

# 膜透過装置を備えたフローインジェクション法による過酸化水素定量の基礎検討とグルコース定量への応用

大島光子, 真田昌宏, 本水昌二

岡山大学理学部 〒700 岡山市津島中3-1-1

---

A Fundamental Study on the Spectrophotometric Determination of Hydrogen Peroxide by Membrane Permeation/ Flow Injection Analysis and Its Application to Glucose Determination

Mitsuko OSHIMA, Masahiro SANADA and Shoji MOTOMIZU

Faculty of Science, Okayama University, 3-1-1 Tsushimanaka, Okayama 700

The permeation unit designed by us was incorporated with a flow injection spectrophotometric system. Hydrogen peroxide was determined by using membrane permeation of iodine which was generated by oxidation of iodide with hydrogen peroxide. Iron(II) accelerated the generation of iodine. Iodine permeated reacted with N,N-diethyl-p-phenylenediamine to form red purple product. Absorbances of the product were measured at 550nm. A calibration graph was rectilinear up to  $4 \times 10^{-5}$ M. This method was applied to the determination of D-glucose using the flow system coupled with an immobilized enzyme column. By the addition of 5ppm of glucose in the buffer solution stream, a calibration graph was rectilinear from 0 to 20ppm, and the detection limit was 0.6ppm of glucose.

## 1. 緒言

医学, 薬学, 生化学などの分野において, 臨床検査, 食品分析などで糖をはじめとする生体成分, 代謝成分の正確で, 迅速かつ簡便な分析方法の開発が望まれている。これらの分野では, 酵素を用いる分析法が, その基質特異性による高い選択性のため広く利用されてきた。なかでも酸化酵素によって生成する過酸化水素を定量する方法が反応性が高いことから注目されている。

一方, 気体状物質定量法として多孔質PTFE (polytetrafluoroethylene) 膜をガス透過させる方法があり, これまでにアンモニア<sup>1</sup>, 二酸化炭素<sup>2</sup>, ハロゲン<sup>3</sup>などについての報告がある。最近著者らは膜透過を利用した残留塩素定量FIAを報告した<sup>4</sup>。本研究はこの方法を過酸化水素定量に応用したものである。まず過酸化水素によるヨウ化物イオンの酸化を検討し, 発生したヨウ素を膜透過させ, 指示薬としてN,N-ジエチル-p-フェニレンジアミンを用い吸光検出するフロー系について検討した。その結果, ヨウ素生成反応は鉄(II)イオンによりかなり促進されることが分かった。またこのフロー系に固定化酵素カラムを組み込み, グルコースの定量に応用したところ, 良好な結果を得ることができた。

## 2. 実験

### 2.1 試薬

#### 2.1.1 過酸化水素定量

過酸化水素標準溶液：30%過酸化水素水（特級，和光純薬製）を水で希釈して用いた。正確な濃度は過マンガン酸カリウム滴定法により決定した。

試薬溶液RS<sub>1</sub>：0.1Mヨウ化カリウム（特級，和光純薬製）水溶液10mlと0.001M硫酸10mlを混合し全量を100mlとした。

試薬溶液RS<sub>1</sub>'：試薬溶液RS<sub>1</sub>に硫酸第一鉄アンモニウム・6水和物（特級，和光純薬製）0.0392gを加えた。この溶液は24時間は安定である。

試薬溶液RS<sub>2</sub>：N,N-ジエチル-p-フェニレンジアミン(DPD) 硫酸塩（特級，和光純薬製）0.0656gと0.1M硫酸0.5mlを混合して全量100mlとし，貯蔵液とした。使用時に10倍に希釈し，試薬溶液RS<sub>2</sub>とした。この貯蔵液は比較的不安定なので，使用日毎に調製するのが好ましい。

#### 2.1.2 グルコース定量

グルコース標準液：無水D-グルコース（特級，和光純薬製）を必要量はかり取り，超純水に溶かし5000mg/l（5000ppm）溶液とした。使用時に，正確に希釈して使用した。

緩衝液：グッド緩衝液（pH 7.0，1mM）を用いた。HEPES（N-Hydroxyethylpyperazine-N'-2-ethanesulfonic acid）（同仁化学製）11.92gを水酸化ナトリウム水溶液でpH 7.0に調整したのち，水を加えて500mlとした。

