慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	含水アセトンを溶媒としたアミノ酸の過塩素酸による電位差滴定
Sub Title	Potentiometric titration of some amino acids in aqueous acetone solvent with perchloric acid
Author	鹿島, 哲(Kashima, Tetsu) 黒崎, 美佐(Kurosaki, Misa) 大脇, 久子(Owaki, Hisako) 館田, 理恵子(Tateda, Rieko)
Publisher	共立薬科大学
Publication year	1981
Jtitle	共立薬科大学研究年報 (The annual report of the Kyoritsu College of Pharmacy). No.26 (1981.) ,p.1- 8
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	原報
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000026-0001

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

共立薬科大学
Annu. Rep. Kyoritsu
Coll. Pharm.

含水アセトンを溶媒としたアミノ酸の過塩素酸による電位差滴定*

鹿島　哲，黒崎　美佐，大脇　久子，館田理恵子

Potentiometric titration of some amino acids in aqueous acetone solvent with perchloric acid

Tetsu KASHIMA, Misa KUROSAKI, Hisako OHWAKI, and Rieko TATEDA

100 μmol of some amino acids in aqueous acetone (1/1) is titrated potentiometrically with 0.1 M $HClO_4$ using Metrohm titroprocessor with glass indicator and silver-silver chloride reference electrodes and a salt bridge of 3 M LiCl aqueous ethanol solution (Table I and Fig. 1).

To clarify the end point, aqueous acetone (2/3) is used to titrate L-histidine and L-leucine. Since the solubility of L-phenylalanine is low, aqueous acetone (3/2) is used for the determination.

It is found that the emf of the half neutralization point of the amino acids is proportional not to the pK_1 but the pH of the isoelectric point, namely pI. This is because that the amino acids will be almost the zwitter ion, NH_3^+ $RCOO^-$ in aqueous acetone solvent.

1. まえがき

アミノ酸は双極イオンとして存在するので，水には比較的よく溶けるが有機溶媒には溶けにくいものが多い。ところが中性アミノ酸水溶液の pH は 6 前後なので，酸はもとより塩基で滴定することも困難である。そこで，いくつかのアミノ酸は氷酢酸を溶媒として過塩素酸で滴定されているが,[1] この場合も溶けにくいことが一つの難点である。

そこでアミノ酸を塩基として酸で滴定するときは，水に溶かし有機溶媒を多量加えた試料液を塩酸で滴定する方法がよく行なわれているが，今回は含水アセトンを溶媒とし，塩酸より強い過塩素酸で滴定したところよい成績がえられた。また，滴定反応や溶媒効果などについても考察したので報告する。

2. 実　験

2.1. 試　薬

1) 試　料

アミノ酸は特級試薬を用い，0.1 M 水溶液をつくり，用時 0.02 M に希釈して使用した。

グリシン，国産化学.

L-α-アラニン，東京化成.

DL-α-アラニン，東京化成.

β-アラニン，日本理化薬品.

L-ロイシン，日本理化薬品.

---

* この一部は日本薬学会，第 101 年会（1981 年 4 月）で発表

1) 第十改正　日本薬局方，1981.

L-イソロイシン，日本理化薬品.
L-トレオニン，日本理化薬品.
L-バリン，日本理化薬品.
L-メチオニン，日本理化薬品.
L-アルギニン，日本理化薬品.
L-ヒスチジン，日本理化薬品.
L-フェニルアラニン，日本理化薬品.

2) 滴定試薬

0.1 *M* 過塩素酸水溶液

メルク社の70% 過塩素酸を希釈。

3)溶媒

純水，用時イオン交換法で精製したものを直ちに用いた。

アセトン，メルク社の分光分析用アセトン（99.7 w/w%）を使用。

2.2. 装 置

滴定記録装置：Metrohm 社製 Titroprocessor E 634 に Dosimat E 635, Stirrer E 649 を接続して使用。電動ピストンビュレットは 5 m*l* を使用，最小単位 1 μl。

滴定容器：Metrohm 社製ウォータージャケット付滴定容器 EA 876-20（20 m*l* 用）または EA 876-50（50 m*l* 用）を使用。

指示電極：Metrohm 社製ガラス電極 EA 109。

比較電極：Metrohm 社製 銀・塩化銀電極 EA 427，内部溶液および塩橋として 3 *M* 塩化リチウム 50 v/v % エタノール溶液を使用。

電子恒温槽：池田科学株式会社製，25.0℃。

定電圧装置：山菱電機株式会社製，100V.

