

アプリケーションノート

# Advanced Polymer Chromatography™ を使用した水溶性バイオポリマーにおける溶媒誘起性イオン性相互作用の調査

Claudia Lohmann, Ekaterina Sobich, Samuel Kyeremateng, Esther Bochmann

Waters Corporation, AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG

## 要約

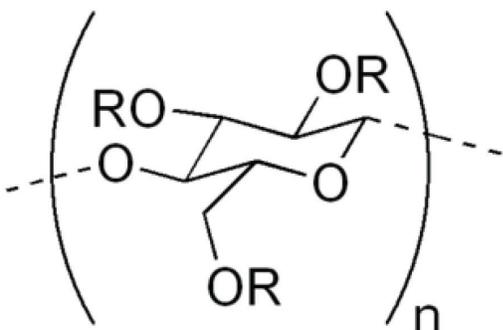
水溶性で無毒のバイオポリマーであるカルボキシメチルセルロースナトリウム (NaCMC) は、多くの業界で、食品やバイオ医薬品などのさまざまな製品に使用されています。その肥厚性と機械的特性および粘弾性特性は、分子量と置換の程度に左右され、溶解度に影響を与えます。最適な性能を得るためには、NaCMC を製品に取り入れる前に適切な特性解析を行うことが重要です。イオン性という性質上、特性解析に適した移動相を見つけることが困難になります。この試験では、時間のかかる従来のサイズ排除クロマトグラフィーに別れを告げ、移動相を迅速にスクリーニングして、2種類の粘度グレードの5つの NaCMC サンプルの分子量を決定するための、Advanced Polymer Chromatography™ システムを使用した分析法開発に焦点を当てています。試験を行った移動相とポリマーの間のイオン性相互作用の結果、大幅に異なるクロマトグラフィーレスポンスが見られました。中性 pH および高塩濃度でイオン性相互作用が最小になり、最も良好なクロマトグラフィー性能が示されました。

## アプリケーションのメリット

- APC は、効率的かつ迅速な分析法開発のための貴重なツールであることが証明済み
- BEH AQ カラムにより、広い pH 範囲で低 RSD の再現性のある結果を実現

## はじめに

さまざまな業界において、長年にわたり、セルロースおよびその誘導体などのバイオベースのポリマーが、製品や工程中に着実に増加しています<sup>1</sup>。ネイティブなセルロースは使用が難しいため、多くの場合、溶解性や粘度などの物理化学的性質が変わるように修飾されます。修飾セルロースの一例として NaCMC があります。1 カルボキシメチルナトリウム置換では、グルコース単位あたり最大 3 ヶ所の修飾が可能です（図 1）。



R = H または CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H

図 1. 置換が可能な部位<sup>2</sup>

異なる修飾工程によって、置換の程度（DS）、つまり、無水グルコース単位あたりの置換カルボキシメチルナトリウム基の平均数が異なります。NaCMC は、食品、医薬品、塗料、セラミックス、石油産業など、多くの分野でますます使用されるようになってきました。NaCMC 水溶液は高粘性の溶液になるため、特に食品や化粧品の増粘、懸濁、安定化特性に利用されています。NaCMC は不均一な化学組成と幅広い分子量（MW）を有する場合があります。NaCMC の分子構造がアプリケーションの特性に及ぼす影響を判定するためには、平均分子量の情報が重要です<sup>2</sup>。NaCMC の産業上の重要性が高まるにつれ、その特性解析のためのさまざまな手法や分析法への関心が高まっています。このセルロース系の多価電解質は、その他の多くの多糖誘導体と同様に、分子量（MW）だけでなく化学組成においても不均一であるため、特性解析が非常に困難です<sup>3</sup>。既存のアプリケーションにおける機能を改善したり、新しいアプリケーションを開発したりするには、DS、MW、レオロジー特性などの物理化学的性質を判定することが不可欠です。DS は、それらの特性の中で、この化合物の溶解度に顕著な影響を及ぼします。置換がなければ、NaCMC は水に容易に溶解します。NaCMC の MW の不均一性およびその分布の測定に関しては、従来のサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）ベースの分析法が主に報告されています<sup>4,5</sup>。しかし、従来の SEC 測定には通常、長い実行時間が必要であり、吸着剤粒子の

