

—Article—

EDTA 共存下, チタン (IV) –サリチルフルオロン–ヘキサデシルピリジニウム 三元錯体の退色に基づく過酸化水素の吸光光度定量¹⁾

山口 敬子, 中原 良介, 大久保 佳代, 山本 奈苗, 藤田 芳一*

Spectrophotometric Determination of Hydrogen Peroxide Based on Fading of Titanium(IV)–Salicylfluorone–Hexadecylpyridinium Ternary Complex in the Presence of EDTA

Takako YAMAGUCHI, Ryosuke NAKAHARA, Kayo OHKUBO,

Nanaye YAMAMOTO, Yoshikazu FUJITA

*Department of Clinical Chemistry, Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1, Nasahara, Takatsuki,**Osaka 569-1094, Japan*

(Received November 5, 2007; Accepted November 30, 2007)

A new, simple, and sensitive spectrophotometric method for the determination of hydrogen peroxide (H_2O_2) was established. This method is based upon the fact that a color reaction between salicylfluorone and titanium(IV) in the presence of EDTA and hexadecylpyridinium is in competition with the formation of a H_2O_2 –Ti(IV)–EDTA ternary complex when H_2O_2 is added. Beer's law was obeyed in the concentration range of 0.02 – 0.4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for H_2O_2 , with an effective molar absorptivity at 600 nm and the relative standard deviation being $1.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ and 1.2 % ($n=5$), respectively.

Key words—hydrogen peroxide; titanium(IV)–salicylfluorone–hexadecylpyridinium ternary complex; spectrophotometry; ethylenediaminetetraacetic acid

緒言

過酸化水素 (H_2O_2) は, 緩やかな酸化剤として古くから化学工業分野で使われているほか, 漂白・殺菌剤として医薬品²⁾や食品添加物³⁾としても広く用いられているが, H_2O_2 の添加物の使用基準においては, 最終製品の完成前に分解又は除去することとなっている。また, 大気, 雨水中の H_2O_2 が酸性雨を生じる過程に関与するといわれている。^{4,5)} 一方, 臨床検査現場においては, 尿酸, コレステロール, ブドウ糖などの生体成分を測定する場合, 相当するオキシダーゼを作用させて発生させた H_2O_2

を測定することにより, 間接的にそれらの成分を定量する方法 (酵素法) が汎用されている。⁶⁾ 更に近年, 悪性腫瘍, メタボリックシンドローム, 加齢など多くの病態と深い関連性がある活性酸素種の一つとして, その生体内における H_2O_2 の動態, 分布, 挙動等について大変興味を持たれている。⁷⁾

このように, 簡便, 高感度で選択的な H_2O_2 測定法はあらゆる分野において非常に重要であり, 更に優れた新しい測定法の開発が要望されている。従来から H_2O_2 の測定には, 吸光光度法,^{8–17)} 蛍光光度法,^{18–21)} 電気分析法,²²⁾ 化学発光法²³⁾ などが用いられているが, 吸光光度法においては, 金属イオ

* 大阪薬科大学, e-mail: fujitay@gly.oups.ac.jp

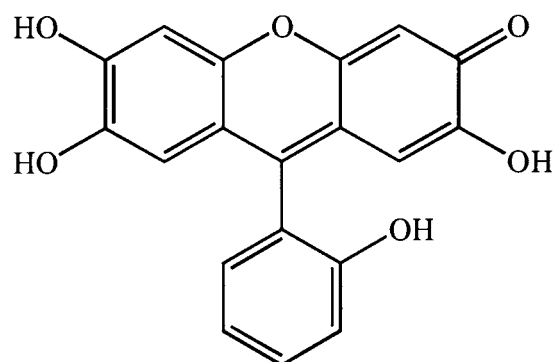


Fig. 1 Structure of SAF.

