分離分析のための分子ふるいに関する研究 (第 3 報¹⁾) Sephadex ゲルの
膨潤と負の電荷に及ぼすリオトロブ系電解質の影響²⁾

松本 潮, 棚田成紀, 長瀬雄三
東京薬科大学³⁾

Studies on Molecular Sieving for Separation Analysis. III.¹⁾ Effects
of Electrolytes of Lyotropic Series on Swelling
and Negative Charges of Sephadex Gels²⁾

USHIHO MATSUMOTO, SEIKI TANADA and YUZO NAGASE
Tokyo College of Pharmacy³⁾

(Received January 16, 1970)

Effect of electrolytes on the swelling and the electrostatic properties of Sephadex gels was examined by measurements of ζ -potential of gel particles, effective diffusion coefficient (D_{eff}) in xerogels, and water regain (W_r) of the gels which had been swollen with aqueous solution of several potassium salts of lyotropic series.

It was revealed that the negative ζ -potential of the gel particles decreased in the order of water $\text{NCS}^- > \text{Cl}^- > \text{OAc}^- > \text{Cit}^{3-} > \text{SO}_4^{2-}$, according to Hofmeister's lyotropic series of the anions, whereas D_{eff} values increased in the order of water $\text{NCS}^- < \text{Cl}^- < \text{SO}_4^{2-}$. The values of water regain of the gels decreased distinctly in the presence of high concentrations of sulfate. In the presence of electrolytes, swelling of Sephadex gels of G-series was assumed to be restricted by the accompanying sealing of the negative charge.

親水性ゲルを用いるパーミエーションクロマトグラフィー (ゲル濾過法) において、媒質に添加された電解質の影響については経験的な知見が断片的に指摘されている。ゲルを使用した分子ふるいクロマトグラフィーの端緒となった Lathe ら⁴⁾の研究では、熱湯で膨潤させたでんぷん粒の膨潤度をチオシアン酸塩を添加して調節することにより、分子ふるいとしての分画可能範囲を変化させている。架橋デキストラン (Sephadex) ゲルに対する電解質添加の影響は、ゲル濾過における分子ふるい効果以外の異常現象であるイオン排斥に基づく溶質の分配係数 K_d の低値や、吸着ないしは収着に起因する高値を $K_d=1$ に近づけ、上記の二次的な効果を解消させる実用面で取り扱われている。このような目的では多くの実例が報告されているが、現象の機構に及んで系統的に検討する試みは行なわれていない。Gelotte⁵⁾は Sephadex G-25 で塩基性アミノ酸やアルカロイドをゲル濾過するとき溶離液として純水を用いると、これらの塩基性溶質は溶出が遅れて $K_d > 1$ となるが塩化ナトリウム水溶液を用いれば $K_d \approx 1$ を示すことから、ゲル中にはわずかながらカルボキシル基が混在し、これが上記の有機カチオンと Na^+ とのイオン交換吸着を営むものと考えている。

ゲル濾過の溶離液に添加された電解質はゲルと試料溶質との双方に影響する結果が溶質の挙動として現われるわけであるが、本報ではゲル側に及ぼす電解質の影響について二、三の検討を加えた。著者らは前報¹⁾で Sephadex ゲル粒子が純水中で負の ζ 電位を示し、その値はゲルの G ナンバー、換言すればゲルの保有水量 W_r の増加に比例して増大することから、 ζ 電位はゲルの膨潤度と相関し、その指標となることを報告した。本報では親水性コロイドの電解質による凝集などの現象に関連して、電解質イオンの脱水和作用ないし塩析・塩溶効果の強弱の序列として知られているリオトロブ系列に注目し、この系列の電解質陰イオンが Sephadex ゲルに

1) 第 2 報: 松本 潮, 長瀬雄三, 棚田成紀, 薬誌, 90, 236 (1970).

2) 日本薬学会第 89 年年会で一部発表, 名古屋, 1969 年 4 月.

3) Location: 600, Kashiwagi-4-chome, Shinjuku-ku, Tokyo.

4) G.H. Lathe, C.R.J. Ruthven, *Biochem. J.*, 62, 665 (1956).

