技術論文

サイズ排除クロマトグラフィーによる高分子平均分子量共同測定*

IV. 第2回ラウンドロビンテスト結果報告(その2) ベースラインの引き方について

森 定雄^{***}, 高山 森^{**}, 後藤幸孝^{**}, 永田公俊^{**}, 絹川明男^{**}, 宝崎達也^{**},
矢部政実^{**}, 高田加奈子^{**}, 杉本 剛^{**}, 清水 優^{**}, 長島 功^{**}, 長谷川 昭^{**},
仙波俊裕^{**}, 大島伸光^{**}, 前川敏彦^{**}, 杉谷初雄^{**}, 大関 博^{**}, 中橋計治^{**},
日比清勝^{**}, 大谷 肇^{**}, 中村茂夫^{**}, 杉浦健児^{**}, 梅田優子^{**}, 荻原誠司^{**},
勝野保夫^{**}, 大久保哲雄^{**}

Report on cooperative determination of molecular weight averages of polymers by size exclusion chromatography. IV. A report on the second round robin test (No. 2). On the construction of baseline

S. MORI, S. TAKAYAMA, Y. GOTO, M. NAGATA, A. KINUGAWA, T. HOUSAKI, M. YABE, K. TAKADA,
T. SUGIMOTO, M. SHIMIZU, I. NAGASHIMA, A. HASEGAWA, T. SENBA, N. OOSHIMA, T. MAEKAWA,
H. SUGITANI, H. OOEKI, K. NAKAHASHI, K. HIBI, H. OOTANI, S. NAKAMURA, K. SUGIURA, Y. UMEDA,
S. OGIWARA, Y. KATSUNO and T. OKUBO*

*Section of Special Study on SEC, Research Committee of Polymer Analysis, The Japan Society for Analytical Chemistry, 26-2, Nishigotanda 1-chome, Shinagawa-ku, Tokyo 141

(Received 29 March 1996, Accepted 26 April 1996)

At 2nd round robin test (RR-2), the problem on the baseline construction was considered to be the main reason of high relative standard deviations (RSD) of number-average molecular weight (M_n). There are two methods to construct baseline of an SEC chromatogram. Method A is the extrapolation from the baseline at the beginning of the polymer chromatogram to the baseline after the solvent related peaks and method B is the draw of a linear baseline between the beginning of the polymer chromatogram and the end of the chromatogram before the solvent related peaks (the lowest point between them). Laboratories at RR-2 were divided into two groups, group A which employed method A and group B which employed method B. After evaluating all data of M_n and removing invalid data, RSDs of M_n were calculated separately. RSDs in group A were between 5.2 and 7.1% and those in group B was between 7.3 and 9.3%. The average values of M_n in group B were 1.13 to 1.23 times higher than those in group A. It is essential to standardize the procedure of the baseline construction in order to obtain better RSD. Ideally, method A is preferable, but there were several invalid data due to the disturbance of solvent related peaks and the low setup of cutoff molecular weight which

* サイズ排除クロマトグラフィーによる高分子平均分子量の共同測定(第4報). 前報は森 定雄ほか: 分析化学, 45, 447 (1996).

** 日本分析化学会高分子分析研究懇談会 SEC 専門部会:
141 東京都品川区西五反田 1-26-2 五反田サンハイツ
304 号

must be between 2500 and 3000. Method B is more appropriate, but tends to neglect low molecular weight components.

Keywords : size exclusion chromatography; number-average molecular weight; round robin test; baseline construction; relative standard deviation

1 はじめに

第2回ラウンドロビテスト (RR-2)¹⁾において、ポリスチレン (PS) 試料の重量平均分子量の相対標準偏差 (RSD) は 5.0~5.8% と、第1回ラウンドロビテスト (RR-1) における RSD より良好な結果が得られたが、数平均分子量については 13.7~15.8% となり、RR-1 と比較して改善が認められなかった。この原因の一つにベースラインの設定法に問題があるものと考えられた。すなわち RR-2 ではクロマトグラムのベースラインの引き方を統一し、更に平均分子量計算に算入する分子量の最低値を規定したが、必ずしもこの方針に沿って計算しなくてもよいことにしたため、従来から一般に用いられている方法によるベースラインの設定と平均分子量計算をしている測定機関が多く、このことが RSD の改善にならなかった原因と考えられる。

