

## ヒドロキシクマリンの過ヨウ素酸塩による酸化反応に及ぼす金属イオンの接触効果

山田 真吉<sup>®</sup>, 伴 和敏, 村田 旭\*

(1991年2月8日受理)

酢酸塩緩衝液中で、クマリンのヒドロキシ誘導体の過ヨウ素酸塩による酸化反応速度を蛍光光度法で研究した。9種の誘導体のうちで、オルトジヒドロキシ誘導体だけが過ヨウ素酸塩により酸化されて黄色無蛍光生成物を与え、この反応は金属イオンによる接触効果を受けた。過ヨウ素酸ナトリウムによる4-メチル-6,7-ジヒドロキシクマリンの酸化反応の接触反応経路の速度定数の解析から、この接触効果は律速段階前の平衡で金属イオンがクマリンとモル比1:1の組成の反応活性な錯体を生成することに起因するとの結果を得た。最大の接触効果を示した銅(II)について、蛍光光度法による定量条件を検討したところ、検出限界0.8 ng/mlで65 ng/mlまでの接触分析が可能であった。

### 1 緒 言

定量目的成分の関与する化学反応が平衡状態に至る過渡現象に着目する反応速度法は、平衡状態の差異だけに着目する方法に比べ選択性に優れている場合が多く、この特長を生かした定量法が多数考案されている<sup>1)~3)</sup>。とりわけ、主(指示)反応への触媒効果を利用する接触分析法は、選択性の高さに加えて感度の向上を反応速度法に付与する方法として注目されている<sup>1)~4)6)</sup>。

著者らは、ベンゾピロン環を含む有機試薬を用いる金属イオンの蛍光光度定量法の検討を続けてきているが、今回、クマリン(2H-1-ベンゾピラン-2-オン)のヒドロキシ誘導体の幾つかが酢酸塩緩衝液中で過ヨウ素酸塩により酸化され黄色の無蛍光生成物を与え、この反応が金属イオンによる接触効果を受けることを見いだした。そこで、この反応系を用いる金属イオンの接触分析法を開発する目的で、この酸化反応(主反応)及び接触反応の速度を測定解析し、得られた速度式から金属イオンによる接触効果の機構を解明することを試みた。その結果、オルトジヒドロキシ基を有するクマリンだけが蛍光消光反応を示し、金属イオンによる接触効果がこれらのクマリンとの律速段階前の錯形成平衡で説明できると共に、本反応系が微量の銅の定量に応用可能なことが明らかになったので報告する。

### 2 実 験

#### 2.1 試 薬

クマリン溶液: クマリンの3-ヒドロキシ、4-ヒドロキシ、4,5-ジヒドロキシ、4,7-ジヒドロキシ、6,7-ジヒドロキシ、7,8-ジヒドロキシ、4-メチル-5,7-ジヒドロキシ、4-メチル-6,7-ジヒドロキシ及び4-メチル-7,8-ジヒドロキシ誘導体は既報<sup>7)</sup>の方法で合成し、メタノール溶液として用いた。

メタノールは活性炭を加えて蒸留したものを、その他の試薬は特級品をそのまま用いた。

#### 2.2 装 置

蛍光スペクトルの測定には日立650-10S型、蛍光強度の測定には120W中圧水銀ランプを光源とする日立203型分光蛍光光度計を、吸収スペクトルの測定には日立124型、吸光度の測定には日立139型分光光度計を用いた。pHの測定には東亜電波IM-20E型pHメーターを用いた。アドバンテック東洋LCH-36型恒温水槽を用い、反応溶液の温度を $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ に保った。

#### 2.3 実験操作

あらかじめ恒温水槽中で $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ に保っておいたクマリンのメタノール溶液40 mlに0.1 M ( $M = \text{mol dm}^{-3}$ )酢酸塩緩衝液2 ml, 試水4 ml, 過ヨウ素酸塩水溶液2 mlをこの順序で添加した。過ヨウ素酸塩を加えた瞬間を反応開始時とし、任意の時間間隔で反応溶液を

