コンドロイチン硫酸に対するカルシウムイオンとナトリウムイオンの結合

中垣正幸, 嶋林三郎, 早川栄治, 小槻 節

京都大学薬学部¹⁾

Binding of Calcium and Sodium Ions to Chondroitin Sulfate in Aqueous Solution

MASAYUKI NAKAGAKI, SABURO SHIMABAYASHI, EIJI HAYAKAWA
and TAKASHI KOTSUKI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University¹⁾

(Received January 26, 1979)

The amounts of both Ca^{2+} and Na^+ , x and y , respectively, bound to C-type chondroitin sulfate (Chs) from an aqueous solution of CaCl_2 mixed with NaCl were obtained by the membrane equilibrium method. To estimate x and y under the effect of the Donnan equilibrium, $[\text{Ca}^{2+}]$ and $[\text{Cl}^-]$ for both sides of the dialysing tube and $[\text{Chs}]$ for the inner side were analysed. The binding isotherm for Ca^{2+} was of the Langmuir type, and both x and $k_{\text{Ca}^{2+}}$, the binding constant for Ca^{2+} , decreased with ionic strength, J . On the other hand, the binding isotherm for Na^+ was not of the Langmuir type but its shape was explained as the competitive adsorption of the two components, Na^+ and Ca^{2+} , because Ca^{2+} binds more strongly to Chs than Na^+ and, therefore, the effect of coexistence of Ca^{2+} with Na^+ cannot be neglected when the Na^+ binding is examined. It was also suggested that y and k_{Na^+} decreases with J when the amount of the occupied site by the Ca^{2+} is kept constant at x .

The degree of the ionization, z , of Chs was found to be 0.40—0.41 for Na_2Chs and 0.20—0.21 for CaChs by this membrane equilibrium method assuming $x+y+z=1$. These values coincide with those obtained from the vapour pressure osmometry by the authors and with the literature values calculated with considering the Manning theory.

Keywords—sodium chondroitin sulfate; calcium chondroitin sulfate; counter-ion binding to chondroitin sulfate; competitive adsorption of Ca^{2+} and Na^+ ; degree of ionization of chondroitin sulfate; membrane equilibrium; Donnan equilibrium; effect of ionic strength on counter-ion binding

緒 言

コンドロイチン硫酸 (以下 Chs と略す) は動物の軟骨, 腱などの結合組織中でタンパク質と結合して複合体として存在している酸性ムコ多糖の一種である.²⁾ これはまた, 2 糖単位あたりにカルボキシル基と硫酸基を 1 個ずつ持つ陰イオン性高分子電解質であり, 金属イオンと結合する. この金属イオンとの結合は軟骨代謝と深い関係があり, Chs が軟骨における重要な結合剤であるといわれている.³⁾

このような見地から, Chs と種々の陽イオンとの結合に関する研究は重要である. 本研究では添加塩として塩化ナトリウム (NaCl) と塩化カルシウム (CaCl_2) の混合系を用いて膜平衡法による実験をおこない, Donnan の膜平衡を考慮して Chs に対する Ca^{2+} および Na^+ の結合量を求めた. ただし Donnan 平衡に対する活動度係数の影響⁴⁾ については無視した.

実 験 の 部

1. **試料および試薬** Chs はサメの軟骨より抽出された C 型のもののナトリウム塩であって, 科研薬化工株式会社より提供されたものを用いた. 分子量は 7—8 万といわれている. 試薬は特級, 水は再蒸留水を用いた.

1) Location: Yoshida Shimoadachi, Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto 606, Japan.

2) D. Kaplan, K. Mayer, *Nature* (London), **183**, 1267 (1959).

3) M.R. Urist, D.P. Speer, K.J. Ibsen, F.S. Strauss, *Calc. Tiss. Res.*, **2**, 253 (1968).

4) 中垣正幸, 小林征雄, 薬誌, **93**, 490 (1973).

2. 膜平衡法 膜平衡に達しさせるための透析膜としては、Visking 社製 Cellulose Tubing (直径 15 mm) を約 1 時間 90° の蒸留水で洗浄したものを使用した。

200 ml のマイヤーフラスコに NaCl と CaCl₂ の混合水溶液 100 ml をいれて外液とした。また長さ 55 cm に切った Cellulose Tubing に NaCl, CaCl₂ および Na₂Chs を含む水溶液 50 ml をいれて内液とした。この Cellulose Tubing は両端をしぼって外液中に浸したがその両端は糸でつるして外液に浸らないようにした。これを 25° の恒温槽中で 48 時間水平に振盪して膜平衡に達させたのち各成分の定量を行った。

3. 分析法 Chs の定量は Dische のカルバゾール硫酸法^{5a)} の改良法^{5b)} でおこなった。

Ca²⁺ の定量は pH 10 で少量の Mg-EDTA 共存下でエリオクロームブラック T を指示薬とする EDTA 規定液によるキレート滴定法によっておこなった。

