

GPC/SEC 電子書籍シリーズ

GPC/SEC アプリケーション

ポリマー、生体高分子、およびタンパク質の
分析時に知っておくべきこと



Agilent
InfinityLab

 **Agilent**
Trusted Answers

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ - GPC/SEC アプリケーション

目次

本電子書籍シリーズについて 3

GPC/SEC アプリケーションの紹介 4

1.1. 製品登録と REACH 5

1.2. 定量および平均分子量以上のものの獲得 11

1.3. サイズ排除クロマトグラフィーによるタンパク質の分析 16

1.4. ブロードスタンダードによるキャリブレーション 23

1.5. 高分子量サンプルの分析技術 29

1.6. 分岐の分析 33

1.7. メンブレンフィルタ分析のための GPC/SEC 39

用語集 43

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ - GPC/SEC アプリケーション

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC の「ヒントとコツ」に関する記事は、10 年以上にわたって LC/GC のデジタルマガジン『The Column』の 60 版以上で発表されてきました。これらのヒントとコツは、日常的に GPC/SEC を使用するユーザーをサポートすることを意図し、GPC/SEC の優れた技術についてさまざまな観点から包括的な概要を提供しています。

発表されているトピックスを一覧で提供するために、本電子書籍を作成しました。

本電子書籍のトピックスは次のとおりです。

- GPC/SEC の理論と背景
- GPC/SEC カラム
- GPC/SEC 検出
- GPC/SEC のトラブルシューティング
- GPC/SEC アプリケーション

各電子書籍には、5 ～ 8 個のさまざまなヒントやコツの発表物が含まれており、これらは最新情報、新しい例、および図表で更新されています。

GPC/SEC の新規ユーザーが読みやすいように、コンテンツを編集しています。このため、オリジナルの発表物といくつか異なる箇所があります。

しかしながら、オリジナルの考え方は踏襲しています。各発行物は、ユーザーが興味のある特定の発表物のみを読むことができるように独立した参考資料となっています。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ - GPC/SEC アプリケーション

GPC/SEC アプリケーションの紹介

GPC/SEC は従来のポリマー材料、建築部材、電子化学品、医薬品賦形剤、食品（ハイドロ）コロイド、バイオ医薬品などを扱うあらゆる最新ラボでの確立された分離方法です。

GPC/SEC の成功には次のような複数の理由があります。

- GPC/SEC は、クロマトグラフィーラボから直接、製品特性およびアプリケーション挙動を予測できる結果を提供します。
- R&D、製品開発、品質保証、および（オンライン、アットラインでの）生産管理のアプリケーションに使用される汎用性の高い技術です。
- また、成熟した分離方法で、十分に理解されています。
- 機器およびソフトウェアは、高分子クロマトグラフィーデータシステム (MCDS) 環境において、シンプルなシステム/アプリケーションから情報を豊富に提供する検出器と接続するシステムまで対応可能です。
- 医薬品、食品、化粧品、およびこれらの関連産業などの規制下にあるラボにも対応しており、定評のあるパートナーが最適化されたハードウェア、ソフトウェア、品質サポート、熟練サービスエンジニアを提供し、包括的な適格性評価サービスを含むシステムライフサイクル全体をカバーしています。

GPC/SEC シリーズの本電子書籍のすべてのセクションで、さまざまな興味深い GPC/SEC アプリケーションが詳しく紹介されています。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ - GPC/SEC アプリケーション

1.1. 製品登録と REACH

ポリマー／高分子の大きな利点は、有毒なモノマーから製造されたものであっても無毒とみなされることです。¹ サイズが大きく、また、重合中に反応性官能基が反応するため、ポリマーは通常、(生) 化学的に不活性であると考えられています。

しかし、懸念すべきは、未反応のモノマー、オリゴマー、最終製品の加工性、安定性、品質を改善する補助剤や添加剤です。これらの成分の溶出は深刻な問題の原因となる可能性があります。

したがって、登録機関は詳細な分子量情報のある包括的な特性解析を必要とし、いくつかの製品については extractables and leachables の調査も必要とします。

ポリマー製品の分子量は従来、GPC/SEC を使用して測定していました。分子量が新しい製品が適用される登録カテゴリに影響を与えるため、測定結果は最も重要です。

例えば、分子量によって、新しい製品が「低懸念ポリマー」(PLC) に分類されるかどうか、または製品が登録 (EU REACH などの) の対象となるかが決定されます。

したがって、規制ガイドラインを満たす詳細で適切な分子量データの作成は、登録を成功させるための重要な要素です。

REACH

REACH(化学製品の登録、評価、認可、および制限に関する規則) は 2007 年 6 月 1 日に 施行された EU 規制です。REACH は化学製品の製造、および化学製品が人の健康や環境に与える影響に対処します。欧州では、ポリマーはすべて REACH の下で登録および評価が免除されます。

ポリマーは次の 3 つの規則を使用して定義されています。

- 分子が分子量範囲全体に分布すること
- 3 つ以上のモノマー単位を含む分子の重量パーセントが 50 % を超えること (3M + 1 ルール)
- 同じ分子量の任意の分子の重量パーセントが 50 % を超えないこと

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

重要性についての規制項目は異なるかもしれませんが、世界中のさまざまな REACH のような規制でこの定義が採用されています。例えば、ポリマーは China-REACH では免除の対象ではありません。

物質がポリマーの定義に分類されるかどうかを決定する適切なメソッドは、経済協力開発機構 (OECD) TG 118 で照会される GPC/SEC です。²

製品の分子量が十分に小さい場合、GPC/SEC 分離では多くの場合、図 1 のサンプルクロマトグラムに示されるように、オリゴマーのプロファイルを示します。各単一ピークの同定は、例えば、1 つ以上の既知の参照物質のデータを重ね表示することで可能です。その後、分子量および重量パーセントに関して、各単一ピークが評価されます。例は、1 つの分子量分布 (基準 1 適合) および 1 から 8+ の繰り返し単位を持つ鎖について 8 つの同定されたピークを持つ、ポリオールを示しています。分子量がより大きい (より長い鎖、8+ の繰り返し単位) 場合は、GPC/SEC の分離能ではこの物質を単一ピークに分離できませんでした。この挙動は GPC/SEC では非常に代表的です。分子量が大きくなるほど、より広い幅のピークが観察されます。

表 1 に、同定された 8 つの種の数値結果、および REACH ポリマー定義基準との比較を示します。

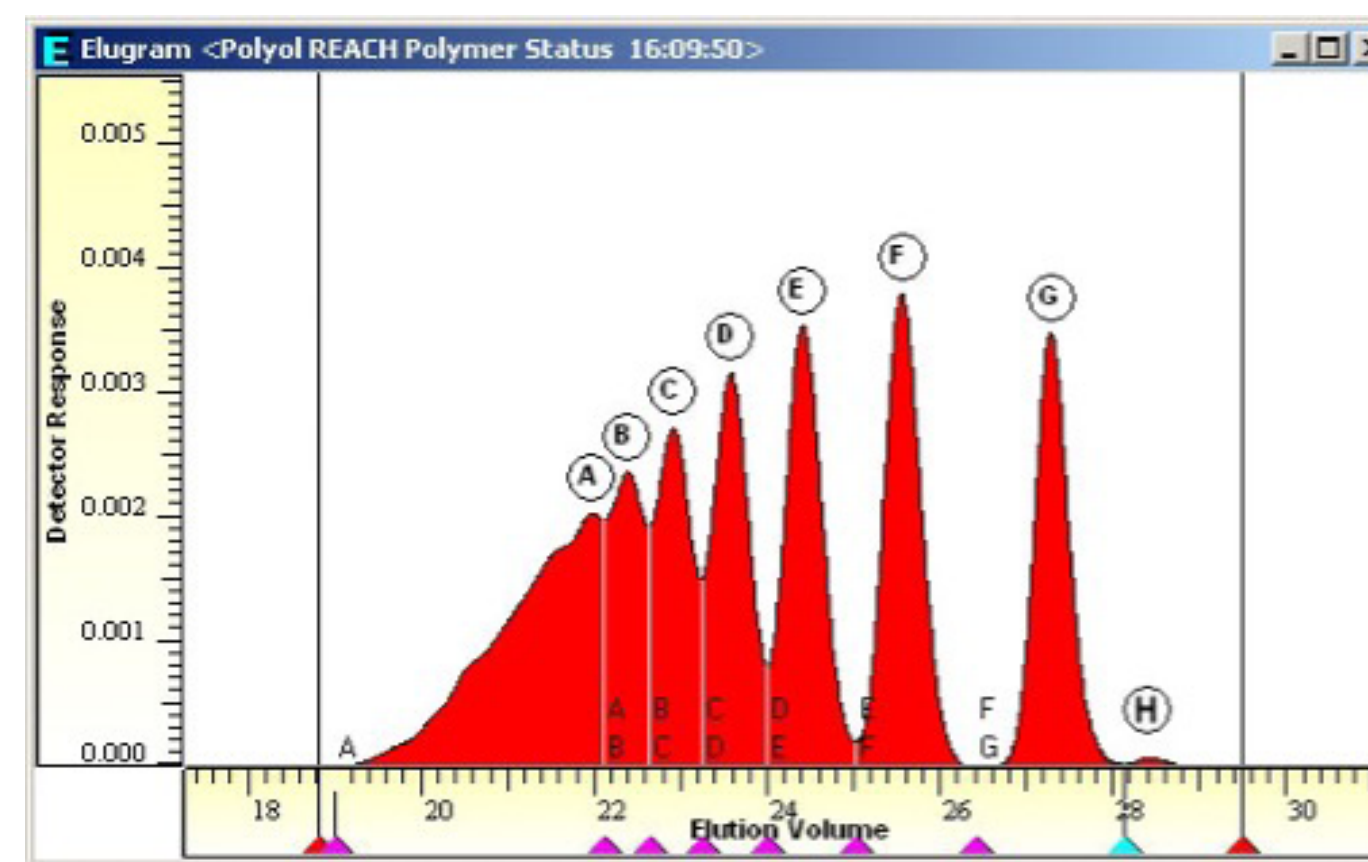


図 1. 1 から 8+ の繰り返し単位を持つ、8+ の同定された各単鎖を持つポリオールのサンプルクロマトグラム

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

ポリオール例	含有率 [%]	分子量 M_p [Da]*	コメント	ポリマー?
ピーク H	0.20	200	R-M、 R-M-M	はい、50 % 未満 (3M + 1)
ピーク G	13.4	490		
ピーク F	15.7	790	R-M-M-M	
ピーク E	14.8	1,090		はい、どの個別の鎖も 50 % 未満
ピーク D	13.3	1,400		
ピーク C	11.0	1,810		
ピーク B	9.30	2,190		はい、分子量分布
ピーク A	22.3	2,550		

表 1. 図 1 の各ピークの分子量および重量パーセントの結果は、この製品が REACH 規則に基づいたポリマーであることを示しています

* ポリスチレン相当

REACH 規則を GPC/SEC 結果と比べることによって、REACH 規則の 3 つの規定を満足していることが証明されます。この結果、この物質は、REACH の定義に従うポリマーです。

低懸念ポリマー

多くの場合、製品登録には M_w (重量平均分子量) と 500 や 1,000 など定義された分子量未満の含有率が必要です。これが必要となるのは、製品を低懸念ポリマー (PLC) として分類するためです。残念ながら、PLC の定義は、必要な措置と同様に国ごとに異なりますが、それでも GPC/SEC は必要となる情報を提供できます。

適切に分離されたピークの面積パーセント値に加え、GPC/SEC 結果には分子量分布が含まれているので、 M_w を測定したり特定の分率を推測したりできます。分子量分布は、検量線が利用できる場合にクロマトグラムから得ることができます (または、各溶出量の分子量情報が利用できる場合は、より高い精度が得られます)。³

GPC/SEC 分析に必要な特別な変換のために、溶出量を分子量に単に置き換えるサンプルクロマトグラムからではなく、真の分子量分布から確実に登録の結果が得られることが重要です。⁴

図 2 は、広い分子量分布の (単一のピークに分離されていない) サンプルの例を図として示します。図で示される分子量分布の形状の他に、平均分子量、分子量 500 未満の割合や分子量 1000 を超える割合が示されています。定義によると、例えば、米国および中国では、 M_w が 10,000 超であること、2 % 未満が M_w 500 未満であること、5 % 未満が M_w 1,000 未満であることから、このサンプルは低懸念ポリマーです。 M_w が 1,000 から 10,000 の間のポリマーの場合、分率がそれぞれ M_w 500 未満では 10 % 未満、 M_w 1,000 未満では 25 % 未満となる必要があります。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

ポリマーには一般的に免除されないいくつかの「一般除外」があります。カチオン性ポリマーまたは潜在的カチオン性ポリマー、高分子量の吸水性ポリマー、および劣化、分解、解重合するポリマーは免除対象ではありません。含有率の結果が低懸念ポリマーを示す場合でも、反応基が問題となって、あるポリマーが規制の免除とならない場合もあります。

また、各分子量スライス（スライスリストと呼ばれることも）の質量分率は製品登録のために要求される可能性があります。分子量分布の利用が可能になると、スライスリストは容易に作成できます。スライスリストから、前述で要求されたパラメータを直接決定できます。

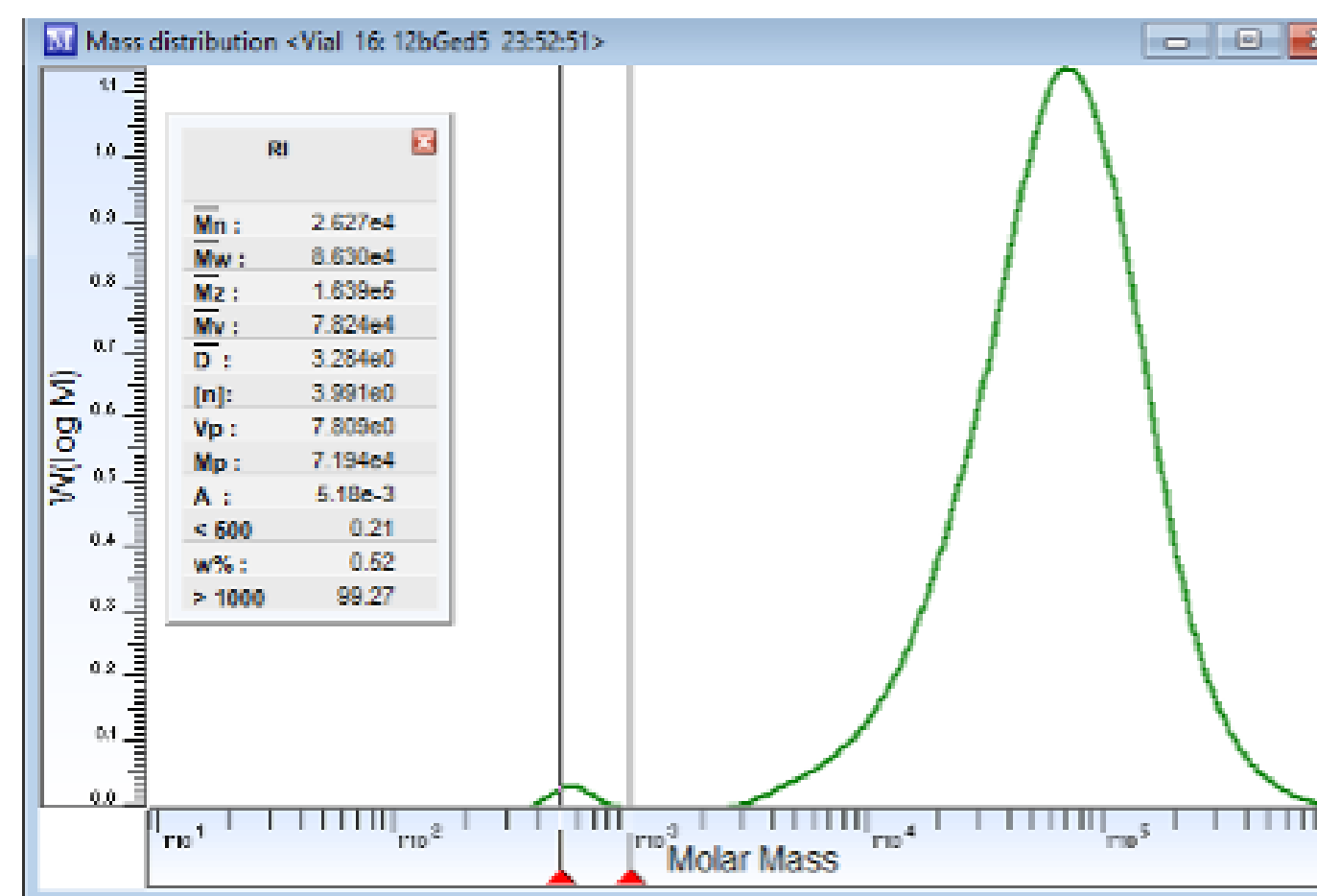


図 2. 製品が低懸念ポリマーであるかどうかを決定するための分子量分布および設定

測定の不確かさおよび分析パラメータの影響

製品登録用のデータを作成する分析研究者は、少なくとも 2 つの GPC/SEC 分析のポイントを押さえる必要があります。

1 つのポイントは、キャリブレーションのために正しい選択をすることが必要です。GPC/SEC は相対的なメソッドで、参照物質、または分子量を直接測定できる追加の検出器のいずれかを使用した、キャリブレーションを常に必要とします。⁵ 登録のケースでは、低分子量部分が最も懸念され、化学的に適合する参照物質を使用できない製品の場合、質量分析 (ESI-MS または MALDI など) が価値ある追加法となる可能性があります。⁶ 化学的に適合する参照物質を使用できる場合は、おそらくより一般的な物質よりもこれらの参照物質を選択することを推奨します。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

レビューすべき 2 つ目のポイントは、キャリブレーションに部分的に関連する測定の不確かさです。7 生データの品質、分析条件、キャリブレーション品質が結果に影響を与えますが、測定の不確かさによって確率的誤差の原因を特定して、データの品質を向上させることができます。

図 3 に、分子量 1,000 未満の分率が 5 % をわずかに超える分子量分布の例を示します。ここでは、結果が PLC 分類の境界に近いため、データ確認が特に重要です。より詳細な分析により、キャリブレーション品質（ここでは、低分子量領域のデータポイント数が不十分）および生データの品質（ここでは検出器のノイズ）の両方が不確かさの主な原因であること、そしてデータのより適切な信頼性を得るために改善する必要があることが示されました。特にこのようなクリティカルなケースで重要なことは、企業が正しく判断できるように確実な根拠があり適切に開発され文書化されたメソッドを持つこと、そして、信頼性が高く高精度で正確なデータの取得ができるよう追加測定のサポートがあることです。

まとめ

- 製品の分子量によって、どの登録基準に当てはまるかが決定されます。このため、GPC/SEC データは製品登録にとって重要です。
- 分子量平均は多くの場合、十分ではありません。特に低分子量領域では詳細な分析が必要です。