\* 静岡大学工学部: 432 静岡県浜松市城北3-5-1

恒温水槽から採り出し、中圧水銀ランプの 366 nm の輝線で励起し、それぞれのクマリンの発光極大波長での蛍光強度の経時変化を測定した。蛍光強度の対照標準として、1.5, 2.0 あるいは 5.0  $\mu\text{g/ml}$  のキニーネの 0.05 M 硫酸水溶液を用いた。それ自体の蛍光が弱いか反応に伴う蛍光強度の変化量が少ないクマリンについては、400 nm での吸光度の経時変化を測定した。

#### 2.4 反応速度の解析

反応溶液の水素イオン濃度が緩衝されており、クマリン (S) に対して酸化剤 (Ox) が大過剰存在し、金属イオン (M) がこの反応に触媒として作用する場合には、この反応を擬一次反応として取り扱うことができる。従ってクマリンの減少速度式は

$$-d[S]/dt = k_{(Ox, H, M)} [S] \quad (1)$$

で表される。ここで、 $k_{(Ox, H, M)}$  は過ヨウ素酸塩、水素イオン及び金属イオン濃度を定数として含む擬一次の条件速度定数である。反応開始時、反応開始  $t$  秒後及び反応完結後の溶液の蛍光強度をそれぞれ  $F_0$ ,  $F_t$  及び  $F_\infty$  で表すと、式(1)は

$$\ln \{(F_0 - F_\infty)/(F_t - F_\infty)\} = k_{(Ox, H, M)} t \quad (2)$$

と書き替えられ、 $\ln(F_t - F_\infty) \sim t$  のプロットの傾きより  $k_{(Ox, H, M)}$  が得られる。種々の条件下で求めた条件速度定数に対する過ヨウ素酸塩、水素イオン及び金属イオン濃度依存性から速度式を得た。吸光光度法で反応を測定した場合は、式(2)の蛍光強度を吸光度に読み替えて、同様の解析を行った。

### 3 結果と考察

#### 3.1 クマリンの酸化反応

**3.1.1 スペクトルの経時変化** クマリンを  $8.0 \times 10^{-5}$  M, 過ヨウ素酸カリウムを  $8.3 \times 10^{-4}$  M 含む溶液について pH 5.77 での蛍光及び吸収スペクトルの経時変化を測定した。6,7-ジヒドロキシ, 7,8-ジヒドロキシ, 4-メチル-6,7-ジヒドロキシ及び 4-メチル-7,8-ジヒドロキシ誘導体については、励起及び発光極大波長には変化が見られないものの、蛍光強度は時間の経過とともに指数関数的に減少し、最終的には蛍光が消失した。同時に、これらの反応では可視域の短波長側で吸光度の増加が観察され、溶液は黄色に着色した。一方、3-ヒドロキシ, 4-ヒドロキシ, 4,5-ジヒドロキシ, 4,7-ジヒドロキシ及び 4-メチル-4,5-ジヒドロキシ誘導体については何の変化も観察されなかった。これらの結果は、クマリン

が過ヨウ素酸塩により酸化されて黄色無蛍光生成物を与えるためには、クマリンがオルト位にある二つのヒドロキシ基を有することが不可欠であることを示している。4,5-ジヒドロキシクマリンのように、二つのヒドロキシ基が互いにペリ位にある誘導体にはこの反応は観察されなかった。又、微量の金属イオンが共存すると、クマリンの酸化反応が金属イオン量に比例して加速され、最終生成物の蛍光及び吸収スペクトルが主反応のそれと一致することから、金属イオンはこの反応に触媒として作用していることが認められた。

