

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

食品分析の信頼性確保に資する外部標準法定量NMR (EC-qNMR) の
高度化及び標準化に関する研究

令和 4 年度 総括研究報告書

研究代表者 西崎 雄三 国立医薬品食品衛生研究所

令和 5 (2022)年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

食品分析の信頼性確保に資する外部標準法定量NMR (EC-qNMR)

の高度化及び標準化に関する研究

1

西崎雄三

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

22

別紙：「第一回自動測定スクリプトを用いた EC-qNMR 共同試験-マニュアル-」

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

総括研究報告書（令和4年度）

食品分析の信頼性確保に資する外部標準法定量NMR（EC-qNMR）

の高度化及び標準化に関する研究

研究代表者 西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 主任研究官

研究要旨 外部標準法定量NMR（EC-qNMR）測定を自動化するスクリプトを用いて、6機関のEC-qNMR共同試験を実施した。分析種及び外部標準（EC）に、それぞれ安息香酸（BA）及びジメチルスルホン（DMSO₂）を用いた。最適化された測定手順及び測定パラメータに従って、BAの純度を算出したところ、全ての機関から、参照値との誤差が2%以内に収まる良好な結果が得られた。このことから、EC-qNMRは十分に高度化できたといえた。本共同試験の結果をもとに、EC-qNMR測定の標準化が期待できた。

研究協力者

石附京子	国立医薬品食品衛生研究所
杉本直樹	国立医薬品食品衛生研究所
山崎太一	産業技術総合研究所
三浦 亨	富士フイルム和光純薬株式会社
武藤康弘	富士フイルム和光純薬株式会社
岩本芳明	富士フイルム和光純薬株式会社
古田浩祐	杏林製薬株式会社
澤 竜一	微生物化学研究所
久保田由美子	微生物化学研究所
加藤 毅	日本食品分析センター
笛木周平	日本食品分析センター
山本佳奈	日本食品分析センター
小松功典	日本電子株式会社
朝倉克夫	日本電子株式会社
松熊伸也	日本電子株式会社
吉村弘伸	日本電子株式会社
末松孝子	日本電子株式会社

A. 研究目的

外部標準法定量 NMR（EC-qNMR）は、NMR 試料管中の基準物質を外部標準（EC）とし、別の NMR 試料管中の分析種の絶対濃度ないし純度を求めることができる。このため、従来の、

基準物質と分析種を共存させる内部標準法定量 NMR（IC-qNMR）と異なり、分析種は内部標準（IC）に汚染されない。

IC による汚染を避けたい高価な標準品、自ら単離した天然原料からの希少な（秤量すら困難な）精製品、あるいは測定溶媒中において IC と溶解性や安定性が著しく異なる分析種を測定するとき、EC-qNMR は非常に有用である。また、分析種毎に IC を添加する必要はなく、EC が入った 1 本の NMR 試料管から複数の分析種を値づけることができるため、試料調製が簡便で経済的である。さらに、測定終了後の NMR 試料液は、各種機器分析や生物活性試験の安全性や有効性を評価するための、純度既知の標準品として扱える点も魅力的である。

ただし、EC-qNMR は IC-qNMR と比べて方法論が一般化されていない。また、EC-qNMR の報告には 5%以上の誤差が散見され、精度の低い測定法と認識されている。しかし、適切な測定手順を踏むことにより、EC-qNMR も IC-qNMR と同様に誤差 1%程度の正確な定量が可能である^{1,2}。具体的には、試料毎に 90° パルス幅 (pw90) を校正し、この校正した pw90 を用いて qNMR 測定することが重要である。一方、EC-qNMR で

多数の試料を測定する場合、オペレータは試料毎に pw90 校正を行うため、装置から離れることができず、長時間拘束されることとなる。そのため、EC-qNMR の実用化には、EC-qNMR 測定の完全自動化が課題として挙げられる。昨年度は、この課題を解決するために、日本電子(株)と共同で EC-qNMR 自動測定スクリプトを開発した。

今年度は、この自動測定スクリプトを利用して共同試験を実施する。具体的には、分析種及び EC に安息香酸 (BA) 及びジメチルスルホン (DMSO₂) を用いて、参加機関が EC-qNMR で算出する BA の真度、精度、繰返し性、再現性を確認し、EC-qNMR の高精度化及び標準化を進める。

B. 研究方法

共同試験参加者は別紙：「第一回自動測定スクリプトを用いた EC-qNMR 共同試験-マニュアル-」に従って EC-qNMR を実施した。

B-1) 装置

参加機関が用いた NMR 装置は全て日本電子製である。分光計及び共鳴周波数は下記の通りである：Lab No. 1, ECA (500.16 MHz) ; Lab No. 2, ECA (600.17 MHz) ; Lab No. 3, ECZ (600.17 MHz) ; Lab No. 4, ECZ (399.78 MHz) ; Lab No. 5.1, ECZ (600.17 MHz) ; Lab No. 5.2, ECA (600.67 MHz) ; Lab No. 6, ECZL (399.78 MHz)。

B-2) 試薬

BA (Cat No. 028-19011, 99.8% mass fraction), DMSO₂ (Cat No. 048-33271, 99.9% mass fraction), 重ジメチルスルホキシド (DMSO-*d*₆; Cat No. 048-34251, 99.9%D) 及び NMR 試料管 (Cat No. 291-48353) は富士フイルム和光純薬(株)から購入した。

B-3) 試料

DMSO-*d*₆ に溶解させた 2.0506 mg/mL の BA 及び 0.4959 mg/mL の DMSO₂ を、それぞれ分析種及び EC として用いた。NMR 試料管は封管した状態で参加機関に配布した。

B-4) EC-qNMR

BA 及び DMSO₂ を下記の通り測定した。交互に 5 回ずつ測定した。NMR 装置に投入した試料を 25°C で 5 分間平衡化させた。グラジエントシム、オートシムにより分解能を調整し、チューニング・マッチング (T&M) により HF コイル (¹H 核) 及び LF コイル (¹³C 核) を調整した。

次に、pw 連続測定により pw90 を校正した。連続測定の照射中心は溶媒ピークに設定した。また、変化させる pw はプローブに記録されているデフォルトの pw90 の値を基準にした。すなわち、初期値 (start90 [μs]) : pw10, 終了値 (end90 [μs]) : pw450, 間隔 (step90 [μs]) : pw40 を推奨した。遅延時間 (calc90_relax_delay [s]) は 60 秒に設定した。この連続測定で得られたアレイデータについて、pw に応じて照射中心のピーク強度をプロットし、減衰正弦波のモデル関数を適用し、pw90 を算出した³⁾。

次に算出した pw90 を下記の qNMR 測定条件に反映した。すなわち、照射中心：5 ppm, 観測幅：15 ppm, 取込み時間：4.5 秒, 遅延時間：60 秒, 積算回数：8 回, ダミーキャン：2 回, サンプル回転：なし, ¹³C デカップリング：MPF8 (取込み時間のみ)。

qNMR 測定で得られた FID を下記に従って処理した。すなわち、窓関数の設定を外し、ゼロフィルでポイント数を 4 倍に増やし、フーリエ変換を行った。得られたスペクトルの位相とベースラインを補正し、EC-qNMR 解析用スペクトルとした。スペクトル上のプロトンに対して自動積分を行い、BA の絶対純度を算出した。具体的には、式 (1) に従って、DMSO₂ のスペクトルから 1 プロトン当たりの感度係数：Q 値を算出した。なお、自動積分範囲が適切でない場合は、手動で積分範囲を補正することとした。

$$A \times pw90 / conc. / H = Q \quad (1)$$

ここで、Conc., モル濃度 (mol/L) ; A, DMSO₂ のピーク面積 ; H, A に由来するプロトン数 (DMSO₂ の場合は 6) ; pw90, 90° パルス幅 (μsec)。

続いて、BA のスペクトルから BA に由来するプロトンを積分し、式 (2) に従って、BA の絶対純度 (P) を算出した。

$$P = A \times pw90 / H / conc. / Q \quad (2)$$

ここで、 A , BA のピーク面積; $pw90$, 90° パルス幅 (μsec); H , A に由来するプロトン数 (BA の場合は 5); $Conc.$, モル濃度 (mol/L); Q , 式 (1) 参照

C. 結果及び考察

共同試験の結果を図 1 に示す。以下、参加機関毎に考察する。

C-1) Lab No. 1

共同試験は、1月6日、1月17日、3月1日に行われた。Lab No. 1 のデフォルトの $pw90$ [μs] の値は 7.40 である。共同試験のマニュアルに従うと、オペレータが入力する $start90$ [μs], $end90$ [μs] 及び $step90$ [μs] の値は、7.40 を基準として、それぞれ 0.82222 ($7.40/9$), 37.1 ($7.40 \times 5 + 0.1$) 及び 3.28889 ($7.40 \times 4/9$) である。pw 連続測定のアレイデータを確認したところ、3日間とも、 $pw0.82222 \sim 36.90222$ の範囲を間隔 3.28 で変化させていた (図 2)。Lab No. 1 がマニュアルに従って $pw90$ を校正していることが分かった。なお、スクリプトに入力する $step90$ [μs] の値は小数点第 5 位まで入力できるが、実際の測定では小数点第 2 位までの値が反映されるようである。

3日間における校正した $pw90$ [μs] の値は、約 6.4~6.6 であり、デフォルトの 7.40 と若干の差異が確認された。デフォルトの 7.40 という値は、プローブを納品する際、標準試料を用いてエンジニアが校正した値と思われる。今回校正した $pw90$ とデフォルトの $pw90$ の差異は、試料、測定溶媒または校正方法の違いによるものと考えられた。ただし、1月6日~3月1日の約 2ヶ月間にわたって Q 値は安定しており、その RSD は 1.8% であった (表 1)。

Lab No. 1 が算出した BA の絶対純度は、 $99.2 \pm 1.0\%$ (1月6日), $98.1 \pm 0.5\%$ (1月17日),

$98.3 \pm 1.0\%$ (3月1日) であり、BA の認証値 : 99.8% との差は最大で 1.7% であった。

C-2) Lab No. 2

共同試験は、11月1日、11月14日、11月28日に行われた。Lab No. 2 のデフォルトの $pw90$ [μs] の値は 7.45 である。共同試験のマニュアルに従うと、オペレータが入力する $start90$ [μs], $end90$ [μs] 及び $step90$ [μs] の値は、7.45 を基準として、それぞれ 0.82778 ($7.45/9$), 37.35 ($7.45 \times 5 + 0.1$) 及び 3.31111 ($7.45 \times 4/9$) である。pw 連続測定のアレイデータを確認したところ、3日間とも、 $pw1.06778 \sim 47.92778$ の範囲を間隔 4.26 で変化させていた。マニュアルで推奨する「 $pw10 \sim 450$ に相当する範囲を $pw40$ の間隔」ではなく、「 $pw13 \sim 578$ に相当する範囲を $pw51$ の間隔」で連続測定していた。しかし、アレイデータの描く減衰正弦波は綺麗にカーブフィッティングされていたため、 $pw90$ は正しく校正されていると判断した (図 3)。

3日間における $pw90$ [μs] の校正結果は、約 7.2~7.4 であり、デフォルトの 7.45 と近い値であった。 Q 値は 11月1日~11月28日の約 1ヶ月間にわたって安定しており、その RSD は 1.4% であった (表 2)。

Lab No. 2 が算出した BA の絶対純度は、 $99.6 \pm 0.7\%$ (11月1日), $100.3 \pm 0.9\%$ (11月14日), $101.2 \pm 0.8\%$ (11月28日) であり、BA の認証値 : 99.8% との差は最大で 1.4% であった。

C-3) Lab No. 3

共同試験は、11月2日、11月17日、11月29日に行われた。Lab No. 3 のデフォルトの $pw90$ [μs] の値は 6.86 である。共同試験のマニュアルに従うと、オペレータが入力する $start90$ [μs], $end90$ [μs] 及び $step90$ [μs] の値は、6.86 を基準として、それぞれ 0.76222 ($6.86/9$), 34.4 ($6.86 \times 5 + 0.1$) 及び 3.04889 ($6.86 \times 4/9$) である。pw 連続測定のアレイデータを確認したところ、3日間とも、 $pw0.76222 \sim 34.20222$ の範囲を間隔 3.04 で変化させていた。Lab No. 3 はマニュアルに従って $pw90$ を校正していることが分かった (図 4)。なお、スクリプトに入力した $step90$ [μs]

の値は小数点第2位までが反映される。

Lab No. 3における3日間のpw90校正結果は、約7.0~7.2であり、デフォルトの6.86と近い値であった。Q値は11月2日~11月29日の約1ヶ月間にわたって安定しており、RSDは1.0%であった(表3)。

Lab No. 3が算出したBAの絶対純度は、98.6 ± 1.2% (11月2日), 99.4 ± 0.9% (11月17日), 100.3 ± 1.1% (11月29日)であり、BAの認証値: 99.8%との差は最大で1.2%であった。

C-4) Lab No. 4

共同試験は、10月6日、11月22日、12月14日に行われた。Lab No. 4のデフォルトのpw90 [μs]の値は6.61である。共同試験のマニュアルに従うと、オペレータが入力するstart90 [μs], end90 [μs]及びstep90 [μs]の値は、6.61を基準として、それぞれ0.73444 (6.61/9), 33.15 (6.61 × 5 + 0.1) 及び2.93778 (6.61 × 4/9)である。pw連続測定のアレイデータを確認したところ、3日間とも、pw0.72222~32.40222の範囲を間隔2.88で変化させていた。これは「pw9.8~441に相当する範囲をpw39.2の間隔」に相当し、マニュアルで推奨する「pw10~450に相当する範囲をpw40の間隔」とわずかなズレがあった。このわずかなズレが生じた原因について確認が必要である。ただし、Lab No. 4のアレイデータが描く減衰正弦波は綺麗にカーブフィッティングされていたため、pw90は正しく校正されていると判断した(図5)。

3日間における校正したpw90 [μs]の値は、約7.3~7.4 (11月2日), 約6.6~6.9 (11月22日及び12月14日)であった。1日目と2・3日目で大きく異なった(表4)。それ故に、Lab No. 4のQ値は1日目と2・3日目で大きく異なるが、それぞれの日に限定してQ値のバラつきを評価すると安定していた。よってBAの純度算出にあたり、Lab No. 4の測定データは問題がないと判断した(表4)。なお、Lab No. 4では1日目と2・3日目でレシーバゲイン(RG)も変えていた。これもQ値が日によって異なる要因の一つである。

Lab No. 4が算出したBAの絶対純度は、100.8 ± 0.8% (11月2日), 100.0 ± 0.7% (11月22日), 99.4 ± 0.8% (12月14日)であり、BAの認証値: 99.8%との差は最大で1.0%であった。

C-5.1) Lab No. 5.1

共同試験は、11月14日、11月25日、12月6日に行われた。Lab No. 5.1のデフォルトのpw90 [μs]の値は10.1である。共同試験のマニュアルに従うと、オペレータが入力するstart90 [μs], end90 [μs]及びstep90 [μs]の値は、10.1を基準として、それぞれ1.12222 (10.1/9), 50.6 (10.1 × 5 + 0.1) 及び4.48889 (10.1 × 4/9)である。pw連続測定のアレイデータを確認したところ、3日間とも、pw1.12222~50.40222の範囲を間隔4.48で変化させていた。Lab No. 5.1はマニュアルに従ってpw90を校正していることが分かった(図6)。なお、スクリプトに入力したstep90 [μs]の値は小数点第2位までが反映される。

3日間における校正したpw90 [μs]の値は、約10.8~11.1であり、デフォルトの10.1と近い値であった。Q値は11月14日~12月6日の約1ヶ月間にわたって安定しており、RSDは0.9%であった(表5)。

Lab No. 5.1が算出したBAの絶対純度は、98.8 ± 0.3% (11月14日), 100.1 ± 0.8% (11月25日), 99.3 ± 1.0% (12月6日)であり、BAの認証値: 99.8%との差は最大で1.0%であった。

C-5.2) Lab No. 5.2

Lab No. 5.2は、Lab No. 5.1と同じ機関、同じオペレータであるが、使用したNMR装置が異なる。共同試験は、1月5日、1月16日、1月27日に行われた。Lab No. 5.2のデフォルトのpw90 [μs]の値は8.5である。共同試験のマニュアルに従うと、オペレータが入力するstart90 [μs], end90 [μs]及びstep90 [μs]の値は、8.5を基準として、それぞれ0.94444 (8.5/9), 42.6 (8.5 × 5 + 0.1) 及び3.77778 (8.5 × 4/9)である。pw連続測定のアレイデータを確認したところ、3日間とも、pw0.94444~42.30444の範囲を間隔3.76で変化させていた(図7)。本来、3.77の間

隔で変化させるはずが、測定に反映された値は 3.76 であった。アレイデータへの影響はないものと考えて差し支えないが、記録のために記しておく。

3 日間における pw90 校正結果の値[μs]は、約 8.6~9.2 であり、デフォルトの 8.5 と近い値であった。Q 値は 1 月 5 日~1 月 27 日の約 1 ヶ月間にわたって安定しており、RSD は 1.5% であった (表 6)。

Lab No. 5.2 が算出した BA の絶対純度は、98.7 \pm 1.3% (1 月 5 日)、98.8 \pm 2.3% (1 月 16 日)、99.6 \pm 1.8% (1 月 27 日) であり、BA の認証値：99.8% との差は最大で 1.1% であった。

C-6) Lab No. 6

共同試験は、11 月 7 日、11 月 24 日、12 月 13 日に行われた。Lab No. 6 のデフォルトの pw90 [μs]の値は 7.44 (1 日目)、7.8 (2 日目)、7.5 (3 日目) と日によって異なった。定期的にプローブの pw90 をキャリブレーションしているようである。共同試験のマニュアルに従うと、オペレータが入力する start90 [μs]、end90 [μs]及び step90 [μs]の値は、7.44 (1 日目) を基準として、それぞれ 0.82667 (7.44/9)、37.30000 (7.44 \times 5 + 0.1) 及び 3.30667 (7.44 \times 4/9) である。pw 連続測定のアレイデータを確認したところ、1 日目と 2 日目は、pw0.82667~37.12667 の範囲を間隔 3.30 で変化させていた。しかし、3 日目においては pw0.82667~22.82667 の範囲を間隔 2.00 で変化させており、マニュアルで推奨した条件とは大きく異なっていた。オペレータがスクリプトに入力する値を誤ったことが原因として挙げられた。しかし、3 日間ともアレイデータの描く減衰正弦波は綺麗にカーブフィッティングされていたため、pw90 は正しく校正されたと判断した (図 8)。

3 日間における校正した pw90 [μs]の値は、約 7.4~7.6 であり、デフォルトの 7.44~7.8 と近い値であった。Q 値は 11 月 7 日~12 月 13 日の約 1 ヶ月間にわたって安定しており、RSD は 1.1% であった (表 7)。

Lab No. 6 が算出した BA の絶対純度は、98.0

\pm 0.5% (11 月 7 日)、98.0 \pm 1.9% (11 月 24 日)、98.6 \pm 0.6% (12 月 13 日) であり、BA の認証値：99.8% との差は最大で 1.8% であった。

なお、Lab No. 6 が解析したスペクトルを確認したところ、自動積分範囲が広いためか、別のプロトンピークの裾も純度計算に含まれている印象を覚えた。そこで、研究代表者が積分範囲を狭めて解析したところ、BA の絶対純度は、99.0 \pm 0.9% (11 月 7 日)、99.3 \pm 2.1% (11 月 24 日)、99.3 \pm 0.7% (12 月 13 日) であり、BA の認証値：99.8% との差は最大で 0.8% であった。Q 値のバラつきはほぼ変わりなく、1 ヶ月間にわたっての RSD は 1.2% であった。

C-7) BA 純度のバラつきについて

ここまで共同試験の結果を参加機関毎に考察した。どの機関も誤差 2% 以内という実用的な精度で BA の純度を算出していた。このことから、EC-qNMR の測定手順及び測定パラメータは十分に最適化されたといえる。図 1 のデータを改めて確認すると、他の機関と比べて Lab No.5.2 と 6 が算出した BA 純度のバラつきが大きかった。この原因について考察したい。

EC-qNMR では pw90 校正の前に T&M によるプローブの最適化を行う。すなわち、EC-qNMR の結果は、T&M によるプローブの調整結果に依存する。T&M では照射信号を試料に与え、その反射値が 0 になるように調整する。ECZ 及び ECZL 分光計では、T&M の際の反射値をモニタリングできるようになっている。そこで、本共同試験では、ブランク試料 (溶媒：DMSO-*d*₆) を用いて、T&M を 5 回実施し、その際の反射値を記録し、報告することとした (図 1, 下)。なお、Lab No. 1 及び 2 が使用した分光計は ECA であるため、T&M の際の反射値を記録することができないため、データはのせていない。Lab No. 3, 4 及び 5.1 では、ほとんどの場合、反射値は 30 以下におさまっていた。Lab No. 4 の 2 日目においては、30 を超える反射値であるが、40 付近で落ちついていた。一方で、Lab No. 5.2 及び 6 については、全ての日において、反射値の値はバラついていた。このことから、Lab No.

5.2 及び 6 では、T&M をするたびにプローブの状態が変わっていると考えられ、その結果、BA の測定結果がバラついたりと考えられた。このような場合、本共同試験のように測定回数を増やし、その平均値を採用することで、真値に近い値が得られると考えられる。

D. 結論

EC-qNMR 共同試験を実施した。測定試料は BA (認証値：99.8% mass fraction) と DMSO₂ (認証値：99.9% mass fraction) であり、それぞれ分析種と EC として用いた。昨年度までに最適化させた EC-qNMR の測定手順、測定パラメータに従って共同試験を実施したところ、全ての機関において、誤差 2% 以内に収まる良好な結果であった。このことから、EC-qNMR の測定手順、測定パラメータは十分に最適化できたといえる。一部の機関では結果のバラつきが他の機関と比べて大きく、その原因として T&M の調整にバラつきがあると考えられた。このような場合は、測定回数を増やし、その平均値を採用することで、真値に近い値が得られる。

本共同試験で得られた結果を関連する団体に情報提供し、継続して研究・普及啓発の活動を続けていく予定である。また、本共同試験の結果をもとに、EC-qNMR の標準化について検討し、EC-qNMR の社会実装を具体的に進めたいと考えている。

E. 参考文献

- 1) Nishizaki Y, Lankin D.C, Chen SN, Pauli G.F: Accurate and precise external calibration enhances the versatility of quantitative NMR (qNMR). *Anal. Chem.*, 93(5), 2733–2741 (2021).
- 2) 西崎雄三: 外部標準法定量 NMR (EC-qNMR) のすすめ. *ぶんせき*, 2022 12 月;12, 498–503.
- 3) Kurimoto T, Asakura K, Yamasaki C, Nemoto N: MUSASHI: NMR pulse width determination method by nonlinear least square curve fitting. *Chem. Lett.*, 34(4), 540–541

(2005).

