

新しい流れ分析システムの開発

—ポルフィリン，自己触媒反応を中心として—

五十嵐 淑郎， 加藤 潤

茨城大学工学部生体分子機能工学科：316-8511 茨城県日立市中成沢町 4-12-1

Development of New Flow Analytical System - As Center on Porphyrin and Autocatalytic Reaction -

Shukuro Igarashi and Jun Kato

Department of Biomolecular Functional Engineering, Faculty of Engineering, Ibaraki University, 4-12-1, Nakanarusawa, Hitachi-shi, Ibaraki 316-8511

In this review, the flow analyses reported up to the present using the unique functions (e.g., spectroscopic characteristics, complex formation, photo-decomposition reaction, etc.) of porphyrin compound, were summarized and discussed. Moreover, the catalytic reaction and the autocatalytic reaction which has “infinite” (in other words, it is “constant”) sensitivity, were theoretically explained from view point of the usefulness in the field of analytical chemistry. Based on these facts, the length-detection flow analytical system and its application to micro-device were especially described as a new flow method.

Keywords FIA, porphyrin, autocatalytic reaction, flow analysis, micro-device, water-soluble porphyrin

1. 序論

分析化学における分析法の開発は、サイエンスを進展させるだけでなく、新しい産業をも生み出すテクノロジーの改革であると言える。これまでの発展してきた過程を歴史的に振り返って見ても高感度、高選択的、特異的、迅速かつ正確な分析法の開発は常に社会的ニーズに対応して要求されてきた。その要求を満たすことのできる分析法の一つとして、汎用性があり多検体をシステムティックに分析できる流れ分析法システムとしてのフローインジェクション分析法 (FIA) がある。一方、超微量物質 (金属イオンや分子) の働きが重大な鍵を握る生命科学や環境科学の分野ではより高い感度と選択性を持つ分析法の開発が以前にも増して強く望まれるようになってきている。高価な計測機器を用いなくとも安価でしかも簡便かつ超高感度な分析法が開発できれば各分野の緊急のニーズに十分容易に対応することが可能である。

本総説では、筆者らのこれまで行なってきた超高感度試薬 “ポルフィリン” を用いた分析法の開発研究¹⁾ から始まり、最近注目されている無限 (定) 感度を持つ自己触媒反応を用いた最新の流れ分析システムの開発までを中心に紹介する。また、極限計測 (1 リットル中の 1 分子計測) を

目指してきた研究過程を流れ分析システムの応用例を示しながらまとめて述べる。

2. 分析試薬としてのポルフィリン

ポルフィリン化合物 (Fig. 1) は、様々な高感度スペクトル特性 (吸光、蛍光、りん光) を有している。

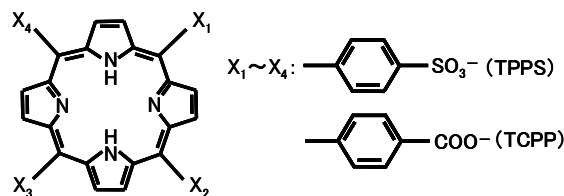


Fig. 1 Structure of water-soluble porphyrins

例えば、吸収スペクトル特性に関して言えば、400 nm 付近に Soret 帯と呼ばれるモル吸光係数 (ϵ) が 50 万にも及ぶ吸収帯を持ち、これを利用する超高感度な分析法の開発が数多く行なわれている¹⁾。モル吸光係数の定義は、光吸収に関する Lambert-Beer の法則 $\log(I_0/I) = \epsilon cl$ における ϵ で表わされ、その単位の次元は長さ (L) と濃度 (M) の関

