

報 文

バクプロインジスルホン酸錯陰イオンとしてキチンへの
濃縮を利用する微量銅の固相吸光光度定量

星 座^{®*}, 小沼 純貴*, 千葉 香織*, 菅原 一晴*,
赤塚 邦彦*, 宇都 正幸**

Solid-phase spectrophotometric determination of trace copper
after collection as its bathocuproinedisulfonate
chelate anion on chitin

Suwaru HOSHI, Kiyotaka KONUMA, Kaori CHIBA, Kazuharu SUGAWARA,
Kunihiko AKATSUKA* and Masayuki UTO**

*Department of Applied and Environmental Chemistry, Kitami Institute of Technology, 165 Koen-cho, Kitami-shi, Hokkaido 090-8507

**Department of Functional Materials, Kitami Institute of Technology, 165 Koen-cho, Kitami-shi, Hokkaido 090-8507

(Received 16 July 1999, Accepted 22 September 1999)

A collection method for anionic species on protonated chitin has been applied to the solid-phase spectrophotometric determination of trace copper. Copper is easily collected as its colored bathocuproinedisulfonate chelate anion on 20 mg of chitin from 20 cm³ of aqueous solution at pH 5.0. The reflection absorbance of the chitin phase at 484 nm was measured directly. The calibration curve was linear in the concentration up to 1 µg of copper on 20 mg of chitin. The relative standard deviation was 2.89% for 0.5 µg of copper with 9 measurements. The tolerance limit for VO₃⁻ is 200-times in the concentration that of copper, and for Fe³⁺ and Al³⁺ it is 500- and 1000-times in the concentration of copper, respectively, when 5 mg of F⁻ is added. Common metal ions, reducing agents and inorganic anions do not interfere in the concentration range of 1000- to 10000- times that of copper. The present method can be applied to the determination of copper in biological standard samples.

Keywords : Solid-phase spectrophotometric determination of trace copper; chitin; collection as copper bathocuproinedisulfonate chelate anion on protonated chitin.

1 緒 言

* 北見工業大学工学部化学システム工学科: 090-8507
北海道北見市公園町 165

** 北見工業大学工学部機能材料工学科: 090-8507 北海
道北見市公園町 165

微量成分の分析において、感度や精度を向上させるため、試料マトリックスから目的成分の分離や濃縮操作が必要となる。そのような方法として従来の溶媒抽出法に

替わり、様々な担体を用いる固相抽出法が主流となりつつある^{1)~6)}。環境試料中の銅についてもその濃度レベルが低いため、そのような試料中の銅の分析を行うに当たり、種々の担体を用いる固相抽出法が前濃縮に利用されている。そのような方法に用いられる担体としてアンバーライト XAD 樹脂⁷⁾、キレート試薬を担持させたシリカゲル⁸⁾、非イオン界面活性剤による曇り点抽出⁹⁾、イオン交換樹脂^{10)~13)}、ナフタレン¹⁴⁾、メンブランフィルター¹⁵⁾¹⁶⁾、ポリ塩化ビニル膜¹⁷⁾¹⁸⁾、熱可逆性高分子¹⁹⁾及びアミノ多糖類キチン²⁰⁾²¹⁾などがある。

キチンはセルロース類似の骨格構造を持ち、親水性と疎水性のバランスの良い天然高分子である。しかし、セルロースと異なり、その分子間における強固な水素結合などにより、広い pH 範囲の水溶液中で安定に存在する。このため、キチンは吸光度法、原子吸光法及び電気化学分析法の前処理として、目的成分をイオン化合物や陰イオン化学種として固相抽出するための担体として利用されている^{20)~36)}。そのような研究の中で、キチンの水ぬれが良いため水溶液中から目的成分を迅速に捕集できること、及び少量のそれぞれの系に適した溶離液で簡単に溶出できるなど、固相抽出担体としてのキチンの持つ優れた特性が指摘されている^{20)22)~28)30)31)}。

本研究では、前処理操作の簡略化、及び固相抽出担体としてキチンの応用範囲を拡大することを目的として、キチン上に目的成分を呈色化学種として捕集した後、固相測定装置を付属した分光光度計を用いて、キチン相の吸光度を直接測定する方法について検討を行った。ここでは銅イオンをバソクプロインジスルホン酸 (BCS) 錯陰イオンとして、弱酸性水溶液からキチンのアセチルアミノ基がプロトン化することにより発現する、陰イオン交換体としての機能を利用して濃縮し、キチン相の反射吸光度を直接測定して分析する方法について検討した。

