

# カチオン性ポリマー分析用水系SECカラム

## TSK・GEL® PW<sub>XL</sub>・CP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

水溶性高分子の分子量分布を測定する水系サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）用充てん剤には、ポリメタクリレート、ポリビニルアルコールおよびシリカゲル系基材が広く使用されている。

イオン性（アニオン性およびカチオン性）高分子のSEC測定溶離液は、試料と充てん剤のイオンの相互作用を抑制するためにまた、試料の安定性を高めるために塩水溶液あるいは緩衝液を使用することが一般的である。

とりわけカチオン性ポリマーのSEC測定においては、イオンの相互作用を抑えるために高塩濃度あるいは低pH溶離液条件が必須であり、さらにこのような厳しい条件下においてもイオンの相互作用が完全に抑制できず十分な測定再現性が得られなかった。

今回、温和な中性溶離液条件下において、カチオン性ポリマーが高回収率かつ再現性に優れた測定が可能となったカチオン性ポリマー用水系SECカラムTSK・GEL®PW<sub>XL</sub>・CPシリーズを開発した。

本報告では、新規SECカラムの特性と応用例について紹介する。

### 2. TSK・GEL® PW<sub>XL</sub>・CPシリーズの基本特性

#### 2.1 充てん剤の特長

TSK・GEL® PW<sub>XL</sub>・CPシリーズは、既存商品である

TSK・GEL® PW<sub>XL</sub>シリーズと同一基材の全多孔性ポリメタクリレート粒子にイオン交換基を導入したものであり、中性の低塩濃度溶離液条件下においても1回目の測定からカチオン性ポリマーが高い回収率で得られ、その結果、測定再現性に優れ、正確な分子量情報が入手可能となる。

#### 2.2 細孔特性

TSK・GEL® PW<sub>XL</sub>・CPシリーズには、表 1 に示すように低分子用から高分子用まで分子量分画範囲を適正にした3グレードを揃えた。

図 1 には、0.1mol/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サイドおよびポリエチレングリコールでの較正曲線を示した。3グレードの細孔特性が低分子領域から高分子領域までバランスよく配置されている。

#### 2.3 試料注入量と理論段高さ（HETP）

図 2 に、TSK・GEL® PW<sub>XL</sub>・CPシリーズにおける試料にエチレングリコール（EG）を用いた時の試料注入量と理論段高さ（HETP）の関係を示した。100 μL を超えるとHETPが大きくなり、望ましい試料注入量が100 μL以下であることがわかる。

#### 2.4 理論段高さ（HETP）の流速依存性

試料に低分子試料であるEGを用いて、TSK・GEL® PW<sub>XL</sub>・CPシリーズのHETPの測定流速依存性を確認し

表 1 TSK・GEL PW<sub>XL</sub>・CPシリーズの物性一覧表

	TSKgel G3000PW <sub>XL</sub> -CP	TSKgel G5000PW <sub>XL</sub> -CP	TSKgel G6000PW <sub>XL</sub> -CP
充てん剤基材	Polymethacrylate	Polymethacrylate	Polymethacrylate
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)	200 ~ 50,000	400 ~ 500,000	1000 ~ 10,000,000
カラム理論段数	16,000TP/30cm	10,000TP/30cm	7,000TP/30cm
カラムサイズ	7.8mmI.D. x 30cm	7.8mmI.D. x 30cm	7.8mmI.D. x 30cm
ガードカラムサイズ	6.0mmI.D. x 4cm	6.0mmI.D. x 4cm	6.0mmI.D. x 4cm

\*：推定値

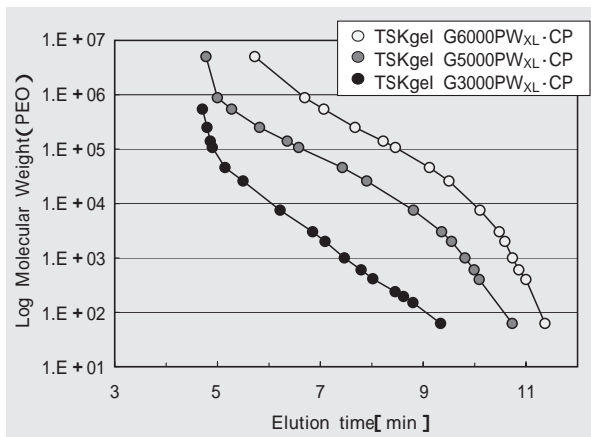


図1 TSK-GEL PW<sub>XL</sub>-CPの較正曲線

Conditions:

