ノート

60 MHz 卓上 NMR 装置を用いる有機化合物の純度測定を検討

山崎 太一^{*1}, 宮脇 俊文², 杉原 万理², 沼田 雅彦¹

1 緒言

核磁気共鳴 (NMR) 法は、有機化学において主に分子構造解析などの目的に用いられてきた。NMR 法による構造解析では、検出されるシグナルの化学シフト値、カップリングや分子内積分比などの情報から分子構造を推定することができるため、定性分析においてきわめて有用性が高い。また、NMR 法ではシグナル面積が測定対象物質の吸光度などの物性に影響されず、実質的に原子核の物質質量にのみ比例するため、測定対象物質と異なる化学種の標準物質を基準として定量を行うことが可能である。このことから、近年 NMR 装置を用いた高精度な定量分析についての検討が進められ、測定条件を定量分析用に最適化することで、正確な定量結果が得られる分析例が報告されている^{1)~6)}。また、食品添加物の定量用標準物質の純度決定に適用されるなど公定法への利用^{7)~9)}が進み、NMR 法を用いた定量分析が一般分析法として、普及し始めている。

また、ごく最近には、永久磁石を用いた NMR 装置も開発され、簡易的な定性分析等について報告されている¹⁰⁾。高分解能の NMR 装置は超電導磁石を用いるために液体ヘリウムや広大な設置スペースが必要であり、維持管理にコストがかかることが一般的であった。永久磁石を用いた卓上 NMR 装置は、低分解能ではあるが、冷媒を必要としないため、ランニングコストを抑えた簡易分析用の卓上 NMR 装置として注目を集めている。

本研究では、永久磁石を用いた卓上 NMR 装置による有機化合物 DSS-*d*₆ の定量分析について検討した。NMR 法を用いた定量分析では、分解能の低い装置ではシグナル間の分離の点で不利となると考えられるが、これまでのところ永久磁石を用いた卓上 NMR 装置による定量分析に関する報告例はない。そこで、手始めとして比較的、シグナル間隔の広い物質間で検討を行い、本装置を用いた場合の定量性を高分解能 NMR 装置と比較して評価するとともに、測

定の精度の要因についても検討した。

2 実験

2.1 装置・試薬及び器具

NMR 装置は卓上型の Pulsar (¹H 核の共鳴周波数: 60 MHz, Oxford Instruments 製, UK) 及び高分解能の VNS 600 (¹H 核の共鳴周波数: 600 MHz, Varian 製, US) を用いた。試料調製のための天秤には、ウルトラミクロ天秤 (UMX2, Mettler Toledo 製, Switzerland) を用いた。データ解析ソフトウェアには MestReNova Ver.9.0.1 (Mestrelab Research 製, US) を用いた。

測定対象物質には、認証標準物質の 3-(トリメチルシリル)-1-プロパン-1,1,2,2,3,3-*d*₆-スルホン酸ナトリウム (DSS-*d*₆, 和光 CRM, 純度: (0.923 ± 0.008) kg kg⁻¹, *k* = 2, 和光純薬工業製) を用い、内標準物質には認証標準物質であるフタル酸水素カリウム (PHP, NMIJ CRM 3001-b, 純度: (0.99991 ± 0.00014) kg kg⁻¹, *k* = 2, 計量標準総合センター製) を用いた。調製溶媒には重水 (D₂O, Deuterium oxide 99.8 atom %D, ACROS Organics 製, US) を用いた。

2.2 測定試料の調製

内標準物質として約 30 mg の PHP を 30 μL のアルミニウムパン (Perkin-Elmer Inc. 製, US) を用いて、精密に秤量し、スクリュバイアルに移した。次に測定対象物質として約 5 mg の DSS-*d*₆ をアルミニウムパンを用いて精密に秤量し、スクリュバイアルに移した。そこに 2 mL の D₂O を加えて、溶解した試料から 0.8 mL を NMR 管 (5 mmφ) に移し、これを測定試料とした。

