

よく用いられる緩衝溶液

山本雅博

June 2, 2020

1 緩衝溶液とは

酸、塩基を加えたり、または溶液を薄めても溶液の pH が大きく変化しない溶液を緩衝溶液 (Buffer solutions) という。化学反応系 (特に生体内で) は溶液の pH によっておおきく変化を受けることが多いため、pH の調節は大変重要である。

プロトン濃度を一定にするためには、濃度が減少すればプロトンを供与する酸 (弱酸 HA) と、濃度が増加すればプロトンを受容する共役塩基 (A^-) [水溶液中に塩 ($NaA \rightarrow Na^+ + A^-$) を溶解させる] を大量に含む水溶液を調製すればよい。Fig.12 にそのイメージを示した。後に示すように、塩酸や水酸化ナトリウム水溶液も緩衝能をもつ。その緩衝作用の強さは、緩衝能の呼ばれ以下で定義されるが、pH 依存性、イオン強度依存性があるため、緩衝溶液は万能ではないことに注意してほしい。

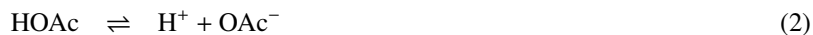
2 Henderson-Hasselbalch 式

近似式である Henderson-Hasselbalch 式は¹、例えば酢酸-酢酸ナトリウム緩衝溶液の場合、全 (分析) 濃度 C (あるいは仕込み濃度) と酸解離平衡定数 K_a を使って以下のように書かれる。

$$pH = pK_a + \log \frac{C_{NaOAc}}{C_{HOAc}} \quad (\text{Henderson - Hasselbalch Eq.}) \quad (1)$$

ここで近似が成立する条件は、以下に述べるように $[HOAc] \simeq C_{HOAc}$ $[OAc^-] \simeq C_{NaOAc}$ である。

Henderson-Hasselbalch 式の導入のための反応式、平衡関係、質量収支、電荷収支を列記すると



$$K_a = \frac{[H^+][OAc^-]}{[HOAc]} \quad (5)$$

$$K_w = [H^+][OH^-] \quad (6)$$

$$C_{NaOAc} = [Na^+] \quad (7)$$

$$C_{HOAc} + C_{NaOAc} = [OAc^-] + [HOAc] \quad (8)$$

$$[Na^+] + [H^+] = [OAc^-] + [OH^-] \quad (9)$$

となる。 $\Delta \equiv [H^+] - [OH^-]$ とすると式 (9) は、

$$C_{NaOAc} + \Delta = [OAc^-] \quad (*) \quad (10)$$

となり、式 (8) は、

$$C_{HOAc} + [OAc^-] - \Delta = [OAc^-] + [HOAc] \quad (11)$$

$$C_{HOAc} - \Delta = [HOAc] \quad (**) \quad (12)$$

となる。

$pH = -\log_{10}[H^+]$ は、(5) 式より

$$\underbrace{-\log_{10}[H^+]}_{= pH} - \log_{10} \frac{[OAc^-]}{[HOAc]} = \underbrace{-\log_{10} K_a}_{= pK_a} \quad (13)$$

$$pH = pK_a + \log_{10} \frac{[OAc^-]}{[HOAc]} \quad (\text{This is **not** Henderson - Hasselbalch Eq.!!!}) \quad (14)$$

$$= pK_a + \log \frac{C_{NaOAc} + \Delta}{C_{HOAc} - \Delta} \quad [(*) \text{ and } (**) \text{ are used.}] \quad (15)$$

$$\Delta \equiv [H^+] - [OH^-] \quad (16)$$

¹Henderson-Hasselbalch 式の Hasselbalch は、ハッセルバルヒと読む方が実際に近い。ハッセルバルクと書いてある本もあるようですが。ちなみに、Gibbs は、ギブズ、と濁るのが正しいことは、最近、広く知られるようになってきました。蛇足ながら。垣内記

と与えられる。従って、 $\Delta \ll C_{\text{NaOAc}}, C_{\text{HOAc}}$ であれば Henderson-Hasselbalch 式の近似は成立する。

溶液を希釈 (dilution) しても、濃度比 $C_{\text{NaOAc}}/C_{\text{HOAc}}$ は変化しないため水溶液の pH は変化しない。
酢酸-酢酸ナトリウム緩衝溶液のイオン強度 μ は、 $[\text{Na}^+]$ と $[\text{OAc}^-]$ によって決まる。

$$[\text{Na}^+] = C_{\text{NaOAc}}, \quad [\text{OAc}^-] \approx C_{\text{NaOAc}}$$

$$\mu = \frac{1}{2}(1)^2 C_{\text{NaOAc}} + \frac{1}{2}(-1)^2 C_{\text{NaOAc}} = C_{\text{NaOAc}}$$

