

# NMIJポリスチレンオリゴマー標準物質 (NMIJ CRM 5001-a 及び 5002-a) の開発

有機分析科

衣笠 晋一、佐藤 圭祐、Marina A. Lusenkova、岸根 加奈

NMIJ Certified Reference Material Polystyrene 2400 (NMIJ CRM 5001-a) and  
Polystyrene 500 (NMIJ CRM 5002-a)

Organic Analytical Chemistry Division

S. Kinugasa, K. Sato, M. A. Lusenkova, and K. Kishine



独立行政法人 産業技術総合研究所

計量標準総合センター

National Metrology Institute of Japan, AIST



産総研計量標準モノグラフ編集委員会

委員長 大嶋 新一 総括研究員

委員 尾藤 洋一 長さ計測科

孫 建新 力学計測科

山田 良郎 温度湿度科

向井 誠二 電磁波計測科

梅原 博行 先端材料科

事務局 米溪真佐子 計量標準管理センター

## はじめに

本モノグラフは独立行政法人産業技術総合研究所計量標準総合センター（National Metrology Institute of Japan: NMIJ）において開発されたポリスチレンオリゴマー標準物質の技術的成果を記述する。実際には、本モノグラフに記載されている技術的成果はPS2400（NMIJ CRM 5001-a）とPS500（NMIJ CRM 5002-a）の2つの標準物質開発時に得られたものであるが、近く開発を予定しているPS1000も本モノグラフに記載されている技術と同様の技術を用いて開発されている。

本モノグラフの目的の第一は、認証書と開発報告書では伝えきれない詳細な技術的内容を本標準物質の使用者に知らせることである。第二の目的は、開発に当たって得られた多くの技術的成果をひとつにまとめ、将来同じ又は類似の標準物質を再生産するための記録を残すことである。

本標準物質を開発した背景として、近年高分子の分子特性解析技術に新しい展開があったことが挙げられる。マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析（MALDI-TOFMS）の出現はその一例であり、より高分離でリアルな分子量分布が得られるようになった。また、光散乱検出器つきサイズ排除クロマトグラフィー（SEC-LS）の進歩により、より少量でかつ低分子量試料まで分子量測定が行えるようになったことも特性値により多くの情報を求めるようになった一因である。このような新規測定法の妥当性を検証するためにも新しいタイプの標準物質が必要となってきた。

このような背景のもと、平成11（1999）年～13（2001）年の3年間にわたり知的基盤創成・利用技術研究開発事業「高分子に関する標準物質の研究開発」により本格的に本標準物質の開発研究が行われた。本標準物質はその成果をもとに開発された。なお、本標準物質の出発点はすでに旧化学技術研究所分析化学部第四課にあったことを特筆しておく必要がある。当時からすでに均一試料を標準物質として作製する試みが服部滋氏らにより行われており、本標準物質開発には当時の研究成果の多くが役立てられている。

# NMIJポリスチレンオリゴマー標準物質 (NMIJ CRM 5001-a及び5002-a) の開発

## 目 次

### Abstract

第1章 開発の概要	1
1.1 標準物質の特長	1
1.2 開発の流れ	1
第2章 候補標準物質の選定と調製	2
2.1 候補標準物質の合成と入手	2
2.2 候補標準物質の化学構造と分子量の算出	2
2.3 候補標準物質の調製	2
第3章 均一ポリスチレンの作製	3
3.1 目 的	3
3.2 原 料	3
3.3 SFC装置	3
3.4 SFCによる均一ポリスチレンの分取条件	4
第4章 検出器感度の重合度依存性	5
4.1 理 論	5
4.2 実 験	5
4.2.1 試薬と試料	5
4.2.2 装置と測定条件	5
4.3 結 果	6
第5章 直接法による候補標準物質の均質性評価	7
5.1 均質性評価の対象	7
5.2 実 験	7
5.2.1 試薬と試料調製	7
5.2.2 装置と測定条件	7
5.3 分散分析による均質性評価の手順	7
5.4 均質性評価の結果	8
第6章 Match Factorによる候補標準物質の均質性評価	9
6.1 均質性評価の対象	9
6.2 Match Factorの定義	9
6.3 実 験	9
6.3.1 試薬と試料調製	9
6.3.2 装置と測定・解析条件	9

6.4	分散分析による均質性評価の手順	9
6.5	均質性評価の結果	10
第7章	SFCによる値付けと不確かさ評価	11
7.1	特性値の定義	11
7.2	実験	11
7.2.1	試薬と試料調製	11
7.2.2	SFC測定	11
7.2.3	MALDI-TOFMS測定	12
7.3	特性値の決定	12
7.4	特性値の結果	13
7.5	特性値の不確かさ評価	16
7.5.1	不確かさ評価の基本方針	16
7.5.2	SFC測定における不確かさの諸要因	16
7.5.3	SFCクロマトグラムの面積分率 $s_i$ の不確かさ評価	16
7.5.4	質量分率 $w_i$ の標準不確かさ評価	16
7.5.5	モル分率 $x_i$ の不確かさ評価	17
7.5.6	重量平均分子量 $M_w$ の不確かさ評価	17
7.5.7	数平均分子量 $M_n$ の不確かさ評価	17
7.5.8	多分散度 $P$ の不確かさ評価	18
第8章	SECによる特性値の値付けと不確かさ評価	19
8.1	考慮された特性値	19
8.1.1	ピーク平均分子量 $M_p$	19
8.1.2	SECによる重量平均分子量 $M_w$ 、数平均分子量 $M_n$ 及び多分散度 $P$	19
8.2	見かけの平均分子量 $M_{w,uc}$ 、 $M_{n,uc}$ 、及び多分散度 $P_{uc}$	19
8.3	実験	20
8.3.1	試薬と試料調製	20
8.3.2	SEC測定	20
8.4	SECで決定された特性値の結果	20
8.5	SECにおける特性値の不確かさ評価	21
8.5.1	不確かさの要因分析	21
8.5.2	ピーク平均分子量 $M_p$ の不確かさ評価	21
8.5.3	SECにおける重量平均分子量 $M_w$ 、数平均分子量 $M_n$ 、多分散度 $P$ の不確かさ評価	22
補足		26
参考文献		
	Molecular Weight Dependency of Refractive Index Increment of Polystyrene Determined by Uniform Oligomers	37
	Reliability of molecular weight determination methods for oligomers investigated using certified polystyrene reference materials	43

## Abstract

This report describes the characterization and uncertainty evaluation procedure of two polystyrene certified reference materials, PS2400 (NMIJ CRM 5001-a) and PS500 (5002-a). These reference materials are monodisperse and were prepared by anionic polymerization with a n-butyl terminal end group. Mole fraction  $x_i$  and mass fraction  $w_i$  of the  $i$ -th component with a degree of polymerization  $i$  were determined and certified from corrected SFC (supercritical fluid chromatography) chromatograms. The mass-average molecular mass  $M_w$  and number-average molecular mass  $M_n$  of PS2400 were determined to be  $2423 \pm 20$  and  $2307 \pm 18$ , respectively. The numbers following  $\pm$  are expanded standard uncertainties with the coverage factor  $k=2$ . The values of  $M_w$  and  $M_n$  of PS500 were determined to be  $501.7 \pm 6.8$  and  $436.2 \pm 5.6$ , respectively.

# 第1章 開発の概要

## 1.1 標準物質の特長

ポリスチレンの標準物質としては市販試料が非常に多く販売されているが、本ポリスチレン標準物質には通常の市販標準物質にはない大きな特長がある。その第一点は、平均分子量だけでなく分子量分布そのものが認証されていることである。このような標準物質は他になく、MALDI-TOFMSやSEC-LS法など最近の分子量分布計測の妥当性を評価するために有効になると考えられる。

第二点目は、特性値が極めて精確に決定されていることである。これは超臨界流体クロマトグラフィー（SFC：Supercritical Fluid Chromatography）により各重合度成分が完全に分離されたことと、均一ポリスチレンを作製することで正確な検出器感度の分子量依存性とサイズ排除クロマトグラフィー（SEC：Size-exclusion Chromatography）の校正曲線を精確に作成できたことによる。

第三の特長は、特性値の不確かさが国際的規約に基づき詳細に行われていることである。一部を除き、これまでの高分子標準物質には不確かさの表記が全くないのが普通であった。

## 1.2 開発の流れ

本標準物質の開発の手順をごく簡単に示すと以下の(1)～(7)のようになる。

### (1) 候補標準物質の選定

標準物質の原料物質を購入し小分けする。

### (2) 均一ポリスチレンの作製

紫外吸光度と示差屈折率増分の分子量依存性を正しく決定するために必要な均一ポリスチレン試料を作製する。

### (3) 検出器感度の重合度依存性

均一ポリスチレン試料の等モルあるいは等質量混合物を用いて紫外吸光度の重合度依存性を実験的に決める。次に紫外可視検出器と示差屈折率検出器とを同時に用いることで示差屈折率増分の重合度依存性を決定する。

### (4) 均質性の評価

試料瓶に小分けされた候補標準物質が瓶間で均質であるかどうかを評価する。

### (5) SFCによる値付けと不確かさ評価

SFCにより重量平均分子量 $M_w$ 、数平均分子量 $M_n$ 、及び多分散度 $P$ を値付けする。これらの値を認証値とする。同時にその不確かさ評価を行う。

### (6) SECによる値付けと不確かさ評価

SECによりピーク平均分子量 $M_p$ を値付けし認証値とする。同時に $M_w$ 、 $M_n$ 、及び $P$ を値付けし参考値とする。また、見かけの平均分子量も参考値として求める。これらの特性値の不確かさ評価を行う。

### (7) 開発のまとめ

開発報告書と認証書を作成する。

## 第2章 候補標準物質の選定と調製

### 2.1 候補標準物質の合成と入手

PS500とPS2400の候補標準物質は東ソー(株)によって合成されたものを購入した。PS500は10g単位の包装を6本、合計60gである。性状は液体であり、瓶間で均質であることが期待された。一方、PS2400は5g単位の包装を8包装、合計40gである。瓶中の試料は全て同じ重合ロットであり、また微粉末であることから瓶間で均質であることが期待された。

### 2.2 候補標準物質の化学構造と分子量の算出

本候補標準物質はアニオン重合法で合成された。すなわち、高真空かつ脱酸素下、スチレンモノマーを溶解した溶液に重合開始剤であるn-Butyl Lithiumを溶解した溶液を加え反応させた。

重合したポリスチレンの化学構造式をFig.1に示す。ここで、片末端基はn-Butyl基、他方の片末端は水素(H)になっている。重合法から立体規則性はアタクチックであることが予想されている。

末端がブチル基と水素からなる重合度*i*のポリスチレンの分子式は $C_{8i+4}H_{8i+10}$ であるから、分子量 $M_i$ は次式により計算される：

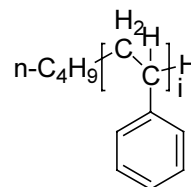


Fig.1 Chemical structure of the polystyrene. One terminal end is n-Butyl and the other one is hydrogen. *i* represents the degree of polymerization.

$$M_i = (8i+4) \times 12.0107 + (8i+10) \times 1.00794 = 104.14912i + 58.1220$$

なお、炭素と水素の原子量 (Atomic Weight) 値はIUPAC発行の原子量表<sup>1)</sup>による。不確かさ付きの原子量は、 $C=12.0107(8)$ 、 $H=1.00794(7)$ である。

### 2.3 候補標準物質の調製

PS2400とPS500を室温下で清浄なスクリー管に小分けした。小分けした量は一瓶当たりPS2400が0.2 g、PS500が0.4 gである。瓶の総数は、PS2400が150本、PS500が146本である。



## 第3章 均一ポリスチレンの作製

### 3.1 目的

一般に高分子の紫外吸光度や屈折率増分は、分子量が小さいオリゴマー領域では重合度に依存する。これは末端基の効果が無視できないからである。このような理由から紫外検出器や示差屈折率検出器により得られたクロマトグラムから質量分率を正しく算出するには紫外吸光度や示差屈折率増分の重合度依存性をあらかじめ実験的に知っておく必要がある。さまざまな重合度の均一試料が必要となるのは、これらの重合度依存性を実験的に正確に求めておくことが特性値の正確な値付けにつながるからである。

### 3.2 原料

PS500とPS2400の候補標準物質と同じロットの別試料を原料とし、SFCにより各重合度成分を分離して均一ポリスチレン試料を作製した。従って、均一ポリスチレン試料の化学構造は候補標準物質と同一であると期待される。また、重合度が10付近の均一ポリスチレンを分取するため、平均分子量300と1000のポリスチレン標準物質

(東ソー㈱、A-300 (TS-506) とA-1000 (TS-501)) を原料に用いたが、この市販標準物質も候補標準物質と同一の化学構造を持つと期待される。なお、高重合度の均一ポリスチレン試料を得るため、Pressure Chemical社製の単分散ポリスチレン試料(平均分子量4000、Lot. No. 11b)を原料として用いた。

### 3.3 SFC装置

均一ポリスチレン試料の分取には日本分光㈱製の超臨界流体クロマトグラフSUPER-201を使用した。その装置概略をFig. 2に示す。

### 3.4 SFCによる均一ポリスチレンの分取条件

SFCによる分取条件は分離対象とするポリスチレン試料ごとに少しずつ異なる。以下、各ポリスチレン試料についてのSFC分離条件をTable 1に、SFCクロマトグラムをFig. 3に示す。分離条件は対象試料によらずほぼ一定であるが、降温プログラムと注入量が異なる。これらの分離条件は各試料に応じて経験的に決められたものである。

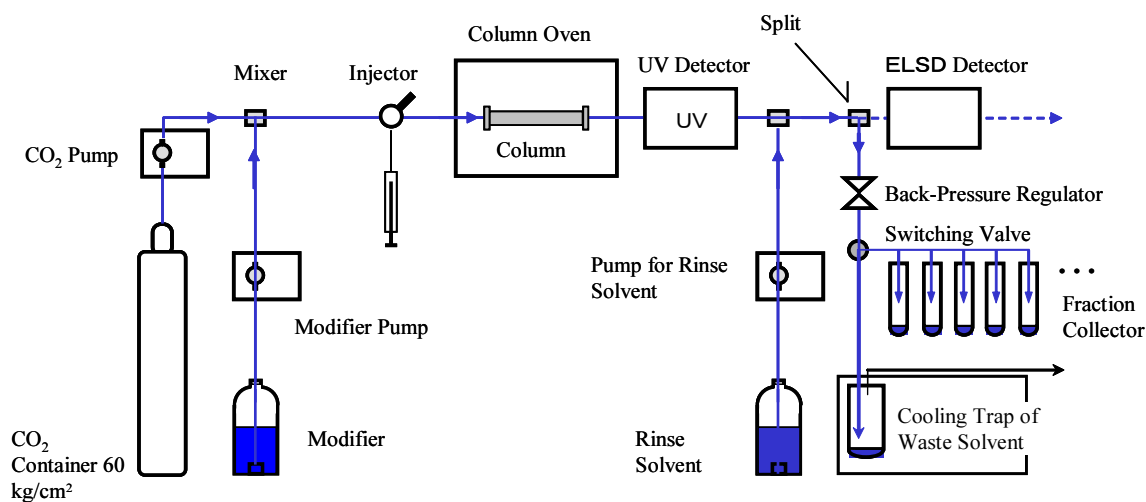


Fig. 2 Schematic view of SFC chromatograph used for the preparation of uniform polystyrenes and determination of the certified values for the certified reference materials.

Table 1 Typical preparative SFC conditions to prepare uniform polystyrenes

	Samples				
	A-300	PS500	A-1000	PS2400	PS-4000
Column	JASCO Superpak SIL 60-5 (10×250mm)				
CO <sub>2</sub> flow (mL/min)	8.0	8.0	7.0	6.0	4.0
Back pressure (kg/cm <sup>2</sup> )	200				
Modifier EtOH:CHCl <sub>3</sub>	4:1	4:1	4:1	0:10	5:95
Flow of Modifier (mL/min)	1.3	0.8	0.7	2.0	0.8
Initial column temperature(°C)	130	130	130	135	125
Final column temperature(°C)	42	42	40	70	40
Temperature rate(°C/min)	-8	-8	-5	-1	-1
Concentration of injected solution (mg/mL)	600	600	600	100	100
Injected volume (μL)	100	100	20	10	5-10

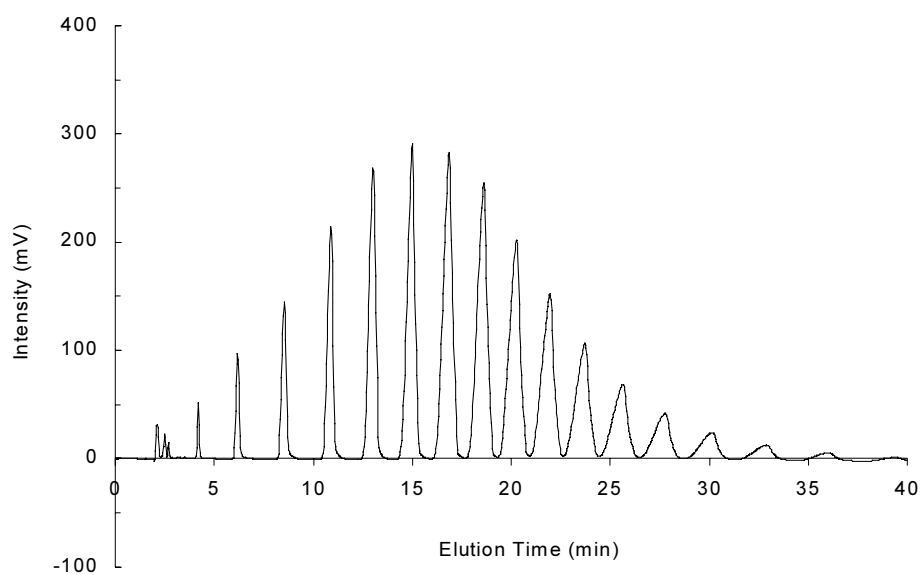


Fig. 3 Preparative SFC chromatogram of polystyrene A-1000 (Mw=1000).

