

## 報 文

反応速度差を用いるアスコルビン酸とグルタチオンの  
フローインジェクション吸光光度同時定量手嶋 紀雄<sup>1</sup>, 信田 拓哉<sup>1,2</sup>, 酒井 忠雄<sup>®1</sup>

1回の試料注入(ワンショット)でアスコルビン酸(AA)とグルタチオン(GSH)を同時定量するフローインジェクション分析法を開発した。AAは、鉄(III)-1,10-フェナントロリン(phen)錯体を迅速に鉄(II)-phen錯体( $\lambda_{\max} = 510 \text{ nm}$ )へと還元するが、GSHによる還元反応は遅い。本研究ではGSHによる還元反応が銅(II)の共存により著しく加速されることを見いだした。したがって、生成する鉄(II)-phen錯体の吸光度は、銅(II)非共存下ではAAのみの量、銅(II)共存下ではAAとGSHの総量に相当する。これらの反応をダブルフローセルを装着したフローシステムに導入した。その結果、AAはダブルフローセル内の第1セル室で検出され、その後、銅(II)を合流させてAAとGSHの含量を第2セル室で検出することが可能となった。最適条件下でAAは $5 \times 10^{-7}$ から $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、GSHは $2 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-4} \text{ M}$ の濃度範囲で同時定量することができた。試料処理速度は毎時45試料であった。本法を医薬品及び栄養補助食品中のAAとGSHの定量に応用し、良好な結果を得た。

## 1 緒 言

近年、健康増進法<sup>1)</sup>が制定されたことから分かるように、我が国で急速に進む高齢化社会において、国民の健康への関心がますます高まっている。各種疾病や老化の促進には、体内の活性酸素が関与していることから、生体及び食品がもつ抗酸化能の評価法の開発が活発化している<sup>2)3)</sup>。

アスコルビン酸(AA)は、抗酸化物の一つとしてよく知られているが、ヒトはAA合成に必要なL-グルコノラクトンオキシダーゼが欠損しているため、食物から摂取しなければならない<sup>4)</sup>。グルタチオン(GSH)は、ヒト細胞内の主要な抗酸化物であり、哺乳動物では、赤血球が酸化的に壊れるのを防いでいる<sup>5)</sup>。近年、これらの抗酸化物をはじめ様々な栄養素が、医薬品や栄養補助食品、化粧品などに添加されており、安全性の確保には厳密な品質管理が要求される<sup>6)</sup>。

チオール類の定量法として、プレカラム<sup>7)</sup>あるいはポストカラム<sup>8)</sup>誘導体化を用いる高速液体クロマトグラフィー(HPLC)が報告されている。Soficら<sup>9)</sup>は、電気化学検出を用いるHPLCによりAA、デヒドロアスコルビン酸、GSH、酸化型グルタチオンを同時分析した。また、紫外検出を用いるキャピラリー電気泳動法(CE)によりAA

とGSHが同時分析されている<sup>10)</sup>。しかし、これらの分離分析法は測定に10数分を要し、迅速性に関して問題がある。

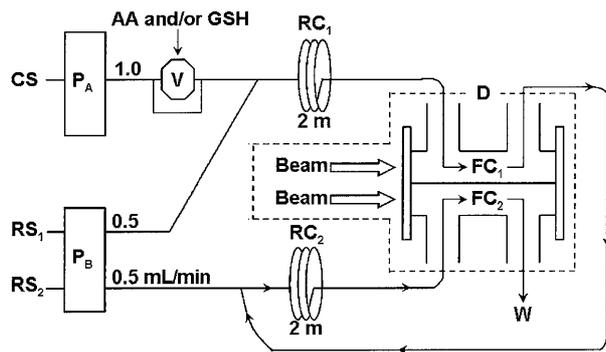
一方、フローインジェクション分析(FIA)法は、迅速性、再現性の良さ、試料や試薬溶液の低減化、外部からの汚染がない等の多くの特長を有することから、近年急速に発展している<sup>11)~13)</sup>。FIAによってAA<sup>14)~16)</sup>あるいはGSH<sup>17)</sup>を定量する迅速分析法が多数報告されている。しかし、FIAによるAAとGSHの同時定量法は報告されておらず、AAと別のチオールであるシステイン(Cys)との同時定量法が数例報告されているだけである<sup>18)~20)</sup>。

このように、FIAは基本的にHPLCやCEのように分離機能を有さないため、多成分分析への適用が困難とされているが、最近では、FIA/吸光光度分析システムにマルチコンパートメントフローセル<sup>18)21)~25)</sup>又はツインフローセル<sup>26)27)</sup>を装着することにより、FIAの迅速性を損なわずに同時定量に対応できるようになった。著者らは、既にダブルビームの入射光路に一つずつのセル室が配置されたダブルフローセルを用いるAAとCysの同時定量法を開発している<sup>18)</sup>。この方法は、1,10-フェナントロリン(phen)共存下でのAAあるいはCysによる鉄(III)の鉄(II)への還元反応の速度差を利用するものである。