Cl⁻ の定量は AgNO₃ 規定液による沈殿滴定法 (Mohr 法) によった。

このようにして各成分のモル濃度 (またはグラムイオン濃度) を求めた。外液 (I) については、カルシウムイオン濃度 C_{Ca}^I , および塩化物イオン濃度 C_{Cl}^I , 内液 (II) についてはカルシウムイオン濃度 C_{Ca}^{II} , 塩化物イオン濃度 C_{Cl}^{II} , および Chs. 濃度 C_{Chs}^{II} , を測定した。 C_{Chs}^{II} は 2 糖単位を基準とするモル濃度であらわした。

なお、内液から外液へ Chs がもれていないことは、上に述べた Dische の方法による Chs の呈色反応が外液についてはみられないことよりたしかめた。

4. 蒸気圧浸透圧計による Chs の電離度の測定 Mechro Lab. 社製蒸気圧浸透圧計を用いて既報⁶⁾ と同様の方法で測定した。Na₂Chs は供与された試料をそのまま水溶液として用いた。CaChs は強酸性カチオン交換樹脂である Amberlite IR-120 B を用いて Na₂Chs より H₂Chs とし、これを Ca(OH)₂ で中和して調製した。調製後 Ca²⁺ および Chs をそれぞれ定量し、当量関係 ($[Ca^{2+}] = [Chs]$) のなりたっていることを確認した。本装置を用いて測定される浸透圧 π は、電離したカチオンの浸透圧への寄与に比べれば高分子アニオンの寄与は無視できるので、

$$\frac{\pi}{RT} = \phi \cdot \frac{2C_{Chs}}{z_g} \cdot z \quad (1)$$

とあらわされる。ここで R , T は気体定数, 絶対温度であり, z_g は対イオンの価数である。希薄溶液であるので浸透圧係数 ϕ は 1 と近似すれば Chs の電離度 z は式 (1) より求まる。

計 算 方 法

前節 3 で述べたように平衡状態における 5 種のモル濃度 (またはグラムイオン濃度) C_i^j を測定すれば、これらは遊離平衡モル濃度 $[i]_j$ と次の関係にある。

$$C_{Ca}^I = [Ca^{2+}]_I \quad (2)$$

$$C_{Cl}^I = [Cl^-]_I \quad (3)$$

$$C_{Ca}^{II} = [Ca^{2+}]_{II} + [CaChs]_{II} \quad (4)$$

$$C_{Cl}^{II} = [Cl^-]_{II} \quad (5)$$

$$C_{Chs}^{II} = [Na_2Chs]_{II} + [CaChs]_{II} + [Chs^{2-}]_{II} \quad (6)$$

ただし Chs は 2 糖単位あたりカルボキシル基 1 個と硫酸基 1 個とを有するが、本研究ではこれらの電離基を区別して取り扱うことはできなかった。これらの電離基は Na⁺ または Ca²⁺ と結合しているかあるいは電離していると考え、それらの濃度を $[Na_2Chs]_{II}$, $[CaChs]_{II}$ および $[Chs^{2-}]_{II}$ であらわした。ただし、たとえば $[Na_2Chs]_{II}$ は 2 糖単位中の 2 つの電離基が共に Na⁺ と結合していることを意味するのではなく、Na⁺ と結合している電離基の濃度を 2 糖単位をもとにしたモル濃度であらわしたものである。なお、ここでいう“結合量”とはポリマー領域にとりこまれたイオンの量であって、そのイオンは必ずしも電離基とイオン対を形成している必要はない。また pH 滴定の結果によれば中性付近ではプロトンはほとんど Chs と結合しないので $[H_2Chs]_{II} \approx 0$ とした。

Chs の電離基が Ca²⁺ と結合している割合いかえればポリマー領域にとりこまれた Ca²⁺ の当量の、Chs の電離基の全量 (当量であらわした) に対する比率を x とすれば式 (4) によって、

$$x \equiv \frac{[CaChs]_{II}}{C_{Chs}^{II}} = \frac{(C_{Ca}^{II} - [Ca^{2+}]_{II})}{C_{Chs}^{II}} \quad (7)$$

となる。Donnan 平衡を考慮しない場合には、

5) a) Z. Dische, *J. Biol. Chem.*, **167**, 189 (1947); b) T. Bitter, H.M. Muir, *Anal. Biochem.*, **4**, 330 (1962).

6) 中垣正幸, 嶋林三郎, 日化, **1972**, 989.

$$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{II}} \doteq [\text{Ca}^{2+}]_{\text{I}} \quad (8)$$

とおくことになるのでみかけの結合率 x_0 は式 (2), (7) を用いて,

$$x_0 = \frac{(C_{\text{Ca}}^{\text{II}} - C_{\text{Ca}}^{\text{I}})}{C_{\text{Chs}}^{\text{II}}} \quad (9)$$

となる. しかし CaCl_2 についての Donnan 平衡

$$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{I}} \cdot [\text{Cl}^-]_{\text{I}}^2 = [\text{Ca}^{2+}]_{\text{II}} \cdot [\text{Cl}^-]_{\text{II}}^2 \quad (10)$$

を考慮すれば式 (7) は式 (2), (3), (5) を用いて,

$$x = \frac{C_{\text{Ca}}^{\text{II}} - C_{\text{Ca}}^{\text{I}} (C_{\text{Cl}}^{\text{I}} / C_{\text{Cl}}^{\text{II}})^2}{C_{\text{Chs}}^{\text{II}}} \quad (11)$$

となる. したがって Chs 濃度と Ca^{2+} 濃度のほかに Cl^- 濃度をも測定すれば, Donnan 平衡を考慮した結合率 x を求めることができる.

