

SEPARATION REPORT

TSK-GEL PWタイプによる水溶性高分子の GFC測定

—— 目 次 ——

	ページ
1 はじめに	1
2 TSK-GEL PWタイプ各グレードの較正曲線	1
3 水溶液系GFC装置	2
4 各標準試料の測定例	3
4-1 標準ポリエチレンオキシド	3
4-2 プルラン	3
4-3 標準ポリスチレンスルホン酸ナトリウム	4
5 カルボキシメチルセルロース、トラガントゴム、アラビアゴム、 ポリアクリルアミド、多糖(コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、 ヒアルロン酸、マンナン、デンプン)の測定例	4
6 ポリビニルピロリドン、ゼラチン、ポリカチオン (ジメチルアミノエチルメタクルート、キトサン、ポリエチレンイミン、 グリコールキトサン)	7

1. はじめに

東ソー(株)は十数年前に有機溶媒系GPC充填剤を開発した後、表-1のような種々のHPLC用充填剤を開発し、販売を行ってきた。数年前に時代の要求にこたえて水溶液系でのGFC用充填剤としてTSK-GEL、SW、PWタイプを開発し、販売を行っている。

ここではTSK-GEL PWタイプを用いての水溶性高分子のGFC測定例を紹介する。

2. TSK-GEL PWタイプ各グレードの分画範囲

表-2にTSK-GEL PWタイプの分画範囲を示す。G6000PWが最もポアサイズが大きく、G3000PWが最も小さい。

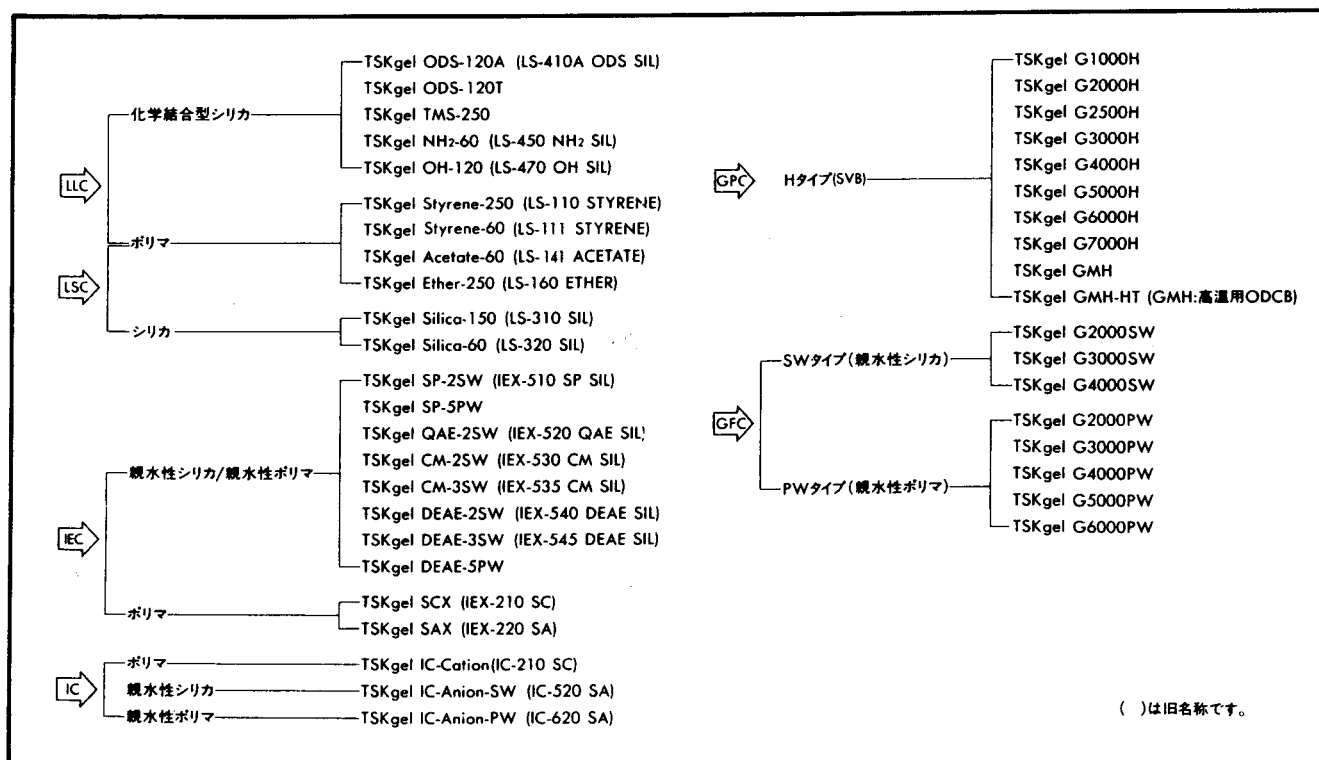
G6000PWとG3000PWのカラムを組み合わせると、較正曲線は広範囲の分子量範囲にわたって直線性が良好であり、水溶性高分子の分子量測定に適していると考えられる。

