

接触反応の速度分析による触媒種のナノスケール計測

手嶋 紀雄, 酒井 忠雄

1 はじめに

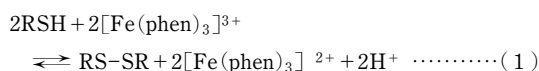
「鉄の仮説」が1980年代の終わりにMartinにより提唱された¹⁾。この説は、海洋中の植物プランクトンの生育量が鉄の不足により制限されてしまうというもので、海洋中に nmol l^{-1} 量の鉄を添加すると、植物プランクトンのクロロフィル生産が増加するという実験事実によるものである。また、微量の銅も植物プランクトンの生産に必要である²⁾。一方、生体内で鉄はヘモグロビン、ミオグロビン生成などに関与し、銅はセルプラスミンやリシロキシンダーゼなどの銅酵素として存在する³⁾。ヒトの血清中には鉄や銅が約 1 mg l^{-1} 存在するので、超高感度定量法は必ずしも必要でないが、血液成分の分析の際、採血量は少ないことが好ましい。このように、微量の鉄や銅の定量は環境化学や臨床化学など各分野に重要な情報をもたらすため、ナノスケールの計測法の開発が求められている。

ある化学反応系では、触媒（接触）作用により活性化エネルギーが低くなり、反応速度が増大する。この反応速度の変化量から触媒の量を測定する方法が接触分析法である^{4)~6)}。接触分析法の最大の特長は、触媒が循環再生し指示反応を増幅するため、化学量論的な反応系を用いるよりも更に高い感度で分析できることである。従って、分光光度計のような汎用装置があれば、高周波誘導結合プラズマ原子発光分光法（ICP-AES）やICP質量分析法（ICP-MS）法と同程度あるいはそれを上回る感度で微量分析が可能になる場合がある。

本稿では、接触分析法における指示反応の設計とアクセレーターの作用に基づく鉄と銅イオンの微量分別定量法について紹介する。

2 接触分析法における指示反応の設計

接触分析法では、有機物の酸化発色反応が指示反応として最もよく用いられる。しかし、新しい接触分析法を計画的に見いだすことは容易ではない。筆者らはこれまで、金属イオンの酸化還元反応に及ぼす配位子の錯形成の効果を利用して、新しいポテンシオメトリック反応を設計してきた⁷⁾。この中で、鉄(III)によるシステイン（RSH）のシスチン（RS-SR）への酸化反応〔式(1)〕が、pH 4~6付近で1,10-フェナントロリン（phen）の共存によって熱力学的に有利に進行することをポテンシオメトリックで示した⁸⁾。



このことは、式(2)のネルンスト式からも明らかである。

$$E_{\text{Fe}}' = E_{\text{Fe}}^\circ + 0.059 \log \frac{\alpha_{\text{Fe(II)}(\text{phen})}}{\alpha_{\text{Fe(III)}(\text{phen})}} + 0.059 \log \frac{C_{\text{Fe(III)}}}{C_{\text{Fe(II)}}} \quad (2)$$

ここで、 E_{Fe}' は鉄(III)/鉄(II)系の条件酸化還元電位、 E_{Fe}° は標準酸化還元電位（0.771 V vs. NHE）、 α は錯形成反応の副反応係数〔例えば $\alpha_{\text{Fe(II)}(\text{phen})} = 1 + \beta_1[\text{phen}] + \beta_2[\text{phen}]^2 + \beta_3[\text{phen}]^3$ 〕であり、 β は全生成定数（ $n=1, 2, 3$ ）、 C は各酸化数の金属の総濃度である。鉄(II)-phen錯体の生成定数（ $\log \beta_3 = 21.3$ ）は、鉄(III)-phen錯体（ $\log \beta_3 = 14.1$ ）の生成定数よりも大きいため⁹⁾、右辺の第2項は大きくなる。この結果 E_{Fe}' は上昇し、鉄(III)の酸化力が高まることでシステインが有利に酸化される。ところが、このシステインの酸化反応の完結は室温で約1時間を要する遅い反応であることも明らかとなった¹⁰⁾。

