

核磁気共鳴 (NMR) 分光法による有機化合物の 定量分析法に関する調査研究

斎藤直樹

(平成 25 年 4 月 3 日受理)

A survey on quantitative analysis of organic compounds by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy

Naoki SAITO

Abstract

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy is known as a powerful analytical technique, which is used to determine the structure of small and macro organic compounds. In recent years, ^1H NMR is being recognized more and more as a quantitative analytical method, which is based on the principle where the area under a ^1H NMR signal peak in solution state is proportional to the number of nuclei contributing to the peak. In this report, the basic concepts, developmental history and current state of the quantitative ^1H NMR (qNMR) method are described. Furthermore, future prospect of the qNMR method is presented.

1. はじめに

私たちの身の周りには多種多様な有機化合物が存在し、今日の豊かな暮らしはそれら有機化合物の恩恵の下で成り立っていると言っても過言ではない。例えば、高度経済成長を支えた石油や石炭、天然ガスは太古の生物を起源としている天然有機化合物であり、また、私たちは石油等から作り出した人工有機化合物として、プラスチック、合成繊維、医薬品等を利用して豊かな日常生活を営んでいる。現在、国際的な化学物質データベース (Chemical Abstract Service; CAS) に登録されている有機化合物は数千万に及ぶが¹⁾、それらの構造決定に用いる代表的な分析手法の一つが核磁気共鳴 (Nuclear Magnetic Resonance; NMR) 法である。NMR 法は古くから定性分析法としての面に着目されていたが、他の分析手法と比べて感度が悪かったことから、市販化された

1950 年代から主として定性に必要な信号雑音比 (Signal to Noise ratio; SN 比) 向上に注力されてきた歴史を持っている。

また NMR 法は、共鳴する核の個数と信号の積分値 (面積強度) が比例する。例えば ^1H NMR 法では、共鳴する ^1H 核の個数と ^1H 核由来の信号の面積強度が比例することから、異なる種類の既知量の化合物を定量的に加えて ^1H NMR スペクトルを測定することで、未知量の有機化合物の純度測定に利用できる特長も持つ。そのため、NMR 法を利用した定量分析が、1960 年代より一部の研究者を中心に医薬品の純度測定として試みられてきた²⁾⁻⁴⁾。医薬品の純度測定に主に利用されていた滴定法や重量法等は、適用できる有機化合物が限定され、さらに対象とする化合物と類似した構造や物性を持つ化合物を区別して評価することが難しい場合があった。一方、NMR 法は ^1H 核を観測することができるため幅広い種類の有機化合物に適用できる上、有機化合物を構成する ^1H 核は一定の磁場強度の下で、その周りの化学的環境により共鳴周波数が異なるため、 ^1H 核を識別し対象とする化

* 計測標準研究部門 計量標準システム科 化学計量システム研究室

合物のみを選択的に評価しやすいことから、純度測定に有用であると考えられた。しかし、当時の NMR 法を利用して定量に必要な SN 比を得るためには、測定する試料溶液の濃度を高くしなければならず、溶解度の問題からその溶液調製がしばしば困難であった。そのため、当時の NMR 法は公的に認められた定量分析法（公定法）としてはほとんど用いられなかった⁵⁾。

当時の NMR 法において、高い SN 比のスペクトルを得ることが困難であった理由としては、以下の 2 点が挙げられる。1 点目としては、NMR 装置の磁石に永久磁石や電磁石を利用していたため、NMR を観測するための磁場が弱かった点である。2 点目としては、当時の NMR 法では、一定の磁場強度の下で、原子核に照射する電磁波の周波数を連続的に変化させながら共鳴スペクトルを長時間かけて観測する方法（Continuous Wave method; CW 法）を利用していたため、信号の積算を効率的に行うことができなかった点である。これらの課題の解決に向けて NMR 法の発展は進み、強力な磁場を生み出せる超伝導磁石が実用化され⁶⁾、また並行して、パルス波により原子核を一斉に励起し、観測される信号をフーリエ変換してスペクトルを取得する手法（Pulse Fourier Transform method; パルス FT 法⁷⁾が発達した。超伝導磁石とパルス FT 法を利用した NMR 法（FT-NMR 法）では、SN 比の高いスペクトルを短時間で得られるようになったものの、一方で NMR 装置等に関する様々な要因によって定量精度に劣るという新たな課題が現れた。この問題については、NMR 法の著名な書籍⁸⁻⁹⁾等において積極的に議論されることは少なく、FT-NMR 法を高精度な定量分析に用いることに関して否定的な見解が目立っていた。そのため、¹H 核を中心とする FT-NMR 法による定量分析法（Quantitative NMR method; qNMR 法）は、高い定量精度を要求しない応用のみに限定され、その精度は長い間向上しなかった。

本調査研究では、純度評価法として今日実用化に至った qNMR 法に関して、さらなる高度化を目指していく上で必要となるこれまでの知見や取り組みの調査を行うことで、現状を把握し、これからの研究方針をまとめた。次章で FT-NMR 法の原理について述べ、qNMR 法における多様な定量手法を紹介する。第 3 章において、最も高精度な定量手法である内標準法に着目し、純度評価に必要な要素技術を確認させるために行われてきた取り組みについて述べる。第 4 章において、実用化した qNMR 法の活用について述べる。第 5 章において、qNMR 法の現在の課題と取り組みについて考察し、最後に第 6 章において、将来を展望する。

2. FT-NMR 法の原理と定量分析への活用

ここでは、NMR 法の原理を示し、NMR を観測することができる核種と化学シフトについて概説したうえで、FT-NMR 法の原理と仕組みについて述べる。そして、信号の面積強度と共鳴核の個数の関係を示し、この関係に基づく qNMR 法の定量手法として、分子内定量法並びに分子間定量法について紹介する。このうち、分子間定量法については代表的な①内標準法、②外標準法、③電気信号法について紹介する。なお、内標準法の一つである残留溶媒分子が持つ¹H 核の信号を利用する方法や外標準法の一つである絶対検量線法、さらには、上記の区分に属さない標準添加法については別稿¹⁰⁻¹¹⁾を参照されたい。

2.1 NMR を観測可能な核と化学シフト

NMR は磁場中における核スピンの共鳴現象であり、スピン量子数 I が 0 でない原子核 ($\pm 1/2$, ± 1 , $\pm 3/2$, ...) で観測される¹²⁾。核の共鳴周波数 ν は、NMR 装置の磁石が生み出す外部磁場強度 B_0 に比例し、その関係は次式で与えられる。

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 \quad (1)$$

ここで、 γ は磁気回転比であり、共鳴核に固有の定数である。同じ強度の磁場中においては、 γ の高い核ほど高い周波数で共鳴する。 γ は共鳴核の磁気モーメント μ と次式で関係付けられる。

$$\mu = \frac{\gamma \hbar}{2\pi} \quad (2)$$

ここで、 I は共鳴核のスピン量子数であり、 \hbar はプランク定数を示す。表 1 に示したように、¹H 核が最も高い感度を持つことが知られている。

一定強度の磁場中において、化合物を構成する同じ種類の共鳴核（例えば ¹H 核）に着目すると、その周りの電子密度分布を左右する化学的環境（官能基の種類）の違いにより局所的な磁場強度が変化するため、核の共鳴周波数は変化する。このことは、化合物の構造決定において役立つ。しかし、(1) 式より外部磁場の強度 B_0 が異なると核の共鳴周波数 ν が変化してしまい、同じ化合物であっても磁場強度の違いで NMR スペクトルが異なってしまう。そこで、基準となる核の共鳴周波数からの相対的な差を表現した化学シフト δ (単位: ppm) が導入されている。

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{\text{ref}}}{\nu_{\text{ref}}} \times 10^6 \quad (3)$$

表 1 NMR を観測可能な代表的な核種

共鳴核の感度は核固有の共鳴周波数に天然存在比を乗じて算出し、 ^1H 核に対する相対値で示した。

核種	スピン 量子数 I	磁気回転比 γ ¹³⁾ ($\times 10^4 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{T}^{-1}$)	共鳴周波数 (MHz) ⁹⁾ (外部磁場 $B_0=9.4 \text{ T}$)	天然存在比 ⁹⁾ (%)	相対的な 感度 ⁹⁾
^1H	1/2	26.753	400.0	99.98	1
^2H	1	4.107	61.4	0.015	1.45×10^{-6}
^{13}C	1/2	6.728	100.6	1.11	1.76×10^{-4}
^{14}N	1	1.934	28.9	99.63	1.01×10^{-3}
^{15}N	1/2	-2.712	40.5	0.37	3.85×10^{-6}
^{17}O	5/2	-3.628	54.2	0.037	1.08×10^{-5}
^{19}F	1/2	25.179	376.3	100	0.83
^{29}Si	1/2	-5.319	79.5	4.7	3.69×10^{-4}
^{31}P	1/2	10.840	161.9	100	6.63×10^{-2}

ここで、 ν_{ref} は基準となる化合物が持つ核の共鳴周波数 (単位: Hz) であり、 ^1H NMR 法ではテトラメチルシラン (TMS; $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$) の共鳴核の信号を基準 (0 ppm) とする。スペクトルの横軸を化学シフトで表すことによって、磁場強度が異なっても同じ化合物では同様のスペクトルとなり、化合物の ^1H 核の信号は概ね 0 ppm ~ 10 ppm の範囲で観測される。

2.2 FT-NMR 法の原理と仕組み

磁場中における化合物の核に対し、その共鳴周波数に相当するラジオ波をパルス状 (例えば μs オーダー) で照射すると、パルス照射時間 t の逆数の 2 倍に相当する周波数範囲で共鳴する核を一度に励起させることができる¹⁴⁾ (図 1)。このパルス状のラジオ波 (パルス波あるいは単にパルス) を与えた直後から、熱平衡状態へ戻っていく緩和の過程で観測される自由誘導減衰 (Free Induction Decay; FID) 信号をフーリエ変換することで NMR スペクトルが得られる。FT-NMR 法では、1: パルス照射による共鳴核の励起、2: FID 信号の受信、3: 次のパルス照射までの待ち時間 (繰返し待ち時間) を 1 サイクルとして、信号の積算を効率的に行うことが可能であり、CW 法を利用した NMR 法に比較して SN 比が大幅に向上したスペクトルを短時間で測定できるようになった。

