

バイオ分析化学特論(5)

等温滴定型カロリメトリー(ITC)測定

竹中繁織

九州工業大学 物質工学研究系 応用化学部門

熱力学の法則

熱力学第0法則：

- ・系 A と B, B と C がそれぞれ熱平衡ならば、A と C も熱平衡にある。

熱力学第1法則(エネルギー保存則)：

系（閉鎖系）の内部エネルギー U の変化 dU は、外界から系に入った熱 δQ と外界から系に対して行われた仕事 δW の和に等しい。

熱力学第2法則：

- ・永久機関は実現不可能である(オストヴァルトの原理)。
- ・断熱系で不可逆変化が起こるとき、エントロピーは必ず増加する。可逆的な変化ではエントロピーの増加はゼロとなる(エントロピー増大の原理・クラウジウスの不等式)。

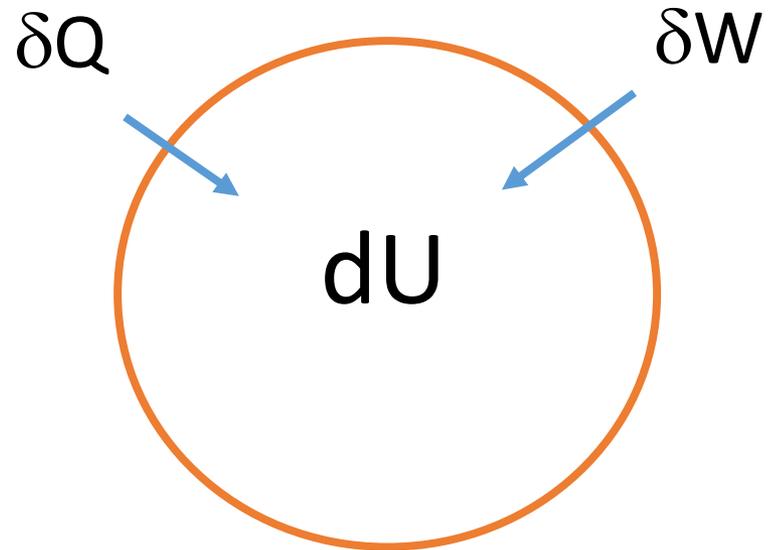
熱力学第3法則：

- ・絶対零度でエントロピーはゼロになる(ネルンスト・プランクの仮説)

。

熱力学第1法則(エネルギー保存則);

$$dU = \delta Q + \delta W$$

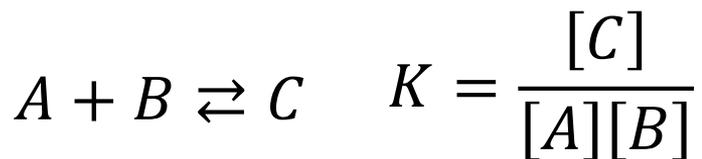


熱力学第2法則;