サイズが大きく装置に関連するバンド幅が広いために分離が悪く、多くの場合、軽微な MW の不均一性に対してあまり感度が高くありません<sup>6</sup>。UPLC などを用いた SEC 分離ではこれらの欠点が克服されており、過去にはバイオベースのポリマーや半合成ポリマーの特性解析に利用されていました<sup>7</sup>。

サイズベースのクロマトグラフィー手法のための頑健な方法を確立しようとする際には、いくつかの重要な要因を考慮する必要があります。主な要因として、固定相の選択、移動相の選択、サンプル前処理があります。サンプル前処理には社内で作成した分析法を利用し、この試験ではそれ以上調査していません。この試験では、特定の固定相（BEH AQ カラム）における移動相の選択に重点を置きました。

この研究では、Advanced Polymer Chromatography™（APC™）を用いて、NaCMC の MW を高い再現性で決定し、短時間で複数の移動相をスクリーニングして、イオン性相互作用を克服することに重点を置きました。

---

## 実験方法

APC の移動相（pH = 5 の酢酸バッファー、pH = 8.8 の希釈 NaOH、pH = 7 の 0.01 M NaNO<sub>3</sub> + 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>）は、それぞれの量の塩を脱イオン水に溶解して調製しました。pH は、酢酸、塩酸、および/または水酸化ナトリウムで調整しました。

## サンプルの説明

サンプルセットは、2 種類の粘度グレードの 5 つの NaCMC サンプルで構成されています。NaCMC 1 および 2 は高粘度グレード、NaCMC 3～5 は中粘度グレードのサンプルです。100 mg の NaCMC を 10 mL の脱イオン水に 80 °C（70 rpm）、1 時間で溶解させました。溶液を室温に冷却し、溶離液で希釈して 1 mg/mL のサンプル溶液を作成しました。

## LC 条件

LC システム:	ACQUITY APC™
検出:	示差屈折率 (RI)
カラム:	AQ900 Å + AQ 450 Å + AQ 125 Å/AQ 45 Å
カラム温度:	40 °C

サンプル温度:	25 °C
注入量:	10 µL
流速:	1 mL/分および 0.5 mL/分

## データ管理

クロマトグラフィーソフトウェア:	GPC オプションを備えた Empower™ 3
------------------	--------------------------

---

## 結果および考察

移動相として脱イオン水を出発点として選択し、ポリマー間およびポリマー - 表面間相互作用を評価しました。5つの NaCMC サンプルは、図 2 に示すように、スパイクとショルダーのある幅の狭いピークとして、ほぼボイドボリューム ( $V_0$ ) に、同じ保持時間の範囲内で溶出しました。ほぼまったく分離のない初期の溶出は、明らかに、反発によるコイル伸展とイオン排除の複合作用の結果ですこの水中での NaCMC の溶出挙動は、低イオン強度の極性溶媒中の多価電解質に通常見られるものです<sup>9</sup>。水を溶離液として用いた場合の NaCMC のこの溶出挙動は、ゲルベースのカラムで見られる挙動と同じであるため、これらの電荷効果は固定相の種類とは無関係です<sup>9</sup>。

