¹H 核定量核磁気共鳴分光法の標準化のためのラウンドロビン試験による評価

三浦 亨,^a 杉本直樹,^b 渡邊龍一,^c 末松孝子,^d 高柳庸一郎,^e
伊藤喜之,^f 斎藤直樹,^g 澤 竜一,^h 加藤 毅,ⁱ 藤峰慶徳,^j
小池 亮,^k 大福裕子,^a 山田裕子,^a 内海博明,^d 鈴木敏之^c

Evaluation for Standardization of ¹H Quantitative NMR Spectroscopy by Round Robin Test

Toru Miura,^a Naoki Sugimoto,^b Ryuichi Watanabe,^c Takako Suematsu,^d Yoichiro Takayanagi,^e
Yoshinobu Ito,^f Naoki Saito,^g Ryuichi Sawa,^h Tsuyoshi Kato,ⁱ Yoshinori Fujimine,^j
Ryo Koike,^k Yuko Ohfuku,^a Yuko Yamada,^a Hiroaki Utsumi,^d and Toshiyuki Suzuki^c

^aWako Pure Chemical Industries, Ltd.; 1633 Matoba, Kawagoe, Saitama 350-1101, Japan; ^bNational Institute of Health Science; 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; ^cNational Research Institute of Fisheries Science; 2-12-4 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama 236-8648, Japan; ^dJEOL RESONANCE Inc.; 3-1-2 Musashino, Akishima, Tokyo 196-8558, Japan; ^eMettler-Toledo K.K.; 6F Ikenohata, Nisshoku Bldg., 2-9-7 Ikenohata, Taito-ku, Tokyo, 110-0008, Japan; ^fJEOL Ltd.; 3-1-2 Musashino, Akishima, Tokyo 196-8558, Japan; ^gNational Institute of Advanced Industrial Science and Technology; 1-1-1 Umezono, Tsukuba, Ibaraki 305-8563, Japan; ^hInstitute of Microbial Chemistry (Bikaken); 3-14-23 Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141-0021, Japan; ⁱJapan Food Research Laboratories; 6-11-10 Nagayama, Tama, Tokyo 206-0025, Japan; ^jOtsuka Pharmaceutical Co., Ltd.; 224-18 Hiraishiebisuno, Kawauchi-cho, Tokushima 771-0195, Japan; and ^kKao Corporation; 5-3-28 Kotobuki-cho, Odawara, Kanagawa 250-0002, Japan.

(Received May 22, 2017; Accepted August 27, 2017; Advance publication released online September 29, 2017)

¹H quantitative NMR (¹H qNMR) is known as a powerful tool for determination of analytes without the need for their identical standards, which is eligible to a primary rate method. ¹H qNMR has been already stipulated to an assay for purity determination in Japanese Pharmacopoeia (JP), and then this technique has been also applied in several fields such as pharmaceutical and food sciences. However, there is little information about the accuracy of ¹H qNMR so that the further applications into other fields such as industrial chemistry could be constricted. In this study, in order to assess the reliability of ¹H qNMR, we designed the round-robin test of ¹H qNMR under the basis of the measurement conditions described in JP. 1,4-Bis(trimethylsilyl) benzene-*d*₄ [1,4-BTMSB-*d*₄, 99.9±0.6% (w/w)] and 3,5-bis(trifluoromethyl) benzoic acid [3,5-BTMFBA, 99.96±0.06% (w/w)], which are certified reference materials (CRMs), were adopted to analyte and qNMR reference standard respectively for the accurate evaluation in this test. Six NMR instruments in 5 institutions optimized to ¹H qNMR conditions provided the purity 1,4-BTMSB-*d*₄ within acceptable error range. This result represented that ¹H qNMR has the capability to determine precisely the value of analyte in practical analytical field and to be set as official analytical method for purity determination or assay of concentration of organic compounds.

Key words—quantitative NMR; absolute quantitation; round-robin test

緒 言

核磁気共鳴 (NMR) スペクトルは、シグナルの化学シフト値、カップリングや分子内積分比などの情報から分子構造を推定することができるため、有

機化学や天然物化学等の分野において、主に分子構造解析を目的とした定性分析に用いられてきた。

NMR スペクトル上に観察される個々の水素原子核 (プロトン; ¹H) シグナルの面積比は、分子上のプロトンの数比に比例する。この現象は、分子内だけ

^a和光純薬工業株式会社, ^b国立医薬品食品衛生研究所, ^c国立研究開発法人水産研究・教育機構中央水産研究所, ^d株式会社 JEOL RESONANCE, ^eメトラー・トレド株式会社, ^f日本電子株式会社, ^g国立研究開発法人産業技術総合研究所, ^h公益財団法人微生物化学研究会微生物化学研究所, ⁱ一般財団法人日本食品分析センター, ^j大塚製薬株式会社, ^k花王株式会社

*e-mail: miura.toru@wako-chem.co.jp

でなく分子間においても共通であることから、測定対象物質とは異なる純度既知の内標準物質を添加した試料溶液を調製し、 ^1H NMR スペクトルを測定することによって、内標準物質の濃度又は純度を基準として測定対象物質の濃度又は純度をシグナル面積比の関係から迅速に測定することが可能である。しかし、精確な定量値を得るためには、精確なシグナル面積比が観測できる測定条件の検討が必須である。また、検出感度においてもクロマトグラフィーに比べて劣るため、 ^1H NMR を用いた定量分析 (^1H quantitative NMR; ^1H qNMR) は、一部の目的を除いて用いられることは少なかった。