Column : TSK-GEL PW<sub>XL</sub>-CP (7.8mm I.D. x 30cm)  
 Eluent : 0.1mol/L NaNO<sub>3</sub>  
 Flow rate : 1.0mL/min  
 Temperature : 25  
 Detection : RI (RI-8020)  
 Sample : STD PEO, PEG & EG

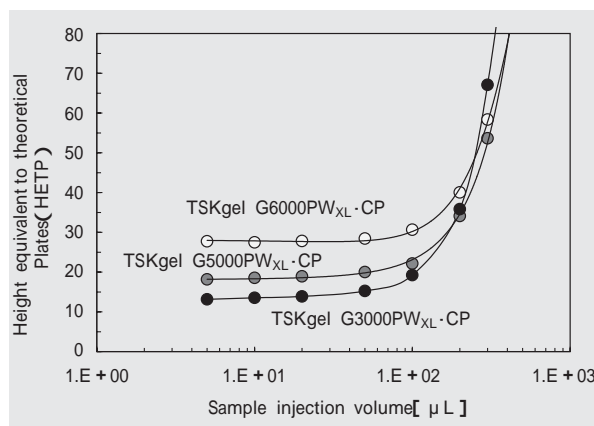


図2 TSK-GEL PW<sub>XL</sub>-CPにおける試料注入量とHETPの関係

Conditions:

Column : TSK-GEL PW<sub>XL</sub>-CP (7.8mm I.D. x 30cm) x 2  
 Eluent : H<sub>2</sub>O  
 Flow rate : 1.0mL/min  
 Temperature : 25  
 Detection : RI (RI-8020)  
 Sample : EG (0.5%) 5 ~ 500 μL

た結果を図3に示した。

粒子径が小さいTSKgel G3000PW<sub>XL</sub>-CPの適正流速は、0.8~1.0mL/minと比較的高い流速であり、粒子径を大きく設定した高分子用グレードは、適正流速が低い領域にあり、推奨される流速は、0.5~0.8mL/minである。

### 3. TSK-GEL® PW<sub>XL</sub>-CPシリーズにおけるカチオン性ポリマーの溶出特性

#### 3.1 TSK-GEL® PW<sub>XL</sub>-CPと現行品によるクロマト特性

TSKgel G5000PW<sub>XL</sub>-CP、現行TSKgel G5000PW<sub>XL</sub>および他社カラムを用いて、中性の低塩濃度溶離液(0.1 mol/L 硝酸ナトリウム水溶液)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図4に示した。

現行グレードと他社品においては、PAA·HClは吸着現象により溶出しなかったが、本開発品であるTSKgel G5000PW<sub>XL</sub>-CPでは、良好な溶出クロマトグラムが得られた。

図5には、3グレード別に分子量の異なるPAA·HClの回収率とSEC法による平均分子量(M<sub>w</sub>)を示した。全グレードにおいて良好なクロマトグラムと分子量データが得られた。

#### 3.2 TSK-GEL® PW<sub>XL</sub>-CPによるクロマト再現性

TSKgel G5000PW<sub>XL</sub>-CPを用い、3.1の溶離液条件下でPAA·HClの測定再現性(日内)を調べた結果を図

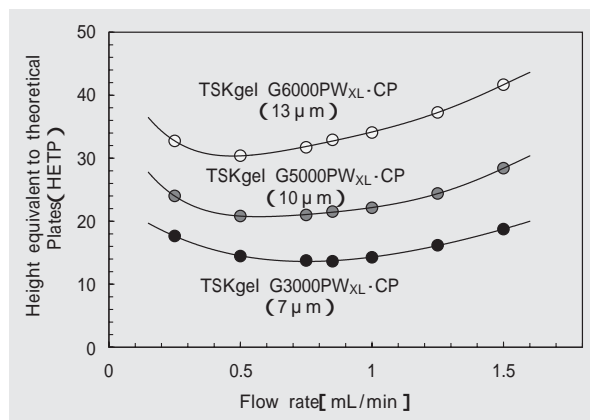


図3 TSK-GEL PW<sub>XL</sub>-CPにおける測定流速とHETPの関係

Conditions:

