

SEPARATION REPORT

高速 GPC カラムの原理と応用 TSK-GEL H_{XL} タイプについて (オリゴマー編)

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. GPC の分離原理	1
3. TSK-GEL H _{XL} タイプ	2
4. カラムの選択法	2
5. カラムの組み合わせ	4
6. TSK-GEL H _{XL} タイプと H タイプの比較	6
7. 流速の影響	8
8. 温度の影響	9
9. 試料量の影響	9
10. おわりに	10
11. データ集	10

1. はじめに

高速液体クロマトグラフィは、分離のメカニズムからゲル浸透* (GPC)、吸着 (LSC)、分配 (LLC)、イオン交換 (I×C) クロマトグラフィの4種類の分離モードに分類される。これらの分離モードの中で、GPCは充填剤と試料の物理的な相互作用を利用しないで、試料分子の大きさにより分離する点に特徴がある。したがってGPCから得られる最大の情報は、試料の大きさ(分子量)に関するものであり、未知試料の解析には非常に有力な手段である。

またGPCでは、他のモードのように移動相の組成を探索する必要がないので、簡単に測定できる利点がある。

現在、GPCは、低分子、オリゴマー、高分子の分析、工程管理のみならず、複雑な試料の前処理、分取などに利用されている。

ここでは、従来のGPCの測定時間を1/2短縮した高性能カラム、TSK-GEL H_{XL}タイプの性能を中心に、GPCの利用法について紹介したい。

*広義のGPCには、移動相に有機溶媒を使用するものと水溶液を使用するものがある。最近では水溶液を使用するものは、ゲル濾過クロマトグラフィ (GFC) として別の分類がなされている。

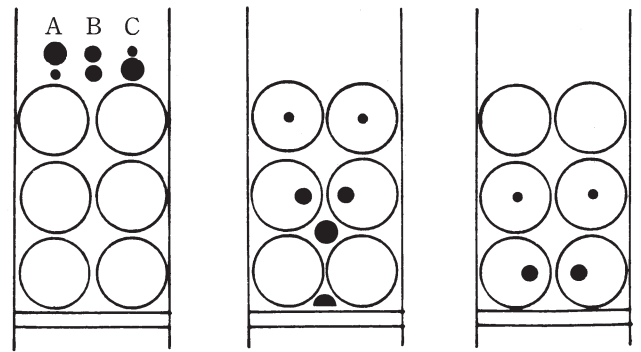
2. GPCの分離原理

GPCで使用するカラムの分離性能を表示するものに較正曲線(calibration curve)がある。図-1は、較正曲線とカラムにおける試料の分離の様子を模式的に示したものである。GPCに使用する充填剤には直径数十~数千Åの細孔(pore)が無数にあって、試料分子が自由に細孔に浸透できると考えられている。

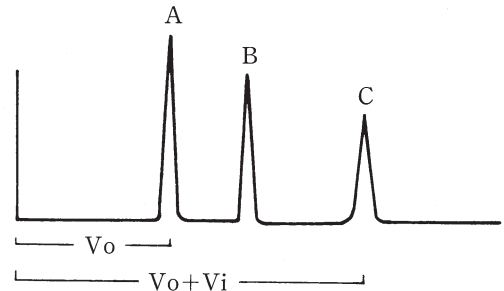
今、カラムに分子量の異なる3種類の試料を注入して(図-1.1)、移動相を流すと、充填剤の細孔より大きいもの(A)は、充填剤の外側(カラムのデッドボリューム、 V_0)を通過して溶出する。

一方、充填剤の細孔径より小さいもの(C)は細孔内部(V_i)に浸透できるので、遅れて溶出する。

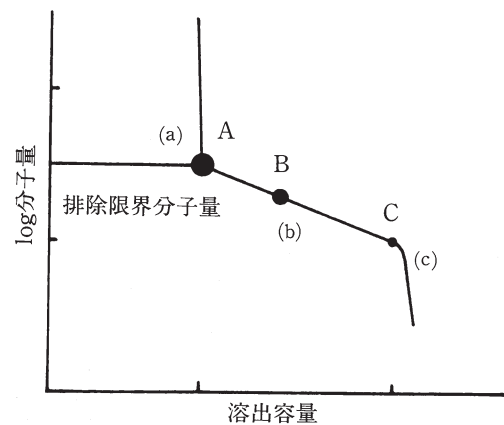
試料が浸透できる細孔の割合は、試料の大きさによって異なり、AとCの中間の大きさの試料(B)は、AとCの中間に溶出する。カラムからの溶出液を適当な検出器でモニターすると図-1.2のようなクロマトグラムが得られる。横軸は溶出時間もしくは溶出容量である。GPCでは、試料は必ず大きいものから溶出するので、溶出容量の比較



1) 試料の分離



2) クロマトグラム



3) 較正曲線

図-1 GPCの分離原理

によって分子量の大小を推定することができる。図-1.3は、試料の溶出容量(時間)と試料の分子量の対数をプロットしたもので、較正曲線といわれる。較正曲線は、通常2本の比較的勾配が大きい部分と、1本のなだらかな部分とからなる。

試料間の分離は較正曲線の勾配から判断でき、勾配が小さいカラムほど分離がよい。

較正曲線の(a)の部分は、試料が充填剤の細孔よりも大きいため、 V_0 に溶出することを表わしている。細孔に浸透できる最大の分子量を、排除限界分子量という。

(c)の部分は、試料が全ての細孔に浸透することを表わしている。実際に分離に有効なのは(b)の部分であり、試

料の大きさに応じた細孔を有する充填剤(カラム)を選択しなければならない。

ここで注意しなければならないのは、較正曲線の縦軸が分子量の対数であるので、分離は試料の分子量の差ではなく、分子量の比($\log M_2 - \log M_1 = \log M_2 / M_1$)で定まることである。また較正曲線は、測定に用いる試料によって異なるので、正確な分子量の測定には同種の標準試料を用意しなければならない。

一例として、図-2にTSKgel G2000H_{XL}により、n-パラフィン、脂肪酸、アルコールを測定して求めた較正曲線を示す。n-パラフィンと脂肪酸は、同一の曲線であるが、アルコールでは分子量が低くなるに従って溶出が遅くなる傾向が認められる。

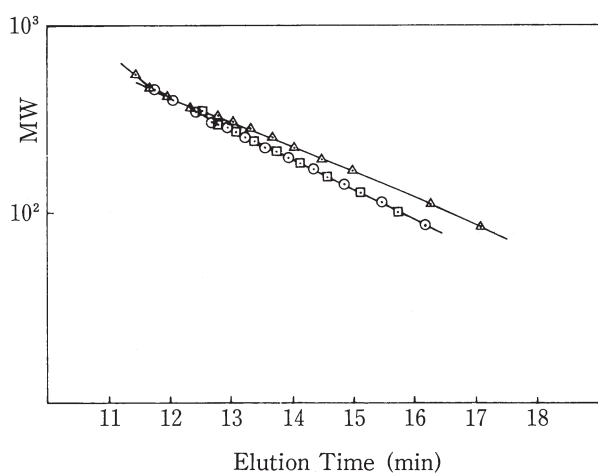


図-2 n-パラフィン、脂肪酸、アルコールによる較正曲線
カラム：TSKgel G2000 H_{XL} × 2 (7.8 mm I.D × 30 cm) × 2
溶離液：THF
流速：1.0 ml/min

- 脂 肪 酸 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$
- △— 脂肪族アルコール $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{OH}$
- n-パラフィン $\text{C}_n\text{H}_2(n+1)$

3. TSK-GEL H_{XL} タイプ

TSK-GEL H_{XL}タイプの基材は、TSK-GEL Hタイプと同様、スチレン-ジビニルベンゼン共重合ゲルである。TSK-GEL H_{XL}タイプには、表-1に示す9種類のグレードがある。従来のGPC用カラムに比較して、理論段数が大幅に改良されている。特に高分離能を要求される低分子用グレードでは、理論段数が2倍に向上した。それに伴って、カラム長は従来の1/2の30cmに短縮されたので、分析時間の短縮、使用溶媒量の低減が可能になった。また、理論段数が向上したので、溶出ピークの拡がりも小

さくなり、ピークの高さが増すので、相対的に感度が向上する利点がある。

TSK-GEL H_{XL}タイプに使用する移動相には、ポリスチレンを溶解する溶媒を選択しなければならない。

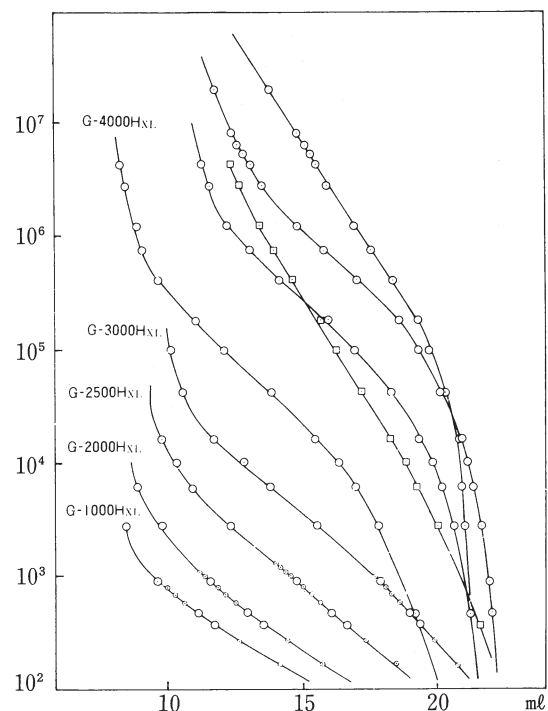
表-1 TSK-GEL H_{XL}

品 名	排除限界分子量*	理論段数
TSKgel G1000H _{XL}	1×10^3	16,000TP/30cm
TSKgel G2000H _{XL}	1×10^4	16,000
TSKgel G2500H _{XL}	2×10^4	16,000
TSKgel G3000H _{XL}	6×10^4	16,000
TSKgel G4000H _{XL}	4×10^5	16,000
TSKgel G5000H _{XL}	4×10^6	14,000
TSKgel G6000H _{XL}	4×10^7 (推定)	14,000
TSKgel G7000H _{XL}	4×10^8 (推定)	14,000
TSKgel GMH _{XL}	4×10^8 (推定)	14,000
TSKgel GMH _{XL} -HT	4×10^8 (推定)	5,500

