分離分析のための分子ふるいに関する研究 (第 5 報¹⁾) Sephadex ゲルに
おける吸着現象とゲル実質の体積との関係

棚田成紀^{2a)}

東京薬科大学²⁾

Studies on Molecular Sieving for Separation Analysis. V.¹⁾ Relationship between
Adsorption Effects and Volume of the Gel Matrix of Sephadex Gels

SEIKI TANADA^{2a)}

Tokyo College of Pharmacy²⁾

(Received October 8, 1970)

Examinations were made on the effect of swelling characteristics of a gel on the different property between lower and higher G-number gels. Measurement was made on the volume of the gel matrix (V_g) of Sephadex G-10 to G-200 and Bio-Gel P-2 to P-100 to find the isotherm from adsorption of some dyes from aqueous solution.

The V_g value of Sephadex G-10 was about 16 times greater than that of G-200. G-series of Sephadex and P-series of Bio-Gel were divided into two groups from the markedly different V_g values between lower and higher G- or P-number gels.

Adsorption isotherm of food dyes was divided into three classes according to the shape of the initial slope of the curve; (1) S-2 curve for food red 3 on Sephadex G-10, (2) L-2 curve for food violet 1 on Sephadex G-10, and (3) constant partition curve for food blue 1 on Sephadex G-10, and for food violet 1, food red 3, and food blue 1 on Sephadex G-200.

既報^{3,4)} で架橋デキストラン (Sephadex) のキセロゲルの膨潤過程における水の有効拡散数などの特性値, 膨潤ゲル粒子について ζ 電位などの値を求め, これらと若干の色素類, ペプチド類の溶出パラメーターとの相関性について検討した。その結果, Sephadex G-10, G-25, G-50, G-100, G-200 が低膨潤性ゲルと高膨潤性ゲルとの 2 群に大別されることを述べた。低膨潤性と高膨潤性 Sephadex との相違はゲル透過における色素類やペプチド類の溶出挙動に対しても影響し, たとえば水溶性色素類において G-10 と G-200 カラムとでは次の点で著しい差異を認めた。すなわち 2 価アニオン型の酸性色素は Sephadex の膨潤度の増加にしたがってその溶出液量 V_e が増大するが, 1 価アニオン型の色素は吸着のため G-10 での V_e のほうが, G-200 よりも大となることを見いだした。このことは純水中だけでなく, 前報¹⁾ で述べたようにリオトロブ系列の電解質溶液中においても認められる。電解質溶液中では溶質相互の V_e の値の差が大きくなり, 低膨潤性ゲルと高膨潤性ゲルとの差異はいっそう拡大されることがわかった。

前報まで³⁻⁵⁾ の実験で膨潤物性ならびに試料の溶出挙動に関し, Sephadex G-10—G-200 が G-50 近傍を境として低膨潤性ゲルと高膨潤性ゲルとに 2 大別されることを見いだしたが, このような相違をもたらす要因については不明確であった。そればかりではなく, ゲル透過における吸着現象を含む二次的な現象の起こる機構に対しても低膨潤性ゲルと高膨潤性ゲルとにおいてみられる相違を積極的に説明することはできなかった。そこでゲル実質の体積 V_g の値および膨潤ゲルに対する数種の水溶性酸性色素類の吸着等温線を求めることによって, またポリアクリルアミドゲル (Bio-Gel P) についても V_g を求め, ゲルの質的な差異に及ぼす膨潤性の影響を追究

1) 第 4 報: 松本 潮, 長瀬雄三, 棚田成紀, 薬誌, 90, 1316 (1970).

2) Location: No. 600, Kashiwagi-4-chome, Shinjuku-ku, Tokyo; a) Present address: Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toyama University, No. 3190, Toyama-shi.

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

4) 松本 潮, 長瀬雄三, 棚田成紀, 薬誌, 90, 236 (1970).

5) 松本 潮, 棚田成紀, 長瀬雄三, 薬誌, 90, 486 (1970).

した。Sephadex G-10—G-200 および Bio-Gel P-2—P-100 の膨潤ゲル中でゲルの支持構造が占める体積をゲルの密度項を含む式から算出すると、たとえば G-10 は G-200 の約 16 倍大きい値を示し、しかもゲル実質の体積は顕著な差から低膨潤性・高膨潤性ゲルの 2 群に大別された。さらに液相における酢性色素類の吸着等温線を求めると、低膨潤性ゲルからの溶出が遅れる 1 価アニオン型の F.R.3 および F.V.1 は G-10 では S-2 型、L-2 型の吸着型、G-200 では分配型の等温線を与えるのに対して、溶出の遅れない 2 価アニオン型の F.B.1 は G-10, G-200 とともに分配型を示した。

