

Technical Review

ポリマー系充填カラム

森山 弘之

HPLC Columns with Polymer Based Packing Materials

Hiroyuki Moriyama

Separation Center, TOSOH Corporation

Kaisei-cho 4560, Shu-Nan, Yamaguchi, 746-8501 Japan

Abstract

Various packing materials based on synthetic polymers have been widely utilized for analyzing various substances. Based on their properties, polymer packing materials can be utilized for determination of high molecular weight substances such as synthetic and biological polymers. We describe the current trend of polymer based packed columns.

Keywords; Polymer base, Packing material, High performance liquid chromatography (HPLC), SEC (Size exclusion chromatography), Ion exchange chromatography (IEC), IC (Ion chromatography)

1. 緒言

本稿では、ポリマー系充填剤について概説する。液体クロマトグラフィーに用いられている充填剤の基材として、シリカゲル、アルミナやアパタイトなどに代表される無機材料、スチレンやアクリル酸エステルなどの有機モノマーを重合して得られる有機合成高分子材料、或いはアガロース、セルロースなどの天然高分子材料が利用されている。基材の持つ様々な特性を生かした分離法が開発され、幅広い試料群の分離分析に使用されている。分離剤に要求される機能は、使用目的により多岐にわたるため、粒子径、細孔径、表面官能基などの物性の最適化が求められる。充填剤の特性を理解することにより、目的に合致した分離を得ると共に、安定した結果を得ることが重要である。ポリマー系充填剤の現状と取り扱いについて述べる。

2. ポリマー系充填剤の種類と特性

ポリマー充填剤として古くから利用されている基材は、スチレンやジビニルベンゼンをベースとした疎水性の高い充填剤や、(メタ)アクリレート系、ビニルアルコール系、アクリルアミド系などの親水性の高い充填剤が挙げられ、現在でも、多くのポリマー系充填剤のベース基材として汎用されている。

有機溶媒で分析される合成ポリマーのサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) では、ポリスチレンをベースとした充填剤が多用されるが、水溶性ポリマー、無機イオン、タンパク質や核酸などの生体試料の分析には、親水性の高い(メタ)アクリレート系充填剤が用いられる。

ポリマー充填剤は、モノマーと架橋剤からなり、その表面に様々な官能基を導入して製造される。充填剤の物性は、モノマー、架橋剤、細孔制御剤、及び重合温度、時間などに依

東ソー株式会社 バイオサイエンス事業部 開発部
〒746-8501 山口県周南市開成町4560
Tel: 0834-63-9864
Fax: 0834-63-9879
E-mail: hiroyuki-moriyama-cx@tosoh.co.jp

表1 主なポリマー系充填剤の種類と用途

	分析適用例	重要な物性
スチレン系	<ul style="list-style-type: none"> ・有機溶媒系合成ポリマーのサイズ排除分析 ・アミノ酸、糖分析用イオン交換分析 ・ペプチド等の逆相分析 	細孔径、細孔分布 表面積、イオン交換容量 細孔径、官能基
(メタ)アクリレート系	<ul style="list-style-type: none"> ・水系合成ポリマーのサイズ排除分析 ・タンパク質のイオン交換、疎水、アフィニティ分析 ・無機/有機イオン分析 	細孔径、細孔分布 細孔径、イオン交換容量 細孔径、イオン交換容量

存し、様々な細孔径、細孔分布を有する充填剤を作製することができるため、分析対象物質の性状に適した物性を選択することが重要である。表1に分析的用例と必要な充填剤物性を示した。

ポリマー充填剤の特徴は、幅広い細孔径を制御・作製でき、巨大細孔が設計しやすく、また、生体親和性、アルカリ耐性が高いことが上げられる。幅広い細孔径の設定により、分子量分布を有するポリマーの分析に適しており、タンパク質分析や、アルカリ条件下での分析に有利である。一方シリカゲル充填剤に比較し微細孔が多いため、低分子試料に対しカラム効率が低い、機械的強度に劣るなどの欠点がある(表2)。

