

報 文

サイズ排除クロマトグラフィー/多角度光散乱法による
ポリアリルアミン塩酸塩の分子量測定香川 信之^①, 徳永 邦行^②

ポリアリルアミン塩酸塩のようなカチオン性ポリマーのサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 測定においては, 試料とカラム充填剤とのイオン性相互作用や疎水性相互作用を抑制することが重要である. 本研究では, この目的のために開発されたカチオン性ポリマー分析専用の新規 SEC カラムについて, SEC/多角度光散乱 (MALS) 法を用いたポリアリルアミン塩酸塩の溶出挙動を評価した. 溶離液中の NaNO_3 濃度が 0.05, 0.1, 及び 0.2 mol/L の場合は, いずれも良好なサイズ排除機構により溶出していることを確認した. 更に, 溶離液中の塩濃度の増加に伴って, ポリアリルアミン塩酸塩の回転半径が減少し, 溶出容量が増加することが明らかとなった. これは, 溶離液中に存在するイオン濃度の増加により, ポリマー分子内のカチオン性官能基同士の反発が抑制されたためであると考えられる.

1 緒 言

各種ポリマーの分子量測定には, サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 法が最も広く用いられている. SEC 法は, カラムに充填された多孔質充填剤によるポリマー分子のサイズ排除機構に基づいて, ポリマーを分子サイズごとに分離する液体クロマトグラフィーの一種であり¹⁾, カラムからは大きなサイズの分子から順次溶出する. SEC 法におけるサイズ排除機構による分離では, カラム充填剤とポリマー分子との間には相互作用が生じないことが前提となる. 一方, ポリアリルアミン塩酸塩に代表される, 分子内にカチオン性官能基を有する水溶性ポリマーの SEC 測定においては, ポリマーとカラム充填剤との間にイオン性相互作用が生じる可能性があり, このイオン性相互作用を抑制するために, 溶離液の pH や塩濃度等による溶離液組成を工夫することが重要であり, 一般的には, 酸と中性塩を添加した水溶液が用いられる²⁾³⁾. この溶離液組成は, 対象ポリマーの種類によって最適条件が異なるため, 従来, 溶離液組成の決定には多くの時間が必要であった.

このような現状に対し, 硝酸ナトリウム等の中性塩のみを添加しただけの水溶液を溶離液として用いて, カチオン性ポリマーの分子量測定を行うことが可能となる新規水系 SEC カラムが開発された⁴⁾⁵⁾. これにより, 溶離液の調製に時間を費やす必要がなくなったといえる. しかし, このような水系 SEC カラムを用いたポリマーの溶出が正常なサ

イズ排除機構により行われているかは確認されておらず, 更に溶離液中の塩濃度に対するポリマーの溶出挙動も明らかにされていない. 標準ポリマーによる校正曲線を用いて相対的に分子量を求める SEC 法を用いた検討では, 正しくサイズ排除機構で溶出しているかどうかを明らかにすることは困難であると考えられる. このような場合に, SEC 装置と, ポリマーの絶対分子量と回転半径を直接求めることが可能な多角度光散乱検出器を組み合わせた, サイズ排除クロマトグラフィー/多角度光散乱 (size exclusion chromatography-multi angle light scattering; SEC/MALS) 法は最も有効な分析手段である.

ある分子に光を照射すると, その分子上に入射光と同一振動数の励起双極子を誘起し, それが散乱光としてあらゆる方向に放射される. これはレイリー散乱と呼ばれており, この散乱光強度は分子量の関数となる. したがって, ポリマー溶液にレーザーなどの光を照射し, そこから生じる散乱光強度を測定することにより, ポリマーの分子量を測定することが可能となる. SEC/MALS 法で得られる分子量は, SEC 法で得られる相対的な標準ポリマー換算分子量に対し, 本来の分子量である“絶対分子量”と呼んで区別される. 一方, 分子から放射される散乱光は, 分子の大きさが波長の 1/20 以上となると, 分子は 1 つの散乱点と見なせなくなるため, 散乱光強度は分子サイズに依存した散乱角度依存性を示す. したがって, ポリマー溶液から生じる散乱光強度の散乱角度依存性を測定することにより, 溶媒中での分子のサイズ, すなわち分子の回転半径を求めることが可能となる. この目的のために, MALS 検出器は複数の検出素子を内蔵しており, 複数の角度の散乱光強度を

