

過酸化水素のルミノール化学発光検出における 酸化剤の比較とpH値の影響

蒲生 啓司 ・ 松本 瑞恵
(教育学部 化学教室)

Comparison of Potassium Ferricyanide with Hemoglobin as a Oxidizing Reagent and Effect of pH Value in Luminol Chemiluminescence Detection of Hydrogen Peroxide

Keiji GAMOH and Mizue MATSUMOTO
Laboratory of Chemistry, Faculty of Education

Abstract:Effect of oxidizing reagents and pH values in luminol chemiluminescence detection of hydrogen peroxide have been investigated at the flow injection system. Chemiluminescence intensity depends on the pH value of each eluent and reaction solution (luminol solution), and the species of oxidizing reagents. Potassium ferricyanide was compared with hemoglobin as a oxidizing reagent at the same luminol chemiluminescence conditions. Phosphate buffers were used as eluents. When the hemo was used as a ox reagent optimization for the determination of hydrogen peroxide (0.1mM) was performed according to the pH value (pH 10.5) of luminol solution. On the other hand when the fero was used as a ox reagent chemi-lumi of 0.1uM of hydrogen peroxide was optimized by pH 11.5 of luminol solution. These results showed chemilumi intensity was varied by the species of ox reagent when the different concentration of hydrogen peroxide. We may have to choose the species of ox reagents according to the concentration of hydrogen peroxide.

キーワード：過酸化水素 ルミノール化学発光 酸化剤 ヘモグロビン フェリシアン化カリウム

緒 言

老化や病気の原因として、活性酸素が大きくクローズアップされている。活性酸素とはどのようなものなのか、それが何ゆえ老化をもたらし、発ガンに至る成人病を引き起こす原因といわれるのか、この点について明快な答は今のところない。少なくとも我々動物は、酸素存在下に生かされているわけであるから、酸素が原因で病気になってしまうことは十分予想できる。活性酸素とは、スーパーオキシドアニオンラジカル、ヒドロキシラジカル、過酸化水素、及び一重項酸素を指すが、これらと発ガン等の病気との係りを研究する上では、何よりもそれらの存在、及びその量の証明が必要であり、これまで数多くの報告がなされてきた。従って、これら化学種の計測が重要な役割を担ってきたことは言うまでもない。

著者等は、これまで不安定化学種の微量分析法の開発を進めてきたが、既にヒドロキシラジカルの間接的定量法を報告した¹⁾。この方法は、段階的化学反应を伴う吸光光度法に基づく検出法であるため、最適化の係わるパラメータが数種存在する。本研究では、過酸化水素に着目し、間接的定量法の一つであるルミノール化学発光法について検討した。

ルミノール (5-アミノ-2,3-ジヒドロ-1,4-フタラジンジオン) は、化学発光物質としてよく知られた化合物であり、その発光のメカニズムについても古くから研究されてきた。発光は、種々の物質によって触媒され、その反応機構は、それぞれの反応条件で異なっており複雑である。即ち、アルカリ性条件下の酸素又は過酸化水素の存在下で、活性化剤により酸化されてアミノフタル酸ジアニオンの励起状態を生じ、それが基底状態に遷移する過程で発光するといわれている。この際、中間体と考えられるジアザキノンは、Gundermannによって合成されたが、塩基性下の過酸化水素で発光することが確認されている²⁾。

このように、ルミノール発光は過酸化水素の測定のために古くから知られている反応であるが、反応のメカニズムが複雑であること、発光強度のバラツキが大きい等、極微量の定量分析のレベルでは、解決すべき問題を数多く残している。そのことは同時に、反応に係わる要因が多岐にわたっていることを意味する。過酸化水素という不安定化学種を計測しなければならないという問題の他に、発光(強度の変動)に対応する装置側の問題、及びその持続性に及ぼすマトリクス全体の要因として、溶媒の種類、pH、塩濃度、更には容器の材質等が考えられ、一方反応に係わる試剤側の直接の要因として、活性化剤の種類及びその濃度、調節時のpH等が考えられる。先のヒドロキシラジカル(過酸化水素から生成する)自身もルミノールを酸化して、それを発光に導くということも報告されている³⁾ことは、過酸化水素の定量に影響を及ぼす可能性がある。

