

2,3,7,8,12,13,17,18-Octabromo-5,10,15,20-tetrakis(4-methylpyridyl)porphin と 金属イオンとの反応に関する分光学的検討

御船正樹,^{*,a} 岩藤章正,^a 谷口将成,^a 神野伸一郎,^b 榎本秀一^{a,b}

Photometric Study on the Reaction between 2,3,7,8,12,13,17,18-Octabromo- 5,10,15,20-tetrakis-(4-methylpyridyl) porphine and Various Metal Ions

Masaki MIFUNE,^{*,a} Akimasa IWADO,^a Masanari TANIGUCHI,^a
Sinichiro KAMINO,^b and Shuichi ENOMOTO^{a,b}

^a*Division of Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Medicine and Dentistry and Pharmaceutical
Sciences, Okayama University, Tsushima-Naka, Kita-ku, Okayama 700-8530, Japan, and*

^b*Multiple Molecular Imaging Research Laboratory, RIKEN Kobe Institute, 6-7-3
Minatojima-minamimachi, Chuo-ku, Kobe 650-0047, Japan*

(Received January 14, 2011; Accepted May 2, 2011; Published online May 12, 2011)

The chelate forming reaction between 2,3,7,8,12,13,17,18-octabromo-5,10,15,20-tetrakis(4-methylpyridyl)porphine (OBTMPyP) and various metal ions, which belong mainly to 4th period and 7th–12th groups in the periodic table, was examined by the observing the absorption spectra. Because one chemical spicy, H-OBTMPyP, which is one protonated compound at an N atom of pyrrole ring among 4 pyrrole rings, was observed at pH 9.0, this pH was used to measure the changes of absorption spectra with metal ions. From these changes of absorption spectra of OBTMPyP with metal ions, OBTMPyP were seen to react easily with Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , or Co^{2+} ion without other additional reagent or heating within 1 min at over 25°C. On the other hand, OBTMPyP reacted little with Ni^{2+} , and was not all with Fe^{3+} (or Fe^{2+} reduced by ascorbic acid from Fe^{3+}) under the same conditions. 5,10,15,20-tetrakis(4-methylpyridyl)porphine (TMPyP) also did not react with metal ions above these conditions. The λ_{max} of each Soret band differed. The stability constants (K_a value) of Cu-, Zn-, Mn- and Co-OBTMPyP was calculated by the change in absorbance of each band, and was 2.6×10^5 , 3.6×10^5 , 2.7×10^5 and 2.9×10^5 (dm^3/mol), respectively. It was revealed that OBTMPyP and metal ions reacted at molar ratio of 1:1, and octabromination of porphine rings improved the reactivity with these ions.

Key words—octabromination; porphine; metal ion; chelate forming; photometric study

緒 言

Tetrakis(4-methylpyridyl)porphine (TMPyP) や tetrakis(sulfophenyl)porphine (TSPP) のような水溶性ポルフィリンは、その大きなモル吸光係数と金属イオンとの錯形成能力より金属イオンの超高感度吸光光度定量用試薬として注目されてきた。¹⁻⁸⁾ しかし、TSPP や TMPyP と金属イオンとの反応性が低いため、遷移金属イオンとそれらとの反応を完結させるには、加熱や余分の試薬の添加が必要であった。近年、ピロール環を八臭素化した TSPP や TMPyP がその非平面構造から注目を集めている。

田口らは、八臭素化 TSPP (OBTSP) を用いて Litium ion の吸光光度定量法について報告している。⁹⁾ Richard らは、2,3,7,8,12,13,17,18-octabromo-5,10,15,20-tetrakis(4-methylpyridyl)-porphine (H_n -OBTMPyP, Fig. 1) とリチウムイオンの反応について分光光度的に研究し報告している。¹⁰⁾ Haberle らは Mn-OBTMPyP のスーパーオキシドデスミクターゼ様機能について報告している。¹¹⁾ なお、これらの八臭素化ポルフィリンのもととなった TSPP や TMPyP と Litium ion は全く反応しないことも明らかにされている。また、Harberle らの報告では Mn-TMPyP を最初に合成し、それを八臭素化し Mn-OBTMPyP を得ている。上記の報告において、Li-OBTSP, Li-OBTMPyP は加熱や余分の試薬の添加なしで定量されている。^{9,10)} このように八臭素

^a岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 (薬学系), ^b理化学研究所神戸研究所分子イメージング研究センター