このように目標の pH (酸と塩の濃度比) と溶液のイオン強度 (塩の濃度) を指定すれば緩衝溶液はユニークに調製できるのである。

問題

神戸の R 研で一躍有名となった O さんは、ST**細胞作成のネタである pH5.7 の弱酸性緩衝溶液の調製が一人ではできなかったようである。イオン強度 0.1 mol dm^{-3} の pH 5.7 の酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液を 100 mL 作成したい。 1 mol dm^{-3} の酢酸水溶液を $x \text{ mL}$, 1 mol dm^{-3} の酢酸ナトリウム水溶液を $y \text{ mL}$ 採取して、 100 mL のメスフラスコで調製する。 x と y の値を求めよ。

濃度の問題はまず絵をかこう。

投入する物質と溶液全体の体積より、 $C_{\text{HOAc}} = 1 \text{ mol dm}^{-3}(x/1000) \text{ dm}^3/0.1 \text{ dm}^3 = x/100$,
 $C_{\text{NaOAc}} = 1 \text{ mol dm}^{-3}(y/1000) \text{ dm}^3/0.1 \text{ dm}^3 = y/100$ となる。イオン強度から $\mu = C_{\text{NaOAc}} = 0.1 \text{ mol dm}^{-3}$ である。 $\text{pH} = \text{p}K_a + \log_{10} \frac{C_{\text{NaOAc}}}{C_{\text{HOAc}}}$, $10^{5.7-4.487} = C_{\text{NaOAc}}/C_{\text{HOAc}}$, $16.33 C_{\text{HOAc}} = C_{\text{NaOAc}}$, $C_{\text{HOAc}} = 0.1/16.33 = 6.12 \times 10^{-3}$ $x = 100 \times 6.12 \times 10^{-3} = 0.612 \text{ mL}$, $y = 100 \times 0.1 = 10.0 \text{ mL}$

3 緩衝能 (Buffer Capacity)、緩衝強度 (Buffer Strength)

緩衝能 (Buffer Capacity) は、 $1 \text{ dm}^3 (= 1 \text{ L})$ 溶液の pH を 1 pH 単位だけ変えるのに必要な強塩基のモル数で表される。[Day & Underwood, 定量分析化学での定義。以下に示すように必ずしも緩衝能とは一致しない。]

さらにより明確な定義として緩衝強度 (Buffer Strength) がある。ここでは、直感的な定義として、

$$\beta = \left[\frac{1}{C_{\text{base}}} \frac{\partial \text{pH}}{\partial V_{\text{base}}} \right]^{-1} \quad (17)$$

ここで、 V_{base} は滴定強塩基の体積、 C_{base} は強塩基のモル濃度である。 β は、 $\text{pH}=\text{p}K_a$ で最大となり、その最大値は全濃度 $C_{\text{tot}} = C_{\text{NaOAc}} + C_{\text{HOAc}}$ に比例する。(Fig.2) 従って、緩衝溶液を希釈するとその緩衝強度は低下する。緩衝溶液を調製する際にイオン強度を指定するが、イオン強度が大きいほど緩衝強度は高い。