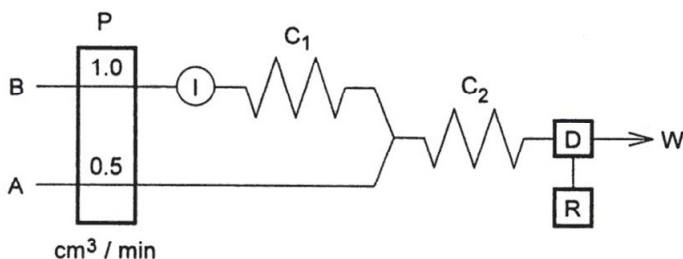


Fig. 2 FIA system for the determination of copper(II) using TPPS⁶⁾
 P: Pump, I: Injector, C₁, C₂: Reaction coil, D: Detector, R: Recorder, W: Waste

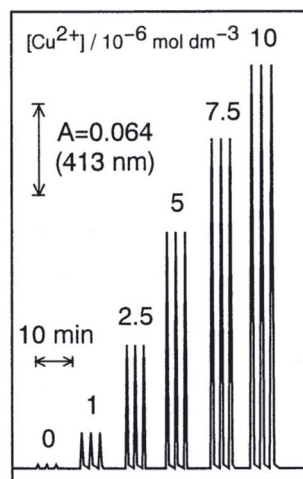


Fig. 3 Flow signals of the FIA

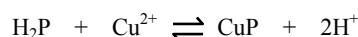
係から L^2M^{-1} であり、発色化学種の面積吸収係数と考えられる。Braude は、半経験的に $\epsilon = 0.87 \times 10^{20} \text{ pka}$ を提示した。ここで、 p は遷移確率、 a は光吸収の有効面積 (cm^2) であり、 $(\pi$ 電子系の長さ) \times (幅 1.5 \AA) で表わされるものとした。 k は所定のエネルギーレベルに電子が存在する割合である。 $p=1, k=1$ と仮定した時、ポルフィリンの π 電子系の有効面積は約 100 \AA^2 であり、理論的には ϵ は $8.7 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ に達する。筆者らの出合ったポルフィリンの中では、亜鉛(II)-TCPP (Fig. 1 の $X_1 \sim X_4$ にカルボキシフェニル基を有するもの) 錯体が、 $\epsilon = 6.78 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ で最大であった。それでは、ポルフィリンを使って金属イオンをどこまで測ることができるのだろうか?

Lambert-Beer の法則を使って計算すると、 A (吸光度) = 0.005、 $\epsilon = 5 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、 $l = 1 \text{ cm}$ では、濃度 $c = 10^{-8} \text{ M}$ となる。原子量 50 の金属イオンに対して $10^{-8} \text{ M} = 0.5 \text{ ppb}$ に相当する。他の光スペクトル特性としては、蛍光に関して、レーザー蛍光分析法²⁾、りん光に関して、ミセルや固相担体を利用する室温りん光分光法³⁾、最近では、ヘミン⁴⁾ やポルフィリン類縁体であるクロロフィル⁵⁾ などの化学発光基質としての機能の発見などがあり、超高感度な分析法の開発は、大きな広がりを見せている。

3. 水溶性ポルフィリンの FIA への応用

3-1. 水溶性ポルフィリン TPPS を用いる血清中の Cu(II) の FIA⁶⁾

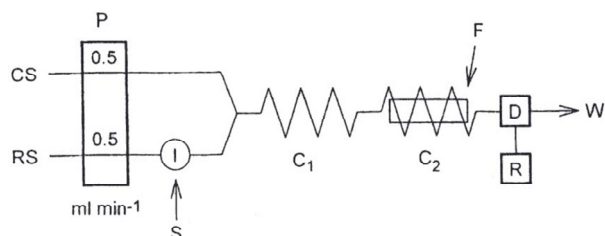
水溶性ポルフィリン (H_2P) と銅(II)イオンとの錯形成反応を利用する典型的な FIA への応用をまず紹介する (Fig. 2)。