一般的には、テトラヒドロフラン(THF)が最もよく用いられるが、分取を目的とする場合、THFは加熱により爆発性の重合物を生成するので、クロロホルムを使用する。またこれらの溶媒では溶解できない試料を測定するときは、DMFあるいはm-クレゾール/クロロホルムなどを使用することもある。

4. カラムの選択法

カラムの選択は、較正曲線により行う。図-3に各グレードの較正曲線を示す。TSK-GEL GMH_{XL}は高分子



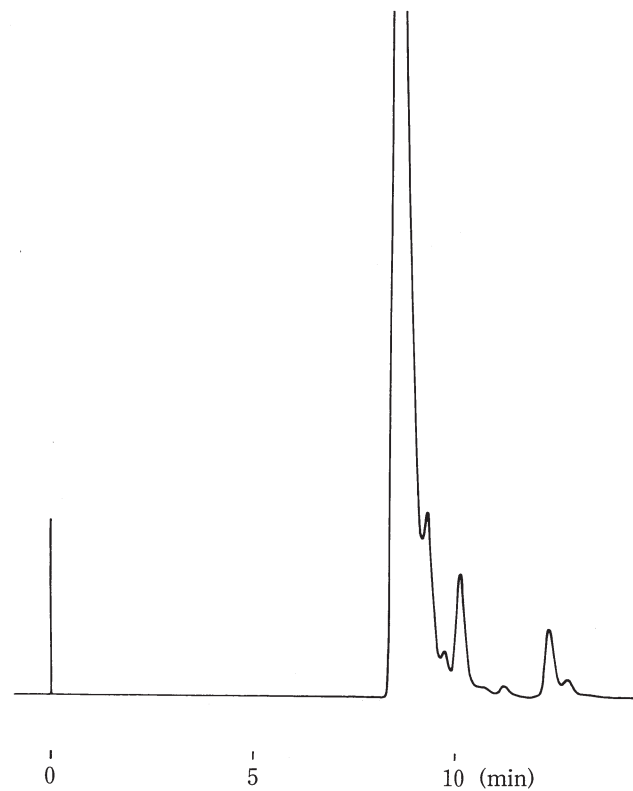
カラム：2本 移動相：THF 試料：ポリスチレン

図-3 TSKgel G-H_{XL}の較正曲線

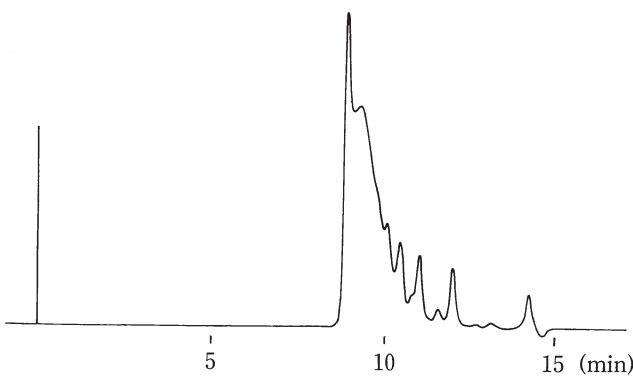
の分子量分布を測定するためのカラムで、広い分子量範囲で直線関係が得られるが、勾配は比較的大きいので、分離の目的には適さない。

測定する試料の分子量が推定できるときは、校正曲線から直接選択することができる。試料の分子量が未知のときは、TSKgel G4000H_{XL}とTSKgel G2000H_{XL}を組み合わせたカラム系で測定すれば、数十～数十万の範囲の分子量の推定ができる。

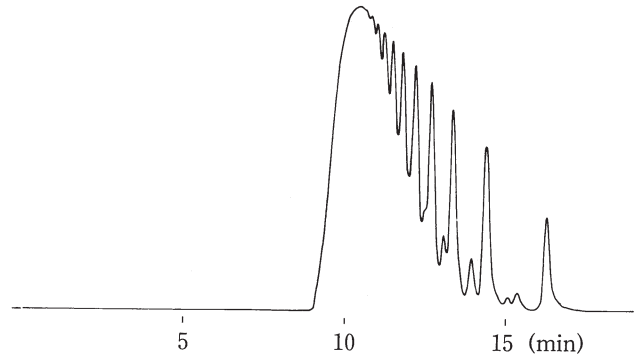
各グレードによって分離がどのように変化するかをみるため、代表例としてエポキシ樹脂をTSKgel G1000H_{XL}～G4000H_{XL}で測定したクロマトグラムを図-4に示す。TSKgel G1000H_{XL}で得られたクロマトグラムでは、大部



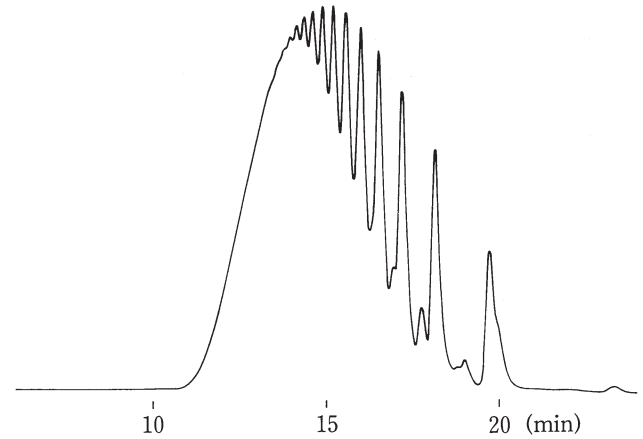
1) TSKgel G1000H_{XL}



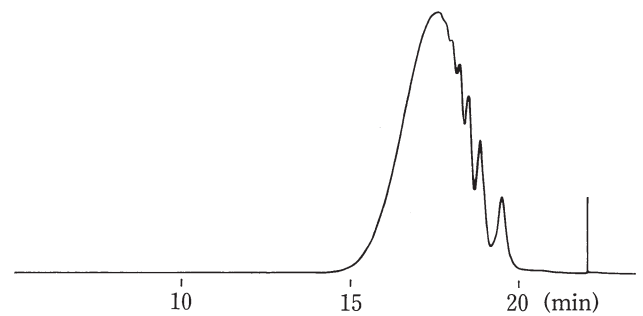
2) TSKgel G2000H_{XL}



3) TSKgel G2500H_{XL}



4) TSKgel G3000H_{XL}



5) TSKgel G4000H_{XL}

カラム：2本 移動相：THF 流速：1.0ml/min

図-4 TSKgel G1000H_{XL}～TSKgel G4000H_{XL}によるエピコート1004の分離

分の成分が排除限界に溶出し、正確な分布状態は得られないが、ポリスチレンで換算した分子量が800以下(溶出時間10分以上)の成分の定量、分取は可能である。分析時間の短縮、高分子領域の一括定量には便利である。

TSKgel G2000H_{XL}では、TSKgel G1000H_{XL}よりもピーク数は増えているが、まだ一部の成分が排除されている。ポリスチレン換算分子量800～1000の領域の分離が改善される。

TSKgel G2500H_{XL}では、ほぼ全体の分布が測定できていると考えられるが、高分子側のピーク形状から排除限

界分子量以上の成分の存在が推定される。ポリスチレン換算分子量2000～10000の領域の分離は改善されるが、TSKgel G2000H_{XL}で最後に溶出する成分(MW≈250)は分離しなくなる。

TSKgel G3000H_{XL}では、ピーク数は最も多く、全体の分布を得るのに最適のカラムである。TSKgel G2500H_{XL}で排除されていたと思われる高分子成分の影響も認められない。ポリスチレン換算分子量1000以下の分離は、TSKgel G4000H_{XL}では、V₀からかなり遅れて溶出し、試料に対して細孔が大きすぎるのがわかる。

以上のことから明らかな様に、同一試料でもカラムのグレードによってクロマトグラムは大幅に異なり、グレードの選択を誤ると正しい情報は得られなくなる。

各グレードによって得られる情報の焦点は、較正曲線から推定することができる。TSKgel G1000H_{XL}～TSKgel G4000H_{XL}の較正曲線を見ると(図-3参照)、TSKgel G1000H_{XL}では、溶出容量10.5ml以後の勾配がなだらかであり、分子量600以下の分離がよいことを示している。TSKgel G2000H_{XL}では、分子量1000以下のものの分離に適する。低分子量領域ではTSKgel G1000H_{XL}の方がTSKgel G2000H_{XL}よりも勾配が小さく、低分子量成分間の分離はTSKgel G1000H_{XL}が最も優れている。TSKgel G2500H_{XL}では、分子量3000まで勾配がなだらかであるが、TSKgel G2000H_{XL}に比べて多少勾配が大きい。TSKgel G2500H_{XL}のクロマトグラムで、高分子側は分離されるが、低分子の分離はTSKgel G2000H_{XL}よりも低下していることに対応する。TSKgel G3000H_{XL}較正曲線は、分子量1500～10500の範囲で、勾配がなだらかである。クロマトグラム上で、TSKgel G2500H_{XL}よりも高分子側の分子が優れ、低分子側の分離が低下していることに対応する。TSKgel G4000H_{XL}の最適分子量範囲は10000～200000で、測定した試料の分子量範囲200～3000とはかなり差があるので、各成分の分離が不十分である。

以上のように、GPCでは較正曲線は重要な情報を与えているので、試料を測定する際は必ず確認すべきである。

5. カラムの組み合わせ

通常、GPCの測定では、複数本のカラムを接続して使用することが多い。その目的は、

- (1) 試料の分離を改善する
- (2) 分離可能な分子量範囲を広げる

ことに大別される。

高速液体クロマトグラフィでは、試料間の分離は(1)式で表わされる。

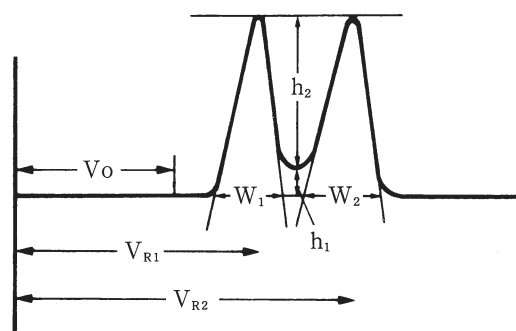
$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{k'}{k' + 1} \right) \quad \dots\dots (1)$$

