



TOSOH

SEPARATION REPORT

水系・極性有機溶媒両用高性能SECセミマイクロカラム TSK-GEL SuperAWシリーズについて

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. SuperAWシリーズの特長	2
3. SuperAWシリーズの基本的性質	3
3-1. 溶媒交換性	3
3-2. 各種溶媒での較正曲線	3
3-3. 分離性能と溶媒消費量	5
3-4. 測定流速の影響	6
3-5. 試料注入容量の影響	7
4. 応用例	8
4-1. 各種ポリマーの測定例	8
4-2. 非SECモードでの測定例	13
5. まとめ	14

1. はじめに

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は、水溶液または有機溶媒に溶解した化合物をその分子サイズにより分離する手法です。適用物質は低分子から高分子、親水性化合物から疎水性化合物まで幅広く、様々な分野で使用されています。分離精製のみでなく、高分子の分子量や分子量分布を測定できることから、特に高分子研究には欠かせない手法になっています。

東ソーは有機溶媒系SECカラムとしてはTSK-GEL HXLシリーズに続き、種々の有機溶媒が使用できるHHRシリーズ、超高速GPC用カラムSuperHシリーズ等順次

商品化致しました。一方、水系SECカラムとしてはPWXLシリーズを、水溶液から極性有機溶媒まで幅広く使用できるSECカラムとしては α シリーズを上市しています。

今回、粒子径の小さな親水性基材をセミマイクロカラムに充てんし、水溶液から有機溶媒まで溶媒交換可能なTSK-GEL SuperAWシリーズを商品化致しました。本稿ではTSK-GEL SuperAWシリーズの基本的な特性と種々の試料の分離例をご紹介します。

表-1 TSK-GEL SuperAWの特長

特 長	利 点
1) 微粒子ゲルをセミマイクロカラムに充てん	<ul style="list-style-type: none">・短時間、高分離能のSEC測定が可能<ul style="list-style-type: none">→ PWXL、α カラム (30cm) の約半分の測定時間で同等の分離能・省溶媒<ul style="list-style-type: none">→ 従来カラム (30cm) の約1/3の溶媒消費量
2) 膨潤収縮が少ない親水性ゲル	<ul style="list-style-type: none">・水から有機溶媒まで溶媒交換可能・極性有機溶媒中での試料の吸着が少ない・水系から極性有機溶媒系SECまで可能
3) 機械的強度が高い	<ul style="list-style-type: none">・耐久性が高い

2. SuperAWシリーズの特長

これまで開発されてきたポリマー系充てん剤は溶離液として使用する溶媒の違いによる充てん剤の膨潤収縮が大きく、また特定の充てん剤を性質の異なる様々な試料に利用した場合、試料によって充てん剤との間に相互作用を生じることがありました。従って、分析する試料、溶離液にあわせカラムを使い分ける必要がありました。これらの問題点を解決するカラムとしてTSK-GEL *a* シリーズが上市され、水系から極性有機溶媒系までをカバーするSECカラムとして好評を博してまいりました。今回、新規に開発されたTSK-GEL SuperAWシリーズは微粒子化した充てん剤をセミマイクロカラムに充てんしているためコンベンショナルカラムと同等の分離が1/2の測定時間、1/3の溶媒消費量で実現できます。また充て

ん剤として *a* シリーズと同様に親水性基材を用いているため、試料との疎水性相互作用を抑制する事ができ、極性有機溶媒下でもSEC測定が可能となりました。充てん剤の膨潤・収縮特性を大幅に改良したため水(水溶液)から有機溶媒まで幅広く溶媒交換が可能です。TSK-GEL SuperAWシリーズの特長を表-1にまとめます。TSK-GEL SuperAWシリーズはそれぞれ分画範囲の異なるゲルを充てんした5種類のカラムと1種類のミックスタイプのカラムから構成されています。これら6種類のカラムにより幅広い分子量範囲をカバーすることができ、試料の分子量や測定目的に合わせたカラムを選択することが可能です。表-2にTSK-GEL SuperAWシリーズの一覧を示します。

表-2 TSK-GEL SuperAWシリーズ一覧

グレード	排除限界分子量 (PEO/DMF)	粒子径 (μm)	理論段数	カラムサイズ (mm I.D. \times cm)
TSKgel SuperAW2500	2×10^3	4	>16,000	6.0 \times 15
TSKgel SuperAW3000	6×10^4	4	>16,000	6.0 \times 15
TSKgel SuperAW4000	4×10^5	6	>10,000	6.0 \times 15
TSKgel SuperAW5000	4×10^6	7	>10,000	6.0 \times 15
TSKgel SuperAW6000	$>4 \times 10^7$	9	>6,000	6.0 \times 15
TSKgel SuperAWM-H	$>4 \times 10^7$	9	>6,000	6.0 \times 15

I.D.は内径を示します

3. SuperAWシリーズの基本的性質

3-1. 溶媒交換性

図-1にTSK-GEL SuperAWシリーズの溶媒交換性試験の結果を示します。試験はあらかじめ理論段数を測定したカラムについて、水から試験溶媒へ置換（流速：0.6mL/min、5時間以上）、放置（14時間以上）後、再び水に置換（流速：0.6mL/min）し、理論段数を測定し、これを各種の試験溶媒について繰り返し行いました。どのグレードのカラムについても、各種の溶媒に交換した後も理論段数の変化が少なく、水溶液から極性有機溶媒まで種々の溶媒に交換可能であることが分かります。

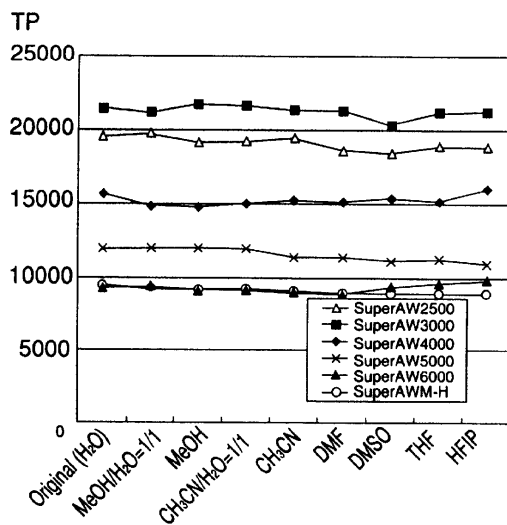


図-1 TSK-GEL SuperAWシリーズの溶媒交換性
(理論段数測定条件)

