

定量 NMR 用標準物質開発のための 高精度純度評価法に関する研究

独立行政法人産業技術総合研究所 計測標準研究部門 山崎 太一

1. 背景及び目的

核磁気共鳴(NMR)を用いた定量分析(以下、定量NMR)はNMR 活性な原子を基準にして定量する分析法で、非破壊的かつ分子構造に依存しない分析が可能であることから、近年、測定対象そのものの標準物質を必要としない定量分析法として注目されている。実際に当研究所では、標準物質の純度測定における定量NMR を軸とした校正サービスを実施し、校正結果のトレーサビリティを確保している。民間企業においても、定量NMR を用いた校正サービスや依頼分析による純度評価等が開始されていて、定量NMR の重要性が高まってきている。一方で、定量NMR に用いる基準物質は市販の標準物質は頒布されているものの、定量NMR のための国家標準は全く整備されておらず、分析者自身が独自評価した基準を用いている場合もある。1つの標準物質で複数の測定対象を定量できる反面、用いる標準物質には精確な値が付与されていることが非常に重要となる。しかし、現在、市販されている定量NMR 用標準物質は付与された不確かさも大きいために、厳密な評価が必要な分析には、より高精度な標準物質が必要である。そのため、本研究では定量NMR 用の国家標準を整備するために、標準物質として有用な物質を探索するとともに国家標準物質開発のための純度測定法について検討し、SI 単位へのトレーサビリティを確保した高精度な国家標準の開発に繋げることを目的とした。

2. 実験方法

まず、既存の定量NMR 用標準物質を参考にして、定量NMR として適切な基準物質を探索し、その物性を評価した。物性評価では溶解性、NMR スペクトル、吸湿性、揮発性について検討した。溶解性の評価では、 D_2O 、ジメチルスルホキシド- d_6 、メタノール- d_4 、アセトニトリル- d_3 、クロロホルム- d 、ジクロロメタン- d_2 、アセトン- d_6 、0.1M NaOD/ D_2O 、ベンゼン- d_6 、トルエン- d_8 への溶解性を確認した。NMR スペクトルでは、検出される化学シフト値とシグナル形状について確認した。吸湿性及び揮発性については、試料秤量中における質量変動の確認に加えて、熱重量分析装置(Q5000SA)を用いた湿度コントロール下での質量変動も評価した。

また、標準物質開発を目指し、選定した基準物質の高精度な純度評価を検討した。本研究では特に有用性の高いと期待できた3,5-ビストリフルオロメチル安息香酸につ

いて純度測定を行った。純度測定法としては、一次標準測定法である滴定法、凝固点降下法に加えて有機不純物、残留溶媒、水分、強熱残分等の不純物評価による差数法について高精度な評価が可能かについて検討した。さらに、選定した基準物質を用いて認証値の付与された標準物質を分析することで有用性を評価した。本研究では3,5-ビス(トリフルオロメチル)安息香酸を内標準物質として用いて、和光純薬製の標準物質であるクロルフェナピル及びジフルベンズロンについて¹H NMR及び¹⁹F NMRを用いた定量分析を行った。

3. 結果と考察

物質の探索では市販される定量NMR用標準物質の14物質に加え、国家計量標準機関(NMI)から供給される認証標準物質(CRM)で定量NMRに用いた例が報告されている物質について調査し、一部の物質については実験による確認を行った。

現在、市販されている定量NMR用標準物質は正確な試料調製のためにすべての標準物質が常温で固体であり、NMRスペクトル上では1つのシグナルのみが検出される非常に単純なスペクトルが得られる対象が販売されている。一方で、小さな分子量の化合物は融点が低く、液体として存在することから対称性の高い芳香族化合物が選択されていた。これらの知見から、本研究では得られるNMRスペクトルおよび予想される化学シフトから“3,5-ビス(トリフルオロメチル)安息香酸”と“2,3,5,6-テトラフルオロ-1,4-ビス(トリメチルシリル)ベンゼン”の2物質を候補標準物質として選定した。本研究では再結晶で高度に精製することができた“3,5-ビス(トリフルオロメチル)安息香酸”について物性評価と純度測定法の検討を行った。

