— 一般論文 —

分光光度法によるアルミニウム(Ⅲ)と没食子酸との
錯生成定数の決定

(2001年10月15日受理)

栗原正日呼*・濱邊裕子・池田美佳†・新川秀則††・大吉慎美子

没食子酸(H_4A)を配位子とし、 $\text{Al}(\text{Ⅲ})$ との間の錯体(1:1)生成反応を、分光光度法で調べた。酢酸緩衝剤を用いて pH を 4–5 に保持し、 $\text{Al}(\text{Ⅲ})$ イオンの濃度増加に伴う配位子の吸光度の減少量(pH一定下)から生成錯体種を解析した。この条件下では、 $\text{Al}(\text{Ⅲ})$ に対する没食子酸と酢酸イオン(緩衝剤)の競合反応および没食子酸に対する $\text{Al}(\text{Ⅲ})$ と水素イオンの競合反応が起こっており、水素イオン濃度および酢酸イオン濃度の増加に伴い $\text{Al}(\text{Ⅲ})$ -没食子酸錯体の生成量が減少した。没食子酸の酸解離定数と $\text{Al}(\text{Ⅲ})$ -酢酸錯体の生成定数を用いて解析した結果、この pH 領域での生成錯体種は $\text{Al}(\text{H}_2\text{A})$ であり、 $\text{Al}(\text{H}_3\text{A})$ の存在は認められなかった。 $\text{Al}(\text{H}_2\text{A})$ の生成定数は、 $\log K = 8.61 \pm 0.02$ であった。この値は、没食子酸の $\text{p}K_2$ の値すなわち、配位子、 H_2A (酸解離したフェノール性ヒドロキシ基)の水素結合定数にほぼ等しいことがわかった。

1 緒 言

茶葉中のポリフェノール、カテキン類は、種々の生理、薬理作用を有するとともに、有害金属である $\text{Al}(\text{Ⅲ})$ とも強く相互作用し、その体内吸収を抑制する効果が示唆されている^{1)–4)}。著者ら⁵⁾はさきに緑茶中の主成分である(–)-エピガロカテキン没食子酸エステル(EGCG)と $\text{Al}(\text{Ⅲ})$ との錯形成反応を調べ、 Al -EGCG(1:1)錯体の生成定数、 $\log K = 7.6$ という値を得た。この値は、酸解離した EGCG イオンの水素結合定数にほぼ等しいことを示した。

本研究では、EGCG に比べ、より簡単な分子構造を有する没食子酸を配位子とし、 $\text{Al}(\text{Ⅲ})$ との錯形成を調べ、両配位子の $\text{Al}(\text{Ⅲ})$ イオンと水素イオンに対する反応性について比較検討を行った。

2 錯体の生成定数の算定

いま、pH 4–5 の領域で、配位子、没食子酸(L , H_4A)が、金属(M)大過剰($C_M \gg C_L$)の下で、錯体種、 MH_3A と MH_2A を生成するとし、さらに緩衝剤(B)($C_B \gg C_M$)と M との錯体、 MB の存在を考慮すれば、平衡状態において、配位子の全濃度 C_L と配位子の λ_{max} における吸光度 A は次のように表される。(電荷は省略)⁶⁾⁷⁾

$$C_L = [\text{MH}_3\text{A}] + [\text{MH}_2\text{A}] + [\text{L}'] \quad (1)$$

$$A = \epsilon_{\text{MH}_3\text{A}}[\text{MH}_3\text{A}] + \epsilon_{\text{MH}_2\text{A}}[\text{MH}_2\text{A}] + \epsilon_{\text{L}'}[\text{L}'] \quad (2)$$

$$[\text{M}'] = [\text{M}] + [\text{MB}] = [\text{M}](1 + K_{\text{MB}}[\text{B}]) \quad (3)$$

