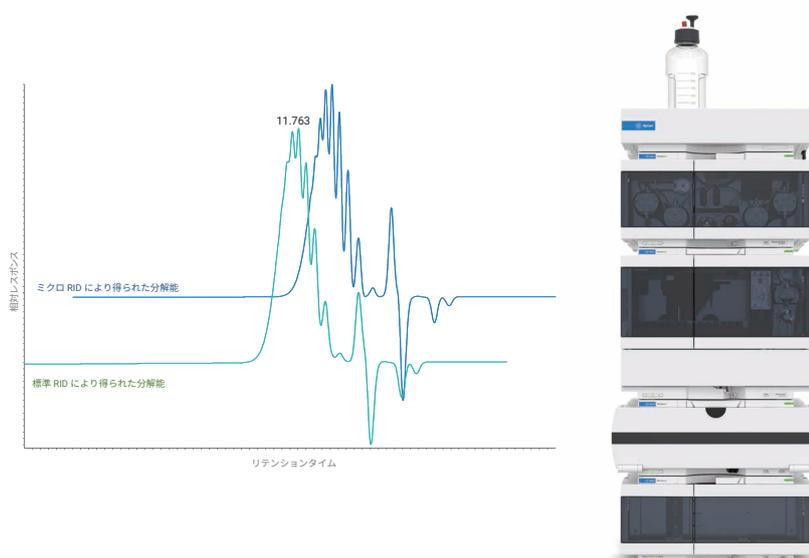


Agilent 1290 Infinity II ミクロ RID による GPC の改善

クラス最高レベルの分解能による最小限の溶媒消費量での
スループットの最大化



著者

Edgar Naegele
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、GPC に Agilent 1290 Infinity II LC と Agilent 1290 Infinity II ミクロ示差屈折率検出器 (RID) を使用することの利点について取り上げます。マイクロ RID により、小内径 (4.6 mm、2.1 mm など) の GPC カラムを使用できるようになります。このシステムでは、一般的な内径 7.5 mm のカラムでの分析も可能ですが、内径の小さなカラムを使用することで、ポリマーに対して同等またはそれ以上の分離性能を維持しながら、分解能を高め、分析時間を短縮し、溶媒消費量を低減することができます。

はじめに

一般的な GPC の標準メソッドでは、比較的内径 (id) の大きな (7.5 mm など) 長いカラムにより、1 mL/min 以上の高流量で分離が行われます。その結果、THF など高価な溶媒が大量に消費されることとなります。この欠点を解消するために、最新の GPC メソッドでは、より低流量での分析が可能な、小内径 (4.6 mm または 2.1 mm) の同じ長さのカラムが使用されています。この流量で十分な精度を達成するためには、最新の UHPLC ポンプが必要です。これらの UHPLC ポンプが備える超高圧動作能力は、通常、シリカ充填剤ベースのカラムで活かすことができ、これによって直列に連結したカラムでの分析が可能になります。また、最新の GPC 固定相にも、高流量に対応できる高強度の充填剤が採用されています。一方、分解能を維持するためには、セルデッドボリュームが非常に小さい検出器が必要です。

このアプリケーションノートでは、GPC に 1290 Infinity II LC を使用することにより、どのような利点もたらされるのかを検証した結果を紹介します。このシステムに搭載されている Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプは、分子量の正確な測定に不可欠な、超低流量での送液能力と優れた流量精度を備えています。また、マイクロ RID により、高分解能を維持しながら、2.1 mm までの小内径の GPC カラムを使用できるようになります。この高性能ポンプとマイクロ RID を組み合わせることで、従来の GPC メソッドと同等またはそれ以上の分離性能を維持しながら、分解能を高め、分析時間を短縮し、溶媒消費量を低減することができます。このシステム構成は従来のメソッドにも対応できます。

実験方法

Agilent 1290 Infinity II GPC/SEC システム

- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II バイアルサンブラ (G7129B)
- Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット (MCT) (G7116A)
- Agilent 1290 Infinity II ミクロ RID (G7162B) または
- Agilent 1260 Infinity II RID (G7162A)

ソフトウェア

- Agilent OpenLab v2.3 および GPC アドオン (G7860AA)

