

オンラインセミナー「HPLCを用いた高分子の組成分布解析」ご質問に対する回答

株式会社東ソー分析センター 平井 貴康

No.	ご質問 (文章表現を一部変更している場合有り)	回答
1	<p>(類似質問まとめ) GPECの測定事例-2では移動相に水/メタノールを選ばれています。どちらも貧溶媒寄りのように思うのですが、どのような理由で選定されているのでしょうか？</p>	<p>大変申し訳ございません。こちらは記載の誤りとなります。 正しい移動相を以下にお示します。 (誤) 水/メタノール (正) メタノール/THF</p>
2	<p>グラジエントの溶媒や割合の決め方をお教えいただけますでしょうか。</p>	<p>溶媒選択の考え方として、溶解度パラメータ(SP値)を用いる方法がございました。 SP値は物質の溶解挙動を示す数値で、溶媒、ポリマーそれぞれに固有の値が存在します。試料とSP値が遠い溶媒を貧溶媒、近い溶媒を良溶媒として用いる事で、条件検討がスムーズになると考えられます。 ただし、用いる2溶媒は互いに混ざり合わなければならないことにご留意ください。 グラジエント比率はまずは貧溶媒100%から良溶媒100%のリニアグラジエントを試し、全体のパターンを把握する事をお勧めいたします。(試料が無保持で溶出していないかなど)</p>
3	<p>1次元目は組成での分離、2次元目は分子量での分離をされていますが、この順番に意味はありますか？ 例えば、1次元目に分子量、2次元目で組成で分離したときはどのような結果になるのでしょうか。</p>	<p>弊社で1次元目:組成(GPEC)、2次元目:分子量(GPC)の順で測定を行う理由としては以下の2つが挙げられます。 ①1回の分析に対し、2次元目の測定は複数回行う必要があるため。 ②2次元目の方が試料注入量が多いため。 (※弊社の条件設定、設備の問題) GPECは溶媒組成を元に戻す平衡化の時間を要し、測定時間が長くなります。 また、良溶媒の注入量が多いと、試料が十分に析出しない事があります。 なお、1次元目と2次元目を入れ替えた場合、基本的には同じ結果が得られますが、完全に一致はしません。上記②の理由で、試料の析出が十分でない場合はCPA条件で溶出せず、ピークがブロードになる等の問題が生じる事があります。</p>
4	<p>検出器にELSDを用いるのはなぜですか。</p>	<p>溶媒グラジエントを用いる場合、移動相の組成が連続的に変化します。すなわち、移動相の屈折率が連続的に変化するため、ベースラインの変動が大きく、RI検出器でのモニターは困難となります。また、一般に有機溶媒のほとんどは、それ自体が僅かであってもUV吸収を持つため、UV検出器でもベースラインのドリフトは起こります。加えてUV吸収を持つ分析種しか検出できないという課題も存在します。 一方、蒸発型光散乱検出器(ELSD)では、検出の際に、移動相を揮発させるため溶媒組成の変動が小さいという利点から選択しています。</p>
5	<p>GPECの検出器としてCoronaCADやELSDを用いていますが、どうしてもベースラインが傾きます。1ppm程度の微量混在するポリマーの定量で、このベースラインの傾きが障害となって困っています。何かよいキャンセル方法がありますでしょうか？</p>	<p>溶媒グラジエント分析では、移動相の組成が連続的に変化するため、移動相の密度や粘度も連続的に変化します。このため、ネブライザーから噴霧される液滴径は一定とならず、結果としてベースラインの変動をもたらすこととなります。 常に液滴径が均一になるよう噴霧条件を制御する事は、ユーザー側では難しいため、出来るだけ密度・粘度の近い移動相の組合せにする等のメソッド側からのアプローチになるかと思われます。なお、CoronaCADでは、移動相組成変化の影響を低減させるために、「逆グラジエント法」により、検出器直前で溶媒を追加して、検出器に入る移動相組成を一定にする、という装置もあります。 (参考: 福島,他, CHROMATOGRAPHY, Vol.32 No.3, 161 (2011)) ただし、GPECの場合、貧溶媒濃度が高いと、試料が析出してしまいうため、注意が必要です。</p>
6	<p>GPECの検出にELSDを用いる場合、ピーク面積がプラスマイナス5%程度ばらつきます。対処方法はありますか？ ELSDで噴霧圧を一定に制御ができれば噴霧液滴サイズが安定して感度も安定すると考えていますが、どう思われますでしょうか？</p>	<p>ELSDの検出器応答は指数応答性を示すため、RI検出器やUV検出器と比較して、ピーク面積のばらつきが大きくなる傾向にあります。面積がばらつく要因としては、オートサンプラーの注入再現性や、ご指摘頂いた噴霧液滴サイズの影響が考えられます。対策としては、【質問No.5】の回答と共通するかと考えられます。</p>