ンと有機試薬を併用する H_2O_2 -金属-有機試薬のような混合配位子型三元錯体の生成反応を利用した高感度な測定法が報告されている。^{8-11, 13, 17)} 今回、著者らは、ポリアミノポリカルボン酸の EDTA 及び陽イオン性界面活性剤共存下、サリチルフルオロン (SAF) (Fig. 1) とチタン (IV) {Ti(IV)} との呈色反応が H_2O_2 -Ti(IV)-EDTA 三元錯体の生成により、著しく妨害されるという新しい反応系を見出したので、本反応系を用いる簡便で高感度な H_2O_2 の吸光光度法の開発を目的として検討した。

実 験

1. 試薬

H_2O_2 溶液: キシダ化学製 30% H_2O_2 溶液の 2.8 ml を水 50 ml に溶解させた溶液をヨウ素滴定法により濃度を補正した後、精製水で正確に 1.0×10^{-4} M に希釈し、冷暗所に保存した。

Ti (IV) 溶液: 和光純薬製の原子吸光分析用チタン標準液 (1000 ppm) を適宜 0.1 M 塩酸溶液で希釈し、 2.0×10^{-4} M 溶液とした。

SAF 溶液: 文献記載の方法²⁴⁻²⁶⁾ で合成した SAF を少量の塩酸を含むメタノールに溶解し、 1.0×10^{-3} M 溶液として調製し、褐色瓶に保存して用いた。

塩化ヘキサデシルピリジニウム (HPC) 溶液:

東京化成製の HPC を水に溶解し、1.0% 溶液とした。

EDTA 溶液: 同人化学研究所製エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムを水に溶解し、 1.0×10^{-2} M 溶液とした。

緩衝液: 0.2 M 塩酸溶液及び 0.2 M 酢酸ナトリウム溶液を pH メーターで測定しながら適宜混合し、pH 3.5 の緩衝液として用いた。

その他の試薬は市販特級品を精製せずそのまま用いた。また、本実験ではミリポア製 Academic A 10 型 Milli Q による精製水を使用した。

2. 装置

吸収スペクトル及び吸光度の測定: 島津 UV-1700 型分光光度計を用い、セルは層長 10 mm の石英製セルを使用した。

pH の測定: 堀場 F-11 型ガラス複合電極 pH メーターを用いた。

3. 標準操作

10 ml のメスフラスコに、最終濃度 $0.02 - 0.4 \mu\text{g ml}^{-1}$ の H_2O_2 を含む液を加え、次いで 1.0% HPC 溶液 1.0 ml, 1.0×10^{-2} M EDTA 溶液 1.0 ml, 2.0×10^{-4} M Ti (IV) 溶液 1.0 ml, 1.0×10^{-3} M SAF 溶液 0.8 ml を加え、水で全量 10 ml

とする。本溶液をよく攪拌しながら試験管に移し、室温で20分間静置後、 H_2O_2 のみを除いて同様に処理して得た試薬空試験液とともに水を対照に600 nmでの両溶液の吸光度差 (ΔA) を測定し、予め作成して得た検量線より H_2O_2 量を求める。

実験結果

1. ポリアミノポリカルボン酸の選定

従来から H_2O_2 の定量法として、 H_2O_2 -Ti (IV)-有機試薬の三元錯体を利用した H_2O_2 測定法が種々報告されているので、これらを参考にして、有機試薬としてキサンテン系色素の利用を試みたが、期待される H_2O_2 -Ti (IV)-キサンテン系色素の三元錯体は生成せず、Ti (IV)-キサンテン系色素の呈色体のみが生成した。一方、本呈色反応系に EDTA のようなポリアミノポリカルボン酸を共存させると、Ti (IV)-キサンテン系色素の呈色

反応が H_2O_2 濃度に比例して著しく妨害されることを認めた。従って今回は、キサンテン系色素のなかで、合成が比較的容易で、高感度化が期待できる SAF を用いて、併用するポリアミノポリカルボン酸の選定を行った。ポリアミノポリカルボン酸としては EDTA、グリコールエーテルジアミン四酢酸 (GEDTA)、ジヒドロキシエチルグリシン (DHEG)、1,2-シクロヘキサンジアミン四酢酸 (CyDTA)、ヒドロキシエチレンジアミン三酢酸 (EDTA-OH)、エチレンジアミンジプロピオン酸 (EDDP) を用いたところ、Table 1 にみられるように、ポリアミノポリカルボン酸としては Ti (IV) との錯体生成定数の高い EDTA の併用により ΔA が最大となり、最適であることを認めた。

2. 定量条件の設定

本反応における液性の影響を検討した。0.2 M 塩酸 / 0.2 M 酢酸ナトリウム溶液、0.1 M 塩酸 /

Table 1 Effect of polyaminopolycarbonic acids on assay of H_2O_2

Polyaminopolycarbonic acid	ΔA at 600 nm
EDTA	0.430
GEDTA	0.293
DHEG	0.274
CyDTA	0.171
EDTA-OH	0.153
EDDP	0.052

H_2O_2 : $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$; [Ti (IV)] = 2.0×10^{-5} M; [polyaminopolycarbonic acid] = 1.0×10^{-3} M; HPC, 0.1 %; [SAF] = 8.0×10^{-5} M; pH, 3.5.

