

## 2004年度 フローインジェクション分析研究懇談会

### 各賞受賞者

2004年度 JAFIAの各賞受賞者が下記の通り決定し、11月26日(金)、九州大学国際ホールにて開催の第45回フローインジェクション分析講演会において表彰されました。

受賞者の方々の栄誉を称え、ますますのご健勝とご研究のご発展をお祈り致します。

#### (1) FIA 学術賞

中野 恵文氏 (鳥取大学地域学部)

業績 新規接触反応及び有機薄膜層抽出のフローインジェクション分析への展開

#### (2) FIA 進歩賞

塚谷 忠之氏 (福岡県工業技術センター)

業績 固定化酵素を用いた FIA 法の開発と食品分析への応用

#### (3) FIA 論文賞

後藤 真吾, 手嶋 紀雄, 酒井 忠雄, 井田 和徳,  
浦 信夫 各氏 (愛知工業大学, 朝日大学附属村上記念病院,  
(株)相馬光学)

業績 **Flow-Injection Simultaneous Determination of Copper and Iron in Patient Sera with 2-(5-Bromo-2-pyridylazo)-5-(N-propyl-N-sulfopropylamino)aniline and Its Application to Disease Diagnosis**  
*Anal. Chim. Acta*, 499, 91-98 (2003).

(フローインジェクション分析褒賞委員会)

2004年度 日本分析化学会フローインジェクション分析研究懇談会  
フローインジェクション分析学術賞

中野 恵文君

Shigenori NAKANO

鳥取大学地域学部教授



1946年福岡県に生まれる。1969年鹿児島大学理学部卒業。1971年九州大学大学院理学研究科修士課程修了。1971年鳥取大学教育学部助手、講師、助教授を経て1994年同教授。1999年同大学教育地域科学部教授配置換え。2004年同大学地域学部教授配置換え、現在に至る。1982年理学博士(九州大学)。1994～1995年米国ワシントン大学文部省在外研究員。

【業績】 新規接触反応及び有機薄膜層抽出の  
フローインジェクション分析への展開

接触分析は、高感度な分析法として古くから知られていた方法であるが、日常分析には余り用いられていない。これは、反応速度を追跡するため分析条件の厳密な設定が必要であり、選択性に乏しかったためである。そこで、中野恵文君は、有機化合物の酸化還元反応に基づく新規な接触反応系を設計してフローインジェクション分析(FIA)法へ適用し、接触分析の難点を克服している。特に金属イオンの接触反応においては、特定の配位子あるいは混合配位子の活性化作用を見だし、sub-ppbレベルまでの金属イオンを選択的に分析可能なFIA法を構築した。またテフロンコイル内壁に形成される有機薄膜抽出を用いたシーケンシャルインジェクション分析(SIA)法も確立した。以下に主な研究の概要を紹介する。

4-アミノアンチピリン(AA)と*N,N*-ジメチルアニリン(DMA)の臭素酸塩酸化カップリング反応を用いたV(IV)、V(V)のFIA法では1,2-ヒドロキシベンゼン-3,5-ジスルホン酸(Tiron)の活性化作用を明らかにした[1]。*N*-フェニル-*p*-フェニレンジアミン(PPDA)と*m*-フェニレンジアミン(PDA)の酸化カップリング反応では、Fe(II, III) [2]及びCu(II) [3]の活性化剤としてそれぞれ酢酸塩、アンモニア/ピリジンの混合配位子系及び非イオン界面活性剤のミセル効果を用いて高感度化を果した。3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾンとDMA及びその誘導体との反応では、Co(II)に対するTiron/炭酸水素イオンの混合配位子系[4]、Cu(II)におけるピリジン[5]、Cr(III)におけるEDTA[6]及びMn(II)における1,10-フェナントロリン/クエン酸混合配位子系[7]の活性化効果を用い、高感度化を達成した。*N,N*-ジメチル-*p*-フェニレンジアミンとPDAの反応に基づくMn(II)のFIA法では、Tiron/トリエチレンテトラミンの混合配位子系を用いた[8]。また、酸化剤を必要としない反応系、すなわち紫外線照射下での*p*-ヒドラジノベンゼンスルホン酸と*N*-(1-ナフチル)エチレンジアミンの反応に基づくSe(IV)及びSe(VI)の酸化状態別分析法では、臭素イオンを活性化剤及びSe(VI)のSe(IV)への還元剤として用いている[9]。AA-DMA-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Fe(III)の反応によるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の定量では、酵素反応を併用してグルコース及び尿酸の分析を可能にしている[10]。PPDA

