

混合溶媒系におけるリン脂質の解離定数の決定

第一報 75% ジオキサン溶液中における Lecithin の電位差滴定

熊坂 繁太郎 加藤 京太

1 緒 論

Lecithin (Phosphatidyl choline) は、水に難溶性のため、主にアルコール類、エーテル類、その他の有機溶媒中で、種々の研究が行われることが多い。著者等は、Lecithin 等磷脂質の存在状態を物理化学的方面から研究しているため、これらの酸塩基滴定の知見を得ることが重要である。

Bjerrum は、電位差滴定法による金属アミンの安定度定数 (Stability constant) 決定の方法を紹介¹⁾ しており、その中で、ガラス電極が、生成反応中の水素イオン濃度決定のために使用された。これをもとにして、水溶液中での安定度定数或は、解離定数 (dissociation constant or ionic constant) が、容易に決定できるようになった。

しかし、水に難溶な物質の場合には、非水溶媒^{注)} を用いて測定しなければならない。水溶液中における pH 計の示めす値は、pH そのものであるが、被検液が、非水溶媒になると、pH 計の示めす値は、熱力学的意味が、存在しなくなる。

Bjerrum の理論²⁾ によれば、非水溶液中における電解質イオンの挙動が、水溶液中とは、かなり異なることが予想される。

LeGrand et al³⁾ は、ジオキサソ-水混合溶媒中の電位差滴定に関する詳細な研究を行い、一連の配位化合物の安定度定数の決定を行っている。又一方、リン脂質の解離定数の決定については、James E. Garvin et al⁴⁾ によって、エトシエタノール中で、Fatty acid, L- α -(Dimyristoyl)-cephalin Phosphatidyl serin, Dipalmitoyl-L- α -glycerophospholic acid, そして、Lecithin が決定された。その他、エタノール、メタノール中での滴定もあるようだが、ジオキサン中での滴定は、みあたらないようである。

現在、リン脂質の抽出や、合成法が非常に進歩している。したがって、これらの物理化学的定数の再検討が必要であり、又、ジオキサソのような物理化学的測定に、^{≠適切な≠} 溶媒中での pK が必要であるため、著者等は

ジオキサソ-水混合溶媒を、ガラス電極を用いて、実験するため若干の検討をし、それをもとにして、酢酸の pH を測定し、熱力学的に検討したのち、Lecithin の pH を決定した。以上の実験を報告する。

2 実 験

2.1 ジオキサソの精製^{5) 6)}

ジオキサソは、市販一級品を用い、1N 塩酸を10%加え、8時間環流する。これに固体状水酸化カリウムを加え、二層が形成するまで、振とうする。次に水の層を取り去り、さらに水酸化カリウムを加え振とうする。これを数回くり返し、乾燥させ、金属ナトリウムを加え蒸留する。

2.2 Lecithin の抽出及び精製

Lecithin の第一回抽出精製を、Pangborn 法⁷⁾ で行い、さらに Hanahan 法⁸⁾ を用いて、第二回精製をし、最後にケイ酸カラムクロマトグラフによる精製を行った。このようにして得られた Lecithin は、TLC テストで one spot を示めした。⁹⁾

キエルダール法による N 定量、キング法による P の定量を行い、N:P=1.0:1.1 となり、ほぼ純粋な Lecithin とみなした。

2.3 その他の試薬

塩酸、硫酸、塩化カリウム、カセイカリ等、実験に使用した薬品は、総べて、市販の特級品をそのまま使用した。

2.4 ガラス電極と水素電極での測定値の相関

滴定装置¹⁰⁾ は、図-1 のような方法を取り、pH メータは、東亜電波製 HM-5A、ポテンシオメータは、横河製 2722 型を使用した。又白金黒付白金電極、銀-塩化銀電極は、著者等の製作したものを使用した。