メソッド

パラメータ	設定
溶媒	THF、イソクラティック、チャンネル B
流量	0.06、0.3、0.6、1.0 mL/min
ストップタイム	22、11、または 7 分
カラム温度	35 °C、カラム 2 本を 75 µm キャピラリー (長さ 105 mm) で直列に連結
注入量	20 µL、4 µL
RID	光学ユニット温度: 35 °C データレート: 18 Hz 信号極性: ポジティブ

カラム

- Agilent PLgel MiniMIX-E、250 × 4.6 mm、3 µm (PL1510-5300)
- Agilent PLgel MIXED-E、300 × 7.5 mm、3 µm (PL1110-6300)
- Agilent InfinityLab OligoPore、250 × 2.1 mm (PL1913-5520)

キャリブレーション

Agilent EasiVial、PS-L 2 mL (PL2010-0401):

- **赤キャップバイアル** (Mp: 47,190、9,960、2,980、580 g/mol)
- **緑キャップバイアル** (Mp: 30,230、7,640、1,840、370 g/mol)
- **黄キャップバイアル** (Mp: 18,340、4,900、935、162 g/mol)

サンプル

- ポリスチレン 580
- ポリスチレン 1320
- エポキシ樹脂 (エピコート)

試薬および溶媒

- THF、テトラヒドロフラン、純度 ≥ 99.9 %、安定剤非含有、CHROMASOLV Plus for HPLC、Honeywell Riedel-de Haën (ドイツ ゼールツェ)

結果と考察

最初の実験として、マイクロ RID と標準 RID を使用して、一般的な GPC/SEC カラム (7.5 × 300 mm) により流量 1 mL/min で一連のポリスチレンキャリブレーションサンプルを測定しました。マイクロ RID により赤キャップバイアルのキャリブレーション混合液 (低分子量キャリブレーション化合物、「実験方法」を参照) で得られた分離結果を図 1 に示します。このクロマトグラムから、すべての化合物が明確に分離されていることがわかります。低分子量側の化合物は部分的に分離されていますが、これは一連のポリスチレンオリゴマーを示しています。標準 RID でも同様の結果が得られました (データは非掲載)。マイクロ RID と標準 RID の違いはセル容量です (それぞれ 2 μL と 8 μL)。この違いは、一般的な標準 GPC/SEC 条件、内径の大きなカラム、高流量を使用した場合の分解能には影響しません。どちらの検出器でも同じ結果が得られることを実証するために、比較的低分子量のポリスチレン (Mp 1,320) の分子量 (Mp、Mn、Mw、および PD) を測定しました (図 2)。この図から、両方の検出器に分解能の違いはなく、分子量情報についても同等の結果が得られていることがわかります。

