

Gradient Polymer Elution Chromatography (GPEC) を用いた組成に基づくポリマーの分離検討の効率化

松岡 佳那、寺田 英敏

ユーザーベネフィット

- ◆ GPECを用いることで、GPCとは異なり分子量に依存しないポリマーの分離を行うことができ、多角的なポリマーの解析を行うことができます。
- ◆ 用いる移動相組成の選択とグラジエント条件調整が非常に重要なGPECの分離条件検討において、Nexera Method Scouting Systemを用いることで、メソッド開発を大幅に省力化、効率化することができます。

■はじめに

高分子（ポリマー）材料において、その組成は材料の物性に大きく影響するため、研究開発から品質管理まで、組成の解析と確認が非常に重要です。このようなポリマーの中でも、共重合体（コポリマー）は複数の種類の単量体（モノマー）から構成されるポリマーとして知られ、分子を構成するモノマーの組成やその配列などの違いにより、材料としての特性も異なることが知られています。このことからコポリマーにおいて、その組成を把握し、単離することは重要です。

一般的に、ポリマーの分離手法としては、分子サイズに基づいて分離を行うサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）/ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）が用いられます。分子量により分離ができるため、分子量の分布などの情報を得ることができますが、同様の分子量で組成の異なるポリマーが混在する場合には分離を行うことはできません。このような場合、分子の大きさに依存することなく、ポリマーの組成の違いによって分離されるグラジエントポリマー溶出クロマトグラフィー（Gradient Polymer Elution Chromatography : GPEC）という手法が有用です。GPECは対象のポリマーが溶解しない移動相組成（貧溶媒）において試料を注入し、カラム先端など流路内で意図的に析出させ、その後移動相組成を対象ポリマーが溶解しやすい組成（良溶媒）にグラジエントして流路内で再溶解・溶出させる分離手法です。グラジエントに用いる溶媒への溶解性の違いにより分離ができるため、ポリマーの組成による分離を行うことができます。しかし、GPECでは分析条件が経験に基づいて検討されることが多いため、サンプルごとに分析条件の検討が必要になり、手間がかかります。

Nexera Method Scouting Systemは、メソッド開発用のシステムで、移動相の溶媒種とその組成、カラムなどの条件を自動で変更して分析条件を探索でき、メソッド開発業務を効率化することができます。本稿では、Nexera Method Scouting Systemと専用ソフトウェア Method Scouting Solutionを用いて、GPECによる分析の条件検討を効率的に行い、コポリマーとその構成ホモポリマー（単一モノマーのみで構成されるポリマー）をGPECという分離手法により分析した例をご紹介します。

■試料

表1に分析に使用したコポリマーとその構成ホモポリマーを示します。各ポリマーの重量平均分子量（Mw）は 1.0×10^4 付近の試料を使用しました。試料は全てTHFに溶解させ、0.2%で調製しました。

表1 試料

| Polymer Name | Name |
|---|-------------------|
| Polystyrene | Homopolymer-A |
| Poly(<i>tert</i> -Butyl Acrylate) | Homopolymer-B |
| Poly(<i>tert</i> -Butyl Acrylate)- <i>block</i> -Poly(styrene) | Copolymer (10:11) |

■GPC分析

表2に表1に示した試料のGPC分析の分析条件を、図1にGPCクロマトグラムを示します。ホモポリマー、コポリマーともに重量平均分子量が 1.0×10^4 付近であるため、GPCではピークを完全分離することはできませんでした。

表2 GPC分析条件

| | |
|----------------|---|
| Column | Shim-pack™ GPC-8025 ^{†1} (300 mm × 8.0 mm I.D., 6 μm) |
| Mobile phase | THF(without stabilizer) |
| Flow rate | 1.0 mL/min |
| Column temp. | 40 °C |
| Injection vol. | 10 μL |
| Vial | SHIMADZU LabTotal™ for LC 1.5 mL, Glass ^{‡2} |
| Detection | Refractive index (RID-20A) |
| | Polarity : + |
| | Cell temp. : 40 °C |
| | Response : 1.5 sec |

