水系ゲルクロマトグラフィー用充てん剤の分級法についての検討

——分級装置とデキストランゲルへの応用——

黒須泰行[®]， 安川 薫 ， 川崎博史* ， 高井信治** ， 奥山典生*

(1984 年 3 月 24 日受理)

粒子の分級法において、デキストラン、アガロースなどの低密度の充てん剤の分級は比較的困難であると言われている。そこで著者らは、hydrodynamic chromatography の概念を導入し、大きな層流部による低密度の粒子の分級を行い、その基礎条件を検討した。樹脂の凝集を抑えるために、10% 2-プロパノールを媒体として用い、向流速度を制御することにより、粒子の破壊物やごみなどを除去するとともに、分級の効率を上げることができた。この方法において分級されたセファデックス G-200 は理論的に得られた流出時間とその粒径の関係がほぼ一致する妥当な結果を得た。

1 はじめに

粒子の分級法としては、大別してふるい^{1)~4)}を用いる方法と流体抵抗を用いる方法^{4)~7)}が知られている^{8)~10)}。

ふるいによる方法では、150 μ m 以下の粒径の粒子の分級は比較的困難である。一方、流体抵抗を利用する方法は微細粒子の分級に優れていると言われている。例えば、Hamilton¹¹⁾ 及び Moore ら¹²⁾ は重力場で流体抵抗を利用する方法により、イオン交換樹脂の分級を行い、高性能のカラムを得ることに成功し、又 Scott¹³⁾ はこの方法を改良し、高速液体クロマトグラフィー用樹脂を得ることに試みている。

ところでタンパク質の分離精製には、デキストラン、アガロースなどの低密度の充てん剤が用いられているが、これらの充てん剤の分級は上記の方法では比較的困難であると言われている。そこで、このような粒子の分級のために、更に Small¹⁴⁾、Giddings¹⁵⁾ らの Hydrodynamic Chromatography の概念と組み合わせ、Scott の装置に層流部が大きくなるような改良を行った。向流速度の制御と層流部の長さの変化によって、より有用な分級法の確立を試み、その基礎的条件の検討を行った。

2 実 験

2.1 粒子の分級の基礎理論

2.1.1 粒子の分級 粒子（球形と仮定）が定常的に沈降している場合、その沈降速度は次式で表される。

$$v = \frac{2(d_p - d_f)g}{9\eta} r^2 \dots\dots\dots (1)$$

ただし、 v (cm/s) は粒子の沈降速度、 d_p (g/cm³) は粒子の密度、 d_f (g/cm³) は媒体の密度、 g (cm/s²) は重力加速度、 η (g/cm s) は媒体の粘度、 r (cm) は粒子の半径とする。すなわち、 v は r の 2 次関数として表される。従って半径 r (cm) の粒子は v (cm/s) の速度で沈降するから、これを分級するには v 以上の速度で媒体を向流すればよいことになる。

ところで式(1)に $g=980$ (cm/s²) を代入し、半径 r (cm) を直径 a (μ m) に、沈降速度 v (cm/s) を v (cm/h) に置き替えると次のようになる。

$$v(\text{cm/h}) = 1.960 \times 10^{-3} \frac{d_p - d_f}{\eta} a^2 \dots\dots\dots (2)$$

又、分級する粒子及び媒体を定めることにより、 $(d_p - d_f)/\eta$ は定数項となり、 v は a のみに依存する。式(2)を使用し、向流速度 V_0 (cm/h) と流出可能な粒子の粒径 (μ m) との関係を計算し、Fig. 1 に実線で示した。

2.1.2 乱流と層流 分級部 (Fig. 2 B) には乱流部と層流部がある。乱流部においては粒子のかき混ぜが行

* 東京都立大学理学部化学科 : 158 東京都世田谷区深沢 2-1-1

** 東京大学生産技術研究所 : 106 東京都港区六本木 7-22-1

Fig. 1 Relation between counter flow rate and diameter of removed particles

Particle: Sephadex G-200 (medium), Eluent: Aqueous solution containing 10% 2-propanol, Column size: 155×5.50 cm I.D. (○), 145×3.05 cm I.D. (△), 97×1.46 cm I.D. (□); Modal diameters of particles were calculated (—●—) and observed (○△□).

