超遠心法によるオリゴ糖類の分子量測定法

富田 繁* 寺島一生* 松田芳人* 安部桂司*

(昭和47年10月17日受理)

On the Ultracentrifugal Method for the Molecular Weight Determination of Oligosaccharides

Shigeru TOMITA*, Kazuki TERAJIMA*, Yoshindo MATSUDA* and Keishi ABE*

*National Chemical Laboratory For Industry (1-5, Honmachi
1-Chome, Shibuyaku, Tokyo)

Short column sedimentation equilibrium method was applied to the determination of molecular weight of the low molecular compounds, especially, oligosaccharides. Theoretical consideration about the basic equilibrium equations were made on the ideal mono-dispersed, non-ideal mono-dispersed and ideal poly-dispersed solutions, then the two new computation methods of molecular weight were proposed. An error caused by the pressure effect was also estimated, and the relation between the error and the solvents properties was showed that the most preferable solvents usable for the molecular weight determination of the low molecular oligosaccharides were water and alcohols. Experimental application of the above method on oligosaccharides such as maltose, lactose, raffinose and their mixtures gave the good results, consisting with the theoretical values.

1. 緒 言

超遠心法, とくに沈降平衡法による分子量測定は Svedberg 以来高分子, なかでも蛋白質, 酵素などの生体高分子の分野で広く行なわれている。しかし原理的にみれば沈降平衡法によればたんに高分子だけでなく, 分子量が 10^2 , 10^3 オーダーのいわゆる中低分子の分子量測定も十分可能なはずである。また平衡到達時間は拡散係数に反比例する¹⁾から, 拡散係数で 10^{-5} のオーダーである低分子物質のほうが, 10^{-7} のオーダーである高分子物質よりも早く平衡に達するから, 測定時間の面からいえば沈降平衡法はむしろ中低分子の分子量測定に適するといえよう。一方オリゴ糖は $10^2 \sim 10^3$ の分子量を有し, この分子量範囲は浸透圧, 光散乱法の測定限界以下で, また氷点降下, 沸点上昇法の限界以上であって, 好適な分子量測定法の存在しない領域に属する。また水を溶媒とすることが多く, 水は上記の測定法にとってはやっか

いな溶媒となっている。そこでオリゴ糖の分子量測定について沈降平衡法を応用することを試み, とくに測定誤差の内容を検討して測定の限界を明らかにした。その結果沈降平衡法が中低分子の分子量測定法として十分利用でき, とくにオリゴ糖-水系に好適であることを認めた。

2. 沈降平衡の基礎式と誤差の計算*

2. 1. 単分散, 理想溶液の場合

2成分系の理想溶液の沈降平衡の基礎式

$$M(1-\bar{V}_\rho)\omega^2 r = \left(\frac{RT}{c} \right) \left(\frac{dc}{dr} \right) \quad (1)$$

において, $A \equiv (1-\bar{V}_\rho)\omega^2/2RT$ とおいて上式を r について積分し, さらに $\theta \equiv c/c_0$, $H \equiv AM(r_0^2-r_a^2)/2$, $\xi \equiv (r_0^2-r^2)/(r_0^2-r_a^2)$ とおくと,

$$\theta = \frac{H}{\sinh H} e^{H(1-2\xi)} \quad (2)$$

と書ける²⁾。(2)式より

* 東京工業試験所 (東京都渋谷区本町1の1の5)

* 式中の記号の意味は文末にまとめて示す。

$$\frac{dc}{dr} = 2AMc_0r \frac{H}{\sinh H} e^{H(1-2\xi)} \quad (3)$$

そこでみかけの分子量 M_{app} を

$$M_{app} \equiv \frac{1}{2Ac_0r} \left(\frac{dc}{dr} \right) \quad (4)$$

と定義すれば, M_{app} は測定可能な量である。

(3), (4)式より

$$M_{app} = M \frac{H}{\sinh H} e^{H(1-2\xi)} \quad (5)$$

であるから, $\xi=1/2$, すなわち $r^2=(r_a^2+r_b^2)/2$ のとき

$$M_{app} = M \frac{H}{\sinh H} \quad (6)$$

図1に示すように, H と $H/\sinh H$ の関係は $H \ll 1$ のときだけ $H/\sinh H$ が1に近くなり, $H \leq 0.25$ のとき(6)式による M_{app} は誤差1%以内となる。したがってこの方法で分子量測定を行なうときには, H を小さくするため液柱の高さを小さくする必要があり, 通常1.5 mm程度とするので short column 法³⁾とよばれる。これをI法とする。