カラム；TSK-GEL SuperAWシリーズ
(6.0mm I.D.×15cm)

溶離液；水

流速；0.6mL/min

温度；25℃

検出；RI

試料；エチレングリコール

注入量；5μL(2.5g/L)

3-2. 各種溶媒での較正曲線

TSK-GEL SuperAWシリーズは種々の溶媒に交換可能ですが、実際の使用にあたっては使用する溶媒に適した標準試料を選択する必要があります。図-2～6に水（標準試料PEO、PEG、及びプルラン）、メタノール（PEO、PEG）、DMF（PEO、PEG）、DMSO（プルラン）における較正曲線を示します。それぞれの溶媒において良好な直線性を有する較正曲線が得られていますが分画分子量範囲や傾きについては各溶媒で若干の違いが見られました。

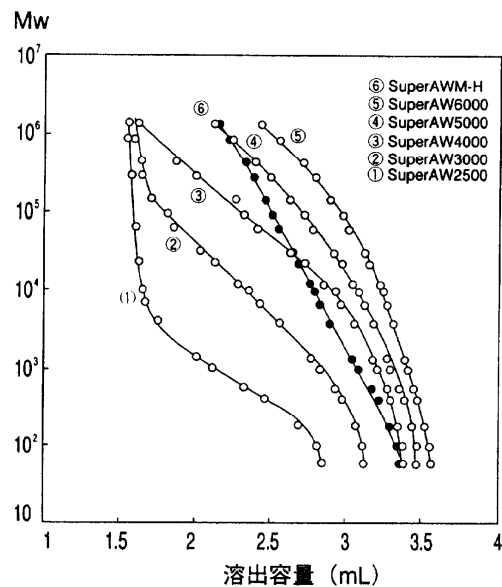


図-2 TSK-GEL SuperAWシリーズの較正曲線(1)

カラム；TSK-GEL SuperAWシリーズ

(6.0mm I.D.×15cm)

溶離液；水

流速；0.6mL/min

温度；25℃

検出；RI

試料；標準ポリエチレンオキシド、ポリエチレングリコール、エチレングリコール

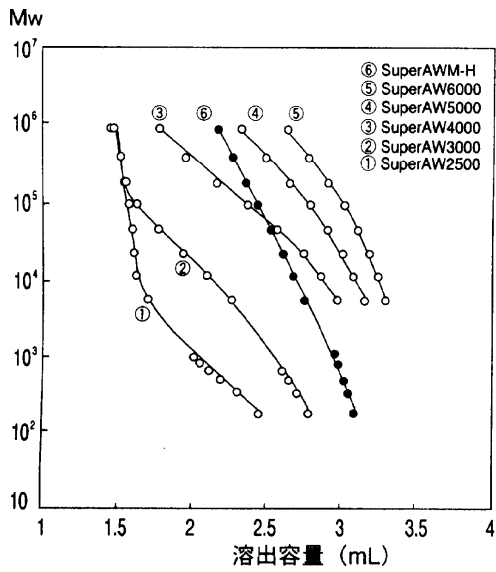


図-3 TSK-GEL SuperAWシリーズの較正曲線(2)
カラム; TSK-GEL SuperAWシリーズ
(6.0mm I.D.×15cm)

溶離液; 水
流速; 0.6mL/min
温度; 25℃
検出; RI
試料; 標準プルラン、オリゴマルトース、グルコース

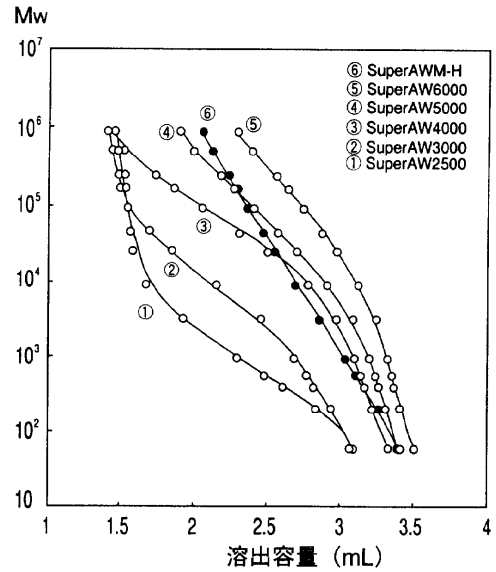


図-4 TSK-GEL SuperAWシリーズの較正曲線(3)
カラム; TSK-GEL SuperAWシリーズ
(6.0mm I.D.×15cm)

溶離液; 10mmol/L LiBrを含むメタノール
流速; 0.6mL/min
温度; 25℃
検出; RI
試料; 標準ポリエチレンオキシド、ポリエチレングリコール、エチレングリコール

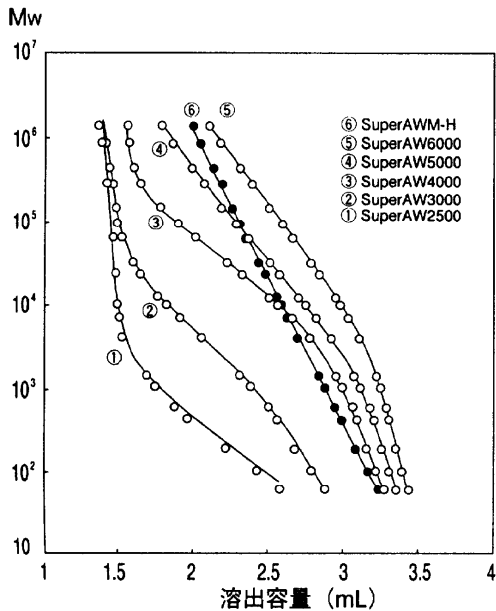


図-5 TSK-GEL SuperAWシリーズの較正曲線(4)
カラム; TSK-GEL SuperAWシリーズ
(6.0mm I.D.×15cm)

