分離分析のための分子ふるいに関する研究 (第 2 報¹⁾) Sephadex 膨潤ゲルの
界面動電的性質と色素, ペプチド類のゲル透過における挙動との関係

松本 潮, 長瀬雄三, 棚田成紀
東京薬科大学²⁾

Studies on Molecular Sieving for Separation Analysis. II.¹⁾ Relation
between Electrokinetic Properties of Swollen Sephadex Gel and
Gel Filtration Behaviour of Several Dyes and Peptides

USHIHO MATSUMOTO, YUZO NAGASE and SEIKI TANADA
Tokyo College of Pharmacy²⁾

(Received November 25, 1969)

Electrokinetic potential of Sephadex G-10, -15, -25, -50, -75, -100, and -200 gel particles swollen with water was measured by the moving boundary electrophoretic method. Relationships were investigated between the ζ -potential and characteristics of swelling process in the xerogels, and elution parameters of several food dyes and peptides in gel filtration.

It was found that the Sephadex gel particles have negative ζ -potential and its values increased in proportion to the increase of G-numbers, namely, water regain of the gels. This finding suggested that the values of ζ -potential was mainly related to the swelling degree of the gels. A different property between lower and higher G-number gels was shown on the basis of distinctive linear relationships between ζ -potential and swelling characteristics of the xerogels such as effective diffusion coefficient of water.

Elution parameters observed in gel filtration of peptides increased relatively to the values of ζ -potential, while the those of several food dyes decreased through adsorption.

前報¹⁾において架橋デキストラン (Sephadex) のキセロゲルについて 2, 3 の物性を調べ, その膨潤過程における水の有効拡散係数などの特性値と膨潤ゲルを用いてのゲル透過時における溶質の挙動, たとえば色素やペプチド類の溶出液量などとの相関性を求めた。さらに G-10, 25 など低 G ナンバーの Sephadex と G-100, 200 など高 G ナンバーのものとは, その膨潤過程の物性やゲル透過時の特性において明らかな傾向の差異が認められることを報告した。

膨潤した Sephadex ゲルの性質に関して, Joustra³⁾ はカラムに充填した Sephadex について溶出時の水圧と溶出液の流速との関係を求め, 圧力に比例して G-25 では流速が速くなるが G-200 では逆に遅くなることを指摘した。そのほか安定性,⁴⁾ 熱安定性,⁵⁾ 密度⁵⁾ などについての報告はあるけれども, 溶質の溶出結果を考察するのに利用できる膨潤ゲルの物性値はゲルの保有水量以外ほとんど提出されていない。またゲル実質の有するわずかな負の極性^{6,7)} が問題にされることもあるが, ゲルとしての Sephadex の性質についてはまだ明確にされていない部分が多い。

そこで著者らは Sephadex の膨潤ゲル粒子について, コロイド粒子界面の電荷密度や, ある種繊維の膨潤度の

1) 第 40 回日本生化学会大会で一部発表, 大阪, 1967 年 11 月。第 1 報: 松本 潮, 長瀬雄三, 棚田成紀, 薬誌, 90, 230 (1970)。

2) Location: No. 600, Kashiwagi-4-chome, Shinjuku-ku, Tokyo.

3) M. K. Joustra, "Gelchromatographie," ed. by H. Determann, Springer-Verlag, Berlin, 1967, p. 50.

4) H. J. Cruft, *Biochim. Biophys. Acta*, 54, 611 (1961).

5) P. Flodin, Dissertation, "Dextran Gels and their Applications in Gel Filtration," AB Pharmacia, Uppsala, 1962.

6) B. Gelotte, *J. Chromatog.*, 3, 330 (1960).

7) J. Porath, *Biochim. Biophys. Acta*, 39, 193 (1960).

