

GPC/SEC 電子書籍シリーズ

GPC/SEC の トラブルシューティングと ベストプラクティス

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 のトラブルシューティング/
ベストプラクティス

1.1.効果的なトラブルシューティングに
必要な知識

1.2.移動相に関する注意事項

1.3.GPC/SEC カラム – 注意事項

1.4.FAQ：GPC/SEC カラムと適切な
扱い方

1.5.安定したベースラインを得る方法

1.6.データ解析に関する注意事項

1.7.GPC/SEC 光散乱に関する
注意事項

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC のトラブルシューティングとベストプラクティス

目次

本電子書籍シリーズについて 3

GPC/SEC のトラブルシューティング/ベストプラクティス 4

1.1. 効果的なトラブルシューティングに必要な知識 5

1.2. 移動相に関する注意事項 9

1.3. GPC/SEC カラム – 注意事項 13

1.4. FAQ：GPC/SEC カラムと適切な扱い方 16

1.5. 安定したベースラインを得る方法 20

1.6. データ解析に関する注意事項 25

1.7. GPC/SEC 光散乱に関する注意事項 30

用語集 36

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC のトラブルシューティング/ ベストプラクティス

1.1.効果的なトラブルシューティングに 必要な知識

1.2.移動相に関する注意事項

1.3.GPC/SEC カラム – 注意事項

1.4.FAQ：GPC/SEC カラムと適切な 扱い方

1.5.安定したベースラインを得る方法

1.6.データ解析に関する注意事項

1.7.GPC/SEC 光散乱に関する 注意事項

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC のトラブルシューティングとベストプラクティス

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 のトラブルシューティング/ ベストプラクティス

1.1.効果的なトラブルシューティングに 必要な知識

1.2.移動相に関する注意事項

1.3.GPC/SEC カラム – 注意事項

1.4.FAQ：GPC/SEC カラムと適切な 扱い方

1.5.安定したベースラインを得る方法

1.6.データ解析に関する注意事項

1.7.GPC/SEC 光散乱に関する 注意事項

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC のトラブルシューティングとベストプラクティス

GPC/SEC のトラブルシューティング/ベストプラクティス

液体クロマトグラフィー（LC）機器は、1 個以上のポンプ、インジェクタ（自動または手動）、1 本以上の分離カラム、1 個以上の検出器で構成された、マルチコンポーネントシステムです。信頼性が高く、正確な結果を得るために、この種のシステムにおいては、すべてのコンポーネントが適切に動作しなければなりません。このようなマルチコンポーネントシステムのトラブルシューティングは、非常に困難になる場合があります。

すべての分析科学者が抱えている課題に加え、GPC/SEC を扱う科学者たちは、さらに多くのタスクに対処する必要があります。

GPC/SEC においては、危険な溶媒、（望ましくない相互作用やサンプルの凝集を抑制する必要がある）塩のような移動相添加物や移動相溶媒は非常に一般的に使用され、システムの複雑性を向上させています。

巨大分子サンプルのためのサンプル前処理は、溶解性の問題のために、かなり困難となる可能性があります。データ解析は他の LC メソッドの場合と非常に異なります。

GPC/SEC システムを扱う科学者には、最新のトラブルシューティング戦略が必要です。

この電子書籍の最初のセクションでは、GPC/SEC システムの効果的なトラブルシューティングを実現するために、GPC/SEC システムを十分に理解する方法についての一般的なアドバイスを提供します。

第 2 から第 4 のセクションでは移動相と固定相について、第 5 セクションでは検出の観点から見た典型的な問題について説明します。

本電子書籍の最後の 2 つのセクションでは、従来の GPC/SEC および GPC/SEC 光散乱を対象としたデータ解析をレビューし、再現性の高い結果を得るための情報を提供します。

最後に、この電子書籍には、追加のリソースのためのリンクもいくつか掲載されています。

1.1.効果的な GPC/SEC トラブルシューティングに必要な知識

LC ユーザーと同じように、GPC/SEC ユーザーも日常的な作業において予想外の問題に遭遇することがあります。GPC/SEC システムに伴う一般的な問題として、以下が挙げられます。

- 圧力の上昇
- カラム分離能の低下
- ベースラインのドリフト、特に屈折率（RI）検出を使用している場合

問題が発生した場合に、効果的なトラブルシューティング手法により、機器のダウンタイムを最小限に低減することが可能です。そのためには、科学者がシステムの設定を詳しく理解している必要があります。いくつかの重要なパラメータを知っていることは、問題の根本原因をすばやく特定するのに役立ちます。

圧力の問題

イソクラティックポンプは、オートサンプラ、GPC/SEC カラム、検出器を通じて LC 移動相を供給するために使用します。コンポーネントを接続するための（コンポーネント内の）チューブの内径と長さは、システムの要件に対して最適化する必要があります。バンド幅の拡大を回避するために、ナローボア（内径 0.17 mm 以下）チューブは、セミマイクロ設定および分析設定のための要件となっています。非常に粘度の高い溶媒や分取機器の設定には、多くの場合、より大きな内径（0.25 mm や 0.5 mm など）のチューブが必要です。

カラムとチューブはどちらも背圧を生成します。実際の圧力値は、移動相の粘度、ポンプでの設定流量、カラムの本数と種類、すべてのチューブの内径と長さ（検出器の内部/外部）に基づきます。それぞれの設定に固有の圧力値があります。その値に対しては、長期において若干の変化のみが許容されます。圧力の変化が、問題を示唆している可能性があります。

分析中に圧力をモニタリングすることが強く推奨されます。またユーザーは、カラムを設置した場合と設置しない場合の、設定条件に対する標準的な圧力値（溶媒、流量、温度）を認識していなければなりません。

新しいカラムを設置する前に¹、ユーザーは最初に、プレカラムに対するポンプ、オートサンプラ、チューブの圧力値を記述します。

- まず、ポンプでの望ましい流量を設定します。チューブの端で廃液を収集し、システムの圧力を記録します。
- 次に、ユーザーマニュアルに従ってプレカラムを取り付け、望ましい流量を設定します。プレカラムを設置したシステムに対する値を記録します。
- 最初の分析カラムを追加し、圧力値を記録します。この手順をすべてのカラムを設置するまで継続します。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC のトラブルシューティング/
ベストプラクティス

1.1.効果的なトラブルシューティングに
必要な知識

1.2.移動相に関する注意事項

1.3.GPC/SEC カラム – 注意事項

1.4.FAQ：GPC/SEC カラムと適切な
扱い方

1.5.安定したベースラインを得る方法

1.6.データ解析に関する注意事項

1.7.GPC/SEC 光散乱に関する
注意事項

用語集

カラム証明書でカラムメーカーから圧力値が提示されている場合は、異なる流量、異なる溶媒、異なる温度（温度は溶媒の粘度に影響するため）により異なる圧力が生じることを念頭に置きつつ、この値と観察された値とを比較することができます。ある程度の偏差は想定されます。表 1 に、2 つの明確に記述された設定の例を示します。

高すぎる圧力での動作はポンプに損傷をもたらし、カラムを破損させる可能性があるため、システムの圧力上限に設定することを推奨します。上限を超過した場合は、この設定によりポンプが停止します。通常は、標準のトータル圧力（プラス 2 ～ 3 MPa）を上限として使用します。ただし、カラムのユーザーマニュアルで（または、直接カラムサプライヤに問い合わせて）カラムが耐久可能な最大圧力を確認し、この値を超過しないようにします。

表 1 は、圧力が上昇した場合の根本原因を特定するのに役立ちます。プレカラムのエントリポートでチューブを開き、システムの圧力が高すぎるかどうかを確認します。高すぎる場合は、ポンプ、オートサンプラ、または接続用チューブが問題の原因となっています。高すぎない場合は、カラムが原因である可能性が高いです。

カラムの後の検出器やチューブにより圧力上昇が生じることはめったにありません。カラムを再接続し、最後のカラムの出口で接続を開くことで、これをダブルチェックできます。設置したすべての分析カラムの値にまで圧力が低下した場合は、検出器（またはカラムの後の 1 本のチューブ）が問題の原因です。

問題の原因となっているコンポーネントのブロック（ポンプ/オートサンプラ、カラム、または、頻度は少ないが、検出器）を特定したら、このブロックの各コンポーネントを個別にチェックする必要があります。そのために、最後のものから 1 つずつ取り外していきます。順々に各コンポーネントを緩めます。流量が通常どおりに設定されている間に、異常な高い圧力低下が起こるかどうかをチェックします。機器が停止している間にフィルタを交換することを推奨します。チューブやニードルに詰まりがある場合は、この部品をすぐに交換して廃棄します。

プレカラムが問題の根本原因である場合は、手順を行い、交換する必要があります。分析カラムによって問題が生じている場合は、クリーニングを行うか、カラムフリットを交換します。この場合は、カラムのユーザーマニュアルを参照してください。

検出器が原因である場合は、取扱説明書を参照し、セルのクリーニングについて確認してください。

表 1. カラム取り付け後の 2 つの明確に記述された GPC/SEC 設定の例

システム	条件	システム圧力 (検出器なし)	プレカラム 取り付け済み	分析 カラム 1 取り付け済み	分析 カラム 2 取り付け済み	トータル 圧力
GPC 1	THF、1 mL/min、35 °C	5 bar	11 bar	31 bar	53 bar	57 bar
GPC 2	水、1 mL/min、35 °C	7 bar	10 bar	18 bar	25 bar	29 bar

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC のトラブルシューティング/ ベストプラクティス

1.1.効果的なトラブルシューティングに 必要な知識

1.2.移動相に関する注意事項

1.3.GPC/SEC カラム – 注意事項

1.4.FAQ：GPC/SEC カラムと適切な 扱い方

1.5.安定したベースラインを得る方法

1.6.データ解析に関する注意事項

1.7.GPC/SEC 光散乱に関する 注意事項

用語集

カラム性能

この設定で使用されるカラムは、サイズによって分子を分離する必要があります。適切に機能している GPC/SEC カラムは高分解能を発揮し、単分散試料に対して狭く対称的なピークを生成します。1 セットの各カラムで分離能が低下すると、プレカラムのみがそのような挙動の原因となっている可能性があります。クロマトグラムの歪み（ピーク幅の拡大、2 つのピーク、ピークテーリングやピークフロンティング）がある場合は、実際に、1 セットの 1 本のみのカラムに不具合がある可能性があります。

カラム性能を表す優れた測定値は、理論段数、ピーク対称性、特定の分離能です。² カラムを取り付けた直後に、カラムセット全体に対してこれらのパラメータを決定します。国内/国際基準では、多くの場合に特に使用される移動相に対し、カラムの許容限界を提示しています。取り付け後にパラメータを記録し、これらの値をカラム証明書に記載のデータと比較することを推奨します。理論段数は多様なパラメータに基づくため、設定ごとに個別化されます。可能な場合は、設置された各カラムの値を記録します。

理論段数試験は定期的に繰り返し実施する必要がありますが、最低でも問題が疑われるときに行います。カラムセットが許容限界を満たさなくなった場合や、以前の測定値からの偏差が大きすぎる場合は、各カラムを個別に検査する必要があります。図 1 に、ピークフロンティングによりカラムセットの非対称性が仕様外になった場合の一例を示します。1 本のカラムを交換する必要があるかどうか、またはセット全体が損傷を受けているかどうかを検証するために、理論段数試験は 3 本の各カラムに対して個別に繰り返し実行する

必要があります。問題のあるカラムを特定した後、以前に分析を行ったサンプルを再確認し、それらの 1 つが問題の原因になっているかどうかを検証します。

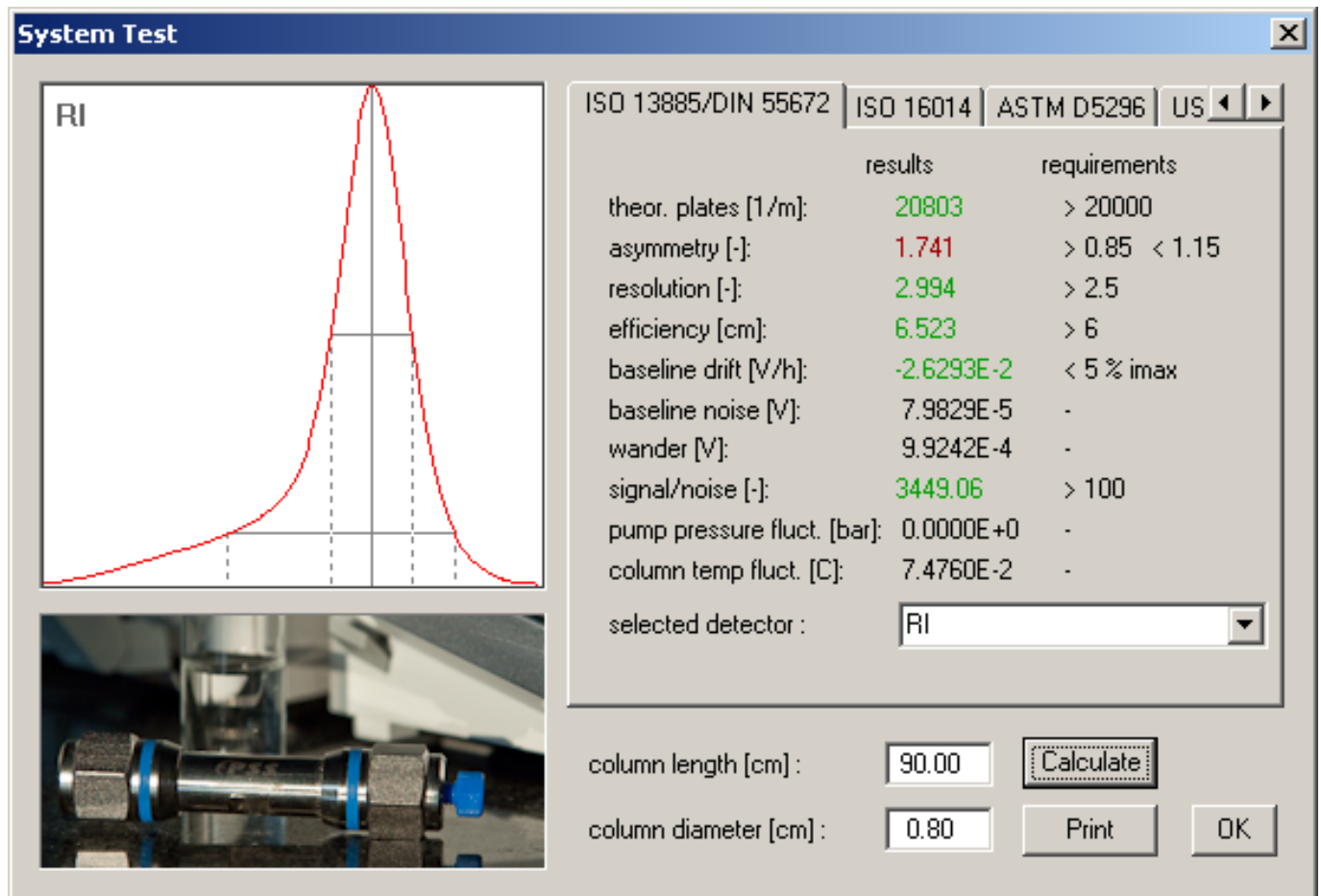


図 1. 1 回の注入による完全なシステム試験（カラムセットの結果）

例に示されている挙動は、誤ったチューブの接続が原因となっている可能性があります。新しいカラムを取り付けるたびに（特にサブライヤが変更された場合）、フィッティングとフェラルを交換し、適合するストップの深さにより低デッドボリユームの接続を確保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 のトラブルシューティング/ ベストプラクティス