実験に使用したガラス電極、カロメロ電極は、あらかじめ75%ジオキサソ溶媒中に浸して用いた。これは、水溶液中での測定とは異なり、測定中に電位勾配と不斉電

注) 非水溶媒とは、純非水溶媒よりなる溶液ばかりでなく、非水-水混合溶媒よりなる溶液も含める。

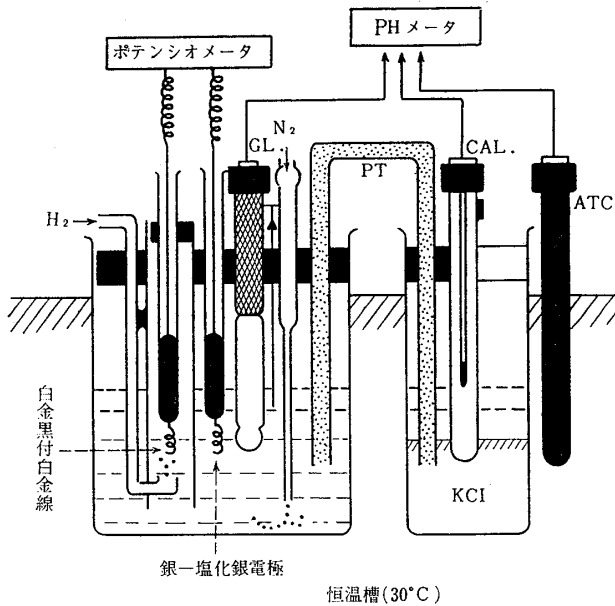


図-1 滴定装置

位差が、少しずつ変化していく傾向があるためであり、又ガラス電極は、ガラスの材質や電極の前歴によって電位勾配の時間的変化の途中は、異なるが、溶媒が同一であるかぎり、最終的平衡値は、同一である。¹¹⁾このような理由から、およそ48時間浸漬した。この方法をとると、応答速度が遅くなる傾向があるようだ。

溶液は、 $1 \times 10^{-2}N$ 酢酸、イオン強度 $\mu=0.03$ (NaCl) に $1 \times 10^{-1}N$ 水酸化ナトリウム溶液を滴下していく方法をとった。

2.5 ジオキサン-水の組成の相違によるガラス電極の値

ジオキサン-水溶媒を、0%から80%までつくり、A: 1価-1価全電解質濃度 0.023F, B: 0.0045F の pH 計による指示目盛りを読んだ。

2.6 75%ジオキサン溶媒中の酢酸の解離定数の決定

0.002N 酢酸溶液 $\mu=0.01$, 25cc に 0.01N KOH 溶液を滴定し、滴定曲線を決定した。

2.7 75%ジオキサン溶媒中の Lecithin の解離定数の決定

0.002 モル/l Lecithin 溶液, $\mu=0.01$. 25cc に 0.01 N KOH を滴下し、アルカリ領域側を定め、さらに別の Lecithin 溶液で酸性領域を、0.01N 塩酸溶液で滴定した。これは Lecithin が、両性電解質であるため、pKa, pKb の二種存在するためである。

3 結果と考察

非水溶液中における電解質イオンの挙動が水溶液中とは、異なっていることが Bjerrum²⁾ によって指摘されているが、電解質イオンの活量係数が、非水溶媒によってどのような影響を受けるか考えなければならない。

Bates¹²⁾ は、すべての電解質イオンと中性分子に対して活量 a_j^* と濃度 m_j とを結びつける活量係数 γ_j^t を二つの部分に分ち、それぞれを、 γ_j^m と γ_j^s にした。すなわち、

$$a_j^* = \gamma_j^t m_j = \gamma_j^m \gamma_j^s m_j \quad (1)$$

$$\log \gamma_j^t = \log \gamma_j^m + \log \gamma_j^s \quad (2)$$

そして、 $\log \gamma_j^m$ を溶媒効果、 $\log \gamma_j^s$ を塩効果、 $\log \gamma_j^t$ を全効果となすけた。 γ_j^s は、電解質の濃度と、溶媒の種類に依存するが、電解質濃度を無限希釈していくと、1に近づく。そして、 γ_j^s が、電解質イオンの場合には、十分希釈された溶液中におけるよりも早く1からはずれるであろう。それに対し、 γ_j^m は、溶媒の種類だけにより、電解質の濃度にはよらず1とは異なる値をもつ。

