

リンを測定核種とした定量核磁気共鳴分光法 (qNMR) に関する調査研究

岡本千奈*

(2023年1月24日受理)

A survey on quantitative Nuclear Magnetic Resonance (qNMR) spectroscopy for phosphorus as a measurement nuclear

OKAMOTO China

Abstract

Quantitative Nuclear Magnetic Resonance (qNMR) spectroscopy can quantify various analytes with a single reference material by comparing atomic nuclei. Because accuracy and practical application of qNMR with ^1H has been well studied, ^1H qNMR is widely used at present. On the other hand, in spite of high potential and demand, there are some experimental issues to overcome for qNMR with other nuclides such as phosphorous. In this report, the present circumstances and experimental issues as well as their solutions of ^{31}P qNMR were investigated and summarized to develop high accurate ^{31}P qNMR.

1. 緒言

近年、水道水中の汚染物質や食品中に含まれる残留農薬、医薬品の品質など、私たちの健康や生活の安全を守るために分析値の信頼性が求められる分野を中心に、使用する標準液の計量トレーサビリティの必要性が高まっている。標準液の計量トレーサビリティを確保するためには、純度評価された高純度有機化合物が有用である。そのため高純度有機化合物の認証標準物質 (CRM) が開発されているが、CRMの開発には時間とコストがかかる。そこで、計量トレーサビリティを確保して迅速に純度評価できる方法として、定量核磁気共鳴分光法 (qNMR) が開発され、普及してきた。qNMRでは、シグナル面積値が測定核種の原子の数に比例することから、異なる分子間での定量が可能である。qNMRはこれまでに様々な検討が行われており¹⁾⁻⁴⁾、日本国内ではJIS K 0138 : 2018⁵⁾ や日本薬局方⁶⁾、食品添加物公定書⁷⁾ などの公定法に記載されるとともに、国際的にも、国際標準化機構 (International Organization for Standardization (ISO)) のISO 24583 : 2022⁸⁾ の発行や

* 物質計測標準研究部門 有機基準物質研究グループ

信頼性評価のための国際比較⁹⁾ などが行われている。今日では、1つの標準物質から様々な化合物を定量可能なqNMRの特徴から、標準物質が入手できない新規化合物の純度や濃度を正しく定量する必要がある製薬業界等において、特に重宝されている。また、qNMRはこれまでに十分な高度化が行われてきたことから、産業技術総合研究所の計量標準総合センター (National Metrology Institute of Japan (NMIJ)) においても、qNMRを中核的な定量技術として用いることで様々なCRMを迅速に開発する¹⁰⁾ とともに、200種類以上の化学物質に対する依頼試験も実施している^{11), 12)}。

現在報告されているqNMRによる定量事例のほとんどが ^1H qNMRであるが、NMRで検出可能な原子核は ^1H 以外にも多く存在する。 ^1H と同様にほとんどの有機化合物に含まれる ^{13}C を測定対象核種としたqNMRでは、植物中の成分¹³⁾ やベンゼン置換体¹⁴⁾、コレステロール¹⁵⁾ 等の定量分析事例が報告されている。また、同一分子内に含まれる原子数が少なく、天然存在比が100%で比較的観測しやすい核である ^{19}F や ^{31}P では、 ^{19}F qNMRによる農薬¹⁶⁾ や医薬品成分¹⁷⁾⁻¹⁹⁾ 等の定量や、 ^{31}P qNMRによるリン脂質²⁰⁾、コーラ中のリン酸塩

21), 医薬品成分²²⁾等の定量分析事例が報告されている。多核 qNMR では、¹H を含まない化合物を検出できることや、¹H qNMR では複雑なスペクトルが得られるために定量が困難な高分子化合物も単純なスペクトルが得られること、溶媒のシグナルが観測されないこと、広範囲にシグナルが観測されるためにシグナルどうしの分離が良いことなど、多くの利点がある。しかし、多核 qNMR に対する不確かさはあまり評価されておらず、感度や測定によるバイアス等の影響から 1 % 以下の不確かさでの定量事例も少ない。

そこで本調査研究では、¹H 以外の核種を測定対象とした qNMR の現状について調査した。その中で、近年注目され始めている ³¹P qNMR について、1 % 以下の不確かさでの高精度な分析技術の確立を目的に、既に広く検討・高度化されている ¹H qNMR を参考にして定量値の信頼性向上に関わる要因についても調査した。また、³¹P qNMR の定量結果におけるバイアスや再現性を改善するための課題を調査し、課題ごとに調査した解決方法について考察した。

2. qNMR の高度化と測定核種の拡大

qNMR では定量分析に利用可能な核種を増やすことにより、分析対象物質の範囲を拡大できる。現在、¹H や ¹⁹F を測定核種とした場合には調製、測定、解析方法等に関して様々な検討が報告されており、1 % 以下の不確かさでの定量分析事例が数多く報告されている^{3),4),16)}。¹³C や ³¹P を測定核種とした定量分析事例も報告されているものの^{13),20)-22)}、1 % 以下の不確かさでの分析はほとんど報告されていない。ここでは、¹H 以外の核種を対象とした qNMR を高度化するために、¹H qNMR での報告例を参考に qNMR の測定法や定量値の信頼性に関わる要因について調査した。また、NMR で ¹H 以外に観測可能

な核種や定量的な分析が報告されている核種を調査し、NMR による検出感度が高く、高精度な定量分析を実現できる可能性が高いことから注目されている ³¹P qNMR の利点や適用範囲をまとめた。

2.1 qNMR の測定法

qNMR 法として利用されている方法には内標準法と外標準法があり、試料や目的に応じて使い分けられている。それぞれの特徴を表 1 にまとめた。内標準法は、標準物質と分析試料を含む溶液を NMR で測定し、得られたスペクトル内において標準物質中の基準物質と分析試料中の分析対象成分のシグナル面積値を比較することで、分析対象成分の含量を算出する方法である。内標準法では標準物質と分析試料の混合液を用い、1 つのスペクトル内で基準物質と分析対象成分のシグナル面積値の比を得ることで測定の際のばらつきを低減できるため、高い精度が必要とされる標準物質の開発^{2)-4),23)}や医薬品中の有効成分の分析²⁴⁾等の高精度な分析に用いられている。一方、外標準法は、標準物質と分析試料を含む溶液の各単成分溶液をそれぞれ NMR で測定し、得られた各スペクトルにおける基準物質と分析対象成分のシグナル面積値の比較から分析対象成分の含量を算出する方法である²⁵⁾。この方法は内標準法と比べて精度は劣るものの、成分間の相互作用やシグナルの重なりが問題となる生体高分子²⁶⁾や、希少性や法令の観点から測定後に回収する必要のある成分²⁷⁾⁻³⁰⁾等の分析に利用されている。

2.2 qNMR の信頼性に関わる要因

本報告書では、高精度な分析技術の確立を目的としているため、精度に優れる内標準法の適用を前提として、qNMR の測定結果の信頼性に関わる要因について調査した。内標準法で定量する場合、図 1 のように、正確に秤り取った分析試料と標準物質を重溶媒で溶解させ、調製

表 1 qNMR における内標準法と外標準法の比較

	内標準法	外標準法
メリット	<ul style="list-style-type: none"> 測定再現性が良い 測定時間が短い 試料の正確な濃度が不要 	<ul style="list-style-type: none"> 試料間の反応性の考慮が不要 シグナルの分離が不要 試料の回収が可能
デメリット	<ul style="list-style-type: none"> 2 成分が溶解する溶媒選択が必要 試料間の反応性を考慮 シグナルの分離が必要 分析試料の回収が困難 	<ul style="list-style-type: none"> 測定再現性が悪い 2 試料の測定が必要 正確な調製濃度が必要 補正項や不確かさ要因が増加

した試料溶液の NMR スペクトルを測定し解析することで分析試料中の分析対象成分の純度を決定できる。この時、分析対象成分の純度 (P_s) は、次式で表される^{5),31),32)}。

$$P_s = \frac{S_s}{S_{IS}} \frac{N_{IS}}{N_s} \frac{M_s}{M_{IS}} \frac{m_{IS}}{m_s} P_{IS} \quad (1)$$

ここで、 S_s は分析対象成分のシグナル面積値、 S_{IS} は標準物質中の基準物質のシグナル面積値、 N_s は分析対象成分のシグナルの核の数、 N_{IS} は基準物質の核の数、 M_s は分析対象成分のモル質量、 M_{IS} は基準物質のモル質量、 m_s は分析試料の質量、 m_{IS} は標準物質の質量、 P_{IS} は標準物質の純度である。信頼性の高い定量値を得るためには、式 (1) に基づいて定量値の算出に関わる各項目をそれぞれ最適化し、不確かさを評価する必要がある³³⁾。分析対象成分や基準物質のモル質量および核の数は物質固有の値であるため、最適化の対象とはならない。ここでは、分析試料および標準物質の質量、分析対象成分および基準物質のシグナル面積値、定量に用いる標準物質の純度に関連して、信頼性の高い結果を得るために考慮すべき要因についてまとめる。

2.2.1 正確な試料調製 (m_s , m_{IS})

微量な分析試料や標準物質を秤り取る際の分析結果の信頼性を確保するためには、適切な試料量の決定や正確な秤量が必要となる。ここでは、分析試料や標準物質を秤量し、試料溶液を調製する際に注意すべき要因についてまとめる。

