水-*N,N*-ジメチルホルムアミド混合溶液中でのシステインの 接触酸化反応を利用する銅(II) の吸光光度定量

(1991 年 9 月 20 日 受理)

片 山 淳・伊 藤 一 男・古 川 幹 夫・上 館 民 夫*・渡 辺 寛 人

銅(II) の新規な接触分析法を開発するため、水と *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF)、ジメチルスルホキシドおよびアセトニトリルの各非水溶媒との混合溶液中で、銅(II)触媒によるシステアミン、*L*-システイン、2-メルカプトエタノールおよび 2-メルカプトプロピオン酸の接触酸化反応を検討した。その結果、反応溶液として 60% DMF 水溶液、また、チオールには *L*-システインを用いた場合、銅(II) を最も高感度に定量でき、また、検量線の直線範囲も広がることが明らかになった。銅(II) の定量は、酸化されるシステイン量と銅(II) 濃度が対応することから、反応開始 20 分後の未反応システイン濃度を吸光光度法で定量することにより行った。銅(II) の検量線は 0 から 1.1×10^{-6} M の範囲で原点を通る直線となった。定量下限は 3.9×10^{-8} M ($2.5 \text{ ng} \cdot \text{cm}^{-3}$) であった。なお、相対標準偏差は 1.8% ($n=5$, 1.7×10^{-7} M) であった。本法は銅(II) に対する選択性に優れ、本法を工場排水中の銅(II) の定量に応用した。

1 緒 言

銅は工業材料に欠くことのできない元素であり、また、生体内に微量に存在して生理的に重要な役割を担っている。一方、環境水、排水、土壌などに含まれる銅は、環境保全の観点から濃度が規制されている。したがって、微量銅の分析は重要であり、これまでに数多くの分析法が報告されてきた。そのなかで、接触分析法は単純な分析操作で、高感度に銅(II) を分析できることから、多くの酸化還元反応が銅(II) の接触分析法に利用されている¹⁾。

一方、銅(II) 触媒によるシステインの酸化反応は、銅を含む酵素の酸化反応機構を解明するためのモデル反応としてこれまで研究されてきたが^{2,3)}、銅の接触分析法に応用する試みはなされていない。この原因は水溶液におけるシステインの接触酸化速度が遅いためと考えられる。

著者らは先にシステインの接触酸化速度を早めるため、水-*N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) 混合溶液中で反応を行ったところ、システインの接触酸化速度が増大することを見いだした。また、酸化されるシステイン量を用いる銅(II) 濃度に比例することから、未反応システインを吸光光度定量することにより、銅(II) の接触分析が可能であることを報告した⁴⁾。

本研究では本接触分析法における最適な反応溶媒およびチオール化学種を選定するため、反応溶媒については DMF 以外の非水溶媒-水混合溶液についても検討し、また、チオール化学種についてはシステイン以外のチオール化学種についても検討を行い、銅(II) の最適分析条件を確立したので報告する。また、本法を工場排水中の銅(II) の定量に応用した結果についても報告する。

2 実 験

2.1 試 薬

試薬はすべて市販の特級品を、特に精製せずに使用した。溶液の調製にはイオン交換水を用いた。

銅標準溶液 (1×10^{-3} M) は硝酸銅を水に溶解して調製し、その濃度は 4-(2-チアゾリルアゾ) レソルシノールを指示薬に用いる EDTA 滴定法で求めた。用いる銅(II) 溶液は標準液を正確に水で希釈して調製した。

チオールにはシステアミン $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$ 、システイン $\text{HS} \cdot \text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ 、2-メルカプトエタノール $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ および 2-メルカプトプロピオン酸 $\text{CH}_3\text{CH}(\text{SH})\text{COOH}$ を使用した。システインは *L*-システインを使用した。チオール溶液は使用のつど調製した。

2.2 装 置

吸光度の測定には日立製自記分光光度計 320 型および 10 mm セルを使用した。pH の測定には東亜電波製 pH メーター HM-60 S 型を使用した。原子吸光光度法による工場排水中の銅の定量にはバリアン製 Zeeman 原子吸光光度計スペクトル AA 型を使用した。

4) T. Kamidate, K. Itoh, H. Watanabe, *Anal. Sci.*, **6**, 769(1990).

