ウレアーゼによる尿素の加水分解を利用する均一溶液からのコバルト-8-ヒドロキシキナルデートの沈殿

多賀 光彦, 吉田 仁志, 墓目 清一郎*

尿素をウレアーゼにより加水分解し溶液の pH を上昇させ、均一溶液からのコバルト-8-ヒドロキシキナルデートの沈殿生成に利用した。コバルトを含む溶液にクエン酸と尿素を加え、アンモニア水で pH を 5.3 に調節する。この溶液に 8-ヒドロキシキナルジン溶液、ウレアーゼ溶液を加え 35°C で一定時間反応させる。生成した沈殿を濾過、乾燥後ひょう量する。本法によれば通常法に比べて、結晶性の濾過しやすい大きな沈殿が生成する。10~40 mg のコバルトを定量できる。アルミニウム、カルシウム、マグネシウムなどの陽イオン、硫酸イオン、塩素イオン、硝酸イオンなどは妨害とならない。

1 緒 言

均一溶液からの沈殿生成法において、溶液の pH を上昇させるために、尿素を加熱分解する方法がよく用いられている。

著者らはこのような尿素の加水分解のための新しい試みとして、さきにウレアーゼによる尿素の分解法について検討し、ニッケルジメチルグリオキシメートの沈殿生成に利用しうることを報告した²⁾³⁾。このような酵素反応を利用する方法には、その適用に際し二、三の制限はあるが、(1) きわめてゆっくりと反応を行なわせることができること、(2) 反応時間に厳密さを要しないこと、(3) 高温の加熱を必要としないことなどの利点を有し、良好な沈殿が得られる。

本報ではこのウレアーゼの利用例として、コバルトを 8-ヒドロキシキナルデートとして均一溶液から沈殿させる方法について検討し、良好な結果が得られたので報告する。

2 試薬および装置

2.1 試 薬

コバルト標準溶液：金属コバルト（三津和化学製高純度 99.99%）10.00 g を塩酸に溶解し、Co 10.00 g/l の 0.5N 塩酸溶液をつくり原液とした。使用にあたっては原液を水で 5 倍にうすめて用いた。

1% 8-ヒドロキシキナルジン：エタノール溶液、使用時調製。

0.01% ウレアーゼ溶液：(Sigma Chemical Co. 製) 使用時調製。

その他：20% クエン酸溶液、20% 尿素溶液、アンモ

ニア水、エタノールなどいずれも特級試薬を使用。

2.2 装 置

pH の調節には東亜電波工業(株)製 HM5A 型 pH メーターを使用した。

恒温水そうには大洋科学工業製サーモユニット 550 型を使用した。

重量の測定にはメトラー直示天びん H16 型を使用した。

3 操 作 法

250 ml の広口試薬びんにコバルト 20.00 mg を含むように標準溶液をとり、20% クエン酸溶液 5 ml、20% 尿素溶液 50 ml を加え、全容を約 200 ml にしたのち、アンモニア水で溶液の pH を 5.3 に調節する。溶液をよくかき混ぜながら 1% 8-ヒドロキシキナルジン溶液 15 ml、ついで 0.01% ウレアーゼ溶液 20 ml を加え、液量を約 250 ml とする。かるくせんをして 35°C の恒温水そう中に 1 夜放置する。生成した沈殿をガラス濾過器 (1G4) を用いて吸引濾過、洗浄し、130°C で恒量を得るまで乾燥し、ひょう量する。

4 定量条件の検討

コバルト-8-ヒドロキシキナルデートの沈殿生成は、クエン酸量、尿素量、ウレアーゼ量、反応温度などによって支配される。これらについて種々検討した結果、前記 3 の操作法に示した条件が最適であることを認めた。これらの条件はニッケルジメチルグリオキシメートにおける場合²⁾³⁾とほぼ同様である（結果省略）。また乾燥温度については 130°C、2 時間で恒量値が得られた。

* 北海道大学理学部化学教室：札幌市北10条西8丁目

上記の諸条件のほか初期 pH, 8-ヒドロキシキナルジン量などによってもコバルト-8-ヒドロキシキナルデートの沈殿生成は影響を受ける。これらについての検討結果を次に述べる。