## 第4章 検出器感度の重合度依存性<sup>2)</sup>

### 4.1 理論

分子量の小さい高分子の紫外吸光度と示差屈折率は溶液中の高分子の質量濃度に比例するだけでなく分子量にも依存する。分子量が小さいほど主鎖に対する末端基の影響が相対的に大きくなるからである。従って、クロマトグラムの面積分率から質量分率を算出する際、吸光度と示差屈折率の重合度（あるいは分子量）依存性を正確に把握しておく必要がある。

吸光度に対して加成性が成立すると仮定する。すなわち、吸光度はモノマー単位の数に比例すると仮定する。また、本標準物質の場合のように末端基は紫外吸収をしないと仮定する。すると重合度*i*の高分子の比吸光度（単位質量あたりの吸光度） $\epsilon_i'$ は次式で与えられる：

$$\epsilon_i' = \epsilon_0' \cdot \frac{iM_0}{M_i} = \epsilon_0' \cdot \frac{iM_0}{M_e + iM_0}$$

ここで $\epsilon_0'$ はモノマー単位の比吸光度、 $M_i$ は重合度*i*の高分子の分子量、 $M_0$ はモノマー単位の“分子量”、 $M_e$ は末端部分の“分子量”である。この式から十分分子量が大きい通常の高分子では比吸光度が分子量によらず一定の値に漸近することがわかる。

後の解析で便利のように分子量無限大での比吸光度を基準にした重合度*i*成分の相対比吸光度 $\alpha_i(\infty)$ は

$$\alpha_i(\infty) \equiv \frac{\epsilon_i'}{\epsilon_\infty'} = \frac{\epsilon_i'}{\epsilon_0'} = \frac{i}{(M_e/M_0) + i}$$

で与えられる。右辺の分母中の比は末端基とモノマー単位の構造式が分かれば計算できるが、吸光度の加成性が完全に成立するとは限らないので実際には均一ポリスチレン試料を用いて実験的に決める。

一般的には示差屈折率増分 $dn/dc$ も分子量に依存せず高分子と溶媒の組み合わせに固有の値であるが、分子量が小さいと末端基の影響により分子量依存性を示す。サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）では通常クロマトグラムが示差屈折率検出器により得られるので、クロマトグラムから正確な分子量分布を算出するためには示差屈折率増分の分子量依存性をあらかじめ実験的に求めておく必要がある。

一般的に $dn/dc$ の分子量依存性は次式のように与えられることが知られている：

$$\frac{dn}{dc} = a - \frac{b}{M_n}$$

ここで定数*a*と*b*は高分子と溶媒の組み合わせに固有の量であり、 $M_n$ は高分子の数平均分子量である。しかし、標準物質の特性値を算出するのに必要なのは $dn/dc$ の絶対値でなく分子量無限大試料の $dn/dc$ に対する比である。これを相対示差屈折率増分 $\beta(M)$ と表すと、

$$\beta(M) = 1 - \frac{c}{M}$$

ここで*c*は実験的に決められる定数、*M*は均一試料の分子量である。

相対示差屈折率増分 $\beta(M)$ の重合度依存性は上記の相対比吸光度 $\alpha_i(\infty)$ の重合度依存性をもとに決定された。すなわち、均一ポリスチレン試料の適当な混合試料をSECで分離し示差屈折率検出器と紫外可視検出器の同時検出を行い、2つの検出器から得られるクロマトグラムのピーク面積比を計算することで $\beta(M)$ の重合度依存性を得た。実際の算出法の詳細は文献2)に譲る。

### 4.2 実験

#### 4.2.1 試薬と試料

SFC実験の移動相として用いた二酸化炭素の純度は99.8%である。第二の移動相（モディファイヤー）と注入溶液に試薬特級のクロロホルム（和光純薬）を用いた。モディファイヤーの第二成分として混合したエタノールは特級試薬（和光純薬）である。SECの移動相として安定剤不含のテトラヒドロフラン（THF）（和光純薬特級）を用いた。均一ポリスチレン試料の各クロマトピークが完全分離されるよう重合度の適当な組み合わせを用いて等モルあるいは等質量混合試料を作製した。

#### 4.2.2 装置と測定条件

SFC測定に用いた装置は前章と同じSUPER-201である。用いたカラムはSuperpak SIL 60-5 (4.6 mm I.D.×250 mm)、背圧は200 kg/cm<sup>2</sup>である。典型的な分離条件を列記すると、注入試料濃度：1.5 mg/mL、注入量：20 μL、初期カラム温度：130℃、降温速度：-5℃、二酸化炭素流量：2.5 mL/min、モディファイヤー：クロロホルム、モディファ

イヤー流量：0.6 mL/min、紫外可視検出器の検出波長：254 nmである。

SEC測定に用いた装置は、送液ポンプ（東ソー製 DP-8020）、デガッサー（同社製SD8020）、インジェクター（Rheodyne製）、カラムオープン（同社製CO-8020）、紫外可視検出器（同社製UV-8020）、そして示差屈折率検出器（同社製RI-8020）から構成された。分子量の計算には示差屈折率検出器で得られたクロマトグラムを用いた。

2本のSECカラム（東ソーTSKgel-G2500H<sub>XL</sub>）を用いて分離を行った。移動相の流速は1.0mL/min、カラム温度は40℃、紫外可視検出器の測定波長は254nmである。重合度1 ( $i=1$ ) の均一ポリスチレンに対して予備的に測定された総理論段数は約33000であり、カラムの分離能としては十分であることが確かめられた。

#### 4.3 結 果

均一ポリスチレンの等モルあるいは等質量混合試料から得られたポリスチレン/THF溶液の相対比吸光度

$\alpha_i(\infty)$ の重合度依存性は、

$$\alpha_i(\infty) = \frac{i}{0.48194+i}$$

$$(u(\alpha_i(\infty)) = \frac{1}{4} \left( \frac{1.02757i}{0.44804+i} - \frac{0.97205i}{0.51765+i} \right)) \quad (4.1)$$

であった。ここで $u(\alpha_i(\infty))$ は重合度成分 $i$ での標準不確かさを示す。なお、吸光度の加成性が成立するとした場合、上式右辺の分母に現れる定数は  $M_e/M_0 = 58.12/104.15 = 0.5580$ なので実験値は若干異なっている。

実験から得られた相対示差屈折率増分 $\beta(M)$ の分子量依存性は、

$$\beta(M) = 1 - \frac{88.53913}{M} \quad (u(\beta(M)) \cong 0.017)$$

ただし、括弧中はそれぞれの重合度あるいは分子量での標準不確かさを表す。

## 第5章 直接法による候補標準物質の均質性評価

### 5.1 均質性評価の対象

PS500についてはSFCの測定が比較的容易であることから特性値の値付けと同時に瓶間の均質性評価を行った。均質性評価の対象となった量は、候補標準物質中の各重合度成分 $i$ の面積分率 $s_i$ と重量平均分子量 $M_w$ である。これらの量が瓶間で有意差があるかどうか検討した。

### 5.2 実験

#### 5.2.1 試薬と試料調製

SFC実験の移動相として用いた二酸化炭素、モディファイヤーとして用いたクロロホルムとエタノールは前章と同じである。SFC装置に注入する試料溶液は、PS500の候補標準物質60mgをスクリー管に秤りとり、0.5mLのクロロホルムを加えて調製した。溶液の濃度は約120mg/mLである。

#### 5.2.2 装置と測定条件

SFC測定に用いた装置は前述したSUPER-201である。用いたカラムはKAY TECH HiQ SIL (4.6 mm I.D.×250 mm)である。典型的な分離条件は、注入試料濃度：120 mg/mL、注入量：5  $\mu$ L、背圧：200 kg/cm<sup>2</sup>、初期カラム温度：130°C、降温速度：-5°C/min、終カラム温度：40°C、二酸化炭素流量：2.5 mL/min、モディファイヤー組成比：クロロホルム/エタノール=1/4、モディファイヤー流量：

0.4 mL/min、紫外可視検出器の検出波長：254 nmである。

### 5.3 分散分析による均質性評価の手順

まず、全てのPS500候補標準物質146本の試料瓶の中からほぼ等間隔に6本の試料瓶を選抜した。これらの試料瓶ごとに1つの溶液を作製、全部で6つの試料溶液を得た。各試料溶液に対して3回のSFC測定を繰り返し行なった。

次に、 $k$ 番目の試料溶液（瓶）の $m$ 回目のSFC測定によって得られた重合度 $i$ 成分のクロマトグラム面積分率 $s_{i,km}$ を算出した。結果の一例（重合度 $i=3$ ）をTable 2にあげる。

### 5.4 均質性評価の結果

各 $s_{i,km}$ について分散分析を行い試料瓶間の有意差を有意水準0.05とした $F$ 検定により判定した。その結果の一例を $i=3$ についてTable 3に示す。

重量平均分子量 $M_w$ 、数平均分子量 $M_n$ 、及び多分散度 $P(=M_w/M_n)$ についても同様の分散分析を行った。例として、重量平均分子量 $M_w$ について得られた分散分析表をTable 4に示す。

分散分析の結果、すべての重合度の面積分率 $s_i$ と重量平均分子量 $M_w$ 、数平均分子量 $M_n$ 、そして多分散度 $P(=M_w/M_n)$ について試料瓶間の有意差はみられなかった。以上の結果からPS500について小分けした瓶は均質であることが示された。

Table 2 SFC peak area fraction  $s_{i,km}$  of the component  $i=3$

Bin No.	Measurements			Average
	1st	2nd	3rd	
1	0.22500	0.22483	0.22461	0.22481
2	0.22463	0.22475	0.22459	0.22466
3	0.22583	0.22405	0.22437	0.22475
4	0.22527	0.22343	0.22418	0.22429
5	0.22357	0.22481	0.22481	0.22440
6	0.22370	0.22376	0.22426	0.22391

Total average  $s_i=0.22447$

Table 3 Analysis of variance for the area fraction of  $i=3$  component

	Sum of squares S	Degree of freedom $f$	Mean square $V$	$F_0=V_A/V_E$	$F(f_A, f_E, \alpha=0.05)$
Between bottles	0.000001745	5	$3.489 \times 10^{-7}$	0.8700	3.106
Within bottles	0.000004813	12	$4.011 \times 10^{-7}$		
Sum	0.000006557	17			

Table 4 Analysis of variance of  $M_w$  for PS500

	Sum of squares S	Degree of freedom $f$	Mean square $V$	$F_0=V_A/V_E$	$F(f_A, f_E, \alpha=0.05)$
Between bottles	1.54	5	0.3088	1.327	3.106
Within bottles	2.79	12	0.2326		
Sum	4.34	17			



# 第6章 Match Factorによる候補標準物質の均質性評価

## 6.1 均質性評価の対象

PS2400に対する均質性評価は特性値の有意差を直接評価するのではなく、米国NISTでも行われているSECクロマトグラムの形状を相互に比較する方法で行った。<sup>3)</sup>

## 6.2 Match Factorの定義

Match Factor (MF) は2つのクロマトグラムがどの程度一致しているかをみる指標であり、次式で定義される：

$$MF = \frac{\left( \sum_i x_i y_i - \frac{\sum_i x_i \sum_j y_j}{p} \right)^2}{\left( \sum_i x_i^2 - \frac{\left( \sum_i x_i \right)^2}{p} \right) \cdot \left( \sum_i y_i^2 - \frac{\left( \sum_i y_i \right)^2}{p} \right)}$$

$$= \frac{\left( \sum_i x_i y_i - \frac{1}{p} \right)^2}{\left( \sum_i x_i^2 - \frac{1}{p} \right) \cdot \left( \sum_i y_i^2 - \frac{1}{p} \right)}$$

ここで、 $p$ はクロマトグラムのデータ点数、 $\{x_i\}$ と $\{y_i\}$ はそれぞれ基準となるクロマトグラムと比較されるクロマトグラムの同じ溶出時間*i*における規格化されたクロマト高さである。

なお、文献ではMatch Factorについて、  
 $MF=1$ ：2つのクロマトグラムは一致する  
 $MF=0.999$ ：程度だと良く一致している  
 $MF=0.99$ ：2つのクロマトグラムは似ている (similar)  
 $MF=0.900 \sim 0.990$ ：2つのクロマトグラムは似ているが解釈は注意を要す  
 $MF < 0.900$ ：異なるクロマトグラムである  
 $MF=0$ ：2つのクロマトグラムは全く一致しない  
 のような解釈が与えられている。

## 6.3 実験

### 6.3.1 試薬と試料調製

SECの移動相として安定剤不含のTHF (和光純薬特級)

を用いた。PS2400の全152本の試料瓶から6本の試料瓶を選び出した。選抜された6本の試料瓶から候補標準物質の一部を採取し別の容器に入れ、THFをこれに適量加えることで注入試料溶液とした。その濃度は約0.5mg/mLである。

### 6.3.2 装置と測定・解析条件

SEC測定に用いた装置と分離条件は前述と同一である。ただし、均質性試験では注入試料数が多かったのでオートサンプラー (東ソーAS-8020) を用いて試料注入をした。生クロマトグラムの収集はMultistation GPC-8020 Model III (東ソー製) を用い、MFの解析にはMS Excelを用いた。

## 6.4 分散分析による均質性評価の手順

Match Factorに対して分散分析を行う一般的な手順を以下の通りとした。

- (1)  $N$ 個の瓶から  $n$ 個の瓶をランダムに選ぶ (通常、 $n \approx \sqrt{N}$ )。本候補標準物質では $N=152$ 、 $n=6$ である。
- (2) 選ばれた瓶内の1箇所から適当にサンプリングし、SEC測定用溶液を作製する。したがって  $n$ 個の溶液が出来上がる (瓶1つに対して溶液が1つ)。
- (3) 各溶液について  $m$  (本候補標準物質では $m=3$ ) 回SECの繰返し測定を行う。 $i$ 番目の瓶の  $j$ 番目のクロマトグラムを  $C_{ij}$  と表す。全体で  $n \times m$ 個のクロマトグラムが得られる。
- (4) 瓶1の1番目のクロマトグラム  $C_{11}$  を基準に取る。
- (5) 瓶1の2番目から  $m$ 番目まで、瓶  $i$  ( $i=2 \sim n$ ) の  $j$  ( $j=1 \sim m-1$ ) 番目のクロマトグラムのMatch Factor  $MF_{ij}$  を計算する。従って、 $MF_{ij}$  に対してTable 5のような表が得られる。  
 ただし、SEC測定は基準となる瓶1のクロマト  $C_{11}$  の測定の後、瓶2 ( $MF_{21}$ ) → 瓶3 ( $MF_{31}$ ) → … → 瓶  $n$  ( $MF_{n1}$ ) → 瓶1 ( $MF_{12}$ ) → 瓶2 ( $MF_{22}$ ) と、測定系の経時変化がなるべく反映しないように測定することが必要である。
- (6) Match Factor表に基づき一元配置の分散分析を行い、分散比に対して  $F$ 検定を行い瓶間の均質性を判定する。本候補標準物質の場合のように均質性評価の実験を行

Table 5 Table of  $MF$  used for the evaluation of homogeneity

	Measurements			
	1st	2nd	---	m th
Bottle 1	$MF_{12}$	$MF_{13}$	---	$MF_{1m}$
Bottle 2	$MF_{21}$	$MF_{22}$	---	$MF_{2(m-1)}$
---	---	---	---	---
Bottle n	$MF_{n1}$	$MF_{n2}$	---	$MF_{n(m-1)}$

うためには日間にわたって測定をせざるを得ない場合がある。このような時にはクロマトグラムの日内変動だけでなく日間変動を考慮に入れた分散分析を行う必要がある。また、 $MF$ は本質的にクロマトグラムの形を評価するので、溶出時間の僅かな変動やベースラインの引き方などに十分注意をしなければならない。

### 6.5 均質性評価の結果

Fig. 4に候補標準物質の入った2つの瓶から採取した

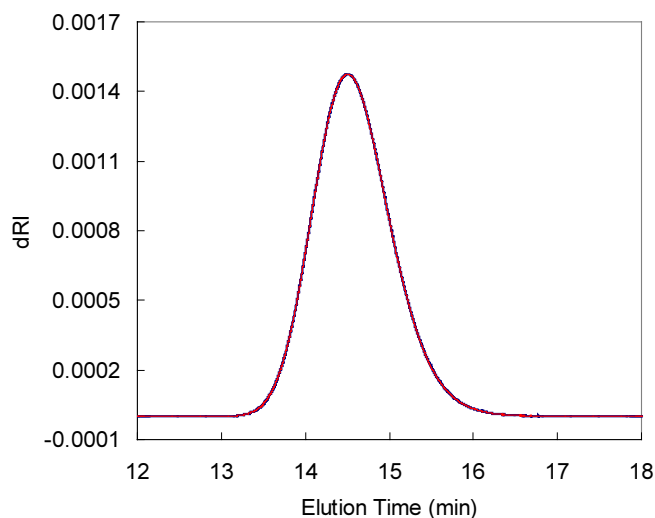


Fig. 4 Typical example for SEC chromatograms corresponding to  $MF=0.9999982$ .  
The two chromatograms overlap completely each other.

