SEC/ESIMSによる 合成高分子の構造解析

住友化学(株) 情報電子化学品研究所 土田好進 山本恵子 山田公美

Investigation of Synthetic Polymer Characterization by means of SEC/ESIMS

Sumitomo Chemical Co., Ltd. IT-Related Chemicals Research Laboratory Yoshinobu Tsuchida Keiko Yamamoto Hiromi Yamada

It is difficult to analyze synthetic polymers using mass spectrometry, because they have a very wide molecular distribution (Mw/Mn). But if we select a relatively low molecular species, we can obtain information on polymer structure by means of MS. In this paper we describe an analysis method for synthetic polymers by means of SEC/ESIMS (using q-MS), some analysis cases, and the problems of this method.

はじめに

合成高分子の質量分析法としては、MALDI/ TOFMS¹⁾が簡便である為、汎用的に用いられている。 MALDIではイオン化助剤としてマトリクスを用いる が、マトリクスは分析対象化合物に対して適したも のを選択する必要がある為、構造不明な合成高分子 や合成高分子混合物の解析への適用に試行錯誤が必 要である。また、分子量分散(Mw/Mn)が大きい試 料はイオン化されにくく、前処理精製が必要である が、MALDI法はその原理からクロマトグラフィーと のオンラインでの結合が困難で、別途分取装置との 組合わせが必要である²⁾。

一方、ESI法^{3),4)}はイオン性あるいは、極性の高い 化合物のイオン化法として有効な方法であるが、ア ルカリ金属塩等をカチオン化剤に用いる事により疎 水性の合成高分子もイオン化できマススペクトルを 得る事ができる⁵⁾。加えて、試料溶液を噴霧してイオ ン化するのでクロマトグラフィーとオンライン結合 が容易であり、LC/MSにおいて最も利用されている イオン化法である。よって、1990年代前半には、す でに、SEC/ESIMSを用いた合成高分子の構造解析手 法の報告例がある⁶⁾。しかし、スペクトルが複雑で、 詳細なマススペクトルの解析には質量分解能の高い 高性能な装置が必要とされることから、現状におい ては、MALDI/TOFMSほど汎用的に用いられている とは言いがたい。

質量分解能の高くない汎用の四重極型質量分析計 を用いたSEC/ESIMS法の報告⁷⁷は少ないが、分子量 が1万程度までの比較的低分子量成分に限定すれば、 合成高分子の構造解析に必要な、分子量や繰り返し 構造に関する重要な情報が得られるはずである。四 重極型質量分析計を用いてどの程度の解析が可能な のか、測定手法だけでなくスペクトルの解析方法も 含めて紹介したい。

尚、本稿は、第54回 質量分析総合討論会ワーク ショップ「合成高分子のMS最前線」⁸⁾および、第9,11 回 高分子分析討論会^{9,10)}における発表内容に追加修 正し、まとめたものである。合成高分子の質量分析 の分野においても、装置や手法の進歩は極めて早い。 現状については、最新の文献等を参照願いたい。

SEC/ESIMS CONT

SEC(サイズ排除クロマトグラフィー)は分子の 大きさにより試料を分離する液体クロマトグラフィ ーの一種で、分子サイズの大きい化合物から順次溶 出してくる。固定相にゲルを用いる事からGPC(ゲ ルパーミエーションクロマトグラフィー)と呼ばれ る事のほうが多いが、本稿では分離原理を現してい

るSECを用いる。

このSECとESIMSをオンラインで結合した手法が SEC/ESIMS^{6,7}である。今回の検討に使用した装置の ブロック図をFig.1に示す。カチオン化剤の添加は、カ ラム溶出後に添加するポストカラム添加法を用いた。



