

Title	自記分光光度計を利用した分光光度滴定法によるアルギニンおよびヒスチジンのCu(II)錯滴定
Sub Title	Recording spectrophotometric titration of arginine and histidine with Cu (II) using a new titration apparatus
Author	鹿島, 哲(Kashima, Tetsu) 河村, 倫子(Kawamura, Michiko) 谷原, 範子(Tanihara, Noriko) 小出, 裕子(Koide, Yuko)
Publisher	共立薬科大学
Publication year	1984
Jtitle	共立薬科大学研究年報 (The annual report of the Kyoritsu College of Pharmacy). No.29 (1984. ) ,p.1- 9
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	原報
Genre	Technical Report
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000029-0001">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000029-0001</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

## 自記分光光度計を利用した分光光度滴定法による アルギニンおよびヒスチジンの Cu(II) 錯滴定\*

鹿島 哲, 河村倫子, 谷原範子, 小出裕子

### Recording spectrophotometric titration of arginine and histidine with Cu(II) using a new titration apparatus

Tetsu KASHIMA, Michiko KAWAMURA, Noriko TANIHARA  
and Yuko KOIDE

(Received September 14, 1984)

Using a recording spectrophotometer with a new titration apparatus, titration curves and absorbances are recorded, and the end point is determined with the titration curve or the value of the maximum absorbance.

5—20  $\mu$ mol of arginine or histidine is titrated with 0.01 M Cu(II) standard solution with an error of about two per cent using an automatic microburet. The molar ratio of bonding Cu(II) to the amino acid is one to four in weak basic solution, one to two in near neutral and one to one in weak acidic.

#### 1. まえがき

前報<sup>1)</sup>に引き続き分光光度滴定法の改良と応用を検討した。まず反応を更に円滑に行なわせるため、滴定セル内の試料溶液を攪拌する方法を更え、分光光度計のセル室下部にマグネチックスターラーの攪拌装置を作製して組込んで攪拌するようにした。金属イオンをアミノカルボン酸であるキレート試薬で滴定する例は多いが、その逆の滴定例はあまり行なわれていないので、アルギニンおよびヒスチジンを硝酸銅(II)標準液で錯滴定してみたので報告する。

#### 2. 実験

##### 2.1 試薬

Arginine, 宝興産製, S級。2 $\times$ 10<sup>-3</sup> または 5 $\times$ 10<sup>-3</sup> mol/kg の水溶液として使用。

Histidine, 宝興産製, S級。2 $\times$ 10<sup>-3</sup> または 5 $\times$ 10<sup>-3</sup> mol/kg の水溶液として使用。

Copper(II)nitrate, Cu(II)(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O, 特級試薬, 0.01 M の銅濃度の硝酸溶液を滴定の標準溶液として使用。

Sodium perchlorate, NaClO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, メルク製, 分析用, 0.1 M 水溶液として使用。

Carbonate buffer, JIS の標準緩衝溶液に, CO<sub>2</sub> を含まない 0.1 M NaOH を加えて pH 8.2 としたもの。

