

# 定量NMR法の測定精度と共同測定の結果に対する考察

The measurement accuracy of quantitative NMR and consideration for the result of collaborative study

国立研究開発法人 産業技術総合研究所 物質計測標準研究部門 研究員 山崎 太一

Taichi Yamazaki (Research Scientist)

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology AIST, Research Institute for Material and Chemical Measurement



キーワード

定量NMR(qNMR)、SIトレーサビリティ、共同測定、正確さ

## 1 はじめに

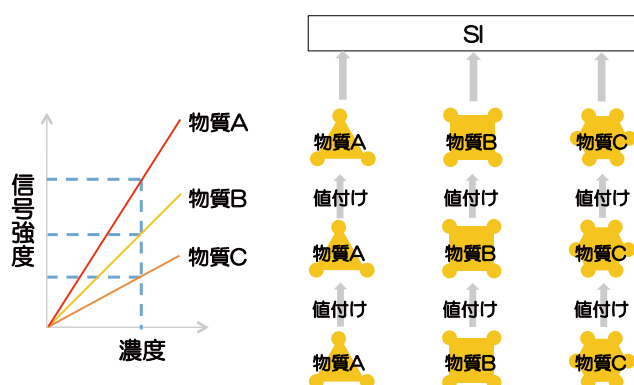


図1 従来の分析化学におけるトレーサビリティ

分析化学における定量分析では、SIトレーサビリティを確保するためには、図1に示すように測定対象と同一の標準物質が必要とされている。このため、凝固点降下法、滴定法や差数法のように一次標準測定法<sup>1)</sup>またはそれに準ずる測定法によって値と不確かさが付与された標準物質が求められ、これらの評価には時間とコストがかかることが多く、幅広い分析対象に対してSIトレーサビリティを確保するには限界がある。日本国内では、計量法におけるJCSS<sup>2)</sup>で定められている数10種類の分析対象成分については標準物質の整備が進み、SIトレーサビリティが確保されている。このことにより、信頼性の高い分析が実現でき、様々な分野での安心・安全が確保されている。一方で、これらの整備には10数年の期間を要しており、この他全ての規制対象成分について従来通りにSIトレーサブルな標準物質を整備することは現実的ではないことは明らかである。

これらの課題を解決するために、近年では核磁気共鳴(NMR)スペクトルを用いた、定量分析が注目され始めて

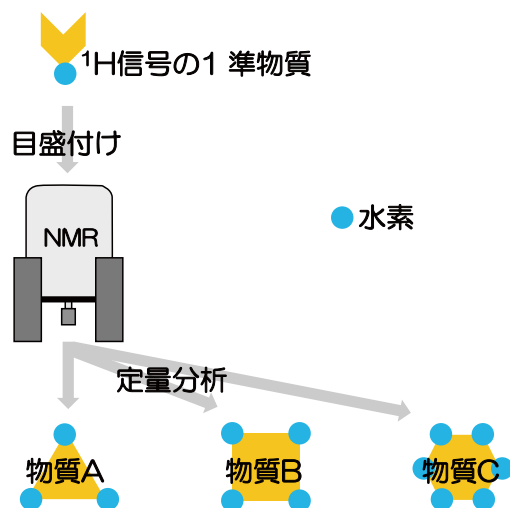


図2 qNMR法によるトレーサビリティ

いる。NMRを用いた定量分析(以下、qNMR)法はプロトン(<sup>1</sup>H)核を基準に定量するために、図2のように異なる分子間での定量が可能とされている。qNMR法では、下記に示す式に従って、定量することができ、基準物質と測定対象成分の分子量、プロトン数や試料の計量値を用いて目的対象成分の含量を知ることができる<sup>3, 4)</sup>。

$$P_A = \frac{H_R}{H_A} \frac{I_A}{I_R} \frac{M_A}{M_R} \frac{W_{RM}}{W_{AS}} P_R$$