Fig. 1 Schematic Diagram of SEC/ESIMS System

カチオン化剤の検討

疎水性の合成高分子のSEC分析においては、移動 相にTHF (テトラヒドロフラン)やクロロホルムが 用いられる事が多く、移動相への溶解性からカチオ ン化剤としてはNaIやKIが用いられるのが一般的⁵⁾で ある。我々は、高分子量成分まで良好にイオン化さ れるカチオン化剤を探索しようと、KCIとNaI,KIの比 較を行った。カチオン化剤は水:アセトニトリル = 1:1溶媒で、濃度1mMに調整したものを 0.05mL/minでポストカラム添加した。試料はSECの 分子量校正用標準品としてポリマーラボラトリー社 より市販されているPMAA (ポリメチルメタクリレ ート, Fig. 2)のうち、MW(分子量)=3100,6540, 9400,12700,29300を混合して評価用試料とした。濃 度は1mg/mLで、注入量は25µLである。



Fig. 3に各種クロマトグラム、Fig. 4にA部分のマ ススペクトル (バックグランド処理無し)を示す。 その結果、TIC (トータルイオンクロマトグラム) では大きな差異は見られなかったが、マススペクト ルには大きな差異がみられた。Nalでは、Nal起因す る150Da間隔のクラスターピーク()群が、また、 KIではKIに起因する166Da間隔のクラスターピーク ()群がバックグランドスペクトルとしてPMMAピ ーク(赤の実線で縁取り部)より強く検出された。

一方、KClの場合は、逆にバックグランドピークが 弱く()、PMMAのスペクトルが主たるピーク群とし て検出された。カチオン化剤のアニオン部は、バック グランドスペクトルに大きな影響を与え、その結果 分析対象のイオン化を左右する事がわかった。



a) 220nm. b) TIC, +NaI. c) TIC, +KI. d) TIC, +KCl A ; averaging area of spectrums in Fig. 4 Column ; Tsk-gel Super HZ(4000*3+3000+2500*2)



Size-exclusion Chromatograms of PMMA mixture



高電圧の印加されたESIプローブの先端の金属表面 では、アニオンに対して、以下の様な反応が起こっ ていると推定される。Cl2は、I2より揮発性が高く系 外(移動相外)へ排出されやすい為、クラスターイ オンの生成が少なく、その分、試料自体のイオン化 がされやすいと推定している。

 $2Cl^{-} - 2e^{-}$ Cl_{2} $2I^{-} - 2e^{-}$ I_{2}

検討の詳細は割愛するが、我々の検討では、KClも しくはKOHが一番高分子量体まで感度良く、シンプ ルなスペクトルを与える事が判った。

合成高分子のSEC/ESIMSスペクトル

ESI/MS法で高分子量体を測定すると、2個以上の 電荷を持った多価イオンのMSスペクトルが一般的に 得られる¹¹⁾。カチオン化剤を用いる疎水性の合成高 分子のSEC/ESIMSスペクトルでは、カチオン化剤が 複数付加した多価イオンが検出される。SEC/ESIMS スペクトルから分子量を推定するにはこの多価イオ ンのピークを解析する必要がある。

今、PMMA分子をMとし、カチオン化剤にKClを 用い、正イオンモードで測定したとすると、PMMA は[M+2K]²⁺の形にイオン化される。2は帯電する電荷 の数でこの場合付加するK⁺イオンの数に相当する。 比較的分子量が小さい場合は2=1であるが、分子量が



a) 220nm b) TIC, 1mM KCl +0.05mL/min B1~B4; averaging area of each mass spectrum in Fig.6 B1; 49.0 – 49.2min B2; 51.5–52.0min B3; 57.0–58.0min B4; 61.0–62.0 Column; Tsk-gel Super HZ(4000*3+3000+2500*2)

Fig. 5 Size-exclusion Chromatograms of PMMA mixture





大きくなるとz 2の多価イオンの形で検出される。 多価イオンが現れる分子量の境界は化合物の種類や、 カチオン化剤の種類によって異なるが、PMMAの場 合n=20、分子量2000 (Fig. 2)前後から2価イオンが 現れ始め、分子量が大きくなるにつれて3価、4価と 検出価数も高くなる。また、2価、3価、4価のように 連続した形で複数のピークで検出される。実際の測 定結果をFig. 5,6に示す。

SECを用いない、ESIMSスペクトルは、Fig. 6にお いてB1 ~ B4を一枚のスペクトルに重ねて描いた形の スペクトルになる。このため、一般的に、多価イオ ンスペクトルは複雑で解析が困難と言われる。