一方、照射するパルス波は化合物の信号が観測される範囲のみを選択的に励起することができず、それを越えた不要な周波数成分も励起してしまう欠点がある。この

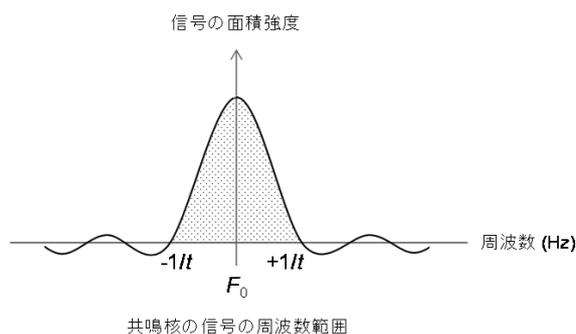


図 1 パルス波によって励起される共鳴核の信号の周波数範囲。 F_0 はパルス状に成形したラジオ波の周波数である。

ような成分に由来する信号は、ノイズとしてスペクトル上に折り返されて検出されるため、化合物の信号へ重複し、SN 比の低下を招く。そこで、FT-NMR 装置では、化合物の信号が観測される範囲を通過させるフィルタを利用して、不要な周波数成分由来の信号を除去する工夫がされている。

FT-NMR 装置の基本的な構成図を図 2 に示す。FT-NMR 装置は、装置の制御を行うコンピュータ、送受信される信号を取り扱う分光計、超伝導磁石の 3 種類のユニットで主に構成される。NMR 測定は、まず、①分光計に接続したコンピュータにおいてパルス照射のプログラムが設定され、②そのプログラムに従って分光計の送信器により、測定する試料溶液にパルス波が照射される。次に、③その試料溶液から検出された FID 信号は、

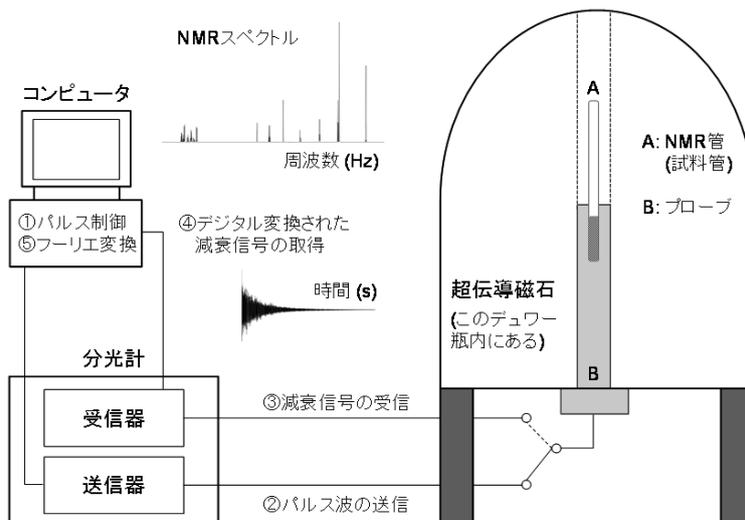


図2 FT-NMR装置の基本的な構成図。プローブはNMR装置において検出器の役割を担う。また、超伝導磁石が収まるデュワー瓶には、磁石の超伝導状態を維持するための液体ヘリウムと、その蒸発量を抑えるための液体窒素が充填されている。

受信器により受信され、アナログ/デジタルコンバータによりデジタル信号へ変換される。そして、④このデジタル信号は、コンピュータへ転送され、⑤コンピュータ上でフーリエ変換されてNMRスペクトルが得られる。このとき、①～④を繰り返す、すなわち積算することで、⑤で得られるNMRスペクトルのSN比が向上する。なお、③で検出されたFID信号は、ノイズに埋もれないように検出直後にプリアンプにより増幅され、その後、不要な周波数成分由来の信号がフィルタにより除去される。

2.3 信号強度と共鳴核の個数の関係

核スピン系が熱平衡状態にある場合、磁気モーメント μ の総和としてZ軸方向(NMR管の高さ方向)に並んだ共鳴核の平衡磁化 M_0 を位相が 90° 異なるXY平面上へ倒す(共鳴核に 90° パルスを照射する)ことで、FID信号を最大強度で検出することが可能となる。共鳴核に 90° パルスを照射してから繰返し待ち時間 T_r 後のZ軸方向の磁化 M_z は、次式で関係付けられる。

$$\frac{M_z(T_r/T_1)}{M_0} = 1 - e^{-\frac{T_r}{T_1}} \quad (4)$$

ここで、 T_1 は共鳴核の縦緩和時間を示す。 T_1 は同じ分子内の同じ種類の共鳴核でも、官能基の違いによって異なることが知られている。 90° パルスで共鳴核を励起した場合、NMRスペクトルにおける信号の面積強度 S は、(4)式を用いて以下のようになる¹⁵⁾。

$$S = kNc(1 - e^{-\frac{T_r}{T_1}}) \quad (5)$$

ここで、 k は対象とする試料溶液の測定に係る定数、 N は信号に寄与する共鳴核の個数、 c は試料溶液のモル濃度をそれぞれ示す。分子内の共鳴核が持つ最も長い T_1 に対して、 $T_r \gg T_1$ の条件下では全ての共鳴核において $1 - e^{-\frac{T_r}{T_1}} = 1$ となることから、(5)式より次式が得られる。

$$S = kNc \quad (6)$$

この $T_r \gg T_1$ の条件(定量条件)下においては、NMRスペクトルにおける信号の面積強度は、共鳴核の個数に比例して積算された強度を示す。

2.4 分子内定量法

ある化合物において、異なる環境にある同じ種類の共鳴核の信号の面積強度 S_1 、 S_2 の比は、(6)式から分子内における共鳴核の個数 N_1 、 N_2 の比として表せる。

$$\frac{S_1}{S_2} = \frac{kN_1c}{kN_2c} = \frac{N_1}{N_2} \quad (7)$$

例えば、エタノール ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) の ^1H NMRスペクトルにおいて、メチル基 ($-\text{CH}_3$) の3個の等価な ^1H 核と、メチレン基 ($-\text{CH}_2-$) の2個の等価な ^1H 核に着目すると、両者の信号の面積強度比は(7)式から ^1H 核の個数比と同じ3:2となる。この情報は、化学シフトの情報と併せて構造解析において重要な役割を果たしている。

このことを利用すると、工業材料として重要な合成高分子化合物において、主鎖と末端基に由来する各信号の

面積強度比から重合度を定量的に評価することができる。高分子化合物の重合度あるいは分子量は、その物性を決定付ける要因であるため、NMR法は高分子化合物における分子内定量法として広く利用されている¹⁶⁾⁻¹⁸⁾。

2.5 分子間定量法

2.5.1 内標準法

複数の化合物が溶解する試料溶液において、化合物間で反応しなければ、得られるNMRスペクトルは各化合物のNMRスペクトルを合わせたものとなる。したがって、信号が重なり合わなければ、複数の化合物の試料溶液においても、信号の面積強度を独立に評価することができる。すなわち、2種類の化合物Xと化合物Sを混合した試料溶液から得られるNMRスペクトルにおいて、各化合物に由来する信号の面積強度は、(6)式より次式で表せる。

$$\frac{S_X}{S_S} = \frac{k}{k} \frac{N_X}{N_S} \frac{c_X}{c_S}$$

これを化合物Xの濃度 c_X で整理すると、次式となる。

$$c_X = \frac{S_X}{S_S} \frac{N_S}{N_X} c_S \quad (8)$$

さらに、はかり取った試料の質量 m_X , m_S , 分子量 M_X , M_S , 純度 p_X , p_S , 試料溶液の体積 V_X , V_S を用いて、

化合物Xと化合物Sの濃度 c_X , c_S をそれぞれ表すと、 $c_X = \frac{p_X m_X}{M_X V_X}$, $c_S = \frac{p_S m_S}{M_S V_S}$ となり、本試料溶液においては $V_X = V_S$ であるから、次式が得られる。

$$p_X = \frac{S_X}{S_S} \frac{N_S}{N_X} \frac{m_S}{m_X} \frac{M_X}{M_S} p_S \quad (9)$$

このとき、化合物X及び化合物Sの構造が明らかであり、かつNMRスペクトルにおいて信号に寄与する共鳴核の帰属ができていれば、各信号に寄与する共鳴核の個数も分かるため、両者の面積強度比は純度比に換算することができる。すなわち、定量的な物質の比較を異なる化合物間で行うことが可能となる。このとき、共鳴核の信号量の基準として定量的に加える化合物Sを内標準物質と呼び、このような方法で化合物Xを定量する手法を内標準法と呼ぶ(図3)。

内標準法の利点としては、内標準物質と対象化合物Xの質量を精密にはかり取りさえすれば、高精度な定量を実現しやすい点が挙げられる。ただし、内標準物質と対象化合物Xが反応しないこと、内標準物質の信号が対象化合物Xの信号に重ならないことを前提としているため、用いる内標準物質の種類を適切に選定する必要がある¹⁹⁾⁻²¹⁾。

