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*

V. 平均分子量の検出器及び移動相依存性について

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^{**}, 勝野保夫^{**}, 田口 充^{**}

Report on the cooperative determination of molecular-weight
averages of polymers by size-exclusion chromatography

V. Dependence of molecular weight averages on detectors and mobile phases

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. OOZEKI, K. NAKAHASHI, K. HIBI, H. OOTANI, S. NAKAMURA, K. SUGIURA,
Y. UMEDA, Y. KATSUNO and M. TAGUCHI^{**}

^{**} 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 24 July 1996, Accepted 2 September 1996)

The effects of the differences in detectors and mobile phases on the calculated molecular-weight averages are discussed based on the data obtained from 1st and 2nd round-robin tests. Although the weight-average molecular weights (M_w) of polystyrene (PS) samples remained unchanged with the detectors, the number-average molecular weights (M_n) obtained with an ultraviolet absorption detector (UV) were 74~88% of those with a differential refractometer (RI). The fractions at a lower molecular weight range of the differential molecular-weight distributions, calculated using UV chromatograms, were higher than those based on RI chromatograms, which caused the M_n obtained by a UV detector to have smaller values than those by an RI detector. Peak broadening due to the cell structure or the difference in the molecular-weight dependence of the response coefficients of UV and RI detectors were negative as the main reason. The most probable assumption was that the end-structure of the PS samples affected the increase in the UV absorption. When a comparison of the M_n values between laboratories is required, the type of detector for size-exclusion chromatography must be the same. The values of M_n and M_w for poly(methyl methacrylate), obtained with chloroform mobile phase, were 5~25% higher than those with the tetrahydrofuran mobile phase. PS standards were used for the calibration; in this case, the change in the values of M_n

* 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5報). 前報は森 定雄ほか, 分析化学, **45**, 879 (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

and M_w for other types of polymers than PS using different mobile phases had to be taken into account.

Keywords : size exclusion chromatography; round robin test; polystyrene; poly (methyl methacrylate); dependence of molecular-weight averages on detectors and mobile phases.

1 はじめに

本会高分子分析研究懇談会では、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) に関する種々の問題点を共同で研究し、解明することを目的に SEC 専門部会を発足させ、活動に入っている。ポリスチレン (PS) 試料 3 種類、ポリメタクリル酸メチル (PMMA) 試料 2 種類について傘下 25 測定機関において共同測定を実施し、その結果については既に第 1 回ラウンドロビンテスト (RR-1) 報告¹⁾及び第 2 回ラウンドロビンテスト (RR-2) 報告²⁾として本誌に報告した。又、較正曲線作成用試料の相違に関する問題³⁾及びベースライン設定法に関する問題⁴⁾についても、その検討結果を報告した。

SEC 測定に用いられる検出器には示差屈折計 (RI) が一般的であるが、紫外吸収を有する試料の場合には、ベースライン安定性の良い紫外吸収検出器 (UV) が用いられることも多い。傘下 25 測定機関 (RR-1 では 23 測定機関) で RI を使用した測定機関数は 19 (RR-1) と 23 (RR-2), UV を使用した測定機関数は 7 (RR-1) と 6 (RR-2) である。このうち RI と UV を併用したのは No. 19, 21, 22, 24 (RR-2 のみ) の 4 測定機関であった。RI, UV それぞれについて較正曲線を作成して平均分子量を計算するので、両者で求められた平均分子量の間には差はないと考えられるが、実際には相違が認められ、特に UV で求められた数平均分子量 M_n の値は RI で求められた M_n の値より 1~2 割低くなっていることが認められている。この理由として、検出器の構造上の差によるピーク広がり程度の相違や、応答量の分子量依存性などが考えられる。

一方、移動相にはテトラヒドロフラン (THF) が一般的に用いられている。RR 測定においても多くの測定機関が THF を用いている。しかし THF には酸化防止剤としてブチルヒドロキソトルエンなどが安定剤として添加されている場合があり、この添加による影響が低分子量領域で認められることが多い。そのため、THF の代わりにクロロホルムが用いられることもある。我々の RR 測定においても 4 ないし 5 測定機関がクロロホル

