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

Title	含水溶媒を使った2種アミノ酸の分別自記電位差滴定
Sub Title	Recording potentiometric differential titration of two amino acids mixtures in some aqueous organic solvents
Author	鹿島, 哲(Kashima, Tetsu) 小出, 裕子(Koide, Yuko) 伊藤, 文子(Ito, Ayako) 大矢, 公子(Oya, Kimiko) 河村, 倫子(Kawamura, Michiko)
Publisher	共立薬科大学
Publication year	1985
Jtitle	共立薬科大学研究年報 (The annual report of the Kyoritsu College of Pharmacy). No.30 (1985.) ,p.15- 25
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	原報
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000030-0015

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.

含水溶媒を使った2種アミノ酸の分別自記電位差滴定*

鹿島　哲，小出裕子，伊藤文子，大矢公子，河村倫子

Recording potentiometric differential titration of two amino acids mixtures in some aqueous organic solvents

Tetsu KASHIMA, Yuko KOIDE, Ayako ITO, Kimiko OHYA
and Michiko KAWAMURA

(Received September 30, 1985)

Some neutral amino acids in aqueous ethanol, 2-propanol or acetone are titrated potentiometrically with 1*M* NaOH using Metrohm titroprocessor with glass indicator and silver-silver reference electrodes and a salt bridge of 3 *m* LiCl aqueous ethanol solution (Fig. 1 and 2, Table I). Aqueous acetone is the best solvent to titrate amino acid, because it consists of polar molecule with a strong tendency to combine positive parts of amino acid, and has a large proton dissociation constants, pK_s and also very weak acidity.

The mixture of L-threonine and β-alanine is differentially titrated with 1*M* NaOH in aqueous acetone with a precision of about one per cent. Using a solvent consisted of eight moles of water and one mole of 1,4-dioxane, the mixture of L-arginine and L-histidine is determined with same accuracy using 1*M* $HClO_4$ as titrant, because the dioxane is a nonpolar, very low dielectric and weak basic substance.

1. まえがき

含水有機溶媒を使ってアミノ酸を NaOH[1] または $HClO_4$[2] で滴定した経験に基づいて，2種のアミノ酸の混合試料を含水溶媒中で水と有機溶媒のモル比を変えて電位差滴定を試みたところ，分別滴定できる例など興味あることが見出されたので報告する。

2. 実　験

2.1 試　薬

1) 試　料

L-α-Alanine，宝興産，S-Grade.
β-Alanine，宝興産，S-Grade.
L-Threonine，宝興産，S-Grade.
L-Serine，宝興産，S-Grade.
L-Phenylalanine，宝興産，S-Grade.
L-Histidine，宝興産，S-Grade.

* 日本薬学会第105年会（1985年4月）で一部発表

L-Arginine, 宝興産, S-Grade.

いずれも 0.02 mol/kg 溶液として使用。

2) 滴定試薬

1*M* 水酸化ナトリウム, Merck 製分析用試薬の 50% 溶液を 80℃ で数時間加温して炭酸ナトリウムを沈殿させ, その上澄液を希釈して 1*M* 溶液を調製し, フタル酸水素カリウムを用いて標定し, 空気中の二酸化炭素を吸収するのを避けるため, 塩化カルシウム管を付けて保存した。

1*M* 過塩素酸 : Merck 社製分析用試薬 70 w/w% を希釈して 1*M* 溶液を調製し, 炭酸ナトリウムで標定した。

3) 溶 媒

純水 : イオン交換法で精製したものを直ちに煮沸し二酸化炭素を除いたもの。

Ethanol : 試薬を常法により蒸留したもの。

Methanol, 2-Propanol, Acetone : Merck 社の分光分析用を使用。

1, 4-Dioxane : 和光純薬社製の非水滴定用を使用。

以上の溶媒を重量で混ぜ合わせて使用。

2.2 装 置

自記滴定装置 : Metrohm 社製 Titroprocessor E 634 に Dosimat E 635, Stirrer E 649 を接続して測定。ウォータージャケットをつけた電動ピストンビュレットは 5 ml 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 876-50(50 ml 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 w/w% エタノール溶液を使用。

電子定温槽 : Lauda 製 Type RC 20 S。

定電圧装置 : 山菱電機製, 110 V。

電子天びん : Sartorius 1265 型, 秤量 400 g, 感量 1 mg, プリンター付き。

重量ビュレット : 10 または 50 ml 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。それを用い直示はかりで試料を秤りとった。