0.1 M グリシン溶液, 0.1 M 酒石酸溶液 / 0.1 M 酒石酸ナトリウム溶液, 0.1 M クエン酸溶液 / 0.1 M クエン酸ナトリウム溶液などの緩衝液のうち, 0.2 M 塩酸 / 0.2 M 酢酸ナトリウム溶液を, 全量 10 ml に対し 2.5 ml 加えて最終液性を pH 2.5 - 4.0 に調整するとき, 最大で一定の ΔA 値を示した.

金属-色素錯体溶液に界面活性剤を添加するとき, 呈色体の安定性, 感度, 再現性などの面で著しく向上することが認められている²⁷⁻²⁹⁾ので, 本反応系においても種々の界面活性剤を検討した. 陽イオン性 {HPC, 塩化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム (HTAC), ゼフィラミン}, 陰イオン性 {ドデシル硫酸ナトリウム, エアロゾル OT}, 両性 {スワノール AM 101}, 非イオン性 {Tween 20, Brij 35, Triton X-100, ポリビニルアルコール} 界面活性剤の併用を検討したところ, 1.0 % HPC 溶液

を全量 10 ml に対し 0.75 - 2.0 ml 加えるとき, ΔA は最大値を示した.

用いる Ti(IV) と SAF 濃度の最適濃度を検討したところ, Ti(IV) と SAF 濃度の比によって, 生成する Ti(IV) - SAF - HPC 呈色錯体の室温での安定性に著しい差異が生じたので, Ti(IV) 濃度を 2.0×10^{-5} M に固定して SAF の添加量について検討した. その結果, Fig. 2 に見られるように SAF の濃度を最終 8.0×10^{-5} M とし, 室温 (15 - 30°C) 下で 15 - 35 分静置するとき, ΔA は一定値を示した.

また, EDTA 濃度としては, 1.0×10^{-2} M EDTA 溶液を全量 10 ml に対し 1.0 ml 以上用いるとき, ほぼ一定の ΔA 値が得られた.

したがって, 最終濃度 2.0×10^{-5} M Ti (IV), 8.0×10^{-5} M SAF 及び 1.0×10^{-3} M EDTA を用いることとした. 尚, 試薬添加順序の影響について検

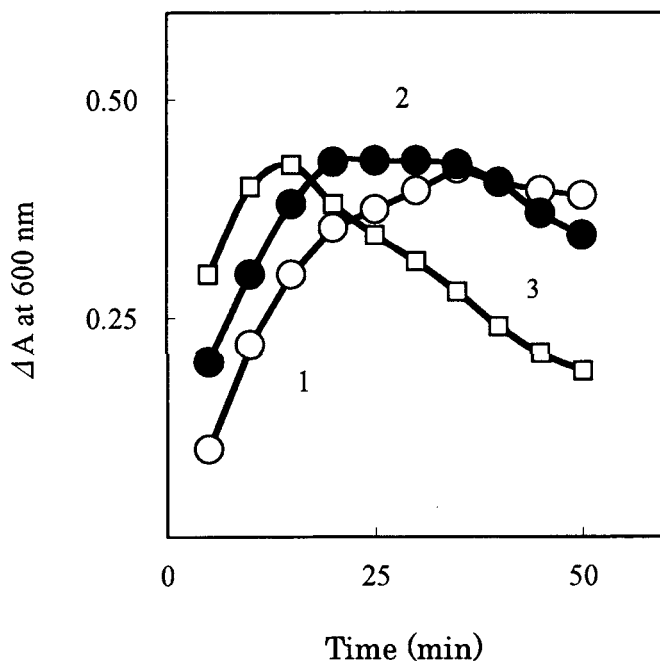


Fig. 2 Relationship between the standing time and ΔA in various SAF concentrations at room temperature.

H_2O_2 : $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$; [Ti (IV)] = 2.0×10^{-5} M; [EDTA] = 1.0×10^{-3} M; [HPC] = 0.1 %; pH, 3.5; SAF concentrations: curve 1 = 4.0×10^{-5} M; curve 2 = 8.0×10^{-5} M; curve 3, 1.6×10^{-4} M.

