

## ノ ー ト

亜硫酸塩-過酸化水素系自己触媒反応を用いる過酸化水素の  
目視マイクロプレート分析法間 中 淳<sup>®1</sup>, 尾崎 佑佳<sup>1</sup>, 五十嵐淑郎<sup>2</sup>

## 1 緒 言

近年, 様々な分野において高価な分析装置や煩雑な操作を必要としない分析法の開発の需要が増えており, これまで多くの簡易分析法が開発されてきた. 特にスポットテスト<sup>1)</sup>, パックテスト<sup>2)</sup>, 比色法<sup>3)</sup>や試験紙法<sup>4)</sup>などに代表される目視定量法は, 迅速性・経済性に優れていることから, 簡易分析法の主な手法として広く用いられている. しかしながら, これらの手法は, 色の濃淡を目視で測定するため, 測定者による測定値のずれが大きいなど, 精度の問題が残されていた.

一方, 反応容器と比色セルを兼ねた多数のウェルからなるマイクロプレート計測法は, 多検体を同時に吸光測定が可能であるため, 主に臨床検査の分野で用いられている. しかし, マイクロプレートそのものは安価であるが, 計測装置であるマイクロプレートリーダーは高価であるため, これまで他分野における応用は, 牧野らの金属イオンの吸光光度定量<sup>5)</sup>やポルフィリンを用いたマイクロプレート上での鉛(II)イオンの分析<sup>6)7)</sup>以外にはほとんど報告されていない. これは, 他の機器分析法に比べ十分な感度が得られないためと考えられる.

また, これまでに, 測定精度の高い簡易目視分析法として自己触媒反応の特性を利用した手法が報告されている. この反応は初期触媒濃度に依存する誘導期間を持つ特徴的なS字型濃度-時間反応曲線を与え, 分析対象物の濃度は自己触媒反応の指示反応の時間(誘導期間)に変換することができる. また, 反応終点における急激な化学変化は目視によって容易に観察することができることから, この反応を用いることで人間の目とストップウォッチによる目視分析が可能となる. 更に, この反応曲線の形状は分析対象物の濃度に依存しないことから一定の感度での定量が可能である利点を有していた. これまでに, ピリジルアゾフェノールのコバルト錯体のペルオキソー硫酸ナトリウムによる自己触媒酸化分解反応を用いたコバルト(III)イオンの

簡易目視計測法<sup>8)</sup>及びこの反応系に対する他の様々な触媒種やインファクターの目視計測への応用<sup>9)10)</sup>が報告されている. また, 著者らもこれまでに亜硫酸塩-過酸化水素系自己触媒反応を用いた標識酵素ペルオキシダーゼの目視計測法<sup>11)</sup>を報告している. しかしながら, いずれの手法も反応速度を利用した分析法であるため, 高い温度依存性, 低い選択性の問題が残されていた. また, ある時間に瞬時に起こる反応終点での化学変化を見逃さないよう気をつける必要があるため, 一度測定を開始させると測定中は反応系から目を離すことができない.

最近, 著者らは亜硫酸塩-過酸化水素系自己触媒反応において, 反応の進行の有無に過酸化水素濃度の閾値が存在し, その閾値濃度は任意の亜硫酸塩の濃度に対して一定の濃度比で決まることを見いだした. そのため, マイクロプレートの各列において, 亜硫酸イオン水溶液を濃度が低い順に添加し, 列単位で試料である過酸化水素を加えると, Fig. 1に示すように各列で過酸化水素の濃度が閾値を超えた部分のみ連続して変色する. このことは, 連続して変色したウェル数を目視で判定することで過酸化水素濃度を定量することができることを意味している. 本研究は, これらの知見をマイクロプレート上に応用することによって, 過酸化水素の目視計測法の開発を目指した.