表2 ポリマー充填剤の利点と欠点

利点	欠点
スチレン系	
化学的耐久性が高い	機械的強度が低い
耐熱性が高い	微粒子化による高圧化
耐有機溶媒性が高い	微細孔が多くカラム効率が低い
幅広い細孔分布	膨潤収縮性
(メタ)アクリレート系	
親水性が高い	機械的強度が低い
生体試料の親和性が高い	微粒子化による高圧化
幅広い細孔分布	微細孔が多く、カラム効率が低い
	膨潤収縮性

高速化・高分離能化をキーワードとして、すべてのHPLCカラムは進化を続けている。高速化は主に粒子径の微小化により、また、高分離能化は微小化と高選択性官能基により実施されている。

高速化には高流速に耐えうる機械的強度を有する微小粒子が必要である。HPLC充填剤の粒子径は10 μ mから5 μ mへ、更に3 μ mから、近年ではSub 2 μ mへと微小化し、高速・高分離能化が進んでいる。ポリマー充填剤はシリカ系無機材料に比べ、機械的強度の観点からは劣るものの、架橋度の増加や非多孔性粒子を用いることにより、高速分離を達成している。また、表面官能基の導入方法により高選択分離場を

設計し、高分離性能化が図られている。

(1) サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

ポリマー分析では、その分子量分布や平均分子量などの情報が重要であり、試料の分子量に合致した細孔径を有するカラムの選択が必要である。このため、試料の分子量に応じて細孔径の異なるいくつかのグレードが用意されている(図1)。

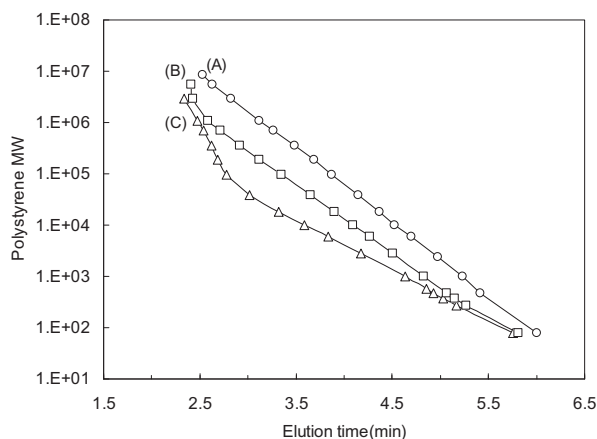


Figure1. SEC カラムの校正曲線

Column; (A) TSKgel SuperMultiporeHZ-H
 (B) TSKgel SuperMultiporeHZ-M
 (C) TSKgel SuperMultiporeHZ-N, 4.6mmI.D. x 15cm
 Eluent; THF, Flow rate; 0.35mL/min, Detection; UV (254nm)
 Sample; Polystyrene standard

分布の狭い標準試料を用いて(ポリスチレンやポリエチレングリコールなど)校正曲線を作成し、標準試料換算の分子量を求めることで、幅広い分子量分布を有するポリマー試料の品質管理が行われている。

SECで最も重要な物性は、校正曲線の傾きと細孔容積である。タンパク質のような単一分子サイズ物質では、校正曲線の傾きは緩やかなほど分離性能は向上する。分子量の近いタンパク質の分離には、校正曲線の傾きの緩やかなシリカゲルをベースとしたSECカラムが多用されているが、ポリマー充填剤は一般に校正曲線の傾きは大きく、単一分子サイ

ズ同士の分離ではシリカゲル充填剤ほどの分離性能は得られない。しかし、分子量分布の広いポリマー試料は、試料の分子量分布に対応した幅広い細孔径を有する充填剤が必要となり、ポリマー系充填剤が有利である。高分離を得るためにSECカラムでも粒子径の微小化がおこなわれており、低分子オリゴマーの分析では有効である。図2に粒子径5μmから3μmへ微小化したSECカラムを用いた分離時間短縮の分離例を示した。粒子径をほぼ半分とすることにより、同等の分離が半分の分析時間で達成することができる。一方、分子量の高い高分子ポリマーは粒子径の微小化や流速増大によるポリマーの切断が観測されるため、SECの微粒子化や高速化には限界がある。

