

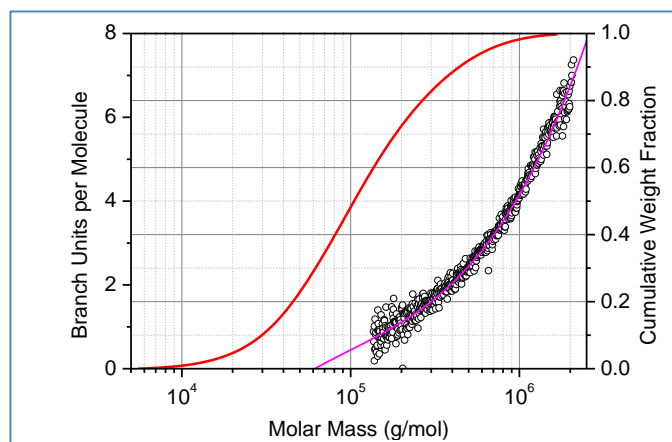
### 分岐構造の解明: MALS 検出器による合成及び天然高分子の構造解析

Stepan Podzimek, Ph.D.†

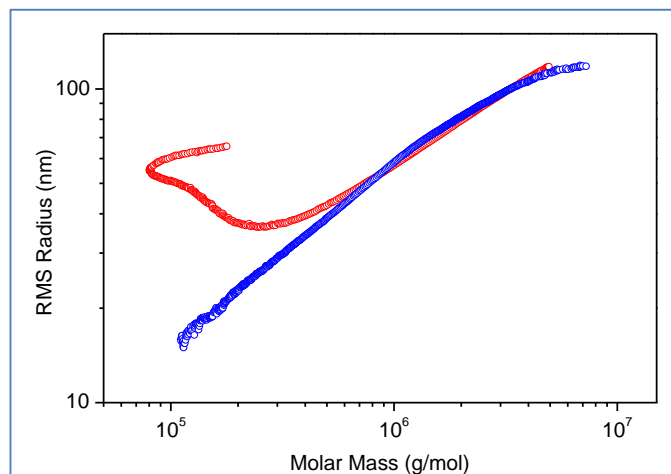
日本語訳: 昭光サイエンティフィック(株)

#### 概要

このアプリケーションノートでは、多角度光散乱検出器 (MALS) を用いた分岐高分子の性状解析をする際に基本となる理論の概要を紹介いたします。ここでは分岐情報を与える最も一般的な方法を説明すると共に、Wyatt Technology 社製品を用いた実験データに基づいて分岐を解明する方法を紹介いたします。はじめに分岐高分子におけるサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) での異常な溶出挙動を説明し、SEC-MALS により得られるデータと非対称流フィールド・フロー・フラクショネーション (AF4) により得られるデータとの比較をします。SEC-MALS と AF4-MALS を比較すると AF4 の方が SEC に比べ、より高度に分岐した高分子を分離するのに優れていることが判ります。本資料では末尾に分岐解析に関するトピックスが掲載されている最新の文献を幾つか紹介していますので、ご興味のある方はご活用下さい。



SEC-MALS 分析で得られた分子量に対する一分子あたりの分岐数。ここでは積分分子量分布曲線 (赤) と実験データポイントの 3 次近似曲線 (マゼンダ) の重ね書きしています。



分岐を含む高分子のコンフォメーションプロット。SEC-MALS により得られたもの (赤) と AF4-MALS により得られたもの (青)



## 序論

分岐は多くの合成及び天然高分子における重要な構造パラメータで、高分子の性質に重要な影響を及ぼします。分岐構造により影響を受ける性質には、高分子溶液の粘性やレオロジー的挙動、融解性などの機械的な性質や熱力学的な性質、結晶もしくは溶解性などがあげられます。分岐トポロジーに関する定量的情報は、優れた特性を有する新規高分子材料の開発や重合過程の理解に必要不可欠です。

