チタン(IV)-ポルフィリン錯体試薬を用いる過酸化水素の フローインジェクション分析

松原チヨ[®], 中道典宏, 河本直樹, 高村喜代子*

(1993年1月22日受理)

Ti-TPyP 試薬 [オキソ(5,10,15,20-テトラ-4-ピリジル-ポルフィリン)チタン(IV), $\text{TiO}(\text{tpypH}_4)^{4+}$ 錯体の酸性水溶液] は過酸化水素と反応し, ペルオキシ錯体 $\{\text{TiO}_2(\text{tpypH}_4)^{4+}\}$ を生成する. この錯体の吸光度 (450 nm) は, 過酸化水素濃度に比例し, モル吸光係数 (ϵ) は $1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ である. 従って, Ti-TPyP 試薬を用いて微量過酸化水素の定量ができる. 本報では, 過酸化水素に対する Ti-TPyP 試薬の高い選択性を生かし, 更に高い感度と迅速性を得るために, 本試薬を用いる微量過酸化水素の FIA を構築した. 検量線は, 10 nM~10 μM (1~1000 pmol/test) の範囲において良い直線性 ($r=0.999$) を示し, 検出限界は 5 nM (0.5 pmol/test) であった. 又, 1 時間に 30 検体の測定が可能であり, 1.00 μM 過酸化水素における相対標準偏差は 0.97% ($n=10$) であった. 本反応はペルオキシ錯体生成反応に基づいているので, 還元性物質による影響を受け難く, 又, 無機イオンの影響もほとんど見られなかった. 本法による雨水中の過酸化水素定量を試みたところ, 含量は 0.7~43 μM の範囲にあり, 1.00 μM 過酸化水素の添加回収率は 99.1~101.9% であった.

1 緒 言

高い感度, 精度及び迅速性をもつ極微量過酸化水素の定量法は, 環境分析¹⁾や酵素反応を組み合わせた臨床分析²⁾など種々の分野において必要性が高い. 近年, ペルオキシダーゼ (POD) を用いた吸光光度法³⁾が広く実用化されているが, この方法は, POD の基質特異性が乏しいため, ビリルビンなど還元性物質の影響を受けて負誤差を生じやすく⁴⁾, 又, 感度も極微量過酸化水素の定量のためには十分でない. 又, 蛍光光度法⁵⁾及び化学発光法⁶⁾なども報告されているが, これらも微量金属イオンなどの共存物質の妨害を受けやすいこと, 高価な装置や煩雑な操作が要求される場合が多いなど, 簡易に日常的な測定を行うには十分な方法と言えない.

著者らは, 酸化還元物質の影響を受け難い発色試薬として, ペルオキシチタン(IV) 錯体を生成する Ti-Y 錯体 (Y は吸光係数の大きい有機試薬) に注目した. これまでに Y としてピリジルアゾ化合物を取り上げて Ti-PAR 及び Ti-PAPS 試薬を開発し, これによる高感度な過酸化水素の定量法を確立した^{7,8)}. しかし最近, 環境分析や臨床分析分野などにおいて, 更に高感度な過酸化水素検出法が求められるようになった. そこで著者

らは, Y としてモル吸光係数の大きいポルフィリン化合物の一つである, 5,10,15,20-テトラ(4-ピリジル)ポルフィリン (以下 tpypH_4^{2+}) を取り上げた. tpypH_4^{2+} のチタン(IV) 錯体は, 過酸化水素と反応して, 吸光係数の大きいペルオキシ錯体 $\{\text{TiO}_2(\text{tpypH}_4)^{4+}\}$ を生成することが報告されている⁹⁾. 著者らは, このチタン(IV) 錯体 $\{\text{TiO}(\text{tpypH}_4)^{4+}\}$ の酸性水溶液 (Ti-TPyP 試薬) を発色試薬とする過酸化水素の高感度定量法を確立し, バッチ法で過酸化水素 25 pmol/test まで測定を可能にした¹⁰⁾. 本報では更に高い感度と精度及び迅速性を得るために, この Ti-TPyP 試薬を用いる FIA を構築した. 又実際試料として, 酸性雨の原因物質の一つであり簡易迅速な定量が求められている雨水中の過酸化水素定量に応用を試みた.

2 実 験

2・1 試 薬

Ti-TPyP 試薬 (30 μM): オキソ(5,10,15,20-テトラ-4-ピリジル-ポルフィリン)チタン(IV) (東京化成工業製) 10 mg を 5 M 塩酸 2 ml に溶解し, 1.6 M 過塩素酸を加えて全量 500 ml とした.

