

GPC/SEC 電子書籍シリーズ

GPC/SEC カラム

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 カラムについて

1.1. GPC/SEC に適した固定相の
特定方法

1.2. 分解と分離に影響する要素

1.3. 分子量分離範囲：カラム選択
時の注意事項

1.4. GPC/SEC カラムの取り付け
方法

1.5. GPC/SEC カラムの試験方法

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC カラム

目次

本電子書籍シリーズについて 3

GPC/SEC カラムについて 4

1.1. GPC/SEC に適した固定相の特定方法 5

1.2. 分解と分離に影響する要素 10

1.3. 分子量分離範囲：カラム選択時の注意事項 16

1.4. GPC/SEC カラムの取り付け方法 20

1.5. GPC/SEC カラムの試験方法 23

用語集 27

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC カラムについて

1.1. GPC/SEC に適した固定相の
特定方法

1.2. 分解と分離に影響する要素

1.3. 分子量分離範囲：カラム選択
時の注意事項

1.4. GPC/SEC カラムの取り付け
方法

1.5. GPC/SEC カラムの試験方法

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC カラム

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「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。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC カラムについて

1.1. GPC/SEC に適した固定相の
特定方法

1.2. 分解と分離に影響する要素

1.3. 分子量分離範囲：カラム選択
時の注意事項

1.4. GPC/SEC カラムの取り付け
方法

1.5. GPC/SEC カラムの試験方法

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC カラム

GPC/SEC カラムについて

カラム（固定相と表面化学）の選択はあらゆる LC システムの中心であり、良好な結果を得るには非常に重要です。GPC/SEC カラムの選択には同じ基準が適用されます。市場で販売されている GPC/SEC カラムは多種多様です。分取カラム、分析カラム、マイクロボアカラムなど異なる寸法で提供されており、さまざまな固定相が充填されています。固定相はさまざまなサイズの粒子とポアで構成されます。

長期にわたり再現性の高い結果を得られる最適なカラムを見つけるのは、かなり困難な場合があります。構成済みの徹底的に試験された各種カラムセットの 1 つと、特定の分子量範囲に適した粒子サイズとポアサイズを選択すれば、このタスクが容易になります。

分離能、分離範囲、溶媒消費量、分析時間のバランスは、あらゆるラボが対応しなければならない重要な要素です。

カラムの選択においては、ルーチン QC、研究開発、多種多様なサンプルの処理など、アプリケーションや要件に応じて、これらの要素の 1 つを他より優先する場合があります。

科学者は、最適なカラムを選択するための基本原則を理解しておくことが重要です。

本電子書籍の最初の 2 つのセクションでは、固定相の材料、粒子サイズ、ポア特性の選択に影響するさまざまな要因について説明します。

3 番目のセクションでは、科学者が最終的にカラムやその組み合わせを選択する際に避けるべき陥りやすい誤りについて説明します。

本電子書籍の最後のセクションでは、カラムの取り付けと試験に関するいくつかの実用的なヒントと、上手なカラム選択に役立つその他のリソースを紹介しています。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC カラムについて

1.1. GPC/SEC に適した固定相の
特定方法

1.2. 分解と分離に影響する要素

1.3. 分子量分離範囲：カラム選択
時の注意事項

1.4. GPC/SEC カラムの取り付け
方法

1.5. GPC/SEC カラムの試験方法

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC カラム

1.1. GPC/SEC に適した固定相の特定方法

GPC/SEC 分離の仕組み

ゲル浸透クロマトグラフィー / サイズ排除クロマトグラフィー (GPC/SEC) は、あらゆる可溶性の (合成および生体) 巨大分子を分析して分子量、分子量分布、化学組成、分子構造を特定するための確立された手法です。

GPC/SEC は液体クロマトグラフィー (LC) から派生した分離手法であり、逆相 LC (HPLC/RPLC)、相互作用ポリマークロマトグラフィー (IPC)、イオン交換クロマトグラフィー (IEX) などの LC パックドカラム手法と同じ標準 LC 機器を使用します。各種 LC 手法間の主な違いは、パックドカラムで使用される固定相/分離相と、分析対象サンプルの溶解に使用される移動相の種類です。

いずれのクロマトグラフィー分離プロセスも、分布係数 K で表すことができます。これは、固定相 (a_s) と移動相 (a_m) の間のサンプル濃度比率と定義されています。

$$K = \frac{a_s}{a_m} = \exp\left[-\frac{\Delta G}{RT}\right] = \exp\left[-\frac{\Delta H - T\Delta S}{RT}\right]$$

説明：

ΔG = ギブスエネルギーの変化

T = 絶対温度

ΔH = エンタルピーの変化

ΔS = エントロピーの変化

R = 普遍気体定数 8.314 J/K mol

この式は 2 つの部分に分けられます。

- 相互作用のあるエンタルピー駆動プロセス (HPLC/IPC)
- 相互作用のないエントロピー駆動プロセス

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC カラムについて

1.1. GPC/SEC に適した固定相の特定方法

1.2. 分解と分離に影響する要素

1.3. 分子量分離範囲：カラム選択時の注意事項

1.4. GPC/SEC カラムの取り付け方法

1.5. GPC/SEC カラムの試験方法

用語集

GPC/SEC の固定相は、サンプル中の巨大分子のサイズまたは流体力学的体積によって、エントロピーのみの分離ができることが理想的です。

$$K_{IPC} = \exp\left[-\frac{\Delta H}{RT}\right] \text{ and } K_{SEC} = \exp\left[\frac{\Delta S}{R}\right]$$

$$0 < K_{SEC} < 1, \Delta H = 0, K_{IPC} > 1, \Delta S \approx 0$$

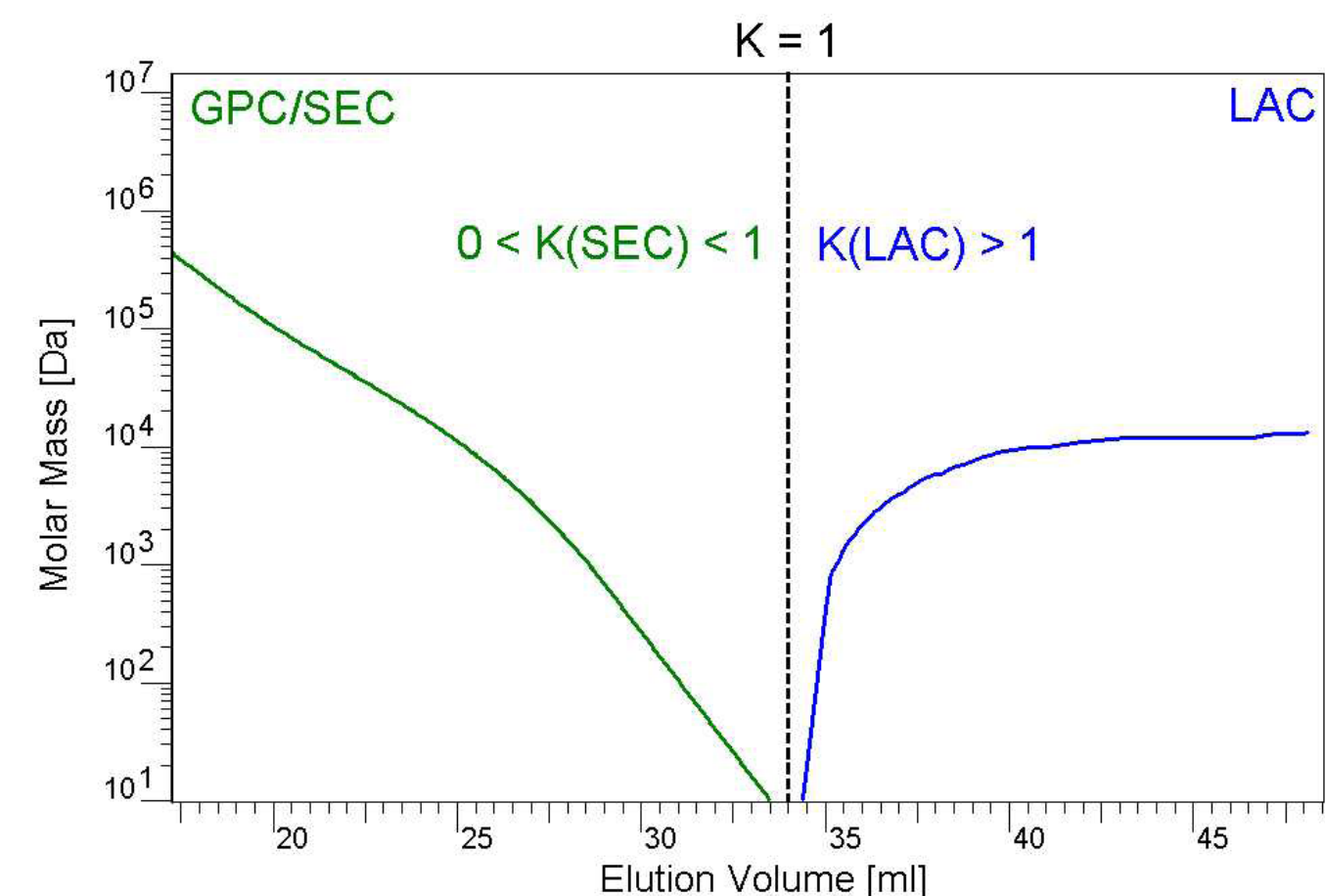


図 1. GPC/SEC と IPC でのクロマトグラフィー挙動を示す、分子量と溶出量の関係のプロット

GPC/SEC モードでの最適なサンプル分離のためには、サンプルと固定相の間の相互作用をなくすか抑える必要があります。この挙動は、質量の影響を受けやすい検出器（オンライン粘度計など）による高度な特性解析にも必要です。

相互作用は引力か斥力のいずれかです。固定相に対するサンプルの親和性が移動相内に残る親和性より高い場合、相互作用は引力となり吸着します。IPC ではこの種の相互作用を応用して、化学組成によってコポリマーを分離できます¹。

サンプルと固定相の間に斥力相互作用があると、サンプルはポアに浸透しません。サンプルの一部のみがポア内に移行します。ポリスチレンスルホン酸などの強い高分子電解質サンプルは、プルラン（多糖類）などの同等サイズの中性サンプルよりずっと早く負電荷固定相から溶出します。サイズによる分離も可能ですが、サンプルの相互作用が異なるため、ユニバーサルキャリブレーションは失敗します。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC カラムについて

1.1. GPC/SEC に適した固定相の
特定方法

1.2. 分解と分離に影響する要素

1.3. 分子量分離範囲：カラム選択
時の注意事項

1.4. GPC/SEC カラムの取り付け
方法

1.5. GPC/SEC カラムの試験方法

用語集

メソッド開発への影響

GPC/SEC のメソッド開発の目標は、サンプル、移動相、固定相の間の潜在的な相互的影響のバランスを取り、相互作用をなくすことです。

特定の分析アプリケーションではサンプルと溶媒の極性が似ていることも多いため、対応する極性が似た固定相を選択する必要があります。「ネットゼロ極性」の条件が達成された場合にのみ、再現性が高く長期的な安定性が保証される堅牢な GPC/SEC メソッドが開発されたことを確信できます。

3 つのパラメータの極性がある程度わかっているカラム充填剤を選択する場合は、正三角形を視覚的ガイドとして使用できます。このマジックトライアングルの各辺が 1 つのパラメータ（サンプル、移動相、固定相の極性）を表します。図 2 に、全種類の移動相のマジックトライアングルを示します。

表 1 に、極性でまとめたサンプル、移動相、固定相の組み合わせの例を示します。等辺三角形を上下に動かすと、マジックトライアングル内の極性軸によって、各サンプルに最適な移動相と固定相の組み合わせを特定できます²。特定の水溶性サンプル（ポリアクリル酸など）の場合、親水性の極性固定相マトリックスを選択する必要があります。

