

# LC TALK

Vol. 117  
October 2021



Talk 私が学生の頃…… P. 2

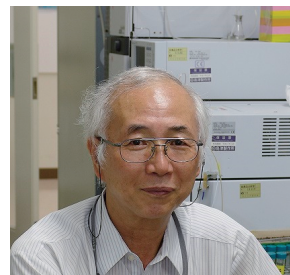
in the LAB よくあるトラブルと対処法 不明ピークの出現 …… P. 4

Products LC-Raman システムと専用ソフトウェア LiChRa …… P. 6

Applications LC-Raman による高分子共重合体の分析 …… P. 9

## Talk

## 私が学生の頃・・・



一般社団法人日本薬業研修センター  
中込 和哉

ある日の会話。

「LCtalkの原稿を頼まれてしまったよ・・・」

「LCtalkといたら、錚々たる有名処の先生が最先端の研究の話を紹介するコラムでしょう。先生は3年も前に大学を定年退職されて、それ以降は研究ともHPLCとも関係ない立場にいらっしゃいますよね。」

「そうなんだけど、帝京大学の研究室では歴代の島津HPLC装置に随分お世話になって来たし、それに学生の頃の昔話をぜひ聞かせてほしいと言われて・・・。」

「学生の頃と言うと50年近く昔でしょう？半世紀も前の話なんて・・・。そもそも、先生は何で分析の分野を選んだんですか？」

「薬学部3年生の学生実習で、オウバクからベルベリンをメタノール抽出する実験があったんだ。今でも学生実習でやっているんじゃないかな。その実習中に、抽出液を減圧濃縮する過程でトラップしたメタノールを、研究室の大学院生が回収していたので聞いたら、精製して実験に使うと教えてくれた。ちょうど昭和48年の第1次オイルショックのときだったので、有機溶媒も手に入りにくい状況だった。学生実習で使った溶媒まで再利用しなければならない逼迫した状況を知って、『これから化学研究はどうなっていくだろう』と疑問に思い、使う試薬の量が少なくて済みそうな分析分野を選んだ、と言う訳さ。」

「でも、研究のテーマは微量分析ではなかったと聞きましたか？」

「4年生で配属されたのが、田村善蔵教授の薬品分析化学教室。助教授の谷村豊徳先生から与えられた研究テーマは『生物活性ペプチドの構造活性相関』だったよ。」

「研究室にはどんな分析機器がありましたか。」

「当時、HPLCが使われ始めていた時期で、簡易型の装置から大型のものまで、いろいろあったよ。今でも覚えているのは、島津ーデュボン高速液体クロマトグラフ830型。

横幅1.5 mほどの大きさで、大事な装置だから、と4年生は触らせてもらえなかった。他には、GCや分光光度計もあったね。」

「アミノ酸分析計をお使いだったとか。」

「研究室に入って担当したのが、アミノ酸分析計。今の飲料の大型自動販売機ぐらいの大きさだった。当時でもかなりなレアものだという話だが、そんな貴重なもののメンテナンスを入ったばかりの4年生に任せるなんて、今思えば結構風通しの良い研究室だったね。」

「どんな装置だったのですか？」

「ここから先の話は、半世紀も前のあいまいな記憶と、奇跡的に残っていたメモ帳からの断片的な内容だということをお断りしておくよ。カラム充填剤は国産品と輸入品を使っていたようだね。どちらもポリスチレン樹脂製強酸性陽イオン交換樹脂だね。カラムは外筒管付きのガラスカラムで、内径1 cm程度、長さは中酸性アミノ酸測定用が1 m弱、塩基性アミノ酸測定用が30 cmくらいか。外筒管部分に恒温水を通してカラム温度を一定にすることが出来るカラムだね。今ではカラムオープンでカラム全体を恒温にする方法を採用しているが、昔のカラムは大きすぎてその方法は使えなかった。外筒管付きのガラスカラムは、今でも製品として販売されているので、需要はあるのかな。こっちの方が、カラムオープンより温度制御はきちんと出来ていたと思うよ。」

充填剤の上にカラムフィルターがあり、そこからカラム上端のキャップまで10 cmほど空間があった。試料溶液は上端キャップを外してフィルターまでの溶離液を抜きとり、カラムフィルターにメスピペットで直接乗せた。1 mL以上はあったと覚えているよ。その後、窒素ガスでカラムフィルター内に押し込み、カラム上部に溶離液を加えて、分析が開始となる。ひと昔前のオープンカラムと同じ試料導入法だね。」

「分析時間はどのくらいでしたか？」

「標準の18種のアミノ酸の分析に、中酸性アミノ酸用のカラムだと溶離液を途中でpH 3.25からpH 4.25に切り替えて、トータルで3時間ほど。塩基性アミノ酸用の短いカラムでもpH 5.28の溶離液で90分ほどはかかっていたね。さすがに、溶離液の切り替えにはタイマーが使われていたの、始めてしまえば付き切りということはなかったよ。『一昔前の、分析に1晩かかった頃と比べると随分と早くなった』と当時は先輩に言われたが、今と比べると雲泥の差だね。ただ、ポストカラムでニンヒドリンを加えて反応させる反応槽に沸騰水浴を使っていたので、始終見ていないとすぐに水が蒸発してしまうのには閉口した。後日、水をグリセリンに替えてもらったときは嬉しかったね、これで随分と楽になったと。」

「そうなんですか。今ならアミノ酸は、島津HPLCシステムを使えば、短時間で精度良く自動分析出来ますよね。」

「他に御苦労されたところは？」

「pH3.25の溶離液調製かな。他のpH 4.25、pH 5.28の各溶離液、洗浄用NaOH溶液は18 Lのポリタンクで調製していたが、pH 3.25の溶離液のみ50 Lのポリタンクで作っていた。pHが0.01違うとアミノ酸の分離に影響すると言われて、一回に大量に調製することにしていただ。試薬のクエン酸などを溶かすのに、抱えて振るわけにもいかず、フロアの廊下をぐるぐる転がして、皆にからかわれながら溶かしたことを覚えているよ。」

それから、打点式の記録計でクロマトグラムが出てきた。ペン型と違って、一定時間ごとに点を打っていく方式だ。今の若い人は見たことがないだろうね。ピークの半値幅を決めるのに、その間の点の数を数えていたんだよ。」