## 2 実 験

## 2.1 試薬・装置

すべての試薬は特級のものを使用した. 亜硫酸ナトリウム(関東化学製), 過酸化水素(和光純薬製), プロモチモールブルー(和光純薬製)の水溶液は蒸留水に希釈して調製した. pHの測定はアズワン製のCyberscan PH1500型を使用した. マイクロプレート及び試薬, 試料の分注に用いたマイクロピペットもアズワン製のものを使用した.

## 2.2 操 作

操作の概略をFig. 2に示す. マイクロプレートの各列において指示薬であるプロモチモールブルー(BTB)を含む種々の濃度の亜硫酸ナトリウム水溶液100 µLを順にウェル内に加える. 次に列単位で試料溶液を加え, 連続して

<sup>1</sup> 富山工業高等専門学校: 939-8192 富山県富山市本郷町13<sup>2</sup> 茨城大学工学部生体分子機能工学科: 316-8511 茨城県日立市中成沢町4-12-1

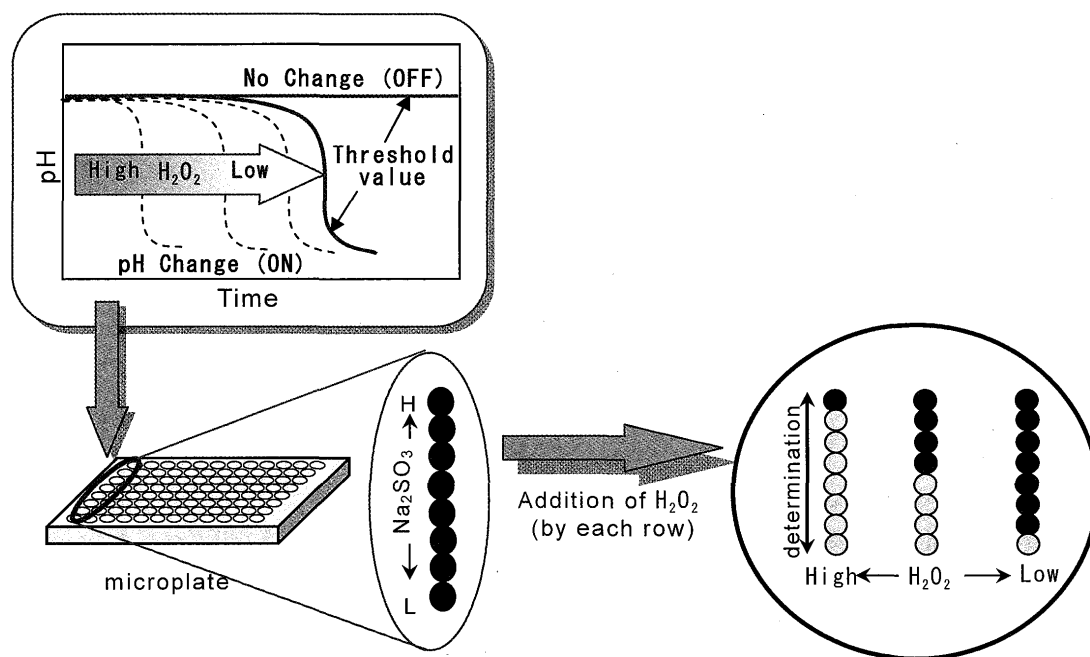


Fig. 1 The concept of the proposal method

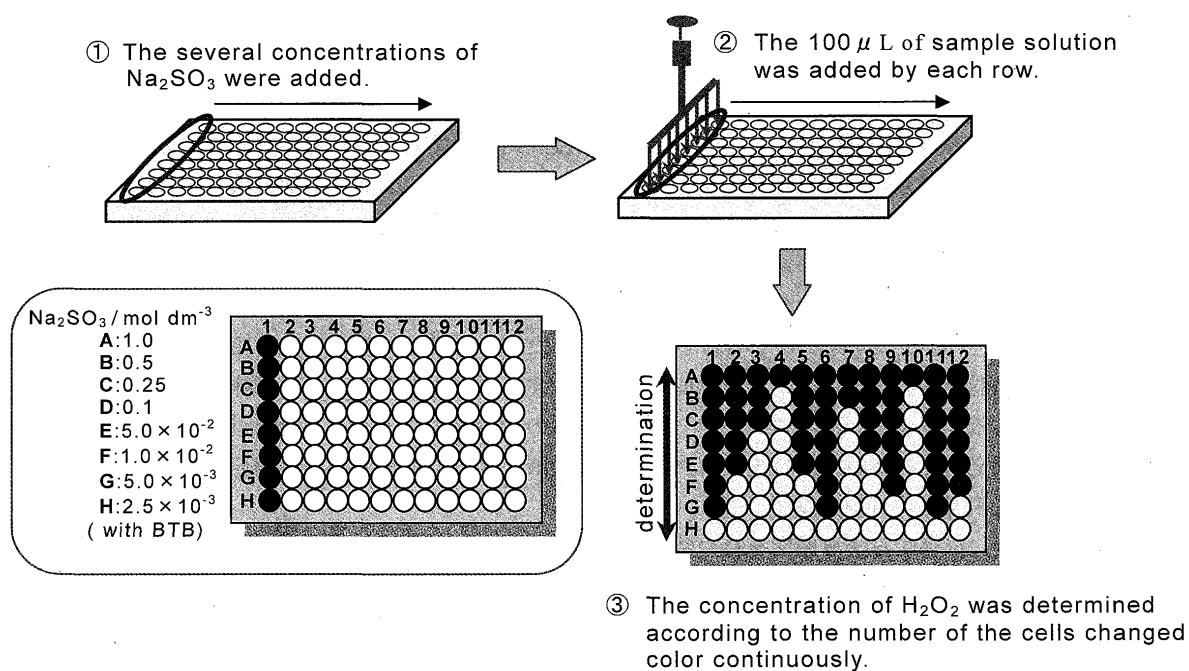


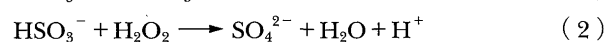
Fig. 2 The procedure of visual determination for hydrogen peroxide

変色した部分の数によって過酸化水素濃度を定量する。

### 3 結果及び考察

#### 3.1 指示反応・反応曲線

過酸化水素の目視計測に用いた指示反応は、式(1)、(2)に示す亜硫酸イオンの酸解離平衡と亜硫酸イオンの過酸化水素による酸化反応からなる。