しかし、SECでは、試料を分子量順に並べて測定 する事になり、重なっていた多価イオンを分離でき る。従って、スペクトルが単純になり、解析が容易 になる。ただ、B1に示すようにSECの分離能力の低 い高分子量域の解析は困難である。しかし、逆に、 これは、PMMAがイオン化されている証拠であり、 SECの分離が改善されればさらに高分子量体の分子 量推定が可能となると言える。

さて、マススペクトルの横軸は、*m/z*(質量/電荷 比)である。*m*は検出イオンの分子量、*z*は前述の通 り電荷数である。

Fig. 6 (B₃)において、n=55, (分子量5708.6)の PMMA分子が、K⁺付加の2価及び3価イオンで検出さ れる場合を考える。イオンの分子量は次の通りであ る。計算には精密質量ではなく分子量を用いた。

 $5708.6+2\times39.1=5786.8$ · · [M+2K]⁺ $5708.6+3\times39.1=5825.9$ · · [M+3K]⁺

ところが、マススペクトルは質量/電荷比 (*m/z*) で検出されるため、ピークは2893.4[M+2K]⁺、1942.0 [M+3K]⁺の位置に検出される。Fig. 6の測定値は計算 で求めた値に良く一致している。

以上のように、多価イオンのスペクトル(ピーク) から分子量を推定する為には、価数を判断しなくて はならないが、構造が全く不明な高分子を測定して いる場合、純粋にスペクトルのみから価数を判断し なくてはならない。

同位体ピークによる価数の判定

一般的に価数の判定は、同位体のピーク間隔より
 判断する。Fig. 7にn=27 PMMAの[M+K]⁺,
 [M+2K]²⁺ ピークの拡大図を示す。マススペクトルの
 ピークは検出した化合物に含まれる元素の数と種類に
 対応した安定同位体の分布を表す形となる。Fig. 7 a)
 のようにピークは1本では無く、同位体の分布(存在)



Fig. 7 Profile Spectrum of n=27 peek (see Fig.6)

比率)を反映したパターンを示す。このピークの間 隔(m/zの間隔)が、1価イオンの場合(すなわち z=1)原子質量単位(1Da)に相当し、2価の場合 (z=2)は0.5Da、3価の場合1/3Da=0.333・・・、4価の 場合0.25Daとなる。しかし、Fig. 7 b)に示すように質 量分解能の低い四重極型質量分析計で測定したスペ クトルでは質量分解能が足りず、2価イオンですら価 数を判断できない。Fig. 7 b)で、分解能は約2000 (FWHM)である。だから、合成高分子の分子量を SEC/ESIMS法で測定するためには高分解能質量分析 計であるq-tof型や、フーリエ変換型の質量分析計が 必要と言われる¹²⁾。

Fig. 8に同じ試料をq-tof型質量分析計(Micromass社 q-tof Ultima)で測定した時の同じ成分のマススペク トルを示す。測定条件の詳細は割愛するが、質量分



resolution = 6000(FWHM)

解能は実測で6000 (FWHM)程度である。図から明 らかなように、2価の判断は容易にできる。しかし、 分解能6000をもってしても、3の価を判断できない。 一般的なq-tof型の質量分解能は良く調整して10000 (FWHM)程度なので、現実的にはm/z=2000付近で4 価、m/z=4000付近で2価程度までしか、同位体ピー クの間隔による価数判断は利用できない。さらに分 解能の高いFT-MSをもちいるか、もっと別の手段が 必要である。