電子天びん：ザートリウス社製，1264MP，記録装置付.

重量ビュレット：10 または 30 m*l* 容積の重量ビュレットで三角フラスコに共通すり合わせで直立するようにしたものに試料溶液を入れて電子天びんで測定するようにしたもの。

2.3. 実験方法

0.02 *M* のアミノ酸水溶液約 5 g（約 100 μ mol）を重量ビュレットを用いて正確に量りとり，25.0℃の電子恒温槽につないだウォータージャケット付の滴定フラスコに入れ，水を加えて約 20 g としたものを試料とした。含水有機溶媒を使う場合には水との混合比が希望の値になるようアミノ酸水溶液に有機溶媒および水を加えて約 20 g の試料溶液をつくった。

その試料溶液にガラスフィルター付きガス導入管から窒素ガスを通じ，マグネチックスターラーで一定速度でかき混ぜながら過塩素酸で滴定した。その電位差滴定曲線，一次微分曲線，滴定量とその起電力値は Titroprocessor で記録した。

溶媒としては主としてモル比で1対1のアセトンを用い，起電力の変化が明確でないとき，アミノ酸が溶解しないときは3対2および2対3のモル比の含水アセトンを用いた。また，終点を明瞭にするため約2分の1当量まで滴定したところで，アセトンを追加して終点を明瞭にすると同時に溶解状態を保つようにした。滴定に要した時間は15～20分である。

2.4. 実験結果

塩基性アミノ酸であるL-アルギニンおよびL-ヒスチジンは水溶液で滴定することができたが，他の中性アミノ酸は滴定することができなかった。

中性アミノ酸のうち，β-アラニン，L-α-アラニン，DL-α-アラニン，L-イソロイシン，L-バリン，グリシンはモル比で1対1の含水アセトンを溶媒として滴定できた。L-ヒスチジンおよびL-ロイシンは沈殿の生成を避けるため3対2の含水アセトンを溶媒として滴定した。L-フェニルアラニンは終点を明瞭にするため2対3の含水アセトンを使った。L-メチオニンは1対1の含水アセトンでは終点が不明瞭であるが，初めからアセトンの含量を増すと沈殿してくるので，2分の1当量点を過ぎたところでアセトン含量を倍増することによって滴定可能となった。L-バリンおよびグリシンは2分の1当量点を過ぎたところでアセトン含量を増して2対3として滴定することによって感度を増すことができた。L-ロイシンは2分の1当量点でアセトン含量を1対1にして滴定した。以上の結果をまとめたものがTable Iで，その電位差滴定曲線がFig. 1である。

1対1モル比の含水溶媒中での2分の1当量点の起電力値と水溶液中におけるアミノ酸pK_1との相関関係をみたところ，一般のカルボン酸の場合と違って相関性がみられなかった。しかし，等電点のpHつまりpIとの関係をみたところFig. 2でわかるようによい相関性がみられた。なお，溶媒の種類，水との混合割合および比誘電率の滴定に及ぼす影響を，β-アラニンを試料として，希釈誤差および滴定による溶媒組成の変化を避けるため1M濃度の過塩素酸で滴定した結果をFig. 3で示した。

