

コバルト(II)によるスチルバゾの接触酸化反応を利用する過酸化水素のフローインジェクション分析法

出口俊雄，竹下良一，田中明[®]，実政勲*

(1988年1月19日受理)

スチルバゾの過酸化水素による酸化反応の際 Co(II) イオンが触媒として働くが、酸化剤として用いる過酸化水素の濃度が低い場合は、スチルバゾの Co(II) イオンによる接触反応が過酸化水素濃度に比例する。このことを利用してスチルバゾ-Co(II) イオン系による過酸化水素の微量定量に FIA を適用した。スチルバゾと Co(II) イオンの混合溶液の流れと、pH 値を 11.9 に調整したアルカリ水溶液の流れを十分混合させ、これに水の流れに注入した試料を合流させた後、試料ゾーンがフローセルを通過する際、503 nm での吸光度変化を連続的に記録した。本法は 0.1~10 ppm 範囲の過酸化水素を含む試料について、1 時間当たり最大 75 検体の分析が可能であった。

1 緒言

従来過酸化水素の分析法はヨウ素滴定法¹⁾、Ti(IV)あるいは V(V) のペルオキシ錯体生成による方法²⁾、電位差滴定法³⁾、そして現在公定法として使われている酸素電極法⁴⁾があるが、簡易迅速という意味では十分ではない。最近、過酸化水素の高感度定量法としてペルオキシターゼなどの酵素を用いたルミノール反応の利用が報告されている⁵⁾⁻⁸⁾。Hayashi ら⁶⁾は酵素固定化カラムを用いた FIA によって過酸化水素の定量 (検出下限 0.5 pmol/20 μ l ; 0.85 ppb) の簡易迅速化を図っている。

接触反応は分析的に利用され、特に FIA においてその特徴を発揮している。著者らは先に、4,4'-ビス(3,4-ジヒドロキシフェニルアゾ)スチルベン-2,2'-ジスルホン酸ジアンモニウム塩 (スチルバゾ) の過酸化水素による酸化反応 (退色反応) において、Co(II) が触媒作用を持つことを利用して FIA による Co(II) の微量定量法を報告⁹⁾した。この際、Co(II) 濃度を一定としたとき、スチルバゾの酸化による退色反応は過酸化水素濃度の低い領域では、過酸化水素濃度に比例していることを見いだした。本法ではこの事実を利用してスチルバゾ-Co(II) 反応系による過酸化水素の定量を FIA に適用し諸条件の詳細な検討を試みた。

2 実験

2.1 試薬

過酸化水素標準溶液 (1110 ppm) : 30% 過酸化水素 (特級, 三菱瓦斯化学製) を再蒸留水で希釈し、ヨウ素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。

スチルバゾ (55 ppm)-Co(II) (0.5 ppm) 混合溶液 : スチルバゾ (ドータイト試薬) を再蒸留水に溶かした溶液と AAS 用 Co(II) 標準溶液 (1000 ppm, 和光純薬工業製) を再蒸留水で希釈した溶液とを混合して調製した。

pH 調整用溶液 (pH 11.9) : 5.0×10^{-2} M 炭酸ナトリウム- 6.0×10^{-3} M 水酸化ナトリウムを調製した。その他の試薬は特に断らないかぎり特級試薬を使用した。

2.2 装置及び操作

種々の検討結果を基にして組み立てた FIA システムを Fig. 1 に示す。ベリスタ型ポンプ ($P_1 \sim P_3$: アトー製, SJ-1211), ループバルブインジェクター (I : 協和精密製, 二連四方切り替えバルブ KMM-4V-2), Na 形陽イオン交換樹脂カラム (R : Dowex 50W-X1, 50~100 メッシュ, 2 mm i.d. \times 25 cm), フローセル付き分光光度計 (D : 協和精密製, KLC-2290, 光路長 10 mm), 記録計 (Re : 理化電機製, R-22), そのほか幾つかのチューブから構成される。チューブ及び連結器はすべてテフロン製を使用した。又試薬混合溶液 (R_1) やチューブ類は恒温槽 (T_1 (5 $^{\circ}$ C), T_2 (30 $^{\circ}$ C) : 太陽科学工業製, クールパイプ 200D) 及びサーモユニット C 600 に浸して所定の温度に保った。スチルバゾ-Co(II) 混合溶液 (R_1), pH 調整用溶液 (R_2) 及び水 (R_3) をそれぞれポ