ここで、 $P_A$ は分析試料中の分析対象成分の純度、 $P_R$ は定量用基準物質の純度、 $H_A$ は分析対象成分のプロトン数、 $H_R$ は定量用基準物質のプロトン数、 $I_A$ は分析対象成分の信号面積、 $I_R$ は定量用基準物質の信号面積、 $M_A$ は分析対象成分のモル質量、 $M_R$ は定量用基準物質のモル質量、 $W_{AS}$ は分析試料の質量、 $W_{RM}$ は標準物質の質量をそれぞれ示す。この

式は純度を想定したものであるが、濃度等にも応用可能である。

qNMR法は、「試料調製」、「NMR測定」、「データ解析」の各操作において最適化することで、純度評価や濃度評価を始め、様々な定量分析に利用されている<sup>5-10)</sup>。当研究所においても、<sup>1</sup>H核を基準に迅速な値付けが実現できることから、qNMR法を用いた純度校正サービスを実施している<sup>11, 12)</sup>。また、認証標準物質(CRM)開発においても、迅速な供給のために有用な分析法となってきた<sup>13)</sup>。さらには、qNMR法は日本薬局方<sup>14)</sup>やフルジオキシニルなどの食品添加物の定量法<sup>15)</sup>等にも掲載され、公定法への適用も進み始めている。このように、qNMR法を用いた純度測定や濃度測定に関する分析事例は数多く報告されているが、測定の繰り返し再現性や他の分析法との測定結果の比較についてのみ議論され、qNMR法の持つ精確さについてはあまり検討されてこなかった。そこで、qNMR法におけるNMR測定やデータ解析によるばらつきやバイアス要因の検討を進めるために産業技術総合研究所計量標準普及センター(NMIJ)内の”定量NMRクラブ<sup>16)</sup>”の主催でqNMR法の共同測定を実施したので、その詳細について紹介する。

## 2 共同測定

今回紹介する共同測定は、qNMR法におけるNMR測定およびデータ解析に着目して2014年に実施したものである。共同測定における参加者は、定量NMRクラブ会員限定として実施した。実施内容としては、内標準法におけるqNMR法の比較試験とし、当研究所で調製した試料をNMR試料管に小分けした試料を参加者へ提供し、NMR測定パラメータおよびデータ解析パラメータについては各機関で最適化し、その測定結果を報告するものとした。以下、共同測定における詳細について記載する。

### 2-1. 測定試料

測定対象物質にはジメチルスルホン(以下DMSO<sub>2</sub>)を用い、内標準物質(IS)には3,5-ビストリフルオロメチル安息香酸(以下3,5-BTFMBA、NMIJ CRM 4601-a、認証値:(0.9996±0.0006) kg/kg)を用い、試料調製溶媒には、メタノール-*d*<sub>4</sub>を用いた。また、値の付与されていない市販品のDMSO<sub>2</sub>を用いたため、不純物分析を行い、差数法による純度を(0.9997±0.0002) kg/kgと算出した。差数法における不純物分析の結果を表1に示す。

表1 差数法によるDMSO<sub>2</sub>の純度測定の結果

	定量値 (kg/kg)	標準不確かさ (kg/kg)	分析法
類似有機化合物 (GC-FID)	0.00004	0.00003	検量線法 (GC-FID)
揮発性有機化合物			
不揮発性成分	0.00008	0.00017	重量法(TG)
水分	0.00015	0.00003	電量滴定法(KF)
DMSO <sub>2</sub> の純度	0.9997	0.0002	

共同測定実施用の試料調製では、試料の計量にはマイクロ天秤(XP56、メトラートレド社製)を用い、溶媒の計量にはセミマイクロ天秤(XS205、メトラートレド社製)を用いた。約115 mgのDMSO<sub>2</sub>と約900 mgの3,5-BTFMBAを計量し、100 mLのスクリーバイアルに加えた後、メタノール-*d*<sub>4</sub>を90 mL加えて、完全に溶解させた。十分に均質化後に0.8 mLの試料溶液をNMR試料管に移して封管し、81本の測定試料を調製した。