本研究では、AA及びGSHによる鉄(III)-phen錯体の鉄(II)-phen錯体への還元反応の速度定数を求めたところ、GSHによる還元反応は銅(II)により著しく加速され、AAによる還元反応は銅(II)の有無にかかわらず迅速に進行す

<sup>1</sup> 愛知工業大学応用化学科：470-0392 愛知県豊田市八草町八千草1247

<sup>2</sup> 現在所属 ㈱日東分析センター：567-8680 大阪府茨木市下穂積1-1-2



**Fig. 1** Schematic diagram of the flow system for the simultaneous determination of ascorbic acid and glutathione

CS: carrier solution ( $\text{H}_2\text{O}$ );  $\text{RS}_1$ : reagent solution 1 {mixed solution of  $2 \times 10^{-4}$  M iron(III),  $2 \times 10^{-3}$  M 1,10-phenanthroline and 0.1 M acetate buffer (pH 5.2)};  $\text{RS}_2$ : reagent solution 2 [ $8 \times 10^{-4}$  M copper(II)];  $\text{P}_A$  and  $\text{P}_B$ : pumps; V: a six-way valve; sample volume: 200  $\mu\text{L}$ ;  $\text{RC}_1$  and  $\text{RC}_2$ : reaction coil (0.5 mm i.d.);  $\text{FC}_1$  and  $\text{FC}_2$ : double flow cell (light path 20 mm); D: double beam spectrophotometer (510 nm); W: waste

ることが明らかとなった。この反応速度差をダブルフローセルを装着したフローシステムに導入し、AA と GSH の同時定量法を開発したので報告する。

## 2 実 験

### 2.1 試 薬

水は、蒸留水製造装置 (GSH-200, Advantec 製) で得られた超純水を使用した。試薬はすべて市販の特級品を精製せずに使用した。

**GSH 標準溶液:** 還元型グルタチオン (ナカライテスク製, MW = 307.32) 0.1536 g を水に溶解し 100 mL に定容して  $5 \times 10^{-3}$  M 溶液を調製し、原液とした。この原液を実験の都度、水で適宜希釈して用いた。

**AA 標準溶液:** L-アスコルビン酸 (片山化学製, MW = 176.13) 0.1761 g を水に溶解し 100 mL に定容して  $1 \times 10^{-2}$  M 溶液を調製し、原液とした。この原液を実験の都度、水で適宜希釈して用いた。

**鉄(III)溶液:** 硫酸アンモニウム鉄(III)・十二水和物 (和光純薬製, FW = 482.19) 1.929 g を 0.1 M HCl に溶解し 200 mL に定容して 0.02 M 溶液を調製し、原液として褐色瓶に入れて遮光保存した。

**1,10-フェナントロリン溶液:** 1,10-フェナントロリン一水和物 (同仁化学研究所製, MW = 198.22) 0.7929 g を水に溶解し 200 mL に定容して  $2 \times 10^{-2}$  M 溶液を調製し、原液として褐色瓶に入れて遮光保存した。

**銅(II)溶液:** 硫酸銅(II)五水和物 (和光純薬製, FW =

249.69) 0.9988 g を 0.1 M HCl に溶解し 200 mL に定容して 0.02 M 溶液を調製し、原液として褐色瓶に入れて遮光保存した。

**酢酸塩緩衝液 (pH 5.2):** 酢酸ナトリウム三水和物 (ナカライテスク製, MW = 136.08) 136 g を水に溶解し 500 mL とし、2 M 溶液を調製した。酢酸 (片山化学製, MW = 60.05, 密度 = 1.05 g/mL) 23 mL を水に溶解し 200 mL とし、2 M 溶液を調製した。これらの溶液を pH 5.2 になるように混合し 2 M 酢酸塩緩衝液を調製した。

### 2.2 装 置

速度定数の測定には、ペルチェ式恒温セルホルダー (ETC-505, 日本分光製) を装着した紫外可視分光光度計 (V-560, 日本分光製) を使用し、セルは光路長 10 mm (Pyrex) のものを用いた。また、pH 測定には、pH メーター (M-8L, HORIBA 製) を使用した。

AA と GSH の同時定量に用いたフローシステムを Fig. 1 に示す。キャリアー及び試薬溶液の送液には、ダブルプランジャーポンプ (DMX-2000, サヌキ工業製) を使用した。試料の注入には、六方インジェクションバルブ (SVM-6M2, サヌキ工業製) を使用した。吸光度は、ダブルフローセル<sup>21)</sup> (光路長 20 mm, 内容量 30  $\mu\text{L}$ ) を装着したダブルビーム型波長可変可視分光検出器 (S-3250, 相馬光学製) により測定し、レコーダー (EB 22005, CHINO 製) により連続記録した。なお流路にはすべて内径 0.5 mm のテフロン管を使用した。

