

※ 本紙に記載している以下の名称は東ソー株式会社の商標です。  
TSKgel、TSKgel SuperMultipore、SuperOligo



TOSOH

## 東ソー株式会社 バイオサイエンス事業部

東京本社 営業部 ☎(03) 5427-5180 〒105-8623 東京都港区芝3-8-2  
大阪支店 バイオサイエンス ☎(06) 6209-1948 〒541-0043 大阪市中央区高麗橋4-4-9  
名古屋支店 バイオサイエンス ☎(052) 211-5730 〒460-0003 名古屋市中区錦1-17-13  
福岡支店 ☎(092) 781-0481 〒810-0001 福岡市中央区天神1-13-2  
仙台支店 ☎(022) 266-2341 〒980-0014 仙台市青葉区本町1-11-1  
山口営業所 ☎(0834) 63-9888 〒746-0015 山口県周南市清水1-6-1  
カスタマーサポートセンター ☎(0467) 76-5384 〒252-1123 神奈川県綾瀬市早川2743-1

お問い合わせe-mail [hlc@tosoh.co.jp](mailto:hlc@tosoh.co.jp)

バイオサイエンス事業部ホームページ <http://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>

東ソーHLCデータベース <http://www2.tosoh.co.jp/hlc/hlcdb.nsf/StartJ?OpenForm>

3107SB—品番0994055A

# SEPARATION REPORT

## 高性能水系 SEC セミマイクロカラム TSKgel SuperMultiporePW シリーズおよび TSKgel SuperOligoPW について

### —— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. TSKgel SuperMultiporePW シリーズおよび TSKgel SuperOligoPW の特長	1
3. TSKgel SuperMultiporePW シリーズおよび TSKgel SuperOligoPW の基本的性質	2
3-1. 細孔特性	3
3-2. 分離性能	4
3-3. 理論段高さ (HETP) の流速依存性	6
3-4. 理論段数の温度依存性	6
3-5. 試料注入量の影響	7
3-6. 試料濃度の影響	8
3-7. 測定温度の影響	9
3-8. 各種測定条件が校正曲線に与える影響	10
3-9. クロマトグラムの歪み	12
4. 各種測定条件がクロマトグラムに与える影響	13
4-1. 溶離液の塩濃度	13
4-2. 測定温度	14
4-3. 溶離液の有機溶媒濃度	14
4-4. 溶離液の pH	15
5. TSKgel SuperMultiporePW シリーズの応用例	16
6. TSKgel SuperOligoPW の基本的性質と応用例	18
7. おわりに	20

## 1. はじめに

サイズ排除クロマトグラフィー (Size exclusion chromatography ; SEC) は、測定法としての簡便さ、再現性の良さから化学、食品、バイオ、医薬など幅広い分野で合成高分子、天然高分子を問わず、また水溶性、非水溶性の高分子材料の分子量分布を測定する方法として、世界の研究・開発者、分析関係者に広く普及し浸透しています。

一般的なSECカラムを用いるとカラムグレードの選択方法によっては近似較正曲線と実較正曲線との誤差が発生する、あるいは異なる細孔径の充てん剤を複数用いる事により高分子試料のクロマトグラムに歪みが認められる場合があります。SECでは、標準試料により作成された較正曲線に基づいて分子量が計算されるため、上述の場合正確な分子量測定が難しくなります。

弊社では、このような問題を解決するため、単一粒子内に幅広い細孔径を有した細孔多分散型有機溶媒系カラムTSKgel MultiporeH<sub>XL</sub>-M<sup>1), 2)</sup> および細孔多分散型有機溶媒系セミマイクロSECカラムTSKgel SuperMultipore HZシリーズ<sup>3)</sup> を商品化し、市場での高い評価を得ております。

今回、TSKgel MultiporeH<sub>XL</sub>-MやTSKgel Super MultiporeHZシリーズと同様に、単一粒子内に幅広い細孔径を有する新規の細孔多分散型水系充てん剤の合成法を確立し、またオリゴマー分離用の水系高性能充てん剤も開発し上市しました。

本稿では、これらの新規細孔多分散型水系SECセミマイクロカラムTSKgel SuperMultiporePWシリーズおよびオリゴマー分離用高性能水系セミマイクロSECカラムTSKgel SuperOligoPWの基本特性と応用について紹介します。

## 2. TSKgel SuperMultiporePWシリーズおよび TSKgel SuperOligoPWの特長

従来よりSEC測定においては、充てん剤細孔径の異なる各種カラムを複数本接続して分子量分画範囲の適正化を図る方法、あるいは細孔径の異なる充てん剤を最適な比率でブレンドし細孔特性 (分子量分画範囲および較正曲線の直線性) を改良したいわゆるミックスベッドカラムを使用することが一般的でした。

しかし、このような方法では、較正曲線に変曲点が存在することや試料によってはクロマトグラム上に歪みが観察されることがあり、正確性と測定精度が不十分でした。

これらの問題を解決するカラムとして細孔多分散型有機溶媒系SECカラムTSKgel MultiporeH<sub>XL</sub>-M および TSKgel SuperMultiporeHZシリーズを上市し、ご好評をいただきました。

今回、新規な合成法で開発された細孔多分散型水系SECセミマイクロカラムTSKgel SuperMultiporePWシリーズは、現行品の特長を受け継いだ上に単分散微粒子化充てん剤をセミマイクロカラムに充てんしているため、従来の水系カラム TSKgel PW<sub>XL</sub>シリーズと同等の分離が半分の測定時間で達成され、溶媒消費量も低減されました。

また、オリゴマーや低分子試料に優れた分離能を有したオリゴマー分離用高性能水系SECセミマイクロカラムTSKgel SuperOligoPWもラインナップしました。

### 3. TSKgel SuperMultiporePWシリーズおよび TSKgel SuperOligoPWの基本的性質

TSKgel SuperMultiporePWシリーズおよびTSKgel SuperOligoPWの基本的性質を表-1および表-2に、また表-3には特長をまとめました。TSKgel SuperMultipore

PWシリーズでは低分子用および高分子用に3グレードを揃えております。それぞれ分子量分画範囲が異なり、測定対象ポリマーに合わせて適切なグレードを選択することが可能です。TSKgel SuperOligoPWは粒子径、排除限界分子量が最も小さくオリゴマーの分離に適しています。

表-1 TSKgel SuperMultiporePW および TSKgel SuperOligoPWの物性一覧表

	SuperMultiporePW-N	SuperMultiporePW-M	SuperMultiporePW-H	SuperOligoPW
充てん剤基材	Polymethacrylate	Polymethacrylate	Polymethacrylate	Polymethacrylate
粒子径	4 μm	5 μm	8 μm	3 μm
排除限界分子量 (PEO, PEG/H <sub>2</sub> O)	120,000	1,000,000	10,000,000*	6,000
分子量分画範囲 (PEO, PEG/H <sub>2</sub> O)	300~50,000	500~1,000,000	1,000~10,000,000	100~3,000
カラム理論段数	16,000 TP/15 cm	12,000 TP/15 cm	7,000 TP/15 cm	16,000 TP/15 cm
カラムサイズ	6.0 mm I.D.×15 cm	6.0 mm I.D.×15 cm	6.0 mm I.D.×15 cm	6.0 mm I.D.×15 cm
ガードカラムサイズ	4.6 mm I.D.×3.5 cm	4.6 mm I.D.×3.5 cm	4.6 mm I.D.×3.5 cm	4.6 mm I.D.×3.5 cm

\*：推定値

PEO：ポリエチレンオキシド

PEG：ポリエチレングリコール

表-2 TSKgel SuperMultiporePW および TSKgel SuperOligoPWのカラム性能

商品名	理論段数 (TP/カラム) (保証値)	非対称係数	カラムサイズ (mm I.D.×cm)	粒子径 (μm)
TSKgel SuperMultiporePW-N	16,000 TP/15 cm	0.7~1.6	6.0×15	4
TSKgel SuperMultiporePW-M	12,000 TP/15 cm	0.7~1.6	6.0×15	5
TSKgel SuperMultiporePW-H	7,000 TP/15 cm	0.7~1.6	6.0×15	8
TSKgel SuperOligoPW	16,000 TP/15 cm	0.7~1.6	6.0×15	3

#### 測定条件

カラムサイズ：6.0 mm I.D.×15 cm

検出：RI (microcell)

溶離液：H<sub>2</sub>O

試料：エチレングリコール (5 g/L)

流速：0.6 mL/min

注入量：2 μL

温度：25 °C

表-3 TSKgel SuperMultiporePWシリーズおよびTSKgel SuperOligoPWの特長

特長	利点
1) 細孔多分散型充てん剤 (単一粒子内に幅広い細孔径分布を有する)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・較正曲線の直線性に優れる</li> <li>・測定試料のクロマトグラムに歪みが観察されない → 分子量測定データの正確性、再現性の向上</li> </ul>
2) 充てん剤 (単分散粒子) の微粒子化	<ul style="list-style-type: none"> <li>・短時間・高分離能測定が可能 → 従来カラム (30 cm) と同等の分離能を1/2の測定時間で達成可能</li> <li>・高流速測定においても分離能が低下しない</li> <li>・カラム性能の安定性の向上</li> </ul>
3) セミマイクロカラム	<ul style="list-style-type: none"> <li>・溶媒消費量の低減 → 従来カラム (30 cm) に比べ1/3の消費量</li> </ul>
4) 高親水性基材の採用	<ul style="list-style-type: none"> <li>・幅広い種類の試料に適用可能</li> </ul>

### 3-1. 細孔特性

図-1は、水溶離液における標準ポリエチレンオキシド (PEO)、ポリエチレングリコール (PEG) およびエチレングリコール (EG) を用いた較正曲線を示します。

低分子用グレードのTSKgel SuperMultiporePW-Nの測定可能な分子量分画範囲は、50,000~300であり、高分子用グレードの一つであるTSKgel SuperMultiporePW-Mでは、1,000,000~500、そしてもう一つの高分子用グレードであるTSKgel SuperMultiporePW-Hでは10,000,000~1,000です。これら3グレードの較正曲線は測定可能な分子量分画範囲において優れた直線性を有し