¹ 株式会社東ソー分析センター: 510-8540 三重県四日市市霞 1-8

² 東ソー株式会社: 746-8501 山口県周南市開成町 4560

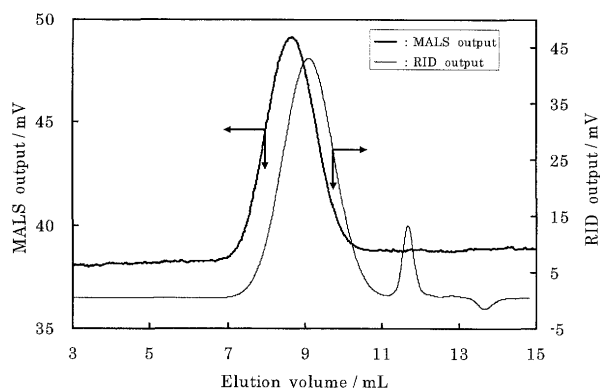


Fig. 1 SEC/MALS chromatograms of PAA-1 with TSKgel G6000PW_{XL}-CP column by 0.1 mol/L- NaNO_3 solution for eluent

同時に測定し、散乱角度依存性を求めることができる。このMALSをSECの検出器として用いることにより、カラムから溶出してくる成分の絶対分子量と回転半径を連続的に測定することが可能になるため、絶対分子量分布や溶出容量に対する回転半径の違いを明らかにすることができる。

そこで本検討では、SEC/MALS法を用いてポリアリルアミン塩酸塩の絶対分子量、及び回転半径と溶出容量との関係を測定し、溶出挙動について解析を行った。

2 実験

2.1 試料及び試薬

試料としては、Aldrich製ポリアリルアミン塩酸塩 No. 283223-1G (以下 PAA-1 と記す)、及び Monomer-Polymer & Dajac Labs, Inc. 製ポリアリルアミン塩酸塩 No. 9216 (以下 PAA-2 と記す) を用いた。硝酸ナトリウムは和光純薬工業製の特級試薬を用いた。

また、比較測定として標準ポリマー換算分子量を求めるために、東ソー製の標準ポリエチレンオキサライド (PEO)、及び和光純薬工業製のポリエチレングリコール (PEG) を用いて校正曲線を作成した。

2.2 試料の調製

試料 10 mg を精秤し、0.1 mol/L の硝酸ナトリウム水溶液 10 mL を加え、一晚、静置溶解させた。その後、緩やかに振り混ぜ、0.45 μm のセルロースアセテートカートリッジフィルター (東ソー製マイシヨリディスク W-13-5) で汙過し、測定に供した。

2.3 装置及び測定条件

SEC装置としては、東ソー製ビルドアップSECシステム (SD-8022, DP-8020, AS-8020, CO-8020, RI-8020) を用いた。MALS検出器としては、Wyatt Technology製DAWN HELEOS (入射光の波長 = 658 nm) を用い、カラム出口

にMALS検出器、更に濃度検出器 (RI-8020) の順で直列に接続した。MALS検出器の出力強度は、ベンゼン (和光純薬工業製特級) のレイリー比 ($1.1931 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$) を用いて校正した。また、低分子量のプルラン (昭和電工製 P-20, $M_w = 22800$) 溶液を用い、各検出素子間の検出感度が等しくなるようにノーマライズした。