4.1 初期 pH

コバルト-8-ヒドロキシキナルデートは pH が 3.8 から沈殿の生成が起り, 5.2 で定量的に沈殿すると報告されている⁴⁾。しかし, 著者らが行なったクエン酸を共存させた実験条件下では pH が 6.0 においてもコバルトはただちに沈殿を生ずることはなかった。そこで, 初期 pH の影響をさらに詳しく知るため, 3 に示した操作法において初期 pH を種々変えて定量的沈殿生成のための最適 pH 値の検討を行なった。その結果を Table I に示す。

Table I Effect of initial pH

Co taken	Initial pH	Final pH	Co found
20.00 mg	4.0	4.5	14.02 mg
20.00	4.3	7.4	15.50
20.00	4.5	7.9	19.30
20.00	4.7	8.1	19.68
20.00	5.0	8.5	19.97
20.00	5.3	8.5	19.99
20.00	5.5	8.6	20.03
20.00	6.3	8.6	20.01
20.00	7.1	8.6	20.10
20.00	8.5	8.7	20.26

Table I からわかるように初期 pH が 4.5 以下では完全沈殿が得られない。これは初期 pH が 4.5 以下のときは, 15時間反応させたのちでも溶液の pH が 7.9 以下にとどまったことからわかるように, ウレアーゼの活性が pH 4.5 以下では妨げられて完全沈殿に必要な pH 値まで上昇しないためであると考えられる。また初期 pH を 7.0 以上とした場合は, 試料溶液に 8-ヒドロキシキナルジン溶液を添加するとただちに, あるいは数分後に沈殿の生成が始まり, その沈殿の形態も通常法で得られる沈殿に近いものであった。

初期 pH を 5.0~5.5 の範囲に調節すると, その後の pH 上昇がきわめてゆるやかに行なわれ, 15 時間程度反応させたのちには溶液の pH は 8.4~8.7 となり, 汙過しやすい結晶性の沈殿が定量的に得られた。

4.2 8-ヒドロキシキナルジン量

コバルト-8-ヒドロキシキナルデートにおけるコバルトと 8-ヒドロキシキナルジンのモル比は 1:2 である。

本法において 8-ヒドロキシキナルジンの添加量を当量の 100~200% の間で種々変化させて定量値に対する影響を調べた。その結果を Table II に示す。この結果からもわかるように, 存在するコバルトを定量的に沈殿させるために必要な 8-ヒドロキシキナルジン量は当量の 10% 程度過剰に存在すればじゅうぶんであることがわかる。なお試薬を大過剰に添加した場合には得られた沈殿の形状がよくなかった。

Table II Effect of amounts of 8-hydroxyquinoline

Co taken (mg)	Initial pH	8-Hydroxy-quinoline		Final pH	Co found (mg)
		(mg)	(%)†		
20.00	5.3	130	102	8.6	19.92
20.00	5.3	150	117	8.5	19.99
20.00	5.3	170	133	8.4	19.87
20.00	5.3	180	141	8.5	20.17
20.00	5.3	200	156	8.4	20.01
20.00	5.3	230	180	8.3	19.86
20.00	5.3	256	200	8.4	19.97
20.00	5.3	260	203	8.4	19.93

† Mol ratio of 8-hydroxyquinoline to cobalt

4.3 エタノール量

8-ヒドロキシキナルジンの溶媒として, アルコールや酢酸が用いられているが, 溶解性, 初期 pH の規制の容易さ, 緩衝作用の点などを考慮してエタノールを選んだ。この溶媒としてのエタノールの量が, コバルト-8-ヒドロキシキナルデートの沈殿量にどのような影響を与えるかについて検討した。結果を Table III に示す。

アルコール量が増加するにしたがい, 生成する沈殿の性状は通常法におけるような微細な沈殿から, 結晶性で汙過しやすい大きな沈殿へと変わる。しかし, その反面定量値はエタノール量の増加にともなって減少する傾向がみられた。これはエタノールに対するコバルト-8-ヒドロキシキナルデートの溶解度に依存するためと推定される。本法では溶液の全量 250 ml に対しエタノール量が 15 ml になるように規制した。

Table III Effect of ethanol

Co taken (mg)	Initial pH	8-Hydroxy-quinoline (mg)	C ₂ H ₅ OH (ml)	Final pH	Co found (mg)
20.00	5.3	150	5	8.6	20.03
20.00	5.3	150	10	8.5	20.03
20.00	5.3	150	15	8.5	19.99
20.00	5.3	150	20	8.4	19.97
20.00	5.3	150	25	8.5	19.87
20.00	5.3	150	30	8.4	19.69