Column : (A) TSKgel G6000PW<sub>XL</sub>-CP (7.8mm I.D. x 30cm)  
 (B) TSKgel G5000PW<sub>XL</sub>-CP (7.8mm I.D. x 30cm)  
 (C) TSKgel G3000PW<sub>XL</sub>-CP (7.8mm I.D. x 30cm)  
 Eluent : H<sub>2</sub>O  
 Flow rate : 0.25 ~ 1.5mL/min  
 Temperature : 25  
 Detection : RI (RI-8020)  
 Sample : EG (0.5%) 20 μL

6に示した。

本開発品では、1回目の測定からPAA·HClの回収率が高い数値を示しており、かつクロマトパターンおよびSEC法による平均分子量(M<sub>w</sub>)の測定再現性に優れていることが確認された。

#### 3.3 TSK-GEL® PW<sub>XL</sub>-CPによる各種カチオン性ポリマーの測定(1)

図7にTSKgel G3000PW<sub>XL</sub>-CPにおける各種ポリエチレンイミンとPAA·HClの溶出クロマトグラムを示した。図8には、TSKgel G6000PW<sub>XL</sub>-CPを用いて分

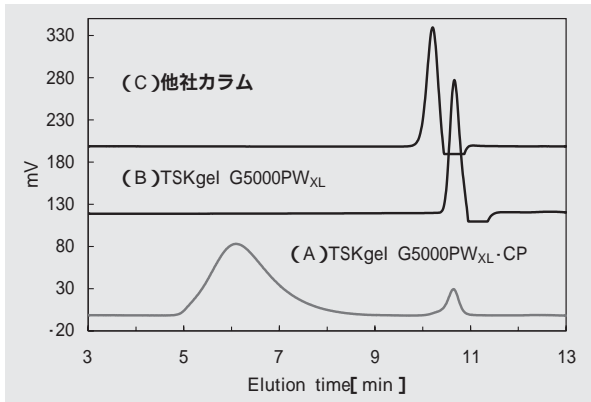


図4 TSKgel G5000PW<sub>XL</sub>-CPと既存品によるポリアリルアミン塩酸塩のクロマトグラム

Conditions

Column : (A) TSKgel G5000PW<sub>XL</sub>-CP (7.8mmI.D. x 30cm)  
 (B) TSKgel G5000PW<sub>XL</sub> (7.8mmI.D. x 30cm)  
 (C) Commercial column (7.8mmI.D. x 30cm)  
 Eluent : 0.1mol/L NaNO<sub>3</sub>  
 Flow rate : 1.0mL/min  
 Temperature : 25  
 Detection : RI (RI-8020)  
 Sample : Polyallylamine Hydrochloride (0.3%) 100 μL

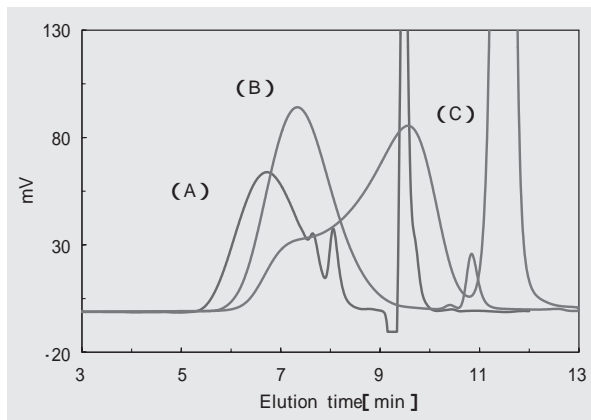


図5 TSK-GEL PW<sub>XL</sub>-CPによるポリアリルアミン塩酸塩のクロマトグラム

Conditions

Column : (A) TSKgel G3000PW<sub>XL</sub>-CP (7.8mmI.D. x 30cm)  
 (B) TSKgel G5000PW<sub>XL</sub>-CP (7.8mmI.D. x 30cm)  
 (C) TSKgel G6000PW<sub>XL</sub>-CP (7.8mmI.D. x 30cm)  
 Eluent : 0.1mol/L NaNO<sub>3</sub>  
 Flow rate : 1.0mL/min  
 Temperature : 25  
 Detection : RI (RI-8020)  
 Sample : Polyallylamine Hydrochloride (0.3%) 100 μL  
 (A) PAA-HCl-01  
 (B) PAA-H-HCl  
 (C) PAA-HCl-10S

