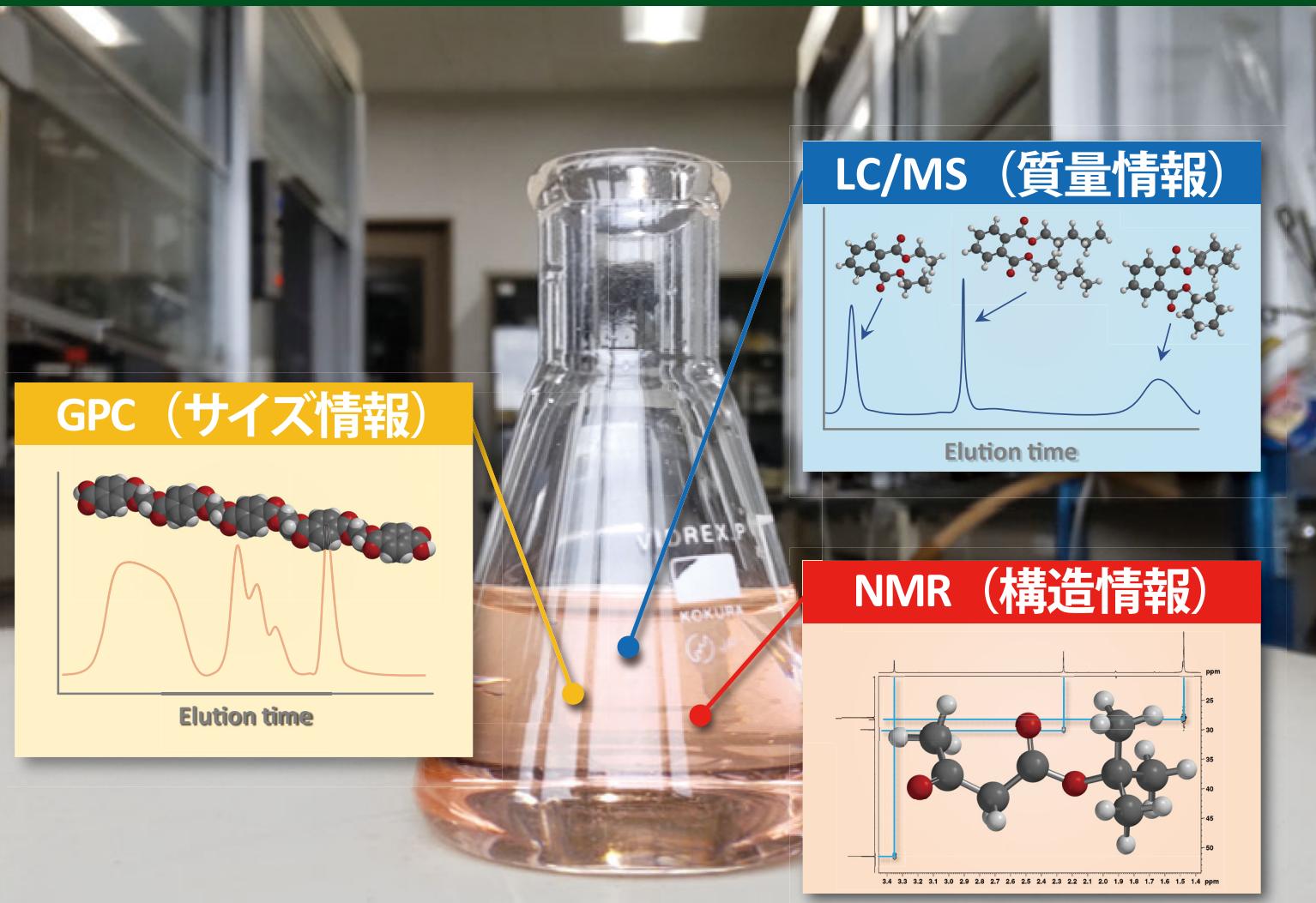


TECHNORIDGE

2024 337



特集 溶液試料の分析手法

TECHNORIDGE

2024 337

試料の何が知りたい？？



質量 ⇒ LC/MS

大きさ ⇒ GPC

構造 ⇒ NMR

目次

巻頭言	2
液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS)	3
分子量分布測定 (GPC)	5
核磁気共鳴分析 (NMR)	6

