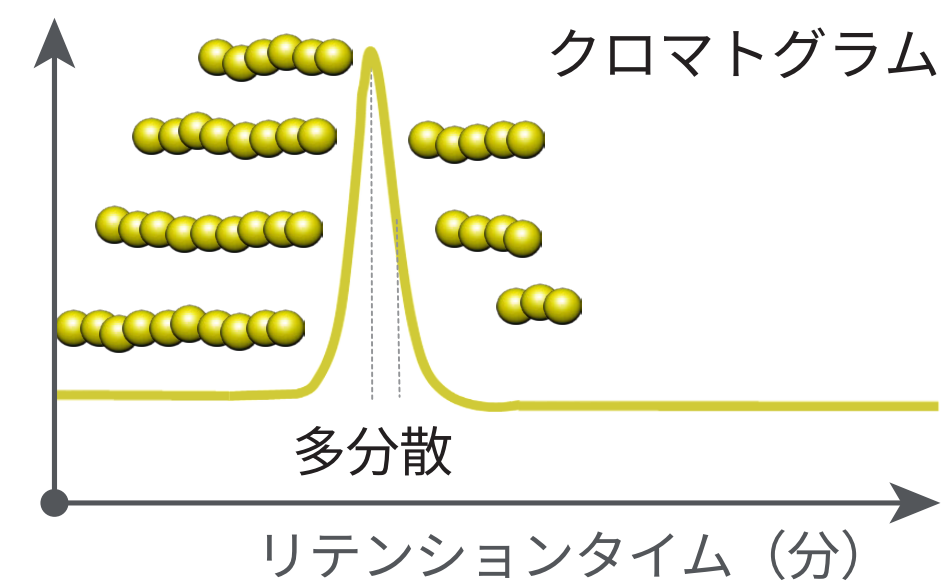
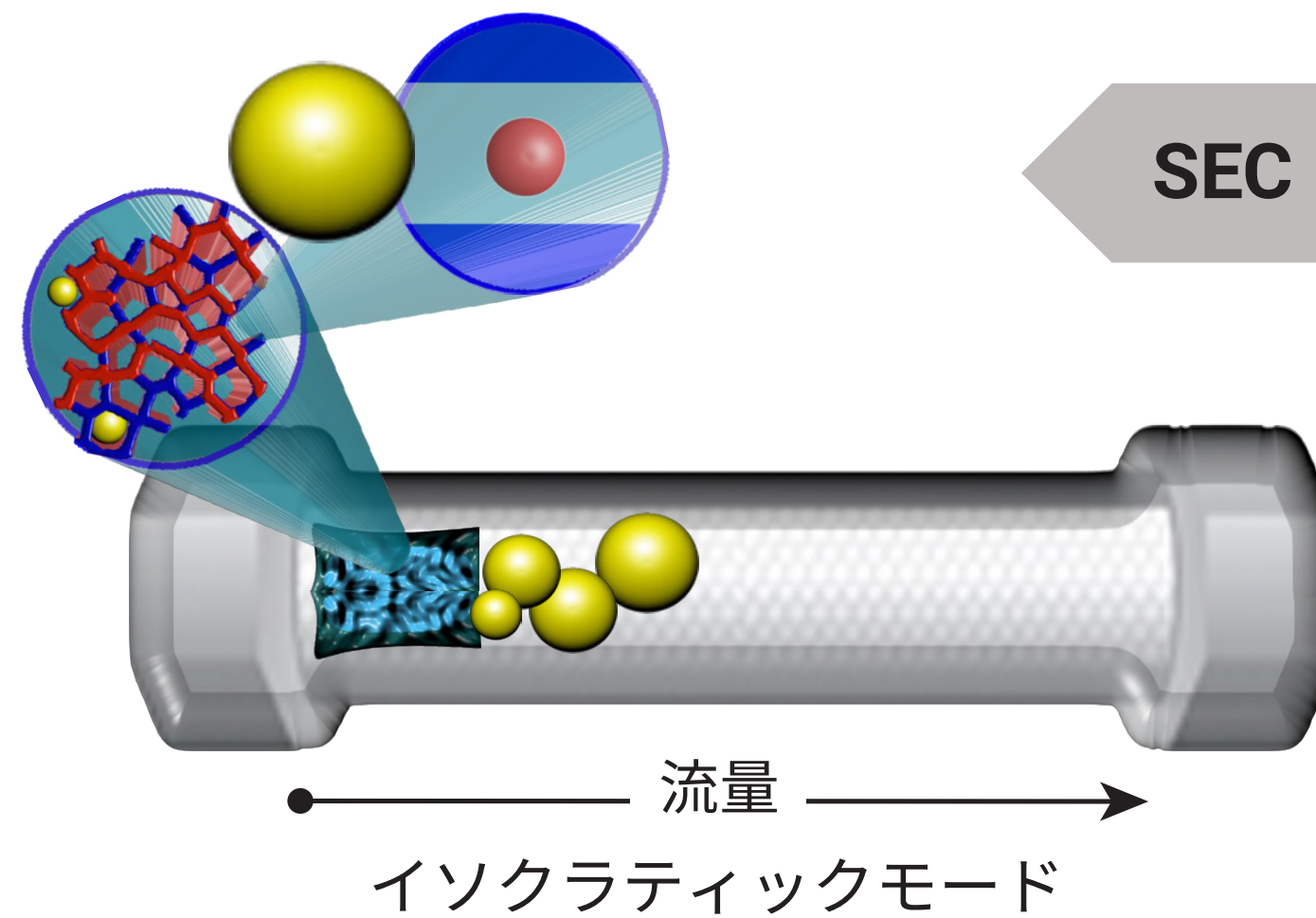


GPC/SEC 電子書籍シリーズ

GPC/SEC の理論と背景

ポリマー、生体高分子、およびタンパク質の分析時に知っておくべきこと



目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC の理論と背景について

1.1 分子量平均の詳細

1.2 クロマトグラムから分子量分布まで

1.3 GPC/SEC システムのキャリブレーション方法

1.4 GPC/SEC における真度と精度

1.5 結果の不確実性 – 結果の信頼性を高めるには

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC の理論と背景

目次

目次 2

本電子書籍シリーズについて 3

GPC/SEC の理論と背景について 4

1.1. 分子量平均の詳細 5

1.2. クロマトグラムから分子量分布まで 9

1.3. GPC/SEC システムのキャリブレーション方法 14

1.4. GPC/SEC における真度と精度 19

1.5. 結果の不確実性 – 結果の信頼性を高めるには 22

用語集 27

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC の理論と背景について

1.1 分子量平均の詳細

1.2 クロマトグラムから分子量分布まで

1.3 GPC/SEC システムのキャリブレーション方法

1.4 GPC/SE における真度と精度

1.5 結果の不確実性 – 結果の信頼性を高めるには

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC の理論と背景

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC の「ヒントとコツ」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「ヒントとコツ」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スを一覧で提供するために、本電子書籍を作成しました。

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「ヒントやコツ」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。ゲル浸透クロマトグラフィー

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC の理論と背景について

1.1 分子量平均の詳細

1.2 クロマトグラムから分子量分布まで

1.3 GPC/SEC システムのキャリブレーション方法

1.4 GPC/SE における真度と精度

1.5 結果の不確実性 – 結果の信頼性を高めるには

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC の理論と背景

GPC/SEC の理論と背景について

(GPC)、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、ゲルろ過クロマトグラフィー (GFC) は、溶液中の巨大分子をそのサイズに基づいて分離するための液体クロマトグラフィー (LC) 手法に対する、置き換え可能な類義語です。

GPC/SEC は、ポリマー、生体高分子、タンパク質の重要な分子パラメータを特定するための選択肢です。例えば、多くの分析ラボですぐに利用可能な標準の LC 機器を用いて 1 回注入するだけで、分子量平均と完全な分子量分布を特定できます。

これらの分子パラメータは材料の全体的な特性に影響するため、GPC/SEC は QC でも研究開発でも同様に実行されます。アプリケーションは、化学業界のプラスチック製品、医薬品業界のタンパク質、食品業界の生体高分子など、巨大分子が使用されるあらゆる分野にわたります。

GPC/SEC の 1 つの側面は実際の分析ですが、もう 1 つの側面は結果を正しく理解して解釈することです。経験豊富な科学者でも、長鎖や、所定の分子量ではない分子量平均を処理するのは容易ではありません。

本電子書籍の最初の 2 つのセクションでは、分子量平均の意味と、GPC/SEC の生データから分子量分布を取得する方法を説明します。

3 番目のセクションでは、GPC/SEC のキャリブレーションオプションの詳細と一般的な手法の概要を説明します。

4 ~ 5 番目のセクションでは、GPC/SEC での真度、精度、結果の不確実性について説明します。結果の不確実性を測定することで分析品質が大幅に向上し、サンプル分析結果の比較をより正確に解釈できます。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC の理論と背景について

1.1 分子量平均の詳細

1.2 クロマトグラムから分子量分布まで

1.3 GPC/SEC システムのキャリブレーション方法

1.4 GPC/SE における真度と精度

1.5 結果の不確実性 – 結果の信頼性を高めるには

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC の理論と背景

1.1. 分子量平均の詳細

巨大分子にはなぜ複数の分子量があるのでしょうか？また、それは何を示すのでしょうか？

低分子の有機化合物、タンパク質、DNA とは異なり、巨大分子には確定的な分子量はありません。巨大分子は繰り返し単位数が異なる相同鎖で構成されるため、分子量分布を示します。

巨大分子の分子量は一般的に、 M_n 、 M_w 、 M_z などの統計的分子量平均で示されます。ポリマーを表すには、これらの平均と分子量分布が必要です。

M_w と M_n の比率が、多分散性指数 ($PDI = M_w/M_n$) となります。

分子量平均 M_n 、 M_w 、 M_z を計算するには、所定の分子量のポリマー鎖の数 n を平均化するか ($\rightarrow M_n$)、その質量 w を平均化します ($\rightarrow M_w$)。このため、これらの平均は数平均分子量 (M_n)、重量平均分子量 (M_w)、z 平均分子量 (M_z) (z はドイツ語で「Zentrifuge (遠心分離機)」) と呼ばれます。この平均は、超遠心分離によって測定できます。

$$\bar{M}_n = \frac{\sum M_i \cdot n_i}{\sum n_i}$$

$$\bar{M}_w = \frac{\sum M_i \cdot w_i}{\sum w_i} \quad \text{with } w_i = M_i \cdot n_i \quad \rightarrow \quad \bar{M}_w = \frac{\sum M_i^2 \cdot n_i}{\sum M_i \cdot n_i}$$

$$\bar{M}_z = \frac{\sum M_i^3 \cdot n_i}{\sum M_i^2 \cdot n_i}$$

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC の理論と背景について

1.1 分子量平均の詳細

1.2 クロマトグラムから分子量分布まで

1.3 GPC/SEC システムのキャリブレーション方法

1.4 GPC/SE における真度と精度

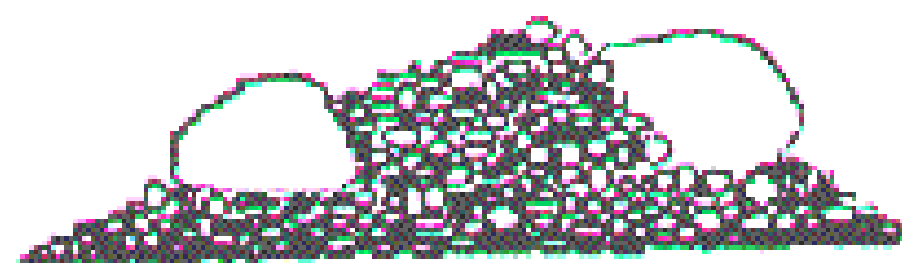
1.5 結果の不確実性 – 結果の信頼性を高めるには

用語集

さまざまな重量の石を例に用いた分子量平均の簡単な説明¹：

事例 1

1 kg の石が 500 個 = 500 kg
250 kg の石が 2 個 = 500 kg
合計 = 1,000 kg



数平均分子量 (M_n):

$$\bar{M}_n = \frac{\sum M_i \cdot n_i}{\sum n_i} = \frac{1 \cdot 500 + 2 \cdot 250}{500 + 2} = 1.99$$

重量平均分子量 (M_w):

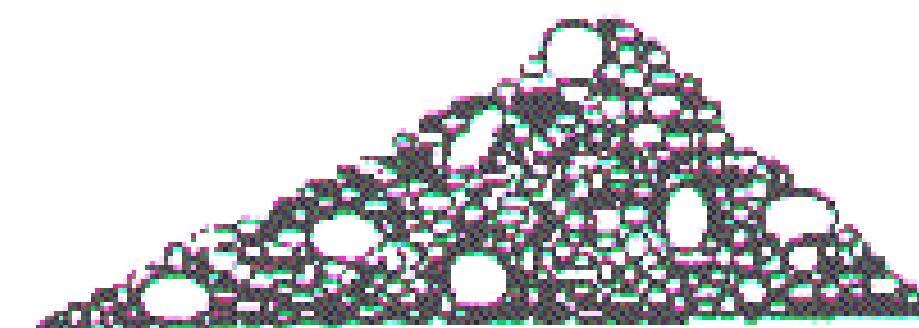
$$\bar{M}_w = \frac{\sum M_i \cdot w_i}{\sum w_i} = \frac{1 \cdot 500 + 250 \cdot 500}{500 + 500} = 125.5$$

