ヒドロキシアパタイトに対する塩化セチルピリジニウムの吸着

嶋林三郎, 田村知津子, 中垣正幸*

京都大学薬学部

Adsorption of Cetylpyridinium Chloride to Hydroxyapatite

SABURO SHIMABAYASHI, CHIZUKO TAMURA, and MASAYUKI NAKAGAKI*

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Yoshida-Shimoadachi-cho,
Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan

(Received September 14, 1981)

Adsorption of cetylpyridinium chloride (CPC) to hydroxyapatite (HAP) was studied. The amount of adsorbed CPC increased and decreased with the amount of added NaOH, and added NaCl or CaCl_2 , respectively. It was assumed that cetylpyridinium cation (CP^+) is adsorbed to negatively charged sites on HAP surface by electrostatic force. Adsorption of anions such as OH^- makes the number of adsorption sites for CP^+ increase on the surface of HAP (cooperative adsorption). But the effect of Cl^- anion, which may increase the amount of CP^+ adsorption, was assumed to be smaller than that of Na^+ cation, which decreases the amount of CP^+ adsorption, because NaCl, as a whole, inhibits CP^+ adsorption. Cations such as Na^+ and Ca^{2+} compete with CP^+ for the adsorption site charged negatively on HAP (competitive adsorption). The effect of Ca^{2+} was more remarkable than that of Na^+ , since Ca^{2+} is one of the lattice ions of HAP crystal. As the affinity of Ca^{2+} to HAP is stronger than that of CP^+ , the adsorption isotherm of Ca^{2+} became just one curve irrespective of concentration of CP^+ added. The fact mentioned above may be one of the reasons why hard tissues and renal calculi adsorb Ca^{2+} selectively from body fluid containing many kinds of organic and inorganic ions, and grow up in our human body.

Keywords—hydroxyapatite; adsorption of cetylpyridinium chloride; adsorption of hydroxyl ion; adsorption of calcium ion; cooperative adsorption; competitive adsorption; renal calculus; hard tissue

緒 言

ヒドロキシアパタイト (HAP) は $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ の化学組織を有する塩基性リン酸カルシウムであって、骨、歯の主成分であり、また尿路結石の成分の1つでもある。この HAP に対する界面活性剤、あるいは電離基または極性基をもつ有機物質の吸着の研究は従来より多岐にわたってなされてきた。

まず薬学あるいは歯学の領域においては、ウ歯予防を目的とした基礎研究として、抗菌作用あるいは歯垢沈着防止作用をもつアルキルアミンのウンデシレン酸塩やフッ化水素酸塩¹⁾ あるいはクロールヘキシジン誘導体²⁾ の吸着の研究がなされている。また、塩化アルキルアンモニウムが吸着すると、鎖長が大になると共に HAP の溶解速度が低下するが、³⁾ HAP を主成分としている歯のエナメル質を硫酸ドデシルナトリウム水溶液で処理した後塩酸でエッチングすると未処理の場合に比べてエッチングされやすいことが指摘されている。⁴⁾

一方、骨や歯に含まれている生体高分子と HAP との結合機構を解明するために、生体高分子の単純化したモデル物質として脂肪酸⁵⁾ やアミノ酸⁶⁾ の HAP に対する結合を研究した結果、カルボキシル基は HAP 表面のカルシウムイオンと、プロトン化したアミノ基は HAP 表面にあるリン酸イオンまたは水酸化物イオンと、静電的に結合していると結論された。これは、臭化セチルトリメチルアンモニウムあるいは臭化セチルピリジニウムの HAP に対する吸着と共に HAP に対する水の接触角が大になること、すなわち疎水基を水相側へ、荷電基を HAP 表面へ配向させて吸着しているとする結果⁷⁾ と結論を一にしている。

工業的には、界面活性剤の吸着に伴って水の接触角が大になることを利用してリン鉱石中に含まれているアパタイトを脈石から分離するのに浮選法が用いられる。⁸⁾ また、精糖用骨炭に含まれている HAP と炭素の各表面

積を界面活性剤の吸着量から算出しようとする試みもなされている。⁹⁾

前報¹⁰⁾において無機カチオンの HAP に対する吸着性を調べ、アルカリ金属イオンではことに Na^+ の、アルカリ土類金属イオンではことに Ca^{2+} の吸着量が大であることを結論した。本報では、有機カチオンであるセチルピリジニウムイオン (CP^+) の HAP に対する吸着等温線を求め、これに対する共存する Na^+ , Ca^{2+} , OH^- の影響について考察する。