2.3 実験方法

0.02 mol/kg のアミノ酸水溶液約 50 g(約 1 m mol) を重量ビュレットを用いて正確に量りとり, 25.0℃ の電子定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 50 g の試料溶液をつくった。有機溶媒として, メタノール, エタノール, 2-プロパノール, アセトンおよび 1, 4-ジオキサンを用い, 水とのモル比が 16/1, 8/1, 4/1, 2/1, 1/1 および 1/2 の含水溶媒を使った。

その試料溶液を入れた滴定フラスコ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, 1*M* NaOH または 1*M* $HClO_4$ 標準液で滴定した。その電位差滴定曲線, 一次微分曲線および滴定量とその起電力値は Titroprocessor で記録した。

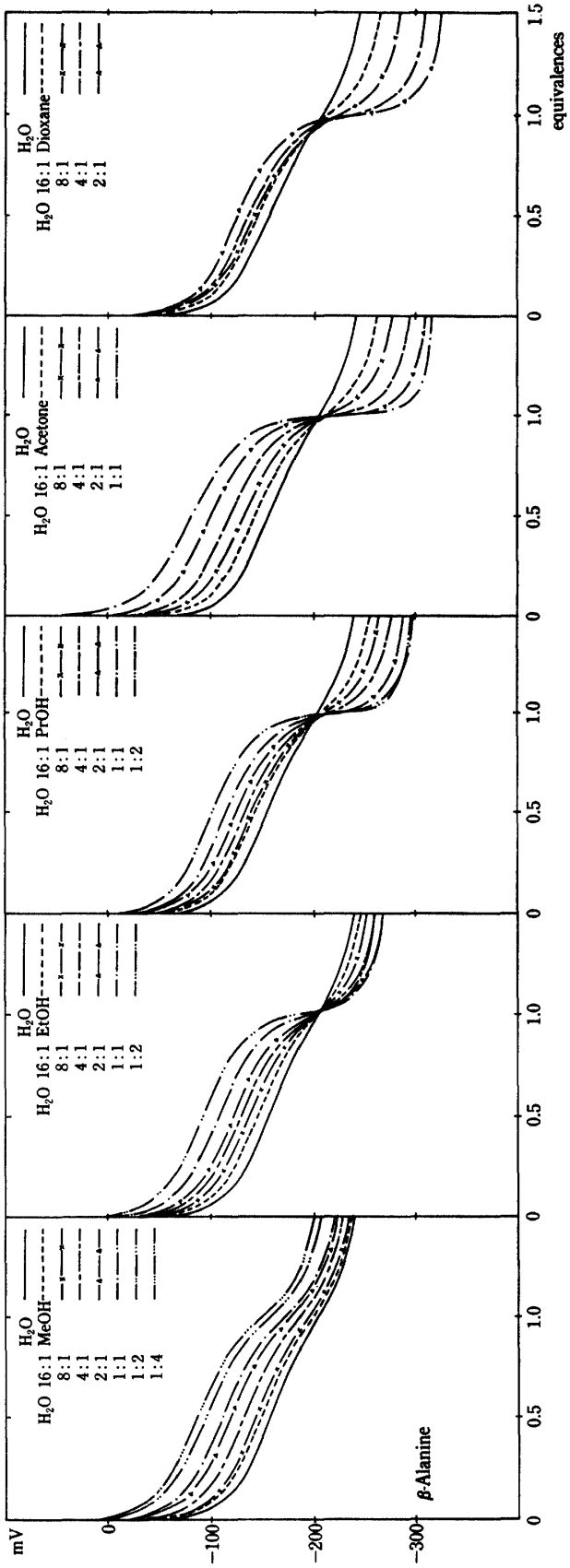


Fig. 1 Potentiometric titration curves of β-alanine in some aqueous organic solvents (molar ratio 16/1—1/4)