*1 P/N : 228-20805-91

*2 P/N : 227-34001-01

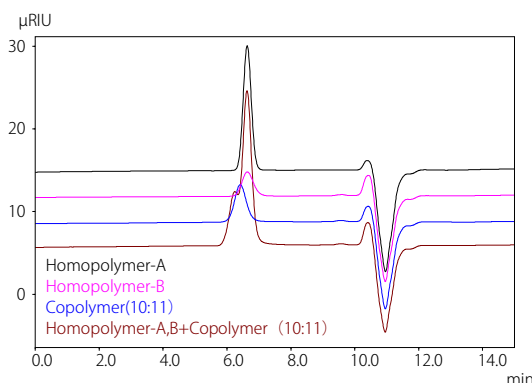


図1 ホモポリマーとコポリマーの単一試料および混合試料のGPCクロマトグラム

■ GPECにおけるメソッド開発の効率化

GPECのメソッド開発では、注入時に対象ポリマーを析出させる溶媒種、グラジエントして再溶解させる溶媒種とグラジエントのプロファイル、用いるカラムとその温度、流量などを熟練者の経験に基づいて変更検討されるため、検討に手間と時間を要します。

そこで本稿では、Nexera Method Scouting Systemと、専用ソフトウェアMethod Scouting Solutionを用いてGPECのメソッド開発を効率的に行いました。図2にMethod Scouting Solutionの設定画面を示します。カラムや移動相を自動で切り替えて分析条件の検討を行うことができます。また、移動相ブレンド機能を用いて溶媒を任意の比率で混合し、予め用意した数種の溶媒のみで、移動相をオンラインで自動調製することもできます。直感的な操作で流量やオープン温度、グラジエントのタイムプログラムなどの条件を自動で変更したメソッドを作成することができるため、検討を行う条件ごとに新たにメソッドを作成する必要はありません。

本システムとソフトウェアの特長につきましてはアプリケーションニュース01-00018もご参照ください。

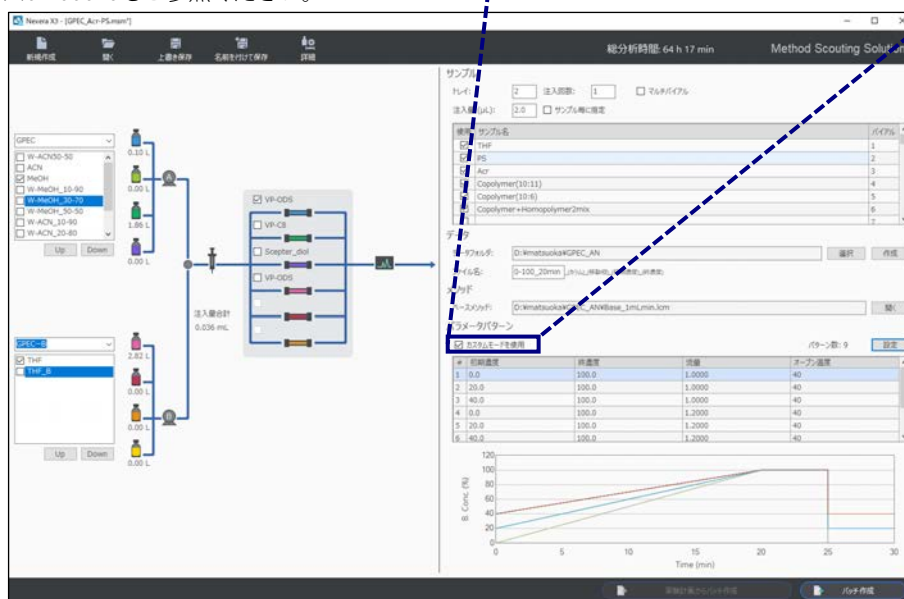
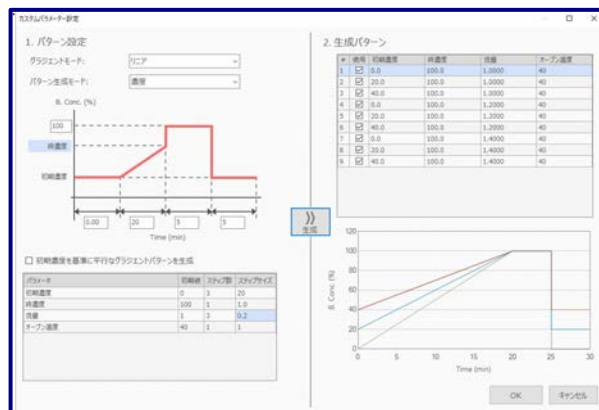


図2 Method Scouting Solution設定画面

■ GPEC条件検討

表1に示した試料3種類について、Nexera Method Scouting Systemを用いてGPEC分析条件を検討しました。まず、移動相とカラムの条件を検討し、最適な移動相とカラムを用いて、移動相流量とグラジエント条件を検討しました。なお、全ての分析条件で、グラジエント終了後に、5分間ずつ良溶媒での洗浄と次の分析のためのカラムの平衡化を行いました。