本研究では、活性化剤(酸化補助剤ともいう)に注目し、用いる活性化剤の種類に応じて、発光強度がどのように変化するかを正確に比較することを目的とした。即ち、活性化剤としてはいずれも汎用的に用いられているヘモグロビンとフェリシアン化カリウムを選び、微量の過酸化水素に対して、フローインジェクションシステムを用いることによる、反応試薬とのミキシングの効率の問題が存在するので、その点も考慮に入れながら反応システムを構築した。

実験方法

1. 試薬、測定機器及び測定条件

フェリシアン化カリウム、ルミノール、リン酸二水素ナトリウム及びリン酸水素二ナトリウムは和光純薬工業製特級を、牛ヘモグロビンはシグマ製を、過酸化水素(濃度30%)は三菱瓦斯化学製特級を用いた。

本研究で用いた測定機種は、送液ポンプ(資生堂製NASOSPACE SI-1, 日立製L1700形ポンプ)、カラムオープン(資生堂製NASOSPACE SI-1)、化学発光検出機(相馬光学製S3400)、及びデータ処理装置(島津製作所製クロマトバックC-R4A)である。溶離液の流量は $200 \mu\text{l}/\text{min}$ に設定し、カラム温度 40°C で分析を行った。

2. 測定原理及び方法

過酸化水素定量のための測定原理として、ルミノールを発光物質とする化学発光法を用いた。先にも述べたように、ルミノールの化学発光反応はプロトン性及び非プロトン性溶媒の両方で、ルミノールが酸化され、生成物アミノフタレートイオンが発光種となる(Fig.1)。

プロトン性溶媒中では、反応は強い塩基、分子状酸素か、過酸化物、そして酸化剤が必要である。ここでは、ルミノール酸化反応の化学発光量子収率が、活性化剤とpHにどのように依存するのかを検討した。

実験の手順として、反応液としてルミノールとヘモグロビン、又はルミノールとフェリシアン化カリウムを0.02Mリン酸水素二ナトリウム水溶液で溶解したものをを用いる。溶離液を0.1Mリン酸二水素ナトリウム水溶液として、過酸化水素を含む試料溶液をシステムに注入し、得られるクロマトグラムからピーク面積を算出した。これにより活性化剤としてのヘモグロビンとフェリシアン化カリウム及びpHの比較検討を行った。

ここで反応液の濃度は5mMルミノール、5 μ Mヘモグロビン、20mMフェリシアン化カリウム⁴⁾に調製した。反応液と溶離液のpHを調節するために5N水酸化ナトリウム水溶液を使用した。

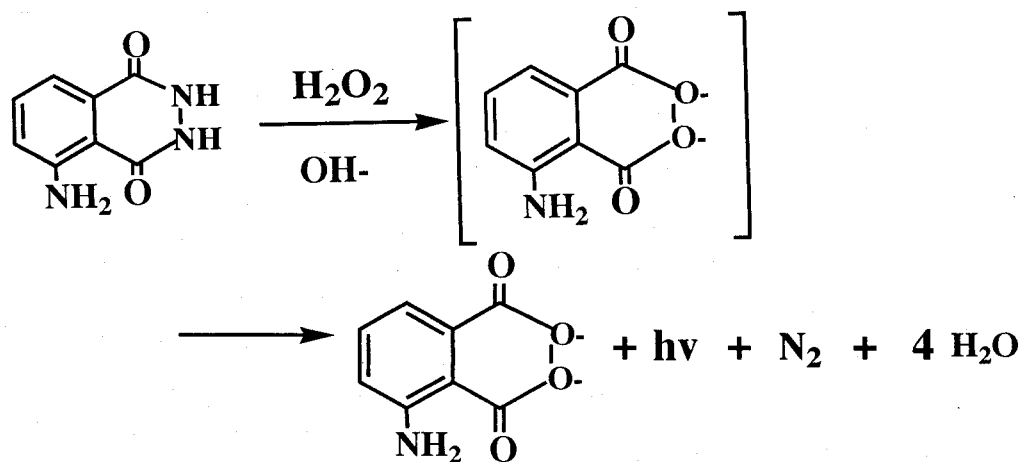


Fig.1 Reaction Scheme of Oxidation Luminol

結果及び考察

1. 反応液の濃度の検討

活性化剤として牛のヘモグロビンを用いて、0.1mM過酸化水素水20 μ lを測定した。このとき反応液のpHを10.5に、溶離液のpHを4.5に固定し、流量を変化させ、0.2Mリン酸水素二ナトリウム水溶液で溶解した (Fig.2)。同じ条件で、0.02Mリン酸水素二ナトリウム水溶液で溶解した場合をFig.3に示した。Fig.2とFig.3より、リン酸水素二ナトリウム水溶液濃度が濃い場合よりも薄いときの方がピーク面積が大きいことから、リン酸水素二ナトリウム水溶液濃度は0.02Mを使用することに決めた。