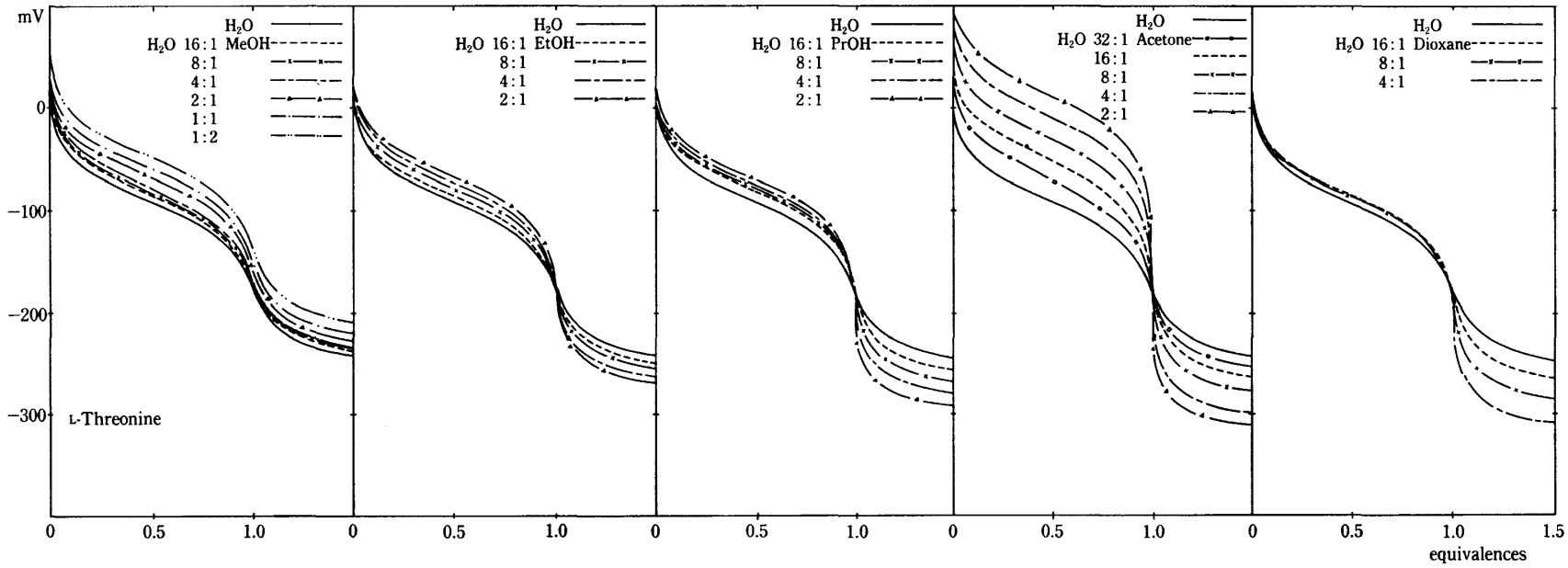


Fig. 2 Potentiometric titration curves of L-threonine in some aqueous organic solvents (molar ratio 16/1—1/2)