表-2 TSK-GEL PWタイプの分画範囲

品名	排除限界分子量	分画範囲
G6000PW		2×10^4 以上
G5000PW	10^6	$10^4 \sim 7 \times 10^5$
G4000PW	3×10^5	$3 \times 10^3 \sim 2 \times 10^5$
G3000PW	10^5	$2 \times 10^2 \sim 8 \times 10^4$

* ポリエチレンオキサイド換算分子量

表-1 分離モード別TSK-GEL一覧表



3. 水溶液系のGFC装置

水溶性高分子のGFC測定においては図-1のように従来のGFC装置に示差屈折計(RI-8011)を内蔵する低角度レーザ光散乱光度計(LALLS) LS-8000接続したシステムが好ましいと考えられる。

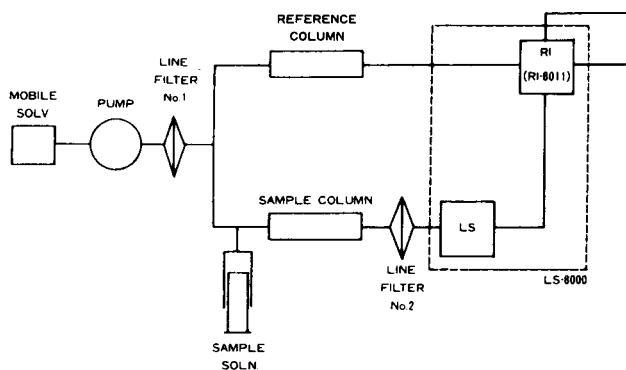


図-1 フローダイアグラム

図-2に従来のGFCとGFC-LALLSシステムとの分子量、分子量分布測定における原理的な相違を示した。従来のGFCでは示差屈折計RIの溶出曲線を較正曲線を用いて、分子量分布曲線に変換する。

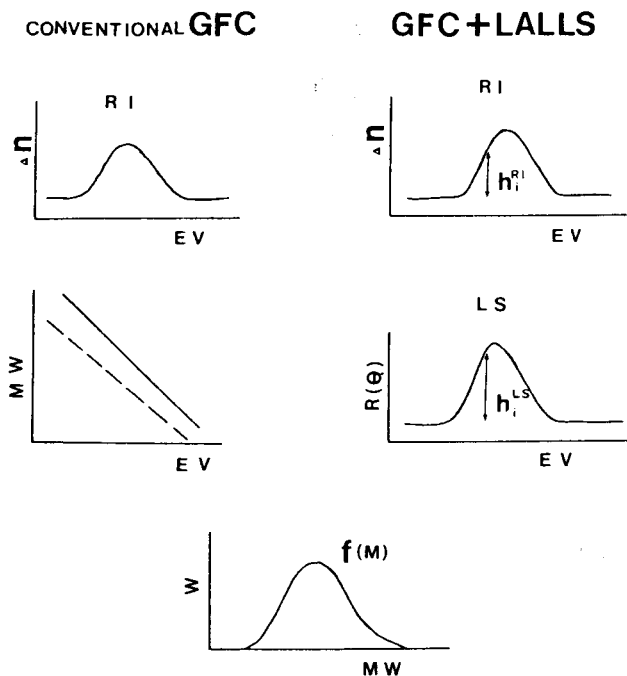


図-2 従来法GFCとGFC-LALLS法との比較

GFC-LALLSシステムでは、RI側の応答は濃度Cに比例し、LSの応答は濃度Cと分子量Mの積に比例することから、LSの応答をRIの応答で除してやると各溶出位置での分子量を決定することができ、較正曲線が不要となる。

水溶液系GFCにおいては、有機溶媒系と異なり、分子ふるい効果以外に試料とゲル基材の間にイオンの相互作用(図-3)、分配吸着相互作用(図-4)等が生じ易いためGFCクロマトグラムは正確な分子量分布を反映しないことが多い。そのため溶離液として純水に無機塩を添加したり、10%~20%程度のアセトニトリル、メタノールなどの有機溶媒を添加する必要がある。また溶離液のpHを選択する必要もある。しかし、GFC-LALLSシステムでは較正曲線を用いずに各溶出位置での分子量 M_i を測定できるので溶離液調製にそれほど神経質にならなくてもよい。