溶離液としては、0.05、0.1、及び0.2 mol/L の硝酸ナトリウム水溶液を用い、流量 1.0 mL/min で送液した。カラム温度は 40°C とした。また、試料注入量は 100 μL とした。

MALS検出器を用いて絶対分子量を求めるために必須のパラメータである屈折率濃度増分 (dn/dc) は、注入した試料がカラムからすべて溶出したと仮定し、注入試料濃度と濃度検出器で得られたピーク面積から求めた。本測定では、0.178 mL/g (0.05 mol/L)、0.179 mL/g (0.1 mol/L、及び0.2 mol/L) とした。

2.4 カラム

測定には、カチオン性ポリマー分析専用カラムとして、東ソー製 TSKgel G6000PW_{XL}-CP (7.8 mm I.D. $\times$ 30 cm, 充填ゲル粒径 13 μm) を用いた。また、比較測定として、従来のカラムである、東ソー製 TSKgel G6000PW_{XL} (7.8 mm I.D. $\times$ 30 cm, 充填ゲル粒径 13 μm) による測定も併せて行った。

3 結果及び考察

3.1 TSKgel G6000PW_{XL}-CP と TSKgel G6000PW_{XL} の比較

カチオン性ポリマー分析専用カラムである TSKgel G6000PW_{XL}-CP を用い、0.1 mol/L 硝酸ナトリウム水溶液を溶離液とした場合に PAA-1 について得られた溶出曲線を Fig. 1 に示す。ここで、MALS検出器による溶出曲線は、90度方向の散乱光の強度を代表値として示した。本カラムを用いた場合、溶離液に中性塩のみを添加することにより、カチオン性ポリマーが溶出することを確認した。今回と同様の測定条件でポリアリルアミン塩酸塩のSEC測定を行った場合、注入した試料の全量が溶出することが報告されている⁵⁾。したがって、今回の PAA-1 についても、注入した試料はすべて溶出していると考えられる。一方、従来のカラムである、TSKgel G6000PW_{XL} を用いて 0.1 mol/L 硝酸ナトリウム水溶液を溶離液とした場合の濃度検出器、及び MALS 検出器により得られた溶出曲線を Fig. 2 に示す。ここで、MALS 検出器による溶出曲線は、Fig. 1 と同様に 90度方向の散乱光の強度のみを示している。Fig. 2 においては、両検出器とも、PAA-1 由来のピークは全く検出されておらず、試料がすべてカラムへ吸着してしまったと考えられる。このように、溶離液を中性塩の水溶液とした場合、従来のカラムでは、PAA-1 中のカチオン性官能基が

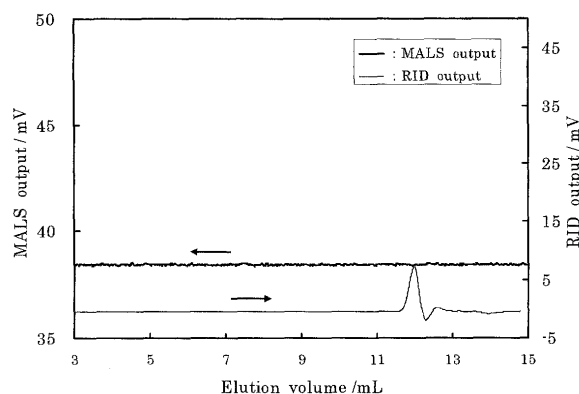


Fig. 2 SEC/MALS chromatograms of PAA-1 with TSKgel G6000PW_{XL} column by 0.1 mol/L-NaNO₃ solution for eluent