北海道大学工学部共通化学系, 060 札幌市北区北 13 条西 6 丁目

- 1) D. Perez-Bendito, M. Silva, "Kinetic Methods in Analytical Chemistry", John Wiley and Sons, Inc., New York, NY (1988), p. 50.
- 2) J. Zwart, J. H. M. C. Van Wolput, D. C. Koningsberger, *J. Mol. Catal.*, **12**, 85(1981).
- 3) A. Hanaki, H. Kamide, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **56**, 2065(1983).

2.3 操 作

一般的な操作は以下の手順で行った。恒温槽 (30℃) 中の 50 cm³ バイエル瓶に所定量の銅(II) 溶液をとり、これに酸素 (80 cm³・min⁻¹) を通じて、銅(II) 溶液を酸素で飽和した。次に所定量のチオール溶液を銅(II) 溶液に添加して接触反応を開始した。酸素は反応中も通気し、かつ、溶液は攪拌子でかきまぜた。反応開始後、任意の反応時間ごとに溶液 0.5 cm³ をセルに分取した。セルにはあらかじめ接触反応の停止剤である 0.1 M EDTA 溶液 0.1 cm³ が入れている。次に、反応溶液中の未反応チオールを吸光光度法で定量するため、 3.0×10^{-4} M 2,2'-ジチオビス(5-ニトロピリジン) (DTNP) の 0.5 cm³ をセルに添加した。銅(II) を含まないブランク溶液についても同様の操作を行い、試料溶液の吸光度 (A_S) およびブランク溶液の吸光度 (A_B) をそれぞれ測定し、 $\Delta A = A_B - A_S$ を求めた。なお、検討内容により、反応溶媒、銅(II) およびチオール濃度ならびにそれらの溶液量は異なる。

60% (v/v) DMF 溶液でのシステインの接触酸化を利用する銅(II) の定量は既報⁴⁾の分析操作に準じて行った。

工場排水のサンプリングは 50% 硝酸と水で洗浄した 1 dm³ ポリエチレン瓶を用いて行った。この排水を 1.2 μ l ミリポアフィルターで濾過後、濾液中の銅(II) を本法および原子吸光光度法で定量した。

3 結果および考察

3.1 接触酸化速度におよぼす反応溶媒の影響

銅(II) 触媒によるシステインの酸化反応において、水に対する DMF の容量比が増大するほど、酸化速度は増大した⁴⁾。そこで、接触酸化速度に対する DMF 以外の非水溶媒の影響をみるため、*N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF)、ジメチルスルホキシド (DMSO) およびアセトニトリル (AN) を用いてシステインの接触酸化を行い、DMF を用いた場合の接触酸化速度と比較した。

システインの接触酸化は、種々の組成の水-非水溶媒溶液で調製した 2.0×10^{-6} M 銅(II) 溶液と 1.0×10^{-3} M システイン溶液

をそれぞれ 10 cm³ 混合して行った。反応開始 10 分後の ΔA を図 1 に示す。酸化速度は用いる非水溶媒により変化した。システインの酸化速度は 80% DMF 溶液で最大となった。水-DMSO 混合溶液でも、DMSO の割合が増大するほど酸化速度は増大した。一方、水-AN 混合溶液ではシステインの酸化はほとんど進行しなかった。以上の結果から、反応溶媒には DMF-水混合溶液を使用することにした。