* 熊本大学理学部化学科 : 860 熊本県熊本市黒髪 2-39-1

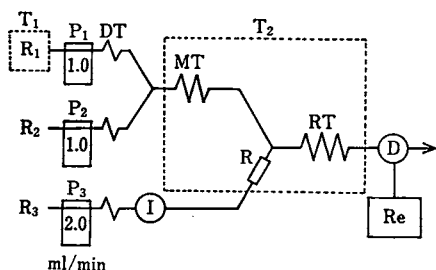


Fig. 1 Schematic diagram of FIA system

R₁: stilbazolone (55 ppm)-Co(II) (0.5 ppm) reagent solution; R₂: buffer solution (pH 11.9); R₃: carrier (water); T₁, T₂: thermostat (T₁ 5°C, T₂ 30°C); P₁~P₃: pump; DT: damping tube (1 mm i.d., 50 cm long); MT: reagent mixing tube (1 mm i.d., 2 m long); RT: reaction tube (1 mm i.d., 3.5 m long); D: spectrophotometer (503 nm); I: injector (390 μl); R: Na-formed cation exchange column* (2 mm i.d., 25 cm long, teflon tube); Re: recorder. *This column was only used to free from interfering metal ions.

ンプ (P₁~P₃) で連続的に流す。流量は P₁: 1.0, P₂: 1.0, P₃: 2.0 ml min⁻¹ である。スチルバゾ-Co(II) 混合溶液と pH 調整用溶液を混合チューブ (MT) 内で十分混合させ、その流れにインジェクター (I) からキャリア水中に注入した試料を合流させた。反応チューブ (RT) 内で接触反応が行われた後、分光光度計のフローセルを通過し 503 nm における吸光度が測定され、記録計で記録した。

3 結果と考察

本研究は既報⁹⁾の実験操作及び条件を基に検討を行った。

3.1 サンプル量の影響

サンプル量を 78 μl~1.26 ml の範囲で変化させ、かつ 1~10 ppm の過酸化水素を注入し、ピーク高さに及ぼす影響を検討した。そのほかは 2 で述べた条件で行った。一定濃度の過酸化水素ではサンプル量の増加に伴いピーク高さは高くなるが、いずれの過酸化水素濃度でも 1.10 ml 付近でその高さはほぼ一定となる。又、サンプル量の増加と共にピーク幅が広くなり、サンプリング速度が減少した。一方、サンプル量 390 μl 以下ではピーク高さが急速に減少した。本研究ではサンプル注入量を 390 μl として、以後の実験を行った。

3.2 反応チューブの長さ

反応チューブの長さを 1.5~7.0 m の範囲で変化さ

せ、そのほかは 2 で述べた条件下で既知濃度の過酸化水素を注入し、ピーク高さに及ぼす影響を検討した。結果を Fig. 2 に示す。いずれの試料濃度でもチューブの長さ 3.5 m 付近で極大が認められる。実験では 3.5 m のチューブを用いた。Co(II) による接触反応は反応時間が長いほど、従って本法では反応チューブが長いほど反応が進行し定量感度も良くなった。しかし、反応チューブが更に長くなればスチルバゾと Co(II) の混合溶液の自発的退色反応 (バックグラウンドとなる反応) も進行し、又、フロー系内で試料ゾーンの分散に起因する試料の希釈が大きくなり、これらの寄与が接触反応の進行を上回るために、反応チューブの長さが 3.5 m 以上ではピーク高さが減ずると考えられる。

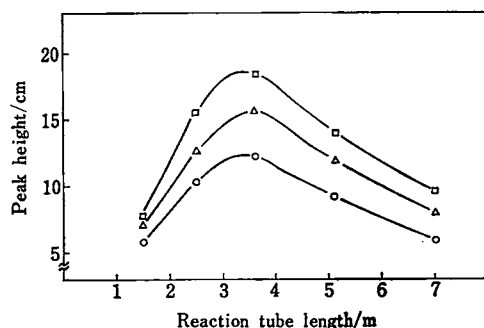


Fig. 2 Effect of length of reaction tube on peak height

Concentration of hydrogen peroxide injected:
○ 4.44 ppm, △ 6.66 ppm, □ 8.88 ppm

3.3 流量の影響

予備実験から Fig. 1 に示した P₁ と P₂ の流量比が 1:1 のときがベースラインが最も安定することが分かったので、本実験ではすべて P₁:P₂ の流量比を 1:1 とした。P₁, P₂, P₃ の流量をそれぞれ、0.5, 0.5, 0.5 ml min⁻¹, 1.0, 1.0, 1.0 ml min⁻¹, 1.0, 1.0, 2.0 ml min⁻¹ 及び 1.4, 1.4, 2.0 ml min⁻¹ と変化させた。そのほかは 2 の条件でピーク高さに及ぼす影響を検討した。その結果最高のピーク高さを示す流量は P₁:P₂:P₃ の流量がそれぞれ 1.0, 1.0 及び 2.0 ml min⁻¹ のときであった。