試薬溶液I：2.1.1の試薬溶液RS<sub>1</sub>'に同じ。

試薬溶液II：2.1.1の試薬溶液RS<sub>2</sub>に同じ。

キャリアー溶液：超純水（MilliQ Labで精製した比抵抗18.1MΩcm<sup>-1</sup>程度の水）を用いた。グルコースオキシターゼ（GOD）：グルコースオキシターゼ（E.C.1.1.3.4，ナガセ生化学製NK-106(5)，100x10<sup>4</sup>単位/g）を用いた。

アミノプロピルガラスビーズ：Electro-Nucleonics社製，CPG 1400，200~400メッシュを用いた。

グルタルアルデヒド：イーストマンコダック社製を用いた。25%溶液とし，褐色瓶に入れ，冷蔵庫に保存した。

その他の試薬は全て試薬特級品を用いた。

### 2.2 装置

#### 2.2.1 固定化酵素カラムの調製法

1gのアミノプロピルガラスビーズに2.5%グルタルアルデヒド溶液100mlを加えて，60分間緩やかに振盪する。これをガラスフィルターを用いて濾別し，水で十分に洗浄する。これに100mg GODを10mlの0.1Mリン酸緩衝液（pH7.0）に溶かしたもの

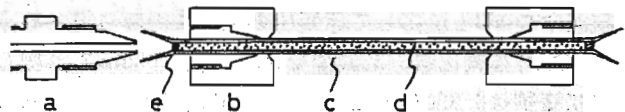


Fig.1 Immobilized reactor

a, PTFE joint plug; b, PTFE screw nut; c, PTFE tubing(0.8mm i.d.x70mm); d, immobilized enzyme; e, absorbent cotton.

を加え、室温で4時間緩やかに振盪する。その後同様にして濾別、十分に洗浄したものに、50mgのL-リジン塩酸塩を含む100mlの0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0) を加えて4℃で一夜静置のち、同様にして洗浄した。固定化酵素ガラスビーズは100mlの0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) 中に4℃で保存した。調製した固定化グルコースオキシダーゼは、この保存状態で少なくとも1年間は失活もなく安定であった。カラムは内径0.8mm、長さ70mmのPTFEチューブの一端に脱脂綿を詰め、他端より固定化酵素ガラスビーズを分散したリン酸緩衝液を注射器で圧入して充填した後、脱脂綿を詰めて固定した。これにグッド緩衝液を満たし、4℃で保存した。Fig. 1にカラムの構造を示す。

## 2.2.2 ガス透過装置

Fig. 2に用いた透過装置の構造を示す<sup>4</sup>。ガス透過膜としてジャパングアテックス社製の外径1.8mm、内径1.0mm、pore size 2.0 $\mu$ m、空孔率50%のチューブを使用した。ジョイント部はできるだけデッドボリュームを減らすように工夫されており、接着剤は全く使用していない。

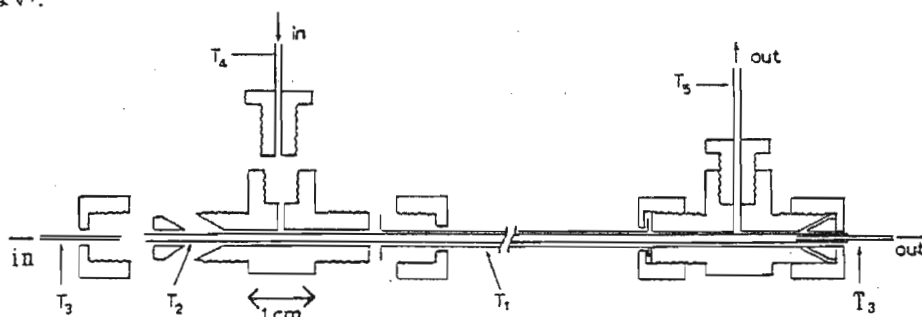


Fig. 2. Membrane permeation unit

T<sub>1</sub>, PTFE tubing(2.0mm i.d.); T<sub>2</sub>: Porous PTFE tubing (GORE-TEX<sup>®</sup> TA001, 1.0mm i.d., 1.8mm o.d., pore size 2.0 $\mu$ m, porosity 50%); T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub>, PTFE tubing(0.5mm i.d.); T<sub>5</sub>: PTFE tubing(1.0mm i.d.).