2 実 験

2.1 試 薬

キチン：金属イオンや不純物を除くため、フナコシ製精製キチンを 2 mol dm^{-3} 塩酸溶液と約 3 時間かくはんし、汙過後、ミリ Q 水及びメタノールで洗浄し、 50°C の真空乾燥器中で 24 時間乾燥したものを使用した。

銅(II) 標準溶液 ($1000 \mu\text{g cm}^{-3}$)：和光純薬製原子吸光用標準溶液を用い、必要に応じて希釈して使用した。

BCS 溶液 (0.01 mol dm^{-3})：同仁化学研究所製バソクプロインジスルホン酸ナトリウム 0.2823 g をミリ Q 水に溶解して 50 cm^3 とした。塩化ヒドロキシアミン (HA) 溶液 (0.1 mol dm^{-3})：和光純薬製特級塩化ヒドロキシ

アミン 0.6949 g をミリ Q 水に溶解して 100 cm^3 とした。

その他の試薬及び溶媒は、精密分析用あるいは市販特級品をそのまま使用した。

2.2 装 置

キチン相の反射吸光度の測定は、島津 PC2400 分光光度計に ISR-240A 形積分球付属装置を装着して行った。溶液の pH の測定は、日立-堀場 F-7_{AD} 型 pH メーターを使用した。試料溶液とキチンとの接触かくはんには、イウチ TMS-6 多連式スターラーを使用した。

2.3 定量操作

銅 $1 \mu\text{g}$ までを含む溶液 20 cm^3 に 0.1 mol dm^{-3} HA 0.2 cm^3 、 0.01 mol dm^{-3} BCS 0.2 cm^3 及び pH 5.0 の 1 mol dm^{-3} 酢酸緩衝溶液 0.1 cm^3 を加えて 5 分間放置した溶液にキチン 20 mg を加え、20 分間かくはんして Cu-BCS キレート捕集する。アドバンテック製 KG-25 メンブランフィルターホルダーに No.5A 汙紙を装着してキチン相を汙過後、汙紙ごと分光光度計の固相測定装置に装着し、 484 nm における反射吸光度を測定する。なお、使用したメンブランフィルターホルダーよりキチン相スポットのサイズは約 16 mm である。

2.4 標準試料の分解

あらかじめシリカゲルデシケーター中で 10 日間以上乾燥した国立環境研究所の標準試料 Pepperbush 0.02 g 、Mussel 0.04 g 、及び Chlorella 0.04 g をテフロンビーカーに正確に採り、濃硝酸 10 cm^3 、過塩素酸 0.5 cm^3 、及びフッ化水素酸 0.5 cm^3 を加えホットプレート上で湿式酸分解を行った。分解後、蒸発乾固近くまで溶液を蒸発させた後、 0.01 mol dm^{-3} 塩酸溶液 5 cm^3 で溶出した。得られたそれぞれの溶液は、 1 mol dm^{-3} アンモニア水で pH を約 3 とした後 20 cm^3 として、2.3 における分析試料とした。

3 結果及び考察

3.1 キチン相のスペクトル

Cu-BCS キレート及び試薬空試験液のキチン相の反射スペクトルを Fig. 1 に示す。Cu-BCS キレートのスペクトルは、 484 nm で吸収極大を示すため、以後の測定波長は 484 nm とした。

3.2 Cu-BCS キレートのキチンへの吸着特性

Cu-BCS キレートのキチンへの吸着特性について検討した。銅(II) $5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ 、HA $1 \times 10^{-2} \text{ mol}$

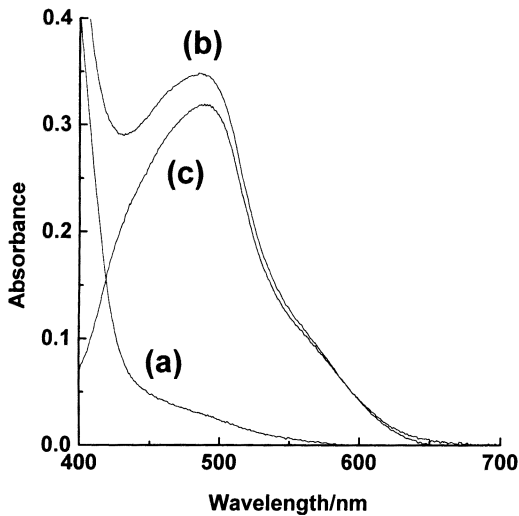


Fig. 1 Reflection spectra on chitin
(a) reagent blank and (b) Cu-BCS chelate. Reference: standard white plate; Initial reagents concentration in 20 cm^3 of aqueous solution at pH 5.0, $[\text{HA}] = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{BCS}] = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; Chitin phase: 20 mg .

dm^{-3} 及び BCS $1.2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ を含み, pH 5.0 に調整した溶液 100 cm^3 とキチン 50 mg を 3 時間かくはんした. 濾過後, Cu-BCS キレート の原液と濾液の吸光度差から求めた銅キレートのキチンへの吸着量は $60.98 \mu\text{mol g}^{-1}$ であった. 陰イオン交換樹脂などに比較して必ずしも大きな値ではないが, 微量の銅を捕集するには十分な吸着量である.