ここで、2 本の反応コイルが必要な理由は、1 本目はポルフィリンと銅 (II) イオンとの錯形成反応、2 本目は過剰なポルフィリンを酸性型化学種 (H_4P^{2+}) に変換するものであり、ポルフィリンが金属イオンの分析試薬として報告された最初の吸光光度法のスペクトルシフト法をフローシステムに応用したものである。血清中の銅 (II) イオンの定量に応用された (Fig. 3)。

3-2 水溶性ポルフィリン-金属錯体の機能を生かした FIA

Cd (II)-及び Zn (II)-TPPS 錯体が、それ自身の Soret 帯の光を吸収して光分解する現象が見い出された。この反応機構は、光酸化還元反応に起因すると考えられている。周期律表中の同族の金属イオン (Cd^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+}) にだけ特異的に起こる現象で興味深い。Cd (II)-TPPS 錯体の光分解反応と金属イオン交換反応を利用して、 Co^{2+} の FIA が開発さ



F=fluorescent light (15W)

Fig. 4 FIA system for determination of cobalt(II) by photo-decomposition using Cd(II)-TPPS⁷⁾.

Table 1 FIA methods using porphyrin or metal-porphyrin complex.

Method	Chemical species of porphyrin and reaction systems	Analyte	Determination range	Ref.	
FIA-spectrophotometry	Ti(IV)-TPyP complex	H ₂ O ₂	—	10)	
	Ti(IV)-TPyP complex	glucose, uric acid, galactose	1×10 ⁻⁸ ~ 1×10 ⁻⁵ M	11)	
	Ti(IV)-TPyP complex	oxalate	5×10 ⁻⁷ ~ 2.5×10 ⁻⁴ M	12)	
	TTMAPP	Zn(II), Cd(II), Pb(II)	—	13)	
	Cd(II)-TCMOPP complex	Mn(II)	0.01 ~ 1.75 mg L ⁻¹	14)	
	Cu(II) and TMPyP	ascorbic acid	—	15)	
	Cu(II) and TTMAPP	ascorbic acid	0.1 ~ 1000 µg L ⁻¹	16)	
	Cu(II) and TTMAPP	cysteine	25 ~ 1000 ng L ⁻¹	17)	
	Cd(II)-TPPS complex	Co(II)	1×10 ⁻⁷ ~ 1×10 ⁻⁶ M	6)	
	TPPS	Cu(II)	—	7)	
	TPPS	albumin	0 ~ 20 µg mL ⁻¹	18)	
	HPLC post column FIA-spectrophotometry	Cu(II) and TTMAPP	lanthanides	—	19)
	electrolytic concentration FIA-spectrophotometry	TPPS	Cd(II)	0.45 ~ 10 µg L ⁻¹	20)
cation-exchange separation FIA-spectrophotometry	TMPyP	Pb(II), Cd(II)	0.001 ~ 0.1 mg L ⁻¹	21)	
stopped-flow method	N-CH ₃ TSPP	Cu(II), Zn(II)	—	22)	
	m-Cl-TPPS ₄	Zn(II) Hg(II)	0 ~ 3.0 µg L ⁻¹ 0 ~ 12.0 µg L ⁻¹	23)	
	TPPyP	Pb(II)	—	9)	

TPyP: 5, 10, 15, 20-tetra(4-pyridyl)porphine, TTMAPP: 5, 10, 15, 20-tetrakis(4-N-trimethyl-aminophenyl)porphine, TCMOPP: meso-tetra[4-(carboxymethylenoxy)phenyl]porphine, TMPyP: 5, 10, 15, 20-tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porphine, TPPS: 5, 10, 15, 20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphine

れた (Fig. 4)。試薬とスペクトルが重なる錯体であっても錯体を選択的に残すことができる。これは、流路に余計な試薬を添加せずに光によって試薬ブランクを消去できる点でユニークな流れ分析法である⁷⁾。