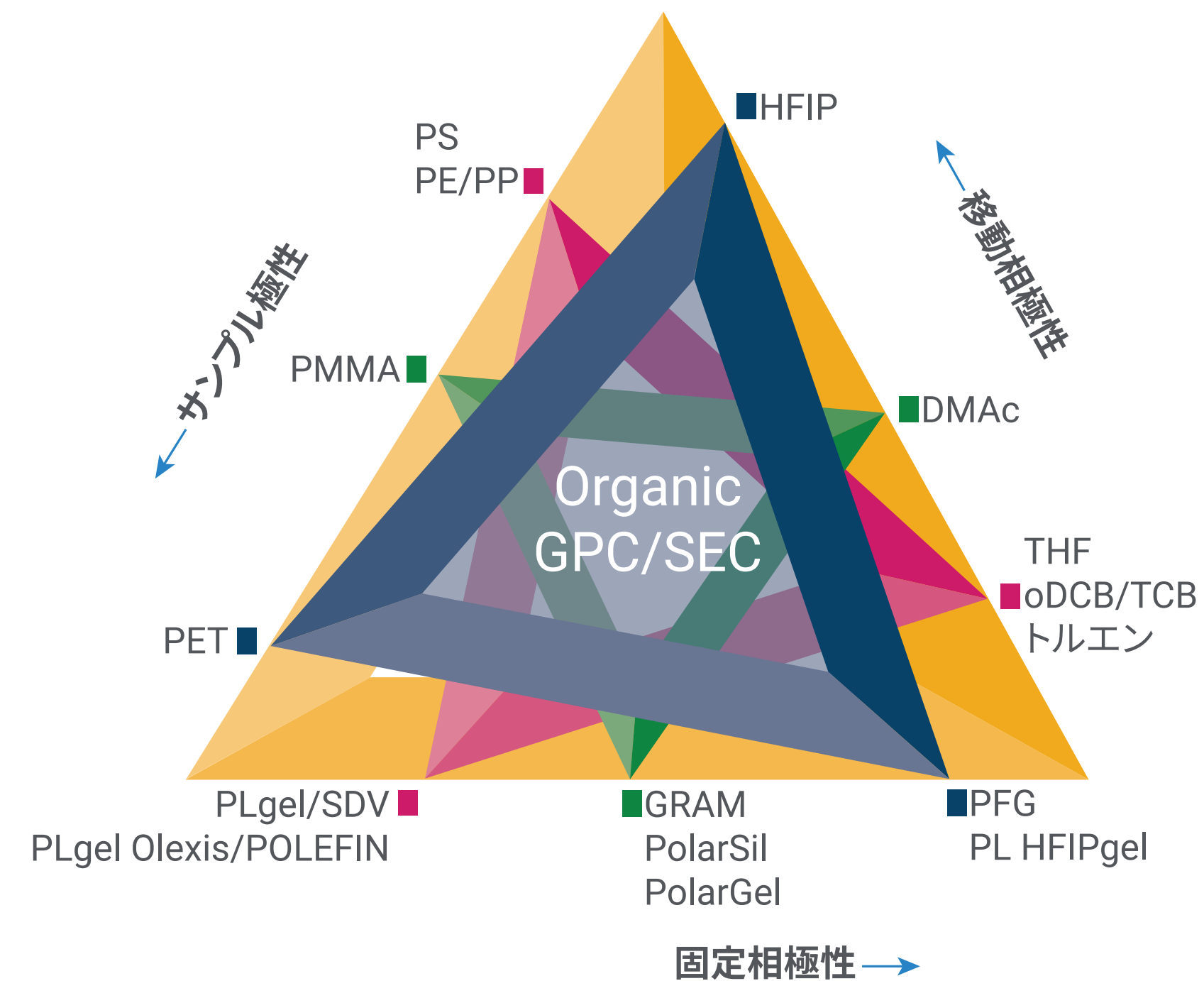


図 2. 成分の極性のバランスを取るマジックトライアングル

表 1. 各種クロマトグラフィーシステムのバランスの良い極性軸

極性	サンプル	移動相	固定相
▲ 低極性または非極性	ポリスチレン	トルエン	SDV/PLgel
▲ 中極性	ポリメチルメタクリレート	ジメチルアセトアミド (DMAc)	GRAM、PolarGel
▲ 中～高極性	ポリエチレンテレフタレート	ヘキサフルオロイソプロパノール	PFG、PL HFIPgel

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC カラムについて

1.1. GPC/SEC に適した固定相の特定方法

1.2. 分解と分離に影響する要素

1.3. 分子量分離範囲：カラム選択時の注意事項

1.4. GPC/SEC カラムの取り付け方法

1.5. GPC/SEC カラムの試験方法

用語集

マジックトライアングルの概念を外挿して、水性アプリケーションでの中性/カチオン/アニオンサンプル用のカラム固定相材料の範囲を示すことができます。

水性 GPC/SEC では荷電サンプルを完全な解離状態（塩形態）にシフトして、あらゆる疎水性相互作用を抑える必要があります。このため、水ベースの移動相を pH で調整する必要があります（図 3）。弱有機酸であるポリアクリル酸は、pH 9 で完全に解離されます。疎水性相互作用（水素結合）は発生しません。それはヒドロキシ化メタクリル酸ベースの材料（SUPREMA）で分析できます。ポリスチレンスルホン酸などの強ポリアニオンは、高 pH で分析する必要があります。

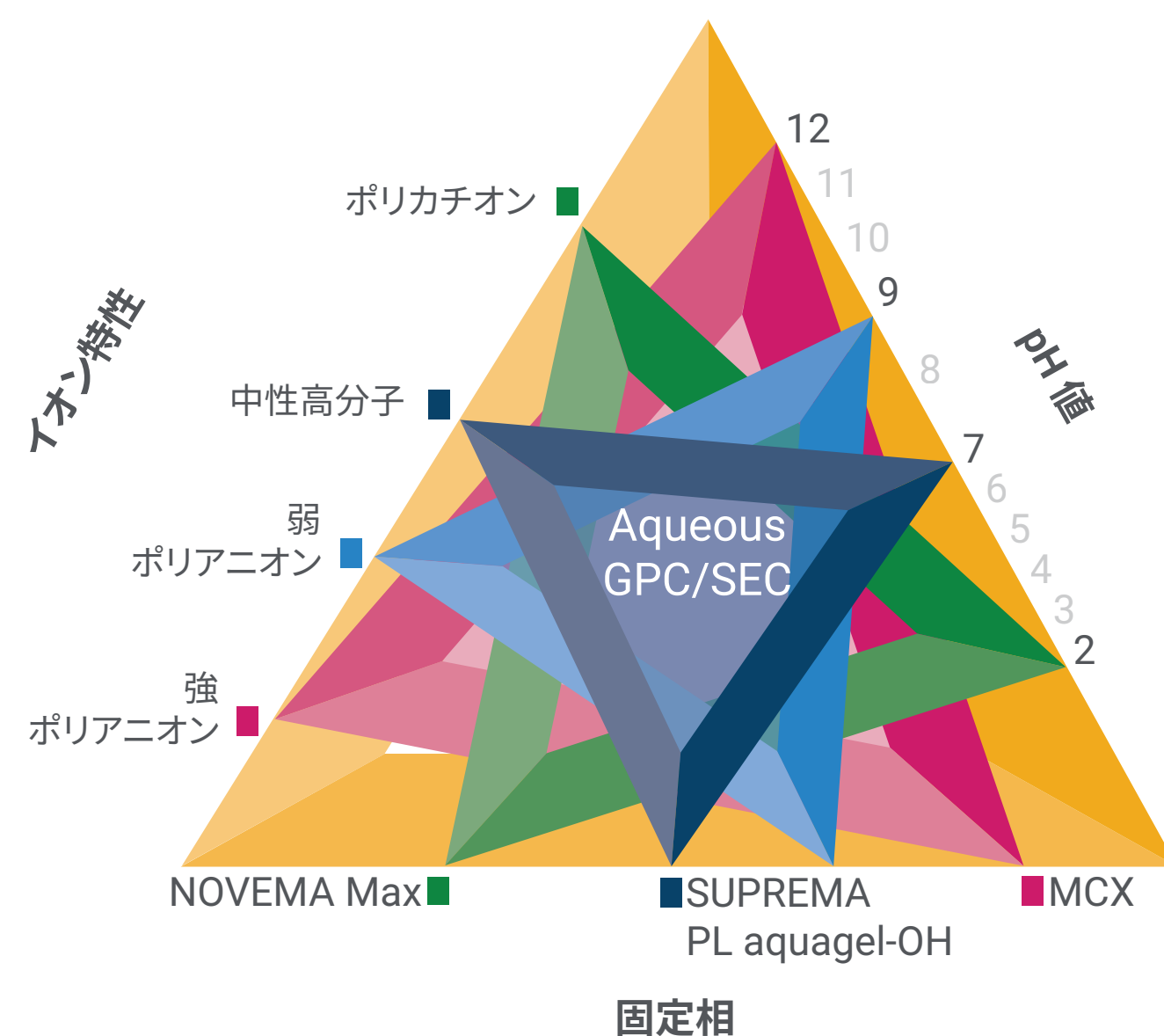


図 3. 水性アプリケーションのマジックトライアングル

信頼性の高い GPC/SEC 測定の要件

極性バランスは、多くの官能基やイオン基を含むサンプル（高分子電解質など）にとって最低限の前提条件ですが、相互作用のない GPC/SEC に十分とは言えません。

イオン排除を抑制するには、低分子の中性塩を添加するか、緩衝液を使用する必要があります。これらの塩によって、固定相との相互作用を最小化してサンプルの凝集を抑制できます。ただし、塩濃度は慎重に選択する必要があります。親水性と疎水性の相互作用を回避できる濃度範囲が狭いためです³。

図 4 に、イオン強度を高める機能としてのサンプルの溶出量依存性を示します。イオン強度が低すぎると、吸着やイオン排除により溶出量が増えます。イオン強度を 0.5 ~ 1.5 mol/L に上げると、必要な GPC/SEC 分離が可能になります。イオン強度が 1.5 mol/L を超えると、疎水性相互作用が強くなり、再び溶出量が増えます。

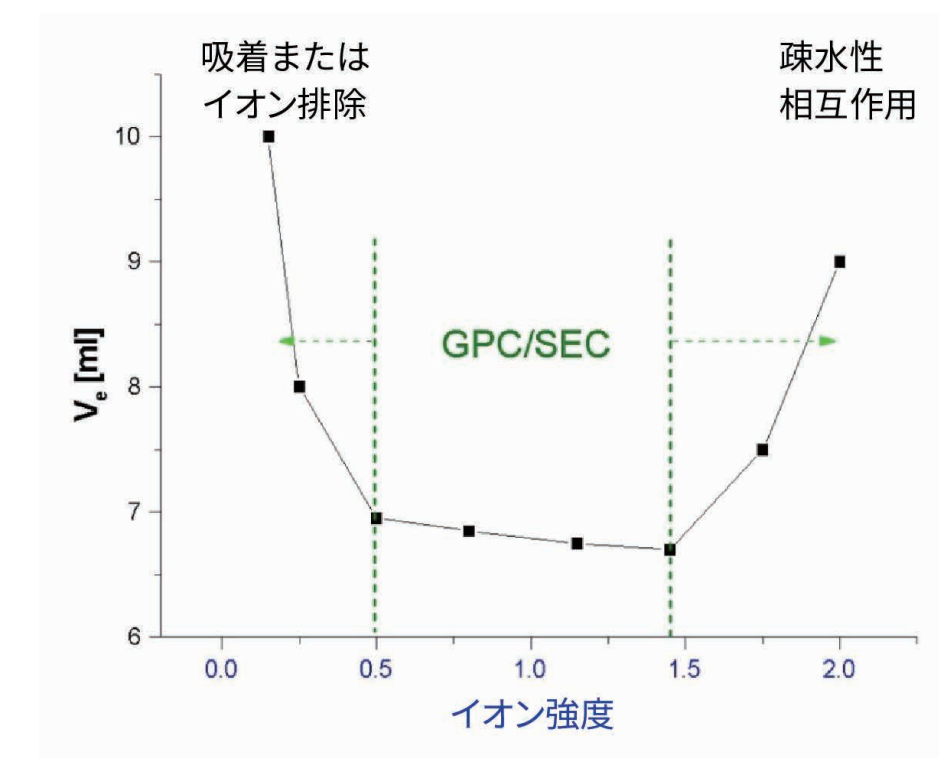


図 4. 真の GPC/SEC 分離のための塩濃度/イオン強度範囲

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC カラムについて

1.1. GPC/SEC に適した固定相の
特定方法

1.2. 分解と分離に影響する要素

1.3. 分子量分離範囲：カラム選択
時の注意事項

1.4. GPC/SEC カラムの取り付け
方法

1.5. GPC/SEC カラムの試験方法

用語集

参考文献

1. Pasch, H.; Kilz, P. Encyclopedia of Analytical Chemistry; John Wiley & Sons Ltd; **2000**, pp. 7495–7543.
2. Reinhold, G. Lecture: Practical Aspects of Stationary Phases Used for SEC, 7th Dresden Polymer Discussion, **1999**.
3. Reinhold, G. The Influence of the Stationary Phase Polarity on GPC/SEC Separations, *Austrian Polymer Days* **2005**.

Originally published in *The Column*, December **2007** by authors Thorsten Hofe and Guenter Reinhold.

