

チタン(IV)-4-(2-ピリジルアゾ)-レソルシノール試液による 新しい微量過酸化水素の吸光光度定量法

——食品中の過酸化水素の定量——

松原 チヨ[®], 高村 喜代子^{*}

(1980 年 4 月 30 日受理)

チタン(IV) と 4-(2-ピリジルアゾ)-レソルシノール (PAR) との混合溶液 (Ti-PAR 試液) を呈色試薬とする微量過酸化水素の吸光光度定量法を見いだした。Ti-PAR 試液を過酸化水素に加えると、PAR 及び過酸化水素を含むチタン(IV) 錯体 ($\lambda_{\max}$ 508 nm) を生成し、その吸光度は過酸化水素の濃度に比例する。[PAR]/[Ti(IV)] ≤ 1 , pH 7.5~12 の条件下で分子吸光係数 $\epsilon = 3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を示し、過酸化水素の濃度 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ まで定量可能 (変動係数 2.0 % 以下) であった。本試液は無機イオン及び有機化合物など種々の共存物質の影響を受け難いので、食品などに適用した場合前処理をほとんど必要としない利点がある。水産ねり製品、めん類など食品に添加された過酸化水素の定量を試みたところ、0.3 ppm まで定量が可能であった。又、試料に本試液を直接滴下するスポットテストでは、かまぼこの場合 2 ppm まで肉眼による検出が可能であった。

1 緒 言

食品添加物の分析法は試料の性質上、その反応は高感度で共存物質の影響を受け難いこと、そして操作が簡易迅速であることが望まれている。

過酸化水素は漂白力と殺菌性を有するので、従来水産ねり製品、各種めん類など種々の食品に殺菌あるいは漂白を目的とする食品添加物として、又食品包装材の殺菌料として使用されてきた。しかしごく最近、過酸化水素の発がん性が見いだされて使用禁止が論議されたが、その有用性から最終製品に残存しないことを条件に使用が認められようとしている。従ってその場合には、微量過酸化水素を検出、定量するための簡易で高感度な分析法がこれまでよりも要求されるであろう。従来、食品中に添加された過酸化水素の検出、定量法としては、衛生試験法註解¹⁾、衛生検査指針²⁾ そして厚生省提示の方法³⁾ のいずれにおいても、ヨウ素滴定による定量法と、チタン(IV) あるいはバナジウム(V) のペルオキシ錯体生成による検出法が採用されている。しかしこれらの方法は、感度あるいは共存物の影響の点で、微量過酸化水素の定量法として十分満足されるものではない。又最近、電位差滴定法及びパルスポーラログラフィーによる高感

度分析法⁴⁾ も報告されているが、簡易迅速を要求される食品添加物への応用の場合必ずしも適当でない。

既に著者らは、Ti-PAR 試液が微量過酸化水素定量のための吸光分析試薬として有用なことを見いだした⁵⁾。本法は感度及び選択性に優れており操作法も簡便である。そこで本報では、Ti-PAR 試液について適用条件の詳細な検討を行うとともに、水産ねり製品、めん類及び飲料などの食品に添加された過酸化水素の定量及び検出を試みた。

2 実 験

2.1 試薬と装置

チタン(IV) 溶液 ($1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$) : 四塩化チタン (特級, 関東化学製) 24 ml を 4 N 塩酸に溶解, 全量 500 ml とし, エチレンジアミン 四酢酸 による キレート 滴定により 標定した。この溶液を 水で 希釈し $1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$ 溶液とした。PAR 溶液 ($1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$) : PAR (ドータイト試薬, 同仁化学製) 22 mg を 1 % 水酸化ナトリウム 4 ml に溶解し水で全量 100 ml とした。Ti-PAR 試液 : チタン(IV) 溶液 40 ml 及び PAR 溶液 30 ml を混合し水で全量 100 ml とした。この溶液の pH は約 3.5 となる。なお、この試液は必要に応じ 2 倍濃度のものを用いる。アンモニア緩衝液 (pH 8.6 及び 10.7) : 0.1 N アンモニア及び 0.1 N 塩化アンモニウムを pH 8.6 では 1 : 8 に、又 pH 10.7 では 16 : 1 の割合に