Table 6 ANOVA of  $MF$  measured for PS2400

	Sum of squares $S$	Degree of freedom $f$	Mean square $V$	$F_0=V_A/V_E$	$F(f_A, f_E, \alpha=0.05)$
Between bottles	$8.265 \times 10^{-12}$	6	$1.3774 \times 10^{-12}$	1.49	2.85
Within bottles	$1.297 \times 10^{-11}$	14	$9.2619 \times 10^{-13}$		
Sum	$2.123 \times 10^{-11}$	20			

# 第7章 SFCによる値付けと不確かさ評価

## 7.1 特性値の定義

値付けの対象となる特性値は、重合度成分*i*の質量分率 $w_i$ 、モル分率 $x_i$ 、重量平均分子量 $M_w$ 、数平均分子量 $M_n$ 、そして多分散度 $P(=M_w/M_n)$ である。一般にこれらの量は分子量標準物質の基本特性値である。

まず実験により質量分率 $w_i$ が決まれば、次式を用いてモル分率 $x_i$ を算出する：

$$x_i = (w_i/M_i) / \sum_j (w_j/M_j)$$

ここで右辺の総和は観測されるすべての重合度成分にわたって行われる。

平均分子量 $M_w$ 及び $M_n$ はそれぞれ次式で定義され算出される：

$$M_w = \sum_i w_i M_i$$

$$M_n = \sum_i x_i M_i$$

これらの式は各平均分子量の一般的な定義と同じである。また多分散度 $P$ は以上で算出した $M_w$ と $M_n$ を用いて次式で計算される：

$$P = M_w/M_n$$

以上の諸式から、質量分析などにより各成分の分子量が、SFCクロマトグラムなどによって質量分率が決め

ば他の特性値は自動的に算出されることが分かる。

## 7.2 実験

### 7.2.1 試薬と試料調製

PS500の場合は値付けと瓶間均質性評価を同時に行ったので、SFC測定に供した試料溶液の調製法はすでに第5章で述べた。一方、PS2400場合はすでに均質性が確認されている候補標準物質の一部を取り出しクロロホルム溶液としSFC測定に供した。SFCの移動相として用いた二酸化炭素CO<sub>2</sub>（純度99.8%）とモディファイヤーとして用いたクロロホルム及びエタノールは第4章の場合と同じである。

MALDI-TOFMS測定に用いたマトリックス試薬はDithranol（Aldrich製）であり、カチオン化助剤はSilver Trifluoroacetate（AgTFA：Aldrich製）である。また、スポット作製の溶液にはTHF（和光純薬特級、安定剤不含）を用いた。

### 7.2.2 SFC測定

SFC測定は前述のSFC装置SUPER-201を用いて行われた。SFCによる分析条件をTable 7に示す。

PS500についてはFig.5に、PS2400についてはFig.6に値付けに用いられたSFCクロマトグラムの一例を示す。

Table 7 Separation conditions for SFC analysis for polystyrenes

	Samples	
	PS500	PS2400
CO <sub>2</sub> flow (mL/min)	2.5	4.0
Column	JASCO Superpak SIL 60-5 (4.6mm×250 mm)	
Modifier EtOH:CHCl <sub>3</sub>	4:1	5:95
Back pressure (kg/cm <sup>2</sup> )	200	
Flow of Modifier (mL/min)	0.4	0.8
Initial column temperature(°C)	130	135
Final column temperature(°C)	40	40
Temperature rate(°C/min)	-5	-1
Concentration of injected solution (mg/mL)	100	30
Injected volume (μL)	5	10
Number of measurements	3	3

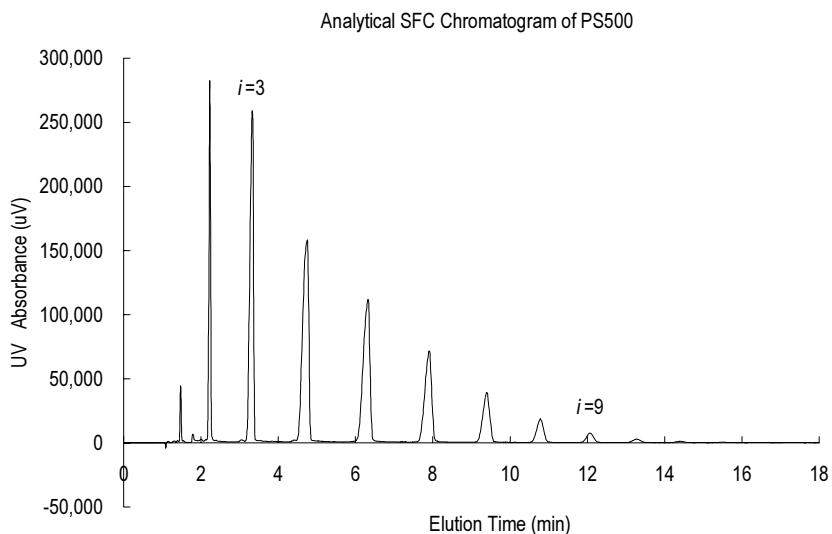


Fig. 5 Analytical SFC chromatogram of PS500 used for determining certified mass fraction. All the components are completely separated.

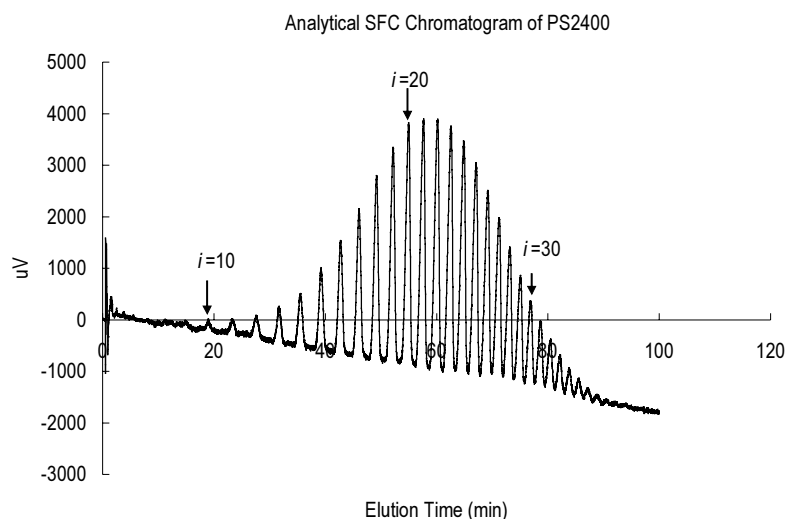


Fig. 6 Analytical SFC chromatogram of PS2400 used for determining certified mass fraction. All the components are completely separated.

### 7.2.3 MALDI-TOFMS測定

MALDI-TOFMS測定はKompact MALDI IV (Shimadzu/Kratos製) を用いて行われた。質量軸の校正にはインスリンを用いた。重合度成分の分子量値は次のように決定された。即ち、SFCクロマトグラムからいくつかのピークを分取し、得られた溶液を乾固させ、これにマトリックス試薬、AgTFAを加えた後THF溶液とした。この溶液約0.5 $\mu$ Lをサンプルスライド上に載せ、THFを乾燥させて測定した。得られたMALDI-TOFMSスペクトルから重合度を同定し、この重合度から分子量を決定した。

### 7.3 特性値の決定

重合度*i*の成分の質量分率 $w_i$ は、*i*成分のSFCクロマトグラムピーク面積分率 $s_i$ を用い次式により算出した：

$$w_i = (s_i / \alpha_i(\infty)) / \sum_j (s_j / \alpha_j(\infty))$$

ここで、 $s_i$ は3回繰り返し測定の平均値である。 $\alpha_i(\infty)$ は紫外光波長 $\lambda=254$  nmにおける、重合度無限大を基準とした相対比吸光度であり、あらかじめ均一ポリスチレン試料を用いて実験的に決定した式(4.1)を用いて計算された。

モル分率、重量平均分子量、数平均分子量、及び多分散度は前述の諸式に従って計算された。

と多分散度の値を Table 8 と Table 9 にそれぞれ示す。PS500 の各重合度成分の質量分率とモル分率をそれぞれ Table 10 と Table 11 に示す。同様に、PS2400 の質量分率とモル分率をそれぞれ Table 12 と Table 13 に示した。

#### 7.4 特性値の結果

SFCにより決定されたPS500及びPS2400の平均分子量

Table 8 Average molecular weights (certified values) determined by SFC and their uncertainties for PS500

Property	Value	Combined standard uncertainty $u_c(M)$ or $u_c(P)$	Relative standard uncertainty $u_c(M)/M$	$u_s(M)$ or $u_s(P)$	$u_a(M)$ or $u_a(P)$	$u_M(M)$ or $u_M(P)$
$M_w$	501.66	3.40	0.00679	1.31	3.14	0.0069
$M_n$	436.22	2.79	0.00639	1.02	2.59	0.0084
$P(=M_w/M_n)$	1.150	0.0152	0.01323	0.0057	0.0141	0.000030

Table 9 Average molecular weights (certified values) determined by SFC and their uncertainties for PS2400

Property	Value	Combined standard uncertainty $u_c(M)$ or $u_c(P)$	Relative standard uncertainty $u_c(M)/M$	$u_s(M)$ or $u_s(P)$	$u_a(M)$ or $u_a(P)$	$u_M(M)$ or $u_M(P)$
$M_w$	2423.40	9.79	0.00404	5.43	8.15	0.0205
$M_n$	2306.93	8.85	0.00383	4.72	7.48	0.0270
$P(=M_w/M_n)$	1.050	0.0082	0.00779	0.004365	0.006917	0.000017

Table 10 Mass fraction determined by SFC and its uncertainties for PS500 (Uncertainty budget sheet)

$i$	$M_i$	$w_i$	$u(w_i)$	$u(w_i)/w_i$	$c_{si}$	$u(s_i)$	$c_{si}u(s_i)$	$c_{ai}$	$u(\alpha_i)$	$c_{ai}u(\alpha_i)$
1	162.27	0.01866	0.00050	0.0266	1.7183	0.000050	0.000087	0.02831	0.0173	0.0004893
2	266.42	0.12987	0.00256	0.0198	2.4280	0.000179	0.000434	0.15021	0.0168	0.0025279
3	370.57	0.22990	0.00396	0.0172	0.8399	0.001903	0.001598	0.22285	0.0163	0.0036237
4	474.72	0.22557	0.00381	0.0169	0.8035	0.002106	0.001692	0.21544	0.0158	0.0034145
5	578.87	0.17518	0.00281	0.0160	1.6402	0.000374	0.000614	0.17628	0.0156	0.0027415
6	683.02	0.11170	0.00204	0.0183	0.9083	0.000997	0.000906	0.11951	0.0153	0.0018321
7	787.17	0.06095	0.00116	0.0191	0.9430	0.000572	0.000539	0.06806	0.0152	0.0010318
8	891.32	0.02874	0.00050	0.0175	2.0184	0.000049	0.000099	0.03287	0.0150	0.0004938
9	995.46	0.01221	0.00022	0.0179	1.2205	0.000047	0.000057	0.01411	0.0149	0.0002104
10	1099.61	0.00472	0.00008	0.018	7.4090	0.000002	0.000015	0.00547	0.0148	0.0000811
11	1203.76	0.00167	0.00003	0.019	0.9897	0.000014	0.000014	0.00193	0.0147	0.0000285
12	1307.91	0.00060	0.00001	0.019	0.9838	0.000005	0.000005	0.00070	0.0147	0.0000103
13	1412.06	0.00022	0.00001	0.046	0.9173	0.000010	0.000010	0.00026	0.0146	0.0000038

Table 11 Mole fraction determined by SFC and its uncertainties for PS500 (Uncertainty budget sheet)

$i$	$x_i$	$u(x_i)$	$u(x_i)/x_i$	$d_{si}$	$u(s_i)$	$d_{si}u(s_i)$	$d_{ai}$	$u(\alpha_i)$	$d_{ai}u(\alpha_i)$	$d_{M_i}$	$u(M_i)$	$d_{M_i}u(M_i)$
1	0.05017	0.00133	0.0264	5.1285	0.0000503	0.0002582	0.07522	0.0173	0.0013000	0.00032321	0.00559	0.000001807
2	0.21264	0.00359	0.0169	4.3807	0.0001789	0.0007838	0.20788	0.0168	0.0034985	0.00069779	0.00927	0.000006465
3	0.27063	0.00379	0.0140	0.7702	0.0019028	0.0014655	0.21502	0.0163	0.0034963	0.00058723	0.01295	0.000007605
4	0.20728	0.00312	0.0151	0.6233	0.0021057	0.0013125	0.17888	0.0158	0.0028351	0.00038369	0.01664	0.000006384
5	0.13201	0.00208	0.0158	1.4194	0.0003743	0.0005313	0.12962	0.0156	0.0020158	0.00021897	0.02033	0.000004451
6	0.07134	0.00133	0.0186	0.5702	0.0009973	0.0005686	0.07836	0.0153	0.0012013	0.00010666	0.02402	0.000002562
7	0.03377	0.00068	0.0200	0.5288	0.0005716	0.0003022	0.03986	0.0152	0.0006043	0.00004536	0.02771	0.000001257
8	0.01407	0.00027	0.0189	1.2387	0.0000492	0.0000609	0.01726	0.0150	0.0002593	0.00001697	0.03140	0.000000533
9	0.00535	0.00010	0.0194	0.6136	0.0000468	0.0000287	0.00668	0.0149	0.0000996	0.00000582	0.03509	0.000000204
10	0.00187	0.000036	0.0191	3.8744	0.0000020	0.0000077	0.00235	0.0148	0.0000349	0.00000185	0.03878	0.000000072
11	0.00060	0.000012	0.0205	0.3764	0.0000140	0.0000053	0.00076	0.0147	0.0000112	0.00000055	0.04248	0.000000023
12	0.00020	0.000004	0.021	0.3438	0.0000052	0.0000018	0.00025	0.0147	0.0000037	0.00000017	0.04617	0.000000008
13	0.00007	0.000003	0.047	0.2839	0.0000105	0.0000030	0.00009	0.0146	0.0000013	0.00000005	0.04986	0.000000003

Table 12 Mass fraction determined by SFC and its uncertainties for PS2400 (Uncertainty budget sheet)

$i$	$M_i$	$w_i$	$u(w_i)$	$u(w_i)/w_i$	$c_{si}$	$u(s_i)$	$c_{si}u(s_i)$	$c_{ai}$	$u(\alpha_i)$	$c_{ai}u(\alpha_i)$
9	995.46	0.001419	0.0001563	0.1102	1.0293	0.000150	0.000155	0.00153	0.0149	0.0000228
10	1099.61	0.002546	0.0003493	0.1372	1.0228	0.000339	0.000347	0.00273	0.0148	0.0000405
11	1203.76	0.004499	0.0000871	0.0194	1.0342	0.000049	0.000051	0.00480	0.0147	0.0000707
12	1307.91	0.006454	0.0004049	0.0627	1.0115	0.000388	0.000392	0.00684	0.0147	0.0001005
13	1412.06	0.010915	0.0004432	0.0406	1.0048	0.000408	0.000410	0.01150	0.0146	0.0001682
14	1516.21	0.016931	0.0005761	0.0340	0.9969	0.000517	0.000515	0.01769	0.0146	0.0002579
15	1620.36	0.024543	0.0005507	0.0224	0.9923	0.000412	0.000409	0.02540	0.0145	0.0003692
16	1724.51	0.034045	0.0006084	0.0179	0.9947	0.000341	0.000339	0.03484	0.0145	0.0005051
17	1828.66	0.044048	0.0006702	0.0152	1.1072	0.000167	0.000184	0.04455	0.0145	0.0006443
18	1932.81	0.054938	0.0008573	0.0156	1.0108	0.000325	0.000329	0.05486	0.0144	0.0007918
19	2036.96	0.064582	0.0009865	0.0153	1.0090	0.000357	0.000360	0.06375	0.0144	0.0009185
20	2141.10	0.073217	0.0010941	0.0149	1.0142	0.000368	0.000373	0.07152	0.0144	0.0010287
21	2245.25	0.078012	0.0011058	0.0142	1.5734	0.000127	0.000200	0.07573	0.0144	0.0010875
22	2349.40	0.080178	0.0011603	0.0145	1.0619	0.000311	0.000330	0.07758	0.0143	0.0011125
23	2453.55	0.078865	0.0012728	0.0161	0.9471	0.000688	0.000651	0.07636	0.0143	0.0010935
24	2557.70	0.075598	0.0010946	0.0145	1.0677	0.000290	0.000309	0.07341	0.0143	0.0010500
25	2661.85	0.069433	0.0012258	0.0177	0.9429	0.000796	0.000751	0.06784	0.0143	0.0009692
26	2766.00	0.061040	0.0010004	0.0164	0.9634	0.000533	0.000514	0.06014	0.0143	0.0008583
27	2870.15	0.051842	0.0007907	0.0153	1.0147	0.000287	0.000292	0.05155	0.0143	0.0007350
28	2974.30	0.042842	0.0006759	0.0158	1.0012	0.000286	0.000286	0.04298	0.0142	0.0006122
29	3078.45	0.033734	0.0004998	0.0148	1.2011	0.000097	0.000117	0.03414	0.0142	0.0004859
30	3182.60	0.026606	0.0004235	0.0159	1.0192	0.000172	0.000175	0.02711	0.0142	0.0003855
31	3286.74	0.020093	0.0004676	0.0233	0.9797	0.000372	0.000365	0.02059	0.0142	0.0002927
32	3390.89	0.014801	0.0005233	0.0354	0.9801	0.000486	0.000476	0.01524	0.0142	0.0002165
33	3495.04	0.010279	0.0006570	0.0639	0.9828	0.000651	0.000639	0.01063	0.0142	0.0001508



34	3599.19	0.006842	0.0002233	0.0326	0.9877	0.000202	0.000199	0.00709	0.0142	0.0001006
35	3703.34	0.004495	0.0004363	0.0971	0.9874	0.000437	0.000431	0.00467	0.0142	0.0000662
36	3807.49	0.002521	0.0001175	0.0466	0.9899	0.000113	0.000111	0.00262	0.0142	0.0000372
37	3911.64	0.001731	0.0001543	0.0891	0.9895	0.000154	0.000152	0.00180	0.0142	0.0000255
38	4015.79	0.000997	0.0001511	0.1515	0.9897	0.000152	0.000150	0.00104	0.0142	0.0000147
39	4119.94	0.001142	0.0001447	0.1267	0.9893	0.000145	0.000144	0.00119	0.0141	0.0000168
40	4224.09	0.000812	0.0001498	0.1846	0.9892	0.000151	0.000149	0.00085	0.0141	0.0000119

