

Ru 錯体化学発光法を用いた  
glucose およびその関連物質の検出法

2014 年

岡山理科大学大学院

理学研究科

材質理学専攻

永井 めぐみ

## 目 次

序論	1
第 1 章 Batch 型による glucose の化学発光検出	
1.1) 緒言	3
1.2) 実験	4
1.2.1) 試薬	4
1.2.2) 装置	4
1.2.3) 打ち込み方式	5
1.2.4) 最適化	5
1.2.5) 検量線	5
1.2.6) 検出機構	6
<吸収スペクトルの測定>	
<発光スペクトルの測定>	
1.3) 結果と考察	7
1.3.1) 打ち込み方式	7
1.3.2) 最適化	8
1.3.3) 検量線	9
1.3.4) 検出機構	10
<吸収スペクトルの測定>	
<発光スペクトルの測定>	
1.4) まとめ	12
1.5) 文献	13
第 2 章 Batch 型による感度の改善と反応機構の解明	
2.1) 緒言	14
2.2) 実験	14
2.2.1) 試薬	14
2.2.2) 装置	14
2.2.3) 温度効果	17
2.2.4) 前処理酸化法	18
2.3) 結果と考察	19
2.3.1) 装置	19
2.3.2) 温度効果	21
2.3.3) 前処理酸化法	23
2.4) まとめ	24
2.5) 文献	25

第3章 Flow型による glucose の化学発光検出	
3.1) 緒言	26
3.2) 実験	27
3.2.1) 試薬	27
3.2.2) off-line 型装置	27
3.2.3) 発光試薬の寿命・発光	28
<発光試薬の寿命>	
<発光試薬の発光>	
3.2.4) 前処理酸化の最適化 off-line 型	29
<HNO <sub>3</sub> 濃度効果>	
<UV 照射時間>	
3.2.5) on-line 型装置	29
3.2.6) 検出系の最適化 on-line 型	30
<Ce 濃度効果>	
<Ru 濃度効果>	
<冷却コイル>	
3.2.7) 検量線	30
3.2.8) 反応液の HPLC 検出	30
3.3) 結果と考察	32
3.3.1) 発光試薬の寿命・発光	32
<発光試薬の寿命>	
<発光試薬の発光>	
3.3.2) 前処理酸化の最適化 off-line 型	34
<HNO <sub>3</sub> 濃度効果>	
<UV 照射時間>	
3.3.3) 検出系の最適化 on-line 型	36
<Ce 濃度効果>	
<Ru 濃度効果>	
<冷却コイル>	
3.3.4) 検量線	39
3.3.5) 反応液の HPLC 検出	40
3.4) まとめ	41
3.5) 文献	42
第4章 glucose 関連物質への適用	
4.1) 緒言	43
4.2) 実験	43
4.2.1) 試薬	43
4.2.2) off-line 型装置	43

4.2.3) 前処理酸化の最適化 off-line 型	44
<HNO <sub>3</sub> 濃度効果>	
<UV 照射時間>	
4.2.4) on-line 型装置	44
4.2.5) 検出系の最適化 on-line 型	44
<Ce 濃度効果>	
<Ru 濃度効果>	
4.2.6) 検量線	45
4.2.7) 妨害物質	45
4.2.8) 反応液の HPLC 検出	45
4.3) 結果と考察	46
4.3.1) 前処理酸化の最適化 off-line 型	46
<HNO <sub>3</sub> 濃度効果>	
<UV 照射時間>	
4.3.2) 検出系の最適化 on-line 型	48
<Ce 濃度効果>	
<Ru 濃度効果>	
4.3.3) 検量線	50
4.3.4) 妨害物質	51
4.3.5) 反応液の HPLC 検出	52
4.4) まとめ	53
4.5) 文献	54
総括	55
謝辞	56
付録	57

## 序論

本論文の先行研究について以下に記述する。所属研究室では、リン酸イオン濃度の定量法の開発が試みられてきていた。リン酸イオン濃度の定量法は種々あるが[1]、主流はリン酸イオンとモリブデン酸イオンとの錯形成による呈色反応を利用したモリブデンブルー法である。この方法以外にも数種の方法が提案されてきており、その中に複数種の酵素を組み合わせて用いる定量法の報告がある[2, 3]。

一般的に酵素反応を利用した測定法では、特有の煩雑さがあり、例えば酵素含む反応試薬中の酵素活性は頻繁に調べておくことが必要である。また、酵素反応試薬の保存時には低温に保つ必要がある。このため、組み合わせて使用する酵素種数は少ない方が望ましい。

そこで開発した方法は、一種類の酵素、sucrose phosphorylaseのみを用いる系である[4]。この酵素は無機リン酸イオンと sucrose が共存するとき、sucrose を glucose と fructose に分解すると同時に、生成してきた1分子の glucose に1分子のリン酸イオンをエステル結合させ、glucose 1-phosphate(G 1-P)を生成させる。反応溶液中の糖類は、未反応の sucrose と副生成する fructose となり、いずれも中性であり、G 1-Pのみが陰イオンとなる。反応溶液中の G 1-P を陰イオン交換樹脂カラムを用いて捕集・洗浄し、ついで塩溶液で全量を溶出させる。この溶出液を酸性下で加熱し、加水分解をすることでエステル結合を切断し、glucose を再生させる。ここで得られる glucose 量はリン酸イオン量に等しいので、この glucose を定量することで間接的にリン酸イオンの定量が可能である。

この方法は酵素を用いているので、選択性が高いこと、またカラム精製を経由しているので妨害イオンを考慮する必要が小さいことなどが利点である。一方、この方法のリン酸イオンの検出限界は、glucose の定量法の検出限界に本質的に依存することになる。当初、この再生した glucose の定量は吸光光度法で行ってきており、その手順等については確立したが[5]、感度追求のためには吸光光度法より高感度が期待される蛍光検出法と化学発光法での検討が必要と考察された。そこで、非酵素法による蛍光検出法と化学発光法による glucose 定量法の開発を企図した。

Glucose は化学系・生命系・技術系などの広い領域で、極めて重要な化合物である。そのため、測定法は多種多様に存在する[6]。中でも主流は酵素を用いる方法であり、一部上述したが、酵素を採用することで選択性が高くなり、このため血液などの複雑な構成成分中の glucose を分離することなく定量が可能となる。吸光光度法よりも高感度検出が期待できる蛍光検出での測定法の開発を試みたが[7, 8]、操作性が煩雑であることや蛍光体へ誘導する反応時間が長いことから、蛍光検出法の採用を断念した。そこで蛍光法より高感度が期待される化学発光法を検討した。化学発光を応用した glucose 定量法としては、glucose 酸化酵素により生成した過酸化水素をルミノール反応により定量する方法が提案されているだけである[9]。そこで、酵素を用いず、また不安定な過酸化水

素に依存しない，化学発光法を検討した。

従来より， $[\text{Ru}(\text{II})(\text{bpy})_3]^{2+}$  の化学発光反応を利用した分析方法が報告されてきたが [10, 11], glucose の定量に関して極めて低感度等の結果を掲載した，否定的な報告が 7 通あるばかりであり [12-18], 望ましい結果を示す報告は現在に至るまで無いと思われる。

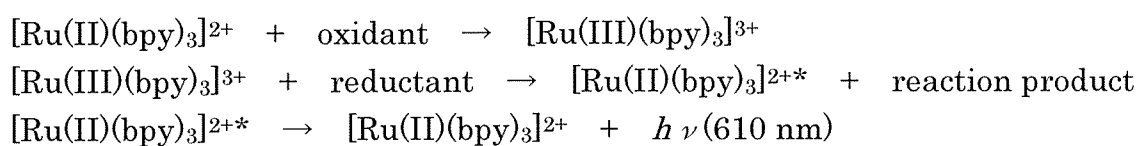
<文献>

- [1] M. D. Patey, M. J. A. Rijkenberg, P. J. Statham, M. C. Stinchcombe, E. P. Achterberg, *Trends in Analytical Chemistry*, 27(2008)169.
- [2] D. K. Morgan, N. D. Danielson, *J. Chromatogr.*, 262(1983)265.
- [3] P. Fossati, *Anal. Biochem.*, 149(1985)62.
- [4] 永井めぐみ, 山崎重雄, 小松司明, 齊藤惠逸, 第 71 回日本分析化学討論会講演要旨集, 2010, p. 182.
- [5] 永井めぐみ, 山崎重雄, 齊藤惠逸, 日本分析化学会第 59 年会講演要旨集, 2010, p. 359.
- [6] C. D. Geddes, J. R. Lakowicz (eds.), *Glucose Sensing*, Springer, New York, USA, 2006.
- [7] S. Katz, W. W. Pitt Jr., J. E. Mrochek, S. Dinsmore, *J. Chromatogr.*, 101(1974)193.
- [8] S. Hase, S. Hara, Y. Matsushima, *J. Biochem.*, 85(1979) 217.
- [9] A. C. Calokerions, N. T. Deftereos, W. R. G. Baeyens, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 13(1995)1063.
- [10] R. D. Gerardi, N. W. Barnett, S. W. Lewis, *Anal. Chim. Acta*, 378(1999)1-41. (review)
- [11] A. Knight, G. M. Greenway, *Analyst*, 121(1996)101R. (review)
- [12] W. K. Nonidez, D. E. Leyden, *Anal. Chim. Acta*, 96(1978)401.
- [13] T. M. Downey, T. A. Nieman, *Anal. Chem.*, 64(1992)261.
- [14] B. Rezaei, A. Mokhtari, *J. Braz. Chem. Soc.*, 22(2011)49.
- [15] M. Keyvanfard, A. Mokhtari, I. Emami, *Acta Chim. Slov.*, 58(2011)563. ( $[\text{Ru}(\text{II})(\text{phen})_3]^{2+}$  was used instead of Ru(II) complex. The former complex is almost same to the later complex.)
- [16] Y. S. Kim, J. H. Park, Y. Choi, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 25(2004)1177.
- [17] H. Han, X. Li, Z. He, L. Lin, Y. Zeng, *Anal. Sci.*, 15(1999)885.
- [18] 内倉和雄, *分析化学*, 39(1990)323.

## 第 1 章 Batch 型による glucose の化学発光検出

### 1.1) 緒言

最初に Ru 錯体の化学発光機構について以下に述べる.  $[\text{Ru(III)(bpy)}_3]^{3+}$  (tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(III), Ru(III)錯体)の発光について先駆的な報告がされたのは 1966 年の Hercules と Lytle であり[1], その後同人らおよび Nonidez と Leyden によって数種の還元剤と反応する際の発光が報告された[2, 3]. 物理化学の分野で詳細で理論的な発光反応の報告は 1981 年に Rubinstein と Bard によってなされた[4, 5]. 分析化学の分野で用いられるようになったのは, 1987 年米国の Noffsinger と Danielson による報告以降からである[6, 7]. 提案された発光機構は数種あるが, 近年受け入れられている発光機構を Scheme 1 に示す[8].



Scheme 1

Ru 錯体は, II 価の状態( $[\text{Ru(II)(bpy)}_3]^{2+}$ , tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II), Ru(II)錯体)が最も安定であり, 溶液中で酸化させて生成する Ru(III)錯体は, 還元性物質により還元されると, 励起状態の Ru(II)錯体となる. この励起状態から基底状態の Ru(II)錯体に戻る際に, 610 nm のオレンジ色の光を放出する[1]. この化学発光法によって検出できる還元性物質には, oxalic acid[4]や pyruvic acid[4], 3 級アミン[6, 7]が報告されている.

Ru(II)錯体溶液を酸化して Ru(III)錯体溶液へする方法としては, Ce(IV)の酸化力を利用した方法[4], 粉末の二酸化鉛を添加・攪拌後遠心あるいは濾過で固体粉末を除去して用いる方法[5], 電解酸化法[6, 7], 流路型電解セル[9]を用いた方法がある. また, ペルオキシ二硫酸と Ru(II)錯体の混合溶液に流路法で光照射を行い, Ru(III)錯体を連続生成させる方法も報告されている[10]. 本論文では Ce(IV)の酸化力を利用して Ru(III)錯体を生成する方法を用いたが, これは Ce(IV)と Ce(III)の間の酸化還元電位が+1.8 V と高く, Ru(III)錯体と Ru(II)錯体の間のそれが+1.25 V[11]であることから, Ce(IV)が酸化剤として利用できること, および Ru(II)錯体に対して過剰量の Ce(IV)を添加しても, 残存する過剰分の Ce(IV)が測定対象化合物を酸化する反応を期待したためである. Ce(IV)と Ru(II)錯体を用いた化学発光の研究は, ここ 10 年で活発となっている. この方法を用いた検出対象である glucose の報告は, 低感度であることから否定的な論文が多い(これについては序論に記述している).

しかし, 酸性条件下で還元性を示す  $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸の一種である乳酸に関

して, Batch 型での発光の観測が報告されていること[4], また glucose を酸化して生成する gluconic acid[12]が  $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸構造をもつことから, セル中で酸化反応により gluconic acid が生成し, ついで発光反応する可能性を考慮して, 発光反応が遅くても対応できる Batch 法での検出を試みることにした. そこで, Flow 型発光検出器を研究室内で Batch 型化学発光検出器に改造をし, glucose の直接検出を目指した.

## 1.2) 実験

### 1.2.1) 試薬

$(\text{NH}_4)_2[\text{Ce}(\text{NO}_3)_6]$  (cerium ammonium nitrate, CAN),  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (tris(2,2'-bipyridyl)dichlororuthenium(II) hexahydrate, Ru(II) 錯体), D-glucose,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{COOH})_2$  (oxalic acid)は全て市販の特級品を精製せずに用いた.

任意の濃度の Ru(II)錯体溶液と CAN in  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液を調整し, 使用直前に同体積で混合した溶液を 10 分間放置後, 発光試薬として用いた.

### 1.2.2) 装置

用いた装置の概略図を Fig. 1-1 に示す. 発光検出器は, 市販の Flow 型発光検出器 (COMET 2000, COMET Co. Ltd., Kawasaki, Japan)を改造して用いた. 反応容器には 5 mL のガラス円筒管 ( $\phi 13$  mm i.d.  $\times$  45 mm height)を用い, PMT(光電子増倍管)に向いた側は透明なままで, 反対側のガラス円筒管の外側には銀鏡反応で鏡面にした. スピンナーと, 自作のミニスターラーで反応容器中の溶液を 600 rpm で攪拌するようにした. 反応容器と自作スターラーは検出器内の暗箱に設置した. 暗箱の外には 2.5 mL シリンジを用意し, 反応容器とテフロンチューブ ( $\phi 0.25$  mm i.d.  $\times$  40 cm length)で接続した. 発光強度は, 電圧単位で測定し, 1.0 秒ごとに, AD(アナログ-デジタル)変換機を通して PC(パーソナルコンピューター)に送り, エクセルファイル(Microsoft 社)として処理した.



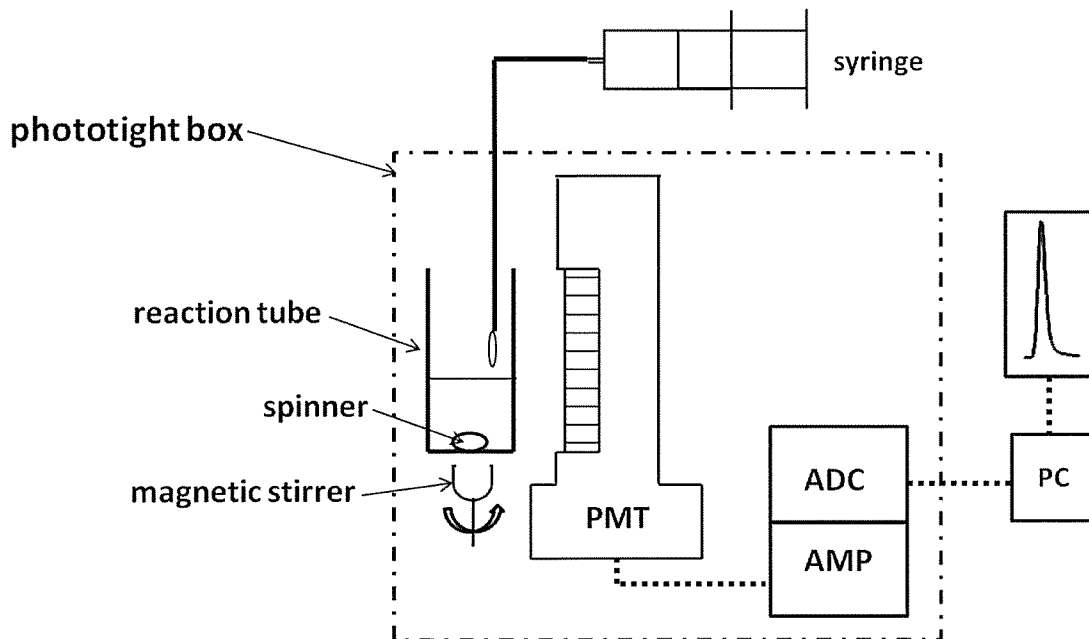


Fig. 1-1 Schematic diagram of the batch-type chemiluminescence (CL) instrument. PMT, photomultiplier tube; AMP, amplifier; ADC, analog-digital converter; PC, personal computer.

### 1.2.3) 打ち込み方式

各溶液の打ち込み方式について、2つの方式で検討を試みた。A方式は、反応容器にあらかじめ  $10^{-8}$  M glucose 溶液を、シリンジには発光試薬をそれぞれ 2 mL 充填し、ガス圧駆動で打ち込んだ。B方式は、A方式の溶液系を入れ替えて行った。すなわち、シリンジに glucose 溶液を充填した。この実験では、0.2 mM Ru(II)錯体溶液と 20 mM CAN 溶液を含む 0.2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  を発光試薬として用いた。

### 1.2.4) 最適化

CAN 溶液の濃度を一定にし、Ru 錯体の濃度効果を検討した。測定は A 方式で行った。

### 1.2.5) 検量線

任意の濃度の glucose 溶液を調整し、検量線の作成を行った ( $n=6$ )。

発光試薬には 0.2 mM Ru(II)錯体溶液と 4 mM CAN in 0.8 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液を同体積で混合した溶液を用い、A方式で測定を行った。

### 1.2.6) 検出機構

#### <吸収スペクトルの測定>

Ru(II)と Ru(III)溶液の吸収スペクトルの測定を行った. Ru(II)溶液は, 0.1 mM Ru(II)錯体溶液と H<sub>2</sub>O を同体積で混合した溶液を用いた. Ru(III)溶液は, 0.1 mM Ru(II)錯体溶液と 0.25 mM CAN in 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液を同体積で混合した溶液を用いた. いずれも, リファレンスを 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> とし, 吸光光度計(JASCO V-550 UV/VIS spectrophotometer, JASCO Co. Inc., Hachioji, Japan)を用いて吸収スペクトルを測定した.

#### <発光スペクトルの測定>

用いた装置の概略図を Fig. 1-2 に示す. 3 台の送液ポンプ(NP-KX-201, 2001, NP-FX(II)-2, NS, Tokyo, Japan)で各溶液を一定速度で送液した. 1 台は反応試薬と反応して発光する 1 mM oxalic acid in 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液, 残り 2 台は 1 mM Ru(II)錯体 in 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液と 2.5 mM CAN in 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液をそれぞれ送液した. 検出器には光源をオフにした蛍光検出器(Fluorescence spectrophotometer F-1050, HITACHI, Tokyo, Japan)を用い, 発光波長を分光した. 発光強度は 1.0 秒ごとに電圧として測定し, AD 変換機を通して PC に送り, エクセルファイルとして処理した.

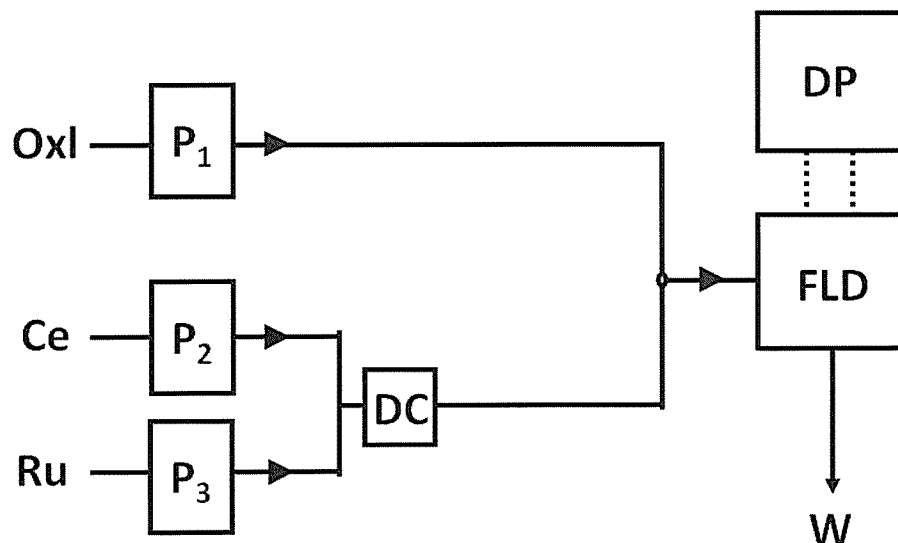


Fig. 1-2 Schematic diagram of the flow system for luminescence spectrum. Oxl, 1 mM oxalic acid in 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; Ce, 2.5 mM CAN in 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; Ru, 1 mM Ru(II) complex in 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> and P<sub>3</sub>, pump (P<sub>1</sub>, 0.5 mL / min; P<sub>2</sub> and P<sub>3</sub>, 0.25 mL / min); DC, delay coil; FLD, fluorescence detector (light source off); DP, data processor; W, waste.

