

細孔多分散型SEC用充てんカラムTSK・GEL[®] SuperMultiporeHZシリーズの特性とその応用

バイオサイエンス事業部 セパレーションメディア製造部 セパレーションセンター

徳永 邦行
津田 輝彦
森山 弘之

1. はじめに

サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）は、高分子材料の分子量分布を測定する方法として、1964年に誕生して以来、世界中に広く普及している。

SEC法で得られる分子量は、標準試料の分子量と溶出容量（溶出時間）から作成された近似較正曲線を基に算出される換算分子量である。しかし、近似較正曲線と実較正曲線とのズレおよび異なる細孔径の充てん剤を複数用いる事による実試料のクロマトグラムの歪み現象などが、SEC法により得られる分子量データの正確性および再現性が充分でない要因であると指摘されている。

当社では、このような問題に対応した単一粒子内に幅広い細孔径を有した細孔多分散型充てん剤（TSKgel MultiporeH_{XL}・M）¹⁾を既に商品化し、市場での高い評価を得ている。

今回、これまでの現行TSKgel MultiporeH_{XL}・Mカラムの特性を維持し、かつ新規合成技術により作製された単分散微粒子充てん剤を用いて高性能化を行い、またカラム径の狭化による省溶媒対応型のセミマイクロカラム（4.6mm I.D. x 15cm）化も実現した。さらにオリゴマーや低分子用試料を対象にした低分子用グレード、および高分子用グレードの細孔多分散型充てん剤も新たに開発した。

本報告では、これらの新規細孔多分散型有機溶媒系セミマイクロSECカラムTSK・GEL[®] SuperMultiporeHZシリーズの特性と応用例について紹介する。

2. TSK・GEL[®] SuperMultiporeHZシリーズの特長

従来よりSEC測定においては、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）を改良したミックスベッドカラムを使用することが一般的であった。

しかし、このような方法では、分子量既知の標準試料の測定データから得られた実際の較正曲線と多次式で近似された較正曲線にはズレが生じること、また分子量分画範囲に排除限界分子量の小さい充てん剤（あるいは充てんカラム）が混合（あるいは接続）されることになり必然的に測定実試料のクロマトグラム上に歪んだ部分が観察され、正確で測定精度に優れたものではなかった。

これらの問題を克服するカラムとして細孔多分散型充てん剤TSKgel MultiporeH_{XL}・Mを上市した。

今回、新規な合成法で開発されたTSK・GEL[®] Super MultiporeHZシリーズは、現行品の特長を受け継ぎ、さら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カラム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1/6に低減した。また、オリゴマーや低分子試料に優れた分離能を有した低分子用グレードの細孔多分散型充てん剤TSKgel Super MultiporeHZ・N、および高分子試料分析用としての細孔多分散型充てん剤TSKgel Super MultiporeHZ・Hもラインナップした。

図1に、本開発品である細孔特性（分子量分画範囲）の異なる3グレードの電子顕微鏡写真を示した。何れのグレードも粒子径分布が非常に狭い単分散微粒子の単一粒子内に幅広い細孔径を有した細孔多分散型充てん剤であることがわかる。

3. TSK・GEL[®] SuperMultiporeHZシリーズの基本特性

3.1 細孔特性

TSK・GEL[®] SuperMultiporeHZシリーズには、表1に示すように低分子用1グレードと高分子用2グレードの計3グレードを揃え、幅広いポリマーの分子量測定に対応が可能である。

