

外部標準法定量 NMR (EC-qNMR) のすすめ

近年、簡便で正確な有機化合物の絶対定量法として注目を集める定量 NMR (qNMR) は、内部標準法 (IC-qNMR) と外部標準法 (EC-qNMR) に大別される。この二つの手法のうち、本稿では EC-qNMR の背景と測定原理について、また、EC-qNMR で正確な定量分析を実現する上で注意すべき点を解説する。本稿が研究業務に EC-qNMR を導入する際の一助となり、EC-qNMR のさらなる実用化に繋がれば幸いである。

西 崎 雄 三

1 はじめに

NMR は、静磁場に置かれた原子核が、その原子核に固有の周波数と共鳴し、低エネルギーから高エネルギー状態に遷移する現象を利用したスペクトル法である。回転座標系を用いて簡単に示すと、静磁場に置かれた原子核は、 z 軸のまわりを歳差運動する。このときの正味の磁化成分 M_0 は、 z 軸上に存在し、 xy 平面には存在しない。通常、NMR は y 軸方向の磁化成分を検出するように設計されており、そのため、ラジオ波パルス照射して、磁化成分を y 軸方向に傾けさせ、これをシグナルとして検出する。この瞬間、磁化成分を構成する xy 成分は扇のように広がり、位相の一致が失われ、減衰する。すなわち自由誘導減衰 (FID) であり、この減衰過程を T_2 緩和と呼ぶ。また、磁化成分を構成する z 成分は、 z 軸に沿って、もとの熱平衡状態に戻り、この過程を T_1 緩和と呼ぶ (図 1)。このことから、NMR で定量性を確保するためには、パルス照射後の T_2 緩和を考慮して、FID をもれなく取込む時間 (取込み時間: AQ) を設ける必要がある。また、通常 NMR 測定では SN 比を向上

させるために積算を行うが、この際は、 T_1 緩和を考慮して、もとの熱平衡状態に戻る時間 (遅延時間: D_1) をパルス照射ごとに設ける必要がある (図 2)。上記の定量性を確保したパルス系列を設定すると、同種核におけるシグナル応答値を分子間で比較することができる。すなわち、片方に純度既知の物質を基準として添加すると、基準物質のシグナル応答値から、もう片方の物質の絶対濃度ないし純度を求めることができる。この手法は、定量 NMR または qNMR と呼ばれる。

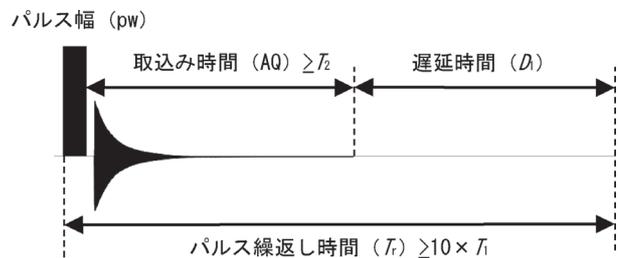


図 2 定量性を確保した NMR のパルス系列
通常、パルス幅は数 μ 秒であり、全体の繰返し時間 (秒) から無視して問題ない。

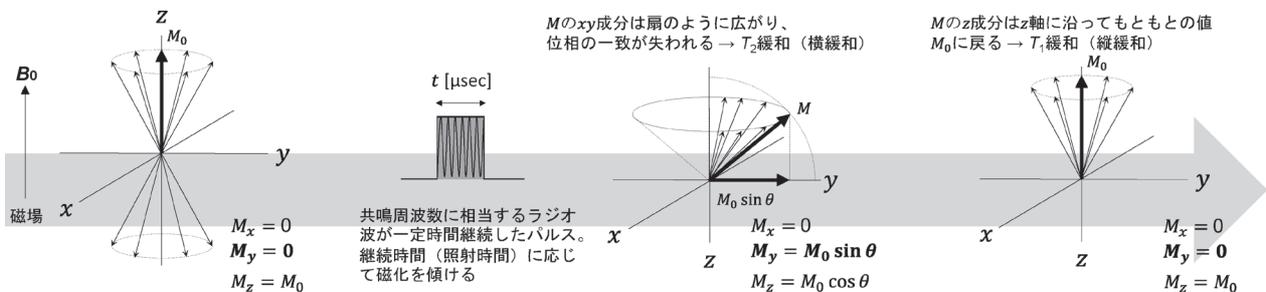


図 1 回転座標系におけるパルス照射後の磁化成分 M の挙動

磁化成分 M_0 を y 軸方向に 90° 傾けたとき、最も強度の高いピークが得られる ($M_y = M_0 \sin 90^\circ$)。磁化成分 M_0 を y 軸方向に 90° 傾けるために必要なパルス照射時間を 90° パルス幅 (pw90) と呼ぶ。