測定試料の均質性試験および安定性試験は、qNMR法で実施し、それぞれ参照値の不確かさに加味した。本測定試料における典型的な<sup>1</sup>H NMRスペクトルを図3に示す。

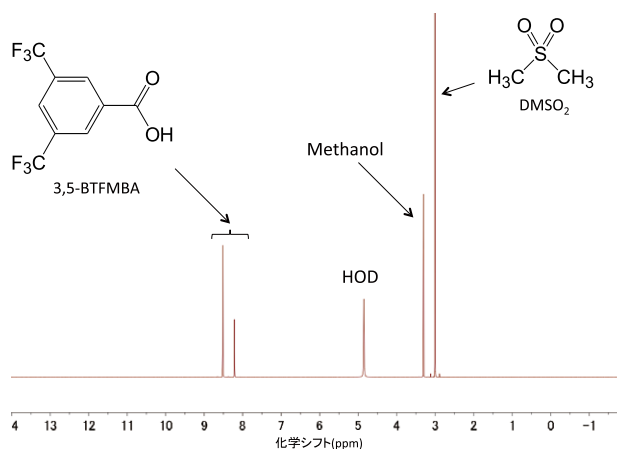


図3 共同測定試料における<sup>1</sup>H NMRスペクトル

均質性試験では全数検査し、小分けした81本の試料について各3回の測定を行った。その測定値をそれぞれ規格化面積値(DMSO<sub>2</sub>の面積値/6)/(3,5-BTFMBAの面積値/3)で算出した。その結果を図4に示す。

図4からは、NMR測定における測定ばらつきの範囲で全ての測定結果が一致し、均質であるという結果が得られた。これは、小分け作業や封管時に調製値に影響を与える要因がなかったと考えられ、共同測定の試料として十分な品質であることが確認された。次に、この結果を分散分析し、均質性の不確かさを算出した。分散分析の結果を表2に示す。

表2 均質性試験における分散分析の結果

要因	平方和	自由度	平均平方	F値	有意確率	5%F境界値
NMR 試料管間 変動	3.71×10 <sup>-5</sup>	79	4.7×10 <sup>-7</sup>	1.000	0.49	1.36
測定間変動	7.52×10 <sup>-5</sup>	160	4.7×10 <sup>-7</sup>			
総変動	1.12×10 <sup>-4</sup>	239	4.7×10 <sup>-7</sup>			