図2には、THF溶離液における標準ポリスチレンキット（PStQuick）を用いた較正曲線を示した。

低分子用グレードのTSKgel SuperMultiporeHZ・Nの

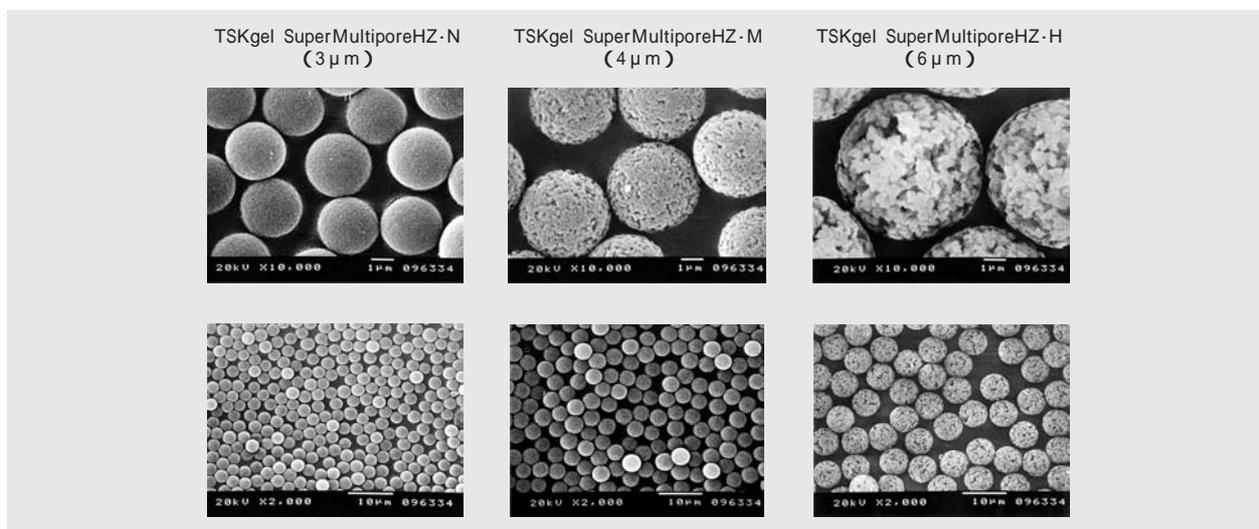


図1 TSK-GEL SuperMultiporeHZのSEM写真

表1 TSK-GEL SuperMultiporeHZシリーズの物性一覧表

	TSKgel SuperMultiporeHZ-N	TSKgel SuperMultiporeHZ-M	TSKgel SuperMultiporeHZ-H
充填剤基材	Poly(Styrene/divinylbenzene)	Poly(Styrene/divinylbenzene)	Poly(Styrene/divinylbenzene)
粒子径	3 μm (単分散粒子)	4 μm (単分散粒子)	6 μm (単分散粒子)
排除限界分子量 (PSt/THF)	120,000	2,000,000	
中心細孔径	8nm	14nm	
分子量分画範囲 (PSt/THF)	300 ~ 50,000	500 ~ 1,000,000	1,000 ~ 10,000,000
カラム理論段数	20,000TP/15cm	16,000TP/15cm	11,000TP/15cm
カラムサイズ	4.6mmI.D. × 15cm	4.6mmI.D. × 15cm	4.6mmI.D. × 15cm
ガ - ドカラムサイズ	4.6mmI.D. × 2cm	4.6mmI.D. × 2cm	4.6mmI.D. × 2cm

分子量分画範囲は、50,000 ~ 300であり、中高分子用グレードであるTSKgel SuperMultiporeHZ-Mの分子量分画範囲は、1,000,000 ~ 500に設定し、高分子用グレードのTSKgel SuperMultiporeHZ-Hは、さらに高分子領域の10,000,000から1,000までの分子量分画範囲とした。これら3グレードは、それぞれの分子量分画範囲において優れた直線性を有した較正曲線に設計されている。

図3では、TSKgel SuperMultiporeHZ-Nと現行のオリゴマー分析用として、一般的な細孔径の異なる複数カラム系 (TSKgel SuperHZ4000 + 3000 + 2500 + 2000) の較正曲線を比較した。TSKgel SuperMultiporeHZ-Nは、現行カラム系に比較して低分子領域の較正曲線の直線性に優れ、傾きが緩やかなことより高精度の測定が可能であり、オリゴマー分離にも最適である。

図4は、現行TSK-GEL® SuperHZ異種カラム接続系とTSK-GEL® SuperMultiporeHZシリーズの較正曲線の近似式からのズレの比較を示した。

細孔多分散型充てん剤であるTSK-GEL® SuperMultiporeHZシリーズでは、較正曲線と近似式

のズレが小さく分子量データの測定精度を高めることになる。

3.2 理論段高さ (HETP) の流速依存性

TSK-GEL® SuperMultiporeHZシリーズを用いて、低分子試料 (フタル酸ジシクロヘキシル (DCHP)) におけるHETPと測定流速の関係を図5に示した。

TSKgel SuperMultiporeHZ-Hにおける最適流速 (最小HETP) は、およそ0.35mL/minであり、微粒子化された高性能TSKgel SuperMultiporeHZ-N&Mでは、より高い領域に最適線流速があり、高流速下条件での高速分析も可能であることを示している。

図6では、TSKgel SuperMultiporeHZ-Hを用い、試料を高分子試料 (標準ポリスチレンF-128, F-20&F-2) とした時のカラム効率と測定流速の関係を調べた。

図6に示すように低分子試料では、高流速での高いカラム効率は維持されるが、実際の高分子試料のSEC測定においては、高分子試料では最適流速が低くなり、この傾向は分子量が高くなれば大きくなる。通常、平均分子量が1万以下の試料では高流速測定が充分可能

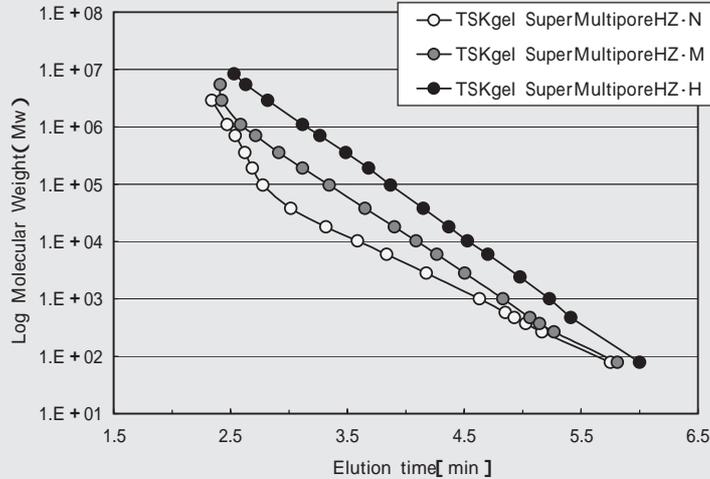


図2 TSK-GEL SuperMultiporeHZシリーズの較正曲線

Conditions:

Column : TSK-GEL SuperMultiporeHZ series (4.6mmI.D. × 15cm)
 Eluent : THF
 Flow rate : 0.35mL/min
 Temperature : 25
 Detection : UV 254nm
 Sample : PStQuick 5 μ L

	直線性	傾き
TSKgel SuperMultiporeHZ-N	0.9996	-2.813
TSKgel SuperMultiporeHZ-M	0.9998	-3.820
TSKgel SuperMultiporeHZ-H	0.9995	-4.131