ここで $[\text{L}']$ は M と結合していない L の全濃度、 $[\text{M}']$ は L と結合していない M の全濃度、 ϵ はモル吸光係数、 K_{MB} は MB の生成定数を示している。(1),(2)式に錯体、 MH_3A , MH_2A の条件生成定数($C_B = \text{一定}$)、 $K_{\text{M}'\text{H}_3\text{A}} = [\text{MH}_3\text{A}]/([\text{M}'][\text{H}_3\text{A}])$ 、 $K_{\text{M}'\text{H}_2\text{A}} = [\text{MH}_2\text{A}]/([\text{M}'][\text{H}_2\text{A}])$ 、および H_4A の酸解離定数、 $K_1 = [\text{H}][\text{H}_3\text{A}]/[\text{H}_4\text{A}]$ 、 $K_2 = [\text{H}][\text{H}_2\text{A}]/[\text{H}_3\text{A}]$ を代入して整理すると、(4),(5)式が得られる。

$$[\text{M}'] \frac{(K_{\text{M}'\text{H}_3\text{A}}K_1[\text{H}] + K_{\text{M}'\text{H}_2\text{A}}K_1K_2)}{\alpha_L K_1 K_2} = \frac{C_L}{[\text{L}']} - 1 \quad (4)$$

$$\frac{A}{\epsilon_{\text{L}'}} = [\text{L}'] \times \frac{1 + (\epsilon_{\text{MH}_3\text{A}}K_{\text{M}'\text{H}_3\text{A}}K_1[\text{H}] + \epsilon_{\text{MH}_2\text{A}}K_{\text{M}'\text{H}_2\text{A}}K_1K_2)[\text{M}']}{\epsilon_{\text{L}'}\alpha_L K_1 K_2} \quad (5)$$

ここで $\alpha_L = [\text{L}']/[\text{H}_2\text{A}]$ である。(4),(5)式から $[\text{L}']$ を消去すれば、(6)式を得る。

$$\begin{aligned} & \frac{(K_{\text{M}'\text{H}_3\text{A}}K_1[\text{H}] + K_{\text{M}'\text{H}_2\text{A}}K_1K_2)}{\alpha_L K_1 K_2} \\ & - \frac{(\epsilon_{\text{MH}_3\text{A}}K_{\text{M}'\text{H}_3\text{A}}K_1[\text{H}] + \epsilon_{\text{MH}_2\text{A}}K_{\text{M}'\text{H}_2\text{A}}K_1K_2)}{\epsilon_{\text{L}'}\alpha_L K_1 K_2} \frac{C_L \epsilon_{\text{L}'}}{A} \\ & = (C_L \epsilon_{\text{L}'}/A - 1)/[\text{M}'] \end{aligned} \quad (6)$$

(6)式において、 $C_L \epsilon_{\text{L}'} = A_0$ (M が存在しないときの吸光度)、また、 $[\text{M}'] = C_M$ ($C_M \gg C_L$)とおけるから、それぞれ代入して次式が得られる。

八代工業高等専門学校生物工学科, 866-8501 八代市平山新町 2627

* 株式会社 A & T, 206-0011 多摩市関戸 2-24-27

†† 岩谷瓦斯株式会社, 532-0011 大阪市淀川区西中島 5-14-5

$$\frac{(K_{M'H_3A}K_1[H] + K_{M'H_2A}K_1K_2)}{\alpha_L K_1 K_2} - \frac{(\varepsilon_{MH_3A}K_{M'H_3A}K_1[H] + \varepsilon_{MH_2A}K_{M'H_2A}K_1K_2) A_0}{\varepsilon_L \alpha_L K_1 K_2} \frac{A_0}{A} = (A_0/A - 1)/C_M \quad (7)$$

(7)式によれば, pH一定, C_B 一定において C_L を一定とし, C_M の増加に対する A の減少を測定し, A_0/A に対して $(A_0/A - 1)/C_M$ をプロットすれば, 負の傾きを持った直線関係が得られる. その切片から $(K_{M'H_3A}K_1[H] + K_{M'H_2A}K_1K_2)/\alpha_L K_1 K_2$ が求められる. さらに, pHを変えて同様の実験を行えば, 各切片の値 y_0 と $\alpha_L K_1 K_2$ の積は(8)式のように $[H]$ の関数として表される.

$$y_0 \times \alpha_L K_1 K_2 = K_{M'H_3A}K_1[H] + K_{M'H_2A}K_1K_2 \quad (8)$$

(8)式により, $y_0 \times \alpha_L K_1 K_2$ を $[H]$ に対してプロットすれば, 直線関係が得られ, その傾きと切片から $K_{M'H_3L}$ と $K_{M'H_2L}$ がそれぞれ求められる. すなわち, 錯体, 配位子いずれのモル吸光係数も未知のままでよいことになる.