● 移動相とカラムの検討

表3に検討した分析条件を、図3に表1に示したポリマー3種の混合試料のクロマトグラムを示します。移動相は、良溶媒であるTHFを移動相B液に用いて、移動相A液に使用する貧溶媒を検討しました。移動相A液、カラムそれぞれ3通り、合計9通りの組み合わせについて検討しました。移動相条件(A-3)については、Nexera Method Scoutingシステムの移動相ブレンド機能を用いて、オンラインで自動調製しました。GPECでは、グラジエント溶解を行う必要があるため、検出には示差屈折率検出器(RID)ではなく蒸発光散乱検出器(ELSD)を用いました。

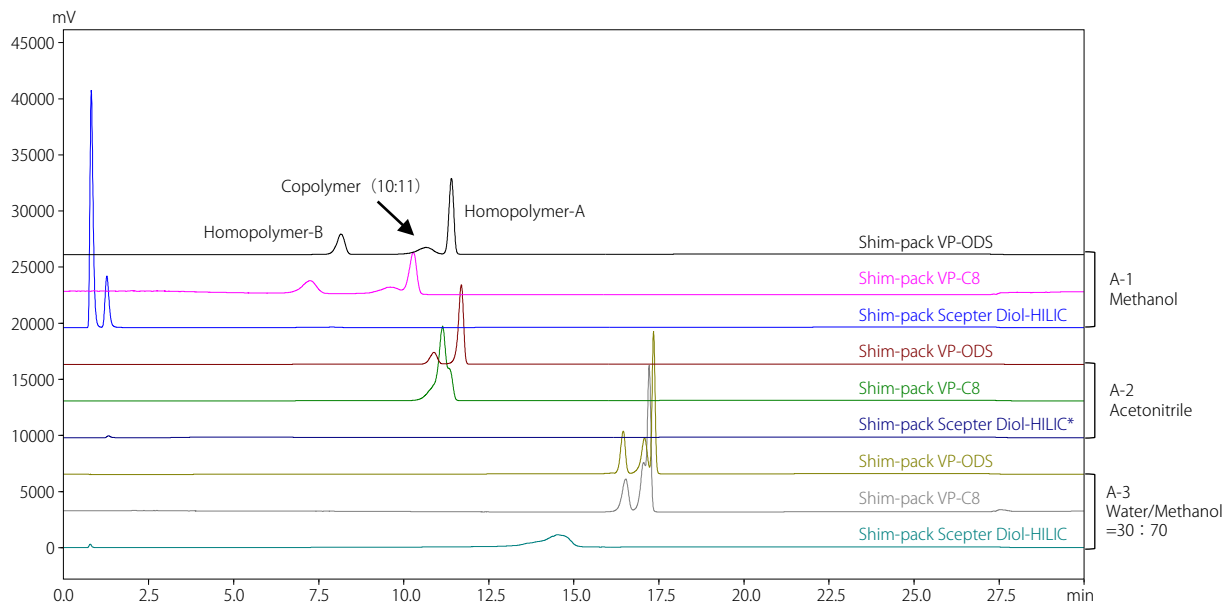
GPC分析では分離ができなかったポリマーがGPECを用いることで、ポリマーの組成の違いによって分離することができました。分離と分析時間を考慮すると、検討した条件においては、移動相A液とカラムの組み合わせとして、移動相A液はメタノール、カラムはShim-pack VP-ODSの組み合わせが最も適していると判断しました。

表3 HPLC条件

| Column | 1) Shim-pack VP-ODS ¹⁾ (150 mm x 4.6 mm I.D., 5 μm) 2) Shim-pack VP-C8 ²⁾ (150 mm x 4.6 mm I.D., 5 μm) 3) Shim-pack Scepter Diol-HILIC-120 ³⁾ (150 mm x 4.6 mm I.D., 5 μm) |
|----------------|--|
| Mobile phase | A-1) Methanol A-2) Acetonitrile A-3) Water/Methanol=30:70 B) THF(without stabilizer) |
| Time program | B. Conc. 0% (0 min) →100% (20-25 min) →0% (25.01-30 min) |
| Flow rate | 1.0 mL/min |
| Column temp. | 40 °C |
| Injection vol. | 2 μL |
| Vial | SHIMADZU LabTotal for LC 1.5 mL, Glass ⁴⁾ |
| Detection | ELSD-LT III Gain : Wide Filter : 40 °C Drift tube temp. : 40 °C Nebulizer gas : N ₂ Gas pressure : 350 kPa |