F. 研究業績

1. 学会発表等

- 1) 西崎雄三, 建部千絵, 石附京子, 増本直子, 吉田久美, 杉本直樹, 佐藤恭子, 外部標準法定量 NMR (EC-qNMR) によるアントシアニンの純度測定, 日本食品化学会 第 28 回総会・学術大会, 2022 年 5 月 19 日
- 2) 西崎雄三, 石附京子, 吉村弘伸, 松熊伸也, 朝倉克夫, 末松孝子, 杉本直樹: Q 値を指標にした外部標準法定量 NMR (EC-qNMR) の測定自動化とその定量精度について. 第 61 回 NMR 討論会(2022.11.8) (高知市)
- 3) 都築明日香, 西崎雄三, 増本直子, 鈴木俊宏, 兎川忠晴, 杉本直樹: 外部標準法定量 NMR (EC-qNMR): 試料間でレシーバーゲインが異なるときの補正について. 第 4 回日本定量 NMR 研究会年会 (2022.12.16) (東京)

2. 論文発表等

- 1) 西崎雄三: qNMR に基づく相対モル感度を利用したクロマトグラフィーによる定量分析. *日本食品衛生学雑誌*, 2022 6 月;63(3), J51–J53.
- 2) 西崎雄三: 外部標準法定量 NMR (EC-qNMR) のすすめ. *ぶんせき*, 2022 12 月;12, 498–503.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

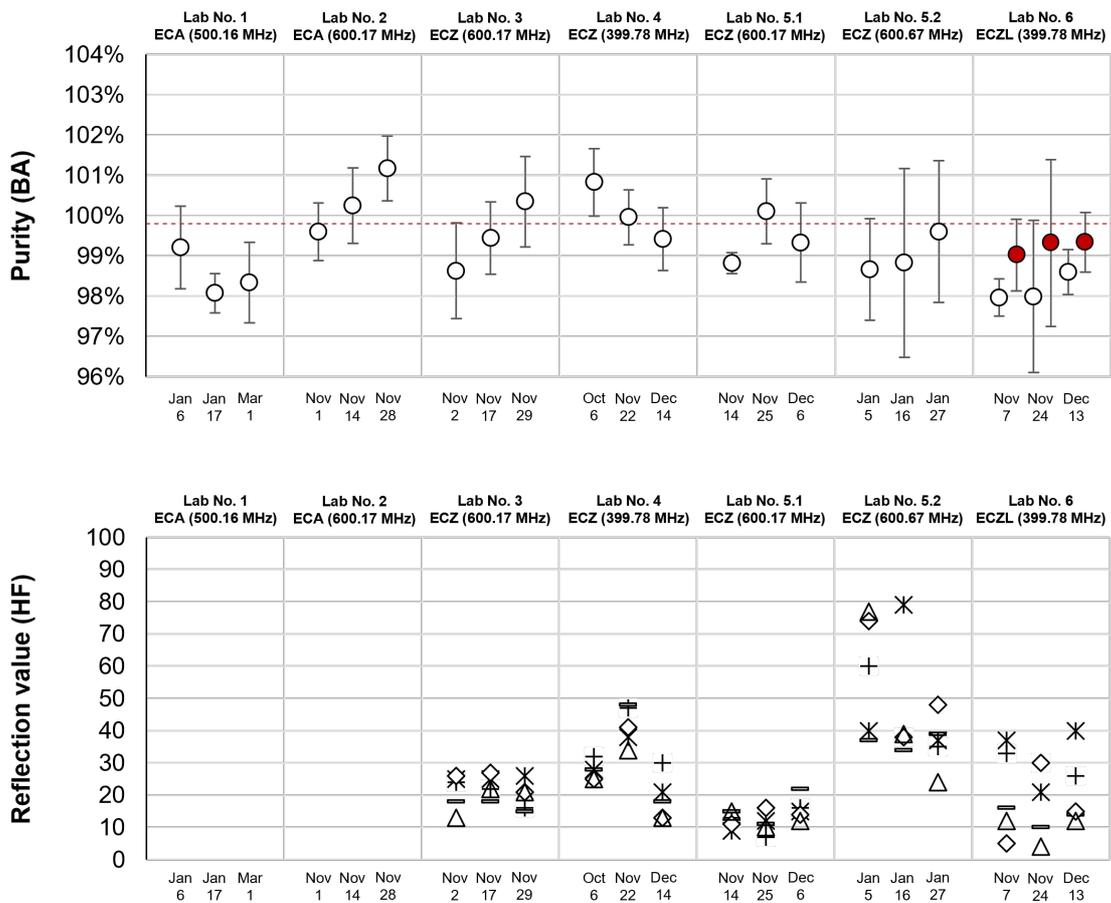


図1 EC-qNMR 共同試験の結果

上はBAの絶対純度。BAの認証値：99.8%に赤い点線を示した。Lab No. 6の赤いプロットは、著者が積分範囲を修正して算出したBAの純度である。下は、EC-qNMR測定前にブランク試料(DMSO- d_6)を用いてT&Mを5回行った際の反射値。

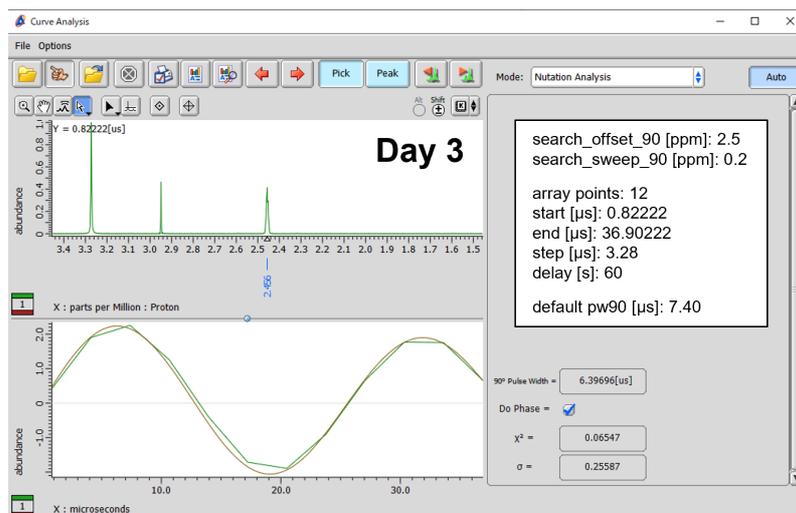
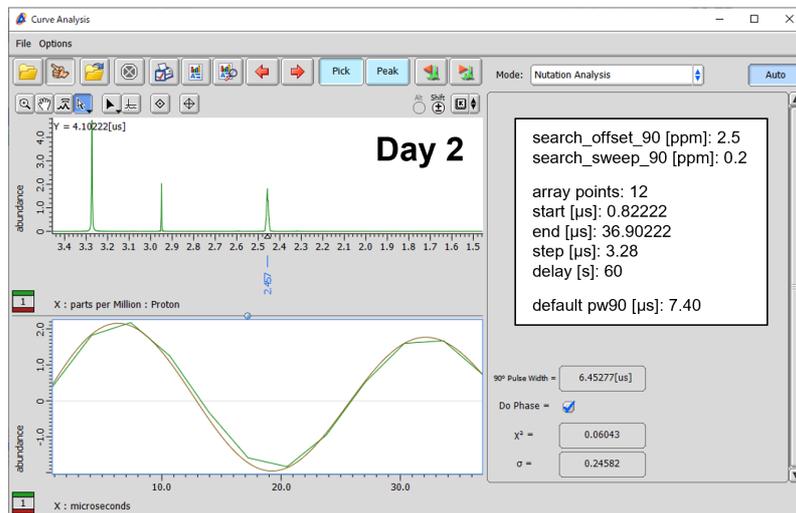
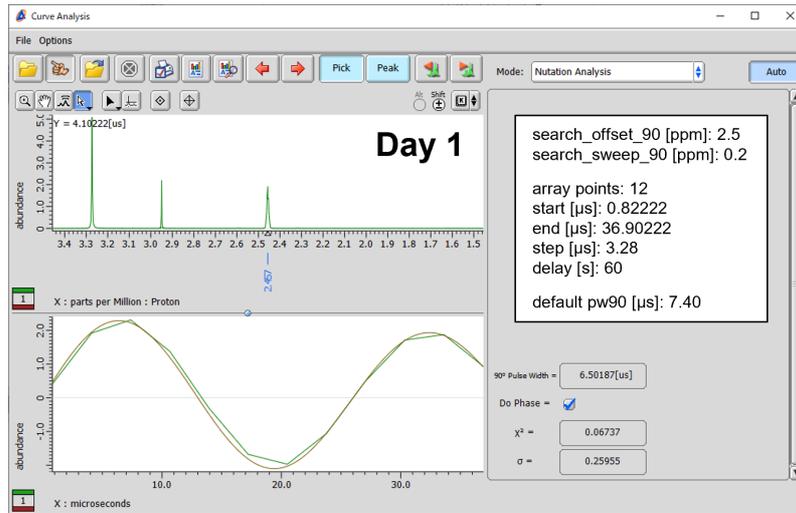


図2 Lab No. 1 の pw 連続測定から得られるアレイデータ。縦軸は溶媒ピークの強度，横軸は変化させた pw。

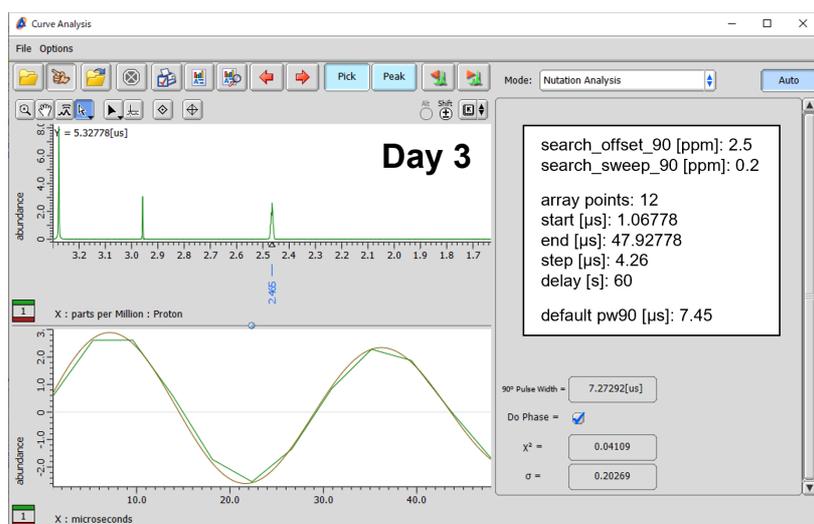
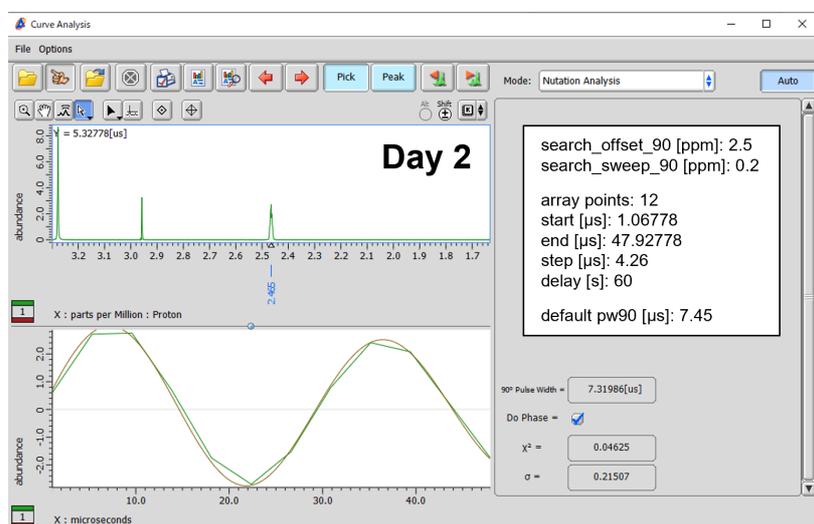
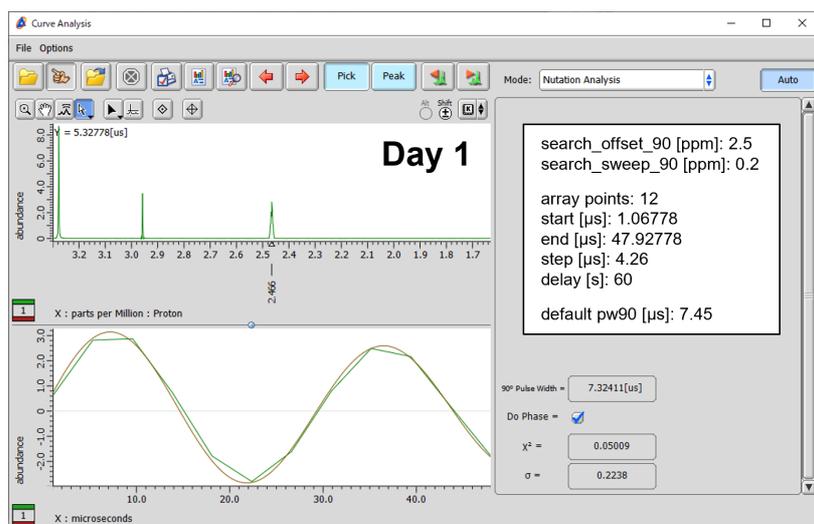


図3 Lab No. 2 の pw 連続測定から得られるアレイデータ。縦軸は溶媒ピークの強度，横軸は変化させた pw。

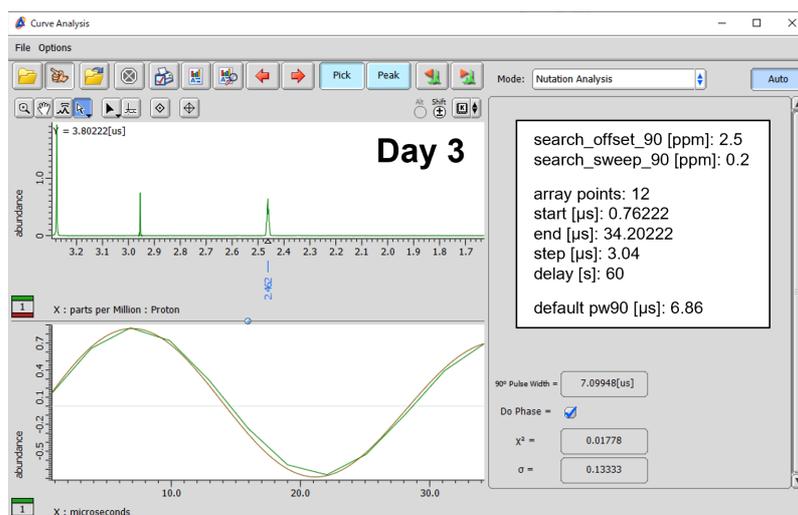
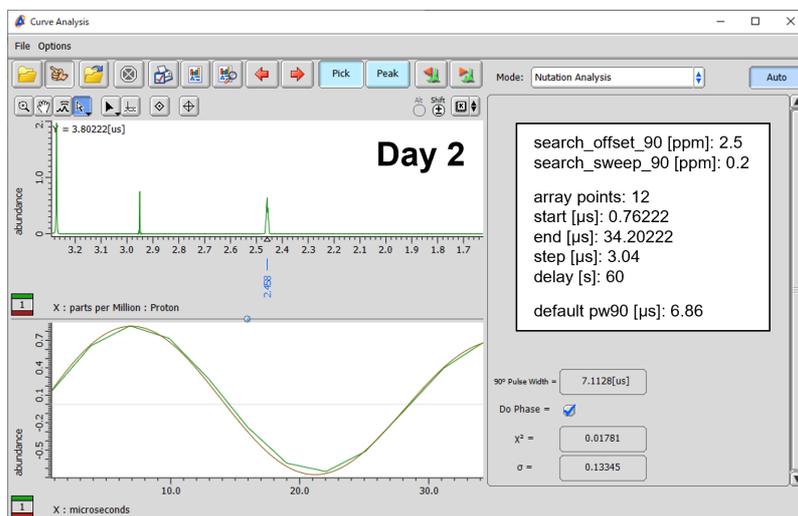
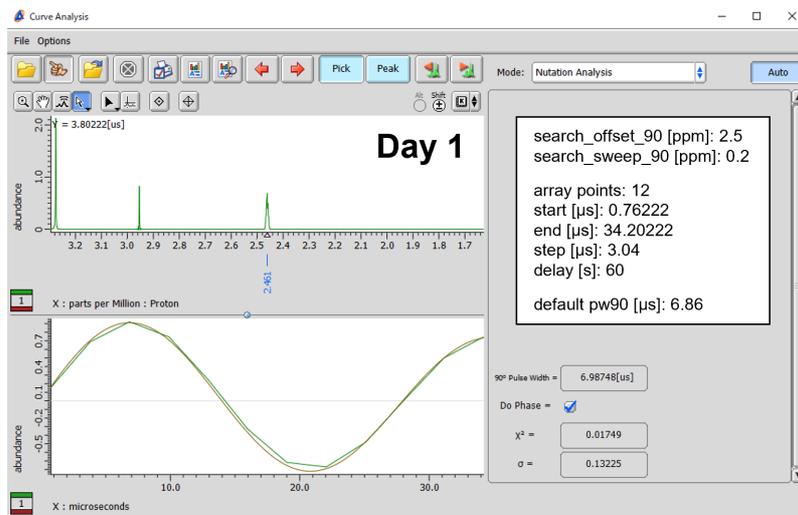


図4 Lab No. 3 の pw 連続測定から得られるアレイデータ。縦軸は溶媒ピークの強度，横軸は変化させた pw。

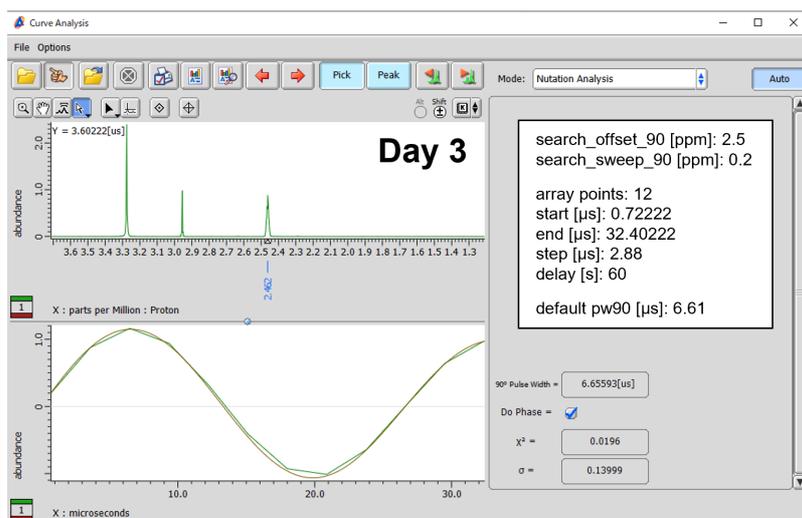
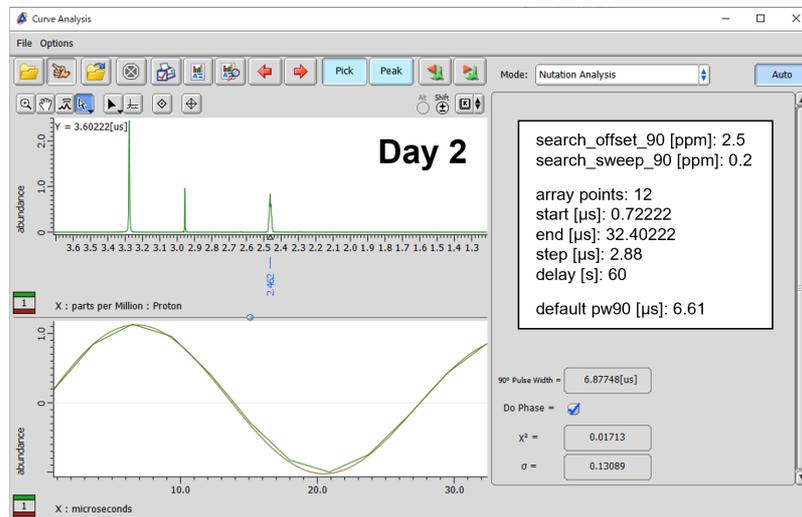
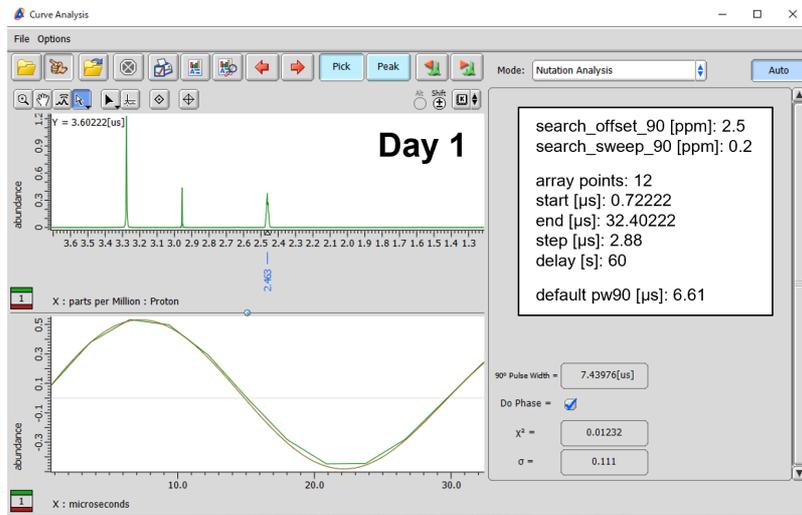