7	(類似質問まとめ) GPCのカラムを順相カラムに変更した場合、順相HPLCとして使用することは可能でしょうか。その場合、溶媒のホースが1種類しかないのですが、追加で購入するのでしょうか？	普段GPCとしてお使いの装置に、順相カラムを取付ける場合と解釈して回答します。 お答えとして、順相HPLCとしての利用は可能です。ただし、送液ラインが1本しかない装置ですと、溶媒グラジエント測定は不可能です。 溶媒グラジエントを行うためには、ポンプ・ミキサーなどの増設が必要ですが、装置によっては改造が不可能な事もございます。詳細は各装置メーカー様にお問い合わせください。
8	GPECの測定は通常のグラジエントHPLCと同じ装置で可能でしょうか？何か特殊な装置など必要になりますでしょうか？	GPECの測定は、通常のグラジエントHPLC装置で実施可能です。 ただし、【質問No.4】の回答に示した通り、ベースラインの変動を避けるため、可能であればELSD、またはコロナ荷電化粒子検出器(CAD)等の検出器があれば望ましいです。両者の導入が難しければ、まずはUV検出器の利用でも良いかと思われます。
9	(類似質問まとめ) 析出・再溶解という手法をとられていますが、圧力の上昇、(ガード)カラムへのダメージはないのでしょうか？	試料を注入した瞬間に系内の圧力が上昇する事はありますが、カラムの圧力損失(耐圧上限)を超えるまで上昇したケースはこれまでの検討ではございません。 また、標準試料を別日に測定し、保持時間・ピーク形状の変化がない事も確認しており、大幅な劣化をもたらすダメージは生じていないと考えております。 これまでの傾向として、高分子量や高粘度の試料溶液や、移動相に水を含む系では圧力上昇が生じやすい傾向にあります。これらサンプルを評価する際は、低濃度・低注入量からの条件検討を推奨します。
10	GPEC原理は分析初期に貧溶媒中でポリマーが析出するというのですが、高压状態で本当に析出しているのでしょうか？確認されたことはありますか？	申し訳ございません。実際に高压状態でカラムの内部を観測した事はございません。
11	ブロック共重合体・ランダム共重合体で、溶出に差異は生まれるのでしょうか？組成比率が同じであれば相互作用点が同じなので、同じ時間で溶出しますでしょうか？	ブロック共重合体とランダム共重合体では、平均組成が同じでも、GPECの保持時間は変化する事が確認されています。一例を弊社HPにお示しております。 https://www.tosoh-arc.co.jp/technique/detail/t1210/
12	GPECでの分離に対し、化学組成以外に分岐/直鎖や鎖状/環状などでも吸着臨界点は変化するのでしょうか？	分岐/直鎖、鎖状/環状のような一次構造の違いでも、吸着臨界点(CPA)は変化する事が報告されています。ただし、CPAの差としてはごく僅かなため、これらをGPECで分離する事は困難と考えられます。 なお、溶媒グラジエントを用いず、ある一成分のCPA条件に移動相を固定する、LCCC(Liquid Chromatography at the Critical Conditions)と呼ばれる分析手法が存在しており、本法を適用すると分岐/直鎖や末端構造の異なるポリマーも精密に分離する事が可能です。参考文献を以下に示します。 ・川口,他,高分子論文集, Vol.64, No.7, 397 (2007) ・T.Chang, J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys., Vol.43, 1591 (2005) など
13	GPECにおいて、グラジエント条件は同じにしてカラムのみ逆相から順相に変えても大丈夫でしょうか。またGPECでの溶出順番はかわらないですか？	固定相のみ順相に変化する事は可能です。ただし、溶出順については変化する可能性がございます。GPECでは試料が再溶解した後、すぐにカラムから溶出するわけではなく、CPAに到達した時点でカラムから溶出します。すなわち、固定相に保持される時間が存在するため、カラムが変化するとCPAも変化します。
14	注入する試料の粘度は？ エマルジョン中の物質の測定をする際、移動相と同等のもので希釈した上澄みを使用しています。GPECの際、どのように作成するのがよいのでしょうか？	GPEC測定の際は、移動相(良溶媒)で試料を希釈いただく形で問題ございません。 試料の粘度について、明確な基準を持ってご回答する事は難しいですが、通常はポリマー濃度0.1wt%程度になるよう調整頂ければ良いかと思われます。