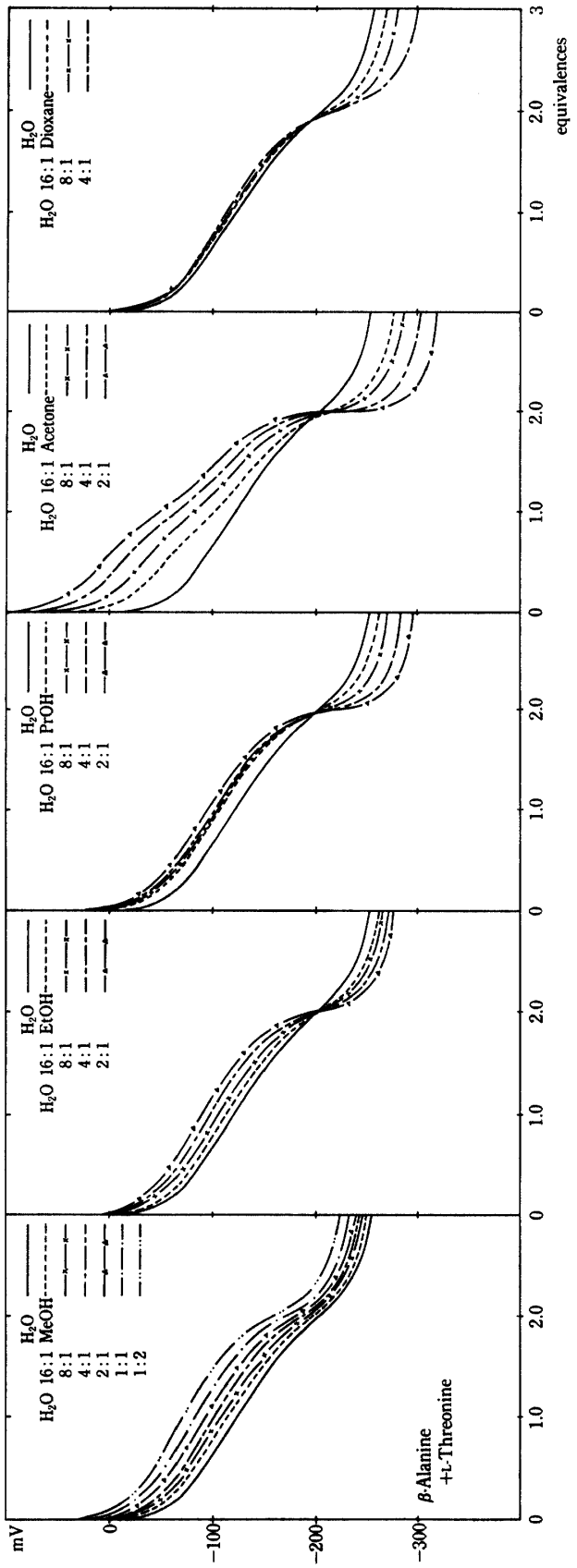


Fig. 3 Potentiometric titration curves L-threonine and β-alanine mixture in some aqueous organic solvents

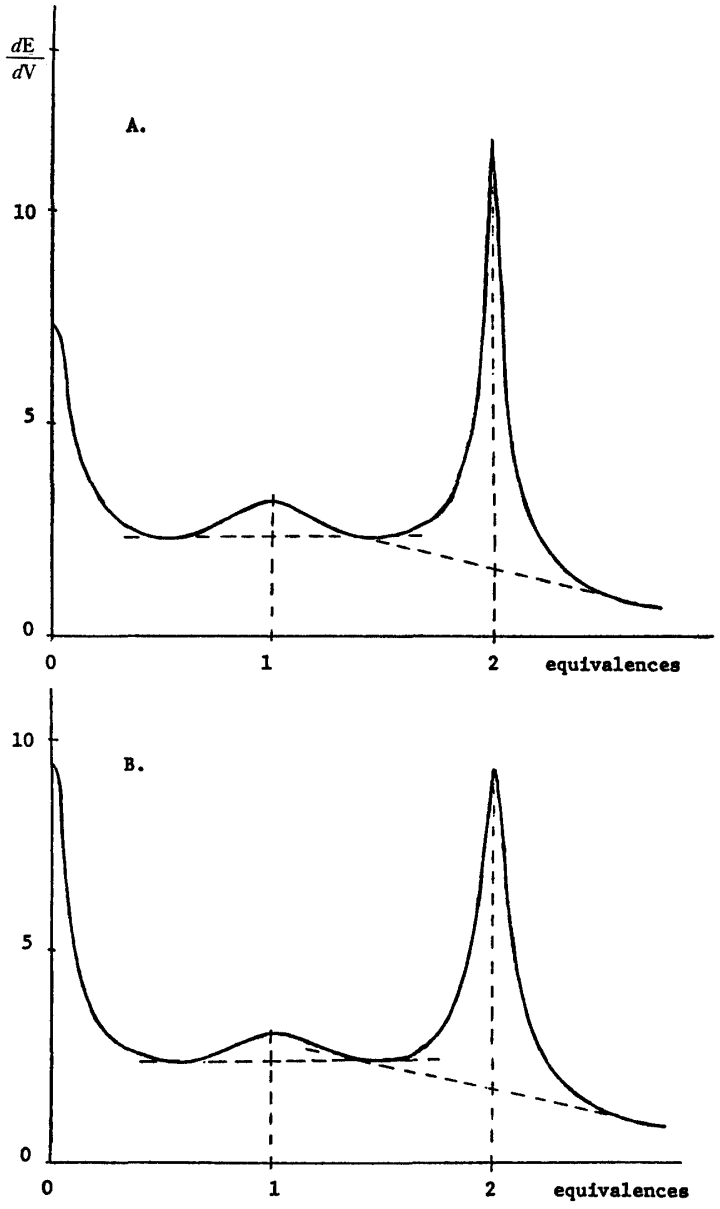


Fig. 4 First derivative titration curves of L-threonine and β-alanine mixture

2.4 実験結果

2.4.1 β-アラニンとL-スレオニンの分別滴定

β-アラニン並びにL-スレオニンを試料として，水とメタノール，エタノール，2-プロパノール，アセトンおよび1,4-ジオキサンとの種々の混合モル比の含水溶媒を使って，1*M* NaOHで滴定した電位差滴定曲線をFig.1およびFig.2に示した。

前2者および類似のアミノ酸を含水溶媒で滴定したときの2分の1当量中和した点の電位（E 1/2)を比較した。その電位の値は各アミノ酸の pK_1 と比例関係にある。それらの値のなかで，滴定による起電力変化が比較的大きく，測定が安定な水と有機溶媒のモル比が4/1を使ったとき