医薬品及び栄養補助食品の各錠剤は水に溶解し、得られたサンプル溶液を吸引装置 (Glass Support 47 mm KG-47, Advantec 製) とメンブランフィルター (Mixed Cellulose Ester, 孔径 0.8  $\mu\text{m}$ , 直径 47 mm, Advantec 製) を用いて濾過して、Fig. 1 に示すフローシステムに注入した。

### 2.3 操 作

**2.3.1 速度定数の測定** 前報<sup>28)</sup>に従って調製した試薬溶液 {鉄(III)  $2 \times 10^{-4}$  M, 銅(II)  $8 \times 10^{-4}$  M,  $2 \times 10^{-3}$  M phen, 0.2 M 酢酸塩緩衝液 (pH 5.2)} 1 mL をセルに採取し、セル内で小型の攪拌子により攪拌しながら、 $2 \times 10^{-5}$  M AA 又は  $2 \times 10^{-5}$  M GSH 1 mL をマイクロピペットを用いて添加し、反応を開始させた。試薬空試験液を対照に 510 nm における吸光度を、反応開始後 1 秒から測定した。

**2.3.2 FIA** Fig. 1 において、CS よりキャリアー溶液として水を、 $\text{RS}_1$  より鉄(III)溶液 ( $2 \times 10^{-4}$  M), phen 溶液 ( $2 \times 10^{-3}$  M), 酢酸塩緩衝液 (0.1 M, pH 5.2) の混合溶液を、 $\text{RS}_2$  より銅(II)溶液 ( $8 \times 10^{-4}$  M) を送液した。六方バルブにより標準あるいはサンプル溶液 (200  $\mu\text{L}$ ) を CS に注入し  $\text{RS}_1$  と合流させ反応コイル 1 ( $\text{RC}_1$ ) を通過後、ダブルフローセル内の第 1 セル室 ( $\text{FC}_1$ ) に導き、AA の

Table 1 Conditional rate constants for pseudo first-order reactions of iron(III)-phen with ascorbic acid (AA) or glutathione (GSH)

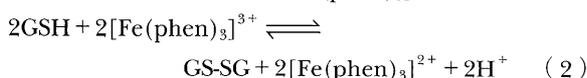
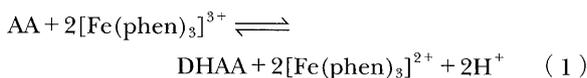
Analyte	$k'/s^{-1}$	
	With Cu(II)	Without Cu(II)
AA	4.3	$2.8 \times 10^{-1}$
GSH	$8.2 \times 10^{-1}$	$1.7 \times 10^{-4}$

みの第1ピークを得る。次いでRS<sub>2</sub>の流れに合流させ、反応コイル2(RC<sub>2</sub>)を通過後、第2セル室に導くことによりAAとGSHに対応する第2ピークを得た。

### 3 結果と考察

#### 3.1 速度論的検討

AA及びGSHによる鉄(III)-phen錯体の還元反応はそれぞれ以下のように表すことができる。



ここで、DHAAはデヒドロアスコルビン酸、GS-SGは酸化型グルタチオンを表す。式(1)、式(2)の反応において $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{3+}$ は過剰に存在するので反応速度式を式(3)と式(4)のように仮定することができる。

$$-d[\text{AA}]/dt = k'_{\text{AA}}[\text{AA}] \quad (3)$$

$$-d[\text{GSH}]/dt = k'_{\text{GSH}}[\text{GSH}] \quad (4)$$

ここで、 $k'_{\text{AA}}$ 、 $k'_{\text{GSH}}$ はそれぞれの条件速度定数である。AA及びGSHの初期濃度を $[\text{AA}]_0$ 、 $[\text{GSH}]_0$ 、反応時間 $t$ における濃度を $[\text{AA}]_t$ 、 $[\text{GSH}]_t$ として、式(3)、式(4)を積分すると式(5)、式(6)を得る。

$$\ln[\text{AA}]_t = \ln[\text{AA}]_0 - k'_{\text{AA}}t \quad (5)$$

$$\ln[\text{GSH}]_t = \ln[\text{GSH}]_0 - k'_{\text{GSH}}t \quad (6)$$

時間 $t$ における $[\text{AA}]_t$ 及び $[\text{GSH}]_t$ はそれぞれ、 $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ のモル吸光係数 $11100 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ から見積もった。 $\ln[\text{AA}]_t$ 又は $\ln[\text{GSH}]_t$ を $t$ に対してプロットしたところ、銅(II)が共存しない場合と共存する場合のいずれも直線が得られたことから、いずれの反応も擬一次反応の速度式(3)と(4)に従うことが確認された。

直線の傾きから得られた条件速度定数 $k'_{\text{AA}}$ 、 $k'_{\text{GSH}}$ をTable 1に示す。求めた $k'_{\text{AA}}$ 、 $k'_{\text{GSH}}$ を用いてAAとGSH

