

銅(II)-1,10-フェナントロリン錯イオンとの酸化還元 反応を利用するシステインの吸光光度定量法

森田みゆき^{®*}, 上舘 民夫, 渡辺 寛人^{**}

(1991 年 10 月 24 日受理)

銅(II)-1,10-フェナントロリン錯イオンとシステインとの酸化還元反応で生成する強く着色した銅(I)-1,10-フェナントロリン錯イオンの吸光度の測定からシステインを定量する方法を開発した。90%ジメチルスルホキシド中で反応は化学量論的に進行し、生成した銅(I)-1,10-フェナントロリン錯イオンの吸光度は15分間一定であった。検量線は、検出下限である $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ から $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ の範囲で良好な直線となった。 $8.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ システインの10回の繰り返し測定の相対標準偏差は1%であった。又、本法を用いてパーマ剤中のシステインの定量を行った結果、エールマン法による分析値とよく一致した。

1 緒 言

チオール基を有するアミノ酸やタンパク質などの定量は、生化学、食品化学あるいは繊維化学などの分野において重要であり、これまでに種々の測定原理に基づく定量法が開発されてきた¹⁾。

著者らは先にジメチルスルホキシド(DMSO)中の銅(II)-1,10-フェナントロリン(phen)錯イオン $[\text{Cu}(\text{II})(\text{phen})_n]^{2+}$ が等モルの疎水性チオールと反応して、強く着色した $[\text{Cu}(\text{I})(\text{phen})_n]^+$ を生成することを見だし、 $[\text{Cu}(\text{I})(\text{phen})_n]^+$ の吸光度の測定から疎水性チオールを定量する方法を報告した²⁾³⁾。本研究では、親水性チオールであるシステインと $[\text{Cu}(\text{II})(\text{phen})_n]^{2+}$ との酸化還元反応を利用するシステインの吸光光度定量法を確立し、それをパーマネントウエーブ用剤中のシステインの定量に応用したところ、良好な結果を得たので報告する。

2 実 験

2.1 試 薬

試薬はすべて市販の特級品を特に精製せず使用した。水は蒸留後、イオン交換処理して使用した。 $[\text{Cu}(\text{II})-$

$(\text{phen})_n]^{2+}$ の調製には硝酸銅(II)と1,10-フェナントロリンの一水和物を使用した。システイン標準溶液($2.0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$)はpH 2.5の塩酸/塩化カリウム緩衝溶液を用いて調製した。測定用のシステイン溶液は標準溶液を塩酸/塩化カリウム緩衝溶液(pH 2.5)で順次希釈して調製した。

システインを主成分とするコールド二浴式パーマネントウエーブ用剤(以下パーマ剤と略記)は市販品を使用した。

2.2 装 置

吸収スペクトル及び吸光度の測定には島津製マルチパーパス MPS 2000 型分光光度計を使用した。セルは光路長 1 cm の石英セルを使用した。

2.3 操 作

分析条件の検討では、水-DMSO 混合溶液を用いて $[\text{Cu}(\text{II})(\text{phen})_n]^{2+}$ 溶液及びシステイン溶液を調製し、それぞれ 10 cm^3 を 50 cm^3 のバイアル瓶に入れて室温で反応を行い、反応 5 分後の 444 nm における吸光度を測定した。最適銅(II)濃度及び phen 濃度の検討を除いて、 $[\text{Cu}(\text{II})(\text{phen})_n]^{2+}$ は $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ の銅(II)及び $4.0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ の phen を用いて調製した。又、システインは $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ の溶液を使用した。