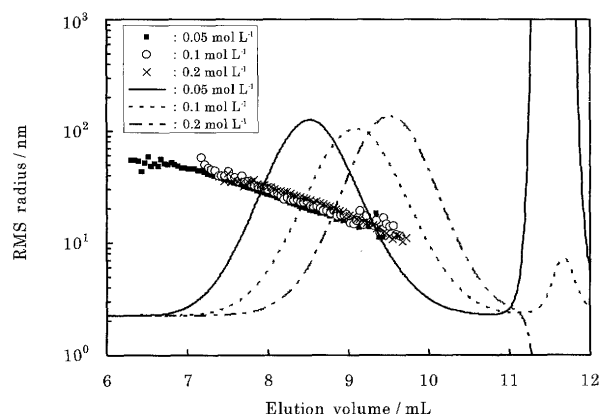


Fig. 4 Chromatograms and RMS radius plots of PAA-1 with TSKgel G6000PW_{XL}-CP column by 0.05, 0.1, and 0.2 mol/L-NaNO₃ solution for eluent

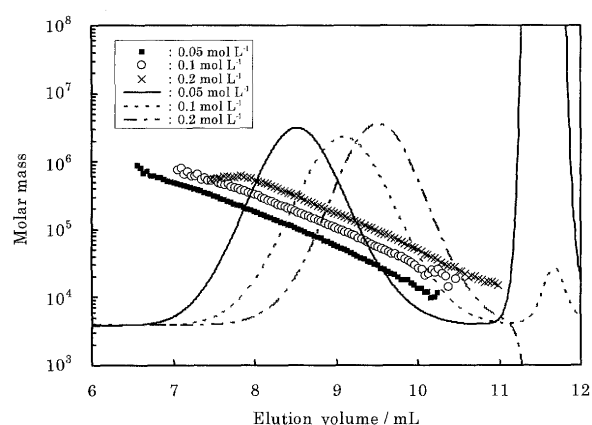


Fig. 3 Chromatograms and molar mass plots of PAA-1 with TSKgel G6000PW_{XL}-CP column by 0.05, 0.1, and 0.2 mol/L-NaNO₃ solution for eluent

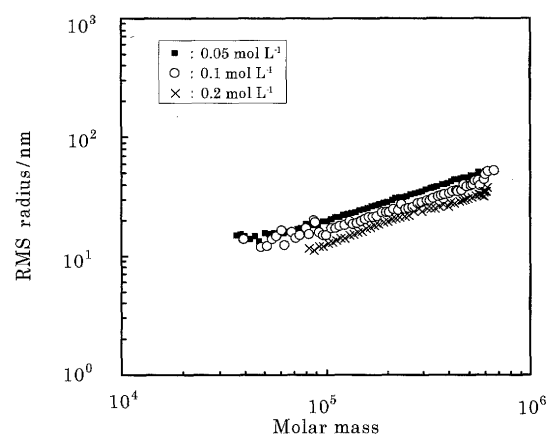


Fig. 5 RMS radius versus molar mass plots of PAA-1 with TSKgel G6000PW_{XL}-CP column by 0.05, 0.1, and 0.2 mol/L-NaNO₃ solution for eluent

カラム中で充填剤ゲルに吸着し、分子量測定が正常に行えないのに対し、新規カラムを用いると、溶出曲線が得られることを確認した。

3・2 溶出挙動に及ぼす溶離液中の塩濃度の影響

TSKgel G6000PW_{XL}-CPを用い、溶離液中の硝酸ナトリウムの濃度を0.05, 0.1, 及び0.2 mol/Lとして得られた濃度曲線と絶対分子量との関係をFig. 3に、更に濃度曲線と回転半径との関係をFig. 4に示す。Fig. 3より、本カラムを用いた場合、PAA-1は高分子量から低分子量へ連続的に溶出していることが確認され、更にFig. 4より、回転半径の大きな成分から小さな成分へと連続的に溶出していることが確認された。SECカラムにおけるサイズ排除機構によるポリマーの分離では、サイズの大きな分子から小さな分子へ連続的に溶出することから、TSKgel G6000PW_{XL}-CPを用いた場合、ポリアリルアミン塩酸塩PAA-1は、硝酸ナトリウムの濃度によらず、良好なサイズ排除機構により溶出し