まず、試料が完全に溶解していない場合、実際に溶解している試料の質量は秤量時の質量よりも小さいため、

算出した純度にバイアスがかかってしまう。したがって、正しいシグナル面積値を得るためには分析試料や標準物質の溶媒への溶解性を考慮し、試料が完全に溶解する試料量や溶媒量を決定する必要がある。加えて、試料を溶解させた後は試料が完全に溶媒へ溶解したことを目視で確認し、攪拌しても試料が溶け残ってしまう場合には、溶媒量を増やすことや、より溶解性の高い溶媒へ変更する等の工夫が必要である。

次に、試料の秤量に用いる天秤の分解能や風袋の選択も重要である。天秤にはウルトラマイクロ天秤 (最小表示: 0.0001 mg, 最大秤量値: 数 g) やマイクロ天秤 (最小表示: 0.001 mg, 最大秤量値: 数十 g)、セミマイクロ天秤 (最小表示: 0.01 mg, 最大秤量値: 数百 g) 等、最小表示値の異なる天秤が存在するが、定量結果の信頼性を向上させるためには秤り取る試料量に合わせて適切な分解能の天秤を選択する必要がある。例えば、数 mg の微量な試料を秤量して 1 % 以下の不確かさでの定量を実現するためには、マイクロ天秤やウルトラマイクロ天秤の使用が求められる¹⁾。どの天秤を使用する際にも、精度よく秤量するためには天秤の最小計量値、つまりユーザーが要求する精度で秤量するための試料の下限値を考慮して秤り取る試料量を検討する必要がある。最小計量値は天秤だけでなく使用する風袋にも依存し、秤り取る試料と同程度の質量の風袋を用いた場合、試料よりも大幅に大きな質量を有する風袋を用いた場合よりも試料調製によるバイアスやばらつきが小さくなったことが報告されている³⁴⁾。したがって、秤りとりたい試料量に合わせて適切な天秤や風袋を選択する必要がある^{35),36)}。所有している天秤に限られている場合でも、試料量を増やすことで信頼性の高い定量結果が得られる。また、信頼性の高い結果を得るためには、秤量値の再現性だけでなく秤量時の質量の

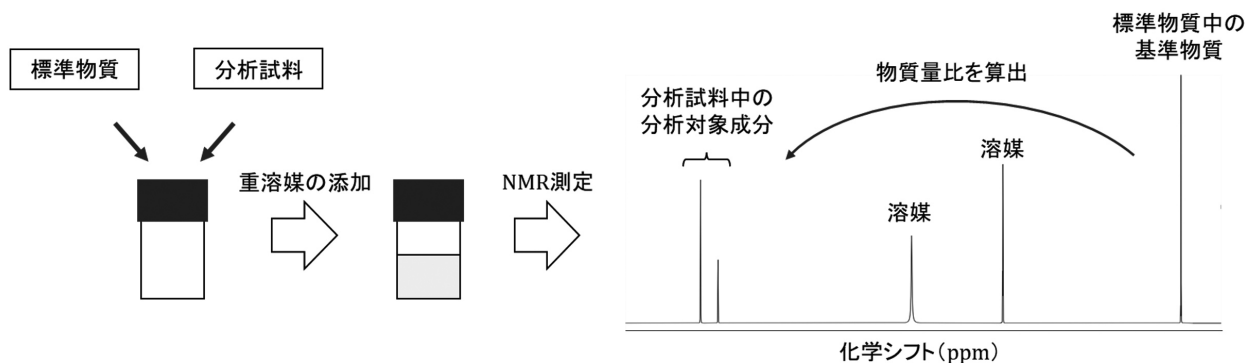


図 1 qNMR の内標準法による定量の模式図。NMR スペクトルの横軸は、化学シフト値 (化学シフトの基準となるシグナルとの共鳴周波数の相対値) で、単位は ppm ((Hz/Hz) × 10⁶)。

不確かさも考慮する必要がある。質量の不確かさは用いた天秤の校正証明書に記載されている校正点の値を使用するが、校正点と著しく離れた質量の試料を秤量した際には、秤量の不確かさが過大評価されてしまう。そのため、質量の不確かさを低減するためには、天秤の校正証明書の校正点も考慮して使用する試料量を検討する必要がある。

その他、分析試料の物性に合わせて調製環境や調製方法を最適化することも大切である。分析試料や標準物質に吸湿性や昇華性がある場合、繰り返し計量中に天秤の表示値が変動してしまい、分析試料中の分析対象成分の純度を正確に求めることができない。このような場合には、試料瓶内から試料を取り出したら迅速に秤量することや、吸湿性がある場合には低湿度環境で、昇華性がある場合には低温環境で秤量する等工夫する必要がある³⁾。また、分析試料や標準物質に吸湿性や昇華性がある場合には、秤りとってから溶媒を添加するまでに質量が変動するため定量値にバイアスがかかる。したがって、試料秤量後すぐに溶媒を添加するよう、分析試料、標準物質および溶媒の添加順を検討するなどの工夫が必要である。

2.2.2 測定パラメータの設定 (S_s , S_{IS})

分析対象成分や基準物質の物質質量に比例した正確なシグナル面積値を得るためには、待ち時間、データポイント数、デジタル分解能、観測幅、 ^{13}C デカップリングの有無、励起中心、積算回数等の測定パラメータを適切に設定する必要がある。

まず、正しいシグナル面積値を得るために重要なこと

は、緩和が不完全なシグナルとならないように十分に長い待ち時間を設定することである。図2に、NMRにおける緩和現象とパルスシーケンスの模式図を示す。図2のように縦磁化(図2Aにおけるz軸方向の磁化)が緩和する時定数である縦緩和時間(T_1)に対して、信号の取り込み時間と待ち時間を合算したパルス繰り返し時間(T_r)が不十分である場合、励起された核スピンの熱平衡状態に戻る前に再び励起されてしまい、正しい定量値を得ることができない³⁵⁾。一般的に、定量性を議論するためには T_1 の5倍以上の T_r を設定することが推奨されている³⁷⁾が、この場合は縦磁化の回復率が99.33%であり、シグナル面積値が約0.7%のバイアスを持つ可能性がある。 T_1 の7倍の T_r を設定すると回復率は99.91%、 T_1 の10倍の T_r を設定した場合には熱平衡状態の99.995%の縦磁化が回復することから、 T_r を長くすることでバイアスを低減してより正確な分析が実現できる³⁵⁾。

隣りあうデータポイント間の周波数の差であるスペクトルのデジタル分解能が低い場合には、正確なシグナル面積値を得ることができずバイアス要因となってしまうため、デジタル分解能は0.25 Hz以下に設定することが推奨されている⁵⁾。また、正確なシグナル面積値を得るためには取り込み時間の設定も重要であり、取り込み時間が不十分な場合ベースラインが不安定化し、データ解析時に正確なシグナル面積値を得ることが難しくなる。一方で、取り込み時間を必要以上に長く設定した場合にはノイズを過剰に取り込むことになり、定量対象シグナルのS/Nが低下する。必要な取り込み時間は試料ごとに異なるため、実際に得られるスペクトルや生データを

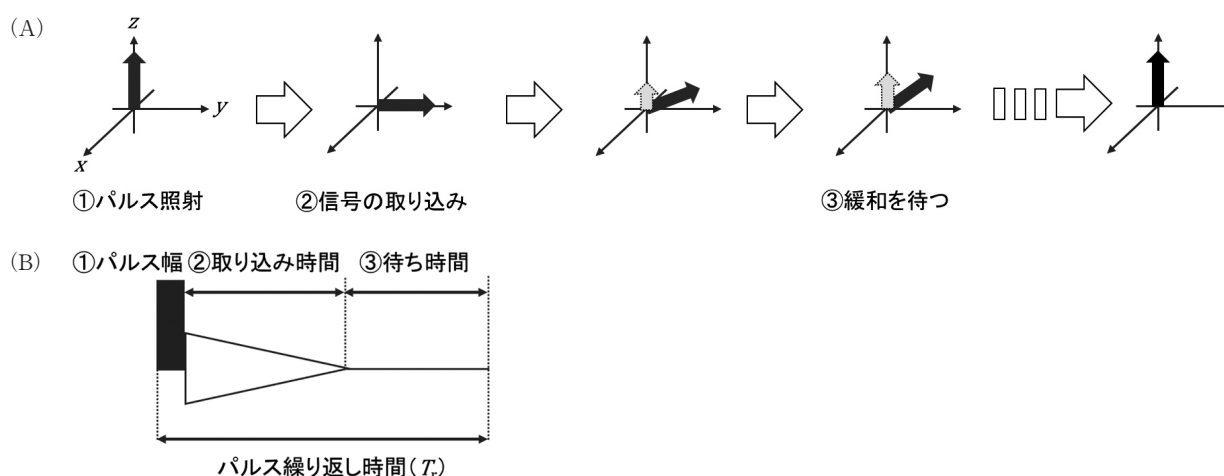


図2 NMRにおける緩和現象 (A) とパルスシーケンス (B) の模式図

確認して適切な取り込み時間を設定する必要がある。

さらに、シグナル面積値を正しく得るためには観測幅を十分に広く設定することが望ましい。一般的にNMRスペクトルを測定する際には、効率よくきれいなスペクトルを得るためにデジタルフィルタを用いるが、qNMRではデジタルフィルタを用いることによりシグナル面積値にバイアスがかかることが報告されている^{1),37)}。一方、デジタルフィルタをオフにした場合には、図3のようにベースラインが励起中心に対して左右対称に湾曲するためにシグナル面積値を正しく評価できず、バイアスが生じる。このため、正確に定量する上では、データ量が膨大になることや積算回数の増加が必要という欠点はあるものの、デジタルフィルタを用いず観測幅を十分に