さらに, C_B を変えて $K_{M'H_3A}$ と $K_{M'H_2A}$ を求めれば, (9)式および(3)式の関係から K_{MB} の値を用いて K_{MH_3A} と K_{MH_2A} の値を求めることができる.

$$K_{MH_3A}/K_{M'H_3A} = K_{MH_2A}/K_{M'H_2A} = \alpha_M = 1 + K_{MB}C_B \quad (9)$$

ここで $\alpha_M = [M']/[M]$, $[B] \approx C_B (C_B \gg C_M \text{ のとき})$ である.

3 実 験

3.1 試薬と溶液

試薬はすべて特級試薬を用いた. 没食子酸は一定量を純水に溶かし 0.010 M (1 M = 1 mol dm⁻³)の溶液とした. Al(III)溶液は, AlK(SO₄)₂ · 12H₂Oを 0.1 M HCl 溶液に溶かして 0.20 M の溶液を調製した. 酢酸緩衝溶液は, 0.20–0.25 M 酢酸と 0.20 M 酢酸ナトリウムを 1 : 1–2 : 1 の比率で混合し, pH が 4.55–4.17, また, 酢酸イオンの濃度が $(1.0–4.0) \times 10^{-2}$ M になるように調製した. イオン強度 I は過塩素酸ナトリウムを用いて $I = 0.1$ とした.

3.2 実験操作

没食子酸を $2.5–10 \times 10^{-5}$ M 含む緩衝液 10.0×10^{-3} dm³に Al(III)溶液を $10–20 \times 10^{-6}$ dm³ずつ加え ($C_M = 2–8 \times 10^{-4}$ M) その都度没食子酸の $\lambda_{\max}$ (262–264 nm, pH 4.55–4.17)における吸光度 A を測定した. 分光光度計は島津 UV-2500PCを用いた.

4 結果と考察

4.1 Al(III)-没食子酸錯体の生成定数

pH および C_B (B = 酢酸イオン)を一定とし, C_M (M = Al(III))の濃度増加に伴う C_L (L = 没食子酸)の減少を調べ, (7)式の関係性をプロットした結果, C_L に関係なく, 負の傾きを持った直線が得られた. Fig. 1-a は $C_B = 0.02$ M (一定)とし, pH = 4.55 および 4.28 としたとき, また, Fig. 1-b は pH = 4.55 (一定)とし, $C_B = 0.02$ M および 0.04 M としたときに得られた(7)式のプロット結果である. pH が高いほど, また C_B が低いほど y 軸 ($y = (A_0/A - 1)/C_M$)の切片 y_0 が増大し, 錯体の生成度が增大していることを示す. すなわち, 前者は L に対する M と H の, また, 後者は M に対する L と B の競合反応が起こっていることがわかる. H₄A および H₃A の酸解離定数, $pK_1 = 4.16$, $pK_2 = 8.55^{(8)}$ を用いて前者の競合効果を算定し, (8)式により生成錯体種を調べた.

Fig. 1-a Plots according to Eq. 7 at different pH. Al(III) concentration was changed from 2×10^{-4} to 8×10^{-4} M.

1: pH = 4.55, $C_B = 0.02$ M, 2: pH = 4.28, $C_B = 0.02$ M.

Fig. 1-b Plots according to Eq. 7 at different C_B .

Al(III) concentration was changed from 2×10^{-4} to 8×10^{-4} M.

1: pH = 4.55, $C_B = 0.02$ M, 2: pH = 4.55, $C_B = 0.04$ M.

Fig. 2 は, $C_B = 0.01$ M, 0.02 M および 0.04 M に保持したときの(8)式のプロット結果である. いずれも水素イオン濃度に依存する錯体種, MH_3A は存在せず, MH_2A のみが存在していることがわかる. Fig. 2 から, $C_B = 0.01$ M, 0.02 M および 0.04 M における MH_2L 錯体の条件生成定数, $K_{M'H_2A}$ の値を求め, Table 1 に示した. さらに, これらの値から, (9)式および Al(III)酢酸錯体の生成定数, $K_{MB} = 1.2 \times 10^{2.5}$ を用いて, 真の生成定数, K_{MH_2A} を算定することができ, 結果を Table 1 に示した. 異なった C_B における条件生成定数から求めた K_{MH_2A} の値は, よく一致していることがわかる.

Fig. 2 Plots according to Eq. 8 at different C_B . $C_B = 0.01$ M (1), $= 0.02$ M (2), $= 0.04$ M (3).