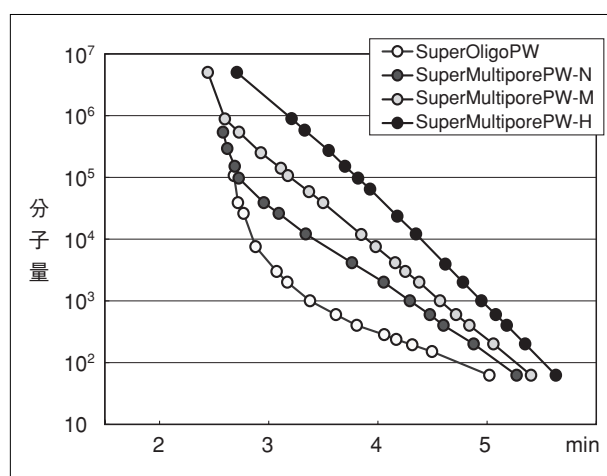


図-1 TSKgel SuperMultiporePWシリーズおよび TSKgel SuperOligoPWの較正曲線

カラム：TSKgel SuperMultiporePWシリーズおよび TSKgel SuperOligoPW (6.0 mm I.D.×15 cm)

溶離液：H<sub>2</sub>O

流速：0.6 mL/min

検出：RI

温度：室温

注入量：20 μL

試料：標準PEO、PEG、EG

ております。

また、オリゴマー分離用TSKgel SuperOligoPWは、3,000~100の分子量分画範囲を有しております。

図-2に、TSKgel SuperMultiporePW-Mと細孔径の異なる汎用カラム (TSKgel G5000PW<sub>XL</sub>、G3000PW<sub>XL</sub>) を複数接続したカラム系の較正曲線を示します (同一カラムサイズで比較)。

TSKgel SuperMultiporePW-Mの較正曲線における直線部分の直線性 (相関係数) が汎用のカラム系に比較して優れていることがわかります。

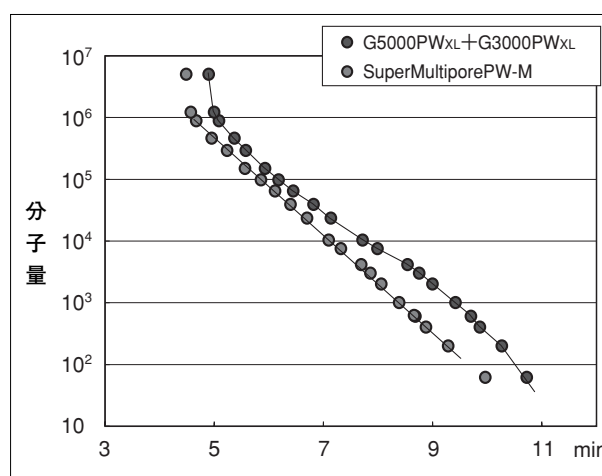


図-2 TSKgel SuperMultiporePW-Mおよび TSKgel PW<sub>XL</sub>カラムの較正曲線

カラム：TSKgel SuperMultiporePW-Mおよび TSKgel G5000PW<sub>XL</sub>+G3000PW<sub>XL</sub> (6.0 mm I.D.×15 cm×2)

溶離液：H<sub>2</sub>O

流速：0.6 mL/min

検出：RI

温度：室温

注入量：20 μL

試料：標準PEO、PEG、EG

### 3-2. 分離性能

オリゴマー分離用カラムのTSKgel SuperOligoPWは、粒子径 $3\mu\text{m}$ の充てん剤を用いているため汎用カラムTSKgel G-Oligo-PWの2倍の理論段数（単位長さ当たり）を有しています。図-3に示されるようにTSKgel SuperOligoPWは、汎用カラムと同等の分離性能を半分の測定時間で達成しています。

低分子用グレードであるTSKgel SuperMultiporePW-Nは、粒子径 $4\mu\text{m}$ の充てん剤を用いており、現行の低分子用汎用カラムTSKgel G3000PW<sub>XL</sub>に比べ単位長さ当たり2倍の理論段数を有しています。図-4に、両カラムで測定したPEOおよびPEG混合物のクロマトグラムを示します。

TSKgel SuperMultiporePW-NがTSKgel G3000PW<sub>XL</sub>と同等の分離性能を半分の測定時間で達成していること

がわかります。

高分子用グレードであるTSKgel SuperMultiporePW-Mは、粒子径 $5\mu\text{m}$ の充てん剤を用いています。細孔径の異なる汎用カラム（TSKgel G5000PW<sub>XL</sub>、G3000PW<sub>XL</sub>）を複数接続したカラム系に比較し、同等の分離性能が半分の測定時間で達成されていることが図-5に示したPEOおよびPEG混合物のクロマトグラムよりわかります。

また、図-6にTSKgel SuperMultiporePW-Hとミックスベッドタイプの汎用カラムTSKgel GMPW<sub>XL</sub>によるPEOおよびPEG混合物のクロマトグラムを示します。

TSKgel SuperMultiporePW-Hが汎用カラムと同等の分離性能を半分の測定時間で達成していることがわかります。

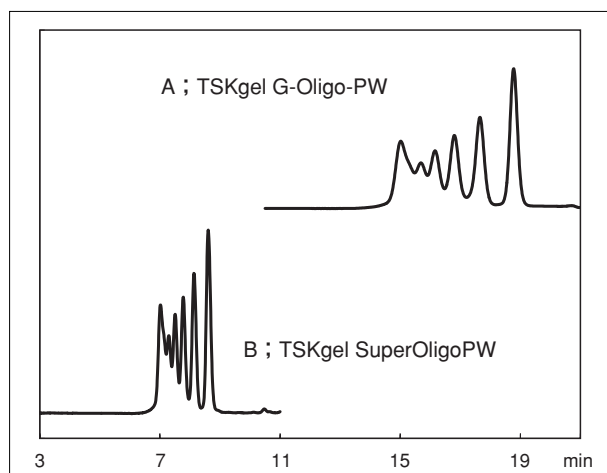


図-3 TSKgel SuperOligoPWとTSKgel G-Oligo-PWによる $\beta$ -シクロデキストリンの加水分解物の分離

カラム：A；TSKgel G-Oligo-PW  
(7.8 mm I.D.×30 cm×2)  
B；TSKgel SuperOligoPW  
(6.0 mm I.D.×15 cm×2)

溶離液：H<sub>2</sub>O

流速：A；1.0 mL/min

B；0.6 mL/min

検出：RI

温度：25℃

注入量：A；100  $\mu\text{L}$

B；20  $\mu\text{L}$

試料： $\beta$ -シクロデキストリンの加水分解物（20 g/L）

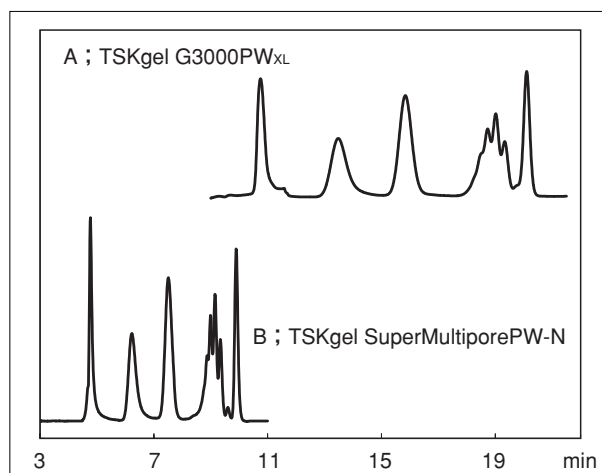


図-4 TSKgel SuperMultiporePW-NとTSKgel G3000PW<sub>XL</sub>によるPEO混合物の分離

カラム：A；TSKgel G3000PW<sub>XL</sub>  
(7.8 mm I.D.×30 cm×2)  
B；TSKgel SuperMultiporePW-N  
(6.0 mm I.D.×15 cm×2)

溶離液：H<sub>2</sub>O

流速：A；1.0 mL/min

B；0.6 mL/min

検出：RI

温度：25℃

注入量：A；100  $\mu\text{L}$

B；20  $\mu\text{L}$

試料：標準PEO、PEG

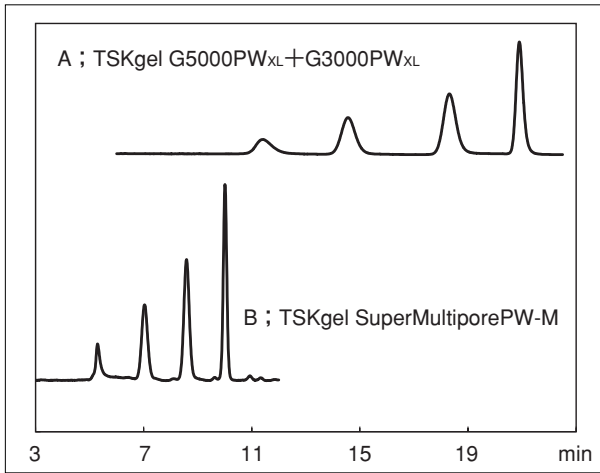


図-5 TSKgel SuperMultiporePW-Mと  
TSKgel PW<sub>XL</sub>によるPEO混合物の分離

カラム：A；TSKgel G5000PW<sub>XL</sub>+G3000PW<sub>XL</sub>  
(7.8 mm I.D.×30 cm×2)  
B；TSKgel SuperMultiporePW-M  
(6.0 mm I.D.×15 cm×2)