ていると考えられる。

更に、PAA-1の溶出曲線は、塩濃度の増加に伴って遅れる傾向が見られる。各溶離液で得られた絶対分子量と回転半径との関係(コンホメーションプロット)をFig. 5に、得られた平均の絶対分子量と回転半径をTable 1に示す。Fig. 5より、塩濃度の増加に伴い、同一分子量における回転半径が減少している。また、Table 1より、絶対分子量は塩濃度によらず一定であるが、平均回転半径は、塩濃度の増加に伴い減少している。これは、溶離液中に存在する中性塩によるイオン濃度の増加により、ポリマー分子内のアミノ基同士の分子内反発が抑制され、分子サイズが小さくなったためと考えられる。このため、塩濃度の増加に伴ってピークの溶出が遅れたと考えられる。

一方、塩濃度の増加に伴ってピークの溶出が遅れる現象は、標準ポリマーによる校正曲線を用いて換算分子量を求める通常のSEC法では問題を生じる。PAA-1の溶出曲線

Table 1 Average Molar Mass and RMS Radius by SEC/MALS and SEC

NaNO ₃ conc./ mol L ⁻¹	Mn	Mw	Mz	RMS Radius/nm	Mw by SEC ^{a)} / × 10 ⁴
	× 10 ⁴				
0.05	7.0	12	19	23	30
0.1	7.0	12	19	20	21
0.2	7.1	12	19	17	14

a) Weight Average Molar Mass calculated by calibration of Standard PEO and PEG

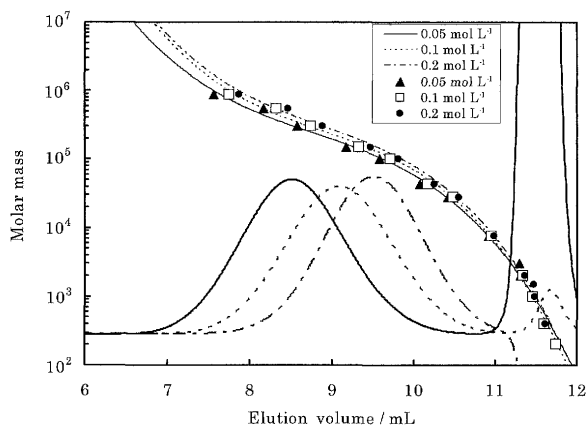


Fig. 6 Chromatograms of PAA-1 and calibration curves of PEO and PEG with TSKgel G6000PW_{XL}-CP column by 0.05, 0.1, and 0.2 mol/L -NaNO₃ solution for eluent

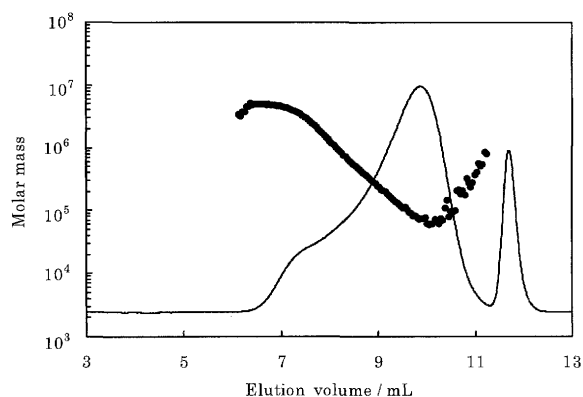


Fig. 7 Chromatogram and molar mass plots of PAA-2 with TSKgel G6000PW_{XL}-CP column by 0.1 mol/L -NaNO₃ solution for eluent

と、これらと同一条件で測定した PEO 及び PEG 標準試料により得られた較正曲線を Fig. 6 に示す。また、これらの較正曲線によって求められた標準 PEO 及び PEG 換算の重量平均分子量 (Mw) を Table 1 に示す。PEO 及び PEG は非イオン性ポリマーであるため、その溶出挙動は、溶離液中の塩濃度の影響はほとんど受けない。したがって Table 1 から明らかなように、溶離液中に添加された塩濃度が増加すると、試料のみの分子サイズが小さくなって溶出体積が

