

イオン交換膜電極法とその応用

第3報 レシチンと金属塩との結合について

加藤京太 熊坂繁太郎

1. 緒 論

イオン交換膜を着装した膜電極は、既報¹⁾のごとく、酸塩基滴定、沈でん滴定、錯形成反応の追跡等に広く利用される可能性のあることが示され、その取扱いの容易さと、測定精度の良好さは電導度法や pH メーターに依る電位差法に匹敵するものであると考えられる。さらに膜電極はアルコール、デオキサン等の有機溶媒系にも有用であり、この点は電導度法より更に広い応用範囲を有するといえよう。

さて、レシチンはアルコール溶液中で CdCl_2 、 FeCl_3 、 CuCl_2 、等と比較的強固な結合体を作り沈でんとなる。これらのうちレシチン— CdCl_2 複合体は、生体試料からレシチンを抽出する際に精製過程に用いられる²⁾ものであり、よく知られているが、これらのレシチンと金属塩とのコンプレックスについては現在も尚良く研究されていない。結合比についても報告はまちまちであり、結合位置等についても赤外線スペクトルによる報告^{3) 4)}があるが、未だ確定していない。またこれらレシチン金属塩 Complex はクロロホルム中によく溶けるが、その中でどのような存在状態を示しているかについても報告がない。

著者等はまづこれらレシチン複合体の結合比の決定に膜電極法を応用することを考え、金属塩に関しては調査済みであるので、レシチンのアルコール溶液について濃度電位曲線を調べ、次で滴定を行って、その結合比を測定した。またレシチン— CdCl_2 複合体については、そのクロロホルム溶液の蒸気圧を測定し、この複合体がクロロホルム中で平均5分子会合して存在することを確かめたので報告する。

2. 実 験

2-1 卵黄レシチンの抽出および精製

(1) Pangborn 法^{2) 5)}による抽出精製

卵黄10ケを400mlのアセトンとともに Waring ブレンダーにて処理して十分混和して濾過、残滓はさらに2回各200mlのアセトンにて同様に処理したのち、400mlの95%エタノール中に懸濁し、30分間振とうする。吸引濾過後、残滓をさらに2回各200mlのアルコールにて同様に処理する。全アルコール抽出液を合せ、それに50% CdCl_2 水溶液15mlを加え、氷室に一夜放置する。吸引濾過アセトンにて洗浄後、沈でんを80mlのクロロホルムに溶解、約7倍量のエタノール(50% CdCl_2 液8ml添加)を加え、室温に30分間放置。吸引濾過後、得られた沈でんを3回同様な方法で反復処理して精製後、約120mlの石油エーテルに懸濁、400mlの80%エタノール(0.1%に CdCl_2 を含有、石油エーテルにて飽和せるもの)を加え、分液ロート中で激しく振とうする。石油エーテル層はさらに2回100mlの80%エタノールにて抽出、全アルコール抽出液を40mlになるまで減圧濃縮し氷室に一夜放置する。吸引濾過し、沈でんを120mlのクロロホルムに溶解、等量の30%エタノールを加え10分間振とうする。この操作を5回反復し、クロロホルム層を減圧濃縮、残滓を95%エタノール100mlに溶解する。

(2) Hanahan⁶⁾法によるアルミナのカラムクロマトグラフィ

径3cm高さ100cmのカラム(ミツミ科学製)に約450gのアルミナ(純正化学製、クロマト用)を95%エタノールに懸濁して充てんする。これに上記 Pangborn 法にて得た粗レシチンの95%エタノール液100mlを加え、同じ溶媒2ℓで溶出する。東洋科学産業製フラクションユ

1) 加藤京太本誌. P.74.P.83

2) M. C. Pangborn. J. Biol. Chem. 137 545 (1941)

3) 原一郎, 加藤京太, 千原呉郎: 昭和36年 生化学会講演

4) 原一郎, 松村 昭和43年6月 脂質生化学研究会講演

5) 安田守雄, 大野公吉: 脂質実験法 P.83 (1967) 共立出版

6) D. J. Hanahan, M. B. Turer, M. E. Jayko, J. Biol. Chem. 192 632 (1951)

