

単分散ポリマー粒子を用いた高分離能HPLC用カラムの開発

Development of High-Resolution HPLC Columns packed with monodisperse polymer particles



日立化成テクノサービス株式会社
ファインケミカル部門
機能材料開発グループ

佛願 道男

共同執筆者
沼尾和幸*1, 櫻井恵太*1

1. はじめに

粒径 3 ~ 20 μm のポリマー粒子は分析用途に広く適用されており、筆者らは、ポリマー粒子合成技術を基に大気捕集管、固相抽出材、HPLC 用カラム等の環境分析ツールを開発している。大気捕集管では大気中のホルムアルデヒド、NO_x、VOC 等の用途に加え、ポリマー粒子多孔化技術、低バックグラウンド技術を活かし個人暴露、作業環境用の捕集管を開発検討中である。固相抽出材では疎水吸着、イオン交換、キレート等の機能を付与したポリマー粒子を用いた固相抽出材を開発した。これらは水質、医薬品等の濃縮、分析に広く用いられている。HPLC 用カラムは 1980 年頃から開発を開始し、有機溶媒系分析用・分取用 SEC カラム、糖・有機酸用カラム、水系 SEC 用カラム、逆相分配用カラム、イオンクロマトグラフィー用カラム等ポリマー系カラムを順次製品化している。

これらの製品では懸濁重合でポリマー粒子を合成し、篩や風力による分級で粒度分布を揃えていた。しかし近年、製品の特性向上のため、粒子の小粒径化、粒度分布のシャープ化が求められ、分級なしで粒度分布が揃うシード重合法による単分散粒子¹⁾が注目されている。そこで、シード重合法による単分散粒子(以下、単分散粒子と称す)のカラム適用検討を行い、カラムの高性能化を図ったので、その内容を報告する。

2. 単分散粒子

シード重合法による単分散粒子の合成方法概要を図 1 に示す。ソープフリー乳化重合²⁾により 0.4 ~ 1 μm の種粒子を作製し、そこに、モノマーや細孔調節剤を吸収させ、10 ~ 500 倍に膨潤後、熱重合で粒子形状を保った状態で重合させる³⁾。この単分散粒子と懸濁重合後、及びその分級後の粒子の粒度分布比較例を図 2 に、単分散粒子の SEM 写真を図 3 に示す。

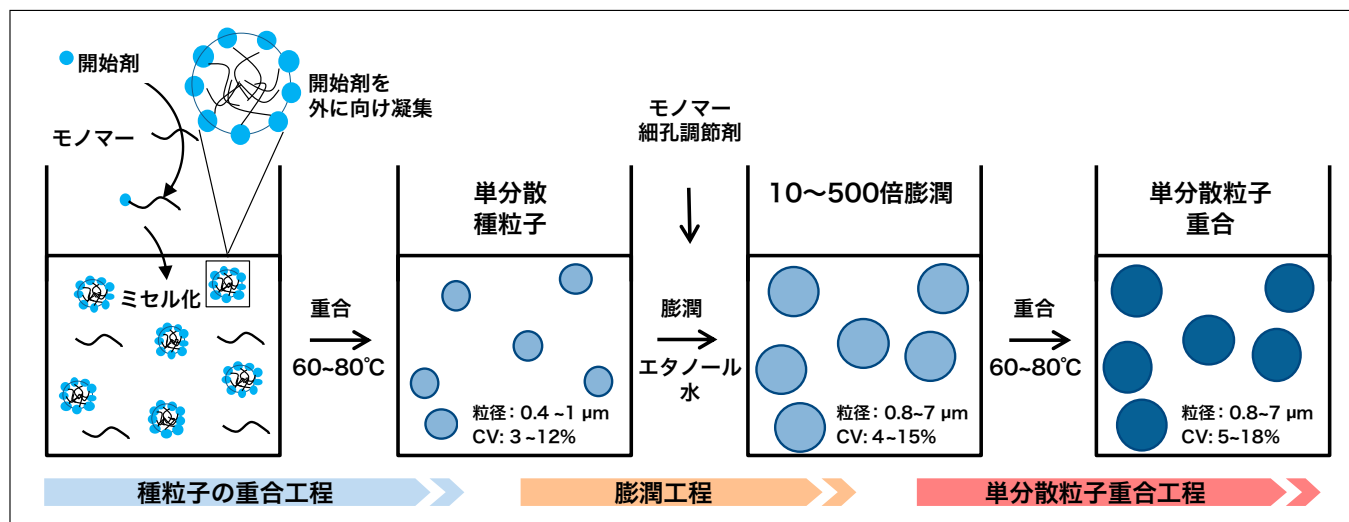


図1 単分散粒子の合成法(シード重合法)