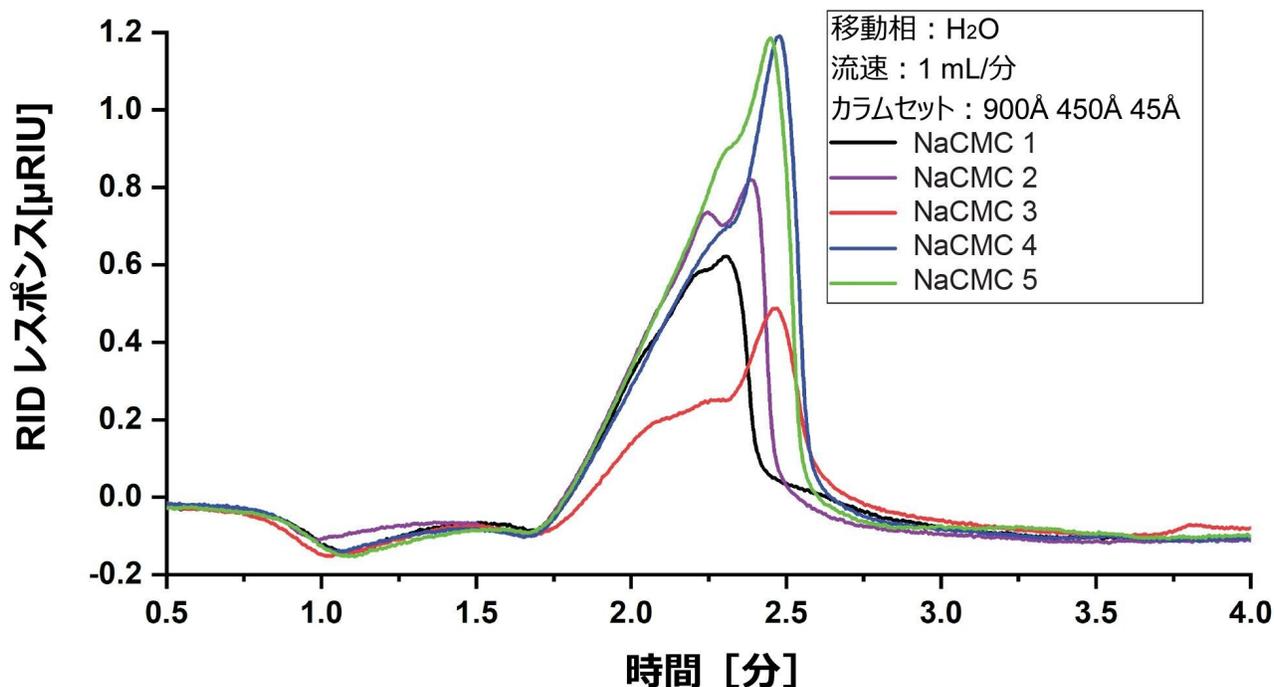


図 2. 水を移動相として使用して分析した NaCMC 1～5 の RI クロマトグラムの重ね描き

NaCMC の多価電解質効果を軽減するために、分析法開発ワークフローの後続のステップでは pH の変更、塩の添加を行い、どの組み合わせがイオン誘発性反発やその他の影響を最も効率的に小さく抑えられるかを調べました。pH 5 の酢酸バッファを使用すると、サンプルのピークの保持時間がわずかに増加し、図 3 に示すようにクロマトグラムに 2 つの特徴的なピークが表れました。1 つ目のピークは NaCMC に対応し、5～6 分の 2 つ目のピークは、サンプルのクロマトグラムにブランクの測定を重ね合わせることにより、溶離液のピークと同定されました。この事実から、脱塩、つまりドナン平衡の結果としてポアから塩が排除されるという可能性が排除されます<sup>3</sup>。メインピークが突然すどく立ち上がっていることから、サンプルのサイズの大きい画分が最大のカラムポアから排除され、分離されずに溶出されたことが示されました。以前の研究によると、NaCMC はバッファ中で会合体を形成します<sup>10,11</sup>。これらの会合体は、カラムのポイドボリュームで溶出する傾向があり、クロマトグラムの急な立ち上がりとなっている可能性があります。水溶性多糖類、特に荷電多糖類の会合体を含まない溶液を調製することは、一般に知られている課題です<sup>11</sup>。サンプルピークのテーリングが、二次的相互作用により生じたものかサンプルの一部である低 MW 画分に対応するものかを見分けることは困難でした。シリカは極性表面であるため、ポリマーとの表面相互作用は非常に少ないと結論付けることができます。ただし、クロマトグラムを詳しく見ると、サンプル NaCMC 2、4、5 では、保持時間 3.5～5 分に 2 番目の集団が存在する可能性が明らかになりました。NaCMC 1 および 3 ではこの特徴的なショルダーが検出されていないため、これがカラムアーティファクトである可能性は除外できます。ショルダーを構成する画分は、サンプル