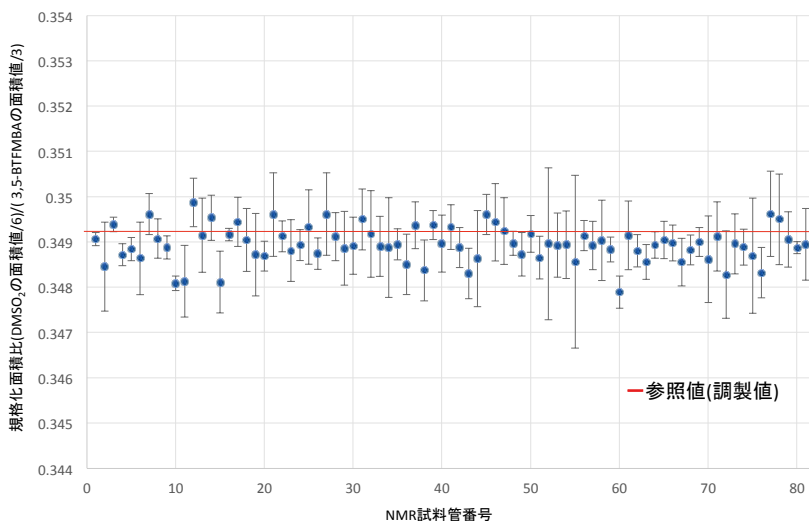


図4 共同測定試料におけるqNMRを用いた均質性試験の結果

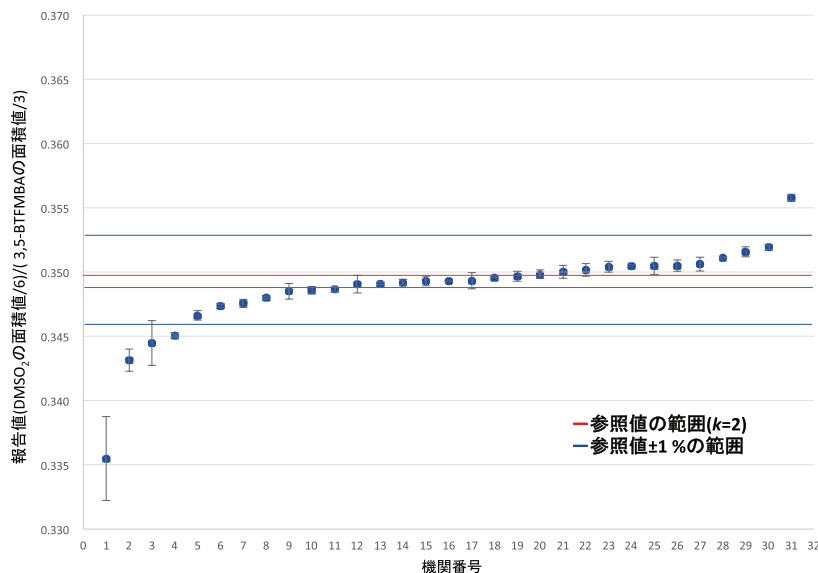


図5 共同測定の結果

表2からNMR試料管間差における有意差はなく、統計的にも十分に均質であることが確認された。このため、ISO Guide 35<sup>17)</sup>に基づき、均質性の不確かさとして $s_{bb}$ を0.002%,  $u_{bb}$ を0.037%と算出し、より大きな値である $u_{bb}$ を均質性由来の不確かさとした。この結果は、本共同測定における参照値の不確かさにも加味した。

次に安定性試験として、均質性試験と同様の方法で共同測定試料の安定性を共同測定の実施期間を含む期間を網羅し、評価した。なお、初回の結果には均質性試験の結果を用いている。安定性試験の結果は、すべて測定ばらつきの範囲で一致し、安定性に有意な差は確認できなかったため、本共同測定における安定性の不確かさは、無視できると考えた。

## 2-2. プロトコル

共同測定試料は参加機関に2本送付し、受け取り後は常温保管とした。NMR測定条件については特に指定条件はなく、参加機関で測定条件を最適化し、各試料につき3回測定した。データ解析についても特に指定条件はなく、化学シフトについてのみ溶媒中のHODのシグナルを4.87 ppmに補正することとした。報告値は、均質性試験や安定性試験と同様に規格化面積値(DMSO<sub>2</sub>の面積値/6)/(3,5-BTFMBAの面積値/3)とした。なお、測定対象のシグナルにおける積分範囲に不純物等が含まれる場合には、スペクトル上積分値を差し引いた値を報告することとした。

## 2-3. 参照値

参照値には調製値を用い、DMSO<sub>2</sub>および3,5-BTFMBAの純度の不確かさ、DMSO<sub>2</sub>および3,5-BTFMBAの計量値に対する天秤の校正証明書の不確かさ、均質性の不確かさおよび安定性の不確かさを加味した。本共同測定における測定値は(DMSO<sub>2</sub>の面積値/6)/(3,5-BTFMBAの面積値/3)で評価しているため、実質的には物質質量比を示している。調製値から算出される規格化面積比は0.3492と計算でき、この値を参照値における中心値とした。また、参照値の拡張不確かさは、上記に示した要因を合成し、0.0004(相対標準不確かさとして0.06%)と算出した。これらの結果から、共同測定における参照値は0.3492±

