

亜硫酸化学発光系を利用するフローインジェクション分析

大野 賢一, 山田 正昭

東京都立大学大学院工学研究科応用化学専攻

〒192-0397 東京都八王子市南大沢 1-1

Flow Injection Analysis Using Sulfite Chemiluminescence

Ken-ichi Ohno and Masaaki Yamada

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Tokyo Metropolitan University,
1-1 Minami-Ohsawa, Hachioji, Tokyo 192-0397, Japan

Sulfite which is important for food chemical and pharmaceutical fields by its anti-oxidative and anti-bacterial activities is readily oxidized and transforms to an excited state of sulfur dioxide (SO_2^*) emitting weak chemiluminescence (CL) in acidic solution. In this paper, flow injection analysis (FIA) coupled with the sulfite CL detection is described.

In order to develop FI-CL systems for the determination of sulfite and sulfur dioxide, the sulfite oxidation was examined with permanganate, cerium(IV) and other oxidants. Some fluorescent molecules and cycloalkane derivatives were effectively sensitizing (enhancing) the sulfite CL. The sulfite CL system was used for the sensitive and selective determination of bioactive compounds such as pharmaceuticals and steroid hormones on the basis of the sensitizing (enhancing) effects.

Keywords flow injection analysis, sulfite, sensitized chemiluminescence, high sensitivity

1. はじめに

亜硫酸塩はその抗酸化作用や抗菌活性から食品化学、医薬品工業等様々な領域においてワインや果物、野菜、錠剤やカプセル剤などの製剤に酸化防止剤や保存料として添加されている。また製紙工業においては原料として使用されている重要な化学物質である。一方、酸性条件において亜硫酸から発生する二酸化硫黄は、自動車の排気ガスに含まれる SO_x の一種で毒性の高い気体である。大気中の二酸化硫黄は、容易に酸化されて硫酸へと変化し、酸性雨を引き起こすことから大気環境汚染物質の一つとして挙げられている。これらの理由から亜硫酸塩の定量法に関しては、これまでに吸光度法^{1,2)}、蛍光法³⁾、クロマトグラフ法⁴⁾、電気化学法⁵⁾、滴定法⁶⁾、酵素法⁷⁾ などにより多くの研究がなされている。更に操作の自動化や簡素化、迅速化と高感度計測を目的としてフローインジェクション分析法 (FIA) と化学発光法 (CL)

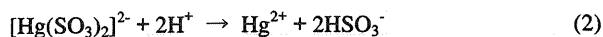
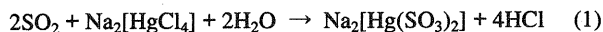
を組み合わせた FI-CL 法が報告されている^{8,9)}。

CL 法は吸光度法や蛍光法と異なり光源を必要としないことから簡易な装置で高感度検出が可能であり、同様に簡易な装置で構成される FIA との接続 (FI-CL) はその特徴を活かした検出系として注目されている。ここで用いられている亜硫酸 CL 反応の多くは酸性条件下 (主に硫酸酸性) で亜硫酸塩を過酸化水素や過マンガン酸カリウム、セリウム(IV) などの酸化剤による酸化反応の際に微弱発光を生じることに基づいている。その微弱発光に対して様々な増感剤が検討され、亜硫酸塩の高感度検出を達成している。また近年では亜硫酸 CL の増感剤を分析対象物に置き換えた手法が検討されており、抗生物質や向精神薬などの医薬品やステロイド、アルカロイドの分析に応用されている。

本稿では亜硫酸 CL を利用する亜硫酸塩や二酸化硫黄、医薬品などの FI-CL 計測について紹介する。

2. 亜硫酸塩の FI-CL 計測

Meixner らは自作装置を用いて大気中の二酸化硫黄測定を報告している¹⁰⁾。その方法は四塩化水銀酸ナトリウムで二酸化硫黄を亜硫酸へと導き、遊離した亜硫酸を過マンガン酸カリウム酸化により CL 検出する。この過マンガン酸カリウムによる CL 機構は、



であり、発光種は励起二酸化硫黄とされている。その後、上記 (3) 式以下の反応を Fig. 1 に示す基本的な FIA システムに構築し、亜硫酸塩の簡便、迅速な FI-CL 法が現在まで報告されている。そこでは酸化剤の種類や増感剤の添加により亜硫酸塩の高感度計測が検討されている。

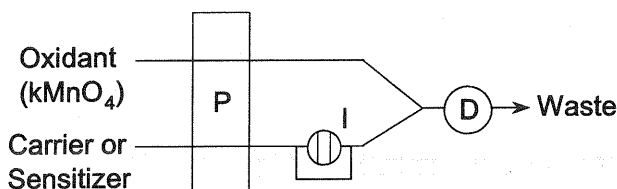


Fig. 1 Schematic diagram of the basic flow system for sulfite CL. P: peristaltic pump, I: sample injector, D: CL detector.

