

SEC 測定の精度向上

(GPC-8020 の内部標準補正機能)

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) では分子量標準を測定して検量線 (溶出位置と分子量の関係) を作成し、目的試料の溶出位置と検量線から分子量 (相対分子量) を求めます。実際の測定では目的試料の分子量を決定する主要なパラメータは溶出時間であるため、溶出時間のずれは分子量測定に大きな影響を与えます。最近の SEC 用装置は性能が向上してはいますがある程度の流量の変化とそれに伴う溶出時間の変動は避けられません。しかしながら、測定日毎に検量線を作成し直し分子量計算する事が精度管理上最も好ましいとされていますが一般にあまり行われておりません。そこで測定結果の再現性を向上させるために内部標準ピークを用い流量の補正を行う方法 (内部標準補正) を検討しました。内部標準補正では一般に試料溶液 (標準試料も含め) に内部標準物質 (以下内標と言う; 一般的には低分子) を添加して測定し、得られたデータに対して内標のピークを基準として目的試料の溶出時間を補正し分子量計算します。したがって個々の試料の測定時間中は流量が変化しない事を前提とすれば正確な分子量値が得られます。内標としてはゲルへの吸着が無い (溶出時間が温度の影響を受けない)、溶媒ピークと重ならない、更に試料によっては試料の低分子領域と重ならないなどの制約が有り実際には汎用できるものはなかなか見当たりません。一方、RI 検出器に必ず見られる溶媒ピークは時間経過と共にピーク形状がかなり変動するものの、添加する内標に比べ測定したい試料と重なる可能性が低い、さらに特別に内標を調製する必要が無いなどの点で簡便な内標となり得ます。

ご好評を頂いています GPC データ処理ソフトウェア「ワークステーション GPC-8020」には、内部標準補正の機能が搭載されており、内部標準ピークとしては正負何れのピークにも対応可能です。今回、この機能を用いて BHT 及び溶媒ピークを内部標準とした場合、どの程度分子量計算値の再現性が向上するか検討しました。その結果を以下に示します。

日内再現性: BHT、溶媒ピーク何れを内部標準として使用した場合も再現性は顕著 (約 1.6 倍) に向上しました。

日差再現性: 毎回検量線を作成した場合には及ばないものの 1.5 から 2.3 倍向上しました。

以上、内部標準補正は日内再現性の向上に特に有効な事、溶媒ピークも内部標準として使用可能な事が示されました。したがって GPC-8020 の内標補正機能は正負何れのピークにも対応可能なため試料や測定条件に適した内部標準を選択する事が出来非常に実用的な機能と言えます。

分析条件: カラム; TSKgel GMHHR-M × 2 (カラム No. W0005, Y0021)

溶離液; THF 流速; 1.0ml/min 検出; RI-8022 注入量; 100 µl 温度; 40

試料; 標準^o リソリン混合溶液, (各標準^o リソリン 0.2mg/ml)

SRM706 (0.5mg/ml)

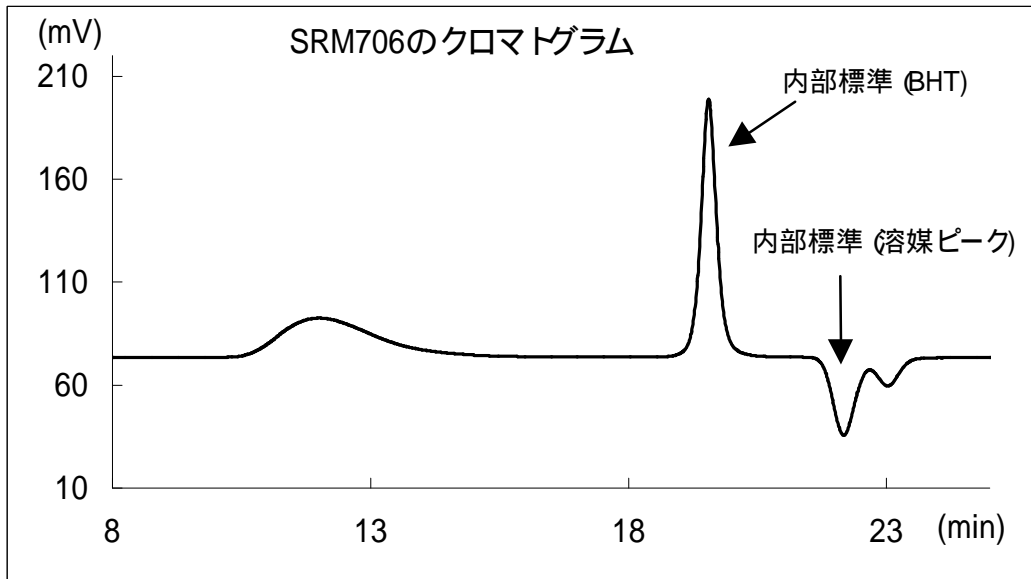
SRM705 (0.5mg/ml)

各試料溶液に BHT (10mg/ml) を 9:1 (容量比) の割合で混合し注入試料としました。

装置; CCPM2、AS8020、C08020、R18022、SD8022

* 測定は n = 6 で 4 日間行いました。

* 実試料は測定日に毎回調製しました。



分子量計算値の再現性

SRM706

	Mw A	Mw B	MwC	MwD
日内再現性	0.42		0.27	0.27
日差再現性	0.80	2.25	1.50	1.12

SRM705

	Mw A	Mw B	MwC	MwD
日内再現性	0.36		0.22	0.27
日差再現性	0.42	2.08	1.12	0.89

n = 6 で 4 日間測定

Mw A : 測定当日の検量線にて分子量計算したもの(内標補正なし)

MwB : 初日の検量線にて分子量計算させたもの(内標補正なし)

MwC : 初日の検量線にて分子量計算させたもの(BHTピークを内部標準として補正)

MwD : 初日の検量線にて分子量計算させたもの(溶媒ピークを内部標準として補正)

日内再現性 : 4 日間の平均値

* HLC-8120GPC を用いる事により Mw A の日差再現性がさらに向上する事を確認しております。