0.0004( $k=2$ )とした。

この値は、「2-1.測定試料」における均質性試験の結果である $0.3489 \pm 0.0008$ ( $k=2$ )と比較してもよく一致しており、NMR測定によっても調製値の妥当性確認ができ、測定条件や解析条件を最適化することで共同測定において良好な結果が得られることが期待できる。

## 2-4.結果

共同測定の結果を図5に示す。また、各参加機関の装置情報、主な測定パラメータおよび解析パラメータをそれぞれ

表3、表4および表5に示す。

まず、共同測定の結果に注目すると報告値の多くは $0.343 \sim 0.353$ の範囲内であり、参照値である $0.3492 \pm 0.0004$ ( $k=2$ )に対しては、ばらついているものの相対値として約1%の範囲に含まれる結果がほとんどであった。qNMRの測定精度としては十分であるという見方もできるが、試料調製をしていないことや不純物が含まれていない単純なスペクトルが得られる系での比較であることを考慮すると、1%もばらついたら結論付けることもできる。また、測定ばらつきの範囲内に参照値を含んでいる結果を報告

表3 共同測定における参加機関の装置情報

機関番号	装置メーカー	型番	プローブ	1H共鳴周波数
1	Jeol	ECA-600	60TH5AT/FG2D	600
2	Jeol	ECS-400	ROYAL PROBE	400
3	Jeol	JNM-ECA600	-	600
4	Jeol	ECS400	NM-03510TH5	400
5	Jeol	ECA500	NM-50TH5AT/EG2	500
6	Jeol	ECA600	TH5	600
7	Jeol	ECS400	TH5ATFG2D	400
8	Jeol	JNM-ECA700	TH5AT/FG2	700.1
9	Jeol	JNM-ECA600	NM-03180HCN	600
10	Bruker	Avance III HD	5mm BBFO Plus Smart	500
11	Varian	VNS 600A	Dual broadband	600
12	Jeol	JNM-ECX-500	TH5ATFG2	500
13	Jeol	ECS400	TH5-ATFG2D	400
14	Bruker	AVANCEIIIHD	5 mm PABBO	500
15	Jeol	JNM-ECA600	NM-03180HCN	600
16	Bruker	M10804 ECL00	5mm CPTCI 1H/19F-13C/15N/D Z-GRD Z126147/0001	800
17	Jeol	JNM-ECA400	ROYAL Probe	400
18	Agilent	VNMR5500	5mmID	500
19	Jeol	JNM-ECA600	NM-03180HCN	600
20	Bruker	AVANCEIII	5mm CPDCH	500
21	Jeol	ECS-400	TH5ATFG2D	399.8
22	Jeol	JNM-ECA600	-	600
23	Jeol	JNM-ECS400	TH5-ATFG2D	399.8
24	Bruker	AVANCEIII	5 mm TCI	600
25	Jeol	ECA-500	TH5/FG2	500.2
26	Agilent	VNMR5600	600MHz 1H (13C/15N) 5 mmφ PFG Triple Resonance 13CEnhanced Cold Probe	600
27	Jeol	ECX-400P	TUNABLE	400
28	Bruker	AVANCE III 600	BBO	600.2
29	JEOL	ECA	ROYAL	395.9
30	Agilent	MR400	OneNMRProbe	400
31	Jeol	ECX-400	TH probe	400