SEC もしくは AF4 を用いた分岐構造の特性解析には、多角度光散乱検出器(MALS)が不可欠です。分岐構造の重要性は分岐に関する多くの科学論文からも明らかです。実際に、Wyatt 社のウェブサイト中にある文献検索で “Polymer Branching” をキーワードとして検索すると非常に多くの論文が検索されます。合成高分子の分岐に関する最近の論文を参照の 1-9 に纏めていますので、ご興味のある方は、ご活用下さい。

分岐は多くの場合、合成高分子において議論されていますが、多くの生体高分子においても重要なパラメータになります。例えば、医学、薬学で重要な生体高分子であるヒアルロン酸は、近年まで直鎖構造を持つと考えられてきましたが、Wyatt 社の検出器を使用することにより、分岐構造を持つものがあることが明らかになりました。<sup>10</sup> なお、生体高分子の分岐に関する他の幾つかの例が参照文献の 11-14 に掲載されていますので、ご興味のある方はご活用下さい。

このアプリケーションノートでは、MALS 検出器を用いた分岐解析の最も一般的な方法を紹介します。より詳細な情報は参考資料 15 に記載されています。

## 理論的背景

分岐解析の歴史は、Zimm と Stockmayer の有名な論文から始まりました。彼らは “分岐度” と呼ばれるパラメータ,  $g$  を理論的に導きました。<sup>16</sup>

$g$  は次の式で表せられます。

$$g = \left( \frac{R_{\text{branched}}^2}{R_{\text{linear}}^2} \right)_M \quad (1)$$

ここで  $R^2$  は、それぞれ同じ分子量 ( $M$ ) における直鎖高分子と分岐高分子の二乗平均平方根半径です。文献 16 に示されているとおり、分岐度  $g$  は、不規則な分岐高分子の分岐ユニット数、もしくは星型高分子の腕の数に直

接関係しています。分岐度  $g$  は 1 以下になり、1 の時には直鎖高分子であると判断できます。 $g$  の数値が小さいほど、より高い分岐度であることを示します。例えば、 $g$  が約 0.1 である場合は、その高分子は高い分岐構造を持つことを示します。

Zimm と Stockmayer が  $g$  を定義してから 10 年後、Zimm と Kilb によって、固有粘度に基づいた新しい分岐度が紹介されました。<sup>17</sup>

$$g' = \left( \frac{[\eta]_{\text{branched}}}{[\eta]_{\text{linear}}} \right)_M \quad (2)$$

ここで  $[\eta]$  は同一の分子量における分岐高分子と直鎖高分子の固有粘度です。 $g'$  と  $g$  の関係は、ドレイニングパラメータと呼ばれる  $e$  の値を用いて以下の式で表されます。

$$g' = g^e \quad (3)$$

パラメータ  $e$  は 0.5~1.5 の範囲で変化すると予想されていますが、 $g'$  から  $g$  を計算する際には  $e \approx 0.7$  が用いられています。

式 1 と 2 は分岐構造を同定し、性状解析するためには分子量と分子サイズの情報が必要であることを示しています。つまりは、分岐解析をする上で、双方の情報を同時にかつ独立して求めることができる MALS 検出器が非常に有用であることを示しています。MALS 検出器は通常 SEC などの分離分析装置に接続して使われ、分子量の関数として分岐パラメータを決定することができます。一般的に関心の向けられるパラメータは、分岐度と一分子あたりの分岐数です。但し MALS 検出器で求められる RMS 半径の下限値は約 10nm で (直鎖状高分子で分子量約 100,000g/mol)、このような高分子を解析する場合、RMS 半径の代わりとなる別のサイズパラメータが用いられます。このパラメータのうち代表的な 2 つが固有粘度と SEC の溶出容量です。前者は粘度検出器 [ViscoStar](#) で求めることができ、式 2 を用いて  $g'$  を計算するために使われ、後者は Yu-Rolling の方法を用いて  $g$  を求めるために使われます：<sup>18</sup>

$$g = \left( \frac{M_{\text{linear}}}{M_{\text{branched}}} \right)_V^{\frac{1+a}{e}} \quad (4)$$