Table. I Acidity of amino acid (E at half neutralization point) in the mixtures of water and organic solvent (molar ratio 4/1) Titrant: 1*m* NaOH

Amino acid (Solvent)	H_2O	MeOH	EtOH	2-PrOH	$(CH_3)_2CO$	
β-Alanine	−156.4	−129.6	−129.6	−135.1	−117.1	−136.2
L-Threonine	− 90.8	− 78.4	− 71.9	− 72.4	− 7.6	− 82.5
L-Serine	− 96.5	− 80.3	− 76.8	− 79.4	− 51.1	− 91.1
L-Phenylalanine	− 99.9	− 77.1	− 71.7	− 71.8	− 72.9	− 82.0
L-Histidine	− 99.3	− 78.3	− 77.1	− 79.3	− 53.2	− 90.0
ΔE (maximum)	65.6	52.5	57.9	63.3	109.5	54.2

$\Delta pK_1 = pK_1(\beta\text{-Alanine}) - pK_1(\text{L-Threonine}) = 3.60 - 2.15 = 1.45$ (in H_2O)
$\Delta E_{1/2} = E_{1/2}(\beta\text{-Alanine}) - E_{1/2}(\text{L-Threonine}) = 109.5\text{mV}$ (1.8 equivalent in H_2O)

Table. II Titration of L-threonine and β-alanine mixture with NaOH in aqueous acetone

Solvent	Found±S.D. (%)			ΔE_1	ΔE_2	ΔE (first derivative)	
H_2O/Acetone	L-Threonine	Thr+β-Ala	β-Alanine	3/2ep-1/2ep	5/2ep-3/2ep	Thr	Thr+β-Ala
H_2O/0	…	98.6±0.20	…	69.4	84.6	…	15
16/1	88.2±5.18	98.5±0.51	108.8±5.7	91.9	119.8	4	31
8/1	93.2±2.23	97.8±0.47	102.4±2.7	99.4	144.5	5	47
4/1	98.3±1.02	98.0±0.21	97.7±1.23	106.6	175.6	7	74
2/1	97.5±0.65	98.4±0.34	99.3±0.99	111.9	206.2	8	99

$\Delta pK_1 = pK_1(\beta\text{-alanine}) - pK_1(\text{L-threonine}) = 1.45$ (in H_2O)

のデータを Table I に示した。それらの成績から，含水アセトンを溶媒としたとき，β-アラニンと L-スレオニンの酸性が特に最も大きい差を示した。

その β-アラニンと L-スレオニンの等モル混合物を試料として種々の含水溶媒で滴定したところ Fig.3 のような滴定曲線がえられ，含水アセトンを溶媒とすれば分別滴定できることが確かめられた。しかし，電位差滴定曲線ではやや不明瞭なので，一次微分曲線を記録させたところ Fig.4 で，分別定量できることが明確になった。その成績をまとめたものが Table II であるが，含水アセトンの混合モル比が 2/1 の溶媒を使ったとき (Fig. 4 A) が最もよい成績を示し，4/1 のもののとき (B) が最も正確で再現性のある測定ができた。

2.4.2 L-アルギニンと L-ヒスチジンの分別滴定

L-アルギニンは強塩基性で L-ヒスチジンは弱塩基性なので，水溶液を使っても過塩素酸標準液で充分滴定できた (Fig.5)。また，両者の pK_2 の差が 3 以上あるので，それらの混合試料も水溶液中で電位差滴定することにより分別定量することができた (Fig.6)。

しかし，含水ジオキサンを溶媒として滴定したところ Table III で示すような成績がえられた。溶媒中の水の含量が少いほど滴定による全体の起電力変化，つまり 1/2 当量点における起電力値と 5/2 当量点における起電力値の差は僅か小さくなったが，L-アルギニンと L-ヒスチジンの混合モル比が 1 対 1 のときは，その一次微分曲線の各当量点の変化から，また ΔE_1 および ΔE_2 の値から，水とジオキサンの混合モル比が 8 対 1 の含水溶媒を使ったとき両試料を同じ測定精度で定