水溶性高分子の測定では、溶離液の粘度を下げて、分離を向上させるため、室温以上の温度(40~50°C)で測定するのが一般的である。

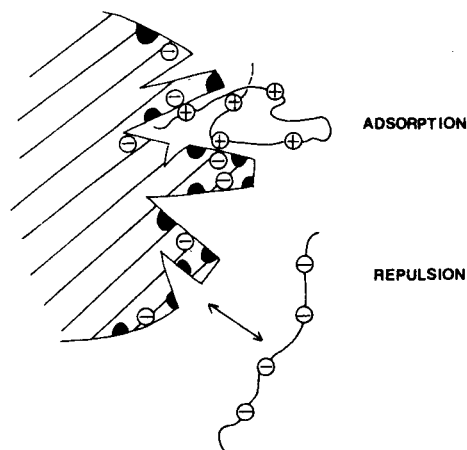


図-3 イオンの相互作用

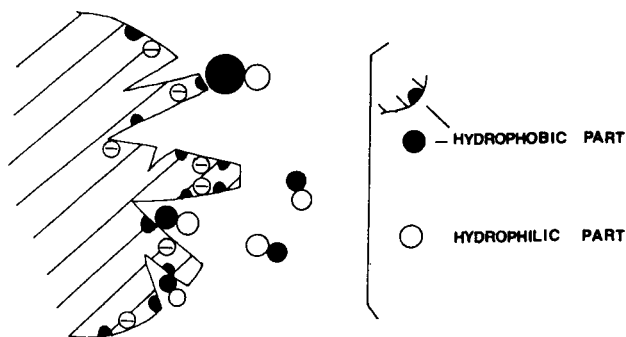


図-4 分配吸着相互作用

4. 各標準試料の測定例

4-1. 標準ポリエチレンオキシド

アニオン重合により合成した一連の分子量分布の狭い各ポリエチレンオキシドのLS、RIのクロマトグラムを
図-5に示す。

注) ポリエチレンオキサイドは水溶液中では劣化しやすいので溶液中に少量のエタノールを添加する必要がある。

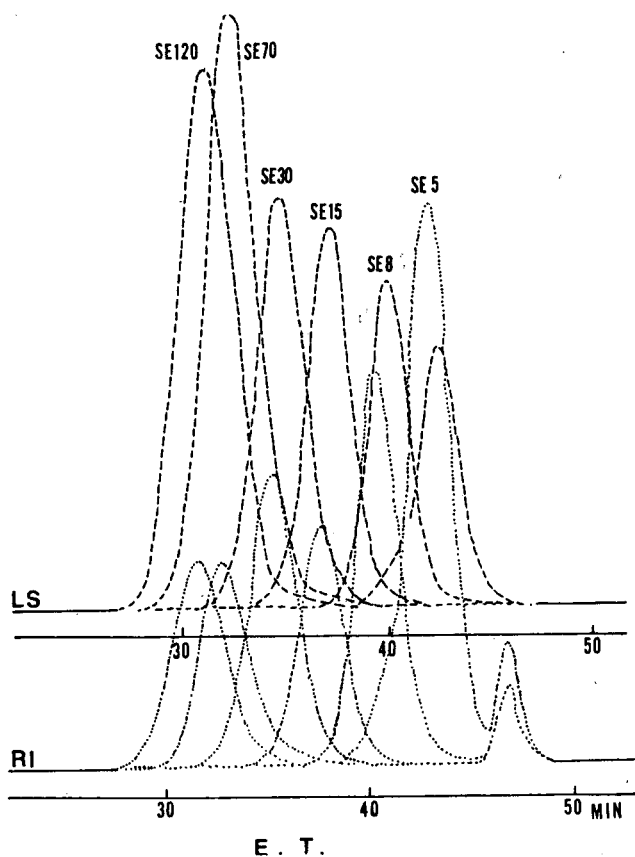


図-5 標準ポリエチレンオキシドの分離

カラム; TSKgel G6000PW+G4000PW

7.5mmID×60cm×2

溶離液; 0.2M P.B. (pH6.9)

流速; 0.9ml/min

温度; 40°C

4-2. プルラン

分別により、分子量分布の狭いプルランが市販されている。一連の各プルランのLS、RIのクロマトグラムを
図-6に示す。

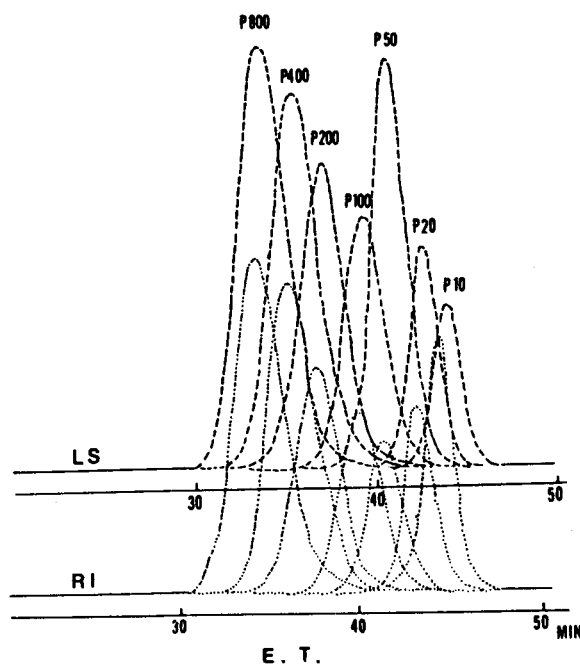


図-6 プルランの分離

カラム; TSKgel G6000PW+G4000PW

7.5mmID×60cm×2

溶離液; 0.2M P.B. (pH6.9)

流速; 0.9ml/min

温度; 40°C

4-3. 標準ポリスチレンスルホン酸ナトリウム

試料が芳香族系で、充填剤と疎水的な相互作用があるのでアセトニトリルを10%添加した溶離液を用いて分子量分布の狭い標準ポリスチレンスルホン酸ナトリウムの測定を行った。LS、RIのクロマトグラムを図-7に示す。