実 験 の 部

試料 ヒドロキシアパタイト (HAP) は前報に用いたのと同じの試料である。^{10,11)}

実験に用いた試薬は半井化学または和光純薬より購入した特級試薬である。

方法 HAP 2 g を 20 ml の試料溶液に懸濁させ、30°C で 3 日間経過したのちにミリポアフィルター (平均孔径 0.22 μm) で濾過し、濾液を分析して HAP に対する吸着量を算出した。

塩化セチルピリジニウム (CPC) の濃度は前報¹⁰⁾ と同様にエプソン法でセチルピリジニウムカチオン (CP^+) の濃度を分析して求めた。

カルシウムイオン濃度は、1-(2-hydroxy-4-sulfo-1-naphthylazo)-2-hydroxy-3-naphthoic acid (ドータイト NN 希釈溶液) を指示薬にして pH 13 で EDTA 標準液を用いてキレート滴定法によって求めた。共存する CPC が指示薬の発色を妨害する時には当量あるいはやや過剰の硫酸ドデシルナトリウムを加えて硫酸ドデシルセチルピリジニウムの沈澱を生じさせたのちにキレート滴定を行った。

吸着量は、秤りこんだ吸着質全濃度と吸着平衡時の遊離平衡吸着質濃度の差、および秤りこんだ HAP の重量より算出した。

顕微鏡電気泳動 三田村理研工業製顕微鏡電気泳動装置 Model 5-160 を用い、前報¹¹⁾ と同様にして HAP 粒子の電荷の符号を判定した。

結 果

CPC の吸着等温線

Fig. 1 は種々の電解質の共存下におけるセチルピリジニウムカチオン (CP^+) の HAP に対する吸着等温線である。添加塩の共存しない場合 (○) に比べ NaCl を 5 mm 添加すると (●) 吸着量 X_{CP^+} は低下する。しかし NaCl と NaOH とがそれぞれ 2.5 mm 共存する場合 (◐), あるいは NaOH が 5 mm 共存する場合 (●) には無添加の場合 (○) よりも X_{CP^+} は大となる。すなわち、添加した Na^+ 濃度とイオン強度が一定であるこれらの場合 ($[\text{Na}^+] = 5 \text{ mm}$, 1価-1価電解質総添加濃度 5 mm) には、 OH^- 濃度と共に CP^+ の吸着量 X_{CP^+} の増大がみられる。

Fig. 1. Adsorption Isotherms of Cetylpyridinium Ion, CP^+

Additives (mm): ○ none, ● NaCl 5.0, ◐ NaCl 25, ◑ NaCl 50, ◒ NaCl 2.5+NaOH 2.5, ◓ NaOH 5.0, □ CaCl_2 1.0, ■ CaCl_2 5.0, ◔ CaCl_2 25.

一方、 NaCl 添加濃度が 5.0 mm (●), 25 mm (◐), 50 mm (◑) と増大する場合、あるいは CaCl_2 添加濃度が 1.0 mm (□), 5.0 mm (■), 25 mm (◔) と増大する場合には X_{CP^+} は添加量と共に低下している。

Fig. 1 に示す CP^+ の吸着等温線はラングミュア型になるので、飽和吸着量 $X_{\text{CP}^+, \infty}$ と結合定数 k_{CP^+} をそれぞれの曲線について求め、添加電解質濃度に対する関係をみたのが Fig. 2(A), (B) である。少量の CaCl_2 の添加で著しく、 NaCl の添加で直線的にゆるやかに $X_{\text{CP}^+, \infty}$ と k_{CP^+} とが低下するのがみられる。 NaOH の添加によっては両者のパラメーターが増大するのがみられる。

NaOH 添加の影響

Fig. 3 には NaOH 添加にともなう CP^+ の吸着量 X_{CP^+} の変化を示した。横軸は添加した NaOH

Fig. 2. Relationship between Additive Concentration and X_{CP^+} , or k_{CP^+} Additives: ● $CaCl_2$, ◐ $NaCl$, ○ $NaOH$. Fig. 3 The Effect of Added NaOH on the Amount of Adsorbed CP^+ or Ca^{2+} (A) $[CPC]=19.2$ mM, (B) $[CPC]=19.2$ mM, $[CaCl_2]=5.5$ mM.
⊗: CP^+ adsorbed, ○: Ca^{2+} adsorbed, ●: OH^- adsorbed.