1.1.効果的なトラブルシューティングに 必要な知識

1.2.移動相に関する注意事項

1.3.GPC/SEC カラム – 注意事項

1.4.FAQ：GPC/SEC カラムと適切な 扱い方

1.5.安定したベースラインを得る方法

1.6.データ解析に関する注意事項

1.7.GPC/SEC 光散乱に関する 注意事項

用語集

検出器性能

検出器は、カラムから溶出しているサンプル分画を検出するために使用します。高純度の溶出液が検出器を通過している場合に、ベースラインが取得されます。検出器シグナルの品質は一般的に、ベースラインのドリフトや揺らぎ、および S/N 比をレビューすることにより表します。国内/国際基準では、ドリフトと S/N の許容限界を示しています。GPC/SEC 結果に対するこれらの値の影響は、徹底的に調査されています。³

問題がクロマトグラフまたは検出の問題に関連しているかどうかを確認するためには、シンプルなサンプルを測定するのが最適です。理論段数試験物質（通常は、小さな、低分子質量材料）を使用して、RI、UV/DAD、または ELSD などの濃度検出器に対するドリフト、揺らぎ、S/N を決定できます。システムの設置後にこの注入の S/N、ドリフト、揺らぎを記録しておく、トラブルシューティングがより簡単になります。

図 1 に、示差屈折率検出器に理論段数試験物質の注入を使用して決定された、ドリフト、揺らぎ、S/N の結果を示します。ISO13885 で規定された、すべての検出の要件は満たされています。ベースラインドリフトに対する規格外の結果は、温度変動に起因していることがよくあります。この場合は、ラボの条件を再確認する必要があります（空調やカラムコンパートメントからの吸気の影響）。濃度検出器に対し低い S/N は多くの場合、フローセルの汚れを示しています。ユーザーマニュアルでクリーニング手順を参照してください。

結論

分離カラムが設置されている場合と設置されていない場合のシステムの圧力を認識することは、カラムや機器が圧力上昇の原因となっているかどうかをすばやく特定するのに役立ちます。

シングルカラムの検査は、カラムの詰まり（高すぎる圧力）やカラムの不具合（低い理論段数、非対称性、分離能）を確認するのに有益です。

理論段数の決定に使用したサンプルは、検出器性能（ドリフト、S/N）を検証するためにも使用できます。

参考文献

1. Held, D. How to Install GPC/SEC Columns.*The Column* **2014**, (2).
2. Gores, F.; Held, D. How to Test GPC/SEC Columns.*The Column* **2014**, (8).
3. Kilz, P.; Held, D. Quantification in LC and GC - A Practical Guide to Good Chromatographic Data.Wiley-VCH, **2008**.

Originally published in *The Column*, December **2018**, by author Daniela Held.

1.2.移動相に関する注意事項

サンプル分析に対して最適なカラム固定相を選択するためのリソースはたくさんありますが、移動相は軽視されがちです。反対に、移動相は分析システムによって重要な要素であり、分析の成果、およびデータと結果の品質に影響を及ぼします。移動相の選択と、サンプル前処理における使用を適切に行うことで、本来ならトラブルシューティングに必要とされる時間を短縮できます。

GPC/SEC に使用可能な移動相の選択は、サンプルを溶解でき、固定相に対応しているものに限定されます。通常、GPC/SEC 移動相は以下のいずれかになります。

- 水系溶媒（純水、または塩やバッファ添加水溶液）
- 有機溶媒（テトラヒドロフラン（THF）、トルエン、ジメチルアセトアミド（DMAc）、ジメチルホルムアミド（DMF）、クロロホルム、ヘキサフルオロイソプロパノール（HFIP）、トリクロロベンゼン（TCB）など）。

誤った移動相は固定相に不可逆的な損傷を与えたり、破壊したりする可能性があります。例えば、適切な有機移動相で膨張した、高度に架橋された疎水性ポリマー固定相（スチレン-ジビニルベンゼンなど）が充填されたカラムは、水性移動相とともに使用すると収縮し、性能がすべて失われます。

ただし、移動相が固定相に対応していても、単独で使った場合は、効果を発揮しない可能性があります。サンプルと固定相との相互作用を抑制するには、多くの場合、低分子質量の移動相溶媒または塩を添加する必要があります。臭化リチウム（LiBr）や塩化リチウム（LiCl）は、DMAc または DMF などの極性有機溶媒によく添加されます。水系では、藻類の繁殖を防ぐために添加物と、相互作用を抑制するために塩を添加する必要があります。

添加物を添加した場合でも、3 つの成分の極性（サンプル – 移動相 – 固定相）が適合しないと、正確なサイズに基づく分離は達成できないことがあります。その一例として、DMF や DMAc などの中極性の有機溶媒に含まれるスチレン-ジビニルベンゼン材料のポリスチレン（PS）の分離が挙げられます。この場合、PS オリゴマーが塩のピークとともに、または後に共溶出します（図 1）。したがって、適合する極性の固定相を使用するか（PSS GRAM など）、システムを完全にキャリブレーションするためにポリメチルメタクリレート（PMMA）が必要です。¹

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC のトラブルシューティング/ ベストプラクティス

1.1.効果的なトラブルシューティングに 必要な知識

1.2.移動相に関する注意事項

1.3.GPC/SEC カラム – 注意事項

1.4.FAQ：GPC/SEC カラムと適切な 扱い方

1.5.安定したベースラインを得る方法

1.6.データ解析に関する注意事項

1.7.GPC/SEC 光散乱に関する 注意事項

用語集

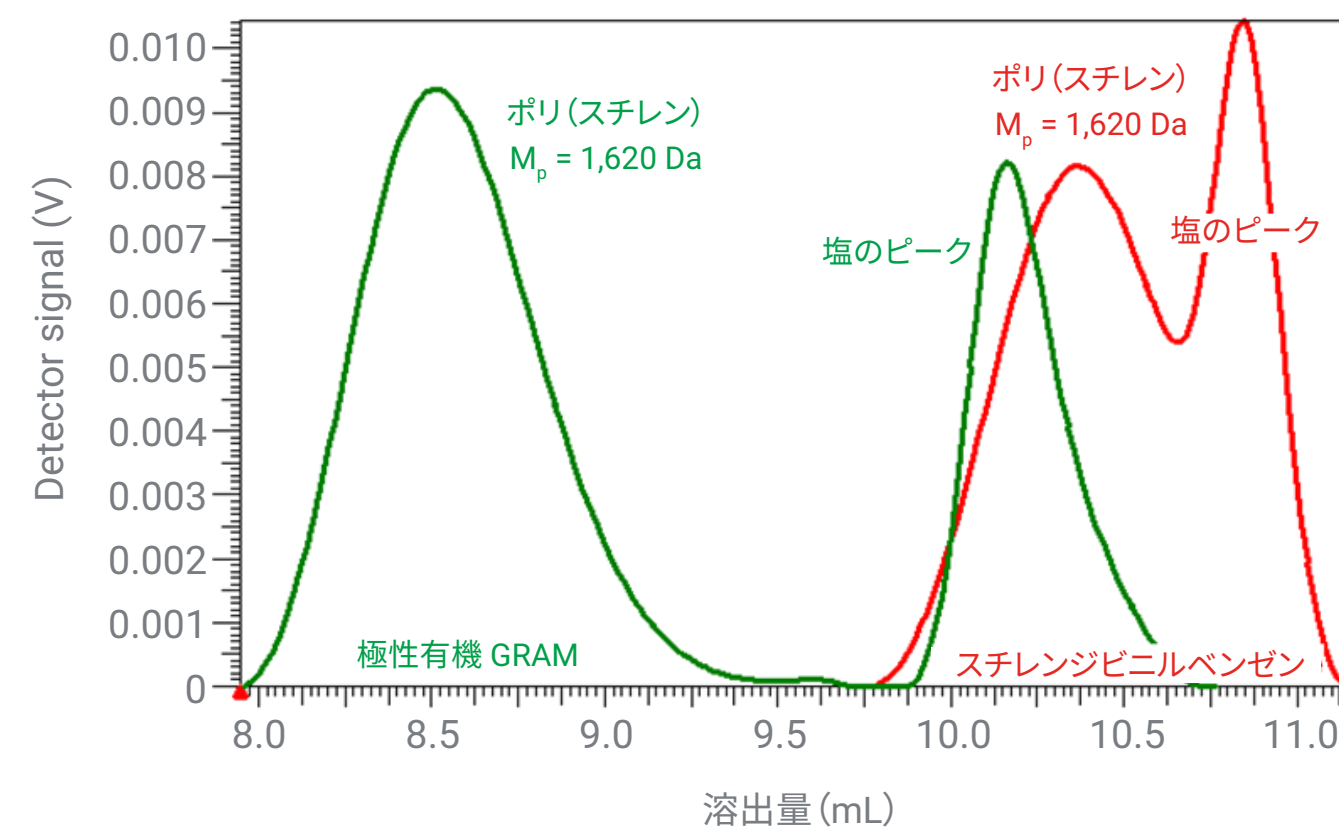


図 1. GRAM 固定相（緑）およびスチレン-ジビニルベンゼン相（赤）で、塩を添加した DMAc で分析した同じポリスチレン。塩のピークが共溶出しています。

移動相によってサンプルの検出が隠されてしまわないようにすることも重要です。屈折率（RI）検出の場合、移動相とサンプルの屈折率はできるだけ異なるようにする必要があります。差異が小さすぎると、信号強度が低くなります。不適合の移動相/サンプルのペアとして顕著な例は、THF 中に溶解されたポリジメチルシロキサンです。どちらも同じ屈折率（等屈折率）であるため、屈折率増分 $dn/dc = 0$ となります。したがって、サンプルが完全に溶解しても、RI 検出器反応がないため分析できません。移動相を例えばトルエン ($dn/dc < 0$) などの異なる屈折率のものに変更するか、蒸発光散乱検出器（ELSD）などの他の検出器を使用することが重要です。

考慮すべきもう 1 つの要素は、移動相の粘度です。粘度が低くなると分離能が向上します。粘度を下げて分離能を向上させるために、粘度の高い移動相（DMAc や DMF など）では高い温度（60 ～ 80 °C）を使用する必要があります。さらに、粘度の高い移動相に対して低い流量は質量移動を促進します。

移動相の品質と溶媒の前処理

異なる溶媒のグレードでは、純度も異なります。より高価ですが、溶媒は HPLC グレード（高純度）でなければなりません。すべての移動相とバッファは、使用する日に調製する必要があります。これにより、バッファ pH が安定し、微生物が発生しません。どちらもクロマトグラフの結果に影響を及ぼしうる要素です。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC のトラブルシューティング/ ベストプラクティス

1.1.効果的なトラブルシューティングに 必要な知識

1.2.移動相に関する注意事項

1.3.GPC/SEC カラム – 注意事項

1.4.FAQ：GPC/SEC カラムと適切な 扱い方

1.5.安定したベースラインを得る方法

1.6.データ解析に関する注意事項

1.7.GPC/SEC 光散乱に関する 注意事項

用語集

イソクラティック GPC/SEC では、均一な移動相が必要です。特に RI 検出器を使用している場合、混合移動相や添加物を含む移動相には特に注意を払わなければなりません。密度が大きく異なる溶媒を混合したり、塩が完全に溶解していなかったりすると、移動相の組成の変化により、クロマトグラムには分析の最初と最後の部分にベースラインシフトが表示されます。これは特に極性有機溶媒を用いる移動相に該当します。

DMAc や DMF を使用している場合は、移動相を慎重に調製することが必要です。リチウム塩は移動相溶媒として添加されることが多いですが、これらの塩は室温の極性有機物質中で溶解性が低いです。LiBr は LiCl よりも簡単に溶解します。50 ～ 80 °C に温度を上げると、溶解性が向上し、粘度が低下します。移動相は 2 時間以上攪拌する必要があります。

有機溶媒系の移動相は吸湿性が高く、時間とともに水の含有量が増える場合があります。また、酸化により移動相の組成が変化する場合、クロマトグラムにシフトが生じることがあります。THF は、例えば少量のブチル化ヒドロキシトルエン（BHT）やクロロホルムと、エタノールなどで安定化する必要があります。藻や細菌の繁殖を防止するためには、アジ化ナトリウム（NaN₃）または類似の成分を水系移動相に添加します。

新たに調製した移動相を使用する前に完全に脱気して、溶解している空気を排除し、ベースラインの問題を回避する必要があります。移動相を最も簡単に脱気する方法は、インラインデガッサを使用することです。インラインデガッサは、溶解空気に関連する圧力変動

を回避できるため、ポンプの前に設置するのが重要です。HPLC デガッサを有機溶媒系 GPC/SEC の移動相に使用する場合は、メーカーに問い合わせてください。一部のデガッサには、標準の GPC/SEC や強溶媒に対応していないメンブレンが含まれています。

移動相をろ過し、チューブやカラムの詰まりの原因となる小さな粒子や塵を取り除くことを強く推奨します。通常、移動相は定期的に変換する必要があります。ある程度の期間にわたりリサイクルモードで使用された、古くなった移動相で分析を行うと、ベースラインにドリフトが生じたり波状になったり、品質の低いデータが生成される可能性が高くなります（図 2）。