## 2.2.3 流路

過酸化水素定量用流路. ポンプはサヌキ工業製ダブルプランジャー型マイクロポンプ (DM2M-1024型) とシングルプランジャー型マイクロポンプ (1P-2M型) を用いた。過酸化水素を含む試料水を六方注入バルブによりキャリアー流れに注入し、試薬溶液RS<sub>1</sub>または試薬溶液RS<sub>1</sub>'の流れと合流させる。この合流した溶液をヨウ素発生液とする。発生したヨウ素はガス透過膜を選択的に透過し、吸収液である試薬溶液RS<sub>2</sub>に吸収され、ただちに吸収液中のDPDと反応して赤紫色を呈し検出部に導かれる。吸光度の測定には相馬光学製波長可変可視検出器S-3250型を用い、波長550nmで計測した。流量は発生液側は0.8ml/min、吸収液側は0.35ml/minで行った。流路の概略図をFig. 3に示す。

グルコース定量用流路. ダブルプランジャー型マイクロポンプ2台を用いた。グルコースを含む試料水をキャリアー流れに注入し緩衝液と合流させ、固定化酵素カラムに導く。発生した過酸化水素を試薬溶液Iの流れと合流させる。この合流した溶液をヨウ素発生液とする。以後は過酸化水素定量系と同じである。なお流量は発生液側は0.9ml/min、吸収液側は0.35ml/minで行った。流路の概略図をFig. 4に示す。

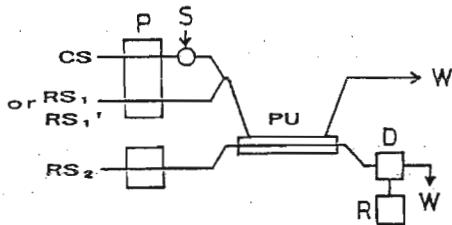


Fig. 3

Fig. 3 Schematic diagram for  $H_2O_2$  determination

CS,  $H_2O$ ;  $RS_1$ ,  $10^{-2}M$  KI +  $10^{-4}M$   $H_2SO_4$ ;  $RS_1'$ ,  $10^{-2}M$  KI +  $10^{-4}M$   $H_2SO_4$  +  $10^{-3}M$   $Fe^{2+}$ ;  $RS_2$ ,  $5 \times 10^{-4}M$  DPD +  $10^{-4}M$   $H_2SO_4$ ; P, pump; S, sample injection; PU, permeation unit; D, detector (550 nm); R, recorder; W, waste.

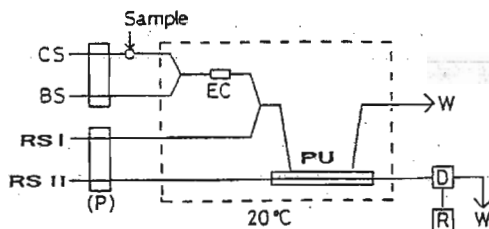


Fig. 4

Fig. 4 Schematic diagram for glucose determination

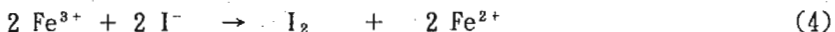
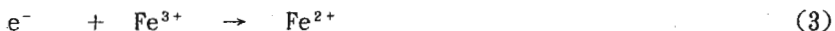
CS,  $H_2O$ ; BS,  $10^{-4}M$  HEPES; EC, immobilized enzyme column (glucose oxidase); PU, permeation unit;  $RS_I$ ,  $10^{-2}M$  KI +  $5 \times 10^{-4}M$   $H_2SO_4$  +  $10^{-3}M$   $Fe^{2+}$ ;  $RS_{II}$ ,  $5 \times 10^{-4}M$  DPD +  $10^{-4}M$   $H_2SO_4$ ; P, pump; D, detector; R, recorder; W, waste.

### 3. 結果及び考察

#### 3.1 過酸化水素定量

##### 3.1.1 ヨウ素発生液中の鉄(II)の効果

既報<sup>4</sup>の残留塩素定量の際、酸化剤である過マンガン酸カリウムの濃度によっては、塩素よりもヨウ素の方が高いピークを与えた。また、GOD固定化酵素カラムを用いるビンドシェドラーグリーンの変色を利用する過酸化水素定量FIAでは、 $Fe(II)$ の増感効果が著しいことが分かっている<sup>5</sup>。そこで本研究でも感度の向上を目的として $Fe(II)$ の効果を検討した。 $Fe(II)$ が共存する場合としない場合とについて、バッチ法でヨウ素自身の吸光度(450nm)の時間変化を調べた結果をFig. 5に示す。 $Fe(II)$ を加えた場合の吸光度は加えない場合の約30倍になった。これは以下の反応が起こっているためと思われる。