### 1.3) 結果と考察

#### 1.3.1) 打ち込み方式

Batch 法による測定であるため、発光セルへの glucose 溶液とシリンジへの発光試薬の充填作業は直接発光強度の再現性に影響するが、注意深い手作業で対応可能である。一方、シリンジからの送液速度も再現性に大きく影響したので、再現性を確保するため手作業でなく、シリンジのピストン部を圧送する装置を開発することにした。反応液を充填した 2.5 mL 小型シリンジの両脇に 2 本の 50 mL シリンジを取り付けた。2 本の 50 mL シリンジは、間にバルブを介在させて 4 L 減圧瓶へ接続した。反応開始時には、バルブの切り替えにより 50 mL シリンジを減圧するとピストンが押されて発光試薬は発光セルに注入された。シリンジ内の溶液系について、得られた結果を Fig. 1-3 に示す。(A)が A 方式での測定、(B)が B 方式での測定で得られたピークである。発光強度が実質零と見なせるまでの時間およびノイズの状態より、A 方式での測定が望ましい結果が得られたので、以降の実験では A 方式での測定方法を採用した。

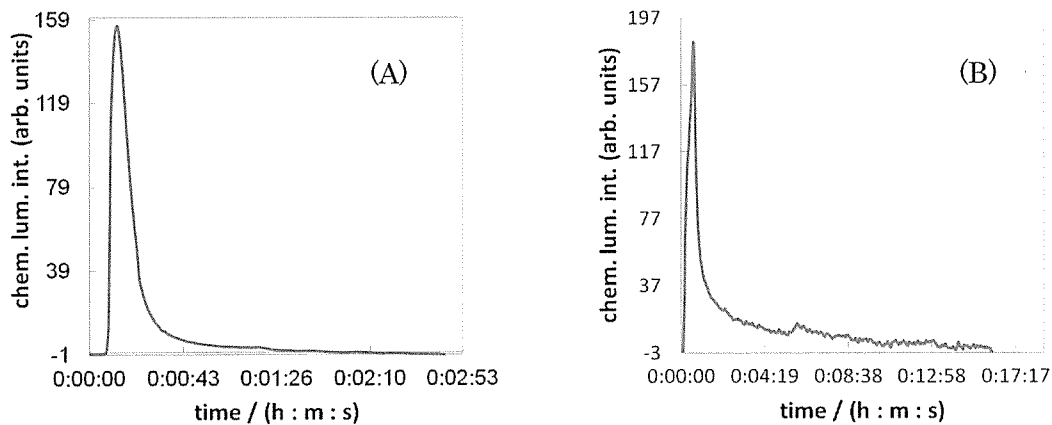


Fig. 1-3 Peak profiles with the batch-type CL detector. (A), using procedure A: sample,  $10^{-8}$  M glucose; CL reagent, 2 mL of a 0.2 mM Ru(II) complex and 20 mM CAN in 0.2 M  $H_2SO_4$ ; (B), using procedure B: used the same sample and CL reagent.

### 1.3.2) 最適化

Ru(II)錯体溶液の濃度の効果を検討した結果を Fig. 1-4 に示す. 0.8 mM で最大発光強度が得られたが, Ru(II)錯体の消費を抑制する目的で, 0.2 mM でも十分な発光強度が得られていることから, 以降の実験では, Ru(II)錯体溶液の濃度は 0.2 mM を採用した.

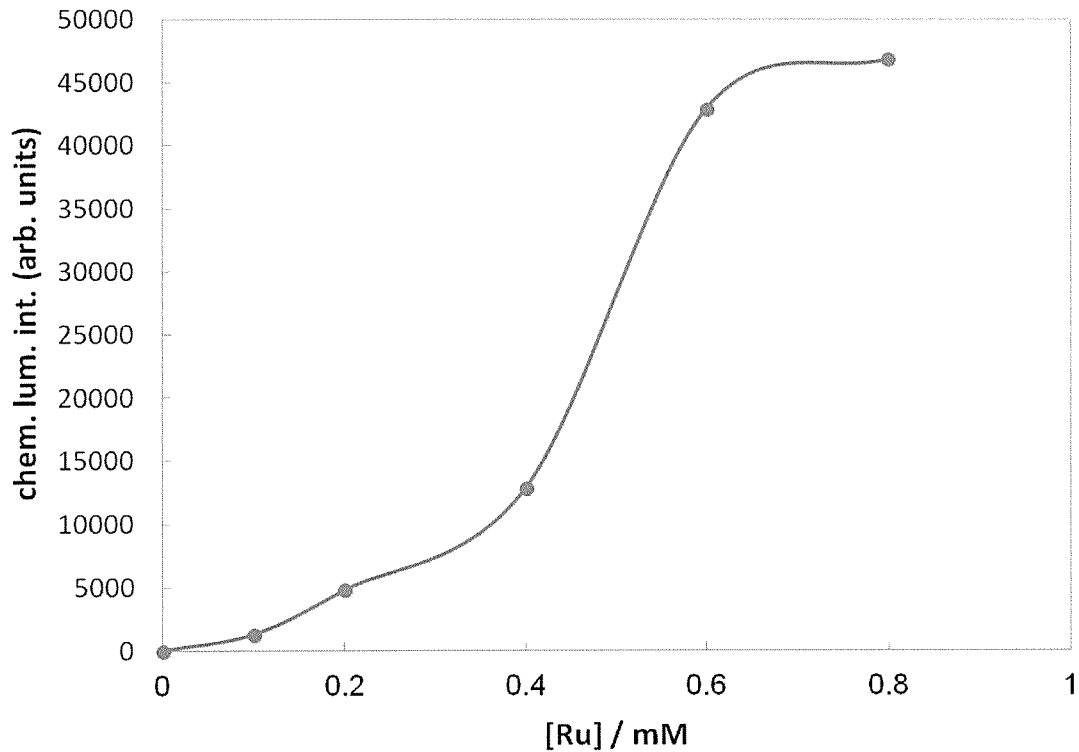


Fig. 1-4 Effect of the Ru(II) complex concentration in the CL reagent using procedure A. Sample, 2 mL of  $10^{-8}$  M glucose; CL reagent, 2 mL of the 0.1–0.8 mM Ru(II) complex and 4 mM CAN in 0.4 M  $H_2SO_4$ .

### 1.3.3) 検量線

得られた検量線を Fig. 1-5 に示す. 直線性はあまり良くないが, これは Batch 法での測定のため妥当な結果だといえる. 検出限界は  $5.0 \times 10^{-9}$  M となった.

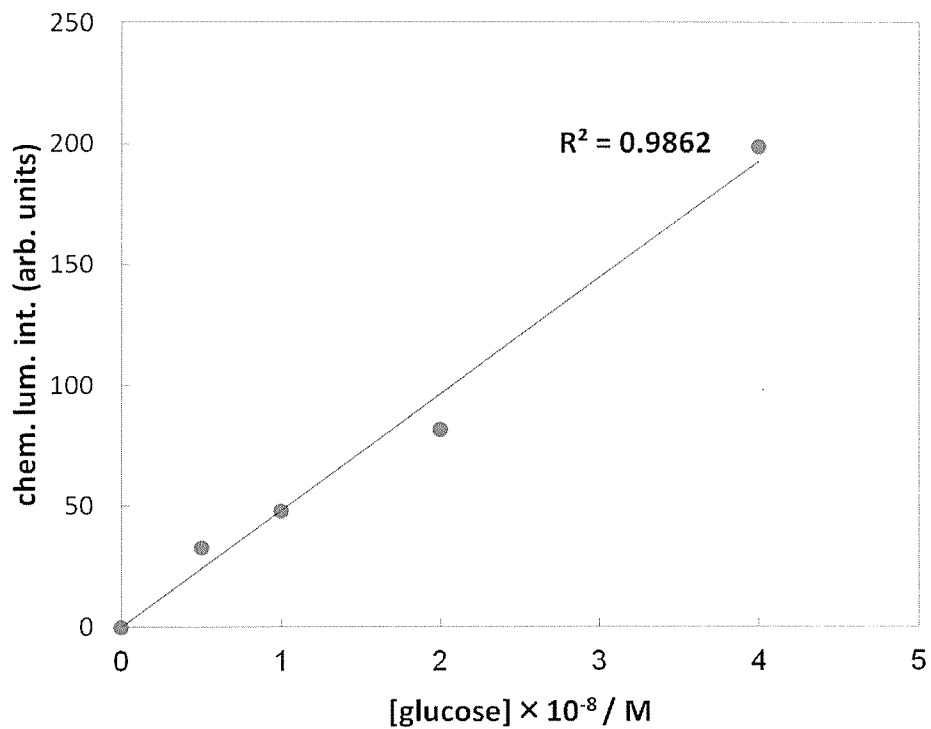


Fig. 1-5 Calibration curve for glucose with the batch-type CL detector using procedure A. Sample, 2 mL of  $0.5-4 \times 10^{-8}$  M glucose; CL reagent, 2 mL of the 0.2 mM Ru(II) complex and 4 mM CAN in 0.4 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### 1.3.4) 検出機構

<吸収スペクトルの測定>

Ru(II)およびRu(III)錯体溶液のスペクトルを Fig. 1-6 に示す. 実線が Ru(II), 破線が Ru(III)錯体溶液である. Ce(III)と Ce(IV)は, この領域近辺に大きな吸収を持たないことからいずれも文献[13]と一致していた. Ru(II)錯体溶液の極大吸収波長は, 454 nm が得られた. 0.2 mM Ru(II)錯体溶液の吸光度は概略 2 あるので, オレンジ色をしていた Ru(II)錯体溶液が, CAN 溶液と混合すると, 直後に緑色となり Ru(III)錯体が生成したことが目視でも把握できた. 454 nm の吸収帯が消失していることから, シリンジに発光試薬を充填する以前に, つまり混和した時点ですでに, Ru(II)錯体は溶液中に存在せず, すべてが Ru(III)錯体に酸化されたと見なせることがわかる.

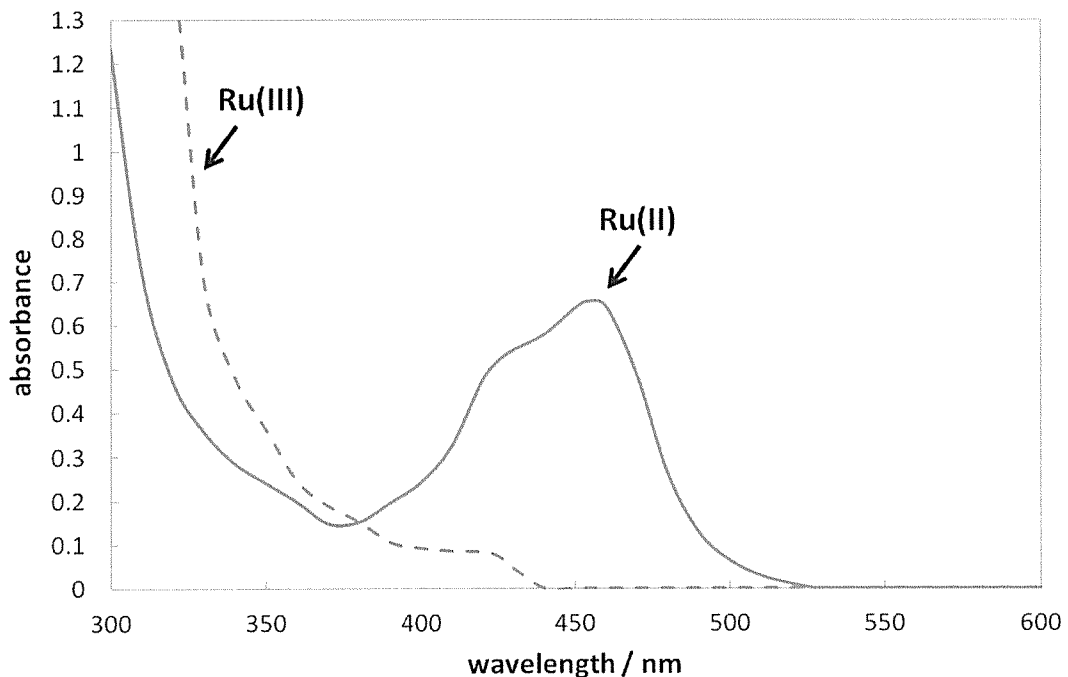


Fig. 1-6 Absorbance spectrum of Ru(II) and Ru(III) complex. Reference, 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; sample, 0.1 mM Ru(II) complex in 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the CL reagent (0.1 mM Ru(II) complex and 0.25 mM CAN in 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

<発光スペクトルの測定>

得られた発光スペクトルを Fig. 1-7 に示す. Ce(IV)が還元されて Ce(III)が生成するときは 350 nm 付近に極大をもち発光をするが[14](一般的に発光波長は蛍光波長に一致する), これは検出されなかった. Ru(II)錯体は特異的に 610 nm に極大を持つリン光を発することが知られている[1]. 今回は 610 nm 付近で最大発光強度が得られたことから, Ru(II)錯体-CAN 溶液系での発光は, Ru(II)錯体由来であると結論できた.

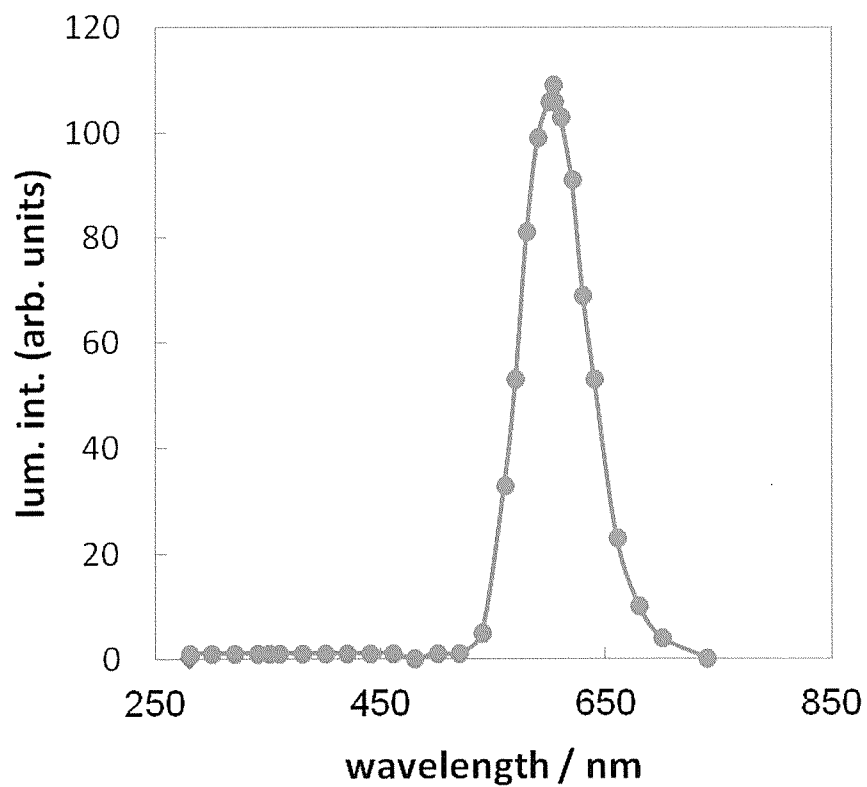


Fig. 1-7 CL spectrum. Conditions are described in Fig. 1-2.

#### 1.4) まとめ

この系における検出メカニズムは、当初 2 通りが考えられた。1 つは、Ru(II)錯体が光増感剤として作用している機構である。これは、Ce(III)がもつ短波長の発光を光増感剤が捉えることで、Ce(III)よりも長波長側で発光し、その光を検出するシステムである。この方法に関しては、用いた Ru(II)錯体以外にも蛍光色素である rhodamine B での検討も行った。検出はできたが、rhodamine B が酸性で分解するので、CAN を用いるこの系では感度的には不向きであった。もう 1 つは、Ru(II)錯体が発光する方法である。1.3.4) で得られた発光スペクトルの測定結果より、後者を支持する結果となった。よって、この系では、CAN は Ru(II)錯体に対して酸化剤として働き、Ru(III)錯体が glucose との反応により励起状態の Ru(II)錯体となり、基底状態に戻る際に発光(610 nm)しているとの結論であり、Ru(II/III)錯体が pH 1 付近の強酸性で、Ce(IV)の高い酸化力に耐性があるからこそ適用できたと考える。

Glucose の検出に否定的であった報告では、2, 3 は Batch 型もあるが、ほとんどは Flow 型が採用されての測定である。Flow 型は流路セルを用いるため、発光試薬と glucose(サンプル)の混合から、発光セルを通過するまでの時間を考慮する必要がある。すなわち速すぎる反応をするサンプルは発光セルの到着以前に反応が終了する可能性があるし、また反応が遅すぎるサンプルは発光セルを通過した後も発光する可能性があり、これらを考慮して FIA に用いる検出系を設計すべきであろう。これらについては、第 2, 3 章で考察している。今回 Batch 型で glucose の検出が可能であったのは、発光反応の開始から終了までを測定できたからだと考えられる。

#### <結論>

自作の Batch 型発光検出装置と、Ru(II)錯体-CAN 混合溶液を発光試薬として用いて、 $10^{-9}$  M (10pmol)の glucose の化学発光検出が可能であることが示された。



### 1.5) 文献

- [1] D. M. Hercules, F. E. Lytle, *J. Am. Chem. Soc.*, 88(1966)4745.
- [2] F. E. Lytle, D. M. Hercules, *Photochem. Photobiol.*, 13(1971)123.
- [3] W. K. Nonidez, D. E. Leyden, *Anal. Chim. Acta*, 96(1978)401.
- [4] I. Rubinstein, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.*, 103(1981)512.
- [5] I. Rubinstein, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.*, 103(1981)5007.
- [6] J. B. Noffsinger, N. D. Danielson, *Anal. Chem.*, 59(1987)865.
- [7] J. B. Noffsinger, N. D. Danielson, *J. Chromatogr.*, 387(1987)520.
- [8] W. Y. Lee, T. A. Nieman, *J. Chromatogr. A*, 659(1994)111.
- [9] K. Uchikura, *Anal. Sci.*, 6(1990)351.
- [10] S. Yamazaki, T. Shinozaki, T. Tanimura, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 21(1988)315.
- [11] F. P. Dwyer, D. P. Melor (eds.), “*Chelating Agent and Metal Chelate*”, Chap. 6 by D. A. Buckingham, A. M. Sargeson, Academic Press, New York, USA, 1964.
- [12] T. N. Smith, K. Hash, C. L. Davey, H. Mills, H. Williams, D. E. Kiely, *Carbohydr. Res.*, 350(2012)6.
- [13] K. Kalyanasundaram, *Coordin. Chem. Rev.*, 46(1982)159.
- [14] J. Yang, X. Cao, C. Sun, X. Wu, L. Li, *J. Fluores.*, 14(2004)275.

## 第 2 章 Batch 型による感度の改善と反応機構の解明

### 2.1) 緒言

吸光光度計や蛍光検出器を検出装置として採用した際は、特別に被検出化学種 (analyte) の寿命が短い場合をのぞいて、概ね装置セル中の被検出化学種の寿命は十分長く、その消失を考慮する必要はないが、被検出化学種の化学発光に依存した検出方法においては、発光試薬と混合直後に発光強度が最大となり、時間経過に伴い発光強度は減衰する。したがって、発光反応期間(時間)が発光セル中での存在期間と一致する領域の大小が検出感度に影響する[1].