2.5.2 外標準法

図4に示したように、内径の異なる2種類の試料管が

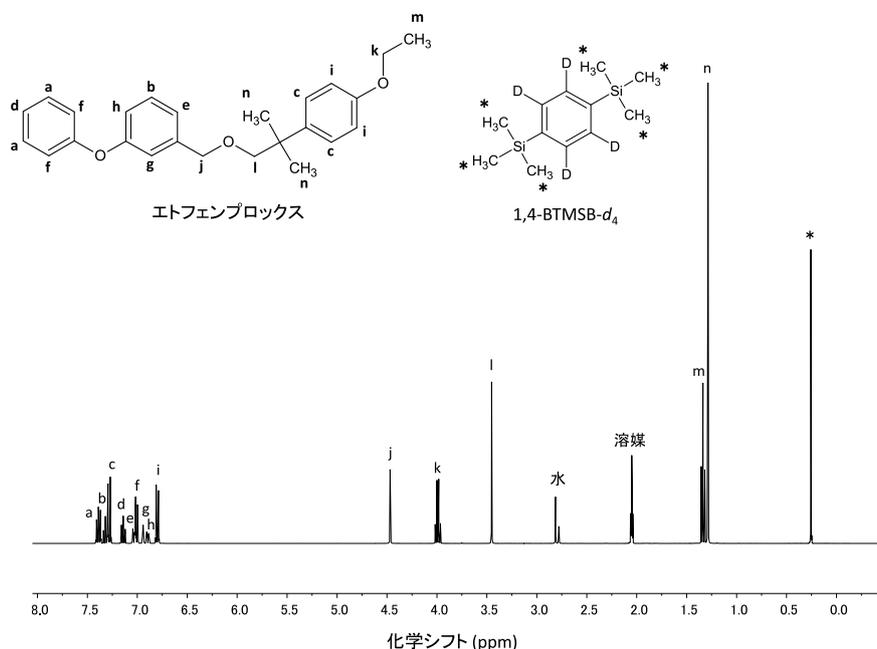


図3 内標準法で得られる¹H NMRスペクトル。農薬(殺虫剤)として知られる有機化合物であるエトフェンプロックスと内標準物質として加えた1,4-BTMSB-d₄(1,4-bis(trimethylsilyl)benzene-d₄)を重アセトンに溶解させた試料溶液における測定結果を示した。1,4-BTMSB-d₄の¹H核の信号量を基準として、エトフェンプロックスを構成するa~nの¹H核の信号を定量することができる。

ら構成される同軸二重試験管を用いて、内管には基準とする化合物 S の試料溶液を加え、外管には対象化合物 X の試料溶液を加えて NMR 測定を行うことで、対象化合物 X を定量する手法を外標準法と呼ぶ²²⁾。この場合、純度を算出する際に、各化合物の試料溶液の体積を考慮しなければならないため、(8) 式より次式が与えられる。

$$p_x = \frac{S_x}{S_s} \frac{N_s}{N_x} \frac{m_s}{m_x} \frac{M_x}{M_s} \frac{V_x}{V_s} p_s \quad (10)$$

外標準法の利点としては、①対象化合物 X と基準とする化合物 S の間の反応や溶解性の違い等を考慮する必要がないため、基準とする化合物 S を選びやすい点、②対象化合物 X のみを回収しやすい点が挙げられる。一方、欠点としては、異なる管に存在する化合物間で定量を行うため、NMR 測定に資する各試料溶液の有効な体積を補正しなければならない点があり、内標準法に比べて高い定量精度を実現することが難しい。

2.5.3 電気信号法

定量性を持つ擬似的な FID 信号を分光計より発生させ、対象化合物 X の FID 信号と同時に検出することで、擬似信号の信号量を基準として対象化合物 X を定量する方法の一つに、ERETIC (Electronic REference To access In vivo Concentrations) 法がある²³⁾。ERETIC 法は、qNMR 法の簡易的な定量手法として用いられている。

ERETIC 法の信号量 (ERETIC 信号) を基準として用いるためには、あらかじめ既知濃度の化合物 S の試料溶液を用いて、ERETIC 信号の校正を行う必要がある。このとき、設定する ERETIC 信号の出力値 c_E に対し、得られる ERETIC 信号の面積強度 S_E は次式より校正される。

$$S_E = \frac{S_E}{N_S} \frac{c_E}{c_S} \quad (11)$$

対象化合物 X の試料溶液を測定する際に、ここであら

かじめ校正された ERETIC 信号を利用することで、対象化合物 X のモル濃度 c_X を次式より評価することができる。

$$c_X = \frac{S_X}{S_E'} \frac{c_E}{N_X} \quad (12)$$

ここで、 S_E' は対象化合物 X の試料溶液を測定した際の ERETIC 信号の面積強度を示す。ERETIC 法の利点としては、2.5.2 で述べた外標準法の利点に加え、ERETIC 信号を NMR スペクトル上の任意の化学シフトに挿入できるため、対象化合物 X に合わせて基準とする化合物 S を選ぶ必要がない点が挙げられる。さらに、ERETIC 信号の校正は測定毎に必ずしも行う必要はないため、迅速かつ簡便な定量測定が可能である。一方、欠点としては、ERETIC 信号の面積強度 S_E を校正する際に扱った基準とする化合物 S の試料溶液と、対象化合物 X の試料溶液が異なるため、同じ条件で測定を行っても ERETIC 信号の面積強度 S_E の再現性が不十分な点 ($S_E \neq S_E'$) が挙げられる。

3. 内標準法を用いた純度評価

qNMR 法は、信号の面積強度が共鳴核の個数に比例することに基いた定量手法であり、分子内における信号の面積強度比からは高分子化合物の重合度等の評価、異なる分子間における信号の面積強度比からは純度等の評価を行うことが可能であることを 2 章で述べた。

しかし、qNMR 法を標準物質の値付け等の精確な定量手法として実用化するためには、2.5.1 で述べた最も高い精度を実現でき得る内標準法をさらに高度化する必要があった。この要素技術の確立のために、これまで行われてきた取り組みについて、最も実用化が進んでいる ¹H NMR 法に焦点を当てて紹介する。具体的には、本法の操作手順に沿って、①試料調製、②スペクトル測定、③スペクトル解析の順に述べていく。その後、③スペクトル解析において、化合物の信号に不純物が重複していることが示唆された場合における④不純物の評価方法の検討について述べる。最後に、①～④における様々な影響を個別に評価するために導入された⑤不確かさ評価について述べる。

3.1 試料調製法の高度化

外径 5 mm の NMR 管を用いて NMR 測定を行う場合、一検体に必要な溶液量は 0.5 mL ~ 0.8 mL である。昨今の環境情勢 (人体へのリスクや環境負荷) を鑑みると、必要以上に多量な有機溶媒を扱うことは社会的に好ま

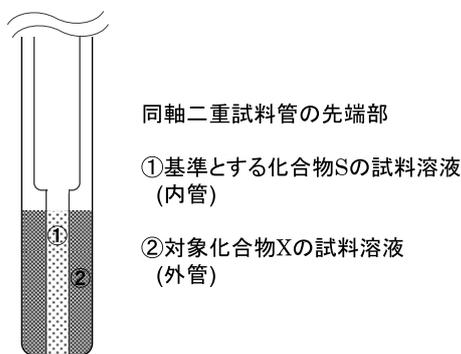


図 4 外標準法で利用される同軸二重試験管。

しくない。その上、 ^1H NMR 測定では、溶媒分子が持つ ^1H 核の信号量を低減すること等を目的として、高価な重水素化溶媒を用いるため、経済的にも好ましくない。したがって、使用する溶媒量を必要最小限に留め、液量に合わせた試料量を扱うことが望ましい。この場合、 ^1H NMR 測定に必要な一検体当たりの試料量は数 mg となるため、微量な試料を精密にひょう量することが定量精度向上に不可欠である²⁴⁾。

純度に付与する不確かさとして 1 % 程度を目標とすると、ひょう量に必要な有効数字は 3桁が要求されるため、少なくとも最小表示が 0.001 mg の天びんが求められる。このとき、風袋を天びんのひょう量皿に乗せた状態で試料を加える操作はやや困難であるため、あらかじめ質量をはかり取った風袋に試料を加えてひょう量し、両者の差し引きから試料量を求める方法の利用が想定される。この方法では、風袋をはかり取る際の不確かさの絶対値の大きさが、試料量の不確かさに寄与する。すなわち、ある試料量をひょう量する際、質量の軽い風袋を使用する場合と重い風袋を使用する場合を比較すると、後者の方がはかり取る試料量の不確かさが増大する²⁵⁾。したがって、微量な試料を精密にひょう量するためには、試料を無理なくひょう量できる容量を持ち、なおかつ極力軽い質量を持つ風袋を選定することが重要である。

さらに、試料を精密にひょう量するためには、化合物の昇華性あるいは揮発性や吸湿性の有無についても意識する必要がある。そのため、産業技術総合研究所計量標準総合センター (National Metrology Institute of Japan; NMIJ) では昇華性や吸湿性が高い化合物については、低温あるいは低湿環境を維持した恒温チャンバー等の環境下で精密なひょう量操作を行える環境を整備している。

3.2 スペクトル測定条件の高度化

3.2.1 パルス波による共鳴核の励起効率

測定する試料溶液に対してパルス波を照射する際の問題点として、共鳴核の励起効率がある。FT-NMR 法では、幅広い周波数範囲で共鳴する核を一度に励起できるが、パルス波の照射位置 (観測中心) から周波数が離れるに従って共鳴核の励起効率が低下する (図 1)。この現象はオフレゾナンス効果と呼ばれるが、 ^1H NMR 法では、化合物の信号が観測される範囲が概ね 0 ppm ~ 10 ppm であるため、この影響は大きくないと主張されており²⁶⁾、観測中心は例えば 5 ppm に固定される。しかし、より正確な定量結果を得るためには、オフレゾナンス効果を考慮して NMR スペクトルごとに観測中心を適

切に設定することが重要である。具体的には、対象化合物の信号と内標準物質の信号の中央に観測中心を設定することが望ましい。対象化合物の複数の信号を定量に用いる場合は、対象化合物の信号と内標準物質の信号のうち、最も離れた信号間の中央付近に観測中心を設定するなどの工夫を行うことが望ましい。

3.2.2 デッドタイム

FT-NMR 装置では、パルス波を照射後、FID 信号を受信するまでの間に送受信回路の切り替えに必要な時間 (デッドタイム) があり、共鳴核を励起した直後の FID 信号を受信することができないため、FID 信号は発生初期の時間領域が失われて受信される。そのため、FID 信号の減衰速度が速い場合、すなわち NMR スペクトルにおいて信号の線幅が広い場合には、とりわけ真の強度を持つ FID 信号を観測することができない²⁷⁾。したがって、NMR スペクトルにおいて広い線幅を示す信号は、その FID 信号がデッドタイムの間に有意に減衰していることから、真の面積強度を示さないと考えられ、信頼性に劣ると言える。そこで、NMR スペクトルにおける信号の面積強度を正確に評価するために、定量に用いる信号の線幅の基準を設定し、デッドタイムの影響を有意に受けている線幅の広い信号を定量に用いないことも重要となる。NMIJ では、信号の半分の高さにおける幅 (半値幅) で 2 Hz を超える信号を可能な限り定量に用いないこととしている。

