

ペルオキシダーゼ, 2,2'-アジノジ(3-エチルベンゾチアゾリン 6-スルホン酸) アンモニウム塩を用いた過酸化水素の微量定量法とその応用

長谷川 敬彦[®], 菅原 悦子, 柏木 力*

(1981 年 3 月 14 日受理)

ペルオキシダーゼ, 2,2'-アジノジ(3-エチルベンゾチアゾリン 6-スルホン酸) アンモニウム塩 (ABTS) を用いた一試薬法による過酸化水素の定量法について検討した. 実試料としてはうどんについて添加回収, 抽出条件を検討した. 定量下限は 420 nm を測光波長とした場合, 標準偏差パーセント 5% 以内で (0.01~0.02) $\mu\text{g/ml}$ である. 過酸化水素の濃度によっては試料量を選択することにより 420 nm, 660 nm, 740 nm のいずれの波長においてもベールの法則が成立する. この点は生物試料などで光学的干渉を避ける点において有利である. 実試料としてうどんでの添加回収率は約 97% であり, 水振とう抽出の抽出効率は (80~87)% である.

1 緒 言

過酸化水素の定量は過酸化水素の還元性に基づいた過マンガン酸塩滴定法やヨウ素酸滴定法, 酸化反応を利用した硫酸チタンによる比色法があるが, いずれも測定感度が低く, 又共存物質による干渉, 分析過程での過酸化水素の分解などの難点がある. 更に過酸化水素に対する測定の特異性を酵素に求め, メタノール又はエタノール共存下にカタラーゼによって生ずるアルデヒドを3-メチル-2-ベンゾチアゾリンヒドラゾン (MBTH) を用いて測定する方法¹⁾は測定感度は高いが, 試料中の水分によってメタノールが希釈される場合は補正を必要とし, 又共存するたん白質の影響を受けるため生物試料や食品の分析には適していない. 酵素センサーとしてペルオキシダーゼ [POD EC 1.11.1.7] を用いた場合, 従来用いられてきた *o*-トリジン, *o*-ジアニシジンは後者は色素が不安定であるとともに, いずれも発がん物質であるところから排除されてきている. 又, 4-アミノアンチピリンとフェノールの縮合反応からキノン型の赤色色素 (5160 $\text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1}$ l, 500 nm) を形成させる方法も定量下限が 10 $\mu\text{g/ml}$ 前後である.

最近, 過酸化水素の発がん性が注目され, 食品, なかでもゆでめん中の過酸化水素の定量が要請されたが, 上述

のいずれの方法も 10 $\mu\text{g/ml}$ 以下の定量性が低いため, 1 ppm 以下の過酸化水素を迅速かつ精度よく分析する方法の確立が望まれてきた. 著者らは過酸化水素に対する特異性をペルオキシダーゼに求め, 測定感度の向上をモル吸光係数の大きい ABTS を色原体として用いることによって 1 ppm 以下の過酸化水素を迅速かつ精度よく定量することが可能となった.

2 試薬, 装置

2.1 試 薬

ABTS: ABTS (ベーリンガー社製) を 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に溶解した.

ペルオキシダーゼ: 西洋ワサビペルオキシダーゼ 250 U/mg (ベーリンガー社製) 3.2 M 硫酸アンモニウム懸濁液を用いた.

標準過酸化水素水: 30% 過酸化水素水 (三菱瓦斯化学製) 2 ml を水で 500 ml に希釈し, この溶液 20 ml に 30 ml の水と 1N 硫酸 5 ml を加えて硫酸酸性とした後, 0.1N 過マンガン酸カリウム水溶液で標定する. この場合 0.1N 過マンガン酸カリウム 1 ml は過酸化水素 1.7 mg に相当する. 標定後, 20 $\mu\text{g/ml}$ になるように蒸留水で希釈し過酸化水素保存標準液を調製した.

その他の試薬類はすべて特級品を用い, 水は蒸留後イオン交換処理したものをを用いた.