とDMAの反応により極微量の亜硝酸イオン[11]のFIA法を確立した。さらに、*N,N'*-ビス(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-トリジンなど単一の有機化合物の酸化反応を用いた接触分析を設計し、V(IV,V)[12, 13]、Mn(II)[14]のFIA法を提案している。

これまで化学発光(CL)試薬として用いられることが少なかったピロガロール及びプルプロガリンの酸化反応を用いてCr(III, VI) [15]、Cu(II) [16]及びV(IV) [17]のCL-FIA法を報告している。V(IV)のフロー系では、銀カラムを挿入してV(V)の分析を可能とした。

有機薄膜抽出/SIA法は、薄膜層に抽出された化学種をマイクロリットル量の有機溶媒で溶出させ、その吸光度測定を行うもので、ユニークな流れ分析法の一つである。V(V)-*N*-シンナモイル-*N'*-(2,3-キシリル)ヒドロキシリアミン錯体の薄膜抽出によるV(V)及びV(IV) [18]、Mo(VI)-SCN錯体/臭化テトラヘプチルアンモニウムイオン対抽出によるMo(VI) [19]、また、Cr-1,5-ジフェニルカルバジド錯体/ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>イオン対抽出によるCr(VI) [20]のSIA法を報告している。

なお、FIA法による接触分析は、分析化学誌の総合論文としてまとめられている[21, 22]。

以上、FIAの特長をいかした一連の研究は、優れた着想と獨創性を有するものであり、FIA法のみならず分析化学の発展に貢献するところ顕著なものである。

【フローインジェクション分析褒賞委員会】

文 献

- [1] *Anal. Sci.*, 5, 69 (1989).
- [2] *Talanta*, 42, 1051 (1995).
- [3] *Talanta*, 44, 765 (1997).
- [4] *Talanta*, 43, 1519 (1996).
- [5] *Anal. Sci.*, 15, 835 (1999).
- [6] *Anal. Chim. Acta*, 474, 167 (2002).
- [7] *Anal. Sci.*, 7, 97 (1991).
- [8] *Anal. Chim. Acta*, 261, 183 (1992).
- [9] *Talanta*, 64, 1266 (2004).
- [10] *Anal. Sci.*, 17, 255 (2001).
- [11] *Talanta*, 48, 103 (1999).
- [12] *Talanta*, 61, 203 (2003).
- [13] *Talanta*, 49, 1083 (1999).
- [14] *Talanta*, 49, 1077 (1999).
- [15] *Talanta*, 40, 75 (1993).
- [16] *Anal. Sci.*, 17, (supplement), i1391 (2001).
- [17] *Talanta*, 58, 1263 (2002).
- [18] *J. Flow Injection Anal.*, 13, 148 (1996).
- [19] *Microchem. J.*, 55, 392 (1997).
- [20] *Talanta*, 44, 1563 (1997).
- [21] 分析化学, 48, 285 (1999).
- [22] 分析化学, 53, 255 (2004).

2004年度 日本分析化学会・フローインジェクション分析研究懇談会  
フローインジェクション分析進歩賞

塚谷 忠之 君

Tadayuki TSUKATANI

福岡県工業技術センター生物食品研究所主任技師



1970年12月岡山県に生まれる。1995年3月九州大学大学院農学研究科修士課程修了。同年4月福岡県工業技術センター生物食品研究所技師。2000年4月九州大学松本清教授の指導の下「食品成分計測用フロー型バイオセンサーシステムの開発に関する研究」により博士(農学)の学位取得。現在に至る。

【業績】

固定化酵素リアクターを用いた FIA 法の開発と食品分析への応用

塚谷忠之君は酵素の持つ卓越した分子識別能と FIA 法の有する簡便・迅速性を組み合わせた食品成分の定量法の開発を行ってきた。測定対象としては、ほとんどの食品や飲料、醸造物に含有され、その味や品質に大きく寄与している有機酸類に注目した。同君は固定化酵素リアクターを用いた FIA による主要有機酸の定量法の開発に尽力し、成果を挙げつつある。以下にその研究の概要を紹介する。