ここで  $M$  は同じ溶出容量に溶出する直鎖高分子と分岐高分子の分子量で、 $a$  は直鎖高分子の Mark-Houwink-桜田の粘度式のべき指数です。

## 実験

全てのデータは、多角度光散乱検出器 (MALS) DAWN HELEOS、オンライン粘度検出器 ViscoStar、示差屈折率検出器 Optilab TrEX、AF4 システム Eclipse AF4 の Wyatt Technology 社製品を用いて得られ、ASTRA6 ソフトウェアにより解析を行いました。SEC、AF4 の双方とも移動相は THF を用いていました。

## 分岐解析の方法

分子量と分岐度の関係のプロットは以下の方法のどれかで求められます:

1. **Radius method:** コンフォメーションプロット (分子半径  $R$  と分子量  $M$  の対数-対数プロット) から式 1 を用いて  $g$  を計算する。
2. **Viscosity method:** Mark-Houwink-桜田プロット (固有粘度  $[\eta]$  と分子量  $M$  の対数-対数プロット) から式 2 を用いて  $g'$  を計算する。
3. **Mass method:** 分子量と溶出容量のプロットから式 4 を用いて  $g$  を計算する。

方法 1 と 2 の有利な点は、文献で報告されているコンフォメーションの数値や Mark-Houwink パラメータを活用できる点です。対象的に Mass Method は分岐高分子を測定するのと同じ SEC 分析条件で、直鎖高分子を測定する必要があります。しかしながら、Mass Method は RMS 半径を測定できない小さな高分子の解析には適しています。また粘度を用いる方法は、分岐に関して感度が高く、分子量 1000g/mol 程度までの幅広い範囲での測定を可能とします。

## 結果と考察

例として、直鎖及び分岐高分子のコンフォメーションプロットを図 1 に示します。分岐はこのプロットのスロープから容易に求めることができます。熱力学的良溶媒中における直鎖高分子のコンフォメーションプロットの傾きは 0.58 付近になり、それ以下の数値の時には、分岐の存在を示しています。(剛体球状の場合は 0.33 を示

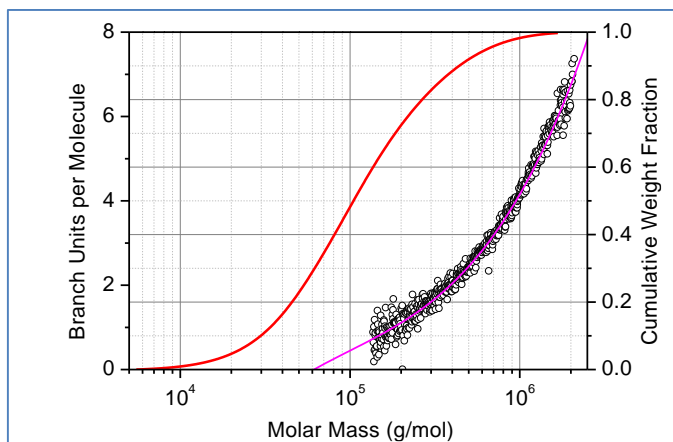
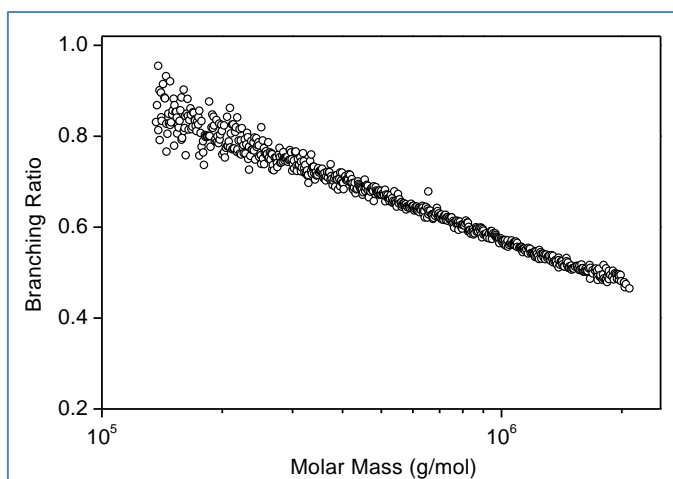
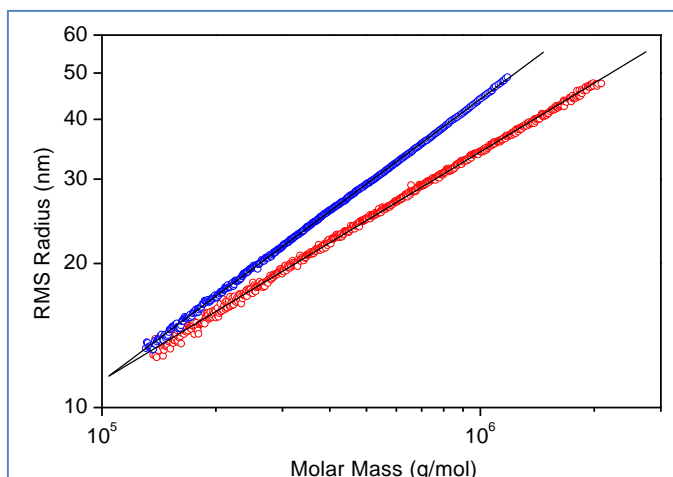