* 東京薬科大学 : 東京都八王子市堀之内 1432-1

混合した。過酸化水素標準溶液 ($1.000 \times 10^{-1} \text{ M}$) : 30 % 過酸化水素 (特級, 三菱瓦斯化学製) 11 ml を水で希釈し全量 1000 ml とし, 過マンガン酸カリウム滴定法により標定した。この溶液は使用時に適宜希釈した。

装置: 吸光度の測定は日立分光光度計 200-10 型を用い, pH 測定は東芝ベックマン pH 計 SS-2 型を用いた。

2.2 測定法

定量法: 試料溶液の調製。水産ねり製品, めん類などの試料を細切し, その 40 g に水 (30~40) ml を加えホモジナイズした後, 200 ml の共せんメスシリンダーに洗い込み水を加えて 200 ml とする。その内容物を遠心分離し {2000 rpm, (10~20) min}, 上澄液を検液とする。吸光度の測定。検液 (必要ならば適宜希釈した後) 5 ml を採り Ti-PAR 試液 1.0 ml を加えた後, 緩衝液 3 ml と水を加え全量 10 ml とする。45°C で 5 分間加温し, 冷後 508 nm における吸光度を測定する。対照液には試薬空試験液を用いた。別に過酸化水素標準溶液を用いて得た検量線により試料中の過酸化水素含量を計算する。

簡易検出法: 水産ねり製品ならば (1~2) mm 厚さの切片とし, めん類などはそのまま検体とする。検体に Ti-PAR 試液及び緩衝液 (pH 8.6) を滴下した後 (35~45)°C に加温し 5 分後に呈色度を観察する。なお緩衝液 (pH 10.7) を用いた場合は, 加温することなく室温に放置 5 分後に呈色を観察する。又試料がジュースなど液体の場合は, 希釈した試料 5 ml を試験管に採り試液 1 ml, 緩衝液 4 ml を加え, (35~45)°C に加温 5 分後に溶液の呈色度を観察する。

3 結 果

3.1 Ti-PAR 試液による呈色条件

Ti-PAR 試液を微量過酸水素の吸光分析試薬として用いる場合の最適条件を検討した。

3.1.1 吸収スペクトル pH 8.6 において Ti-PAR 試液に過酸化水素を添加した場合, 溶液の吸収スペクトルは 508 nm に吸収ピークを示し, その吸光度は過酸化水素濃度に比例する (Fig. 1, a)。この吸収は 3.1.4 に述べるように過酸化水素と PAR を含むチタン(IV) 錯体によるものと考えられ, Fig. 1, a の吸収スペクトルから得られる分子吸光係数 ϵ は 508 nm において $3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ である。一方 Ti-PAR 試液の吸収スペクトルは, pH 8.6 において λ_{max} 523 nm にチタン(IV)-PAR 錯体によるやや幅広い吸収を示す⁶⁾ (Fig. 1, b)。この吸収は常温では徐々に, 加温した場合には

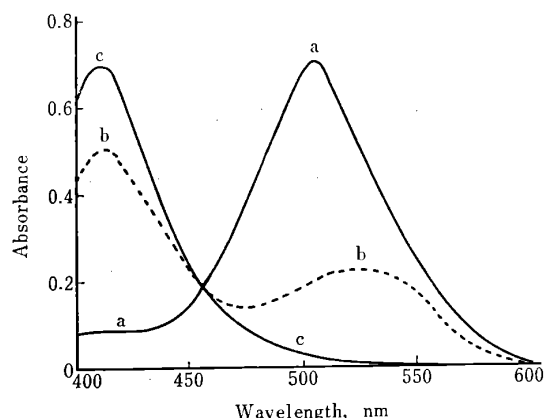


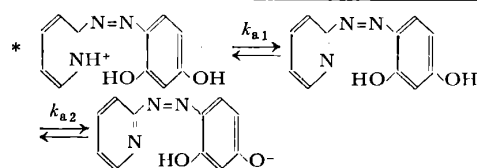
Fig. 1 Absorbance spectra of Ti(IV)-PAR-H₂O₂ systems at pH 8.6

	[Ti(IV)] (M)	[PAR] (M)	[H ₂ O ₂] (M)
a	4.0×10^{-5}	3.0×10^{-5}	2.0×10^{-5}
b	4.0×10^{-5}	3.0×10^{-5}	
c		3.0×10^{-5}	

