

# 分析による拡散定数の新しい測定装置について

中村 正 好・渡 辺 格

(1958年2月13日受理)

## A New Apparatus for Diffusion Measurements using Analytical Method

Masayoshi NAKAMURA and Itaru WATANABE

(Received February 13, 1958)

**ABSTRACT:** A new type apparatus for diffusion measurements has been constructed and diffusion constants of several substances have been measured with considerably satisfying results. This apparatus is composed of two upper and lower round metal-blocks which are held together with a center pin. A sharp boundary between solution and solvent can be formed by rotating the upper section which contains solvent relative to the lower section which contains solution. This apparatus is suitable for diffusion measurements on colored substances, turbid solutions, and very dilute solutions, the diffusion constants of which can hardly be measured by the usual optical method.

The substances tried were methylene blue ( $D_{20,w} = 45 \times 10^{-7} \text{cm}^2/\text{sec}$  at 0.05% and 0.025%), ribonucleic acid from brewers yeast ( $D_{20,w} = 8.7 \times 10^{-7} \text{cm}^2/\text{sec}$  at 0.1% and 0.05%), and deoxyribonucleic acid from herring soft roe ( $D_{20,w} = 1.6, 1.7, \text{ and } 1.9 \times 10^{-7} \text{cm}^2/\text{sec}$  at 0.28%, 0.1%, and 0.03% respectively). The data obtained on nucleic acids were quite in agreement with those obtained by the optical method.

It must be noteworthy that diffusion constant of substances which have any activity such as bacteriophages, enzymes, or radio-isotope-labeled compounds can be measured without any special considerations on contaminating substances even in very dilute solutions.

蛋白質・核酸などの様な高分子物質の分子量、分子形状などを知るために重要な拡散定数を測定する装置は、光学系(所謂シュリーレン法など)を利用したものが多く用いられている<sup>1)</sup>。

光学的方法によつて蛋白質・核酸などの拡散定数に関する知見が多く得られ、その貢献するところ大であるが、上下二液相間に光学的に鋭い境界面を形成させる必要があるために、比較的高濃度(核酸では最低0.1%位)の試料が要求される。又光学的な測定であるために試料が不透明であつ

たり、著しく着色したりしていると測定が不可能になる。

上の方法の他に初期には Porous disk 法<sup>2)</sup>も高分子物質の拡散定数の測定に使用された。これは試料溶液と溶媒とを硝子濾過板様の多孔質平板を隔てて接触させ、この多孔質層を通して拡散移行した溶質の量の分析から拡散定数を知ろうとするものである。

Porous disk 法は稀薄な溶液や着色した溶液にも適用出来るが、複雑な層を通して溶質を拡散

させるために、高分子物質の場合には分子形状や電荷などの影響を受け易く測定精度が不安定なのでだんだん使用されなくなり、今日ではその使用が塩類などの低分子物質に限られてしまった。

生化学方面では試料が極めて稀薄な溶液、或は不純物が充分取除けない状態でしか調製出来ないことが屢々起り、そのまま拡散定数を測定したいときには光学的な方法の使用が出来ない。又一般に巨大な粒子の拡散定数は、粒子自身の濃度によつて拡散速度が変化を受けるが、溶液濃度が低くなれば溶質粒子間の相互作用が少くなり、各粒子の独立運動による拡散定数（濃度零のときの値）に近い値が得られる筈である。

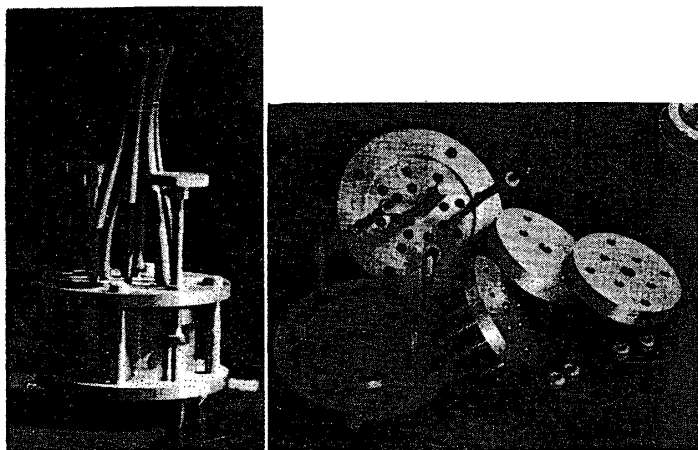
この装置では先に述べた二つの拡散定数測定法の利点を生かし、先ず溶液と溶媒とを直接接触させて溶質を自由拡散させ、一定時間後に初めの境界面の位置で再び両液相を切断し、溶媒側に移動した溶質の量を直接分析して拡散定数を算出する方法を採つた。この結果、次の様な物質の拡散定数測定に対して非常に有効である事がわかつた。