*e-mail: mifune@pharm.okayama-u.ac.jp

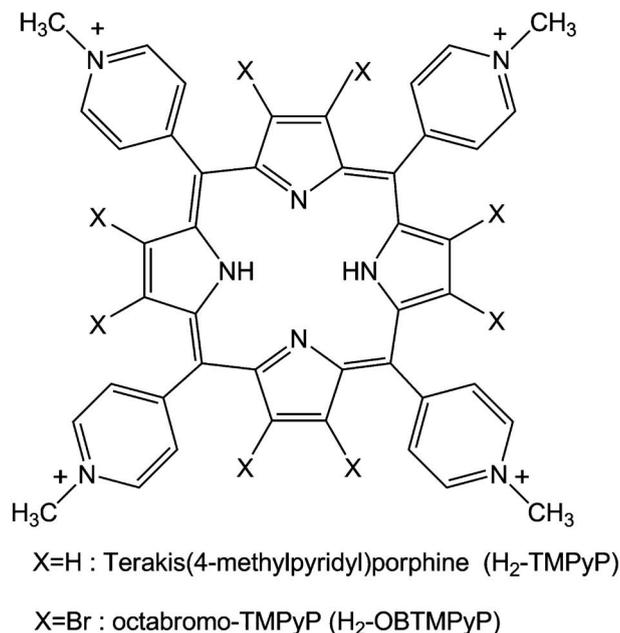


Fig. 1. Structure of Tetrakis(4-methylpyridyl) porphine and Octabromotetrakis(4-methylpyridyl)-porphine

化ポルフィリンでは、普通のポルフィリンに比べ、金属との錯体生成反応が容易ではないかと考え、OBTMPyP と主に 2 価の金属イオンとの反応性に関して検討することにした。

実験方法

1. 2,3,7,8,12,13,17,18-octabromo-5,10,15,20-tetrakis(4-methylpyridyl)-porphine (OBTMPyP) の調製 OBTMPyP の調製のための 5,10,15,20-tetrakis(4-methylpyridyl) porphine (TMPyP) は、同仁化学研究所より購入したものをそのまま用いた。OBTMPyP の調製は、Richard らの方法に従った。¹⁰⁾

最初に、銅-TMPyP を調製し、dimethylformamide (DMF) に溶かした Br₂ を Cu-TMPyP の DMF 懸濁液に添加して八臭素化を行った。さらに、Cu-OBTMPyP を 98% 硫酸中で処理して metal-free の OBTMPyP を調製し、最終的に OBTMPyP の塩化物塩とした。OBTMPyP の λ_{max} やモル吸光係数は文献値と一致した。¹⁰⁾

2. 金属標準液 以下の原子吸光用標準液 (和光純薬工業株式会社製) を用いた。

銅標準液 ; 1006 mg/dm³ Cu²⁺ (as Cu(NO₃)₂)
 in 0.1 mol/dm³ HNO₃
 亜鉛標準液 ; 1004 mg/dm³ Zn²⁺ (as Zn(NO₃)₂)

in 0.1 mol/dm³ HNO₃

コバルト標準液 ;

1003 mg/dm³ Co²⁺ (as Co(NO₃)₂)

in 0.1 mol/dm³ HNO₃

マンガン標準液 ;

1004 mg/dm³ Mn²⁺ (as Mn(NO₃)₂)

in 0.1 mol/dm³ HNO₃

ニッケル標準液 ;

1002 mg/dm³ Ni²⁺ (as Ni(NO₃)₂)

in 0.1 mol/dm³ HNO₃

鉄標準液 ; 1006 mg/dm³ Fe³⁺ (as Fe(NO₃)₃)

in 0.1 mol/dm³ HNO₃

3. 緩衝液 緩衝液として、それぞれ、pH 2.0 は、酢酸ナトリウム (1 mol/dm³)-塩酸 (1 mol/dm³) 緩衝液を pH 4.0-6.0 は、酢酸 (0.1 mol/dm³)-酢酸ナトリウム (0.1 mol/dm³) 緩衝液を、pH 7.0 及び 7.5 は、リン酸水素二ナトリウム (0.01 mol/dm³)-リン酸二水素カリウム (0.01 mol/dm³) 緩衝液を、pH 7.5-10.0 は、ホウ酸ナトリウム (0.05 mol/dm³)-ホウ酸 (0.2 mol/dm³, 塩化ナトリウム (0.05 mol/dm³) 含む) 緩衝液を用いた。なお、これらの緩衝液の調製には、試薬特級品又は一級品を用いた。また、他の試薬は、試薬特級品又は一級品を用いた。

4. 装置 吸収スペクトルと吸光度の測定には、日本分光製 JASCO UV-570 型紫外可視分光光度計と 1.0 cm の石英セルを用いた。また、pH の調整には、堀場製作所製 HORIBA pH METER D-52 を用いた。

5. 検討方法

5-1. 種々の金属イオンとの反応に関する検討法

10.0 ml メスフラスコにそれぞれ 5 × 10⁻⁵ mol/dm³ OBTMPyP (f=1.04 f はモル濃度係数) 溶液 2.0 ml と buffer (pH 9.0 ホウ酸ナトリウム (0.05 mol/dm³)-ホウ酸 (0.2 mol/dm³, 塩化ナトリウム (0.05 mol/dm³) 含む) 緩衝液) 2.0 ml と加えて混合したものに、4 μg/ml 金属イオン溶液 (Cu²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Fe³⁺ 最終濃度で、それぞれ、1.26, 1.22, 1.36, 1.46, 1.36, 1.43 × 10⁻⁵ mol/dm³ に相当) を 2.0 ml 加え、buffer (pH 9.0) を用いてメスアップし、混和した後、25°C で 10 分放置後、吸収スペクトルを測定した。なお、OBTMPyP 最終濃度は、1.0 × 10⁻⁵ mol/dm³ (f=1.04)