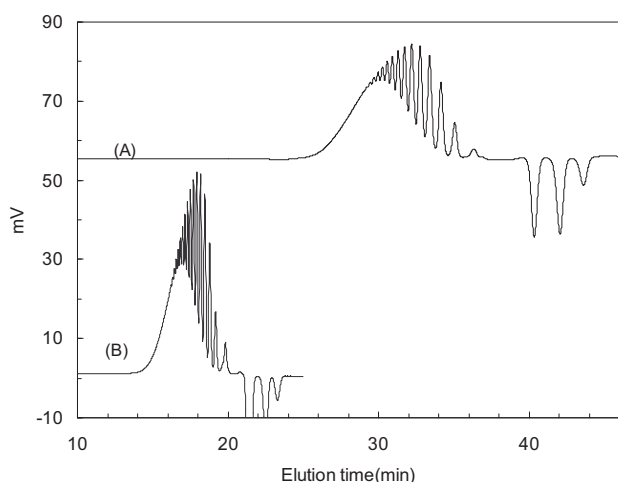


Figure2. 合成オリゴマーのSEC高速分析

Column; (A) TSKgel G4000HXL+G3000HXL+2500HXL+G2000HXL (7.8mmI.D. x 30cm x 4)
 (B) TSKgel SuperMultiporeHZ-N (4.6mmI.D. x 15cm x 4)
 Eluent; THF, Flow rate; (A) 1.0mL/min, (B) 0.35mL/min, Detection; RI
 Sample; PTMEG650 (Polytetramethyleneetherglycol)

SECは分子サイズの違いだけを認識し分離するモードであるが、一般的にポリマー系充填剤の表面には様々な官能基が存在している。特にイオン性ポリマー試料の場合、ゲル表面に存在するイオン性基とのイオンの相互作用により、吸着して溶出されない場合がある。図3に示すように、従来のSECカラムでは吸着が観測されるが、イオンの吸着を抑制したカラムを用いると、ゲルロット間差による溶出パターンの変化がなく安定したクロマトグラムが得られる。

今後SECカラムは、低分子ポリマー向けカラムとして較正曲線の傾きを保ったまま、更なる微粒子化による高速・高分離化が進められると思われる。一方、中高分子ポリマーでは、細孔容積と細孔径の確保が重要であるため、微粒子化に限界がある。このため、イオン性、難溶性、超高分子ポリマーなどの特殊ポリマー試料に対応した表面化学構造、架橋度、及び細孔径を有したSECカラムが開発されると思われる。

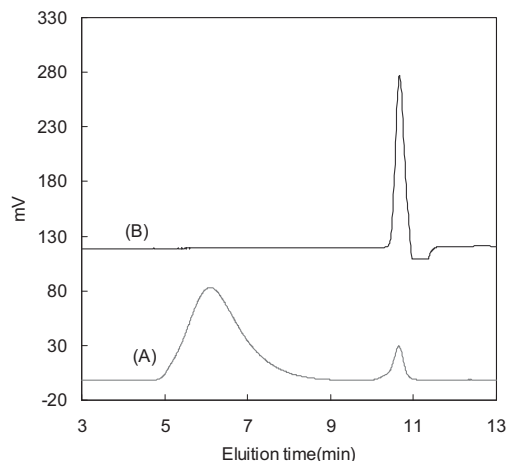


Figure3. カチオン性ポリマーのSEC分析

Column; (A) TSKgel 5000PWXL-CP (7.8mmI.D. x 30cm)
 (B) TSKgel 5000PWXL (7.8mmI.D. x 30cm)
 Eluent; 0.1mol/L NaNO₃, Flow rate; 1.0ml/min, Detection; RI,
 Sample; Polyallylamine

(2) イオン交換クロマトグラフィー (IEC)

親水性ポリマー系充填剤は、生体物質適応性が高いことから、タンパク質や核酸などの生体高分子試料の分析に多用されている。これは、高分子試料に適した巨大細孔が作製しやすいこと、基材のアルカリ耐久性が高いこと、疎水的吸着が少ないことなどの理由が挙げられ、(メタ)アクリレート系

