

GPC/SEC のための段階的なメソッド開発

技術概要

著者

Adam Bivens
Agilent Technologies, Inc.

概要

アジレントは、さまざまなアプリケーションおよびサンプルに適応する GPC/SEC ソリューションを包括的に提供しています。堅牢なメソッドと適切な製品の選択は、スループットを最大化しデータエラーを低減して、ラボの予算に直接影響を及ぼします。この技術概要では、最初の化合物の同定からカラムの寿命までを通してメソッド開発の各段階を確認します。

はじめに

ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) は、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) またはゲルろ過クロマトグラフィー (GFC) と呼ばれる、サンプルの分子量分布を決定するための主要なメソッドです。

GPC カラムは、ポア径が明確に定められポア容積が大きな多孔質ビーズを充填しています。注入後、低分子はポアに入り込み、一方で高分子は排除されて溶媒により運ばれます。この分離メカニズムによって、分析対象物は大きいものから順に溶出されます。

精密なメソッドの開発は、一貫性がありエラーのないデータを確実に得るために必要で、同時に各分析の開発時間を最小に抑えます。



Agilent Technologies

はじめに

化合物の同定

化学的同定は通常、製品文書や安全性データシートの記載により行えます。

ターゲットサンプルに関して何も分からない場合、同定するために分光分析メソッドが使用されます。図 1 は、Agilent 4300 ポータブル FTIR でポリマーを簡単に同定できる様子を示しています。



図 1. アジレントの 4300 ハンドヘルド FTIR でポリマーを容易に同定できます。

サンプル分析を実現するためのカラム・溶媒・温度の組み合わせの決定

カラムを購入する前に、Polymer-To-Solvent Reference Table for GPC/SEC (5991-6802EN) [1] を参照して、アプリケーションに適したカラムと溶媒をご確認ください。

分子量 (MW) の範囲の特定

サンプルの MW 範囲は、カラムを選択する上で重要です。

ポリマー

- 製造文書には多くの場合、MW 範囲が記載されています。MW の推定には、光散乱、レオロジー、滴定などのオフライン手法を使用することができます。
- MW 範囲として平均 MW 値が 1 つのみ示されている場合、範囲の上限値はこの平均値の 10 倍で、下限値は 0.01 倍を使用します。

添加剤、プレポリマー、可塑剤

- ほとんどの非ポリマー添加剤の MW は 1,500 Da 未満です。ポリマーおよび MW が大きな添加剤は一般的に 10 kDa を下回ります。

サンプルクリーンアップ

- 質量分析では、イオン化中に大きな分子フラグメントが解離し干渉を引き起こされます。正確な MW 限界値はイオン化手法によって変化します。
- 農業分析では、脂肪、ワックスなどの大きな分子を原因とする干渉を除去するために、EPA メソッド 3640A では 390 Da の上限 MW カットオフを使用します。
- 詳細については、5991-5321EN を参照してください [2]。

機器の確認

温度

- サンプルが、システム全体の通過時に遭遇するすべての温度で溶解することを検証してください (キャピラリーは室温にさらされているものと仮定)。
- 溶解の維持に高温が必要なサンプルの場合、Agilent PL-220 高温 GPC/SEC システム (G7820A) により溶解から検出までを温度コントロールできます。

圧力

- システムに対する圧力が、ユーザーマニュアルに記載されているポンプまたはカラムの限度を超えないことを検証してください。

検出器

示差屈折率 (RI)

- GPC ではきわめて一般的
- 汎用的な検出、UV-Vis と比べると低い感度
- サンプルと溶媒間の屈折率の差に応答が比例

紫外可視 (UV-Vis)

- 一般的な高感度検出器
- サンプルと干渉のない溶媒が必要

蒸発光散乱検出器 (ELSD)

- RI よりも高い感度
- 汎用的な検出
- 揮発性サンプルの場合は適用が困難

トリプル検出 (示差屈折率、光散乱、粘度測定 of 組み合わせ)

- 複雑なサンプル、非線形/分岐状ポリマー、グラフトポリマー、コポリマーの分析に必要
- 示差屈折率、固有粘度、分岐度のインライン測定

詳細については、次のガイドを参照してください。

A Guide to Multi-detector Gel Permeation Chromatography (5990-7196EN) [3].