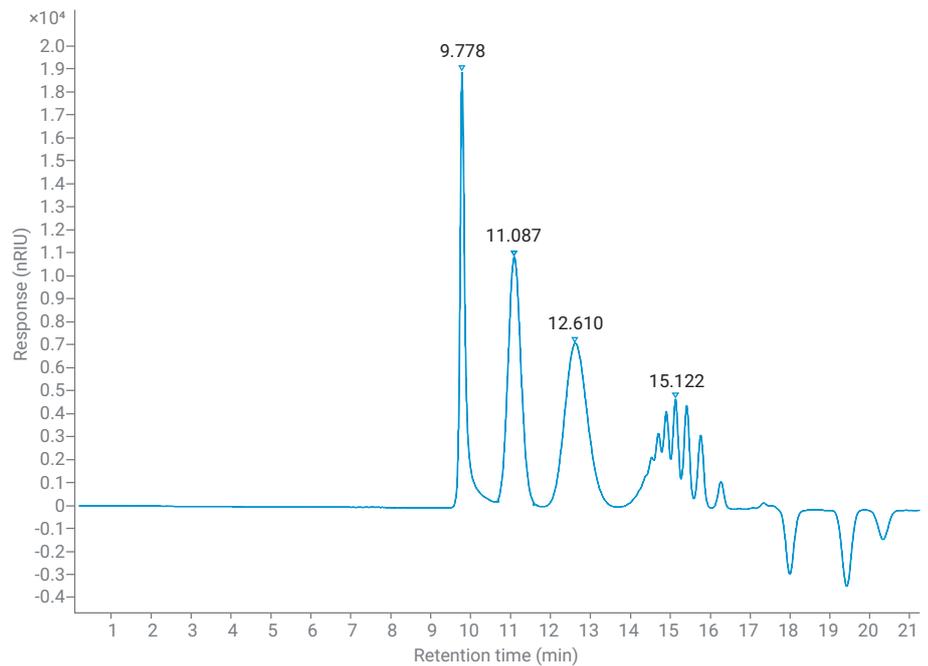


図 1. 低分子量ポリスチレン混合液 (赤キャップバイアルの低分子量キャリブレーション化合物、「実験方法」を参照) の分離結果。Agilent PLgel カラム (300 × 7.5 mm、3 μm、2 本) により THF 流量 1 mL/min で分離し、Agilent 1290 Infinity II ミクロ RID で検出しています。

結果セット	RT (分)	Mp (g/mol)	Mn (g/mol)	Mw (g/mol)	PD
GPC 標準 RID	13.805	1,314	1,048	1,265	1.21
GPC ミクロ RID	13.740	1,345	1,065	1,254	1.18

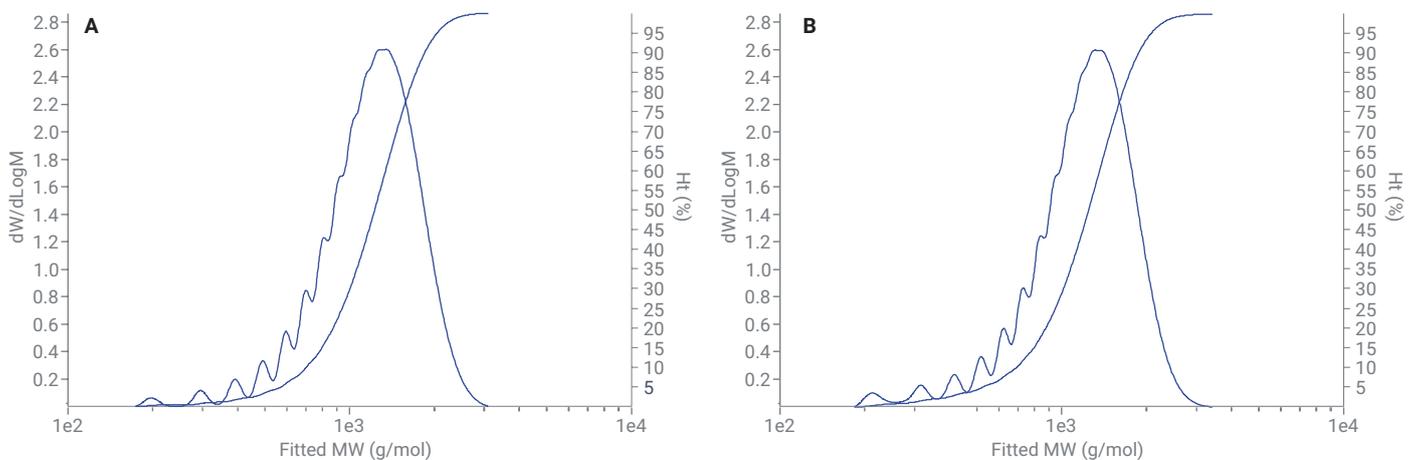


図 2. 低分子量ポリスチレンの分子量測定結果の比較。Agilent PLgel カラム (300 × 7.5 mm、3 μm、2 本) により THF 流量 1 mL/min で分離し、Agilent 1290 Infinity II ミクロ RID (A) と Agilent 1260 Infinity II 標準 RID (B) で検出しています (Mn: 数平均分子量、Mw: 重量平均分子量、Mp: ピーク最大値における分子量、PD: 多分散指数)。

一般的な GPC/SEC の標準条件の欠点は、流量が 1 mL/min 以上であるために、溶媒が大量に消費されることです。また、これによって有害な溶媒廃棄物が大量に生じ、溶媒コストだけでなく廃棄コストも高くなります。この欠点を解消するために、内径 4.6 mm のカラムを使用してさまざまな流量で一連の実験を実施し、その結果を比較評価しました。最初の流量は、標準条件下でのキャリブレーション混合液と同等のリテンションタイムが得られるように、この条件をもとに計算しました。その後、スループットを高めるために、この流量を増加させました。

