可溶化系のゲルろ過 (第2報¹⁾) Bio Gel P-4 を用いたゲルろ過によるアルキル
パラベン-ラウリル硫酸ナトリウム間複合体の研究²⁾五島綾子, 遠藤文男,^{3a)} 伊藤圭二^{3b)}
静岡薬科大学,^{3a)} 北海道薬科大学^{3b)}Gel Filtration of Solubilized Systems. II.¹⁾ Studies on the Complexes of Sodium
Lauryl Sulfate and Alkyl Paraben by the Gel Filtration on Bio Gel P-4²⁾AYAKO GOTO, FUMIO ENDO^{3a)} and KEIJI ITO^{3b)}Shizuoka College of Pharmacy^{3a)} and Hokkaido Institute of Pharmaceutical Sciences^{3b)}

(Received May 31, 1977)

The presence of complexes of monomer sodium lauryl sulfate (SLS) and alkylparaben (methyl-, ethyl-, and butyl-parabens) can be observed by gel filtration on Bio-Gel P-4. Stability constants for the complex formation from monomer SLS and respective alkyl parabens in aqueous SLS solutions below critical micelle concentration(s) (cmc) were estimated from the elution curves of SLS and alkylparabens obtained by the tail analysis on Bio-Gel P-4. It was found that stability constants increased as the carbon number of alkyl group for alkylparabens increased.

It was observed that stability constants for the complex formation in SLS micellar solutions solubilizing alkylparabens were nearly equal to those in the SLS solution below cmc. However, the partition ratio of respective alkylparabens between the aqueous and SLS micellar phases, found by considering a complex formation in the solubilized system, was approximately equal to the apparent partition ratio obtained without considering the complex formation, because concentration of the complexes was negligibly low compared with those of free alkylparabens in the aqueous phase.

Keywords—alkyl paraben; sodium lauryl sulfate; Bio Gel P-4; complex; tail analysis; stability constant; partition ratio; apparent partition ratio

前報¹⁾では, Sephadex G-50 で可溶化溶液をゲルろ過することによって, 被可溶化溶質として用いたアルキルパラベンの SLS (Sodium Lauryl Sulfate) ミセル相-水相間分配比についてばかりでなく, 可溶化によるミセルサイズの変化についても検討しうることを見出した. このような高分子溶液系の平衡についてゲルろ過による解析が近年盛んになされてきた. たとえば界面活性剤のミセル生成系,⁴⁻⁶⁾ ヨウ素-澱粉溶液系,⁷⁾ ステロイド-蛋白溶液系,⁸⁾ あるいはソゾチーム-オバルブミン⁹⁾ といった高分子溶液系においてである.

1) Part I: A. Goto, F. Endo, K. Ito, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **25**, 1165 (1977).

2) 五島綾子, 遠藤文男, 伊藤圭二, 日本薬学会第 94 年会一部発表 (1974).

3) Location: a) 2-2-1 Oshika Shizuoka-shi; b) 62 Katsuraoka-cho Otaru-shi.

4) a) 佐々木恒孝, 油化学, **16**, 49 (1967); b) H. Suzuki, T. Sasaki, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **44**, 2630 (1971); c) H. Suzuki, *ibid.*, **49**, 375 (1976); d) H. Suzuki, *ibid.*, **49**, 1470 (1970).5) a) F. Tokiwa, K. Ohki, I. Kokubo, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **41**, 2285 (1968); b) F. Tokiwa, K. Ohki, I. Kokubo, *ibid.*, **41**, 2845 (1968).6) a) T. Nakagawa, H. Jizomoto, *Kolloid z. z. Polym.*, **236**, 79 (1970); b) T. Nakagawa, H. Jizomoto, *ibid.*, **234**, 1124 (1969); c) T. Nakagawa, H. Jizomoto, *ibid.*, **239**, 606 (1970); d) T. Nakagawa, H. Jizomoto, *J. Amer. Oil Chemist's Soc.*, **48**, 571 (1971).7) M. Kodama, T. Sasaki, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **47**, 1368 (1974).8) W. Burke, *Biochim. Biophys. Acta*, **176**, 403 (1969).9) L.W. Nichol, D.J. Winzor, *J. Phys. Chem.*, **68**, 2455 (1964).