図5 Lab No. 4 の pw 連続測定から得られるアレイデータ。縦軸は溶媒ピークの強度，横軸は変化させた pw。

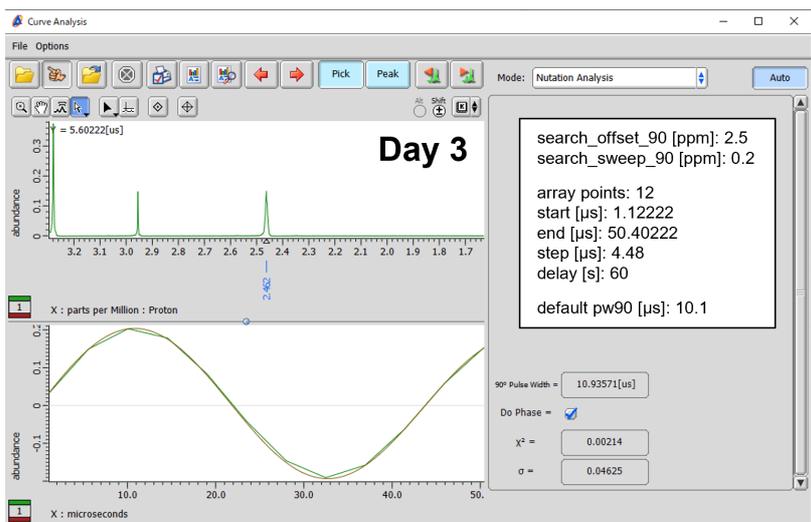
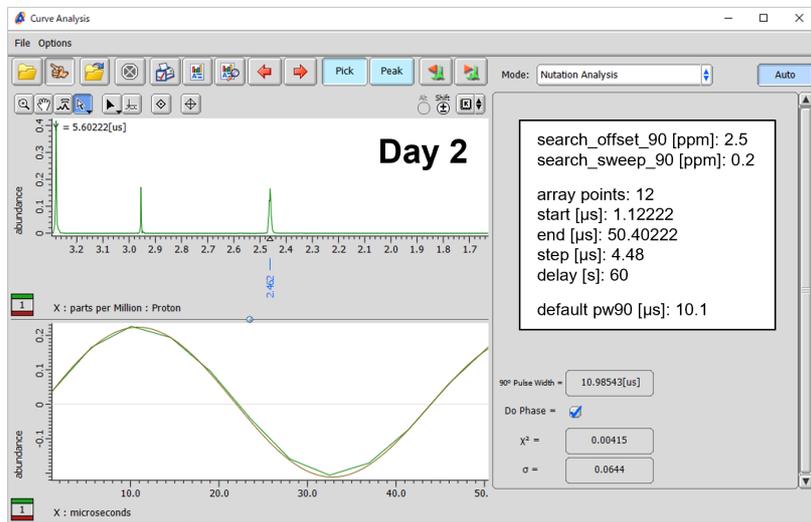
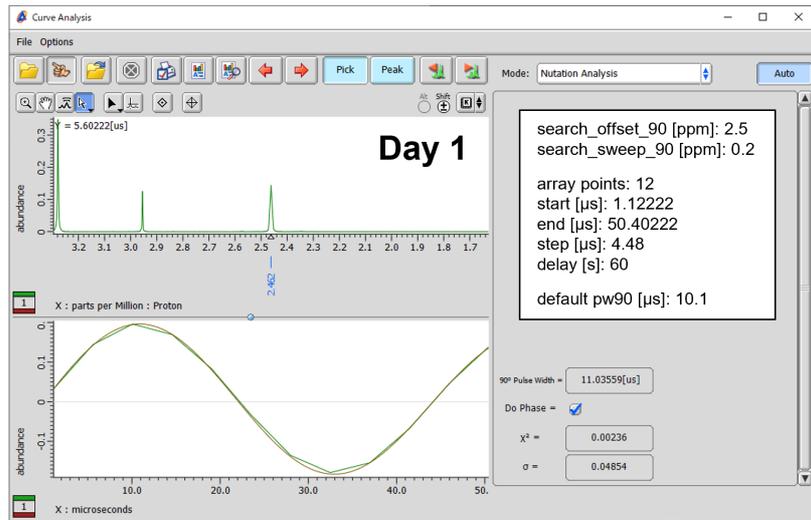


図6 Lab No. 5.1 の pw 連続測定から得られるアレイデータ。縦軸は溶媒ピークの強度，横軸は変化させた pw。

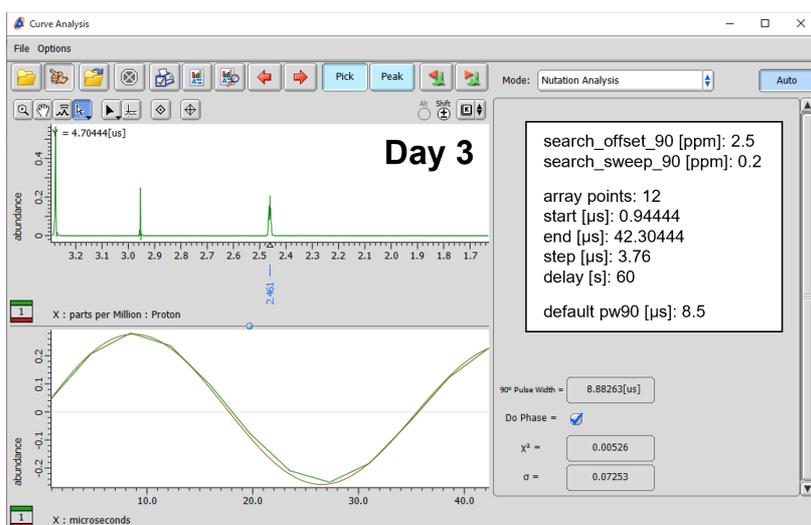
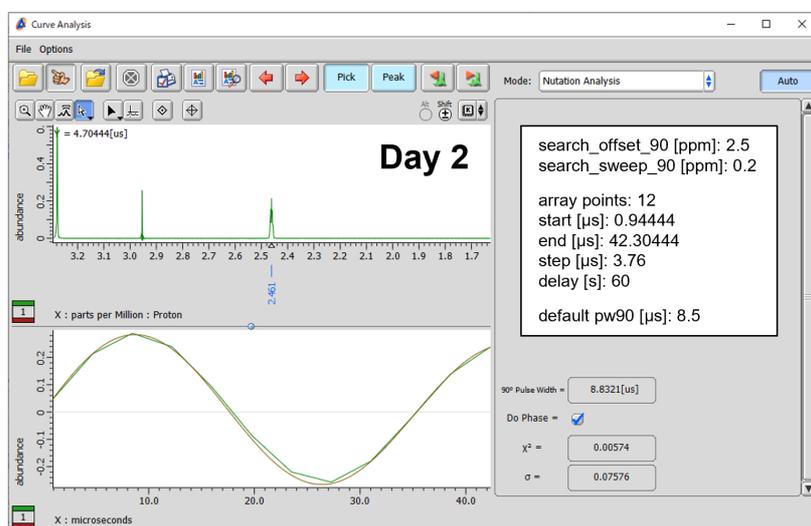
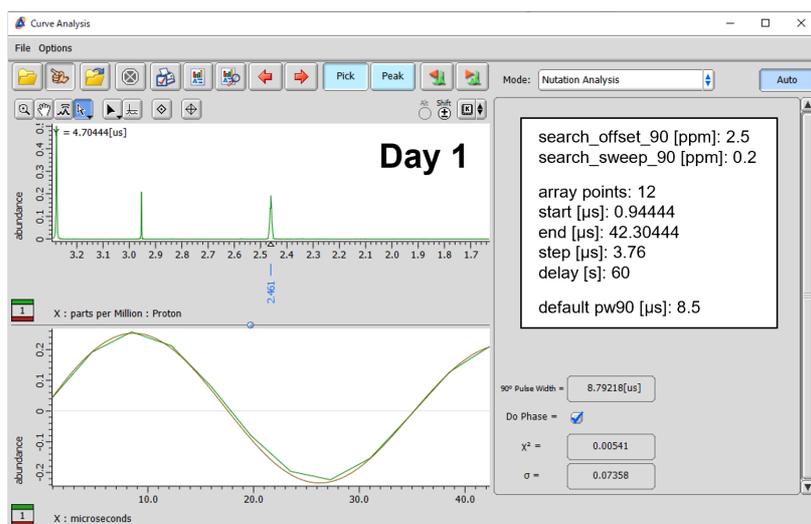


図7 Lab No. 5.2 の pw 連続測定から得られるアレイデータ。縦軸は溶媒ピークの強度，横軸は変化させた pw。

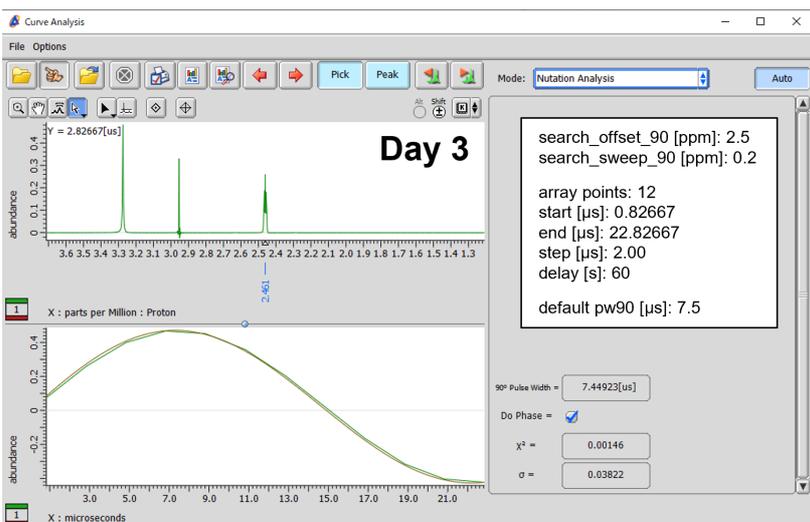
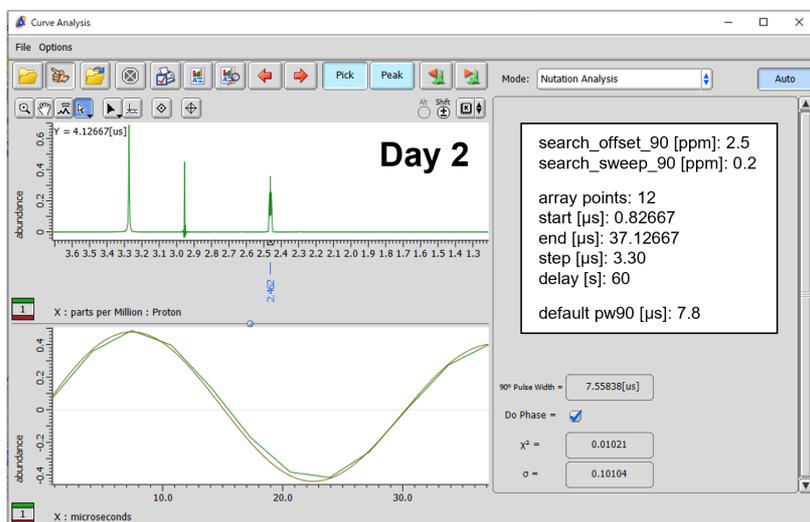
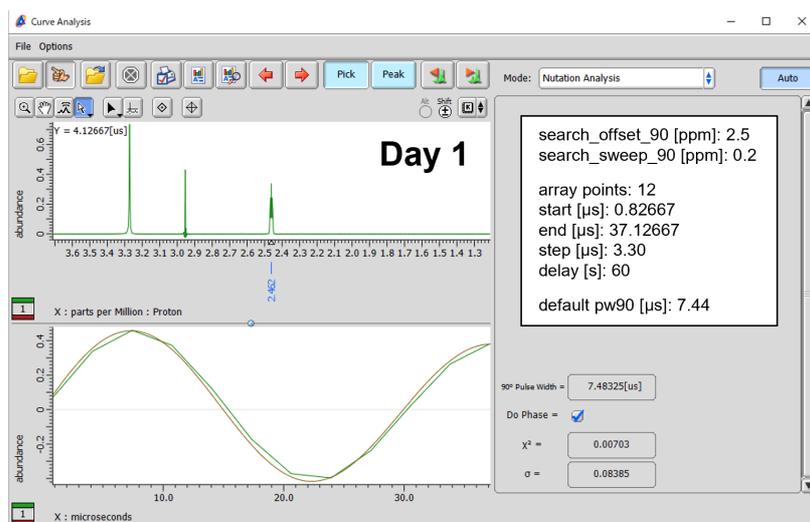


図8 Lab No. 6 の pw 連続測定から得られるアレイデータ。縦軸は溶媒ピークの強度，横軸は変化させた pw。

表 1. Lab No. 1 の Q 値

		RG	絶対濃度 [mmol/L]	pw90 [μsec]	ピーク面 積	Q 値	Q 値 AVE	Q 値 RSD (%)	Q 値全体 RSD (%)
2023/1/6	n1	36	5.2631	6.5019	12.9019	2.6564	2.6217	2.2%	
	n2	36	5.2631	6.3730	12.6610	2.5552			
	n3	36	5.2631	6.4640	12.7624	2.6124			
	n4	36	5.2631	6.4468	12.6664	2.5859			
	n5	36	5.2631	6.5632	12.9847	2.6987			
2023/1/17	n1	36	5.2631	6.4528	12.4733	2.5488	2.5909	1.7%	1.8%
	n2	36	5.2631	6.4706	12.6282	2.5876			
	n3	36	5.2631	6.4529	12.7063	2.5965			
	n4	36	5.2631	6.4794	12.9668	2.6606			
	n5	36	5.2631	6.4260	12.5843	2.5608			
2023/3/1	n1	36	5.2631	6.3970	12.5995	2.5523	2.6109	1.6%	
	n2	36	5.2631	6.4795	12.7302	2.6120			
	n3	36	5.2631	6.4670	12.7373	2.6085			
	n4	36	5.2631	6.4658	12.7372	2.6080			
	n5	36	5.2631	6.4231	13.1446	2.6736			

表 2. Lab No. 2 の Q 値

	RG	絶対濃度 [mmol/L]	pw90 [μsec]	ピーク面 積	Q 値	Q 値 AVE	Q 値 RSD (%)	Q 値全体 RSD (%)	
2022/11/1	n1	38	5.2631	7.3241	15.5545	3.6076			
	n2	38	5.2631	7.2940	15.3060	3.5354			
	n3	38	5.2631	7.3182	15.3589	3.5594	3.5844	1.1%	
	n4	38	5.2631	7.3231	15.6564	3.6307			
	n5	38	5.2631	7.3502	15.4189	3.5889			
2022/11/14	n1	38	5.2631	7.3198	15.3440	3.5567			
	n2	38	5.2631	7.2919	15.2658	3.5251			
	n3	38	5.2631	7.2985	15.3866	3.5562	3.5431	0.6%	1.4%
	n4	38	5.2631	7.2463	15.5112	3.5594			
	n5	38	5.2631	7.2468	15.3312	3.5183			
2022/11/28	n1	38	5.2631	7.2729	15.1568	3.4908			
	n2	38	5.2631	7.2831	14.9793	3.4547			
	n3	38	5.2631	7.2523	15.4630	3.5512	3.4925	1.0%	
	n4	38	5.2631	7.2833	15.1231	3.4880			
	n5	38	5.2631	7.2454	15.1582	3.4779			

表 3. Lab No. 3 の Q 値

	RG	絶対濃度 [mmol/L]	pw90 [μsec]	ピーク面 積	Q 値	Q 値 AVE	Q 値 RSD (%)	Q 値全体 RSD (%)
2022/11/2	n1	50	5.2631	6.9875	4.7319	1.0470		
	n2	50	5.2631	7.0179	4.6357	1.0302		
	n3	50	5.2631	6.9541	4.7060	1.0363	1.0393	0.6%
	n4	50	5.2631	7.0081	4.6854	1.0398		
	n5	50	5.2631	7.0663	4.6605	1.0429		
2022/11/17	n1	50	5.2631	7.1128	4.5560	1.0262		
	n2	50	5.2631	7.0916	4.5658	1.0254		
	n3	50	5.2631	7.1037	4.5969	1.0341	1.0361	1.4%
	n4	50	5.2631	6.9785	4.8020	1.0612		1.0%
	n5	50	5.2631	7.0132	4.6541	1.0336		
2022/11/29	n1	50	5.2631	7.0995	4.5918	1.0323		
	n2	50	5.2631	7.0466	4.6655	1.0411		
	n3	50	5.2631	7.1056	4.5675	1.0277	1.0310	0.6%
	n4	50	5.2631	7.1179	4.5703	1.0302		
	n5	50	5.2631	7.1877	4.4973	1.0236		

表 4. Lab No. 4 の Q 値

	RG	絶対濃度 [mmol/L]	pw90 [μsec]	ピーク面 積	Q 値	Q 値 AVE	Q 値 RSD (%)	Q 値全体 RSD (%)
2022/10/6	n1	50	5.2631	7.4398	2.9530	0.6957		
	n2	50	5.2631	7.3605	3.0400	0.7086		
	n3	50	5.2631	7.3743	2.9870	0.6975	0.6969	1.1%
	n4	50	5.2631	7.2950	2.9750	0.6873		
	n5	50	5.2631	7.3103	3.0030	0.6952		
2022/11/22	n1	56	5.2631	6.8770	6.3690	1.3870		
	n2	56	5.2631	6.8711	6.2366	1.3570		
	n3	56	5.2631	6.8831	6.3285	1.3794	1.3732	0.8%
	n4	56	5.2631	6.9045	6.2744	1.3719		29.2%
	n5	56	5.2631	6.8506	6.3189	1.3708		
2022/12/14	n1	56	5.2631	6.6559	6.7049	1.4132		
	n2	56	5.2631	6.6499	6.6896	1.4087		
	n3	56	5.2631	6.6576	6.6504	1.4021	1.4084	0.3%
	n4	56	5.2631	6.6598	6.6980	1.4126		
	n5	56	5.2631	6.6591	6.6644	1.4054		

表 5. Lab No. 5.1 の Q 値

		RG	絶対濃度 [mmol/L]	pw90 [μsec]	ピーク面 積	Q 値	Q 値 AVE	Q 値 RSD (%)	Q 値全体 RSD (%)
2022/11/14	n1	30	5.2631	11.0356	1.5881	0.5550			
	n2	30	5.2631	10.9601	1.5936	0.5531			
	n3	30	5.2631	11.0621	1.5882	0.5564	0.5544	0.3%	
	n4	30	5.2631	11.1564	1.5632	0.5523			
	n5	30	5.2631	10.9917	1.5960	0.5555			
2022/11/25	n1	30	5.2631	10.9854	1.5892	0.5528			
	n2	30	5.2631	10.9823	1.5750	0.5478			
	n3	30	5.2631	10.9709	1.5778	0.5482	0.5474	0.7%	0.9%
	n4	30	5.2631	10.9136	1.5698	0.5425			
	n5	30	5.2631	10.9782	1.5704	0.5459			
2022/12/6	n1	30	5.2631	10.9357	1.5897	0.5505			
	n2	30	5.2631	10.9309	1.5811	0.5473			
	n3	30	5.2631	10.7525	1.5842	0.5394	0.5450	0.8%	
	n4	30	5.2631	10.8859	1.5763	0.5434			
	n5	30	5.2631	10.7654	1.5966	0.5443			

表 6. Lab No. 5.2 の Q 値

	RG	絶対濃度 [mmol/L]	pw90 [μsec]	ピーク面 積	Q 値	Q 値 AVE	Q 値 RSD (%)	Q 値全体 RSD (%)
2023/1/5	n1	30	5.2631	8.7922	1.5690	0.4368		
	n2	30	5.2631	8.8124	1.5298	0.4269		
	n3	30	5.2631	8.8895	1.4889	0.4191	0.4268	1.8%
	n4	30	5.2631	8.6447	1.5749	0.4311		
	n5	30	5.2631	8.8255	1.5021	0.4198		
2023/1/16	n1	30	5.2631	8.8321	1.5083	0.4218		
	n2	30	5.2631	8.9152	1.4990	0.4232		
	n3	30	5.2631	8.9119	1.5226	0.4297	0.4233	0.9%
	n4	30	5.2631	8.9163	1.4844	0.4191		1.5%
	n5	30	5.2631	8.9597	1.4893	0.4225		
2023/1/27	n1	30	5.2631	8.8826	1.4848	0.4177		
	n2	30	5.2631	8.9744	1.5087	0.4288		
	n3	30	5.2631	8.9605	1.4823	0.4206	0.4197	1.6%
	n4	30	5.2631	9.0710	1.4673	0.4215		
	n5	30	5.2631	9.1953	1.4079	0.4100		

表 7. Lab No. 6 の Q 値

	RG	絶対濃度 [mmol/L]	pw90 [μsec]	ピーク面 積	Q 値	Q 値 AVE	Q 値 RSD (%)	Q 値全体 RSD (%)
2022/11/7	n1	46	5.2631	7.4832	2.1950	0.5202		
	n2	46	5.2631	7.6031	2.2485	0.5414		
	n3	46	5.2631	7.5695	2.2008	0.5275	0.5281	1.5%
	n4	46	5.2631	7.5662	2.1983	0.5267		
	n5	46	5.2631	7.5428	2.1958	0.5245		
2022/11/24	n1	46	5.2631	7.5584	2.2606	0.5411		
	n2	46	5.2631	7.5820	2.1814	0.5238		
	n3	46	5.2631	7.5444	2.2146	0.5291	0.5310	1.2%
	n4	46	5.2631	7.5518	2.2113	0.5288		1.1%
	n5	46	5.2631	7.5377	2.2300	0.5323		
2022/12/13	n1	46	5.2631	7.4498	2.2665	0.5347		
	n2	46	5.2631	7.4371	2.2692	0.5344		
	n3	46	5.2631	7.3890	2.2572	0.5282	0.5333	0.5%
	n4	46	5.2631	7.4546	2.2636	0.5344		
	n5	46	5.2631	7.4968	2.2530	0.5349		

別添 4

研究成果の刊行に関する一覧

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
西崎雄三	qNMRに基づく相対モル感度を利用したクロマトグラフィーによる定量分析	日本食品衛生学雑誌	63(3)	J51-J53	2022
西崎雄三	外部標準法定量NMR (E-C-qNMR) のすすめ	ぶんせき	12	498-503	2022

別添4

研究成果の刊行に関する一覧

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
西崎雄三	qNMRに基づく相対モル感度を利用したクロマトグラフィーによる定量分析	日本食品衛生学雑誌	63(3)	J51-J53	2022
西崎雄三	外部標準法定量NMR (EC-qNMR) のすすめ	ぶんせき	12	498-503	2022