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC カラムについて

1.1. GPC/SEC に適した固定相の
特定方法

1.2. 分解と分離に影響する要素

1.3. 分子量分離範囲：カラム選択
時の注意事項

1.4. GPC/SEC カラムの取り付け
方法

1.5. GPC/SEC カラムの試験方法

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC カラム

1.2. 分解と分離に影響する要素

適切な固定相を特定したら、GPC/SEC のカラム選択で次に重要なのは、分離範囲、分析時間、溶媒消費量、分離能の最適なバランスを見つけることです。

- 高い汎用性と適用性には広い分離範囲が必要ですが、包括的な分析、特に詳細な分子量分布（MMD）を得るには優れた分離能が必要です。
- 品質管理、ハイスループット GPC/SEC、および高価な溶媒の使用時には、分析時間と溶媒消費量が重要な要素です。
- 分離能は、カラム材料、粒子サイズやパッキング品質、ポアサイズとポアサイズ分布、溶媒粘度、流量、およびサンプル濃度や質量移動の考慮事項など、さまざまな要素に依存します。

分離の測定は特定の分離能である R_{sp} です（GPC/SEC 用に推奨）¹。特定の分離能では、ピーク幅に比例するピーク標準偏差と、検量線の傾きが必要です（セクション 1.5 を参照）。

リニアカラムとシングルポアサイズカラムの比較

市販カラムの形状は次の 2 種類です。

- ポアサイズ分布が狭い（単峰性）シングルポアカラム
- ポアサイズ分布が広いまたはマルチモーダルのリニアカラムまたはミックスベッドカラム

どのカラム形状でも、分離範囲能力自体は使用可能なポアサイズ分布により制限されます。検量線はさまざまな分離能領域の視覚化に役立ちます。

シングルポアカラムの場合、分離範囲は狭い分子量範囲に集中するため、この特定の領域での検量線の傾きは非常に平坦または緩やかになります。このため、シングルポアカラムの分離範囲は限定的ですが、分離能は高くなります。反対に、ポアサイズ分布が広いカラムは分離範囲が広いので、検量線の傾きが急になり、分離能が低くなります。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC カラムについて

1.1. GPC/SEC に適した固定相の
特定方法

1.2. 分解と分離に影響する要素

1.3. 分子量分離範囲：カラム選択
時の注意事項

1.4. GPC/SEC カラムの取り付け
方法

1.5. GPC/SEC カラムの試験方法

用語集

図 1 に特定の溶出量範囲 ΔV ($V_2 - V_1$) を示します。リニアカラムの分子量範囲は同等のシングルポアカラムより広がっています。ただし、シングルポアカラムは分離能が高いため、対応している分子量範囲での分離は良好です。

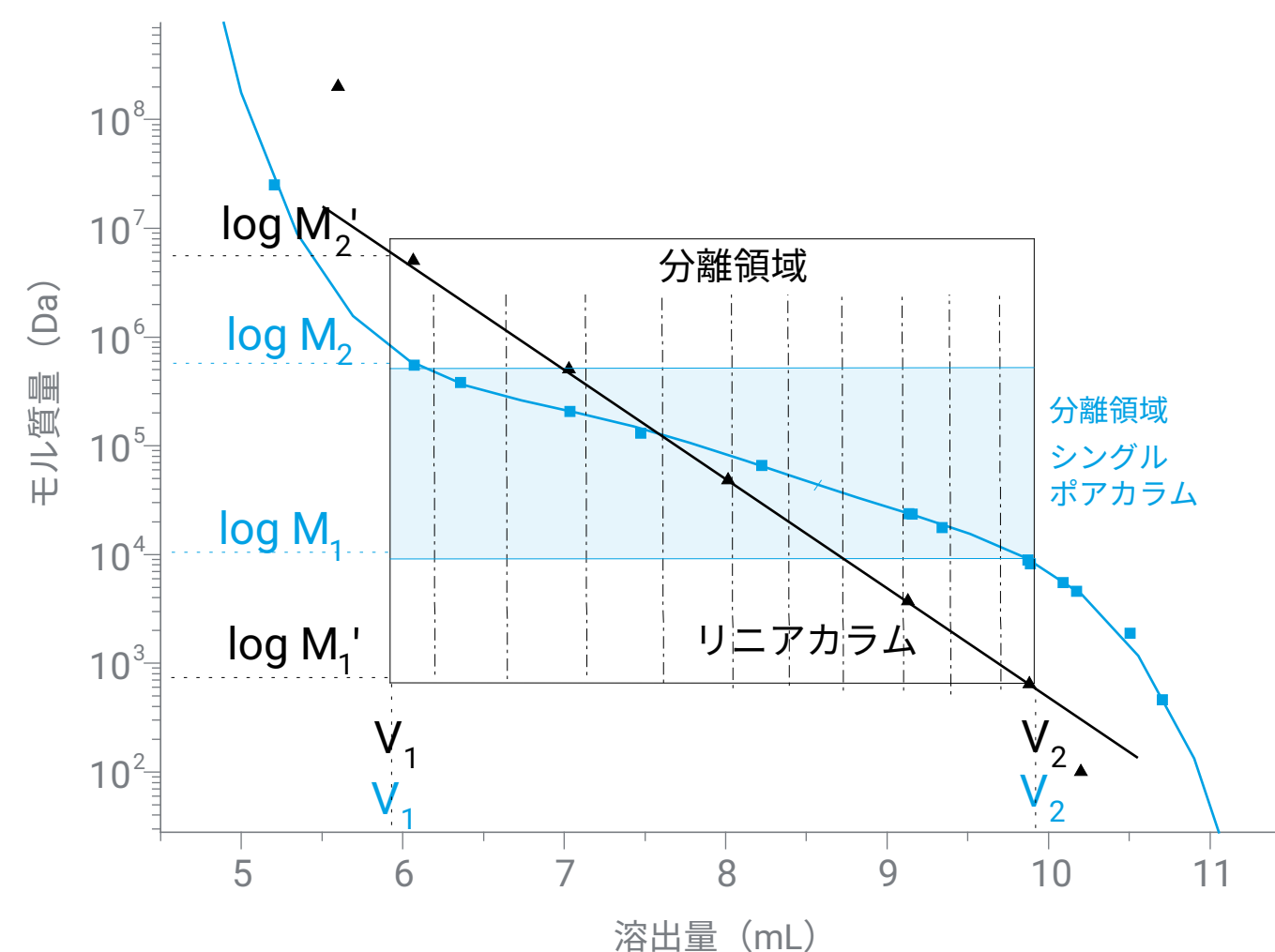


図 1. リニアカラムとシングルポアカラムの分離範囲の比較

分離範囲へのポア特性の影響

カラムのポア特性はカラムの分離範囲に直接関連します。図 2 は、シングルポアサイズカラムとリニアカラム/ミックスベッドカラム（ポア特性が異なる粒子（測定単位：Å）を含む）の分子量範囲の比較です。

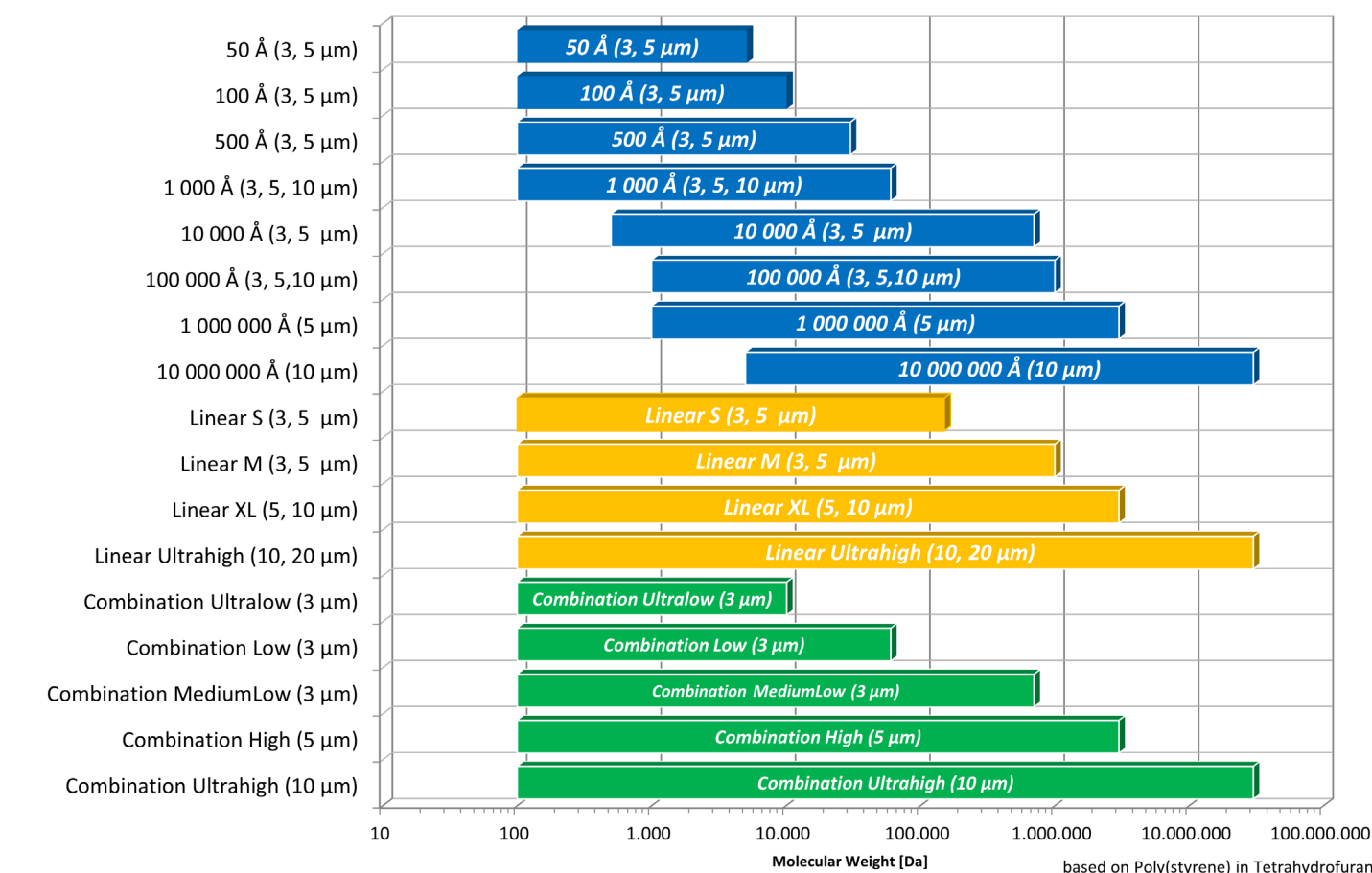


図 2. シングルポアサイズカラムとリニアカラムの分子量範囲の比較

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC カラムについて

1.1. GPC/SEC に適した固定相の特定方法

1.2. 分解と分離に影響する要素

1.3. 分子量分離範囲：カラム選択時の注意事項

1.4. GPC/SEC カラムの取り付け方法

1.5. GPC/SEC カラムの試験方法

用語集

分離能の向上と分離範囲の拡大

分離能を上げたり分離範囲を拡大したりするには、非常にシンプルなアプローチが使用されます。

1つのカラムのみを使用するのではなく、複数のカラムを1セット（またはカラムバンク）にまとめてポア容積を増やすか分離能を上げます。GPC/SECでは、2～4つのカラム（プレカラムを含む）を1セットにするのが一般的です。

- サイズの異なるシングルポアカラムを適切に組み合わせることで、分離範囲を効果的に拡大し、高い分離能レベルを維持できます。ポリマーはいくつかの分子量ディケードにわたりベースライン分離されます。
- リニアカラム（または同じ種類のシングルポアサイズカラム）を組み合わせることで分離能は向上しますが、分離範囲は拡大しません。同じポア特性（シングルポアまたはリニア/ミックスベッド/マルチポア）の2つのカラムを組み合わせると、検量線が平坦になるため、分離能が向上します。ガイドラインとしては、ポア特性が同じ2つのカラムを組み合わせると、分離能 (R_s) が1.4倍に向上します。

分析時間、溶出液消費量、圧力の増加は、カラムセットのメリットを損なうものです。圧力が上昇すると、特に高分子量ポリマーの場合、適切なクロマトグラフィー条件を実現するために流量が減少したり温度が上昇したりする場合があります。また、すべてのカラムタイプでポア特性の不適合が発生する潜在的なリスクもあります²。

図3に、リニアカラムと3つのシングルポアカラムの組み合わせの間の性能の違いを示します。このカラムの組み合わせにより、分子量範囲全体で分離能が大幅に向上し（溶出量範囲が広くなり）、分離範囲が拡大しています。4つの異なる分子量からなるポリマー混合物（PEO ReadyCal Black）は良好にベースライン分離されています。いっぽう、1つのリニアカラムでの分析時間は組み合わせたカラムセットの1/3であるため、製品のスクリーニングに適している可能性があります。