「今では考えられないですよ。」

「HPLCの記録計は、その後ペン型のレコーダーから島津が画期的なクロマトパックを開発して、簡便なデータ処理装置の時代に入ったんだよ。就職した通産省の研究所で、

初めて島津のクロマトパックE1Aを使ったときのことは、今でも覚えているよ。E1Aは初期の装置で、クロマトグラムなしで保持時間とピーク幅のみ印字するものだったが、こんな便利なものが出来たのか・・・と感激したね。」

「アミノ酸分析計は活躍したのですか？」

「私はペプチドのアミノ酸組成をチェックするのに使っていたが、時々外部から食品のアミノ酸組成を測定する依頼が来ていたな。結構役に立っていたと思うよ。」

「私はあまり実験技術も運もなかったようで、在学中は大した実験成果はでなかったね。アミノ酸分析計の前に座ってツートン、ツートン、と打点が繰り返されてクロマトグラムが出来上がっていくのを眺めているのがとても幸せな気分だったことは記憶に残っている。それがあってこの道に進んだのかもしれないね。」

「他に研究室のことで覚えていることはありますか？」

「そうだね、TLCのプレートを自分たちで作っていたことかな。シリカゲルを溶液に溶いたスラリーを入れたアプリケーターという塗布装置を、実験台上に並べた30 cm幅のガラス板の上を滑らせてガラス板に薄層を塗布していくんだ。均一なスラリーを均一に塗布しないと、使える薄層プレートは出来ないことは分かるね。大学院の先輩にとっても上手な人がいて、その人がほぼ専門に作ってくれていた。私もやらせてもらったが、とても人に使ってもらえるものは出来なかったね。」

あとは、主任教授の田村先生がスポーツ好きで、空き時間が出来ると研究室に学生を誘いに来て、先生方と一緒にバレーボールや卓球を始終やっていたな。今から考えると、随分とのんびりとした研究室の生活だった。でもそれぞれのペースで実験を進めていたので、私も時折研究室に泊まり込んだりして一生懸命に実験したことを覚えているよ。」

「随分と楽しい学生生活だったようですね。昔の話をありがとうございます。ところで、この会話、本当にLCtalkに載るんですか？」

## 執筆者紹介

東京大学大学院薬学系研究科修了。通産省生命工学工業技術研究所（現 産総研）、富山医科薬科大学（現 富山大学）を経て、2002年帝京大学薬学部教授。2018年年退職し、現在、一般社団法人日本薬業研修センター理事長、薬剤師・登録販売者・配置薬販売者の研修等が主な業務。

専門分野 分析化学（だった）

将来の夢 余生を穏やかに過ごす

趣味 毎日10000歩の散歩

## in the LAB

よくあるトラブルと対処法  
不明ピークの出現島津総合サービス リサーチセンター  
三上 博久

今号のテーマは、日常分析で時として悩まされる「不明ピークの出現」です。

不明ピークは、図1に示すようなクロマトグラム上の予期しない不必要なピークで、時として負方向に現れることもある厄介なものです。また、グラジエント溶離においては、何も注入しなくても現れることがあります。図2に、不明ピークの主な原因を示します。

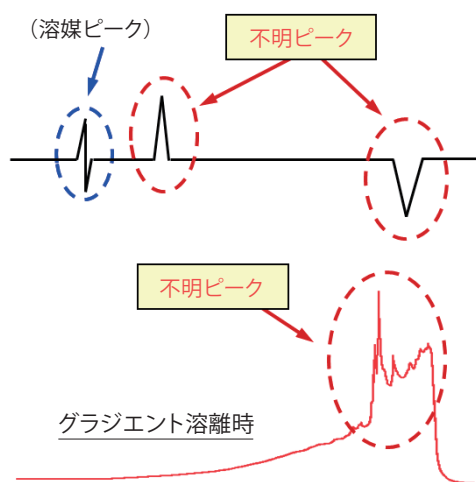


図1 不明ピーク

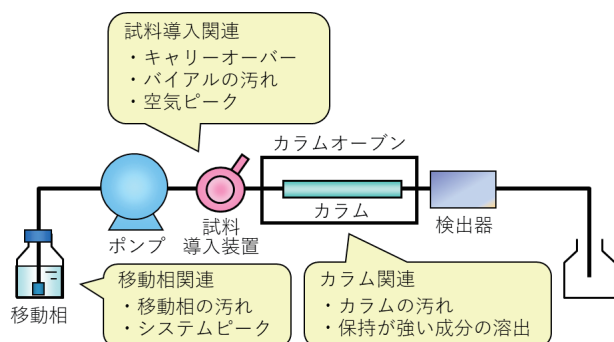


図2 不明ピークの主な原因

## 1. 移動相関連

## ● 移動相の汚れ

グラジエント溶離で出現する不明ピークの多くは、移動相中の汚染物や不純物によるものです。これは、移動相のこれら物質がグラジエントの初期濃度でカラムに蓄積され、強溶媒の比率が高くなるにつれて溶出してくるものです。この場合、何も注入せずにグラジエント溶離を実行しただけでも出現します。移動相の再調製、移動相容器の洗浄、新しい溶媒（水も含む）や別の試薬の使用などを試します。

## ● システムピーク

システムピークは、試料溶媒と移動相組成の違いから生じるピークで、移動相中に含まれる試薬、溶媒およびそれらの不純物などに由来し、用いている検出器に何らかの応答を示す成分となります。例えば、移動相に添加されている試薬Aが検出器に正の応答を示し、かつ固定相に保持されるとします。そこに試薬Aを含まない試料溶媒が注入されると固定相の試薬Aが平衡化のため試料溶媒ゾーンに移行します。この移動相—固定相間の平衡の乱れによる移動相中の試薬Aの濃度変化（再平衡による移動相からの固定相への試薬Aの移行に伴う濃度減少）がシステムピークとして、その保持時間の位置に現れます（図3）。

