

Fig. 2. (A–J). Micrographs of methanol-fixed transplants (Met), proteinase K-treated transplants (ProK), polarity reversal (upside-down) transplants (Reverse), sham transplant (Sham), and ontogenic scales (Control) on day 5 (TRAP staining) and day 10 (ALP staining). Black arrowheads and black arrows indicate the TRAP-positive area and regenerating scales, respectively.

be studied in the same animal. In addition, compared to observing real-time bone regeneration, which requires a high-effort approach such as x-ray irradiation, scales are easier to work with, as they are on the outer part the animal's body.

Our previous histological observation indicated that scale regeneration is very similar to the development of mammalian membrane

Table 3
Summary of the histological observation.

Type of autotransplant	New scale formation	Scale resorption (osteoclastic activity)			
		Day 3	Day 5	Day 10	Day 15
Methanol-fixed scale (Met)	○	+/-	+	++	+++
Proteinasek-treated scale (ProK)	○	+/-	+	++	+++
Polarity-reversal scale (Reverse)	○	+/-	+	+	++
Unmodified scale (Sham)	—	+/-	—	—	—

Degree of TRAP-positive area on scales was quantified by numbers of plus signs (+).

bone [2]. Moreover, we reported that the estrogen receptor is expressed in regenerating scales and estrogen participates in osteogenesis as it does in mammalian bone [2]. Genetically, considering the peak and sequence of osteoblastic gene expression, our results are in accordance with those reported in the femoral marrow ablation model [39–41], a conventional model of intramembranous bone

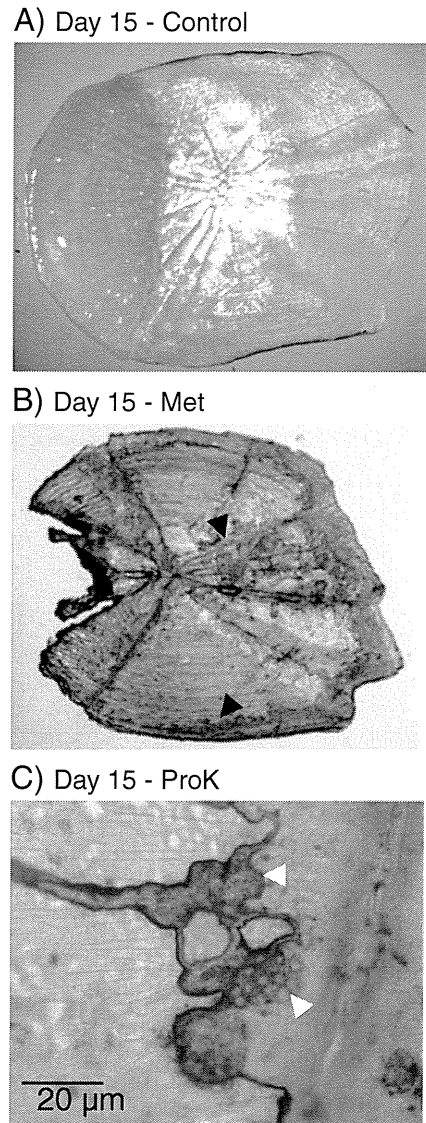


Fig. 3. (A–C). Micrographs of ontogenic scales (Control), methanol-fixed transplants (Met), and proteinase K-treated transplants (ProK) at day 15 after TRAP staining. Black arrowheads and white arrowheads indicate the TRAP-positive area and multinucleate osteoclasts, respectively. In panel B, a micrograph was taken after removing the new regenerating scale from the autotransplant. TRAP staining was performed before the removal.

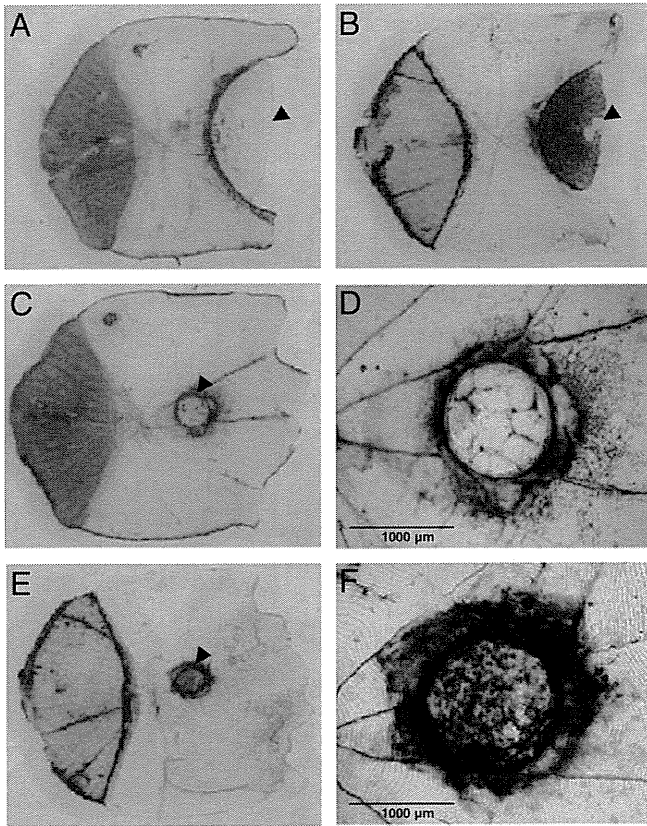


Fig. 4. (A–F). Micrographs of new regenerating scales that formed and adhered to the posterior side of the modified scales at post-autotransplant day 10; U-shape trimmed scales (A–B), circular-hole perforated scales (C, E), and zoom image of C and E (D, F). Each transplant was individually stained with TRAP (A, C, D) and ALP (B, E, F). Black arrowheads indicate new regenerating scales.

regeneration. Scale osteoblastic genes, *dlx5*, *osterix*, collagen, ALP, and osteocalcin, show almost the same patterns of expression as intramembranous bone regeneration. In addition, compared to the results from an *in vitro* experiment using MC3T3-E1 cells [48], scale osteoblastic genes share almost the same sequence of expression except for one gene, *Runx2*. *Runx2* in regenerated scales did not show significant expression above those in ontogenic scales.

In mammal, osteogenesis is regulated by the transcription factors *runx2*, *osterix*, *dlx5*, and *msx2* and the transcriptional activator β -catenin [49]. *Runx2* controls the expression of major osteoblast proteins, such as alkaline phosphatase, collagen, and osteocalcin [20,49]. *Osterix* lies downstream of *runx2* and is necessary for the differentiation of pre-osteoblasts into mature osteoblasts [49]. *Dlx5* is a homeobox domain transcription factor that also regulates osteogenesis [20,50,51] and is involved in the response of osteogenic cells to BMP-2 [21,52,53]. In the present study, both transcription factor *dlx5* and *osterix* were found to be expressed during scale regeneration prior to activation of the osteoblast functional genes type I collagen, ALP, and osteocalcin (Figs. 1C–G). These results indicate that genetic regulation of scale regeneration resembles that of developing mammalian bone. In mammals, *runx2* is the first osteoblast-specific transcription factor to be identified and still the earliest cell-specific transcription determinant known in this cell lineage [54]. Many molecular biology, mouse, and human genetic studies converge to demonstrate that *runx2* is a master gene of osteoblast differentiation [55]. However, our present study indicated that *runx2* is less likely to be a crucial factor in an early stage of scale regeneration, while *dlx5* is rather contributory for the following reasons: 1) *runx2* mRNA during the early stage of scale regeneration did not show significant expression above those in ontogenic scales (Figs. 1A–B), while *dlx5* did (Fig. 1C), and 2) in the same sample, the

cycle threshold of *dlx5* (CT value = 27–28) was lower than that of *runx2* (CT value = 31–32), indicating that *dlx5* mRNA expression was much higher than *runx2*.

For osteoclasts, it has been shown that scale osteoclasts and bone osteoclasts share elements morphologically and genetically. Scale osteoclasts create a ruffled border which is rich in mitochondria to increase the surface area interface for bone resorption. Mature scale osteoclasts are multinucleated and express TRAP and cathK [1]. Together with scale osteoblasts, scale osteoclasts respond to parathyroid hormone 1 (1–34) [10]. In bone, osteoclasts are differentiated from hemopoietic precursor cells at bone-resorbing sites under the control of osteotropic hormones and local factors produced in the microenvironment [56–58]. Nonetheless, to the best of our knowledge, the specific location where goldfish scale osteoclasts differentiate is unknown. In this study, the presence of early osteoclastic markers (NFATc1 and RANKL) in cell-free autotransplants on day 3 indicates that early (undifferentiated) osteoclasts did migrate to the autotransplants. After this, elevation of late osteoclastic markers (TRAP and cathK) was detected (Figs. 6A–B). This result indicates that differentiation of scale osteoclast is most likely taking place in autotransplants.

We consider that the regeneration of scale after scale injury can be used as a model for studying bone regeneration. For example, from an autotransplantation experiment, the regeneration process in U-shape trimmed scales and circular-hole perforated scales could resemble the healing process in a bone fracture. Besides, the regeneration process in polarity reversal (upside-down) scales and cell-free scales may be a model for bone regeneration after inflammation. In the present study, we found that new scales regenerated at the trimmed/perforated part of each transplant without obvious inflammation (Figs. 4A–B: U-shape trimmed transplants and Figs. 4C–F: circular-hole perforated transplants). However, inflammation is another considerable possibility that could induce the onset of scale resorption and regeneration. The inflammation-induced bone resorption theory reviewed in [59] could be used to explain the process. Briefly, several cytokines and inflammatory mediators have been shown to be able to stimulate osteoclast formation and bone resorption and have, therefore, been implicated in the pathogenesis of inflammation-induced bone resorption. Some cytokines, the two kinins bradykinin and kallidin, as well as thrombin, are stimulatory, whereas other cytokines are inhibitory. Stimulatory cytokines exert their effects not by affecting the osteoclast progenitor cells directly but by stimulating the RANKL/OPG ratio in periosteal osteoblasts. Inhibitory cytokines cause their effects either indirectly, by affecting osteoblasts, or, in some cases, directly, by affecting the osteoclast progenitor cells. Chemokines are important for the recruitment of osteoclast progenitor cells to the inflammatory site and also for the fusion of these cells to multi-nucleated osteoclasts. In the current study, we found that RANKL expression increased in the early stage of all modified scale autotransplants. However, at this stage, the expression of osteoblastic markers *dlx5* and *osterix* was still insignificant. To explain this point, it is possible that the cells that expressed RANKL could be cells other than osteoblasts, such as those involved in the inflammatory response. Lymphocytes, fibroblasts, inflammatory epithelial cells and synovial cells have been reported to express RANKL [60–65].

