

報 文

疎水性樹脂カラムを用いる金属ポルフィリンの錯形成時 及び金属置換反応時における中間体の会合定数の測定

戸田 敏^{®*}, 實政 熱*, 出口 俊雄*

Measurement of association constants between metal ions and porphyrin or
metalloporphyrins before their complexation or replacement reaction
using a hydrophobic resin column

Kei TODA, Isao SANEMASA and Toshio DEGUCHI*

*Department of Chemistry, Faculty of Science, Kumamoto University, Kurokami 2-39-1,
Kumamoto-shi, Kumamoto 860

(Received 18 December 1995, Accepted 9 February 1996)

The existence of intermediate species during complex formation between metal ions and porphyrin in aqueous solution was confirmed using an Amberlite XAD-2 resin column. When porphyrin solution is injected into the metal ion solution stream, the porphyrin adsorbed to the XAD column with the metal ions associated or complexed with it, and the decrease of the metal ion in solution is observed in the column eluant. Calculated from the decrease, the association constants of Cu^{2+} and Zn^{2+} with α , β , γ , δ -tetrakis(4-N-methylpyridyl)porphine (TMPyP) are 32 (10°C) and 57 M^{-1} (25°C), respectively. It was also confirmed that the intermediate exists before the metal replacement reaction between Cu^{2+} and the metalloporphyrin complex. The association constant in the Cu^{2+} /Zn-TMPyP system was especially large. As mentioned above, the interaction of the metal ion and the ligand before complex formation can be investigated by separating the ligand with the attached metal ion from the free metal ion using the hydrophobic interaction between the column and the ligand. These results were in good agreement with the values obtained by the kinetic method.

Keywords : porphyrin; metalloporphyrin; XAD column; association constants; kinetic constants.

1 緒 言

ポルフィリンが水溶液中で金属イオンを取り込み金属ポルフィリン錯体を形成する反応は生化学的にも重要であり興味深い。ポルフィリンのソーレーバンドと呼ばれる吸収バンドはモル吸光係数が20万~50万と非常に大

* 熊本大学理学部化学科: 860 熊本市黒髪 2-39-1

きく、ポルフィリン錯体を用いる金属イオンの比色定量は高感度分析法として有用である¹⁾²⁾。この錯形成反応は比較的遅く、反応メカニズムの解明や反応速度の改善^{3)~5)}について多くの研究が行われてきた。中でも、金属イオンがポルフィリン面内に取り込まれる際、sitting-atop (SAT) と呼ばれる中間体があるか否かが論議してきた。SAT 機構では、錯形成反応は次のように説明される。金属イオンはポルフィリンと会合し、い

ったん中間会合体を形成し、金属イオンと中間体との間で平衡が成立する。その後で金属イオンから配位水が脱離するとともにポルフィリン環の水素イオンが外れ、ポルフィリンの金属錯体が形成する。Fleischer らは、金属イオン共存下でポルフィリンのソーレーバンドがシフトすることから SAT の存在を主張した^{6,7)}。しかし、Burnham らはこれを否定し⁸⁾、その後多くの研究が行われてきたが^{9)~15)}、SAT の存在についてはいまだ完全に解明されてはいない。

当研究室では、従来、カラムを用いた会合定数決定法の研究を行ってきた。ゲルクロマトグラフィーを用いる Hummel-Dreyer 法¹⁶⁾は、高分子物質と低分子物質の両者の間の相互作用を調べる方法として有用であることはよく知られている。この方法では、両者の溶質がカラム充てん剤とは相互作用をしないことが前提になっている。しかし、一方の溶質が相互作用する場合でも、Hummel-Dreyer 法がうまく適用できることが明らかになつた¹⁷⁾。更にこの相互作用を積極的に利用して、疎水性樹脂を詰めたカラムを用いて、疎水性物質の関与する異種溶質間の会合定数を測定する方法が開発された¹⁸⁾。この方法では、Hummel-Dreyer 法が分子量の違いを利用するのに対して、一方が疎水性で他方が親水性の異種溶質間の会合を調べる手法として有用である。