となる。

5-2. Cu^{2+} , Zn^{2+} に関する検討における操作法

10.0 ml メスフラスコに $5 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ OB-TMPyP ($f=1.04$) 溶液 2.0 ml と buffer (pH 9.0) 2.0 ml とを加えて混合したものに、それぞれ $4 \mu\text{g/ml}$ 金属イオン溶液 (Cu^{2+} , Zn^{2+}) 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0, 2.5 ml を加えたもの (最終濃度でそれぞれ, Cu^{2+} 0, 0.126, 0.252, 0.378, 0.504, 0.629, 0.755, 1.003, 1.007, 1.132, 1.259 及び $1.573 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ に相当, Zn^{2+} では, 0, 0.122, 0.244, 0.366, 0.488, 0.610, 0.732, 0.984, 1.101, 1.223, $1.529 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ に相当) を添加し, buffer (pH 9.0) を用いてメスアップし, 混和した後, 室温で 10 分放置後に各々紫外・可視分光光度計を用いて測定した。なお, OB-TMPyP 最終濃度は, $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ ($f=1.04$) となる。

5-3. Co^{2+} , Mn^{2+} に関する検討における操作法

10.0 ml メスフラスコに $5 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ OB-TMPyP ($f=1.04$) 溶液 2.0 ml と buffer (pH 9.0) 2.0 ml とを加えて混合したものに、それぞれ $4 \mu\text{g/ml}$ 金属イオン溶液 (Co^{2+} , Mn^{2+}) 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 ml を加えたもの (最終濃度でそれぞれ, Co^{2+} 0, 0.272, 0.543, 0.815, 1.086 及び $1.357 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ に相当, Mn^{2+} では, 0, 0.291, 0.582, 0.881, 1.164 及び $1.456 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ に相当) を加え, buffer (pH 9.0) を用いてメスアップし, 混和した後, 室温で 10 分放置後に各々紫外・可視分光光度計を用いて測定した。ここでも, なお, OB-TMPyP の最終濃度は, $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ ($f=1.04$) とした。

結果及び考察

1. 様々な pH における OB-TMPyP の吸収スペクトル Haberle らは, OB-TMPyP は, ポルフィリンの 4 個のピロール環の窒素原子に結合した水素イオンの数により, OB-TMPyP, H-OBTMPyP, H_2 -OBTMPyP, H_3 -OBTMPyP, H_4 -OBTMPyP の分子種があり, それぞれの吸収極大は 579.8 nm, 540.0 nm, 493.1 nm, 501.2 nm, 504.6 nm にあると報告している。¹¹⁾ pH 2.0 付近では, 極大吸収が 500 nm の H_3 -OBTMPyP のみが主に観測され, pH 3-6 の酸性領域では吸収極大が 493-500 nm 付近にある H_2 -OBTMPyP 及び H_3 -OBTMPyP が混在していると

考えられる。このうち pH 6 では主に H_2 -OBTMPyP のみの吸収スペクトルがみられた。また, pH 8.0 以上でソーレー帯の極大吸収が 540 nm の化学種を H-OBTMPyP と報告している。¹¹⁾ この検討でも同様の結果が得られた (Fig. 2)。この時の pH による 495 nm と 540 nm の吸光度変化を Fig. 3 に示した。Figure 3 に示すように, pH 5.0 以下では, H_3 -OBTMPyP の 495 nm の吸光度はほぼ一定の値を示し

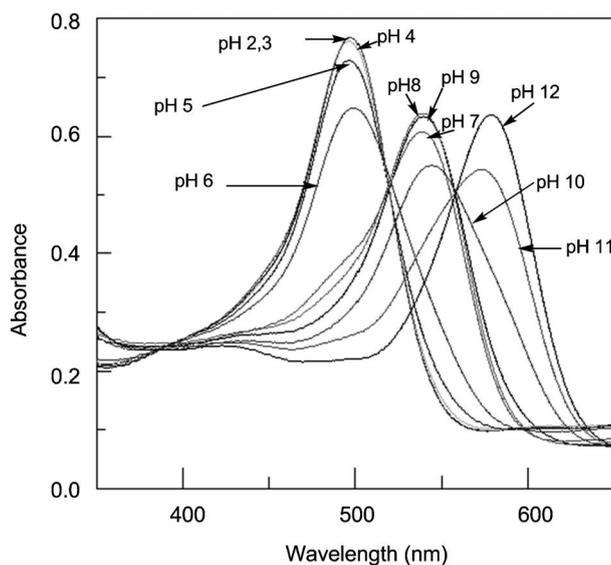


Fig. 2. Effect of pH on Absorption Spectra of H_n -OBTMPyP H_n -OBTMPyP final concentration; $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, 25°C.