討したところ、添加順序による差異は認められなかった。

3. 吸収スペクトル

設定した基礎的定量条件に従って、SAF-HPC-EDTA 溶液, Ti(IV)-SAF-HPC-EDTA 溶液 (blank 溶液) 及び H₂O₂-Ti(IV)-SAF-HPC-EDTA 溶液 (sample 溶液) の吸収スペクトルを測定した。Fig. 3 に見られるように blank 溶液と sample 溶液の吸光度差 (ΔA) は 600 nm 付近で最大で、H₂O₂ 濃度に比例することを認めた。

4. 検量線の作成

定量操作に従って検量線を作成したところ、0.02 - 0.4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ H₂O₂ 濃度範囲で良好な直

線を得ることができた。本操作法による定量感度は、みかけのモル吸光係数 (ϵ) が $1.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を示し、報告されている吸光度法^{8-11, 13)} の 3 - 10 倍以上、最も高感度とされている Ti(IV)-ポルフィリン法¹⁷⁾ と同程度の感度を示した。また、0.18 $\mu\text{g ml}^{-1}$ H₂O₂ 定量時の相対標準偏差 (RSD) は 1.2 % (n = 5) , 定量限界 (0.02 $\mu\text{g ml}^{-1}$ H₂O₂ 定量時) における RSD も 8.3 % (n = 5) であり、再現性においても極めて良好な結果が得られた。

5. 共存物質の影響

本法における共存物質の影響を Table 2 に示した。ナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオン、硝酸イオン、塩化物イオン、硫酸イ

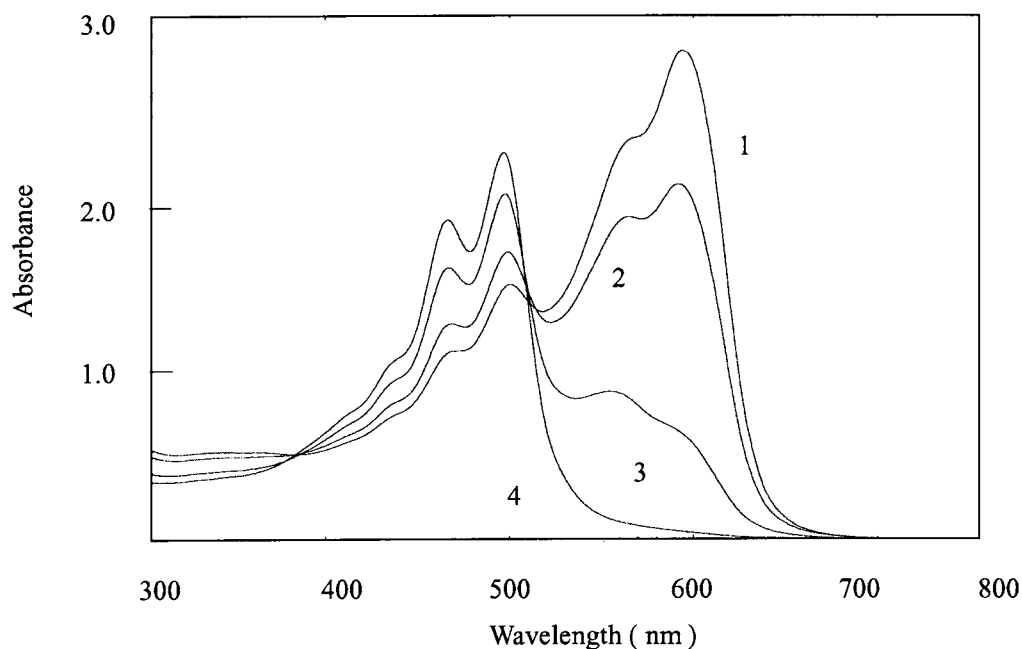


Fig. 3 Absorption spectra of SAF-HPC-EDTA, Ti(IV)-SAF-HPC-EDTA and H₂O₂-Ti(IV)-SAF-HPC-EDTA solutions.
[Ti(IV)] = 2.0×10^{-5} M; [EDTA] = 1.0×10^{-3} M; HPC, 0.1 % ; [SAF] = 8.0×10^{-5} M; pH, 3.5;
Curve 1, Ti(IV)-SAF-HPC-EDTA solution; curves 2 and 3, H₂O₂-Ti(IV)-SAF-HPC-EDTA solution (H₂O₂ concentrations ($\mu\text{g ml}^{-1}$): curve 2 = 0.12; curve 3 = 0.36); curve 4, SAF-HPC-EDTA solution.

