

# 多核NMRの応用

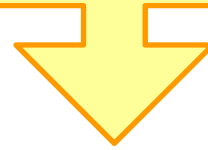
## ～<sup>19</sup>F NMRを用いた定量分析～

### 第1回定量NMRクラブ(2012/12/4)

産業技術総合研究所 計測標準研究部門  
有機分析科 バイオディカル標準研究室 山崎 太一

## 定量 $^{19}\text{F}$ NMR法の開発目的

フッ素化合物は生化学におけるスクリーニングや材料科学におけるポリマー分析等幅広く用いられている



**分子構造解析や酵素活性等の速度論解析に使用**  
 **$^{19}\text{F}$  NMRを用いた高精度な定量法開発は重要！**

- ・ $^1\text{H}$  NMRと同等の検出感度
- ・目的以外の成分にフッ素が含まれないことが多く、スペクトル上で他の成分の影響を受けにくい

# 発表内容

1.  $^{19}\text{F}$  NMRの特性
2. 定量分析法の検討
3. 標準物質を用いた分析法の評価
4. 解析法の最適化
5. まとめ

# 使用装置

測定装置 : Varian Inc.製 VNS 600A

磁石 : 14.1 T

$^1\text{H}$ 共鳴周波数: 600 MHz

検出器(プローブ): Dual broadband probe

測定核種 :  $^1\text{H}$ - $^{19}\text{F}$ / $^{15}\text{N}$ - $^{31}\text{P}$

温度可変 : -5~80 °C



# $^1\text{H}$ NMRと $^{19}\text{F}$ NMRの比較

	$^1\text{H}$	$^{19}\text{F}$
共鳴周波数	600 MHz	564.48 MHz
核スピン	1/2	1/2
天然存在比	99.98 %	100.00 %
測定範囲	20 ppm以下	200 ppm以上

$^{19}\text{F}$  NMRに $^1\text{H}$  NMRと類似かつ感度も良好→定量NMRとして有効

## $^{19}\text{F}$ を用いるメリット

- 天然存在比100 %で同位体の影響がない
- 溶媒の影響を受けにくい
- 測定範囲が広いため、シグナル分離が良好
- 多成分の一斉分析の可能性

# オフレゾナンス効果とは？

励起中心から遠い位置のシグナルほど  
シグナル強度が減衰する

～オフレゾナンス効果～

パルスは励起中心周波数付近ではほとんど励起できるが、  
励起中心から遠い位置(オフレゾナンス)では100 %励起されない

オフレゾナンス効果はNMR活性な全ての核種で確認できるが、  
 $^{19}\text{F}$  NMRのように測定範囲が広い核種では影響が顕著に現れる

# 測定・解析条件

## 測定条件

測定核	: 19 F
測定温度	: 25 °C
測定スペクトル幅	: <b>131578.9 Hz (233.1 ppm)</b>
取り込み時間	: <b>1 s</b>
遅延時間	: 60 s
パルス幅	: 14.4 μs
パルス角度	: 90°
積算回数	: 32

# 測定対象

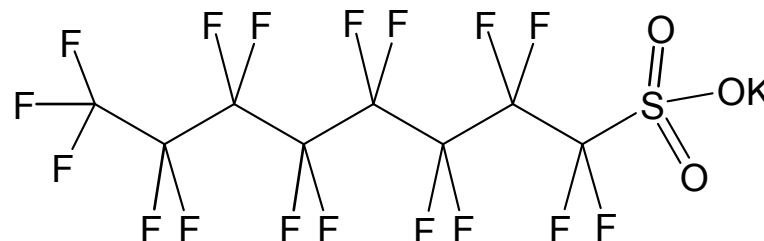
$^{19}\text{F}$  NMR測定における分子内積分比を比較し、測定法の確立を目指す

物質名：ペルフルオロオクタンスルホン酸カリウム (PFOS-K)