3.1 ガラス電極と水素電極での測定値の相関

まず、水とジオキサン混合溶媒中の水素イオンに対するガラス電極の反応を実証することが必要である。³⁾ これら非水溶媒中の proton の電気化学 potential は、 H_3O^+ として存在している水溶液中での電気化学 potential とは、当然等しくないと考えられるからである。

75%ジオキサン溶媒に、pHメータを使用した場合、測定される pH 値は、上記理由により水溶液中では異なるので、pH 値そのものとはいえない。従って pHメータ指示を B³⁾ という記号で以下表示する。

ガラス電極とカロメロ電極によって、B 領域 2 から 11 まで、75%ジオキサン溶液を測定した。一方同時に水素電極と銀-塩化銀電極により、電位差を測定した。ガラス電極電池に対する B 値と、それに対応する水素電極電池の電位差を、図-2 に示めた。これらのデータは、塩化ナトリウムを含む酢酸の75%ジオキサン溶液に、水酸化ナトリウムの75%ジオキサン溶液で中和しており又、低い B 領域に対するために、塩酸の75%ジオキサン溶液で、再び酸性にして続けた。

このような結果から、次のようにいうことができる。

与えられた塩の濃度において、又与えられた混合溶液中で、得られた測定値によれば、水素イオン濃度の広い

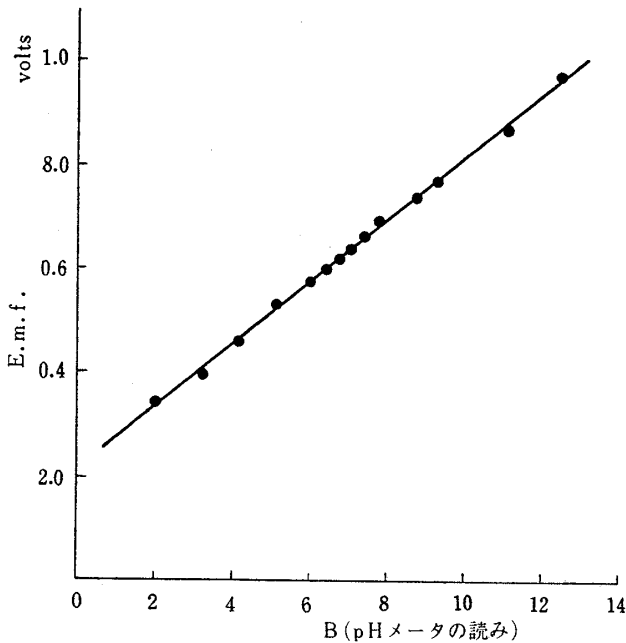


図-2 75%ジオキサン溶液中の pH メータの読み B と、 $H_2 | H^+, Cl^- | Ag-AgCl$ 電池の e.m.f との関係。

直線の傾き：0.0604 (最小二乗法による)

領域にわたって有効である。

すなわち、ガラス電極電池は、水素電極電池によって明らかにされたように「水素イオン活量を測定する」¹⁾

3.2 水-ジオキサン溶液中のガラス電極の値

pH メータの読み B を、水素イオン濃度におきかえる方法³⁾ は、次のようにしてなされる。この実験は、純粋な水から、80%容量のジオキサンまでの範囲に及ぶ一連の溶液についておこなわれた。

化学量論的水素イオン濃度 $[H^+]$ から、

$$U_H = \text{anti log}(-B) / [H^+] \quad (3)$$

と定義された量 U_H が算出される。したがって U_H は、pH メータの読み B から水素イオン濃度を得るための換算率であり、一般に溶媒組成と、イオン濃度の関数である。