一方、近年、 ^1H qNMR の手法が検証され始め、定量用に最適化された測定条件を設定することで、精確な定量値を求めることが可能であることを示す測定例が報告されている。¹⁻⁵⁾ ^1H qNMR は、個々の測定対象物質の分子が持つ吸光や蛍光などの物理特性を指標とせず、分子上のプロトンの量から物質量を求める方法であるため、試薬、残留農薬、天然物や食品添加物標準品等の精確な純度決定、標準品の存在しない物質の絶対定量等に応用が可能な手法である。^{6,7)} 実際に、生薬、食品添加物、残留農薬、アミノ酸、マイコトキシン及びマリントキシンなどは、これまで絶対純度を保証した標準物質や標品の供給が困難であったが、 ^1H qNMR を利用することによって、この問題が解決され、複数の国家計量機関や試薬メーカーから供給され始めている。さらに、 ^1H qNMR 用に開発された国際単位系 (International System of Units; SI) トレーサブルな認証標準物質 (certified reference material; CRM) を内標準物質 (qNMR 用基準物質) として正確に添加した試料溶液を調製し、本試料溶液を ^1H qNMR 条件で測定することで、SI トレーサブルな精確な定量値を得ることができる手法として、accurate quantitative NMR with internal reference substance (AQARI) 法が報告されている。⁸⁻¹⁰⁾ 日本薬局方や食品添加物公定書等の公的な試験法において、純度又は含有率を精確に測定するための定量法として、この AQARI 法の方法論を応用した ^1H qNMR の採用が既に開始されている。¹¹⁾ 日本薬局方では生薬等の分野に限ってではあるが、既に 8 種の定量指標成分標品の純度決定に、また食品添加物公定書では、3 種の定量対象標品の純度決定に ^1H qNMR が採用され

ている。

このように ^1H qNMR は、従来のクロマトグラフィーとは原理が異なる新しい定量法であり、マスバランス法のように含有するすべての不純物を同定・定量することなく、SI トレーサブルで精確な定量値を効率的に得ることができる方法であることから、医薬品や食品だけでなく、工業化学等の精確な定量値が求められる様々な分野への応用が期待されている。本稿では、 ^1H qNMR の標準化を目的として同一の測定対象物質及び qNMR 用基準物質を用いてラウンドロビン試験を実施し、本定量法の精確さについて評価したので報告する。

方 法

1. 実施機関 国立医薬品食品衛生研究所、国立研究開発法人産業技術総合研究所、国立研究開発法人水産研究・教育機構中央水産研究所、株式会社 JEOL RESONANCE、和光純薬工業株式会社の 5 機関で行った。

2. NMR 装置、測定条件及び解析条件 NMR 装置には、各機関が保有するプロトン (^1H) 共鳴周波数 300 MHz 以上の合計 6 機を用いた (Table 1)。ラウンドロビン試験の実施に先立ち、NMR 装置は、機器の取扱い説明書等に従って、0.1% (v/v) エチルベンゼン重水素化クロロホルム溶液、1-3% (v/v) クロロホルム重水素化アセトン溶液などを用いて、あらかじめ測定に支障のない状態に調整したものを用いた。

^1H qNMR 測定条件は、第十七改正日本薬局方「10. 核磁気共鳴 (NMR) 法を利用した生薬及び漢方処方エキスの定量指標成分の定量法」及び具体的品目に記載されている条件を参考に標準的な測定条件を設定した。すなわち、測定対象とする核は ^1H 、デジタル分解能は 0.25 Hz 以下、観測スペクトル幅は -5-15 ppm を含む 20 ppm 以上、スピニングはオフ、パルス角は 90° 、 ^{13}C デカップリングはあり、遅延時間は繰り返しパルス待ち時間 60 秒以上、積算回数は 8 回以上、ダミースキャンは 2 回以上、測定温度は 20-30°C の一定温度とした。この標準的な測定条件に基づき、各機関はそれぞれ具体的な ^1H qNMR 測定条件を設定して測定することとした (Table 1)。