分子式： $\text{C}_8\text{F}_{17}\text{SO}_3\text{K}$

分子量：538.214

構造式：



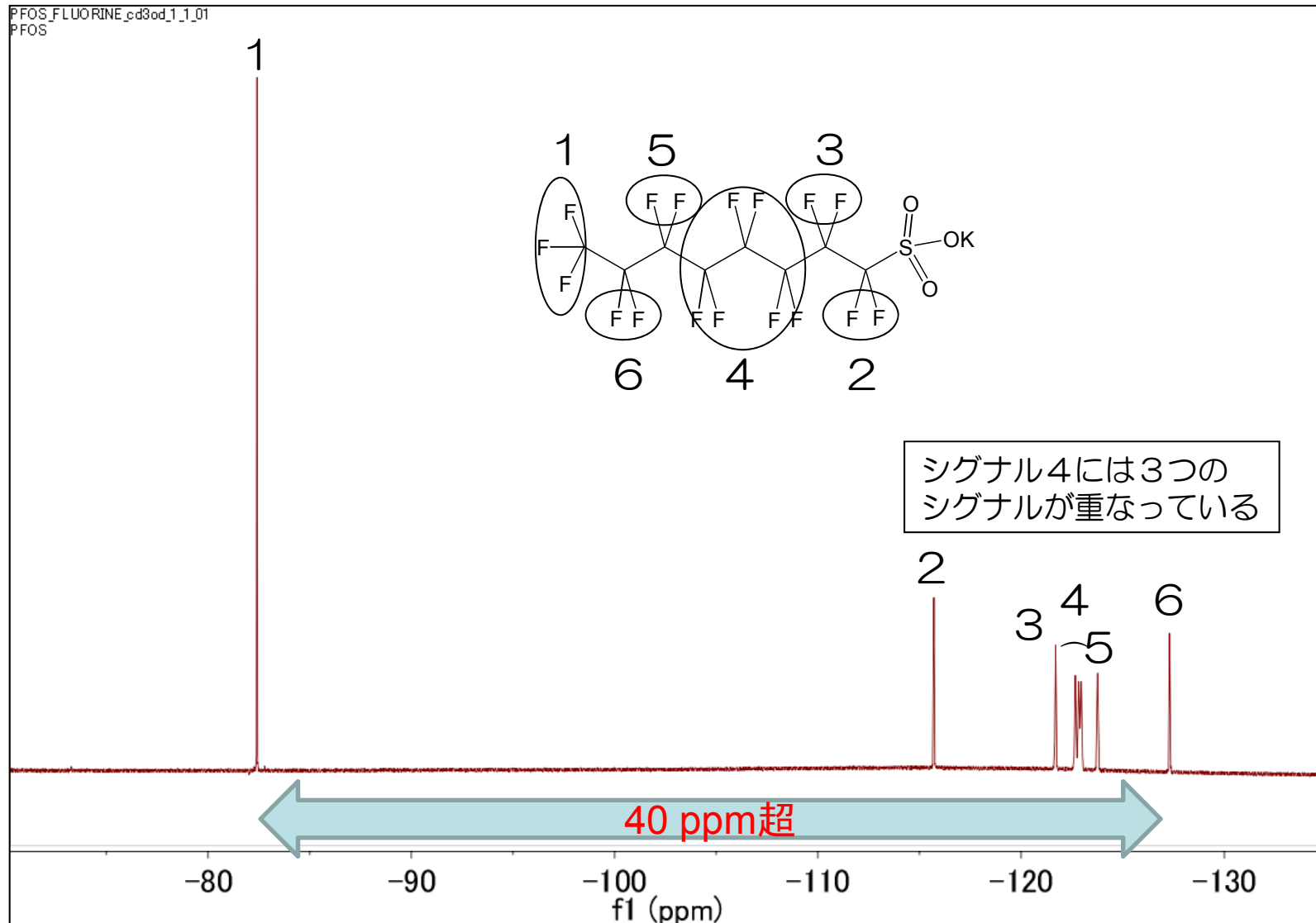
試料はNMIJ CRM 4220-aの原料(高純度品)に用いられたものを使用

分子内に類似した複数のFを有するため、  
 $^{19}\text{F}$  NMR測定のスグナル分離や積分比比較に適している

※2010度から特化物の対象に指定

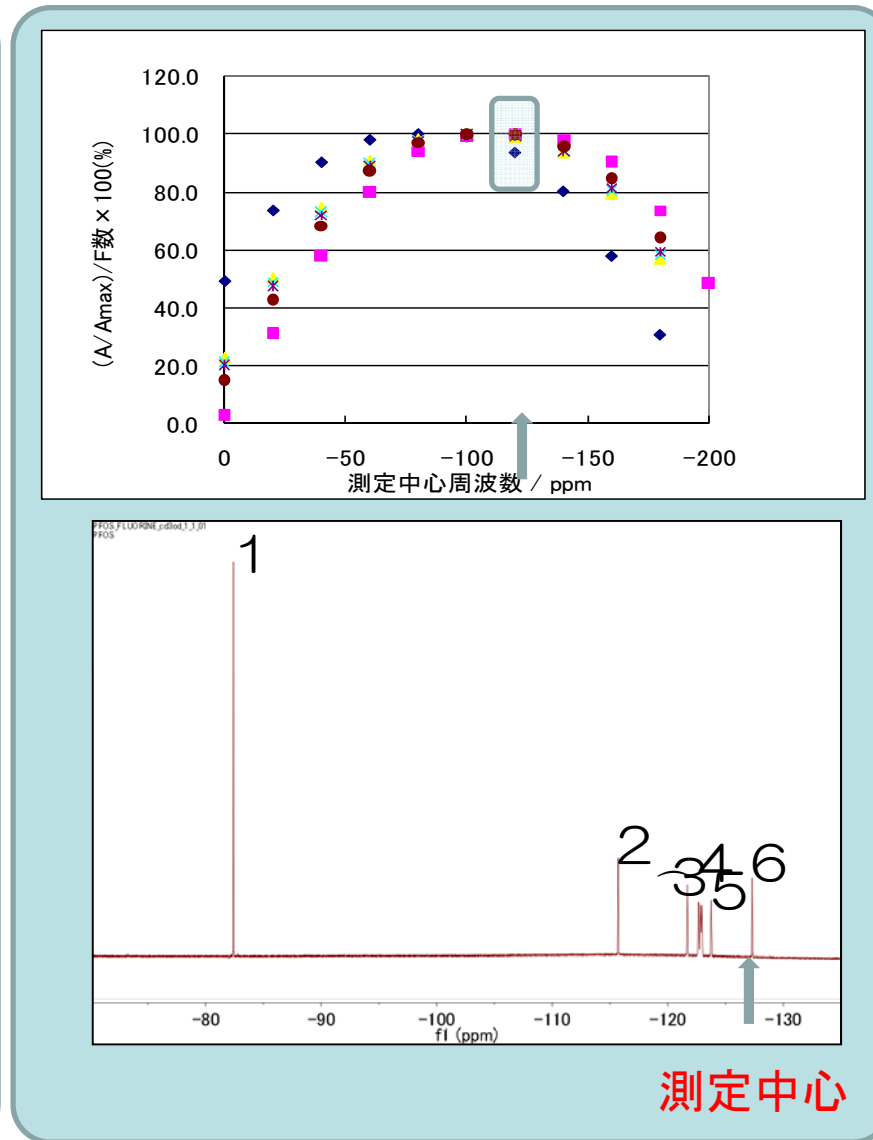
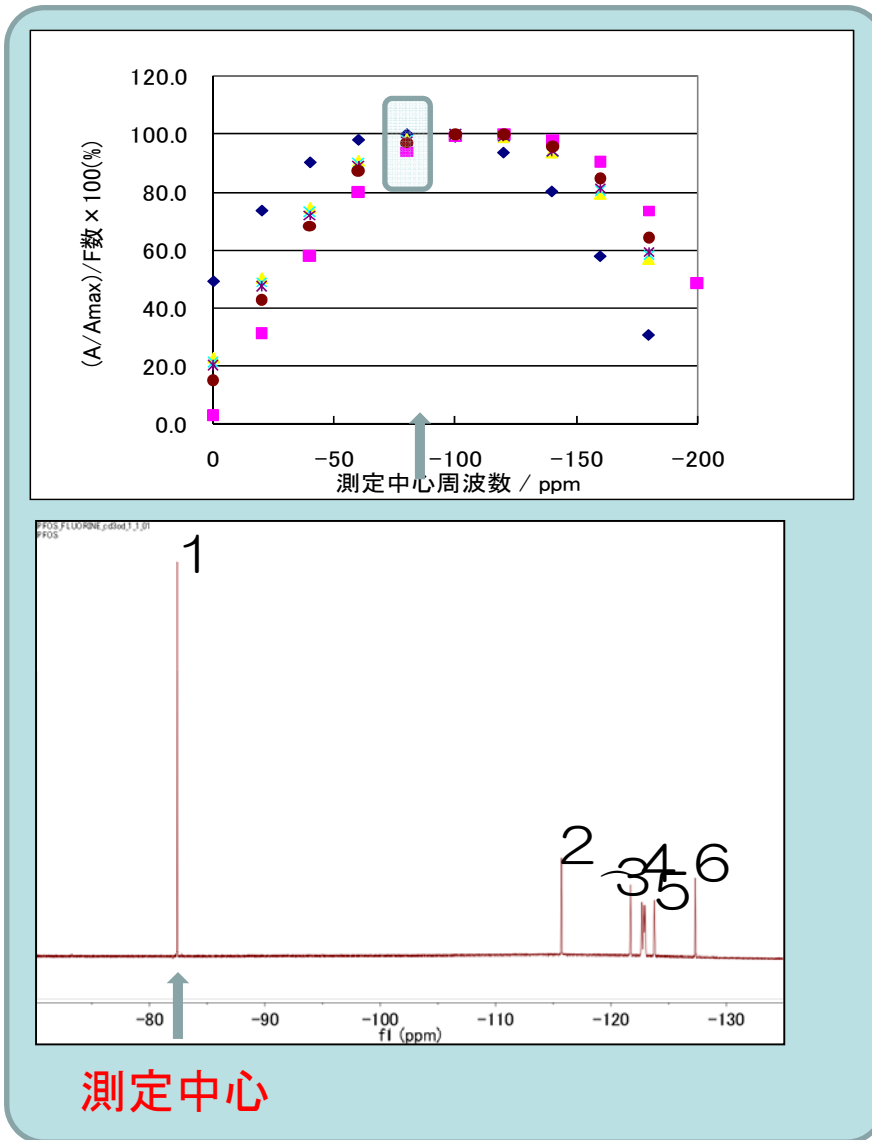