5. カルボキシメチルセルロース、トラガントゴム、アラビアゴム、ポリアクリルアミド、多糖(コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸、マンナン、デンプン)の測定例

図-8~図-15に示す。溶離液は主に0.1M~0.2Mのりん酸緩衝液(pH7.0)を用いている。

高分子電解質でも、ポリアニオンの測定については上記の溶離条件で測定できる。

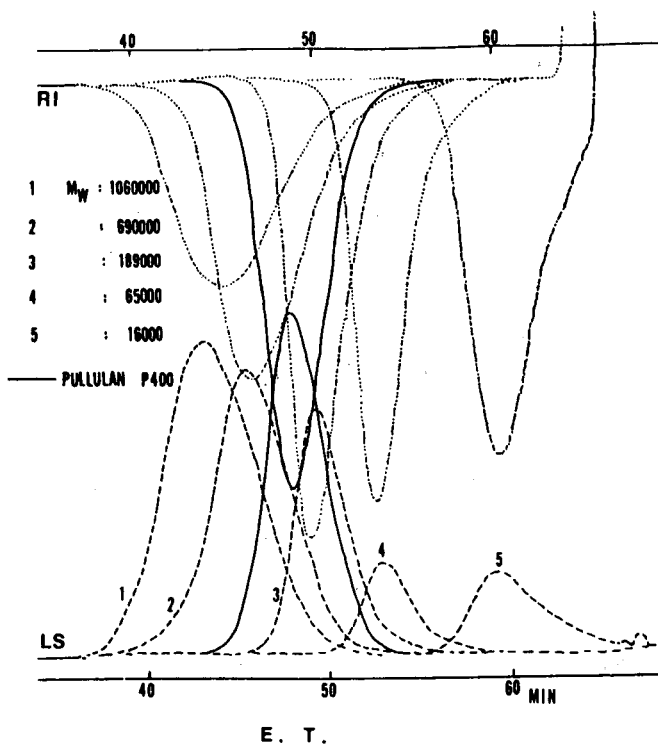


図-7 標準ポリスチレンスルホン酸ナトリウムの分離

カラム; TSKgel G6000PW+G3000PW

7.5mmID×60cm×2

溶離液; 10% CH₃CN/0.2M P.B. (pH6.9)

流速; 0.6ml/min

温度; 40°C

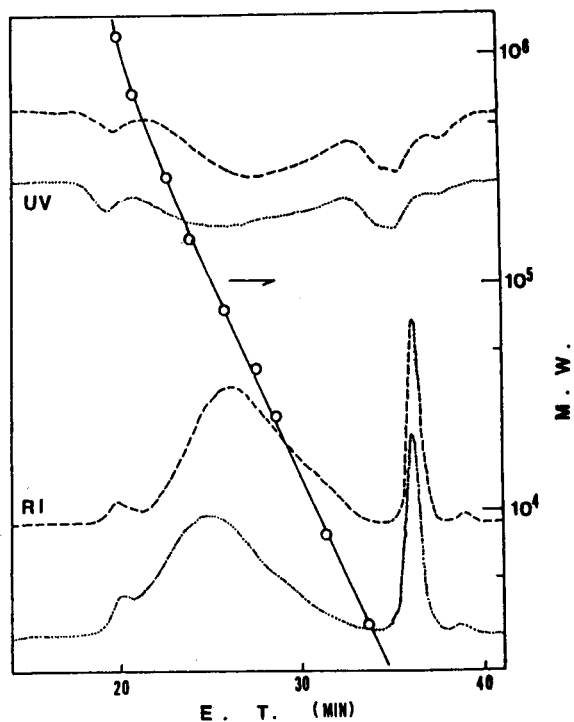


図-8 カルボキシメチルセルロースの分離

カラム; TSKgel G5000PW+G3000PW

7.5mmID×60cm×2

溶離液; 0.1M P.B. (pH6.8)

流速; 1.0ml/min

温度; 40°C

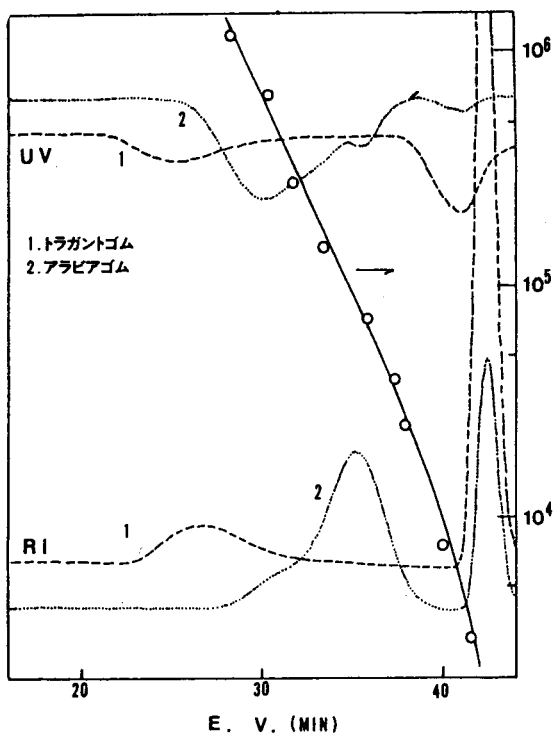


図-9 トラガントゴム、アラビアゴムの分離

カラム；TSKgel G6000PW+G4000PW

7.5mmID×60cm×2

溶離液；0.1M P.B. (pH6.8)