##### 2.2 装置

\* 日本薬学会第 104 年会 (1983年 3 月) で発表

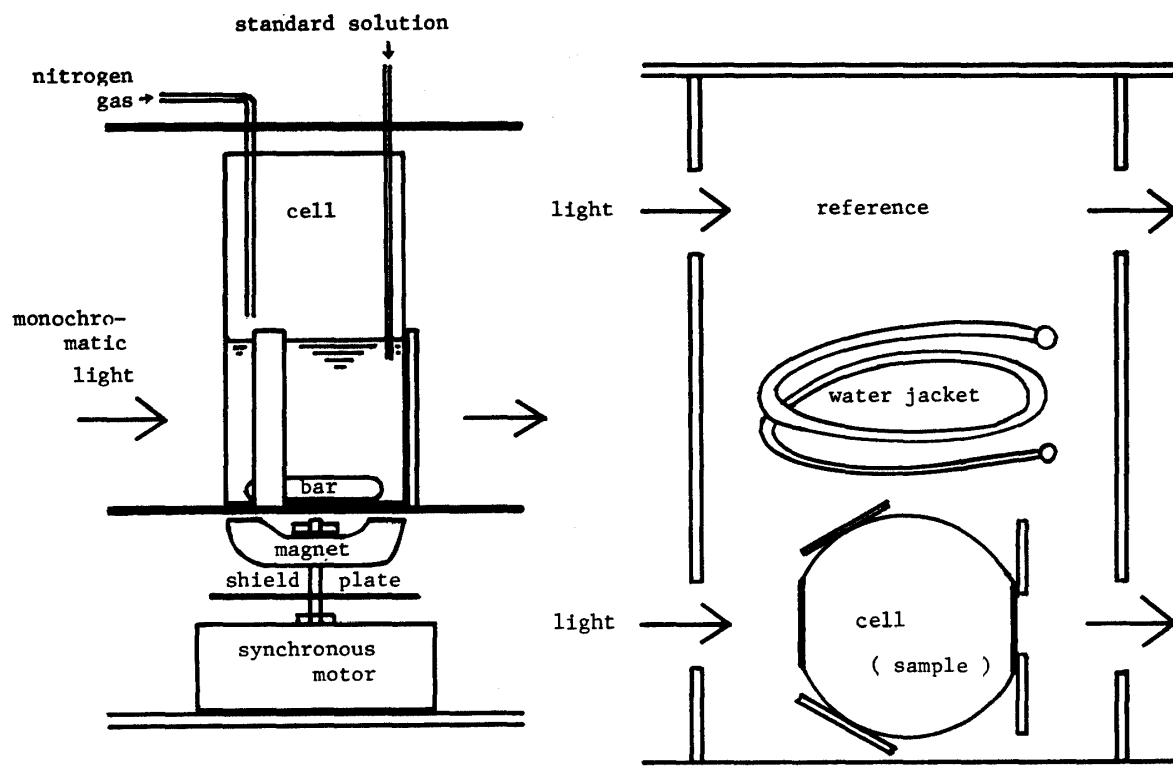


Fig. 1 Titration apparatus

自記分光光度計：島津デジタルダブルビーム分光光度計 UV 210-A 型，吸収スペクトルおよび吸光度を記録。

光度滴定装置：Fig. 1 に示したもので，光路に光学石英板を用いた石英ガラス製の円筒形滴定セルと，シンクロナスモーターで 105 RPM で回転するマグネチックスターラーを持った装置で，分光光度計のセル室にセットできるようにしたもの。

自動ビュレット：ラジオメーター AB Ue 型（全量 2.5 ml，最小目盛 1  $\mu$ l），滴下速度 14 min/ml または 28 min/ml。

pH メーター：Metrohm pH meter, E 603。

電子天秤：Sartorius 1265 型，秤量 400 g，感量 1 mg；風防およびプリンター付き。

## 2.3 実験方法ならびに実験結果

### 2.3.1 アルギニン

アルギニンの  $5 \times 10^{-3}$  mol/kg 溶液，2 g を電子天秤で滴定セルに秤りとり，同じモル量の炭酸塩緩衝液を加えて約 33 g としたもの ( $3 \times 10^{-4}$  mol/kg) の吸収スペクトル，および Cu(II) 標準溶液並びに滴定後の試料溶液のスペクトルを Fig. 2 に示した。

アルギニンの  $5 \times 10^{-3}$  mol/kg 溶液を 2 g または 4 g を直接滴定セルに電子天秤で秤りとり，そのままか，10倍モル量程度の  $\text{NaClO}_4$  を加えて水で約 35 g にした試料を 255 nm の単色光（波長幅 1 nm）を使って Cu(II) 標準溶液で滴定したときの滴定曲線を Fig. 3 に示す。次にアルギニン試料溶液を 1 g または 2 g とり，それに同モル量程度の炭酸塩緩衝液を加えて滴定したときの滴定曲線を Fig. 4 に示す。