# $^{19}\text{F}$ NMRスペクトル(PFOS-K)

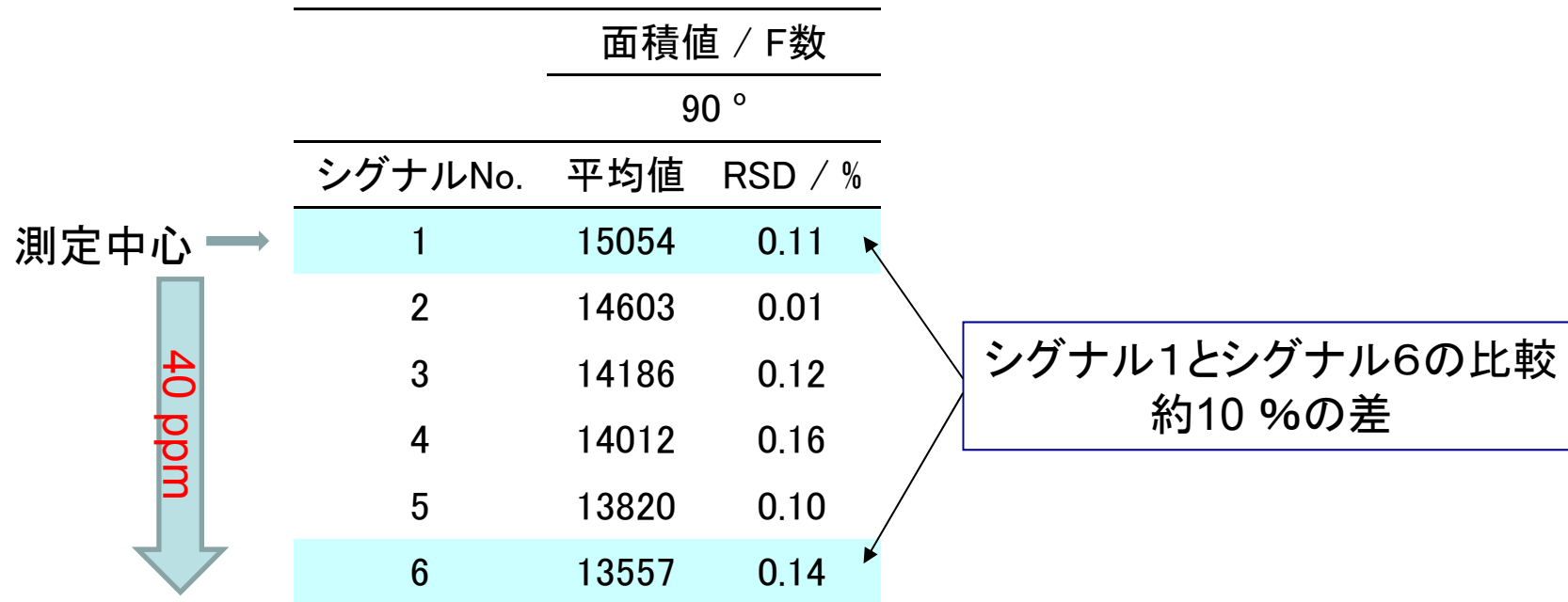




# $^{19}\text{F}$ NMRスペクトル(PFOS-K)



# シグナル強度と再現性へのオフレゾナンス効果の影響



## 結果

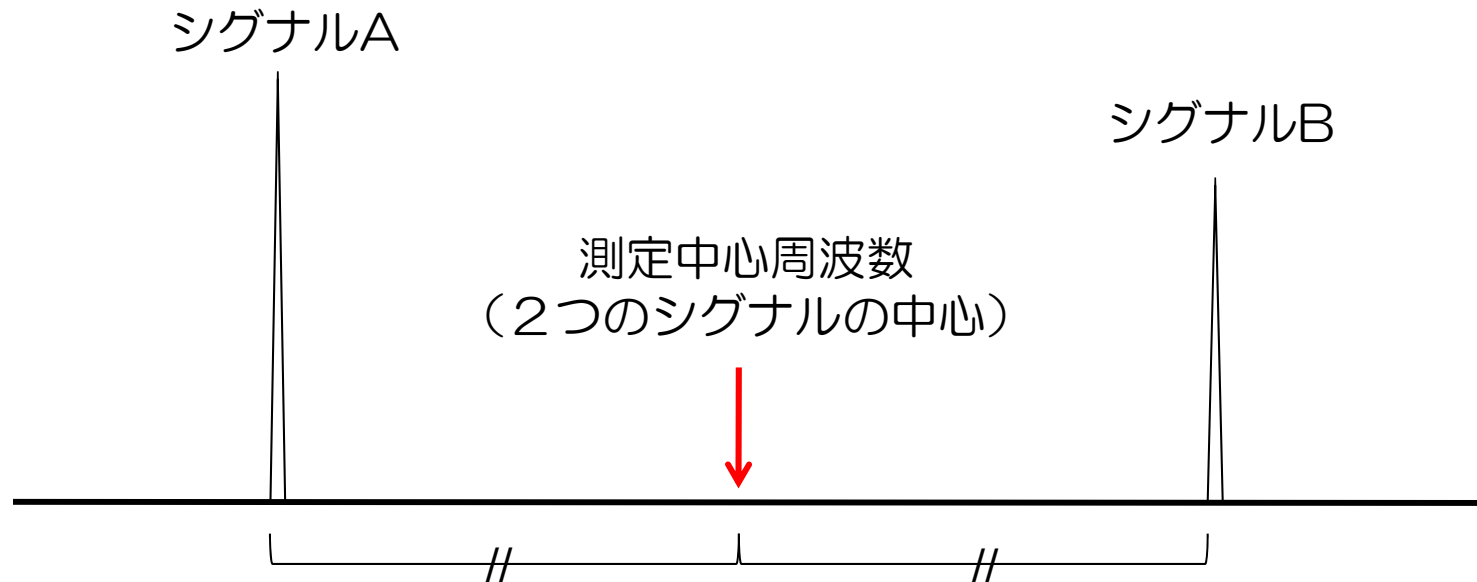
	面積値	再現性	分子内シグナル間差
90°	1	<0.2 %	<b>&lt;10 %</b>