表4 共同測定における参加機関の主な測定パラメータ

機関番号	観測幅	測定中心	13Cデカップル	パルス角	パルス幅	待ち時間	データポイント数	取り込み時間
1	20	5	off	90	12.05	60	32768	2.18
2	20	5	off	90	10.6	60	32768	3.3
3	15	5	off	45	6.025	5	16384	6.45
4	15	5	on	90	10	60	32768	4.36732
5	15	6	off	90	12.8	35	32000	4.36767
6	20	5	on	90	10.89	60	48014	4
7	15	5	on	90	9.8	60	32768	5.46431
8	20	8	off	90	12	60	65536	3.12
9	11	6	off	90	6.4	40	32768	5
10	20	6.175	on	90	12	100	65536	3.28
11	100	5.7	off	90	13	60	512000	4
12	25	5	on	90	13.5	60	32768	2.64721
13	400	6	on	90	10	60	638052	4
14	16	6.2	on	90	12	60	65536	4
15	11	6	off	90	6.4	40	32768	5
16	20	6	off	90	8.95	30	98682	3
17	20	5	on	90	6.75	60	32768	3
18	20	6	on	90	10.4	60	100000	5
19	11	6	off	90	6.4	40	32768	5
20	20	5.5	off	30	3.33	21.723	32768	3.276
21	20	5	off	90	10.45	64	32768	5
22	20	5	on	90	14.5	64	32768	2.7
23	20	5	on	90	9.607	60	39979	4
24	20	6	on	90	9.45	60	96152	4
25	20	5.74	on	90	12.6	60	50024	4
26	16	6	off	90	7.25	60	76924	4
27	20	5	on	90	12.1	60	32768	4
28	22.04	6.175	off	90	14.1	55	145500	5.5
29	20	5	on	90	7.1	64	32768	3.3
30	16	6	off	90	10.1	60	22436	3.5
31	20	5	on	90	11	60	39979	

表5 共同測定における参加機関の主な測定パラメータ

機関番号	ソフトウェア	窓関数	スペクトルサイズ	線形予測	ゼロフィル	位相補正	ベースライン補正
1	Delta5.0	Exponential	952384	No	Yes	マニュアル	なし
2	Delta5.1	Exponential	238096	No	Yes	自動	なし
3	ALICE2	exp	524288	No	Yes	自動	なし
4	Delta Ver.4	single exponential, trapezoid3	-	No	No	マニュアル	なし
5	Alice v6	Exponential	-	No	No	マニュアル	なし
6	qNMR-Alice v2	-	524000	No	Yes	マニュアル	あり
7	Delta v5.0.4	sexp(0.2[Hz],0.0[s]),trapezoid(0[%],0[%],80[%],100[%])	-	No	Yes	マニュアル	なし
8	delta ver.5.0.2 (JEOL)	single exponential	-	No	Yes	マニュアル	なし
9	ALICE2	Trapezoidal	59523	-	-	マニュアル	あり
10	TopSpin 3.2 pi0	Single Exponential (0.3 Hz)	262144	No	Yes	マニュアル	なし
11	MestReNova ver.7.0.2	-	524288	No	No	マニュアル	あり
12	Delta Ver4.3.2	sexp:0.2 Hz :0.0 s	32678	No	No	マニュアル	なし
13	Mnova	-	524288	No	No	マニュアル	あり
14	ACD/Spec Manager V12.00	Exponential	-	No	No	自動	あり
15	DELTA5.04	Single Exponential	-	No	No	マニュアル	なし
16	Topspin 3.0	exponential (line brodening 0.3Hz)	262144	No	Yes	マニュアル	あり
17	delta v5.0.4	0.2Hz	-	No	No	マニュアル	なし
18	VNMRJ2.2C	-	262144	No	No	マニュアル	あり
19	ALICE2 V6	Exponential	262144	No	No	マニュアル	あり
20	Alice2	exponential(BF=0.12Hz) &trapezoidal	262144	No	No	マニュアル	あり
21	Delta ver. 5.0.3	Trapezoid	238096	No	Yes (4 times)	自動	あり
22	Jeol delta v5.0.4.3	sexp, trapezoid	32768	Yes	Yes	自動	なし
23	Alice2 for qNMR Ver.1.1	-	-	No	Yes	マニュアル	あり
24	Vnmrj 3.2 SW	-	524288	Yes	Yes	マニュアル	あり
25	alice2	single exponential	-	No	No	マニュアル	あり
26	VNMRJ2.2C	-	262144	No	No	マニュアル	あり
27	Topspin 3.0	exponential (line brodening 0.3Hz)	262144	No	Yes	マニュアル	あり
28	MestReNova 9.0.1	Exponential	16000	No	Yes	マニュアル	あり
29	Delta	Trapezoid	-	No	Yes	マニュアル	なし
30	Vnmrj ver.3.2	-	524288	Yes	No	マニュアル	あり
31	Delta V5.043	-	-	No	Yes	マニュアル	なし