3.4 温度の影響

反応及び混合チューブを浸した恒温槽の温度を 10~50°C の範囲で変化させ、そのほかは 2 の条件で既知濃度の過酸化水素を注入し、ピーク高さに及ぼす影響を検討した。結果を Fig. 3 に示す。20°C 付近で極大が認

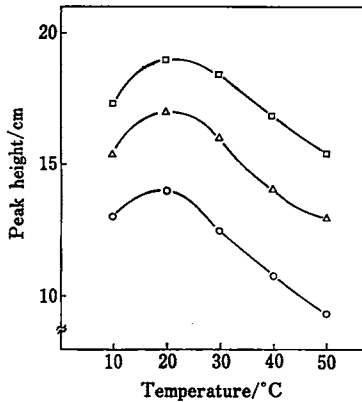


Fig. 3 Effect of temperature on peak height

Concentration of hydrogen peroxide: ○ 4.44 ppm, △ 6.66 ppm, □ 8.88 ppm

められる。それよりも温度が高くなるとピーク高さが低くなる。これは温度が高くなるほどバックグラウンドとなる反応も促進され、その寄与が大きくなるためであると考えられる。逆に、20°Cよりも温度が低いと過酸化水素とスチルバゾとの反応が進行しにくいことによるものと考えられる。以上の結果と室温での実験を考慮して30°Cで行った。なお、スチルバゾ-Co(II)混合溶液はスチルバゾの酸化反応を可及的に抑制するために5°Cに保った。

3.5 Co(II) 濃度の影響

Co(II)濃度を0.1~3.0 ppmの範囲で変化させ、そのほかは2の条件下で既知濃度の過酸化水素を注入し、ピーク高さに及ぼす影響を検討した。結果をFig. 4に示す。Co(II)濃度0.5 ppm付近でそれぞれの試料濃度に

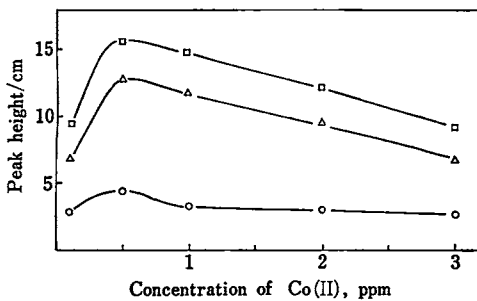


Fig. 4 Effect of concentration of Co(II) on peak height

Concentration of hydrogen peroxide: ○ 4.44 ppm, △ 6.66 ppm, □ 8.88 ppm

対して極大が認められる。それよりもCo(II)濃度が高くなるとピーク高さが低下しているのは、この退色反応が既報⁹⁾に述べたようにCo(II)濃度に比例して進行するためである。以上の結果から、Co(II)濃度は0.5 ppmを最適濃度とした。

3.6 スチルバゾ濃度の影響

スチルバゾ濃度を6.2~123 ppmまで変化させ、そのほかは2の条件下で既知濃度の過酸化水素を注入し、感度に及ぼす影響を検討した。結果をFig. 5に示す。55 ppm付近で極大が認められる。スチルバゾ濃度がそれ以上に高くなるとピーク高さが低下しているのは、スチルバゾの酸化反応の際、中間段階の酸化生成物が生成するためと思われる。この中間段階の酸化物は、水酸基のみの酸化にとどまり、ジアゾ基が酸化されておらず、ベンゼン核間の共役二重結合が残されていて、測定波長503 nmで吸収を示すためと思われる。以上の結果からスチルバゾの最適濃度を55 ppmとした。