溶離液; 10mmol/L LiBrを含むDMF
流速; 0.6mL/min
温度; 25℃
検出; RI
試料; 標準ポリエチレンオキシド、ポリエチレングリコール、エチレングリコール

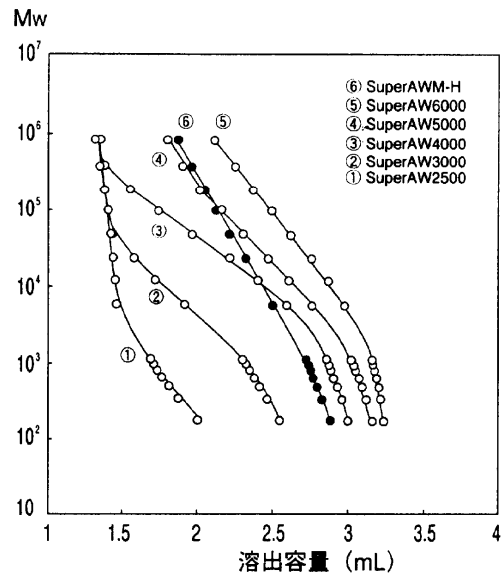


図-6 TSK-GEL SuperAWシリーズの較正曲線(5)
カラム; TSK-GEL SuperAWシリーズ
(6.0mm I.D.×15cm)

溶離液; 10mmol/L NaNO₃を含むDMSO
流速; 0.6mL/min
温度; 25℃
検出; RI
試料; 標準プルラン、オリゴマルトース、グルコース

3-3. 分離性能と溶媒消費量

TSK-GEL SuperAWシリーズは現行のTSK-GEL PW_{XL}シリーズやTSK-GEL α シリーズと比較すると粒子径の小さなゲルが充てんされています。カラム性能は粒子径に依存し、粒子径が小さいほどカラム効率は高くなります。さらにデッドボリュームの少ない構造のカラムに充てんされているので、TSK-GEL PW_{XL}シリーズなどと比較すると単位長さ当たり2倍の理論段数を有しております。即ち1/2のカラム長さで同等の分離性能が得られます。図-7にTSKgel SuperAW2500、及びTSKgel G2500PW_{XL}を用いて測定したデキストラン

T-40の加水分解物のクロマトグラムを示します。SuperAW2500カラムは現行カラムと比較すると約半分の時間で同等の分離が得られている事が分ります。

更にこの時、SuperAW2500カラムの流速はG2500PW_{XL}カラムの60% (1.0mL/minに対し0.6mL/min) であるので1回の試料測定で消費する溶媒量は1/3となります。

この様に、TSK-GEL SuperAWシリーズは現行の一般的なSECカラムの1/2の測定時間、1/3の溶媒消費量で同等のクロマトグラムを得る事が可能であり非常にコストパフォーマンスの高いカラムと言えます。

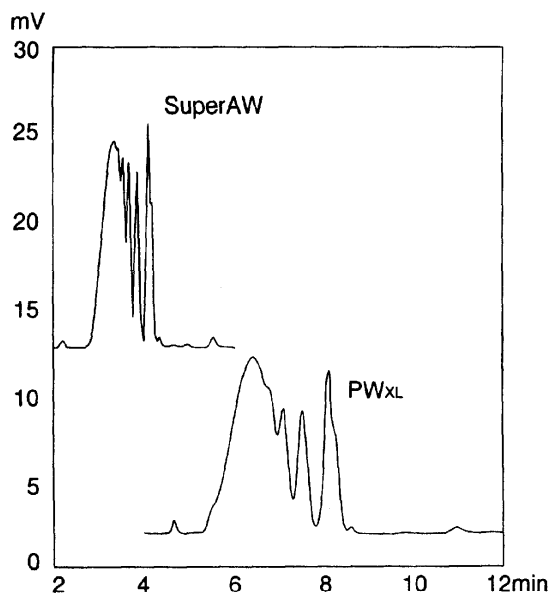


図-7 クロマトグラムの比較

カラム ; TSKgel SuperAW2500 (6.0mm I.D. × 15cm)

TSKgel G2500PW_{XL} (7.8mm I.D. × 30cm)

溶離液 ; 水

流速 ; 0.6mL/min (TSKgel SuperAW2500)

1.0mL/min (TSKgel G2500PW_{XL})

温度 ; 25℃

検出 ; RI

試料 ; デキストランT-40加水分解物

3-4. 測定流速の影響

HETP (理論段高さ) の流速依存性を確認しました。通常、最適流速は充てん剤の粒子径及び試料の分子量に依存します。図-8 に SuperAW2500 と G2500PW_{XL} のエチレングリコールに対する HETP の流速依存性を示します。PW_{XL} カラムの最適流速が 10 mm/min (流速 0.5 mL/min) であり、その前後で HETP が大きく変化しているのに対し、SuperAW カラムは流速が 10~20 mm/min (流速 0.3~0.6 mL/min) の範囲で最も HETP が低くかつほとんど変化がありません。即ち SuperAW カラムはこの流速範囲で高い理論段数を示し高流速下でも性

能の低下がほとんどありません。図-9 に高分子のプルラン (P-20; 分子量 23,700 P-5; 分子量 5,800) に対する HETP の流速依存性を示します。PW_{XL} カラム、SuperAW カラムともに流速が大きくなるにつれ HETP も高くなっていますが SuperAW カラムの方が HETP の変化率が少ない事が分ります。以上から SuperAW シリーズは試料の分離に対する流速の影響が非常に少なく、広い流速範囲で高いカラム効率を発揮できるカラムであることが分ります。

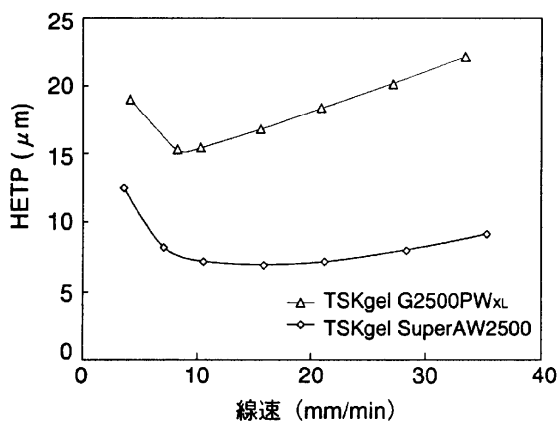


図-8 HETPと線速の関係 (1)