ナトリウムイオンの結合率 y および Chs の電離度 z は次式 (12), (13) で定義される.

$$y \equiv \frac{[\text{Na}_2\text{Chs}]_{\text{II}}}{C_{\text{Chs}}^{\text{II}}} \quad (12)$$

$$z \equiv \frac{[\text{Chs}^{2-}]_{\text{II}}}{C_{\text{Chs}}^{\text{II}}} \quad (13)$$

x, y, z の間には式 (6) によって,

$$z + y + x = 1 \quad (14)$$

なる関係がある. なお, 低分子量物質の場合には Na 塩は完全に電離していると考えて $(y+z)$ を電離度とすることがあるが, 高分子電解質の場合には Na^+ もポリマー領域にとりこまれるので y と z を区別して取り扱う必要がある. y, z の値は次のようにして求められる. NaCl についての Donnan 平衡の条件は,

$$[\text{Na}^+]_{\text{I}} \cdot [\text{Cl}^-]_{\text{I}} = [\text{Na}^+]_{\text{II}} \cdot [\text{Cl}^-]_{\text{II}} \quad (15)$$

であり, また電気中性が外液 (I) については,

$$[\text{Na}^+]_{\text{I}} + 2[\text{Ca}^{2+}]_{\text{I}} = [\text{Cl}^-]_{\text{I}} \quad (16)$$

とあらわされ, 内液 (II) については,

$$[\text{Na}^+]_{\text{II}} + 2[\text{Ca}^{2+}]_{\text{II}} = [\text{Cl}^-]_{\text{II}} + 2[\text{Chs}]_{\text{II}} \quad (17)$$

とあらわされるので $[\text{Chs}^{2-}]_{\text{II}}$ が求められ,

$$z = \frac{\left(\frac{C_{\text{Cl}}^{\text{I}} + C_{\text{Cl}}^{\text{II}}}{2} + C_{\text{Ca}}^{\text{I}} \cdot \frac{C_{\text{Cl}}^{\text{I}}}{C_{\text{Cl}}^{\text{II}}} \right) \left(\frac{C_{\text{Cl}}^{\text{I}}}{C_{\text{Cl}}^{\text{II}}} - 1 \right)}{C_{\text{Chs}}^{\text{II}}} \quad (18)$$

が得られる. また式 (11), (14), (18) より

$$y = 1 - \frac{2 \left\{ C_{\text{Ca}}^{\text{II}} - C_{\text{Ca}}^{\text{I}} \cdot \frac{C_{\text{Cl}}^{\text{I}}}{C_{\text{Cl}}^{\text{II}}} \right\} + \left\{ C_{\text{Cl}}^{\text{I}} \cdot \frac{C_{\text{Cl}}^{\text{I}}}{C_{\text{Cl}}^{\text{II}}} - C_{\text{Cl}}^{\text{II}} \right\}}{2C_{\text{Chs}}^{\text{II}}} \quad (19)$$

が得られる.

これらの結果から, 高分子電解質と低分子電解質の膜平衡においても高分子の電離度がゼロ ($z=0$) の時にはイオンの結合率を求めるのに Donnan 平衡を考慮する必要がなく, $C_{\text{Cl}}^{\text{I}} = C_{\text{Cl}}^{\text{II}}$ となっていることが結論される. この時には $x=x_0$ であり, また $y=1-x_0$ である. しかし高分子電解質が電離している時には Donnan 平衡を考慮せねば正しい結合率は求められないが, 陽イオン 2 種, 低分子陰イオン 1 種, 高分子陰イオン 1 種の系では陽イ

オン 1 種と陰イオン 2 種の濃度を内液と外液について求めれば, x, y, z のすべてを実験的に決定できることが結論される.

結 果

1. カルシウムの結合率

25°において Table I に示す 7 つの系列について Na^+ と Ca^{2+} の割合を変えて膜平衡の実験をおこなった. ただし, C_{Chs}^0 は内液中のコンドロイチン硫酸ナトリウムの初濃度である. また添加電解質の初濃度 C_{NaCl}^0 および $C_{\text{CaCl}_2}^0$ は内液, 外液ともに同一とし, 系列 1, 2, 3, では Cl^- の初濃度

$$[\text{Cl}^-]^0 = C_{\text{NaCl}}^0 + 2C_{\text{CaCl}_2}^0 \quad (20)$$

を一定に保ち, 系列 4, 5, 6 ではイオン強度

$$J^0 = C_{\text{NaCl}}^0 + 3C_{\text{CaCl}_2}^0 \quad (21)$$

を一定に保った. また系列 7 では添加電解質として CaCl_2 のみを用いた場合であって $[\text{Cl}^-]^0$ も J^0 も一定ではなく Na^+ は添加したコンドロイチン硫酸ナトリウムに由来する量のみである. なお Table I には平衡後の外液のイオン強度 J_I の各系列における平均値 $\langle J_I \rangle$ も示してある. ただし系列 4, 5, 6 では J_I の値は $\pm 1 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ 程度であったが, 系列 7 では J_I は $2.63\text{--}73.0 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ にわたって変化した. なお, 本論文に示す図で用いた実験条件を示す符号を, Table I の右側の欄に示した.