した機関は半数以下であり、中心値に対して小さなバイアスがあることも示唆された。これは、NMR測定またはデータ解析で小さなバイアス要因があることが懸念される結果であった。

表3から各機関で使用した装置について比較すると装置の分解能は、全ての参加機関において<sup>1</sup>H周波数を基準に400 MHz以上の装置を用いていた。これは、通常、qNMR法を実施している参加機関では、薬局方等の公定法<sup>9)10)</sup>で規定されている規格に準じたNMR装置を使用していると考えられた。表4に示す測定パラメータについても、機関3を除いて装置と同様に公定法に準じた測定パラメータを設定した機関が多くなっていった。機関3については定性的なNMR条件で測定しているため、報告値には1%以上のバイアスがあったと想定される。表5に示す解析パラメータについては、公定法等に条件の記載がないため、参加機関によって様々なバリエーションの解析方法が見られた。

本共同測定では、「NMR測定」と「データ解析」を同時に比較していたため、各機関におけるバイアス要因やばらつき要因について厳密な評価はできていないが、「試料調製」、「NMR測定」<sup>3)4)</sup>、「データ解析」<sup>16)</sup>の各手順を最適化することで、正確な定量値が得られることが期待できる<sup>19)</sup>。

### 3 qNMR法の正確さと信頼性

本共同測定では、qNMR法における「NMR測定」および「データ解析」を併せた試験を実施し、約1%の範囲内で測定できた機関がほとんどであった。一方で、不純物を含まない非常に単純な測定系で実施したにも関わらず、約1%以上の機関間差があったことも事実として挙げられる。また、本共同測定においては、「試料調製」のばらつきは評価できていないために、実際のqNMR測定では、数%の機関間差が表れると予想される。各機関における測定再現性は小さいため、一定条件下でqNMRを実施すると良好な結果が得られることも想定される。しかし、測定パラメータや解析パラメータのみでは説明できないバイアスのあった機関も多く確認された。想定されるこれらのバイアス要因としては、スペクトルの質、解析ソフト間差やオペレータ間差等が挙げられる。スペクトルの質では、主にNMR装置の磁場の調整(シム調整)が重要であり、シム調整が不十分な場合には、非対称なシグナルやブロードで裾の広がったシグナルが観測され、正確なデータ解析が行えない場合がある。ほとんどの装置で測定ごとに自動でシム調整は可能となっているが、実際に得られるスペクトルの質は、個々に確認する以外ないため、定量分析の際には特に注意が必要と考えられる。また、解析ソフトやオペレータ間におけるデータ解

析による影響については、これまでに報告例はないため、純度や濃度既知の物質間で、データ解析方法の最適化を事前に行うことが重要である。

これらのことを考慮し、qNMR法において信頼性の高い測定結果を得るためには、測定試料毎に測定条件や解析条件を最適化し、値の変動要因について評価する必要がある。冒頭で紹介した日本薬局方や食品添加物公定書<sup>15)</sup>においては、測定対象物質、測定パラメータ条件や確認試験方法が設定されているため、十分な定量性が見込まれるが、未知の試料について、これらの試験法に準じた条件で測定するだけでは、信頼性の高い定量結果は得られないことが危惧される。そのため、測定条件だけではなく、定量シグナルの選択や不純物の影響等も十分に考慮し、バイアスやばらつきの要因を評価することがqNMR法を用いた正確な分析結果を得ることに重要であると言える。また、qNMR法だけでは、評価できない要因も懸念されるため、より信頼性の高い結果を得るためには、他の分析法等による妥当性確認が有用であると考えられる。