カラム ; TSKgel SuperAW2500 (6.0mm I.D. × 15cm)

TSKgel G2500PW_{XL} (7.8mm I.D. × 30cm)

溶離液 ; 水

温度 ; 25℃

試料 ; エチレングリコール 2.5g/L

注入量 ; 5 μL (TSKgel SuperAW2500)

10 μL (TSKgel G2500PW_{XL})

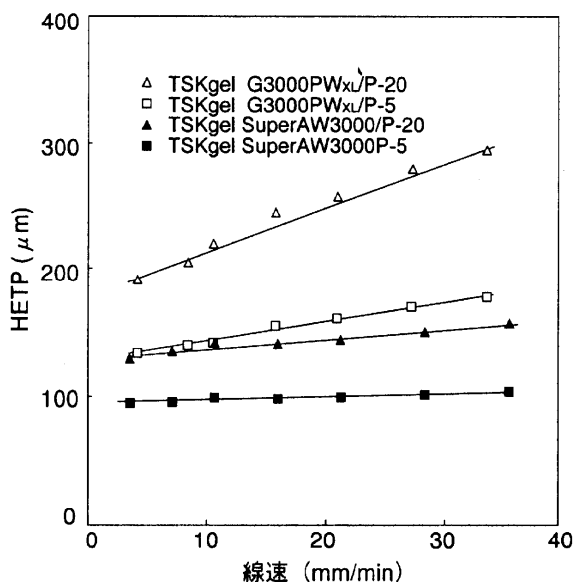


図-9 HETPと線速の関係 (2)

カラム ; TSKgel SuperAW3000 (6.0mm I.D. × 15cm)

TSKgel G3000PW_{XL} (7.8mm I.D. × 30cm)

溶離液 ; 水

温度 ; 25℃

試料 ; プルラン P-5 (1g/L)

プルラン P-20 (1g/L)

注入量 ; 5 μL (TSKgel SuperAW3000)

10 μL (TSKgel G3000PW_{XL})

3-5. 試料注入容量の影響

試料注入容量を大きくするとピークが広がり分離に影響を及ぼします。低分子（エチレングリコール）と分子量分布を持った高分子（プルラン）を用いて注入容量に対するHETPの影響を示します（図-10~11）。エチレングリコールに対してはPW_{XL}カラムでは20 μ Lを超えた付近からHETPの上昇が見られるのに対し、SuperAWカラムでは5 μ Lを超えた付近からHETPの上昇が見

られます。一方、プルランに対してはSuperAWカラムでは20 μ L程度まではHETPの急激な上昇は見られません。以上から、SuperAWカラムでは低分子やオリゴマーの分離を目的とする場合はカラム1本当たり5 μ L、高分子の分子量・分子量分布測定を目的とする場合はカラム1本当たり20 μ L以下の試料注入容量にする必要があります。

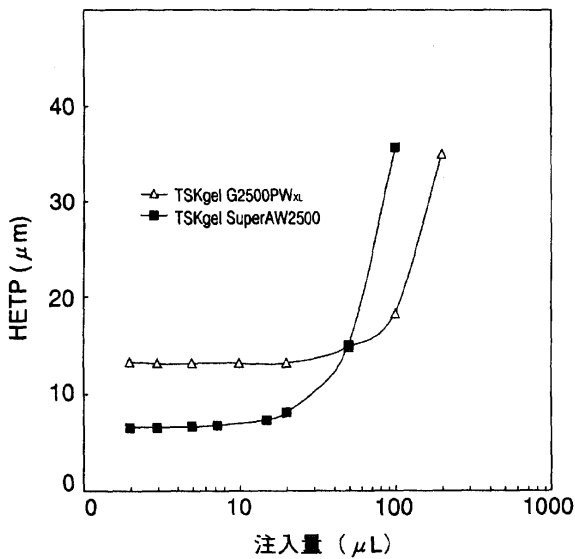


図-10 HETPと試料注入容量の関係 (1)

カラム ; TSKgel SuperAW2500 (6.0mm I.D. × 15cm)
 TSKgel G2500PW_{XL} (7.8mm I.D. × 30cm)
 溶離液 ; 水
 流速 ; 0.6mL/min (TSKgel SuperAW2500)
 1.0mL/min (TSKgel G2500PW_{XL})
 温度 ; 25℃
 試料 ; エチレングリコール、2.5g/L

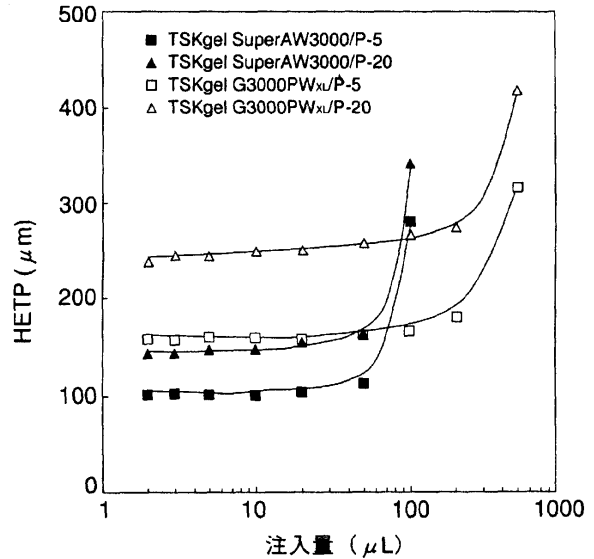


図-11 HETPと試料注入容量の関係 (2)

カラム ; TSKgel SuperAW3000 (6.0mm I.D. × 15cm)
 TSKgel G3000PW_{XL} (7.8mm I.D. × 30cm)
 溶離液 ; 水
 流速 ; 0.6mL/min (TSKgel SuperAW3000)
 1.0mL/min (TSKgel G3000PW_{XL})
 温度 ; 25℃
 試料 ; プルランP-5 (1g/L)
 プルランP-20 (1g/L)
 注入量 ; 5 μ L (TSKgel SuperAW3000)
 10 μ L (TSKgel G3000PW_{XL})