まず初めに過マンガン酸酸化による亜硫酸 CL 反応系にリン酸リボフラビンやイソキノリン誘導体を添加し、その増感 CL による亜硫酸の高感度 CL 計測が報告された¹¹⁾。更に大気中の二酸化硫黄測定に応用され、その増感メカニズムも検討された¹²⁾。光学干渉フィルターを用いた CL スペクトル測定や一重項、三重項増感剤による検討から、励起二酸化硫黄の発光波長は 450-600 nm で三重項増感剤である 9,10-ジプロモアントラセンにより増感効果が確認された。従って亜硫酸 CL は励起三重項二酸化硫黄 ($^3\text{SO}_2^*$) から生じるリン光であることが明らかとなった。しかしながら高濃度の過マンガン酸溶液は赤紫色に着色していることから励起二酸化硫黄由来の CL を吸収する結果、著しい感度の低下を招く。そのため使用する過マ

ンガン酸溶液濃度が制限され、希薄溶液による酸化反応から十分な感度が得られないことが欠点となっている。そこで過マンガン酸塩とリン酸リボフラビンの陰イオンを利用し、両試薬を陰イオン交換カラムに固定化して試薬を供給しない亜硫酸塩の FI-CL 系が報告された¹³⁾。イオン交換カラムの使用により、前述した過マンガン酸溶液の抱える問題の改善と簡便な FI-CL 系の構築が図られている (Fig. 2)。

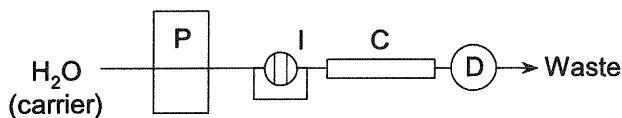


Fig. 2 Reagentless FI-CL system for the determination of sulfite. P: peristaltic pump, I: sample injector, C: anion-exchange column retaining permanganate and riboflavin phosphate, D: CL detector.

また、硫酸セリウム (Ce(IV)) を用いることにより高濃度の酸化剤の使用を可能にした報告もある¹⁴⁾。その結果、亜硫酸塩の検出に過マンガン酸の場合と比較して 5 倍の高感度化を達成している。その他の酸化剤としては、電気化学酸化により硝酸銀から生成する不安定な Ag(II)イオンを用いる方法 (Fig. 3)¹⁵⁾ や、亜硫酸塩の自動酸化による方法 (ローダミン 6G と界面活性剤 Tween80 による増感 CL: Fig. 4)^{16,17)} が報告されている。最近では、電気化学発光で汎用されているルテニウム-ビピリジン錯体 ($\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$) を過マンガン酸酸化による亜硫酸 CL 系の増感剤として用いる方法も報告されている¹⁸⁾。

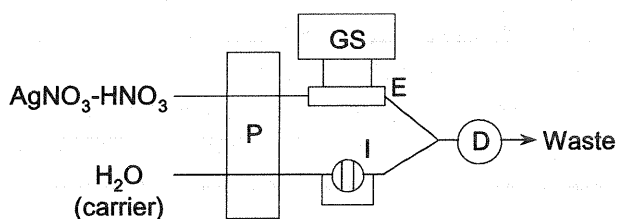


Fig. 3 FI-CL system for the determination of sulfite using unstable Ag(II) generated by galvanostatic oxidation. P: peristaltic pump, I: sample injector, E: flow electrolysis cell, GS: galvanostat, D: CL detector.