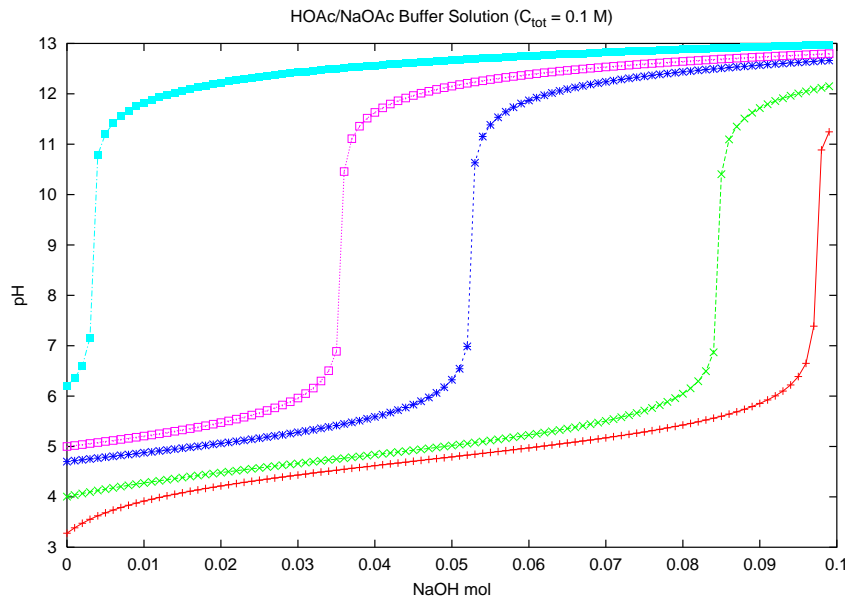


Figure 1: 種々の pH をもつ酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液 (1 dm^3 , 全濃度 0.1 M) に $\text{NaOH}(10 \text{ M})$ を入れたときの pH の変化。横軸は NaOH のモル数である。緩衝能の定義と比較せよ。

問題

上の問題で作成した緩衝溶液に水を加え 200 mL の溶液とした。溶液の pH はどうなるのか? また、溶液の緩衝強度はどうなるのか?

$C_{\text{NaOAc}}/C_{\text{HOAc}}$ は変化しないので pH は変化しない。Fig.2 より緩衝強度は約半分になる。

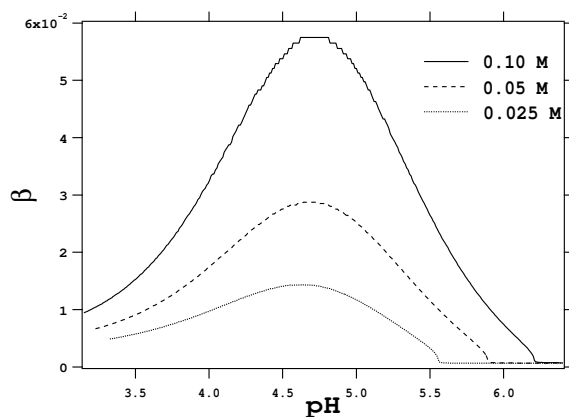


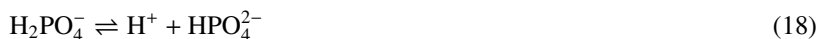
Figure 2: 酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液 (全濃度 0.1, 0.05, 0.025 M) の緩衝強度

4 よく用いられる緩衝溶液

生化学、生物学、臨床化学等でよく使用する緩衝溶液の例として、リン酸緩衝液、Tris [tris (hydroxymethyl) aminomethane]、HEPES [2- [4- (2-Hydroxyethyl) -1-piperazinyl] ethanesulfonic acid] および広 pH 域緩衝溶液を紹介する。試料の精製法、調整 (特に乾燥) の具体的な方法については、D. D. Perrin and B. Dempsy 「緩衝液の選択と応用」辻啓一訳 (講談社) の 8, 9, 10 章に詳しく記述されている。

4.1 リン酸緩衝溶液

生体系にはすでにながりのリン酸がふくまれているため、この緩衝液は生体系の反応を干渉しない利点がある。リン酸の 3 段階の解離の pK_a は、2.12, 7.21, 12.32 である。従って、分率の図に示すように、 $pH = 7$ 近傍では、実際上 $H_2PO_4^-$ と HPO_4^{2-} だけが存在すると考えてよい。すなわち、次の解離の平衡関係のみを考えればよい。



以下に、イオン強度一定の条件でどのようにリン酸緩衝液を調整したらよいかを示す。 $H_2PO_4^-$ イオンは NaH_2PO_4 塩または KH_2PO_4 塩から、 HPO_4^{2-} イオンは Na_2HPO_4 塩から完全解離したものを用いる。

今、 NaH_2PO_4 の全濃度を C_1 、 Na_2HPO_4 の全濃度を C_2 とすると、イオン強度 μ は

$$\mu = \frac{1}{2} \sum_i Z_i^2 C_i \quad (19)$$

$$= \frac{1}{2} (1^2 [Na^+] + 1^2 [H_2PO_4^-] + 2^2 [HPO_4^{2-}]) \quad (20)$$

$$\approx \frac{1}{2} [(C_1 + 2C_2) + C_1 + 4C_2] \quad (21)$$

$$= C_1 + 3C_2 \quad (22)$$

Here we approximate (23)

$$C_1 \approx [H_2PO_4^-] \quad (24)$$

$$C_2 \approx [HPO_4^{2-}] \quad (25)$$

Henderson-Hasselbalch 式より

$$pH = pK_a + \log_{10} \frac{C_2}{C_1} \quad (26)$$

となる。具体的な例としてイオン強度 $0.100 \text{ mol dm}^{-3}$ で $pH 7.4$ のリン酸緩衝液を作る場合、Henderson-Hasselbalch 式より

$$7.4 = 7.21 + \log_{10} \frac{C_2}{C_1} \quad (27)$$

となりイオン強度より

$$0.100 = C_1 + 3C_2 \quad (28)$$

である。両式より、 $C_1 = 0.0177 \text{ mol dm}^{-3}$ 、 $C_2 = 0.0274 \text{ mol dm}^{-3}$ となる。