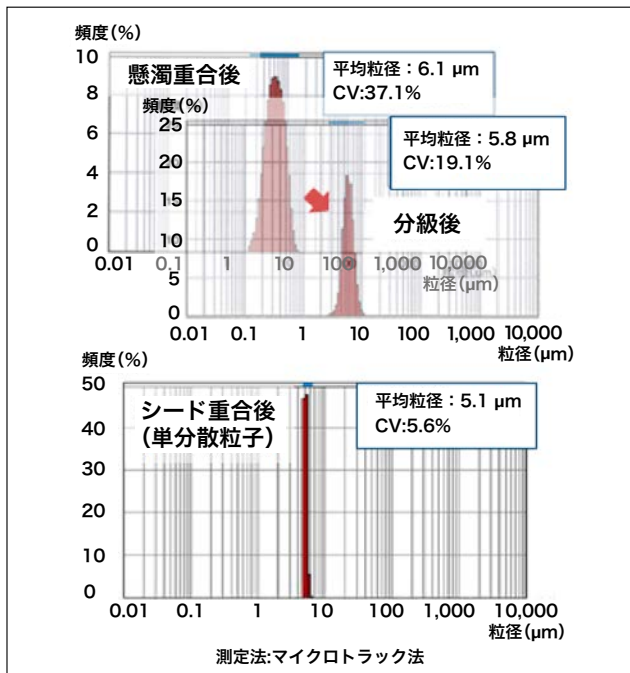


図2 懸濁重合粒子と単分散粒子との粒度分布比較例

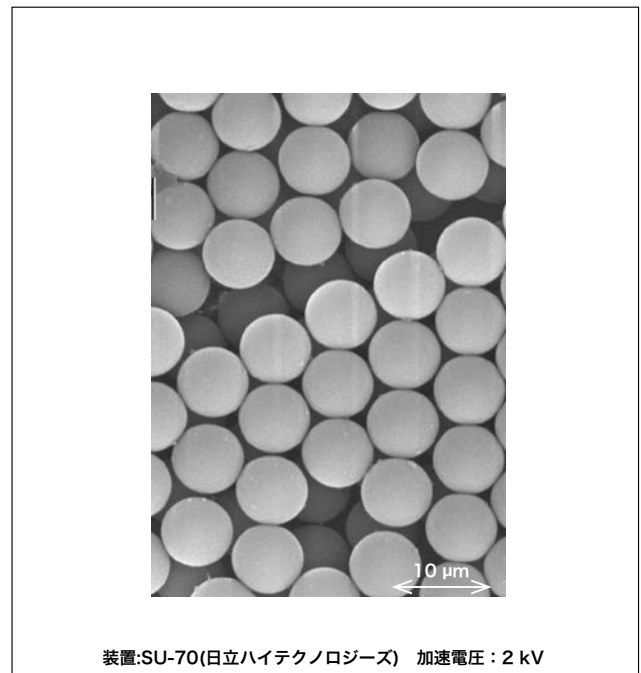


図3 単分散粒子のSEM像

図2、図3より、単分散粒子の粒度分布のシャープさの指標 CV (標準偏差 / 平均粒径 × 100) は、懸濁重合による粒子及びその分級粒子に比べて小さいことが分かる。

懸濁重合法に比べ、シード重合法で粒度分布がシャープな単分散粒子を得られることを確認したので、親水性アクリル系とスチレン系の単分散粒子を合成し、それぞれ、蛋白質分析用 SEC カラム、有機化合物分取用 SEC カラムへの適用を検討した。

