

# カチオン性重合体の水系GPC分離

雲 井 貞 勝  
堤 幸 弘

## Separation of Cationic Polymers by Gel Permeation Chromatography Using TSK-GEL G-PW Columns

Sadakatsu KUMOI  
Yukihiro TSUTSUMI

Gel permeation chromatographic separation of polyethyleneimine (PEI) has been investigated. Results are summarized below:

- 1) Molecular weights and molecular weight distributions of PEI have been successfully determined under the following conditions; average molecular weight of PEI 140~20,000, column TSK-GEL G-2000 PW and G-3000 PW, mobile phase 0.1-0.4M ethanolamine/acetic acid in aqueous medium at pH 5.1.
- 2) Separation of propoxylated PEI has been easily made in various acidic buffer solutions, since PEI derivatives show little adsorptive interaction with hydrophilic gels.
- 3) Molecular weights of PEI have been measured using the laser light scattering detector, TOYO SODA LS-8.

### 1. はじめに

主鎖の鎖員または、側鎖にアミノ基態窒素原子を有する水溶性のカチオン性重合体は、その特異的な性質により多くの産業分野において、多様な用いられ方をしている。

製紙工業においては、抄紙時の沝水性向上剤・填料歩留向上剤・紙力増強剤として、繊維工業においては、繊維改質剤・染色助剤として、また、下水・し尿処理・食品加工・塗装・染色廃水等に含まれる有機質の浮上・沈降および脱水を目的とした高分子凝集剤として広く使用されている。

カチオン性重合体は、その構造や分子量の違いにより用いられる用途も多様化している<sup>1)</sup>。例えば、主鎖の鎖員にアミノ基を有するカチオン性重合体であるポリエチレンイミン (略, PEI) では、分子量の大きいものが製紙用沝水性向上剤として、比較的分子量の小さいものがメッキ光沢剤・ガラス繊維収束剤・カップリング剤としての用途をもつ。このように同じ構造をもつ化合物であっても分子量の違いにより機能性が変化し、用途も異な

ってくるため、カチオン性重合体を製造または使用する両者の立場から、その分子量に関する知見を得ることは極めて意義が大きい。

これまでカチオン性重合体の製造にあたっては、粘度の測定により重合の進行度を管理する方法がとられているが、水溶性合成高分子であるカチオン性重合体を含む系の粘度は、塩等の混合物の影響を著しく受け、粘度からのみ分子量を推定することは危険性を伴なう。一般に、比較的分子量の小さいカチオン性重合体は、沸点上昇法・凝固点降下法により分子量が測定され、分子量の大きいカチオン性重合体は、超遠心分離による分別と光散乱法との組み合わせにより分子量分布の測定が行なわれている<sup>2)</sup>。水溶媒系から製造されたカチオン性重合体は、分子量を測定するための試料の調製が極めて困難であったり、測定には煩雑な手間と時間を要し、また上記の測定法を適用できない場合が多い。

近年、高速液体クロマトグラフィー用水系ゲルの開発により、多糖類・蛋白質・ウイルスや核酸関連化合物等の高分子物質から、ポリエチレングリコール・ポリビニルアルコール・ポリアクリルアミド等の合成高分子に至

る多くの水溶性高分子物質の分子量分布が、水系 GPC により測定可能となっている<sup>3)4)</sup>。カチオン性を有するアミン化合物は、一般にゲルとの相互作用があるため、イオン交換ゲルを用いて低分子化合物の分離が行なわれている<sup>5)</sup>。

今回、著者らは、カチオン性重合体の中で強カチオン性のポリエチレンイミンの分子量および分子量分布の測定を TSK-GEL PW タイプのカラムを用い、高速 GPC による分離を検討した。ポリエチレンイミンを前処理することなく直接 GPC 分析にかけた場合、ゲルへの吸着性を完全に取り除くことができないため、最適溶離条件を検討した。その結果を、ポリエチレンイミンの直接 GPC 分析の項で報告する。次いで、ポリエチレンイミンのゲルへの吸着性を抑制するため、ポリエチレンイミンのベンゾイル化・アセチル化・エチレンオキシド付加・プロピレンオキシド付加等の前処理により誘導体に変換した型で GPC 分析を検討した。ここでは、プロピレンオキシド付加処理した試料についての実験結果を報告する。また、GPC 装置の検出器として、示差屈折計の他にレーザー光散乱光度計を併用し分子量の検討も行なったのでここに報告する。