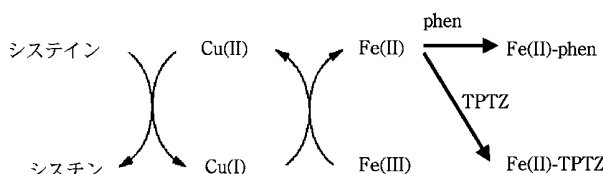
ところで、アルカリ性溶液中で溶存酸素によるチオール類の自動酸化が銅(II)により加速されることはよく知られており、多くの報告がある¹¹⁾¹²⁾。そこで、式(1)に示す反応に対する銅(II)の接触作用について速度論的に検討した¹³⁾。式(1)の反応において $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{3+}$ は過剰に存在しているので、反応速度式を式(3)式のように仮定した。

$$-d[\text{RSH}]/dt = k'[\text{RSH}] \quad (3)$$

ここで k' は条件速度定数である。式(4)の積分式

$$\ln[\text{RSH}]_t = \ln[\text{RSH}]_0 - k't \quad (4)$$

により、時間 t に対し $\ln[\text{RSH}]_t$ をプロットすると、銅(II)が存在してもしなくても直線が得られた。よって、この反応は擬一次反応の速度式(3)に従うことが判明した。直線の傾きから k' は、銅(II)の非共存下で $8.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、共存下では 1.7 s^{-1} となり、約2000倍の速度の増大が確認された。この接触作用をFIAシステムに導入したところ、銅 $0.1 \sim 10 \text{ ng ml}^{-1}$ を自動計測することができた⁸⁾。銅イオンの触媒サイクルを図1に示す。図1のようにphenの代わりに、2,4,6-トリス(2-



phen: 1,10-フェナントロリン, TPTZ: 2,4,6-トリス(2-ピリジル)-1,3,5-トリアジン

図1 銅イオンの触媒サイクル

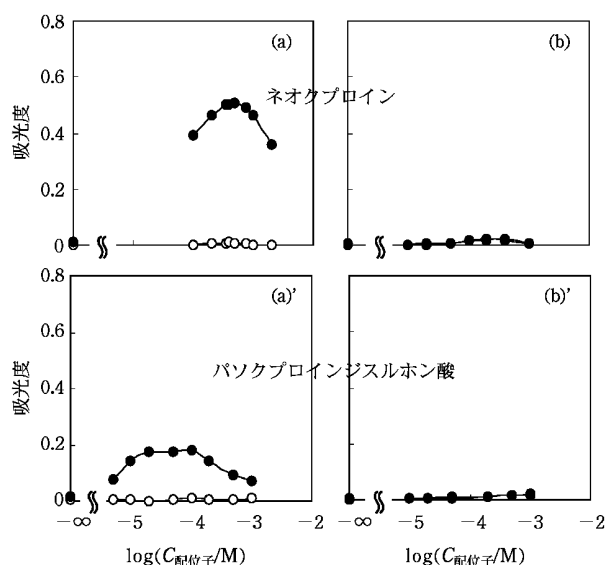
ピリジル)-1,3,5-トリアジン(TPTZ)を用いると、定量範囲は銅 0.05~8 ng ml⁻¹ となり感度の改善が図られた¹⁴⁾。FIA システムに注入した試料体積 200 μ l 中の銅の物質量は、0.16~25 pmol であり、質量感度としても高感度な方法といえることができる。