3. 分析用SECカラム

3-1 粒子特性

蛋白質の SEC 分析用に親水性アクリルモノマーを用い、シード重合法で単分散粒子を合成した。単分散粒子は理論段数向上のため、平均粒径は 3.5 μm と懸濁重合粒子の 9.5 μm に比べ小さく、また、カラム圧低減を考慮し架橋性モノマー比を高く設計した。この単分散粒子 (W540-SM) と、懸濁重合後に分級 (8 μm ~ 12 μm) した粒子 (現行 SEC カラム Gelpack W540S 用) の特性を表1に、粒度分布を図4に示す。CVは5.8%と懸濁重合分級粒子より小さな値を示し、また、架橋性モノマー比増加による膨潤度低減が確認できた。

表1 アクリル系粒子の特性

粒子	架橋性 モノマー比 ***	平均粒径 **** (μm)	CV (%)	膨潤度 *****
W540-SM*	1.7	3.5	5.8	1.2
W540S**	1.0	9.5	23.7	1.3

* シード重合法の単分散粒子

** 懸濁重合法の粒子

*** W540Sの架橋性モノマー量を1.0としたときの値

**** マイクロトラック法により測定

***** アセトンの膨潤体積を測定 膨潤度=膨潤体積/乾燥体積

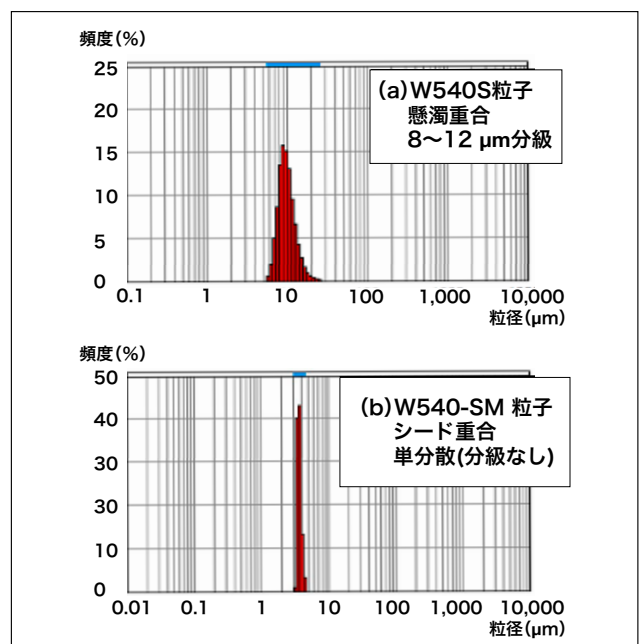


図4 懸濁重合粒子と単分散粒子との粒度分布

3-2 カラム特性

上記の単分散粒子を分級することなくφ 4.6×150 mm のステンレス製カラムに充填し、カラム (W540-SM) を作製後、その特性を装置 1 (HPLC) と装置 2 (UHPLC) を用い評価した。表 2 に理論段数とカラム圧を、図 5 にクロマトグラムを示す。現行 Gelpack W540S のカラムサイズはφ 7.8×300 mm とカラムサイズが違うためカラム理論段高さ (H) を性能指標として表 2 に併記した。現行カラム Gelpack W540S では装置 1, 2 とも理論段高さ 23 μm (理論段数 13,000) と変化がなかった。一方、W540-SM では装置 1 では理論段高さ 21 μm (理論段数 7,100) と現行品と大きく変わらなかったが、装置 2 で測定すると理論段高さが 9 μm (理論段数 16,000) と大幅に向上し、理論値に近くなった。装置 1 は、装置 2 に比べ、セルサイズと流路径が小さいため、装置内での拡散が少なく⁵⁾、小粒子単分散カラム W540-SM 本来の特性が発現したものとする。したがって、今後、3.5 μm 程度の単分散粒子を用いる分析用カラム開発に当たっては評価装置との適合性が重要と思われる。