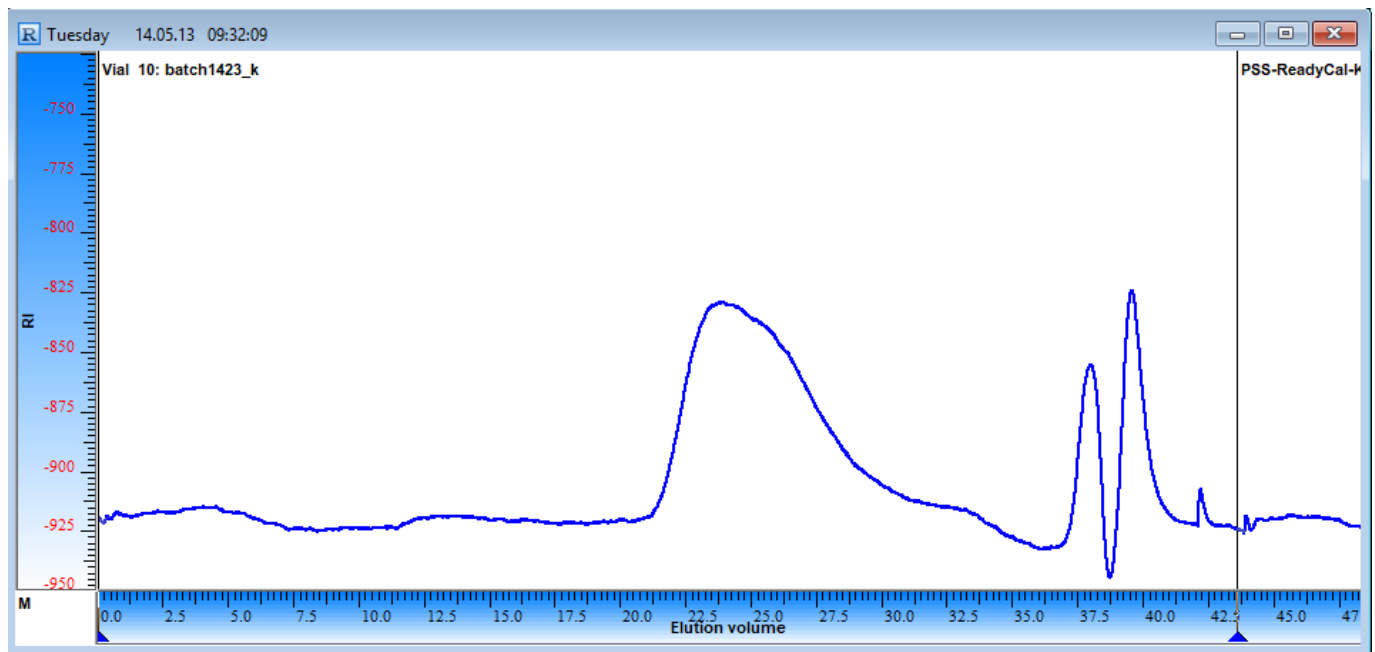


図 2.低い溶媒品質に対するベースラインレスポンス

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC のトラブルシューティング/
ベストプラクティス

1.1.効果的なトラブルシューティングに
必要な知識

1.2.移動相に関する注意事項

1.3.GPC/SEC カラム – 注意事項

1.4.FAQ：GPC/SEC カラムと適切な
扱い方

1.5.安定したベースラインを得る方法

1.6.データ解析に関する注意事項

1.7.GPC/SEC 光散乱に関する
注意事項

用語集

分析に最適化されておらず、適切に調製されていない移動相で分析を行うと、ポンプ、インジェクタ、検出器の機能を損なう可能性があります。塩の含有量が高い移動相で機器を動作させる場合は、特別な配慮が必要です。機器やカラムの腐食を防ぐためには、システムは必ず低い流量で分析を実行します。溶媒の交換やポンプの停止、カラムの保管を行う前に、高純度の溶媒でシステム全体をフラッシュし、移動相に含まれた塩をシステムから取り除きます。

結論

- 移動相はシステムに不可欠な要素で、慎重に選択する必要があります。
- ポリマー（架橋）固定相の場合、不適切な種類の溶媒によりカラムが破壊される可能性があります（水系ゲルに有機、または有機ゲルに水）。ゲルの構造が壊れてしまいます。
- 新たに調製し脱気された、高純度（HPLC グレード）溶媒を使用することで、機器やクロマトグラフの問題を防止するとともに、時間を節約できます。

参考文献

1. Hofe, T.; Reinhold, G. How to Find the Ideal Stationary GPC/SEC Separation Phase.*The Column* **2007**, (12).

Originally published in *The Column*, April **2014**, by author Daniela Held.

1.3.GPC/SEC カラム – 注意事項

GPC/SEC カラムは、流体力学的体積やサイズによる巨大分子の分離のための重要なコンポーネントです。一般的に、GPC/SEC カラムは、力学的および化学的に非常に安定的です。高度に架橋された多孔質のポリマー粒子、または多孔質のシリカ粒子のいずれかが充填されています。LC カラムなどの GPC/SEC カラムの寿命は限られています。カラムから最高の性能と長い寿命を引き出すために、適切な方法で取り扱う必要があります。

カラムはさまざまな方法や理由により、損傷を受けたり（または壊れたり）、特性や性能に変化が生じます。

- ポリマーネットワークの破壊
- ポアの部分的または全体的な破壊
- カラム表面の極性の変化
- カラムハードウェア（カラムハウジングの金属）の損傷や酸化
- フリットの損傷や詰まり

カラムの性能は、理論段数、分離能力、分解能測定によって決まります。ポア容量やポアサイズ分布は、分離能力や分解能に影響を及ぼす可能性があります。理論段数は主に、粒子サイズ、充填剤密度、間隙容量に基づきます。全般的なカラム性能は、これら 3 つのパラメータの値を最適化することで向上します。

カラム背圧も考慮する必要があります。背圧は主に、粒子サイズと溶媒の粘度の影響を受けます。粒子サイズが小さくなり、溶媒の粘度が高くなると、カラムの背圧は増加します。

大きな疑問は、カラムをどのように扱ったらいいのか、ということです。

溶媒の注意事項

GPC/SEC で、移動相に用いる溶媒は分析の成功に重要な役割を果たします。溶媒はサンプルを溶解させるだけでなく、ポンプ材料に対応していなければなりません。溶媒とカラム固定相との互換性は、マジックトライアングルで示されているように、両方の極性が似ている場合に最適な状態です（カラムの電子書籍を参照）。

分析に非溶媒（または貧溶媒）を使用することは控えてください。非溶媒は、特にポリマータイプの充填剤の場合に、充填剤と溶媒との相互作用を妨げてしまいます。これは、ポアが破壊され、カラム材料に不可逆的な損傷をもたらす原因となります。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC のトラブルシューティング/ ベストプラクティス

1.1.効果的なトラブルシューティングに 必要な知識

1.2.移動相に関する注意事項

1.3.GPC/SEC カラム – 注意事項

1.4.FAQ：GPC/SEC カラムと適切な 扱い方

1.5.安定したベースラインを得る方法

1.6.データ解析に関する注意事項

1.7.GPC/SEC 光散乱に関する 注意事項

用語集

カラムを適切に保管する方法

カラムを数週間または数か月にわたり使用しない場合は、塩を含まない、高純度で安定した溶媒で保管することが推奨されます。保管用溶媒を使用する前に、混和性、沸点および氷点温度、蒸気圧をチェックしてください。高沸点溶媒が充填されたカラムは、室温で保管できます。カラムを揮発性溶媒（高蒸気圧）に入れて冷蔵庫（4 °C）で保管し、蒸発と溶媒の劣化を防ぎます。¹

塩溶液でカラムを保管しないでください。塩溶液は腐食の原因となり、保管の状態が悪いために溶媒が蒸発すると、カラム内で沈殿したり結晶化したりする可能性があります。沈殿した塩は、再度取り付ける際に充填剤を損なうことがあります。唯一の例外は水系カラムで、藻や細菌の繁殖を防ぐために少量のアジ化ナトリウム（NaN₃）を添加する必要があります。

カラムが冷蔵庫で保管されていた場合は、すぐにカラムを取り付けしないでください。カラムを取り付ける前や、（必要に応じて）取り付け後に推奨温度にする前に、カラムが室温に戻るまで十分な時間を取ります。

溶媒の交換

充填剤粒子のポア特性はナノメートル範囲で、最大で数百ナノメートルです。粒子サイズそのものはミクロン範囲です（図 1 を参照）。効果的に充填された GPC/SEC カラムでは、非常に大きな合計表面積になります。溶媒は各粒子の外表面（小さな表面積）だけでなく、内表面（大きな表面積）も覆います。新しいカラムや保管されていたカラムを取り付ける際に、この点を考慮する必要があります。ポア内の溶媒が、溶媒が完全に交換されるのを妨げます。

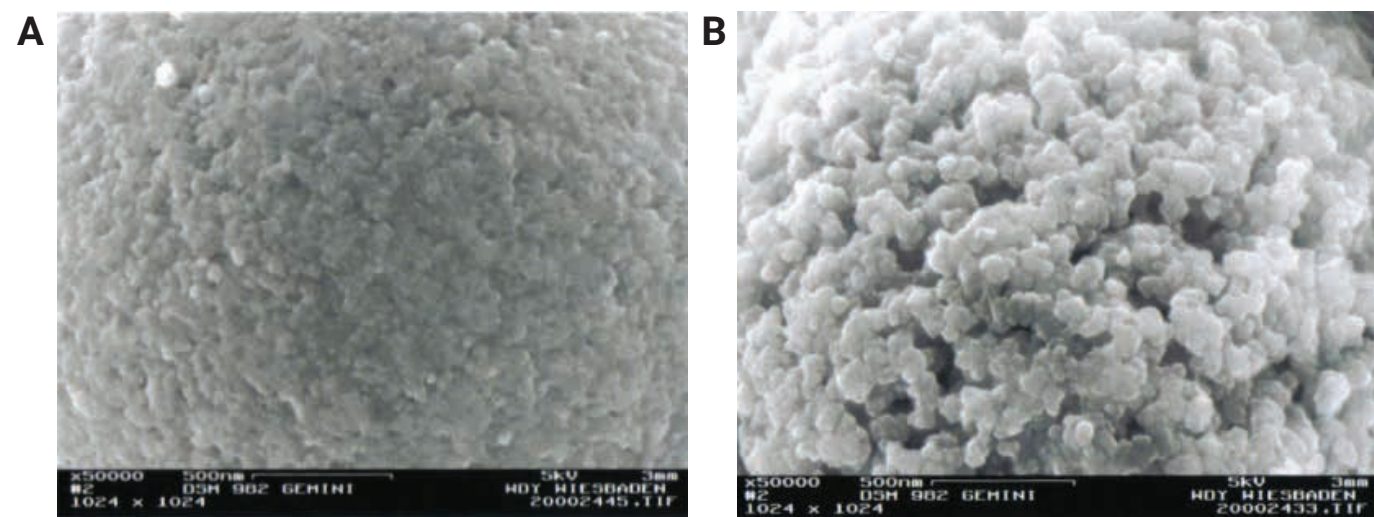


図 1. PSS SDV 5 μm 粒子のさまざまなポアサイズの電子顕微分光画像（100 (A) および 10⁵ (B) のポア) 倍率：50,000

溶媒の混和性は、効率的な溶媒の交換のための主要な要件となります。交換溶媒は、粒子を適切に濡らすために、固定相に対し最適なものを選ぶ必要があります。溶媒を交換する場合、溶媒は必ず直接廃液に送ります。検出器は接続しません。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC のトラブルシューティング/ ベストプラクティス

1.1.効果的なトラブルシューティングに 必要な知識

1.2.移動相に関する注意事項

1.3.GPC/SEC カラム – 注意事項

1.4.FAQ：GPC/SEC カラムと適切な 扱い方

1.5.安定したベースラインを得る方法

1.6.データ解析に関する注意事項

1.7.GPC/SEC 光散乱に関する 注意事項

用語集

完全な溶媒交換のための一般的なルールとして、必要な溶媒の量は、カラムに含まれる溶媒の総量（カラム容量と呼ばれることが多い）の 10 倍とされます。溶媒の粘度も交換の進捗に影響を及ぼすことがあります。交換溶媒の粘度が高くなるほど、完全に交換するのにより長い時間を要します。交換プロセスのための推奨流量は、動作流量の 10 ～ 30 % に設定します。溶媒交換の最初の段階において、短期的な圧力上昇の原因となりうる、溶媒混合物が形成されます。

カラムフィッティングと流れの方向

フィッティングとチューブの注意事項に関しては、カラムの電子書籍を参照してください。

カラム軸に沿った流れの方向は通常、カラム本体に矢印で記されています。必ず、正しい流れの方向でカラムを取り付けます。流れの方向はポンプの方向も示しています。充填プロセス中の高い圧力と流量により、粒子とパackedカラムベッドは、流れの方向に沿って整列します。したがって、パackedカラムの粒子にはフローベクトルに沿って優先の方向があります。

カラムの流れの方向を逆にすると、充填された粒子が乱され、間隙容量が増加し、バンド幅の拡大の原因となります。

背圧のモニタリング

カラムを充填中に適用される圧力は、カラムを操作しているときの圧力よりもはるかに高く、カラム使用圧力の上限であると見なすことができます。一般的に、シングルカラムは最初の充填圧力（充填している粒子サイズに基づく）の約 10 ～ 20 % で操作します。こ

れはシングルカラム/マルチカラム操作の両方に適用されます。カラム証明書に記載の所定の圧力上限（この情報が提示されている場合）の 70 ～ 80 % 以下で GPC/SEC カラム/カラムセットを操作することが推奨されます。これにより、充填剤とポア構造の安定性が確保され、カラム寿命が長くなります。長期にわたり背圧が大幅に上昇し、充填圧力に近づいた場合、すぐにカラムの使用を中止します。たとえ短い間でも、充填圧力は超過してはなりません。操作が継続されると、優先の方向が損なわれ、ポア構造が壊れる傾向があります。ポアサイズが大きくなると、ポア構造はより脆弱になり、簡単に破損しやすくなります。したがって、5 μm 粒子の 10 nm ポアは、5 μm 粒子の 10^4 nm ポアよりもはるかに安定的です。

短時間にわたり、カラム圧力は所定の限界値にまで上昇させることができます。圧力をゆっくりと上げていけば、短い間カラム操作を限度近くまで近づけることが可能です。

参考文献

1. Reinhold, G. How to Expand the Lifetime of Columns.*The Column* **2009**, (12).

Originally published in *The Column*, July **2011**, by author Thorsten Hofe.