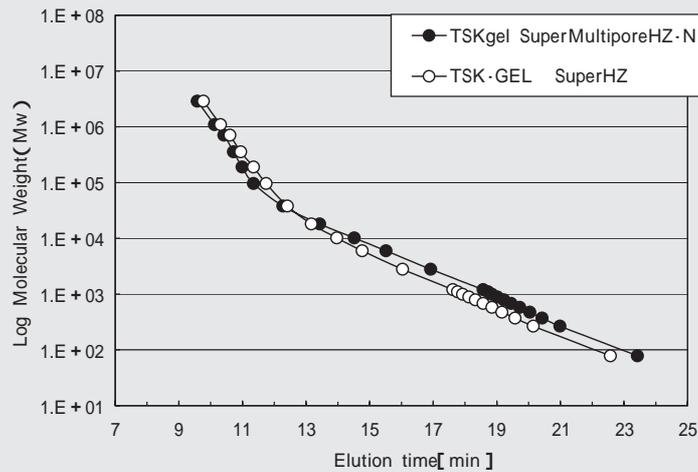


図3 TSKgel SuperMultiporeHZ-NとTSK-GEL SuperHZカラムの較正曲線

Conditions

Column : (A) TSKgel SuperMultiporeHZ-N (4.6mmI.D. × 15cm) × 4
 (B) TSKgel SuperHZ4000 + 3000 + 2500 + 2000
 (4.6mmI.D. × 15cm) × 4
 Eluent : THF
 Flow rate : 0.35mL/min
 Temperature : 25
 Detection : UV 254nm
 Sample : PStQuick 5 μ L

であるが、5万以上の高分子試料では低流速測定が望ましい。

3.3 試料注入量の影響

図7に、TSK-GEL® SuperMultiporeHZシリーズにおける低分子試料(DCHP)のHETPの注入量依存性

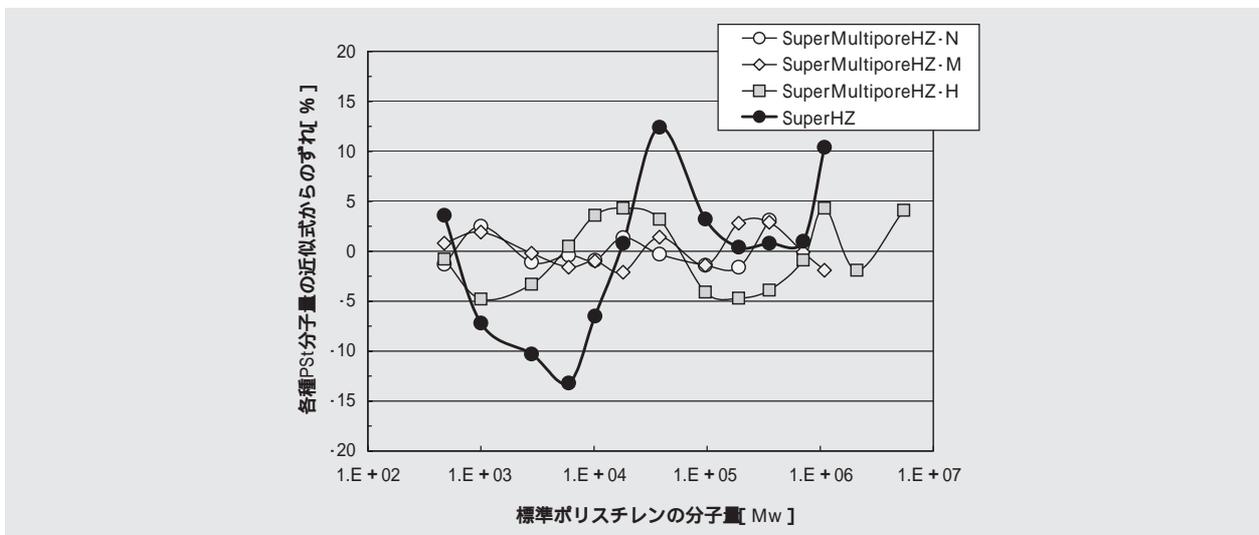


図4 TSK-GEL SuperMultiporeHZカラムとTSK-GEL SuperHZカラムの較正曲線の近似式からのズレ

Conditions

Column : (A) TSKgel SuperMultiporeHZ-N (4.6mmI.D. × 15cm)
 (B) TSKgel SuperMultiporeHZ-M (4.6mmI.D. × 15cm)
 (C) TSKgel SuperMultiporeHZ-H (4.6mmI.D. × 15cm)
 (D) TSKgel SuperHZ4000 + 3000 + 2500 + 2000
 (4.6mmI.D. × 15cm) × 4

Eluent : THF
 Flow rate : 0.35mL/min
 Temperature : 25
 Detection : UV 254nm
 Sample : PStQuick 5 μ L