表2 分析用SECカラムの特性

カラム	カラムサイズ (mm)	流速 (mL/min)	装置1**測定値			装置2**測定値			理論値 ⁴⁾	
			理論段数 N***	理論段高さ H**** (μm)	カラム圧 P (MPa)	理論段数 N	理論段高さ H (μm)	カラム圧 P (MPa)	理論段数 N	理論段高さ H (μm)
		線速度 (mm/sec)								
W540-SM	φ4.6×150	0.35 (0.35)	7,100	21	2.8	16,000	9	3.5	21,000	7
W540S	φ7.8×300	1.00 (0.35)	13,000	23	2.2	13,000	23	2.4	17,000	18

* 装置1: HPLC LaChrom Elite (日立ハイテクサイエンス), UV検出器 (セル容量: 13 μL), 配管径: 0.3 mm

** 装置2: UHPLC ChromasterUltra Rs (日立ハイテクサイエンス), DAD (ダイオードアレイ) 検出器 (セル容量: 2.2 μL), 配管径: 0.1 mm

*** N=5.54x (保持時間/半値幅)

**** H (μm) =カラム長さ (μm) /N

測定条件: 溶離液: 1/15リン酸ナトリウム(pH7)+0.2 M NaCl, 試料: 1%アラニン, 注入量: 5 μL

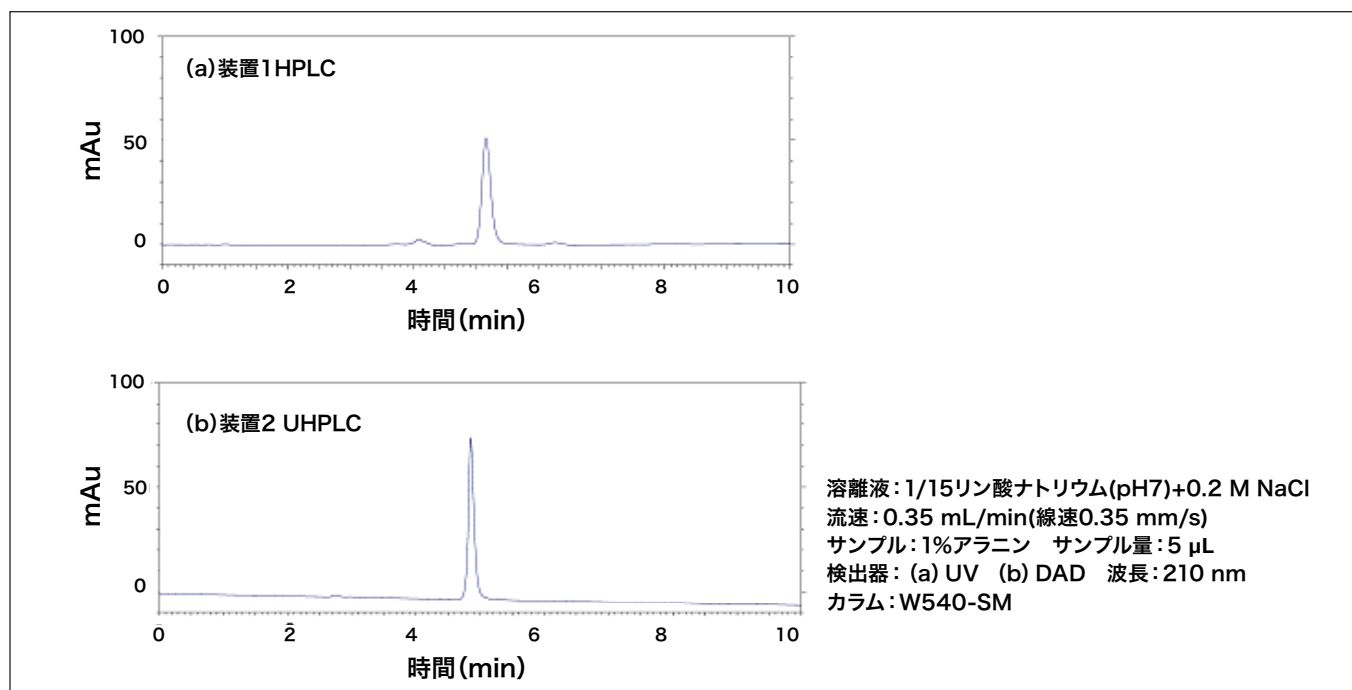


図5 装置によるクロマトグラム比較

4. 分取用SECカラム

4-1 粒子特性

有機化合物のSEC分取用にスチレン系モノマーを用い、シード重合法で排除限界違いの単分散粒子2種を合成した(P212MD, P213MD)。単分散粒子は理論段数向上のため平均粒径は8 μmと懸濁重合粒子の14 μmに比べ小さく、また、カラム圧低減を考慮し架橋性モノマー比を高く設計した。