3.3 キチンへの捕集に及ぼす諸条件の検討

Cu-BCS キレートのキチンへの捕集に及ぼす HA 及び BCS 濃度の影響について検討した. 銅 $1 \mu\text{g}$ に対し, HA については $5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ 以上, 及び BCS については $2.5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ 以上で一定の吸光度を示した. この結果より, 添加する試薬濃度は, 試料溶液に対して HA は $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, 及び BCS は $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ 付近の濃度になるように加えた. なお, HA の代わりに L-アスコルビン酸を用いても定量法の設計は可能であるが, 溶液を調製後 HA のほうが長期間保存できるため, 本研究では主に HA を用いた.

Cu-BCS キレートのキチンへの捕集に及ぼす試料溶液の pH の影響について検討した結果を Fig. 2 に示す. 水溶液中では pH 3~7 付近で定量的に錯形成するが, キチンへの捕集では pH が 4.8~6.1 付近でキチン相の

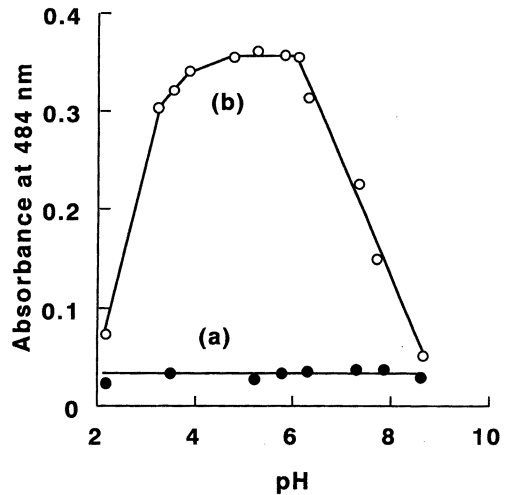


Fig. 2 Effect of pH for collection of Cu-BCS chelate on Chitin
(a) reagent blank and (b) Cu-BCS; Condition as in Fig. 1 except for pH.

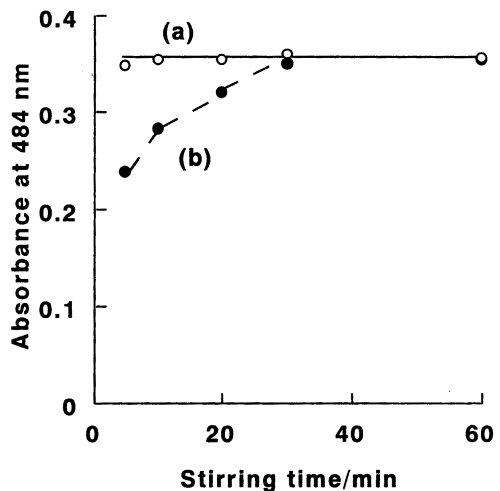


Fig. 3 Effect of aqueous volume for collection of Cu-BCS chelate on chitin
Aqueous volume: (a) 20 cm^3 ; (b) 100 cm^3 ; Condition as in Fig. 1 except for aqueous volume.

吸光度は一定となった. このような点から, 本研究ではキチンへの固相抽出の際は酢酸緩衝溶液を用い pH 5.0 に調整して行った. なお, pH 5.0 の水溶液中で Cu-BCS キレートの組成についてモル比法により検討した結果, $\text{Cu} : \text{BCS} = 1 : 2$ の組成であることが確認された.

したがって、この組成のキレートがキチン上に捕集されていると推定した。

捕集に及ぼすかくはん時間の影響を調べた結果、Fig. 3に示すように5分間程度のかくはんによって一定の吸光度を得た。ここでは安全のためかくはん時間は20分とした。キチンの量の影響については、その量が30 mg以上になると希釈の効果によると思われる吸光度の低下が認められた。実験操作としての取り扱いやすさを考慮して、ここでは捕集に使用するキチン量は20 mgとした。

Fig. 3に試料溶液20及び100 cm³からの銅キレートの捕集に及ぼすかくはん時間の影響について検討した結果を示す。水相体積が20 cm³ではかくはん時間が5分間以上で一定の吸光度を示すが、100 cm³では一定の吸光度を得るのに30分間以上のかくはん時間が必要であった。したがって、本法を環境水など極微量の銅を含む