4. 応用例

4-1. 各種ポリマーの測定例

SuperAWカラムを用いて測定した各種試料の一覧を表-3にまとめます。また各試料のクロマトグラムを図-12~27に示します。

表-3 TSK-GEL SuperAWシリーズを用いた各種試料の測定例

図	試料名	使用カラム	使用溶媒
12	コンドロイチン硫酸ナトリウム	TSKgel SuperAWM-H	0.2 mol/L 硝酸ナトリウム
13	アルギン酸ナトリウム	TSKgel SuperAWM-H	0.2 mol/L 硝酸ナトリウム
14	カルボキシメチルセルロース	TSKgel SuperAWM-H	0.2 mol/L 硝酸ナトリウム
15	ポリスチレンスルホン酸ナトリウム	TSKgel SuperAWM-H	0.2 mol/L 硝酸ナトリウム/アセトニトリル=80/20
16	ポリビニルピロリドン	TSKgel SuperAWM-H	0.2 mol/L 硝酸ナトリウム/アセトニトリル=80/20
17	アラビアゴム	TSKgel SuperAWM-H	0.2 mol/L 硝酸ナトリウム/アセトニトリル=80/20
18	エチルヒドロキシエチルセルロース	TSKgel SuperAWM-H	10 mmol/L LiBr を含む メタノール
19	ビニルアルコール/ビニルブチラール共重合体	TSKgel SuperAWM-H	10 mmol/L LiBr を含む メタノール
20	ヒドロキシプロピルセルロース	TSKgel SuperAWM-H	10 mmol/L LiBr を含む メタノール
21	ポリメチルビニルエーテル	TSKgel SuperAWM-H	10 mmol/L LiBr を含む メタノール
22	酢酸セルロース	TSKgel SuperAWM-H	10 mmol/L LiBr を含む DMF
23	N-イソプロピルアクリルアミド	TSKgel SuperAWM-H	10 mmol/L LiBr を含む DMF
24	ポリアクリロニトリル	TSKgel SuperAWM-H	10 mmol/L LiBr を含む DMF
25	塩化ビニル/酢酸ビニル共重合体	TSKgel SuperAWM-H	10 mmol/L LiBr を含む DMF
26	スチレン/アリルアルコール共重合体	TSKgel SuperAWM-H	10 mmol/L LiBr を含む DMF
27	ポリ p-フェニレンエーテルスルホン	TSKgel SuperAWM-H	10 mmol/L LiBr を含む DMF

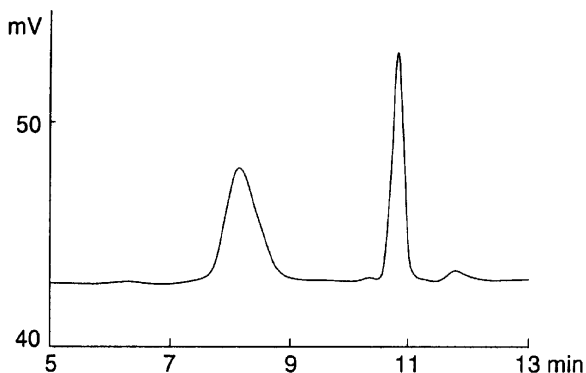


図-12 コンドロイチン硫酸ナトリウムのクロマトグラム

カラム ; TSKgel SuperAWM-H (6.0mm I.D.×15cm×2)
 溶離液 ; 0.2mol/L 硝酸ナトリウム
 流速 ; 0.6mL/min
 温度 ; 40℃
 検出 ; RI
 注入量 ; 20 μL (0.5g/L)

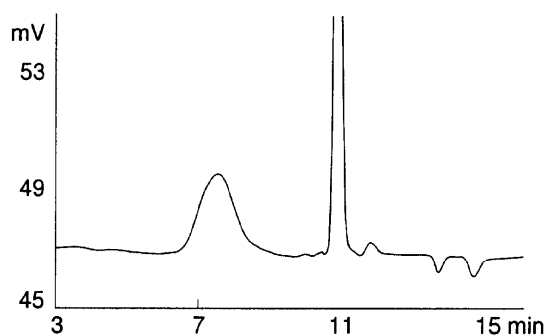


図-13 アルギン酸ナトリウムのクロマトグラム

カラム ; TSKgel SuperAWM-H (6.0mm I.D.×15cm×2)
 溶離液 ; 0.2mol/L 硝酸ナトリウム
 流速 ; 0.6mL/min
 温度 ; 40℃
 検出 ; RI
 注入量 ; 20 μL (0.5g/L)

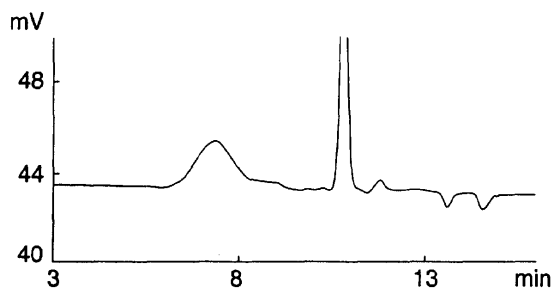


図-14 カルボキシメチルセルロースのクロマトグラム

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

溶離液 ; 0.2mol/L 硝酸ナトリウム

流速 ; 0.6mL/min

温度 ; 40℃

検出 ; RI

注入量 ; 20 μL (0.5g/L)

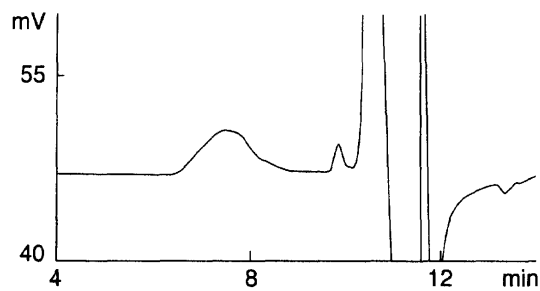


図-15 ポリスチレンスルホン酸ナトリウムのクロマトグラム

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

溶離液 ; 0.2mol/L 硝酸ナトリウム/アセトニトリル
=80/20

流速 ; 0.6mL/min

温度 ; 40℃

検出 ; RI

注入量 ; 20 μL (0.5g/L)