システインの定量は以下の操作で行った。DMSO 中

* 北海道教育大学札幌分校: 002 北海道札幌市北区あいの里 5 条 3 丁目 1 番

** 北海道大学工学部: 060 北海道札幌市北区北 13 条西 8 丁目

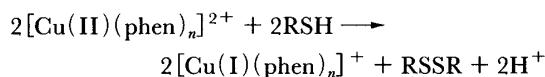
で銅(II)及びphenの濃度がそれぞれ $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ 及び $4.0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ になるように溶解し、 $[\text{Cu(II)(phen)}_n]^{2+}$ を調製した。 $[\text{Cu(II)(phen)}_n]^{2+}$ を含むDMSO 9.0 cm^3 を 25 cm^3 のバイアル瓶に分取した。次に、塩酸/塩化カリウム緩衝溶液(pH 2.5)で調製したシステイン溶液 1.0 cm^3 をバイアル瓶に入れ、5分間室温でかき混ぜた。その後、反応溶液を石英セルに入れ、から試験液を対照にして444 nmにおける吸光度を測定した。から試験液にはシステイン溶液の代わりに塩酸/塩化カリウム緩衝溶液(pH 2.5)を用いた。

パーマ剤中のシステインの定量では、試料約 0.5 cm^3 を分取し、ひょう量後、これを塩酸/塩化カリウム緩衝溶液(pH 2.5)で 1.0 dm^3 に希釈して試料溶液とした。この試料溶液の 1.0 cm^3 をバイアル瓶に入れ、同様な操作により、パーマ剤中のシステイン濃度を定量した。

3 結果及び考察

3・1 DMSO-水混合溶液の最適組成の検討

システインと $[\text{Cu(II)(phen)}_n]^{2+}$ との酸化還元反応においても、疎水性チオールの場合と同様に非水溶媒にはDMSOを使用した。いま、疎水性チオールの定量では、疎水性チオールが溶解しているヘキサノールと $[\text{Cu(II)(phen)}_n]^{2+}$ が溶解しているDMSOの2相から成っているが、システインのような親水性チオールの定量においては、反応溶液は水とDMSOの混合溶液となる。従って、システイン(RSH)と $[\text{Cu(II)(phen)}_n]^{2+}$ との酸化還元反応で生成する $[\text{Cu(I)(phen)}_n]^+$ の吸光度の測定からシステインを定量するためには、次式に従って $[\text{Cu(II)(phen)}_n]^{2+}$ が化学量論的に $[\text{Cu(I)(phen)}_n]^+$ に還元され、かつ、生成した $[\text{Cu(I)(phen)}_n]^+$ が安定に存在する水とDMSOの混合組成を求める必要がある。



そこで、種々の組成の水[塩酸/塩化カリウム緩衝溶液(pH 2.5)]-DMSO混合溶液を用いて、 $[\text{Cu(II)(phen)}_n]^{2+}$ 及びシステイン溶液を調製し、反応を行った。各反応時間における $[\text{Cu(I)(phen)}_n]^+$ の生成量は444 nmの吸光度の測定から求めた²⁾。Fig. 1に示すように、DMSOの容量比が90%の条件で、吸光度は15分間一定であった。この条件での $[\text{Cu(II)(phen)}_n]^{2+}$ とシステインとの反応の化学量論を確認するため、システイン溶液の代わりに等濃度のアスコルビン酸溶液を調

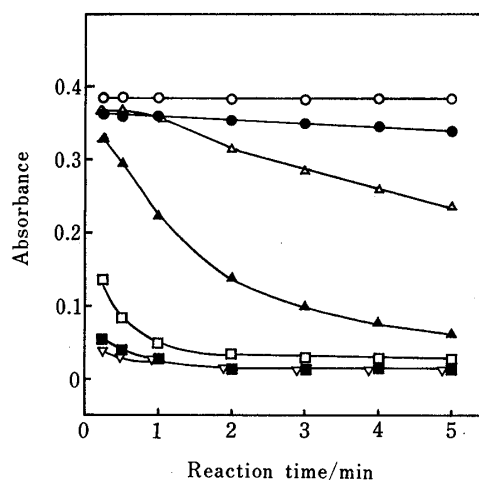


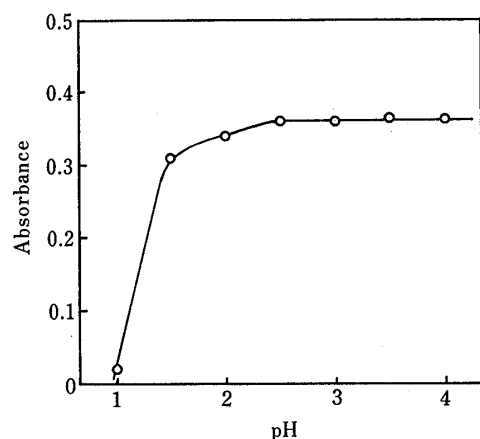
Fig. 1 Effect of reaction time on absorbance in aqueous DMSO solutions