**3.1.2 速度式** 中圧水銀ランプの 366 nm の輝線で励起した場合、反応に伴う蛍光強度の変化量は 4-メチル-6,7-ジヒドロキシ, 7,8-ジヒドロキシ, 6,7-ジヒドロキシ誘導体の順で減少した。各誘導体について最適な測定波長(蛍光光度法では各誘導体の発光極大波長, 吸光光度法では 400 nm)を選定し、主反応の速度を測定解析した。  $8.0 \times 10^{-5}$  M のクマリンを含む溶液について、過ヨウ素酸カリウムを  $(3.3 \sim 8.3) \times 10^{-4}$  M, pH を 4.6~6.3 の範囲で変化させ条件速度定数  $k_{(Ox, H)}$  を求め、過ヨウ素酸カリウム及び水素イオン濃度に対する依存性を解析した。その結果(解析の手順は 3.2 を参照)、いずれのクマリンについても主反応の速度式として

$$-d[S]/dt = k_1 [S][IO_4^-] + k_2 [S][IO_4^-]/[H^+] \quad (3)$$

を、25.0°C での速度定数として以下の値を得た。6,7-ジヒドロキシクマリン:  $\log(k_1/M^{-1} s^{-1}) = -0.47$ ,  $\log(k_2/s^{-1}) = -6.63$  (蛍光光度法, 測定波長: 450 nm),  $\log(k_1/M^{-1} s^{-1}) = -0.56$ ,  $\log(k_2/s^{-1}) = -6.49$  (吸光光度法); 7,8-ジヒドロキシクマリン:  $\log(k_1/M^{-1} s^{-1}) = -0.22$ ,  $\log(k_2/s^{-1}) = -6.01$  (蛍光光度法, 測定波長: 428 nm),  $\log(k_1/M^{-1} s^{-1}) = -0.40$ ,  $\log(k_2/s^{-1}) = -6.14$  (吸光光度法); 4-メチル-6,7-ジヒドロキシクマリン:  $\log(k_1/M^{-1} s^{-1}) = -0.48$ ,  $\log(k_2/s^{-1}) = -6.72$  (蛍光光度法, 測定波長: 438 nm); 4-メチル-7,8-ジヒドロキシクマリン:  $\log(k_1/M^{-1} s^{-1}) = -0.60$ ,  $\log(k_2/s^{-1}) = -6.09$  (吸光光度法)。なお、クマリンの  $pK_{a1}$  値<sup>8)</sup> {6,7-ジヒドロキシクマリン: 7.42; 7,8-ジヒドロキシクマリン: 8.07; 4-メチル-6,7-ジヒドロキシクマリン: 7.72; 4-メチル-7,8-ジヒドロキシクマリン: 8.26。いずれも 20°C, イオン強度 0.1 (NaClO<sub>4</sub>), メタノール 50% v/v} から判断して、本実験条件下ではクマリンはほぼ定量的にプロトン非解離型で存在していると考えられる。蛍光光度法と吸光光度法で求めた速度定数は厳密には一致していないが、測定及び解析の過程で生じる誤

差を考慮すれば, 両者の間には有意の差はないと考えられる。

**3・1・3 酸化剤の影響**  $8.0 \times 10^{-5}$  M の 4-メチル-6,7-ジヒドロキシクマリンを含む溶液について, pH 4.6~6.3 で過ヨウ素酸ナトリウムを  $(0.8 \sim 8.0) \times 10^{-4}$  M の範囲で, pH 6.0~6.5 でヨウ素酸カリウムを  $(0.8 \sim 2.0) \times 10^{-4}$  M の範囲で変化させ, 酸化剤の違いが主反応の速度に及ぼす影響を検討した。3・1・2 と同様の測定解析から得られた速度式は, いずれの酸化剤についても, 過ヨウ素酸カリウムの場合と一致したが, 速度定数には差異が見られた {過ヨウ素酸ナトリウム:  $\log(k_1/M^{-1}s^{-1}) = -0.42$ ,  $\log(k_2/s^{-1}) = -6.64$ ; ヨウ素酸カリウム:  $\log(k_1/M^{-1}s^{-1}) = -0.93$ ,  $\log(k_2/s^{-1}) = -8.54$ }. すなわち, 過ヨウ素酸塩による酸化反応はヨウ素酸塩に比べて速いが, 対陽イオンの違いによる速度の差は認められなかった。溶媒への溶解性を考慮して, 以下の実験には過ヨウ素酸ナトリウムを用いることとした。