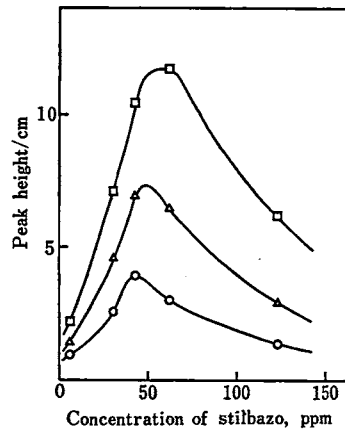


Fig. 5 Effect of concentration of stilbazo on peak height

Concentration of hydrogen peroxide: ○ 4.44 ppm, △ 6.66 ppm, □ 8.88 ppm

最適実験条件で測定したFIAシグナルと数ppmレベルでの検量線を各々Fig. 6A, Bに示す。検出限界は0.1 ppm($S/N=2$)であり、6 ppmの試料を10回注入した場合の相対標準偏差は1.5%であった。又、本研究のFIAマニホールドでの最大サンプリング速度は75検体/hであり、イオン交換樹脂カラムを取り付けた場合のサンプリング速度は30検体/hであった。

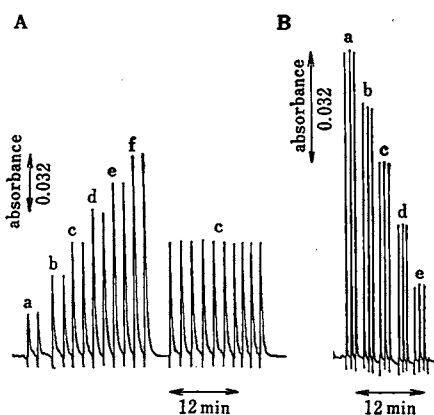


Fig. 6 FIA signal for injection of standard solution of hydrogen peroxide with (A) and without (B) cation exchange column
 (A) H_2O_2 (ppm): a=2, b=4, c=6, d=8, e=10, f=12; (B) H_2O_2 (ppm): a=5, b=4, c=3, d=2, e=1

3.7 共存化学種の影響

共存化学種の影響を検討するために、6.66 ppm の過酸化水素に種々の化学種を適量共存させた溶液を注入し、得られたピーク高さと 6.66 ppm の過酸化水素だけを含む溶液を注入したときに得られたピーク高さとを比較した。結果を Table 1 に示す。ただし、水に溶かしたときに加水分解を起こす共存化学種を含むものについては、塩酸性 (pH 2~3) にしてある。又、金属イオンによる著しい妨害が予想されたために⁹⁾、金属イオンの妨害を検討するときのみ Fig. 1 に示したように、インジェクターの直後に陽イオン交換カラムを挿入し実験を行った。L-グルタミン酸、グリシン及びL-アスコルビン酸について妨害が認められた。特にL-アスコルビン酸については著しい妨害が認められた。その他の化学種については妨害は認められなかった。

実試料の分析を考慮に入れて塩化ナトリウム及びめん類の改良剤として加えられる臭素酸カリウムについてもその影響を調べたが、塩化ナトリウムについては 230 ppm、臭素酸カリウムについては 400 ppm 以下であると全く妨害は認められなかった。

又、金属イオンについては Table 1 から分かるように陽イオン交換カラム (2 mm i.d. × 25 cm) によって完全に妨害が除去できた。ただし、Fe(III) イオンが共存した場合は、試料調製して約 5 分程度経過後の注入でピーク高さが 50% も低下した。これは、Fe(III) イオンが過酸化水素の分解に接触的な作用を示すことから十

Table 1 Effect of diverse ions on the determination of 6.66 ppm hydrogen peroxide

| Species | Concentration, ppm | (H/H_0) × 100 |
|----------------------|--------------------|-----------------------------|
| Cu ²⁺ | 100 | 100 |
| Zn ²⁺ | 100 | 100 |
| Ni ²⁺ | 100 | 98.4 |
| Mg ²⁺ | 100 | 100 |
| Ca ²⁺ | 100 | 100 |
| Al ³⁺ | 100 | 100 |
| Fe ³⁺ | 100 | 96.7 |
| | | 98.4 |
| | | (1 min after) ^{a)} |
| | 100 | 89.3 |
| | | (3 min after) ^{a)} |
| | 100 | 48.5 |
| | | (5 min after) ^{a)} |
| NaCl | 200 | 100 |
| KBrO ₃ | 400 | 100 |
| Glucose | 200 | 100 |
| D-(-)-Fructose | 200 | 100 |
| Urea | 200 | 98.4 |
| Citric acid | 200 | 98.4 |
| Oxalic acid | 200 | 96.7 |
| Tartaric acid | 200 | 96.7 |
| Starch ^{b)} | 200 | 98.4 |
| Thiourea | 200 | 95.2 |
| L-Glutamic acid | 200 | 67.7 |
| | 20 | 86.1 |
| Glycine | 200 | 32.2 |
| | 20 | 86.2 |
| L-Ascorbic acid | 200 | -9.7 |
| | 20 | 30.8 |
| | 2 | 81.5 |

H : peak height of 6.66 ppm hydrogen peroxide in the presence of the diverse ions; H_0 : peak height of 6.66 ppm hydrogen peroxide. a) Elapse of time from sample preparation to injection; b) Saturated solution. A negative value of (H/H_0) × 100 means that in the presence of the diverse ion, the absorbance corresponding to the peak, H , is higher than the base line absorbance. Sample solutions containing metal ion were passed through cation exchanger column installed behind injector in the flow system.