2.2 装 置

ホモジナイザー: ポリトロソ 10 を用いた.

遠心器: 久保田 KR 18000, ローターは RA-3 (久保

* 名古屋大学環境医学研究所: 愛知県名古屋市千種区不老町

田)を用いた。

分光光度計: 日立 557 型, ギルフォード 250 型を用い, 1 cm 石英セルを使用した。

3 試料の調製

過酸化水素を含まない湯上げうどん約 5 g に 20 ml の水を加え, ポリトロン 10 でホモジナイズした後, 最大遠心速度 $25400 \times g$ で 30 分間遠心後, その上清を試料とした。

別に後述のように水で振とう抽出し, その上清を試料とする方法についても検討した。

4 実験結果及び考察

4.1 ABTS のスペクトル

ABTS は 340 nm 付近に吸収極大を持つ色原体であるが, 過酸化水素とペルオキシダーゼの反応で生ずる水素の供与体として酸化されると 390 nm, 420 nm, 660 nm, 740 nm 付近に吸収を示すようになる (Fig. 1-a, 1-b)。

4.2 ABTS の濃度

POD 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むリン酸緩衝液 2.8 ml 中の

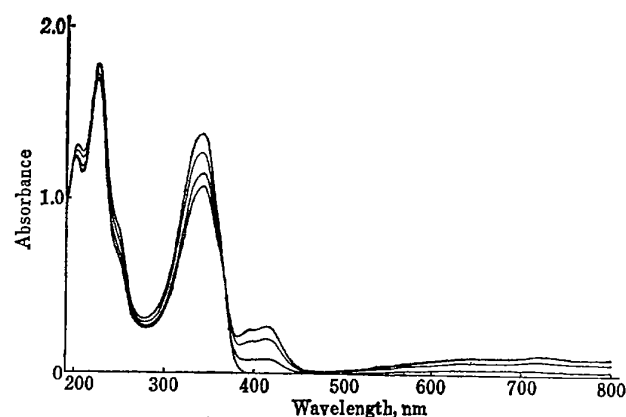
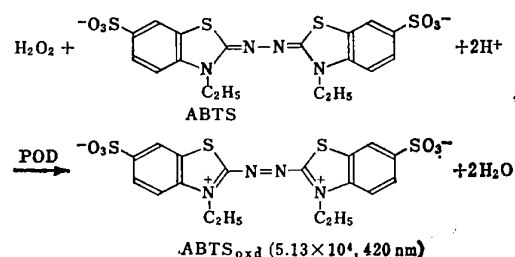


Fig. 1-a Absorption spectra of ABTS and radical cation

ABTS 0.1 mg/ml, POD 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 2.8 ml of 0.1 M phosphate buffer; Hydrogen peroxide : 0, 0.7 μg , 1.5 μg , 2.7 μg



化水素 100 μl を加えた場合の 420 nm の吸光度はペルオキシダーゼ 0.8 $\mu\text{g/ml}$ 以上で一定値に達した。過酸化水素量及び試料中に含まれるペルオキシダーゼの阻害物質の共存を考慮してペルオキシダーゼの濃度は 20 $\mu\text{g/ml}$ を採用した (Fig. 3)。

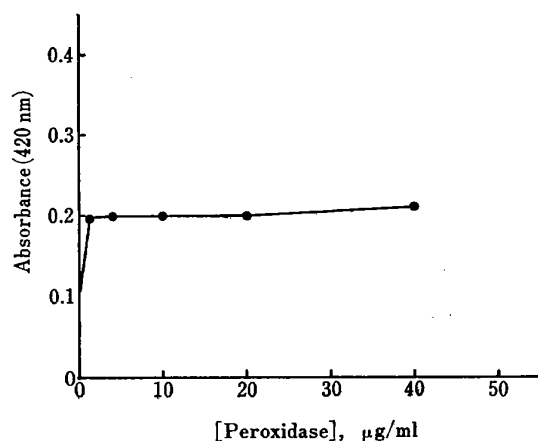


Fig. 3 Effect of the concentration of POD on absorbance

ABTS 1 mg/ml in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 (2.8 ml); Hydrogenperoxide : 7 $\mu\text{g/ml}$ (0.1 ml)

