プルラン球状体の合成とそのゲルクロマトグラフ特性

(1986 年 4 月 17 日 受理)

本里 義明・伊原 博隆・朋田 崇志・平山 忠一*

プルランを基本骨格とする球状ゲルが, 独自技術によって初めて調製された。合成はプルラントリアセテートの懸濁蒸発法による球状微粒子化, 不均一系でのけん化およびエピクロロヒドリンによる橋かけによって行なわれた。得られたプルラン球状体は水系ゲルクロマトグラフィー用充填剤として, (1) 幅広い排除限界分子量 ($10^3 \sim 10^6$) を有するものが調製できる, (2) 分離係数が高い, (3) 耐流速特性に優れている, および (4) 分離物質との特異的な相互作用がほとんどない, などの特徴を有することが明らかになった。

1 緒 言

ゲルクロマトグラフィー (GPC) 用充填剤は天然多糖類や水溶性合成高分子からなる親水性充填剤とポリスチレンを代表とする疎水性充填剤に大別できる。とくに前者はタンパク質や核酸、ウイルスなどの生体物質の分離分析が可能のため, 幅広い分野で使用されている。そのため従来から, デキストラン¹⁾²⁾, 寒天³⁾, ポリアクリルアミド⁴⁾⁵⁾, ポリ(ビニルアルコール)⁶⁾⁷⁾ などから無定形あるいは球状ゲルが調製され, 水系 GPC 用充填剤として使用されてきた。しかしながら従来の充填剤には重大な欠点があった。それは膨潤ゲル型素材には避けられない耐流速性に劣る点である。とくにゲルクロマトグラフィーの使命が, 最近の生化学の進歩にともなってより高分子な物質の高速分離へと移行しているため, この問題はますます深刻になっている。一方, この問題の解決策の一つとして, 著者らは充填剤のマトリックス素材の改善に着目し, セルロース^{8)~10)}あるいはポリ(γ -メチル=L-グルタメート)¹¹⁾¹²⁾ からなる新しい球状充填剤を開発し, これらがいずれもきわめて高い耐流速性を示すことを明らかにしてきた。しかしこれら2種の素材によってすべての問題が解決されたわけではない。セルロースにおいては, 球状化のさいに通常の希釈剤を用い

るかぎり, 排除限界分子量に限界があり, 巨網化方法の検討が必要である¹³⁾。またポリ(γ -メチル=L-グルタメート)の場合には, GPC の基本特性ならびに高い排除限界分子量が得られるが, 素材の特長を生かすにはアフィニティークロマトグラフィーへの応用が期待される¹⁴⁾。

この一連の研究において, 著者らは新しいマトリックス素材としてプルランに着目した。プルランは 1938 年にその存在が確認され¹⁵⁾, 1978 年日本で初めて工業化された新しい多糖類であり, 一部マルトテトラオースを含むマルトトリオースが α -1, 6-結合でくり返し結合した線状グルカンである。河原らによれば分子量分布が狭く, 結晶化, ゲル化などの異常性のないきわめて扱いやすい水溶性高分子とされている¹⁷⁾。本報告では, プルランからの初めての球状微粒子化およびその網状構造を利用した水系 GPC への応用について述べる。

2 実験方法

2.1 球状微粒子の調製

真空乾燥器中で 24 時間以上減圧乾燥したプルラン (PF-20, 林原生物化学研究所製) 60 g を 600 ml のホルムアミド中 50°C で溶解させたのち, ビリジン 180 ml を加えた。さらに 1 時間以上かきまぜたのち, 無水酢酸 400 ml を加え, 50°C で 48 時間かきまぜた。反応物を水 7 l 中で再沈させ, 50°C の水で数回洗浄した。得られたプルラントリアセテートを常温で減圧乾燥した。