佐々木¹⁰⁾は水溶液中で2種類の溶質による複合体生成系に関し、ゲルろ過による解析が可能であろうと示唆した。しかし上に述べたように高分子溶液系においてなされた例はあるが、低分子量の異種分子間複合体生成系に対してゲルろ過による検討は現在のところ見当たらない。そこで本報では、Bio Gel P-4 をゲルとして用いることにより、SLS-アルキルパラベン間複合体の存在に関し検討を試みた結果、若干の知見を得たので報告する。

実験材料および方法

試薬 SLS およびアルキルパラベン類は前報¹⁾と同じものを用いた。

試料溶液の調製 前報¹⁾と同じ方法で調製した。

ゲルろ過 直径 1.6 cm, 高さ 40 cm のジャケット付ファルマシア社製カラムに、水で十分に膨潤させた Bio Gel P-4 (Bio Rad 社製) を充填した。27.0 ± 0.1° に保たれたこのゲルカラムを用い、次の方法でゲルろ過を行った。方法 I (Tail 分析): 多量 (100 ml) の試料溶液をゲルに飽和した後、水で溶離し、得られた流出曲線について、前報¹⁾と同様 Tail 分析を行なった。方法 II (Zone 分析): 少量 (2 ml) の試料溶液を水で溶離し、流出曲線を得た。いずれの場合も流出速度は 8 ± 2 ml/hr であった。流出液は約 1.2 ml づつに分画したが、各画分の正確な容量はそれぞれの重量と比重の測定より得られた。アルキルパラベンおよび SLS の濃度は、各画分を水で適宜希釈した後、後述の方法で測定した。このカラムの Bio Gel P-4 の総体積 (V) は 45.0 ml であり、ゲル粒子外水量 (V_0) は 19.2 ml であった。同じゲルカラムで、SLS (4 mm) および NaCl (10 mm), メチルパラベン (5 mm), エチルパラベン (1 mm), ブチルパラベン (0.5 mm) の水溶液 2 ml を溶出させて、各々の溶質の溶離体積 (V_e) を測定し、これより K_{av} ¹⁰⁾ を算出した。

アルキルパラベンおよび SLS の定量 アルキルパラベン濃度は前報¹⁾と同様分光光度法で測定した。SLS 濃度は青木ら¹¹⁾の方法に従って測定した。アルキルパラベンと SLS の共存する際の分析に対する相互妨害は認められなかった。

pK_a の測定 256.5 nm におけるアルキルパラベンの吸光度の pH (pH 7.21—9.10) による変化から各々のアルキルパラベンの pK_a を求めた。

実験結果と考察

Bio Gel P-4 における SLS とアルキルパラベンの流出パラメーター

Polyacrylamide 構造で分画範囲が 500—4000 の Bio Gel P-4 におけるアルキルパラベンと SLS の K_{av} 値が Table I に示されている。SLS の K_{av} 値は 1 より小さいので、SLS はゲル基質に吸着されないことを示す。他方いずれのアルキルパラベンも K_{av} 値は 1 より大きいことから、アルキルパラベンはゲル基質に対して吸着のあることを示す。この溶離特性は、Sephadex G-50 の場合と比較すると、¹⁾ SLS は NaCl に類似した挙動をとり、ゲルへの吸着が少いこと、またアルキルパラベンの場合はゲルへの吸着がより大であることを示している。

4mM SLS 溶液中アルキルパラベンのゲルろ過 (Tail 分析)

4 mM SLS 溶液にエチルパラベンを溶解し、これをゲルろ過した結果、Fig. 1 に示す流出曲線が得られた。ゼロ点はあらかじめ試料溶液で飽和したゲルカラムに、溶離液である水を流入し始めた点である。SLS 流出曲線にみられる plateau, $[S]_{ef}$ は用いた試料溶液中の SLS 濃度に等しい。Plateau が 1 つしか認められないので、こ

TABLE I. K_{av} Values for Alkyl Parabens, SLS and NaCl obtained by Zone Analysis

	V_e	K_{av}
Methylparaben	60.0	1.58
Ethylparaben	58.4	1.52
Butylparaben	62.0	1.66
SLS	44.0	0.96
NaCl	42.4	0.90

K_{av} values were calculated from the equation

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}; V_0 \text{ and } V_t \text{ were 19.2 and 45.0 ml, respectively.}$$

10) T.C. Laurent, J. Killander, *J. Chromatog.*, **14**, 317 (1961).