多分散性指数 (PDI):

$$PDI = \frac{\bar{M}_w}{\bar{M}_n} = \frac{125.5}{1.99} = 63$$

事例 2

1 kg の石が 400 個 = 400 kg
6 kg の石が 100 個 = 600 kg
合計 = 1,000 kg



数平均分子量 (M_n):

$$\bar{M}_n = \frac{\sum M_i \cdot n_i}{\sum n_i} = \frac{1 \cdot 400 + 6 \cdot 100}{400 + 100} = 2.00$$

重量平均分子量 (M_w):

$$\bar{M}_w = \frac{\sum M_i \cdot w_i}{\sum w_i} = \frac{1 \cdot 400 + 6 \cdot 600}{400 + 600} = 4.00$$

多分散性指数 (PDI):

$$PDI = \frac{\bar{M}_w}{\bar{M}_n} = \frac{4.00}{2.00} = 2.0$$

¹出典：Schlegel, A. Kunststoffe-Plastics (1957), p. 7

M_n 、 M_w 、PDI は、ポリマーの全体的な特性（溶解性、剛性、硬度、粘度など）に関連する重要なパラメータです。ポリマー類の M_w 値は類似していますが、 M_n 値は異なります。ポリマー類の質量分布は異なるため、その特性もさまざまです。このような平均値と分

布の違いは、PDI によって説明できます。分子量分布から分子量平均を測定することはできますが、分子量平均から分子量分布を再構成することはできません。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC の理論と背景について

1.1 分子量平均の詳細

1.2 クロマトグラムから分子量分布まで

1.3 GPC/SEC システムのキャリブレーション方法

1.4 GPC/SE における真度と精度

1.5 結果の不確実性 – 結果の信頼性を高めるには

用語集

図 1 に、 M_w がほぼ同じ 2 種類のサンプルの分子量分布の重ね表示を示します。1 つは PDI が 1.1 未満であるため、分子量分布が「狭い」サンプルと呼ばれます。もう 1 つは PDI が約 2 であるため、通常は分子量分布が「広い」サンプルと見なされます。

図 1 に両サンプルの分子量範囲を示します。低 PDI サンプルでも、分子量範囲は 58,000 ~ 230,000 Da です。分子量分布が広いサンプルの分子量範囲は 4,000 ~ 800,000 Da です。これは、 M_w が 124,000 Da のサンプルに高分子テールが含まれる可能性があることを示します。

また、 M_n と M_w のどちらも最大ピークやピーク分布に割り当てられることはできません。

平均値としての M_w と M_n で、ポリマー全体やその限界を示すことはできません。

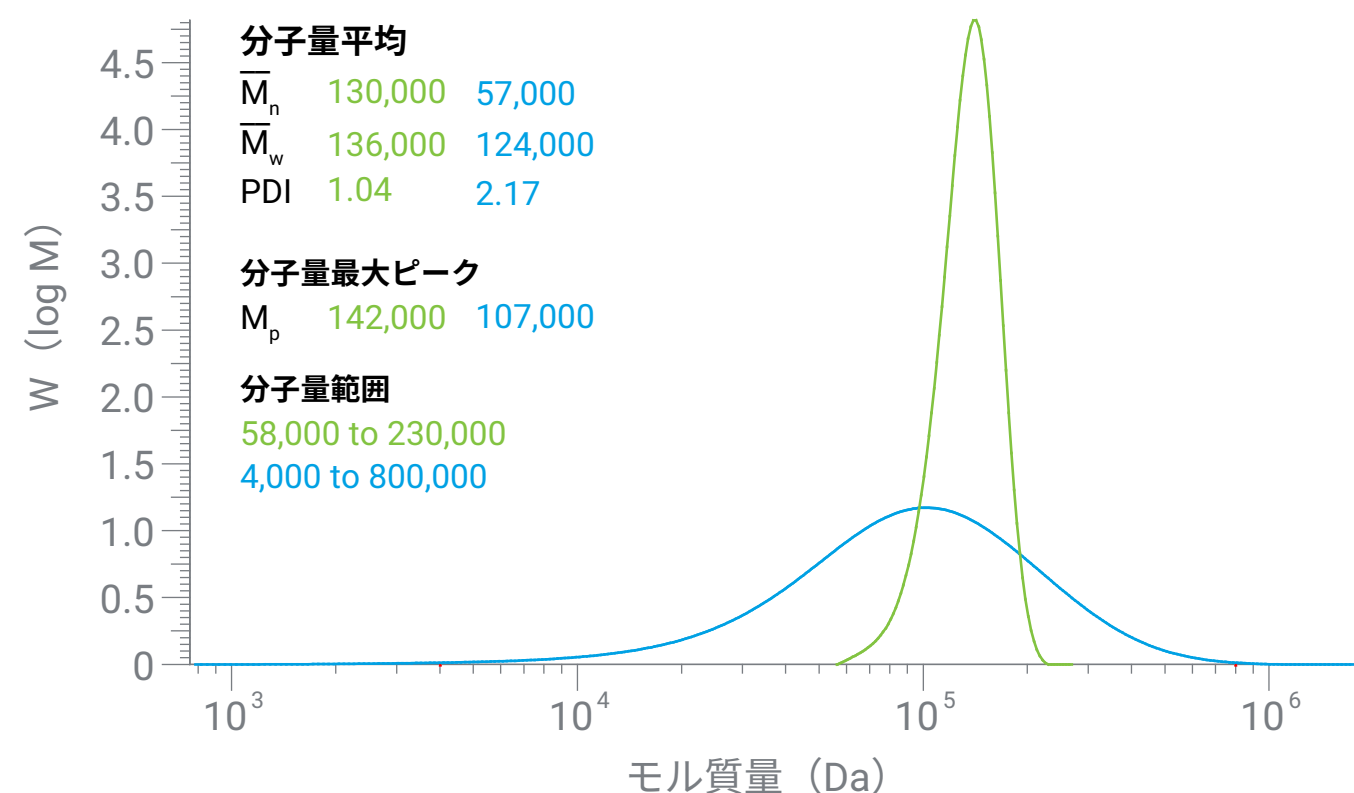


図 1. M_w が類似する、分子量分布が広いサンプルと狭いサンプルの比較。

分子量平均の測定方法

2 つの原理（非分画と分画）に基づいて分子量平均を測定するには、いくつかの特性解析手法があります。手法に応じて、 M_n 、 M_w 、またはその両方を測定できます。

表 1 に、単一の平均値を測定できる非分画手法の概要を示します。

表 1. バルク特性を測定するための手法。

M_n	M_w
浸透圧測定 (膜、蒸気圧)	静的光散乱
凝固点降下法、沸点上昇法	動的光散乱
末端基分析	タービジメトリー
NMR	X 線小角散乱
	中性子小角散乱

分子量分布と両方の平均を測定できる分画手法は少ししかありません。

- GPC/SEC
- 超遠心分離
- 質量分析/MALDI-TOF
- フィールドフロー分画

GPC/SEC は使いやすいため、非常によく使用される手法です。GPC/SEC は、分子量の大きいサンプル（50,000 Da 超、MALDI-TOF のほぼ限界）や分子量分布の広いサンプルなど、幅広い分子量範囲に適用できます。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC の理論と背景について

1.1 分子量平均の詳細

1.2 クロマトグラムから分子量分布まで

1.3 GPC/SEC システムのキャリブレーション方法

1.4 GPC/SE における真度と精度

1.5 結果の不確実性 – 結果の信頼性を高めるには

用語集

信頼性の高い GPC/SEC 測定の要件

溶出

GPC/SEC には完全な溶出が必要です。超遠心分離は、サンプル分離の手段とは見なされていません。ポリマーの分子量はよく過小評価されます。分子量が 124,000 Da と小さく、分子量分布の広いサンプルが、最大 1,000,000 Da の分画を含む可能性は大いにあります。GPC/SEC ユーザーは、サンプル中の高分子量テールの存在を過小評価することは避けるべきです。これが溶出時間に影響して、数時間もかかる場合があります。溶出時間が十分でないと、高分子量分画が完全には溶出せず、分子量平均と PDI が過小になります。

分離能

分離能や排除限界が低いカラムを使用すると、分離が不十分になります。すべての分子量分画を効率的に分離し、GPC/SEC で最高の結果を得るには、分子量範囲の広さに対応する高分離能カラムが必要です。1 つのリニアカラムやミックスベッドカラムを使用するより、さまざまな分子量範囲に対応する複数のシングルポアカラムや同じ種類の複数のミックスベッドカラムの組み合わせを使用することをお勧めします。最適化されたカラムセットにより、ポリマー成分の分離能力が向上します。分子量の影響を受けやすい検出（光散乱、粘度、三重検出など）を適用する場合も、効率的な分離が必要です。

検出

すべてのシステムに 1 台以上の濃度検出器が必要です。示差屈折率 (RI) 検出器は汎用性が高く使いやすいため、UV 検出器や蒸発光散乱検出器 (ELSD) よりもよく使用されます。GPC/SEC は、通常、マルチ検出モードで実行されます。

キャリブレーション

M_w と M_n の値は、クロマトグラムや分子量分布の特定のポイントには関連しません。したがって、これらの値を使用して検量線を作成しないでください。検量線の作成に最適な値は M_p (最大ピークでの分子量) です。 M_p は分子量平均ではなく、特定の分子量です。 M_p は GPC/SEC によってのみ測定でき、すべての GPC/SEC 標準溶液の証明書に記載する必要があります。

Originally published in *The Column*, October **2007**, by author Daniela Held.

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC の理論と背景について

1.1 分子量平均の詳細

1.2 クロマトグラムから分子量分布まで

1.3 GPC/SEC システムのキャリブレーション方法

1.4 GPC/SE における真度と精度

1.5 結果の不確実性 – 結果の信頼性を高めるには

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC の理論と背景

1.2. クロマトグラムから分子量分布まで

巨大分子の全体的な特性の多くは、分子量分布（MMD）から得ることができます。 M_n や M_w などの分子量平均から得られるサンプル情報は限定的ですが、MMD からは完全なサンプル特性を把握できます。2 種類のサンプルの分子量平均が同じでも、分子量分布、すなわち全体的な挙動は大きく異なる場合があります。

GPC/SEC クロマトグラムと MMD の違い

MMD とクロマトグラムの違いは、次の例で簡単に理解できます。

2 つのラボで、同じサンプルを異なる機器に注入します。これらのラボで使用するカラムの数/長さ/内径、チューブ、検出器は異なります。このため、一次情報として得られるクロマトグラムは異なります。追加情報がなくては、これらのクロマトグラムが同じサンプルのものであるかどうかを判定することはできません。クロマトグラムからは、サンプルの 2 つのピークが、分子量分布が狭い（または広い）1 つの種に対応しているかどうかを判断することもできません。高分離能のカラム領域で広いピークが溶出する場合、広く見えるピークの分子量分布は、小さいピークよりも狭い場合があります。

ただし、サンプルが評価され、MMD が比較されれば、ラボ間の比較と分布情報の取得が容易になります。このプロセスにより、実験条件が不要になります。つまり、分子量分布を正しく計算するだけで、サンプルとサンプル特性をラボ間で直接、長期的に比較できます。

クロマトグラムを分子量分布に変換するには

GPC/SEC 測定の一次情報は、サンプル関連パラメータと実験条件のコンボリューションです。これは見かけ上の濃度分布（クロマトグラム、 $h(V)$ ）と呼ばれます。

MMD は、クロマトグラム中のシグナルの高さから、スライス法で計算できます。このようにして、溶出ピークが等距離時間、またはより適切に、ボリュームスライスに分離されます^{1, 2}。

ステップ 1:

まず、GPC/SEC キャリブレーションからの情報を用いて、リテンション軸（X 軸、溶出量）を分子量軸に変更します。分子量/溶出量の間関係を測定するには、いくつかの方法があります。メソッドは実用的観点から、参照物質を使用するメソッド、または静的光散乱検出器により各サンプルのオンライン分子量を測定するシステムに区別できます。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC の理論と背景について

1.1 分子量平均の詳細

1.2 クロマトグラムから分子量分布まで

1.3 GPC/SEC システムのキャリブレーション方法

1.4 GPC/SE における真度と精度

1.5 結果の不確実性 – 結果の信頼性を高めるには

用語集

参照物質を使用する最も一般的な手法は、分子量分布が狭いポリマー参照物質によるシステムのキャリブレーションです³。

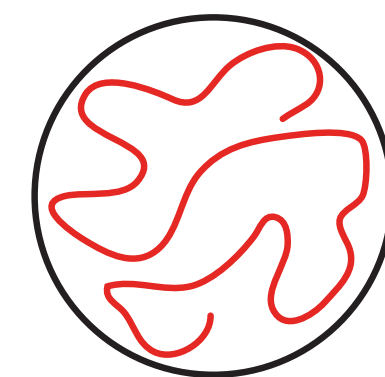
GPC/SEC は分子量ではなく流体力学的体積によって分離するため、検量線とサンプルが化学的/構造的に異なる場合は、(検量線に関連する) 見かけ上の分子量のみが取得されます。分子量平均と分子量分布の偏差は、20 % ~ 100 % の範囲になることがよくあります。それでも各種サンプルの分析結果を相互に比較でき、メソッドの堅牢性が高く使いやすいため、多くのラボはこのような手順を品質管理やサンプル比較、および絶対分子量が不要なアプリケーションに適用しています。