H を小さくすることにもある限界がある。いま dc/dr に相当する乾板上の高さを Y とすると, Y が大きいほど読み取り誤差が小さい。

$$Y = \left(\frac{dLGr}{\tan \varphi} \right) \bar{R} \left(\frac{dc}{dr} \right) \quad (7)$$

で表わされ, $dLGr/\tan \varphi$ は装置常数*で, $\bar{R}$ も定数であるから Y は dc/dr に比例する。また, (3)式から $dc/dr = [4Hc_0r/(r_b^2 - r_a^2)] \cdot H/\sinh H$ であるから, Y を大きくするためには H, c_0 を大きくする必要がある。この H および Y の両方の制約から, 糖-水系の測定の際通常の実験条件で選ぶべき回転数と分子量との関係を図2に示す。

図1. H と $H/\sinh H$ の関係

図2. 糖-水系の回転数の選択

実験条件として液柱1.5 mm, $r_a=6.95$ cm, $r_b=7.10$ cm, 温度 25°C とした。また糖-水系の場合 $1-\bar{V}\rho=0.4$, $\bar{R}=0.15 \text{ cm}^3/\text{g}$ とし計算した。

図2のように両方の条件を満足する範囲は比較的せまう, しかも実測上 Y はできるだけ大きい方が読み取りの誤差が小さいから, H の制限をもっと緩和して H を大きく(すなわち回転数を高く)するか, $\xi=1/2$ 点よりもっとボトムよりの Y の大きい所で分子量を計算することが望ましい。そこでこの点の検討を行なった。

1) H の大きい場合の計算法

$E \equiv H/M$ とおき, $\xi=1/2$ 点において M' を

$$\frac{1}{M'} \equiv \frac{1}{M_{app}} - \frac{E^2}{6} M_{app} \quad (8)$$

と定義する。 M' は実測値から計算できる。この場合の誤差を ϵ とし, $\epsilon \equiv (M - M_{calc})/M$ とすると, ϵ と H との関係は図3のようである。この計算法によれば, H が大きくとも ϵ を小さくすることができ, I法では $H \leq 0.25$ で1%の誤差であったが, この方法では $H \leq 0.75$ で同程度の誤差を与え, したがって Y を最大約3倍にすることができる。これをII法とする。

2) $\xi=1/2$ 点以外の計算法

$\zeta \equiv 1-2\xi$ とおき, $\zeta \neq 0$ の点で(4)式に従い計算したみかけの分子量を $M_{app,\zeta}$ とする。(5)式を展開すると

$$\frac{1}{M_{app,\zeta}} = \frac{1}{M} \left[1 - H\zeta + \frac{H^2}{6} (3\zeta^2 + 1) - \frac{H^3}{6} \zeta (1 + \zeta^2) + \dots \right]$$

であるから, 前項にならって M'_ζ を

$$\frac{1}{M'_\zeta} \equiv \frac{1}{M_{app,\zeta}} + E\zeta - \frac{E^2}{6} M_{app,\zeta} (3\zeta^2 + 1) \quad (9)$$

と定義すると, これは実測値から計算できる。これから

* われわれの装置 (Spinco E 型) では 70° , 12 mm のセルで約 85 cm^2 である。

** 糖-水系では $\bar{R}=0.15 \text{ cm}^3/\text{g}$

図 3. 分子量測定のエラと H との関係
I, II法: 単分散, 理想溶液

図 4. 分子量測定のエラと H との関係
III法: 単分散, 理想溶液

誤差 ε を計算し図示すると図 4 のようになる。図では $\xi=1/2$ 点 ($\xi=1/4$), $\xi=1$ (ボトム) の両者について示してある。前者では $H \leq 0.35$, 後者では $H \leq 0.22$ で 1% の誤差範囲内で分子量が計算できることがわかる。これを III 法とする。III 法では Y を特に大きくすることは望めないが, $\xi=1/2$ 以外の点でも分子量が求まる利点があり, 情報量をふやすことができる。

2. 2. 単分散, 非理想溶液の場合

このときの沈降平衡の式は (1) の代りに

$$M(1-\bar{V}\rho)\omega^2 r = \left(\frac{RT}{c}\right) \left(\frac{dc}{dr}\right) \left\{1 + c \left(\frac{\partial \ln \gamma}{\partial c}\right)_{T,P}\right\} \quad (10)$$