過酸化水素標準溶液 (1.00 M): 30% 過酸化水素 (特級, 三菱瓦斯化学製) 11 ml を蒸留水で希釈し, 全量 100 ml とし, 過マンガン酸カリウム滴定法により標定

* 東京薬科大学薬学部: 192-03 東京都八王子市堀之内 1432-1

Fig. 1 Schematic diagram of the FIA system for the determination of hydrogen peroxide

R₁: carrier solution (water); R₂: Ti-TPyP reagent (30 μ M in 1.6 M perchloric acid); S: 6-ways sampling valve (100 μ l); T: thermostat bath (75°C); MC: mixing coil (0.5 mm i.d., 15 m long); D: spectrophotometer (450 nm)

した。

2.2 装置

FIA システムを Fig. 1 に示す。検出器には日本分光 870-UV 型分光光度計 (光路長 10 mm) を使用した。ポンプは FIA 用ダブルプランジャーポンプ DMX-2300T (サスキ工業製)、サンプルインジェクターにはレオダイン 8125、流路には内径 0.5 mm のテフロンチューブを使用した。

2.3 定量操作

試料液 100 μ l をキャリアー溶液 (蒸留水) 中に注入する。過酸化水素はミキシングコイル (15 m, 75°C) 中で、Ti-TPyP 試薬と反応し、生成した $\text{TiO}_2(\text{tpypH}_4)^{4+}$ 錯体の吸光度 (450 nm) はピーク高さとして検出される。

3 結果及び考察

3.1 定量条件の検討

3.1.1 発色反応 過酸化水素は酸性条件下、Ti-TPyP 試薬と次式のように反応しペルオキソ錯体を生成する¹⁰⁾。

$\text{TiO}(\text{tpypH}_4)^{4+}$ 錯体、すなわち Ti-TPyP 試薬は 432 nm に極大吸収をもつが、過酸化水素と反応して生成した $\text{TiO}_2(\text{tpypH}_4)^{4+}$ 錯体は 450 nm に極大吸収ピークを示し、その吸光度は加えた過酸化水素量に比例する。 $\text{TiO}_2(\text{tpypH}_4)^{4+}$ 錯体の見掛けのモル吸光係数は $1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ である。一方、 $\text{TiO}_2(\text{tpypH}_4)^{4+}$ 錯

体生成に伴う $\text{TiO}(\text{tpypH}_4)^{4+}$ 錯体の吸光度 (λ_{max} : 432 nm) の減少を測定することによっても、過酸化水素の高感度定量が可能である¹⁰⁾。しかしこの場合、ベースラインの吸光度を高く設定するので、測定濃度領域を広くするためには、FIA の検出器の測定領域を超えてしまう。そこで、本法では感度はやや劣るが、過酸化水素の定量範囲がより広い 450 nm における吸光度を測定することとし、以下のように FIA の至適条件の設定を行った。

3.1.2 Ti-TPyP 試薬濃度の検討 $\text{TiO}(\text{tpypH}_4)^{4+}$ 錯体の濃度を高くするにつれて過酸化水素との反応速度は増大するので、ピーク高さは大きくなった。しかし一方、ベースラインの乱れも大きくなるので、低濃度の過酸化水素定量が困難となった。そこで、本法では、S/N 比を考慮して試薬濃度を 30 μ M とした。

3.1.3 過塩素酸による反応促進の検討 本錯生成反応は酸の存在により促進されるので、種々の酸についてその影響を検討した結果、過塩素酸が最も反応を促進することが分かった¹⁰⁾。そこで FIA においても過塩素酸を用いることとし、その濃度がピーク高さに及ぼす影響について検討を行った (Fig. 2)。1.6 M 以上においてピーク高さは最大かつ一定となったので、Ti-TPyP 試薬中の過塩素酸の濃度は 1.6 M とした。

3.1.4 反応温度の検討 本反応は加温により促進される。温度がピーク高さに及ぼす影響を検討し、その結果を Fig. 3 に示す。温度の上昇と共に反応速度が大

Fig. 2 Effect of perchloric acid on the peak height of hydrogen peroxide

Concentration of hydrogen peroxide: $1.00 \times 10^{-6} \text{ M}$

Fig. 3 Effect of the temperature on the peak height of hydrogen peroxide
Concentration of hydrogen peroxide: 1.00×10^{-6} M

Fig. 4 Effect of the mixing coil length on the peak height of hydrogen peroxide
Concentration of hydrogen peroxide: 1.00×10^{-6} M

