

Arc HPLC を用いた PEO/PEG の水系 SEC/GPC 分離

Jennifer Gough

Waters Corporation

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

このアプリケーションブリーフでは、ポリエチレンオキシド/ポリエチレングリコール（PEO/PEG）のゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）分析（サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）とも呼ばれる）に用いた Waters Arc HPLC システムの性能を評価します。

アプリケーションのメリット

- Empower 3 ソフトウェアを実行する Arc HPLC システムでは、高精度の流速が提供され、GPC 分析で正確で再現性のあるピークが得られる
- Ultrahydrogel Linear カラムにより、公称 700 万ダルトンのポリマーのサイズ排除分離を達成



Ultrahydrogel Linear
(WAT011545)



ポリエチレングリコール
(WAT035711) および
ポリエチレンオキシド
(WAT011572) 標準試料キット



はじめに

ゲル浸透クロマトグラフィーには、高精度の流速と再現性のある結果が得られる高速液体クロマトグラフィー（HPLC）システムが必要です。GPC 技法では、保持時間が分子量の対数に対してプロットされ、再現性のあるクロマトグラフィーピークを得るために、ポンプによって一貫したアイソクラティック送液が生成される必要があります¹。未知サンプルの分子量測定に最も頻繁に使用される分析法では、サンプルを、幅の狭い分子量のポリマー標準試料の相対検量線に対して比較します²。

実験方法

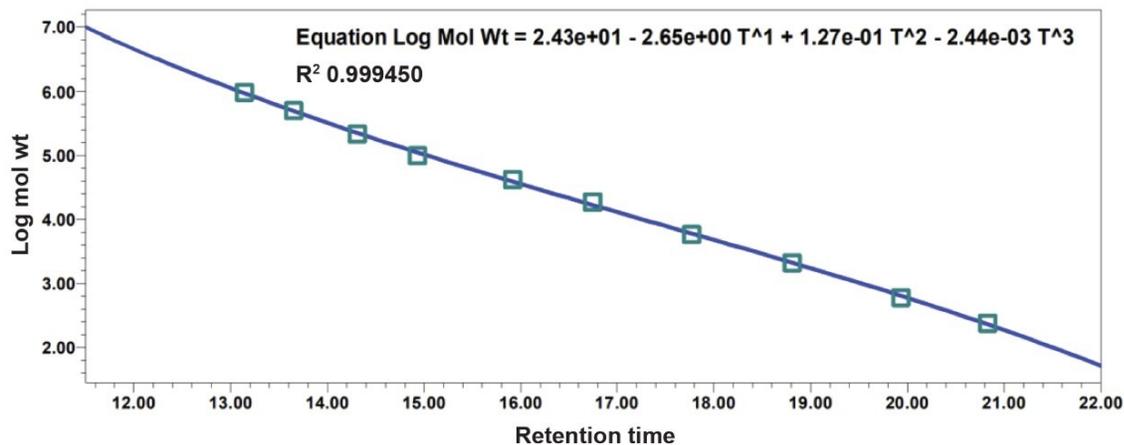
流速は、表 1 に記載されている多くの Arc HPLC GPC 分析法パラメーターの 1 つです。このアプリケーションでは、検量線の生成にポリエチレングリコールおよびポリエチレンオキシド標準試料（PEG/PEO）を使用します（図 1）。

メソッドパラメーター	カラム 1
システム :	Arc HPLC
移動相 :	0.1 M 硝酸ナトリウム含有脱イオン水 (アイソクラティック送液)
シール洗浄溶媒 :	50/50 水/メタノール
流速 (mL/分) :	1
分析時間 (分)	30
SM 洗浄およびパージ :	脱イオン水
サンプル濃度 (mg/mL) :	1.5
サンプル温度 (°C) :	25
注入量 (μL) :	50
カラム温度 (°C) :	30
パーティクルケミストリー :	ヒドロキシル化ポリメタクリル酸ベースのゲル
カラム直径 (mm)	7.8
カラム長 (mm)	300
粒子径 (mm)	10 μm
ポアサイズ (Å) :	ポアサイズ混合、排除限界 7M ダルトン
検出器 :	W2414 RI
検出器温度 (°C) :	30
サンプル情報	
	ポリエチレングリコール/ポリエチレンオキシド (PEG/PEO)
分子量 :	Mp = 238 ~ 969 kDa
ソフトウェア	
Empower 3, FR5	GPC オプション付き