*1 P/N : 228-34937-91 *2 P/N : 228-55927-91

*3 P/N : 227-31051-05 *4 P/N : 227-34001-01



*本条件ではカラムから溶出せず

図3 移動相・カラム検討のクロマトグラム

● 流量とグラジエント条件の検討

表4に検討した分析条件を、図4に表1に示したポリマー3種の混合試料のクロマトグラムを示します。流量は3条件、タイムプログラムは3種類を検討しました。タイムプログラムについては、グラジエント時間を変更せず、グラジエント開始時の初期濃度を変化させました。初期濃度40%の場合は、流量に関係なく、最初に溶出しているピークが2つに割れました。これは、初期の移動相溶媒のポリマー溶解度が大きすぎたため、Homopolymer-Bの次に溶出するCopolymer (10:11)の一部が十分に析出することなく、早く溶解し溶出したと考えられます。表5にHomopolymer-AとCopolymer (10:11)のピーク間での分離度を示します。Homopolymer-Aの分離度は①の値が最大で、その値は1.5以上でした。このことから、表1に示したコポリマーとその構成ホモポリマー2種の分析条件として最適な条件は①で示したクロマトグラムの分析条件であると考えられます。

表5 分析条件の評価

| No. | HPLC Conditions | | Resolution (JP) |
|-----|-----------------|--------------|-----------------|
| | Flow Rate | Time Program | |
| ① | 1 | 1 | 1.55 |
| ② | 1 | 2 | 1.50 |
| ③ | 1 | 3 | 1.26 |
| ④ | 2 | 1 | 1.47 |
| ⑤ | 2 | 2 | 1.35 |
| ⑥ | 2 | 3 | 1.16 |
| ⑦ | 3 | 1 | 1.34 |
| ⑧ | 3 | 2 | 1.32 |
| ⑨ | 3 | 3 | 1.14 |

表4 HPLC条件

| | |
|----------------|---|
| Column | Shim-pack VP-ODS ^{*1} (150 mm x 4.6 mm I.D., 5 μm) |
| Mobile phase | A) Methanol B) THF(without stabilizer) |
| Time program | 1) B. Conc. 0% (0 min) →100% (10-15 min) →0% (15.01-30 min) 2) B. Conc. 20% (0 min) →100% (10-15 min) →20% (15.01-30 min) 3) B. Conc. 40% (0 min) →100% (10-15 min) →40% (15.01-30 min) |
| Flow rate | 1) 1.0 mL/min 2) 1.2 mL/min 3) 1.4 mL/min |
| Column temp. | 40 °C |
| Injection vol. | 2 μL |
| Vial | SHIMADZU LabTotal for LC 1.5 mL,Glass ^{*2} |
| Detection | ELSD-LT III Gain : Wide Filter : 40 °C Drift tube temp. : 40 °C Nebulizer gas : N ₂ Gas pressure : 350 kPa |