部 験 実

Helmholtz-Smoluchowski の式¹⁰⁾

$$\xi = 150 v/E \quad (2)$$

E: electrodes (Ag-AgCl)
G: Sephadex gel suspension
B: branch tube for filling of swollen Sephadex
S: side tube for subelectrodes

11) H.M. Burlage, C.O. Lee, L.W. Rising, "Physical and Technical Pharmacy," McGraw-Hill, Inc., New York, 1963, p. 415.

現象を説明したい。なぜならば、G-200 よりも G-10 のほうが膨潤ゲルの密度が大であるからゲルの単位体積当りの負の電荷も比例して大きくなり、実験結果とは逆に $G-10 > G-200$ となるはずである。著者らは別に Sephadex をベンゼンアゾジフェニルアミンを指示薬として n -ブチルアミンのシクロヘキサン溶液で滴定し、固体酸としての酸性度の測定を試みた。その結果はどの G ナンバーのものでもブランク値と大差なく、Sephadex の全酸量の値は $9.0 \times 10^{-2} \mu\text{eq/g}$ 程度の微少な値しか得られず、非水滴定法では認めうるほどの酸性度が示されなかった。この知見からも ζ 電位の値がゲルの酸性度に対応するとは考えがたい。

ゲルの W_r の差に対応して G-10 では膨潤ゲル粒子の密度 $d=1.23$ に比べて G-200 では $d=1.02^{20)}$ と小さくなることから、 ζ 電位の値がゲルの W_r の増大とともに増加する傾向を次のように解釈した。すなわち、Sephadex ゲルの ζ 酸位がゲル粒子の膨潤度と相関し、その指標となりうるものと考えた。いま、粒子の半径を r 、粒子に固定された液層およびイオン雰囲気を含めた球の半径を r_1 、粒子の電荷を e 、分散媒の誘電率を ϵ とするとき、球状粒子の ζ 電位は一般に次式によって表わされる。

$$\zeta = \frac{e}{\epsilon} \left(\frac{1}{r} - \frac{1}{r_1} \right) \quad (3)$$

(3) 式において媒質が純水で ϵ は一定、前記の非水滴定の結果から e は G ナンバーの相違とは無関係であり、また ζ 電位は粒子自身の大きさには一応関係しないとされている。これらのことから、粒子の周囲の拡散二重層中のより強固な吸着層 (Stern の固定層) の厚さ ($r_1 - r$) は、高膨潤性ゲルのほうがゲルの支持構造に固定され不動化した構造水の量 (V_i に近似する) に対応して低膨潤性ゲルよりも当然大となるために、ゲルの膨潤度は Stern 層の厚さの大小を介して、Sephadex ゲル粒子の ζ 電位の値と相関するものと考えられる。

2. ζ 電位と膨潤過程の特性値との関係

前報¹⁾ で求めた $D_{\text{eff}}^{\text{H}_2\text{O}}$ や平衡膨潤容 Q_m はキセロゲル態の Sephadex が膨潤する過程についての特性値であったが、これらの値は膨潤ゲル粒子の ζ 電位と密接に関連しているものと考えられる。各 G ナンバーのゲルの ζ 電位に対して $\log D_{\text{eff}}^{\text{H}_2\text{O}}$ または Q_m の値をプロットすると Fig. 3 が得られた。これらのプロットは G-25 または G-50 を折れ曲り点とする異なった直線関係を示し、前報および本報の 1. で指摘した低膨潤性・高膨潤性の 2 グループに Sephadex が大別されるとの知見と一致した。

Fig. 2. Water Regain vs. ζ -Potential in Water

(1): Sephadex G-10, (2): G-15, (3): G-25, (4): G-50, (5): G-75, (6): G-100, (7): G-200

Fig. 3. $\log D_{\text{eff}}^{\text{H}_2\text{O}}$, Q_m vs. ζ -Potential in Water

(1): Sephadex G-10, (2): G-15, (3): G-25, (4): G-50, (5): G-75, (6): G-100, (7): G-200

Fig. 4. ζ -Potential of Gel Particles *vs.* Elution Parameters for Several Peptides in Water