Table 13 Mole fraction determined by SFC and its uncertainties for PS2400 (Uncertainty budget sheet)

$i$	$x_i$	$u(x_i)$	$u(x_i)/x_i$	$d_{s_i}$	$u(s_i)$	$d_{s_i}u(s_i)$	$d_{a_i}$	$u(\alpha_i)$	$d_{a_i}u(\alpha_i)$	$d_{M_i}$	$u(M_i)$	$d_{M_i}u(M_i)$
9	0.003288	0.000361	0.1099	2.3779	0.0001503	0.0003573	0.00361	0.0149	0.0000538	0.00000339	0.03512	0.000000119
10	0.005342	0.000729	0.1365	2.1346	0.0003392	0.0007241	0.00582	0.0148	0.0000863	0.00000497	0.03881	0.000000193
11	0.008623	0.000169	0.0196	2.0043	0.0000491	0.0000984	0.00932	0.0147	0.0001375	0.00000730	0.04251	0.000000310
12	0.011384	0.000707	0.0621	1.7649	0.0003877	0.0006843	0.01222	0.0147	0.0001794	0.00000885	0.04620	0.000000409
13	0.017833	0.000715	0.0401	1.6151	0.0004081	0.0006591	0.01890	0.0146	0.0002764	0.00001276	0.04990	0.000000637
14	0.025761	0.000860	0.0334	1.4815	0.0005167	0.0007655	0.02688	0.0146	0.0003918	0.00001704	0.05359	0.000000913
15	0.034943	0.000769	0.0220	1.3759	0.0004119	0.0005667	0.03580	0.0145	0.0005204	0.00002142	0.05729	0.000001227
16	0.045542	0.000798	0.0175	1.3039	0.0003411	0.0004447	0.04567	0.0145	0.0006622	0.00002595	0.06098	0.000001583
17	0.055569	0.000828	0.0149	1.5171	0.0001665	0.0002526	0.05454	0.0145	0.0007889	0.00002955	0.06468	0.000001911
18	0.065573	0.000990	0.0151	1.2132	0.0003251	0.0003944	0.06293	0.0144	0.0009083	0.00003264	0.06837	0.000002232
19	0.073141	0.001074	0.0147	1.1528	0.0003568	0.0004113	0.06887	0.0144	0.0009922	0.00003426	0.07207	0.000002469
20	0.078888	0.001128	0.0143	1.1137	0.0003676	0.0004094	0.07310	0.0144	0.0010514	0.00003493	0.07576	0.000002647
21	0.080154	0.001091	0.0136	2.0538	0.0001272	0.0002612	0.07375	0.0144	0.0010590	0.00003380	0.07946	0.000002686
22	0.078728	0.001094	0.0139	1.1150	0.0003107	0.0003464	0.07233	0.0143	0.0010372	0.00003178	0.08315	0.000002642
23	0.074152	0.001145	0.0154	0.8571	0.0006877	0.0005894	0.06852	0.0143	0.0009813	0.00002880	0.08685	0.000002502
24	0.068186	0.000958	0.0141	1.0406	0.0002898	0.0003016	0.06360	0.0143	0.0009096	0.00002557	0.09054	0.000002316
25	0.060175	0.001026	0.0170	0.7852	0.0007961	0.0006250	0.05694	0.0143	0.0008135	0.00002187	0.09424	0.000002061
26	0.050909	0.000817	0.0161	0.7914	0.0005334	0.0004222	0.04904	0.0143	0.0006998	0.00001798	0.09793	0.000001761
27	0.041669	0.000632	0.0152	0.8467	0.0002873	0.0002433	0.04087	0.0143	0.0005828	0.00001432	0.10163	0.000001456
28	0.033229	0.000524	0.0158	0.7948	0.0002860	0.0002273	0.03315	0.0142	0.0004723	0.00001112	0.10533	0.000001171
29	0.025280	0.000379	0.0150	1.0549	0.0000974	0.0001027	0.02564	0.0142	0.0003649	0.00000824	0.10902	0.000000898
30	0.019286	0.000311	0.0161	0.7673	0.0001721	0.0001321	0.01980	0.0142	0.0002816	0.00000611	0.11272	0.000000689
31	0.014103	0.000329	0.0233	0.6832	0.0003722	0.0002543	0.01464	0.0142	0.0002080	0.00000435	0.11641	0.000000507
32	0.010069	0.000355	0.0352	0.6617	0.0004861	0.0003217	0.01054	0.0142	0.0001497	0.00000302	0.12011	0.000000363
33	0.006784	0.000432	0.0636	0.6447	0.0006506	0.0004195	0.00715	0.0142	0.0001015	0.00000198	0.12380	0.000000245
34	0.004385	0.000144	0.0328	0.6322	0.0002019	0.0001276	0.00465	0.0142	0.0000659	0.00000125	0.12750	0.000000159
35	0.002800	0.000271	0.0969	0.6135	0.0004367	0.0002680	0.00298	0.0142	0.0000422	0.00000078	0.13119	0.000000102
36	0.001528	0.000071	0.0467	0.5996	0.0001126	0.0000675	0.00163	0.0142	0.0000231	0.00000041	0.13489	0.000000056
37	0.001021	0.000091	0.0891	0.5831	0.0001538	0.0000897	0.00109	0.0142	0.0000154	0.00000027	0.13858	0.000000037
38	0.000573	0.000087	0.1515	0.5683	0.0001519	0.0000863	0.00061	0.0142	0.0000087	0.00000015	0.14228	0.000000021
39	0.000640	0.000081	0.1267	0.5537	0.0001453	0.0000804	0.00068	0.0141	0.0000097	0.00000016	0.14597	0.000000023
40	0.000443	0.000082	0.1846	0.5400	0.0001510	0.0000815	0.00047	0.0141	0.0000067	0.00000011	0.14967	0.000000016

## 7.5 特性値の不確かさ評価

### 7.5.1 不確かさ評価の基本方針

可能な限り不確かさ評価のガイド (GUM)<sup>4)</sup>と化学分析における不確かさガイド<sup>5)</sup>に基づいて不確かさを算出し表現した。まず、特性値に不確かさを発生させる要因を列挙しその相互の関係を確定して不確かさ要因図を作成した。次に、できるだけ特性値を不確かさ要因に関する解析的な式で表現できるようにした。不確かさ要因の大きさを標準不確かさとして個別に評価した。解析的な形式にできない不確かさ要因については分散分析などからその大きさを評価した。すべての不確かさ要因が評価された後、感度係数を考慮しながら合成標準不確かさを計算し、最後に包含係数 $k=2$ をかけ最終的な拡張不確かさとした。以下、その具体的な解析を示す。

### 7.5.2 SFC測定における不確かさの諸要因

質量分率などの特性値の不確かさを生ずる諸要因は、大きく分けて

- (1) 相対比吸光度の不確かさ (標準不確かさ $u(\alpha_i)$ )
- (2) SFCクロマトグラム面積分率の不確かさ (標準不確かさ $u(s_i)$ )
- (3) 各重合度成分の分子量の不確かさ (標準不確かさ $u(M_i)$ )

の3つである。特に、(2)の面積分率の不確かさでは、試料の不均質性に起因する不確かさと測定の繰り返し不確かさのほかに、SFCクロマトグラムの積分の仕方に起因する不確かさなどが含まれる。これらの不確かさはすべて質量分率などの各特性値の不確かさに反映する。

### 7.5.3 SFCクロマトグラムの面積分率 $s_i$ の不確かさ評価

(1) PS500の場合は均質性評価と特性値 (この場合は $s_i$ )の値付けを同時に行ったので面積分率 $s_i$ の標準不確かさ $u(s_i)$ を次式により評価した：

$$u^2(s_i) = u_{\text{hom}}^2(s_i) + u_{\text{int}}^2(s_i)$$

ここで、 $u_{\text{hom}}(s_i)$ は試料の均質性と測定変動に起因する面積分率の標準不確かさ、 $u_{\text{int}}(s_i)$ はSFCクロマトグラムにおいて重合度 $i$ 成分のピークを積分する際に生じる変動に起因する不確かさである。前者はAタイプ、後者はBタイプ不確かさとして評価された。

前述の均質性試験で実施した分散分析の結果から $u_{\text{hom}}(s_i)$ を算出した。試料瓶間の均質性が確認されたので、次式により全ての面積分率値をプールして不確かさを算出した：

$$u_{\text{hom}}(s_i) = \sqrt{\frac{S_T}{nr(nr-1)}} = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^n \sum_{m=1}^r (s_{i,km} - s_i)^2}{nr(nr-1)}}$$

ここで、 $s_i$ は重合度 $i$ 成分の面積分率であり、測定試料瓶数 $n=5$ 、繰り返し測定回数 $r=3$ である。

重合度 $i$ 成分のピーク面積を積分する範囲に起因する標準不確かさ $u_{\text{int}}(s_i)$ は、Bタイプの不確かさとして評価されるので代表的なSFCクロマトグラムをひとつ選択し、積分範囲を変えたときどのように面積分率が変動するかによって評価した。すなわち、主ピークの裾にあるごく小さなピークを含めた時の面積分率を $s_i$ 、含まないときの面積分率を $s_i'$ とし、 $s_i$ を平均値とし $\pm \Delta s_i \equiv \pm |s_i - s_i'|$ の分布をもった矩形分布を仮定し、

$$u_{\text{int}}(s_i) \equiv \Delta s_i / \sqrt{3}$$

と評価した。

(2) PS2400の場合は均質性評価と値付けは別々に行われたので、SFCクロマトグラムのピーク面積の標準不確かさ $u(s_i)$ は単に3回の繰り返し測定の実験標準偏差とした。

### 7.5.4 質量分率 $w_i$ の標準不確かさ評価

質量分率 $w_i$ の標準不確かさ $u(w_i)$ を次式により評価した：

$$u^2(w_i) = c_{si}^2 u^2(s_i) + c_{ai}^2 u^2(\alpha_i)$$

ここで、 $u(s_i)$ 、 $u(\alpha_i)$ はそれぞれSFCクロマトグラム面積分率の標準不確かさ、相対比吸光度の標準不確かさであり、感度係数 $c_{si}$ 、 $c_{ai}$ は次式より定義されている：

$$\begin{aligned} c_{si}^2 &\equiv \frac{\sum_j \left( \frac{\partial w_i}{\partial s_j} \right)^2 u^2(s_j)}{u^2(s_i)} \\ &= \frac{1}{f^4 \alpha_i^2} \left\{ \left( f^2 - 2f \frac{s_i}{\alpha_i} \right) + s_i^2 \sum_j \frac{u^2(s_j)}{\alpha_j^2} \cdot \frac{1}{u^2(s_i)} \right\} \\ c_{ai}^2 &\equiv \frac{\sum_j \left( \frac{\partial w_i}{\partial \alpha_j} \right)^2 u^2(\alpha_j)}{u^2(\alpha_i)} \\ &= \frac{1}{f^4 \alpha_i^4} \left\{ \left( f^2 s_i^2 - 2f \frac{s_i^3}{\alpha_i} \right) + \alpha_i^2 s_i^2 \sum_j \frac{s_j^2 u^2(\alpha_j)}{\alpha_j^4} \cdot \frac{1}{u^2(\alpha_i)} \right\} \end{aligned}$$

ここで、 $u^2(s_i)$ は上述された面積分率 $s_i$ の標準不確かさである。

相対比吸光度 $\alpha_i$  ( $\infty$ )の標準不確かさ $u(\alpha_i)$ は、均一ポリスチレン試料について実験的に求められた (4.1) 式によ

り重合度ごとに算出した。また、上式に現れる因子 $f$ は次式により定義される量である：

$$f \equiv \sum_j (s_j / \alpha_j)$$

計算された $u(w_i)$ の値とそれを構成する不確かさ成分をPS500についてはTable 10に、PS2400についてはTable 12にそれぞれ示す。

### 7.5.5 モル分率 $x_i$ の不確かさ評価

重合度 $i$ 成分のモル分率の標準不確かさ $u(x_i)$ を次式により評価した：

$$u^2(x_i) = d_{si}^2 u^2(s_i) + d_{ai}^2 u^2(\alpha_i) + d_{Mi}^2 u^2(M_i)$$

ここで $u^2(M_i)$ は重合度 $i$ 成分の分子量の標準不確かさであり、次式により求めた：

$$u^2(M_i) = (8i+4)^2 u^2(C) + (8i+10)^2 u^2(H)$$

ただし、 $C$ と $H$ はそれぞれ炭素原子と水素原子の原子量であり、IUPAC発行の原子量表 (2001)<sup>1)</sup>から、

$$C=12.0107(8) \quad u^2(C)=0.0008^2/3=2.13 \times 10^{-7}$$

$$H=1.00794(7) \quad u^2(H)=0.00007^2/3=1.63 \times 10^{-9}$$

とした。ここで原子量の標準不確かさの算出では矩形分布を仮定した。

重合度 $i$ 成分の感度係数 $d_{si}$ 、 $d_{ai}$ 、及び $d_{Mi}$ は次式により算出した：

$$\begin{aligned} d_{si}^2 &\equiv \frac{\sum_j \left( \frac{\partial x_i}{\partial w_j} \right)^2 u^2(w_j)}{u^2(s_i)} \\ &= \frac{1}{g^4 M_i^2} \left\{ \left( g^2 - 2g \frac{w_i}{M_i} \right) \cdot c_{si}^2 + w_i^2 \sum_j \frac{c_{sj}^2 u^2(s_j)}{M_j^2} \cdot \frac{1}{u^2(s_i)} \right\} \\ d_{ai}^2 &\equiv \frac{\sum_j \left( \frac{\partial x_i}{\partial w_j} \right)^2 u^2(w_j)}{u^2(\alpha_i)} \\ &= \frac{1}{g^4 M_i^2} \left\{ \left( g^2 - 2g \frac{w_i}{M_i} \right) \cdot c_{ai}^2 + w_i^2 \sum_j \frac{c_{aj}^2 u^2(\alpha_j)}{M_j^2} \cdot \frac{1}{u^2(\alpha_i)} \right\} \\ d_{Mi}^2 &\equiv \frac{\sum_j \left( \frac{\partial x_i}{\partial M_j} \right)^2 u^2(M_j)}{u^2(M_i)} \\ &= \frac{1}{g^4 M_i^4} \left\{ \left( g^2 w_i^2 - 2g \frac{w_i^3}{M_i} \right) + M_i^2 w_i^2 \sum_j \frac{w_j^2 u^2(M_j)}{M_j^4} \cdot \frac{1}{u^2(M_i)} \right\} \end{aligned}$$

ここで因子 $g$ は次式で定義される量である：

$$g \equiv \sum_j (w_j / M_j)$$

計算された $u(x_i)$ の値とそれを構成する不確かさ成分をPS500についてはTable 11に、PS2400についてはTable 13に示す。

### 7.5.6 重量平均分子量 $M_w$ の不確かさ評価

重量平均分子量の標準不確かさ $u(M_w)$ を次式により計算した：

$$u^2(M_w) = u^2_s(M_w) + u^2_a(M_w) + u^2_M(M_w)$$

ただし、右辺の各項は順にSFCクロマト面積分率、相対比吸光度、及び分子量の標準不確かさからの寄与であり、それぞれ次のような式で算出された：

$$u^2_s(M_w) \equiv \sum_j \left( \frac{\partial M_w}{\partial w_j} \right)^2 u^2_s(w_j) = \sum_j M_j^2 u^2_s(w_j) = \sum_j M_j^2 c_{sj}^2 u^2(s_j)$$

$$u^2_a(M_w) \equiv \sum_j \left( \frac{\partial M_w}{\partial w_j} \right)^2 u^2_a(w_j) = \sum_j M_j^2 u^2_a(w_j) = \sum_j M_j^2 c_{aj}^2 u^2(\alpha_j)$$

$$u^2_M(M_w) \equiv \sum_j \left( \frac{\partial M_w}{\partial M_j} \right)^2 u^2(M_j) = \sum_j w_j^2 u^2(M_j)$$

計算された $u(M_w)$ の値とそれを構成する不確かさ成分をPS500についてはTable 8に、PS2400についてはTable 9に示す。

### 7.5.7 数平均分子量 $M_n$ の不確かさ評価

数平均分子量の標準不確かさ $u(M_n)$ を次式により計算した：

$$u^2(M_n) = u^2_s(M_n) + u^2_a(M_n) + u^2_M(M_n)$$

ただし、右辺の各項は順にSFCクロマト面積分率、相対比吸光度、及び分子量の標準不確かさからの寄与であり、それぞれ次のような式で算出された：

$$u^2_s(M_n) \equiv \sum_j \left( \frac{\partial M_n}{\partial x_j} \right)^2 u^2_s(x_j) = \sum_j M_j^2 d_{sj}^2 u^2(s_j)$$

$$u^2_a(M_n) \equiv \sum_j \left( \frac{\partial M_n}{\partial x_j} \right)^2 u^2_a(x_j) = \sum_j M_j^2 d_{aj}^2 u^2(\alpha_j)$$

$$\begin{aligned} u^2_M(M_n) &\equiv \sum_j \left( \frac{\partial M_n}{\partial x_j} \right)^2 u^2_M(x_j) + \sum_j \left( \frac{\partial M_n}{\partial M_j} \right)^2 u^2(M_j) \\ &= \sum_j (M_j^2 d_{Mj}^2 + x_j^2) u^2(M_j) \end{aligned}$$

計算された $u(M_n)$ の値とそれを構成する不確かさ成分をPS500についてはTable 8に、PS2400についてはTable 9に示す。

#### 7.5.8 多分散度 $P$ の不確かさ評価

多分散度の標準不確かさ $u(P)$ を次式により計算した：

$$u^2(P) = \frac{1}{M_n^4} \left[ M_n^2 u^2(M_w) + M_w^2 u^2(M_n) - 2M_w M_n u(M_w, M_n) \right] \\ = u^2_s(P) + u^2_a(P) + u^2_M(P)$$