Fig. 2 Size classification system

A: Pumping section (① reservoir, ② pump), B: Separation section (③ inlet port, ④ turbulent flow layer, ⑤ laminar flow layer, ⑥ outlet port), C: Fraction section (⑦ fraction collector)

われている。この効果は大きな粒子間に埋もれている流出可能な小さい粒子を層流部に送り込んだり、粒子の凝集により大きな凝集粒子となって層流部から沈降してく

る粒子を乱流部のかき混ぜにより、再び単位粒子に戻す。これらの繰り返しの乱流部には向流速 v_c に打ち勝つ沈降速度 v を持つ粒子が集積される。乱流部の大きさは、注入部 (Fig. 2 B ③) の形状例えば円すい部分の角度の大きさや向流速に依存するが、注入部にガラスフィルターを入れるなどの工夫で著しく小さくすることができる。ただし、上述のようなかき混ぜ効果も小さくなるので、樹脂の負荷量を減少させる。一方、層流部においては粒子の大きさによって定まった流出速度 v_f ($=v_c - v$) で粒子は層流部を上昇する。この原理に従うとすれば、式 (2) より、任意の径の粒子の v を求めれば、 v_c に対する流出時間が予測でき、各粒径の粒子を分画することができる。

分級管の長さを l (cm)、乱流部の長さを x (cm)、層流部の長さを y (cm) とすると、流出時間 t_f は式 (3) のようになる。

$$t_f = \frac{y}{v_c - v} = \frac{\eta(l - x)}{v_c \eta - 1.960 \times 10^{-8} (d_p - d_f)^2 a^2} \quad \dots\dots\dots (3)$$

乱流部の長さ x (cm) は分級管の外側より観察し、その長さを計測した。式 (3) から目的の粒径の流出時間を予測することができる。

2.2 試 薬

分級に用いる樹脂として、2種類のセファデックス G-200 {(Pharmacia, medium, 粒径 40~120 μm , $d_p = 1.04$, lot No. 2208), 及び (Pharmacia, superfine, 粒径 10~40 μm , $d_p = 1.05$, lot No. 9730)} を用いた。分散剤として、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、ジオキサン、アセトン (いずれも和光純薬工業製特級) を用いた。

2.3 分級装置の構成

分級装置は Fig. 2 に示すように、A 送液部 (①貯液部, ②送液ポンプ部)、B 分級部 (③注入部, ④乱流部, ⑤層流部, ⑥流出部)、C 分画部 (⑦分取部) によって成り立っている。②には耐圧性の高い定流量ポンプ (耐圧 40 kg/cm^2) を使用した。分級管の上端部すなわち⑥は層流を乱すことなく流出させるために円すい状にした。⑦には孔径 5~10 μm のガラスフィルター (G 4) を使用した。ここで、分級管より流出した粒子はフィルター上に分取され、流出液は再び①に戻し循環させた。配管は粒子の吸着のないテフロンチューブなどのフレキシブルなチューブを使用し、各連結部分にはシリコンチューブを使用した。

2.4 操作方法

(1) Fig. 2 のように配管した装置の分級管の⑥を取り外し、そこから媒体に懸濁させた樹脂を管壁に触れないように分級管の下部に負荷した。このとき漏斗の先にチューブを接続して、そのチューブの先を③まで挿入し、上から漏斗を通して樹脂を加えると都合がよい。