3 アクチベーターによる二成分系同時定量

接触分析法は、単一触媒を定量目的とする報告が圧倒的に多い。これは、しばしば同一の指示反応に対して複数の触媒種が存在するためである。しかし、接触分析法において金属イオンが触媒種となる場合、特定の配位子を添加することにより、接触作用が飛躍的に増大する場合がある。このような配位子はアクチベーターと呼ばれ、感度の増大とともに選択性の向上を図ることができる¹⁵⁾。そこで、同一の指示反応に対して二種のアクチベーターを用いることにより、選択的かつ高感度な銅、鉄の分別定量法を開発した¹⁶⁾。

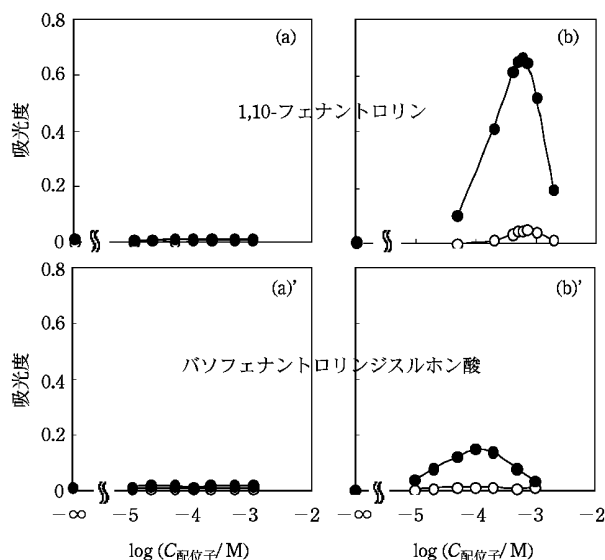
過酸化水素の存在下で *p*-アニシジンと *N,N*-ジメチルアニリン (DMA) は酸化カップリングし、740 nm 付近に吸収極大を有する色素を形成するが、この反応は極めて遅い。しかし、極微量の銅(II) や鉄(III) が存在すると、この反応は著しく促進される。このままでは、互いの触媒種は妨害を及ぼし合う。そこで、選択性を発現させるため数種のポリピリジン類の作用を検討した。図2にネオクプロイン及びバソクプロインジスルホン酸塩 (BCS) の影響を示す。図2(a), (a')に示すように、これらの配位子は銅イオンに対してアクチベーターとして作用する。一方、鉄イオンに対しては空試験値と一致していることから、アクチベーターとして作用していないことが分かる〔図2(b), (b')〕。従って、ネオクプロインまたはBCSの添加により、銅イオンの選択的な定量が可能となる。図2(a)と(a')に見られるように、アクチベーターの濃度がある濃度を超えると、徐々に吸光度が減少した。Bontchev¹⁵⁾は、このような濃度の影響は「アクチベーター-触媒金属-基質」(ここで基質とは *p*-アニシジンまたはDMAを指す)の三元錯体が形成されるためと説明している。この指示反応の場合、「ネオクプロイン-(あるいはBCS-)銅-*p*-アニシジン(あるいはDMA)」の三元錯体となる。BCSはネオクプロインに比べ立体障害を受けるため、高い吸光度が得られなかったと考えられる。図3に、phen及びバソフェナントロリンジスルホン酸塩(BPS)の濃度の影響を示す。これらの配位子は、逆に鉄イオンに対してのみアクチベーターとして作用した。つまり、ネオクプロインの代わりにphenまたはBPSを添加すれば、鉄イオンを選択的に検出することができる。

銅(I)-ネオクプロイン錯体の生成定数 ($\log \beta_2 = 19.1$) は、銅(II)-ネオクプロイン錯体の値 ($\log \beta_2 = 11.7$) よりも大きい。ため、ネルンスト式から、銅(II)/銅(I)系の条件酸化還元電位 $E_{Cu'}$ は標準酸化還元電位 (0.153 V vs. NHE) よりも上昇する。従って、ネオクプロインの存在で銅(II)の酸化力が増大し、基質が酸化されやすい条件となる。式(2)で考察したように、phenは鉄(III)の酸化力を増大させるので、この指示反応系の場合、触媒化学種の酸化力を増大させる配位子が選択的なアクチベーターとして作用した。しかし、3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン(MBTH)がDMAとカップリ