In our scale transplant model, we entirely disrupted the spontaneous cell-to-cell contact between the scale-pocket lining and scale cortex in groups 1–3 by pulling off the scales, modifying them (by methanol-fixation, proteinase K-treatment, and polarity reversal (upside-down)), and re-inserting them into their original scale pockets. Similarly, we partially disrupted the cell-to-cell contact in groups 4–5 by U-shape trimming and circular-hole perforation. Here, we demonstrated that correct cell-to-cell contact between the scale-pocket lining cells and scale cortex cells is the key to switch off the onset of scale resorption and regeneration. Sham transplantation was the only method that did not produce a result in scale resorption and new scale formation. This could be explained by the fact that the reported method had caused the scale pocket lining to be disconnected from the scale surface for only a short

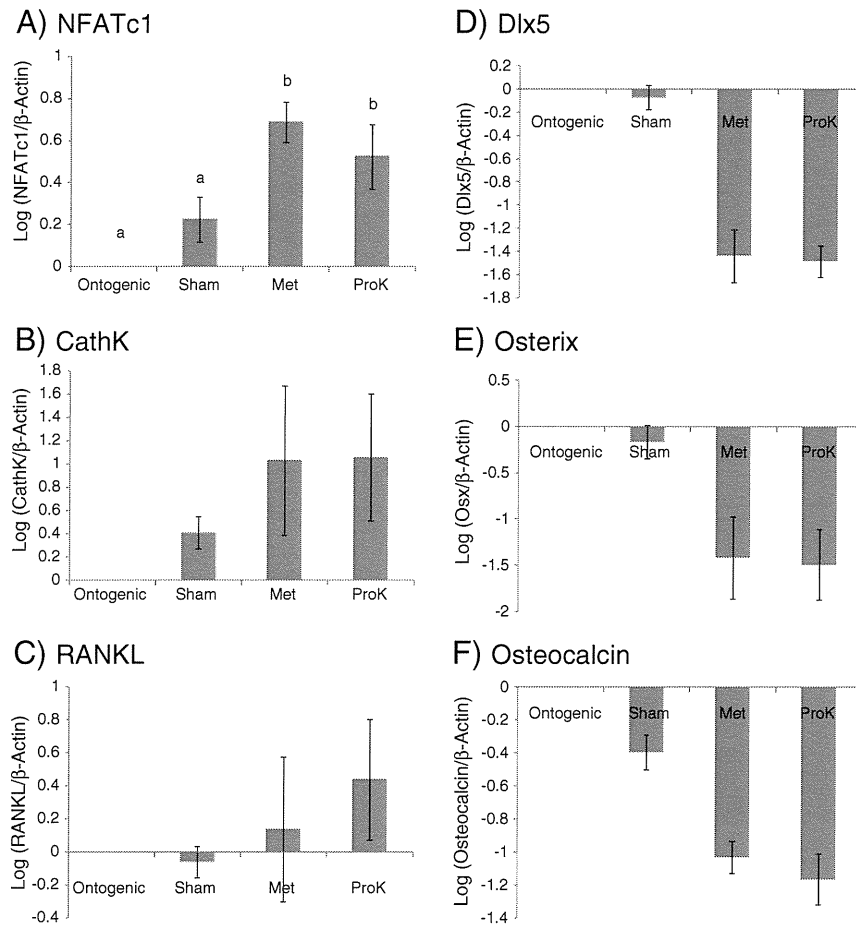


Fig. 5. (A–F). Relative expression amounts of osteoclastic and osteoblastic marker mRNA in methanol-fixed transplants (Met), proteinase K-treated transplants (ProK), and sham transplants on day 3 compared to those in ontogenic scales. Column and bars represent the mean and SEM (N = 5), respectively. The different superscripts represent statistically significant differences at P < 0.05.

time (about 5–10 s). This enabled the post-transplant revascularization and made it possible for the old cell-to-cell contact to be preserved. On the contrary, it was difficult for the old cell-to-cell contact to be correctly

re-established in the methanol-fixed transplant, proteinase K-treated cell-free transplant, and polarity reversal (upside-down) transplant. In these groups, resorption of the transplanted scales took place first, and

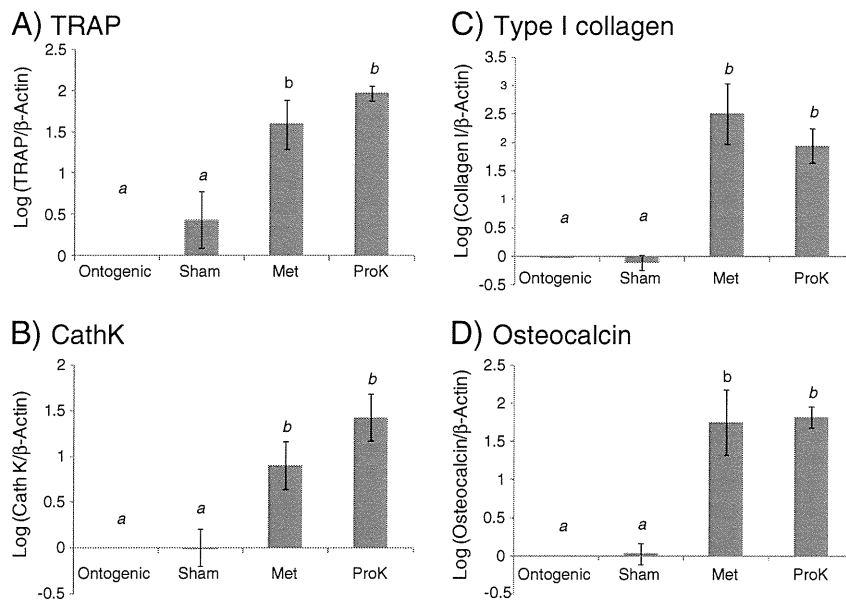


Fig. 6. (A–D). Relative expression amounts of osteoclastic and osteoblastic marker mRNA in methanol-fixed transplants (Met), proteinase K-treated transplants (ProK), and sham transplants in the late post-autotransplant stage (day 15) compared to those in ontogenic scales. Column and bars represent the mean and SEM (N = 5), respectively. The different superscripts represent statistically significant differences at P < 0.05.

new scale regeneration followed. Again, we found that scale regeneration started at the area that lacks cell-to-cell contact (trimmed/perforated parts) in transplant groups 4–5. From our preliminary experiments, trimmed/perforated scales could not be regenerated *in vitro* when cultured without scale pocket tissue. With scale pocket tissue, however, the new scale regenerated at the trimmed/perforated parts but had not fully grown. This may be due to the other environmental conditions. From these facts, we suggest that the preserved cell-to-cell contact should be considered to be a determining factor for inhibiting scale resorption and formation.

As for the loss of cell-to-cell contact theory, similar to our results, it has been shown that the proliferation of type 1 astrocytes is strongly inhibited by homotypic cell contact [66]. In addition, the cell-to-cell contact-dependent inhibition of astrocyte proliferation and reactive gliosis was demonstrated *in vitro* and *in vivo* [67]. In this process, cyclin-dependent kinase P27 contributes to the regulation of cell cycle re-entry in type 1 astrocytes [67,68]. In liver regeneration as well, hepatocytes can also be primed to respond to the hepatocyte growth factor and transforming growth factor alpha by mild collagenase perfusion of intact liver, suggesting that the loss of cell-to-cell contact may facilitate re-entry into the cell cycle [69]. Moreover, even though it is not well understood, loss of cell-to-cell contact is suggested to be an important early regulator of intestinal regeneration by being a potential modulator in initiating signal and cell proliferation [70]. In the present study, correct cell-to-cell contact withheld scale resorption in sham transplantation, as shown in Table 3; TRAP positive disappeared after day 5. On the contrary, in the methanol-fixed (scale with non-living cells) and proteinase K-treated (cell-free scale) transplants, scale resorption preceded new scale formation and lasted at least until two weeks after transplantation. Our experiment is the first to show that, other than induce cell proliferation, loss of cell-to-cell contact could trigger the resorption process. In addition, the resorption process was confirmed to happen before the regeneration process.

In conclusion, we found that goldfish scale regeneration shares similarities in gene expression and morphology with intramembranous bone regeneration. Using scale regeneration as a model of intramembranous bone regeneration has advantages over the conventional bone marrow ablation model, largely because it does not require that animal be sacrificed. Moreover, the goldfish scale regeneration model allows all stages of the regeneration process to be observed in the same animal. Improved understanding of scale regeneration will help elucidate the process of intramembranous bone regeneration. Therefore, we consider goldfish scale as a possible new tool to study intramembranous bone regeneration.

Acknowledgments

This study was supported in part by grants to A.H. (Grant-in-Aid for Scientific Research (C) No. 21570062 by JSPS) and to N.S. (Grant-in-Aid for Scientific Research (C) No. 21500404 by JSPS; Grant-in-Aid for Space Utilization by Japan Aerospace Exploration Agency; the Environment Research and Technology Development Fund (B-0905) by the Ministry of the Environment in Japan; Health and Labour Sciences Research Grants of Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan).