図 1. 上: 直鎖 (青) と分岐 (赤) ポリスチレンのコンフォメーションプロット。中: 分岐度 vs 分子量のプロット。下: 分子量と 1 分岐あたりの分岐数の関係を示すプロットと 3 次フィット曲線 (マゼンダ)。赤線は積分分子量分布曲線。直鎖と分岐のコンフォメーションプロットの傾きは、それぞれ 0.59 と 0.48 です。

します) コンフォメーションプロットから図-1に示すように分岐度 vs 分子量及び 1 分子あたりの分岐数 vs 分子量のプロットを求めることができます。ここでは分岐の定量的評価をより容易にするために分岐パラメータのプロットと積分分子量分布曲線を重ね書きしています。図-1を見ると、分子量 60,000 以下の約 28% の分子が分岐を含んでいないことが判ります。注目すべきは SEC-MALS 法は高分子鎖の 1 つの分岐ユニットを検出できる点です。

図-2 では、それほど分子量の大きくない高分子の分岐解析の例として、乳酸をベースとしたポリエステル直鎖と分岐を Mark-Houwink-桜田プロット及び分子量 vs 溶出容量で比較しています。この生体適合性及び生分解性高分子はドラッグデリバリー材料として利用され、その膨潤能、分解及び活性分子の放出は分岐度によって制御されます。両者のプロットは分岐分子の存在を検出し、式 2-4 により  $g$  を計算するために用いられます。

SEC-MALS 分析における Radius Method は小さな高分子や高分岐高分子には適さないことがあります。RMS 半径が 10nm 以下の高分子の分子半径測定は、MALS 測定に限界があるためです。また巨大な高分岐高分子においては、SEC カラムでの分離に限界を生じることがあります。これは、分岐があるがゆえに SEC カラムの充填ゲルの細孔に高分子が一時的に引っかかり、異常な溶出挙動を示し、その結果、実際の分子よりも小さな流体力学的体積に相当する時間に溶出することがあるという場合です<sup>19</sup>