(3)を変形すれば、

$$-\log[H^+] = B + \log U_H \quad (4)$$

となり、

$$\text{pH} = B + \log U_H \quad (5)$$

である。変化する溶媒組成と異なった塩と酸濃度の溶液によって得られた $\log U_H$ の値を、図-3 の A, B 曲線で示めた。 U_H は、予期していたように、濃度に依存することがわかる。この関係は、主に全イオン濃度と共に水素イオンの活量係数が変化するということであるならば、概知の活動係数を使うことによって、補正することができ、イオン濃度に関係ない補正因数 U_H^0 を得ることができる。

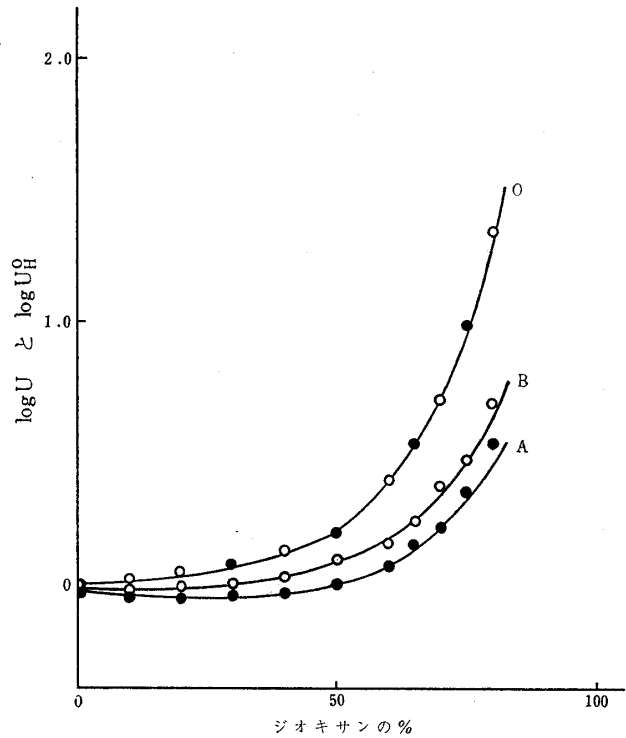


図-3 溶媒組成と $\log U_H$ 及び $\log U_H^0$ との関係

1 価-1 価全電解質濃度

A : 0.023F, B : 0.0045F,

O : イオン強度 0,

すなわち、 U_H^0 は、溶液中のイオン強度を 0 に補正したことに等しい。いま

$$U_H^0 \equiv U_H \times \frac{1}{\gamma} \quad (6)$$

と定義する。したがって γ は、 U_H が決定されるための溶媒組成とイオン濃度に関する活量係数である。(6)によって補正された曲線が、図-3 の O である。用いた活量係数は、Harned et al¹³⁾ のデータから計算して得たものである。

ガラス電極 | 有機溶媒中の HCl | 飽和 KCl

| Hg_2Cl_2-Hg

なる電池の電位差は、溶媒組成で変化するという事実により二つの原因が考えられる。

- (1) (無限希釈における) 水素イオンの一部の分子の自由エネルギーは、溶媒組成(主媒体効果 primary medium effect)と共に変化する。
- (2) 飽和 KCl 界面の液間電位差 liquid junction error は、溶媒組成と共に変化する。

Dole¹⁴⁾によれば、ガラス電極電位差は、proton が移動すると同様に、水が移動することによって決定されるという確証を得ていると述べているが、これは、水の活量の変化からの効果も予測していることになる。しかしながら、LeGrand et al³⁾によれば Hovorka et al¹⁵⁾のデータを使用して、この原因の大きさを計算すると75

%ジオキサン溶液中の 25°C における水の活量は、純粋な水の活量とわずかに10%しか異ならないとしている。これは、2.5mvolt 或は、実験誤差の電位に等しい。したがってこの原因については、本実験からは、観察されないであろう。