11) 青木 大, 岩山陽治, 薬誌, **79**, 522 (1958).

の系ではミセルは存在しないと考えられる。一方エチルパラベンの流出曲線には二つの plateau が認められた。最初の plateau, $[D]_{ef}$ は用いた試料溶液中エチルパラベン濃度に等しい値を示すが, SLS 流出曲線の低下とともに, パラベン濃度にも減少が起こり, 第2の plateau, $[D]_f$ に達する。これら SLS とパラベンの流出曲線から次のことが推察された。 $[S]_{ef}$ と $[D]_{ef}$ は cmc 以下の SLS 溶液で monomer SLS (S) と遊離のパラベン (D) および両者の間で形成された複合体 (SD_n : S と D が 1:n からなる複合体) が共存した状態を示すと考えられる。何故ならゲル透過の過程で, 複合体生成系の平衡速度がゲル中における S, D, SD_n の溶質の移動速度に比べて充分速ければ, 複合体は流出の front において平衡定数にしたがって解離し, その結果 S, D, SD_n がカラムの下端から同時に流出されることになるかと推察されるからである。

この系では, ミセル生成系¹⁾と異なり, D と S が存在する限り, SD_n が形成され则认为られる。SLS とパラベンの Bio Gel P-4 における K_{av} 値 (Table I) から, S が SD_n とともに流出された後でも, D だけが流出され続けると推察される。この状態を第2の plateau, $[D]_f$ が示していると考えられる。したがって $[D]_f$ は S や SD_n が共存時においては, 遊離のパラベン濃度を示すと考えられる。それ故 $[D]_{ef}$ と $[D]_f$ の差は複合体形成にあずかるパラベン濃度 ($[D]_c$) に相当すると考えられる。

SD_n の複合体のモル比を 1:1 と考えて (1)–(2) 式にしたがって安定度定数, K を求めた結果, Table II に示すように, メチル, エチルパラベンはほぼ一定となった。

$$S + D = SD \quad (1)$$

$$K_{1:1} = \frac{[SD]_c}{[S]_f \cdot [D]_f} = \frac{[D]_c}{\{[S]_{ef} - [D]_c\} \cdot [D]_f} \quad (2)$$

$[S]_f$ monomer SLS 濃度, $[D]_f$ 遊離パラベン濃度

$[SD]_c$ 複合体濃度

しかしブチルパラベンは $n=1$ と仮定すると, 得られた K は増加の傾向が認められる。そこで (3)–(6) 式の平衡状態を想定し, (7) 式にしたがい, 安定度定数 $K_{1:2}$ を計算した。

$$S + D = SD \quad (3)$$

$$K_1 = \frac{[SD]_c}{[S]_f \cdot [D]_f} \quad (4)$$

$$SD + D = SD_2 \quad (5)$$

$$K_2 = \frac{[SD_2]_c}{[SD]_c \cdot [D]_f} \quad (6)$$

$$K_{1:2} = K_1 \cdot K_2 = \frac{[SD_2]_c}{[D]_f^2 [S]_f} = \frac{\frac{1}{2}[D]_c}{[D]_f^2 \{[S]_{ef} - \frac{1}{2}[D]_c\}} \quad (7)$$

その結果, $K_{1:2}$ はほぼ一定値を示すので, monomer SLS-ブチルパラベン複合体生成系においては (3) および (5) 式にしたがった平衡状態が共存すると推察される。

ただしこの系においてはパラベンの解離は考慮に入れていない。なぜならいずれのパラベンも pK_a が 8.44–8.48 であり, かつパラベンを溶解した 4 mM SLS 溶液の pH は, 5.5–6.1 の範囲にあるからである。

また各々のパラベン pK_a がほぼ等しいという事実から, パラベンの水酸基はほぼ同じ程度の水素結合能力があると推察される。したがってパラベンの水酸基は同じ程度の強さで monomer SLS に水素結合していると推察

Fig. 1. Tail Analysis for Elution Curves of 3.78 mM Ethylparaben in 4 mM SLS using Bio Gel P-4

On the gel column pre-equilibrated with the sample solution of 100 ml, the sample was eluted with water.
 —●—, ethylparaben concentration in the eluate.
 —○—, SLS concentration in the eluate.