Grade	Mw	Recovery (%)
TSKgel G3000PW <sub>XL</sub> -CP	6,500	100.2
TSKgel G5000PW <sub>XL</sub> -CP	168,000	98.8
TSKgel G6000PW <sub>XL</sub> -CP	455,000	97.4

分子量の異なる各種PAA・HClの溶出クロマトグラムを示した。

何れの測定においても1回目の測定から良好なクロマトグラムが得られ、分子量の大きい(分子サイズの大きい)試料から溶出し、正常なSEC溶出が行われて

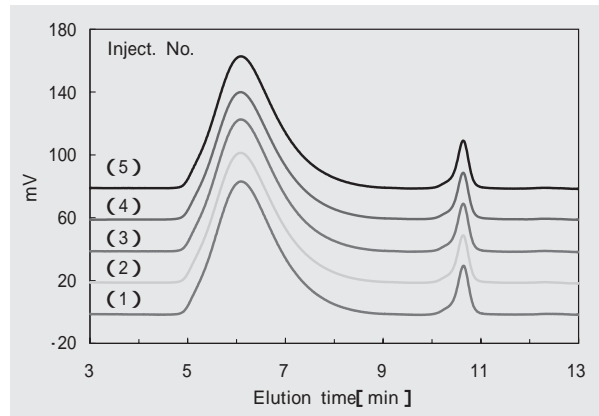


図6 TSKgel G5000PW<sub>XL</sub>-CPによるポリアリルアミン塩酸塩のクロマトグラム注入再現性

Conditions

Column : TSKgel G5000PW<sub>XL</sub>-CP (7.8mmI.D. x 30cm)  
 Eluent : 0.1mol/L NaNO<sub>3</sub>  
 Flow rate : 1.0mL/min  
 Temperature : 25  
 Detection : RI (RI-8020)  
 Sample : Polyallylamine Hydrochloride (0.3%) 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

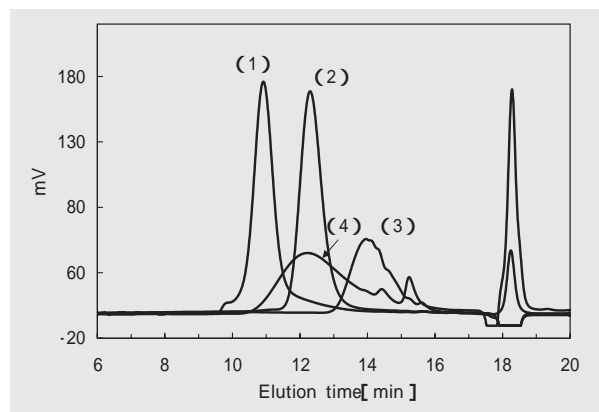


図7 TSKgel G3000PW<sub>XL</sub>-CPによるカチオン性ポリマーのクロマトグラム

Conditions

Column : TSKgel G3000PW<sub>XL</sub>-CP (7.8mmI.D. x 30cm) x 2  
 Eluent : 0.1mol/L NaNO<sub>3</sub>  
 Flow rate : 1.0mL/min  
 Temperature : 25  
 Detection : RI (RI-8020)  
 Sample : Cationic Polymer (0.3%) 100 μL  
 (1) Polyethyleneimine (10000)  
 (2) Polyethyleneimine (1800)  
 (3) Polyethyleneimine (300)  
 (4) Polyallylamine-HCl

