

GPC/SEC 電子書籍シリーズ

GPC/SEC 検出

ポリマー、生体高分子、および
タンパク質の分析のポイント



目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC 検出の概要

1.1 GPC/SEC 検出器信号の理解

1.2. 検出器の組み合わせと配列

1.3. RI 検出器の理解

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

1.5. GPC/SEC 粘度測定 – 構造解析のための汎用的なツール

1.6. 静的光散乱法の選び方

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC 検出

目次

本電子書籍シリーズについて

3

GPC/SEC 検出の概要

4

1.1. GPC/SEC 検出器信号の理解

5

1.2. 検出器の組み合わせと配列

8

1.3. RI 検出器の理解

13

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

18

1.5. GPC/SEC 粘度測定 – 構造解析のための汎用的なツール

21

1.6. 静的光散乱法の選び方

26

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

31

用語集

33

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC 検出の概要

1.1 GPC/SEC 検出器信号の理解

1.2. 検出器の組み合わせと配列

1.3. RI 検出器の理解

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

1.5. GPC/SEC 粘度測定 – 構造解析のための汎用的なツール

1.6. 静的光散乱法の選び方

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC 検出

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC の「Tips & Tricks」に関する記事は、10 年以上にわたって 60 版以上を重ねた LC/GC のデジタルマガジン『The Column』で発表されてきました。これらの「Tips & Tricks」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を一覧で提供するために、本電子書籍シリーズを作成しました。

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「Tips & Tricks」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 検出の概要

1.1 GPC/SEC 検出器信号の理解

1.2. 検出器の組み合わせと配列

1.3. RI 検出器の理解

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

1.5. GPC/SEC 粘度測定 – 構造解析のための汎用的なツール

1.6. 静的光散乱法の選び方

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC 検出

GPC/SEC 検出の概要

すべての GPC/SEC システムには 1 つ以上の濃度検出器が必要です。最新の GPC/SEC 機器には複数の検出器が搭載されていることが多く、これらの検出器の組み合わせが GPC/SEC の価値を高めています。GPC/SEC はマルチ検出により、巨大分子の包括的な特性解析のための優れた技法となっています。この電子書籍の最初の 2 つのセクションでは、検出器の種類、特性、接続について取り上げます。

さらに、最も一般的な GPC/SEC 検出器に関する詳細情報も扱います。

- すべてのサンプル（発色団のない場合も）のための汎用的な検出器、示差屈折率検出器 (RI) はセクション 1.3 で説明します。
- 最も一般的な、分子量が検出可能な検出器、オンライン光散乱検出器 (LALS、RALS、または MALS) は、セクション 1.6 で取り上げます。
- オンライン粘度計（構造分析のための最も重要な検出器）は、セクション 1.5 で説明します。
- 蒸発光散乱検出器 (ELSD) は代替的な濃度検出器で、セクション 1.4 で説明します。

この電子書籍の最後のセクションでは、低分子量高分子の分析の機会を広げる技法、GPC/SEC と質量分析の組み合わせについて取り扱います。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC 検出の概要

1.1 GPC/SEC 検出器信号の理解

1.2. 検出器の組み合わせと配列

1.3. RI 検出器の理解

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

1.5. GPC/SEC 粘度測定 – 構造解析のための汎用的なツール

1.6. 静的光散乱法の選び方

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC 検出

1.1.GPC/SEC 検出器信号の理解

各検出器と、それらの信号の違いとは？

すべての検出器の信号強度 (SI) は、注入量 (濃度および注入量)、サンプル関連の定数 k_{Sample} (すなわち、レスポンス係数)、および検出器の定数 K_{Detector} に基づきます。

さらに、サンプルの分子量に基づく信号を生成する検出器もあります。

したがって、すべての検出器の信号は、1つのシンプルな手法に従います。

$$SI = K_{\text{Detector}} \cdot k_{\text{Sample}} \cdot c \cdot M^x$$

SI = 信号強度

K_{Detector} = 検出器定数

k_{Sample} = サンプル定数またはレスポンス係数

c = 濃度

M = 分子量

指数 x により、検出器は 2つのカテゴリに分類されます。

- 濃度検出器、 $x = 0$
- 分子量が検出可能な検出器、 $x \neq 0$

表 1. 濃度および分子量が検出可能な検出器

x	タイプ	備考	例
0	濃度	$M^0 = 1,$ $SI = K_{\text{Detector}} \cdot k_{\text{Sample}} \cdot c \cdot 1$	屈折率、RI UV/Vis 蒸発光散乱、ELS
1	分子量が検出可能		多角度/直角/低角度レーザー 光散乱、MALS/RALS/LALS
α	分子量が検出可能	Mark-Houwink 指数	粘度計

定数と分子量の影響は、濃度と分子量が検出可能な検出器によって異なるため、それぞれの検出器は所定のサンプルに対して異なる信号出力を生成します。このような差異は、分布の広いサンプルに対してより顕著です。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC 検出の概要

1.1 GPC/SEC 検出器信号の理解

1.2. 検出器の組み合わせと配列

1.3. RI 検出器の理解

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

1.5. GPC/SEC 粘度測定 – 構造解析のための汎用的なツール

1.6. 静的光散乱法の選び方

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

用語集

図 1 に、分布の広いサンプルの、RI トレースおよび 2 種類の分子量が検出可能な検出器の信号を示します。この偏在している見かけ上の信号シフトは、さまざまな検出原理に由来します。

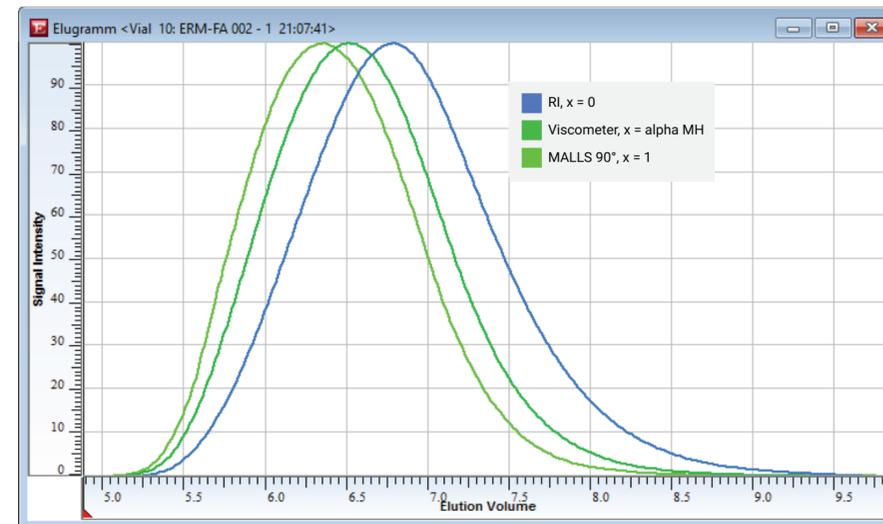


図 1. 検出器信号の比較：分布の広いサンプルの屈折率、粘度計、光散乱検出器

負の検出器信号は生じる可能性がありますか？どのように回避できますか？

A) サンプル特性によって生成された負のピーク

正の値の k_{Sample} は正の検出器信号を、負の値の k_{Sample} は負の検出器信号を生成します。検出できる場合は、サンプル関連の定数またはレスポンス係数に基づき、測定することも可能です。 k_{Sample} が 0、または 0 に近い場合、検出は困難か不可能です。

RI と LS 検出器では、 k_{Sample} は屈折率増分 (dn/dc) です。UV/VIS 検出器では、 k_{Sample} は吸光係数 (ϵ) です。

dn/dc の値は、正または負になる可能性があります。光散乱検出器では、信号強度は $(dn/dc)^2$ に基づくため、必ず正の検出器信号が生成されます。特定の溶媒中の負の dn/dc のサンプルも、正のシグナルを生成します。

$dn/dc = 0$ である希少な例の 1 つは、THF のポリジメチルシロキサン (PDMS) です。このようなサンプルと溶媒の組み合わせは等屈折率であるため、RI と光散乱の検出は不可能です。したがって、PDMS はトルエン ($dn/dc < 0$) で特定解析するか、あるいは ELS 検出器を使用する必要があります。図 2 に、トルエン中の 3 種類の PDMS 標準の PDMS 混合物の RI 信号を示します。サンプル関連の定数 < 0 であるため、負の信号が記録されます。

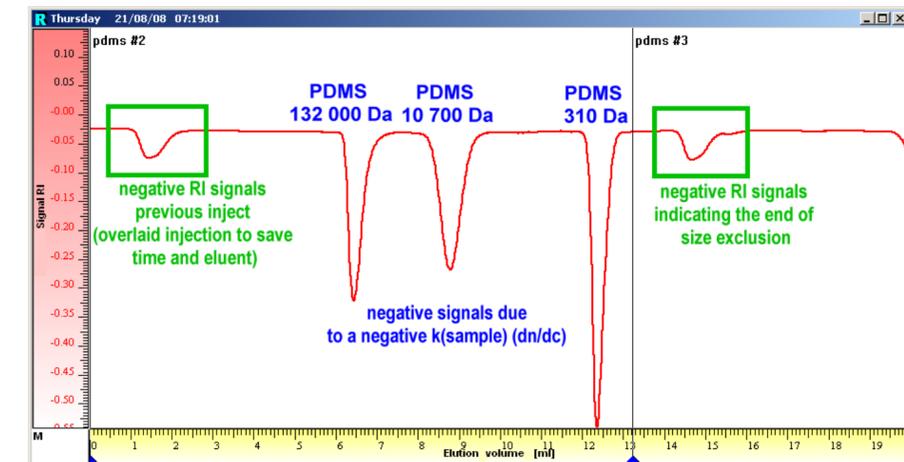


図 2. PDMS トルエン溶液は負の dn/dc 値を持ち、屈折率信号は負です。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC 検出の概要

1.1 GPC/SEC 検出器信号の理解

1.2. 検出器の組み合わせと配列

1.3. RI 検出器の理解

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

1.5. GPC/SEC 粘度測定 – 構造解析のための汎用的なツール

1.6. 静的光散乱法の選び方

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

用語集

適切なソフトウェアを使用している場合は、負の検出器信号を評価することが可能です。ソフトウェアは負の信号を処理できない場合、一部の検出器では、正のサンプル信号が記録されるように、信号出力の極性を変更できます。ただし、前は正だった信号（内部流量マーカーなど）は、負のピークとして取得されます。

B) 検出器によって生成された負のピーク

検出器の設計により、サンプルに関連しない負の信号を生成する検出器もあります。データ処理では、ブランクサンプルを注入することで、これらの信号を特定することが重要です。

すべての RI 検出器はクロマトグラムの最後にシステムピークを示し、そのうちの 1 つ以上が負になる可能性があります（図 2 を参照）。これらの信号は、サイズ排除分離の終わりを示しています。高純度溶媒（ブランク）を注入した場合でも、これらの信号は偏在します。

ディレイカラムを用いた粘度計でも負の信号が生成されます。ディレイカラムまたはホールドアップカラムを使用した場合、溶媒パスに残ったサンプルが本来のサンプルの後に溶出し、システムピークは負のピークとして溶出します。図 3 に、ディレイカラムを用いた粘度計（図 3A）とリザーバを用いた粘度計の比較を示します（図 3B）。

より多くのディレイカラムを使用すると、負のピークはより遅く溶出します。また、トータル分析時間が長くなります。

Originally published in *The Column*, October **2008**, by authors Daniela Held and Peter Kilz.