情報、溶液状態の試料の「質量」、「大きさ」、「構造」測定できます。

編集担当
藤井 亮

試料分析において、試料の性状（溶液 or 固体）や得たい情報によって、どの分析装置を選定するか迷われることがあるかと思います。そこで、本号と次号では、

- ・溶液試料の分析手法（337号）
- ・固体試料の分析手法（338号）

として、各試料の分析手法をご紹介します。

化学分析で分かること

質量	構造
大きさ	含有官能基
熱安定性	構成元素
結晶構造	表面状態

『溶液試料の分析手法』と題した337号（本号）では、当センターでご利用いただける「溶液試料」の分析手法として、試料の質量を分析する液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS)、大きさを分析する分子量分布測定 (GPC)、構造を分析する核磁気共鳴分析 (NMR) についてご紹介いたします。

● 液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS)

分析したい試料が必ずしも純品とは限りません。そんな時、各成分を分離し、それらの質量情報を取得できる LC/MS が有効です。過去の323号（2020年発刊）では、低分子を対象とした質量分析測定の基礎的な情報を掲載しております。本号ではそれを踏まえた応用編として、多成分混合試料の LC/MS についてご紹介いたします。

● 分子量分布測定 (GPC)

特定の質量を持つ低分子とは異なり、高分子評価においては、分子量分布の情報を取得することが有効です。ここでは GPC について「どんな手法か」「何がわかるか」「データ解析時の注意点」等をご紹介いたします。

● 核磁気共鳴分析 (NMR)

研究開発品や製造原料の化合物構造を知るうえで、NMR は非常に有効な手段です。過去の305号（2014年発刊）では、NMR の基本的な原理や一次元及び二次元 NMR 測定法を掲載しております。一方で、一次元測定、二次元測定といつても多様な手法があり、化合物情報取得のために実際どの測定方法を選択すべきか、判断に困る場面があるかと思います。

ここでは、各測定手法で「何の構造情報が得られるか」に着目しつつ、一次元測定 (¹H 及び ¹³C NMR (Inverse Gated Decoupling 法、DEPT 法))、二次元測定 (HSQC、HMBC) を通じて一つの化合物構造を同定する事例をご紹介いたします。

液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS)

化学技術部 大崎 秀介

はじめに

液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS) は、試料溶液に含まれる混合成分を液体クロマトグラフ (LC) で分離し、分離されたそれぞれの成分を質量分析計 (MS) により検出する装置です。試料中の微量成分の定性・定量分析などに広く利用されている分析法で、様々な分野で活用されています。

近年では、LC の性能が大幅に向上し、従来よりも短時間かつ高分離能での測定が可能になっています。

超高速液体クロマトグラフ

LC では、移動相とよばれる液体を分離カラムに通し、対象成分と分離カラム内に充填されている固定相 (充填剤) との相互作用により混合物を分離します。この固定相の粒子が小さいほど表面積が大きくなるため、対象成分との相互作用が大きくなり高い分離能が得られます。

分離カラムに用いられる充填剤は、これまで標準的に使用してきた高速液体クロマトグラフ (HPLC) であれば装置の耐圧性能のため $5\mu\text{m}$ 程度の粒径ものまで

しか使用できませんでしたが、最近では充填剤の粒径が $2\mu\text{m}$ 以下のカラムを使用可能な装置があります (装置耐圧: ~約 130MPa)。この様な仕様の装置を超高速クロマトグラフ (UPLC あるいは UHPLC) と呼びます。

UPLC は分離能が向上するだけではなく、従来の HPLC と比較して分析時間を $1/5 \sim 1/10$ に短時間化できると同時に、使用する移動相の溶媒量も低減することができます。

高速・高感度測定

UPLC を用いた測定の一例として、フタル酸エステル類の混合溶液を測定した際のクロマトグラムを図 1 に示します。上段が充填剤の粒径が $5\mu\text{m}$ のカラムを用いた、従来の HPLC 条件で測定した結果です。ここでは、すべてのフタル酸エステルを検出するために約 30 分の測定時間が必要でした。一方、充填剤の粒径が $1.7\mu\text{m}$ のカラムを用いた場合 (図 1 下段)、約 3 分ですべてのフタル酸エステルが検出されていることが分かります。