表 1. 分析法パラメーター表

GPC calibration curve information

Sample Name: **** A: 2.432678e+01 D: -2.439494e-03
 Processing Method: ArcHPLC PEO PEG 1ml Lin 30min B: -2.648674e+00 E: 0.000000e+00
 Fit Order: 3 C: 1.273373e-01 F: 0.000000e+00
 Cal Curve ID: 1718 R: 0.999725 R²: 0.999450
 v0: 11.500000 vt: 22.000000
 Date Calibrated: 7/15/2021 9:47:03 AM EDT



GPC キャリブレーションテーブル

	保持時間 (分)	分子量 (ダルトン)	分子量の 対数	計算重量 (ダルトン)	% 残差
1	13.141	969000	5.9863	941646	2.905
2	14.931	99000	4.9956	111481	-11.196
3	17.770	5800	3.7634	6039	-3.966
4	13.651	504000	5.7024	493664	2.094
5	15.914	42000	4.6232	39162	7.246
6	19.932	599	2.7774	638	-6.180
7	13.651	217000	5.3365	225328	-3.696
8	16.748	18600	4.2695	16761	10.971
9	18.808	2100	3.3222	2111	-0.525
10	20.828	238	2.3766	228	4.342

図1および表2. PEG/PEOの狭い分子量範囲のキャリブレーション標準試料を用いて作成した相対検量線、および結果として得られた保持時間、計算重量、% 残差値の表

図 2 に示されているように、PEO/PEG 混合分子量標準試料の 6 回の注入の重ね描きにより、Arc HPLC ポンプの優れた流速精度が実証されています。Waters Arc HPLC システムで、2 本のリニア GPC カラムを使用し、分析時間 30 分間で、ピーク保持時間およびピーク分子量 (Mp) の相対標準偏差 0.3% 未満が得られます (表 3 および 4)。