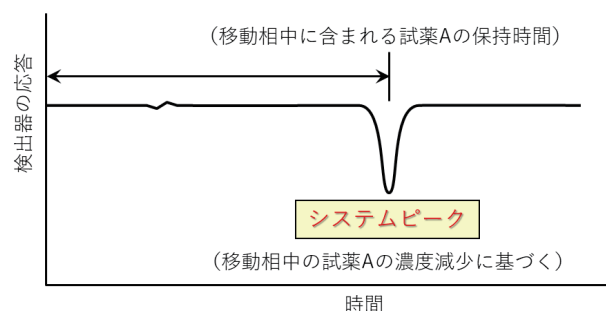


図3 システムピーク



システムピークは、試料溶媒の繰り返し注入でも同じように出現しますが、移動相を注入すると小さく、あるいは見えなくなります。システムピークは、それほど経験するものではありませんが、移動相に添加している試薬が多いほど出現しやすくなります。システムピーク対策は、試料溶液を移動相で調製することになりますが、難しい場合は分析種と重ならないように移動相条件を最適化するしかありません。

## 2. 試料導入関連

### ● キャリーオーバー

キャリーオーバーは、前に注入した成分（分析種や夾雑成分）が試料導入装置内に残り、後の分析で検出される現象です。一般に、試料溶媒のみを何度か繰り返し注入すると小さくなります。オートサンプラーにおけるキャリーオーバーの発生箇所としては、図4に示すように試料成分が接するあらゆる部分が考えられます。

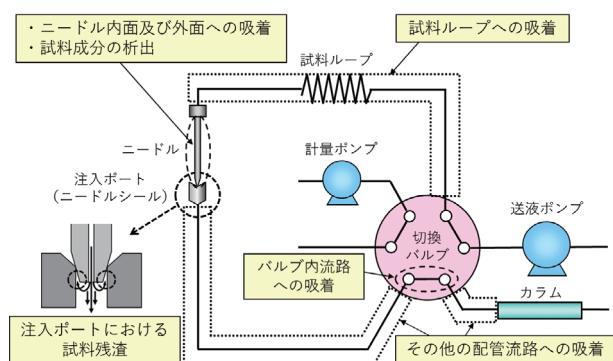


図4 キャリーオーバーの発生箇所

キャリーオーバーの抑制には、流路に成分を吸着させない工夫（ニードル形状の最適化、ニードルや切り換えバルブ内部の材質変更など）、吸着した成分を洗浄により徹底除去する工夫（複数のニードル洗浄液の使用など）が必要です<sup>1)</sup>。なお、島津オートサンプラーは種々の技術により、超低キャリーオーバーを実現しています。

### ● バイアルの汚れ

バイアルを試料溶媒や強溶媒でよく洗ってみます。材質の変更（内面処理バイアル、樹脂製バイアルなど）が効果的な場合もあります。また、質量分析計で使用する際には、品質証明書付きバイアル「島津 LabTotal Vial」も有効です。

### ● 空気ピーク

脱気装置により脱気されている移動相に空気飽和した試料溶液が注入された場合、分析条件によっては試料溶液中の溶

存空気が適度に保持されて、かつ検出されることがあります。溶存空気が原因であるため、試料溶媒を変更しても、移動相容器中の移動相（空気飽和している）のみを注入しても同じように現われます。一方、検出器から出てくる移動相（脱気されている）を注入すると小さく、あるいは見えなくなります。空気ピークは、示差屈折率検出器や吸光光度検出器の短波長域で出現しやすくなります。

空気ピーク対策はいくつかありますが、完全になくすことは困難です<sup>2)</sup>。基本的には、分析種と溶出位置が重ならないように、分析条件を調整することになります。

## 3. カラム関連

### ● カラムの汚れ

カラム入口付近に蓄積した汚れが、試料溶媒が変わったことにより溶出してくることがあります。カラムの洗浄をしましょう。

### ● 保持が強い成分の溶出

カラムに強く保持される試料中の成分が、その後の分析時に現れるもので、極端に遅いとベースライン変動のように見えます。図5の例では、最後に溶出するブチルパラベン（3）の溶出前に次々注入した結果、ブチルパラベンが後のクロマトグラム上に現れています（矢印ピーク）。

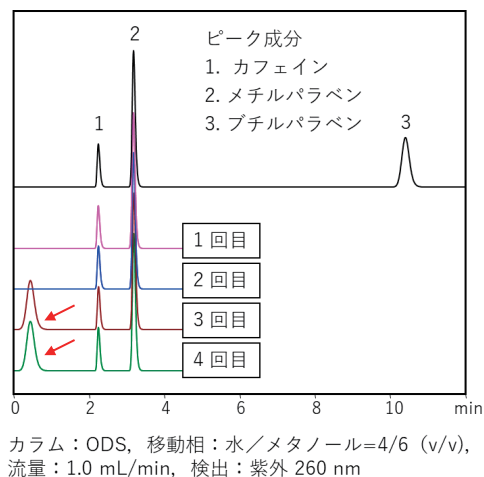


図5 保持が強い成分の溶出例

実試料の場合、分析種の後に溶出して来る夾雑成分を確認しておく必要があります。保持が強い成分がある場合、分析時間を長くする、グラジエント溶離を利用する、洗浄工程を入れるなどの対策が必要です。

## 参考文献

- 1) 三上博久, 早川禎宏, *CHROMATOGRAPHY*, 32, 17-21 (2011)
- 2) <https://www.an.shimadzu.co.jp/hplc/support/lib/ltalk/37/37lab.htm>

## Products

# LC-Raman システムと専用ソフトウェア LiChRa™

LCビジネスユニット  
長井 悠佑



LC-Raman システムは、高速液体クロマトグラフ (High Performance Liquid Chromatograph: HPLC) とラマン分光装置を組み合わせた新しい分析システムです。ラマン分光法は、非接触・前処理不要で分析・同定を行う優れた手法である一方、多種類の化合物が混在する試料の測定ではスペクトルが重なり、解析が困難になります。HPLCで試料中の成分を分離してから、スペクトルを測定することで、混合試料中成分の同

定をより正確に実施します。また構造異性体やUV吸収のない成分など、一般的なLC検出器では検出が困難な化合物に対してラマン分光法を適用することで、HPLC分析にも新たな可能性が広がります。HPLCとラマン分光装置は、専用ソフトウェアLiChRa (リクラ) を介して操作します。これにより異なる装置間でのデータの紐づけや、統一された操作を実現しました。