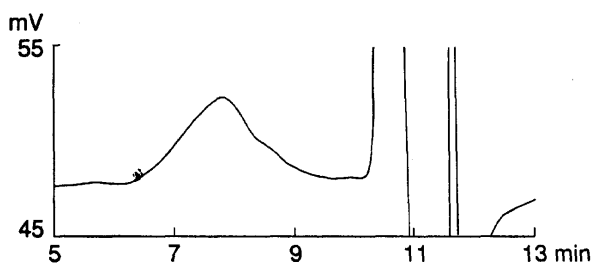


図-16 ポリビニルピロリドンのクロマトグラム

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

溶離液 ; 0.2mol/L 硝酸ナトリウム/アセトニトリル
=80/20

流速 ; 0.6mL/min

温度 ; 40℃

検出 ; RI

注入量 ; 20 μL (0.5g/L)

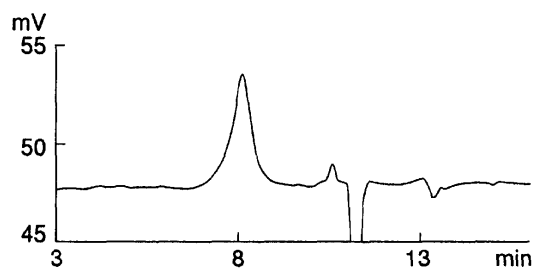


図-17 アラビアゴムのクロマトグラム

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

溶離液 ; 0.2mol/L 硝酸ナトリウム/アセトニトリル
=80/20

流速 ; 0.6mL/min

温度 ; 40℃

検出 ; RI

注入量 ; 20 μL (0.5g/L)

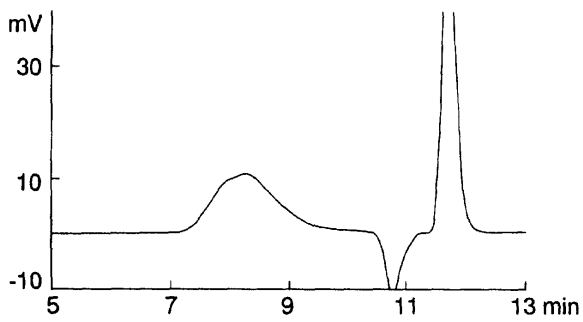


図-18 エチルヒドロキシエチルセルロースのクロマトグラム

カラム ; TSKgel SuperAWM-H(6.0mm I.D.×15cm×2)
 溶離液 ; 10mmol/L LiBrを含むメタノール
 流速 ; 0.6mL/min
 温度 ; 40℃
 検出 ; RI
 注入量 ; 20 μL(0.5g/L)

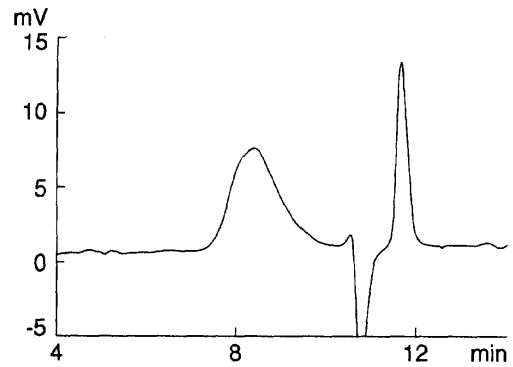


図-19 ビニルアルコール/ビニルブチラール共重合体のクロマトグラム

カラム ; TSKgel SuperAWM-H(6.0mm I.D.×15cm×2)
 溶離液 ; 10mmol/L LiBrを含むメタノール
 流速 ; 0.6mL/min
 温度 ; 40℃
 検出 ; RI
 注入量 ; 20 μL(0.5g/L)

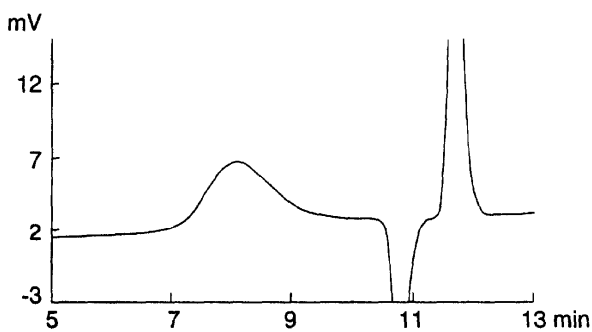


図-20 ヒドロキシプロピルセルロースのクロマトグラム

カラム ; TSKgel SuperAWM-H(6.0mm I.D.×15cm×2)
 溶離液 ; 10mmol/L LiBrを含むメタノール
 流速 ; 0.6mL/min
 温度 ; 40℃
 検出 ; RI
 注入量 ; 20 μL(0.5g/L)

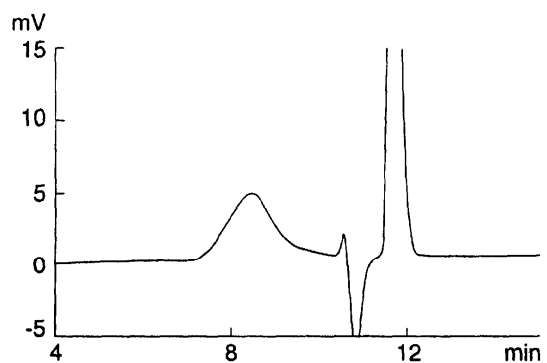


図-21 ポリメチルビニルエーテルのクロマトグラム

カラム ; TSKgel SuperAWM-H(6.0mm I.D.×15cm×2)
 溶離液 ; 10mmol/L LiBrを含むメタノール
 流速 ; 0.6mL/min
 温度 ; 40℃
 検出 ; RI
 注入量 ; 20 μL(0.5g/L)

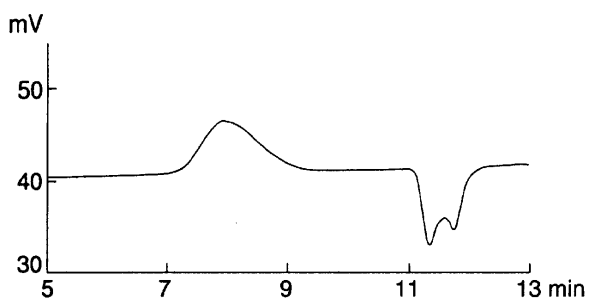


図-22 酢酸セルロースのクロマトグラム

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

溶離液 ; 10mmol/L LiBrを含むDMF

流速 ; 0.6mL/min

温度 ; 40℃

検出 ; RI

注入量 ; 20 μL (0.5g/L)

