

アプリケーションノート

クオータナリーソルベントマネージャーとエバポレイト光散乱検出器を備えたアドバンスドポリマークロマトグラフィー（APC）を用いたグラジエントポリマー溶出クロマトグラフィー

Jennifer Gough, Will Martin, Neil J. Lander

日本ウォーターズ株式会社



要約

QSM を搭載した APC は、ポリマー業界で使用される強力な溶媒向けに特別に設計されたものです。Waters ACQUITY アドバンスドポリマークロマトグラフィー（APC）システムは、THF、クロロホルム、ジメチルスルホキシドなどの強溶媒を使用して、一貫して動作するように設計されています。業界で認められている APC システムにクォータナリーポンプの柔軟性を追加することで、ポリマー分析技術は HPLC テクノロジーに制限されなくなりました。

アプリケーションのメリット

- 高い溶媒適合性備えた、設定不要の p-QSM。
- 逆相や順相、およびサイズに基づく分離により、柔軟な分析が可能に。
- p-QSM を搭載した低拡散 APC は、HPLC や GPC よりも溶媒消費量が少なく、環境により優しくなっている。
- 粒子径 3 μm 以下の BEH カラムテクノロジーが高分離能を実現。

はじめに

図 1 のグラジエントポリマー溶出クロマトグラフィー（GPEC）クロマトグラムは、Alliance HPLC（高速液体クロマトグラフィー）システムを使用しており、分析時間に 30 分かかります。このメソッドを超高速高分離液体クロマトグラフィー（UPLC）システムに移管すると、分析時間を大幅に短縮できます。一方、大半の UPLC システムはテトラヒドロフラン（THF）などの有機溶媒に適合しておらず、100% の有機溶媒を頻繁に使用できるだけの堅牢性を備えていません。

Waters ACQUITY アドバンスドポリマークロマトグラフィー（APC）システムは、THF、クロロホルム、ジメチルスルホキシドなどの強溶媒を使用して、一貫して動作するように設計されています。APC システムは元々、アイソクラティックポンプを使用するゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）用に設計されました。グラジエント溶出用のポリマークォータナリーソルベントマネージャー（p-QSM）とエバポレイト光散乱検出器（ELSD）を APC システムに接続することで、GPEC を 10 分以内に完了できます（図 1）。

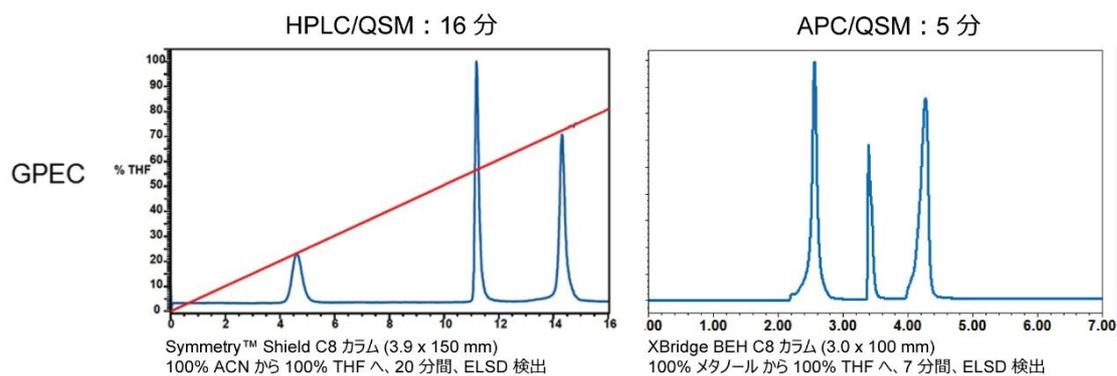


図 1.HPLC および UPLC 分析時間の GPEC による比較。

実験方法

| | |
|----------|---|
| システム: | p-QSM 搭載 APC |
| カラム: | XBridge BEH C8、XP、2.5 μm、3.0 × 100 mm (製品番号: 186006047) |
| 移動相 A/B: | メタノール |
| 移動相 C/D: | テトラヒドロフラン |
| 流量: | 0.7 mL/分 |
| カラム温度: | 40 °C |
| 注入量: | 1 μL |
| サンプル濃度: | PMMA (1 mg/mL)、PS (0.12 mg/mL)、PBD (0.5 mg/mL) |