※ 本システムは、株式会社堀場製作所との共同開発製品です。

## 1. LC-Raman システム開発背景

### ● HPLCとラマンの得意・不得意を補完

HPLCは混合試料の分離・抽出を得意とし、定量正確さが良好な分析手法です。その際、標品を必要とするため、対象外の成分が含まれていた場合、その同定・定量は困難となります。ラマン分光法は分子振動に由来するラマン散乱光のスペクトルから分子構造を解析する手法です。スペクトルの特異性が高く、例えば液体クロマトグラフ質量分析計 (Liquid Chromatograph-Mass Spectrometer: LC-MS) で分離分析が

困難な同じ分子量の異性体の識別や、データベースとの照合による成分推定も可能です。一方、試料が複数成分から構成されている場合、得られるスペクトルが複雑になり、解析が困難になると言う弱点を有します (表1)。このように、HPLCが得意とする点はラマンの不得意な点であり、お互いの特徴を補完し合う関係にあるHPLCとラマンを融合することで、従来のHPLC・ラマンユーザーに対し、各手法が使用されるあらゆる分野で新しい活躍の機会を提供できると考えました。

表1 HPLCとラマン分光法の特徴比較

|            | HPLC                           | ラマン分光法                         |
|------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 対象成分の定量正確さ | ✓ 混合試料中の計測対象を分離・抽出して測定→定量正確さ良好 | ✗ 混合試料では複数スペクトルが重複し解析が困難       |
| 対象成分の定量正確さ | ✗ 対象外の成分の判定は困難                 | ✓ 分子構造の違いから未知成分の推定やデータベース照合が可能 |
| 主力市場・用途    | 医薬・ライフサイエンス                    | マテリアル、合成化学                     |

## 2. LC-Raman システムと専用ソフトウェア：LiChRa

### ● 2つの技術の融合で、混合試料の成分分析をより簡単に、詳細に実現

LC-Ramanシステムは、混合試料中の成分を分離し、捕集する「分ける」工程と、ラマンスペクトルによる成分判定の「見える」工程を、島津のHPLCと堀場製作所のラマン分光装置がそれぞれ提供し、そして専用ソフトウェア：LiChRaが一連の作業をサポートします。システムの特長を、3つのキーワードで説明します。

#### ①「くっきり」判別：混合試料の構成成分を明確化

HPLCにより混合試料中の各成分を分離し、ラマンスペクトルの測定と解析がより明確に実現できるようになりました。液体状態の混合試料をHPLCに導入し、ここで分離と専用プレートへの分画を行います。プレート上の各点には、純度の高い各成分が存在し、得られるラマンスペクトルは純粋な化合物のスペクトルに近くなります。これにより、スペクトルとデータベースとの照合のヒット率や判別の正確さ向上に貢献します。

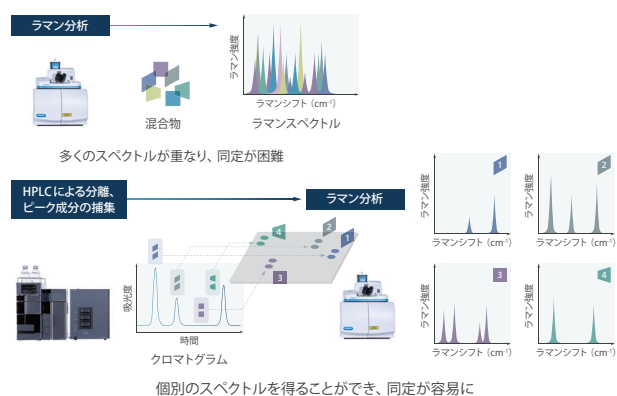


図1 混合試料のラマン測定をLC-Ramanシステムを使った場合とラマン分光装置単独で行った場合の比較イメージ

またラマン分光法を使うことで、UV吸収のない成分や、質量分析計では検出が難しい構造異性体の検出が、標品がなくても可能になります。

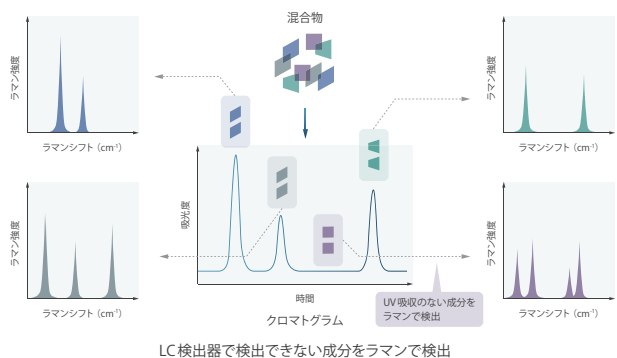


図2 UV吸収を有する/有しない混合試料をLC-Ramanシステムで分析した場合のイメージ

#### ②「すっきり」整理：データ管理を一元化

得られたラマンスペクトルが、どの試料に由来するのか把握するためには、注入した試料、LCデータ、プレートのどここの場所に分画したか、などの情報とラマンスペクトルデータを紐づけて管理する必要があります。これを手動で管理することは大変な労力を要するだけでなく、予期せぬミスが発生させるリスクになります。LC-Ramanシステムでは、LiChRaが膨大な情報を全て自動で紐付け、一元管理します。ユーザーは装置の操作をするだけで良く、情報の紐付け作業は必要ありません。LiChRaのData Viewer画面には、該当画分に対応するクロマトグラムやスペクトルなど一連のデータが一覧表示され、必要なデータの選択を容易にし、欲しい情報に簡単にアクセスすることができます (図3)。



図3 LiChRa DataViewer表示例

#### ③「かんたん」操作 直感的操作を実現

LiChRaは、複雑な操作を一切排除し、HPLCやラマン分光装置の各装置操作や、得られたデータへのアクセスを簡単に実行します (図4)。島津のHPLCや堀場製作所のラマン分光装置のソフトウェアの使用経験がなくとも、LC-Ramanシステムを使うことができます。