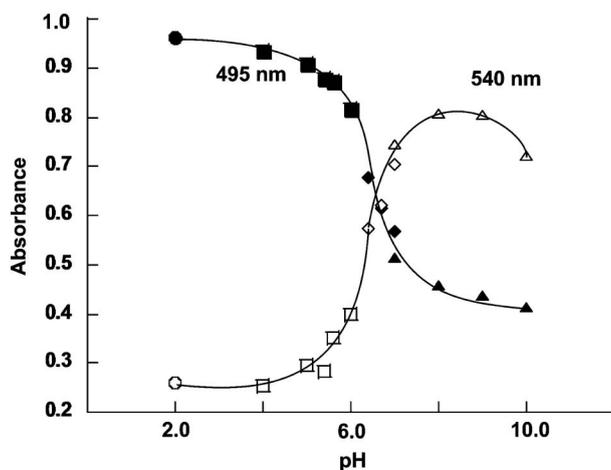


Fig. 3. Effect of pH on the Absorbances at 495 nm and 540 nm of H_n -OBTMPyP

H_n -OBTMPyP final concentration; $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, 25°C ●, ○: CH_3COONa (1 mol/dm³)-HCl (1 mol/dm³) Buffer (pH 2.0), ■, □: CH_3COONa (0.1 mol/dm³)- CH_3COOH (0.1 mol/dm³) buffer (pH 4.0-6.0), ◆, ◇: NaH_2PO_4 (0.01 mol/dm³)- K_2HPO_4 (0.01 mol/dm³) buffer (pH 7.0-7.5), ▲, △: $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (0.05 mol/dm³)- HBO_3 (0.2 mol/dm³, containing NaCl (0.05 mol/dm³)) buffer (pH 7.5-10.0).

た。一方、pH 8.0–9.0 では、H-OBTMPyP の 540 nm の吸光度もほぼ一定な値を示した。pH 10 以上では、540 nm の吸光度が減少したが、これは、OBTMPyP が生成し、580 nm における吸光度が上昇したためである。また、pH 5.0–8.0 の間では H₂-OBTMPyP と H-OBTMPyP の混液が、pH に応じて様々な割合で生成しているものと考えた。以下の実験では、金属イオンとの反応性が高いと考えられる H-OBTMPyP のみが生成している pH 9.0 を用いることにした。なお、以下の検討では、金属と反応していない OBTMPyP, H-OBTMPyP, H₂-OBTMPyP, H₃-OBTMPyP 及び H₄-OBTMPyP の各分子種を、特に化学種の特定が必要でなければ OBTMPyP として一括して表すことにする。

2. 様々な金属イオンとの反応性 H-OBTMPyP と金属イオン (Cu²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Fe³⁺) との錯体形成についての検討を行った。なお、いずれも金属イオンも H-OBTMPyP とのモル比 1 : 1 以上になるよう添加した。

pH 9.0 において、H-OBTMPyP に様々な金属イオンを添加して得られた吸収スペクトルを Fig. 4 に示した。Figure 4 に示したように Cu²⁺ イオン, Zn²⁺ イオン, Co²⁺ イオン, Mn²⁺ イオンを添加すると OBTMPyP の吸収スペクトルに変化が観測された。これは、金属イオンとの錯体形成によるものと考えた。しかし、Fe³⁺ イオンの添加では吸収スペクトルに特に変化はなく、錯体は形成されていないと考えた。これは、2 価と 3 価、どちらも取り得

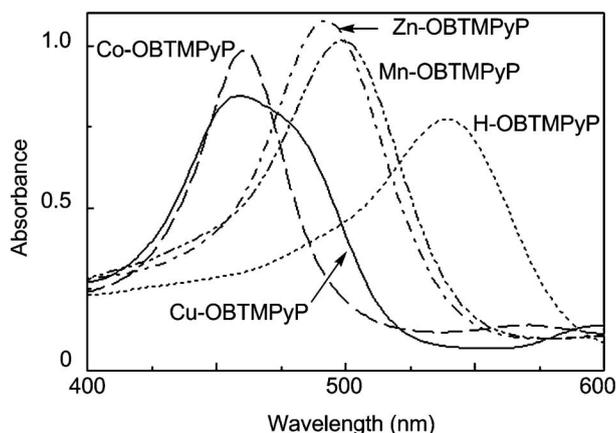


Fig. 4. The Absorption Spectra of Various Metal-OBTMPyP
Metal-OBTMPyP final concentration; 1.0×10^{-5} mol/dm³, pH 9.0, 25 °C, 10 min. metal ion; 4 µg/ml, 2.0 ml Added in 10.0 ml volumetric flask.

る Co, Mn, Fe の場合、初めに 2 価イオンの溶液を加えないと TMPyP, TCPP あるいは TSPP と反応せず、反応後が空気中の酸素による自動酸化により 3 価の金属ポルフィリンのみが観測されることより、Fe³⁺ イオンの添加では OBTMPyP 錯体は生成しなかったものと考えた。したがって、ここで測定されたスペクトルは、Co³⁺-と Mn³⁺-OBTMPyP によるものと考えられる。特に、Mn³⁺-OBTMPyP については、Haberle らの報告¹¹⁾による λ_{\max} と一致した。なお、Fe³⁺ イオンにアスコルビン酸を加え Fe²⁺ イオン溶液とし、OBTMPyP と反応させたが、スペクトル変化は観測されず、鉄イオンは反応しないものと考えた。