References

- Azuma K, Kobayashi M, Nakamura M, Suzuki N, Yashima S, Iwamura S, et al. Two osteoclastic markers expressed in multinucleate osteoclasts of goldfish scales. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;362:594–600.
- Yoshikubo H, Suzuki N, Takemura K, Hosono M, Yashima S, Iwamura S, et al. Osteoblastic activity and estrogenic response in the regenerating scale of goldfish, a good model of osteogenesis. *Life Sci* 2005;76:2699–709.
- Suzuki N, Kitamura K, Nemoto T, Shimizu N, Wada S, Kondo T, et al. Effect of vibration on osteoblastic and osteoclastic activities: analysis of bone metabolism using goldfish scale as a model for bone. *Adv Space Res* 2007;40:1711–21.
- Suzuki N, Somei M, Seki A, Reiter RJ, Hattori A. Novel bromomelatonin derivatives as potentially effective drugs to treat bone diseases. *J Pineal Res* 2008;45:229–34.
- Ejiri S. The preosteoclast and its cytodifferentiation into the osteoclast: ultrastructural and histochemical studies of rat fetal parietal bone. *Arch Histo Jpn* 1983;46:533–57.
- Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 1997;89:755–64.
- Rice DP, Rice R, Thesleff I. Molecular mechanisms in calvarial bone and suture development, and their relation to craniosynostosis. *Eur J Orthod* 2003;25:139–48.
- Lian JB, Balint E, Javed A, Drissi H, Vitti R, Quinlan EJ, et al. Runx1/AML1 hematopoietic transcription factor contributes to skeletal development *in vivo*. *J Cell Physiol* 2003;196:301–11.
- Ito Y, Yeo JY, Chytil A, Han J, Bringas Jr P, Nakajima A, et al. Conditional inactivation of Tgfb2 in cranial neural crest causes cleft palate and calvaria defects. *Development* 2003;130:5269–80.
- Suzuki N, Danks JA, Maruyama Y, Ikegame M, Sasayama Y, Hattori A, et al. Parathyroid hormone 1 (1–34) acts on the scales and involves calcium metabolism in goldfish. *Bone* 2011;48:1186–93.
- Witten PE, Bendahmane M, Abou-Haila A. Enzyme histochemical characteristics of osteoblasts and mononucleated osteoclasts in a teleost fish with acellular bone (*Oreochromis niloticus*, Cichlidae). *Cell Tissue Res* 1997;287:591–9.
- Flores M, Tsang V, Hu W, Kalev-Zylinska M, Postlethwait J, Crosier P, et al. Duplicate zebrafish runx2 orthologues are expressed in developing skeletal elements. *Gene Expr Patterns* 2004;4:573–81.
- Glenney GW, Wiens GD. Early diversification of the TNF superfamily in teleosts: genomic characterization and expression analysis. *J Immunol* 2007;178:7955–73.
- Zylberberg L, Bonaventure J, Cohen-Solal L, Hartmann D, Bereiterhahn J. Organization and characterization of fibrillar collagens in fish scales *in situ* and *in vitro*. *J Cell Sci* 1992;103:273.
- Renn J, Winkler C. Osterix-mCherry transgenic medaka for *in vivo* imaging of bone formation. *Dev Dyn* 2009;238:241–8.
- Gavaia PJ, Simes DC, Ortiz-Delgado JB, Viegas CS, Pinto JP, Kelsh RN, et al. Osteocalcin and matrix Gla protein in zebrafish (*Danio rerio*) and Senegal sole (*Solea senegalensis*): comparative gene and protein expression during larval development through adulthood. *Gene Expr Patterns* 2006;6:637–52.
- Pinto JP, Conceicao N, Gavaia PJ, Cancela ML. Matrix Gla protein gene expression and protein accumulation colocalize with cartilage distribution during development of the teleost fish *Sparus aurata*. *Bone* 2003;32:201–10.
- Aubin JE, Gupta AK, Bhargava U, Turksen K. Expression and regulation of galectin 3 in rat osteoblastic cells. *J Cell Physiol* 1996;169:468–80.
- Nishimoto SK, Araki N, Robinson FD, Waite JH. Discovery of bone gamma-carboxylglutamic acid protein in mineralized scales. The abundance and structure of *Lepomis macrochirus* bone gamma-carboxylglutamic acid protein. *J Biol Chem* 1992;267:11600–5.
- Li H, Marijanovic I, Kronenberg MS, Erceg I, Stover ML, Velonis D, et al. Expression and function of Dlx genes in the osteoblast lineage. *Dev Biol* 2008;316:458–70.
- Lee MH, Kim YJ, Kim HJ, Park HD, Kang AR, Kyung HM, et al. BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF-beta 1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression. *J Biol Chem* 2003;278:34387–94.
- Harris SE, Guo D, Harris MA, Krishnaswamy A, Lichtler A. Transcriptional regulation of BMP-2 activated genes in osteoblasts using gene expression microarray analysis: role of Dlx2 and Dlx5 transcription factors. *Front Biosci* 2003;8:s1249–65.
- Verreijdt L, Debais-Thibaud M, Borday-Birraux V. Expression of the dlx gene family during formation of the cranial bones in the zebrafish (*Danio rerio*): differential involvement in the visceral skeleton and braincase. *Dev Dyn* 2006;235:1371–89.
- Abe G, Ide H, Tamura K. Function of FGF signaling in the developmental process of the median fin fold in zebrafish. *Dev Biol* 2007;304:355–66.
- Sire JY. The same cell lineage is involved in scale formation and regeneration in the teleost fish *Hemichromis bimaculatus*. *Tissue Cell* 1989;21:447–62.
- Squier C, Ghoneim S, Kremenak C. Ultrastructure of the periosteum from membrane bone. *J Anat* 1990;171:233.
- Fell H. The osteogenic capacity *in vitro* of periosteum and endosteum isolated from the limb skeleton of fowl embryos and young chicks. *J Anat* 1932;66:157.
- Ito Y, Fitzsimmons J, Sanyal A, Mello M, Mukherjee N, O'driscoll S. Localization of chondrocyte precursors in periosteum. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9:215–23.
- Dwek JR. The periosteum: what is it, where is it, and what mimics it in its absence? *Skeletal Radiol* 2010;39:319–23.
- Sire JY, Géraudie J. Fine structure of regenerating scales and their associated cells in the cichlid *Hemichromis bimaculatus* (Gill). *Cell Tissue Res* 1984;237:537–47.
- Neave F. On the histology and regeneration of the teleost scale. *Q J Microsc Sci* 1940;81:541–68.
- Zhao Q, Wang X, Liu Y, He A, Jia R. NFATc1: functions in osteoclasts. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42:576–9.
- DR S. Fixation of implants. In: Callaghan JJ, Rosenberg AG, Rubash HE, Simonian PT, Wickiewicz TA, editors. *The adult knee*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003. p. 289–96.
- Amsel S, Maniatis A, Tavassoli M, Crosby WH. The significance of intramedullary cancellous bone formation in the repair of bone marrow tissue. *Anat Rec* 1969;164:101–11.
- Patt HM, Maloney MA. Bone marrow regeneration after local injury: a review. *Exp Hematol* 1975;3:135–48.
- Liang CT, Barnes J, Seedorf JG, Quartuccio HA, Bolander M, Jeffrey JJ, et al. Impaired bone activity in aged rats: alterations at the cellular and molecular levels. *Bone* 1992;13:435–41.

- [37] Suva LJ, Seedor JG, Endo N, Quartuccio HA, Thompson DD, Bab I, et al. Pattern of gene expression following rat tibial marrow ablation. *J Bone Miner Res* 1993;8:379–88.
- [38] Bab IA. Postablation bone marrow regeneration: an *in vivo* model to study differential regulation of bone formation and resorption. *Bone* 1995;17:437S–41S.
- [39] Lu H, Kraut D, Gerstenfeld LC, Graves DT. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. *Endocrinology* 2003;144:346–52.
- [40] Boabaid F, Berry JE, Koh AJ, Somerman MJ, McCauley LK. The role of parathyroid hormone-related protein in the regulation of osteoclastogenesis by cementoblasts. *J Periodontol* 2004;75:1247–54.
- [41] Kuroda S, Virdi AS, Dai Y, Shott S, Sumner DR. Patterns and localization of gene expression during intramembranous bone regeneration in the rat femoral marrow ablation model. *Calcif Tissue Int* 2005;77:212–25.
- [42] van der Meulen T, Kranenbarg S, Schipper H, Samallo J, van Leeuwen JL, Franssen H. Identification and characterisation of two runx2 homologues in zebrafish with different expression patterns. *Biochim Biophys Acta* 2005;1729:105–17.
- [43] Suzuki N, Hattori A. Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish. *J Pineal Res* 2002;33:253–8.
- [44] Milona M, Gough J, Edgar A. Expression of alternatively spliced isoforms of human Sp7 in osteoblast-like cells. *BMC Genomics* 2003;4:43.
- [45] Weiss MJ, Henthorn PS, Lafferty MA, Slaughter C, Raducha M, Harris H. Isolation and characterization of a cDNA encoding a human liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci* 1986;83:7182.
- [46] Dohi Y, Tabata S, Yamaguchi M, Ohgushi H, Yonemasu K. Characterization of the cDNA encoding bullfrog, *Rana catesbeiana*, osteocalcin and two forms of the protein isolated from bone*. *Biochimie* 2004;86:471–80.
- [47] Nishimoto SK, Waite JH, Nishimoto M, Kriwacki RW. Structure, activity, and distribution of fish osteocalcin. *J Biol Chem* 2003;278:11843.
- [48] Maeda T, Matsunuma A, Kurahashi I, Yanagawa T, Yoshida H, Horiuchi N. Induction of osteoblast differentiation indices by statins in MC3T3-E1 cells. *J Cell Biochem* 2004;92:458–71.
- [49] Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem* 2006;99:1233–9.
- [50] Lee M, Kim Y, Yoon W, Kim J, Kim B, Hwang Y, et al. Dlx5 specifically regulates Runx2 type II expression by binding to homeodomain-response elements in the Runx2 distal promoter. *J Biol Chem* 2005;280:35579–87.
- [51] Samee N, Geoffroy V, Marty C, Schiltz C, Vieux-Rochas M, Levi G, et al. Dlx5, a positive regulator of osteoblastogenesis, is essential for osteoblast-osteoclast coupling. *Am J Pathol* 2008;173:773–80.
- [52] Lee MH, Kwon TG, Park HS, Wozney JM, Ryoo HM. BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:689–94.
- [53] Ulsamer A, Ortuño M, Ruiz S, Susperregui A, Osses N, Rosa J, et al. BMP-2 induces Osterix expression through up-regulation of Dlx5 and its phosphorylation by p38. *J Biol Chem* 2008;283:3816–26.
- [54] Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997;89:747–54.
- [55] Karsenty G, Kronenberg H, Settembre C. Genetic control of bone formation. *Annual Review of Cell and Developmental* 2009;25:629–48.
- [56] Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev* 1992;13:66–80.
- [57] Suda T, Udagawa N, Nakamura I, Miyaura C, Takahashi N. Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone* 1995;17:87S–91S.
- [58] Roodman GD. Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr Rev* 1996;17:308–32.
- [59] Lerner UH. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res* 2006;85:596–607.
- [60] Romas E, Gillespie MT, Martin TJ. Involvement of receptor activator of NFkappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha in bone destruction in rheumatoid arthritis. *Bone* 2002;30:340–6.
- [61] Weitzmann MN, Pacifici R. The role of T lymphocytes in bone metabolism. *Immunol Rev* 2005;208:154–68.
- [62] Quinn JM, Gillespie MT. Modulation of osteoclast formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328:739–45.
- [63] Romas E, Bakharevski O, Hards DK, Kartsogiannis V, Quinn JM, Ryan PF, et al. Expression of osteoclast differentiation factor at sites of bone erosion in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:821–6.
- [64] Martin TJ, Gillespie MT. Receptor activator of nuclear factor [kappa] B ligand (RANKL): another link between breast and bone. *Trends Endocrinol Metab* 2001;12:2–4.
- [65] Srivastava S, Matsuda M, Hou Z, Bailey JP, Kitazawa R, Herbst MP, et al. Receptor activator of NF-κB ligand induction via Jak2 and Stat5a in mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 2003;278:46171.
- [66] Nakatsuji Y, Miller RH. Homotypic cell contact-dependent inhibition of astrocyte proliferation. *Glia* 1998;22:379–89.
- [67] Koguchi K, Nakatsuji Y, Nakayama K, Sakoda S. Modulation of astrocyte proliferation by cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1). *Glia* 2002;37:93–104.
- [68] Nakatsuji Y, Miller RH. Density dependent modulation of cell cycle protein expression in astrocytes. *J Neurosci Res* 2001;66:487–96.
- [69] Liu ML, Mars WM, Zarnegar R, Michalopoulos GK. Collagenase pretreatment and the mitogenic effects of hepatocyte growth factor and transforming growth factor-alpha in adult rat liver. *Hepatology* 1994;19:1521–7.
- [70] Thompson JS, Saxena SK, Sharp JG. Regulation of intestinal regeneration: new insights. *Microsc Res Tech* 2000;51:129–37.