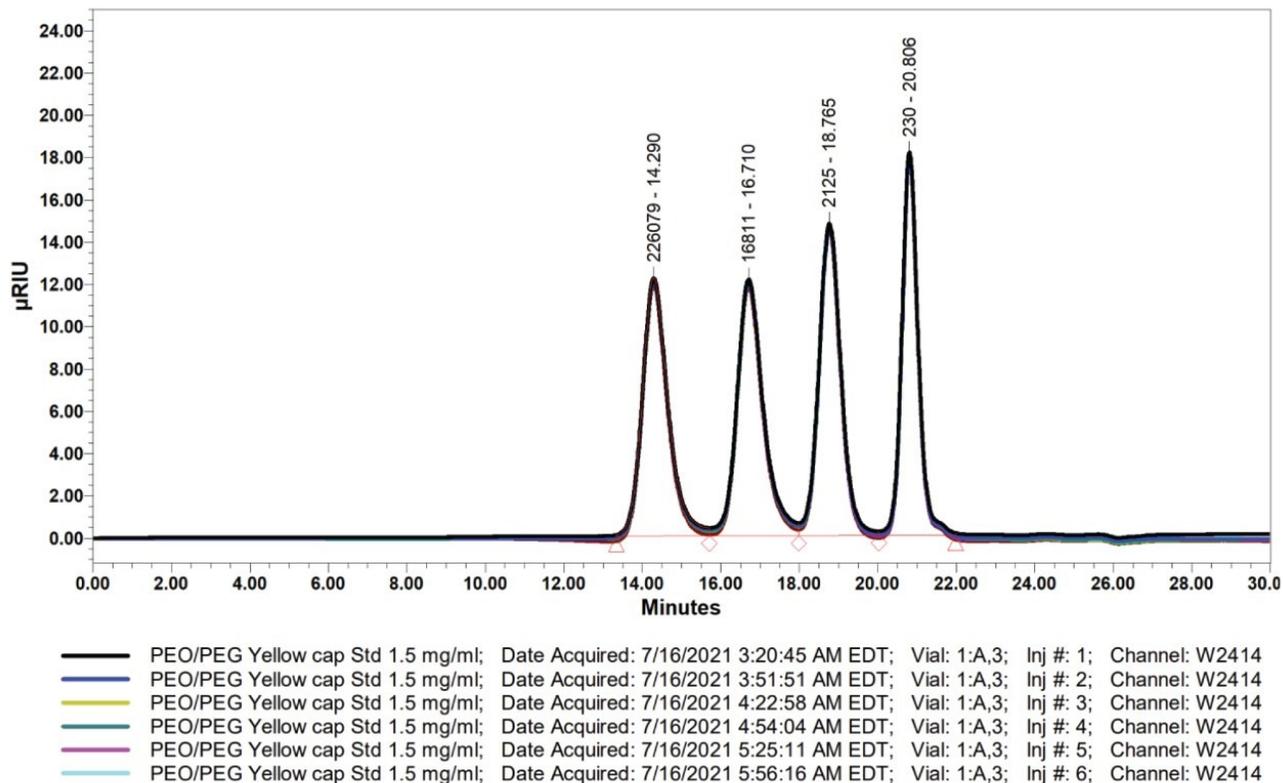


図 2. PEO/PEG キャリブレーション標準試料の 6 回の注入

ピーク結果
名前別にまとめた保持時間

	Y1 (分)	Y2 (分)	Y3 (分)	Y4 (分)
1	14.289	16.712	18.767	20.808
2	14.289	16.708	18.764	20.805
3	14.290	16.708	18.764	20.808
4	14.290	16.708	18.765	20.807
5	14.290	16.710	18.765	20.806
6	14.292	16.714	18.769	20.811
平均値	14.2902	16.7100	18.7655	20.8074
標準偏差	0.0012	0.0025	0.0019	0.0020
% RSD	0.0081	0.0151	0.0101	0.0096

ピーク結果 名前別にまとめた MP

	Y1 (Da)	Y2 (Da)	Y3 (Da)	Y4 (Da)
1	226523	16765	2121	229
2	226427	16843	2128	230
3	226130	16836	2126	229
4	226104	16837	2126	229
5	226079	16811	2125	230
6	225653	16742	2117	228
平均値	226153	16806	2124	229
標準偏差	307	43	4	1
% RSD	0.14	0.25	0.19	0.24

表 3 および 4. 黄色キャップの PEO/PEG キャリブレーション標準試料の 6 回の注入で得られた、ピーク保持時間およびピーク分子量 (Mp) の Empower 3 データレポート

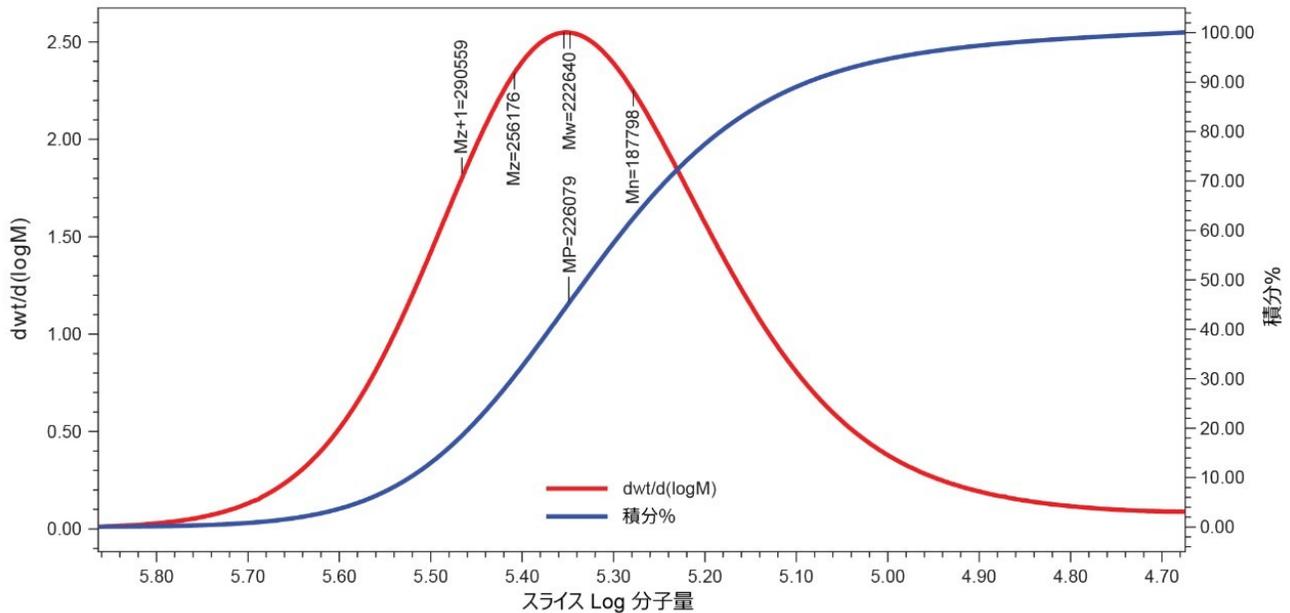


図 3. 227,000 ダルトンの PEO/PEG キャリブレーション標準試料の分子量分布と % 積分が、Empower 3 GPC オプションの自動計算機能の例の 1 つとして示されています。