の濃度である。(A) には CPC を 19.2 mM 添加し、それに NaOH を添加していく時の CP^+ と OH^- の吸着量 X_{CP^+} , X_{OH^-} の変化が示してある。NaOH の添加量あるいは吸着量の増大と共に X_{CP^+} は増大し、NaOH 添加濃度約 15 mM で添加した CPC の約 90% が吸着され、25—30 mM の NaOH の添加でほとんどの CPC が HAP に吸着される。破線は全ての CPC が吸着された場合の吸着量の位置を示している。 OH^- のみが吸着する場合であれば NaOH の添加量と共に (pH の増大と共に) HAP 粒子の負荷電が増大するのであるが、図に示すように X_{OH^-} よりも X_{CP^+} の方が大であるので媒質の pH が高いにもかかわらず X_{CP^+} の増大と共に HAP 粒子の正電荷が増大することを顕微鏡電気泳動法で確認した。

Fig. 3 (B) は 19.2 mM CPC と 5.5 mM $CaCl_2$ とが共存する場合の CP^+ と Ca^{2+} の吸着量 X_{CP^+} , $X_{Ca^{2+}}$ の変化である。NaOH の添加全濃度が 10 mM に達するまでは Ca^{2+} の吸着量 (○) はほとんど直線的に増加し、この NaOH 濃度で添加 Ca^{2+} 量の約 90% が吸着される。この間には CP^+ の吸着量 (⊗) はきわめてゆるやかに低下

Fig. 4. The Effect of Added CaCl_2 on the Amount of CP^+ adsorbed

(A) $[\text{CPC}]=19.2 \text{ mM}$, $[\text{CaCl}_2]/[\text{NaOH}]=1.0 \text{ (mol/mol)}$,
 (B) $[\text{CPC}]=11.5 \text{ mM}$, $[\text{NaOH}]=19.7 \text{ mM}$.
 ●: Ca^{2+} adsorbed, ○: CP^+ adsorbed.

している。添加した Ca^{2+} が全て吸着される場合の吸着量を示す破線 (.....) に Ca^{2+} の吸着量が漸近しはじめ、溶液中に残存する Ca^{2+} の濃度が十分に小になったのちに CP^+ の吸着量の増大がはじまり、⊗ で示す曲線が急激に上昇する。すなわち、 CP^+ と Ca^{2+} とが共存する場合には Ca^{2+} の吸着が CP^+ の吸着よりも優先されることを示している。

CaCl₂ 添加の影響

Fig. 3 においては CaCl_2 の添加量は一定であったが、Fig. 4 には CaCl_2 の添加量の CPC の吸着量におよぼす影響が示してある。(A) は CPC 濃度を 19.2 mM に一定にし、 CaCl_2 と NaOH のモル濃度比が 1.0 になるようにして CaCl_2 の濃度を变化させた場合の結果である。 Ca^{2+} の吸着量は直線的に増加し、 CP^+ の吸着量は Ca^{2+} の添加量と共に (したがって OH^- の添加量とともに) 低下してほとんど 0 になるのがみられる。

(B) は、CPC 添加濃度と NaOH 添加濃度をそれぞれ 11.5 mM , 19.7 mM に一定にした時の CP^+ と Ca^{2+} の吸着量の変化である。(A) の場合と同様に、 CP^+ の吸着量は CaCl_2 の添加量は共に低下し、 Ca^{2+} の吸着量は増大する。後者は、横軸が添加全 Ca^{2+} 濃度で示してあるが CPC と NaOH とが共存する場合の Ca^{2+} の吸着等温線でもある。

Fig. 5 は NaOH が 20 mM , CPC が種々の濃度共存する場合の Ca^{2+} の吸着等温線である。この吸着等温線は共存する CPC の濃度の影響をうけずに 1 本のラングミュア型吸着等温線で表わされ、飽和吸着量 $X_{\text{Ca}^{2+},\infty}$ は $11.5 \times 10^{-5} \text{ mol/g-HAP}$, 結合定数 $k_{\text{Ca}^{2+}}$ は $14.3 \times 10^3 \text{ l/mol}$ となった。