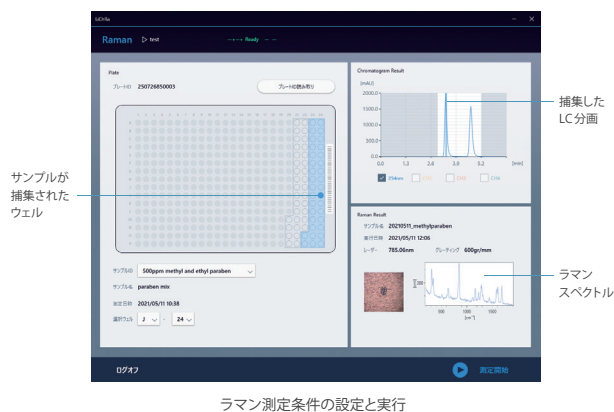


図4 LiChRa Raman画面表示例

(クロマトグラムとプレート上の捕集情報を紐づけながら、Raman測定点を検討できる)

### 3. 分析フローの紹介

#### ● 4種のパラベン混合試料の分離分析

よく似た構造をもつ4種類のパラベン混合試料のラマン測定を例に、LC-Ramanシステムの分析フローを紹介します。

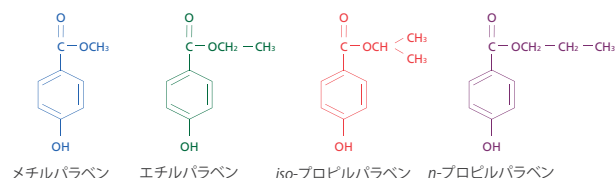


図5 パラベン4種類の構造式

図6に、パラベン4種類混合試料のラマンスペクトルを示します。スペクトルは大変複雑で、それぞれが混合されていることを事前に知らなければ各成分の判別は困難です。

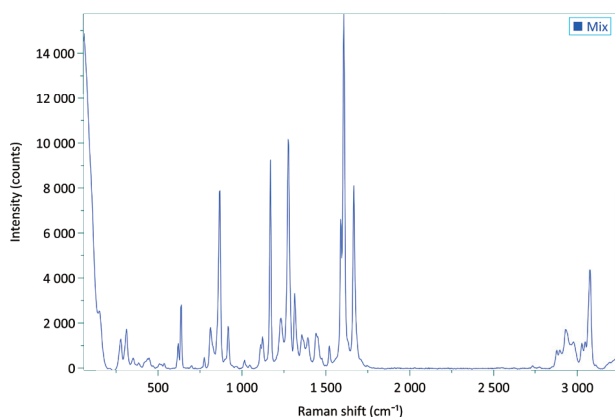


図6 パラベン4種類混合試料のラマンスペクトル

LC-Ramanシステムを用いて、まず4成分を分離し、専用プレート上に分画します(図7)。

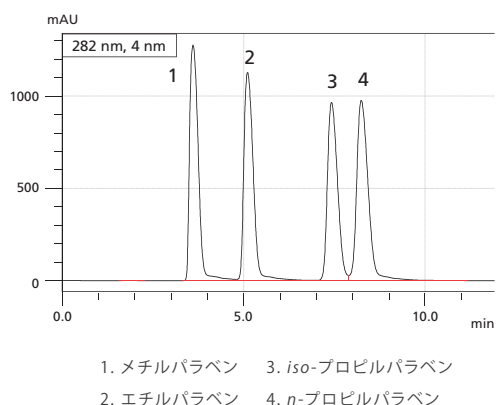


図7 パラベン4種類混合試料のクロマトグラム

各クロマトピークに該当する画分のラマンスペクトルを測定し、その結果をラマンスペクトルライブラリと照合した結果、原試料を構成する4成分を同定することができました(図8)。特に*iso*-プロピルパラベンと*n*-プロピルパラベンは、構造異性体と呼ばれる関係にあり、標品を用意しないとHPLCやLC-MSでは判別が困難です。図8のラマンスペクトルでは、2種類のプロピルパラベンの構造の違いがラマンスペクトル形状の違いに表れていることを確認でき、データベースとの照合によって同定情報を得ることができます(図8中、鎖線枠の波数域)。

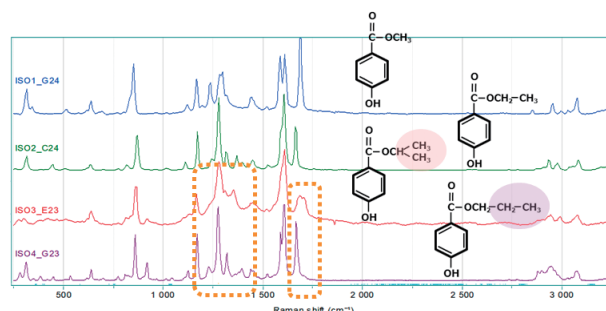


図8 HPLCで分離したパラベン4成分のラマンスペクトル

### 4. おわりに

本システムの特長は、既存のHPLCユーザー、LC-MSユーザーやラマンユーザーだけでなく、未知成分を多数含む混合試料の網羅解析や新規有用物質探索を目指す探索・オミクス分野ユーザーにも活用いただけたと考えています。今後、ユーザーのみなさまと議論を重ね、LC-Ramanシステムのさらなる機能拡充とアプリケーションの充実を目指します。

※ LiChRaは、株式会社堀場製作所および株式会社島津製作所の商標です。

※ 本資料のデータは、株式会社堀場製作所と共同で取得しました。



## Applications

## LC-Ramanによる高分子共重合体の分析

島津総合サービス リサーチセンター  
渡部 悦幸

LC-Ramanシステムは、高速液体クロマトグラフ（HPLC）-ラマン顕微鏡複合装置です。高速液体クロマトグラフを用いて分離し、専用プレート上に捕集した混合試料中の成分を、ラマン顕微鏡を用いて、そのラマンスペクトルを取得します。紫外可視吸光光度検出器や質量分析計では判別の難しい構造異性体や類縁体の判別が可能です。

本稿では、このユニークな機能を活かした、高分子化合物の品質分析に適用した事例をご紹介します。

## 1. AS樹脂のGPC分離による組成確認

スチレンとアクリロニトリルの共重合体であるAS樹脂は様々な樹脂製品に用いられています。高分子化合物であるため、一般には、ある程度の分子量分布をもちます。また、共重合体であるため、スチレンとアクリロニトリルが相互に結合した状態にあります。結合の様式によって、ブロック重合、グラフト重合、ランダム重合などに分類されます。低分子域から高分子域に至る広い分布を持つ共重合体の場合、分子量によって構成単位である2つ以上のモノマーの組成比が変化する場合もあり、合成反応の良否、製品の品質管理の上でも、分子量によるモノマーの組成比を把握することには一定の意義があると考えられます。