試料へ適用する際には、試料体積を多くする必要がある、これに伴ってかくはん時間も長くする必要がある。

3・4 検量線

2・3の定量操作に従って検量線を作成した結果、銅1 µgまでについて、 $y = 0.325x + 0.061$ ($r = 0.994$)に従う直線性を示した。ここで、 y はキチン相の484 nmにおける反射吸光度であり、 x は銅の量を表す。また、銅0.5 µg、9回測定の内相標準偏差は2.89%であった。

3・5 共存イオンの影響

銅0.5 µgに対する共存イオンの影響を調べた結果をTable 1示す。銅単独の場合の吸光度と比較して±5%以内を許容範囲とした。この方法は比較的選択性の高い方法であるが、VO₃⁻は200倍までの許容量であった。Fe(III)及びAl(III)についてはF⁻を5 mg添加することにより、500倍及び1000倍までそれぞれ影響を抑えることができた。金属イオンなどの陽イオン、還元剤、オキソ酸イオン及び一般の無機陰イオンはTable 1に示すように1000～10000倍まで共存しても影響しなかった。

3・6 実試料中の銅の分析への応用

Table 2に国立環境研究所の標準試料であるPepperbush, Mussel及びChlorellaの3種類について、本法により銅の分析を行った結果を示す。それぞれの試料は2・4に示す湿式酸分解処理の後、分析を行った。Pepperbush及びMusselについては保証値とほぼ一致したのに対し、Chlorellaはかなり大きな値を示した。これはChlorella中の銅に対して高い比率で含まれる鉄の影響であると考えられる。

Table 1 Effect of diverse ions on the determination of 0.5 µg of copper

Ion added	Ion/Cu(II)
L-ascorbic acid, F ⁻ , Cl ⁻ , ClO ₄ ⁻ , NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺	10000
Mn ²⁺ , Al ³⁺ *, Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺ , Cd ²⁺ , Pb ²⁺ , CrO ₄ ²⁻ , MoO ₄ ²⁻ , WO ₄ ²⁻	1000
Fe ²⁺ , Fe ³⁺ *	500
VO ₃ ⁻	200

The tolerance limit was taken as being the amount causing an error ±5% in the absorbance of copper alone. * 5 mg of F⁻ was added.

Table 2 Determination of copper in Standard samples issued by National Institute for Environmental Studies

Sample	This method/µg g ⁻¹	Certified value/µg g ⁻¹
Pepperbush	12.61, 12.31, 13.04 av. 12.7 ± 0.4 RSD 2.9%	12 ± 1
Mussel	4.53, 5.05, 4.60 av. 4.7 ± 0.3 RSD 5.9%	4.9 ± 0.3
Chlorella	7.48, 8.14, 8.22 av. 8.0 ± 0.4 RSD 5.9%	3.5 ± 0.3

以上, キチンの陰イオン交換能を利用して銅を陰イオン化学種として濃縮した後, 固相を直接吸光分析することで, 以前に検討したキチンヘイオン会合体として濃縮後, 少量の溶離液で溶出する方法²⁰⁾と比較して操作がより簡略化でき, より微量の銅の分析法を設計することができた. また, 溶出を行わないため, キチン相への濃縮を行う条件下でのみ安定な化学種すなわちアルカリ溶離液による溶出条件下で不安定な化学種にも本法は適用でき, 今後, 多くの呈色化学種を生成する系に应用可能であると考えられる.