最初に $Fe(II)$ と過酸化水素が反応し、OHラジカルと $Fe(III)$ が生じる。発生したOHラジカルの反応性は非常に高いため、直ちに(2)の反応が起こり、ヨウ素生成が促進されるものと思われる。また $Fe(III)$ によるヨウ素の酸化(4)も起こり、ヨウ素生成反応が加速されるものと思われる。なお、予想以上に吸光度が上昇した原因としては溶液内に存在している酸素がなんらかの影響を与えているものと考えている。本法ではヨウ素によるDPDの呈色変化を利用しており、さらに高感度になることが期待できる。

次に $Fe(II)$ の濃度の影響について、その濃度を $10^{-5}M$ から $10^{-3}M$ まで変化させて調べた。 $Fe(II)$ の濃度が増すにつれて吸光度は増加し、 $5 \times 10^{-4}M$ 以上で一定になった。従ってFIAでの試薬溶液 $RS_1'$ 中の $Fe(II)$ 濃度は $10^{-3}M$ とした。

##### 3.1.2 KI濃度の影響

バッチ法でKI濃度を変えて3.1.1と同じくヨウ素の吸光度の時間変化を測定したところ、

$5 \times 10^{-3} \text{M}$ から $10^{-1} \text{M}$ の範囲では吸光度に変化はなかった。FIAでの試薬溶液RS<sub>2</sub>中のKI濃度は $10^{-2} \text{M}$ とした。

### 3.1.3 検量線

以上の検討結果を考慮し、Fig. 2の流路系で検量線を作成した。過酸化水素濃度0~ $4 \times 10^{-5} \text{M}$ の範囲で良い直線関係が得られた。試薬溶液にFe(II)を加えることにより、また検出器の吸光度レンジの切り替えにより、感度はFe(II)を加えない場合の200倍になった。

### 3.2 グルコース定量への応用

前述のように $10^{-5} \text{M}$ オーダーの過酸化水素定量が可能になったので、この系にさらに固定化酵素リアクターを組み込み、Fig. 4に示す流路でグルコースの定量を行なった。検討した諸条件について以下に述べる。

#### 3.2.1 透過膜の長さの影響

Fig. 6に透過膜の長さを10cm~30cmまで変化させたときの影響を示す。透過膜の長さが短いほど測定時間は短くなり、試料の分散も押さえられるが、膜透過するヨウ素の量が減りピーク高が非常に小さくなった。感度と測定時間を考慮し透過膜長は30cmとした。

#### 3.2.2 反応コイル長の影響

固定化酵素カラムと試薬溶液Iとの合流部からガス拡散装置までを反応コイルとし、その長さを2mまで変えて検討した。その結果コイル長が長くなるほど測定時間が長くなり、試料の分散が生じてピークがブロードになった。反応、混合は非常に短時間で終結しており、むしろ反応コイルは短い方がよいことが分かったので、最短の4cmにした。

#### 3.2.3 試料注入量の影響

試料注入量を50~300 $\mu\text{l}$ まで変化させた場合、試料量が多いとピーク高は高くなるが、ピークがブロードになり測定に時間がかかるため、測定時間との兼ね合いより試料注入量は100 $\mu\text{l}$ とした。

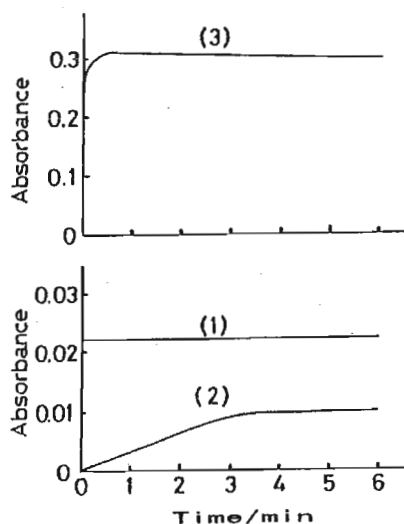


Fig.5 Effect of iron(II) on the formation of iodine  
 $\lambda \text{I}_2$ , 450nm; (1) $10^{-2} \text{M}$  KI+ $10^{-4} \text{M}$  I<sub>2</sub>; (2) $10^{-2} \text{M}$  KI+ $10^{-4} \text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; (3) $10^{-2} \text{M}$  KI+ $10^{-4} \text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ $10^{-3} \text{M}$  Fe<sup>2+</sup>.