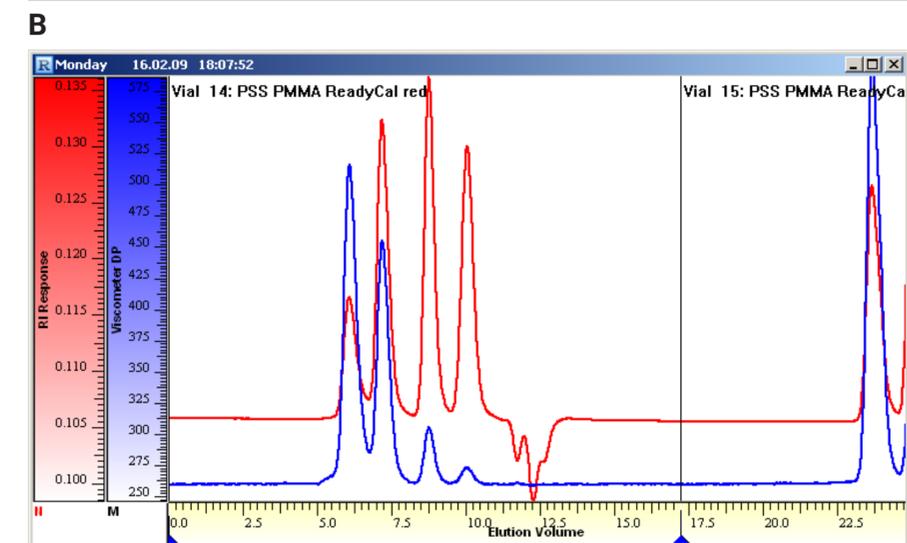
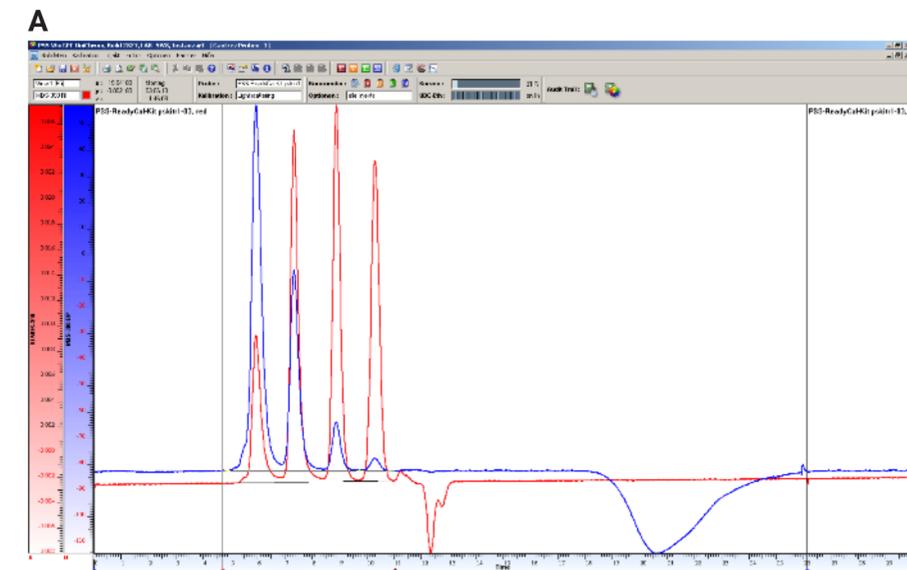


図 3. 屈折率、ディレイカラムを用いた粘度計（負のピーク）、リザーバを用いた粘度計を使用して分析したポリスチレン混合液の比較。(A) RI 検出器（赤色のトレース）とディレイカラムを用いた粘度計（DP、青色のトレース）で分析した、4 つの異なるポリスチレン標準の混合液。検出器設計により、2 倍の溶出量において負の信号が生成されます。(B) RI 検出器（赤色のトレース）と、リザーバを搭載した粘度計（DP、青色のトレース）で分析した、4 つの異なるポリスチレン標準の同じ混合液。次のサンプルをより早く注入できます。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC 検出の概要

1.1 GPC/SEC 検出器信号の理解

1.2. 検出器の組み合わせと配列

1.3. RI 検出器の理解

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

1.5. GPC/SEC 粘度測定 – 構造解析のための汎用的なツール

1.6. 静的光散乱法の選び方

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC 検出

1.2. 検出器の組み合わせと配列に関する推奨事項

一般的に、GPC/SEC 分析メソッドでは、従来の分子量情報（平均および分布）を生成するためだけでなく、巨大分子の分子構造の詳細情報を得るために、複数の検出器を使用します。従来の濃度が検出可能な検出器（RI、UV、ELSD）に、分子量が検出可能な検出器（光散乱と粘度計）に組み合わせることが非常に一般的になりました。また、FTIR、MS、NMR など、豊富な情報を提供する検出器を GPC/SEC 機器に追加することに対する関心が高まっています。¹ 表 1 に、検出器の組み合わせに関する概要と、標準的なアプリケーションを示します。

データ生成におけるエラーを回避するための、複数の検出器を組み合わせる最善の方法については、混乱と誤解が起こりがちです。

検出器を効果的に使用するには、複数のアプローチがあります。² その 1 つは流路スプリッタデバイスでカラムからの流出物を分割し、並列で検出器を動作させることです。この手法の欠点は、流出物を分割することによるもので、クロマトグラフスライス内の成分の質量はスプリット比によって減少します。検出器の信号強度は注入量に関連しているため、この手法は多数の検出器には適用できない可能性があります。

2 つ目の手法は、検出器を直列し、連続して取り付けることです。このやり方にも制限があります。バンド幅の拡大が問題となるため、すべての検出器の組み合わせには適用できません。

バンド幅の拡大は、カラムからのサンプル溶出が複数の検出器セルを通過するときに発生する可能性があります。³ 検出器が多くなり、接続チューブがより長くなると、大幅なピーク広がりが生じるリスクが高まり、不良な分析品質のデータが生成されます。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC 検出の概要

1.1 GPC/SEC 検出器信号の理解

1.2. 検出器の組み合わせと配列

1.3. RI 検出器の理解

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

1.5. GPC/SEC 粘度測定 – 構造解析のための汎用的なツール

1.6. 静的光散乱法の選び方

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

用語集

表 1. 標準的な検出器の組み合わせとアプリケーション

検出器の組み合わせ	適用対象：
UV/VIS および UV/VIS	– コポリマー特性解析：コポリマー組成分布、コポリマー分子量 – コポリマー特性解析：コポリマー組成分布、コポリマー分子量
UV/VIS および RI	– Pharmeuropa に基づくヘパリン分析：低分子量ヘパリンの分析 – 末端基分析
RALS/LALS/MALS および RI	– ホモポリマー /タンパク質特性解析：絶対分子量と分子量分布 – MALS のみ：回転半径、平均およびサイズ分布、構造、分岐
粘度計および RI	– Benoit のユニバーサルキャリブレーションに基づく、特定の粘度と固有粘度、分子量、分子量分布 – 流体力学半径、分岐、構造、サイズ分布
RALS、粘度計、RI (三重検出)	– ホモポリマー特性解析：絶対分子量と分子量分布 – Benoit のユニバーサルキャリブレーションに基づく、特定の粘度と固有粘度、分子量、分子量分布 – 流体力学半径、分岐、ポリマー構造、サイズ分布
MALS、粘度計、RI	– ホモポリマー特性解析：絶対分子量と分子量分布 – 回転半径平均および分布、ポリマー構造、分岐 – Benoit のユニバーサルキャリブレーションに基づく、特定の粘度と固有粘度、分子量、分子量分布 – 流体力学半径、分岐、ポリマー構造、サイズ分布
UV/RI および FTIR/MALDI インタフェース (オフライン FTIR/MALDI)	– 分子量と分子量分布 – 添加物の特性解析と定量 – 立体規則性、コポリマー組成

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC 検出の概要

1.1 GPC/SEC 検出器信号の理解

1.2. 検出器の組み合わせと配列

1.3. RI 検出器の理解

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

1.5. GPC/SEC 粘度測定 – 構造解析のための汎用的なツール

1.6. 静的光散乱法の選び方

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

用語集

図 1 に、連続した 2 台の検出器、5 μ L フローセル (赤色のトレース) 搭載 UV 検出器と、UV の直後に配置された (GPC/SEC 設定において標準的) 50 μ L 検出器セル搭載テスト RI 検出器 (緑色のトレース) との比較を示します。*

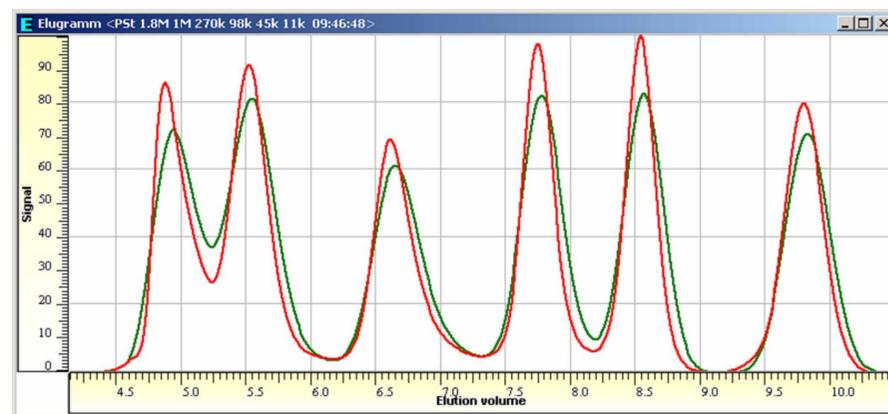


図 1. 異なる分子量のポリスチレン混合液の試験屈折率および UV 254 nm 信号。赤色のトレースは 5 μ L フローセル搭載 UV 検出器、緑色のトレースは 50 μ L 検出器セル搭載テスト RI 検出器です。理論上、2 つの信号は類似したものになります。より幅広い RI 信号は、バンド幅の拡大によるものです。

* **標準 RI :** 8 μ L セル容量 (Agilent RID など)、 μ RI (RI など) 2.5 μ L セル容量。

複数の検出器を連結して使用することのもう 1 つの問題は、それぞれの検出器が異なるタイミングで同じサンプルスライスを参照し、それにより検出器ディレイボリューム補正が必要になることです。この遅延は、単分散参照物質を注入し、ピーク溶出量の差を測定することにより測定することができます。多くの場合、分布の広い参照標準を追加で測定することで、遅延を微調整します。GPC/SEC 粘度測定の場合、Mark-Houwink プロットで正しい傾きが生成されるまで (Mark-Houwink 係数 α)、検出器間の遅延は若干調整されます。³

検出器間の遅延を適切に測定することにより、複数の濃度検出器に対して 1 本の検量線のみを使用することができます。光散乱/粘度測定/三重検出データの評価は、正確な検出器間の遅延によってのみ適切に実行することができます。不正な検出器間の遅延は、誤った分子量や構造の結果をもたらします。⁴ これはコポリマーの組成分析にも当てはまります。

複数の検出器の連結において、どのように検出器を配置すべきか？

検出器は、個別の検出器セルの種類と規格をもち、固有の検出特性に依存するため、これらの検出器を連結して配置するには、複数の側面を考慮する必要があります。^{2,5,6}

検出器の一般的なルール：

- セル容量が最小の検出器は、連結の最初に設置します。一般的にこれらは UV、DAD、FLD 検出器です。
- 物理的に堅牢なセルを搭載した検出器は、感圧セル搭載の検出器の前に設置します。
- 高い背圧に対応できないセルを搭載した検出器は、連結の最後に配置します。これらは RI と IR で、フローセルは非常に脆弱です。
- 圧力の影響を受けやすい信号を生成する検出器は最後に配置します。これらは RI と粘度計です。
- 移動相を排除するタイプの検出器も、検出器シーケンスの最後に配置します。これらには ELSD、FTIR スプレー検出器、MS 検出器などがあります。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC 検出の概要