繰り返し構造の分子量を利用した価数の推定

Fig. 9にスペクトルB2 (Fig. 6)の拡大図を示す。 スペクトル B_2 は低m/z側(すなわち左側)から5価、 4価、3価、2価の様に高い価数の順にピークが並んで いる。この時点では各ピークの価数は判らないので、 +(z+1)K, +zK, +(z-1)Kと表記する。点線部分の拡大ス ペクトルをa), b) に示す。質量分解能が不足している ので同位体ピークの間隔は読み取れない。ピークx1 からx8までの間隔、及びピークy1からy6の間隔を図 に記載した。これらの間隔はPMMAの繰り返し構造 に由来し、1価イオンであるならば100Daとなり繰り 返し構造の分子量に一致するが、図中では多価のイ オンであるために100Daより小さくなっている。前 章で、多価になると検出*m/z*は小さくなる事を述べた が、繰り返し構造の分子量も同様に検出価数が高くな るとそれに対応して1/2,1/3・・・と小さくなって検 出される。b)の高分子量側の間隔がa)の低分子量側の 間隔に対して大きいのは価数が一つ低いからである。 +2Kピーク間隔の平均は14.3、+(2-1)Kピーク間隔の平 均は16.7これらは2価、2-1価に相当するから、



 $14.3 \times 7 = 100.1$ $16.7 \times 6 = 100.2$ z = 7

z×14.3 (*z*-1)×16.7

という等式が成り立つ、誤差を含むので厳密では無いが、*z*=7とすると

7×14.3=100.1 6×16.7=100.2

となり、価数と繰り返し構造の分子量が推定できる。 この場合繰り返し構造の分子量は100と推定され、確 かに、PMMAに一致する。

当然、この方法は、推定する為に選択したピーク が同種の合成高分子である場合に限られるため、高 分子混合物に適用する場合に注意が必要であるが、 筆者の経験からは多くの場面で分子量の推定法とし て非常に有効である。

高分子量物質のマススペクトルと分子量

価数がわかれば、簡単に分子量を推定可能である が、理論値との比較において、高分子量物質のマス スペクトルはさらに厄介な問題を含んでいる。

Fig. 10にPMMAの10量体 a)と100量体 b)のM⁺の マススペクトルのシュミュレーション結果を示す。 質量分解能は10000 (FWHM) である。ただし、電子 の質量は考慮していないので、厳密にはM⁺ではない がご容赦いただきたい。(10量体、100量体とは、Fig. 20nの値をさす。)

前述の通り、マススペクトルは安定同位体の存在 比率を反映する。10量体は分子量が1000程度で、質 量分解能が10000なので、同位体ピークの半値幅は 0.1Da程度となり、分離もよく非常にシャープなピー クが得られる。最も低分子量側のピークは単一の同





位体で構成された分子由来のピークでモノアイソト ピックピークと呼ばれる。このピークの値は精密質 量(Exact Mass)に一致し、ミリマス(精密質量) 測定の時に利用されるピークである。大雑把に言っ て分子量2000程度までの低分子量物質の構造推定に はこの精密質量を利用できる。

ところが、100量体で、分子量が10000程度になる とそのスペクトルの様相は一変する。質量分解能が 10000であっても、分子量も10000であるため、各同 位体ピークの半値幅は1Daとなり、ピーク幅は10量 体に比べて10倍広がる。また、分子を構成する原子 数が多い為、同位体の組み合わせが多くなりピーク の本数も非常に多くなる。このため、Fig. 10 b) に示 すように各同位体ピークはほとんど分離できず一つ のブロードな山形のピークとなる。また、モノアイ ソトピックピークにいたってはブロードなピークの すそに位置し、そのピークトップも判定できない。 つまり、このピークのどこを指して100量体の分子量 と言うのかきちんと考察しなければ、実験から得た 分子量の精度比較すらできない。ピークトップの 10213.3828をMSで測定される分子量と決めるのが妥 当であるが、この値は、化学でいうところの分子量 (MW)とは違う為、高分子量体の分子量を質量分析 計で測定し評価する場合は、あらかじめこのような スペクトルシュミレーションをして検出される分子 量を確認しておく必要がある。本稿では、高分子量 体の理論分子量として、シュミレーションスペクト ルのピークトップの値を分子量として使用し、MSか らの実測値と比較した。

多価イオンピークからの分子量の推定精度

Fig. 9のx5, y5成分の分子量を推定した結果をTable 1に示す。計算値のMWは分子量で、参考のため記載 した。四重極型MSを用いて、6価、7価イオンから分 子量14000以上の成分を推定し、その誤差が±1以内 に収まる事を確認できた。誤差は100ppm以内となり m/z=1000換算では±0.1以内の精度がある事になる。 極めて良い一致であり、実際の合成高分子の構造解 析に十分利用可能だと筆者は考える。我々の検討で はPMMAを用いた場合、8価イオンで分子量18000程 度まで分子量を精度良く推定できた。