考 察

添加電解質による CP^+ の吸着量の増減

添加電解質によって塩析が生じる場合、あるいは CPC の活量 (近似値としては CP^+ と Cl^- のイオン積 $[\text{CP}^+][\text{Cl}^-]$) によって CP^+ の吸着量が定まる場合には、添加塩濃度と共に吸着量 X_{CP^+} あるいはみかけの結合定数 k_{CP^+} は増大するが飽和吸着量 $X_{\text{CP}^+,\infty}$ は一定のはずである。^{11,12)} しかし Fig. 1, 2 にみられるように NaCl または CaCl_2 の添加に伴って Cl^- 濃度が増加するにもかかわらず、 X_{CP^+} , $X_{\text{CP}^+,\infty}$, k_{CP^+} のいずれもが低下している。この原因は、 CP^+ , Na^+ , Ca^{2+} のいずれもが正電荷を有しているので、HAP 表面にある負電荷を有する吸着サイトに対してこれらのイオンが競争吸着するためと考えられる。¹⁰⁾ 一方、Fig. 3(A) にみられるように NaOH の共存によって CP^+ の吸着量が増大するのは、アニオンである OH^- の HAP に対する吸着¹¹⁾ によって HAP の表面の負電荷が増し、カチオンである CP^+ の吸着サイトが形成されるためである。

しかし Fig. 3(A) によれば NaOH の共存による CP^+ の吸着量の増分は OH^- の吸着量よりも大きい。これは、 CP^+ は単に吸着 OH^- の近傍へ吸着するのみならず、 NaOH の添加と共に H_2PO_4^- から HPO_4^{2-} , PO_4^{3-} , へと

変化する表面リン酸基の近傍へも CP^+ が吸着するためと考えられる。また、HAP 表面で CPC のヘミミセルが形成される可能性も考えられるが、⁸⁾ 現時点ではこの点に関しては不明である。

上に述べたように Na^+ 自身は CP^+ の吸着を妨害するのであるが、 OH^- の吸着による CP^+ の吸着促進効果の方が強いために NaOH の添加は CP^+ に対する吸着促進効果を示す。この理由は、 OH^- は HAP の格子イオンの 1 つであるので HAP 表面あるいは内部ヘルムホルツ層で HAP に吸着していると考えられるが、この吸着 OH^- の対イオンである Na^+ の大部分は外部ヘルムホルツ層あるいは拡散電気二重層に分布していると

考えられるためである。したがって、Fig. 1 にみられるように Na^+ 添加濃度を 5 mM に一定にする場合には、 OH^- 添加濃度の増大と共に CP^+ に対する吸着促進効果が大となり、 $\odot$, $\otimes$, $\bullet$ の順に CP^+ の吸着量が增大する。

しかし OH^- によって形成される吸着サイトに対しては、 CP^+ と同様にカチオンである Ca^{2+} も吸着する。しかもこの Ca^{2+} は HAP の格子イオンであるので CP^+ よりも優先的に HAP に対して吸着する。その結果、 CP^+ と Ca^{2+} とが一定濃度加えられている Fig. 3(B) においては、 OH^- 濃度が増すにもかかわらず Ca^{2+} が溶液中からはほとんど全量吸着されるまでは CP^+ の吸着量は増加しない。また、Fig. 4 にみられるように、 Ca^{2+} 濃度の増大にともなって CP^+ の吸着量は低下し、Fig. 5 にみられるように、 Ca^{2+} の吸着等温線は共存する CPC の濃度に無関係に一意的に定まる結果となる。

OH^- と同様にアニオンである Cl^- も HAP への吸着によってカチオンである CP^+ に対して吸着促進作用を示すはずである。しかし NaCl 水溶液からの Cl^- の吸着量が少ないこと、および Fig. 1 に示すように NaCl が CP^+ に対して吸着妨害作用を示すことより、 Cl^- による CP^+ の吸着促進効果は極く僅かと考えられ、本報では Cl^- による作用については無視している。

以上の結果より CP^+ の吸着におよぼす添加イオンの影響についてまとめると、 OH^- の吸着促進作用は Na^+ の吸着妨害作用にまさり NaOH は吸着促進剤であるが、 Na^+ の作用は Cl^- の吸着促進作用にまさり NaCl は吸着妨害剤となる。また Ca^{2+} の吸着妨害作用は Na^+ の作用よりも顕著である (Figs. 1, 2)。この序列は、 Ca^{2+} と OH^- が HAP の格子イオンであり、 Na^+ は Ca^{2+} と結晶イオン半径は似ているが荷電数が小なること、¹⁰⁾ および Cl^- は HAP 構成アニオンであるリン酸イオンや水酸化イオンとは結晶イオン半径が異なっていて HAP に対する親和性が乏しく吸着が生じにくいことによって生じると考えられる。