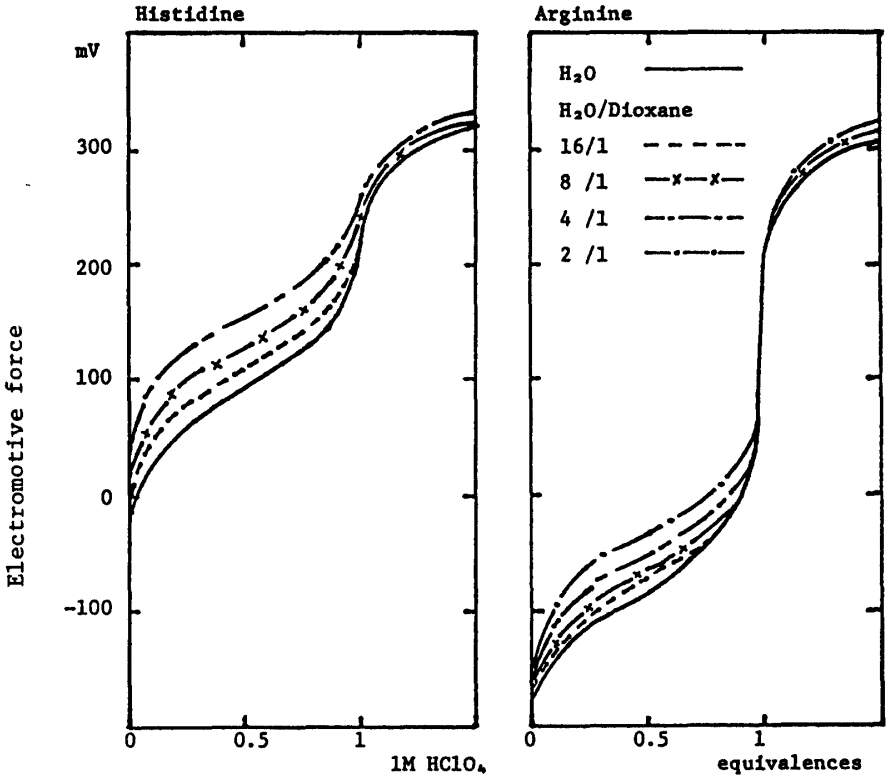


Fig. 5 Potentiometric titration curves of histidine or arginine with $HClO_4$ in aqueous 1,4-dioxane

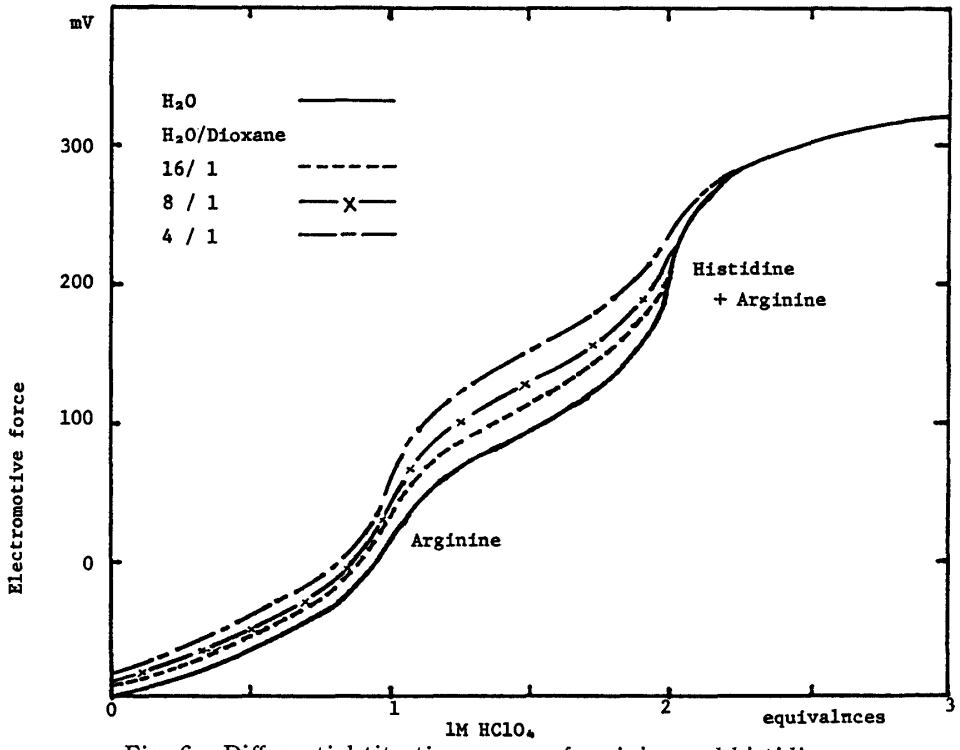


Fig. 6 Differential titration curves of arginine and histidine mixture in aqueous 1,4-dioxane

Table. III Titration of arginine and histidine mixture with $HClO_4$ in 1,4-dioxane