Table 1 PMMA MW from SEC/ESIMS Spect

Peak	ion type	Experimental	Calcu	lated
(m/z)		MW	Peak top	MW
2084.5	M+7K	14718.6	14718.7	14719.0
2492.2	M+6K	14317.8	14318.4	14318.6

後先となるが、四重極型MSのm/z検出精度は通常 ±0.1Da程度であり、6価イオンの検出精度が±0.1Daで あれば、計算により求める1価イオンの分子量の誤差 は±0.6Daとなる。四重極型MSの多価イオンからの 分子量推定精度は理論的に考えてもそれほど悪くな いのである。仮に、四重極型MSのm/z検出精度が ±0.01Da程度までもう一桁上がれば、合成高分子の分 子量決定精度は飛躍的に高まり、さらに詳細な構造 解析が四重極型MSとSEC/ESIMSを組み合わせる事 で可能になると思う。

合成高分子混合物

PPGとPMMAの混合物を測定した結果をFig. 11 ~ 13に示す。当然ながら、UVクロマトグラムやTICか



a) UV=220nm b) TIC(+KCl)

C1~C3; averaging area of the mass spectrum in Fig.12 Column ; Tsk-gel Super HZ (2500+2000*2+1000)



Sample ; PMMA+PPG







ら両者を区別する事はできないし、2成分の存在を推 定する事も不可能である。Fig. 12のスペクトルを用 いて、各ピークを詳細に解析すればPPGとPMMAの 混合物である事を導き出せるかもしれないが、時間 と労力とひらめきが必要である。従来のMSスペクト ルからの解析では、混合物になった途端に解析が非 常に困難になる。

そこで、2次元プロットからの解析を試みた (Fig. 13) SEC/ESIMS 測定で得られたデータを、縦軸: m/z, 横軸:溶出時間(分)、各イオンピークの強度を 濃淡で表したものである。一見して、2成分の存在を 推定する事ができる。その情報を元に、マススペク トルを解析すると、一連の成分のうちどのピーク群 がPPG、PMMAに対応するのかを用意に解析できる。 また、価数については、マススペクトルが複雑で判断 つかないような高分子量成分までも各成分の溶出挙動 から価数の推定が可能である。Fig. 13より、高分子 量成分はSECによる分離が不十分である事が見て取 れ、高分子量成分の更なる解析にはカラムを増やす 等の分離能力の向上が有効な事も容易に判断がつく。

このように、混合物だけでなく、複雑な組成の合 成高分子の解析には2次元プロットが非常に有効であ る事がわかる。

GB/MA**コポリマー**

より実際的な試料である2元のコポリマーの測定結 果をFig. 14~16に示す。本試料は2元のラジカル共







Fig. 14 SEC of GB/MA copolymer







Fig. 16 GB/MA copolymer 2–D plot by SEC/ESIMS (1,6) means G=1, M=6

重合体で、重量平均分子量(Mw) 10000、分散 (Mw/Mn) 1.9である(ポリスチレン換算)。分子量 は比較的小さいが、分子量分布が広くランダムなシ ーケンスを持つため非常に複雑な組成をもつ試料で ある。このため、SECを用いないフローインジェク ション法によるESIMS測定ではスペクトルが複雑で イオン化しているかどうかの判断すら難しかった。

SEC/ESIMS(+KCl)法では、MW=2500程度までの 低分子量成分について、コポリマー組成を反映した マススペクトルが1価イオン[M+K]*として検出され 分子量を容易に推定でき、各ピークの組成を同定す る事ができた(Fig. 15 a)。また、キャピラリースキ マーCID法を利用すればさらに詳細な情報が得られ える事がわかった(Fig. 15 b)。