RR-2 における PS 試料の測定データを詳細に検討し、ベースラインの引き方や分子量計算に算入する分子量の大きさによって、数平均分子量がどのように変動するかを調べた。その結果、ベースラインの設定法を確実に統一することにより、数平均分子量の RSD が著しく改善されることが見いだされ、その数値を 10% 以下に抑えることができた。ここにその結果を報告する。

2 検討要領

RR-2 におけるベースラインの設定法はポリマーピークの立ち上がりを始点とし、溶媒起因ピーク (溶媒不純物ピークなど、以下溶媒ピークとする) が出終わり、安定したベースラインになったところを終点とし、この間を直線で結んでポリマーピークのベースラインとする方法である。この場合、平均分子量計算に算入する分子量の最低値 (カットオフ分子量とする) を 500 とし、それ以下は計算に算入しないこととした。この方針の基でクロマトグラムを測定し、平均分子量を計算した測定機関を A 群とする。このベースライン設定法では計算できない場合には、使用しているデータ処理機の計算法に従っても良いこととしている。そのグループを B 群とする。RR-2 において得られた 4 種類の PS 試料 (PS-1,

PS-2, PS-3, PS-4) の数平均分子量の測定値についてベースライン設定法との関連を調べた。

3 結果と考察

ポリマーピークの終点近傍では始点の位置 (ベースライン) まで戻らず、そのベースラインと平行を保ち、溶媒ピークが出終わった後になってポリマーピークの始点のベースラインと一致することがよく認められる。その様子を模式的に Fig. 1 に示す。試料注入時からクロマトグラム出始めまで安定したベースラインが認められる。このベースラインを延長させると溶媒ピークの出終わった後のベースラインと一致する (ベースライン a)。ポリマーピーク終点では c の位置から a のベースラインと平行になっている。理想的にはポリマーピークの終点は溶媒ピークが出始める前に a のベースラインまで戻るべきであるが、図のような形のクロマトグラムはよく認められている。ASTM 規格²⁾ではこのようにポリマーピークの始点 (S) と溶媒ピークの終点 (E) 以降の安定なベースラインを結ぶこととしているが、ポリマーピークの終点がポリマーピークと溶媒ピークの間にあり、ベースライン a まで戻った場合のみを計算対象としている。

しかし、多くの実例で認められている Fig. 1 の場合には、一般にベースライン b のように、ポリマーピークの出始めと c 点を結んでベースラインとすることが行われている。c から溶媒ピークまでの間では成分が溶出しているのか、あるいは単に別の理由によりベースラインまで戻っていないだけなのか不明であったが、最近の研究では、成分の溶出に基づくものであることが明らかにされている。そして c と溶媒ピークまでの間でのカットオフ分子量の取り方によって数平均分子量計算値が著しく異なることが認められた³⁾。

RR-2 では a のようなベースラインの設定を意図し、分子量 500 まで分子量計算に算入することとした (A 群)。A 群の測定機関は No. 6, 8, 15, 18, 19, 20, 21, 25, 28 の 9 測定機関であった。一方ポリマーピークの始点から Fig. 1 の c 点まで直線を引き、これをベースラインとする方法もよく知られている方法である

Fig. 1 Schematically illustrated SEC chromatogram

A: polymer peak; B: solvent related peak

(B 群). B 群の測定機関は No. 1, 3, 4, 7, 9~12, 14, 16, 17, 24, 27, 28' の 14 測定機関である. このうち測定機関 No. 28 は A, B 両群の計算を試みているので B 群に ' を付した. RR-2 におけるデータから A, B 二つの群に分けて数平均分子量をまとめたのが Table 1 である. 測定機関 No. 13 と 22 はベースラインの引き方が不明であったので, そのデータは省略した. 検出器に示差屈折計 (RI) を用いて得られたデータの平均値を見ると, B 群のほうが 20% ほど大きくなっている. 一方, RSD は A 群では 8.2~24.3% とかなり大きくなっているが, B 群では 7.2~9.5% と良好であった.

