_r をカラムに充てんするには、乾式法を用いた。なお、チューブをカラム代わりに用いた場合には、前後に脱脂綿を詰め、M-P_r が流出しないように工夫した。

5) FIA システムと定量操作

図 1 に FIA システムの概略を示す。カラムと試料注入部のサイズが異なる他は、基本的に

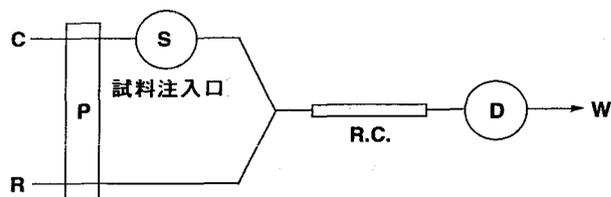


図 1 FIA システムの概略

前報⁷⁾と同じものを使用した。定量操作は、試料注入部 S (50 μl ループ)⁸⁾より、試料溶液 (1.0 ppm 未満) を注入し、触媒カラム (R.C.) で生成したキノイド型色素を紫外可視検出器 (D, 505nm) で吸光度を測定し、ピーク高法による検量線から過酸化水素量を求めるという簡便なものである。また、試薬溶液 R と精製水 C をポンプ P で、それぞれ流速 1.5 ml/min で流した。なお、試薬溶液は前報と類似の phenol 水溶液 (14 mg/ml)、4-aminoantipyrene 水溶液 (1.0 mg/ml) およびホウ酸塩緩衝液 (0.1 mol/l, pH 8.5) の 1:1:4 混液である。

また、比較に用いた化学発光法には、日音医理工学機械製作所製のフロー式ルミカウンターやデジタルフォトメーターなどを用いた。

結果および考察

1 担持樹脂および色原体などの選択

図 2 に本研究で検討した金属ポルフィリン (M-P) の構造を示した。いずれも、側鎖にカチオンあるいはアニオン基を持ち、水溶性でイオン交換樹脂とイオン結合のみならず π-π 電子相互作用などの物理的相互作用によって、イオン交換樹脂に強く担持され、容易には溶離しない^{4, 5)}。本研究では、これらの M-P および種々のイオン交換樹脂を組み合わせることで各種の担持樹脂を調製し、そのペルオキシダーゼ様活性を、phenol/4-aminoantipyrene 系による検量線の傾きから評価検討した。その結果、pH

表1 水素供与体の影響

水素供与体	相対吸光度 (%) *		
	30 mm カラム	60 mm カラム	100 mm カラム
phenol	100	100	100
<i>p</i> -chlorophenol	149	148	148
diethylaniline	-	-	49
<i>o</i> -chlorophenol	38	47	40
<i>p</i> -methoxyphenol	-	-	7

* Phenol を用いた場合を 100% とする。

場合の約1.5倍のピーク高が得られたが、その他の3種の供与体では、いずれの長さのチューブでも、phenolを用いた場合の半分未満のピーク高しか得られなかった。しかし、バッチ法で *p*-chlorophenol と phenol を用いた場合の反応速度を検討したところ、平衡に達するまでの時間は、phenolの方が短く、*p*-chlorophenolの場合の半分程度であった。そこで、本研究では、実際試料に適用する場合には、反応阻害質の存在も予想されるために、安全を見込み、反応が早く進行する phenol を用いる系を使用することにした。なお、以下に述べるように、phenol を用いる系であっても、感度は充分満足のいくものであった。

2) 検量線、再現性および繰り返し使用

定量操作に従って得られた Mn-TSPP_r ステノレスチューブ (1.0×100mm) による高濃度域の検量線とピークを図3に示す。図3からもわかるように、ピーク形状は良好で、検量線も良好な直線となった。また、検出下限をシグナルとノイズとの比 (S/N比) で2とすると、検出下限は、すくなくとも10ppbと満足できるものであった (図3参照)。さらに、再現性を過酸化水素標準液 (280ppb) を用いて検討した結果、10回繰り返しによる変動係数は0.50%と極めて良好であった。さらに、4.0×10mmの Mn-TSPP_r カラムを用いて、1日あたり50回、6日間、計300回繰り返し過酸化水素標準液 (0.9