1.4.GPC/SEC カラムと適切な扱い方に関する FAQ

正確で持続的に再現性の高い結果をもたらす、堅牢で高い分離能の GPC/SEC メソッドを開発することは、簡単なタスクではありません。したがって、最適なカラム/カラムセットを選択する際に、多くのユーザーがエキスパートのアドバイスを求めるのは驚くべきことではありません。

ユーザーからさまざまな優れた質問が挙がっており、これらは、他の人たちも疑問に思っているかもしれません。以下に、このようなよくある質問と、科学的経験に基づいた回答をご紹介します。

質問：ミックスベッド/リニアカラムと、単一ポアサイズの カラムのメリットとデメリットについて教えてください。

答え：検討すべき要素が数多くあります。直線の検量線について、一般的に期待されることを確認してみましょう。残念ながら、シングル GPC/SEC カラムの場合、単一ポアサイズの充填剤の排除と浸透の影響により、分子量の対数と溶出量との関係が直線的ではありません。したがって、GPC/SEC 検量線は、一般的に S 字状になります。多くの場合、3 次（立方）多項式関数はキャリブレーションデータに適合します。したがって、この手法では、カラムの分離範囲全体を完全に使用することもできます。また、必要に応じて、データと適合させるために 5 次および 7 次多項式フィッティングも使用できます。ただし、検量線の傾きがフィットしすぎないように注意する必要があります。¹ リニアカラムは上下端で非直線的な挙動を示す可能性があるという点に留意してください。サンプルがその領域で溶出した場合、異なるフィッティングが必要です。

リニア/ミックスベッドカラムは、カラムメーカーによる熱心な取り組みの結果としてでき上がった製品です。その製造には、特殊な合成ルートか、より一般的には、個々の細孔サイズを注意深くブレンドする必要がある。分子量範囲の広さに対応する分離性能と、安定した高分解能がリニアカラムの大きな利点です。分子量の異なる試料を幅広く扱うユーザーにとって、これらのリニアカラムは品質管理やスクリーニングの分析に最適です。同じタイプの他のリニアカラムを追加することで、簡単に分離能を向上させることも可能です。

特に同じサンプルでより高い/低い分子量を分離しなければならない場合など、必要な分離範囲に対応する適切なポアサイズを慎重に選択する必要があります。(例えば) リニアカラムに、オリゴマーの分離に最適な個々のカラムと組み合わせる場合などは、ポア特性の不適合のリスクが非常に高くなります。²

単一ポアサイズカラムは分子量範囲は限られているものの、分離効率が高いことが大きなメリットです。単一ポアサイズカラムは、カラムセットとして連結されることが多いです。アプリケーションの分子量範囲に合わせるには、カラムを追加するか取り除いて、該当の範囲を調節します。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC のトラブルシューティング/ ベストプラクティス

1.1.効果的なトラブルシューティングに 必要な知識

1.2.移動相に関する注意事項

1.3.GPC/SEC カラム – 注意事項

1.4.FAQ：GPC/SEC カラムと適切な 扱い方

1.5.安定したベースラインを得る方法

1.6.データ解析に関する注意事項

1.7.GPC/SEC 光散乱に関する 注意事項

用語集

質問：高分子量の巨大分子に対して高い背圧とせん断を回避するためには、低い流量で GPC/SEC を実行するだけで十分でしょうか？それとも、より大きな粒子サイズの カラムを使用したほうがよいでしょうか？

答え：この質問は、巨大分子が非常に繊細であるという問題に関するものです。高分子量の巨大分子や剛直なポリマー鎖を、高い背圧で GPC/SEC システムに通液すると伸長流動（extensional flow）が生じる可能性があります。伸長流動はポリマーの鎖切断を誘発し、せん断劣化の原因となり、分析結果として得られる分子量が、実際の分子ではなく分解された断片に基づいた値になってしまうことがあります。

システムの背圧は主に、流量、移動相の粘度、温度、内径、充填剤の粒子径、カラムの接続本数、すべての接続配管に基づきます。高分子量のサンプルを分析する際に、流量を下げて背圧を低下させるだけでは、残念ながら不十分であることが多いです。せん断劣化の影響を排除または最小限に抑えるためには、より大きな粒子径のカラムの使用を推奨します。

小さな粒子（5 μm 以下など）が充填されたカラムは、高分子量/超高分子量（UHMW）サンプルに使用すべきではありません。³ また、ポアサイズ/粒子径が大きいカラムは、より空隙率の大きな多孔性フリットを使用するため、さらにせん断応力が低減されます。UHMW サンプルの場合、大きな粒子サイズ、低流量、低い濃度および少量の注入量が推奨されます。カラムセットを使用する場合、最も細孔径の大きいカラムを最初に接続することで、粘性の高い高分子量サンプルを分離する場合に、「粘性フィンガリング」を回避することができます。粘度の効果をさらに低減するには、カラムオーブンを使用し室温よりも高い温度で操作することを推奨します。

質問：ジメチルホルムアミド（DMF）と臭化リチウム（LiBr）は機器にとって過酷ですが、良い結果を提供します。塩によって機器に対する腐食性は異なりますか？

答え：通常、ハロゲン化物は他の塩よりも腐食性が高く、塩素は臭素よりも強力です。幸い LiCl や LiBr は、他のハロゲン塩よりも、一般的な有機溶媒で高い溶解性を有しています。他の対イオンと比較し、リチウムイオンは凝集体の分解に優れています。水系溶媒では、NaCl の代わりに硝酸塩や硫酸塩などの弱い塩を使用し、腐食を最小限に抑制することができます。

移動相に塩を添加する主な理由は、静電相互作用を遮断し、凝集体の形成を低減することにあります。分析に塩を添加した移動相を使用する場合、常に新しく調製した溶液を用いて分析を実行する必要があります。長期にわたり GPC/SEC システムをアイドル状態のまま放置してはなりません。塩の結晶化を回避するには、低流量で送液を維持し、腐食を防止します。システムを長期にわたり使用しない場合や、システムの電源をオフにする場合、添加剤を含まない高純度の溶媒ですべての流路をフラッシュする必要があります。

質問：ポリマー系のカラムは、溶媒置換に耐えられるほど十分に安定ですか？様々な溶媒で 1 つのカラムセットを使用するより、溶媒ごとに専用のカラムセットを用意することを推奨しますか？少量の添加物（酸またはアミン）を含むテトラヒドロフラン（THF）と、添加物を含まない高純度の THF との間で繰り返し置換し使用するとどうなりますか？

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC のトラブルシューティング/ ベストプラクティス

1.1.効果的なトラブルシューティングに 必要な知識

1.2.移動相に関する注意事項

1.3.GPC/SEC カラム – 注意事項

1.4.FAQ：GPC/SEC カラムと適切な 扱い方

1.5.安定したベースラインを得る方法

1.6.データ解析に関する注意事項

1.7.GPC/SEC 光散乱に関する 注意事項

用語集

答え：一般的に、THF、クロロホルム、ジクロロメタン、トルエンなど、極性が類似した溶媒であれば、溶媒置換時にカラムへ悪影響をもたらす可能性は低いです。カラムは物理的/化学的に堅牢なスチレン-ジビニルベンゼン系の充填剤が充填されているためです。0.3 ～ 0.5 mL/min の低い流量で、ゆっくりと溶媒を置換することが推奨されます。カラムからの排液は直接廃液に送り、決して検出器に接続してはいけません。以上より、運用として溶媒を置換してはいけない理由は特にありません。ただし、この作業には非常に時間がかかります。溶媒置換後に膨張平衡が完全に再確立されるまでは、RI ベースラインの安定化に長い時間を要することが多いです。また、頻繁な溶媒置換はカラムの寿命を縮める原因にもなります。

使用する溶媒の極性がカラム充填剤の材質と大きく異なる場合は、異なる充填剤のカラムを使用するのが最適です。ゲルの膨張度が異なるだけでなく、非立体相互作用が発生する可能性があります。⁴ もう 1 つの選択肢は、使用予定の溶媒でカラムを注文することです。溶媒置換はリスクが高いためです。

高純度の溶媒と、添加物を含む溶媒（アミン、酸、塩など）との置換については、頻繁に交換を行っても問題は生じにくいですが、ただし、カラムを保管する場合は必ず添加物を含まない高純度溶媒に置換してください。唯一の例外は水性アプリケーション用のカラムで、少量のメタノールまたはアジド（0.05 g/L）を添加し、藻または細菌の繁殖を防ぐ必要があります。

質問：溶媒組成を変更（塩や共溶媒の添加など）した場合、検出器は再キャリブレーションは必要ですか？標準試料も、サンプルと同じ添加剤を加えて測定すべきですか？

答え：小さなものでもシステム設定に変更があった場合は、カラムや検出器の再キャリブレーションを行うことが必要です（優良試験所基準であると考えられます）。溶媒を変更することで溶液中のポリマーの流体力学的体積が変化し、既存のキャリブレーションが無効になります。

キャリブレーションには 2 つの種類があります。

- 最もよく行われているキャリブレーションは、カラムのキャリブレーション（校正曲線）です。校正曲線は、標準物質のモル質量の対数をピークの最大点における溶出体積に対してプロットすることで作成されます。ただし、溶媒を変更すると、溶液中の標準物質の流体力学的体積が変化し、既存のキャリブレーションが無効になります。
- マルチ検出 GPC/SEC や共重合体分析における濃度測定の場合、検出器のキャリブレーションは HPLC に似た方法で行われます。さまざまな濃度を測定して検出器のレスポンスを求めます。

どちらの方法でも、標準物質とサンプル分析は常に同じ条件で行うことが推奨されます。標準物質とサンプルを移動相で調製し、移動相と同じバッチで分析する必要があります。LC システムにセットした移動相リザーバから一定量を分取することが望ましいです。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC のトラブルシューティング/ ベストプラクティス

1.1.効果的なトラブルシューティングに 必要な知識

1.2.移動相に関する注意事項

1.3.GPC/SEC カラム – 注意事項

1.4.FAQ：GPC/SEC カラムと適切な 扱い方

1.5.安定したベースラインを得る方法

1.6.データ解析に関する注意事項

1.7.GPC/SEC 光散乱に関する 注意事項

用語集

結論

他の分析手法と同じように、些細なことが GPC/SEC に大きな影響を及ぼす可能性があります。

最適なカラムやカラムセットを選択し、適切なメソッド開発を実行するには時間がかかるものの、将来的には時間短縮とコスト削減を実現できます。推定に基づき作業を行うことや、初期に誤った設定を使用することは、誰のメリットにもなりません。質問することは簡単なので、すべての読者に疑問や懸念を共有することをお勧めします。知識に基づく選択に役立つ回答が数多くあります。

参考文献

1. Held, D. How Do I Calibrate a GPC/SEC System? *The Column* **2008**, (6).
2. Hofe, T. Beware of Mismatch. *The Column* **2008**, (4).
3. Held, D. The Art of Analyzing High Molar Mass Samples. *The Column* **2014**, (6).
4. Hofe, T. ; Reinhold, G. How to Find the Ideal Stationary GPC/SEC Separation Phase. *The Column* **2007**, (12).

Originally published in *The Column*, June **2015**, by authors Daniela Held and Wolfgang Radke.

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC のトラブルシューティング/ ベストプラクティス

1.1.効果的なトラブルシューティングに 必要な知識

1.2.移動相に関する注意事項

1.3.GPC/SEC カラム – 注意事項

1.4.FAQ：GPC/SEC カラムと適切な 扱い方

1.5.安定したベースラインを得る方法

1.6.データ解析に関する注意事項

1.7.GPC/SEC 光散乱に関する 注意事項

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC のトラブルシューティングとベストプラクティス

1.5.安定したベースラインを得る方法

安定したベースラインは、特に分布の広いサンプルの場合、正確で精度と再現性の高い GPC/SEC 分析のための前提条件となります。ベースラインの問題には、ドリフト、揺らぎ（長期ノイズ）、ノイズ/スパイク（短期ノイズ）のほか、正と負のシステムピークなどがあります。

- ドリフトとは、検出器レスポンススケールの上下でベースラインが規則的にシフトすることです。
- 揺らぎ、または長期ノイズとは、6 ～ 60 サイクル/時の揺らぎによる検出器の信号変動です。
- 秒あたり 1 サイクルを超える頻度のランダム検出器信号変動は、短期ノイズと呼ばれています。

図 1 に、小さなドリフト、揺らぎ、検出器ノイズのあるベースラインを示します。

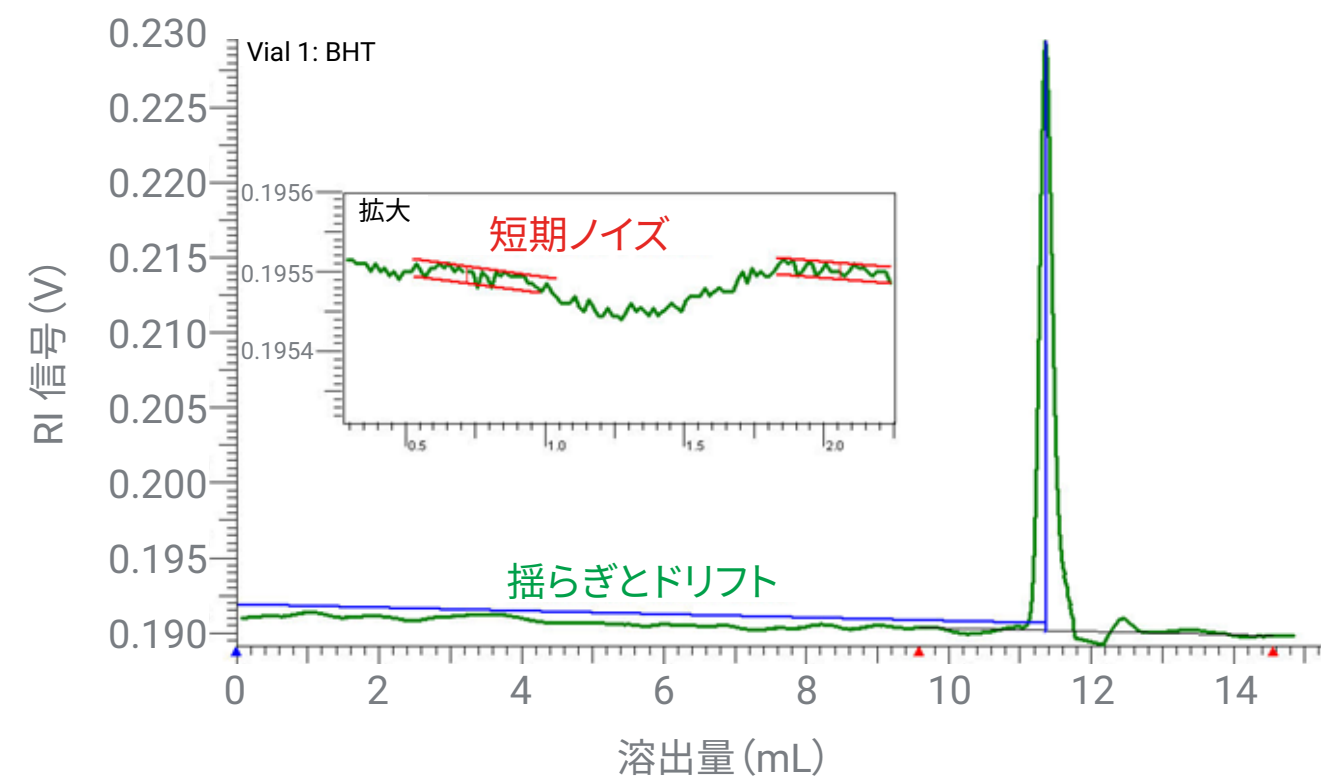


図 1. ベースラインのドリフト、長期ノイズ（揺らぎ）、短期ノイズ。青線は小さな負のベースラインドリフトを視覚化したものです。

複数の国際標準では試験手順について説明しており、ドリフト、長期ノイズ、短期ノイズに関する規定を提示しています。¹

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC のトラブルシューティング/
ベストプラクティス

1.1.効果的なトラブルシューティングに
必要な知識

1.2.移動相に関する注意事項

1.3.GPC/SEC カラム – 注意事項

1.4.FAQ：GPC/SEC カラムと適切な
扱い方

1.5.安定したベースラインを得る方法

1.6.データ解析に関する注意事項

1.7.GPC/SEC 光散乱に関する
注意事項

用語集

揺らぎの潜在的原因

多くの場合、ベースラインの揺らぎの原因はポンプの圧力脈動です。圧力トレースとブランク注入のベースラインの重ね表示から、圧力脈動が問題の原因かどうかを確認できます。シールの漏れ、摩耗したり傷のあるピストン、適切にチェックされていないバルブによって脈動が生じる可能性があります。その他の原因には、ポンプの不正な圧縮率設定、不適切な溶媒の脱気、ポンプ内の気泡などがあります。溶出量の変化や再現性があまり良くないポンプは、問題を示唆しています。表 1 に、ベースラインの揺らぎの原因となりうる潜在的な問題に対する解決策を示します。