本研究は、この手法をポルフィリン及びその金属錯体(共に疎水性)と金属イオン(親水性)との間の相互作用に適用し、SAT のような中間会合体の存在について情報を得ることを目的としている。反応速度論を用いた中間会合体の研究では、中間会合体が形成しているとの仮定の下に解析を行うので、カラムを用いた本実験で得られた情報は従来の説を補強するのに有益である。

2 実験

2・1 試薬

ポルフィリンには同仁化学製の α , β , γ , δ -tetrakis(4-N-methylpyridyl) porphine·tetra(*p*-toluene sulfonate)(TMPPyP)を使用した。金属ポルフィリン錯体は、TMPPyPを金属イオンと反応させた後、過塩素酸塩として沈殿させ、ガラスフィルターで汎過後、五酸化リンとともに減圧乾燥させて調製した。得られた金属錯体を、1 M 硝酸ナトリウムで硝酸型にした陰イオン交換樹脂(Dowex 1-X8)とともにイオン交換水中でかき混ぜて溶解させた。この溶液をロータリーエバボレーターで2 mlに濃縮し、0.05 M 酢酸緩衝溶液(0.1 M NaNO₃)で希釈して、金属錯体試料を調製した。

銅イオン試料溶液は、和光純薬製特級硝酸第二銅を上

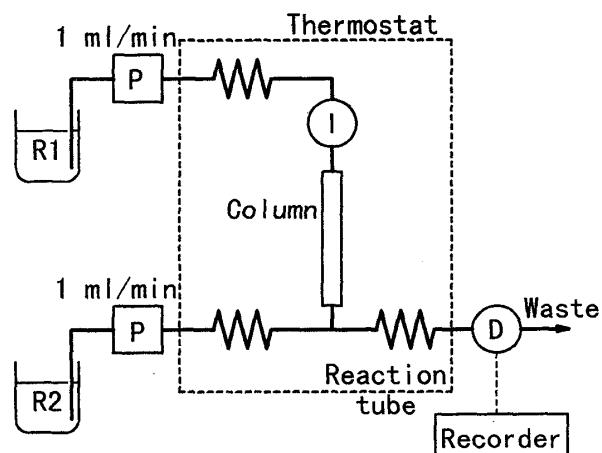


Fig. 1 Block diagram of the apparatus for the study of interaction between the porphyrin and the metal ions

P: pump, I: sample injector, D: spectrophotometer, R1: metal ion solution, R2: color-producing reagent solution

記緩衝溶液に溶解し、同緩衝溶液で希釈して調製した。亜鉛イオン試料溶液は、和光純薬製特級亜鉛を少量の硝酸に溶解させ、その後、銅イオン試料溶液と同様にして調製した。

カラム溶出液中の銅イオン及び亜鉛イオンの発色試薬として、それぞれ同仁化学製のバソクプロインスルホン酸ナトリウム及びジンコンを用いた。

カラムは 150~200 メッシュのスチレン-ジビニルベンゼン共重合体樹脂 Amberlite XAD-2(以下 XAD と略す)を内径 2 mm、長さ 30 cm のガラスカラムに充てんしたものを用いた。

2・2 測定装置及び操作

Fig. 1 は本実験で用いた装置である。プランジャー型ポンプ(協和精密、KHD-94型)を用いて金属イオン溶液(R1)及び発色試薬溶液(R2)を一定流量で流した。インジェクター(東京理化製、VHU-6)を用いて、金属イオン溶液の流れの中へ R1 と同濃度の金属イオンを含むポルフィリン溶液 580 μ l を注入した。注入液がカラムに達するとポルフィリンはカラムに保持される。このとき、会合及び錯形成した分の金属イオンもポルフィリンに伴って樹脂に吸着する。カラムから排出した溶液は発色試薬溶液と混合し、生成した錯体の吸光度をフローセル付き吸光光度計(日本分光製、UVIDEC-100-III)で測定し、記録計(理化電機製、R-22型)で金属イオン濃度変化を追跡した。各試料溶液、インジェク