また、UPLC では HPLC に比べ、短時間で試料を溶出する (シャープなピークとして検出する) ことがで

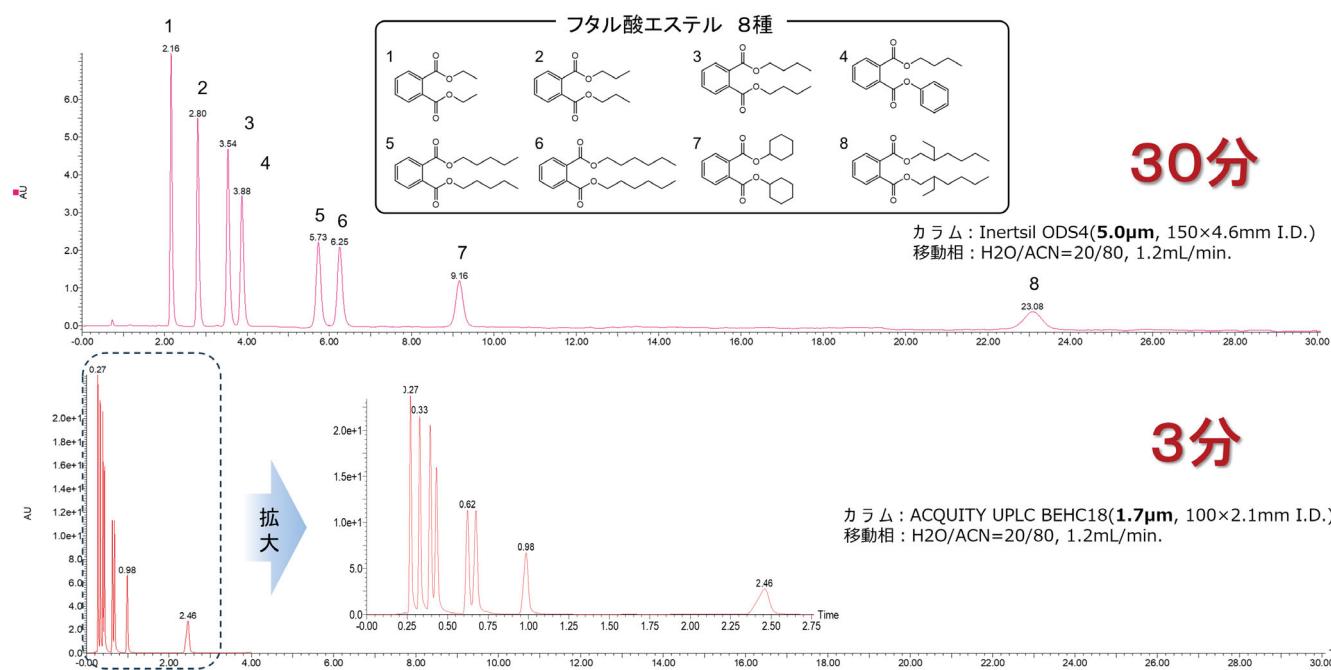


図1 超高速液体クロマトグラフを用いた高速分析の一例
上段:HPLC、下段:UPLC

きます。そのため、同一濃度の試料溶液を測定した場合、UPLC の方が単位時間当たりの試料量が多く検出器に導入されるため、ピーク強度が高くなり、検出感度が向上します。

2D-LC システム

多成分混合試料の場合、LC の条件を工夫しても全てのピークを分離することが困難な場合があります。

2D-LC システムは、1 本目のカラム (1D) から溶出される成分を、LC に内蔵されたバルブにより流路を切り替えることで 2 本目のカラム (2D) に導入し、対象成分を分離 (高分離) する機能です (図 2)。1 D カラムと 2 D カラムで異なる LC 条件 (カラムや移動相など)

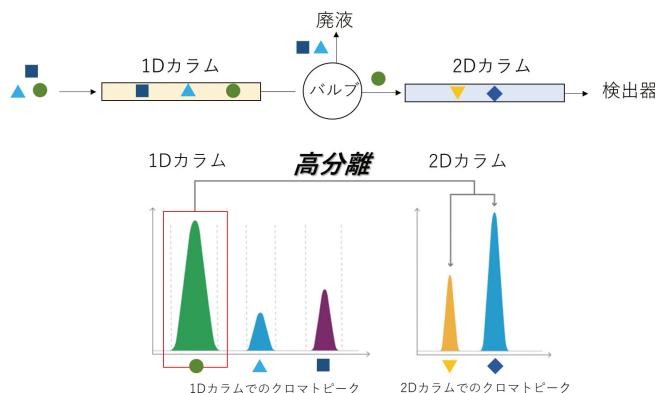


図 2 2D-LC システムの概略図

を選択することで、LC 分離を可能とし、分離が困難な混合試料の分離を容易にします。

図 3 に 2D-LC システムによってピーク分離を行った測定例を示します。芳香族アミン類の混合溶液を測定しており、1 D カラムでは保持時間 0.9 分 (A)、1.2 分 (B) 及び 2.5 分 (C) 付近のピークでは複数の成分が分離されずに 1 本のピークとして検出されています。これらピーク A、B 及び C を、LC に内蔵されたバルブにより流路を切り替え、それぞれのピーク成分のみを 2D カラムに導入します。2 D カラムでは 1D とは異なる移動相を用いることで対象成分に対して異なる相互作用を生じさせることができます。各ピーク成分が分離されて検出されました。