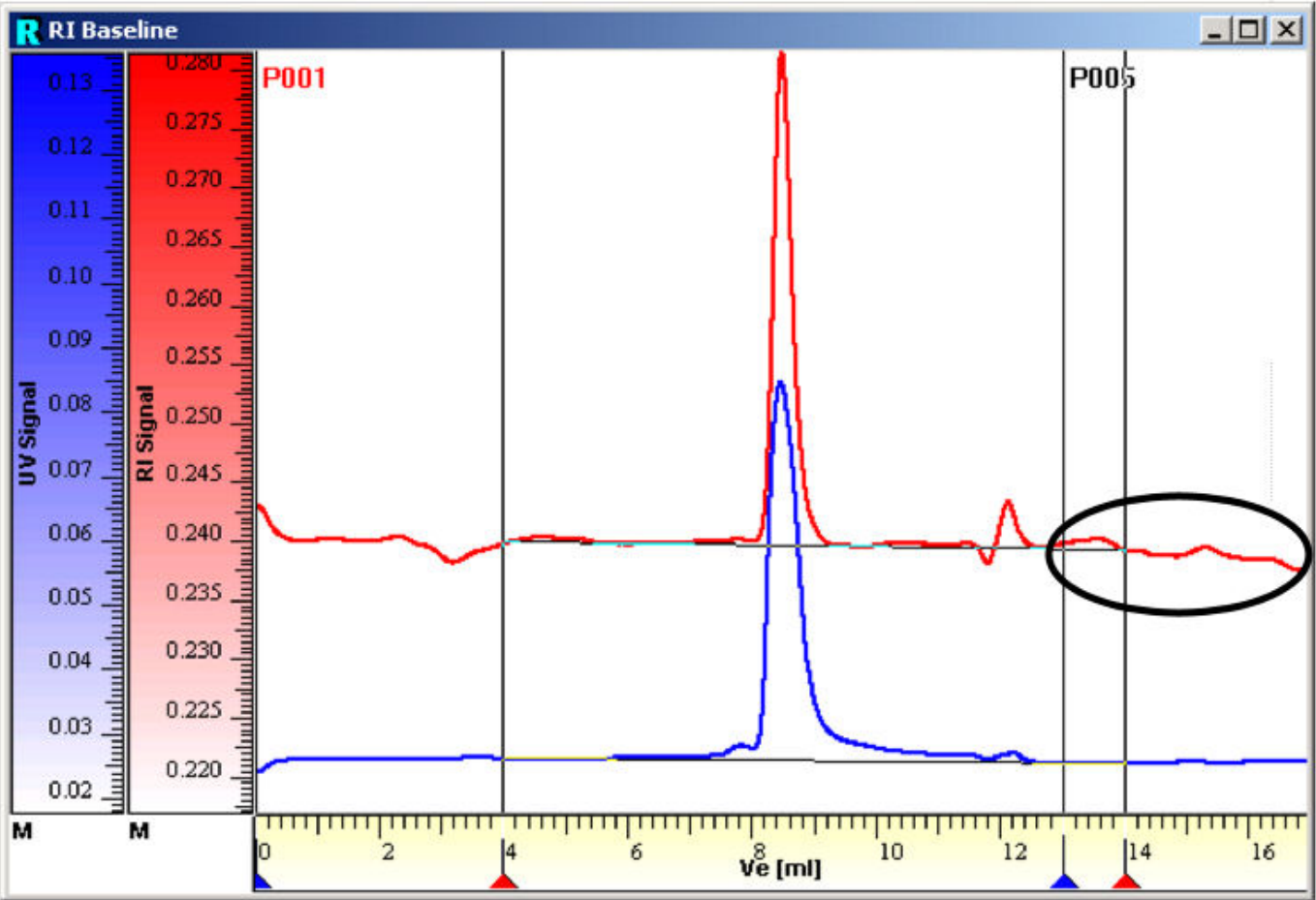


図 2. 分子量分布が狭いサンプル。RI は特に検出器の強い揺らぎを示しています。

表 1. ベースラインの揺らぎのトラブルシューティング

所見	潜在的な問題	解決策
揺らぎ	ポンプ圧力脈動	緩いフィッティングまたは（検出器セル）リーク。 ポンプを点検し、シールを交換します。チェックバルブを洗浄し、交換します。
揺らぎ (周期的なベースラインの上昇/下落、波状、RI)	デガッサが適切に動作しない	デガッサを取り外して波が解消されるかどうか確認します。GPC/SEC 溶媒に最適な デガッサのみを使用します。揮発性の高い溶媒に対しては真空レベルを調整します。
揺らぎ (周期的なベースラインの上昇/下落、波状、RI)	ドラフト（エアコン）、ラボ内の温度変化	空調を停止し、室温を安定化し、ドラフトゾーンから機器を移動させ、窓から離れた ところに置きます。チューブを断熱するか、カラムオープンを使用します。
揺らぎ（UV/DAD/PDA）	弱い UV ランプ強度 (短期ノイズおよび揺らぎ)	メーカーの使用説明書に従いランプ強度検査を実行します。必要に応じてランプを交換 します。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC のトラブルシューティング/ ベストプラクティス

1.1.効果的なトラブルシューティングに 必要な知識

1.2.移動相に関する注意事項

1.3.GPC/SEC カラム – 注意事項

1.4.FAQ：GPC/SEC カラムと適切な 扱い方

1.5.安定したベースラインを得る方法

1.6.データ解析に関する注意事項

1.7.GPC/SEC 光散乱に関する 注意事項

用語集

ベースラインのドリフトの潜在的な原因

RI 信号のドリフトは GPC/SEC でよく観察される問題の 1 つです。ドリフトの原因を特定するには、ポンプの流れがある場合とない場合でベースラインを比較し、ポンプやその他のシステムコンポーネント（検出器など）がドリフトに関与しているかどうかを確認します。

実際のところ、RI ベースラインのドリフトの主な原因は、以下の 2 つです。

- － カラムと検出器セルとの間の大幅な温度差
- － 溶媒置換後など、システムの平衡化が不十分

温度の問題は、良好なサーモスタットセル搭載の RI 検出器を使用することで解消できる可能性があります。

カラムとセルの温度差はできるだけ小さくなるようにする必要があります。移動相を交換する場合、システム平衡化にはカラム（またはカラムセット）容量の 5 ～ 10 倍以上が必要になります。RI 検出器リファレンスセルのフラッシュやパージ（数分間）を複数回実行する必要があります。

通常、ベースラインの揺らぎはドリフトよりも分析に影響を与えます。ベースライン制限と積分限界が決定され、国際的に認知されている GPC/SEC 標準に対して参照されている場合、継続的なドリフトは修正できることが多いです。ベースラインの揺らぎに対しては不可能です。図 3 のベースラインのドリフトは修正可能ですが、図 2 に示されたベースラインの揺らぎでは正確な結果は計算できません（EasyValid バリデーションキットから取得したデータ）。表 2 に、ベースラインのドリフトの原因となりうる潜在的な問題に対する解決策を示します。

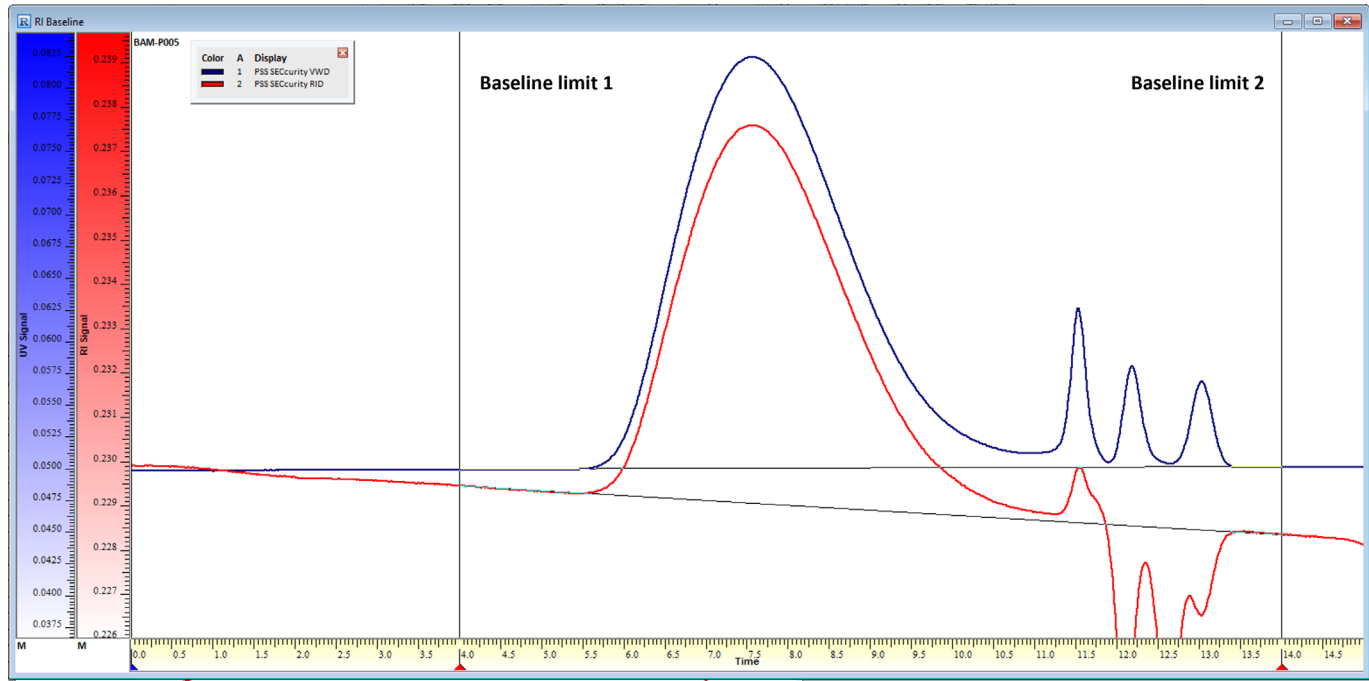


図 3. 分子量分布が広いサンプル。RI 信号は一定のドリフトを示し、UV シグナルは安定しています。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC のトラブルシューティング/
ベストプラクティス

1.1.効果的なトラブルシューティングに
必要な知識

1.2.移動相に関する注意事項

1.3.GPC/SEC カラム – 注意事項

1.4.FAQ：GPC/SEC カラムと適切な
扱い方

1.5.安定したベースラインを得る方法

1.6.データ解析に関する注意事項

1.7.GPC/SEC 光散乱に関する
注意事項

用語集

表 2. 継続的なベースラインドリフトのトラブルシューティング

潜在的な問題 継続的なベースラインのドリフト	解決策
カラムとセルとの間の大幅な温度差	サーモスタットセル搭載 RI 検出器を使用します。
溶媒置換後など、カラムの平衡化が不十分	– 溶媒置換後、最低でもカラム（セット）容量 5 ～ 10 倍以上分の移動相を通液します。RI 検出器セルを完全にフラッシュします。 非混和性の溶媒で満たされている場合、最初に中間溶媒を用いてフラッシュします。新しいシーケンスを開始する前に、いくつか ブランク注入を実行します。
汚染された/不均一/不良な品質の移動相	– 新たに調製した、高純度の移動相を使用します。 – 混合溶媒を使用する場合は、使用前に移動相を十分に攪拌します。 – 2 日間以上室温で保管された緩衝液は廃棄します。中性に近い pH の水系溶媒で微生物が繁殖するのを防止します。
検出器セル中の汚染や空気	– メーカーの指示に従って検出器セルを洗浄します。カラムを取り外し、異なる流量でフラッシュして気泡を取り除き ます。 – すべての検出器の部品（すべてのシールを含む）が一般的な GPC/SEC 溶媒に対応していることを確認します。

システムピークの潜在的な原因

クロマトグラムの最後のいくつかの正と負の信号は、示差屈折率検出器では正常です。これらのゴーストピークとシステムピークはサイズ分離の終わりを示し、GPC/SEC モードでは溶出しない可能性が高いですが、HPLC/LAC モードでは溶出します。

ゴーストピークやシステムピークは、未希釈の移動相によるブランク注入を行うことで確認できます。サンプルとブランク注入を同じ手法で扱うことが重要です。例えば、同じシリンジ、フィルタタイプ、フラスコ、バイアル、キャップなどを使用して、ブランク注入を調製します。

オリゴマー分析における追加のピークが、問題の原因になることがあります。小さなポアのカラムを追加すると、低分子側の分離能を向上させるのに役立つ場合があります。ただし、通常、リニア/ミックスベッドカラムと、小さなポアのシングルポアカラムを組み合わせることは、ポア特性の不適合により推奨されません。² 新たに調製した、高純度の移動相により、システムピークの強度と量が低減されます。

ノイズ/スパイクの潜在的な原因

標準的なスパイクの潜在的な原因は、移動相、または検出器セルなどのシステムに含まれる空気です。ポンプを停止し、スパイクが消えるかどうかを確認します。その場合、検出器セルの中の気泡である可能性が高いです。閉じ込められた気泡は、異なる流量を適用することで（カラムは取り付けない）適切に取り除くことができます。

気泡を防ぐために、水溶性と有機移動相の両方を脱気することが重要です。空気は、カラムに含まれた溶出液の中で高圧により溶解され続け、カラムを出てフローセルに入るときに放出されます。したがって、不適切な脱気はフローセル内の気泡の原因となり、ノイズの高い信号が生成されます。インラインデガッサにより問題を解消できます。また、検出器セルに低い背圧を適用することも有効です。表 3 に、スパイクの原因となりうる潜在的な問題に対する解決策を示します。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC のトラブルシューティング/
ベストプラクティス

1.1.効果的なトラブルシューティングに
必要な知識

1.2.移動相に関する注意事項

1.3.GPC/SEC カラム – 注意事項

1.4.FAQ：GPC/SEC カラムと適切な
扱い方

1.5.安定したベースラインを得る方法

1.6.データ解析に関する注意事項

1.7.GPC/SEC 光散乱に関する
注意事項

用語集

表 3. スパイクのトラブルシューティング

所見	潜在的な問題	解決策
スパイク	気泡	– 移動相を脱気します。オンラインデガッサの場合、一般的な GPC/SEC 溶媒（特に HFIP）に対応していることを確認します。
		– 検出器セルで小さい背圧を生成するには、廃液ボトルを検出器の出口の上に配置します。これで不十分な場合は、検出器の出口で背圧レギュレータを使用します。セルの最大圧力を超過してはなりません。特に RI 検出器は高い圧力に耐久できません。
スパイク	移動相の沸点を超えるカラム温度	低いカラム温度を使用します。
短期ノイズ、スパイク (UV/DAD/PDA)	弱い UV ランプ強度	弱いランプはベースラインの短期ノイズと揺らぎの原因となります。UV 検出器に対しては、ランプ強度試験を実行します。
短期ノイズ、スパイク	汚れたセル	メーカーの指示に従ってセルを洗浄します。

結論

- サーモスタットセル搭載 RI を使用します。カラムオープンを使用する場合、RI 検出器セルの温度をできるだけカラムオープン温度の近くに設定し、オープンから検出器までの接続用チューブを断熱します。
- 移動相を脱気します。新たに調製した、高純度の移動相を使用し、時間経過に伴う分解生成物の蓄積を防止します。混合溶媒を使用する場合は、十分に攪拌します。
- システムの点検サービスを実行し、定期的にチェックします（ポンプ性能など）。機器を交換した後に、リークをしっかりとチェックします。
- サンプル前処理に同じ移動相を使用します。可能な場合は注入量を減らします。ブランク注入を使用してゴースト/システムピークを確認します。

参考文献

1. ASTM International.Standard Practice for Testing Variable Wavelength Photometric Detectors Used in Liquid Chromatography; *ASTM E* 1657-98.
2. ASTM International.Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography; *ASTM D* 5296-05.
3. Hofe, T. Beware of Mismatch.*The Column* **2008**, (4).
Originally published in *The Column*, April **2012**, by author Daniela Held.