実 験 の 部

1. 試料 Sephadex G-10, G-25, G-50, G-100, G-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。Bio-Gel P は P-2, P-4, P-10, P-30, P-100 を試料とし、粒度はいずれも 50—100 メッシュのものを用いた。

吸着等温線の測定に使用した色素類 food blue 1 (F.B.1) 式量 792.88, food violet 1 (F.V.1) 733.90, food red 3 (F.R.3) 897.91 は三栄化学工業の食品衛生法製品検査合格証つきの製品を使用した。

2. ゲルの比重 d の測定 Sephadex については既知⁶⁾ の値をそのまま用いた。Bio-Gel P については文献未知なので次のようにして求めた。空气中における比重びんの重さ M_0 (22.1462 g), これに Bio-Gel P を入れたときの重さを M_1 とする。蒸留水を加え湯煎してびん内の Bio-Gel P および蒸留水中の気泡が出なくなるのを確かめたのち、水で満たし、その重量を測り M_2 とする。次にびん内の Bio-Gel P および水を除き、蒸留水だけを満たしたときの重量を M_3 とする。25° における Bio-Gel P の見かけの比重は、

$$d = \frac{M_1 - M_0}{M_3 + (M_1 - M_0) - M_2}$$

ここで水の温度補正, 空気の浮力補正をして Bio-Gel P の真の比重 d を求めた。

なお, カラムサイズ (0.8×24 cm), ゲルの総体積 $V_t = 12.05$ ml のカラムから Blue Dextran 2000 (分子量 200 万) を溶出させ, その溶出液量をゲルの粒子外水量 V_0 として V_g の算出に用いた。

3. 膨潤ゲルに対する水溶性色素の吸着等温線 25±0.05° の恒温槽中に固定した装置の底部に膨潤ゲル (キセロゲルとして 0.5 g) を入れたのち, 恒温槽の温度になった色素水溶液 (0.1, 0.2, 0.5, 0.75, 1, 2, 3 g/liter 濃度のもの 10 ml ずつを使用) を入れてかき混ぜる。72 時間後溶液 5 ml をとり出し, 遠心分離して液相をゲルから分離し, その吸光度を測定する。標準溶液とした各色素水溶液の吸光度を検体の吸光度と比較してゲルへの吸着量を求めた。

結 果 お よ び 考 察

ゲル実質の体積の算出

ゲルの粒子内水量を V_i とするときカラム中のゲルの総体積 V_t は (1) 式で表わされる。⁷⁾

$$V_t = V_0 + V_i + V_g \quad (1)$$

試料溶質の分配係数 K_d ならびに K_{av} はそれぞれ,

$$K_d = (V_e - V_0) / V_i = (V_e - V_0) / a \cdot W_r \quad (2)$$

$$= (V_e - V_0) / W_r d / (W_r + 1) (V_t - V_0) \quad (3)$$

$$K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0) \quad (4)$$

ここで a はカラムに充填したキセロゲルの重量 (g), W_r は膨潤ゲルの保有水量 (水 g/乾燥キセロゲル g), d はゲルの比重である。(3), (4) 式において K_d , K_{av} それぞれについて $(V_e - V_0)$ 項が分子にあり, (2) 式の V_i 値と (4) 式の $(V_t - V_0)$ 値とを比較すれば, すなわち K_d 値と K_{av} 値とを比較することによって V_g 値を求めることができる。

(1) 式は次の (5) 式のようにも書くことができるから,

$$V_g = (V_t - V_0) - V_i \quad (5)$$

(2), (4), (5) 式から, もし $(V_t - V_0) \geq V_i$ ならば $V_g \geq 0$ であり, $V_g \geq 0$ であればすなわち $K_d \geq K_{av}$ となる。

従来 V_i を求めるために以下の算出が用いられている。

$$V_i = a \cdot W_r \quad (6)^{7,8)}$$

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

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

8) B. Gelotte, *J. Chromatog.*, **3**, 1330 (1960)

媒質の比重を d とすれば,

$$V_i = a \cdot W_r / d \quad (7)$$

膨潤状態で比重びんで求めたゲルの比重を d とすれば V_i は次のようにも示されている.

$$V_i = [(W_r \cdot d)(V_t - V_0) / d(W_r/d + 1)] \quad (8)$$

あるいは,

$$V_i = W_r / (1 + W_r) \cdot d \cdot (V_t - V_0) \quad (9)^9$$

Saunders ら¹⁰⁾ は最近 (10) 式を提出している. W はゲルカラムの全重量, W_t はカラムのみの重量, d は水の比重である.

$$V_i = (W - W_t - a - d) / d \quad (10)$$

従来, V_i は (6) 式から近似的に求められていたが, (6) 式では G ナンバーによって相異なる密度項が含まれていないため V_i を求めるには不満がある. そこで密度項を考慮してある (7), (8), (9), (10) 式から V_i を求めればよいがここでは (9) 式から求めた V_i を使用し, この値を以下に $V_{i,d}$ と記した.