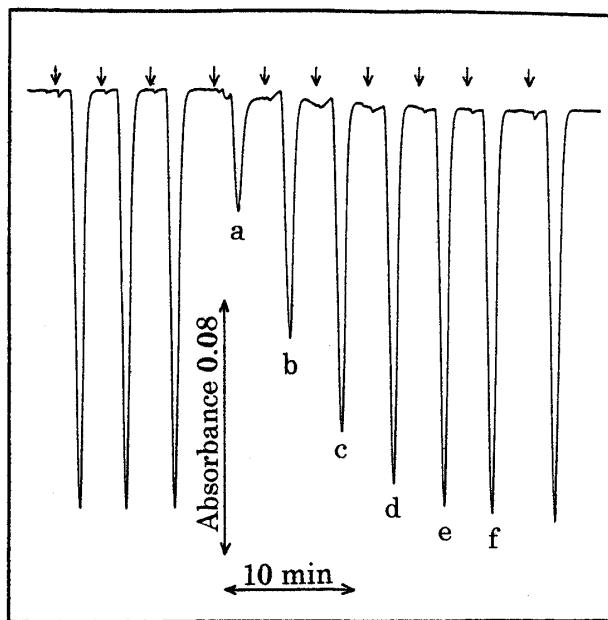


Fig. 2 Typical chromatogram obtained in Cu-TMPyP system

Reaction time, min: a 2, b 6, c 10, d 14, e 18, f 22; metal ion solution: 4.00×10^{-5} M Cu^{2+} , pH 4.0; injected sample: 1.00×10^{-3} M TMPyP dissolved in the metal ion solution; temperature 25°C. The arrow marks indicate the sample injection points. The three peaks before a and the last one were obtained by the injection of Cu^{2+} - and TMPyP-free solution.

ター及びカラムは 10~25°C の恒温槽中に設置した。吸着したポルフィリンをテトラヒドロフラン、次にメタノールで溶離し、カラムは繰り返し使用した。

3 結果と考察

3・1 チャート及び会合定数の算出方法

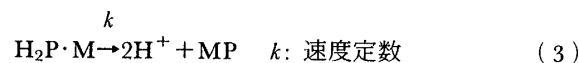
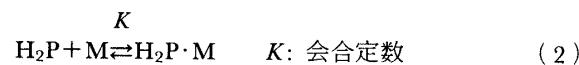
ポルフィリンの一つである TMPyP (H_2P^{4+}) は、水溶液中で水素イオンと式(1)の平衡関係にある。



H_4P^{6+} (以下、 H_4P と略記) になるとソーレーバンドがシフトする事項に基づいて、吸収スペクトルの pH による変化を調べた結果、pH 3.0 以上ではすべて H_2P^{4+} (以下、 H_2P と略記) になっていることが確認された。従って本実験は pH 3.0 以上で行った。

銅イオン溶液をカラムに連続的に流し、同濃度の銅イオンを含むポルフィリン溶液を注入したときに得られたチャートの一例を Fig. 2 に示す。銅イオンの一部はポルフィリンに伴われて樹脂に吸着し、負のピーク (a~

f) となって現れ、この面積を S で表す。チャートの最初の三つと最後の一つのピークは銅イオンもポルフィリンも含まない緩衝溶液のみを注入したときに得られたものである。これら四つのピークの再現性はよく、そのピーク面積 S_0 は、a~f で注入した試料溶液中に含まれる銅イオンの全物質量 (mol) に相当する。ポルフィリン H_2P と銅イオン M を混合してからインジェクターより注入し、試料溶液がカラムに到達するまでの時間 (反応時間) を変化させると、会合体 $\text{H}_2\text{P}\cdot\text{M}$ が生成すると同時に錯体 MP の形成が進むので、ピーク面積はしだいに増加する。



式(2)及び(3)のように反応が進むとすれば、会合定数 K は次のように表される。

$$K = [\text{H}_2\text{P}\cdot\text{M}] / [\text{H}_2\text{P}] [\text{M}] \\ = Q(\text{H}_2\text{P}\cdot\text{M}) / Q(\text{H}_2\text{P}) \cdot [\text{M}] \quad (4)$$