拡散

- 拡散はシステムによって達成できる最大効率と速度を制限します。
- 拡散が大きいシステムでは分析時間が長く、分離能も低いです。より効率の高いカラムに切り替えるだけでは改善できません。
- 拡散の一般的な発生源はキャピラリ、カラム、フィッティング、フローセル、注入ループ、システムのデッドボリュームです。
- 性能を高めるために対策を取ることができる場合があります。Instrument Setup for Fast GPC (5991-7191EN) を参照してください [4]。

メソッドの開発

カラムの選択

固有のアプリケーションに適したカラムと溶媒を、Polymer-To-Solvent Reference Table for GPC/SEC (5991-6802EN) を参照して選択してください [1]。目的の化合物を分離できるすべてのカラムを、この技術概要から MW 範囲を基に、特定します。

どのカラムで最高の性能が得られるかを確認するために、効率と検量線を比較します。

分離能を最大に高めるために、カラムは可能な限り早い段階で大きな化合物を溶出し、可能な限り遅い段階で小さな化合物を溶出させることが必要です。MW 範囲は、ターゲットの MW 範囲を捕捉でき、可能な限りターゲットの MW 範囲を超える部分を少なくすることが必要です。重要でない領域は MW 範囲外にできますが、ピーク形状はきわめて歪みます。

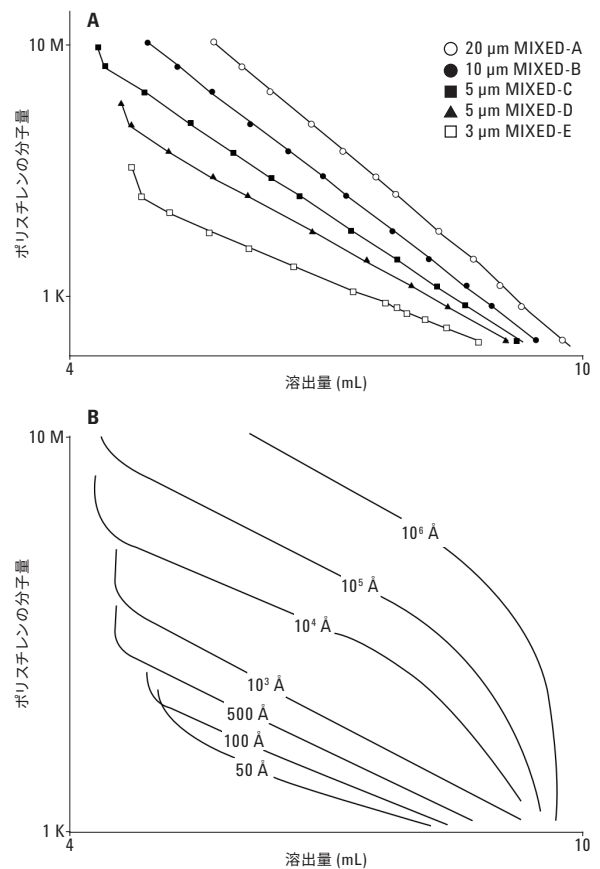


図 2. PLgel MIXED の各ポアサイズのカラムの検量線。

最終的に、より適切に分離できるカラムか、より高い効率の分離のどちらかを選択する場合は、より適切な分離を選択してください。効率を選択した場合は拡散またはカラム劣化の影響を受けやすくなりますが、適切な分離を選択した場合に影響を受けるのはシステムの総カラム長のみです。

条件

溶媒

ほとんどの一般的な溶媒システムに関するガイドについては、Polymer-To-Solvent Reference Table for GPC/SEC (5991-6802EN) に記載されています [1]。

- 特性の分からない化合物を取り扱う場合、媒体と相互作用が生じないことを検証することが重要です。
- 計算された MW は、光散乱、滴定、粘度などの別のメソッドで得られた値と比較する必要があります。

他の相互作用の兆候は、MW と相関を直接もたないピークの順です。例えば、ピークがカラムの下限 MW を超えて溶出する場合 (図 3 のように) または既知の低 MW 化合物が既知の高 MW 化合物の後に溶出する場合があります。