上に述べた系列について, Ca^{2+} の結合率 x と内液中の遊離の Ca^{2+} 濃度 $[\text{Ca}^{2+}]_{II}$ との関係をみると Fig. 1 のようになる. Fig. 1 より濃度の増大につれて結合率 x は Langmuir 型の曲線に沿って増大していることがわかる. 高分子濃度のみを約 2 倍とした 1 と 2 の系列 (Fig.

1 の●と○) はほぼ同一の曲線を与え, Ca^{2+} の結合率は高分子濃度には依存しない事がたしかめられた. また同一の Ca^{2+} 濃度における x の値は系列 7 (Fig. 1 の×) を除いて $\langle J_I \rangle$ が小さいほど大きくなった.

2. ナトリウムの結合率

Na^+ の結合率 y と内液の遊離 Na^+ 濃度 $[\text{Na}^+]_{II}$ との関係をみると Fig. 2 のようになる. Fig. 1 の Ca^{2+} の結合等温線が Langmuir 型であるのに対し, Fig. 2 の Na^+ の結合等温線は Langmuir 型にはならず, 平衡濃度 $[\text{Na}^+]_{II}$ の高い領域 (すなわちこの領域は, 各系列の $[\text{Cl}^-]^0$ あるいは J^0 が一定に保っているので $[\text{Ca}^{2+}]_{II}$ の低い領域である) で, y の顕著な増加がみられることがわかる. また Na^+ の場

Fig. 1. Relationship between the Binding Ratio, x , for Ca^{2+} and the Free Concentration of Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_{II}$, in the Inner Solution (25°)

Plots are experimental, and curves are theoretical by Eq. (23).

TABLE I. Experimental Conditions for the Membrane Equilibrium at 25°

No.	C_{Chs}^0 (mol/m ³)	$\text{NaCl} + \text{CaCl}_2$ (mol/m ³)	$\langle J_I \rangle$ (mol/m ³)	Symbols in Figures
1	2.93	$[\text{Cl}^-]^0 = 50$	58.6	●
2	6.49	$[\text{Cl}^-]^0 = 50$	59.9	○
3	5.93	$[\text{Cl}^-]^0 = 25$	29.3	⊙
4	6.53	$J^0 = 100$	99.8	□
5	6.48	$J^0 = 50$	49.5	△
6	5.78	$J^0 = 25$	24.5	▲
7	5.96	$C_{\text{NaCl}}^0 = 0$	(28.9)	×

Fig. 2. Relationship between the Binding Ratio, y , for Na^+ and the Free Concentration of Na^+ , $[\text{Na}^+]_{\text{II}}$, in the Inner Solution (25°)

Plots and full lines are experimental, and dotted lines are theoretical by Eq. (23-a).

Fig. 3. Relationship between Equivalent Fraction of Ca^{2+} or Na^+ in the Inner Solution, II, and x or y

—: variation of x , : variation of y .

合には Ca^{2+} の場合にみられたような $\langle J_1 \rangle$ の増加と共に結合率が低下する傾向は、部分的にしかみられないことがわかる。

Fig. 3 は内液中に遊離状態で存在する Ca^{2+} の当量分率, $2[\text{Ca}^{2+}]_{\text{II}}/([\text{Na}^+]_{\text{II}} + 2[\text{Ca}^{2+}]_{\text{II}})$, と x (—) または y (····) との相互関係をみたものである。ただし y は、右側のたて軸上に上から下へ $0-1.0$ の目盛がとってある。また上側の横軸には Na^+ の当量分率 $[\text{Na}^+]_{\text{II}}/([\text{Na}^+]_{\text{II}} + 2[\text{Ca}^{2+}]_{\text{II}})$ が右から左へ $0-1.0$ の目盛がとってある。したがって Fig. 3 中の実線は x と Ca^{2+} の当量分率 (あるいは Na^+ の当量分率) との関係をあらわし、破線は y と Na^+ の当

Fig. 4. Relationship between the Degree of Dissociation, z , for Chs Anion and Equivalent Fraction of Ca^{2+} in the Inner Solution, II

Full line and dotted line show the experimental value and the theoretical value by Eq. (22), respectively.