この制限を克服するキャリブレーションメソッドとしては、適合する参照物質や次の手法の使用があります。

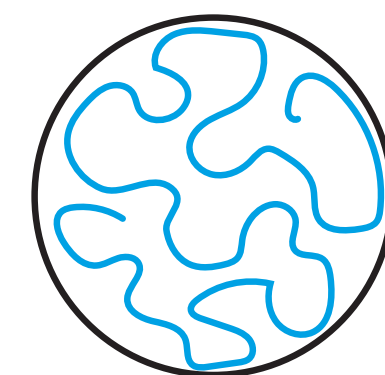
- Mark-Houwink 係数を用いたユニバーサルキャリブレーション
- ブロードスタンダードキャリブレーション⁷
- 累積照合キャリブレーション⁴
- オンライン粘度計によるキャリブレーション⁵

もう 1 つのよく利用される方法は、オンライン静的光散乱検出器 (MALS、RALS、LALS など) を適切なサンプルに使用することです⁶。

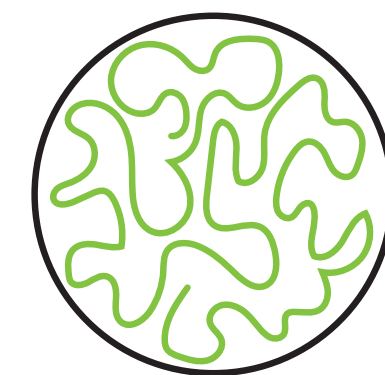
同一溶媒中の異なるポリマータイプ



ポリイソプレン (PI)
M = 15,000 Da



ポリスチレン (PS)
M = 20,000 Da



PMMA
M = 24,000 Da

$V_h(\text{PI}) = V_h(\text{PS}) = V_h(\text{PMMA})$
 $M(\text{PI}) < M(\text{PS}) < M(\text{PMMA})$

図 1. GPC/SEC で流体力学的体積 (V_h) に基づいて分離。すべてのサイズが同じ量で溶出します。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC の理論と背景について

1.1 分子量平均の詳細

1.2 クロマトグラムから分子量分布まで

1.3 GPC/SEC システムのキャリブレーション方法

1.4 GPC/SE における真度と精度

1.5 結果の不確実性 – 結果の信頼性を高めるには

用語集

ステップ 2 :

次に、Y 軸を質量分率 $w(\lg M)$ (1 分子量増分) に変換します。これが必要な理由は、クロマトグラムの検出器シグナルが一定の時間間隔で記録されているためです。ただし、分子量分布には分子量区間の一定の濃度が必要です。

正確な分子量分布を測定するには、正規化されたシグナルの高さ (h_i) を検量線の傾きで補正する必要があります。この補正が不要なのは、分離範囲全体の検量線が完全に直線である場合だけです。これは通常、ほとんどの市販のリニアミックスベッドカラムでは実現できない機能です。一般的な GPC/SEC 近似関数 (3 次近似、3 次多項式、5 次多項式など) を用いて分析結果の真度を上げると、すぐに補正が必要となります。データは時間的に直線的に記録されるのに対して、分子量の変化は直線的でないためです。高さの測定値 (h_i) が同じ場合、エルグラムの高分子量分画でのポリマー鎖の数は、低分子量分画よりずっと少なくなります。

分子量 M の微分分布 $w(M)$ は、 $w(M) = dm/dM$ 、 dM 区間の分子の質量分率 (m) (分子量) として定義されます。

簡単な変換により、 $w(M)$ は測定量、 $h(V)$ 、検出器シグナルと $\sigma(V)$ 、検量線の傾きで表すことができます。

$$w(M) = \frac{h(V)}{M(V)\sigma(V)} ; \sigma(V) = \frac{d \lg M}{dV}$$

分子量平均は、分子量分布のモーメント (μ_i) から計算できます。

数平均分子量 :

$$M_n = \frac{\sum h(M)}{\sum h(M)/M}$$

重量平均分子量 :

$$M_w = \frac{\sum h(M)M}{\sum h(M)}$$

多くの HPLC クロマトグラフィソフトウェアプログラムの GPC ソフトウェアモジュールは、検量線の傾きによる補正を実行しません。この結果、一般的な GPC/SEC キャリブレーションが非直線的になり、あらゆるシステムでの分子量分布が不正確なものになります。結果的に発生するエラーは、サンプルの幅とともに増加し、データ記録頻度とともに減少します。これは、GPC/SEC 結果を FDA や

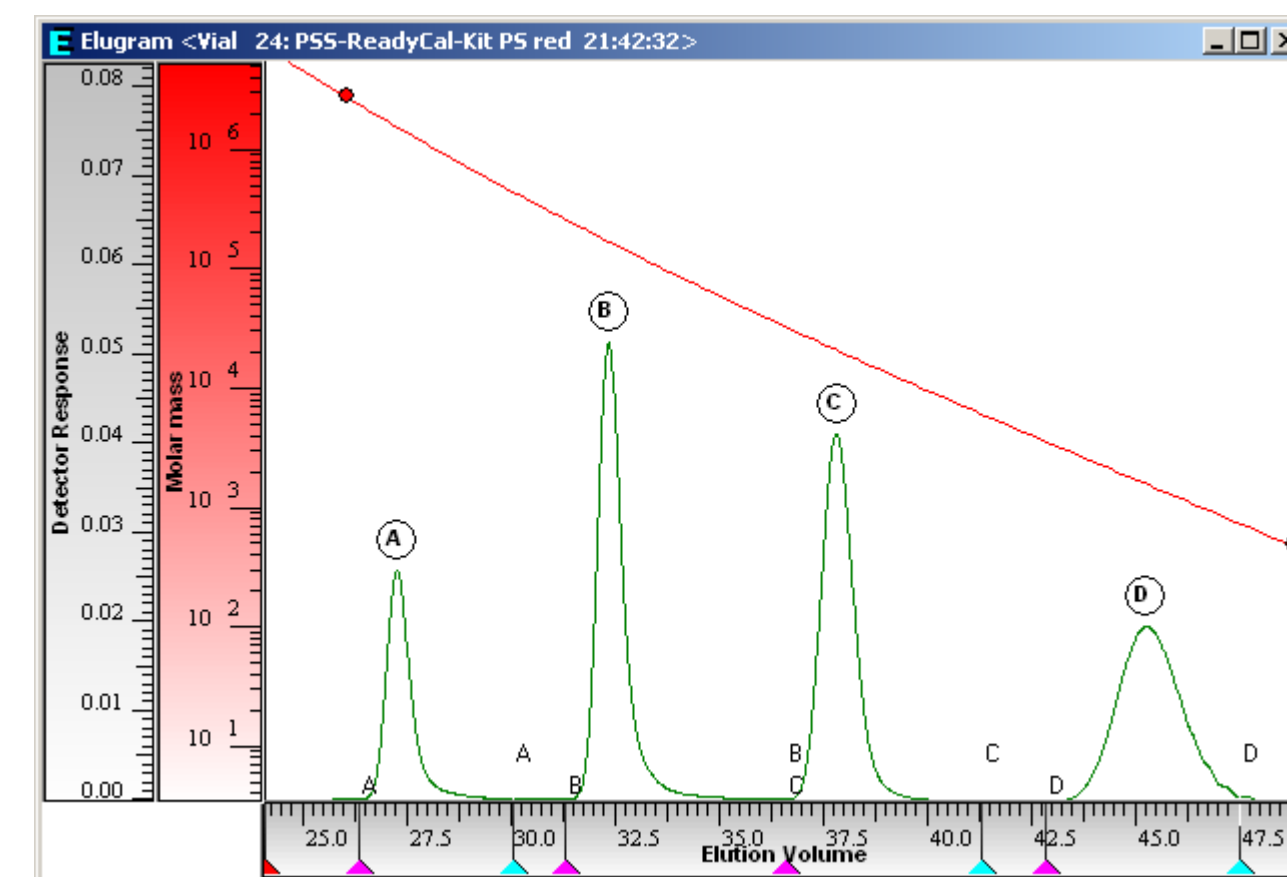


図 2. クロマトグラムが検出器のシグナルの高さ (Y 軸) と溶出量 (X 軸) の関係を示すのに対し、MMD は $w(\log M)$ (Y 軸) と $\log M$ (X 軸) の関係を示します。ピークの形状と幅は、非直線の検量線の傾きに応じて、変換中に変わる可能性があります (赤で表示)。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC の理論と背景について

1.1 分子量平均の詳細

1.2 クロマトグラムから分子量分布まで

1.3 GPC/SEC システムのキャリブレーション方法

1.4 GPC/SE における真度と精度

1.5 結果の不確実性 – 結果の信頼性を高めるには

用語集

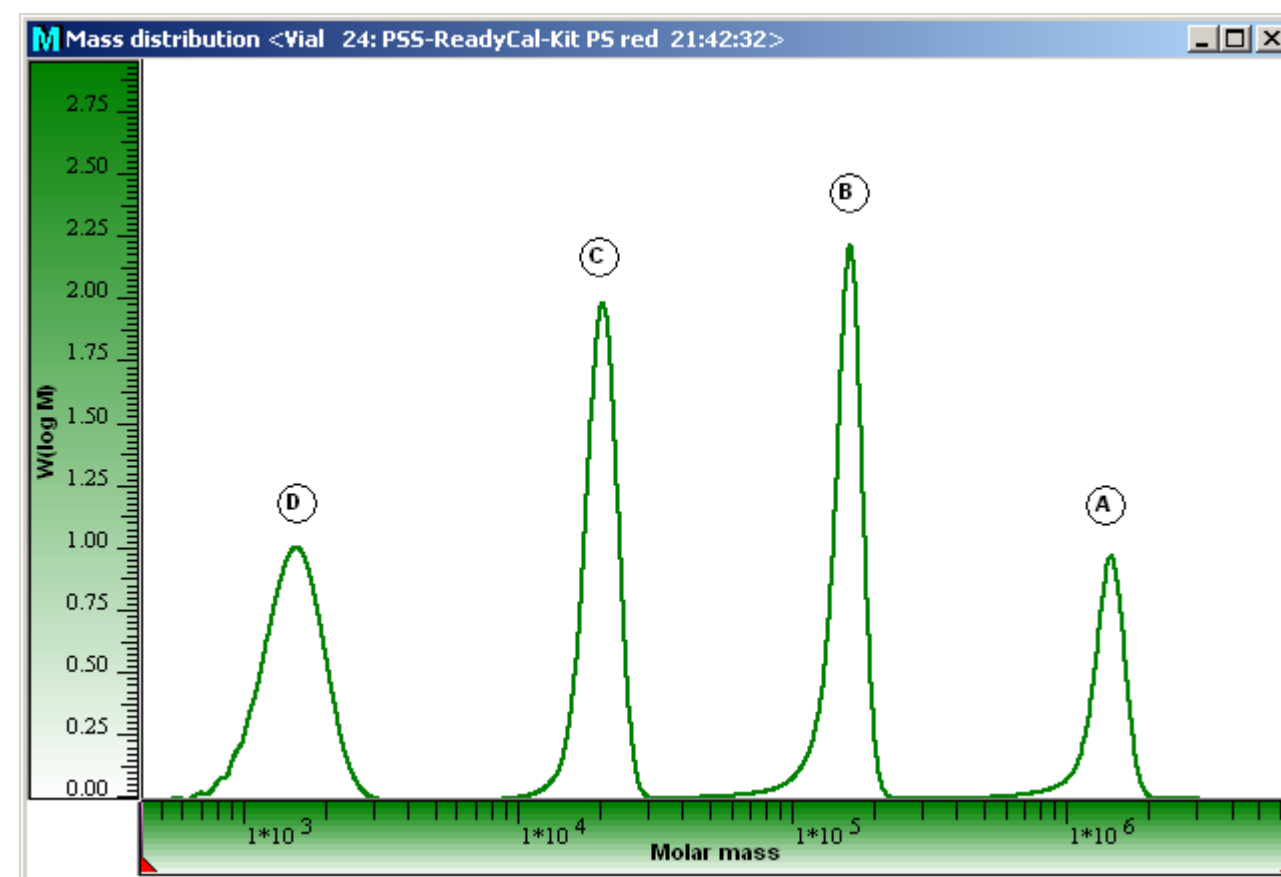


図 3. クロマトグラムと分子量分布の比較。MMD では $w(\log M)$ (Y 軸) と $\log M$ (X 軸) の関係が表示されます。Y 軸にシグナルの高さなどが表示されるグラフは、真の分子量分布を示していないと考えられます。

EMA などの規制機関や REACH への登録用に提出する場合に危険です。

図 4 に、真の MMD と $w(\log M)$ に正しく変換されなかった分子量図の比較を示します。この図から、ピーク位置 (分子量) とピーク幅 (PDI) が異なる可能性があるのがわかります。分子量平均は通常、分布曲線とは別に計算されるため、この現象の影響を受けないこともよくあります。このため、分子量分布から変更されていない情報を取得し、製品仕様の直接比較が可能です。