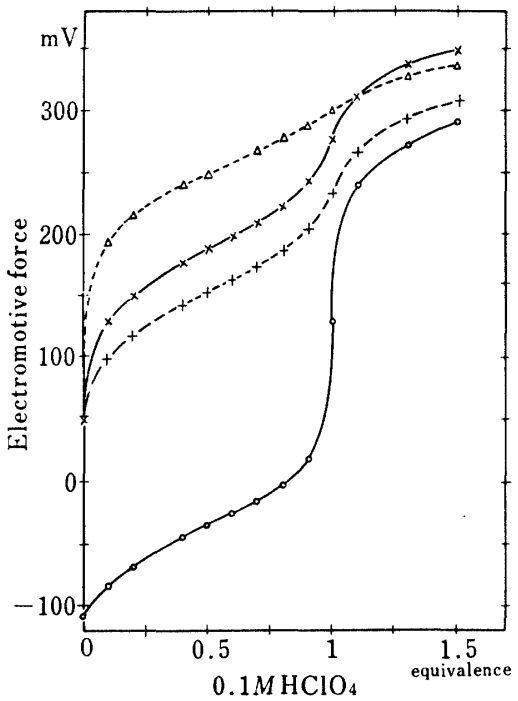


Fig. 1. Titration curves of some amino acids in aqueous actetone △ Glycine, L-α-Alanine, DL-α-Alanine, L-Isoleucine, L-Valine, L-Phnylalanine, L-Methionine, L-Leucine. × L-Histidine, + β-Alanine, ○ L-Arginine $H_2O/(CH_3)_2CO=1/1$ molar ratio, $H_2O/(CH_3)_2CO=3/2$ molar ratio [× and ○]

Table I. Titration of some amino acids with 0.1 M $HClO_4$ in aqueous acetone

Amino acids	$H_2O/(CH_3)_2CO$ 1/1				$H_2O/(CH_3)_2CO$ (1/1→2/3)						
	Found %	S.D. %	e.p.(1/2) mV	ΔE mV	Found %	S.D. %	ΔE mV	pK_1	pK_2	pK_3	pI
L-Arginine	99.6	0.40	−35.2	352.0				2.18	9.09	13.2	11.2
L-Histidine*	99.0	0.21	(+153.2)	(153.2)				1.78	5.97	8.97	7.47
β-Alanine	99.4	0.25	+188.2	160.5				3.60	10.19		6.90
L-α-Alanine	98.1	0.40	+250.1	87.4				2.34	9.69		6.01
DL-α-Alanine	97.2	0.53	+250.1	87.3				2.34	9.69		6.01
L-Leucine*	95.5	0.46	(+247.7)	(78.1)	96.8	0.12 (3/2→1/1)	88.9	2.36	9.60		5.98
L-Isoleucine	98.2	1.0	+253.8	97.9				2.26	9.62		5.94
L-Valine	97.7	1.2	+254.3	90.3	98.6	0.33	108.9	2.32	9.62		5.97
Glycine	96.2	0.50	+263.8	77.4	97.4	0.33	99.8	2.34	9.60		5.97
L-Methionine	—	—	(+266.0)	—	100.7	0.76 (1/1→1/2)	107.2	2.28	9.21		5.74
L-Phenylalanine†	98.2	0.25	(+271.4)	(92.5)				1.33	9.13		5.48