Solvent	Found±SD(%)			ΔE_1	ΔE_2	ΔE(first derivative)	
H_2O/Dioxane	Arginine	Arg+His	Histidine	3/2ep—1/2ep	5/2ep—3/2ep	Arg	Arg+His
H_2O/0	99.5±0.25	100.1±0.08	100.7±0.33	159.0	206.6	36	78
16/1	97.4±0.28	99.6±0.05	101.8±0.33	169.1	185.7	44	61
8/1	99.0±0.22	99.9±0.08	100.8±0.30	179.7	172.3	51	51
4/1	98.4±0.22	99.9±0.08	101.4±0.30	101.8	150.3	58	34

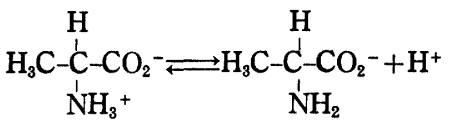
$\Delta pK_2 = \Delta pK_2(Arg) - pK_2(His) = 9.09 - 5.97 = 3.12$ (in H_2O)
$\Delta pK_1 = \Delta pK_1(Arg) - pK_1(His) = 2.18 - 1.78 = 0.40$ (in H_2O)

量できることがわかった。溶媒中の水の含量が少くなるほどアルギニンの，水が多いほど試料の合計量のつまりヒスチジンの測定精度が上っていった。つまり2種の混合物を試料として電位差滴定するとき，2種の溶媒の混合溶媒を使う場合は，その混合比を変えることによって，各物質の定量精度をコントロールすることができる場合があることがわかった。

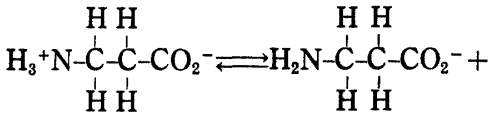
3. 考 察

3.1 β-アラニンとL-スレオニンの分別滴定

一般に α-アミノ酸は双極イオンとして存在するため，分子内の NH_3^+ と CO_2^- それぞれのイオンに溶媒和するため，その極性溶媒間に反撥が生じ，下記の(1)式の平衡は右辺にずれ[3]，その力は混合溶媒の比誘電率が低下するにつれて増加する。つまり，アミノ酸の酸性が強くなる。



(1)



(2)

β-アラニンでは NH_3^+ と CO_2^- とが α-アミノ酸と比較して炭素一つだけ多く離れているため，(2)式の平衡は(1)式ほど右辺に傾くことはない。それでも溶媒中の極性の有機溶媒の含量が増加するにつれ酸性が強くなり，水溶液では滴定できなかったものが可能になる(Fig.1, Fig.2)。

その上，有機溶媒の含量が増加するにつれ，水より酸性の僅か強いメタノールを除いて，溶媒の塩基性領域が増大するため[4]滴定による起電力の変化が大きくなり，ますます滴定によるアミノ酸の定量が一層正確にできるようになる。また，大多数の中性アミノ酸は双極イオンであるため，有機溶媒に溶けにくく水に溶け易いものが多数あるので，アミノ酸の定量は非水滴定や水溶液中の滴定[6]より含水溶媒を使う滴定のほうが適している場合が多い。

1,4-ジオキサンを含む溶媒を使った場合には，ジオキサンが無極性なため，その含量が増加すると酸性を強める作用をする極性溶媒の水の含量の減少が比誘電率の低下の逆作用をするため，アミノ酸の酸性はあまり強くならなかった。

アセトンを含む溶媒を使った場合には，極性の強いアセトンが特に NH_3^+ に結合するため CO_2^- に結合した極性溶媒と反撥を起し，他の溶媒よりアミノ酸の酸性を強めるうえ，アセトンの自己プロトン解離定数 pK_s は非常に大きく，酸性が極めて弱いため滴定による起電力変化が最も大

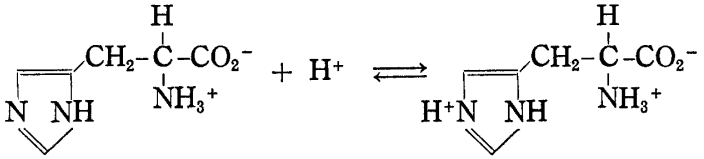
きくなった。

スレオニンの場合には，その水酸基とアセトンが水素結合をするため NH_3^+ から H^+ が取れ易くなり，それは同じ水酸基を有するセリンと比較すると，スレオニンは+I 効果を有するメチル基を余分に持っているため最も強い酸性を示すものと考えられる。