流速；1.0ml/min 温度；40°C

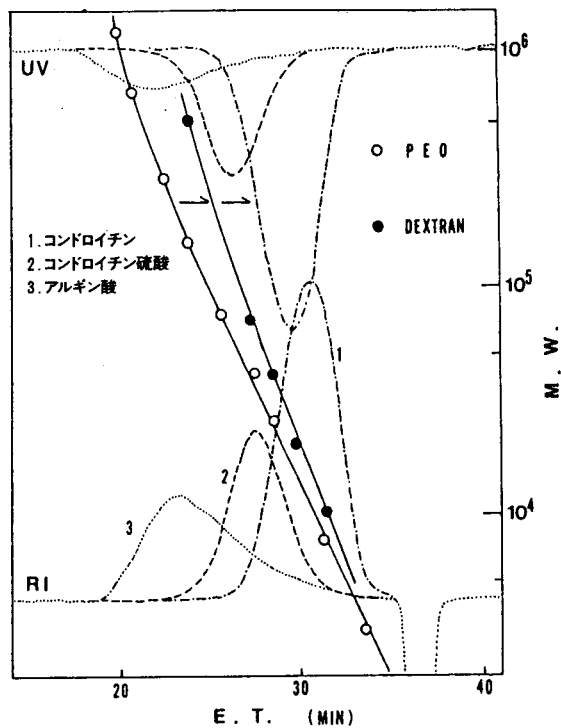


図-11 多糖類の分離

カラム；TSKgel G5000PW+G3000PW

7.5mmID×60cm×2

溶離液；0.2M P.B. (pH6.8)

流速；1.0ml/min

温度；40°C

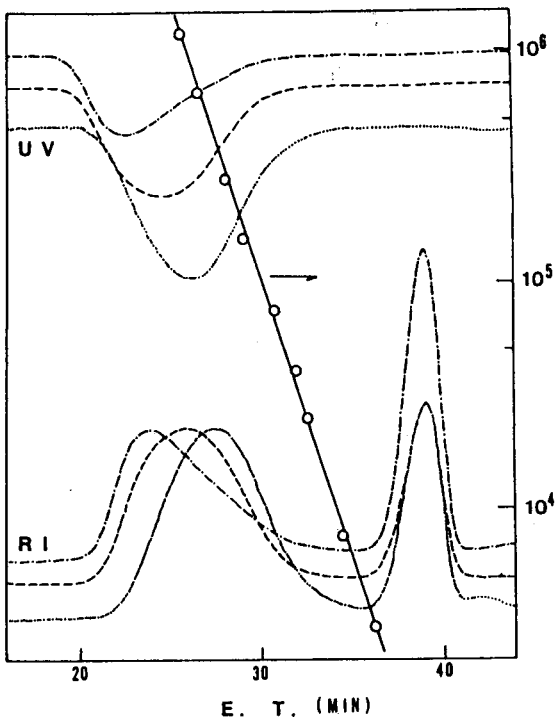


図-10 ポリアクリルアミドの分離

カラム；TSKgel G6000PW+G3000PW

7.5mmID×60cm×2

溶離液；0.1M P.B. (pH6.8)

流速；1.0ml/min 温度；40°C

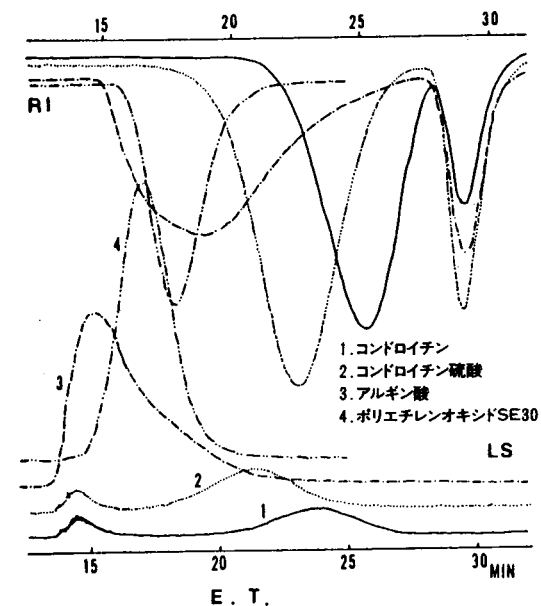


図-12 多糖類の分離

カラム；TSKgel G4000PW

7.5mmID×60cm

溶離液；0.2M P.B. (pH6.8)