上に述べたように CP^+ 等の有機カチオンの HAP に対する吸着量は pH の増大 (OH^- 濃度の増大) と共に大となるが、 Ca^{2+} の共存では小となる。したがってカチオン性界面活性剤あるいはクロールヘキシジン誘導体²⁾ 等の陽イオン性の薬物を HAP に対して有効に結合させるに際しては pH が大であることおよび Ca^{2+} 濃度の低いことが望ましいといえる。

負電荷を有する生体高分子、たとえば蛋白質や核酸、の分別と精製の目的に HAP のカラムが用いられ、この際の溶出液としては種々の濃度のリン酸緩衝液が用いられる。¹³⁾ これは HAP に対する親和性が大きいリン酸イオンと試料の高分子アニオンとの HAP に対する競争吸着を利用して、吸着している試料アニオンを溶離させるためである。同様に考えて Ca^{2+} の HAP に対する大きな親和性を利用すれば正電荷をもつ試料物質を HAP カラムに吸着させ、種々の濃度の CaCl_2 水溶液で溶出させることによって、この物質の分別と精製を行うことができると思われる。

硬組織の形成と成長

体内に硬組織あるいは尿路結石の一成分としての HAP の微結晶あるいは結晶核が存在する時、これは体液中に含まれている種々のイオン性および非イオン性物質と接触しており、結合あるいは吸着する可能性がある。し

Fig. 5. Adsorption Isotherm of Ca^{2+}

Added $[\text{NaOH}] = 20.0 \text{ mM}$,
Added $[\text{CPC}] (\text{mM}) = 0.0 (\odot), 5.0 (\otimes), 10.0 (\bullet),$
 $20.0 (\circ), 40.0 (\circ)$.

かし前報¹⁰⁾に示したように、2価アルカリ土類金属イオンではことに Ca^{2+} が、1価アルカリ金属イオンではことに Na^+ が、他のイオンに比べ優先的に HAP へ取りこまれると考えられている。また本報で上に述べたように、有機カチオンと比較しても Ca^{2+} が優先的に HAP 表面へ取り込まれ吸着される。HAP の結晶成長の微視的過程は格子イオンの HAP 表面への吸着と考えられるので、この吸着の結果、種々のイオンが共存しているにもかかわらず構成カチオンの大部分を Ca^{2+} とする硬組織あるいは尿路結石が体内で形成され、成長することになる。

引用文献および注

- 1) V.D. Warner, J.N. Sane, A.M. Warner, D.B. Mirth, S. Turesky, B. Soloway, *J. Dental Res.*, **56**, 1599 (1977).
- 2) R.G. Fisher, R.P. Quintana, M.M. Boulware, *J. Dental Res.*, **54**, 20, 25 (1975); M. Hata, N. Nambu, T. Nagai, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 1151 (1981).
- 3) T.J. Roseman, W.I. Higuchi, B. Hodes, J.J. Hefferren, *J. Dental Res.*, **48**, 509 (1969).
- 4) W.J. Hamilton, G. Judd, G.S. Ansell, *J. Dental Res.*, **54**, 49 (1975).
- 5) J.J. Bladon, *J. Colloid Interface Sci.*, **78**, 175 (1980).
- 6) M. Kresak, E.C. Moreno, R.T. Zahradnik, D.I. Hay, *J. Colloid Interface Sci.*, **59**, 283 (1977); D.I. Hay, E.C. Moreno, *J. Dental Res.*, **58**, special issue B, 930 (1979).
- 7) H.S. Hanna, F.Z. Saleeb, *Colloids and Surfaces*, **1**, 295 (1980).
- 8) R.K. Mishra, S. Chander, D.W. Fuerstenau, *Colloids and Surfaces*, **1**, 105 (1980).
- 9) M.C. Bennett, J.C. Abram, *J. Colloid Interface Sci.*, **23**, 513 (1967).
- 10) S. Shimabayashi, C. Tamura, M. Nakagaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 3090 (1981).
- 11) S. Shimabayashi, C. Tamura, M. Nakagaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 3090 (1981).
- 12) M. Nakagaki, T. Handa, S. Shimabayashi, *J. Colloid Interface Sci.*, **43**, 521 (1973).
- 13) G. Bernandi, *Biochim. Biophys. Acta*, **174**, 449 (1969); G. Bernandi, T. Kawasaki, *Biochim. Biophys. Acta*, **160**, 301 (1968).