ここで、Rは試料の分離率で値が大きい程分離がよいことを示す。Nは理論段数、 α は試料の分離係数、 k' はキャパシティ比で、それぞれ(2)、(3)式により計算される。

$$\alpha = \frac{V_{R2} - V_0}{V_{R1} - V_0} \quad \dots\dots (2)$$

$$k' = \frac{V_R - V_0}{V_0} \quad \dots\dots (3)$$

(V_R、V₀については図-5参照)



$$R = \frac{2(V_{R2} - V_{R1})}{W_1 + W_2} \quad \dots\dots (a)$$

または

$$\frac{h_2}{h_1 + h_2} \times 100 \quad \dots\dots (b)$$

(a)では分離がよくする程数値が大きくなるが
(b)では完全分離で100%になる。

図-5 分離率の計算法

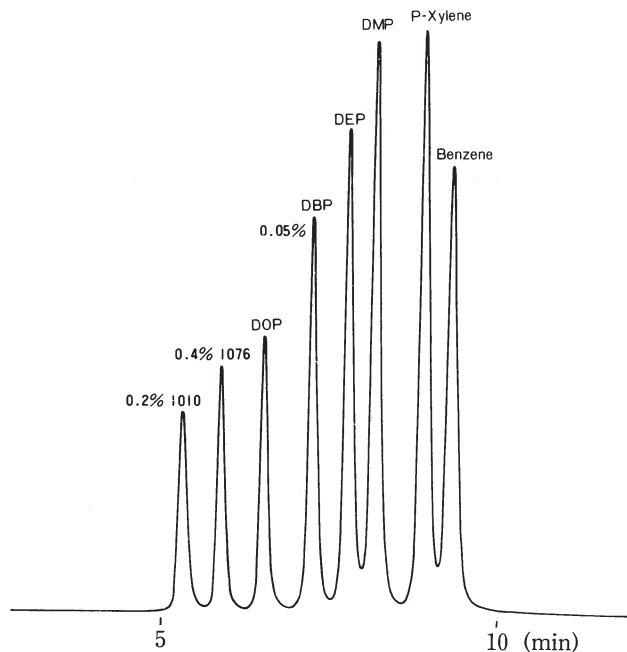
GPCでは、分離原理の項で述べたように、試料と充填剤の相互作用を利用しないので、試料間の分離(R)は、理論段数と較正曲線の勾配に支配される。

試料S₁とS₂をGPCで分離する場合、 α および k' はカラムの長さには関係なく一定である。(カラムの長さを2倍にすると、V_R、V₀も2倍になる。)したがって(1)式は、

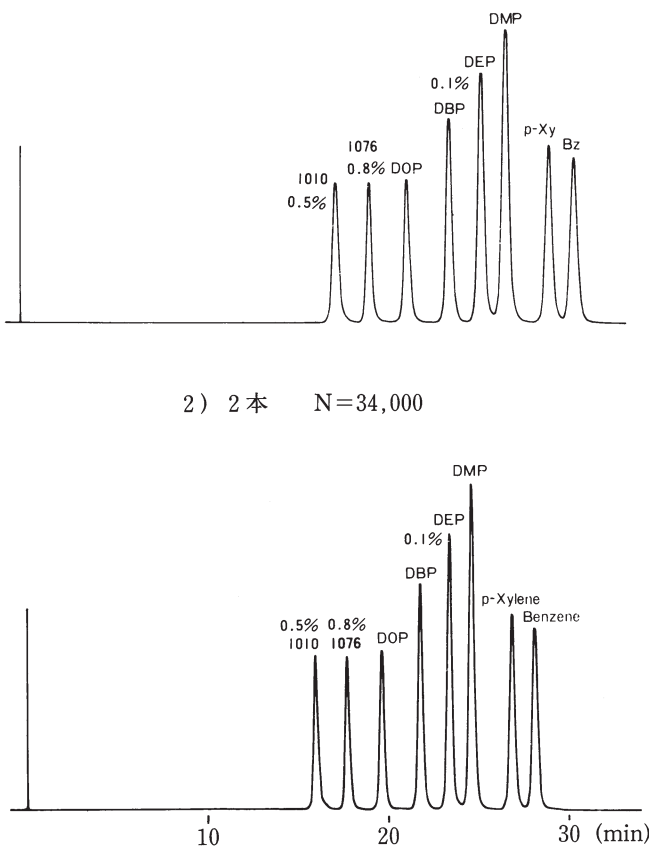
$$R = K \sqrt{N} \quad \dots\dots (1) \quad K: \text{定数}$$

になる。

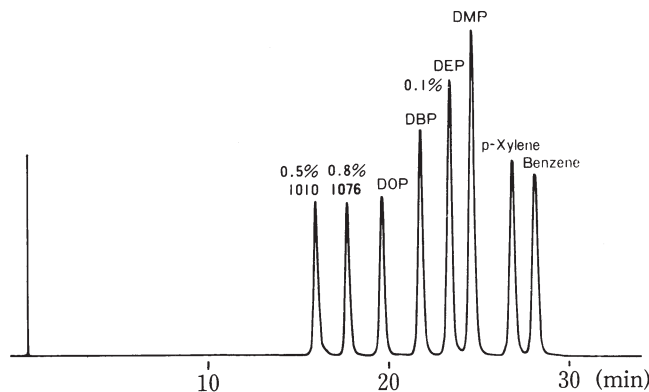
理論段数を大きくする最も簡単な方法は、カラムを長くすることである。図-6に、TSKgel G2000H_{XL} 1~4本でフタル酸エステル等を測定したクロマトグラムを示す。カラムを長くするにしたがって理論段数(Benzeneで測定)が大きくなり、分離も向上する。



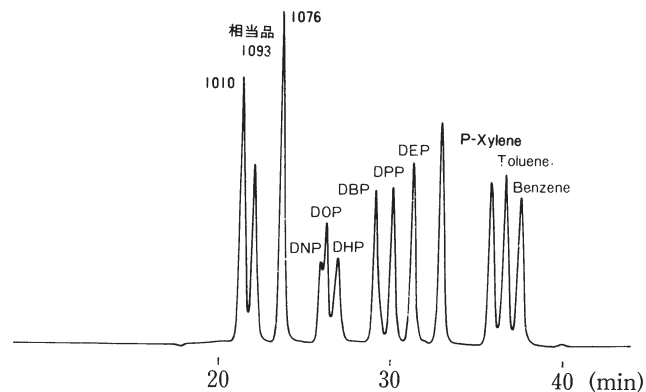
1) 1本 N=17,000



2) 2本 N=34,000



3) 3本 N=51,000



4) 4本 N=68,000

図-6 TSKgel G2000H_{XL}によるフタル酸エステルの分離

図-7は、DEPとDMPの分離率*(R)と理論段数の1/2乗(\sqrt{N})をプロットした結果である。Rと \sqrt{N} は直線関係にあり、試料の分離は \sqrt{N} に比例して改善されることがわかる。一般にGPCでは、総理論段数は各カラムの理論段数の和で表わされる。したがって試料の分離を改良したいときは、目標とする分離率から \sqrt{N} を計算し、必要なカラム本数を求めることができる。

次に1グレードのみでは、分離可能な分子量範囲が狭く、試料の分離ができない場合、複数のグレードを接続

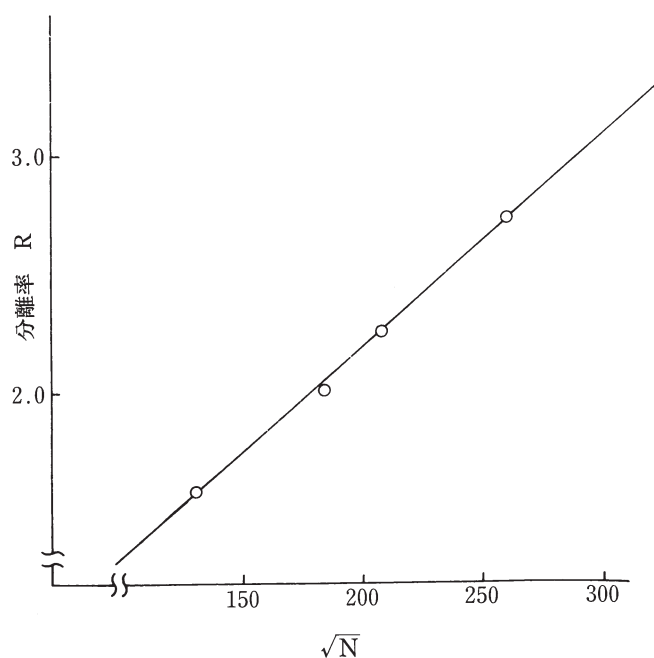


図-7 DEP-DMPの分離率におよぼす理論段数の影響

して使用する。複数グレード接続したカラムの較正曲線は各カラムの較正曲線から計算することができる。表-2にTSKgel G2000H_{XL}とTSKgel G3000H_{XL}の例を示す。表-2のTSKgel G2000H_{XL}およびTSKgel G3000H_{XL}の欄は、各2本を使用して求めた標準試料の溶出容量である。TSKgel G2000H~TSKgel G3000H_{XL}(cal)は、*図-5(a)の方法で計算。

表-2 較正曲線の計算法

分子量 ¹⁾	G2H _{XL} ²⁾	G3H _{XL} ³⁾	G2H+3H _{XL} (cal) ³⁾	G2H+3H _{XL} (obs) ⁴⁾
6200	9.0(ml)	13.9(ml)	22.9(ml)	22.9(ml)
2800	9.8	15.6	25.4	25.2
682	12.1	18.3	30.4	30.4
578	12.5	18.6	31.1	31.0
474	12.9	18.9	31.8	31.8
370	13.5	19.3	32.8	32.8
266	14.4	19.9	34.3	34.3
162	15.8	20.7	36.5	36.4

TSKgel G3000Hの溶出容量の和でTSKgel G2000H_{XL} 2本と、TSKgel G3000H_{XL} 2本を接続したときの溶出容量に対応する。TSKgel G2000H+TSKgel G3000H_{XL}(obs)の欄は、実際にTSKgel G2000H_{XL} 2本とTSKgel G3000H_{XL} 2本を接続したカラムによる実測値である。図-8に較正曲線を示す。実線が計算値、各プロットが