いる。

3.4 TSK-GEL® PW<sub>XL</sub>-CPによる各種カチオン性ポリマーの測定(2)

TSKgel G3000PW<sub>XL</sub>-CP、TSKgel G5000PW<sub>XL</sub>-CPお

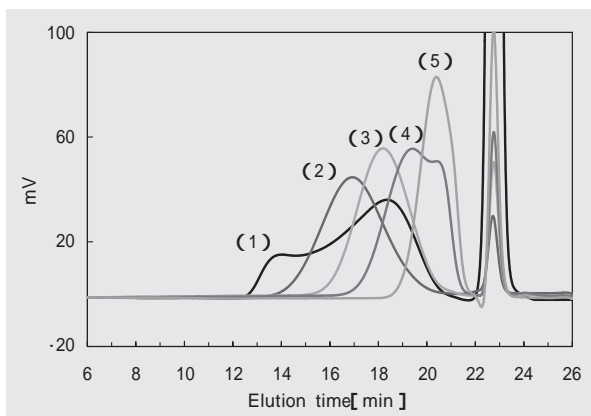


図8 TSKgel G6000PW<sub>XL</sub>-CPによるポリアリルアミン塩酸塩のクロマトグラム

Conditions

Column : TSKgel G6000PW<sub>XL</sub>-CP(7.8mmI.D. x 30cm) x 2  
 Eluent : 0.1mol/L NaNO<sub>3</sub>  
 Flow rate : 1.0mL/min  
 Temperature : 25  
 Detection : RI(RI-8020)  
 Sample : Polyallylamine Hydrochloride(0.3%)100 μL  
 (1)PAA-HCl  
 (2)PAA-H-HCl  
 (3)PAA-HCl-3L  
 (4)PAA-HCl-05  
 (5)PAA-HCl-01

よびTSKgel G6000PW<sub>XL</sub>-CPを接続したカラム系において、特性の異なる各種カチオン性ポリマーの重ね書きクロマトグラムを図9に示した。これらのデータは、あらゆるカチオン性ポリマーのSEC測定が良好に行えることを示している。

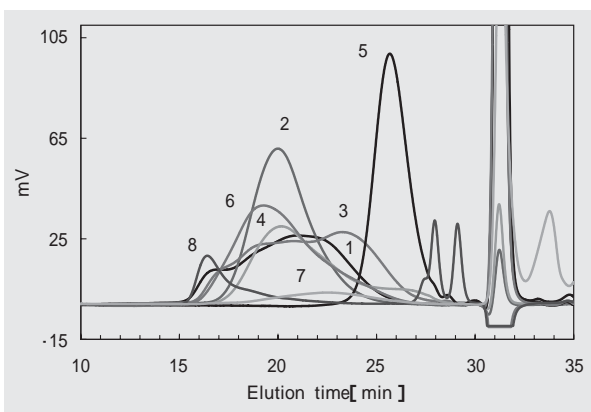


図9 TSK-GEL PW<sub>XL</sub>-CPによる各種カチオン性ポリマーのクロマトグラム

Conditions

Column : TSKgel G3+5+6000PW<sub>XL</sub>-CP(7.8mmI.D. x 30cm) x 3  
 Eluent : 0.1mol/L NaNO<sub>3</sub>  
 Flow rate : 1.0mL/min  
 Temperature : 25  
 Detection : RI(RI-8020)  
 Sample : Cationic Polymer(0.3%)100 μL  
 (1)PAA-HCl  
 (2)PAA-H-10C  
 (3)Polyethyleneimine(70000)  
 (4)PDADMACl  
 (5)PAS-A-5  
 (6)PAS-J  
 (7)Cationic Dextran  
 (8)Chitosan 10

#### 4. TSK-GEL® PW<sub>XL</sub>-CPシリーズによるカチオン性ポリマーの絶対分子量測定

本開発品TSK-GEL® PW<sub>XL</sub>-CPカラムを用い、SEC-MALS法による各種カチオン性ポリマーの絶対分子量の測定および慣性半径との関係を調査した。

##### 4.1 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

カラムにTSKgel G6000PW<sub>XL</sub>-CPを用い、SEC-MALS法によりポリジアリルジメチルアンモニウムクロライド(PDADM-NH<sub>4</sub>Cl)の絶対分子量測定結果を図10に示す。

図11には、絶対分子量と慣性半径の関係図を示す。これらのデータより、高分子量成分から順次溶出し、良好な分離が行われていることが確認され、また絶対分子量と慣性半径の関係も良好であった。

##### 4.2 PDADM-NH<sub>4</sub>Cl共重合体の絶対分子量

PDADM-NH<sub>4</sub>ClとアクリルアミドおよびSO<sub>2</sub>との共重合体の絶対分子量を4.1と同条件で測定した。

図12に絶対分子量と慣性半径の関係を示す。正常なSEC分離が行われていた。ここで得られた結果では、両者の絶対分子量は、同程度(約20万)であったが、慣性半径はアクリルアミドとの共重合体の方が1.5倍程度大きかった。