で表わされる。活量係数 γ は希薄溶液では第 2 ビリアル係数 B と $\ln \gamma = MBc$ の関係にある²⁾ から, $\beta \equiv MBc_0$ として (10) 式を積分すると, $\ln \theta + \beta \theta = -2H\xi + k$ (11) k は $\beta=0$ では $k = \ln(H/\sinh H) + H$ であり, (11) 式は (2) 式に還元される。 $\beta \neq 0$ では (11) 式の一般解は得られないが, β が十分小さければ近似的に $k = \beta + \ln(H/\sinh H) + H$ とおくことができ, したがって (2) 式の代りに

$$\theta = \frac{H}{\sinh H} e^{H\xi} e^{\beta(1-\xi)} \quad (12)$$

が得られる。濃度勾配 dc/dr は

$$\frac{dc}{dr} = 2AMc_0r \frac{\theta}{1+\beta\theta} \quad (13)$$

理想溶液のときより小さくなるので, みかけの分子量は小さくなることが予想される。

(12) 式において $|\beta(1-\theta)| \ll 1$ であり, また $H/\sinh H \approx 1$ であれば

$$\theta = \frac{H}{\sinh H} e^{H\xi(1-\beta)} \quad (14)$$

と近似できる。また M_{app} は (4), (13) 式から

$M_{app} = M \cdot \theta / (1 + \beta \theta)$ で表わされるから, これと (14)

式から $\xi=1/2$ 点では

$$\frac{M}{M_{app}} = \frac{\sinh H}{H} + \beta \quad (15)$$

であり, I 法を用いるときは $\beta=0$ の理想溶液の場合より誤差が大きくなることがわかる。

いっぽう II 法による計算では

$$\frac{M}{M'} = \frac{\sinh H}{H} + \beta - f(H, \beta) \quad (16)$$

の形となり, II 法の誤差は I 法の誤差よりも小さくなる。以上のように非理想溶液のときの誤差は, H と β の 2 つのパラメータにより規定される。誤差が 1% および 2% の場合の I および II 法における H と β との関係を図 5 に示す。図示のように II 法による計算の方が優れていることがわかる。また H が小さい場合でも, 理想溶液のときと異なり, 誤差は 0 とならずに β に収れんする。したがって β が大きいときには c_0 を変えて実験し, 測定値を $c_0 \rightarrow 0$, すなわち $\beta \rightarrow 0$ に外挿することになるが, このとき H を一定に保つことが必要である。

β が小さいときは, 一点測定だけでも 1~2% の誤差で分子量が測定できる。糖-水系の場合は β が小さく, 濃度 1% のとき $M=1,000$ で $\beta \approx 0.02$, $M=500$ で

図 5. 分子量測定のエラにおける β と H との関係
単分散, 非理想溶液: I 法-----; II 法——。

図 6. 分子量測定のエラにおける β と H との関係
単分散, 非理想溶液: III法 $\xi=1/2$ $\varepsilon=0$ —, $|\varepsilon|=0.01$ — —, $|\varepsilon|=0.02$ - · - ·

図 7. 分子量測定のエラと H との関係
多分散, 理想溶液: I法 $h=1$ · · · · ·, $h=2$ - - - -, 単分散 —

$\beta \approx 0.01$ であるから, II法を用いれば図5に示すようにかなり H が大きい所でも, 理論上 1~2% の誤差で分子量を求めることができる。

ついで $\xi=1/4$ 点でIII法を用いた場合の誤差を図6に示す。I, II法では理想溶液のときより誤差が必ず大きくなるが, III法では図示のように β が小さい限り, 理想溶液のときとほとんど誤差の大きさが変わらない点に特長がある。すなわち $\beta \leq 0.016$, $H \leq 0.35$ では $|\varepsilon| \leq 0.01$ を与え, $\beta \leq 0.031$, $H \leq 0.44$ で $|\varepsilon| \leq 0.02$ を与える。

2. 3. 多分散, 理想溶液の場合

多分散系の沈降平衡の場合, i 番目の溶質について考えると, $\xi=1/2$ のとき, (4), (6) 式から

$$\frac{1}{2Ac_{0ir}} \left(\frac{dc}{dr} \right)_i = M_i \frac{H_i}{\sinh H_i} = M_i \left[1 - \frac{H_i^2}{6} + \frac{7}{360} H_i^4 - \dots \right] \quad (17)$$

であるから, $H_i \equiv EM_i$ とし, i についての和を求め, (4) 式の定義を用いると,

$$M_{app} = M_w - \frac{E^2}{6} M_w \cdot M_z \cdot M_{z+1} + \frac{7E^4}{360} M_w \cdot \dots \cdot M_{z+3} - \dots \quad (18)$$

