

SEPARATION REPORT

カチオン性ポリマー用水系 SEC カラム TSKgel® PW_{XL}-CP シリーズについて

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. 特長	1
3. 基本的性質	2
3-1. 細孔特性	2
3-2. 試料注入量と理論段高さ (HETP)	2
3-3. 理論段高さ (HETP) の流速依存性	3
3-4. 分離性能	3
4. 較正曲線の溶離液依存性	4
4-1. 測定温度依存性	4
4-2. 溶離液中の pH 依存性	4
4-3. 溶離液中の有機溶媒の影響	5
4-4. 較測定流速依存性	5
5. カチオン性ポリマーの溶出特性	6
5-1. 市販 SEC カラムとの溶出の比較	6
5-2. 測定再現性	8
5-3. 各種カチオン性ポリマーの測定例	9
6. SEC-MALS によるカチオン性ポリマーの絶対分子量測定	10
6-1. ポリジアリルジメチルアンモニウムクロライドの 絶対分子量	10
6-2. PDADM-NH ₄ Cl 共重合体の絶対分子量	11
7. おわりに	11

1. はじめに

水溶性高分子の分子量分布を測定するための水系サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）用充てん剤には、ポリマー基材とシリカ基材が広く使用されています。弊社では、親水性ビニルポリマーを基材とした水系SEC用充てんカラム TSKgel® PW & PW_{XL} シリーズを商品化しています。

SECにより水溶性高分子の分子量分布測定を行う場合には、一般的に試料と充てん剤の相互作用を抑制するために溶離液のpH、塩の種類や濃度を最適化する必要があります。

特に、カチオン性ポリマーのSEC測定においては、充てん剤との静電的相互作用を抑えるために低pH溶離液あるいは高塩濃度溶離液を使用する必要がありますが、このような条件下においても静電的相互作用が十分に抑制できず、試料の低回収率と測定再現性不足により適正な分子量情報が得られない場合があります。

今回、上述の課題を克服し、温和な中性溶離液条件下においてもカチオン性ポリマーが高回収率かつ再現性良く測定可能となったカチオン性ポリマー用水系SECカラ

ム TSKgel® PW_{XL}-CP シリーズを開発し、発売開始しました。

本稿では、新規SECカラム TSKgel® PW_{XL}-CP シリーズの基本特性と応用例についてご紹介します。

2. 特長

TSKgel® PW_{XL} シリーズでカチオン性ポリマーをSEC測定する場合、充てん剤表面に微量に存在するカルボキシル基と試料との間に静電的相互作用による吸着現象が観察され、適正な分子量分布情報が得られないことがあります。

今回、新規な合成法で開発された TSKgel® PW_{XL}-CP シリーズは、TSKgel® PW_{XL} シリーズと同一基材を使用し、現行品の基本特性を保持した上で充てん剤表面のイオン性を改良することにより、中性の低塩濃度溶離液条件下においても高い回収率と、優れた測定再現性が得られます。

TSKgel® PW_{XL}-CP シリーズの基本的性質を表-1 および表-2にまとめました。

表-1 TSKgel® PW_{XL}-CP シリーズの物性一覧表

	TSKgel G3000PW _{XL} -CP	TSKgel G5000PW _{XL} -CP	TSKgel G6000PW _{XL} -CP
充てん剤基材	親水性ビニルポリマー	親水性ビニルポリマー	親水性ビニルポリマー
粒子径	7 μm	10 μm	13 μm
排除限界分子量 (PEO)	100,000	1,000,000	20,000,000*
分子量分画範囲 (PEO & PEG)	50,000 ~ 200	500,000 ~ 400	10,000,000 ~ 1,000

*：推定値

表-2 TSKgel® PW_{XL}-CP シリーズの製品規格

商品名	理論段数 (TP/カラム)	非対称係数	カラムサイズ (mmI.D.×cm)
TSKgel G3000PW _{XL} -CP	16,000/30cm	0.7 ~ 1.6	7.8×30
TSKgel G5000PW _{XL} -CP	10,000/30cm	0.7 ~ 1.6	7.8×30
TSKgel G6000PW _{XL} -CP	7,000/30cm	0.7 ~ 1.6	7.8×30