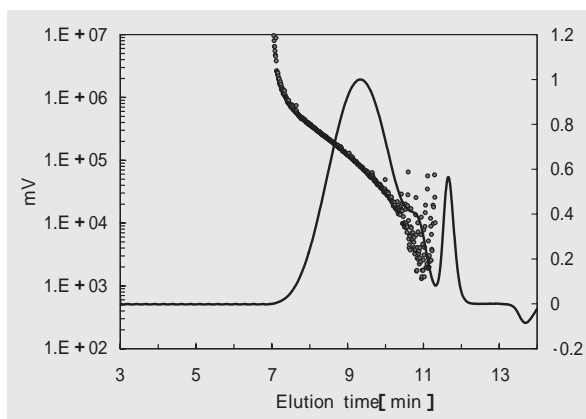


図10 TSKgel G6000PW<sub>XL</sub>-CPによるPDADM-NH<sub>4</sub>Clの溶出クロマトグラムと絶対分子量

Conditions

Column : TSKgel G6000PW<sub>XL</sub>-CP(7.8mmI.D. x 30cm)  
 Eluent : 0.1mol/L NaNO<sub>3</sub>  
 Flow rate : 1.0mL/min  
 Temperature : 40  
 Detection : MALS(DAWN HELEOS)  
 Detection : RI(RI-8020)  
 Sample : PDADM-NH<sub>4</sub>Cl(0.1%)100 μL

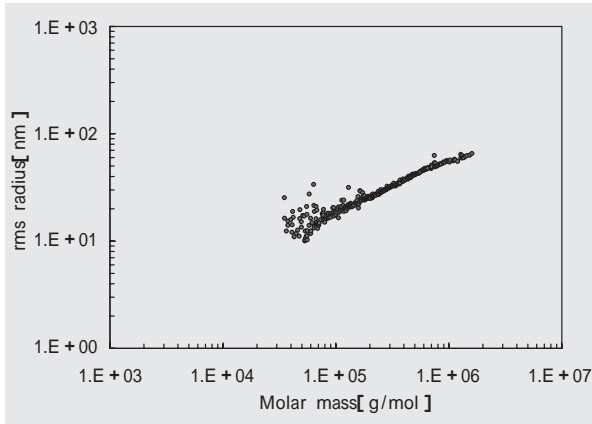


図11 TSKgel G6000PW<sub>XL</sub>-CPによるPDADM-NH<sub>4</sub>Clの絶対分子量と慣性半径の関係

Conditions

Column : TSKgel G6000PW<sub>XL</sub>-CP(7.8mmI.D. x 30cm)  
 Eluent : 0.1mol/L NaNO<sub>3</sub>  
 Flow rate : 1.0mL/min  
 Temperature : 40  
 Detection : MALS(DAWN HELEOS)  
 Detection : RI(RI-8020)  
 Sample : PDADM-NH<sub>4</sub>Cl(0.1%)100 μL

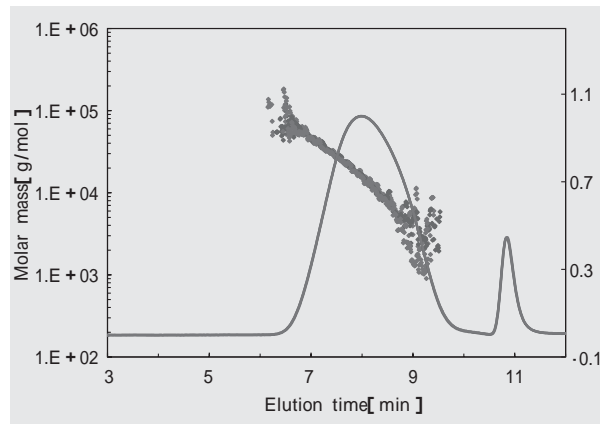


図13 TSKgel G5000PW<sub>XL</sub>-CPによるポリエチレンイミンの溶出クロマトグラムと絶対分子量

Conditions

Column : TSKgel G5000PW<sub>XL</sub>-CP(7.8mmI.D. x 30cm)  
 Eluent : 0.1mol/L NaNO<sub>3</sub>  
 Flow rate : 1.0mL/min  
 Temperature : 40  
 Detection : MALS(DAWN HELEOS)  
 Detection : RI(RI-8020)  
 Sample : Polyethyleneimine(Wako)1mg/mL(100 μL)