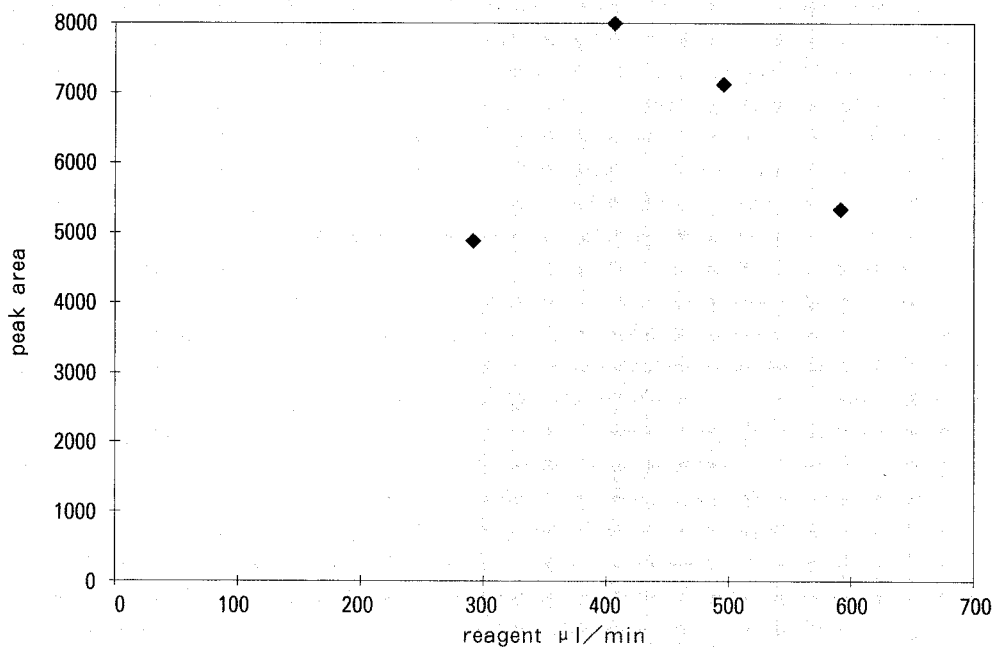


Fig.2 Chemiluminescence Intensity using Hemoglobin
Conditions : eluent (0.2M phosphate buffer, pH4.5),
luminol solution (pH10.5), H_2O_2 (0.1mM)