流速；0.7ml/min

温度；40°C

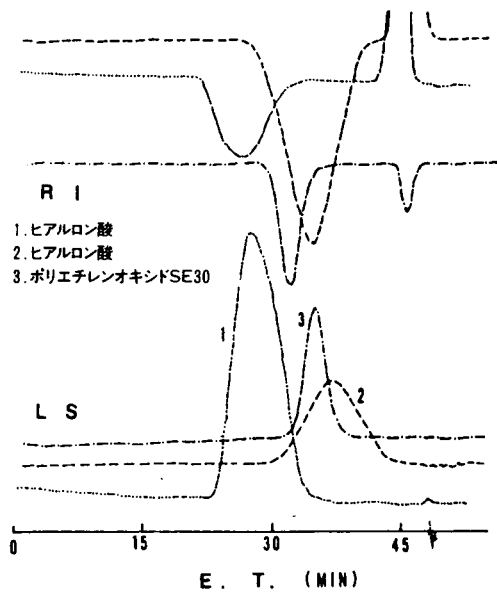


図-13 ヒアルロン酸の分離

カラム ; TSKgel G6000PW+G4000PW

7.5mmID×60cm×2

溶離液 ; 0.2M NaCl

流 速 ; 0.9ml/min

温 度 ; 40°C

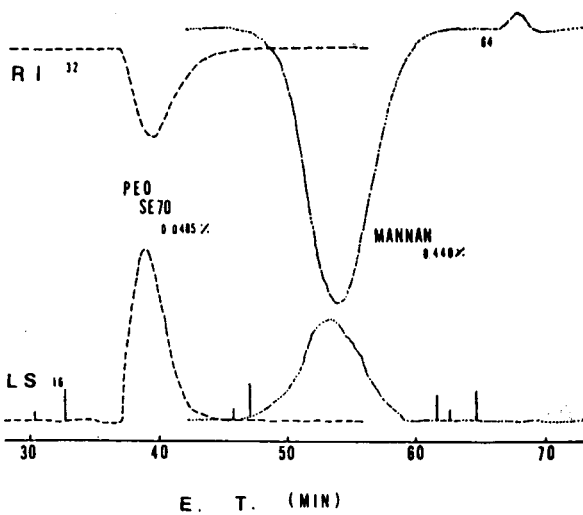


図-14 マンナンの分離

カラム ; TSKgel G5000PW+G3000PW

7.5mmID×60cm×2

溶離液 ; 0.2M P.B. (pH6.8)

流 速 ; 0.5ml/min

温 度 ; 40°C

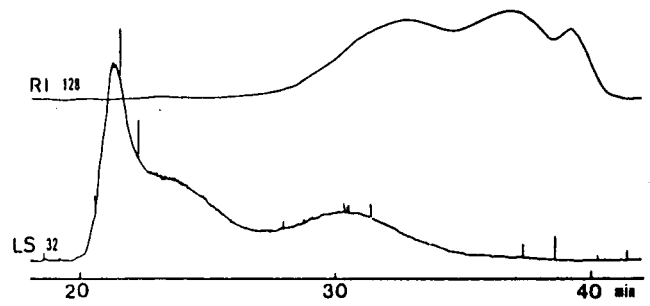


図-15 デンプンの分離

カラム ; TSKgel G5000PW+G3000PW

7.5mmID×60cm×2

溶離液 ; 0.2M P.B. (pH6.9)

流 速 ; 0.8ml/min

温 度 ; 40°C

6. ポリビニルピロリドン、ゼラチン、ポリカチオン (ジメチルアミノエチルメタクリレート、キトサン、ポリエチレンイミン、グリコールキトサン) の測定例

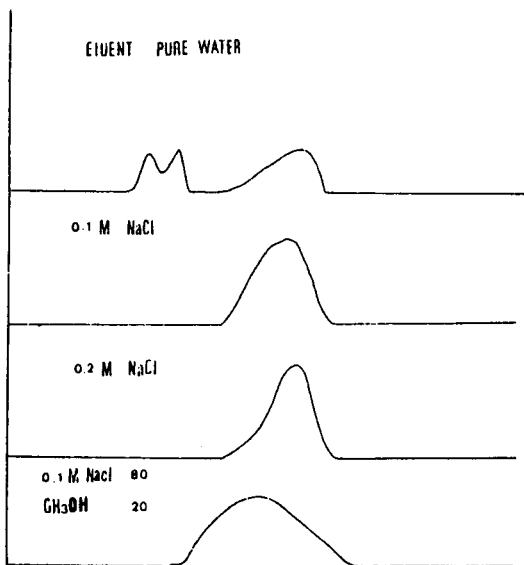
経験的にも理論的にも、溶離液の組成に厳密な検討を必要とするのが上記の水溶性高分子である。

ポリビニルピロリドンについては、ある程度の塩濃度の水溶液に20%のメタノールの添加が必要である。ゼラチンの場合は試料によってはpHによって溶出挙動が異なるので、注意が必要である。