(○): 銅, 鉄非存在下 (ブランク), (●): 銅, 鉄存在下, (a)と(a'): 10 ng ml⁻¹ 銅, 反応時間: 5 分, 反応温度: 55°C, (b)と(b'): 40 ng ml⁻¹ 鉄, 反応時間: 15 min, 反応温度: 60°C, その他の条件: [*p*-アニシジン]=0.01 M, [DMA]=0.02 M, [酢酸塩緩衝液]=0.1 M (pH 3.2), [ニリン酸塩]=2×10⁻³ M, [過酸化水素]=0.5 M。

図2 銅・鉄イオンの接触作用に及ぼすネオクプロイン {(a), (b)} とバソクプロインジスルホン酸塩 {(a'), (b')} 濃度の影響



(○): 銅, 鉄非存在下 (ブランク), (●): 銅, 鉄存在下, (a)と(a'): 10 ng ml⁻¹ 銅, (b)と(b'): 40 ng ml⁻¹ 鉄, 他の条件は図2と同様。

図3 銅・鉄イオンの接触作用に及ぼす1,10-フェナントロリン {(a), (b)} とバソフェナントロリンジスルホン酸塩 {(a'), (b')} 濃度の影響

ングする指示反応の場合には、ネオクプロインよりもむしろphenが銅イオンのアクチベーターとして作用する報告がある¹⁷⁾。このようにカップラーが変わるだけで、異なるアクチベーターが作用することがあるので、系統的な研究が必要である。

最適条件下で銅イオンと鉄イオンのそれぞれの定量範囲は0.16~10 ng ml⁻¹, 1~100 ng ml⁻¹であった。ブランクの3 σ

で算出した銅イオンの検出限界 (LOD) は 0.05 ppb であり, ICP-MS の感度 ($\text{LOD}_{\text{Cu}} = 0.04 \text{ ppb}$)¹⁸⁾ に匹敵する。本法の鉄イオンの LOD は 0.3 ppb であり, ICP-MS ($\text{LOD}_{\text{Fe}} = 0.58 \text{ ppb}$)¹⁸⁾ よりも高感度である。

本法を水道水, 井戸水, 河川水, 池水などの天然水中の銅と鉄の定量に応用したところ, 天然水中に存在する種々の共存物質の影響を受けることなく, サブ ng ml^{-1} レベルの銅と鉄の定量が可能であることが分かった。

4 おわりに

接触分析法は, 反応速度を測定して目的成分の定量値を求めるため, 試薬の添加順序, 反応時間, 温度などの実験条件を厳密に制御しなければならない。しかし今日, 実験条件を厳密に制御する困難さは, FIA システムを用いることにより容易に解決される。筆者は FIA 用のマルチチャンネルフローセルを種々開発しており¹⁹⁾, 現在アクチベーターの作用を利用する接触分析法をシリアルフローセル装着の FIA 同時計測システムに導入している。今後は測定システムのダウンサイズ化を進め, 試料導入量をさらに少量化し, 濃度感度とともに質量感度を更に向上させ, ナノスケール・ピコスケール計測法の実現化を目指す。

文 献

- 1) J. H. Martin, S. E. Fitzwater: *Nature*, **331**, 341 (1988).
- 2) K. H. Coale: *Limnol. Oceanogr.*, **36**, 1851 (1991).
- 3) “広範囲血液・尿化学検査免疫学的検査—その数値をどう読むか”, 日本臨牀, **750** (増刊号), (1999).
- 4) T. Kawashima, S. Nakano, M. Tabata, M. Tanaka: *Trends Anal. Chem.*, **16**, 132 (1997).
- 5) 中野恵文: 分析化学, **48**, 285 (1999).
- 6) T. Kawashima, N. Teshima, S. Nakano: “*Encyclopedia of Analytical Chemistry*”, Edited by R.A. Meyers, pp. 11034–11070, (2000), (John Wiley & Sons, Chichester).
- 7) N. Teshima, H. Katsumata, T. Kawashima: *Anal. Sci.*, **16**, 901 (2000).
- 8) N. Teshima, H. Katsumata, M. Kurihara, T. Sakai, T. Kawashima: *Talanta*, **50**, 41 (1999).