ここで、 $Q(\text{H}_2\text{P}\cdot\text{M})$ と $Q(\text{H}_2\text{P})$ は $\text{H}_2\text{P}\cdot\text{M}$ と H_2P の物質量 (mol) であり、それぞれ式(5)及び(6)で表される。

$$Q(\text{H}_2\text{P}\cdot\text{M}) = V \cdot [\text{M}] \cdot S_i / S_0 \quad (5)$$

$$Q(\text{H}_2\text{P}) = V \cdot [\text{P}]_0 \quad (6)$$

V は注入試料の体積、 $[\text{P}]_0$ は注入試料中のポルフィリンの全濃度である。又、 S_i は反応時間を横軸に、各反応時間におけるピーク面積 S を縦軸にとってプロットした場合の縦軸の切片、すなわち S を反応時間 0 に外挿して得られた面積である。従って式(4)は式(7)のように表される。

$$K = S_i / [\text{P}]_0 \cdot S_0 \quad (7)$$

この式から S_i / S_0 を実測し、既知の $[\text{P}]_0$ を代入することにより会合定数 K を簡単に求めることができる。

又、時間に対する S / S_0 のプロットの時間 0 における直線の傾きから速度定数 k を次式から算出することができる。

$$k = \{d(S/S_0)/dt\} / (K \cdot [\text{P}]_0) \quad (8)$$

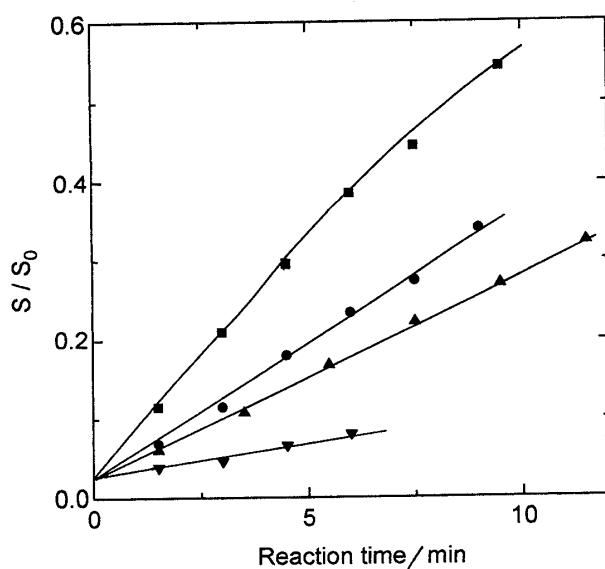


Fig. 3 Effect of temperature on the reaction between Cu^{2+} and TMPyP

Temperature: ▼ 10°C, ▲ 15°C, ● 20°C, ■ 25°C; Cu^{2+} 4.00×10^{-5} M; TMPyP 1.00×10^{-3} M; pH 3.5

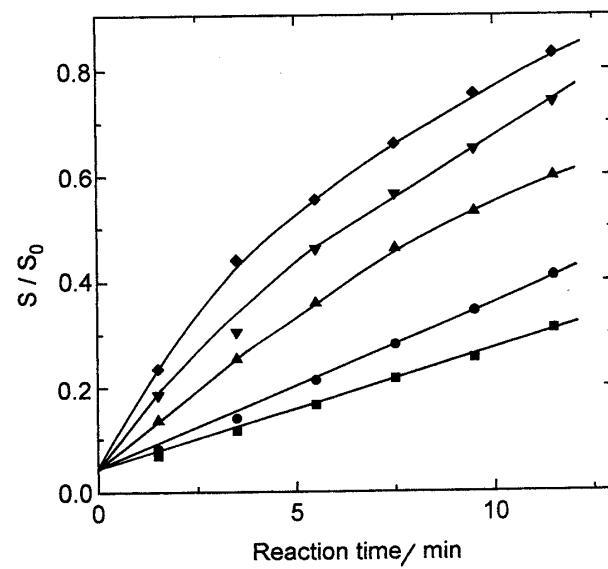


Fig. 4 Effect of pH on the reaction between Cu^{2+} and TMPyP

pH; ■ 3.55, ● 3.67, ▲ 3.88, ▼ 4.07, ◆ 4.26; Cu^{2+} 4.00×10^{-5} M; TMPyP 1.00×10^{-3} M; temperature 10°C