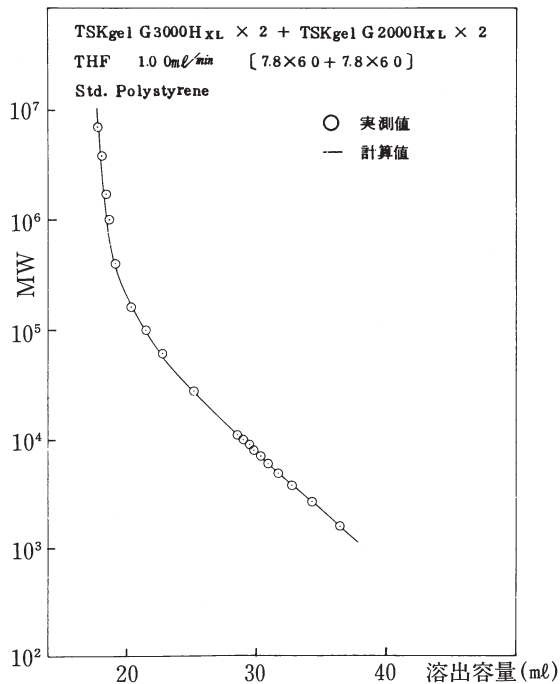
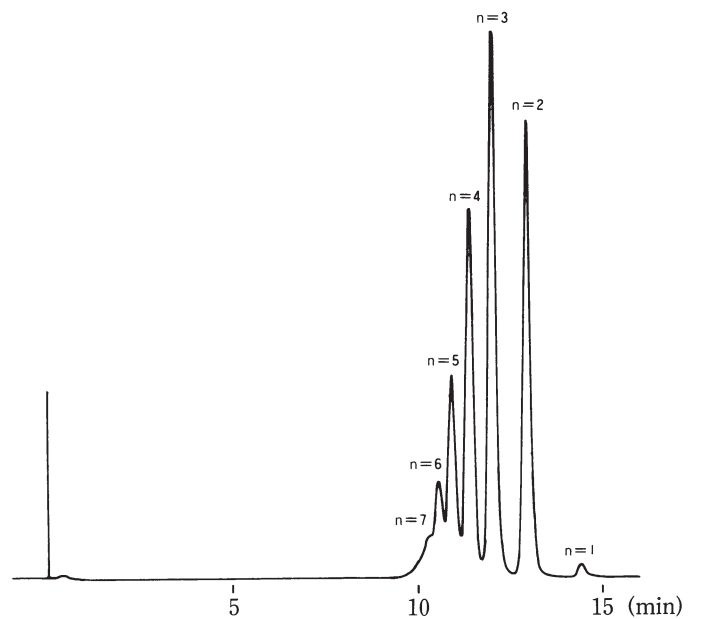


図-8 TSKgel G2000H_{XL}+TSKgel G3000H_{XL}系の較正曲線

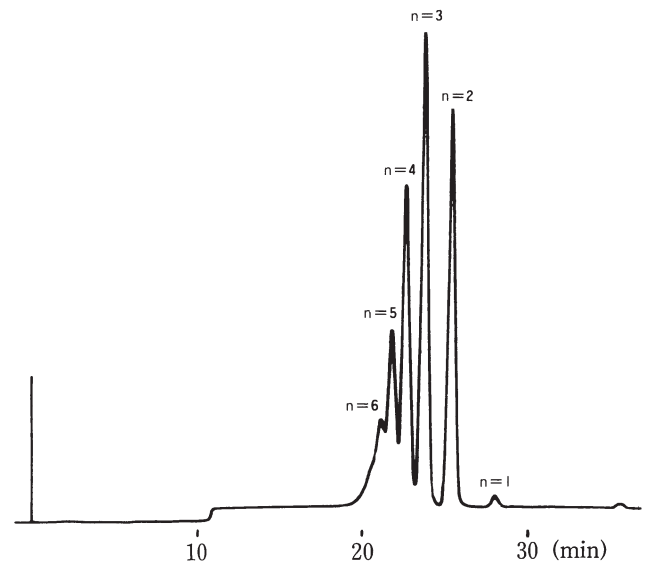
実測値である。計算値と実測値は完全に一致する。各種グレードのカラムを組み合わせる必要がある場合、各カラムの較正曲線がわかっているならば、計算により任意のカラム系の較正曲線を求めることができる。

6. TSK-GEL H_{XL}タイプとHタイプの比較

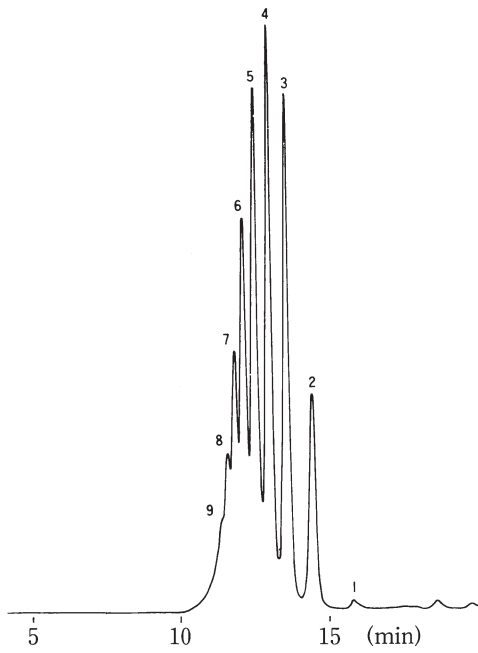
図-9に、TSKgel G1000H_{XL}~TSKgel G3000H_{XL}およびTSKgel G1000H~TSKgel G3000Hによるポリスチレンオリゴマーの測定例を示す。



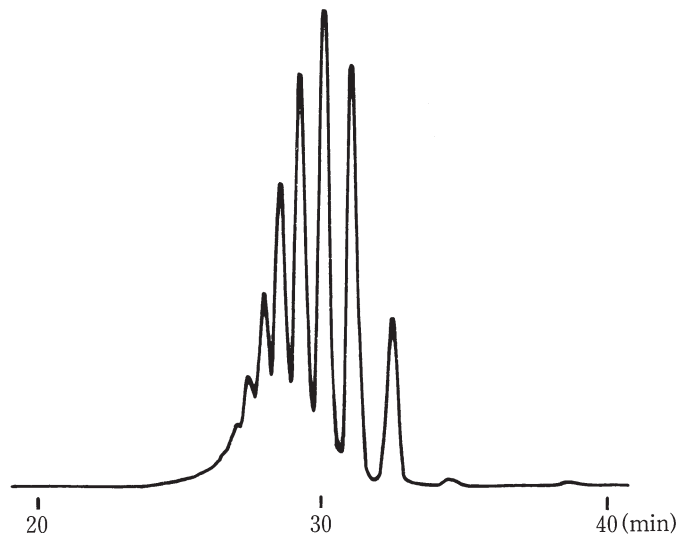
1) TSKgel G1000H_{XL} 30cm x 2
Polystyrene A-300



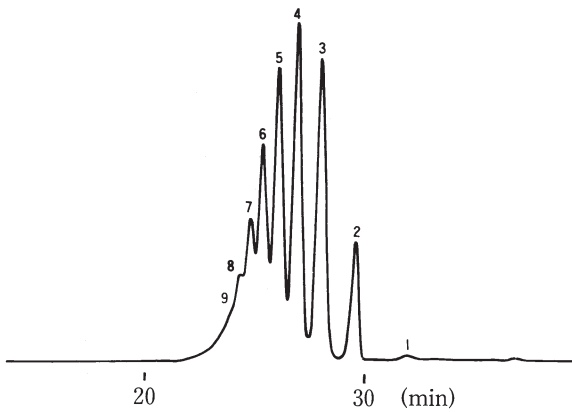
2) TSKgel G1000H_s 60cm x 2
Polystyrene A-300



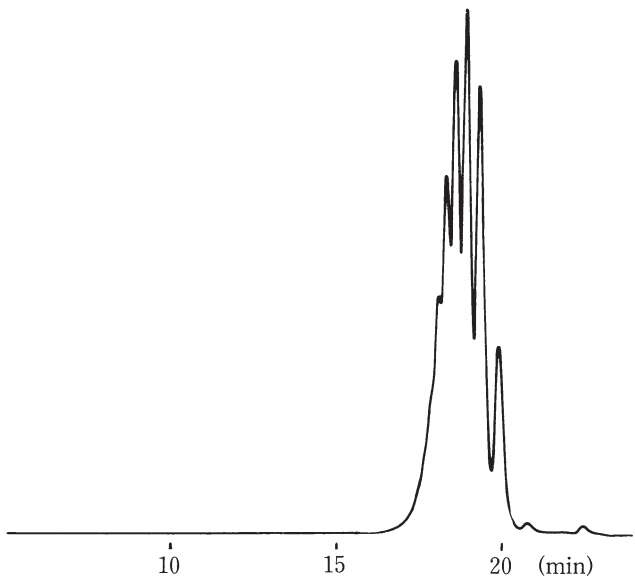
3) TSKgel G2000H_{XL} 30cm×2
Polystyrene A-500



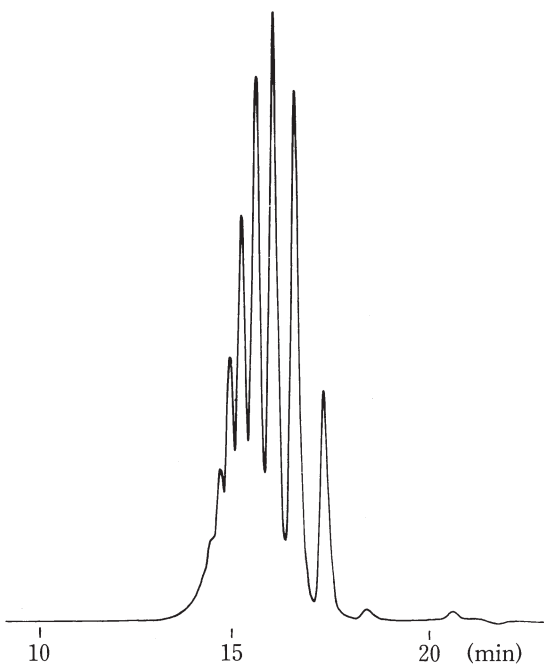
6) TSKgel G2500H₈ 60cm×2
Polystyrene A-500



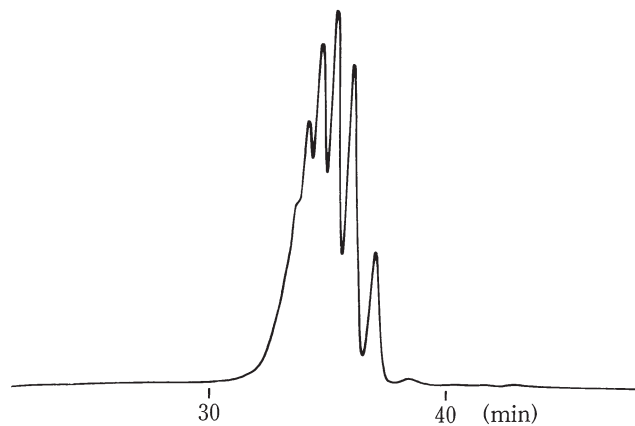
4) TSKgel G2000H₈ 60cm×2
Polystyrene A-500