パルス角90° の場合は  
面積強度・再現性は十分だが、  
分子内シグナル間差があるため  
定量には工夫が必要

# 発表内容

1.  $^{19}\text{F}$  NMRの特性
2. 定量分析法の検討
3. 標準物質を用いた分析法の評価
4. 解析法の最適化
5. まとめ

# 定量法案



シグナルAの信号強度とシグナルBの信号強度を比較

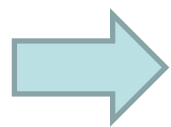
※中心周波数の設定に問題が無いことが条件となる

# 測定結果

PFOS-K

比較シグナル		90°			30°		
A	B	シグナルA の面積値	シグナルB の面積値	(A-B)/A × 100 (%)	シグナルA の面積値	シグナルB の面積値	(A-B)/A × 100 (%)
1	2	18251	18093	<b>0.86</b>	6826	6922	<b>1.40</b>
1	3	18147	17986	<b>0.88</b>	6811	6845	<b>0.50</b>
1	5	18126	18160	<b>0.19</b>	6816	6779	<b>0.55</b>
1	6	18064	18039	<b>0.14</b>	6761	6725	<b>0.53</b>
2	6	18230	18081	<b>0.81</b>	6680	6775	<b>1.42</b>

シグナル間の面積強度比を比較



90° : 約1 %  
30° : 約2 %

程度で測定することが出来た

# 結果

測定条件を適切に設定することでオフレゾナンス効果を低減することができた

90° パルス照射のほうが30° パルスと比較するとより再現性が高い結果が得られた



S/Nの影響と考えられ、高精度かつ短い測定時間で分析するためには90° パルスのほうが有効と考えられる



# 発表内容

1.  $^{19}\text{F}$  NMRの特性
2. 定量分析法の検討
3. 標準物質を用いた分析法評価
4. 解析法の最適化
5. まとめ

# 分子間純度測定(内標準法)

$^{19}\text{F}$  NMRの特性を考慮し、提案した定量法を  
分子間測定へと応用し、測定法の有効性を検証

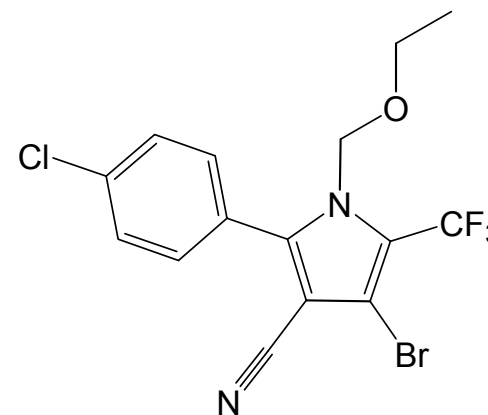
～検討方法～

標準物質間で比較(一方を基準物質、他方を測定対象)  
することで、定量法の妥当性評価を行った

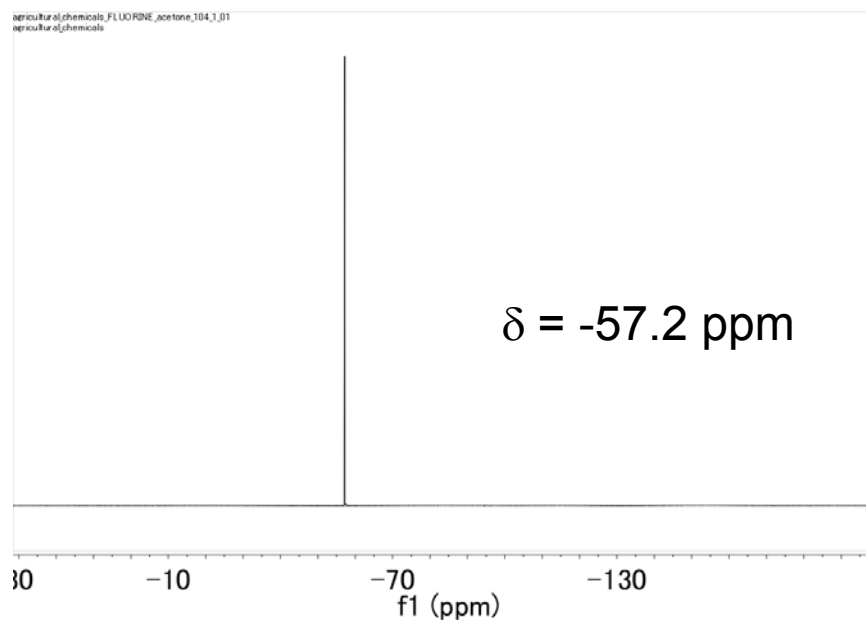
観測されるケミカルシフトの近い物質・遠い物質でそれぞれ  
検討し、幅広い環境に適応できる定量法・解析法を検討

# 基準物質

物質名 : クロルフェナピル  
CAS No. : 122453-73-0  
純度 :  $0.996 \pm 0.005$  g/g ( $k = 2$ )

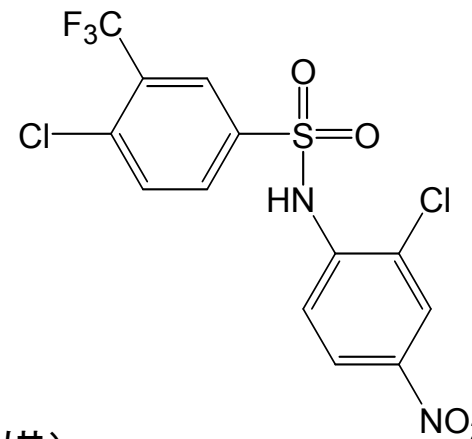


<sup>19</sup>F NMRスペクトル(アセトン溶媒)