SEC の異常な溶出挙動はコンフォメーションプロットを押し上げ、その結果誤った  $g$  の値を与えます。異常な溶出挙動を示す高分子の場合、AF4 の方が良い分離手法で、適当なコンフォメーションプロットが得られることがあります。エラー!ブックマークが定義されていません。SEC-MALS と AF4-MALS で得られたコンフォメーションプロットの比較を図-3 に示します。SEC-MALS から得たコンフォメーションプロットが上に押し上げられているのは、溶出容量の大きな領域において分子が不均一になるためです。MALS 検出器は Z 平均 RMS 半径 ( $R_z$ ) と重量平均分子量 ( $M_w$ ) を求める検出器で、かつ  $R_z$  は  $M_w$  よりも不均一性に対してより敏感なため、不均一な画分においてコンフォメーションプロットを押し上げる結果となります。一方、AF4 による分離は、分岐高分子と担体の相互作用を受けないため、コンフォメーションプロットの押し上げを防ぐことができます。

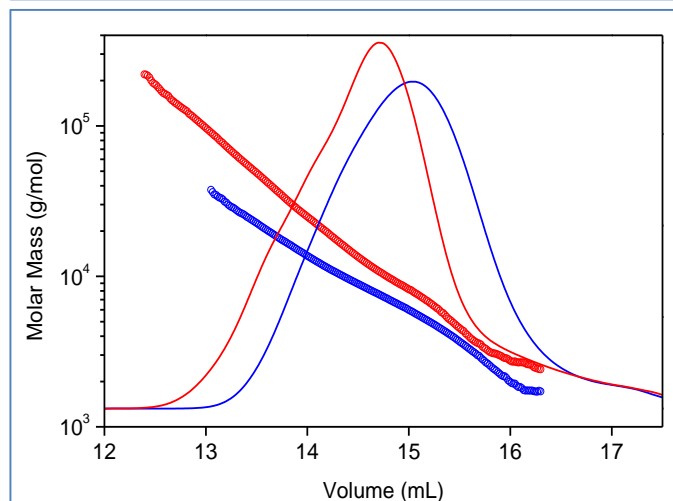
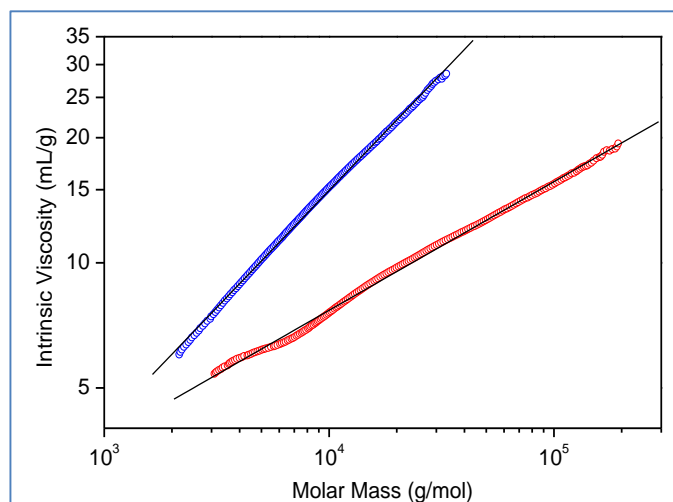


図 2. 上: ポリ乳酸の Mark-Houwink プロット。直鎖 (青) と分岐 (赤) 下: 分子量 vs 溶出容量 (同色) クロマトグラムは RI 検出器  
直鎖と分岐の Mark-Houwink プロットの傾きは、それぞれ 0.56 と 0.31 です。

