

アプリケーションノート

## p-QSM および ELS 検出器を搭載した ACQUITY APC システムを用いた GPEC 技法 による PLA の立体構造解析

---

Jennifer Gough

日本ウォーターズ株式会社



本書はアプリケーションブリーフであり、詳細な実験方法のセクションは含まれていません。

---

## 要約

ACQUITY APC システムは、p-QSM および ACQUITY BEH カラムテクノロジーを搭載することで、有機溶媒に適合する 100% 強溶媒による分離ソリューションを準備不要で利用できます。p-QSM ポンプには、アイソクラティックモードまたはグラジエントモードに対応する柔軟性があります<sup>2</sup>。GPEC では、グラジエント溶出を使用して、溶解度とケミストリーによって分離が行われます。このグラジエント溶出技法を、逆相分離やサイズに基づく GPC 分離と混同しないでください。この方法では、相性の悪い溶媒を用いてポリマーを意図的にカラムに沈殿させてカラムと相互作用させず、その後、グラジエント中の相性の良い溶媒濃度でカラムから溶離させます。GPEC には、さまざまな移動相中のポリマーや発色団のない可能性のあるポリマーを検出できる検出器が必要です。ELSD は、このような条件下で、GPEC 技法に適合して良好に機能します<sup>3-5</sup>。このアプリケーションブリーフでは、グラジエントポリマー溶出クロマトグラフィー（GPEC）と、ポリマークオータナリーソルベントマネージャー（p-QSM）およびエバポレイト光散乱検出器（ELSD）を搭載した ACQUITY Advanced Polymer Chromatography（APC）システムを使用して、さまざまな立体構造を持つポリ乳酸サンプルを溶解度で分離することを目的としています。

### アプリケーションのメリット

- 強溶媒に適合し、準備不要な効率的な設置による時間の節約
- より短い実行時間の迅速な分析法の開発
- ACQUITY BEH カラムテクノロジーによる迅速な溶媒切り替え

---

## はじめに

メーカーや化学品供給業者からは、多種多様なポリラクチドやポリ乳酸（PLA）を入手できます。PLA のバリエーションには、分子量、立体構造、末端基終端、結晶化度などがあります<sup>1</sup>。PLA のサンプルを製造してこれらの可変特性を管理するには、原材料、合成、合成後処理を管理する必要があります。研究、検査、最終製品合成の過程でポリマーを正確に測定するには、迅速で簡単な分析技法が必要です（このプロセスは図 1 の PLA ワークフローに記載されています）。ポリマーの品質と性能の一貫性を確認できるように、ワークフロー全体で頻繁に分析測定が行われます。

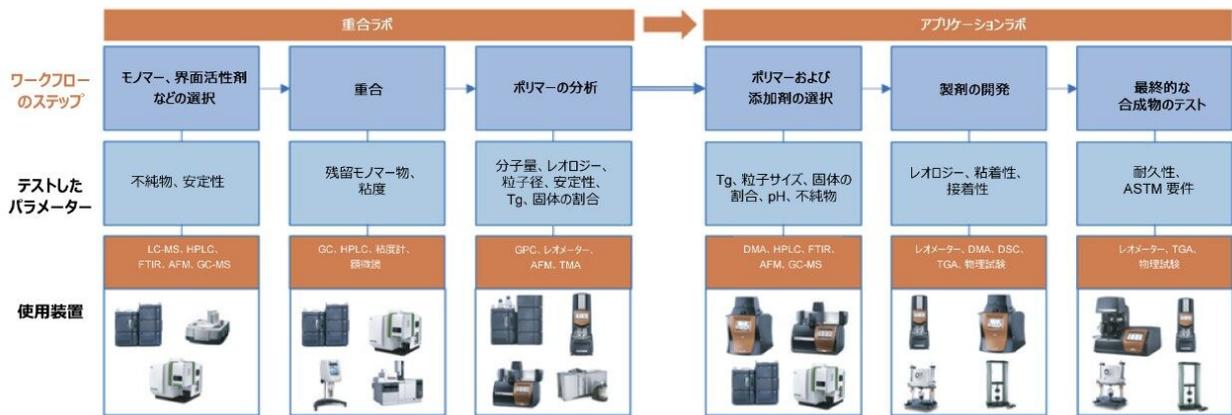
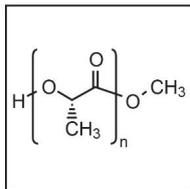