TABLE II. Stability Constants (K) for the Complex Formation of Monomer SLS and Alkyl Paraben in Aqueous Solutions at 27°

	$[D]_{ef}$ $M \times 10^3$	$[D]_f$ $M \times 10^3$	$[D]_e$ $M \times 10^3$	$[S]_f = [S]_{ef} - [D]_e$ $M \times 10^3$	$K_{1:1}$ M^{-1}
Methylparaben $K_{1:1}$	3.62	3.54	0.08	3.92	5.77
	5.95	5.83	0.12	3.88	5.30
	9.74	9.50	0.24	3.76	6.72
	12.8	12.5	0.3	3.70	7.20
	$[D]_{ef}$ $M \times 10^3$	$[D]_f$ $M \times 10^3$	$[D]_e$ $M \times 10^3$	$[S]_f = [S]_{ef} - [D]_e$ $M \times 10^3$	$K_{1:1}$ M^{-1}
Ethylparaben $K_{1:1}$	1.22	1.15	0.07	3.93	15.5
	2.64	2.50	0.14	3.86	14.5
	3.78	3.57	0.21	3.79	15.5
	5.24	4.95	0.29	3.71	15.8
	$[D]_{ef}$ $M \times 10^3$	$[D]_f$ $M \times 10^3$	$[D]_e$ $M \times 10^3$	$[S]_f = [S]_{ef} - \frac{1}{2}[D]_e$ $M \times 10^3$	$K_{1:2}$ M^{-2}
Butylparaben $K_{1:2}$	0.524	0.490	0.017	3.98	1.78×10^4
	0.678	0.630	0.024	3.98	1.52×10^4
	0.884	0.812	0.036	3.96	1.38×10^4
	1.00	0.900	0.05	3.95	1.56×10^4
	1.18	1.05	0.07	3.93	1.58×10^4

$$K_{1:1} = \frac{[SD]}{([S]_{ef} - [D]_e) \cdot [D]_f} \quad K_{1:2} = \frac{[SD_2]}{[S]_f \cdot [D]_f^2} = \frac{\frac{1}{2}[D]_e}{([S]_{ef} - \frac{1}{2}[D]_e) \cdot [D]_f^2}$$

Fig. 2. Tail Analysis for Elution Curves of 20.6 mM Ethylparaben in 40 mM SLS using Bio Gel P-4

On the gel column pre-equilibrated with the sample solution of 100 ml, the sample was eluted with water.

- , ethylparaben concentration in the eluate.
—○—, SLS concentration in the eluate.

される。しかしこれら複合体の平衡状態が、パラベンのアルキル鎖長の増加につれて、変わってくるのは、複合体の形成において水素結合とともに疎水結合が重要な因子と考えられる。特にブチルパラベンのようにアルキル鎖長が増加すると、SLSのラウリル基との疎水結合が強まり、(3) および (5) 式の平衡状態が成立すると推察される。このように Tail 法ではパラベンの種々の濃度でも、その複合体の K を求められる有利な点があることが明らかとなった。

40 mM SLS 溶液中アルキルパラベンのゲル透過 (Tail 分析)

SLS ミセル溶液にエチルパラベンを可溶化し、これをゲル透過した結果、Fig. 2 に示す流出曲線が得られた。これらの流出曲線には、4 mM SLS を用いた場合と比較して、出現する plateau の数に違いがある。SLS の場合、先ず用いた試料溶液中の SLS 濃度に相当する第 1 の plateau が出現し、その後低下して $[S]_{ef}$ で示した第 2 の plateau に達する。一方のエチルパラベン曲線は 3 つの plateau を示す。