別紙

第一回

自動測定スクリプトを用いた EC-qNMR 共同試験

－マニュアル－

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

研究課題名：食品分析の信頼性確保に資する外部標準法定量 NMR（EC-qNMR）の高度化
及び標準化に関する研究

課題番号：21KA3008

研究代表者名：所属機関 国立医薬品食品衛生研究所
氏 名 西崎 雄三

内容

1	目的	1
2	実施時期	1
3	試料及び自動測定スクリプトの配布	1
4	試料について	1
4-1	試料の保管	1
4-2	試薬及び NMR 測定溶媒	1
4-3	試料調製方法	2
5	自動測定スクリプトについて	2
6	NMR 装置の条件	2
7	測定結果の提出方法	2
8	EC-qNMR 測定におけるサンプル定義及び Job ファイルの作成方法	3
8-1	サンプル定義の設定	3
8-2	Job ファイルの作成	3
9	EC-qNMR 測定条件	9
10	共同試験の手順	13
10-1	試料の準備	13
10-2	サンプル定義の設定及び Job ファイルの作成	13
10-3	Tuning&Matching (T&M) の再現性の確認 (ECZ 分光計使用者が対象)	13
10-4	EC-qNMR 測定	18
11	EC-qNMR 測定データの取得方法	20
12	EC-qNMR 測定データの解析方法	21
付属 1	相反定理を利用した EC-qNMR の測定原理	25
付属 2	試料調製方法	26
付属 3	EC-qNMR スクリプトのセットアップ	27
1	ホストコンピュータへのスクリプトファイルのコピー	27
2	ホストコンピュータへの experiment ファイルのコピー	28
3	分光計へのプロセスリストのアップロード	29
付属 4	Delta を Advanced モードに変更する方法	32
付属 5	測定 Method に Utilities を表示させる方法	33
付属 6	測定 Method に qNMR(NIHZ)ECZ (ローカル) を表示させる方法	34
付属 7	溶媒ピークの化学シフト及びレシーバーゲイン (RG) の確認方法	35
付属 8	scout_scan 測定データの分光計内部処理方法	38
付属 9	pw 連続測定データの分光計内部処理方法	39

第一回 自動測定スクリプトを用いた EC-qNMR 共同試験

1 目的

核種プロトン (^1H) を測定対象核とする外部標準法定量 NMR (EC-qNMR: External Calibration qNMR) の共同試験を実施する。複数の試験機関に同一の試料及び EC-qNMR 自動測定スクリプトを配布して測定を行い、化学物質の純度又は濃度を求める際の真度、精度、繰返し性、再現性などを検証し、EC-qNMR の高精度化及び標準化を進める。なお、EC-qNMR には内径の異なる 2 種類の試料管から構成される同軸二重試料管を用いた方法、擬似的な FID 信号を挿入する方法が提案されているが、本共同試験では相反定理を利用した EC-qNMR に限定して検証を行う。相反定理を利用した EC-qNMR の測定原理は、[付属 1](#)を参照すること。

2 実施時期

実施時期は次の通りとする。

- | | |
|-------------------------------------|---------------------------|
| 1) 自動測定スクリプトのセットアップ | 2022 年 9 月 1 日～ 9 月 30 日 |
| 2) 試料の配布 | 2022 年 9 月 12 日～ 9 月 30 日 |
| 3) 共同試験の実施 | 2022 年 10 月 1 日～12 月 25 日 |
| 4) 参加機関の測定値の共有 | 2023 年 3 月 31 日 |
| 5) 研究報告書の共有 <small>注 1) ~3)</small> | 2023 年 4 月 30 日 |

注 1) 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性確保推進事業）「食品分析の信頼性確保に資する外部標準法定量 NMR (EC-qNMR) の高度化及び標準化に関する研究」の研究報告書としてまとめる。

注 2) 共同試験参加者は研究報告書の研究協力者となる（任意）。

注 3) 第 5 回日本定量 NMR 研究会年会にて詳細を発表予定。

3 試料及び自動測定スクリプトの配布

試験に使用する試料は産総研で調製し、NMR 試料管に封管した状態で国立衛研に配布する。国立衛研は試料の均質性を評価した上で、参加機関に配布する。

自動測定スクリプトは電子メールで配布する。各自 CD 又は USB にコピーして、NMR のホストコンピュータにインストールする。

4 試料について

試料は、DMSO- d_6 に溶解させた以下のものを用いる。

- 1) blank (以下、blank)
- 2) 0.50 mg/mL ジメチルスルホン (以下、EC)
- 3) 2.0 mg/mL 安息香酸 (以下、BA)

4-1 試料の保管

試料は遮光して、冷蔵 (8°C 以下) で保管する。

4-2 試薬及び NMR 測定溶媒

ジメチルスルホン (Cat No. 048-33271)、安息香酸 (Cat No. 028-19011)、DMSO- d_6 (Cat No. 048-34251) 及び 5 mm-NMR 試料管 (Cat No. 291-48353) は富士フイルム和光純薬製のものを使用した。

4-3 試料調製方法

試料調製方法は[付属 2](#)を参照。

5 自動測定スクリプトについて

スクリプトは以下のスクリプトファイル (.jaf)、プロセスリスト (.list)、experiment ファイル (.jxp) の 1)~12) から構成される。3)~6) は NMR 分光計に合わせて選択する。NMR 分光計へのセットアップは[付属 3](#)を参照。

- | | | |
|---|---|-----------------|
| 1) Gradient_Shim_Solvent.jaf | } | スクリプトファイル |
| 2) Environment.jaf | | |
| 3) qNMR(NIHS).jaf (ECZ 用と ECA 用がある) | | |
| 4) scout_scan_qnmr.list (ECZ 用と ECA 用がある) | } | プロセスリスト |
| 5) 1h90_qnmr.list (ECZ 用と ECA 用がある) | | |
| 6) loren_gauss.list (ECZ 用と ECA 用がある) | | |
| 7) single_pulse.jxp | } | experiment ファイル |
| 8) single_pulse_at.jxp | | |
| 9) obs_90_check_qnmr.jxp | | |
| 10) single_pulse_dec.jxp | | |
| 11) single_pulse_dec_at.jxp | | |
| 12) double_pulse.jxp | | |

本スクリプトは 1) scout_scan 測定、2) pw 連続測定及び 3) qNMR 測定の 3 つの測定を自動化する。それぞれの測定の概要は以下の通りである。

- 1) scout_scan 測定：パルス幅 (pw) 連続測定における照射中心ピークを選択するための測定
- 2) pw 連続測定：90°パルス幅 (pw90) を校正するための測定
- 3) qNMR 測定：校正した pw90 を反映した qNMR 測定

6 NMR 装置の条件

本共同試験を行うにあたり、NMR 装置に以下の制約を設ける。

- 日本電子製の核種プロトン (^1H) 共鳴周波数 400 MHz 以上の装置であること。
- ECZ 型又は ECA 型の分光計であること。ECZ 型が望ましい。
- プローブは 5 mmφ の溶液プローブかつ温度制御可能であること。
- オートサンプラー及びオート Tuning 及び Matching (T&M) 機能が搭載されていること。
- T&M は HF コイル (^1H 核) 及び LF コイル (^{13}C) を調整できること。
- ^1H 観測時に ^{13}C デカップリングが可能であること。

7 測定結果の提出方法

測定で得られたオリジナルデータ (FID)、データ処理後の qNMR 測定データ及び Excel ファイルは、全てファイル転送サービスを用いて提出する。ファイル転送サービスの案内は 10 月以降に周知する。

8 EC-qNMR 測定におけるサンプル定義及び Job ファイルの作成方法

相反定理に従った EC-qNMR 測定は図 1 に示す手順で実施する。特に⑨T&M は⑩scout_scan 測定の直前に実施すること。図 1 に示す測定手順を踏襲するためのサンプル定義の設定及び Job ファイルの作成手順を、それぞれ [8-1](#) 及び [8-2](#) に示す。これらの設定は Delta“Advanced モード”で行うこと。Advanced モードの設定は[付属 4](#)を参照。

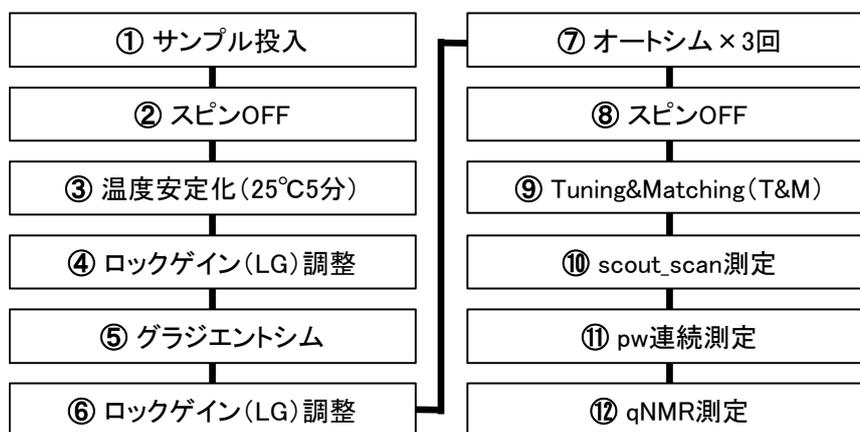


図 1 : EC-qNMR 測定手順

②～⑥はサンプル定義、⑦～⑫は Job ファイルで制御する。

8-1 サンプル定義の設定

図 1 に示した測定手順のうち、②～⑥はサンプル定義で制御する。サンプル定義の設定は表 1 及び図 2 に示す。

8-2 Job ファイルの作成

図 1 に示した測定手順のうち、⑦～⑫は Job ファイルで制御する。Job ファイルの設定は図 3 及び図 4 に示す。図 3 は blank 用の Job ファイル (ECZ 利用者のみ)、図 4 は EC 及び BA 用の Job ファイルとなる。

表 1 : サンプル定義パラメータの設定根拠		
パラメータ	設定値	根拠
gradient shim	<input checked="" type="checkbox"/>	グラジエントシムを行うため。
lock_state	AUTOLOCK	NMR ロックをかけるため。
preparation	<input checked="" type="checkbox"/>	初期値のままとする。
spin_set	15[Hz]	初期値のままとする。次のパラメータ「spin_state」: SPIN OFF に設定するため、15[Hz]で回転することはない。無効のパラメータである。
spin_state	SPIN OFF	NMR 試料管投入から測定終了まで SPIN OFF の状態を保つため。
temp_set	25[dC]	測定温度を 25°Cの一定にするため。
temp_state	TEMP ON	パラメータ「temp_set」を有効にするため。
temp_delay	300[s]	NMR 試料管投入後、プローブ内を 25°C5 分間で安定化させるため。
lock_achieve_point	1500	NMR ロックの初期値を通常よりも高めの値 : 1500 に設定する。測定中に NMR ロックが外れることを防ぐため。

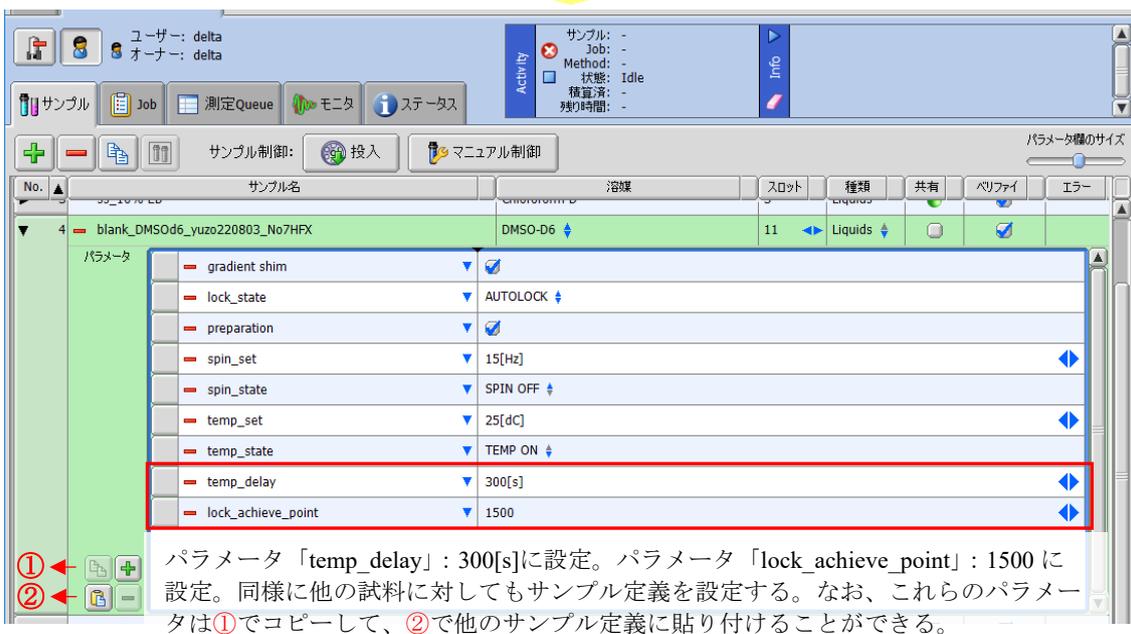


図 2 : サンプル定義の設定

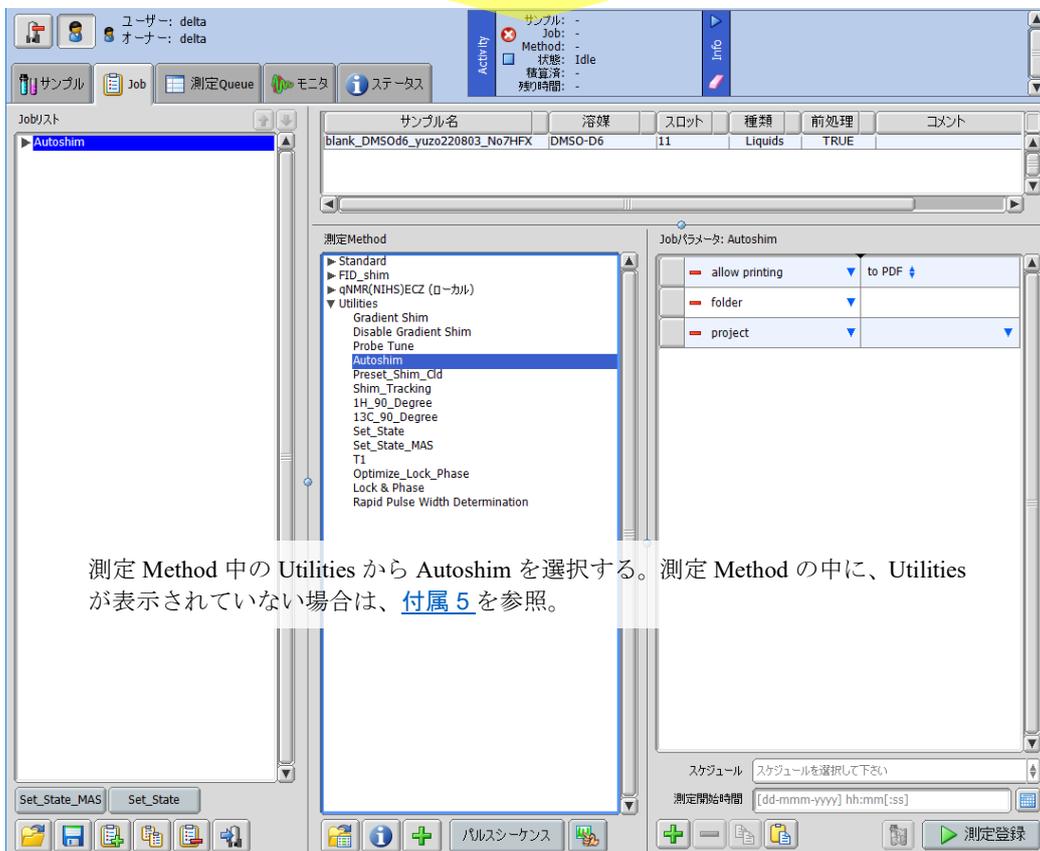
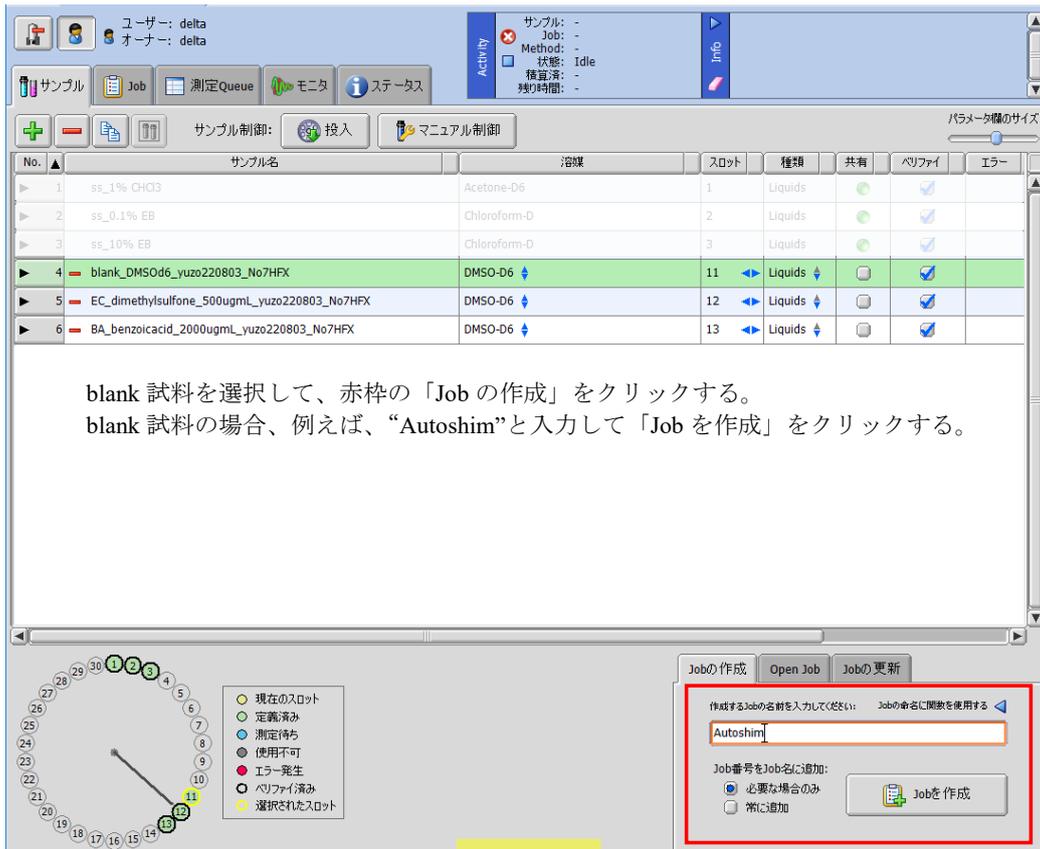
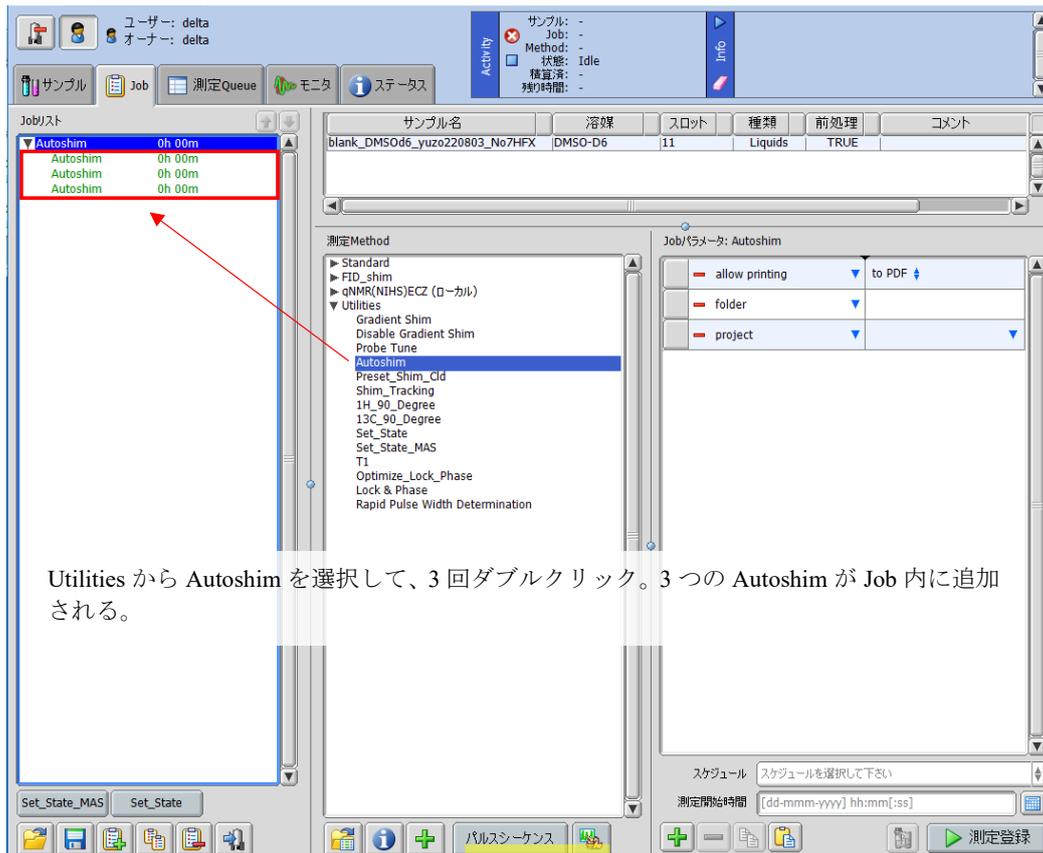
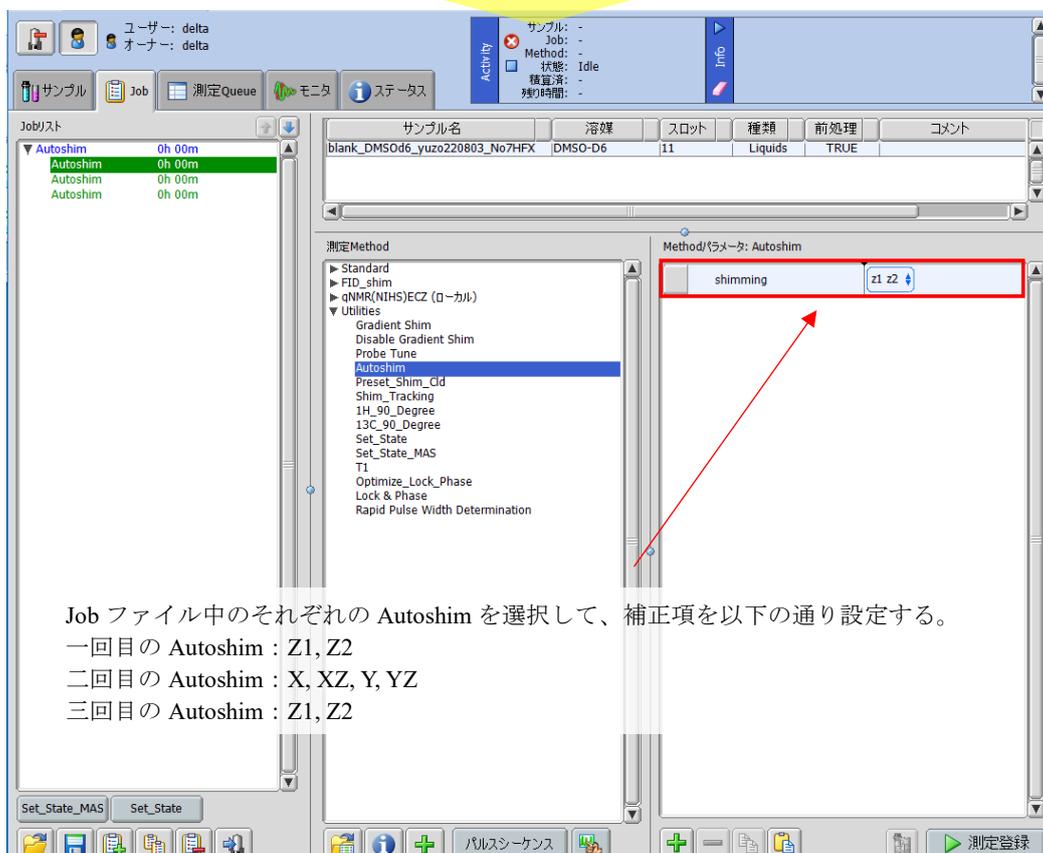