7) TSKgel G3000H_{XL} 30cm×2
Polystyrene A-500



5) TSKgel G2500H_{XL} 30cm×2
Polystyrene A-500



8) TSKgel G3000H₈ 60cm×2
Polystyrene A-500

図-9 TSK-GEL G-H_{XL}タイプとTSK-GEL G-H
によるポリスチレンオリゴマーの分離

GPCでは可燃性の有機溶媒を使用するので、夜間の無人連続運転を行うには、特別の施設、配慮が必要である。試料の処理能力の向上は、このような面からも経済上非常に有意義であると考えられる。

TSK-GEL H_{XL}タイプは、カラム長がTSK-GEL Hタイプの1/2であるので、測定条件が同じならば、測定時間を1/2に短縮できる。分離は従来のカラムと同等もしくはそれ以上である。したがってTSK-GEL HタイプをTSK-GEL H_{XL}タイプに置き換えることによって、測定時間が大幅に短縮され、試料の処理能力を2倍に向上させることができる。

7. 流速の影響

高速液体クロマトグラフでは、移動相の流速によって分離が変化することはよく知られている。TSKgel G2000H_{XL}で、ポリスチレンオリゴマー・A-500をTHFの流速をかえて測定した結果を図-10に示す。クロマトグラム上では、A-500の分離はほとんど変化していない。重合度(n)5-4、4-3の分離率*を計算した結果を表-3に示す。

表-3 流速による分離率の変化

流速	0.26 (ml/min)	0.50	100
R ₅₋₄	86 (%)	83	81
R ₄₋₃	94 (%)	92	90

* 図-5 (b)の方法で計算

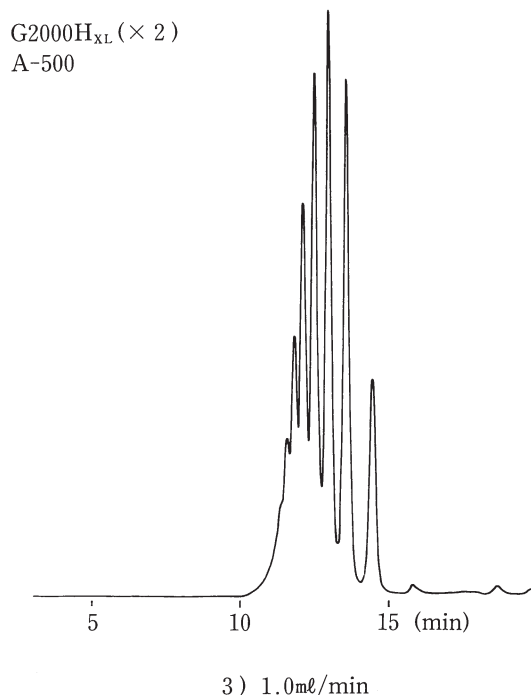
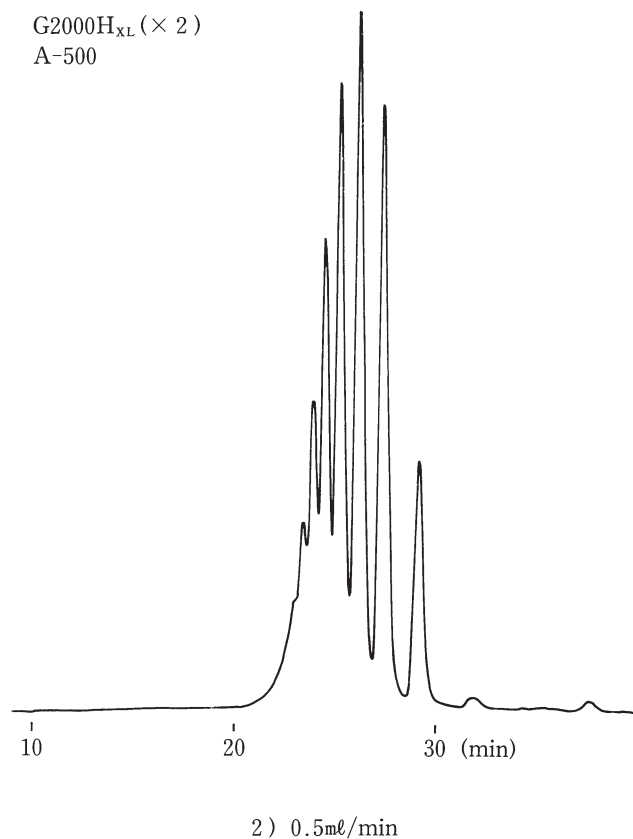
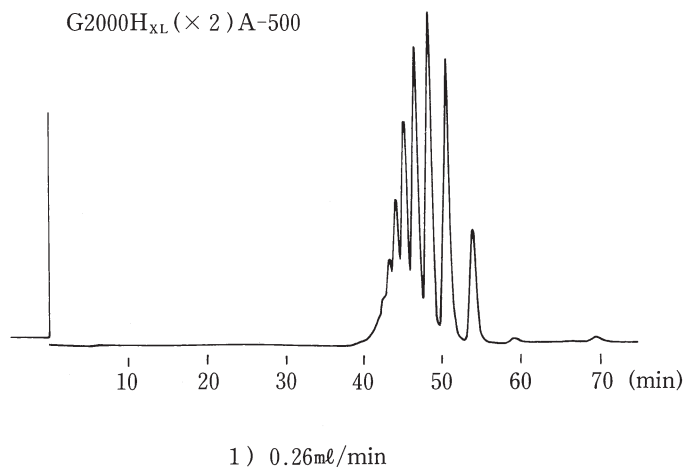


図-10 流速による分離の変化

流速0.26ml/minでも分離率は、1.0ml/minの場合に比べて大幅には改善されない(TSK-GEL H_{XL}タイプでは、充填剤の粒子径を小さくしてあるので、従来のカラムに比べて流速の影響が少ない)。一方、測定時間は流速を下

げるにしたがって長くなる。図-11にTSKgel G2000H_{XL} 4本でA-500を測定した結果を示す。図-11の測定時間は、図-10 2)とほぼ同じである。クロマトグラムから明らかなように、同じ測定時間ならば、カラムを増す方がはるかに分離が改良される(R₅₋₄、R₄₋₃はそれぞれ95、98%)。

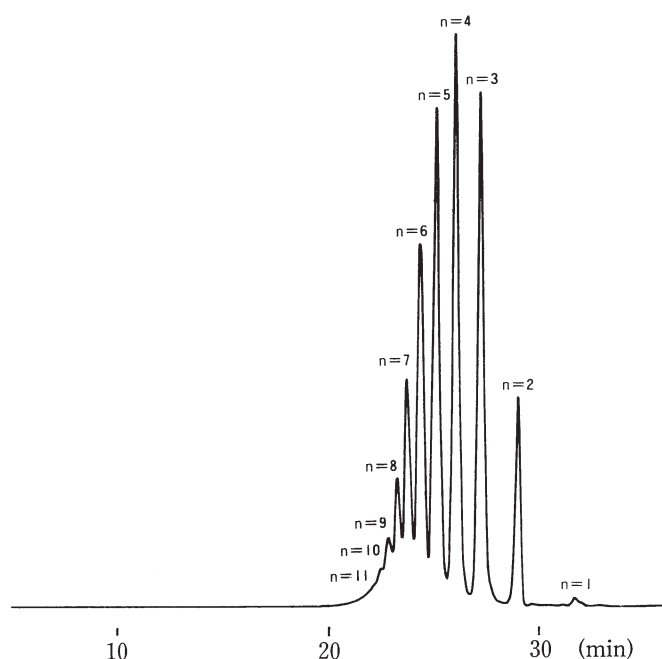


図-11 G2000H_{XL} 4本によるA-500の分離
移動相：THF 流速：1 ml/min

8. 温度の影響

一般にGPCでは、カラムの温度を増すと、ピークが鋭くなり、分離が改良される。これは温度を増すことにより移動相の粘度が低下し、試料の拡散が速くなることによると考えられている。図-12に室温および40℃で、ポリスチレン500を測定したクロマトグラムを示す。表-4は各ピークの見分け率を計算した結果である。図-12、表-4から明らかなように、低分子量成分の見分け率は、カラム温度の影響をあまり受けないが、分子量が大きくなると40℃の方が見分け率は多少改良される。カラムの温度の影響は試料によって異なると考えられ、分子量の大きいものを測定する場合、カラム温度を増すことによって、好効果を得ることができると思われる。

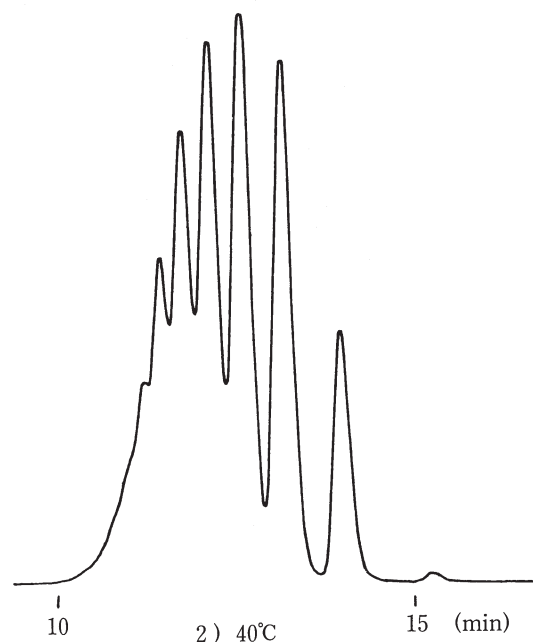
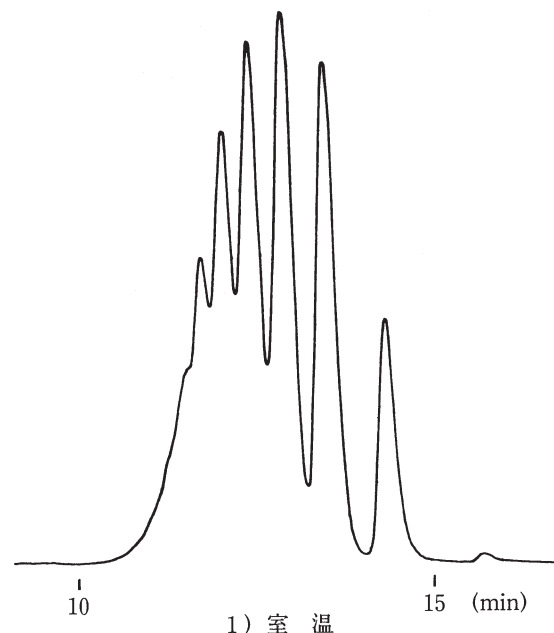