DMSO: ○ 90%, ● 80%, △ 70%, ▲ 60%, □ 40%, ■ 20%, ▽ 0%. $\text{Cu(II)} = 1.0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$; $\text{phen} = 4.0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$; $\text{cysteine} = 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$

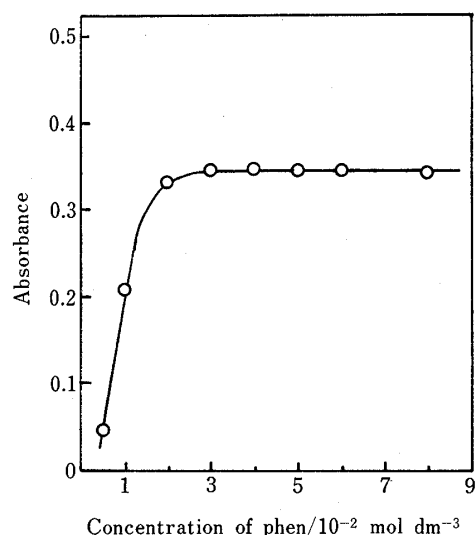
製して、同様の操作により吸光度を測定した。その結果、二電子還元剤であるアスコルビン酸を用いた場合、一電子還元剤であるシステインを用いた場合に得られた吸光度の2倍となった。従って、90% DMSO中ではシステインと $[\text{Cu(II)(phen)}_n]^{2+}$ とは等モルずつ反応しているものと考えられる。しかし、DMSOの容量比が減少するに従って、反応初期における $[\text{Cu(I)(phen)}_n]^+$ の生成量が減少し、又、反応時間に伴う吸光度の減少速度が増大している。この原因は水の容量比が増大するに従って、溶存酸素による $[\text{Cu(I)(phen)}_n]^+$ から $[\text{Cu(II)(phen)}_n]^{2+}$ への再酸化がより進行するためと考えられる。以上の結果から、以下の検討において反応溶液には容量比90%のDMSO溶液を使用し、吸光度は反応5分後に測定することにした。

3・2 最適測定条件の検討

pHの影響: 塩酸/塩化カリウム緩衝溶液(pH 1.0~2.5)あるいはクエン酸緩衝溶液(pH 2.0~5.0)を用いて種々のpHの $[\text{Cu(II)(phen)}_n]^{2+}$ 及びシステイン溶液を調製した。次いで、種々のpH条件で反応を行い、吸光度の測定を行った。Fig. 2に示すようにpH 2以上で吸光度は一定になったが、pH 4以上では溶液が白濁した。又クエン酸緩衝溶液を使用した場合、反応時間が2分以上になると $[\text{Cu(I)(phen)}_n]^+$ から $[\text{Cu(II)(phen)}_n]^{2+}$ への再酸化が始まった。従って、

**Fig. 2** Effect of pH on absorbance

Cu(II) = $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$; phen = $4.0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$; cysteine = $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$; DMSO: 90%

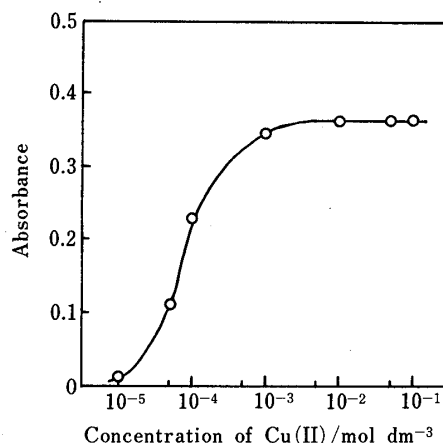
**Fig. 3** Effect of phen concentration on absorbance