- 9) W. A. E. McBryde: “*A Critical Review of Equilibrium Data for Proton and Metal Complexes of 1,10-phenanthroline, 2,2'-Bipyridyl and Related Compounds*”, (1978), (Pergamon Press, Oxford).
- 10) N. Teshima, T. Nobuta, T. Sakai: *Anal. Chim. Acta*, **438**, 21 (2001).
- 11) J. Zwart, J. H. M. C. van Wolput, D. C. Koningsberger: *J. Mol. Catal.*, **12**, 85 (1981).
- 12) A. Hanaki, H. Kamide: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **56**, 2065 (1983).
- 13) 手嶋紀雄, 信田拓哉, 酒井忠雄, 河嶋拓治: 分析化学, **50**, 47 (2001).
- 14) J. Wei, N. Teshima, S. Ohno, T. Sakai: *Anal. Sci.*, **19**, 731 (2003).
- 15) P. R. Bontchev: *Talanta*, **19**, 675 (1972).
- 16) S. Ohno, N. Teshima, H. Zhang, T. Sakai: *Talanta*, **60**, 1177 (2003).
- 17) 佐藤敬一, 岩村直美, 手嶋紀雄, 中野恵文, 河嶋拓治: *J. Flow Injection Anal.*, **10**, 245 (1993).
- 18) H. Haraguchi, E. Fujimori, K. Inagaki: “*Methods in Molecular Biology*”, edited by D. Armstrong, Vol. 108, pp. 389–411, (1998), (Humana Press, Totowa).
- 19) T. Sakai: *J. Flow Injection Anal.*, **17**, 156 (2000).



手嶋紀雄 (Norio TESHIMA)

愛知工業大学応用化学科 (〒470-0392 豊田市八草町八千草 1247)。筑波大学大学院博士課程化学研究科修了。博士 (理学)。<現在の研究テーマ>環境中の微量金属定量, 血清金属と病態, フロー分析の機能化。<主な著書>“環境・分析化学実験” (分担執筆) (三共出版)。<趣味>音楽鑑賞, 野球観戦。
E-mail: teshima@aitech.ac.jp



酒井忠雄 (Tadao SAKAI)

愛知工業大学応用化学科 (〒470-0392 豊田市八草町八千草 1247)。鳥取大学教育学部卒。薬学博士, 博士 (工学)。<現在の研究テーマ>特異的イオン会合反応, 高機能 FIA。<主な著書>“基礎分析化学” (朝倉書店)。<趣味>テニス, バスケットボールの観戦。
E-mail: tadsakai@aitech.ac.jp

原 稿 募 集

I & D 欄の原稿を募集してます

内容: 実際に分析を行っている現場での分析法や分析技術にまつわるちょっとしたアイディア, 実験器具の創案あるいは改良, コンピュータなどのソフトウェアなど。I は Idea, Information あるいは Innovation の I, D は Design, Development あるいは Device の D を意味しています。

執筆上の注意: 1) 2000 字以内 (図・表は 1 枚 500 字に換算) とする。2) 簡単な図などを積極的に

入れる。

◇採用の可否は編集委員会にご一任ください。原稿の送付先及び問い合わせは下記へ。

〒141-0031 東京都品川区西五反田 1-26-2

五反田サンハイツ 304 号

(株)日本分析化学会「ぶんせき」編集委員会

〔電話: 03-3490-3537〕