3・2 Cu-TMPyP 系での反応温度、pH の影響

pH, 銅イオン濃度, ポルフィリン濃度を一定とし, 反応温度を 10~25°C に変化させて実験を行った結果を Fig. 3 に示す。横軸は反応時間, 縦軸は得られたピーカ面積 S と S_0 の比である。注入時間の遅れとともに S/S_0 は直線的に増加する。但し温度が高いと, 反応速度が大きく金属イオンが十分に補えなくなるので, 直線からずれてくる。これらの直線の切片は正の値をとる。これは, 錯体形成前に会合体ができていることを示唆している。この切片の値から, 3・1 項で述べた会合定数を求めたところ, 32 M^{-1} (10°C) が得られた。温度が高くなるにつれ錯形成反応が速くなり傾きが大きくなつた。このため, 温度が高いと切片の値の信頼性が低くなつた。

次に, 速度解析が容易になるように, 反応温度を 10°C に設定し, pH を変化させて実験を行った結果を Fig. 4 に示す。pH が高くなるにつれて反応速度が大きくなつた。pH 3.0 以上では, TMPyP は H_4P 型としては存在せず, 完全に H_2P になっており, 実験を行った pH 領域では会合体の量は pH に依存しないはずである。Fig. 4 の結果からも会合の pH 依存性は誤差範囲内であった。一方, pH が高くなることによる反応速度の増大は, 会合体からプロトンが解離しやすくなつたためと考えられる。

Cu^{2+} 以外の金属イオンとして, Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} についても調べた。 Zn^{2+} との反応では, Cu^{2+} ほど反応速度が大きくなないので, 解析も容易であった。又, Fe^{2+} , Ni^{2+} に関してはチャート上に負のピークは現れなかった。

3・3 速度論的解析との比較

吸光度測定用セル中でポルフィリン溶液と大過剰の金属イオン溶液をそれぞれ濃度が C_P , C_M となるように混合し, 吸光度変化から錯形成速度を測定した。金属イオンとポルフィリンが式(2) 及び(3) のようにいつたん会合体を形成してから錯形成が進むと仮定すると, 次の関係が成り立つ。

$$d[\text{MP}]/dt = kK[\text{H}_2\text{P}]C_M \quad (9)$$

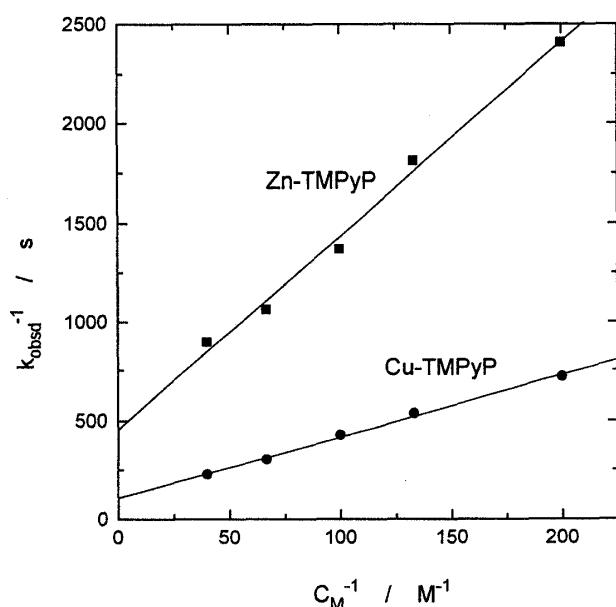
式(9)を積分すると次式を得る。

$$-\ln(C_P - [\text{MP}]) = \{kKC_M/(1 + KC_M)\}t - \ln C_P \quad (10)$$

横軸に反応時間 t , 縦軸に $-\ln(C_P - [\text{MP}])$ をとりプロットすると, 切片が $-\ln C_P$, 傾きが $kKC_M/(1 + KC_M)$ の直線となる。この直線の傾き, すなわち見掛けの速度定数 k_{obsd} を種々の金属イオン濃度について測定し, $1/C_M$ に対して $1/k_{\text{obsd}}$ をプロットすれば (Fig. 5), k 及び K が求められる。XAD カラム及び速度論的