プルラントリアセテート 6 g を所定量のジクロロメタンに溶かし, これを 2 wt% に調製した 10 倍容量のポリ(ビニルアルコー

- 熊本大学工学部応用化学学科, 860 熊本市黒髪
- 1) J. Porath, P. Flodin, *Nature*, **183**, 1657(1959).
 - 2) P. Flodin, Dissertation, Uppsala University, Uppsala, Sweden (1962).
 - 3) A. Polson, *Biophys. Acta*, **50**, 565(1961).
 - 4) S. Hjerten, R. Mosbach, *Anal. Biochem.*, **3**, 109 (1962).
 - 5) K. Sun, A. H. Schon, *Can. J. Chem.*, **43**, 969(1965).
 - 6) 本里義明, 平山忠一, 松本和秋, *工化*, **74**, 1904(1971).
 - 7) 本里義明, 平山忠一, *日化*, 1972, 1087.
 - 8) Y. Motozato, C. Hirayama, *J. Chromatogr.*, **298**, 499 (1984).
 - 9) Y. Motozato, Chisso Co., U. S. P., 4, 312, 980(1982).
 - 10) 本里義明, 松本和秋, 平山忠一, *日化*, 1981, 1883.
 - 11) H. Ihara, T. Yoshinaga, Y. Motozato, C. Hirayama, *Polym. J.*, **17**, 1301(1985).
 - 12) C. Hirayama, H. Ihara, *J. Chromatogr.*, **347**, 357 (1985).

- 13) セルロース球状ゲルは現在セルロファインとして市販されているが, 最大排除限界分子量 (ポリ(オキシエチレン)として) は 7×10^4 である。
- 14) すでに逆相液体クロマトグラフィー用充填剤としての応用¹⁵⁾が確認されている。
- 15) C. Hirayama, H. Ihara, T. Yoshinaga, H. Hirayama, Y. Motozato, *J. Liq. Chromatogr.*, **9**, 945(1986).
- 16) R. Bauer, *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektuonskr. Hyg. Abt 2*, **98**, 138(1938).
- 17) 太田和子, 宮本裕美, 河原一男, *Polym. Preprints. Jpn.*, **28**, 525(1979).

ル)¹⁸⁾水溶液に加え、パドル型攪拌子を用いて激しくかきまぜ懸濁させた。所定温度でジクロロメタン臭がなくなるまでかきまぜたのち、吸引濾別および水で十分に洗浄した。かきまぜ速度は生成物の直径が $44\sim 105\ \mu\text{m}$ になるように適宜調節した。

得られたプルラントリアセテートの球状体を $3\ \text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ 水酸化ナトリウムメタノール水溶液 (メタノール: 水=9:1) に懸濁させ、室温で 17 時間以上かきまぜてけん化した。これをすばやく濾取し、ジメチルスルホキシド/アセトン混合溶媒中に懸濁させた。所定量のエピクロロヒドリンを加え、 60°C で 24 時間、ゆっくりとかきまぜた。得られた橋かけプルラン球状体を濾取したのち、アセトン/水混合溶媒および水で十分に洗浄した。JIS 規格のステンレススチール製のふるいを用いて $44\sim 105\ \mu\text{m}$ の粒子径をもつフラクションを集め、水中で保存した。

2.2 膨潤度の測定

合成したプルラン球状体の水に対する膨潤度 (S_d , wet-ml/dry-g) の測定法は既報⁹⁾と同様である。

2.3 ゲルクロマトグラフィー (GPC)

GPC は溶出液に蒸留水を用いて既報¹⁹⁾の方法で行なった。溶出試料は合成したプルラン球状体の分別領域に応じてポリ(オキシエチレン) (分子量 350 万, 200 万, 120 万, 99.6 万, 85 万, 59.4 万, 28 万, 25.2 万, 14.5 万, 86000, 73000, 40000, 28500, 22500, 10350, 3520, 3232, 1106, 740, 450, 240, 106) の標準試料およびエチレングリコール, 重水, メタノール, 1-ブタノールを用いた。試料濃度は特殊な場合を除いてすべて 0.5 wt% とした。得られた溶出曲線のピーク溶出量とその分子量の関係から既報¹⁹⁾²⁰⁾にしたがって校正曲線を作製し, 排除限界分子量 (M_{lim}) および空孔率を求めた。空孔率 (P_{or}) は重水が浸透できる分配係数として次式で表わした。