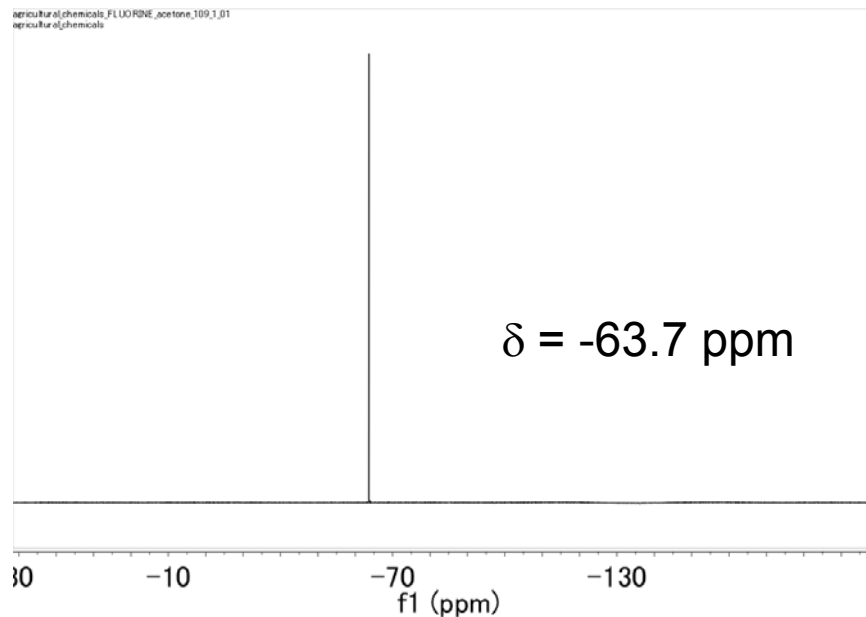


# 測定対象1

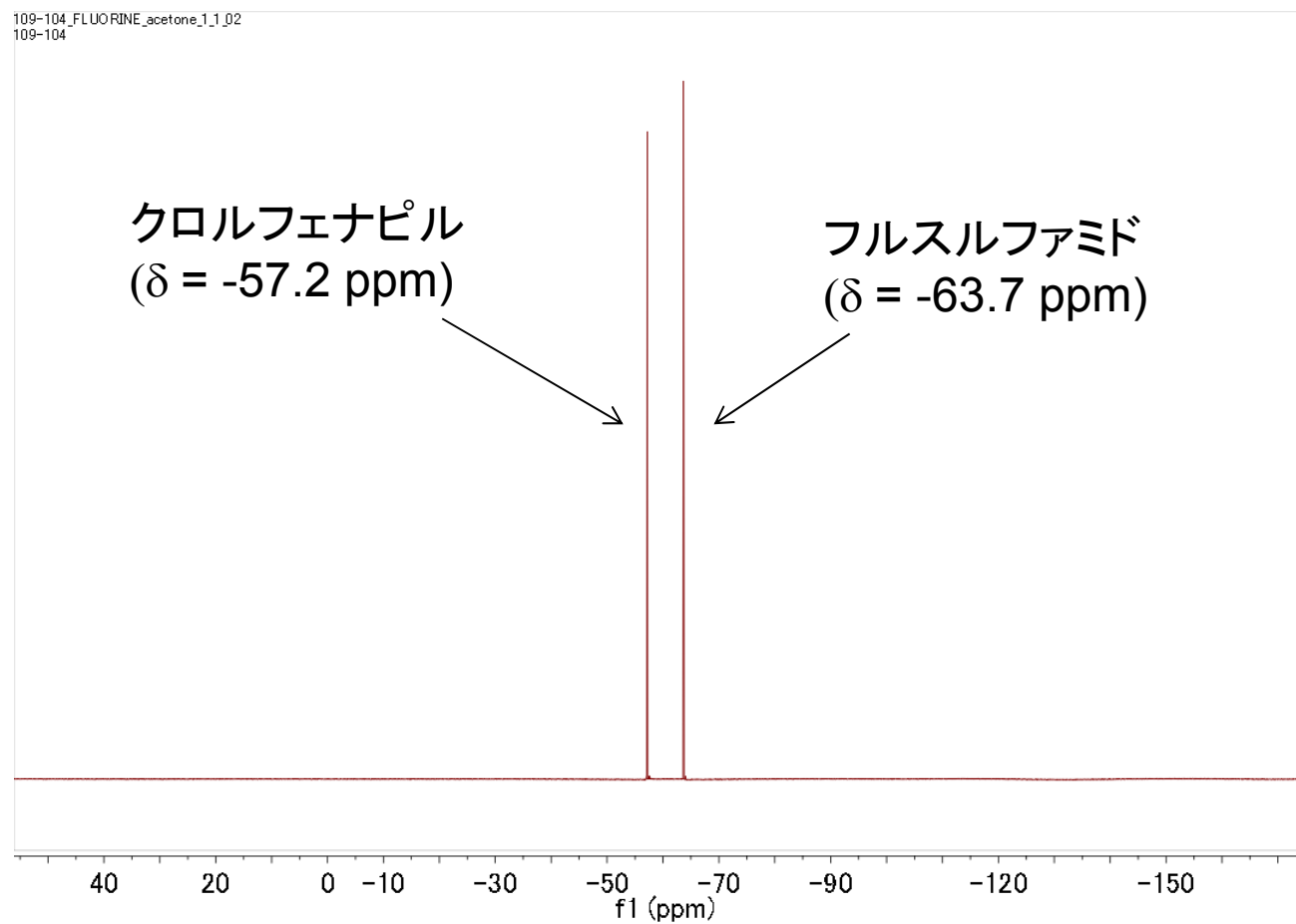
物質名 : フルスルファミド  
CAS No. : 106917-52-6  
純度 :  $0.995 \pm 0.006$  g/g ( $k = 2$ )



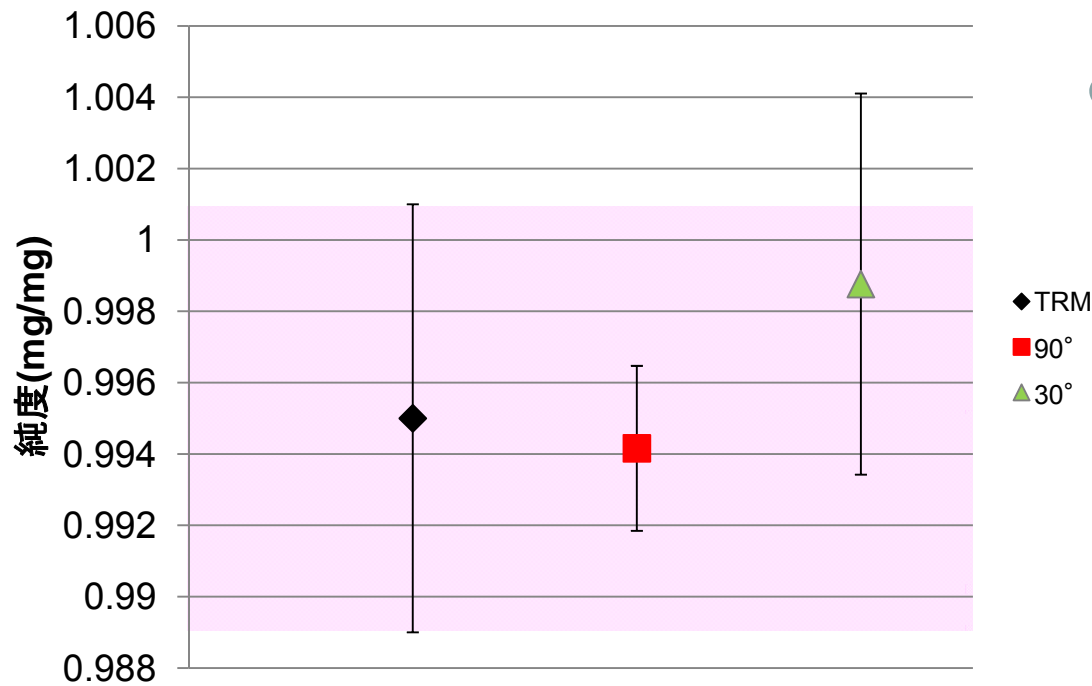
$^{19}\text{F}$  NMRスペクトル(アセトン溶媒)