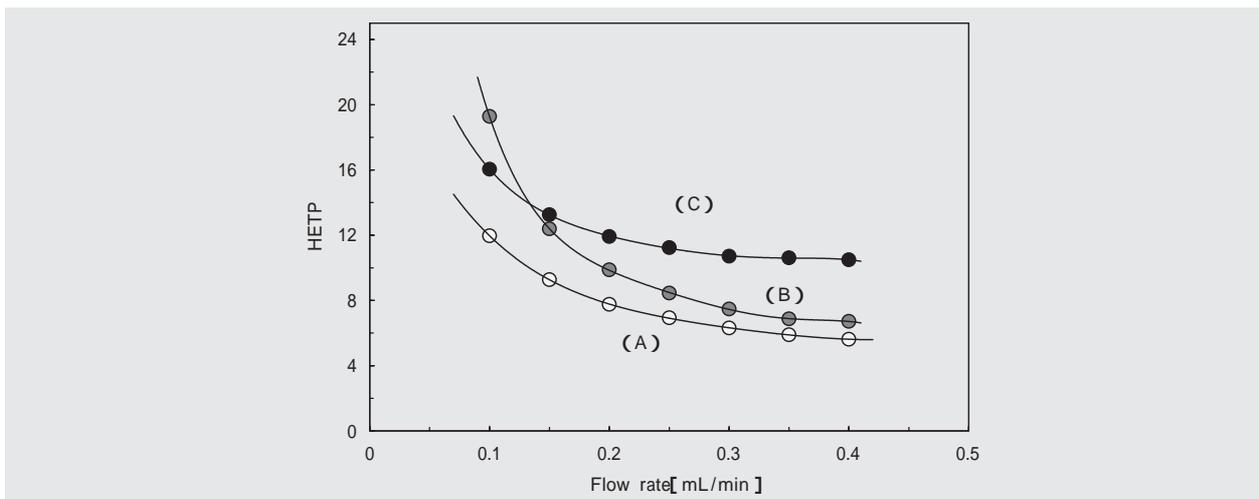


図5 TSK-GEL SuperMultiporeHZにおける流速とHETPの関係

Conditions

Column : (A) TSKgel SuperMultiporeHZ-N (4.6mmI.D. × 15cm)
 (B) TSKgel SuperMultiporeHZ-M (4.6mmI.D. × 15cm)
 (C) TSKgel SuperMultiporeHZ-H (4.6mmI.D. × 15cm)

Eluent : THF
 Flow rate : 0.10 ~ 0.40mL/min
 Temperature : 25
 Detection : UV 254nm
 Sample : DCHR(0.3%) 1 μ L

を示す。TSK-GEL® SuperMultiporeHZシリーズの最大試料注入量は、10 μ Lであり、望ましくは5 μ L以下である。

TSKgel SuperMultiporeHZ-Nによる低分子標準ポリスチレン (A-500) の分離能の注入量依存性を図8、9に示した。最大試料注入量は、10 μ L程度である。

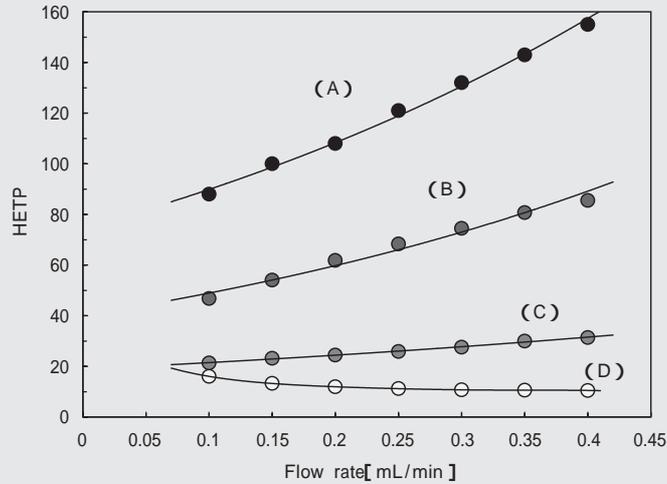


図6 TSKgel SuperMultiporeHZ-Hにおける流速とHETPの関係

Conditions

Column: TSKgel SuperMultiporeHZ-H (4.6mmI.D. × 15cm)
 Eluent: THF
 Flow rate: 0.10 ~ 0.40mL/min
 Temperature: 25
 Detection: UV 254nm
 Sample: (A)STD PSt (Mw:1,090,000)
 (B)STD PSt (Mw:190,000)
 (C)STD PSt (Mw:18,100)
 (D)DCHP
 Inject.vol.: (A)(B)(C)5 μ L
 (D)1 μ L

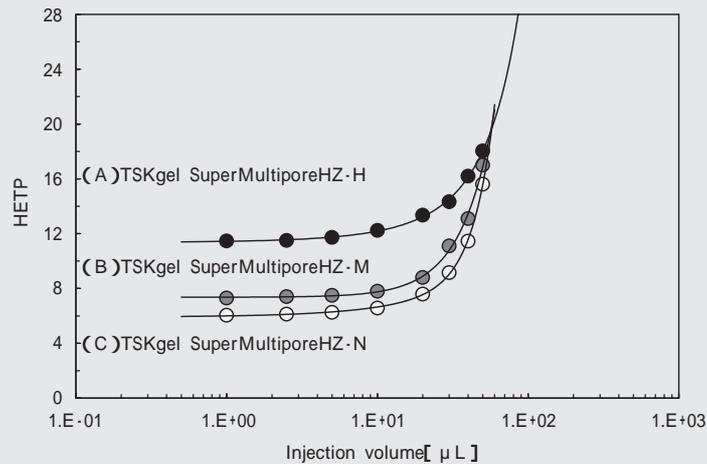


図7 TSK-GEL SuperMultiporeHZにおける試料注入量とHETPの関係

Conditions

Column: (A)TSKgel SuperMultiporeHZ-N (4.6mmI.D. × 15cm) × 2
 (B)TSKgel SuperMultiporeHZ-M (4.6mmI.D. × 15cm) × 2
 (C)TSKgel SuperMultiporeHZ-H (4.6mmI.D. × 15cm) × 2
 Eluent: THF
 Flow rate: 0.35mL/min
 Temperature: 25
 Detection: UV 254nm
 Sample: DCHP(0.3%)
 Inject.vol.: 1 ~ 200 μ L