グラジエント:

| シリアル番号 | 時間 | 流量 (mL/分) | %A | %B | %C | %D | カーブ |
|--------|------|-----------|-------|-----|-------|-----|------|
| 1 | 初期条件 | 0.700 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 初期条件 |
| 2 | 1.00 | 0.700 | 60.0 | 0.0 | 40.0 | 0.0 | 11 |
| 3 | 2.00 | 0.700 | 35.0 | 0.0 | 65.0 | 0.0 | 11 |
| 4 | 3.00 | 0.700 | 15.0 | 0.0 | 85.0 | 0.0 | 11 |
| 5 | 4.00 | 0.700 | 15.0 | 0.0 | 85.0 | 0.0 | 11 |
| 6 | 5.00 | 0.700 | 0.0 | 0.0 | 100.0 | 0.0 | 6 |
| 7 | 6.00 | 0.700 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 6 |
| 8 | 7.00 | 0.700 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 11 |

カラムにポリマーを沈殿させるには、グラジエント混合溶媒におけるポリマーの溶解度を決定する必要があります。文献で一般に認められている方法は、濃度既知のポリマー溶液 ($10^{-2} \sim 10^{-3}$ mg/mL) を非溶媒 (貧溶媒) で滴定することです。滴定が進むと、ポリマーが凝集して沈殿するため、ポリマー溶液は濁って見えます。ポリマーは非溶媒によってはじかれ、ポリマー分子の凝集が進みます。非溶媒の体積分率は、式 1 を使用して計算されます。ここで、ファイ (Φ) は曇点 (CP) を 100 で割った値に等しく、非溶媒の体積 (Vns) をポリマー体積、良溶媒体積、および非溶媒体積の合計 (Vp + Vs + Vns) で割った値に等しくなります。この手法は、曇点測定と呼ばれます^{4,5}。

$$\text{式 1 } F = CP/100 = Vns / Vp + Vs + VNS$$

再現性のあるピーク面積を達成するように線形グラジエントを最適化できない場合、ステップグラジエントが必要になることがあります。この実験では、ポリスチレン (PS)、ポリブタジエン (PBD)、ポリメチルメタクリレート (PMMA) の 3 つのポリマーの GPEC 分析を行いました (表 1)。線形グラジエントでは、PS および PMMA のピーク面積の再現性が低く、PBD は溶出しません。

| | 1 | 2 | 3 |
|-----------------------------------|--------------|-------------|---------------------|
| サンプル | ポリブタジエン (PB) | ポリスチレン (PS) | ポリメチルメタクリレート (PMMA) |
| モル質量 (g/mol) | 120,000 | 200,000 | 200,000 |
| クロマトグラフィー墨点 [MeOH (非溶媒) / THF] | 30/70 | 46/54 | 65/35 |

表 1. GPEC 実験で使用したポリマー。

そのため、ステップグラジエント法を使用して、ポリマーがグラジエントの不溶性領域で費やす時間を抑えます。グラジエントテーブルおよび得られたクロマトグラム (図 2) を見てわかるように、グラジエントプロファイルの不溶性領域 (11) には急勾配曲線が使用されますが、可溶性領域には勾配が緩やかな曲線 (6) が使用されます。