(2) ⑥を装着後、ポンプの電源スイッチを入れ、分級管の下端部すなわち③より媒体を送液した。

(3) 流出液は⑦で分取され、液は再び①に戻した。

(4) ⑦に分取された樹脂及び分級管内に残った樹脂を粒径により分級した樹脂として集めた。

(5) 集められた樹脂は顕微鏡により、粒径、粒子数を計測した (2.5)。

2.5 粒子数の測定法

各種の粒子試料 (懸濁液) を 1 滴、トーマ計に採り、粒子の粒径をトーマ計の目盛り (25 μm) に従って、顕微鏡 (50 倍) により計測し、10 μm ごとの粒子数を測定した。この操作を 5 視野について繰り返した。更にこの操作を 4~6 回繰り返した。すなわち、各粒子試料についてそれぞれ 20~30 視野の測定を行ったことになる。測定粒子総数 N (300~400 個) について粒径とその粒子数に関する分布図を作成した。

3 結果と考察

3.1 凝集抑制剤の検討

3.1.1 凝集率 分級の流体抵抗を利用する方法において、粒子は媒体内で個々の単位粒子に分散していることが必要である。粒子間の凝集が生じると、2.1.1 で述べた原理に従わない。媒体として水を用いた場合、セファデックス G-200 では粒子間の凝集が生じる。そこで、表面荷電を低下させ凝集を抑える役目の分散剤として有機溶媒を用い、その影響を調べた。Fig. 3 A に顕微鏡で測定した凝集率を示した。凝集率は凝集体を形成している単位粒子数を総単位粒子数で割ったものとして表した。その結果、凝集は有機溶媒を 5~10% 以上添加すれば、抑えられることが分かった。

3.1.2 膨潤度 流体抵抗を利用する分級方法において、粒子が同じ密度であるならば、粒径の大きいほうが分級に有利である (2.1.1)。Fig. 3 B に分散剤として用いた有機溶媒の濃度によるセファデックス G-200 の膨潤度を示した。その結果、10% までの有機溶媒の添加では、膨潤度は有機溶媒を添加しないものと比較して、その 80% 以上に保たれていることが分かった。

3.1.3 粘度と密度 2.1.1 より $(d_p - d_f)/\eta$ の項が

Fig. 3 Effect of flock-inhibitory agent on aggregation ratio of particles (A) and on swelling ratio of particles (B)

A—Particle: Sephadex G-200 (medium), Flock-inhibitory agent: 2-propanol (—○—), dioxane (—●—), acetone (—□—); Number of aggregated particles was counted using a light microscope. B—Particle: Sephadex G-200 (medium), Flock-inhibitory agent: 2-propanol (—○—), dioxane (—●—), acetone (—□—), methanol (—■—), ethanol (—△—), 1-propanol (—▲—)

大きくなるほど分級に有利である。すなわち、媒体の粘度 η と密度を小さくする方向である。一方、2.1.2 の方向から考えると η を大きくすることは層流部の安定化につながり分級に有利で、両者の考え方は相反する。つまり粒子の沈降の理論からは η 及び d_p の小さい媒体例えばアセトン $\{\eta=0.322, d_f=0.792 (20^\circ\text{C})\}$ 、又乱流と層流の考え方からは逆に粘度の大きい媒体例えば 2-プロパノール $\{\eta=2.39 (20^\circ\text{C})\}$ が選択できる。

以上、凝集率、膨潤度及び粘度と密度を考え合わせた結果、凝集率が低く、膨潤度が大きく、しかも層流部を安定する媒体として、10% 2-プロパノール $\{\eta=1.79, d_f=0.981 (20^\circ\text{C})\}$ を選択した。

3.2 分級管の大きさと粒子の負荷量

媒体に 10% 2-プロパノール、分級する樹脂にセファデックス G-200 (medium)、分級管に 155 $\times$ 5.5 cm I. D. ガラス管を用いて Fig. 2 に示した装置で 1 回の操作で分級できる樹脂の負荷量を検討した。

分級管内に樹脂を膨潤量にして 50 ml (分級管容積の約 1/60) を負荷し、4.4 cm/h の向流速度で 96 時間送液した後の分級管内の粒子の粘度分布を Fig. 4 A に示した。この条件で流出可能な粒子 (計算では粒径 29 μm まで) は残存していない。次に分級管内に膨潤量にして約 7 倍量の 360 ml (分級管容積の約 1/10) を負荷し、9.6 cm/h の向流速度で 96 時間送液した後の分級管内の粒子の粒度分布を Fig. 4 B に示した。この条件で流出可能な粒子 (計算では粒径 42 μm まで) は残存していない。又分級管内に樹脂を膨潤量にして約 20 倍