急速に低下する。45°C では 3 分後には完全に消滅するが, それに伴って 413 nm における吸光度が増大し, 溶液のスペクトルは PAR のみの場合に一致する。pH 8.6 において 413 nm に見られる吸収は, PAR の第 2 段の酸解離により生じた陰イオン* によるものである⁷⁾, この現象はチタン(IV)-PAR 錯体が加温した場合には急速に解離することを示唆している。従って本試液による過酸化水素定量時には, 試液中のチタン(IV)-PAR 錯体の吸収の影響を加温することにより速やかに除くことが可能である。以上の結果に基づいて, 吸光度測定時の波長を 508 nm とした。

3.1.2 pH の影響 Ti-PAR 試液に過酸化水素を添加した場合, 溶液の吸光度に対する pH の影響を Fig. 2 に示した。pH 7.5~12 の範囲で一定吸光度が得られる。しかし, pH 10 以上では吸収スペクトルは 532 nm 付近に肩を示し, 過酸化水素を含む種々の錯体化学種の生成が推察される。従って, 定量時の溶液の pH を 8.6 と定めた。

3.1.3 呈色の経時変化 前述のように, チタン(IV)-PAR 錯体の吸収の影響は加温によって速やかに除去できる。そこで, 吸光度に対する加温時間の影響を検討した。その結果を Fig. 3 に示す。試薬空試験液を用いて吸光度を測定する場合, pH 8.6 に調整後 45°C



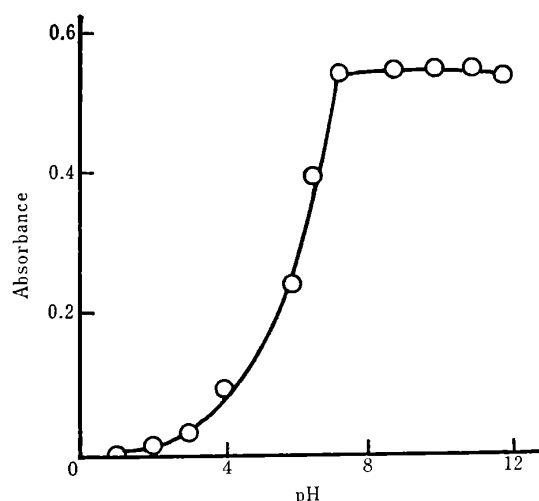


Fig. 2 Effect of pH on the absorbance of Ti(IV)-PAR-H₂O₂ system

Concentration : [Ti(IV)], 4×10^{-5} M, [PAR], 3×10^{-5} M, [H₂O₂], 1.5×10^{-5} M; Wavelength : 508 nm

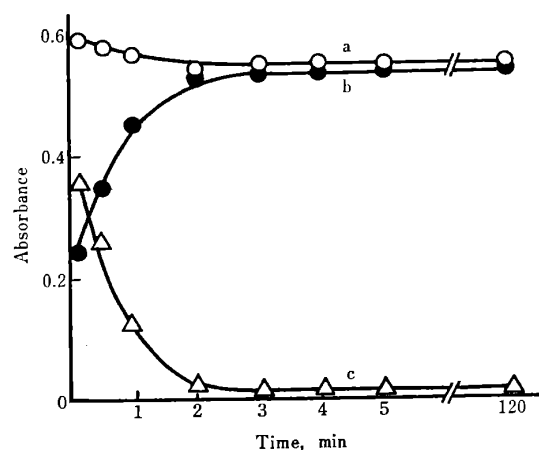


Fig. 3 Time dependence of the absorbance of Ti(IV)-PAR-H₂O₂ (a) and Ti(IV)-PAR (c) systems obtained at pH 8.6 and at 45 °C

Curve b was obtained by subtracting curve c from curve a. Concentration : [Ti(IV)], 4×10^{-5} M, [PAR], 3×10^{-5} M, [H₂O₂], 1.5×10^{-5} M; Wavelength : 508 nm

に 3 分間加温するとチタン(IV)-PAR-過酸化水素錯体による一定吸光度が得られる (Fig. 3, b). なお, この吸光度はその後室温に 2 時間以上放置しても変化が認められなかった. 従って定量における吸光度測定は, pH 8.6 に調整し, 次に 45 °C で 5 分間加温した後に行うことにした. なお, pH 10.7 では室温でも 3 分後にはチタン(IV)-PAR 錯体の吸収の消失が認められたが, この場合測定値のばらつきがやや大きくなるので定量条件としては適当でない.