特に Cu²⁺ イオン, Zn²⁺ イオン, Co²⁺ イオン, Mn²⁺ イオンを添加した場合については吸収極大などに大きな変化がみられた。Ni²⁺ については、錯体は生成しているが、反応条件が最適とは言えず、わずかに生成した Ni-OBTMPyP と未反応の H-OBTMPyP の共存状態のスペクトルであると考えた。

Table 1 に今回得られた様々な金属 OBTMPyP のソーレー帯の吸収極大波長とモル吸光係数をまとめた。このうち、OBTMPyP, Cu-OBTMPyP と Mn-OBTMPyP による値は、Haberle らの報告とほぼ一致した。¹¹⁾ Table 1 に示すように、金属-OBTMPyP

Table 1. λ_{\max} of the Soret Band and Molar Absorptivity of Various Metal-OBTMPyP

	λ_{\max} of the Soret band	molar absorptivity (dm ³ /mol·cm)
H ₂ -OBTMPyP (pH 2.0)	498 nm (500 nm) ¹¹⁾	9.7×10^4 (10.0×10^4) ¹¹⁾
H-OBTMPyP (pH 8.0)	539 nm (540 nm) ¹¹⁾	8.1×10^4 (8.1×10^4) ¹¹⁾
Cu ²⁺ -OBTMPyP (pH 8.0)	459 nm (457 nm) ¹¹⁾	9.0×10^4 (9.1×10^4) ¹¹⁾
Zn ²⁺ -OBTMPyP (pH 8.0)	486 nm (—)*	1.1×10^5 (—)*
Ni ²⁺ -OBTMPyP (pH 8.0)	Not observed (—)*	Not calculated (—)*
Mn ³⁺ -OBTMPyP (pH 8.0)	498 nm (497.6 nm) ¹¹⁾	6.9×10^4 (6.9×10^4) ¹¹⁾
Fe ²⁺ -OBTMPyP (pH 8.0)	Not observed (—)*	Not calculated (—)*
Co ²⁺ -OBTMPyP (pH 8.0)	460 nm (—)*	9.8×10^4 (—)*

()¹¹⁾: values from Ref 11). (—)*: not available in literature.

のソーレー帯の λ_{\max} は、金属によりそれぞれ異なっていることがわかった。

ついで、様々な水溶性ポルフィリンで定量法が検討されている銅イオンを用いて定量条件の検討等を行うことにした。

なお、臭素化されていない TMPyP と今回の検討で用いた金属イオンを反応させても、室温、10 分間では、反応は全く進行せず、金属-MPyP は生成しなかった。これらの金属イオンと TMPyP の反応を進行させるには、1 時間以上の環流が必要であった。

3. 銅イオンによる定量条件の検討 pH 9.0 において 25°C、反応時間 10 分間で様々な濃度の銅イオン溶液を OB-TMPyP に加えて得られた Cu-OB-TMPyP の吸収スペクトルを Fig. 5 に示した。

Figure 5 に示すように、添加する銅イオン濃度の上昇に従って、540 nm の OB-TMPyP の吸光度は減少し、新たに 459 nm の吸光度が上昇した。4 $\mu\text{g/ml}$ 以上の銅イオン標準液 2.0 ml を加えた時、540 nm の OB-TMPyP の peak は消失し、ソーレー帯の吸収極大は、540 nm から 459 nm に完全に移動した。459 nm に吸収極大を持つ吸収スペクトルは文献による Cu-OB-TMPyP のものと一致した。¹¹⁾

4. pH の影響 pH 2-9 の間で銅イオンと OB-TMPyP の反応性を検討し、その結果を Fig. 6 に示した。なお、この検討では、 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ の OB-TMPyP 1.0 ml に緩衝液 3.0 ml を加え、そこに 4.0 $\mu\text{g/ml}$ の銅イオン溶液を 1.0 ml を添加し吸収スペクトルを測定した。OB-TMPyP の pH による化学種の変化及び Cu-OB-TMPyP の λ_{\max} (459 nm) から考えると λ_{\max} を 540 nm に持つ H-OB-TMPyP のみが生成している pH 9.0 以上を用いた方がよいと考えられる。Figure 6 から明らかなように、pH 2.0 では、反応は終了しておらず、H₃-OB-TMPyP に起因するピークが観測された。pH 4.0 以上では、反応は完全に終了し吸収スペクトルは、ほぼ同じものとなった。データとして示していないが、2.0 $\mu\text{g/ml}$ の銅イオン 1.0 ml の添加では、未反応の OB-TMPyP に起因するピークが観測された。特に pH 5.0-8.0 の間では、未反応の H-, H₂-, H₃-OB-TMPyP が観測されるため、複雑な吸収スペクトルを示した。ここでは、完全に H-OB-TMPyP のみの生成する pH 9.0 を用いるのが最適と考えた。