図 1. ポリマーワークフローの例

このアプリケーションブリーフでは、p-QSM および ELSD を搭載した ACQUITY APC の高い溶媒適合性によって、どのようにしてこの迅速で堅牢なソリューションを使用し、GPEC 技法を適用して PLA の立体構造を同定するかについて、実証します。

## 結果および考察

この実験では、Millipore Sigma から購入した PLA サンプルを使用しました。サンプルは、図 2 に示されているように、類似した分子量範囲内にあり、異なる立体化学構造のものを選択しました。プロセスの最初のステップは、ポリマーサンプルの溶解度の決定でした。PLA のゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) 実験をポリマーサンプル溶解の出発点として使用し、表 1 に溶解度試験の結果を記載しました<sup>4</sup>。ポリマーの溶解度は、分子の対称性および結晶化度につながる会合性と関連している場合があります (図 3)。PLLA 型は PLDLA 型より対称性が高く、この対称性が会合を促進し、溶解を阻害してしまいます。



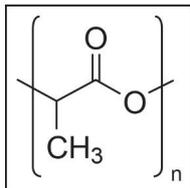
764689-5G Sigma-Aldrich

ポリ (ラクチド) 、平均 MN 20,000、PDI&



製品販売情報 : 1: 20/07/27 に出荷予定

経路 : UPS 陸路



719943-1G Sigma-Aldrich

RESOMER (R) R 203 H ポリ (D, L-LACTIDE)ACI ★ ①

製品販売情報 : 1: MILWAUKEE 04/3020 から在庫

経路 : FedEx 陸路

図 2. Millipore Sigma から購入した PLA サンプル

## PLA サンプルの溶解度

| 溶媒                               | D および L、酸性末端基 | L |
|----------------------------------|---------------|---|
| THF                              | 緑             | 赤 |
| クロロホルム                           | 緑             | 緑 |
| 20% THF 含有クロロホルム<br>(SEC ペーパーより) | 緑             | 緑 |

表 1. PLA の溶解度試験のヒートマップ

緑 = 可溶性、赤 = 不溶性

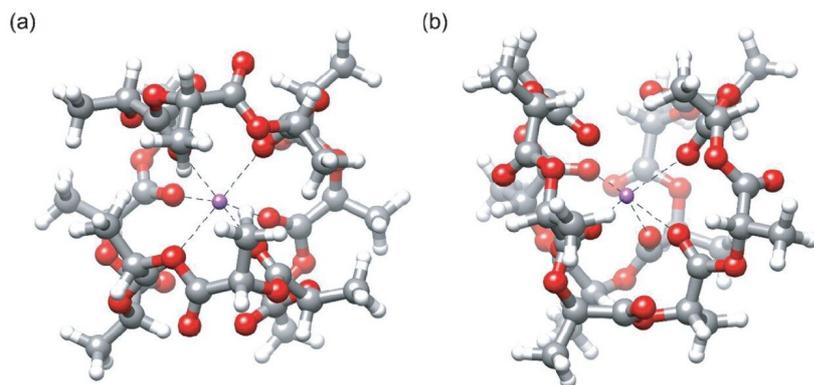


図 3. PLA の (a) PLLA 型および (b) PLDLA 型の立体構造。点線は  $\text{Na}^+$ -酸素間相互作用を表します<sup>1</sup>。