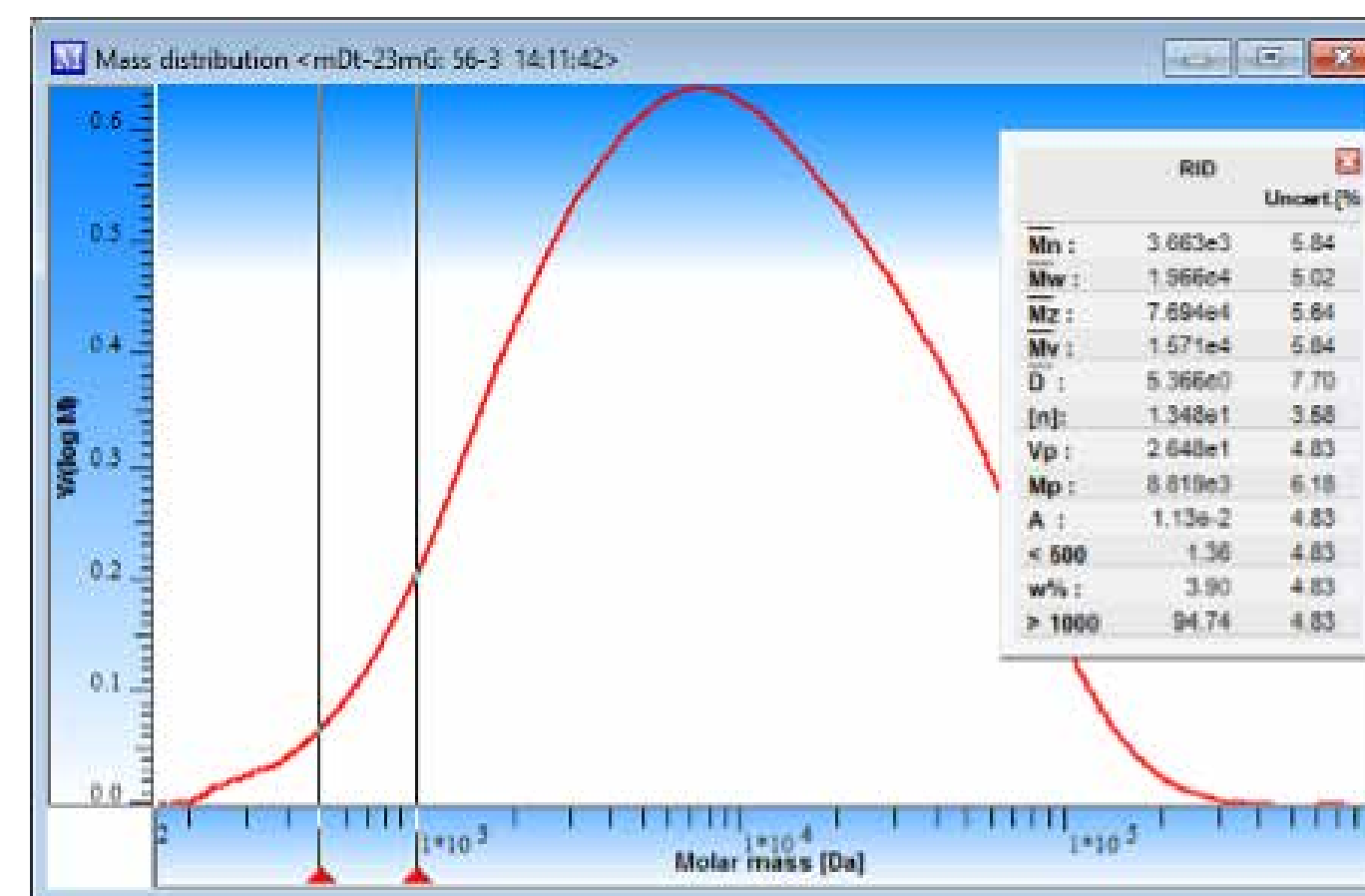


図 3. 低懸念ポリマーの分子量の要件を満たしていない（分子量 1,000 未満が 5 % を超える）ポリマー製品を決定づけた分子量分布

- 登録データが得られるのは、y 軸 w (log M) が適切に変換されている、真の分子量分布からだけです。そうでない場合は、分率の結果が間違っている可能性があります。
- 結果の不確かさの決定は、提示された結果が高い分析品質のものであることを確実にするために重要です。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

文献

1. https://echa.europa.eu/documents/10162/2324906/polymers_en.pdf/9a74545f-05be-4e10-8555-4d7cf051bbed
2. Test No. 118: Determination of the Number-Average Molecular Weight and the Molecular Weight Distribution of Polymers Using Gel Permeation Chromatography. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, Physical-Chemical Properties, **1996**.
3. Kilz, P.; Held, D. Tips & Tricks: GPC/SEC From a Chromatogram to the Molar Mass Distribution. The Column **2014**, 10 (22).
4. Kilz, P.; Held, D. Qualification of GPC/GFC/SEC Data and Results, in: Quantification in LC and GC. Wiley, **2009**.
5. Held, D. Tips & Tricks: GPC/SEC How Do I Calibrate a GPC/SEC System? The Column **2008**.
6. Held, D. Tips & Tricks: GPC/SEC: Absolute or True Molar Masses for Macromolecules - Mass Spectrometry as a New Solution. The Column **2011**, 7 (6).
7. Kilz, P.; Held, D. Tips & Tricks: GPC/SEC Result Uncertainty - How Reliable Are Results? The Column **2012**, 8 (10), 14–20

ヒントとコツ :「GPC/SEC Product Registration and REACH」は、Daniela Held を著者とし、元々 2017 年 6 月に『The Column』で発表されたものです。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ - GPC/SEC アプリケーション

1.2. 定量および平均分子量以上のものの獲得

GPC/SEC は、溶液中でサイズを基に分子を分離する液体クロマトグラフィー (LC) 分離技術です。分離は分離カラム中に充填されている粒子のポア内で起こります。サイズのより大きい分子はポアに入らないため、先に溶出し、サイズのより小さい分子はポア内に浸透して後で溶出します。

分子量の対数が溶出量に対してプロットされる代表的な GPC/SEC 検量線 (図 1 を参照) は、挙動をわかりやすく示しており、3 つの範囲を識別するのに役立ちます。

範囲 I では、注入と排除限界の間の範囲で何も溶出しません。サイズが大きすぎてどのポアにも入らない分子 (サイズに非依存) が溶出される排除限界の後、効率的なサイズ分離が可能となり、範囲 II が開始します。今度は、分子はより大きいポアに入り、より小さいポアからは排除されます。ここで、分子量分布を正確に求めることができます。全浸透限界で範囲 II が終了します。この限界では溶液中の分子は小さく、すべてがポアに浸透します。ここで範囲 III が開始します。この範囲は、低分子量の画分や添加剤についてより詳細に調査するための最も関心が持たれる範囲です。

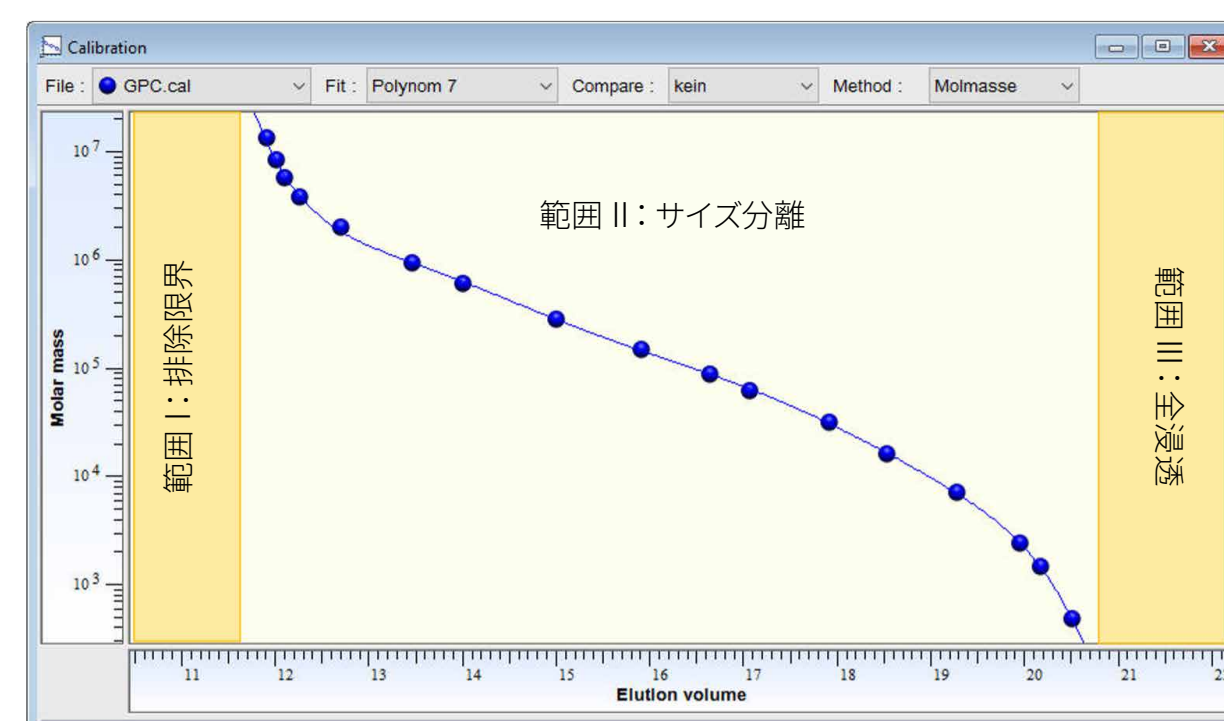


図 1. GPC/SEC 検量線と 3 つの異なる範囲

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

理論上、相互作用のないサイズ排除の場合、トルエンのような分子をブチルヒドロキシトルエン (BHT) やアセトンから分離することは不可能です。しかし、分離は頻繁に観察されます。

図 2 に、中程度の分子量分離範囲のカラムを使用して得た、BHT、トルエン、アセトンのサンプルクロマトグラムの重ね表示を示します。分子のサイズの違いだけでは説明できない (ベースライン) 分離があります。そのため、分離は分析対象物と固定相との間のエンタルピーの相互作用に起因すると考えられ、これはミックスモードのメカニズムが機能していることを示します。つまり、分子サイズ、および分子と固定相の相互作用の両方が溶出挙動に寄与しています。

GPC/SEC によるポリマーの分子量分布の測定時には相互作用を防ぐ必要がありますが、低分子量の場合には同定や定量も可能となるため、このミックス分離は好都合な可能性があります。

同定

図 3 に、ブロードなポリマーピーク、および低分子量範囲 (高い溶出量) で全浸透限界近くに溶出する異なるピークを有する、品質管理サンプルのクロマトグラムを示します。まず、サンプルピークと代表的なシステムピークを区別します。これは、ブランクサンプルを測定することによって、実現できます。ブランクは、サンプルと同様の方法で処理された (理想的には移動相ボトルから取り出された) 純粋な移動相です。

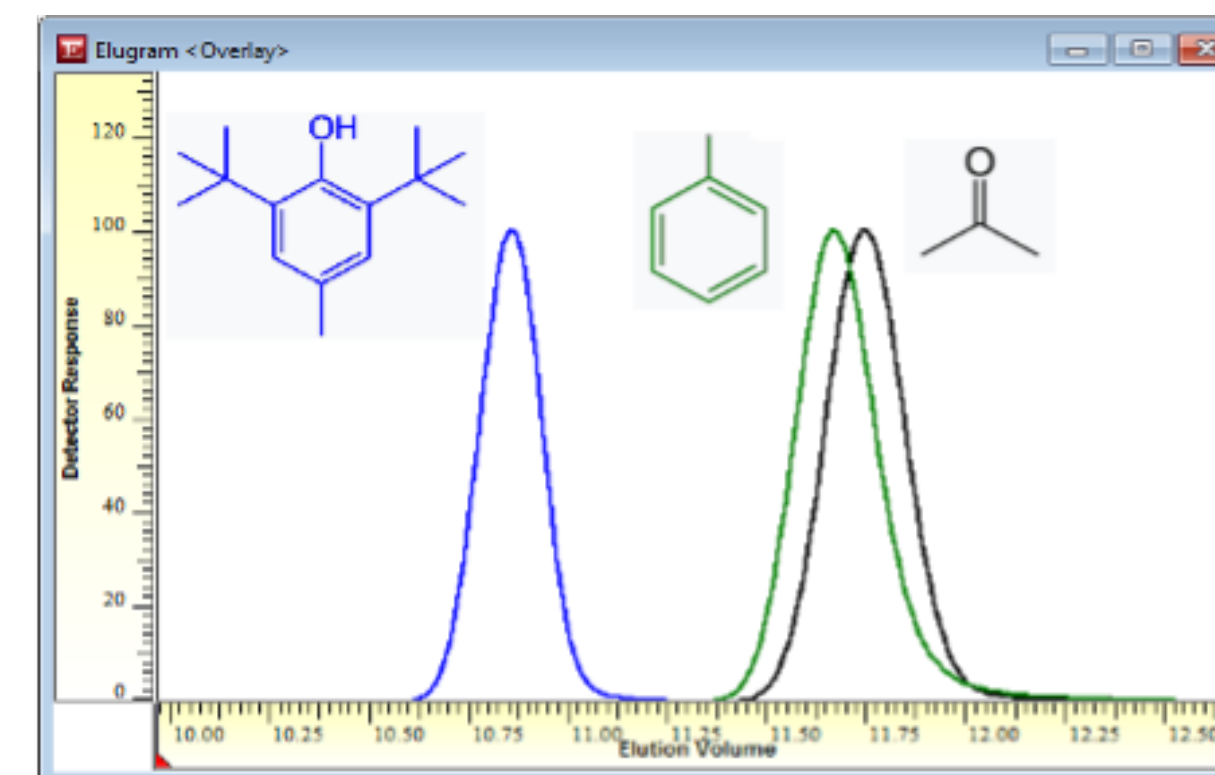


図 2. BHT (青)、トルエン (緑)、アセトン (黒) の重ね表示。すべてのペアに分子は入り込みましたが、分離が観察されました (相互作用によるリテンション)。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

ブランク注入とサンプルの重ね表示は、どのピークがシステムピークであるかを直接示します。図 3 の例では、2 つのピーク F と G はシステムピークと特定できます。¹ ピーク E もサンプル由来ではありませんが、このピークは追加された内部フローマーカーの BHT の結果です。² サンプル自体はポリマー部分 (ピーク A) とテーリング部分を含みます。テーリング領域では、3 つのピーク (B、C、D) がさらに特徴付けられています。

ピークの同定方法

ここでは、いくつかの方法を適用できます。

すでに疑わしい物質があつて (例えば、既知の製品プロセスからの抽出物、残留モノマー、溶媒、開始剤、添加剤)、その標準物質を用意できる場合は、これを別のサンプルとして調製して注入できます。サンプルクロマトグラムを重ね表示したり、溶出量を比較したりすることによって、ピークを同定できます。また、オリジナルサンプルに疑わしい物質を添加してそれぞれのピーク面積内で増加をモニタリングすることも可能です。

しかし、ピークの位置のみに依存するのは十分ではありません。高度な検出手法またはフラクションコレクションによるオフライン特性解析によって検証を実施できます。また、この方法は、可能性のある添加剤または混入異物についての情報が無い場合にも推奨されます。

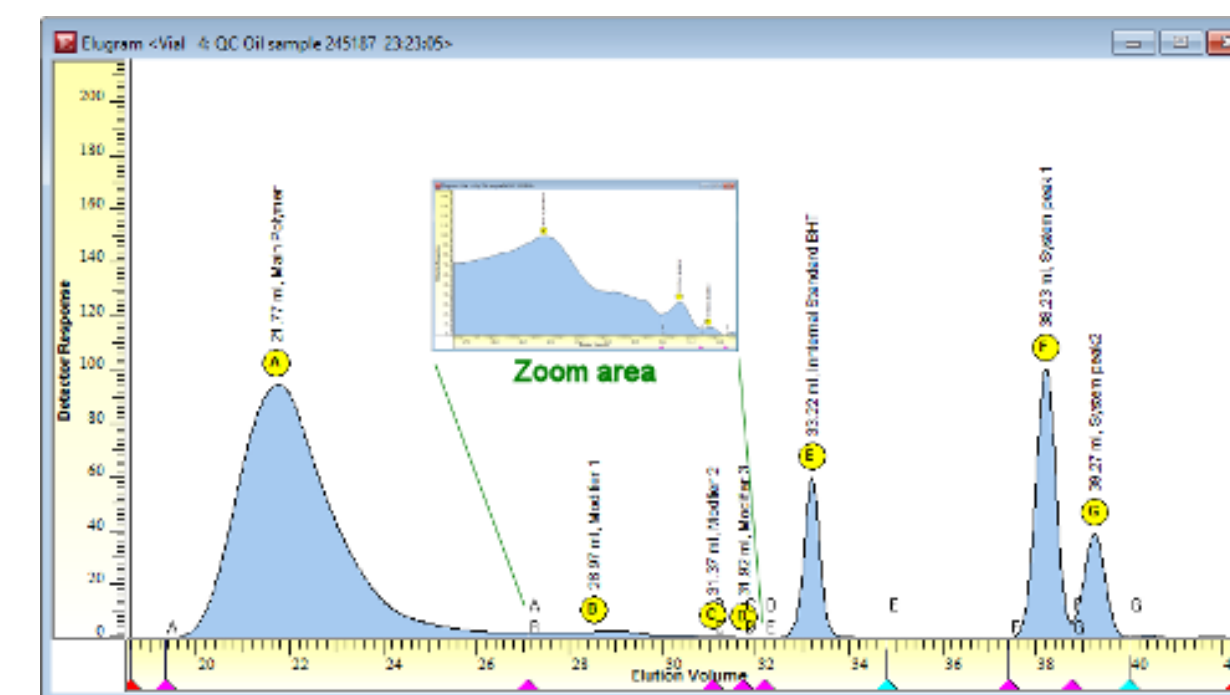


図 3. オイルサンプルのクロマトグラム。ピーク F および G はシステムピーク。ピーク E は内部フローマーカーの BHT。挿入図は、低分子量の溶出部分の拡大図で、ピーク B、C、および D を同定して定量することができます。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

容易でコスト効率の高い手法には、追加の UV 検出の使用があります。多くの場合、GPC/SEC システムは、より汎用の示差屈折率 (RI) 検出器とより選択的な UV 検出器 (DAD/PDA) の 2 つの異なるタイプの濃度検出器を装備しています。物質が UV で検出可能な場合は、UV 波長を選択して物質を特定して検出できます。DAD/PDA が利用可能な場合、同定のためにスペクトルも使用できます。

より複雑な分析では、GPC/SEC をオンライン質量分析、NMR、または (溶媒の数に制限がある場合) FTIR 検出と接続することが必要です。³

実践的な手法は、分取とオフライン分析です。GPC/SEC は非破壊分析手法のため、フラクションを採取し分光分析技術や分光測定技術をオフラインで適用してフラクションを特性解析することができます。フラクションの量が十分でない場合は、分取を繰り返し実行します。分析 GPC/SEC システムは、分析カラムを分取カラムに取り換えるだけで、分取システムに容易にアップグレードできるため、より多くの量を注入できます。フラクションコレクタを追加することによって、容易に自動化できます。

オンラインコレクションモジュールを使用すると、GPC/SEC を FTIR に手際よく接続することができます。この FTIR インタフェースはシステムの最後のデバイスとして接続されます。溶離液がカラムから出たら、加熱されたノズルによって溶媒が蒸発し、非揮発性の成分が回転ゲルマニウムディスクに沈着して、さまざまな成分の特別な分離が実現します。この分離が終了した後、ゲルマニウムディスク上のトレースを FTIR 分光光度計を使用してスポットごとに分析します。MALDI 機器で類似の手法が可能です。