溶離液：H<sub>2</sub>O

流速：A；1.0 mL/min  
B；0.6 mL/min

検出：RI

温度：25℃

注入量：A；100 μL  
B；20 μL

試料：標準PEO、PEG

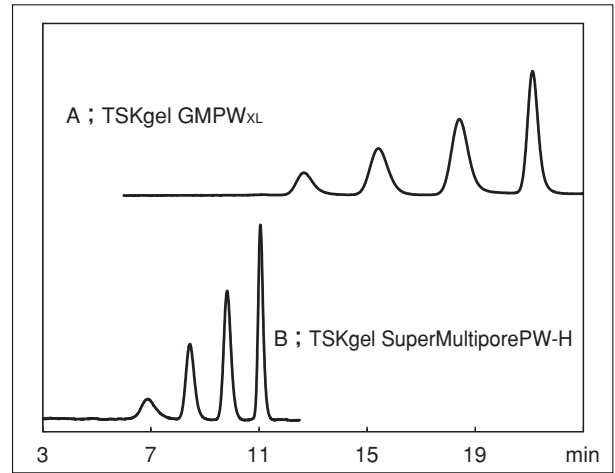


図-6 TSKgel SuperMultiporePW-Hと  
TSKgel GMPW<sub>XL</sub>によるPEO混合物の分離

カラム：A；TSKgel GMPW<sub>XL</sub> (7.8 mm I.D.×30 cm×2)  
B；TSKgel SuperMultiporePW-H  
(6.0 mm I.D.×15 cm×2)

溶離液：H<sub>2</sub>O

流速：A；1.0 mL/min  
B；0.6 mL/min

検出：RI

温度：25℃

注入量：A；100 μL  
B；20 μL

試料：標準PEO、PEG

### 3-3. 理論段高さ (HETP) の流速依存性

試料に低分子試料エチレングリコール (EG) を用いてTSKgel SuperOligoPW (粒子径: 3  $\mu\text{m}$ ) とTSKgel SuperMultiporePW-N, MおよびH (粒子径: 4  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ および8  $\mu\text{m}$ ) における理論段高さ (HETP) の流速依存性を確認した結果を図-7に示します。

これらのカラムにおける最適流量 (最小HETP) は、0.5~0.6 mL/minであることがわかります。この範囲外の流量ではHETPが徐々に大きくなりカラム効率が低下することがわかります。

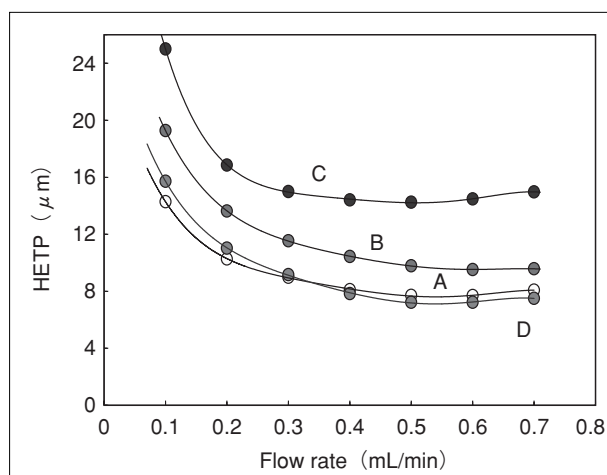


図-7 TSKgel SuperMultiporePWおよび  
TSKgel SuperOligoPWにおける流速とHETPの関係

カラム：A；TSKgel SuperMultiporePW-N  
B；TSKgel SuperMultiporePW-M  
C；TSKgel SuperMultiporePW-H  
D；TSKgel SuperOligoPW

カラムサイズ：6.0 mm I.D.×15 cm

溶離液：H<sub>2</sub>O

流速：0.10~0.70 mL/min

検出：RI

温度：25℃

注入量：2  $\mu\text{L}$

試料：EG (5 g/L)

### 3-4. 理論段数の温度依存性

試料に低分子試料エチレングリコール (EG) を用いて、TSKgel SuperMultiporePWシリーズおよびTSKgel SuperOligoPWについて、測定温度のカラム理論段数への影響を調べました (図-8)。

粒子径が小さく理論段数の高いTSKgel SuperMultiporePW-N, M およびTSKgel SuperOligoPWは温度が高くなるにつれカラム理論段数が低下することがわかりました。

高分子用グレードであるTSKgel SuperMultiporePW-Hの理論段数は、温度の影響をあまり受けず温度依存性が小さいことが示されました。

実際の測定においては、高分子試料を扱いますので測定温度は高めに設定し、試料の拡散速度を高めると共に溶離液の粘度を下げて操作圧力を下げる方が適切と言えます (温度の影響を受ける試料の場合はこの限りではありません)。

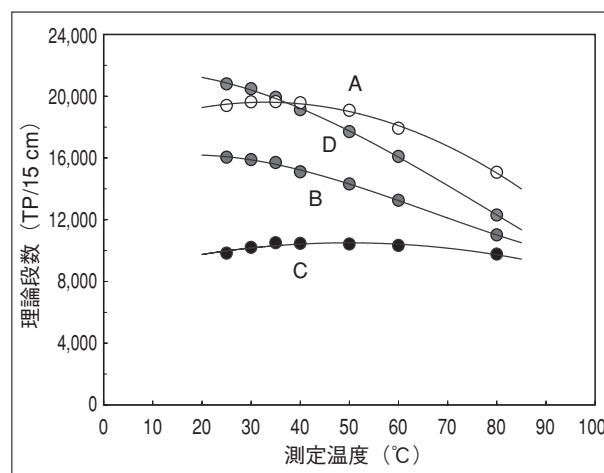


図-8 TSKgel SuperMultiporePWおよび  
TSKgel SuperOligoPWにおける温度と理論段数の関係

カラム：A；TSKgel SuperMultiporePW-N  
B；TSKgel SuperMultiporePW-M  
C；TSKgel SuperMultiporePW-H  
D；TSKgel SuperOligoPW

カラムサイズ：6.0 mm I.D.×15 cm

溶離液：H<sub>2</sub>O

流速：0.6 mL/min

検出：RI

温度：25~80℃

注入量：2  $\mu\text{L}$

試料：EG (5 g/L)



### 3-5. 試料注入量の影響

試料注入量は、分離性能や分子量分布データに大きく影響することは良く知られています。一般的には、カラムサイズ（容量）が小さく充てん剤の粒子径が小さくなるほど最大試料注入量は小さくなります。

図-9に、TSKgel SuperMultiporePWシリーズおよびTSKgel SuperOligoPWにおける低分子試料（EG）のHETPの注入量依存性を示します。

微粒子が充てんされた高性能セミマイクロカラムであるTSKgel SuperMultiporePWシリーズおよびTSKgel SuperOligoPWでは、カラム1本当りの最大試料注入量は、およそ20  $\mu\text{L}$ 程度であることがわかります。

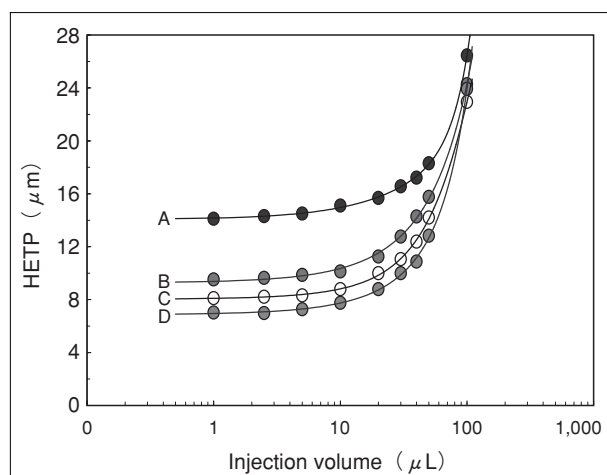


図-9 TSKgel SuperMultiporePWおよびTSKgel SuperOligoPWにおける試料注入量とHETPの関係

カラム：A；TSKgel SuperMultiporePW-N  
B；TSKgel SuperMultiporePW-M  
C；TSKgel SuperMultiporePW-H  
D；TSKgel SuperOligoPW

カラムサイズ：6.0 mm I.D.×15 cm

溶離液：H<sub>2</sub>O

流速：0.6 mL/min

検出：RI

温度：25 °C

注入量：1～100  $\mu\text{L}$

試料：EG (5 g/L)

### 3-6. 試料濃度の影響

試料注入量の違いや変動は確実に試料の溶出時間（溶出容量）に影響し、分子量値および分離性能の変動や低下につながります。さらに、最大試料注入量を超えた条件下ではこの影響が顕著に現れてきます。また、最大試料注入量を超えていなくとも測定条件（測定流速、温度、分子量および分布）、充てん剤特性あるいは充てんカラムにより、悪影響を及ぼすことは前述したとおりです。

試料濃度が高くなると、試料注入量やその他の条件が最適化されたとしても溶出時間（溶出容量）が遅く（大きく）なることが一般的です。

この現象は濃度効果と呼ばれ、一般に充てん剤の粒子径が小さいほど、試料の分子量が高いほど強くなる傾向にあります。

図-10、11に高分子用グレードであるTSKgel Super MultiporePW-Hを用いて試料濃度の異なるポリアクリルアミド（分子量約30万）を測定したクロマトグラムと平均分子量（Mw）を示します。ここでは比較的試料濃度が低い範囲（0.1～1.6 g/L）であったために、平均分子量（Mw）に変化が認められないことがわかりました。