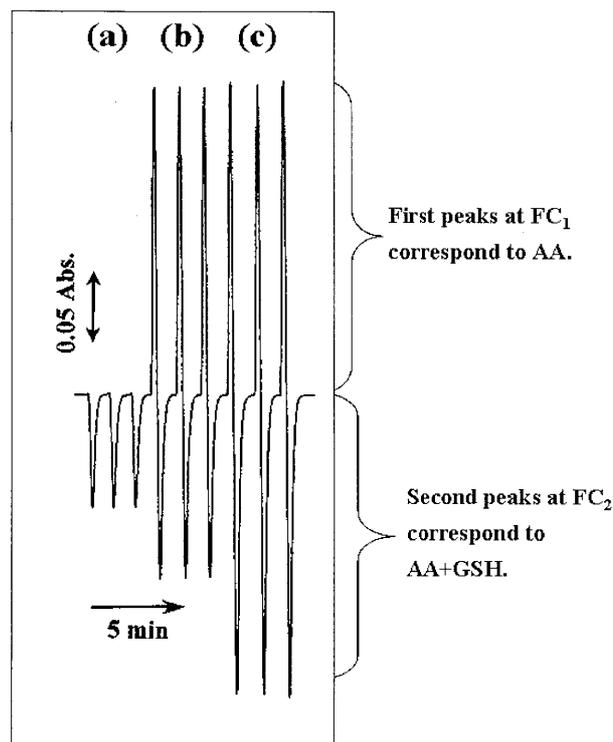
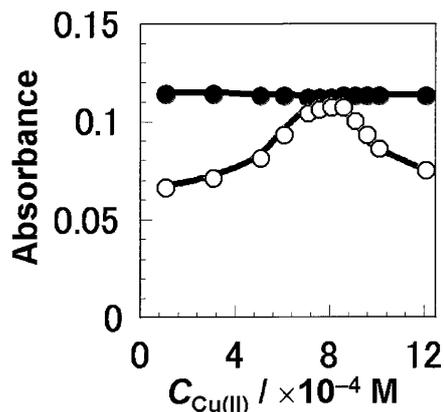


Fig. 2 Typical flow signals for ascorbic acid (AA) and/or glutathione (GSH) with triplicate injections (a) Only GSH ( $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ ); (b) only AA ( $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ ); (c) binary mixture of AA ( $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) and GSH ( $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ )

の反応率と所要時間を算出した。銅(II)が共存しない場合、AAの反応率99%に必要な時間は16秒で、その際のGSHの反応率は0.3%である。したがって、銅(II)非共存下でのAAの単独定量に及ぼすGSHの影響は十分小さい。銅(II)が共存するとAA及びGSHの反応率99%に必要な時間はそれぞれ1及び6秒であり、これら2成分の含量を求めることができる。この反応速度差の原理を利用したAAとGSHのFIA同時定量の検討結果を以下に示す。

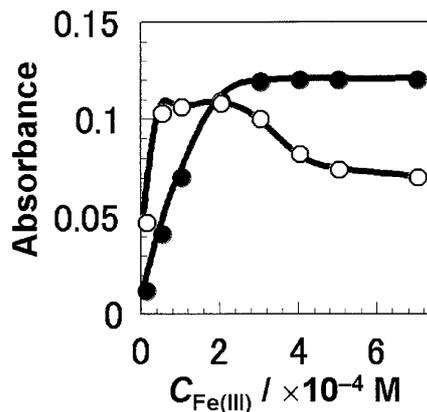
#### 3.2 ダブルフローセルによるピーク形状

Fig. 1に示すように、ダブルフローセルの二つのセル室は、ダブルビームの各光路に配置されているので、第1セル室(FC<sub>1</sub>)で正の第1ピークが出現し、第2セル室(FC<sub>2</sub>)では負の第2ピークが出現する(負方向であるが退色ではなく、発色を検出する)。Fig. 2(a)はGSHのみを注入した場合で、負のピークのみが観測された。正のピークが観測されないのは、前節で議論したように、銅(II)が共存しない場合はGSHの反応率は極めて小さいからである。Fig. 2(b)はAAのみを注入した場合で、正、負の両ピークが検出される。Fig. 2(c)はAAとGSHの混合液を注入したときのピークであるが、正のピーク高さは(b)と



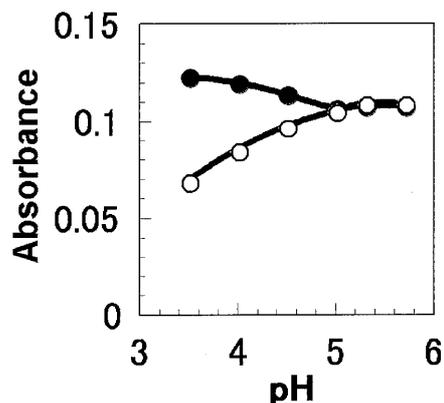
**Fig. 3** Effect of copper(II) concentration on the heights for (●) first peak at  $FC_1$  and (○) second peak at  $FC_2$