問題: 実際に、上で得られた C_1, C_2 を使って水溶液を 1 dm^3 調製したところ pH は 7.25 となった。これは、 $H_2PO_4^-$ 、 HPO_4^{2-} イオンの活量を考慮してないためである。イオンの活量係数 γ_i が

$$\log_{10} \gamma_i = -0.509 Z_i^2 \sqrt{\mu} \quad (29)$$

で与えられるとして、 pH が 7.25 になった理由を示せ。

リン酸は、多くの多価のカチオンと錯形成をしたり、さらには沈殿生成（特にカルシウムと）が見られたりする。また、特定の酵素（例えば、カルボキシペプチターゼ）の活性を抑制することもあるので注意が必要である。リン酸の NaOH での滴定曲線 (pH vs v_t) と $[d(pH)/dv_t]-1$ と pH の関係（緩衝能に相等する）を図に示す。

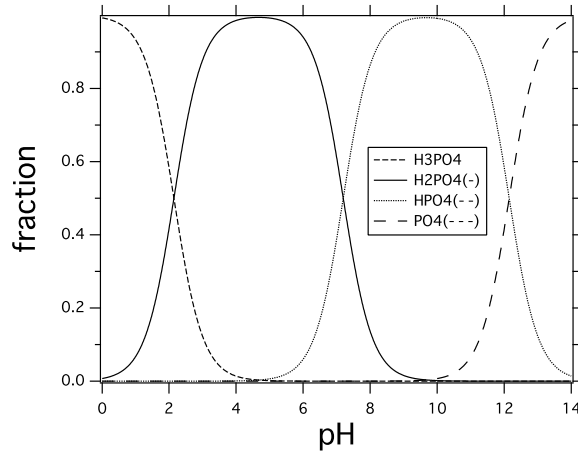


Figure 3: リン酸イオンの分率の pH による変化

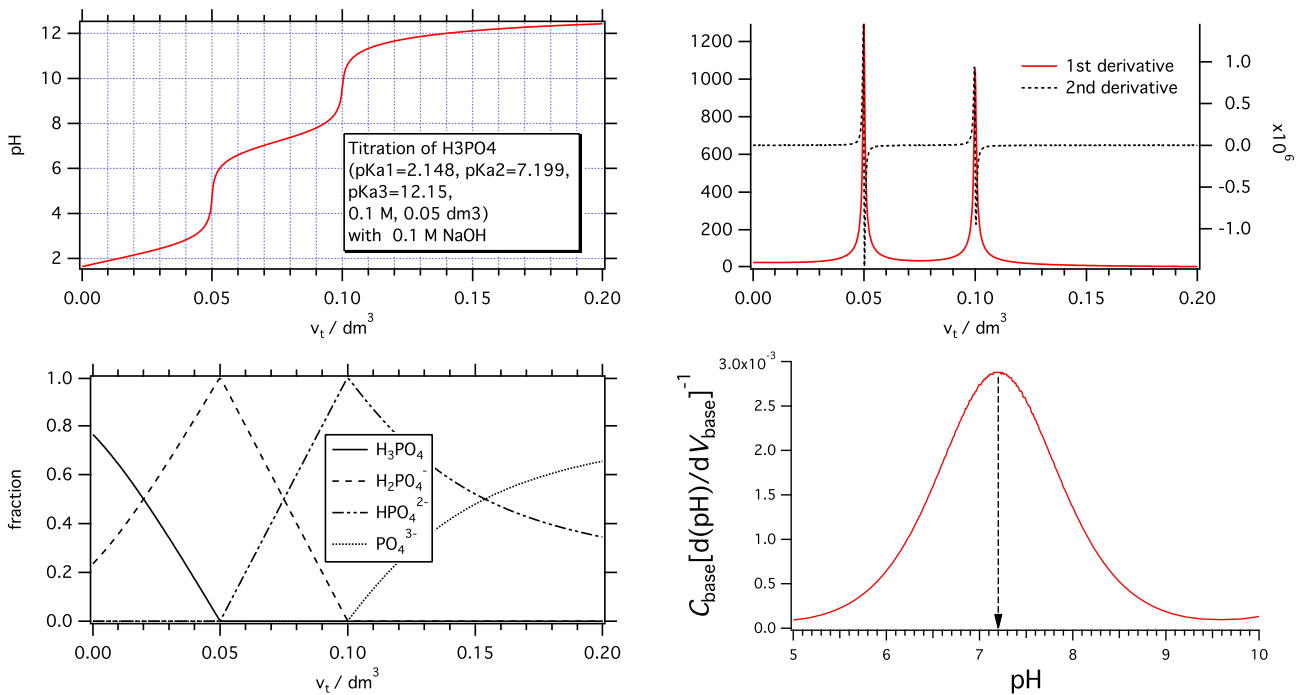
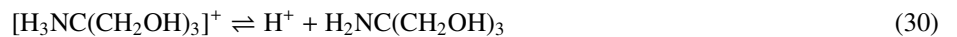