しかし、LeGrand et al³⁾ は、主媒体効果 primary medium effect について、

ガラス電極 | 有機溶媒中の HCl | Ag-AgCl なる電池によって、かなり詳細に研究している。

すなわち、この場合、液間電位差 liquid junction error がなく、補正項 $\log U_H^0$ は、主媒体効果 primary medium effect である $\log \gamma_0$ に等しくなる。このような実験から得られた値は次のように処理される。

$$E = E^0 - RT/F \ln C_{H^+} C_{Cl^-} - RT/F \ln \gamma_{\pm}^2 \quad (7)$$

から、

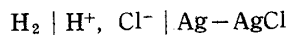
$$\frac{E^0 - \text{const.}}{0.0601} = \frac{E}{0.0601} + \log \gamma_{\pm}^2 \quad (8)$$

又、x を水-ジオキサン溶媒の γ ある組成とし、1 を水溶液とすれば、

$$\frac{E_1^0 - E_x^0}{0.0601} = \frac{E_1 - E_x}{0.0601} + \log \frac{\gamma_1^2}{\gamma_x^2} = \log \gamma_0^2 \quad (9)$$

ここで $\log \gamma_0^2$ は、主媒体効果 primary medium effect である。

水-ジオキサン溶媒中の塩酸として計算した $\log \gamma_0$ なる値は、Harned et al¹³⁾ によって



なる電池によって測定された e.m.f と一致している。計算には、塩酸の活量係数を用いたのであるが、このことから、この活量係数は、塩酸-塩化ナトリウム混合の場合にも適用できることを示めている。

3.3 酢酸の解離定数の決定

以上の考察により、具体的に酢酸の熱力学的解離定数の決定を試みた。この解離定数決定の場合、75%ジオキサン溶媒一種類中で行った。なお、酢酸のような水溶性物質については、種々の溶媒組成中での pK を調べる必要があるが、著者等の実験目的は、Lecithin の pK 決定であり又 Lecithin のジオキサン中での溶解は、70%ジオキサン以上でなければならない。従って、ジオキサン中における場合は、75%一種類の組成のみで決定した。

上述の考察に従って、酢酸の KOH での滴定状態を、pH メータにより、B を測定し、この値から熱力学的解離定数、

$$K_0 = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \cdot \frac{\gamma_{H^+} \gamma_{A^-}}{\gamma_{HA}} \quad (10)$$