Injected standard : a mixed solution of AA ( $1 \times 10^{-5}$  M) and GSH ( $1 \times 10^{-5}$  M)



**Fig. 5** Effect of iron(III) concentration on the heights for (●) first peak at  $FC_1$  and (○) second peak at  $FC_2$

Injected standard : a mixed solution of AA ( $1 \times 10^{-5}$  M) and GSH ( $1 \times 10^{-5}$  M)



**Fig. 4** Effect of pH on the heights for (●) first peak at  $FC_1$  and (○) second peak at  $FC_2$

Injected standard : a mixed solution of AA ( $1 \times 10^{-5}$  M) and GSH ( $1 \times 10^{-5}$  M)

ほとんど変わらず、負のピーク高さは (a) と (b) の負のピーク高さの合計となっていることが分かる。このように、 $FC_1$  では銅(II)が共存しないため、AAのみのピークが得られ、 $FC_2$  では銅(II)共存下でAAとGSHの含量に対応するピークが得られる。

### 3.3 実験諸条件の最適化

AAとGSHがそれぞれ $5 \times 10^{-6}$  Mずつ共存する混合試料溶液をFig. 1に示すフローシステムに注入し、反応pH、各試薬濃度並びにFIAの測定条件について検討した。

**3.3.1 銅(II)濃度の影響** Fig. 1の $RS_2$ から送液する銅(II)濃度を変化させ、ピーク高さに及ぼす影響を調べた。結果をFig. 3に示す。第1ピーク高さは、検討した範囲で最大かつ一定となった。第2ピーク高さは銅(II)の

濃度の増加に伴い増大し、 $7 \times 10^{-4}$  から  $9 \times 10^{-4}$  Mの濃度範囲で一定値を示し、これ以降では減少した。銅(II)の低濃度領域では、銅(II)とphenとのトリス錯体  $\{(\log \beta_3 = 20.9)^{29}\}$  の生成により、銅が十分な触媒作用を発現することができず、高濃度領域では、同錯体の生成によりphenが消費され、phenが鉄へ十分に供給されなくなるためであると考えられる。Milneら<sup>30)</sup>は、銅(II)存在下におけるDNAの過酸化水素による酸化反応に及ぼすGSHとphenの影響を検討し、銅(II)とphenとのビス錯体  $(Cu(phen)_2)^{2+}$  が反応活性であり、また、GSHが  $(Cu(phen)_2)^{2+}$  の酸化還元サイクルに関与していると述べている。本研究の触媒化学種も  $(Cu(phen)_2)^{2+}$  である可能性があるが、詳細は明らかではない。以降の検討では、銅(II)濃度を  $8 \times 10^{-4}$  Mとした。

**3.3.2 pHの影響** Fig. 1の $RS_1$ から送液する酢酸塩緩衝液のpHを変化させ、反応に及ぼすpHの影響を調べた。結果をFig. 4に示す。第1ピーク高さはpH 5付近まで徐々に減少し、これ以降では一定となった。第2ピーク高さはpH 5.2付近まで増加し、これ以降では一定となった。したがって、測定pHは5.2とした。

**3.3.3 鉄(III)濃度の影響** 結果をFig. 5に示す。第1ピークは鉄(III)濃度の増加に伴い増大し、 $3 \times 10^{-4}$  M以上で一定となった。第2ピークは  $3 \times 10^{-5}$  から  $2 \times 10^{-4}$  Mの範囲で最大かつ一定となるが、これ以上では減少した。したがって、鉄(III)濃度は  $2 \times 10^{-4}$  Mを選択した。

**3.3.4 phen濃度の影響** 結果をFig. 6に示す。第1ピーク高さはphen濃度の増加に伴い徐々に減少した。第2ピーク高さはphen濃度の増加に伴い増大し、 $2 \times 10^{-3}$  Mで最大となるが、これ以上では減少した。この要因は、phen濃度が  $2 \times 10^{-3}$  M以上になると安定な銅(II)-phen

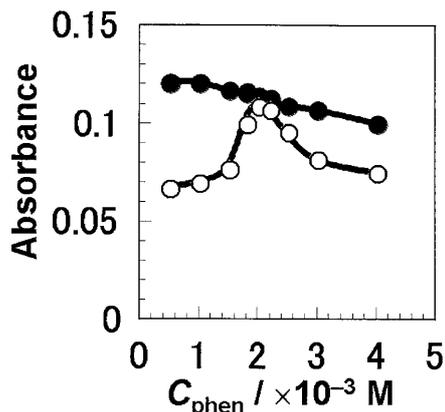


Fig. 6 Effect of phen concentration on the heights for (●) first peak at  $FC_1$  and (○) second peak at  $FC_2$   
 Injected standard: a mixed solution of AA ( $1 \times 10^{-5}$  M) and GSH ( $1 \times 10^{-5}$  M)