測定条件

溶離液：0.1 mol/L 硝酸ナトリウム水溶液
検出：RI
流速：1.0 mL/min (7.8 mmI.D.×30 cm)

温度：25℃
試料：エチレングリコール (5 g/L)
注入量：20 μL

3. 基本的性質

3-1. 細孔特性

TSKgel® PW_{XL}-CPシリーズは、表-1および表-2に示すように分子量分画範囲を適正化した低分子用から高分子用までの3グレードを揃えています。

図-1に、0.1 mol/L硝酸ナトリウム水溶液における標準ポリエチレンオキシドおよびポリエチレングリコールでの較正曲線を示します。

低分子用グレードのTSKgel G3000PW_{XL}-CPの測定可能な分子量分画範囲は、50,000～200であり、TSKgel G5000PW_{XL}-CPでは、500,000～400の範囲に設定されており、そして高分子用グレードであるTSKgel G6000PW_{XL}-CPにおいては10,000,000～1,000の範囲に設定されています。したがって、対象試料の分子量および分子量分布に応じてこれらのカラムを組合せて接続することにより高分子量ポリマーから低分子量のオリゴマーまで幅広い試料に対応することが可能です。

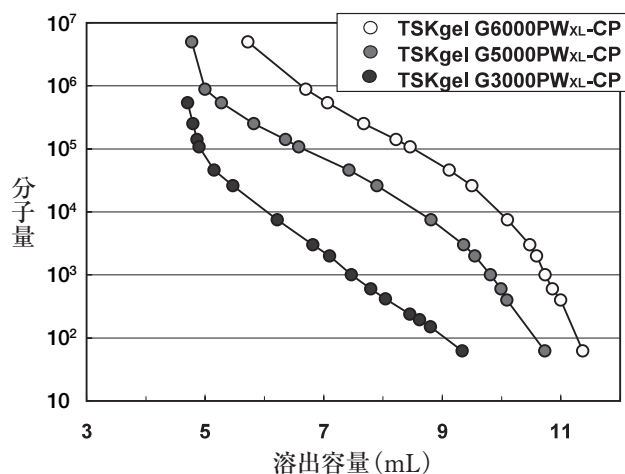


図-1 TSKgel® PW_{XL}-CPシリーズの較正曲線

カラム： TSKgel® PW_{XL}-CPシリーズ
(7.8 mmID.×30 cm)

溶離液：0.1 mol/L硝酸ナトリウム

流速：1.0 mL/min

検出：RI

温度：25℃

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およびエチレングリコール

注入量：100 μL

3-2. 試料注入量と理論段高さ (HETP)

図-2に、TSKgel® PW_{XL}-CPシリーズにおけるエチレングリコール (EG) の理論段高さ (HETP) の試料注入量依存性を示します。

いずれのグレードにおいてもカラム2本の場合注入量が50μLを超えるとHETPが大きくなり始め、TSKgel® PW_{XL}-CPシリーズでの最大試料注入量は、カラム1本当たりおよそ25 μLであることがわかります。

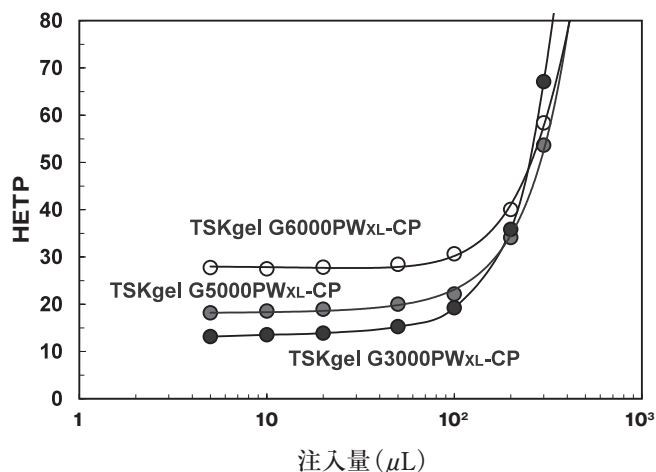


図-2 TSKgel® PW_{XL}-CPにおける試料注入量とHETPの関係

カラム： TSKgel® PW_{XL}-CPシリーズ
(7.8 mmID.×30 cm) × 2

溶離液：H₂O

流速：1.0 mL/min

検出：RI

温度：25℃

試料：エチレングリコール (5 g/L)