* $H_2O/(CH_3)_2CO=3/2$, †=2/3

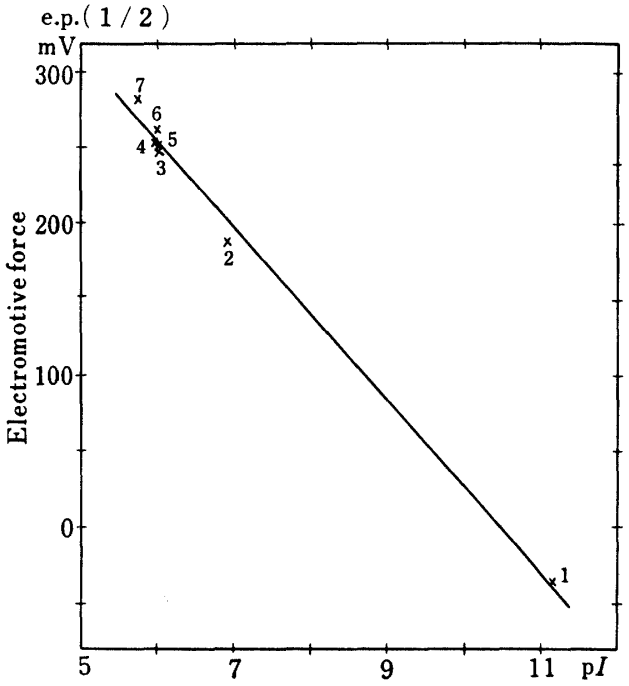
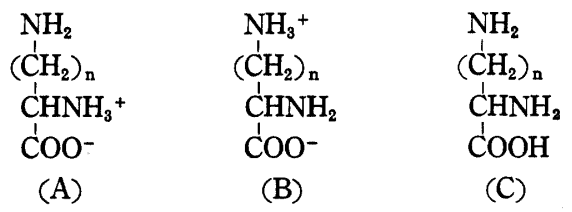


Fig. 2. Relationship between the pI and the emf of half neutralization point of amino acids
1 L-Arginine, 2 β-Alanine, 3 L-α-Alanine, 4 L-Isoleucine, 5 L-Valine, 6 Glycine, 7 L-Methinonine.

3. 考 察

塩基性アミノ酸は水溶液として強酸を使って滴定することができるが，中性アミノ酸はその水溶液の pH が 6 前後なので強酸で滴定してもよい結果をうることができない。そこで氷酢酸を溶媒として過塩素酸で滴定する方法やホルモール法が用いられている。[1] しかし，アミノ酸は水には比較的溶け易いが，非水溶媒には溶けにくいこと，また間接滴定には別の難点があるので，含水溶媒を使って電位差滴定で検討することにした。

アミノ酸の溶液中における双極イオンと中性分子の存在比 $K_D=[NH_3^+RCOO^-]/[NH_2RCOOH]$ は水溶液中では 10^5 より大きい，つまり双極イオンとして存在する。溶媒が 90 w/w % エタノールとなっても $K_D=500$ にまで低下するが大部分が双極イオンとして存在することに変わりがない。[2] つまり，次に示した (A), (B) および (C) の構造の存在を考えた場合 (C) で存在する割合は非常に少い。



アルギニンは大部分 (B) 構造として存在するので，[2] その塩基性は強い。ヒスチジンはモノカ

ルボン酸のとる (A) 構造として存在するので,[2] NH_3^+ が COO^- に近接しているため，他の中性アミノ酸と同様，その部分の塩基性はなくなり，末端の NH_2 に基づく塩基性のみになるため，その強さは弱くなる。

アミノ酸を水に溶かし，メタノール，エタノール，2-プロパノールおよびアセトンを加えた含水試料溶液を過塩素酸で滴定したところ，含水アセトンを溶媒とした試料がよい成績を示したので，水とアセトンのモル比，1対1 (76.3 w/w %，ε : 31.8) を主に使って滴定することにした。なお，含水アセトンを溶媒とし指示薬を用いた滴定はかなり報告されているので，ここで電位差滴定法で詳しく検討することにした。

溶媒としてアセトンがメタノールおよびエタノールより適している一つの理由は，アセトンの比誘電率が上記のアルコールより低いため,[3] 次式の反応が右辺に片寄るからである。