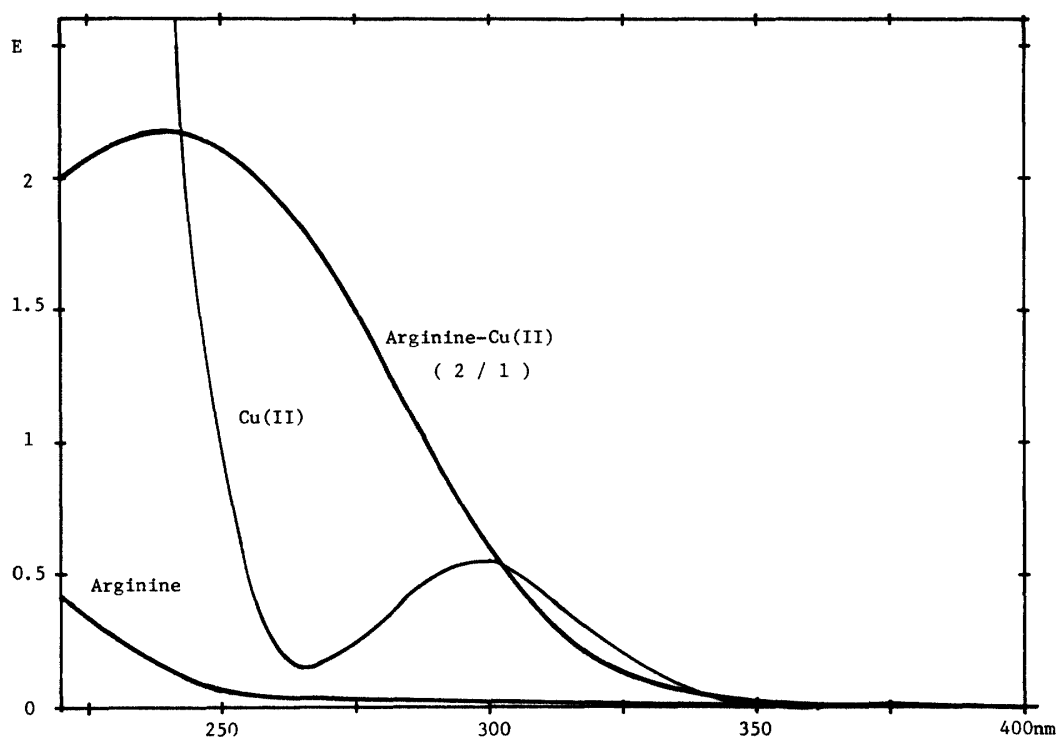


Fig. 2 Absorption spectra of arginine, Cu(II) and the complex solution

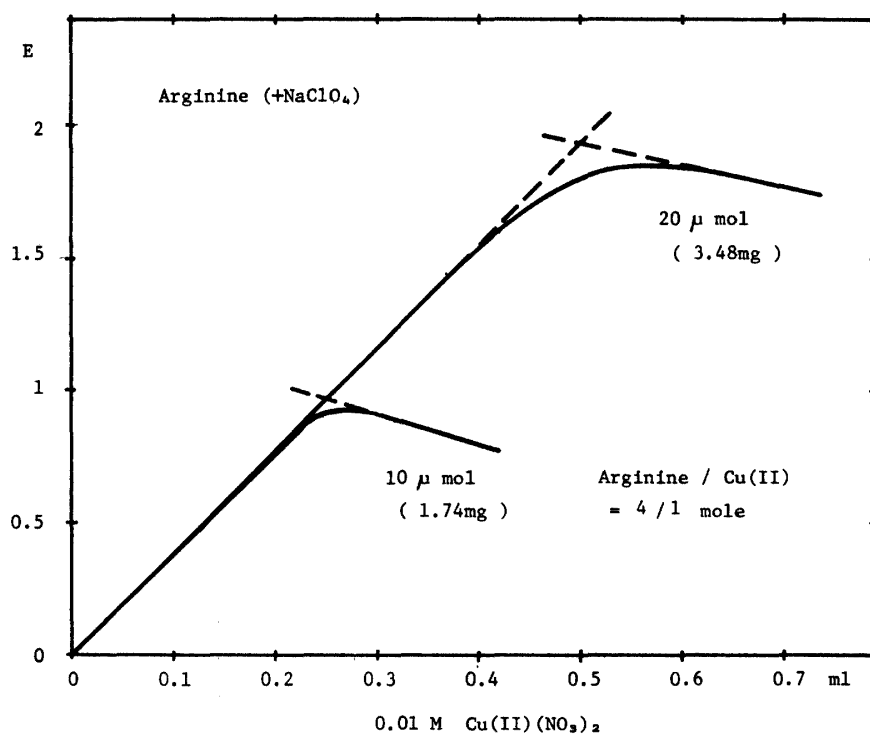


Fig. 3 Spectrophotometric