2 EC-qNMRの現状

一般に、我々が手にする市販試薬（標準品）、特に天然由来のものに表示された純度は、クロマトグラフィーによる面積百分率法で値付けされた相対純度であり、クロマトグラム上で検出できない水分や無機物等の不純物含量は無視される¹⁾。したがって、食品や医薬品などの規格試験では、標準品を開発した試薬会社、標準品を購入してからの保管状態、標準品の不純物の組成の違いにより、食品や医薬品の最終的な分析結果や規格値に対する適否判定が、試験機関によって異なることが懸念される。このような問題の解決に、qNMRは非常に有効である。例えば、クロマトグラフィーによる定量試験、抗酸化能を評価するための力価試験、あるいは毒性試験において、自身が使用した標準品の絶対純度をあらかじめqNMRで算出し、標準品の調製濃度を校正すれば、試験機関間で標準品の純度差に由来する試験結果の差異は解消される。現在、qNMRは、我が国の食品、医薬品の品質に関する公定法を収載した、食品添加物公定書および日本薬局方の中で、定量用標準品の純度測定法として採用されている。さらに、日本産業規格（JIS）としても標準化がなされ²⁾、規制科学分野における絶対的な地位を確立したといえる。

しかしながら、食品添加物公定書、日本薬局方およびJISを読むと、試料調製方法がすべて内部標準法qNMR（IC-qNMR：internal calibration qNMR）に限定されていることに気づく。内部標準による試料の汚染を避けたい高価な標準品、自ら単離した天然原料からの希少な（秤量すら困難な）精製品、あるいは測定溶媒中において内部標準と溶解性や安定性が著しく異なる物質を測定するとき、IC-qNMRでは純度測定が困難な場面が実際には存在する。このような場面で、外部標準法qNMR（EC-qNMR：external calibration qNMR）は非常に有用である。EC-qNMRには内径の異なる2種類の試料管から構成される同軸二重試料管を用いた方法³⁾、擬似的なFID信号を挿入する方法⁴⁾が提案されているが、本稿では相反定理を利用したEC-qNMRに限定して話を進めたい⁵⁾⁶⁾。EC-qNMRに相反定理を適用すると、特定のNMR装置や制御ソフトに依存することなく、誰でもEC-qNMRを実施することができる⁷⁾。この相反定理を利用したEC-qNMRはPULCONという名称でも知られていて⁸⁾、これまでに多くの論文で良好な定量精度が示されてきた。一方、これらのポジティブな結果を受けて、自身のNMR装置を使ってEC-qNMRを実施すると、5%以上の誤差があったとの話をよく聞く。原因解明のために既報の論文に目を通して、ポジティブな結果しか示されておらず、EC-qNMRを実施する上での具体的な注意点は記載がほとんどない。結局、EC-qNMRは有用であるものの、IC-qNMRとは違い、方法

論がまだ標準化されていないのが現状である。最近、著者らはEC-qNMRの高精度化および標準化に資する検討の中で、適切な測定手順を踏むことにより、EC-qNMRでもIC-qNMRと同様に誤差1%以内の正確な定量が可能であることを示した⁹⁾。本稿は、この過程で抽出した、分析値にばらつきを与える要因を整理し、EC-qNMRの測定原理とあわせて解説していきたい。