4.2 Al(Ⅲ)-没食子酸と-EGCG 錯体との比較

さきに求めた Al(Ⅲ)-EGCG 錯体の安定度は, $\log K = 7.6$ となり, この値は配位子 EGCG の pK_a (K_a = 酸解離定数) にほぼ等しいことがわかった⁵⁾. 今回用いた配位子, 没食子酸の場合, その酸解離定数は $pK_1 = 4.16$ ($H_4L \rightleftharpoons H_3L + H$; カルボキシル基の解離), $pK_2 = 8.55$ ($H_3A \rightleftharpoons H_2A + H$; ヒドロキシ基の解離) である. この pK_2 の値は, 得られた Al(Ⅲ)-没食子酸錯体, Al(H_2A) の安定度定数 $\log K_{MH_2A} = 8.61 \pm 0.02$ にほぼ等しいことがわ

Table 1 Conditional and intrinsic formation constants of Al(Ⅲ)-gallate complex, $K_{M'H_2A}$ and K_{MH_2A} , at $I = 0.1$, $25^\circ C$

C_B	a_M	pH	$\log K_{M'H_2A}$	$\log K_{MH_2A}$
0.01 M	2.2	4.43	8.27	8.61
		4.30	8.26	8.60
		4.16	8.27	8.61
0.02 M	3.4	4.55	8.04	8.57
		4.28	8.08	8.61
		4.17	8.07	8.61
0.04 M	5.8	4.55	7.81	8.58
		4.28	7.82	8.58
		4.17	7.87	8.63

かる. このことから, Al(Ⅲ)-EGCG 錯体においても, 配位子 EGCG の没食子酸基のヒドロキシ基が解離し, Al がキレート結合しているものと推定される.

- 1) J. J. Powell, S. M. Greenfield, H. G. Parkes, J. K. Nicholson, R. P. H. Thompson, *Food Chem. Toxic.*, **31**, 449 (1993).
- 2) 福島正子, 谷村顕雄, 日食工誌, **42**, 425 (1995).
- 3) 福島正子, 谷村顕雄, 日食工誌, **43**, 437 (1996).
- 4) 福島正子, 谷村顕雄, 日食工誌, **44**, 477 (1997).
- 5) E. Ohyoshi, T. Sakata, M. Kurihara, *J. Inorg. Biochem.*, **73**, 31 (1999).
- 6) E. Ohyoshi, *Anal. Chem.*, **55**, 2404 (1983).
- 7) E. Ohyoshi, *Anal. Chem.*, **57**, 448 (1985).
- 8) H. K. J. Powell, M. C. Taylor, *Aust. J. Chem.*, **35**, 739 (1982).

Determination of the Formation Constants of Aluminum(III) with Gallic Acid Studied by Spectrophotometry

Masahiko KURIHARA*, Yuko HAMABE, Mika IKEDA†,
Hidenori SHINKAWA†† and Emiko OHYOSHI

*Department of Bioengineering, Yatsushiro National College of Technology; 2627
Hirayama-shinmachi, Yatsushiro-shi 866-8501 Japan*

†A & T Corporation; 2-24-27 Sekido, Tama-shi 206-0011 Japan

*††Iwatani Industrial Gases Corp.; 5-14-5 Nishinakajima, Yodogawa-ku,
Osaka-shi 532-0011 Japan*

Complex formation (1 : 1) between Al(III) and gallic acid (H_4L) was studied by spectrophotometry at 25 °C and at ionic strength $I=0.1$. At pH 4–5 buffered with acetate ions, the complex species can be analyzed by measuring the absorbance of the free ligand, which decreases along with the increase in Al(III) concentration. The method is based on the competition between gallic acid and buffer ligands for Al(III) ions, or between hydrogen ions and Al(III) ions for gallic acid. The concentration of the Al(III)–gallate complex formed at constant pH or at constant acetate (buffer) concentration decreased along with the increase in acetate ion or hydrogen ion concentration, respectively. The results showed that the complex species $Al(H_2A)$ was formed but $Al(H_3A)$ was not in the pH 4–5. By using the acid dissociation constants of gallic acid and the formation constant of Al(III)–acetate complex the intrinsic formation constant of $Al(H_2A)$ was determined to be $\log K_{Al(H_2A)} = 8.61 \pm 0.02$ which was close to the value of pK_2 (K_2 = the proton dissociation constant of H_3L), the protonation constant of the phenolate group of gallic acid.

~~~~~