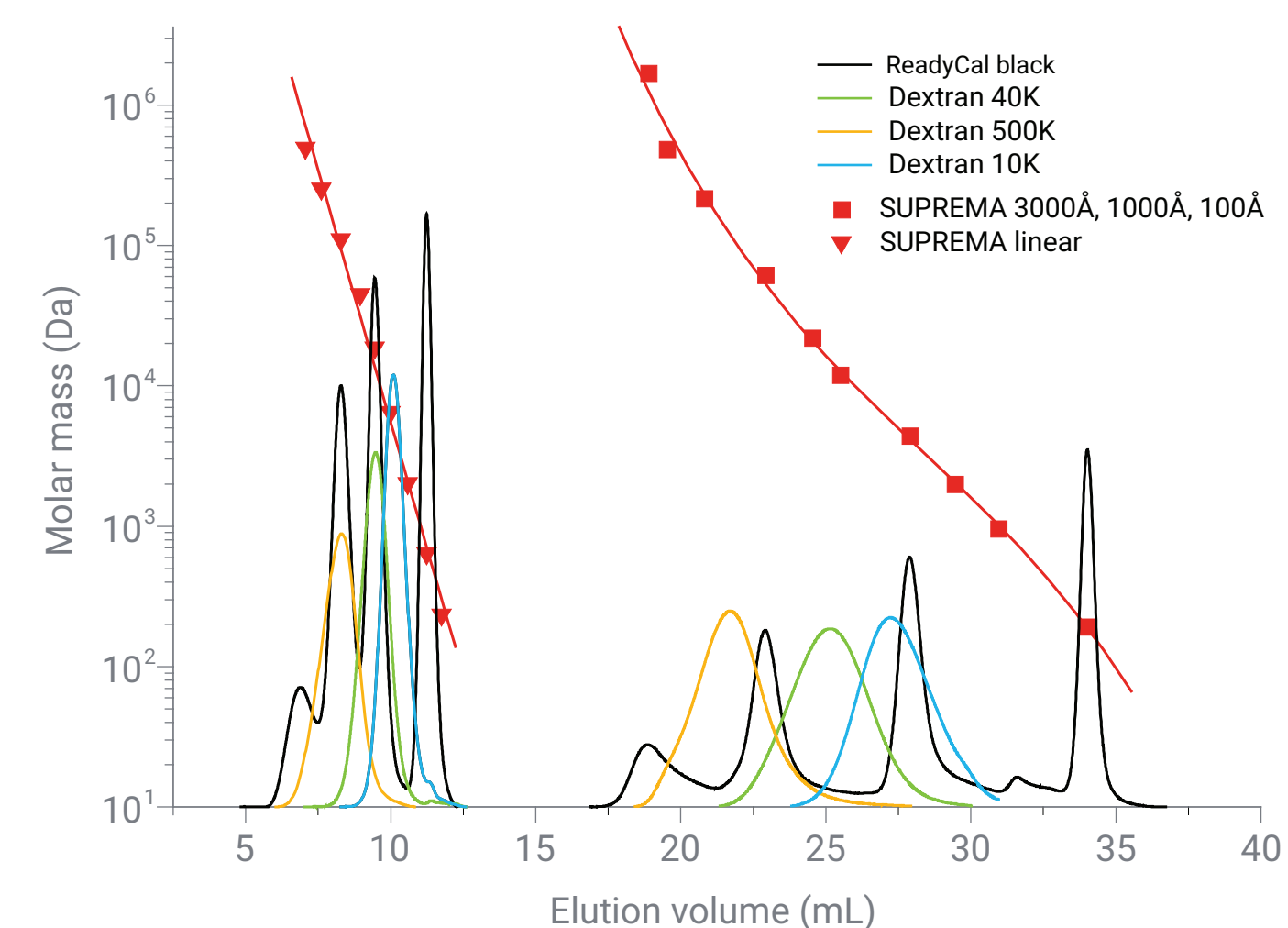


図3. リニアカラムと3つのシングルポアカラムの組み合わせの比較

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC カラムについて

1.1. GPC/SEC に適した固定相の
特定方法

1.2. 分解と分離に影響する要素

1.3. 分子量分離範囲：カラム選択
時の注意事項

1.4. GPC/SEC カラムの取り付け
方法

1.5. GPC/SEC カラムの試験方法

用語集

各種カラムセットのクロマトグラム

カラムセットは多くの場合、さまざまな分離範囲向けに最適化されています（図 2 に、カラムセットとリニアカラムの範囲の対比を示します）。高分子量および低分子量/オリゴマー用のセットがあります。図 4 に、2 種類のカラムセットに注入されたサンプル混合物の比較を示します。

分離能に影響するパラメータ

一般的に、質量移動を改善するすべてのパラメータが分離能の向上につながります。GPC/SEC ユーザーによる直接的な影響を受ける可能性があるパラメータは次のとおりです。

A) 粒子サイズ

粒子サイズが大きくなると、理論段数が小さくなり、カラムの浸透性が低下します。粒子サイズが小さいカラムは分離能が高くなります。図 5 に、材料とポアサイズ範囲が同じで粒子サイズが異なるカラムで PS オリゴマー混合物を分析した場合の比較を示します。3 μm の材料を用いたカラムのほうが質量移動はるかに良好で、分離能が高くなっています。このため、ポリマーのサイズと剛性に問題がなく、せん断劣化が発生しないのであれば、高い分離能を得るにはハイエンドの粒子サイズが小さいカラムをお勧めします。

一般的に、粘度の低い溶媒やタンパク質中のオリゴマーから中分子量（500 KDa）のサンプルには、約 3 μm の粒子サイズを使用できます。これより分子量が大きい、または粘度が高い溶媒（キシレンなど）には、5 ~ 10 μm の粒子サイズが使用されます。さらに高分子量の、または粘度が高い溶媒には、10 ~ 20 μm の粒子サイズが使用されます。

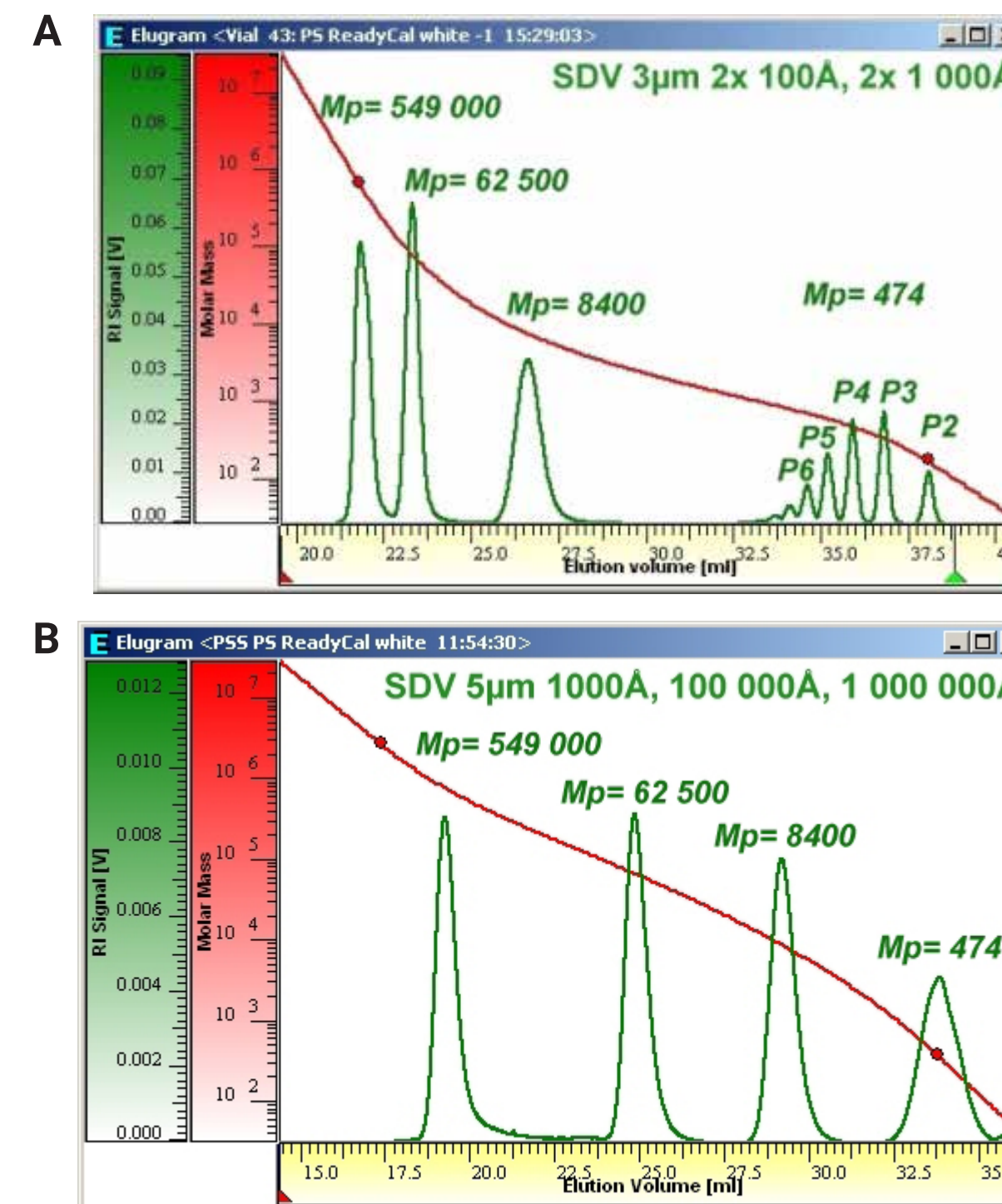


図 4. (A) 4 種類のポリスチレン標準の混合物を、オリゴマー領域の高分離能力向けに最適化されたカラムセットで分析した結果。このカラムセットで複数のオリゴマーを分解し、ベースライン分離できます。(B) 同じ混合物を中分子量および高分子量向けに最適化されたカラムセットで分析した結果。このカラムセットはオリゴマー領域での分離能は低いですが、(A) のカラムセットと比べて中分子量と高分子量の分離が良好です。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC カラムについて

1.1. GPC/SEC に適した固定相の
特定方法

1.2. 分解と分離に影響する要素

1.3. 分子量分離範囲：カラム選択
時の注意事項

1.4. GPC/SEC カラムの取り付け
方法

1.5. GPC/SEC カラムの試験方法

用語集

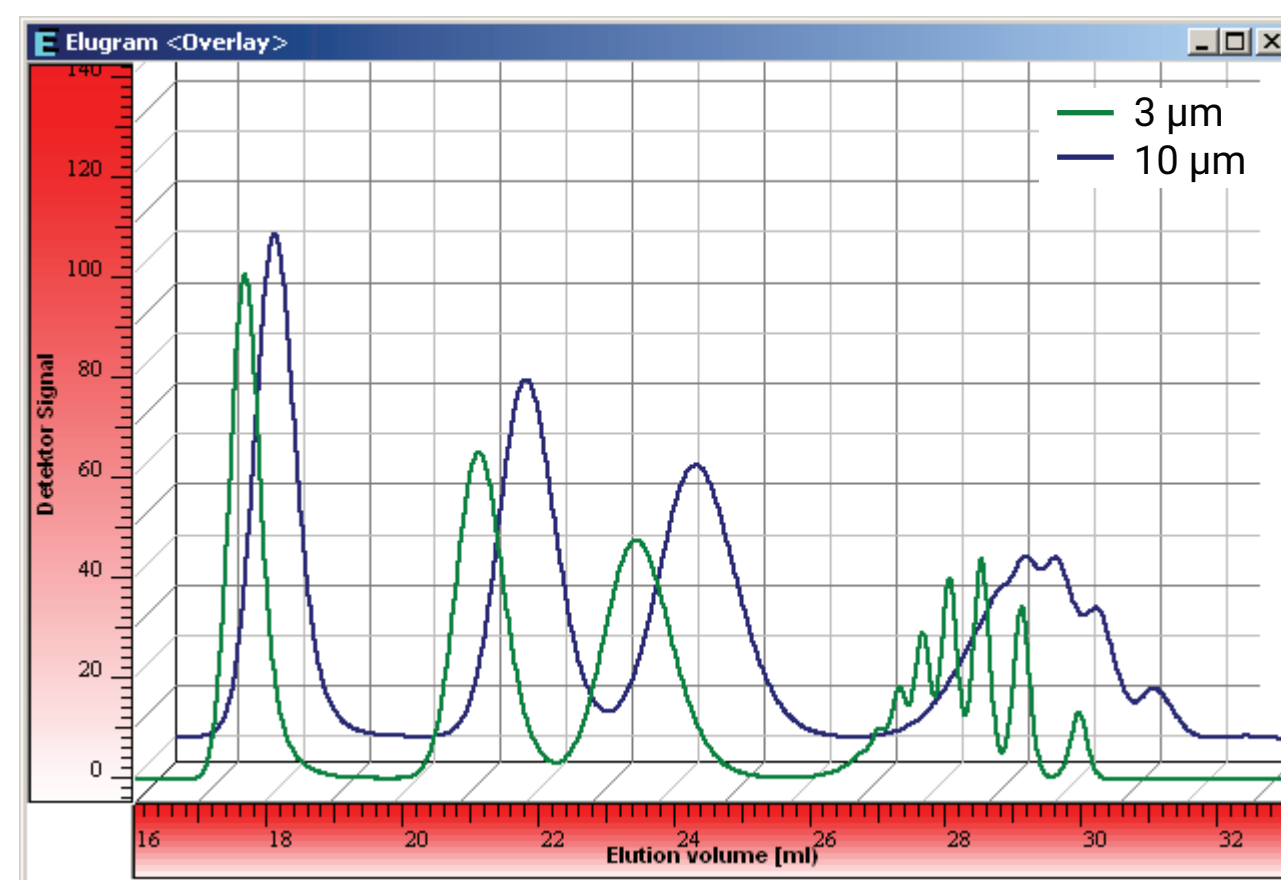


図 5. 粒子サイズ 3 μm および 10 μm のカラムセットでの PS オリゴマー分離の比較

B) 流量

GPC/SEC 分析カラムでは、一般的に 1 mL/min の流量が使用されます。分離能と分析時間のバランスを取るには、7 ~ 8 mm の内径が最適です。特に分子量が大きい場合は、低い流量が必要な場合があります。オリゴマーの場合、流量の低下により分離能が向上します。