3.4 較正曲線の流速依存性

図10に、TSK-GEL® SuperMultiporeHZシリーズについて、測定流速を0.1mL/minから0.35mL/minの範

囲で変化させた時の較正曲線を示す。

細孔多分散型充填剤は、オーバーロード効果や分子鎖切断現象による試料の流体力学的容積の変化が少

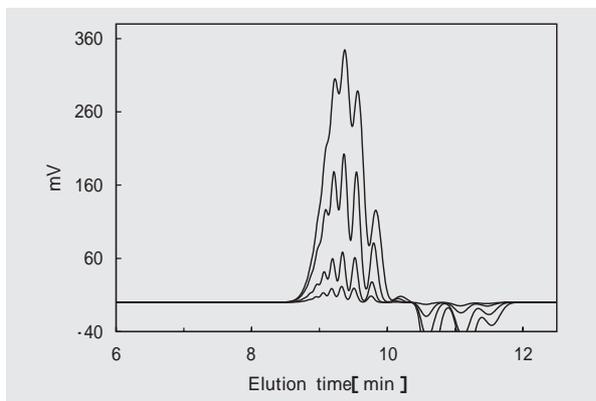


図8 TSKgel SuperMultiporeHZ-Nによる標準ポリスチレンのクロマトグラムの注入量依存性

Conditions

Column : TSKgel SuperMultiporeHZ-N (4.6mmI.D. × 15cm) × 2
 Eluent : THF
 Flow rate : 0.35mL/min
 Temperature : 40
 Detection : RI
 Sample : STD PSt(A-500)
 Injection Volume : 5, 15, 50 & 100 μ L

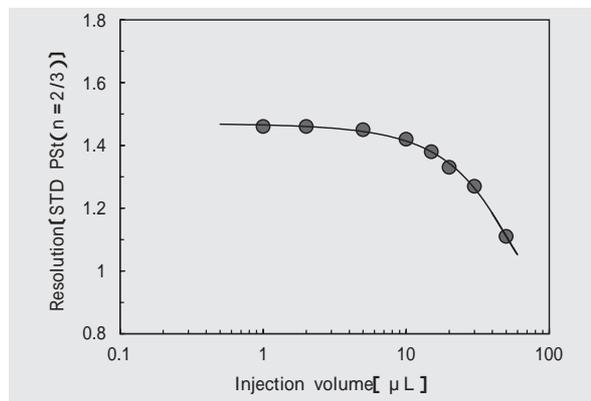


図9 TSKgel SuperMultiporeHZ-Nによる標準ポリスチレンの分離能の注入量依存性

Conditions

Column : TSKgel SuperMultiporeHZ-N (4.6mmI.D. × 15cm) × 2
 Eluent : THF
 Flow rate : 0.35mL/min
 Temperature : 40
 Detection : RI
 Sample : STD PSt(A-500)
 Injection Volume : 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30 & 50 μ L

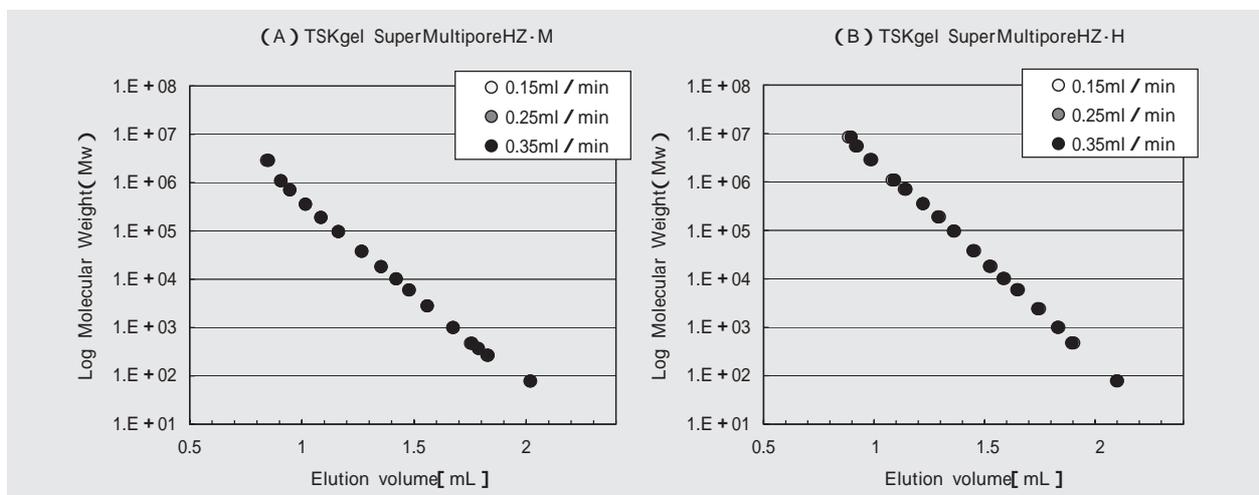


図10 TSK-GEL SuperMultiporeHZの較正曲線の流速依存性

Conditions

Column : (A) TSKgel SuperMultiporeHZ-M (4.6mmI.D. × 15cm)
 (B) TSKgel SuperMultiporeHZ-H (4.6mmI.D. × 15cm)
 Eluent : THF
 Flow rate : 0.15, 0.25 & 0.35mL/min
 Temperature : 25
 Detection : UV 254nm
 Sample : PStQuick 5 μ L

なく測定流速の影響を受け難いと言える。

3.5 分離性能

図11に、TSKgel SuperMultiporeHZ-Nと現行低分子用TSK-GEL® H_{XL}カラム両タイプにおけるポリテトラメチレンエーテルグリコール (PTMEG 650) 分離の比較を行い、TSKgel SuperMultiporeHZ-Nが現行品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

る。

図12には、TSKgel SuperMultiporeHZ-Mと現行 TSKgel MultiporeH_{XL}-Mにおける各種標準ポリスチレンの溶出曲線の重ね書きの比較を示した。