ここでは、市販AS樹脂をTHFに溶解して超迅速分析用GPC用カラムにより、分子量順に溶出するクロマトグラム上の異なる溶出位置、即ち異なる分子量の溶出液を専用プレートにスポットングして、ラマン測定に供しました。表1にGPC分離の分析条件を、図1に得られたGPCクロマトグラムとポリスチレン標準品で作成した較正曲線を示します。ラマン向けスポットングのため低流量を用いていますが、超迅速分析用GPCカラムを用いることで、10分以内に分析が終了しています。分子量とモノマー組成の関係を観察するため、図1に示した3か所でスポットング（A,B,C）を行いました。溶出の早い部分

が分子量の大きな画分となります（較正曲線参照）。これら3つのプレート上のスポットについて、ラマン測定した結果を次に示します。

表1 AS樹脂のGPC測定条件

|              |                                                  |
|--------------|--------------------------------------------------|
| 装置           | : LC-Ramanシステム                                   |
| カラム          | : Shodex HK-404L<br>(150 mm×4.6 mm I.D., 3.5 μm) |
| 流量           | : 0.2 mL/min                                     |
| 移動相          | : テトラヒドロフラン（THF）                                 |
| カラム温度        | : 40 °C                                          |
| 試料           | : AS樹脂（0.2% w/v in THF）                          |
| 注入量          | : 10 μL                                          |
| 試料バイアル       | : LabTotal for LC 1.5 mL, Glass*1                |
| 検出           | : フォトダイオードアレイ検出器（SPD-M30A）<br>260 nm             |
| スプリット比       | : 9:1                                            |
| スポットティング時間   | : 20 秒                                           |
| スポットティングプレート | : Hudson PL-PC-000040-P                          |

\*1 P/N: 227-34001-01

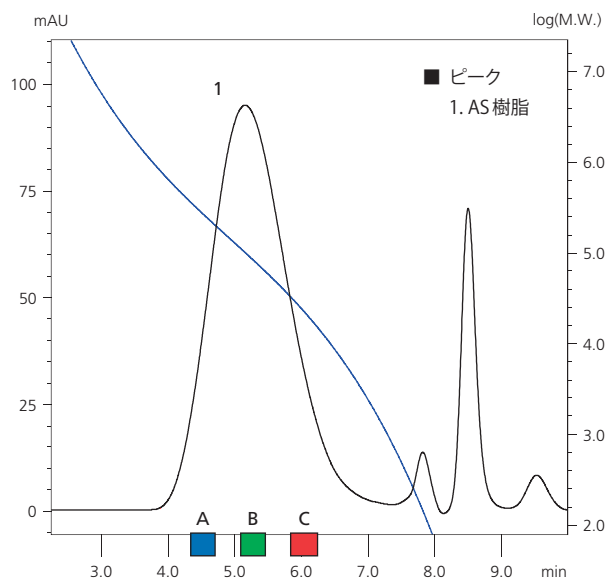


図1 AS樹脂のGPCクロマトグラム

## 2. AS樹脂のラマン測定

ポリスチレンおよびポリアクリロニトリルの構造式を、それぞれ図2に示します。

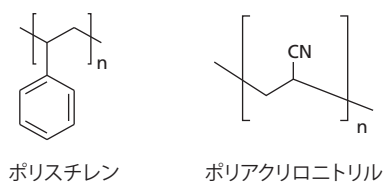


図2 ポリスチレンおよびポリアクリロニトリルの構造式

ラマンスペクトルの測定は、ラマン顕微鏡 XploRA PLUSを用いて図1のクロマトグラムでA、B、Cと示した溶出部分をプレート上にスポッティング・乾固させた試料およびリファレンスとしてポリアクリロニトリルとポリスチレンを用いました。532 nmのレーザーを試料に照射し、散乱光を分光した後、CCD検出器でスペクトルを取得しました。図3に、ポリアクリロニトリル、ポリスチレンおよびクロマトグラムにおける区間A由来のラマンスペクトルを積層表示しています。

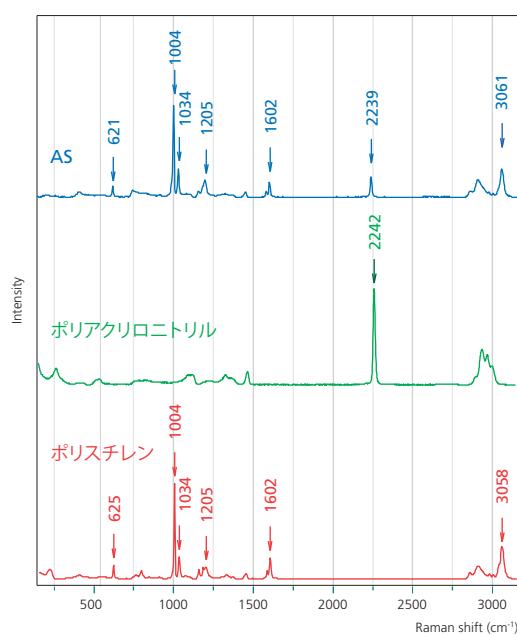


図3 AS樹脂とポリアクリロニトリル、ポリスチレンのラマンスペクトル比較

溶出部分A由来のラマンスペクトルには、矢印で示す箇所においてポリアクリロニトリルおよびポリスチレンのラマンスペクトルと共通するピークが得られました。図1のクロマトグラムにおける溶出部分A、BおよびC由来のラマンスペクトルの積層表示を図4に示します。分子量の大きな溶出部分A（分子量20万程度）、分子量が中程度の溶出部分B（分子量5万程度）および分子量の小さな溶出部分C（分子量6000程度）において観察される主要なラマンピークは共通していました。

ポリアクリロニトリル由来のピーク（2242 cm<sup>-1</sup>）およびポリスチレン由来のピーク（1004 cm<sup>-1</sup>および1602 cm<sup>-1</sup>）における強度はいずれも溶出部分Bにおいて最も強く検出されており、測定箇所における存在量が他の溶出部分に比べて多いことがわかります。また、両ピークの強度推移においては溶出箇所による特徴は見られなかったことから、共重合体を構成するモノマー組成は分子量によらずほぼ一定で、分子量依存性は認められないと考えられます。