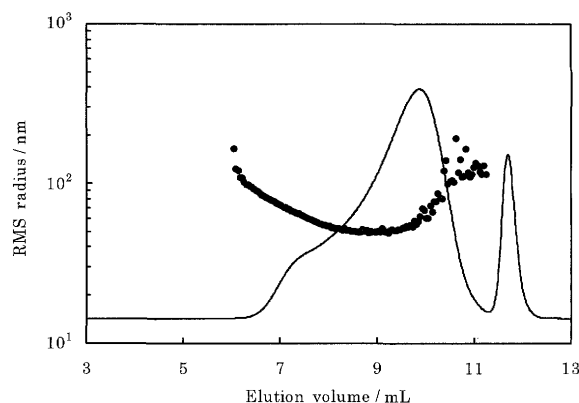


Fig. 8 Chromatogram and RMS radius plots of PAA-2 with TSKgel G6000PW_{XL}-CP column by 0.1 mol/L -NaNO₃ solution for eluent

小さくなり、結果として得られる換算分子量が小さくなる。これに対し、SEC/MALS 法によって得られる平均分子量は塩濃度によらず一定であることから、SEC 法に対する SEC/MALS 法の優位性が示されたと考えられる。なお、今回は、試料がカラムから全量溶出していると考えられるが、イオン性ポリマーの SEC/MALS 測定の場合、溶離液条件によっては試料の一部がカラム充填剤に吸着し、完全に溶出しな場合もある。このような状況では、SEC/MALS から正しい絶対分子量が得られない場合もあり得るので注意が必要となる。

3・3 溶出挙動に及ぼす流量の影響

TSKgel G6000PW_{XL}-CP を用い、溶離液中の硝酸ナトリウムの濃度を 0.1 mol/L として PAA-2 について測定した結果、得られた濃度曲線と絶対分子量の関係、濃度曲線と回転半径の関係、及び絶対分子量と回転半径との関係を Fig. 7~9 に示す。Fig. 8 では、PAA-2 は、PAA-1 と比較して、溶出容量が約 9 mL より大きくなると、回転半径が増加するという、通常のサイズ排除機構とは逆の傾向を示している。また、Fig. 9 に示す絶対分子量と回転半径との関係については、一般的な直鎖ポリマーの場合、傾きが約 0.6 の直線となり、長鎖分岐を有するポリマーでは、直鎖ポリマーのプロットよりも下側に、0.6 より小さな傾きのプロットとなることが知られている^{6)~8)}。しかし、PAA-2 は上方

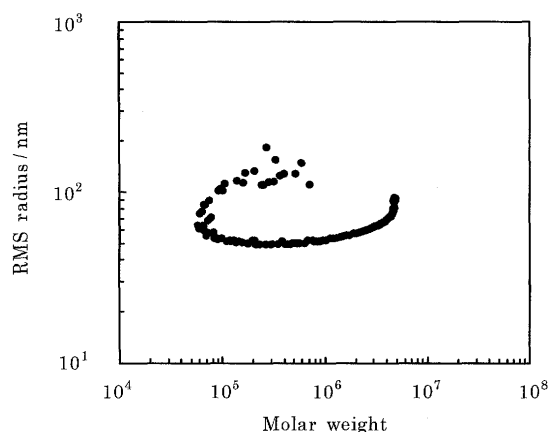


Fig. 9 RMS radius versus molar mass plots of PAA-2 with TSKgel G6000PW_{XL}-CP column by 0.1 mol/L- NaNO_3 solution for eluent