## 2. 実 験

### [1] 試 薬

ポリエチレンイミンは、某社製の PEI-(A), (B), (C), (D), (E) の分子量の異なる 5 種類の試料を用いた。エチレンジアミン (EDA), トリエチレンテトラミン (TETA), テトラエチレンペンタミン (TEPA) は、東洋曹達工業社製を用いた。溶離液等に用いた試薬は、和光純薬工業社製特級品をそのまま用いた。標準試料ポリエチレングリコール PEG は、東洋曹達工業社製 TSK standard Poly (ethyleneoxide) SE-5, 分子量40,000を用いた。

### [2] 装 置

装置；東洋曹達工業社製高速液体クロマトグラフィー HLC-802UR (RI 検出器使用)。同社製高速液体クロマトグラフィー HLC-801A に検出器として同社製レーザー光散乱光度計 LS-8 および示差屈折計を接続して用いた。

充填剤；TSK-GEL G3000PW+G2000PW

カラム；内径 7.5 mm, 長さ 60 cm のステンレスカラムに上記充填剤を湿式充填した。

### [3] PEI のプロピレンオキシド付加誘導体の調製

50 cc の共栓付三角フラスコに試料 PEI 2 g と水 10 g を入れた。プロピレンオキシド (略, PO) を少量ずつ添加する操作と湯浴にて 40~50°C に加温する操作を交互に繰り返し PEI への PO 付加反応を行なった。反応

の進行と共に過剰の未反応 PO は飛散し反応液の重量変化がほとんどなくなった。このようにして調製した PEI の PO 付加物を分析試料に供した。

### [4] GPC 分析試料の調製

GPC 分離に供する PEI あるいは PEI 誘導体は、溶離液と同一溶媒に所定濃度溶解させた後、溶離液に用いたと同じ酸を添加し、溶離液と同一 pH に調製し分析試料とした。

## 3. 実 験 結 果

### [1] PEI の直接 GPC 分析

#### (1) 分離条件の検討

溶離液の最適 pH を選択するため水/トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (略, トリス)/酢酸系の溶離液を用い pH を 5~8 の間で検討した結果、PEI は中性~塩基性領域でゲルへの吸着が激しく、試料溶離後も長時間にわたり記録計ベースラインの不安定化を招き吸着物が徐々に溶離してきた。pH 5~6 の酸性領域では、試料とゲルとの吸着相互作用が弱められることを見出した。

Fig. 1 にカチオン性化合物として代表的なエチレンジアミン (略, EDA) を酢酸または塩酸水溶液中で中和したときの滴定曲線を示す。EDA は水溶液中で次式に示

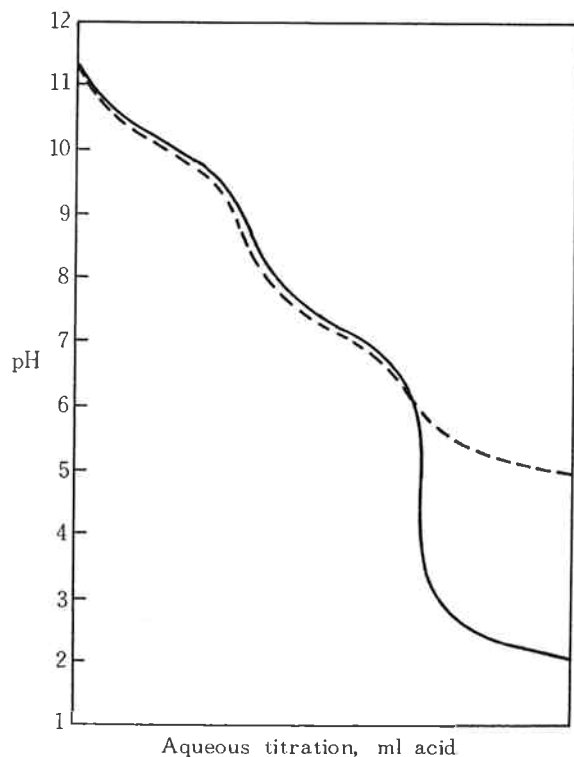
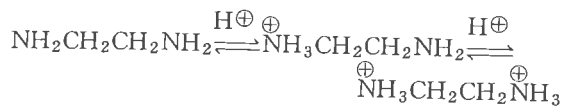