これらの単分散粒子と、10 ~ 20 μmに分級した現行SECカラム(分取用Gelpack P212, P213)用懸濁重合粒子の特性を表3に、P212L, P212MDの粒度分布を図6に示す。そのCVは7.2 ~ 7.6と懸濁重合分級粒子の18.6 ~ 25.0より小さな値を示し、また、架橋性モノマー比増加による膨潤度低減が確認できた。

表3 スチレン系粒子の特性

粒子	架橋性モノマー比***	平均粒径****(μm)	CV(%)	膨潤度*****
P212MD*	3.8	8.0	7.2	1.3
P213MD*	3.8	8.2	7.6	1.2
P212L**	1.0	14.6	18.6	2.1
P213L**	1.3	13.6	25.0	2.1

*シード重合法により合成した単分散粒子

**懸濁重合法により合成した粒子

*** P212Lの架橋性モノマー量を1.0としたときの値

****コールターカウンタ法で測定

*****メスシリンダで膨潤体積を測定 膨潤度=膨潤体積/乾燥体積

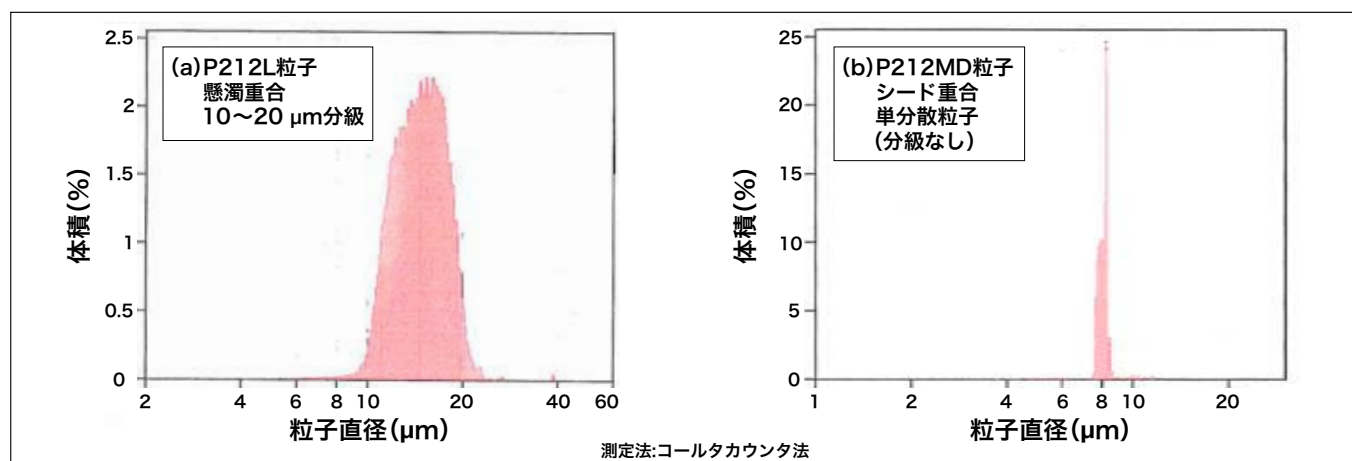


図6 懸濁重合粒子と単分散粒子との粒度分布比較例

4-2 カラム特性

これらの単分散粒子及び懸濁重合粒子をそれぞれφ20×600 mmのステンレス製カラムに充填し、カラム(P212MD, P213MD, P212L, P213L)を作製後、その特性を評価した。表4に理論段数及びカラム圧を示す。

表4 分取用SECカラムの特性

カラム	理論段数N	測定値*		理論値**
		ピーク対称度 fas	カラム圧P(MPa)	理論段数N
P212MD	40,000	1.1	2.1	38,000
P213MD	41,000	1.1	2.1	37,000
P212L	17,000	1.0	2.4	21,000
P213L	24,000	1.0	1.7	22,000