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

及ぼす影響を調べた。KNCS, KCl, K_2SO_4 , 酢酸カリウム (KOAc), クエン酸カリウム (K_3Cit) の水溶液中で膨潤させたゲル粒子の負の ζ 電位は, これらの陰イオンのリオトロップ系列に従って減少した。その原因として, 媒質に添加された電解質はゲルの負の電荷を遮蔽するとともに, 陰イオンの脱水和性によってゲルの膨潤を抑制することを認めた。

実験の部

1. 試料 Sephadex G-10, 15, 25, 50, 75, 100, 200 を使用し, 粒度, Lot No. は第 1 報⁶⁾ で用いたものとすべて同一である。

2. ζ 電位の測定 電解質濃度が高いと分極に伴って ζ 電位の値がゼロに収斂していく傾向を示したので, G ナンバーによる ζ 電位の差異がよく表われる 0.001F 濃度を選び, KNCS, KCl, KOAc, K_3Cit , K_2SO_4 水溶液中で膨潤したゲル粒子の ζ 電位を前報¹⁾ と同様にして測定した。ただし本報では両端電圧として 1620—1760 ボルトを負荷した。

3. キセロゲルにおける膨潤媒の有効拡散係数の測定 0.1F KNCS, KCl, K_2SO_4 水溶液を媒質とし, 他は第 1 報⁶⁾ と全く同様にして測定した。

4. ゲルの W_r の測定 ゴムパッキングでミリポアフィルター (0.8μ) を固定したネジ込み式の網底を有する外径 17, 内径 12, 高さ 20 mm のスチロール樹脂製円筒 (a 部) に, G ナンバーに応じて 0.05—0.3 g のキセロゲルを精密に量り, a の底部を媒質中に浸して十分に膨潤させる。媒質としては純水, KCl, K_2SO_4 の飽和水溶液 (25°) を使用した。a 部をポリエチレン製遠心管 (b 部) にはめ込み, まず 1000 rpm で 10 分間遠心分離して膨潤ゲル粒子に付着している媒質の一部を b 部へ除去, b 部からはずした a 部を秤量する, ふたたび a 部を b 部に取り付け, 2000 rpm で遠心分離して同様に操作し, 以下 1000 rpm ごとに 8000 rpm まで繰り返す。各回転数ごとの重量変化をプロットして Fig. 1 を得, 図には数例を示すにとどめたが G ナンバー, 媒質の種類により若干の相違はあっても, ゲルの減量曲線の折れ曲り点はすべて 2000—3000 rpm の間に認められた。折れ曲り点における重量から容器 a とキセロゲルの重量を減じて吸水量を求め, キセロゲル 1 g あたりの値に換算して W_r とした。

Fig. 1. Changes in the Weight of Swollen Cross-linked Dextran Gels by Centrifugation (for 10 Min at each rpm)

—○—: with water, —●—: with saturated K_2SO_4 solution

結果および考察

リオトロップ系陰イオンとゲルの膨潤性

純水中で膨潤させた Sephadex のゲル粒子が負の ζ 電位を示し, その値はゲルの膨潤度の高低に比例して増減することを前報¹⁾ で報告した。この ζ 電位に及ぼす陰イオンの影響を調べるために KNCS, KCl, KOAc, K_3Cit , K_2SO_4 の各 0.001F 水溶液中で膨潤させた G-10, 15, 25, 50, 75, 100, 200 のゲル粒子の ζ 電位を Table I に示した。各 G ナンバーのゲル粒子はいずれも負の ζ 電位を示し, その絶対値は純水中での対照値に比べて低下し, 高 G ナンバーのゲルよりも低 G ナンバーのものほど顕著に減少する。また ζ 電位の低下は, どのゲル種についても $SO_4^{2-} > Cit^{3-} > OAc^- > Cl^- > NCS^-$ なる傾向が認められ, これは陰イオンのリオトロップ系列に一致している。両者の結果, 共存 SO_4^{2-} の影響として G-10 では ζ 電位の絶対値が純水中での値のほぼ 1/10 に減少するのに対して, G-200 においては純水中での約 1/2 の低下にとどまる。

ゾルの凝集に関して, 一般に媒質中に添加された電解質は, ゾル粒子の表面付近に存在して粒子の電荷とは反対の電荷の対イオンを増加させることによって媒質中の対イオンに及ぼす粒子の静電引力を遮蔽する効果を示す。同時に粒子の周囲の拡散二重層を圧縮しその厚さを減少することにより, 二重層内の固定層 (Stern 層) 内で主として起こる界面電位の降下に伴ない ζ 電位は低下するとされている。Sephadex ゲル粒子の ζ 電位が電解質の存在でリオトロップ系列に従って低下する Table I の傾向が, 単に上記のような拡散二重層の圧縮に基づくのか,

6) 松本 潮, 長瀬雄三, 棚田成紀, 薬誌, 90, 230 (1970).