注入量：5～500 μL

3-3. 理論段高さ (HETP) の流速依存性

試料に低分子単分散試料であるEGを用いて、TSKgel PW_{XL}-CPシリーズのHETPの測定流速依存性を確認した結果を図-3に示しました。

粒子径により最適流速（最小HETP）が異なります。粒子径の小さいTSKgel G3000PW_{XL}-CPの最適流速（最小HETP）は、比較的高い流速（0.6～1.0 mL/min）ですが、粒子径が大きくなるにしたがって最適流速は低下し、TSKgel G5000PW_{XL}-CPは0.5～0.8 mL/min、TSKgel G6000PW_{XL}-CPは0.4～0.7 mL/minでした。

3-4. 分離性能

TSKgel[®] PW_{XL}-CPシリーズとTSKgel[®] PW_{XL}シリーズの細孔特性に大きな差異がないことを前述しましたが、低分子用グレードであるTSKgel G3000 PW_{XL}-CPは、TSKgel G3000 PW_{XL}に比較し、細孔特性が改善されています。

図-4に、TSKgel G3000 PW_{XL}-CPとTSKgel G3000 PW_{XL}によるポリエチレングリコール200 (PEG 200) のクロマトグラムを示します。

低分子領域の細孔特性が改良されたTSKgel G3000 PW_{XL}-CPは、TSKgel G3000 PW_{XL}よりも優れた分離能を示しました。

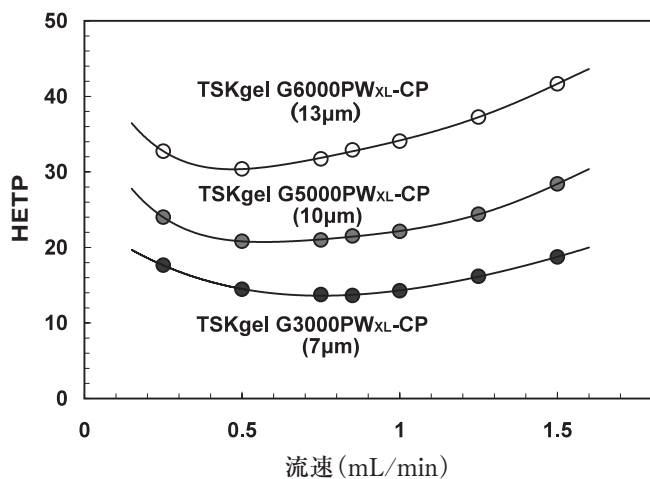


図-3 TSKgel[®] PW_{XL}-CPにおける測定流速とHETPの関係

カラム： TSKgel[®] PW_{XL}-CPシリーズ
(7.8 mmID.×30 cm)

溶離液：H₂O

流速：0.25～1.5 mL/min

検出：RI

温度：25℃

試料：エチレングリコール (5 g/L)

注入量：20 µL

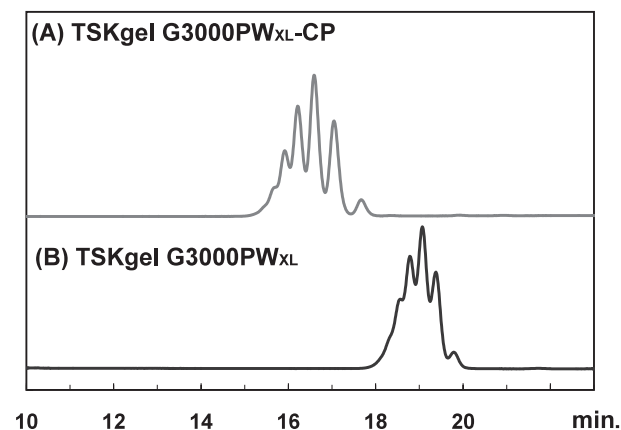


図-4 TSKgel G3000PW_{XL}-CPとTSKgel G3000PW_{XL}によるポリエチレングリコール200の分離

カラム：(A) TSKgel G3000PW_{XL}-CP
(7.8 mmID.×30 cm×2)