図-12 カラム温度の見分けに及ぼす影響

カラム：G2000H_{XL}

溶離液：THF 流速：1.0ml/min 試料：ポリスチレンA500

表-4 カラム温度の見分け率に及ぼす影響

カラム温度	R ₃₋₂	R ₄₋₃	R ₅₋₄	R ₅₋₆	R ₆₋₇
室温	98(%)	86	64	44	28
40℃	98(%)	87	65	46	32

9. 試料量の影響

GPCは、分析以外によく試料の分取の目的に使用される。分取の場合、多量の試料が必要なときは、大型の分取カラムを使用するが、少量の試料の精製には通常に分

析カラムを利用することができる。試料の分取では、試料の注入量と分離の関係が重要である。一般に試料の注入量を増すと、ピークがオーバーロードのためひずむという問題を生ずる。またこのような傾向は、充填剤の粒径が小さい高性能のカラムほど顕著に現れる。図-13にTSKgel G2000H_{XL}を使用して、BenzeneとIrganox1010の注入量と理論段高さ(H)の関係を示す。注入量によるHの変化は、試料の分子量によると考えられ、分子量の大きいもの程影響を受け易い。注入可能な試料量は、分離すべき成分の溶出位置によっても規制されるので、一般的な数値で表わせないが、TSKgel G2000H_{XL}では1~数mgを分取できると思われる。

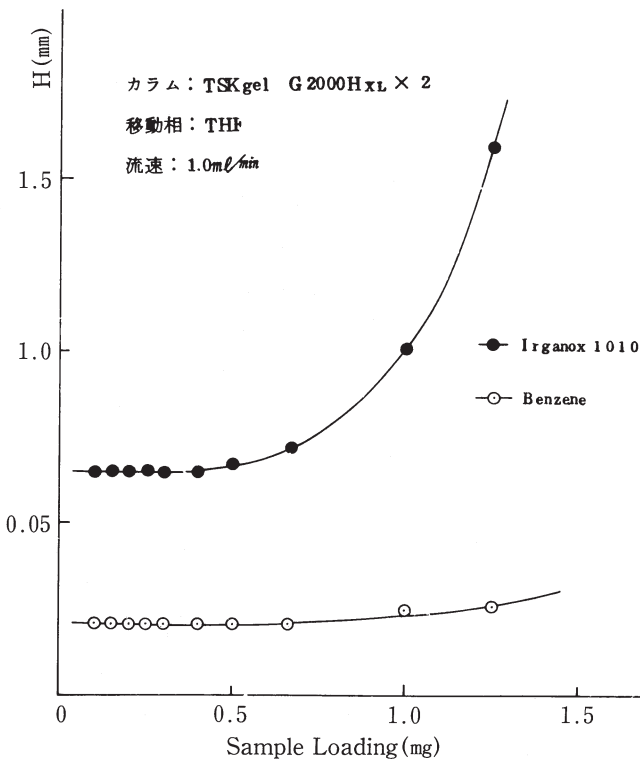


図-13 試料注入量と理論段数の関係

10. おわりに

TSK-GEL H_{XL}タイプは、従来のGPC用カラムを大幅にうまわる性能を有するカラムである。本カラムの使用により、測定時間は1/2に短縮され、分析能率の向上、経済的効果等多大の利点を有している。一般に従来のGPCは、LLC、LSCなどに比べて測定時間が長いという問題があったが、TSK-GEL H_{XL}タイプを導入することにより、かなりの問題点が改良されると思われる。高速、高性能GPCは、分析に要求される三要素、簡便、迅速、高感度をより満足させるものとして、今後の応用が期待される。

11. データ集

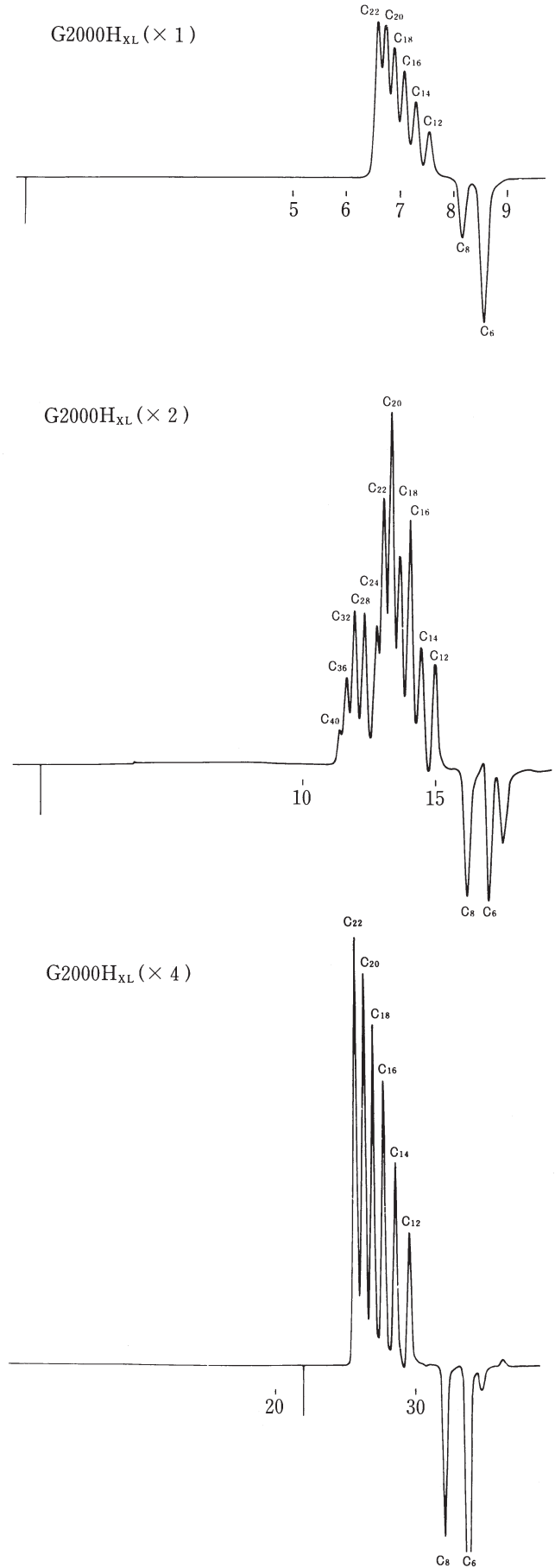


図-14 n-パラフィンの分離

カラム: G2000H_{XL} 移動相: THF 流速: 10ml/min

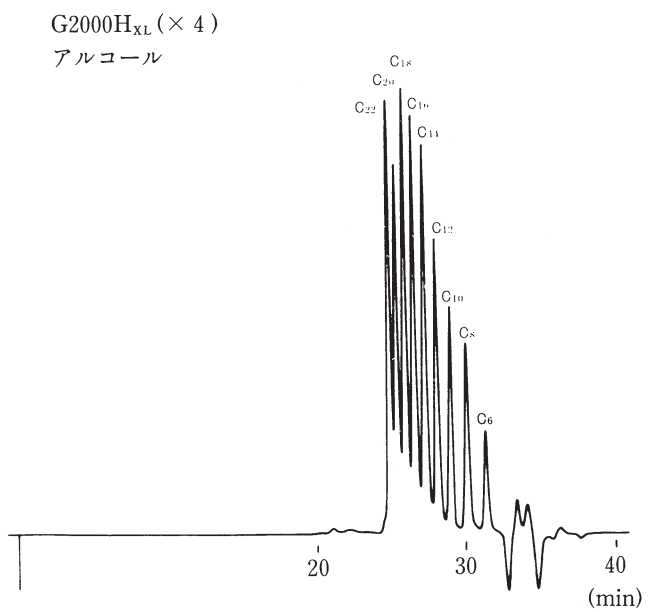
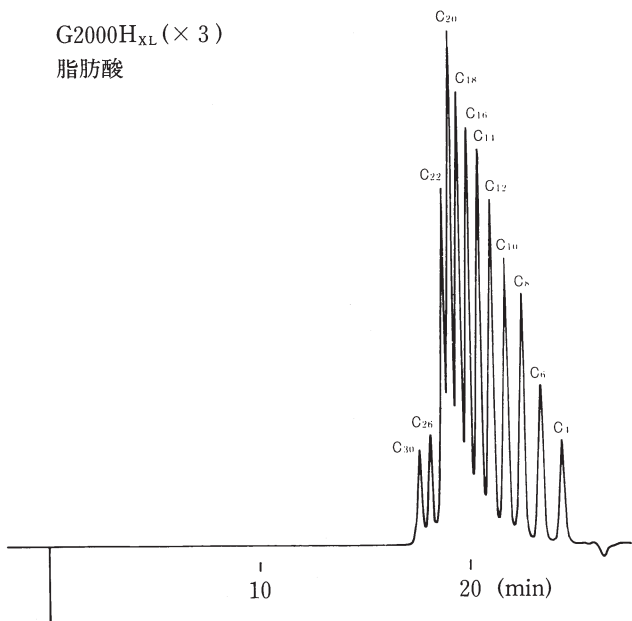
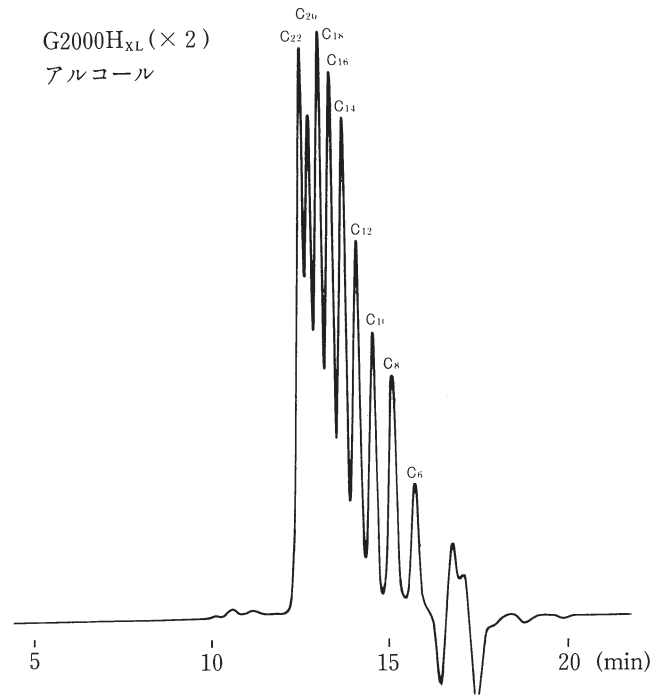
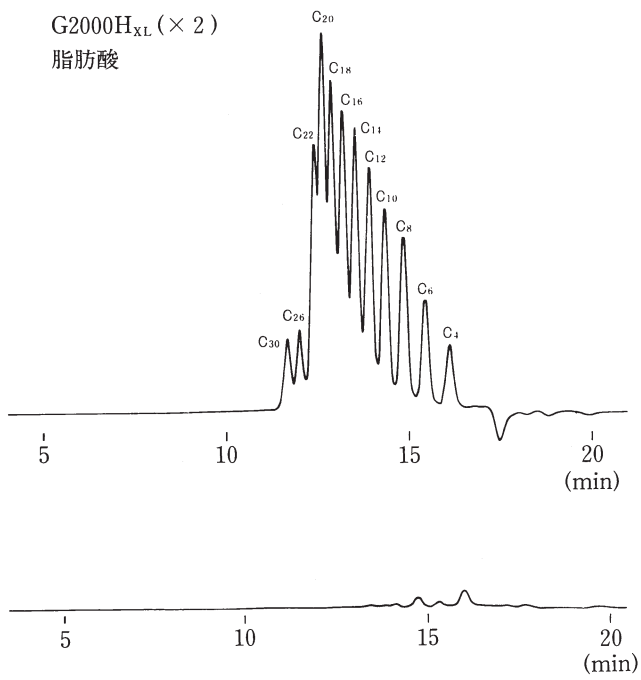