1.1 GPC/SEC 検出器信号の理解

1.2. 検出器の組み合わせと配列

1.3. RI 検出器の理解

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

1.5. GPC/SEC 粘度測定 – 構造解析のための汎用的なツール

1.6. 静的光散乱法の選び方

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

用語集

- 3 台以上の検出器の直列は回避します。累積的なバンド幅の拡大によるリスクが増加するからです。

3 台以上の検出器の場合、または複数の検出器を連結の最後に配置する必要がある場合、流路スプリッタを取り付ける必要があります。T ピースを追加することにより、ポンプ流量が 2 つのパスウェイに分割されます。各部分の流量はそれぞれの背圧に基づきます。

必ず、ユーザーマニュアルを参照するかベンダーに問い合わせて、セル容量、または検出器の配列を最適化するための圧力安定性など、特定の検出器の仕様を確認してください。

システムの設置に役立つ例

1. UV、MALS、RI 検出器で構成された GPC/SEC システム

検出器の仕様	UV	5 μL セル容量、40 bar 圧力安定性
	RI	8 μL セル容量、圧力依存性信号
	MALS	15 μL セル容量、7 bar 圧力安定性

最良の検出器構成：

UV = MALS = RI

2. UV、粘度計、RI 検出器で構成された GPC/SEC システム：

検出器の仕様	UV	5 μL セル容量、40 bar 圧力安定性
	RI	8 μL セル容量、圧力依存性信号
	粘度計	8 μL セル容量、圧力依存性信号

最良の検出器構成：

Viscometer
UV = RI

3. UV、MALS、粘度計、RI 検出器で構成された GPC/SEC システム：

検出器の仕様	UV	5 μL セル容量、40 bar 圧力安定性
	RI	8 μL セル容量、圧力依存性信号
	MALS	15 μL セル容量、7 bar 圧力安定性
	粘度計	8 μL セル容量、圧力依存性信号

最良の検出器構成：

Viscometer
UV = MALS = RI

4. UV、FTIR、ELS 検出器で構成された GPC/SEC システム：

検出器の仕様	UV	5 μL セル容量、40 bar 圧力安定性
	FTIR	10 μL セル容量、20 bar 圧力安定性
	ELSD	5 bar 圧力安定性、蒸発

最良の検出器構成：

FTIR
UV = ELS

5. DAD、FLD、RI、MS 検出器で構成された GPC/SEC システム：

検出器の仕様	DAD	5 μL セル容量、40 bar 圧力安定性
	RI	8 μL セル容量、圧力依存性信号
	FLD	7 μL セル容量、20 bar 圧力安定性
	MSD	蒸発

最良の検出器構成：

MSD (10% flow)
DAD = FLD = RI (90% flow)

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC 検出の概要

1.1 GPC/SEC 検出器信号の理解

1.2. 検出器の組み合わせと配列

1.3. RI 検出器の理解

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

1.5. GPC/SEC 粘度測定 – 構造解析のための汎用的なツール

1.6. 静的光散乱法の選び方

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

用語集

参考文献

1. Kilz, P., Pasch, H. Coupled Liquid Chromatographic Techniques in Molecular Characterization; John Wiley & Sons Ltd, **2000**.
2. Striegel, A. *et al.* Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography, 2nd ed.; Chapter 3, pp 49; John Wiley & Sons Ltd, New York, **2009**.
3. Held, D.; Radke, W. Inter-Detector Delay, LC/GC *The Column* **2017**, (8).
4. Jackson, C.; Barth, H.G. Concerns Regarding the Practice of Multiple Detector Size-Exclusion Chromatography; *Advances in Chemistry*, Vol. 247, ACS, Washington, **1995**.
5. Netopilik, M. Influence of Peak-Broadening and Interdetector Volume Error on Size-Exclusive Chromatographic Analysis with Dual Viscometric-Concentration Detection Using the Universal Calibration Method. *J. Chromatogr.A* **2001**, (915), 15.
6. Jackson, C.; Yau, W.W Computer Simulation Study of Size-Exclusion Chromatography with Simultaneous Viscometry and Light Scattering Measurements. *J.Chromatogr.A* **1993**, (645), 209.

Originally published in *The Column*, October **2012**, by authors Daniela Held and Peter Kilz.

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC 検出の概要

1.1 GPC/SEC 検出器信号の理解

1.2. 検出器の組み合わせと配列

1.3. RI 検出器の理解

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

1.5. GPC/SEC 粘度測定 – 構造解析のための汎用的なツール

1.6. 静的光散乱法の選び方

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC 検出

1.3. RI 検出器の理解

GPC/SEC で試料の濃度を測定する際に最もよく使われるのが、示差屈折率検出器 (RI) です。この汎用性の高い検出器の利点は、ほぼすべてを検出できることですが、同時に欠点にもなります。

このセクションでは、RI 検出器を扱う場合に役立つアドバイスや、他の濃度検出器との比較を取り上げます。

RI 検出の原理

RI 検出器は 屈折率 (n) の変化に反応します。ほとんどの RI は示差屈折計です。高純度溶媒とサンプルを含む溶媒との間の屈折率の差異により、光線の屈折量を測定します。この差異は Δn といい、屈折率の単位 (RIU) で示されます。

図 1 に、斜めに 2 つに分割される石英検出器セルにより、検出の原理を示します。セルは、カラムから流れてくる溶出物で絶えず満たされるサンプルサイドと、それと対比をなすリファレンスサイド (通常は流入なし) の高純度移動相で構成されています。両方のサイドに同じ移動相が含まれる場合、検出器は最適なバランス状態になります。サンプル分画がカラムから溶出すると、サンプルサイドを満たす溶液の屈折率は変化し、光線が屈折します。屈折の強度の変化 (電圧として測定される) は、カラムでサイズ分画の後にセルを通過するサンプルの濃度に比例します。

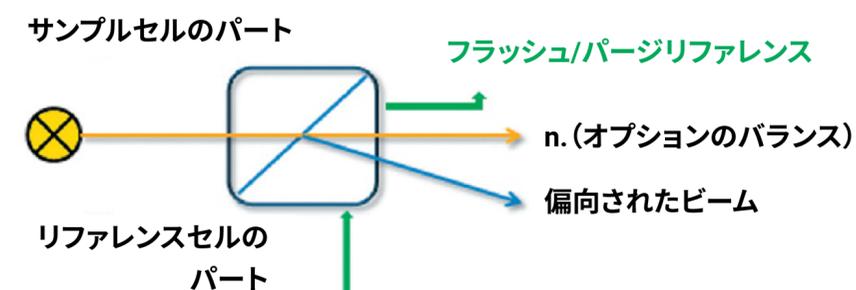


図 1. 示差屈折率検出器セル設計 (セルがリファレンス部分とサンプル部分に分割)

RI 検出器のメリット

UV 検出器とは対照的に、サンプルに発色団は不要です。多数の種類 (多糖類、デンプン、ポリエステルなど) のサンプルを検出できます。

ELSD には発色団は不要ですが、RI 検出器の出力は濃度に対する応答が ELSD よりもはるかに直線的で、RI は ELSD と異なり、溶媒の蒸発も必要ありません。したがって、RI に溶媒の制限はありません。(サンプルと移動相は同じ屈折率、すなわち等屈折率ではないことは除く)。さらに、RI 検出器は、ELSD では蒸発過程で失われがちな低分子種も検出可能です。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC 検出の概要

1.1 GPC/SEC 検出器信号の理解

1.2. 検出器の組み合わせと配列

1.3. RI 検出器の理解

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

1.5. GPC/SEC 粘度測定 – 構造解析のための汎用的なツール

1.6. 静的光散乱法の選び方

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

用語集

RI 検出器のデメリット

屈折率信号は一般的に、屈折率の変化に対して直線的ですが、RI 検出器はイソクラティックモードでのみ適用可能で、グラジエントは適用できません。

また、屈折率の変化は、次の要素の影響を受けます。

- 温度変動
- 微量の汚染物質
- 不十分な脱気
- 溶媒組成

したがって、実験条件を変えると、RI は信号の変化、およびベースラインの変動に反応します。RI が不安定だったり、不安定なベースラインを生成しているように見えることがありますが、実際のところ RI は、機器および環境的な変動を反映しているに過ぎません。

RI は UV 検出器や ELSD よりも感度が低いため、RI には比較的高い濃度の試料溶液が必要になります。

セルの設計と検出の原理が実際の作業に弊害となる可能性があります。GPC/SEC の標準的なマルチ検出器設定では、RI は多くの場合、最後に配置する必要があります。^{1,2}

安定したベースラインを得るためには、リファレンスセルの溶媒と移動相は同じバッチのものをすることを推奨します。したがって、リファレンスセルは定期的に、または最低でもリザーバの移動相を交換したときに、フラッシュ/パーズする必要があります。RI をパーズ/フラッシュするのに最適なタイミングは、システムとカラムを完全

にフラッシュし、時間をかけて安定化させた後の、分析の直前です。システム (またはカラム) の平衡化の最中にパーズ/フラッシュを実行すると、リファレンスセルの溶媒組成はサンプルセルのものと異なってしまいます。したがって、分析の前に適切なバランスを得ることができず、低い信号品質によって分析中に問題が生じる可能性があります。

トラブルシューティング

負のピーク/システムピーク

図 2 に、分子量が異なる 4 種類のポリメチルメタクリレート (PMMA) 標準の混合物の一般的な RI トレースを示します。クロマトグラムの最後にシステムピークが現れるのは、珍しいことではありません。通常これらのピークは負ですが、負と正のピークの組み合わせが生じる可能性もあります。

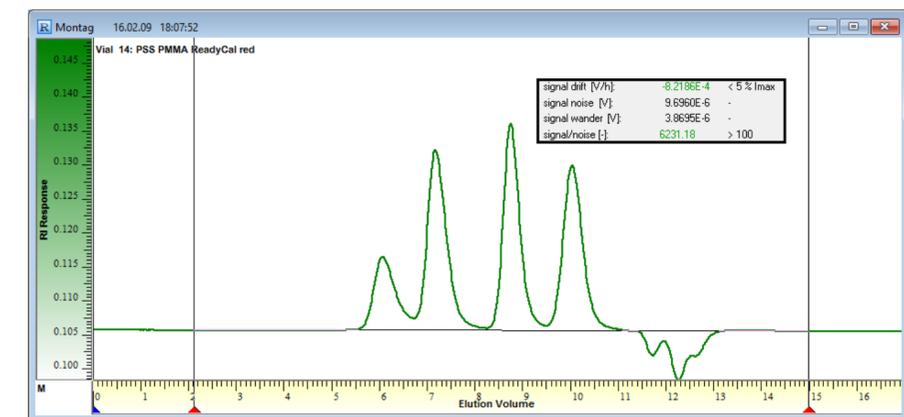


図 2. 標準的なシステムピークの PMMA 標準混合物の屈折率クロマトグラム。挿入図は、ドリフト、ノイズ、揺らぎ、S/N を示しています (ISO13885-1)。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC 検出の概要

1.1 GPC/SEC 検出器信号の理解

1.2. 検出器の組み合わせと配列

1.3. RI 検出器の理解

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

1.5. GPC/SEC 粘度測定 – 構造解析のための汎用的なツール

1.6. 静的光散乱法の選び方

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

用語集

システムピークの面積を最小化するために、移動相リザーバからの溶媒でサンプルを調製することが最適です。以下によって、システムピークの強度をさらに低減できます。

- 注入量を減らす
- 分析に使用する移動相でオートサンプリングとニードルを洗浄（該当する場合）

サンプル前処理に使用する溶媒と移動相との組成の違いが大きくなるほど、システムピークがより顕著になります。システムピークは、未希釈の移動相を分析し、ブランクランとサンプル分析を重ね表示することで同定できます。移動相ブランクとサンプルの調製は、すべてのろ過ステップを含め、同じでなければなりません。