(B) TSKgel G3000PW_{XL}
(7.8 mmID.×30 cm×2)

溶離液：H₂O

流速：1.0 mL/min

検出：RI

温度：25℃

試料：ポリエチレングリコール 200 (3 g/L)

注入量：50 µL

4. 較正曲線の溶離液依存性

4-1. 測定温度依存性

TSKgel G5000PW_{XL}-CPを用いて、溶離液は0.1 mol/L 硝酸ナトリウム水溶液として、標準ポリエチレンオキシドによる較正曲線の測定温度依存性を調べた結果を図-5に示します。測定温度25℃から60℃の範囲では依存性はないことが確認されました。

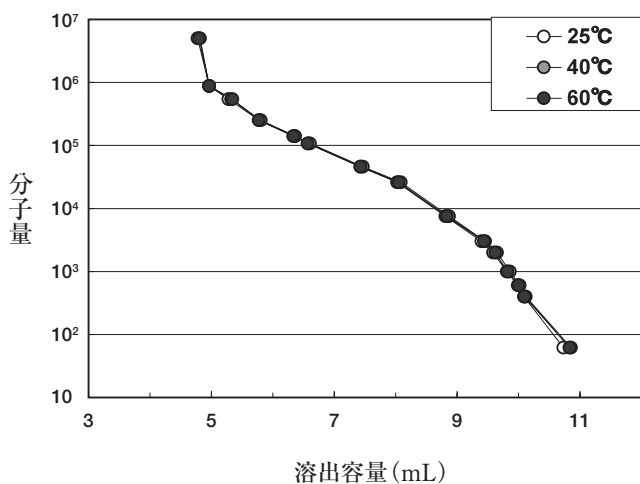


図-5 TSKgel G5000PW_{XL}-CPの較正曲線の温度依存性
カラム：TSKgel G5000PW_{XL}-CP (7.8 mmI.D.×30 cm)
溶離液：0.1 mol/L 硝酸ナトリウム
流速：1.0 mL/min
温度：25、40、60℃
試料：標準ポリエチレンオキシド、ポリエチレングリコールおよびエチレングリコール
注入量：100 μL

4-2. 溶離液のpH依存性

図-6にTSKgel G5000PW_{XL}-CPを用いて、溶離液（0.1 mol/L 酢酸緩衝液）中のpHを変化させた時の標準ポリエチレンオキシドによる較正曲線を示します。

pHが4.5から8.3の範囲では、較正曲線の変化はありませんでした。

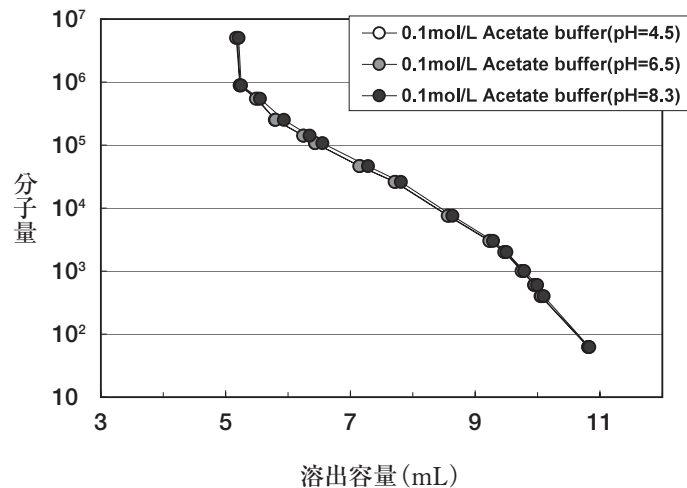


図-6 TSKgel G5000PW_{XL}-CPの較正曲線の溶離液中のpH依存性
カラム：TSKgel G5000PW_{XL}-CP (7.8 mmI.D.×30 cm)
溶離液：0.1 mol/L 酢酸緩衝液 (pH = 4.5, 6.5, 8.3)
流速：1.0 mL/min
温度：25℃
試料：標準ポリエチレンオキシド、ポリエチレングリコールおよびエチレングリコール
注入量：100 μL