FTIR または MALDI とのフラクションコレクションの接続の両方の手法で問題となるのは、非揮発性添加剤です。例えば、適切な GPC/SEC 分離を確保するために、塩類が必要となる場合があります。その場合は揮発性塩類に交換することが必要です。⁴

定量

図 4 に、1 つの高分子量ピークと 3 つの低分子量ピークの詳細な結果の例を示します。ポリマーピークの絶対分子量分布は、GPC/SEC と光散乱検出を使用して求めます。同時に、示差屈折率検出器の信号のみを使用して相対ピーク面積 (組成の結果) を決定します。このため、1 回の実行のみで、サンプルを十分に特性解析できます。

このようなセットアップでは定量も可能です。HPLC 分析と同様に、各ピークの面積パーセントを容易に測定できます。絶対濃度も測定できます。各ピークを同定すると、既知の濃度の標準物質を注入して各ピークの示差屈折率検出器のレスポンスファクターを決定することができます。

レスポンスファクターがわかれば各ピークの濃度を求めることができます。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

この検出器キャリブレーションは、代表的な GPC/SEC キャリブレーションとは異なることに注意してください。検出器キャリブレーションには濃度既知の標準物質が必要です。一方、GPC/SEC キャリブレーションでは図 1 に示すような検量線を得るために分子量が既知の複数の標準の注入が必要です。⁵

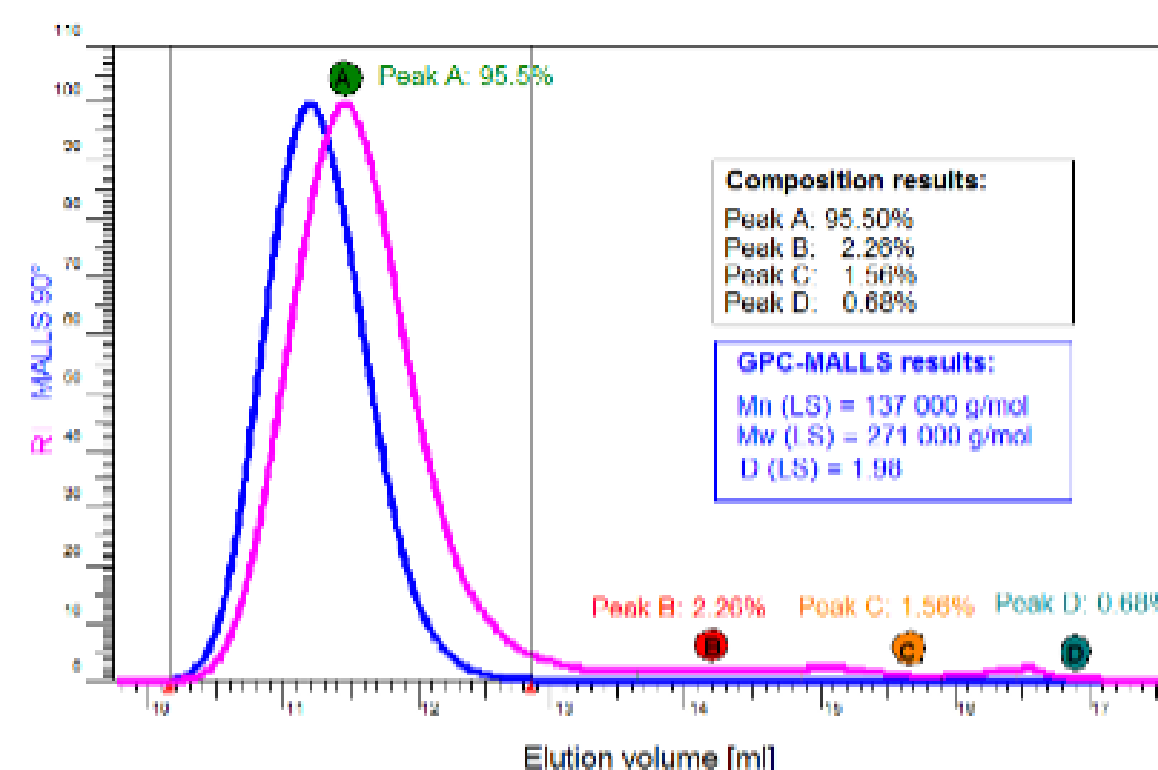


図 4. ピーク A の絶対分子量（GPC/SEC と光散乱検出器）および 4 つの同定済みピークの相対量

まとめ

- GPC/SEC は非破壊分析の分離分析手法です。
- ピーク面積（例えば、パーセントの単位）および分子量分布の 2 つの異なるタイプの情報を同時に得ることができます。
- 製造/工程からのヒントが得られる場合、重ね表示によりピークを同定できます。分画後、ピークを同定するために、特別な検出（UV(スペクトル)、FTIR、または MS など）をオンラインまたはオフラインのいずれかで適用できます。
- 代表的な HPLC 分析と同様に、検出器のレスポンスファクターを求めることができます。これらの係数により、測定したピーク面積を用いて、濃度を測定することができます。

文献

1. Held, D. Tips & Tricks: GPC/SEC Peak Identification in GPC/SEC. The Column **2010**, 6 (22).
2. Held, D.; Radke, W. Tips & Tricks: GPC/SEC Flow Marker — An Easy Concept to Increase Reproducibility. The Column **2016**, 12 (6), 24–27.
3. Pasch, H.; Kilz, P. Coupled Liquid Chromatographic Techniques in Molecular Characterization, in: Encyclopedia of Analytical Chemistry. Wiley, **2006**.
4. Held, D. Tips & Tricks: Evaporative Light Scattering Detection in GPC/SEC. The Column **2013**, 9, (18).
5. Held, D. Tips & Tricks: GPC/SEC How Do I Calibrate a GPC/SEC System? The Column **2008**.

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ - GPC/SEC アプリケーション

1.3. サイズ排除クロマトグラフィーによる タンパク質の分析

合成した巨大分子および多くの生体高分子とは異なり、大半のタンパク質は分子量分布を示すことはなく、分子量は均一です。とはいえ、分離技術は、凝集体の存在を確認したりモニタリングできるため、タンパク質サンプルにも有用です。

従来、サイズ排除クロマトグラフィーは、モノマーやフラグメントから安定した凝集体を分離でき、光散乱や質量分析のような高度な検出と組み合わせ、分子量およびサイズも測定できます。

分子量分布のあるタンパク質混合物（ゼラチンなど）の場合、GPC/SEC を使用すると分子量分布を測定でき、品質関連および安全関連の結果を入手できます。

GPC/SEC タンパク質解析での主な課題は、分離カラム内で使用されている固定相との望ましくない相互作用を排除する堅牢なメソッドの開発です。

タンパク質の分析のための GPC/SEC の利点および制限

GPC/SEC の大きな利点は非破壊分析の分離手法です。サンプル中にある巨大分子のサイズに基づいて分離します。GPC/SEC は、質量分析、光散乱分析、粘度計などの高度な検出手法を適用する前に、サンプルの複雑さを低減するために最適です。複雑さを低減することで、分離されていない不均一なサンプルを直接分析するよりも、データ評価および解釈が容易になります。複数の検出器を使用する高度な検出は多くの場合、オンラインで実行できます。このアプローチが可能でない場合は、GPC/SEC 手法を使用してサンプルフラクションを収集し、さらなるオフライン特性解析を実施できます。

GPC/SEC ではタンパク質は溶液中で非変性のネイティブ状態で分析できます。これは、構造、およびタンパク質間相互作用がインタクトなまま保たれているため望ましいことです。したがって、多くの GPC/SEC 分離では巨大分子の生物学的活性が保たれています。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

しかし、溶液中のタンパク質のサイズに基づいた真の GPC/SEC 分離の条件を達成することは困難な可能性があります。サンプルと固定相との間の相互作用が起こる場合も多く、結果として予期しないピーク形状、不安定なリテンションタイム、および不十分な回収率をもたらします。さまざまなタンパク質がさまざまな形状を示すため（例えば、球形、棒状、フレキシブルな鎖など）、溶液中のサイズは多くの場合、分子量と直接的に相関関係がなく、正確な分子量測定にはより高度な検出メソッドが必要です。

タンパク質の分析の全メソッド開発は次のように構成されています。

- 相互作用のない固定相、粒子サイズ、多孔性の適切なカラム（またはカラムの組み合わせ）の選択
- 移動相の pH およびイオン強度の調整
- 一連のサンプルに対して最適な検出器の選択

サンプル中に存在するすべての成分および凝集体のクロマトグラフィー回収率を評価することも重要な要件です。

メソッド開発での落とし穴

タンパク質は水溶液中で分析する必要があるため、水系 GPC/SEC に含まれます。水系 GPC/SEC 分析の一般的なメソッド開発のすべてのヒントは、タンパク質の分析メソッド開発にも適用可能です。このセクションでは、タンパク質に特有の要件のみを解説します。

合成したポリマーや大きな生体分子と比較した場合のタンパク質の利点は、タンパク質は通常サイズが小さく、1 つのサンプル内のサイズ分布が相対的に狭いことです。これにより、高効率の小さな粒子が充填された GPC/SEC カラムを使用できます。さらに、分布が狭いため、非常に浅い検量線（狭い分子量範囲で高分離能）を持つカラムを使用できます。これを達成するために、大半のタンパク質アプリケーション分析ではシリカベースの GPC/SEC カラムが選択されます。

クロマトグラフィーの観点から見てタンパク質分析の困難な点は、タンパク質が多数の官能基/荷電基を持ち、より大きな疎水性セグメントまたはシーケンスを保有していることです。この 2 つの特性によって、カラムの固定相とタンパク質の静電的相互作用と疎水性相互作用のない（最小限の）真の GPC/SEC メソッドの開発が困難になっています。相互作用によってある程度の吸着し、この結果、回収率の低下（またはピーク検出不可能な完全な吸着）、溶出時間のシフト、ピーク形状の歪み（テーリングなど）が生じます。

相互作用を防止または最小化するために、pH 値、イオン強度/塩含有量、および有機溶媒の添加量を調整する必要があります。しかし、サンプルの溶解性にも影響を与えるため、添加する塩または添加剤の濃度は制限されます。安定した GPC/SEC メソッドの開発が可能でない場合は、固定相の変更（シリカカラムからポリマーベースのカラムへ）を検討することが必要です。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

メソッド開発の良い開始点は等電点 pI でのタンパク質の分析です。タンパク質の pI は、タンパク質を構成する異なるアミノ酸がもたらす、正電荷と負電荷のバランスがとれている pH 値です。正に電荷されたアンモニウム基または負に電荷されたカルボキシル基のどちらも優位ではありません。各単一タンパク質に最適な GPC/SEC メソッドを、pI と一致する pH の水溶液で実行します。

各タンパク質に対するメソッドを持つことを必要とする複雑なアプローチを回避するために、移動相の pH が pI 近くになるように選択し、追加の高分子電解質、塩化ナトリウムまたは塩化カリウムなどの一価の塩類を添加します。電解質は残留電荷からの保護に有用で、タンパク質と固定相との間の望ましくない相互作用をさらに低減させます。

検討すべきもう 1 つのパラメータはタンパク質の疎水性です。最も重要なことはタンパク質中の異なる R 基の極性です。R 基に基づいて、アミノ酸は荷電、親水性、または疎水性に分類されます。ロイシン、アラニン、およびバリンなどの多くのアミノ酸を含む

タンパク質はどちらかと言えば疎水性で、セリン、アルギニン、またはヒスチジンなどのアミノ酸を含む親水性または電荷したタンパク質と同じ条件で分析することはできません。

図 1 は、イオン強度の影響を疎水性が異なるタンパク質のサンプルクロマトグラムで比べています。キモトリプシノーゲン A などの親水性タンパク質は高いイオン強度で測定する必要があります。疎水性でも親水性でもないタンパク質のウシ血清アルブミン (BSA) は、高いイオン強度と低いイオン強度で測定できます。そして、アラニンや置換アラニンなどの疎水性アミノ酸は、低いイオン強度で分析する必要があります。タンパク質の極性を基にイオン強度が調整されない場合、分離は失敗します。

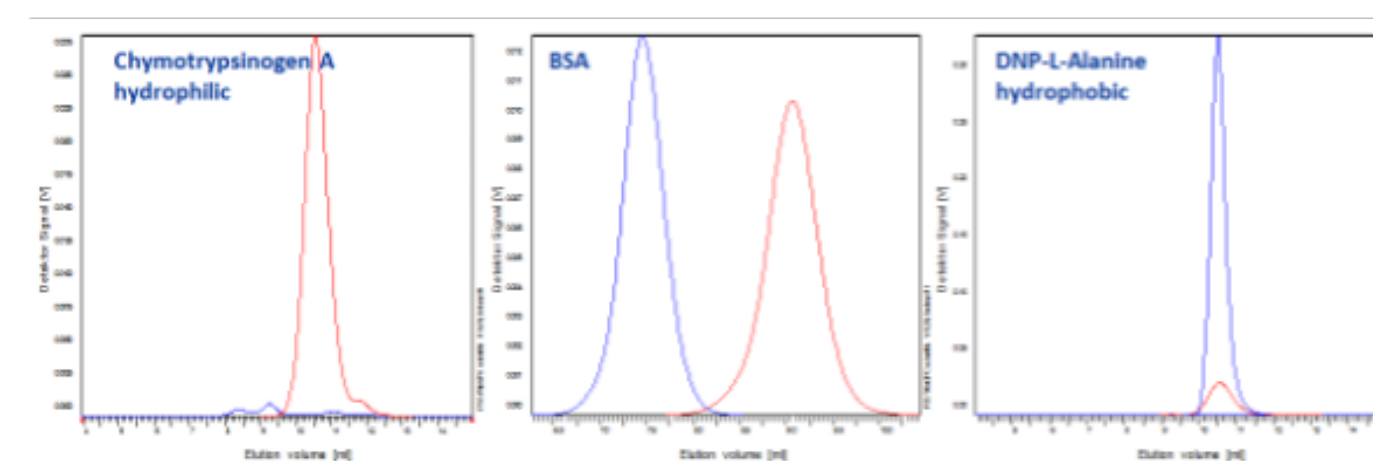


図 1. 疎水性が異なる (イオン強度が低い: 青、高い: 赤) タンパク質/アミノ酸のサンプルクロマトグラム

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによるタンパク質の分析

ブロードスタンダードによるキャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための GPC/SEC

用語集

ステンレス製の接液部品を有する標準の LC 機器と検出セルを使用した結果として、予期しないピーク形状（例えば、テーリング）が生じる可能性があります。タンパク質への金属イオンの付加または望ましくないタンパク質の相互作用を最小化するために、バイオイナートまたはバイオコンパチブルクロマトグラフィーシステムやカラムハードウェアの使用を検討する必要があります。このようなシステムは、極端な pH 値や高塩含有量などのアグレッシブな移動相条件を必要とする場合にも利点があります。操作上、殺菌剤や静菌薬を使用するとバクテリア汚染を防ぐことができます。使用しない場合、数時間内に藻類が水性移動相で繁殖して深刻な問題が生じる可能性があります。

検出のオプション

タンパク質は UV 検出器を使用して検出できます。UV 検出器は使いやすく、広い範囲にわたって直線性のある応答を示し、高感度で、ベースラインが安定しているため、高い利便性が得られます。UV 波長範囲ごとにその利点があります。多くの場合、280 nm が標準的な波長として選択されます。近紫外や長波長（380 ~ 315 nm）では、トリプトファンなどの芳香族アミノ酸が検出されます。220 nm などの遠紫外範囲（280 ~ 200 nm）の波長を選択するとより高い感度が得られ、ここではペプチド結合が強い吸光を有します。

タンパク質濃度を測定するために 2 つの異なる波長が同時に記録される、セットアップがあります。この 2 波長検出手法は、純度のために提案されていました。この手法では、短波長はより低い濃度の化合物に感度を提供し、長波長は主成分（例えば、モノマー）に高濃度における直線線を提供します。²

サイズに基づいた GPC/SEC 分離の限界を克服するには、分子量を直接測定するために質量分析 (MS) または光散乱 (LS) 検出のいずれかを使用できます。どちらの手法も完全に異なるアプリケーション分野でソリューションを提供するため、相補的な技術と認識する必要があります。MS は、低から中分子の各化合物について、非常に特異的に詳細を測定する必要がある場合に有用です。MS が適用可能な場合は、最も精度が高く正確に分子量を測定する方法です。しかし、サンプルの複雑さおよび分子量が増大すると、結果の質量スペクトルの複雑さのためにデータの解釈および結果の割り当てが事実上、不可能となります。幸い、このような場合は、LS を使用できます。これは、LS が多分散の高分子量サンプルの分析に非常に適しているためです。もう 1 つの利点は、LS は低濃度の場合でも、高分子量サンプルに対して非常に感度が高いことです。このため、LS は多くの場合、他の検出器よりも高い感度で、凝集体を検出できます。

操作上、GPC/SEC と MS を接続する際の最大の難関は、要求される移動相の組成です。GPC/SEC の移動相は多くの場合、MS が対応していない高濃度の非揮発性の塩類を含み、質量分析計の汚染、およびイオン抑制を伴う問題をもたらします。このため、ハイフネーテッド手法は、LS を用いるととても容易に実現できます。検出は溶液中で実施されるため、移動相を蒸発させることなく、MS 検出でタンパク質のイオン化や乾燥の際に失われる情報を得ることができます。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

角度の数が異なり、散乱強度を同時に捕捉できる多くの LS 検出器が市販されています。³

大半の球状タンパク質は小さいため分子量を測定するには通常、90° の光散乱で十分です。残念ながら、単一角度でサイズ (回転半径) を測定することは不可能です。この値を得るには、流体力学半径 (Rh) を測定するための動的光散乱 (DLS、QUELS としても知られる) のような多角度光散乱検出 (MALS) などの手法の使用が必要です。

合成ポリマー用の GPC/SEC の最も一般的な検出器である示差屈折率検出器 (RI) もタンパク質の分析に使用されます。しかし、RI は主に、オンラインで屈折率増分 dn/dc を測定するために LS 検出器と組み合わせて使用されます。このサンプル関連パラメータは、光散乱検出の結果の精度に大きく影響を及ぼします。また、パラメータは、LS 検出器の波長、溶媒などの実験設定に

も左右されます。しかし、一般的なスクリーニングの目的では、平均 dn/dc の 0.185 mL/g を多くのタンパク質に適用できます。 dn/dc はタンパク質のタイプによって大幅に変化する可能性があるため気を付ける必要があります。⁴

他の GPC/SEC 検出オプションを使用することができます。例えば、一部のタンパク質は、蛍光検出器で測定でき、感度や選択性が向上します。

オンライン粘度計の使用は、例えば、変性と凝集とを識別するために、より一般的になりつつあります。粘度計は密度の差によって構造の変化を特定できます。したがって、複数検出手法は合成ポリマーの GPC/SEC 分析ではすでに一般的なものになっており、タンパク質の分析においてもより普及しつつあります。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによるタンパク質の分析

ブロードスタンダードによるキャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための GPC/SEC

用語集

分析結果

図 2 に、タンパク質の凝集体の調査に使用されてきた UV-LS セットアップの生データと結果を示します。UV トレースと光散乱トレースを使用した組み合わせ分析は、カラムキャリブレーションなしにダイマーおよびモノマーの分子量への直接アクセスを提供します。小さいピークの分子量は大きいピークの約 2 倍の分子量であるため、これは二量体化を示します。UV トレースのピーク面積の分析から、この例では二量体の含有量が 10 % 程度であることも分かります。