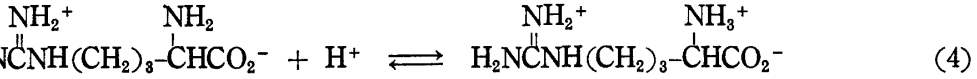
β-アラニンとスレオニンの pK_1 の差は 1.45 しかないので当然水溶液中では分別滴定できない。含水アセトン（モル比 4/1）を使っても，半分中和した点の電位の差は 109.5 mV つまり水溶液に換算しても pK で 1.8 にしかならない。それなのに充分分別電位差滴定できたのは，滴定の進行につれてアセトンの溶媒効果が増大するためと考えられる。

3.2 L-アルギニンと L-ヒスチジンの分別滴定

ヒスチジンおよびアルギニンの 0.02 mol/kg 水溶液の pH はそれぞれ 7.6 および 10.2 なので，それらの試料を $HClO_4$ で滴定するときの反応は(3)および(4)式で表わされる。



(3)



(4)

1, 4-ジオキサンの比誘電率が 2.2 と非常に低いので，溶媒中のその含量が増加するにつれて双極イオンであるアミノ酸とプロトンとの結合力が落ちるため，無極性のジオキサンの含量が多くなるほどアルギニンおよびヒスチジンの塩基性は弱くなると考えられる(Fig.5)。

アルギニンとヒスチジンの等モル混合試料を滴定すると，まず強塩基性のアルギニンが滴定され，ついで弱塩基性のヒスチジンが滴定される（Fig.6）それは両アミノ酸の pK_2 の差が水溶液中で 3 以上あるからである。溶媒中のジオキサンの含量が増加するにつれ，長い鎖状のアルギニンよりヒスチジンの分子内の 2 つのプラス荷電の影響が強くなるためヒスチジンの塩基性の弱まり方が多い（Fig.5)。そして，溶媒内の水とジオキサンの混合モル比が 8 対 1 のとき，ΔE_1 と ΔE_2 がほぼ等しくなり両試料を同じ正確さで滴定できるようになった（Table III)。それは一次微分曲線のデータにも表われている。

2 種の試料の混合物の滴定としては，滴定値の再現性は各 0.3% 程度と非常によい成績を得たが，その定量値は 2 %以上の振れを示した。このことは，混合溶媒を使って滴定を行なう場合には，特に溶媒の組成，試料の濃度および温度を一定にして，同じ種類の今回でいえばアミノ酸の標準品を用いて標定し，標定時と同一条件で滴定を行なうことが，正確精密な滴定をするための必要条件であることを改めて認識した。

また，総ての実験は，有機溶媒を使うために生じる温度による体積変化を避けるため，25℃付近で実験を行なうばかりでなく，試料は mol/kg 単位でつくり，それを重量ビュレットで秤り取ったので良い成績をうることができた。

4. 結 論

中性アミノ酸は水とエタノール，2-プロパノールおよびアセトンの混合溶媒を使い 1M NaOH によって電位差滴定することができた。それらの溶媒のなかで含水アセトンが最もよい成績を示したが，それは双極イオンであるアミノ酸に溶媒和したアセトンの極性に由来する静電的反撥と

非常に大きな自己プロトン解離定数 pK_s のためである。

L-スレオニンと β-アラニンの等モル混合試料は含水アセトン（混合モル比 4/1 または 2/1）を使うことによって約1％の再現性をもって分別滴定することができた。

L-アルギニンと L-ヒスチジンの等モル混合試料は水溶液中で 1M $HClO_4$ を使って滴定できるが，含水ジオキサン（混合モル比 8/1）を溶媒とすることによって，両アミノ酸を同じ精度で電位差滴定することができた。それは両者に対する溶媒ジオキサンの無極性および低誘電率の作用の違いによるものであろう。

文　献

1) 鹿島　哲，小出裕子，酒井由美，高橋圭子：日本薬学会第102年会（1982年4月）発表.
2) 鹿島　哲，黒崎美佐，大脇久子，館田理恵子：共立薬大年報，No. 26, 1 (1981)
3) A. Streitwieser, Jr., C.H. Heathcock: "Introduction to organic chemistry", 2nd ed. (1976), p. 940, Macmillan Publ., New York.
4) G. Charlot, B. Termillon；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.
5) J.P .Greenstein, M. Winitiz: "Chemistry of the amino acids", Vol. 1, Chap. 4 (1961), John Wiley and Sons, New York.
6) 第十改正日本薬局方（1981）第一部，イソロイシン.