$$dS = dQ/T$$

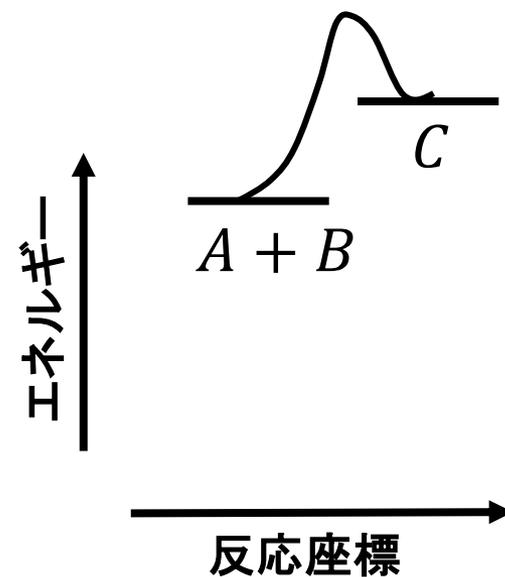
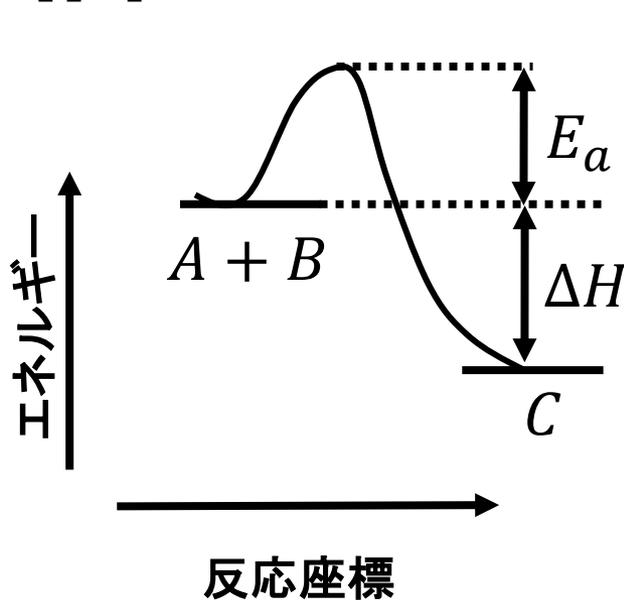
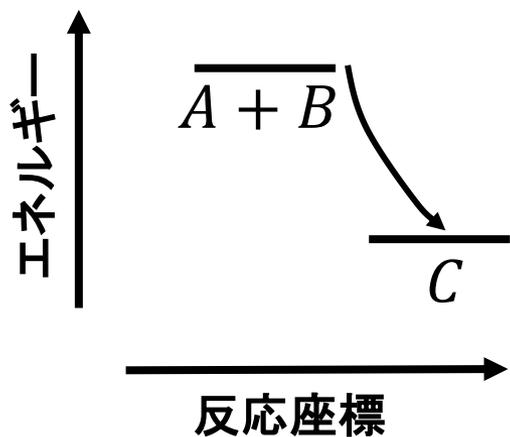
$$S = k \log w \text{ (k:ボルツマン定数)}$$

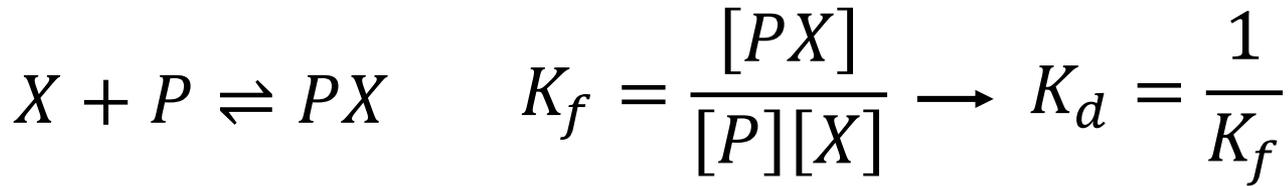
化学平衡



$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

$$\Delta G = -RT \ln K$$





$$\Delta G_f^{\circ} = -RT \ln K_f$$

$$= -5.708 \log K_f \text{ KJmol}^{-1} (25^{\circ}\text{C})$$

$$\log K_f = -\log K_d = pK_d$$

pK_d が1だけ異なると ΔG の違いは -5.7 KJmol^{-1}

溶液中での粒子の平均運動エネルギー $-\frac{3}{2}k_B T \approx 3.7 \text{ KJ (or } 0.89 \text{ kcal)} (25^{\circ}\text{C})$

$$K_f = 10 (\Delta G^{\circ} = -5.7 \text{ KJmol}^{-1} \text{ or } -1.36 \text{ Kcalmol}^{-1})$$

結合エネルギーは、分子の熱運動エネルギーをわずかに上回るだけ。→弱く結合

$$K_f = 10^4 (\Delta G^{\circ} = -22.8 \text{ KJmol}^{-1})$$

→38%が結合体

$$K_f = 10^7 (\Delta G^{\circ} = -40 \text{ KJmol}^{-1} \text{ or } -22.8 \text{ Kcalmol}^{-1})$$