図 3 に、溶媒消費量を抑えるため、またはスループットを高めるために、マイクロ RID を使用してさまざまな流量で得られた結果を比較します。例えば、内径 4.6 mm のカラムで流量 0.3 mL/min を使用した場合、分析時間は、前述の標準条件下で観察されたものと同じでした。キャリブレーション混合液 (赤キャップバイアルの低分子量キャリブレーション化合物、「実験方法」を参照) に含まれる低分子量側の化合物の分解能についても、同品質です (図 3A1 および図 3A2)。スループットを高めるために、流量を 0.6 mL/min (図 3B1 および図 3B2) および 1.0 mL/min (図 3C1 および図

3C2) に増加させました。流量を 0.6 mL/min に上げることで、低分子量化合物の分解能を損なうことなく、ちょうど 2 倍のスループットを達成することができました。流量をさらに 1.0 mL/min まで増加させると、スループットは最初の条件の約 3 倍になりました。この場合も、低分子量化合物の分解能は良好でしたが、高分子量側の (リテンションタイムがより短い) 化合物についてはわずかに低下しました (図 3C1 および図 3C2)。すべての流量について、サンプルあたりの溶媒消費量は、標準条件下で内径 7.5 mm のカラムを使用した場合の約 30 % に低減しました (表 1)。