この他、Ag(I)₂-TPPS 錯体から銀(I)の脱離反応に伴う Soret 帯スペクトル変化を利用したイオンクロマトグラフィーのポストカラム検出システムが開発され、陰イオン (S²⁻, I⁻) などの多成分同時定量⁸⁾が報告されている。また、ストップフロー法などの 1 秒以内に反応が終了する分光光度法⁹⁾なども開発され、トリプトファンをはじめとする生体試料分析に応用されている。これまでのポルフィリンを用いた流れ分析システムの報告を Table 1 にまとめて示す。

4. 接触分析法

水溶性ポルフィリンを用いる分析法の定量限界は、その高感度なスペクトル特性を利用すると、試料の前段濃縮なしに 10⁻⁹M レベルに達している。さらに、この濃度レベル以下のセンシングの可能性を追求するには、平衡反応より

も速度論的反応を応用することが得策である。

ポルフィリン類縁体の水溶性 Cu(II)-フタロシアニン錯体/過ヨウ素酸ナトリウム系において、錯体の分解反応を速度論的に計測したところ、触媒となる Ru³⁺の濃度は、検出限界が 2×10⁻¹¹M であった (Fig. 5)。これは、室温 5 分で 1

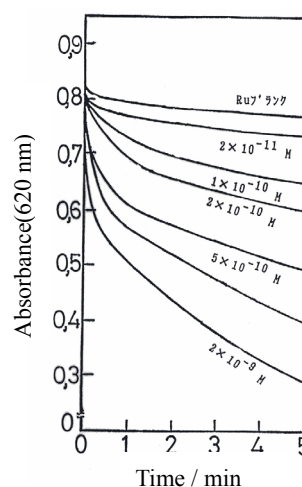


Fig. 5 Absorbance-time curve
[NaIO₄] = 2.5×10⁻² mol dm⁻³, I⁻ 0.3, pH ~ 2.

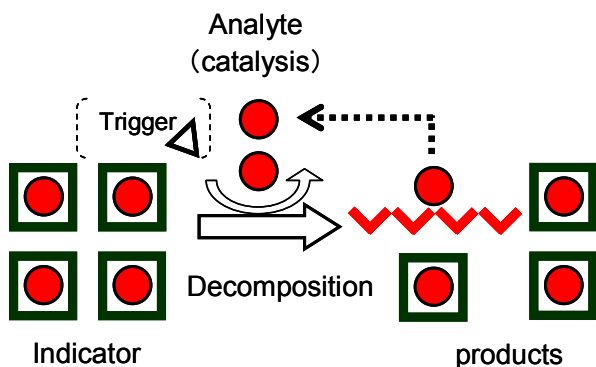


Fig. 6 Autocatalytic reaction

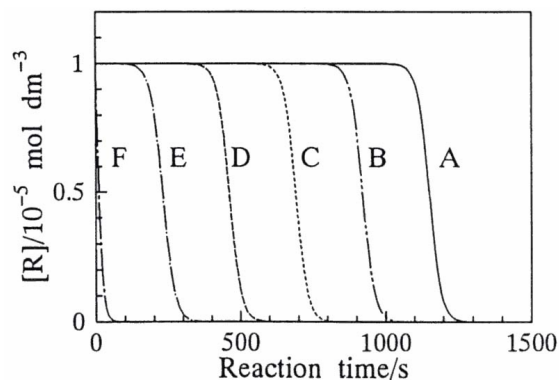


Fig. 7 Computer simulation about concentration of indicator [R]-time curve
 $[C_0] = \text{A) } 10^{-30}, \text{ B) } 10^{-25}, \text{ C) } 10^{-20}, \text{ D) } 10^{-15}, \text{ E) } 10^{-10}, \text{ F) } 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.