C) 温度

温度が上昇すると、通常は質量移動の改善により分離能も向上します。ただし、これはすべてのポリマーに当てはまるわけではありません。例えば、水溶液中のポリエチレングリコール (PEG) は温度が低下すると分離能が向上します。

図 6 のいくつかの結果から、粒子サイズ、カラム数、流量、温度の最適化により、分離能が大幅に向上することがわかります。図 6 は、さまざまなカラムと条件でデキストランを分析した結果です。2 本の 5 μm カラムを使用して低流量で分析した場合に、最も高い分離能を得ることができました。

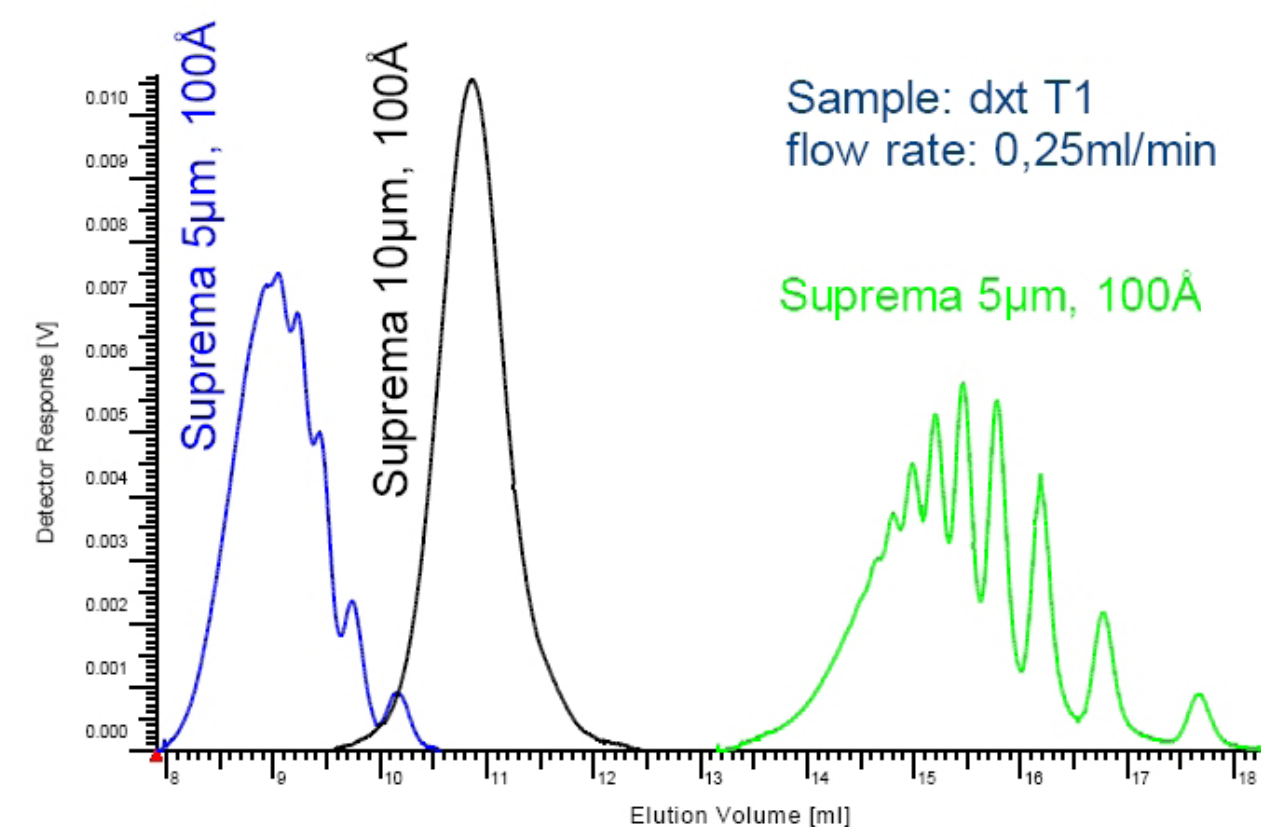


図 6. 粒子サイズ、流量、温度の最適化

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC カラムについて

1.1. GPC/SEC に適した固定相の
特定方法

1.2. 分解と分離に影響する要素

1.3. 分子量分離範囲：カラム選択
時の注意事項

1.4. GPC/SEC カラムの取り付け
方法

1.5. GPC/SEC カラムの試験方法

用語集

カラム選択と分離能の最適化に関する実用的なアドバイスは次のとおりです。

- 一致する固定相極性を選択して、相互作用を回避します。
- できるだけ小さい粒子サイズを使用します。オリゴマーやタンパク質の場合は、小さい粒子サイズを制限なく使用できます。
- 同じポア特性のカラムを組み合わせると、分離能が向上します。他のポアサイズのカラムを追加すると、分離範囲が拡大します。
- カラムを購入する際には、適合する組み合わせの例をメーカーに問い合わせてください。低分子量範囲で分離能を上げるために、リニア/ミックスベッド/マルチポアカラムとシングルポアカラムを組み合わせないでください。不適合によるピークショルダーを高分離能と誤認しないでください。
- 分析時間に問題がない場合は、流量を下げてみてください。これが溶媒消費量に影響することはありません。

参考文献

1. Reinhold, G. How to Expand the Life Time of Columns, LC/GC. *The Column* **2009**, 12(7).
2. Hofe, T. Beware of Mismatch, LC/GC. *The Column* **2008**, 4(20).

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

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC カラムについて

1.1. GPC/SEC に適した固定相の
特定方法

1.2. 分解と分離に影響する要素

1.3. 分子量分離範囲：カラム選択
時の注意事項

1.4. GPC/SEC カラムの取り付け
方法

1.5. GPC/SEC カラムの試験方法

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC カラム

1.3. 分子量分離範囲：カラム選択時の注意事項

特定の分離能の概念により、GPC/SEC ユーザーは分離能を把握および比較し、それが分子量精度に与える影響を特定できます¹。検量線の傾きを確認することで、分離能を視覚的に把握できます。傾きが平坦になるほど、分離能が向上します²。

1つのカラムでの高い分離能、限定的な分離範囲での分離は、タンパク質、抗体、オリゴマーのアプリケーションには十分です。ただし、分子量分布が広い合成ポリマーや天然ポリマーには、広範囲の効率的な分離が必要です。このため、カラムを直列に接続して使用することがよくあります。この方法は非常に有効ですが、不適合などのいくつかの陥りやすい誤りにより、クロマトグラムや分子量分布の結果が不自然になる場合があります。

より高い分子量分離上限の選択

GPC/SEC ユーザーがカラムやカラムセットを選択する際に、概算の重量平均分子量 (M_w) しか把握していないことがよくあります。サンプルの MMD の幅 (M_w/M_n の比率、つまり分散度 (Ð)) が不明だと、選択を誤る可能性があります。

あるサンプルの Ð が約 2 (フリーラジカル重合で生産した合成ポリマーの一般的な値) である場合、予想される分子量範囲は非常に広がります。一般的に、分子量上限は、最大の分析対象サンプルの M_w 予想値の 10 倍を選択する必要があります。

図 1 に、 $M_w = 181,200$ Da および $\text{Ð} = 2.26$ のポリスチレン (欧州標準物質) の分子量分布を示します。このポリマーの M_w は比較的低いですが、サンプルには最大 2×10^6 Da の分子量分画が含まれます。

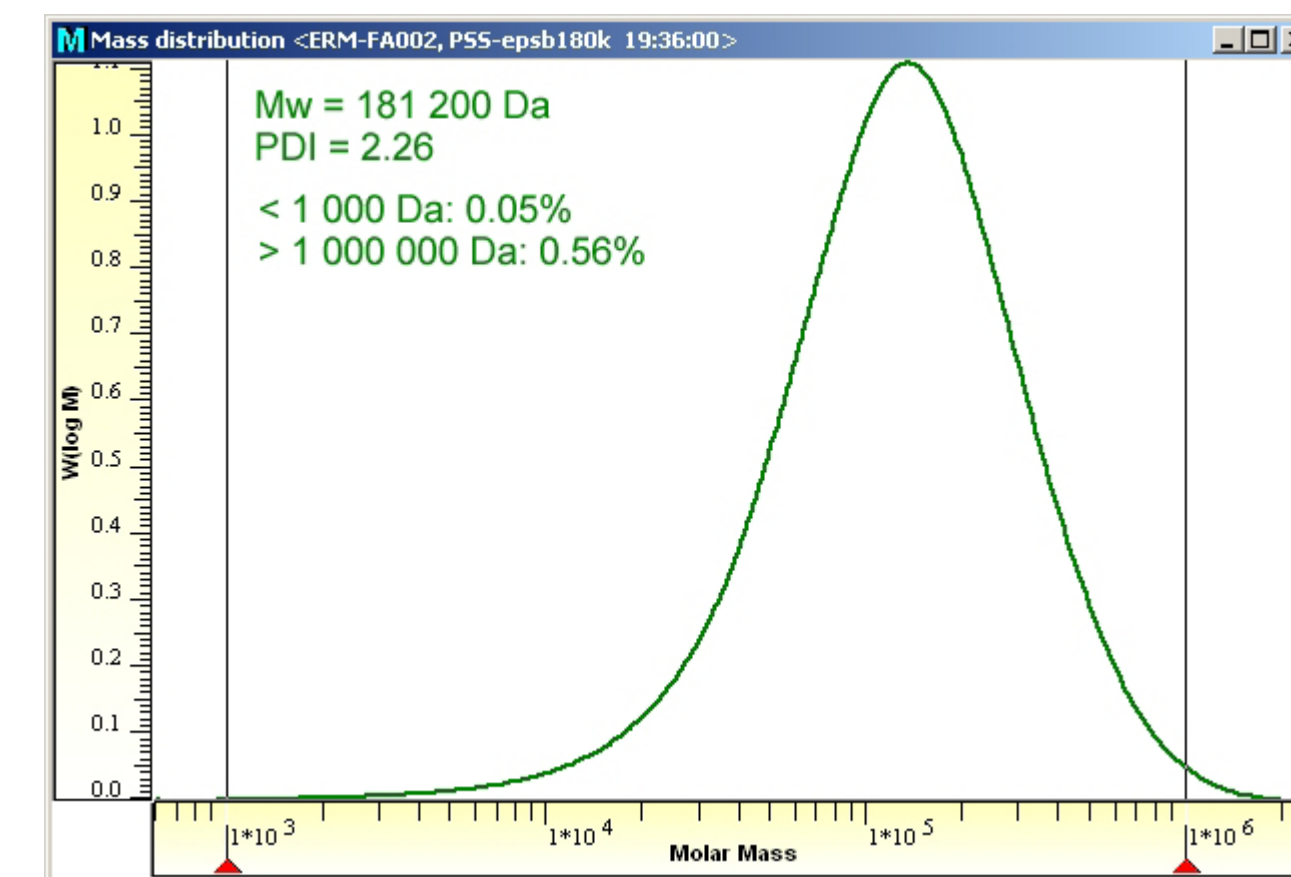


図 1. Ð が約 2、中分子量 M_w の PS の分子量範囲

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC カラムについて

1.1.GPC/SEC に適した固定相の特定方法

1.2.分解と分離に影響する要素

1.3.分子量分離範囲：カラム選択時の注意事項

1.4.GPC/SEC カラムの取り付け方法

1.5.GPC/SEC カラムの試験方法

用語集

図 2 に、排出限界（分子量分離上限）を超える分子量分画を含むサンプルの例を示します。屈折率シグナル（RI、緑の線）が個々の検量線（赤の線）に重ね表示されています。2 つの赤い点は、標準溶液の最大分子量と最小分子量を示します。排除限界を超えると、クロマトグラムでは約 6 mL の溶出量で、見かけ上のショルダーが現れます。このショルダーはサンプルとは無関係ですが、分離能の変化によって引き起こされるものであり、検量線では傾きの変化によって示されます。この問題は、ポアサイズの大きい（排除限界の高い）2 つ目の適合するカラムを追加することで解決できます。