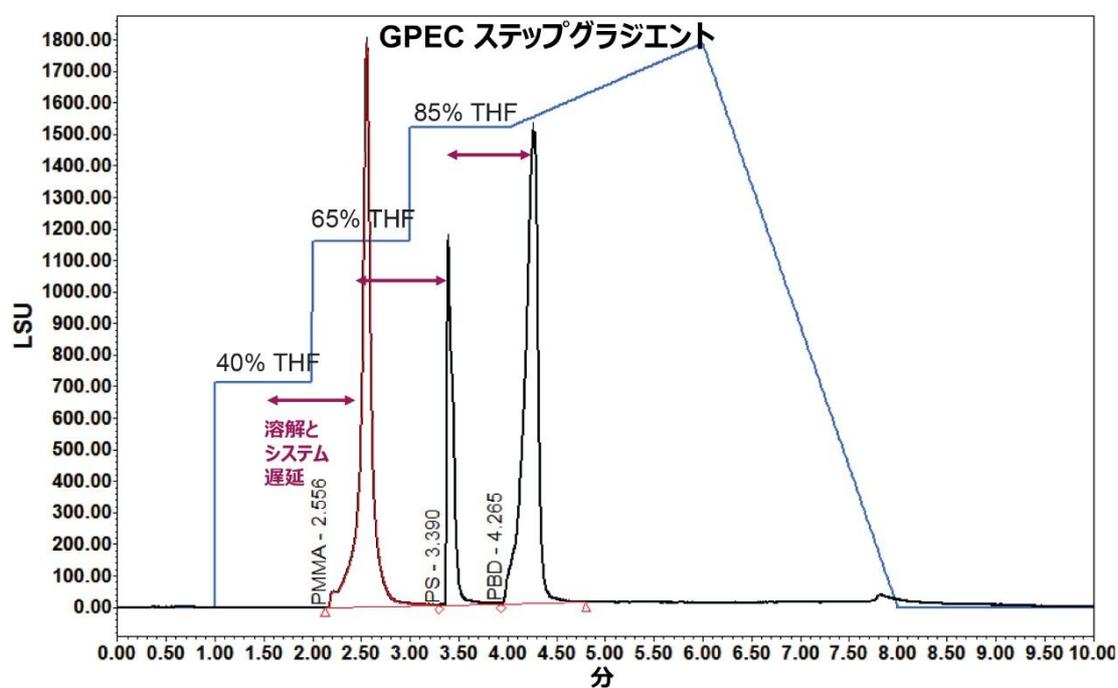
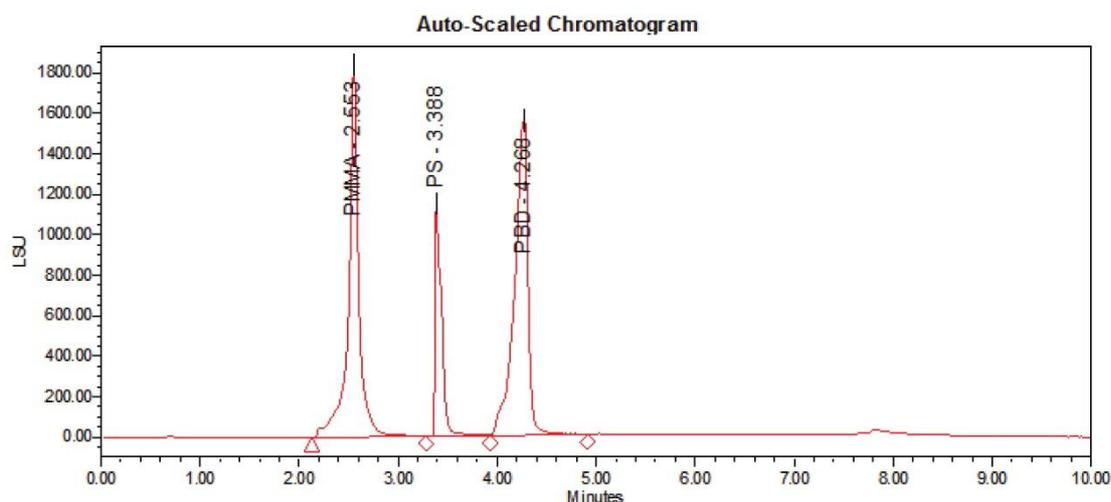


図 2. PMMA、PS、PBD の GPEC 分析における Empower による重ね書き。

Empower 3 CDS カスタム計算およびレポート機能を使用する場合、データを別のスプレッドシートにエクスポートする必要はありません。図 3 のレポートは、Empower 内で計算されたピーク面積比とグラジエント比を示しています。完全な GPEC プロジェクトおよび詳細な GPEC ガイドは、Waters の Web サイトおよび Empower マーケットプレースから入手できます。

| SAMPLE INFORMATION | | | |
|--------------------|---|---------------------|-----------------------------|
| Sample Name: | Mix (1,012,05) PMMA,PS,PBD | Acquired By: | System |
| Sample Type: | Unknown | Sample Set Name | GPEC Usability Sample Set |
| Vial: | 1:A,4 | Acq. Method Set: | 40C MeOH 10min Step 1 |
| Injection #: | 1, 2, 3 | Processing Method | New GPEC Processing Method. |
| Injection Volume: | 0.80 ul | Channel Name: | % A, % C, ELSD Signal |
| Run Time: | 10.0 Minutes | Proc. Chnl. Descr.: | % A, % C, ELSD Signal |
| Date Acquired: | 8/28/2019 10:05:33 AM EDT, 8/28/2019 10:16:04 AM EDT, 8/28/2019 10:26:36 AM | | |
| Date Processed: | 9/24/2019 2:24:31 PM EDT, 9/24/2019 2:24:32 PM EDT | | |