のトリス錯体が生成し、銅(II)の触媒効果が低下するためと考えられる。phen濃度は $2 \times 10^{-3}$  Mを選択した。

**3.3.5 流量の影響** CSの流量を0.9から1.7 mL/min,  $RS_1$ ,  $RS_2$ の流量を0.45から0.85 mL/minまで変化させ、ピーク高さに及ぼす影響を調べた。第1ピーク高さは流量の増大とともにわずかに減少し、第2ピーク高さはわずかに上昇した。流量はCSを1.0 mL/min,  $RS_1$ と $RS_2$ をそれぞれ0.5 mL/minとした。

**3.3.6 反応コイル長さの影響** 反応コイル $RC_1$ 及び $RC_2$ 長さを1から10 mの範囲で変化させ、ピーク高さに及ぼす影響を調べた。第1ピーク高さは、 $RC_1$ が2 mで最大となり、第2ピーク高さは検討した範囲で徐々に減少した。一方、 $RC_2$ 長さが2 m以上で第1ピーク高さは最大かつ一定となり、第2ピーク高さは5 mで最大となった。以上の結果から、 $RC_1$ ,  $RC_2$ 共に2 mを選択した。

### 3.4 検量線

AAあるいはGSHだけを含む標準溶液をFig. 1に示すフローシステムに注入し、式(7)から式(9)に示す直線性の良好( $r^2 = 0.999$ )な検量線を得た。

$$A_{AA, FC_1} = 0.227[AA] \quad (7)$$

$$A_{AA, FC_2} = 0.135[AA] \quad (8)$$

$$A_{GSH, FC_2} = 0.0822[GSH] \quad (9)$$

ここで $A_{AA, FC_1}$ はAA標準溶液を注入したときに $FC_1$ で得られる吸光度、 $A_{AA, FC_2}$ は同溶液の $FC_2$ で得られる吸光度、 $A_{GSH, FC_2}$ はGSH標準溶液を注入したときの $FC_2$ で得られる吸光度である。また、[AA]と[GSH]は、モル濃度( $10^{-5}$  M)である。AAの検量線は既報<sup>18)</sup>で述べたが、本報においてGSHとの同時定量を行う上で新たに作成し、

既報とほぼ同じ感度を得た。GSHの検量線は $1 \times 10^{-6}$ から $1 \times 10^{-4}$  Mの範囲で直線となり、 $2 \times 10^{-5}$  MのGSHを10回繰り返して測定した際の相対標準偏差は0.53%、検出限界( $S/N = 3$ )は $2 \times 10^{-7}$  Mであった。

AAとGSHを含むサンプルを注入した際に $FC_1$ 及び $FC_2$ で得られる吸光度を $A_{FC_1}$ ,  $A_{FC_2}$ とすれば、[AA]と[GSH]は、式(7)から式(9)を変形して式(10)と式(11)で表すことができる。

$$[AA] = \frac{A_{FC_1}}{0.227} \quad (10)$$

$$[GSH] = \frac{A_{FC_2} - 0.135[AA]}{0.0822} \quad (11)$$

2成分混合試料を調製し、式(10)と式(11)を用いて解析したところ、AAは $5 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-6}$  Mの範囲で96~104%、GSHは $2 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-4}$  Mの範囲で97~102%と良好な回収率が得られた。試料処理速度は、毎時45試料である。

### 3.5 共存物質の影響

AAとGSHがそれぞれ $5 \times 10^{-6}$  M含まれる2成分混合試料を同時定量する際の共存物質の影響を検討した。AAとGSH単独のピーク高さに対して、 $\pm 5\%$ 以下の妨害を許容とした。結果をTable 2にまとめた。還元性をもつ糖類、検討した無機陽・陰イオンはモル比で2000倍の共存が許容された。AAとGSHの酸化体であるDHAAとGS-SGは、少なくとも5倍の共存が許容された。phen共存下で鉄(III)を還元するコバルト(II)やバナジウム(IV)、また検出波長領域に吸収をもつ赤色のビタミン $B_{12}$ は正の妨害を示した。また、還元力の強いヒドロキノン、塩化ヒドロキシアニモニウム、*N*-アセチル-L-システインはGSHの定量値に著しい正の妨害を示した。しかし、これらの還元物質もAAの定量には少なくとも等倍の共存が許容された。

### 3.6 医薬品と栄養補助食品への応用

Table 3に医薬品(錠剤AとB)及び栄養補助食品(錠剤C)への応用結果を示す。錠剤AはAAを、錠剤BはGSHを主成分とする医薬品であり、錠剤Cは両成分を含む栄養補助食品である。それぞれの錠剤を約500 mLの水で溶解し、不溶物をろ過した後、水で全量を1 Lとした。得られた錠剤Aのサンプル溶液は400倍希釈、錠剤Bの溶液は50倍希釈、錠剤Cの溶液は5倍希釈して測定に用いた。錠剤A中のAA濃度は第1ピークと第2ピークの両方から求めたが、共に成分表示値とよく一致した。錠剤B中のGSHの分析値も良好な結果であった。また、錠剤C

