メモリー付ポーラログラフイーを用いた定量法

アメリカでメモリー付ポーラログラフイーにめぐり合った筆者は、懸案であったタバコのタール中に生成する過酸化水素 (H_2O_2) の検出、定量に成功した。そこで、本稿ではその操作の簡便さやデータ取扱の容易さを紹介し、あわせて食品など多成分系での応用についても述べたい。

使用したポーラログラフイーは EG & G Princeton Applied Research 社の 384 B 型で、滴下水銀電極以外の電気化学計測も可能である。この器械の最大の特徴は、測定したポーラログラムが自動的に内蔵コンピューターのメモリーに記憶されることにある。それは参照溶液を測定する際に B (ブランク) のボタンを、また目的とするサンプル溶液を測定する際に S (サンプル) のボタンを押すという操作に端的に現われている。これは分光光度計を使用するとき、最初にブランク溶液の吸光度または吸光度曲線を測定しておくこととよく似ている。この B, S ボタン開発の目的は、分析しようとする物質の濃度が薄いとき、支持電解質に起因する末端上昇 (たとえば 0.1 N の KCl 溶液を使用したとき、 -1.8 V 以下で電流値が急激に上昇すること) などのバックグラウンドを差し引くためであったと思われる。この特徴を積極的に利用すれば、ある処理をした溶液の処理前後のポーラログラムの差スペクトルを得ることにより、濃度変化した成分だけに由来するピークを得ることができる。つまり、ポーラログラムへの他成分の寄与を一切消去できることになり、多成分系での分析が容易になる。

以下に、具体的な研究例をもとに詳しく説明したい⁽¹⁾。タバコのタール溶液は自動酸化の過程で H_2O_2 を生成するが、酸化還元反応を利用した発色法はタール中に存在する多量の還元物質の妨害で再現性がなく、酸素電極法も簡便性という点で問題があった。また、従来のポ

ーラログラフイーを用いた測定も試みられていたが、タール中には電気化学的に活性な物質が多量に存在するため、 H_2O_2 の選択的な定量は不可能であった。

そこで実際の操作であるが、一定時間放置したタール溶液を 2 つに分け (B と S)、片方をカタラーゼ処理した (B)。そのあと短い逆相カラムにそれぞれの溶液を通し、着色物質を除いた。この操作で S 液中の H_2O_2 濃度はまったく変化せず、また B 液においてはカタラーゼ

4 時間静置したタバコタール溶液のポーラログラム
a : 非処理, b : カタラーゼ処理, c : 差スペクトル (a-b).
文献 (1) より改変。

も除去できた。カラム処理後のB、S両液のポーラログラムを図-a, bに示す。複数の物質に由来する複雑なピークが観測されている。ここでは、differential pulse modeで測定しているため、normal modeでの半波電位がピークとして表現されている点に注意していただきたい。さて、Bのポーラログラフィーを前もって測定し、ブランクとしてメモリーに記憶させた後、次にSのポーラログラフィーをサンプルとして測定すると、得られた差スペクトルは単一ピークであった(図-c)。これはパーオキシドに特徴的な非対称形を示し、 H_2O_2 標品のポーラログラムと完全に一致した。この結果は当然であるが、カタラーゼ処理の後に両サンプルの差をとっていることと、ピークの半波電位の一致(たとえば CH_3OOH の半波電位は H_2O_2 のそれより 0.2 V 以上高い)から、タール中に H_2O_2 が生成していることを二重に証明したことになる。また、ピークの高さ、つまり半波電位における電流値は H_2O_2 濃度に厳密に比例するので、定量分析も可能になった。

以上の例を参考にして、この方法を多成分系に適用するのに必要な条件と注意点を以下に述べる。

① 目的とする化学種が電気化学的に活性な必要がある。ただし半波電位がサンプルによって微妙に変動するため、 H_2O_2 のように幅の広いピークを与える物質のほうか、きれいな差スペクトルを得るためには、かえって有利である。また同じ理由から、バックグラウンド中のシャープな不要ピークを差スペクトル中で消すには、scan rate をできる限り大きくしたほうがよい。この操作により差スペクトルのベースラインが安定すると同時に分析時間も短縮される。今回の測定例では 10 mV/drop/sec であった。

② 目的物質だけが特異的かつ完全に反応する方法を見いだす必要がある。通常の化学反応や、例で述べた酵素による分解の他にアフィニティクロマトグラフィーによる目的物質の選択的除去なども考えられる。このような処理の有無によって得られた2つの溶液のポーラログラフィーを測定すれば、その差スペクトルに基づいて選択性と感度の高い分析ができる。

③ サンプルを直接測定するのは、電極の維持やバックグラウンドによるポーラログラムの妨害からみて得策

でない。そこで目的物質の濃度が変化しない方法で、ブランクとサンプル溶液の簡単な前処理をすることが望ましい。しかしバックグラウンドに寄与する成分の濃度を不規則に変化させる溶媒抽出などは、差スペクトルのベースラインに乱れを起こす原因となるので避けるべきである。

以上のような理由から、この方法は液状食品や Maillard 反応溶液などの多成分系に含まれる H_2O_2 などの分析に有効であると考えられるが、さらに前処理法の工夫や器械のソフト、ハード両面の開発により、他の微量成分への適用も可能になると思われる。電気化学に素人の筆者が、一段と解釈が容易になったポーラログラムをもとに、測定困難であった成分の分析を行なったことを強調して筆をおきたい。

1) T. Nakayama, D. F. Church & W. A. Pryor: *Free Radical Biology & Medicine*, 7, 9 (1989).

(中山 勉, 名古屋大学農学部)

お知らせ

理化学研究所研究員

理化学研究所昆虫生態制御研究室では研究員1名を公募します。当研究室では昆虫の生理・生態制御機構の研究から得られる生体情報に基づき、標的有害生物に選択的に作用する化学物質の探索や、昆虫と植物あるいは微生物との相互作用に関わる化学物質の作用発現とその調節機構などを研究対象にしています。したがって、昆虫生理・生化学、分子生物学に興味を持つ若い研究者を希望しています。

資 格：平成2年3月31日現在32歳未満

応募方法：平成2年3月15日までに、①履歴書、②研究業績リストを下記あて郵送してください。

送 り 先：〒351-01 和光市広沢 2-1

理化学研究所 昆虫生態制御研究室 満井 喬