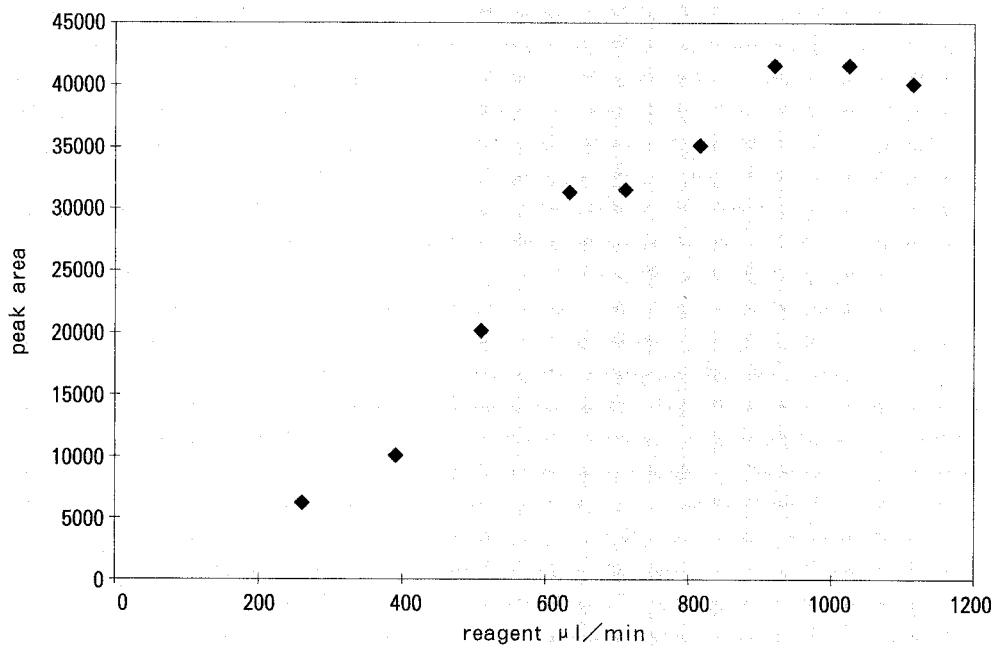


Fig.3 Chemiluminescence Intensity using Hemoglobin
Conditions : eluent (0.02M phosphate buffer, pH4.5),
luminol solution (pH10.5), H_2O_2 (0.1mM)

2. 反応液の流量とpHの検討

(a) 反応液の流量と溶離液のpHの検討

①ヘモグロビンを反応液とした場合

活性化剤として牛のヘモグロビンを用いて, 0.1mM過酸化水素水を測定した. このとき反応液のpHを10.5に固定し, 流量を変化させ, 溶離液のpHを4.5, 5.5及び6.5と変化させたときの, 反応液の最適流量と溶離液の最適pHを検討した. Fig.4に示したように反応液の最適流量はpHにより異なり, すべての流量範囲においてpHが4.5のときに最適となった. このことから, 反応液の最適流量は1000 $\mu\text{l}/\text{min}$, 溶離液の最適pHは4.5とした.

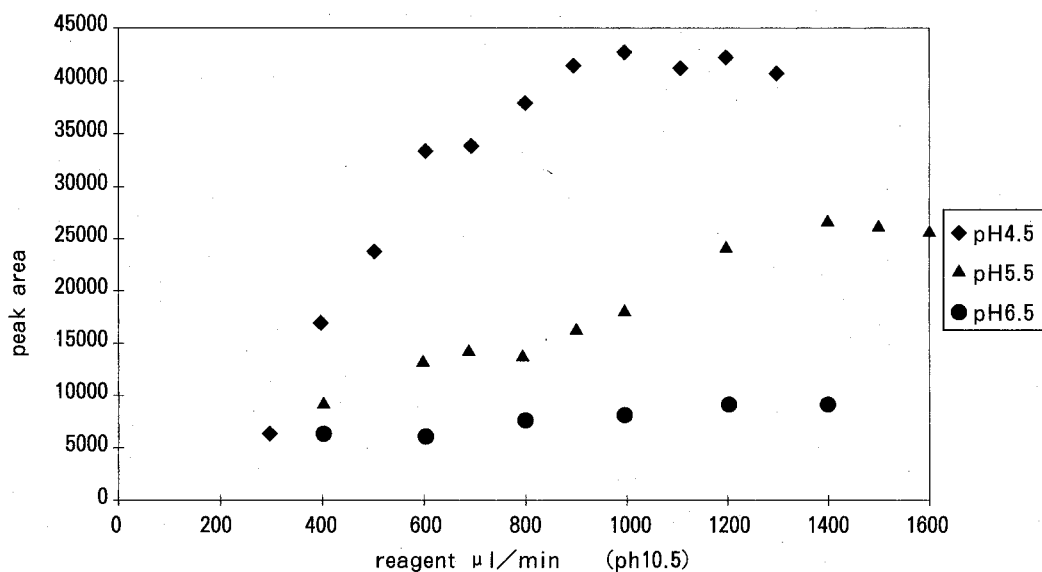


Fig.4 Chemiluminescence Intensity using Hemoglobin
Conditions : eluent (0.02M phosphate buffer, pH4.5, 5.5, 6.5),
luminol solution (pH10.5), H_2O_2 (0.1mM)

②フェリシアン化カリウムを反応液とした場合

活性化剤としてフェリシアン化カリウムを用いて, 上記と同様に0.1mM過酸化水素水を測定した. このとき反応液のpHを10.5に固定し, 流量を変化させ, 溶離液のpHを4.5, 5.5及び6.5と変化させて, 反応液の最適流量と溶離液の最適pHを検討した. Fig.5に示したように反応液の最適流量はpHにより異なった. pH5.5と4.5はピーク面積の差があまりなかった. pHが6.5のときにすべての流量において最適となった. このことから, 反応液の最適流量は1200 $\mu\text{l}/\text{min}$, 溶離液の最適pHは6.5とした.