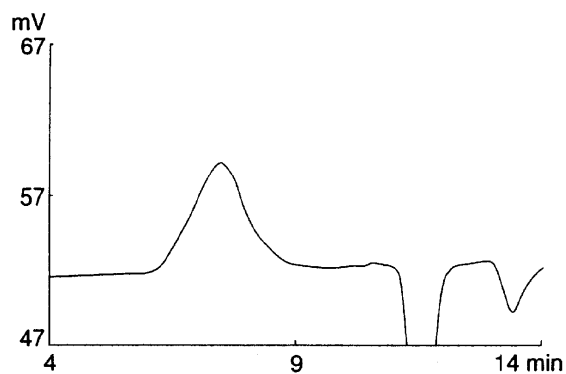


図-23 N-イソプロピルアクリルアミドのクロマトグラム

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

溶離液 ; 10mmol/L LiBrを含むメタノール

流速 ; 0.6mL/min

温度 ; 40℃

検出 ; RI

注入量 ; 20 μL (0.5g/L)

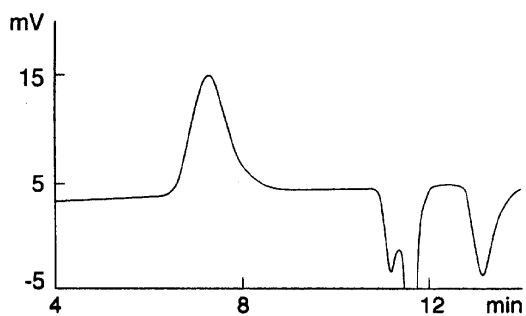


図-24 ポリアクリロニトリルのクロマトグラム

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

溶離液 ; 10mmol/L LiBrを含むDMF

流速 ; 0.6mL/min

温度 ; 40℃

検出 ; RI

注入量 ; 20 μL (0.5g/L)

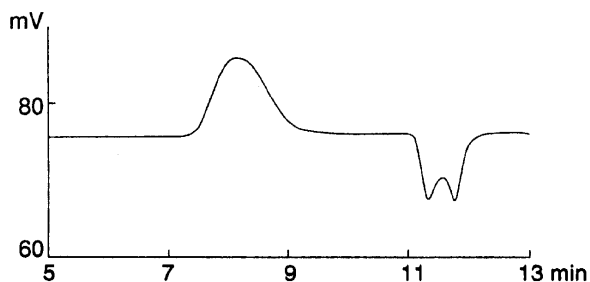


図-25 塩化ビニル/酢酸ビニル共重合体のクロマトグラム

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

溶離液 ; 10mmol/L LiBrを含むDMF

流速 ; 0.6mL/min

温度 ; 40℃

検出 ; RI

注入量 ; 20 μL (0.5g/L)

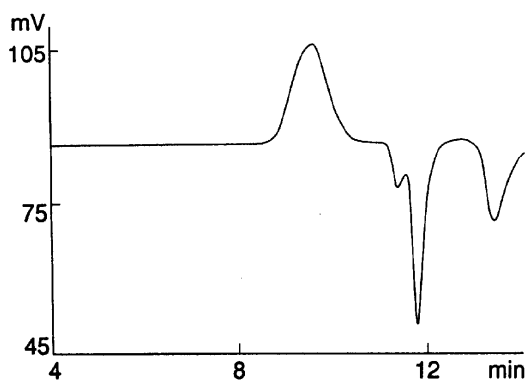


図-26 スチレン/アクリルアルコール共重合体のクロマトグラム

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

溶離液 ; 10mmol/L LiBrを含むDMF

流速 ; 0.6mL/min

温度 ; 40℃

検出 ; RI

注入量 ; 20 μL(0.5g/L)

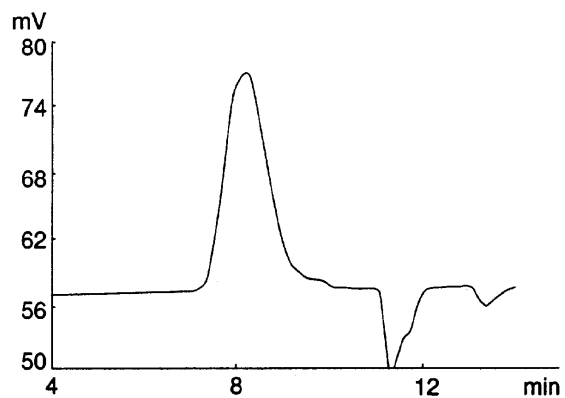


図-27 ポリp-フェニレンエーテルスルホンのクロマトグラム

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

溶離液 ; 10mmol/L LiBrを含むDMF

流速 ; 0.6mL/min

温度 ; 40℃

検出 ; RI

注入量 ; 20 μL(0.5g/L)

4-2. 非SECモードでの測定例

溶媒交換性に優れているため、界面活性剤のような試料に対して溶離液を変更する事により、図-28に示すように異なるクロマトグラムを得る事ができます。即ち、60%アセトニトリル水溶液では試料は分子サイズに基づいて分離（SECモード）されており、他の溶離液組成では保持（非SECモード）されています。このように1つのカラムで測定目的（分子量測定・定量・分離）に合わせた溶離条件を設定する事が可能です。製剤を測定した例を図-29~30に示します。図-29ではパップ剤の低分子成分がカラムに保持されきれいに分離されています。図-30では添加剤成分がカラムに保持され分離されています。このように、高分子から低分子まで含む試料や、複数の低分子成分を含む試料の分離にも非常に有効です。