個の Ru^{3+} が 5000 分子のフタロシアニン錯体を分解したことに相当する²⁴⁾。この例からも分かるように、特異的かつターナーオーバーの大きい化学増幅系を探索することは重要である。手嶋・酒井の総説²⁵⁾では、多くの接触分析法が FIA へ応用された例が紹介されている。一方で、ポルフィリンの接触反応を FIA に応用した例は、未だ十分にはなされていない。通常の接触分析と FIA との相性を考えると今後、ポルフィリンの接触分析法は超微量 FIA の有力分析システムとなるであろう。

5. 自己触媒反応と長さ計測による FIA の開発

Ishihara らは、接触分析法の開発を進める過程で、水溶性 Co(II) -フタロシアニン錯体が微量の Co(II) を触媒として分解される自己触媒反応を見出した²⁶⁾。“自己触媒反応”とは、「反応を速める物質(触媒)をねずみ算式に作り出してどんどん反応を加速し、ある一定時間後一気に反応を終わらせてしまう反応」のことをいう(Fig. 6)。接触分析法が単に指示薬が触媒を介して分解されるだけの反応を利用しているのに対して、自己触媒反応は指示薬の分解に対応して触媒が増殖する反応であり、指示薬濃度-時間曲線は誘導期間を有する特徴的な S 字曲線を示す。したがって、指示薬の半減期または誘導期間を測定することで、分析対象物である最初に添加された触媒の濃度を分析することができる。

自己触媒反応系の S 字曲線は、触媒に対し原理上は無限(定)感度を持つ。これは、誘導期間が異なるだけで S 字曲線の形状には変化がなく、いかなる低濃度でも濃度によらず一定の信号強度で検出し、分析対象の触媒濃度を時間に変換できることを意味している。Ishihara は、指示薬濃度 [R]-時間曲線についての計算機シミュレーションを行ない、

その結果、理論上(速度定数 $k=5000 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ 、指示薬濃度 $=1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ とする)では、20 分間で触媒となる金属イオンを 10^{-30} M まで測定できることが示された(Fig. 7)²⁶⁾。

自己触媒反応を利用した計測法は、遠藤の総説²⁷⁾にまとめられている。最近では、臭素酸カリウムによる水溶性銅-フタロシアニン錯体の酸化分解反応が見い出されており、この自己触媒反応²⁸⁾では 10^{-14} M レベルのルテニウムイオンが定量された。また、これまでは簡易分析法の視点から自己触媒反応系は、人間の目とストップウォッチによる超微量な触媒計測が行なわれてきた²⁹⁾。例として、亜硫酸塩/過酸化水素/HRP (ホースラディッシュペルオキシターゼ)

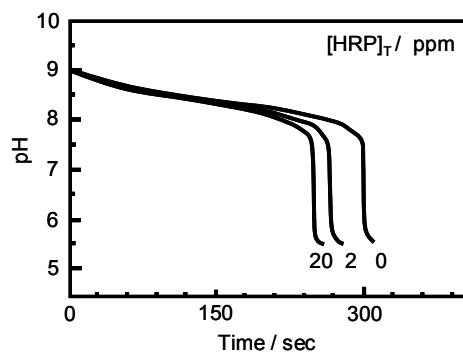
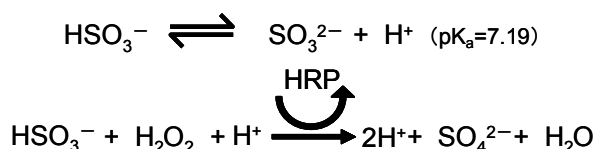


Fig. 8 pH-time curve²⁹⁾

$[\text{Na}_2\text{SO}_3]_T = 5 \text{ mM}, [\text{H}_2\text{O}_2]_T = 26.4 \text{ mM}, 25^\circ\text{C}$.