ただし、右辺の各項は順にSFCクロマト面積分率、相対比吸光度、そして分子量の標準不確かさからの寄与であり、それぞれ次のような式で算出された：

$$u^2_s(P) \equiv \frac{1}{M_n^4} \left[ M_n^2 u^2_s(M_w) + M_w^2 u^2_s(M_n) + 2M_w M_n^3 \sum_j u^2_s(w_j) \right]$$

$$u^2_a(P) \equiv \frac{1}{M_n^4} \left[ M_n^2 u^2_a(M_w) + M_w^2 u^2_a(M_n) + 2M_w M_n^3 \sum_j u^2_a(w_j) \right]$$

$$u^2_M(P) \equiv \frac{1}{M_n^4} \left[ M_n^2 u^2_M(M_w) + M_w^2 u^2_M(M_n) - 2M_w M_n^3 \sum_j \frac{w_j^2}{M_j^2} u^2(M_j) \right]$$

計算された $u(P)$ の値とそれを構成する不確かさ成分をPS500についてはTable 8に、PS2400についてはTable 9に示す。

## 第8章 SECによる特性値の値付けと不確かさ評価

### 8.1 考慮された特性値

SEC測定によりピーク平均分子量 $M_p$ 、重量平均分子量 $M_w$ 、数平均分子量 $M_n$ 、及び多分散度 $P (=M_w/M_n)$ を決定した。また、示差屈折率増分の分子量依存性をまったく考慮せずSECクロマトグラムの高さから直接得られる見かけの重量平均分子量 $M_{w,uc}$ 、見かけの数平均分子量 $M_{n,uc}$ 、及び見かけの多分散度 $P_{uc}$ も利用者の利便性のために定義した。これらの特性値のうち、 $M_p$ のみ認証値とし、他の量はすべて参考値とした。これらの特性値は以下のように定義された。

#### 8.1.1 ピーク平均分子量 $M_p$

ピーク平均分子量 $M_p$ を各ポリスチレン試料のクロマトグラムの最高高さ位置（ピークトップ）溶出時間に対応する分子量として定義した。具体的には、 $k$ 番目のクロマトグラムのピークトップ溶出時間 $t_{pk}$ を校正曲線に代入しピーク平均分子量 $M_{pk}$ を決めた：

$$M_{pk} = 10^{\frac{t_{pk}-a'}{b'}}; (k=1,2,\dots,N)$$

ここで係数 $a'$ と $b'$ は校正曲線（直線）

$$t = a' + b' \log M$$

の切片と傾きであり、均一ポリスチレン試料により実験的に決められたものである。

認証値として得られる最終的なピーク平均分子量 $M_p$ は次式により各 $M_{pk}$ の算術平均として求めた：

$$M_p \equiv \sum_{k=1}^N M_{pk} / N$$

ここで $N$ は繰返し測定回数である。

#### 8.1.2 SECによる重量平均分子量 $M_w$ 、数平均分子量 $M_n$ 及び多分散度 $P$

SEC測定による $M_w$ 、 $M_n$ 、及び $P$ の参照値は適当な繰返し測定の平均値として算出する。すなわち、まず測定ごとに溶出時間 $t_i$ における質量分率を次式により算出した：

$$w_{ki} = (h_{ki}/\beta_i) / \sum_j (h_{kj}/\beta_j)$$

ここで、 $w_{ki}$ は $k$ 番目の測定で得られたクロマトグラムの溶出時間 $t_i$ に対応した質量分率であり、 $\beta_i$ は重合度 $i$ 成分

の相対示差屈折率増分である。 $\beta_i$ の分子量依存性はすでに均一ポリスチレン試料を測定した実験的により与えられている。

次に、各SEC測定 $k$ における重量平均分子量 $M_{wk}$ 、数平均分子量 $M_{nk}$ 、及び多分散度 $P_k$ を次式により定義する：

$$M_{wk} = \sum_i w_{ki} M_{ki}$$

$$M_{nk} = \sum_i \frac{1}{w_{ki}/M_{ki}}$$

$$P_k = M_{wk} / M_{nk}$$

ただし、 $M_{ki}$ は $k$ 番目のクロマトグラムにおける溶出時間 $t_i$ での分子量であり、校正曲線により算出される。

最終的に、参考値としての $M_w$ 、 $M_n$ 及び $P$ は、各測定値の算術平均として定義、算出する：

$$M_w = \sum_{k=1}^N M_{wk} / N$$

$$M_n = \sum_{k=1}^N M_{nk} / N$$

$$P = \sum_{k=1}^N P_k / N$$

### 8.2 見かけの平均分子量 $M_{w,uc}$ 、 $M_{n,uc}$ 、及び多分散度 $P_{uc}$

本標準物質の一般利用者の利便性を図るため、示差屈折率の分子量依存性を考慮せずSECクロマトグラムから直接算出する平均分子量と多分散度についても参考値としてあげることとした。高分子の平均分子量をSECで決定する場合、一般的には濃度検出器感度の分子量依存性を考慮しなくてもすむ場合が多く、利用者の多くは本標準物質を測定し平均分子量を求める際に示差屈折率の分子量依存性を考慮しないと考えられるからである。

各ポリスチレン試料の見かけの重量平均分子量 $M_{w,uc}$ は $N$ 回の繰返し測定の算術平均として求めた：

$$M_{w,uc} \equiv \sum_{k=1}^N M_{w,uck} / N \quad (\text{測定回数 } N=5)$$

ここで $M_{w,uck}$ は $k$ 番目の測定における見かけの重量平均分子量であり、次式により決定した：

$$M_{w,uck} = \sum_i h_{ki} M_{ki}$$

ただし、 $h_{ki}$ は $k$ 番目の測定で得られたクロマトの溶出時間 $t_{ki}$ における規格化されたクロマト高さである。また $M_{ki}$ は $t_{ki}$ に対応した分子量であり、校正曲線の係数 $a'$ と $b'$ とを用い、

$$M_{ki} \equiv 10^{\frac{t_{ki}-a'}{b'}}$$

で与えられる。

見かけの数平均分子量 $M_{n,uc}$ 、及び各試料の $M_{n,uc}$ も $M_{w,uc}$ と同様に次式により決定した：

$$M_{n,uc} \equiv \sum_{k=1}^N M_{n,uck} / N$$

ここで、

$$M_{n,uck} = 1 / \sum_i (h_{ki} / M_{ki})$$

である。

同様に見かけの多分散度 $P_{uc}$ も、まず $k$ 番目のクロマトグラムについて見かけの多分散度

$$P_{uck} \equiv M_{w,uck} / M_{n,uck}$$

を算出し、算術平均として見かけの多分散度 $P_{uc}$ を決定した：

$$P_{uc} \equiv \sum_{k=1}^N P_{uck} / N$$

## 8.3 実験

### 8.3.1 試薬と試料調製

SECの移動相として安定剤を含まないTHF（和光純薬特級）を用いた。校正曲線作成に用いられた均一ポリスチレン試料は、測定対象となっている候補標準物質及び他の候補標準物質からSFCにより分取・精製されたものであり純度は98～100%であった。

### 8.3.2 SEC測定

測定に用いたSEC装置及びカラム等の分離条件は前述（第4章）と同一である。ポリスチレン試料及び校正曲

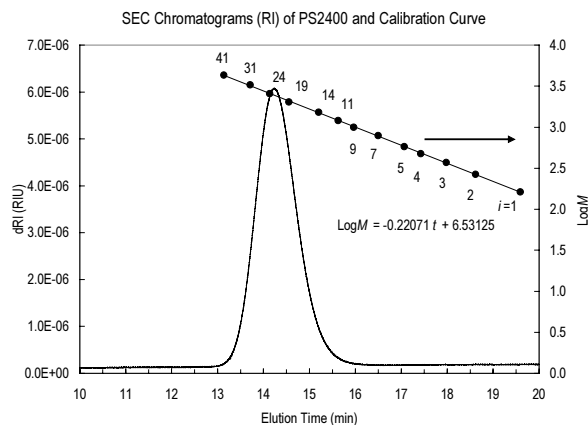


Fig. 7 SEC chromatogram of PS2400 and calibration curve constructed using uniform polystyrenes.

線作成用の均一ポリスチレン混合試料はTHF溶液として100  $\mu$ Lの試料ループを用いて注入された。本標準物質に対するSEC測定は5回繰返された。ただし、校正曲線作成用の均一ポリスチレン混合溶液（3種類）の測定は各1回とした。候補標準物質のSECクロマトグラムと均一ポリスチレン試料により得られた校正曲線をFig.7に示す。実測された校正曲線は非常によい直線性を示し、溶出時間 $t$ と分子量 $M$ の関係が

$$t = 29.5882 - 4.52964 \text{Log} M \quad (r^2=0.99975)$$

と与えられた。

## 8.4 SECで決定された特性値の結果

Table 14にPS500の、Table 15にPS2400の認証値と参考値の結果をそれぞれ示す。後述する不確かさ評価方法により求められた合成標準不確かさも合わせて示しておく。また、見かけの平均分子量と多分散度についても参考までにTable 16とTable 17に示した。ただし、これら見かけの特性値については不確かさ評価を行わず単に繰返しの標準偏差を示している。

Table 14 Average molecular weights determined by SEC for PS500

$M_p \pm u_c(M_p)$	$M_n \pm u_c(M_n)$	$M_w \pm u_c(M_w)$	$P(=M_w/M_n) \pm u_c(P)$
475.27 $\pm$ 3.98	426.51 $\pm$ 3.78	494.93 $\pm$ 4.08	1.1604 $\pm$ 0.0018
Certified value	Information value	Information value	Information value

Table 15 Average molecular weights determined by SEC for PS2400

$M_p \pm u_c(M_p)$	$M_n \pm u_c(M_n)$	$M_w \pm u_c(M_w)$	$P(=M_w/M_n) \pm u_c(P)$
2469.4 $\pm$ 16.6	2291.6 $\pm$ 14.7	2414.5 $\pm$ 16.3	1.0536 $\pm$ 0.0007
Certified value	Information value	Information value	Information value



Table 16 Uncorrected average molecular weights determined by SEC for PS500 (Information values)

$M_{n,uc} \pm s^a$	$M_{w,uc} \pm s$	$P_{uc}(=M_w/M_n) \pm s$
448.08±5.08	512.86±5.83	1.1446±0.0004

a)  $s$  is the standard deviation of repeated measurements ( $N=5$ )

Table 17 Uncorrected average molecular weights determined by SEC for PS2400 (Information values)

$M_{n,uc} \pm s$	$M_{w,uc} \pm s$	$P_{uc}(=M_w/M_n) \pm s$
2297.15±9.96	2419.41±11.40	1.0532±0.0004

a)  $s$  is the standard deviation of repeated measurements ( $N=5$ )

### 8.5 SECにおける特性値の不確かさ評価

#### 8.5.1 不確かさの要因分析

連続的なクロマトグラムから特性値と参考値を求めるのでモデル式が複雑となり、SFCと比較して不確かさ評価はより複雑になる。しかし、瓶間の均質性が確認されている場合不確かさの発生要因を大きく分類すると以下の4つになる。

- (1) 校正曲線自身をもつ不確かさ
- (2) SECクロマトグラムの溶出位置の変動
- (3) SECクロマトグラムの高さの変動
- (4) 相対示差屈折率増分 $\beta_i$ の不確かさ

これらの要因は独立のものもあれば独立でないものもあ

る。例えば校正曲線の不確かさはクロマトグラム溶出位置の変動に依存する。また、特性値によってこれらの不確かさ要因の寄与の仕方が異なるので、特性値ごとに不確かさ評価の詳細を以下に述べる。なお、SEC測定により求められる平均分子量と多分散度における不確かさ要因図をFig.8に示す。

#### 8.5.2 ピーク平均分子量 $M_p$ の不確かさ評価

$M_p$ の不確かさは、試験試料のクロマトグラムのピーク溶出時間の不確かさと校正曲線自身をもつ不確かさから構成されるが、まず、ピーク溶出時間の変動によりもたらされる $M_p$ の相対標準不確かさ $u_t(M_p)/M_p$ を、

$$\frac{u^2_t(M_p)}{M_p^2} = \frac{(\text{Ln}10)^2}{b^2} \frac{1}{N} u^2(t_p)$$

により算出した。ここで、 $b'$ は校正曲線の傾きであり、ピーク溶出時間の標準不確かさ $u(t_p)$ は実験標準偏差として次式で与えた：

$$u^2(t_p) \equiv \sum_{i=1}^N (t_{pk} - t_p)^2 / (N-1)$$

実測された $u(t_p)$ は $u^2(t_p) = 6.950 \times 10^{-5} \text{ min}^2$ であり、校正曲線の傾き $b'$ が $b' = -4.52964$ であったことから、これらを上式に代入して、

$$\frac{u^2_t(M_p)}{M_p^2} = \frac{(\text{Ln}10)^2}{b'^2} \frac{1}{N} u^2(t_p) = \frac{(\text{Ln}10)^2}{4.52964^2} \times \frac{1}{5} \times 6.950 \times 10^{-5} = 3.592 \times 10^{-6}$$

すなわち、

$$u_t(M_p)/M_p = 0.001895$$

を得た。

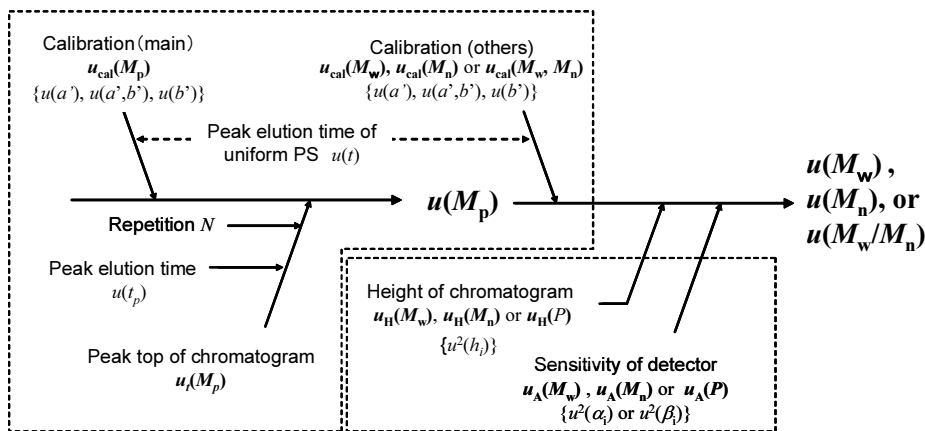


Fig. 8 Cause and effect diagram for SEC measurement.

一方、校正曲線から由来する標準不確かさ  $u_{cal}(M_p)$  は、

$$\frac{u_{cal}^2(M_p)}{M_p^2} = \frac{(\text{Ln}10)^2}{b^2} [u^2(a') + 2\text{Log}M_p u(a', b') + (\text{Log}M_p)^2 u^2(b')]$$

で与えられる。ここで、

$$u^2(b') = u^2(t) \left/ \sum_{i=1}^n (m_i - \langle m \rangle)^2 \right.$$

$$u^2(a') = u^2(t) \cdot \langle m^2 \rangle \left/ \sum_{i=1}^n (m_i - \langle m \rangle)^2 \right.$$

$$u(a', b') = -u^2(t) \cdot \langle m \rangle \left/ \sum_{i=1}^n (m_i - \langle m \rangle)^2 \right.$$

また  $m_i$  は、溶出時間  $t_i$  に対応する均一ポリスチレンの還元分子量で、

$$t_i = a' + b' m_i$$

であり、上式中の平均値は、校正曲線を構成する点の数を  $n$  として、

$$\langle m \rangle \equiv \sum_{i=1}^n m_i / n$$

$$\langle m^2 \rangle \equiv \sum_{i=1}^n m_i^2 / n$$

で定義される。また、校正曲線を構成する均一ポリスチレンのピーク溶出時間の標準不確かさがすべての重合度について同じであると仮定し、溶出時間の標準不確かさが残差標準偏差、

$$u^2(t) = \sum_{i=1}^n \{ \hat{t}_i - t_i \}^2 / (n-2) = \sum_{i=1}^n \{ (a' + b' m_i) - t_i \}^2 / (n-2)$$

で求められるとした。

実際に  $u_{cal}(M_p)$  を評価する際は、校正曲線の傾き  $b' = -4.52964 \text{ min}$ 、校正曲線由来の標準不確かさ  $u^2(a') = 0.004157 \text{ min}^2$ 、 $u^2(b') = 0.0004607 \text{ min}^2$ 、 $u(a', b') = -0.001370 \text{ min}^2$ 、及びピーク平均分子量  $M_p = 2469.4$  を用いた。その結果、

$$u_{cal}(M_p) / M_p = 0.006453$$

が得られた。

最終的に次式により  $M_p$  の合成標準不確かさ  $u_c(M_p)$  を計算した：

$$\begin{aligned} \frac{u_c^2(M_p)}{M_p^2} &= \frac{u^2(M_p)}{M_p^2} + \frac{u_{cal}^2(M_p)}{M_p^2} \\ &= \frac{(\text{Ln}10)^2}{b^2} \frac{1}{N} u^2(t_p) + \frac{(\text{Ln}10)^2}{b^2} [u^2(a') + 2\text{Log}M_p u(a', b') + (\text{Log}M_p)^2 u^2(b')] \end{aligned}$$

$u_c(M_p)$  の不確かさ成分を、PS500についてはTable 18に、PS2400についてはTable 19にバジェットシートとしてまとめた。

Table 18 Uncertainty budgets of certified  $M_p$  of PS500

Parameter	Relative standard uncertainty		
	Type	Expression	Value
Peak elution time	A	$u_t(M_p)/M_p$	0.00623
Calibration curve	A	$u_{cal}(M_p)/M_p$	0.00560
Relative combined standard uncertainty		$u_c(M_p)/M_p$	0.00838
Combined standard uncertainty		$u_c(M_p)$	3.98