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC のトラブルシューティング/ ベストプラクティス

1.1.効果的なトラブルシューティングに 必要な知識

1.2.移動相に関する注意事項

1.3.GPC/SEC カラム – 注意事項

1.4.FAQ：GPC/SEC カラムと適切な 扱い方

1.5.安定したベースラインを得る方法

1.6.データ解析に関する注意事項

1.7.GPC/SEC 光散乱に関する 注意事項

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC のトラブルシューティングとベストプラクティス

1.6.データ解析に関する注意事項

GPC/SEC データ処理要件は基本的に、HPLC などの他の液体クロマトグラフ手法とは異なります。¹ 図 1 に、1 つ以上の検出器で生成された生データから始まる、GPC/SEC データ解析のフロー手法を示します。

メタデータは、自動作成された処理パラメータ、ユーザー入力、ユーザーデフォルト設定など、複数のソースから生成されます。これらは、結果を計算するために必要です。GPC/SEC 標準に従い、サンプル関連情報、メソッドパラメータ、適切な評価に必要なすべての評価パラメータなどが含まれます。例えば、GPC/SEC ガイドラインで必要とされている、質量分率の計算のためのベースライン制限、積分限界、パラメータなどです。

GPC/SEC キャリブレーションデータは、生データとメタデータが含まれる、特殊なタイプのデータです。キャリブレーションデータには以下が含まれます。

- 保持容量（カラムキャリブレーション）
- 強度キャリブレーション（一部のアプリケーションに対してのみ。オプション）
- キャリブレーションの種類、キャリブレーションの理由、使用される参照値を記述したパラメータ

GPC/SEC ユーザーは、サンプル結果を計算するためにメタデータとキャリブレーションデータを適用するときに、いくつかの基本的なルールに従う必要があります。以下のヒントは、正確で再現性の高い結果を取得するのに役立ちます。

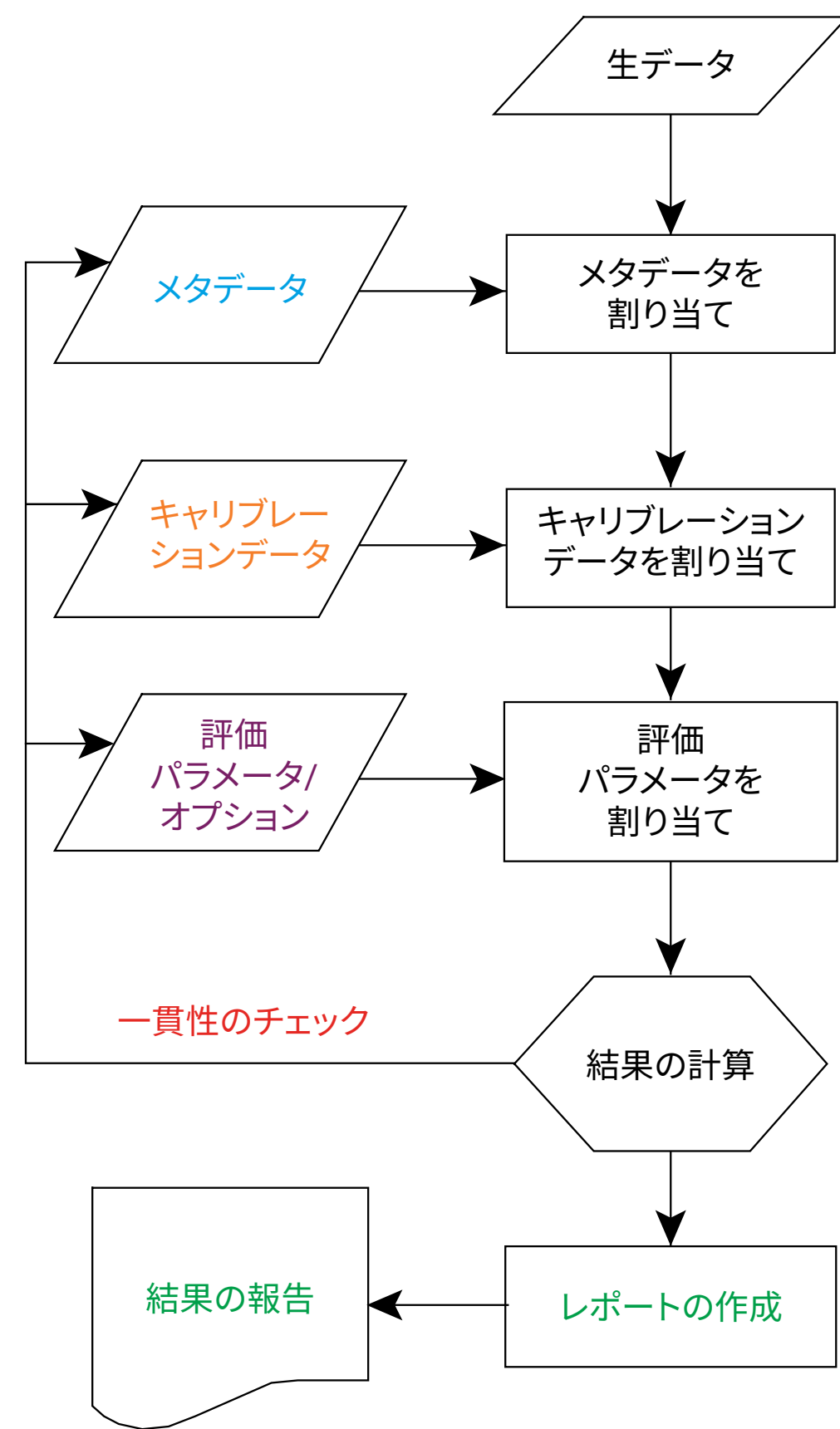


図 1. 生データから GPC/SEC 結果を取得する方法のフローチャート

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC のトラブルシューティング/ ベストプラクティス

1.1.効果的なトラブルシューティングに 必要な知識

1.2.移動相に関する注意事項

1.3.GPC/SEC カラム – 注意事項

1.4.FAQ：GPC/SEC カラムと適切な 扱い方

1.5.安定したベースラインを得る方法

1.6.データ解析に関する注意事項

1.7.GPC/SEC 光散乱に関する 注意事項

用語集

結果の計算のためのピークの選択

GPC/SEC では、分布の広い巨大分子物質に対し、検出器信号が元のベースラインに完全に戻らないことが非常に一般的です。したがって、2 ステップの評価手順が推奨されます。

- ベースラインが排除限界で始まり、最後のシステムピーク（通常 RI 信号の負のピーク）の後ろで終わるように、ベースライン制限を最初に定義します。多くの場合、信号は最初のベースライン値に戻っています。
- 次に、積分限界をサンプルのピークの周囲で定義します。存在しうるゴーストピークまたはシステムピークを排除することが重要です。ゴーストピークやシステムピークは、未希釈の移動相を注入することにより簡単に特定できます。

正確な GPC/SEC データ評価のために、最初のステップからの限度に従ってベースラインを除算する一方、2 つ目のステップからの積分限界内で分子量平均と分布を決定します。

この 2 ステップ手順は自動的に行われ、サンプル範囲全体で堅牢な評価を実現します。図 2 に、認証標準物質で実施した 2 ステップ手順を示します。垂直線は積分限界を表しています。2 ステップ手順からのベースライン制限は、緑色で示されています。重ね表示された赤色のトレースは、ベースラインと積分限界が独立していない、シングルステップの評価手順を示しています。赤色の領域は、

ベースライン制限のみの手順によって排除されたサンプルの部分を示しています。この場合、分子量分布はオフセットで、表 1 で報告されているように、分子量平均は過大評価されています。

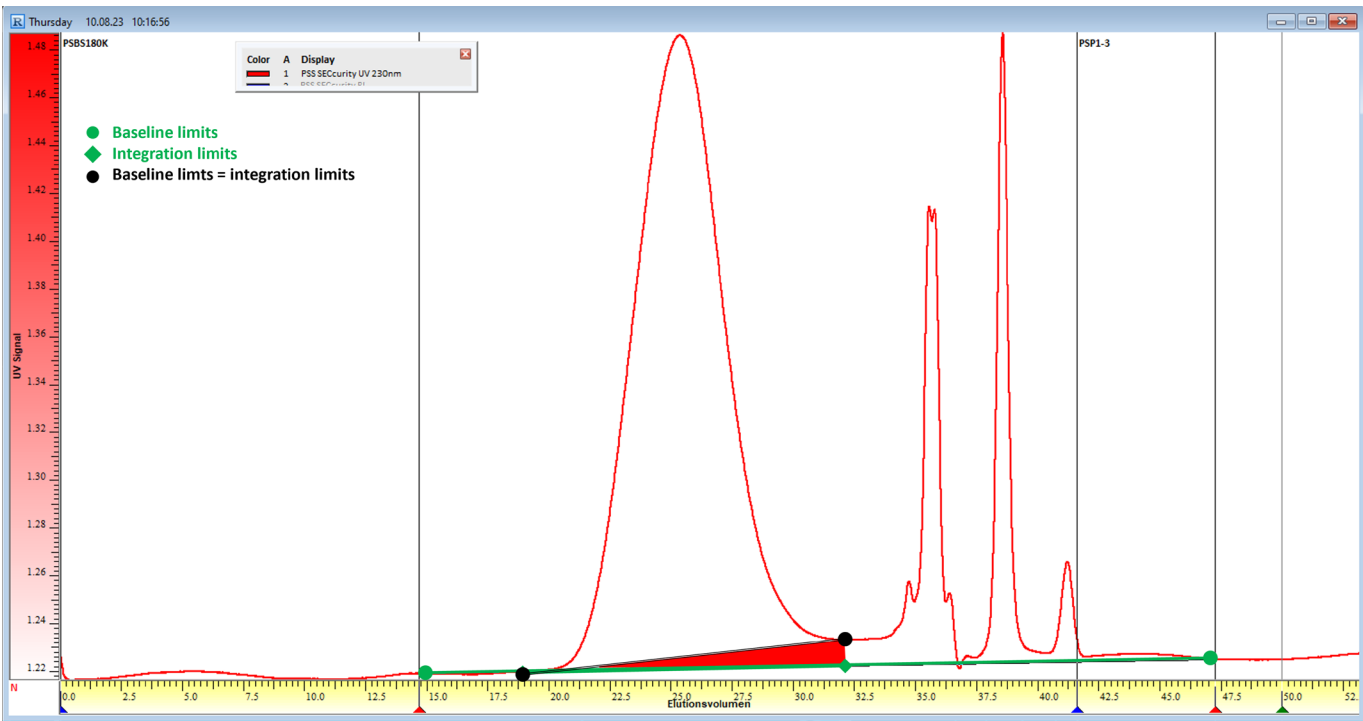


図 2. ベースライン制限のための個々の設定を含む 2 ステップ評価手順と、1 対の限度のみの 1 ステップメソッドによる積分限界との比較

表 1. 不正な 1 ステップの手順と正しい 2 ステップの手順を示した、分布の広いサンプルの結果

結果	1 ステップ手順	2 ステップ手順
M _n (Da)	86,400	66,700
M _w (Da)	181,300	178,400
M _z (Da)	327,200	351,600
PDI	2.10	2.68
<10,000 Da (%)	0.52	1.87
>1,000,000 Da (%)	0.38	0.44

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC のトラブルシューティング/ ベストプラクティス

1.1.効果的なトラブルシューティングに 必要な知識

1.2.移動相に関する注意事項

1.3.GPC/SEC カラム – 注意事項

1.4.FAQ：GPC/SEC カラムと適切な 扱い方

1.5.安定したベースラインを得る方法

1.6.データ解析に関する注意事項

1.7.GPC/SEC 光散乱に関する 注意事項

用語集

適合するキャリブレーションの適用

GPC/SEC (RI、ELSD、または UV などの濃度検出器を含む) は、絶対メソッドではなく、MW データを生成するための相対的メソッドです。測定された保持容量 (V_e) は、分析されたサンプルの分子量と直接的に関連しておらず、分析条件 (ポリマーの種類、カラム、溶媒など) に依存しています。したがって、同じ分析条件によるキャリブレーションが必要です。

分布の狭いポリマー標準を使用するのが、最も簡単で正確なキャリブレーションメソッドです (分子量を溶出量に割り当てる)。² 精度は使用する標準液によって異なります。真の分子量は、化学的に同一の化合物に対してのみ取得されます。幅広い標準物質を使用できるため、多数のホモポリマー (ポリスチレン、ポリエチレンオキシド、ポリアクリレート、ポリメチルメタクリレート) に対し、一致する検量線を作成することが可能です。

分布の狭い標準を使用できない場合は、他のメソッドを使用できます。例えば、以下があります。

- 広範囲なキャリブレーション³
- 累積キャリブレーション⁴
- Mark-Houwink 係数によるユニバーサルキャリブレーション、またはオンライン粘度検出器によるユニバーサルキャリブレーション⁵
- オンライン光散乱検出器⁶ (濃度検出器と組み合わせる) を使用し、溶出量スライスごとにサンプル分子量を測定できます。

正しい分子量分布の測定には、任意の溶出量における分子量を計算できるよう、測定されたデータポイントを数学関数で近似させることが必要です。オンライン光散乱を使用している場合でも、データは近似されることが多いです。近似関数の品質は、結果の品質に直接影響します。最高の近似関数とは、偏差が最小となるものです。その場合、一次導関数では変曲点は得られません。²

サンプル比較と品質管理のみを対象とした GPC/SEC データ解析には、標準の測定のために正確な濃度と注入量、検量線のために最適な近似関数の選択が必要となります。標準物質分析のための測定条件は、分子量、多分散性、分離のために使用するカラムの本数に基づきます。

正確な分子量が必要な場合は、キャリブレーションのために化学的に同一の化合物を使用するか、分子量が検出可能な検出器を使用することが推奨されます。分子量が検出可能な検出器を使用した場合、結果は、屈折率増分、 dn/dc 、スライス濃度の測定に使用したメソッドなど、評価パラメータによって異なります。ラボ間の比較のために、メタデータを大規模に記録する必要があります。⁷