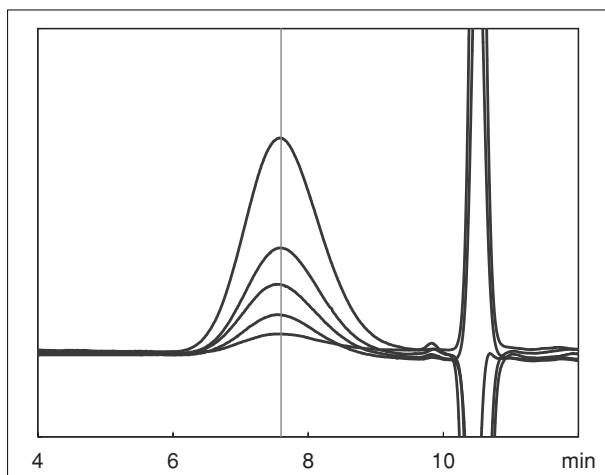


図-10 TSKgel SuperMultiporePW-Hによる  
ポリアクリルアミドのクロマトグラムの濃度依存性

カラム：TSKgel SuperMultiporePW-H  
(6.0 mm I.D.×15 cm) ×2

溶離液：H<sub>2</sub>O

流速：0.6 mL/min

検出：RI

温度：25 °C

注入量：30 μL

濃度：0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 g/L

試料：ポリアクリルアミド

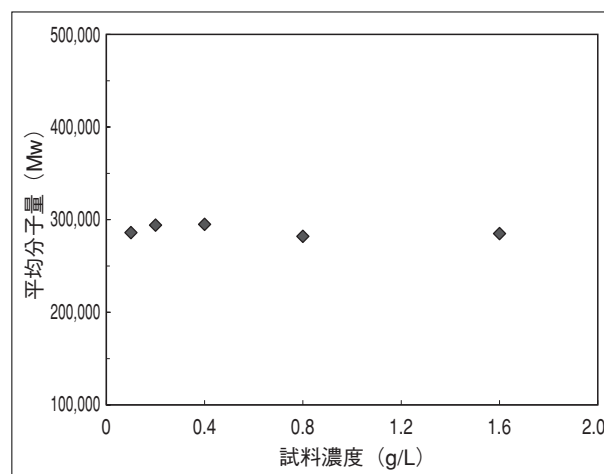


図-11 TSKgel SuperMultiporePW-Hによる  
ポリアクリルアミドの平均分子量の濃度依存性

カラム：TSKgel SuperMultiporePW-H  
(6.0 mm I.D.×15 cm) ×2

溶離液：H<sub>2</sub>O

流速：0.6 mL/min

検出：RI

温度：25 °C

注入量：30 μL

濃度：0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 g/L

試料：ポリアクリルアミド

### 3-7. 測定温度の影響

図-12にTSKgel SuperMultiporePW-Mと他社品（ミックスベッドタイプ）における標準PEO、PEGの校正曲線の温度依存性を示します。

他社品においては、温度が高くなるほど試料の溶出が遅れ（あるいは吸着して溶出しない）校正曲線の作成が

困難となり、また実試料の溶出にも影響が出るということが予想され正常なSEC測定に支障を来すことがわかりました。

一方TSKgel SuperMultiporePW-Mにおいては試料の溶出の温度依存性が非常に小さく、試料と充てん剤との間の相互作用が弱いことが確認されました。

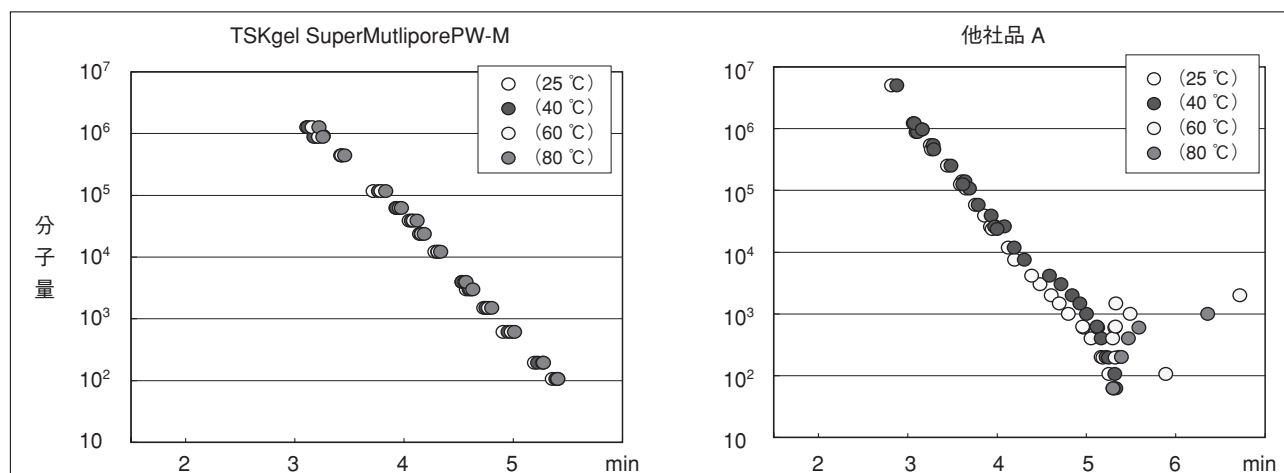


図-12 TSKgel SuperMultiporePW-Mと他社カラムの校正曲線の温度依存性

カラム：TSKgel SuperMultiporePW-Mおよび他社品（A）（6.0 mm I.D.×15 cm）

溶離液：H<sub>2</sub>O

流速：0.6 mL/min

検出：RI

温度：25, 40, 60, 80 °C

注入量：20 μL

試料：標準PEO、PEG、EG（5 g/L）

### 3-8. 各種測定条件が校正曲線に与える影響

TSKgel SuperMultiporePWシリーズおよびTSKgel SuperOligoPWの各種溶離条件におけるPEO、PEGの校正曲線を図-13～17に示します。

溶離液の塩濃度、カラム温度、pH、溶離液中の有機溶媒濃度、緩衝液の種類が変わると、何れの場合もPEO、PEGの溶出時間が僅かに変わり、校正曲線が変化しますが直線性が大きく損なわれることはありませんでした。

また、図-18に水溶離液における多糖を用いた時の校正曲線を示します。何れのグレードでも分子量分画範囲において直線性の高い校正曲線が得られています。

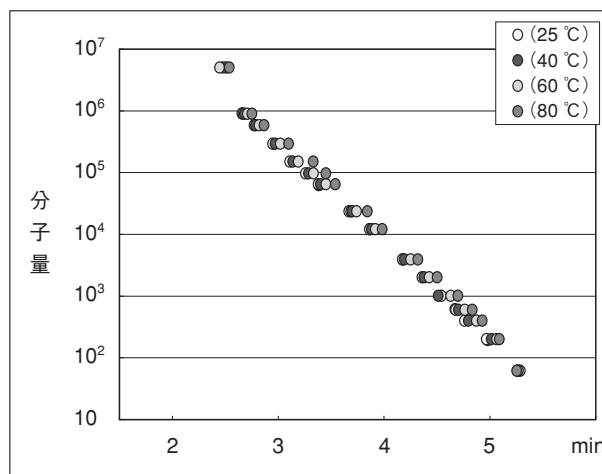


図-14 TSKgel SuperMultiporePW-Mの校正曲線  
(温度依存性)

カラム：TSKgel SuperMultiporePW-M  
(6.0 mm I.D.×15 cm)

溶離液：H<sub>2</sub>O  
流 速：0.6 mL/min  
検 出：RI  
温 度：25, 40, 60, 80 °C  
注入量：20 μL  
試 料：標準PEO、PEG、EG

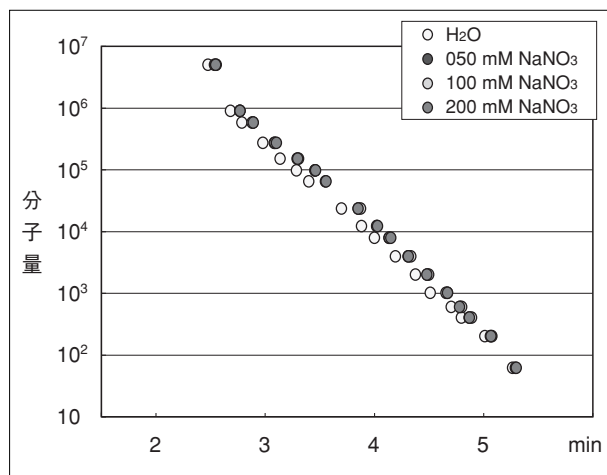


図-13 TSKgel SuperMultiporePW-Mの校正曲線  
(塩濃度依存性)

カラム：TSKgel SuperMultiporePW-M  
(6.0 mm I.D.×15 cm)

溶離液：H<sub>2</sub>O, 50, 100, 200 mmol/L NaNO<sub>3</sub>  
流 速：0.6 mL/min  
検 出：RI  
温 度：40 °C  
注入量：20 μL  
試 料：標準PEO、PEG、EG

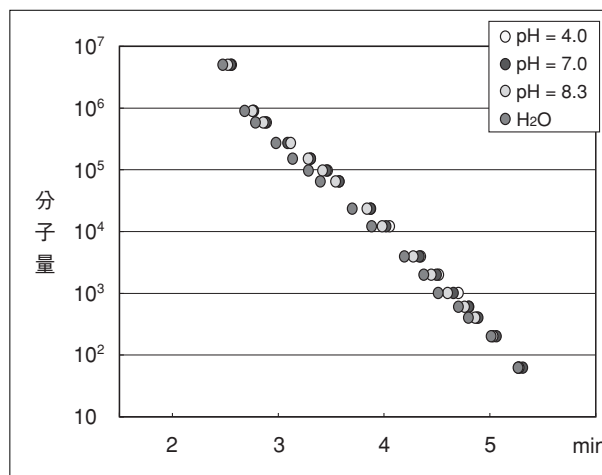


図-15 TSKgel SuperMultiporePW-Mの校正曲線  
(pH依存性)

カラム：TSKgel SuperMultiporePW-M  
(6.0 mm I.D.×15 cm)

溶離液：100 mmol/L 酢酸緩衝液  
流 速：0.6 mL/min  
検 出：RI  
温 度：40 °C  
注入量：20 μL  
試 料：標準PEO、PEG、EG

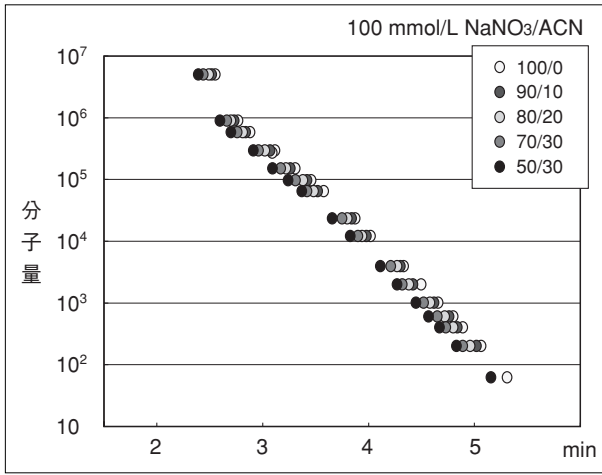


図-16 TSKgel SuperMultiporePW-Mの較正曲線  
(アセトニトリル濃度依存性)