Fig. 1 Titration curve for EDA in water  
— titration with 0.05N-HCl  
--- titration with 0.05M-Acetic acid (AcOH)

す平衡が存在し、系の水素イオン濃度により平衡が



移動し、これらのイオン種の平衡混合物を形成している。中性から塩基性領域では、十分に解離していないイオン種とゲルとの吸着相互作用が大きいため、分析に際してはアミノ基を十分に解離しうる pH を選択する必要がある。Fig. 1 より、酢酸酸性溶離液を用いるときは、pH 5~5.5、塩酸酸性の場合は pH 2~3 の範囲の緩衝液を使用することが望ましい。

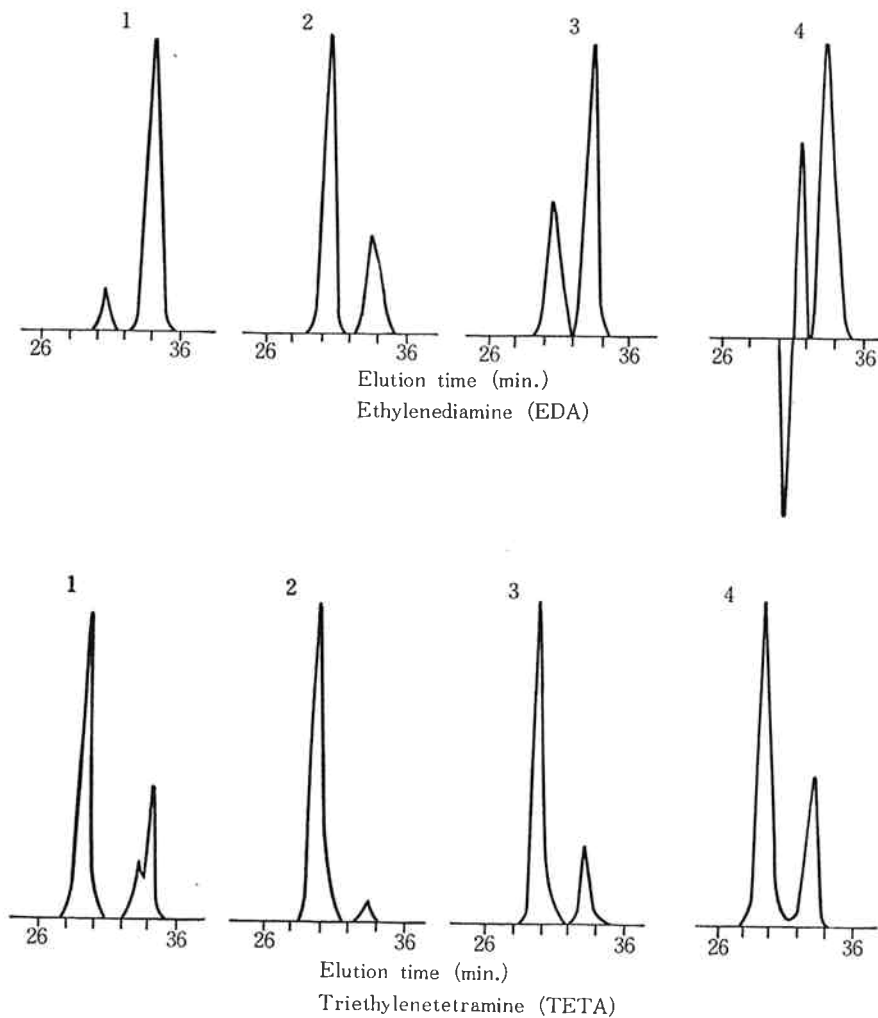
次に、溶離液の塩濃度を0.1~0.5Mの間で検討した結果、ゲルへの吸着性に及ぼす塩濃度の影響はほとんど認