図-15 脂肪酸の分離

図-16 脂肪族アルコールの分離

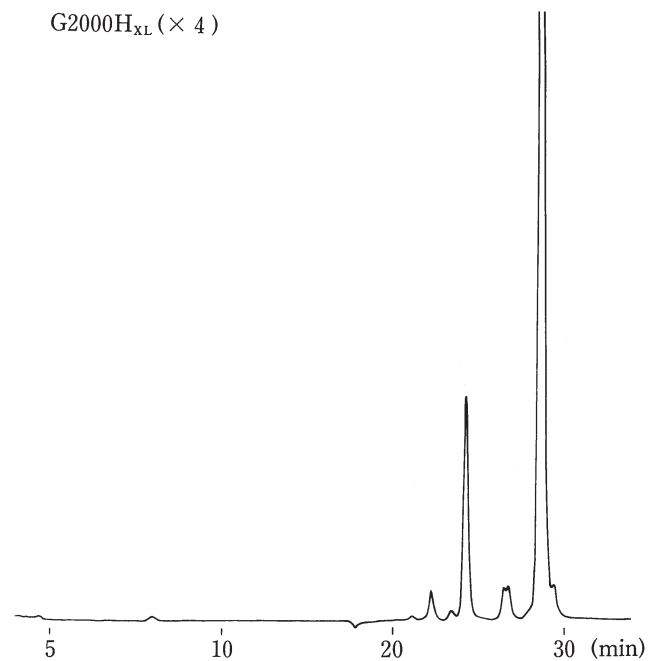
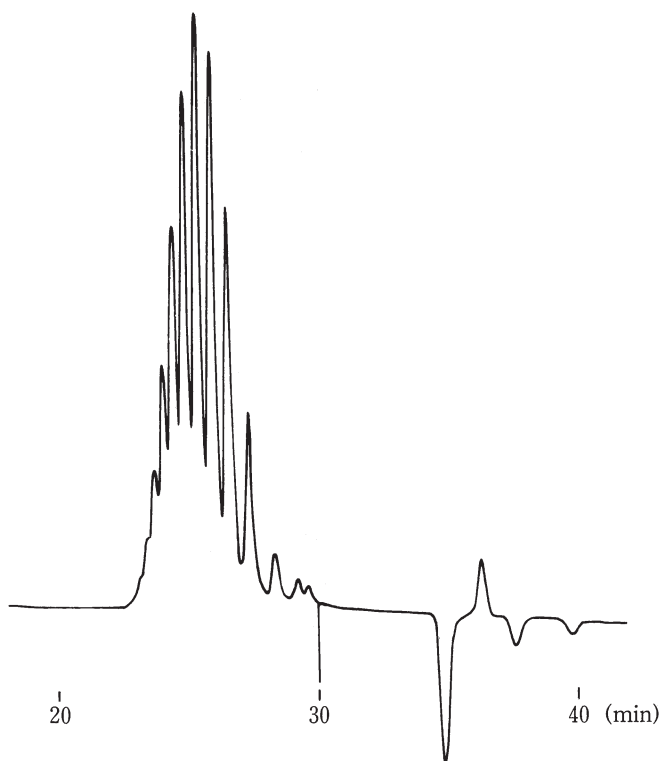
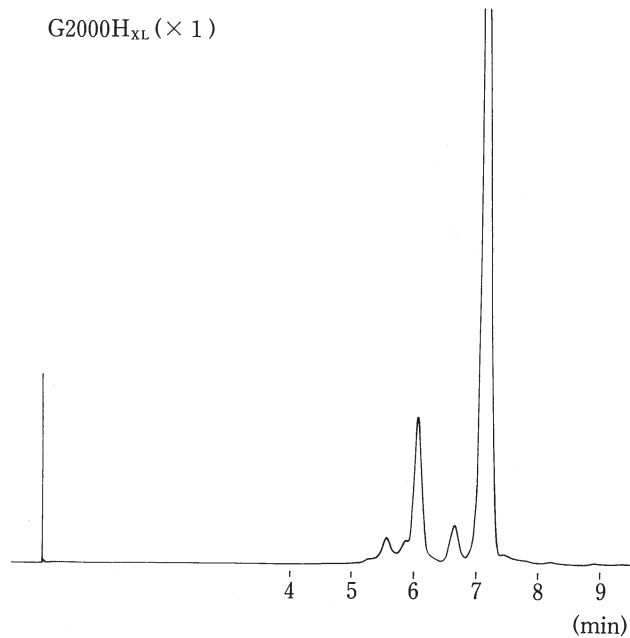
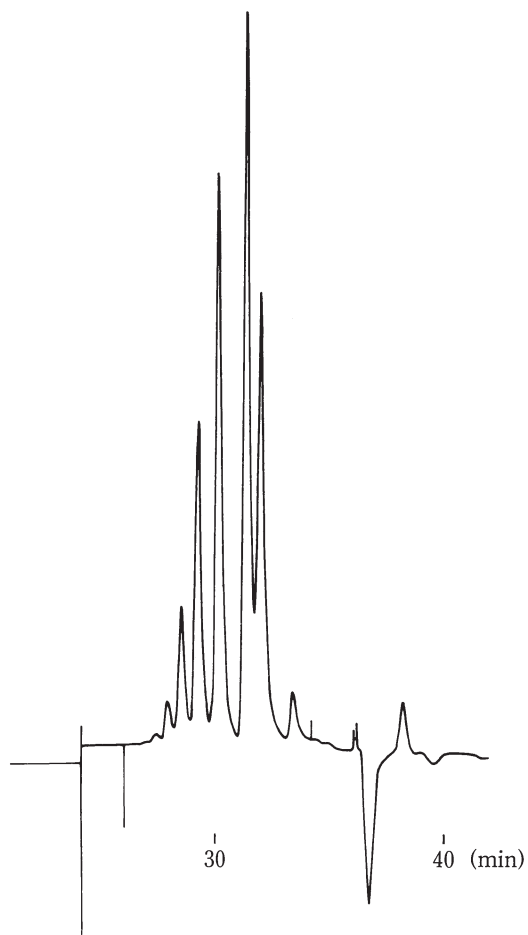
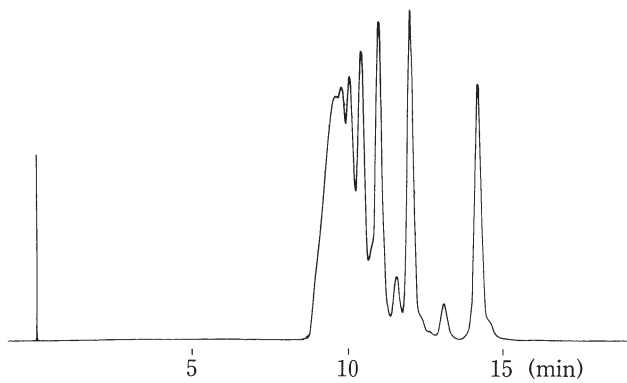
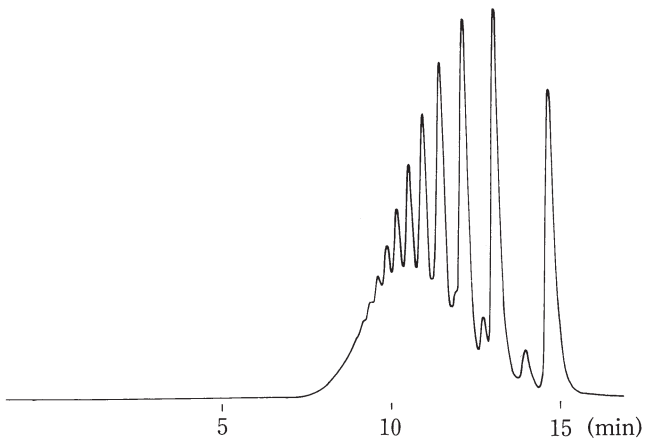