を求めることができる。量論的濃度は、実験的に知るこ

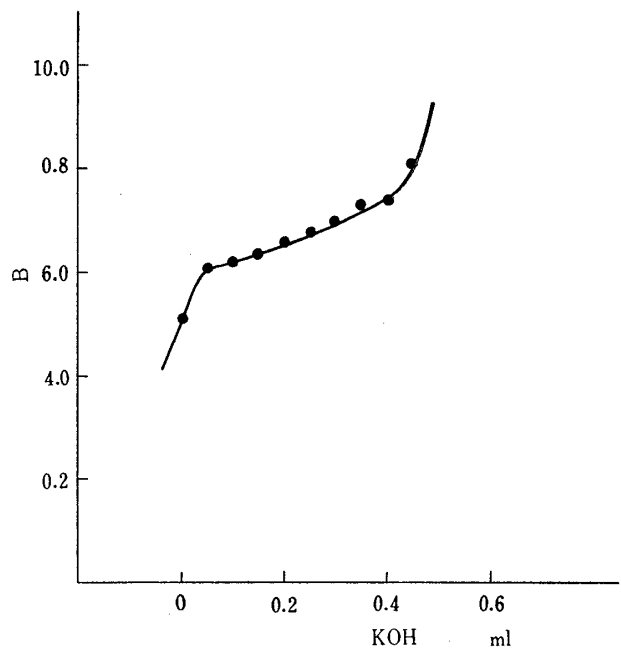


図-4 CH₃COOH の滴定曲線
0.002モル, $\mu=0.01$

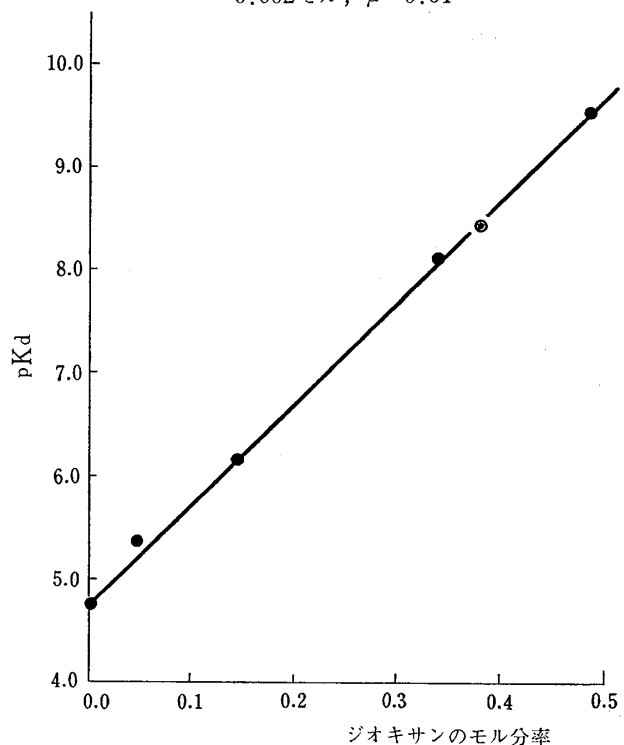


図-5 ジオキサンのモル分率と酢酸の pKD

● 本実験により求めた値

● 水素電極と銀-塩化銀電極によって求めた Harned et al のデータから計算した値。

とができ、又 KD は、以下のような近似的とりあつかいをした。

(1) $\gamma_{HA} \approx 1$ とおいた。これは、中性分子における塩効果を考えないものとする近似的とりあつかいである。

(2) γ_{H^+} , γ_{A^-} は、75%溶媒中で全イオン濃度を塩酸として得られた γ_{\pm}^2 を使用した。

このようにして得られた活量係数の値は、溶媒と共に変化し、一般には、溶媒の透電定数が減少すれば、小さくなる。

(10)を変形すれば、

$$K_D = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \gamma_{\pm}^2 \quad (11)$$

又、最終的には、

$$pK_d = B + \log U_H^0 + \log [CH_3COOH] - \log [CH_3COO^-] - \log \gamma_{\pm} \quad (12)$$

となり、算出された pK_d は、 8.42 ± 0.02 となる。図-4 に滴定曲線を示めた。一方、Harned et al¹³⁾ によって、水素電極と銀-塩化銀電極で得られた値も示めた。図-5 で明らかなように、熱力学的データと、本実験の pH 測定によるデータは、これまでの考察により、近似的とりあつかいの正確さを実証したことになる。

3.4 Lecithin の解離定数の決定

75%ジオキサン溶媒中の Lecithin の解離定数を求めるため、酢酸の pK と同様の方法で実験した。Lecithin の場合、リン酸基とコリン基が荷電した両性電解質である。したがって、酸滴定、塩基滴定の相方を検討しなければならない。Lecithin の酸塩基滴定を、図-6 に示めた。