3.2.3 フィルタ

NMR スペクトルに応じて観測中心を適切に設定する必要性を 3.2.1 で述べたが、信号の測定を行うスペクトルの幅 (観測幅: この中央に観測中心が位置する) を定性的な ^1H NMR 測定で一般に利用される 15 ppm 程度に設定した場合、FID 信号を受信する際に利用されるフィルタ (2.2 参照) の設定が信号の面積強度に大きく影響する。すなわち、SN 比の向上を目的として一般に利用される観測幅の 50 % 程度の幅を持つフィルタでは、スペクトルの両端付近における信号の面積強度の低下は、15 % を超えることが実験的に示されている²⁸⁾ (図 5)。

この問題を解決するために、観測幅は変えず、通常より広い幅を持ったフィルタ (例えば観測幅に対して 2 倍の幅を持つフィルタ)²⁹⁾ の設定を行うことで、スペクトルの両端付近における信号の面積強度の低下を抑える方法が提案された。しかし、この場合、2.2 で述べたように、ノイズがスペクトル上に折り返され、化合物の ^1H 核の信号へ重複する問題を防ぐことができない。

そこで、NMIJ では観測幅を 400 ppm に広げて、 ^1H 核の信号を測定する方法を考案し、利用している¹⁵⁾。こ

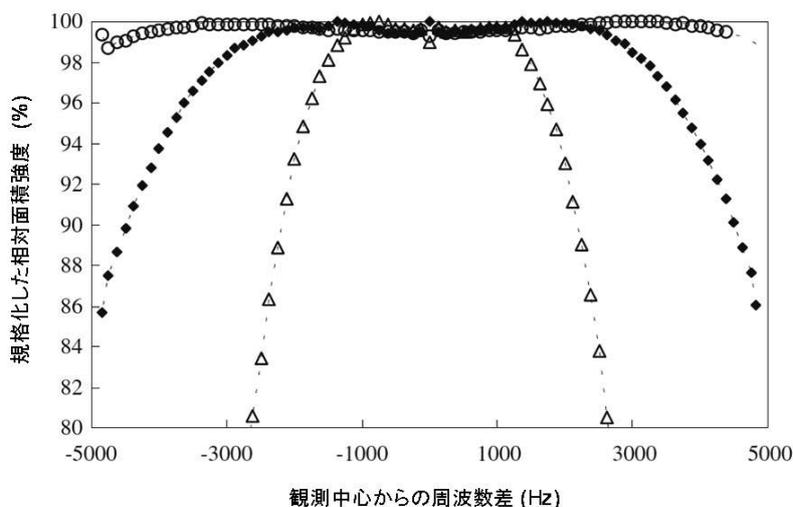


図 5²⁸⁾ フィルタの利用に伴う信号の面積強度の低下. 600 MHz の FT-NMR 装置 (バリアン製, Unity Inova-600A) において, 観測中心を変化させた場合におけるヘキサメチルジシロキサン の ¹H 核の信号の面積強度の変化を示した. 観測幅は 17 ppm (10 000 Hz) であり, フィルタ幅はその 30 % (△), 60 % (◆), 100 % (○) の 3 条件で変化させている. なお, 図は英国物理学会出版局 (IOP Publishing) から提供されたものを一部改変している.

の方法では, 観測幅に対して 50 % 程度の幅を持つフィルタを設定しても, 観測される化合物の ¹H 核の信号は面積強度の低下が抑えられ, なおかつこれらの信号に対するノイズの重複を抑えることができる. 具体的には, 化合物の ¹H 核の信号は, その面積強度を低下させずにバイアスを 0.1 % 以下に抑えて観測することが可能である³⁰⁾.

3.2.4 繰返し待ち時間

定量測定を行う際の繰返し待ち時間 T_r の重要性は 2.3 で述べたが, 理論的には T_r を縦緩和時間 T_1 の 7 倍以上に設定することで, NMR スペクトルにおける信号の面積強度にかかるバイアスを 0.1 % 以下に抑えることが可能である⁹⁾. そのため, 定量測定においては, 目標とする精度に応じて適切な T_r を設定し, 信号の面積強度にかかるバイアスを低減させることが重要である.

3.3 スペクトル解析条件の高度化

3.3.1 位相補正

NMR 法では, FID 信号の観測に関わる検出器と受信器の間で, FID 信号の位相にずれが生じる. そのため, NMR スペクトルにおいて観測される信号の位相補正を行う必要がある. 自動で位相補正を行う場合, 解析ソフトウェアによっては信号の面積強度に一定のバイアスが生じることが示唆されているため, あらかじめ手動で位相補正を行う方法を以てその妥当性を確認しておく必要がある³¹⁾. その上で, 信号の面積強度を精確に評価する

ために, 適切な位相補正の方法を選択することが望ましい.

3.3.2 積分範囲

NMR スペクトルにおいて, 信号の面積強度は信号とベースラインに囲まれた領域を積分することで得られるが, 信号の積分範囲をどこまでに設定するかという点は, 得られる面積強度にかかるバイアスを低減する上で重要となる. スペクトル上で観測される信号は, 理論的には指数関数的に減衰するローレンツ曲線に従う. そのため, 信号の面積強度にかかるバイアスを 1 % 以下まで抑えるためには, 半値幅のおよそ 40 倍の積分範囲を設定しなければならない⁸⁾. しかし, ¹H NMR 法の場合, 隣接する ¹H 核との相互作用 (J -カップリング) により信号が 2 本や 3 本に分裂した形状を示すことが多いことから, 半値幅を基準に信号の積分範囲を設定する方法は議論があり, 必ずしも実用的ではない.

そこで, NMJ では ¹H 核が直接結合する ¹³C 核と J -カップリングして生じる ¹³C サテライトの信号 (¹H 核の信号の両側にその 0.55 % の高さで検出される信号) を基準として, その外側およそ 30 Hz までを信号の積分範囲として設定する方法を考案している³¹⁾⁻³²⁾. このような ¹³C サテライトの信号を基準とする方法では, ¹H 核の信号が十分鋭ければ, その分裂の形状に依らず積分範囲を適切に設定でき得る.

3.3.3 ベースライン補正

信号の面積強度を精確に評価するためには, その信号

のベースラインを適切に評価する必要がある。個別の信号に対して、信号ごとの積分範囲に適したベースライン補正を独立して行うことによって、信号の面積強度にかかるバイアスを顕著に低減できることが報告されている³¹⁾。そのため、定量を行う上でベースラインの適切な評価とその補正は極めて重要となる。

3.4 信号に重複する不純物の評価

NMR スペクトルにおける信号の面積強度から定量値を算出する際には、定量に用いることが可能な対象化合物の各官能基に由来する複数の信号の面積強度を全て加算して定量値を算出する方法と、各信号の面積強度を用いて個別に定量値を算出後、相加平均する方法がある。後者の方法は、積分範囲が重ならない場合は定量に用いた複数の信号間で得られた定量値を比較することが可能であり、特定の信号における不純物の重複を把握しやすいため、定量値の信頼性確保のために推奨される。

個別に信号を評価する方法において、定量に用いた複数の信号間で定量値に有意な差 (シグナル間差) が生じた場合は、高い定量値が得られた信号において不純物が重複している可能性を十分に検討した上で、その信号を定量に用いるか否かを判断する必要がある。不純物の重複を検討する主な方法としては、①溶媒や測定温度を変えて重複した不純物を分離できる NMR 法の測定条件を検討する方法、②クロマトグラフ法 (例えば GC/MS 法や LC/MS 法) で試料に含まれる不純物を分離し、定性した後、同定された不純物を入手して不純物が重複するか否かを NMR スペクトル上で確認する方法がある。さらに、同定された不純物が入手困難であった場合は、③液

体クロマトグラフ (LC) 法等で不純物を分取し³³⁾、得られた試料溶液を NMR 法で測定する方法もある。

3.5 不確かさ評価の導入

従来、qNMR 法の定量精度としては測定の繰返し性のみを評価するのが主であったが、qNMR 法で値付けた純度に関わる不確かさを評価する必要性が指摘されている^{15), 34)}。例えば、qNMR 法で値付ける純度 p_X に影響を及ぼす不確かさ要因としては、(9) 式に示されるように、対象化合物 X 及び内標準物質 S に関して①はかり取った質量 m_X , m_S 、②分子量 M_X , M_S 、③¹H 核の個数 N_X , N_S 、④信号の面積強度 S_X , S_S と、⑤内標準物質の純度 p_S がある。ここで、試料をはかり取った質量と得られる信号の面積強度には相関があるため、両者を独立して評価することができない。そのため、NMIJ ではこれら相関のある要因を一体とした関数 g を導入して、試料調製、NMR 測定の繰返し性、スペクトル解析におけるシグナル間差の 3 つの要因を分散分析を利用して分離し、各要因が純度へ及ぼす寄与を個別に評価する方法 (次式) を提案した³⁵⁾。

$$p_X = \frac{M_X N_S}{M_S N_X} p_S g(m_X, m_S, S_X, S_S) \quad (13)$$

その後、NMIJ では不確かさ要因のより精確な評価を行い、信号の面積強度 S_X , S_S に影響を及ぼす要因として、繰返し待ち時間 T_r 並びに FT-NMR 装置のバイアス S_I を評価した。図 6 に、NMIJ で利用している qNMR 法の典型的な不確かさバジェット表を示す。3.1~3.4 で述べた取り組みによって、NMIJ における qNMR 法の拡張不確かさ U ($k=2$) は、1% 以下に到達している。