4.4 反応時間と発色の安定性

ペルオキシダーゼの濃度が 4 $\mu\text{g/ml}$ 以上の上記反応液では、反応は瞬時に起こるため直ちに測定を行うことができる。又、発色の安定性は発色後 2 時間以内では吸光度の変化は認められず、12 時間後の吸光度の低下は約 12% であった。

4.5 検量線

過酸化水素が (1~10) $\mu\text{g/ml}$ の濃度の場合には POD 20 $\mu\text{g/ml}$, ABTS 1 mg/ml を含む定量試薬 2.8 ml に対し各濃度の標準液 0.1 ml を用い、過酸化水素が 1 $\mu\text{g/ml}$ 以下の場合には定量試薬 1.8 ml に対し各濃度の標準液 1.0 ml を用いて検量線を作成した (Fig. 4)。直線性、再現性ともに良好な結果が得られた。

又、420 nm におけるモル吸光係数は $51000 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ である。

4.6 標準的な定量法

以上の定量条件の検討結果から定量試薬は 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 中に ABTS 1 mg/ml, ペルオキシダーゼ 20 $\mu\text{g/ml}$ を含む液とし、過酸化水素の含量に応じて試料量と反応液の割合を変化させる。過酸化水素が (1~10) $\mu\text{g/ml}$ では試料 0.1 ml に反

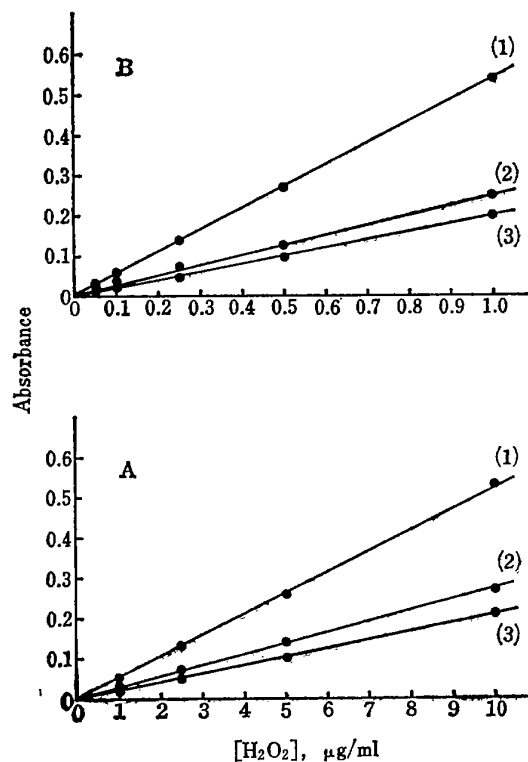


Fig. 4 Calibration curve for hydrogen peroxide

A : Sample 0.1 ml mixed reagent 2.8 ml; B : Sample 1.0 ml mixed reagent 1.8 ml; (1) $\lambda=420 \text{ nm}$; (2) $\lambda=740 \text{ nm}$; (3) $\lambda=660 \text{ nm}$

応液 2.8 ml が適当であり、1 $\mu\text{g/ml}$ 以下の場合には試料 1.0 ml に反応液 1.8 ml とした場合でも検量線の直線性が得られた。

波長の選択は試料中の過酸化水素量や共存物質による光学的干渉、特に血清などの溶血によるヘモグロビンや共存するビリルビンなどの光学的干渉を考慮して 420 nm, 660 nm, 740 nm を選択することが可能である。