められなかった。このため以下の溶離条件においては、塩濃度0.3~0.4Mを選んだ。

(2) 溶離液の塩の種類の影響

溶離液として酸性緩衝液を用いるにあたり、酸およびその塩の種類がカチオン性重合体のゲルへの吸着に及ぼす影響を検討した。酸については有機酸である酢酸、無機酸である塩酸を、塩基については、トリス、モノエタノールアミンおよびトリエチルアミンを用い、これらの酸および塩基を組み合わせ使用した。

EDA とトリエチレンテトラミン(略, TETA) をカチオン性試料として種々の上記緩衝液にて GPC 分離したときのピーク形状を Fig. 2 に示した。EDA の分離において、溶離時間30.3分の位置に強度の最も大きいピー



Column : TSK-Gel  
G3000PW + G2000PW

Flow rate : 1 ml/min

Detector : RI

Mobile phase

pH

Ion strength

1 Tris.-AcOH

5.1

0.4

2 Ethanolamine-AcOH

5.1

0.4

3 Ethanolamine-HCl

2.9

0.4

4 Triethylamine-HCl

2.9

0.4

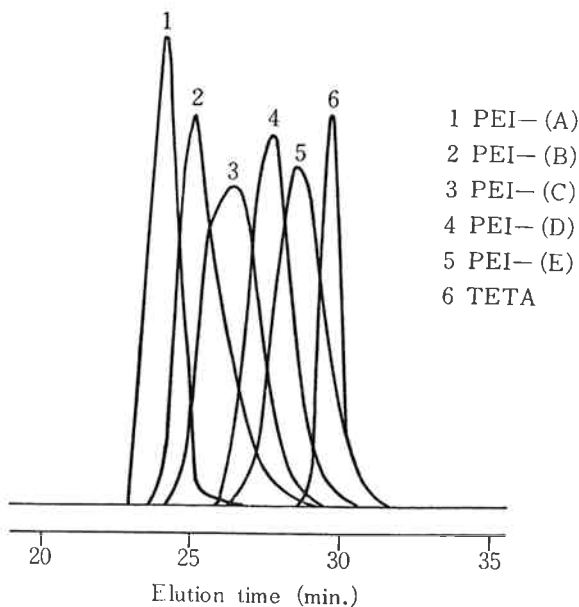
Fig. 2 Gel permeation chromatograms of EDA and TETA in various mobile phases

クが確認されるのは、エタノールアミン/酢酸系の溶離液を用いた場合のみで、その他の種類の溶離液では、複雑なピーク形状を示す。EDA より分子量の大きい TETA の分離において、トリス/酢酸系の溶離液を用いた場合、複雑なピーク形状を示すが、エタノールアミン/酢酸系およびエタノールアミン/塩酸系の溶離液では比較的小さな強度のサイドピークをもつ1本のメインピーク（溶離時間29.5分）からなりほぼ良好な GPC 分離を示した。更に、分子量が300以上の PEI においては、ピークの形状および溶離位置に及ぼす溶離液の塩の種類の違いは認められず、いずれもサイドピークのない分離を示した。

低分子量から高分子量にいたる分子量を有し、かつカチオン強度の異なるカチオン性重合体を GPC 分離する場合、溶離液としては、無機酸より酢酸のような有機酸とエタノールアミンとを組み合わせ合わせた塩の酸性緩衝液を使用することが好ましいと考えられる。

### (3) 検量線の作成

分子量の異なるエチレンアミン類および PEI を試料に、TSK-GEL G 3000 PW と G 2000 PW とを用い分離測定した例を Fig. 3 に示す。また Fig. 4 に PEI の分子量と溶離時間との関係をプロットした検量線を示す。試料の分子量は、後述3・[2]・(3)項でのレーザー光散乱光度計により実測した値を利用した。



Column : G3000PW + G2000PW  
 Mobile phase : 0.4M Ethanolamine and Acetic acid  
 pH : 5.1  
 Flow rate : 1 ml/min  
 Temperature : r. t.  
 Detector : RI

Fig. 3 Gel permeation chromatograms of Polyethyleneimine and Triethylenetetramine