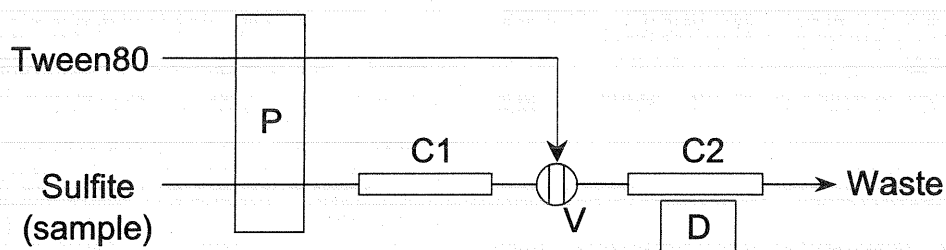


Fig. 4 FI-CL system for the determination of sulfite by auto-oxidation. P: peristaltic pump, V: valve, C1: cation-exchange column, C2: cation-exchange column retaining rhodamine 6G, D: CL detector.

亜硫酸 CL 系において、リボフラビンよりも強い増感効果を示す水溶性のシクロヘキサン誘導体が報告された¹⁹⁾。数種類のシクロヘキサン誘導体を増感剤として検討し、3-Cyclohexylaminopropanesulfonic acid (CAPS) が最も高い増感効果を示した。CAPS は蛍光性を示さないため従来のエネルギー移動による増感 CL とは異なるメカニズムと推定されたが、その詳細に関しては不明であった。

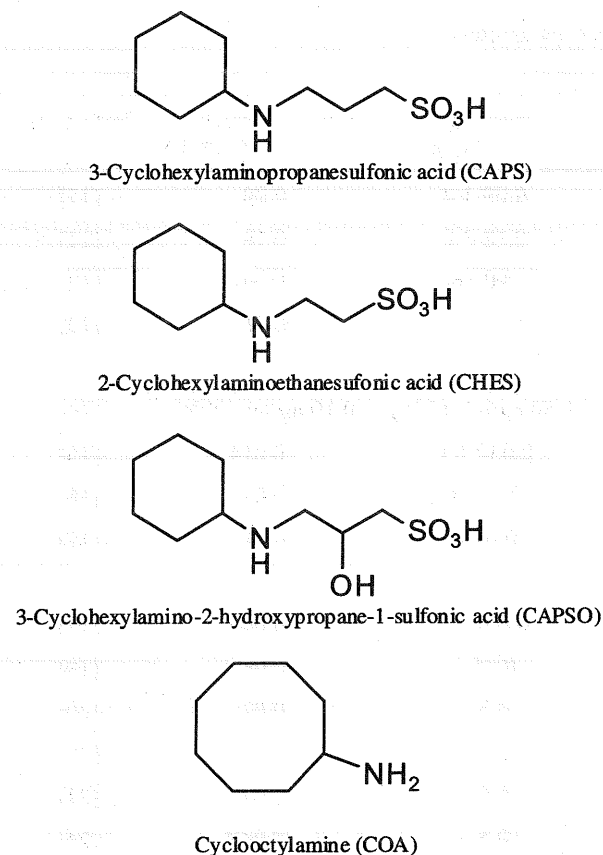


Fig. 5 Chemical structures of cycloalkane derivatives sensitizing sulfite CL.

他のグループによって、2-Cyclohexylaminoethane-sulfonic acid (CHES) や 3-Cyclohexylamino-2-hydroxypropane-1-sulfonic acid (CAPSO), Cyclooctylamine (COA) などのシクロアルカン類 (Fig. 5) にも増感効果が見出され²⁰⁻²²⁾、更にその増感メカニズムが検討された²³⁾。Quadricyclane (クワドリシクラン) は SO₂ の環化付加反応を受けて不安定なβ-Sultine 化合物 (スルチン: 環内に -SO-O- 基を持つ化合物) を与えることから、同様に CAPS もシクロヘキサンの 1,4- 位に SO₂ の環化反応を受けてβ-Sultine 化合物 (Fig. 6) を形成すると推定した。このβ-Sultine 化合物の形成はシクロアルカンのリングサイズに影響を受けることから 9 員環まで形成可能であり、その影響は増感効果と一致している。

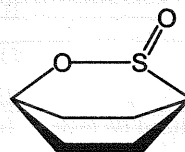
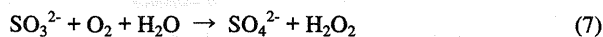


Fig. 6 Possible structure of a β-sultine formed between cyclohexane and SO₂.