化学発光反応は酸化還元反応であるので、温度上昇に伴い反応速度は速くなり、発光強度の増大が期待できる。一方、ミキシング T と発光セルの間で反応が進行する可能性もあり、精密な検討が必要となる。Flow 型へ適用する際には、反応試薬と混合後、流路セルに至るまでの時間に発光反応が進行すれば、発光強度は減衰する可能性もあり、また発光反応の遅い被検出化学種の場合は、発光セル通過後も発光が持続する可能性もあり得るし、いずれの場合も感度に影響を与える。これらのことから Flow 型での発光検出を目指すには、被検出化学種と発光試薬との間の反応速度の情報が感度改善を試みる上で重要となる。そこで、Flow 型検出方法の開発を指向した、Batch 型検出による glucose の発光反応の期間(時間)と反応機構を調査すること[2]、および発光強度増大が期待できる温度効果を検討することにし、これらの目的に沿った装置開発を行った。

### 2.2) 実験

#### 2.2.1) 試薬

$\text{CH}_2(\text{COOH})_2$  (malonic acid),  $\text{HNO}_3$  は、市販の特級品を精製せずに用いた。その他試薬に関しては第 1 章に記載した。発光試薬には、0.2 mM Ru(II)錯体溶液と 4 mM CAN in 0.8 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液を同体積で混合した溶液を 10 分間放置後、用いた。

#### 2.2.2) 装置

温度調節機能をもたせた Batch 型化学発光検出装置を研究室内で製作した。全体の概略図を Fig. 2-1 に示す。また、温度調節機能付き発光セルの概略図を Fig. 2-2 に示す。発光セルには内容積 15 mL の小型試験管を用いた。内部には長さ 9 mm のスピナーを設置した。内径 30 mm のガラス円筒管内部にシリコンゴム栓を用いて上述の小型試験管を取り付け、セルの外側には循環恒温槽により一定温度の水を循環させた。発光セルの外部からマグネチックスターラーを用いて、約 1200 rpm で攪拌した。発光セルとマグネチックスターラー、PMT は内部を黒塗りした 40 cm 立方体木製の暗箱内に設置した。温度調節機能付き試料打ち込み装置の概略図を Fig. 2-3 に示す。試薬の打ち込みには 2.5 mL のシリンジを用いた。内径 30 mm のガラス管にシリコンゴム栓

でシリンジを固定し、シリンジの外側には循環恒温槽により一定温度の水を循環させた。温度調節機能試料付き打ち込み装置は暗箱の外側に取り付けた。シリンジと発光セルの間はテフロンチューブ(φ2.5 mm i.d.×1.6 mm o.d.)で接続した。発光強度は電圧単位で0.2秒ごとに測定し、AD変換機を通してPCに送り、エクセルファイルとして処理した。

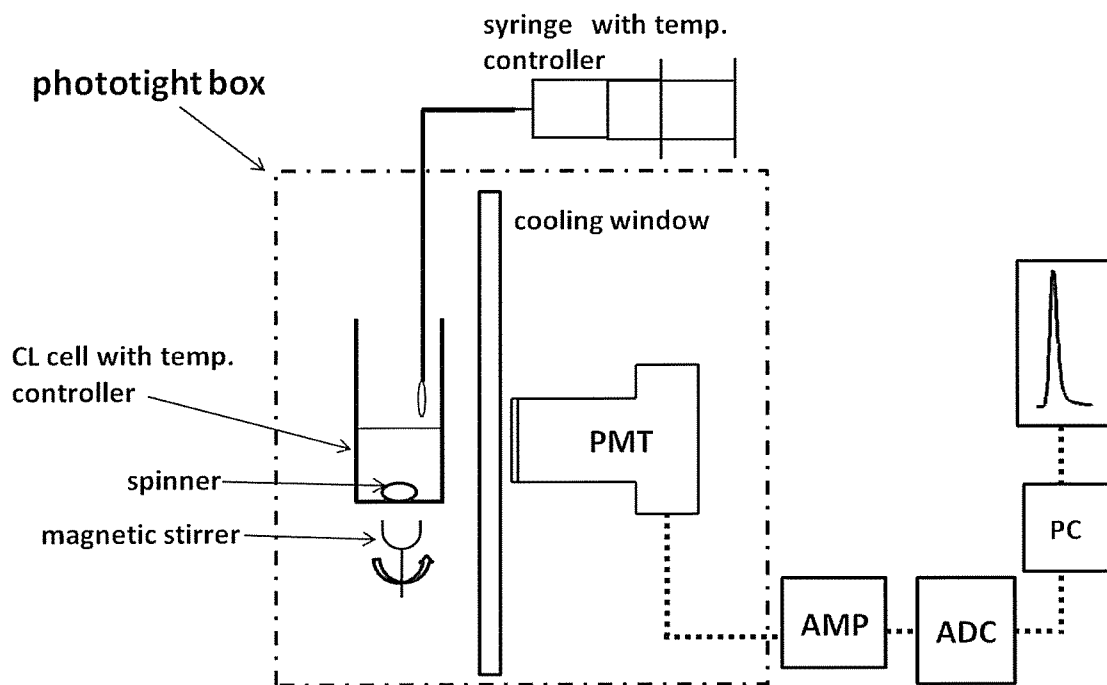


Fig. 2-1 Schematic diagram of the batch-type CL instrument with temperature controller. PMT, photomultiplier tube; AMP, amplifier; ADC, analog-digital converter; PC, personal computer.

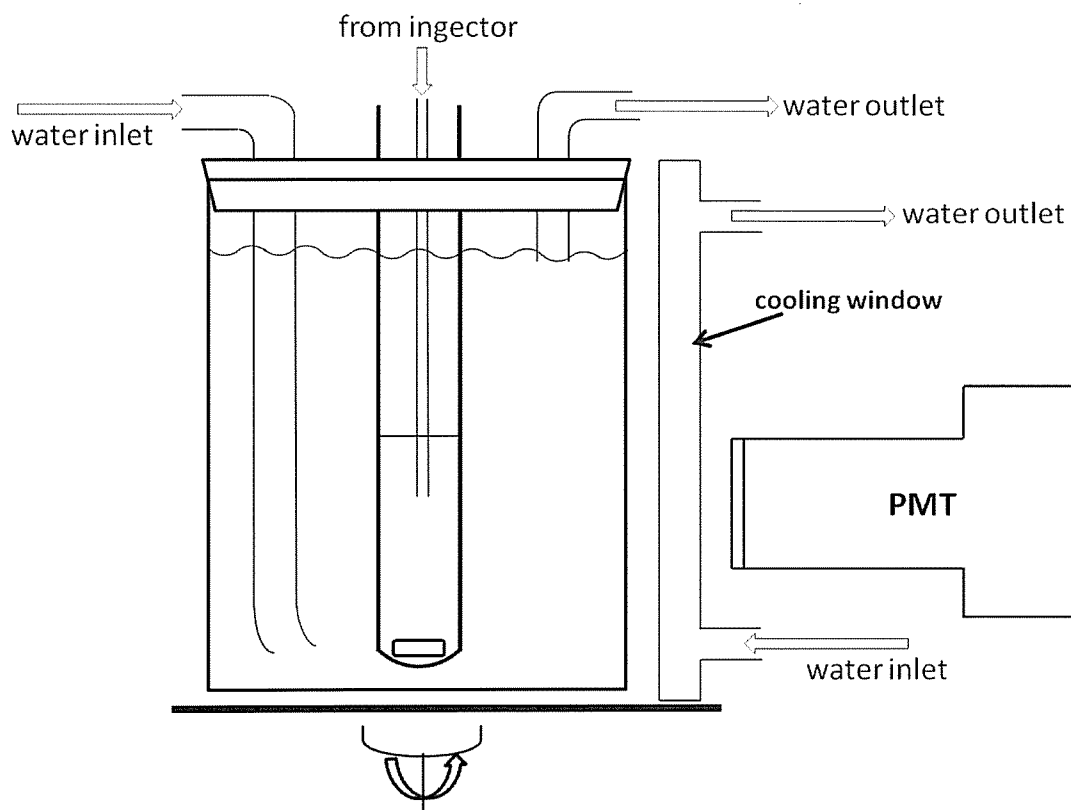


Fig. 2-2 Schematic diagram of the CL cell with temperature controller. PMT, photomultiplier tube.

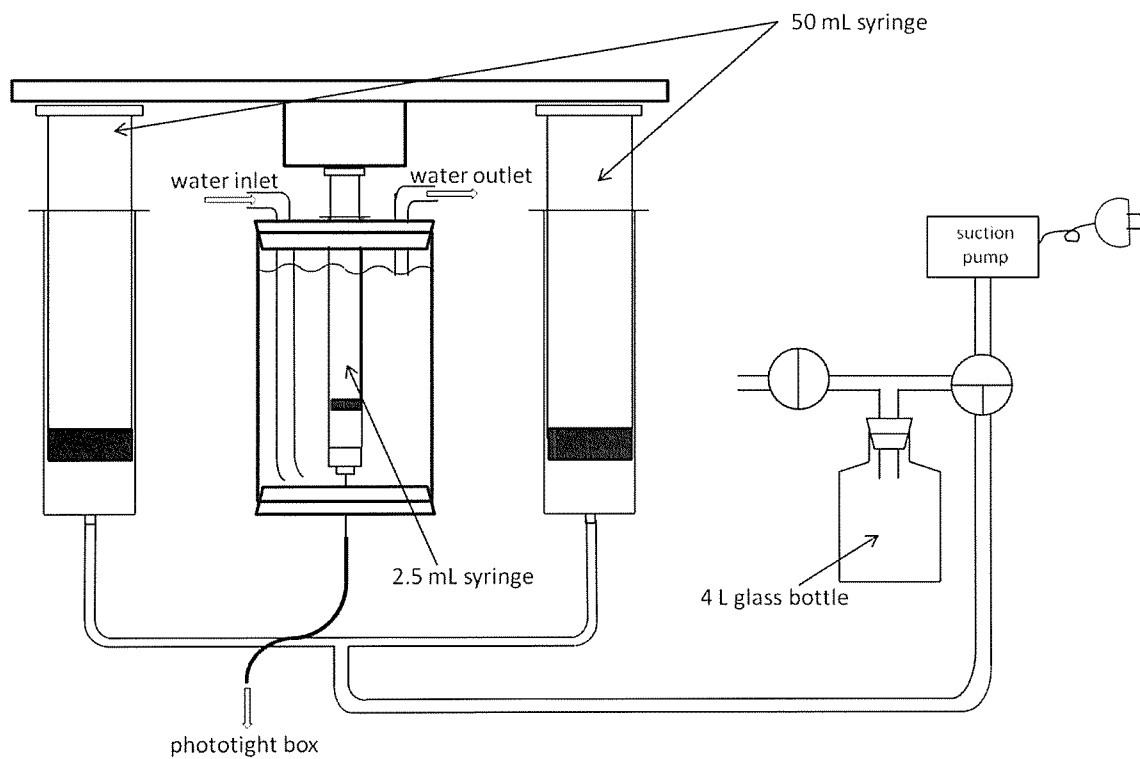


Fig. 2-3 Schematic diagram of the injector with temperature controller.

### 2.2.3) 温度効果

2 mL の  $10^{-4}$  M glucose 溶液を発光セル内にあらかじめ充填しておいた。シリンジには 2 mL の発光試薬を充填し、発光セルの温調温度と一致させた。温調水を最短 10 分間通液した後、シリンジから発光セル内に発光試薬を注入した。27°C ~ 57°C まで 10°C ごとに発光強度を測定した (n=3)。

#### 2.2.4) 前処理酸化法

UV 発生管(254 nm, 10 W)にテフロンチューブ( $\phi 0.5$  mm i.d. $\times 1.6$  mm o.d. $\times 10$  m length)を巻き付けた。概略図を Fig. 2-4 に示す。これにシリンジで 0.2 M  $\text{HNO}_3$  と同体積の  $10^{-5}$  M glucose 溶液との混合液を満たし, UV を 2 分間照射した。その後, 空気を送り込むことで反応液をテフロンチューブ内から取り出し, さらに 10 倍希釈をした反応液を発光セル内に 2 mL 充填した。発光試薬を打ち込み装置に 2 mL 充填し, 温調水を 27°C に設定し最短 10 分間通液させた後, 発光セル内に発光試薬を注入した。

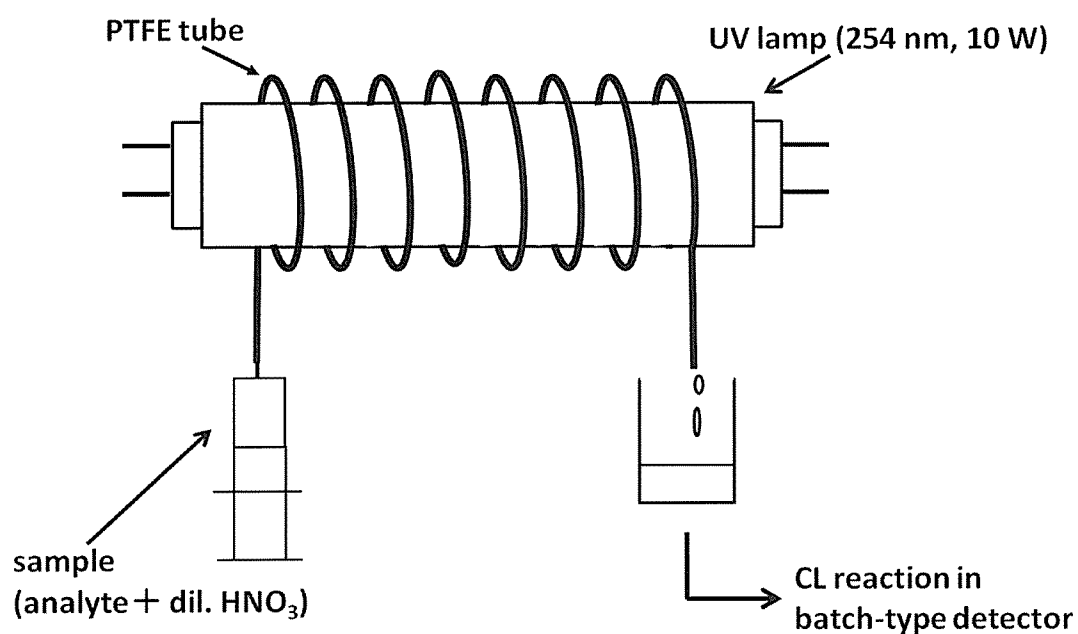


Fig. 2-4 Device for sample oxidation.

## 2.3) 結果と考察

### 2.3.1) 装置

化学発光反応の温度効果を検討するための装置は、米国では市販されているが、国内では市販されていない。このため、自作する必要がある。PMT のノイズ(暗電流)は温度上昇に伴い増大するので、この効果を一定に保つためには発光セルとは別に PMT を一定温度に保つ必要があり、発光セルと PMT の間に冷却窓を設置した。冷却窓という呼び方をここでは採用したが、一般で用いられている呼称ではない。厚さ 2 mm の透明アクリル板を削り出して自作している。

この報告では、発光試薬溶液とサンプル液の体積はいずれも 2 mL であることから、反応させる以前に両者を希望の温度に設定する必要がある。別の実験により約 2 分間循環水に接触させれば、希望の温度に達することを確認している。試料の打ち込み速度について再現性を維持するため、試料注入シリンジの稼働は自動化している。方式については第 1 章で述べている。

UV 照射装置については、後述する前処理酸化法の項で述べる。

自作した温度調節機能付き化学発光検出器の有効性を確認するために、反応の速いサンプルとして oxalic acid を、遅いサンプルとして malonic acid を採用し、温度を変えて測定をしている。結果を Fig. 2-5 と 2-6 に示す。Fig. 2-5-(A)は oxalic acid のピークプロファイルであるが、反応開始後、約 3 秒で最大値に達し 30 秒以内に実質発光量は零となることがわかる。反応が速いので、温度効果の検討をするには不相当と判断した。一般に発光反応は一次反応速度式で表され得ることが知られており、発光強度の自然対数をとると、横軸に時間をとると反応初期で 1 本の直線が得られ(Fig. 2-5-(B)), 反応ステップ数は 1 と考えられる。Fig. 2-6-(A)は malonic acid のピークプロファイルであるが、温度の違いにより発光強度に明解に差があることがわかる。27.3°C と 47.2°C では最大発光強度は約 4 倍増大していることがわかる。この増大は基本的には、反応速度に起因していると解釈できる。Oxalic acid と同様に自然対数をとると、いつでも反応初期では直線が得られ(Fig. 2-6-(B)), 反応ステップ数は 1 であることがわかる。これらの結果より、装置の稼働が確認できたので、glucose をサンプルとした温度効果を検討した。

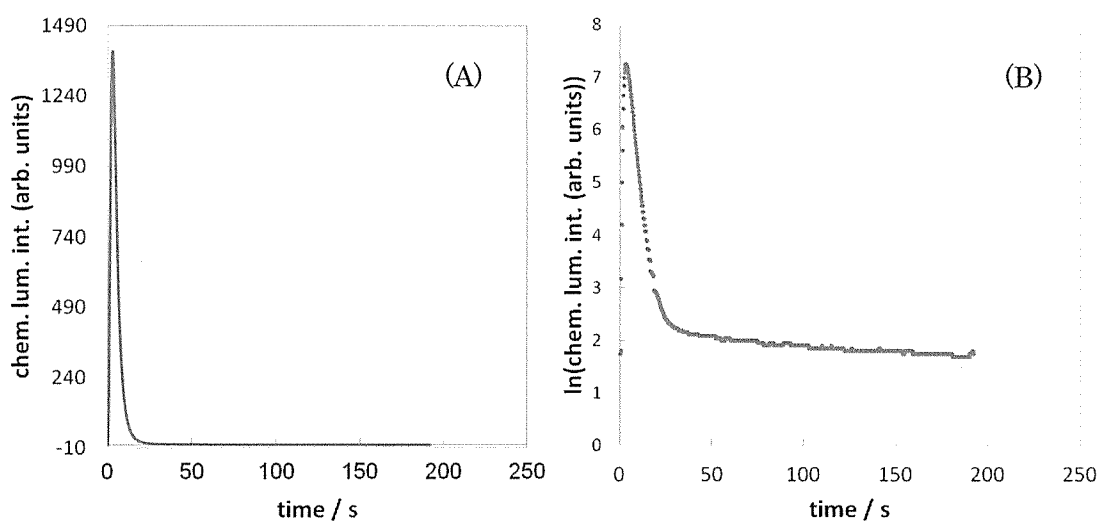


Fig. 2-5 Peak profiles of oxalic acid (A) and plots of first-order reaction rate from oxalic acid (B). Sample,  $10^{-6}$  M oxalic acid; temp.,  $27^{\circ}\text{C}$ ; another conditions are described in text.

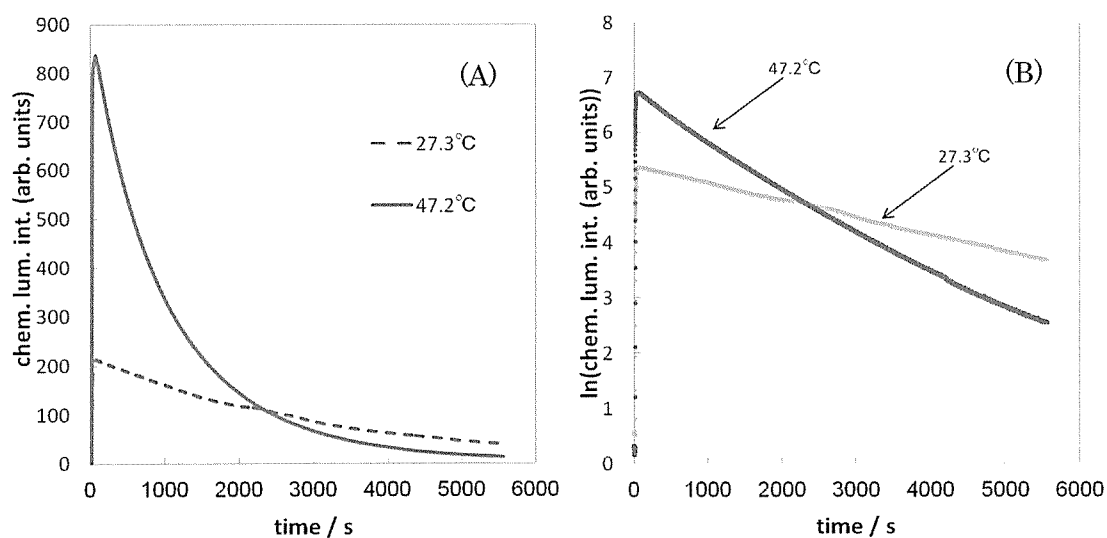


Fig. 2-6 Peak profiles of malonic acid (A) and plots of first-order reaction rate from malonic acid (B). Sample,  $10^{-4}$  M malonic acid; temp.,  $27^{\circ}\text{C}$  and  $47^{\circ}\text{C}$ ; another conditions are described in text.



### 2.3.2) 温度効果

化学発光反応の温度依存性の研究は、ルミノール反応については数通見出されるが [3, 4], Ru(II)錯体化学発光法に関しては、非水溶液(アセトニトリル)系で2通[5, 6], 水系では1通ある[7]. しかし、水系でさらに Ce(IV)が関与した系は確認した範囲では見出されていない. 実際に glucose の検出に対する温度効果を検討した. 結果を Fig. 2-7 に示す. 50°C付近が最も発光強度が大きいという結果が得られた. さらに温度を上げると、強度は減少した. ルミノール反応については、温度の上昇に伴い発光強度は増大することが、60°Cで最大であり 70°Cでは減少することが確認されており、類似の挙動が得られた[1]. これは、Ru(II)錯体の蛍光量子数量が温度上昇に伴い減少する効果が出現したのではないのかと思われる[7]. 27°Cを基準とし、47°Cにおける発光強度と比較すると、温度による感度改善は約5倍となった.