Figure 4: リン酸の NaOH による滴定曲線と緩衝能

4.2 Tris

生理学的緩衝液で最も使われてきたのは Tris $H_2NC(CH_2OH)_3$ (tris (hydroxymethyl) aminomethane) である。緩衝作用に関連した反応は



で、解離の pK_a は 8.08 である。 pK_a より酸性側で使用するため通常は塩酸と組み合わせる。以下に塩酸による pH 調整法と緩衝能の図を示す。

Tris/HCl 緩衝液に対する Henderson-Hasselbalch 式は、塩酸の全濃度を C_{HCl} , Tris の全濃度を C_{Tris} , $[H^+] - [OH^-] = \Delta$ とすれば

$$pH = pK_a + \log_{10} \frac{C_{Tris} - C_{HCl} + \Delta}{C_{HCl} - \Delta} \approx pK_a + \log_{10} \frac{C_{Tris} - C_{HCl}}{C_{HCl}} \quad (31)$$

となる。

pH7.5 以下で緩衝能が弱くなること、1級アミンと反応すること、有機溶剤に溶ける、時には細胞毒性があることなどの欠点がある。

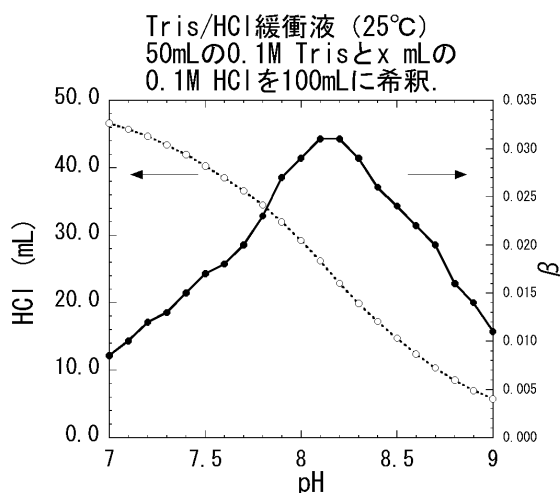


Figure 5: Tris/HCl 緩衝液 (25 °C) (R. G. Bates and V. E. Bower, *Anal. Chem.* **28** (1956) 1322.)

4.3 HEPES

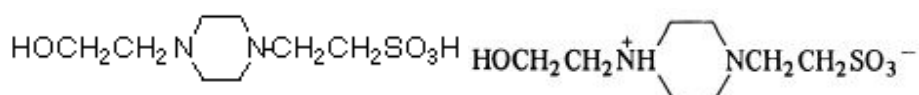


Figure 6: HEPES とその zwitterion

pH6 から 8 の間で緩衝能が高く、水溶液に良く溶解し、有機溶剤には溶解度が低く、毒性も低いと考えられている、ほぼ理想に近い緩衝溶液として HEPES がある。

HEPES [2- [4- (2-Hydroxyethyl) -1-piperazinyl] ethanesulfonic acid] 緩衝液では、水溶液中でスルホン基から解離したプロトンが piperazine 基の 4 位の窒素にプロトネーションして正負の電荷を同じ分子内にもつ両性イオン (zwitterion)[HEPES-ZW⁺⁻] と脱プロトン化した 2- [4- (2-Hydroxyethyl) -1-piperazinyl] ethanesulfonate [HEPES⁻] 間の平衡関係を利用する。