図4 AS樹脂の分子量別画分毎のラマンスペクトル比較

## 3. ポリ(2-ビニルピリジン-メタクリル酸メチル)ブロック共重合体 (VP-MM樹脂) のGPC分離による組成確認

前項では、高分子共重合体でモノマー組成比に分子量依存性のないことを確認しましたが、ここではモノマー組成に分子量依存性のある場合についてのアプリケーションをご紹介します。

2-ビニルピリジンとメタクリル酸メチルのブロック共重合体であるポリ(2-ビニルピリジン-b-メタクリル酸メチル) (VP-MM) の市販樹脂についてモノマー組成の分子量依存性についてLC-Ramanシステムで確認しました。

前項でご説明したとおり、高分子の重合様式はいろいろありますが、いずれも低分子域から高分子域に至る広い分布を持つ共重合体の場合、分子量によって構成単位である2つ以上のモノマーの組成比の把握は重要な品質管理の指標になります。

AS樹脂の場合と同様に、市販VP-MM樹脂をTHFに溶解して超迅速分析用GPC用カラムにより、分子量順に溶出するクロマトグラム上の異なる溶出位置、即ち異なる分子量の溶出液を専用プレートにスポッティングして、ラマン測定に供しました。

図5に、試料であるVP-MMブロック共重合体樹脂の各ホモポリマーであるVPおよびMMの構造式を示します。

表2にGPC分離の分析条件を、図6に得られたGPCクロマトグラムとポリスチレン標準品で作成した較正曲線を示します。

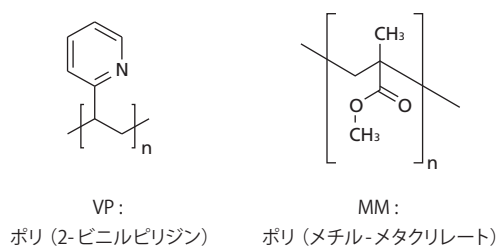


図5 VPおよびMMの構造式

表2 VP-M樹脂のGPC分析条件

|              |                                                  |
|--------------|--------------------------------------------------|
| 装置           | : LC-Ramanシステム                                   |
| カラム          | : Shodex HK-404L<br>(150 mm×4.6 mm I.D., 3.5 μm) |
| 流量           | : 0.2 mL/min                                     |
| 移動相          | : THF                                            |
| カラム温度        | : 40 °C                                          |
| 試料           | : VP-MM co-polymer (0.2 % w/v in THF)            |
| 注入量          | : 10 μL                                          |
| 試料バイアル       | : LabTotal for LC 1.5 mL, Glass*1                |
| 検出           | : フォトダイオードアレイ検出器 (SPD-M30A)<br>260 nm            |
| スプリット比       | : 9:1                                            |
| スポットティング時間   | : 20 秒                                           |
| スポットティングプレート | : Hudson PL-PC-000040-P                          |

\*1 P/N: 227-34001-01

ラマン測定向けスポットティングのため低流量を用いていますが、超迅速分析用GPCカラムを用いることで、本分析の場合は、12分以内に分析が終了しています。分子量とモノマー組成の関係を観察するため、図6に示した3か所でスポットティング(A,B,C)を行いました。溶出の早い部分が分子量の大きな画分となります(図6のクロマトグラム中に示した較正曲線をご参照ください)。

## 4. VP-MM樹脂のラマン測定

ラマンスペクトルの測定には、AS樹脂同様、ラマン顕微鏡XploRA PLUSを用い、図6のクロマトグラムでA,B,Cとした溶出部分をプレート上にスポットティング・乾固させた試料を用いました。532 nmのレーザーを試料に照射し、散乱光を分光した後、CCD検出器でスペクトルを取得しました。図6のクロマトグラムにおける溶出部分A、B、C由来のラマンスペクトルを重ね合わせて図7に示します。分子量の大きな溶出画分A(分子量8万程度)、分子量が中程度の溶出画分B(分子量2万程度)および分子量の小さな溶出画分C(分子量7000程度)において観察される主要なラマンピークの中で、AからCに分

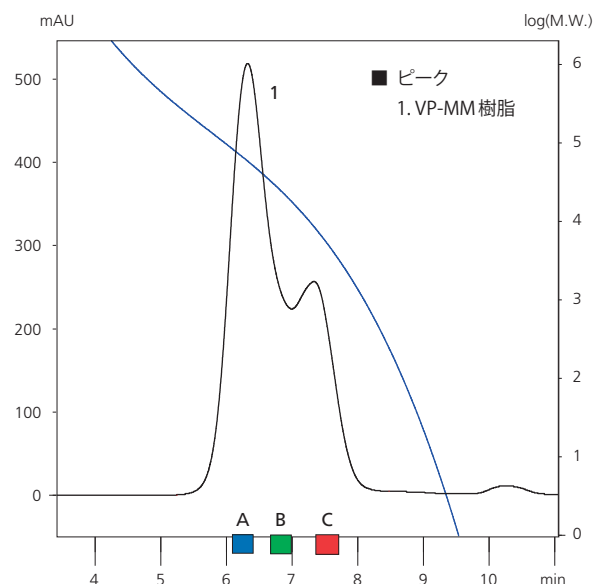


図6 VP-MM樹脂のGPCクロマトグラム

子量の減少する順に黄色の帯で示したように強度の増加するピーク群と、緑色の帯のように強度の減少するピーク群が確認できました。このように、異なる分子量範囲で分画された試料が、異なるスペクトルを示したことで、VPとMMの組成比の分子量依存性が示唆されました。

さらに詳細な観察を行うため、分子量毎の各画分のスペクトル(黒)およびWileyのデータベースに登録されているVPおよびMMのホモポリマーのスペクトル(赤)と比較したものを図8～10に示します。分子量の大きな画分Aでは主要なピークが下側赤で示したMMホモポリマーのそれとほぼ一致する反面、上のVPホモポリマーとの一致部分は少なく、高分子部はMMの組成比が大きいことが推察されます。

次に溶出区間の中間位置にある画分Bでは、MMホモポリマーと一致しないピークは上側のVPホモポリマーと一致しており、高分子組成中にVPとMMが混在していることが示唆されます。低分子量領域にあたる画分Cでは主要なピークはVPホモポリマーのそれと一致しているものの、MMホモポリマーと一致するピークも見られることから、両者は混在しているものの、VP由来の組成比は中間分子量領域の画分Bより大きいことが示唆されました。