titration curves of arginine in weak basic solution (255nm)

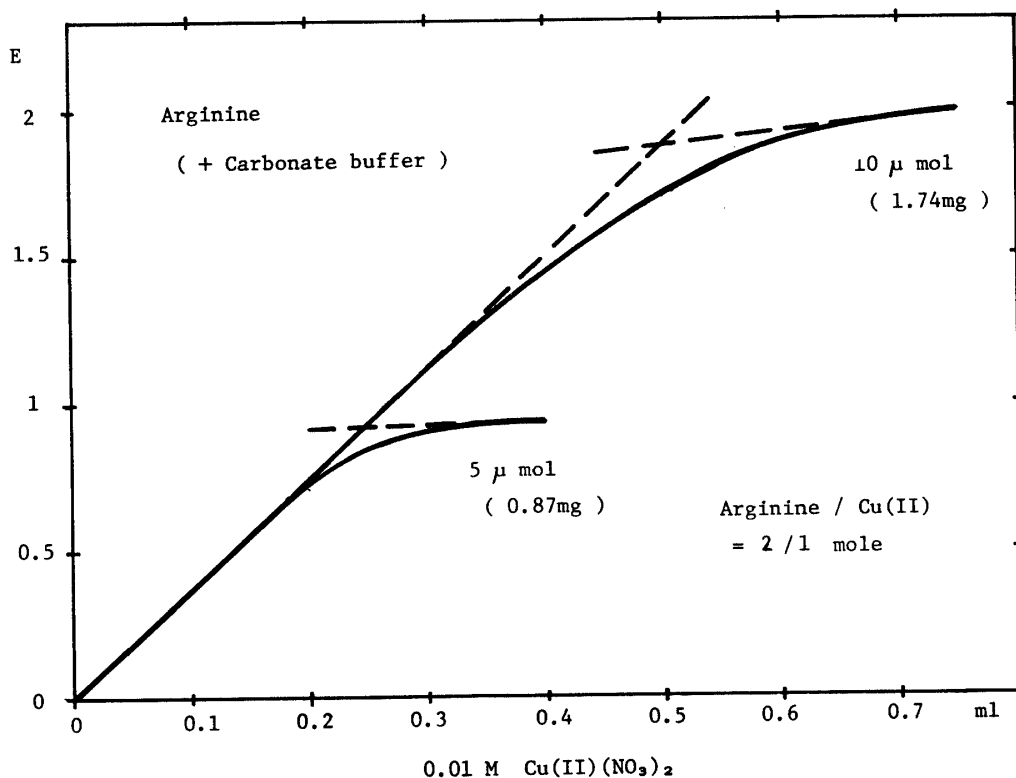


Fig. 4 Spectrophotometric titration curves of arginine in near neutral solution (255nm)