文 献

- 1) C. Kantipuly, S. Katragadda, A. Chow, H. D. Gesser: *Talanta*, **37**, 491 (1990).
- 2) K. Terada: *Anal. Sci.*, **7**, 187 (1991).
- 3) K. Goto, S. Taguchi: *Anal. Sci.*, **9**, 1 (1993).
- 4) 寺田喜久雄: ぶんせき (*Bunseki*), **1993**, 514.
- 5) 後藤克己, 波多宣子: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **44**, 169 (1995).
- 6) 奥谷忠雄, 鷗澤 惇: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **44**, 663 (1995).
- 7) Y. Sakai: *Talanta*, **27**, 1073 (1980).
- 8) K. Terada, K. Matsumoto, H. Kimura: *Anal. Chim. Acta*, **153**, 237 (1983).
- 9) 渡辺寛人, 太刀川貢平, 大森秀樹: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **31**, 471 (1982).
- 10) K. Yoshimura, S. Nigo, T. Tarutani: *Talanta*, **29**, 173 (1982).
- 11) 赤岩英夫, 川本 博, 木下博晃: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **36**, 662 (1987).
- 12) K. Ohzeki, M. Minorikawa, F. Yokota, I. Nukatsuka, R. Ishida: *Analyst*, **115**, 23 (1990).
- 13) M. L. Fernandez-de Cordova, A. Molina-Diaz, M. I. Pascual-Reguera, L. F. Capitan-Vallvey: *Z. Anal. Chem.*, **349**, 722 (1994).
- 14) M. Satake, G. Goto, B. K. Puri, S. Usami: *Anal. Chim. Acta*, **199**, 209 (1989).
- 15) M. Kan, H. Sakamoto, T. Nasu, M. Taga: *Anal. Sci.*, **7**, 913 (1991).
- 16) T. Shimizu, I. Nukatsuka, K. Ohzeki: *Anal. Sci.*, **15**, 153 (1999).
- 17) 齊藤 貴: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **40**, 227 (1991).
- 18) T. Saito: *Talanta*, **41**, 811 (1994).
- 19) M. Hiraide, A. Morishima, H. Kawaguchi: *Anal. Sci.*, **13**, 295 (1997).
- 20) S. Hoshi, Y. Tanaka, S. Inoue, M. Matsubara: *Anal. Sci.*, **5**, 471 (1989).
- 21) 南澤宏明, 新井信正, 奥谷忠雄: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **42**, 767 (1993).
- 22) S. Hoshi, Y. Kamada, S. Inoue, M. Matsubara: *Anal. Sci.*, **4**, 227 (1988).
- 23) S. Hoshi, M. Yamada, S. Inoue, M. Matsubara: *Talanta*, **36**, 606 (1989).
- 24) S. Hoshi, M. Yamada, S. Inoue, M. Matsubara: *Anal. Sci.*, **7**, 657 (1991).
- 25) S. Hoshi, S. Kanagami, M. Uto, M. Matsubara: *Anal. Sci.*, **8**, 103 (1992).
- 26) S. Hoshi, T. Tomizuka, C. Enjo, Y. Haga, M. Uto and K. Akatsuka: *Anal. Sci.*, **11**, 729 (1995).
- 27) S. Hoshi, K. Konuma, K. Sugawara, M. Uto, K. Akatsuka: *Talanta*, **44**, 1473 (1993).
- 28) S. Hoshi, K. Konuma, K. Sugawara, M. Uto, K. Akatsuka: *Anal. Sci.*, **13**, 863 (1997).
- 29) K. Sugawara, T. Miyashita, S. Hoshi, K. Akatsuka: *Anal. Chim. Acta*, **353**, 301 (1997).
- 30) S. Hoshi, K. Konuma, K. Sugawara, M. Uto, K. Akatsuka: *Talanta*, **47**, 659 (1998).
- 31) 小森一徳, 五十嵐淑郎, 四ツ柳隆夫: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **35**, 890 (1986).
- 32) 南澤宏明, 外園岳彦, 新井信正, 奥谷忠雄: 日本化学会誌, **1993**, 937.
- 33) 南澤宏明, 新井信正, 立幅義人, 奥谷忠雄: 日本化学会誌, **1995**, 512.
- 34) H. Minamizawa, N. Arai, T. Okutani: *Anal. Sci.*, **11**, 961 (1995).
- 35) H. Minamizawa, Y. Tatehara, N. Arai, T. Okutani: *Anal. Sci.*, **12**, 947 (1996).
- 36) Z-ping Bai, T. Nakamura, K. Izutsu: *Anal. Sci.*, **6**, 443 (1990).

要 旨

弱酸性領域におけるアミノ多糖類キチンのアセチルアミノ基のプロトン化に基づく陰イオン交換体としての機能を利用し, 銅をそのバソクプロインジスルホン酸 (BCS) 錯陰イオンとして濃縮した後, キチン相の反射吸光度を直接測定して銅を定量する方法を検討した. 銅は pH 5 の水溶液 20 cm³ からキチン相 20 mg 上に BCS キレートとして短時間のかくはん時間で迅速に濃縮された. キチン相中の 1 μg までの銅と 484 nm における固相吸光度との間に直線関係があった. 銅 0.5 μg, 9 回測定の相対標準偏差は 2.89% であった. VO₃⁻ や Fe³⁺ の許容量はやや低かったが, 金属イオン, 還元剤及び一般の無機陰イオンなどは 1000~10000 倍共存しても影響しなかった. 本法により国立環境研究所の生物標準試料中の銅の定量を行った結果, 鉄の共存量が比較的少ない試料中の銅の分析値は保証値と良く一致した.