Fig. 4 Size distribution of remaining particles in a column

Particle: Sephadex G-200 (medium), Eluent: 10 % 2-propanol, Column size: 155×5.50 cm I. D. (3600 cm³), Counter flow rate: A 4.4, B 9.6, C 17.8 cm/h, Used resin volume: A 50, B 360, C 1000 ml

量の 1000 ml (分級管容積の約 1/4) を負荷し, 17.8 cm/h の向流速度で送液すると, 24 時間以内に粒子の流出は終わる. しかし, 分級管内には流出可能な粒子 (計算では粒径 58 μm まで) が Fig. 4 C に示すように残存している.

従って, この条件において粒子の負荷量を分級管容積の 1/10 以下で分級に使用する目安とした. この目安を基に異なる大きさの分級管で異なる向流速度で分級した粒子の粒径 (モード平均) を Fig. 1 に示した. 式 (2) より得られる計算値 (実線) と実験値は分級管の大きさによることなく一致した. この結果から, 例えば高速液体クロマトグラフィー用充てん剤などの少量の粒子の分級のための装置のミニスケール化が容易となった.

3.3 向流速度と層流部の長さ

媒体に 10 % 2-プロパノール, 分級管に 155×5.50 cm I. D. ガラス管, 分級する樹脂にセファデックス G-200 (medium) を使用し, 向流速度と層流部の長さ

の関係を調べた. 層流部の長さは樹脂の動きを見て計算した. 向流速度が, 4.4, 9.6, 17.8 cm/h のとき, 層流部の長さはそれぞれ 130, 107, 35 cm であった. Fig. 5 に式 (3) を使用して, 予測される流出時間 t_f と向流速度 V_c の関係を粒径 2, 5, 10, 20, 30 及び 40 μm の粒子に対して計算しプロットした. Fig. 5 より, 目標の粒径の粒子の流出時間及びその近傍の粒径の粒子の流出時間との間隔が分かる.

Fig. 5 Relation between counter flow rate and predicted elution time

Particle: Sephadex G-200 (medium), Eluent: 10 % 2-propanol, Length of laminar flow layer: 130 cm (4.4 cm/h), 107 cm (9.6 cm/h), 35 cm (17.8 cm/h); Predicted elution time was calculated using equation (3). Particle size: 2 μm (○), 5 μm (●), 10 μm (△), 20 μm (▲), 30 μm (□), 40 μm (■)

Fig. 6 A 1, 2, 3 に向流速度 4.4, 9.6, 17.8 cm/h のときの 0~24 時間の間に分画した粒子の粒度分布, Fig. 6 B にセファデックス G-200 (superfine) の分級前の粒子の粒度分布のヒストグラムを示した. これを比較すると, A 1, A 2 は市販の superfine よりも更に粒径が小さく, 粒度分布の小さいものであった. ただし, A 1 の分画にはごみ及び樹脂の破壊物が混入していた. 一方, 得られた粒子の粒径と流出時間の関係は Fig. 5 で得られた予想時間と一致しており, 必要とする粒径の粒子の流出時間の予測が可能となった.