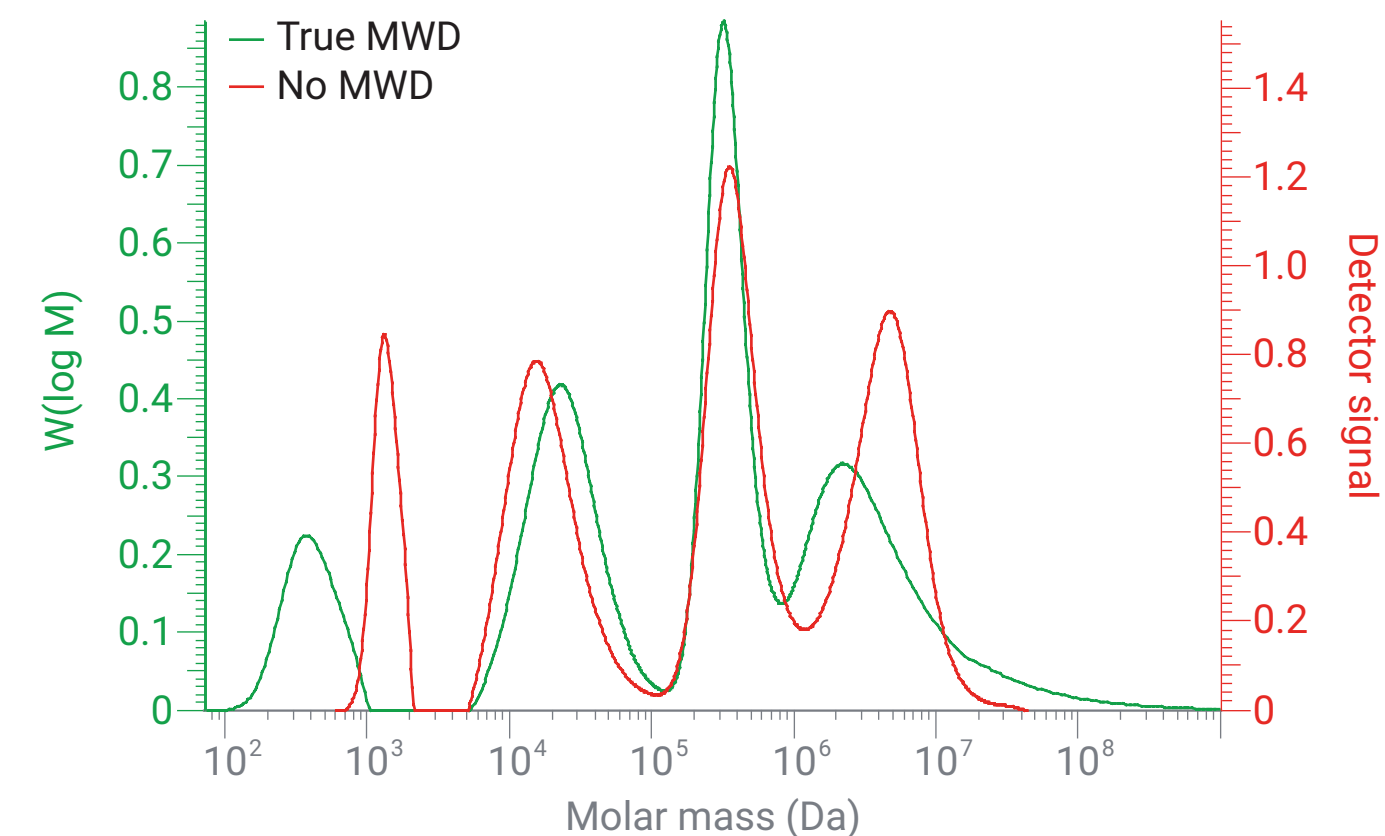


図 4. MMD (緑) と、HPLC ソフトウェアにより不適切に処理された分子量図 (赤) の重ね表示。

分子量分布や分子量図が表示されているかどうかは、簡単な試験でわかります。同じ濃度のポリマー標準混合物を (リニア/ミック スベッドカラム以外の) GPC/SEC カラムに注入し、多項式近似関数 (3 次近似、3 次多項式など) を用いて非直線の分子量キャリブレーションを生成します。標準混合物を分析して、分子量分布図を作成します。ピーク高とピーク幅が変わらない場合は、ソフトウェアが分子量分布を計算していない、単なる分子量を測定したクロマトグラムです (図 2 と比較)。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC の理論と背景について

1.1 分子量平均の詳細

1.2 クロマトグラムから分子量分布まで

1.3 GPC/SEC システムのキャリブレーション方法

1.4 GPC/SE における真度と精度

1.5 結果の不確実性 – 結果の信頼性を高めるには

用語集

参考文献

1. Striegel, A. et al. Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography: Practice of Gel Permeation and Gel Filtration Chromatography. 2nd ed; John Wiley & Sons, **2009**.
2. Schroeder, E.; Mueller, G.; Arndt, K. F. Polymer Characterization; Hanser, **1998**.
3. Held, D. How Do I Calibrate a GPC/SEC System? *The Column* **2008**.
4. Held, D.; Kilz, P. An Alternative to Calibration with Narrow Standards. *The Column* **2013**.
5. Held, D.; Kilz, P. GPC/SEC-Viscometry – a Versatile Tool for Structure Determination and More. *The Column* **2012**.
6. Held, D.; Kilz, P. How to Choose a Static Light Scattering Technique for Molar Mass Determination. *The Column* **2009**.
7. Radke, W.; Held, D. Calibration Using Broad Standards. *The Column* **2015**.

Originally published in *The Column*, August **2007** and December **2014**, by authors Daniela Held and Peter Kilz.

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC の理論と背景について

1.1 分子量平均の詳細

1.2 クロマトグラムから分子量分布まで

1.3 GPC/SEC システムのキャリブレーション方法

1.4 GPC/SE における真度と精度

1.5 結果の不確実性 – 結果の信頼性を高めるには

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC の理論と背景

1.3. GPC/SEC システムのキャリブレーション方法

GPC/SEC は、ポリマーの分子量平均と分子量分布 (MMD) を測定して特性解析するためのメソッドの一種です。この使いやすい手法は、標準の LC 機器で、適切な高分離能 GPC/SEC カラムと、データ取り込み/分析専用の GPC/SEC ソフトウェアを使用して実行できます。

GPC/SEC でキャリブレーションが必要な理由

標準的な GPC/SEC 検出器 (UV、ELSD、RI) で取得される一次情報は分子量ではなく、特定の溶出量での見かけ上の濃度です。すべての分子量平均と MMD を計算するには、検量線と濃度検出器からの濃度プロファイルが必要です^{1, 2}。このため GPC/SEC は相対的手法と見なされています。カラムのキャリブレーションは、分子量への溶出量の割り当てに基づいています。これは、濃度をキャリブレーションして検出器レスポンス (シグナル強度、ピーク面積) に割り当てる HPLC 方式とは反対です。

GPC/SEC 検量線の一般的な特性

GPC/SEC 検量線では、溶出量に対して分子量の対数がプロットされます。ほとんどの検量線 (リニアカラムやミックスベッドカラムの検量線を含む) は S 字状であり、これは基本的な分離特性と一致します。これは、ピーク面積と濃度の関係をプロットすることで直線の検量線が作成される、クロマトグラフィーの他のキャリブレーションとは対照的です。

GPC/SEC 検量線は、図 1 に示すように 3 つの領域に分けられます。領域 1 は、サイズの大きいポリマー種の不十分な分離が起こっている領域です。ポアが小さすぎるため、これらのポリマー種を流体力学的体積に基づいて分離することはできません。この領域はカラムセットの排除限界と呼ばれます。ここでは、大きい種はサイズにかかわらず同じ量で溶出します。領域 2 はカラムセットの最適な分離範囲です。ポリマーは溶液中のサイズに基づいて分離されます。大きい分画が最初に溶出し、次に流体力学的体積が小さい分画が高溶出量で溶出します。領域 3 (浸透限界量) では、一時的な相互作用により分離速度が低下します。溶出量の測定値は、ポリマーの分子量だけでなく、その溶液構造や化学的性質にも関連します。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC の理論と背景について

1.1 分子量平均の詳細

1.2 クロマトグラムから分子量分布まで

1.3 GPC/SEC システムのキャリブレーション方法

1.4 GPC/SE における真度と精度

1.5 結果の不確実性 – 結果の信頼性を高めるには

用語集

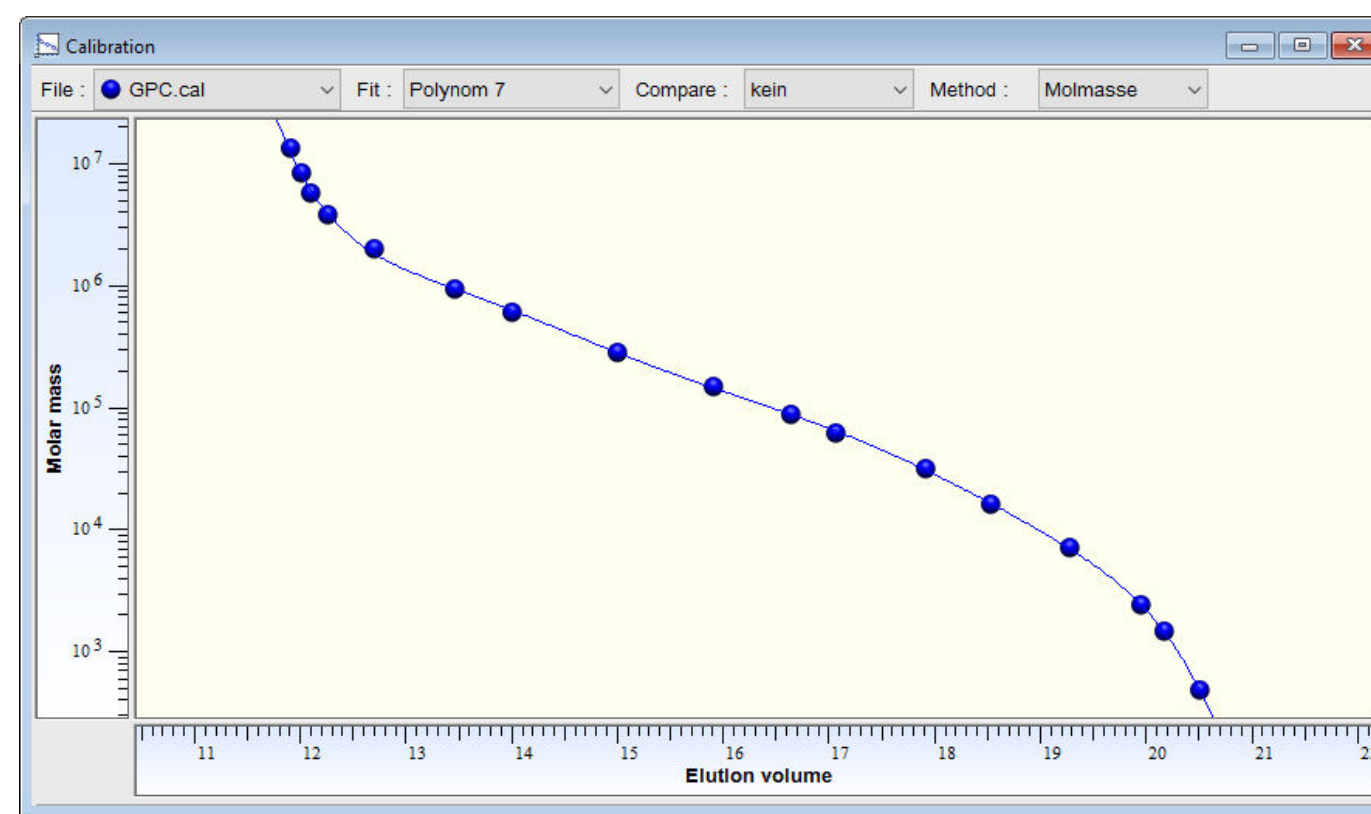


図 1. 一般的な GPC/SEC 検量線と 3 つの異なる領域。キャリブレーション用の推奨サンプル濃度は、分子量によって異なります (Y 軸に表示)。

GPC/SEC 検量線の作成方法

検量線の作成方法はいくつかあります。表 1 に、各種メソッドの概要、およびその利点と欠点を示します。表 1 のメソッドはすべて、分子量標準溶液の使用に基づくものです。

最も汎用的なキャリブレーション用メソッドでは、分子量分布の狭い標準を使用します。標準ピークの溶出量は最大ピークで測定され、その分子量の対数に対してプロットされます。GPC/SEC を適切に実行するには、分子量ディケードあたり 3 種類以上の標準が推奨されています⁴。GPC/SEC で正確な結果を得るのに濃度は不要ですが、適切な濃度の分子量分布の狭い標準を注入することが重要です⁵。図 1 は、標準の分子量に依存する推奨濃度範囲 (Y 軸) も示しています。