### 3・2 接触反応の速度

**3・2・1 銅(II) による接触反応**  $8.0 \times 10^{-5}$  M の 4-メチル-6,7-ジヒドロキシクマリンを含む溶液について, 過ヨウ素酸ナトリウムを  $(0.4 \sim 5.0) \times 10^{-3}$  M, pH を 4.3~6.5, 銅(II) を  $0 \sim 5.0 \times 10^{-6}$  M の範囲で変化させ, 条件速度定数  $k_{(Ox,H,Cu)}$  を求めた。

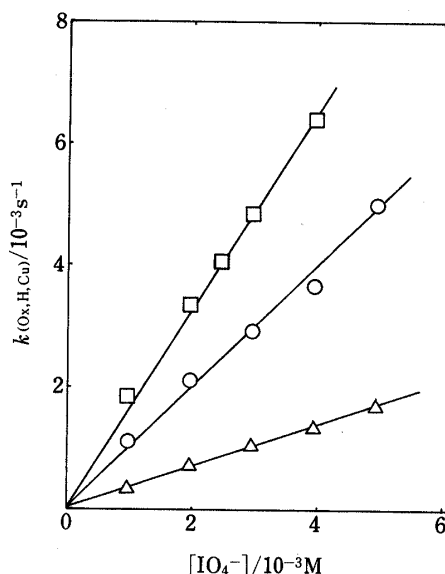
pH 及び銅(II) 濃度一定の条件で求めた条件速度定数を過ヨウ素酸ナトリウム濃度に対してプロットしたところ (一例を Fig. 1 に示す)。原点を通る直線関係が得られた。この直線の傾きを  $k_{(H,Cu)}$  で表すと,  $k_{(Ox,H,Cu)}$  の過ヨウ素酸ナトリウム濃度依存性は

$$k_{(Ox,H,Cu)} = k_{(H,Cu)} [IO_4^-] \quad (4)$$

で与えられる。次に, 銅(II) 濃度一定の条件で, この直線の傾きを水素イオン濃度の逆数に対してプロットしたところ (一例を Fig. 2 に示す), 切片を有する直線関係が得られた。直線の傾きは銅(II) 濃度が増すにつれて大きくなったが, 切片は実験誤差内で一致した。この直線の切片を  $k_1$ , 傾きを  $k_{(Cu)}$  で表すと  $k_{(H,Cu)}$  の水素イオン濃度依存性は

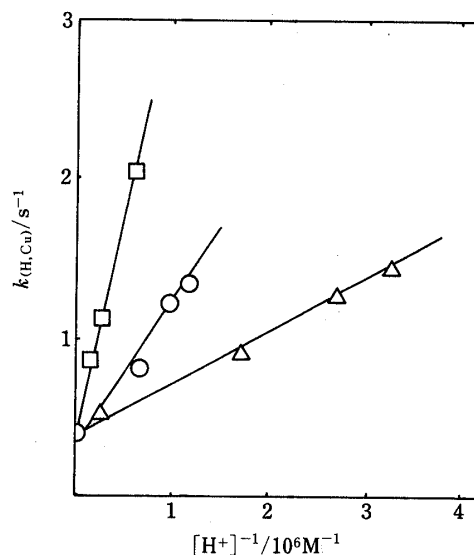
$$k_{(H,Cu)} = k_1 + k_{(Cu)} / [H^+] \quad (5)$$