1) 核酸（紫外吸収により微量定量出来る）などの様な高分子物質に対してはかなり稀薄な溶液にも適用出来る。

2) 生物活性（バクテリオファージのプラーク形成能、酵素活性など）を有するものや、放射能をもっている物質などについては、不純物が或程度存在していてもその活性量の測定で拡散定数が決定出来る。

3) 色素、ヘモグロビンなどの着色物質も比色定量で測定が容易に行える。

ここに装置の構造と、それによつて得た二、三



第 1 図 写 真

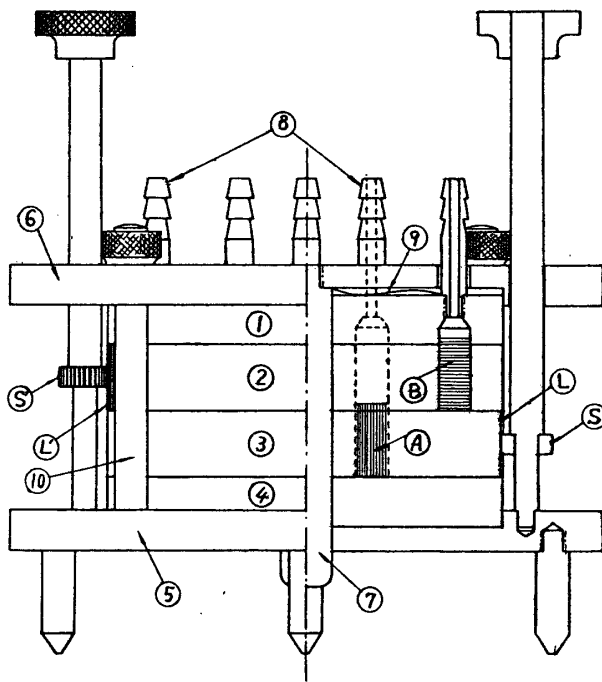
の実験結果を報告する。

尙本装置と類似のものに関して Polson の報告<sup>3)</sup>がある。

### 装 置

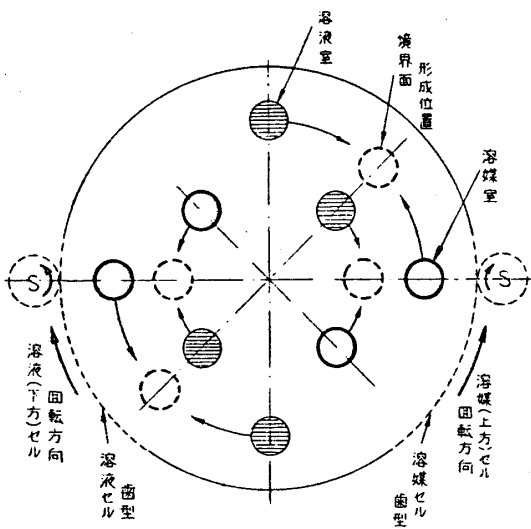
以上に述べた諸点を考慮して第 1 図及び第 2 図に示す様な装置を設計製作した。

この装置の主体は 1 本の軸 (7; 特に示さない限り今後記する ( ) 内の符号は第 2 図の符号を指すものとする) を中心として回転出来る 2 枚の円盤 (2, 3) に溶液と溶媒の入る円形の孔 (A, B) を夫々 4 個ずつ備えたもので、その孔は第 3 図に示した様に夫々が全く重り合う様にしている。又この二枚の円盤状セルの側面約 60° にわた



第 2 図 組立図

つて歯型 (L, L') をつけてセル自体の一部を歯車とし、セルに隣接して設けた小歯車 (S, S') を用いて或角度セルを回転させることが出来る。セルの歯型の位置と溶液室及び溶媒室との間には第 3 図に示す様な関連があつて、上下のセル (2, 3) を歯車で反対の方向に 45° 回転したとき丁度重り合い、この位置でセルの回転が止る様にストッパーをつけた。この時同時に 4 個の界面が形成されることになる。尙第 1 図に 8 個の孔のあるセルがあるが、その 4



第3図 拡散室と歯型との関連

個が試料溶液を（装置を組立ててから）下方のセル（3）に注入するために用いる孔であつて、この目的だけからはもつと小さな孔でよいわけだが、孔が小さいと溶液室に試料を注入するとき溶液室（A）の上端に気泡が残り易く、界面形成に悪影響を及ぼすので同径の孔にした。このため上方のセルには8個の孔があけてある。