ゲル基材には少量のカルボキシル基が存在するため、ポリカチオンの測定においては溶離液は酸性側にして塩濃度の高い状態にして解離を抑える必要がある。

図-16～図-23に測定例を示す。

尚、ポリカチオン試料の測定に用いたカラムをポリアニオン試料の測定に用いるとポリアニオン試料の吸着を生じる可能性が高いことに留意されたい。



CHROMATOGRAM OF POLYVINYLPIRROLIDONE

図-16 ポリビニルピロリドンの分離

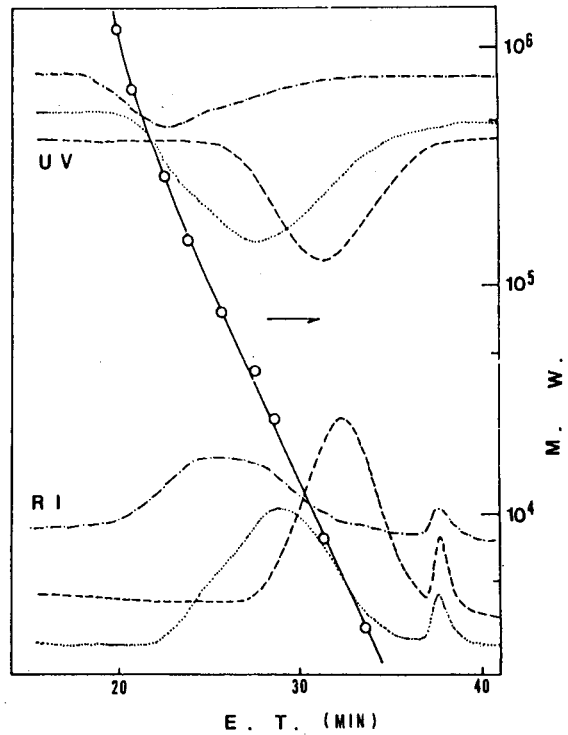


図-17 ポリビニルピロリドンの分離

カラム; TSKgel G5000PW+G3000PW

7.5mmID×60cm×2

溶離液; 20% CH₃OH/0.1M CH₃COONa

流速; 1.0ml/min 温度; 40°C

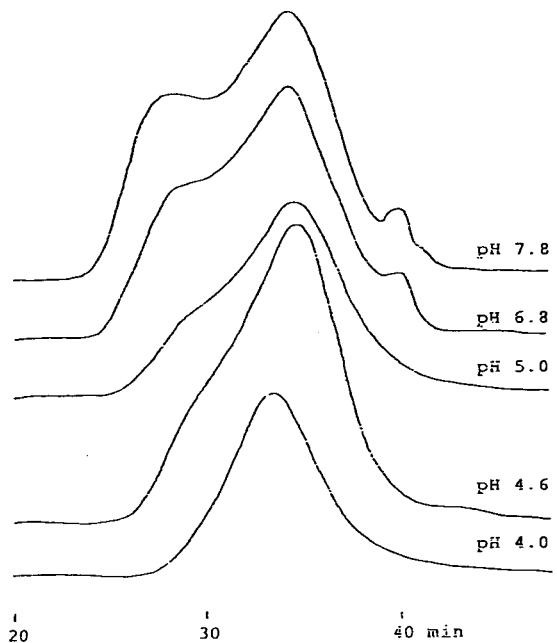


図-18 ゼラチンの分離

カラム; TSKgel G6000PW+G4000PW

7.5mmID×60cm×2

溶離液; 0.2M P.B.

流速; 1.0ml/min 温度; R.T.

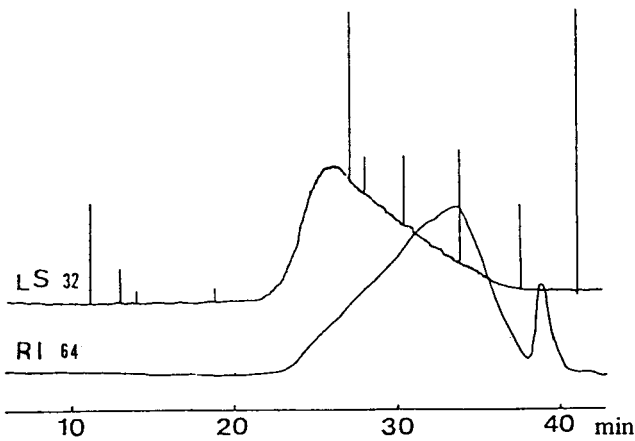


図-19 ゼラチンの分離

カラム ; TSKgel G6000PW+G3000PW

7.5mmID×60cm×2

溶離液 ; 0.2M P.B. (pH6.9)

流速 ; 1.0ml/min

温度 ; 40°C

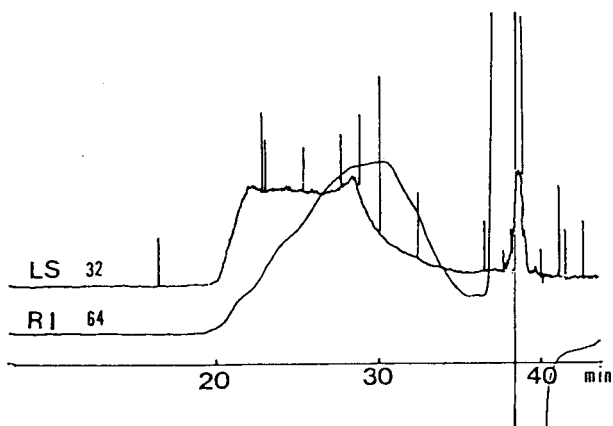


図-20 ゼラチンの分離

カラム ; TSKgel G6000PW+G3000PW

7.5mmID×60cm×2

溶離液 ; 0.2M P.B. (pH4.5)