Table I Spectrophotometric titration of Arginine with 0.01 M Cu(II), 255nm

+ NaClO <sub>4</sub> (1-3 × 10 <sup>-3</sup> M)				+ Carbonate buffer (pH 9.4, 1-3 × 10 <sup>-3</sup> M)			
Arginine	Arginine	Cu(II)	Found	Arginine	Arginine	Cu(II)	Found
0.005m	weight	solution	%	0.005m	weight	solution	%
1.999 g	1.741mg	0.251ml	96.5%	1.002 g	1.745mg	0.253ml	97.1%
2.002	1.744	0.253	97.2	1.004	1.749	0.250	95.8
2.006	1.747	0.253	97.0	1.000	1.742	0.254	97.7
2.000	1.742	0.261	100.4	1.003	1.747	0.256	98.2
2.003	1.745	0.261	100.2	1.001	1.744	0.251	96.2
(about 10 μ mol)		Av.	98.3%	(about 5 μ mol)		Av.	97.0%
(3 × 10 <sup>-4</sup> M)		SD	1.88%			SD	0.96%
3.999 g	3.483mg	0.514ml	98.8%	1.998 g	1.740mg	0.514ml	98.8%
4.001	3.485	0.511	98.3	2.000	1.742	0.503	96.7
4.006	3.489	0.517	99.2	2.000	1.742	0.509	97.9
4.004	3.487	0.505	97.0	2.006	1.747	0.503	96.7
4.003	3.486	0.506	97.2	2.002	1.743	0.491	94.4
(about 20 μ mol)		Av.	98.1%	(about 10 μ mol)		Av.	96.9%
		SD	0.97%			SD	1.65%

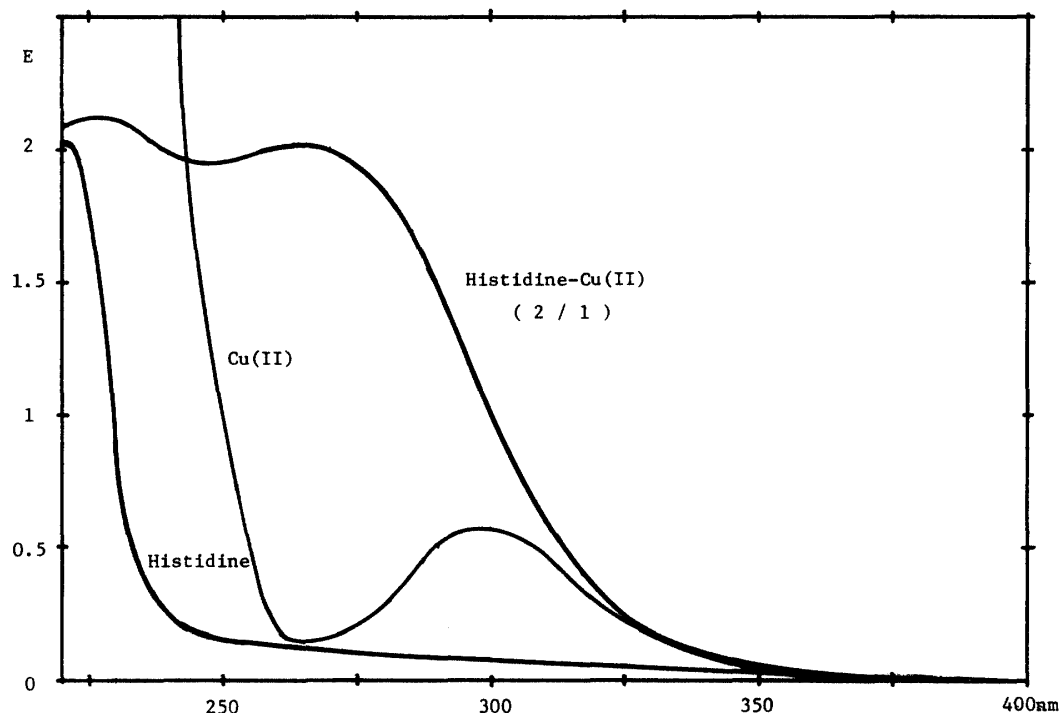


Fig. 5 Absorption spectra of histidine, Cu(II) and the complex solution

以上の成績をまとめたものが Table I で、試料そのままか、 $\text{NaClO}_4$  を加えて滴定したときは、 $\text{Cu(II)}$  とアルギニンとのモル比が 1 対 4 のところで終点がえられ、炭酸塩緩衝溶液を加えて滴定したときは 1 対 2 のところで終点がえられ、2% 以内の誤差で滴定できた。