この指示反応は水素イオンが反応物だけでなく生成物でもある自己触媒反応である。そのため、この反応曲線はFig. 3に示すように一定の誘導期間の後急激なpH変化を示す特徴的なS字型pH-時間曲線を描く。また、この反

応曲線は過酸化水素の濃度がある閾値濃度を境にS字型を示さなくなる。

そこで, 種々の濃度の亜硫酸ナトリウム水溶液に対する過酸化水素の濃度の影響を検討した。その結果を Table 1 に示す。亜硫酸ナトリウム濃度に対して過酸化水素濃度の濃度比が 1 : 1 以上のとき反応が進行することが確認できた。

### 3.2 過酸化水素の目視定量法の検討

上記の結果より, 反応の閾値を設定しておいたマイクロプレートに列単位で種々の濃度の試料溶液を加えた様子を Fig. 4 に示す。各列において過酸化水素の濃度に応じて連続して溶液が変色するウェルの数が変化し,  $2.5 \times 10^{-3} \sim 1.0 \text{ mol dm}^{-3}$  の濃度範囲の過酸化水素を目視によって検出することができた。また, 同一測定条件における繰り返し測定 (12 回) を行ったところ測定結果に変化は見られなかった。

共存物質の影響を検討した結果, ほとんどのカチオン, アニオン ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) とともに高濃度で共存しても, 変色するウェル数に変化は見られなかった。しかし, 鉄(II)イ

オンは  $10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  以上の存在で妨害を示した。鉄(II)イオンが亜硫酸イオンの酸化作用を示すためと考えられる。しかし, マスキング剤としてエチレンジアミン四酢酸 (EDTA,  $5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) を加えることによってその影響を抑えることが可能であった。