量分率（あるいは Ca^{2+} の当量分率）との関係をあらわし、共通の符号を有する破線と実線の距離（たとえば…▲…と—▲—との垂直距離）は式 (14) により Chs の電離度 z をあらわすことになる。

Fig. 3 より、 Ca^{2+} の結合率 x は Ca^{2+} の当量分率の増加とともに Langmuir 型の曲線に沿って増加し、 Ca^{2+} の当量分率が 1 に近付くといずれの実験条件においても x の値は 0.79—0.80（すなわち z の値は 0.20—0.21）に収束するが、 Na^{+} の結合率 y は Na^{+} の当量分率の増加に対しては Langmuir 型の曲線とはならず、 Na^{+} の当量分率が 1 に近付くといずれの実験条件においても y の値は 0.59—0.60（すなわち z の値は 0.40—0.41）に収束することがわかる。

3. コンドロイチン硫酸の電離度

前節で述べたように式 (14) によって電離度 z を求め、Fig. 3 と同様に遊離状態にある Ca^{2+} の当量分率を横軸にとり、 z をたて軸にとって相互関係をみたのが Fig. 4 である。Fig. 3 では、実験条件によって x, y の値はそれぞれことになったが、Fig. 4 では 1 本の曲線ではほぼ表わされ、 $z (=1-x-y)$ に対してはイオン強度あるいは添加塩濃度の効果はほとんどあらわれず、 z は Ca^{2+} の当量分率でほぼ決定されることがわかる。ただし Ca^{2+} 当量分率の大なる領域ではややバラツキが大になる傾向がみられる。

Fig. 4 より、 Ca^{2+} 当量分率が 0（あるいは Na^{+} 当量分率が 1）の時には、すなわち Na_2Chs の時には z は 0.41 となり、 Ca^{2+} 当量分率の増加と共にはじめやや急激に、のちにはややゆるやかに低下して Ca^{2+} 当量分率が 1（あるいは Na^{+} 当量分率が 0）の時には、すなわち CaChs の時には z は 0.15—0.18 となることがわかる。

前節結果の部 2 で述べたように Fig. 3 で Na^{+} 当量分率を 1 に外挿して Na_2Chs の y を求め、この時には $x=0$ であることを考慮すれば、 $z=0.40-0.41$ となって Fig. 4 の結果と一致するが、同様にして Ca^{2+} の当量分率を 1 に外挿して Fig. 3 より CaChs の z を求めると 0.20—0.21 となり、この値は Fig. 4 によって得られる値 $z=0.15-0.18$ とはややぐいちがっている。この原因は Fig. 3 右上の破線にみられるように、 Na^{+} 当量分率の小なる時に y の増加が急激であり、その後ゆるやかに増加している点にある。そのため、Fig. 4 のように z を求めたのちに Ca^{2+} 当量分率 1 に z を外挿する際には z を過小に評価する結果となったと考えられる。 CaChs の電離度 z のみを求めるためには、Fig. 4 を経由しないでむしろ Fig. 3 から直接に外挿法で求める方が精度が高いと考えられる。

蒸気圧浸透圧計で浸透圧 π を測定し、式 (1) によって z を求めると Na_2Chs については 0.41、 CaChs については 0.20 となり、上述の膜平衡法による結果と一致した。また CaChs の z については、Fig. 3 から求めた結果 ($z=0.20-0.21$) の方が Fig. 4 から求めた結果 ($z=0.15-0.18$) よりもよく一致した。

岸本らの研究⁷⁾によれば Chs A 型と C 型の Na^{+} 塩の電離度はそれぞれ 0.45, 0.46 で本報の値よりやや大である。また Ba^{2+} 塩の電離度は A 型、C 型ともに 0.22 と報告している。A 型の Ca^{2+} 塩の電離度も 0.22 と報告しているが C 型の Ca^{2+} 塩の電離度のデータは欠けている。しかし A 型と C 型の電離度の類似性より C 型の

7) 米勢政勝, 柘植英哉, 岸本 博, 日化, 1978, 108.

Ca^{2+} 塩の電離度も 0.22 程度と推測すれば、本報の結果 ($z=0.20-0.21$) とほぼ一致したといえる。また岸本ら⁷⁾によれば、Manning の理論⁸⁾より Chs の実用浸透圧係数 ϕ' (これは本報でいう電離度 z に相当する) は、

$$\phi' = \frac{1}{2.26 z_g} (=z) \quad (22)$$

と表わすことができる。ただし z_g は対イオンの価数である。式 (22) によれば CaChs の z は 0.22, Na_2Chs の z は 0.44 となり、本報の実験結果とほぼ一致しているといえる。

Na^+ と Ca^{2+} の混合系については、平衡内液中の遊離平衡状態にある Na^+ と Ca^{2+} の組成で算術平均した価数 z_g をもつ (仮想的な) カチオンについての z を式 (22) より計算し、Fig. 4 に破線 (...) で示した。全領域にわたって実測値は破線より小となっている。これは Fig. 3 にみられるように、平衡内液中の遊離カチオンの Ca^{2+} 当量分率よりも Chs に結合しているカチオンの Ca^{2+} 当量分率の方が大であるためと考えられる。

考 察

1. カルシウムの結合等温線

Ca^{2+} の結合率 x と濃度 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{II}}$ の関係は Langmuir 型の結合等温式、

$$x = \frac{x_{\infty} \cdot k_{\text{Ca}^{2+}} \cdot [\text{Ca}^{2+}]_{\text{II}}}{1 + k_{\text{Ca}^{2+}} \cdot [\text{Ca}^{2+}]_{\text{II}}} \quad (23)$$