18式は分子量分布の形によって変わってくるが, いま分布が Schulz-Zimm 分布にしたがうと仮定し, h を分布の広さのパラメータとすると

$$M_w \cdot M_z \cdot \dots \cdot M_{z+n-2} = M_w^n \prod_{n=1}^{n=n} \left(\frac{h+n}{h+1} \right)$$

M_w^n の係数を簡単に $\prod$ と書き, $H_w \equiv EM_w$ とすると,

$$\frac{M_{app}}{M_w} = 1 - \frac{H_w^2}{6} \prod^3 + \frac{7H_w^4}{360} \prod^5 - \frac{31H_w^6}{15120} \prod^7 + \dots \quad (19)$$

(19)式はI法によるみかけの分子量と真の重量平均分子量との比を表わし, H_w, h のパラメータで規定される。いま $h=1$, すなわち, most probable 分布のときと, もっと狭い分布の $h=2$ のとき, および単分散のときの M_{app}/M_w の値を H_w について比較すると図7のとおりである。 M_{app}/M_w の値は分布が広いほど1より小さくなることが示されている。これは実際の沈降平衡において, 平均分子量が同一があっても $\theta=1$ の点が $\xi=1/2$ の所よりもボトムよりにずれるためであって, 誤差1%を与える H が単分散のとき 0.25 であるに対し, $h=2$ では 0.17, $h=1$ では 0.14 と小さくなることがわかる。

II法での M' の誤差は図8のようである。I法よりはやや改善され, 誤差1%を与える H は, 単分散では 0.75 であるが, $h=2$ では 0.22, $h=1$ では 0.17 である。

ついでIII法はI法と同様な計算により

$$\begin{aligned} \frac{M_{app,\xi}}{M_w} = & 1 + \xi \prod^2 H_w + \frac{(3\xi^2-1)}{6} \prod^3 H_w^2 + \frac{\xi(\xi^2-1)}{6} \\ & \cdot \prod^4 H_w^3 + \frac{(7-10\xi^2+15\xi^4)}{360} \prod^5 H_w^4 + \frac{\xi(7-10\xi^2+3\xi^4)}{360} \\ & \cdot \prod^6 H_w^5 + \dots \end{aligned}$$

したがって (9) 式により計算した分子量 M'_i の誤差

図 8. 分子量測定のエラと H との関係
多分散, 理想溶液 II法 $h=1$ · · · · ·, $h=2$ - - - -, 単分散 —

図 9-a. 分子量測定の誤差と H との関係
多分散, 理想溶液: Ⅲ法, $\xi=1/2$, (9) 式の 2
項までと, 3 項まで計算した場合。

図9-b. I 法とⅢ法の平均値の誤差と H との関係

$(M_w - M_c)/M_w$ と H_w との関係を $h=1$, $h=2$, 単分散のおおのについて示すと, 図 9-a のようである。図示のようにⅢ法の計算結果は過大な分子量を与え, むしろ (9) 式の第 2 項までの計算値の方が誤差が小さい。いずれも単分散, $h=2$, $h=1$ の順に, つまり分布が広いほど誤差が大きくなることがわかる。

以上の場合Ⅲ法の有用性は, 分布の有無にかかわらず, I 法が過小な値を与えるに対し, Ⅲ法では過大な値を与えるという点にあり, したがって両者を平均すれば真の値に最も近い値を与えるという点にある。図 9-b に I 法とⅢ法の計算値の相加平均値の H による誤差の関係を示しており, $h=1$ のとき $H \leq 0.63$, $h=2$ のとき $H \leq 0.77$, 単分散のとき $H \leq 0.80$ まで, 誤差が 1% 以下であることが示されている。

2. 4. 各計算法の考察

沈降平衡法は遠心力によって生ずる溶液の濃度分布の変化から分子量を求める方法である。ことに本法では, 原理的に溶液中の濃度が初濃度 c_0 に等しい所の濃度勾配が問題になる。セル中の濃度は一般に $\xi=1/2$ 点よりもボトム側の所で c_0 に等しくなるので, 理想溶液のときの従来法, すなわち I 法は分子量の計算値がやや小さくなり, II 法では H の高次項を入れて補正するので誤差が小さくなるわけである。Ⅲ法では $\xi < 1/2$ の点, すなわち $c > c_0$ の点で測定するので, H の高次項の補正にもかかわらず, 分子量がやや大きく計算されてくる。非理想溶液のときは理想溶液のときよりも濃度分布が小さくなる傾向があり, したがって I 法では分子量がさらに小さく計算されてくるが, II 法では H の高次項の補正により大きく改善され, Ⅲ法では $\xi < 1/2$ のボトム寄りの濃度勾配が大きいところをとるので, 理想溶液のときよりかえって正しい値に近づくといえる。多分散のときは高分子区分がボトム側に集まるために分子量分布の再配分が起こり, はじめの濃度に等しい濃度をもつ点は, $\xi=1/2$ の点よりボトム側に位置し, 分布が広いほどその度合いが大きくなるので, I, II 法では平均分子量が小さくなり, Ⅲ法では $\xi < 1/2$ であるから大きい値を与えることになる。同様にして多分散, 非理想溶液のときは, 前両者の中間に考えると考えられる。しかし I 法が過小, Ⅲ法が過大な値を与えるという事情は, H がきわめて大きくない限りいずれの場合も変わらないので, 分子量の一点濃度測定を目的とする限り, 図 9-b に示すように I 法Ⅲ法の計算値の相加平均が最も正しい値に近いといえるであろう。

