

## 1 2.05 サイズ排除クロマトグラフィー

2 サイズ排除クロマトグラフィーは、液体クロマトグラフィー  
3 の分離技術の一つで、溶液中の分子をそのサイズに応じて分離  
4 する手法である。多糖類、核酸、タンパク質及び化学合成ポリ  
5 マーなどの高分子化合物の分子量の確認、分子量分布の確認及  
6 び純度の試験などに使用される。水溶性の高分子を対象とし、  
7 水系の溶媒を移動相として用いる手法は、ゲルろ過クロマトグ  
8 ラフィーとも呼ばれる。有機溶媒を移動相に用いる手法はゲル  
9 浸透クロマトグラフィーとも呼ばれる。ここでは、水系の溶媒  
10 を移動相として用いる手法について記述する。有機溶媒を移動  
11 相に用いる場合も、分離の原理は同様である。

### 12 1. 分離の原理

13 被検成分は、カラムの充填剤に存在する細孔への入りやすさ  
14 に基づいて分離される。最大の細孔より大きなサイズの分子は、  
15 細孔に入らずに充填剤粒子間の空隙を通り速やかに移動し、ク  
16 ロマトグラムのカラムに保持されない物質の保持容量( $V_0$ )の位  
17 置に溶出する。細孔より小さなサイズの分子は、そのサイズに  
18 応じて細孔中に浸透し、小さなサイズの分子ほど、より内部に  
19 浸透するので溶出が遅くなる。全ての細孔に自由に入ることの  
20 できる小さな分子は最も遅く、完全浸透する物質の保持容量  
21 ( $V$ )の位置に溶出する。分子の溶出位置は、分子量だけでなく、  
22 分子の構造、溶媒及び充填剤との相互作用などによっても影響  
23 を受ける。

### 24 2. 装置

25 通例、液体クロマトグラフを用いる。カラムには多孔質の充  
26 填剤を使用する。充填剤として、シリカ粒子の表面に親水性の  
27 修飾を被覆したものや親水性ポリマーを架橋したものなどが用  
28 いられる。充填剤の細孔のサイズ及びその分布により、測定可  
29 能な分子サイズの範囲が異なるので、適切なものを選択する。  
30 測定可能な分子サイズの範囲を広げるため、対象分子範囲の  
31 異なるカラムを連結して用いる場合もある。移動相には緩衝液  
32 などが用いられる。移動相を適切に選択し、サイズ排除の原理  
33 以外の、充填剤と被検成分との相互作用を抑制することが重要  
34 である。充填剤と被検成分との静電相互作用の抑制には、pH  
35 の調整、塩の添加などが、疎水性相互作用の抑制には、有機溶  
36 媒(メタノール、アセトニトリルなど)の添加などが有用である。  
37 移動相の流量、カラム温度、試料注入量及び試料溶液の濃度は  
38 分離に影響を与えるため、適切に設定する。検出器には、紫外  
39 又は可視分光光度計、示差屈折計、静的光散乱検出器、動的光  
40 散乱検出器、蒸発光散乱検出器などが用いられる。通常、分子  
41 量標準物質と溶出位置を比較することにより被検成分の分子量  
42 を求めるが、静的光散乱検出器を用いた場合には、直接溶出液  
43 中の分子の分子量が得られる。

### 44 3. 操作法

45 液体クロマトグラフィー(2.01)に従う。

### 46 4. 分子量の測定

47 サイズ排除クロマトグラフィーにより分子量、平均分子量又  
48 は分子量分布を求める場合には、別に規定するもののほか、試  
49 料溶液及び適切な分子量標準物質を用いて調製した分子量標準  
50 溶液を同一試験条件で測定し、以下のように求める。分子量標  
51 準物質は被検成分と類似の物性を有するものを用いる。得られ  
52 た分子量は、用いた分子量標準物質と分析条件に依存し、分子

53 量標準物質に対する相対値となる。

#### 54 4.1. 単分散被検成分の分子量

55 分子量標準物質に表示された分子量の対数値に対する保持容  
56 量(又は保持時間)の関係をプロットした分子量較正曲線を作成  
57 する。試料溶液のクロマトグラムから得られる保持容量(又は  
58 保持時間)に対応する分子量を分子量較正曲線から読み取る。  
59 通常、被検成分の分子量は、分子量較正曲線の範囲内にあるこ  
60 とが必要である。

#### 61 4.2. 多分散被検成分の平均分子量

62 分子量標準溶液から得られたクロマトグラムより分子量較正  
63 曲線を作成する。試料溶液から得られるクロマトグラムを分割  
64 し、各溶出画分の分子量を分子量較正曲線から読み取り、濃度  
65 又は量を求め、次式により、数平均分子量( $M_n$ )、質量平均分  
66 子量( $M_w$ )及び多分散度( $d$ )を計算する。

67 多分散度は分子量分布の幅の指標となる。

$$69 M_n = \frac{\sum M_i N_i}{\sum N_i} = \frac{\sum C_i}{\sum \frac{C_i}{M_i}} = \frac{1}{\sum \frac{w_i}{M_i}}$$

$$70 M_w = \frac{\sum M_i^2 N_i}{\sum M_i N_i} = \frac{\sum C_i M_i}{\sum C_i} = \sum w_i M_i,$$

$$71 d = \frac{M_w}{M_n}$$

72  $M_i$ :  $i$ 番目の画分の分子量

73  $C_i$ :  $i$ 番目の画分の濃度

74  $N_i$ :  $i$ 番目の画分の分子数

75  $w_i$ :  $i$ 番目の画分の質量分率( $w_i = \frac{M_i N_i}{\sum M_i N_i} = \frac{C_i}{\sum C_i}$ )

#### 76 4.3. 分子量分布

77 分子量分布を表す分布曲線として、横軸に分子量の対数値、  
78 縦軸に質量分率の積分値をプロットした積分分子量分布曲線や、  
79 各分子量における積分分子量分布曲線の傾きを求め、横軸に分  
80 子量の対数値、縦軸に傾きをプロットした微分分子量分布曲線  
81 が用いられる。

82 分子量分布に関する規格は、例えば、質量平均分子量、多分  
83 散度、特定の分子量範囲の分子の質量分率など、目的に応じた  
84 形で示すことができる。

### 85 5. システム適合性及び試験条件の変更に関する留意事項

86 システム適合性の規定及び試験条件の変更に関する留意事項  
87 については液体クロマトグラフィー(2.01)を準用する。

88

89