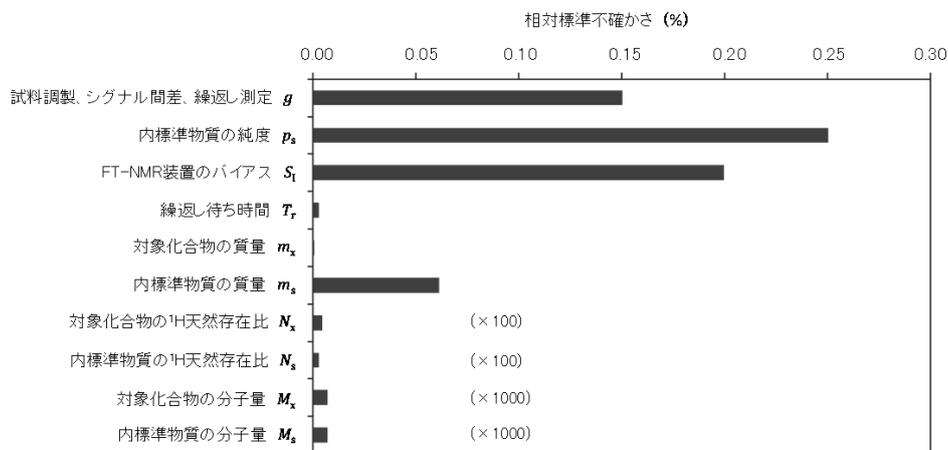


図 6 qNMR 法を用いた純度評価における典型的な不確かさバジェット。内標準物質に 1,4-BTMSB- d_4 (1,4-bis(trimethylsilyl)benzene- d_4) を用いた場合を示した。

4. qNMR 法の実用化とその活用

近年では、内標準法の精確さや直線応答性、堅牢性等を評価した妥当性の検証研究^{36)~38)}等が進んだこともあって、qNMR法の活用が急速に広がっている。例えば、標準物質の安定性試験³⁹⁾や、界面活性剤のような工業製品の品質管理における原料の純度評価^{40)~42)}等に利用されるようになった。さらに、内標準法によるqNMR法の高度化に伴って、外標準法やERETIC法の発展に向けた研究も進み^{43)~44)}、これらの定量手法を用いて標準物質等の純度評価も検討されている^{45)~46)}。

ここでは、現在のqNMR法の代表的な活用事例として、内標準法を用いた標準物質の値付けへの利用による効率的なトレーサビリティ体系の確立と、公定法としての利用について述べる。

4.1 効率的なトレーサビリティ体系の確立

化学分析では、複数の化合物の同時分析が行える利点から、クロマトグラフ法を利用した定量分析が主流である。しかし、この手法で通常用いられる検出器は分子構造に依存した感度を持つため、対象化合物ごとの標準物質がそれぞれ必要となる。これら標準物質の信頼性は、トレーサビリティ源となる国家標準物質を基準として値付け(校正)することで確保されるが、同様にクロマトグラフ法が用いられているため、対象化合物ごとに国家標準物質を整備することが要求される(図7)。しかし、

国家標準物質は、国際単位系(SI)にトレーサブルな値を得るべく計量的に高度な定量分析法で評価を行うため、開発には多くの歳月が必要となることから、従来のトレーサビリティ体系の下では、分析者が使用する標準物質(図中では実用標準物質)を迅速に整備することができなかった。

これまで述べてきたように、qNMR法は信号の面積強度と共鳴する¹H核の個数が比例するため、異なる分子間で¹H核の個数、すなわち分子数の比較が可能となる定量分析法である。NMIJでは、この技術の中核的な校正技術として用いることで、これまでの同じ化合物同士の校正の連鎖によるトレーサビリティ体系とは異なる、¹H核の校正の連鎖による効率的なトレーサビリティ体系を着想し、実用化させた^{15),47)}(図8)。さらに、国家標準物質(図中では基準物質)にトレーサブルであり、かつ扱い易い仲介物質をqNMR法等により開発し、これをqNMR法の内標準物質として用いることで、SIへのトレーサビリティを確保した純度評価を広範囲かつ容易に行えるようにした。

ここで開発したトレーサビリティの確保された仲介物質には、1,4-BTMSB-*d*₄(1,4-bis(trimethylsilyl)benzene-*d*₄; 疎水性溶媒用)、DSS-*d*₆(Sodium 3-(trimethylsilyl)-1-propane-1,1,2,2,3,3-*d*₆-sulfonate; 親水性溶媒用)、DMSO2(Dimethyl sulfone; 疎水性及び親水性溶媒用)及びマレイン酸(Maleic acid; 親水性溶媒用)等がある³⁹⁾。これまでNMIJでは、これらをqNMR法

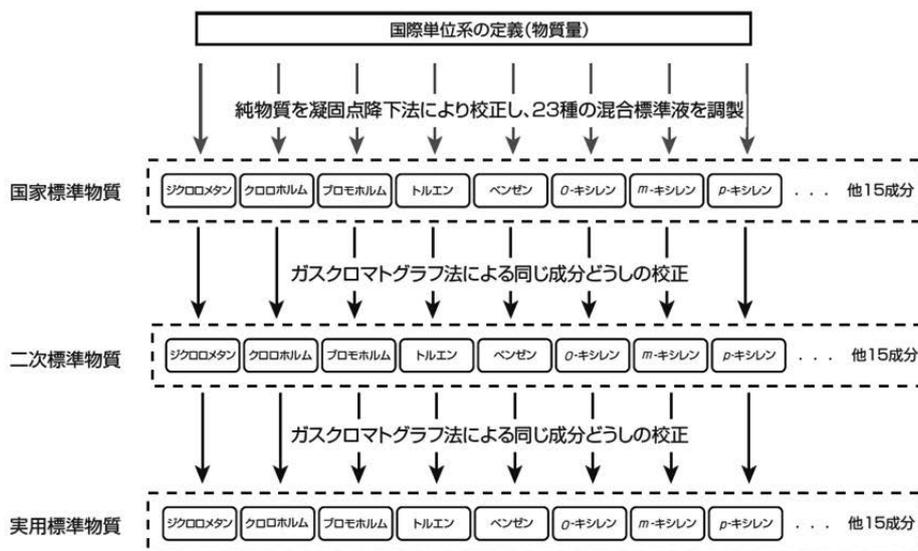


図7⁴⁷⁾ 標準物質の一般的なトレーサビリティ体系。河川水・水道水の水質試験等に用いられる揮発性有機化合物分析用の標準物質におけるトレーサビリティを例に示した。国家標準物質へのトレーサビリティの確保は、クロマトグラフ法によって化合物ごとに行われる。なお、図は独立行政法人産業技術総合研究所(AIST)提供。

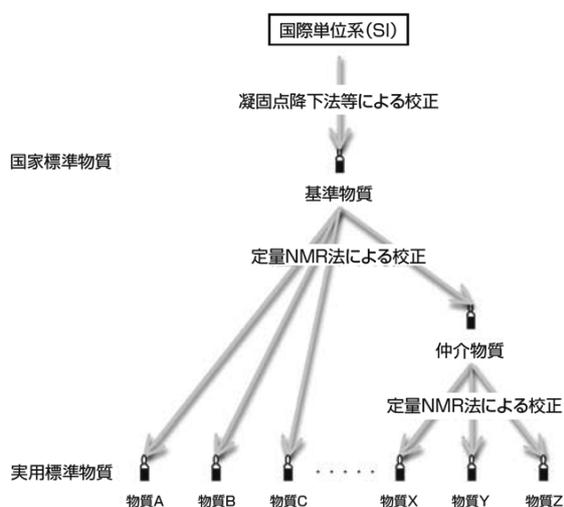


図 8⁴⁷⁾ qNMR 法による効率的なトレーサビリティ体系。1 種類の国家標準物質を基準として、qNMR 法によって様々な化合物のトレーサビリティを確保することができる。なお、図は独立行政法人産業技術総合研究所 (AIST) 提供。

の内標準物質として用いて、試薬会社が供給する 150 種類以上の残留農薬試験用の高純度標準物質（農薬標準物質）に対して純度校正サービスを行ってきた^{48)~49)}。現在では、農薬標準物質と併行して、需要の多いアミノ酸標準物質の迅速な整備に取り組んでいる。

4.2 公定法としての利用

qNMR 法は、医薬品標準物質の純度評価法として日本薬局方に採用された⁵⁰⁾。医薬品のうち特に生薬では、有効成分が天然由来の有機化合物の場合が多く、薬局方で指定された手法で純度評価された標準物質が利用されている⁵¹⁾。しかし、従来は、クロマトグラフ法とカールフィッシャー法等の複数の定量手法を組み合わせることで純度を求めるため、操作が煩雑であり、またトレーサビリティの点からも問題があった。そこで、qNMR 法を利用することで、¹H 核の信号量の基準となる内標準物質から生薬の有効成分を直接評価することが可能となり、トレーサビリティが確保された医薬品標準物質を迅速かつ簡便に供給できるようになってきている。

また、食品添加物関連の標準物質の純度評価法としても qNMR 法は着目されており^{52)~53)}、食品添加物公定書への記載が進んでいる⁵⁴⁾。

5. 現在の課題

計測技術としての qNMR 法の現在の課題として、①不確かさの低減、②適用範囲の拡大、そして③技術の普及がある。ここでは、これらの課題に対する NMIJ における取り組みについて考察する。

5.1 不確かさの低減

3.5 で述べた取り組みによって、qNMR 法の主要な不確かさ要因を評価したことで、これから低減していくべき不確かさ要因が明確になってきた。ここでは、qNMR 法を国際的に認められた最も信頼性の高い計測技術である一次標準測定法として確立させることを目標として、qNMR 法の不確かさ要因を低減するための取り組みについて述べる。

5.1.1 qNMR 法のための国家標準物質の開発

4.1 で述べたように、qNMR 法で用いる内標準物質（例えば 1,4-BTMSB-*d*₄ や DSS-*d*₆）は、既存の国家標準物質をトレーサビリティ源として、qNMR 法等によって値付けしている。そのため、qNMR 法の測定不確かさがボトルネックとなり、これを下回る不確かさを持つ内標準物質を整備することができない。したがって、qNMR 法よりも小さな測定不確かさを持つ定量手法（例えば一次標準測定法である凝固点降下法や滴定法）を利用して、qNMR 法のための高精度に評価された国家標準物質を開発し、これを内標準物質として用いることで、qNMR 法の測定不確かさをより低減できる。現在 NMIJ では、このような化合物として、同じ分子内に ¹H 核と ¹⁹F 核を有する qNMR 法のための国家標準物質（後述する ¹⁹F qNMR 法での利用も考慮）の開発を検討している。