また沈降平衡法に用いる光学系は, 高分子の場合レーリー干渉法を用いる方が正確とされているが, 本法は通常のシュリーレン法を用いている。これはレーリー干渉法の実際上の測定限界は約 30,000 rpm までであり, これ以上の回転数で干渉縞がぼやけてくるが, $10^2 \sim 10^3$ の中低分子量のものでは, もっと高い回転数をかけなくては測定可能な程度の濃度変化を与えないので, 現在の段階ではシュリーレン光学系しか用いられないためである。

3. 圧力の影響

前述の計算では遠心力によって生ずる圧力の効果を見捨ててある。しかし 1.5 mm 程度の液柱でも, 60,000 rpm ではボトムで約 41 atm の圧力がかかるので, 圧力による影響を考察してみる必要があらう。

前述のように本法ではシュリーレン光学系によって屈

折率勾配を用いる。一般に溶液の屈折率 n は、濃度 c 、圧力 P 、温度 T の関数である。

$$n(c, P, T) = n(0, P, T) + \bar{R}c \quad (20)$$

いま $\bar{R}$ の圧力依存性を無視するとし、屈折率勾配を求めると次式のようになる。

$$\frac{\partial n(c, P, T)}{\partial r} = \frac{\partial n(0, P, T)}{\partial r} + \bar{R} \left(\frac{\partial c}{\partial r} \right) \quad (21)$$

$n(0, P, T)$ は遠心されつつある溶液中の溶媒のみの屈折率を表わす。しかしこの値は測定不能であるので、通常はダブルセクターセルを用い、同時に溶媒を遠心し、溶媒の屈折率勾配 $\partial n_0(P, T)/\partial r$ で代用する。しかし遠心力が大きいと前者の方が溶質の分だけ圧力が高くなり、両者の間には差が生じ、したがって実測値と理論値の間には Δ だけの差ができる²⁾。

$$\Delta = \frac{\partial n(c, P, T)}{\partial r} - \frac{\partial n_0(P, T)}{\partial r} \quad (22)$$

したがって屈折率勾配のみによる測定誤差を ε_n とすると

$$\varepsilon_n = \Delta / \bar{R} \left(\frac{\partial c}{\partial r} \right) \quad (23)$$

いま温度が一定であるとし、 Δ を求めると

$$\Delta = \left[\left(\frac{\partial P}{\partial r} \right)_{\text{sol'n}} - \left(\frac{\partial P}{\partial r} \right)_{\text{sol'v}} \right] \left(\frac{\partial n_0}{\partial P} \right) \quad (24)$$

ローレンツ-ローレンツの公式から

$$\begin{aligned} \frac{\partial n_0}{\partial \rho_0} &= \frac{(n_0^2 - 1)(n_0^2 + 2)}{6n_0\rho_0} \doteq \frac{[(n_0^0)^2 - 1][(n_0^0)^2 + 2]}{6n_0^0\rho_0^0} \\ &\equiv k(n, \rho) \end{aligned} \quad (25)$$

上式は密度の変化の小さい範囲ではほぼ一定であると仮定し、 $k(n, \rho)$ とおく。よって $\rho_0 = \rho_0^0(1 + \kappa P)$ から

$$\frac{\partial n_0}{\partial \rho} = k(n, \rho)\rho_0^0\kappa \quad (26)$$

で、 $\partial n_0/\partial P$ は溶媒により定まる定数と考えられる。また溶液と溶媒の屈折率がほとんど等しいとし、かつ $y \equiv \omega^2(r^2 - ra^2)/2$ とおくと

$$\begin{aligned} \left(\frac{\partial P}{\partial r} \right)_{\text{sol'n}} - \left(\frac{\partial P}{\partial r} \right)_{\text{sol'v}} &= \omega^2 r (1 - \bar{V}\rho_0^0)c \left\{ 1 + \right. \\ &\quad \left. 2\rho_0^0\kappa y \left[1 + (1 - \bar{V}\rho_0^0)c/2\rho_0^0 \right] \right\} \end{aligned}$$