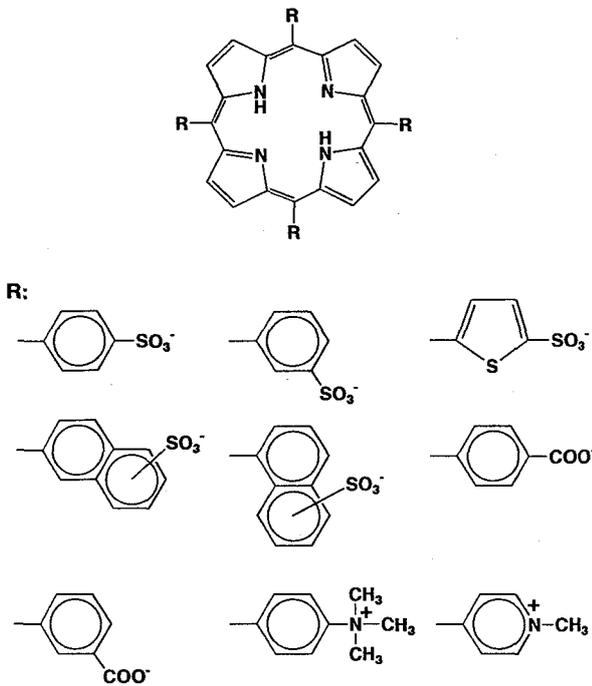


図2 ポルフィリンの構造

8.5付近の緩衝液を用いる限り、Mn-TSPP_r 以上に優れた活性を持つ樹脂は見いだせなかった。しかし、pHが10.5とアルカリ性が強い領域では、Co³⁺-tetrakis (1-methylpyridium-4-yl) porphine を担持した陽イオン交換樹脂 Dowex MSC-1 (Co-TMPyP_r) を用いた場合、検量線の傾きは、Mn-TSPP_r を用いた場合の1.85倍と優れていた。しかしながら、本研究では、Co-TMPyP_r を用いると緩衝液の影響を受けやすいこと、およびポンプを含むシステム全体の保守の容易さなどの面から、前報⁷⁾と同じくほぼ中性の緩衝液が使用できるうえ、緩衝液の影響を受け難い Mn-TSPP_r を用いることにした。

一方、色原体のうち水素供与体として最も一般的なものは phenol であるが、表1に示すような供与体もよく知られている。そこで、長さの異なる内径1.0mmの Mn-TSPP_r テフロンチューブを用いて水素供与体のピーク高に及ぼす影響を検討した。その結果、表1に示すように、*p*-chlorophenol を用いた場合、phenol を用いた

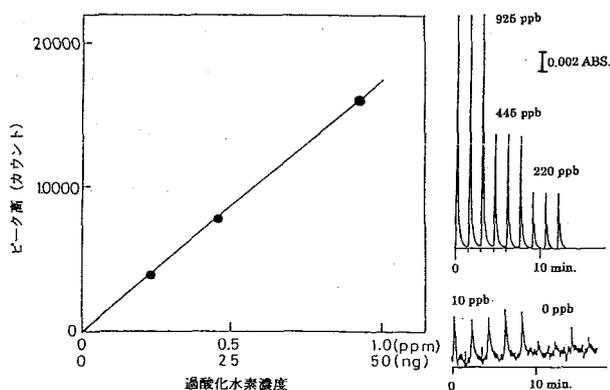


図3 検量線とフローシグナル

表2 繰り返し注入の影響

注入回数	1	50	100	150	300
相対ピーク高*	100	102	102	98	103

* 1回目の注入時に得られたピーク高を100とする。

ppm) をインジェクションし、ピーク高を検出した。その結果、表2に示すように300回注入してもピーク高の変動はわずかであり、Mn-TSPPr カラムは、繰り返し使用に充分耐え、実用的に満足できるものであった。

3) 過酸化水素の雨水への添加回収

雨水には、過酸化水素と反応する物質が含まれているため⁹⁾、実際に雨水を採取し、無処理で直接FIAを行うと、過酸化水素は全く検出されなかった。そこで、雨水採取後の過酸化水素の分解を抑制するために、雨水100mlに0.5%ピロリン酸ナトリウム水溶液18mlを採取時に添加することにした。なお、過酸化水素を雨水に230ppbになるように添加して過酸化水素量の経時変化を検討した結果、ピロリン酸ナトリウムを加えたものでは、添加後1時間程度は過酸化水素量に大きな変化はなかったが、ピロリン酸ナトリウムを加えない場合には、過酸化水素量は添加1時間後には10~48%まで減少した。しかし、いずれの場合でも添加24時間後には、