(b) 反応液の流量及びpHの検討

①ヘモグロビンを反応液とした場合

(1) 活性化剤として牛のヘモグロビンを用いて, 0.1mM過酸化水素水を測定した. このとき溶離液のpHを6.5, 反応液のpHを10.5に固定し, 最適反応液流量を検討した. Fig.6に示したように, 反応液の流量が400から1300 $\mu\text{l}/\text{min}$ まではピーク面積が増加したが, 1400からは減少していった.

このことから反応液の最適流量は1400 $\mu\text{l}/\text{min}$ とした。

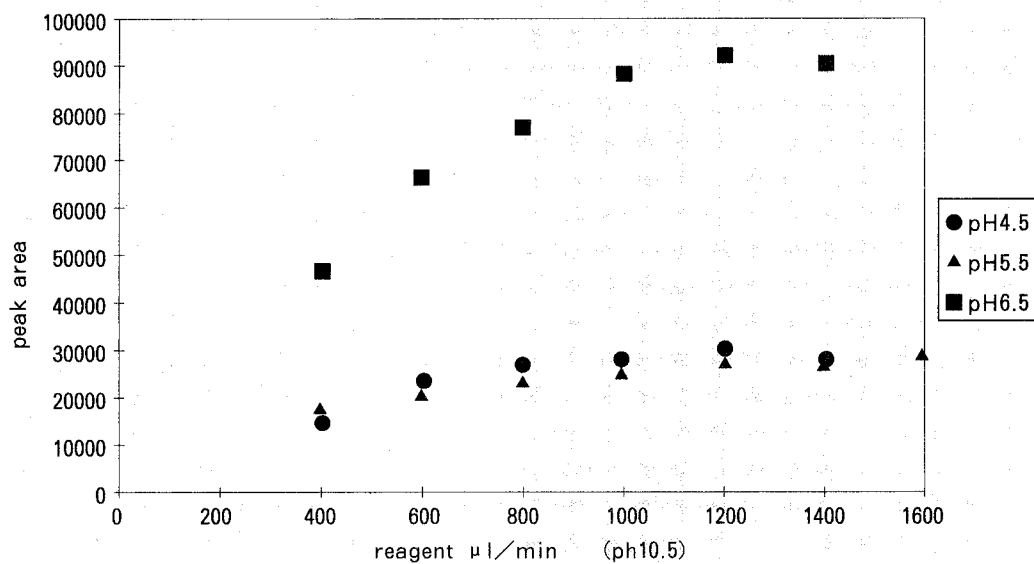


Fig.5 Chemiluminescence Intensity using Ferricyanide
Conditions : eluent (0.02M phosphate buffer, pH4.5, 5.5, 6.5),
luminol solution (pH10.5), H_2O_2 (0.1mM)

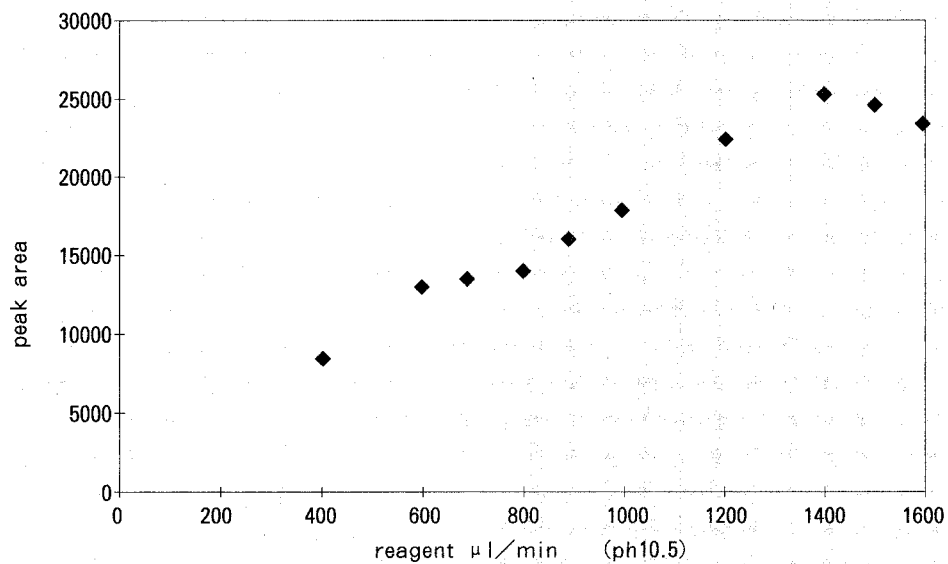


Fig.6 Chemiluminescence Intensity using Hemoglobin
Conditions : eluent (0.02M phosphate buffer, pH6.5),
luminol solution (pH10.5),