で与えられる。この直線の傾きを銅(II) 濃度に対してプロットしたところ, Fig. 3 に示すような切片を有する直線関係が得られた。この直線の切片を  $k_2$ , 傾きを  $k_3$  で表すと,  $k_{(Cu)}$  の銅(II) 濃度依存性は



**Fig. 1** Dependence of  $k_{(Ox,H,Cu)}$  on the concentration of  $NaIO_4$

4-Methyl-6,7-dihydroxycoumarin:  $8.0 \times 10^{-5}$  M;  
Cu(II):  $2.5 \times 10^{-6}$  M; pH: 4.31( $\Delta$ ), 5.37( $\circ$ ), 5.77( $\square$ )



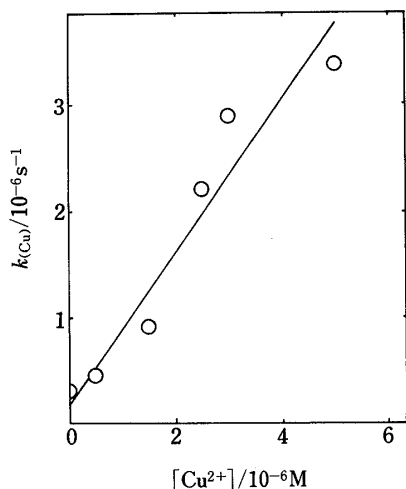
**Fig. 2** Dependence of  $k_{(H,Cu)}$  on the reciprocal concentration of hydrogen ion

4-Methyl-6,7-dihydroxycoumarin:  $8.0 \times 10^{-5}$  M;  
Cu(II)/ $10^{-6}$  M: 0.5( $\Delta$ ), 1.5( $\circ$ ), 3.0( $\square$ )

$$k_{(Cu)} = k_2 + k_3 [Cu^{2+}] \quad (6)$$

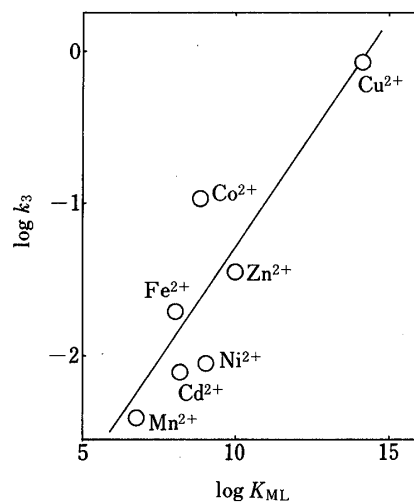
で与えられる。

以上の結果より, 銅(II) による接触反応の速度式と



**Fig. 3** Dependence of  $k_{(\text{Cu})}$  on the concentration of copper(II) ion

4-Methyl-6,7-dihydroxycoumarin:  $8.0 \times 10^{-5}$  M



**Fig. 4** Plot of  $\log k_3$  against  $\log K_{\text{ML}}$ .

$K_{\text{ML}}$ : formation constant of 1:1 pyrocatecholate complex

して

$$-d[\text{S}]/dt = k_1[\text{S}][\text{IO}_4^-] + k_2[\text{S}][\text{IO}_4^-]/[\text{H}^+] + k_3[\text{S}][\text{IO}_4^-][\text{Cu}^{2+}]/[\text{H}^+] \quad (7)$$

を、 $25^\circ\text{C}$ での速度定数として  $\log(k_1/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}) = -0.47$ ,  $\log(k_2/\text{s}^{-1}) = -6.74$ ,  $\log(k_3/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}) = -0.14$ を得た。式(3)と比較すると、式(7)の第三項に銅(II)イオンによる接触効果が反映されている。接触効果は反応溶液のpHが高いほど大きくなり、3.3に示す銅(II)イオンの定量に用いたpH 7.17では、銅(II)イオンによって反応は約  $10^{6.5}$ 倍促進される。なお、式(7)の  $k_1$ 及び  $k_2$ は  $3 \cdot 1 \cdot 2$ で得た値と実験誤差内で一致した。