また,  $10 \sim 35^\circ\text{C}$  において温度の影響を検討した結果, 測定結果に変化が見られなかった。既報<sup>8)~11)</sup>の自己触媒反応を用いる計測法は温度・共存物質の影響が大きいという欠点があったが, 本計測法は既報の手法と比べ温度, 共存物質の影響を受けにくい手法である。

## 4 結 言

本計測法は, 反応に濃度の閾値のある自己触媒反応をマイクロプレートの列に利用することで, 従来の目視計測法が抱えていた測定結果の同一性の問題を解決できる手法を提案したといえる。また, これまでの自己触媒反応を用いる目視計測法が抱えていた温度・共存物質の影響や測定系から目を離せない等の問題がないため, より操作性が優れた手法となった。更に, 本計測法のコンセプトは亜硫酸塩-過酸化水素系自己触媒反応以外にも滴定 (中和滴定, 酸化還元滴定, キレート滴定等) に用いられる反応のように

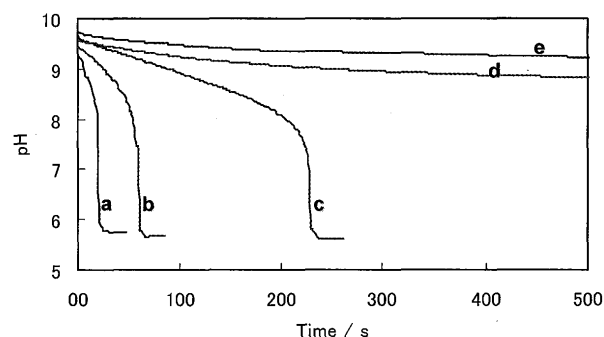


Fig. 3 The pH-time curve of autocatalytic reaction with  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$

$[\text{Na}_2\text{SO}_3] = 0.25 \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $[\text{H}_2\text{O}_2] = \text{a: } 1.0, \text{ b: } 0.5, \text{ c: } 0.25, \text{ d: } 0.2, \text{ e: } 0.1 \text{ mol dm}^{-3}, 25^\circ\text{C}$

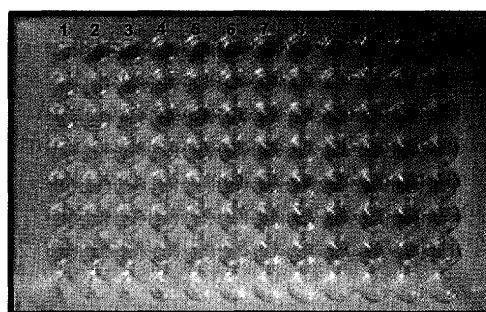


Fig. 4 Visual determination of hydrogen peroxide

$[\text{H}_2\text{O}_2] = 1: 1.0, 2: 0.5, 3: 0.25, 4: 0.1, 5: 5.0 \times 10^{-2}, 6: 1.0 \times 10^{-2}, 7: 5.0 \times 10^{-3}, 8: 2.5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$

Table 1 Relationship between the concentration ratio of reagents and the change of color

| $\text{Na}_2\text{SO}_3 / \text{mol dm}^{-3}$ | $\text{H}_2\text{O}_2 / \text{mol dm}^{-3}$ |     |      |      |                    |                    |                    |                      |
|-----------------------------------------------|---------------------------------------------|-----|------|------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
|                                               | 1.0                                         | 0.5 | 0.25 | 0.10 | $5 \times 10^{-2}$ | $1 \times 10^{-2}$ | $5 \times 10^{-3}$ | $2.5 \times 10^{-3}$ |
| 1.0                                           | ○                                           | ×   | ×    | ×    | ×                  | ×                  | ×                  | ×                    |
| 0.5                                           | ○                                           | ○   | ×    | ×    | ×                  | ×                  | ×                  | ×                    |
| 0.25                                          | ○                                           | ○   | ○    | ×    | ×                  | ×                  | ×                  | ×                    |
| 0.10                                          | ○                                           | ○   | ○    | ○    | ×                  | ×                  | ×                  | ×                    |
| $5 \times 10^{-2}$                            | ○                                           | ○   | ○    | ○    | ○                  | ×                  | ×                  | ×                    |
| $1 \times 10^{-2}$                            | ○                                           | ○   | ○    | ○    | ○                  | ○                  | ×                  | ×                    |
| $5 \times 10^{-3}$                            | ○                                           | ○   | ○    | ○    | ○                  | ○                  | ○                  | ×                    |
| $2.5 \times 10^{-3}$                          | ○                                           | ○   | ○    | ○    | ○                  | ○                  | ○                  | ○                    |