レクター-SF160K型を用いて分取。溶出液に50% CdCl_2 2~3 mlを滴下、白沈の生ずるものを集めて遠心分離、上澄を捨て残滓を100mlのクロロホルムに溶解、等量の30%エタノールを加え10分間振とうする。この操作を5回反復しクロロホルム層を減圧濃縮して約半量にする。

(3) ケイ酸カラムクロマトグラフによる精製

上記と同様のクロマトカラムにMallinckrodt製のクロマト用ケイ酸200gとケイ藻土100gを混ぜたものをCM 1:1の溶媒に懸濁して充てんし、アルミナクロマトにより精製したレシチンのクロロホルム溶液を注加、CM (1:1) 溶媒1.5lで展開する。各フラクションにつき濾紙上にてSpot testを行い、P-反応陽性の部分を集めて減圧濃縮し残滓を少量の無水エーテル(あらかじめ過酸化物を除去しておく)に溶かし、5倍量の精製アセトンを加え再沈でんせしめる。溶媒を傾斜して残滓を再びエーテルに溶かしアセトンを加え、この操作を3回反復してから残滓を減圧乾燥し、無水エタノールに溶解し、 N_2 を通じて氷室に保存する。かくして得られたレシチンは薄層クロマトによるテストにおいてone spotを与えるのみであり、一応純粋なものとして使用した。

2-2 レシチンのアルコール溶液における濃度電位曲線の測定

Pumping型電極のI室に 0.5×10^{-2} モルのレシチン(80%エタノール溶液に溶かしたもの)20mlを入れ、II室にも同一の溶液を入れ80%エタノールで倍々希釈しながら膜電位の変動を測定した。既報の如く、エタノール溶液では被測定回路の内部抵抗が高くなっているため、横河製の電位差計を使用せず、東亜電波の記録計と真空管電位計とを併用した。

2-3 アルコール溶液における FeCl_3 、 CdCl_2 の濃度電位曲線の測定

水-エタノール混合溶媒に対する金属塩の膜電位については、0~60%エタノール中におけるKClの濃度電位曲線についてさきに検討したが、80%エタノール系につき、特に2価、3価の金属塩については未経験であるため、レシチンと同一の条件での電位特性を知る目的で測定を行った。Pumping型電極のI、II室にそれぞれ 1×10^{-3} モルの CdCl_2 、又は FeCl_3 の80%エタノール溶液を入れ、II室側を倍々希釈して電位変動を追跡した。

2-4 レシチン溶液に対する CdCl_2 および FeCl_3 溶液の電位差滴定

廻転型電極のI室およびII室に 1×10^{-3} モルに調製し

たレシチンの80%エタノール溶液を入れ、電極を廻転させながら、II室のレシチン溶液に対し、0.05モルの CdCl_2 、 FeCl_3 80%エタノール溶液で滴定した。

2-5 レシチン塩化カドミウム複合体のクロロホルム溶液の蒸気圧測定

日立分子量測定器115型を用い、蒸気圧の測定を行った。レシチンの原試料(実験2-1)に50% CdCl_2 水溶液を滴下して生成したレシチン- CdCl_2 の白沈を遠心分離し、無水エタノールで洗浄、回転蒸発乾固したものをクロロホルムに溶かして試料とした。クロロホルムについてはBenjilを試料として、予め濃度蒸気圧曲線を求め(図-1)、これと比較してレシチン複合体の分子量を計算した。