^1H qNMR 解析条件は、各機関が保有するソフト

Table 1. List of Devices and Parameters in Cooperative Measurements

device and parameter		A	B	C	D	E	F
sample preparation	balance	Mettler Toledo XP2U	Mettler Toledo XP6U	Mettler Toledo XP6U	Mettler Toledo XP6U	Mettler Toledo XP2U	Mettler Toledo XP2U
	minimum indicated value	0.0001 mg	0.0001 mg	0.0001 mg	0.0001 mg	0.0001 mg	0.0001 mg
	minimum weight	0.7 mg	0.2 mg	0.2 mg	0.2 mg	0.3 mg	0.4 mg
	sample volume analyte: 1,4-BTMSB- <i>d</i> ₄	≈ 20 mg	≈ 13 mg	≈ 13 mg	≈ 20 mg	≈ 20 mg	≈ 20 mg
	standard: 3,5-BTFMBA	≈ 2 mg	≈ 1 mg	≈ 1 mg	≈ 2 mg	≈ 2 mg	≈ 2 mg
NMR measurement	added solvent volume	2 mL	1 mL	1 mL	2 mL	2 mL	2 mL
	NMR instrument	JEOL ECA800	JEOL ECS400	BRUKER Avance III 300	BRUKER Avance III 800	JEOL ECS400S	JEOL ECS400
	spectrometer frequency	800 MHz	400 MHz	300 MHz	800 MHz	400 MHz	400 MHz
	spectral width	20 ppm (−5 to 15 ppm)	400 ppm (−196 to 204 ppm)	20 ppm (−5 to 15 ppm)	20 ppm (−5 to 15 ppm)	20 ppm (−5 to 15 ppm)	20 ppm (−5 to 15 ppm)
	digital filter	on	off	on	on	on	on
	pulse angle	90°	90°	90°	90°	90°	90°
	resolution	0.25 Hz	0.25 Hz	0.25 Hz	0.25 Hz	0.25 Hz	0.25 Hz
	relaxation delay time	60 s	60 s	60 s	60 s	60 s	60 s
	measurement temperature	25°C	25°C	22°C (r.t.)	25°C	25°C	25°C
	¹³ C decoupling	on	on	on	on	on	on
	decoupling sequence	MPF8	MPF8	MPF9	Chirp	MPF8	MPF8
	scan times	8	32	16	8	8	8
process	dummy scan times	2	2	2	2	2	2
	analysis software	Delta v5.0.5.1	MestReNova ver.7.0.2	MestReNova ver.7.0.2	Topspin 3.1	Delta V5.1	ALJCE2 for qNMR Ver.1.1
	window function	off	off	off	off	off	off
	zero filling	2 times	off	off	2 times	2 times	2 times
	phase correction	manual	manual	manual	manual	manual	manual
baseline correction	baseline correction	on	on	on	on	on	on

ウェアを用い、それぞれ定量分析に適した条件に独自に設定したものをを用いた (Table 1).

3. 試薬など 測定対象物質として、国際単位系にトレーサブルな認証標準物質 1,4-ビス (トリメチルシリル) ベンゼン- d_4 [1,4-bis (trimethylsilyl) benzene- d_4 ; 1,4-BTMSB- d_4] (和光純薬工業製, 認証値: 質量分率 $99.9 \pm 0.6\%$) を, qNMR 用基準物質として, 3,5-ビス (トリフルオロメチル) 安息香酸 [3,5-bis (trifluoromethyl) benzoic acid; 3,5-BTFMBA] (産業技術総合研究所製, 認証値: 質量分率 $99.96 \pm 0.06\%$) を使用した. 測定対象物質及び qNMR 用基準物質を溶解する重水素化溶媒には, メタノール- d_4 [和光純薬工業製, 純度 (GC) 質量分率 98.5% 以上及び重水素化率 99.8% 以上] を用いた. NMR 試料管には, 外径 $4.965 (+0.005, -0.014 \text{ mm})$, 全長 200 mm で, その材質がほうけい酸ガラス製のもの (和光純薬工業製) を使用した. 測定対象物質及び qNMR 用基準物質の質量を計量する際の試料採取用容器には, アルミひょう量皿 (和光純薬工業製) を用いた. なお, 測定対象物質, qNMR 用基準物質, NMR 試料管及びアルミひょう量皿は同一ロットのものを全機関に配布した.

4. 試料溶液の調製 ラウンドロビン試験に供する試料溶液の調製は, 配布された試薬等を用いて各機関で行った. 調製室内環境が, 温度 常温 ($15\text{--}25^\circ\text{C}$), 相対湿度 $0\text{--}80\%$ であることを確認した後, 最小計量値以上, かつ, 定量に用いるシグナルの SN 比が同程度の大きさになるように測定対象物質及び qNMR 用基準物質をバイアル瓶にはかりとり, このバイアル瓶に, 測定対象物質に対して約 0.1% (w/v) になるようにメタノール- d_4 を加えてそれぞれ溶かしたものを試料溶液とした. 試料溶液約 0.6 mL をマイクロピペットなどで NMR 試料管 (液高約 40 mm) に移し, 蓋をして ^1H qNMR 測定用試料とした.

この操作を 3 回繰り返し, 測定対象物質及び qNMR 用基準物質の両者を含む試料溶液を入れた NMR 試料管を 3 本準備した [試料 1, 2, 3 (test sample 1, 2, 3, NMR 試料管 1, 2, 3)]. 各機関が用いた精密天びん, 最小計量値, 実際に計量した測定対象物質及び qNMR 用基準物質の質量並びに添加した重水素化溶媒の容量等の情報を Table 1 に示した. なお, 精密天びんの最小計量値は, Eq. (1) に

従いあらかじめ別に求めた.

$$W_{\min} = \sigma \times 2000 \quad (1)$$

ここで最小計量値 $W_{\min}$ は, 試料採取用容器として用いるアルミひょう量皿 (約 60 mg) について, 質量を 10 回繰り返し測定した際の標準偏差 (standard deviation; S.D.) σ に, 安全係数 2 を計量における許容範囲 (0.10%) で除した値 $2000 [= 2 / (0.10 / 100)]$ を乗じて算出した.¹²⁾

5. ^1H qNMR 測定 Figure 1 に示したように, あらかじめ調整した NMR 装置に, 試料溶液を入れた NMR 試料管を NMR 装置に導入し, ^1H qNMR 測定した後, NMR 装置より NMR 試料管を一旦排出させるといった一連の操作を 1 セットとし, 試料 1, 2 及び 3 に関してそれぞれ 3 セット, 合計 9 つの自由誘導減衰 (free induction decay; FID) データを得ることとした.