定量分析値の信頼性確保のための qNMR を用いた 市販試薬の純度決定

田原麻衣子¹⁾, 杉本 直樹¹⁾, 大槻 崇²⁾, 多田 敦子²⁾,
穂山 浩²⁾, 合田 幸広³⁾, 西村 哲治¹⁾

¹⁾国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 (〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1)

²⁾国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 (〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-8-1)

³⁾国立医薬品食品衛生研究所 生薬部 (〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1)

[平成23年9月27日受付, 平成23年12月8日受理]

Determination of the Purities of Commercial Reagent Products using qNMR for the Ensuring the Reliability of Quantitative Analysis

Maiko TAHARA¹⁾, Naoki SUGIMOTO¹⁾, Takashi OHTSUKI²⁾, Atsuko TADA²⁾,
Hiroshi AKIYAMA²⁾, Yukihiro GODA³⁾ and Tetsuji NISHIMURA¹⁾

¹⁾Division of Environmental Chemistry, National Institute of Health Sciences
(1-18-1 Kamiyoga, Setagaya, Tokyo 158-8501)

²⁾Division of Food Additives, National Institute of Health Sciences
(1-18-1 Kamiyoga, Setagaya, Tokyo 158-8501)

³⁾Division of Pharmacognosy, Phytochemistry and Narcotics, National Institute of Health Sciences
(1-18-1 Kamiyoga, Setagaya, Tokyo 158-8501)

[Received September 27, 2011; Accepted December 8, 2011]

Summary

In environmental analysis, the commercial reagent and reference material products of analyte compounds are indispensable for chromatography such as GC/MS and LC/MS. However, most of their purities are not certificated traceability to the International System of Units (SI). Hence the possibility that their obscure purities greatly ruin the reliability of the quantitative value is incontrovertible. In this study, the purities of forty one commercial pesticide reagent products (new or old) were determined by a quantitative analytical method which is traceable to SI using nuclear magnetic resonance (qNMR). qNMR is a rapid and simple quantitative analysis method and no reference compound of analyte is needed. The purities of ten commercial reagent products among our measured forty one products are different more than 5% to their labeled purities by the manufacturers, and the values were found in 47.9-94.8%. Therefore it consequently seems that the differences between SI traceable purities and labeled purities cause the error of 5.1-50.8% to the quantitative values of analytes. This result represents that qNMR analysis has potential to work as a bridge of SI traceability and the quality control of reagent product using qNMR is greatly important to secure the accuracy of analytical data.

Key words: quantitative NMR, standard, purity, reliability

1. はじめに

環境分析における水や大気等の時間軸上で流動的な試料は、同一の試料を再度採取することができないため、定量分析値の信頼性確保が特に重要である。現在、環境中の農薬等の有機物質の定量分析法には、分解能や微量分析能に優れた液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィー等のクロマトグラフィーが広く採用されている。クロマトグラフィーは標準被検物質を用いて相対的に定量するため、測定対象化合物の標準物質が不可欠である^{1,2)}。一方、物質

量の絶対値は普遍的な国際計量標準である国際単位系(SI)にトレーサブルな測定によって得られると定義されているが^{3,4)}、有機化合物については、この定義に従い、計量計測トレーサビリティの確保された純度が保証された標準物質として市販されているものは少ない。そのため、市販試薬が定量用標準物質の代用品として使用される。しかし、市販試薬の多くは、試薬メーカー独自の方法で調製および管理を行っており、これらの製品のラベルや成績書には、品質保証として、JIS規格に準拠したクロマトグラム上に観察される主成分のピーク面積百分率、あるいは吸光光度法による比吸光度等よ

り算出したものを「純度%」と示している場合が多い。ピーク面積百分率は、クロマトグラム上に観察されるすべての成分のピーク面積の総和に対する測定対象化合物のピーク面積を比率として表したものであり^{1,2)}、元素組成比の異なる不純物を含む混合物の純度は原理的に精確な測定が困難である。また、吸光光度法では、化合物の吸光係数が正確であることを大前提としているが、純度100%の上位標準となる化合物が存在しなければ、精確な純度値を求めることが不可能と思われる。したがって、SIへの計量計測トレーサビリティが確保された標準物質が定量分析に用いられていない以上、得られた定量分析値は厳格なトレーサビリティの連鎖から外れ、試薬の純度値の誤差が定量分析値の信頼性を大きく損なっている可能性を否定できない。

実際に、我々は、純度が計量計測トレーサビリティの確保されていない市販試薬を定量分析に用いた場合、得られた定量分析値に非常に大きなばらつきがあり、結果として、メーカー間にある純度の差が定量分析値の不確かさを大きくし、室間精度に影響を与えていることを報告している⁹⁾。また近年、各国の標準物質の同源性、化学計測の国際的整合性が議論されるようになり、得られた定量分析値について、計量計測トレーサビリティの欠如が問題視されるようになってきた。国際標準化機構(ISO)発行のISOガイドにおいても、測定値および分析結果の精確さの問題についての勧告があり、分析手順や校正手順、適切な認証標準物質の選択、トレーサビリティの確保等、トレーサビリティを実現し、精確な特性値を得ることを含んだ標準物質に関する指針が示されている⁶⁻¹¹⁾。このような背景から、環境分析の分野における分析精度の更なる向上のために、有機化合物の純度を計量学的に精確に測定する方法が早急に必要とされている。

我々は、これまでに定量分析値の高精度化を目指し、SIに基づく計量計測トレーサビリティが確保された新たな定量法として、一次標準測定法の資格を原理的に有する核磁気共鳴装置(NMR)を用いた定量分析法(quantitative NMR: qNMR)を開発してきた¹²⁻¹⁹⁾。本研究では、qNMRの測定対象として、過去の全国水道事業体の農薬実態調査において、浄水での検出率や個別評価値が高い農薬等を30種選択し、標準物質として使用される可能性の高いこれら市販試薬の純度を測定し、同製品のラベルや成績書に記載されている純度値が分析精度に及ぼす影響について検討した。

2. 方法

2.1 対象化合物

Table 1に測定に供した市販試薬30種41製品を示した。その化合物名、化学構造による分類、分子式、分子量、試薬メーカーを示す。

2.2 試薬および試液

高純度 hexadimethyldisilane (HMD) は和光純薬工業株式会社特注品、重溶媒は acetone-*d*₆ (99.9 atom % D) および methanol-*d*₄ (99.8 atom % D) (Isotec), diethyl phthalate (DEP) は、独立行政法人 産業技術総合研究所の認証標準物質 (NMIJ CRM 4022-b: 純度 99.98 ± 0.01 w/w% (99.74 ± 0.09 mol/mol %)) を用いた。

2.3 装置

ウルトラマイクロ天秤はXP2U (メトラートレド株式会社) を使用した。試料の秤量値は、最小目盛0.0001 mg まで読み取った値を用いた。

核磁気共鳴装置(NMR)はオートサンプラー付きJNM-ECA (600 MHz, 日本電子株式会社(現: 株式会社 JEOL RESONANCE)) を

使用した。qNMRのケミカルシフト値は、HMDを基準シグナル(0 ppm)とし、 δ 値をppm単位で表した。NMR測定条件はTable 2に示す。

なお、qNMR用標準液および試料溶液の調製には、化学用体積計(50, 100 mLメスフラスコ)または電動オートピペッター(マルチピペット Xstream (エッペンドルフ製), 10 mL (不確かさ ± 0.4 %), 3 ~ 5 mL (不確かさ ± 0.5 %)) を用いた。