きくなり、ピーク高さの増加が見られたが、実用性を考慮して温度は 75°C とした。

3・1・5 流量の検討 流量を小さくすると共にピーク高さの上昇が見られたが、ピーク幅も増加し、単位時間当たりの測定数が減少してしまう。そこで迅速性を考慮して、流量は 1 時間に 30 検体測定できる 0.4 ml/min とした。

3・1・6 ミキシングコイルの長さの検討 ミキシン

Fig. 5 FIA signals of standard solution of hydrogen peroxide
Amount of hydrogen peroxide in sample (pmol): a, 20; b, 40; c, 60; d, 80; e, 100

グコイルの長さを検討した結果を Fig. 4 に示す。15 m 以上の長さにおいてピーク高さは最大かつ一定となった。よって、コイルの長さは 15 m とした。

以上の検討結果に基づいて Fig. 1 に示した FIA を構築した。

3・2 検量線及び精度

本法によって得た検量線は、標準溶液中の過酸化水素濃度 $10 \text{ nM} \sim 10 \text{ } \mu\text{M}$ ($1 \sim 1000 \text{ pmol/test}$) の範囲において良い直線性 ($r=0.999$) を示し、検出限界は 5 nM (0.5 pmol/test , $S/N=2$) であった。本法によって得られた FIA シグナルの一例を Fig. 5 に示す。又、 $1.00 \text{ } \mu\text{M}$ の過酸化水素における繰り返し実験の相対標準偏差は 0.97% ($n=10$) であった。

3・3 共存物質の影響

実際試料として雨水中過酸化水素定量に应用するに先立って、予想される共存物質が過酸化水素の FIA シグナルに及ぼす影響を検討した。その結果を Table 1 に示す。 $1.00 \text{ } \mu\text{M}$ 過酸化水素の測定値に対して、 Na^+ , K^+ , Ba^{2+} , NH_4^+ などの陽イオンや、 SO_4^{2-} , NO_3^- , Cl^- などの陰イオンは 5000 倍濃度、 Ni^{2+} , Co^{2+} , 及び Cu^{2+} は 1000 倍濃度で共存しても影響を与えなかった。 Fe^{3+} については 100 倍濃度以上の共存では負誤差を生じた。しかし、雨水中の Fe^{3+} は $9 \times 10^{-8} \text{ M}$ 程度

Table 1 Effects of inorganic foreign substances on the determination of hydrogen peroxide by Ti-TPyP reagent

Substance	Conc/M	Hydrogen peroxide found, % [†]
NaCl	5×10^{-3}	101.4
KCl	1×10^{-2}	100.5
BaCl ₂	5×10^{-3}	100.8
NH ₄ Cl	2×10^{-2}	101.6
NiCl ₂	1×10^{-3}	100.8
CuCl ₂	1×10^{-3}	99.4
MnCl ₂	1×10^{-2}	102.4
CoCl ₂	1×10^{-3}	99.2
FeCl ₃	1×10^{-4}	97.6
CaCl ₂	5×10^{-3}	100.6
MgCl ₂	1×10^{-2}	102.0
NaBr	1×10^{-2}	102.6
Na ₂ SO ₄	1×10^{-2}	100.8
NaNO ₃	2×10^{-2}	101.2
NaN ₃	5×10^{-3}	100.2
NaH ₂ PO ₄	5×10^{-3}	100.2
H ₃ BO ₃	5×10^{-3}	101.5

[†] Concentration of hydrogen peroxide: 1.00×10^{-6} M

であると報告されており¹¹⁾, 本法を雨水中過酸化水素定量に応用した場合には, 鉄イオンの影響は無視できると考えられる。

3・4 雨水への応用

本法を用いて, 酸性雨の原因の一つとして簡易迅速な定量が望まれている雨水中の過酸化水素の定量を試みた。東京都八王子市で採集した雨水について, 定量を行った結果を Table 2 に示す。それぞれの試料について $1.00 \mu\text{M}$ の過酸化水素を添加したところ回収率は 99.1~101.9% と良好であり, 本法の信頼性の高いことが確認された。

以上, Ti-TPyP 試薬を用いる過酸化水素の FIA は, 0.5 pmol/test まで高感度な測定が可能である。現在は用いられているペルオキシダーゼ法を FIA に応用した場合, 検出限界 78 pmol/test と報告されており³⁾, 本法ではその約 160 倍の感度が得られている。本法は酸化還元反応によらないので還元性物質の影響を受け難い。又発色体 $\text{TiO}_2(\text{tpyph}_4)^{4+}$ の錯生成定数は $4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ であり, その安定性が比較的大きいので⁹⁾, 共存物質の影響を受け難く, 煩雑な前処理なしに試料を注入するだ