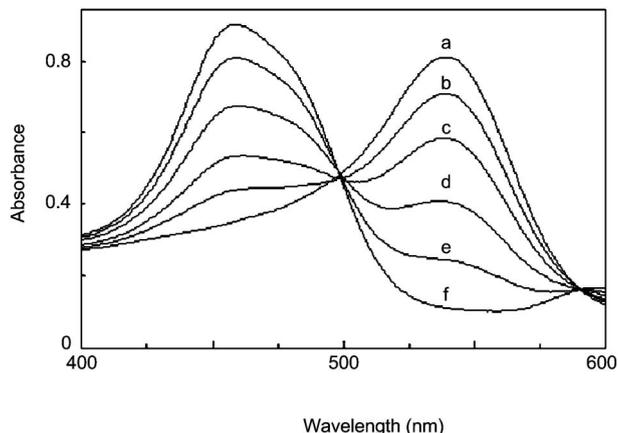


Fig. 5. Change of Absorption Spectra of H-OB-TMPyP by addition of Cu^{2+} Ion

H-OB-TMPyP final concentration; $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, pH 9.0, 25°C, 10 min, a; H_2O , Cu^{2+} ion, b; 1.6 $\mu\text{g/ml}$, c; 3.2 $\mu\text{g/ml}$, d; 4.8 $\mu\text{g/ml}$, e; 6.4 $\mu\text{g/ml}$, f; 8.0 $\mu\text{g/ml}$, 1.0 ml added in 10.0 ml volumetric flask.

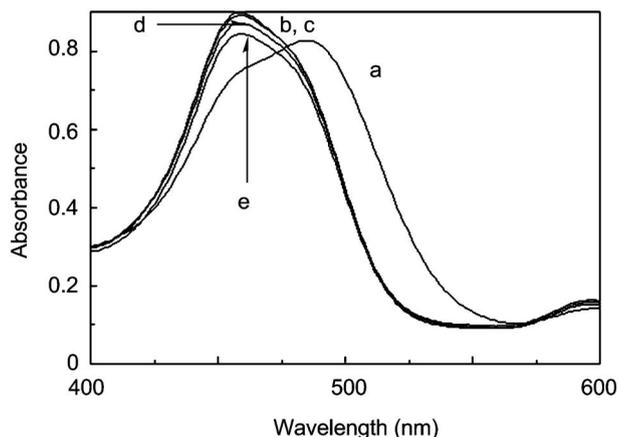


Fig. 6. Effect of pH for the Reaction of Cu^{2+} Ion and H_n-OB-TMPyP

H_n-OB-TMPyP final concentration; $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, Cu^{2+} ion; 4.0 $\mu\text{g/ml}$, 1.0 ml added in 5.0 ml final solution, 25°C, 10 min. a; pH 2.0, b; pH 4.0, c; pH 6.0, d; pH 8.0 e; 9.0.

5. 反応時間及び温度の影響 4. で示した条件下、OB-TMPyP 溶液と銅イオン溶液を混合しセルに入れ、Cu-OB-TMPyP の λ_{\max} (459 nm) で吸光度変化を、セルを吸光度計にセットしてから 25 分まで測定した (Fig. 7)。Figure 7 に示すように、0-25 分まで 459 nm の吸光度は一定の値を示した。この結果は、銅イオンと OB-TMPyP の反応は非常に速く進むことを示している。ここでは、10 分を反応時間とした。ここには、示していないが、反応 pH 9.0 を用いる限り 20-40°C まで、反応温度の影響はなく、Fig. 7 と同様な吸光度変化が観測された。

6. Cu^{2+} 濃度が OB-TMPyP との錯体形成に与え

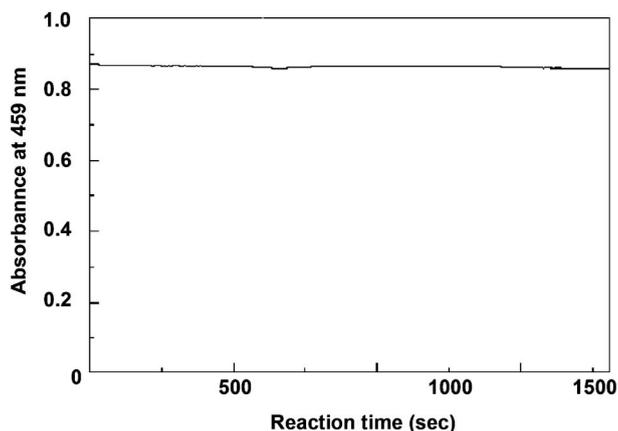


Fig. 7. Effect of Reaction Time for the Absorbance at 459 nm
H-OBTMPyP final concentration; 1.0×10^{-5} mol/dm³, Cu²⁺ ion; 4.0 μ g/ml, 2.0 ml added in 10.0 ml volumetric flask, pH 9.0, 25°C.