# $^{19}\text{F}$ NMRスペクトル



# 定量結果



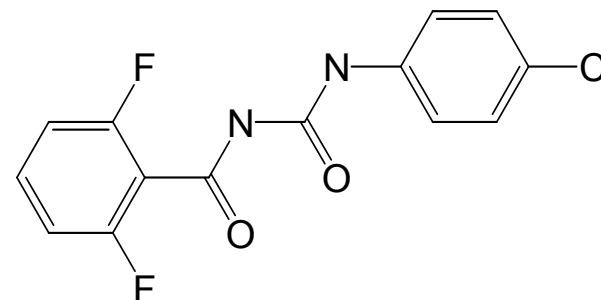
中心値で約0.4 %程度の差

標準物質の純度範囲( $k = 2$ )

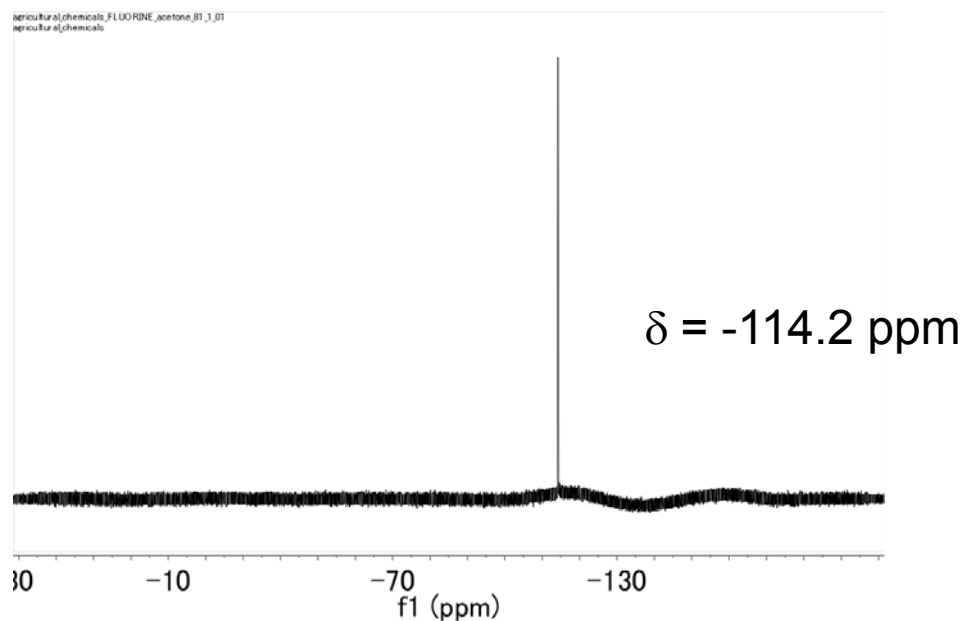
標準物質の不確かさの範囲内で定量値が一致

## 測定対象2

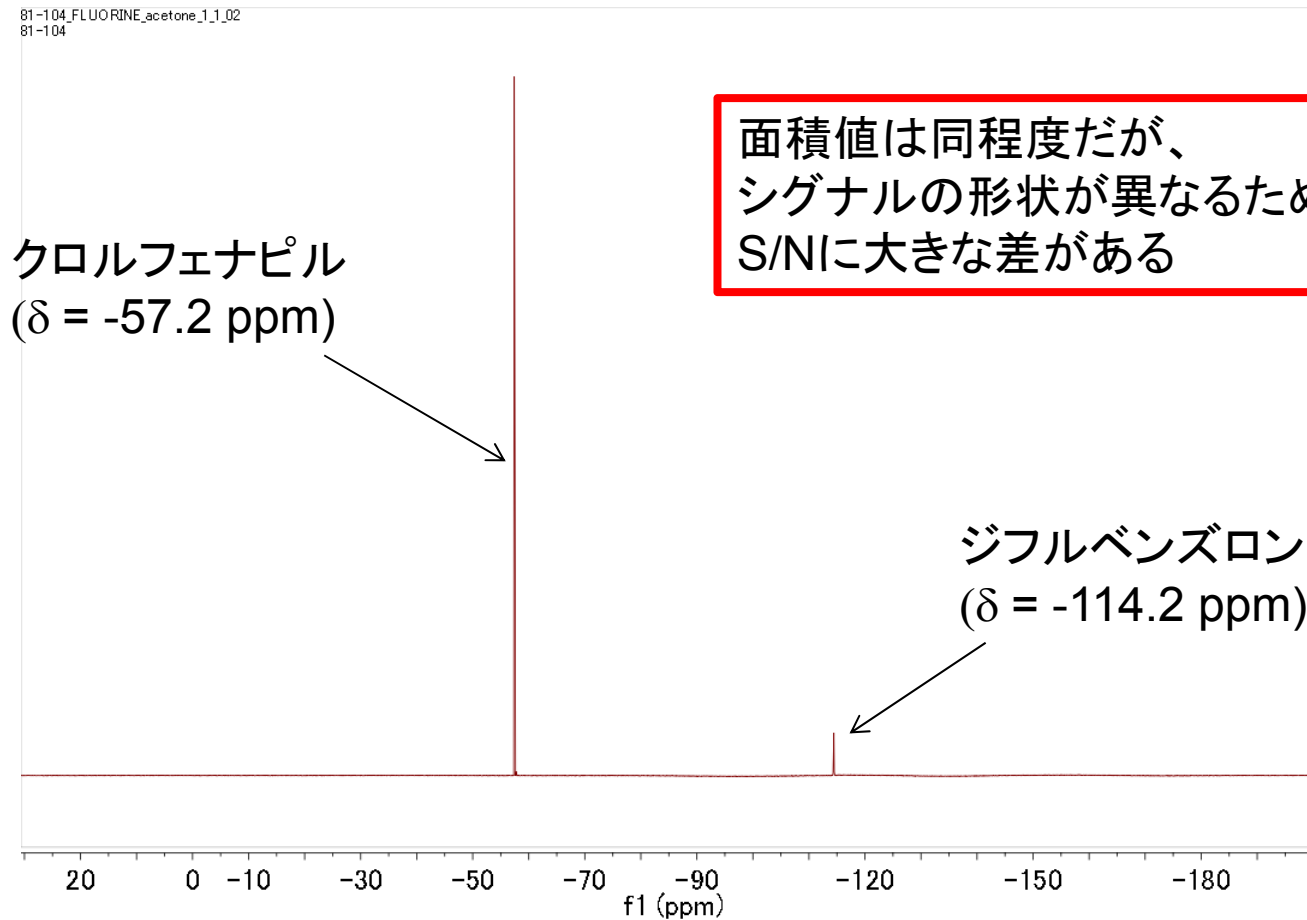
物質名 : ジフルベンズロン  
CAS No. : 35367-38-5  
純度 :  $0.998 \pm 0.008$  g/g ( $k = 2$ )



$^{19}\text{F}$  NMRスペクトル(アセトン溶媒)