であらわされることがわかった。それぞれの実験条件における飽和結合率 x_{∞} と結合定数 $k_{\text{Ca}^{2+}}$ の対数の $\sqrt{\langle J_1 \rangle}$ に対する変化を Fig. 5, 6 に示した。Fig. 5, 6 中の水平線はイオン強度の最小値, 最大値を示している。Fig. 1 に示したそれぞれの曲線はこれらのパラメーターを式 (23) に代入してえられた理論曲線であるが、実験結果をよく再現しているのがみられる。

Fig. 5 にみられるように、イオン強度を一定に保った系列ではいずれも $x_{\infty} = 1.0$ (破線) となったが、 Cl^- 濃度を一定に保った場合および NaCl 無添加の場合には、ここに実験をおこなった濃度範囲内ではみかけ上 Langmuir 型の関係が成立するにもかかわらず x_{∞} の値は 1.0 よりも小さくなり、不合理な結果となった。また Fig. 6 にみられるように、イオン強度を一定とした系列では $\log k_{\text{Ca}^{2+}}$ と $\sqrt{\langle J_1 \rangle}$ は直線関係となったが、その他の場合には $k_{\text{Ca}^{2+}}$ の値はこれより大となった。これらのことは、従来からいわれているように、高分子イオンと低分子イオンの相互作用には高分子の表面電位 ψ が関係することをあらわしている。

荷電を有する物質間の吸着あるいは結合の強さをあらわす定数 k (式 (23) の $k_{\text{Ca}^{2+}}$ に相当する) は電位 ψ を考慮すれば式 (24) のようにあらわされる。

Fig. 5. Relationship between $\sqrt{\langle J_1 \rangle}$ and the Amount of Saturated Binding, x_{∞} , for Ca^{2+}

—: range of $\sqrt{\langle J_1 \rangle}$.

Fig. 6. Relationship between $\sqrt{\langle J_1 \rangle}$ and $\log k_{\text{Ca}^{2+}}$ or $-\Delta\mu^0$

8) G.S. Manning, *J. Chem. Phys.*, **51**, 924 (1969).

$$k = k_0 \cdot \exp\left(\frac{-z_g \cdot e \cdot \phi}{k_B \cdot T}\right) \quad (24)$$

ここで k_0 は系に固有の定数, e は電気素量, k_B はボルツマン定数, T は絶対温度を示す. 電位 ϕ の絶対値 $|\phi|$ はイオン強度の平方根 $\sqrt{I}$ と共に低下するので, みかけの結合定数 k , すなわち式 (23) の $k_{Ca^{2+}}$, は Fig. 6 に示した様に $\sqrt{\langle J_I \rangle}$ と共に小となる. これにともなって Fig. 1 の Ca^{2+} の結合等温線の初期勾配 ($[Ca^{2+}]_{II} \rightarrow 0$) も小になるといえる. しかし ϕ のイオン強度による変化は飽和結合率 x_∞ には影響しないので, $[Ca^{2+}]_{II}$ が大となれば x は 1 に漸近することになる.

Fig. 6 に示した結合定数 $k_{Ca^{2+}}$ をいわゆる R.W. Gurney の unitary 量 k_x に換算し, それから結合の標準化学ポテンシャル $-\Delta\mu^\circ$ を求めた. すなわち,

$$\begin{aligned} k_x &= \left(\frac{\rho_1 \times 10^6}{M_1} \right) \cdot k_{Ca^{2+}} \\ &= 55.34 \times 10^3 k_{Ca^{2+}} (25^\circ, H_2O) \end{aligned} \quad (25)$$

ただし ρ_1 ($g \cdot cm^{-3}$) および M_1 ($g \cdot mol^{-1}$) は水の密度および分子量である. したがって,

$$\begin{aligned} -\Delta\mu^\circ &= R T \cdot \ln k_x \\ &= 1.364 \cdot \log k_{Ca^{2+}} + 6.470 \text{ (kcal} \cdot \text{mol}^{-1}) \end{aligned} \quad (26)$$

となる. Fig. 6 の右側のたて軸にこれを目盛った. $J_I \rightarrow 0$ における結合の標準化学ポテンシャル $-\Delta\mu^\circ_0$ として $7.03 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ が得られた. なお, イオン強度が高くなると高分子の電荷がイオン雰囲気によって一部遮蔽されるために, 結合の標準化学ポテンシャルが低下するものと考えられる.

2. ナトリウムの結合等温線

Fig. 3 においてイオン強度 $\langle J_I \rangle$ 一定の実験結果 ($\blacktriangle$, $\triangle$, $\square$) について調べてみると, Ca^{2+} の当量分率が大きくなると共に x は大となり y は小となるのは当然であるが, イオン強度の増加と共に ($\blacktriangle$, $\triangle$, $\square$ の順に) x が低下するのに対し y が増加するのは対照的な結果である.

Ca^{2+} の結合率 x ($=0.40, 0.50, 0.60$) と平衡状態にある y の値を, それぞれの実験条件 (それぞれの符号) について Fig. 3 より読みとり, この y の値を与える $[Na^+]_{II}$ を Fig. 2 より求め, 両者の関係を示したのが Fig. 7 である. ただし x が小なる領域あるいは大なる領域では Fig. 2, 3 における読みとりの誤差が大きいので, 調べる

Fig. 7. Relationship between $[Na^+]_{II}$ and y at Constant Binding Ratio, x , of Calcium

(A) $x=0.40$, (B) $x=0.50$, (C) $x=0.60$.