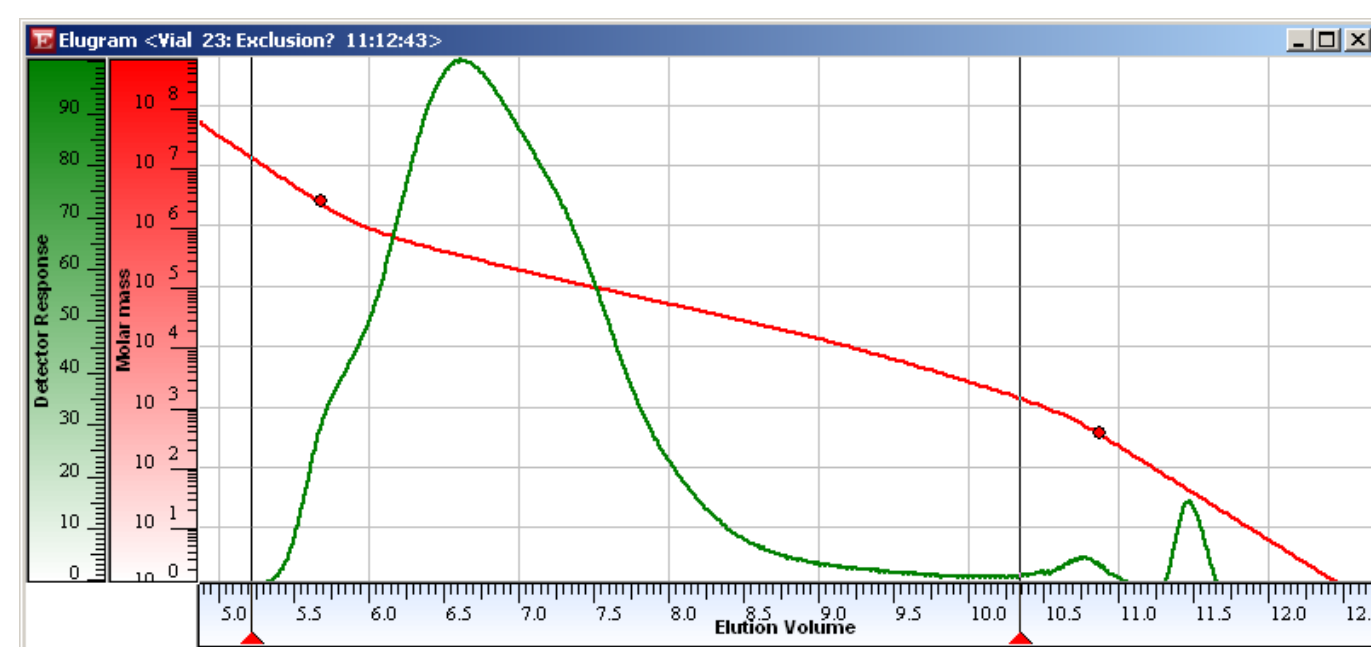


図 2. 選択する分子量分離の上限が低すぎると、クロマトグラムに見かけ上のショルダーが現れる場合があります。

適切なカラムの組み合わせの選択

リニア/ミックスペッドカラムとシングルポアカラムは、どのような組み合わせでも使用することはできません。図 3 に、4 種類のデキストランサンプルを、ポア特性が大きく異なる 2 つの GPC/SEC 分析カラムのセットで分析した例を示します。サンプルの 1 つのデキストラン 40（黒のトレース）にはショルダーがあるため二峰性に見えます。ただし、このショルダーはサンプルとは無関係であり、シングルカラムでの分析や別のカラムセットでは現れません（図 4 と比較）。

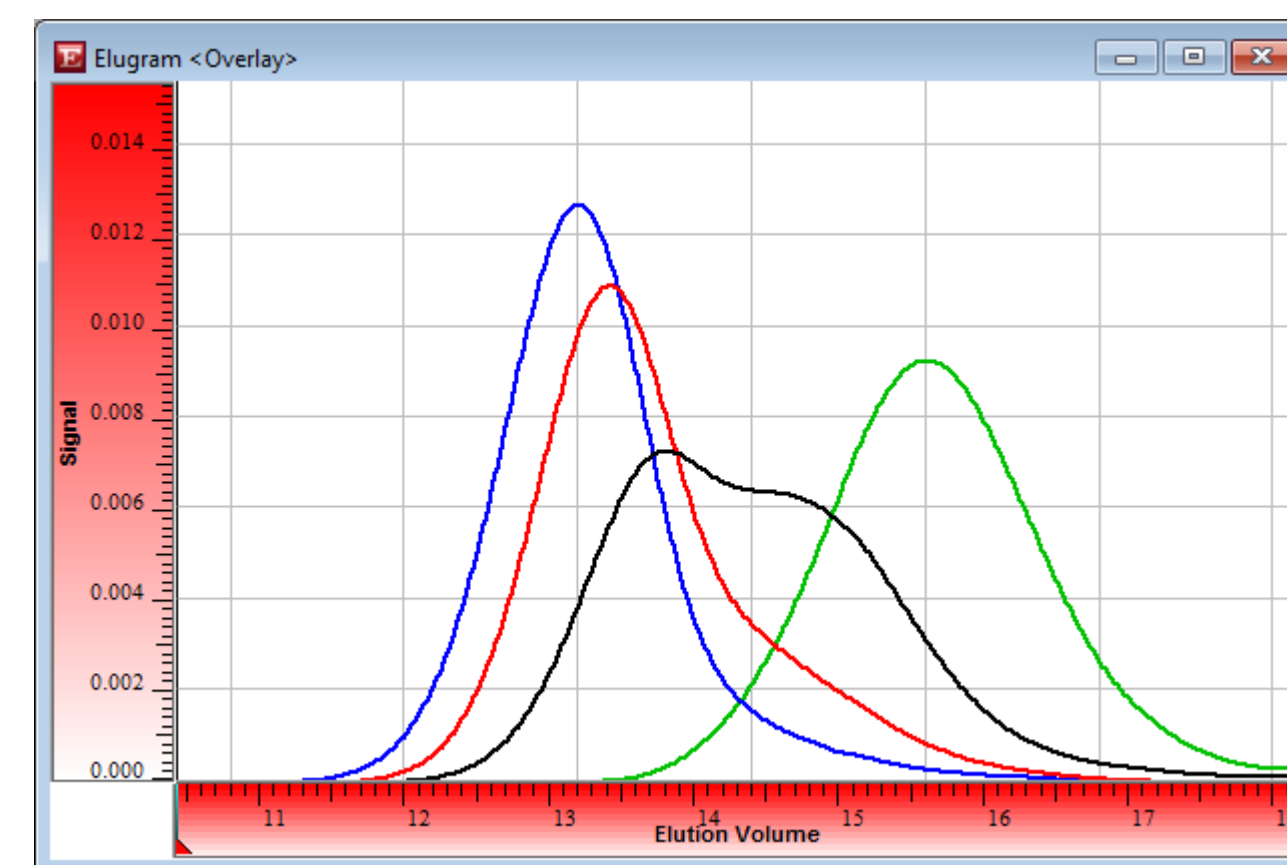


図 3. 不適合なカラムの組み合わせにより二峰性に見えるデキストラン

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC カラムについて

1.1. GPC/SEC に適した固定相の
特定方法

1.2. 分解と分離に影響する要素

1.3. 分子量分離範囲：カラム選択
時の注意事項

1.4. GPC/SEC カラムの取り付け
方法

1.5. GPC/SEC カラムの試験方法

用語集

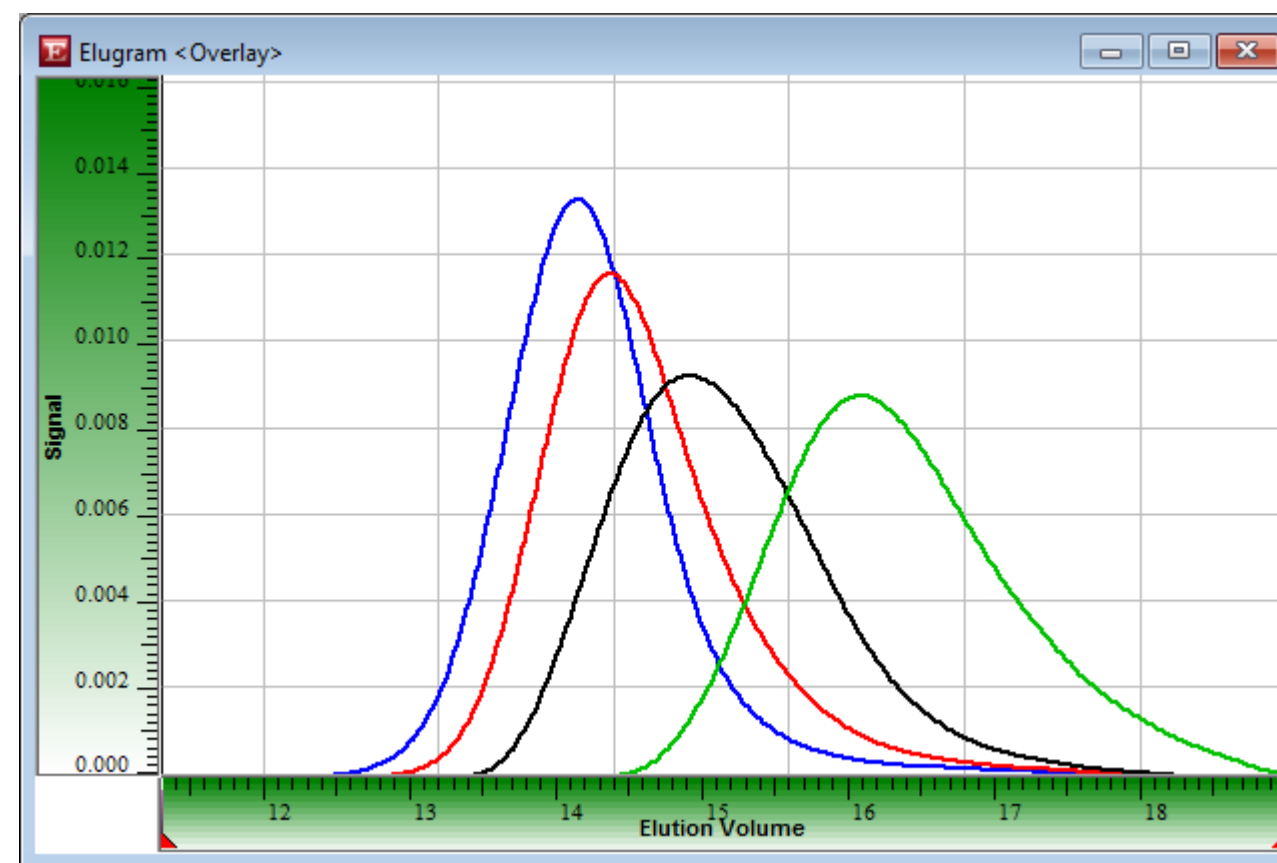


図 4. 不適合のないカラムの組み合わせでのデキストランの分析結果

図 3 の生データのその後の処理では、分子量分布に誤ってショルダーが現れます。問題なのは、メーカーの合成方法が少し変わると、このショルダーが移動したり消滅したりする可能性もあることです。この概念に基づくと、長時間の分析で再現性の高い結果を達成するのは困難です。

ポア特性の不適合は、必ずしも検量線にわかりやすく表示されるわけではありません。図 5 に、ポアが非常に小さいカラムと非常に大きいカラムを直列につないだ場合の検量線の例を示します。この検量線には、異なる傾きと変曲点を含む 2 つの領域があります。このような組み合わせにより、不自然なクロマトグラフィーが生成されます。

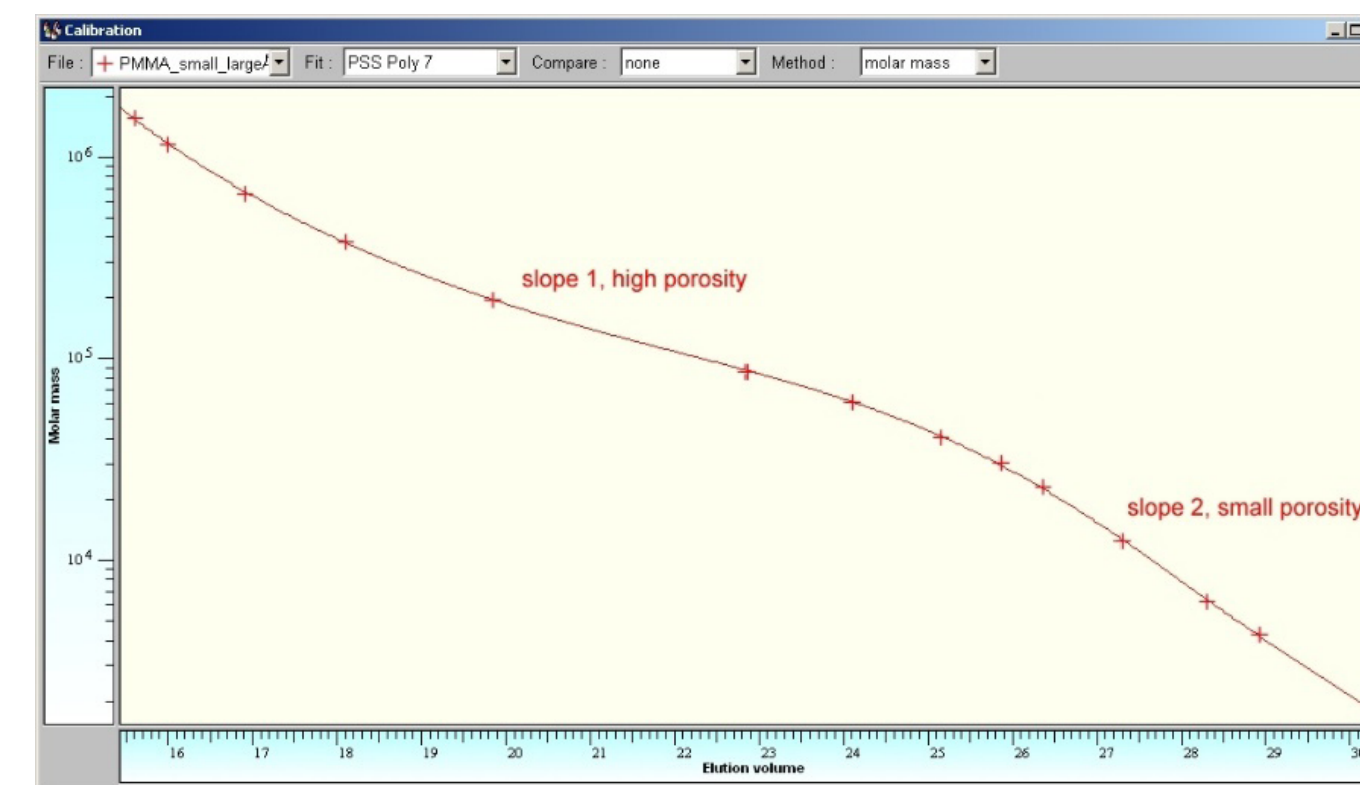


図 5. ポア特性が適合しない 2 種類のカラムの検量線。検量線に 2 つの異なる傾きがあるため、ショルダーを含む正しくないクロマトグラムになります。

これに対し、検量線は正常に見えますが、目に見えない不適合の問題が含まれている可能性があります。この不適合の問題を検出するには、分子量分布が広い参照物質を使用して変曲点の領域を証明するしかありません³。