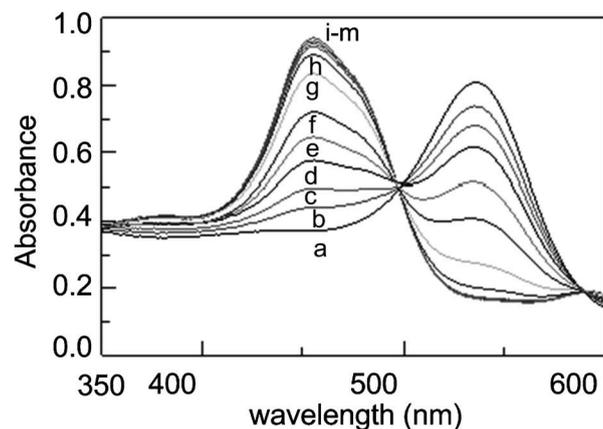
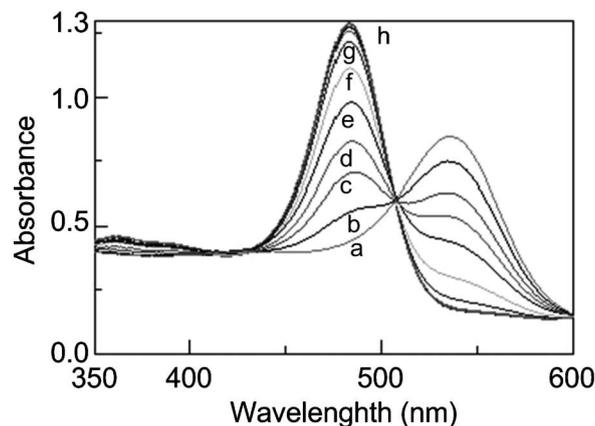


Fig. 9. Absorption Spectra and Calibration Curve for Zn²⁺
H-OBTMPyP final concentration; 1.1×10^{-5} mol/dm³, pH 9.0, 25°C, 10 min, a; H₂O, Zn²⁺ ion, b; 0.5 μ g/ml, c; 1.0 μ g/ml, d; 1.5 μ g/ml, e; 2.0 μ g/ml, f; 2.5 μ g/ml, g; 3.0 μ g/ml, h; 3.5 μ g/ml, i-m, 4.0 μ g/ml-8.0 μ g/ml, 2.0 ml added in 10.0 ml volumetric flask.

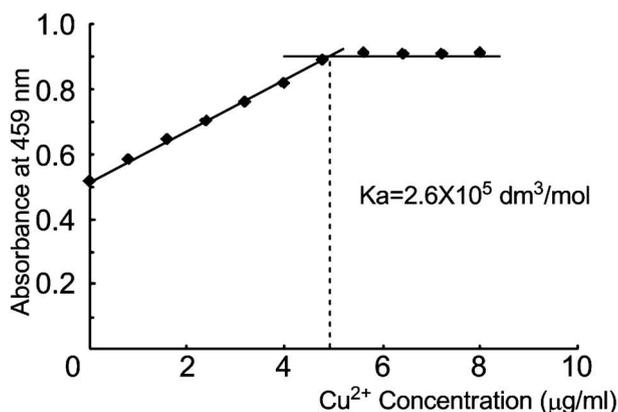


Fig. 8. Absorption Spectra and Calibration Curve for Cu²⁺ Ion
H-OBTMPyP final concentration; 1.0×10^{-5} mol/dm³, pH 9.0, 25°C, 10 min. a; H₂O, Cu²⁺ ion, b; 0.5 μ g/ml, c; 1.0 μ g/ml, d; 1.5 μ g/ml, e; 2.0 μ g/ml, f; 2.5 μ g/ml, g; 3.0 μ g/ml, h; 3.5 μ g/ml, i-m, 4.0 μ g/ml-8.0 μ g/ml, 2.0 ml added in 10.0 ml volumetric flask.

る影響 Cu-OBTMPyP の生成に対する Cu²⁺ (Cu(NO₃)₂ として) イオン濃度の影響について、吸収スペクトルと吸光度を用いて検討を行った。

測定したスペクトル及びそれぞれの溶液について 459 nm における吸光度を測定し作成した検量線を Fig. 8 に示した。

Figure 8 に示したように 0.5-5.0 μ g/ml の Cu²⁺ イオンに対し、良好な直線を示す検量線が得られた。また、この直線から得られた結合定数 (K_a) は 2.6×10^5 dm³/mol であった。さらに、銅イオンに対するモル吸光係数は 8.4×10^4 dm³/mol \cdot cm、変動係数は 2.8% ($n=10$) であった。

7. Zn²⁺ 濃度が OBTMPyP との錯体形成に与える影響 同様に、Zn-OBTMPyP の生成に対する Zn²⁺ (Zn(NO₃)₂ として) イオン濃度の影響について、吸収スペクトルと吸光度を用いて検討を行った。

測定したスペクトルを Fig. 9 に示した。

また、それぞれの溶液について 486 nm における吸光度を測定し検量線を作成したところ 0.5-5.2 μ g/ml の Zn²⁺ イオンに対し、良好な直線性を示す検量線が得られた。また、この検量線から得られた結