この場合、スルホン酸の解離の pK_a は十分酸性側にあるので考慮しなくてよい。この反応に対する解離の pK_a は 7.55 である。イオン強度一定での緩衝溶液を調整するため、水酸化ナトリウムと塩化ナトリウムと HEPES の混合物を用いる。

HEPES/NaOH/NaCl または HEPES/NaOH/NaClO₄ 緩衝液に対する Henderson-Hasselbalch 式は、NaOH の全濃度を C_{NaOH}, HEPES の全濃度を C_{HEPES}, [H⁺] - [OH⁻] = Δ とすれば、

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{HEPES}^-]}{[\text{HEPES} - \text{ZW}^{+-}]}, \quad \text{pH} = \text{p}K_a + \log_{10} \frac{[\text{HEPES}^-]}{[\text{HEPES} - \text{ZW}^{+-}]} \quad (33)$$

$$C_{\text{NaOH}} + C_{\text{NaClO}_4} = [\text{Na}^+], \quad C_{\text{NaClO}_4} = [\text{ClO}_4^-], \quad (34)$$

$$C_{\text{HEPES}} = [\text{HEPES} - \text{ZW}^{+-}] + [\text{HEPES}^-] \quad (35)$$

$$[\text{H}^+] + [\text{Na}^+] = [\text{OH}^-] + [\text{ClO}_4^-] + [\text{HEPES}^-] \quad (36)$$

$$[\text{HEPES}^-] = \Delta + [\text{Na}^+] - [\text{ClO}_4^-] = C_{\text{NaOH}} + \Delta \quad (37)$$

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log_{10} \frac{C_{\text{NaOH}} + \Delta}{C_{\text{HEPES}} - C_{\text{NaOH}} - \Delta} \approx \text{p}K_a + \log_{10} \frac{C_{\text{NaOH}}}{C_{\text{HEPES}} - C_{\text{NaOH}}} \quad (38)$$

となり、イオン強度一定の下では、pH は NaClO₄ の全濃度には依存しない。イオン強度 (ionic strength) I は、

$$I = \frac{1}{2} \sum_i Z_i^2 c_i = \frac{1}{2} ([\text{H}^+] + [\text{Na}^+] + [\text{OH}^-] + [\text{ClO}_4^-] + [\text{HEPES}^-]) \quad (39)$$

$$\approx \frac{1}{2} ([\text{Na}^+] + [\text{ClO}_4^-] + [\text{HEPES}^-]) \approx \frac{1}{2} [(C_{\text{NaOH}} + C_{\text{NaClO}_4}) + C_{\text{NaClO}_4} + C_{\text{NaOH}}] \quad (40)$$

$$= C_{\text{NaOH}} + C_{\text{NaClO}_4} \quad (41)$$

となる。

問題 上の式を導け。また、イオン強度 0.1 mol dm⁻³, pH 7.3 の HEPES/NaOH/NaCl 緩衝液を 1 dm³ 作成したい。C_{HEPES} = 0.05 mol dm⁻³ の時、C_{NaOH}, C_{NaCl} それぞれ何 mol dm⁻³ 必要か？ **答え**: C_{NaOH} = 0.018 mol dm⁻³, C_{NaCl} = 0.082 mol dm⁻³ (詳解: (35) 式より 7.3 = 7.55 + log₁₀[C_{NaOH}/(0.05 - C_{NaOH})], 10^{-0.25} = 0.56234 = [C_{NaOH}/(0.05 - C_{NaOH})], C_{NaOH} = 0.017996 = 0.018 mol dm⁻³, (38) 式より C_{NaCl} = 0.1 - 0.018 = 0.082 mol dm⁻³)

4.4 フタル酸緩衝溶液：Phthalic acid buffer

フタル酸水素カリウムに、塩酸または水酸化ナトリウムを入れて pH を調整する。

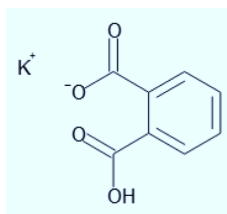


Figure 7: フタル酸水素カリウム

フタル酸は pK_{a1} が 2.92, pK_{a2} が 5.41 のジプロトン酸である。フタル酸水素カリウム単体を水に溶解して標準液とすることも多いが、Fig.8 に示すように濃度が低いと pH が増加することに注意されたい。