6. 測定対象物質の純度の算出 測定対象物質の純度の算出は以下の 2 手法を用いた. なお, 純度の算出に用いるシグナルの積分区間の設定は, 得られたスペクトルより各機関が判断し, 適切な区間を設定することとした. また, 参考スペクトルを Fig. 2 に示した.

6-1. qNMR 用基準物質 (3,5-BTFMBA) の各シグナルの面積を用いる場合 Figure 3 (A) に示したように, qNMR 用基準物質 (3,5-BTFMBA) のシグナル a ($\delta 8.20 \text{ ppm}$) (プロトン数 1) 及びシグナル b ($\delta 8.50 \text{ ppm}$) (プロトン数 2), 測定対象物質 (1,4-BTMSB- d_4) のシグナル ($\delta 0.20 \text{ ppm}$) (プロトン数 18) のシグナル面積を求め, Eqs. (2)–(4) に代入して純度を算出することとした.

$$P_a = (A_t / A_{sa}) \times (1/18) \times (226.50/258.12) \times (m_s / m_t) \times P_s \quad (2)$$

$$P_b = (A_t / A_{sb}) \times (2/18) \times (226.50/258.12) \times (m_s / m_t) \times P_s \quad (3)$$

$$P_t = (P_{sa} + P_{sb}) / 2 \quad (4)$$

ここで, 純度 (質量分率%) を P , はかりとった質量 (mg) を m , シグナル面積を A , qNMR 用基準物質 (3,5-BTFMBA) 及び測定対象物質 (1,4-BTMSB- d_4) をそれぞれ s, t, qNMR 用基準物質 (3,5-BTFMBA) のシグナル a 及び b をそれぞれ a, b, qNMR 用基準物質 (3,5-BTFMBA) 及び測定対象物質 (1,4-BTMSB- d_4) の分子量をそれぞれ 258.12, 226.50 とする.

Fig. 1. ^1H qNMR Data Acquisition Designed for This Round Robin Test

Three test samples dissolved analyte (1,4-BTMSB- d_4) and qNMR reference (3,5-BTFMBA) in methanol- d_4 were individually prepared and then each of them was discontinuously measured on NMR instrument optimized to ^1H qNMR conditions each three times.

Fig. 2. Typical ^1H qNMR Spectrum of Test Sample Used for the Round Robin Test

The test sample was prepared to 0.1% (w/v) 1,4-BTMSB- d_4 and 1% (w/v) 3,5-BTFMBA in methanol- d_4 . This spectrum was measured by 400 MHz NMR instrument (JNM-ECS400 with TH5 Probe) under ^1H qNMR conditions.

Fig. 3. Two Integration Manners for Signal a and b of 3,5-BTFMBA

A) Integral ranges of signal a and b were set individually. B) Integral ranges of signal a and b were set together.

6-2. qNMR 用基準物質 (3,5-BTFMBA) の各シグナル間の面積を用いる場合 Figure 3 (B) に示したように, qNMR 用基準物質 (3,5-BTFMBA) のシグナル a 及び b の両者を含む範囲の面積 (プロトン数 3), 測定対象物質 (1,4-BTMSB- d_4) のシグナル (δ 0.20 ppm) (プロトン数 18) のシグナル面積を求め, Eq. (5) に代入して純度を算出することとした.

$$P_t = (A_t/A_{s(a+b)}) \times (3/18) \times (226.50/258.12) \times (m_s/m_t) \times P_s \quad (5)$$

ここで, qNMR 用基準物 (3,5-BTFMBA) のシグナル a 及び b の両者を含む範囲のシグナル面積を $A_{s(a+b)}$ とする.

7. システム適合性試験

7-1. 検出の確認 各機関において調製した試料 3 (test sample 3, NMR 試料管 3) について ^1H qNMR 測定し, qNMR 用基準物質 (3,5-BTFMBA) のシグナル a (δ 8.20 ppm) 及び b (δ 8.50 ppm), 測定対象物質 (1,4-BTMSB- d_4) のシグナル (δ 0.20 ppm) の SN 比を二乗平均平方根 (root mean square; RMS) 法により計算したとき, 500 以上で検出されることを確認することとした.

7-2. システムの性能 各機関において調製した試料 3 (test sample 3, NMR 試料管 3) について ^1H qNMR 測定し, qNMR 用基準物質 (3,5-BTFMBA) のシグナル a (δ 8.20 ppm) 及び b (δ 8.50 ppm), 測定対象物質 (1,4-BTMSB- d_4) のシグナル (δ 0.20 ppm) における不純物シグナルの存否を目視により確認するとともに, シグナル面積比

$a/(b/2)$ が 0.99–1.01 以内であることを確認することとした.