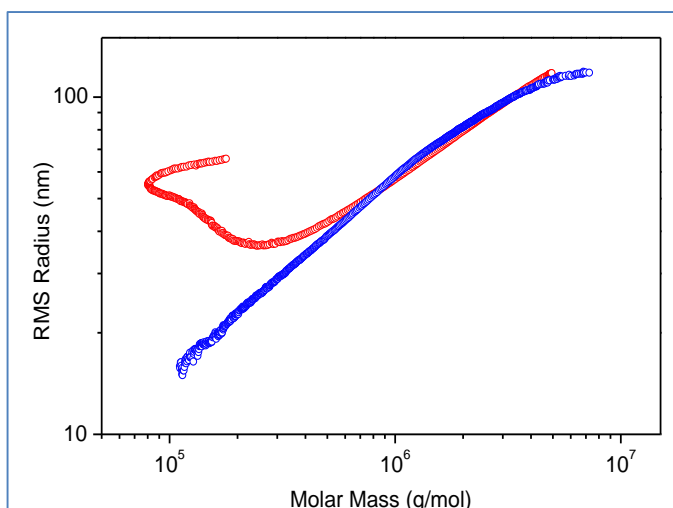


図 3. 分岐高分子のコンフォメーションプロット。SEC-MALS によるもの (赤)、AF4-MALS によるもの (青)。

結論

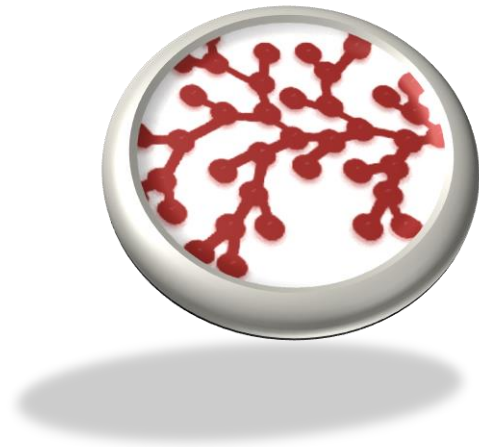
Wyatt MALS 検出器を用いることで分岐度  $g$  及び 1 分子あたりの分岐数を求めることができます。

Radius method は分岐解析を行う上で最も直接的で基本的に正しい手法ですが、この手法の適応は RMS 半径が 10nm 以上の高分子に限られています。

SEC-MALS システムに粘度検出器を接続することにより、Mark-Houwink-桜田のプロットを作成することができます。

小さな分岐高分子の解析は、Mark-Houwink-桜田プロットか分子量と溶出容量の関係により行えます。

分岐高分子の中には SEC カラムでの分離時に充填ゲルとの相互作用を受けるものがあります。このような分岐高分子には、AF4 による分離がより優れ、正確なコンフォメーションプロットと  $g$  を求めることができます。