TABLE I. ζ -potential of Cross-linked Dextran Gel Particles in Electrolyte Solutions (mV)

Sephadex type	Water	0.001 F				
		KNCS	KCl	KOAc	K ₃ Cit	K ₂ SO ₄
G-10	-2.33	-0.740	-0.426	-0.264	-0.208	-0.187
G-15	-2.73	-0.915	-0.636	-0.478	-0.208	-0.191
G-25	-4.14	-1.67	-0.911	-0.632	-0.354	-0.224
G-50	-14.3	-9.31	-4.28	-2.05	-1.80	-1.36
G-75	-16.6	-12.5	-10.2	-5.72	-3.66	-2.18
G-100	-18.2	-15.5	-12.5	-10.2	-6.70	-5.95
G-200	-31.2	-23.3	-20.3	-19.4	-18.3	-16.6

TABLE II. Logarithmic Values of Effective Diffusion Coefficient D_{eff} in Swelling Process of Cross-linked Dextran in Electrolyte Solutions (cm²/min)

Sephadex type	Water	0.1 F		
		KNCS	KCl	K ₂ SO ₄
G-25	-4.75	-4.66	-4.61	-4.55
G-50	-5.186	-5.150	-5.139	-5.122
G-100	-5.310	-5.287	-5.269	-5.249

電解質がゲルの膨潤性に影響し前報¹⁾で認められたゲルの W_r と ζ 電位の値との相関性から低下するのは明らかでない。これを検討するために Sephadex の膨潤過程の特性値に及ぼす電解質の陰イオンの影響を調べた。すなわち G-25, 50, 100 のキセロゲル (乾膠体) 3 種について、第 1 報⁶⁾の方法で KNCS, KCl, K₂SO₄ の各 0.1F 水溶液による膨潤過程での有効拡散係数 D_{eff} を測定した。

Table II に示すとおり D_{eff} の対数値は純水で求めた値に比べていずれも減少し、その傾向は $\text{SO}_4^{2-} > \text{Cl}^- > \text{NCS}^-$ の順に陰イオンのリオトロープ系列に従っている。 D_{eff} の値は時間 t における膨潤容 Q の平衡膨潤容 Q_m に対する比 Q/Q_m が 0.5 となる時間 $t_{0.5}$ から次式^{6,7)}により算出したものである。それゆえ D_{eff} の値の増

$$D_{\text{eff}} = 1.96 \times 10^{-5} / t_{0.5}$$

大はゲルの 50% 膨潤に要する $t_{0.5}$ が $\text{H}_2\text{O} > \text{NCS}^- > \text{Cl}^- > \text{SO}_4^{2-}$ の順となり、 SO_4^{2-} の共存によってもっとも短時間に膨潤平衡に到達し、また Q_m の値も最小になることを意味する。これらのことから、ゲル粒子の ζ 電位が陰イオンのリオトロープ系列に従って減少する現象は拡散二重層の圧縮と電荷の遮蔽によるだけでなく、ゲルの膨潤性もまた抑制される結果であることを示唆している。

ゲルの保有水量と ζ 電位

次に各 Sephadex の保有水量を表わす既知⁸⁾の値 W_r に対して、Table I に示した電解質水溶液中での各ゲル粒子の ζ 電位の値をプロットすると Fig. 2 が得られる。図から G-25 までと G-50 または 75 以上とで勾配は同じであるが異なった直線関係あるいは G-25 と 50 との間に折れ曲り点のある異なった直線関係として、 ζ 電位と W_r の値との相関性が示された。そこで前述した陰イオンによるゲルの膨潤性の抑制を例証するために、飽和 KCl, K₂SO₄ 水溶液中で膨潤させた Sephadex G-10, 25, 50, 100, 200 の W_r がどのように変化するかを調べた。飽和水溶液の使用は電解質の効果を拡大させるためである。実験の部 4. の方法で Fig. 1 の遠心回転数

7) I. Vavrukh, *Kolloid-Z. u. Z. Polymere*, **205**, 32 (1965).

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

とゲルの重量変化とのプロットにおける折れ曲り点での吸水量から求めた W_r の値, および飽和水溶液で膨潤させた上記の Sephadex をカラムに充填し Blue Dextran 2000 を溶出させて求めた粒子外水量 V_o の値を Table III に示した. 検討したどのゲル種についても純水中での値に比較して W_r は減少し, その影響は $\text{SO}_4^{2-} > \text{Cl}^-$ である. この効果は低 G ナンバーのゲルに比べて高 G ナンバーのものほど大きく表われている. 一方, ゲルカラムの V_o の値にはほとんど差異が認められなかった. Table III での SO_4^{2-} による W_r の明らかな減少はいわばゲルの低 G ナンバー化を意味し, 陰イオンによる ζ 電位の低下にはゲルの膨潤性の減少も寄与していることを支持する.