2.4 NMR 測定と純度算出

本検討における測定パラメーターは、これまでに報告されている条件を参考に適宜、最適化して用いた¹¹⁾。各 NMR 装置における主な測定パラメーターを Table 1 に示す。データ解析では測定で得られた自由誘導減衰 (FID) をフーリエ変換し、得られたスペクトルを位相補正後、積分、ベースライン補正することで各シグナルの面積値を得た。また、積分操作では ¹³C サテライトシグナルを基準として、外側 30 Hz までを積分範囲として統一して解析した¹²⁾。こ

* E-mail: t-yamazaki@aist.go.jp

¹ 独立行政法人産業技術総合研究所計測標準研究部門: 305-8563 茨城県つくば市梅園 1-1-1 つくば中央第 3

² ジャスコインタナショナル株式会社第 2 事業部応用研究部応用研究課: 192-0046 東京都八王子市明神町 1-11-10

Table 1 Measurement conditions and process parameter for quantitative ^1H NMR

Parameter		Condition	
		60 MHz	600 MHz
NMR measurement	Spectrometer frequency of ^1H	60.35	599.90
	Pulse angle		90°
	Delay time		60 s
	Offset	5 ppm	5 ppm
	Spectrum width	133 ppm	100 ppm
	Digital filter		ON
	Acquisition time	4.1 s	4 s
	^{13}C decoupling	Off (can not to set)	Off
	Number of scan	32 or 128 times	32
	Dummy scan	1 time	2 times
	Temperature control	On (37°C)	On (23°C)
Data process	Phase collection	Manual	
	Integral range	^{13}C satellite + 30 Hz	
	Baseline collection	On	

こで、2本のシグナルが検出される PHP では、二つのシグナルの合計値を PHP のシグナル面積とした。また、最も外側の ^{13}C サテライトシグナルをそれぞれ基準点として、PHP の積分範囲を決定した。また、ベースライン補正では、積分範囲のすぐ外側にベースライン補正点を設定した。

純度は下記の式を用いて算出した。

$$P_{\text{DSS}} = \frac{A_{\text{DSS}}}{A_{\text{PHP}}} \frac{N_{\text{PHP}}}{N_{\text{DSS}}} \frac{M_{\text{DSS}}}{M_{\text{PHP}}} \frac{m_{\text{PHP}}}{m_{\text{DSS}}} P_{\text{PHP}}$$

ここで DSS- d_6 の純度 (kg kg^{-1}) を P_{DSS} 、DSS- d_6 、及び PHP のシグナル面積の測定値を A_{DSS} 、 A_{PHP} 、 ^1H 数を N_{DSS} (9)、 N_{PHP} (4)、分子量を M_{DSS} (224.3605)、 M_{PHP} (204.2206)、試料量 (mg) を m_{DSS} 、 m_{PHP} 、PHP の純度 (kg kg^{-1}) を P_{PHP} とした。

3 結果と考察

Table 1 の測定条件で測定した各 ^1H NMR スペクトルを Fig. 1 に示す。ここでは、分解能以外についてはなるべく同等の測定条件で比較するために、卓上 NMR 装置 (Pulsar)、高分解能 NMR 装置 (VNS600) それぞれの測定における積算回数を 32 回に統一した。また、本研究においては NMR を用いて、精確な定量分析が報告されている 1 % 程度の試料濃度で検討した。卓上 NMR 装置と高分解能 NMR 装置で得られた ^1H NMR スペクトルを比較すると、卓上 NMR 装置ではシグナルがブロードであり、その影響でシグナル強度も低下していた。DSS- d_6 のシグナルの半値幅 (FWHM) を測定すると、卓上 NMR 装置で約 0.6 Hz、600 MHz の NMR 装置で約 0.5 Hz であり、周波数単位では半値幅は同等となることから、ここでのシムは両装置で十分に最適化されており、定量性を分解能以外の要因