Table 1 Number-average molecular weights of polystyrene samples divided into A and B groups

Lab. No.	PS-1		PS-2		PS-3		PS-4	
	A $\times 10^{-5}$	B $\times 10^{-5}$	A $\times 10^{-4}$	B $\times 10^{-4}$	A $\times 10^{-4}$	B $\times 10^{-4}$	A $\times 10^{-4}$	B $\times 10^{-4}$
1		1.42		7.89		4.14		3.97
3		1.40		6.83		3.56		3.37
4		1.43		8.15		3.93		3.73
6	(0.51)		(4.04)		(2.73)		3.47	
7		1.53		7.51		4.03		4.13
8	(1.34)		(7.08)		(3.55)		(3.72)	
9		1.36		7.47		3.88		3.69
10		1.29		6.30		3.54		3.44
11		1.13		6.09		3.33		3.47
12		1.60		7.30		4.31		3.95
14		1.48		7.23		4.14		4.11
15	1.12		6.36		3.41		3.36	
16		(1.23)		(6.95)		(4.24)		(4.06)
17		(1.53)		(7.73)		(3.98)		(4.02)
18	1.14		5.62		2.96		3.01	
19 UV	1.15		5.54		2.65		2.55	
RI	(1.21)		(5.11)		(2.95)			
20	(1.30)		(7.11)		(3.71)		(3.95)	
21 RI	(1.43)		(7.14)		(3.86)		(3.70)	
UV	(1.31)		(6.06)		(3.03)		(2.91)	
24 RI		1.22		6.31		3.50		3.42
UV		1.00		5.13		2.48		2.56
25 UV	1.18		5.38		2.37		2.67	
27 UV		0.92		4.90		2.67		2.58
28	(0.93)		6.00		3.20		3.35	
28'		1.43		6.75		3.68		3.62
Ave.(RI)	1.12	1.38	5.84	7.10	3.24	3.87	3.51	3.76
RSD%	24.3	9.5	18.0	9.0	11.3	7.8	8.2	7.2
Ave.(RI) calculated excluding the values in parentheses								
	1.13	1.39	5.99	7.08	3.19	3.82	3.30	3.72
RSD%	—	9.3	6.2	9.1	7.1	7.9	5.2	7.3
Ave.(UV) calculated excluding the values in parentheses								
	1.16	0.96	5.46	5.01	2.51	2.58	2.61	2.57

Fig. 2 Chromatograms obtained at laboratory No. 18

a: PS-1; b: PS-2; c: PS-3; d: PS-4

A 群について考察する。まず測定機関 No. 18 の各試料のクロマトグラムを Fig. 2 に示す。測定条件が最適な場合、試料注入からポリマーピークの始点 (S) までのベースラインは安定であり、その外挿は溶媒ピークの終点 (E) 以降のベースラインに一致する。Fig. 2 の a (PS-1), b (PS-2), c (PS-3), d (PS-4) はいずれもそのような状況下で得られたクロマトグラムである。このように、ポリマーピークのベースラインとしては試料注入からポリマーピークの始点までのベースラインと溶媒ピークが出終わった以降のベースラインを結んで得られるベースラインが望ましい。ここではクロマトグラムを記録紙上に記録し、手計算で分子量を計算している例である。

Fig. 2, a において、ポリマーピークの終点は保持容量 (V_R) = 21.5 ml で、このときの分子量は 1380 である。ポリマーピークと溶媒ピークは完全に分離している。Fig. 2, b ではポリマーピークの終点は V_R = 22.0 ml で、分子量は 950 であった。Fig. 2, c ではポリマーピークの終点と溶媒ピークの始点は重なり、ベースラインに戻っていないことが分かる。 V_R = 22.7 ml から溶媒ピークは立ち上がっており、この位置の分子量は 480 である。従って分子量 500 まで分子量計算に算入することについては溶媒ピークの妨害はない。Fig. 2, d は Fig. 2, c と同じ PS であるが、精製法が異なるため (RR-2¹⁾ 参照) か、最初の溶媒ピークは小さく、 V_R = 22.8 ml (分子量 465) でポリマーピークはベースラインに戻っていることが分かる。従って Fig. 2, d の場合にはここまで分子量計算に算入すべきであろうが、規定により 500 までとしており、PS-3 と PS-4 の数平

Fig. 3 Chromatograms obtained at laboratory No. 28

a: PS-1 in A group; b: PS-1 in B group

均分子量に差は認められない。

測定機関 No. 15 においては分子量計算に算入しているカットオフ分子量は PS-1 で約 3000, PS-2 で約 1800, PS-3 で約 1200, PS-4 で約 900 であり、測定機関 No. 18 より分子量の高いところで終点としているため、PS-1 を除いて数平均分子量は高めになっている。測定機関 No. 28 の PS-1 では保持容量約 19 ml (分子量約 2000) の位置でポリマーピークはベースラインに近づいているが、その後溶媒ピークの始点まで若干立ち上がっており、この部分を計算に算入しているので数平均分子量が著しく低くなっている (Fig. 3, a)。他測定機関の測定例から見てこの部分には PS 成分の溶出はないと認められるからである。PS-1 以外はいずれも分子量 500 まで計算に算入しているが、これについては特に問題はないと思われる。