4-3. 溶離液中の有機溶媒濃度の影響

カラムにTSKgel G5000PW_{XL}-CPを用い、溶離液(0.1 mol/L 硝酸ナトリウム) にアセトニトリルを添加した条件下でのアセトニトリル濃度が較正曲線に及ぼす影響を調べた結果を図-7に示します。ACN濃度が0から20%の範囲では、較正曲線への影響は、あまり観られませんでしたが、アセトニトリル濃度が高くなると標準試料の溶出が早まり、較正曲線は全体的に小さいほうへシフトする傾向がありました。

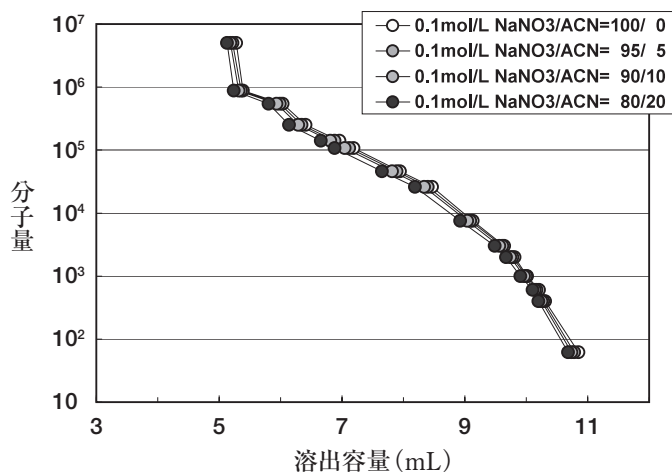


図-7 TSKgel G5000PW_{XL}-CPの較正曲線の
溶離液中の有機溶媒濃度の影響

カラム：TSKgel G5000PW_{XL}-CP (7.8 mmI.D.×30 cm)
 溶離液：0.1 mol/L 硝酸ナトリウム/アセトニトリル= 0/100 ~ 20/80
 流速：1.0 mL/min
 温度：25℃
 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およびエチレングリコール
 注入量：100 μL

4-4. 測定流速依存性

TSKgel G6000PW_{XL}-CPを用いて、溶離液は0.1 mol/L 硝酸ナトリウム水溶液として、標準ポリエチレンオキシドによる較正曲線の測定流速依存性を調べた結果を図-8に示します。0.25から1.0 mL/minの範囲内では較正曲線に顕著な変化がないことを確認しました。

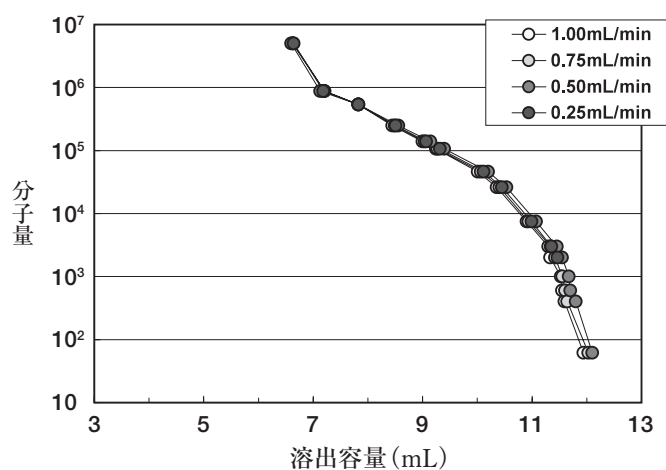


図-8 TSKgel G6000PW_{XL}-CPの較正曲線の
測定流速依存性

カラム：TSKgel G6000PW_{XL}-CP (7.8 mmI.D.×30 cm)
 溶離液：0.1 mol/L 硝酸ナトリウム
 流速：0.25 ~ 1.0 mL/min
 温度：25℃
 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およびエチレングリコール
 注入量：100 μL

5. カチオン性ポリマーの溶出特性

5-1. 市販SECカラムとの溶出の比較

TSKgel G5000PW_{XL}-CP、TSKgel G5000PW_{XL}および市販水系SECカラムを用いて温和な溶離液条件（中性の低塩濃度溶離液（0.1 mol/L硝酸ナトリウム水溶液））下でカチオン性ポリマーであるポリアリルアミン塩酸塩（PAA-HCl）の溶出特性の比較を行った結果を図-9に示します。