$$P_{or} = \frac{V_{D_2O} - V_0}{V_t - V_0} \times 100 (\%)$$

ここで V_0 は排除体積, V_t はカラム床体積, V_{D_2O} は重水の溶出体積を示す。

3 結果と考察

3.1 プルランの球状化

プルランの球状化は, 原理的には, 独自技術⁹⁾²¹⁾である懸濁粒子からの溶媒の除去によって行なわれる。したがって調製される粒子の径は, 球状化の初期過程において形成される懸濁粒子の径がかきまぜ速度および懸濁媒体あるいは懸濁体 (プルラントリアセテート溶液) の粘度に依存するので, これらを調節することによって目的とする大きさの球状体得られる。本研究においては, 懸濁媒体の粘度は部分けん化ポリ(ビニルアルコール)水溶液を用いて一定とし, おもにかきまぜ速度を調節して粒径を制御した。一般に水系 GPC 用充填剤は特殊なものを除けば $44\sim 105\ \mu\text{m}$ の粒子として市販されているが, 分離能にかかわる理論段数を考慮すれば粒径は $5\sim 10\ \mu\text{m}$ が最適とされている。しかしなが

Fig. 1 Typical electron micrographs of pullulan spheres

Scale bars, $5\ \mu\text{m}$

ら, 粒径が小さくなると送液時の圧力がいちじるしく増大し, また高度な充填技術も必要となる。本研究は, プルランをマトリックスとする網状化球状体の基本特性を調べることを目的としているので, 粒径は取り扱いのもっとも簡便な $44\sim 105\ \mu\text{m}$ とした。なお, $44\ \mu\text{m}$ 以下の球状体も懸濁媒体の粘度を増大させるか, あるいはかきまぜ速度を増大させることによって容易に成し遂げられた。

懸濁蒸発法によって球状化されたプルラントリアセテートは, 球形を破壊しない条件下, すなわち良/貧混合溶媒中でけん化および橋かけが通常の方法で行なわれた。後に述べるように良溶媒の含量が増大すると粒子は膨潤するので粒子中の網状構造も広がり, GPC における分別領域が変化する。図 1 は得られたプルラン球状体の代表的な走査型電子顕微鏡写真であり, 球状でかつマクロポーラス型であることは明白である。

3.2 プルラン球状体の GPC 特性

分別可能領域, 排除限界分子量 (M_{lim}) および空孔率 (P_{or}) におよぼす合成条件の影響を球状化および橋かけの両過程に分けて検討した。

3.2.1 球状化条件の影響: プラントリアセテートの球状化は, 懸濁粒子中のジクロロメタンの蒸発にともなってプルラントリアセテートが網状構造を形成しながら粒子中に析出することによって行なわれているものと考えられる。それゆえ, その析出速度に影響をおよぼすと考えられる球状化温度およびプルラントリアセテートの初期濃度に関して検討した (なお, 橋かけ条件はジメチルスルホキシド (DMSO)/アセトン=1/1, エピクロロヒドリン濃度 $0.78\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ と一定にした)。

図 2 に代表的な GPC の校正曲線を, 表 1 にこれから得られる排除限界分子量 (M_{lim}) および空孔率 (P_{or}) をまとめた。図 2 から明らかなように, 調製条件によって校正曲線の形状は異なる

18) 日本合成化学製 GH-20: けん化度 86.5~89.0 mol%, 粘度 $40\sim 46\ \text{cP}$ 。

19) 平山忠一, 本里義明, 日化, 1975, 1352。

20) K. A. Granath, P. Flodin, *Makromol. Chem.*, 48, 160 (1961)。

21) 本里義明, 平山忠一, 特公昭 52-36, 917 (1977)。

Fig. 2 Typical calibration graphs of GPC for pullulan packings sphered with various concentration