TSKgel SuperMultiporeHZ-Mの分離性能が現行品のそれを半分の測定時間で達成していることがわかる。

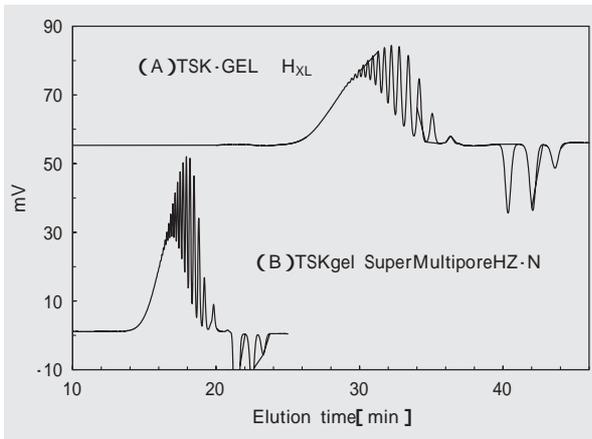


図11 TSKgel SuperMultiporeHZ-NとTSK-GEL HXLカラムによるPTMEGの分離

Conditions

Column : (A) TSKgel G4000 + 3000 + 2500 + 2000HXL (7.8mmI.D. × 30cm) × 4
 (B) TSKgel SuperMultiporeHZ-N (4.6mmI.D. × 15cm) × 4
 Eluent : THF
 Flow rate : (A) 1.0mL/min
 (B) 0.35mL/min
 Temperature : 40
 Detection : RI
 Sample : PTMEG650
 Inject.vol. : (A) 50 μL
 (B) 10 μL

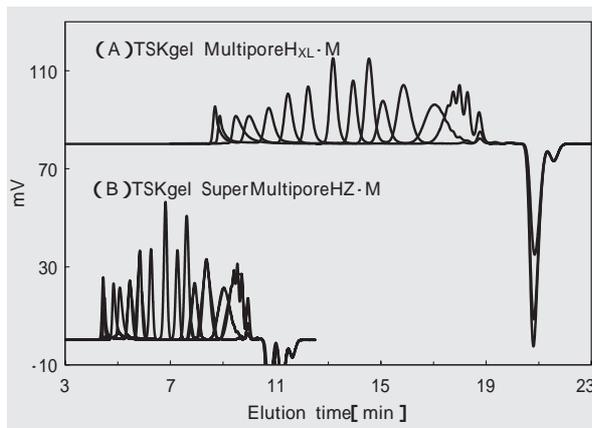


図12 TSKgel SuperMultiporeHZ-MとTSKgel MultiporeHXL-Mの標準ポリスチレンの溶出曲線

Conditions

Column : (A) TSKgel MultiporeHXL-M (7.8mmI.D. × 30cm) × 2
 (B) TSKgel SuperMultiporeHZ-M (4.6mmI.D. × 15cm) × 2
 Eluent : THF
 Flow rate : (A) 1.0mL/min
 (B) 0.35mL/min
 Temperature : 40
 Detection : RI
 Sample : PStQuick
 Inject.vol. : (A) 50 μL
 (B) 10 μL

3.6 測定試料クロマトグラムの凹凸現象

細孔多分散型充填カラムの最大の特徴は、その細孔特性（細孔構造）にあり、従来の細孔径の異なる異種グレードカラムの複数本接続や細孔径の異なるグレードを混合したミックスベッド型のカラムで観察され

た試料クロマトグラム上の凹凸現象が観られない所にある。

図13にTSKgel SuperMultiporeHZ-NとTSKgel SuperHZ (3000 + 2500 + 2000) によるフェノール樹脂の分離クロマトグラムを示す。従来品では、試料クロマトグラム上に凹凸現象が観られるが、細孔多分散型充填カラムではこの現象が観察されない。

図14にTSKgel SuperMultiporeHZ-MとTSKgel

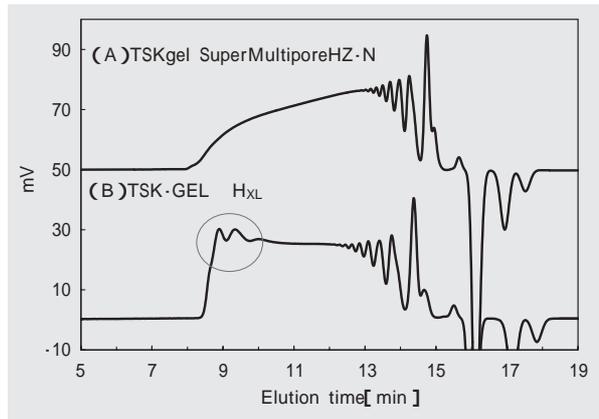


図13 TSKgel SuperMultiporeHZ-NとTSK-GEL SuperHZによるフェノール樹脂の分離

Conditions

Column : (A) TSKgel SuperMultiporeHZ-N (4.6mmI.D. × 15cm) × 3
 (B) TSKgel SuperHZ3000 + 2500 + 2000 (4.6mmI.D. × 15cm) × 3
 Eluent : THF
 Flow rate : 0.35mL/min
 Temperature : 40
 Detection : RI
 Sample : Phenolic resin (0.3%) 10 μL

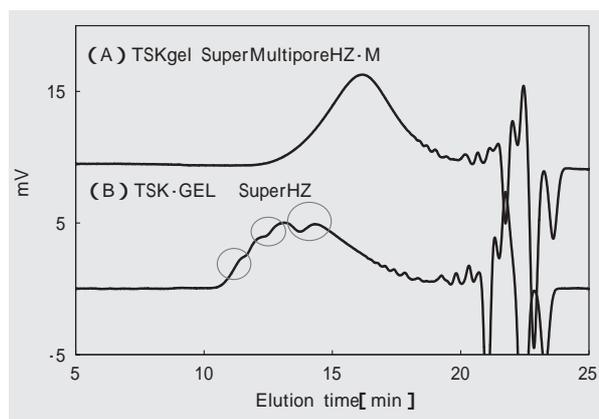


図14 TSKgel SuperMultiporeHZ-MとTSK-GEL SuperHZによるアクリル樹脂の分離

Conditions

Column : (A) TSKgel SuperMultiporeHZ-M (4.6mmI.D. × 15cm) × 4
 (B) TSKgel SuperHZ4000 + 3000 + 2500 + 2000 (4.6mmI.D. × 15cm) × 4
 Eluent : THF
 Flow rate : 0.35mL/min
 Temperature : 40
 Detection : RI
 Sample : Acryl resin (0.3%) 10 μL