L-リンゴ酸の測定には L-リンゴ酸デヒドロゲナーゼを用いるが、その平衡は大きく NAD の生成方向(逆方向)へ傾いているため、FIA への適用は困難である。そこで、NADH オキシダーゼを同時固定化したリアクターを用いることにより、反応生成物を除去して L-リンゴ酸の酸化反応を促進すると共に過酸化水素生成へと導き、白金電極による検出を可能としている[1]。本システムは果実中の L-リンゴ酸定量へ適用されている。また、果実の品質決定因子の5成分(グルコース、フラクトース、スクロース、L-アスコルビン酸及び L-リンゴ酸)同時定量への応用も行っている[2]。さらに、L-リンゴ酸を単独で酸化できるマリックエンザイムを用いた固定化酵素リアクターと、D-リンゴ酸デヒドロゲナーゼ(D-MDH)固定化リアクターを同一流路に直列に導入し、NADPHあるいはNADHを蛍光測定する FIA システムを構築している[3]。本システムでは、それぞれの補酵素である NADP と NAD の注入を切り替えることにより1つのラインで L-リンゴ酸と D-リンゴ酸の逐次定量が可能である。本システムはリンゴ果汁の品質管理へ適用されている。

クエン酸の定量に用いるクエン酸リアーゼ(CL)は反応に伴い失活する性質を有している。また、CL は反応生成物阻害を受けることから固定化酵素リアクターへの適用は困難である。そこで、CL 及びオキサロ酢酸デカルボキシラーゼ同時固定化リアクター、及びピルビン酸オキシダーゼ固定化リアクターを直結することで反応生成物を迅速に除去すると共に過酸化水素生成へと導き、白金電極による検出を可能としている。また、注入する試料の絶対量を低減化することで約100回の繰り返し分析を可能としている。さらに、イソクエン酸デ

ヒドロゲナーゼ固定化リアクターを併用したクエン酸及びイソクエン酸同時定量システムを構築し、柑橘果汁の偽和物添加の検出へ適用している[4,5]。

コハク酸の測定では通常、複雑な酵素リレー系が用いられる。また、高価な補酵素や化学物質を共存させる必要があるため、固定化酵素リアクターを用いた FIA への適用は不可能である。そこで、酵素反応系が単純なイソクエン酸リアーゼ及びイソクエン酸デヒドロゲナーゼのリレー系を新たに考案し、最終生産物である NADPH を検出する FIA システムを構築している[6]。本 FIA システムは貝類や日本酒中のコハク酸定量へ適用されている。

L-酒石酸に関しては、これまで酵素分析法が開発されていなかった。そこで、D-MDH の副次反応の利用を考案し、まずバッチ系における分析法を開発し、さらに固定化D-MDHリアクターを用いた FIA システムを構築している[7,8]。D-MDH の副次反応は主反応と比較して速度が遅いため、Stopped-FIA を採用してリアクターにおける反応時間の延長を試みている。本 FIA システムはワインやブドウ果汁中の L-酒石酸定量へ適用されている。

この他、ほうれん草中のシュウ酸[9]や蜂蜜、食酢、貴腐ワイン中の D-グルコン酸[10]の定量用 FIA システムを構築している。さらに、食品成分ではないが培養細胞の増殖過程をモニターするための FIA システムも構築している[11]。

以上の研究業績はいずれも実用性の高いものであり、食品製造における工程管理や品質管理など幅広く利用できると考えられる。本研究は FIA 研究に貢献するところ顕著なものである。

(フローインジェクション分析褒賞委員会)

文献

- 1) *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 847 (1996).
- 2) *Sensors Mater.*, **7**, 167 (1995).
- 3) *Talanta*, **65**, 396 (2005).
- 4) *Electroanalysis*, **7**, 527 (1995).
- 5) *Anal. Chim. Acta*, **321**, 157 (1996).
- 6) *Anal. Chim. Acta*, **416**, 197 (2000).
- 7) *Biosci. Biotech. Biochem.*, **63**, 1730 (1999).
- 8) *Anal. Sci.*, **16**, 265 (2000).
- 9) *J. Flow Injection Anal.*, **17**, 43 (2000).
- 10) *Anal. Chim. Acta*, in press.
- 11) *J. Flow Injection Anal.*, **21**, 43 (2004).