3.2 接触酸化速度におよぼすチオール化学種の影響

接触酸化速度に対するシステイン以外のチオール化学種の影響を見るため、親水性チオールであるシステアミン、2-メルカプトエタノールおよび 2-メルカプトプロピオン酸を用いて接触酸化を行い、システインを用いた場合の接触酸化速度と比較した。各チオールの接触酸化は 60% DMF 溶液で行った。 2.5×10^{-7} M 銅(II) および 2.5×10^{-4} M 各チオール溶液を 60% DMF 溶液で調製した。銅(II) 溶液 10 cm³ に各チオール溶液 2 cm³ を加えて反応を開始後、任意の反応時間における ΔA を求めた。2-メルカプトエタノールおよび 2-メルカプトプロピオン酸と DTNP との反応は再現性に欠けるため、信頼性のある ΔA を求めることができなかった。システアミンおよびシステインについて得られた結果を図 2 に示す。システアミンの酸化速度はシステインの約 6 倍となった。

3.3 水-DMF 混合溶液でのシステアミンの最適接触酸化条件

3.2 の結果から、チオールにシステインのかわりにシステアミンを用いた方が、銅(II) をより高感度に定量できることが期待できる。そこで、システアミンを用いて銅(II) の接触分析を行う場合の最適分析条件を検討した。

最初に最適 DMF 容量%を求めた。銅(II) の 6.2×10^{-7} M 水溶液を調製し、種々の割合で DMF と混合した。システアミンも水-DMF 混合溶液に溶解し、 1.5×10^{-3} M 溶液を調製した。銅(II) 溶液 10 cm³ にシステイン溶液 2 cm³ を加え、反応を行った。その結果、50% DMF 溶液を用いた場合、 ΔA は最大となった。そこで、最適 DMF 容量%は 50% とした。

pH の影響を pH 3~8 の範囲で検討した。システアミン溶液の

Fig.1 Effect of reaction media on ΔA

○ : DMF, ● : DMSO, ● : AN.
Conditions : $[Cu^{2+}]$; 2.0×10^{-6} M,
and [cysteine] ; 1.0×10^{-3} M.

Fig.2 Effect of thiols on the oxidation rate

○ : Cysteamine, ● : Cysteine
Conditions : $[Cu^{2+}]$; 2.5×10^{-7} M,
and [thiols] ; 2.5×10^{-4} M.

pH は DMF と混合する前に、希硝酸あるいは水酸化ナトリウム溶液を添加して調製した。 ΔA は pH 4~6 の範囲で一定となり、最適 pH は 5 とした。

反応温度が 20~45 °C の範囲では反応温度が増大するにしたがって ΔA は増大したが、ブランク溶液の吸光度も増大した。そこで、繰り返し測定精度も考慮して、30 °C で 10 分間反応させた後に ΔA を求めることにした。

最後に、システアミン濃度の影響を $5 \times 10^{-4} \sim 2 \times 10^{-3}$ M の範囲で検討した。その結果、 1×10^{-3} M 以上のシステアミン濃度で ΔA は一定となった。そこで、最適システアミン濃度は 1.5×10^{-3} M とした。

3.4 種々の反応条件での銅(II) の分析

50% DMF 溶液中でのシステアミンの接触酸化から銅(II) の検量線を作成し、60% DMF 溶液中でのシステインの接触酸化から作成した銅(II) の検量線と比較した。それぞれの反応系の最適条件で作成した検量線を図 3 に示す。定量下限はブランク溶液の A_B の相対標準偏差の 3 倍の吸光度を与える銅(II) 濃度とした。

60% DMF 溶液中でのシステインの接触酸化から作成した銅(II) の検量線では、0 から 1.1×10^{-6} M の範囲で、銅(II) 濃度

Fig. 3 Calibration curve for copper(II)

- : Cysteamine (50% DMF),
- : Cysteine (60% DMF)