Table 2 Effects of foreign ions and compounds on the simultaneous determination of a mixed solution of  $5 \times 10^{-6}$  M ascorbic acid (AA) and  $5 \times 10^{-6}$  M glutathione (GSH)

Tolerance molar ratio	Added compounds	
	AA determination	GSH determination
10000	Na(I), Mg(II), K(I), Ca(II), $\text{CH}_3\text{COO}^-$ , $\text{Cl}^-$ , $\text{NO}_3^-$ , $\text{Br}^-$	
8000	Glucose, fructose, urea	Na(I), $\text{CH}_3\text{COO}^-$ , urea
5000	Sucrose	Mg(II), K(I), $\text{Cl}^-$ , $\text{NO}_3^-$ , $\text{Br}^-$ , glucose, fructose
4000	Glutathione oxidized form	
2000	$\text{SO}_4^{2-}$ , vitamin B <sub>1</sub>	Ca(II), $\text{SO}_4^{2-}$ , sucrose
500		Glutathione oxidized form, vitamin B <sub>1</sub>
100	Zn(II)	
50	Vitamin B <sub>6</sub>	Vitamin B <sub>6</sub>
20	V(V), hydroxylammonium chloride, cysteine	
10	Co(II), dehydroascorbic acid	
5	Fe(III), <i>N</i> -acetyl-L-cysteine	V(V), Zn(II), dehydroascorbic acid
2		Fe(III)
1	Vitamin B <sub>2</sub> , hydroquinone	Co(II), vitamin B <sub>2</sub>
0.5	V(IV), Cr(VI)	V(IV), Cr(VI)
0.2		Hydroquinone
0.1	Vitamin B <sub>12</sub>	Vitamin B <sub>12</sub> , hydroxylammonium chloride
0.05		Cysteine, <i>N</i> -acetyl-L-cysteine

The tolerance limit was taken as the concentration causing an error  $\pm 5\%$ .

Table 3 Individual and simultaneous determination of ascorbic acid (AA) and glutathione (GSH) in pharmaceutical preparations (tablets A and B) and supplement (tablet C)

Sample <sup>a)</sup>	Found <sup>b)</sup> /mg in one tablet		Labeled/mg in one tablet	
	AA	GSH	AA	GSH
Tablet A	201 $\pm$ 2 <sup>c)</sup> 200 $\pm$ 1 <sup>d)</sup>	—	200	—
Tablet B	—	99 $\pm$ 1	—	100
Tablet C	20.6 $\pm$ 0.1	4.14 $\pm$ 0.06	20	4

a) Each tablet was dissolved in *ca.* 500 mL of water, an insoluble residue was removed by filtration, the filtrate was transferred into 1-L volumetric flask and diluted with water. The resulting solutions were diluted to 400-fold for tablet A, 50-fold for tablet B and 5-fold for tablet C before measurement; b) Three determinations; c) Obtained by the first peak; d) Obtained by the second peak

における同時分析値も成分表示値とよく一致した。

#### 4 結 言

鉄(III)-phen 錯体の還元発色反応に及ぼす AA と GSH の反応速度差を用いてこれら還元物質の FI 同時定量法を開発した。ダブルフローセルの利用により、サンプル溶液のワンショットによる同時計測を実現した。本法は、分析成分を分離する必要がないので迅速であり、医薬品や栄養補助食品の正確な品質管理に役立つと考えられる。

本研究の一部は、文部科学省交付の科学研究費補助金(若手研究(B), No. 18750067)により行われた。付記して深謝する。

#### 文 献

- 1) 厚生労働省法令: “健康増進法”, 法令番号, 平成 14 年 08 月 02 日法律第 103 号.
- 2) 受田浩之: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **53**, 221

(2004).

- 3) D. L. Giokas, A. G. Vlessidis, N. P. Evmiridis: *Anal. Chim. Acta*, **589**, 59 (2007).
- 4) 雪印乳業株式会社健康生活研究所編(柘植治人監修): “からだに役立つ水溶性ビタミン”, “第 9 章ビタミン C” (大塚 恵, 荒川信彦共著), p. 89 (1992), (雪印乳業(株)健康生活研究所).
- 5) 田宮信雄, 八木達彦訳: “生化学”, 第 5 版, p. 69 (1988), (東京化学同人).
- 6) 中野正史, 吉原将明, 櫻川昭雄: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **56**, 765 (2007).
- 7) V. Concha-Herrera, J. R. Torres-Lapasió, M. C. García-Alvarez-Coque: *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, **27**, 1593 (2004).
- 8) S. Pelletier, C. A. Lucy: *Analyst*, **129**, 710 (2004).
- 9) E. Sofic, P. Riederer, R. Burger, W. Gsell, G. Heuschneider: *Fresenius J. Anal. Chem.*, **339**, 258 (1991).
- 10) M. W. Davey, G. Bauw, M. V. Montagu: *J. Chromatogr. B*, **697**, 269 (1997).
- 11) 八尾俊男: ぶんせき (*Bunseki*), **2004**, 324.