Table 1 Association constants K and rate constants k between Cu^{2+} , Zn^{2+} and porphyrin or metalloporphyrin

Reaction system	Method	pH	Solution medium	Temp./ $^{\circ}\text{C}$	K/M^{-1}	$10^3 \cdot k/\text{s}^{-1}$
Metal complex formation						
Cu-TMPyP	XAD	3.5	acetate + $\text{NaNO}_3^{\text{b)}$	10	32	13
	Kinetics	3.5	acetate + NaNO_3	10	34	9.3
Cu-TPP ^{a)}	Kinetics		0.2 M KNO_3 in DMSO	35	8.24	3.63
	Kinetics		0.2 M KNO_3 in DMSO	50	13.5	9.06
	Kinetics		0.2 M KNO_3 in DMSO	60	18.3	15.9
Zn-TMPyP	XAD	3.9	acetate + NaNO_3	25	57	3.4
	Kinetics	3.9	acetate + NaNO_3	25	47	2.2
Metal replacement						
Cu-TMPyP	XAD	4.0	acetate + NaNO_3	25	120	1.6
Cu/Ni-TMPyP	XAD	4.0	acetate + NaNO_3	25	95	0.24
Cu/Fe-TMPyP	XAD	4.0	acetate + NaNO_3	25	72	—

^{a)} Reference 14), ^{b)} 0.05 M acetate buffer + 0.1 M NaNO_3 Fig. 5 Kinetic treatment of the reactions between Cu^{2+} or Zn^{2+} and TMPyPMetal ion: ● Cu^{2+} (pH 3.5 at 10°C), ■ Zn^{2+} (pH 3.9 at 25°C); TMPyP 1.05×10^{-5} M

解析によって求めた k 及び K の値を文献値とともに Table 1 に示す。Cu- 及び Zn-TMPyP の両方の系について、XAD カラムを用いた方法と速度論によって求めた会合定数はよく一致した。

Pasternack ら¹⁴⁾は、同様の速度論的解析からジメチルスルホキシド (DMSO) 中での Cu^{2+} と $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -tetraphenylporphine (TPP) との相互作用について報告し、 Cu^{2+} とポルフィリンとの間で外圈的なイオン対が

形成していると提案している。このイオン対ではポルフィリン環はゆがんでいない。次に律速段階でポルフィリン環がゆがみ、プロトンが外れ、金属イオンとの間で共有結合ができると同時に、金属イオンとポルフィリンとの間に存在していた溶媒分子が取り除かれる。ちょうどこの状態が SAT タイプの錯体であり、SAT は予備(前) 平衡の状態よりむしろ遷移状態の構造として考えられた。

従来の速度論的解析は予備的な会合平衡が成り立っているとの仮定に基づいて算出されている。一方、本カラム法ではこのような仮定は必要なく、実際に会合が起こっていることが確認でき、それに基づいて会合定数が算出される。TMPyP に対する Zn^{2+} の会合定数は、 Cu^{2+} の値より大きいが、錯形成反応は遅い。これは Zn^{2+} の配位水の脱離反応が遅いためと考えられる。