$(1 - \bar{V}\rho_0^0)c/2\rho_0^0 \ll 1$ だから省略すると、

$$\Delta = k(n, \rho)\rho_0^0\kappa\omega^2 r (1 - \bar{V}\rho_0^0)c (1 + 2\rho_0^0\kappa y) \quad (27)$$

したがって (1) 式、(27) 式から $1 - \bar{V}\rho \doteq 1 - \bar{V}\rho_0^0$

$$\text{として } \varepsilon_n = k(n, \rho)\rho_0^0(1 + 2\rho_0^0\kappa y) RT / \bar{R}M \quad (28)$$

(28) 式から、誤差は $k(n, \rho)\rho_0^0\kappa$ に比例し、 $\bar{R}$ 、 M に逆

比例することがわかる。(25)式から $k(n, \rho)\rho_0^0\kappa$ は溶媒により定まる定数としたが、その妥当性を検討してみた。

ある溶媒において $P \ll 1$ として

$$\frac{dn_0}{dr} = k(n, \rho)(\rho_0^0)^2\kappa\omega^2 r \quad (29)$$

だから、2種の溶媒 (s と w とする) を同時に遠心したときの dn/dr の差 Δ_Y (乾板上の) は

$$\Delta_Y = \left(\frac{dLGr}{\tan \varphi} \right) [k(n, \rho)_s(\rho_0^0)^2\kappa_s - k(n, \rho)_w(\rho_0^0)^2\kappa_w]\omega^2 r \quad (30)$$

で表わされ、回転数を一定として溶媒 s をいろいろ変え、溶媒 w との差を求めて $k(n, \rho)_s(\rho_0^0)^2\kappa_s$ に対してプロットすると直線になるはずである。これを図 10 に示す。図示のように w を水としたプロットはほぼ直線となるので、以上の関係は成立するとみられ、また κ が未知の溶媒について同様に Δ_Y/r を実測すれば、 n_0^0 、 ρ_0^0 が既知のとき κ を求めることが可能である。

さらに(28)式に従い、糖類の分子量測定の場合、圧力効果による誤差 ε_n が 1% 以下であるような最低分子量を計算し、各溶媒について表 1 に示した。ただし実際の溶解性は考慮していない。また各溶媒の $\bar{R}$ はグラッドストーン-デールの式から計算したものを用いた。その結果表示のように、 10^2 オーダーの分子量まで測定可能な溶媒は、水の 270 を筆頭にメタノール、イソプロパノール、酢酸エチル、エタノール、プロパノール、アセトン、ブタノールの順であり、その中でも水がとくに良好な溶媒であることがわかる。この関係は糖類の誘導体の場合も定性的には同一と考えられ、表 1 は溶媒の選択の基準を与えるものといえよう。

図 10. 溶媒の屈折率勾配と物性との関係

表 1. 各種溶媒に対する圧力効果

No.	溶 媒	$k(n, \rho)\rho_0^0\kappa$ $\times 10^6 \text{ atm}^{-1}$	$\Delta r/r$ 56100r pm として	最低分子量 $M \times 10^{-2}$
1	水	16.8		2.7
2	アニリン	25.8	4.71	600
3	ニトロベンゼン	31.4	6.53	36
4	1,2-ジクロロエタン	40.1	9.95	12
5	ブタノール	41.5	5.48	89
6	イソプロパノール	42.0	6.29	8.1
7	酢酸エチル	43.0	7.99	8.1
8	メタノール	43.1	5.58	6.7
9	プロパノール	43.1	5.51	8.6
10	エタノール	45.6	6.02	8.2
11	ブロムベンゼン	45.5	14.4	66
12	クロロベンゼン	46.9	9.81	31
13	ジクロロメタン	47.1	14.8	12
14	トリクロロエチレン	47.4	17.0	17
15	エチルベンゼン	48.2	8.09	12
16	アセトン	49.7	6.94	8.8
17	トルエン	50.6	8.39	23
18	クロロホルム	51.8	17.8	15
19	ヘプタン	52.0	7.25	11
20	ベンゼン	56.0	9.60	26
21	四塩化炭素	58.6	21.0	19
22	臭化エチル	59.2	21.4	15
23	ヘキサン	62.5	9.18	12
24	エチルエーテル	71.7	9.18	13
25	二硫化炭素	73.4	21.8	69