親水性ゾルに対する凝集能における陽イオンの種類による差は顕著ではないのに反して, コロイド粒子が正・負のいずれに帯電していても, 陰イオンではその影響が著しいことが知られている. リオトロブ系列は経験的な序列であり, 陰イオンについては $\text{Cl}^- > \text{tartrate} > \text{Br}^- > \text{I}^-$, $\text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{NO}_2^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{NCS}^-$ など対象によって若干の相違があるが, 一般には $\text{SO}_4^{2-} > \text{Cit}^{3-} > \text{tartrate} > \text{OAc}^- > \text{Cl}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{NCS}^-$ なる Hofmeister の系列が代表的である. 親水性コロイドの塩析では, 媒質中に添加された電解質が粒子の電荷を中和して凝集させると同時に脱水も行ない, 塩析力の強さは主としてイオンの水和性に依存すると考えられている. イオンの水和性の強弱は水和によるエンタルピー変化すなわちイオンの水和熱によって表われ, イオンの水和熱は結晶イオン半径の関数として求められることが指摘されている.⁹⁾ したがって, リオトロブ系列はイオンの水和熱の大小を示す序列と考えられる.¹⁰⁾ 陰イオンのリオトロブ系列の頭初に位置する親水性の SO_4^{2-} はもっとも脱水和的・塩析性で, 末尾に来る疎水性の NCS^- はもっとも水和的・塩溶性である.

Sephadex においてもゲルの支持構造 (ゲル実質) である架橋デキストラン鎖を構成する単量体単位と水和水を奪い合うことによって, 電解質のイオンは親水性ゲルの膨潤度に影響するものと考えられる. キセロゲルの膨潤に際して支持構造により不動化されてゲルを形成する内部水を含む多重水和層の一部を陰イオンが引き離すことにより, 陰イオンの水和性に従ってゲルの水和度すなわち膨潤度を低下させ, Table I ではゲル粒子の ζ 電位, Table II では膨潤過程における D_{eff} の値に対してリオトロブ系列に従った効果が表われている. Table III で認められた高膨潤性ゲルでの W_r の値の SO_4^{2-} による著しい減少は, 脱水和に基づくゲルの収縮を実証している.

Fig. 2. ζ -Potential vs. Water Regain in Various Electrolyte Solutions

(1): Sephadex G-10, (2): G-15, (3): G-25, (4): G-50, (5): G-75, (6): G-100, (7): G-200
W: water, T: 0.001F KNCS, Cl: 0.001F KCl, A: 0.001F KOAc, Ci: 0.001F K_2Cit , S: 0.001F K_2SO_4

TABLE III. Variation of Water Regain (W_r) and Column Void Volume (V_o) of Cross-linked Dextran Gels with Several Media

Sephadex type	W_r (g H_2O /g dry Sephadex)			V_o (ml) ^{a)}		
	Water	KCl ^{b)}	K_2SO_4 ^{b)}	Water	KCl ^{b)}	K_2SO_4 ^{b)}
G-10	1.100	1.098	0.989	4.40	4.54	4.54
G-25	2.720	2.695	2.505	4.55	4.54	4.61
G-50	6.820	6.670	6.020	4.32	4.35	4.39
G-100	12.40	12.10	10.95	4.35	4.40	4.47
G-200	21.90	21.15	18.30	4.45	4.54	4.76

a) determined as the elution volume of Blue Dextran 2000 from 0.8×24 cm column, total volume of the gel column $V_t = 12.05$ ml

b) aqueous solution saturated at 25°

9) R.M. Noyes, *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 513 (1962); E. Glueckauf, *Trans. Faraday Soc.*, **60**, 572 (1964).

10) D.F.C. Morris, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **6**, 295 (1958).

電解質のゲル粒子に対する電荷遮蔽効果

一方、媒質中に添加された電解質はζ電位により示されるゲル粒子の負の電荷を遮蔽する第二の効果によって、ζ電位の絶対値を低下させていると考えられる。このことは、検討した陰イオンのうちでゲルの水和をもっとも促進するはずの NCS^- の共存下でも、各 Sephadex ゲルのζ電位が純水中よりも低い値を示したことから推察できる。もし陰イオンの添加がゲルの膨潤性だけに影響するのであれば、親水性コロイドの塩析・塩溶に関する多くの実例から類推して、純水中でのζ電位は Cl^- または OAc^- の前後にあたる値を示すであろう。Sephadex ゲルに固定された負の電荷はゲル実質中に混在する微量 ($10-30 \mu\text{eq/g}$ キセロゲル) のカルボキシル基に原因すると一般に考えられているが、^{5,8,11)} 著者らは前報¹⁾ での非水滴定の結果ならびにゲルのζ電位と W_r との関係から、ゲル粒子の示す負のζ電位の成因でもあるこの負の極性は粒子の周囲の二重層中の OH^- を主とする電位決定イオンに基づくものと考えた。ゲル透過における分子ふるい効果以外の二次的現象のうち、純水溶出時に認められる塩基性物質の吸着と酸性物質の排斥 (Gelotte の B 効果,⁹⁾ イオン効果) が溶離液に電解質を添加すれば緩和、解除されるという経験的な現象は、本報での実験からゲル粒子の拡散二重層に由来する負の極性の電解質イオンによる遮蔽効果によるものとして説明できる。

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