ゲル実質の体積とゲルの差異

ゲルの比重の測定および計算から a , $V_{i,d}$, V_0 , V_g などを求めれば, 必要に応じて各項相互の関係を示すことができる. そして各種類のゲルの V_g と W_r とをプロットすれば, V_g が低膨潤性ゲルと高膨潤性ゲルとでどのような相違を示し, または示さないかを知ることができる.

TABLE I. Water Regain and Density of Cross-linked Dextran and Polyacrylamide Gel in Water

Sephadex			Bio-Gel P		
	W_r^a	d		W_r^a	d
G-10	1.10	1.230	P-2	1.5	1.143
G-25	2.72	1.130	P-4	2.4	1.102
G-50	6.82	1.070	P-10	4.5	1.084
G-100	12.4	1.040	P-30	5.7	1.066
G-200	21.9	1.020	P-100	7.5	1.037

a) ml H₂O/g dry gel

Table I に Sephadex, Bio-Gel P それぞれについての W_r と d の値を示し, Fig. 1 に Sephadex について V_g , $V_{i,d}$, $(V_t - V_0)$ と W_r との関係をプロットした. 純水中における V_g は Fig. 1 からわかるように G-10 は G-200 の約 16 倍大きい値を示し, 低膨潤性 Sephadex の V_g 値は大きく高膨潤性 Sephadex の V_g 値は小さいことがわかった. このことは分子ふるい現象に伴う二次的な吸着現象を説明するためには低 G ナンバーではゲル実質にあたる部分が高 G ナンバーのものよりも多いということで一応理解できたが, ここで V_g 値を求めたことによって数値で示した.

第 1 報³⁾ で W_r に対する膨潤媒の平衡体積分率 ϕ_m , キセロゲルの 50% 膨潤に要する時間 $t_{0.5}$, ゲル粒子中への水の有効拡散係数 $\log D_{\text{eff}}^{\text{H}_2\text{O}}$ の対数のプロットがいずれも G-50 近傍に折れ曲り点を有する直線関係が認められたが, 第 2 報⁴⁾ でゲル粒子の電位に対して $\log D_{\text{eff}}^{\text{H}_2\text{O}}$ または平衡膨潤容 Q_m の値をプロットすると 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た. Fig. 1 での V_g 対 W_r のプロットによって, V_g 値の大小の点からも G-系列 Sephadex が G-10 タイプと G-200 タイプの 2 つのグループに大別されることが明らかとなった. これらのことから電位や $\log D_{\text{eff}}^{\text{H}_2\text{O}}$ または Q_m で示されたゲルの膨潤性が Fig. 1 の V_g 対 W_r のプロットで示したゲルの質的な差異に対して影響を及ぼしていると考えても不自然はない. ある値以上の V_g を示すゲルと試料の溶質分子との間には吸着あるいは負の吸着が起こるものと考えられ, ゲル透過におけ

9) K.H. Altgelt, J.C. Moore, "Polymer Fractionation," ed. by M.J.R. Cantow, Academic Press, New York, 1967.

10) D. Saunders, R.L. Pecsok, *Anal. Chem.*, **40**, 44 (1968).

Fig. 1. Water Regain vs. V_g , $V_{i,d}$, $(V_t - V_0)$

(1) Sephadex G-10, (2) G-25, (3) G-50, (4) G-100,
(5) G-200
 Δ : V_g , $\circ$: $V_{i,d}$, $\bullet$: $(V_t - V_0)$

Fig. 2. Water Regain vs. V_g , $V_{i,d}$, $(V_t - V_0)$

(1) Bio-Gel P-2, (2) P-4, (3) P-10, (4) P-30
(5) P-100
 Δ : V_g , $\circ$: $V_{i,d}$, $\bullet$: $(V_t - V_0)$

る吸着・排斥現象に対しては、ゲル実質の体積、換言すればゲルの膨潤性の差が支配的な影響を及ぼしているといえる。

Fig. 2 に Bio-Gel P-2, P-4, P-10, P-30, P-100 について V_g , $V_{i,d}$ などを測定した結果を、Sephadex に対応して示した。

Bio-Gel P についての V_g 値と W_r との関係を Fig. 2 でみれば、P-10 あたりを境として低膨潤性ゲルと高膨潤性ゲルとに分けられることがわかる。高膨潤側において Sephadex の V_g 値は $0.17-0.29/12.05$ ml であるのに比較して Bio-Gel P の $0.61-0.69/12.05$ ml と約 2—3 倍高値を示している。このようなゲル実質の体積