Fig. 8. Relationship between $\sqrt{\langle J_I \rangle}$ and $\log k_{Na^+}$ for Na^+ -binding Isotherm (A) $x=0.40$, (B) $x=0.50$, (C) $x=0.60$, obtained from Fig. 7, respectively. (D) obtained by Eq. (27) using the experimental values.

x の値は 0.40, 0.50, 0.60 に限定した。Fig. 7 よりそれぞれの x の値において各点はほぼ一本の直線上にあるのがみられる。

それぞれの実験条件 (それぞれの符号) について、ある y を与える x と $[\text{Na}^+]_{\text{II}}$ の値の組合せは 1 つしかないので十分とはいえないが、原点 ($y=0$, $[\text{Na}^+]_{\text{II}}=0$) と各符号をつなぎあわせた破線は Ca^{2+} による被覆率 x が一定の場合の、種々のイオン強度 $\langle J_I \rangle$ における Na^+ の結合等温線の一部とみなせる。Fig. 7 (A), (B), (C) のいずれにおいても $\langle J_I \rangle$ が大となるとともに破線の傾斜が小になっているのがみられる。

式 (23) の x を y に、 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{II}}$ を $[\text{Na}^+]_{\text{II}}$ に書きあらためると Na^+ に関する Langmuir 型の結合等温式となる。この時の結合等温線の初期勾配 ($[\text{Na}^+]_{\text{II}} \rightarrow 0$) は $y_{\infty} \cdot k_{\text{Na}^+}$ であるが、 Ca^{2+} が既に x だけ結合サイトを被覆している時には y_{∞} は $(1-x)$ と書きかえねばならず、式 (23) は Na^+ の結合等温式としては次式 (23-a) となる。

$$y = (1-x) \cdot \frac{k_{\text{Na}^+} [\text{Na}^+]_{\text{II}}}{1 + k_{\text{Na}^+} [\text{Na}^+]_{\text{II}}} \quad (23-a)$$

したがって $(1-x) \cdot k_{\text{Na}^+}$ が初期勾配となる。Fig. 7 の破線の勾配を $(1-x) \cdot k_{\text{Na}^+}$ に等しいとして k_{Na^+} を求め、イオン強度一定の場合 ($\blacktriangle$, $\triangle$, $\square$) について $\langle J_I \rangle$ と k_{Na^+} の関係を示したのが Fig. 8 である。

本節 2 のはじめに述べたように Ca^{2+} と Na^+ の結合率 x と y は $\langle J_I \rangle$ に対して対照的な変化を示したが、Fig. 8 と Fig. 6 に示す Na^+ と Ca^{2+} の結合定数の $\langle J_I \rangle$ による変化の傾向はともに式 (23), (23-a), (24) が要求するように電位 ψ したがって $\log k_{\text{Na}^+}$ あるいは $\log k_{\text{Ca}^{2+}}$ が $\sqrt{\langle J_I \rangle}$ とともに直線的に低下する関係をみたしている。このことより、 Na^+ の結合等温線を考慮する時には $\langle J_I \rangle$, $[\text{Na}^+]_{\text{II}}$ の他に Ca^{2+} による被覆率 (結合率) x も考慮しなければならないことがわかる。

3. Ca^{2+} と Na^+ の競争吸着

水溶液中の陰イオン性高分子電解質に対しても陽イオン交換樹脂に対しても 1 価金属カチオンよりも多価金属カチオンの方が結合しやすいことは一般にいわれていることであるが、岸本らは⁹⁾ Chs に対する対イオンのサイトの結合の生じる割合は、1 価, 2 価, 3 価金属カチオンでそれぞれ 0.30, 0.43, 0.53 であることを見出した。以下本報においてはイオン雰囲気によってとりこまれているカチオンによっては Chs アニオンの個々の荷電基は中和されない (すなわちイオン対結合を形成しないので高分子鎖上の電荷の線密度 σ は一定である) が、サイトの結合あるいはイオン対結合をするカチオンによっては個々の荷電基が中和されて σ が低下するとし、またイオン強度 J は式 (24) にみられるようなみかけの結合定数 $k (=k_0 \cdot \exp[-z_g \cdot e \cdot \psi / k_B \cdot T])$ には影響するが飽和結合率には影響しないとして論をすすめる。

上に述べたように Na^+ は Ca^{2+} に比べて Chs にイオン対結合をする割合が低いので、 NaCl と CaCl_2 とで $\langle J_I \rangle$ を調整して Ca^{2+} の結合を考察する時には NaCl は電位 ψ を弱めても Chs の σ を低下させる作用は相対的に小であると考えられ、 NaCl は“準”無関係塩とみなせる。したがって既に述べてきたように Ca^{2+} の結合率 x を“準”一成分吸着と近似して取り扱えたといえる。その結果、 $\langle J_I \rangle$ の増大とともに Fig. 1, Fig. 6 に示したように Langmuir 型の結合等温線を維持しつつ ($x_{\infty}=1$) $k_{\text{Ca}^{2+}}$ が低下したといえる。