**3.2.2 接触反応機構** 銅(II)以外の金属イオンによる接触効果も式(7)で表されると仮定し、4-メチル-6,7-ジヒドロキシクマリン  $8.0 \times 10^{-5}$  M、過ヨウ素酸ナトリウム  $6.0 \times 10^{-4}$  M、pH 5.77 という条件で、幾つかの二価金属イオンについて、条件速度定数  $k_{(\text{Ox,H,M})}$ の金属イオン濃度依存性の解析から  $k_3$ 値を求めた。Fig. 4に、 $k_3$ の対数値と4-メチル-6,7-ジヒドロキシクマリンの配位官能基に相当するピロカテコールとそれぞれの金属イオンとの1:1錯体の生成定数  $K_{\text{ML}}$ <sup>9)10)</sup>の対数値とのプロットを示す。速度定数の対数値と生成定数の対数値とが直線関係にあるというFig. 4の結果は、金属イオンの接触効果が律速段階前のクマリンとの錯形成平衡に帰属できることを示している。すなわち、クマリンが過ヨウ素酸塩により酸化され黄色無蛍光生成物を与え

る反応に微量の金属イオンが共存すると、律速段階前の平衡で金属:クマリンのモル比が1:1の組成の錯体が生成し、この錯体はクマリン自体よりも速く過ヨウ素酸塩により酸化されるという機構でこの反応が進行するものと考えられる。酸化生成物に関する知見を得るために、過酸化水素によるクマリンの酸化反応を検討したところ、酢酸塩緩衝液中では酸化反応は進行しないがホウ酸塩緩衝液中では銅(II)イオンによる接触効果が観察され、黄色生成物が得られた。従って、酸化生成物には、過酸化水素によるアリザリン、ピロカテコール、タイロンのようなオルトジヒドロキシ芳香族化合物の酸化反応生成物に対して提案されている<sup>1)</sup>ようなオルトキノ型のカマリンが推測される。配位能の低いこのようなクマリンが生成することにより、金属イオンは触媒として再生される。

### 3.3 銅の定量

#### 3.3.1 検量線

3.2で得た結果を基に、最大の接触効果を示した銅(II)について本反応系を用いる定量条件を検討し、反応溶液の条件を以下のように設定して検量線を作成した。4-メチル-6,7-ジヒドロキシクマリン及び過ヨウ素酸ナトリウム濃度:それぞれ  $1.0 \times 10^{-5}$  M及び  $5.0 \times 10^{-4}$  M; pH: 7.17 (酢酸塩緩衝液); 溶媒組成: メタノール 83% v/v; 反応温度:  $25^\circ\text{C}$ ; 測定波長: 438 nm (励起波長 366 nm); 蛍光強度の対照標準: 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のキニーネの0.05 M 硫酸水溶液。条件速度定数を用いた場合と反応開始1分後と4分後の蛍光強度の

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

Tolerance limit/µg	Ion
0.01	EDTA
1	Fe(II) <sup>†</sup>
10	Ni(II) <sup>†</sup> , Mn(II) <sup>†</sup> , Sc(III) <sup>†</sup> , Se(VI) <sup>†</sup> , V(V), Cr(III), Cr(VI), Zn(II), Cd(II), Al(III), La(III), Ag(I), Hg(II), Zr(IV), W(VI), As(III), Sb(III)
100	Pb(II), Ga(III), In(III), Ge(IV), Cl <sup>-</sup> , Br <sup>-</sup> , carbonate, oxalate
1000	Mo(VI), Se(IV), NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>