Fig. 3. Adsorption of Food Red 3 on Swollen Sephadex from Aqueous Solution at 25°

$\bullet$: Sephadex G-10, $\circ$: G-200

Fig. 4. Adsorption of Food Violet 1 on Swollen Sephadex from Aqueous Solution at 25°

$\bullet$: Sephadex G-10, $\circ$: G-200

Fig. 5. Adsorption of Food Blue 1 on Swollen Sephadex from Aqueous Solution at 25°

●: Sephadex G-10, ○: G-200

大きく高膨潤性ゲルでは小さいという事実が膨潤ゲルに対する溶質の吸着とどのような関係を有するのか明らかではない。これらの未明な点を水溶性色素の吸着等温線から検討した。

従来, Sephadex を用いるゲル濾過では $K_d, K_{av} > 1$ となっても溶出曲線のピークは対称形でありティリングしないことから, 非可逆的な吸着は起こらないと言われている。⁸⁾ ここで $K_{av} \geq 1$ なることと吸着の有無との関係を知るために, 2価アニオン型の色素として F.B.1, これに対して V_e, K_{av} 値が他の色素類のそれに比べて大きいところの 1価アニオン型の色素として F.R.3, F.V.1 を選び, G-10 と G-200 に対するこれらの色素類の吸着等温線を求めた。その結果, 1価アニオン型色素である F.R.3, F.V.1 は Fig. 3, Fig. 4. のように G-10 で S-2 型¹¹⁾ または L-2 型¹²⁾ の吸着型の吸着等温線を示し, G-200 では平衡濃度と試料の吸着量の関係が直線性を示す分配型であった。一方, 2価アニオン型色素である F.B.1 については Fig. 5 のように G-10, G-200 とともに分配型を示した。1価アニオン型, あるいは2価アニオン型という色素の型式電荷の差がどのようにして吸着等温線において吸着型と分配型とになるかは, 第2報,⁴⁾ 第3報⁵⁾ において電位測定の結果ゲル粒子が負の電位を示したことから色素アニオンがこれに対してイオン排斥するというふうに考えれば2価アニオン型が正常な分子ふるいの挙動を示すことについて理解される。しかしこれだけでは1価アニオン型が吸着型を示すことの説明はなされない。そこでさらにこれらの色素が triphenylmethane 系の共役二重結合系に富む溶質であることを考えあわせると1価アニオン型色素類はゲル濾過において aromatic sorption の効果のほうが負の電位の効果よりも強いと考えれば吸着型を示す事実を説明することができる。

水溶性色素の吸着等温線から1価アニオン型色素である F.R.3, F.V.1 について G-10 でそれぞれ S-2 型, L-2 型の吸着型を示し G-200 で分配型であったこと, また2価アニオン型色素である F.B.1 については G-10, G-200 とともに分配型を示したことから, V_g の大小に基づく低膨潤性ゲルと高膨潤性ゲルの相違はゲル濾過における吸着現象にも現われてきていると考えられる。

謝辞 終わりに御指導, 御校閲を賜った東京薬科大学 長瀬雄三教授, 松本 潮教授に厚く御礼申し上げます。

11), 12) C.H. Giles らの命名に従う。

の差異は, 分子ふるい効果に伴う吸着現象が, Bio-Gel P で P-ナンバーの比較的大きいゲルにおいても現われることを示唆している。

膨潤ゲルに対する水溶性色素の吸着等温線

第1報⁴⁾ と第2報⁴⁾ とでは triphenylmethane 系水溶性食用色素類のうち, F.B.1, F.G.2, F.G.3 など2価アニオン型の色素類はペプチド類と同様に, V_e 対 $\log D_{500}^{\text{app}}$ または V_e 対 $\log$ 電位のプロットにおいて, G-ナンバー低下とともに溶出パラメーターの値が減少する傾向を示した。一方1価アニオン型の色素類 F.G.1, F.V.1, F.R.3 では G-10, G-25 においては上記と逆の現象すなわち Sephadex の G-ナンバーの低下とともに溶出パラメーターの値は増大する傾向を認めた。ここで2価アニオン型色素類や一部の低・中分子量のペプチド類を低膨潤性のゲルカラムを用いて溶出させたときに認められた $K_{av} < 1$ となる現象については, 分子量の大きな順にゲル濾過されるという分子ふるい効果で説明できるが, 1価アニオン型色素類でみられた $K_{av} \gg 1$ なる値については説明できない。

また本報で述べてきたように V_g 値が低膨潤性ゲルでは