4.7 干渉

ABTS は溶存塩素の定量に用いられるように塩素原子と反応することが知られているが³⁾、生物試料中に多量に含まれる共存物、試料調製に際してよく用いられる物質、並びに食品中に添加されている幾つかの物質のうちから色原体やペルオキシダーゼに干渉することが予想される物質について検討した (Table 1)。

ABTS 0.5 mg/ml, ペルオキシダーゼ 40 $\mu\text{g/ml}$ を含む反応試薬 (2.8 ml) を用い過酸化水素 0.35 μg について検討したところ、アスコルビン酸は 0.18 μM 以上、システインは 0.9 μM 以上の終末濃度でいずれも負の干渉を示した (Fig. 5, Fig. 6)。アスコルビン酸はペルオキシダーゼ存在下で過酸化水素によって生じた 420 nm, 660

Table 1 Effect of foreign compounds

Foreign compound	Final concentration	Absorbance (%)
—	—	100
Sodium chloride (NaCl)	18 mM	100
Calcium chloride (CaCl ₂)	18 mM	100
Magnesium chloride (MgCl ₂)	18 mM	100
Ferric chloride (FeCl ₃)	0.18 mM	100
Potassium bromate (KBrO ₃)†	1.8 mM	100
Albumin (bovine)	0.18 mM	100
Glucose	18 mM	100
L-Glutamic acid	18 μM	100
L-Cysteine	18 μM	0
Perchloric acid (HClO ₄)	18 mM	100
L-Ascorbic acid	3.6 μM	0
Sorbic acid sodium salt	18 mM	263
Dithiothreitol	1.1 mM	0
Sodium lauryl sulfate (NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄)	1.8 mM	100
Triton X-100	0.018 %	100
Formaldehyde (HCHO)	0.0004 %	100

Mixed reagent: ABTS 0.5 mg/ml, POD 40 μg/ml in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 (2.8 ml); Hydrogenperoxide : 0.35 μg; † After centrifugation (3000 rpm, 5 min), clear supernatant was measured.

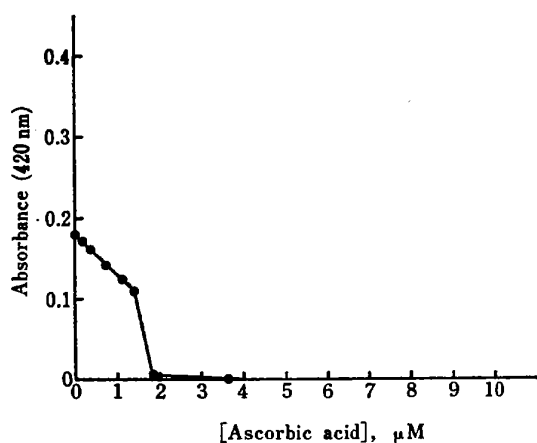


Fig. 5 Effect of the concentration of ascorbic acid on the absorbance for determination of hydrogen peroxide

ABTS 0.5 mg/ml, POD 40 μg/ml in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0; Hydrogenperoxide : 0.13 μg in final concentration

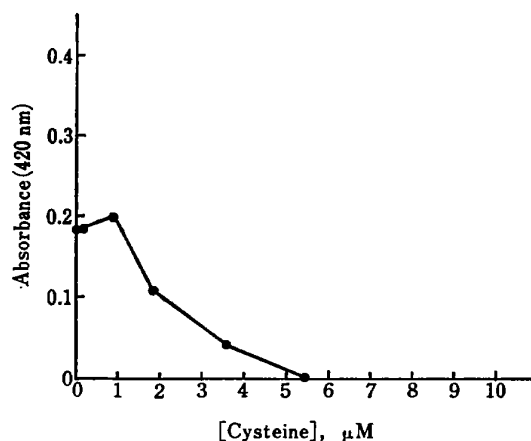


Fig. 6 Effect of the concentration of cysteine on absorbance on determination for hydrogen peroxide

ABTS 0.5 mg/ml, POD 40 μg/ml in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0; Hydrogenperoxide : 0.13 μg in final concentration