図 3 (1/2) : Blank 用の Job ファイルの設定 (ECZ 利用者のみ)



Utilities から Autoshim を選択して、3 回ダブルクリック。3 つの Autoshim が Job 内に追加される。



Job ファイル中のそれぞれの Autoshim を選択して、補正項を以下の通り設定する。

- 一回目の Autoshim : Z1, Z2
- 二回目の Autoshim : X, XZ, Y, YZ
- 三回目の Autoshim : Z1, Z2

図 3 (2/2) : Blank 用の Job ファイルの設定 (ECZ 利用者のみ)

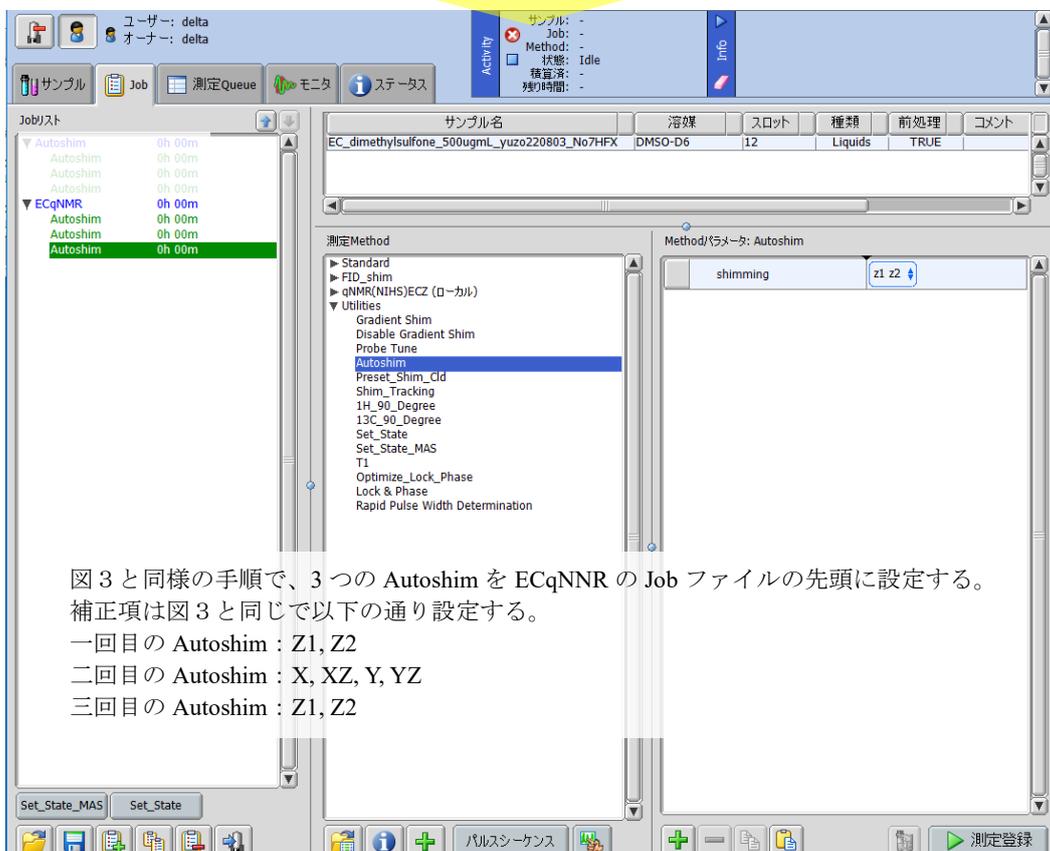
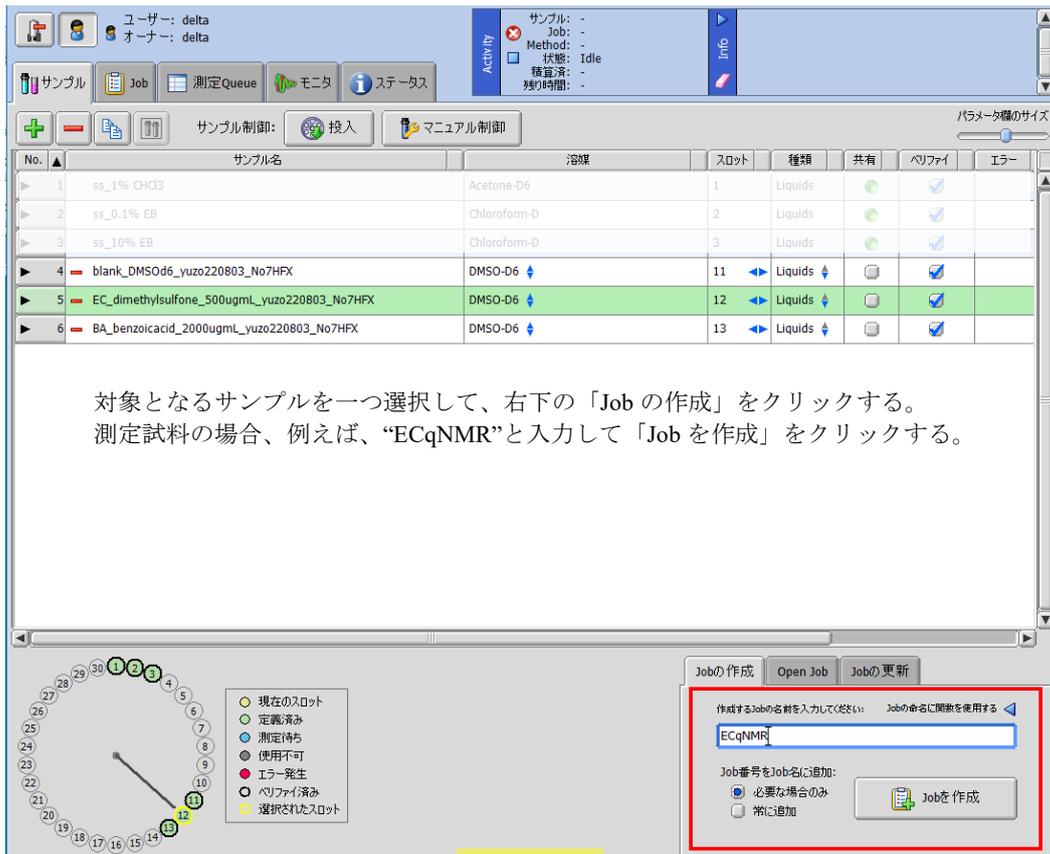


図4 (1/2) : EC 及び BA 用の Job ファイルの設定

qNMR(NH2)ECZ (ローカル) から「2. Proton qNMR (Acq Time)」を選択してダブルクリック。先の Autoshim の次に「2. Proton qNMR (Acq Time)」が追加される。本共同試験では「2. Proton qNMR (Acq Time)」の前に必ず Autoshim を加えること。Autoshim が入っていない場合、T&M がグラジエントシムの直前に実施される。測定 Method の中に、qNMR(NH2)ECZ (ローカル) が表示されていない場合は、[付属 6](#) を参照。

「2. Proton qNMR (Acq Time)」を選択すると、Method パラメータが表示される。この Method パラメータの設定は「[9 EC-qNMR 測定条件](#)」を参照すること。

図 4 (2/2) : EC 及び BA 用の Job ファイルの設定

9 EC-qNMR 測定条件

本共同試験は統一した測定条件を用いる。先に作成した「EC-qNMR」Job ファイル中の「2. Proton qNMR (Acq Time)」を選択して、Method パラメータを図 5 に示すように設定する。ただし、赤枠で囲んだ Method パラメータは装置ごとに異なるため、表 2 を参照して各自が最適化した条件を採用すること。

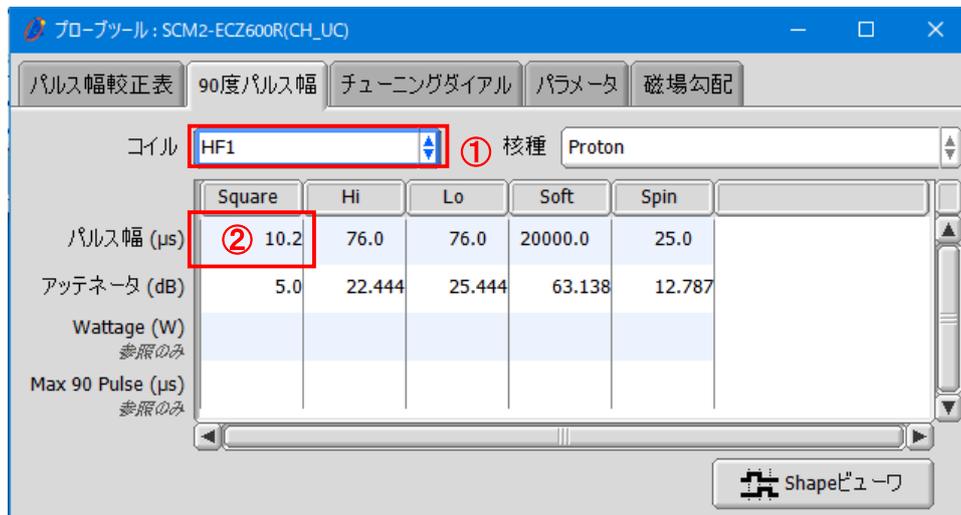
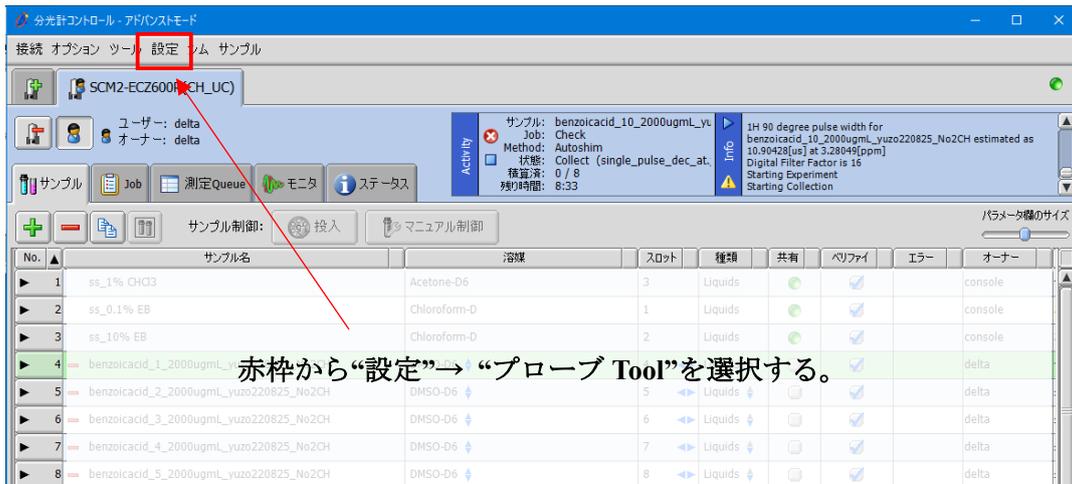
▶	return_data_to_screen	<input type="checkbox"/>
▶	filename_part2	RG30_scan8_delay60s
▶	calculate_proton_90	<input checked="" type="checkbox"/>
▶	search_offset_90	2.5[ppm]
▶	search_sweep_90	0.2[ppm]
	start90	0.92222222[us]
	end90	41.6[us]
	step90	3.68888889[us]
	calc90_relax_delay	60[s]
▶	force_tune	<input checked="" type="checkbox"/>
	autogain	<input type="checkbox"/>
	receiver_gain	30
▶	scans	8
▶	dummy_scans	2
▶	x_angle	90[deg]
▶	x_offset	5[ppm]
▶	x_sweep	15[ppm]
▶	x_acq_time	4.5[s]
▶	relaxation_delay	60[s]
▶	inv_gated_noe	<input type="checkbox"/>
▶	decoupling	<input checked="" type="checkbox"/>
▶	decoupler_offset	90[ppm]
▶	decoupler_modulation	MPF8
	spinner_frequency	15[Hz]
	spinner_state	SPIN OFF
▶	turn_off_spin	<input checked="" type="checkbox"/>
▶	scout_x_offset	
▶	scout_x_sweep	
▶	scout_x_acq_time	

図 5 : EC-qNMR 測定条件の設定画面

赤枠で囲んだ設定値は NMR 装置ごとに異なるため、表 2 を参照して設定すること。

Method パラメータ	設定値	根拠
return_data_to_screen	<input type="checkbox"/>	測定終了後は、①scout_scan データ・②pw 連続測定データ・③qNMR データをデータサーバから抽出し、ホストコンピュータ上にコピーする(「 11 EC-qNMR 測定データの取得方法 」を参照)。この Method パラメータに <input checked="" type="checkbox"/> を入れると、測定終了後に③qNMR データのみが自動でデスクトップ上に表示され、ホストコンピュータ上に保存される。わずらわしいので、 <input checked="" type="checkbox"/> を外すこと。
filename_part2	RG30_scan8_delay60s	データファイル管理のため、設定したレシーバゲイン (RG)・積算回数・遅延時間に基づいて filename_part2 を設定する。例えば、RG30・積算回数 8 回・遅延時間 60 秒の場合、「RG30_scan8_delay60s」とする。
calculate_proton_90	<input checked="" type="checkbox"/>	pw90 校正のための pw 連続測定を実施する。必ず <input checked="" type="checkbox"/> を入れること。
search_offset_90	2.5[ppm]	scout_scan スペクトルから、分光計が最も SN 比の良い ¹ H ピークを探す範囲を決めるパラメータ。ここで選択された ¹ H ピークは pw 連続測定の照射中心となる。本共同試験の測定溶媒は全て DMSO-d ₆ であるため、DMSO-d ₆ の溶媒ピークが選択されるように値を 2.5[ppm]に設定する。 付属 7 に従って、使用する NMR 装置で溶媒ピークが 2.5[ppm]付近に現れることを事前に確認しておくこと。
search_sweep_90	0.2[ppm]	search_offset_90 と関連するパラメータ。0.2[ppm]に設定する。この場合、scout_scan スペクトルの 2.4~2.6[ppm]の範囲内で分光計は最も S/N 比の良い ¹ H ピークを探す。 付属 7 に従って設定する。
start_90	pw10 に相当するパルス幅[us]	pw 連続測定において変化させる pw の条件。プローブに記録されている pw90 に対して、pw10 のフリップ角を入力する。例えば、プローブに記録されている pw90 が 8.3μsec の場合は、「8.3×10/90 → 0.9222222[us]」と設定する。プローブに記録されている pw90 の値は、 図 6 を参照すること。
end90	pw450 に相当するパルス幅 + 0.1[us]	pw 連続測定において変化させる pw の条件。プローブに記録されている pw90 に対して、pw450 のフリップ角を入力する。例えば、プローブに記録されている pw90 が 8.3μsec の場合は、「(8.3×450/90) + 0.1 → 41.6[us]」と設定する。
step90	pw40 に相当するパルス幅[us]	pw 連続測定において変化させる pw の条件。プローブに記録されている pw90 に対して、pw40 のフリップ角を入力する。例えば、プローブに記録されている pw90 が 8.3μsec の場合は、「8.3×40/90 → 3.68888889[us]」と設定する。

calc90_relax_delay	60[s]	pw 連続測定における遅延時間。この連続測定から得られるアレイデータが歪みの無い正弦波を描くために、照射中心の ^1H ピークに対して、十分な遅延時間を設ける必要がある。ほとんどの ^1H ピークは、遅延時間 60[s] で十分であるため、本共同試験は 60[s] に統一する。なお、設定の目安は $T_1 \times 2$ 倍以上が良い。DMSO- d_6 溶媒ピークの T_1 は約 15 秒である。
force_tune	<input checked="" type="checkbox"/>	NMR の相反定理を成立させるために、Tuning&Matching を行う。必ず <input checked="" type="checkbox"/> を入れること。
autogain	<input type="checkbox"/>	試料間でレシーバゲイン (RG) を統一するため、autogain の <input type="checkbox"/> は必ず外すことにする。
receiver_gain	装置ごとに確認	付属 7 に従って、事前に EC 及び BA をオートゲイン (AG) の定量条件下でそれぞれ 1 回測定する。低い AG 値から 6 差し引いた値をレシーバゲイン (RG) として設定する。
scans	8	qNMR 測定の積算回数。
dummy_scans	2	qNMR 測定のダミースキャン。
x_angle	90[deg]	qNMR 測定のパルス幅。pw90 を採用。pw 連続測定で校正された pw90 が適用される。
x_offset	5[ppm]	qNMR 測定の照射中心。
x_sweep	15[ppm]	qNMR 測定の観測幅。15 ppm で十分。
x_acq_time	4.5[s]	qNMR 測定の取込み時間 (AQ)。通常、4 秒が採用されるが、ジメチルスルホンの T_2 は長いので、気持ち長めの 4.5[s] に設定する。
relaxation_delay	60[s]	qNMR 測定の遅延時間。60[s] に統一。
inv_gated_noe	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> を入れると、遅延時間中も ^{13}C デカップリングが適用される。qNMR 測定中の温度変化を最小限とするため、またシム崩れを防ぐため、 <input type="checkbox"/> を外すこと。
decoupling	<input checked="" type="checkbox"/>	^1H ピーク面積を積分しやすくするため、 ^{13}C デカップリングを適用する。
decoupler_offset	90[ppm]	90 [ppm] とする。
decoupler_modulation	MPF8	MPF8 に統一する。
spinner_frequency	15[Hz]	サンプル定義で spin_state を SPIN OFF に設定しているため、無効のパラメータ。変更する必要は無い。
spinner_state	SPIN OFF	SPIN OFF で測定する。
turn_off_spin	<input checked="" type="checkbox"/>	サンプル定義で spin_state を SPIN OFF に設定しているため、無効のパラメータ。変更する必要は無い。



①コイル HF1 を選択する。②の値から pw90 を確認する。このプローブに記録されている pw90 は 10.2 μsec となる。

図 6 : プローブに記録されている pw90 の確認方法

10 共同試験の手順

本共同試験は 10 日以上の間隔を空けて、3 日間行う。1 日当たりの NMR 装置占有時間は、約 8~9 時間を見積もると良い。内訳は T&M の再現性確認に約 30 分、EC-qNMR 測定に 400 分である。EC-qNMR 測定は自動測定であるため、オペレータが装置の前に拘束される時間は、後述の「[10-3 T&M の再現性の確認](#)」に要する約 30 分である。

10-1 試料の準備

冷蔵庫から試料を取り出して、室温に戻す。NMR 試料管を 5 回以上転倒混和し、試料液を均一にする。

10-2 サンプル定義の設定及び Job ファイルの作成

「[8-1 サンプル定義の設定](#)」及び「[8-2 Job ファイルの作成](#)」に従う。

10-3 Tuning&Matching (T&M) の再現性の確認 (ECZ 分光計使用者が対象)

本共同試験では EC-qNMR を実施する前に、ECZ 分光計使用者を対象に、blank 試料を用いた NMR 装置の Tuning&Matching (T&M) の再現性を確認する。まず、blank 試料に対して「Job : Autoshim」を測定登録する。図 1 の①~⑧が実行される。「Job : Autoshim」が終了した後、マニュアル制御画面から Probe チューン画面を選択し、「¹³C&¹H チューニング」のボタンを押し、LF 側及び HF 側の反射値を記録する (1 回目)。次に試料を排出せずに、そのまま 15[Hz]まで一度回転させて、再びスピニングを OFF にし、シムグループ : Z1 Z2 の高速シムを行う。高速シム終了後、先と同様に Probe チューン画面から、「¹³C&¹H チューニング」を行い、LF 側及び HF 側の反射値を記録する (2 回目)。この操作を以下に示したように 5 回目まで繰り返し、指定の Excel ファイルに記入する (図 7)。所要時間は 30 分程度である。具体的な操作画面は図 8 に示す。

Blank 試料の準備→「Job : Autoshim」の実行→¹³C&¹H チューニング (1 回目)

→試料回転→スピニング OFF→高速シム (Z1 Z2) →¹³C&¹H チューニング (2 回目)

→試料回転→スピニング OFF→高速シム (Z1 Z2) →¹³C&¹H チューニング (3 回目)

→試料回転→スピニング OFF→高速シム (Z1 Z2) →¹³C&¹H チューニング (4 回目)

→試料回転→スピニング OFF→高速シム (Z1 Z2) →¹³C&¹H チューニング (5 回目)