セルの底に相当する部分（4）はセルと同径の円盤で、中央に軸（7）が入る孔だけがある。このブロック（4）は4本の柱（10）を持ちセルより一周り大きい円板状の台（5）に取つてあつて、この台には水平調節が出来る脚が設けてある。

セルの蓋に相当する部分（1）もセルと同径の円盤で、8個の試料注入孔があり、この孔には筒（8）を取りつけ、セル全体を恒温槽に浸すときこの筒に長いゴム管をはめ他端が水面から出せる様にした。

以上4個のブロックには試料が直接触れるので、化学的に安定な不銹鋼を用い、回転接触面は機械研磨し更に精密な手仕上げを行い、平行性、平面性ともに良好なものとし、界面形成及び切断の際の液体の乱れを出来るだけ防ぐ様にした。

4個のブロックを緊密に保持するために、底部の台（5）と同径のセル固定板（6）があつて、これにはブロック（1）の筒の出る孔、4個のセルブロックを貫きその回転中心となる軸（7）、セルの回転に使う小歯車（S, S'）、底部の台に取りつけた柱（10）の頭部のねじの部分が出る孔などがある。小歯車とセルの歯型とを噛合し、4本

の柱（10）の頭部のねじで台（5）とこのセル固定板（6）の間に4つのブロックが締つけられる。尚セルを均等に押しつけるためにブロック（1）と固定板（6）との間にバネ（9）を入れた。又小歯車（S, S'）の軸には大きなニギリをつけて回転を容易にした。

### 拡散定数の算出

溶液室に溶液を溶媒室に溶媒を満して静かに重ね合せ境界面を形成したとする。この時から  $t$  秒後断面積  $a$  なる境界面を通つて拡散した溶質の量を  $S$ 、位置  $x$  の濃度を  $C$ 、拡散定数を  $D$ 、溶液の初濃度を  $C_0$  とし、界面 ( $x=0$ ) を通つた溶質の全移行量  $S$  を考えれば、Fick の第1法則<sup>4)</sup>及び Wiener<sup>5)</sup>-Boltzmann<sup>6)</sup> の式より

$$S = DaC_0 \sqrt{\frac{t}{\pi D}}$$

なる関係式が得られる。次にこの全移行量  $S$  を  $B$  内に均等に分散させたときの平均濃度  $C_m$  は  $B$  の高さを  $h$  とすれば、 $C_m = S/ah$  であるから

$$D = \left(\frac{C_m}{C_0}\right)^2 \cdot \frac{\pi h^2}{t} \dots\dots\dots(1)$$

なる関係が得られる。ここで  $C_0$ 、 $C_m$  及び  $t$  を知れば  $D$  が決定出来る。実際の測定では同一試料について拡散時間を変えて数回の実験を行い、この時の  $C_m/C_0$  と  $\sqrt{t}$  との関係を示す直線の傾斜角から拡散定数を算出した。

### 操 作

セルの各回転接触面に少量のシリコングリースを丁寧に塗り、第2図の様に装置を組立てる。この時、試料注入孔の下に4個の溶液室と4個の溶媒室がある様にする。次に注射器（針長10cm）を用いて溶液及び溶媒を注入、各室の容積よりやや過剰の液量とする。次にゴム管を（第1図組立図の様に）ブロック（1）の筒にはめ、その他端が水面上に出る様にして装置を恒温槽中に浸す。水準器を用いて装置を水平にし、そのまま20~30分間放置、装置内の温度が充分一定になつてから、小歯車のニギリを極めて静かに回転し、両液相を重ね合せる。拡散室内の温度不均一による熱対流や振動による機械的攪拌などは境界面の乱れの原因となり、溶質の移行量から算出した拡散

定数の値が真の値より大きい値を持つ方向に誤差を生ずる結果となるからこの点充分注意しなければならない。

拡散一定時間後下方のセルブロック (3) のみを静かに回転して上下二液相に分離し、各溶媒室から注射器で攪拌しつつ液を採取する。この液の平均濃度  $C_m$  とはじめの溶液濃度  $C_0$  を最も適当な方法で分析し、 $C_m/C_0$  と  $\sqrt{t}$  の関係グラフから得た  $\tan\theta$  を用いて拡散定数を決定する。

尙この他実験上、1) 核酸などの様に吸光分析を行うものは特にグリースの使用に注意しなければならない。本実験に於てはシリコングリースを用いてよい結果を得ることが出来た。2) 保温能率のよい恒温槽と精度の高い温度調節器を使用する必要がある。3) 恒温槽は外からの振動を防ぐ目的でクッションを敷く。