図-17 ポリエチレングリコルの分離

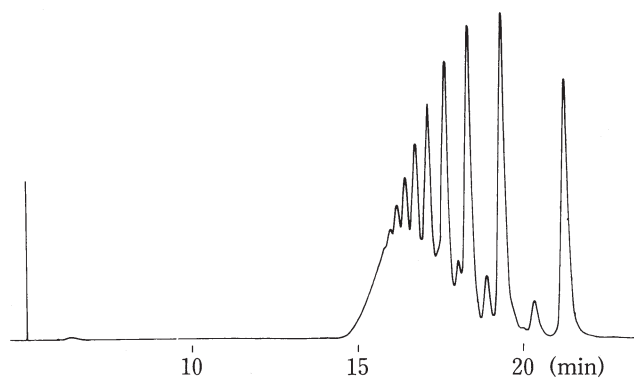
図-18 エピコート828の分離



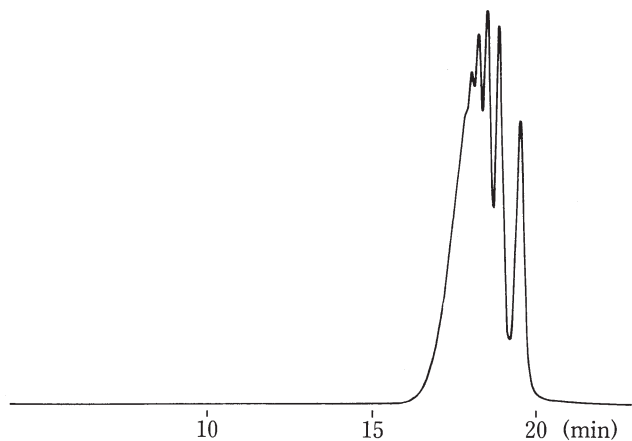
(1) G2000H_{XL} 2本



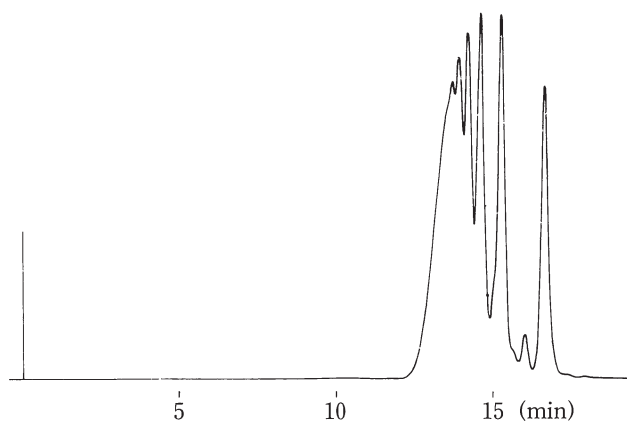
(2) G2500H_{XL} 2本



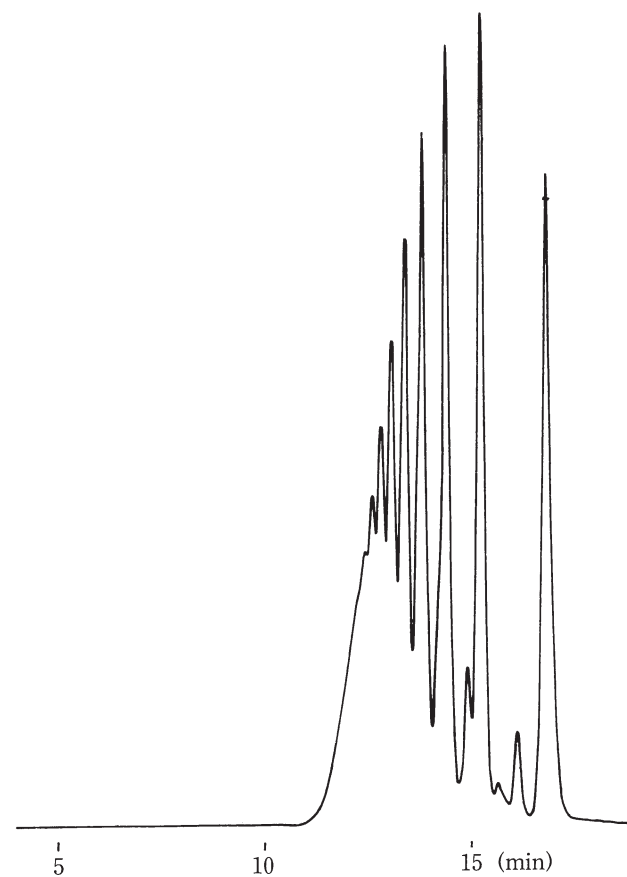
(3) G3000H_{XL} 2本



(4) G4000H_{XL} 2本



(5) TSKgel G4000H_{XL} + TSKgel G2000H_{XL}



(6) TSKgel G4000H_{XL} + TSKgel G3000H_{XL} +
TSKgel G2500H_{XL} + TSKgel G3000H_{XL}

図-19 エピコート1001の分離

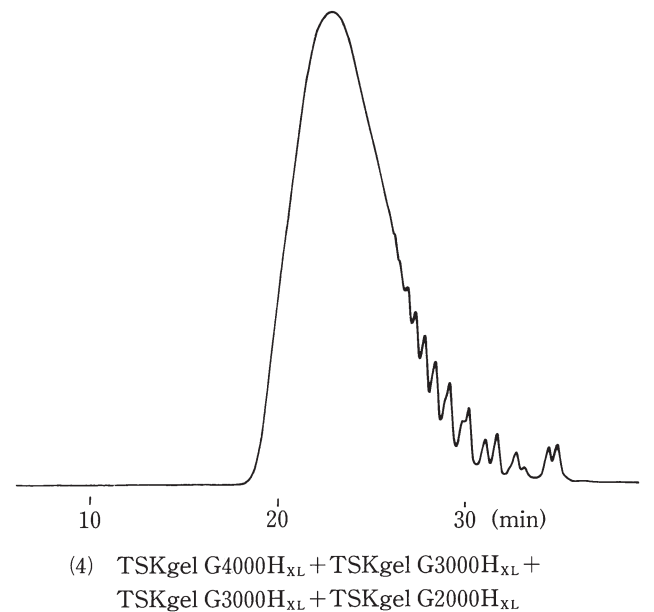
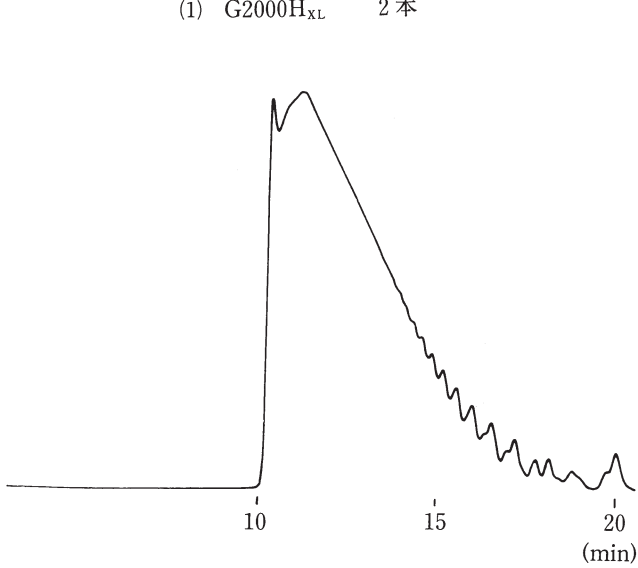
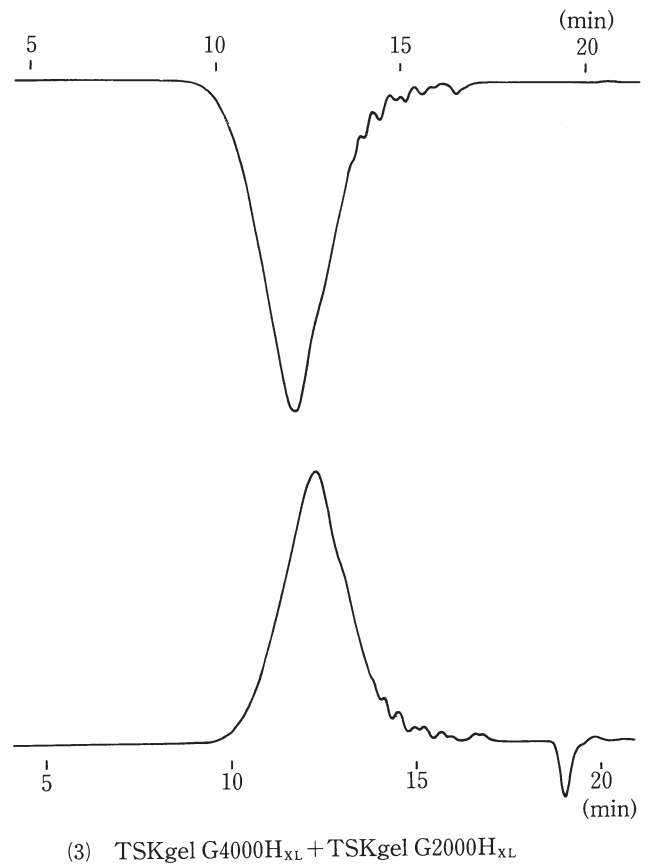
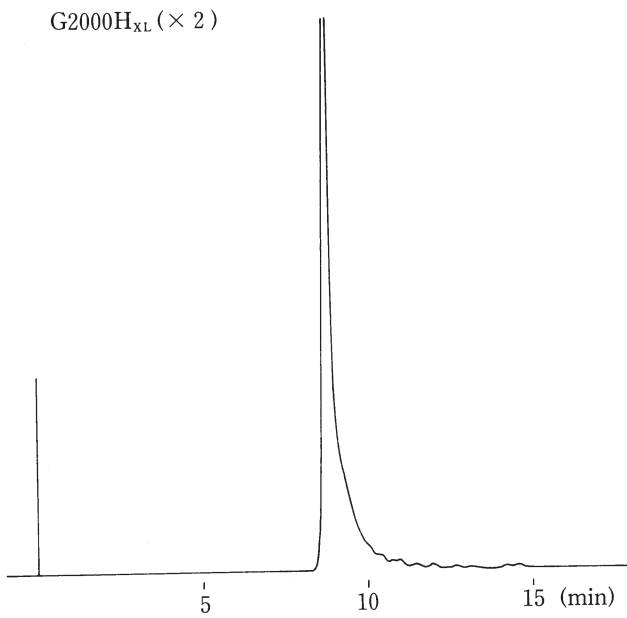


図-20 エピコート1009の分離

※“TSKgel”は東ソー株式会社の登録商標です。



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) 6636-3733	〒104-0028	東京都中央区八重洲2-2-1
大阪支店 バイオエス	☎ (06) 6209-1948	〒541-0043	大阪市中央区高麗橋4-4-9
名古屋支店 バイオエス	☎ (052) 211-5730	〒460-0008	名古屋市中区栄1-2-7
福岡支店	☎ (092) 710-6694	〒812-0011	福岡市博多区博多駅前3-8-10
仙台支店	☎ (022) 266-2341	〒980-0014	仙台市青葉区本町1-11-1
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 tskgel@tosoh.co.jp

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