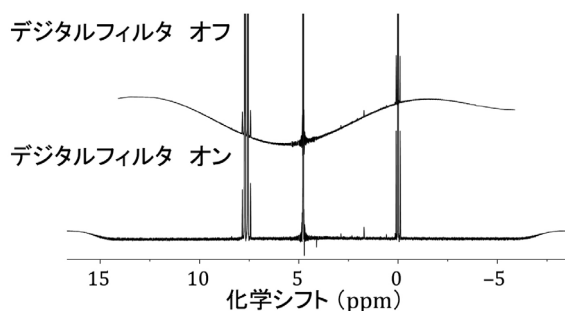


図3 デジタルフィルタのオンオフによるNMRスペクトルの変化。試料は、フタル酸水素カリウム(内標準物質)と3-(トリメチルシリル)-1-プロパン-1,1,2,2,3,3-*d*₆-スルホン酸ナトリウムの重水溶液

広く設定する必要がある⁴⁾。具体例として、図4にデジタルフィルタを用いず観測幅を変化させて測定したNMRスペクトルを示す。¹H NMRの場合、JIS K 0138:2018⁵⁾では観測幅を20 ppm以上に設定すると定めているが、デジタルフィルタを用いない場合、観測幅を20 ppmに設定するとシグナルが観測される領域におけるベースラインの変動が大きい。しかし、観測幅を400 ppmから500 ppm程度まで広げることでベースラインの変動を小さくし、デジタルフィルタを用いずに正確な分析が可能となる。

その他、正確なシグナル面積値を得るためには、分析対象成分や基準物質のシグナルに不純物のシグナルが重なっていないことの確認が重要である。NMRでは、¹Hと¹³Cの化学結合を介した相互作用(カップリング)によりシグナルが分裂し、¹³Cサテライトシグナルが観測される。¹³Cサテライトシグナルは、¹³Cの共鳴周波数に相当するラジオ波を照射することで、¹Hと¹³Cのカップリングを解消してスペクトル上から除去できる(デカップル)。このため、¹³Cデカップルすることで¹³Cサテライトシグナルへの不純物シグナルの重なりを確認し、重なっている場合には¹³Cデカップルした状態で定量することが望ましい。また、定量対象シグナルの励起効率に影響するため、適切な励起中心を設定することや、目標とする精度に合わせたS/Nが得られるよう、適切な積算回数を設定することも重要である。さらに、装置のコンディションも重要であり、磁場の状態が悪いと余計なシグナルの分裂が生じたりシグナルの対称性が悪化した

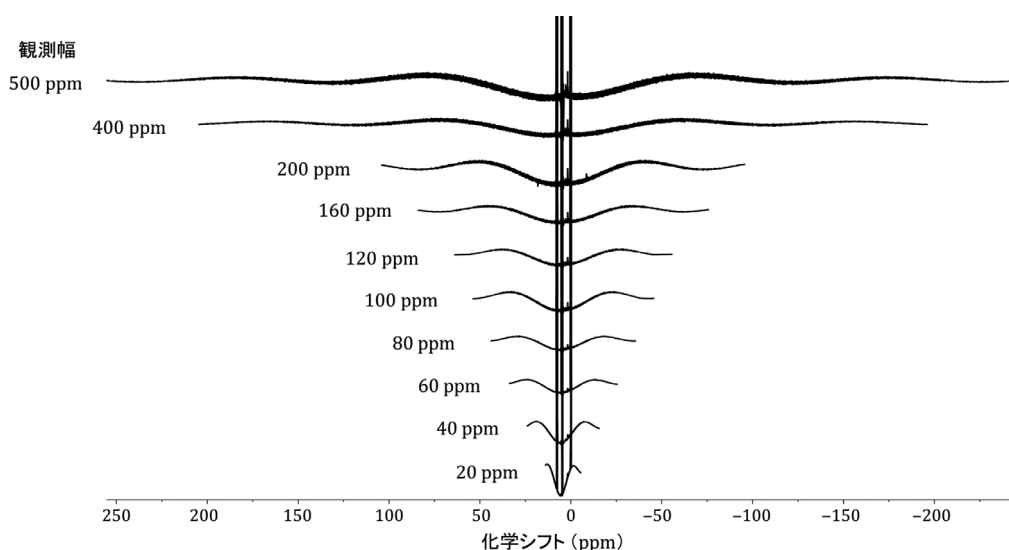


図4 観測幅を変化させた時のNMRスペクトル

りすることで、データ解析やS/Nに影響を及ぼす。したがって、磁場を均一にするシム調整を行い、可能な限り磁場が均一な状態で測定を行う必要がある。

2.2.3 正確なデータ解析 (S_s , S_{IS})

分析対象成分および基準物質のシグナル面積値を正しく得るためには、測定パラメータの適切な設定だけでなく、正確にデータ解析を行うことも重要である。qNMRにおけるデータ解析は通常、フーリエ変換、位相補正、積分範囲の設定、ベースライン補正の手順で行われ、正確なシグナル面積値を得るための解析方法についてはいくつもの報告がある^{1),38),39)}。例えば、シグナルごとに適切な位相を設定するためには手動で位相補正を行うことが望ましく、シグナルのラインフィッティングや窓関数を設定する場合にはバイアスの有無を確認する必要がある。また、積分範囲を設定する際にはシグナルが完全にベースラインに戻っている範囲まで積分することが重要であり、ベースラインはシグナルごとに直線で設定することが推奨される³⁵⁾。その他、NMRスペクトルでは同一分子から複数のシグナルが検出されるため、不純物のシグナルが重なっている可能性を考慮し、同一分子内の複数のシグナルから得られる定量結果を比較することで妥当性確認を行うことも重要である³⁾。

2.2.4 標準物質の選択 (S_s , S_{IS} , P_{IS})

信頼性の高い測定結果を得るためには、適切な標準物質の選択が不可欠である。「2.2.3 正確なデータ解析(S_s , S_{IS})」で示した通り、qNMRではシグナル面積値を正しく得ることが重要であるため、分析試料に合わせて適切な標準物質を選択できるよう、溶媒への溶解性や化学シフト値の異なる様々な標準物質が供給されている。正確な定量結果を得るためには、分析試料と標準物質の両方が溶媒に完全に溶解することが重要であり、また、分析対象成分と基準物質それぞれのシグナルや不純物のシグナルが重なってはならない。ラベル化合物を標準物質として用いる場合には、ラベル化されていないシグナルが分析対象成分のシグナルと重ならないよう注意する必要がある。これらを考慮し、分析試料に合わせて適切な標準物質を選択することが重要である。

現在、国家計量標準機関や試薬メーカーから世界的に供給されているqNMR用のCRMを表2にまとめた。NMIJからは、3,5-ビス(トリフルオロメチル)安息香酸、1,4-ビス(トリメチルシリル)-2,3,5,6-テトラフルオロベンゼン、フタル酸水素カリウムの3種類をqNMR用のCRMとして頒布している。NMIJ以外の国家計量

標準機関もqNMR用のCRMを開発しており、アメリカ国立標準技術研究所(National Institute of Standards and Technology (NIST))から安息香酸、オーストラリア国立標準研究所(National Measurement Institute Australia (NMIA))からジメチルスルホンが頒布されている。その他、主に試薬メーカーからも多くのqNMR用のCRMを入手可能であるが、そのほとんどが ^1H qNMR用である。一方で、多核qNMR用のCRMとしては ^{19}F や ^{31}P を対象としたものが数種類供給されているもののその数は少なく、 ^{31}P qNMR用のCRMは国家計量標準機関からは頒布されていないのが現状である。したがって、ユーザーが分析対象成分に合わせて適切な標準物質を選択できるように、NMIJでは計量トレーサビリティを確保した、信頼性の高い ^{31}P qNMR用のCRM開発を計画している。

2.2.5 不確かさ評価

計量トレーサビリティの確保された信頼性の高い結果を得るためには、不確かさを評価することも重要である。調製ミスや装置の不調の可能性を考慮し、試料調製や測定は複数回行うことが望ましいが、この時、それぞれの結果の繰り返し再現性のみが評価されている場合も多い。しかし、定量結果に対して高い信頼性を確保するためには、再現性だけでなく秤量や核の数等、純度算出式(1)に用いる全ての要因の不確かさを見積もる必要がある。ここで、NMIJ CRMである3,5-ビス(トリフルオロメチル)安息香酸を用いて、市販されている1,4-BTMSB- d_4 をqNMRにより定量した際のバジェット表を例として表3に示す。測定の不確かさについては、複数の試料調製や測定により得られた結果を分散分析することで、調製の不確かさや測定の再現性を見積もる。標準物質や分析試料の質量の不確かさは、計量法校正事業者登録制度(Japan Calibration Service System(JCSS))に基づき校正された天秤の校正証明書に記載されている不確かさ⁴³⁾、核の数の不確かさは天然存在比の不確かさ⁴⁴⁾、モル質量の不確かさはその算出に用いた原子量の不確かさ^{45),46)}から見積もる。これらの値は国際純正・応用化学連合(International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC))から報告されている。それぞれの要因の不確かさを評価して合成することで初めて、計量トレーサビリティが確保された信頼性の高い結果が得られる⁴⁷⁾。なお、表3における不確かさは各要因の測定量の標準不確かさを合成し、純度に対して0.5%の拡張不確かさ($k=2$)と見積もられる。