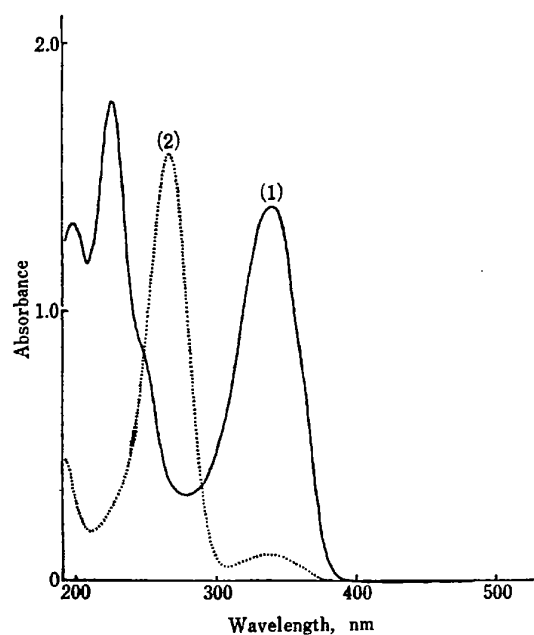


Fig. 7 Absorption spectra of ABTS and ABTS with ascorbic acid

(1) ABTS : ABTS 0.1 mg/ml in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0; (2) ABTS with ascorbic acid : ABTS 0.01 mg/ml in 2.8 ml of mixed reagent. Ascorbic acid 7 mol

nm, 740 nm の吸収を減少させるので生成されたラジカル陽イオンを還元するものと考えられるが, ABTS にアスコルビン酸を加えた場合, 340 nm の吸収は低下して新たに 265 nm 付近に強い吸収がみられるようになることから ABTS そのものとも直接反応すると考えられる (Fig. 7). 一方, カマボコなどに食品添加物として用いられているソルビン酸は正の干渉を示すが, これはソルビン酸がペルオキシダーゼの基質となりうるためである.

5 実試料への応用

5.1 試料の調製法及び回収率

実試料として過酸化水素が含まれていない湯上げうどんについて検討した. 試料の調製法としてポリトロン 10 でホモジナイズした懸濁液を通常の 3000 rpm 程度の遠心分離やセルロース濾紙, 0.45 μm のメンブランフイ

ルターを用いても透明な汙液を得ることができなかった。透明な抽出液を得るためには $25000 \times g$, 30 分間程度の遠心分離を必要とする。

湯上げうどん 5 g をホモジナイズした後、過酸化水素を終末濃度 $1 \mu\text{g/ml}$, $8.7 \mu\text{g/ml}$ になるように添加し、 $25000 \times g$, 30 分の遠心分離後得られた試料についての添加回収率は過酸化水素が $1 \mu\text{g/ml}$ の水準では $(90 \pm 8.5)\%$ ($n=4$), $8.7 \mu\text{g/ml}$ の水準では $(97 \pm 6.7)\%$ ($n=4$) であった。

5.2 水浸せき抽出についての検討

うどんは多孔質であることから単純な水抽出によって含まれる過酸化水素を抽出することができるのではないかと予想される。 $1 \mu\text{g/ml}$ の濃度の過酸化水素水 300 ml に約 20 g の湯上げうどんを約 12 時間浸して平衡させた後、うどんを引き上げセルロース汙紙で表面に付着している過酸化水素水を吸い取り、約 7 g のうどんを精製水 20 ml 中でホモジナイズし $25000 \times g$, 30 分遠心した場合と、約 7 g のうどんを精製水 20 ml の入ったビーカー内で 1 時間振とう (60 ストロークス/min) 抽出した場合とを比較した。

試料グラム当たりの過酸化水素の抽出量は単純な水抽出でもホモジナイズ、高速遠心分離を行った場合に対し約 90 % の回収が得られており、前述の添加回収率からみて水抽出により (80~87) % の抽出率が可能と考えられる (Table 2)。