$$NH_3^+RCOO^- + H^+ \rightarrow NH_3^+RCOOH \quad \cdots\cdots (1)$$

また，一般的に双極イオンはアセトンよりアルコール類によってよく溶媒和されて安定化されている。

溶媒の自己プロトン解離，K_s を考えるとアルコールの解離は次式で表わされる。

$$ROH + ROH \rightarrow ROH_2^+ + RO^- \quad \cdots\cdots (2)$$

メタノール，エタノールおよび2-プロパノールの pK_s はそれぞれ 16.7, 19.1 および 20.8 であるが,[3] それらに対してアセトンは理論的には自己プロトン解離しないが，現実には水などの不純物などを含むことなどから，比較的大きな値ではあるが，ある pK_s 値を示す。もちろん，含水状態の溶媒ではやや小さい pK_s 値になる。主に使用した 76 w/w % アセトンの見掛けの pK_s は約 18 で，他の含水アルコールの pK_s より約2ほど大きいものと推定される。[3] したがって，溶媒として含水アセトンを使って中性アミノ酸が強酸で滴定できるのは，主として溶媒の比誘電率が小さいこと，溶媒和しにくいこと，自己プロトン解離が比較的大きいためと考えることができる。また，含水アセトンは水より塩基性領域も少し拡大しているものと見なせよう。[3]

滴定試薬として 0.1 M 過塩素酸水溶液を用いたのは，試料の溶媒として多種の含水溶媒を用いるため共通の溶媒である水を使った。また，水の比誘電率は 78.5 と高く，H_3O^+ の動きが早いことを考慮した。実際，含水アセトン中で過塩素酸が塩酸より強い酸性を示すことは，反応速度が約2倍になり，起電力変化もやや増加することに表われていた。

なお，滴定試薬の溶媒が水で，試料の溶媒が含水アセトンのため Table II に見られるように滴定の進行につれて試料溶媒の組成が変化し，その比誘電率も変化するため，滴定反応に及ぼす溶媒組成との相関性を正確に解釈することは困難である。それを避けるためには，過塩素酸の濃度 0.1 M を 1 M にすることである。それによって滴定による希釈誤差と溶媒組成の変化を無視することができる。したがって溶媒およびその含水量の変化が滴定に及ぼす影響を見るときは，1 M 濃度の過塩素酸を使った。(Fig. 3) 詳しく検討しなかったが，含水ジオキサンは溶媒として好適だと思われるが，その理由は比誘電率が他の溶媒と比べて非常に小さいことと，溶解能が高く水と水素結合するためであろう。

2) J. P. Greenstein, M. Winitz: "Chemistry of the amino acids," Vol. 1, Chap. 4, 1961, John Wiley & Sons.

3) G. Charlot, B. Tremillon; 藤永太一郎，佐藤昌憲訳："シャルロー 溶媒内の化学反応と平衡", 1963, 丸善。

Table II. Relationship between the molar ratio of water/acetone and the weight percent of acetone and the dielectric constant

$H_2O/(CH_3)_2CO$ molar ratio	Initial concentration w/w%	e.p.(1/2) w/w%	e.p. w/w%	e.p.(3/2) w/w%
3/2	68.3(36.8)	66.7(37.5)	65.2(38.8)	63.7(35.9)
1/1	76.3(31.8)	74.5(33.0)	72.8(32.0)	71.2(35.0)
2/3	82.9(28.0)	80.9(29.0)	79.0(30.0)	77.2(31.2)
1/2	86.6(25.6)	84.5(27.0)	82.5(28.2)	80.6(29.2)