不確かさを評価すると、定量結果に対する信頼性を確

表2 世界的に供給されている qNMR 用の CRM^(2),40)-42)

化合物名	核種	化学シフト値	可溶溶媒	頒布元
3,5-ビス (トリフルオロメチル) 安息香酸	¹ H ¹⁹ F	8 ppm から 9 ppm -66 ppm から -60 ppm	有機溶媒系	NMIJ
1,4-ビス (トリメチルシリル) -2,3,5,6-テトラフルオロベンゼン	¹ H ¹⁹ F	0 ppm から 1 ppm -130 ppm から -128 ppm	有機溶媒系	NMIJ
フタル酸水素カリウム	¹ H	7 ppm から 8 ppm	水系	NMIJ, メーカー
炭酸エチレン	¹ H	4 ppm から 5 ppm	水系, 有機溶媒系	メーカー
ギ酸カルシウム	¹ H	8 ppm から 9 ppm	水系	メーカー
安息香酸	¹ H	7 ppm から 8 ppm	有機溶媒系	NIST, メーカー
デュロキノン	¹ H	2 ppm	有機溶媒系	メーカー
テレフタル酸ジメチル	¹ H	4 ppm 8 ppm から 9 ppm	有機溶媒系	メーカー
1,2,4,5-テトラクロロ-3-ニトロベンゼン	¹ H	6 ppm から 10 ppm	有機溶媒系	メーカー
ジメチルスルホン	¹ H	3 ppm	水系, 有機溶媒系	メーカー
4 (ジメチルアミノ) 安息香酸エチル	¹ H	1 ppm から 2 ppm 3 ppm 4 ppm から 5 ppm 6 ppm から 7 ppm 7 ppm から 8 ppm	有機溶媒系	メーカー
チモール	¹ H	1 ppm から 2 ppm 2 ppm から 3 ppm 3 ppm から 4 ppm 6 ppm から 7 ppm	有機溶媒系	メーカー
ペンタクロロベンゼン	¹ H	7 ppm から 8 ppm	有機溶媒系	メーカー
1,3,5-トリメトキシベンゼン	¹ H	3 ppm から 4 ppm 6 ppm から 7 ppm	有機溶媒系	メーカー
1,2,4,5-テトラメチルベンゼン	¹ H	2 ppm から 3 ppm 6 ppm から 7 ppm	有機溶媒系	メーカー
ジメチルマロン酸	¹ H	1 ppm から 2 ppm	水系, 有機溶媒系	メーカー
マレイン酸	¹ H	6 ppm から 7 ppm	水系, 有機溶媒系	メーカー
3,5-ジニトロ安息香酸メチル	¹ H	4 ppm 9 ppm から 10 ppm	有機溶媒系	メーカー
1,4-ビス (トリメチルシリル) ベンゼン- <i>d</i> ₄ : 1,4-BTMSB- <i>d</i> ₄	¹ H	0 ppm から 1 ppm	有機溶媒系	メーカー
ジメチルスルホン	¹ H	3 ppm	水系, 有機溶媒系	NMIA, メーカー
3- (トリメチルシリル) -1-プロパン -1,1,2,2,3,3- <i>d</i> ₆ -スルホン酸ナトリウム : DSS- <i>d</i> ₆	¹ H	0 ppm	水系	メーカー
4,4'-ジフルオロベンゾフェノン	¹⁹ F	-108 ppm から -105 ppm	有機溶媒系	メーカー
2,4-ジクロロベンゾトリフルオリド	¹⁹ F	-66 ppm から -61 ppm	有機溶媒系	メーカー
2-クロロ-4-フルオロトルエン	¹⁹ F	-118 ppm から -115 ppm	有機溶媒系	メーカー
トリフェニルホスファート	³¹ P	-18 ppm から -17 ppm	有機溶媒系	メーカー
リン酸二水素カリウム	³¹ P	0 ppm から 1 ppm	水系	メーカー
ホスホノ酢酸	³¹ P	14 ppm から 18 ppm	水系, 有機溶媒系	メーカー

表3 内標準法を用いた qNMR における純度評価のパジャット表の例

不確かさ要因	記号	不確かさの内容	値	標準不確かさ	感度係数	測定量の標準不確かさ (kg/kg)
NMR 測定	P_s	分散分析 (試料調製, 測定再現性)	0.9998 kg/kg	2.04×10^{-4} kg/kg	1.00 kg/kg	2.04×10^{-4}
シグナル面積値	S_s	分析対象成分の シグナル面積値	7.7206	P_s に含まれる	—	—
	S_{IS}	基準物質の シグナル面積値	7.3076	P_s に含まれる	—	—
核の数	N_s	分析対象成分中の 核の天然存在比	18 個	1.62×10^{-3} 個	-5.55×10^{-2} / 個	8.99×10^{-5}
	N_{IS}	基準物質中の 核の天然存在比	3 個	2.70×10^{-4} 個	3.33×10^{-1} / 個	8.99×10^{-5}
モル質量	M_s	分析対象成分の モル質量	226.502 g/mol	1.30×10^{-2} g/mol	4.41×10^{-3} mol/g	5.74×10^{-5}
	M_{IS}	基準物質の モル質量	258.1165 g/mol	3.00×10^{-3} g/mol	-3.87×10^{-3} mol/g	1.16×10^{-5}
質量	m_s	分析試料の質量	2.3507 mg	5.02×10^{-3} mg	-4.75×10^{-1} /mg	2.39×10^{-3}
	m_{IS}	標準物質の質量	13.6785 mg	5.02×10^{-3} mg	7.31×10^{-2} /mg	3.67×10^{-4}
標準物質の純度	P_{IS}	標準物質の純度	0.9996 kg/kg	3.00×10^{-4} kg/kg	1.00 kg/kg	3.00×10^{-4}

保できるだけでなく、分析結果に大きく寄与している要因を確認できる。例として図5に、拡張不確かさ0.1% ($k=2$)の純度が付与された標準物質と、拡張不確かさ0.5% ($k=2$)の純度が付与された標準物質を用いて定量した場合における各成分の不確かさを比較したデータを示す。ここでは、測定のみを0.1%、核の数や

モル質量、試料の質量の不確かさをそれぞれ0.01%と仮定した。定量値の拡張不確かさ ($k=2$)は、拡張不確かさ0.1%の純度が付与された標準物質を用いた場合は0.23% (合成標準不確かさ0.113% ($k=1$)), 拡張不確かさ0.5%の純度が付与された標準物質を用いた場合は0.54% (合成標準不確かさ0.270% ($k=1$))と見積もられた。また、図5から拡張不確かさ0.1%の純度が付与された標準物質を用いた場合は測定のみが大きな割合を占めている一方で、拡張不確かさ0.5%の純度が付与された標準物質を用いた場合には、定量に用いた標準物質の純度の不確かさが大きな割合を占めていることがわかる。したがって、拡張不確かさ0.1%の純度が付与された標準物質の結果を高精度化するためには主に調製や測定、解析方法を見直すこと、拡張不確かさ0.5%の純度が付与された標準物質の結果を高精度化するためには不確かさがより小さい標準物質を用いることが重要となる。このように、不確かさ評価を行い各要因の不確かさへの寄与率を確認することで、高精度化のために見直すべき要因を抽出できる。

ここでは純度算出式(1)に基づいて不確かさを見積もったが、試料の安定性や緩和時間の設定、データ解析、

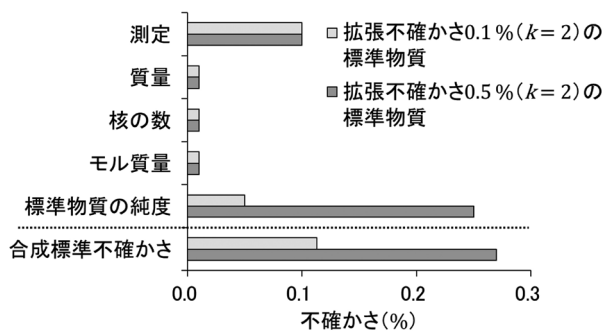


図5 拡張不確かさ0.1% ($k=2$)と拡張不確かさ0.5% ($k=2$)の純度が付与された標準物質を用いて定量した場合の不確かさ評価のシミュレーション例

表4 NMRで分析される代表的な核種とその特徴。数値データは一部単位の表現を修正して文献⁵⁰⁾より引用。

核種	スピン量子数	磁気回転比 ($10^7 \text{ rad s}^{-1} \text{ T}^{-1}$)	^1H を100.0とした時の共鳴周波数(MHz)	天然存在比 (%)	^1H を1.00とした時の相対感度
^1H	1/2	26.75	100.0	99.984	1.00
^{13}C	1/2	6.73	25.1	1.108	1.76×10^{-4}
^{14}N	1	1.93	7.2	99.635	1.01×10^{-3}
^{15}N	1/2	-2.71	10.1	0.365	3.80×10^{-6}
^{17}O	5/2	-3.63	13.6	0.037	1.08×10^{-5}
^{19}F	1/2	25.17	94.1	100	0.833
^{31}P	1/2	10.83	40.5	100	6.63×10^{-2}