図 3 に、同じカラムセットで分析した全長モノクローナル抗体 (mAb) と抗体フラグメントで得られたサンプルクロマトグラムの重ね表示を示します。赤の曲線は全長の抗体とその二量体の UV シグナルを示します。一方、青の曲線は抗体フラグメントまたはその高次の凝集体の UV シグナルです。

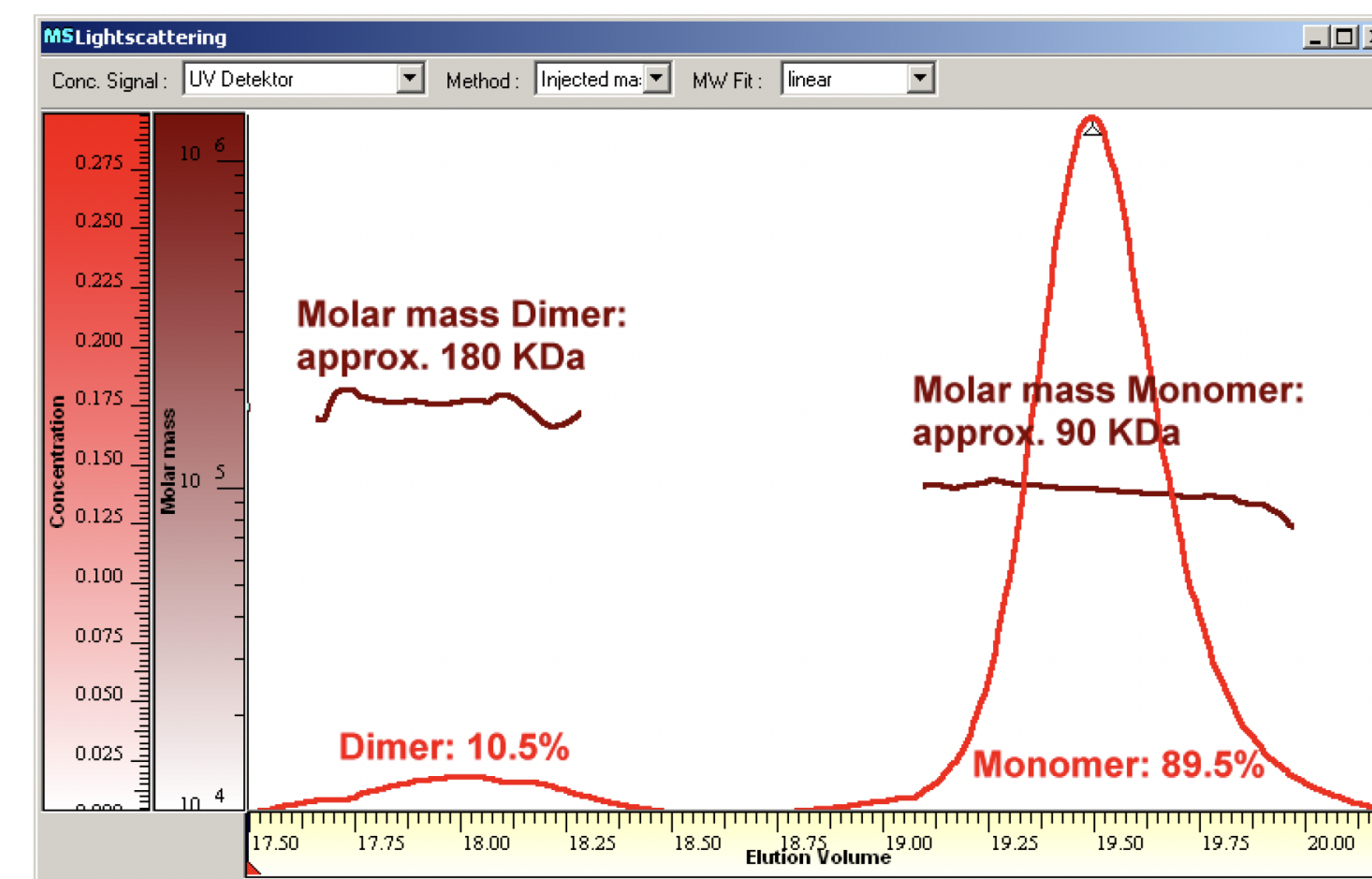


図 2. タンパク質の凝集体の調査に使用された UV-LS セットアップの生データと結果。赤の曲線はモノマーとダイマーの濃度を示し、濃い赤の線は溶出量ごとにオンラインで測定した分子量を示します。

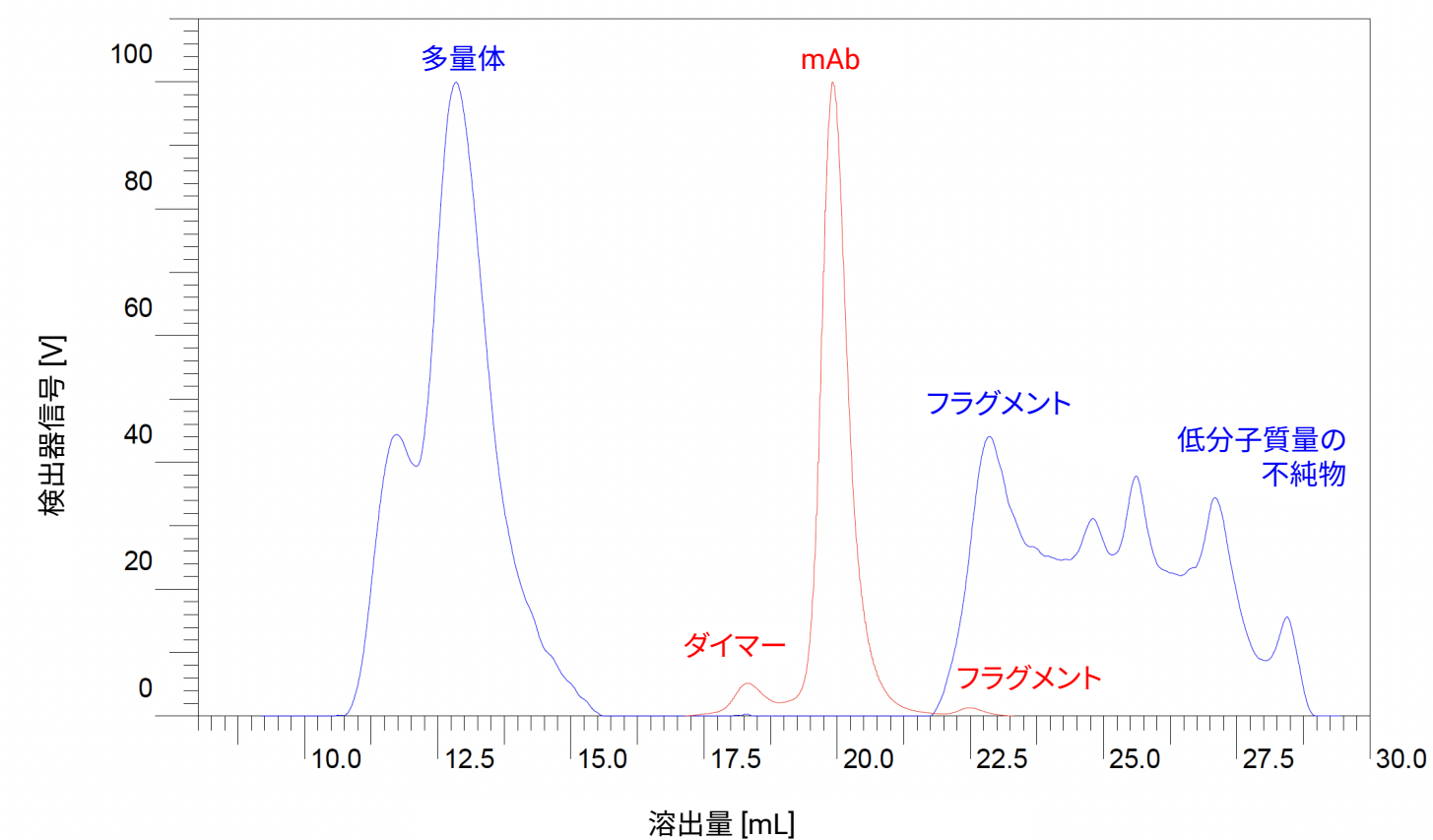


図 3. 同じカラムセットで測定した、モノクローナル抗体 (mAb) (赤、UV トレース) とフラグメント (青、UV トレース) のサンプルクロマトグラムの重ね表示

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによるタンパク質の分析

ブロードスタンダードによるキャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための GPC/SEC

用語集

図 4 に、分子量分布を示すタンパク質の測定結果を示します。この重ね表示では、3 種類のゼラチンで明確に差異が見られ、平均分子量および分子量分布を容易に測定することができます。

まとめ

- GPC/SEC はタンパク質の凝集体を調査するための優れた手法です。溶液中でサイズに基づいてネイティブ条件下でタンパク質を分離できます。
- サイズに基づいた分離条件は一般的にイオン強度が調整された移動相が必要です。メソッド開発には回収率の評価も含めるべきです。
- 高度な検出オプション（相補的技術としての MS または LS）は、GPC/SEC の限界を克服し、分子量を直接測定するために有用です。
- RI や粘度計などのその他の代表的な GPC/SEC 検出器では、dn/dc(LS 評価に必要) や構造情報を提供できます。

文献

1. Held, D. Tips & Tricks: GPC/SEC The Importance of Molar Mass Distributions. The Column **2007**.
2. Bond, M. et al. Evaluation of a Dual-Wavelength Size Exclusion HPLC Method with Improved Sensitivity to Detect Protein Aggregates and Its Use to Better Characterize Degradation Pathways of an IgG1 Monoclonal Antibody. J Pharm Sci. **2010**, 99 (6), 2582–97.
3. Held, D.; Kilz, P. Tips & Tricks: GPC/SEC How to Choose a Static Light-Scattering Technique for Molar Mass Determination. The Column **2009**.
4. Zhao, H.; Brown, P.; Schuck, P. On the Distribution of Protein Refractive Index Increments. Biophys J. **2011**, 100 (9), 2309–17.

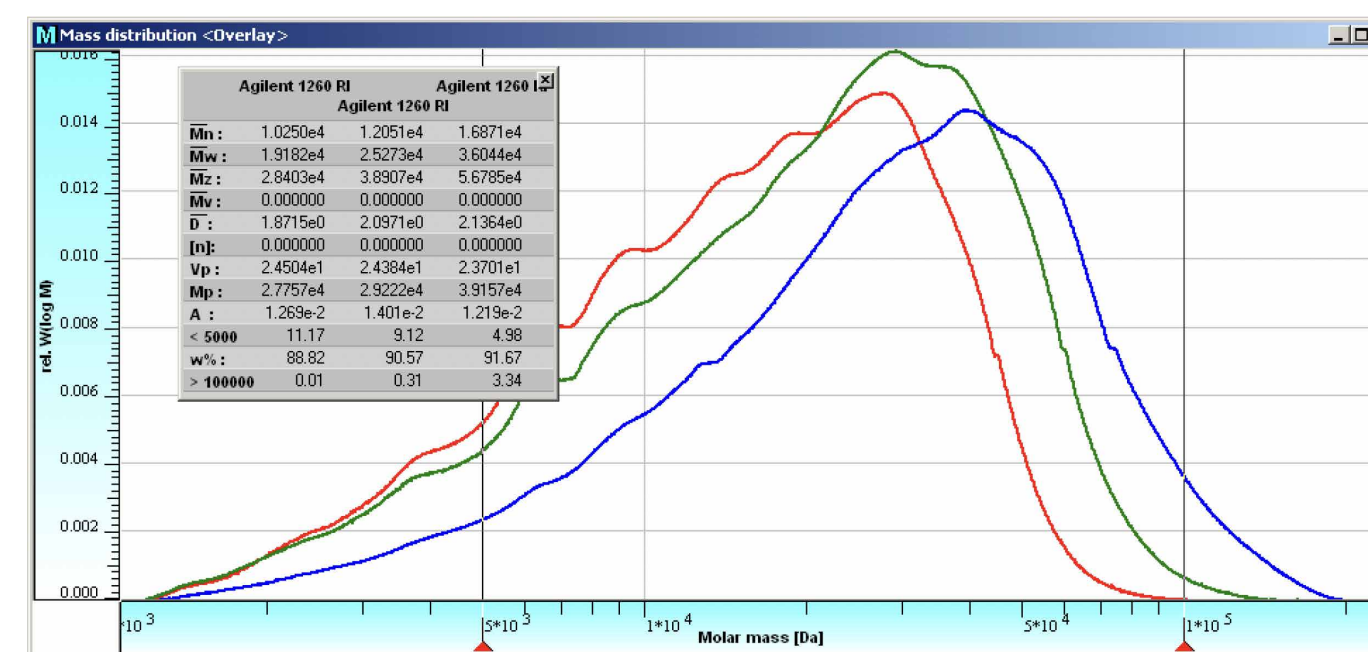


図 4. 3 種類のゼラチンの分子量の重ね表示：シルバー 140 ブルーム（赤）、ゴールド 180 ブルーム（緑）、プラチナ 240 ブルーム（青）

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ - GPC/SEC アプリケーション

1.4. ブロードスタンダードによるキャリブレーション

ポリマー材料では、化学的に類似していて分子量の分布が狭い標準を使用できず、信頼できる真の分子量を濃度検出器だけで測定することは不可能です。しかし、分子量分布は広いが特性がよく解析された同じ種類のサンプルを使用することによって、信頼できる真の分子量を得ることができます。この手法では追加の測定機器が必要ないため、より高価なアプリケーションのオンラインの光散乱検出器や粘度検出器などの分子量が検出可能な検出器に対して、費用対効果が優れた代替手段を提供します。

はじめに

ゲル浸透クロマトグラフィー / サイズ排除クロマトグラフィー (GPC/SEC) は、巨大分子の分子量および分子量分布を測定するための容易かつ堅牢性の高いメソッドです。分離は、溶液中の巨大分子のサイズに基づきます。巨大分子が大きいほど、カラムから早く溶出されます。

GPC/SEC での 1 次情報は、溶出量の関数としての検出器信号を示すクロマトグラムです。分子量分布を導出するには、溶出量と溶出ポリマーの分子量を関係付ける検量線を用いてこのクロマトグラムを変換する必要があります。このような検量線は通常、単分散スタンダードを使用して確立されます。しかし、分子量が同じで化学的に異なるポリマーは多くの場合、非常に異なるサイズを溶液中で示します。したがって、正しい分子量は、キャリブラントの化学構造がサンプルの構造と一致する場合にのみ得られます。

残念ながら、ポリアミド、ポリエステル、またはポリオレフィンなどの多くの重要なポリマーについては、単分散スタンダードは市販されていません。真の分子量を得るには、代替メソッドが必要です。代替メソッドの 1 つは、分子量が検出可能な検出器の使用です。しかし、この場合は、他の高価な機器、より高精度で正確なサンプル前処理、より多くの時間、データ評価のより高いレベルの知識が必要です。品質管理ラボでは特に、これらの制限はきわめて重要です。ここでは、高速かつ堅牢で使いやすいキャリブレーションメソッドが必要とされます。適合性があり費用対効果が高いソリューションは、ブロードスタンダードの使用です。

ブロードスタンダードを用いたキャリブレーション— その機能

分子量分布の狭いポリマーでは、サンプルクロマトグラムの最大ピークを容易に同定し、割り当てることができます。これは、分子量分布の広いサンプルとは異なるケースです。M_p の値が既知の場合でも、分離カラムの分離能に依存するため、最大ピークを高い精度で同定することは困難な可能性があります。このため、分子量の値と最大ピークでの溶出量を単純にプロットして検量線を作成することは推奨されません。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

GPC/SEC でのユニバーサルキャリブレーション¹ の一般的に受け入れられている概念は、単分散のキャリブラントで構築される検量線と分析対象成分との間の次の関係をもたらします。

$$\log M_{\text{analyte}} = A + B \times \log M_{\text{calibrant}}$$

これは、キャリブラントと分析対象成分の両方が固定相との相互作用なしに溶出すると仮定しています。

パラメータ A は、単分散のキャリブラントを用いて作成された検量線に対して検量線を垂直方向にシフトさせ、一方、B の変化は、検量線の傾きを変更させます (図 1 を比較)。パラメータ A および B は、同じ溶液中の分析対象成分とキャリブラントのマーク・ホーウィングのパラメータと関係付けられます。²⁻⁵ パラメータ A および B の検量線への効果のために、所定のサンプルクロマトグラムで計算される分子量分布とその結果としての分子量平均もパラメータの関数として変化します。

これを表 1 に示します。この表では、広い分布のポリ乳酸 (PLA) サンプルの 2 つのサンプルクロマトグラムを、ポリスチレンの検量線 (ベースキャリブレーション) およびパラメータ A および B の異なるセットを使用して評価しました。ポリスチレンの検量線の適用は真の分子量の値 (M_w および M_n) を約 3 倍過大評価します。パラメータを変更すると、分子量の値が真の値に近付きます。しかし、両方のパラメータを変更し、異なるサンプルに対して信頼できる結果を得るようにすることが必要です。表の最終行で提供されている A および B の最適化されたパラメータセットでは、光散乱検出器から得られた基準値と良好な一致が認められます。

表 1 は、パラメータ A および B がサンプルクロマトグラムおよび広い分布の標準の分子量の既知の値からどのように決定されるかも説明しています。A および B を得るには、既知の分子量と、ベースキャリブレーションを用いてそれぞれのサンプルクロマトグラムから計算される分子量との間で最良の一致が得られるまで A および B を系統的に変えます。

幸いにも、最新の GPC/SEC ソフトウェアパッケージを用いると、自動的に変えることができます。計算されたパラメータ A および B の値を用いて、分析対象成分と同じ構造の未知のサンプルの適切な検量線がベースラインキャリブレーションから容易に導出されます。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