について十分に比較できる装置状態と考えられる。また、Pulsar ではノイズレベルも高く、シグナル強度の低い PHP シグナルの S/N 比は 600 MHz の NMR 装置で 10000 以上であったのに対して、卓上 NMR 装置では 200 程度であった。なお、卓上 NMR 装置で溶媒シグナルが高磁場にシフトしているのは、温度の影響である。温度の影響で化学シフトが変動するのは一般的で、測定温度を変化させることで分離やシグナル形状を改善できる場合があるが、卓上 NMR 装置では 37°C にのみ設定できる。このように分解能の影響で、低分解能装置は一般的に定量分析に不利であるが、Fig. 1 のようにシグナルの分離に問題がない物質に対しては定量分析が可能であると考えられる。

PHP を基準に DSS- d_6 の純度測定を行った結果を Table 2 に示す。ここでは、 S/N を考慮して、卓上 NMR 装置は 128 回、600 MHz の NMR 装置は 32 回の積算で測定を行った。各装置で得られた定量値は、認証値と不確かさの範囲でよく一致しており、分解能の低い卓上 NMR 装置でも正確な値が得られることが確認できた。一方で測定ばらつきは 1.1 % となり、600 MHz の NMR 装置と比較すると低い再現性を示した。これは、シグナルの S/N が低いことと、シグナル形状がブロードなために解析時の積分範囲やベースライン補正の設定によるばらつきが原因であると推定される。 S/N の影響は試料調製濃度や積算回数を上げることで改善できるものと期待されるが、その検討は今後の課題である。ここでは解析時のばらつきの程度を評価するために、積分範囲やベースライン補正の条件について検討した。まず、DSS- d_6 のシグナルの積分範囲を、シグナル中心を基準に 180 Hz (3.0 ppm)、240 Hz (4.0 ppm)、300 Hz (5.0 ppm) に変化させた場合の面積値の変化を評価した。その結果、積分範囲の増大に伴う面積値の正または負の変化は確認されなかったが、積分範囲を変えることで面積値のばらつきに対する相対標準偏差 (RSD) として 0.1 % ば

Fig. 1 ^1H NMR spectra of PHP and $\text{DSS-}d_6$ dissolved in a D_2O

The solid line shows ^1H NMR spectra by the benchtop NMR spectrometer, the dotted line shows ^1H NMR spectra by the 600 MHz NMR spectrometer.

Table 2 The results of purity determination of $\text{DSS-}d_6$

Resolution of magnet/MHz	Purity/%	FWHM/Hz	Integral range of $\text{DSS-}d_6$ /Hz
60	$92.0 \pm 1.1^{\text{a}}$	0.6	180 Hz (3 ppm)
600	$92.4 \pm 0.1^{\text{a}}$	0.5	180 Hz (0.3 ppm)
Certified value	$92.3 \pm 0.8^{\text{b}}$	—	—

a) Standard deviation (3 measurement), b) Expanded uncertainty [coverage factor (k) is 2].

らつくことが確認された。また、Table 2 ではベースライン補正点の間隔を積分範囲のすぐ外側に設定することで正確な値が得られたが、ベースライン補正点の間隔についても積分範囲と同様にシグナル中心を基準に 180 Hz (3.0 ppm), 240 Hz (4.0 ppm), 300 Hz (5.0 ppm) と変えた場合について検討した。ベースライン補正点の間隔が広がるにつれ、面積値は正に 0.8 % 程度ドリフトする傾向が確認された。これは、目視では確認できないが、シグナルの裾がブロードに広がっているために、ベースライン補正点の間隔を広げることで、シグナルの面積値が増大したと考えられる。

これらのことから、本検討における定量結果は、シグナルの S/N とブロード化の影響を大きく受けていると結論付けることができる。積分範囲によってバイアスが確認さ

れなかったことは、 S/N が低いために広範囲を積分した場合にもシグナルの裾がノイズに埋もれ、面積値への寄与が少ないためと考えられる。一方でブロードなシグナルであるために、面積値のバイアスを無視するためのベースライン補正の影響は大きく、正しい補正点を設定することでより高精度な定量結果が得られると期待できる。そのため、卓上 NMR 装置でシグナル分離が可能な測定物質間では、測定精度がシグナルの S/N に大きく影響されたものの、定量分析ができた。