おわりに

本稿では、溶液中の多成分混合試料に対して効率的なピーク分離が行える LC 機能について紹介させていただきました。これらの機能を備えた LC/MS を当センターでも保有しております。従来の HPLC ではピーク分離が十分ではなく、分析条件の設定が難しい場合などに活用いただければ幸いです。

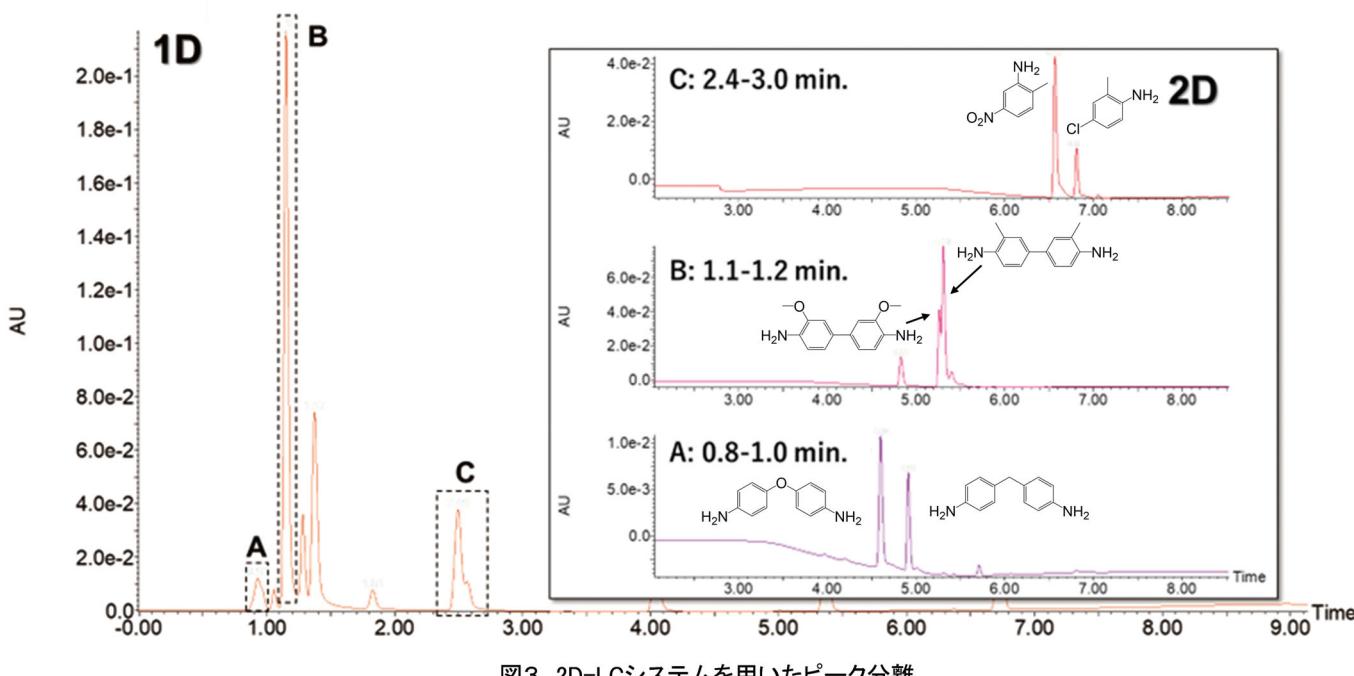


図 3 2D-LC システムを用いたピーク分離

分子量分布測定 (GPC)

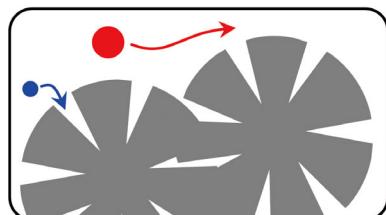
化学技術部 齋藤 茜

はじめに

高分子材料は、分子量やその分布の程度によって発現する機能や物性が大きく異なります。このため、分子量分布測定を行うことで、製品性能の比較はもちろん、使用時の劣化・分解の程度なども確認できます。前述のとおり高分子材料を扱う上では分子量や分子量分布を知ることは大変重要です。今回は、分子量分布測定法としてよく用いられているゲル浸透クロマトグラフィー (Gel Permeation Chromatography、GPC) についてご紹介します。