流速 ; 1.0ml/min

温度 ; 40°C

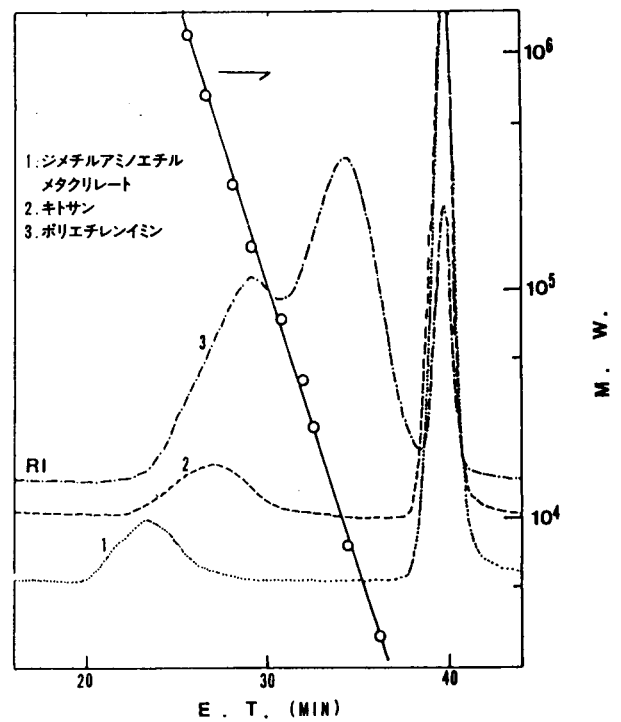


図-21 ポリカチオンの分離

カラム ; TSKgel G6000PW+G3000PW

7.5mmID×60cm×2

溶離液 ; 0.5M CH₃COOH+0.5M CH₃COONa

流速 ; 1.0ml/min 温度 ; 40°C

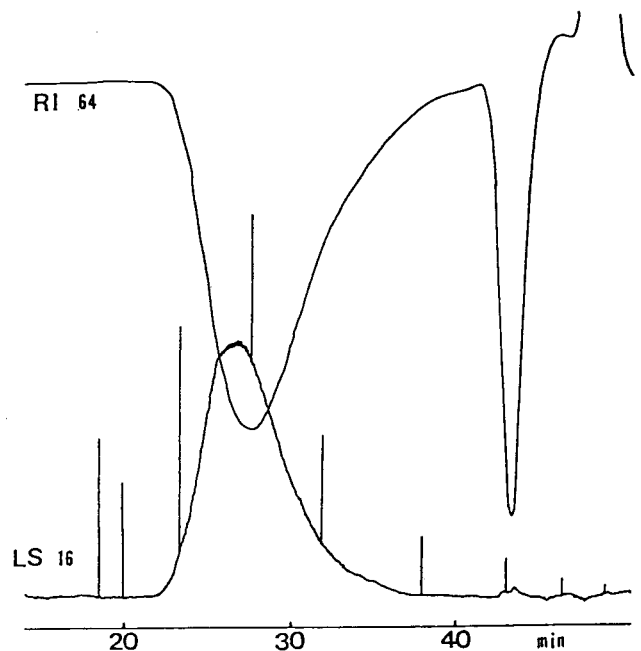


図-22 グリコールキトサンの分離

カラム ; TSKgel G5000PW+G3000PW

7.5mmID×60cm×2

溶離液 ; 0.1M TEA*+Conc.H₃PO₄ (pH2.9)

流速 ; 0.7ml/min

温度 ; 40°C (TEA* : トリエタノールアミン)

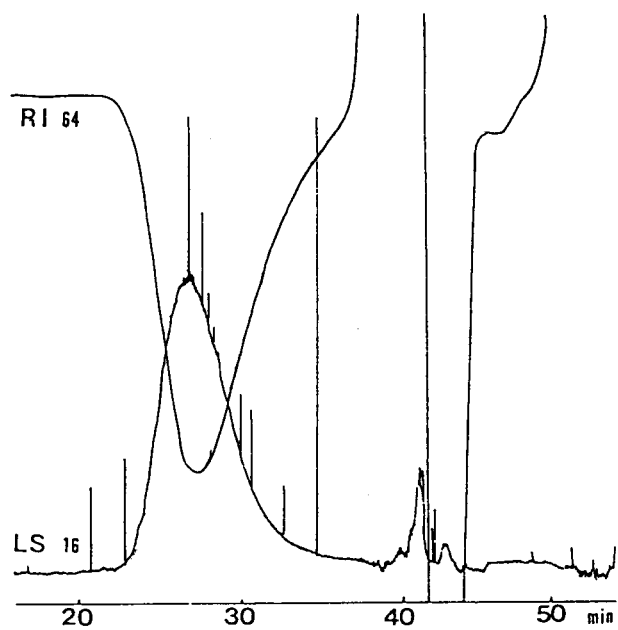


図-23 グリコールキトサンの分離

カラム ; TSKgel G5000PW+G3000PW

7.5mmID×60cm×2

溶離液 ; 0.5M CH_3COOH +0.3M Na_2SO_4

流速 ; 0.7ml/min

温度 ; 40°C