Ti-PAR 試液は pH 3.5 において冷蔵庫に 4 か月以上保存しても吸光度に変化が認められないことから, 本試液はかなり長期間の保存ができることを知った.

3.1.4 Ti-PAR 試液の組成比 Ti-PAR 試液の濃度比を決めるために, チタン(IV)-PAR-過酸化水素錯体の組成をモル比法及び連続変化法により検討した.

いずれの方法でも錯体の組成比は 1 : 1 : 1 と求められ, この値は Li らの報告と一致する⁸⁾. この結果から, Ti-PAR 試液の濃度比を [PAR]/[Ti(IV)]=1 とすることは妥当と考えられる. しかし, 過剰な PAR の存在は試液空試験液の吸収を高めること, 又 [PAR]/[Ti(IV)] > 1 の場合には吸光度値にばらつきを生じ精度の低下が見られることから, 濃度比を [PAR]/[Ti(IV)] ≤ 1 に保つことが望ましい. 以上のことから, 本報では実験の項に述べたように [PAR]/[Ti(IV)]=3/4 と定めた.

3.2 過酸化水素の定量と検出

3.2.1 検量線 前項の結果に基づいて Ti-PAR 試液による過酸化水素定量のための最適条件を求め, 実験の項に述べたような定量及び検出法を定めた. この定量法により過酸化水素標準液を用いて検量線を作成したところ, [H₂O₂] = (1×10^{-6} ~ 5×10^{-5}) M の範囲で濃度と吸光度はよい比例性を示し, その変動係数は 2 % 以下であった. なお, 分光光度計の目盛拡大下では 3×10^{-7} M 過酸化水素まで吸光度との比例性が確認された.

3.2.2 簡易検出法 実験の項の簡易検出法によって, 過酸化水素濃度を段階的に変化させた溶液列について呈色を肉眼で識別したところ, 検出可能な濃度限界は 4×10^{-6} M であった.

3.2.3 共存物質の影響 本試液を食品中の過酸化水素定量に応用するために, 定量値に及ぼす共存物質の影響を調べた結果を Table 1 及び Table 2 に示した.

Table 1 Effects of inorganic compounds on the determination of H₂O₂ by the Ti-PAR reagent

Inorganic compound (M)		H ₂ O ₂ found (%)	Inorganic compound (M)		H ₂ O ₂ found (%)
NaCl	5×10 ⁻²	100	CuCl ₂	5×10 ⁻⁶	111
KCl	1×10 ⁻²	100		5×10 ⁻⁷	100
CaCl ₂	5×10 ⁻⁴	94	KBr	2×10 ⁻³	100
	5×10 ⁻⁵	100	KBrO ₃	2×10 ⁻³	100
MgCl ₂	2×10 ⁻⁴	100	Na ₂ CO ₃	2×10 ⁻³	100
FeCl ₃	2×10 ⁻⁵	120	Na ₂ SO ₄	1×10 ⁻³	100
	1×10 ⁻⁶	102	Na ₃ PO ₄	5×10 ⁻²	100

[H₂O₂] added : 2×10^{-5} M

Table 2 Effects of organic compounds on the determination of H_2O_2 by the Ti-PAR reagent

Organic compound (M)	H_2O_2 found (%)	Organic compound (M)	H_2O_2 found (%)
Acetic acid 1×10^{-1}	100	Amino acid 1×10^{-4} †	100
Ascorbic acid 1×10^{-3}	100	Sorbic acid 2×10^{-3}	100
Citric acid 1×10^{-2}	100	Benzoic acid 2×10^{-3}	100
Glycolic acid 1×10^{-4}	100	EDTA 1×10^{-5}	100
Lactic acid 1×10^{-4}	100		

[H_2O_2] added: 1×10^{-5} M; † Each of the following amino acids was tested, Arg, His, Met, Asn, Asp, Gly, Ala, Thr, Ser, Orn, Cit, Trp and Tyr.