測定機関 No. 6 では規定どおりのベースライン設定と分子量計算を行っているが、分子量 1500 以下の成分と溶媒ピークとの分離度が悪く、ポリマーピーク終点と溶媒ピーク始点が重なっており、そのため分子量 1000 ~ 500 の範囲 (Fig. 4, B 点以降) の応答量が分子量

Fig. 4 Chromatograms obtained at laboratory No. 6

a: PS-3; b: PS-4

1500 (同 A 点) 付近より大きくなっている。この範囲も分子量計算に算入しているため数平均分子量は小さくなったものと推定される。但し PS-4 (Fig. 4, b) ではそのことが認められず、合理的な値になっている。このことから溶媒ピークのうち最初のピークは PS 精製時に混入した不純物と推定できる。測定機関 No. 8 ではベースラインは規定に従って設定され、非常に安定なベースラインが得られている。ポリマーピークの終点は溶媒ピークの始点よりかなり前の方でベースラインに達している (Fig. 5)。これはミックスカラム 3 本とオリゴマー用カラム 1 本を接続しているため、低分子領域の分離範囲が広がり、そのため少量の低分子量部分の応答量がほとんど無視できるくらいに拡散されたためと考えられる。従ってカットオフ分子量が大きくなり、平均分子量計算値を大きくしている原因であろう。

測定機関 No. 19 では 3 回の測定で RI はばらつきが大きく、これに対し紫外吸収検出器 (UV) ではばらつきの小さい値が得られていた。測定機関 No. 20 ではベースラインに不規則性が認められている。測定機関 No. 21 ではポリマーピークと溶媒ピークの分離が不十分で、カットオフ分子量が 2600 となっており、そのた

Fig. 5 Chromatograms obtained at laboratory No. 8

a: PS-1; b: PS-4

め数平均分子量は大きくなっている。

以上 A 群で RI を用いた場合の測定結果について、クロマトグラムと平均分子量計算状況を考察した。RI を用いた場合の全平均値の RSD は 8.2~24.3% と大きくなっているが、当初の規定から外れているなどにより削除に相当する値 (Table 1 の括弧で示した値) を除いた 3~4 個の平均値の RSD は 5.2~7.1% と良好になった。PS-1 はデータ 2 個であるので RSD は計算から除外した。

次に B 群について考察する。RI 測定値の全体の平均値に対する RSD は 7.2~9.5% と良好であった。測定機関 No. 28 のデータにおいて Fig. 1, b のベースライン設定をした場合 (測定機関 28' のデータ)、ポリマーピーク終点の分子量は PS-1 で 2300, PS-2 で 670, PS-3 で 530, PS-4 で 570 で、数平均分子量は Table 1 の No. 28 の値と比較していずれも高くなっている。クロマトグラムとベースライン設定例を Fig. 3, b に示す。測定機関 No. 16 と No. 17 はベースラインに不規則性が認められ、このため平均分子量計算値の信頼性は低いと考えられる。この 2 測定機関を除く残りの測定値の平均値の RSD は 7.3~9.3% であった。又、A 群に対し B 群の数平均分子量計算値は 1.13~1.23 倍であった。

カットオフ分子量の分かっている測定機関についてその値を Table 2 に示す。測定機関 No. 6, 8, 15, 18, 28 は A 群で、No. 9, 10, 12, 14, 24, 28' は B 群である。B 群のうち No. 9 は始点、終点をあらかじめ設定し、その間を直線で結ぶ方法によるベースラインであり、その他は始点、終点を自動設定する方法である。

Table 2 Cutoff molecular weight at different laboratories

Lab. No.	PS-1	PS-2	PS-3	PS-4
6	540	540	540	540
8	1100	650	500	500
15	3000	1800	1200	900
18	1380	950	500	500
28	500	500	500	500
9	2310	1420	620	620
10	1550	640	420	440
12	2780	650	515	685
14	6070	2520	1450	1540
24 RI	2240	1500	1170	810
UV	815	600	510	515
28'	2300	670	530	570

No. 28 と 28' は同じ測定機関で同じデータからベースラインの設定法を変えて平均分子量を計算した例である。No. 28 と 28' を比較すると、カットオフ分子量には大きな差はないが、数平均分子量で 10% 程度の差がでていることが分かる。No. 24 では RI の場合より UV の場合のほうがカットオフ分子量が著しく小さく、平均分子量もその分低くなっている。ほかの測定機関の間ではカットオフ分子量が低いほうが数平均分子量も低くなっているが、両者で常に相関があるわけではなく、一番のポイントはベースラインの設定にあると言える。