GPC とは？

GPC は液体クロマトグラフィーの一種で、分子のサイズによって分離するため、サイズ排除クロマトグラフィー (Size Exclusion Chromatography、SEC) とも呼ばれます。図 1 (左) に示すように、大きな分子はカラムに充填されたゲルの細孔に浸透できず、ゲルの間をすり抜けるため早く溶出されます。一方、小さな分子はゲルの細孔の奥に入り込むため、溶出に時間がかかります。その結果、分子サイズによって溶出時間に差が生まれるため、サイズの分布がクロマトグラム (図 1 (右)) として得られます。



カラム内分離イメージ図

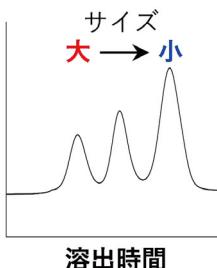


図 1 分離原理モデルとクロマトグラム

測定時の注意点

GPC ではサンプルの分子サイズによって分離しますが、分子量を直接求めることはできません。このため、分子量が既知の標準試料 (ポリスチレンなど) を測定して標準試料の分子量と溶出時間の検量線を作成し、サンプルの分子量を算出します。この時、算出される分子量は標準物質との比較による相対分子量ですので、サンプルの構造や溶媒との親和性、分岐の数などによっては真の分子量とは大きくずれる可能性があります。また、カラムにサンプルが相互作用する場合も正しい分子量が測定でき

ません。この場合は溶離液に塩を添加するなどの工夫が必要です。

GPC 測定で得られる結果

GPC では、数平均分子量 M_n や重量平均分子量 M_w (図 2)、多分散度 M_w/M_n などが算出できます。 M_n は単純に高分子 1 分子当たりの重量であるため、合成反応における目的高分子の理論分子量や高分子末端数の計算などによく用いられます。一方、 M_w は重量を反映した平均値です。高分子量成分は低分子量成分に比べて重量や体積が大きいため、分子数が少なくても高分子材料の物性に与える影響は大きくなります。このため、高分子材料を利用する際の物性の指標として用いられます。多分散度は、分子量の分布がない単分散高分子の場合は 1 となり、分布が広いほど大きな値となることで、分子量分布を表します。

成分A、B…が混合しているポリマーの場合

Mn
$A\text{の分子量} \times \frac{A\text{の分子数}}{\text{総分子数}} + B\text{の分子量} \times \frac{B\text{の分子数}}{\text{総分子数}} \dots$
Mw
$A\text{の分子量} \times \frac{A\text{の重量}}{\text{総重量}} + B\text{の分子量} \times \frac{B\text{の重量}}{\text{総重量}} \dots$
Mn と Mw の比較
成分A : 分子量 $10,000 \times 2\text{個}$ 成分B : 分子量 $10 \times 100\text{個}$ } を含むサンプル
成分Bが多いが、ポリマーの物性としてはAに近い
$M_n = 206$ (分子数を強く反映) $M_w = 9,524$ (分子量を強く反映)

図 2 Mn と Mw の比較

おわりに

当センターでは、一般的によく用いられる THF や DMF の他、クロロホルムや水系など、様々な移動相での GPC 測定が可能です。また、数百から数百万程度までの分子量を分離できる各種カラムがありますので、高分子量サンプルだけでなく、添加材等の低分子量サンプルまで、幅広い用途でお使いいただけます。測定したいサンプルがありましたら、お気軽にお問い合わせください。

核磁気共鳴分析 (NMR)

化学技術部 藤井 亮

はじめに

有機化合物の構造を推定するのには様々な手法があります(質量分析:重さ情報、赤外分光分析:官能基の情報、元素分析:構成元素の情報)、NMRからはより詳細な構造情報が得られます。一般的によく利用されているのは¹H NMRと¹³C NMRであり、それぞれ有機化合物が持つ水素及び炭素の結合様式に関する情報が得られます(図1)。

¹H NMR(図1A)

有機化合物全般に利用できる分析手法です。あらかじめ化合物の構造がある程度予想できているのであれば、この手法で事足りる場合が多いです。化合物中に含まれる水素(¹H)を検出し、そのピークが現れる領域(ケミカルシフト)、ピーク形状及び面積(積分値、水素の個数に相当)から化合物構造の推定が可能です。