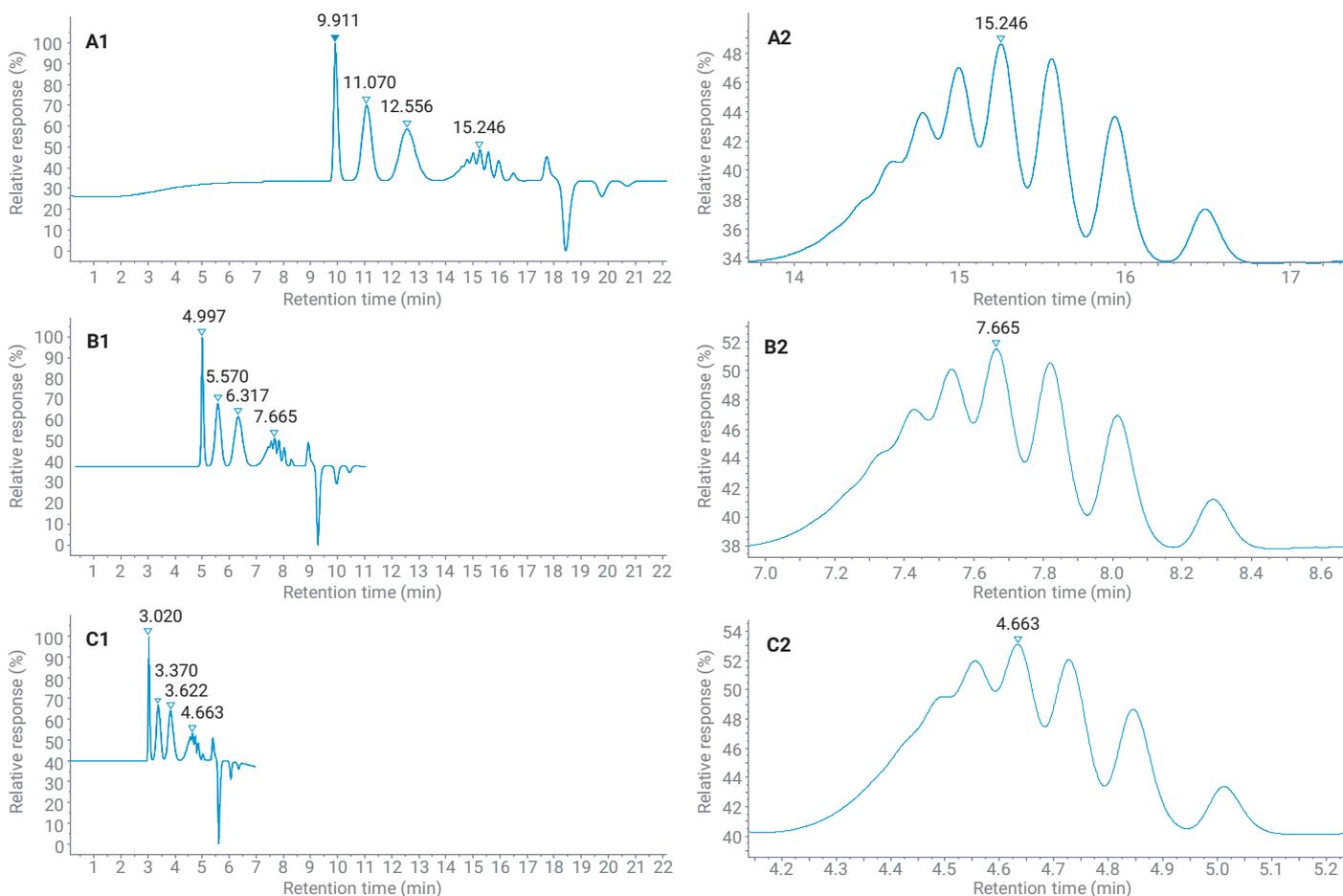


図 3. 低分子量ポリスチレン混合液の分離結果の比較。Agilent PLgel カラム (250 × 4.6 mm, 3 μm, 2 本) によりさまざまな THF 流量 ((A) 0.3 mL/min, (B) 0.6 mL/min, (C) 1.0 mL/min) で分離し、Agilent 1290 Infinity II ミクロ RID で検出しています。

流量が異なっても同一の分子量測定結果が得られることを実証するために、エポキシ樹脂の分子量 (Mp、Mw、Mn、および PD) を測定しました (図 4)。どの分子量分布 (図 4A、図 4B、および図 4C) も良好な分解能を示しています。最大流量では、より大きなオリゴマーで多少の分解能の低下が見られましたが、分子量の計算結果はほぼ同じでした (図 4 中の表)。

表 1. 標準メソッドに対する、より内径の小さなカラムを使用したメソッド (250 × 4.6 mm カラム 2 本、流量 0.3、0.6、および 1.0 mL/min) のサンプルあたりの溶媒消費量とサンプルスループットの比較*

流量 (mL/min)	分析時間 (分)	サンプルあたりの溶媒消費量 (%)	サンプルスループット係数*
0.3	22	30.0	1
0.6	11	30.0	2
1.0	7	31.8	3

* 標準メソッド (1 mL/min、分析時間 22 分、図 1 を参照) との比較

流量 (mL/min)	RT (分)	Mp (g/mol)	Mn (g/mol)	Mw (g/mol)	PD
0.3	11.678	7261	2614	6415	2.45
0.6	5.876	7278	2638	6340	2.40
1.0	3.544	7297	2606	6238	2.39

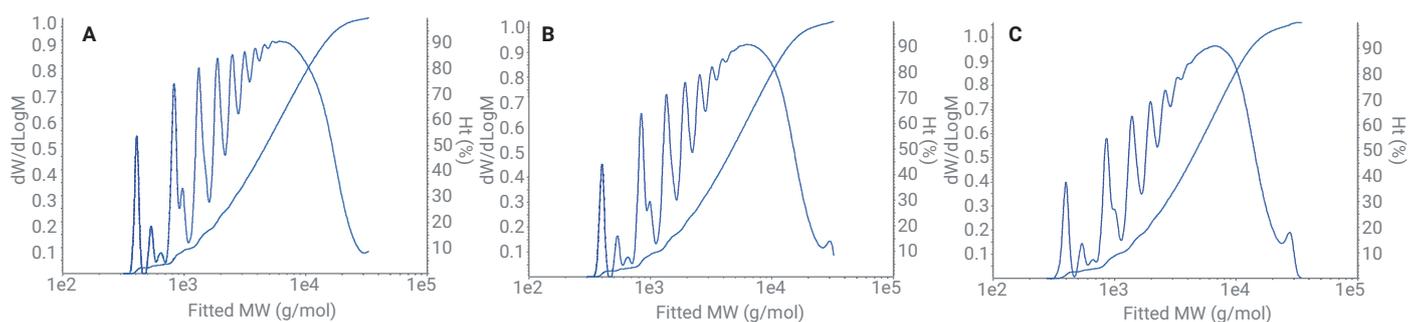


図 4. エポキシ樹脂の分子量測定結果の比較。Agilent PLgel カラム (250 × 4.6 mm、3 μm、2 本) によりさまざまな THF 流量 ((A) 0.3 mL/min、(B) 0.6 mL/min、(C) 1.0 mL/min) で分離し、Agilent 1290 Infinity II ミクロ RID で検出しています (Mn: 数平均分子量、Mw: 重量平均分子量、Mp: ピーク最大値における分子量、PD: 多分散指数)。