- : P-52 spheres (1.1 wt%)
 —●— : P-42 spheres (1.5 wt%)
 —△— : P-12 spheres (3.7 wt%)

The values in parentheses stand for the initial concentration of pullulan triacetate in the sphering process

All measurements were made by use of a 300×5 mm i.d. glass column

ものの、プラン球状体が GPC の基本特性を有することがわかる。排除体積 (V_0) は充填状態によっても影響されるが、45% 以下と良好な値が得られている。

表 1 に示すように GPC の性能に直接関係する M_{lim} および空孔率の各値は、プルラントリアセテートの初期濃度および蒸発温度にいちじるしく依存した。たとえば蒸発温度 30°C の場合、 M_{lim} は濃度の低下にとともに 2000 から 850000 まで 425 倍に、空孔率は 67% から 95% に増大した。一般に巨孔化および多孔化は球状化の過程において希釈剤を添加し、最終的にこれを抜き取ることによって行なわれる。したがって希釈剤を使用しない場合、得られる球状体の M_{lim} および空孔率は小さい。たとえば M_{lim} に関しては、セルローストリアセート⁹⁾ およびポリ(γ-メチル=ε-グルタマート)¹²⁾ の場合、それぞれ 760~1900 および 200 である。とくに後者は球状化のさいの自己凝集力が強いために空孔率も 20% 以下になる。プルラントリアセートの異常な巨孔化および多孔化現象は解明されるべき重要な性質であるが、現段階ではその機構は不明である。しかしながらプルラントリアセートは懸濁液滴中の濃度を低くすることにより、セルロースやポリ(γ-メチル=ε-グルタマート)あるいはポリ(ビニルアルコール)では、不可能であった巨孔化が容易に行なわれることは明らかであり、これにより本研究の目的がほぼ達成された。蒸発温度の効果はより複雑で濃度効果にくらべて系統性が低いが、プルラントリアセートの初期濃度が高い (3.0~3.7 wt%) 場

Table 1 Relationship between the sphering conditions and the values of M_{lim} , porosity and k_{Bu}/k_{Me}

No.	Temp. of suspension (°C)	Concn. of pullulan triacetate (wt%)	M_{lim} for POE ^{a)}	Porosity (%)	k_{BuOH}/k_{MeOH}
P-11	0	3.7	1100	65	1.1
P-12	30	3.7	2000	67	1.3
P-13	38	3.7	15000	67	1.3
P-21	0	3.0	4000	58	1.3
P-22	30	3.0	15000	66	1.2
P-23	38	3.0	15000	66	1.3
P-31	0	2.2	20000	75	1.1
P-32	30	2.2	20000	74	1.1
P-33	38	2.2	20000	66	1.2
P-41	0	1.5	50000	64	1.1
P-42	30	1.5	70000	75	1.2
P-43	38	1.5	50000	72	1.2
P-51	0	1.1	150000	26	1.3
P-52	30	1.1	850000	95	1.0
P-53	38	1.1	300000	95	1.1

Acetone/DMSO=1.0, Epichlorohydrin 0.78 mol·l⁻¹.

k_{Bu}/k_{Me} stands for the ratio of the elution volume of 1-butanol to methanol subtracted V_0 .

a) Poly(oxyethylene).