* 試料0.1%ベンゼン500 μL, 溶離液:クロロホルム
流速:7.5 mL/min, 装置:LC-9101 (日本分析工業)

**N=カラム長さ/粒子径×2

単分散粒子を用いた P212MD, P213MD の理論段数はそれぞれ 40,000 段, 41,000 段となり, 現行の 2.3 倍程度の高理論段数が得られた。粒度分布がシャープなため, 粒径から計算した理論値とほぼ一致している。また, 架橋性モノマー比を高くしたため, 小粒径化しても圧力は従来カラムと同等であった。P212MD, P213MD について較正曲線を作成し, 排除限界分子量は P212MD が 5,000, P213MD が 20,000 であることを確認した (図 7)。

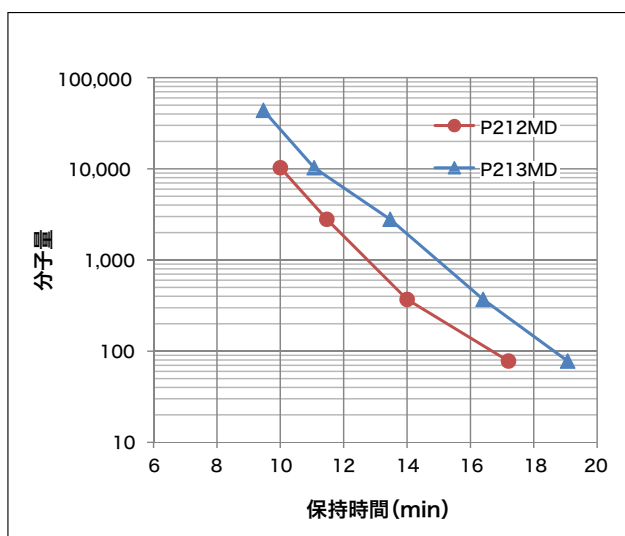


図7 較正曲線

次に単分散粒子カラムについて流速と理論段数との関係を調べた。その結果とクロマトグラムを図 8, 図 9 に示す。P212MD, P213MD とも通常の流速の 2 倍の 15 mL/min で通液しても理論段数は 30,000 段を超えていた。架橋性モノマー比を高くしたため, 高流速条件で分析時間が半減でき, 単分散かつ小粒径のため, 高分離が可能になったと考えられる。