3.4 流出時間と粒度分布の関係

Fig. 5 より, 粒径 40 μm 以下の分級には 4.4 cm/h の向流速度が適していると考えられる. そこでこの条件下で, 流出時間とその粒度分布の関係を Fig. 7 に示した. Fig. 7 において流出時間が 24 h とは 0~24 h, 48

Fig. 6 Size distribution of removed particles within 24 h (A) and of commercially available particles of Sephadex G-200 (superfine) (B)

Particle: Sephadex G-200 (medium), Eluent: 10% 2-propanol, Column size: 155×5.50 cm I. D., Counter flow rate: A-1 4.4, A-2 9.6, A-3 17.8 cm/h

Fig. 7 Relation between elution time and size distribution of particles (%)

Particle: Sephadex G-200 (medium), Eluent: 10% 2-propanol, Column size: 155×5.50 cm I. D., Counter flow rate: 4.4 cm/h, Particle size: 0~10 μm (○), 11~20 μm (●), 21~30 μm (□), 31~40 μm (■).

h とは 24~48 h の間に分取した粒子の粒度分布を表す。Fig. 7 から分かるように小さい粒子から流出し、順次大きな粒子が流出してきている。その流出時間は Fig. 5 で予測した時間と一致している。例えば、10 μm の粒子は、48 h で流出してきたが、式(3)を用いた計算では 34.6 h となる。又、20 μm の粒子は 96 h で流出してきたが、同様の計算では 71.6 h となる。又、分離度を更に上げるためには、層流部の長さを長くするこ

と及び向流速の制御が考えられる。

文 献

- 1) 久保輝一郎, 水渡英二, 中川有三, 早川宗八郎: “粒体”, p. 457 (1962), (丸善).
- 2) J. R. Johnson, J. S. Newman: *Anal. Chem.*, **26**, 1843 (1954).
- 3) 三輪茂雄: 化学工学, **24**, 150 (1960).
- 4) 井伊谷綱一, 荒川正文, 神保元二, 三輪茂雄: 化学増刊 **31**, 161 (1967), (化学同人).
- 5) J. H. Perry: “*Chemical Engineering Handbook*”, 3rd ed., 1084 (1950), (McGraw-Hill, New York).
- 6) H. W. Cremer, T. Davis: “*Chemical Engineering Practice*”, Vol. 3, 128 (1950).
- 7) 水渡英二, 荒川正文, 馬場靖夫: 工化, **59**, 303 (1956).
- 8) 森 芳郎: 工化, **59**, 288 (1956).
- 9) 久野 洋: 工化, **59**, 292 (1956).
- 10) 小川和彦, 大久保大蔵: 工化, **59**, 297 (1956).
- 11) P. B. Hamilton: *Anal. Chem.*, **35**, 2055 (1963).
- 12) S. Moore, D. H. Spackman, W. H. Stein: *Anal. Chem.*, **30**, 1185 (1958).
- 13) C. D. Scott: *Anal. Biochem.*, **24**, 292 (1968).
- 14) H. Small: *J. Colloid Interface Sci.*, **48**, 1 (1974).
- 15) J. C. Giddings: *J. Chromatogr.*, **125**, 3 (1976).

☆

Size classification method of packing materials for aqueous gel chromatography; Instrumentation of classification system and application to dextran particles. Yasuyuki KUROSU, Kaoru YASUKAWA, Hiroshi KAWASAKI*, Nobuharu TAKAI**, and Tsuneo OKUYAMA* (*Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University, 2-1-1, Fukazawa, Setagaya-ku, Tokyo, 158; **Institute of Industrial Science, University of Tokyo, 7-22-1, Roppongi, Minato-ku, Tokyo, 106)

The size classification of low density particles *e.g.* dextran or agarose ($d_p=1.00\sim1.05$) is relatively difficult compared to that of ion exchange resin ($d_p=1.2$). In this paper, the concept of hydrodynamic chromatography is introduced for the size classification of low density particles. Aqueous solution containing 10% 2-propanol was used to inhibit aggregation of particles. The classification was made for the suspension using the long range of laminar flow. Elution time (t_f) of particles can be predicted using the following equation:

$$t_f = \eta l / [v_c \eta - 1.960 \times 10^{-3} (d_p - d_f) a^2]$$

t_f : elution time (h), η : viscosity of eluent (g/cm s), l : length of laminar flow layer (cm), v_c : counter flow rate (cm/h), d_p : density of particle (g/cm³), d_f : density of eluent (g/cm³), a : diameter of particle (μm). Sephadex G-200 was classified using this method by the following conditions: column size; 155×5.5 cm I.D., counter flow rate; 4.4 cm/h, eluent; 10% 2-propanol. For the given size of classified particles, the elution time was found to be approximately identical with that predicted by

the equation. Particles of 10 and 20 μm were flowed out within 48 h (the predicted time is 34.6 h) and 96 h (the predicted time is 71.6 h) respectively.