ムを移動相に用いている。PS 標準試料を用いて較正曲線を作成して PS 試料の分子量を測定する場合には、移動相の相違により平均分子量測定値が相違するとは考えにくく、実際に RR-1, RR-2 における比較ではほとんど差が認められていない。これに対し、PS 標準試料による較正曲線を用いて異種ポリマーの平均分子量を測定する場合には、移動相が相違すると差が生ずることもあることは容易に推定できる。

そこで今回は、検出器と移動相の相違が平均分子量測定値にどのように影響を及ぼすかを検討した。まず検出器に RI あるいは UV を用いることにより、平均分子量の数値がどの程度異なってくるか、又その原因はどこにあるのか、について RR-1, RR-2 の PS 試料のデータを基に検討した。更に PMMA について、移動相が THF の場合とクロロホルムの場合で平均分子量測定値の差があるかどうか、同様に検討した。

2 比較検討要領

2・1 検出器依存性の検討

(1) 平均分子量計算値に及ぼす検出器の影響を調べるため、RR-1, RR-2 それぞれについて PS 試料 3 種類 (PS-1, PS-2, PS-3) の数平均分子量 M_n 及び重量平均分子量 M_w 測定値の平均値を RI 及び UV に分けて Table 1 に示す。これらの数値は RR-1¹⁾ の Table 3~5, RR-2²⁾ の Table 2~3 から抜粋した。ここで抜粋した数値は問題のあるデータを除いたものの平均値である。

(2) M_n はクロマトグラムのベースライン設定法の違いにより、その数値が大きく変わることが認められている。RR-2 のデータのうちベースライン設定法の異なる 2 群について別々に集計を行った。その結果を Table 2 に示す。

(3) RI と UV を併用している 4 か所の測定機関について M_w と M_n の数値を比較する。それを Table 3 に示す。

(4) 測定機関 No. 22 の両検出器で得られたクロマトグラムから分子量分布を求め、その比較を行う。

Table 1 Calculated molecular weight averages obtained with RI and UV detectors

RR	PS	Detector	$M_w \times 10^{-5}$	$M_n \times 10^{-4}$
RR-1	PS-1	RI	4.04	13.8
		UV	4.07	12.1
	PS-2	RI	2.43	7.03
		UV	2.43	5.98
	PS-3	RI	1.70	3.86
		UV	1.65	3.08
RR-2	PS-1	RI	3.87	13.4
		UV	3.78	11.5
	PS-2	RI	2.33	6.81
		UV	2.23	5.54
	PS-3	RI	1.61	3.67
		UV	1.51	2.73

(5) 両検出器でのピーク広がり程度の程度, 及び両検出器の応答係数の比較を行う。

2・2 移動相依存性の検討

PMMA について, 移動相が THF の場合とクロロホルムの場合で平均分子量測定値がどのように異なるかを調べるため, RR-1¹⁾ の Table 6, 7, RR-2²⁾ の Table 4 より問題のあるデータを除いた平均値を求めた。これを Table 4 に示す。平均値の母集団の測定値の範囲及び測定数も併せて示した。なおここで示す PMMA の分子量は PS 相当分子量である。

3 結果と考察

3・1 検出器依存性

Table 1 より, いずれの場合も M_w では RI と UV で差はほとんど認められていないが, M_n では UV のほうがいずれも低く, RI の値に対し, 74~88% であることが分かる。又, PS-1, PS-2, PS-3 と平均分子量が小さくなるに従って低くなる比率も大きくなっていることが認められる (PS-1 で 86~88%, PS-2 で 81~85%, PS-3 で 74~80%)。