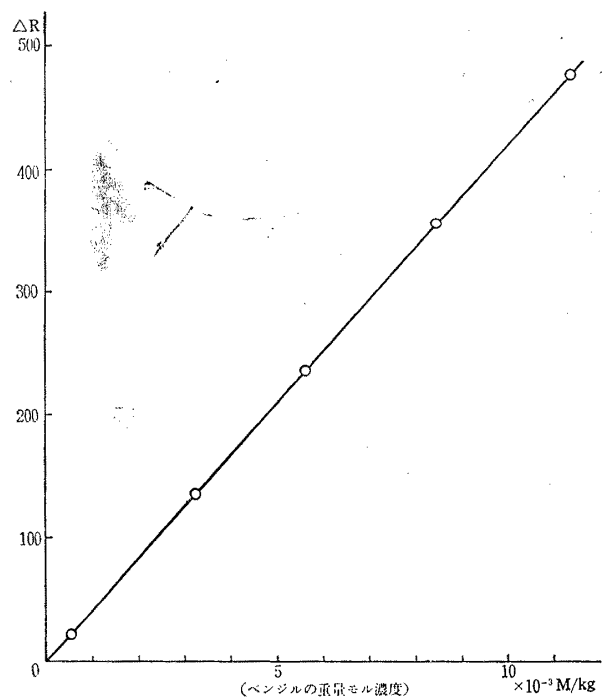


図-1 ベンジルのクロロホルム溶液における濃度・蒸気圧曲線

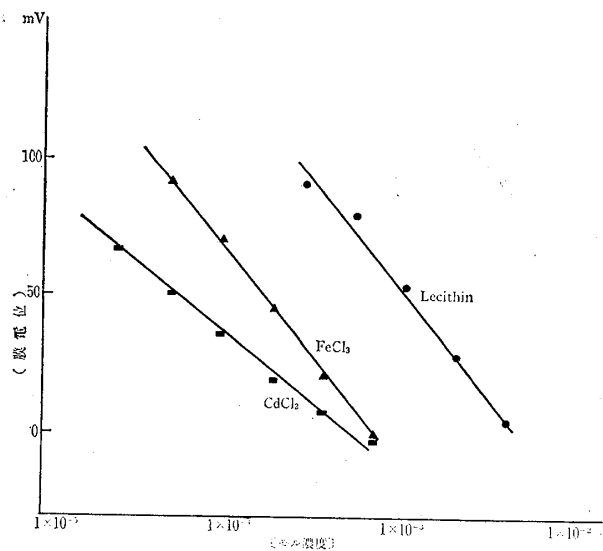
3. 結果および考察

3-1 レシチンのエタノール溶液の膜電位特性

レシチンは分子内にリン酸およびコリン残基による親水性の部分と、2個の脂肪酸による疎水性の部分とを有する界面活性剤であり、且つ、構造上両性イオンの性格も併せ持っており、溶液中では殆どの場合、ミセルを形成しているものと考えられる。

両性イオンから成るミセルの一般的な膜電位特性につ

いては今日迄報告されたものがほとんどなく、未知の分野であるといえよう。ただ巨大イオンであることと、条件に従って種々の会合形態をとり、分子量分布も様々な状態にあるもの推定されるので、無機化合物のような判然とした電位特性を示すことは期待できない。図一2は 10^{-3} モル order 以下の濃度におけるレシチンの濃度電位曲線である。両性イオンであることから、溶液の pH 依存性、エタノールの含有率との問題等について、更に詳細な検討が必要であるが、兎に角、二三のパラつきはあっても、無機イオン系のもものと比較して予想外のものではなく、一つの判然とした傾向を示していることが解る。