また、これまでの手法と全く異なる亜硫酸塩の定量法として、高選択的な検出を目的に、無機性酸化剤である過マンガン酸カリウムや硫酸セリウムなどの代わりに亜硫酸酸化酵素 (Sulfite oxidase: SOD) を利用したバイオセンサーが構築された²⁴⁾。その方法は、SOD の酵素反応によって以下の反応が促進され、



その際に生じる過酸化水素をルミノール / ペルオキシダーゼ (POD) の CL 反応で定量するものである。SOD と

POD をともにポリカーボネート膜に固定化し、酵素の再利用を図っている。

Table 1 に前述した内容の CL 反応系、検出限界、検量域をまとめた。

3. 亜硫酸 CL を利用した医薬品類の FI-CL 計測

前項の亜硫酸 CL 系では亜硫酸塩の高感度検出を目的として様々な酸化剤や増感剤が検討された。この CL 反応系では亜硫酸塩の他に酸化剤と増感剤の検出系の構築が考えられるが、酸化力の強い化合物は無機化合物が多くその範囲が限られる。そこで増感効果を示す化合物の検出系が数多く報告されている。即ち、酸化剤と亜硫酸塩を送液して増感効果のある化合物を注入する FI-CL 法である。

臭素酸酸化による亜硫酸 CL 反応系の増感剤としてステロイドの増感効果を検討し、その増感効果に基づくス

テロイドホルモン類の定量法が報告された²⁵⁾。ステロイドホルモンによる増感メカニズムは、CAPS で検討されたシクロアルカンと励起二酸化硫黄から形成される β -sultine 化合物によるものと考えられている。即ち、ステロイド骨格は3つのシクロヘキサンと1つのシクロペンタンから構成されているために十分な増感効果が得られると考えられる。糖質コルチコイドであるコルチゾンや男性ホルモンのテストステロン、女性ホルモンのプロゲステロンの高感度 CL 計測を達成している。また、エネルギー移動による増感 CL では、蛍光性分子であるシンコナルカロイド (キニン、キニジン、シンコニン)²⁶⁾ や第三世代のニューキノロン系合成抗菌薬 (オフロキサシン、ノルフロキサシン、シプロキサシン、ロメフロキサシン)^{27,28)}、向精神薬 (スルピリド、スルトピリド、チアピリド)²⁹⁾ の定量法が報告されている。更にビタミンK₃ (メナジオン亜硫酸水素ナトリウム)^{30,31)} の定量法では、その分子内に亜硫酸塩を保持することから酸化剤との混合のみで CL を生じる。高感度化を目的として数種類の増感剤も

Table 1 Determination of sulfite (sulfur dioxide) and its analytical parameters

Analyte	Oxidant	Sensitizer (Enhancer)	Linear range ($\mu\text{g/mL}$)	Limit of detection ($\mu\text{g/mL}$)	Reference
Sulfite	MnO_4^-	Riboflavin phosphate	0.09-1.4	0.09	[11]
		Brilliant sulfaflavine	0.18-3.6	0.18	[11]
SO_2	MnO_4^-	Flavin mononucleotide	6-90 ppb	3 ppb	[12]
Sulfite	MnO_4^- (immobilized on resin)	Riboflavin phosphate (immobilized on resin)	0.1-100	0.06	[13]
Sulfite	Ce(IV)	- (unused)	1-50 ng/mL (SO_2)	0.19 ng/mL (SO_2)	[14]
Sulfite	Ag(II)	- (unused)	0.032-0.8	0.014	[15]
Sulfite	Auto-oxidation (O_2)	Rhodamine 6G	0.05-10	0.03	[16]
Sulfite	Auto-oxidation (O_2)	Rhodamine 6G (immobilized on resin)	0.01-5	0.01	[17]
Sulfite	MnO_4^-	[Ru(bipy) ₃] ²⁺	0.004-10	0.002	[18]
Sulfite	MnO_4^-	CAPS	0.25-3	0.06	[19]
Sulfite	Ce(IV)	CAPS	0.3-3	0.02	[20]
Sulfite	Ce(IV)	CAPS	0.3-3	0.02	[21]
		CHES	0.5-5	0.032	[21]
		CAPSO	0.5-5	0.049	[21]
Sulfite	Ce(IV)	CAPS	0.8-80	0.81	[22]
		COA	0.044-8	0.044	[22]
Sulfite	SOD	Luminol/POD/ H_2O_2	0.08-8	0.04	[24]