3・4 ポルフィリンの金属置換反応

ポルフィリン環内の金属イオンが置換する場合の反応についても、錯形成反応と同様に中間体を含む反応機構が考えられる。そこで上で述べたポルフィリンの代わりに金属ポルフィリン錯体を用いて実験を行った。2・1 で述べたように Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} をポルフィリンと反応させて錯体を合成した。なお、鉄錯体は環流中に酸化され三価となっている。Zn-TMPyP と Cu^{2+} との置換反応において反応初期における負のピークは、 Cu^{2+} と H_2P との錯形成反応のそれに比べかなり大きく、ピーク面積の増加速度は小さい。この結果を Fe, Ni-TMPyP 錯体の場合と合わせて Fig. 6 に示す。それぞれの錯体の濃度が同一ではないので、縦軸は S/S_0 では

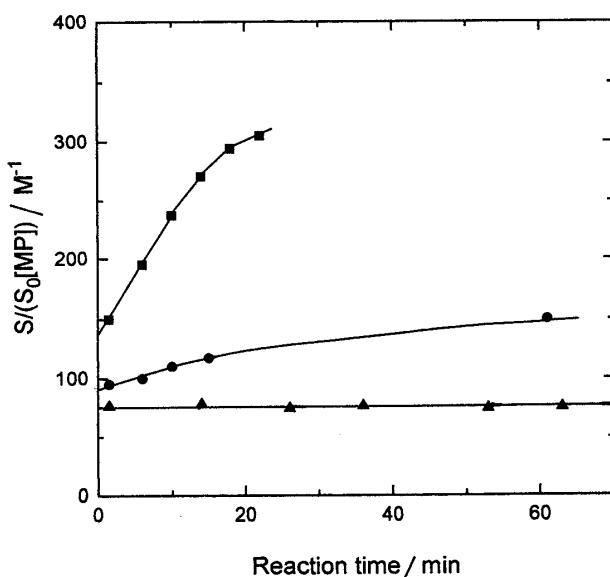


Fig. 6 Metal replacement reactions between Cu^{2+} and metalloporphyrins

Cu^{2+} 4.00×10^{-5} M; pH 4.0; Temperature 25°C;
metalloporphyrin: ■ Zn-TMPyP(1.01×10^{-3} M),
● Ni-TMPyP(5.74×10^{-4} M), ▲ Fe-TMPyP(1.23×10^{-3} M)

なく、 $S/S_0 \cdot [MP]$ をとった。Ni-TMPyP の場合、この錯体に Cu^{2+} が直ちに会合し、次に徐々に Ni^{2+} と Cu^{2+} が入れ替わっていくと考えられる。又、Fe-TMPyP の場合、 Cu^{2+} が直ちにこの錯体に会合するが 60 分の反応時間内では Cu-TMPyP はできないと考えられる。 Cu^{2+} と Zn-TMPyP, Fe-TMPyP 及び Ni-TMPyP との会合定数を Table 1 に示す。これら置換反応を錯形成反応と比較すると、 Cu^{2+} は H_2P よりも MP に強く会合していることが分かる。特に、Zn-TMPyP では Cu^{2+} が比較的強く会合している。Zn²⁺ と Cu-TMPyP との反応についても調べたが、この場合、得られたチャートに負のピークは現れなかった。Cu-TMPyP 錯体の安定度が大きく、しかも平面構造をとるので、この錯体に他の金属イオンが会合しにくいためであろう。これに対し、Zn-TMPyP はこの平面からゆがんでおり、その結果、ピロール環の窒素の孤立電子対がポルフィリン環の面外を向き、そこに Cu^{2+} が会合しやすくなっているものと考えられる。一つのポルフィリン環に Zn²⁺ と Cu²⁺ が会合すると銅錯体のほうが安定なので Zn²⁺ が外れて銅錯体のほうが優先的に生成する。 Cu^{2+} は平面構造をとること、 Cu^{2+} イオンの大きさがポルフィリン環により適合していることなどの理由により、銅-ポルフィリン錯体は非常に安定であ

る。ポルフィリン金属錯体の安定度は $\text{Cu} > \text{Zn} > \text{Mn} > \text{Co} > \text{Cd} > \text{Pb} > \text{Hg}$ となっており、この順に優先的かつ定量的に置換することが報告されている¹⁹⁾。