Table 2 Comparison of extractability between homogenizing method and simple water extraction

	Weight of sample (g)	Extracted H_2O_2 ($\mu\text{g/g}$ sample)
Supernatant of the homogenized	7.21 ± 0.11 ($n=4$)	46.92 ± 1.67
Water extraction with shaking	7.28 ± 0.03 ($n=4$)	42.1 ± 0.63

6 ま と め

(1) POD-ABTS 系による過酸化水素の定量は簡易迅速性、直線性、再現性ともに良好で試料液 1 ml を用いる場合、標準偏差パーセント 5 % 以内で $0.02 \mu\text{g}$ の過酸化水素を定量しうる (波長 420 nm)。測定波長を 420 nm, 660 nm, 740 nm と選択しうることは共存物質による光学的干渉を避ける点においても有利である。

(2) アスコルビン酸, システイン, ジチオスレイトールを除いて生物試料中に多量に含まれる物質、通常試

料調製時に用いられる物質については検討した範囲では干渉は少ない。食品添加物中に含まれるソルビン酸は POD の基質となりうるため正の干渉を示した。

(3) うどんについて検討した結果からはグラム当たり $0.01 \mu\text{g}$ 前後の過酸化水素を含む試料については約 5 g の試料量で定量可能である。抽出に際しては単純な水抽出でも約 90 % の抽出回収が可能である。

文 献

- 1) 石崎睦夫：食品衛生学雑誌, **19**, 167 (1978).
- 2) R. E. Child, W. G. Bardsley : *Biochem. J.*, **145**, 93 (1969).
- 3) S. Hunig, H. Balk, H. Conrad, A. Scott : *Ann. Chem. Justus Liebigs*, **676**, 36 (1964).

☆

A spectrophotometric determination of small amounts of hydrogen peroxide with peroxidase and 2,2'-azinodi[3-ethylbenzthiazoline sulfonate (6)]. Norihiko HASEGAWA, Etsuko SUGAWARA and Tsutomu KASHIWAGI (The Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya)

A simple and rapid spectrophotometric determination of small amounts of hydrogen peroxide with peroxidase (POD) and 2,2'-azinodi[3-ethylbenzthiazoline sulfonate (6)] is described. The oxidized ABTS has absorption peak at 390 nm, 420 nm, 660 nm, and 740 nm in the mixed reagent containing $20 \mu\text{g/ml}$ of POD and 1 mg/ml of ABTS in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0. The apparent absorptivity at 420 nm is estimated to be $51000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ l}$. Calibration curve obeyed to Beer's law over the range 0~10 $\mu\text{g/ml}$ of hydrogen peroxide and the absorbance was stable at least 2 h. Above $0.18 \mu\text{M}$ of ascorbic acid and $0.9 \mu\text{M}$ of cysteine (final concentration) interfered with the determination of hydrogen peroxide by decreasing the absorbance and sorbitol by increasing the absorbance because of its action as a substrate on POD. The determination procedure given below is simple and rapid. For sample solution containing less than $1 \mu\text{g/ml}$ of hydrogen peroxide, take 1 ml of sample and add 1.8 ml of mixed reagent, and for those containing above $1 \mu\text{g/ml}$ of hydrogen peroxide, take (0.1~0.05) ml of sample and add 2.8 ml of mixed reagent. Measure the absorbance within 2 h. For the determination of hydrogen peroxide in Japanese noodle, take about 5 g of noodle sample, homogenize it in distilled water and then centrifuge at $25000 \times g$. An aliquot taken from the clear supernatant can be used for the spectrophotometric determination described above. By this method, 1 ppm of hydrogen peroxide could be determined and the recovery was $(90 \pm 8.5)\%$.

(Received May 14, 1981)

Keyword phrases

spectrophotometric determination of hydrogen peroxide; absorption spectroscopy, ABTS, Japanese noodle.