## 参考文献

- <sup>1</sup> S. Podzimek: Truths and Myths about the Determination of Molar Mass Distribution of Synthetic and Natural Polymers by Size Exclusion Chromatography, *Journal of Applied Polymer Science*, in press. DOI: [10.1002/APP.40111]
- <sup>2</sup> W. Huang, H. Yang, X. Xue, B. Jiang, J. Chen, Y. Yang, H. Pu, Y. Liu, D. Zhang, L. Kong, G. Zhai: Polymerization Behaviors and Polymer Branching Structures in ATRP of Monovinyl and Divinyl monomers, *Polymer Chemistry*, **4**, 3204 (2013). DOI: [10.1039/c3py00338h]
- <sup>3</sup> S. Podzimek: Importance of Multi-Angle Light Scattering in Polyolefin Characterization, *Macromolecular Symposia*, **330**, 81 (2013). DOI: [10.1002/masy.201300014]
- <sup>4</sup> A. Agirre, J. I. Santos, A. Etxebarria, V. Sauerland, J. R. Leiza: Polymerization of n-butyl Acrylate With High Concentration of a Chain Transfer Agent (CBr4): Detailed Characterization and Impact on Branching, *Polymer Chemistry*, **4**, 2062 (2013). DOI: [10.1039/c2py21123h]
- <sup>5</sup> A. C. Makan, T. Otte, H. Pasch: Analysis of High Molar Mass Branched Polybutadienes by SEC-MALLS and AF4-MALLS", *Macromolecules*, **45**, 5247 (2012). DOI: [10.1021/ma3007812]
- <sup>6</sup> H. Zhang, J. Zhu, J. He, F. Qiu, H. Zhang, Y. Yang, H. Lee, T. Chang: Easy Synthesis of Dendrimer-like Polymers Through a Divergent Iterative "End-grafting" Method, *Polymer Chemistry*, **4**, 830 (2013). DOI: [10.1039/c2py20742g]
- <sup>7</sup> A. Agirre, J. I. Santos, J. R. Leiza: Toward Understanding the Architecture (Branching and MWD) of Crosslinked Acrylic Latexes, *Macromolecular Chemistry and Physics*, **214**, 589 (2012). DOI: [10.1002/macp.201200482]
- <sup>8</sup> J. E. Puskas, W. Burchard, A. J. Heidenreich, L. D. Santos: Analysis of Branched Polymers by High Resolution Multidetector Size Exclusion Chromatography: Separation of the Effects of Branching and Molecular Weight Distribution, *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, **50**, 70 (2012). DOI: [10.1002/pola.24982]
- <sup>9</sup> J. M. Torres, C. M. Stafford, D. Uhrig, B. D. Vogt: Impact of Chain Architecture (Branching) on the Thermal and Mechanical Behavior of Polystyrene Thin Films, *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, **50**, 370 (2012). DOI: [10.1002/polb.23014]
- <sup>10</sup> S. Podzimek, M. Hermannova, H. Bilerova, Z. Bezakova, V. Velebny: Solution Properties of Hyaluronic Acid and Comparison of SEC-MALS-VIS Data with Off-Line Capillary Viscometry, *Journal of Applied Polymer Science*, **116**, 3013 (2010). DOI: [10.1002/app.31834]
- <sup>11</sup> J. Malmo, K. M. Varum, S. P. Strand: Effect of Chitosan Chain Architecture on Gene Delivery: Comparison of Self-Branched and Linear Chitosans, *Biomacromolecules*, **12**, 721 (2011). DOI: [10.1021/bm1013525]
- <sup>12</sup> N. T. Hoai, A. Sasaki, M. Sasaki, H. Kaga, T. Kakuchi, T. Satoh: Synthesis, Characterization, and Lectin Recognition of Hyperbranched Polysaccharide Obtained from 1,6-Anhydro-D-hexofuranose, *Biomacromolecules*, **12**, 1891 (2011). DOI: [10.1021/bm2002413]
- <sup>13</sup> C. Fernandez, C. C. Rojas, L. Nilsson: Size, Structure and Scaling Relationships in Glycogen from Various Sources Investigated with Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation and <sup>1</sup>H NMR", *International Journal of Biological Macromolecules*, **49**, 458 (2011). DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2011.05.016]
- <sup>14</sup> S. L. Isenberg, A. K. Brewer, G. L. Cote, A. M. Striegel: Hydrodynamic versus Size Exclusion Chromatography Characterization of Alternan and Comparison to Off-Line MALS", *Biomacromolecules*, **11**, 2505 (2010). DOI: [10.1021/bm100687b]
- <sup>15</sup> S. Podzimek: *Light Scattering, Size Exclusion Chromatography and Asymmetric Flow Field Flow Fractionation*, Wiley, 2011. DOI: [978-0470386170]
- <sup>16</sup> B. H. Zimm, W. H. Stockmayer: The Dimensions of Chain Molecules Containing Branches and Rings, *J. Chem. Phys.* **17**, 1301 (1949).
- <sup>17</sup> B. H. Zimm, R. W. Kilb: Dynamics of Branched Polymer Molecules in Dilute Solution, *J. Polym. Sci.*, **37**, 19 (1959).
- <sup>18</sup> L. P. Yu, J. E. Rollings: *J. Appl. Polym. Sci.*, **33**, 1909 (1987).
- <sup>19</sup> S. Podzimek, T. Vlcek, C. Johann: Characterization of Branched Polymers by Size Exclusion Chromatography Coupled with Multiangle Light Scattering Detector. I. Size Exclusion Chromatography Elution Behavior of Branched Polymers, *J. Appl. Polym. Sci.*, **81**, 1588 (2001).