シグナル間差、実験者の違い、装置間差などを考慮し、これらの不確かさを見積もることで、さらに信頼性の高い結果が得られる。

2.3 ^1H 以外の核への応用

NMRでは、スピン量子数が0でない原子を観測することができ、測定可能な原子核をもつ元素は多岐にわたる。NMRで観測可能な代表的な核種とその特徴を表4に示す。NMRで検出可能な原子核の中でも、スピン量子数が1/2の原子核は比較的観測しやすい核種であり、スピン量子数が1/2より大きい原子核はシグナルがブロードになる傾向があるために、観測が難しい。また、NMRにおけるシグナルの観測のしやすさは共鳴周波数や天然存在比に依存し、共鳴周波数が大きく天然存在比が高いほど、感度が高く観測しやすくなる。様々な核種でNMRスペクトルが測定可能だが、有機化合物において、NMRによる定量分析が報告されているのは ^1H 、 ^{13}C 、 ^{19}F 、 ^{31}P の4種類に限られている^{4),22),24),30)}。

^1H 以外の核種を測定対象としたqNMRの中でも、 ^{19}F qNMRの実用化のための研究はさかんに行われている。 ^{19}F qNMRを用いた1%以下の不確かさでの定量分析事例も報告されており²⁴⁾、NMIJではCRMの開発や依頼試験で ^{19}F qNMRを利用している。その他の核種では、近年、 ^{31}P qNMRが注目されている。 ^{31}P は ^1H 、 ^{19}F に次いで高感度で、比較的測定しやすい核種である。また、リンは、医薬品、農薬、食品添加物、難燃剤等、私たちの身の回りにある様々な物質に含まれているため、 ^{31}P qNMRの定量対象となりうる物質は多く存在する。 ^{31}P qNMRの利点としては、高分子化合物のような複雑な構造を持つ有機化合物でも単純なスペクトルが得られること、水や有機溶媒のシグナルが観測されないこと、構造が類似した不純物の分離が良いことなどが挙げられる^{48),49)}。このため、 ^{31}P qNMRの測定技術を確認することによりqNMRの適用範囲を拡大でき、 ^1H qNMRでは精確に定量できなかったリン脂質や核酸医薬等の迅速な

医薬品開発への大きな貢献が期待される。

3. ^{31}P qNMRの実用化に向けた課題と対策

「2.3 ^1H 以外の核種への応用」で示した通り、 ^{31}P qNMRは生体試料中の成分や高分子化合物などの定量分析に対して有用性が期待されるが、精確な ^{31}P qNMRを実現するためにはいくつかの課題がある。ここでは、バイアスに関わる「3.1 オフレゾナンス効果」と「3.2 核オーバーハウザー効果 (NOE)」、再現性に関わる「3.3 低い検出感度」、バイアスと再現性の両方に関わる「3.4 ブロードなシグナル」の4つの課題とこれらの解決策を調査・考察した。

3.1 オフレゾナンス効果

NMRでは測定核種に関わらず、広い周波数領域で一定の効率で励起できない⁵¹⁾。図6にパルス幅ごとのNMRにおける励起効率の周波数特性を示す。図6のように、励起中心から離れた周波数では励起効率が減少しオフレゾナンス効果の影響が著しくなることで、励起効率の影響を直接受けるシグナル面積値に対してバイアス

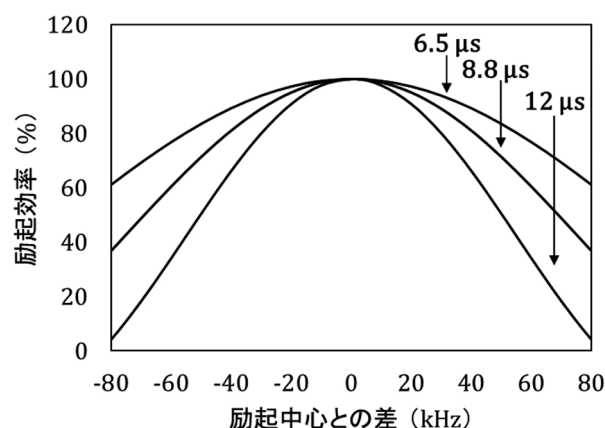


図6 パルス幅ごとのNMRにおける励起効率の周波数特性

がかかる。有機化合物における ^1H NMRの場合、スペクトル上でシグナルが観測される領域はおよそ20 ppm程度と狭いため、オフレゾナンス効果の影響は小さい。一方で、 ^{31}P NMRではおよそ200 ppmの広い領域にシグナルが観測されることからオフレゾナンス効果の影響は著しく、シグナル面積値が減少する。したがって、測定対象とした全てのシグナルの励起効率を等しくする必要がある。

3.1.1 解決策1：励起中心の最適化

オフレゾナンス効果によるシグナル面積値のバイアスを解消する方法として励起中心の最適化があり、最適化には2つのアプローチがある。1つ目は、励起中心を分析対象成分のシグナルと基準物質のシグナルの近傍にそれぞれ設定し、2回測定を行う方法である。図6のように、励起中心の近傍では励起効率はほとんど変化しない。そこで、基準物質のシグナルの近傍に励起中心を設定した測定、分析対象成分のシグナルの近傍に励起中心を設定した測定の2回の測定を行い、2つのスペクトルから定量値を算出することでオフレゾナンス効果の影響を無視できる³⁵⁾。この時、シグナルの中心に励起中心を設定した場合が最も励起効率が高くなるが、励起中心にはノイズが検出される場合があるため、励起中心はシグナルの近傍1 ppm程度に設定することが望ましい。この方法では、1回の測定では分析対象成分または基準物質のどちらか1つのシグナル面積値しか得られない。しかし、2回測定を行いそれぞれの測定から得られる情報を合わせることで、基準物質のシグナルと分析対象成分のシグナルが遠く離れている場合でも正確な定量が可能となる。ただし、この方法はいわば外標準法のような測定であり異なるスペクトル間で比較することから、内標準法を用いた場合と比較し信頼性が低下する可能性がある。

2つ目は、励起中心を分析対象成分のシグナルと基準物質のシグナルの中央に設定する方法である。図6のように、NMRにおける励起効率は励起中心に対して左右対称である。したがって、分析対象成分と基準物質の2本のシグナルの中央に励起中心を設定することで、それぞれのシグナルに対する励起効率を等しくしシグナル面積値のバイアスを低減できる。 ^{31}P qNMRと同様に広い領域にシグナルが観測される ^{19}F qNMRにおいて、この手法を用いた1%以下の不確かさでの定量分析が報告されている²⁴⁾ことから、 ^{31}P qNMRにおいても同様にオフレゾナンス効果の影響の低減が期待される。ただしこの手法では、広い領域に3本以上のシグナルが観測される場合には、1スペクトルで全てのシグナルの励起効率

を等しくすることはできず、定量値にバイアスがかかる。したがって、定量に用いるシグナルの取捨選択することや励起中心を変えた複数の測定を行う等の工夫が必要である。また、励起中心とシグナルが著しく離れている場合には励起効率が低くなり、S/Nの低下に伴い測定再現性も低下するため、必要に応じて試料濃度や積算回数を増やすなどの工夫が必要である。

3.1.2 解決策2：広帯域の均一な励起

オフレゾナンス効果によるシグナル面積値のバイアスを解決する方法としては、広帯域を均一に励起可能なパルスを利用する方法もある。 ^{13}C NMRや ^{19}F NMR等、 ^1H 以外のNMRでは広い周波数領域にシグナルが観測されることから、断熱パルス^{14),52)-54)}、コンポジットパルス^{55),56)}、最適制御パルス⁵⁷⁾等様々なパルスの開発により、広帯域を励起できるよう工夫されている⁵⁸⁾。例えば、断熱パルスの一種であるCHIRP (Compressed High Intensity Radar Pulse)を用いたCHORUS (CHirped, Ordered pulses for Ultra-broadband Spectroscopy)では、広い周波数領域を励起可能と報告されている^{52),53),59)}。また、最近開発された最適制御パルスの一種であるOPERA (Optimizing Phase of Excitation Removes Artifacts)では様々なフリップ角で検証されており、このパルスでは、励起時間を短くすることにより正しい位相で広い周波数領域を励起できると報告されている⁵⁸⁾。

これらのパルスを用いることは、広い周波数領域を均一に励起してオフレゾナンス効果の影響を受けないシグナル面積値が得られるため、シグナルが観測される領域が広い場合や分析対象成分のシグナル数が多い場合にも有用な方法だと考えられる。しかしながら、これらのパルスが定量値のバイアスや再現性にどの程度影響を及ぼすのかについてはこれまでにほとんど検討されていないため、予め定量性を評価することが重要である。