2.4 qNMR用標準液の調製およびHMDの濃度校正

HMD約20 mgを精密に量り取り、acetone-*d*₆ 100 mLに定容した。もしくは、HMD約100 mgを精密に量り取り、methanol-*d*₄ 50 mLに定容し、この溶液をmethanol-*d*₄で25倍希釈した。これらHMDのacetone-*d*₆溶液またはmethanol-*d*₄溶液をqNMR用標準液とした。qNMR用標準液中のHMDの濃度を下記に従い、DEPを内標準物質として校正して求めた。すなわち、CRMであるDEP約5-10 mgを精密に量り取り、qNMR用標準液1.0 mLに溶解した。この溶液0.6 mLをNMR試験管(5 mm φ × 200 mm, 日本電子株式会社)に封入したものをHMD濃度校正用試料溶液とした。この溶液をqNMRに付し、DEPのCH₂ × 2およびHMDのCH₃ × 6に由来するシグナル面積、分子量、濃度等を式(1)に代入し、qNMR用標準液中のHMDの濃度を校正した。

$$W_{HMD} = \frac{M_{HMD} \times I_{HMD}}{H_{HMD}} / \frac{M_{DEP} \times I_{DEP}}{H_{DEP} \times W_{DEP}} \times \frac{P_{DEP}}{100} \quad (1)$$

ただし、 W_{HMD} , W_{DEP} = HMDおよびDEPの濃度(mg/mL), M_{HMD} , M_{DEP} = HMDおよびDEPの分子量(146.3781および222.2337, 分子量はIUPAC 2007年発表の原子量表²⁰⁾を用いて算出), H_{HMD} , H_{DEP} = HMDのCH₃ × 6およびDEPのCH₂ × 2のプロトン数, I_{HMD} , I_{DEP} = HMDのCH₃ × 6およびDEPのCH₂ × 2のシグナル面積, P_{DEP} = DEPの純度(99.98 w/w%)を示す。

2.5 qNMRによる市販試薬の純度測定

市販試薬を約5-10 mg精密に量り取り、予め調製したqNMR用標準液1.0 mLに溶解した。qNMR用標準液として、benzofenapおよびdalaponはmethanol-*d*₄溶液、その他はacetone-*d*₆溶液を使用した。これらの溶液0.6 mLをNMR試験管に封入したものを試料溶液とした。この試料溶液をqNMRに付し、HMDのシグナル強度面積、化合物に由来するそれぞれの特定シグナルの相対面積、分子量、濃度等を式(2)に代入し、農薬等の対象化合物の純度を算出した。

$$P_{target} = \frac{I_{target} / H_{target}}{I_{HMD} / H_{HMD}} \times \frac{M_{target} / W_{target}}{M_{HMD} / W_{HMD}} \times 100 \quad (2)$$

ただし、 W_{HMD} , W_{target} = HMDおよび対象化合物の濃度(mg/mL), M_{HMD} , M_{target} = HMDおよび対象化合物の分子量²⁰⁾(146.3781およびTable 1), I_{HMD} , I_{target} = HMDおよび対象化合物の特定基のシグナル強度面積, H_{HMD} , H_{target} = HMDおよび対象化合物の特定基のプロトン数, P_{target} = 対象化合物の純度(%)を示す。

2.6 qNMR測定条件および解析処理

市販試薬41製品の純度は、既報のqNMR¹⁶⁻¹⁹⁾により計量学的に精確に決定した。qNMRのケミカルシフト値は、HMDを基準シグナル(0 ppm)とし、 δ 値をppm単位で表した。qNMRデータ解析は、得られたFree Induction Decay (FID) 信号データを定量解析ソフトウェア(Alice2 for qNMR, 日本電子株式会社(現: 株式会社 JEOL RESONANCE))に導入して自動処理した。すなわち、

Table 1 Information of commercial reagent and reference material products

Compound	Class ^{a)}	Formula	Molecular mass	Manufacturer ^{b)}	Sample No.
Acetamidrid	NN	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄	222.67414	Wako	1
Benzofenap	PZ	C ₂₂ H ₂₀ Cl ₂ N ₂ O ₃	431.31180	Hayashi	2
Bromobutide	AA	C ₁₅ H ₂₂ BrNO	312.24528	Wako	3
Butamifos	OP	C ₁₃ H ₂₁ N ₂ O ₄ PS	332.35560	Wako, Kanto, Hayashi	4, 5, 6
Cafenstrole	AA	C ₁₆ H ₂₂ N ₄ O ₃ S	340.43588	Wako	7
Carbofuran	CM	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	221.25240	Sigma	8
Dalapon	FA	C ₃ H ₄ Cl ₂ O ₂	142.96866	Kanto	9
Dichlorvos (DDVP)	OP	C ₄ H ₇ Cl ₂ O ₄ P	220.97574	Wako	10, 11
Disulfoton	OP	C ₈ H ₁₉ O ₂ PS ₃	274.40402	Wako, Kanto, Sigma	12, 13, 14
Diuron	U	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	233.09450	Wako	15
Fenobucarb	CM	C ₁₂ H ₁₇ NO ₂	207.26888	Wako	16
Fipronil	PZ	C ₁₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ OS	437.14778	Wako	17
Fipronil sulfone	PZ	C ₁₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ O ₂ S	453.14718	Wako	18
Flutolanil	AA	C ₁₇ H ₁₆ F ₃ NO ₂	323.30965	Wako	19
Iprobenfos (IBP)	OP	C ₁₃ H ₂₁ O ₃ PS	288.34280	Wako	20
Imidacloprid	NN	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	255.66100	Wako	21
Isoxathion	OP	C ₁₃ H ₁₆ NO ₄ PS	313.30920	Wako, Kanto, Hayashi	22, 23, 24
MCPA	PA	C ₉ H ₉ ClO ₃	200.61896	GL Sciences	25
Mecoprop	PA	C ₁₀ H ₁₁ ClO ₃	214.64554	GL Sciences	26
Mefenaset	AA	C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O ₂ S	298.35956	Wako	27
Fenthion (MPP)	OP	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂	278.32806	Wako	28
MPP sulfoxide	OP	C ₁₀ H ₁₅ O ₄ PS ₂	294.32746	Wako	29
MPP sulfone	OP	C ₁₀ H ₁₅ O ₅ PS ₂	310.32686	Wako	30
MPP oxon	OP	C ₁₀ H ₁₅ O ₄ PS	262.26246	Wako	31
MPP oxon sulfoxide	OP	C ₁₀ H ₁₅ O ₅ PS	278.26186	Wako	32
MPP oxon sulfone	OP	C ₁₀ H ₁₅ O ₆ PS	294.26126	Wako	33
Pirimiphos-methyl	OP	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS	305.33356	Wako	34
Pretilachlor	AA	C ₁₇ H ₂₆ ClNO	311.84684	Wako, Kanto, Sigma	35, 36, 37
Pyroquilon	HF	C ₁₁ H ₁₁ NO	173.21114	Wako, Kanto, Sigma	38, 39, 40
Tricyclazole	HF	C ₉ H ₇ N ₃ S	189.23698	Wako	41

^{a)} The analyte compounds were classed by the chemical structure: neonicotinoid, NN; pyrazole, PZ; acid amido, AA; organophosphorus, OP; carbamate, CM; fatty acid, FA; urea, U; phenoxyalkanoic acid, PA; heterocyclic fungicide, HF.

^{b)} The compounds were purchased from five manufacturers: Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Wako; Hayashi Pure Chemical Ind., Ltd., Hayashi; Kanto Chemical Co., Inc., Kanto; Sigma-Aldrich Inc., Sigma; GL Sciences Inc., GL Sciences.

Table 2 Instruments and acquisition parameters

Spectrometer	JNM-ECA600 (JEOL)
Probe	5 mm broadband autotune probe
¹³ C decoupling	Multi pulse decoupling with Phase and Frequency switching (MPF-8)
Spectral width	-5 ~ 15 ppm
Data points	64000
Auto filter	on (8 times)
Flip angle	90°
Pulse delay	60 s (>5 * T ₁)
Scan times	8
Sample spin	no spin
Probe temperature	22-25°C
Sample solvent	Acetone- <i>d</i> ₆ or Methanol- <i>d</i> ₄
qNMR reference material	HMD
Primary standard material	DEP
Window function	—

このソフトウェア上で、qNMR データをフーリエ変換および自動位相調整を行い、HMD および特定シグナルの積分範囲設定等を設定後、予め入力した HMD および対象化合物の濃度、分子量、特定基のプロトン数等の化合物情報から、純度を式 (2) に従い算出した。

3. 結果および考察

3.1 qNMR の原理

¹H-NMR は、測定対象化合物の分子構造にかかわらず、すべての水素原子が個々に定量的な信号として観測され、スペクトル上に観測される異なる化合物のシグナル強度の比は化合物に寄与する水素のモル比に対応する特徴を有する。このことから、2つのシグナルが異なる化合物 (A, B) に由来する場合には、個々のシグナル面積と化合物の濃度は関係式 (3) で表すことができる。言い換えれば、一方の化合物の純度が明らかで定量的に混合すれば、それぞれのシグナル面積と寄与する水素原子を勘案することで、両者のモル比の関係から測定対象の化合物の純度を決定する関係式 (4) が成り立つ。したがって、qNMR は、測定対象の化合物以外の標準物質を上位標準として定量分析値を得ることが可能であり、一次標

準測定法のうち、一次比率法すなわち「物質量の基準となる別の化学物質を用い、それとの比較において目的の化学物質の物質量を測定する方法」の資格を原理的に有する。故に本法は、国家標準物質や認証標準物質 (CRM) を上位標準とすることで、SI にトレーサブルな定量分析値 (純度) を得ることが可能である。

$$\frac{I_A}{I_B} = \frac{H_A m_A}{H_B m_B} = \frac{H_A W_A / M_A}{H_B W_B / M_B} \quad (3)$$

$$P_{\text{sample}} = \frac{I_{\text{sample}} / H_{\text{sample}}}{I_{\text{std}} / H_{\text{std}}} \times \frac{M_{\text{sample}} / W_{\text{sample}}}{M_{\text{std}} / W_{\text{std}}} \times P_{\text{std}} \quad (4)$$

ただし、 I = シグナル面積、 H = 特定基のプロトン数、 m = モル濃度、 W = 重量、 M = 分子量、 P = 純度 (%), $sample$ = 試料、 std = 基準物質を示す。