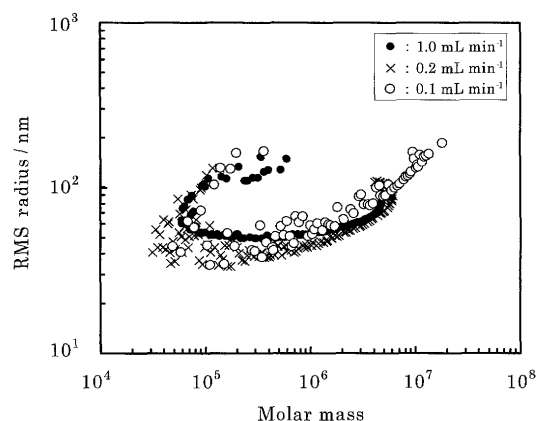


Fig. 11 The effect of the flow rate on RMS radius versus molar mass plots of PAA-2 with TSKgel G6000PW_{XL}-CP column by 0.1 mol/L- NaNO_3 solution for eluent

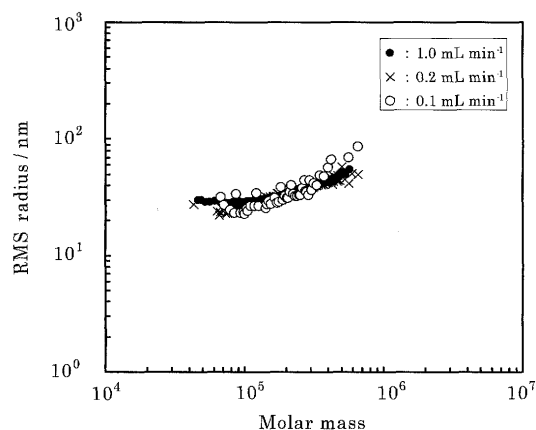


Fig. 10 The effect of the flow rate on RMS radius versus molar mass plots of PAA-1 with TSKgel G6000PW_{XL}-CP column by 0.1 mol/L- NaNO_3 solution for eluent

に弧を描くような特異的なプロットが得られた。すなわち、PAA-2については、異常な溶出挙動を示していると考えられる。

SEC/MALS法で得られるそれぞれの溶出容量における分子量は、検出器をごく短時間に通過した成分の重量平均値であり、また、回転半径は z 平均値である⁹⁾。重量平均分子量の場合は、その統計式的特性から、高分子量成分が微量でも存在すると、この影響を受け、平均値が通常の算術平均の分子量(数平均分子量)と比較してより大きくなる性質がある。更に z 平均である回転半径の場合は、大きな分子が微量でも存在すると、平均値が著しく大きくなる性質がある。このことから、溶出が遅れた大きい分子が微量存在すると、溶出容量の後半では、得られる絶対分子量は大きい値へ、更に回転半径は、より大きい値となると考えられる。PAA-2については、微量の高分子量成分が遅れて

溶出し、絶対分子量、及び回転半径が増加する傾向が見られ、その結果としてFig. 9に示すような特異的なプロットが得られた可能性が考えられる。

同様の溶出挙動については、Podzimekら¹⁰⁾、Fraterら¹¹⁾も報告しており、このような異常溶出を示す試料について、絶対分子量と回転半径との関係が流量依存性を示すと報告されている。そこで、PAA-1、及びPAA-2について、流量を1.0, 0.2, 0.1 mL/minとした場合の絶対分子量と回転半径との関係を求めた。得られた結果をFig. 10~11に示す。今回、異常な溶出挙動を示さなかったPAA-1については、プロットに流量依存性は見られない。これに対し、PAA-2については、流量を低下させるにつれて、プロットが直線に近づく傾向が見られた。この結果から、PAA-2については、流量の低下に伴って遅れて溶出する高分子量成分が減少する傾向にあると考えられる。このような挙動を示す理由について、Podzimekら¹⁰⁾、Fraterら¹¹⁾は、ポリマー中の高度な長鎖分岐の存在のためと結論している。しかし本研究において、PAA-2については、詳細な構造解析を行っておらず、今回の異常な溶出挙動や流量依存性が、ポリマーの長鎖分岐構造に起因するものかどうかは明らかではない。