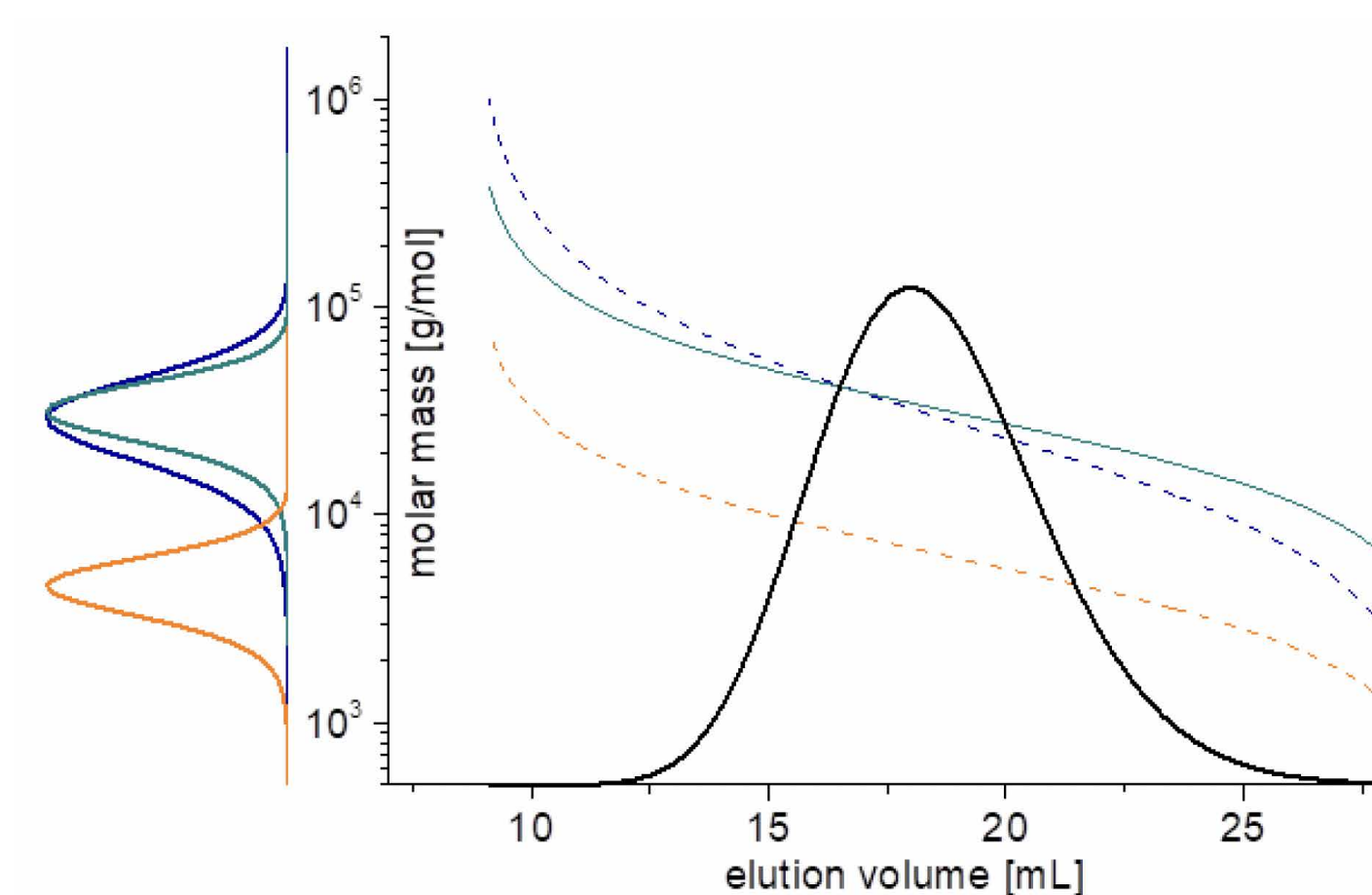


図 1. パラメータ A および B が検量線及び分子量分布に及ぼす影響

- 水色：オリジナル（ベース）検量線、およびこの検量線から導出した分子量分布（左）
- 青色：パラメータ B（傾き）を変化させて水色の曲線から導出した検量線および分子量分布
- オレンジ色：パラメータ A（垂直シフト）を変化させて青色の曲線から導出した検量線および MWD

	PLA サンプル 1 M_w [g/mol]	PLA サンプル 2 M_w [g/mol]
光散乱分析による基準値	37,000	500,000
ポリスチレンのキャリブレーション (A = B = 1)	82,300	1,247,000
A = 0.5、B = 1	35,400	580,000
A = 0.5、B = 8	3,790	355,000
ソフトウェアで 最適化された値 A = 0.717、B = 0.957	36,950	500,700

表 1. ポリスチレンの検量線および分子量分布の広い PLA サンプルのクロマトグラムから導出された分子量に及ぼす、パラメータ A および B の変化の影響

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

ブロードスタンダードによるキャリブレーションとは対照的に、前述の手法には、ベースキャリブレーションからカラム充填剤の細孔分布が明らかになり、その結果、検量線の形状（多くのケースで S 字または非線形の形状）、排除限界容積、ベース検量線の分離限界が明らかにされるという利点があります。その他の利点は、2 つ以上のサンプルを使用して検量線を作成できることです。これにより、精度が向上し、外挿なしにより広い分子量の範囲がカバーされます。

ブロードスタンダードを用いて検量線を確立するプロセス

前述の手順のための検量線を確立するためには、次のものが必要です。

1. 多くの有機溶媒系にはポリスチレン、水系アプリケーションにはプルランや PEO/PEG のような、任意の化学構造の単分散スタンダードを使用して確立された従来の検量線（ベースキャリブレーション）
2. M_w と M_n が既知で特性評価対象の成分と同じ化学構造を有する 1 つ以上の分子量分布の広いサンプル。2 つ以上のサンプルを使用する場合は、1 サンプルあたり M_w または M_n のような 1 つの平均分子量で十分です。

そして、手順は簡単です。

- GPC/SEC システムで単分散およびブロードスタンダードを分析します。
- 単分散スタンダードのピークトップ分子量 (M_p) を用いてベースキャリブレーションを確立します。⁶
- ソフトウェアツール（例えば Agilent WinGPC または Agilent OpenLab CDS GPC/SEC）を使用して検量線をシフトさせ、傾きを調整し、キャリブレーションによって分子量分布の広いサンプルに対して正しい結果が得られるようにします。つまり、ソフトウェア内部で、ブロードスタンダードのクロマトグラムを使用し、既知の平均分子量を適用することによって、最適化されたパラメータ A および B を内部で求めます。
- 分子量が未知のサンプルに対して完全な分子量分布および真の平均分子量を決定できるように、この新しい検量線を保存します。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

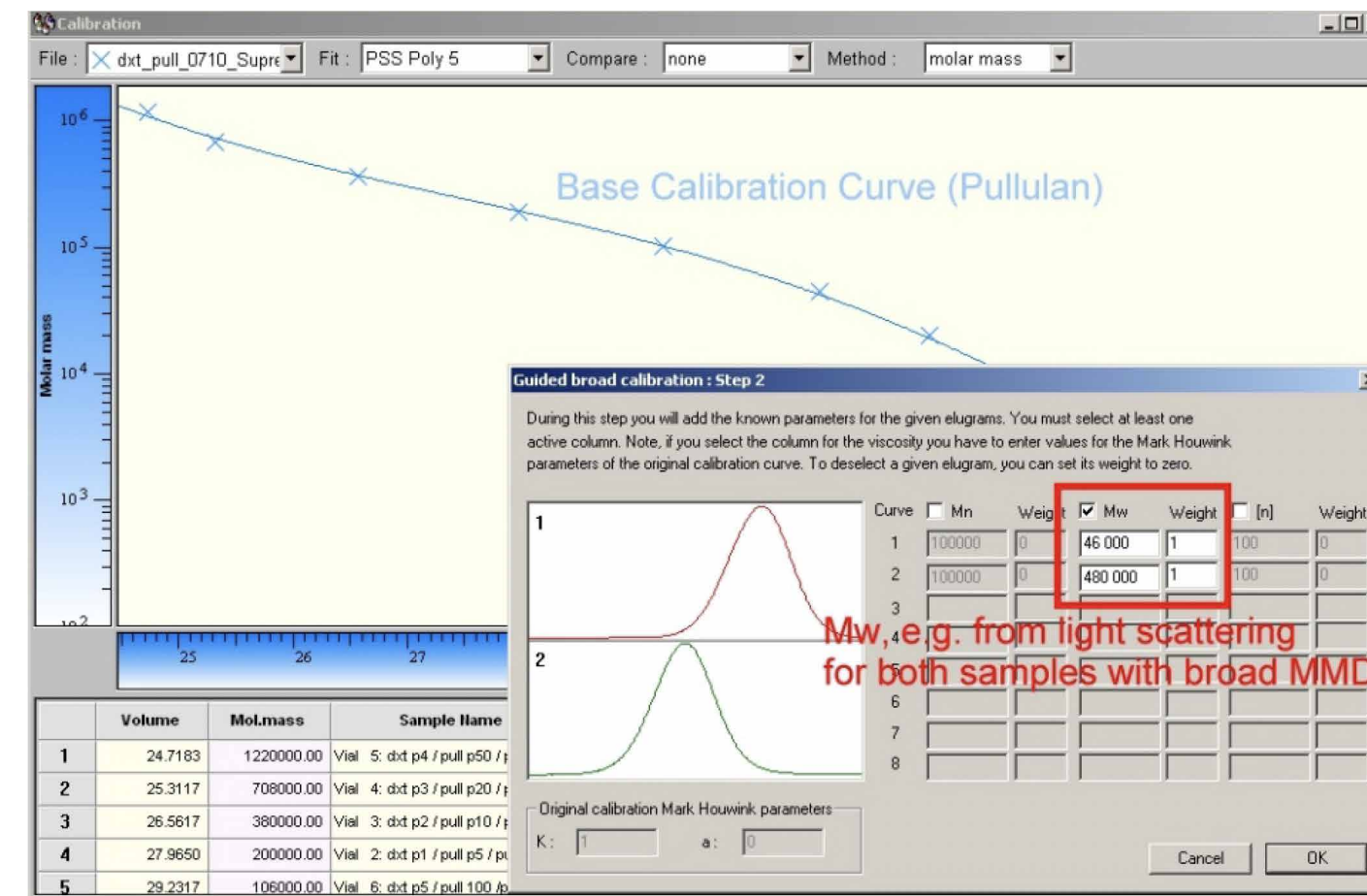


図 2 は、ブロードスタンダードのクロマトグラムと、ブロードスタンダードによるキャリブレーション概念を使用するために必要なものを示しています。キャリブレーションの精度を向上させるには、1 つ以上のブロードスタンダードを使用するべきです。広い分子量範囲をカバーする必要がある場合は、複数のサンプルの使用を推奨します。

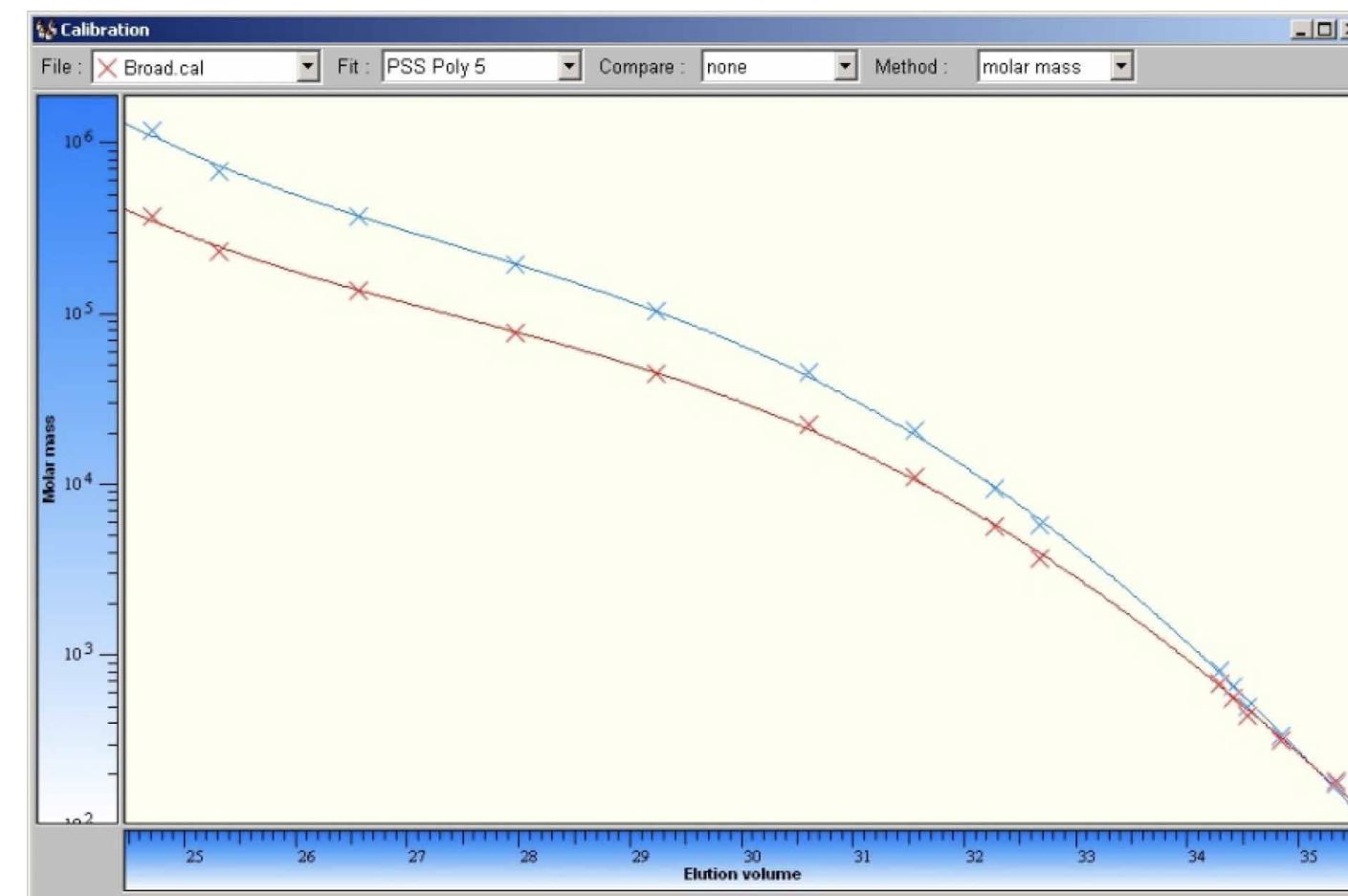


図 2. ベースキャリブレーションおよび Mw が既知の 2 つの分子量分布の広いサンプルのクロマトグラム。精度を向上させ分子量範囲を広くするために、最大 8 種類のサンプルを使用できます。

図 3 に、従来のベースキャリブレーション（青）と A と B を求めた後の検量線（赤）との比較を示します。この検量線を使用して未知のサンプルを評価し、このポリマーと同じタイプのサンプルの分子量を知ることができます。

図 3. プルランのベース検量線（青）と分子量分布が広いサンプルから最適化された A および B の値を用いた検量線（赤）との比較

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

ブロードスタンダードを入手する方法

サプライヤーから入手できるさまざまな化学構造を持つブロードスタンダードは限られています。ブロードスタンダードが市販されていない場合は、バッチ測定で例えば、 M_w については光散乱分析、 M_n については NMR または浸透圧測定から得られた結果を使用して真の分子量の値を決定することができます。マルチ検出 GPC/SEC を使用したオンライン測定も、この問題を解決できます。

文献

1. Grubisic, Z.; Rempp, P.; Benoît, H. A Universal Calibration for Gel Permeation Chromatography. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters* **1967**, 5 (9), 753–759.
2. Mori, S. Calibration of Size Exclusion Chromatography Columns for Determination of Polymer Molecular Weight Distribution. *Anal Chem* **1981**, 53, 1813–1818.
3. Mahabadi, H.; O’Driscoll, K. A Gel Permeation Chromatography Calibration Method for a Broad Molecular Weight Distribution Polymer. *J Appl Polym Sci* **1977**, 21, 1283–1287.
4. Weiss, A.; Cohn-Ginsberg, E. A Note on the Universal Calibration Curve for Gel Permeation Chromatography. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters* **1969**, 7 (5), 379–381.
5. Radke, W. Chromatography of Polymers, in: *Macromolecular Engineering*, Vol. 3. Wiley-VCH, **2007**, 1881–1936.
6. Held, D. Tips & Tricks: GPC/SEC How Do I Calibrate a GPC/SEC System? *The Column* **2008**.

まとめ

- ブロードスタンダードを使用したキャリブレーションは、高価で高度な検出を使用しない品質管理ラボにとって高速で使いやすいメソッドです。
- M_w および M_n が既知のブロードスタンダードは、コントラクトラボから容易に入手できます。これにより、研究者は正確で的確な分子量を世界中で測定できます。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ - GPC/SEC アプリケーション

1.5. 高分子量サンプルの分析技術

GPC/SEC は、分子量範囲がわずか数百から数百万までに及ぶさまざまなサンプルで使用できるメソッドです。低分子量サンプルの分析が簡単な一方で、数百万の範囲にある高分子量サンプルの分析では、より多くの注意と理解が必要です。

サンプルの準備

高分子量のポリマーの分析には忍耐が必要です。これは高分子量サンプルの場合は特に真実です。高分子量のポリマーが必要とする溶解時間は多大で、最悪の場合は数週間になることもあります。溶解時間は、サンプル、溶媒、分子量、多分散度、ポリマー鎖の化学的性質、結晶化度、組成、および立体化学などの多くのパラメータに依存します。経験則として、物質の分子量が高く、その分布が狭いほど、完全かつ再現性のある溶解にはより多くの時間が必要です。

ポリマーの溶解プロセスを高速化するためのオプションは多くありません。超音波装置の使用は、サンプルの分解を引き起こす可能性が高いため、推奨しません。超高分子量サンプルでは、マグネチックスターラーの使用でもポリマー鎖切断が生じることがあります。したがって、唯一の選択肢は、サンプルが単一の単離されたポリマー鎖の溶液となるまで待つことです。溶解プロセスに数週間/数日かかる場合は、安定化された溶媒を使用してください。多くの場合、溶解容器を暗所に保管することも推奨されます。せいぜい、溶液の均一化を助けるために、溶解容器を時々穏やかに攪拌するのみです。

サンプルがゲルや粒子を含む場合、メンブレンフィルタによるサンプル溶液のろ過は一般的に推奨されていますが、高分子量サンプルに対しては注意が必要です。フィルタのポアサイズを調整して、サンプルの分解を防ぐ必要があります。可能であれば、高分子量サンプル溶液のろ過は回避すべきです。

また、低分子量サンプルよりも、低濃度で使用すべきです。高分子量の分子は、他の鎖からの干渉なしに真の流体力学的体積までに膨張させるための余地が必要です。例えば、高分子量の物質の全く同じ質量を、広い範囲の注入量/濃度オプションを有する分析用カラムセットに注入できます。例として 2 つのオプションを使用し、最初に、サンプルを 10 μL の容量に 1.0 % w/v または 100 μL の容量に 0.1 % w/v で注入します。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによるタンパク質の分析

ブロードスタンダードによるキャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための GPC/SEC

用語集

前者の例では、高分子量の物質についての確かかつ再現可能な分子量の値を得ることはほぼできません。これは溶液の粘度の値がきわめて高く、前述したように高分子量の分子が真の流体力学的体積ではないという事実によるものです。実際には、より遅い溶出時間にサンプルピーク溶出が観察されるか（図 1 を参照）、またはカラムからさらに広いピークの溶出として観察されます。

分子量範囲	濃度
100 ~ 10,000	2 mg/mL (0.2 %)
10,000 ~ 1,000,000	1 ~ 2 mg/mL (0.1 ~ 0.2 %)
> 1,000,000	0.5 mg/mL 以下 (0.05 %)

溶出量に対するサンプル濃度の影響は、分子量とともに増大します。表に、分子量を基に、推奨されるサンプル濃度をまとめます。これらの推奨は、狭い分子量分布を持つサンプル用です。高多分散度が高いサンプル（広い分子量分布）の場合、より高い濃度が可能です。

図 1 に、参照物質の分子量が 500,000 Da および 5,000 Da の場合の溶出量およびピーク形状の変化を比較して示します。低分子量サンプルでは影響が小さい一方で、高分子量の溶出量およびピーク形状は大幅に変化します。

GPC/SEC システムを狭い分布の分子量標準でキャリブレーションする場合は、サンプルのピーク位置を参照標準のピーク位置と比較するため、溶出量の変化は特に問題となります。ピーク形状の変化（分離の不足を示す）は、オンライン粘度計、光散乱検出器、または三重検出システムによるキャリブレーションでも、すべての種類のキャリブレーションに影響を与えます。