(2) 溶離液のpHを6.5, 反応液のpHを11.5に固定し, 0.1 μ M過酸化水素水を測定した. 過酸化水素水濃度を下げた理由として, 0.1mMではピーク面積が飽和してしまうために, 正確なピーク面積が得られなかったからである. Fig.7に示したように, 反応液流量が200から減少していった. このことから反応液の最適流量は200 μ l/minとした.

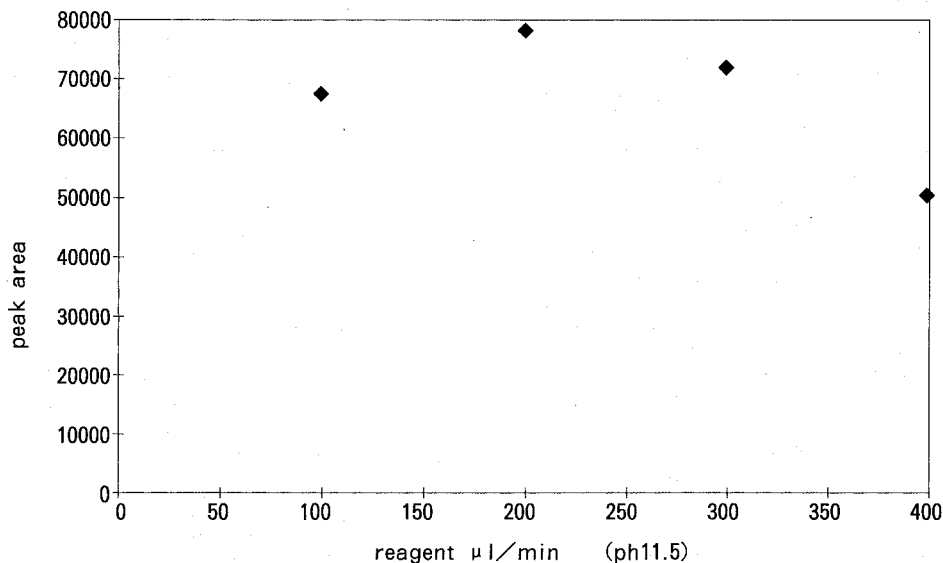


Fig.7 Chemiluminescence Intensity using Hemoglobin
Conditions : eluent (0.02M phosphate buffer, pH6.5),
luminol solution (pH11.5), H_2O_2 (0.1 μ M)

(3) 溶離液のpHを6.5, 反応液のpHを12.5に固定し, 過酸化水素水を測定すると, バックグラウンドノイズが大き過ぎて測定できなかった.

②フェリシアン化カリウムを反応液とした場合

(1) 活性化剤としてフェリシアン化カリウムを用いて, 0.1mM過酸化水素水を測定した. このとき溶離液のpHを6.5, 反応液のpHを10.5に固定し, 最適反応液流量を検討した. Fig.8に示したように, 反応液流量が1000 μ l/minからはピーク面積が一定になった. このことから反応液の最適流量は1200 μ l/minとした.

(2) 溶離液のpHを6.5, 反応液のpHを11.5に固定し, 0.1 μ M過酸化水素水を測定した. 過酸化水素水濃度を下げた理由として, 0.1mMではクロマトグラムがなだらかになるために正確なピーク面積が得られないからである. Fig.9に示したように, 反応液の最適流量は400 μ l/minとした.

(3) 溶離液のpHを6.5, 反応液のpHを12.5に固定し, 0.01mM過酸化水素水を測定した. Fig.10に示したように, 全体的にピーク面積が横這いした形となった. このときの反応液の最適流量を400 μ l/minとした.