Table 19 Uncertainty budgets of certified  $M_p$  of PS2400

Parameter	Relative standard uncertainty		
	Type	Expression	Value
Peak elution time	A	$u_t(M_p)/M_p$	0.00190
Calibration curve	A	$u_{cal}(M_p)/M_p$	0.00645
Relative combined standard uncertainty		$u_c(M_p)/M_p$	0.00673
Combined standard uncertainty		$u_c(M_p)$	16.6

### 8.5.3 SECにおける重量平均分子量 $M_w$ 、数平均分子量 $M_n$ 、多分散度 $P$ の不確かさ評価

#### (1) $M_w$ 、 $M_n$ 及び $P$ の不確かさ要因

平均分子量の計算はクロマトグラム全体にわたって行われるので溶出時間の不確かさと校正曲線の不確かさ以外にベースラインの引き方、検出器の相対感度係数の不確かさなどが要因として入ってくる。校正曲線作成に用いた均一ポリスチレンの分子量の不確かさは他の不確かさに比べて非常に小さいので今回の評価では無視した。

#### (2) $M_w$ の不確かさ評価

SECにより求められる重量平均分子量  $M_w$  の合成標準不確かさ  $u_c(M_w)$  を次式により算出した：

$$\begin{aligned} \frac{u_c^2(M_w)}{M_w^2} &= \frac{u_w^2(M_w)}{M_w^2} + \frac{u_M^2(M_w)}{M_w^2} \\ &= \frac{u_H^2(M_w)}{NM_w^2} + \frac{u_A^2(M_w)}{NM_w^2} + \frac{u_t^2(M_p)}{M_p^2} + \frac{u_{cal}^2(M_p)}{M_p^2} \\ &\quad + \frac{u_{cal}^2(M_w)}{M_w^2} + \frac{u_d^2(M_w)}{M_w^2} \end{aligned}$$

ここで、

$$u_H^2(M_w) \equiv \sum_i M_i^2 u_h^2(w_i) : \text{クロマトグラム高さの変動寄与}$$

$$u_A^2(M_w) \equiv \sum_i M_i^2 u_a^2(w_i) : \text{相対感度係数からの寄与}$$

$$\frac{u_{cal}^2(M_w)}{M_w^2} = \frac{(\text{Ln}10)^2}{b^2} A \cdot [2u(a', b') + 2\text{Log}M_p \cdot u^2(b') + A \cdot u^2(b')] :$$

校正曲線の変動と試料のクロマトグラムの変動の交差項

$$\frac{u_d^2(M_w)}{M_w^2} \approx (\text{Ln}10)^2 \left( \frac{M_d}{M_w} \right)^2 \cdot 10 \cdot \frac{u^2(t_p)}{t_p^2} :$$

クロマトグラムの形が変動することに起因した不確かさである。

上式中に現れる総和はクロマトグラムの全溶出時間についてのものであり、今回の測定では2500点程度だった。また、 $M_i$ は溶出時間 $t_i$ に対応する成分の分子量、 $w_i$ はクロマトグラムの高さから算出される重量分率、 $u_h(w_i)$ はクロマトグラムの高さの変動に起因する重量分率の標準不確かさ成分、そして $u_a(w_i)$ は検出器の相対感度係数に起因する重量分率の標準不確かさ成分である。

上式中の $M_d$ は分子量の次元をもち、次式で定義される量でクロマトグラムから計算される：

$$M_d \equiv \frac{1}{N} \sum_k \sum_i w_{ki} M_{ki} \frac{d_{ki}}{b'}$$

ここで、 $d_{ki}$ はピーク溶出時間 $t_{pk}$ と溶出時間 $t_{ki}$ との差である：

$$d_{ki} \equiv t_{ki} - t_{pk}$$

$M_d$ はクロマトグラムの形により負にもなり得る量である。また、因子 $A$ は次式で定義される無次元量である。

$$A \equiv \frac{M_d}{M_w}$$

実際に求められた $A$ の値はPS2400では $M_d=4.276$ 、 $M_w=2414.5$ より、

$$A=0.00177$$

であった。

$M_w$ に関する不確かさ成分の一覧をバジェットシートとして、PS500についてはTable 20に、PS2400についてはTable 21に示す。

Table 20 Uncertainty budgets of  $M_w$  (information value) determined by SEC for PS500

Parameter	Relative standard uncertainty		
	Type	Expression	Value
Peak elution time	A	$u_t(M_p)/M_p$	0.006227
Calibration curve	A	$u_{cal}(M_p)/M_p$	0.005602
Between chromatogram and calibration	A	$u_{cal}(M_w)/M_w$	-0.001537
Chromatographic shape	A	$u_d(M_w)/M_w$	0.000216
Height of chromatogram	A	$u_H(M_w)/NM$	0.000053
Relative refractive index increment	A	$u_A(M_w)/NM_w$	0.000285
Relative combined standard uncertainty		$u_c(M_p)/M_p$	0.008242
Combined standard uncertainty		$u_c(M_p)$	4.08

Table 21 Uncertainty budgets of  $M_w$  (information value) determined by SEC for PS2400

Parameter	Relative standard uncertainty		
	Type	Expression	Value
Peak elution time	A	$u_t(M_p)/M_p$	0.001895
Calibration curve	A	$u_{cal}(M_p)/M_p$	0.006453
Between chromatogram and calibration	A	$u_{cal}(M_w)/M_w$	0.000420
Chromatographic shape	A	$u_d(M_w)/M_w$	0.000011
Height of chromatogram	A	$u_H(M_w)/NM$	0.000036
Relative refractive index increment	A	$u_A(M_w)/NM_w$	0.000255
Relative combined standard uncertainty		$u_c(M_p)/M_p$	0.006744
Combined standard uncertainty		$u_c(M_p)$	16.3

### (3) $M_n$ の不確かさ評価

SECにおける数平均分子量 $M_n$ の合成標準不確かさ $u_c(M_n)$ は次式により算出した：

$$\begin{aligned} \frac{u_c^2(M_n)}{M_n^2} &= \frac{u_w^2(M_n)}{M_n^2} + \frac{u_M^2(M_n)}{M_n^2} \\ &= \frac{u_H^2(M_n)}{NM_n^2} + \frac{u_A^2(M_n)}{NM_n^2} + \frac{u^2(M_p)}{M_p^2} + \frac{u_{cal}^2(M_p)}{M_p^2} \\ &\quad + \frac{u_{cal}^2(M_n)}{M_n^2} + \frac{u_d^2(M_n)}{M_n^2} \end{aligned}$$

ここで、

$$u_H^2(M_n) \equiv M_n^4 \sum_i \frac{1}{M_i^2} u_h^2(w_i) : \text{クロマトグラム高さの変動寄与}$$

$$u_A^2(M_n) \equiv M_n^4 \sum_i \frac{1}{M_i^2} u_a^2(w_i) : \text{相対感度係数からの寄与}$$

$$\frac{u_{cal}^2(M_n)}{M_n^2} = \frac{(\text{Ln}10)^2}{b^2} B \cdot [2u(a', b') + 2\text{Log} M_p \cdot u^2(b') + B \cdot u^2(b')]$$

$$\frac{u_d^2(M_n)}{M_n^2} \approx (\text{Ln}10)^2 \left( \frac{M_n}{M_f} \right)^2 \cdot 10 \cdot \frac{u^2(t_p)}{t_p^2}$$

である。これらの不確かさ表現は重量平均分子量の不確かさ成分と同様の意味を持っている。ただし、

$$M_f \equiv \frac{1}{\sum_i \frac{w_{ik}}{M_{ik}} \frac{d_{ik}}{b'}}$$

は $M_d$ と同様に分子量の次元を持つ量で、クロマトグラムの形に大きく依存する量である。また、因子 $B$ は、

$$B \equiv \frac{M_n}{M_f}$$

で定義される無次元量である。実際された $B$ の値は、 $M_n=2291.6$ 、 $M_f=52600$

$$B = -0.0436$$

であった。

$M_n$ に関する不確かさ成分の一覧をバジェットシートとして、PS500についてはTable 22に、PS2400についてはTable 23に示す。

(4)  $P$ の不確かさ評価方法

多分散度 $P (=M_w/M_n)$ の合成標準不確かさ $u_c(P)$ は次式により算出した。

$$\frac{u_c^2(P)}{P^2} = \frac{u_w^2(P)}{P^2} + \frac{u_M^2(P)}{P^2}$$

Table 22 Uncertainty budgets of  $M_n$  (information value) determined by SEC for PS500

Parameter	Relative standard uncertainty		
	Type	Expression	Value
Peak elution time	A	$u_t(M_p)/M_p$	0.006227
Calibration curve	A	$u_{cal}(M_p)/M_p$	0.005602
Between chromatogram and calibration	A	$u_{cal}(M_n)/M_n$	0.002789
Chromatographic shape	A	$u_d(M_n)/M_n$	0.000577
Height of chromatogram	A	$u_H(M_n)/NM_n$	0.000133
Relative refractive index increment	A	$u_A(M_n)/NM_n$	0.000340
Relative combined standard uncertainty		$u_c(M_n)/M_n$	0.008855
Combined standard uncertainty		$u_c(M_n)$	3.78

Table 23 Uncertainty budgets of  $M_n$  (information value) determined by SEC for PS2400

Parameter	Relative standard uncertainty		
	Type	Expression	Value
Peak elution time	A	$u_t(M_p)/M_p$	0.001895
Calibration curve	A	$u_{cal}(M_p)/M_p$	0.006453
Between chromatogram and calibration	A	$u_{cal}(M_n)/M_n$	0.002027
Chromatographic shape	A	$u_d(M_n)/M_n$	0.000265
Height of chromatogram	A	$u_H(M_n)/NM_n$	0.000068
Relative refractive index increment	A	$u_A(M_n)/NM_n$	0.000247
Relative combined standard uncertainty		$u_c(M_n)/M_n$	0.006424
Combined standard uncertainty		$u_c(M_n)$	14.7

右辺の不確かさ成分はそれぞれ重量分率の不確かさと校正曲線から決定される分子量の不確かさに由来する。

それぞれはさらに以下のように分解される：

$$\begin{aligned} \frac{u_w^2(P)}{P^2} &= \frac{u_w^2(M_w)}{M_w^2} - 2\frac{u_w(M_w, M_n)}{M_w M_n} + \frac{u_w^2(M_n)}{M_n^2} \\ &= \frac{u_H^2(M_w)}{NM_w^2} + \frac{u_A^2(M_w)}{NM_w^2} + 2\frac{u_H(P)}{NM_w M_n} + 2\frac{u_A(P)}{NM_w M_n} + \\ &\quad + \frac{u_H^2(M_n)}{NM_n^2} + \frac{u_A^2(M_n)}{NM_n^2} \end{aligned}$$

ただし、

$$u_H^2(P) \equiv M_n^2 \sum_i u^2_h(w_i)$$

$$u_A^2(P) \equiv M_n^2 \sum_i u^2_a(w_i)$$

及び、

$$\begin{aligned} \frac{u_M^2(P)}{P^2} &= \frac{1}{M_w^2} \left[ u_M^2(M_w) - 2Pu_M(M_w, M_n) + P^2 u_M^2(M_n) \right] \\ &= \frac{u_M^2(M_w)}{M_w^2} - \frac{2u_M(M_w, M_n)}{M_w M_n} + \frac{u_M^2(M_n)}{M_n^2} \\ &= \frac{u^2(M_p)}{M_p^2} + \frac{u_{cal}^2(M_w)}{M_w^2} - \frac{2u^2(M_p)}{M_p^2} - \frac{2u_{cal}(M_w, M_n)}{M_w M_n} + \\ &\quad + \frac{u^2(M_p)}{M_p^2} + \frac{u_{cal}^2(M_n)}{M_n^2} \\ &= \frac{(\text{Ln}10)^2}{b^2} (A-B)^2 u^2(b') \end{aligned}$$

$u_M^2(P)/P^2$ を計算するために、既に8.5.3節で言及した $A$ と $B$ の値を、また、8.5.2節で言及した校正曲線の傾きの標準不確かさ $u^2(b')$ を代入した。その結果、

$$\frac{u_M^2(P)}{P^2} = 2.447 \times 10^{-7}$$

すなわち、

$$\frac{u_M(P)}{P} = 0.000495$$

を得た。

$u_w(P)$ は上記のように $u_H^2(M_w)$ など6つの項の和から計算される。詳細は省略し、実際に評価されたそれぞれの値を、PS500についてはTable 24に、PS2400についてはTable 25に示す。

Table 24 Uncertainty budgets of  $P$  (information value) determined by SEC for PS500

Parameter	Relative standard uncertainty		
	Type	Expression	Value
Molecular weight	A	$u_M(P)/P$	0.00142
Mass fraction	A	$u_w(P)/P$	0.00062
Relative combined standard uncertainty		$u(P)/P$	0.00155
Combined standard uncertainty		$u_c(P)$	0.00180

Table 25 Uncertainty budgets of  $P$  (information value) determined by SEC for PS2400

Parameter	Relative standard uncertainty		
	Type	Expression	Value
Molecular weight	A	$u_M(P)/P$	0.000495
Mass fraction	A	$u_w(P)/P$	0.000505
Relative combined standard uncertainty		$u(P)/P$	0.000707
Combined standard uncertainty		$u_c(P)$	0.000745

## 謝辞

本標準物質開発にあつては多くの方の協力を得た。ポリスチレンのUV相対吸光度係数の決定するために用いた均一試料を得るためには元物質工学工業技術研究所非常勤職員のMarina A. Lusenkovaさんの働きが欠かせませんでした。ここに感謝します。開発段階では、新エネルギー

工業技術総合開発機構（NEDO）が(社)日本化学工業協会に委託、さらに(財)化学技術戦略推進機構（JCII）に再委託した知的基盤創成・利用技術研究開発事業「高分子に関する標準物質の研究開発」（平成11（1999）年～13（2001）年度実施）における共同研究が大きな推進力となりました。JCIIの皆さんに感謝します。その他、MALDI-TOFMSによる分析を支援していただいた（独）産業技術総合研究所の長畑律子氏、（株）島津製作所の川畑慎一郎氏に感謝します。

## 文献

- 1) IUPAC, "Atomic Weights of the Elements 1999" *Pure Appl. Chem.* **2001**, 73, (4), 667-683.
- 2) Itakura, M.; Sato, K.; Lusenkova, M.A.; Matsuyama, S.; Shimada, K.; Saito, T.; Kinugasa, S. *J. Appl. Polym. Sci.* **2004**, 94, 1101-1106.
- 3) Guttman C.M.; Blair W.R.; Maurey J.R. "Recertification of the SRM 706a, a Polystyrene", *NISTIR* 6091, 1998. 文献中では本報告中のMFに1000を掛けたMFを定義している。
- 4) International Organization for Standardization, "Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement" ISO, Geneva, Switzerland, 1993.
- 5) EURACHEM, *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 2nd ed.*, Laboratory of the Government Chemist: London, 2000.

## 補足

### 補足1 主な記号一覧

$a'$ :	SEC校正曲線の切片
$b'$ :	SEC校正曲線の傾き
$M_0$ :	モノマー単位の“分子量”
$M_i$ :	重合度 <i>i</i> の成分の分子量又は単に成分 <i>i</i> の分子量
$dn/dc$ :	示差屈折率増分
$i$ :	重合度あるいは成分記号
$j$ :	重合度あるいは成分記号
$M$ :	分子量
$MF$ :	Match Factor
$M_0$ :	モノマー単位の“分子量”
$M_e$ :	末端基部分の“分子量”
$M_w$ :	重量平均分子量
$M_{w,uc}$ :	見かけの(補正してない)重量平均分子量

$M_n$ :	数平均分子量
$M_{n,uc}$ :	見かけの(補正してない)数平均分子量
$P$ :	多分散度 ( $M_w/M_n$ )
$P_{uc}$ :	見かけの(補正してない)多分散度
$M_p$ :	ピーク平均分子量
$s_i$ :	重合度 <i>i</i> の成分のSFCクロマトグラム面積分率
$w_i$ :	重合度 <i>i</i> の成分の質量分率
$x_i$ :	重合度 <i>i</i> の成分のモル分率
$\alpha_i(\infty)$ :	重合度無限大(非常に分子量の大)の高分子を基準にした相対比吸光度
$\beta(M)$ :	分子量 <i>M</i> での相対示差屈折率増分
$\varepsilon_i'$ :	重合度 <i>i</i> の成分の比吸光度(単位質量あたりの吸光度)
$\varepsilon_0'$ :	モノマー単位の成分の比吸光度(単位質量あたりの吸光度)

### 補足2 Match Factorの実例

Match Factorがどのような数値を取るか実例をTable 26に示す。

Table 26 Example of Match Factor for 6 bottles of PS2400

Bottle No.	Measurement				Average $\langle x_i \rangle$	$(\langle x_i \rangle - \langle x \rangle)^2$
	1st	2nd	3rd			
②	0.9999972	0.9999966	0.9999951	0.9999963	$2.469 \times 10^{-14}$	
③	0.9999968	0.9999982	0.9999948	0.9999966	$2.090 \times 10^{-13}$	
④	0.9999971	0.9999984	0.9999961	0.9999972	$1.118 \times 10^{-12}$	
⑤	0.9999958	0.9999965	0.9999964	0.9999962	$8.186 \times 10^{-15}$	
⑥	0.9999964	0.9999956	0.9999955	0.9999958	$9.580 \times 10^{-14}$	
⑦	0.9999957	0.9999943	0.9999952	0.9999951	$1.158 \times 10^{-12}$	
⑧	0.9999959	0.9999953	0.9999961	0.9999958	$1.415 \times 10^{-13}$	
			Total average	0.9999961		

### 補足3 不確かさを評価する式の導出

本標準物質の特性値は多数の成分分布そのものであったり平均量であったりするので、低分子化合物の純度あるいは濃度の不確かさ評価とは異なった不確かさ評価法が要求される。また、本標準物質の特性値に対して行った不確かさ評価法は高分子分析分野では行われていないものであり初めての試みである。従って、本標準物質の不確かさ評価法の詳細を補足資料として取り上げておくことは同様の標準物質を再生産する際に役立つものと予想される。以下参考のため代表的な不確かさ評価法の詳細を掲載しておく。