(1): Sephadex G-10, (2): G-25, (3): G-50, (4): G-100, (5): G-200
 ○: oxytocine, ●: lysine-vasopressin, △: pteroyl-glutamic acid, ▲: insulin, □: Gly-Phe, ■: Gly-Try, ⊠: Gly-Gly-Gly

Fig. 5. ζ -Potential of Gel Particles *vs.* Elution Parameters for Several Food Dyes in Water

(1): Sephadex G-10, (2): G-25, (3): G-50, (4): G-100, (5): G-200
 ○: F.B. 1, ●: F.G. 2, △: F.G. 3, ▲: F.G. 1, □: F.V. 1, ■: F.R. 3

3. ζ 電位と色素, ペプチド類のゲル透過における挙動との関係

グリシルペプチド類, oxytocine など若干の低・中分子量ペプチド類の溶出パラメーター各種と ζ 電位とのプロットを Fig. 4 に示した。ペプチド類における ζ 電位の値と溶質の V_e , V_e/V_t , K_{av} との関係は, 溶出パラメーターの種類にかかわらずほぼ同じような傾向が得られた。なお溶出パラメーターとして V_e/V_o や K_d を用いても, 同様の関係が認められた。前報¹⁾における $\log D_{50}^{50}$ と溶出パラメーターとのプロットよりも, 上記のように ζ 電位に対してプロットしたほうが, ゲルの膨潤特性と溶質の溶出パラメーターとの相関性は一層明瞭である。すなわち, 各 G ナンバーのゲルカラムからこれらのペプチド類を溶出すれば, その分配係数 K_{av} の値はゲル粒子の ζ 電位に対応して増大する。

Fig. 5 には水溶性色素類について, ペプチド類と同様にプロットした結果を示した。ペプチド類では Fig. 4 のように膨潤 Sephadex のゲル粒子が示す ζ 電位の値の増大, すなわち G ナンバーの増加にしたがって一様に V_e も増大する傾向を示したのに対し, G-10 から G-50 の範囲では逆に V_e の減少の傾向を示す色素グループが認められる。これら Food Red 3 (F.R. 3), Food Violet 1 (F.V. 1), Food Green 1 (F.G. 1) の挙動に対しては, Food Blue 1 (F.B. 1) や Food Green 2 (F.G. 2) など 2 価アニオン型の色素に比べて, F.V. 1 や F.G. 1 など 1 価アニオン型色素はゲル実質の架橋デキストランへの本質的な吸着性が強いいため低膨潤性ゲルにおいて $K_{av} > 1$ となるものと考えられる。このことに関しては, 続報において等温吸着実験の結果から報告する。なお, Fig. 5 から 1 価アニオン型色素が G-50 あたりを境として折れ曲り点を有していることは, 前報¹⁾での $\log D_{50}^{50}$ 対溶出パラメーターのプロットでも示されたことであり, 低膨潤性ゲルと高膨潤性ゲルの質的な相異をここでも認めることができた。

次に, 分離分析を行なう立場から Fig. 4 と Fig. 5 をみれば, 本報で試料に用いた低・中分子量のペプチド類

を相互分離するには G-25 または G-50 が有利であり、色素類については 1 価アニオン型と 2 価アニオン型色素との分属には G-10 が、また 1 価と 2 価アニオン型色素を相互分離するには G-25 が有利なことなどがわかる。ここに用いた水溶性色素類の式量はいずれも 800 前後であり、これらを相互分離しようとするれば、Sephadex の G ナンバーごとに既知のいわゆる分画可能範囲ないしは exclusion limit の値からは G-10 が適当であると予想される。しかし上述のように G-25 の使用が有利な場合もある。前報¹⁾と本報で行なったように、Sephadex の膨潤に関するパラメーターと溶質の溶出パラメーターとの関係を求めることは、ある溶質の分離を目的とする場合の Sephadex 種類の選択にあたり実的な意義があると考えられる。