オンなどは、 H_2O_2 に対して大過剰が共存した場合でも全く影響を与えなかった。鉄 (III) イオン、アルミニウム (III) イオンの 5 倍モル量の共存では、僅かに負の妨害が観察された。また、グリシン、グルコースなどの有機化合物は、 ΔA 値には影響を及ぼさなかった。更に H_2O_2 定量時、度々深刻な問題となるアスコルビン酸の共存もヒト尿中に対して大過剰量の添加を試みたが、本操作法においてはわずかな負の誤差を与えるのみであった。尿酸についてもヒト尿中の実試料で想定される大過剰量の添加にもかかわらず、 ΔA 値には、全く影響を示さなかった。

次に本法の応用例としてヒト尿中への添加回収

実験 ($0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$) を行ったところ、回収率及び RSD は、それぞれ 101.1 %, 1.6 % ($n = 5$) と良好な結果を得ることができた。

6. 錯体の組成及び反応機構

Ti (IV) : SAF の組成比と Ti (IV) : HPC の組成比を Job の連続変化法を用いて検討したところ、それぞれ 1 : 4 並びに 1 : 4 であった。従って、本反応系で生成する呈色体は $\{\text{Ti}(\text{SAF})_4\}(\text{HPC})_4$ のイオン会合型三元錯体が考えられる。一方、 H_2O_2 - Ti (IV) - EDTA 錯体の組成比を検討したところ、HPC の有無にかかわらず 1 : 1 : 1 の結果となり、文献記載³⁰⁾の組成比と同様の結果であった。さらに生成速

Table 2 Effect of foreign substances on assay of H_2O_2

Substance	Added, $\mu\text{g ml}^{-1}$	[Substance]* [H_2O_2]	ΔA at 600 nm	Recovery, %
None	—	—	0.430	100.0
Fe(III), alum	7.09	5	0.415	96.5
Al(III), nitrate	1.31	5	0.420	97.7
Zn(II), chloride	4.01×10	100	0.430	100.0
Ca(II), chloride	3.26×10	100	0.430	100.0
NaNO_3	2.50×10	100	0.430	100.0
KCl	2.19×10	100	0.430	100.0
Na_2SO_4	4.18×10	100	0.430	100.0
Caffeine	5.71×10	100	0.430	100.0
Glucose	5.30×10	100	0.430	100.0
Uric acid	4.94×10	100	0.430	100.0
Creatinine	3.32×10	100	0.430	100.0
Urea	1.77×10	100	0.430	100.0
Glycine	2.21×10	100	0.430	100.0
Ascorbic acid	5.18×10	100	0.420	97.7
Human serum albumin	(100 μg)	—	0.430	100.0

H_2O_2 : $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$; [Ti (IV)] = 2.0×10^{-5} M; [EDTA] = 1.0×10^{-3} M; HPC, 0.1 %; [SAF] = 8.0×10^{-5} M; pH, 3.5; *molar ratio

度について目視的に観察した結果、 H_2O_2 -Ti(IV)-EDTA 三元錯体の生成反応速度が、{Ti(IV)-SAF}-HPC 三元錯体生成反応速度よりも速いことを認めた。従って、 H_2O_2 -Ti(IV)-EDTA の生成定数³⁰⁾ (log K) が 20.4、Ti(IV)-EDTA の log K が 17.3 であることを考慮すると、 H_2O_2 、Ti(IV)、SAF、EDTA 及び HPC の混合溶液においては、 H_2O_2 -Ti(IV)-EDTA 三元錯体が生成した後、残余の Ti(IV) により {Ti(IV)-SAF}-HPC の三元錯体を生成するものと考えられるが、より詳細な検討が必要である。