## 4 おわりに

近年、qNMR法は、同一の標準物質を必要としない定量分析法として急速に発展してきたが、共同測定の結果からは、ばらつきまたはバイアスとして数%程度の変動要因が内在していることが懸念された。このため、qNMR法を用いて正確な定量分析を行う場合には、十分な検証と評価を行う必要があることが共同測定から確認された。簡便で迅速な定量分析法としての注目が高いqNMR法であるが、正確な結果を得るためにも個々の最適化が重要であることを理解し、利用することが重要となると考えられる。

謝辞

本稿の執筆に当たり、測定データ取得に協力して頂いた、定量NMRクラブ員(2014年度)の皆様にご心から感謝いたします。

## 参考文献

- 1) T. J. Quinn, *Metrologia* 34, 1, 61-66 (1997).
- 2) JCSS (Japan calibration service system), <http://www.nite.go.jp/iajapan/jcss/outline/index.html> (参照2016-5-31)
- 3) T. Saito, S. Nakaie, M. Kinoshita, T. Ihara, S. Kinugasa, A. Nomura, T. Maeda: *Metrologia* 41, 213-218 (2004).
- 4) F. Malz, H. Jancke, *J. Pharmaceut: Biomed.* 38, 813-823 (2005).
- 5) Saito T, Ihara T, Koike M, Kinugasa S, Fujimine Y, Nose K, Hirai T, *Accred Qual Assur* 14, 79-86 (2009).
- 6) T. Yamazaki, A. Takatsu, *Accred Qual Assur* 19, 275-282 (2014).
- 7) T. Ohtsuki, K. Sato, N. Sugimoto, H. Akiyama, Y. Kawamura, *Anal. Chem. Acta*, 734, 54-61 (2012).
- 8) T. Ohtsuki, K. Sato, Y. Abe, N. Sugimoto, H. Akiyama, *Talanta*, 131, 712-718 (2015).
- 9) 山崎太一, 大槻崇, 三浦亨, 末松孝子, 堀之内高暁, 村上雅代, 齋藤剛, 井原俊英, 多田敦子, 田原麻衣子, 合田幸広, 穠山浩, 中尾慎治, 山田裕子, 小池亮, 杉本直樹, *分析化学*, 63(4), 323-329 (2014).
- 10) 小池亮, 城昭一, 東美喜子, 脇阪達司, *分析化学* 54(8), 715-722 (2005).
- 11) Saito T, Ihara T, Miura T, Yamada Y, Chiba K, *Accred Qual Assur* 16:421-428 (2011).
- 12) 齋藤直樹, 齋藤剛, 山崎太一, 加藤尚志, 井原俊英, *分析化学* 63(11), 909-913 (2014).
- 13) Michael W, Christine H, Alex R, Robert S, Jurg W, *Accred Qual Assur.* 18(2): 91-98 (2013).
- 14) 厚生労働省, 第16改正日本薬局方第二追補 (平成26年2月28日)
- 15) 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).
- 16) 定量NMRクラブ, <https://www.nmij.jp/~nmijclub/qNMR/qNMR.html> (参照2016-5-31)
- 17) International Organization for Standardization, "Reference materials-General and statistical principles for certification," ISO Guide 35, 3<sup>rd</sup> ed., ISO, Geneva (2006).
- 18) 山崎太一, 齋藤剛, 三浦亨, 井原俊英: *分析化学* 61, 963-967 (2012).
- 19) 「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, 東京, 2015).