Cu(II) = $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$; cysteine = $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$; DMSO: 90%

緩衝溶液には pH 2.5 の塩酸/塩化カリウム緩衝溶液を用いることにした。

phen 濃度の影響: 銅(II) ($1.0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) に対する phen の濃度比を 1~8 の範囲で変化させて, $[\text{Cu(II)(phen)}_n]^{2+}$ を調製し, システインとの反応を行い, 吸光度の測定を行った。Fig. 3 の結果から, phen 濃度が増大するに従って吸光度は増大し, 濃度比が 3 以上で吸光度は一定となった。そこで, 最適 phen 濃度は Cu^{2+} 濃度の 4 倍とした。

銅(II) 濃度の影響: 銅(II) 濃度を 1.0×10^{-5} から

**Fig. 4** Variation of absorbance with copper(II) concentration

cysteine = $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$; $[\text{phen}]/[\text{Cu(II)}] = 4$; DMSO: 90%

0.10 mol dm^{-3} の範囲で変化させて $[\text{Cu(II)(phen)}_n]^{2+}$ ($[\text{phen}]/[\text{Cu}] = 4$) を調製し, システインとの反応を行い, 吸光度の測定を行った。Fig. 4 の結果から, 銅(II) 濃度が増大するに従って吸光度は増大し, 銅(II) 濃度がシステイン濃度に等しくなると吸光度は一定となった。この結果からも, 等モルの銅(II) とシステインが反応していることが分かる。以上の結果からシステインの検量線を作成する際の濃度範囲を考慮して, 最適銅(II) 濃度は $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ とした。

混合比率の影響: これまでの検討ではシステイン水溶液を DMSO で 10 倍希釈してシステインの 90% DMSO 溶液を調製し, 更に 90% DMSO で調製した $[\text{Cu(II)(phen)}_n]^{2+}$ 溶液と等量混合するため, 反応溶液中のシステイン濃度は初濃度の 1/20 となる。そこで, 本法のシステインに対する検出感度を向上させるため, DMSO で $[\text{Cu(II)(phen)}_n]^{2+}$ を調製し, その 9 容とシステイン水溶液 1 容を直接混合することにより, DMSO の容量比を 90% にすることにした。反応溶液中におけるシステイン濃度は初濃度の 1/10 になることから, 得られる吸光度は 2 倍となった。このような条件で反応を行っても, $[\text{Cu(I)(phen)}_n]^+$ の吸光度及びその安定性に影響を与えなかった。

3・3 検量線

以上の最適条件でシステインの検量線を作成した。検量線は, 検出下限である $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ から $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ の範囲 (最終濃度で 5.0×10^{-6}

mol dm⁻³ ~ 2.0 × 10⁻⁴ mol dm⁻³ の範囲) で良好な直線性を示した. 検量線の傾きから得られた [Cu(I)-(phen)_n]⁺ のモル吸光係数は 7000 dm³ mol⁻¹ cm⁻¹ となった. 又, システイン濃度が 8.0 × 10⁻⁴ mol dm⁻³ の溶液の 10 回の繰り返し測定 of 相対標準偏差は 1% であった.

3・4 共存物質の影響

種々の物質をシステイン溶液に添加して反応を行い, 吸光度の測定からそれらの物質のシステインに対する許容濃度を求めた. 共存物質の許容濃度はシステイン単独で反応を行った場合に得られる吸光度の値に対して, 最大 ±5% の誤差を与える濃度とした.