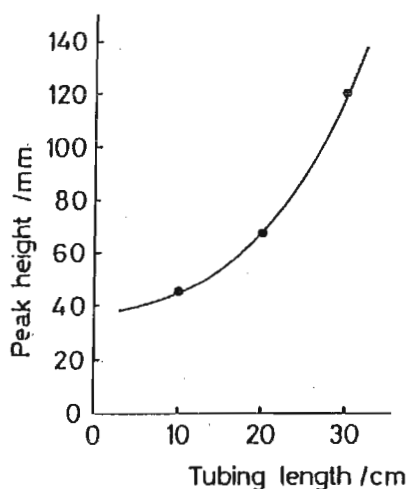


Fig.6 Effect of the length of permeation tubing  
 Glucose, 40ppm;  $\lambda$ , 550nm; sample size, 100 $\mu\text{l}$ .

Table 1 Effect of foreign ions

Ions	Added as	Concn. /mM	Recovery/%
none	-	1	100
Ca <sup>2+</sup>	CaCl <sub>2</sub>	1	97
Mg <sup>2+</sup>	MgCl <sub>2</sub>	1	104
Fe <sup>3+</sup>	FeNH <sub>4</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1	38
		0.1	75
Cl <sup>-</sup>	NaCl	1	99
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NaNO <sub>3</sub>	1	95
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NaHCO <sub>3</sub>	1	62
		0.1	87
SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	1	75
		0.1	83

Glucose: 10ppm, peak height 47.5±0.2mm.

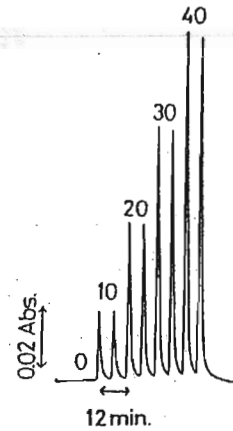


Fig.7 Flow signals for glucose  
Sample: glucose/ppm; λ, 550nm;  
sample size, 100μl.

### 3.2.4 共存イオンの影響

Table 1に共存イオンの影響について調べた結果を示す。Fe(III)、亜硫酸イオン、炭酸水素イオンが存在すると負の妨害を与える。例えば血清などにはFe(III)は約 $10^{-5}$ M程度含まれているが、本法は感度が高く、試料を約100倍に希釈するため、実際試料の測定には影響しないと思われる。

### 3.2.5 検量線

これまでの検討によって得られた条件下でグルコースの定量を行なった。Fig. 7にフローシグナル例を示す。検量線は0~10ppmの範囲においてわずかにカーブする傾向がみられるが、40ppmまで直線となった。低濃度でのカーブをなくすために様々な検討を行なったところ、あらかじめ緩衝溶液内に5ppm相当のグルコースを加えることにより、0~20ppmの範囲でも良好な直線性を示すことが分かった。本法でのグルコースの検出下限 (S/N=3) は0.6ppmであった。

本研究は過酸化水素及びグルコース定量の測定時間の短縮、感度の向上を目的としほぼ満足できる結果を得ることができた。本法は実際試料として血清中のグルコース定量に応用できると思われる。さらに固定化する酵素の種類を変えることにより他の糖類などの定量が可能であり、応用範囲は広いと思われる。

グルコース定量法の固定化酵素カラム製作に当たり、林原生物研究所秋庭正典氏に試薬の供与ならびに技術を教授していただきました。またガス透過膜として用いたゴアテック スチューブを供与いただきましたジャパンゴアテックス社に感謝の意を表します。

### 参考文献

- 1) T. Kuwaki, M. Akiba, M. Oshima and S. Motomizu, *Bunseki Kagaku*, **36**, T81(1987).
- 2) S. Motomizu, K. Tōei, T. Kuwaki and M. Oshima, *Anal. Chem.*, **59**, 2930(1987).
- 3) T. Aoki and M. Munemori, *Anal. Chem.*, **55**, 209(1983).
- 4) S. Motomizu and T. Yoden, *Anal. Chim. Acta*, **261**, 461(1992).
- 5) M. Akiba, S. Motomizu and K. Tōei, *Bunseki Kagaku*, **36**, 561(1987).