## 実験

### 1) メチレンブルー

試料; メチレンブルー (市販) 0.05%, 0.025% 水溶液, 20°C で測定。

分析; 日立製光電比色計を用い、あらかじめ求めた「濃度・吸光特性曲線」によつて濃度を決定した。

結果; 第1表及び第4図に示す。これより得た  $\tan\theta$  を用い算出された拡散定数は

$$D_{20,w}^* = 45 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$$

である。

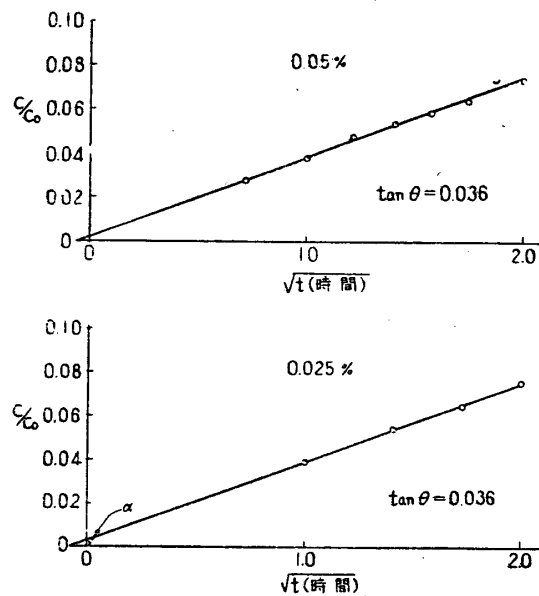
尙第4図  $\alpha$  に示された部分は、この試料が低分子物質であるために界面形成の際幾分乱れが起りやすく、この時少量の溶質が溶媒側に混入したものに相当するものと思われるが、拡散定数を  $\tan\theta$  の値から算出すれば補正されると見てよい。

### 2) 酵母リボ核酸 (YNA)

試料; 麦酒酵母リボ核酸 (YNA, キリン No. 7) をイオン強度 0.2, pH 7.6 の磷酸塩緩衝液を溶媒として 0.1% 及び 0.05% の溶液を作り、この溶液を多量の溶媒中でセロファン膜を隔てて 24 時間以上透析し、透析内液を遠心してその上清を溶液室 (A) に、透析外液を溶媒室 (B) に

第1表 メチレンブルー水溶液  
実験温度 20°C

$t$ (時間)	$\sqrt{t}$	$C_m/C_0 \times 10^2$	
		0.05 %	0.025 %
0.5	0.72	2.72	—
1	1.00	3.90	3.84
1.5	1.22	4.68	—
2	1.44	5.36	5.40
2.5	1.58	5.84	—
3	1.75	6.40	6.48
3.5	1.87	7.42	—
4	2.00	7.37	7.52



第4図 メチレンブルー測定値

注入して拡散させた。測定温度 30°C。

分析; 試料を適当に稀釈し、ベックマン DU 型分光光度計を用い波長 260 m $\mu$  の吸収の読みの比で濃度比  $C_m/C_0$  を決定した。

結果; 第2表及び第5図に示す。これより得た  $\tan\theta$  の値から算出した拡散定数を 20°C の水の中の値に換算すると、

$$D_{20,w} = 8.7 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$$

$$(D_{30} = 11.3 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec})$$

となり光学的方法で測定した値\*\*とよく一致する。

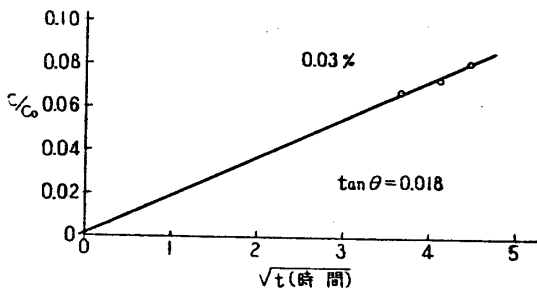
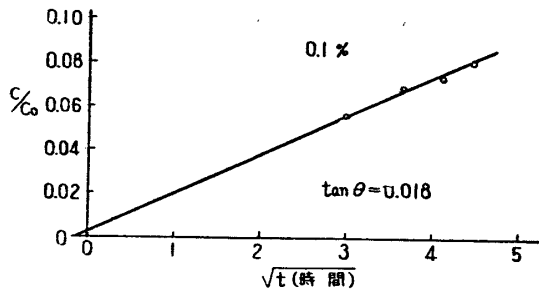
### 3) デオキシリボ核酸 (DNA)