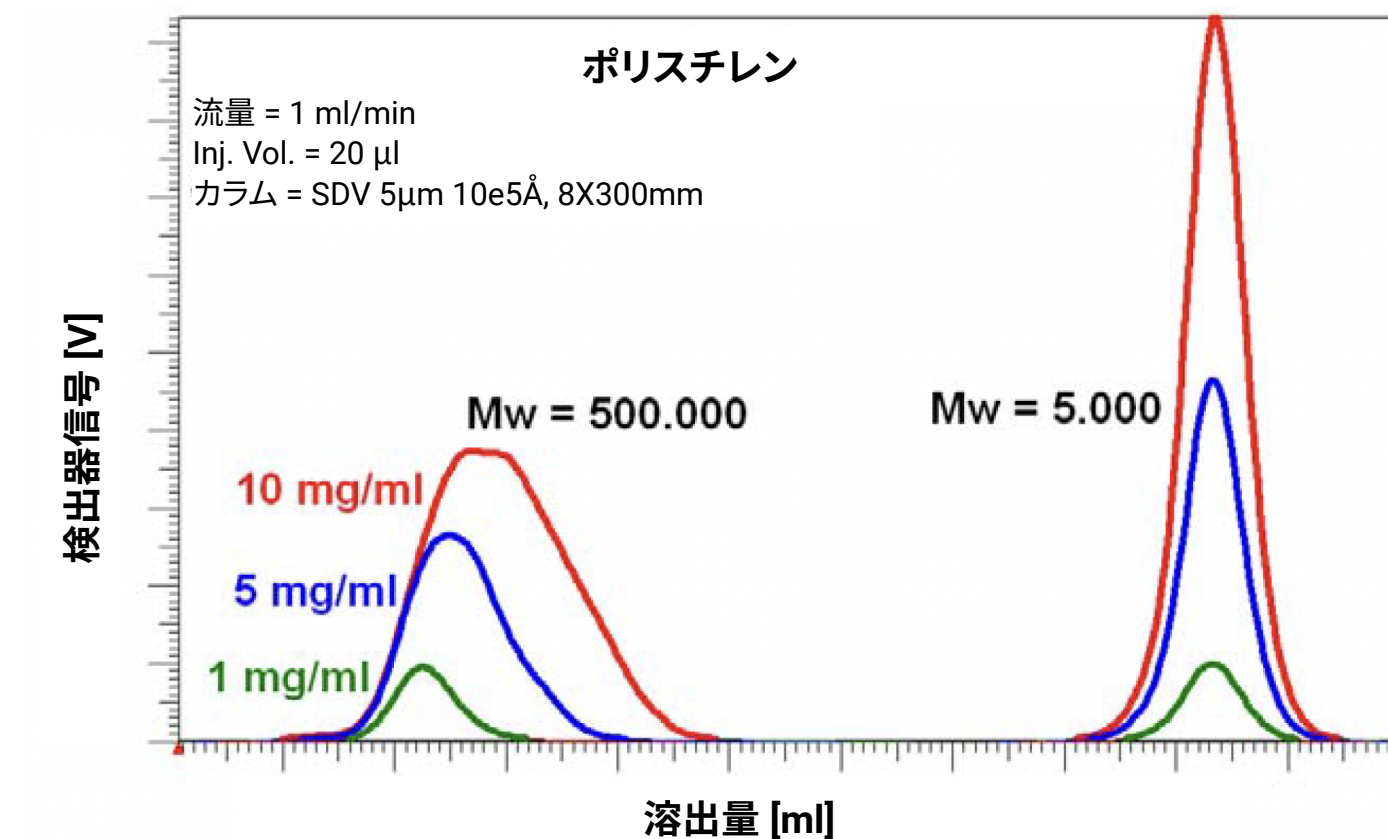


図 1. それぞれ 3 つの異なる濃度の 2 種類のポリスチレンのサンプルクロマトグラムの重ね表示。5,000 Da サンプルでは影響はごくわずかですが、500,000 Da サンプルでは溶出量、さらにはピーク形状までが濃度に強く影響されています。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

クロマトグラフィー条件

次のルールをすべてのサンプルに適用して GPC/SEC で分析します。

- より高い分子量の分離にはより大きなポアを持つ分離カラムが必要です。
- より高い分子量に対して通常より大きな粒子サイズを使用して、サンプルのせん断劣化を防止します。

しかし、分子量が数百万ダルトンのサンプルでは、追加の実験条件を考慮する必要があります。

最適化するための最も重要な条件はシステムの流量です。拡散係数が極端に低いため、高すぎる流量で分析すると、ポリマーは重大なピーク広がり、または予期しないピーク形状を示します。流量を 0.25 mL/min 以下にまで低減することで、高分子量サンプルにより現実的なピーク形状をもたらします。考慮すべきもう 1 つの要素は長いポリマー鎖の伸長によるせん断です。

図 2 に、0.5 mL/min および 0.25 mL/min で測定した高分子量サンプルの重ね表示を示します。0.50 mL/min の曲線は不自然により高い溶出容量にシフトし、さらにピーク形状が変化しています。

オンライン光散乱検出器は、間違ったクロマトグラフィー条件を視覚化する適切な検出器です。これらの検出器は、使用できる超高分子量キャリブレーション標準の欠如を克服するためによく必要とされるため、多数のセットアップにデバイスがすでに含まれています。

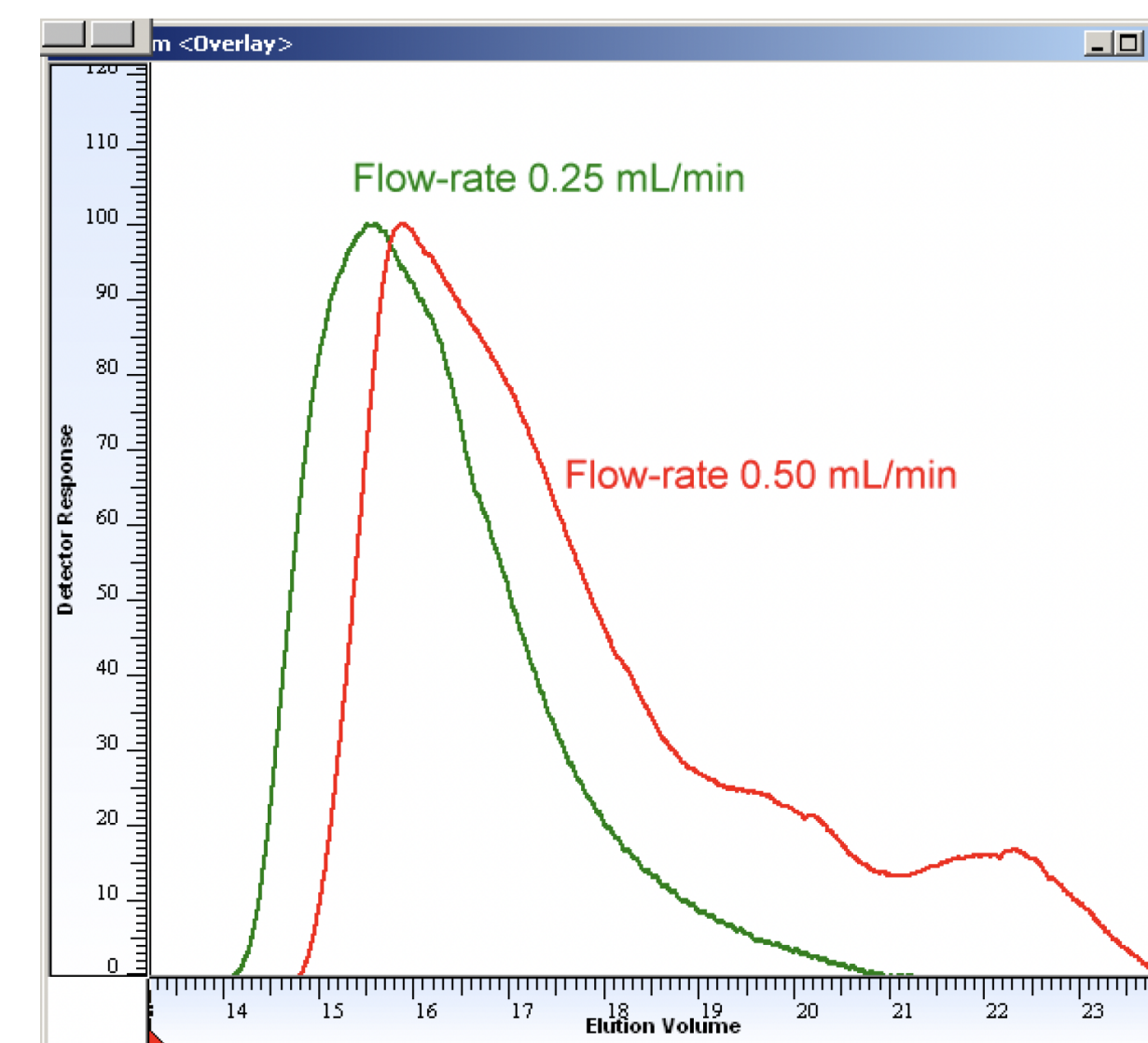


図 2. 0.5 mL/min (赤) および 0.25 mL/min (緑) の流量で得た、3,800,000 Da サンプルのクロマトグラムを重ね表示。流量を 0.1 mL/min に低減することで、分析結果はさらに向上します。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

クロマトグラフィー条件

図 3 は、0.5 mL/min の流量での高分子量サンプルの多角度光散乱検出分析の結果です。測定した分子量は広い溶出量範囲で基本的に一定を保っています。これは、間違っただクロマトグラフィー条件の使用がもたらした、非効率な分離が原因です。

高分子量を分析する際のこの他の実際の条件は、検出限界とサンプルの粘度です。

- 低濃度を使用する必要があるため、非常に多くの場合、濃度検出器の S/N 比は低くなります。しかし、サンプル濃度を高めるのではなく、注入での溶出量を増やす方が適しています。これにより、注入された質量全体も増大するため、信号が改善します。ただし、これはより低い分子量では推奨されません。この場合は、濃度を上げて少量を注入する方が適しています。
- オートサンプラを使用し、高分子量の存在のためにサンプル粘度が高い場合、オートサンプラシリンジの吸引スピードを低下させることを推奨します。これにより、注入の再現性が向上します。

高分子量分析のための優れた実践

- 低濃度を使用します。必要な場合は注入量を増やします。
- 落ち着いて完全にサンプルが溶解するための十分な時間を与えます。
- 可能な場合は、サンプルのろ過を回避します。回避できない場合は、適切なポアサイズの充填剤を使用します。
- 低流量 (0.25 ~ 0.1 mL/min) を使用してオートサンプラシリンジの吸引速度を下げます。
- 大きな粒子サイズの充填剤およびより大きいポアのカラムを使用します。クロマトグラムに疑わしいショルダーがある場合、カラムの排除限界を確認します。

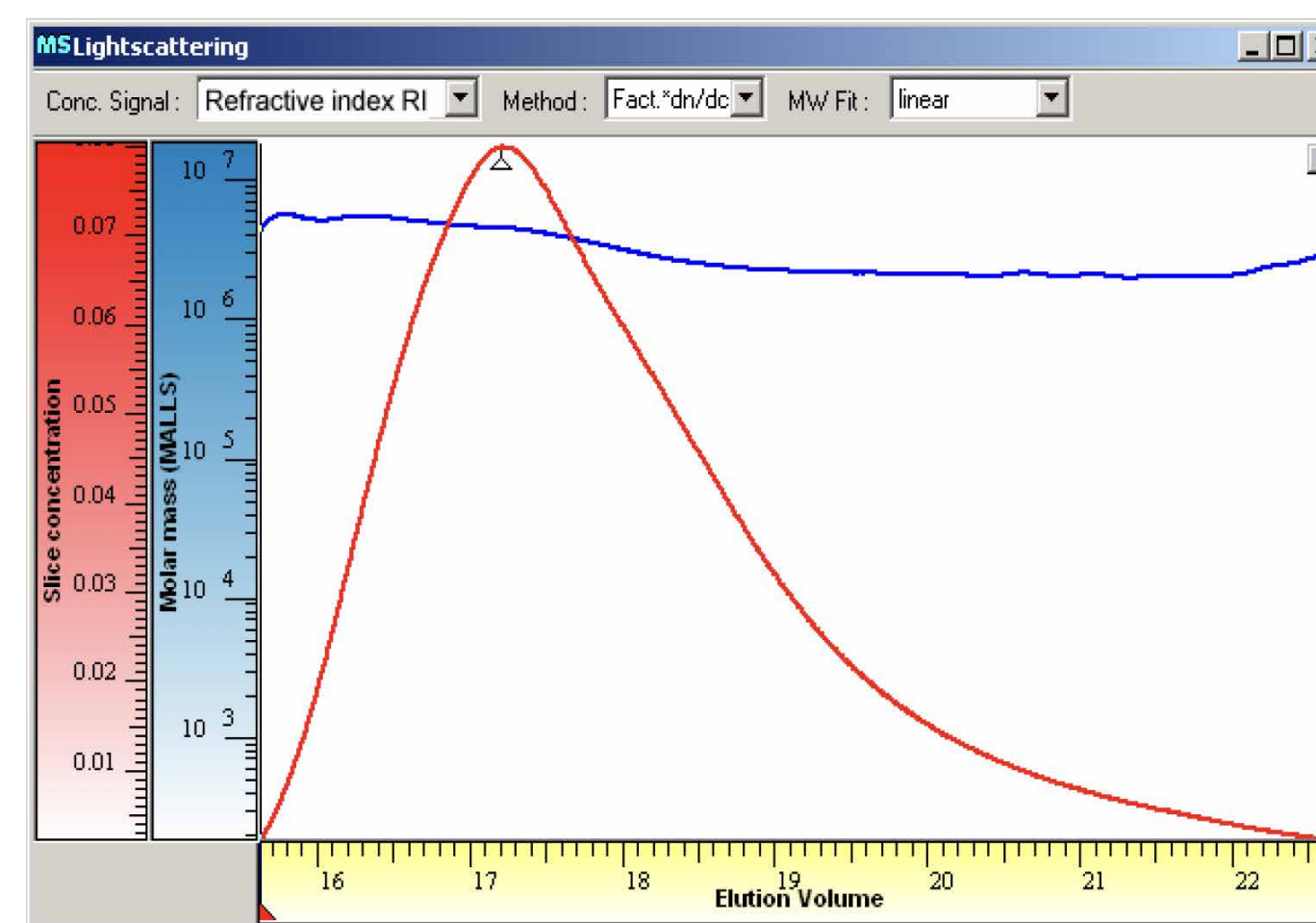


図 3. 高すぎる流量 (0.5 mL/min) でのサンプル分析のスライス濃度 (赤) およびオンライン測定された分子量 (MALS、青)

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ - GPC/SEC アプリケーション

1.6. 分岐の分析

ポリマー材料の利点は、多くのパラメータを調整することによって特定の用途に合わせて材料の物理的特性をカスタマイズできることです。組成、平均分子量、分子量分布のほかに、物理的特性をコントロールするもう 1 つの鍵となる要素は分岐です。クロマトグラフィーおよび高度な検出により、分岐した分子の特性を明らかにできます。

分岐には 3 つ以上の鎖が接続された少なくとも 1 つの分岐点が必要です。分岐は、合成中に望ましくない副反応として発生することがあります。または、材料の物理的特性を最適化するために意図的に導入されることがあります。星型または櫛型ポリマーなどの定義された構造を合成するためのさまざまな合成経路が存在します。

分岐ポリマーの特性は、(溶融) 粘度、ガラス転移温度、バルク熱膨張の係数、溶解度などの点で、線状ポリマーの特性とは大いに異なります。特性の変化は、分岐のタイプ、分岐の長さ、分岐の密度などのパラメータに依存します。

分子量分布だけでなく分岐分布も存在する複雑なポリマー混合物の特性解析は、大きな課題となります。分岐のタイプに応じて、より深い理解を提供するさまざまな検出および分離オプションがあります。

星型または櫛型ポリマーなどの定義された構造を特性解析したり、または長鎖分岐を調べたりするためには、GPC/SEC をオンライン粘度検出器¹ (または、適切さに欠けますが多角度光散乱検出器) と接続して使用することができます。ポリオレフィンの短鎖分岐を調査するためには、高温 GPC (HT-GPC) と赤外線 (IR) 検出器を使用できます。²

幅広い分子量分布を示す分岐ポリマーや、さまざまな分岐密度をもつポリマーサンプルの場合、構造を詳しく解明するためには GPC/SEC でのサイズに基づいた分離の分離能が十分でない可能性があります。このため、相互作用ポリマークロマトグラフィー (例えば、グラジエントポリマー HPLC、TGIC) などの代替分離メソッドまたは 2 次元クロマトグラフィーを適用すべきです。³

GPC/SEC と粘度計

GPC/SEC の制約は、溶液中の分子のサイズのみに基づいて分離されることです。分岐したポリマーサンプルでは、参照物質を用いた従来のキャリブレーションを行うとサンプルの分子量を過小評価する結果となります。ここでの解決策は、オンライン粘度計や光散乱検出器などの分子量測定が可能な検出器を使用することです。粘度計を使用して、構造分析およびユニバーサルキャリブレーションに基づいた分子量測定を実施します。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによるタンパク質の分析

ブロードスタンダードによるキャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための GPC/SEC

用語集

オンライン粘度計は分子量測定が可能な検出器に分類されますが、しかし、信号強度は分子量よりも粘度に依存します。粘度計により溶液中の分子の密度の情報を直接得ることができます。このような機器のセットアップ（多くの場合、光散乱検出器も含む）は非常に一般的ですが、測定結果を理解するには経験を積む必要があります。

分岐分析のための重要な方法はマーク・ホーウィंकプロットです。これは、（例えば、オンライン粘度計を使用して得られる）固有粘度の対数を、ユニバーサルキャリブレーション（または光散乱検出）を使用して得られる分子量の対数に対してプロットするものです。マーク・ホーウィंकプロットの傾き（マーク・ホーウィंक指数 α ）は、溶液中の分子の形状に依存します。固有粘度（固体球）の分子量依存性がなければ、傾きは 0 と予想されます。一方、剛体棒のマーク・ホーウィंक指数は 2 です。代表的なランダムコイルポリマーは、溶媒に依存し、0.5 ~ 0.8 の範囲のマーク・ホーウィंक指数を示します。

生成されたデータを同一の化学構造および分子量を有する直鎖と比較することができれば、所定のポリマーについての分岐分析は容易になります。図 1 に、異なるポリエチレンサンプルのマーク・ホーウィंकプロットを示します。オンライン粘度計を搭載した HT-GPC 機器を使用してこのプロットは作成されました。