ベースラインの設定法を統一することは RSD の良好な数平均分子量を得るために不可欠であると言える。一方どの範囲までの成分を分子量計算に算入すべきか考慮することも必要である。もし低分子量領域まで成分が含まれているならば、それらも平均分子量計算に算入させるべきであろう。しかし数平均分子量あるいは重量平均分子量の持つ意味を考えた場合、テイリングしている低分子量領域は切り捨てておくべきであるという考え方も同意できる。すなわち B 群のようなベースラインの引き方も間違っていないし、A 群のような引き方は本来ポリマー中に含まれているオリゴマーも含めた平均分子量算出という観点から妥当である。後者 (A 群) ではカットオフ分子量をあらかじめ決めておくことが必要である。本論文においては 2500~3000 くらいが妥当であろう。ポリマーピークと溶媒ピークをなるべく分離させ、

かつ校正曲線の形が直線から大きく変形しない方法の採用が必要となる。測定機関 No. 8 が好例である。含まれているであろう低分子量成分を数平均分子量計算値に算入することの可否を含め、ベースライン設定についての一般的な合意が必要である。

検出器に UV を用いた場合の平均値は、RI の平均値より A 群では 80~90%, B 群では 70% 程度であった。これは特にオリゴマー領域における検出器応答量の分子量依存性の相違によるものと推定される。このことについては次報で考察する。ここで言えることは平均分子量計算において、UV と RI で得られた値を比較したり、両者の平均をとったりすることは避けるべきである、ということである。

付記

今回の測定への参加者と所属機関名は次のとおりである。森 定雄、加藤秀俊 (三重大工)、高山 森、後藤幸孝 (三菱化学)、永田公俊 (東ソー)、絹川明男 (東レリサーチセンター)、宝崎達也 (出光石油化学)、矢部政実、清田光晴 (関西ペイント)、高田加奈子、森 佳代 (大日本インキ)、杉本 剛、葛谷孝史 (トヨタ自動車)、清水 優 (日本石油)、長島 功 (デュボン)、長谷川昭 (工学院大)、仙波俊裕 (住ベテクノ)、大島伸光 (ブリヂストン)、前川敏彦、中野治夫 (富士フイルム)、杉谷初雄 (日立化成)、大関 博、加々美穂美 (旭化成)、中橋計治 (日本分析工業)、日比清勝、佐々木圭子 (日本分光)、大谷 肇、石田康行 (名大工)、中村茂夫 (神奈川大工)、杉浦健児、福井明美 (日東技術情報センター)、梅田優子 (帝人)、荻原誠司 (富士ゼロックス)、勝野保夫 (電気化学工業)、大久保哲雄、中村雅英 (昭光通商)。

文 献

- 1) 森 定雄ほか: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **45**, 95 (1996).
- 2) ASTM D 3536-76 (Reapproved 1986), Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation chromatography-GPC) (1976).
- 3) S. Mori, H. Kato, Y. Nishimura: *J. Liq. Chromatogr.*, **19**, 2077 (1996).

要 旨

第2回ラウンドロビンテストにおいて、数平均分子量の相対標準偏差が高い値になった理由として、ベースラインの設定の問題が考えられた。ベースライン設定には、(1) ポリマーピークの始点と溶媒起因ピークの終点を直線で結ぶ方法、(2) ポリマーピークの始点とポリマーピークが出終わり、溶媒起因ピークが出始める間の最低位置との間を結ぶ方法、がある。(1) 又は (2) を採用した測定機関を別々の群とし、示差屈折計で得られた数平均分子量の値から測定上の問題のあるデータを除いた後のそれぞれの相対標準偏差を求めたところ、(1) では 5.2~7.1%, (2) では 7.3~9.3% と著しく改善されることが見いだされた。又、(2) の方法で得られた数平均分子量計算値は (1) の方法で得られた値の 1.13~1.23 倍であった。ベースラインの設定法を統一することは良好な相対標準偏差を得るために不可欠であると言える。理想的には (1) のような設定が望ましいが、溶媒起因ピークの妨害やカットオフ分子量の設定値の問題などにより、測定値のばらつきが大きくなる傾向が認められた。カットオフ分子量を 2500~3000 と大きくする必要がある。この点、(2) のようなベースラインの設定は問題点が少ないが、反面、低分子量部分を無視することになる。