- 12) 大島光子 : ぶんせき (*Bunseki*), **2004**, 528.
- 13) 福井啓典, 大野慎介, 樋口慶郎, 手嶋紀雄, 酒井忠雄 : 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **56**, 757 (2007).
- 14) T. Hasebe, T. Kawashima : *Anal. Sci.*, **12**, 773 (1996).
- 15) M. Tabata, H. Morita : *Talanta*, **44**, 151 (1997).
- 16) R. L. C. P. Thiago, M. Bertotti : *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **46**, 528 (2008).
- 17) T. Kamidate, H. Watanabe : *Talanta*, **43**, 1733 (1996).
- 18) N. Teshima, T. Nobuta, T. Sakai : *Anal. Chim. Acta*, **438**, 21 (2001).
- 19) B. Rezaei, A. A. Ensafi, S. Nouroozi : *Anal. Sci.*, **21**, 1067 (2005).
- 20) B. Li, D. Wang, C. Xu, Z. Zhang : *Microchim. Acta*, **149**, 205 (2005).
- 21) T. Sakai, Y. Maeda, N. Ura : *Talanta*, **49**, 989 (1999).
- 22) T. Sakai, N. Teshima, M. Sakashita, N. Ura : *Anal. Sci.*, **16**, 251 (2000).
- 23) T. Sakai : *J. Flow Injection Anal.*, **17**, 156 (2000).
- 24) S. Ohno, M. Tanaka, N. Teshima, T. Sakai : *Anal. Sci.*, **20**, 171 (2004).
- 25) N. Teshima, S. Gotoh, K. Ida, T. Sakai : *Anal. Chim. Acta*, **557**, 387 (2006).
- 26) T. Sakai, A. Yanagisawa, K. Higuchi, N. Teshima, N. Ura : *Talanta*, **52**, 153 (2000).
- 27) S. Gotoh, N. Teshima, T. Sakai, K. Ida, N. Ura : *Anal. Chim. Acta*, **499**, 91 (2003).
- 28) 手嶋紀雄, 信田拓哉, 酒井忠雄, 河野拓治 : 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **50**, 47 (2001).
- 29) W. A. E. McBryde : "A Critical Review of Equilibrium Data for Proton- and Metal Complexes of 1, 10-Phenanthroline", (1978), (Pergamon Press, Oxford).
- 30) L. Milne, P. Nicotera, S. Orrenius, M. J. Burkitt : *Arch. Biochem. Biophys.*, **304**, 102 (1993).

## Simultaneous Spectrophotometric Determination of Ascorbic Acid and Glutathione by Kinetic-Based Flow Injection Analysis

Norio TESHIMA<sup>1</sup>, Takuya NOBUTA<sup>1,2</sup> and Tadao SAKAI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Applied Chemistry, Aichi Institute of Technology, 1247, Yachigusa, Yakusa-cho, Toyota-shi, Aichi 470-0392

<sup>2</sup> Nitto Analytical Techno-Center Co., Ltd., 1-1-2, Shimohozumi, Ibaraki-shi, Osaka 567-8680

(Received 27 February 2008, Accepted 27 March 2008)

A flow injection (FI) spectrophotometric method for the simultaneous determination of ascorbic acid (AA) and glutathione (GSH) in a single injection (one-shot) is presented. The method is based on the reaction kinetics of a reduction reaction of an iron(III)-1,10-phenanthroline (phen) complex to a red iron(II)-phen complex ( $\lambda_{\max} = 510 \text{ nm}$ ) with each reducing compound. AA rapidly reduces an iron(III)-phen complex to a red complex, while the reaction rate with GSH is very slow. However, copper(II) greatly accelerates the reaction rate with GSH. Therefore, in the presence of copper(II) the concentration of the produced red complex corresponds to the total concentration of AA and GSH. A double flow cell that has two cell compartments in parallel is installed in a double-beam spectrophotometer. The use of the double flow cell makes it possible to detect simultaneously two analytes from a one-shot, *i.e.* AA can be detected at 510 nm in the absence of copper when an injected sample zone passes through the first compartment in the double flow cell, and then after the sample zone merges with a copper(II) solution, the total concentration of AA and GSH can be detected in the second compartment. Under the optimum conditions, AA and GSH can be determined simultaneously in the ranges of  $5 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-6} \text{ M}$  for AA and of  $2 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-4} \text{ M}$  for GSH with a sample throughput rate of  $45 \text{ h}^{-1}$ . The proposed FI method was successfully applied to the determination of these compounds in pharmaceutical preparations and a supplement.

**Keywords :** flow injection analysis ; double flow cell ; spectrophotometry ; simultaneous determination ; ascorbic acid ; glutathione.