7-3. システムの再現性 各機関において調製した試料 3 (test sample 3, NMR 試料管 3) について, NMR 装置への導入, 測定, 排出を 6 回繰り返し, 得られた 6 つの独立した ^1H qNMR スペクトル上における測定対象物質 (1,4-BTMSB- d_4) のシグナル (δ 0.20 ppm) と, qNMR 用基準物質 (3,5-BTFMBA) のシグナル a (δ 8.20 ppm) の面積の比の相対標準偏差 (relative standard deviation; R.S.D.) が 0.5% 以下になることを確認することとした.

結果及び考察

1. 実施計画 本ラウンドロビン試験は, ^1H qNMR により得られる定量値の精度の評価を目的とするため, この目的に適した測定対象物質及び qNMR 用基準物質を選定した. その選定条件として, ①吸湿性及び揮発性が低く取り扱いが容易な安定な固体の物質, ②SI にトレーサブルな純度 (質量分率) が付与されている物質, ③単一若しくは複数の定量に適したシャープなシグナルを与える物質, ④不純物のシグナルが定量対象シグナル付近に観察されない物質, 等が挙げられた. これらの条件を満たすものとして, 測定対象物質に 1,4-BTMSB- d_4 を, qNMR 用基準物質に 3,5-BTFMBA を用いることとした. いずれも安定な固体であり, SI にトレーサブルな認証標準物質である. また, ^1H qNMR スペクトル上に, 3,5-BTFMBA は δ 8.20 ppm (プロト

ン数 1) 及び δ 8.50 ppm (プロトン数 2) のシグナル a 及び b を与え, 1,4-BTMSB- d_4 は δ 0.20 ppm (プロトン数 18) のシグナルを与え, ^1H qNMR に適したいずれも完全に分離したシャープなシグナル形状を示すものである (Fig. 2). 3,5-BTFMBA の認証値は, 質量分率 $99.96 \pm 0.06\%$ と値付けられており, 不確かさが非常に小さいため, 精度評価において与える影響が非常に小さく qNMR 用基準物質として適していると判断した. 一方, 1,4-BTMSB- d_4 の認証値は, 質量分率 $99.9 \pm 0.6\%$ と値付けられており, その不確かさは 3,5-BTFMBA に比べて大きい, ^1H qNMR により得られる定量値の精度の評価を目的としたとき, その不確かさが無視できない. よって, 本ラウンドロビン試験では, 3,5-BTFMBA を qNMR 用基準物質とし, 1,4-BTMSB- d_4 を測定対象物質とした.

また, 通常の ^1H qNMR では, qNMR 用基準物質の 1 つのシグナルから測定対象物質のそれぞれのシグナルについて定量値を求めるが, 本ラウンドロビン試験では, qNMR 用基準物質とする 3,5-BTFMBA がシグナル a (δ 8.20 ppm) (プロトン数 1) 及びシグナル b (δ 8.50 ppm) (プロトン数 2) の 2 つのシグナルを与え, 測定対象物質とする 1,4-BTMSB- d_4 は 1 つのシグナル (δ 0.20 ppm) (プロトン数 18) を与えることから, 通常の ^1H qNMR とは逆方向, すなわち, qNMR 用基準物質の複数のシグナルを基準として測定対象物質の 1 つのシグナルに対して定量値を求めることとした. 通常の ^1H qNMR とは異なる方式となるが, ①qNMR 用基準物質 (3,5-BTFMBA) の各シグナルの面積を用いる場合 [Fig. 3(A)], ②qNMR 用基準物質 (3,5-BTFMBA) の各シグナル間の面積を用いる場合 [Fig. 3(B)], について評価可能であると判断し, シグナル面積の求め方の違いによる定量値の差の有無についても同時に評価することとした. また, 測定対象物質とした 1,4-BTMSB- d_4 の認証値: 質量分率 $99.9 \pm 0.6\%$ に対して, ^1H qNMR がどの程度の精度で定量値を導くかどうかを評価の指標とすることとした.

2. 試料調製及び測定条件 試料調製においては, 調製時に生じるばらつきを軽減させるために, 各機関に同一ロットの測定対象物質, qNMR 用基準物質, アルミひょう量皿及び重水素化溶媒を配布

した. ひょう量にはウルトラマイクロ天びんを用いることとし, 測定対象物質及び qNMR 用基準物質のひょう量値が米国薬局方 (United States Pharmacopeia; USP) に記載の手順に従って求めた最小計量値以上になるように指示した. 各機関において使用する天びんの最小計量値は, 0.2–0.7 mg と求められ, 使用する天びんの測定誤差を考慮したとき, 1 mg 以上のひょう量が最低限必要であると判断された. また, 各機関における測定対象物質及び qNMR 用基準物質のシグナル強度が極端に異なることのないよう, 前者が約 1 mg/mL, 後者が約 10 mg/mL になるように重水素化溶媒を加えて調製したものを試料溶液とした.