3 相反定理に基づくEC-qNMRの測定原理

NMRの応答は相反定理に従う。すなわち、チューニングとマッチング（T&M：tuning and matching）により、NMRの検出コイル（プローブ）が測定対象核の共鳴周波数に同調するとき限り、「パルス幅（pw：pulse width）×ピーク面積/プロトン数/モル濃度」はプローブ固有の値（Q値）となる。塩濃度が高い試料の場合、感度は低下し、ピーク面積が小さくなるが、その分pwは長くなるので、式（1）に示すようにQ値は一定のままである。

$$\frac{A \times pw90}{Conc. \times H} = Q \dots\dots\dots (1)$$

ここで、*Conc.*、モル濃度（mol/L）；*A*、プロトンのピーク面積；*H*、*A*に由来するプロトン数；*pw90*、90°パルス幅（μsec）。

したがって、2本のNMR試料管を用いてEC-qNMRを実施した場合、両者の関係性は以下の式（2）で示すことができる。すなわち、基準物質の絶対純度（*Conc._C*）が明らかなき、分析種の絶対濃度（*Conc._A*）ないし純度を求めることができる。

$$Conc._A = Conc._C \times \frac{A_A}{A_C} \times \frac{H_C}{H_A} \times \frac{pw90_A}{pw90_C} \dots\dots\dots (2)$$

ここで、添字A、分析種；添字C、基準物質（内部標準または外部標準）。

分析種と基準物質が同じNMR試料管中にあるIC-qNMRの場合、両物質それぞれの磁化成分をy軸方向に傾けるpwは同じ値となり（図1）、通常、プローブ



図3 NMRの相反定理を成立させるためのEC-qNMR測定手順
シム調整とT&Mは順番が逆になっても良い。

に記録されているデフォルトの 90°パルス幅 (pw90) が測定条件に適用される. そのため, 式 (2) に示す pw90 は相殺される. 一方, EC-qNMR の場合, 分析種と基準物質が異なる NMR 試料管にあるため, それぞれの NMR 試料管で, 試料の導電性や pw90 が異なる可能性がある. そのため, EC-qNMR で正確な定量分析を行うためには, 図 3 に示す測定手順に従い T&M および pw90 校正を行う必要がある. これらは上述の相反定理を成立させる上での必須の手順である. このことから, プローブの T&M および pw90 校正が, EC-qNMR の分析値にばらつきを与える要因となることは明らかである.

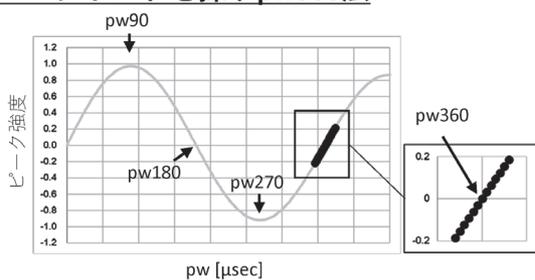
4 EC-qNMR の分析値にばらつきを与える要因

本稿は, 図 3 に示す測定手順で分析種にカフェイン (CAF), 外部標準に 3 濃度のジメチルスルホン (DMSO₂) を用いた EC-qNMR の実例を示す. いずれも, 国際単位系 (SI) にトレーサブルな絶対純度が付与された認証標準物質を用いており, これらの認証値を参照値として扱い, 定量結果を評価する. pw90 校正および T&M をはじめとする, 分析値にばらつきを与える要因を整理したい. なお, 実例データは日本電子製 SuperCOOL プローブ付き JNM-ECZ400S/L1 を用いて取得した. 測定中はプローブ温度を 25 °C に制御した.

4.1 pw90 校正

NMR では照射中心のピーク強度を pw に応じてプロットすると, 減衰する正弦曲線が描かれる. この特性を利用した pw90 校正方法を二つ紹介する (図 4). 一つは, ピーク強度が 0 となる pw360 をはさみ込むよう