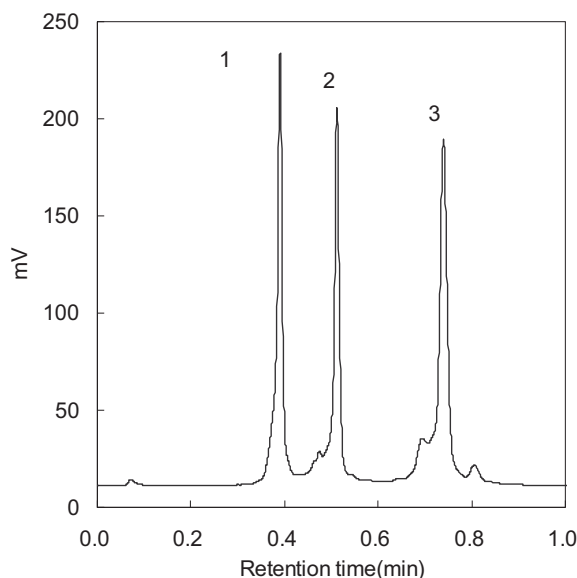


Figure4. 非多孔性IECカラムによるタンパク質の高速分離

Column; TSKgel Q-STAT (3mm I.D. x3.5cm, 10μm),
 Eluent; (A) 20mmol/L Tris-HCl (pH8.5), (B) 20mmol/L Tris-HCl + 1mol/L NaCl (pH8.5), B10% (0min) - 30% (30min) - 100% (30min) - 100% (32min) - 10% (32min) - 10% (36min)
 Flow rate; 2 mL/min, Temperature; 25°C, Detection; UV (280nm)
 Sample; 1. Conalbumin, 2. Ovalbumin, 3. Trypsin inhibitor

充填剤に代表される親水性充填剤をベースとしたカラムが市販されている。IEC 以外にも、疎水性クロマトグラフィー (HIC) やアフィニティクロマトグラフィー (AFC) など多種の分離モードに用いられている。粒子径は10 μm 粒子が主流であったが、高分離・高速分離の要望に対し、粒子径の微小化が行われている。また、粒子細孔内への試料拡散を抑えることにより高分離分析を意図した非多孔性充填剤が開発され、Sub 2 μm の IEC 充填剤も市販されている。図4には非多孔性充填剤を用いたタンパク質の高速分析例を示した。粒子径は10 μm であるが、高速分離が達成できる。

非多孔性充填剤は細孔内への試料拡散を抑制でき、更に微小化することでシャープなピークを得ることができる。しかしながら、非多孔性充填剤は多孔性充填剤に比べ、比表面積が極端に小さくなるため、選択性は低下する。このため、選択性向上が重要となるが、表面修飾法の改良がおこなわれている。充填剤表面の空間を利用した官能基を導入することでイオン交換容量を向上させ、タンパク質などの高分子物質を捕捉する有効表面積を増大したイオン交換充填剤が市販されている。これにより非多孔性充填剤でありながら、従来の微小な非多孔性充填剤に比べ高い選択性を有しているため、高分離が得られる (図5)。

IEC でも Sub-2 μm 充填剤を用いた高速分析が今後増加すると思われるが、微小化と共に表面官能基による高選択性分離場の創出による高分離分析用カラムの開発も期待される。

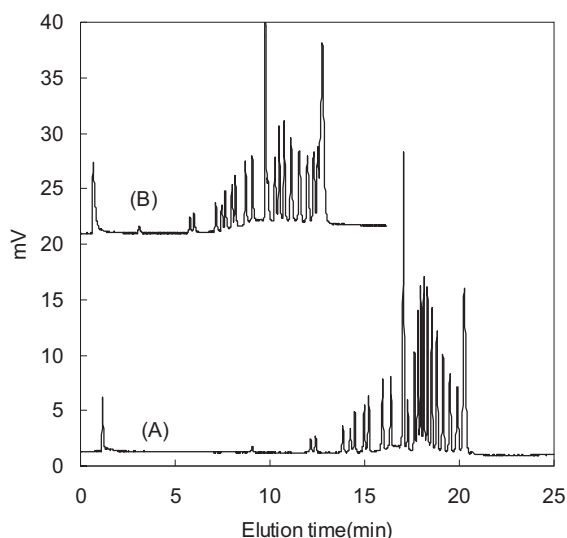


Figure5. 非多孔性 IEC カラムによる核酸の高分離分析

Column; (A) TSKgel DNA-STAT (4.6mm I.D. x10cm, 5 μm)
(B) TSKgel DNA-NPR (4.6mm I.D. x3.5cm, 2.5 μm)
Eluent; A; 20mmol/L Tris-HCl (pH8.5), B; A+500mmol/L NaCl (pH8.5), 75%B to 100% 20min for (A), 50%B to 100% 20min for (B)
Flow rate; 0.5mL/min, Detection; UV(280nm)
Sample; 1Kb Ladder