カラム：TSKgel SuperMultiporePW-M  
(6.0 mm I.D.×15 cm)

溶離液：100 mmol/L NaNO<sub>3</sub>/アセトニトリル

流 速：0.6 mL/min

検 出：RI

温 度：40 °C

注入量：20 μL

試 料：標準PEO、PEG、EG

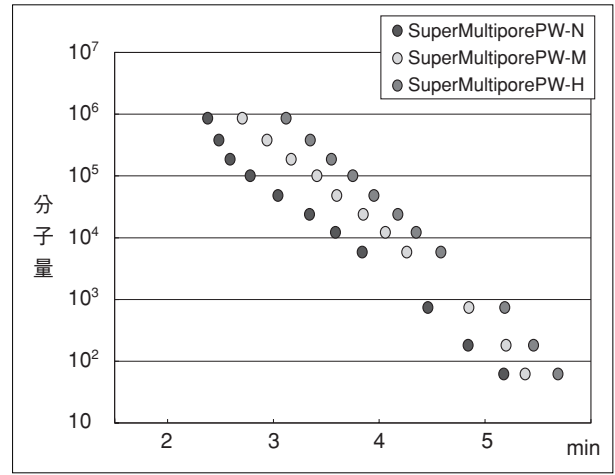


図-18 TSKgel SuperMultiporePWシリーズの  
較正曲線 (多糖/H<sub>2</sub>O)

カラム：TSKgel SuperMultiporePWシリーズ  
(6.0 mm I.D.×15 cm)

溶離液：H<sub>2</sub>O

流 速：0.6 mL/min

検 出：RI

温 度：25 °C

注入量：20 μL

試 料：標準ポリサッカライド

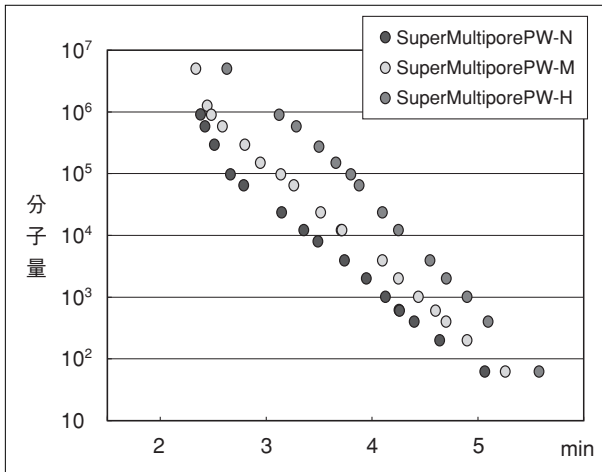


図-17 TSKgel SuperMultiporePWシリーズの  
較正曲線 (炭酸緩衝液)

カラム：TSKgel SuperMultiporePWシリーズ  
(6.0 mm I.D.×15 cm)

溶離液：100 mmol/L 炭酸緩衝液 (pH=10.6)

流 速：0.6 mL/min

検 出：RI

温 度：25 °C

注入量：20 μL

試 料：標準PEO、PEG、EG

### 3-9. クロマトグラムの歪み

一般にSECは細孔径の異なるグレードのカラムを複数本接続し、あるいは細孔径の異なるグレードを混合したミックスベッドカラムで測定されます。この場合、試料によってはクロマトグラム上に歪みが観察されることがあります。

一方、細孔多分散型充填カラムであるTSKgel SuperMultiporePWシリーズを用いた場合は、その最大の特長である細孔特性（細孔構造）によりクロマトグラムに歪みが認められません。

以下にTSKgel SuperMultiporePW-Mと汎用カラムTSKgel PW<sub>XL</sub>（異種グレードカラム接続系）によるポリマーのクロマトグラムの比較を行いました。

図-19にTSKgel SuperMultiporePW-MとTSKgel

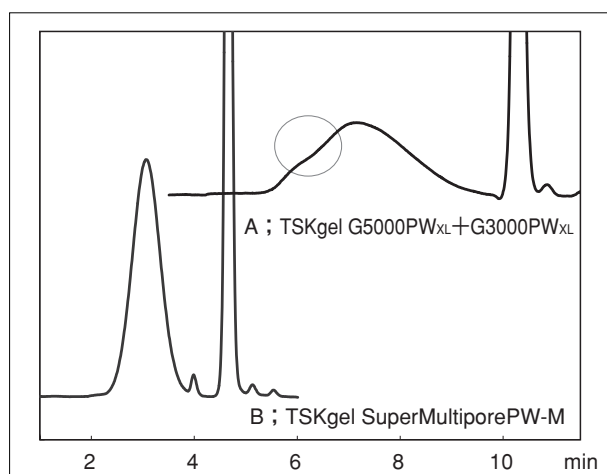


図-19 TSKgel SuperMultiporePW-Mと  
TSKgel PW<sub>XL</sub>によるポリビニルピロリドンの分離

カラム：A；TSKgel G5000PW<sub>XL</sub>+G3000PW<sub>XL</sub>  
(7.8 mm ID.×30 cm)  
B；TSKgel SuperMultiporePW-M  
(6.0 mm ID.×15 cm)

溶離液：100 mmol/L NaNO<sub>3</sub>

流速：A；1.0 mL/min  
B；0.6 mL/min

検出：RI

温度：25℃

注入量：A；100 μL  
B；20 μL

試料：ポリビニルピロリドン（3 g/L）

G5000PW<sub>XL</sub>+G3000PW<sub>XL</sub>によるポリビニルピロリドン（PVP）のクロマトグラムを示します。TSKgel PW<sub>XL</sub>カラムでは、クロマトグラム上に歪みが観られますが、TSKgel SuperMultiporePW-Mではこの現象が観察されません。

図-20にはTSKgel SuperMultiporePW-MとTSKgel G5000PW<sub>XL</sub>+G3000PW<sub>XL</sub>によるデキストランのクロマトグラムを示します。TSKgel G5000PW<sub>XL</sub>+G3000PW<sub>XL</sub>を用いた場合は、PVPと同様にクロマトグラム上に歪みが観察されます。また、この歪み現象は特定の溶出時間（6.5分付近）に起こっています。一方、TSKgel SuperMultiporePW-Mにおいては、デキストランにおいてもクロマトグラムに歪みが観察されません。

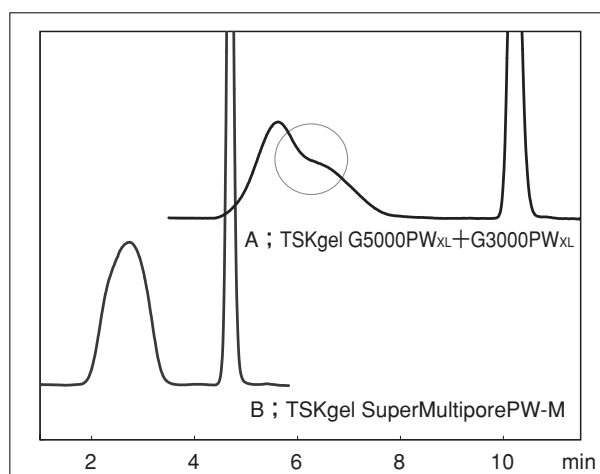


図-20 TSKgel SuperMultiporePW-Mと  
TSKgel PW<sub>XL</sub>によるデキストランの分離

カラム：A；TSKgel G5000PW<sub>XL</sub>+G3000PW<sub>XL</sub>  
(7.8 mm ID.×30 cm)  
B；TSKgel SuperMultiporePW-M  
(6.0 mm ID.×15 cm)

溶離液：100 mmol/L NaNO<sub>3</sub>

流速：A；1.0 mL/min  
B；0.6 mL/min

検出：RI

温度：25℃

注入量：A；100 μL  
B；20 μL

試料：デキストラン（3 g/L）

## 4. 各種測定条件がクロマトグラムに与える影響

### 4-1. 溶離液の塩濃度

図-21にTSKgel SuperMultiporePW-Mを用いてPVPを溶離液中の硝酸ナトリウム (NaNO<sub>3</sub>) 濃度を変えて測定した結果を示します。

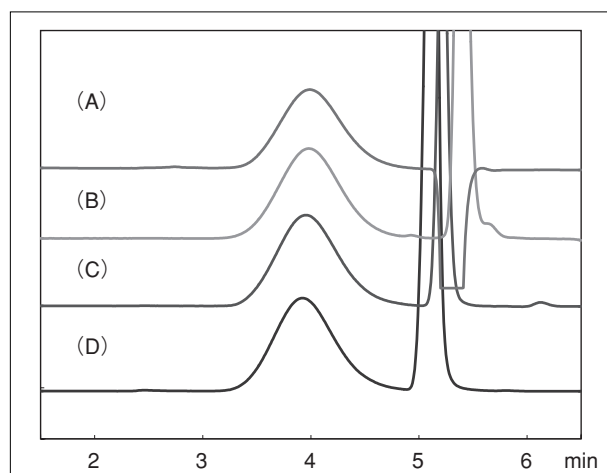


図-21 TSKgel SuperMultiporePW-Mによるポリビニルピロリドンのクロマトグラムおよび分子量の塩濃度依存性

カラム：TSKgel SuperMultiporePW-M  
(6.0 mm I.D.×15 cm)

溶離液：25, 50, 100, 200 mmol/L NaNO<sub>3</sub>

流速：0.6 mL/min

検出：RI

温度：40 °C

注入量：20 μL

試料：PVP (3 g/L)

	NaNO <sub>3</sub> 濃度 (mmol/L)	Mw
(A)	200	19,000
(B)	100	19,000
(C)	50	21,000
(D)	25	22,000