M_n の値はベースラインの設定法によって大きな影響を受けることは既報⁴⁾で報告した。そこで, M_n の比較検討にはベースライン設定法を統一することがまず必要である。ベースラインとしてはポリマークロマトグラムの始点から溶媒起因ピーク終点までを内挿して得たベースライン (内挿法) と, ポリマークロマトグラムの始点からポリマークロマトグラムの終点近傍へ接線を引いて得たベースライン (接線法) がある。RR-2 での M_n のうち, ベースライン設定法の異なる 2 群に分けて別々

Table 2 Influence of baseline determination on number-average molecular weight

Sample	Detector	$M_n \times 10^{-4}$	
		Interpolation	Tangent
PS-1	RI	11.3	13.9
	UV	11.6	9.6
PS-2	RI	5.99	7.08
	UV	5.46	5.01
PS-3	RI	3.19	3.82
	UV	2.51	2.58

に集計し, M_n の数値がどのように変化するかを見たのが Table 2 である。検出器に RI を用いた場合と UV を用いた場合に分けて平均値を示した。内挿法の PS-1 を例外とし (その理由は不明), RI で求めた値に対し, UV で求めた値は 70~80% 程度であり, 特に接線法のほうが低下率が大いことが認められる。RI, UV いずれにおいても, 一般に接線法のほうが内挿法で得られた数値より大きくなることについては既報⁴⁾で議論している。

傘下測定機関の中で No. 19, 21, 22, 24 の 4 測定機関は RI と UV を併用している。これらの測定機関で得られた値は同じ測定条件下 (ベースライン設定法も含む) で得られた RI と UV による平均分子量であるので, 両者を比較することは妥当である。これらの測定機関で得られた RR-2 での平均分子量を Table 3 に示す。 M_w はほとんど同じか, UV による測定値のほうが若干低い程度 (最大 8%) である。これに対し, M_n は UV による測定値は RI の値に比べかなり低くなっている (最大 30%, いずれも測定機関 No. 24) ことが分かる。測定機関 No. 24 は移動相がクロロホルムであり, ほかにいずれも THF であった。

測定機関 No. 22 で求められた, RI, UV 両検出器で得られた微分分子量分布を Fig. 1~3 に示す。PS-1 (Fig. 1) では二つの分子量分布は完全に重なっている。これに対し, PS-2 (Fig. 2), PS-3 (Fig. 3) と平均分子量が低下するに従い, UV で得られた分子量分布 (波線) は低分子量部分が増加していることが認められる。PS-2 では UV で得られた分子量分布のほうが分子量 3 万以下で分率が多くなっており, それに比例してクロマトグラム頂点部分の分率が減少している。分子量分布の分子量の大きい部分は両者でほぼ一致している。PS-3 では高分子量領域から分子量数万まで UV による分子量分布の分率が小さく, これに対し, 3 万以下では大

Table 3 Molecular weight averages obtained by connecting RI and UV detectors

Sample	Lab. No.	Solvent	Detector	$M_w \times 10^{-5}$	$M_n \times 10^{-4}$
PS-1	19	THF	RI	3.64	12.1
			UV	3.68	11.3
	21	THF	RI	3.94	14.3
			UV	3.93	13.1
	22	THF	RI	3.64	13.8
			UV	3.61	13.7
PS-2	24	CHCl ₃	RI	3.96	12.2
			UV	3.87	10.0
	19	THF	RI	2.19	5.11
			UV	2.24	5.44
	21	THF	RI	2.38	7.14
			UV	2.32	6.06
PS-3	22	THF	RI	2.22	6.90
			UV	2.16	6.30
	24	CHCl ₃	RI	2.30	6.31
			UV	2.20	5.13
	19	THF	RI	1.54	2.95
			UV	1.49	2.65
	21	THF	RI	1.64	3.86
			UV	1.56	3.03
	22	THF	RI	1.57	3.76
			UV	1.50	3.15
	24	CHCl ₃	RI	1.58	3.50
			UV	1.46	2.48

くなっている。低分子量部分の応答量の増加は M_n を小さくする効果があり、このことが UV で得られた M_n が RI で得られた M_n より小さくなっている主な理由と考えられる。