本報告では、qNMR 基準物質として HMD を用いた。しかしながら、SI にトレーサブルな純度が証明された HMD が流通していないことから、qNMR による定量分析値の SI トレーサビリティーの確保には、SI にトレーサブルな CRM である DEP を一次標準として用い、qNMR 標準液中の HMD の濃度を校正した後に、HMD を二次標準として測定対象化合物の qNMR 測定を行う二段階方式を採用した。すなわち、HMD を qNMR 基準物質として用いた際の測定対象化合物の定量分析値の SI トレーサビリティーは、CRM の DEP を介して実現した (Fig. 1)。また、qNMR は 1 測定当たりの所要時間が約 10-20 分であり、得られた測定値は高い再現性を示し、測定結果の不確かさは概ね 1% 以内が達成されている。

3. 2 市販試薬製品の純度

市販試薬は、新品 23 製品、開封後冷蔵保存約 2 ~ 5 年の 18 製品の計 41 製品について、qNMR により計量計測トレーサビリティーの確保された純度を測定した。試薬メーカー 3 社から購入した農薬はそれぞれの試薬メーカーの頭文字で表した。また、同一製品の開封後冷蔵保存約 5 年と新品 (未開封) の 2 製品を測定した DDVP は DDVP-old, DDVP-new と表記した。qNMR スペクトル上に観察さ

れた基準物質 HMD および対象化合物に由来する各シグナル面積、水素数、濃度等を関係式 (2) に代入し、それぞれの純度を算出した。なお、観察されたシグナルのうち、OH や NH 基由来のプロトンは重水素置換が考えられるため、定量には用いなかった。また、低分子化合物の NMR スペクトルは、低磁場側より高磁場側のシグナルに予想される不純物のシグナルが重なる危険性が高い。qNMR の定量用シグナルは、不純物のシグナルと十分に分離していることが理想であるため、明らかに不純物のシグナルと重なっているシグナルを除外し、それぞれのシグナルより算出された平均値を対象化合物の純度とした。定量に用いたシグナルと算出された純度を Table 3 に示す。qNMR を用いて得られた純度 ($\pm n = 3 \text{ RSD} \%$) は $47.9 \pm 2.5 \sim 100.9 \pm 0.2 \%$ であった。純度の低い製品については、NMR スペクトル上の化合物と基準物質の HMD に由来するシグナル以外に不純物のシグナルが観察された。DDVP-old に関しては、各シグナルから得られた純度の RSD が 15.0% と大きく、不純物を含んでいる可能性が高いと考えられた。従って DDVP-old は、すべてのシグナルによる定量値を用いず、最も低い定量値 47.9% を純度値とした。

3. 3 純度が定量分析値の精度に及ぼす影響

対象化合物の計量計測トレーサビリティーの確保された純度と成績書記載の純度値と比較した (Table 4)。その結果、市販試薬製品に記載の面積百分率による純度値は、95.3 ~ 100% であり、41 製品のうち 73.2% に相当する 30 製品 (新品 16 製品、開封済み 14 製品) の qNMR による純度は 95% 以上で、それぞれの成績書記載の純度値と総じてほぼ等しい値を示した (Fig. 2)。一方、41 製品のうち、新品の butamifos-W, K, H, pretilachlor-W, K, S の 6 製品、開封済み製品の acetamidrid, dalapon, DDVP-old, fipronil の 4 製品計 10 製品は qNMR による純度と成績書記載の純度値との差が 5% 以上あった。これらの 10 製品について、qNMR による純度と成績書記載の純度値との比較を Fig. 3 に示す。開封済み製品では 5.1 ~ 50.8%, 新品では 5.2 ~ 22.8% の差があった。

現状では、市販試薬製品の純度値は精確に値付けされていると前提して、定量用標準物質として使用することが多い。仮に市販試薬製品の成績書記載の純度値を信用してクロマトグラフィーにより定量分析を行ったとすると、qNMR による純度と成績書記載の純度値に差があった 10 製品の得られる定量分析値は真値より 5.1 ~ 50.8% の誤差を生じることになると言える。

3. 4 純度評価の問題点

新品の pretilachlor 3 製品は qNMR による純度が 76.9 ~ 77.1% となり、添付の成績書に記載の面積百分率による純度値 97.7 ~ 99.8% と大きな開きがあった。得られた NMR スペクトルを Fig. 4 に示す。pretilachlor に由来するシグナルと基準物質の HMD に由来するシグナル以外に、分解物または製造原料に由来すると思われるシグナル (Fig. 4 中*印のシグナル: 0.89, 1.12, 1.55, 3.38, 3.78, 4.55, 7.12, 7.20 ppm) が観察され、明らかに純度が低いことが予想された。この市販試薬製品をガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS) により測定し、不純物のピークを観察した結果、クロマトグラム上には pretilachlor 以外のピークは検出されなかった (データ未掲載)。つまり、qNMR スペクトル上には不純物のシグナルが明瞭に観察されていることを考慮すると、添付の成績書に記載されているクロマトグラフィーから得られた純度値を質量% 純度として扱うことは不適切であると考えられる。

クロマトグラフィーによる面積百分率を用いて値付けられた試薬メーカーの成績書記載の純度値が、あらゆる不純物のレスポンス

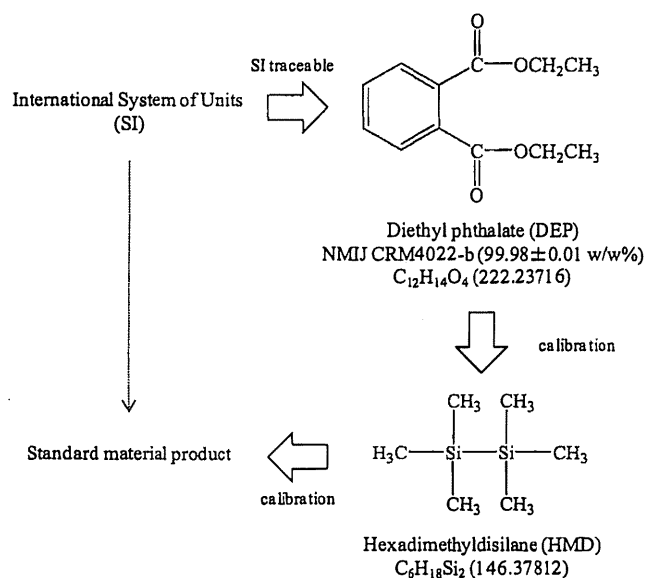


Fig. 1 Strategy of building up SI traceability of qNMR analysis

The concentration of HMD in qNMR solvent was corrected by DEP.

Table 3 Calculated purities of samples from listed proton signals
The signals of OH, NH and overlapped protons with the impurities were not used for the quantification.

Sample No.	Compound	Signal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Average (%), RSD(%)	
1	Acetamidiprid	a)	3H,s	3H,s	2H,s	1H,d							
		b)	2.45	3.20	4.79	7.40	—	—	—	—	—	—	
		c)	74.6	75.1	75.0	74.8							74.9 (0.3)
2	Benzofenap		3H,s	6H,2s	3H,s	2H,s	1H,d	2H,d	1H,d	2H,d			
			1.81	2.35	3.72	5.64	7.08	7.27	7.34	7.71	—	—	99.2 (2.7)
3	Bromobutide		9H,s	3H,s	3H,s	1H,s	1H,t	2H,t	2H,d				
			1.06	1.56	1.63	4.29	7.13	7.24	7.37	—	—	—	100.0 (0.6)
4	Butamifos-W		1H,d	1H,s	1H,d								
			7.09	7.42	7.74	—	—	—	—	—	—	—	94.7 (0.3)
5	Butamifos-K		94.4	95.0	94.7							90.3 (0.2)	
6	Butamifos-H		90.1	90.4	90.5							94.8 (0.2)	
7	Cafenstrole		6H,s	3H,s	6H,s	4H,q	2H,s	1H,s					
			1.15	2.25	2.61	3.47	7.03	8.96	—	—	—	—	97.9 (0.4)
8	Carbofuran		6H,s	2H,s	1H,t	1H,d	1H,d						
			1.37	2.99	6.68	6.80	6.92	—	—	—	—	—	100.3 (0.3)
9	Dalapon		100.2	100.3	100.8	100.4	100.1						
			3H,s										
10	DDVP-old		2.16	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
			71.8										71.8 (—)
11	DDVP-new		3H,s	3H,s	1H,d								
			3.80	3.81	7.16	—	—	—	—	—	—	—	
12	Disulfoton-W		64.9	47.9	57.9								56.9(15.0)
			96.6	93.4	93.5								94.5 (1.9)
13	Disulfoton-K		3H,t	6H,t	2H,q	2H,m	4H,m						
			1.18	1.28	2.55	3.04	4.11	—	—	—	—	—	
14	Disulfoton-S		99.6	99.9	99.9	99.4	99.7						99.7 (0.2)
			102.0	97.7	102.2	96.9	97.4						99.3 (2.6)
15	Diuron		100.6	99.3	100.1	98.4	99.2						99.5 (0.9)
			6H,s	1H,d	1H,d	1H,s							
16	Fenobucarb		2.94	7.32	7.43	7.89	—	—	—	—	—	—	
			99.2	98.9	98.9	99.6							99.1 (0.3)
17	Fipronil		2H,m	1H,m	2H,m	1H,m							
			1.51	7.11	7.21	6.97	—	—	—	—	—	—	
18	Fipronil sulfone		100.0	100.1	99.6	100.0							99.9 (0.2)
			2H,s										
19	Flutolanil		8.09	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
			92.9										92.9 (—)
20	IBP		2H,s										
			8.13	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
21	Imidacloprid		99.9										99.9 (—)
			6H,d	1H,m	1H,d	2H,m	1H,s	2H,2t	1H,t	1H,d			
22	Isoxathion-W		1.26	4.55	6.64	7.19	7.46	7.65	7.70	7.76	—	—	
			100.6	99.7	99.7	99.5	99.9	100.4	98.9	100.7			99.9 (0.6)
23	Isoxathion-K		12H,m	1H,s	1H,s	2H,m	1H,t	2H,t	2H,d				
			1.21	4.01	4.03	4.55	7.22	7.28	7.35	—	—	—	
24	Isoxathion-H		99.8	100.3	98.0	100.2	99.8	99.7	98.8				99.5 (0.9)
			2H,t	2H,t	2H,s	1H,d	1H,d	1H,s					
25	Isoxathion-H		3.61	3.78	4.52	7.41	7.80	8.36	—	—	—	—	
			99.3	99.2	98.4	98.9	99.0	99.6					99.1 (0.4)
26	Isoxathion-H		6H,t	4H,m	1H,s	3H,m	2H,d						
			1.33	4.28	6.82	7.50	7.83	—	—	—	—	—	
27	Isoxathion-H		98.7	98.5	98.0	99.2	98.0						98.5 (0.5)
			99.9	99.8	99.4	99.9	99.8						99.7 (0.2)
28	Isoxathion-H		98.8	98.7	98.3	99.2	98.3					98.6 (0.4)	