15	CPAを決める要因として、温度がりましたが、今回紹介されたGPECではどのような場面で温度が利用されますか。	例えばあるGPEC測定条件で、極めて保持時間の近い2成分が存在する場合、グラジエント条件はそのままに測定温度を変更すると、分離能を改善できるケースがございます。 ただし、溶媒沸点やカラムオープンの性能などの制約により、温度のパラメータは変更できる幅が狭いため、実験的には移動相を変更する方がより有利と考えられます。

16	GPEC測定の時、ピーク前のリーディングがよく発生しました。考えられる原因や対処法を教えてくださいませんか。	<p>推定される要因はいくつかございます。</p> <p>①試料がCPAで溶出していない(分配/吸着モードで溶出している) ②試料の注入量が多い ③対象とする材料の分子量が低い</p> <p>①や②の場合、条件を改良する事で溶出挙動を改善できる可能性がございます。</p> <p>一方、③が原因の場合、解決は困難となります。GPECは測定原理上、分子量に依存しない、組成のみでの分離が可能とされていますが、実際には分子量が約1万以下の低分子量成分では、分子量依存性を示すことが報告されています。</p>
17	近い分子量を持つ高分子同士の共重合体でも分離させる事は可能なのでしょうか。例えば分子量1万と9000のポリマーの共重合体でも分離可能なのでしょうか。従来のGPC単体ではこの近さでは分離は難しいイメージです。	<p>分離したい2種類のポリマーの組成が異なっていれば、分子量が近接していてもGPECで分離する事は可能です。ただし、【質問No.16】の回答の通り、分子量が約1万を下回る試料では分子量依存性が現れる可能性がございます。</p> <p>なお、LCCCでは低分子量成分の分子量依存性が現れないため、オリゴマー領域でも組成の違いだけで分離可能です。例えば、分子量1万のCPA条件にてLCCC測定を行うと、この成分は分子量依存性を示さず溶出します。一方、9000の試料にとってはCPA条件ではないため、こちらはSECモード、または分配/吸着モードで分子量依存性を示して溶出し、両者を分離可能となります。</p>
18	溶出したピークの定性分析は、他の分析手法を用いてなされているのでしょうか？	<p>通常の分析では、組成既知の標準試料との比較で組成分布を評価する事がほとんどですが、定性分析が必要な場合は溶出したピークを分取し、FT-IRや熱分解GC-MS等でさらに評価を行うこともございます。</p>
19	構成モノマーが3種類以上のポリマーをGPECでわかることは可能でしょうか？	<p>結論として、3種類のモノマーから構成された共重合体(3元共重合体)の場合も、同様の測定は可能ですが、保持時間と組成の紐付けが出来ないため、結果を解釈する事が出来ません。</p> <p>例えば2元共重合体(A-B)の場合、一方の成分の比率が定まると、もう一方の比率は自動的に決定するため、保持時間と組成の検量線を作成する事は可能です。</p> <p>これに対し、3元共重合体(A-B-C)の場合、1成分の比率を定めても、残り2成分の比率が独立に変化するため、検量線を作成できず、組成の帰属が不可能となります。したがって、3元共重合体の場合は【質問No.18】のように、溶出したピークを分取し、他の分析手法で定性を行う必要がございます。</p>
20	2D-HPLCの特長を生かせるのは2つ以上のモノマーで構成されたポリマーという認識でよろしいでしょうか。単一のモノマーで構成されたポリマーであれば通常のSECと大きな差はないでしょうか。	<p>2元共重合体のほかに、GPECの分析事例(1)でご紹介したようなホモポリマーが複数混ざった試料に対しても、各成分の分子量を別々に評価可能であり、有効です。</p> <p>ブレンド等が行われていない、単一のホモポリマーであれば、通常のSECと大きな差は無いという認識でお間違いありません。</p>
21	NBRの分析時の2D-HPLCは、コンプリヘンシブモードなのでしょうか。2次元目の分析時間を考えると、ハートカットと呼ばれる手法なのでしょうか。また、ハートカットの場合、鳥瞰図を得るためには、何度か測定を行い、グラフを重ねているのでしょうか。	<p>ご推察の通り、今回のNBRの2D-HPLCデータはハートカットと呼ばれる手法で取得しております。2次元目の測定時間が長い系では、一度の測定でピーク全範囲を網羅する事が困難であり、今回は2回の測定を重ね書き、鳥瞰図を得ています。</p>
22	2D-HPLC測定において、校正曲線はどのように取得されているのでしょうか。	<p>2D-HPLCの校正曲線には、組成検量線と分子量検量線の2種類が存在します。</p> <p>組成検量線作成には、共重合組成の異なる標準試料数点が必要です。これらを実試料と同じ条件でGPEC測定し、平均組成とピークトップ保持時間の関係をプロットして、組成と保持時間の関係式を得ます。</p> <p>一方、分子量検量線には、分子量の異なる標準試料数点が必要です(一般的なGPC測定と同じ)。2D-HPLC測定において、GPCは2次元目側になります。1次元目と2次元目では流路の長さが異なるため、正確な分子量検量線を得るために、分子量標準も実試料と同じ条件で2D-HPLC測定を行い、分子量と溶出時間の関係式を得ています。</p>