この2つの温度で得られたピークを Fig. 2-8-(A)に示す. 本来、反応速度は温度に依存することから、glucose の温度効果においても、いずれの温度でもピークプロファイルの面積は一定で、温度の上昇に伴い発光強度が増大し、発光時間が短くなると期待された. しかし、得られた結果は異なっており、高温時の方が面積及び最大発光強度は大きくなり、いずれもおおよそ 3 秒の位置に発光強度の最大値が見出された. Fig. 2-8-(B)には、(A)の発光強度の自然対数をとった結果を示す. この結果では 10 秒までの反応初期とそれ以降では傾きが異なる2種の直線が得られた. このことより glucose と Ru(III)錯体の反応は複数のステップで反応していることがわかる. 上述したが、Flow 型検出への適用は、glucose が発光セル中に存在する期間と、発光期間を一致させるタイミングが重要となる. いずれにしろ、反応温度を上昇させても10倍を超える発光強度増大は不可能と判断した. 10 秒以降に反応している部分を、さらに速く反応する物質に変換することができれば、感度改善につながると考えた. そこで、前もって glucose に酸化処理を施し、測定を行った.

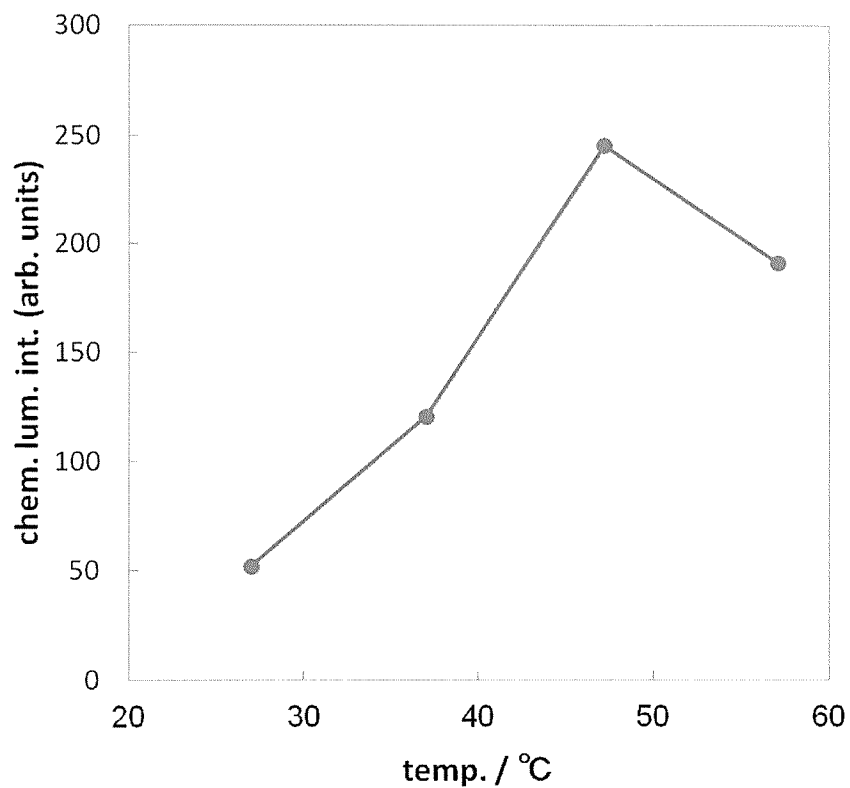


Fig. 2-7 Effect of the temperature using procedure A. Sample, 2 mL of  $10^{-4}$  M glucose; another conditions are described in text.

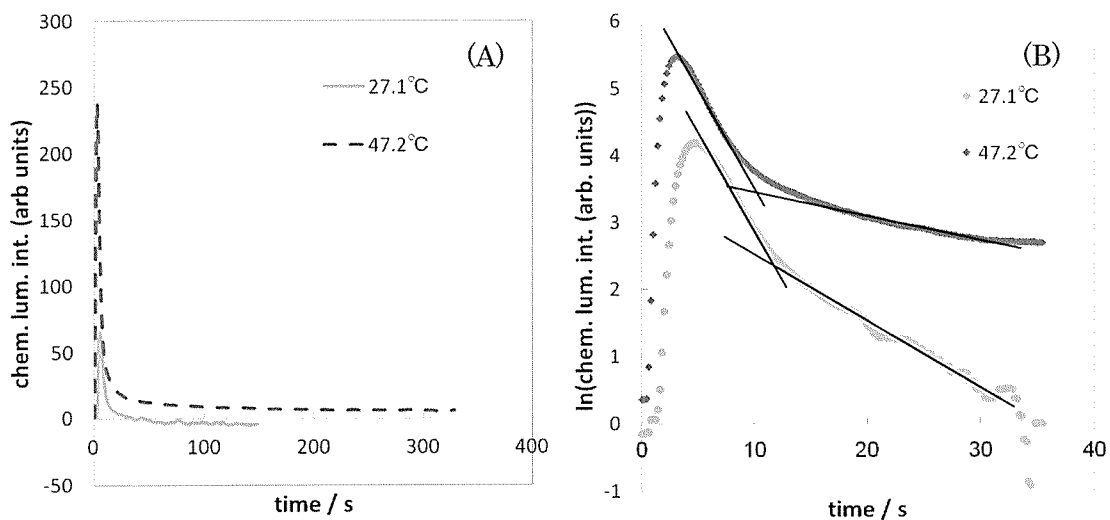


Fig. 2-8 Peak profiles of glucose (27°C and 47°C) (A) and plots of first-order reaction rate from glucose (B). The conditions are described in text.

### 2.3.3) 前処理酸化法

Dil.  $\text{HNO}_3$  と UV 照射を用いて, glucose を前もって酸化して得られた反応液(UV 処理後)を Batch 型で検出した結果を Fig. 2-9 に示す. (A)が未処理の glucose, (B)が酸化処理を行って得られたピークである. どちらも温度は  $27^\circ\text{C}$  で統一した. 前もって酸化をすることで, 約 500 倍の感度改善につながった.

$\text{HNO}_3$  の酸化力については古くから知られており, 2 M 以上のとき酸化力が期待できるが, それより薄い時には期待できない[8]. ここではより薄い  $\text{HNO}_3$  を使うことから酸化力に期待できないため, UV 照射による酸化反応の促進を利用した.  $\text{HNO}_3$  は紫外部に吸収帯をもつが, この UV 発生管の UV の波長は 254 nm であり,  $\text{HNO}_3$  を励起するには本来は不適である. しかしながら, 254 nm の約 4 分の 1 の強度で 185 nm の UV を発生することが知られており, この波長を発生する UV 管ならば  $\text{HNO}_3$  を十分励起させることができるので, 185 nm の UV が有効であったと考えている.

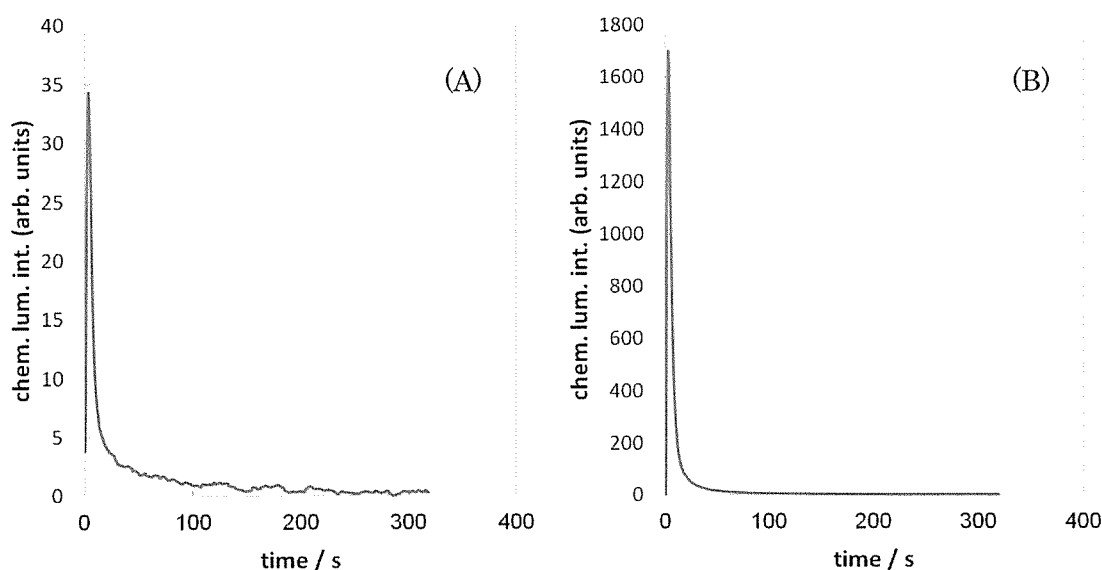


Fig. 2-9 Effect of the pretreated oxydation. (A)untreated sample; (B)treated sample; CL detector, batch-type; sample volume, 2 mL; conc. of glucose,  $0.5 \times 10^{-5}$  M for (A) and  $0.5 \times 10^{-6}$  M for (B); CL reagent, 2 mL of mixing solution prepared with 0.2 mM Ru(II) complex and 4 mM CAN in 0.4 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; treated conditions, in text.

## 2.4) まとめ

Malonic acid と Ru(III)錯体との反応で得られる結果は、反応時間が3時間を超えても発光し続ける。ところが、反応時の温度を 10°C 上昇させると、発光時間は約 1 時間半となった。さらに、温度が上昇することで発光試薬を打ち込んでから発光最大値までの時間も短縮した。このように反応速度は、通常、温度が 10°C 上昇すれば、反応時間は 2 倍速くなる。しかし、glucose の温度効果では、最大発光強度は変化するが、発光試薬を打ち込んでから発光最大値までの時間はほぼ変化していない。発光反応時の温度を上昇させることで、glucose と Ru(III)錯体の反応が促進されれば、発光期間(時間)は短くなるはずである。しかし、今回の発光試薬の組成は、Ce(IV)が Ru(II)錯体に対して大過剰であることから、温度上昇させることで残存している Ce(IV)の酸化力により glucose が酸化され、Ru(III)錯体との反応が速い物質に変換されたことで発光強度が増大したと思われる。この効果は 50°C 付近までは見出されたが、60°C 以上になるとこの増大した Ce(IV)の酸化力により、glucose が非発光体まで酸化されたと考えるが確認はできていない。また、前もって glucose に酸化処理をして測定を行うと、未処理のときと比べ、感度および発光が落ち着くまでの時間が改善されている。

化学発光は、発光反応の開始と終了がある。そこで、Flow 型での検出では、流路セルであることを考慮する必要がある。そのために、Batch 型で反応速度を検討する必要がある、その結果をふまえた上で Flow 型への適用を考えなければならない。

Flow 型検出系では被検出化学種を流路へ注入した際は、流路管内を移動して、検出装置のセルに至るまでに 50 倍程度の濃度へ希釈され、感度低下の原因となることが指摘されている。また Flow 型検出系と異なり、Batch 型検出装置を用いる際は、発光セル内の反応溶液は発光反応開始から終了時点まで、その発光測定が終わるまで入れ替わることがない。ゆえに、発光反応の開始から終了までを測定でき、総発光量として検出が可能であり、高感度が期待できる。一方、Batch 型反応セルに被検出化学種を注入する装置(インジェクター)の再現性が乏しいなどの欠点があり、また時間当たりの測定回数などの効率を考慮した、操作性などの観点からは、自動化する方が望ましい。装置の特性を考慮すると Batch 型は自動化するには不向きであり、むしろ Flow 型が自動化に適していると考えられる。

## 2.5) 文献

- [1] A. M. Garcia-Campana, W. R. G. Baeyens (eds.), *"Chemiluminescence in Analytical Chemistry"*, Marcel Dekker, New York, USA, 2001. Chap. 12(p. 321-348). ("Chemiluminescence in Flow Injection Analysis" by A. C. Calokerinos, L. P. Palilis.)
- [2] L. L. Shultz, T. A. Nieman, *J. Biolumin. Chemilumin.*, 13(1998)85.
- [3] R. G. Shinde, V. M. Raut, M. L. Narwade, *Der Chemica Sinica*, 4(2013)161.
- [4] R. G. Shinde, *Int. J. Pharm. Bio. Sci.*, 4(2013)B1032.
- [5] J. D. Luttmmer, A. J. Bard, *J. Phys. Chem.*, 85(1981)1155.
- [6] J. Gonzales-Velasco, *J. Physical Chem.*, 92(1988)2202.
- [7] J. Van Houten, R. J. Watts, *J. Am. Chem. Soc.*, 98(1976)4853.
- [8] F. A. Cotton, G. Wilkinson (eds.), *"Advanced Inorganic Chemistry"* Chap. 6, 3rd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, 1980.

## 第3章 Flow型による glucose の化学発光検出

### 3.1) 緒言

Flow Injection Analysis(FIA)の検出装置として吸光光度計や蛍光検出器を採用した際は、被検出化学種のセル通過時間と比べてその寿命は十分長く、その消失過程時間を考慮する必要は実質的にはほとんど無いと思われる。一方、化学発光検出器を採用した際はこれらと異なり、被検出化学種は発光試薬と混合された直後から発光反応を開始し、時間経過に伴い被検出化学種は減少し、発光強度も減衰する。従って、第2章において一部指摘したが、Flow型での化学発光を利用した検出を行う際には、流路型発光セルの構造を考慮し、発光試薬とサンプルの混合後から発光セルに到着し、通過するまでの時間を考慮する必要がある[1, 2]。特に発光試薬と混合後、短時間で減衰する試料は注意が必要である。一方、発光反応期間(時間)が長期に渡る試料は混合直後であっても最大発光強度は低いことを意味している。これら反応の遅い試料の検出感度を改善するためには発光強度を増大させる方法が必要であり、このため反応速度を速くすることで最大発光強度を増大させる方法を検討することになった[3]。Glucoseの発光強度はoxalic acidなどのそれと比べて低いこと[4]、またglucoseの発光反応期間(時間)もoxalic acidのそれと比べて長いことから、glucose検出感度改善のためにはglucoseと発光試薬とを反応させる以前に、より短時間で反応が終了する化学種に誘導した後、発光試薬と反応させることで望ましい結果が得られると考えられた。2.3.2)の結果より、glucoseを前もって酸化処理した後、この得られた反応液を、発光試薬と反応させる系を検討することが必要となった。そこで、第2章でも述べたdil. HNO<sub>3</sub>-UV照射システムを用いてFlow型への適用を試みた。

試料溶液中のglucoseを弱く酸化するための酸化剤にはdil. HNO<sub>3</sub>を用いた。一般的にHNO<sub>3</sub>は、その濃度が2M以上のときに酸化力があることが知られており、dil. HNO<sub>3</sub>には酸化力がない[5, 6]。この酸化力のないdil. HNO<sub>3</sub>にUV照射を行うことで、酸化力を促進させられると考えた[7-9]。UV照射で酸化力が制御できるこのシステムを用いることで、HNO<sub>3</sub>の消費量も小さくでき、また、dil. HNO<sub>3</sub>を使用することからステンレスなどへの腐食性もなく、安全性も高くなる。Glucoseの酸化過程は、off-line型とon-line型の2つの形式を検討し、glucoseの化学発光法での直接検出を目指した。

さらに、glucoseの化学発光検出において、Batch型とFlow型の比較例が少ないことから、測定方法の長所と短所の検討を試みた。

### 3.2) 実験

#### 3.2.1) 試薬

用いた試薬は、全て市販の特級品を精製せずに用いた。発光試薬には、Ru(II)錯体溶液と CAN 溶液の混合液を用いた。

#### 3.2.2) off-line 型装置

Glucose を酸化するために用いた装置は、2.2.4)と同様である。UV 照射後の反応液の検出には FIA を用いた。FIA の装置概略図を Fig. 3-1 に示す。3 台の送液ポンプからなり、1 台はキャリアの 0.2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  を、残り 2 台は 0.8 mM Ru(II)錯体 in 0.2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液と 2.4 mM CAN in 0.2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液をそれぞれ送液した。キャリアの送液ポンプの後ろには 10  $\mu\text{L}$  のループを取り付けたインジェクター(Rheodyne valve 7125, Rheodyne Co., CA, USA)を接続し、サンプルを打ち込んだ。発光試薬を送液するポンプの後ろには、ディレイコイル(5 min)を設けた。サンプルと発光試薬の混合後、発光検出器(CL-2027 Plus, JASCO Co. Inc., Hachioji, Japan)で発光強度を測定した。発光強度は電圧単位で 0.5 秒ごとに測定し、AD 変換機を通して PC に送り、エクセルファイルとして処理した。

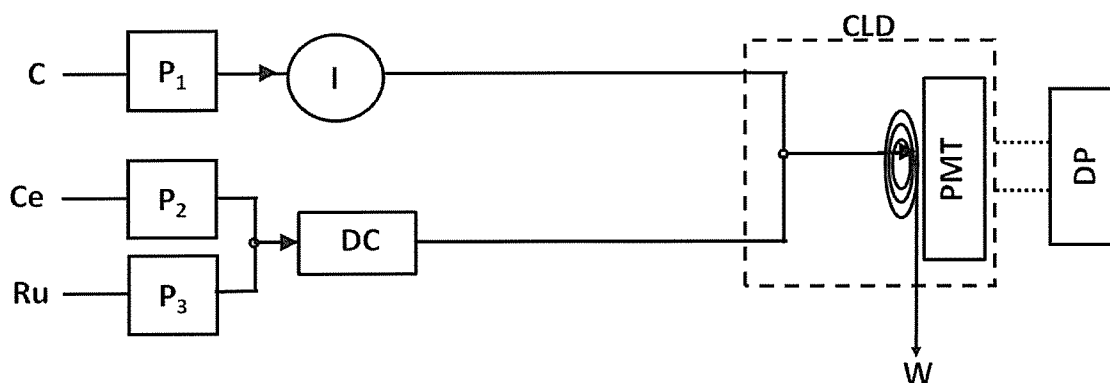


Fig. 3-1 Schematic diagram of the FIA system. C, carrier (0.2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ); Ce, 2.4 mM CAN in 0.2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , Ru, 0.8 mM Ru(II) complex in 0.2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> and P<sub>3</sub>, pump (P<sub>1</sub>, 0.5 mL / min; P<sub>2</sub> and P<sub>3</sub>, 0.25 mL / min); I, injector (10  $\mu\text{L}$ ); DC, delay coil (5 min); CLD, chemiluminescence detector; PMT, photomultiplier tube; DP, dataprocessor; W, waste.

### 3.2.3) 発光試薬の寿命・発光

#### <発光試薬の寿命>

0.1 mM Ru(II)錯体 in 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液と 0.25 mM CAN in 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液を同体積で混合し、吸光光度計(第 1 章に記載)を用いて一定時間ごとに吸収スペクトルを測定した。ブランクは 0.1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を用いた。

#### <発光試薬の発光>

検出に用いた装置の概略図を Fig. 3-2 に示す。2 台の送液ポンプと発光検出器を用いた。送液ポンプでそれぞれ 1 mM Ru(II)錯体 in 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液と 3 mM CAN in 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液を一定速度で送液した。一定量送液した後、送液ポンプのスイッチをオフにし、発光試薬の発光強度の経時変化を測定した(stopped-flow 法)。

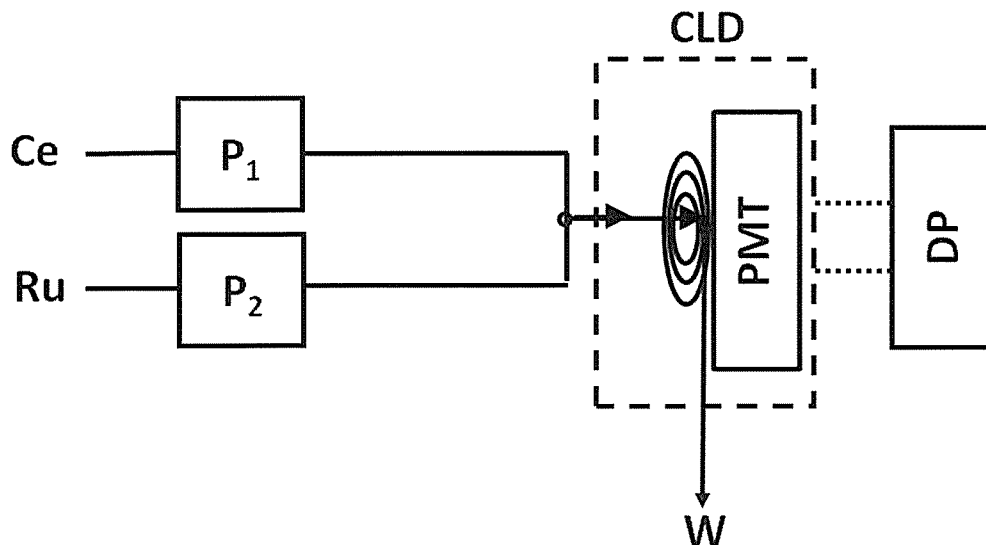


Fig. 3-2 Schematic diagram of the FIA system. Ce, 3 mM CAN in 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; Ru, 1 mM Ru(II) complex in 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; P<sub>1</sub> and P<sub>2</sub>, pump (0.25 mL / min); another conditions are described in Fig. 3-1.