RI 検出器に伴う問題は、GPC/SEC における他の検出器の問題と同様です。例えば、以下があります。

- ベースラインのドリフト（上下でベースラインが規則的にシフト）
- ベースラインの揺らぎ（6～60 サイクル/時の揺らぎによる検出器の変動）
- 検出器ノイズ（1 サイクル/秒を上回る揺らぎによる検出器の信号変動）³

ベースラインのドリフト

この種のドリフトは、グラジエント勾配（正と負の）の継続的で規則的な変化によって示されます。ベースラインドリフトの 3 つの主な原因：

- 移動相の純度が低い
- カラムとフローセル間の温度差
- システムの平衡化不足

新しいバッチの高品質溶媒を使用し、カラム、検出器セル、システムのサンプル平衡時間を十分に確保することにより、この問題は解消されます。ベースラインのドリフトは、特に推奨の 2 ステップの評価手順によって、簡単に補正できます。⁴

ベースラインの揺らぎ

検出器の揺らぎは簡単に補正できないため、ドリフトよりも困難です。

図 3 に検出器の揺らぎを示します。この例では、デガッサと使用された移動相との不適合によって信号変動が生じています。デガッサを取り除いた後、信号の安定性が回復しました。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC 検出の概要

1.1 GPC/SEC 検出器信号の理解

1.2. 検出器の組み合わせと配列

1.3. RI 検出器の理解

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

1.5. GPC/SEC 粘度測定 – 構造解析のための汎用的なツール

1.6. 静的光散乱法の選び方

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

用語集

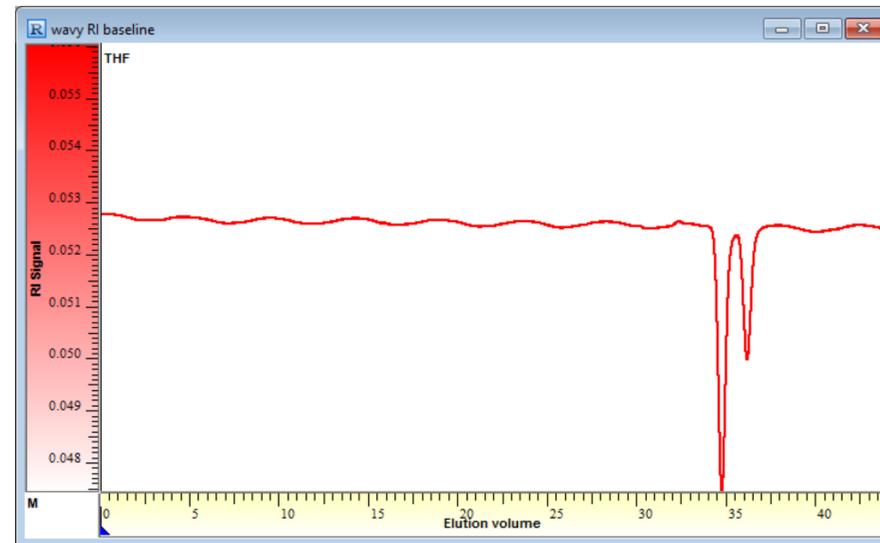


図 3. 示差屈折率検出器の揺らぎの例。この種の変動の理由は、不具合のあるデガッサやカラムオープン（加熱サイクル）、またはラボの不良な空調である可能性があります。

同じような変動は、デガッサの真空ポンプの不具合や、欠陥のあるカラムヒーターサーモスタット（加熱サイクル）によって生じます。どちらの場合も、デガッサやカラムヒーターを取り外すと、問題のあるコンポーネントを使用している場合よりも、ベースラインの安定性が向上します。

冷暖房完備のラボでは、A/C ユニットの加熱/冷却サイクルにより、空調が検出器の揺らぎの原因となることもあります。

S/N 比

S/N 比を議論する際には、サンプルの RI 検出器信号レスポンスの大きさを理解することが重要です。RI 信号強度は、濃度と屈折率増分、 dn/dc に基づきます。

最大の S/N 比を得るには、2 つの要素を評価する必要があります。

- 信号領域は濃度の上昇に伴って増加します。図 2 では、すべての PMMA の dn/dc 値が同じであり、同じ濃度は同じピーク面積となります。これはこの例にも当てはまり、最高の分子量（約 6 mL を溶出）は他の 3 つのサンプルと比べて濃度が半分に過ぎず、ピーク面積は半分の大きさとなります。⁵
- 信号領域は dn/dc 値が高くなるにつれて増加します。例えば、分子量と濃度が同じポリスチレン（PS）混合物を分析した場合（THF、35 °C）、THF 溶液中の PMMA よりも PS の dn/dc 値は高いため、PS のピークは PMMA のピークよりも大きくなります。 dn/dc 値が 0 の等屈折率サンプルの場合、RI により信号は取得されません（または末端基からの小さな信号のみ）。

その他の問題

図 4 に興味深いトラブルシューティングの例を示します。この図では、内部標準の信号は負の値で始まり、ピークの最小値で極性が正の値にまで高くなります。このような挙動の原因は、検出器の問題のあるパージバルブによるものです。したがって、分析中にリファレンスサイドが完全に閉じられておらず、サンプルがセルの両側を通過しており、正と負の信号が生成されました。バルブに段階的に不具合が進み、ピークの前にベースラインが徐々に大きくなる負のくぼみが生じます。パージバルブを交換することにより、この問題は解消されました。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC 検出の概要

1.1 GPC/SEC 検出器信号の理解

1.2. 検出器の組み合わせと配列

1.3. RI 検出器の理解

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

1.5. GPC/SEC 粘度測定 – 構造解析のための汎用的なツール

1.6. 静的光散乱法の選び方

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

用語集

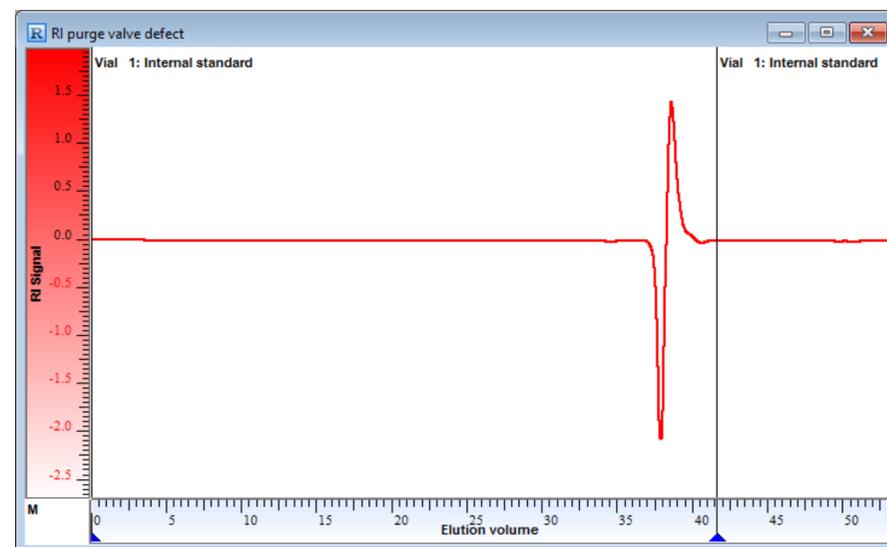


図 4. 問題のあるパージバルブを用いて屈折率から取得された屈折率信号。この問題の特徴は、負から正への信号のシフトです。

結論

- 直線的レスポンス（信号レスポンス対濃度）により、RI 検出器は汎用的な検出器と認められ、多数の種類 of 巨大分子に最適です。
- 信号が屈折率の変化に反応するため、サンプルに発色団は不要です。
- GPC/SEC では、一般的に RI は光散乱検出器と組み合わせて使用し、 dn/dc 値を予測します。

- RI のデメリットとは、比較的感度が低く（UV と ELSD と比較して）、ラボ環境や条件に影響を受け、リファレンスセルが必要なことです。
- 安定したベースラインを得るために、RI 検出器には高品質溶媒が必要です。
- RI リファレンスセルのパージ/フラッシュは、完全に平衡化されたシステムで、分析を開始する直前の作業として実施する必要があります。

参考文献

1. Held, D.; Kilz, P. What is the Best Detector Sequence? *The Column* **2012**.
2. Held, D.; Radke, W. Inter-Detector Delay. *The Column* **2017**.
3. Held, D. How to Get a Stable Baseline. *The Column* **2012**.
4. Held, D. GPC/SEC Do's and Don'ts for Data Analysis. *The Column* **2013**.
5. Held, D. The Art of Analyzing High Molar Mass Samples. *The Column* **2014**.

Originally published in *The Column*, December **2017**, by author Daniela Held.

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC 検出の概要

1.1 GPC/SEC 検出器信号の理解

1.2. 検出器の組み合わせと配列

1.3. RI 検出器の理解

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

1.5. GPC/SEC 粘度測定 – 構造解析のための汎用的なツール

1.6. 静的光散乱法の選び方

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC 検出

1.4.蒸発光散乱検出器

1980 年代、蒸発光散乱検出器 (ELSD) は、非揮発性のサンプル成分を検出する、感度に優れた汎用的な検出器として導入されました。

ELSD は、移動相の蒸発後に固体成分粒子の散乱光を測定します。ポリマー溶液を扱う光散乱検出器とは対照的です。ELSD は、濃度が検出可能な検出器です (RI 検出器など)。最も重要なポイントは、信号強度が分子量の影響を受けないということです。したがって、ELSD は (絶対) 分子量を測定できません。

したがって、GPC/SEC で ELSD を使用するには、依然として、分子量が既知の標準を用いたカラムのキャリブレーションが必要です。

検出原理および分析パラメータの影響

ELSD は、ガス相中の粒子成分からの散乱光を検出します。動作原理は 3 つのステップで構成されます。

- **噴霧化**：カラムからの溶出物は、検出器に入った後に、不活性キャリアガス (N₂、空気、He) を使用して噴霧され、微小のエアロゾルを生成します。
- **蒸発**：形成されたエアロゾルは、キャリアガスによって加熱された蒸発チューブを通して移送されます。ここで溶媒は気化し、高純度の成分の粒子を生成し、検出器の光線を横切るときに光を散乱させます。蒸発温度は溶媒を蒸発させるのに十分に高い必要がありますが、分析対象が揮発性の成分の場合は蒸発させてはなりません。また熱分解を引き起こしてはいけません。

- **検出**：粒子の流れが検出器の光路を通るときに、光が散乱されます。フォトダイオードによって検出される光の量は、成分の濃度と粒子サイズの分布に比例します。

流出物の液滴のサイズと均一性は、感度と再現性に影響を及ぼす重要なパラメータです。エアロゾルの液滴のサイズは、溶媒粘度、密度、表面張力、および気体/液体流の速度など、多数のパラメータに依存します。¹

高い信号強度を生成するには、大きなサイズの流出物液滴が望ましいです。高いガス流量により、小さな液滴が形成されます。低すぎる流量は、不十分な噴霧化によるベースラインノイズの原因になります。さらに、噴霧化中にオリゴマーが取り除かれないように注意を払う必要があります。

ELS 検出器のメリット

ELS 検出器は (RI 検出器のように) 汎用的な検出器です。UV 活性の発色団は不要です。ELSD は、非揮発性のサンプル化合物を検出します。

RI 検出器と比較し、ELSD の検出下限 (LoD) は大幅に低いです。およそ 10 倍の感度を発揮します。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC 検出の概要

1.1 GPC/SEC 検出器信号の理解

1.2. 検出器の組み合わせと配列

1.3. RI 検出器の理解

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

1.5. GPC/SEC 粘度測定 – 構造解析のための汎用的なツール

1.6. 静的光散乱法の選び方

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

用語集

溶媒または低分子量移動相溶媒からのシステムピークは、ほぼ確実に蒸発中に解消されます。さらに、ELSD は、溶媒のグラジエント溶出を適用した場合に、相互作用クロマトグラフィー (IPC、ポリマー -HPLC) でも使用できます。これらのメリットにより ELS 検出器は、2D-IPC-GPC/SEC の二次元目に適した選択肢となっています。²