Table 3 Continued

SampleNo.	Compound	Signal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Average (% , RSD%)
25	MCPA		3H,s	2H,s	1H,d	1H,d	1H,s					
			2.18	4.71	6.83	7.08	7.12	—	—	—	—	
			100.1	100.2	99.2	100.4	99.1					99.8 (0.6)
26	Mecoprop		3H,d	3H,s	1H,q	1H,d	1H,d	1H,s				
			1.56	2.17	4.81	6.77	7.06	7.12	—	—	—	
			100.2	99.7	99.5	99.5	99.9	99.0				99.6 (0.4)
27	Mefenaset		3H,s	2H,s	1H,t	1H,t	5H,m	1H,d	1H,d			
			3.20	4.87	7.21	7.40	7.45	7.57	7.75	—	—	
			95.3	90.1	101.9	107.3	95.5	106.7	100.7			99.6 (6.4)
28	MPP		3H,s	3H,s	3H,s	3H,s	2H,s+d	1H,d				
			2.24	2.42	3.79	3.80	6.98	7.17	—	—	—	
			101.1	100.9	100.4	99.3	100.1	100.5				100.4 (0.6)
29	MPP sulfoxide		3H,s	3H,s	3H,s	3H,s	1H,s	1H,d	1H,d			
			2.34	2.61	3.81	3.84	7.06	7.25	7.82	—	—	
			100.8	100.7	100.1	98.8	100.2	99.8	99.8			100.0 (0.6)
30	MPP sulfone		3H,s	3H,s	3H,s	3H,s	2H,s+d	1H,d				
			2.65	3.11	3.83	3.85	7.22	7.95	—	—	—	
			99.3	99.4	99.8	98.9	99.3	99.8				99.4 (0.3)
31	MPP oxon		3H,s	3H,s	3H,s	3H,s	2H,s+d	1H,d				
			2.24	2.41	3.76	3.78	7.04	7.17	—	—	—	
			97.7	97.3	98.5	96.7	97.3	97.6				97.5 (0.6)
32	MPP oxon sulfoxide		3H,s	3H,s	3H,s	3H,s	1H,s	1H,d	1H,d			
			2.34	2.61	3.80	3.82	7.11	7.24	7.81	—	—	
			99.4	99.9	98.6	97.5	98.2	98.0	97.9			98.5 (0.9)
33	MPP oxon sulfone		3H,s	3H,s	3H,s	3H,s	2H,s+d	1H,d				
			2.65	3.10	3.82	3.84	7.26	7.95	—	—	—	
			99.6	99.8	97.7	96.9	99.0	99.6				98.8 (1.2)
34	Pirimiphos-methyl		6H,t	3H,s	4H,s	3H,s	3H,s	1H,s				
			1.11	2.23	3.55	3.85	3.85	6.02	—	—	—	
			99.2	99.6	97.2	99.8	99.7	98.7				99.0 (1.0)
35	Pretilachlor-W		3H,t	6H,t	2H,m	2H,t	2H,t	4H,s+t	2H,d	1H,t		
			0.79	1.20	1.42	3.25	3.51	3.69	7.24	7.32	—	
			79.1	79.5	73.4	79.2	79.1	79.0	78.5	78.3		77.1 (0.4)
36	Pretilachlor-K		3H,t	6H,t	2H,m	2H,t	2H,t	4H,s+t	2H,d	1H,t		
			78.6	80.2	71.6	79.3	79.9	78.7	78.2	79.8		77.0 (1.2)
			78.9	79.6	72.8	78.9	78.9	78.4	78.1	78.3		76.9 (0.3)
37	Pretilachlor-S		2H,t	2H,t	2H,t	2H,t	1H,t	1H,d	1H,d			
			2.49	2.89	3.11	3.92	6.82	6.93	7.01	—	—	
			101.1	100.8	100.7	100.8	101.0	100.9	100.9			100.9 (0.1)
38	Pyroquilon-W		2H,t	2H,t	2H,t	2H,t	1H,t	1H,d	1H,d			
			100.6	100.2	100.3	100.2	100.4	100.3	100.3			100.3 (0.1)
			101.1	100.8	100.8	100.8	101.0	100.9	100.8			100.9 (0.1)
39	Pyroquilon-K		2H,m	1H,d	1H,s							
			7.36	7.65	9.27	—	—	—	—	—	—	
			99.6	99.8	98.8							99.4 (0.5)
40	Pyroquilon-S		2H,m	1H,d	1H,s							
			7.36	7.65	9.27	—	—	—	—	—	—	
			99.6	99.8	98.8							99.4 (0.5)
41	Tricyclazole		2H,m	1H,d	1H,s							
			7.36	7.65	9.27	—	—	—	—	—	—	
			99.6	99.8	98.8							99.4 (0.5)

a) Upper column shows a number of proton with the spin-spin coupling (s: singlet, d: doublet, t: triplet, q: quartet, m: multiplet).

b) Middle column shows the signal region (ppm).

c) Lower column shows the purity of each signal (%).

ファクターが主成分と同じであると仮定して主成分の相対比を示すもので、絶対量を示しているわけではないことは明らかであるが、問題視されることはなかった。今回、qNMRを用いた純度測定により、市販試薬製品に記載の純度値が絶対量と異なることがあり得ることが証明された。なお、qNMRによる純度試験に供した化合物は概ね1製品1ロットについてであり、市販試薬製品の純度について正確な情報を収集するためには、ロット間差についても今後検討する必要があると考えられる。

3. 5 開封済み製品の品質管理

市販試薬製品の純度の誤差が定量分析値の精度に及ぼす要因として、開封済の製品における品質管理について着目した。

DDVPは未開封の新品DDVP-newのqNMRによる純度が94.5%であるのに対し、開封後冷蔵保存約5年の製品DDVP-oldは47.9%であった。DDVPは熱には安定であるとされているが、長期保存により加水分解や酸化による純度値の低下が生じたと考えられた。化合物の安定性は化合物毎に異なり、保存期間や保存状態によっては

Table 4 Summary of commercial reagent products purities calculated by qNMR and labeled percentage of peak area on chromatogram by manufacturer

Sample No.	Compound	Purity (%)			Sample No.	Compound	Purity (%)		
		qNMR (n=3 average, RSD %)		Manufacturer ^{a)}			qNMR (n=3 average, RSD %)		Manufacturer ^{a)}
1	Acetamidrid *	74.9	0.4	98.8 (GC/FID)	21	Imidacloprid *	99.1	0.6	100 (LC/UV)
2	Benzofenap	99.2	1.9	99.6	22	Isoxathion-W	98.5	0.5	98.9 (GC/FID)
3	Bromobutide *	100.0	0.2	— ^{b)}	23	Isoxathion-K	99.7	0.3	99.1 (GC/FID)
4	Butamifos-W	94.7	0.8	99.8 (GC/FID)	24	Isoxathion-H	98.6	0.1	99.9 (GC/FID)
5	Butamifos-K	90.3	0.6	99.2 (GC/FID)	25	MCPA *	99.8	0.2	— ^{b)}
6	Butamifos-H	94.8	0.7	99.9 (GC/FID)	26	Mecoprop	99.6	0.7	— ^{b)}
7	Cafenstrole *	97.9	0.8	99.8 (HPLC/UV)	27	Mefenaset *	99.6	0.2	99.9 (GC/FID)
8	Carbofuran	100.3	0.4	99.9 (HPLC)	28	MPP *	100.4	0.4	99.9 (GC/FID)
9	Dalapon *	71.8	0.8	99 (GC/FID)	29	MPP sulfoxide	100.0	0.3	99.8 (LC/UV)
10	DDVP-old *	47.9	2.5	98.7 (GC/FID)	30	MPP sulfone *	99.4	0.4	99.3 (GC/FID)
11	DDVP-new	94.5	0.4	99 (GC/FID)	31	MPP oxon *	97.5	0.3	100 (GC/FID)
12	Disulfoton-W	99.7	0.4	98.6 (GC/FID)	32	MPP oxon sulfoxide	98.5	0.5	99.4 (GC/FID)
13	Disulfoton-K	99.3	0.2	95.3 (GC/MS, LC/DAD)	33	MPP oxon sulfone	98.8	0.5	99.8 (GC/FID)
14	Disulfoton-S	99.5	0.3	98.6 (HPLC/UV)	34	Pirimiphos-methyl	99.0	0.1	98.9 (GC/FID)
15	Diuron *	99.1	0.01	100 (LC/UV)	35	Pretilachlor-W	77.1	0.5	99.2 (GC/FID)
16	Fenobucarb *	99.9	0.5	— ^{b)}	36	Pretilachlor-K	77.0	1.6	99.8 (GC/FID)
17	Fipronil *	92.9	0.2	98.1 (GC/FID)	37	Pretilachlor-S	76.9	0.4	97.7 (HPLC/UV)
18	Fipronil sulfone *	99.9	0.4	— ^{b)}	38	Pyroquilon-W	100.9	0.2	100 (GC/FID)
19	Flutolanil *	99.9	0.7	100 (GC/FID)	39	Pyroquilon-K	100.3	1.1	99 (HPLC/DAD)
20	IBP *	99.5	0.3	100 (GC/FID)	40	Pyroquilon-S	100.8	0.5	99.9 (GC)
					41	Tricyclazole *	99.4	0.1	100 (LC/UV)

^{a)} The purity means the area percentage of main peak on chromatogram.
^{b)} There was no mention of the purity in the certificate.
 * Eighteen products are stored in 4°C for about 2-5 years after first opening the pack.