食品中に存在が予想されるナトリウム、カルシウム、塩素、リン酸などの無機イオン及び食品添加物あるいはその分解生成物である臭素酸カリウム、臭化カリウムは、いずれも過酸化水素の(10~100)倍量の存在において定量への影響がほとんど認められなかった。しかし、鉄(III)あるいは銅(II)の存在は、PARとの錯体生成によって過酸化水素の定量結果に大きな誤差をもたらす。

すなわち、鉄(II)及び銅(II)のPAR錯体の λ_{max} はそれぞれ(500~550)nm及び(490~500)nm付近にあり、チタン(IV)-PAR-過酸化水素錯体の λ_{max} 508 nmに近接しており、かつ錯体の吸光係数も大である。

Table 1 に示したように鉄(II)及び銅(II)イオンは、それぞれ 2×10^{-5} M, 5×10^{-6} Mの存在でかなり大きな正誤差を与えた。又Ti-PAR試液の添加30分前に、 5×10^{-6} M前後の濃度になるように鉄(III)を添加した場合、過酸化水素の分解が触媒されて濃度の減少をもたらす、見掛け上負の誤差を示す。鉄(III)、銅(II)は食品中にかなり高含量に存在し、例えばかまぼこでは1 mg/100 gまで存在の可能性がある。しかし、食品中でこれらのイオンはたん白質などと結合しており、水浸液中に遊離状態で高濃度に移行する可能性は少ないと考えられる。又本法が高感度であるので、十分希釈した試料に適用することも可能である。従ってこれらのイオンは、後述の実例では試料中の過酸化水素の定量結果に大きな影響を及ぼさなかった。又有機物としては、食品由来の各種カルボン酸、13種のアミノ酸などについて検討したが、過酸化水素の10倍量が存在しても定量結果に影響を与えない。又食品添加物であるソルビン酸、あるいは過酸化ベンゾイルの分解生成物である安息香酸の存在は、200倍以上とかなり高濃度でも定量結果に影響を与えない。

3.3 食品中の過酸化水素の定量、検出への応用

本法が食品中の微量過酸化水素の定量、検出法として

実用性が期待されるので、数種の水産ねり製品、めん類及びジュースなどに添加された過酸化水素の検出を試みた。

Table 3 は、市販のかまぼこを3%及び0.3%過酸化水素に浸したのについて、本法と衛生試験法収載のヨウ素滴定法による定量結果を比較した結果であり、両者はよい一致を示している。又かまぼこの抽出液を用いた添加回収実験では、2000 ppm相当以上の高濃度に過酸化水素を添加直後に測定した場合は回収率97%を得た。しかし添加量が少量である場合は、試料溶液調製の過程で過酸化水素が分解されてしまうために回収率(76~90)%程度しか得られなかった。Table 4 に過酸化水素量(5~14)ppmにおける添加回収の結果を示した。

Table 3 Determination of H_2O_2 by the present method (1) and the titration using I_2 (2)

Sample†	H_2O_2 (ppm)	
	(1)	(2)
Fish paste product, steamed a	2050	2030
	2050	2035
	2050	2025
	av. 2050	av. 2030
Fish paste product, steamed b	778	770
	777	776
	778	764
	av. 778	av. 770

† Fish paste products, steamed a and b were dipped in 3% and 0.3% H_2O_2 for 2 min, respectively.

Table 4 Recovery of H_2O_2 from foods

Sample	H_2O_2 added (ppm)	H_2O_2 found	
		ppm†	c. v. (%)††
Fish paste product, steamed	5.7	4.9	4.0
	7.1	6.1	3.0
Noodle	11.7	9.2	3.0
Apple juice	6.8	6.6	3.0
	13.6	12.3	3.0

† Average value of 5 determinations; †† cv was calculated from 5 determinations

Table 5 は、市販の水産ねり製品、めん類などに残存する過酸化水素を本法によって定量した結果である。本法では含量1 ppmの試料では吸光度0.1を示し、信頼性の高い結果を得ることが可能である。一方衛生試験法によるヨウ素滴定法では、0.02 Nチオ硫酸ナトリウム消費量1 mlまで定量可能とすれば、定量下限は約30 ppmとなる。従って、このTable 4のような低含量の試料については、ヨウ素滴定法では信頼性のある結果を得るのは困難である。又、本法は十分希釈した試料液に適用できかつ共存物質による影響が少ないので、分離などの前処理をほとんど必要としない。このことは実用上

Table 5 Determination of H_2O_2 in various foods

Sample		H_2O_2 (ppm)
Noodle	a	32.0
	b	15.0
	c	11.6
	d	2.1
Fish paste product steamed	a	16.0
	b	0.9
	c	0.7
	d	0.6
Fish paste product, steamed, spongy texture	e	0.0
Fish paste product, steamed, cylindrical type	a	4.1
	b	1.4
Fish paste product, steamed, with red spiral pattern		1.1
Boiled and semidried whitebait		0.0
Apple juice	a	1.1
	b	1.3
		2.0