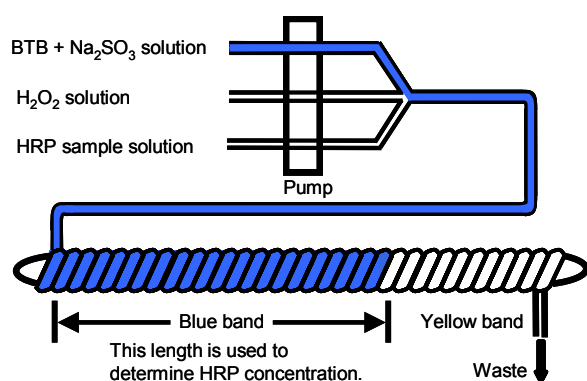


Fig. 9 CoBRA (Color Band Length-detection flow³⁰ Analytical) system

系を述べる。

得られた pH-時間曲線を Fig. 8 に示す。反応開始から pH が大きく変化するまでの時間を測定することにより、この自己触媒反応のトリガー（引き金物質）としての機能をもつ HRP を定量することができる。もちろん、pH の変化はプロモチモールブルーなどの pH 指示薬を用いて目視で判定することができる。

最近、筆者らは、流速が一定な FIA を利用すると時間計測による濃度定量が、距離の計測によるものに変換できることを着想した。原理は、速さ×時間＝距離（ハ・ジ・キの法則）である。開発した FIA は（CoBRA：Color Band Length-detection flow Analytical）システムと命名した（Fig. 9）³⁰。具体的には、亜硫酸ナトリウム／過酸化水素自己触媒反応系をモデル反応として、反応溶液を各流路にポンプで流して混合し、ガラス棒に PFA(Tetra fluoro ethylene-perfluoro alkylvinyl ether copolymer)チューブを巻きつけた攪拌コイルの中に通した。その結果、混合溶液の色が、攪拌コイルの任意の長さの場所を境に、青色バンドと黄色バンドに分かれた。また、これらの溶液とともに HRP 溶液を流すと、その濃度の増加とともにガラス棒上の青色バンドの長さが短縮された。この青色バンドの長さを“モノサシ”で測定することで“目視とモノサシ”により HRP 濃度が定量できた。本法ではただ単に一個のサンプルの濃度を測定することが可能だけでなく、そのサンプルの濃度変化をリアルタイムに追跡できた（Fig. 10）。1 時間に 30 検体の計測ができる。HRP の定量範囲は、1ppm～50ppm である。また、この流れ分析法は、金属イオンのトリガー(反応の引き金物質)である 10^{-9} M レベルの Ni (II) の定量にも応用された³¹。

さらに、現在、長さ計測-マイクロフローデバイス検出器としての開発³²が行なわれている。

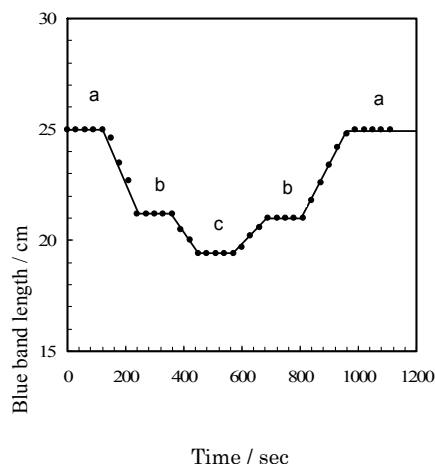


Fig. 10 Variation in color band length based on the change in HRP concentration
a ~ c: [HRP]₀ = 0, 1, 2 ppm.

6. おわりに

本稿では、ポルフィリンのセンシング試薬としての機能（分光学特性、反応特性）から始まり、微量定量ができる流れ分析システムをいくつかまとめて述べた。これらの中で、自己触媒反応に基づく分析法は、極限計測が狙える数少ない化学計測法であることを強調しておきたい。このコンセプトを持つ反応は、今後数多く見出される可能性があり、有用な新しい流れ分析システムへと応用されることが期待される。