4 結 言

本研究では、分解能 60 MHz の卓上 NMR 装置を用いた有機化合物 $\text{DSS-}d_6$ の定量分析について検討し、その純度を約 1 % の再現性で測定することができた。本装置で得られた NMR シグナルのシグナル幅や S/N は 600 MHz の NMR 装置に比べて劣り、測定ばらつきも大きかったものの、両装置で得られた純度の値は、標準物質の認証値と不確かさの範囲で一致した。結果のばらつきにおける主な要因は解析条件の設定によるものと考えられ、測定時に S/N を向上させることで解析の影響を受けないシグナルを得られると考えられ、再現性の向上が可能になると期待できる。

文 献

- 1) T. Saito, S. Nakaie, M. Kinoshita, T. Ihara, S. Kinugasa, A. Nomura, T. Maeda : *Metrologia*, **41**, 213 (2004).
- 2) 齋藤 剛, 井原俊英, 佐藤浩志, JANCKE Harald, 衣笠晋一 : 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **52**, 1029 (2003).
- 3) T. Saito, T. Ihara, M. Koike, S. Kinugasa, Y. Fujimine, K. Nose, T. Hirai : *Accred Qual Assur*, **14**, 79 (2009).
- 4) A. Tada, K. Takahashi, K. Ishizuki, N. Sugimoto, T. Suematsu, K. Arifuku, M. Tahara, T. Akiyama, Y. Ito, T. Yamazaki, H. Akiyama, Y. Kawamura : *Chem. Pharm. Bull.*, **61**, 33 (2012).
- 5) M. Tahara, T. Suematsu, M. Hayakawa, Y. Goda, R. Konishi, N. Sugimoto : *Micotoxins*, **62**, 111 (2012).
- 6) M. Tahara, N. Sugimoto, T. Ohtsuki, A. Tada, H. Akiyama, Y. Goda, T. Nishimura : *J. Environ. Chem.*, **22**, 33 (2012).
- 7) 内閣府 : 食品衛生法施行規則及び乳及び乳製品に関する省令の一部を改正する命令, (府令・省令 : 内閣府・厚生労働 5 号), 食品, 添加物等の規格基準の一部を改正する件, (告示 : 厚生労働 307 号), (官報, 号外第 191 号), (平成 23 年 8 月 31 日).
- 8) J. Hosoe, N. Sugimoto, T. Suematsu, Y. Yamada, M. Hayakawa, Y. Katsuhara, H. Nishimura, Y. Goda : *PMDRS*, **43**, 182 (2012).
- 9) J. Hosoe, N. Sugimoto, Y. Goda : *PMDRS*, **41**, 960 (2010).
- 10) T. Parker, E. Limer, A. D. Watson, M. Defernez, D. Williamson, E. K. Kemsley : *Trends Anal. Chem.*, **48**, 96 (2014).
- 11) F. Malz, H. Jancke, J. Pharmaceut : *Biomed.*, **38**, 813 (2005).
- 12) 山崎太一, 齋藤 剛, 三浦 亨, 井原俊英 : 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **61**, 963 (2012).

Study of Purity Determination of Organic Compounds with 60 MHz Benchtop NMR

Taichi YAMAZAKI^{*1}, Toshifumi MIYAWAKI², Mari SUGIHARA² and Masahiko NUMATA¹

* E-mail : t-yamazaki@aist.go.jp

¹ National Metrology Institute of Japan (NMIJ), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-1-1, Umezono, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8563

² JASCO international co., ltd., 1-11-10, Myojin-cho, Hachioji-shi, Tokyo, 192-0046

(Received September 4, 2014; Accepted September 11, 2014)

Since quantitative values on the basis of a nucleus can be obtained by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, the quantitative NMR technique requires no identical standard. For this reason, it is expected to be a universal quantitative method. However, the quantification using an NMR requires a high resolution NMR spectrometer in NMR measurement. In this paper, we discuss the quantitative NMR method using a benchtop NMR spectrometer with a low magnetic field. We studied the conditions of NMR measurement and data process. The precision of the result was evaluated with approximately 1 % using a benchtop spectrometer. Especially, the low *S/N* and large FWHS of the NMR signals caused low repeatability.

Keywords: quantitative NMR; benchtop NMR; ¹H NMR.