*1 P/N : 228-34937-91

*2 P/N : 227-34001-01

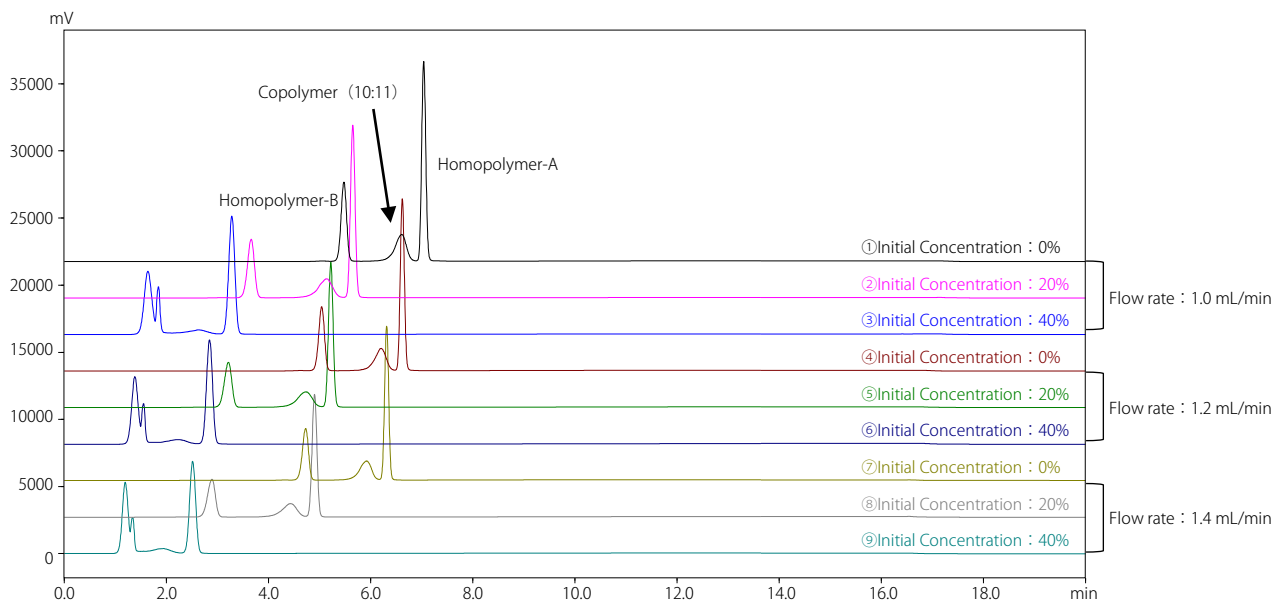


図4 流量・グラジエント条件検討のクロマトグラム (溶出時間30分)

■再現性

表6に検討結果の分析条件を、図5に表5に示した条件を用いてCopolymer (10:11)とHomopolymer-A, Bの混合物を分析したクロマトグラムを示します。また、表7に6回繰り返し分析の再現性と分離度を確認した結果を示します。すべての化合物の保持時間、面積値について、相対標準偏差(%RSD, n=6)がそれぞれ0.12、2.25以下であることから、良好な再現性が得られました。また、分離度は全てのポリマーピークにおいて1.5以上であることから、コポリマーとその構成ホモポリマーを良好に分離することができました。

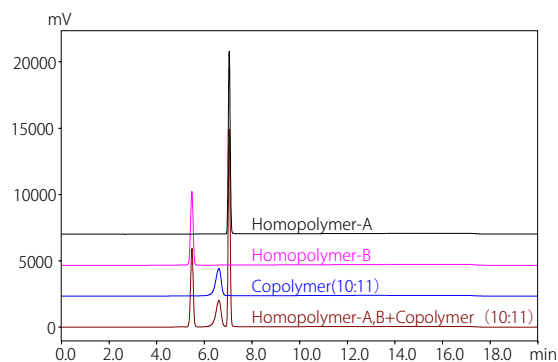


図5 Homopolymer-A,BとCopolymer (10:11) 混合物のクロマトグラム (検討結果)

表6 HPLC条件

| | | |
|----------------|--|------------------|
| Column | Shim-pack VP-ODS ^{*1} (150 mm x 4.6 mm I.D., 5 μm) | |
| Mobile phase | A) Methanol B) THF(without stabilizer) | |
| Time program | B. Conc. 0% (0 min) →100% (10-15 min) →0% (15.01-30 min) | |
| Flow rate | 1) 1.0 mL/min | |
| Column temp. | 40 °C | |
| Injection vol. | 2 μL | |
| Vial | SHIMADZU LabTotal for LC 1.5 mL,Glass ^{*2} | |
| Detection | ELSD-LT III | |
| | Gain | : Wide |
| | Filter | : 40 °C |
| | Drift tube temp. | : 40 °C |
| | Nebulizer gas | : N ₂ |
| | Gas pressure | : 350 kPa |

*1 P/N : 228-34937-91

*2 P/N : 227-34001-01

表7 繰り返し6回分析の結果

| | Retention Time (%RSD) | Area (%RSD) | Resolution* (JP) |
|-------------------|-----------------------|-------------|------------------|
| Homopolymer -B | 0.02 | 1.22 | -- |
| Copolymer (10:11) | 0.12 | 1.45 | 3.62 |
| Homopolymer-A | 0.01 | 2.25 | 1.54 |

*繰り返し6回分析の平均値

■まとめ

Nexera Method Scouting Systemおよび専用ソフトウェアMethod Scouting Solutionを用いてGPCによるポリマー分離条件検討を効率化することができました。GPC分析では分離ができない分子量が同程度のコポリマーとコポリマーを構成するホモポリマー2種の合計3種類のポリマーについてGPCでの分離条件を検討し、良好な分離を得ることができました。

Nexera、LabSolutions、SHIMADZU LabTotalおよびShim-packは、株式会社島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

01-00350-JP 初版発行：2022年3月

島津コールセンター ☎ 0120-131691