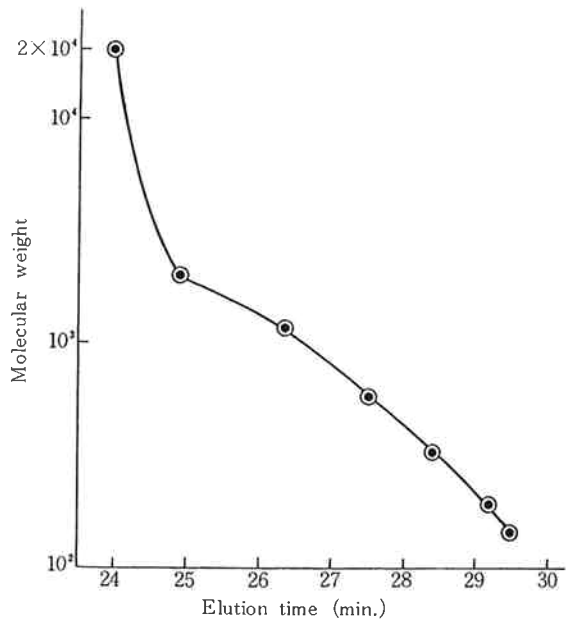


Fig. 4 Calibration Curve of PEI

平均分子量140~2,000の範囲で、分子量と溶離時間との間に良好な相関関係が認められる。平均分子量20,000の PEI は、G 3000 PW ゲルの排除体積外にあることから、分子量の比較的大きなカチオン性重合体の GPC 分離には、より大きな孔径を有し分子量分画範囲がより大きい TSK-GEL G 4000 PW~G 6000 PW を使用することによって可能となる。

## (2) PEI のプロピレンオキシド付加誘導体の GPC 分析

エチレンアミン類および PEI は、水系 GPC ゲルへの吸着性が比較的に強い。試料を簡単に前処理し誘導体に変換することによりゲルとの相互作用が弱められ、GPC 分離の溶離条件が緩和されるかどうかその可能性を検討した。

### (1) 溶離条件の検討

エチレンジアミンのプロピレンオキシド付加体である N, N, N', N'-テトラ(2-ヒドロキシプロピル)-エチレンジアミンを試料に用い、溶離液の pH および塩濃度を検討した。

#### 溶離条件

カラム ; TSK-GEL G 3000 PW  
 + G 2000 PW

溶離液 ; 0.3M トリス/酢酸

流速 ; 1.0 ml/min.

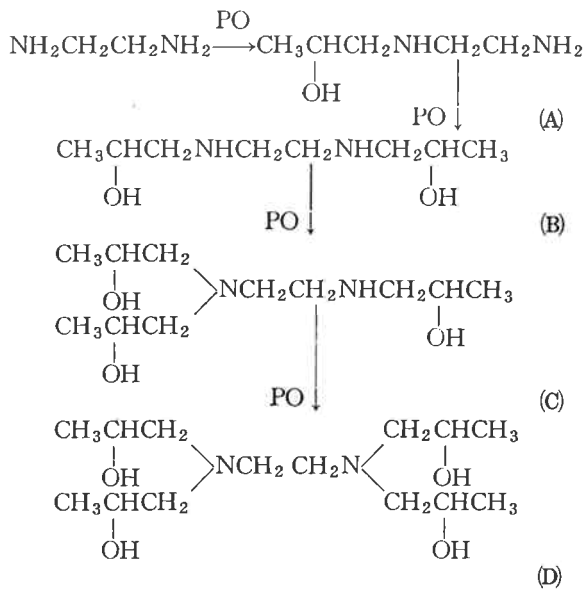
溶離液の pH が 5.1 の酢酸酸性領域では、試料ピークが 1 本確認されるが、pH 6.9 の中性領域では、試料ピークが 2 本に分裂する。この原因として 3・[1]・(1)項で述べ

たように、イオン種の違いによるゲルへの吸着性の差が生じたためと考えられる。前処理を施さない PEI と同様、PEI のプロピレンオキシド付加誘導体の場合も、溶離液 pH は、3 級アミノ基を十分に解離しうる酸性領域を選ぶ必要がある。