PW_{XL}および市販水系SECカラムにおいては、カチオン性ポリマーであるPAA-HClは吸着現象により全く溶出しませんでした。TSKgel G5000PW_{XL}-CPでは良好な溶出クロマトグラムが得られました。

図-10に、TSKgel G6000PW_{XL}-CPおよびTSKgel G6000PW_{XL}を用いて図-9と同じ溶離液条件（0.1 mol/L硝酸ナトリウム水溶液）でPAA-HClを光散乱検出器（MALS）で測定したクロマトグラムを示します。

TSKgel G6000PW_{XL}では、MALSでもPAA-HClは検出されず吸着現象により溶出されていないことが検証され

ました。

水系SECでは一般的に、カチオン性ポリマーとの静電的相互作用を抑制するために、高塩濃度溶離液が使用されます。

図-11に、市販水系SECカラムを用いて高塩濃度の溶離液条件である0.5 mol/L酢酸+0.1 mol/L硝酸ナトリウム水溶液でPAA-HClを繰り返し測定したクロマトグラムを示します。この溶離液条件では、カチオン性ポリマーが溶出することは確認しましたが、注入回数が少ない段階では試料の回収率は低く、測定再現性も充分なものではありませんでした。

図-12には、TSKgel® PW_{XL}-CPシリーズの各カラムを用いて0.1 mol/L硝酸ナトリウム水溶液におけるPAA-HClの溶出特性を調べ、併せて回収率とSEC法による平均分子量（M_w）データを示しました。全グレードにおいて良好な回収率（97%以上）が確認されると共に分子量データも適性な結果が得られました。

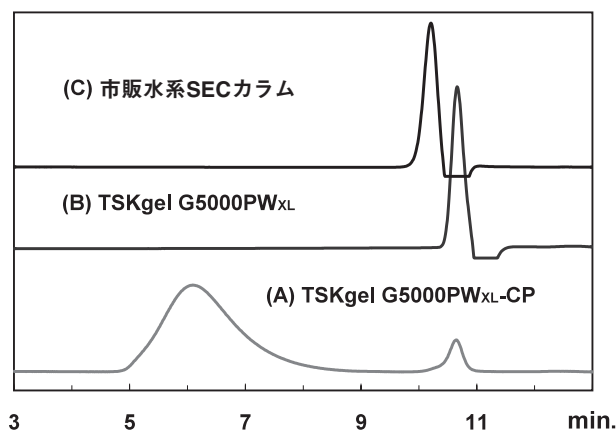


図-9 TSKgel G5000PW_{XL}-CPと既存品によるPAA-HClのクロマトグラム

カラム：(A) TSKgel G5000PW_{XL}-CP (7.8 mmI.D.×30 cm)
(B) TSKgel G5000PW_{XL} (7.8 mmI.D.×30 cm)
(C) 市販水系SECカラム (7.8 mmI.D.×30 cm)

溶離液：0.1 mol/L硝酸ナトリウム

流速：1.0 mL/min

検出：RI

温度：25℃

試料：ポリアリルアミン塩酸塩（PAA-HCl）（3 g/L）

注入量：100 μL

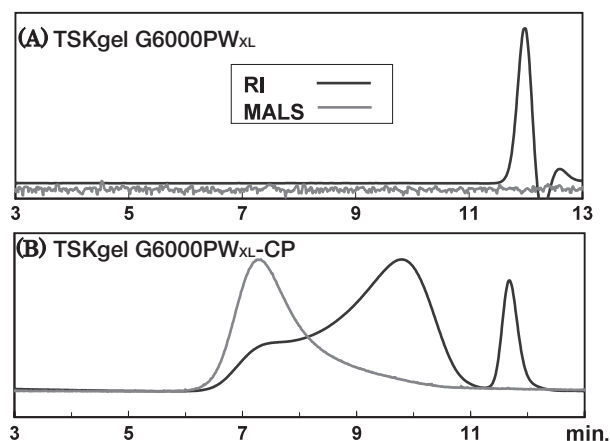


図-10 TSKgel G6000PW_{XL}-CPとTSKgel G6000PW_{XL}によるPAA-HClのクロマトグラム

カラム：(A) TSKgel G6000PW_{XL} (7.8 mmI.D.×30 cm)
(B) TSKgel G6000PW_{XL}-CP (7.8 mmI.D.×30 cm)