SuperHZ (4000 + 3000 + 2500 + 2000) によるアクリル樹脂の分離クロマトグラムを示す。

フェノール樹脂同様に、アクリル樹脂においても従来品では試料クロマトグラムに凹凸現象が確認されるが、細孔多分散型充填カラム TSKgel SuperMultiporeHZ-M ではこの現象が観察されないことを確認した。

図15には、他社ミックスベッド型カラムと TSKgel SuperMultiporeHZ-M によるフェノール樹脂の分離クロマトグラムを示す。

従来の他社ミックスベッドカラムにおいても同様に試料クロマトグラムに凹凸現象が観察された。

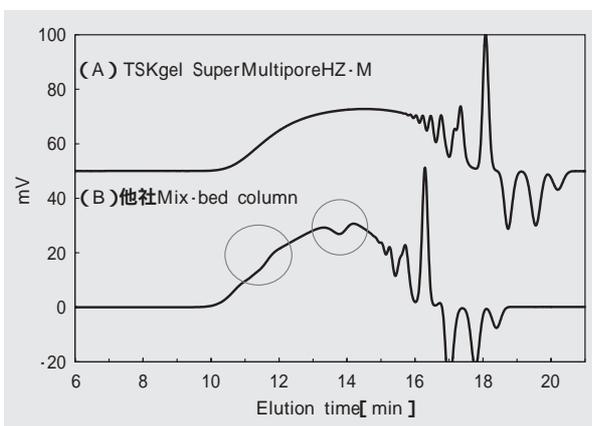


図15 TSKgel SuperMultiporeHZ-Mと他社ミックスカラムによるフェノール樹脂の分離

Conditions

Column : (A) TSKgel SuperMultiporeHZ-M (4.6mm I.D. × 25cm) × 2
(B) 他社ミックスベッドカラム (4.6mm I.D. × 25cm) × 2
Eluent : THF
Flow rate : 0.35mL/min
Temperature : 40
Detection : RI
Sample : Phenolic resin (0.3%) 10 μL

4. 分子量分布測定例

4.1 TSKgel SuperMultiporeHZ-N

TSKgel SuperMultiporeHZ-Nと TSKgel SuperHZ (4000 + 2000) におけるシリコン樹脂の分離クロマトグラムを図16と17にそれぞれ示す。細孔多分散型充填カラムにおいては、スムーズなクロマトパターンであり、ゲルロット間差が小さいことがわかる。一方、従来のカラム接続系である SuperHZ においては、クロマトグラム上の凹凸現象が観察されている。

ここで得られた両カラム系における分子量データを表2に示す。細孔多分散型充填カラムでの分子量分

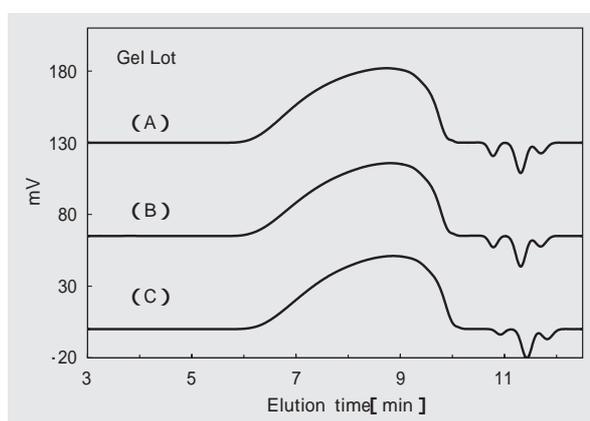


図16 各種ロット TSKgel SuperMultiporeHZ-N によるシリコン系樹脂の分離

Conditions

Column : TSKgel SuperMultiporeHZ-N (4.6mm I.D. × 15cm) × 2
Eluent : THF
Flow rate : 0.35mL/min
Temperature : 40
Detection : RI
Sample : Polysilicone (0.3%) 10 μL

表2 各種ロットの TSKgel SuperMultiporeHZ-N と TSK-GEL SuperHZ によるシリコン樹脂の平均分子量

Grade (Gel Lot)	平均分子量			多分散度	
	Mw	Mn	Mz	Mz/Mw	Mw/Mn
TSKgel SuperMultiporeHZ-N (A)	3,410	1,340	7,750	2.27	2.54
TSKgel SuperMultiporeHZ-N (B)	3,400	1,340	7,740	2.28	2.54
TSKgel SuperMultiporeHZ-N (C)	3,430	1,350	7,850	2.29	2.54
Ave. (RSD)	3,410 (0.37%)	1,340 (0.35%)	7,780 (0.64%)	2.28 (0.36%)	2.54 (0.00%)
TSKgel SuperHZ4000 + 2000 (A)	3,430	1,330	7,640	2.23	2.58
TSKgel SuperHZ4000 + 2000 (B)	3,480	1,310	7,990	2.30	2.66
TSKgel SuperHZ4000 + 2000 (C)	3,370	1,270	7,850	2.33	2.65
TSKgel SuperHZ4000 + 2000 (D)	3,540	1,320	7,710	2.18	2.68
Ave. (RSD)	3,455 (1.81%)	1,310 (1.74%)	7,800 (1.72%)	2.26 (2.60%)	2.64 (1.43%)