溶離液中の塩濃度を0.1~0.3M変化させ、試料のピーク形状や溶離時間に及ぼす影響を検討した。その結果、上記塩濃度の範囲では全く影響が認められなかった。また、溶離液の塩として酢酸ソーダ、トリス/酢酸およびモノエタノールアミン/酢酸の3種類について、主として試料のピーク形状に及ぼす影響を検討した。その結果、いずれの塩の溶離液を用いても試料ピークは1本のみで、ピーク形状の変化は認められなかった。

(2) プロピレンオキシド付加量の影響

アミノ基へのプロピレンオキシド(略, PO)の付加は、1 級アミノ基が2 級化更には3 級化し、2 級アミノ基が3 級化する反応である。例えば、EDA と PO との反応は次式で示される。

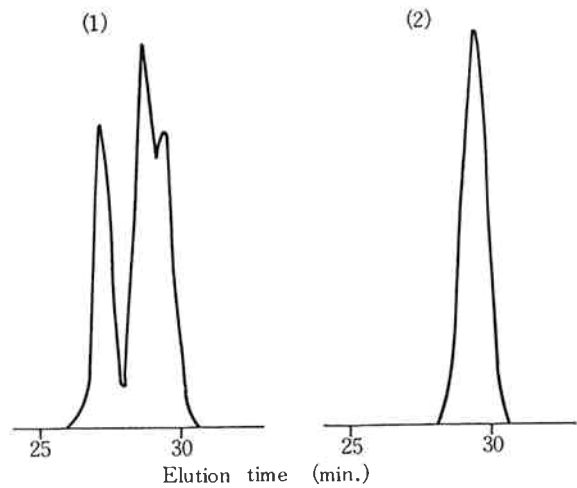


アミンに対する PO 付加量の違いにより生成物は種々の構造をとりうる。EDA 1 モルに対し PO を 2.5 モルおよび 4 モル反応させた試料の GPC チャートを Fig. 5 に示す。試料(1)は PO 付加量の異なる数種の混合物であることを示している。試料(2)は単一ピークであることから、主として(D)の構造を有する化合物であることを示している。

以上の結果より、カチオン性重合体を PO で前処理する場合、全アミノ基を3 級アミンに変換することが重要である。

(3) 検量線の作成

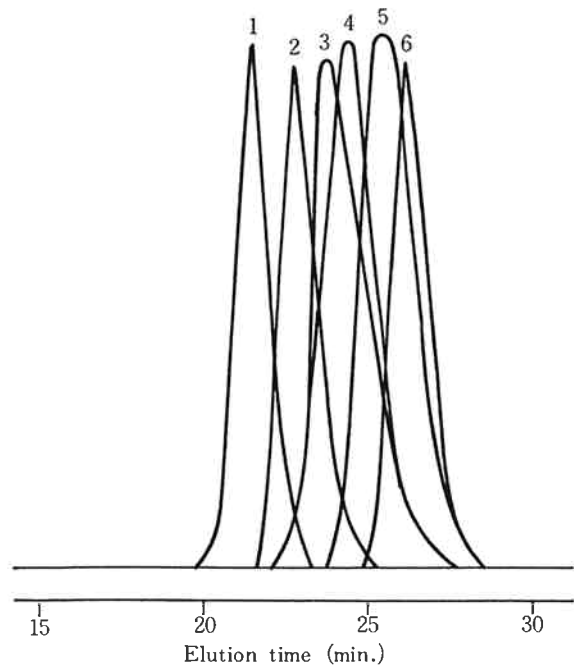
Fig. 6 にテトラエチレンペラタミンの PO 付加体と分子量 300~20,000 の PO 付加体の GPC チャートを示



Column : TSK-Gel G3000PW+G2000PW  
 Mobile phase : 0.3M sodium acetate  
 pH : 5.1  
 Flow rate : 1.0 ml/min