また、図-22には、試料をデキストランとし、図-21と同様の条件で測定した結果を示します。

いずれの条件下においても良好でほぼ均一なクロマトグラムが得られました。分子量は、溶離液の塩濃度により試料の分子サイズが異なるため差が見られます。

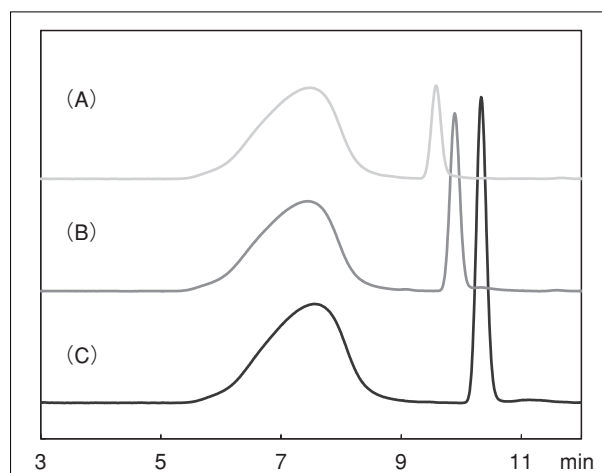


図-22 TSKgel SuperMultiporePW-Mによるデキストランのクロマトグラムおよび分子量の塩濃度依存性

カラム：TSKgel SuperMultiporePW-M  
(6.0 mm I.D.×15 cm×2)

溶離液：25, 50, 100 mmol/L NaNO<sub>3</sub>

流速：0.6 mL/min

検出：RI

温度：40 °C

注入量：20 μL

試料：デキストラン (3 g/L)

	NaNO <sub>3</sub> 濃度 (mmol/L)	Mw
(A)	100	92,000
(B)	50	91,000
(C)	25	90,000

## 4-2. 測定温度

図-23に、TSKgel SuperMultiporePW-Mを用いてPVPを測定した時のクロマトグラムおよび平均分子量(Mw)の温度依存性データを示しました。

25～60℃の温度範囲ではMwおよびクロマトグラムに顕著な影響が見られませんでした。

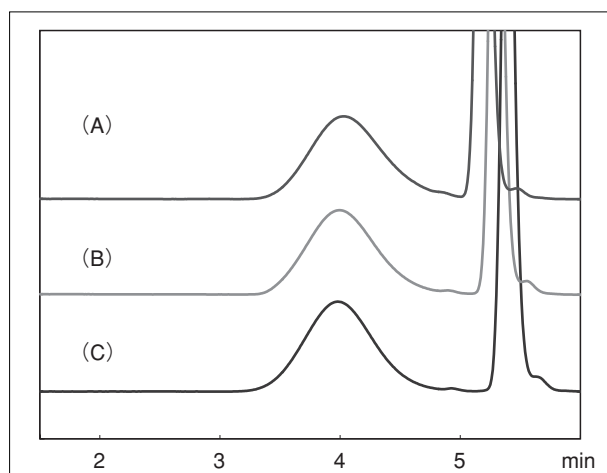


図-23 TSKgel SuperMultiporePW-Mによるポリビニルピロリドンのクロマトグラムおよび分子量の温度依存性

カラム：TSKgel SuperMultiporePW-M  
(6.0 mm I.D.×15 cm)

溶離液：100 mmol/L NaNO<sub>3</sub>

流速：0.6 mL/min

検出：RI

温度：25℃

注入量：20 μL

試料：PVP (3 g/L)

	温度 (℃)	Mw
(A)	60	20,000
(B)	40	19,000
(C)	25	19,000

## 4-3. 溶離液の有機溶媒濃度

図-24にTSKgel SuperMultiporePW-Hを、図-25にはTSKgel GMPW<sub>XL</sub>を用いてPVPを溶離液中の有機溶媒濃度を変えて測定した結果を示します。

TSKgel SuperMultiporePW-Hにおいては、クロマトグラムへの有機溶媒濃度の影響がほとんどないのに対し、汎用カラムTSKgel GMPW<sub>XL</sub>では有機溶媒を含有しない条件、また有機溶媒濃度が50%の条件下においては試料と充てん剤との間の相互作用が強まり、試料の溶出が遅れ結果的にMwが小さくなることがわかりました。

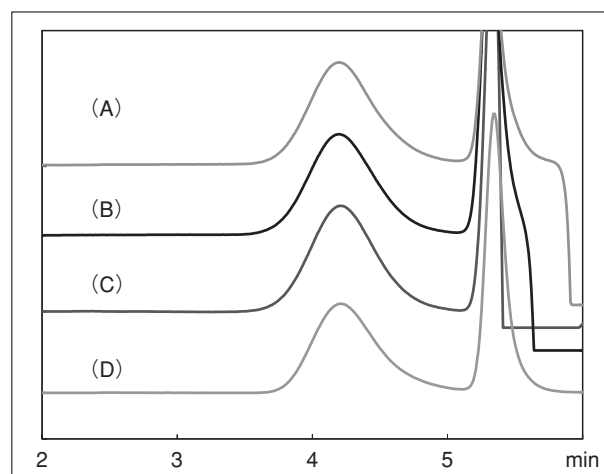


図-24 TSKgel SuperMultiporePW-Hによるポリビニルピロリドンのクロマトグラムおよび分子量の有機溶媒 (ACN) 濃度依存性

カラム：TSKgel SuperMultiporePW-H  
(6.0 mm I.D.×15 cm)

溶離液：100 mmol/L NaNO<sub>3</sub>/アセトニトリル

流速：0.6 mL/min

検出：RI

温度：40℃

注入量：20 μL

試料：PVP (3 g/L)

	100 mmol/L NaNO <sub>3</sub> / アセトニトリル	Mw
(A)	70/30	24,000
(B)	80/20	20,000
(C)	90/10	20,000
(D)	100/0	19,000



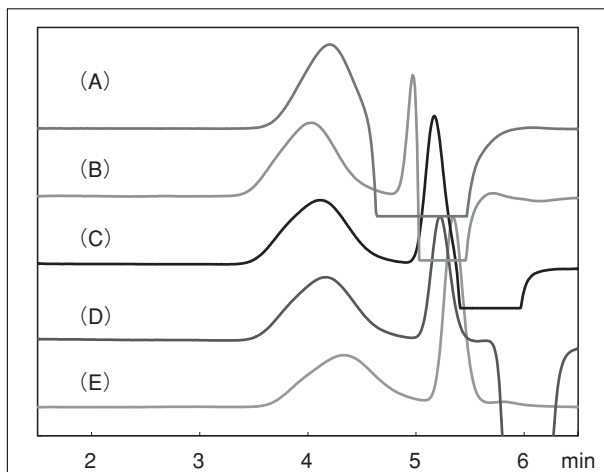


図-25 TSKgel GMPW<sub>XL</sub>によるポリビニルピロリドンのクロマトグラムおよび分子量の有機溶媒(ACN)濃度依存性

カラム：TSKgel GMPW<sub>XL</sub> (6.0 mm I.D.×15 cm)

溶離液：100 mmol/L NaNO<sub>3</sub>/アセトニトリル

流速：0.6 mL/min

検出：RI

温度：40℃

注入量：20 μL

試料：PVP (3 g/L)

	100 mmol/L NaNO <sub>3</sub> / アセトニトリル	Mw
(A)	50/50	15,000
(B)	70/30	23,000
(C)	80/20	21,000
(D)	90/10	20,000
(E)	100/0	13,000

#### 4-4. 溶離液のpH

図-26にTSKgel SuperMultiporePW-Mを用いて、溶離液のpHを変えてPVPを測定した結果を示します。pHによりピークトップの溶出位置、及び高分子側のピーク形状が異なることが分かります。これは充てん剤の表面特性がpHにより変化したことが原因と考えられます。充てん剤と試料の相互作用の違いにより分子量値も異なります。

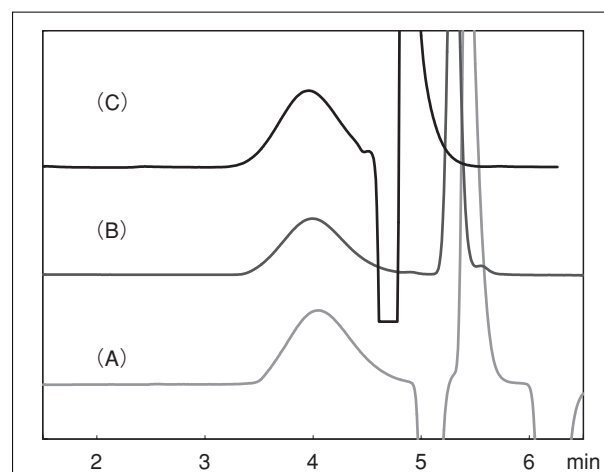


図-26 TSKgel SuperMultiporePW-Mによるポリビニルピロリドンのクロマトグラムおよび分子量のpH依存性

カラム：TSKgel SuperMultiporePW-M

(6.0 mm I.D.×15 cm)

溶離液：100 mmol/L 酢酸緩衝液

流速：0.6 mL/min

検出：RI

温度：40℃

注入量：20 μL

試料：PVP (3 g/L)

	pH	Mw
(A)	4.0	17,000
(B)	7.0	19,000
(C)	8.3	22,000

## 5. TSKgel SuperMultiporePWシリーズの応用例

図-27にTSKgel SuperMultiporePW-Hと汎用品 (TSKgel GMPW<sub>XL</sub>および他社品) を用いて、100 mmol/L NaNO<sub>3</sub>溶離液で測定したPVPのクロマトグラムおよびMwを示します。

TSKgel SuperMultiporePW-Hでは、試料の分子量データおよびクロマトグラムとも良好な結果が得られていますが、TSKgel GMPW<sub>XL</sub>では、試料と充てん剤間での相互作用の影響で試料の溶出が遅れて分子量が小さく算出されていました。

また、他社品においては、分子量はそれ程小さく算出されませんが、クロマトグラムに歪みが観察されました。

図-28に、TSKgel SuperMultiporePW-Mと汎用品 (TSKgel G5000PW<sub>XL</sub>, G3000PW<sub>XL</sub>) を用いて、100 mmol/L NaNO<sub>3</sub>溶離液で各種ポリマーを測定したクロマトグラムおよびMwを示します。

汎用品 (TSKgel G5000PW<sub>XL</sub>, G3000PW<sub>XL</sub>) では、試料と充てん剤間での相互作用の影響で試料の溶出が遅れて分子量が小さく算出される場合があります。また、試料によってはクロマトグラムに歪みが観察されました。