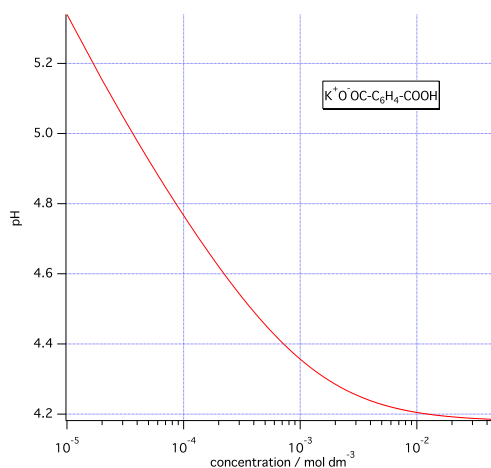


Figure 8: フタル酸水素カリウムの濃度による pH 変化

また、pH 4 はフタル酸自身の pK_{a1} , pK_{a2} に等しくないので緩衝能も最大値をしめさないことにも注意されたい。フタル酸緩衝溶液の緩衝強度を Fig.9 に示す。

有機酸であるため、他の無機イオンとちがって、有機溶媒やイオン液体に分配されるためその点も注意が必要である。

4.5 広域緩衝溶液

pK_a が約 2 の間隔で離れた緩衝液を混合することにより、広い pH で均一な緩衝能をもつ広域緩衝溶液が作成できる。例として、クエン酸、リン酸、ジエチルバルビツル酸、ホウ酸のもつ 7 個の pK_a で pH2.6 から 12 までの Britton-Robinson 緩衝液がある。Fig.10 にそれを示す。

4.6 塩酸も緩衝溶液になる!?

塩酸も緩衝溶液になる。NaOH による滴定曲線と緩衝能のプロットを Fig.11 に示す。

4.7 緩衝溶液のイメージ、最適 pH

緩衝溶液のイメージ、最適 pH に関する図を Fig.12 に示す。

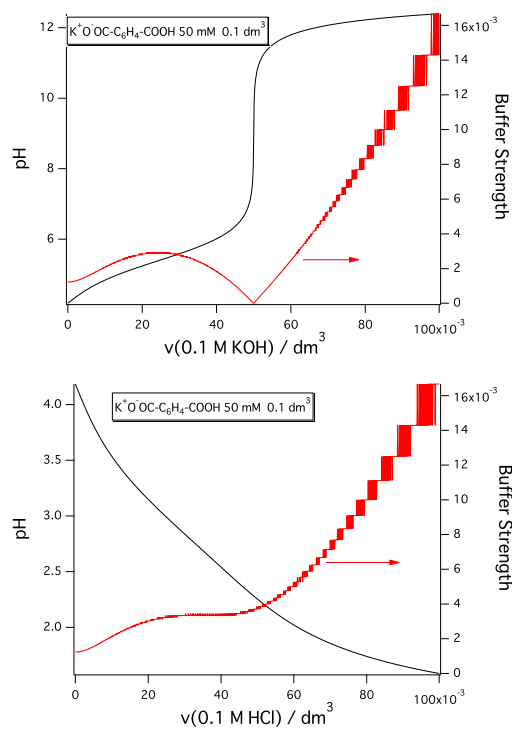


Figure 9: フタル酸水素カリウム緩衝液の緩衝能

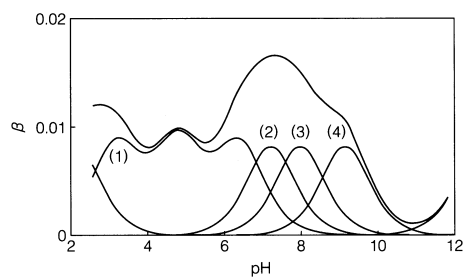


図3.6 ブリトン・ロビンソンの広域緩衝液の緩衝能
 (1) 0.0183 M クエン酸, (2) 0.0183 M リン酸, (3) 0.0183 M ジエチルサルピツル酸, (4) 0.0183 M ホウ酸.

Figure 10: Britton-Robinson 緩衝液の緩衝能の pH 依存性 (姫野・市村「溶液内イオン平衡に基づく分析化学」p.59 (化学同人) より)