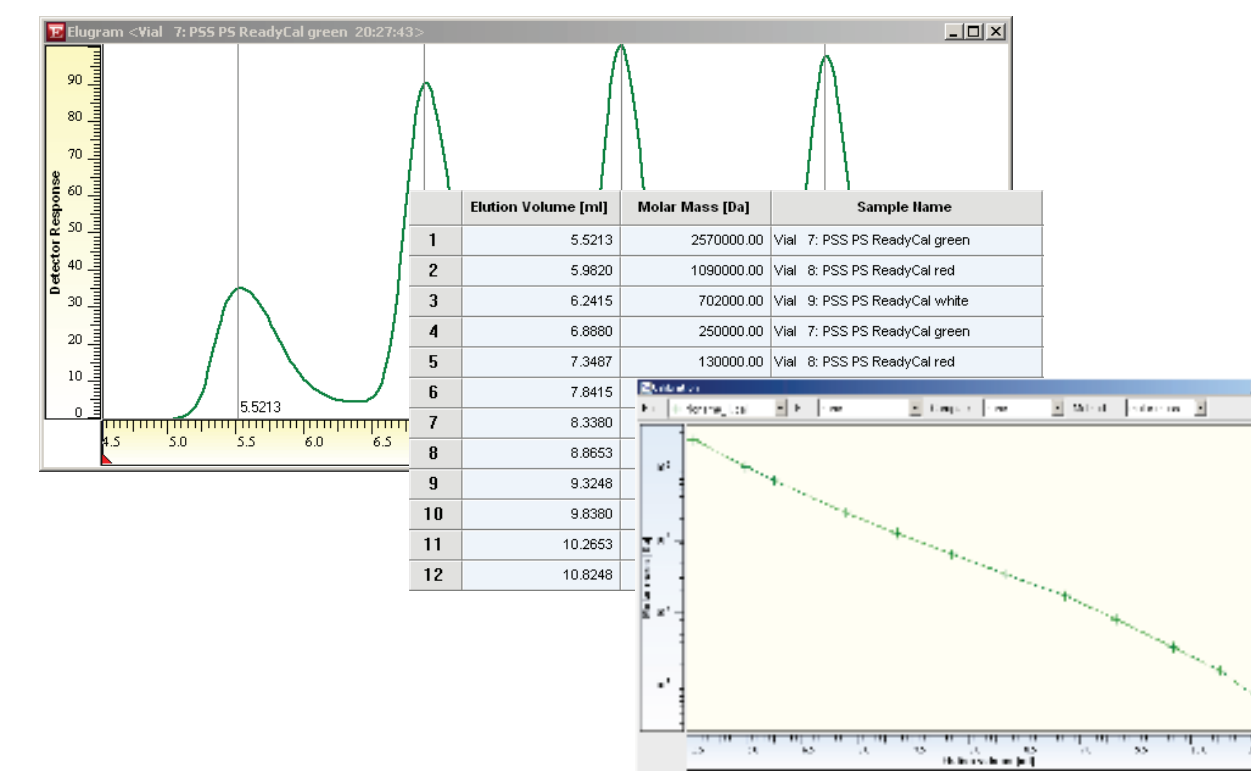


図 2. 分子量分布が狭い標準によるキャリブレーション

溶出量を測定し、これを分子量 (通常はピーク分子量²) の対数に対してプロットしたら、検量線の形状を示す近似関数を選択する必要があります。特定のカラムセット用の最適な近似関数についての推奨事項はないため、複数の要素に基づいて適切な近似関数を選択する必要があります。

近似関数は通常、直線にはなりません。これらの近似は、標準の多項式関数 (3 ~ 7 次) に基づいて計算されます。陥りやすい一般的な誤りを回避するために変更された多項式関数に基づく近似関数もあります (キャリブレーション関数)。

分子量と溶出量の関係を測定するもう 1 つの方法は、濃度検出器 (RI、UV、ELSD) とオンライン光散乱検出器 (LALS、RALS、MALS。ただし ELSD は不可) を組み合わせることです。1 つの標準で、光散乱検出器定数 (キャリブレーション定数) と濃度検出器

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC の理論と背景について

1.1 分子量平均の詳細

1.2 クロマトグラムから分子量分布まで

1.3 GPC/SEC システムのキャリブレーション方法

1.4 GPC/SE における真度と精度

1.5 結果の不確実性 – 結果の信頼性を高めるには

用語集

表 1. GPC/SEC キャリブレーションメソッドとその利点/欠点

キャリブレーション方法	利点	欠点
分子量分布が狭い GPC/SEC 標準	<ul style="list-style-type: none">- 簡単でわかりやすい- 高精度メソッド³- 構造的/化学的特性が同じサンプルと標準に適した高真度メソッド³- すべてのキャリブラントの平均偏差に基づく真度	<ul style="list-style-type: none">- 正確な結果を得られるのは構造的/化学的特性が同じ化合物のみ- 分子量分布が狭い標準は、一部の種類のポリマーにしか使用できない
十分に特性解析された分子量分布の広い標準	<ul style="list-style-type: none">- 簡単で正確- 内部標準として分析条件の内部参照に最適	<ul style="list-style-type: none">- 正確なキャリブレーションが可能なのは構造的/化学的特性が同じ化合物のみ- 市販されている標準の量が限られる- 分子量分布が広い 1 つの標準では、限定的な分子量範囲にしか対応できない- このメソッドを適用できないソフトウェアがある
積分キャリブレーション/ 累積キャリブレーション	<ul style="list-style-type: none">- 簡単で正確- 正確なキャリブレーションが可能なのは構造的/化学的特性が同じ化合物	<ul style="list-style-type: none">- 市販されている標準の量が限られる- 標準の品質により真度が限定される- 高/低分子量領域で真度が低下する（外挿が必要）
分子量分布が狭い標準と Mark-Houwink 係数 (ユニバーサルキャリブレーション I)	<ul style="list-style-type: none">- 簡単で正確- 各種ポリマーの一致する検量線を 1 つの検量線から作成できる	<ul style="list-style-type: none">- キャリブレーションの精度は高いが、真度が高いのは特定の種類のポリマーのみである- 精度が Mark-Houwink 係数の真度に依存する
分子分布範囲が狭い標準と追加の オンライン粘度計による検出 (ユニバーサルキャリブレーション II)	<ul style="list-style-type: none">- 簡単で正確- 1 つの検量線をすべての種類のポリマーに使用できる	<ul style="list-style-type: none">- 実験の複雑さが増し、コストが増大- 濃度への依存、バンドの広がり、検出器間の遅延により実験エラーが増える

定数（レスポンス係数）が測定されます。定数に基づいて、真の分子量平均が計算されます。この結果作成される検量線は、分子量プロットを反映しています。光散乱ソフトウェアではよく、生データではなく近似データが表示されます。スムーズな分子量プロットのために、近似を適用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 の理論と背景について

1.1 分子量平均の詳細

1.2 クロマトグラムから分子量分布まで

1.3 GPC/SEC システムのキャリブレーション方法

1.4 GPC/SE における真度と精度

1.5 結果の不確実性 – 結果の信頼性を高めるには

用語集

最適な GPC/SEC キャリブレーション近似が選択されているかどうかを判断する方法

適切な関数が選択されているかどうかを判断するための要素は、次の3つです。

- 回帰係数、 R^2
- 近似値からのキャリブレーションポイントの偏差 (平均偏差)
- 検量線の傾き

表 2 にこれらの選択肢を示します。近似関数が異なる同じキャリブレーションデータの回帰係数と、すべてのデータポイントの平均偏差が表示されています。最適なキャリブレーション近似関数を選択する際に、回帰係数は検討すべき最適なパラメータではありません。回帰係数がほぼ 1 であっても、平均偏差が大きいためです。データ処理ソフトウェアの近似関数の選択条件として回帰係数しかない場合は、超高精度な GPC/SEC 結果で 0.999 を上回る値を達成する必要があります。

表 2. キャリブレーション近似関数が回帰係数に与える影響

近似関数	R^2	平均偏差 (%)
直線 (2 乗)	0.9925	30.2
3 次多項式 (3 乗)	0.9986	10.4
5 次多項式	0.9995	7.35
7 次多項式*	0.9999	3.57
PSS 7 次多項式	0.9998	4.92

* 1 次導関数は間欠的です。この関数は使用しないでください。

表 2 の結果から、次数の大きい多項式関数を選択すると、回帰係数が大きくなり、平均偏差が小さくなることもわかります。ただし、平均偏差が最も小さくなる、次数が最も大きい関数を使用することは推奨しません。平均偏差を小さくすることより、検量線の形状のほう重要です。一般的にこれが分離メカニズムと一致するためです。このため、検量線の 1 次導関数 (傾き) を使用することが適切です。

図 4 に、検量線に最適な 1 次導関数を示します。傾きは排除限界と浸透限界量の近くでのみ変化し、最適な分離範囲では一定です。7 次多項式近似関数を選択すると (図 3 を参照)、傾きが一定でなくなり、局所的な最小値と最大値が現れます。したがって、この近似関数の使用は避けるべきです。サンプル特性に関連しない、不自然な結果 (MMD のショルダーなど) が導かれる可能性があるためです⁵。

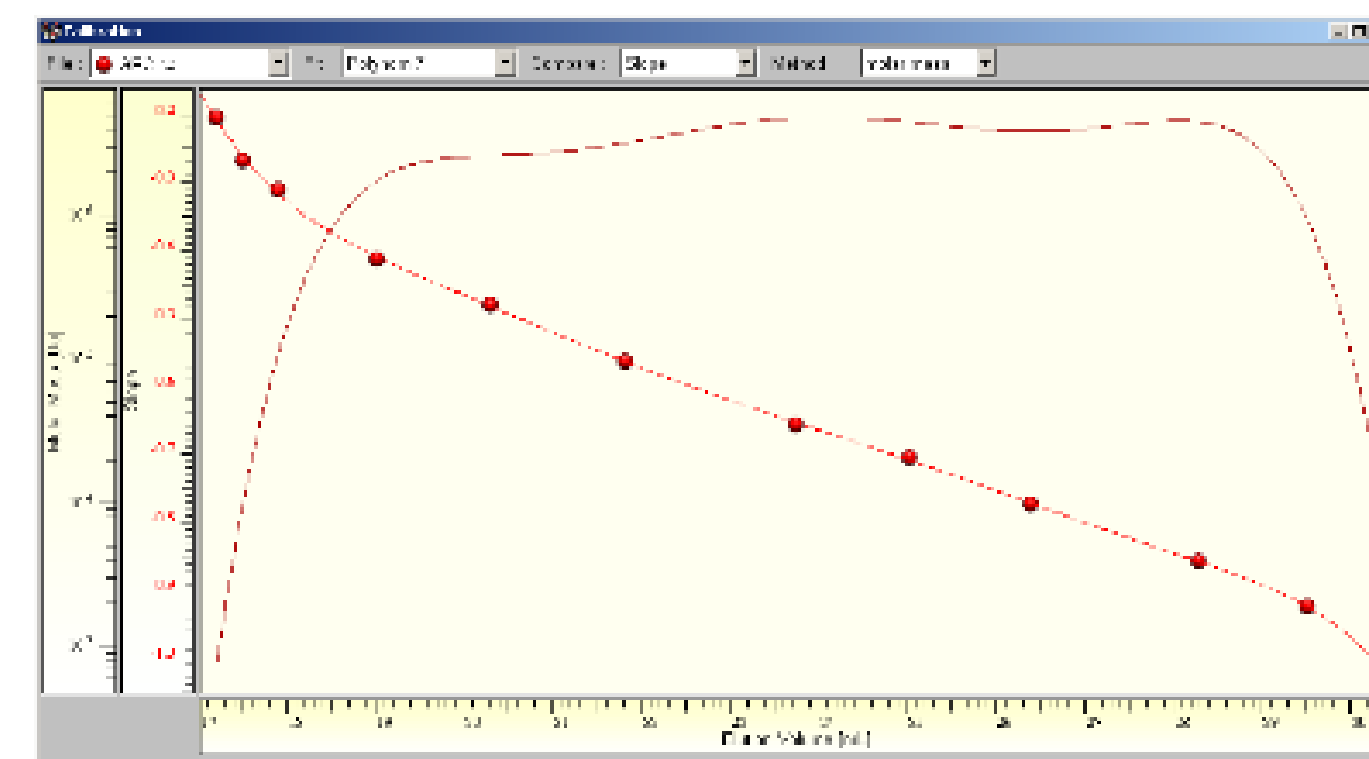


図 3. 7 次多項式近似関数による検量線。1 次導関数が局所的に誤った最大値と最小値を示しています。この関数は適切ではありません。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC の理論と背景について