Table 2 Hydrogen peroxide concentration in rainwater collected in Hachioji

Date	[H ₂ O ₂] found/ μM	Recovery, % [†]
30, Apr., 1992	0.7	101.9
15, Jun.	2.1	99.4
18, Jun.	43.0	101.9
30, Jun.	9.0	101.5
2, Jul.	12.0	99.1
18, Jul.	3.7	101.7
1, Aug.	2.4	99.2
1, Aug.	6.5	101.6

[†] Hydrogen peroxide added: 1.00×10^{-6} M

けで 1 時間に 30 検体の測定が可能である。又, 環境分析に用いられているヒドロキシフェニル酢酸による蛍光法⁵⁾は 18 pmol の過酸化水素まで検出される。この方法に比べて, 本法は共存物質の影響を受け難く, 前処理を一切必要とせず, 装置も簡易であり, 試料を注入するだけで 0.5 pmol まで信頼性の高い結果が得られる。

高感度と高精度をもつ Ti-TPyP 試薬を FIA に適用することによって, 微量過酸化水素の迅速な測定を可能にした。環境分析や酵素反応を組み合わせた臨床分析などにおいて本法は有用性が高いと考えられる。

(1992 年 9 月, 日本分析化学会)
第 41 年会において一部発表)

文 献

- 1) 松原チヨ, 酒井和明, 高村喜代子: 日化, **1991**, 430.
- 2) 松原チヨ, 河本直樹, 高村喜代子: 分析化学, **41**, 215 (1992).
- 3) B. C. Madsen, M. S. Kromis: *Anal. Chem.*, **56**, 2849 (1984).
- 4) 松本宏治郎, 溝口香代子, 菅野剛史: 臨床化学, **8**, 63 (1979).
- 5) A. L. Lazrus, G. L. Kok, S. N. Gitlin, J. A. Lind: *Anal. Chem.*, **57**, 917 (1985).
- 6) S. A. Eremin, S. B. Vlasenko, A. P. Osipov, A. M. Egerov: *Anal. Lett.*, **22**, 2037 (1989).
- 7) C. Matsubara, K. Kudo, T. Kawashita, K. Takamura: *Anal. Chem.*, **57**, 1107 (1985).
- 8) 松原チヨ, 高村喜代子: 分析化学, **29**, 759 (1980).
- 9) M. Inamo, S. Funahashi, M. Tanaka: *Inorg. Chem.*, **22**, 3734 (1983).
- 10) C. Matsubara, N. Kawamoto, K. Takamura: *Analyst (London)*, **117**, 1781 (1992).
- 11) 原 宏: ぶんせき: **1992**, 612.

Flow-injection analysis for hydrogen peroxide using a titanium(IV)-porphyrin complex. Chiyo MATSUBARA, Norihiro NAKAMICHI, Naoki KAWAMOTO and Kiyoko TAKAMURA (Tokyo College of Pharmacy, 1432-1, Horinouchi, Hachioji-shi, Tokyo 192-03)

A sensitive flow-injection analysis using the Ti-TPyP reagent was developed for the determination of trace amounts of hydrogen peroxide. The reagent, which is an acid solution containing oxo[5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)porphyrinato]titanium(IV) $\{\text{TiO}(\text{tpypH}_4)^{4+}\}$, reacts with hydrogen peroxide to form a monoperoxo complex $\{\text{TiO}_2(\text{tpypH}_4)^{4+}\}$, which exhibits an absorption maximum at 450 nm. A flow-injection manifold comprises two channels system. The molar absorptivity (ϵ) of the complex was found to be $1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. The absorbance was measured as the peak height in the FIA system. The linear response was obtained over the range of $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ hydrogen peroxide and the detection limit was $5 \times 10^{-9} \text{ M}$ for a 100 μl sample injection. The method was used to analyze 30 samples per hour, the results were accurate with a relative standard deviation of 0.97% for the injection of $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ hydrogen peroxide ($n=10$). The concentration of hydrogen peroxide in rainwater samples collected in Tokyo area (Hachioji) was determined by this method over the range of $7 \times 10^{-7} \sim 4.3 \times 10^{-5} \text{ M}$.

(Received January 22, 1993)

Keyword phrases

Ti-TPyP reagent; oxo[5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)porphyrinato]titanium(IV); peroxo[5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)porphyrinato]titanium(IV); trace hydrogen peroxide; FIA for the determination of hydrogen peroxide.