ではなぜ低分子量領域で UV で得られた分子量分布の分率が多くなっているのであろうか。考えられる一つはセル構造の違いによるピーク広がりや他検出器の接続によるピーク広がりである。しかし UV は RI の前に接続されており、後者の原因は否定できる。又、分子量分布の狭い標準 PS について両検出器で得られたピークを比較するとほとんど広がりやの相違がないことが認められた。更に Fig. 1 はほとんど差がないことからピーク広がりやの差の影響は否定できる。

次に考えられる理由は RI と UV で、検出器応答係数の分子量依存性が異なることである。RI については比屈折率 dn/dc の分子量依存性が報告されている。例えば THF 中、波長 546 nm、25°C における PS の dn/dc は分子量 2.4 万で 0.193 から分子量 570 万で 0.198 と分子量とともにわずかながら増加することが報告されている⁵⁾。一方、UV については報告されていない

Fig. 1 Differential molecular weight distribution curves of PS-1 sample obtained with RI and UV detectors

Both distribution were overlapped.

Fig. 2 Differential molecular weight distribution curves of PS-2 sample obtained with RI and UV detectors

—: with an RI detector;: with a UV detector at 254 nm

Fig. 3 Differential molecular weight distribution curves of PS-3 sample obtained with RI and UV detectors

—: with an RI detector;: with a UV detector at 254 nm

Fig. 4 Plot of reduced peak ratio (UV/RI) vs. log molecular weight

The value of PS MW 190000 was taken as 1.00.
○: Lab. No. 19; ×: Lab. No. 21; ●: Lab. No. 24

が, 末端基効果などにより分子量の低い部分の応答係数は分子量依存性があることは容易に推定できる。そして RI と UV のそれぞれの応答係数の分子量依存性の程度が異なると, RI と UV で得られた分子量分布に差が生ずることになる。

そこで UV と RI を併用している測定機関の各標準 PS の UV (分子) と RI (分母) の各ピーク面積 (測定機関 No. 19, 24) 又はピーク高さ (同 No. 21) の比を求めた。この結果を Fig. 4 に示す。これは分子量 19 万の PS 標準試料の UV と RI のピーク比を 1.00 として各 PS 標準試料の比を換算して図示したものである。この結果, かなりばらつきが認められるものの, ピーク面積比では分子量が特に大きい部分と分子量が低い部分で UV 応答係数の増加は RI のそれを上回っていることが

分かる。一方ピーク高さ比では分子量の高いほうが 0.2~0.5% 程度小さく, 分子量の低いほうでは反対に 0.2~0.5% 程度大きくなっている。しかしその値はピーク面積の場合に比べ著しく小さい。又, PS-1, PS-2, PS-3 の UV と RI のピーク面積比も PS-1 を 1.00 としたとき, PS-2 は 2%, PS-3 は 4% 程度 UV 応答量が大きいことが認められた。

Fig. 4 の結果から, PS 標準試料の応答係数の分子量依存性が RI と UV で異なることが数平均分子量の相違になっていると結論づけることはできない。しかし PS 試料の低分子量領域の応答量は UV のほうが RI より大きいことは Fig. 2, Fig. 3 より事実であり, そのことが UV による数平均分子量を小さくしていることは確かである。平均分子量測定に用いた PS 試料の末端構造が影響を及ぼしているのかもしれない。

3・2 移動相依存性

Table 4 は移動相に THF を用いた場合とクロロホルムを用いた場合で, PMMA の平均分子量がどのように相違するかを見たものである。ほぼ等しい場合もあるが, クロロホルムを移動相とした場合のほうが 5~25% 程度大きい値になっている。THF 移動相とクロロホルム移動相で母集団の数が大きく異なるので, 単純に比較することはできないが, クロロホルム移動相のほうが PS 相当分子量は大きくなる傾向があるといえる。

4 結 論

PS 試料において, 検出器に RI を用いた場合と UV を用いた場合で, その M_n は最大 30% 程度の相違が認められる (M_w はほとんど差がない)。従って, 測定値を相互比較する場合には検出器を RI 又は UV に統一