遷移金属はシステインと錯体を生成することから, 種類の遷移金属をシステイン溶液 (1.0 × 10⁻³ mol dm⁻³) に添加して反応を行い, 吸光度の測定から, 各金属のシステインに対する許容濃度を求めた. システインに対して Cd²⁺ 及び Zn²⁺ では 1000 倍, Ni²⁺ 及び Mn²⁺ は 400 倍, Fe³⁺ 及び Ag⁺ は 4 倍共存しても, 吸光度の変化は許容限界以内であった. これらの金属が許容限界以上に存在すると, いずれの金属においても吸光度は減少した. この原因は, システインがこれらの金属と錯体を生成し, [Cu(II)(phen)_n]²⁺ の還元に関するシステイン濃度が減少するためと考えられる.

3・5 パーマ剤中のシステインの定量

パーマ剤は厚生省の告示に基づくパーマネントウェーブ用剤基準⁴⁾によって品質の基準が定められている. 例えば“システインを主成分とするコールド二浴式パーマネントウェーブ用剤”の場合はシステインが 3.0~7.5%, シスチンは 0.65% 以下であることが定められている. 又, システインの試験法として, 発色試薬と

して *N*-エチルマレイミドを用いる吸光光度法⁵⁾が定められている. 本研究では市販のシステインを主成分とするパーマ剤中のシステインの定量を本法及び親水性チオール of 吸光光度定量法として広く利用されているエールマン法⁶⁾で行った. エールマン試薬には 5,5-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)を使用した. パーマ剤中のシステイン濃度は大きいことから, 2・3 の操作手順に従ってパーマ剤を希釈してから定量を行った. その結果, システイン含量は本法では 7.1 重量%, エールマン法では 7.0 重量% となり, 両方で得られた分析値はよい一致を見た.

以上の結果から, 本法と従来の吸光光度定量法との検出感度を比較すると, 検出感度は *N*-エチルマレイミド法の約 10 倍向上するが, エールマン法の検出感度の約 1/2 となった. 一方, 繰り返し測定の精度 (相対標準偏差で 1%) はエールマン法 (相対標準偏差で 3%) と比較して大幅に改善された. パーマ剤中のシステインの定量結果から明らかなように, 本法は実用分析法としても十分応用できるものと考ええる.

文 献

- 1) 松本 博, 国則登代: “SH 基の定量法”, (1986), (学会出版センター).
- 2) T. Kamidate, A. Katayama, H. Watanabe: *Anal. Sci.*, **4**, 329 (1988).
- 3) A. Katayama, T. Kamidate, H. Watanabe, M. Morita: *Anal. Sci.*, **7**, 633 (1991).
- 4) “パーマネント・ウェーブ用剤基準” (昭和 43 年 6 月 10 日厚生省告示第 280 号, 昭和 60 年 10 月 14 日厚生省告示第 166 号一部改正).
- 5) J. Leslie, D. L. Williams, G. Gorin: *Anal. Biochem.*, **3**, 257 (1962).
- 6) G. L. Ellman: *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70 (1959).



Spectrophotometric determination of cysteine based on redox color reaction with copper(II) complex of 1,10-phenanthroline. Miyuki MORITA*, Tamio KAMIDATE and Hiroto WATANABE** (*Sapporo Campus, Hokkaido University of Education, 5-3-1, Ainosato, Kita-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 002; **Faculty of Engineering, Hokkaido University, Kita-13, Nishi-8, Kita-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 060)

A novel spectrophotometric method was developed for the determination of cysteine. This method was based on the stoichiometric redox reaction between cysteine and a copper(II) complex with 1,10-phenanthroline in 90% dimethyl sulfoxide solution. An intensely colored copper(I) complex was formed and the molar absorptivity of which was 7000 dm³ mol⁻¹ cm⁻¹ at 444 nm. The calibration curve was linear over the range from the detection limit of 5.0 × 10⁻⁵ to 2.0 × 10⁻³ mol dm⁻³ of cysteine. The relative stan-

dard deviation of ten successive determinations was 1.0% at $8.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ of cysteine. This method was applied to the determination of cysteine in permanent wave solution.

(Received October 24, 1991)

Keyword phrases

spectrophotometric method; cysteine; copper-1,10-phenanthroline complex.