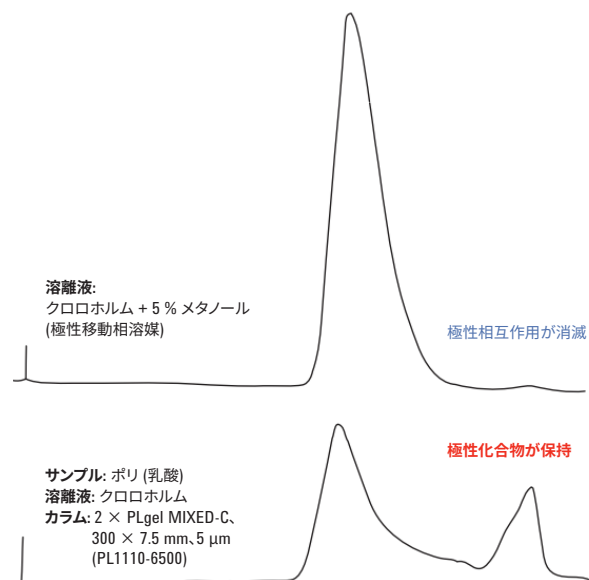


図 3. 溶離液への 5% のメタノール添加により、下のクロマトグラムの極性相互作用が排除されます。

温度

粘度が低下し、効率が向上し、圧力が低下し、流速が高速化するため、GPC においてカラム温度が 5 ~ 10 °C 上昇するだけでもきわめて望ましいことです。

流速

GPC では、流速はサンプルに合わせて最適化する必要があります。溶媒速度と効率との関係 (van Deemter 曲線) は、粒子サイズとサンプル MW の両方によって変化します。

より大きな分子は大きな粒子を必要とし、より低速の流量でより適切に分離します (SI-01745) [5]。より小さな分子は径がより短い粒子で最適に分離されるため、より高い効率で、より高い流速で最適に分離します (5990-8332EN) [6]。

さまざまな流速で MW 標準を繰り返し注入することによって、流速は最適化されます。ターゲット MW に最も近接する標準ピークについてその幅が最も狭く最も適切に分離される場合が最適な流速です (SI-01745) [5]。

最終的に、流内径の大きなカラムであれば流速を高めることができ、拡散の大きなシステムでも、優れた効率と分離能と実現することができます。この戦略は、Agilent PL 高速カラムと組み合わせて使用することにより、拡散の大きなシステムにおける性能を最大化します [4]。

注入量

長いポリマー鎖は低濃度であっても、溶媒の粘度を大幅に増大させます。サンプル濃度は、検出が可能な範囲で低めにする必要があります。複数の注入量と濃度をテストして、MW の測定値を変化させず信号を最大にする条件を特定することが必要です。詳細については、GPC/SEC Column User Guide (5991-3792EN) に記載されています [7]。

ソフトウェアのパラメータ

ピークのフロントまたはテール部分をピーク積分から除くと、トータルピーク形状の統計解析から導出した Mn、Mz、MW の計算値に大きなばらつきが生じることがあります。ポリマーの物理的および化学的性質の予測において、一貫性のない値に有用性はほとんどありません。

ピークのフロントまたはテールが欠如したり、ピークが異常な形状 (二峰性ピークなど) を示す状況では、計算で求めた MW 分布を直接重ね表示することがサンプル間の相違を特定するための最適な方法です。

必要なメンテナンス

カラムの状態のモニタリング

キャリブレーション: 正確な MW 値を得るために、標準を用いてカラムを定期的に校正する必要があります。GPC/SEC ではエラーは指数関数的に増大するため、リテンションタイムの 1% の不確かさにより測定した MW において 10% のシフトが容易に生じます。

ポンプドリフト、カラムエイジング、新しいキャピラリ、再固定されたフィッティング、新しいカラム接続のすべてがリテンションタイムのシフトの原因となります。データ採取の前と後でのシステムキャリブレーションにより、これらのエラーを除去します。詳細については、次のガイドを参照してください。

- Calibrating GPC Columns, A Guide to Best Practice (5991-2720EN) [8]
- Agilent Standards Brochure (5990-7996EN) [9]

流量マーカー: 分析の終了を示すために、トルエン、BHT、アセトン、エチレンジリコールなどの低分子が、すべてのサンプルに流量マーカーとして付加されます。流量マーカー (図 4 のピーク 6) の狭いピークは、広いサンプルピークでは明らかにならない劣化、テーリング、リテンションのシフトを特定するために使用できます。