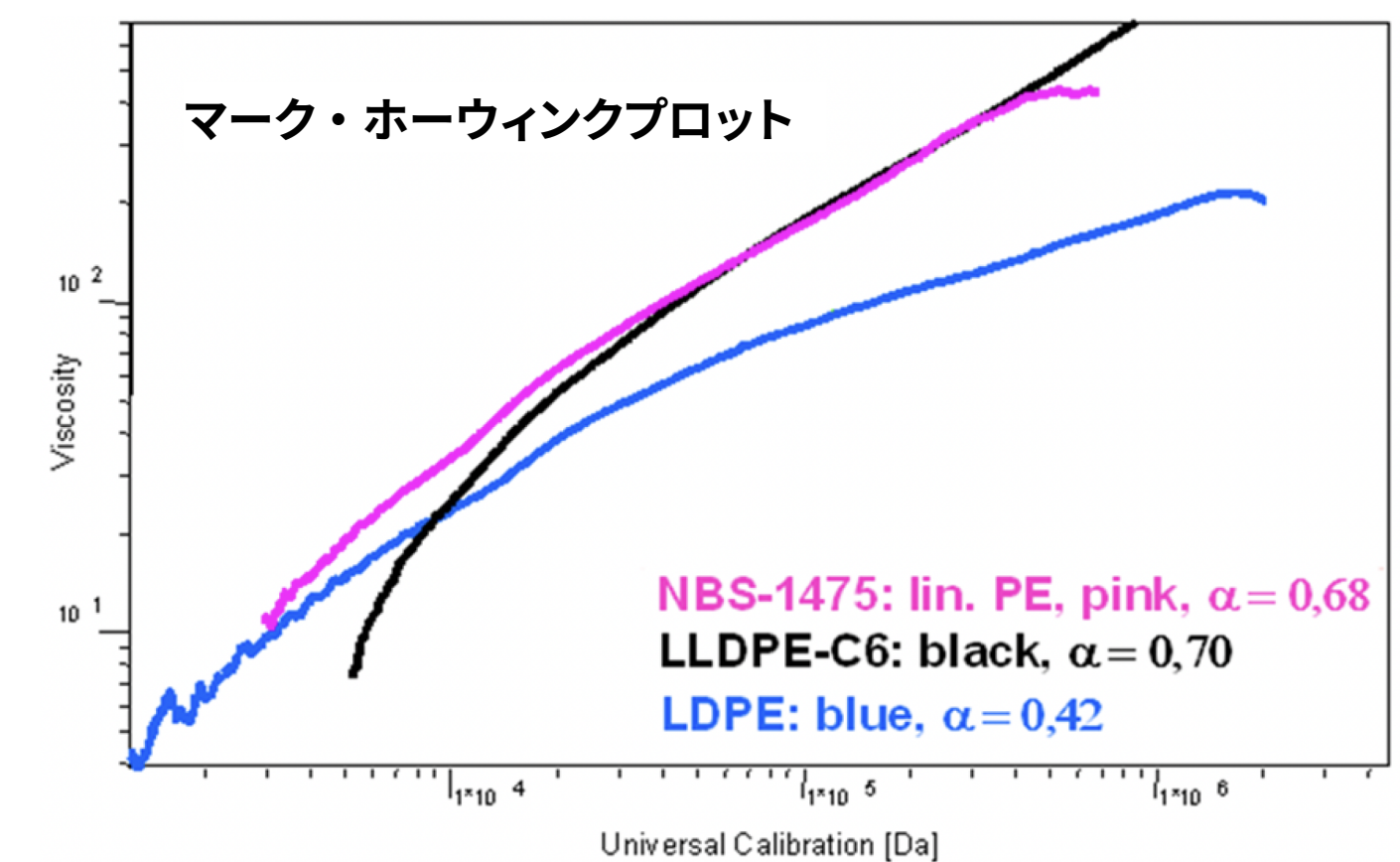


図 1. 3 つの異なるサンプルに対するマーク・ホーウィंकプロットの重ね表示。線状 NBS-1475（ピンク）、短鎖分岐を有する線状低密度ポリエチレン（LLDPE、黒）、および長鎖分岐を有する低密度ポリエチレン（LDPE、青）

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

短鎖分岐のみを有する線状低密度ポリエチレン (LLDPE) のマーク・ホーウィングプロットは線状サンプル (NBS-1475) のプロットとほぼ重なっていますが、長鎖分岐を有する低密度ポリエチレン (LDPE) は NBS-1475 から大きくはずれています。同じ分子量で、LDPE 鎖は、線状サンプルと比較して大幅に低い固有粘度を明らかに示しています。これは分岐が存在する結果です。このずれは分岐密度が増大すると大きくなります。分岐ポリマーと直鎖ポリマーのマーク・ホーウィングプロットを共通切片に外挿することによって、分岐が最初に起こる分子量を検出することができます。同じ分子量で分岐ポリマーと直鎖ポリマーの固有粘度の比をとることによって、収縮係数 g' を決定することができます、そこから分岐の数に関する結論を導き出すことができます。

図 2 に、ポリ (tert-ブチルアクリレート)、PtBuA、星型ポリマーの GPC/SEC と粘度計での測定結果を示します。星型ポリマーは、中心コアにいくつかのアーム (直鎖) が結合した比較的単純な分岐ポリマーです。

星型ポリマーは、アームファースト法を使用して合成されました。狭い分子量分布の PtBuA プリカーサアームを、少量の二官能性クロスリンカーを使用して結合し、コアが形成されます。つまり、2 つの星型ポリマーは、コアに結合した (ほぼ同じ長さを有する) アームの数によって分子量が異なります。

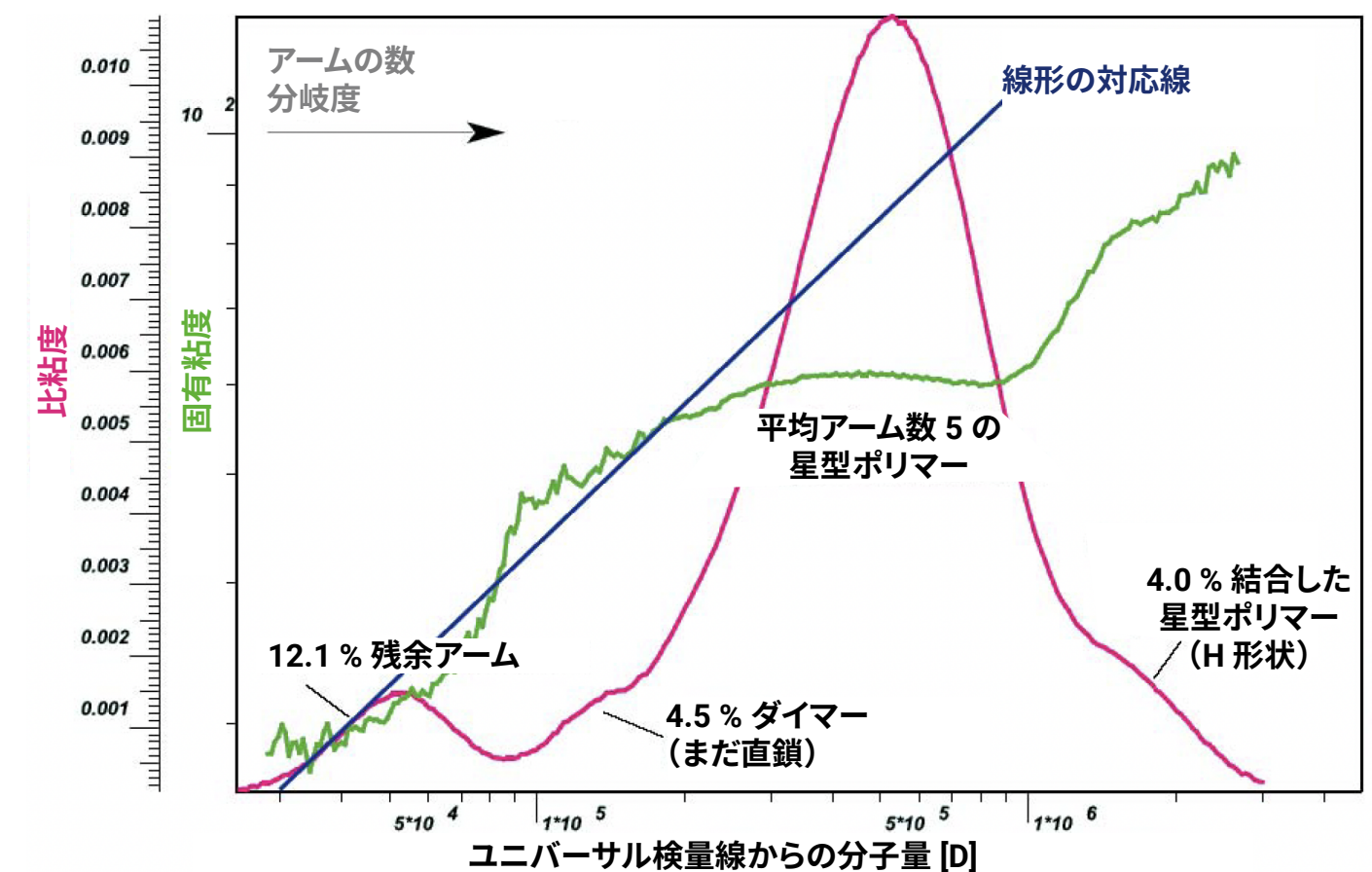


図 2. アームファースト星型ポリマー (アームの結合によって分子量が増加) のマーク・ホーウィングプロット。構造の変化 (ランダムコイルから高密度球状へ) は固有粘度の最大値により反映されます。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによるタンパク質の分析

ブロードスタンダードによるキャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための GPC/SEC

用語集

マーク・ホーウィングプロットは固有粘度の最大値を明らかに示し、これは dendrimer に対しても認められます。合成は線状プリカーサから開始され、2本の直鎖の結合によって、まだ線状の分子であるダイマーが形成されます。プリカーサ分子とコアとのさらなる反応は、3つ以上のアームの星型ポリマーをもたらします。ここで、分子量による固有粘度の増加は、分岐構造のアーム数の増加に伴うセグメント密度の増加による固有粘度の減少によって相殺されます。この分子構造の変化はオンライン粘度計を用いて測定した粘度から正確にモニタリングできます。注意すべきは、分子量最大値の約2倍で生じる固有粘度の突然の変化です。粘度の急激な増加は、おそらくアームを介した2つの星型分子の結合が起こるときの H 形状の分子の形成に起因します。

前述の合成経路とは異なり、星型ポリマーは、多官能性開始剤を使用するなどコアファースト法を使用して合成されます。この場合、結果は異なります。星型の分子量の増加はアームの成長に起因するため、構造変化はありません。このような星型ポリマーの場合、マーク・ホーウィングプロットは、図3に示すように予想されます。各星型ポリマーでは、マーク・ホーウィングプロットは、同じ分子量でより低い粘度へ平行にシフトします。解析すると、同じママーク・ホーウィング α 、低下したママーク・ホーウィング K(切片) が得られるはずですが、アーム数が増加すると固有粘度はより低くシフトします。

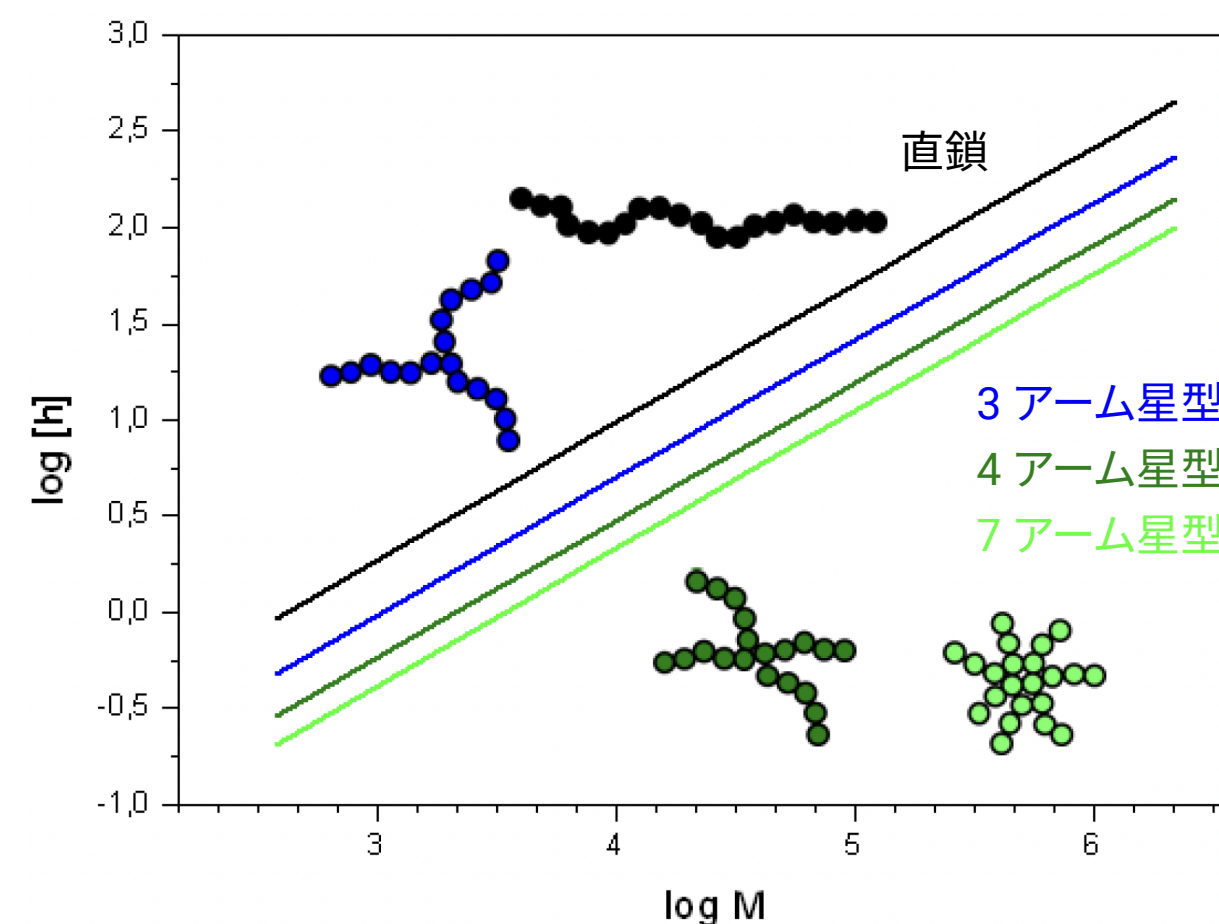


図3. コアファーストで合成された星型ポリマーのマーク・ホーウィングプロット。アームは多官能性開始剤コアから始まり、分子量の増加はアームへのモノマーユニットの追加に起因します。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによるタンパク質の分析

ブロードスタンダードによるキャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための GPC/SEC

用語集

高度な分離技術

前述したように、GPC/SEC の技術の制約は、溶液中の分子のサイズに基づいてしか分離しないことです。粘度計や光散乱検出器などの分子量測定が可能な検出器を使用した場合でも、分岐ポリマーの分析戦略の変更が必要となる状況があります。

アームファースト星型ポリマーのように、流体力学的体積が分子量とともにわずかにしか増加しない場合、サイズに基づく分離では限りがあります。この場合、相補的技術として相互作用ポリマー کروマトグラフィー (IPC、分離は化学組成に基づく) を使用できます。図 4 に、アーム数がより多い星型ポリマーに対して高分離能を有する、アームファースト星型ポリマーのグラジエント分離のクロマトグラムを示します。

サンプルが構造的不均質性に加えて広い分子量分布を示す場合 (例えば、分岐鎖および直鎖が存在する場合) は、共溶出のリスクが増大します。この場合、分子量の小さい線状鎖と同じ流体力学サイズを持つ分子量の大きい分岐分子が、同じ保持容量で溶出します。結果的に、カラムから溶出するフラクションを単分散であるとみなすことは、もはやできません。

2次元 (2D) 分離を適用すると、分岐ポリマーの包括的特性解析を実現できる可能性があります。2D では 2 つの独立した分離技術を組み合わせて等高線プロットを作成し、異なる種のポリマーの定量を行うこともできます。図 5 に、組成が異なる線状および櫛状の分子が適切に分離されている例を示します。