加えて、2次元プロット(Fig. 16)からは、マスス ペクトルの解析に役に立つ、溶出挙動や価数に関す る情報が得られる事がわかった。2次元プロットでは、 通常のマススペクトルでは確認できなかった、2価イ オンについてもが検出されている事が明瞭に確認で きた。しかし、この2価イオンのスペクトルは非常に 複雑で、成分の特定や、分子量推定は困難であった。 Fig. 17に2元コポリマーのマススペクトルの複雑性を イラストで示したが、たった2元のコポリマーである が、マススペクトルが想像以上に複雑化する事を理 解願えると思う。多元のコポリマーの解析にはクロ マトグラフィーの高い分離能力が必須である。



a) homo-polymer model b) co-polymer model α , β =1,2,3..., (2,3) means α =2, β =3



おわりに

以上より、カチオン化剤を用いるSEC/ESIMS法を 用いれば疎水性の合成高分子でも分子量数万程度ま でイオン化させる事ができるが、その組成が複雑な 場合は分子量の推定等が困難になる事が判った。従 って、高性能な質量分析装置よりも分離能力の高い クロマトグラフィーの手法を用いる事が合成高分子 の構造解析には重要であると言える。

また、Fig. 2 PMMAを例にとるが、繰り返し構造 の分子量を解析する場合、n=100体のみを取り出し 精製して測定しても、n=100体の分子量が判るだけ で、繰り返し構造の分子量は判らない。N=・・・98,99, 100,・・・のように連続する一連の群を捉えて解析しな ければならない。これら群の判断は、Fig. 13,15に示 した2次元表示が有効で、UVやTICからは判断でき ない。2次元表示から直接、3価イオンのみのスペク トルを表示させたり、バックグランド処理する機能 があれば、解析しやすいマススペクトルが得られる し、結果としてより効率的に詳細な解析が可能とな ると思う。

近年、コポリマー組成解析の為の新しいソフトウ エアの報告¹³⁾もされるようになり、今後の発展が期 待される。

謝辞

最後になりましたが、本研究に興味を示して戴き、 ご助言、激励をいただきました関西大学 化学生命工 学部 荒川 隆一教授に感謝いたします。

引用文献

- 1) 浅野 哲,山本 潔, 広明 修,加藤 三典,住友化学, 1998-I,68(1998).
- X.Michael Liu, E. Peter Maziarz, David J. Heiler and George L. Grobe, *J.Am.Soc.Mass Spectrom.*, 14, 195 (2003).

- 3) 柏木 俊彦, 広明 修, 加藤 三典, 滝川 宏司, 住友化
 学, 1993-II, 71 (1993).
- John B. Fenn, Matthias Mann, Chin Kai Meng, Shek Fu Wong and Craige M. Whitehouse, *Mass Spec. Revi.*, 9, 37 (1990).
- 5) 荒川隆一, 奥野昌二, ぶんせき, 2002年9号, 502 (2002).
- Laszlo Prokai and William J. Simonsick, Jr., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 7, 853 (1993).
- 7) Michel W. F. Nielen, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **10**, 1652 (1996) .
- 8) 土田 好進,山本 恵子,山田 公美,森本 真次,山本
 滚,"第54回質量分析総合討論会要旨集"(2006), p.42.
- 9) 山本 恵子, 土田 好進, "第9回高分子分析討論会要 旨集" (2006), p.147.
- 10) 土田 好進,山本 恵子,山田 公美,森本 真次,山本 家,"第11回高分子分析討論会要旨集"(2006), p.71.
- Y. Yokoyama, J.Am.Soc.Mass Spectrom., 18, 1914 (2007).
- 12) David J. Aaserud, Laszlo Prokai and William J. Simonsick, Jr., Anal. Chem., **71**, 4793 (1999) .
- Steffen M. Weidner, Jana Falkenhagen, Sergey Maltsev, Volker Sauerland and Marian Rinken, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 21, 2750 (2007).

PROFILE



<mark>土田 好進</mark> Yoshinobu Tsuchida **住友化学株式会社**

情報電子化学品研究所 主席研究員



山本 恵子 Keiko YAMAMOTO

住友化学株式会社 情報電子化学品研究所 主任研究員



山田 公美 *Hiromi YAMADA* 住友化学株式会社 情報電子化学品研究所 研究員