ヌルポイントを探す pw360 法



カーブフィッティング (CF) 法

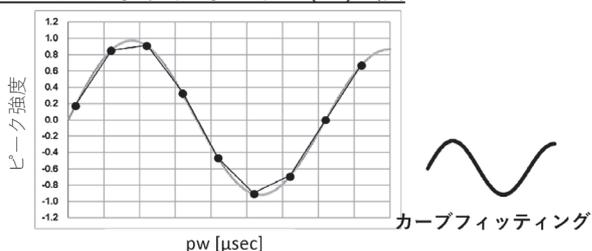


図 4 pw90 校正方法: pw360 法とカーブフィッティング (CF) 法

に pw を変化させる連続測定を行い, このアレイデータからヌルポイントとなる pw360 を探し, 4 で除して pw90 を決定する方法である (以下, pw360 法)¹⁰. この方法は, 照射中心ピークの T₁ 緩和の影響をほとんど受けずに正確な pw90 を算出できるため, 現在も広く一般に利用されている. ただし, 手動でヌルポイントを探す必要があるため, 測定試料数が多い場合は, オペレータが NMR 装置の前から離れられず, 敬遠されがちである. もう一つの pw90 校正方法を紹介する. この方法は pw360 付近ではなく, 広く全体に pw を変化させる連続測定, 具体的には pw10~pw450 の範囲を 10 点程度プロットする連続測定を行い, このアレイデータに対するカーブフィッティング (CF) から pw90 を校正する方法である (以下, CF 法)¹¹. この CF 法は Delta ソフトウェア (日本電子製) 上の回帰計算解析 (モード: Nutation Analysis) で自動計算が可能である. ただし, CF 法は T₁ の長いピークが照射中心となるとき, pw 連続測定条件の D₁ について注意する必要がある. 図 5 に示すのは, DMSO-d₆ の溶媒ピークを照射中心とした際の CF 法の結果である. 溶媒ピーク (DMSO-d₅) の T₁ (T₁ = 15 sec) に対して pw 連続測定条件の D₁ が短いと, アレイデータの描く正弦曲線が歪み正確な pw90 を算出できない. しかし, これまでの経験上, D₁ を 60 sec 以上に設定すると, どのようなピークが照射中心になっても, 歪みのない正弦曲線として CF することができる. pw360 法および CF 法ともに, 実際の測定試料では観測範囲に複数のプロトンピークが観察され, これらの

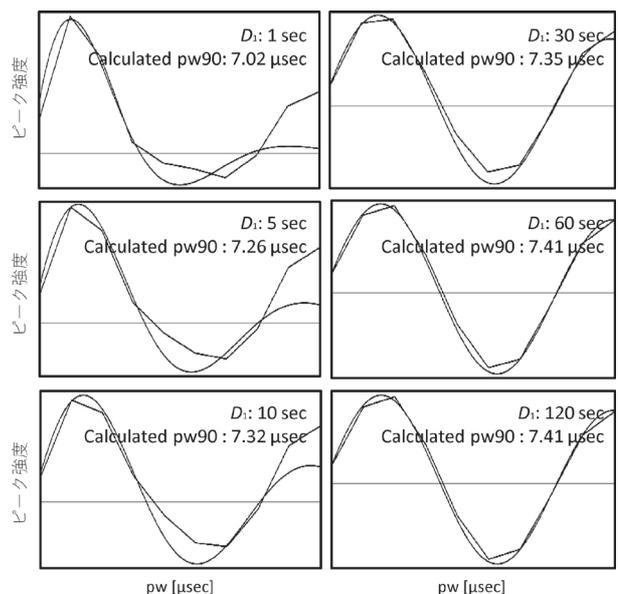


図 5 pw 連続測定条件の D₁ を 1, 5, 10, 30, 60, 120 秒に設定して得られたアレイデータに対する CF 法の結果 (pw90 校正結果)

pw 連続測定の照射中心は DMSO-d₆ の溶媒ピーク (DMSO-d₅: 図 6 の A を参照). Delta ソフトウェア (日本電子製) 上の回帰計算解析 (モード: Nutation Analysis) を使用した.

ピークのうち、どのピークを照射中心とするか判断に迷うかもしれない。結論は、どのピークを照射中心としても良い (IC-qNMR では観測されるすべてのピークは、同じ pw で照射されている)。実用的には、最も S/N 比の良いピークを照射中心にすると良いし、試料間で統一したい場合は共通して存在する溶媒ピークを選択すると良い。図 6 に示すのは、DMSO- d_6 に溶解させた CAF とマレイン酸 (MA) の混合試料である。これらのピークを照射中心とした際の、CF 法および pw360 法による pw90 校正結果はほぼ一致し、さらに分子内および分子間での pw90 も 1 % 以内で良好な一致を示すことから、CF 法と pw360 法ともに正確に pw90 を校正できていることが分かる。EC-qNMR の導入を検討する場合は、CAF と MA 混合試料のように、分子内および分子間での pw90 の一致を確認して、自身の pw90 校正方法が正しく行えているかどうか確認すると良い。特に CF 法では、最適な pw 連続測定条件を確認しておかないと、pw90 校正で 5 % 以上の誤差が生まれてしまうので、注意が必要である (図 5 の D_1 が 1 sec と 60 sec 以上のときの pw90 校正結果を比較: 7.02 μ sec vs. 7.41 μ sec)。なお、pw90 校正では pw 連続測定中に試料の温度が上昇してアレイデータの描く正弦曲線が歪まないように、 ^{13}C デカップリングを off にすることを勧める。