表-4には、図-28において測定した一部試料のMwの測定再現性データを示します。

TSKgel SuperMultiporePW-Mで得られたMwの測定再現性 (日内) は、汎用品よりも優れていることが確認されました。

図-29に、TSKgel SuperMultiporePW-Hを用いて、100 mmol/L NaNO<sub>3</sub>溶離液で測定した各種ポリマーのク

ロマトグラムおよびMwを示します。

図-28のTSKgel SuperMultiporePW-Mと同様にTSKgel SuperMultiporePW-Hにおいても各種ポリマーのクロマトグラムおよびMwとも良好な結果が得られました。

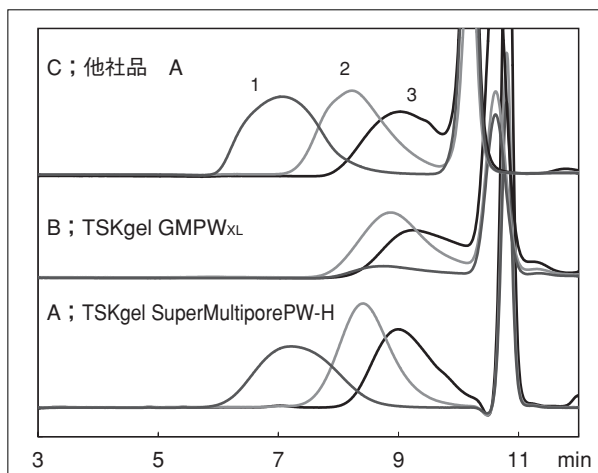


図-27 TSKgel SuperMultiporePW-Hと現行品によるポリビニルピロリドンのクロマトグラムおよび分子量

カラム：A；TSKgel SuperMultiporePW-H  
B；TSKgel GMPW<sub>XL</sub>  
C；他社品 (A)

カラムサイズ：6.0 mm I.D.×15 cm×2

溶離液：100 mmol/L NaNO<sub>3</sub>

流速：0.6 mL/min

検出：RI

温度：40℃

注入量：20 μL

試料：PVP (3 g/L)

	Mw		
	(A)	(B)	(C)
1. PVP (K-15)	6,500	2,600	4,500
2. PVP (K-30)	25,000	5,200	21,000
3. PVP (K-90)	340,000	5,000	300,000

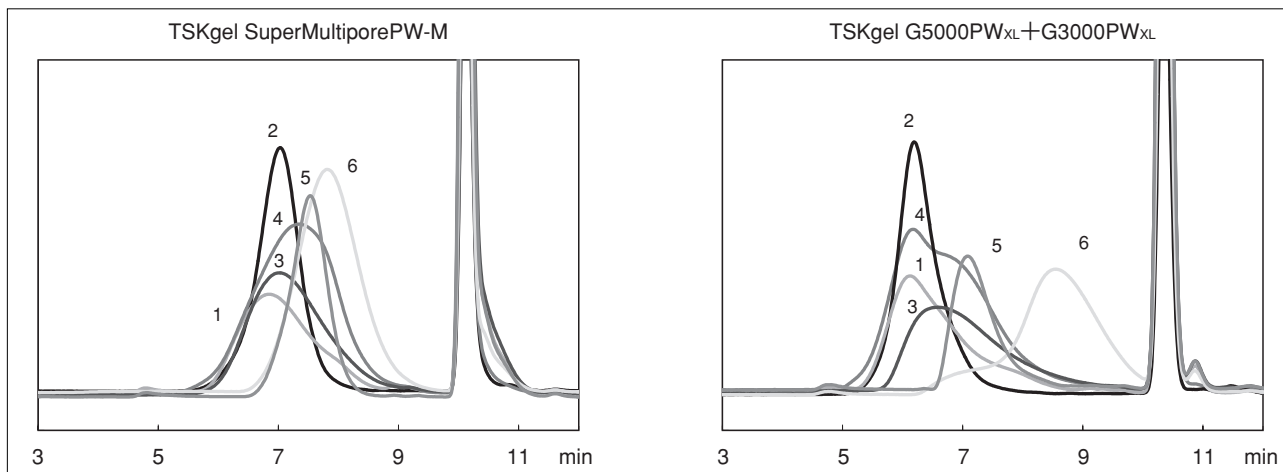


図-28 TSKgel SuperMultiporePW-MとTSKgel G5000PW<sub>XL</sub>+G3000PW<sub>XL</sub>による各種ポリマーのクロマトグラムおよび分子量

カラム：(6.0 mm I.D.×15 cm) ×2

溶離液：100 mM NaNO<sub>3</sub>

流速：0.6 mL/min

検出：RI

温度：40℃

注入量：20 μL

試料：各種ポリマー (3 g/L)

	Mw	
	SuperMultiporePW-M	G5000PW <sub>XL</sub> +3000PW <sub>XL</sub>
1. カルボキシメチルセルロース	134,000	115,000
2. アラビアゴム	126,000	125,000
3. ヒドロキシプロピルセルロース	108,000	55,000
4. デキストラン	105,000	105,000
5. コンドロイチン硫酸ナトリウム	48,000	28,000
6. ポリビニルピロリドン (K-30)	26,000	9,300

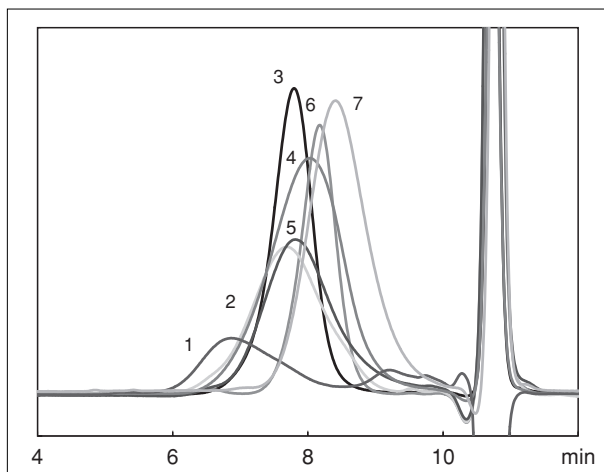


図-29 TSKgel SuperMultiporePW-Hによる各種ポリマーのクロマトグラムおよび分子量

カラム：TSKgel SuperMultiporePW-H(6.0 mm I.D.×15 cm)×2

溶離液：100 mmol/L NaNO<sub>3</sub>

流速：0.6 mL/min

検出：RI

温度：40℃

注入量：20 μL

試料：各種ポリマー (3 g/L)

	Mw
1. デキストラン (200)	470,000
2. カルボキシメチルセルロース	150,000
3. アラビアゴム	103,000
4. デキストラン (EH-7114)	95,000
5. ヒドロキシプロピルセルロース	91,000
6. コンドロイチン硫酸ナトリウム	41,000
7. ポリビニルピロリドン (K-30)	29,000

表-4 TSKgel SuperMultiporePW-Mと汎用カラムにおける各種試料のMw測定再現性 (日内)

(n=5)

	コンドロイチン硫酸Na		アラビアゴム		カルボキシメチルセルロース	
	平均値	RSD(%)	平均値	RSD(%)	平均値	RSD(%)
TSKgel SuperMultiporePW-M	48,000	0.49	126,000	0.35	134,000	0.67
TSKgel PWXLシリーズ(TSKgel G5000PW <sub>XL</sub> +3000PW <sub>XL</sub> )	34,600	1.89	125,000	0.57	115,000	1.05

測定条件

カラム：TSKgel SuperMultiporePW-M  
(6.0 mm I.D.×15 cm×2)

TSKgel G5000PW<sub>XL</sub>+G3000PW<sub>XL</sub>  
(7.8 mm I.D.×30 cm×2)

溶離液：100 mmol/L NaNO<sub>3</sub>

流速：0.6 mL/min (TSKgel SuperMultiporePW-M)  
1.0 mL/min (TSKgel G5000PW<sub>XL</sub>+G3000PW<sub>XL</sub>)

温度：40℃

検出：RI

注入量：20 μL (TSKgel SuperMultiporePW-M)  
100 μL (TSKgel G5000PW<sub>XL</sub>+G3000PW<sub>XL</sub>)

## 6. TSKgel SuperOligoPWの基本的性質と応用例

図-30にTSKgel SuperOligoPWと汎用カラム(TSKgel G-Oligo-PW)を用いて、ポリエチレングリコール(PEG 200)を測定したクロマトグラムを示します。

TSKgel SuperOligoPWでは、汎用カラムと同等の分離性能が半分の測定時間で達成されていることがわかります。

TSKgel SuperOligoPWと汎用カラム(TSKgel G-Oligo-PW)を用いて、図-31にマルトペンタオース分解物を、図-32にマルトオリゴ糖を、図-33にはセロオリゴ糖を測定したクロマトグラムを示します。

何れの試料においてもTSKgel SuperOligoPWでは、

汎用カラムと同等の分離性能が半分の測定時間で達成されていることがわかります。

図-34にTSKgel SuperOligoPWを用いて、マルトオリゴ糖を測定温度(25, 40, 60, 80および95℃)を変えて測定したクロマトグラムを示します。

温度が高くなるほど試料の溶出が早まり分離能が高くなることも確認されました。特に高分子試料について分離能の向上が顕著でした。

図-35に、TSKgel SuperOligoPWにおける最適化された条件下でのアルコール類のクロマトグラムを示します。

この条件下では、SEC溶出ではなくHIC溶出での測定が行われています。

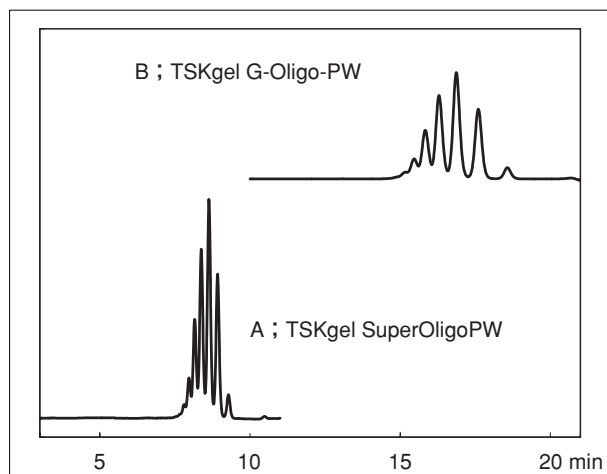


図-30 TSKgel SuperOligoPWとTSKgel G-Oligo-PWによるポリエチレングリコールのクロマトグラム

カラム：A；TSKgel SuperOligoPW  
(6.0 mm I.D.×15 cm×2)  
B；TSKgel G-Oligo-PW  
(7.8 mm I.D.×30 cm×2)