図一2 レシチンおよび CdCl_2 , FeCl_3 のエタノール (80%) 溶液における濃度電位曲線

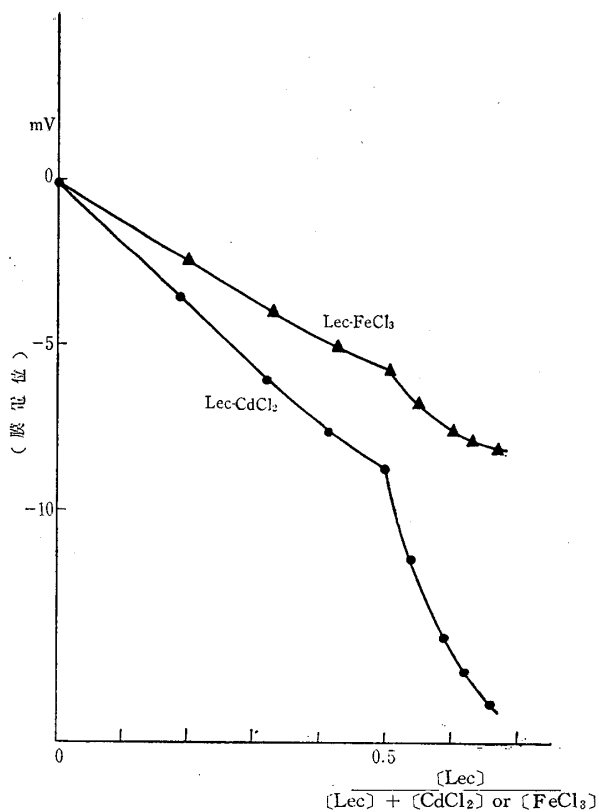
3-2 CdCl_2 , FeCl_3 エタノール溶液の膜電位特性

無機化合物の膜電位は水溶液から有機溶媒に移された場合に、主として溶媒の誘電率に従って低下し、直線のパターンはそのまま保存されるものと推定される。

3-3 レシチン溶液に対する電位差滴定曲線

レシチンのエタノール溶液に対する CdCl_2 および FeCl_3 エタノール溶液による滴定結果を図一3に示した。レシチン金属塩のコンプレックスは無水エタノール溶媒においても溶解せず、沈でんを生ずるが、80%系においては勿論沈でんとなり、一種の沈でん滴定となる。この場合も硝酸銀、塩化ナトリウムの滴定の場合と同様に、被滴定溶液中の free なレシチン濃度の減少に伴う曲線が現れ、反応終点を過ぎてからは Cd^{2+} , Fe^{3+} イオンの濃度電位曲線に移行し、屈折点が現れることが期待

される。図一3の滴定曲線は CdCl_2 , FeCl_3 とともに明瞭な折点を与え、折点における溶質間のモル分率はいずれも 0.5 と計算された。したがって80%エタノール溶液中におけるレシチンと塩化カドミウムおよび塩化第二鉄との結合体は1:1の結合比で構成されていることが解る。この結合比は分光法で行ったレシチン、塩化第二銅コンプレックスの場合のものとも一致するので、これらのコンプレックスは分子内にイオン電場を有するレシチンと金属塩との一種の静電結合に依る分子化合物であるという著者等の推定が更に確められたわけである。



図一3 レシチンに対する CdCl_2 , FeCl_3 溶液の電位差滴定曲線

3-4 Lec- CdCl_2 コンプレックスの分子量

これらのレシチン金属塩複合体はクロロホルムを除いて、他の一般の有機溶媒には溶解し難く沈でんしてしまい、放置しておくとう樹脂状を呈するようになる。またクロロホルム中に溶解している場合の存在状態についても殆ど未解決である。Lec- CuCl_2 コンプレックスはクロロホルム中において $400\text{m}\mu$ に新しい吸収を生じ、美しい緑色を呈するが、これは同じ溶媒における Cu^{2+} イオン単独の発色に近いものである。また一方、レシチン自身はクロロホルム中で約10分子が会合して小さなミセルを形

成することが観察⁷⁾されている。これらの事情からレシチン、金属塩複合体はクロロホルム中において溶媒と可成密接な溶媒和現象を伴いつつミセルを形成しているものと考えられる。Lec-CdCl₂ のクロロホルム溶液 (4.1 g/l), (2.6 g/l) (1.8 g/l) について蒸気圧平衡法の原理から測定された分子量は平均5200と与えられた。Lec-CdCl₂ の平均分子量を約1000と仮定すると、この分子量から Lec-CdCl₂ の約5分子が会合し、小型ミセルを結成しているものと考えられる。

4. 結 語

- (1) 80%エタノール溶媒中におけるレシチンの濃度膜電位曲線は予想より再現性の勝れたパターンを与え、分析法として利用できることがたしかめられた。

- (2) レシチン溶液に80%エタノール溶媒系でCdCl₂, FeCl₃ 溶液を滴下して沈でん滴定を行い、電位曲線の屈折点からレシチン金属塩コンプレックスが1:1の分子比で結合していることがたしかめられた。
- (3) レシチン金属塩コンプレックスのクロロホルム溶液の蒸気圧を測定し、複合体が5分子会合して溶存していることが認められた。

* * *

本研究は昭和39年より41年に到る3年間著者等が福島大学教育学部化学科に在籍中に行った実験を仙台大学に転勤後補足したものである。福島大学において主として実験にたづさわった伊藤峰祝、佐藤誠徳の両君に深く感謝する次第である。

(昭和43年10月2日、日本化学会秋季大会発表)

7) 加藤京大, 熊坂繁太郎 未発表