Table 4 Molecular weight averages of PMMA obtained with mobile phase THF or chloroform

RR	Sol ^{a)}	$M_w \times 10^{-4}$	Range	RSD, %	$M_n \times 10^{-4}$	Range	RSD, %	Pop ^{b)}
PMMA-1								
1	THF	3.19	2.23~4.05	12.6	1.71	1.23~2.23	15.8	19
	CHCl ₃	3.09	2.83~3.39	7.5	1.64	1.30~1.91	15.4	3
2	THF	3.15	2.61~3.80	10.6	1.62	1.10~1.98	12.3	19
	CHCl ₃	3.51	2.98~3.88	10.2	1.63	1.42~1.87	10.2	4
PMMA-2								
1	THF	7.76	6.39~8.62	7.7	3.87	2.84~4.94	14.5	18
	CHCl ₃	8.27	7.70~8.84	5.6	4.07	3.40~4.47	11.7	3
2	THF	7.55	6.73~8.34	5.5	3.68	2.80~4.31	11.0	20
	CHCl ₃	9.36	8.21~10.70	10.0	4.40	3.50~4.99	12.5	4

a) Sol means solvent used as mobile phase; b) Pop means number of each population.

することが必要である。PS 標準試料による校正曲線を用いて PMMA 試料の平均分子量を測定する場合、移動相の種類によって平均分子量測定値 (M_n , M_w とともに) に影響を与えることが分かり、測定値の相互比較には移動相を同じにする必要がある。PS 試料の平均分子量を測定する場合にはその影響はない。

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、西村泰彦 (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 (富士フィルム), 杉

谷初雄 (日立化成), 大関 博, 藤沢 操 (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, 大松明美 (日東技術情報センター), 梅田優子 (帝人), 勝野保夫 (電気化学工業), 田口 充, 中村雅英 (昭光通商)。

文 献

- 1) 日本分析化学会高分子分析研究懇談会 SEC 専門部会: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **44**, 497 (1995).
- 2) 森 定雄ほか: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **45**, 95 (1996).
- 3) 森 定雄ほか: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **45**, 447 (1996).
- 4) 森 定雄ほか: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **45**, 879 (1996).
- 5) G. V. Schulz, H. Baumann: *Makromol. Chem.*, **114**, 122 (1968).

要 旨

検出器 [示差屈折計 (RI) と紫外吸収検出器 (UV)] と移動相 [テトラヒドロフラン (THF) とクロロホルム] の種類の相違が平均分子量測定値にどのように影響を及ぼすかを検討した。検出器の問題については第 1 回及び第 2 回ラウンドロビンテストにおけるポリスチレン (PS) 試料の平均分子量測定値を基に考察した。重量平均分子量 M_w は RI と UV で得られた値に差は認められなかったが、数平均分子量 M_n では UV で得られた値は RI で得られた値の 74~88% であることが分かった。又、平均分子量の低い PS 試料ほど、低下率も大きいことが分かった。RI と UV で得られた分子量分布を比較すると、低分子量領域で UV による分子量分布が大きくなっており、このことが UV で得られた M_n が RI で得られた M_n より小さくなっている理由と考えられる。この原因として、セル構造などによるピーク広がり的问题や検出器応答係数の分子量依存性の程度の相違は否定でき、測定試料の末端構造が UV における応答係数の増大になんらかの影響を及ぼしているものと推定した。従って測定値、特に M_n を相互比較する場合には検出器を RI 又は UV いずれかに統一することが必要である。ポリメタクリル酸メチル (PMMA) 試料において、クロロホルム移動相によって得られた平均分子量は M_n , M_w とともに THF 移動相の場合より 5~25% 程度大きい値になっている。PS 標準試料による校正曲線を用いて PMMA のような異種ポリマーの平均分子量を計算する場合、移動相の相違によって平均分子量が異なるので注意が必要である。PS 標準試料による校正曲線を用いて PS 試料の平均分子量を測定する場合には移動相の差は認められなかった。