溶離液：H<sub>2</sub>O

流速：A；0.6 mL/min  
B；1.0 mL/min

検出：RI

温度：40℃

注入量：A；20 μL  
B；100 μL

試料：ポリエチレングリコール(PEG 200)

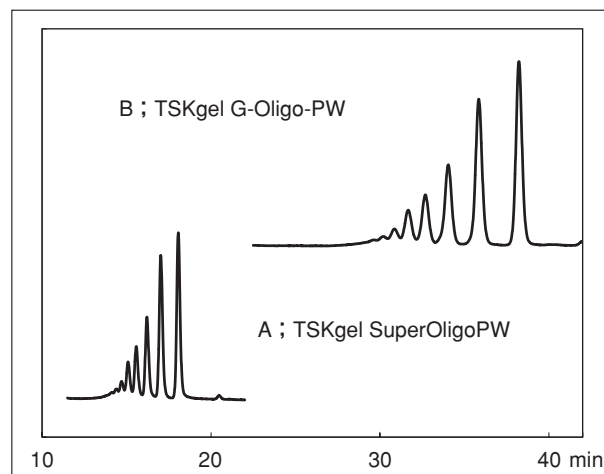


図-31 TSKgel SuperOligoPWとTSKgel G-Oligo-PWによるマルトペンタオースのクロマトグラム

カラム：A；TSKgel SuperOligoPW  
(6.0 mm I.D.×15 cm×4)  
B；TSKgel G-Oligo-PW  
(7.8 mm I.D.×30 cm×4)

溶離液：H<sub>2</sub>O

流速：A；0.6 mL/min  
B；1.0 mL/min

検出：RI

温度：25℃

注入量：A；10 μL  
B；50 μL

試料：マルトペンタオース分解物

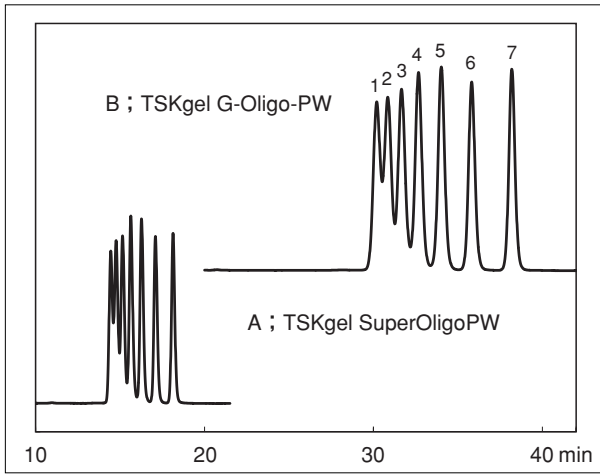


図-32 TSKgel SuperOligoPWとTSKgel G-Oligo-PWによるマルトオリゴ糖のクロマトグラム

カラム：A；TSKgel SuperOligoPW (6.0 mm I.D.×15 cm×4)  
 B；TSKgel G-Oligo-PW (7.8 mm I.D.×30 cm×4)  
 溶離液：H<sub>2</sub>O  
 流速：A；0.6 mL/min  
 B；1.0 mL/min  
 検出：RI  
 温度：25℃  
 注入量：A；10 μL  
 B；50 μL  
 試料：1. マルトペンタオース、2. マルトヘキサオース、  
 3. マルトペンタオース、4. マルトテトラオース、  
 5. マルトトリオース、6. マルトース、  
 7. グルコース

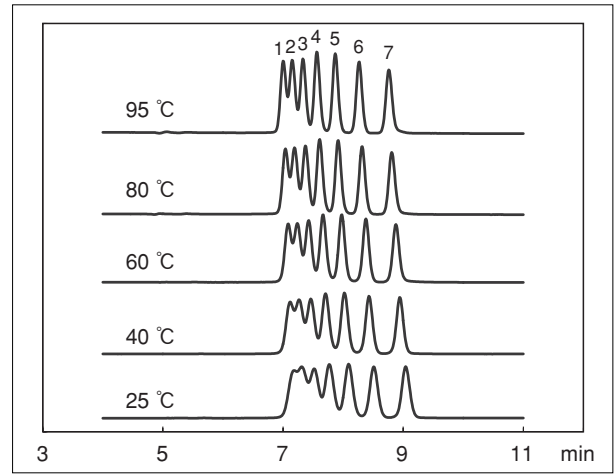


図-34 TSKgel SuperOligoPWによるマルトオリゴ糖のクロマトグラムの温度依存性

カラム：TSKgel SuperOligoPW (6.0 mm I.D.×15 cm×2)  
 溶離液：H<sub>2</sub>O  
 流速：0.6 mL/min  
 検出：RI  
 温度：25, 40, 60, 80, 95℃  
 注入量：10 μL  
 試料：1. マルトヘプタオース、2. マルトヘキサオース、  
 3. マルトペンタオース、4. マルトテトラオース、  
 5. マルトトリオース、6. マルトース、  
 7. グルコース

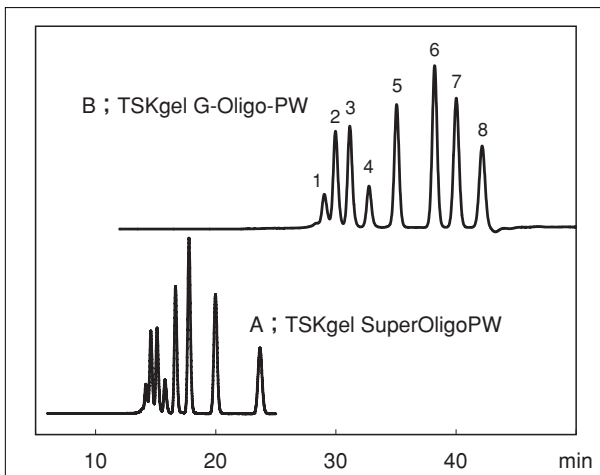


図-33 TSKgel SuperOligoPWとTSKgel G-Oligo-PWによるセロオリゴ糖のクロマトグラム

カラム：A；TSKgel SuperOligoPW (6.0 mm I.D.×15 cm×2)  
 B；TSKgel G-Oligo-PW (7.8 mm I.D.×30 cm×2)  
 溶離液：H<sub>2</sub>O  
 流速：A；0.3 mL/min  
 B；0.5 mL/min  
 検出：RI  
 温度：55℃  
 注入量：A；5 μL  
 B；20 μL  
 試料：1. セロヘキサオース、2. セロペンタオース、  
 3. セロテトラオース、4. セロトリオース、  
 5. セロビオース、6. グルコース  
 7. エチレングリコール、8. エタノール

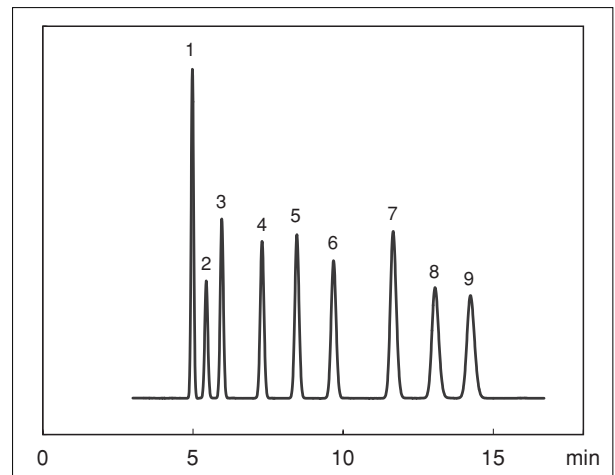


図-35 TSKgel SuperOligoPWによるアルコール類の分離クロマトグラム

カラム：TSKgel SuperOligoPW (6.0 mm I.D.×15 cm)  
 溶離液：H<sub>2</sub>O  
 流速：0.6 mL/min  
 検出：RI  
 温度：80℃  
 注入量：2 μL  
 試料：1. エチレングリコール、2. メタノール、  
 3. エタノール、4. n-プロパノール、  
 5. 2-ブタノール、6. n-ブタノール、  
 7. sec-アミルアルコール、8. iso-アミルアルコール  
 9. n-アミルアルコール

## 7. おわりに

TSKgel SuperMultiporePWシリーズは、細孔多分散型充てん剤を充てんした高性能水系SECセミマイクロカラムであり、従来の細孔径の異なるカラム接続法やミックスペッドカラムなどに比較して、理想的なクロマトグラムが得られ、その結果として測定再現性が高く正確な分子量分布データが得られることがお分かり頂けたと思います。

また、本充てん剤は、新規な合成法により微粒子化と単分散粒子化を達成し、これまでの分離性能を維持した上で高速分析を実現しました。

加えて、オリゴマー分離用TSKgel SuperOligoPWは、従来型カラムの分離性能を半分の測定時間で達成し、高速分析を可能としました。

なお、本充てんカラムは、省溶媒に対応したダウンサイジングカラムを採用しており、SEC測定においては送液再現性、ベースライン安定性に優れた弊社高速SECシステム専用機であるHLC-8320GPCでの測定を推奨致します。

## (参考文献)

- 1) M.Nagata,T.Kato,H.Furutani,J.Liq.Chrom & Rel.Technol.,21 (10) 1471-1484 (1998)
- 2) 東ソー研究報告 第41巻 (1997) 細孔多分散型GPC用充填カラム  
TSKgel MultiporeHシリーズの開発
- 3) 東ソーセパレーションレポート No.103、105 有機溶媒系サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 用細孔多分散型セミマイクロカラムTSKgel SuperMultipore HZシリーズについて