固有のものと考えられます。全体として、この移動相条件は不十分で、区別が十分にできないと考えられました。

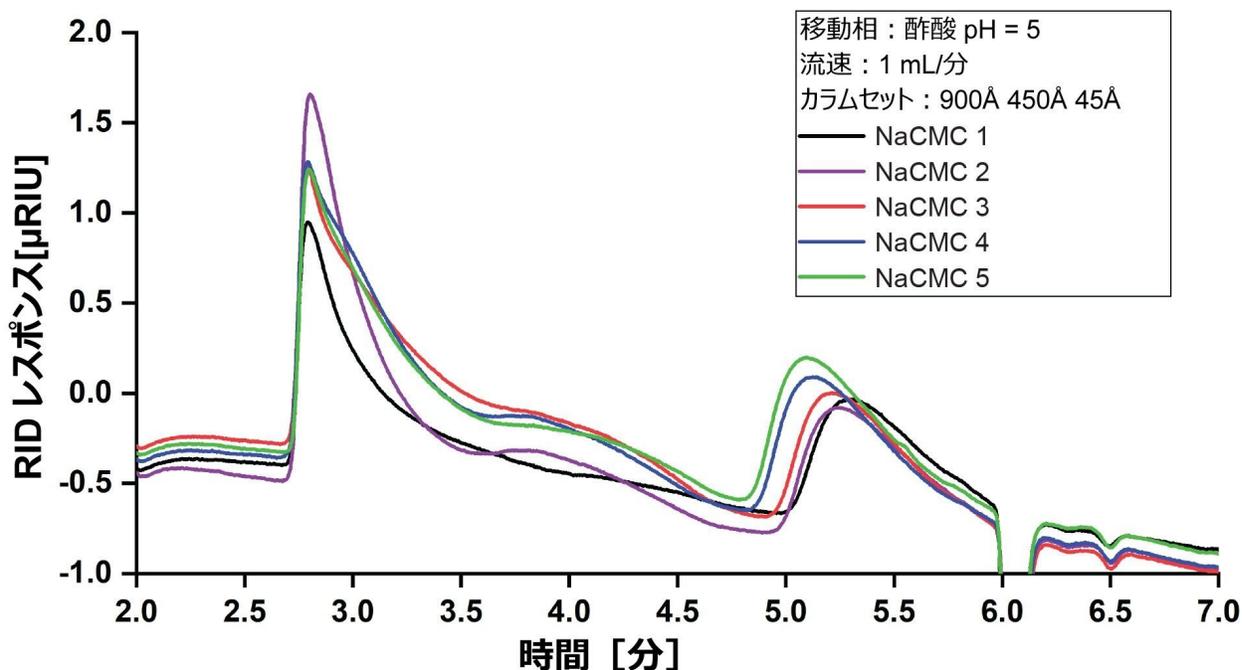


図 3. pH 5 の酢酸バッファー中で分析したすべての NaCMC サンプルの RI 重ね描き

低 pH ではわずかに分離が改善されるのみであったため、pH 8.8 の希釈 NaOH 溶液を図 3 に示すように調べました。pH を高くした意図は、図 3 で見られた多価電解質効果が、流速の低下にとともにさらに減少するかどうかを確認するためでした。ピーク形状は、以前に試験した移動相よりも改善されていました。相互作用はまだ起きていた可能性があります。高 pH がコイル状ポリマー鎖の形状に異なる影響を及ぼしたため、異なる種類の相互作用となりました。ピーク形状は一見均一であったにも関わらず、高 pH の移動相では、粘度グレードの異なる 5 サンプルが顕著に区別されませんでした。また、低 pH の酢酸バッファーでは、2 番目の集団が高 pH で分離されませんでした。このように、高 pH の移動相により分離が著しく促進されることはありませんでした。流速を 1 mL/分から 0.5 mL/分に下げた場合にのみ改善が見られる可能性があります。