大きな利点である。

本試液による呈色が明りょうな赤色であるので目視による検出が可能である。実験の項に述べた簡易検出法を試みたところ水産ねり製品, うどんでは過酸化水素含量 2 ppm まで, 紙製容器入りジュースでは 0.5 ppm まで識別が可能であった。なお, 衛生試験法収載のペルオキシチタン(IV) 錯体生成による従来法に比較して, λ_{max} が長波長側にあり, かつ吸光係数も大である本法は, 呈色の判定が容易であった。

4 結 語

Ti-PAR 試液を用いる 微量過酸化水素の定量の最適条件を検討し, その方法を確立した。

本法の定量下限は, 1×10^{-6} M (分光光度計のスケール拡大下で 3×10^{-7} M) であり, これは化学発光法⁹⁾ の 1×10^{-6} M, あるいは増感化学発光法¹⁰⁾ の 1×10^{-7} M とほぼ同程度といえる。しかも精度においては, 化学発光法が変動係数 10 % 程度であるのに比較して, 本法では 2 % 以下であり再現性に優れている。又本法が共存物質, 特に還元性化合物の影響を受け難いことは, 従来臨床分析の分野で実用化されているペルオキシダーゼ-アミノアンチピリン-フェノール法¹¹⁾ などに比較しても大きな利点となろう。なお, 食品中の過酸化水素の定量に適用した場合, 衛生試験法収載の従来法であるカタラーゼを用いるヨウ素滴定に比較して, 本法は操作が簡易であり, 感度も約 100 倍高いなど実用上大きな利点を有している。

もし食品中の過酸化水素の分解法が開発され, 食品への添加そして分解がなされるようになったときには, 残留する微量過酸化水素の定量法としても本法は有用と考える。

本法は, 高感度であり共存物質の影響を受け難い特性を有するので, 他分野での応用が期待される。

(1980 年 4 月, 日本薬学会第 100 年会において一部発表)

文 献

- 1) 日本薬学会衛生化学調査委員会: “衛生試験法注解”, 日本薬学会編, p. 192 (1973), (金原出版)。
- 2) 厚生省環境衛生局監修: “食品衛生検査指針”, I, p. 361 (1973), (日本食品衛生協会)。
- 3) 厚生省食品化学課: 食品衛生研究, **26**, 11 (1976); **27**, 37, 1123 (1977)。
- 4) K. G. Boto, L. F. G. Williams: *Anal. Chim. Acta*, **85**, 179 (1976)。
- 5) 松原チヨ, 高村喜代子: 第四回生体成分の分析化学シンポジウム講演要旨集, p. 21 (1979)。
- 6) 小沢敏夫: 分化, **16**, 435 (1967)。
- 7) R. G. Anderson, G. Nickless: *Analyst* (London), **92**, 207 (1967)。
- 8) J. C. Li, S. M. Cheng: *Ko Hsueh Tung Pao*, No. 7, 623 (1964); *Sci. Sinica*, **14**, 144 (1965)。
- 9) 合田四郎, 山下芳文, 西川泰治, 重松恒信: 分化, **22**, 1180 (1973)。
- 10) D. C. Williams III, G. F. Huff, W. R. Seitz: *Anal. Chem.*, **48**, 1003 (1976)。
- 11) P. Trinder: *Ann. Clin. Biochem.*, **6**, 24 (1969)。

☆

A new spectrophotometric method for the determination of trace of hydrogen peroxide by the titanium(IV)-4-(2-pyridylazo)-resorcinol reagent; Application to the assay for hydrogen peroxide as a food additive. Chiyo MATSUBARA and Kiyoko TAKAMURA (Tokyo College of Pharmacy, 1432-1, Horinouchi, Hachioji-shi, Tokyo)