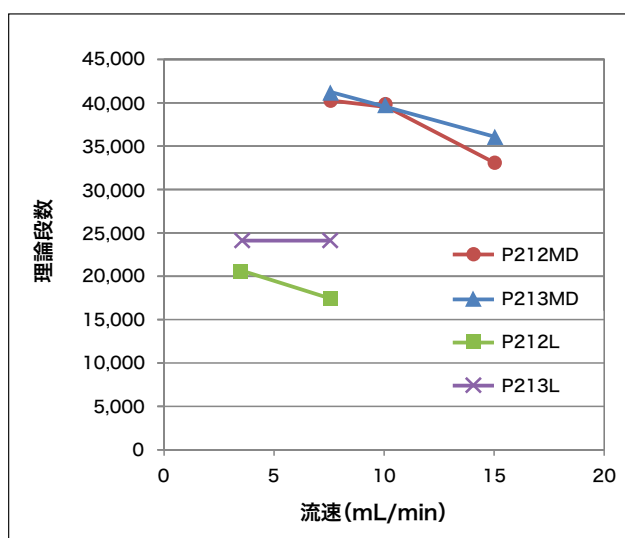


図8 流速と理論段数との関係

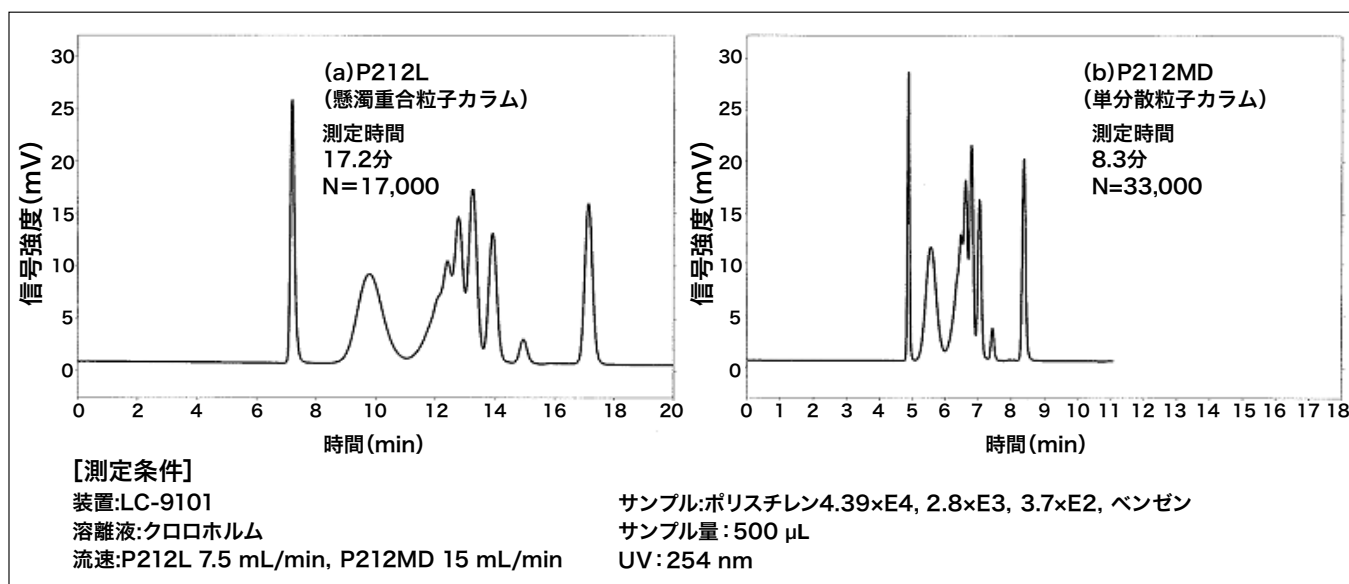


図9 懸濁重合粒子と単分散粒子カラムとのクロマトグラムの比較

5. おわりに

単分散ポリマー粒子の HPLC カラム適用を検討した。

- ・親水性アクリル系単分散粒子を ϕ 4.6×150 mm のカラムに充填した蛋白質分析用 SEC カラムは、UHPLC 測定で理論段高さが 9 μ m (現行カラム 23 μ m) となった。
- ・スチレン系単分散粒子を ϕ 20×600 mm のカラムに充填した有機化合物分取用 SEC カラムは理論段数 40,000 段 (現行カラム 20,000 段) で、流速を 15 mL/min と現行カラム条件の倍にしても理論段数は 33,000 段以上を示した。

以上のように、単分散粒子を HPLC カラムに適用することにより、分離能やスループット等のカラム特性の大幅な向上が期待できる。

6. 今後の予定

蛋白質分析用 SEC カラムは分離特性と装置との適合性検討、有機化合物分取用 SEC カラムは排除限界 10^5 相当品の作製検討を行い、早期の上市をめざしている。

参考文献

- 1) S. T. Camli, E. Unsal, S. Senel, A. Tuncel, *Journal of Applied Polymer Science*, 92, 3685-3696 (2004)
- 2) 今野 幹男, 「ソープフリー乳化重合による単分散ポリマー粒子の合成」, 日本ゴム協会誌, 79, 61-66 (2006)
- 3) Kazuhiro Shibuya, Daisuke Nagao, Haruyuki Ishii, Mikio Konno, *Polymer*, 55, 535-539 (2014)
- 4) A. Fallon 他, 「高速液体クロマトグラフィ」, 東京化学同人, 9-22 (1989)
- 5) Masahito Ito, Kosaku Toyosaki, Katsutoshi Shimizu, *Chromatography*, 28, 101-104 (2007)

共同執筆者

*1) 沼尾和幸 櫻井恵太

日立化成テクノサービス株式会社 ファインケミカル部門機能材料開発グループ