PLA サンプルは、濃度 5 mg/mL になるようにクロロホルムに溶解して原液とし、さらに別のバイアル中で 1 mg/mL に希釈してから、PTFE 0.2  $\mu\text{m}$ 、13 mm のシリンジフィルター（製品番号 [WAT200556 <https://www.waters.com/nextgen/us/en/search.html?category=Shop&isocode=en\\_US&keyword=WAT200556&multiselect=true&page=1&relevant>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/search.html?category=Shop&isocode=en_US&keyword=WAT200556&multiselect=true&page=1&relevant)）でろ過します。ろ過したサンプルを、スリット入りセプタムキャップ（製品番号 [186005666CV <http://www.waters.com/nextgen/us/en/search.html?category=Shop&isocode=en\\_US&keyword=186005666CV&multiselect=true&relevant>](http://www.waters.com/nextgen/us/en/search.html?category=Shop&isocode=en_US&keyword=186005666CV&multiselect=true&relevant)）付き Waters 2 mL 液体クロマトグラフィーバイアルに入れます。

サンプル前処理が完了したら、カラム（製品番号 [186006046 <https://www.waters.com/nextgen/us/en/search.html?category=Shop&isocode=en\\_US&keyword=186006046&multiselect=true&page=1&rows=25&sort=most-relevant>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/search.html?category=Shop&isocode=en_US&keyword=186006046&multiselect=true&page=1&rows=25&sort=most-relevant)）を装着し、移動相を装置の上に配置し、Empower 装置制御ソフトウェアに装置設定を入力します。実験の詳細を表 2 に記載します。図 4～6 に、Empower 科学ソフトウェアでの ACQUITY APC システムの装置設定のスクリーンショットが示されています。

## 実験の詳細

|          |   |
|----------|---|
| システム:    | p-QSM 搭載 APC（製品番号 176015030）                              |
| カラム:     | XBridge BEH C8 XP カラム、130Å、2.5 $\mu\text{m}$ 、<br>3×75 mm |
| 移動相 A/B: | クロロホルム  |
| 移動相 C/D: | メタノール   |

グラジエント:

スクリーンショットを参照

流速:

0.7  $\mu$ L/分

分析時間:

10 分

サンプル注入量:

1  $\mu$ L

サンプル濃度:

1 mg/mL

検出器:

ELS

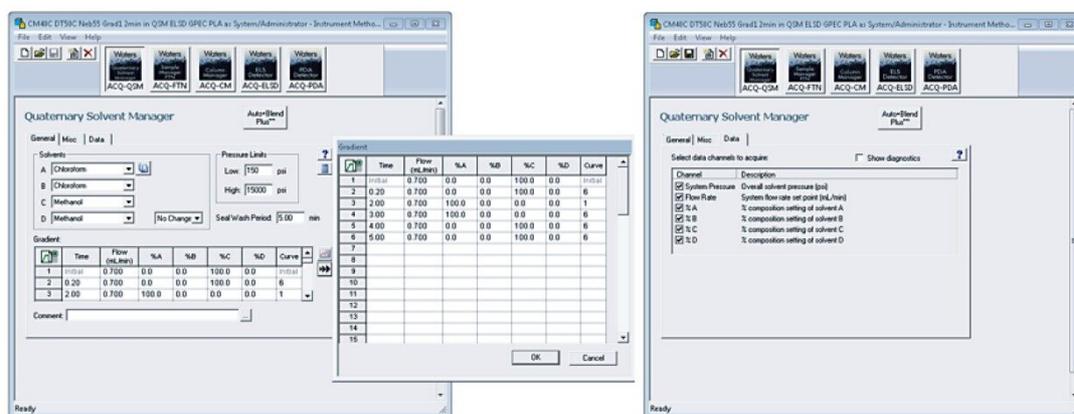


図 4. *p*-QSM GPEC メソッド用のグラジエントテーブル

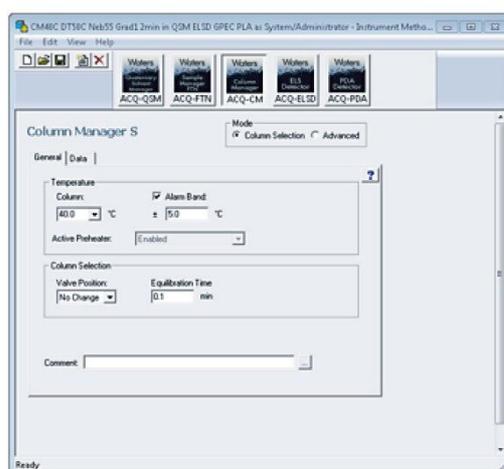
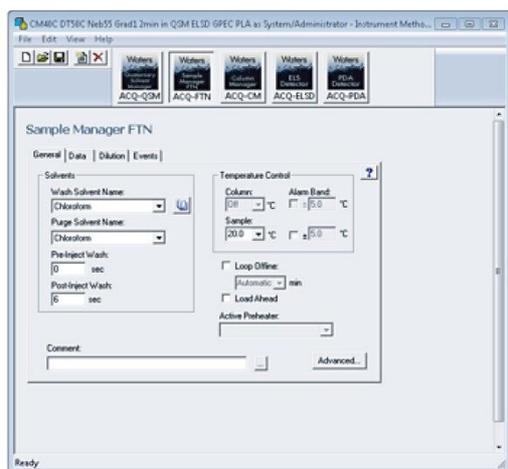


図 5. GPEC メソッド用のサンプルマネージャーとカラムマネージャーの設定



図 6. GPEC メソッド用の ELS 検出器の設定

%A グラジエント、PLA(L)、および PLA(D,L) を選択すると、実験の結果データがレビューに入力されます。重ね描きビューを選択してプロットを重ねると、図 7 に示したようなクロマトグラムが表示されます。グラジエントの勾配は 2 です。これは、相性の良い溶媒のクロロホルムを非常に急速に添加したためです。クロロホルムを急速に加えることで、ポリマーがカラムから急速に溶離し、クロマトグラフィーピークが狭くなります。PLA サンプルは、溶解度、グラジエント溶媒比、立体構造により、異なる時間に溶出します。