3.2 核オーバーハウザー効果 (NOE)

リン化合物の構造によっては、 ^{31}P と ^1H のカップリングにより ^1H サテライトシグナルが観測されることがある。「2.2.2 測定パラメータの設定 (S_S , S_{IS})」に示した通り、正確なシグナル面積値を得るためには、サテライトシグナルへの不純物シグナルの重なりの有無を確認する必要がある。 ^1H サテライトシグナルを除去するために ^1H デカップルを行うと、不純物シグナルの重なりを確認できるだけでなく、シグナルのS/Nが良くなることや解析が容易になることなどの利点がある。一方で、一般

的に用いられる広帯域デカップリングでは、図7に示すように核オーバーハウザー効果 (NOE) によりシグナル面積値が増大してしまうことが知られている。NOEは、空間的に近い距離にある2つの核のうち一方にラジオ波を照射し続けた際、空間的な相互作用により核スピンの占有数が増えることで現れる効果であり、磁気回転比の大きな¹Hから磁気回転比の小さい¹³Cや³¹PへNOEを発生させることで、シグナル強度が増大する。実際、³¹P qNMRにおいてNOEが発生することで、10%から15%シグナル面積値が増大した例が報告されている^{60)~62)}。¹Hサテライトシグナルに不純物シグナルが重なっていない場合には必ずしも¹Hデカップルする必要はないが、感度が低く十分なS/Nが得られにくい³¹P qNMRにおいては¹Hデカップルすることが推奨される。このため、NOEを抑制して定量性を確保しながらも³¹Pと¹Hのカップリングを抑制する工夫が必要となる。

3.2.1 解決策1：逆ゲートデカップリングの利用

デカップルしつつNOEを抑制する方法として、逆ゲートデカップリングが普及している。例えば¹³C NMRにおいて¹Hをデカップルする場合、通常は¹³Cの核にパルス照射し、信号を取り込んで緩和を待つ間、常に¹Hにもラジオ波を照射する。この方法では、NOEによりシグナル面積値が増大するため、感度の低い¹³C NMRのスペクトルにおけるシグナルのS/Nが良くなる一方で、定量性が失われる。この時、待ち時間に¹Hにラジオ波を照射することでNOEが発生してシグナル面積値が増大することから、逆ゲートデカップリングでは取り込み時間のみ¹Hにラジオ波を照射し待ち時間には照射しないことで、図8のようにNOEによるシグナル面積値の増大を抑制できる^{51),63)}。

このように、逆ゲートデカップリングを行うことでNOEを抑制できるものの、定量性については十分な検証が行われていないため、逆ゲートデカップリングを行ってもシグナル面積値にバイアスがかかる懸念があ

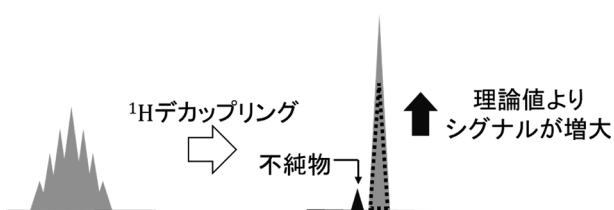


図7 ¹Hデカップルした際のシグナルの模式図

る。この点については、待ち時間が十分でない場合には逆ゲートデカップリングでもNOEが生じてしまうことがある⁵¹⁾とされていることから、待ち時間を適切に設定することでバイアスを低減できる可能性がある。定量性確保のために必要な待ち時間は、パルス照射角や取り込み時間、定量対象シグナルの T_1 に依存することから、測定条件や測定試料ごとにNOEによる影響の有無を確認する必要がある。また、NOEによるシグナル面積値のバイアスを低減する別の方法として、分析対象成分とNOEが同程度のシグナルをもつ基準物質を用いて定量する方法がある^{64),65)}。この方法では、逆ゲートデカップリングによりNOEによる影響が完全に除去されなかったとしても、分析対象成分と基準物質のシグナルのNOEによるバイアスのキャンセルが期待できる。

3.3 低い検出感度

表2に示すように、NMRにおける³¹Pの感度は¹Hに対して 6.63×10^{-2} 倍しかない。感度が低いとS/Nは低下し、積分やベースライン補正の設定によるばらつきが大きくなることで測定再現性が悪くなる。過去にはS/Nと測定の再現性の関係について検証が行われており、S/Nが1000以上の時に1%以下の再現性となることが報告されている³⁷⁾。測定結果の不確かさを見積もる際には再現性以外の要因も考慮する必要があるため、目標の精度に合わせたS/Nが得られるよう工夫する必要がある。

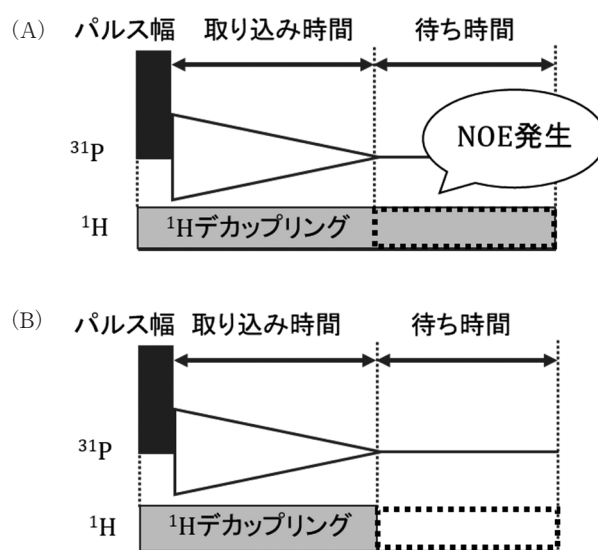


図8 広帯域デカップリング (A) と逆ゲートデカップリング (B) のパルスシーケンスの模式図

3.3.1 解決策 1：積算回数と試料濃度の最適化

S/Nを向上させる最も単純な方法は、積算回数を増やすことである。例えば、S/Nを2倍にする場合、S/Nは積算回数の平方根に比例することから、積算回数を4倍に設定する必要がある。このように、積算回数を大幅に増やすことで目標とするS/Nを得ることができる。しかし、調製や測定にばらつきがある可能性を考慮すると、信頼性の高い1つの定量値を得るためには、複数の試料調製と測定が求められる。したがって、積算回数を増やすと、定量分析に必要な総時間は膨大となる。

一方で試料濃度を2倍にした場合には、同じ測定時間でS/Nを2倍にできる。このように、試料濃度を高くすることで測定時間を延ばさずにS/Nを向上できるため、試料濃度を可能な限り高くすることはS/N向上のための重要な解決策の1つとなる。ただし、高濃度試料では粘性が上がり、シグナルがブロードになる場合があることや、シム調整が難しくなるなどの課題もある。また、試料が析出する場合や溶解しない場合には正確な調製値が得られないことで正しい定量値が得られない。その他、希少で高価な試料では容易に濃度を高くできない場合もある。したがって、目標とする精度に合わせたS/Nを得るために、試料濃度と積算回数それぞれを最適化することが重要である。

3.3.2 解決策 2：緩和試薬による測定時間の短縮

「2.2.2 測定パラメータの設定 (S_s, S_{IS})」で述べた通り、 T_1 が不十分である場合には励起された核スピンの熱平衡状態に戻らないため、正確なシグナル面積値を得る上では十分な待ち時間を設定する必要がある。NMRの測定では、パルスを照射し、信号を取り込んで緩和を待つというサイクルを繰り返す。例えば、JIS K 0138：2018⁵⁾

に記されている通常のqNMRの条件では、パルス照射時間が6.5 μ s、取り込み時間が4 s、待ち時間が60 s程度である。このように、qNMRでは待ち時間が測定時間の大半を占めているため、待ち時間を短縮することで1回の測定時間を大幅に短縮し、同じ測定時間でも積算回数を増やすことでS/Nを向上できる。

NMRで待ち時間を短縮するための試薬として、緩和試薬が知られている。緩和試薬は常磁性金属を含む試薬であり、 ^{13}C NMRなど T_1 が長いシグナルを含む場合のNMRスペクトルを測定する際に用いられる^{66),67)}。電子の磁気回転比はプロトンのおよそ600倍であるため、電子スピンと核スピンの相互作用により緩和時間が短くなることから、緩和試薬を添加することで T_1 が短縮され⁶³⁾、図9のように待ち時間を短縮できる。 ^{13}C NMR以外にも ^1H NMR⁶⁷⁾や ^{31}P NMR⁶⁰⁾において適切な緩和試薬の添加量の検討について報告されており、測定核種や分析対象成分にもよるが、緩和試薬を添加することで T_1 が1/20程度に短縮した例もある。したがって、検出感度が低く長時間の測定が必要な ^{31}P qNMRにおいても、適切な緩和試薬を添加することで測定時間の短縮が期待できる。しかし、緩和試薬の添加量を増やすと T_1 だけでなく横緩和時間(T_2)も短縮されるため、シグナルがブロードになる。 T_2 が短縮されるとS/Nが悪くなってしまい積算回数を増やす必要があることから、結果的に測定時間を短縮することができない。したがって、 T_1 の短縮による測定時間の短縮や T_2 の短縮によるシグナルのブロード化、S/Nを考慮し、効率よく測定できる適切な緩和試薬の添加量を検討する必要がある。また、緩和試薬の中でも電子スピンの緩和時間が長い金属ほど T_2 が短くなるため、金属や緩和試薬の種類によってもシグナルのブロード化への影響は異なる。したがって、効率