5.1.2 信号の面積強度にかかるバイアスの低減

qNMR 法における信号の面積強度のバイアスやばらつきは複数の要因に起因するが、各要因が定量結果にどの程度寄与するか詳しく評価できていない。そのため、まずはこれらの不確かさ要因を個別に評価し、各要因を低減できる条件をそれぞれ模索していく必要がある。

具体的には、FT-NMR 装置のバイアスが挙げられる。3.2.3 で述べたように、フィルタの利用に伴う信号の面積強度の低下を抑えるためには、観測幅を十分広く設定（例えば 400 ppm に設定）し、これらの信号を測定することが有効であるが、この場合、取り込むデータ量が膨大になってしまうという欠点がある。そこで、この問題を解決する方法の一つとして、デジタルフィルタの利用が挙げられる。

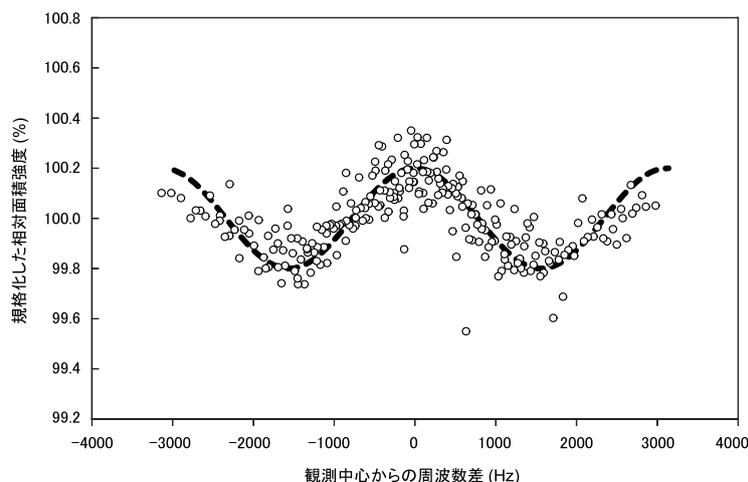


図9 デジタルフィルタの利用に伴う信号の面積強度の周期的な振動. 測定には図3で扱った試料溶液を用いた. 400 MHzのFT-NMR装置(日本電子製, JNM-ECS400)においてデジタルフィルタを利用し, 観測中心を変化させて測定した場合における ^1H 核の信号の面積強度の変化を示した. 相対的な面積強度が, $\pm 0.2\%$ 程度の幅で周期的に振動する傾向を示す(破線は近似曲線). 観測幅は100 ppm (40 000 Hz)であり, オーバーサンプリングレートはおよそ5である.

一般に, デジタルフィルタを利用すると, 受信されたFID信号に対して, 不要な周波数成分由来の信号を効率的に除去することができる. また, デジタルフィルタを利用した場合, 20 ppm程度の観測幅における信号を測定しても, 通常のアナログフィルタに比べて, スペクトルの両端付近における信号の面積強度の低下を抑えることが可能であると考えられており, その利用が進んでいる^{40)-42), 50), 52)-54)}. しかし, NMIJでは, デジタルフィルタを利用した場合, 周期的な振動による無視できないバイアスが観測されることを実験的に確認している³⁰⁾(図9). したがって, デジタルフィルタ特性の向上を行うなど, デジタルフィルタを定量測定に適したものにするための研究を進める必要がある, この研究により実用性と定量性を兼ね備えることができると考えている.

5.1.3 信号に重複する不純物の効率的な評価

qNMR法で扱う信号はNMRスペクトルの化学シフト軸のみに展開されるため, 対象化合物と類似構造の不純物がある場合には, この不純物由来の信号を対象化合物の信号から分離することが難しい場合がある. 3.4で述べた方法よりも効率的な不純物の評価方法として, LC法の検出器にNMR装置を用いたLC/NMR法を利用する方法がある⁵⁵⁾.

この方法は, LC法により分離した不純物をNMR法で評価する方法であり, 対象化合物のどの信号に不純物が重複しているかを迅速に判別することができる. しか

し, NMR法では微量な不純物を検出するための感度が不足することから, 不純物が検出器に入った時点でLCの移動相を止めて信号の積算を行う必要があり, 不純物ごとに同様の操作を行わなければならない.

一方, LCの移動相を止めずにNMR法を用いることができれば, 多数の不純物を一度に評価することができ, 対象化合物の信号に不純物が重複しているか否かを極めて効率的かつ簡便に判別することができ得る. 現状では, 既存のNMR装置では不純物を十分な感度で検出することができないため, 比較的高濃度の不純物への適用に限られており, 汎用的に用いるためには高感度な検出を実現する仕組みを確立する研究が必要である.

5.1.4 国際比較への参加

qNMR法の堅牢性を高め, 一次標準測定法として確立することは, 計量学的見地から重要な課題である. 国際度量衡委員会(Comité International des Poids et Mesures; CIPM)の物質質量諮問委員会(Comité Consultatif pour la Quantité de Matière; CCQM)において, 過去にqNMR法の研究的な意味での国際比較が数回行われたが, 国家計量標準機関が利用する計測技術としては不十分な精確さであるとの結論に至った⁵⁶⁾. しかし, NMIJではその後も純度測定に対してqNMR法の適用を試み, 良好な結果を示してきた. 2008年秋に行われたCCQMの有機分析ワーキンググループ(OAWG)において, qNMR法に関するNMIJのこれまでの取り組みに関する発表を行ったことを受け, 2009年の秋に

は、CCQM OAWG で qNMR 法に関するワークショップが開催されるなど、qNMR 法のポテンシャルが再認識されている。さらに、2011 年に実施された国際比較では、差数法（検出した各不純物量を 100 % から差し引くことで対象化合物の純度を間接的に求める方法）を用いた多くの機関が、検出できなかった不純物の存在によってバイアスのかかった評価結果を示した一方で、qNMR 法は概ね良好な結果を示したことにより⁵⁷⁾、qNMR 法が改めて注目されることとなった。現在 NMIJ は、qNMR 法の技術的な課題を明確にするための国際比較の提案を行っており、今後も CCQM で一次標準測定法として確立するための活動を継続して行く予定である。

5.2 適用範囲の拡大

5.2.1 多核種への拡大

表 1 に示したように、NMR 法は ^1H 核以外の核種でも観測することが可能であるため、 ^1H 核以外の核種へ qNMR 法の適用範囲を拡大することは原理的に可能である。 ^1H 核以外の核種を扱う主な利点としては、① ^1H 核を持たない化合物に対しても、 ^1H 核以外の観測可能な核種を持てば適用できる点、② ^1H 核以外の観測可能な核が同じ分子内にある場合、異なる核種を利用して多角的に評価できる点、③ ^1H NMR 法ではしばしば問題となる溶媒分子が持つ信号の影響が少ない点が挙げられる。一般に、qNMR 法に限らず、単独の定量手法では、正しい値が得られているか検証することが難しいため、他の手法（例えば qNMR 法に対してクロマトグラフ法）を用いて相互に値の検証を行っている。しかし、 ^1H 核以外の核種からも値を評価することで、qNMR 法単独で値を相互に検証することができ得ると期待される⁵⁸⁾⁻⁵⁹⁾。

^1H 核以外の核種の定量分析においては、 ^1H 核に次いで感度の良い ^{19}F 核や、生体試料（例えば核酸等）に豊富に存在する ^{31}P 核がしばしば対象とされるが⁶⁰⁾⁻⁶¹⁾、高精度な定量方法はまだ確立されていない。 ^1H 核以外の核種を利用して定量する場合、核種によって異なる問題点がある。

例えば ^{19}F 核では、化合物の信号が観測される範囲が 0 ppm ~ 200 ppm 以上と ^1H 核に比べて広いため、オフレゾナンス効果 (3.2.1 参照) が顕著に現れる。したがって、 ^{19}F qNMR 法を確立するためには、特にオフレゾナンス効果を低減できる方法を研究していく必要がある⁶²⁾。加えて、 ^{19}F 核に対応した信号量の基準が必要となるため、5.1.1 で述べたように、NMIJ では ^{19}F 核を有する国家標準物質の開発を検討している。

5.2.2 標準液への拡大

NMIJ では、qNMR 法による標準物質の値付けにおいて、高純度有機標準物質を現在の対象としている。しかし、化合物によっては、その物性のために高純度な状態では取り扱いが難しいことから、あらかじめ調製された標準液としてのみ市販されている化合物も少なくない。

その一例として、可燃性気体の酸化エチレンが挙げられる。酸化エチレンは強い滅菌作用を持つため、医療器具等の滅菌に有用であり、多くの医療機関等で使用されている。しかし、一方ではその発がん性が問題視されており、医療器具に残留あるいは環境中に排出された酸化エチレンの量を迅速かつ正確に管理することが望まれている⁶³⁾⁻⁶⁴⁾。酸化エチレンは常温気体であるため扱いが難しく、熟練した技術を持つ試薬会社であってもその溶液を正確に調製することは容易ではない。すなわち、市販されている標準液（例えば 100 mg/L の機器校正用標準液）は、調製された濃度に大きな不確かさを持つことが予想されるため、分析結果の信頼性向上のために、その濃度を正確に評価した上で標準液を供給することが望ましい。そこで、qNMR 法を利用してその濃度を正確に評価することができれば、SI へのトレーサビリティが確保された信頼性の高い標準液を供給することができると期待される。