A simple and rapid method was developed for the determination of trace of hydrogen peroxide using a mixture of titanium(IV) and 4-(2-pyridylazo)-resorcinol (named Ti-PAR reagent) as a color developing agent. The addition of hydrogen peroxide to the reagent results in a red coloration due to the formation of titanium(IV) complex with hydrogen peroxide and PAR. The absorbance at 508 nm was proportional to the concentration of hydrogen peroxide added under the conditions of $[\text{PAR}]/[\text{Ti(IV)}] \leq 1$ and $[\text{Ti(IV)}] = (3 \times 10^{-5} \sim 6 \times 10^{-5})$ M in pH 7.5~12. The Ti-PAR reagent itself also exhibits the absorption peak (λ_{max} 523 nm) at pH 8.6 due to the formation of titanium(IV)-PAR complex. However, the latter peak was rather unstable and disappeared rapidly when it was warmed, while the former peak remained unchanged at 45 °C over a period of several hours. Then the absorption measurements at 508 nm were performed after heating at 45 °C for 5 min. The method was applicable to the determination of hydrogen peroxide in the concentration range of 1×10^{-6} to 5×10^{-5} M with a molar absorptivity of $3.6 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$. The data were reliable with a coefficient of variation below 2.0 %. Little effect was observed by other substances. The method was successfully applied to the determination of hydrogen peroxide

added in food, and the lower limit of determination was found to be about 0.3 ppm. A spot test of hydrogen peroxide by dropping the reagent directly to samples was further examined and the lower limit of detection was *ca.* 2 ppm for white boiled fish-paste. (Received Apr. 30, 1980)

Keywords

Food additives
Hydrogen peroxide
4-(2-Pyridylazo)resorcinol (PAR)
Spectrophotometric determination
Titanium(IV) complex

高速液体クロマトグラフィーによるチオシアン酸イオンの定量

戸井田敏彦，緒方 惟治，田辺 信三，今成登志男*®

(1980 年 7 月 10 日受理)

高速液体クロマトグラフィーを用いて微量のチオシアン酸イオンを測定するための諸条件を検討した。カラムに強塩基性陰イオン交換樹脂 (TSK-ゲル LS-222, 6 μ) を用い、溶離液として過塩素酸-過塩素酸鉄(III) の混合液を用いることにより、チオシアン酸イオンの溶離と鉄(III) 錯体としての検出が 1 台のポンプで行える簡単なクロマトグラフシステムを開発した。検量線は (0.25~10) nmol の範囲で直線となった。

本法を用いて、ヒト尿中のチオシアン酸イオンの定量を試みたところ、原尿を遠心分離してその上澄液 100 μ l を直接カラムに注入するだけで精度良く定量できた。

1 緒 言

ヒト生体内には微量のチオシアン酸イオン (SCN^-) が存在している。その SCN^- を分析することは含硫化合物の代謝¹⁾、シアン²⁾の解毒代謝³⁾、医薬品としての SCN^- の作用機序など、多くの未知の分野を研究する手掛かりとして興味深い。

従来、生体内 SCN^- の分析にはオートアナライザーに組まれたチオシアン酸鉄(III) 錯体法⁴⁾ と、シアンの検出反応であるビリジーン-ピラゾロン法⁵⁾ を応用した比色法が報告されている。前者は反応、操作が簡単であるが、鉄(III) との反応が SCN^- に特異的でなく、サリチル酸類などの妨害を受ける。一方、後者は高感度であるが元来、シアンの検出法であり SCN^- の定量には更に煩雑な前処理が必要である。最近、ガスクロマトグラフィーによる高感度な方法⁶⁾ が報告されているが、臭化シアンとして電子捕獲検出器を用いるため、前処理や操作に高度の熟練を要し、ルーチン法としての適用が難しい。

本研究では、高速液体クロマトグラフィー (以下 HPLC と略記) を用いて SCN^- を他の物質と分離し、検出系として反応、操作の簡単なチオシアン酸鉄(III) 錯体の比色法を適用する微量定量法の開発を試み、更にそれをヒト尿中の SCN^- の分析に応用することを検討した。

2 試薬及び装置

2.1 試 薬

チオシアン酸標準液：チオシアン酸カリウム 389 mg/1 の保存水溶液を調製し、適宜希釈して用いた。その他の試薬類は市販の試薬特級品を用いた。

2.2 装 置

高速液体クロマトグラフは市販の部品を用いて組み立てた。すなわち、送液用ポンプは盛進製薬社製の耐酸性定流量ポンプを、試料の注入には同社製高圧手動マルチバルブ VMU-6 を、検出器には 50 μ l のフローセルを装着した日立 181 型分光光度計を、又、記録計はセコニック SS-250F を使用した。又、可視部の吸収スペクトルの測定には日立自記分光光度計 340 型を用いた。

* 千葉大学薬学部：千葉県千葉市弥生町 1-33