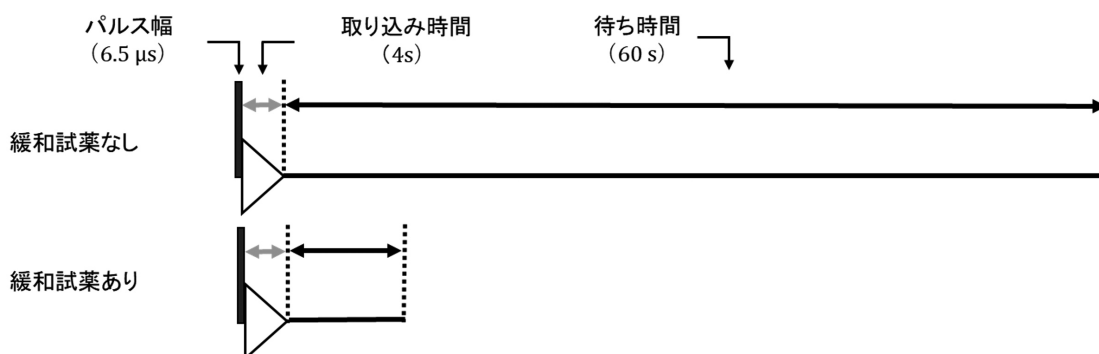


図9 緩和試薬を添加した際のパルスシーケンスの模式図

よく S/N を向上させるためには、適切な緩和試薬の検討も必要である。緩和試薬を添加した際の定量性はあまり評価されていないことから、緩和試薬の種類や添加量を最適化したうえで、定量値のバイアスや再現性を評価することも重要である。

また、緩和試薬の添加により NOE によるシグナル面積値のバイアスが抑制されることが報告されている⁶⁸⁾。逆ゲートデカップリングした際の定量性を向上させるためにも、緩和試薬の添加は有効な手段として期待される⁶⁹⁾。

3.4 ブロードなシグナル

1 Hz 以下の半値幅のシャープなシグナルが観測される¹H NMR と比較すると、³¹P NMR ではシグナルがブロードになる傾向がある^{60,70)}。例えば半値幅が2倍になった場合、シグナル面積値は変わらないことから S/N は 1/2 倍となる。しかし、「3.3 低い検出感度」に記載した通り、S/N が悪い場合には積分やベースライン設定の影響が再現性に大きく影響してしまう。また、ブロードなシグナルのシグナル面積値を正しく得るためには積分範囲を広げる必要があるが、この時、積分範囲の設定、シグナルの分離、ベースライン設定などの影響で、定量性が低下する。さらに、³¹P NMR は検出感度が悪いことから、シグナルがブロードになることで S/N が悪くなることは大きな課題といえる。したがって、ブロードなシグナルを正しく解析する工夫や、シグナルをシャープにする工夫が必要となる。

3.4.1 解決策 1：解析条件の最適化

「2.2.3 正確なデータ解析 (S_S , S_{IS})」で述べた通り、qNMR ではシグナル面積値を正しく求めることが重要である。NMIJ では、¹H qNMR の積分範囲は、¹³C サテライトシグナルの外側 30 Hz 程度としている³⁹⁾。これは、¹³C サテライトシグナルを基準に積分範囲を変化させて解析を行い、シグナル面積値を正しく評価できる積分範囲を検討した結果である。したがって、³¹P を測定対象にした場合でも正しいシグナル面積値を求められるよう、解析方法を最適化する必要がある。³¹P qNMR の場合、分析対象物質の化学構造によって¹³C や¹H のサテライトシグナルは観測されない場合もあるため、これらのサテライトシグナルを基準とした積分範囲の設定は汎用性に欠ける。一般的に NMR のシグナルはローレンツ型であることから、半値幅の 64 倍から 128 倍を積分範囲として設定することが望ましいとされている⁵⁾。しかし、これはあくまで目安であり、NMR では磁場の状態

やシグナルのカップリング等でシグナル形状が変わるため、半値幅を基準に積分範囲を検討し、ブロードなシグナルでも正確な面積が得られる適切な積分範囲を設定することが必要となる。

3.4.2 解決策 2：溶液条件の最適化

³¹P NMR では温度や pH、³¹P のイオン化状態、溶液中のイオン強度が化学シフト値やシグナルの形状に影響を及ぼしやすい⁷⁰⁾。例えば、アデノシン三リン酸の試料溶液に Mg²⁺ を添加した結果、Mg²⁺ とアデノシン三リン酸の相互作用によりリン酸部分の動きが制御されてシグナルがシャープになったことが報告されている⁷¹⁾。また、温度や pH を変化させることでシグナルがシャープになる場合もある。ただし、測定中に温度や pH が変化してシグナルの化学シフト値がずれると積算する過程でシグナルがブロードになってしまう可能性がある。そこで、温度を一定に保つことや溶媒に緩衝液を用いて pH を一定に保つことなど、測定中の試料溶液の状態を一定に保つことでシグナルをよりシャープにすることができると考えられる。このように、試料溶液の状態によりシグナルの形状や化学シフト値が容易に変化することから、シャープなシグナルが得られる適切な条件を探索することで、バイアスなく再現性の良い定量結果を得ることができる。

4. まとめ

本調査研究では、¹H を測定核種とした定量核磁気共鳴分光法 (qNMR) を参考に qNMR の信頼性向上に関わる要因を調査し、調製、測定、解析の各手順において測定結果の信頼性向上のために注意すべき要因についてまとめた。また、近年注目され始めている³¹P qNMR の現状を調査し、³¹P qNMR は生体中の核酸やリン脂質等の社会的なニーズの高い化学物質の正確な定量分析への利用が期待できることが分かった。さらに、正確な³¹P qNMR の測定技術を確立して実用化していくため、定量結果におけるバイアスの低減や再現性向上のための課題を調査し、これらの課題の解決方法について考察した。本調査研究で整理した課題を解決することで、バイアスがなく、再現性の高い正確な³¹P qNMR 測定技術の実現が期待できる。

今後は、生体試料中の成分等の信頼性の高い定量分析を可能にするため、本調査研究を通して得た知見を活かして³¹P qNMR の技術課題を解決していく。さらに、正確な³¹P qNMR の測定技術を確立する過程で培った経験

や技術を応用し、他の核種に対する qNMR も確立していきたい。

謝辞

本調査研究を行うにあたり、日頃からきめ細やかにご指導いただいている物質計測標準研究部門 有機基準物質研究グループの山崎太一主任研究員、伊藤信靖グループ長をはじめ、有機基準物質研究グループの諸先輩方には、多くのご助言をいただきました。心より感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 斎藤直樹. 計測と制御, 53, 529 (2014).
- 2) M. Weber, C. Hellriegel, A. Rueck, J. Wuethrich, and P. Jenks. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 93, 102 (2014)
- 3) T. Yamazaki and A. Takatsu. *Accred. Qual. Assur.*, 19, 275 (2014).
- 4) T. Saito, T. Ihara, M. Koike, S. Kinugasa, Y. Fujimine, K. Nose, and T. Hirai. *Accred. Qual. Assur.*, 14, 79 (2009).
- 5) JIS K 0138:2018, 定量核磁気共鳴分光法通則 (qNMR 通則).
- 6) 第十六改正日本薬局方第一追補—G5. 生薬関連, 核磁気共鳴 (NMR) 法を利用した定量技術と日本薬局方試薬への応用 (平成 24 年 10 月 1 日施行) .
- 7) 食品衛生施行規則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 (告知: 厚生労働 307 号) (官報, 号外第 191 号, 平成 23 年 8 月 31 日) .
- 8) ISO 24583:2022, Quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy – Purity determination of organic compounds used for foods and food products – General requirements for ^1H NMR internal standard method.
- 9) 齋藤剛, 井原俊英, 佐藤浩志, Harald JANCKE, 衣笠晋一. 分析化学, 52, 1029 (2003).
- 10) 齋藤剛. 計測と制御, 49, 726 (2010).
- 11) T. Saito, T. Ihara, T. Miura, Y. Yamada, and K. Chiba. *Accred. Qual. Assur.*, 16, 421 (2011).
- 12) M. Numata, Y. Kitamaki, Y. Shimizu, T. Yamazaki, N. Saito, M. Kuroe, N. Hanari, K. Ishikawa, T. Saito, and T. Ihara. *Metrologia*, 56, 034002 (2019).
- 13) L. Marchetti, V. Brighenti, M. C. Rossi, J. Sperlea, F. Pellati, and D. Bertelli. *Molecules*, 24, 1138 (2019).
- 14) W. Wollinger, J. L. N. Fernandes, L. H. K. Q. Júnior, B. C. Garrido, and F. R. de A. Neto. *Microchem. J.*, 140, 167 (2018).
- 15) A. V. Mäkelä, I. Kilpeläinen, and S. Heikkinen. *J. Magn. Reson.*, 204, 124 (2010).
- 16) T. Yamazaki, T. Saito, and T. Ihara. *J. Chem. Metrol.*, 11, 16 (2017)
- 17) Y. Liu, Z. Liu, H. Yang, and L. He. *J. Anal. Methods Chem.*, 2016, 5 (2016).
- 18) N. M. Do, M. A. Oliver, J. J. Salisbury, and C. B. Wager. *Anal. Chem.*, 83, 8766 (2011).
- 19) W. He, F. Du, Y. Wu, Y. Wang, X. Liu, H. Liu, and X. Zhao. *J. Fluor. Chem.*, 127, 809 (2006).
- 20) 加藤毅, 西宮真美, 川田晶子, 視弘乃介. オレオサイエンス, 19, 43 (2019).
- 21) M. Köllö, M. Kudrjašova, M. Kulp, and R. Aav. *Anal. Methods*, 5, 4005 (2013).
- 22) N. Uchiyama, J. Hosoe, N. Sugimoto, K. Ishizuki, T. Koide, M. Murabayashi, N. Miyashita, K. Kobayashi, Y. Fujimine, T. Yokose, K. Ofuji, H. Shimizu, T. Hasebe, Y. Asai, E. Ena, J. Kikuchi, K. Kiyota, K. Fujita, Y. Makino, N. Yasobu, Y. Iwamoto, T. Miura, K. Mizui, K. Asakura, T. Suematsu, H. Muto, A. Kohama, T. Goto, M. Yasuda, T. Ueda, and Y. Goda. *Chem. Pharm. Bull.*, 69, 630 (2021).
- 23) 齋藤直樹, 齋藤剛, 山崎太一, 加藤尚志, 井原俊英. 分析化学, 63, 909 (2014).
- 24) G. Dikmen and O. Uslu. *Turk. J. Chem.*, 4, 132 (2021).
- 25) T. D. W. Claridge. *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry (Third edition)*, Elsevier Science (2016).
- 26) G. Wider and L. Dreier. *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 2571 (2006).
- 27) L. E. C. Benedito, A. O. Maldaner, and A. L. Oliveira. *Anal. Methods.*, 10, 489 (2018).
- 28) R. Watanabe, C. Sugai, T. Yamazaki, R. Matsushima, H. Uchida, M. Matsumiya, A. Takatsu, and T. Suzuki. *Toxins*, 8, 294 (2016).
- 29) O. Frank, J. K. Kreissl, A. Daschner, and T. Hofmann. *J. Agric. Food Chem.*, 62, 2056 (2014).
- 30) I. W. Burton, M. A. Quilliam, and J. A. Walter. *Anal. Chem.*, 77, 3123 (2005).
- 31) F. Malz and H. Jancke. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 38, 813 (2005).