( ) : dielectric constant

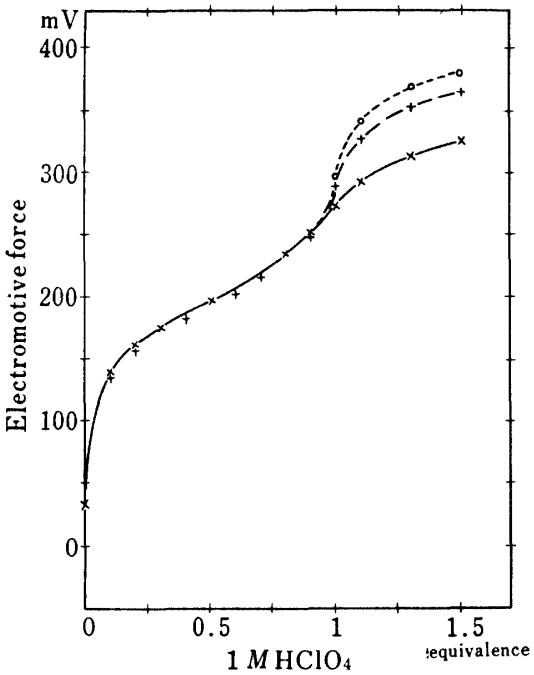


Fig. 3. Titration curves of 0.01 M β-alanine in aqueous organic solvents

Aqueous solvent	ε			ε
○ 1,4-Dioxane (75 w/w%)	14	×	2-Propanol (75 w/w%)	29
+ Acetone (75 w/w%)	32.5	×	Ethanol (75 w/w%)	35
+ Ethanol (90 w/w%)	27.5	×	Acetone (50 w/w%)	45
+ 2-Propanol (90 w/w%)	19	×	1,4-Dioxane (50 w/w%)	36

含水アセトン中で酸の作用をするものが OH_3^+ であるか $(CH_3)_2COH^+$ であるか問題であるが，含水メタノール中でメタノール含量が約 80 w/w % (ε : 約 40) まではプロトンはほとんど OH_3^+ として存在し，それ以上メタノールの含量が増加し比誘電率が低下するにつれて $CH_3OH_2^+$ の割合が増すことが知られているので,[4] 76 w/w % アセトン中ではプロトンは OH_3^+ として大部分存在するものと推定される。

ある塩基を強酸で2分の1当量中和した点［e. p. (1/2)］の電位の値は，中和反応以外の反応が生じるのでなければその塩基の pK_b，アミノ酸でいえば pK_1 と比例関係にあるのが通例であるが，Table I および Fig. 2 でみられるように，アミノ酸では2分の1当量点の電位は等電点の pH (pI) と比例関係があることがわかった。まずアミノ酸のプロトンの授受の関係を表わすと次のようになる。

$$NH_3{}^+RCOOH \underset{K_1}{\overset{+H^+}{\leftrightarrows}} NH_3{}^+RCOO^- \underset{K_2}{\leftrightarrows} NH_2RCOO^- + H^+ \quad \cdots\cdots (3)$$

$$K_1 = \frac{[NH_3{}^+RCOO^-][H^+]}{[NH_3{}^+RCOOH]} \quad \cdots\cdots (4)$$

$$K_2 = \frac{[NH_2RCOO^-][H^+]}{[NH_3{}^+RCOO^-]} \quad \cdots\cdots (5)$$

$$pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2} \quad \cdots\cdots (6)$$

溶媒中のアミノ酸，$NH_3{}^+RCOO^-$ は COO^- が塩基性の作用をすると同時に $NH_3{}^+$ は酸の性質を示すから，アミノ酸を塩基として酸で2分の1中和したときの電位は，pK_1 ばかりでなく pK_2 にも同等に関係する，つまりその両者の平均値である pI に比例すると解釈できよう。

Table I でわかるように，試料溶液の溶媒の混合比が変わると定量値が1％ぐらいは変動した。それは過塩素酸標準液を標定するときと，試料を滴定するときと同じ混合比の溶媒を使う必要があることを示すもので，日本薬局方[1]では空試験をすることによってその誤差をなくすようにしている。

4. 結 論

約 100 μmol のアミノ酸をモル比1対1の含水アセトンを溶媒として 0.1 M 過塩素酸水溶液で滴定することができた。終点を明瞭にするため L-ヒスチジンおよび L-ロイシンを滴定するときはモル比3対2の含水アセトンを用い，溶解度の低い L-フェニルアラニンには2対3の溶媒を使った。また，溶ける程度の含水溶媒を用いた試料に約2分の1当量の酸を加えてからアセトンを追加してその割合を増してから滴定することによって終点を明瞭にすることができた。

アミノ酸に酸を2分の1当量を加えたときの起電力値は pK_1 ではなくて等電点の pH である pI と比例関係にあることを見出した。その理由はアミノ酸が一般のカルボン酸と違い溶液中で双極イオンとして存在するためであろう。

4) R. W. Gurney: "Ionic Processes in Solution," Chap. 13, 1953, McGraw-Hill.