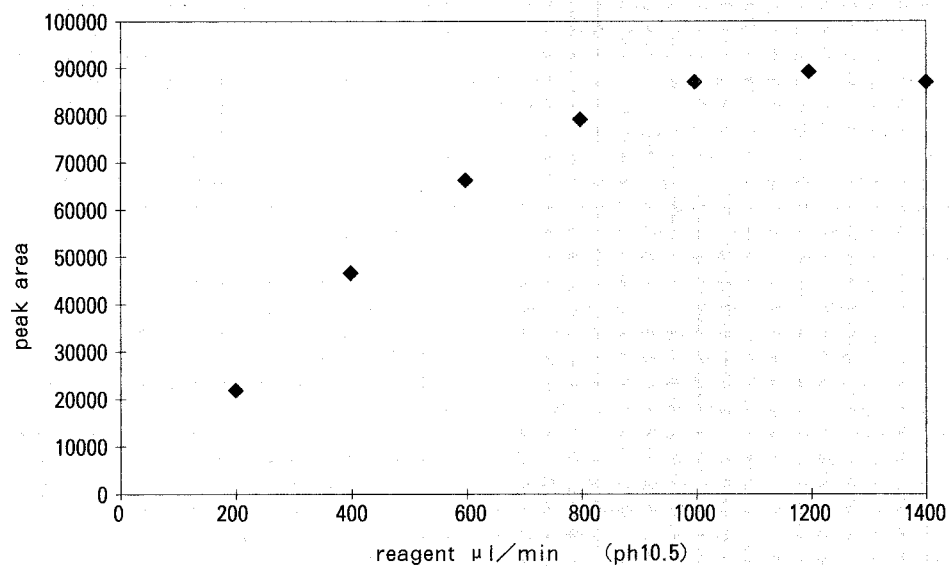


Fig.8 Chemiluminescence Intensity using Ferricyanide
Conditions : eluent (0.02M phosphate buffer, pH6.5),
luminol solution (pH10.5), H_2O_2 (0.1mM)

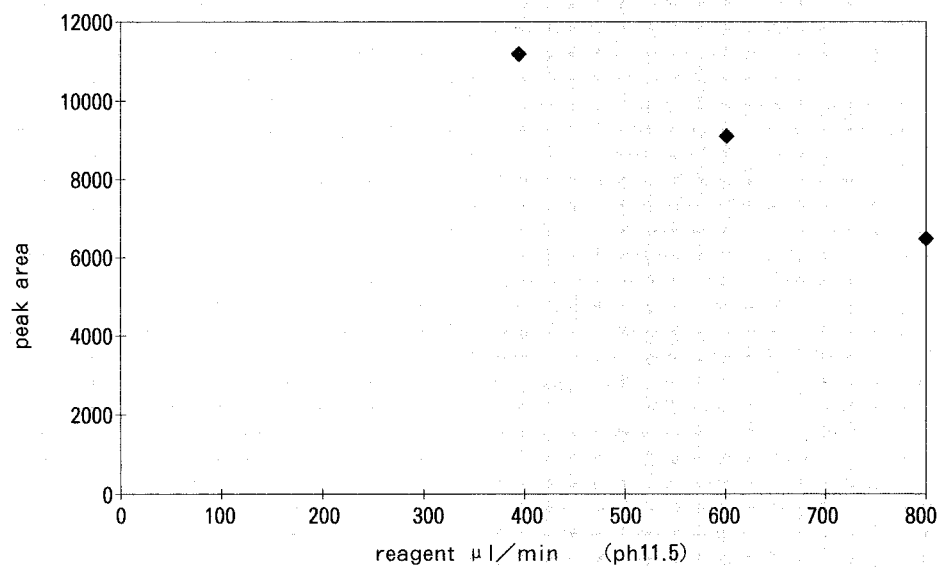


Fig.9 Chemiluminescence Intensity using Ferricyanide
Conditions : eluent (0.02M phosphate buffer, pH6.5),
luminol solution (pH11.5),