その第 1 の plateau は用いた試料溶液中エチルパラベン濃度に等しく、その後 SLS 曲線とともに低下し、Sephadex G-50 では認められなかった二つの plateau が現われる。すなわち monomer SLS が共存する第 2 の plateau, $[D]_{ef}$ であり、monomer SLS が流出後に現われる plateau, $[D]_f$ である。この $[D]_f$ は試料溶液中の遊離のパラベン濃度を示すと考えられ、 $[D]_{ef}$ と $[D]_f$ の差、 $[D]_e$ は $[D]_f$ と平衡にある monomer SLS とパラベンの複合体の濃度を示すと考えられる。 $[D]_e$ と $[D]_f$ はミセル中のパラベン濃度、 $[D]_m$ とともに平衡状態にあると推察される。

いま流出液として水を用いて得られたパラベンの V_e (Table I) は、固有の各々のパラベンの流出パラメーターである。したがってこの各々の V_e が monomer SLS やミセルが共存していても変化がなければ、パラベンの流出挙動は monomer SLS やミセルによって影響を受けないと考えられる。Fig. 2 に示されるように、エチルパラベンの場合 $[D]_f$ の plateau の Tail の部分の midpoint, P に注目すると、Zone 法より得られたエチルパラベンの V_e (Table I) にほぼ等しい。同様なことが、メチル、ブチルパラベンについて認められた。したがって monomer SLS やミセルが共存していてもパラベンの流出挙動は影響を受けないと考えられる。それ故 $[D]_f$, $[D]_m$, $[D]_e$ は元の試料の遊離のパラベン濃度、ミセルに可溶化されたパラベン濃度および複合体形成にあずかるパラベン濃度を表わしていると考えられる。

そこで可溶化系における複合体も Table II に示されているモル比と同じと考えるならば、SLS の $[S]_{ef}$, パラベンの流出曲線の $[D]_e$, $[D]_f$ から (1) — (7) 式にしたがって複合体の安定度定数, K を求めることが可能である。その結果メチルパラベンの $K_{1:1}$ 7.50 M^{-1} , エチルパラベンの $K_{1:1}$ 18.0 M^{-1} , ブチルパラベンの $K_{1:2}$ $1.2 \times 10^4 \text{ M}^{-2}$ であった。いずれのパラベンの場合も cmc 以下の SLS 溶液 (4 mM) のとき得られた安定度定数とほぼ等しい。したがって可溶化系の monomer SLS とパラベンの複合体は、ミセルが共存しない場合と同じものと推察される。このようにに Bio Gel P-4 によって複合体が、ミセルや複合体と平衡にある遊離のパラベンから分離できると同時に、SLS-パラベン溶液中で SLS やパラベンの広い濃度範囲においてミセルによる可溶化や複合体の形成が行われているかどうか直接推察できることで興味もたれる。

可溶化溶液中のパラベン濃度、 $[D]_t = [D]_m + [D]_e + [D]_f$ を示しているので、ミセルに可溶化された $[D]_m$ は、 $[D]_t$ から $\{[D]_f + [D]_e\}$ を差し引いたものである。Bio Gel P-4 で求めた $[D]_m/[D]_f$ をミセル相-水相間のパラベンの分配比と考えるならば、先に Sephadex G-50 で見積られた分配比は、みかけの分配比といわねばならない。というのは Sephadex G-50 で得られたパラベンの流出曲線より求めた遊離のパラベン濃度は、monomer SLS 共存下のものであるため、複合体濃度も含めているからである。しかし本報の場合、たとえば 33.5 mM メチルパラベンの場合 $[D]_m/\{[D]_f + [D]_e\} = 1.21$, $[D]_m/[D]_f = 1.26$, 20.6 mM エチルパラベンの場合、 $[D]_m/\{[D]_f + [D]_e\} = 3.23$, $[D]_m/[D]_f = 3.37$, 23.8 mM ブチルパラベンの場合、 $[D]_m/\{[D]_f + [D]_e\} = 21.0$, $[D]_m/[D]_f = 24.7$ であまり差がない。したがって SLS-アルキルパラベン溶液では、Sephadex G-50 でも Bio Gel P-4 でもよいが、 $[D]_e$ が無視できないような複合体生成系ではゲルの選択に配慮が必要である。