1290 Infinity II GPC/SEC システムでマイクロ RID を使用することにより、内径 2.1 mm のナローボア GPC/SEC カラムによるマイクロスケールの分析が可能になります。前述の内径 4.6 mm のカラムに適用した流量をもとに計算した内径 2.1 mm のカラムの流量は、60 $\mu\text{L}/\text{min}$ でした。1290 Infinity II ハイスピードポンプを使用することにより、リテンションタイムをより内径の大きなカラムと同等に維持するために必要な流量精度が得られました。この他、マイクロ RID (セル容量 2 μL) には、標準 RID (8 μL) より分散量が小さいため、低分子量側のオリゴマーの分解能が高まるという利点もあります (図 5)。

結論

このアプリケーションノートでは、Agilent 1290 Infinity II GPC/SEC システムと Agilent 1290 Infinity II ミクロ RID を使用して従来の GPC メソッドとマイクロスケールの GPC メソッドを実行した結果を紹介しました。内径の大きなカラムと高流量を使用し、一般的な GPC の標準条件下で分析したポリマー混合液の分解能は、標準 RID で得られたものと同等でした。また、より内径の小さなカラムを使用することにより、サンプルあたりの溶媒消費量を低減し、サンプルスループットを高めることができました。さらに、1290 Infinity II ミクロ RID を使用してナローボアカラムを適用することにより、マイクロスケールの GPC メソッドをマイクロリットルレベルの超低流量で実行し、分解能を高めながら一貫性のある分子量測定結果を得ることができました。

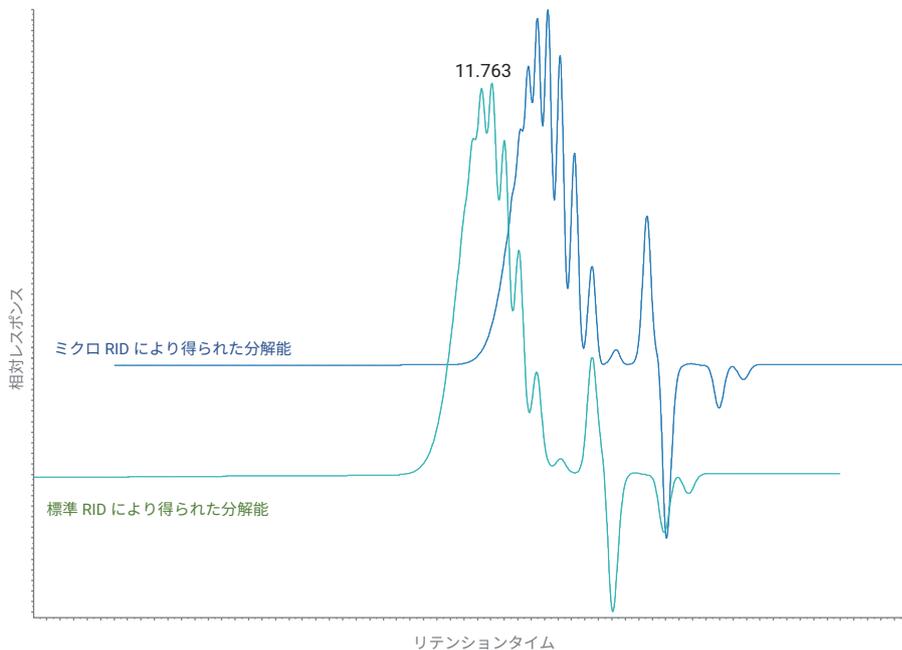


図 5. 低分子量の PS 580 に対する標準 RID とマイクロ RID の分解能の比較 (Agilent OligoPore カラム、 $250 \times 2.1 \text{ mm}$ 、2 本、流量 60 $\mu\text{L}/\text{min}$)。重ね表示モードのため、リテンションタイムは示されていません。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

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。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2019
Printed in Japan, August 1, 2019
5994-1089JAJP