(3) イオンクロマトグラフィー (IC)

ICで分析される試料は、無機、及び有機のアニオン、及びカチオンなど他のモードに比較して特定の物質であり、それぞれの特性に合わせた充填剤を設計できる。ICもイオン交換充填剤を用いる分離モードであり、IC用充填剤として重要な物性は、細孔径とイオン交換容量、及び基材の親水性、疎水性が上げられる。各種イオンは水中において水和しており、イオン半径により利用できる細孔内のイオン交換容量が異なる。このため、分離対象となるイオン種の価数に適合した細孔径、及びイオン交換容量を設定し、各ピークがバランスの良く溶出する基材と表面修飾を設定することが重要である。疎水性の強いイオン種は充填剤基材との相互作用により、保持位置及びピーク形状が大きく異なるため、ベース基材の選定も重要である。

ICにおける高速化も他のモードと同様に、粒子の微小化によって達成されている。IECと同様に多孔性 IC 充填剤では、細孔内への拡散によるピーク幅への影響が大きいため、粒子表面のみの分離を意図したペリキュラー型や非多孔性充填剤が用いられている。図5に無機イオン種の分析例を示した。従来の多孔性充填剤 (5 μm) では比表面積が大きいため各イオン種の保持力は大きいですが、微小粒子の非多孔性充填剤 (3 μm) を用い、高速下で測定することにより、溶出時間を大幅に短縮することができる。IECと同様に高選択性を発現する充填粒子表面の官能基導入方法が重要であり、有効なイオン交換基量の増加、疎水性の調整などを付与することにより高分離性能を維持した高速分析が可能となる。

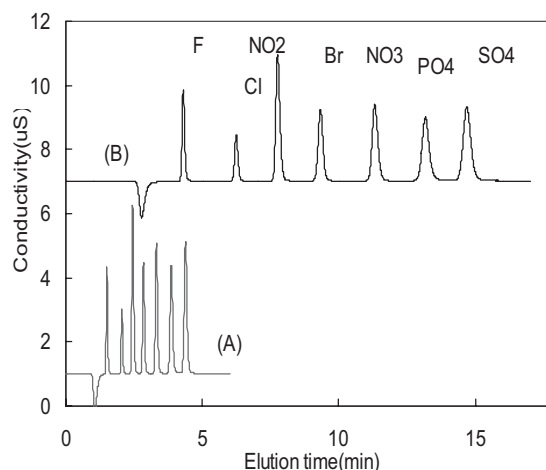


Figure6. 無機イオン種の高速分析

Column; (A) TSKgel SuperIC-Anion HS (4.6mm I.D. x10cm + 4.6mm I.D. x1cm guard)
(B) TSKgel SuperIC-AZ (4.6mm I.D. x15cm + 4.6mm I.D. x1cm guard)
Eluent; (A) 3.8mmol/L NaHCO₃ + 3.0mmol/L Na₂CO₃
(B) 1.9mmol/L NaHCO₃ + 3.2mmol/L Na₂CO₃
Flow rate; (A) 1.5mL/min, (B) 0.8mL/min,
Temperature; 40°C, Detection; Conductivity

ICでは、高速化よりも試料毎に要求される高選択的分離、高感度分析などに対応したカラムが求められている。高純度水中のイオン種分析や、汚泥水などに含有する多量イオン種中の微量イオン種の分析、高温下でのイオン分析など、特殊用途向けカラムの提供が期待される。