また、装置の占有時間に余裕がある場合、ECqNMR 測定終了後にも T&M を 5 回行い、指定の Excel ファイルに記入する (図 7)。

ヘッダーの追加

測定データ記入欄_1日目											
測定順	測定日	絶対濃度 [mmol/L]	pw90 [μsec]	ピーク面積		Q値	AVE	RSD (%)	Tuning&Matching		
1	2022/mm/dd	5.263				0.000	0.000	#DIV/0!	試料	HF	LF
2						Blank_n1					
3						Blank_n2					
4						Blank_n3					
5						Blank_n4					
測定順	測定日	調整濃度 [mmol/L]	pw90 [μsec]	ピーク面積 (2H分)	ピーク面積 (3H分)	絶対純度	AVE	RSD (%)	Blank_n5		
1	2022/mm/dd	15.000				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	Blank_n6		
2						#DIV/0!			Blank_n7		
3						#DIV/0!			Blank_n8		
4						#DIV/0!			Blank_n9		
5						#DIV/0!			Blank_n10		

幹事検閲が入力 BAの調整濃度は入力エラーにならないように配布時には仮の値を入力します
 参加検閲が入力
 参加検閲が実施した場合は入力

EC-qNMR 測定の前に blank 試料を用いて T&M を行い、得られた反射値を記入する。

EC-qNMR 測定終了後に blank 試料を用いて T&M を行い、得られた反射値を記入する。

図 7 : T&M の LF 及び HF 反射値を記入する Excel シート

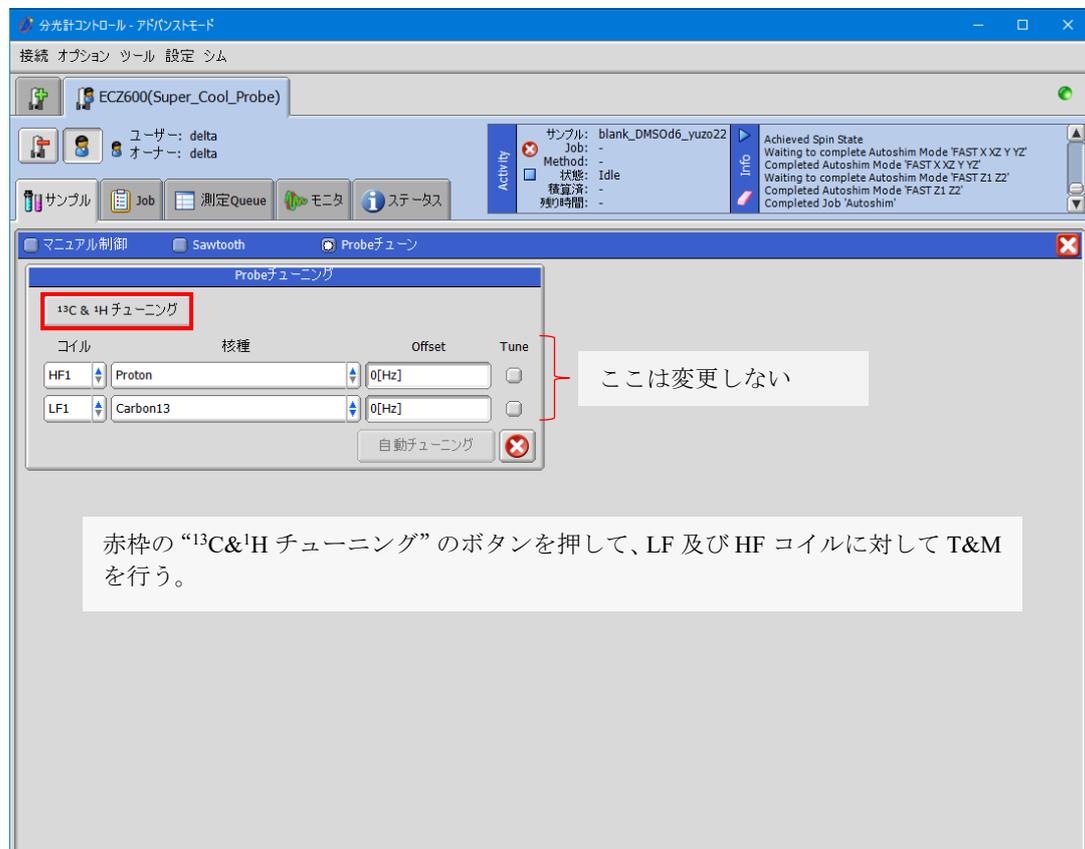
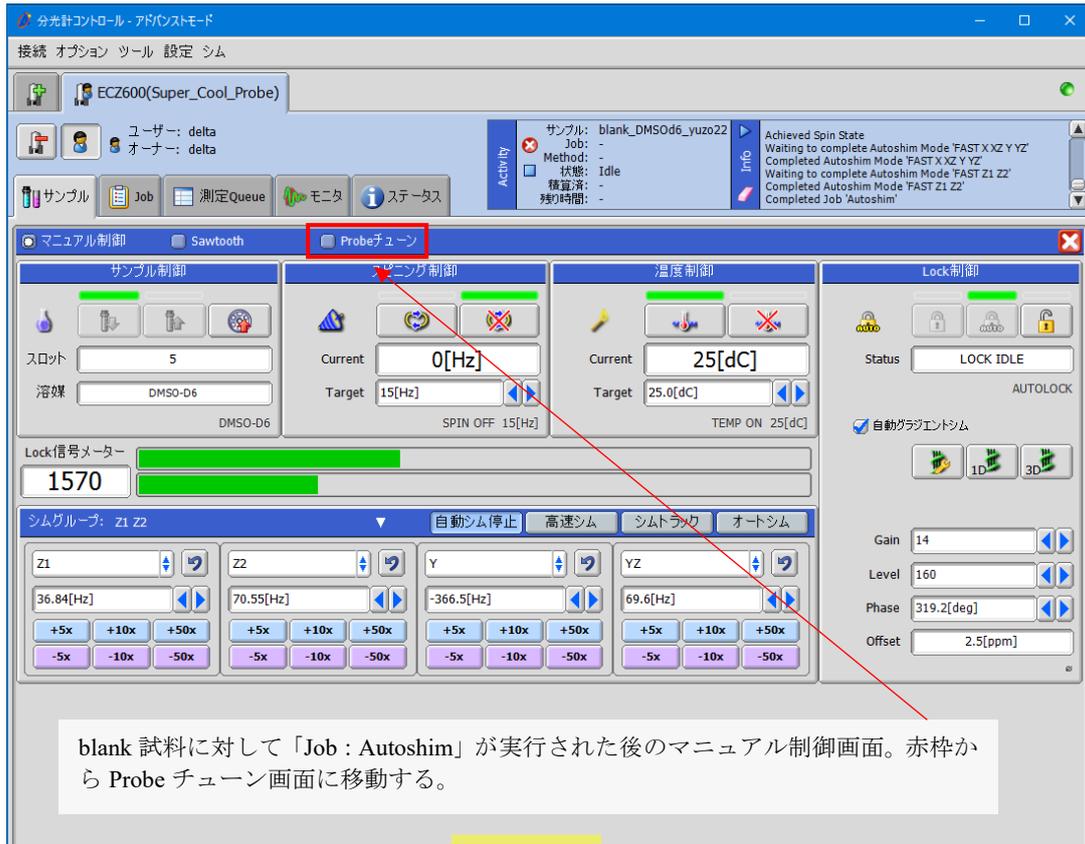
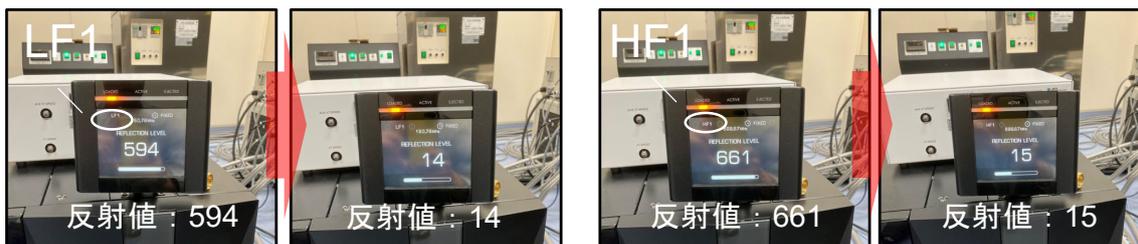


図 8 (1/3) : T&M の再現性の確認方法

LF側の反射値

HF側の反射値



はじめはLF (^{13}C) からT&Mがはじまる。画面が消える瞬間の反射値を記録する。画面停止はできないので見逃さないように！



分光計コントロール - アドバンスモード

接続 オプション ツール 設定 シム

ECZ600(Super_Cool_Probe)

ユーザー: delta
オーナー: delta

Activity: blank_DMSOd6_yuzo22
Job: -
Method: -
状態: Idle
種管理: -
残り時間: -

Info: Probe connector HF1 is being tuned to Proton
Tuning Autotune Probe for LF1(13C)
Tune Finished
Tuning Autotune Probe for HF1(1H)
Tune Finished
Exiting standalone probe tune mode

マニュアル制御 Sawtooth Probeチューン

サンプル制御: スロット 5, 溶媒 DMSO-D6

スピニング制御: Current 7[Hz], Target 15[Hz], SPIN ON 15[Hz]

温度制御: Current 25[dC], Target 25.0[dC], TEMP ON 25[dC]

Lock制御: Status LOCK IDLE, AUTOLOCK

Lock信号メーター: 1537

シムグループ: z1 z2

自動シム停止 高速シム シムトラック オートシム

Z1: 36.84[Hz], Z2: 70.55[Hz], Y: -366.5[Hz], YZ: 69.6[Hz]

Gain 14, Level 160, Phase 319.2[deg], Offset 2.5[ppm]

T&M 終了後の反射値を記録した後、赤枠のボタンを押して、試料を 15[Hz] まで一度回転させる。

図 8 (2/3) : T&M の再現性の確認方法

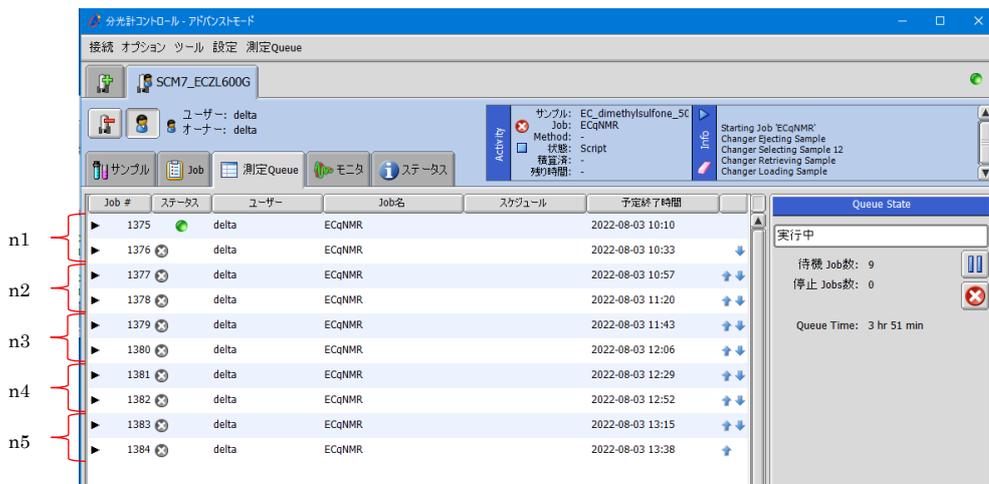
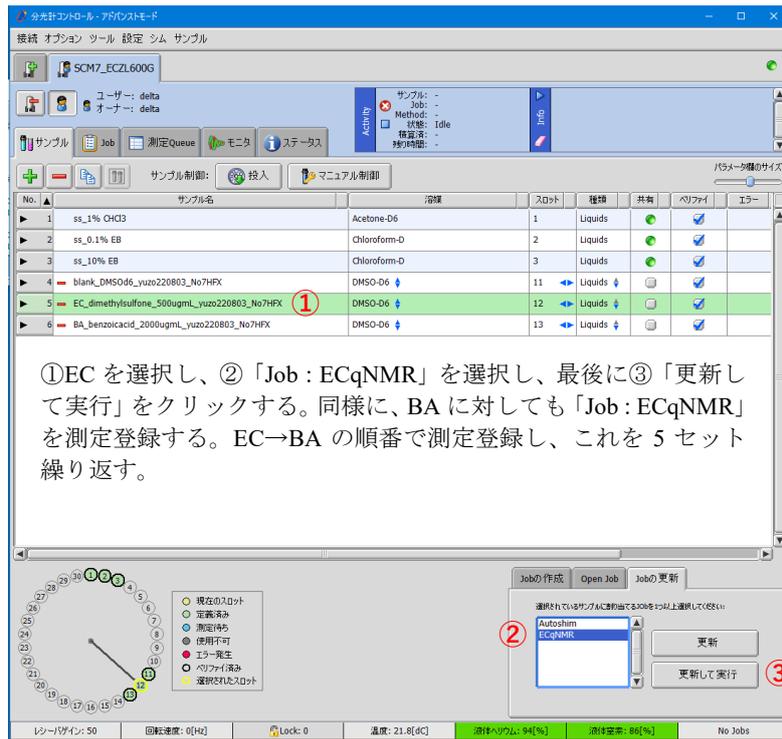
① 回転を止める
 ② シムグループ : Z1 Z2 を選択
 ③ 高速シムのボタンを押す

高速シムが終了した後、先と同様に Probe チューン画面に移動して、 ^{13}C & ^1H チューニングを実行する。以降はこの操作を繰り返して、5 回分の T&M を実行して、それぞれの T&M における LF 側及び HF 側の反射値を記録する。

図 8 (3/3) : T&M の再現性の確認方法

10-4 EC-qNMR 測定

EC 及び BA の計 2 試料に対して「Job : ECqNMR」を測定登録する。「Job : ECqNMR」のサンプル投入から測定終了までの所要時間は 1 試料当たり約 40 分である。1 試料毎に測定登録し、登録する順番は、EC (n1) →BA (n1) →EC (n2) →BA (n2) →EC (n3) →BA (n3) →EC (n4) →BA (n4) →EC (n5) →BA (n5) とする。この時の測定 Queue 画面は図 9 の通りとなる。また、「Job : ECqNMR」が実行されると、分光計コントロール画面の Info 欄には図 10 に示すメッセージが表示される。自身の NMR 装置で、サンプル定義が正しく設定されているか、また自動測定スクリプトが正しく動作しているか、1 度確認すること。



この測定 Queue 画面には、温度安定化時間 (25°C5 分) やグラジエントシム、Autoshim に要する時間は含まれない。1 回の「Job : ECqNMR」に要する時間は約 40 分を見積もると良い。

図 9 : 「Job : ECqNMR」の測定登録

The screenshot shows the Bruker console software interface. The 'Info' window is open, displaying a log of the EC-qNMR execution process. The log is divided into two columns. The left column contains the following text:

```

Starting Job 'ECqNMR'
Changer Ejecting Sample
Changer Selecting Sample 1
Changer Retrieving Sample
Changer Loading Sample
Changer Loaded Sample
Waiting to achieve Spin State 'SPIN OFF'
Achieved Spin State
Waiting Temp Delay 300[s]
Temp Delay wait finished
Shimming...
Waiting to reach Lock State 'AUTOLOCK'
Reached Lock State 'AUTOLOCK'
Increasing Lock Gain to reach Lock Achieve Point of 1500
Lock Gain was increased to 31
Reached Lock Achieve Point
Finding On-Resonance and/or Receiver Gain
Digital Filter Factor is 16
Starting Experiment
Starting Collection
Building Output File : 16 kB
Sending file to data server
Post-experiment Default Initialization
Calculating On-Resonance frequency
X_Offset set to 231.22303[Hz]
Initializing Experiments...
Pass 1 : Collecting data
Digital Filter Factor is 16
Starting Experiment
Starting Collection
Building Output File : 8 kB
Sending file to data server
Post-experiment Default Initialization
Pass 2 : Collecting data
Digital Filter Factor is 16
Starting Experiment
Starting Collection
Building Output File : 8 kB
Sending file to data server
Post-experiment Default Initialization
Shimming complete
Waiting to reach Lock State 'AUTOLOCK'
Reached Lock State 'AUTOLOCK'
Increasing Lock Gain to reach Lock Achieve Point of 1500
Lock Gain was increased to 17
Reached Lock Achieve Point
Waiting to complete Autoshim Mode 'FAST Z1 Z2'
Completed Autoshim Mode 'FAST Z1 Z2'
Waiting to achieve Spin State 'SPIN OFF'
Achieved Spin State
Waiting to complete Autoshim Mode 'FAST X XZ Y YZ'
Completed Autoshim Mode 'FAST X XZ Y YZ'
Waiting to complete Autoshim Mode 'FAST Z1 Z2'
Completed Autoshim Mode 'FAST Z1 Z2'

```

The right column contains the following text:

```

Waiting to achieve Spin State 'SPIN OFF'
Achieved Spin State
Waiting to achieve Spin State 'SPIN OFF'
Achieved Spin State
Waiting to achieve Spin State 'SPIN OFF'
Achieved Spin State
Waiting to achieve Spin State 'SPIN OFF'
Achieved Spin State
Probe connector LF1 is being tuned to Carbon13
Probe connector HF1 is being tuned to Proton
Tuning Autotune Probe for LF1(13C)
Tune Finished
Tuning Autotune Probe for HF1(1H)
Tune Finished
Waiting to reach Lock State 'AUTOLOCK'
Reached Lock State 'AUTOLOCK'
Reached Lock Achieve Point
Scouting Receiver Gain...
Digital Filter Factor is 16
Starting Experiment
Starting Collection
Building Output File : 792 kB
Sending file to data server
Post-experiment Default Initialization
1H 90 degree Pulse Width Calibration starts 60[s] later...
nutation_points = 12
29-JUN-2022 16:53:39 : STATUS : 1H 90 calibration on
EC1_dimethylsulfone_1000ugmL_yuzo220630_No2UC -
Start at 0.92222[us] with 3.68889[us] step, for 12 points
x_offset is set to 2.46115[ppm]
Digital Filter Factor is 16
Starting Experiment
Starting Collection
Building Output File : 192 kB
Sending file to data server
Post-experiment Default Initialization
1H 90 degree pulse width for
EC1_dimethylsulfone_1000ugmL_yuzo220630_No2UC
estimated as 8.96949[us] at 2.46115[ppm]
Digital Filter Factor is 16
Starting Experiment
Starting Collection
Building Output File : 792 kB
Sending file to data server
Post-experiment Default Initialization
Waiting to achieve Spin State 'SPIN OFF'
Achieved Spin State
Completed Job 'ECqNMR'

```

Annotations 1 through 12 are placed throughout the log to indicate specific steps in the process. A legend at the bottom right explains these steps:

① サンプル投入 → ② スピンOFF → ③ 温度安定化
→ ④ LG調整 → ⑤ Gradinet shim → ⑥ LG調整 →
⑦ オートシム → ⑧ スピンOFF → ⑨ T&M → ⑩
scout_scan測定 → ⑪ pw連続測定 → ⑫ qNMR測定

図 10 : EC-qNMR 実行時に Info 欄に表示されるログ

11 EC-qNMR 測定データの取得方法

EC-qNMR 測定データは 1) scout_scan 測定、2) pw 連続測定及び 3) qNMR 測定の 3 つの測定からなる。それぞれの測定データは分光計の Data Servers に保管されている。これら 3 つの測定データを開き、ホストコンピュータ上にコピーする。これら 3 つのオリジナルデータは、ファイル転送サービスを利用して提出するが、共同試験が終了するまでは各自でも保管しておくこと（図 11）。

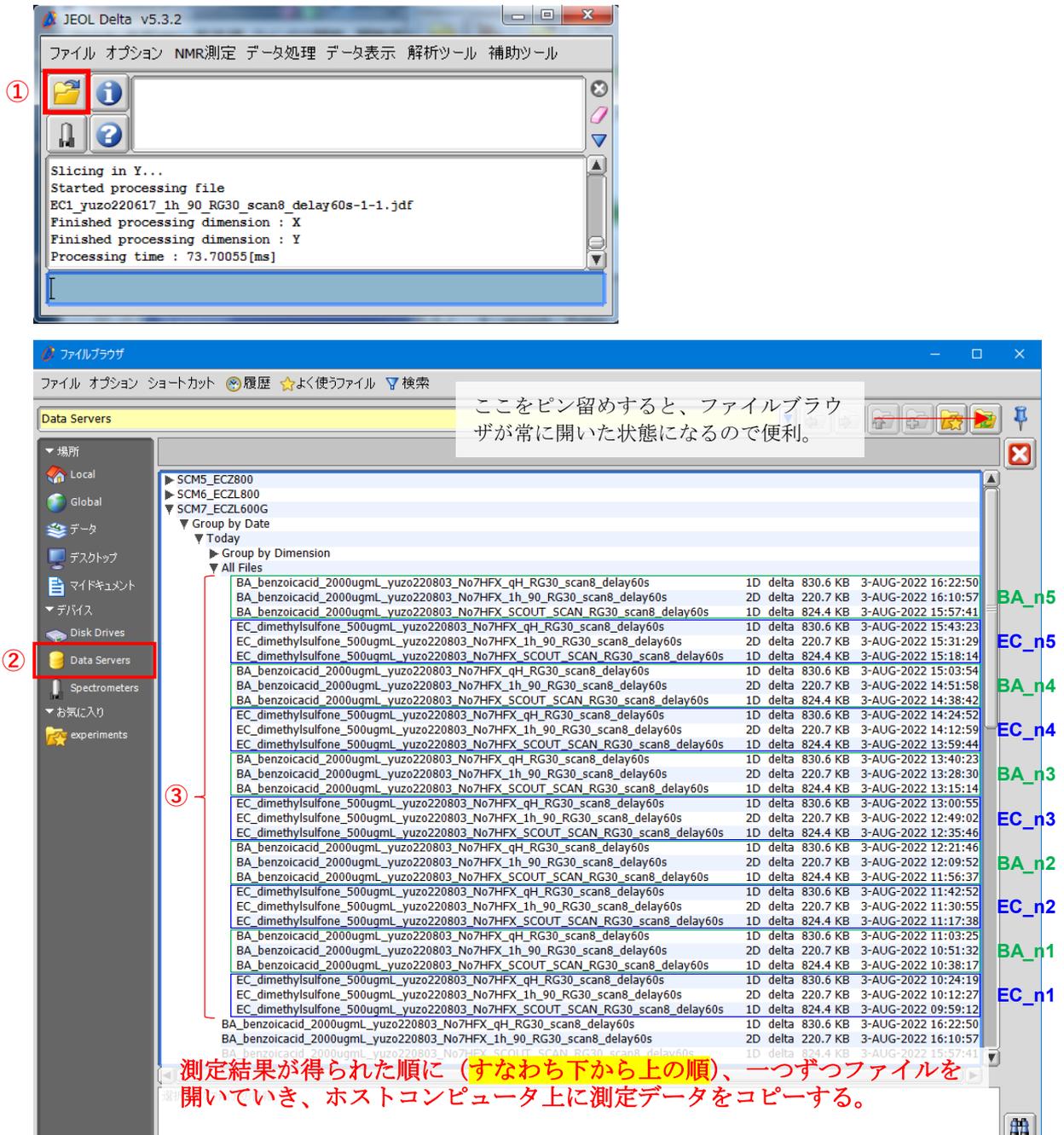


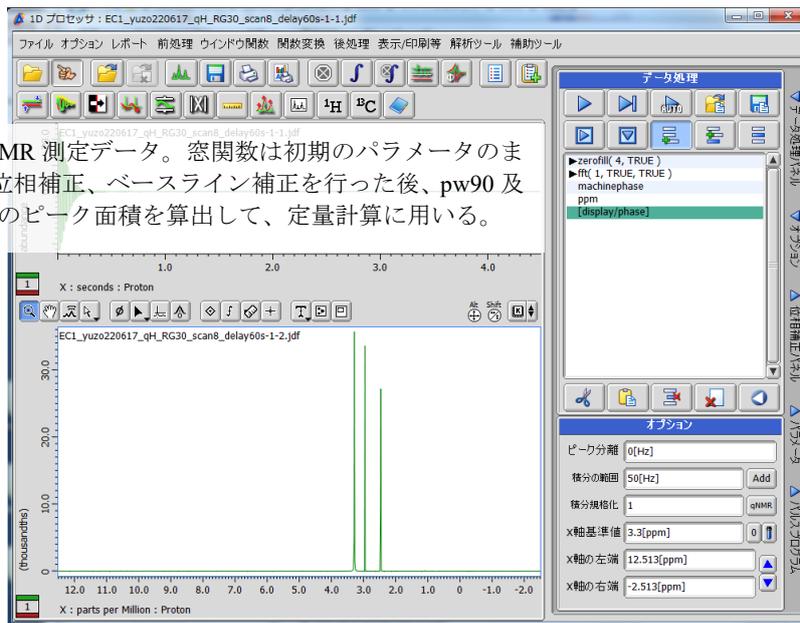
図 11 : EC-qNMR 測定データの取得方法

①ファイルブラウザを選択する → ②Data Servers を選択する → ③scout_scan 測定・pw 連続測定・qNMR 測定の 3 つのオリジナルデータを開く。