† In the presence of 100 µg of oxalate

差を用いた場合について検量線を作成したが、いずれについても  $1 \times 10^{-6}$  M までの銅について直線関係が得られた。2,4,6 及び  $8 \times 10^{-7}$  M の銅について、それぞれ 5 回の繰り返し定量を行った場合の相対標準偏差の平均値は 1.3% であった。検出限界をから試験値の標準偏差の 3 倍で定義すると 0.8 ng/ml となり、フレーム AAS あるいは ICP-AES に匹敵する<sup>11)</sup>感度であった。

**3.3.2 共存イオンの影響** 1 µg の銅(II)の定量に及ぼす共存イオンの影響を、代表的な重金属と陰イオンについて検討した。その結果を Table 1 に示す。±5% 以上の誤差を与える場合を妨害とした。コバルト(II)は 0.01 µg, 鉄(II)は 0.1 µg, ニッケル, マンガン(II), スカンジウム, セレン(VI)は 1 µg までの共存

しか許容されなかったが、100 µg のシュウ酸をマスキング剤として用いると、鉄については 1 µg, その他の金属については 10 µg までの共存が許容された。

(1988 年 10 月, 日本分析化学会)  
(第 37 年会において一部発表)

## 文 献

- 1) K. B. Yatsimirskii: "Kinetic Methods of Analysis", (1966), (Pergamon, Oxford).
- 2) H. B. Mark, Jr., G. A. Rechnitz: "Kinetics in Analytical Chemistry", (1968), (Interscience, New York).
- 3) M. Kopanica, V. Stará: "Kinetic Methods in Chemical Analysis" in "Comprehensive Analytical Chemistry", Vol. 13, Edited by G. Svehla, (1983), (Elsevier, Amsterdam).
- 4) H. A. Mottola: "Kinetic Aspects of Analytical Chemistry", (1988), (John Wiley, New York).
- 5) 田端正明, 中野恵文, 河野拓治: ふんせき, **1988**, 347.
- 6) 中野恵文, 河野拓治: ふんせき, **1987**, 317.
- 7) 日本化学会編: "実験化学講座", 21 卷 III (下), p. 198(1958), (丸善).
- 8) 村田 旭: 未発表.
- 9) D. D. Perrin: "Stability Constants of Metal-Ion Complexes-Part B-Organic Ligands", IUPAC Chemical Data Series, No. 22, (1979), (Pergamon Press, Oxford).
- 10) A. E. Martell, R. M. Smith: "Critical Stability Constants", Vol. 3, (1977), (Plenum Press, New York).
- 11) 日本化学会編: "実験化学ガイドブック", p. 332 (1984), (丸善).



**Catalytic effect of metal ions on the oxidation of hydroxycoumarins with periodate.** Shinkichi YAMADA, Kazutoshi BAN and Akira MURATA (Faculty of Engineering, Shizuoka University, 3-5-1, Johoku, Hamamatsu-shi, Shizuoka 432)

Kinetics of the oxidation of hydroxycoumarins with periodate was studied fluorometrically in acetate buffer. Among the nine coumarins studied, only the *o*-dihydroxy derivatives were oxidized by periodate to give yellow-colored nonfluorescent product. The reaction was catalytically accelerated by trace amount of metal ion. In the presence of copper(II) ion, the rate law for the oxidation of 4-methyl-6,7-dihydroxycoumarin (S) with sodium periodate can be expressed as  $-d[S]/dt = k_1 \times [S][IO_4^-] + k_2[S][IO_4^-]/[H^+] + k_3[S][IO_4^-][Cu^{2+}]/[H^+]$ . The catalytic capacity of metal ion was reflected in the value of  $k_3$ . The linear relationship between the logarithmic values of  $k_3$  and the formation constant of 1:1 pyrocatecholate complex suggests that reaction involves a preequilibrium where a reactive complex is formed between metal ion and the coumarin. Employing this reaction system, copper(II) can be catalytically determined up to 65 ng/ml with the detection limit of 0.8 ng/ml.

(Received February 8, 1991)

***Keyword phrases***

oxidation of hydroxycoumarins with periodate; catalytic determination of copper;  
fluorometry.

---