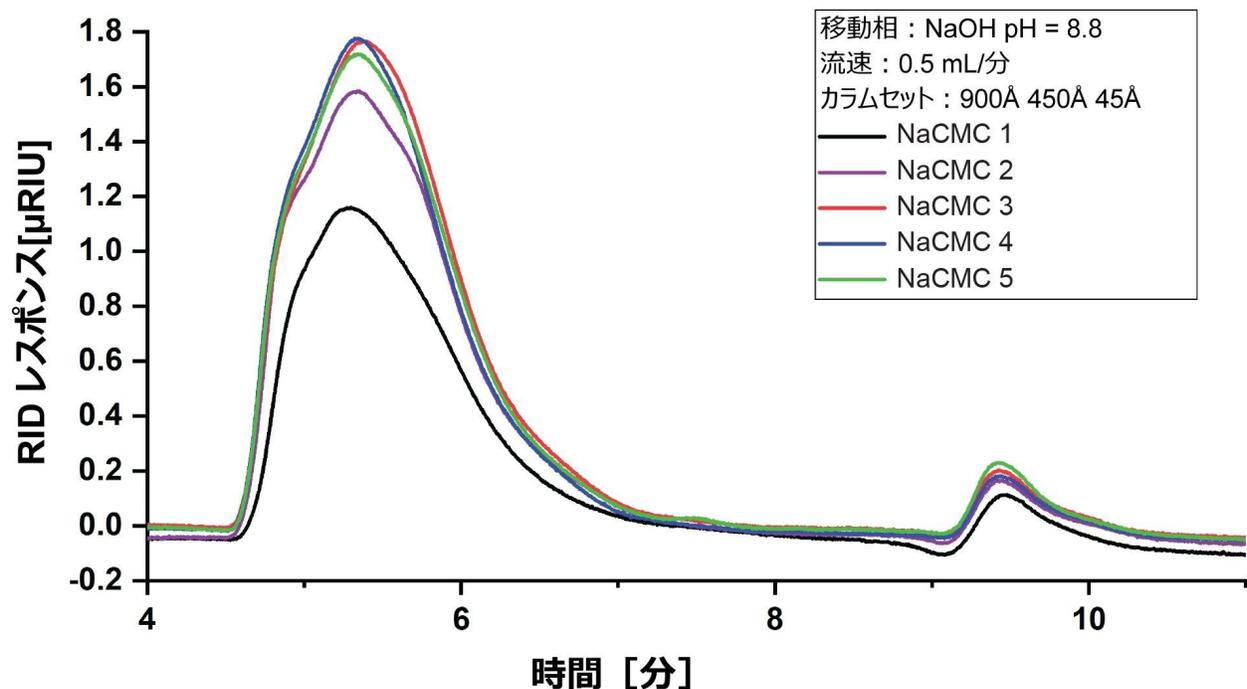


図 4. pH 8.8 の希釈 NaOH 中で分析したすべての NaCMC サンプルの RI 重ね描き

高 pH および低 pH の移動相によって多価電解質の代表的な挙動が十分に抑制されなかった後で、塩を多く含む中性 pH のリン酸 - 硝酸塩移動相の影響を調べました<sup>12</sup>。さらに、以前の試験では AQ 45 Å が使用されていましたが、これを AQ 125 Å カラムに交換しました。分離は 11 分未満で達成されました。図 5 からわかるように、サンプルは、NaCMC 1 以外、2 つの集団に分離しました。これは、低 pH の試験ですで見られていたことです。このことは、NaCMC 1 中の低分子量画分の存在量が、他のサンプルほど多くなかったことを示しています。NaCMC とカラム充填剤の間の望ましくない相互作用は、塩を含む中性 pH 移動相中で実行することにより低減したように見えました。