考 察

EDTA 共存下、 H_2O_2 -Ti(IV)-EDTA 三元錯体の生成による Ti(IV)-SPF-HPC 三元錯体の退色に基づく H_2O_2 の簡便で高感度な吸光度定量法を開発した。現在臨床現場で利用されている H_2O_2 測定法⁶⁾ (酵素法) は、 H_2O_2 による酸化反応に基づく呈色反応であり、アスコルビン酸などの還元性共存物質の影響を受けやすい欠点を有している。これに対し、 H_2O_2 の錯生成能を利用した本定量法は、アスコルビン酸、金属イオンなど多くの共存物質の影響も少なく、また再現性に優れ、ヒト尿中での回収率も良好なことから、実試料中の H_2O_2 の測定法として十分応用可能であることが示唆される。

REFERENCES

- 1) Yamamoto N., Ohkubo K., Nakahara R., Yamaguchi T., Fujita Y., Abstracts of papers, the 68th Symposium of the Japan Society for Analytical Chemistry of Japan, Utsunomiya, May 2007, p.183.
- 2) The Japan Pharmacopoeia, Fifteenth Edition, 2006.
- 3) Japanese Standard of Food Additives, Seventh Edition, 1999, D-246.
- 4) Jacob D. J., Hoffman M., *J. Geophys. Res.*, **55**, 6611-6621 (1983).
- 5) Murano K., *Kougai To Taisaku*, **25**, 77-83 (1989).
- 6) Kanai M., Kanai I., *Rinsyokensa Teiyo*, Kanahara & Co., Ltd., Tokyo, 1993.
- 7) Taniguchi N., Yodoi J., *Sankasutoresu-Redokkusu No Seikagaku*, Kyoritsu Shuppan Co., Ltd., Tokyo, 2000.
- 8) Matsubara C., Takamura K., *Yakugaku Zasshi*, **97**, 41-45 (1977).
- 9) Matsubara C., Takamura K., *Microchem. J.*, **22**, 505-513 (1977).
- 10) Matsubara C., Takamura K., *Microchem. J.*, **24**, 341-349 (1979).
- 11) Matsubara C., Takamura K., *Bunseki Kagaku*, **29**, 759-764 (1980).
- 12) Madsen B. C., Kromis M. S., *Anal. Chem.*, **56**, 2849-2850 (1983).
- 13) Matsubara C., Takamura K., *Bunseki Kagaku*, **38**, 72-75 (1989).
- 14) Nakano T., Takahashi A., *Anal. Sci.*, **6**, 823-826 (1990).
- 15) Clapp P. A., Evans D. F., *Anal. Chim. Acta*, **243**, 217-220 (1991).
- 16) Afsar H., Apak R., Tor I., *Analyst[London]*, **115**, 99-103 (1992).
- 17) Matsubara C., Kawamoto N., Takamura K., *Analyst [London]*, **117**, 1781-1784 (1992).
- 18) Guilbault G. G., Brignac P., *Anal. Chem.*, **40**, 1256-1263 (1968).
- 19) Ci Y-X., Wang F., *Anal. Chim. Acta*, **233**, 299-302 (1990).
- 20) Genfa Z., Dasgupta P. K., Edgmond W. S., Marx J. N., *Anal. Chim. Acta*, **243**, 207-216 (1991).
- 21) Mori I., Fujita Y., Toyoda M., Kato K., Yoshida N., Akagi M., *Talanta*, **38**, 683-690 (1991).
- 22) Boto K. G., Williams L. F. G., *Anal. Chim. Acta*, **85**, 179-183 (1976).
- 23) Nakashima K., Maki K., Kawaguchi S., Akiyama S., Tsukamoto Y., Imai K., *Anal. Sci.*, **7**, 709-714 (1991).

- 24) Lieberman C., *Chem. Ber.*, **34**, 2299-2302 (1901).
- 25) Sano H., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **31**, 974-980 (1958).
- 26) Shimizu K., Morita Y., Tanaka K., Kamino S., Fujimoto T., Yamaguchi T., Fujita Y., *Bunseki Kagaku*, **56**, 773-780 (2007).
- 27) Yamaguchi T., Murase H., Mori I., Fujita Y., *Bunseki Kagaku*, **50**, 563-566 (2001).
- 28) Yamaguchi T., Inoue M., Miyachi K., Tominaga H., Fujita Y., *Anal. Sci.*, **20**, 387-389 (2004).
- 29) Kamino S., Yamaguchi T., Mori T., Miyamoto M., Kusumi Y., Fujita Y., *Anal. Sci.*, **21**, 1549-1552 (2005).
- 30) Musha S. and Ogawa K., *Nihon Kagaku Kaishi*, **78**, 1686-1690 (1957).