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC のトラブルシューティング/ ベストプラクティス

1.1.効果的なトラブルシューティングに 必要な知識

1.2.移動相に関する注意事項

1.3.GPC/SEC カラム – 注意事項

1.4.FAQ：GPC/SEC カラムと適切な 扱い方

1.5.安定したベースラインを得る方法

1.6.データ解析に関する注意事項

1.7.GPC/SEC 光散乱に関する 注意事項

用語集

内部標準/フローマーカーによる流量補正

分析条件の再現性と、キャリブレーションに対する関連性は、GPC/SEC データ解析に影響を及ぼします。GPC/SEC 結果は、正確で再現性に優れたピーク高から取得されます。したがって、ピーク高に影響を及ぼしているすべてのパラメータは、最終的な結果の精度に影響を与えます。

GPC/SEC が必要とされる重要な理由の 1 つは、再現性が高く安定した流量を得ることです。最新の LC ポンプは安定した流量を提供しますが、ポンプピストンやバルブシールの摩耗や破損は時間とともに供給される溶出量を変化させる可能性があるため、ポンプの影響を無視することはできません。また、不適切に平衡化されたカラムによって溶出量が変化する可能性があります。

どちらの要素も、内部標準/流量補正マーカー（FRCM）を使用して簡単にモニタリングできます。標準的な FRCM は低分子質量化合物で、すべての標準やサンプル溶液に添加されます。最適な FRCM は、長期にわたり安定的で、非毒性で、検出器で強力な信号を生成するものです。FRCM は溶媒、固定相、サンプルとは反応しません。オリゴマーや残留開始剤を妨げることなく溶出するため、定量が可能です。

BHT、トルエン、アセトン、または硫黄は、有機溶媒のための標準的な FRCM です。エチレングリコール、アセトン、またはグルコースは水性移動相で使用できます。図 3 に、塩を含む DMAc でフローマーカーとして使用される安息香酸メチルの例を示します。

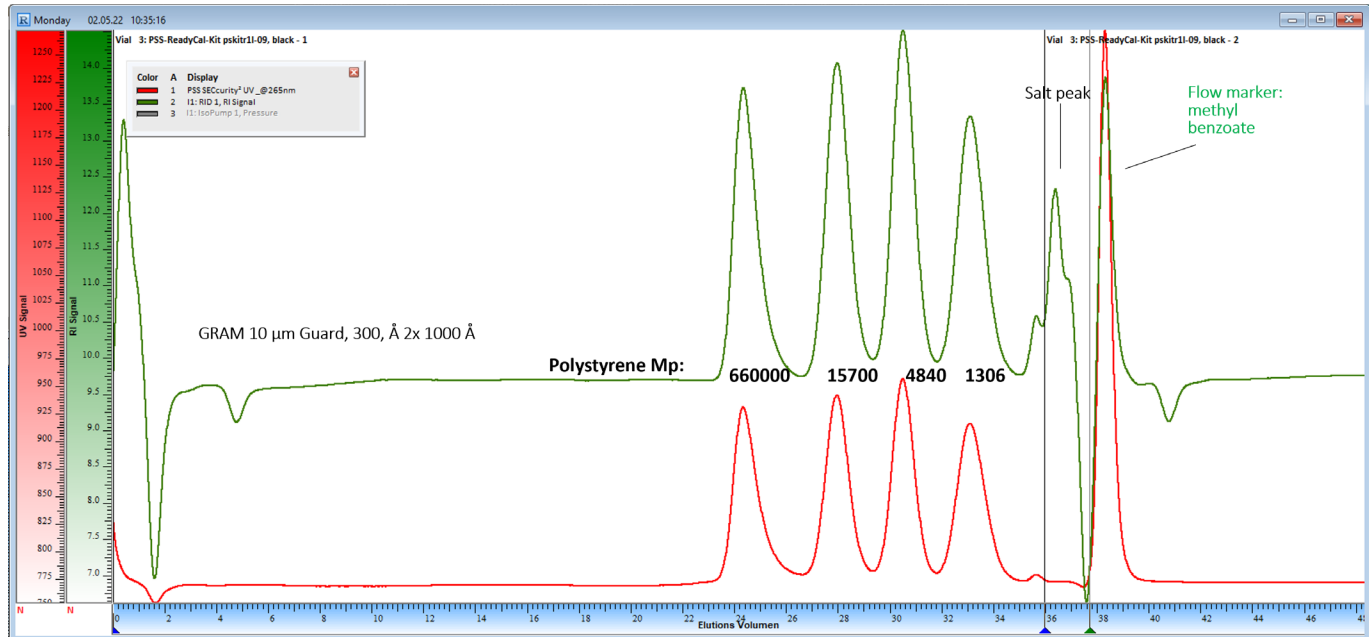


図 3. 4 つの異なる分子量のポリスチレンの混合物と、DMAc および 5 g/L LiBr 中のフローマーカー安息香酸メチルの生データ（RI（緑）、および UV 280 nm（赤））

FRCM はまた、流量の小さな偏差や平衡状態を補うためにも使用できます。このような効果は、FRCM の実験的な溶出量と、元の検量線が作成された際の溶出量とを比較し、比率を計算することによってバランスを図ることができます。⁸

次に、キャリブレーションとサンプル分析のための条件が同じになるよう、同じ手法で比率を使用することで、すべてのクロマトグラムを補正できます。より高い溶出量で、若干早く/遅くフローマーカーが溶出した場合、サンプルピーク溶出量はスライスごとに変化し、流量の変動や不完全な平衡化を補います。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC のトラブルシューティング/
ベストプラクティス

1.1.効果的なトラブルシューティングに
必要な知識

1.2.移動相に関する注意事項

1.3.GPC/SEC カラム – 注意事項

1.4.FAQ：GPC/SEC カラムと適切な
扱い方

1.5.安定したベースラインを得る方法

1.6.データ解析に関する注意事項

1.7.GPC/SEC 光散乱に関する
注意事項

用語集

この手順を使用することでキャリブレーションライブラリを簡単かつ
確実に使用でき、各サンプルセットの前のキャリブレーションを排
除できる可能性があります。内部標準/フローマーカーを用いるこ
とで、充填剤や流量の継続的な変化が反映されます。ただし、この
手法では劇的な変化は補正できず、再キャリブレーションが必要に
なります。

参考文献

1. Held, D.; Kilz, P. Qualification of GPC/GFC/SEC Data and Results in Quantification in LC and GC, A Practical Guide to Good Chromatographic Data; Wiley-VCH, **2009**.
2. Held, D. How Do I Calibrate a GPC/SEC System? *The Column* **2008**, (6).
3. Radke, W.; Held, D. Calibration Using Broad Standards.*The Column* **2015**, (2).
4. Held, D.; Kilz, P. An Alternative to Calibration with Narrow Standards.*The Column* **2013**, (8).
5. Held, D. GPC/SEC-Viscometry – a Versatile Tool for Structure Determination and More.*The Column* **2012**, (2).
6. Held, D.; Kilz, P. How to Choose a Static Light-Scattering Technique for Molar Mass Determination.*The Column* **2009**, (4).
7. Held, D.; Kilz,P.Improving the Reliability of GPC/SEC Light Scattering and Viscometry Results.*The Column* **2011**, (10).
8. Held, D. ; Radke, W. Flow Marker - An Easy Concept to Increase Reproducibility, LCGC *The Column* **2016**, (4).

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

1.7.GPC/SEC 光散乱に関する注意事項

光散乱（LS）は、ポリマーと生体高分子の分子量と分子サイズを測定するための絶対的技法の 1 つです。LS 機器は 1950 年代後半に発売が開始されました。GPC/SEC の場合、LS 検出器は 1970 年代半ばに登場しました。以降、これらの検出器は巨大分子の分析のための重要なツールになりました。

絶対的とはパラメータが不要ということではありません。絶対的技法でも特定の種類の巨大分子に適さない場合があります。計算パラメータの知識と、測定値の徹底的な設定が必要になるからです。

適切でない溶液で多分散、異方性散乱体を分析するために必要な式は、正確な濃度が重要であることを示しています。

$$\frac{K \cdot c}{R_{\theta}} = \frac{1}{M_w P(\theta)} + 2A_2c + 3A_3c^2 + \dots$$

説明：

c = 濃度

θ = 散乱角度

R_{θ} = レイリー比

M_w = 重量平均分子量

A_2 = 第 2 ビリアル係数

および K 、光学定数、

$$K = \frac{4\pi^2}{\lambda_0^4 N_A} \left(n_0 \frac{dn}{dc} \right)^2$$

説明：

λ_0 = レーザー波長

N_A = アボガドロ数

n_0 = 溶媒の屈折率

dn/dc = 屈折率増分

および

$$\frac{1}{P_{\theta}} = 1 + \frac{16\pi^2 n_0^2 R_g^2}{3\lambda_0^2} \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

R_g は分子の回転半径です。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC のトラブルシューティング/ ベストプラクティス

1.1.効果的なトラブルシューティングに 必要な知識

1.2.移動相に関する注意事項

1.3.GPC/SEC カラム – 注意事項

1.4.FAQ：GPC/SEC カラムと適切な 扱い方

1.5.安定したベースラインを得る方法

1.6.データ解析に関する注意事項

1.7.GPC/SEC 光散乱に関する 注意事項

用語集

サンプルを正確に測定

GPC/SEC では、クロマトグラフスライスにおける正確な濃度の知識は不要ですが、GPC/SEC-LS では必要です。散乱強度から分子量を計算するためには、クロマトグラフスライスのサンプル濃度や注入量を把握する必要があります。¹ スライス濃度のエラーは不正な分子量の測定につながります。

スライス濃度は濃度検出器（RI、UV 検出器）で測定できます。

2 つの異なるメソッドを使用できます。

- メソッド 1 ではバルクサンプル濃度の正確な知識が必要です。スライス濃度は、100 % のサンプルがカラムから溶出し、注入システムが適切に機能するという仮定に基づき、バッチ濃度から計算します。サンプルは分析用天秤で正確に測定する必要があります。
- メソッド 2 の場合、濃度検出器のキャリブレーション定数と、サンプルの特定のレスポンスを把握する必要があります。RI 検出器の場合、屈折率増分（dn/dc）は特定のレスポンスです。ポリスチレンまたはプルランなどの標準、および正確な dn/dc と濃度を使用して、メソッド 1 を使用して濃度検出器のキャリブレーション定数を求めることができます。

不正な注入量、オンカラム吸着、不溶性サンプル成分からのエラーはスライス濃度に影響せず、ゆえにサンプル分子量にも影響を及ぼさないため、一般的に、メソッド 2 はより正確な結果をもたらします。²

それでもなお、正確にサンプルを測定することを推奨します。サンプル回収率を計算できるからです。回収率は、プロセスの初期において、システムエラーや、不具合のあるシステム部品を特定するのに役立ちます。

dn/dc の影響

サンプルの dn/dc は、散乱強度から分子量を計算するために把握する必要があります。dn/dc は、溶液の屈折率 n （dn）の変化と、サンプル濃度（dc）の変化を示します。サンプルの dn/dc は、サンプル組成、溶媒、温度、使用される光源の波長などのパラメータに基づきます。通常、dn/dc は、約 10,000 Da を上回る定数として見なすことができます。ただし、低分子量の場合、末端基効果が観察されます。³ dn/dc のエラーは分子量の測定に影響を与えます。

表 1 に、どのようにメソッドパラメータの偏差が GPC/SEC-LS 結果に影響するかを示します。不正確なメソッドパラメータを使用して、理論上の Schulz-Flory 分布と既知の分子量平均からのデータ⁴ を評価しました。⁵

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC のトラブルシューティング/
ベストプラクティス

1.1.効果的なトラブルシューティングに
必要な知識

1.2.移動相に関する注意事項

1.3.GPC/SEC カラム – 注意事項

1.4.FAQ：GPC/SEC カラムと適切な
扱い方

1.5.安定したベースラインを得る方法

1.6.データ解析に関する注意事項

1.7.GPC/SEC 光散乱に関する
注意事項

用語集

表 1. GPC/SEC 光散乱のための分子量平均の精度に対する評価パラメータの影響

	変動	M _w (Da)	偏差 (%)	M _n (Da)	偏差 (%)
参照値	–	300,000	–	150,000	–
dn/dc	5 %	331,000	10.3	165,600	10.4
濃度	5 %	315,800	5.27	158,000	5.33
検出器間の遅延	5 %	295,100	1.63	159,500	6.33

正確な dn/dc 値は、特定の dn/dc 機器を使用してバッチモードで測定できます。ただし、濃度データ（通常は RI）を使用した GPC/SEC-LS 実験から dn/dc を測定するのが一般的な方法です。このメソッドを使用した場合、メソッド 2（説明したように）はスライス濃度の測定には適用できません。バッチモードおよびオンライン dn/dc 測定の両方で、サンプル濃度を正確に取得する必要があります。不溶性サンプル成分、水、および/または塩成分は、信頼性の高い結果を得るために補正しなければなりません。エラーを最小限に低減するために、測定は同じ温度、および光散乱検出器の波長で実行する必要があります。

チェックアウトサンプルの使用とシステムのバリデーション

絶体検出器を使用している場合でも、システムのバリデーションは必要です。光散乱バリデーション標準または認証標準物質を使用して検出器性能を検査し、システムエラーを特定し、システムの完全性を検証できます。

GPC/SEC-LS データの評価のために、システム関連のパラメータの数を把握する必要があります。適切なデータ解析は、以下の要素を把握している場合にのみ実行できます。

- LS と濃度検出器との間の遅延
- LS 検出器の検出器定数
- 濃度検出器の検出器定数
- 規格係数（MALS 検出器のみ）

これらのパラメータのいずれかが誤っていたり変更されている場合、結果が不正になります。チェックアウトサンプルを使用することは、設定における意図しない、または未確認の変更を特定するのに役立ちます。さらに、適切に選択されたチェックアウトサンプルを使用して、実際のシステム関連パラメータを測定できます。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC のトラブルシューティング/ ベストプラクティス

1.1.効果的なトラブルシューティングに 必要な知識

1.2.移動相に関する注意事項

1.3.GPC/SEC カラム – 注意事項

1.4.FAQ：GPC/SEC カラムと適切な 扱い方

1.5.安定したベースラインを得る方法

1.6.データ解析に関する注意事項

1.7.GPC/SEC 光散乱に関する 注意事項

用語集

正確な分析結果が得られないケース

1) コポリマーの場合

光散乱検出器を使用した正確な分子量値の計算は、 dn/dc の精度によって制御されます。巨大分子物質の dn/dc はその組成に基づきます。ホモポリマーの場合、 dn/dc 値は正確に測定できます。分布が不均質なコポリマーの場合、 dn/dc はクロマトグラム全体で予測不可能に変動し、正確で絶対的な分子量値を求めることはできません。