ELS 検出器のデメリット

ELSD は、移動相を気化させて、廃棄する成分を取り除くため、破壊検出器です。したがって、マルチ検出器の配列の最後に配置する必要があります。

ELS 検出器の問題は、非直線的な検出器レスポンス³ (対数直線関係) により、成分の定量が可変であるということです。信号強度は、分子量、サンプルの化学組成、移動相組成、液滴のサイズなど、多数のパラメータに基づきます。

測定ピーク面積 (A) は、注入量 (m)、2 つのサンプル依存性係数 (b および x) に伴い変化します。

$$A = b \cdot m^x$$

したがって、ELS 検出器は、定量に使用できる状態にするのに、慎重なキャリブレーションが必要です。

ELSD 使用に関する実用的なアドバイス

ELSD では、1 分あたり数リットル (最新の機器ではより少量) の、微粒子が含まれていないガス供給が必要です。

水性移動相または極性有機溶媒 (DMF または DMAc) 中のサンプルの分析は、より高い沸点と蒸気圧により、問題が生じる可能性があります。

好ましくない相互作用を抑制するために、塩やその他の添加物の移動相溶媒が必要な場合、それらは揮発性でなければなりません。

一般的に使用される揮発性移動相溶媒には、トリフルオロ酢酸や酢酸アンモニウムなどがあります。鉍酸、臭素、リン酸カリウムなどの非揮発性バッファは使用できません。表 1 に、複数の揮発性添加物と推奨濃度を示します。ELS 検出では、可能な限り低い溶媒濃度を使用することが推奨されます。

表 1. 最適な揮発性移動相溶媒および推奨濃度

添加物	濃度
ギ酸	0.1 %
酢酸	0.1 %
トリフルオロ酢酸	0.1 %
酢酸アンモニウム	最大 10 mM
炭酸アンモニウム	最大 10 mM
アンモニウムギ酸	最大 10 mM

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC 検出の概要

1.1 GPC/SEC 検出器信号の理解

1.2. 検出器の組み合わせと配列

1.3. RI 検出器の理解

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

1.5. GPC/SEC 粘度測定 – 構造解析のための汎用的なツール

1.6. 静的光散乱法の選び方

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

用語集

結論

- ELSD は、混合溶媒に対する検出下限、グラジエント溶出の適用、ベースライン安定性により、RI 検出器よりも優れています。したがって、2D-GPC/SEC 二次元目検出器として最適です。
- 低分子成分の損失の可能性、揮発性移動相溶媒の使用、非線形レスポンスによる定量の難しさは、メソッド開発とバリデーションに関して大きな懸念となります。

参考文献

1. Schulz, R.; Engelhardt, H. The Application of an Evaporative Light Scattering Detector in Polymer Analysis. *Chromatographia* **1990**, (29), 517–522.
2. Pasch, H., Trathnigg, B. Two-Dimensional Liquid Chromatography in Multidimensional HPLC of Polymers; Springer, **2013**.
3. Guiochon, G.; Moysan, A.; Holley, C. Influence of Various Parameters on the Response Factors of the Evaporative Light Scattering Detector for a Number of Non-Volatile Compounds. *J. Liq. Chromatogr.* **1988**, 11(12), 2547–2570.

Originally published in *The Column*, October **2013**, by author Daniela Held.

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC 検出の概要

1.1 GPC/SEC 検出器信号の理解

1.2. 検出器の組み合わせと配列

1.3. RI 検出器の理解

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

1.5. GPC/SEC 粘度測定 – 構造解析のための汎用的なツール

1.6. 静的光散乱法の選び方

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC 検出

1.5. 粘度測定 – 構造解析などのための汎用的なツール

光散乱や RI 検出器などの他の GPC/SEC 検出器と比較し、粘度計はより慎重に扱う必要があります。それでも、粘度計は、他の検出器では得られない特定の情報を提供するため、取り組む価値があります。

オンライン粘度計の仕組み

一部のシングル/デュアルキャピラリー粘度計は依然としてあるものの、今日のほとんどの検出器は、Max Haney が最初に開発した 4 キャピラリーブリッジ設計をベースとしています¹ (図 1 を参照)。4 キャピラリー粘度計はすべて、類似のコンセプトに基づいています。サンプル溶液は、ブリッジに入るときに 2 つの部分に分割されます。対称性ブリッジでは 50:50 (Malvern (以前の Viscotek) モデルなど)、非対称性ブリッジでは 80:20 (ETA20xx/DVD1260 モデルなど) の割合です。

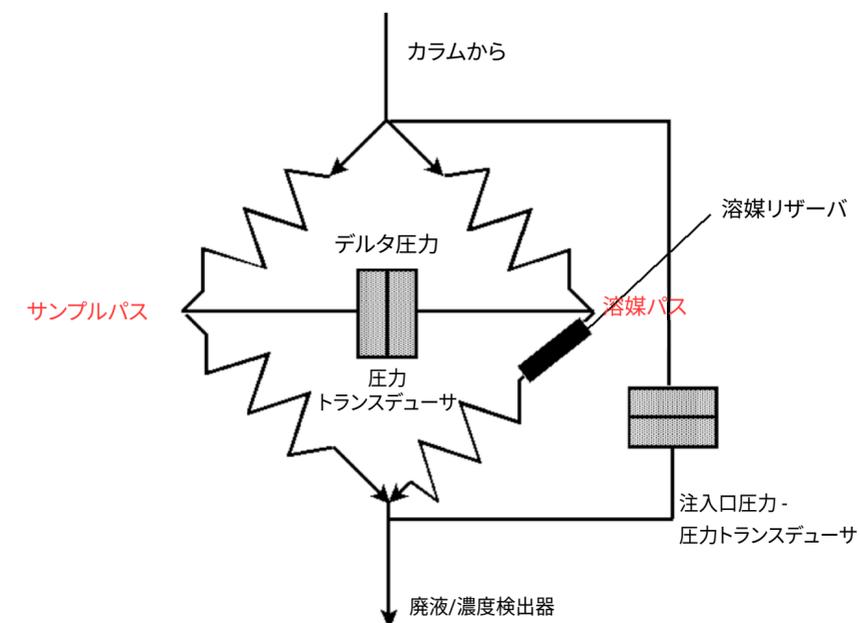


図 1. サンプル/溶媒パス、およびゼロ濃度にまで希釈するためのリザーバを含む、4 キャピラリーブリッジ設計の粘度計

サンプルの 1 部分はサンプルパスを通ります。他の部分はリファレンス (または溶媒) パスを通ります。ゼロにまで濃度を希釈するために、この部分にホールドアップカラムまたは溶媒リザーバが設置されます。

1 つの圧力トランスデューサが、サンプルと溶媒パスとの圧力差 (デルタ圧力 (DP)) を継続的に測定します。さらに、ほとんどの検出器では、サンプル溶液が分割される前に、注入口圧力 (IP) も測定されます。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC 検出の概要

1.1 GPC/SEC 検出器信号の理解

1.2. 検出器の組み合わせと配列

1.3. RI 検出器の理解

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

1.5. GPC/SEC 粘度測定 – 構造解析のための汎用的なツール

1.6. 静的光散乱法の選び方

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

用語集

サンプルの 1 部分がホールドアップカラムにより溶媒パスで遅れると、溶媒パスの内容物はサンプルの後に溶出し、負のピークとしてのシステムピークが検出されます。サンプルの 1 部分が高純度溶媒で満たされたりリザーバで約ゼロの濃度に希釈されると、これらの粘度計は負のブレイクスルーピークを生成しません。これらの粘度計では、リザーバをフラッシュする必要があります (RI リファレンスセルと同様)。

図 2 に、異なる分子量で同じ濃度の、4 種類の分布が狭いポリスチレン標準の混合物の生データを示します。分子量が増えると、粘度が高くなり、それに伴い粘度計の信号強度も向上します。

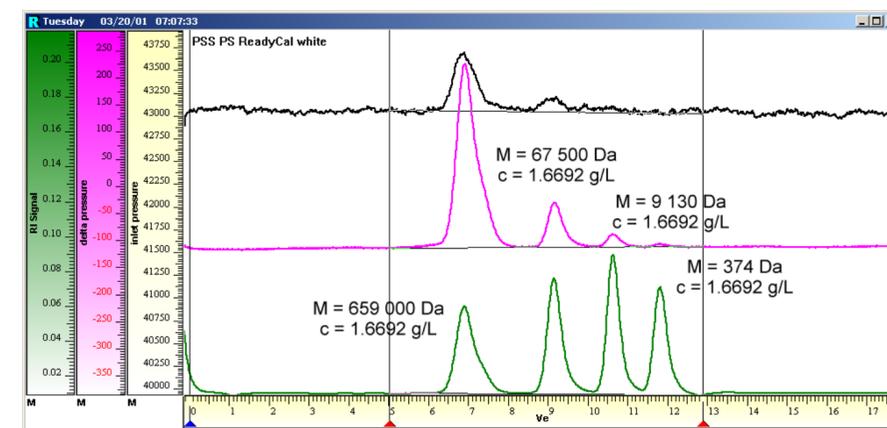


図 2. 粘度計と示差屈折率検出器で分析した、4 種類のポリスチレン標準の混合物のデルタ (紫) と注入口 (黒) 圧力信号

粘度計で得られる結果

粘度計は、溶出量スライスごとに特定の粘度を測定します。メーカーと設計に基づき、式を使用して、注入口圧力とデルタ圧力から特定の粘度を計算します。

包括的な粘度データの評価のために、RI 検出器または UV 検出器からの濃度データが必要になります。

濃度検出器は、溶出量スライスごとの濃度を測定します。濃度で特定の粘度を除算することで、溶出量スライスごとの固有粘度 (η)、およびサンプルのバルク固有粘度が得られます。計算では、濃度が非常に低く、ゼロ濃度への外挿は無視できるものと仮定します。

次に、スライス固有粘度を使用して、ユニバーサル検量線からスライス分子量を取得できます。Benoit² のグループは、固有粘度で乗算した分子量の対数を溶出量に対して (分子量の対数だけでなく (図 3 を参照)) プロットすると、結合相や構造に関わらず、すべてのサンプルは 1 本の検量線になることを明らかにしました。

検量線が参照物質の濃度と粘度のデータを使用して作成されている場合、キャリブントとは化学的および/または構造的に異なるサンプルの真の分子量を測定できます。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC 検出の概要