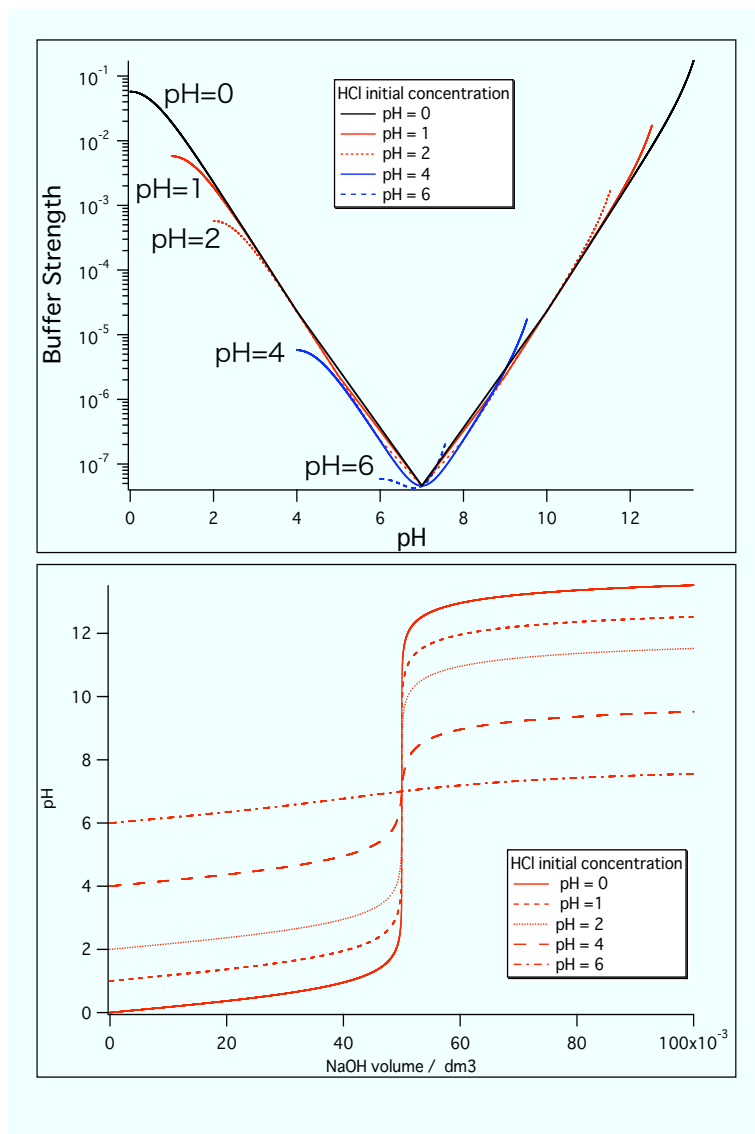


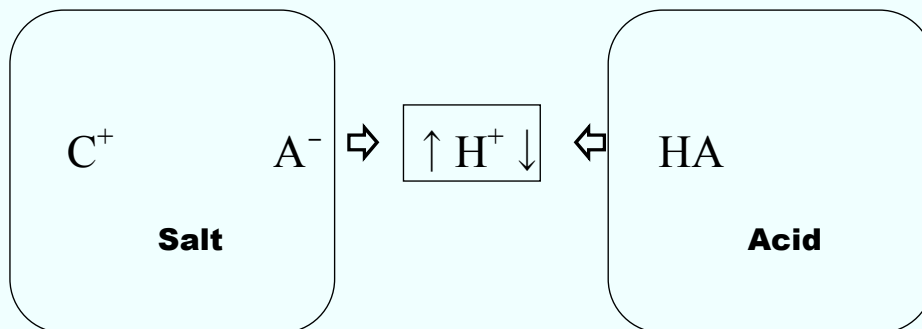
Figure 11: 塩酸の緩衝能と滴定曲線

Buffer バッファー、バファー、

緩衝となるもの、緩衝器、緩衝装置◆動きを緩衝させる、または一時的に蓄える場所。

Origin:buff 'to hit or be hit softly' (16-19 centuries), probably from the sound.

Buffer solution 緩衝溶液



$[H^+]$ が増加すると $[A^-]$ がプロトン捕捉, $[H^+]$ が減少すると $[HA]$ がプロトン放出

Optimum pH

酵素が作用を発揮する最適の pH のこと。酵素の活性には種々のアミノ酸の解離性原子団が関与する。酵素活性が pH に依存するのは、それらの原子団の解離が pH によって変化するためである。

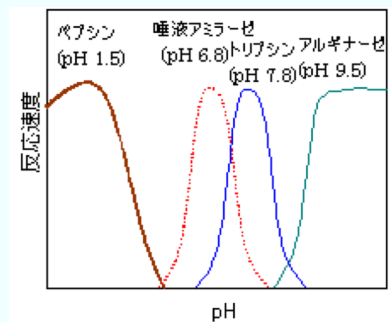


Figure 12: 緩衝溶液のイメージ, 最適 pH