この滴定曲線から、 pK_a , pK_b を計算により求めると

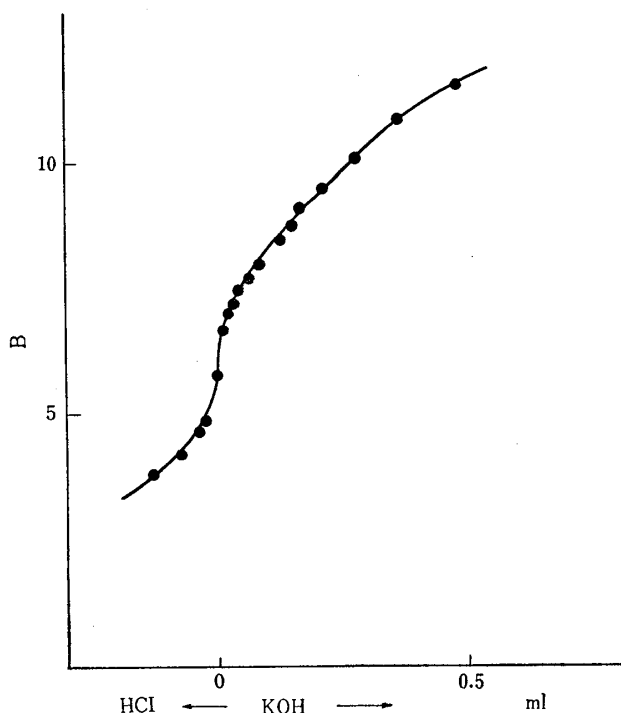


図-6 Lecithin の滴定曲線
0.002モル Lecithin, $\mu=0.01$

$pK_a=3.84 \pm 0.4$, $pK_b=11.33 \pm 0.11$ となる。

酸性領域は、実験の際、Lecithin の性質による泡沫が、吹き上げることから、測定が困難であった。したがって滴定は、数点で中止せざるを得なかった。しかし、測定値の計算の結果、比較的精密な pK_a が測定できた。

一方アルカリ性領域は、ラフな決定にとどまった。たゞ、 $pK_b > 11$ であることが本実験によって推定できた。

これらの結果から、Lecithin は、酸性域で H^+ と結合するが、これは、リン酸基中の負荷電素との結合であり、比較的結合しやすい。しかし、アルカリ領域で、コリン基の第四アミンと OH^- が結合すると考えられるが上記値から推定すると、非常に結合しにくい性質を有しているものと思われる。

4 結 語

本実験は、ジオキサン-水混合溶媒の特質と Lecithin の解離定数を、電位差滴定法により、決定することが、目的である。

- (1) ジオキサン混合溶媒で、ガラス電極-カロメロ電極電池により測定された値は、水素電極-銀塩化銀電極電池によって明らかにされたように、水素イオン活量を測定する。
- (2) 真の pH と混合溶媒中の pH メータの指示とのずれは、溶媒組成とイオン濃度に相関する。
- (3) 75%ジオキサン-水中の Lecithin のイオン定数は $pK_a=3.84 \pm 0.04$, $pK_b=11.33 \pm 0.11$ であつた。

文 献

- 1) J. Bjerrum, "Metal Ammine Formation in Aqueous Solution" P. Haase and Sons, Copenhagen, 1941.
- 2) Bjerrum, N. : Kgl. Danske Vidensk. Selskab. 7, No.9 (1956).
- 3) LeGrand G. Van Uitert and Charles G. Haase : J. Am. Chem. Soc. 48, 126 (1926).
- 4) James E. Garvin and Manfred L. Karnovsky : J. Am. Soc. 211 (1956).
- 5) M. Calvin and K. W. Wilson ; J. Am. Chem. Soc. 67, 2003 (1945).
- 6) A. Weissberger and E. S. Proskauer, "Organic Solvents," Oxford University Press, London, 1935, p.139.
- 7) M. C. Pangborn ; J. Biol. Chem. 137, 545 (1941).
- 8) D. J. Hanahan, M. B. Turner, M. E. Jayko ; J. Biol. Chem. 192, 632 (1951).
- 9) 加藤京太, 熊坂繁太郎 ; 仙台大学紀要, 1, 86 (1969).
- 10) 小寺 明, "物理化学実験法," p.240(1966), 朝倉書店.
- 11) 坂口武一, 上野景平, "金属キレート (1)," 第一版, 南江堂, p.207 (1965).
- 12) Bates, R. G., Schwarzenbach, G. : Helv. Chim. Acta, 38, 699 (1955).
- 13) H. S. Harned and B. B. Owen, "Physical Chemistry of Electrolytic Solutions," 3rd Ed., Reinhold Pub. corp., New York, N.Y., 548(1964).
- 14) M. Dole, "The Glass Electrode," John Wiley and Sons, Inc., New York, N.Y., 1941, p.276-279.
- 15) F. Hovorka, R. A. Schaefer and D. Dreisbach : J. Am. Chem. Soc. 58, 2264 (1936).