¹³C NMR(図1B)

¹H NMRに次いでよく利用される手法です。化合物中の炭素を検出する手法ですが、NMRの特性上、天然

存在比率が低い¹³Cを検出する必要があるため、¹H NMRよりも多くの試料が必要となります。

¹³C NMRでは、水素を持たない第四級炭素やカルボニル炭素(C=O)を検出することができます。また、ケミカルシフトからどの構造に含まれる炭素なのかを推定できます。しかし、炭素の級数によって感度に差があるため、ピークの積分値には定量性はありません。定量性を議論するためにはIG (Inverse Gated Decoupling)法による¹³C NMR測定が有効です。

DEPT法(¹³C NMR)(図1C)

DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)法は¹³C NMRで観測された炭素が「何個の水素と結合しているのか」がわかります。各ピークの正負及び消失パターンと、通常の¹³C NMRスペクトルと照らし合わせることで各ピークが第何級炭素であるかがわかります。

二次元NMR(HSQC, HMBC)(図1D)

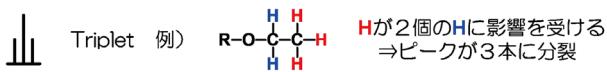
二次元NMRでは、化合物中の水素や炭素の位置関

A: ¹H NMRで得られる情報

①おおよそのピーク領域

- 脂肪族炭素と結合している¹H ⇒ 高磁場側 (0 - 5 ppm)
- 芳香族炭素と結合している¹H ⇒ 低磁場側 (6 - 9 ppm)
- アルキンと結合している¹H ⇒ 2 - 2.5 ppm
- アルケンと結合している¹H ⇒ 4 - 7 ppm

②ピークの形状(シグナルの分裂=カップリング)



ピークの分裂幅(スピン結合定数(J))

同じJ値=それぞれ隣り合った炭素と結合している¹H
(HとHは同じJ値)

③ピークの面積(積分値)

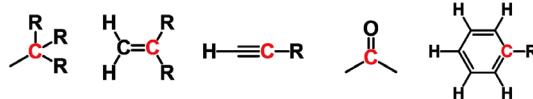
各スペクトルの積分値が¹Hの数に相当する

B: ¹³C NMRで得られる情報

①おおよそのピーク領域

- 脂肪族炭素 ⇒ 高磁場側 (0 - 70 ppm)
- 芳香族炭素 ⇒ 低磁場側 (100 - 150 ppm)
- アルキン炭素 ⇒ 70 - 90 ppm
- アルケン炭素 ⇒ 100 - 140 ppm
- カルボニル炭素 ⇒ 150 - 220 ppm

②水素を持たない炭素の存在がわかる



C: ¹³C NMR(DEPT法)で得られる情報

DEPT法の選択により、スペクトルが正負に出たり、消失するこれにより1~4級炭素を見分けることができる

DEPT	CH ₃ (1級)	CH ₂ (2級)	CH (3級)	C (4級)
45	正	正	正	消失
90	消失	消失	正	消失
135	正	負	正	消失

D: 二次元NMR(HSQC, HMBC)で得られる情報

どの炭素と水素が結合しているかわかる

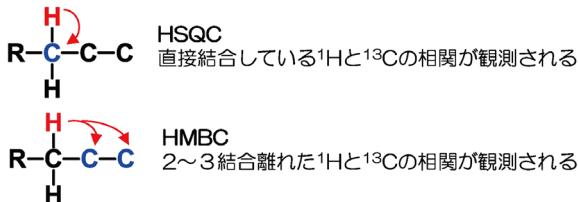


図1 各種NMRによって得られる情報

係に関する情報が得られます。HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) では、化合物に含まれる水素と炭素の相関シグナルが得られます。これによって、各炭素と直接結合している水素のペアが分かります。また、HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) では、水素と、2~3結合離れた炭素との相関シグナルが得られます。これによって、化合物中の炭素の配列を推測することが可能です。

NMRによる構造推定の事例

今回は下記のアセト酢酸 *tert*-ブチル (図2) を合成したと仮定し、各種 NMR 測定を用いた構造確認の手法をご紹介します。

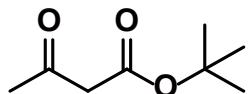


図2 アセト酢酸 *tert*-ブチル

¹H NMR

化合物約 5 mg を重クロロホルム 500 μ L に溶解させ、¹H NMR 測定を行った結果を図3に示します。

まず、3つのピークが観測されたことから、3種類の水素が化合物に含まれており、ケミカルシフトからいずれも脂肪族炭素に結合している水素であることが推測できます。また、各ピークはカップリング(分裂)していない singlet ピークであることから、「各水素が結合している炭素は隣り合っていない」ことが分かります。さらに、ピーク面積(積分値)から、各水素の比率が 9 : 3 : 2 であることが分かります。各水素を便宜上、H_a、H_b、H_c とすると、アセト酢酸 *tert*-ブチルの *tert*-ブチル基(H_a)、メチル基(H_b)、メチレン基(H_c)と考えられ、推定構造と矛盾ありません。