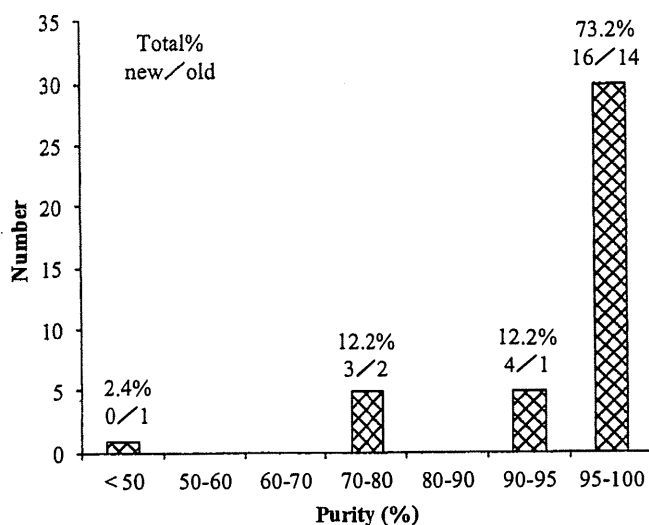


Fig. 2 Distribution of absolute purities of commercial reagent material products measured by qNMR

The 41 products were classified according to the absolute purities. The proportions and the number of new and old products were shown.

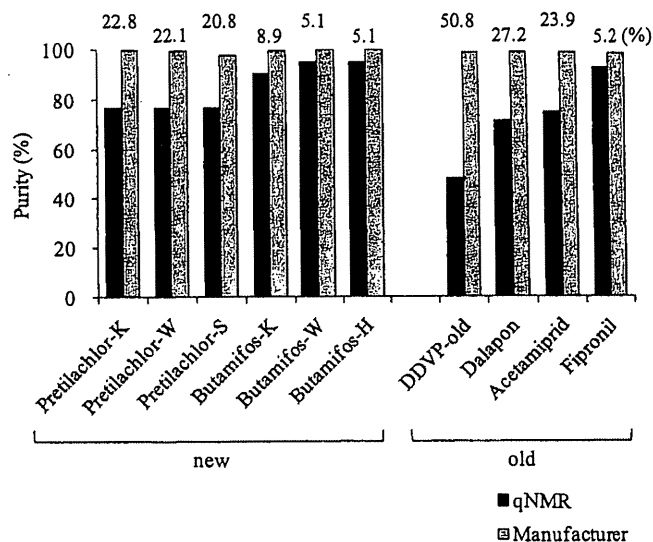


Fig. 3 Differences between manufacturer's labeled purities and the absolute purities measured by qNMR

Ten pesticide reagent products, which had difference more than 5% between the labeled purities and absolute purities, were shown.

分解し、純度値が低下していく可能性を否定できない。この純度の低下が、結果として定量分析値の精度を悪くする恐れがあることが明らかとなった。

農薬等の試薬に記載されている有効期限は、開封前のメーカーの保証期間であり、開封後についてメーカーは保証していない。また、開封後の使用期限を設定しても、管理を徹底しなければ意味をなさない。つまり、現状では試薬の保管状態、開封試薬の廃棄期限等研

究者自身が把握する必要がある。これらのことから、qNMRによる純度試験は、開封後の試薬の純度変化または有効期限の記載がない研究用試薬が、試験を行うことができる許容範囲にあるかを評価する手段としても有用である。さらに、市販製品の純度が低下していても、分析時に純度を測定することで、計量計測トレーサビリティの確保された純度値が得られるという利点がある。

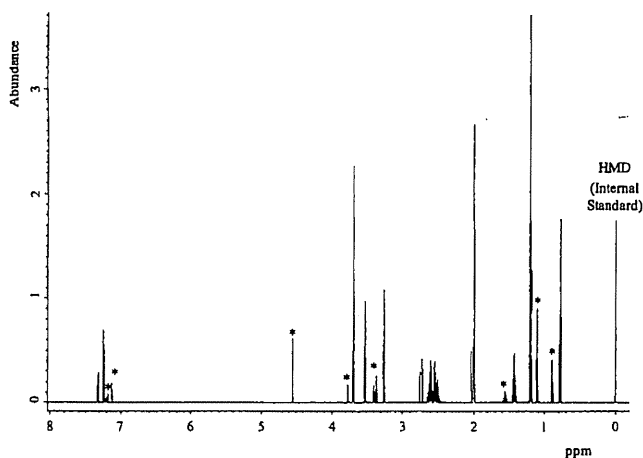


Fig. 4 qNMR spectrum of pretilachlor

HMD was used as a reference at δ 0 ppm and an internal standard for quantitative analysis. * Signals were impurities.

4. まとめ

環境分析に用いられるクロマトグラフィーは、測定対象の標準物質が必要であり、測定対象と同一の基準となる物質のピーク面積の比から求められる相対的な値のため、定量分析値の信頼性は標準物質の質に依存する。科学的な根拠に基づく定量分析値の信頼性確保には、市販医薬製品それぞれについて計量計測トレーサビリティの確保された純度の決定が最重要であると考えられる。そこで本研究では、qNMRの高い定量精度を応用し、市販試薬 41 製品について純度評価を行った。その結果、約 75 % が成績書記載の純度値と総じてほぼ等しい値を与えた。しかし、それ以外は成績書記載の純度値より 5 % 以上低く、その純度の低下が定量分析値に誤差を与える要因となることが示唆された。本研究により、定量分析値の実験室間の相互比較には、純度が計量学的に証明された標準物質の精確な使用が重要であり、純度に対して SI トレーサビリティを確保しておけば、定量分析値の信頼性が飛躍的に向上すると考えられた。近年では、第三者の認定を受けた標準物質生産者が供給する認証標準物質や計量標準供給制度 (JCSS) の体系内で扱われている認証標準物質の販売を行うようになってきている。しかし、環境分析において測定対象となる化合物は多種多様であるため、市販されている認証標準物質の数は未だ少ない。これらのことから、分析技術者が精確に値付けされた標準品を標準物質として使用する重要性を認識し、qNMRによる計量計測トレーサビリティの確保された定量法が標準品の純度や濃度の値付けや品質の保証を行う体制の整備に重要なツールとなることが期待される。

要約

環境分野で広く用いられているクロマトグラフィーは測定対象化合物の標準物質が不可欠であるが、国際単位系 (SI) への計量計測トレーサビリティが保証された市販の標準物質は少ない。SI トレーサビリティが確保された標準物質を用いない以上、標準物質の純度が定量分析値の信頼性を大きく損なっている可能性を否定できない。本研究では、核磁気共鳴装置を用いた SI トレーサブルな定量分析法を応用して、市販試薬 41 製品の純度を測定した。41 製品のうち 26.8 % に相当する 10 製品の純度は、成績書記載の純度値との差が 5 % 以上の 47.9 ~ 94.8 % であった。新品の純度の結果から、成績書記載の純度値を質量 % 純度として扱うことは不適切であると考えられた。また、市販試薬製品の純度および開封後の品質管理が

定量分析値の室間精度に大きく影響を及ぼすことが示唆され、成績書記載の純度値を信用して使用すると、得られる定量分析値は真値より 5.1 ~ 50.8 % の誤差を生じることが明らかとなった。定量分析値の信頼性確保には、計量計測トレーサビリティの確保された純度が精確な標準物質を使用していくことで、飛躍的に向上すると考えられた。

文献

- 1) 「第十六改正日本薬局方」, 一般試験法 2. 物理的試験法 クロマトグラフィー (2011)
- 2) JISK 0114, ガスクロマトグラフ分析通則 (2000)
- 3) BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML: International vocabulary of basic and general terms in metrology, Second edition, ISO (1993)
- 4) BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML: Guide to the expression of uncertainty in measurement, First edition, ISO (1993)
- 5) 田原麻衣子, 中島晋也, 杉本直樹, 有菌幸司, 西村哲治: 水道水質試験の標準液調製における不確かさと定量精度に影響を及ぼす要因, 水道協会雑誌, in press (2012)
- 6) ISO Guide 30: Terms and definitions used in connection with reference (1992)
- 7) ISO Guide 31: Reference materials - Contents of certificates and labels (2000)
- 8) ISO Guide 32: Calibration in analytical chemistry and use of certified reference materials (1997)
- 9) ISO Guide 33: Uses of certified reference materials (2000)
- 10) ISO Guide 34: General requirements for the competence of reference material producers (2009)
- 11) ISO Guide 35: Reference materials - General and statistical principles for certification (2006)
- 12) Saito, T., Nakaie, S., Kinoshita, M., Ihara, T., Kinugasa, S., Nomura, A. and Maeda, T.: Practical guide for accurate quantitative solution state NMR analysis. *Metrologia*, 41, 213-218 (2004)
- 13) Sugimoto, N., Koike, R., Furusho, N., Tanno, M., Yomota, C., Sato, K., Yamazaki, T. and Tanamoto, K.: Quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopic determination of the oxyethylene group contents of polysorbates. *Food Add. Contam.*, 24, 799-806 (2007)
- 14) Saito, T., Ihara, T., Koike, M., Kinugasa, S., Fujimine, Y., Nose, K. and Hirai, T.: A new traceability scheme for the development of international system-traceable persistent organic pollutant reference materials by quantitative nuclear magnetic resonance. *Accred. Qual. Assur.*, 14, 79-86 (2009)
- 15) 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, 12-22 (2009)
- 16) 田原麻衣子, 杉本直樹, 末松孝子, 有福和紀, 齋藤 剛, 井原俊英, 吉田雄一, 多田敦子, 久保田領志, 清水久美子, 山崎 壮, 棚元憲一, 中澤裕之, 西村哲治: qNMR に基づく有機リン系農薬イソキサチオンオキシソンの品質管理, 日本食品化学学会誌, 16, 28-33 (2009)
- 17) 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, 19-27 (2010)

- 18) 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, 田原麻衣子, 久保田領志, 清水久美子, 山崎 壮, 河村葉子, 西村哲治: 定量 NMR を用いたダッタンソバ乾麺中のクエルセチンの迅速定量, 日本食品化学学会誌, 17, 179-184 (2010)
- 19) 細江潤子, 杉本直樹, 合田幸広: 定量 NMR (qNMR) による日本薬局方試薬の純度規格化の検討, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 41, 960-970 (2010)
- 20) IUPAC Inorganic Chemistry Division, CIAAW: Standard Atomic Weights Revised. Chem. Int., 29, 18 (2007)