### 3.2.4) 前処理酸化の最適化 off-line 型

#### <HNO<sub>3</sub> 濃度効果>

サンプル液中の glucose を酸化するための前処理条件を検討した。0.2 mM glucose 溶液と種々の濃度の HNO<sub>3</sub> を同体積で混合して調整した。それぞれの混合液を 2.2.4) で記載した方法で 2 分間 UV 照射し、取り出した反応液を off-line 型 FIA の注入サンプルとして、HNO<sub>3</sub> の濃度効果を検討した(n=6)。FIA の条件は 3.2.2) に記載した。ただし、発光試薬は 1 mM Ru(II) 錯体 in 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液と 3 mM CAN in 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液を用い、インジェクターに取り付けたループ体積は 20 μL で行った。

#### <UV 照射時間>

0.2 mM glucose 溶液と 0.2 M HNO<sub>3</sub> を同体積で混合し、サンプル液を調整した。2.2.4) で記載した方法で UV 照射し、取り出した反応液を HNO<sub>3</sub> 濃度の検討時と同じ off-line 型 FIA の注入サンプルとして、UV 照射時間の効果を調べた(n=6)。

### 3.2.5) on-line 型装置

UV 照射装置を流路内に含む FIA の概略図を Fig. 3-3 に示す。送液ポンプは 3 台からなり、1 台はキャリアの 0.2 M HNO<sub>3</sub>、残り 2 台の条件は 3.2.2) に記載した。インジェクターと検出器の間に、UV 照射時間を 2 分に調節した UV 照射装置を設け、その後冷却コイル(φ0.5 mm i.d.×1.6 mm×50 cm, 0°C)へ接続した。用いたインジェクターとディレイコイル、発光検出器の条件は 3.2.2) に記載した。

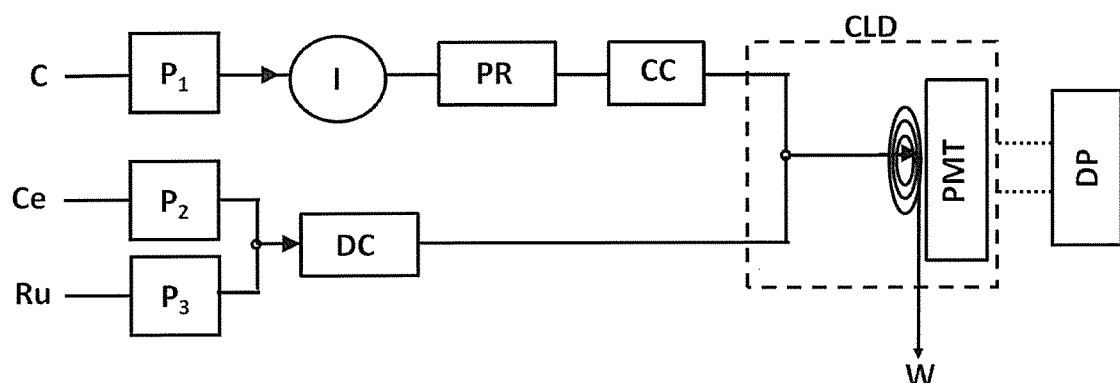


Fig. 3-3 Schematic diagram of the FIA with oxidation system. C, carrier (0.2 M HNO<sub>3</sub>); PR, photochemical reactor (UV lamp, 254 nm, 10 W, 2 min); CC, cooling coil (φ0.5 mm i.d.×50 cm length, 0°C); another conditions are described in Fig. 3-1.

### 3.2.6) 検出系の最適化 on-line 型

#### <Ce 濃度効果>

FIA での検出における CAN 濃度の効果を, on-line 型 FIA を用いて検討した. サンプル液には 1 mM glucose 溶液を用いた. Ru(II)錯体溶液の濃度は 1 mM に固定し, 種々の濃度の CAN 溶液を用いて発光強度を測定した(n=6). インジェクターに取り付けたループ体積は 20  $\mu$ L であり, その他の FIA の条件は 3.2.5)に記載した.

#### <Ru 濃度効果>

FIA での検出における Ru(II)錯体濃度の効果を, on-line 型 FIA を用いて検討した. サンプル液には 1 mM glucose 溶液を用いた. Ru(II)錯体溶液と CAN 溶液の濃度比を 1:3 に固定し, 種々の濃度で発光強度を測定した(n=6). その他の FIA の条件は 3.2.5)に記載した.

#### <冷却コイル>

On-line 型 FIA における UV 照射後の冷却コイルの必要性を検討した. サンプル液には 0.1 mM glucose 溶液を用いた. インジェクターに取り付けたループ体積は 20  $\mu$ L で, 発光試薬には 1 mM Ru(II)錯体 in 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液と 10 mM CAN in 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液を用いた. その他の FIA の条件は 3.2.5)に記載した.

### 3.2.7) 検量線

種々の濃度の glucose 溶液と 0.2 M HNO<sub>3</sub> を同体積で混合し, 各溶液をそれぞれ 2.2.4)で記載した方法で UV 照射を 2 分間行い, 取り出した反応液を off-line 型 FIA の注入サンプルとし, 検量線を作成した(n=6). FIA の条件は 3.2.2)に記載した.

UV 照射装置を流路内に組み込んだ on-line 型 FIA でも種々の濃度の glucose 溶液をサンプルとし, 検量線を作成した(n=6). FIA の条件は 3.2.5)に記載した.

### 3.2.8) 反応液の HPLC 検出

Glucose を dil. HNO<sub>3</sub>—UV 照射することで得られる誘導体化物質を調べるために, High Performance Liquid Chromatography(HPLC)でカラム分離を行った. HPLC の概略図を Fig. 3-4 に示す. 溶離液は 5 mM tetrabutylammonium hydrogen sulfate と 1% methanol を含む 50 mM CH<sub>3</sub>COOH (pH 3.5)を用いた. 分離には ODS カラム (Chromolith RP-8e,  $\phi$ 4.6 mm i.d.  $\times$  15 cm length, MERCK, Germany)を用いた. 2 mM glucose 溶液と 0.4 M HNO<sub>3</sub> を同体積で混合し, 2.2.4)で記載した方法で 2 分間 UV 照射をし, 取り出した反応液を HPLC の注入サンプルとした. インジェクターに取り付けたループ体積は 20  $\mu$ L とし, その他の装置, 溶液系の条件は 3.2.4)に記載した.

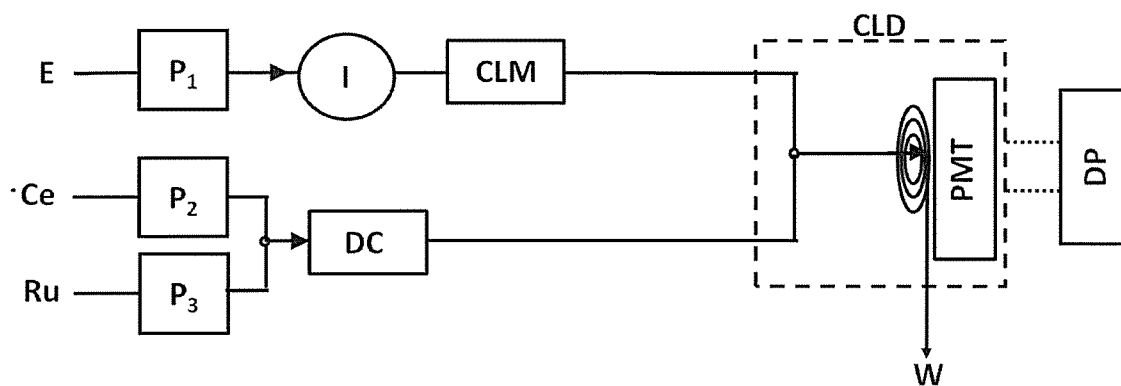


Fig. 3-4 Schematic diagram of the HPLC system. E, eluent (5 mM tetrabutylammonium hydrogen sulfate and 1% methanol in 50 mM CH<sub>3</sub>COOH, pH 3.5); CLM, ODS column (Chromolith RP-8e,  $\phi$  4.6 mm i.d.  $\times$  100 mm length); another conditions are described in text.

### 3.3) 結果と考察

#### 3.3.1) 発光試薬の寿命・発光

##### <発光試薬の寿命>

Fig. 3-5-(A)には、一定時間ごとに得られた吸収スペクトルの変化を示す。Ru(II)錯体溶液と CAN 溶液を混合した直後(0 h)に得られた吸収スペクトルは、1.2.6)の結果で得られた Ru(III)錯体のスペクトルと一致している。2種の溶液を混合してから78 h後に得られた吸収スペクトルは、Ru(II)錯体のスペクトルと一致している。Ru(II)錯体の極大吸収波長である454 nmにおける吸光度の変化をプロットした結果をFig. 3-5-(B)に示す。2種の溶液を混合してから8時間が経過したところから、徐々にRu(III)がRu(II)に戻ることがわかる。このことから、一定の条件での実験が望ましいことおよび、Ru(II)錯体溶液や CAN 溶液がそれぞれ個別に保存すると十分に寿命が長く、発光試薬としての寿命を考えなくて済むことから、FIA システムにおいて2台の送液ポンプを用いて、Ru 錯体溶液と CAN 溶液を個別に送液することで、発光反応直前に発光試薬を生成させ、供給している。

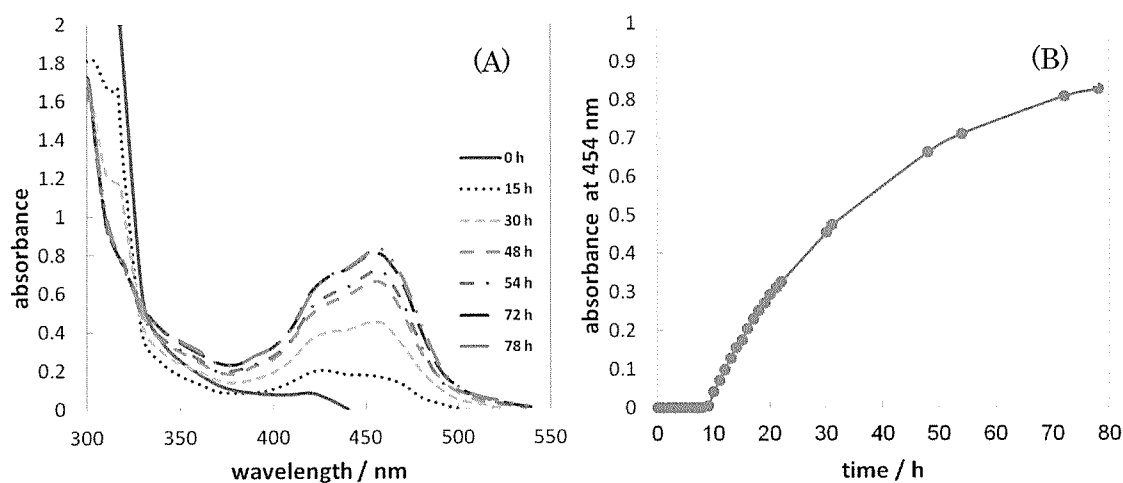


Fig. 3-5 Changes in the visible spectra of the CL reagent (A) and plot of absorbance at 454 nm (B) as a function of storage time. Conditions are described in text.

<発光試薬の発光>

Ru(II)錯体溶液と CAN 溶液は、混合直後に弱く発光することが見出された。混合直後の発光試薬をそのまま発光反応に用いると、バックグラウンドの増大を引き起こし、検出感度の悪化を引き起こすことが予想された。これを避けるために、stopped-flow 法を用いて、発光試薬の混合後の発光期間(時間)を調べた。Fig. 3-6 に得られた発光強度の経時変化を示す。混合後約 5 分で、発光強度は実質的に零とみなせる。そこで、Ru(II)錯体溶液と CAN 溶液の混合用ミキシング T(三方ジョイント)の後に 5 分間に設定したディレイコイルを接続した。

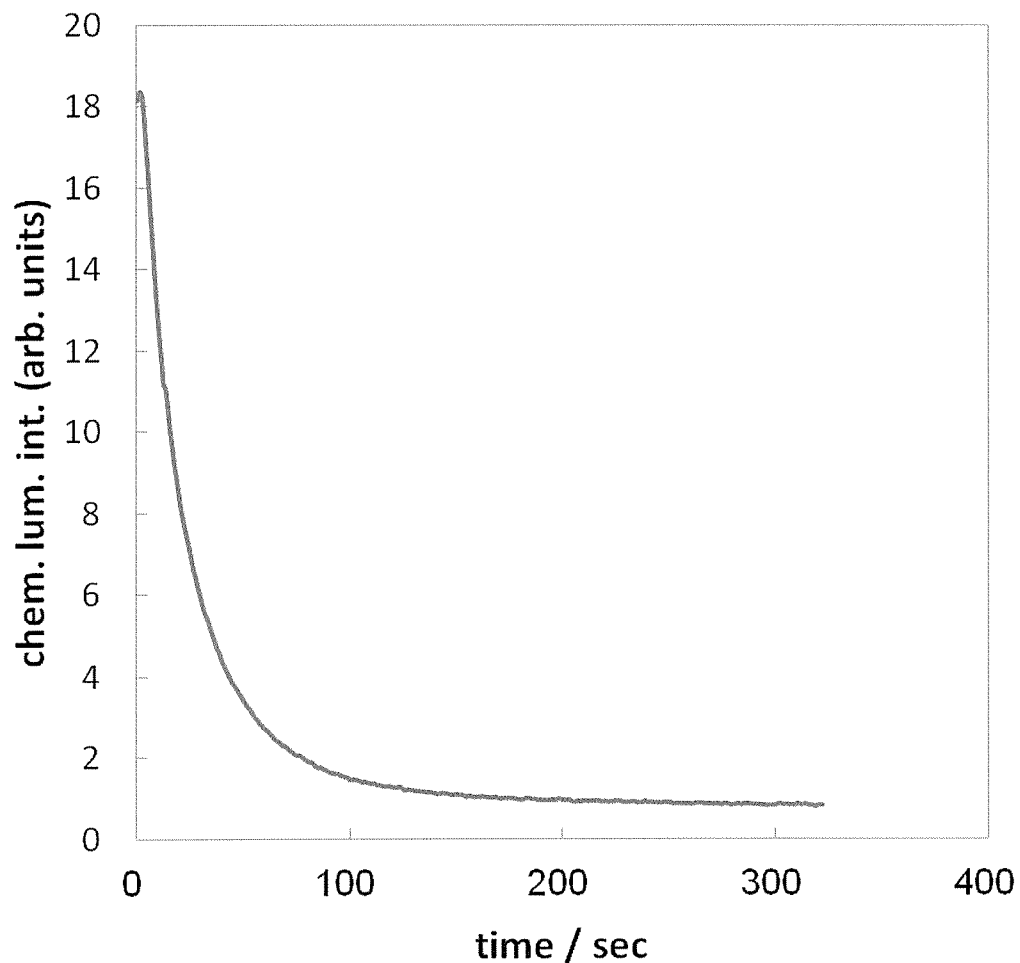


Fig. 3-6 CL intensity as a function of time. The stopped-flow method was employed. Conditions are described in text.

### 3.3.2) 前処理酸化の最適化 off-line 型

Glucose を酸化する手段として, dil.  $\text{HNO}_3$  と UV 照射を組み合わせた研究の報告はない。

#### < $\text{HNO}_3$ 濃度効果>

Fig. 3-7 に得られた  $\text{HNO}_3$  濃度効果の結果を示す.  $\text{HNO}_3$  濃度が 0.2 M のときに, 最大の発光強度が得られ, 以降の実験には酸化条件として採用した. 0 M のときはピークを与えず, 0.2 M よりも濃度が濃くなると発光強度の減少がみられた. これは,  $\text{HNO}_3$  濃度が上がることで glucose の酸化が進み, 発光反応する化学種が減少したためと考えられる。

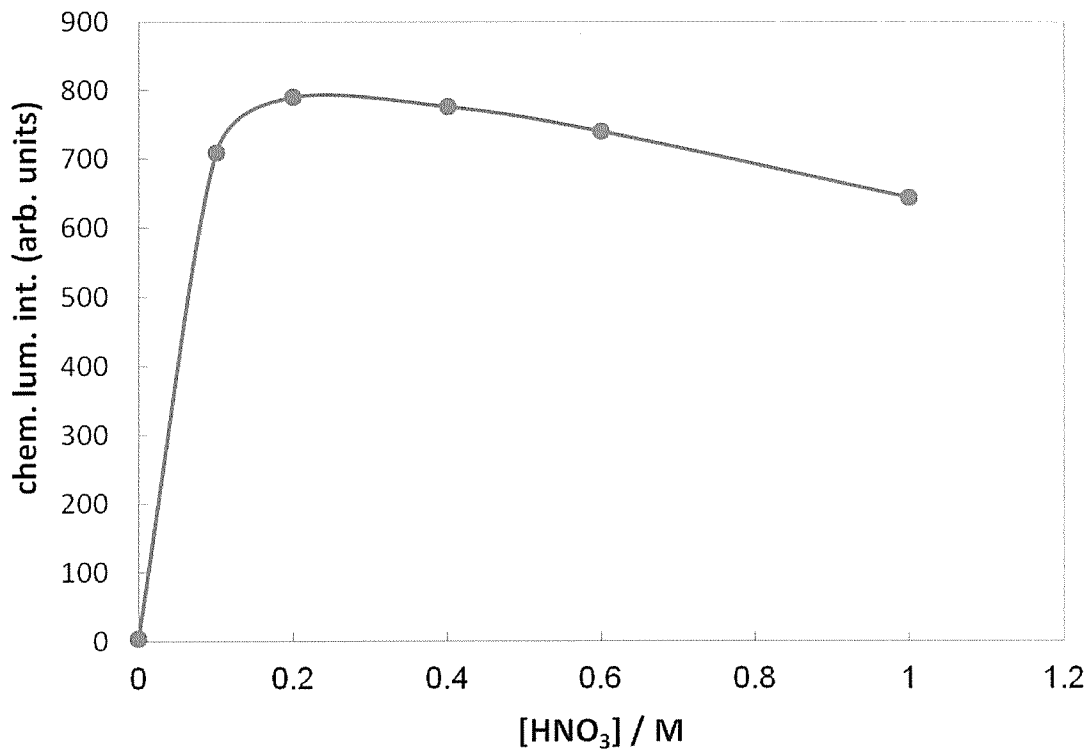


Fig. 3-7 Effect of  $\text{HNO}_3$  concentration on the oxidation using off-line system. Sample,  $2 \times 10^{-4}$  mM glucose; oxidation reagent, 0–1 M  $\text{HNO}_3$ ; UV irradiation time, 2 min; another conditions are described in text.

### <UV 照射時間>

得られた結果を Fig. 3-8 に示す.  $\text{HNO}_3$  濃度を 0.2 M に固定し, UV 照射時間を変化させているが, 照射時間が 2 分の時に最大発光強度が得られた. 0 分の時にはピークを与えず, 照射時間が 2 分を超えると発光強度は減少した. これは,  $\text{HNO}_3$  濃度を上げた時と同様に UV 照射時間が長くなることで glucose の酸化が進み, 発光反応する化学種が減少したためとが考えられる.

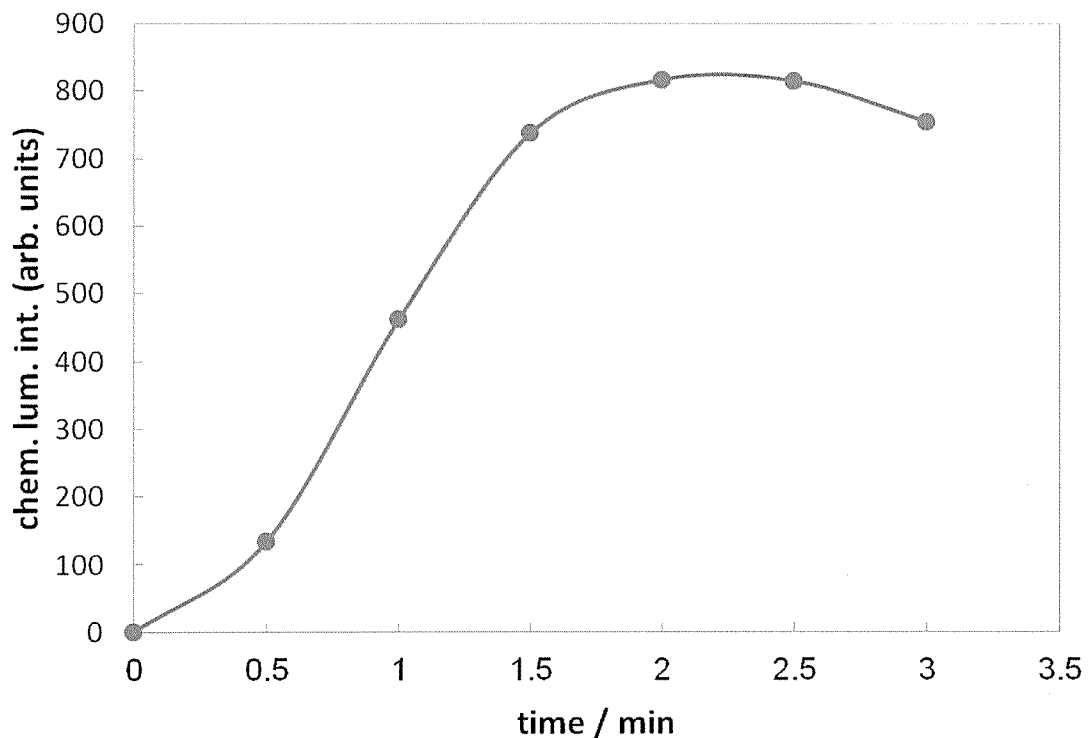


Fig. 3-8 Effect of UV irradiation time on CL intensity using off-line system. Sample,  $2 \times 10^{-4}$  mM glucose; oxidation reagent, 0.2 M  $\text{HNO}_3$ ; UV irradiation time, 1–3 min; another conditions are described in text.