12 EC-qNMR 測定データの解析方法

qNMR 測定データ・pw 連続測定データ・scout_scan 測定データのうち、qNMR 測定データを用いて定量計算を行う。Delta ソフトウェアを用いて、定量結果を得るための手順を図 12 に示す。解析は Delta ソフトウェア以外に Mnova を使用しても良い。また、図 13 を参照して、EC 及び BA の積分結果を指定の Excel ファイルに記入する。なお、scout_scan 及び pw 連続測定データは分光計内部で処理された後、校正した pw90 が qNMR 測定に適用される。scout_scan 及び pw 連続測定データは定量計算に用いない。しかし、共同試験を進める上でオペレータ及び解析者は、分光計が両測定データをどのように処理しているのか理解していることが望ましい（付属 8 及び付属 9 を参照）。

EC のオリジナル qNMR 測定データ。窓関数は初期のパラメータのまままで良い。この後、位相補正、ベースライン補正を行った後、pw90 及びジメチルスルホンのピーク面積を算出して、定量計算に用いる。



ベースライン付近を拡大すると、位相が若干ずれている。赤枠①の位相補正ボタンをクリックして、赤枠②の位相補正パネル中のボタンをクリックして、 $\Phi 0$ 及び $\Phi 1$ を最適化する。また、赤枠③で示したパラメータ中のカテゴリー All → フィルタ *pulse で、この qNMR 測定に適用された pw90 を確認する。

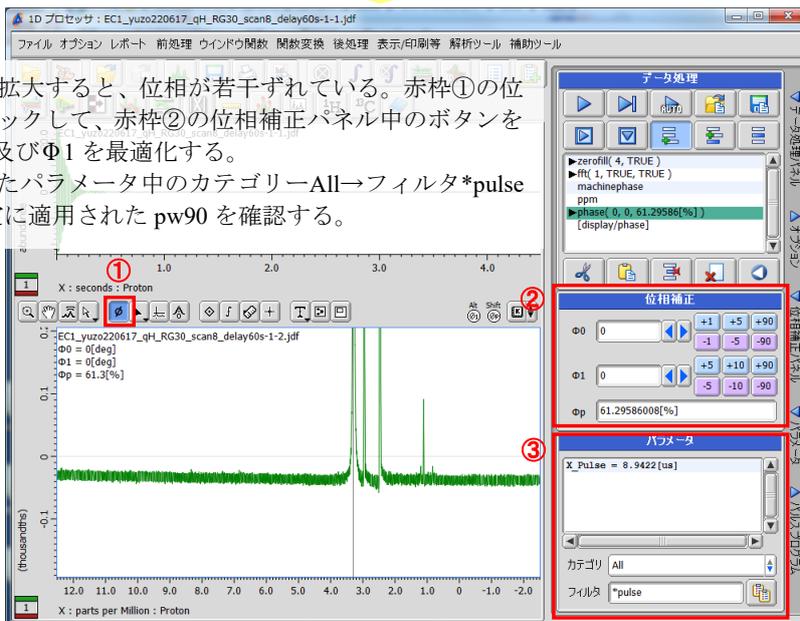
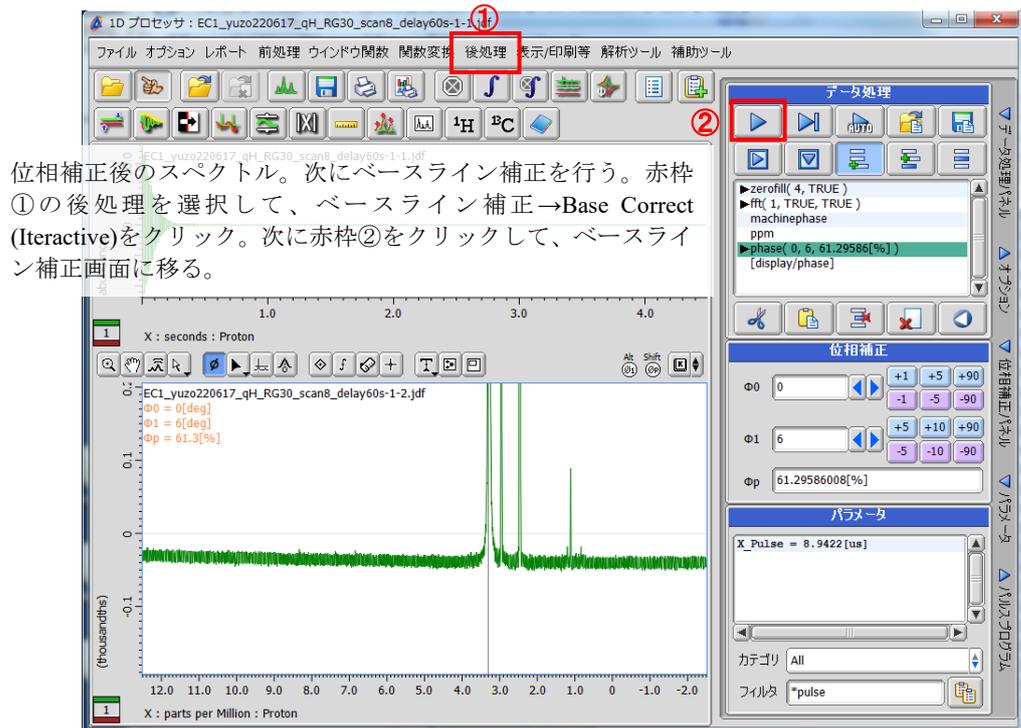
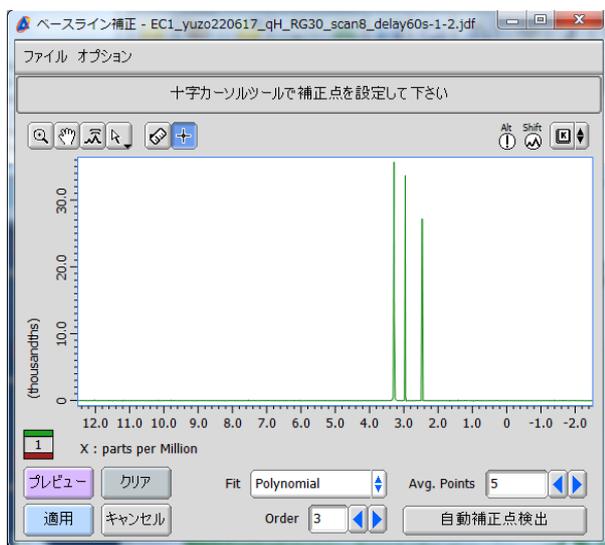


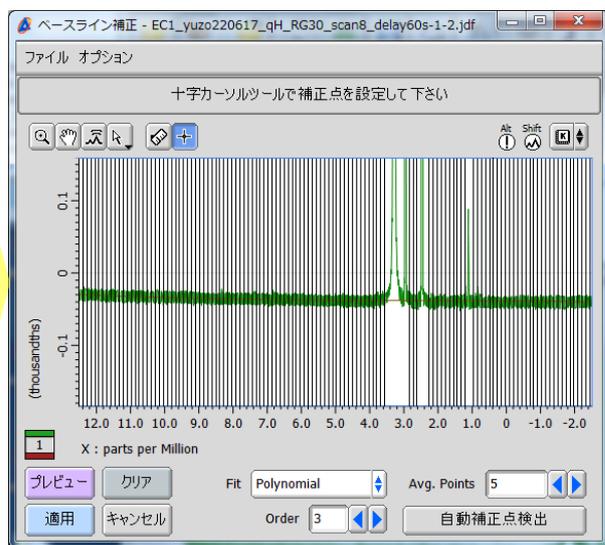
図 12 (1/3) : EC-qNMR 測定データの解析方法



位相補正後のスペクトル。次にベースライン補正を行う。赤枠①の後処理を選択して、ベースライン補正→Base Correct (Interactive)をクリック。次に赤枠②をクリックして、ベースライン補正画面に移る。

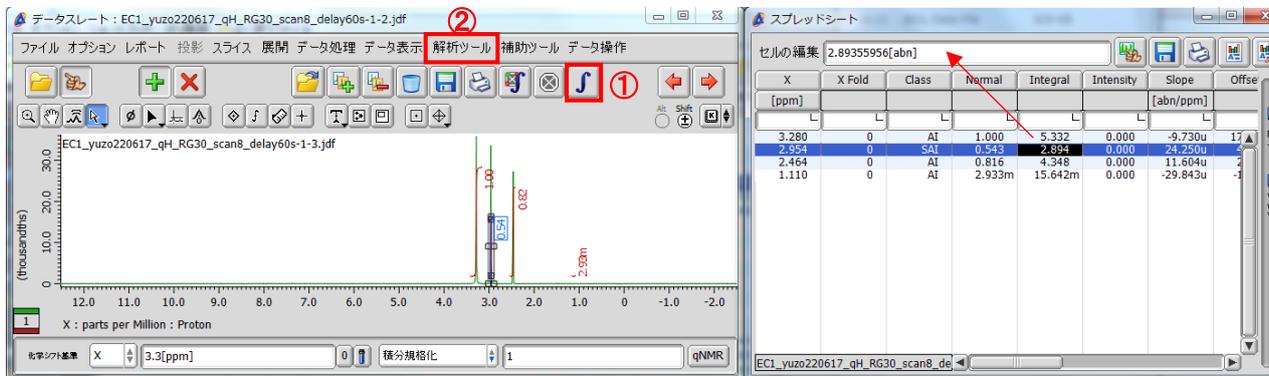
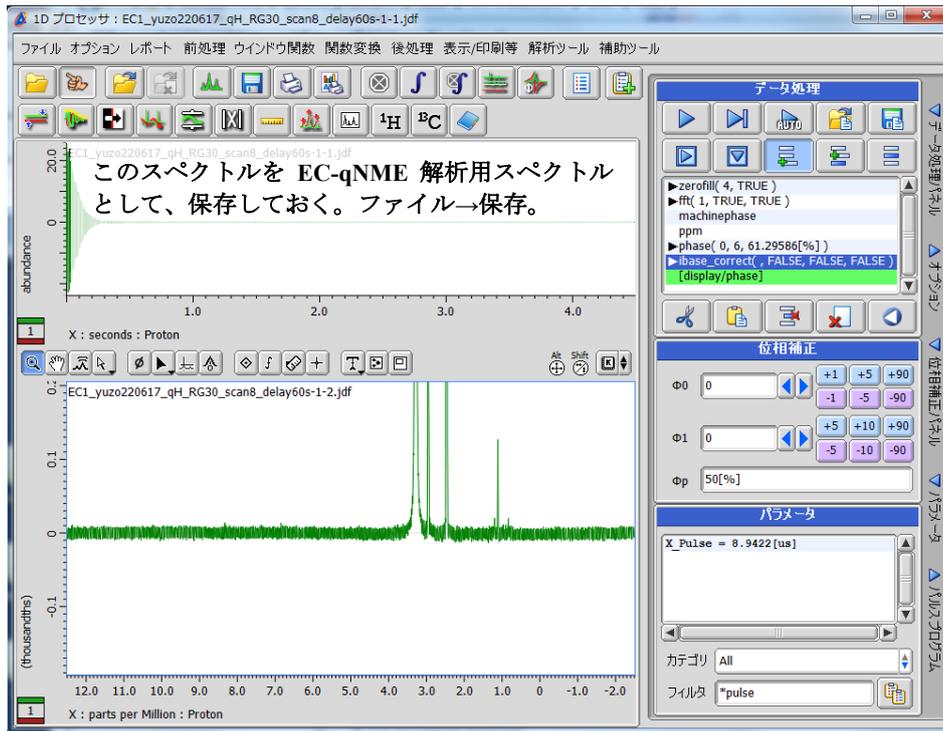


ベースライン補正画面。Fit : polynomial (おすすめ) を選択した後、自動補正点検出をクリック。Avg.Points 及び Order は各自で最適化する。



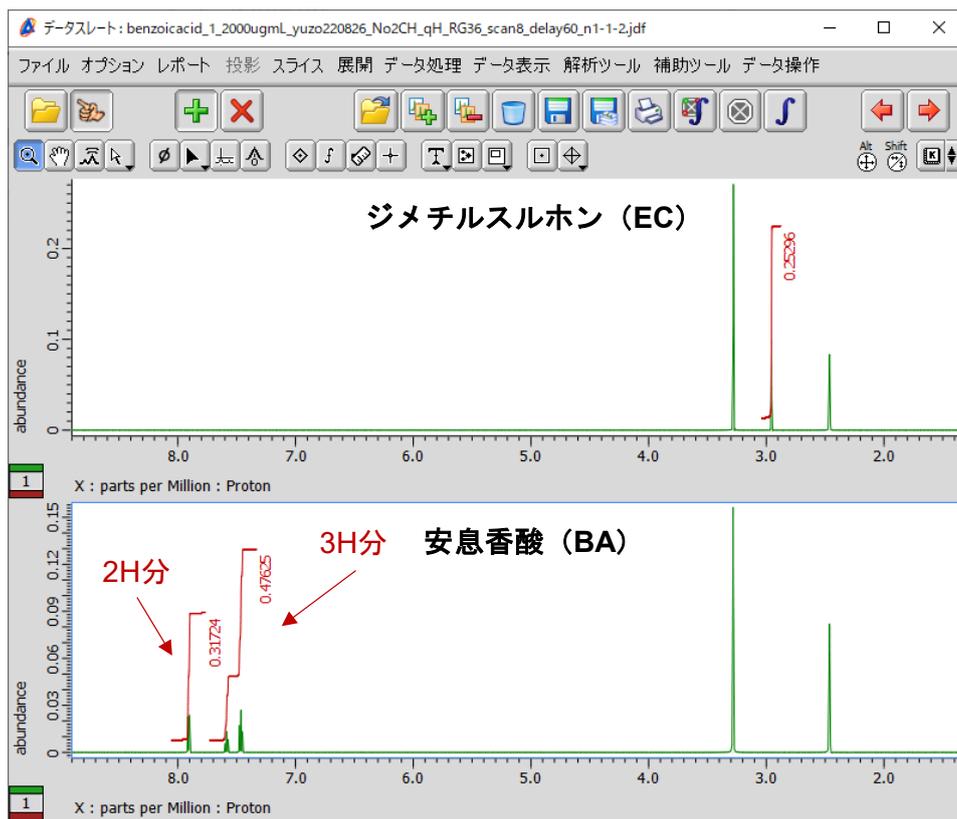
自動補正点が表示される。不必要な補正点は端に寄せるか、削除する。自動補正点を確認した後、適用をクリック。

図 12 (2/3) : EC-qNMR 測定データの解析方法



赤枠①の自動積分ボタンをクリックする。積分範囲が適切でない場合は、手で積分範囲を補正する。次に赤枠②の解析ツール→スプレッドシートを開き、ジメチルスルホンのピーク面積を得る。ピーク面積は、絶対値 [abn] の値を採用すること。最後の桁数まで計算に用いること。
 以上、ピーク面積及び pw90 の値を指定の図 13 に示した Excel シートに記入し、定量結果を得る。

図 12 (3/3) : EC-qNMR 測定データの解析方法



ヘッダーの追加

測定データ記入欄_1日目											
測定順	測定日	絶対濃度 [mmol/L]	pw90 [μsec]	ピーク面積		Q値	AVE	RSD (%)	Tuning&Matching		
1						0.000			試料	HF	LF
2						0.000			Blank_n1		
3	2022/mm/dd	5.263				0.000	0.000	#DIV/0!	Blank_n2		
4						0.000			Blank_n3		
5						0.000			Blank_n4		
6						0.000			Blank_n5		
測定順	測定日	調製濃度 [mmol/L]	pw90 [μsec]	ピーク面積 (2H分)	ピーク面積 (3H分)	絶対純度	AVE	RSD (%)	Blank_n6		
1						#DIV/0!			Blank_n7		
2						#DIV/0!			Blank_n8		
3	2022/mm/dd	15.000				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	Blank_n9		
4						#DIV/0!			Blank_n10		
5						#DIV/0!					

① 測定データ記入欄_1日目
 ② AVE, RSD (%)

① 競争機関が入力 BAの調製濃度は入力エラーにならないように配布時には仮の値を入力しています
 ② 参加機関が入力
 ③ 参加機関が実施した場合は入力

EC 及び BA の pw90 とピーク面積を入力すると ①、BA の定量結果が得られる ②。ただし、BA の調製濃度は仮の値を入力している。不確かさが付与された BA の調製濃度は、共同試験終了後に公表する。

図 13 : EC 及び BA の積分範囲の例と計算シート

付属 1：相反定理を利用した EC-qNMR の測定原理

NMR の応答は相反定理に従う。すなわち、チューニングとマッチング (T&M : Tuning and Matching) により、NMR の検出コイル (プローブ) が測定対象核の共鳴周波数に同調するとき限り、「パルス幅 (pw : pulse width) ×ピーク面積 / プロトン数 / モル濃度」はプローブ固有の値 (Q 値) となる。塩濃度が高い試料の場合、感度は低下し、ピーク面積が小さくなるが、その分 pw は長くなるので、式 (1) に示すように Q 値は一定のままである。

$$\frac{A \times pw90}{Conc. \times H} = Q \quad (1)$$

ここで、*Conc.*, モル濃度 (mol/L); *A*, プロトンのピーク面積; *H*, *A* に由来するプロトン数; *pw90*, 90°パルス幅 (μsec)。

従って、2 本の NMR 試料管を用いて EC-qNMR を実施した場合、両者の関係性は以下の式 (2) で示すことができる。すなわち、基準物質の絶対濃度 (*Conc._C*) が明らかなきとき、分析種の絶対濃度 (*Conc._A*) ないし純度を求めることができる。

$$Conc._A = Conc._C \times \frac{A_A}{A_C} \times \frac{H_C}{H_A} \times \frac{pw90_A}{pw90_C} \quad (2)$$

ここで、添字 A, 分析種; 添字 C, 基準物質 (内部標準または外部標準)。

ただし、上記の式の成立には、各測定における NMR 試料管の規格、温度、レシーバゲイン (RG) が同じであること。さらに、T&M が毎回正しくとれていることが前提条件としてある。

参考文献

- 1) I. W. Burton, M. A. Quilliam, J. A. Walter: Quantitative ¹H NMR with external standards: use in preparation of calibration solutions for algal toxins and other natural products, *Anal. Chem.* **77**, 3123 (2005)
- 2) G. Wider, L. Dreier: Measuring protein concentrations by NMR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 2571 (2006)
- 3) Y. Nishizaki, D. C. Lankin, SN. Chen, G. F. Pauli: Accurate and precise external calibration enhances the versatility of quantitative NMR (qNMR), *Anal. Chem.*, **93**, 2733 (2021)
- 4) 西崎雄三: 外部標準法定量 NMR (EC-qNMR) のすすめ, *ぶんせき*, *in press*

付属 2 : 試料調製方法

ジメチルスルホン及び安息香酸を冷蔵庫から取り出した後、デシケーターの中で室温になるまで放置した。次に、ジメチルスルホン及び安息香酸を天秤の傍に置き、開封して、蓋をのせた状態で 30 分以上放置した。

EC 原液 : アルミカップで量り取ったジメチルスルホン 20 mg を 20 mL のメスフラスコに入れ、DMSO- d_6 を加えて正確に 20 mL とした。