過酸化水素量は5%前後まで分解されてしまった。したがって、ピロリン酸ナトリウムを添加しても、雨水を試料とする限り、速やかに分析をする必要がある。

次いで、異なる時期に採取した雨水2試料にピロリン酸ナトリウムを加え、さらに過酸化水素を57-944ppbになるように添加し、添加後1時間以内にMn-TSPPrステンレスチューブ(1.0×100mm)を用いるFIAで回収実験を行った。その際、最も高感度であるとされている化学発光法(ルミノールとヘミン)⁹⁾でも過酸化水素の定量を行い、FIAの結果との比較検討を行った(表3)。その結果、表3からもわかるように、ここで用いたFIA法は、回収率および再現性とも化学発光法より優れていた。とくに、再現性の面では、57ppb程度の過酸化水素定量した場合には、化学発光法では変動係数8.54%であるのと比較して、FIAでは変動係数が1.20%と極めて良好であった。

以上述べたように、本研究で用いたFIAは、ppbレベルの過酸化水素を再現性よく定量できる方法である。したがって、本研究で得られたFIAは、今後種々の環境水中の過酸化水素の定量に利用できるものと期待できる。

表3 雨水(地表採取)中の過酸化水素の回収実験

試料	H ₂ O ₂ 添加量 (ppb)	FIA			化学発光法		
		測定値 (ppb)	回収率 (%)	変動係数 (%、n=5)	測定値 (ppb)	回収率 (%)	変動係数 (%、n=5)
雨水*	0	0	-	-	0	-	-
雨水 I	944	925	98	0.65	809	86	6.97
	472	481	102	0.26	370	78	1.12
	236	236	100	0.72	191	81	1.53
	118	120	102	0.72	98	83	8.55
	59	62	105	1.10	62	105	3.14
雨水 II	0	0	-	-	0	-	-
	915	915	100	0.24	897	98	-
	458	444	97	0.49	449	98	-
	229	215	94	0.12	218	95	5.45
	115	112	97	0.80	115	100	4.64
	57	54	95	1.20	55	96	8.54

*0.5%ピロリン酸ナトリウム18ml/100mlを雨水に添加

謝 辞

本研究を実施するにあたって、実験に協力を賜った関東化学(株)佐藤勝彦氏に感謝致します。

脚注および文献

- 1) 岡山大学自然科学研究科
- 2) 岡山大学薬学部
- 3) 岡山大学薬学部・岡山大学環境管理センター
- 4) Y.Saito *et al.*, *Reactive Polymer*, 4,243(1986)
- 5) M.Mifune *et al.*, *Talanta*, 38,779(1991)
- 6) Y.Saito *et al.*, *Anal. Sci.*, 3,171(1987)
- 7) M.Mifune *et al.*, *Anal. Sci.*, 14,519(1998)
- 8) 前報では, 20 μ lのループを用いた。
- 9) K.Yoshizumi *et al.*, *Atmospheric Environment*, 18,395(1984)

Flow Injection Analysis for Hydrogen Peroxide in Environmental Waters

Akimasa IWADO*, Takashi MUKUNO*, Hiromichi AKIZAWA**,
Masaki MIFUNE*** and Yutaka SAITO***

*The Graduate School of Natural Sciences and Technology, Okayama University

**Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University

***Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University and Okayama University
Administration Center for Environmental and Technology

Abstract

We tried to determine a low-level hydrogen peroxide by using a flow injection analysis (FIA) which was reported in our previous paper. For this purpose, the constituents of the system including the catalytic column were re-examined in detail. As the result, we developed a new system of the FIA which is available for the determination of ppb-order hydrogen peroxide. When hydrogen peroxide spiked in rain-waters(57-944ppb) was analyzed by the FIA, better recovery and reproducibility were attained compared to chemiluminescent analyses. The lower-limit of determination was 10 ppb hydrogen peroxide.