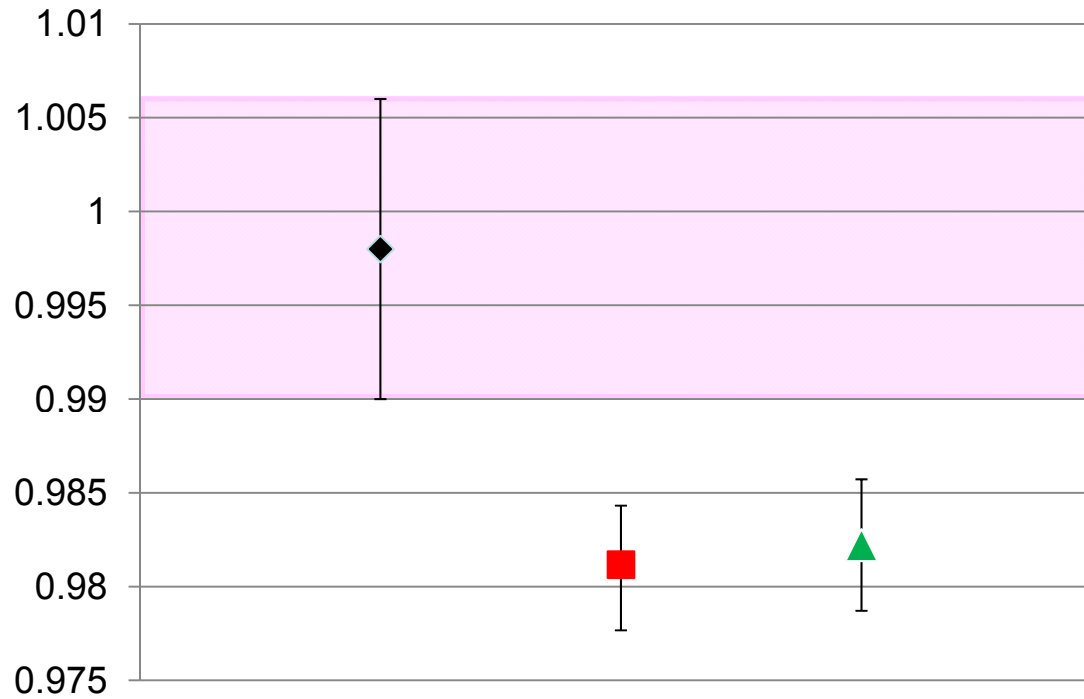


# $^{19}\text{F}$ NMRスペクトル





# 定量結果



中心値で約2%程度の差

◆ TRM  
■ 90°  
▲ 30°

標準物質の純度範囲( $k = 2$ )

標準物質の認証純度と比較して大きな差が確認

S/N、ベースライン(補正)、半値幅、積分区間などいくつかの要因が懸念

# 発表内容

1.  $^{19}\text{F}$  NMRの特性
2. 定量分析法の検討
3. 標準物質を用いた分析法の評価
4. 解析法の最適化
5. まとめ

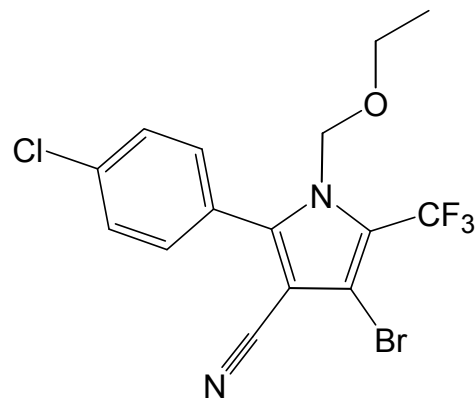
# 解析法の最適化

$^{19}\text{F}$  NMRでは $^1\text{H}$  NMRと比較して半値幅の大きなシグナルが観測されることがある

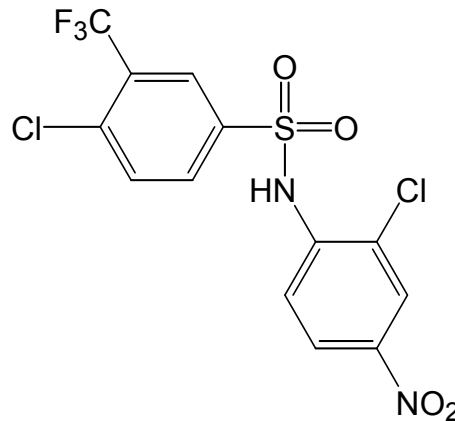
$^{19}\text{F}$  NMRでは測定のスเปクトル幅は広く、広い積分範囲ではベースラインの影響を受ける

$^1\text{H}$  NMRにおける定量分析は十分広い積分範囲を設定し、精確に定量できるが、 $^{19}\text{F}$  NMRではシグナルごとの最適化が必要 ⇒ **固定範囲ではなく半値幅を基準？**

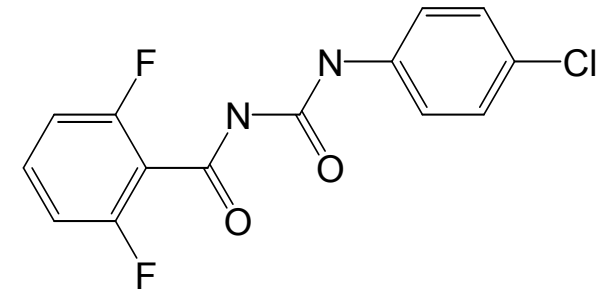
# 測定対象物質



クロルフェナピル(IS)



フルスルファミド



ジフルベンズロン

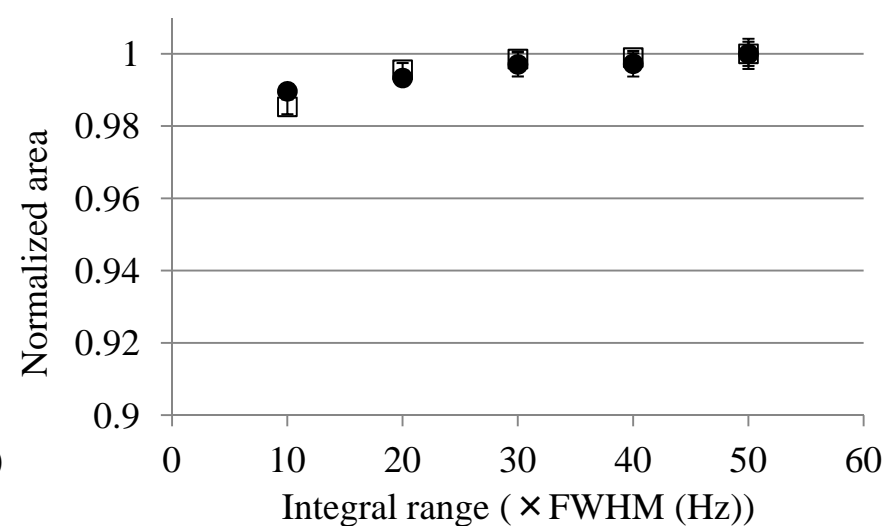
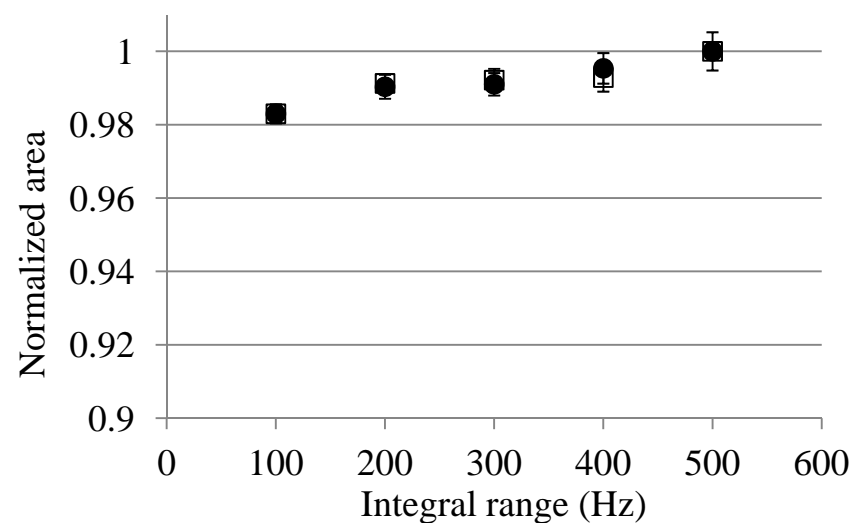
IS : Chlorfenapyl (0.996 kg/kg ± 0.005 kg/kg, 半値幅: **2 Hz**)