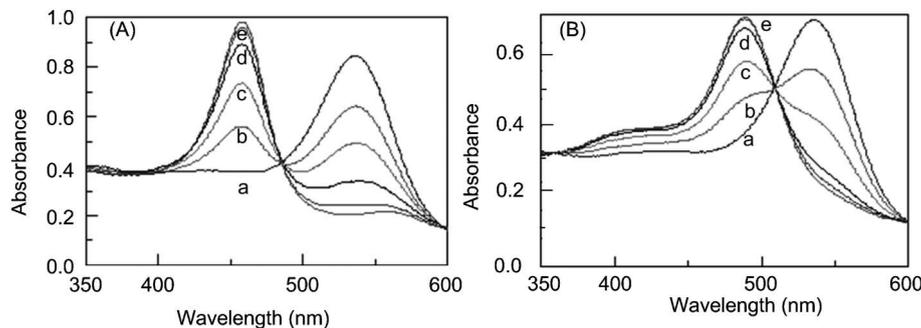


Fig. 10. Change of Absorption Spectra of H-OBTMPyP by Addition of Co²⁺ Ion (A) and Mn²⁺ Ion (B)

H-OBTMPyP final concentration; 1.0×10^{-5} mol/dm³, pH 9.0, 25°C, 10 min, a; H₂O, Co²⁺ ion or Mn²⁺ ion, b; 1.0 μg/ml, c; 2.0 μg/ml, d; 3.0 μg/ml, e; 4.0 μg/ml, 2.0 ml added in 10.0 ml volumetric flask.

合定数 (K_a) は 3.6×10^5 dm³/mol であった。

8. Co²⁺ 及び Mn²⁺ 濃度が OBTMPyP との錯体形成に与える影響 Co(NO₃)₂ と Mn(NO₃)₂ 溶液を用いてそれぞれ, Co²⁺ 及び Mn²⁺ イオン濃度の影響について, 同様に吸収スペクトルと吸光度を用いて検討を行った。

測定したスペクトルを Fig. 10 に示した。

また, Co²⁺ イオンについては, 460 nm における吸光度を測定し検量線を作成した。Mn²⁺ イオンについては 498 nm における吸光度を測定し検量線を作成した。これらのスペクトルは, ポルフィリン類と Co, Fe, Mn と反応する際, 2 価の金属イオンしか反応せず, 反応後, 空気中の酸素により酸化され 3 価になるのが一般的なため, 各々 Co³⁺-OBTMPyP 及び Mn³⁺-OBTMPyP によるものと考えた。特に Mn³⁺-OBTMPyP の λ_{\max} は, Haberle らの報告¹¹⁾ とほぼ一致した。検量線は, それぞれ, 1.6–5.2 μg の Co²⁺ イオン及び 1.6–5.6 μg の Mn²⁺ イオンに対し, 良好な直線性を示す検量線が得られた。また, それぞれ, 検量線から得られた結合定数 (K_a) は, それぞれ, 2.7×10^5 dm³/mol 及び 2.9×10^5 dm³/mol であった。

ま と め

このように, OBTMPyP は, 25°C 以上であれば, 様々な金属イオンと短時間で錯体を生成することがわかった。近年, ポルフィリンの中には, HPLC 用の金属イオンの吸光度用定量試薬として用いられているものがある。^{12–14)} H-OBTMPyP の余分な試薬の添加なしで, 25°C で容易に金属イオンと反応するという性質は, HPLC 用の試薬と

しての可能性を示すものである。

H-OBTMPyP は, 25°C 以上で余分な試薬の添加なしで, 様々な金属イオンと容易に反応することを示した。得られた金属 OBTMPyP のモル吸光係数は約 1×10^5 であり, それらのソーレー帯の極大吸収波長は, それぞれ異なる値を示した。以上の結果より, H-OBTMPyP は, 様々な金属イオンの吸光度定量用試薬として利用できる可能性があることがわかった。

謝辞 この実験の一部は, 科学研究費補助金 (基盤研究 (C) 課題番号 20590035) により行われた。

REFERENCES

- 1) Itoh J., Yotsuyanagi T., Aomura K., *Anal. Chim. Acta*, **74**, 53–60 (1975).
- 2) Ishii H., Koh H., *Talanta*, **24**, 417–420 (1977).
- 3) Watanabe H., Ohmori H., *Talanta*, **28**, 774–776 (1981).
- 4) Makino T., Itoh J., *Clin. Chim. Acta*, **111**, 1–8 (1981).
- 5) Ishii H., Koh H., Satoh, K., *Anal. Chim. Acta*, **136**, 347–352 (1982).
- 6) Ishii H., Satoh, K., Satoh Y., Koh H., *Talanta*, **29**, 545–550 (1982).
- 7) Komata M., Itoh J., *Talanta*, **35**, 723–724 (1988).
- 8) Tabata M., *Analyst*, **11**, 141–144 (1987).
- 9) Tabata M., Nishimoto J., Kusano T., *Talanta*, **46**, 703–709 (1998).
- 10) Richards R. A., Hammons K., Joe M., Mis-

-
- kelly G. M., *Inorg. Chem.*, **35**, 1940–1944 (1996).
- 11) Haberle I. N., Liochev S. I., Spasojević, I., Fridovich I., *Arch. Biochem. Biophys.*, **343**, 225–233 (1997).
- 12) Shi Z., Fu C., *Talanta*, **44**, 593–604 (1997).
- 13) Suzuki T., Matsumoto K., Tsunoda K., Akaiwa H., *J. Chromatogr. A*, **786**, 269–274 (1997).
- 14) Igarashi S., Ide N., Takagai Y., *Anal. Chim. Acta*, **424**, 263–269 (2000).