

## 「過酸化水素の FIA」からの贈り物



東京薬科大学名誉教授

高村 喜代子

今日、臨床検査、環境分析、あるいは食品・化学工業分析など多くの分野で、感度・精度ともに高い過酸化水素定量法が求められている。過酸化水素はその酸化力ゆえに、防腐剤、殺菌剤、消毒剤、漂白剤として広く使用されている。一方、自然・環境問題としては酸性雨の生成過程に過酸化水素が関わるということが指摘され、大気、雨水中の過酸化水素量は大気汚染の指標として重要になった。さらに、種々の生体成分はそれぞれ特定の酸化酵素で酸化されて過酸化水素を生じる。したがって、この過酸化水素を定量することにより、生体成分の量的変化を把握し疾病を診断するのに有用な情報が得られる。このように過酸化水素の定量は極めて重要な課題なのである。

私は東京薬科大学に就任以来、周囲から過酸化水素の定量についての質問を何度か受けるうちに、この問題の重要性を次第に認識するようになった。過酸化水素定量法としては、従来から吸光光度法、蛍光光度法、化学発光法、電気化学法など、さまざまな方法が考案され、それに伴って数多くの試薬も開発されてきた。それならばなんでいまさら新規方法の開発が必要なのだろうか。実はこれまでの方法のほとんどが酸化還元反応に基づいているので、その分析値は試料中に共存する還元性、もしくは酸化性物質の影響を受け易いという難点がある。そのため常に共存物質による妨害に留意して、必要に応じて適宜対策を講じなければならない。それに、たとえ現状では十分と思われる方法が確立されていても、それで万事ことたれりというわ

けにはいかない。世の進歩に伴い、より微量な物質を捉える必要が生じれば、より高感度な計測法が求められる。こうなると従来法の改良だけでは十分対応できるとは限らず、より性能の高い新規定量法の出現が待たれるようになる。したがって、共存物質の問題点をどうやって克服し、感度・精度・信頼性の高い新規定量法を開発するかが、我々の課題となった。

新規開発といっても、検出原理が酸化還元反応にとどまる限り、上述の問題点は解決されない。そこで我々は、発想の転換に挑んだ。すなわち、過酸化水素とチタン  $Ti(IV)$  との金属錯体生成反応に目を付け、従来法とは全く異なる発色機構による過酸化水素の吸光分析法の開発に着手した。 $Ti(IV)$  は過酸化水素との親和性が高く、黄色のペルオクソ  $Ti(IV)$  錯体を生成する。この反応はかつては過酸化水素の検出に利用されていたことを、学生時代の分析実習を通して知っていた。しかしそのモル吸光係数は  $10^2 M^{-1} cm^{-1}$  程度と非常に小さく、微量過酸化水素の定量に利用するにはとうてい及びもつかない。そこでこれに吸光性の大きい有機試薬(Y)を配位子として導入すれば、もっと吸光係数の大きい錯体  $Ti(IV)-Y-H_2O_2$  の生成が期待できる。そうすれば、 $Ti(IV)-Y$  なる錯体は過酸化水素の有用な吸光分析試薬になるはずである。

というわけで、微量過酸化水素の新しい高感度吸光分析試薬の創製を目指して、配位子(Y)として有効な有機試薬をあれこれ探索した。そのうち特に有効性の高いものとしてピリジルアゾ化合物に着目し、 $Ti-PAR$ 、 $Ti-PAPS$  試薬<sup>註)</sup>の誕

生に至った。両試薬とも過酸化水素と安定な赤紫色の  $\text{Ti(IV)-Y-H}_2\text{O}_2$  型錯体を生成し、過酸化水素 1 M あたりの吸光係数はそれぞれ  $3.6 \times 10^4$  および  $5.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  と非常に高感度である。その上、共存物質の影響を受けにくい利点があり、実際に環境・生体試料分析への応用を図ることができた。1980年代のことであった。

これで一旦は当初の目的は遂げられたかの感があった。しかし1990年代になって、科学の進歩に伴いさらなる極微量過酸化水素検出のニーズが高まるようになってきた。そこでもっと強い光吸収能（モル吸光係数十万台）を持つポルフィリン化合物を配位子(Y)とする、超高感度の試薬創製を企てた。ポルフィリンのソーレ帯による強い光吸収能は古くからよく知られるところであったが、水溶性が低いことが分析試薬としてポルフィリンが広く実用されることの障害となっていた。しかし、幸いにもその当時水溶性ポルフィリンの合成が進み、製品の入手が容易になってきた。その一つである 5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)porphyrin (TPyP と略) をとりあげ、Ti-TPyP 試薬を開発した。この試薬は過酸化水素と安定な橙黄色錯体  $\text{Ti(IV)-TPyP-H}_2\text{O}_2$  を生成し、そのモル吸光係数は  $1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  と極めて大きい。こうして Ti-PAR, Ti-PAPS 試薬をさらに上回る高感度試薬が得られた。この試薬についても種々の実試料への応用を広げた。