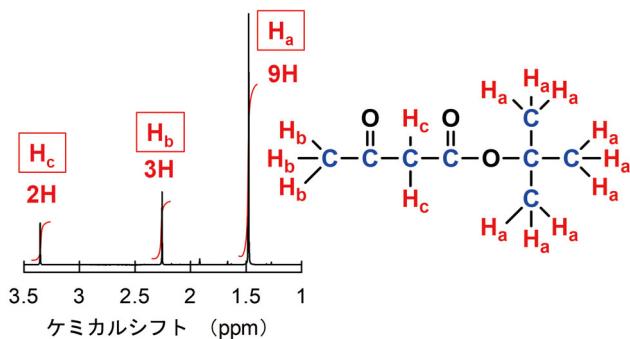


図3 ¹H NMR スペクトル

¹³C NMR (通常測定、DEPT 法及び IG 法)

化合物約 30 mg を重クロロホルム 500 μ L に溶解させ、¹³C NMR 及び DEPT 法(135)による ¹³C NMR 測定を行った結果を図4に示します。まず、通常の ¹³C NMR(上段)ですが、重クロロホルムのピークを除くと主に 6つのピーク (C_A ~ C_F) が観測されました。また、DEPT 法(下段)による測定から、C_A、C_B が第一級又は第三級炭素、C_C が第二級炭素、C_D ~ C_F が第四級炭素であることが分かります。さらに各ピークの定量性が得られる IG 法による測定を行った結果 C_A が炭素 3 個、C_B ~ C_F が炭素 1 個のピークであることが分かりました。

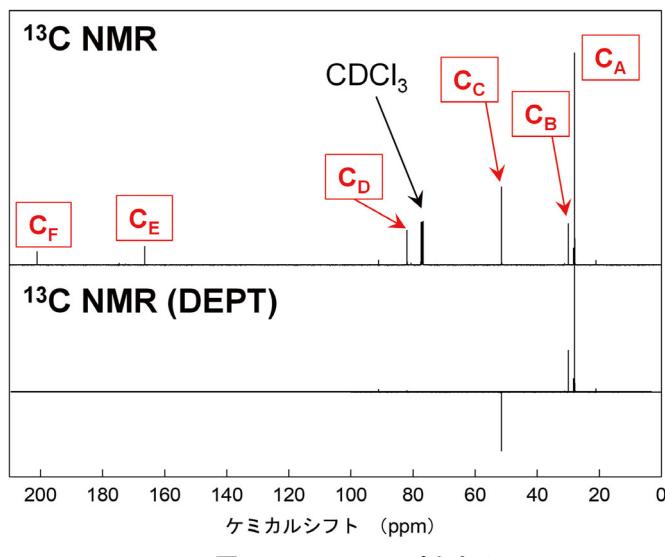


図4 ¹³C NMR スペクトル

DEPT 法の結果より、C_C のみが第二級炭素であることから、メチレン基の炭素であることが分かりました。また、定量測定により炭素三個に相当する積分値が得られていることから、C_A が *tert*-ブチル基の炭素であること、炭素一個分の積分値から、C_B がメチル基の炭素であることが推定できます(図5)。

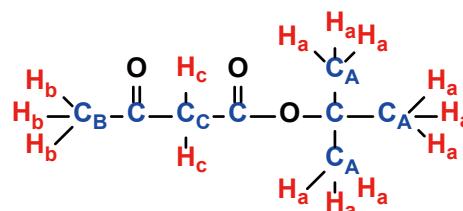


図5 C_A ~ C_C の帰属

核磁気共鳴分析 (NMR)

HSQC

HSQC からは、水素と直接結合している炭素がある場合、等高線の様なシグナルが得られます。この様に一次元 NMR から推測した ^1H と ^{13}C のペアを、HSQC では直接シグナルとして観測できます(図 6)。これにより、上述の ^1H NMR 及び ^{13}C NMR 結果と相違ない水素 / 炭素ペアが分かりました。