Empower 3 には、多くの機能が内蔵されており、通常はスプレッドシートで作成する高度なデータレポートを作成できます。よく使用されるレポート領域は、システム適合性機能に含まれるカラムの理論段数です。カラムの理論段数を報告することで、性能のあらゆる変化について、カラム効率をグラフ化し、観察することができます（表 5）。

	名前	Mn (Da)	Mw (Da)	MP (Da)	Mz (Da)	Mz+1 (Da)	分散度	Mz/Mw	Mz+1/Mw	面積 ($\mu\text{V} \cdot \text{秒}$)	面積 %	高さ (μV)	USP 理論段数
1	Y1	187798	222640	226079	256176	290559	1.186	1.151	1.305	565016	24.99	12190	2328
2	Y2	14435	16580	16811	18766	21167	1.149	1.132	1.277	575722	25.47	12125	3174
3	Y3	1951	2139	2125	2321	2507	1.096	1.085	1.172	586796	25.96	14757	5396
4	Y4	209	227	230	244	260	1.087	1.071	1.143	532986	23.58	18102	12578

表 5. Empower 3 で計算されたピークフィールド

結果および考察

Empower 3 ソフトウェアを搭載した Arc HPLC は、基本的なクロマトグラムや複雑なクロマトグラム、および計算のための非常に有能な GPC データ解析ツールです。この実験では、基本的な GPC 計算について実証します。この実験では、単分散 PEO/PEG 標準試料をキャリブレーション標準試料およびブロード未知試料として使用しています。このアプリケーションで選択された分析法および標準試料は、炭水化物のようなポリマーの水性 GPC に一般的に使用されません³。公称 700 万ダルトンの広い分子範囲に対してリニア Ultrahydrogel カラムが選択され、2 本の同じカラムがポリマーピークの高度分離に使用されています⁴。表 5 に示す Empower 3 ソフトウェアの報告可能なピーク結果フィールドの部分的なリストには、Mn、Mw、Mp、Mz、Mz+1、および分散度が含まれます。ポイントツーポイントで 1 次近似から 5 次近似までを使用した相対および修正ユニバーサルキャリブレーションタイプが使用可能であり、相対キャリブレーションの例が図 1 に示されています。

結論

アイソクラティックモードの Arc HPLC ポンプにより、高品質ゲル浸透クロマトグラフィーに必要な優れた流速精度が得られます。

GPC オプション付き Empower 3 ソフトウェアを使用して、すべての基本 GPC 計算が行え、多数の複雑な GPC 計算にアクセスできます。

2 本のリニアカラムを使用して、30 分間という短い分析時間が実証されました。

参考文献

1. Arc HPLC System, https://www.waters.com/waters/en_US/Arc-HPLC-System/nav.htm?cid=135068659&locale=en_US <https://www.waters.com/waters/en_US/Arc-HPLC-System/nav.htm?cid=135068659&locale=en_US> US <https://www.waters.com/waters/en_US/Arc-HPLC-System/nav.htm?cid=135068659&locale=en_US>.
2. Frequently Asked GPC/SEC Questions, https://www.waters.com/waters/en_US/Frequently-Asked-GPC-SEC-Questions/nav.htm?cid=10167847&locale=en_US <https://www.waters.com/waters/en_US/Frequently-Asked-GPC-SEC-Questions/nav.htm?cid=10167847&locale=en_US>.
3. Yakindra Prasad Timilsena, Raju Adhikari, Stefan Kasapis, Benu Adhikari, Molecular and Functional Characteristics of Purified Gum From Australian Chia Seeds, *Carbohydrate Polymers*, Volume 136, 2016, Pages 128–136, ISSN 0144-8617, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.035> <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.035>> <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.035>>.
4. Ultrahydrogel Columns. Waters Care and Use Manual, [WAT011556](https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/wat011556.pdf) <<https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/wat011556.pdf>>, Revision F March 2015.
5. Empower GPC Software. Waters Getting Started Guide, [71500031303](https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/71500031303ra.pdf) <<https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/71500031303ra.pdf>>, Revision A May 2004.
6. Waters Corporation. Empower Tips. <https://blog.waters.com/category/empower-tips> <<https://blog.waters.com/category/empower-tips>> <<https://blog.waters.com/category/empower-tips>>.

ソリューション提供製品

- [Arc HPLC システム](https://www.waters.com/135068659) <<https://www.waters.com/135068659>>

720007334JA、2021年8月



© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.