これまで NMIJ では、重水素化溶媒を用いて、対象化合物の試料溶液を比較的高濃度 (10000 mg/L オーダー) に調製することで、qNMR 法による正確な値付けを実現してきたが、上述した標準液（例えば 100 mg/L の標準液）は、①溶媒分子が持つ ^1H 核が重水素化されていない上、②対象化合物の濃度が低いという問題点がある。この場合、対象化合物に対して溶媒分子がはるかに多い（例えば 100 mg/L のエタノール標準液の場合、溶媒分子の物質量は対象化合物の物質量のおよそ 10000 倍となる）ため、 ^1H NMR スペクトルにおける主要な信号は溶媒分子が持つ信号となる。そのため、対象化合物の信号は溶媒分子が持つ信号に埋もれてしまい、通常の測定では検出することすら不可能になる可能性が高い。重水素化溶媒で調製された高濃度の標準液をあらかじめ用意し、これを qNMR 法で値付けした後、通常の溶媒で希釈して利用することもこれらの問題を解決し得る一つの方法ではあるが、qNMR 法のいくつかの課題を克服することで、市販されている標準液に対する値付けを実現できる可能性がある。すなわち、溶媒分子が持つ ^1H 核の信号を消去するプリサチュレーション法⁹⁾の高度化や、対象化合物の共鳴核のみを選択的かつ定量的に励起できる選択励起パルス法⁹⁾の開発、そしてこれらを組み

合わせた手法を確立することで、市販標準液に適した定量手法へと qNMR 法を高度化できる可能性がある。

さらに、このような市販標準液の値付けにおいては、内標準物質のはかり取り量が極めて微量となるため、これまでの試料調製法では対応が困難であると予想される。そのため、例えば 2.5.3 で述べた ERETIC 法²³⁾に着目し、低濃度化合物の ¹H 核の信号量の基準として ERETIC 信号を利用できるよう高度化することも必要であると考えている。その上で、極低温プローブ⁶⁵⁾の導入等により SN 比を向上させれば、より精確に標準液の濃度評価が期待できる。

5.3 技術の普及

今後さらに qNMR 法の利活用を広げるためには、① qNMR 法の啓発、② qNMR 法の技能試験による技術力の確認、③ qNMR 法についての勉強会等の場を設けることで、利用者の qNMR 法に対する知識等を高めて行く必要がある。そこで、NMIJ では汎用的な定量分析法としての qNMR 法の普及を目指して、定量 NMR クラブを設立した⁶⁶⁾。クラブ会員以外の参加者も募り、今後定期的に会合を行うことを予定している。qNMR 法の有用性に関して認知度が高まることによって、qNMR 法の測定不確かさの低減や適用範囲の拡大等において、新たな展開も期待したい。

これらの活動を通して、qNMR 法を利用した信頼性の高い定量結果を得るために必要な情報等を共有することで、qNMR 法を堅牢な方法へと醸成させるとともに、化学分析全体の信頼性向上に寄与して行くことが重要であると考えている。

6. 将来の展望

4.2 で述べたように、qNMR 法は今日の医薬品標準物質等の公定法に採用されるほど、その実用化が進展している。実用化された qNMR 法は、規制対象となる有機化合物が今後増え続けることが予想される状況の中、対象化合物とは異なる化合物を基準にしてトレーサビリティを確保した値付けを行うことができる利点を活かして、ますます利用されていくと思われる。また、信頼性の高い標準物質の整備を加速するためには、4.1 で述べたトレーサビリティ体系を活用し、試薬会社等が自ら qNMR 法を用いて信頼性の高い標準物質の開発ができる環境を整備して行くことも必要だと考えている。そのためには、qNMR 法のさらなる技術の向上に努めながらも、誰もが扱い易い定量手法として普及させていくこ

とが必要である。

さらに、究極的には 5 章で述べた研究によって確立した要素技術を基にして、高感度化した LC/NMR 法で精確に定量する手法 (LC/qNMR 法)⁶⁷⁾⁻⁶⁸⁾の実現を目指したい。今日の分析現場では、対象化合物が多数ある場合には、クロマトグラフ法を用いた一斉定量が常用されているが、機器校正を行うには対象化合物ごとに標準物質が必要である。したがって、qNMR 法の実用化に伴い、標準物質の種類を迅速に増やせたとしても、標準物質が整備されていない化合物については、精確な定量を行うことが依然として困難な状況にあるのは変わらない。そこで、LC/qNMR 法を利用すれば、LC 法の利点を活かして多数の対象化合物を時空間的に分離し、さらに qNMR 法の利点を活かして 1 種類の標準物質から多数の化合物を対象とした精確な一斉定量が実現し得る。現段階では、LC/qNMR 法を実用化させるにあたり多くの困難があるが、将来的にこの定量手法を実用化させることができれば、定量分析の体系は大きく変化するであろう。

本調査研究を通して整理できたこれまでの知見を活かして、多角的な視点から qNMR 法の高度化に臨み、普遍かつ汎用的な計測技術としての発展を目指していきたい。

謝辞

本調査研究を行うにあたり、日頃からご指導・ご助言を頂いている井原俊英室長、齋藤剛上級主任研究員をはじめ、計量標準システム科、有機分析科及び無機分析科の諸先輩方に多くのご助言を頂きました。また、加藤健次科長には本報告書をまとめる際に貴重なご意見を頂きました。ここに深く謝意を表します。

参考文献

- 1) <http://www.cas.org/content/chemical-substances>
- 2) J. W. Turczan, B. A. Goldwitz and J. J. Nelson: Nuclear Magnetic Resonance Analysis of Pharmaceuticals – VII. Determination of Aminophylline in Tablets. *Talanta*, 19 (1972) 1549–1554.
- 3) J. W. Turczan: Nuclear Magnetic Resonance Analysis of Pharmaceuticals – Part XI. Determination of Acetazolamide and Its Sodium Salt in Various Dosage Forms. *Analytica Chimica Acta*, 68 (1974) 395–400.
- 4) N. Noyanalpan and T. Ozden: Quantitative Deter-

- mination of Meprobamate by NMR in Commercial Preparations Marketed in Turkey. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 7 (1977) 189-195.
- 5) U. Holzgrabe, R. Deubner, C. Schollmayer and B. Waibel: Quantitative NMR spectroscopy – Applications in drug analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 38 (2005) 806-812.
- 6) 荒田洋治著: NMRの書. (丸善, 2000) pp.303-320.
- 7) R. R. Ernst and W. A. Anderson: Application of Fourier Transform Spectroscopy to Magnetic Resonance. *Review of Scientific Instruments*, 37 (1966) 93-102.
- 8) A. E. Derome 著, 竹内敬人, 野坂篤子訳: 化学者のための最新 NMR 概説 – よりよいスペクトルを得るための実験法と考え方. (化学同人, 1992) 319 pp.
- 9) T. D. W. Claridge 著, 竹内敬人, 西川実希訳: 有機化学のための高分解能 NMR テクニック. (講談社, 2004) 402 pp.
- 10) D. S. Dalisay and T. F. Molinski: NMR Quantitation of Natural Products at the Nanomole Scale. *Journal of Natural Products*, 72 (2009) 739-744.
- 11) S. K. Bharti and R. Roy: Quantitative ^1H NMR spectroscopy. *Trends in Analytical Chemistry*, 35 (2012) 5-26.
- 12) T. Shimizu, A. Goto, K. Hashi and S. Ohki: Trial Measurement of NMR in a Bitter Magnet of NIMS. *Chemistry Letters*, 33 (2004) 1502-1503.
- 13) 阿久津秀雄, 嶋田一夫, 鈴木榮一郎, 西村善文編: NMR 分光法 – 原理から応用まで (日本分光学会測定法シリーズ) –. (学会出版センター, 2003) 269 pp.
- 14) 田代充, 加藤敏代著, (社) 日本分析化学会編: NMR – 分析化学実技シリーズ (機器分析編 3) –. (共立出版, 2009) pp. 25-26.
- 15) T. Saito, T. Ihara, M. Koike, S. Kinugasa, Y. Fujimine, K. Nose and T. Hirai: A new traceability scheme for the development of international system-traceable persistent organic pollutant reference materials by quantitative nuclear magnetic resonance. *Accreditation and Quality Assurance*, 14 (2009) 79-86.
- 16) 西岡篤夫: NMR による共重合物の確認. *高分子*, 15 (1966) 309-315.
- 17) 小西一生, 狩野喜治: 高分解能 NMR によるテトラヒドロフラン-プロピレンオキシド共重合体およびエチレンオキシド-プロピレンオキシド共重合体の分析. *分析化学*, 15 (1966) 1110-1114.
- 18) T. Saito, M. A. Lusenkova, S. Matsuyama, K. Shimada, M. Itakura, K. Kishine, K. Sato and S. Kinugasa: Reliability of molecular weight determination methods for oligomers investigated using certified polystyrene reference materials. *Polymer*, 45 (2004) 8355-8365.
- 19) P. Cironi, M. Alvarez and F. Albericio: ^1H NMR spectroscopy with internal and external standards for the quantification of libraries. *Molecular Diversity*, 6 (2003) 165-168.
- 20) V. Rizzo and V. Pinciroli: Quantitative NMR in synthetic and combinatorial chemistry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 38 (2005) 851-857.
- 21) T. Rundlof, M. Mathiasson, S. Bekiroglu, B. Hakkarainen, T. Bowden and T. Arvidsson: Survey and qualification of internal standards for quantification by ^1H NMR spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52 (2010) 645-651.
- 22) 畑田耕一, 寺脇義男, 北山辰樹: 同軸二重試験管を用いた高分解能 NMR による微量成分の定量と定量限界. *高分子論文集*, 49 (1992) 335-344.
- 23) S. Akoka, L. Barantin and M. Trierweiler: Concentration Measurement by Proton NMR Using the ERETIC Method. *Analytical Chemistry*, 71 (1999) 2554-2557.
- 24) 三浦亨, 齋藤剛, 井原俊英, 前田恒昭, 杉本直樹, 多田敦子, 山崎壮, 西村哲治, 有福和紀, 末松孝子, 山田裕子, 吉田雄一, 小池亮, 堀之内高暁: NMR を用いた定量分析における試料調製の重要性. (第 77 回日本分析化学会有機微量分析研究懇談会, 京都, 2010)
- 25) 齋藤剛, 井原俊英, 前田恒昭, 杉本直樹, 多田敦子, 西村哲治, 有福和紀, 末松孝子, 山田裕子, 吉田雄一: NMR を利用した有機化合物の定量における精確な秤量の重要性. (第 76 回日本分析化学会有機微量分析研究懇談会, 埼玉, 2009)
- 26) L. Griffiths and A. M. Irving: Assay by nuclear magnetic resonance spectroscopy: quantification limits. *The Analyst*, 123 (1998) 1061-1068.
- 27) M. C. M. Gribnau: Determination of solid/liquid ratios of fats and oils by low-resolution pulsed NMR. *Trend in Food Science and Technology*, 3 (1992) 186-190.
- 28) T. Saito, S. Nakaie, M. Kinoshita, T. Ihara, S. Kinugasa, A. Nomura and T. Maeda: Practical guide for accurate quantitative solution state NMR analysis. *Metrologia*, 41 (2004) 213-218. DOI: 10.1088/0026-