### 2.3.2 ヒスチジン

ヒスチジンの  $5 \times 10^{-3}$  mol/kg 溶液、2 g を滴定セルに秤りとり、同じモル量程度の炭酸塩緩衝溶液を加えた約 33 g の試料 ( $3 \times 10^{-4}$  mol/kg) の吸収スペクトルおよび  $\text{Cu(II)}$  標準溶液並びに滴定後の試料溶液のスペクトルを Fig. 5 に示した。

ヒスチジンの  $5 \times 10^{-3}$  mol/kg 溶液を 2 g または 4 g とり、そのままか、10 倍モル量程度の  $\text{NaClO}_4$  を加え、260 nm (波長幅 1 nm) の単色光を使って  $\text{Cu(II)}$  で滴定したときの滴定曲線を Fig. 6 に示した。この場合、吸収極大のところを終点とすると、 $\text{Cu(II)}$  とヒスチジンのモル比は 1 対 4 となった。ヒスチジン試料溶液 1 g または 2 g とり、同モル量程度の炭酸塩緩衝溶液を加えて滴定したときの滴定曲線を Fig. 7 に示す。 $\text{Cu(II)}$  とヒスチジンのモル比が 1 対 2 のところで終点がえられた。

以上の結果をまとめたものを Table II に示したが、ヒスチジンも  $\text{Cu(II)}$  標準溶液を使って 2% 以内の誤差で滴定できるといえよう。

なお、アルギニンまたはヒスチジンに酢酸塩緩衝溶液を加え弱酸性 (pH 5) で 260 nm の単色光を使って滴定したところ、 $\text{Cu(II)}$  とのモル比が約 1 対 1 のところで終点がえられたが、あまり良い成績がえられなかった。

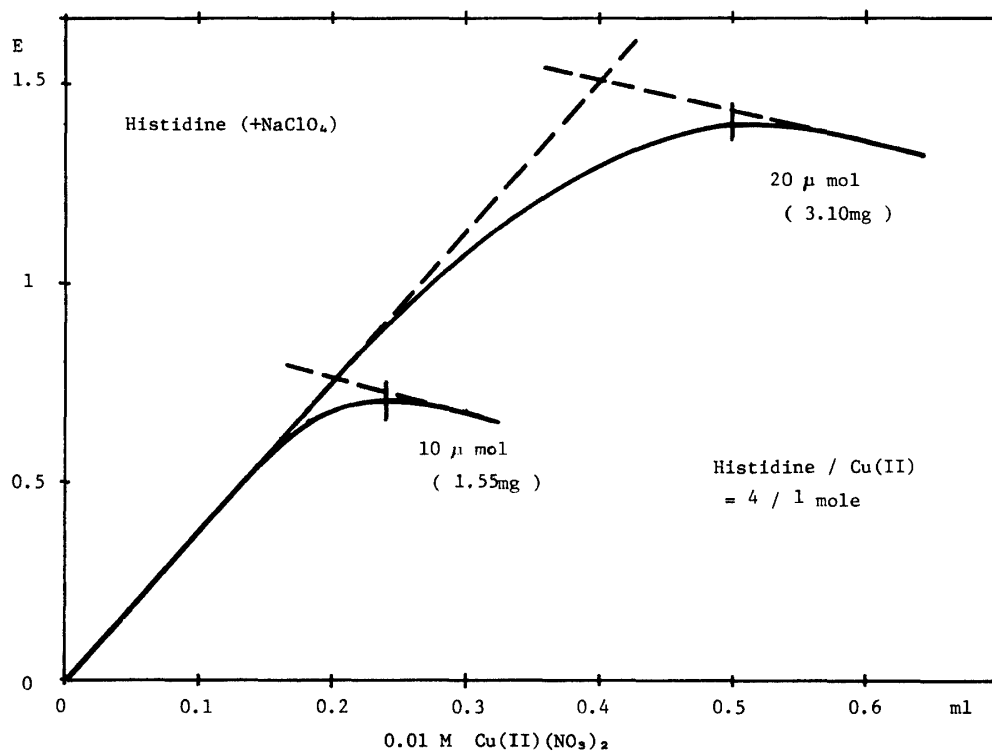


Fig. 6 Spectrophotometric titration curves of histidine in weak basic solution (260nm)