% Area Summarized by Name
Channel: ELSD Signal

| | SampleName | Inj | Channel | Vial | PMMA | PS | PBD |
|-----------|---------------------------|-----|-------------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | Mix(1,012,05) PMMA,PS,PBD | 1 | ELSD Signal | 1:A,4 | 39.75 | 15.56 | 44.69 |
| 2 | Mix(1,012,05) PMMA,PS,PBD | 2 | ELSD Signal | 1:A,4 | 39.65 | 16.21 | 44.14 |
| 3 | Mix(1,012,05) PMMA,PS,PBD | 3 | ELSD Signal | 1:A,4 | 40.12 | 15.55 | 44.33 |
| Mean | | | | | 40 | 16 | 44 |
| Std. Dev. | | | | | 0 | 0 | 0 |
| % RSD | | | | | 0.6 | 2.4 | 0.6 |

Channel: % A

| Channel | YValue_Pk1 | YValue_Pk2 | YValue_Pk3 |
|---------|------------|------------|------------|
| 1 % A | 35.000 | 15.0 | 13.0 |

Channel: % C

| Channel | YValue_Pk1 | YValue_Pk2 | YValue_Pk3 |
|---------|------------|------------|------------|
| 1 % C | 65.000 | 85.0 | 87.0 |

図 3. グラジエントカスタム計算を用いた 3 回の注入の GPEC 分析の Empower レポート。

結果および考察

GPEC と GPC は異なるものです。図 4 のクロマトグラムの例では GPC 分離を使用しており、化学的性質の異なる 3 種のポリマーが流体力学的容積が類似しているために共溶出しています。これらのポリマーを分離するために逆相分離を使用した場合、ポリマーは分離全体にわたって一部が溶けた状態のままとなり、ベースライン分離せず、一部が重なります。GPEC 分析法は、良溶媒のグラジエント比がポリマー溶解点に達するまで、意図的にポリマーをカラムまたはカラムフリットに沈殿させ、カラムの表面からポリマーを除去します。GPC でのサイズに基づく分離の代わりに、GPEC ではポリマーは化学的溶解度に基づいて分離されます。GPEC は、GPC アプリケーションと