1.1 GPC/SEC 検出器信号の理解

1.2. 検出器の組み合わせと配列

1.3. RI 検出器の理解

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

1.5. GPC/SEC 粘度測定 – 構造解析のための汎用的なツール

1.6. 静的光散乱法の選び方

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

用語集

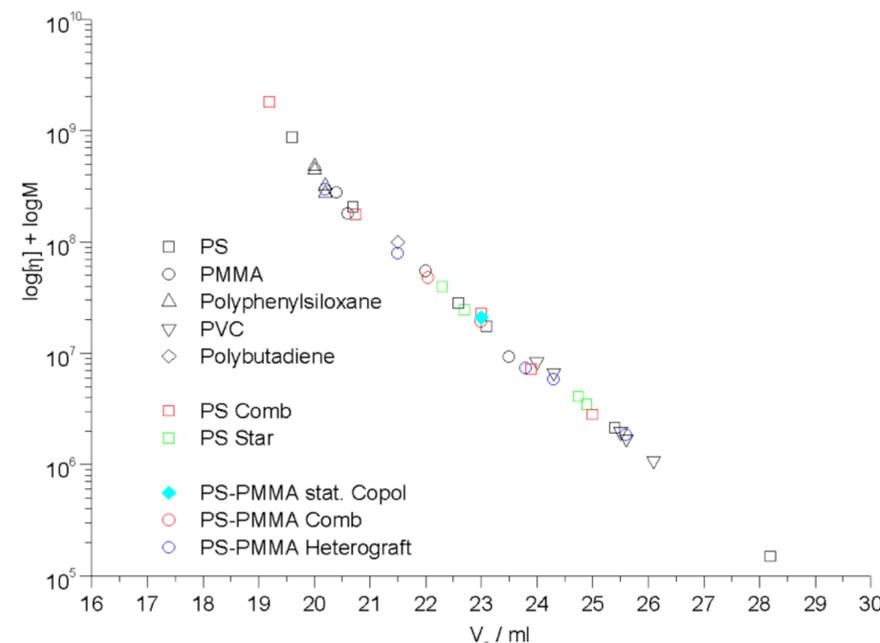


図 3. Benoit のグループによって測定されたユニバーサル検量線。Y 軸は、固有粘度で乗算された分子量の対数を示します。

その他の結果は Mark-Houwink プロットから取得できます。Mark-Houwink 式は、分子量と固有粘度を関連付けます。

$$[\eta] = K \cdot M^\alpha$$

M = 分子量

η = 固有粘度

α = 傾き

K = Y 軸切片

図 4 では、固有粘度の対数（オンラインで測定）を分子量の対数に対してプロットしています。直線の近似曲線から傾きと軸切片が得られます。Mark-Houwink α は、ポリマー鎖の溶液構造を測定したものです。

表 1 に複数の例を示します。

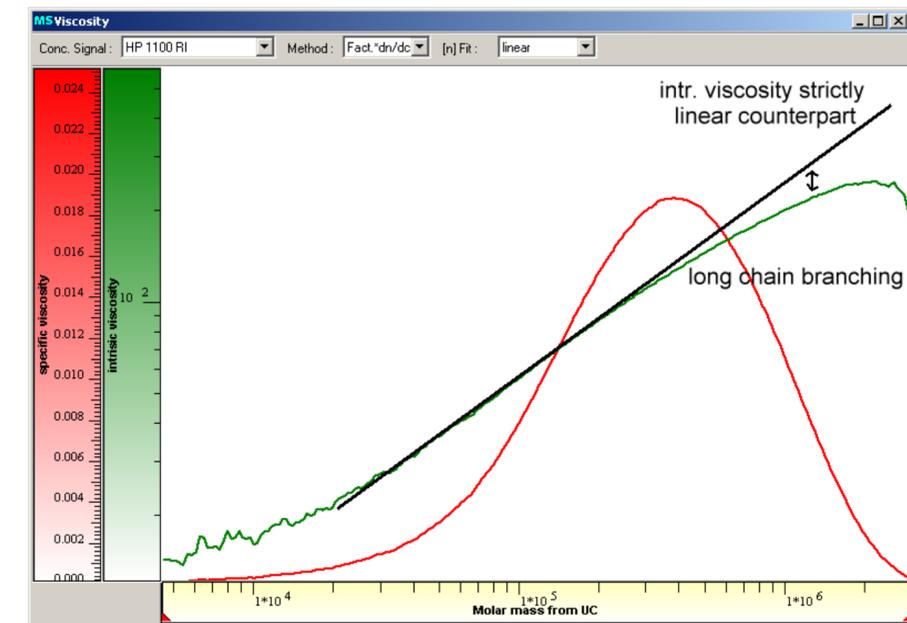


図 4. 線状サンプル（黒）の固有粘度と比較した、特定（赤）および固有粘度（緑）を示した Mark-Houwink プロット。偏差は、長鎖分岐が始まる部分を表しています。

表 1. 一部の Mark-Houwink α 値の溶液構造

Mark-Houwink α	提示された構造
0	凝縮した球状構造
0.5	柔軟なコイル状（シータ状態）
$0.5 \geq \alpha \geq 0.8$	柔軟なコイル状（良い溶媒）
≥ 0.8	半剛直鎖
2	剛直棒状鎖

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC 検出の概要

1.1 GPC/SEC 検出器信号の理解

1.2. 検出器の組み合わせと配列

1.3. RI 検出器の理解

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

1.5. GPC/SEC 粘度測定 – 構造解析のための汎用的なツール

1.6. 静的光散乱法の選び方

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

用語集

データ解析の方法

固有粘度は、比容として見なすことができます。つまり、粘度と信号強度が高くなるほど、対応するポリマー鎖の密度が低くなるということです。したがって、生データから構造に関する情報を簡単に取得できます。

粘度計と光散乱検出器の組み合わせは、両方の検出器の信号強度と出現順序を比較することで、追加の情報を提供します。光散乱検出器は高分子量に対し高い信号強度を、粘度計は低密度に対して高い信号強度を生成します。両方の生の信号により、分子量が高いかどうか、および/または分子の密度が高いかどうかを判断できます。

Mark-Houwink プロットは、分岐など、サンプル特性の詳細に関する優れた情報源になります。サンプルの構造が分子量によって変化しない場合、分子量に対して固有粘度の線形依存性があります。分岐したサンプルを扱う際には、同じ分子量範囲で固有粘度を比較し、サンプルプロットを重ね表示するのが有効です。同じ分子量で固有粘度が低い場合、分岐の程度は高くなります。サンプルプロットの傾きの変化は、長鎖分岐 (図 4 を参照) や、例えば星型ポリマーへのアームの付加など、構造 (および密度) の変化を示しています。

サンプルが複数のピークを生成する場合、各ピークがベースラインで分離されるよう、分離能がより優れたカラムで再分析するのが最適です。異なる種が適切に分離されない場合は、共溶出のある溶出範囲の平均の固有粘度が測定されます。したがって、ベースライン分離されていないピーク間でデータを解釈することは推奨されません。解釈により、真値が示されないからです。

粘度計を使用する際の実用的なアドバイス

粘度計は小さな圧力差を測定するため、良好にメンテナンスされた、脈動のないポンプを使用することが重要です。システムの背圧が、ポンプが適切に動作するのに十分高いことを確認します。背圧が低すぎる場合は、例えば、リストラクシオンキャピラリーなどを追加して高くします。DP 信号のノイズが高くなると、ポンプに点検サービスが必要であることを示している可能性があります。この信号でフーリエ分析を行うと、例えば、ポンプから高周波の乱れが追加的に生じているかどうかを確認できます。その場合、フーリエ合成は、ピーク高と形状を変えることなく、データを平滑化するための優れた手段となります (図 5 を参照)。

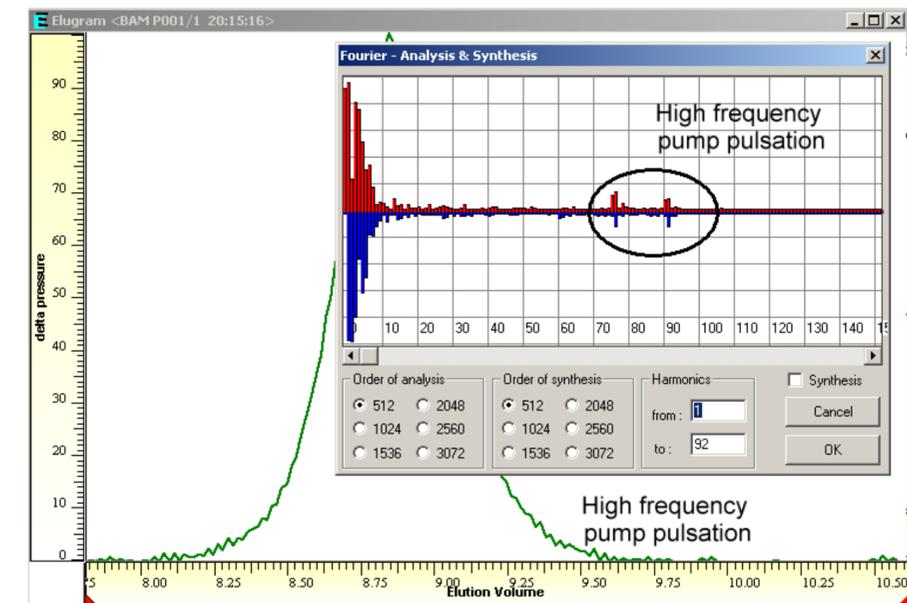


図 5. 顕著な高周波の乱れの原因となる、適切にメンテナンスされていないポンプを使用した、システムのデルタ圧力信号のフーリエ分析

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC 検出の概要

1.1 GPC/SEC 検出器信号の理解

1.2. 検出器の組み合わせと配列

1.3. RI 検出器の理解

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

1.5. GPC/SEC 粘度測定 – 構造解析のための汎用的なツール

1.6. 静的光散乱法の選び方

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

用語集

特にバッファを扱う場合など、定期的に注入口圧力 (IP) をモニタリングして詰まりを検出します。IP は稼働中に上昇しません。

リザーバを備えた粘度計の場合、溶媒の交換が必要です (水から THF へなど)。手動で実行し、一晩かけてシステムを安定化させます。

ホールドアップカラムを取り付けた粘度計の場合、負またはブレイクスルーピークがサンプルピークと重ならないよう、分析カラムとディレイカラムの本数は一致しなければなりません。後続のサンプルは、負のピークが溶出した後にのみ注入できます。

Mark-Houwink 係数を測定する際には、調べたサンプルの分子量分布が十分に広いことを確認します。Mark-Houwink 係数を単一のサンプルから求める場合、多分散性指数 (PDI) は 1.3 以上である必要があります。PDI は高い方が望ましいです。データポイントが多いため、より高い精度で直線近似が可能になるからです。PDI が小さすぎる場合は、分子量が異なる複数のサンプルから係数を求めることにより、精度を向上させることができます。

Mark-Houwink 係数を測定する際には、粘度計と濃度検出器との間の検出の遅延を正確に確認することが重要です。Mark-Houwink 指数 (α) は検出器間の遅延に対して最も感度が高く、微調整のために実際に使用されます。線状で、分子量分布の広いサンプル (ポリスチレンや特殊なプルランなど、分布の広い参照物質) を使用し、濃度検出器と粘度計との間の検出の遅延を検証します。³

参考文献

1. Haney, M.A. The Differential Viscometer.II.On-Line Viscosity Detector for Size-Exclusion Chromatography. *J. Appl.Polym.Sci.* **1985**, (30), 3037–3049.
2. Benoit, H. et al.Étude par Chromatographie en Phase Liquide de Polystyrènes Linéaires et Ramifiés de Structures Connues.*J. Chim.Phys.* **1966**, (63), 1507–1514.
3. Held, D; Radke, W. Inter-Detector Delay, LC/GC.*The Column* **2017**, (8).

Originally published in *The Column*, February **2012**, by author Daniela Held.