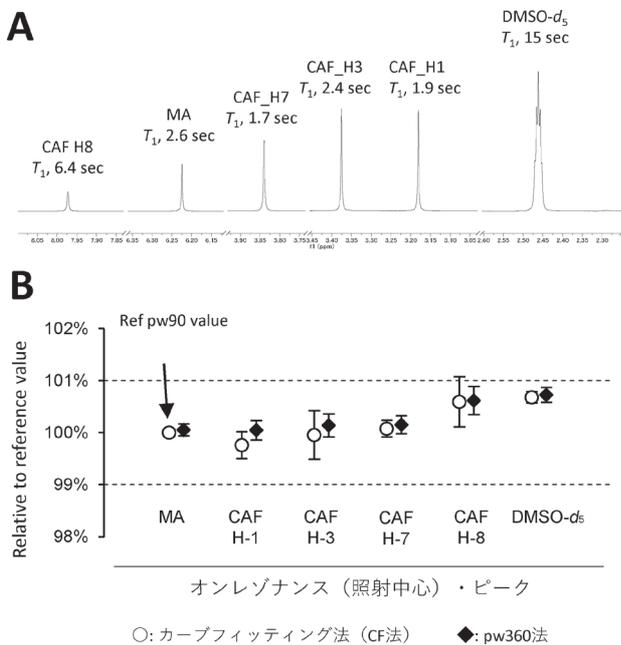


図 6 CAF と MA 混合試料を用いた際の CF 法と pw360 法による pw90 校正結果

(A) DMSO- d_6 に溶解させた CAF と MA 混合試料の ^1H NMR スペクトル。それぞれのプロトンピークの上に T_1 を示した。(B) ^1H NMR スペクトル上に観察されたプロトンピークを照射中心とした際の、CF 法および pw360 法から得られる pw90 校正結果。MA を照射中心とする CF 法から得られた pw90 を参照値としてプロットした (n3)。CF 法と pw360 法における pw 連続測定条件の D_1 はそれぞれ 60 sec と 20 sec に設定した。

4.2 チューニングとマッチング

pw90 校正方法を最適化した後に、自動 T&M と手動 T&M での EC-qNMR 定量結果を比較すると、T&M の精度を確認できる。手動 T&M ではウォブル曲線を監視しながら、反射値を 0 に調整して測定を行った。自動 T&M では反射値が 20~30 程度であったが、両者の EC-qNMR の定量結果は 1 % 以内の誤差に収まり、IC-qNMR と比べて遜色のない定量精度であった。このことから、自動 T&M 機能は十分信頼できることがわかる (図 7)。ただし、T&M を行うタイミングは注意が必要である。EC-qNMR では、通常サンプルの温度を一定にして測定を行う。NMR 試料管を投入後すぐに T&M を行うと、プローブ内に残存する温度むらにより、3 % を超える誤差が生まれる (図 7)。EC-qNMR で正確な定量を行うためには、プローブ内の温度を十分平衡化させた後、T&M を行うと良い。著者らが使用した NMR 装置および装置周囲温度 (記録はしていないが、22 $^{\circ}\text{C}$ 付近と記憶している) においては、NMR 試料管を投入後、