4 結 言

SEC/MALS法により、カチオン性ポリマー専用水系SECカラムを用いて、ポリアリルアミン塩酸塩の溶出挙動について検討を行った。その結果、本カラムを用いた場合、中性塩を添加しただけの溶離液を用いても、ポリアリルアミン塩酸塩は、良好なサイズ排除機構で溶出していることが確認された。

ポリアリルアミン塩酸塩は、溶離液中の塩濃度の増加により、回転半径が小さくなることが確認された。この結果

は、較正曲線を用いる SEC 法で標準ポリマー換算分子量を求める際に、溶離液条件によって異なる分子量が得られてしまうという問題を生じることを示唆しているが、SEC/MALS 法を用いることにより、塩濃度に影響されず、一定の平均分子量を得ることが可能となる。

(2007 年 11 月第 12 回高分子分析討論会において発表)

文 献

- 1) S. Mori, H. G. Barth : "Size Exclusion Chromatography", p. 11 (1999), (Springer).
- 2) E. M. Meyer, S. R. Vasconcellos : ACS Symposium Series, **548**, 131 (1994).
- 3) D. J. Nagy : "Column Handbook for Size Exclusion Chromatography", Edited by C. Wu, p. 559 (1999), (Academic Press).
- 4) 徳永邦行, 津田輝彦, 森山弘之 : 第 12 回高分子分析討論会予稿集, p. 113 (2007).
- 5) 徳永邦行, 津田輝彦, 森山弘之 : 東ソー研究報告, **51**, 57 (2007).
- 6) V. Kasparkova, E. Ommundsen : *Polym.*, **34**, 1765 (1993).
- 7) T. Housaki, K. Satoh : *Makromol. Chem. Rapid Commun.*, **9**, 257 (1988).
- 8) S. Podzimek : *American Laboratory*, **34**, 38 (2002).
- 9) S. Mori, H. G. Barth : "Size Exclusion Chromatography", p. 116 (1999), (Springer).
- 10) S. Podzimek, T. Vlcek, C. Johann : *J. Appl. Polym. Sci.*, **81**, 1588 (2001).
- 11) D. J. Frater, J. W. Mays, C. Jackson : *J. Polym. Sci. : Part B, Polym. Phys.*, **35**, 141 (1997).

The Molar Mass Measurement of Poly(allylamine hydrochloride) by Size Exclusion Chromatography/Multi Angle Light Scattering Method

Nobuyuki KAGAWA¹ and Kuniyuki TOKUNAGA²

¹ TOSOH Analysis and Research Center Co., Ltd., 1-8, Kasumi, Yokkaichi-shi, Mie 510-8540

² TOSOH Corporation, 4560, Kaisei-cho, Syuunan-shi, Yamaguchi 746-8501

(Received 28 October 2008, Accepted 4 February 2009)

In SEC (size exclusion chromatography) measurements of cationic polymers, such as poly(allylamine hydrochloride), it is important to suppress any ionic interaction or hydrophobic interaction between a sample and a column packing material. In this study, regarding a new SEC column for exclusive use in cationic polymer analysis, which had been developed for this purpose, the elution behavior of polyallylamine hydrochloride was evaluated using the SEC/MALS method. When the NaNO₃ concentration in the eluant was 0.05, 0.1 or 0.2 mol/L, elution with an excellent size-exclusion mechanism was confirmed for each case. In addition, it was clarified that following an increase in the salt concentration in the eluant, the radius of gyration of poly(allylamine hydrochloride) decreased, resulting in an increase in the elution volume. This fact suggests that, due to an increase in the ion concentration existing in the elutant, each others' repulsion among the cationic functional groups in the polymer molecules was suppressed.

Keywords : poly(allylamine hydrochloride); cationic polymer ; SEC ; MALS.