オンライン光散乱による絶対検出を使用しても、高度なキャリブレーションデータの近似でこの問題を解消することはできません。正しく適合するカラムを組み合わせで分離を最適化することが、唯一の解決方法です。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC カラムについて

1.1. GPC/SEC に適した固定相の
特定方法

1.2. 分解と分離に影響する要素

1.3. 分子量分離範囲：カラム選択
時の注意事項

1.4. GPC/SEC カラムの取り付け
方法

1.5. GPC/SEC カラムの試験方法

用語集

結論

メーカーを問わずすべてのカラムに適用できる、いくつかの一般的なルールがあります。これら 3 つの基本ルールを適用することで、高い再現性で適用でき、長期的に利用できる GPC/SEC メソッドを確立できます。

A) サンプル D を考慮して、分子量分離の上限が十分であることを確認します。サンプルの生データの上に検量線を重ねて、領域内ですべてのサンプル分画が十分に分離されて溶出していることを確認します。

B) 次の組み合わせは使用しないでください。

- 種類の異なるリニアカラム
- リニアカラムとシングルポアカラム（例：リニア + 100 Å）
- 粒子サイズが異なるシングルポアカラム（メーカーが推奨している場合、または慎重な不適合試験を実施した場合に限っては使用可能）

C) 予想外のショルダーを慎重に調査します。傾きの変化について検量線を確認し、分子量分布が広い参照物質を使用して隠れたポア特性の不適合を検出します。リニア/ミックスドカラムでの分子量範囲を拡大するためにメーカーが充填剤を誤って混合すると、シングルカラム内でもポア特性の不適合が発生する場合があります。また、リニア/ミックスベッドカラムを使用した場合に（THF 溶液などで）特定の傾きの直線の検量線が生成されても、トルエン溶液などで直線性と傾きが同じになるとは思わないでください。

参考文献

1. Yau, W. W. et al. Effect of Column Performance on the Accuracy of Molecular Weights Obtained from Size Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography) .*J. Chromotog. A* **1976**, 125, 219–230.
2. Held, D. Increase Resolution and Separation Range, LC/GC. *The Column* **2011**.
3. Hofe, T. Beware of Mismatch, LC/GC. *The Column* **2008**, 4(20).

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

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC カラムについて

1.1. GPC/SEC に適した固定相の
特定方法

1.2. 分解と分離に影響する要素

1.3. 分子量分離範囲：カラム選択
時の注意事項

1.4. GPC/SEC カラムの取り付け
方法

1.5. GPC/SEC カラムの試験方法

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC カラム

1.4. GPC/SEC カラムの取り付け方法

カラムを適切に取り付けるには、溶媒の互換性、最大流量、最高動作温度などのカラム特性を理解しておく必要があります。

GPC/SEC カラムの取り付け方法は HPLC カラムと似ています。ただし、いくつかの重要な違いを考慮する必要があります。

HPLC 固定相と同様に、GPC/SEC カラムはシリカベースとポリマーベースに分類できます。シリカベースの固定相のメリットは、圧力安定性と溶媒適合性が高いことです。シリカベースの固定相は、狭い分子量範囲で高い分離能を示します。いっぽう、ポリマーベース材料の分子量範囲はより広くなります。ポリマーベース材料は多くの場合、カラムセット（バンク）に組み込んで分離範囲を拡大することが容易です。サンプルとの相互作用が発生する可能性も低いです。

いずれもカラムタイプでも、取り付け中に最大カラム圧力を超えないことと、空気が入らないようにすることが重要です。

取り付け前の考慮事項

A) 溶媒の適合性

使用する溶媒がカラムに対応していることを確認します。

GPC/SEC システムの移動相とカラム内の溶媒が異なる場合は、システムの移動相をカラムの移動相に合わせて変更します。

システムとカラムの移動相が非混和性である場合は、中間溶媒を使用します。

カラムの取り付け手順に従います。取り付け後に、カラムのユーザーマニュアル中の手順に従って、カラムを必要な溶媒に切り替えることができます。

B) チューブ

カラムと検出器の間のチューブの長さは、バンド幅の拡大を招くデッドボリュームをなくすため、できるだけ短くしてください。

また、チューブの内径（ID）をカラム ID とアプリケーションに合わせる必要があります。これは、ナローボアカラムや分取カラムが使用される場合に特に重要です。ナローボアカラムには ID の小さいチューブが必要です。高流量で実行される分取アプリケーションでは、多くの場合、より大きい ID が必要です。

C) フィッティングとフェラル

既存のフィッティングとフェラルを交換することをお勧めします（特に別のメーカーのカラムが取り付けられている場合）。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC カラムについて

1.1. GPC/SEC に適した固定相の 特定方法

1.2. 分解と分離に影響する要素

1.3. 分子量分離範囲：カラム選択 時の注意事項

1.4. GPC/SEC カラムの取り付け 方法

1.5. GPC/SEC カラムの試験方法

用語集

図 1 にフィッティングおよびフェラル付きのチューブを示します。ストップの深さ (x) は、メーカーやブランドにより異なります。既存のフィッティングで別のメーカーのカラムを取り付けようとする、x が短くなったり長くなったりします。x が短いとデッドボリュームや分離能低下の原因となり、長いとフィッティングを締めるときにカラムフリットが破損する危険性があります。

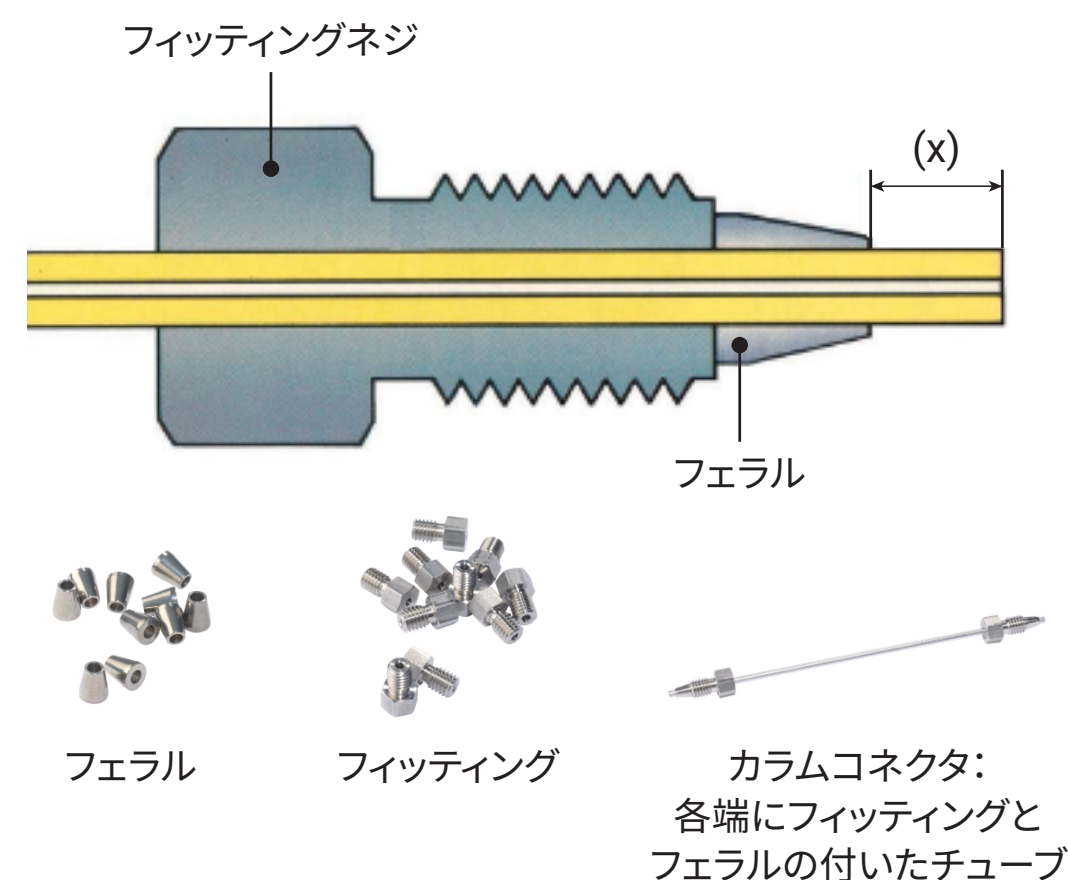


図 1. ストップの深さ (x) はメーカーにより異なります。カラムの変更時には、既存のフィッティングとフェラルを交換してください。

カラム取り付け

1. 低流量 (0.2 mL/min) を設定して、システム内に空気が入らないようにします。
2. チューブから溶媒が滴下しているかどうかを確認します。
3. 取り付けるプレカラムのプラグを取り外し、正しい流れの方向でカラムとチューブを接続します (ほとんどのカラムでは、この方向が矢印で示されています)。
4. チューブが底に達するまで挿入します。フィッティングを締め過ぎないようにしてください。手締めで十分に密封できます。

5. 溶媒がカラムのもう一方の端から流れ出るかどうかを確認します。流れ出ない場合は、フィッティングがきつすぎないか、またはカラム内に空気が残っていないかどうかを確認します。気泡をモニタリングするための簡単な試験方法は、カラムの端を移動相の入ったビーカーに入れることです。
6. 注入口に気泡が閉じ込められている場合：カラムを逆方向に取り付け、0.1 mL/min の流量で、カラム出口に気泡が現れなくなるまでカラムに溶媒を充填します。その後、カラムを正しい流れの方向に変更します。気泡が現れなくなるまで、0.1 mL/min の流量を使用します。
7. カラム出口から溶出液が滴下したら、次のカラムを接続します。
8. 検出器を再接続する前に、カラム容量の 3 ~ 5 倍以上でカラムを洗浄します。
9. 流量が動作流量に達するまで、5 分ごとに 0.2 mL/min 増分でゆっくりと増やします。システム圧力が安定したら、新しい接続部にリークがあるかどうかをチェックします。

カラムセット内のカラムの順序

一般的に、カラムセット内のカラムの順序は、GPC/SEC 分析の結果に影響しません。

カラムセットが異なるポア特性で構成されている場合は、ポアサイズが大きいカラムから取り付けていくことを推奨します。ただし、メーカーが別の方法を推奨している場合は除きます。この結果、注入バンドの粘度が早く低下するため、分離能が向上します。分子量が大きい化合物は、粘度に対する最大の寄与要素です。カラムが高分子を分離すると粘度が早く低下し、ポアへの拡散プロセスが促進されます。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC カラムについて

1.1. GPC/SEC に適した固定相の特定方法

1.2. 分解と分離に影響する要素

1.3. 分子量分離範囲：カラム選択時の注意事項

1.4. GPC/SEC カラムの取り付け方法

1.5. GPC/SEC カラムの試験方法

用語集

例外は、圧力安定性が低いカラムが使用される場合です。このようなカラムはセットの末端に取り付けて、（ポンプの故障などによる）潜在的な圧力変動から保護することをお勧めします。

カラムとシステムの性能チェック

GPC/SEC カラムの平衡化にはある程度の時間がかかります。一般的に、カラムの平衡化には、カラム容量の 5 倍以上（溶媒交換時にはできれば 10 倍以上）が必要です。

新しいカラムを平衡化する前に、理論段数の測定などによってカラム性能をチェックすることをお勧めします。メーカーの試験手順に従うことを推奨します。理論段数は、必ずしもカラムに関係しない多くのパラメータに依存することを覚えておいてください。不適切なチューブ、フィッティング、フェラルなどによりシステム内のデッドボリュームが大きくなると、理論段数が低下する可能性があります。

カラムセットの理論段数試験が失敗した場合は、カラム試験を別途実施して、欠陥のあるカラム（またはプレカラム）を特定することをお勧めします。理論段数試験が成功したら、カラムを平衡化して、分離能を測定してください。この試験を実施すれば、システムのサンプル分析準備が整ったことになります。