本稿の執筆の機会を賜りました酒井忠雄 FIA 委員長、今任稔彦編集委員長に感謝いたします。

参考文献

- 1) 五十嵐淑郎：分析化学(*Bunseki Kagaku*), **46**,1(1997).
- 2) 五十嵐淑郎：ぶんせき(*Bunseki*), 190(1989).
- 3) S.Igarashi, K.Endo： *Anal.Chim.Acta*, **320**, 133(1996).
- 4) T.Nagoshi,O.Ohno,T.Kotake,S.Igarashi： *Luminescence*, **20**, 401(2005).
- 5) T.Nagoshi, S.Igarashi： *Chem.Lett.*, **34**, 22(2005).
- 6) 足立弘明、五十嵐淑郎、四ッ柳隆夫：分析化学(*Bunseki Kagaku*), **44**, 797(1995).
- 7) S.Igarashi, T.Aihara, T.Yotuyanagi： *Anal.Chim.Acta*, **323**, 63(1996).
- 8) T.Takahata, S. Igarashi： *Chem.Pharm.Bull.*, **44**, 226(1996).
- 9) K.Kawamura, S.Igarashi, T.Yotuyanagi： *Microchim. Acta*, **157**, 87(2007).
- 10) K.Takamura, C. Matsubara： *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **76**, 1873(2003).
- 11) 高村喜代子、中道典宏、松原チヨ：分析化学(*Bunseki*

- Kagaku*, **53**, 315(2004).
- 12) C. Matsubara, Y. Yokoi, M. Tsuji, K. Takamura : *Anal. Sci.*, **11**, 245(1995).
- 13) Y. Li, J. Hu, J. Yang, B. Zheng, Y. Ha : *Anal. Chim. Acta*, **461**, 181(2002).
- 14) H. Chen, D. Wei, T. An, Y. Fang : *Anal. Lett.*, **32**, 787(1999).
- 15) M. Tabata, M. Morita : *Talanta*, **44**, 151(1997).
- 16) J. Liu, J. Ito : *Spectrochim. Acta Part A*, **67**, 455(2006).
- 17) J. Liu, J. Ito : *Talanta*, **70**, 791(2006).
- 18) S. Igarashi, K. Takahata, J. Nakamura, T. Sudo : *Bunseki Kagaku* **46**, 995(1997).
- 19) J. Ito, J. Liu, M. Komata : *Talanta*, **69**, 61(2006).
- 20) 伊藤正司, 板垣昌幸, 渡辺邦洋 : 分析化学(*Bunseki Kagaku*), **52**, 873(2003).
- 21) 山根兵, 土本武文, 吉川裕泰 : 分析化学(*Bunseki Kagaku*), **53**, 297(2004).
- 22) S. Funahashi, Y. Ito, H. Kakito, M. Inamo, Y. Hamada, M. Tanaka : *Microchim. acta*, **88**, 33(1986).
- 23) X.-J. Peng, Q.-K. Mao, J.-K. Cheng : *Fresen. J. Anal. Chem.*, **348**, 644(1994).
- 24) 石原正仁, 五十嵐淑郎, 四ッ柳隆夫 : 日本分析化学会第39年会講演要旨集, p.238(1990).
- 25) 手嶋紀雄, 酒井忠雄 : *ぶんせき*(*Bunseki*), 215(2006).
- 26) M. Ishihara, M. Endo, S. Igarashi, T. Yotuyanagi : *Chem. Lett.*, **1995**, 349.
- 27) 遠藤昌敏 : *ぶんせき*(*Bunseki*), 588(1999).
- 28) J. Kato, O. Ohno, S. Igarashi : *Anal. Sci.*, **21**, 705(2005).
- 29) A. Manaka, S. Igarashi : *Anal. Lett.*, **36**, 135(2003).
- 30) J. Kato, S. Igarashi : *Anal. Lett.*, **38**, 2431(2005).
- 31) J. Kato, S. Igarashi : *Anal. Chim. Acta*, **590**, 245(2007).
- 32) J. Kato, S. Igarashi : *Mikrochim. Acta*, in press(2007).