^1H qNMR 測定条件については, 原則, 第十七改正日本薬局方に記載されている試験条件に準じた. 第十七改正日本薬局方には, 装置として, 「 ^1H 共鳴周波数 400 MHz 以上の核磁気共鳴スペクトル測定装置」と記載されているが, 各機関が保有する装置性能には幅があり, 現在一般的に普及している 300 MHz の NMR 装置を含め, 結果として 300–800 MHz の NMR 装置を用いることとした. また, 観測スペクトル幅は「–5–15 ppm を含む 20 ppm 以上」と記載されているが, 装置 B (^1H 共鳴周波数 400 MHz) のみ, 当該装置が通常採用している –196–204 ppm の観測スペクトル幅を採用した. ^{13}C 核デカップリングの方法については, 特に指定せず, 各機関において採用している方法を用いることとした. 積算回数は「8 回以上」と記載されているが, 精度を十分担保するために定量に用いるシグナルの SN 比が 500 以上になるように, 各機関が積算回数 8 回以上で適宜設定することとした. また, 第十七改正日本薬局方の定量指標成分の純度決定において遅延時間は「繰り返しパルス待ち時間 60 秒以上」と記載されているが, これは, 定量に用いるシグナル面積を正確に求めることを考慮して設定されたパラメータである. ^1H qNMR において正確なシグナル面積を得るためには, 遅延時間を, 測定対象物質及び qNMR 用基準物質の定量に用いるすべてのシグナルの縦緩和時間 (spin-lattice relaxation time; T_1) を考慮して設定する必要がある. T_1 は簡易的にはパルスによって励起された核スピンの, 熱平衡状態に回復する時定数のことを意味するが, 遅延時間を T_1 の 10 倍に設定した場合, 励起された核

Table 2. List of the Signal to Noise Ratio (S/N) of the Target Signals

sample No.	target signal	spectrometer frequency of instrument					
		A 800 MHz	B 400 MHz	C 300 MHz	D 800 MHz	E 400 MHz	F 400 MHz
test sample 3	1,4-BTMSB- <i>d</i> ₄ (δ 0.20 ppm)	13460	9418	3463	58300	7143	4567
	3,5-BTFMBA signal a (δ 8.20 ppm)	1620	1297	586	9232	990	582
	3,5-BTFMBA signal b (δ 8.50 ppm)	3726	2903	1342	21107	2315	1335

スピンは 99.995% 熱平衡状態に回復することになり、積算によるシグナル強度の飽和はほぼ生じないことになる。¹³⁾ 一般的な化合物の場合、 T_1 は長くても 6 秒程度であることから第十七改正日本薬局方記載の遅延時間は「繰り返しパルス待ち時間 60 秒以上」と妥当な値が設定されている。今回、測定対象物質 (1,4-BTMSB-*d*₄) 及び qNMR 用基準物質 (3,5-BTFMBA) のシグナルについて T_1 をあらかじめ確認したところ、すべてのシグナルの T_1 が 6 秒以下であったことから、第十七改正日本薬局方と同様に遅延時間を 60 秒に設定することとした。本ラウンドロビン試験において各機関が用いた測定条件を Table 1 に示した。

3. ¹H qNMR 解析条件 構造解析に用いる一般的な定性 ¹H NMR では、分解能や感度の向上を目的にスペクトル解析時には窓関数処理を設定するのが一般的である。また、シグナル面積に関しては、規格化したプロトン数の面積値として有効数字 1 桁の精度を確保できれば問題ないことから、位相補正を自動で実施するのが一般的である。一方、¹H qNMR では、精確なシグナル面積を得るために解析条件の設定に注意が必要である。精確なシグナル面積が得られる解析条件の報告例はあるが、¹⁴⁾ 第十七改正日本薬局方にはその指定がない。そこで、本ラウンドロビン試験では、正確なシグナル面積が得られるように解析条件を指定することとした。すなわち、FID データをゼロフィリングによって、強度がゼロのデータを 2 倍補完した後に、窓関数処理を行わずにフーリエ変換し、得られたスペクトルの位相補正をマニュアルで行った後、各機関が適宜選択したアルゴリズムに従ってベースライン補正を実行することとした。なお、ゼロフィリング処理を実行できないソフトウェアを使用した場合は、ゼロフィリングなしで解析を行うこととした。また、リファレンス設定は qNMR 用基準物質の低周波数

(右側) のシグナルを δ 8.20 ppm に設定することとした。本ラウンドロビン試験において各機関が用いた解析条件を Table 1 に示した。

4. システム適合性試験 第十七改正日本薬局方において、¹H qNMR による純度規定が設定されている具体的品目の記載を参考にシステム適合性試験を設定した。¹⁵⁾ すなわち、各機関は、指定された測定条件に従って試料 3 (test sample 3, NMR 試料管 3) について ¹H qNMR 測定し、測定対象物質 (1,4-BTMSB-*d*₄) のシグナル (δ 0.20 ppm)、qNMR 用基準物質 (3,5-BTFMBA) のシグナル a (δ 8.20 ppm) 及びシグナル b (δ 8.50 ppm) について RMS 法により SN 比を求めたとき、それぞれのシグナルの SN 比が 500 以上で検出されていることを確認することとした。その結果、いずれの装置においても十分な SN 比を与えることが確認された (Table 2)。