以上のことから、分子量の大きな領域ではほぼMMで構成されていますが、低分子量領域に移行するに従いVPの構成比率が大きくなる傾向がホモポリマーとのスペクトル比較から確認できました。

なお、図7の1213/1547-1607 cm<sup>-1</sup>におけるピークはピリジン由来、3061 cm<sup>-1</sup>のそれは芳香環のCH結合由来であることが知られており、それぞれの図7でのピーク強度の増減は上記考察と矛盾しません。

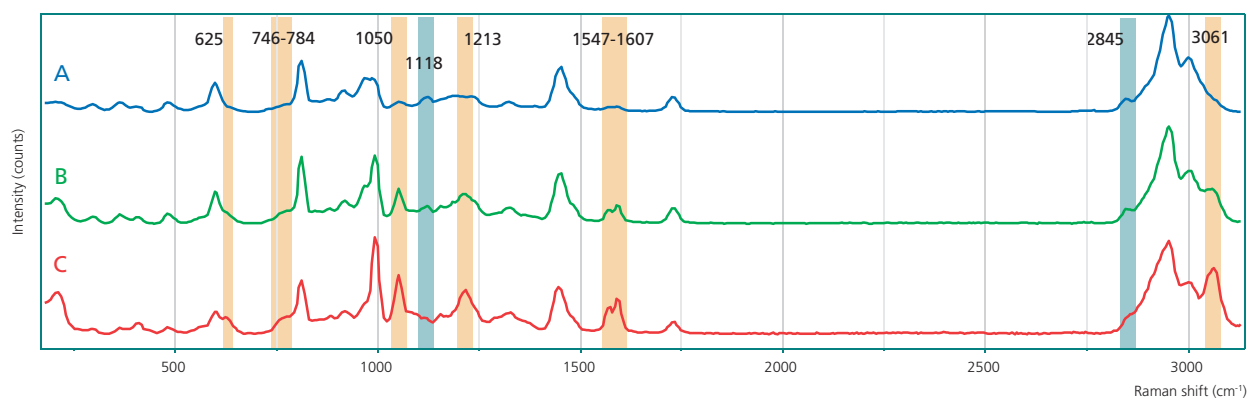


図7 VP-MM樹脂の分子量別画分毎のラマンスペクトル比較

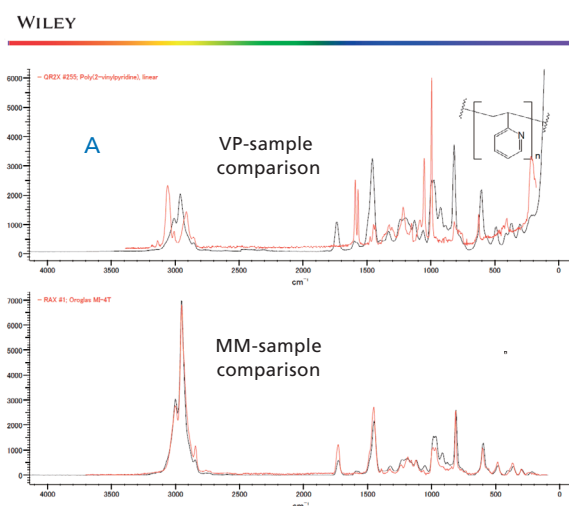


図8 VP-MM樹脂の分子量別画分とVPおよびMMホモポリマーのラマンスペクトルの比較-A

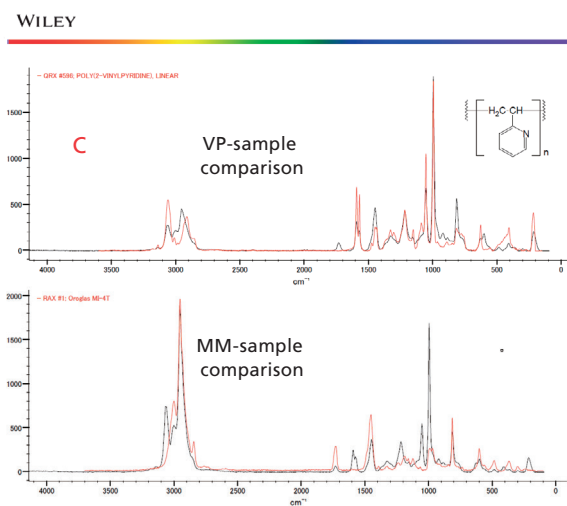


図10 VP-MM樹脂の分子量別画分とVPおよびMMホモポリマーのラマンスペクトルの比較-C

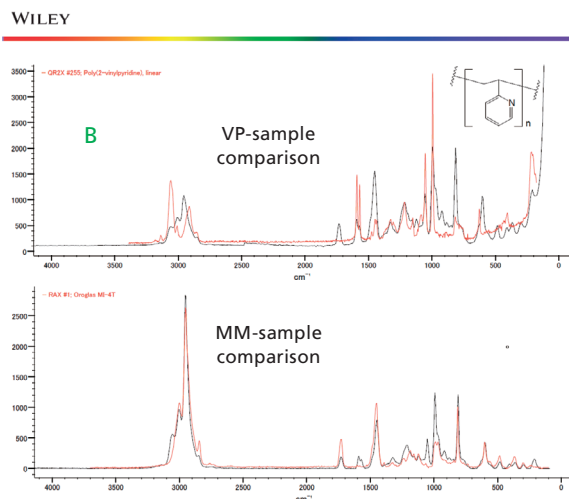


図9 VP-MM樹脂の分子量別画分とVPおよびMMホモポリマーのラマンスペクトルの比較-B

## 5. まとめ

本システムを用いることで、従来HPLC単独では不明瞭であったり、煩雑な複合的手法が必要であった高分子のキャラクタリゼーションが短時間かつ容易に実行可能であることが確認できました。また、クロマトグラム上の分取情報とラマンスペクトルデータとの紐づけがなされるため、データの情報照合が瞬時に可能になります。さらに市販スペクトルライブラリーなどの利用で広範な応用が期待されます。

※ 本資料のデータは、株式会社堀場製作所と共同で取得しました。

本文に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。  
なお、本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。