合には M_{lim} に、初期濃度が低い (1.1~1.5 wt%) 場合には空孔率に影響するといえる。おそらく、蒸発温度がジクロロメタンの沸点 (38°C) より十分低い場合には、球状化時により密に凝集して M_{lim} および空孔率を低下させるものと推察される。

GPC において充填剤と基質との相互作用、とくに水系では疎水的な相互作用が存在することは好ましくない。本研究では、メタノールとそれより疎水的な 1-ブタノールの溶出位置を比較することによって疎水的な吸着挙動を評価した。 k_{Bu}/k_{Me} はメタノールに対する 1-ブタノールの分離係数を表わすが、いずれの球状体においても約 1.0~1.3 で、1-ブタノールの吸着が非常に小さいことがわかる。

以上の結果により、プランは水系 GPC 用素材として有用であることが実証された。

3.2.2 橋かけ条件の影響: 橋かけ反応は DMSO/アセトンの組成およびエピクロロヒドリン (ECH) の量を変化させて検討した。図 3 に代表的な校正曲線を、表 2 に M_{lim} 、空孔率および k_{Bu}/k_{Me} をまとめた。なお、球状化条件は 3.2.1 でもっとも高い M_{lim} および空孔率が得られた P-52 の調製条件に固定して行なった。

橋かけ媒体中のアセトンの比率が高くなると M_{lim} は 100 万から 3.5 万まで約 1/30 に低下した。これはプランに対してアセトンが貧溶媒であるため、収縮した条件下で橋かけが進行したものと考えられる。一方、DMSO によって膨潤された条件下においても橋かけ剤である ECH の量が増加すると M_{lim} はいちじるしく低下 (最大 1/200) した。したがってプラン球状体の橋かけ反応は単純にプランの網目構造を橋かけ微細化するものと考えられる。この結果は自己凝集力の強いセルロースの場合⁹⁾と異なっている。セルロースは、その強い分子間水素結合によって未橋かけ体においても水に不溶であるが、これをエピクロロヒ

Fig. 3 Typical calibration graphs of GPC for pullulan packings crosslinked with various conditions

—○—: P-54 spheres
—●—: P-57 spheres
—△—: P-554 spheres

All measurements were made by use of a 300×5 mm i. d. glass column.

Table 2 Relationship between the crosslinking conditions and the value of M_{lim} , porosity and k_{Bu}/k_{Me} ^{a)}

No.	Acetone/ DMSO (mol· ml ⁻¹)	Concn of ECH ^{b)} (mol· l ⁻¹)	M_{lim} for POE	Poro- sity (%)	k_{Bu} / k_{Me}
P-54	0.67	0.78	1000000	84	1.1
P-52	1.0	0.78	850000	95	1.0
P-551	1.5	0.62	1000000	83	1.1
P-552	1.5	0.78	1000000	83	1.1
P-553	1.5	0.94	10000	68	1.2
P-554	1.5	1.1	5000	64	1.3
P-56	2.3	0.78	170000	76	1.1
P-57	4.0	0.78	50000	80	1.1
P-58	9.0	0.78	35000	77	1.1

a) Sphering conditions: 30°C, 1.1 wt% of pullulan triacetate.

b) Epichlorohydrin.

ドリンを用いて橋かけすると M_{lim} は増大する。ただしさらに橋かけ処理を施すといくらか低下するが、未橋かけ体の M_{lim} より小さくならない。この現象は、セルロースを一部橋かけすることによって水素結合が破壊され、かえってセルロースの網目構造が大きくなり、 M_{lim} が増大するものと理解されている⁹⁾。すなわちセルロースでは、このことが高い M_{lim} を得にくい原因となっており、プルランにおいて容易に高い M_{lim} が達成されることと対照的である。

3.3 GPC における耐流速性

耐流速性は同じ条件下で充填されたカラムに対して、流速と圧力増加の関係から議論した。比較として市販の Sephadex, Sepha-

Fig. 4 Relationship between flow-rate and pressure drop for P-41 spheres

—○—: P-41 spheres (M_{lim} , 50000)
—●—: Sephadex G-50 m (M_{lim} , 10000)
—△—: Sephadex G-150 m (M_{lim} , 150000)
—▲—: Bio-Gel P-30 (M_{lim} , 50000)

All measurements were made by use of a 150×8 mm i. d. metal column packed with gels ranging from 44 to 105 μ m in diameter.