(Received March 24, 1984)

Keyword phrases

sedimentation of particle; size classification method of hydrophilic gel particles for aqueous gel chromatography; hydrodynamic chromatography.

アパタイト鉱物中のサマリウムの溶媒抽出- 誘導結合プラズマ発光分析法による定量

藤野 治[®], 米谷欣宣, 杉山雅人, 松井正和*

(1984 年 2 月 6 日受理)

溶媒抽出-誘導結合プラズマ (ICP) 発光分析によるアパタイト鉱物中のサマリウムの定量法についての基礎的検討を行った。硝酸溶解したアパタイト試料にはリン酸カルシウムがマトリックス成分として存在し、これがサマリウムの発光強度測定に対して分光干渉と減感干渉を同時に示した。これらの干渉除去に対し溶媒抽出法を用いるために、シクロアルカンやアルカン系など有機溶媒種の ICP への適応性を調べた。その結果、これらの溶媒系では炭素数の多いものほど ICP は安定となり、石英トーチへの炭素の付着も生じにくいことが認められた。又ジ-2-エチルヘキシルリン酸をサマリウムの抽出剤に用いたとき、各種有機溶媒間ではサマリウムの発光強度にかなりの差が認められたが、これは主として溶媒の粘性に基づくものであることが判明した。天然アパタイト中のサマリウムを測定するときシクロオクタンが各種有機溶媒の中で最高の検出限界 ($S/N=3$) 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を示したので、これを抽出溶媒に用いて定量した。

1 緒 言

希土類元素の誘導結合プラズマ (以下 ICP と略記) 発光分析法は感度、精度及び迅速性に優れ、種々の実試料への適用が試みられている^{1)~9)}。

著者らはリン酸塩鉱物中の希土類元素含量とその分布に興味をもち、ICP 発光分析法によるこれら希土類元素の定量法についての基礎的検討を行っている。イットリウム族やセリウム族を主成分としたゼノタイムやモナズ石中のサマリウムは硫酸溶解¹⁰⁾した試料をそのまま ICP に導入することにより、直接定量が可能であった。そこでカルシウムを主成分としたリン酸塩鉱物であるアパタイト中のサマリウムにも適用したところ、これらマクロ成分によってサマリウムは大きな分光干渉と減感干渉を受けたので、これらからの分離が必要となった。ここではその分離法に溶媒抽出法を採用したが、これらを併用した ICP 発光分析に関する報告は極めて少な

く^{12)~14)}、特に希土類元素については皆無である。アパタイトのマクロ成分より希土類元素を分離する溶媒抽出系としては抽出剤としてジ-2-エチルヘキシルリン酸 (以下 HDEHP と略記) を、又抽出溶媒には分配比の大きいシクロヘキサンが用いられている¹⁵⁾。しかしシクロヘキサンは瞬時にして ICP を消滅させるので、本研究では ICP を維持することが可能な有機溶媒種の選択について、次いでこれら溶媒に対するサマリウム-HDEHP 錯体の抽出挙動、測定条件及び感度などについて詳細な検討を行った後、天然アパタイト分析に適用したので報告する。

2 試薬、装置及び測定条件

2.1 試 薬

標準希土類元素溶液は Alpha Products 製酸化物 (99.999 %) を、セリウムのみは Merck 製の硫酸セリウム (IV) をそれぞれ硝酸で加熱溶解したものを用いた。有機溶媒、無機酸類は和光純薬工業製の特級及び精密分析用を、HDEHP は半井化学薬品製をそれぞれ使用した。

* 京都大学化学研究所: 611 京都府宇治市五ヶ庄