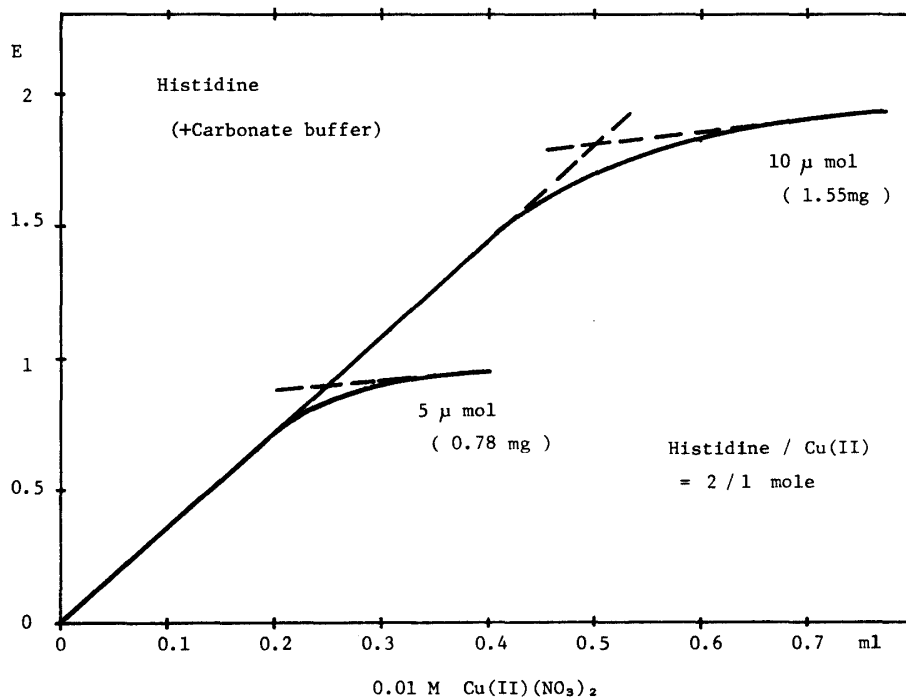


Fig. 7 Spectrophotometric titration curves of histidine in near neutral solution (260nm)

Table II Spectrophotometric titration of Histidine with 0.01 M Cu(II), 260nm

+ NaClO <sub>4</sub> (1-3×10 <sup>-3</sup> M)					+ Carbonate buffer (pH9.5, 1-3×10 <sup>-3</sup> M)			
Histidine 0.005m	Histidine weight	Cu(II) solution	Cu(II) at λ max	Found %	Histidine 0.005m	Histidine weight	Cu(II) solution	Found %
0.002 g	3.107mg	0.203ml	0.254ml	97.6%	1.003 g	1.557mg	0.249ml	95.8%
2.006	3.113	0.200	0.257	98.6	1.005	1.560	0.247	95.0
1.999	3.102	0.203	0.257	98.9	1.005	1.560	0.251	96.5
2.002	3.107	0.201	0.256	98.4	1.001	1.553	0.252	96.9
2.005	3.112	0.203	0.258	99.0	0.998	1.548	0.253	97.3
(about 10 μ mol)			Av.	98.5%	(about 5 μ mol)		Av.	96.3%
(3×10 <sup>-4</sup> M)			SD	0.57%			SD	0.91%
4.007 g	6.215mg	0.419ml	0.509ml	97.7%	2.003 g	3.107mg	0.503ml	96.7%
4.000	6.204	0.411	0.507	97.5	2.008	3.115	0.503	96.0
3.998	6.200	0.406	0.504	97.0	1.999	3.100	0.497	95.6
4.000	6.201	0.406	0.509	97.9	1.998	3.099	0.514	98.8
4.006	6.213	0.406	0.506	97.2	1.999	3.100	0.498	95.8
(about 20 μ mol)			Av.	97.5%	(about 10 μ mol)		Av.	96.3%
			SD	0.36%			SD	1.31%