さて、分析法の実用化となると、できるだけ少量の試料を用いて迅速に分析することが望まれる。そこで、これらの試薬を用いる過酸化水素の検出法を組み込んだフローインジェクション分析法 (FIA) を構築した。これが私の FIA との出会いとなった。たとえば Ti-TPyP 試薬を用いる雨水・河川水中の過酸化水素定量では、注入した検液をミキシングコイル中で試薬と混合して  $\text{Ti(IV)-Y-H}_2\text{O}_2$  錯体を生成させ、フローセルを通過する錯体の吸光度を計測するのである。こうして1時間に40検体の分析が可能とな

り、煩雑な試料の前処理なしに信頼性のある分析結果が得られた。過酸化水素の検出限界は  $0.5 \text{ pmol/assay (S/N = 3)}$  であった。さらにこの FIA 系に固定化酸化酵素カラムを設置することにより、種々の食品・生体成分分析にも応用を広げた。本法は共存物質の影響を受け難いので、血清中グルコースの定量では除蛋白などの前処理を必要とせず高い検出感度が得られた。

2001年に分析化学国際会議 (ICAS) が東京で開催されたとき、”Porphyrins in Analytical Chemistry” Symposium の呼びかけに応じて、「Ti-TPyP 試薬を用いる過酸化水素の FIA」に関する研究成果をまとめて発表した。講演終了後数件の質問を受けたが、最後に後部座席の方が立ち上がり、実験の条件から試薬の入手法にまで亘る詳細な質問をされた。テキサス工科大学の Prof. Dasgupta であった。本会会員には Prof. Dasgupta と懇意な方が多いことを後から知ったが、私にはこれが初対面であった。ICAS の後も何度かメールでの問い合わせが続いた。その中に、有機過酸化物の影響をチェックしたか、というのがあった。すでに我々は、かなり多数の共存物質の影響をチェック済みであった。しかし有機過酸化物に関しては、我々の応用範囲ではさほど問題にする必要がないと思い、ほとんどチェックしていなかった。ただ一つの実施例として、「benzoyl peroxide の妨害は認められず」とだけお答えしておいた。その頃彼は気相中過酸化水素の FIA に我々の Ti-TPyP 試薬を取り入れ、pptv レベルまでの過酸化水素の定量に成功され、その成果を *Anal. Sci.*, **19**, 517 (2003) に報告された。その報文中に、本試薬は過酸化水素にのみ特異的に反応し、methyl hydroperoxide にはまったく反応しないことを確かめた、という記載があった。というのは、methyl hydroperoxide は最も一般的な大気中有機過酸化物とのこと。これまで彼は大気中過酸化水素の定量をペルオキシダーゼ (POD) /蛍光検出法で行っていたため、methyl

hydroperoxide による妨害を除去できず、苦慮されていたそうである。だから過酸化水素にのみ特異的に作用するということは Ti-TPyP 試薬の優れた特徴であると、非常に評価していただいたのである。

ちょうどその頃、私は日本化学会の欧文誌の Accounts 欄に寄稿を依頼されて、Ti-TPyP 試薬に関する総合論文を執筆中であった。そのため過去の資料を見返していたとき、偶然に一枚のゼロックスコピーを見つけた。"Methods of Enzymatic Analysis", 3rd Ed., (1983) の中のあるページである。そこになんと、"POD is specific for the hydrogen acceptor: only H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, methyl- and ethyl peroxide are active."と記載されているではないか。十数年前にこのコピーは私の手許にあったはずなのに、この一行を見落としていたのだろうか。見たとしても、当時その必要性に直面していなかったもので、脳裏に刻み込まれなかったのだろうか。なにはともあれ、共存物質の影響をチェックする際に、この二つの過

酸化物についても行うべきであった。まさに「古きを尋ねて新しきを知る」の名言の重要性を再認識させられた。

そこで Prof. Dasgupta が Ti-TPyP 試薬の有用性を評価し、かつ実用分析への応用範囲を大気試料にまで広げてくださったことに対する謝意を込めて、私の Account (*Bull. Chem. Soc. Jp.*, **76**, 1873 (2003)) 中には "Measurement of Gaseous Hydrogen Peroxide" なる一項目を設けて彼の成果の大要を紹介させてもらった。これをご縁に、その後も Prof. Dasgupta とは懇意にしている。

研究を進めていくと、単に学識・経験が蓄積されるばかりでなく、処々方々で思いがけない人たちとの出会いに遭遇する。学識・経験は頭脳を肥やし、人との交流は心を豊かにする。自分とは異なる視点からの指摘や助言には啓発されることが多い。これは「過酸化水素の FIA」が私に与えてくれた貴重な贈り物と思っている。

---

注) PAR: 4-(2-pyridylazo)resorcinol;

PAPS: 2-[(5-bromo-2-pyridyl)azo]-5-[N-propyl-N<sup>2</sup>(3-sulfopropyl)hydrazino]phenol disodium