Analyte A: Flusulfamid (0.995kg/kg ± 0.006 kg/kg, 半値幅: **2 Hz**)

Analyte B: Diflubenzurone (0.998 kg/kg ± 0.008 kg/kg, 半値幅: **27 Hz**)

# フルスルファミド

クロルフェナピル(□)/フルスルファミド(●)



積分範囲の拡大とともに規格化面積値も増加

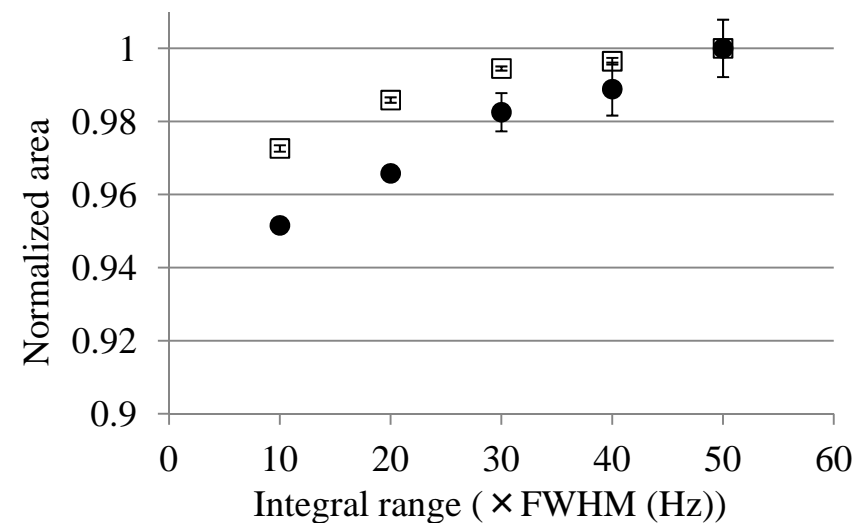
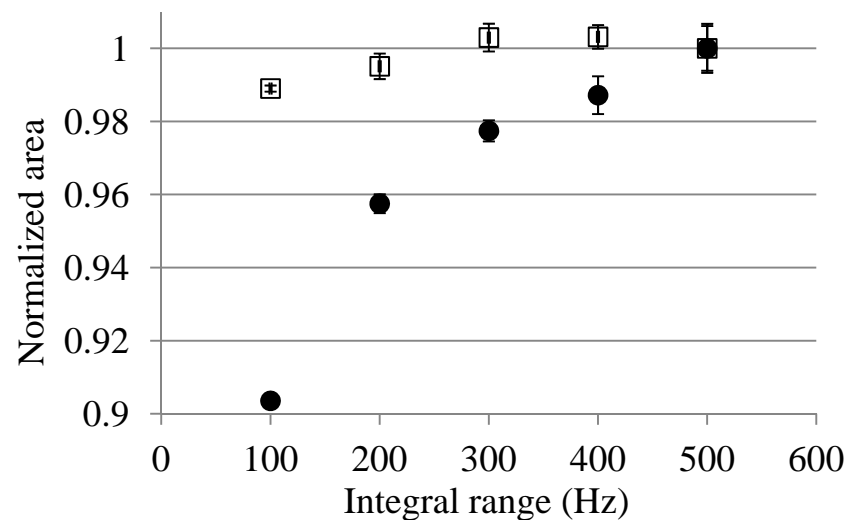


内標準と測定試料の面積変動が同等！

測定結果(純度値)は変わらない

# ジフルベンズロン

クロルフェナピル□) / ジフルベンズロン(●)



積分範囲の拡大とともに規格化面積値も増加



内標準と測定試料の面積変動が異なる！

測定結果(純度値)に影響

# 最適化後の定量結果

integral range	flusulfamide		diflubenzurone	
	purity	SD	purity	SD
reference value	0.995	0.006	0.998	0.008
100 Hz	<b>0.995</b>	<b>0.002</b>	0.897	0.002
200 Hz	<b>0.996</b>	<b>0.002</b>	0.944	0.004
300 Hz	<b>0.996</b>	<b>0.000</b>	0.956	0.006
400 Hz	<b>0.992</b>	<b>0.005</b>	0.966	0.003
500 Hz	<b>0.995</b>	<b>0.007</b>	0.981	0.011
10 times to FWHM	0.988	0.001	0.986	0.001
20 times to FWHM	<b>0.995</b>	<b>0.000</b>	0.987	0.001
30 times to FWHM	<b>0.994</b>	<b>0.002</b>	<b>0.996</b>	<b>0.005</b>
40 times to FWHM	<b>0.994</b>	<b>0.002</b>	<b>1.000</b>	<b>0.008</b>
50 times to FWHM	<b>0.992</b>	<b>0.006</b>	1.008	0.007

半値幅に差がない場合 ⇒ 積分方法の影響は小さい

半値幅に差がある場合 ⇒ 積分方法の影響は大きい

**半値幅の30~40倍で積分すると妥当な値が得られた**

## まとめ

- $^{19}\text{F}$  NMRでは測定周波数範囲が広く、オフレゾナンス効果の影響を大きく受けるために影響を低減可能な測定法が必要
- $^1\text{H}$  NMRと比較してブロードなシグナルもあり、半値幅に対応した解析方法が有効
- 測定法及び解析法を最適化することで、0.5 %程度の精度で測定が可能



## 今後の課題

- ふっ素含有の様々な化合物の定量を試み、  
本法の妥当性を検証する
- $^{19}\text{F}$  NMR用の内標準物質の開発
- 溶液中の成分定量への応用
- オフレゾナンス効果を低減させる工夫

ご静聴ありがとうございました