と ΔA の間に原点を通る良好な直線関係が成り立った。定量下限は 3.9×10^{-8} M (2.5 ppb) であった。 1.1×10^{-7} M の銅(II)溶液の 5 回の繰り返し測定相対標準偏差は 1.8% であった。一方、60% DMF 溶液中でのシステアミンの接触酸化から作成した銅(II) の検量線は曲線となった。定量下限は 60% DMF 溶液中でのシステインの接触酸化から得られた値と同じであったが、銅(II) 濃度が増大するにしたがって、 ΔA は顕著に増大した。そのため、銅(II) の定量範囲が狭くなった。以上の結果から判定すれば、銅(II) の接触分析には反応溶媒として 60% DMF 溶液を、また、チオールとしてシステインを用いるのが最適である。

3.5 工場排水中の銅(II) の定量

前報において本法に対する共存金属イオンの影響を検討し、本法が Fe^{3+} をはじめ多くの金属イオンに対する選択性に優れていることを報告したが⁴⁾、工場排水中の銅(II) の定量に応用するため、陰イオンの影響についても検討を行った。種々の濃度になるように、 F^- , Cl^- , Br^- , I^- および SO_4^{2-} のナトリウム塩を 1.73×10^{-7} M 銅(II) 溶液に添加して、標準操作により ΔA を測定した。共存イオンの許容限界は、それらのイオンが存在しない場合の ΔA に対し、添加による ΔA の変動が $\pm 3\%$ に収まる最大濃度とした。各イオンが銅(II) に対して 1000 倍量共存しても ΔA に影響を与えないことがわかった。

次に、本法を用いて工場排水中の銅(II) の定量を行った。最初に排水中に含まれる銅(II) および他の金属イオンを原子吸光度法で定量した。その結果、 Cu^{2+} は 31.4 ppb 含まれ、他に Cr^{6+} が 13 ppb, Co^{2+} が 8.4 ppb, Fe^{3+} が 2.8 ppb, Zn^{2+} が 2.1 ppb および Ca^{2+} が 154 ppm 共存することがわかった。いずれの金属イオンとも銅(II) に対する許容濃度内であったので、前処理なしで排水中の銅(II) を定量した。その結果、銅(II) は 32.2 ppb となり、本法の分析値と原子吸光度法で得られた分析値とがよく一致した。

結論として、チオールの接触酸化反応を利用する銅(II) の接触分析法において、反応溶液には 60% DMF 水溶液、また、チオールにはシステインを用いるのが最適であることが明らかとなった。また、本法によって簡便に数 ppb レベルの微量銅(II) の分析が可能となった。

Spectrophotometric Determination of Copper(II) by Using
Catalytic Oxidation of Cysteine in an Aqueous
N,N-Dimethylformamide Solution

Atsushi KATAYAMA, Kazuo ITOH, Mikio FURUKAWA, Tamio KAMIDATE*
and Hiroto WATANABE

Faculty of Engineering, Hokkaido University; Kita-ku, Sapporo-shi 060 Japan

In order to develop a new kinetic method for the determination of trace amounts of copper (II), the Cu(II)-catalyzed oxidation of such water-soluble thiols as cysteamine, L-cysteine, 2-mercaptoethanol and 2-mercaptopropionic acid has been examined in water or in a mixture of water and such aprotic solvents as *N,N*-dimethylformamide (DMF), dimethyl sulfoxide and acetonitrile. In this method, the decrease in the concentration of thiols was measured spectrophotometrically for the determination of Cu(II). The best sensitivity was achieved using 60% DMF solution as the reaction media and L-cysteine as water-soluble thiols. The calibration curve of Cu(II) was linear over the range $0-1.1 \times 10^{-6}$ M and passed through the origin. The determination limit was reached down to 3.9×10^{-8} M (2.5 ppb) for Cu(II). The relative standard deviation of five successive experiments was 1.8% at 1.7×10^{-7} M of Cu (II). The selectivity achieved by the proposed method was highly excellent, since most of diverse ions tested were tolerated high ratios. The proposed method has been applied successfully to the determination of Cu(II) in waste water.

~~~~~