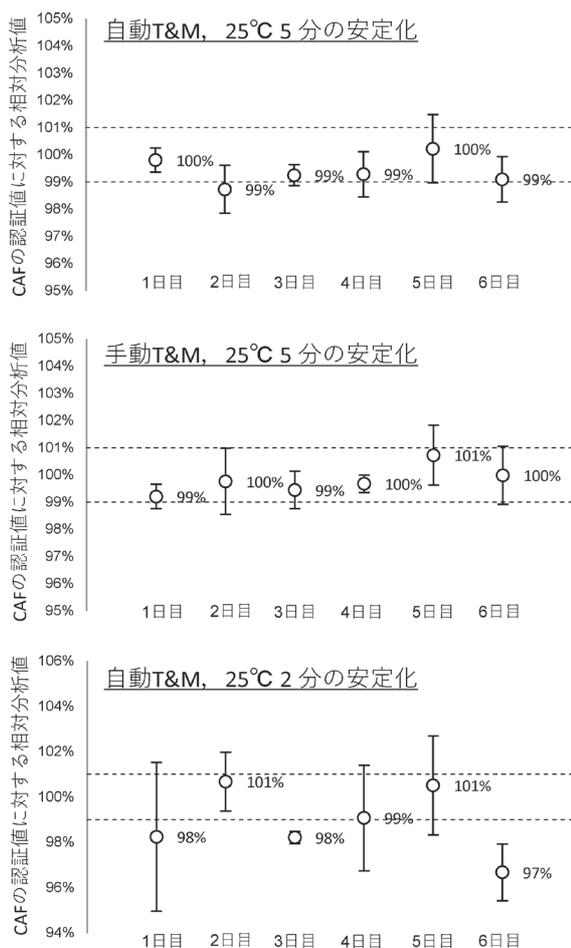


図 7 自動 T&M と手動 T&M での EC-qNMR 測定結果 DMSO $_2$ を外部標準とした際の、CAF の分析値。CAF の認証値に対する相対値をプロットした。3 濃度の DMSO $_2$ を外部標準として、CAF を定量した。このときの調製濃度 (絶対濃度) は、CAF は 1.679 mg/mL、DMSO $_2$ は 0.255, 0.482, 0.948 mg/mL。

プローブを 25 °C で 5 分以上安定化させた後に T&M を行うと、定量精度が向上した。なお、日本電子(株)に確認したところ、理想的にはプローブ温度は「装置周囲温度+5 °C 以上」に設定すると、プローブヒータが安定して作動すること、装置周囲温度を「プローブ温度-5 °C 以下」に保つことが難しい場合、長時間低温空気供給装置を使用して強制的に低温にすることができるとのこと。このとき、プローブ内の NMR 試料管が接する周囲温度は低温になり、この状態でプローブヒータを作動させる。以上、T&M における温度が与える影響を解説したが、より詳細な解析を行う場合は、プローブヒータのキャリブレーションもあわせて検討したい¹²⁾。

次に、T&M における試料の導電性が与える影響について簡単に触れておきたい。例えば、10 % TFA-*d* 含有重水に溶解させた試料の場合、導電性が非常に高くなり T&M の精度が下がることがあった。一般に溶液の塩濃度が高くなると T&M が合わせにくくなるが、この時の自動 T&M の反射値は 120~160 程度であり、定量結果に 2~3 % のバイアスがかかっている印象を受けた。このような試料を扱う場合、分析種および外部標準ともに 10 % TFA-*d* 含有重水に溶解させて EC-qNMR を実施すれば、バイアスを相殺できると考えている。

4.3 NMR 試料管

NMR プローブは、試料管の下 1 cm から 3 cm の約 2 cm の領域を検出している。多くの場合、5 mm NMR 試料管を使用するが、メーカーによって NMR 試料管の内径に若干の差がある (NMR 試料管のブランドが違う

と、スピナーへの差し込み具合が若干異なる場合がある)。この体積差はそのままプロトンピーク面積に反映される。そのため、外部標準と分析種の NMR 試料管のブランドは統一すると良い。

4.4 測定条件

基本的に EC-qNMR では、レシーバーゲイン、積算回数、観測幅、AQ、 D_1 、 ^{13}C デカップリングの有無およびスピニングの有無などの qNMR 測定条件を統一して、外部標準と分析種を測定すると思われる (ただし、pw90 は各試料に対して校正した固有の pw を適用する)。しかし、外部標準と分析種の測定条件を統一していない場合、予期せぬ誤差を生むことがあるので、その一例を紹介したい。pw90 にピーク面積を乗じた Q 値が常に一定になるという相反定理に従い (式 (1))、DMSO₂ を試料として用いて、qNMR 測定条件を変更した際の「pw90×ピーク面積」の値をモニタリングした。図 8 に示す 4 パターンの qNMR 測定条件を検討し、パターン 1 と 2 では ^{13}C デカップリング条件下で FID を取り込み、パターン 3 と 4 では ^{13}C カップリング条件下で FID を取得した。 D_1 はパターン 1 と 3 で 60 sec、パターン 2 と 4 で 20 sec とした。なお、DMSO₂ の T_1 は 2.8 秒と短く、すべてのパターンで、積算ごとにもとの熱平衡状態に戻る十分な D_1 が設定されている (パルス繰返し時間 $T_r > 10 \times T_1$: 図 8)。結果は、パターン 2 の ^{13}C デカップリング条件下で D_1 が 20 sec のとき、ピーク面積は 3 % 以上減少した。一方、このような減少は ^{13}C カップリング条件下では確認されなかった。一般に、