1.1 分子量平均の詳細

1.2 クロマトグラムから分子量分布まで

1.3 GPC/SEC システムのキャリブレーション方法

1.4 GPC/SE における真度と精度

1.5 結果の不確実性 – 結果の信頼性を高めるには

用語集

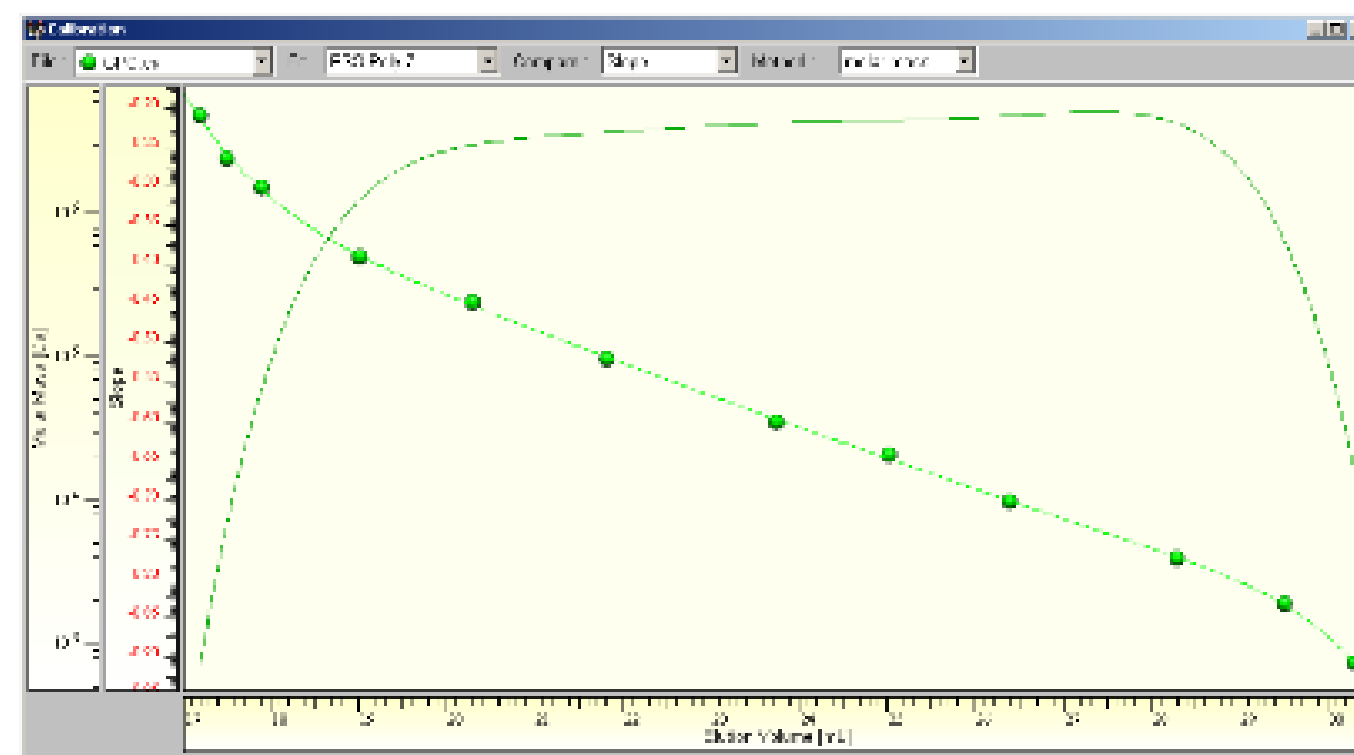


図 4. PSS 近似関数の 7 次多項式による検量線：最大値と最小値の問題が解消されているので、この関数は推奨されます。選択した近似関数を使用できます。

適切な再キャリブレーションの頻度

頻度は状況に応じて異なります。多くの分析ラボは、サンプル分析の前後にカラムセットのキャリブレーションを実施しています。これは、サンプル分析後にもカラムが適切に分離していることを確認する簡単な方法です。最新の GPC/SEC ソフトウェアを使用すれば、この品質確認作業の時間と手間を大幅に削減できます。このソフトウェアとオートサンプライアルの便利な使い捨てキャリブレーションセット (EasiVial/ReadyCal キットなど。溶媒を添加するだけで使用可能) を組み合わせることで、自動キャリブレーション/再キャリブレーションルーチンを実行できます。

もう 1 つの方法は、サンプルシーケンスごとにサンプルバリデーションを実行することです。バリデーションサンプルの結果が所定の範囲内であれば、再キャリブレーションは不要です。キャリブラントとサンプルを別の時間に分析する場合は、長期的な再現性を確保するために、内部フローマーカー / 標準を使用することをお勧めしま

す。これはクロマトグラムの最後に溶出している低分子量化合物です⁶。キャリブレーションとサンプルの分析がこの内部参照物質と相互に関連付けられると、非常に高い真度と精度を容易に達成できます。

同じカラムでさまざまなサンプルを分析する場合や、サンプルの純度が疑わしい場合（製造工程でサンプルに低分子不純物が混入している可能性があるなど）は、再キャリブレーションの頻度を上げることをお勧めします。

参考文献

1. Held, D. The Importance of Molar Mass Distributions. *The Column* **2007**.
2. Held, D. Reinhold, G. A Look at the Importance of Molar Mass Averages. *The Column* **2007**.
3. Gores, F.; Kilz, P. Accuracy and Precision in GPC/SEC. *The Column* **2008**.
4. International Organization for Standardization. Gel Permeation Chromatography (GPC) Part 1: Tetrahydrofuran (THF) as Eluent; ISO EN 13885.
5. Kilz, P.; Held, D. Qualification of GPC/GFC/SEC Data and Results in Quantification in LC and GC - a Practical Guide to Good Chromatography Data, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.
6. Held, D.; Radke, W. Flow Marker - An Easy Concept to Increase Reproducibility. *The Column* **2016**.

Originally published in *The Column*, June **2008**, by author Daniela Held.

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC の理論と背景について

1.1 分子量平均の詳細

1.2 クロマトグラムから分子量分布まで

1.3 GPC/SEC システムのキャリブレーション方法

1.4 GPC/SEC における真度と精度

1.5 結果の不確実性 – 結果の信頼性を高めるには

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC の理論と背景

1.4. GPC/SEC における真度と精度

どの分析手法でも、さまざまな要因により真度が低下する可能性があります。結果を正しく解釈するには、分析手法の本来の精度と真度を把握しておくことが重要です。さらに、シンプルなツールや適切な実験システムにより、これらの要素がどのように影響を受け、改善されるかを知っておく必要があります。

ツールの検討に入る前に知っておくべき、上記の要素の一般的な定義：

- 分析手順の真度とは、許容値（取り決めによる（真の）値、または一般的に許容される参照値）と実際の値が、どの程度一致するかということです。
- 分析手順の精度とは、同じ条件下での同じ均質なサンプルの複数回のサンプルリングから得た一連の測定結果間の、一致の近接性（散乱度）です。

より詳しく言うと、精度には短期的精度と長期的精度があります。

- 反復性とは、複数回のサンプル測定結果の、短期的なラボ間の実験のばらつきです。
- 室内再現精度とは、長期的なラボ間のばらつきです。

もう 1 つの重要な用語は再現性です。これはラボ間の偏差によって評価されます。

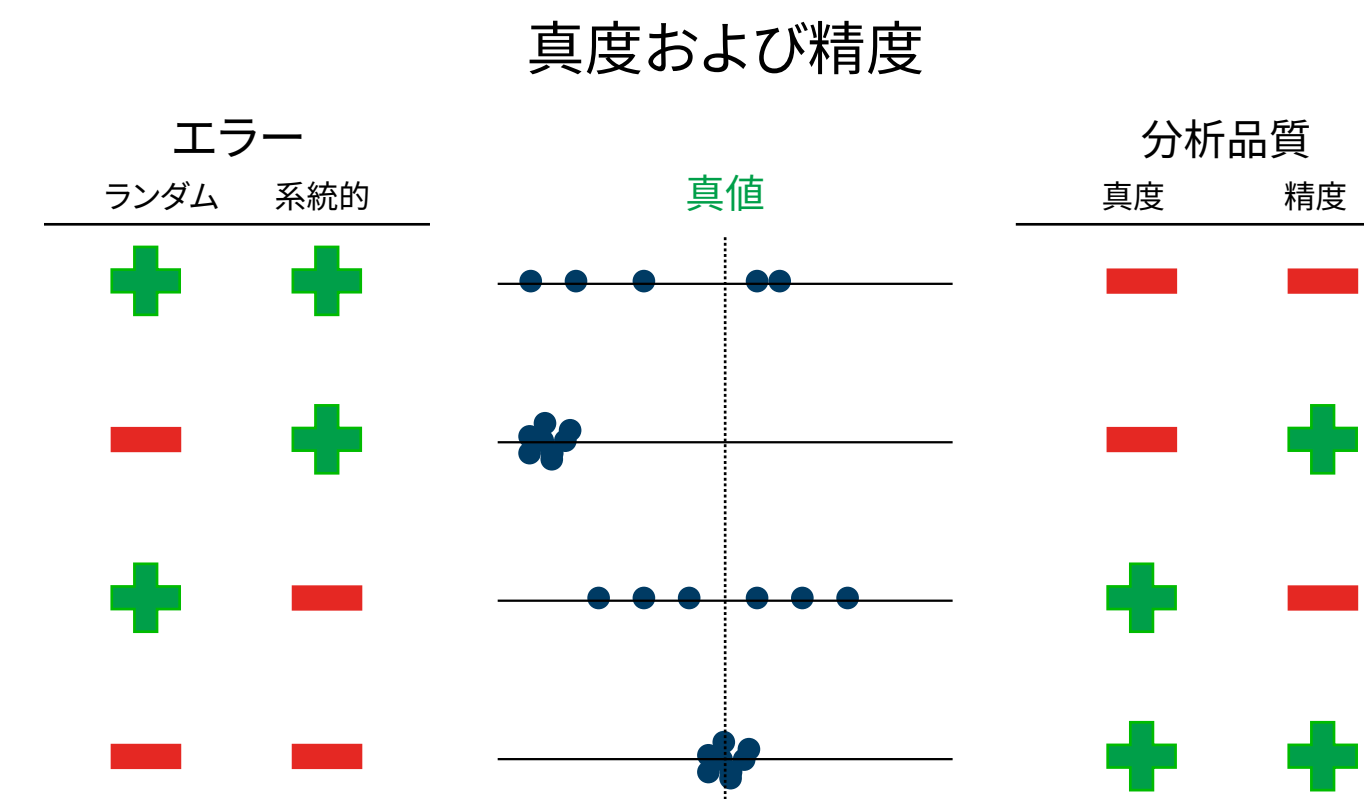


図 1. 真度と精度の違い

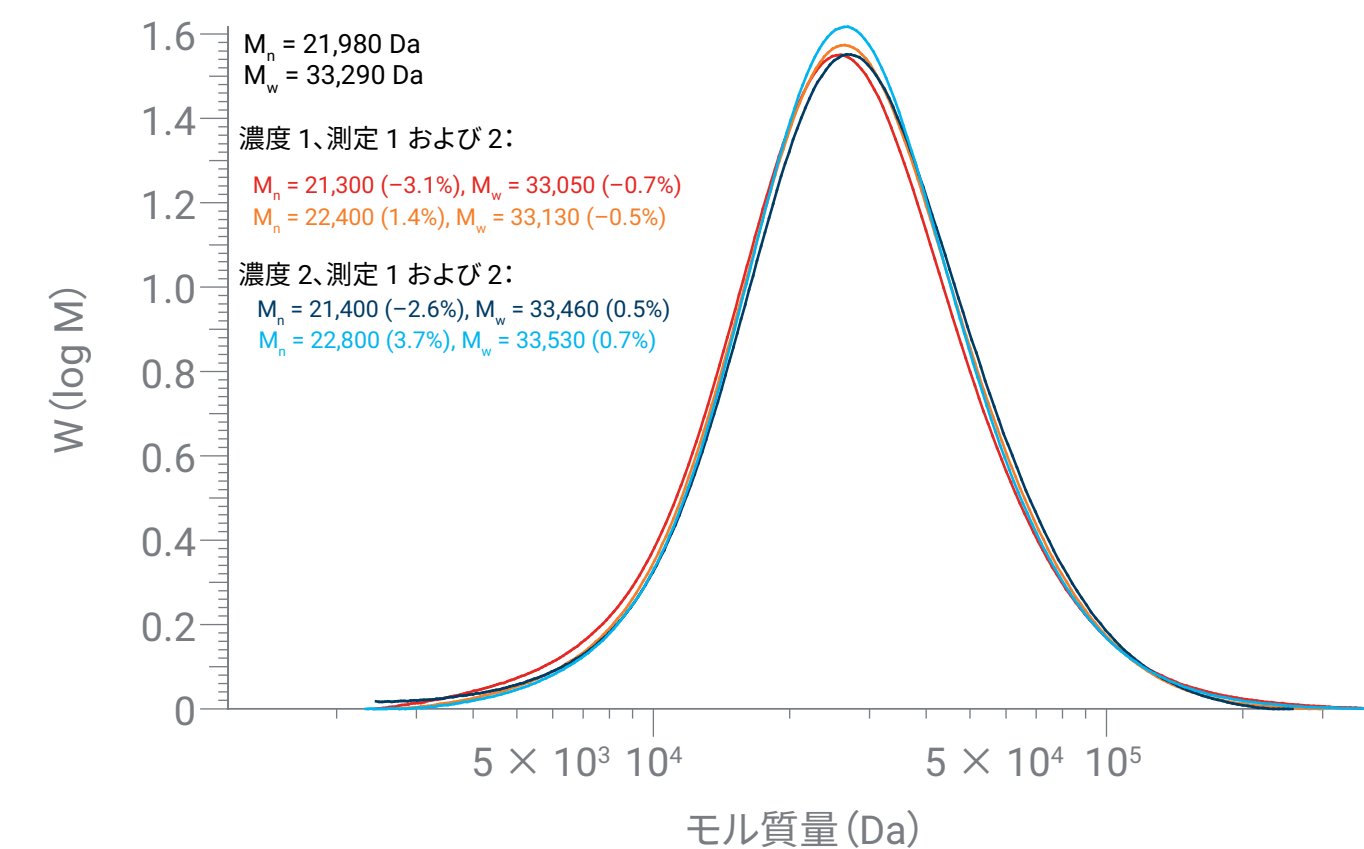


図 2. 水性 GPC/SEC 分析の反復性 (2 種類の濃度、2 回注入)