- 32) 山崎太一. ケミカルタイムス, 4, 18 (2016).
- 33) S. Westwood, T. Yamazaki, T. Huang, B. Garrido, I. Ün, W. Zhang, G. Martos, N. Stoppacher, T. Saito, and R. Wielgosz. *Metrologia*, 56, 064001 (2019).
- 34) T. Yamazaki, S. Nakamura, and T. Saito. *Metrologia*, 54, 224 (2017).
- 35) 「qNMR プライマリーガイド」ワーキンググループ. qNMR プライマリーガイド: 基礎から実践まで, 共立出版 (2015).
- 36) T. Miura, N. Sugimoto, S. Bhavaraju, T. Yamazaki, Y. Nishizaki, Y. Liu, A. Bzhelyansky, C. Amezcua, J. Ray, E. Zailer, B. Diehl, V. Gallo, S. Todisco, K. Ofuji, K. Fujita, T. Higano, C. Geletneky, T. Hausler, N. Singh, K. Yamamoto, T. Kato, R. Sawa, R. Watanabe, Y. Iwamoto, and Y. Goda. *Chem. Pharm. Bull.*, 68, 868 (2020).
- 37) T. Saito, S. Nakaie, M. Kinoshita, T. Ihara, S. Kinugasa, S. Nomura, and T. Maeda. *Metrologia*, 41, 213 (2004).
- 38) 三浦亨, 杉本直樹, 渡邊龍一, 末松孝子, 高柳庸一郎, 伊藤喜之, 斎藤直樹, 澤竜一, 加藤毅, 藤峰慶徳, 小池亮, 大福裕子, 山田裕子, 内海博明, 鈴木敏之. *YAKUGAKU ZASSHI*, 137, 1543 (2017).
- 39) 山崎太一, 齋藤剛, 三浦亨, 井原俊英. *分析化学*, 61, 963 (2012).
- 40) M. Weber, C. Hellriegel, A. Rück, R. Sauer Moser, and J. Wüthrich. *Accred. Qual. Assur.*, 18, 91 (2013).
- 41) M. Weber, C. Hellriegel, A. Rueck, J. Wuethrich, P. Jenks, and M. Obkircher. *Anal. Bioanal. Chem.*, 407, 3115 (2015).
- 42) R. Rigger, A. Rück, C. Hellriegel, R. Sauer Moser, F. Morf, K. Breitru ck, and M. Obkircher. *J. AOAC Int.*, 100, 1365 (2017).
- 43) 独立行政法人製品評価技術基盤機構認定センター. JCSS 不確かさの見積りに関するガイド 登録に関わる区分: 質量 校正手法の区分の呼称: はかり (第 13 版).
- 44) J. Meija, T. B. Coplen, M. Berglund, W. A. Brand, P. de Bièvre, M. Gröning, N. E. Holden, J. Irrgeher, R. D. Loss, T. Walczyk, and T. Prohaska. *Pure App. Chem.*, 88, 293 (2016).
- 45) T. Prohaska, J. Irrgeher, J. Benefield, J. K. Böhlke, L. A. Chesson, T. B. Coplen, T. Ding, P. J. H. Dunn, M. Gröning, N. E. Holden, H. A. J. Meijer, H. Moossen, A. Possolo, Y. Takahashi, J. Vogl, T. Walczyk, J. Wang, M. E. Wieser, S. Yoneda, X. -K. Zhu and J. Meija. *Pure Appl. Chem.*, 94, 573 (2022).
- 46) 公益財団法人 日本分析化学会. 分析値の不確かさ 求め方と評価, 丸善出版 (2013).
- 47) 田中健一. 精密工学会誌, 65, 945 (1999).
- 48) 吉藤正明. 有機合成化学協会誌, 28, 177 (1970).
- 49) X. Li and K. Hu. *Annu. Rep. NMR Spectrosc.*, 90, 85 (2017).
- 50) 安藤喬志, 宗宮創. これならわかる NMR—そのコンセプトと使い方—, 化学同人 (2009).
- 51) 浅野敦志. ぶんせき, 6, 266 (2014).
- 52) N. Khaneja. *J. Magn. Reson.*, 282, 32 (2017).
- 53) J. E. Power, M. Foroozandeh, R. W. Adams, M. Nilsson, S. R. Coombes, A. R. Phillips, and G. A. Morris. *Chem. Commun.*, 52, 2916 (2016).
- 54) A. Tannús and M. Garwood. *NMR Biomed.*, 10, 423 (1997).
- 55) M. H. Levitt. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 18, 61 (1986).
- 56) S. Odedra, M. J. Thrippleton, and S. Wimperis. *J. Magn. Reson.*, 225, 81 (2012).
- 57) T. E. Skinner, T. O. Reiss, B. Luy, N. Khaneja, and S. J. Glaser. *J. Magn. Reson.*, 167, 68 (2004).
- 58) P. Coote, W. Bermel, and H. Arthanari. *J. Magn. Reson.*, 325, 106928 (2021).
- 59) M. Foroozandeh, M. Nilsson, and G. A. Morris. *J. Magn. Reson.*, 302, 28 (2019).
- 60) K. R. Metz and L. K. Dunphy. *J. Lipid Res.*, 37, 2251 (1996).
- 61) N. Sotirhos, B. Herslöf, and L. Kenne. *J. Lipid Res.*, 27, 386 (1986).
- 62) T. S. Al-Deen, D. B. Hibbert, J. M. Hook, and R. J. Wells. *Accred. Qual. Assur.*, 9, 55 (2004).
- 63) 竹内敬人, 加藤敏代. よくある質問シリーズ よくある質問 NMR の基本, 講談社 (2016).
- 64) R. J. Wells, J. Cheung, and J. M. Hook. *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical analysis*, Elsevier Science (2008).
- 65) Y. Miyata and H. Ando. *J. Health Sci.*, 47, 75 (2001).
- 66) E. Caytan, G. S. Remaud, E. Tenailleau, and S. Akoka. *Talanta*, 71, 1016 (2007).
- 67) Z. Zhou, Y. He, X. Qiu, D. Redwine, J. Potter, R. Cong, and M. Miller. *Macromol. Symp.*, 330, 115 (2013).
- 68) K. R. Metz and L. K. Dunphy. *J. Lipid Res.*, 37, 2251 (1996).
- 69) G. C. Levy and R. A. Komoroski. *J. Am. Chem. Soc.*,

- 96, 678 (1974).
- 70) K. Choi, S. Myoung, Y. Seo, and S. Ahn. *Magnetochemistry*, 7, 15 (2021).
- 71) F. Bhinderwala, P. Evans, K. Jones, B. R. Laws, T. G. Smith, M. Morton, and R. Powers. *Anal. Chem.*, 92, 9536 (2020).