これら 2 つの結果より, FIA での glucose 検出は dil.  $\text{HNO}_3$  と UV 照射を組み合わせた前処理酸化過程が必要であることが示唆された.

### 3.3.3) 検出系の最適化 on-line 型

#### <Ce 濃度効果>

得られた結果を Fig. 3-9 に示す. Ru(II)錯体溶液の濃度を 1 mM に固定して測定を行うと, CAN 溶液の濃度が 3 mM のときに最大の発光強度が得られた.

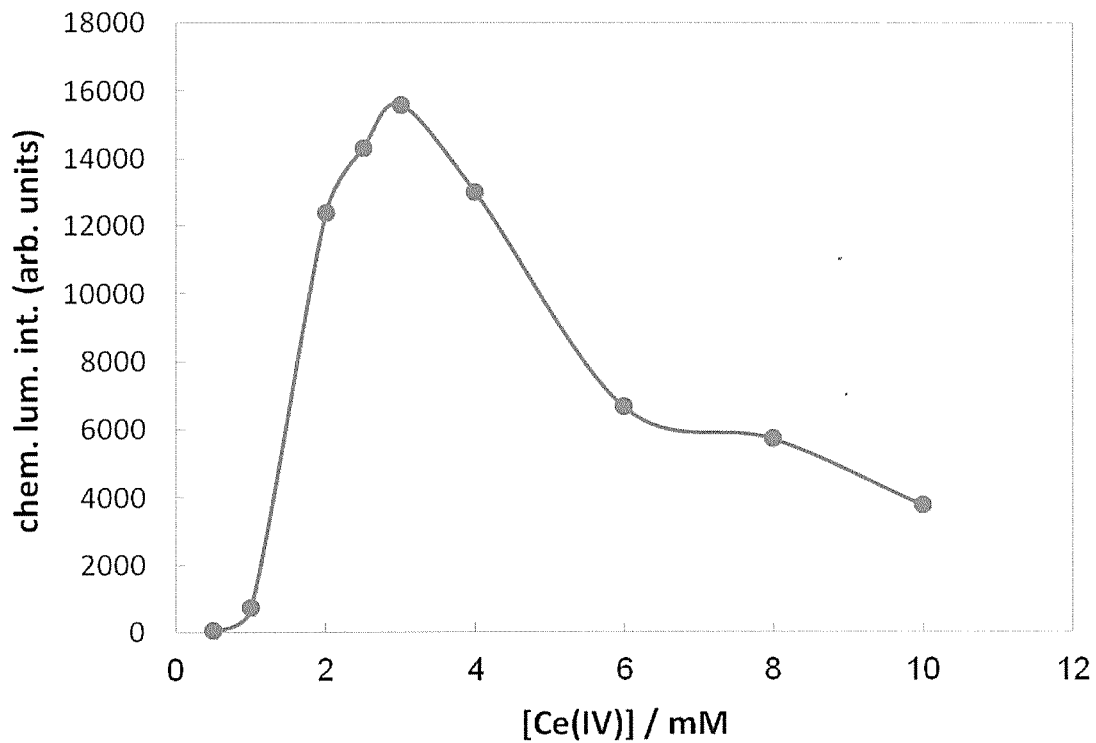


Fig. 3-9 Effect of CAN concentration in the CL reagent using FIA system. FIA conditions, as for Fig. 3-3 captions expect CL reagent concentration and injector; Ce, various concentration of CAN in 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; Ru, 1 mM Ru(II) complex in 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; injector, 20 μL.



< Ru 濃度効果 >

Ru(II)錯体溶液と CAN 溶液の濃度比を 1 : 3 にし, 測定して得られた結果を Fig. 3-10 に示す. Ru(II)錯体溶液の濃度が 0.8 mM, CAN 溶液の濃度が 2.4 mM のとき, 最大の発光強度が得られ, 以降の実験では, これらの値を FIA における発光試薬の条件に採用した.

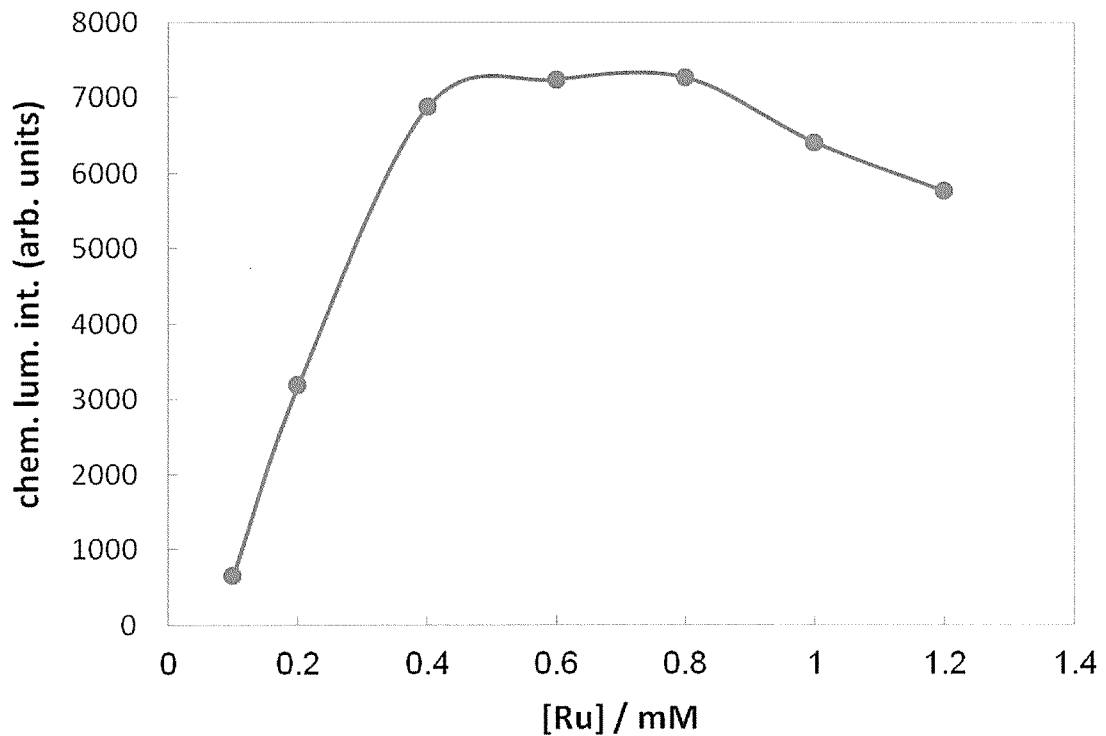


Fig. 3-10 Effect of Ru(II) complex concentration in the CL reagent using FIA system. FIA conditions, as for Fig. 3-3 captions expect CL reagent concentration; various concentration of CL reagent at  $[\text{CAN}] / [\text{Ru(II) complex}] = 3$ .

＜冷却コイル＞

Fig. 3-11 に冷却コイルが検出に与える影響を示す. (A)は冷却コイルを用いないとき, (B)は冷却コイルを接続したときに得られたピークである. ベースラインのノイズおよび発光強度が, ともに冷却コイルを接続した方が望ましいことがわかる. このことから, on-line 型 FIA において UV 照射装置と発光検出器の間に冷却コイルを接続した.

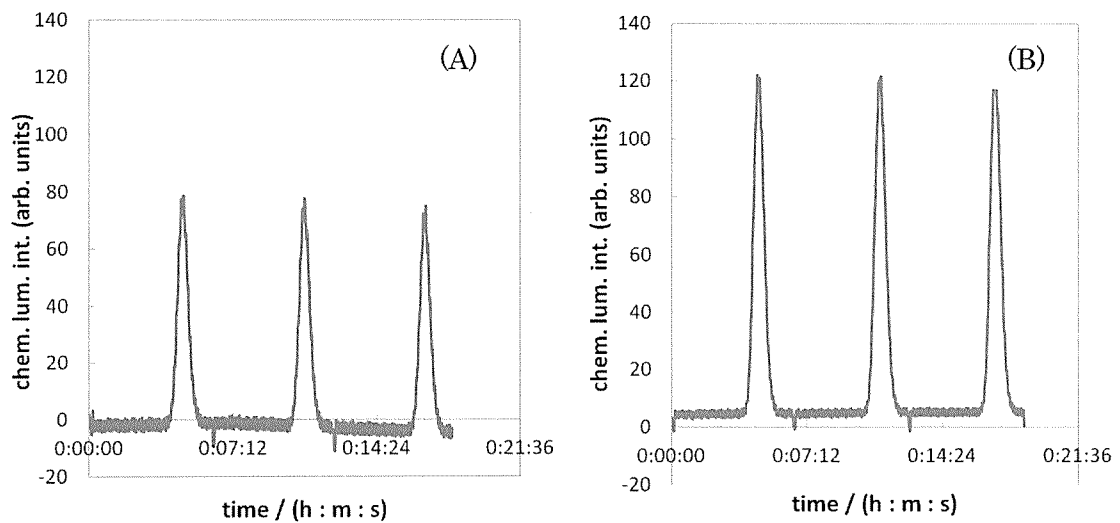


Fig. 3-11 Effect of cooling coil on CL intensity using FIA on-line system. (A), without cooling coil; (B), with cooling coil; another conditions are described in text.

### 3.3.4) 検量線

3.3.1~3.3.3)で得られた結果に基づく条件を採用して得られた検量線を Fig. 3-12 に示す. (A)は off-line 型での検量線である. 種々の濃度のサンプル原液に対してそれぞれ UV 照射を行い, 取り出した反応液を FIA の注入サンプルとした. 検出限界は  $3.2 \times 10^{-6}$  M となり,  $10 \times 10^{-5}$  M における C.V.値は 1.0%となった. (B)は on-line 型での検量線である. 検出限界は  $5.6 \times 10^{-6}$  M となり,  $10 \times 10^{-5}$  M における C.V.値は 1.7%となった.  $R^2$  値より, 直線性は on-line 型の方が望ましい結果となった. これは, glucose の酸化過程を自動化することにより, 望ましい再現性につながったといえる. しかし, C.V.値は off-line 型の方が良い値となった. これは, すでに Batch 法により酸化された反応原液を検出することで C.V.値が小さくなったと考える.

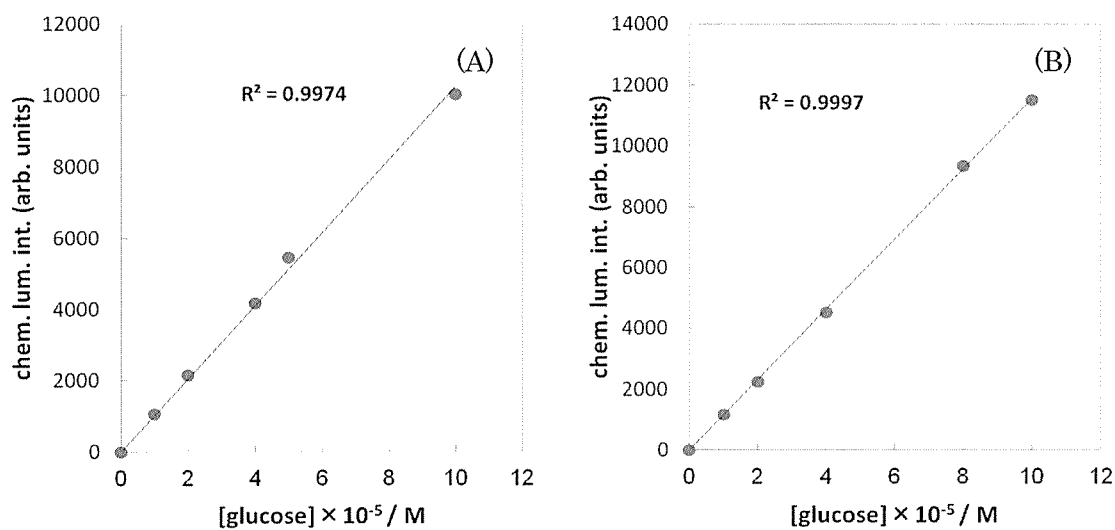


Fig. 3-12 Calibration curve for glucose using off-line system (A) and on-line system (B). The conditions are described in text.

### 3.3.5) 反応液の HPLC 検出

Glucose を酸化して得られる誘導化物質は, oxalic acid などの陰イオンが期待されたため, 陰イオン系のイオン対クロマトグラフィーを用いて HPLC 検出を行った. 得られたクロマトグラムを Fig. 3-13 に示す. (A)は反応原液を HPLC に打ち込んで得られたクロマトグラム, (B)は反応原液に oxalic acid をスパイクした後, HPLC に打ち込んで得られたクロマトグラムである. ピークが何本か得られたことから, glucose の前処理酸化過程により得られた反応原液中にはこの発光試薬と反応して発光する, 複数の発光性化学種が生成していることがわかる. これは第 2 章での glucose 検出において傾きが異なる 2 種の直線が得られたことと一致している. また, oxalic acid をスパイクした結果より, 発光強度へのシュウ酸の寄与は小さいことがわかる. 発光に大きく寄与すると考えられる 1 本目のピークについては, 物質の特定はできていない.

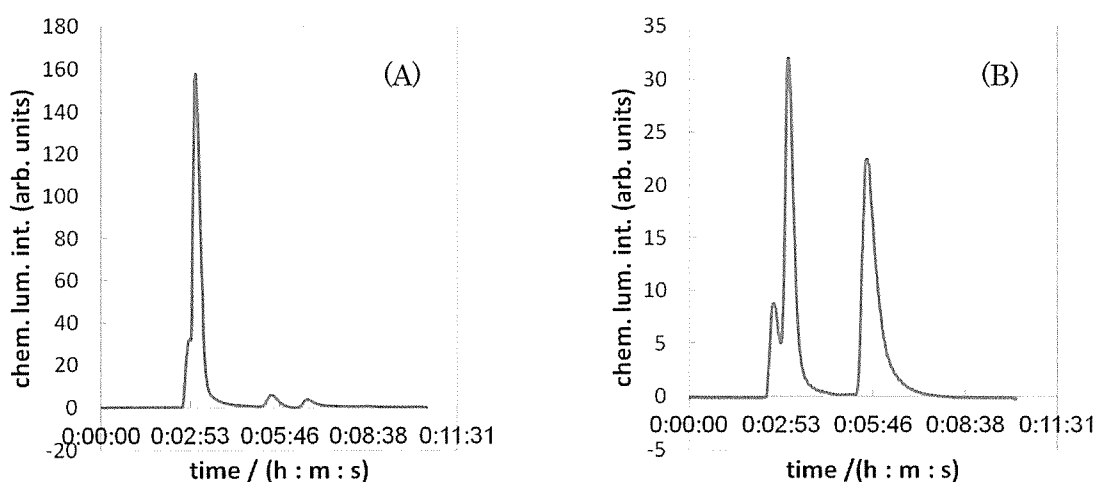


Fig. 3-13 Chromatogram of reacted solution (A) and spiked various compounds in reacted solution (B) by HPLC. The conditions are described in Fig. 3-4.

### 3.4) まとめ

FIA での glucose 検出に否定的な報告が数例あったが、今回、dil.  $\text{HNO}_3$  と自作の UV 照射装置を組み合わせ、前もって glucose に酸化処理を行うことで、FIA の検出へ適用することができた。また、キャリアに dil.  $\text{HNO}_3$  を用い、流路内に UV 照射装置を用いた酸化過程を組み込むことで、glucose の自動化検出も可能となった。Glucose の酸化に光量や照射時間などが調節可能な UV 照射を用いることで、dil.  $\text{HNO}_3$  の酸化力を促進し、酸化過程の制御ができた。Batch 型と Flow 型での検出限界を比較すると、Batch 型の方が約 1000 倍良かった。化学発光は、吸光光度法や蛍光検出法とは違い、発光反応の開始と終了がある。Flow 型では流路セルのために、発光のどの部分をとらえているかにより、感度が決定される。一方 Batch 型での検出は、溶液の流動がなく、発光の開始から終了までの総発光量で検出ができ、感度が決定される。また、発光セルに銀鏡反応を施すことで、発光を PMT に集める工夫をしており、これらが感度改善につながっている。よって、感度は Batch 型での検出の方が良いが、Flow 型での検出は酸化過程などを自動化することで、検出の再現性が向上している。

3-5) 文献

- [1] A. Townshend, *Analyst*, 115(1990)495.
- [2] J. M. Terry, S. Mohr, P. R. Fielden, N. J. Goddard, N. W. Barnett, D. C. Olson, D. K. Wolcott, *Anal. Bioanal. Chem.*, 403(2012)2353.
- [3] “*Studies of the Chemiluminescence of Luminol*”, Doctoral Thesis of J. D. Gorsuch, 1969, Mass. Inst. Tech. in USA.
- [4] 内倉和雄, *分析化学*, 39(1990)323.
- [5] D. J. Newman, in *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, Vol. 15, p. 853-871, Wiley- Intersciencen New York, 1981.
- [6] F. A. Cotton, G. Wilkinson (eds.), “*Advanced Inorganic Chemistry*” *Chap. 6*, 3rd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, 1980.
- [7] H. Kodamatani, S. Yamazaki, K. Saito, A. Amponsaa-Karikari, N. Kishikawa, N. Kuroda, T. Tomiyasu, Y. Komatsu, *J. Chromatogr., A*, 1216(2009)92.
- [8] H. Kodamatani, S. Yamazaki, K. Saito, Y. Komatsu, T. Tomiyasu, *Ana. Sci.*, 27(2011)187.
- [9] N. Kishikawa, N. Kondo, A. Amponsaa-Karikari, H. Kodamatani, K. Ohyama, K. Nakashima, S. Yamazaki, N. Kuroda, *Luminescence*, 29(2014)8.

## 第4章 glucose 関連物質への適用

### 4.1) 緒言

第1~3章では Ru 錯体-Ce(IV)混合溶液を発光試薬として用いる化学発光法を、その適用範囲を glucose に限定して Batch 法[1]と Flow 法[2]の二つの形式で検出可能であることを記述している。この化学発光検出法を、glucose 以外の、適用出来る測定対象の拡大を試みたところ、興味ある知見を得た[3]。

単糖類は大きくアルデヒド基を持つアルドース、ケト基を持つケトースおよびカルボニル基を持たない糖アルコール(ポリオール)に分類される。Glucose は生物学・生化学・医学・薬学・化学工業などの広い領域で重要な役割を果たしているアルドースであり、その測定法は多種多様に提案されてきているが[4]、複雑な構成成分中の glucose でも適用できる酵素法が主流である[5, 6]。酵素に依存しない方法は比較して少ないとはいえ高感度であることから glucose のアルデヒド基に注目して蛍光誘導化法が多数提案されてきている[7, 8]。しかし、glucose を装置に注入する以前に前処理過程で蛍光体に誘導する方法が多く、何ら前処理をしないで測定可能な直接法の報告は少ない。ケトースについても同様なことが云える。しかし、カルボニル基を持たずアルコール基のみを有する xylitol や sorbitol などの糖アルコールは、反応性がないことから誘導化が難しく、そのため検出方法が限定されているので、酵素法を除けば電極酸化による直接法による数例が知られているだけである[9, 10]。またアルコール基を持たず、エーテル基をもつ 1,4-dioxane の検出については、確認した範囲では FIA や Liquid Chromatography での報告例は無く、Gas Chromatography(GC)による報告例が多数ある。米国環境保護庁による環境中の 1,4-dioxane の指定分析法も GC を採用している[11]。そこで、第3章で述べた流路酸化システムである、dil. HNO<sub>3</sub>-UV 照射装置を組み込んだ Flow 型を用いた glucose 関連物質、糖類等の直接検出について、xylitol を中心に記述する。

### 4.2) 実験

#### 4.2.1) 試薬

試薬は全て市販の特級品を精製せずに用いた。発光試薬には 1 mM Ru(II)錯体 in 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液と 2.5 mM CAN in 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液を用いた。

#### 4.2.2) off-line 型装置

Xylitol を酸化するために用いた装置は 2.2.4) に記載した。UV 照射後の反応液の測定には FIA を用いた。FIA の条件は 3.2.2) に詳しく記載した。発光試薬の条件は 4.2.1) のとおりである。

#### 4.2.3) 前処理酸化の最適化 off-line 型

##### <HNO<sub>3</sub> 濃度効果>

サンプル液中の xylitol を酸化するための前処理条件を検討した. 0.1 mM xylitol と種々の濃度の HNO<sub>3</sub> を同体積で混合して調整した. それぞれの混合液を 2.2.4) で記載した方法で 2 分間 UV 照射をし, 取り出した反応液を off-line 型 FIA の注入サンプルとして, HNO<sub>3</sub> の濃度効果を検討した(n=6).