23	GPCのRIが最近安定しません、なにか原因があるのか安定させる方法があったら教えてください	発生している事象により原因は様々ですが、例えば以下のような対処法が考えられるかと思います。 ①ベースラインが大きくうねる、波打つ →測定室の温度を一定に保つ、空調の風を直接装置に当てない ②周期的なノイズが細かく発生する →ポンプのパージを行う、ポンプ部品(プランジャーシール/チェックバルブ)を交換する ③ノイズレベルが高い ★カラムを外して送液した時、安定する場合 →カラムの洗浄、交換を行う ★カラムを外して送液しても安定しない場合 →溶離液を交換する、混合溶液や塩を添加している場合は攪拌しながら送液 →セルを洗浄する ④送液を停止してもベースラインが安定しない →RIのランプを交換する
24	通常のHPLC測定では、溶離液に塩水を用いています。溶媒に塩が入っていると、やはり測定不可でしょうか。	検出器としてELSDを用いるため、不揮発塩での測定は不可能ですが、揮発塩に置き換える事が出来れば水系でも測定は可能と考えられます。ただし、水などの高沸点溶媒は検出感度の低下、ベースラインのノイズが生じる事が起こります。 また、HPLC用カラムの中には水100%での使用を推奨していないものも存在しますので、条件検討の際に注意は必要かと思われます。
25	ポリアクリルアミド系の水溶性高分子の測定は可能ですか。	上記の回答と共通しますが、水系での測定の際は添加塩の種類に注意が必要となります。加えてアクリルアミド系のサンプルは、溶液の粘度が高い傾向にあり、測定の難易度は高いポリマーに分類されるかと思われます。ポリマー組成により、利用できる溶媒も異なりますので、詳細につきましては一度ご相談いただければ幸いです。
26	多糖類もGPECや2D-HPLC等を用いて測定することは可能でしょうか。	弊社には多糖類の組成分布解析事例はございませんが、文献を調査すると多糖類や糖タンパクの分析において2D-HPLCが用いられた事例は存在するようです。 しかしながら、分配吸着モード×分配吸着モードでの利用がほとんどで、今回ご紹介したGPEC×GPCでの組合せは確認できませんでした。多糖類の場合、移動相は水系になりますので、【質問No.24,25】と共通の課題をクリアする必要がありますかと思われます。
27	例えば、PE-PP共重合体のようなポリマーの組成分布解析は困難という理解でよいでしょうか。	PE-PP共重合体のようなポリオレフィン試料の場合、トリクロロベンゼン(TCB)やo-ジクロロベンゼン(ODCB)のような塩素系溶媒を用い、かつ高温でなければ試料が溶解しないため、弊社所有のELSDではGPEC測定は不可能です。 ただし、現在はこれら溶媒にも対応可能な高温ELSDが販売されているようですので、装置が揃えば測定可能と考えられます。 なお、弊社では組成分布解析手法として、高温GPC-FTIRという装置も取り揃えています。PE-PP共重合体の組成分布解析には本装置が適用可能です。
28	PHAS(PFOA,PFOSなど)の分析をHPLCで行う場合の手法と注意点を教えてください。	PFOA、PFOS類は、構造が定まった低分子量化合物のため、GPECではなく分配/吸着モードによる分離が望ましいかと思われます。固定相としては一般的なODSカラムを用いる事も可能ですが、フッ素化合物の分離に特化したフルオロカーボン系のシリカカラムも販売されているようです。 なお、PFOA,PFOS類の場合、フッ素系溶媒を用いたHPLC測定を行う場合も想定されますが、一般的なHPLC装置では、フッ素系溶媒に耐性がない部品が用いられている可能性がございます。装置メーカーに確認の上、必要に応じて専用の電磁弁やデガッサをご利用ください。
29	(複数質問まとめ) カラムはODS以外で何か使われたことはありますか。ある場合、どのように使い分けておりますでしょうか。	これまでに使用実績のあるカラムとして、以下のようなものがございます。 逆相系カラム…Octyl, Phenyl, cyanopropyl 順相系カラム…Silica, Amide, カラムの使い分けですが、まずは標準的なODSで分析を行い、より試料の保持(固定相との相互作用)を強くしたい場合に、試料の極性を考慮し変更しています。 弊社では溶媒・カラムの選定、最適化を行うサービスもございますので、ご興味ございましたらお気軽にお問い合わせください。