これに対したとえばポリスチレンを試料とした場合は、最もふつうの溶媒であるベンゼン、トルエンでの同様な分子量はそれぞれ 1,300, 1,200 である。したがって一般に 10^3 以下の分子量測定に適する溶媒は、水および低級アルコール類が主なものであって、本法による低分子量の分子量測定は、水を溶媒とすることのできるオリゴ糖類とくに好適であることが結論づけられる。

4. 実験法および実験結果

4. 1. 実験法

装置はスピニコE型分析用超遠心機を用い、セルは $21/2^\circ$, 12 mm のダブルセクター型合成界面セルを使用した。試料を蒸留水に溶解し、溶液側セクターに溶液、50 μl 、ボトム液 30 μl 、溶媒側には溶媒 70 μl 、ボトム液 20 μl を用い、溶液層の液柱を約 1.5 mm とした。光学系はシュリーレン光学系とし、位相差板の角度はす

べて 70° にし、ロータ温度は 25°C に調節した。沈降平衡時間は定速到達後約 2 時間とし、測定後同一のセルに溶液および溶媒を加えて合成界面セル実験を行ない、ピークの面積を測定して c_0 とした。沈降図形の測定は万能投影機で行ない、倍率 10 倍でグラフ用紙にトレースした。

試料はいずれも東京化成 KK 製の特級試薬をそのまま用いた。

偏比容 $\bar{V}$ は 25°C の恒温水槽中で 50 cc のピクノメーターを用い、水溶液について測定した。 $\bar{V}$ の値はマルトーズが、0.621, ラクトーズおよびラフィーズが 0.605 あった。

4. 2. 実験結果

4. 2. 1 沈降平衡到達までの時間

沈降平衡到達までの時間は、液柱の高さの自乗に比例し、拡散係数に反比例する。拡散係数は分子量が大き

図 11. 沈降平衡到達時間

いほど小さいから、平衡到達時間は液柱の高さと分子量によって規定される。ラフィノーズ、マルトースの各1%水溶液について、 $\xi=1/2$ 点の dn/dr が一定となる時間を測定すると、図 11 のように前者では約1時間、後者では約30分で一定に達する。したがってこの程度の分子量のものでは、沈降平衡までの時間は、約1時間で十分であることがわかる。

4. 2. 2. オリゴ糖類の分子量測定結果

マルトース、ラクトース、ラフィノーズの各水溶液について、濃度を変えて測定した結果を図 12-a, b, c に示す。分子量の計算はI法に従った。図によれば濃度4ないし1%の範囲の測定値は、ほぼ3%の誤差内で文献値に一致している。 H の値は0.09ないし0.14の範囲内であるから、理論誤差1%以内であるはずであるが、幾分か誤差が大きいのは、 dn/dr および合成界面の面積

図 12-a. マルトースの分子量測定

図 12-b. ラクトースの分子量測定

図 12-c. ラフィノーズの分子量測定

の読みとり誤差が加わったためであり、濃度が小さくなると、読みとり誤差が相対的に大きくなるので、特に低分子量の測定の場合は、濃度1%程度が下限であるといえよう。

4. 2. 3. 混合物の分子量測定結果

ラフィノーズとラクトースの各2%水溶液を混合し、I, II, III法による分子量の測定および計算を行ない、文献値と比較した結果を表2に示す。表示のように、重量平均分子量の文献値と実測値の誤差は、どの計算法でも最大2%程度であり、多くは1%以内である。すなわち沈降平衡法によって、重量平均分子量が求められることを示している。

5. 結 語

以上のように沈降平衡法を用いる低分子オリゴ糖の分子量測定は、ほぼ満足すべき結果を与えることが認められ、日常分析法として、十分使用可能であると考えられる。ことに新しい計算法であるIII法によれば、従来法と異なりメニスカスからボトムまでのあらゆる点で分子量が計算できるので、測定値の精度を高めることがこきるうに、試料の均一性の判定にも有用であると考えられる。

6. 要 約

超遠心機を用いる沈降平衡法を、中低分子量をもつ物質、とくに糖類-水系の分子量測定に応用することを目的として、単分散の理想溶液、単分散の非理想溶液および多分散の理想溶液の三者について、理論的に測定誤差の見積りを行ない、かつ新しい分子量計算法を提案した。測定の理論誤差と、液柱の高さ、分子量、回転数のパラメーター H 、分子量、第二ビルアル係数、濃度のパラメーター β 、Schulz-Zimm の多分散性のパラメーター h との関係を明らかにした。さらに圧力効果による誤差を検討し、溶媒の屈折率、密度、圧縮率との関係を示し、多くの溶媒を比較した結果、最も低分子量側まで測定できる溶媒は、水、アルコール類であることを指摘した。