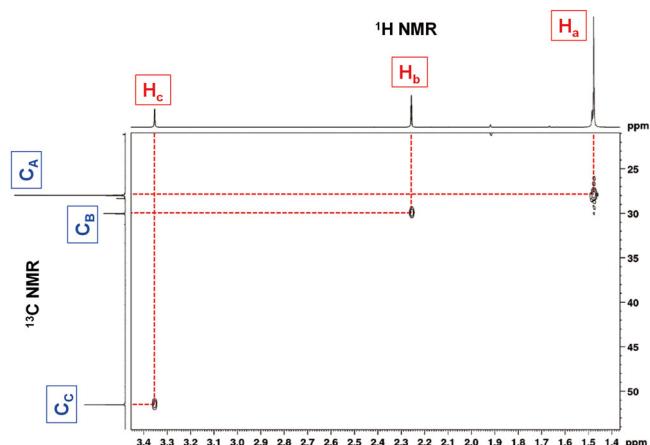


図 6 HSQC 测定結果

HMBC

図 7 に HMBC 测定結果を示します。HMBC では、水素と 2 又は 3 結合分離された炭素との相関シグナルが得られます。まず、H_a と相関を示すのは、C_D と C_A です。前者は、HSQC でシグナルを示さなかったこと

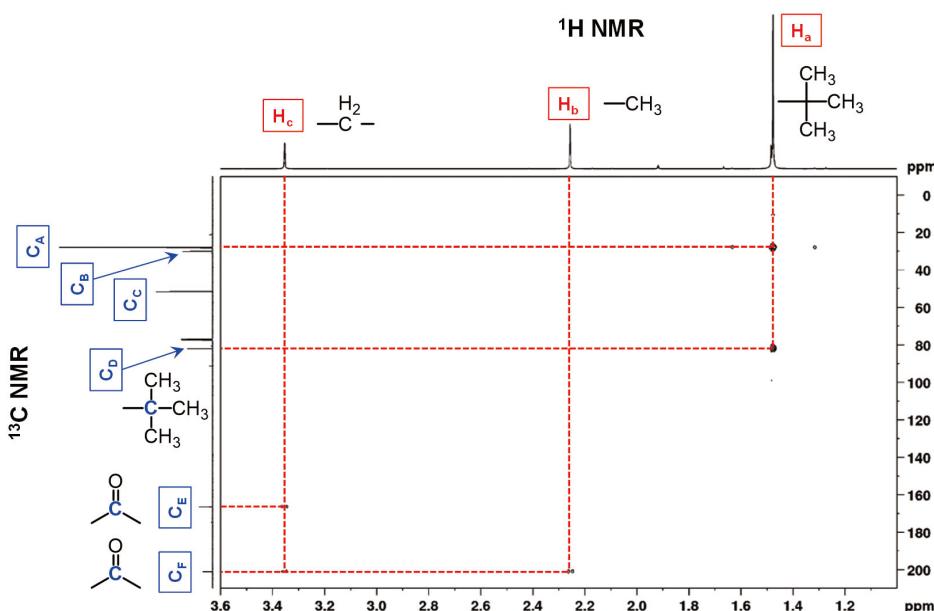


図 7 HMBC 测定結果

から、*tert*-ブチル基の第四級炭素、後者は第四級炭素を介した H_a と別の C_A との相関と解釈できます。

次に、H_b と相関を示す C_F は、メチル基の隣のカルボニル炭素、H_c と相関を示す C_E はメチレン基の隣のカルボニル炭素と推定できます。

おわりに

質量分析 (化合物の大きさ) や赤外分光分析 (官能基の判別) 等で大まかな化合物の推定は可能ですが、例えば元素のつながり方や立体構造の情報を得る上で、NMR は非常に有用なツールです。

また、今回はご紹介しましたが、水素同士の位置関係が分かる COSY (Correlation Spectroscopy)、空間的に近い水素同士が分かる NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)、混合物であってもスペクトルを分離することができる DOSY (Three Dimensional-Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy) 等、様々な NMR 法がありますので、有機化合物の構造情報が知りたい場合は、受託試験や機器貸付で NMR をご利用ください。

技術情報誌
和歌山県工業技術センター
60番地

F T 発行日
A E /
X L /
/ 0 0 2
7 7 0
3 3 2
- - 4
4 4 4
7 7 10
7 7 月
- - 30
2 1 日
8 2
8 7
0 1

住印
TE /
L 和歌山県工業技術センター
0 7 3
3 1 4
4 9 5
5 7 1
7 1 7