Fig. 5 Relationship between flow rate and pressure drop for P-552 spheres

—○—: P-552 spheres (M_{lim} , 1000000)
—●—: Sephadex G-150 m (M_{lim} , 150000)
—△—: Sepharose 4 B (M_{lim} , 3000000)

All measurements were made by use of a 150×8 mm i. d. metal column packed with gels ranging from 44 to 105 μ m in diameter.

rose および Bio-Gel P 型を用いた。図 4 および 5 に示されるように、P-41 (M_{lim} , 5000) および P-552 (M_{lim} , 1000000) 球状体は、同等かあるいはそれ以下の M_{lim} をもつ市販の充填剤より、低圧下で高い流速を達成しうることは明らかである。一般に

Table 3 Comparison of P-552 with P-54 spheres

No.	M_{lim} for POE	Porosity (%)	Sd $\frac{wet-ml}{dry-ml}$	Maximum of flow rate ($ml \cdot min^{-1} \cdot cm^{-2}$)	Crosslinking concn. ($mol \cdot l^{-1}$)	Medium Acetone/ DMSO
P-552	1000000	83	7.9	3.2	0.78	1.5
P-54	1000000	84	9.0	1.7	0.78	0.67

M_{lim} が高くなると機械的強度ならびに耐流速性が低下するのでプルラン球状体が高速液体クロマトグラフィー用充填剤としてすぐれていることがわかる。

また, 3.2.2 で述べたように橋かけ処理時の溶媒の極性を調節することにより, M_{lim} を制御することができるが, アセトン/DMSO の比が 0.67 から 1.5 までの間では M_{lim} はほとんど変化しない(表3参照)。しかしながら, 膨潤度(Sd)を比較すると, より高い流速を達成しうる P-552 球状体で小さな値が得られている。この現象は市販の耐流速性の低い充填剤と比較するとさらに明確となる。 M_{lim} 700 以下の Sephadex G-10 の Sd はわずか 2~3 とされているが, M_{lim} 800000 の Sephadex G-200 では Sd は 30~40 となる²²⁾²³⁾。すなわち, 市販の水系充填剤の

ほとんどは, 高い M_{lim} を達成するために膨潤多孔(巨孔)性のゲルが使用されている。したがってプルラン球状体の耐流速性能はより小さな膨潤性に起因していると考えられる。

4 結 論

プルランをマトリックス素材とした多孔質球状体が独自技術によって初めて調製され, つぎのような結果を見いだした。

懸濁蒸発法による球状化とエピクロロヒドリンによる不溶化によって GPC に適した目的とする粒径および多孔度を有する球状体を得られた。排除限界分子量においては $10^3 \sim 10^6$, 空孔率において 60~95% が達成された。このプルラン球状体は疎水吸着のような基質との異常吸着現象を示さず, さらに, 市販の水系 GPC 用充填剤にくらべて高流速での使用に耐えることができる。これらの好結果はプルランの化学構造および製造過程において膨潤度が低く抑えられたことに起因するものと考えられる。

本研究の一部は文部省科学研究費(一般B)によって行なった。

Preparation of Pullulan Spheres for High-speed Gel Chromatography in an Aqueous System

Yoshiaki MOTOZATO, Hirotaka IHARA, Takashi TOMODA and Chuichi HIRAYAMA*

Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Kumamoto University;
Kurokami, Kumamoto-shi 860 Japan

The sphering of pullulan and its application to aqueous gel chromatography as a packing material were studied for the first time in the world. Pullulan spheres were prepared by the sphering of pullulan triacetate by means of the suspension and evaporation method, followed by the saponification and the crosslinking with epichlorohydrin. By adjusting the preparation conditions, pullulan spheres with the exclusion molecular weight 10^3 to 10^6 can be produced. In addition, the packing exhibits almost no interactions with sample substances, e.g. poly(oxyethylene) and pressure-resisting property. These favorable properties are attributable to the molecular structure of pullulan and the low swellig degree of pullulan spheres.