→97%が結合体

NaClが水に溶ける際の熱力学

	$\Delta H/KJmol^{-1}$	$\Delta S/KJmol^{-1}$
$NaCl (s) \rightarrow Na^+ (g) + Cl^- (g)$	+786.3	+0.227
$Na^+ (g) + Cl^- (g) \rightarrow Na^+ (aq) + Cl^- (aq)$	-782.0	-0.184
Total	+4.3	+0.043

溶解熱 $\Delta H = +786.3 - 782.0 = +4.3 \text{ KJmol}^{-1}$ わずかに吸熱

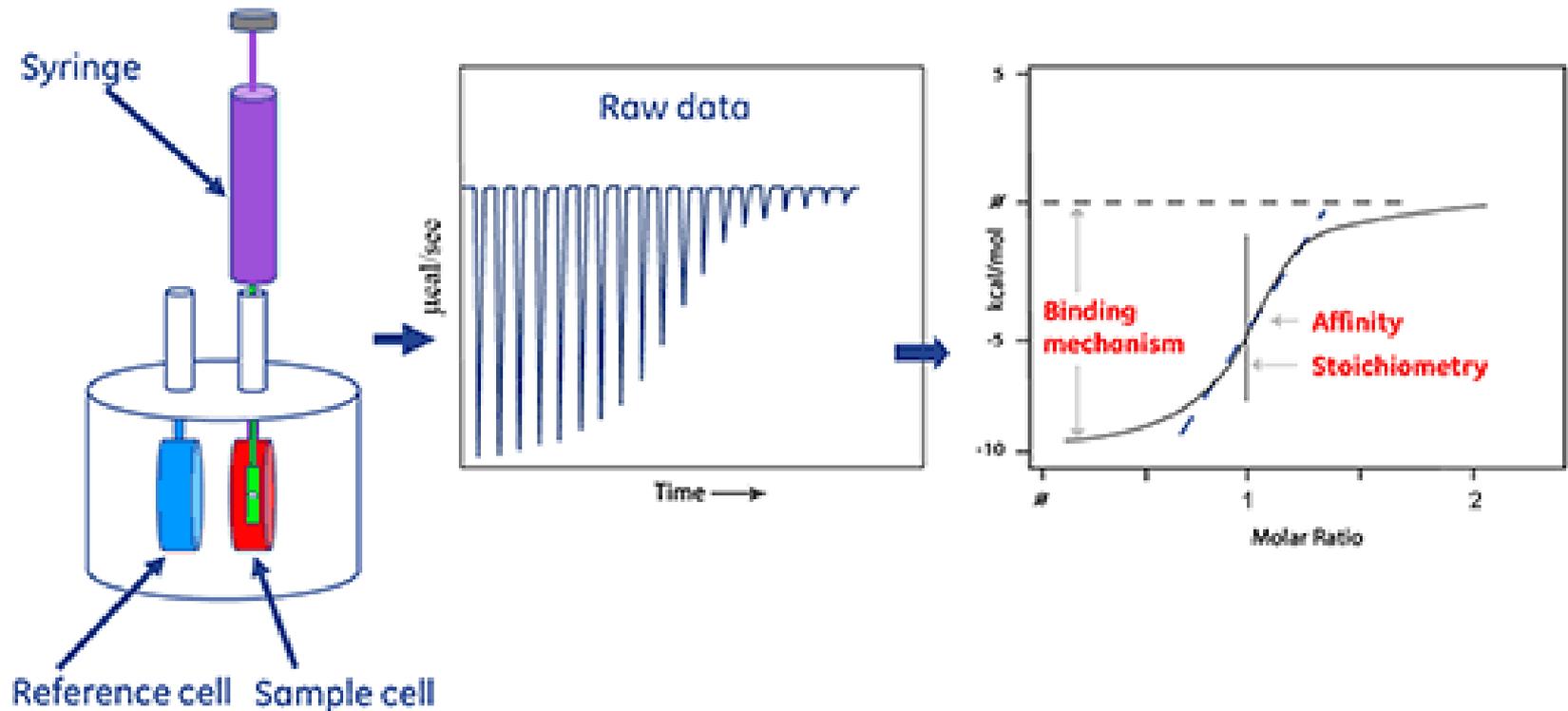
エントロピー変化 $\Delta S = +0.227 - 0.184 = +0.043 \text{ KJmol}^{-1}$ エントロピー増大