検討されたが、最も効果的なローダミン 6G でさえ 1.3 倍程度であった。この原因は亜硫酸水素ナトリウムの酸化反応に続く増感 CL 過程において、メナジオンのナフトキノン骨格による増感効果が他の増感剤と比較して大きいためとも考えられる。

抗菌薬の基本骨格であるチアゾールをリード化合物として N-tetarhydrobenzothiazolyl imine (N-THBTI) を代表とする数種類の誘導体が合成された³²⁾。Ce(IV)-sulfite 反応においていずれの誘導体にも増感効果が見出され、試薬濃度や混合順序などの最適化が検討された。しかし CL スペクトル測定や反応分解物などの詳細な解析から、従来とは異なる CL 反応と推測された。そのメカニズムは N-THBTI が Ce(IV) で酸化されて活性中間体 (フリーラジカル) を生成し、その活性種と亜硫酸塩が反応すると結論付けている。その証明に酒石酸やクエン酸、アスコル

ビン酸などフリーラジカルを生成する化合物による増感効果を示している。

最近では、時間分解蛍光測定で用いられる希土類イオンを利用した合成抗菌薬の定量法も報告されている^{33,34)}。ルフロキサシンやグレパフロキサシンは希土類イオンと錯体を形成して通常のエネルギー移動による増感 CL よりも更に強い効果が得られている。希土類イオンには、ランタン (La(III))、テルビウム (Tb(III))、ユーロピウム (Eu(III)) が検討され、Tb(III) や Eu(III) を用いたときに ~100 倍程度の高感度化が達成されている。

Table 2 に前述した内容の対象化合物とその CL 反応系、検出限界、検量域をまとめた。

Table 2 Determination of bioactive compounds sensitizing (enhancing) sulfite CL

Analyte	Oxidant	Linear range ($\mu\text{g/mL}$)	Limit of detection ($\mu\text{g/mL}$)	Reference
Cortisone	Bromate	0.5-20	0.3	[25]
Hydrocortisone	Bromate	0.5-5	0.3	[25]
Cortisone	Ce(IV)	0.5-10	0.1	[25]
Hydrocortisone	Ce(IV)	0.5-5	0.3	[25]
Quinine	Ce(IV)	0.04-100	0.01	[26]
Quinidine	Ce(IV)	0.1-1000	0.04	[26]
Cinchonine	Ce(IV)	1-800	0.6	[26]
Ofloxacin	Ce(IV)	0.04-4	0.016	[27]
Ofloxacin	Ce(IV)	0.04-4	0.016	[28]
Norfloxacin	Ce(IV)	0.4-40	0.16	[28]
Lomefloxacin	Ce(IV)	0.4-40	0.16	[28]
Sulpiride	Ce(IV)	0.05-2.5	0.01	[29]
Sultopride	Ce(IV)	0.01-2.5	0.01	[29]
Tiapride	Ce(IV)	0.01-1.5	0.01	[29]
Vitamin K ₃ (Menadione sodium bisulfite)	Ce(IV)	0.01-10	0.02	[30]
N-THBTI	Ce(IV)	0.2-80 μM	0.08 μM	[32]
Rufloxacin (+ Eu(III))	Ce(IV)	20-500 nM	5 nM	[33]
Grepafloracin (+ Tb(III))	Ce(IV)	0.05-2	0.01	[34]

4. おわりに

本稿では亜硫酸塩を用いた CL 反応系を紹介したが、FI-CL 法は比較的安価で簡易な装置により高感度検出が可能であり、イオン交換樹脂や高分子膜の利用により試薬の低減や流路系の単純化を図れる優れた技術である。最近ではシリンジポンプなどの使用による装置全体のダウンサイジング化も検討され、CL 検出器の特性が十分に活かされる環境も整いつつある。これにより環境負荷の少ない分析技術への展開が望まれる。今後の更なる FI-CL 研究の進展を期待したい。