○: Color changed, ×: Color did not changed,  $25^\circ\text{C}$

反応の進行に濃度の閾値が存在するような反応であれば応用が可能である。

(2007年5月20日, 第68回)  
(分析化学討論会において発表)

## 文 献

- 1) E. Kaneko : *Anal. Sci.*, **20**, 247 (2004).
- 2) 笠原一世, H. F. Sun : *ぶんせき (Bunseki)*, **2001**, 615.
- 3) E. Kaneko, K. Yashimoto, T. Yotsuyanagi : *Chm. Lett.*, **1999**, 751.
- 4) 太田宜秀 : *ぶんせき (Bunseki)*, **2001**, 661.
- 5) 牧野鉄男 : 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **49**, 921 (2000).
- 6) S. Igarashi, A. Manaka, M. Terunuma, M. Kaneki : *Anal. Lett.*, **36**, 2393 (2003).
- 7) A. Manaka, T. Kubota, S. Igarashi : *Journal of Ecotechnology Research*, **12**[1-2], 72 (2006).
- 8) M. Ishihara, M. Endo, S. Igarashi, T. Yotsuyanagi : *Chem. Lett.*, **1995**, 349.
- 9) M. Endo, M. Ishihara, T. Yotsuyanagi : *Analyst*, **121**, 391 (1996).
- 10) M. Endo, S. Abe, Y. Deguchi, T. Yotsuyanagi : *Talanta*, **47**, 349 (1998).
- 11) A. Manaka, S. Igarashi : *Anal. Lett.*, **36**, 135 (2003).

## Visual Microplate Determination of Hydrogen Peroxide by Autocatalytic Reaction with Sulfite and Hydrogen Peroxide

Atsushi MANAKA<sup>1</sup>, Yuka OZAKI<sup>1</sup> and Shukuro IGARASHI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemical and Biochemical Engineering, Toyama National College of Technology, 13, Hongo-machi, Toyama-shi, Toyama 939-8630

<sup>2</sup> Department of Biomolecular Functional Engineering, Faculty of Engineering, Ibaraki University, 4-12-1, Nakanarusawa, Hitachi-shi, Ibaraki 316-8511

(Received 31 August 2007, Accepted 12 December 2007)

The oxidation reaction from sulfite ion to sulfate ion with hydrogen peroxide is an autocatalytic reaction, in which a proton ( $H^+$ ) acts not only as the reaction product, but also as the reactant. This reaction provides the characteristic S-shape pH *vs.* time curve, which contains the inflection time and the dynamic pH change at the end point. The threshold of the concentration of hydrogen peroxide exists in the presence of the progress of this reaction, and the value of the threshold is determined by the ratio of the concentration for several concentrations of a sulfite ion. Furthermore, the pH change at the end point can be visualized using a pH indicator, such as bromothymol blue. Based on these findings, using this reaction for the microplate, the visual determination of hydrogen peroxide by counting the discoloring color number has been developed. By the proposed method,  $2.5 \times 10^{-3} \sim 1.0 \text{ mol dm}^{-3}$  of hydrogen peroxide could be visibly determined. Moreover, the influence of the temperature was examined. As a result, the analytical method was able to be used within a wide range of temperatures.

**Keywords** : autocatalytic reaction ; microplate ; visual analysis ; threshold of concentration ; determination of hydrogen peroxide.