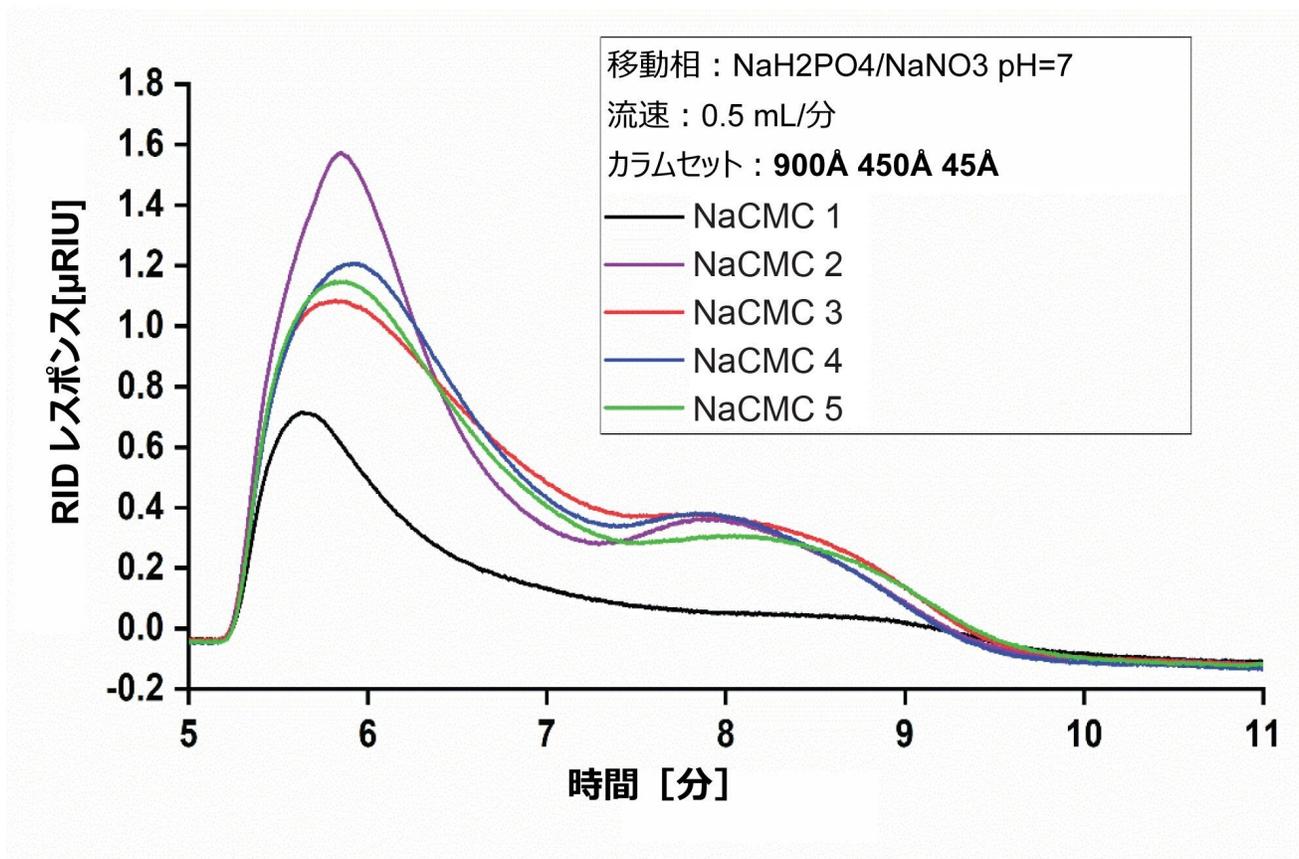


図 5. pH 7 の 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/0.01 M NaNO<sub>3</sub>中で分析したすべての NaCMC サンプルの RI 重ね描き