分に考えられることである。

多試量の分析を行う場合、妨害化学種除去用のイオン交換樹脂の寿命が問題となる。そこで本 FIA 系を用いて、過酸化水素 (2.2 ppm) と Mg イオン (100 ppm) を含む試料を 180 回注入したが、樹脂は支障なく使用可能であった。

本法による過酸化水素の定量では FIA 特有の再現性の良い応答が得られ、分析速度も 1 時間当たり最大約 75 検体と迅速分析の点においても推奨できる。ただし、本法は酵素を用いた定量法による検出限界値に比べるとやや感度が劣る。しかし、装置の簡便さ、実験のしやす

さという点では利点がある。

文 献

- 1) 日本薬学会編：“衛生試験法注解”，p. 192 (1973)，(金原出版)。
- 2) 松原チヨ，高村喜代子：分析化学，**29**，759 (1980)。
- 3) K. G. Boto, L. F. G. Williams : *Anal. Chim. Acta*, **85**, 179 (1976)。
- 4) 厚生省環境衛生局食品化学課：“食品中の食品添加物分析指針，その 3”，p. 4 (1982)。
- 5) Y. Hayashi, K. Zaitzu, Y. Ohkura : *Anal. Sci.*, **1**, 65 (1985)。
- 6) C. Matsubara, K. Kudo, T. Kawashita, K. Takamura : *Anal. Chem.*, **57**, 1107 (1985)。
- 7) P. K. Dasgupta, H. Hwang : *Anal. Chem.*, **57**, 1009 (1985)。
- 8) A. L. Lazrus : *Anal. Chem.*, **57**, 917 (1985)。
- 9) T. Deguchi, A. Higasi, I. Sanemasa : *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **59**, 295 (1986)。

☆

Determination of hydrogen peroxide by FIA based on the cobalt(II)-catalyzed oxidation reaction of stilbazo. Toshio DEGUCHI, Ryoichi TAKESHITA, Akira TANAKA and Isao SANEMASA (Department of Chemistry, Faculty of Science, Kumamoto University, 2-39-1, Kurokami, Kumamoto-shi, Kumamoto 860)

Stilbazo, 4,4'-bis(3,4-dihydroxyphenylazo) stilbene-2, 2'-disulfonic acid diammonium salt, is oxidized in the presence of hydrogen peroxide, where cobalt(II) acted as catalyst and accelerated the oxidation reaction.

The decoloration of stilbazo measured at 503 nm was found to be proportional to the hydrogen peroxide concentration over its low concentration range. A 90 μ M stilbazo solution containing 0.5 ppm Co(II) and a buffer solution (pH 11.9, NaOH+Na₂CO₃) were delivered each into the FIA system at a flow rate of 1.0 ml/min. The resulting mixture was then converged with the water stream flowing at a rate of 2.0 ml/min, that served as a sample carrier. The sample solution of hydrogen peroxide (390 μ l) was injected into the sample carrier, and was sent to a reaction tube (3.5 m \times 1 mm i.d.) thermostated at 30 °C. The absorbance change in stilbazo was measured at 503 nm. The following experimental conditions were examined: sample volume injected, reaction tube length, reagent solution flow rate, reaction temperature, concentration of stilbazo and Co(II), and the interference of diverse ions. Ascorbic acid seriously interfered, while glucose, fructose, urea, NaCl, KBrO₃, and some other inorganic electrolytes did not. Heavy metals (Cu, Zn, Ni) were effectively removed by an ion-exchange column (25 cm \times 2 mm i.d.) installed just after the sample injection section. The determination range of hydrogen peroxide was from 0.1 to 10 ppm. The sampling rates were ca. 30 samples/h with the ion-exchange column and 75 samples/h without the column.

(Received January 19, 1988)

Keyword phrases

determination of hydrogen peroxide by FIA; spectrophotometric detection based on decoloration of stilbazo; catalytic effect of Co(II).