また、各機関は、試料 3 (test sample 3, NMR 試料管 3) を用いて得られた ¹H qNMR スペクトルについて、測定対象物質 (1,4-BTMSB-*d*₄) のシグナル (δ 0.20 ppm)、qNMR 用基準物質 (3,5-BTFMBA) のシグナル a (δ 8.20 ppm) 及びシグナル b (δ 8.50 ppm) 付近における不純物シグナルの存否、シグナル面積比 a/(b/2) が 0.99–1.01 以内であることを確認した。その結果、いずれの装置の ¹H qNMR スペクトルにおいても、不純物のシグナルは観察されず、また、シグナル面積比 a/(b/2) は装置 A が 1.01、その他の装置が 1.00 を与えたことから、今回設定したラウンドロビン試験の系において、定量結果に偏りを与える要因が存在しないことが確認された (Table 3)。

さらに、各機関は、試料 3 (test sample 3, NMR 試料管 3) について、6 つの独立した ¹H qNMR スペクトルを測定し、測定対象物質 (1,4-BTMSB-*d*₄) のシグナル (δ 0.20 ppm) と、qNMR 用基準物質

Table 3. List of the Ratio of Signal Area per Nuclei of Signal a and b

sample No.	ratio of signal area per nuclei	spectrometer frequency of instrument					
		A 800 MHz	B 400 MHz	C 300 MHz	D 800 MHz	E 400 MHz	F 400 MHz
test sample 3	a/(b/2)	1.01	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Table 4. Relative Standard Deviation (R.S.D.) Calculated from the Area Ratio of Signal a of BTMFBA to Signal of 1,4-BTMSB-*d*₄

sample No.	R.S.D.	spectrometer frequency of instrument					
		A 800 MHz	B 400 MHz	C 300 MHz	D 800 MHz	E 400 MHz	F 400 MHz
test sample 3	R.S.D.	0.15%	0.08%	0.28%	0.06%	0.06%	0.28%

R.S.D. were calculated from the data that were obtained by 6 times measurements for test sample 3.

(3,5-BTFMBA) のシグナル a (δ 8.20 ppm) の面積の比の相対標準偏差が 0.5% 以下になることを確認した。その結果、相対標準偏差は最大 0.28% となり、今回設定したラウンドロビン試験の系において、安定的なシグナル面積の測定が可能であることが確認された (Table 4)。

5. 定量値の比較 本ラウンドロビン試験では、①qNMR 用基準物質 (3,5-BTFMBA) の各シグナルの面積を用いる場合 [Fig. 3(A)], ②qNMR 用基準物質 (3,5-BTFMBA) の各シグナル間の面積を用いる場合 [Fig. 3(B)] において、それぞれの手法が分析結果に与える影響を確認した。その結果、Table 5 に示したように、平均値を純度に、また得られたデータが正規分布に従うと仮定し標準偏差 σ に 2 を乗じた値 (95% 信頼区間) をばらつきとした場合の、すべての分析結果に関して、分析対象物質 (1,4-BTMSB-*d*₄) (認証値：質量分率 99.9 $\pm$ 0.6%) の認証値とばらつきの範囲内で一致する値が導かれた。結果が示すように、シグナル面積の範囲を広げた場合においても、分析結果として同じ値が導かれたことから、不純物がシグナル面積の測定範囲に含まれていなければ、¹H qNMR が定量法として実用的に機能し、精確な定量を実現可能であることが分かった。すなわち、不純物がシグナル面積の測定範囲に含まれていないことが、¹H qNMR において精確な分析結果を求めるための必須条件であると言える。

結 論

¹H qNMR が有機化合物の純度又は含有率の測定法として実的に機能することを検証するために、5 機関 6 装置により、ラウンドロビン試験を実施した。第十七改正日本薬局方に記載の手法を参考に ¹H qNMR 測定条件を設定し、3,5-BTFMBA (認証値：質量分率 99.96 $\pm$ 0.06%) を qNMR 用基準物質として、1,4-BTMSB-*d*₄ (認証値：質量分率 99.9 $\pm$ 0.6%) の純度を求める系を用いて評価した。¹H qNMR は、試料調製、NMR 測定及びデータ解析それぞれの操作の中に偏りやばらつきの要因が含まれていることから、適切な試料調製、NMR 測定及びデータ解析条件を設定した。その結果、すべての分析結果が 1,4-BTMSB-*d*₄ の認証値と同じ値となり、¹H qNMR が有機化合物の純度又は含有率の測定法として実的に機能することが確認された。

本法は、原子核同士の比較で定量可能な手法であり、効率的に精確な定量が可能であることのみならず、広範囲な有機化合物へ適用できる汎用性を有していることから、今後、医薬品分析の分野において広く普及し分析結果の信頼性の担保に寄与することが期待される。また、今回、内標準法による ¹H qNMR (AQARI 法) は適切な条件で測定するとき、高い精度の定量値を与えることを明らかとしたが、qNMR 用基準物質を測定対象物質が溶解した溶液に混合することなく、¹H qNMR が実施可能な外標準法についても、検討がさらに進むことで、¹H qNMR の適用範囲が広がると考えられる。