参考文献

- [1] P. W. West, G. C. Gaeke, *Anal. Chem.*, **28**, 1816 (1956).
- [2] P. K. Dasgupta, K. Decasare Jr, J. C. Ullrey, *Anal. Chem.*, **52**, 1912 (1980).
- [3] G-Q. Gong, H. Xia, H. G. Wang, *Anal. Lett.*, **28**, 909 (1995).
- [4] Y. Miura, T. Maruyama, T. Koh, *Anal. Sci.*, **11**, 617 (1995).
- [5] V. P. Benov, B. P. Atanasov, *Anal. Lett.*, **26**, 2061 (1993).
- [6] US Environmental Protection Agency, Fed. Regist, **51**, 25012 (1986).
- [7] V. J. Smith, *Anal. Chem.*, **59**, 2256 (1987).
- [8] S. W. Lewis, D. Price, P. J. Worsfold, *J. Biolumin. Chemilumin.*, **8**, 183 (1993).
- [9] A. R. Bowie, M. G. Sanders, P. J. Worsfold, *J. Biolumin. Chemilumin.*, **11**, 61 (1996).
- [10] F. X. Meixner, W. A. Jaeschke, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **10**, 51 (1981).
- [11] M. Yamada, T. Nakada, S. Suzuki, *Anal. Chim. Acta*, **147**, 401 (1983).
- [12] M. Kato, M. Yamada, S. Suzuki, *Anal. Chem.*, **56**, 2529 (1984).
- [13] W. Qin, Z. Zhang, C. Zhang, *Anal. Chim. Acta*, **361**, 201 (1998).
- [14] K. Takeuchi, T. Ibusuki, *Anal. Chim. Acta*, **174**, 359 (1985).
- [15] B. Li, Z. Zhang, M. Wu, *Anal. Chim. Acta*, **432**, 311 (2001).
- [16] Y. Huang, C. Zhang, X. Zhang, Z. Zhang, *Anal. Chim. Acta*, **391**, 95 (1999).
- [17] Y. Huang, C. Zhang, X. Zhang, Z. Zhang, *Anal. Lett.*, **32**, 1211 (1999).
- [18] H. Meng, F. Wu, Z. He, Y. Zeng, *Talanta*, **48**, 571 (1999).
- [19] S. A. Al-Tamrah, A. Townshend, A. R. Wheatley, *Analyst*, **112**, 883 (1987).
- [20] I. I. Koukli, E. G. Sarantonis, A. C. Calokerinos, *Analyst*, **113**, 603 (1988).
- [21] I. I. Koukli, E. G. Sarantonis, A. C. Calokerinos, *Anal. Lett.*, **23**, 1167 (1990).
- [22] D. A. Paulls, A. Townshend, *Analyst*, **120**, 467 (1995).
- [23] D. A. Paulls, A. Townshend, *Analyst*, **121**, 831 (1996).
- [24] J. Hlavay, G. G. Guilbault, *Anal. Chim. Acta*, **299**, 91 (1994).
- [25] A. B. Syropoulos, E. G. Sarantonis, A. C. Calokerinos, *Anal. Chim. Acta*, **239**, 195 (1990).
- [26] M. Feng, G. Zhang, Z. Zhang, *Anal. Lett.*, **31**, 2537 (1998).
- [27] Y. Rao, Y. Tong, X. Zhang, G. Luo, W. R. G. Baeyens, *Anal. Chim. Acta*, **416**, 227 (2000).
- [28] Y. Rao, Y. Tong, X. Zhang, G. Luo, W. R. G. Baeyens, *Anal. Lett.*, **33**, 1117 (2000).
- [29] F. A. Aly, N. A. Alarfaj, A. A. Alwarthan, *Talanta*, **54**, 715 (2001).
- [30] Y. Hung, Z. Chen, Z. Zhang, *Anal. Lett.*, **32**, 2789 (1999).
- [31] Y. Hung, Z. Zhang, D. Zhang, *Anal. Lett.*, **33**, 2677 (2000).
- [32] S. Zhang, Y. Wu, H. Li, *Analyst*, **125**, 753 (2000).
- [33] X. Wang, H. Zhao, L. Nie, L. Jin, Z. Zhang, *Anal. Chim. Acta*, **445**, 169 (2001).
- [34] J. A. Ocana, M. Callejon, F. J. Barragan, F. F. De la Rosa, *Anal. Chim. Acta*, **482**, 105 (2003).

(Received October 30, 2003)