#### (1) $w_i$ の不確かさ評価式の導出

本文中に示したようにSFCクロマトグラムの面積分率 $s_i$ から質量分率 $w_i$ を次式により決定する：

$$w_i = (s_i / \alpha_i(\infty)) / \sum_j (s_j / \alpha_j(\infty)) \quad (A1)$$

ここで $\alpha_i(\infty)$ は相対比吸光度である。この式から $w_i$ は2組の変数 $\{s_i\}$ 、 $\{\alpha_i(\infty)\}$ の関数となっていることが分かる。添え字*i*は重合度成分の数だけある。厳密には $\{s_i\}$ は分率であるからひとつだけが他の $s_i$ に従属している従属変数であるが、本標準物

質のように多数の成分がある場合は変数  $\{s_i\}$  はすべて独立変数のように扱っても問題はないと考えられる。従って、 $w_i$  の標準不確かさの2乗  $u^2(w_i)$  は次式のように与えられる：

$$u^2(w_i) = \sum_j \left( \frac{\partial w_i}{\partial s_j} \right)^2 u^2(s_j) + \sum_j \left( \frac{\partial w_i}{\partial \alpha_j} \right)^2 u^2(\alpha_j) \quad (\text{A2})$$

右辺の偏微分係数を計算するためA1式を  $\{s_i\}$  及び  $\{\alpha_i(\infty)\}$  で偏微分すると、

$$\frac{\partial w_i}{\partial s_j} = \frac{1}{f^2} \left( \delta_{ij} \frac{f}{\alpha_i} - \frac{s_i}{\alpha_i \alpha_j} \right)$$

及び

$$\frac{\partial w_i}{\partial \alpha_j} = -\frac{1}{f^2 \alpha_i^2} \left( \delta_{ij} f s_i - \frac{\alpha_i s_i s_j}{\alpha_j^2} \right)$$

が得られる。ここで  $\delta_{ij}$  はいわゆる Kronecker の  $\delta$  であり、 $i=j$  のときには1を、 $i \neq j$  のときは0をとる。

この2つの式を(A2)式に代入すると、

$$u^2(w_i) = \frac{1}{f^4 \alpha_i^2} \left\{ \left( f^2 - 2f \frac{s_i}{\alpha_i} \right) u^2(s_i) + s_i^2 \cdot \sum_j \frac{u^2(s_j)}{\alpha_j^2} \right\} + \frac{1}{f^4 \alpha_i^4} \left\{ \left( f^2 s_i^2 - 2f \frac{s_i^3}{\alpha_i} \right) u^2(\alpha_i) + \alpha_i^2 s_i^2 \sum_j \frac{s_j^2 u^2(\alpha_j)}{\alpha_j^4} \right\}$$

を得る。この式から本文中に与えられた感度係数  $c_{si}$  と  $c_{\alpha i}$  の表式が得られる。

## (2) $M_p$ の不確かさ評価式の導出

$N$  回の繰返しSEC測定を行う。 $k$  番目の測定で得られたピーク平均分子量を  $M_{pk}$ 、対応する“還元分子量”  $m_{pk}$  を下式により定義する：

$$m_{pk} (\equiv \text{Log } M_{pk}) = \frac{t_{pk} - a'}{b'}$$

本文中にあるように  $M_p$  は繰返し測定の平均値として、

$$M_p \equiv \sum_{k=1}^N M_{pk} / N$$

と定義されるので、

$$\delta M_p = \frac{(\text{Ln}10)}{N} \sum_k M_{pk} \delta m_{pk}$$

ただし、確率変数  $x$  についてその平均値からの偏差を  $\delta x$  と表すことにする。すなわち、 $k$  番目の測定で得られる還元分子量  $m_{pk}$  は確率変数であり、その平均値  $\mu_{m_{pk}}$  からの偏差  $\delta m_{pk}$  は、

$$\delta m_{pk} \equiv m_{pk} - \mu_{m_{pk}}$$

と定義される。 $\delta m_{pk}$  自体も平均値が0で、 $m_{pk}$  と同じ分散をもつ確率変数である。確率変数である  $M_p$ 、 $M_{pk}$ 、 $a'$ 、あるいは  $b'$  も同様である。こうして、

$$\langle (\delta M_p)^2 \rangle = \frac{(\text{Ln}10)^2}{N^2} \sum_k \sum_l M_{pk} M_{pl} \langle \delta m_{pk} \delta m_{pl} \rangle$$

ただし、

$$\begin{aligned}
\langle \delta m_{pk} \delta m_{pl} \rangle &= \left( \frac{\partial m_{pk}}{\partial t_{pk}} \right) \left( \frac{\partial m_{pl}}{\partial t_{pl}} \right) \langle \delta t_{pk} \delta t_{pl} \rangle + \left( \frac{\partial m_{pk}}{\partial a'} \right) \left( \frac{\partial m_{pl}}{\partial a'} \right) \langle (\delta a')^2 \rangle + \left( \frac{\partial m_{pk}}{\partial a'} \right) \left( \frac{\partial m_{pl}}{\partial b'} \right) \langle \delta a' \delta b' \rangle \\
&+ \left( \frac{\partial m_{pk}}{\partial b'} \right) \left( \frac{\partial m_{pl}}{\partial a'} \right) \langle \delta a' \delta b' \rangle + \left( \frac{\partial m_{pk}}{\partial b'} \right) \left( \frac{\partial m_{pl}}{\partial b'} \right) \langle (\delta b')^2 \rangle \\
&= \frac{1}{b'^2} \left[ \langle (\delta t_{pk})^2 \rangle \delta_{kl} + \langle (\delta a')^2 \rangle + (m_{pk} + m_{pl}) \langle \delta a' \delta b' \rangle + m_{pk} m_{pl} \langle (\delta b')^2 \rangle \right]
\end{aligned}$$

上式を導く際、

$$\langle \delta t_{pk} \delta a' \rangle = 0$$

などの性質を使った。これは、 $t_{pk}$ と $a'$ あるいは $t_{pk}$ と $b'$ が独立変数であることを利用している。また、 $\langle \rangle$ を確率変数の期待値、

$$\langle X(x) \rangle \equiv \int X(x) P(x) dx$$

の意味で使用した。不確かさの表現で言えば、同一の変数については $\langle (\delta x)^2 \rangle = u^2(x)$ であり、2変数の共分散については $\langle \delta x \delta y \rangle = u(x, y)$ である。以上から、

$$\begin{aligned}
u^2(M_p) \equiv \langle (\delta M_p)^2 \rangle &= \frac{(\text{Ln}10)^2}{b'^2} \left[ \frac{1}{N^2} \sum_k M_{pk}^2 u^2(t_{pk}) + M_p^2 u^2(a') + \right. \\
&\left. + \frac{2M_p}{N} \sum_k m_{pk} M_{pk} u(a', b') + \frac{\left( \sum_k m_{pk} M_{pk} \right)^2}{N^2} u^2(b') \right] \tag{A3}
\end{aligned}$$

が得られる。ここで、本文中に記載されているように $u^2(t)$ 、 $u(a')$ 、 $u(a', b')$ 、及び $u^2(b')$ はすべて校正曲線を構成するデータから算出される。

繰り返し測定が確率的に同じであるとすれば、

$$t_{pk} = t_p$$

$$u^2(t_{pk}) = u^2(t_p) \quad (k=1 \sim N)$$

$$M_p = M_{pk} \text{、あるいは} m_p = m_{pk} \quad (k=1 \sim N)$$

とおける。ただし、 $t_p$ は以下の式で定義されるピーク溶出時間の平均値とする：

$$t_p \equiv \sum_{k=1}^N t_{pk} / N$$

これらの式を(A3)に代入すれば本文中の式、

$$\frac{u^2(M_p)}{M_p^2} = \frac{(\text{Ln}10)^2}{b'^2} \left[ \frac{u^2(t_p)}{N} + u^2(a') + 2 \text{Log} M_p u(a', b') + (\text{Log} M_p)^2 u^2(b') \right]$$

が得られる。

### (3) SECによる $M_w$ の不確かさ評価式の導出

本文中にもあるように $M_w$ は繰り返し測定の平均値として以下のように定義される：

$$M_w = \sum_{k=1}^N M_{wk} / N = \sum_{k=1}^N \sum_i w_{ik} M_{ik} / N$$

である。ここで $k$ は測定回数、 $i$ 番目の成分を表す。

$M_w$ は確率変数とみなせるので $\delta M_w$ を平均値からの偏差とすると



$$\delta M_w = \frac{1}{N} \left( \sum_k \sum_i \delta w_{ik} M_{ik} + \sum_k \sum_i w_{ik} \delta M_{ik} \right)$$

$\delta w_{ik}$  と  $\delta M_{ik}$  も共に確率変数  $w_{ik}$  と  $M_{ik}$  の推定値からの変位である。

よって、変位  $\delta M_w$  の2乗平均すなわち分散は

$$\begin{aligned} \langle (\delta M_w)^2 \rangle = & \frac{1}{N^2} \left( \sum_k \sum_l \sum_i \sum_j M_{ik} M_{jl} \langle \delta w_{ik} \delta w_{jl} \rangle + \right. \\ & \left. + 2 \sum_k \sum_l \sum_i \sum_j M_{ik} w_{jl} \langle \delta w_{ik} \delta M_{jl} \rangle + \sum_k \sum_l \sum_i \sum_j w_{ik} w_{jl} \langle \delta M_{ik} \delta M_{jl} \rangle \right) \end{aligned}$$

と与えられる。

重量平均分子量  $M_w$  の変動はSECクロマトグラムの変動に起因している。クロマトグラムの変動は縦軸方向の変動すなわち質量分率  $w_{ik}$  の変動と、横軸方向の変動すなわち分子量  $M_{ik}$  の変動に分解される。さらに、分子量  $M_{ik}$  の変動はクロマトグラムの各溶出位置の変動（横方向の変動であり、溶出位置が変動すると対応する分子量も変動）と校正曲線自身の不確かさに起因している。

ここで、確率変数としては  $w_{ik}$  が独立変数、 $w_{ik}$  と  $M_{ik}$  とは独立なので（クロマトグラムの縦方向の変動と横方向の変動は独立）、

$$\langle \delta w_{ik} \delta w_{jl} \rangle = \delta_{ki} \delta_{lj}$$

$$\langle \delta w_{ik} \delta M_{jl} \rangle = 0$$

従って、

$$u^2(M_w) = \frac{1}{N^2} \sum_k \sum_i M_{ik}^2 u^2(w_{ik}) + \frac{1}{N^2} \sum_k \sum_l \sum_i \sum_j w_{ik} w_{jl} \langle \delta M_{ik} \delta M_{jl} \rangle$$

この式の右辺第一項は質量分率の不確かさあるいはクロマトグラム高の不確かさからくるものであり、第二項は校正曲線から求められる分子量の不確かさから由来するものである。

まず上式の右辺第一項については、右辺第一項を  $u_w^2(M_w)$  と置くと、

$$u_w^2(M_w) \equiv \frac{1}{N^2} \sum_k \sum_i M_{ik}^2 u^2(w_{ik}) = \frac{1}{N} \sum_i M_i^2 u^2(w_i)$$

となる。ここで、各測定（添字  $k$  で表現）における  $i$  成分の質量分率  $w_i$  の統計的挙動はすべて同じであるから、

$$u^2(w_{ik}) = u^2(w_i): \text{ for all } k$$

であることを使った。

$u^2(w_i)$  は質量分率の変動に起因している。質量分率は規格化されたクロマトグラムの各溶出時間におけるクロマト高さを相対示差屈折率増分  $\beta_i$  で除した商に比例するから、ある溶出時間  $t_i$  での高さ分率の不確かさ  $u^2(h_i)$  と  $\beta_i$  の不確かさ  $u^2(\beta_i)$  の和で与えられる：

$$u^2(w_i) = u^2_h(w_i) + u^2_\beta(w_i)$$

ただし、

$$w_i = \frac{h_i / \beta_i}{\sum_j (h_j / \beta_j)}$$

であるから、

$$u^2_h(w_i) = \sum_j \left( \frac{\partial w_i}{\partial h_j} \right)^2 u^2(h_j) = \frac{1}{f^4 \beta_i^2} \left\{ f \left( f - \frac{2h_i}{\beta_i} \right) \cdot u^2(h_i) + f_h \cdot h_i^2 \right\}$$

$$u^2_a(w_i) = \sum_j \left( \frac{\partial w_i}{\partial \beta_j} \right)^2 u^2(\beta_j) = \frac{h_i^2}{f^4 \beta_i^4} \left\{ f \left( f - \frac{2h_i}{\beta_i} \right) u^2(\beta_i) + f_a \cdot \beta_i^2 \right\}$$

ここで、

$$f \equiv \sum_j (h_j / \beta_j)$$

$$f_h \equiv \sum_j (u^2(h_j) / \beta_j^2)$$

$$f_a \equiv \sum_j (h_j^2 u^2(\beta_j) / \beta_j^4)$$

を定義した。

結局、第一項  $u_w^2(M_w)$  は、

$$u_w^2(M_w) = \frac{1}{N} u^2_H(M_w) + \frac{1}{N} u^2_A(M_w)$$

と2つの項の和で与えられる。ただし、

$$u^2_H(M_w) \equiv \sum M_i^2 u^2_h(w_i) \quad (\text{クロマトグラム高さの変動寄与})$$

$$u^2_A(M_w) \equiv \sum M_i^2 u^2_a(w_i) \quad (\text{相対感度係数からの寄与})$$

である。

$\beta_i$ の重合度依存性は実験で求められるべきものであり、例えば、ポリスチレンについてはTHF中で

$$\beta_i(\infty) = 1 - \frac{88.53913}{M_i}$$

を用いる。ただし、 $M_i$ は成分*i*の分子量である。

次に、 $u_w^2(M_w)$ を与える右辺第二項の各成分  $u^2_M(M_w)$  を考える。これは分子量の不確かさからくる寄与である。 $u^2_M(M_w)$ は次のように定義される：

$$u^2_M(M_w) \equiv \frac{1}{N^2} \sum_k \sum_l \sum_i \sum_j w_{ik} w_{jl} \langle \delta M_{ik} \delta M_{jl} \rangle$$

上式を測定可能な不確かさ成分に分解して表現しやすくするために、*k*番目の測定における溶出時間*i*での分子量 $M_{ik}$ に対して還元分子量 $m_{ik}$ を用いると、

$$\begin{aligned} u^2_M(M_w) &= \frac{1}{N^2} \sum_k \sum_l \sum_i \sum_j w_{ik} w_{jl} \langle \delta M_{ik} \delta M_{jl} \rangle \\ &= \frac{(\text{Ln}10)^2}{N^2} \sum_k \sum_l \sum_i \sum_j w_{ik} w_{jl} M_{ik} M_{jl} \langle \delta m_{ik} \delta m_{jl} \rangle \end{aligned}$$

となる。

前述のように還元分子量 $m_{ik}$ の変動はまず二つの変動要因に起因する。第一は*i*成分の溶出時間の変動、第二は校正曲線の不確かさに起因するものである。SECのクロマトグラムを解析してみると、SECクロマトグラムの変動はピーク溶出位置（ピークでなくともある特定の溶出位置でもよい）の変動とピーク溶出位置からの相対位置の変動とに分割するほうがよいことがわかる。すなわち、

$$m_{ik} = m_{pk} + \frac{d_{ik}}{b'}$$

ここで、 $b'$ は校正曲線の傾き、 $m_{pk}$ はピーク溶出時間に対応する還元ピーク分子量、 $d_{ik}$ は*i*成分の溶出時間のピーク溶出時間

からの差、すなわち

$$d_{ik} \equiv t_{ik} - t_{pk}$$

もし校正曲線が直線で表されると仮定する、すなわち、

$$t_{ik} = a' + b' m_{ik}$$

とするならSECにおいてはクロマトグラムの形はほとんど変化せず、全体的に溶出時間が

$$m_{ik} = m_{pk} + \frac{d_{ik}}{b'}$$

と表現できる。ただし、 $m_{pk}$ は*k*番目の測定で得られたクロマトグラムのピークトップに対応した還元分子量であり、

$$m_{pk} = \frac{t_{pk} - a'}{b'}$$

$d_{ik}$ はピークトップ溶出位置と*i*番目の溶出位置との差である：

$$d_{ik} = t_{ik} - t_{pk}$$

これらの式から  $m_{ik}$  の変動  $\delta m_{ik}$  は、

$$\delta m_{ik} = \delta m_{pk} + \frac{\delta d_{ik}}{b'} - \frac{d_{ik}^2}{b'^2} \delta b'$$

よって、

$$\begin{aligned} \langle \delta m_{ik} \delta m_{jl} \rangle &= \langle \delta m_{pk} \delta m_{pl} \rangle + \frac{1}{b'} \langle \delta m_{pk} \delta d_{jl} \rangle - \frac{d_{jl}}{b'^2} \langle \delta m_{pk} \delta b' \rangle \\ &\quad + \frac{1}{b'} \langle \delta d_{ik} \delta m_{pl} \rangle + \frac{1}{b'^2} \langle \delta d_{ik} \delta d_{jl} \rangle - \frac{d_{jl}}{b'^3} \langle \delta d_{ik} \delta b' \rangle \\ &\quad - \frac{d_{ik}}{b'^2} \langle \delta b' \delta m_{pl} \rangle - \frac{d_{ik}}{b'^3} \langle \delta b' \delta d_{jl} \rangle + \frac{d_{ik} d_{jl}}{b'^4} \langle (\delta b')^2 \rangle \end{aligned}$$

となる。この式中で、 $d_{jl}$  と  $m_{pk}$  とは互いに独立である、つまりピーク溶出時間の変動と各成分の溶出時間との差の変動とは無関係であると考えられるから、

$$\langle \delta m_{pk} \delta d_{jl} \rangle = \langle \delta m_{pl} \delta d_{ik} \rangle = 0$$