残念ながら、単一バッチの測定では、平均 dn/dc を決定し、すべてのクロマトグラフスライスで同じであると仮定するには不十分です。コポリマーの真の dn/dc を測定するための単一のメソッドはありません。したがって、GPC/SEC-LS からのコポリマーの分子量の結果は不正確です。このような基準の例外は、分布の狭いブロック共重合体の分析です。この場合、計算された分子量は真の分子量に近くなります。⁶ コポリマーの化学組成分布の幅が大きくなると、ホモポリマー dn/dc の値は変化し、測定された見かけの分子量と真の分子量は大幅に異なります（図 1）。⁷

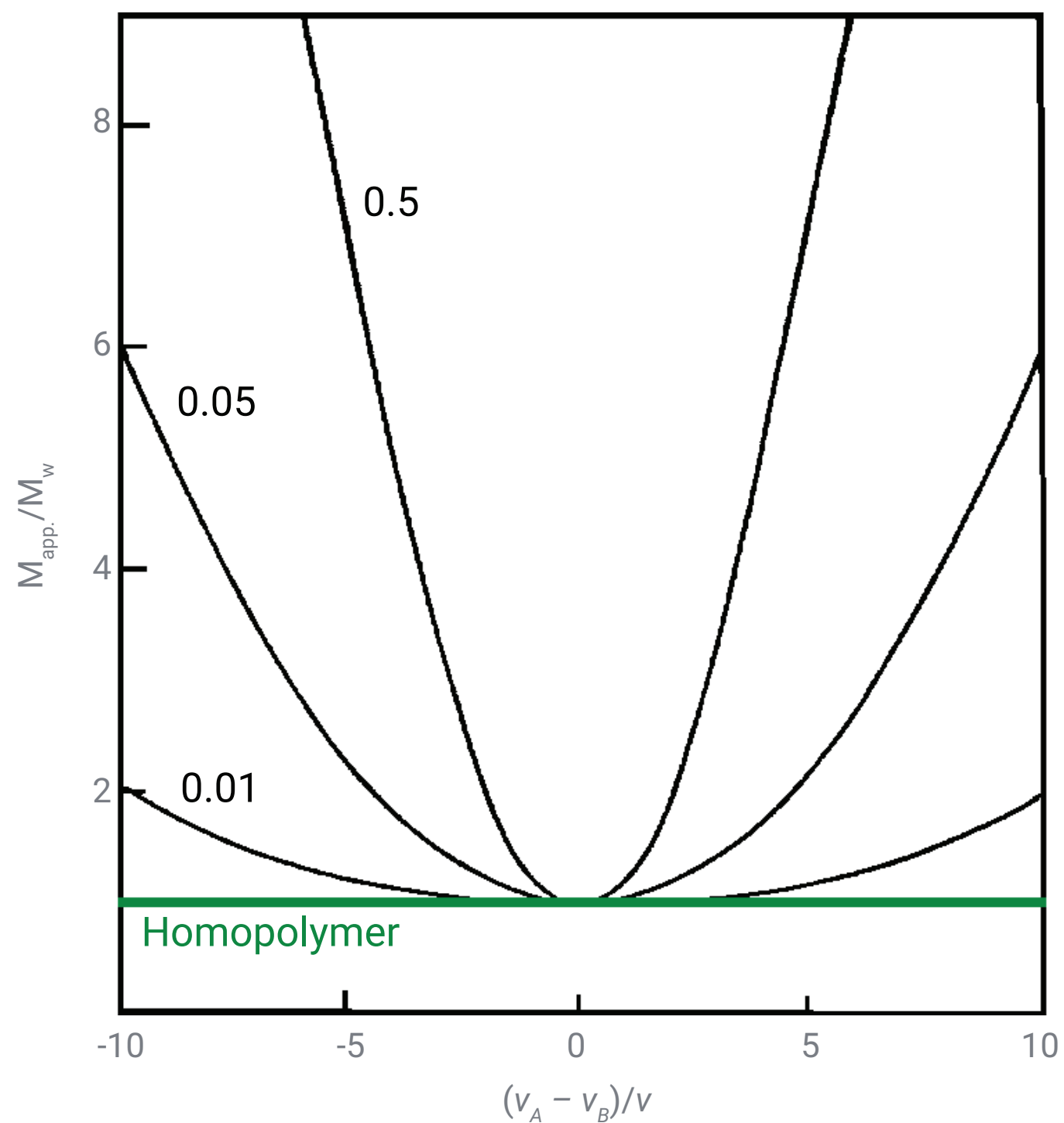


図 1. 化学組成が不均質なコポリマーの見かけの分子量と真の分子量の変化（文献からのデータ）⁷

さらに、GPC/SEC-LS 実験から、コポリマー組成やサンプルの均一性に関する情報は得られません。コポリマーに関するデュアル検出分析、相互作用ポリマークロマトグラフィー（IPC）、2D クロマトグラフィーなどの他の手法は、見かけの分子量以上の情報を提供します。⁸

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC のトラブルシューティング/ ベストプラクティス

1.1.効果的なトラブルシューティングに 必要な知識

1.2.移動相に関する注意事項

1.3.GPC/SEC カラム – 注意事項

1.4.FAQ：GPC/SEC カラムと適切な 扱い方

1.5.安定したベースラインを得る方法

1.6.データ解析に関する注意事項

1.7.GPC/SEC 光散乱に関する 注意事項

用語集

2) 混合溶媒中

選択吸着（優先吸着とも呼ばれる）は、溶媒混合物において一般的な作用です。混合物中の 1 つの溶媒に対するポリマーの親和性が高くなると、この溶媒の濃度は、ポリマー鎖の近くでは、ポリマーを含まない溶媒の部分よりも高くなります。⁷ この現象は dn/dc と、測定の方法に影響を及ぼします。混合溶媒のための手法は、浸透圧平衡でポリマー溶液と混合溶媒により dn/dc を測定することです。このような手順なしでは、 dn/dc は不正確になります。そのため、細心の注意を払って溶媒増強光散乱を使用します。

正確な分子量分布情報は得られないケース

1) カラムがオーバーロード状態の場合

バッチモードの光散乱（LS）では、サンプルの重量平均分子量（ M_w ）のみ測定できます。GPC/SEC カラムなどの分画システムと組み合わせた LS では、その他の分子量平均（ M_n 、 M_z ）、多分散性指数、PDI、分子量分布を測定できます。

解析ソフトウェアは、基本的に単分散（1 分子量のみが存在）であるクロマトグラフスライスを生成します。したがって、LS 検出器は、サンプル注入から特定のサンプルのスライスごとの M_w 値に基づく検量線を作成できます。多くの場合、この検量線を近似して、濃度検出器信号から分子量分布を計算するために使用します。

分離が不十分で、スライスが単分散でない場合、この手法は上手くいきません。GPC/SEC-LS 実験からの唯一の有価値な結果は、重量平均分子量（および MALS 検出器の回転半径（RG）の z 平均）となります。

したがって、カラムがオーバーロード状態の場合、分布情報は取得できません。低分子量サンプル（および低 dn/dc ）に対しては、多くの場合、より高い信号と優れた S/N 比が得られるよう、濃度を高めることが推奨されます。カラムがオーバーロード状態で、濃度が高くなりすぎると、分離ステップは無意味になり、 M_w が正確に測定可能な唯一のパラメータとなります。この場合、バッチモードで光散乱を実行することが、よりベターなオプションとなります。

2) 適切に開発された GPC/SEC メソッドがない

GPC/SEC メソッドが適切に機能していなければ、あらゆる分布情報も失われてしまいます。ただし、LS 検出器から取得される情報は、GPC/SEC メソッドが有効かどうかを示すヒントとなる可能性があります。

図 2 に、分子量が溶出量とともに減少しないため、メソッド再評価が推奨される分離の 2 つの事例（赤色の曲線を参照）を示します。溶出量とともに分子量が増加する領域もあります。これは GPC/SEC 分離のメカニズムと矛盾します。さらにこの図に、予想される挙動が観察される例を示します（緑色の曲線を参照）。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC のトラブルシューティング/ ベストプラクティス

1.1.効果的なトラブルシューティングに 必要な知識

1.2.移動相に関する注意事項

1.3.GPC/SEC カラム – 注意事項

1.4.FAQ：GPC/SEC カラムと適切な 扱い方

1.5.安定したベースラインを得る方法

1.6.データ解析に関する注意事項

1.7.GPC/SEC 光散乱に関する 注意事項

用語集

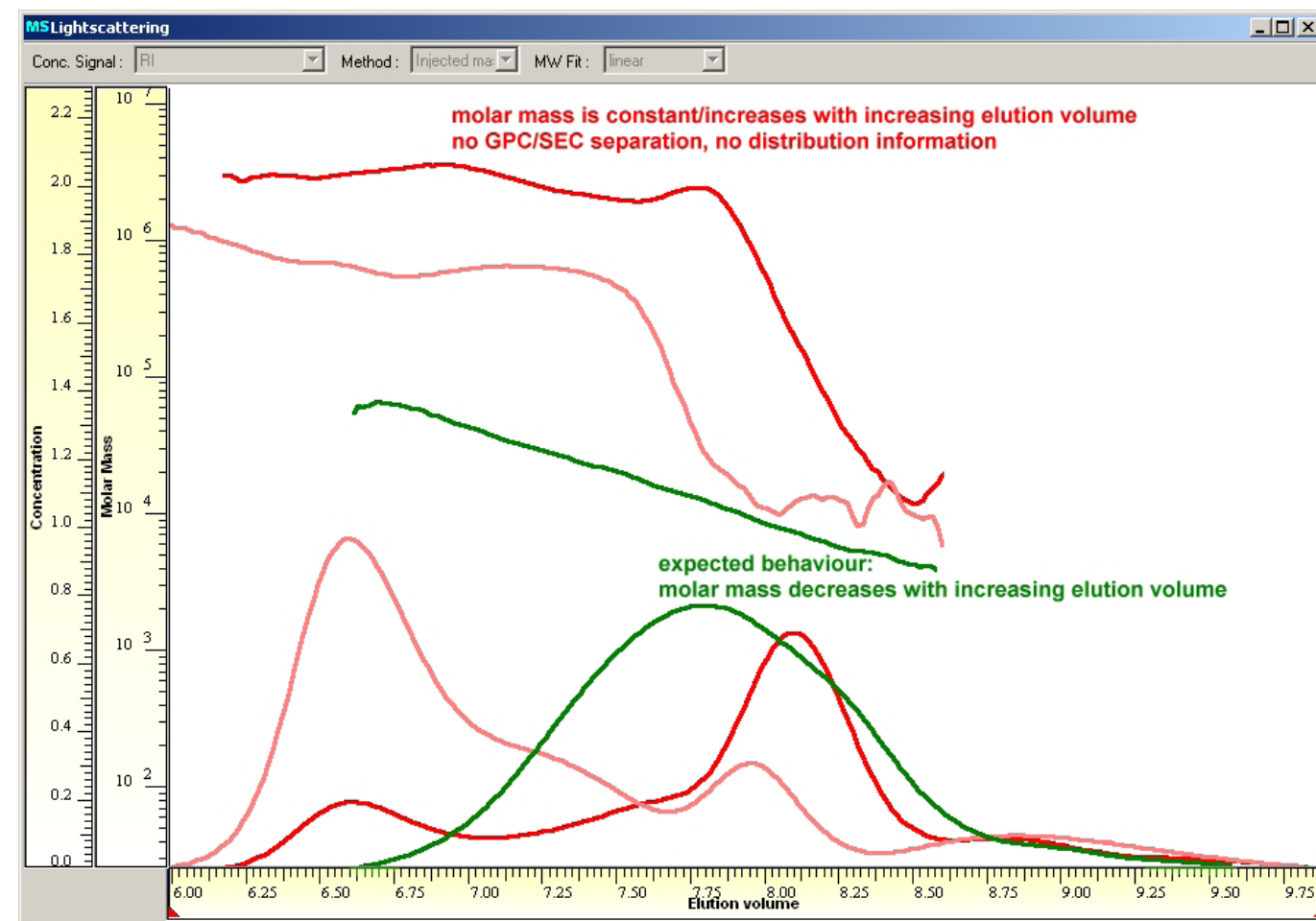


図 2. 赤色：不正な GPC/SEC メソッドによる測定の例。
緑色：予想される分子量は減少し、溶出量は増加します。

結論

GPC/SEC 光散乱は、低濃度の高分子量成分を同定し、凝集体を調査するために最適です。以下の場合に、ホモポリマーの分子量分布を測定するための有効な非侵襲性の技法となります。

- dn/dc 値が既知である、または測定できる
- GPC/SEC メソッドが適切に開発されている
- 実験パラメータが正確に測定され、システムのライフサイクル全体でモニタリングされている

参考文献

1. Held, D. Understanding Positive and Negative Detector Signals.*The Column* **2008**, (12).
2. Held, D. GPC/SEC-Light Scattering: Garbage In, Garbage Out.*The Column* **2016**, (8).
3. Mori, S.; Barth, H. Size Exclusion Chromatography. *Springer*, **1999**, (122).
4. Kilz, P.; Reinhold, G. Proceedings International GPC Symposium San Diego 1996, Boston, **1997**.
5. Kilz, P.; Held, D. Quantification in LC and GC - A Practical Guide to Good Chromatographic Data, Wiley-VCH, **2009**.
6. Gores, F.; Kilz, P. Copolymer Characterization Using Conventional Size-Exclusion Chromatography and Molar-Mass-Sensitive Detectors.*Chromatography of Polymers*, **1993**, ACS Symp.Ser.521, 122–148.
7. Kratochvil, P. Classical Light Scattering from Polymer Solutions; *Elsevier*, New York, **1987**.
8. eBook: Practical Copolmer Analysis using GPC/SEC and Related techniques.

Originally published in *The Column*, February **2009**, by author Daniela Held.

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC のトラブルシューティング/
ベストプラクティス

1.1.効果的なトラブルシューティングに
必要な知識

1.2.移動相に関する注意事項

1.3.GPC/SEC カラム – 注意事項

1.4.FAQ：GPC/SEC カラムと適切な
扱い方

1.5.安定したベースラインを得る方法

1.6.データ解析に関する注意事項

1.7.GPC/SEC 光散乱に関する
注意事項

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC のトラブルシューティングとベストプラクティス

用語集

BHT	ブチル化ヒドロキシトルエン
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
ELSD	蒸発光散乱検出器
FRCM	流量補正マーカー（内部標準）
GPC	ゲル浸透クロマトグラフィー
HFIP	ヘキサフルオロイソプロパノール
LAC	液体吸着クロマトグラフィー
LC	液体クロマトグラフィー
LiBr	臭化リチウム
LiCl	塩化リチウム
LS	光散乱
MALS	多角度レーザー光散乱
M _n	数平均分子量
移動相	クロマトグラフィーシステムで使用される液相
M _w	重量平均分子量

M _z	z 平均分子量
NaCl	塩化ナトリウム
NaN ₃	アジ化ナトリウム
QC	品質管理
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
RG	回転半径
RI	示差屈折率（検出/検出器）
SDV	スチレン-ジビニルベンゼン
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
固定相	分離装置中の物質を分離する固相
TCB	トリクロロベンゼン
THF	テトラヒドロフラン
UV	紫外線（検出/検出器）
V _e	溶出量

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。

DE52520805

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

5994-6433JAJP