まず、熱重量分析装置(Q5000SA)を用いて、吸湿性と揮発性の評価を行った。吸湿性は相対湿度環境を20%~80%で5%間隔で変動させた際の質量変動で評価した結果、全湿度範囲での変動は0.1%以下であり、変動はほとんど確認されなかった。さらに、湿度環境を繰り返し変動させることで、水分の吸脱着の変動に対して質量値に対するドリフトの有無で揮発性を評価した。揮発性がある場合には、時間経過とともに質量値は減少すると予想されるが、候補標準物質では質量変動は確認されなかった。このことから、本候補標準物質は大気中で吸湿性・揮発性ともに極めて低く、標準物質の物性として適切と考えられた。溶解性の評価では、5種類の溶媒に対して10 mg/mL以上溶解し、溶媒の選択性が高いことも確認できた。さらには、¹H NMR測定では検出された化学シフト値は8.0 ppmから8.5 ppmと低磁場に観測され、一般的な有機化合物の化学シフト値と比べて、比較的低磁場に観測された。従って、3,5-ビス(トリフルオロメチル)安息香酸は定量NMR用標準物質として有用と考えられる。

物性評価の結果から定量NMR用の標準物質として有用と考えられた3,5-ビス(トリフルオロメチル)安息香酸の純度評価法について、差数法・凝固点降下法・電量中和滴定法を用いて検討した。差数法では有機不純物、残留溶媒、水分、強熱残分について

個々に定量し、純度算出を行った結果、差数法の純度として(999.74±0.19) g/kg と評価できた。差数法では微量に含まれる不純物を個々に評価したために不確かさが低減できたと考えられる。次に凝固点降下法による純度測定を検討したところ、総不純物量として(0.168 ±0.102) mmol/mol と評価できた。得られた総不純物量を 1000 mmol/mol から差し引き、不純物の平均分子量で単位補正することで、凝固点降下法による純度を(999.83±0.102) g/kg と評価できた。凝固点降下法による純度も差数法同様に不純物を評価しているために、小さな不確かさが達成できたと考えられる。さらに、電量中和滴定法による純度測定では、酸の総量として(999.59±0.082) g/kg と評価でき、HPLC で定量した類似不純物を差し引くことで、電量中和滴定による純度を(999.57±0.082) g/kg と評価できた。電量中和滴定は非常に高精度な分析法であるため、定量対象を直接評価したにもかかわらず、非常に小さな不確かさで評価することができた。検討した 3 つの手法は全て 0.1 %以下の不確かさ評価でき、定量 NMR 用標準物質の純度測定法として有用であると期待できる結果が得られた。

最後に純度測定法を CRM 開発に適用したところ、0.06 %の拡張不確かさ($k = 2$)で、認証値を決定することができた。この値は定量 NMR の測定ばらつき(>0.1 %)と比較して十分に小さく、定量 NMR 用標準物質として十分な精度で評価できたと考えられる。また、本 CRM を用いて、値の付与されたクロルフェナピル標準物質およびジフルベンズロン標準物質を ^1H NMR 及び ^{19}F NMR で評価した結果、2つの核種で同等の値が得られ、2つの核種で定量分析が可能であることが確認できた。

4. 今後の課題

定量 NMR では対象物質そのものの標準を必要としないものの、溶解性や化学シフトによって適用範囲が限られるため、今回の研究期間中で開発した 1 物質では不十分と考えられる。そこで、本研究課題内で候補となった他の化合物についても認証標準物質として開発することで、適用分析対象を拡大することが大きな課題である。特に水系の溶媒に可溶で有用な基準物質は探索に至っていないため、水系で有用性の高い物質の探索も重要な課題の 1 つである。また、定量 NMR 自身がまだ発展途上の分析法であるために測定法の標準化も大きな課題であると考えている。