##### <UV 照射時間>

0.1 mM xylitol と 0.2 M HNO<sub>3</sub> を同体積で混合し, サンプル液を調整した. 2.2.4) で記載した方法で UV 照射をし, 取り出した反応液を off-line 型 FIA の注入サンプルとして, UV 照射時間の効果を調べた(n=6).

#### 4.2.4) on-line 型装置

Xylitol を直接検出するために用いた UV 照射装置を流路内に含む FIA の条件は, 3.2.5) に記載した. UV 照射時間は 2 分に設定した. 発光試薬の条件は 4.2.1) のとおりである.

#### 4.2.5) 検出系の最適化 on-line 型

##### <Ce 濃度効果>

FIA の検出における CAN 溶液の濃度効果を, on-line 型 FIA を用いて検討した. サンプル液には 0.1 mM xylitol 溶液を用いた. Ru(II)錯体溶液の濃度は 1 mM に固定し, 種々の濃度の CAN 溶液を用いて発光強度を測定した(n=6). その他の FIA の条件は 4.2.4) に記載した.

##### <Ru 濃度効果>

FIA の検出における Ru(II)錯体溶液の濃度効果を, on-line 型 FIA を用いて検討した. サンプル液には 0.1 mM xylitol 溶液を用いた. Ru(II)錯体溶液と CAN 溶液の濃度比を 1 : 2.5 に固定し, 種々の濃度で発光強度を測定した(n=6). FIA の条件は 4.2.4) に記載した.



#### 4.2.6) 検量線

種々の濃度の xylitol 溶液をサンプルとし, on-line 型 FIA で検量線を作成した(n=6). FIA の条件は 4.2.4)に記載した.

#### 4.2.7) 妨害物質

Xylitol の検出における妨害イオンの検討を行った. 0.2 mM xylitol に対して同モル数の各種物質を添加した溶液を 4.2.4)で記載した FIA のサンプルとした. 0.2 mM xylitol に対して各種物質のモル数が 10 倍量の添加についても検討した.

#### 4.2.8) 反応液の HPLC 検出

Xylitol を dil. HNO<sub>3</sub>-UV 照射システムで酸化し, 得られる誘導体化合物を調べるために, HPLC でカラム分離を行った. 用いた HPLC の条件は 3.2.8)に記載した. 1 mM xylitol と 0.2 M HNO<sub>3</sub>を同体積で混合し, 2.2.4)で記載した方法で 2.5 分 UV 照射をし, 取り出した反応液を HPLC の注入サンプルとした. インジェクターに取り付けたループ体積は 10 μL とし, 発光試薬の条件は 4.2.1)に記載した.

#### 4.3) 結果と考察

##### 4.3.1) 前処理酸化の最適化 off-line 型

##### <HNO<sub>3</sub> 濃度効果>

Fig. 4-1 に HNO<sub>3</sub> の濃度効果の結果を示す. 0 M のときにはピークを与えず, 0.2 M のときに最大発光強度が得られた.

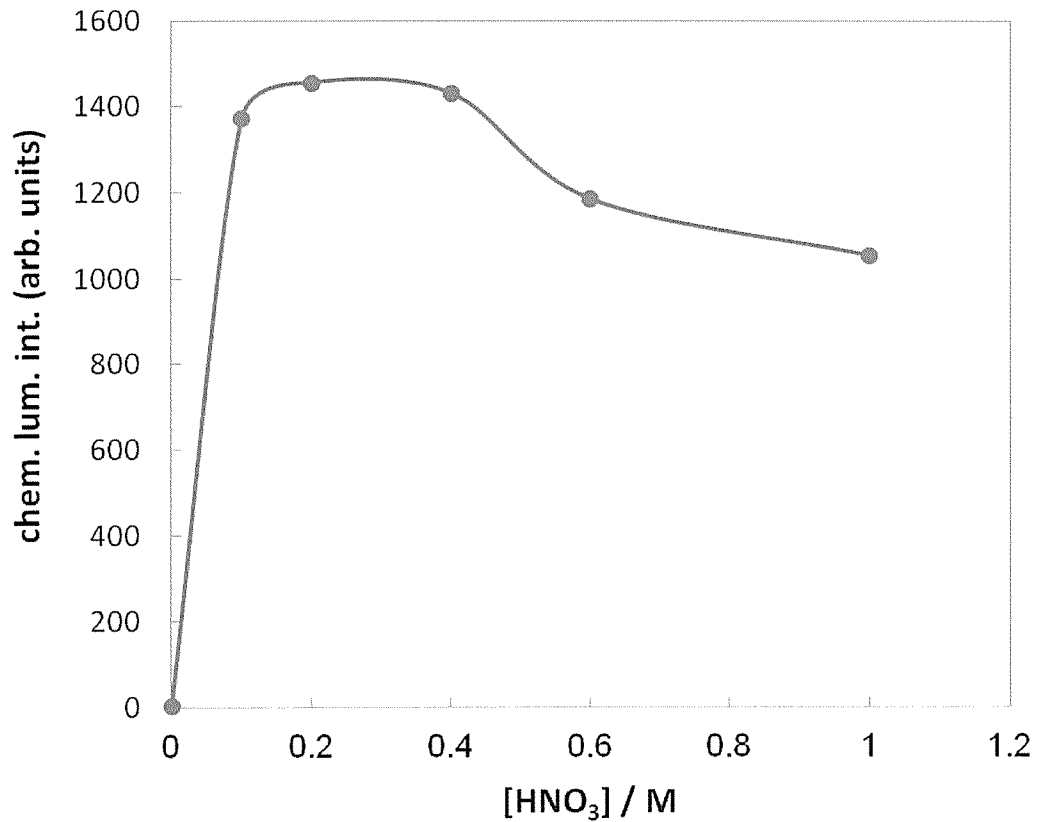


Fig. 4-1 Effect of HNO<sub>3</sub> concentration on the oxidation using the off-line system. Sample, 10<sup>-4</sup> M xylitol; oxidation reagent 0–1 M HNO<sub>3</sub>; another conditions are described in text.

<UV 照射時間>

0.2 M HNO<sub>3</sub>を用いて UV 照射時間の検討結果を Fig. 4-2 に示す. UV 照射時間が 0 分のときはピークを与えず, 2.5 分のとき最大発光強度が得られたが, UV 照射時間は 2 分を採用した. これは, 検出時間の短縮などを考慮したとき, 照射時間が 2 分でも発光強度は十分であると判断したためである.

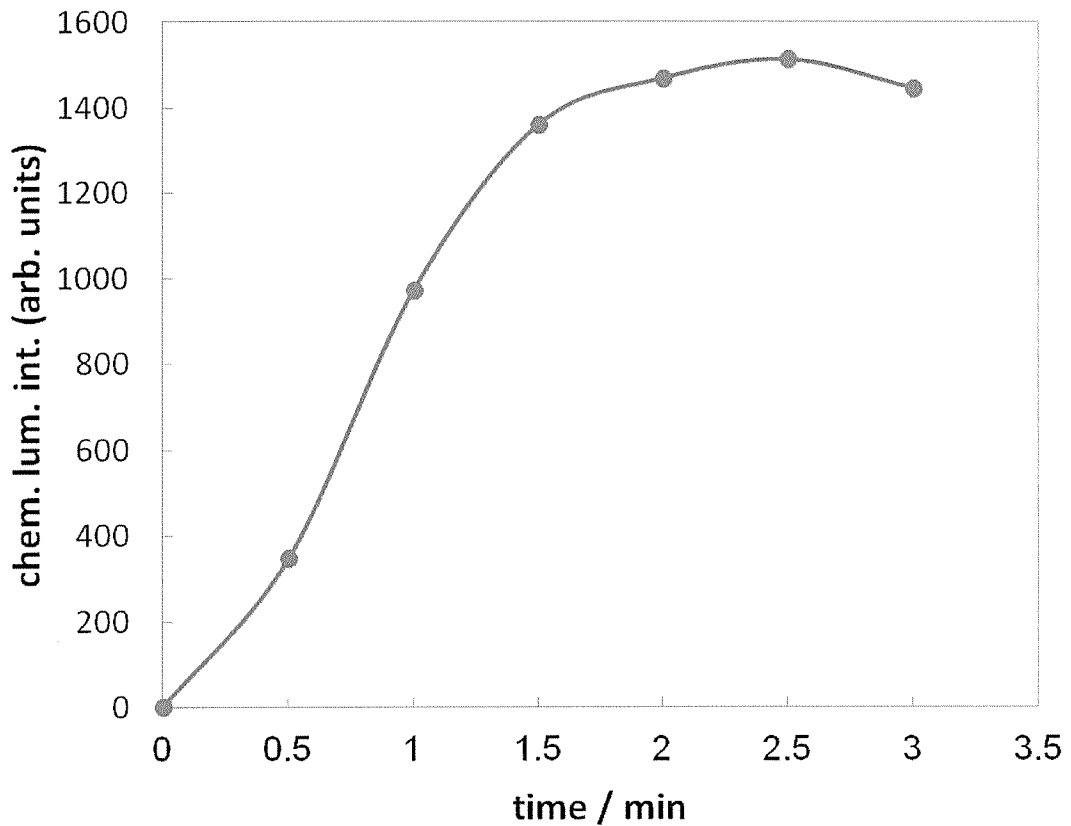


Fig. 4-2 Effect of UV irradiation time on CL intensity using the off-line system. Sample, 10<sup>-4</sup> M xylitol; oxidation reagent, 0.2 M HNO<sub>3</sub>; another conditions are described in text.

#### 4.3.2) 検出系の最適化 on-line 型

##### <Ce 濃度効果>

得られた結果を Fig. 4-3 に示す. CAN 溶液の濃度が 2.5 mM のとき, 最大の発光強度が得られた.

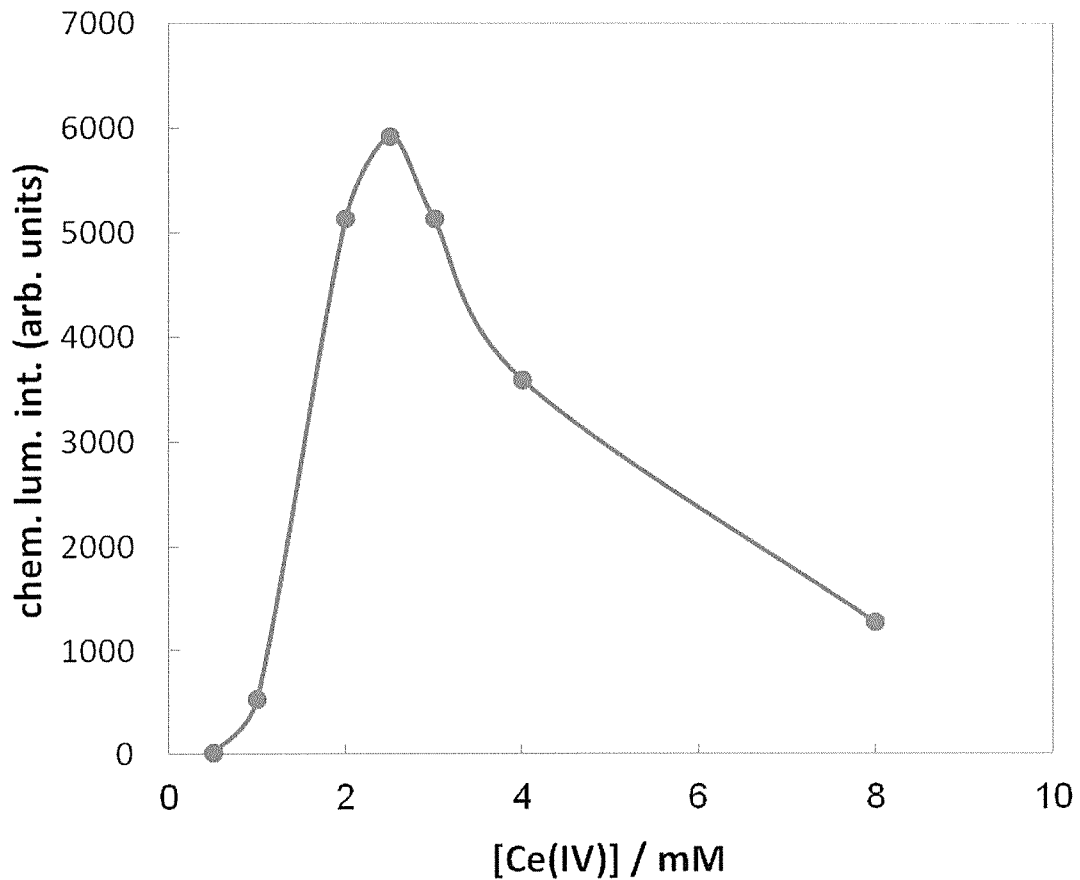


Fig. 4-3 Effect of CAN concentration in the CL reagent using FIA system. FIA conditions, as for text expect CL reagent concentration; Ce, various concentration of CAN in 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; Ru, 1 mM Ru(II) complex in 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

< Ru 濃度効果 >

Ru(II)錯体溶液と CAN 溶液の濃度比を 1 : 2.5 にし, 種々の濃度で測定して得られた Ru 濃度効果を Fig. 4-4 に示す. Ru(II)錯体溶液の濃度が 1 mM, CAN 溶液の濃度が 2.5 mM のとき, 最大の発光強度が得られたので, これらの値を FIA における発光試薬の条件に採用した.

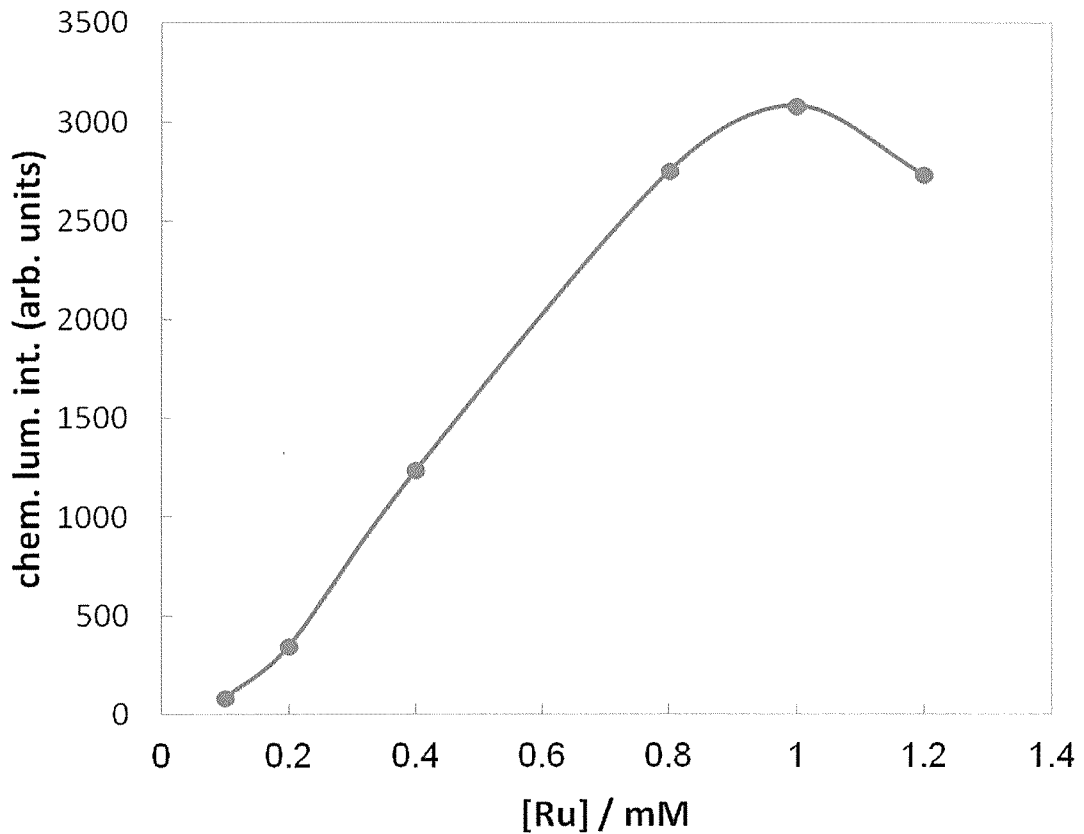


Fig. 4-4 Effect of Ru(II) complex concentration in the CL reagent using FIA system. FIA conditions, as for text expect CL reagent concentration; various concentration of CL reagent at  $[\text{CAN}] / [\text{Ru(II) complex}] = 2.5$ .

### 4.3.3) 検量線

on-line 型 FIA で作成した検量線を Fig. 4-5 に示す. 良好な直線性が得られ, 検出限界は  $4.3 \times 10^{-6}$  M となった.

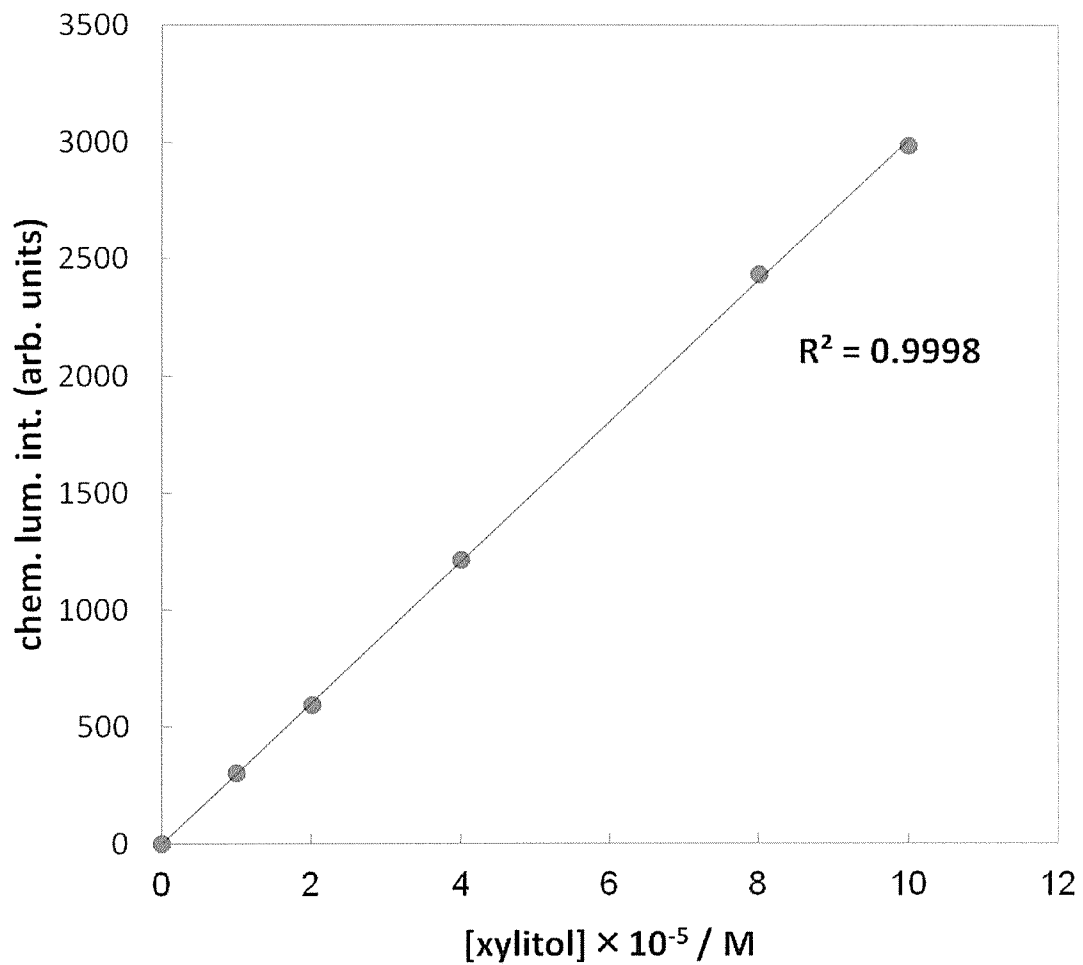


Fig. 4-5 Calibration curve for xylitol using on-line system.  
The conditions are described in text.

#### 4.3.4) 妨害物質

0.1 mM xylitol の発光強度を 100 としたとき、種々の溶液を添加して得られた発光強度の割合を Tab. 4-1 に示す。この結果では、xylitol の検出を妨害する物質がわかると同時に、この検出系において検出可能な物質もわかる。無機系のイオンであればほとんどの物質が xylitol の検出に妨害をしないが、塩化物イオンは共存すると、発光強度の減少が見られた。また、有機系物質は xylitol の検出において、妨害物質であることがわかる。

Tab. 4-1 Recovery of xylitol ( $10^{-4}$  M) from various additives.