はまったく異なる LC アプリケーションです¹。

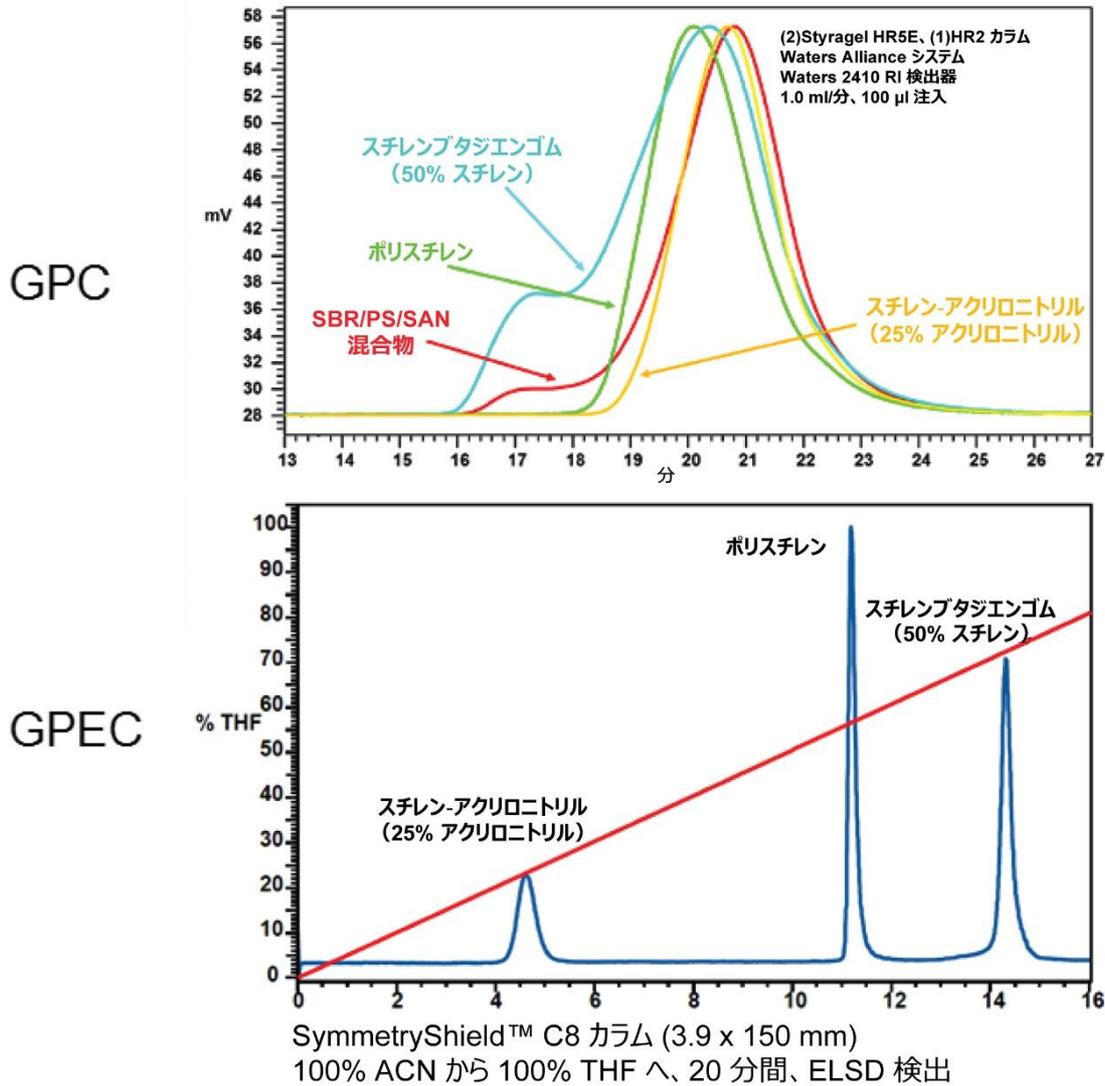


図 4. Alliance システムを使用した 3 種類のポリマーの GPC および GPEC。

GPEC 用に設計された APC システムは新しい構成を採用しています (図 5)。ポリマーアイソクラティックソルベントマネージャー (p-ISM) は、100% 有機溶媒によるグラジエント溶出に対応するために、ポリマークオータナリーソルベントマネージャー (p-QSM) に変更されました。RI はグラジエント溶出に適合しないため、示差屈折率 (RI) 検出器は、エバポレイト光散乱検出器 (ELSD) に変更されました。すべてのポリマーが紫外線を吸収するわけではないため、フォトダイオードアレイ (PDA) 検出器は、このアプリケーションでは使用しません^{2,3}。



図 5. p-QSM および ELSD を搭載した APC システム。

結論

GPEC は、ポリマー混合物の比率の測定において共溶出ピークが干渉する場合に、GPC を補完するための分析法です。この特別な分析手法は何十年も使用されてきましたが、従来の HPLC 装置に制限されていました。UPLC 装置には溶媒適合性の制限があり、GPEC などの分析オプションが制限されることがあります。QSM を搭載した APC は、ポリマー業界で使用される強力な溶媒向けに特別に設計されたものです。業界で認められている APC システムにクォータナリーポンプの柔軟性を追加することで、ポリマー分析技術は HPLC テクノロジーに制限されなくなりました。

参考文献

1. Uliyanchenko, E.; van der Walac, S.; Schoenmakers, P.J., Challenges in Polymer Analysis by Liquid Chromatography. *Polym.Chem.* 2012, 3, 2313–2335. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2012/py/c2py20274c#!divAbstrac>.
2. Waters ACQUITY UPLC ELS Detector, <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=514219>.
3. ACQUITY UPLC Evaporative Light Scattering Detector Getting Started Guide, <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/71500109303rd.pdf>.
4. Klumperman, B.; Cools, P.; Philipsen, H.; Staal, W. (1996), A Qualitative Study to the Influence of Molar Mass on Retention in Gradient Polymer Elution Chromatography (GPEC). *Macromol.Symp.*, 110: 1–13. doi:10.1002/masy.19961100102, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/masy.19961100102>.
5. Klenin, V. J.; Shmakov, S.L. Features of Phase Separation in Polymeric Systems: Cloud-Point Curves (discussion). *Universal Journal of Materials Science* 2013, 1 (2), 39–45. <https://pdfs.semanticscholar.org/44cf/8e3fc4396d2d8bc6bc55b5be0b2648e70619.pdf>.

ソリューション提供製品

ACQUITY APC (アドバンスド ポリマー クロマトグラフィー) システム <
<https://www.waters.com/134724426>>

Empower 3 クロマトグラフィーデータソフトウェア <<https://www.waters.com/513188>>

720006705JA、2019 年 11 月