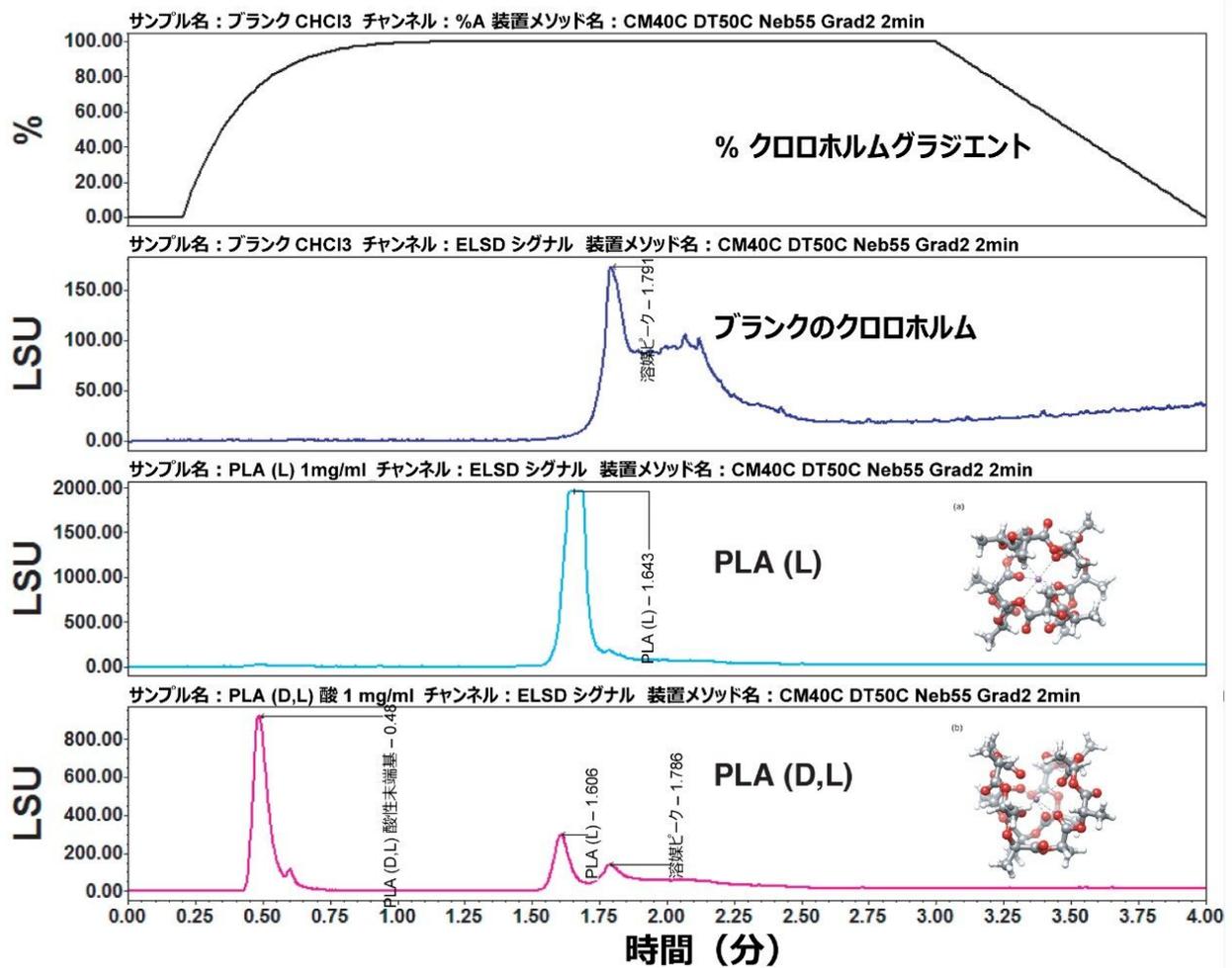


図 7. データチャンネル %A、ブランク CHCl<sub>3</sub>、PLA(L)、PLA(D,L) を積み重ねたプロットビュー中のクロマトグラムの重ね描き

## 結論

p-QSM および ELSD を搭載した ACQUITY APC システムで、GPEC 技法を使用することで、立体構造が異なる 2 つの PLA サンプルが、溶解度によってクロマトグラフィー分離され、異なる保持時間で溶出します。この GPEC の分析例は、これからより大規模の研究として発表される一連の PLA 実験の最初の分析例です。このより大きなドキュメント資料では、さまざまな PLA 立体構造のサンプルの構造および特性を取り上げます。

---

## 参考文献

1. Kihyun Kim, Jong Wha Lee, Taihyun Chang, Hugh I. Kim, Characterization of Polylactides with Different Stereoregularity Using Electrospray Ionization Ion Mobility Mass Spectrometry, *J. Am.Soc.Mass Spectrom* .(2014) 25:1771Y1779.DOI: 10.1007/s13361-014-0949-1.
2. APC with p-QSM Brochure, [https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135037217&locale=en\\_US](https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135037217&locale=en_US) <[https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135037217&locale=en\\_US](https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135037217&locale=en_US)>
3. Klumperman, B. , Cools, P. , Philipsen, H. and 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> <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/masy.19961100102>>
4. Waters ACQUITY UPLC ELS Detector, [https://www.waters.com/waters/en\\_US/ACQUITY-UPLC-ELSD/nav.htm?locale=en\\_US&cid=514219](https://www.waters.com/waters/en_US/ACQUITY-UPLC-ELSD/nav.htm?locale=en_US&cid=514219) <[https://www.waters.com/waters/en\\_US/ACQUITY-UPLC-ELSD/nav.htm?locale=en\\_US&cid=514219](https://www.waters.com/waters/en_US/ACQUITY-UPLC-ELSD/nav.htm?locale=en_US&cid=514219)>
5. ACQUITY UPLC Evaporative Light Scattering Detector Getting Started Guide, <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/71500109303rd.pdf> <<https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/71500109303rd.pdf>>
6. SEC Analysis of Polylactic Acid Using Advanced Polymer Chromatography, [https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134994155&locale=en\\_US](https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134994155&locale=en_US) <[https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134994155&locale=en\\_US](https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134994155&locale=en_US)>

---

## ソリューション提供製品

ACQUITY 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>>

ACQUITY UPLC ELS 検出器 <<https://www.waters.com/514219>>

Empower 3 クロマトグラフィーデータソフトウェア <<https://www.waters.com/10190669>>

720006942JA、2020年6月

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.