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC 検出の概要

1.1 GPC/SEC 検出器信号の理解

1.2. 検出器の組み合わせと配列

1.3. RI 検出器の理解

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

1.5. GPC/SEC 粘度測定 – 構造解析のための汎用的なツール

1.6. 静的光散乱法の選び方

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC 検出

1.6. 静的光散乱法の選び方

光散乱は、巨大分子の特性解析を対象に絶対分子量データを生成できる数少ない技術の 1 つです。オンライン光散乱検出器は、GPC/SEC システムにおいて、分子量、回転半径を測定するために濃度検出器と組み合わせて使用したり、低濃度の高分子量成分の同定のために使用したりします。

光散乱の検出は、従来の (カラム) キャリブレーションが不要な、高分子量ホモポリマー、タンパク質、その他の生体高分子の特性解析のための優れたメソッドです。

信号強度は、分子量、注入量、屈折率増分 $(dn/dc)^2$ に直接依存しています。このうちいずれかの情報がないと、真の分子量を取得することは不可能です。異なる動作原理に基づく複数の検出器があります。基本原理を理解することにより、ユーザーは特定のアプリケーションに最適な技術を選択することができます。

ポリマー溶液の静的光散乱 (SLS) の原理

既知の波長のレーザー光源からの単色光が希釈ポリマー溶液を通過すると、光が散乱します。散乱光は、静的または動的光散乱検出器 (SLS 対 DLS) のいずれかにより検出できます。

「静的」という用語は、光散乱の実験の動作モードを示すものではありません。時間平均散乱強度が測定されることを示しています。動的光散乱の実験では、光強度の変動を測定します。静的および動的の検出はどちらも、オンライン (GPC/SEC、フローモード) またはバッチモード (スタンドアロン技法) で実行できます。

散乱光の強度は 1 つ以上の検出器固定角度で測定されます (図 1)。

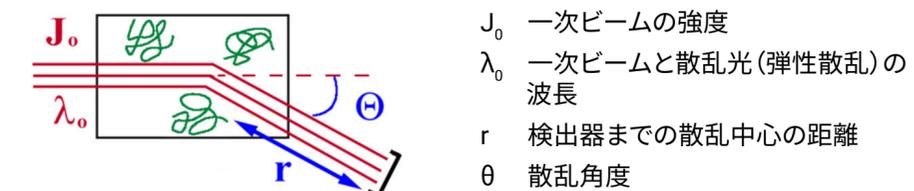


図 1. ポリマー溶液の光散乱の概略図

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC 検出の概要

1.1 GPC/SEC 検出器信号の理解

1.2. 検出器の組み合わせと配列

1.3. RI 検出器の理解

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

1.5. GPC/SEC 粘度測定 - 構造解析のための汎用的なツール

1.6. 静的光散乱法の選び方

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

用語集

セルの設計と形状によって、検出器の角度は真の散乱角度である場合もあるし、そうでない場合もあります。

- 強度を円筒形セルで直接測定する場合、散乱角度と検出器角度は必ず同じです (図 2A)。
- 一般的なガラス製セルを使用する場合、溶液/ガラスの界面はあらゆる検出器角度のオフセットの原因となります (ただし、真の散乱角度のために補正が必要な 90°の角度は除く (図 2B))。

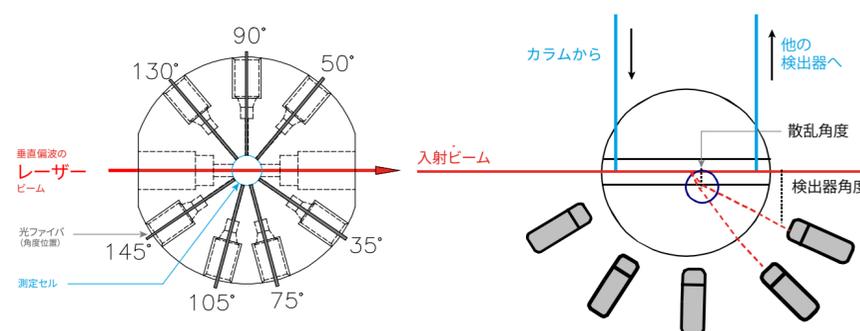


図 2. セル設計、検出器角度と散乱角度

光散乱に対し 1 つの角度 (90°) では不十分な理由

成分のサイズが入射光線の波長と比べて小さい場合、成分は点状散乱体として見なされます。これは、成分の 2 つの散乱点間の最大距離が、レーザー波長 (λ) の $\sim\lambda/20$ よりも小さい場合に発生します。この場合、1 つの角度で生成された分子量データは正確になります。

一般的に、1 つの角度からの結果は、以下に対して正確になります。

- 200,000 Da 以下の分子量の、ランダム鎖、線状ポリマー
- 1,000,000 Da 以下の分子量の球状タンパク質
- 200,000 Da 以上の分子量の分岐ポリマー (分岐密度による)³

シンプルな実験設定と非常に優れた S/N 比により、90°角度は多くの場合にこれらのアプリケーションに好ましいとされています。

溶液中の高分子量種が最大で数百ナノメートルの大きさである場合、成分の異なる散乱点からの散乱光はコヒーレントで、干渉の原因となります (図 3)。

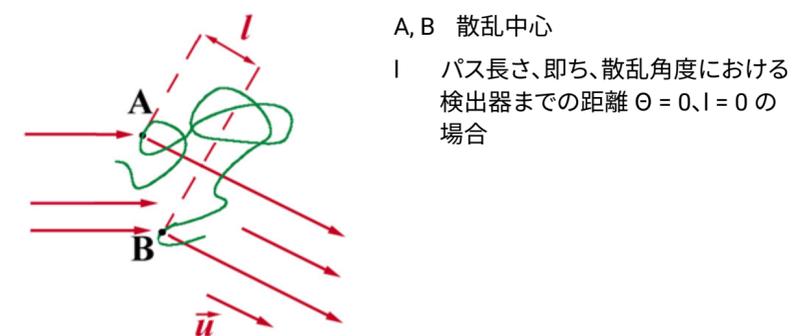


図 3. 大きな成分の光散乱

干渉により、すべての質量点からの散乱光を合わせた場合と比べて、大きな成分の散乱強度が低下します。これにより、散乱強度が角度依存性となり、90°の角度のみで大きな成分を測定すると、十分な結果は得られません。¹

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC 検出の概要

1.1 GPC/SEC 検出器信号の理解

1.2. 検出器の組み合わせと配列

1.3. RI 検出器の理解

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

1.5. GPC/SEC 粘度測定 – 構造解析のための汎用的なツール

1.6. 静的光散乱法の選び方

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

用語集

未知のサンプルから正確な結果を得るためには、90°の光散乱 (LS) 結果のみに依存することは推奨されません。

図 4 に、大きな成分の RI および光散乱信号を示します。LS 信号は、35°/90°/145°の散乱角度で取得しました。RI は濃度が検出可能な検出器、MALS が分子量が検出可能な検出器である場合、RI/MALS 信号に見かけ上のシフトが確認されます。²

3つの異なる LS 信号の見かけ上の信号シフトは角度依存性に由来し、大きな成分の特性解析のために複数の検出器角度を使用することの重要性を示しています。

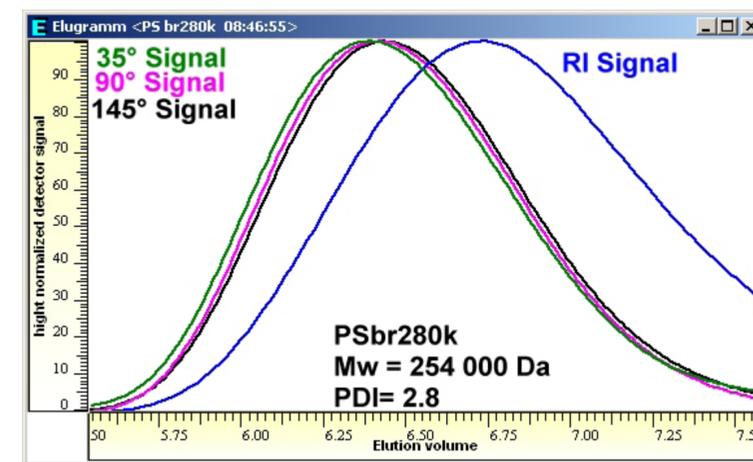


図 4. 分布の広いポリスチレンの 35°/90°/145°の角度における屈折率と 3つの光散乱信号

LALS、RALS、MALS について

これらの略語は、低角度、直角、多角度レーザー光散乱の技法と検出器を表しています。これらの検出器の違いは、検出角度の数と位置に基づきます。LALS/RALS 機器は低角度 (6 ~ 7°など) または直角 (90°) の 1つの角度で、MALS 検出器は同時に複数の角度で測定を行います。

直角光散乱 - RALS

RALS (90°光散乱) には、最も正確で有用な信号が得られるというメリットがあります。迷光の問題や、溶液に存在する塵粒子による散乱の干渉が少なく、信号の品質が低下しにくいというメリットもあります。ただし、正確に測定される分子量の範囲は、低から中分子量の巨大分子に限定されます。

低角度光散乱 - LALS

LALS には、観察される散乱強度が、0°の散乱角度で予測される理論上の強度値に非常に近いというメリットがあります。理論上、すべての光散乱の測定は 0°の角度で行う必要があります。RALS/MALS 測定に影響を及ぼす一部の外部干渉の影響を受けないからです。分子量の範囲は他の LS 技術よりもはるかに広く、分子量値は直接測定できます。

残念ながら、LALS には、実験上最大の困難さが伴います。弱い散乱信号を高い精度と真度で測定するために、複雑な光学系と非常にクリーンなシステムが必要になります。有用なデータを生成するために検出器やソフトウェアで多くの信号処理が必要ですが、真の生データを確認することが不可能な場合があります。一部のクロマトグラフシステム (特に水溶性 GPC/SEC システム) では、クリーンなシステムの要件を満たすことがほぼ不可能です。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC 検出の概要

1.1 GPC/SEC 検出器信号の理解

1.2. 検出器の組み合わせと配列

1.3. RI 検出器の理解

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

1.5. GPC/SEC 粘度測定 – 構造解析のための汎用的なツール

1.6. 静的光散乱法の選び方

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

用語集

多角度光散乱 - MALS

実用的な目的のために、および非常に広い範囲で正確な分子量値を得るために、MALS 機器は最適なソリューションとなります。散乱強度/検出角度のプロットの傾きは、0 °散乱角度に外挿できません。さらに、データから回転半径 (R_g) 平均を計算できます。

MALS 検出器の大きなデメリットの 1 つは高いコストです。これは、複雑なエンジニアリングによるものです。

三重検出

近年、三重検出 GPC/SEC は非常に人気の高い技法になっています。「三重検出」という用語はもともと、粘度、90 °の単一角度光散乱、濃度検出器で構成されたシステムのみで使用されていました。データ処理は複数の仮定を行う特殊なアルゴリズムによって実行されます。⁵ サンプルはシート状態 (GPC/SEC 条件ではない) で分析され、サンプルは線状で、鎖モデルによって表現できると仮定します。したがって、未知のサンプルに三重検出を使用する場合、慎重に行わないと、不正な結果となる可能性があります。⁶

現在この用語は、従来の示差屈折率検出器に、光散乱 (LALS、RALS、MALS) と粘度検出器の両方を組み合わせたすべての技法にも使用されています。この技術は、天然分子および合成ポリマーの両方に適用できます。結果として得られる分子量と構造に関する情報は、分析のための有価なツールとなります。

絶対分子量データに加え、この種の三重検出システムは以下を生成できます。

- Mark-Houwink-Sakurada パラメータ
- Mark-Houwink コンフォメーションプロット
- 収縮係数および分岐比情報
- ユニバーサルキャリブレーションプロット
- R_g および R_h 情報

ただし、三重検出 GPC/SEC 手法は、機器構成とデータ取得の管理/処理に関してより複雑で、すべての状況で適用できない可能性があります。

1 つの低角度と組み合わせて、高分子量を測定できます。図 5 は、低角度に対して実験エラーが最大であり、したがって、複数の角度を使用することで分子量結果の精度を向上できることを示しています。

コポリマー分析のための光散乱検出

コポリマーを分析している場合、光散乱検出 (使用している場合) では不正な分子量データが提供されます。コポリマーの dn/dc は組成と鎖の長さによって変化するからです。 dn/dc における差異、および低分子化合物は、低い信号強度により精度の低い光散乱データを生成します。¹