5 濾液に残留するコバルト量

これまでに示した結果からわかるように、本法によればコバルトはコバルト-8-ヒドロキシキナルデートとして定量的に沈殿しているとみなしうる。これをさらに確かめるために沈殿を濾別した濾液中のコバルトの定量を試みた。すなわち、濾液中のコバルトをジチゾンにより抽出後、硫酸と硝酸で分解し、ニトロソR塩による吸光度法⁵⁾によって定量した。

Table IV から明らかなように、本法では濾液中に残るコバルトは重量分析の定量誤差内にある。

Table IV Determination of cobalt in filtrate

Co taken (mg)	Co found as ppt (mg)	Co in filtrate (mg)	Remarks
20.00	20.07	0.029	
20.00	20.09	0.024	
20.00	20.07	0.009	
20.00	20.07	0.013	
20.00	20.24	0.004	Co-existing 1 g of NO ₃ ⁻
20.00	20.25	0.004	Co-existing 1 g of Cl ⁻

6 共存イオンの影響

共存イオンの影響を検討した結果を Table V に示す。一般にウレアーゼの活性を阻害するイオン、あるいはコバルトと同じように 8-ヒドロキシキナルジンと錯塩をつくり沈殿するイオンの共存は許されない。Table V に示したように、アルミニウム(III)、カルシウム(II)、

Table V Effect of diverse ions

Co taken (mg)	Diverse ions added (mg)	Final pH	Co found (mg)
20.00	Al	10	8.5
20.00	Ca	5	8.6
20.00	Mg	5	8.5
20.00	Mn(II)	5	8.7
20.00	Fe(III)	5	8.4
20.00	Ni	5	8.6
20.00	Cu(II)	1	8.6
20.00	Cd	1	8.7
20.00	Zn	5	8.5
20.00	Pb	5	8.7
20.00	Bi	1	8.7
20.00	Tl(III)	1	6.2
20.00	Ag	1	5.6
20.00	Hg(II)	1	5.6
20.00	Pd(IV)	1	5.6
20.00	EDTA	500	8.5
20.00	SO ₄ ²⁻	1000	8.4
20.00	NO ₃ ⁻	1000	8.8
20.00	Cl ⁻	1000	8.4

† No precipitate was found.

マグネシウム(II)などのイオンは本法の妨害とならない。しかし、マンガン(II)、鉄(III)、ニッケル(II)、銅(II)、カドミウム(II)、亜鉛(II)、鉛(II)の各イオンは正の誤差を与える。これは 8-ヒドロキシキナルジンと反応し沈殿を生成するためと推定される。また、タリウム(III)、銀(I)、水銀(II)、パラジウム(IV)の各イオンが共存するとウレアーゼの酵素作用が阻害されるので溶液の pH は上昇しない。したがって沈殿の生成は認められない。EDTA が共存する際には溶液の pH は上昇するがコバルト-8-ヒドロキシキナルデートの沈殿はまったく生成しない。これは EDTA がコバルトと強固なキレートをつくるためと考えられる。陰イオンについては硫酸イオン、硝酸イオン、塩素イオンについて検討したが多量共存しても本法の妨害とならないことがわかった。

7 定量範囲

本法におけるコバルトの定量範囲を調べた結果は Table VI に示すとおりである。コバルトの存在量が小さいと誤差はいくぶん大きくなるが、10~40 mg では 0.4% 以下の誤差で定量しうることがわかった。

Table VI Determination of cobalt

Co		Recovery (%)
Added (mg)	Found (mg)	
2.00	2.07	103.5
4.00	4.04	101.0
10.00	10.02	100.2
20.00	20.01	100.1
40.00	39.85	99.6

ウレアーゼによる尿素の加水分解を利用して溶液の pH を上昇させ、コバルト-8-ヒドロキシキナルデートを均一溶液から沈殿させる方法について検討した。この結果クエン酸を共存させ、初期 pH を 5.3 に調節すると試薬添加当初には沈殿の生成はなく、その後尿素の加水分解が進行するとともに徐々に pH が上昇し、約 15 時間で 10~40 mg のコバルトが定量的に沈殿することを認めた。

なお、コバルトのほかにマンガン、鉄、銅、カドミウム、亜鉛、鉛などについても本法を多少改良することによって同様な操作で、均一溶液からの沈殿生成が可能であると考えられる。