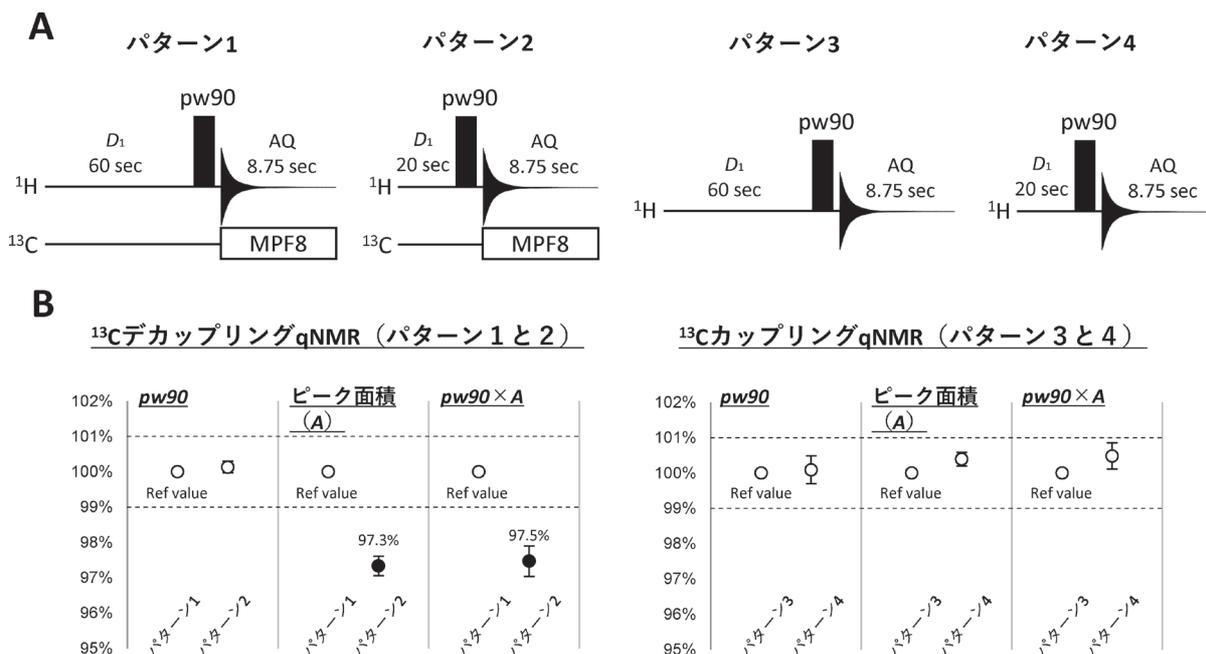


図 8 qNMR 測定条件の違いが EC-qNMR 分析値に与える影響

(A) 4 パターンの qNMR パルス系列。(B) 各パターンにおける pw90、ピーク面積 (A) および pw90×A のモニタリング結果。試料は DMSO-*d*₆ に溶解させた 1.065 mg/mL DMSO₂。

FIDの取込み中に¹³Cデカップリングを行うと、試料に対していくらかの熱が加わる。このことから、パターン2ではAQ中に¹³Cデカップリングに由来する熱が試料に加わり、さらにD₁が20 secと短かったため、qNMR測定中に最適なpw90の値がわずかにシフトし、ピーク強度が予想していたものよりも小さくなったのだろうと考えられる。「4-1 pw90校正」で、校正時のpw連続測定で¹³Cデカップリングをoffにすることを勧める理由は、まさにこれで、pw連続測定中に試料に熱が加わり、正弦曲線が歪むことを避けるためである。いずれにせよ、EC-qNMRで正確に定量するには、分析種と外部標準でqNMR測定条件を統一することが望ましい。