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC 検出の概要

1.1 GPC/SEC 検出器信号の理解

1.2. 検出器の組み合わせと配列

1.3. RI 検出器の理解

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

1.5. GPC/SEC 粘度測定 – 構造解析のための汎用的なツール

1.6. 静的光散乱法の選び方

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

用語集

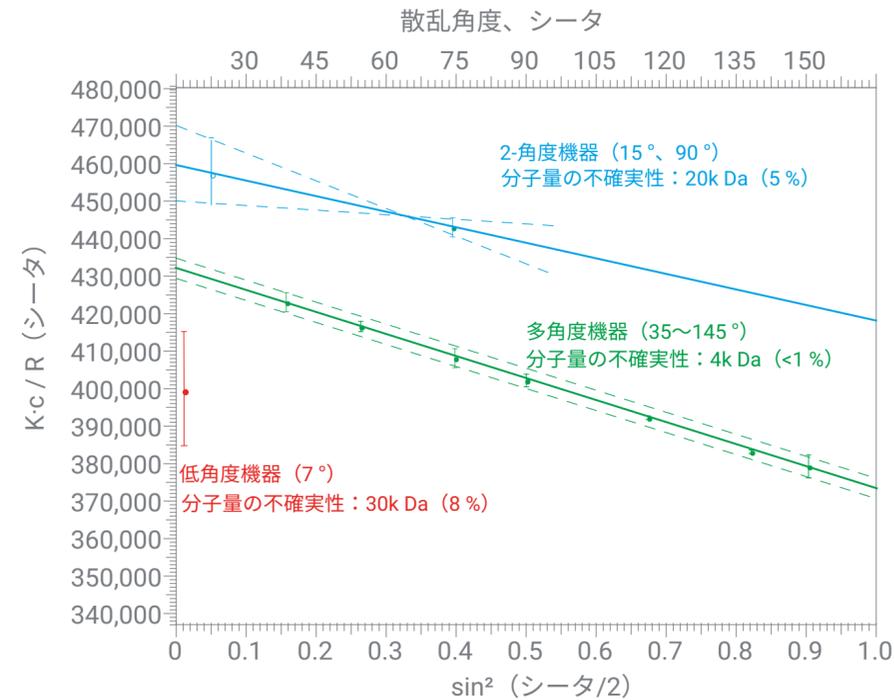


図 5. 単一または多角度検出を使用した場合の、異なる散乱角度および分子量測定のエラーの比較

参考文献

1. Kratochvil, P. Classical Light Scattering from Polymer Solutions; Elsevier, **1987**.
2. Held, D. Understanding positive and negative detector signals. *The Column* **2008**, (12).
3. Mori, S., Barth, H. Size Exclusion Chromatography; Springer, **1999**.
4. Held, D.; Reinhold, G. A look at the importance of molar mass averages. *The Column* **2007**, (10).
5. Haney, M.A.; Jackson, C.; Yau, W.W. SEC-Viscometry-Right Angle Light Scattering (SEC-VISC-RALS). *International GPC Symposium Proceedings* **1991**.
6. Radke, W. Chromatography of Polymers; in *Macromolecular Engineering: Precise Synthesis, Materials Properties, Applications*; Vol.3, K. Matyjaszewski, Y. Gnanou, L. Leibler Eds., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGa, **2007**.
7. Berry, G.C.; Cotts, P.M. Static and dynamic light scattering. *Experimental methods in polymer characterization*; Wiley & Sons Ltd., **1998**.
8. T. Chang *et al.* *Macromolecules* **1998**, 31, 4114–411.
9. T. Macko, *Adv. Polym. Sci.* **2003**, 163, 61–136.

Originally published in *The Column*, April **2009**, by authors Daniela Held and Peter Kilz.

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC 検出の概要

1.1 GPC/SEC 検出器信号の理解

1.2. 検出器の組み合わせと配列

1.3. RI 検出器の理解

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

1.5. GPC/SEC 粘度測定 – 構造解析のための汎用的なツール

1.6. 静的光散乱法の選び方

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC 検出

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

一般的に GPC/SEC 分析は、参照標準によって作成される検量線から得られる、分子量と分布の情報を提供します。この使いやすい技法は、再現性の高い結果を提供し、サンプル比較や堅牢な品質管理メソッドのために簡単に適用できます。

化学的/構造的に異なるサンプルと参照物質から結果として得られる分子量は、真の分子量とは大幅に異なる、見かけ上の分子量となります。このような制限は、分子量の範囲に基づき、さまざまなメソッドや技法を適用することにより克服できます。

GPC/SEC におけるオンライン検出ソリューションの新たな手法は、質量分析 (MS) を組み合わせることです。このオンライン検出手法は、質量に応答する他の検出器 (LS および粘度計) では困難な低分子量サンプルに最適で、巨大分子の特性解析における隙間を埋める技術となっています。GPC/SEC と組み合わせるとために、最も適用され、最も紹介されている質量分析メソッドは、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) です。¹ ESI-MS 手法の大きな利点の 1 つは、質量分析計を簡単に LC システムに接続できるという点です。複数の電荷状態を実現し、高分子量成分を分析できます。

定量的場合、GPC/SEC-ESI-MS では濃度検出器 (RI または UV) が必要です。LC コンポーネント以外に必要なのは、濃度検出器のためにフローを適切に分割するシンプルな T コネクタ (例、9:1) と、質量分析計だけです。

この種の GPC/SEC-MS の組み合わせは、ポリアクリレート、ポリエステル、ポリエーテル、ポリアミド、樹脂、ポリカーボネート、タンパク質、ポリスチレンなど、幅広い天然/合成巨大分子に適用されています。原則として、巨大分子は、溶液中でモノマー単位あたり 1 つ以上のイオン化可能な官能基が必要です。

メリットとデメリット

- 分離された後、分子量分布が狭い分画の解析しやすいスペクトルは、ESI-MS に移されます。
- 質量分析の感度が大幅に向上します。オンライン接続の後の分子量範囲を 1 ~ 2 万 Da にまで拡大できます (質量分析計の分離能による)。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC 検出の概要

1.1 GPC/SEC 検出器信号の理解

1.2. 検出器の組み合わせと配列

1.3. RI 検出器の理解

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

1.5. GPC/SEC 粘度測定 – 構造解析のための汎用的なツール

1.6. 静的光散乱法の選び方

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

用語集

デメリットは、一部の GPC/SEC メソッドで、分離中に相互作用を最小限に抑制するために塩または添加物が必要であるということです。このような塩や添加物が揮発性でない場合、MS 検出に悪影響を及ぼします。したがって、ELS 検出器の場合、揮発性塩の使用は MS を組み合わせるための前提条件となります。最適な溶媒とは、THF、クロロホルム、塩化メチレン、トルエンなど、簡単に蒸発するものです。

この有効な技法により、結果として真の分子量分布が得られます。溶出量ごとに、質量スペクトルを取得できます。

図 1 に評価の例を示します。概略図の上部に、検出器信号 (RI 信号/青色のトレース)、MS 信号、トータルイオンクロマトグラム (TIC) /赤色のトレース) を、下部に、緑色の分画マーカの溶出量における質量スペクトルを示します。電荷状態、重合の程度、末端基の分子量が自動で割り当てられます。特定の構造、またはベースピーク (スペクトルで最もアバンダンスが高い信号) を選択することにより、クロマトグラムとしてこの構造の分布を表示することができます。これにより、単一オリゴマープロファイル (SOP) とも呼ばれる、抽出イオンクロマトグラム (EIC) が生成されます。これらの各構造により、それぞれの一致する検量線が作成されます。MS では分子量の絶対測定が可能だからです。この検量線、および濃度検出器からの定量情報により、真の分子量を測定することができます。

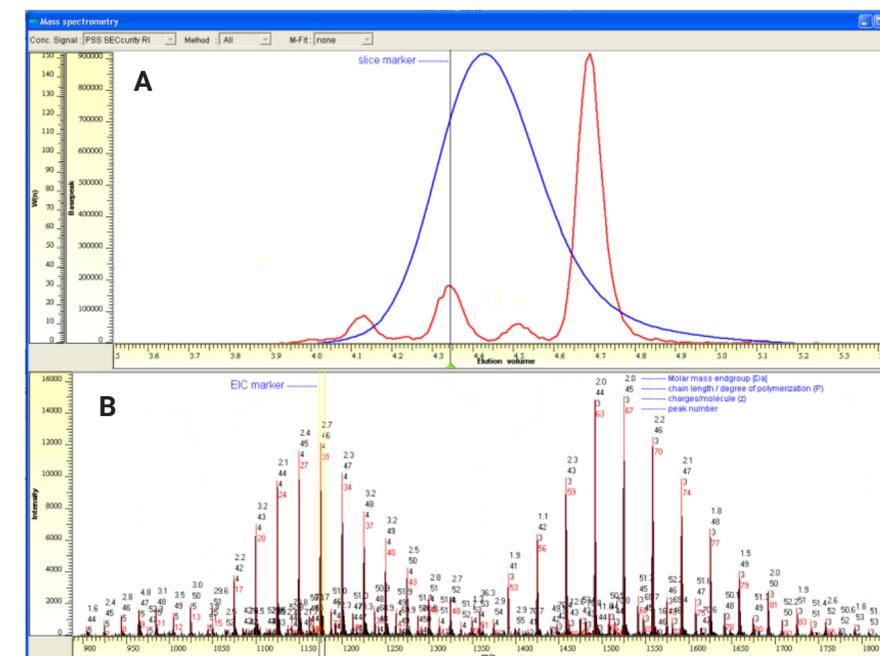


図 1. GPC/SEC-ESI-MS データ

図 1A に、検出器信号 (RI 信号/青色のトレースおよび MS 信号 (TIC) /赤色のトレース)、図 1B に緑色の分画マーカの溶出量における質量スペクトルを示します。電荷状態、重合の程度、末端基の分子量が自動で割り当てられます。

参考文献

1. Gruending, T.; Guilhaus, M.; Barner-Kowollik, C. Quantitative LC–MS of Polymers: Determining Accurate Molecular Weight Distributions by Combined Size Exclusion Chromatography and Electrospray Mass Spectrometry with Maximum Entropy Data Processing. *Anal.Chem.* **2008**, (80), 6915 .

Originally published in *The Column*, April **2011**, by author Daniela Held.

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC 検出の概要

1.1 GPC/SEC 検出器信号の理解

1.2. 検出器の組み合わせと配列

1.3. RI 検出器の理解

1.4. 蒸発光散乱検出 (ELSD)

1.5. GPC/SEC 粘度測定 – 構造解析のための汎用的なツール

1.6. 静的光散乱法の選び方

1.7. オンライン質量分析により得られるさまざまな情報

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC 検出

用語集

Da	ダルトン (g/mol)
DAD	ダイオードアレイ検出器
DMac	ジメチルアセトアミド
DMF	ジメチルホルムアミド
dn/dc	屈折率増分
DP	差圧
ELSD	蒸発光散乱検出器
EIC	抽出イオンクロマトグラム
ESI	エレクトロスプレーイオン化
FLD	蛍光検出器
FTIR	フーリエ変換赤外
GPC	ゲル浸透クロマトグラフィー
H ₂ O	水
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
IP	注入口圧力
LALS	低角度レーザー光散乱
LC	液体クロマトグラフィー
LS	光散乱
M _w	重量平均分子量

MALS	多角度レーザー光散乱
移動相	クロマトグラフィーシステムで使用される液相
MMD	分子量分布
MS	質量分析
n	屈折率
PDI	多分散性指数 ($D = M_w/M_n$)
PDMS	ポリジメチルシロキサン
PMMA	ポリメチルメタクリレート
PS	ポリスチレン
R ²	回帰係数
RALS	直角光散乱
RI	示差屈折率 (検出/検出器)
RIU	屈折率単位
SEC	サイズ排除クロマトグラフィー
溶媒	溶液を作成するために溶質が溶解された液体
THF	テトラヒドロフラン
TIC	トータルイオンクロマトグラム
UV	紫外線 (検出/検出器)

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。

DE09152032

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, February 13, 2024

5994-5937JAJP