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC の理論と背景について

1.1 分子量平均の詳細

1.2 クロマトグラムから分子量分布まで

1.3 GPC/SEC システムのキャリブレーション方法

1.4 GPC/SE における真度と精度

1.5 結果の不確実性 – 結果の信頼性を高めるには

用語集

GPC/SEC の真度

GPC/SEC は相対的メソッドであり、標準溶液が分析対象サンプルの化学組成と一致する場合にのみ、取得した分子量が正確であることを確認できます。

GPC/SEC 用の規格 (ISO 13885 など) では真度の参照値を定めていませんが、多くの分析ラボでは、 M_w で 5 % 未満、 M_n で 10 ~ 15 % を真度の許容範囲外としています。この値はサンプルの複雑さに応じて異なります。一致する標準溶液がない場合は、偏差が 100 % になることもあります。

多くの GPC/SEC ユーザーは、製品/製品比較の品質管理が必要な場合などには、反復可能で正確な測定のみを重視しています。ただし、真の分子量の正確な結果が必要な場合は、一致する標準溶液がないという制限を克服するためのオプションがいくつかあります。

- Mark-Houwink 係数によるユニバーサルキャリブレーション
- 広範囲なキャリブレーション
- 積分キャリブレーション
- 分子量測定が可能な検出器 (オンライン粘度計や光散乱検出器など) の使用

いずれのオプションでも、参照値は必要です。未知のサンプルの結果の真度は、参照値の真度に大きく依存します。これは、(通常は絶対メソッドと見なされている) 光散乱検出による GPC/SEC 分析でも同じです。ここでは、評価のパラメータと定数の真度も結果の真度に影響します。

真度を最大限に高めるには、システムの慎重なキャリブレーションと精度の高い評価が必要です。GPC/SEC の国内/国際ガイドライン (ISO EN 13885 など)¹では、分離ベースラインと積分限界、および適切なキャリブレーション手順を含む、貴重な情報と正しい評価の説明を提供しています。機器については、流量精度の高いポンプと感度の高い検出器が必要です。使用するカラムは状態が良く、サンプルで予想される分子量範囲に適している必要があります。カラムセット (ポア特性が異なるカラムの組み合わせ) を使用すると分離能と効率が上がるため、シングル (リニアまたはミックスベッド) カラムより結果の真度が向上します。

GPC/SEC の精度

精度は短期的な精度 (反復性) と長期的な精度 (室内再現精度) に分けられます。表 1 に、いくつかのラウンドロビン試験の反復性とラボ間の再現性の結果を示します。これらの結果は、分子量分布が広い複雑なサンプルから取得しました。

表 1. 代表的な溶媒の精度と再現性

	THF 精度/反復性	DMA	H ₂ O	THF 再現性	DMA	H ₂ O
M_n	3 %	2 %	2 %	15 %	15 %	15 %
M_w	2 %	2 %	2 %	10 %	15 %	15 %
M_z	3 %	3 %	3 %	15 %	24 %	24 %
M_n/M_w	3 %	3 %	3 %	15 %	24 %	24 %

反復性は、メソッドバリデーションの重要な要素です。標準化された計算アルゴリズムを使用すると、反復性を上げることができます。特に分布が広く、低分子種とオリゴマーの量が多いサンプルが調査

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC の理論と背景について

1.1 分子量平均の詳細

1.2 クロマトグラムから分子量分布まで

1.3 GPC/SEC システムのキャリブレーション方法

1.4 GPC/SE における真度と精度

1.5 結果の不確実性 – 結果の信頼性を高めるには

用語集

対象である場合は、分離ベースラインと積分限界により、反復性が向上します⁴。低分子量の内部標準をフローマーカーとして使用することも推奨します^{2, 5}。

室内再現精度に影響する一般的な差異としては、日数、機器、オペレータの違いなどがあります。分離カラムも重要な役割を果たします。相互作用がなく、サイズに基づいて分離できる、適切なカラム材料を使用することが重要です³。不適切な材料の使用、カラムメーカーによるわずかな調製方法の変更、別のバッチから作成した新しいカラムなどにより、さまざまな相互作用が発生する可能性があります。これにより系統的偏差が発生するため、室内再現精度が低下します。

システム設定、サンプル前処理、キャリブレーション、データ処理のための厳格なワークフローを確立することで、室内再現精度が向上する可能性があります。製品グループごとにカラムセットを割り当て、同じカラムで別のアプリケーションを実行しないことを推奨します。反応基（イソシアネート、アミン、ポリオールなど）を含むサンプルを分析する場合は、この方法を検討する必要があります。高分子電解質（ポリアニオン、ポリカチオンなど）を用いる水性アプリケーションでは、充填剤表面との相互作用が発生する可能性があります。(医薬品アプリケーションのような) 厳格な品質管理により、カラムバッチの備蓄による潜在的な問題を解消できる可能性があります。

表 1 に、再現性の一般的な偏差を示します。その他の重要なアプリケーション、例えば高分子電解質での GPC/SEC や光散乱カップリングの GPC/SEC では、偏差が大きくなる可能性があります。ただし、同じ装置と同じデータ解析ソフトウェアを使用することで、偏差を大幅に減らすことができます。カラムセットは、同じ充填剤バッチから、同じ標準溶液とフィットを用いて製造する必要があります。こうすることで、再現性偏差を反復性の範囲内に収めることができます。

参考文献

1. International Organization for Standardization. Gel Permeation Chromatography (GPC) — Part 1: Tetrahydrofuran (THF) as Eluent; ISO EN 13885.
2. Kilz, P.; Held, D. Qualification of GPC/GFC/SEC Data and Results in Quantification in LC and GC - a Practical Guide to Good Chromatography Data. Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.
3. Hofe, T.; Reinhold, G. How to Find the Ideal Stationary GPC/SEC Separation Phase. *The Column* **2007**.
4. Held, D. GPC/SEC Do's and Don'ts for Data Analysis. *The Column* **2013**.
5. Held, D.; Radke, W. Flow Marker - An Easy Concept to Increase Reproducibility. *The Column* **2016**.

Originally published in *The Column*, February **2008**, by authors P. Kilz and F. Gores.

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC の理論と背景について

1.1 分子量平均の詳細

1.2 クロマトグラムから分子量分布まで

1.3 GPC/SEC システムのキャリブレーション方法

1.4 GPC/SE における真度と精度

1.5 結果の不確実性 – 結果の信頼性を高めるには

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC の理論と背景

1.5. 結果の不確実性 – 結果の信頼性を高めるには

GPC/SEC 結果とその妥当性は、製品リリースのための QC/QA 試験、ポリマーベース製品の登録と認定、FDA や REACH などの規制機関での定式化など、多くのアプリケーションにおいて非常に重要です。GPC/SEC 結果の真度と精度は、これに関する重要な要素です。

結果の不確実性を測定することで、メソッド開発およびバリデーション中の許容基準を選択できます。これにより、バリデーション済みメソッドの許容範囲外になった場合に、作業時間や高いコストをかける必要がなくなります。

結果の不確実性の意味

多くの方法論的側面や実験の詳細が、分析実験の結果と品質に影響する可能性があります¹。さまざまな系統的/ランダムな寄与が、最終結果の真度と精度に影響します。系統的エラーとランダムエラーの両方を解消して初めて、高い分析品質を達成できます。

多くのエラー原因が、結果の真値からの全体的な偏差に寄与するため、高度なエラー伝播計算を実行して、最終結果の不確実性に関する信頼性の高い推定値を得る必要があります。このような計算はソフトウェアで実行できますが、ユーザー環境固有の系統的エラーをソフトウェアで制御することはできません。ソフトウェアが評価できるのは、ランダムエラーに寄与する結果の不確実性だけです。

結果の不確実性の定義

不確実性の数値を含む GPC/SEC 結果は、次の形式で報告されます。

(1 つの標準偏差の信頼度における) 結果 \pm 結果の不確実性

つまり、分析の結果 (G) が、68 % の可能性で $G - \Delta G$ および $G + \Delta G$ 内に収まるということです。高い有意水準を適用すれば、結果の不確実性は簡単に上がります。これは、不確実性値に 1 より大きい係数を使用することで取得できます。結果報告の一般的な形式は次のとおりです。

$G \pm k \Delta G$ $k = 1, 2, 3...$

結果の不確実性で一般的に許容されるデフォルト値は $k = 1$ です。これはガウス統計に基づく 68 % の信頼度に対応します。大きい k 係数を使用すると有意性の数値が上がります。例えば、 $k = 2$ では信頼度が 96 %、 $k = 3$ では信頼度が 99.7 % になります。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC の理論と背景について

1.1 分子量平均の詳細

1.2 クロマトグラムから分子量分布まで

1.3 GPC/SEC システムのキャリブレーション方法

1.4 GPC/SE における真度と精度

1.5 結果の不確実性 – 結果の信頼性を高めるには

用語集

図 1 に、一般的な結果の表 (列 1 および 2) と個々の相対的結果の不確実性 (% 単位、列 3) を含む分子量分布を示します。

この例では、重量平均分子量 (M_w) が 4,304 Da の場合に不確実性が 3.84 % (すなわち 165 Da) です。つまり、このサンプルの M_w の真値は、約 68 % の信頼度で 4,139 ~ 4,469 Da です。結果において (実質的に) 100 % の信頼度を達成するには、エラーに 3 を乗じる ($k = 3$ にする) 必要があります。つまり M_w の真値の範囲が 3,808 ~ 4,800 Da になります。独立した実験 (繰り返しや良悪の比較) の個々の結果が信頼限界 4,139 ~ 4,469 Da (99.7 % では 3,808 ~ 4,800 Da) の範囲内である場合、これらの結果の不確実性は、実験結果が 68 % の妥当性と一致することを示しています。

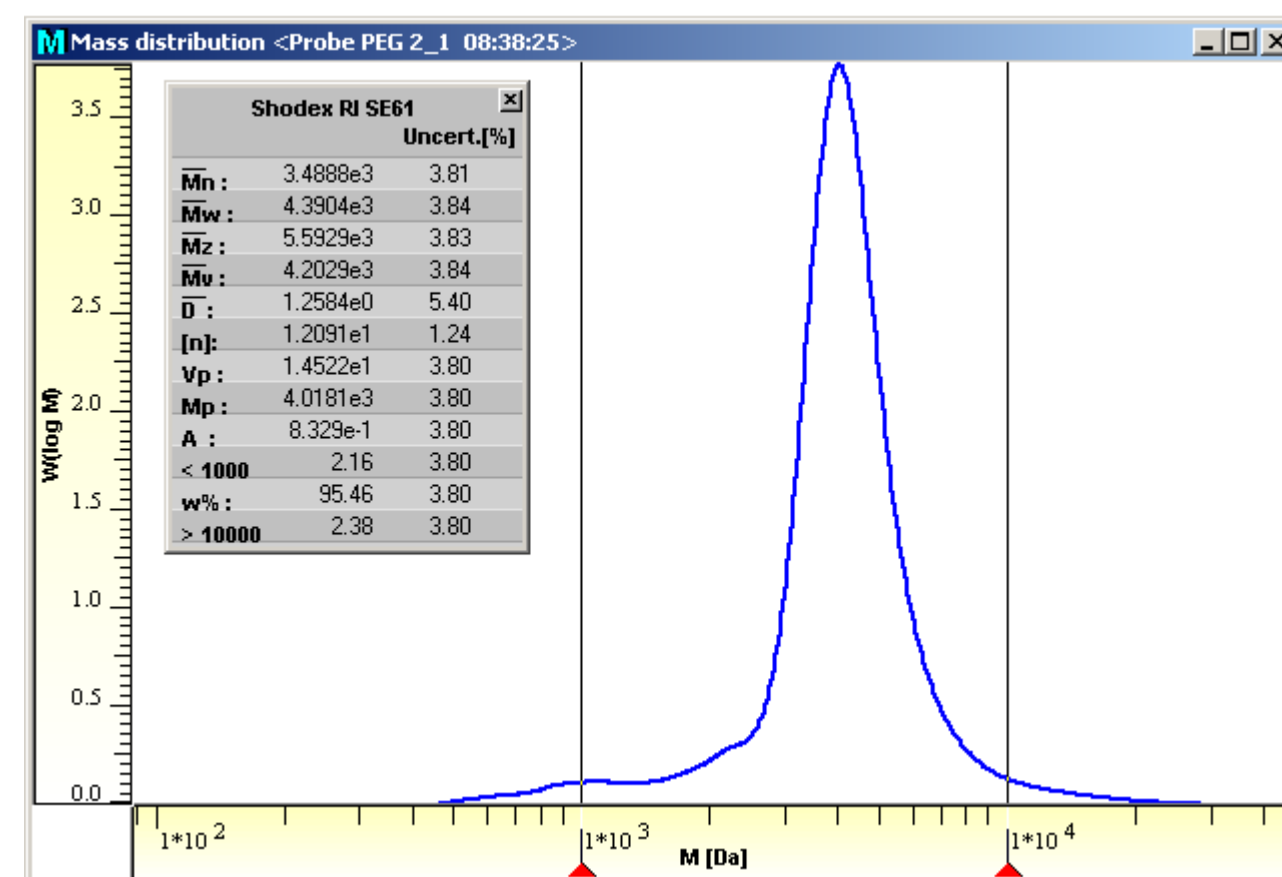


図 1. 分子量分布と個々の相対的結果の不確実性 (%) を含む GPC/SEC 結果

系統的错误とランダムエラー

GPC/SEC 実験における一般的な系統的错误の原因としては、次のようなものがあります。

- GPC/SEC システムのリーク
- 無効なメソッドパラメータ (不適切なカラムセット、溶出液、温度)
- 不完全な溶出によるサンプル濃度
- 古いキャリブレーションまたは不適切なサンプルパラメータに基づく分子量計算
- 注入量の誤り
- 粘度検出における DPT 感度係数の誤用
- 光散乱/三重検出からの dn/dc 値が不明または不正確
- 粘度、三重検出、光散乱システムにおける不正確な機器キャリブレーション係数