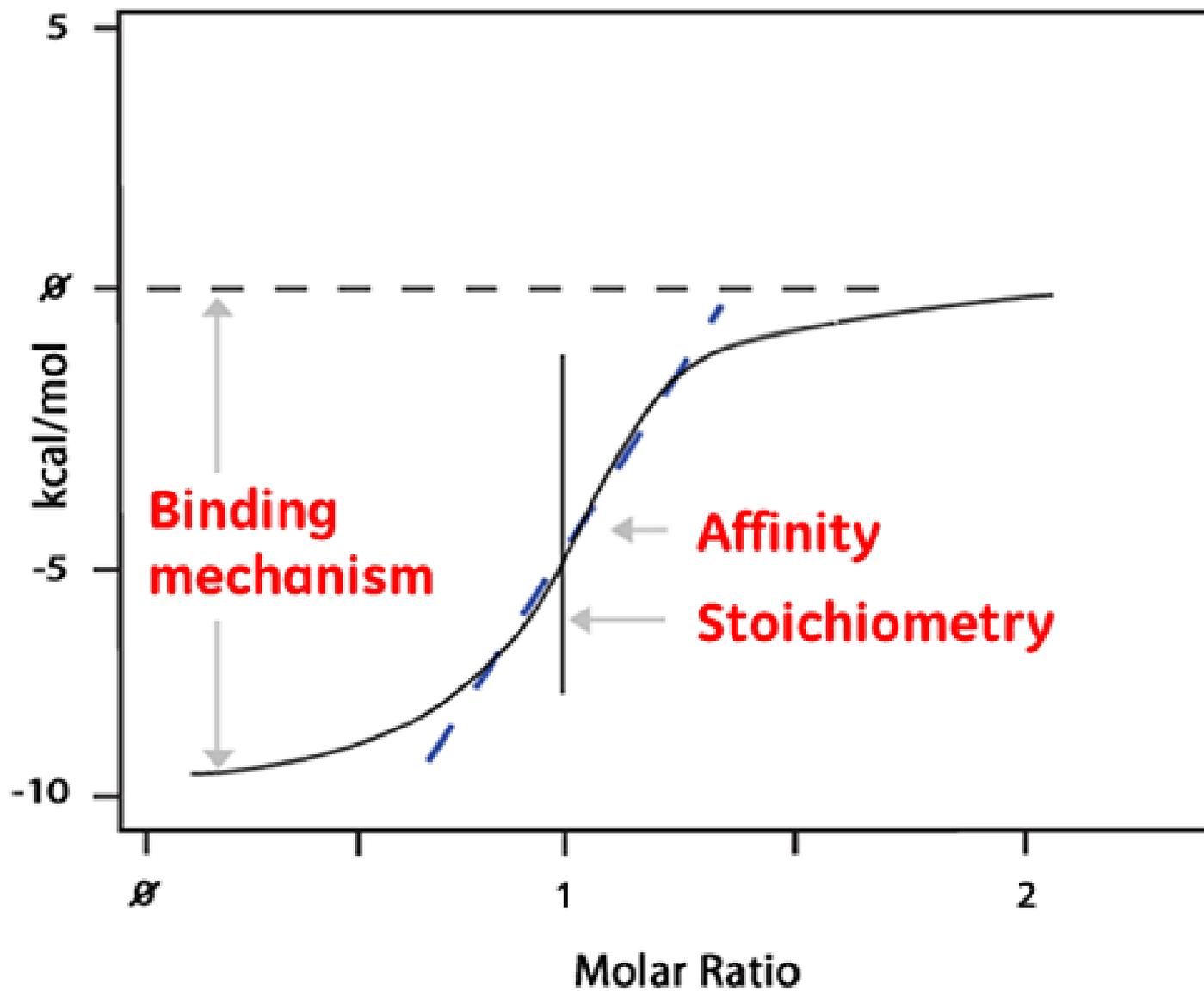
室温25°C (298 K)

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S = (+4.3) - (0.043 \times 295) = -8.5 \text{ KJmol}^{-1}$$