また、時間差  $\delta d_{ik}$  と校正曲線とは互いに相関がないと考えられるから

$$\langle \delta d_{ik} \delta b' \rangle = \langle \delta d_{jl} \delta b' \rangle = 0$$

としてもよい。

以上の考察をもとにすると、

$$\begin{aligned} \langle \delta m_{ik} \delta m_{jl} \rangle &= \langle \delta m_{pk} \delta m_{pl} \rangle - \frac{d_{jl}}{b'^2} \langle \delta m_{pk} \delta b' \rangle - \frac{d_{ik}}{b'^2} \langle \delta b' \delta m_{pl} \rangle + \\ &\quad + \frac{d_{ik} d_{jl}}{b'^4} \langle (\delta b')^2 \rangle + \frac{1}{b'^2} \langle \delta d_{ik} \delta d_{jl} \rangle \end{aligned}$$

となる。

さらに、

$$\delta m_{pk} = \delta \left( \frac{t_{pk} - a'}{b'} \right) = \frac{\delta t_{pk}}{b'} - \frac{\delta a'}{b'} - \frac{(t_{pk} - a')}{b'^2} \delta b'$$

を上式に代入すると、

$$\begin{aligned}
\langle \delta m_{ik} \delta m_{jl} \rangle &= \frac{1}{b^2} \langle (\delta t_{pk})^2 \rangle \delta_{kl} + \frac{1}{b^2} \langle (\delta a')^2 \rangle + \frac{d_{ik} + d_{jl}}{b^3} \langle \delta a' \delta b' \rangle + \\
&+ \frac{m_{pk} + m_{pl}}{b^2} \langle \delta a' \delta b' \rangle + \frac{d_{jl} m_{pl}}{b^3} \langle (\delta b')^2 \rangle + \frac{d_{ik} m_{pk}}{b^3} \langle (\delta b')^2 \rangle + \\
&+ \frac{m_{pk} m_{pl}}{b^2} \langle (\delta b')^2 \rangle + \frac{d_{ik} d_{jl}}{b^4} \langle (\delta b')^2 \rangle + \frac{1}{b^2} \langle \delta d_{ik} \delta d_{jl} \rangle
\end{aligned}$$

となる。これを  $u_M(M_w)$  に代入すれば、

$$\begin{aligned}
\frac{u^2_M(M_w)}{\left(\frac{\text{Ln}10}{N}\right)^2} &= \sum_k \sum_l \sum_i \sum_j w_{ik} w_{jl} M_{ik} M_{jl} \frac{\langle (\delta t_{pk})^2 \rangle}{b^2} \delta_{kl} + \\
&+ \frac{1}{b^2} \langle (\delta a')^2 \rangle \cdot \sum_k \sum_l \sum_i \sum_j w_{ik} w_{jl} M_{ik} M_{jl} + \\
&+ \frac{1}{b^3} \langle \delta a' \delta b' \rangle \cdot \left( \sum_k \sum_l \sum_i \sum_j w_{ik} w_{jl} M_{ik} M_{jl} d_{ik} + \sum_k \sum_l \sum_i \sum_j w_{ik} w_{jl} M_{ik} M_{jl} d_{jl} \right) + \\
&+ \frac{1}{b^2} \langle \delta a' \delta b' \rangle \cdot \left( \sum_k \sum_l \sum_i \sum_j w_{ik} w_{jl} M_{ik} M_{jl} m_{pk} + \sum_k \sum_l \sum_i \sum_j w_{ik} w_{jl} M_{ik} M_{jl} m_{pl} \right) + \\
&+ \frac{1}{b^3} \langle (\delta b')^2 \rangle \cdot \left( \sum_k \sum_l \sum_i \sum_j w_{ik} w_{jl} M_{ik} M_{jl} d_{jl} m_{pl} + \sum_k \sum_l \sum_i \sum_j w_{ik} w_{jl} M_{ik} M_{jl} d_{ik} m_{pk} \right) + \\
&+ \frac{1}{b^2} \langle (\delta b')^2 \rangle \left( \sum_k \sum_l \sum_i \sum_j w_{ik} w_{jl} M_{ik} M_{jl} m_{pk} m_{pl} \right) + \\
&+ \frac{1}{b^4} \langle (\delta b')^2 \rangle \left( \sum_k \sum_l \sum_i \sum_j w_{ik} w_{jl} M_{ik} M_{jl} d_{ik} d_{jl} \right) + \\
&+ \frac{1}{b^2} \sum_k \sum_l \sum_i \sum_j w_{ik} w_{jl} M_{ik} M_{jl} \langle \delta d_{ik} \delta d_{jl} \rangle
\end{aligned}$$

と書き下せる。

まず、右辺第1項 (①と表現する。以下他項も同じ) は、

$$\begin{aligned}
\textcircled{1} &= \sum_k \sum_l \sum_i \sum_j w_{ik} w_{jl} M_{ik} M_{jl} \frac{\langle (\delta t_{pk})^2 \rangle}{b^2} \delta_{kl} = \frac{u^2(t_p)}{b^2} \sum_k \sum_l \sum_i \sum_j w_{ik} w_{jk} M_{ik} M_{jk} \\
&= \frac{u^2(t_p)}{b^2} \sum_k \left( \sum_i w_{ik} M_{ik} \right) \left( \sum_j w_{jk} M_{jk} \right) = \frac{u^2(t_p)}{b^2} N M_w^2
\end{aligned}$$

ここで、 $u^2(t_p) = \langle (\delta t_p)^2 \rangle$  を用いた。

第2項②は、

$$\begin{aligned}
\textcircled{2} &= \frac{1}{b^2} \langle (\delta a')^2 \rangle \cdot \sum_k \sum_l \sum_i \sum_j w_{ik} w_{jl} M_{ik} M_{jl} = \frac{u^2(a')}{b^2} \cdot \sum_k \sum_i w_{ik} M_{ik} \sum_l \sum_j w_{jl} M_{jl} \\
&= \frac{u^2(a')}{b^2} \cdot (N M_w)^2
\end{aligned}$$

ここで、 $u^2(a') = \langle (\delta a')^2 \rangle$  を用いた。

第3項③は、

$$\begin{aligned}
 \textcircled{3} &= \frac{1}{b'^3} \langle \delta a' \delta b' \rangle \cdot \left( \sum_k \sum_l \sum_i \sum_j w_{ik} w_{jl} M_{ik} M_{jl} d_{ik} + \sum_k \sum_l \sum_i \sum_j w_{ik} w_{jl} M_{ik} M_{jl} d_{jl} \right) \\
 &= \frac{2u(a', b')}{b'^3} \cdot \sum_k \sum_i w_{ik} M_{ik} d_{ik} \cdot \sum_l \sum_j w_{jl} M_{jl} = \frac{2u(a', b')}{b'^2} \cdot NM_d \cdot NM_w \\
 &= \frac{2u(a', b')}{b'^2} \cdot N^2 M_d M_w
 \end{aligned}$$

ここで、 $M_d$ は分子量の次元をもつ量で次式で定義される：

$$M_d \equiv \sum_i w_i M_i \frac{d_i}{b'} \quad (\text{すべての測定回}k\text{について共通})$$

$d_i$ も $b'$ も時間の次元をもつので $M_d$ は分子量の次元となる。ポリスチレンオリゴマーでは $M_d$ のおおよその値は大きくても、

$$M_d \approx 10$$

また、 $u(a', b') = \langle \delta a' \delta b' \rangle$ を用いた。

第4項④は、

$$\begin{aligned}
 \textcircled{4} &= \frac{1}{b'^2} \langle \delta a' \delta b' \rangle \cdot \left( \sum_k \sum_l \sum_i \sum_j w_{ik} w_{jl} M_{ik} M_{jl} m_{pk} + \sum_k \sum_l \sum_i \sum_j w_{ik} w_{jl} M_{ik} M_{jl} m_{pl} \right) \\
 &= \frac{2u(a', b')}{b'^2} \cdot \sum_k \sum_i w_{ik} M_{ik} m_{pk} \sum_l \sum_j w_{jl} M_{jl} = \frac{2u(a', b')}{b'^2} \cdot Nm_p M_w \cdot NM_w \\
 &= \frac{2u(a', b')}{b'^2} \cdot N^2 m_p M_w
 \end{aligned}$$

第5項⑤は、

$$\begin{aligned}
 \textcircled{5} &= \frac{1}{b'^3} \langle (\delta b')^2 \rangle \cdot \left( \sum_k \sum_l \sum_i \sum_j w_{ik} w_{jl} M_{ik} M_{jl} d_{jl} m_{pl} + \sum_k \sum_l \sum_i \sum_j w_{ik} w_{jl} M_{ik} M_{jl} d_{ik} m_{pk} \right) \\
 &= \frac{2u^2(b')}{b'^2} \cdot \sum_k \sum_i w_{ik} M_{ik} \sum_l m_{pl} \sum_j w_{jl} M_{jl} \frac{d_{jl}}{b'} = \frac{2u^2(b')}{b'^2} \cdot NM_w \cdot Nm_p M_d \\
 &= \frac{2u^2(b')}{b'^2} \cdot N^2 M_w M_d m_p
 \end{aligned}$$

第6項⑥は、

$$\begin{aligned}
 \textcircled{6} &= \frac{1}{b'^2} \langle (\delta b')^2 \rangle \cdot \left( \sum_k \sum_l \sum_i \sum_j w_{ik} w_{jl} M_{ik} M_{jl} m_{pk} m_{pl} \right) \\
 &= \frac{u^2(b')}{b'^2} \cdot \sum_k \sum_i w_{ik} M_{ik} m_{pk} \cdot \sum_l \sum_j w_{jl} M_{jl} m_{pl} \\
 &= \frac{u^2(b')}{b'^2} \cdot \left( \sum_k m_{pk} \sum_i w_{ik} M_{ik} \right)^2 = \frac{u^2(b')}{b'^2} \cdot N^2 m_p^2 M_w^2
 \end{aligned}$$

第7項⑦は、

$$\begin{aligned}
 \textcircled{7} &= \frac{1}{b'^4} \langle (\delta b')^2 \rangle \cdot \left( \sum_k \sum_l \sum_i \sum_j w_{ik} w_{jl} M_{ik} M_{jl} d_{ik} d_{jl} \right) \\
 &= \frac{u^2(b')}{b'^2} \cdot \sum_k \sum_i w_{ik} M_{ik} \frac{d_{ik}}{b'} \cdot \sum_l \sum_j w_{jl} M_{jl} \frac{d_{jl}}{b'} = \frac{u^2(b')}{b'^2} \cdot M_d^2
 \end{aligned}$$

第8項⑧は、

$$\textcircled{8} = \frac{1}{b'^2} \sum_k \sum_l \sum_i \sum_j w_{ik} w_{jl} M_{ik} M_{jl} \langle \delta d_{ik} \delta d_{jl} \rangle$$

$\delta d_{ik}$ は流速などの変動によりもたらされる。その主な原因はポンプヘッドでの温度変動である。ある溶出成分の時間 $t_i$ に相応する温度とピーク溶出時間に相応する温度とは微妙に異なるし、異なる測定間ではポンプ温度がずれているかもしれない。

溶出時間のポンプヘッド依存性が、

$$t = t_0 f(T) \quad (T \text{はポンプヘッド温度})$$

と与えられるとすると、

$$\delta t_{ik} = t_{ik} \left( \frac{\partial f}{\partial T} \right) \delta T$$

だから、

$$\begin{aligned} \langle \delta d_{ik} \delta d_{jl} \rangle &= \langle (\delta t_{ik} - \delta t_{pk}) (\delta t_{jl} - \delta t_{pl}) \rangle = \langle (t_{ik} - t_{pk}) (t_{jl} - t_{pl}) (\partial f / \partial T)^2 (\delta T)^2 \rangle \\ &= (t_{ik} - t_{pk}) (t_{jl} - t_{pl}) (\partial f / \partial T)^2 \langle (\delta T)^2 \rangle = d_{ik} d_{jl} (\partial f / \partial T)^2 u^2(T) \end{aligned}$$

ここで  $u^2(T)$  はポンプヘッドでのランダムな温度変動を表す標準偏差である。こうして第8項⑧は、

$$\begin{aligned} \textcircled{8} &= \frac{1}{b^2} \sum_k \sum_l \sum_i \sum_j w_{ik} w_{jl} M_{ik} M_{jl} \langle \delta d_{ik} \delta d_{jl} \rangle \\ &= \frac{1}{b^2} \sum_k \sum_l \sum_i \sum_j w_{ik} w_{jl} M_{ik} M_{jl} d_{ik} d_{jl} (\partial f / \partial T)^2 u^2(T) \\ &= (\partial f / \partial T)^2 u^2(T) \cdot \sum_k \sum_i w_{ik} M_{ik} \frac{d_{ik}}{b'} \cdot \sum_l \sum_j w_{jl} M_{jl} \frac{d_{jl}}{b'} \\ &= (\partial f / \partial T)^2 u^2(T) N^2 M_d^2 \end{aligned}$$

となる。

ちなみに、第8項を実験的に評価するためには関数  $f$  の温度依存性と  $u^2(T)$  を知る必要がある。以下、具体的に見積もってみる。

関数  $f$  は溶離液の体積膨張率  $\alpha_p$  を用いて、小さな温度変動については

$$f = 1 + \alpha_p \Delta T$$

とおける。これは実験的に確かめられている。THFの場合は

$$\alpha_p = 0.001145 (K^{-1})$$

である。ポンプヘッドの温度変動  $u(T)$  と  $0.5^\circ C$  とする。

このような状況では、

$$(\partial f / \partial T) u(T) = \alpha_p u(T) = 0.001145 \times 0.5 = 5 \times 10^{-4}$$

あるいは、

$$(\partial f / \partial T)^2 u^2(T) = 3 \times 10^{-7}$$

となる。

以上、各項についての考察をもとにすると  $u_M(M_w)$  は次式のように与えられる：

$$\begin{aligned} \frac{u_M^2(M_w)}{(\text{Ln}10/N)^2} &= \frac{u^2(t_p)}{b^2} N M_w^2 + \frac{u^2(a')}{b^2} \cdot (N M_w)^2 + \frac{2u(a', b')}{b^2} \cdot N^2 M_d M_w + \\ &+ \frac{2u(a', b')}{b^2} \cdot N^2 M_w \text{Log} M_p + \frac{2u^2(b')}{b^2} \cdot N^2 M_w M_d \text{Log} M_p + \\ &+ \frac{u^2(b')}{b^2} \cdot N^2 (\text{Log} M_p)^2 M_w^2 + \frac{u^2(b')}{b^2} \cdot M_d^2 + \\ &+ (\partial f / \partial T)^2 u^2(T) N^2 M_d^2 \end{aligned}$$

これらを不確かさ要因ごとにまとめると、

$$\frac{u_M^2(M_w)}{M_w^2} = \frac{u^2(t_p)}{M_p^2} + \frac{u^2_{cal}(M_p)}{M_p^2} + \frac{u^2_{cal}(M_w)}{M_w^2} + \frac{u^2_d(M_w)}{M_w^2}$$

ただし、

$$\frac{u^2(t_p)}{M_p^2} = \frac{(\text{Ln}10)^2}{b^2} \cdot \frac{1}{N} u^2(t_p)$$

$$\frac{u^2_{cal}(M_p)}{M_p^2} = \frac{(\text{Ln}10)^2}{b'^2} \{u^2(a') + 2\text{Log} M_p u(a', b') + (\text{Log} M_p)^2 u^2(b')\}$$

$$\frac{u^2_{cal}(M_w)}{M_w^2} = \frac{(\text{Ln}10)^2}{b'^2} A \cdot [2u(a', b') + 2\text{Log} M_p \cdot u^2(b') + A \cdot u^2(b')]$$

$$\frac{u^2_d(M_w)}{M_w^2} \approx (\text{Ln}10)^2 \left(\frac{M_d}{M_w}\right)^2 \cdot \left(\frac{\partial f}{\partial T}\right)^2 u^2(T)$$

最後の項はクロマトグラムの形が変動することによる寄与である。ただし、最後の項については実際の認証時は次の式を使った：

$$\frac{u^2_d(M_w)}{M_w^2} \approx (\text{Ln}10)^2 \left(\frac{M_d}{M_w}\right)^2 \cdot 10 \cdot \frac{u^2(t_p)}{t_p^2}$$

ここで、

$$A \equiv \frac{M_d}{M_w} = \frac{1}{M_w} \sum_i w_i M_i \frac{d_i}{b'}$$

$d_i$ はピーク溶出時間 $t_{pk}$ と溶出時間 $i$ との差である：

$$d_i \equiv t_i - t_p$$

クロマトグラムの平行移動だけを前提としているので成分 $i$ の $d_i$ は変動しないと考える（ $k$ に依存しない）。次式で定義される $M_d$ は特定の（ $k$ 番目の）クロマトについて計算されればよい：

$$M_d \equiv \sum_i w_i M_i \frac{d_i}{b'}$$

ここで $M_d$ は分子量の次元はもつが負にもなり得る量である。従って、 $u^2_{cal}(M_w)$ も負数になり得る。

以上の議論では校正曲線作成用に用いた標準物質（均一ポリスチレンなど）の特性値の不確かさを考慮していない。この不確かさはタイプBの不確かさとして $M_w$ の不確かさに入ってくる。その相対不確かさを $\mu$ とすると、 $M_w$ の標準不確かさは結局7つの相対標準不確かさの総和として求められる：

$$\begin{aligned} \frac{u^2(M_w)}{M_w^2} &= \frac{u^2_w(M_w)}{M_w^2} + \frac{u^2_M(M_w)}{M_w^2} \\ &= \mu^2 + \left[ \frac{u^2_H(M_w)}{NM_w^2} + \frac{u^2_d(M_w)}{NM_w^2} \right] + \\ &\quad + \left[ \frac{u^2_i(M_p)}{M_p^2} + \frac{u^2_{cal}(M_p)}{M_p^2} + \frac{u^2_{cal}(M_w)}{M_w^2} + \frac{u^2_d(M_w)}{M_w^2} \right] \end{aligned}$$