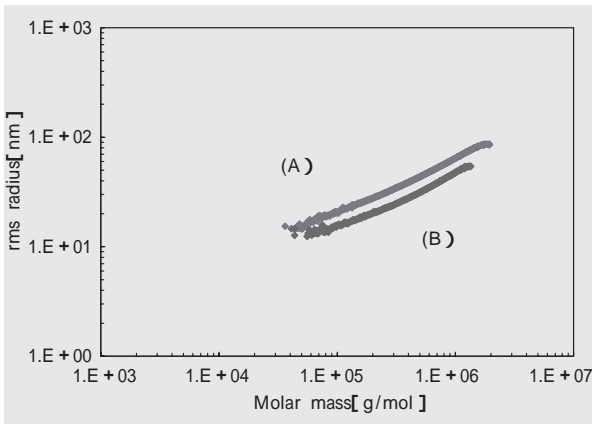


図12 TSKgel G6000PW<sub>XL</sub>-CPによるPDADM-NH<sub>4</sub>Cl共重合体の絶対分子量と慣性半径の関係

Conditions

Column : TSKgel G6000PW<sub>XL</sub>-CP(7.8mmI.D. x 30cm)  
 Eluent : 0.1mol/L NaNO<sub>3</sub>  
 Flow rate : 1.0mL/min  
 Temperature : 40  
 Detection : MALS(DAWN HELEOS)  
 Detection : RI(RI-8020)  
 Sample : (A) PDADM-NH<sub>4</sub>Cl/Acrylamide(PAS-J-81)1mg/mL(100 μL)  
 (B) PDADM-NH<sub>4</sub>Cl/SO<sub>2</sub>(PAS-A-120L)1mg/mL(100 μL)

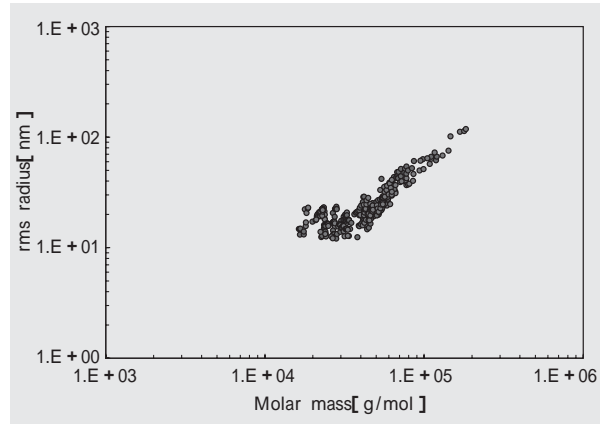


図14 TSKgel G5000PW<sub>XL</sub>-CPによるポリエチレンイミンの絶対分子量と慣性半径の関係

Conditions

Column : TSKgel G5000PW<sub>XL</sub>-CP(7.8mmI.D. x 30cm)  
 Eluent : 0.1mol/L NaNO<sub>3</sub>  
 Flow rate : 1.0mL/min  
 Temperature : 40  
 Detection : MALS(DAWN HELEOS)  
 Detection : RI(RI-8020)  
 Sample : Polyethyleneimine(Wako)1mg/mL(100 μL)

4.3 ポリエチレンイミンの絶対分子量

カラムにTSKgel G5000PW<sub>XL</sub>-CPを用い、ポリエチレンイミン (PEI) の絶対分子量を4.1と同条件で測定した。

測定データを図 13、14に示した。これまでのカチオン性ポリマーと同様に良好な分離が行われた。

5. おわりに

これまで、水溶性カチオン性ポリマーのSEC測定においては、試料と充てん剤とのイオンの相互作用による吸着現象を十分に抑えられないために、正確で精度の高い分子量情報を取得することが困難であった。

今回、われわれが開発したカチオン性試料用水系SECカラムTSK-GEL® PW<sub>XL</sub>-CPシリーズは、中性の低塩濃度水溶液でカチオン性ポリマーが再現性良く測定出来る従来にはなかったカラムであることを確認した。

また、SEC・MALS測定による絶対分子量と慣性半径データからも、正常にSEC分離されていることも確認され、今後の応用範囲の拡大が期待される。