結論

- GPC/SEC カラムの取り付け時には、必ず流量を小さくしてカラム内に空気が入らないようにすることを推奨します。
- 最新の GPC/SEC カラムは旧式のカラムより安定性が大幅に向上していますが、推奨されている流れの方向でカラムを取り付けることをお勧めします。
- カラムセット内のカラムの順序は結果には影響しませんが、カラムの寿命や分離能に影響する可能性があります。通常は、ポアサイズが大きいカラムから取り付けていくことを推奨します。ただし、メーカーが別の方法を推奨している場合は除きます。

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

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC カラムについて

1.1. GPC/SEC に適した固定相の
特定方法

1.2. 分解と分離に影響する要素

1.3. 分子量分離範囲：カラム選択
時の注意事項

1.4. GPC/SEC カラムの取り付け
方法

1.5. GPC/SEC カラムの試験方法

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC カラム

1.5. GPC/SEC カラムの試験方法

カラムの理論段数、非対称性、分離能

カラムの性能を示すには、理論段数 N (または理論段数/ m)、ピークの対称性または非対称性、特定の分離能 (R_{sp}) がよく使用されます。特定の溶媒の各種パラメータの許容基準を定めた国内/国際基準がいくつかあります。例えば ISO 13885、DIN 55672、ASTM D 5296-05 などです。これらのパラメータを定期的にモニタリングすることをお勧めします。

メーカーはカラムの販売前にカラム性能の試験を実施しています。その結果は試験条件と共に分析証明書に記載されています。カラムの取り付け後に、ユーザーのラボで、この試験を同条件で再実施することを推奨します。

全体的なパラメータ性能を比較するには、適正なパラメータの維持が必要であることに注意してください。移動相、試験材料、流量、温度、カラムへのロード量、検出器、システム (チューブを含む) が一致している必要があります。そうでないと、数値結果を比較できません。

理論段数と非対称性を測定するには、単分散サンプルを注入するという方法があります。詳細な実験条件については、対応する GPC/SEC 標準、またはカラム品質証明書を参照してください。

一般的な各種 GPC/SEC 溶媒のその他の参照物質については、表 1 をご覧ください。これらの参照物質の注入量は 20 μL (以下) で十分ですが、濃度は使用するカラム数に合わせる必要があります (カラム 1 本:0.2 g/L、カラム 2 本:0.5 g/L、カラム 3 本:1 g/L)。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC カラムについて

1.1. GPC/SEC に適した固定相の
特定方法

1.2. 分解と分離に影響する要素

1.3. 分子量分離範囲：カラム選択
時の注意事項

1.4. GPC/SEC カラムの取り付け
方法

1.5. GPC/SEC カラムの試験方法

用語集

表 1. 理論段数、ピーク対称性、分離能の測定に適した参照物質。

移動相 (極性順)	理論段数	分離能	推奨操作温度 (°C)
トルエン	BHT	ポリスチレン	30 ~ 40
テトラヒドロフラン	BHT	ポリスチレン	30 ~ 40
クロロホルム	BHT	ポリスチレン	30 ~ 40
1,2,4-トリクロロベンゼン	BHT	ポリスチレン	140 ~ 160
ジメチルアセトアミド	メチルイソブチレート、 例：mm102	ポリメチルメタクリレート	60 ~ 80
N-メチルピロリドン	メチルイソブチレート	ポリメチルメタクリレート	60 ~ 80
ジメチルスルホキシド	メチルイソブチレート	ポリメチルメタクリレート、 またはプルラン*	60 ~ 80
ジメチルホルムアミド	メチルイソブチレート	ポリメチルメタクリレート	60 ~ 80
ヘキサフルオロイソプロパノール	メチルイソブチレート	ポリメチルメタクリレート	30 ~ 40
水	エチレングリコール	プルラン	30 ~ 60

* DMSO 溶液中の PMMA の dn/dc が小さいと、PMMA シグナルが弱くなります。S/N 比が不十分な場合はプルランを使用してください。

1 m あたりの理論段数 (N_{th} (1/m)) の計算には、ピークの位置と半値幅 ($w_{1/2}$) を使用します。

$$N_{th} = \left(\frac{V_p}{\sigma} \right)^2 = \frac{554}{L} \cdot \left(\frac{V_p}{w_{1/2}} \right)^2$$

説明：

σ = 半値幅法 ($w_{1/2}$) によるばらつきの推定値

V_p = 最大ピークでの溶出量

L = カラム長 (cm 単位)

非対称性の計算は、適用する参照標準に大きく依存します。DIN 56672 と ISO/EN 13885 では、ピークの非対称性を次のように定義しています。

$$A = \frac{w_l}{w_r}$$

w_l と w_r は、最大ピークの左右のピーク幅です (ピーク高の 10 % で測定)。

ASTM では、非対称性を $A' = w_r/w_l$ 、すなわち $A' = 1/A$ と定義しています。

一般的には分離能のほうが重要です。分離能は、特定の分子量領域内での分離性能を示すためです。ポリマー標準の混合物を注入することで、分離能を測定できます。また、検量線から必要な情報 (傾き (D) など) を得られることもあります。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC カラムについて

1.1. GPC/SEC に適した固定相の特定方法

1.2. 分解と分離に影響する要素

1.3. 分子量分離範囲：カラム選択時の注意事項

1.4. GPC/SEC カラムの取り付け方法

1.5. GPC/SEC カラムの試験方法

用語集

特定の分離能 R_{sp} によって 2 つのピークの実験品質 (R_s) がわかります。ここでは分子量が 1 桁異なります。

$$R_{sp} = \frac{R_s}{\lg \frac{M_1}{M_2}} = \frac{0.579}{\sigma \cdot D}$$

図 1 に、ブチルヒドロキシトルエン (BHT) の THF 溶液による試験結果を示します。緑の数値は、適用される基準 ISO 13885/DIN 55672 の許容基準に適合することを示します。

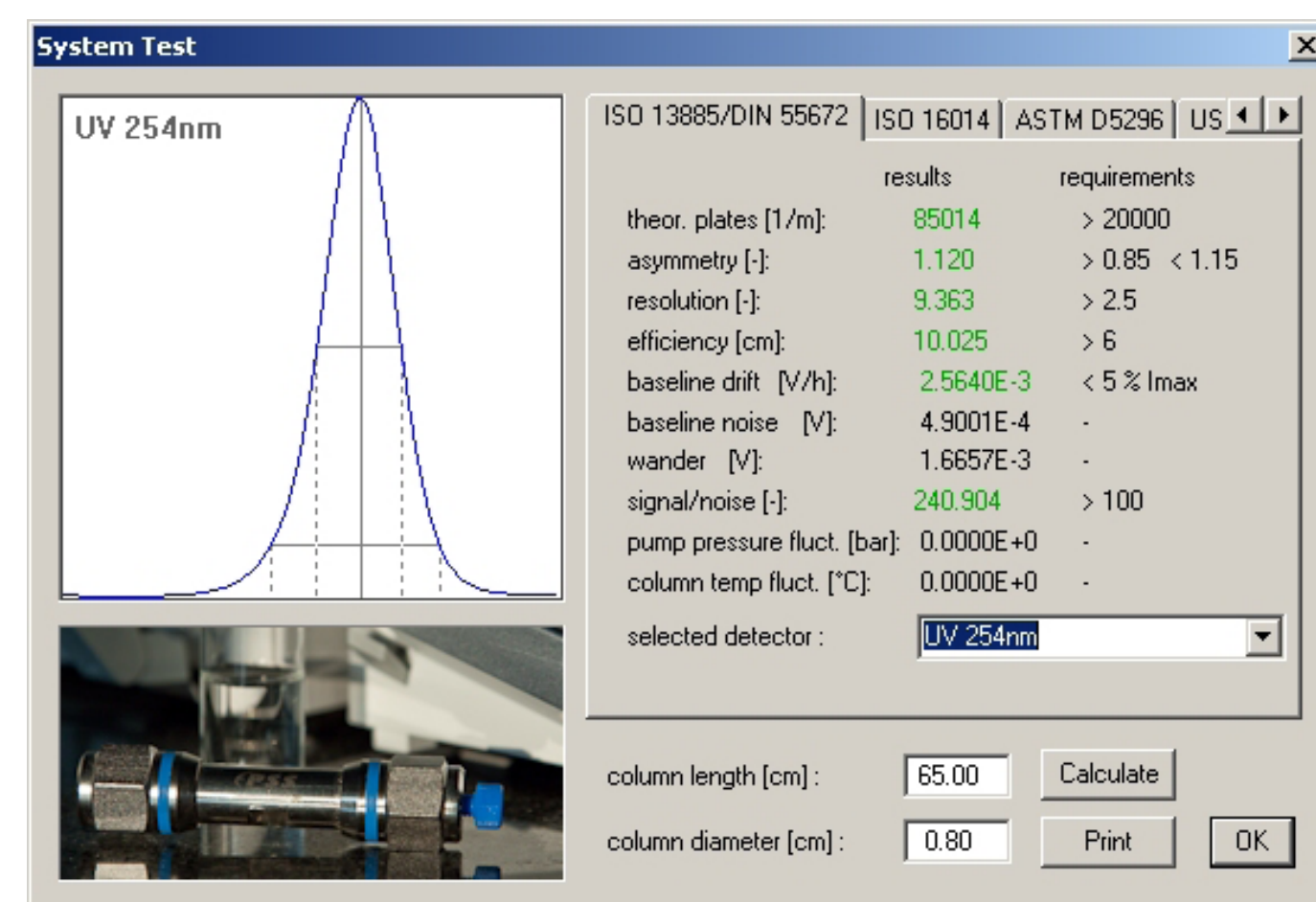


図 1. ISO 13885/DIN 55672 の許容基準に基づく理論段数、ピーク対称性、分離能の測定の例。

出所不明の多種多様なサンプルケミストリやサンプルを分析する場合は、必ず理論段数を測定することを強く推奨します。分析前後の試験により、不十分なサンプル前処理によるカラム性能の低下や、特定の条件で分析できないサンプルを特定できます。品質管理設定においては、メインサンプルとケミストリが同じコントロールサンプルを分析して、メソッドの完全性を確保します。

不適合試験

ピーク内の特定の溶出量でショルダーが現れる場合は、ポアサイズの不適合が原因である可能性があります。ポアサイズの不適合は、カラムセット内や、マルチポアサイズのシングルカラムで発生する可能性があります¹。ポアサイズの不適合試験では、分離能試験とは異なり、分子量分布が広い参照物質を注入する必要があります。クロマトグラムに予想外のショルダーが現れたら、これらの参照物質を注入する必要があります。

理論段数試験に失敗した場合のアクション

新しく取り付けられたカラムの理論段数試験や非対称性試験に失敗したら、まずカラム接続部を点検することを推奨します。カラムメーカーを変更した場合は、カラムヘッドのストップの深さが性能低下の原因である可能性があります。ストップの深さは、メーカーによって異なります。新しいカラムを取り付けたときに既存のチューブをそのまま利用すると、問題が発生することがよくあります。

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC カラムについて

1.1. GPC/SEC に適した固定相の 特定方法

1.2. 分解と分離に影響する要素

1.3. 分子量分離範囲：カラム選択 時の注意事項

1.4. GPC/SEC カラムの取り付け 方法

1.5. GPC/SEC カラムの試験方法

用語集

ストップの深さが試験の失敗や性能低下の原因でない場合は、個々のカラム試験を実施することを推奨します。プレカラムとガードカラムの試験も実施する必要があります。カラムセット内に欠陥のあるカラムやプレカラムが 1 つでもあると、理論段数や非対称性が仕様外になる可能性があります。欠陥のあるカラムは交換が必要です。試験結果が不明確な場合は、カラムメーカーにお問い合わせください。

参考文献

1. Hofe, T. Beware of Mismatch, LC/GC. *The Column* **2008**, 4(20).

Originally published in *The Column*, August **2014**, by authors Friedhelm Gores and Daniela Held.

目次

本電子書籍シリーズについて

GPC/SEC カラムについて

1.1. GPC/SEC に適した固定相の
特定方法

1.2. 分解と分離に影響する要素

1.3. 分子量分離範囲：カラム選択
時の注意事項

1.4. GPC/SEC カラムの取り付け
方法

1.5. GPC/SEC カラムの試験方法

用語集

GPC/SEC 電子書籍シリーズ – GPC/SEC カラム

用語集

Å	オングストローム、 10^{-10} m と等しい長さの単位
BHT	ブチル化ヒドロキシトルエン
Da	ダルトン (g/mol)
DMAc	ジメチルアセトアミド
D	分散度 ($D = M_w/M_n$)
dn/dc	屈折率増分
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
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
id	内径
LS	光散乱
M_n	数平均分子量
M_w	重量平均分子量
移動相	クロマトグラフィーシステムで使用される液相
MMD	分子量分布
臨界点	ポリエチレングリコール
PMMA	ポリメチルメタクリレート
PS	ポリスチレン
RI	示差屈折率 (検出/検出器)
R_{sp}	特定の分離能
SDV	PSS 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
S/N	S/N 比
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

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。

DE37780935

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

5994-5936JAJP