表 2. ラフィノーズ-ラクトーズ混合物の分子量測定結果

混 合 比 R : L	分 子 量 計 算 値			I 法		II 法		III 法		H_w
	数平均	重量平均	z 平均	M_{app}	誤差(%)	M'	誤差(%)	M'_c	誤差(%)	
0 : 10	342.3	342.3	342.3	335	2.1	335	2.0	336	2.0	0.0899
2 : 8	365.8	374.7	386.0	373	0.5	374	0.3	373	0.4	0.106
3 : 7	378.8	390.9	405.1	393	0.5	394	0.7	394	0.8	0.110
5 : 5	407.9	423.4	438.9	425	0.3	426	0.5	427	0.8	0.120
7 : 3	441.7	455.8	467.9	463	1.6	465	1.9	460	0.8	0.133
8 : 2	460.8	472.0	480.9	470	0.4	472	0.1	468	0.8	0.135
10 : 0	504.4	504.4	504.4	505	0.1	507	0.4	506	0.4	0.138

ついでマルトース、ラクトース、ラフィノーズを試料とし、沈降平衡の到達時間、分子量の測定結果、および各混合物の分子量の測定結果を示し、300 ないし 500 程度のオリゴ糖類の重量平均分子量が、小さい誤差範囲内で測定できることを明らかにした。

引用文献

- 1) K. E. VAN HOLDE, R. L. BALDWIN: *J. Phys. Chem.*, **62**, 734 (1958).
- 2) H. FUJITA: "Mathematical Theory of Sedimentation Analysis", Academic Press, New York (1962).
- 3) D. A. YPHATIS: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **88**, 586 (1960).

記号の説明

A: $(1 - \bar{V}\rho)\omega^2/2RT$

B: 第 2 ビリアル係数

c: 濃度 g/cm³

c₀: 初濃度

d: セルの厚さ cm

E: H/M

G_r: 円筒レンズの倍率

H: $AM(r_b^2 - r_a^2)/2$

H_w: $AM_w(r_b^2 - r_a^2)/2$

h: 分子量分布の広さのパラメーター

k: 積分常数

k(n, ρ): 溶媒の屈折率と密度により定まる定数

L: オプティカル・レバー・アーム

M: 分子量

M_{app}: ξ=1/2 点における見かけの分子量 ≡ (1/2 A_{cor}) · (dc/dr)

M_{app,ξ}: ξ=1/2 点以外における見かけの分子量

M': II 法による分子量の計算値

M'_c: III 法による分子量の計算値

M_{calc}: 分子量の計算値

M_w, M_z, M_{z+1} etc: 重量平均, z 平均, z+1 平均分子量

n: 屈折率

n₀: 溶媒の屈折率

n₀⁰: 1 atm の溶媒の屈折率

n⁰: 1 atm の溶液の屈折率

P: 圧力 dyne/cm²

R: 気体常数 8.3143 × 10⁷ erg/deg
82.05 cm³·atm/deg

$\bar{R}$: 屈折率の濃度変化 cm³/g

r: 回転中心からの距離 cm

r_a: 回転中心からメニスカスまでの距離 cm

r_b: 回転中心からボトムまでの距離 cm

T: 絶対温度

$\bar{V}$: 偏比容 cm³/g

Y: dn/dr に相当する乾板上の読み cm

y: $\omega^2(r^2 - r_a^2)/2$

β: MB_{c0}

γ: 溶液の活量係数

Δ: 屈折率勾配の理論値と測定値の差

Δ_r: 2 種の溶媒の屈折率勾配の差, 乾板上の読みとり値

ε: 分子量測定の誤差 ≡ (M - M_{calc})/M

ε_n: 屈折率による測定誤差

ξ: 1-2 ξ

θ: c/c₀

κ: 溶媒の圧縮率 atm⁻¹

ξ: $(r_b^2 - r^2)/(r_b^2 - r_a^2)$

$\prod_{n=1}^n \left(\frac{h+n}{h+1} \right)$

ρ: 溶液の密度 g/cm³

ρ₀: 溶媒の密度 g/cm³

ρ⁰: 1 atm の溶液の密度 g/cm³

ρ₀⁰: 1 atm の溶媒の密度 g/cm³

φ: 位相差板の角度

ω: 回転の角速度 sec⁻¹