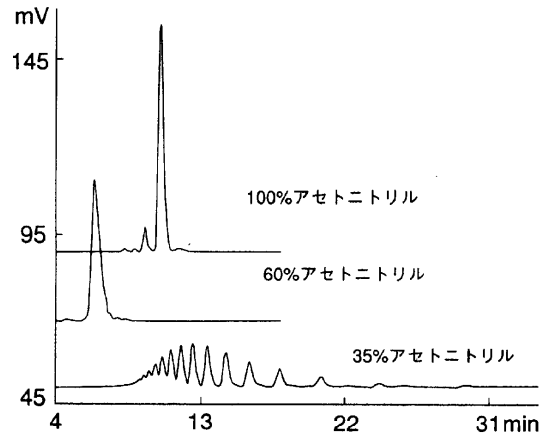


図-28 界面活性剤の測定

カラム；TSKgel SuperAW2500(6.0mm I.D.×15cm)
 溶離液；アセトニトリル、アセトニトリル水溶液
 流速；0.6mL/min
 温度；40℃
 検出；UV(280nm)
 注入量；20μL

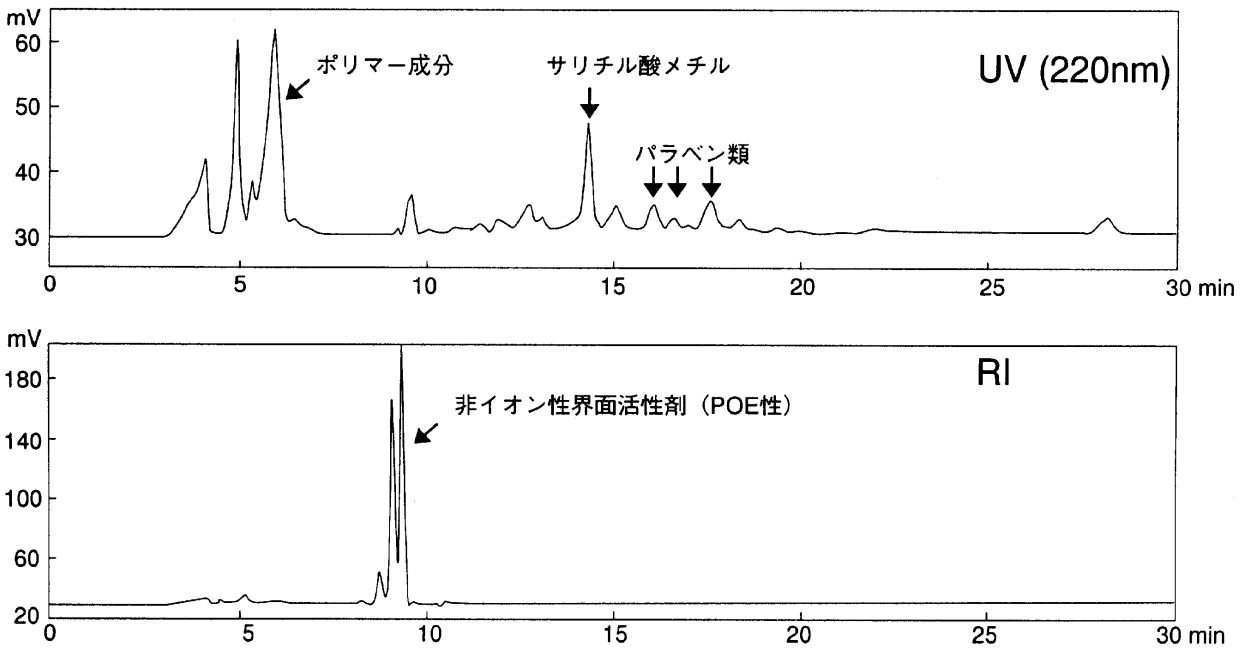


図-29 パップ剤の測定例

カラム；TSKgel SuperAW2500(6.0mm I.D.×15cm×2)
 溶離液；メタノール/水=60/40
 流速；0.6mL/min
 温度；40℃
 検出；UV(220nm), RI
 注入量；10μL

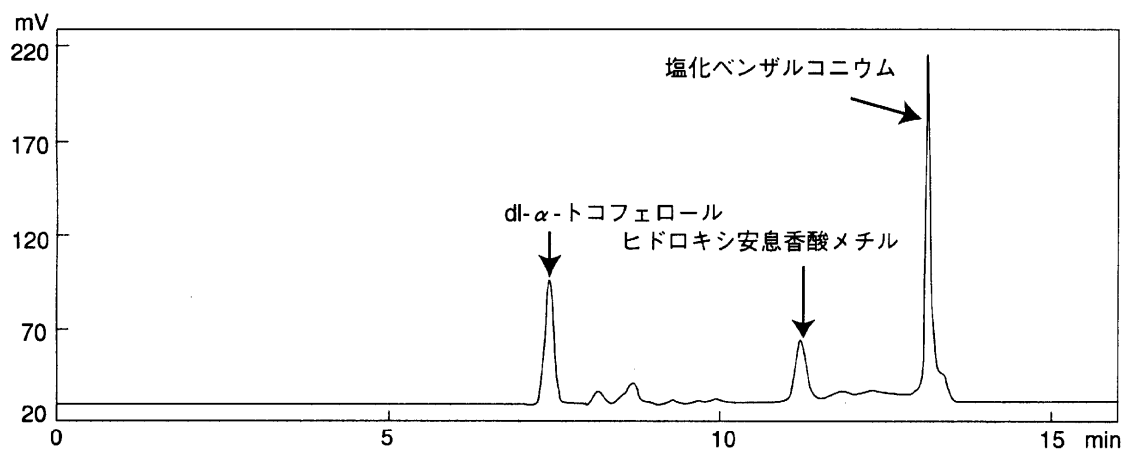


図-30 薬用クリームの実験例

カラム；TSKgel SuperAW2500 (6.0mm I.D.×15cm×2)

溶離液；エタノール

流速；0.6mL/min

温度；40℃

検出；UV (275nm)

注入量；10 μ L

5. まとめ

以上ご紹介しましたようにTSK-GEL SuperAWシリーズは水系から極性有機溶媒系まで広い範囲をカバーするSECカラムであり、従来のカラムに比べ高速・高分離・省溶媒を実現した非常に汎用性の高いカラムであることがお分り頂けた事と思います。また、非SECモードでの測定も容易に検討可能であり正に未知試料に対するファーストチョイスカラムと言えます。