Cd^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} のようにそのイオン半径の大きさのためにポルフィリン環から金属イオンがはみ出している錯体についても実験を試みた。しかし、錯体が緩衝溶液の陰イオンとの反応により分解してしまったり、金属置換反応が瞬時に完了してしまったりして今回の測定法では解析不可能であった。

以上のように、XAD カラムを用いて反応の中間過程にある会合体の存在を確認し、かつ会合定数を算出することができた。本法は、反応速度の大きい系には適用できない。しかし、従来の反応速度を利用した会合定数の算出が中間化学種（会合体）の生成機構の仮定に基づいているのに対し、本法は直接的に会合体の存在を確認することができるので、速度論的手法と併用するとなお一層有意義な方法であると言えよう。

文 献

- M. Tabata, M. Tanaka: *Anal. Lett.*, **13**, 427 (1980).
- 五十嵐淑郎, 佐伯知司, 四ツ柳隆夫: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **32**, 39 (1983).
- M. Tabata, K. Kaneko: *Analyst (London)*, **116**, 1185 (1991).
- M. Tabata, M. Babasaki: *Inorg. Chem.*, **31**, 5268 (1992).
- 田端正明, 香田 忍, 安田啓司, 野村浩康: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **44**, 221 (1995).
- E. B. Fleischer, J. H. Wang: *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 3498 (1960).
- E. B. Fleischer, E. I. Choi, P. Hambricht, A. Stone: *Inorg. Chem.*, **3**, 1284 (1964).
- B. F. Burnham, J. J. Zuckerman: *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 1547 (1970).
- H. Baker, P. Hambricht, L. Wagner: *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 5942 (1973).
- P. Hambricht, P. B. Chock: *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 3123 (1974).
- K. Letts, R. A. Mackay: *Inorg. Chem.*, **14**, 2990 (1975).
- K. Letts, R. A. Mackay: *Inorg. Chem.*, **14**, 2993 (1975).
- M. J. Bain-Ackerman, D. K. Lavallee: *Inorg. Chem.*, **18**, 3358 (1979).
- R. F. Pasternack, G. C. Vogel, C. A. Skowronek, R. K. Harris: *Inorg. Chem.*, **20**, 3763 (1981).
- M. Tabata, M. Tanaka: *Inorg. Chem.*, **27**, 203 (1988).
- J. P. Hummel, W. J. Dreyer: *J. Biochim. Biophys. Acta*, **63**, 532 (1962).
- I. Sanemasa, T. Mizoguchi, T. Deguchi: *Bull.*

- Chem. Soc. Jpn.*, **57**, 1358 (1984).
 18) I. Sanemasa, K. Toda, T. Deguchi, A. G. Sykes:
Anal. Chem., **57**, 2405 (1985).
- 19) 石井 一, 高 英昌, 佐藤勝彦: 日本化学会誌,
1980, 1919.

要 旨

金属イオンとポルフィリンが水溶液中で錯形成する際, 錯体形成前に両化学種間の会合体が存在していることを疎水性樹脂 (Amberlite XAD-2) カラムを用いて確認した。金属イオン溶液の連続的な流れの中にポルフィリン溶液を注入すると, ポルフィリンはインジェクターの下流に設けた XAD カラムに吸着する。その際, 会合及び錯形成した分の金属イオンも伴われて吸着し, その分金属イオン濃度が一時的に減少する。この減少分から算出すると, Cu^{2+} 及び Zn^{2+} と $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -tetrakis (4-N-methylpyridyl) porphine (TMPyP)との会合定数は, それぞれ 32 (10°C) 及び 57 (25°C) M^{-1} であった。ポルフィリンの金属錯体が Cu^{2+} と金属置換反応する際も, 錯形成時と同様に会合体が生成していることが分かった。亜鉛錯体と Cu^{2+} との置換反応の場合, 大きな会合定数が得られた。本研究により, 配位子あるいはその金属錯体が疎水性樹脂に吸着される現象を利用して, 金属イオンと配位子あるいはその金属錯体との間の相互作用を調べることができた。その結果は錯形成の反応速度論の実験より算出した値とほぼ一致した。