終わりに、本研究費の一部は文部省科学研究費によった。付記して謝意を表する。

(昭和 42 年 4 月, 日本化学会)
(第 20 年会において一部講演)

文 献

- 1) 日本分析化学会編：“新分析化学講座”，5巻，p. 230 (1959)，(共立出版)。
- 2) 多賀光彦，吉田仁志，藝目清一郎：本誌，15，698 (1966)。
- 3) S. Hikime, H. Yoshida, M. Taga : *Talanta*, 14, 1417 (1967)。
- 4) 日本分析化学会編：“新分析化学講座”，6巻，p. 63 (1959)，(共立出版)。
- 5) 日本分析化学会編：“新分析化学講座”，3巻，p. 88 (1960)，(共立出版)。

☆

Application of urease for the precipitation of cobalt-8-hydroxyquinaldate by urea from homogeneous solution. Mitsuhiko TAGA, Hitoshi YOSHIDA

and Seiichiro HIKIME (Faculty of Science, Hokkaido University, Sapporo-shi)

Urease can be used to decompose urea for the precipitation of cobalt-8-hydroxyquinaldate from a homogeneous solution.

Citric acid and urea solutions were added together to a solution containing cobalt ion and pH of the solution was adjusted to 5.3. After adding 8-hydroxyquinaldine and urease solutions, the solution was kept overnight at 35°C. By the present procedure, 10 to 40 mg of cobalt could be precipitated quantitatively as dense crystal.

The effect of diverse ions on the determination of cobalt was also examined. Although cations such as Tl(III), Ag(I), Hg(II) interfered with the formation of precipitate, Al(III), Ca(II), Mg(II), sulfate, chloride, and nitrate ions did not interfere.

(Received Mar. 29, 1968)

く形波ポーラログラフィーを適用したアノーディック・ストリッピング・ボルタンメトリーによる極微量鉛の定量

水 池 敦 ， 三 輪 智 夫 ， 沖 修 一 郎 *

く形波ポーラログラフ法を水銀メッキ白金電極を用いるアノーディック・ストリッピング法に適用し，極微量鉛の定量に応用した。

0.1M 塩化カリウム-0.01M 塩酸溶液 (20 ml) 中の鉛を電極 (0.7 mmφ×2.2 mm) 上に -1.0V (vs. S. C. E.) で 30 または 15 分間電解析出させた。次にく形波ポーラログラフによりく形波電圧 10 mV，走査速度 0.2 V/min で溶出曲線を記録した。溶出波高-鉛濃度曲線は再現性があり，0.1~1 μg/20 ml (15 分間前電解) および 0.01~0.1 μg/20 ml (30 分間前電解) の範囲内で直線であった。

本法により高純度アルミニウム 0.1~0.2 g 中の 0.1~5 ppm の鉛が 20% 以下の誤差で定量できた。定量所要時間は約 100 分間であった。

1 緒 言

最近，アノーディック・ストリッピング法は極微量成分分析に比較的多く利用されるようになってきている。これらの大部分は溶出過程に連続電位変化法を適用したもので，これについては著者らもすでに報告¹⁾²⁾した。しかし，ストリッピング法にく形波ポーラログラフ法を組み合わせた研究は，わずかに二，三あるにすぎない。Barker³⁾は塩化カリウム溶液中の 10⁻⁹M あるいはそれ以下の銅，鉛およびカドミウムなどを検出した。Sturm⁴⁾らはビスマス，銅 (II) など 11 元素の基礎的検討をし，

その後ヒ素中の銅 (II)，タリウム (I)，鉛，カドミウムおよび亜鉛のそれぞれ 0.1~0.6 ppm 程度を定量した⁵⁾。山崎⁶⁾は鉛およびカドミウムの基礎的検討をした。これらはいずれもつり下げ水銀滴電極を用いている。著者らは水銀メッキ白金電極を用い，本法の基礎的検討と，その高純度金属分析への応用の可能性につき研究した。その結果，本法が鉛の定量にきわめて有効であることを認めた。さらに高純度アルミニウムの分析に応用し，0.1 g (または 0.2 g) 試料中の 0.01~0.5 μg の鉛をアルミニウムから分離せずに簡単迅速 (定量所要時間約 100 分間) に 20% 以下の誤差で定量することができたので，これらにつき報告する。

* 名古屋大学工学部：名古屋市千種区不老町