(1) PO/EDA=2.5/1 mol  
 (2) PO/EDA=4/1 mol

Fig. 5 Gel permeation chromatograms of Ethylenediamine-propyleneoxide adducts



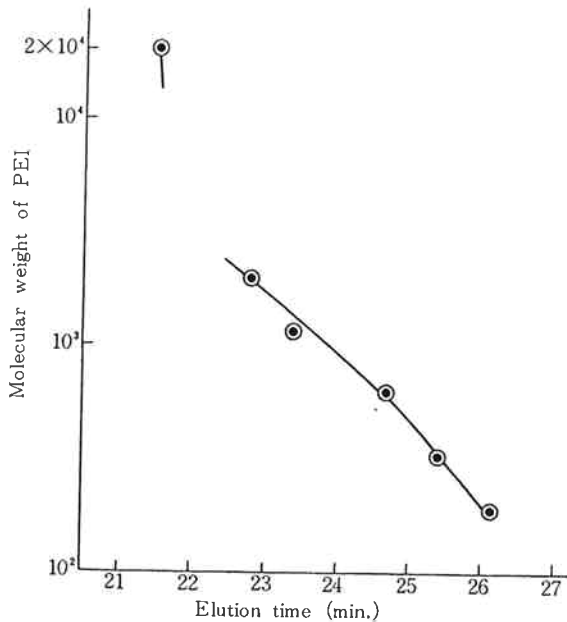
Column : TSK-Gel G3000PW+G2000PW  
 Mobile phase : 0.4M-Ethanolamine and acetic acid  
 pH : 5.1  
 Flow rate : 1.0 ml/min  
 Pressure : 24 kg/cm<sup>2</sup>  
 Temperature : r. t.  
 Detector : RI

1 PEI-(A)-PO adduct.  
 2 PEI-(B)-PO adduct.  
 3 PEI-(C)-PO adduct.  
 4 PEI-(D)-PO adduct.  
 5 PEI-(E)-PO adduct.  
 6 Tetraethylenepentamine-Propyleneoxide adduct

Fig. 6 Gel permeation chromatograms of PEI-PO adducts and TEPA-PO adduct

す。

Fig. 7 に付加処理前のカチオン性重合体の分子量とピーク極大点での溶離時間との関係を示す。分子量 190~2,000 のオリゴマー領域の PEI について良好な検量線が得られた。



Column : TSK-Gel G3000PW + G2000PW  
 Mobile phase : 0.4 M-Ethanolamine and Acetic acid  
 pH : 5.1  
 Flow rate : 1.0 ml/min  
 Detector : RI

Fig. 7 Calibration curve of PEI-PO adducts

### [3] レーザー光散乱光度計による分子量および分子量分布の測定

高速液体クロマトグラフィー HLC-801 A の検出器にレーザー光散乱光度計 LS-8 と示差屈折計を直列に接続し、GPC による PEI 試料の分子量および分子量分布を測定した。標準試料として分子量 40,000 のポリエチレングリコールを用いた。

#### 溶離条件

カラム ; TSK-GEL G 3000 PW  
 + G 2000 PW

溶離液 ; 0.4M モノエタノールアミン/酢酸

pH ; 5.1

流速 ; 1.0 ml/min.

標準試料 PEG のピーク極大点におけるピーク高さと分子量との関係を基準に用いて、各 PEI 試料のピーク高さより求めた平均分子量を Table 1 に示す。Fig. 8 に PEI の分子量分布曲線を示す。PEI-(B) 試料の高分子量側分布が狭くなっているのは、カラムの排除限界との関係に帰因している可能性があると考えられる。

Table 1 Average molecular weights  $\bar{M}_w$  of PEI measured by Laser light scattering method

Sample name	$\bar{M}_w$
PEI-(A)	20,000
PEI-(B)	2,000
PEI-(C)	1,150
PEI-(D)	570
PEI-(E)	320