2004 年度日本分析化学会・フローインジェクション分析研究懇談会  
フローインジェクション分析論文賞受賞論文

論文題名 : Flow-Injection Simultaneous Determination of  
Copper and Iron in Patient Sera with 2-(5-Bromo-  
2-pyridylazo)-5-(*N*-propyl-*N*-sulfo-propylamino)aniline  
and Its Application to Disease Diagnosis  
(5-Br-PSAA を用いる患者血清中の銅・鉄の FIA  
および病態診断への応用)

掲載誌 : Analytica Chimica Acta, 499, 91-98 (2003).

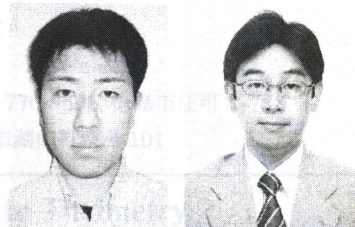
著者名 : Shingo Gotoh, Norio Teshima, Tadao Sakai,  
Kazunori Ida, Nobuo Ura  
(後藤真吾, 手嶋紀雄, 酒井忠雄;  
井田和徳, 浦 信夫)

所 属 : Aichi Inst. Tech., Murakami Memorial Hospital,  
Soma Optics (愛知工大, 村上記念病院,  
相馬光学)

本論文は、病態診断にとって重要な血清銅・鉄の定量法を開発したものである。新規に設計されたツインフローセルを採用することにより二波長同時計測が可能となり、極めて選択性に優れた方法である。また数十 $\mu$ Lの血清があれば、本法により3回以上の測定をすることで、計測法の自動化とともにマイクロ化が実現されている。

Wilson 病やヘモクロマトーシスなどの病態診断にとって、血清銅及び鉄の分析は、蛋白質の分析と共に欠かせない検査項目である。水溶性で高感度のチアゾリルアゾ化合物、ピリジルアゾ化合物が血清金属のバッチマニュアル分析に利用されてきた。しかし、銅、亜鉛、鉄はマスキング剤などを添加し、個別に定量されることが多く、定量操作も簡便ではない。そこで効率的で再現性がよくかつ血清量が少ない計測法が求められている。

これらのニーズに対応するため、本研究ではモル吸光係数が大きな 2-(5-ブロモ-2-ピリジルアゾ)-5-(*N*-プロピル-*N*-スルホプロピルアミノ)アニリン (5-Br-PSAA) を用い、銅と鉄とのキレート生成反応を詳細に検討した。その結果次のような化学特性を見出した。すなわち銅(II)は pH4 で 580 nm 付近に  $\epsilon = 65,000$  のキレートを生成するが、鉄(III)はキレート生成しない。一方、還元剤の共存下で鉄(II)がキレート生成し、710 nm 付近に特有の吸収 ( $\epsilon = 42,000$ ) を示すが、銅 (I) キレートは生成されない。本研究では高感度・高選択性・高精度・スキルフリーを目的に、二波



長検出が可能な長光路ツインフローセル (セル長 2~5 cm) を装着した FIA 装置を作製した。まず銅(II)と 5-Br-PSAA を反応させ第一セルで 580 nm における吸光度を測定する。次いで還元剤の存在下で鉄(II)との反応を進行させ、第二セルで鉄(II)キレートのみが有する 710 nm において吸収度を測定する。この装置を利用することで、試料のワンショットで二成分のピークを 4 分以内に出現させることに成功した。

本法による標準血清の分析結果は、ICP-AES による結果とよく一致した。臨床化学的知見により病態診断への適用の可否を評価するため、各種の疾患を持つ患者血清を本法により分析したところ、肝臓や肝硬変の疾患に特徴的な銅と鉄の濃度に顕著な関係が見られた。合併症などの要因により血清金属濃度は大きく変動することが予測されるため、本法のような再現性が高く異常値の再確認が容易な多検体分析法は臨床化学の分野に多大な貢献をもたらすものと考えられる。

このように本論文は学術的に優れているだけでなく、実用性の観点からも高く評価され (特願 2003-327414)、本法及び装置の応用により臨床化学的、また病態診断上極めて重要なデータの提供が容易になるものと期待される。

以上の理由により、本論文を 2004 年度 FIA 論文賞受賞論文に値するものと認め、選定した。

(FIA 論文賞褒賞委員会)