これは Ca^{2+} が Na^+ をポリマー領域から排除する傾向にあるためと考えられるが、これと類似の現象は同じく酸性多糖の一種であるデキストラン硫酸ナトリウム水溶液についてもみられる。¹⁰⁾ すなわち 2 価あるいは 3 価金属塩化物 (SrCl_2 , NiCl_2 , CdCl_2 , LaCl_3) を添加するとイオン交換によって多価金属イオンがデキストラン硫酸アニオンへ結合し、 Na^+ はポリマー領域から溶液へと排除されるので、添加塩濃度とともに Na^+ の活量 (これは遊離の Na^+ 濃度に相当) が増加することが報告されている。

一方、 Na^+ の結合等温線を考察する際には $\langle J_I \rangle$ を調整するために添加する CaCl_2 無関係塩とみなすことはできず、 Ca^{2+} 量の増加と共に σ (したがって Na^+ の結合可能なサイトの数) が低下するので、Fig. 2 の Na^+ の結合等温線は Langmuir 型にならないといえる。

Na^+ の結合等温線を考慮するにあたって、イオン強度を調整するために添加される電解質のカチオン (Na^+ 以外の) による Chs の被覆の効果を考慮しないですませるためには、このカチオンは Chs に対する結合率と結合定

9) 柘植英哉, 米勢政勝, 岸本 博, 日化, 1978, 609.

10) I. Satake, M. Fukuda, T. Ohta, K. Nakamura, N. Fujita, A. Yamauchi, H. Kimizuka, *J. Polymer Sci., Polymer Phys.*, 10, 2343 (1972).

数が Na^+ よりも小であり、イオン対結合の度合の小なる無関係カチオンあるいは“準”無関係カチオンでなければならない。これにはテトラメチルアンモニウムイオン⁹⁾ あるいはテトラブチルアンモニウムイオン¹¹⁾ などが考えられる。

式 (23-a) をもとにして、前節では x が一定時の Na^+ の結合率 y を“準”一成分吸着として考察したが、本節では x と y が同時に変化する 2 成分の競争吸着として考察する。式 (23-a) は次式 (27) のように書きかえられる。

$$\frac{1}{[\text{Na}^+]_{\text{II}}} \cdot \frac{y}{1-x-y} = k_{\text{Na}^+} \quad (27)$$

式 (27) の左辺の値を実験値 $x, y, [\text{Na}^+]_{\text{II}}$ より計算し、この値と $[\text{Na}^+]_{\text{II}}$ の関係をみると、 $[\text{Na}^+]_{\text{II}}$ の大なる領域ではほぼ一定の値 k_{Na^+} を与えるが $[\text{Na}^+]_{\text{II}}$ の小なる領域では大となることがわかった。この $[\text{Na}^+]_{\text{II}}$ の大なる領域における k_{Na^+} の対数 $\log k_{\text{Na}^+}$ と $\sqrt{\langle J_I \rangle}$ の関係を Fig. 8 に (D) として示した。 $\langle J_I \rangle$ 一定の系 ($\blacktriangle$, $\triangle$, $\square$) では $\log k_{\text{Na}^+}$ と $\sqrt{\langle J_I \rangle}$ は直線関係にあるが他の場合には直線関係よりはずれることがわかった。また Fig. 8 より、先に求めた x 一定時の k_{Na^+} ((A), (B), (C)) も式 (27) より求めた k_{Na^+} (D) も $\times$ 印を除けば、いずれも $\log k_{\text{Na}^+}$ が 2.0—2.6 の範囲にあり、 Ca^{2+} についての $k_{\text{Ca}^{2+}}$ (Fig. 6) よりも小であることがわかった。すなわち Ca^{2+} の結合定数は Na^+ の結合定数よりも大であり、このために Ca^{2+} は Na^+ に比べて優先的に Chs に結合することになる。

上に述べた方法で求めた k_{Na^+} の値を式 (23-a) に代入し、 $[\text{Na}^+]_{\text{II}}$ とこれに対応する x の値を用いて y を計算した結果が Fig. 2 に破線で示してある。 $[\text{Na}^+]_{\text{II}}$ の小なる領域では実験値と計算値の一致はあまりよくないが、 $[\text{Na}^+]_{\text{II}}$ の大なる領域では計算値は実験値をよく再現しており、Fig. 2 の $[\text{Na}^+]_{\text{II}}$ の大なる領域における急激な落ちあがりとは Ca^{2+} と Na^+ の競争吸着の結果であり、 Ca^{2+} 添加量（したがって Ca^{2+} の結合率）の低下と共に Na^+ の結合率がいちじるしく増大することをあらわしている。

謝辞 一部の測定に協力いただきました吉岡みゆき氏に感謝いたします。この研究に要した費用の一部は、文部省科学研究費総合研究 (A) “生体分子集合体およびそのモデルの電解質的特異性に関する研究” によった。この研究に種々の便宜を与えられた研究班長 名古屋大学理学部池田勝一教授に感謝いたします。

11) H.P. Gregor, D.H. Gold, *J. Polymer Sci.*, 23, 467 (1957).