Column : TSKgel SuperMultiporeHZ-N & TSKgel SuperHZ4000 + 2000 (4.6mm I.D. × 15cm) × 2
Eluent : THF
Flow rate : 0.35mL/min
Temperature : 40
Detection : RI
Sample : Polysilicone (0.3%) 10 μL

表3 TSKgel SuperMultiporeHZ・Mと現行品における各種試料の分子量(Mw)日内再現性(n=5)

	ポリスチレン		ポリカ - ボネ - ト		ポリスチレン	
	Ave.	RSD (%)	Ave.	RSD (%)	Ave.	RSD (%)
TSKgel SuperMultiporeHZ・M	254000	0.43	44600	0.51	11200	0.67
TSK・GEL SuperHZシリ - ズ	243000	0.79	47000	1.83	11300	1.32
他社品 (Mix-bed Type)	249000	0.67	48200	0.72	10400	0.94

Conditions

Column : TSKgel SuperMultiporeHZ・M(4.6mmI.D. × 15cm) × 4
 TSK・GEL SuperHZ(4.6mmI.D. × 15cm) × 4

Eluent : THF

Flow rate : 0.35mL/min

Temperature : 40

Detection : RI

Sample : Polystyrene, Polycarbonate & Phenolic resin(each 0.3%) 10 μL

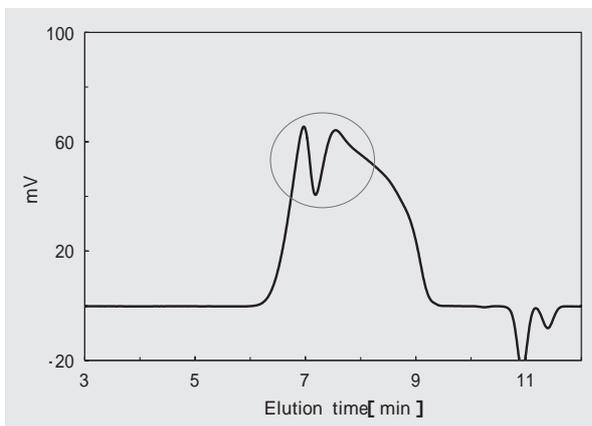


図17 TSKgel SuperHZ4000 + 2000によるシリコン系樹脂の分離

Conditions

Column : TSKgel SuperHZ4000 + 2000(4.6mmI.D. × 15cm) × 2

Eluent : THF

Flow rate : 0.35mL/min

Temperature : 40

Detection : RI

Sample : Polysilicor(0.3%) 10 μL

布データにおいては、充てん剤ロット間差が非常に小さいことが示され、一方の従来タイプではロット間差が大きいことがわかる。

4.2 TSKgel SuperMultiporeHZ・M

従来タイプカラムと細孔多分散型充てんカラム TSKgel SuperMultiporeHZ・Mによる各種試料の分子量分布測定再現性の比較を行った結果を表3に示した。

TSKgel SuperMultiporeHZ・Mで得られる測定再現性は、従来タイプよりも高いことが確認された。

4.3 TSKgel SuperMultiporeHZ・H

図18にTSKgel SuperMultiporeHZ・Hによる各種ポリマーのクロマトグラムと平均分子量(Mw)を示した。

アクリル樹脂(1)とポリスチレンSRM 706につい

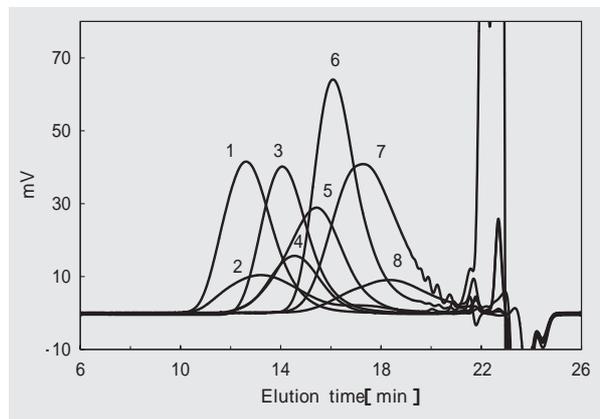


図18 TSKgel SuperMultiporeHZ・Hによる各種ポリマーのクロマトグラム

Conditions

Column : TSKgel SuperMultiporeHZ・H(4.6mmI.D. × 15cm) × 4

Eluent : THF

Flow rate : 0.35mL/min

Temperature : 40

Detection : RI

Sample : Polymer(0.3%) 10 μL

	Mw
(1) Polyisobutylene	925,000
(2) Acrylic resin(1)	635,000
(3) Polystyrene(SRM706)	258,000
(4) Polybutadiene	215,000
(5) PVB	125,000
(6) Polycarbonate	45,000
(7) Epoxyresin	18,000
(8) Acrylresin	12,000

ては、日内測定再現性も良好であった。

5. おわりに

細孔多分散型充てん剤は、従来のミックスベッドタイプカラムなどに比較して、優れた細孔分布特性と理想的な試料クロマトグラムが得られることにより、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を確認した。

今回、われわれが開発したTSK・GEL® Super MultiporeHZシリーズは、新規な合成法により単分散

微粒子化と細孔多分散型充填剤を同時に達成することにより、高分離能を有し、かつ迅速な分子量分布測定に最適な有機溶媒系省溶媒型高性能SECセミマイクロカラムである。

本開発カラムの性能を十分に発揮するために、送液再現性に優れたポンプを搭載し、高安定性高速GPCシステム専用機であるHLC-8320GPCとの組合せによりさらに安定した測定が可能である。

参考文献

- 1) M. Nagata, T. Kato, H. Furutani, J. Liq. Chrom&Rel. Technol., 21 (10) 1471-1484 (1998)