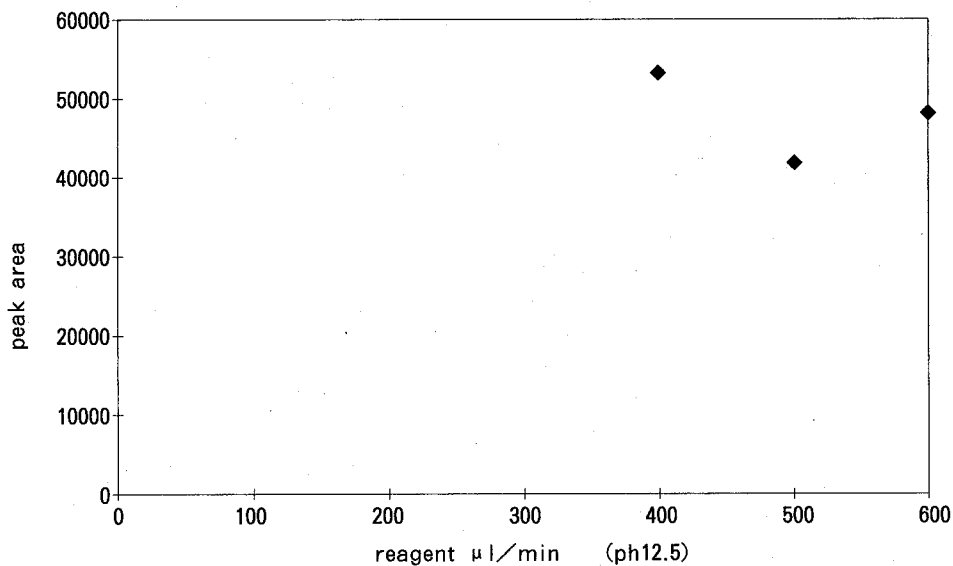


Fig.10 Chemiluminescence Intensity using Ferricyanide
Conditions : eluent (0.02M phosphate buffer, pH6.5),
luminol solution (pH12.5),

Fig.4とFig.5の結果は活性化剤として、それぞれヘモグロビン、フェリシアン化カリウムを用いたときのルミノール酸化反応において得られる発光強度を示している。活性化剤の違いを問わず、いずれも溶離液のpHが中性域に近づくにつれ、発光強度は増加しているが、活性化剤としてヘモグロビンを用いた場合、pH4.5の方がpH5.5及び6.5より高感度であった。他の分析機器による予備実験の結果により、pHの高い方が高感度であることが推察されたが、本実験の結果はそれとは異なるものであった。一方、活性化剤としてフェリシアン化カリウムを用いた場合、高いpHほど高い発光強度を示した。これは予備実験による結果を裏づけるものであった。

前述より溶離液のpHが高くなるにつれ感度が上昇することが分かったが、Fig.6とFig.7の結果は、ヘモグロビンで固定した時に、反応液のpHの違いによるルミノールの感度の変化を示している。即ち、反応液のpH変化による感度への影響も検討した結果、pHを上げることにより、感度の上昇が認められた。

Fig.7とFig.9の結果は、反応液のpHを11.5に固定し、それぞれヘモグロビン、フェリシアン化カリウムを用いたときのルミノール酸化反応における発光強度の比較を示しているこの結果はヘモグロビンを用いた方が発光強度が大きいことを示しており、これまでの結果から、活性化剤としてフェリシアン化カリウムを使用したほうが検出感度が高いであろうとの予測に反する結果が得られた。この理由については、現在検討中である。

結 語

以上、本研究は活性化剤としてヘモグロビンとフェリシアン化カリウム、それぞれを用いたときの発光強度を検討したものである。実験の結果はpHを高くすることにより、ルミノール酸化反応

において得られる発光強度が上昇し、過酸化水素の濃度の違いによって、活性化剤による発光強度が変化する結果が得られた。この事実が再現するのであれば、計測する過酸化水素の濃度に応じて、ルミノール反応に用いる活性化剤の種類を選択しなければならないことを意味する。一般に、微量であればあるほど誘導体化反応の効率が低くなることは言われているが、今回の件は、本来の反応効率の問題なのか、本質的に酸化剤の違いによる問題なのかこれ以上の議論をする材料を持合わせていない。今後、酵素活性の測定や生体試料(細胞)中の過酸化水素の定量など多分にある。

謝 辞

本研究を推進するにあたり、研究費の一部は、平成9年度教育改善推進費によった。ここに感謝の意を表する。

文 献

- 1) 蒲生啓司・坂本真紀: 分析化学, 43(6), 691 (1994).
- 2) M. M. Rauhut, Acc. Chem. Res., 2,80(1969).
- 3) E. Hodgson, I. Fridovich, Photochem. Photobiol., 18,451(1973)
- 4) 田畑勝好, 池本正生, 木戸隆宏, 戸谷誠之, 村池 孝: 臨床病理(補), 34, 90

平成9(1997)年9月30日受理

平成9(1997)年12月25日発行