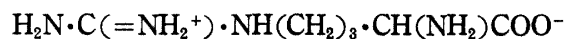
### 3. 考 察

前報では滴定セル上部のスターラーでかき混ぜたが、反応を円滑に進行させるにはやや不適当だったので、今回はマグネチックスターラーを使い、その駆動部分を分光光度計のセル室に入れた。しかし、その部分が狭いため 4 W のシンクロナスマーターより大きいものを入れることができなかつた。その回転数は 60 RPM より多いものがえられなかつたので、ナイロンギアを組合わせて 105 RPM とし、28 min/ml の遅い速度で標準溶液を加えることにより、今回の遅い反応に対応することができた。なお、滴定を長時間連続して行なうときは、ウォータージャケットに 25°C の水を通して温度の上昇を防ぎ、窒素ガスを通じて空気中の酸素の影響を防ぐことが望ましい。

試料溶液の濃度は mol/kg 単位でつくり、滴定セルに重量で秤りとしたので温度の影響を受けず、容量によるより 1 ケタ以上の正確さで試料を採ることができた。ただし、滴定セルを電子天秤で 1 mg の精度で秤りとするときは風防内で行う必要があつた。

光度滴定に使う波長は通例試料と生成物との吸収の差が極大の波長を使うが、今回の例ではその波長における標準溶液 Cu(II) の吸収が影響するうえ、pH による変動も加わるので、むしろ Cu(II) の吸収の弱い 255~265 nm の単色光を使うことによって良い結果をうるることができた。その波長による吸収の変化は Cu(II) の可視部の吸収バンドを使うより大きかつた<sup>18)</sup>。

アルギニンの水溶液中における構造は Greenstein ら<sup>2),3)</sup>によれば大部分次のような状態である。



それが溶液が酸性になるにつれて、次の電子状態のもの割合が増加する。





自体に基づく吸収が増加するので、あまり多量加えることができないため pH が 1 程度変化するのが避けられなかった。

#### 4. 結 論

自記分光光度計のセル室下部にマグネチックスターラーを組込んだ光度滴定装置をつくり、毎分 105 回転でかきまぜ、28 分に 1 ml の速度で自動ビュレットから標準溶液を加えることによって、反応速度の遅い反応をも微量で分光光度滴定することができた。

アルギニンおよびヒスチジン、5~20  $\mu$  mol (0.8~4 mg) を 0.01 M Cu(II) 標準溶液で滴定したところ、2%以内の誤差で定量できた。滴定の結果から Cu(II) とそれらアミノ酸の結合モル比は弱塩基性のときは 1 対 4、ほぼ中性のときは 1 対 2、弱酸性のときは 1 対 1 といえよう。

#### 文 献

- 1) 鹿島 哲, 河村倫子, 熊谷佳子: 共立薬大年報, **28**, 17 (1983).
- 2) J.P. Greenstein, M. Winitz: "Chemistry of Amino Acids," John Wiley & Sons (1961).
- 3) N.C. Li, E. Doody: *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 4184 (1952).
- 4) N.C. Li, E. Doody: *ibid.*, **76**, 211 (1954).
- 5) The Chemical Society: "Stability Constants of Metal-ion Complexes" (1964).
- 6) L.W. Birch, J.T. Harris: *Biochem. J.*, **24**, 564 (1930).
- 7) P. Brooks, N. Davidson: *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 2118 (1960).
- 8) R. Leberman, B.R. Rabin: *Nature*, **183**, 746 (1959).
- 9) 湊 顕, 小木曾健人, 星野英雄: 薬誌, **85**, 596 (1965).
- 10) N.C. Li, B.E. Doody, J.M. White: *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 6859 (1957).
- 11) J.T. Edsall, G. Felsenfeld, DeW.S. Goodman, F.R.N. Gurd: *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 3054 (1954).
- 12) D.D. Perrin: *Nature*, **184**, 1868 (1959).
- 13) M.A. Leonard: "Photometric Titrations", "Comprehensive Analytical Chemistry", Edited by G. Svehla, Vol. VIII, Chap. III (1977), Elsevier Sci. Publ. Co., Amsterdam.