すべての NaCMC について決定された分子量を表 1 に示します。計算されたサンプルの相対標準偏差 (RSD) は 4.5 未満であり、測定の再現性が優れていることを示しています。さらに、RSD 値が低いことは、せん断によってポリマー鎖が分解しないことを示唆しています。分解が起きていれば、シグナル (クロマトグラム) の再現性が低くなり、RSD 値が高くなるためです。

サンプル	Mn, kDa	%RDS	Mn, kDa	%RDS	Đ
NaCMC 1 (高粘度)	201.5	3.2	1051.9	1.8	5.23
NaCMC 2 (高粘度)	190.2	1.2	905.6	3.3	4.76
NaCMC 3 (中粘度)	151.6	2.8	698.2	3.1	4.61
NaCMC 4 (中粘度)	175.7	4.4	718.1	4.5	4.09
NaCMC 5 (中粘度)	154.0	0.6	750.0	2.6	4.87

表 1. 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / 0.01 M NaNO<sub>3</sub> pH = 7 中のすべての NaCMC サンプルの分子量および標準偏差

予想通り、高粘度グレードのサンプルである NaCMC 1 と 2 は 900 ~ 1,000 kDa の範囲で最も大きい平均分子量 (MW) を示し、中粘度グレードのサンプルは 700 ~ 750 kDa の範囲の MW を示しました。さらに、NaCMC 1 (Đ が 5.23) は NaCMC 2 (Đ が 4.76) と比べて分散度が大きいことがわかります。クロマトグラム (図 4) では目立った明らかな違いを追うことができ、NaCMC 1 は大部分が高 MW 画分であり、少量の低 MW 画分が幅の広いテーリングとして現れていました。これと比較して、NaCMC 2 には、高 MW 画分と、より長い保持時間で溶出した 2 番目のよく分離した低 MW 画分が含まれていました。一方、すべての中粘度グレードのクロマトグラムには高 MW 画分と低 MW 画分の両方が含まれていました。ただし、中粘度グレードの高 MW 画分は高粘度グレードの高 MW 画分と比べて比較的長い保持時間で溶出しました。これらのプロットから、それぞれの粘度グレードのセット内 (特に高粘度グレードのセット (NaCMC 1 と NaCMC 2)) では、同一のロットはないことが明らかになりました。実際、注入の前のサンプルろ過時に、NaCMC 1 溶液の粘度は、NaCMC 2 や他のサンプルよりもはるかに高いことが定性的に観察されました。試験した 4 種類の移動相を比較すると、中性 pH の移動相が、AQ 900 Å+ 450 Å+ 125 Å のカラムと組み合わせた場合に、NaCMC サンプルを最もよく分離できました。

## 結論

すべてのサンプルについて、高塩濃度で、pH 値が低い場合と高い場合のクロマトグラフィー結果を比較したところ、次の点が明らかになりました。

1. 移動相中の塩が増加すると多価電解質効果が減少する
2. pH レベルは、ポリマー間相互作用の軽減にあまり寄与しない
3. 高塩濃度と pH 7 の 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/0.01 M NaNO<sub>3</sub> のような中性 pH の組み合わせにより、すべてのサンプルで、再現性のある MW 数と、区別可能なクロマトグラムが得られた。この移動相では、最も効率的にイオン化効果が抑