- 1394/41/3/015.
- 29) D. A. Forsyth, M. Hedlger, S. S. Mahmoud and B. C. Giessen: Quantitative Analysis of Alkene/Alkane Mixtures by Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 54 (1982) 1896-1898.
- 30) 齋藤剛, 齋藤直樹, 山崎太一, 大手洋子, 村上雅代, 井原俊英: 定量分析における NMR 装置に起因する測定不確かさの考察. (第 51 回 NMR 討論会, 名古屋, 2012)
- 31) 山崎太一, 齋藤剛, 三浦亨, 井原俊英: 精確な定量 NMR 測定のための解析条件の検討. *分析化学*, 61 (2012) 963-967.
- 32) 三浦亨, 齋藤剛, 大手洋子, 井原俊英: NMR を利用した有機化合物の定量における解析条件の妥当性確認. (第 49 回 NMR 討論会, 東京, 2010)
- 33) 表正克, 山下智恵, 森下潔, 小路庸子, 栗山尚浩: 逆相分取 HPLC を用いる効率的な精製方法. *CHROMATOGRAPHY*, 31 (2010) 31-36.
- 34) T. S. Al-Deen, D. B. Hibbert, J. M. Hook and R. J. Wells: An uncertainty budget for the determination of the purity of glyphosate by quantitative nuclear magnetic resonance (QNMR) spectroscopy. *Accreditation and Quality Assurance*, 9 (2004) 55-63.
- 35) 齋藤剛, 井原俊英, 佐藤浩志, H. Jancke, 衣笠晋一: ^1H 核磁気共鳴法による水溶液中のエタノールの定量に関する国際比較. *分析化学*, 52 (2003) 1029-1036.
- 36) G. Maniara, K. Rajamoorthi, S. Rajan and G. W. Stockton: Method Performance and Validation for Quantitative Analysis by ^1H and ^{31}P NMR Spectroscopy. Applications to Analytical Standards and Agricultural Chemicals. *Analytical Chemistry*, 70 (1998) 4921-4928.
- 37) F. Malz and H. Jancke: Validation of quantitative NMR. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 38 (2005) 813-823.
- 38) H. H. Gadape and K. S. Parikh: Quantitative determination and Validation of Pioglitazone in Pharmaceutical using Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 3 (2011) 649-664.
- 39) 三浦亨: NMR を利用した安定性試験. (第 1 回定量 NMR クラブ会合, 東京, 2012)
- 40) 小池亮, 城昭一, 東美喜子, 脇阪達司: 内部標準物質を用いる ^1H 核磁気共鳴法による陰イオン及び陽イオン界面活性剤の高精度・迅速定量. *分析化学*, 53 (2004) 1125-1131.
- 41) 小池亮, 城昭一, 東美喜子, 脇阪達司: 内部標準物質を用いる ^1H 核磁気共鳴法による両性及び非イオン界面活性剤の高精度・迅速定量. *分析化学*, 53 (2004) 1133-1138.
- 42) 小池亮, 城昭一, 東美喜子, 脇阪達司: 内部標準物質を用いる ^1H 核磁気共鳴法による界面活性剤の高精度・一斉定量. *分析化学*, 54 (2005) 715-722.
- 43) I. W. Burton, M. A. Quilliam and J. A. Walter: Quantitative ^1H NMR with External Standards: Use in Preparation of Calibration Solutions for Algal Toxins and Other Natural Products. *Analytical Chemistry*, 77 (2005) 3123-3131.
- 44) K. Mehr, B. John, D. Russell and D. Avizonis: Electronic Referencing Techniques for Quantitative NMR: Pitfalls and How to Avoid Them Using Amplitude-Corrected Referencing through Signal Injection. *Analytical Chemistry*, 80 (2008) 8320-8323.
- 45) T. Kato, M. Nagae, T. Igarashi and T. Yasumoto: Accurate quantification of DTX1 standard by quantitative Nuclear Magnetic Resonance. (The 15th International Conference on Harmful Algae, Korea, 2012)
- 46) P.-L. Ding, L.-Q. Chen, Y. Lu and Y.-G. Li: Determination of protoberberine alkaloids in Rhizoma Coptidis by ERETIC ^1H NMR method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 60 (2012) 44-50.
- 47) 井原俊英, 齋藤剛, 杉本直樹: 食品・環境中の有害成分分析のための有機標準物質の拡充 - 定量 NMR 法による効率的な計量トレーサビリティの実現 -. *Synthesiology*, 2 (2009) 12-22.
- 48) T. Saito, T. Ihara, T. Miura, Y. Yamada and K. Chiba: Efficient production of reference materials of hazardous organics using smart calibration by nuclear magnetic resonance. *Accreditation and Quality Assurance*, 16 (2011) 421-428.
- 49) 加藤尚志: 高純度有機標準物質の純度校正サービスより迅速な標準物質供給を目指して -. *産総研 Today*, 12 (2012) 18.
- 50) 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)
- 51) 杉本直樹: 分析対象の有機化合物の純度は大丈夫ですか?: 定量 NMR による絶対純度測定法の開発. *日本薬理学雑誌*, 137 (2011) 232-236.
- 52) 杉本直樹, 多田敦子, 末松孝子, 有福和紀, 齋藤剛,

- 井原俊英, 吉田雄一, 久保田領志, 田原麻衣子, 清水久美子, 伊藤澄夫, 山崎壮, 河村葉子, 西村哲治: 定量 NMR を用いたコチニール色素中のカルミン酸の絶対定量. 食品衛生学雑誌, 51 (2010) 19-27.
- 53) 多田敦子, 高橋加奈, 杉本直樹, 末松孝子, 有福利紀, 齋藤剛, 井原俊英, 吉田雄一, 石附京子, 西村哲治, 山崎壮, 河村葉子: 定量 NMR に基づく既存添加物中のクエルセチンおよびクエルセチン配糖体の絶対定量. 食品衛生学雑誌, 51 (2010) 205-212.
- 54) 食品衛生法施行規則及び乳及び乳製品に関する省令の一部を改正する省令 (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 (告示: 厚生労働 307 号) (官報, 号外第 191 号, 平成 23 年 8 月 31 日)
- 55) 川口謙, 中野隆行, 木村一雄: 液体クロマトグラフィ-核磁気共鳴 (LC-NMR) の有効な使い方-医薬品の類縁物質および代謝物の構造決定を目指して-. CHROMATOGRAPHY, 32 (2011) 171-179.
- 56) H. Jancke and K. S. Webb: CCQM Pilot Study - Determination of Ethanol (CCQM-P35) in Aqueous Matrix. CCQM-P35 Report, (2001).
- 57) S. Westwood, R. Josephs, T. Choteau, A. Daireaux, C. Mesquida and R. Wielgosz: CCQM-K55.b Key Comparison on the Characterization of Organic Substances for Chemical Purity. CCQM-K55.b (Aldrin) Final Report, (2012) 1-41.
- 58) T. S. Al-Deen, D. B. Hibbert, J. M. Hook and R. J. Wells: Quantitative nuclear magnetic resonance spectrometry - II. Purity of phosphorus-based agrochemicals glyphosate (N-(phosphonomethyl)- glycine) and profenofos (O-(4-bromo-2-chlorophenyl) O-ethyl S-propyl phosphorothioate) measured by ^1H and ^{31}P QNMR spectrometry. Analytica Chimica Acta, 474 (2002) 125-135.
- 59) W. He, F. Du, Y. Wu, Y. Wang, X. Liu, H. Liu and X. Zhao: Quantitative ^{19}F NMR method validation and application to the quantitative analysis of a fluoro-polyphosphates mixture. Journal of Fluorine Chemistry, 127 (2006) 809-815.
- 60) G. Fardella, P. Barbetti, I. Chiappini and G. Grandolini: Quantitative analysis of fluoroquinolones by ^1H - and ^{19}F -NMR spectroscopy. International Journal of Pharmaceutics, 121 (1995) 123-127.
- 61) Y. Miyata and H. Ando: Examination of an Internal Standard Substance for the Quantitative Analysis of Sarin Using ^{31}P -NMR. Journal of Health Science, 47 (2001) 75-77.
- 62) 山崎太一: 定量 NMR の多核種への応用 - ^{19}F NMR へのアプローチ-. (第 60 回日本分析化学会年会, 名古屋, 2011)
- 63) 重岡昌代, 村瀬茂世, 山崎誠: 酸化エチレン分析法の検討. 福岡市保健環境研究所報, 22 (2001) 107-108.
- 64) 門田実, 石井学, 野村茂, 杉山広和, 前田泉 (大気科): 有害大気汚染物質 (酸化エチレン) 測定法の検討. 岡山県環境保健センター年報, 31 (2007) 27-32.
- 65) 日本電子株式会社: 極低温プローブ-UltraCOOL プローブの紹介. SOLUTIONS NEWS, 95 (2013) 6-7.
- 66) <http://www.nmij.jp/~nmijclub/qNMR/qNMR.html>
- 67) 井原俊英, 齋藤剛, 清水由隆, 岩澤良子, 木下美雪, 衣笠晋一, 野村明: LC-NMR による有機化合物の絶対量測定. 第 63 回分析化学討論会 (口頭発表, 兵庫, 2002)
- 68) T. Saito, R. Iwasawa, T. Ihara, S. Kinugasa, A. Nomura and T. Maeda: Evaluation of Accuracy for the Quantitative Analysis Using Nuclear Magnetic Resonance as a Detector of HPLC. Chromatography: Journal of separation and detection sciences, 24 (2003) 117-120.