\* 20°C の水中に於ける拡散定数を示し、普通これを標準とし、これに換算した値と比較される。

\*\* シュリーレン法での測定結果は  $D_{20,w} = 8.6 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$  (当研究室北村とも子嬢測定, 未発表)。

第2表 YNA (キリン No. 7)  
測定温度 30°C

t (時間)	$\sqrt{t}$	$C_m/C_0 \times 10^3$	
		0.1 %	0.03 %
9	3	5.60	—
13.5	3.67	6.90	6.75
17	4.13	7.33	7.34
20	4.48	8.35	8.10



第5図 YNA

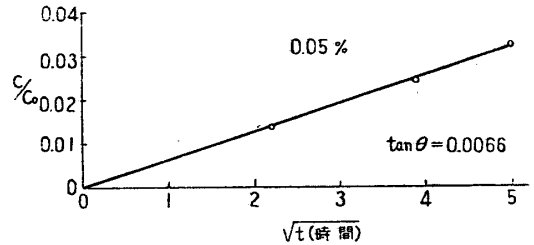
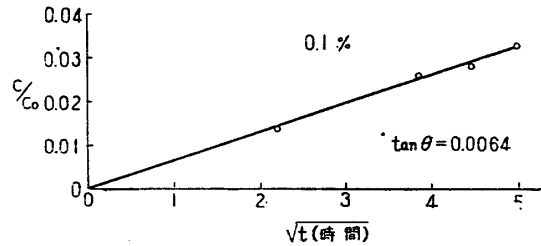
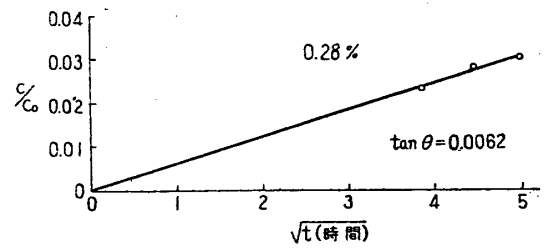
試料; ニシン白子デオキシリボ核酸 (DNA 7b)\* の 0.28%, 0.1%, 0.05% 溶液について, 溶媒その他は, 実験 2) と全く同様にして行つた.  
測定温度 15°C.

分析; 実験 2) と同じ.

第4表 DNA (7b)  
測定温度 15°C

t (時間)	$\sqrt{t}$	$C_m/C_0 \times 10^3$		
		0.28 %	0.1 %	0.05 %
5	2.23	—	1.37	—
15	3.88	2.32	2.56	1.36
20	4.48	2.82	2.71	2.48
25	5	3.02	3.22	3.27

\* シュリーレン法による測定結果<sup>7)</sup>は  $D_{20, w} = 2.1 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$



第6図 DNA

結果; 第3表及び第6図に示す. これより得た  $\tan \theta$  より算出された拡散定数を 20°C の水中での値に換算すると夫々

0.28%;  $D_{20, w} = 1.6 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$

0.1%;  $D_{20, w} = 1.7 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$

0.05%;  $D_{20, w} = 1.9 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$

となる.

結 び

以上の実験結果は光学的方法で得た結果とよく一致し, 又光学的方法では測定困難な試料 (極端に着色したメチレンブルー水溶液, 0.1% 以下の核酸溶液) の拡散定数が直接測定出来ることを示す. このことははじめの期待通り分析可能な範囲内で稀薄な溶液の測定や活性量が容易に定量出来るもの (バクテルオフェージなど) については不純物を含んだままの試料についても可成りな精度で測定出来ることを示すものである. 光学的な方法に比し実験にやや手数のかかる欠点があるが, 大がかりな光学系を必要としない利点もある.

終りに本研究に当り終始種々討論御助言下さつた当研究室の磯見二郎, 川出由己, 宇井信生, 鈴

木撃之の各氏, ならびに装置の製作に多大の御便宜をお計り下さつた当研究所工作部尾上伍市技官  
その他の方々に厚く感謝する.

#### 文 献

- 1) セルについての代表的なものをあげると,  
H. Neurath: *Science*, **93** (1941) 431.
- 2) J. Northrop, M.L. Anson: *J. Gen. Physiol.*,  
**12** (1928-29) 543.
- 3) A. Polson: *Onderstepoort J. Vet. Sci. Animal Ind.*, **22** (1947) 41.
- 4) A. Fick: *Pogg. Ann.*, **94** (1855) 59.
- 5) O. Wiener: *Ann. physik. Chem.*, **49** (1893)  
105.
- 6) L. Boltzmann: *Wied. Ann. Physik*, **53** (1894)  
959.
- 7) 渡辺 格, 鈴木撃之, 宇井信生, 磯晃二郎: *日化誌*, **74** (1953) 575.