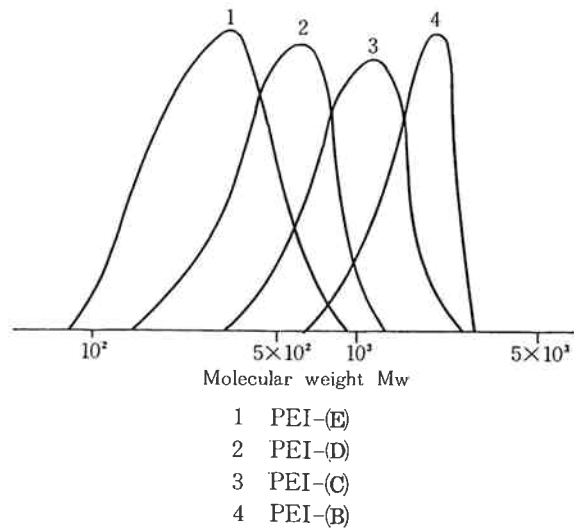


Fig. 8 Molecular weight distribution curves of PEI

## 4. ま と め

カチオン性重合体の中で代表的な PEI は、強カチオン性を有し、水、メタノール、エタノール、エチレングリコール以外のほとんどの有機溶媒に溶解しない。このようなカチオン性高分子電解質の分子量および分子量分布を GPC 法により測定する場合、溶離液の種類が限定される。水系 GPC ゲルを用い、水またはメタノール溶離液にて PEI の分離を試みたが、ゲルへの吸着が激しく、溶出し難いことが判明した。また PEI を塩化ベンゾイルで処理したベンゾイル化 PEI 誘導体がクロロホルムへ溶解することを利用して、有機溶媒系 GPC ゲルを用いクロロホルム溶離液にて分離を試みたが、ゲルへ吸着し全く溶出しなかった。

以上のようにカチオン性高分子電解質はゲルへの吸着が激しいため、試料とゲルとの吸着相互作用を弱め、GPC 効果を十分に発揮しうるゲルおよび溶離液の選択と溶離条件の最適化が重要である。

PEI を前処理することなく GPC 分離を行なうため、水溶離液中の塩の種類を検討した結果、酢酸ソーダ、ト

リス/酢酸塩、トリエチルアミン/酢酸塩等では、比較的分子量の小さなカチオン性試料と水系 GPC ゲルとの間に吸着相互作用が存在するが、分子量300以上の PEI 試料については試料とゲルとの間の相互作用は極めて小さくなることが明らかになった。

以上の知見から、試料の有するカチオン強度がゲルへの吸着作用に影響を及ぼす因子の1つであると推定した。モノエタノールアミン/酢酸塩は、カチオン強度の大きいアミノ基を有する試料とゲルとの吸着相互作用を弱める効果があることから、塩の種類も試料とゲルとの相互作用に影響を与えることが判明した。

PEI のカチオン強度を弱める方法として、無水酢酸による PEI のアセチル化処理、エチレンオキシドおよびプロピレンオキシド付加による試料の前処理を検討した。その結果、試料自身が本来有するカチオン強度および水溶液中の塩の種類に関係なく、前処理された試料とゲルとの相互作用は、無視できる程度にまで抑制できることを見出した。カチオン強度が大きくゲルとの相互作用が大きいカチオン性重合体であっても、これらの前処理を行なうことにより GPC 分離が容易となる。

また、溶離液の水素イオン濃度は、PEI の GPC 分離に影響を及ぼす重要な因子である。カチオン性重合体中のアミノ基を十分に解離しうる水素イオン濃度を選択す

ることが分離のポイントとなる。

今回、TSK-GEL G-PW タイプカラムを用いカチオン性重合体の中で、最も大きなカチオン強度の範疇に属する PEI の分子量および分子量分布の測定法を確立するに至った。PEI 以外にも多様な構造と分子量を有するカチオン性重合体が多く産業分野で用いられているが、これらの重合体の分子量測定も本報告で検討された溶離条件を基礎に、対象となる試料の物性に適応した溶離条件の展開をはかることにより可能になると思われる。

## 文 献

- 1) M. F. Hoover; *J. Macromol. Sci. Chem.*, A, 4, (6), 1327 (1970).
- 2) L. H. Peebles Jr.; *Encyclopedia of Polymer Sci.*, 1, 25 (1976).
- 3) “東洋曹達テクニカルデータ” TSK-GEL PW TYPE, (1979).
- 4) 波多野博行編; “高速液体クロマトグラフィー”(化学の領域増刊121号), 77 (1978).
- 5) 原 昭二, 辻 章夫; “最新液体クロマトグラフィー”, 南江堂, 292 (1978).