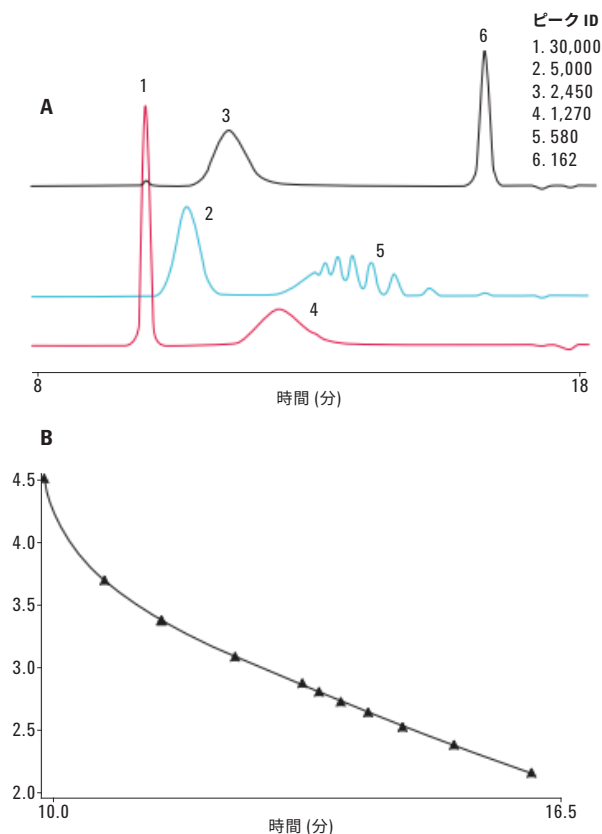


図 4. ポアサイズが小さいカラムのキャリブレーション。

トラブルシューティング

Agilent GPC/SEC カラムの耐久性および寿命には定評がありますが、最終的には劣化します。

いくつかの不具合は GPC/SEC に特有のもので、これらの不具合を熟知することにより、研究者は不正確なデータの生成を回避できます。

- **大きなポアをつぶれ** – 溶媒の流れが最大のポアをゆっくりと押しつぶすため、高分子を分離することができなくなります。
 - **症状:** 高 MW 標準が分離されません。クロマトグラムの最初の部分で、最も大きな分子がすべてひとまとまりで溶出し、ピークまたはピークのショルダー部として示されます。
 - **解決策:** 定期キャリブレーションでポアをつぶれを追跡し、カラム交換によりデータ品質を向上させます。
- **カラムベッドの劣化** – 使用に伴い粒子がゆっくりつぶれ、ポアサイズ分布がシフトして、分離と効率全体が低下します。
 - **症状:** 効率が低下し、最高と最低の MW 校正標準の間の分離が低下します。
 - **解決策:** 定期キャリブレーションで流量マーカーを使用して分離と効率の損失を追跡します。効率が許容レベル (通常は初期値の 80%) よりも低下している場合はカラムを交換します。
- **薬品浸食** – 活性化合物により粒子の表面を変化させ、分析対象物が張り付きます。一般的な原因は、残留酸化性物質、ラジカル開始剤、反応性の高いプレポリマー (アシル塩化物など)、溶媒劣化生成物質です。
 - **症状:** 時間とともに、同じサンプルがより保持されるようになり、ピーク割れやピークテーリングが生じます。
 - **解決策:** 注入前に、強酸および強塩基を中性化し、BHT で残留酸化性物質およびラジカル開始剤を不活性化し、アルコールで求核種および求電子剤を破壊します。

結論

適切に開発された GPC/SEC メソッドにより、分析者はラボのスループットと効率を最大限に高めながら、遅れやエラーを防ぐことができます。

アジレントは、業界を代表する GPC/SEC 分析用の包括的なソリューションと、分析に最適なメソッドの開発に必要な専門知識を提供します。

参考文献

1. Adam Bivens. *Polymer-to-Solvent Reference Table for GPC/SEC*; Technical overview, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-6802EN, **2016**.
2. Catherine Jones, Praveen Kutty, Alan Brookes. *An Automated System for the Routine Clean-up of Environmental Samples Prior to Instrument Analysis*; Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-5321EN, **2014**.
3. *A guide to multi-detector gel permeation chromatography*; Agilent Technologies, Inc. Publication number 5990-7196EN, **2012**.
4. Adam Bivens. *Instrument Setup for Fast GPC*; Technical overview, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-7191EN, **2016**.
5. *Plate Height vs Flow Rate - Effect of Molecular Weight*; Technical overview, Agilent Technologies, Inc. Publication number SI-01745, **2010**.

詳細情報

本文書のデータは代表的な結果を記載したものです。アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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いません。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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2016

Printed in Japan, August 25, 2016

5991-7272JAJP



Agilent Technologies