3. カラム選定時の留意点

より良い分離、安定した分離を得るためには、各分離モードで使用される充填剤の特性を良く理解する必要がある。

SECでは、様々な排除限界分子量を有したカラムが用意されているが、使用する場合、以下の点に留意する必要がある。排除限界領域に溶出する試料の場合、より大きめの排除限界分子量を有するカラムを選択する。排除限界領域は、ゲルロットにより変動が現れやすい領域であり、パターン分析をおこなう場合、ロットによる変動が観測される可能性がある。

また、幅広い領域をカバーするため数種類の排除限界分子量の異なるカラムを連結して使用する場合(図7(B))、それぞれのカラムが有する排除限界分子量領域で試料が排除さ

れ、ポリマー試料によってはピークパターンが変化することがある。この現象は試料の性状に起因するものではないため、分析判断を誤る危険性がある。異なった排除限界分子量を有するゲルの混合(ミックス型)、或いはカラムの連結で分析する場合には、このような現象を回避できないため、近年では1個の粒子自体に幅広い細孔径を有し、かつ較正曲線の直線性に優れた多分散型細孔充填カラムが各社より市販されており、歪のないクロマトグラムが得られている(図7(A))。

また、ポリマーの合成時には様々な開始剤が使用され、開始剤の種類により、充填剤に開始剤由来の官能基が導入されているため各社カラムは異なった性状を持っており、有機溶媒系、或いは水系SECいずれにおいてもイオンの相互作用の影響度が異なるため、分析対象のポリマーの性状をよく理解して適切なカラムを選択する必要がある。

IEC用ポリマー充填剤は微細孔が多く存在するため、イオン交換容量と試料の保持力は必ずしも相関がないことが挙げられる。多孔性充填剤では、分離対象試料の分子サイズにより、利用できる細孔量が決まる。このため公表されているイオン交換容量がすべて利用できるとは限らず、メーカーによって同じイオン交換容量でも保持力が異なり、表面のイオン交換基導入形態により、分離度も異なる場合がある。ICでも同様に細孔径、官能基導入方法、及び基材の種類により、分離は異なる。このためICでは、メーカー毎に良好な分離が得られる溶離条件が推奨されており、他メーカーとの組み合わせでは十分な分離が得られない場合が多い。

4. まとめ

HPLC充填カラムに対して高速・高分離分析が求められ、シリカゲル充填剤のみならずポリマー系充填剤に対しても同様である。ポリマー系充填剤は機械的強度が欠点であるというイメージがあったが、近年では、Sub 2 μm 粒子も市販化されており、大きく進歩している。より速く分けたい要望に対して、更に多くの分離モードでも粒子の微粒子化が進み、高流速下での高速分析が提案されると思われる。また高分離分析の要望には、微粒子化だけでは高選択性発現には限界があるため、表面官能基と試料との相互作用を向上させる官能基の構造設計が重要であり、今後多くの充填剤が提案されると思われる。

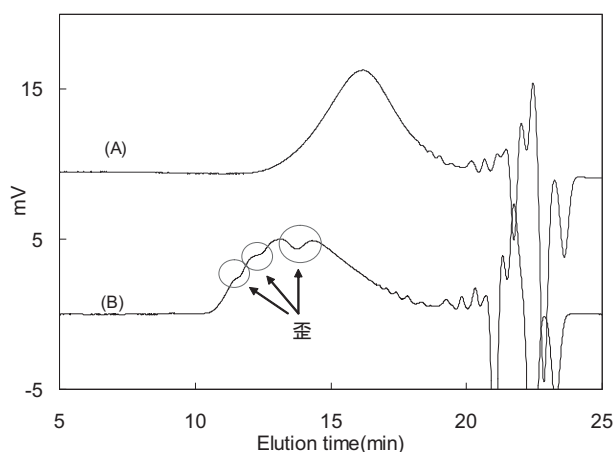


Figure 7. SEC カラムにおけるクロマトグラム上の歪み

Column: (A) TSKgel SuperMultiporeHZ-M (4.6mmI.D. x 15cm x 4)

(B) TSKgel SuperHZ-4000 + HZ-3000 + HZ-2500 + HZ-2000 (4.6mmI.D. x 15cm x 4)

Eluent: THF, Flow rate; 0.35mL/min

Detection; RI, Sample; Acryl resin