$\Delta G < 0$ NaClが水に溶解するのはエントロピーの増大の効果

等温滴定型カロリメトリー (ITC)





3. 等温滴定型熱量測定

3-1. 測定原理

等温滴定型熱量測定 (Isothermal Titration Calorimetry; ITC) は結合成分を標的分子に滴下した際に起こる化学反応もしくは結合反応を観測する熱力学的方法です。物質同士が結合するときには熱の発生もしくは吸収が起こるため、この熱量を測定することにより相互作用の結合定数(k_{ass})、反応の結合比(n)、エンタルピー変化(ΔH)、およびエントロピー変化(ΔS)を精度良く得ることができます。他の手法と異なり、試料への化学修飾や物理的固定化等を必要とせず、自然状態に近い環境下で測定できます。また、1回の実験で分子間相互作用の完全な熱力学的プロファイルを把握できることも特長の一つといえます。

ITCの装置内部にはサンプルセルとリファレンスセルが備わっており、任意の一定温度に保たれたサンプルセル中の標的分子溶液に対して、滴定シリンジ中のリガンド溶液を数マイクロリットルずつ逐次滴定します。リガンドがサンプルセル内へ滴定されて両物質が相互作用すると、結合量に正比例した熱の発生または吸収が起こります。リガンド滴定の進行に沿ってサンプルセル中の標的分子の結合サイトが飽和され、熱シグナルは減少して最終的にリガンドの希釈熱のみが観測されるようになります。Fig. 4にその模式図を示しました。