溶離液：0.1 mol/L硝酸ナトリウム

流速：1.0 mL/min

検出：MALS (DAWN HELEOS)、RI

温度：40℃

試料：ポリアリルアミン塩酸塩（PAA-HCl）（3 g/L）

注入量：100 μL

5-2. 測定再現性

TSKgel G5000PW_{XL}-CPを用い0.1 mol/L硝酸ナトリウム水溶液におけるPAA-HClの測定再現性（日内）を調べた結果を図-13に示します。

初回の測定から試料は高回収率を示し、クロマトグラムおよびSEC法による平均分子量（Mw）の測定再現性に優れていることが確認されました。

一方、図-14に示しましたようにTSKgel G5000 PW_{XL}における測定再現性データから、本条件下では繰り返し注入によっても試料ピークは認められず、非常に強い吸着現象であることがわかります。

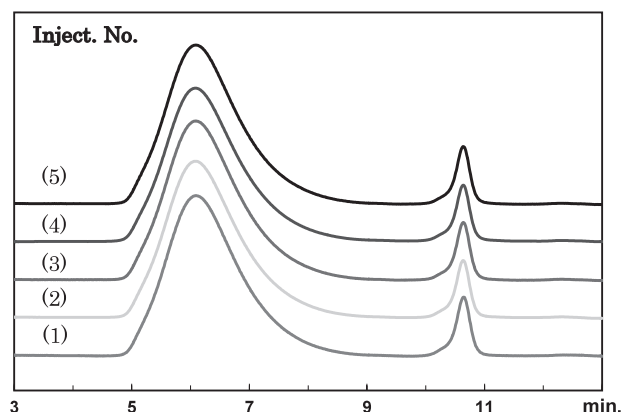


図-13 TSKgel G5000PW_{XL}-CPによる
PAA-HClの測定再現性（日内）

カラム：TSKgel G5000PW_{XL}-CP (7.8 mmID.×30 cm)
 溶離液：0.1 mol/L硝酸ナトリウム
 流速：1.0 mL/min
 検出：RI
 温度：25℃
 試料：ポリアリルアミン塩酸塩（PAA-HCl）（0.3%）
 注入量：100 μL

Inject.No.	Mw	Recovery (%)
1	168,000	98.8
2	169,000	99.1
3	168,000	99.1
4	170,000	99.3
5	170,000	99.2

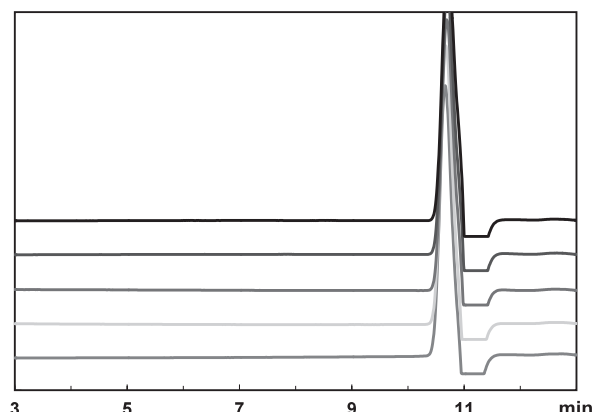


図-14 TSKgel G5000PW_{XL}による
PAA-HClの測定再現性（日内）

カラム：TSKgel G5000PW_{XL} (7.8 mmID.×30 cm)
 溶離液：0.1 mol/L硝酸ナトリウム
 流速：1.0 mL/min
 検出：RI
 温度：25℃
 試料：ポリアリルアミン塩酸塩（PAA-HCl）（0.3%）
 注入量：100 μL



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 バイオエッセンス ☎(06) 6344-3857 〒530-0004 大阪市北区堂島浜1-2-6
名古屋支店 バイオエッセンス ☎(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 〒746-8501 山口県周南市開成町4560
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 <http://www.tosoh.co.jp/science/>

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