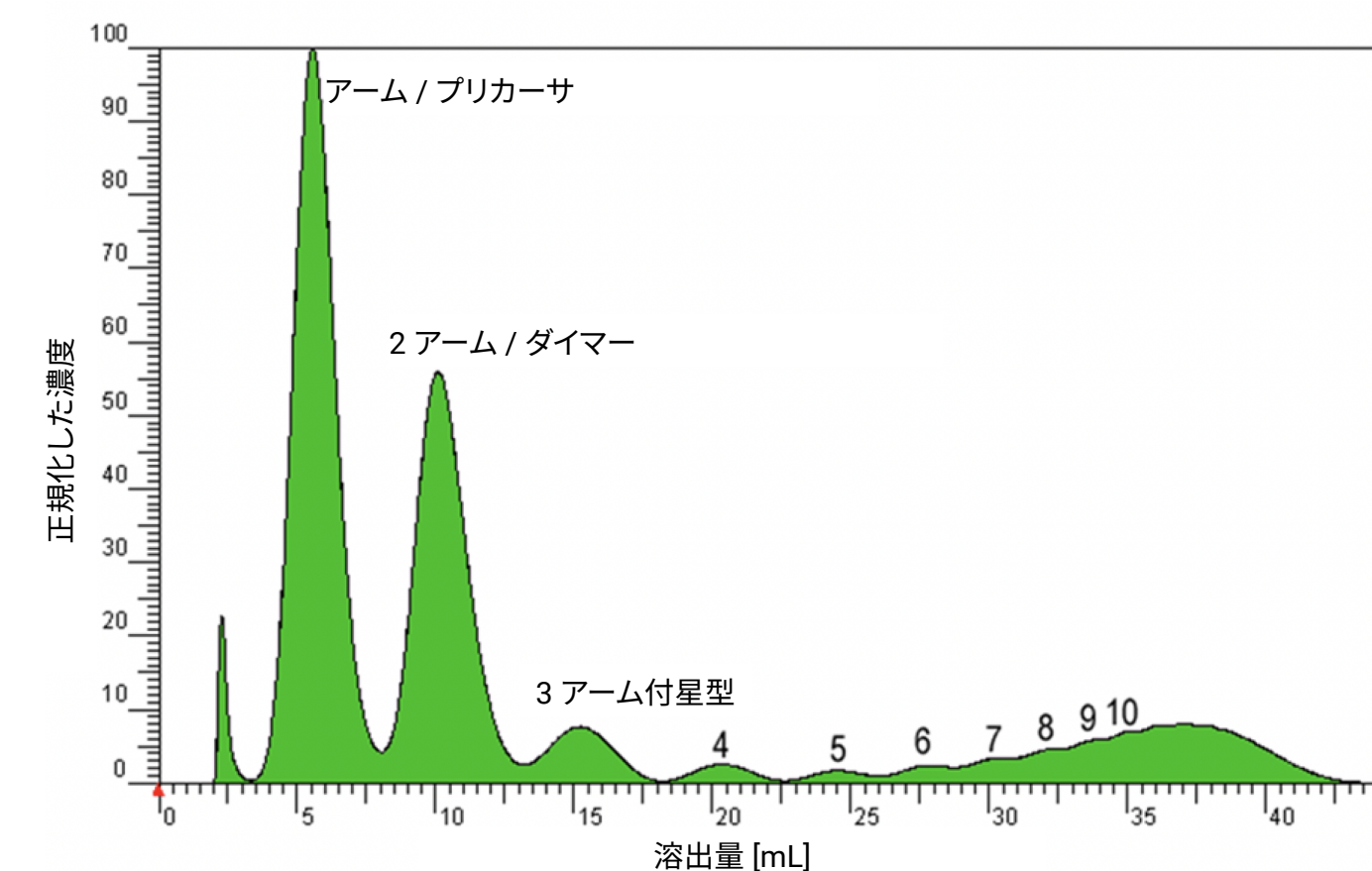


図 4. 相互作用ポリマー کروマトグラフィー (IPC) による星型分岐ポリマーの分離

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

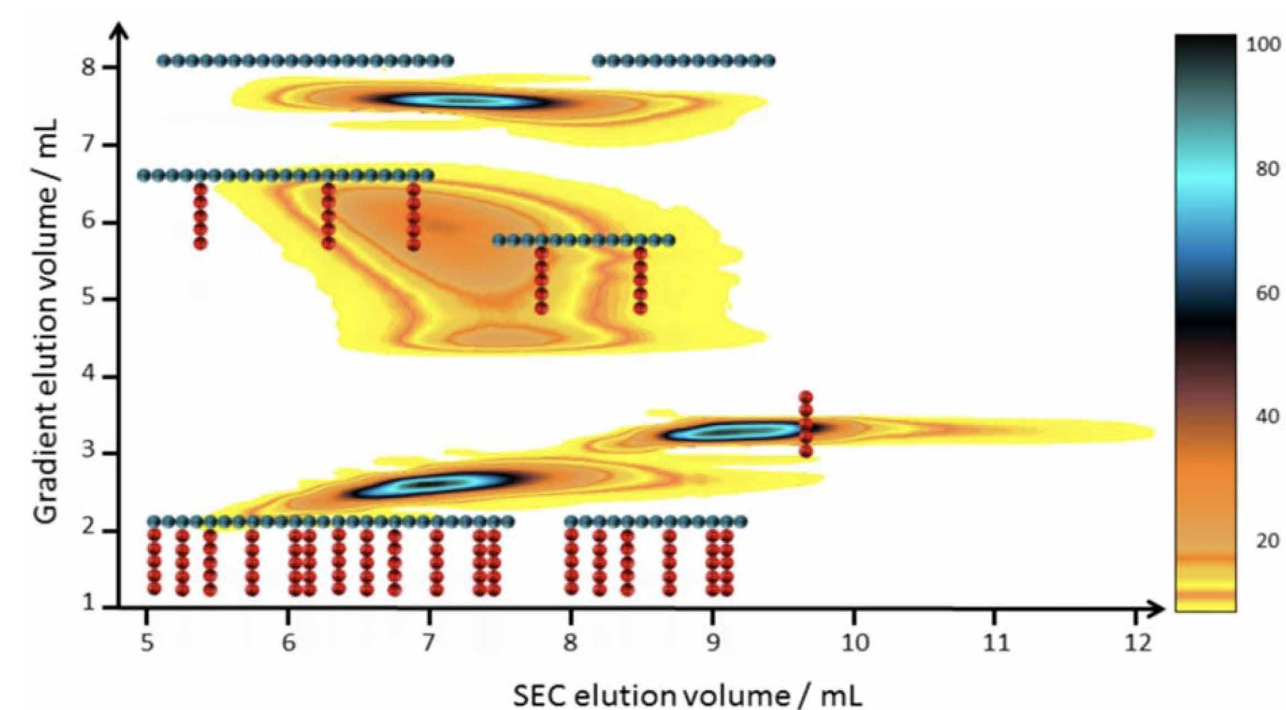


図 5. 2次元分離 SEC × 相互作用ポリマークロマトグラフィー (IPC) による星型分岐ポリマーの分離

まとめ

- 分岐は、重合中の副反応として生じる場合や、材料の物理的特性をカスタマイズするために導入されることがあります。
- オンライン粘度計は分子の密度情報を提供し、分子量による構造変化のモニタリングにより、分岐分子の特性評価を可能にします。
- 長鎖分岐を示すポリエチレンはオンライン粘度計で分析でき、一方、短鎖分岐に関する情報は FTIR 検出によって得ることができます。
- 分岐分子および線状分子の共溶出が問題となる可能性があります。このような場合、高度な分離技術または 2 次元クロマトグラフィーを適用できます。

文献

1. Held, D. Tips & Tricks: GPC/SEC Viscometry - A Versatile Tool for Structure Determination and More. The Column **2012**, 8 (2), 12–16.
2. Montag, P. Tips & Tricks: GPC/SEC New Development in High-Temperature (HT) GPC/SEC. The Column **2008**.
3. Gerber, J.; Radke, W. Topological Separation of Linear and Star-Shaped Polystyrenes by Offline 2D Chromatography. Polymer **2005**, 46, 9224–9229

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ - GPC/SEC アプリケーション

1.7. メンブレンフィルタ分析のための GPC/SEC

薄膜またはディスク形状のメンブレンまたはメンブレンフィルタは、特定のポアサイズおよび分布を持つ多孔性のポリマーまたは無機物質で製造されます。メンブレン技術の進歩によって、メンブレンろ過分野は多様なアプリケーションに対応して急速に拡大しています。例えば、汚染除去および水処理ソリューション、特定のサイズを超える粒子および微生物の保持、または溶液中の大きな可溶性の巨大分子の除去や推定に対応するニーズが高まっています。明らかに、品質管理や再現性の要件のためには、多孔性のメンブレン材料のポアサイズおよび捕集挙動を知る必要があります。

捕集挙動、ポアサイズ、カットオフ分子量などのメンブレン性能パラメータは、標準的なクロマトグラフィー機器を使用して測定することができます。このメンブレン特性評価手法は、既知のサイズまたは分子量の参照物質の選択、準備して最終的にろ過を行い、その後 GPC/SEC 分析を行います。¹

GPC/SEC は、溶液中の可溶性巨大分子を特性解析するための標準的な技術です。サイズの違いを基に巨大分子を分離するため、未ろ過溶液とろ過溶液を比較してメンブレンのろ過能力についてさらに理解するために使用できます。

この手法の利点は、現場の使用条件下でメンブレンが試験されることです。これは、メンブレンの品質として、膨張または非永久的な多孔性を考慮しなければならない場合には特に重要です。

参照物質の選択と準備

ストックソリューションの調製のため、サイズまたは分子量が既知の参照物質を選択します。¹ ろ過プロセスのために有機溶媒または水系溶媒が使用されるかによって、ポリスチレン、デキストラン、またはプルランを使用できます。

参照物質が広い分子量/分子量分布（大きな多分散性指数（PDI））を示す場合、湿潤状態のメンブレンのポアサイズ範囲全体を単一の参照物質で十分にカバーすることができます。合成プロセスの生成物で大きな PDI を持つ参照物質を使用することは、広い分子量分布をもつこと、材料が安価となることから、狭い分子量分布を持ついくつかのサンプルを混合したものよりも好まれます。

参照物質の分子量/分子量の範囲を選択して、そのいくつかの部分がメンブレンによって保持され、他の部分は通過するようにする必要があります。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

その後、参照物質を目的の溶媒で溶解し、ストックソリューションを得ます。ストックソリューションに適切なる過条件（クロスフロー、背圧など）を適用し、試験メンブレンでろ過します。

メンブレンのポアよりも小さい分子はメンブレンを通過してろ過液中に浸透することができますが、大きな分子は供給側（残余分）に残ります。

同じストックソリューションを使用して複数のメンブレンを試験することができます。容易な品質管理または異なるメンブレンの種類の比較が可能になります。

GPC/SEC によるサンプル分析

重要なメンブレン特性は、ストックソリューションの濃度プロファイル、ろ過液、および残余分（オプション、手法によっては不要）の具体的な比較によって得ることができます。収集されたサンプルを、イソクラティックポンプ、注入システム、そして可能であれば示差屈折率 (RI) 検出器を搭載する標準的な GPC/SEC クロマトグラフィーシステムで測定すると、どの程度メンブレンを通過したかが検出できます。

例えば、3 つの異なる分子量のデキストラン標準混合からなるストックソリューションとろ過液のサンプルクロマトグラムの重ね表示を図 1 に示します。広い分子量分布を持つデキストランを使用する場合、サンプルクロマトグラムは最大値および最小値を示さず、一様な分布として現れます。

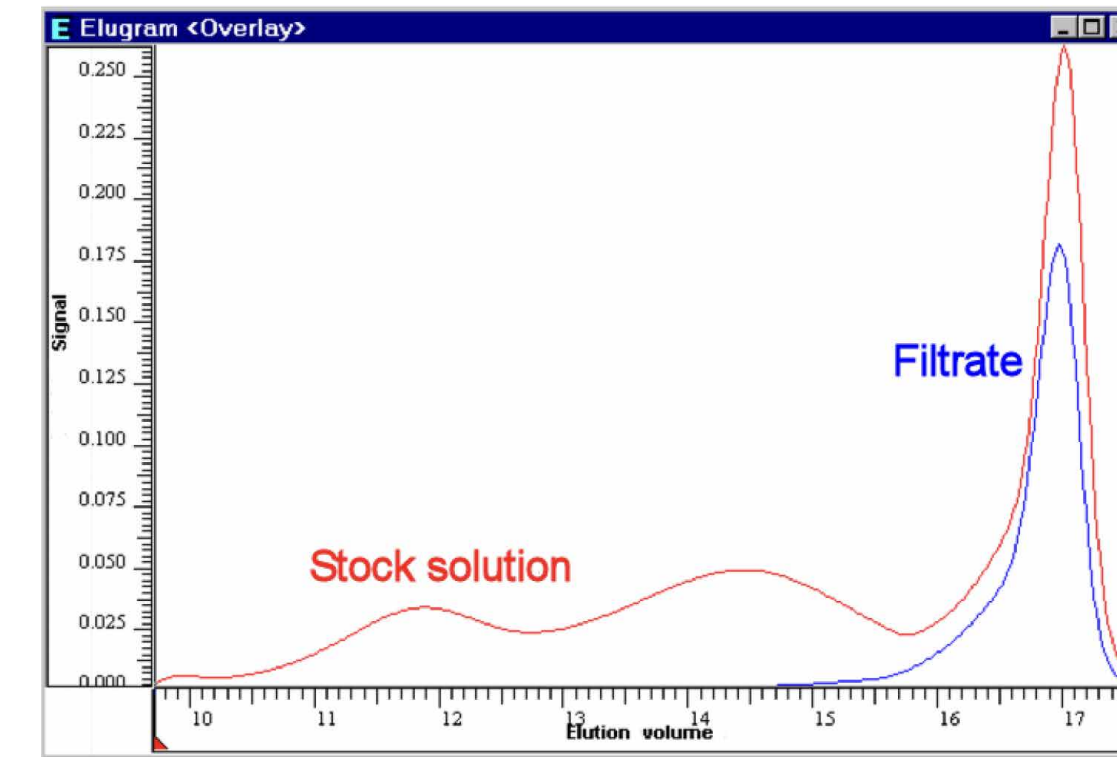


図 1. 3 つの異なる分子量のデキストラン混合からなるストックソリューションと（赤）とろ過液（青）の GPC/SEC クロマトグラムの重ね書き表示

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

ストックソリューションとろ過液のデータを重ね書き表示することによって、大きな分子量/分子量分布の大半は GPC/SEC での検出量が低く、メンブレンで保持されたことが明らかに分かります。溶出量が約 17 mL のピークについて、低分子ピークの割合を比較しました。

サンプルクロマトグラムを比較するすべての場合で、再現性のある結果が最も重要です。内部標準またはフローマーカーの使用は、結果に再現性がない問題を早期に特定するときに役立ちます。フローマーカーを使用した補正は、データおよび結果の品質を向上させます。²

結果およびメンブレンのパラメータ

次の段階は、定量により重要なメンブレンのパラメータを求めることです。

- シーブ曲線および捕集効率
- 平均ポアサイズおよびポアサイズ分布
- カットオフ分子量
- サイズ選択性
- ポアのアクセス性

シーブ曲線と呼ばれる曲線を、図 1 に示すストックソリューションとろ過液のサンプルクロマトグラムを基に生成することができます。

シーブ曲線の値 (S) は、次の式を使用し、ストックソリューション (cS)、ろ過液 (cF)、および (すべてのアプリケーションで必要とされるわけではない) 残余分 (cR) から計算することができます。

$$S = 1 - (cF / cS)$$

一方で、文献には他の手法/式が示されており、このデータに適用することもできます。

GPC/SEC では複数のメンブレンを順に特性評価でき、それぞれのシーブ曲線を容易に比較できます。

シーブ曲線の分子量は、ストックソリューションの参照物質と同じタイプの標準を使用して作成した較正曲線を適用することによって測定できます。³

さらに、メンブレンのカットオフ分子量を推定できます。このカットオフ分子量の値は特定の量のサンプルの捕集を定義します。通常は、90 % がカットオフ分子量として使用されます。しかし、その他の捕集パラメータは特定の質問に回答したり、または異なるメンブレンを詳細に比較したりするために役に立ちます。分子量から、ポアサイズを、例えば文献から得たパラメータと R_g -M の関係を使用して計算することもできます。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

図 2 に、3 つの異なる再生セルロースメンブレンの 90 % カットオフと平均ポアサイズの結果を示します。3 つのメンブレンはすべて、異なるろ過特性を示し、重ね合わせたデータにより、わずかな特性の違いも視覚化することが可能です。メンブレンの選択性 D も計算できます。通常、これは 25 % および 75 % の捕集率で決定されます。 $D = 1$ の理想的な選択性の場合、メンブレンでは単一サイズのみがポアを通過します。選択性が達成されず、選択性パラメータ $D = \infty$ の場合は、すべてのサイズがメンブレンを通過します。

まとめ

- 標準の GPC/SEC 機器を使用してメンブレンの特性解析が可能です。この場合、ろ過実験から得られる、ストックソリューション、ろ過液、および残余物を GPC/SEC サンプルとして分析します。
- フローマーカーの使用によりデータ品質が向上します。
- 作成された GPC/SEC サンプルクロマトグラムからシープ曲線を計算できます。
- 校正曲線を使用して分子量を決定でき、 R_g - M の関係を使用してポアサイズを計算できます。

文献

1. Strathmann, H. Economic Assessment of Membrane Processes, in: Separation and Purification Technology. Marcel Dekker, **1992**.
2. Held, D.; Radke, W. Tips & Tricks: GPC/SEC Flow Marker — An Easy Concept to Increase Reproducibility, The Column **2016**, 12 (6), 24–27.
3. Held, D. Tips & Tricks: GPC/SEC How Do I Calibrate a GPC/SEC System? The Column **2008**.

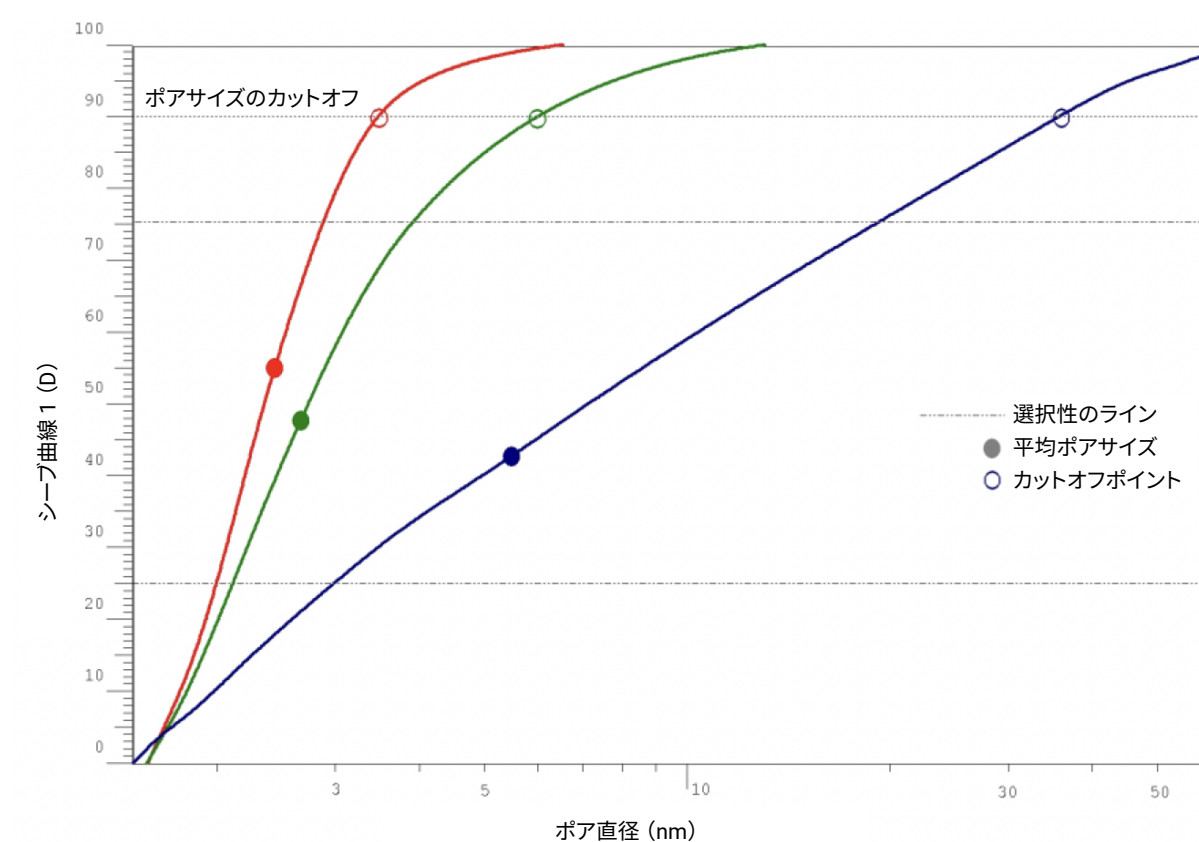


図 2. 再生セルロース製の 3 つの異なる平面メンブレンのシープ曲線の重ね書き表示

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC アプリケーションの紹介

製品登録と REACH

定量および平均分子量以上のものの獲得

サイズ排除クロマトグラフィーによる
タンパク質の分析

ブロードスタンダードによる
キャリブレーション

高分子量サンプルの分析技術

分岐の分析

メンブレンフィルタ分析のための
GPC/SEC

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ - GPC/SEC アプリケーション

用語集

BHT	ブチルヒドロキシトルエン	NaN₃	アジ化ナトリウム
Da	ダルトン (E g/mol)	QC	品質管理
DAD	ダイオードアレイ検出器	PDI	多分散性指数 ($D = M_w / M_n$)
DMAc	ジメチルアセトアミド	PLA	ポリ乳酸
DMF	ジメチルホルムアミド	PLC	低懸念ポリマー
dn/dc	屈折率増分	PMMA	ポリメチルメタクリレート
ELSD	蒸発光散乱検出器	PS	ポリスチレン
ESI-MS	エレクトロスプレーイオン化質量分析	R_g	回転半径
GPC	ゲル浸透クロマトグラフィー	REACH	化学品の登録、評価、認可及び制限に関する規則
LAC	液体吸着クロマトグラフィー	RI	示差屈折率 (検出/検出器)
LC	液体クロマトグラフィー	SEC	サイズ排除クロマトグラフィー
LiBr	臭化リチウム	溶媒	溶液を作成するために溶質が溶解された液体
LiCl	塩化リチウム	固定相	分離装置中の物質を分離する固相
LS	光散乱	TCB	トリクロロベンゼン
MALS	多角度光散乱	THF	テトラヒドロフラン
M_n	数平均分子量	UV	紫外線 (検出/検出器)
移動相	クロマトグラフィーシステム内で使用される液相	Ve	溶出量
M_w	重量平均分子量		
M_z	z 平均分子量		
MALDI-TOF	マトリックス支援レーザー脱離イオン化 飛行時間型		



ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE11979303

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, June 1, 2023

5994-5915JAJP