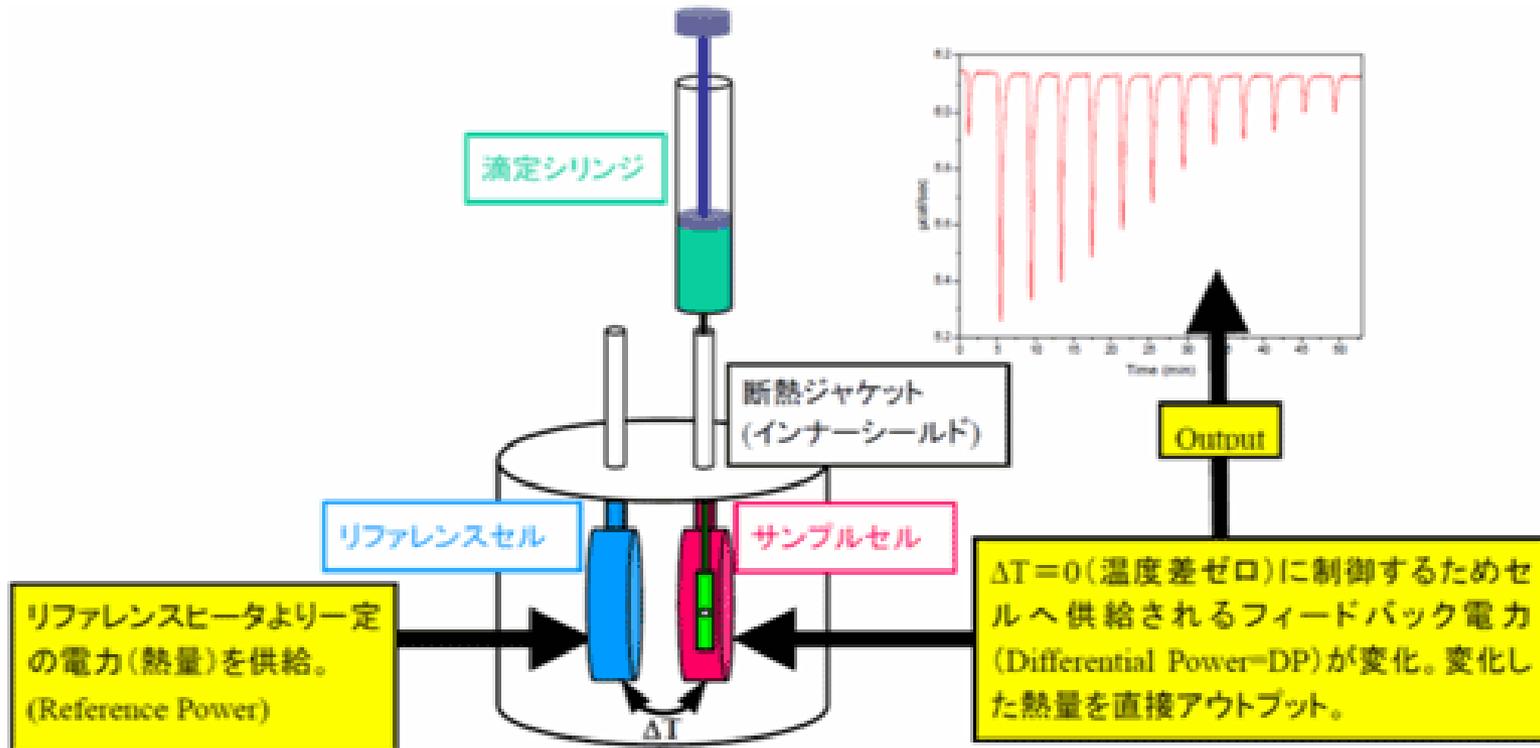
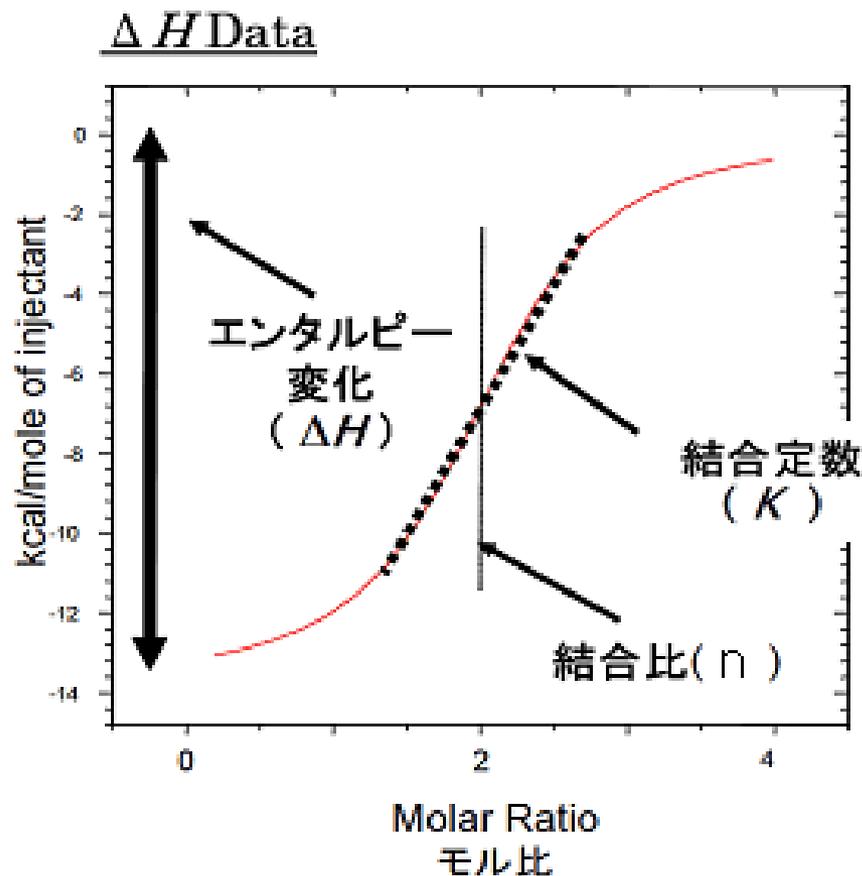
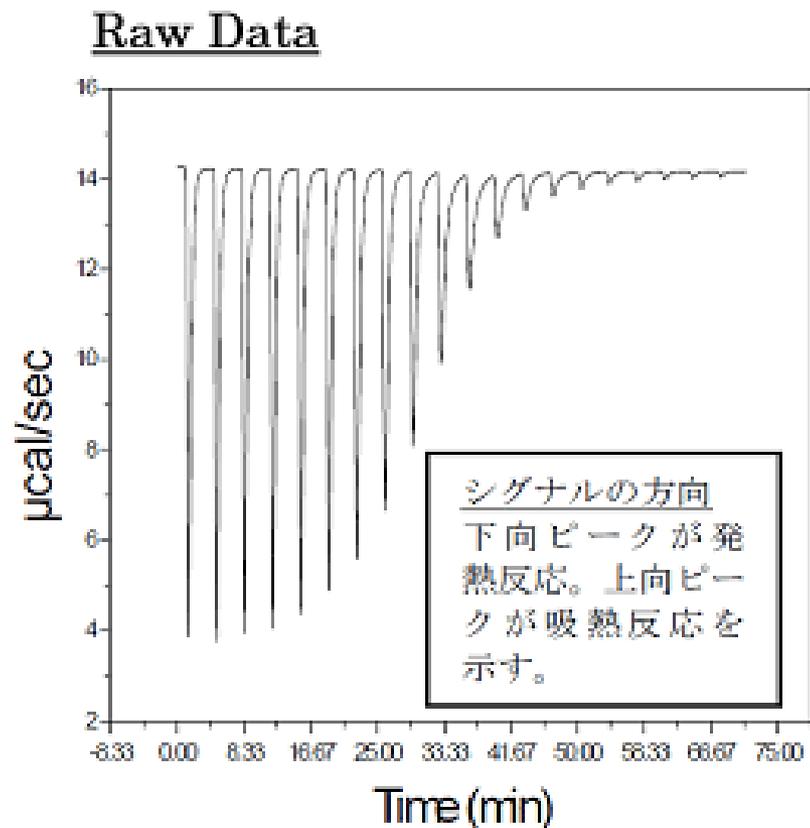