Additive	Concentration ratio (additives to xylitol)	Recovery (%)(n = 6)
glucose	1	242.9
fructose	1	248.4
ethanol	1	95.0
	10	167.4
acetic acid	1	95.6
	10	162.5
acetone	1	112.7
	10	295.5
triethylamine	1	107.0
	10	229.1
1,4-dioxane	1	113.8
	10	299.7
NaCl	1	87.0
	10	71.2
MgSO <sub>4</sub>	1	102.3
	10	96.7
CaCl <sub>2</sub>	1	88.0
	10	53.5
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	90.8
	10	98.0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	98.5
	10	99.9

#### 4.3.5) 反応液の HPLC 検出

Glucose と同様に、陰イオン系のイオン対クロマトグラフィーを用いて、酸化処理をした xylitol の反応原液を HPLC に打ち込んだ。得られたクロマトグラムを Fig. 4-6 に示す。(A)は反応原液を HPLC に打ち込んで得られたクロマトグラム、(B)は反応原液に oxalic acid と pyruvic acid をスパイクして得られたクロマトグラムである。3.3.5) に記載したように、xylitol の検出においても複数の要因で発光していることがわかる。また、スパイクした結果も glucose と同様に、期待されていた oxalic acid や pyruvic acid の発光への寄与は小さく、大部分に関しては特定できていない。

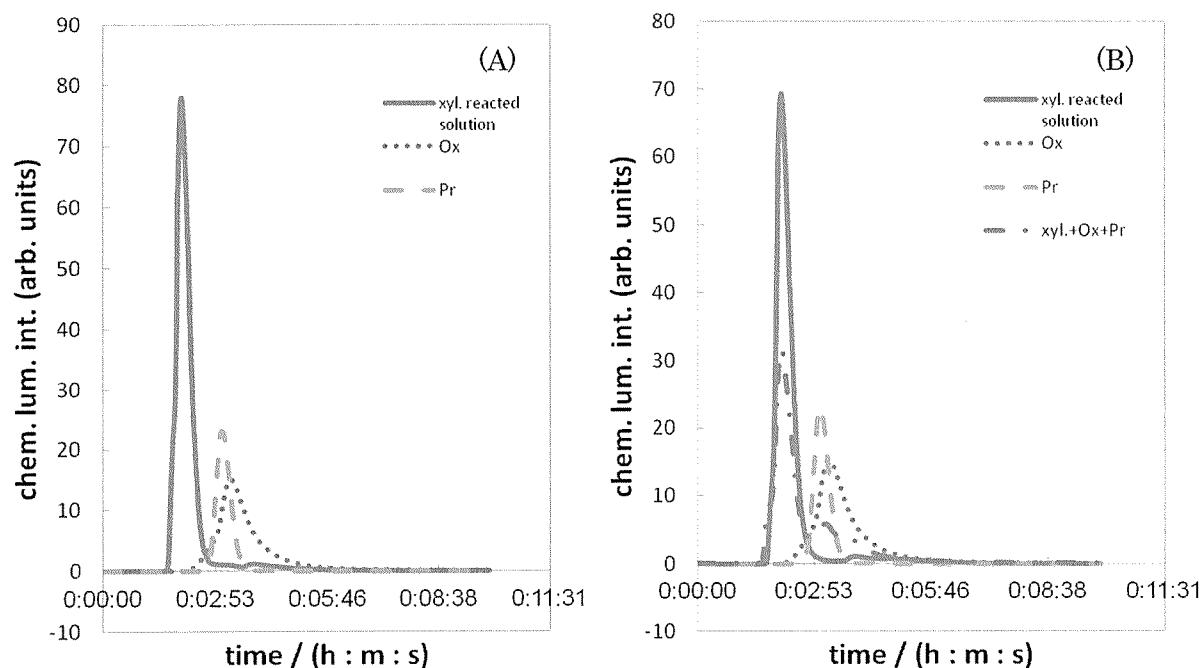


Fig. 4-6 Chromatogram of reacted solution (A) and spiked various compounds in reacted solution (B) by HPLC. xyl., xylitol; Ox, oxalic acid; Pr, pyruvic acid; the conditions are described in text.



#### 4.4) まとめ

本来、カルボニル基など反応性のある官能基をもたない化合物は、反応性がないために誘導化が難しく、検出法も限られる。しかし、今回の dil. HNO<sub>3</sub>-UV 照射での酸化システムを用いることで、アルコール基のみの **xylitol** の直接検出が可能となった。妨害物質の検討結果より、種々の水溶性有機化合物の検出への適用が示唆された。最適化は行っていないが、これについては付録部に検討した化合物のピークプロファイルのみであるが、載せている。

#### 4.5) 文献

- [1] M. Nagai, W. Miyahara, H. Sagawa, S. Yamazaki, K. Saito, *Anal. Sci.*, 29(2013)21.
- [2] 永井めぐみ, 山崎重雄, 佐川保奈美, 齊藤惠逸, *日本分析化学会第61年会講演要旨集*, 2012, p. 365.
- [3] 永井めぐみ, 山崎重雄, 齊藤惠逸, *第73回日本分析化学討論会講演要旨集*, 2013, p. 177.
- [4] C. D. Geddes, J. R. Lakowicz (eds.), *"Glucose Sensing"*, Springer, New York, USA, 2006.
- [5] J. Emneus, G. Marko-Varga, *J. Chromatogr. A*, 703(1995)191. (review)
- [6] G. M. Widdowson, J. R. Penton, *Clin. Chem.*, 18(1972)299.
- [7] S. Hase, S. Hara, Y. Matushima, *J. Biochem.*, 85(1979)217.
- [8] W. Wu, K. Hamase, M. Kiguchi, K. Yamamoto, K. Zaito, *Anal. Sci.*, 16(2000)919.
- [9] H. Karatani, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 79(1994)71.
- [10] W. R. LaCourse, D. C. Johnson, M. A. Rey, R. W. Slingsby, *Anal. Chem.*, 63(1991)134.
- [11] Method 522: Determination of 1,4-dioxane in drinking water by solid phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry with selected ion monitoring; Environmental Protection Agency.

## 総括

Ru(II)錯体-CAN 混合溶液を用いた glucose の化学発光検出が Batch 型と Flow(on-line)型のいずれでも可能であった。本論文で報告した系は、カルボニル基とアルコール基を同一分子内に持つ化合物である glucose や glucose を構成単位とする二糖類の検出に適用可能ばかりでなく、カルボニル基を持たず、アルコール基だけを持つポリオール化合物である xylitol や sorbitol の検出にも適用可能であった。さらに、カルボニル基・アルコール基の両者を持たないエーテル化合物である 1,4-dioxane と ethylene glycol の化学発光検出が十分可能であることが確認できた。これら多種多様の水溶性有機化合物への適用可能であることは、適用範囲が広いといえるが、同時にこのことは Flow 型(FIA)の検出系に用いた際は共存する有機化合物からの妨害を受けやすく、定量目的の成分の選択検出が難しいことを意味している。しかし、off-line で前もって試料中の目的成分だけを単離・精製した後に、FIA の注入サンプルとすれば、共存物質による妨害は回避できるし、また開発されたこの on-line 反応系を分離カラム後に接続するポストカラム検出反応系に適用することは可能である。本論文で用いた装置はいずれも、研究室内で市販装置の改造を行い、組み立てて用いた。さらに、用いた試薬はいずれも市販されている化合物を購入して利用しており、また溶媒は全て水系であることから定量法としては十分に実用性が高い分析系であるといえる。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、御指導、御鞭撻いただきました岡山理科大学 山崎 重雄教授に心より感謝いたします。また、本研究に対し貴重な御助言をいただき、審査を引き受けて下さいました神戸大学 齊藤 惠逸教授、岡山理科大学 林 宏哉教授、尾堂 順一教授、横山 崇教授に深く感謝いたします。さらに、本研究を進めるにあたり、御助言いただきました鹿児島大学 児玉谷 仁博士と、御支援いただきました岡山理科大学理学部基礎理学科 所属研究室の皆様に厚く御礼申し上げます。

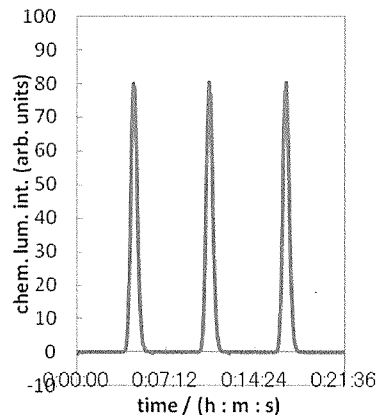
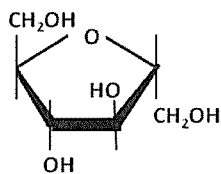
## 付録

第4章の「まとめ」で述べたが、この論文で述べた dil. HNO<sub>3</sub>-UV 照射での酸化システムを用いた xylitol の直接検出法の開発を研究中に妨害物質を検討したところ、種々の水溶性有機化合物の検出への適用が示唆された。さらに検討したところ 1) glucose 以外のアルドース, 2) glucose を構成成分にもつ二糖類, 3) アルコール基のみをもつ sorbitol や ethylene glycol, 4) アルコール基をもたずエーテル基だけをもつ 1,4-dioxane や polyethylene glycol (高分子であり, 両端にアルコール基をもつが, 大部分はエーテル基である) 等々の検出にも適用出来る可能性が出てきたが, 最適化の検討がされていないので付録部を設け, ここにのみ記載する。いずれも FIA(on-line 型)での検出結果である。

### 1) glucose 以外のアルドース

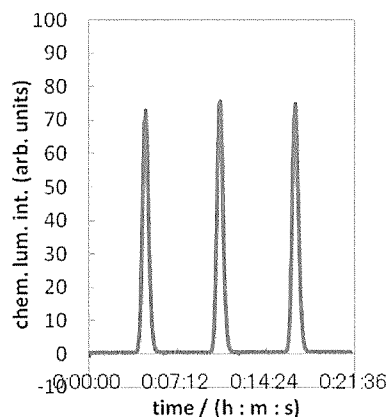
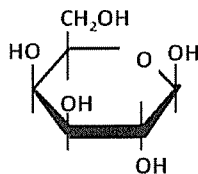
発光試薬; 1 mM Ru(II)錯体, 10 mM CAN

**1 mM fructose**  
UV irr. time; 2 min



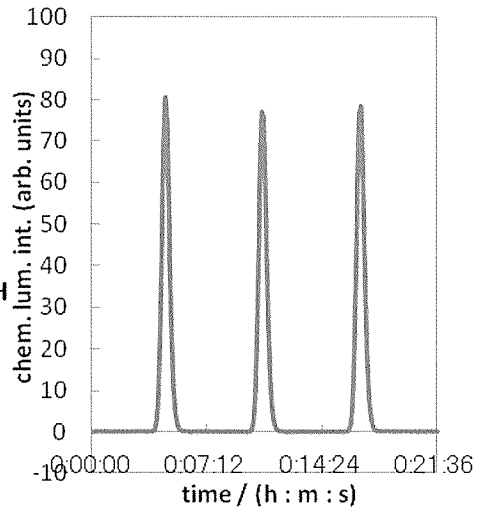
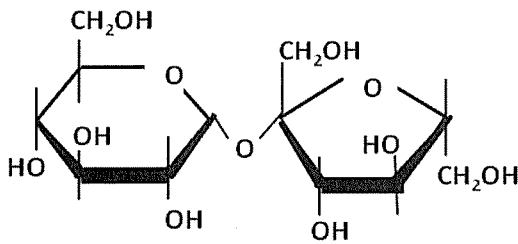
※ケトースではあるが、逆アルドール反応によりアルデヒドを生成する。

**1 mM galactose**  
UV irr. time; 2 min

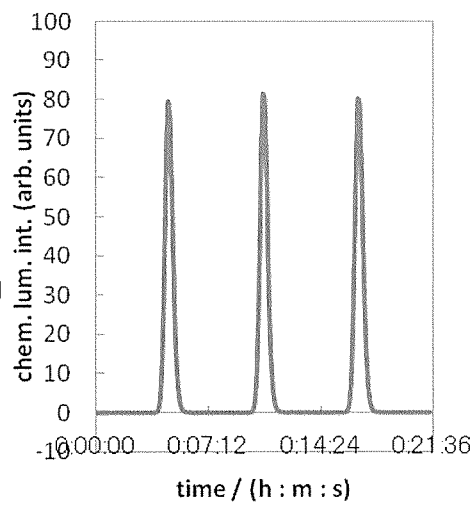
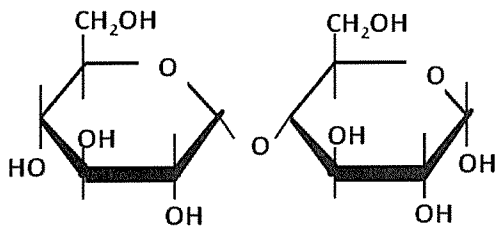


2) glucose を構成成分にもつ二糖類  
発光試薬; 1 mM Ru(II)錯体, 10 mM CAN

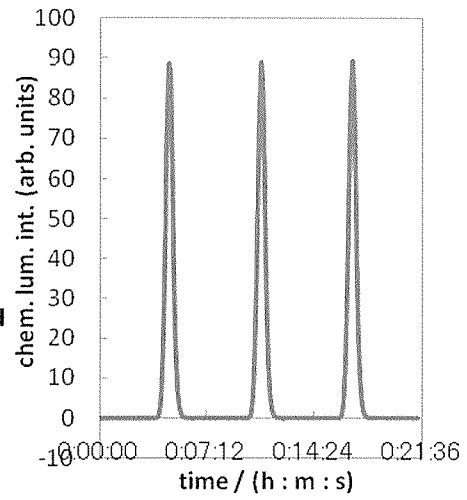
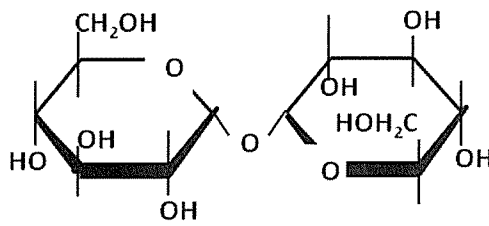
**1 mM sucrose**  
**UV irr. time; 2 min**



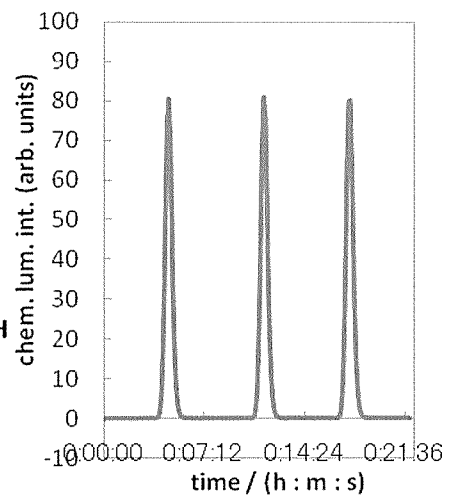
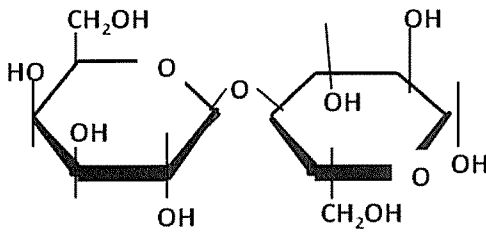
**1 mM maltose**  
**UV irr. time; 2 min**



**1 mM trehalose**  
**UV irr. time; 2 min**

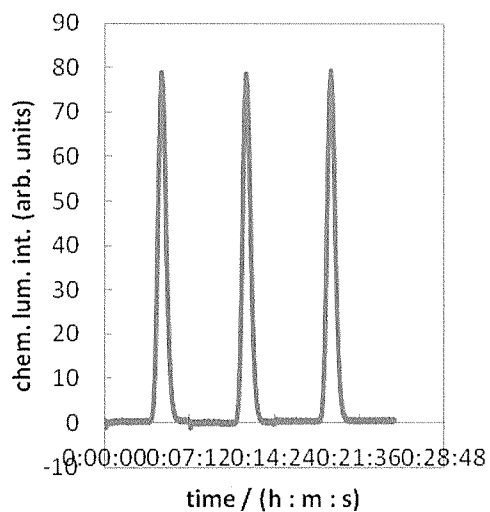
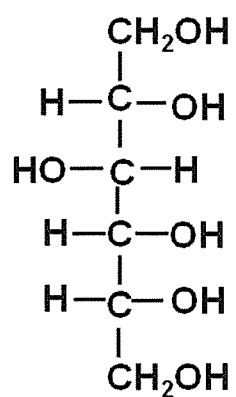


**1 mM lactose**  
**UV irr. time; 2 min**

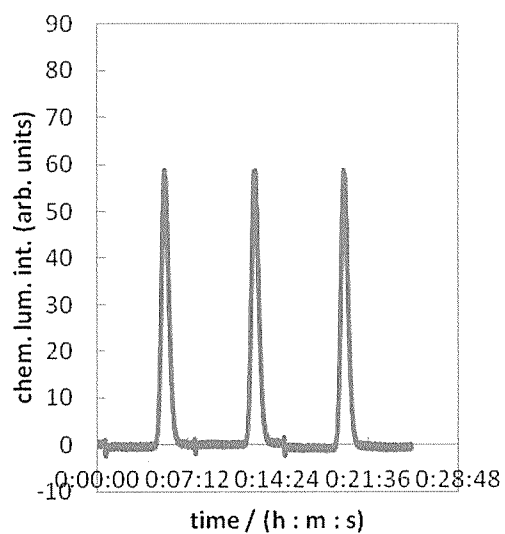
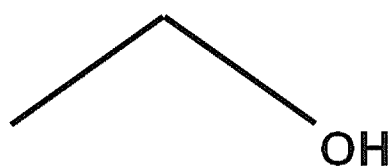


3) アルコール基のみをもつ化合物  
発光試薬; 1 mM Ru(II)錯体, 2.5 mM CAN

**0.1 mM sorbitol**  
UV irr. time; 2 min

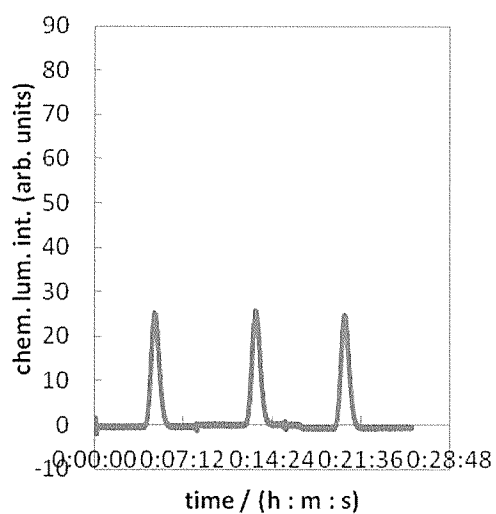
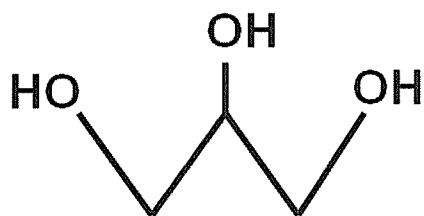


**21.7 mM ethanol**  
UV irr. time; 2 min

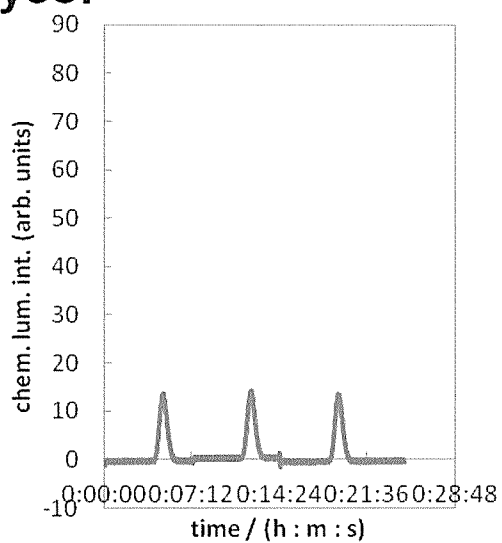
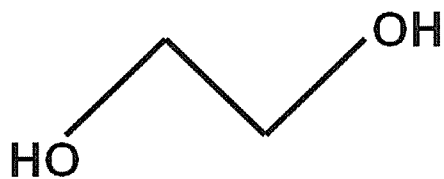




**0.1 mM glycerol**  
**UV irr. time; 2 min**



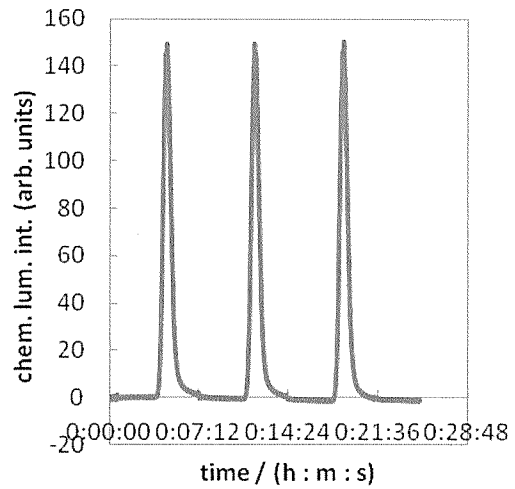
**0.1 mM ethylene glycol**  
**UV irr. time; 2 min**



- 4) アルコール基をもたずエーテル基だけをもつ化合物  
発光試薬; 1 mM Ru(II)錯体, 2.5 mM CAN

### 250ppm poly(ethylene glycol)

UV irr. time; 3 min



### 100ppm 1,4-dioxane

UV irr. time; 2 min