5 おわりに

EC-qNMRはIC-qNMRよりも精度が低く、その原因が整理されていなかったため、qNMRを用いた絶対定量法の第一選択肢はIC-qNMRであった。本稿では、相反定理に基づいたEC-qNMRの測定原理、定量結果にバラつきを与える要因について解説した。特にpw90校正時のpw連続測定条件およびT&Mを行うタイミングの最適化、また、外部標準と分析種のNMR試料管やqNMR測定条件を統一することにより、EC-qNMRでも誤差1%以内という高精度な定量が達成できることを紹介した。EC-qNMRは測定ごとに基準物質を調製する必要はなく、試料調製が簡便で経済的である。また、純度測定終了後のNMR試料液は、各種機器分析や生物活性試験の安全性や有効性を評価するための、純度既知の標準品として扱える点も魅力的である。分析結果の国際整合性や信頼性が求められる現在、純度測定終了後に貴重な試料を汚染することなく、全量回収可能なEC-qNMRに期待される部分は大きいと考えている。一方、EC-qNMRのさらなる実用化のためには、EC-qNMR測定の完全自動化が課題として挙げられる。具体的には、あらかじめオペレータが設定したpw連続測定条件およびqNMR測定条件に従って、分光計がpw90を校正して、この校正結果を次のqNMR測定に反映する自動測定スクリプトの開発が望まれる。これは、pw90校正方法に分光計が自動計算できるCF法を採用することで実現可能である。現在、EC-qNMR自動測定スクリプトの開発に取り組んでいる。この自動測定スクリプトを用意できれば、オペレータがNMR装置

の前に拘束されないため、EC-qNMRの敷居がぐっと下がり世界中の産官学においてEC-qNMRの導入が促進されるだろう。このことは、分析データの信頼性の要となる標準品の純度測定が活性化され、あらゆる分野における分析結果の信頼性底上げに繋がると考えている。また、自動測定スクリプトの開発により試験機間で統一した手順とパラメータを用いた共同試験を簡便に実施できるようになり、EC-qNMRのさらなる高度化および標準化に貢献できると考えている。

謝辞 本稿で紹介したEC-qNMRの基礎研究はイリノイ大学シカゴ校で実施し、終始多大なご指導を賜ったDr. Guido F. PauliおよびDr. Shao-Nong Chenに深謝致します。またEC-qNMRのさらなる実用化に向けた共同研究者である株式会社JEOL RESONANCEの末松孝子様、松熊伸也様、吉村弘伸様、日本電子株式会社の朝倉克夫様、産業技術総合研究所の山崎太一様、国立医薬品食品衛生研究所の杉本直樹様に多大なるご協力とご助言を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 合田幸広：化学と教育，**61**，300 (2013)。
- 2) JIS K 0138，定量核磁気共鳴分光法通則 (2018)。
- 3) 畑田耕一，寺脇義男，北山辰樹：高分子論文集，**49**，335 (1992)。
- 4) S. Akoka, L. Barantin, M. Trierweiler : *Anal. Chem.*, **71**, 2554 (1999)。
- 5) D. I. Hoult, R. E. Richards : *J. Magn. Reson.*, **24**, 71 (1976)。
- 6) D. I. Hoult : *Concepts Magn. Reson.*, **12**, 173 (2000)。
- 7) I. W. Burton, M. A. Quilliam, J. A. Walter : *Anal. Chem.*, **77**, 3123 (2005)。
- 8) G. Wider, L. Dreier : *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 2571 (2006)。
- 9) Y. Nishizaki, D. C. Lankin, SN. Chen, G. F. Pauli : *Anal. Chem.*, **93**, 2733 (2021)。
- 10) P. A. Keifer : *Concepts Magn. Reson.*, **11**, 165 (1999)。
- 11) T. Kurimoto, K. Asakura, C. Yamasaki, N. Nemoto : *Chem. Lett.*, **34**, 540 (2005)。
- 12) D. S. Raiford, C. L. Fisk, E. D. Becker : *Anal. Chem.*, **51**, 2050 (1979)。



西崎雄三 (Yuzo NISHIZAKI)

国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部
(〒210-9501 神奈川県川崎市川崎区殿町3-25-26)。東京農工大学大学院工学府生命工学専攻博士後期課程修了。博士(工学)。《現在の研究テーマ》定量NMR。卓上NMRを用いた試験法開発のための研究。

E-mail : ynishizak@nihs.go.jp