Fig. 5に典型的なITCデータと等温滴定曲線を示します。左図はリガンド溶液をサンプルセル中の標的分子溶液へ合計18回にわたって滴下したときのデータを示しており、各滴定ピークの面積はその滴定によって発生した熱量に等しくなります。また、各滴定の発生熱量をセル中におけるリガンドと標的分子のモル比に対してプロットすることにより右図のような相互作用の結合等温線が得られます。この例の場合、カーブフィッティングにはOne-Set-of-Sitesモデルを使用し、得られたベストフィットカーブを赤線で示してあります。各フィッティングパラメータから、結合定数、結合比、エンタルピー変化を求めることができます。



滴定のデータから結合定数Kを以下のように求めることができます。化学量論的に1：1の反応に対して、 $M+X=MX$ の結合平衡は次式で記述されます。

$$K = \frac{[MX]}{[X][M]} \quad (f16)$$

$$X_{tot} = [X]+[MX] \quad (f17)$$

$$M_{tot} = [MX]+[M] = [MX]+\frac{[MX]}{K[X]} \quad (f18)$$

ここでKは結合定数です。

MX濃度の変化は、熱変化として次式と関連付けられます。

$$dQ = d[MX]\Delta H^{\circ}V_0 \quad (f19)$$

ここで ΔH° は結合のモルエンタルピー、 V_0 はセル容積、Qは吸収または発生した熱量です。(f16)、(f17)、(f18)、(f19)式より次式が導かれます。

$$\frac{1}{V_0(dQ/dX_{tot})} = \Delta H^{\circ} \left(\frac{1}{2} + \frac{1 - (1+r)/2 - X_r/2}{(X_r^2 - 2X_r(1-r) + (1+r)^2)^{1/2}} \right) \quad (f20)$$

ここで、 $r=1/(K M_{tot})$ 、 $X_r=X_{tot}/M_{tot}$ です。

滴定型熱量測定装置で測定される実験的パラメータは示差熱 dQ/dX_{tot} (実際には $\Delta Q/X_{tot}$)です。 ΔH° は滴定曲線下の総面積から得られます。上記のようにして、測定値として ΔH° とKが求められるので、(f21)式よりギブスエネルギー ΔG° とエントロピー ΔS° が算出されることとなります。

$$\Delta G^{\circ} = \Delta H^{\circ} - T \Delta S^{\circ} = RT \ln K \quad (f21)$$