これらの影響を、GPC/SEC ソフトウェアによる結果の不確実性の計算に組み込むことはできません。幸い、オペレータの制御により、系統的错误が頻繁に発生することはありません。

ランダムエラーの寄与は影響が重大で、制御がより困難です。このために堅牢な統計モデルを使用できます。これらのモデルは、結果の真値 (または一般的な許容値) からの偏差に対するランダムエラーの影響の定量に最適です²。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC の理論と背景について

1.1 分子量平均の詳細

1.2 クロマトグラムから分子量分布まで

1.3 GPC/SEC システムのキャリブレーション方法

1.4 GPC/SE における真度と精度

1.5 結果の不確実性 – 結果の信頼性を高めるには

用語集

ランダムな（統計上の）エラーに対する一般的な寄与としては、（特に）次のようなものがあります。

- ポンプ流量の変動
- 古い（ノイズの出る）UV ポンプ
- パージしていない RI 検出器
- 溶出液の不十分な脱気や気泡
- 不適切なキャリブレーション近似
- MALS 検出器の正規化における大きなばらつき

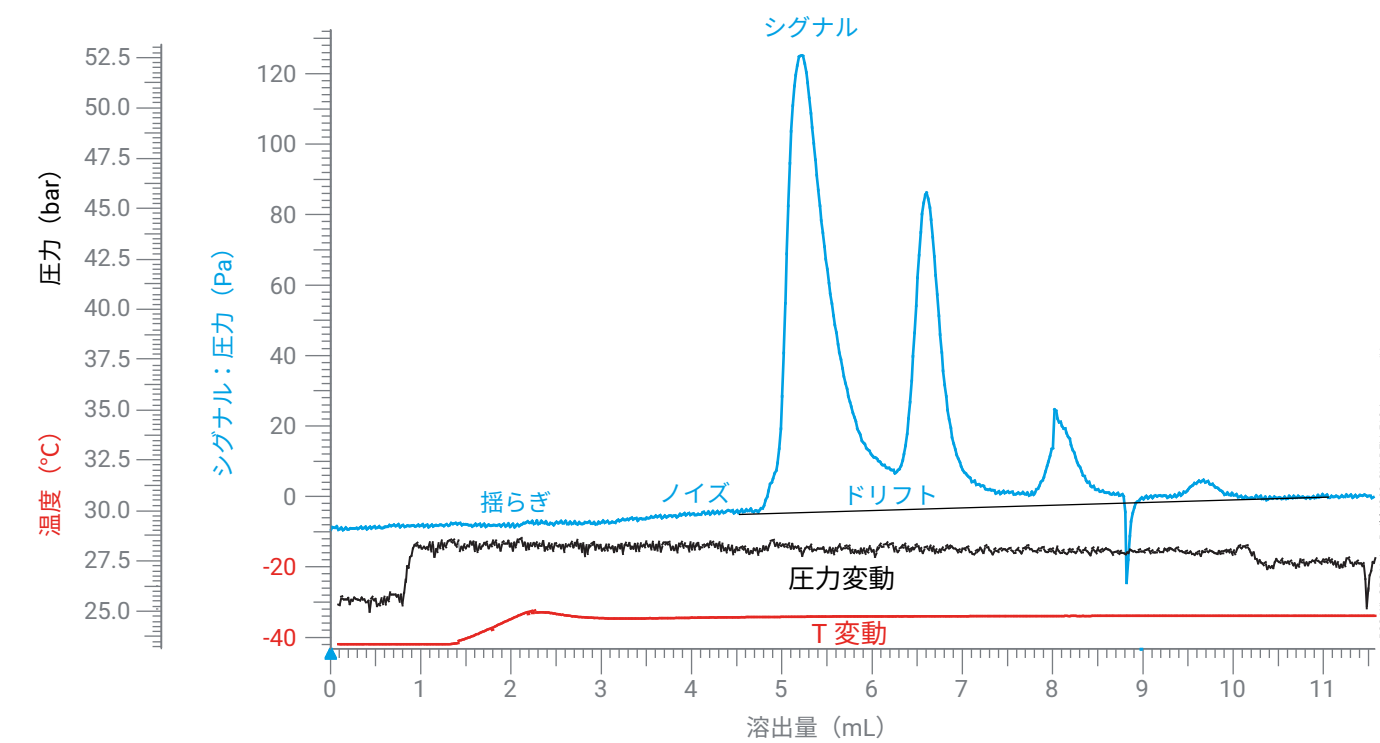


図 2. 結果の不確実性に寄与するさまざまなランダムエラー

結果の不確実性の測定

最終結果は、システム特性によりさまざまな影響を受けます。全体的な結果の不確実性の計算においては、これらを考慮する必要があります。

このため計算においては、ソフトウェアが次の要素を管理する必要があります。

- 流量安定性
- 圧力変動
- 温度安定性
- 注入再現性
- シグナルのノイズ、ドリフト、揺らぎ
- キャリブレーションの範囲と品質
- 粘度と光散乱データの精度

全体的な結果に寄与する特定のパラメータ x の不確実性は、その標準偏差 (σ_x) から計算できます。例えば、温度安定性は次のように、測定した平均温度と標準偏差からオンラインで計算されます。

$$T = \langle T \rangle \pm \Delta T$$

説明： $\langle T \rangle$ ：平均温度
 ΔT ：標準偏差、 σ_T

パラメータの数により、パラメータセット全体のエラー伝播メソッドを考慮して不確実性の値を測定する必要があります³。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC の理論と背景について

1.1 分子量平均の詳細

1.2 クロマトグラムから分子量分布まで

1.3 GPC/SEC システムのキャリブレーション方法

1.4 GPC/SE における真度と精度

1.5 結果の不確実性 – 結果の信頼性を高めるには

用語集

各分析の分析品質は、不確実性評価によって簡単に判定できます。不確実性評価では、シグナル品質（検出器ノイズなど）、システム安定性（流量など）、キャリブレーション品質（偏差など）に関する寄与がまとめて考慮されます。

図 3 に、RI データから計算した GPC/SEC 結果の不確実性評価の例を示します。ここでは、キャリブレーションの品質が結果の精度に大きく寄与します。システム安定性とシグナル品質の寄与は、これよりずっと少ないです。結果の品質を上げるには、まずキャリブレーションを最適化します（従来型、汎用型、または光散乱）。さらに、高いシグナル品質（安定化した検出器シグナル、最適化した注入量や注入濃度）で繰り返し測定すれば、結果がさらに改善されます。

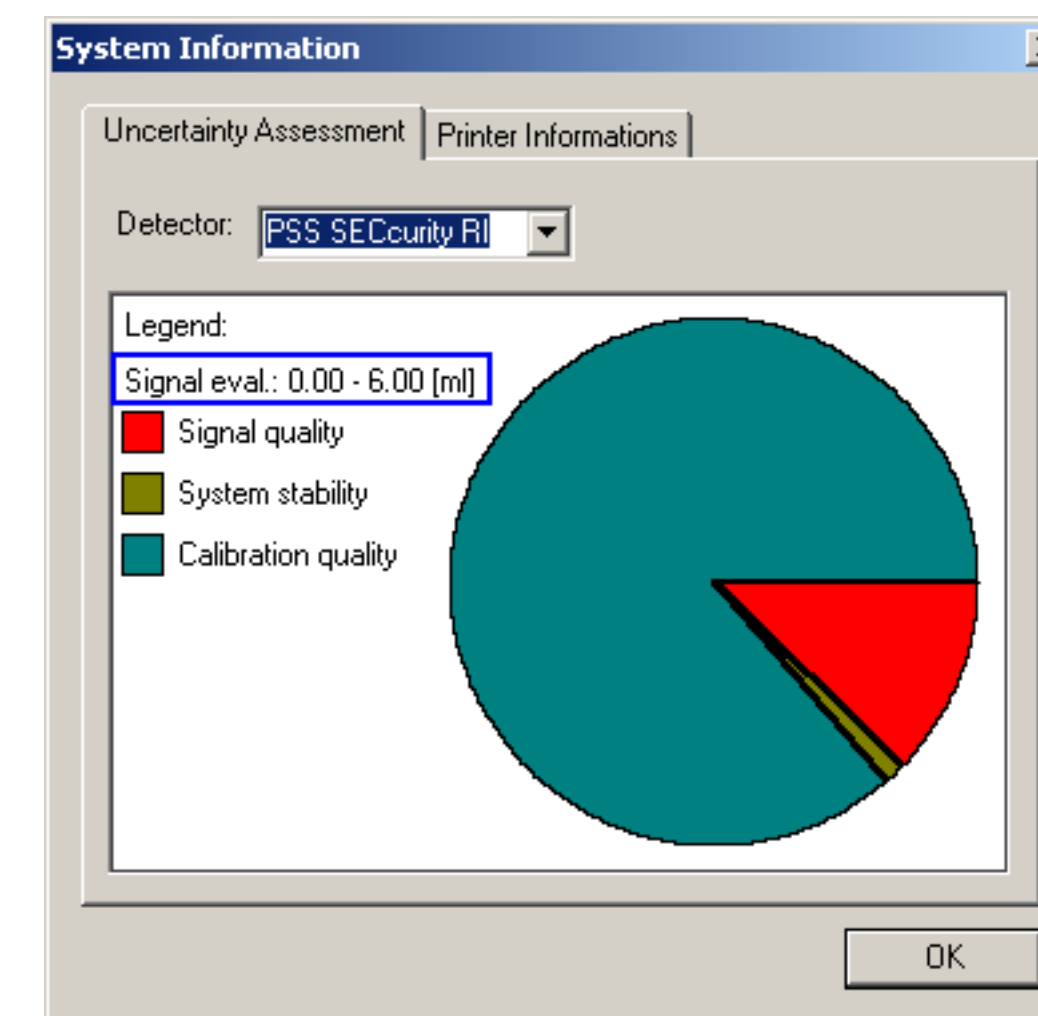


図 3. システム安定性、シグナル品質、キャリブレーション品質のエラーの寄与を組み合わせ、不確実性を評価します。これにより、結果の不確実性に対する最大の寄与要因を特定して、結果の品質を改善できます。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC の理論と背景について

1.1 分子量平均の詳細

1.2 クロマトグラムから分子量分布まで

1.3 GPC/SEC システムのキャリブレーション方法

1.4 GPC/SE における真度と精度

1.5 結果の不確実性 – 結果の信頼性を高めるには

用語集

結論

- 結果の不確実性の測定により、分析品質が大幅に向上します。
- サンプル比較の結果をより正確に解釈して、不確実性の限界と一致しているか、異なるか、またはその範囲内であるかを判断できます。
- 標準の GPC/SEC ソフトウェアを使用すると、追加ステップなしで結果の精度計算を実行できます。

参考文献

1. Held, D.; Kilz, P. Qualification of GPC/GFC/SEC Data and Results, Wiley-VCH, Weinheim, **2009**.
2. ISO Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, *International Organization for Standardization*, Geneva, **1995**.
3. ISO 5725: Accuracy of Measurement Methods and Results, Geneva, **1997**.
4. EURACHEM/CITAC Guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement; S. Ellison, M. Rosslein, A. Williams, (eds.), London, **1995**.
5. EURACHEM/CITAC Guide: Use of Uncertainty Information in Compliance Assessment; A. Williams, S. Ellison (eds.), London, **2007**.
6. EURACHEM/CITAC Guide: Traceability in Chemical Measurement; S. Ellison, M. Rosslein, A. Williams, (eds.), London, **2003**.
7. Bevington, P. R.; Robinson, D. K. Data Reduction and Error Analysis for the Physical.
8. WinGPC UniChrom documentation.

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

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC の理論と背景について

1.1 分子量平均の詳細

1.2 クロマトグラムから分子量分布まで

1.3 GPC/SEC システムのキャリブレーション方法

1.4 GPC/SE における真度と精度

1.5 結果の不確実性 – 結果の信頼性を高めるには

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ - GPC/SEC の理論と背景

用語集

Da	ダルトン (g/mol)
DMA	ジメチルアミン
DMAc	ジメチルアセトアミド
dn/dc	屈折率増分
ELSD	蒸発光散乱検出器
溶出液	物質の溶解に使用する液体
排除限界	カラムの分離能力の上限。大きい成分種は充填剤のポアを浸透できなくなります。
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
LALS	低角度レーザー光散乱
M _n	数平均分子量
M _w	重量平均分子量
M _z	z 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
PDI	多分散性指数 (D=Mw/Mn)
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	直角レーザー光散乱
RI	示差屈折率 (検出/検出器)
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
THF	テトラヒドロフラン
浸透限界	別名は全浸透限界。カラムの分離能力の下限を示す。対応する分子は、カラム充填剤のすべてのポアに浸透できるサイズである。
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。

DE46235001

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

5994-5935JAJP