Table 5. Average (AV) and Standard Deviation (S.D.) $\times 2$ (95% Confidence Interval) of 1,4-BTMSB- d_4 Purity Measured by Each Instrument under ^1H qNMR Conditions

calcd. type	abbrev.	A 800 MHz		B 400 MHz		C 300 MHz		D 800 MHz		E 400 MHz		F 400 MHz		overall of all instrument	
		AV	S.D. $\times 2$	AV	S.D. $\times 2$	AV	S.D. $\times 2$	AV	S.D. $\times 2$	AV	S.D. $\times 2$	AV	S.D. $\times 2$	AV	S.D. $\times 2$
3,5-BTFMBA signal a to 1,4-BTMSB- d_4	P_a	99.20%	0.34%	99.90%	0.25%	99.65%	0.88%	99.71%	0.20%	99.95%	0.40%	99.95%	0.39%	99.73%	0.58%
	P_b	99.70%	0.42%	99.98%	0.12%	100.07%	0.34%	99.79%	0.10%	100.09%	0.38%	99.70%	0.14%	99.89%	0.36%
$P_{\text{indiv.}} = (P_a + P_b)/2$		99.45%	0.63%	99.94%	0.21%	99.86%	0.78%	99.75%	0.17%	100.02%	0.40%	99.83%	0.39%	99.81%	0.59%
3,5-BTFMBA signal a and b to 1,4-BTMSB- d_4	P_{all}	99.46%	0.39%	99.95%	0.16%	99.93%	0.48%	99.75%	0.11%	100.04%	0.33%	99.78%	0.21%	99.82%	0.48%

AV and S.D. were calculated from 3 measurements of 3 samples.

謝辞 本研究は、新市場創造型標準化制度を活用した標準化案件における提案テーマ「定量核磁気共鳴 (qNMR) 分析法に関する標準化」の一環として実施されました。ここで得られた研究成果は、経済産業省中山和泉様、曾根邦男様、福田順子様及び一般財団法人日本規格協会伴 直人様、桑原純夫様、大芦 誠様のご尽力なくしては得られなかったものであり、ここに深く感謝致します。

利益相反 三浦 亨 (和光純薬工業株式会社の社員)、末松孝子 (株式会社 JEOL RESONANCE の社員)、高柳庸一郎 (メトラー・トレド株式会社の社員)、伊藤喜之 (日本電子株式会社の社員)、藤峰慶徳 (大塚製薬株式会社の社員)、小池 亮 (花王株式会社の社員)、大福裕子 (和光純薬工業株式会社の社員)、山田裕子 (和光純薬工業株式会社の社員)、内海博明 (株式会社 JEOL RESONANCE の社員)。

REFERENCES

- 1) Pauli F. G., Chen S., Simmler C., Lankin C. D., Gödecke T., Jaki U. B., Friesen B. J., McAlpine B. J., Napolitano G. J., *J. Med. Chem.*, **57**, 9220–9231 (2014).
- 2) Koike R., Jo S., Azuma M., Wakisaka T., *Bunseki Kagaku*, **53**, 1133–1138 (2004).
- 3) Yamazaki T., Ohtsuki T., Miura T., Suematsu T., Horinouchi T., Murakami M., Saito T., Ihara T., Tada A., Tahara M., Goda Y., Akiyama H., Nakao S., Yamada Y., Koike R., Sugimoto N., *Bunseki Kagaku*, **63**, 323–329 (2014).
- 4) Schoenberger T., *Anal. Bioanal. Chem.*, **403**, 247–254 (2012).
- 5) Watanabe R., Sugai C., Yamazaki T., Matsushima R., Uchida H., Matsumiya M., Takatsu A., Suzuki T., *Toxins*, **8**, 294 (2016).
- 6) Sugimoto N., Tada A., Suematsu T., Arifuku K., Saito T., Ihara T., Yoshida Y., Kubota R., Tahara M., Shimizu K., Ito S., Yamazaki T., Kawamura Y., Nishimura T., *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, **51**, 19–27 (2010).
- 7) Saito T., Ihara T., Miura T., Yamada Y., Chiba K., *Accred. Qual. Assur.*, **16**, 421 (2011).
- 8) Tahara M., Sugimoto N., Ohtsuki T., Tada A., Akiyama H., Goda Y., Ikarashi Y., *En-*

- vironmental Science*, **27**, 142–150 (2014).
- 9) Ohtsuki T., Sato K., Abe Y., Sugimoto N., Akiyama H., *Talanta*, **131**, 712–718 (2015).
- 10) Kato T., Saito M., Nagae M., Fujita K., Watai M., Igarashi T., Yasumoto T., Inagaki M., *Anal. Sci.*, **32**, 729–734 (2016).
- 11) Hosoe J., Sugimoto N., Suematsu T., Yamada Y., Miura T., Hayakawa M., Suzuki H., Katsuhara T., Nishimura H., Kikuchi Y., Yamashita T., Goda Y., *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science*, **45**, 243–250 (2014).
- 12) USP “General Chapter 41 Balances,” U.S. Pharmacopeia USP39-NF34, 2016.
- 13) Saito T., Nakaie S., Kinoshita M., Ihara T., Kinugasa S., Nomura A., Maeda T., *Metrologia*, **41**, 213–218 (2004).
- 14) Yamazaki T., Saito T., Miura T., Ihara T., *Bunseki Kagaku*, **61**, 963–967 (2012).
- 15) “The Japanese Pharmacopoeia, Seventeenth Edition,” (*E*)-Cinnamic acid for assay, 2) (*E*)-Cinnamic acid for assay 2 (Purity value by quantitative NMR).