制された

4. APC システムにおいて 3 カラムセットでも短い実行時間が達成でき、移動相のスクリーニングに役立ち、時間のかかる溶媒置換が不要になった

---

## 参考文献

1. Shaghaleh H, Xu X, Wang S. Current Progress in Production of Biopolymeric Materials Based on Cellulose, Cellulose Nanofibers, and Cellulose Derivatives. *RSC Adv.* 2018;8:825–842.
2. [https://en.wikipedia.org/wiki/Carboxymethyl\\_cellulose](https://en.wikipedia.org/wiki/Carboxymethyl_cellulose)
3. Shakun, M, Maier, H, Heinze, T, Kilz, P, Radke, W. Molar Mass Characterization of Sodium Carboxymethyl Cellulose by Sec-Malls SEC-MALLS. *Carbohydr Polym.* 2013;95:550–559.
4. Rinaudo M, Danhelka J, Milas M. A New Approach to Characterizing Carboxymethyl Celluloses by Size Exclusion Chromatography. *Carbohydr Polym.* 1993; 21:1–5.
5. Melander, M, Vuorinen T. Determination of Degree of Polymerization of Carboxymethyl Cellulose by Size Exclusion Chromatography, *Carbohydr Polym.* 2001;46:227–233.
6. Porsch, B, Wittgren, B. Analysis of Calcium Salt of Carboxymethyl Cellulose: Size Distributions of Parent Carboxymethyl Cellulose by Size-Exclusion Chromatography With Dual Light-Scattering and Refractometric Detection. *Carbohydr polym.* 2005;59: 27-35.
7. Janco, M, Alexander IV, J N, Bouvier, E S P, Morrison, D. Ultra High-Performance Size-Exclusion Chromatography of Synthetic Polymers. *J Sep Sci.* 2013;36:2718–2727.
8. Perez-Moral, N, Plankeele, J-M, Domoney, C, Warren, F J. Ultra High-Performance Liquid Chromatography-Size Exclusion Chromatography (UPLC-SEC) As an Efficient Tool for the Rapid and Highly Informative Characterisation of Biopolymers. *Carbohydr Polym.* 2018;196: 422–426.
9. Eremeeva T E, Bykova T O. SEC of Mono-Carboxymethyl Cellulose (CMC) In a Wide Range of PH; Mark–Houwink Constants. *Carbohydr Polym.* 1998;36:319–326.
10. Gruber E. Microgel Particles in Solutions of Cellulose and Cellulose Derivatives. *Cellul Chem Technol*, 1979 Jan;3(3):258–278.

11. Kulicke W-M, Reinhardt U, Fuller GG, Arendt O. Characterization of the flow Properties of Sodium Carboxymethylcellulose via Mechanical and Optical Techniques. *Rheo Acta* 1999;38:26–33.
12. Cleaver G. Analysis of Carboxymethyl Cellulose via GPC Viscometry. 2015; [www.agilent.com](http://www.agilent.com) <  
<http://www.agilent.com/>>

## 開示

Ekaterina Sobich、Esther Bochmann、Samuel Kyeremateng は AbbVie の社員であり、AbbVie の株式を保有している可能性があります。Claudia Lohmann はウォーターズコーポレーションの社員であり、開示すべき追加の利益相反はありません。AbbVie が本研究のスポンサーとして資金提供を行い、デザインに寄与し、データの収集・分析・解釈、並びに最終発表の執筆・レビュー・承認にかかりました。

---

## ソリューション提供製品

ACQUITY アドバンスドポリマークロマトグラフィーシステム <<https://www.waters.com/134724426>>

2414 示差屈折率 (RI) 検出器 <<https://www.waters.com/514425>>

Empower クロマトグラフィーデータシステム <<https://www.waters.com/10190669>>

720007774JA、2022 年 10 月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#)   [プライバシー](#)   [商標](#)   [サイトマップ](#)   [キャリア](#)   [クッキー](#)   [クッキー](#)  
[環境設定](#)