EC : **EC 原液** 10 mL を正確に量り、20 mL のメスフラスコに入れ、DMSO- d_6 を加えて正確に 20 mL とした。

EC 希釈液 : **EC** 10 mL を正確に量り、20 mL のメスフラスコに入れ、DMSO- d_6 を加えて正確に 20 mL とした。

BA : 安息香酸 40 mg を量り、20 mL のメスフラスコに入れ、DMSO- d_6 を加えて正確に 20 mL とした。

全ての試料は質量比混合法で調製し、密度測定することでモル濃度換算する。

各試料液 0.6 mL ずつを NMR 試料管に分注し、トーチバーナを用いて封管する。

EC、**BA** 及び **Blank** (DMSO- d_6) は 10 本の NMR 管に移して封管し、参加機関に配布する。

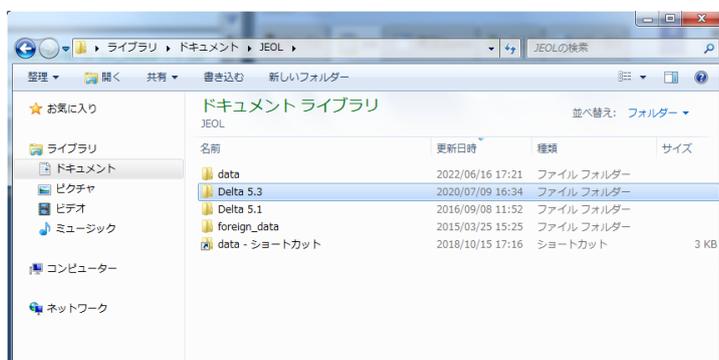
EC 原液 及び **EC 希釈液** は 3 本の NMR 管に移して封管し、国立衛研に配布する。国立衛研は **EC 原液**、**EC** 及び **EC 希釈液** を用いて、NMR 装置の直線性を確認する。

付属 3 : EC-qNMR スクリプトのセットアップ

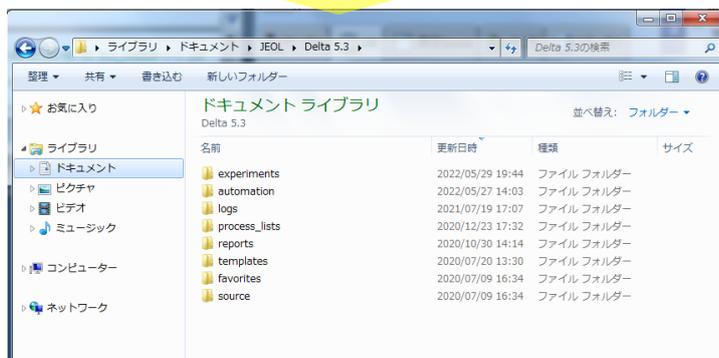
EC-qNMR 自動測定スクリプトのセットアップ方法について説明する。本セットアップは、「[1 ホストコンピュータへのスクリプトファイルのコピー](#)」、「[2 ホストコンピュータへの experiment ファイルのコピー](#)」及び「[3 分光計へのプロセスリストのアップロード](#)」からなる。**重要！！→すべての作業を終えた後は、一度 Delta ソフトウェアを閉じて、分光計をオーナー接続すると変更が更新される。**

1 ホストコンピュータへのスクリプトファイルのコピー

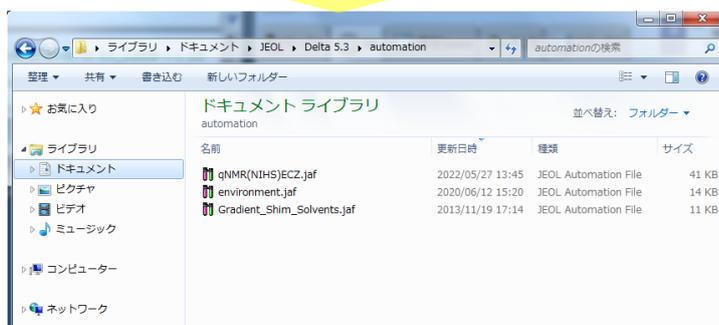
1. Windows OS に delta ユーザーでログインする。
2. セットアップ CDROM をドライブにセットする。
3. エクスプローラーより CDROM を開き、[automation]フォルダを開く。
4. 「qNMR(NIHS)ECZ.jaf」または「qNMR(NIHS)ECA.jaf」を装置機種に合わせて以下のフォルダにコピーする。C > Users > delta > Documents > JEOL > Delta 5.X > automation
5. 「Gradient_Shim_Solvents.jaf」、「environment.jaf」も同様のフォルダにコピーする（図 13）。



試験機関によっては、ホストコンピュータ上に古い Delta version のフォルダが残ったままの可能性もある（左の場合は Delta 5.1 フォルダに相当）。スクリプトファイルは、最新の Delta version フォルダを選択してコピーすること（現在、分光計を制御している Delta version）。



automations フォルダを選択して、3 つのスクリプトファイルをコピーする。



作業を終えると左のようになる。

図 13 : ホストコンピュータへのスクリプトファイルのコピー

2 ホストコンピュータへの experiment ファイルのコピー

1. エクスプローラーより CDRROM を開き、[experiments]フォルダを開く。
2. 6 つの experiment ファイルを以下のフォルダにコピーする^{注)}。

C > Users > delta > Documents > JEOL > Delta 5.X > experiments

^{注)} experiments フォルダに別のファイルがある場合、適当なフォルダを作成して移動させておくこと (図 14)。

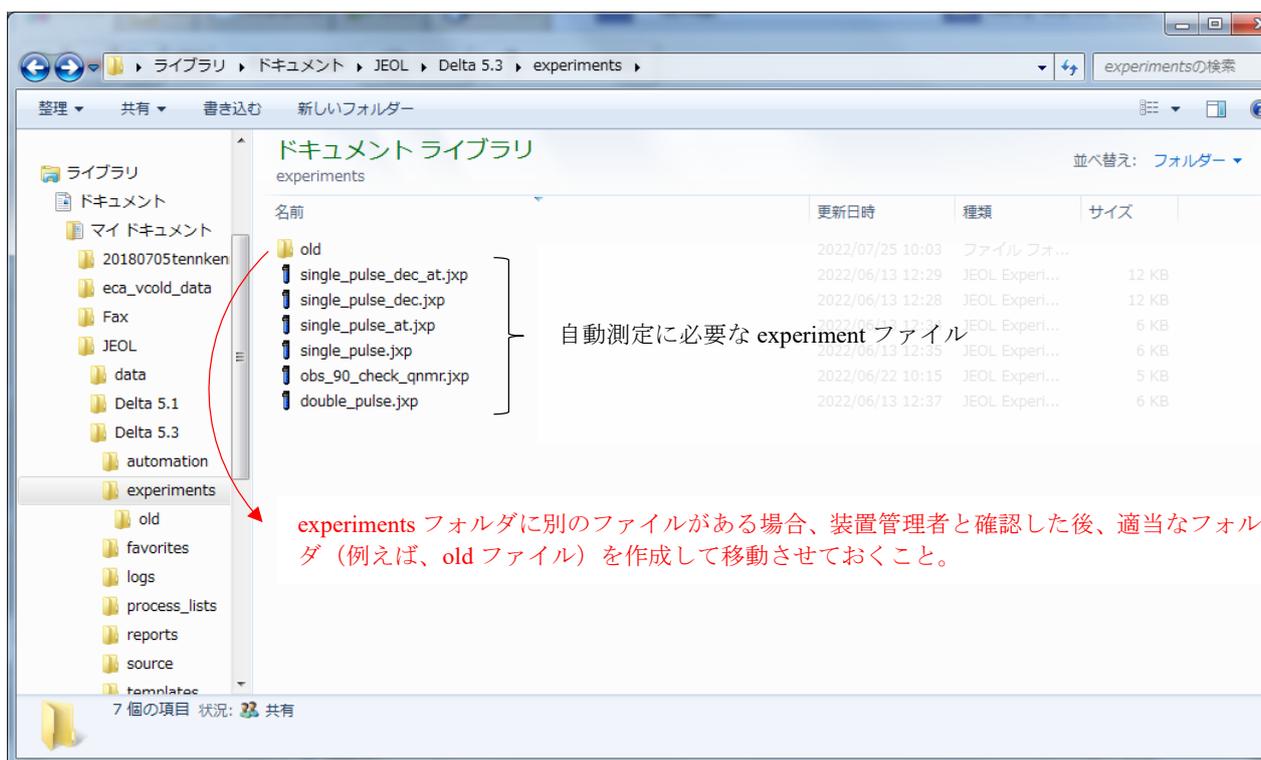


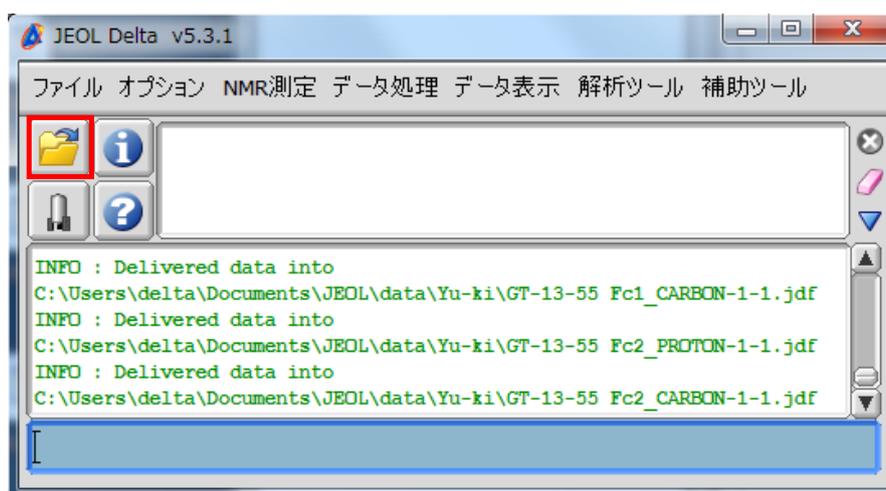
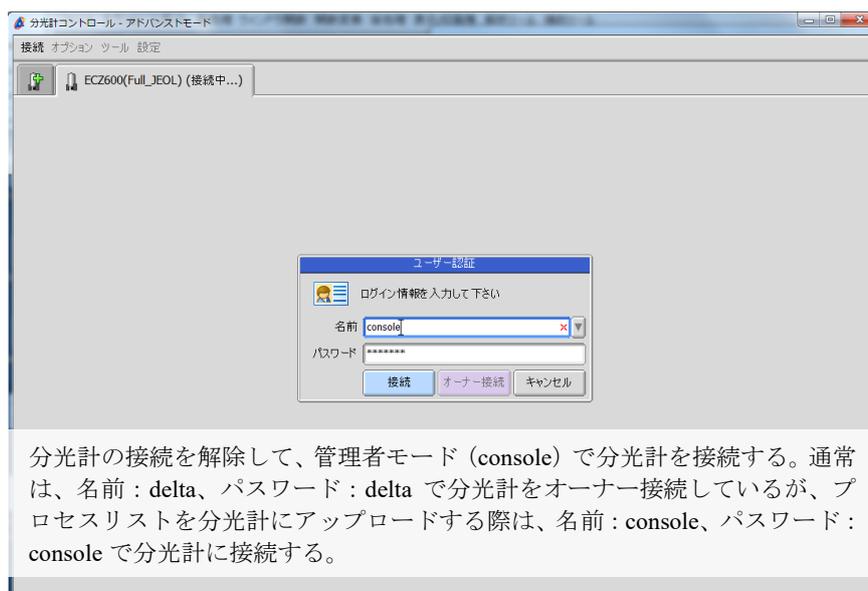
図 14 : ホストコンピュータへの experiment ファイルのコピー

3 分光計へのプロセスリストのアップロード

1. エクスプローラーより CDROM を開き、[process_lists]フォルダを開く。
2. ホストコンピュータのデスクトップ上に、[process_lists]フォルダをコピーする^{注)}。

注) ホストコンピュータの process_lists フォルダにコピーしない。コピーした場合は削除すること。

3. 分光計の接続を解除して、管理者モード (console) で分光計を接続する。
4. 分光計にプロセスリストをアップロードする (図 15)。
5. **分光計の接続を解除して、測定モードで分光計をオーナー接続する。**



Delta コンソールの赤枠の File Browser ボタンをクリックする。このときは、管理者モード (console) で分光計を接続している。

図 15 (1/3) : 分光計へのプロセスリストのアップロード

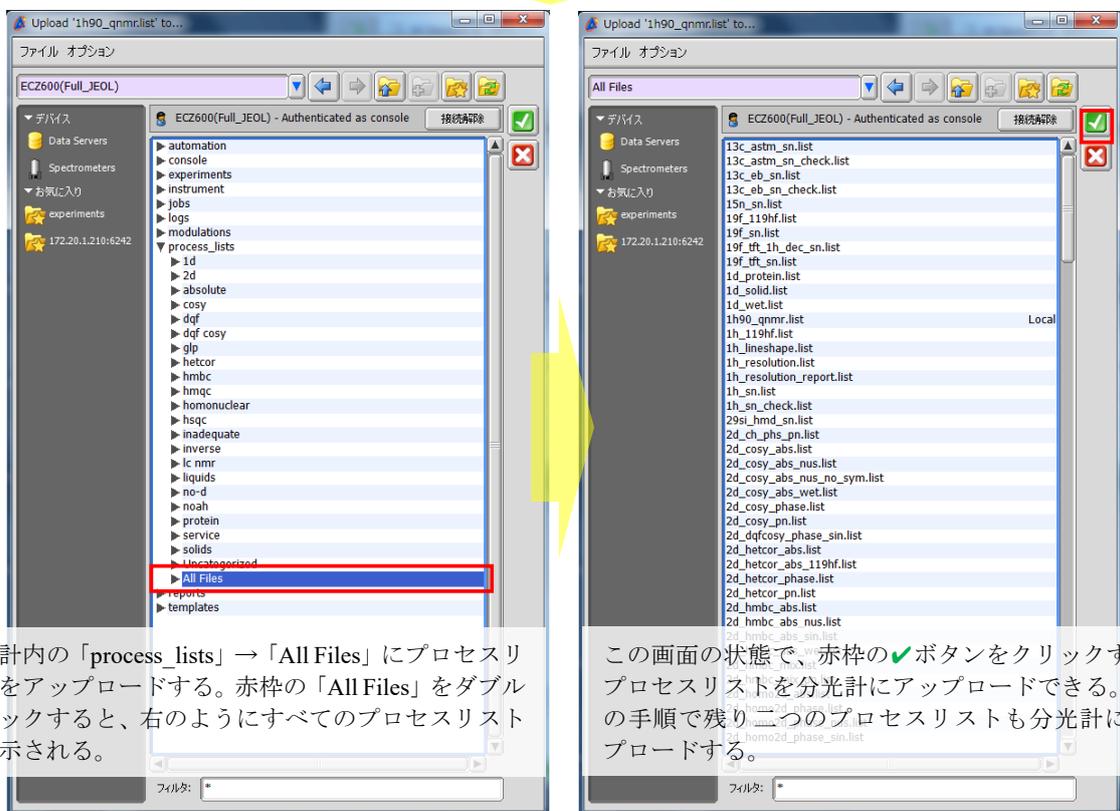
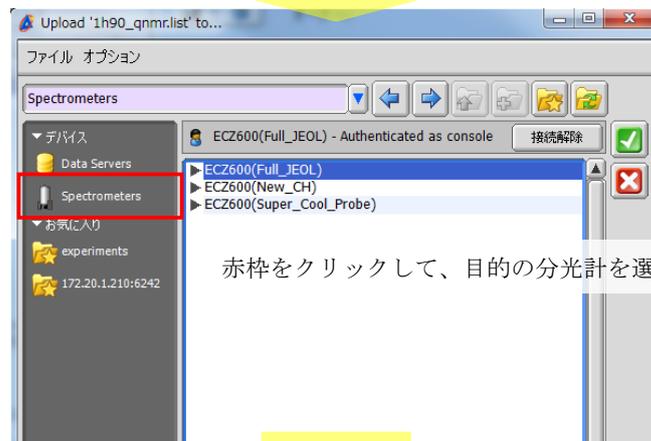
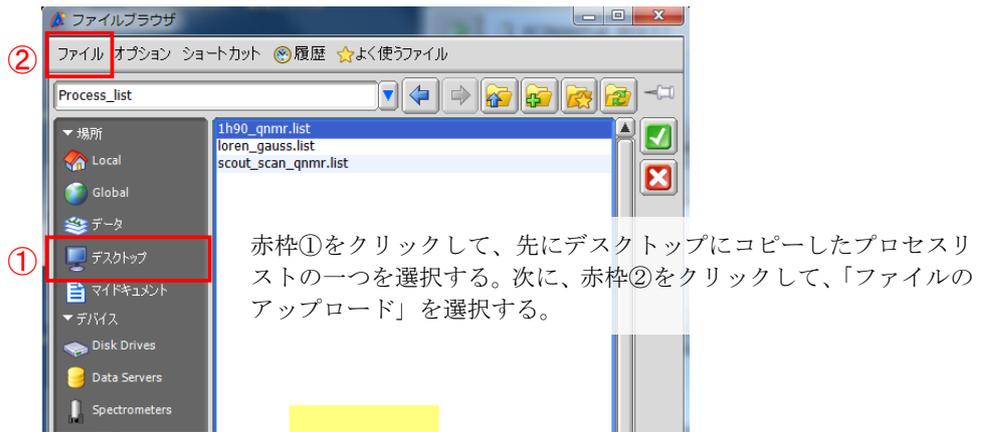
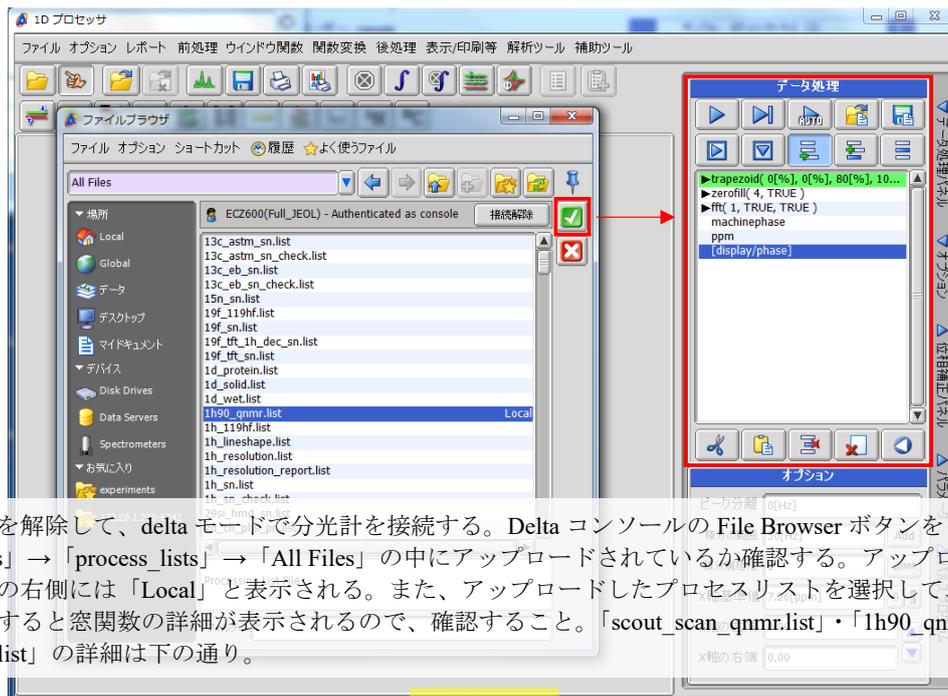
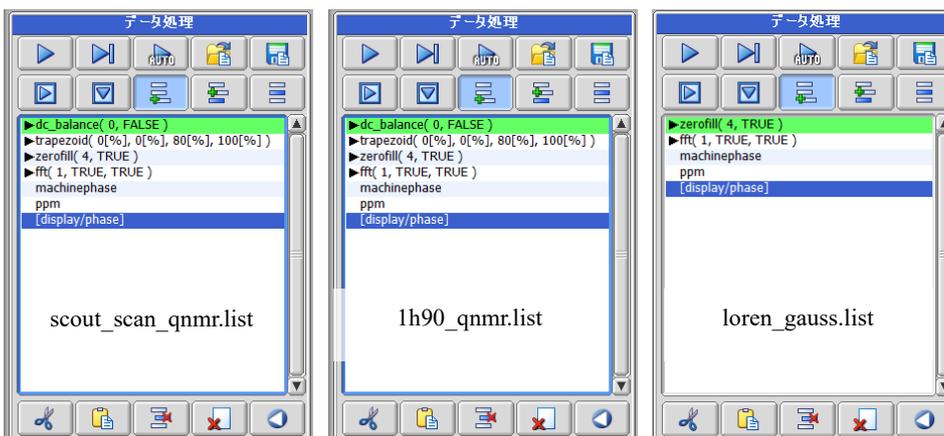


図 15 (2/3) : 分光計へのプロセスリストのアップロード



分光計の接続を解除して、delta モードで分光計を接続する。Delta コンソールの File Browser ボタンをクリック→「Spectrometers」→「process_lists」→「All Files」の中にアップロードされているか確認する。アップロードされたプロセスリストの右側には「Local」と表示される。また、アップロードしたプロセスリストを選択して、赤枠の✓ボタンをクリックすると窓関数の詳細が表示されるので、確認すること。「scout_scan_qnmr.list」・「1h90_qnmr.list」・「loren_gauss.list」の詳細は下の通り。

ECA 分光計用プロセスリスト



ECZ 分光計用プロセスリスト

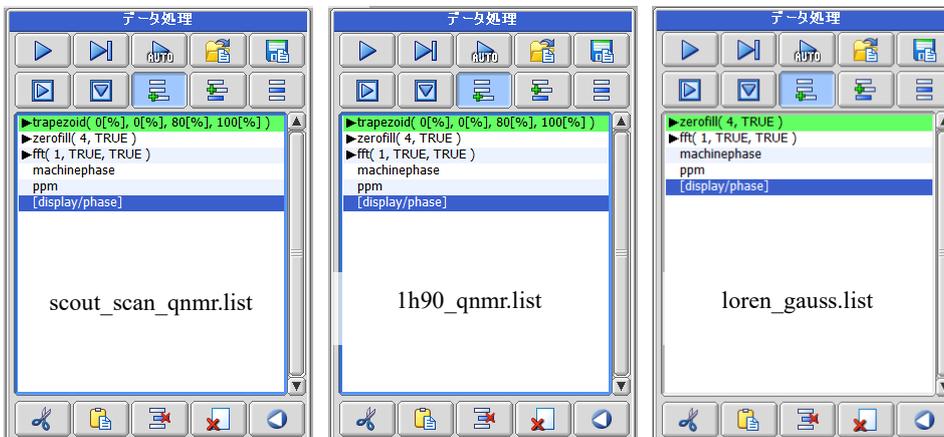
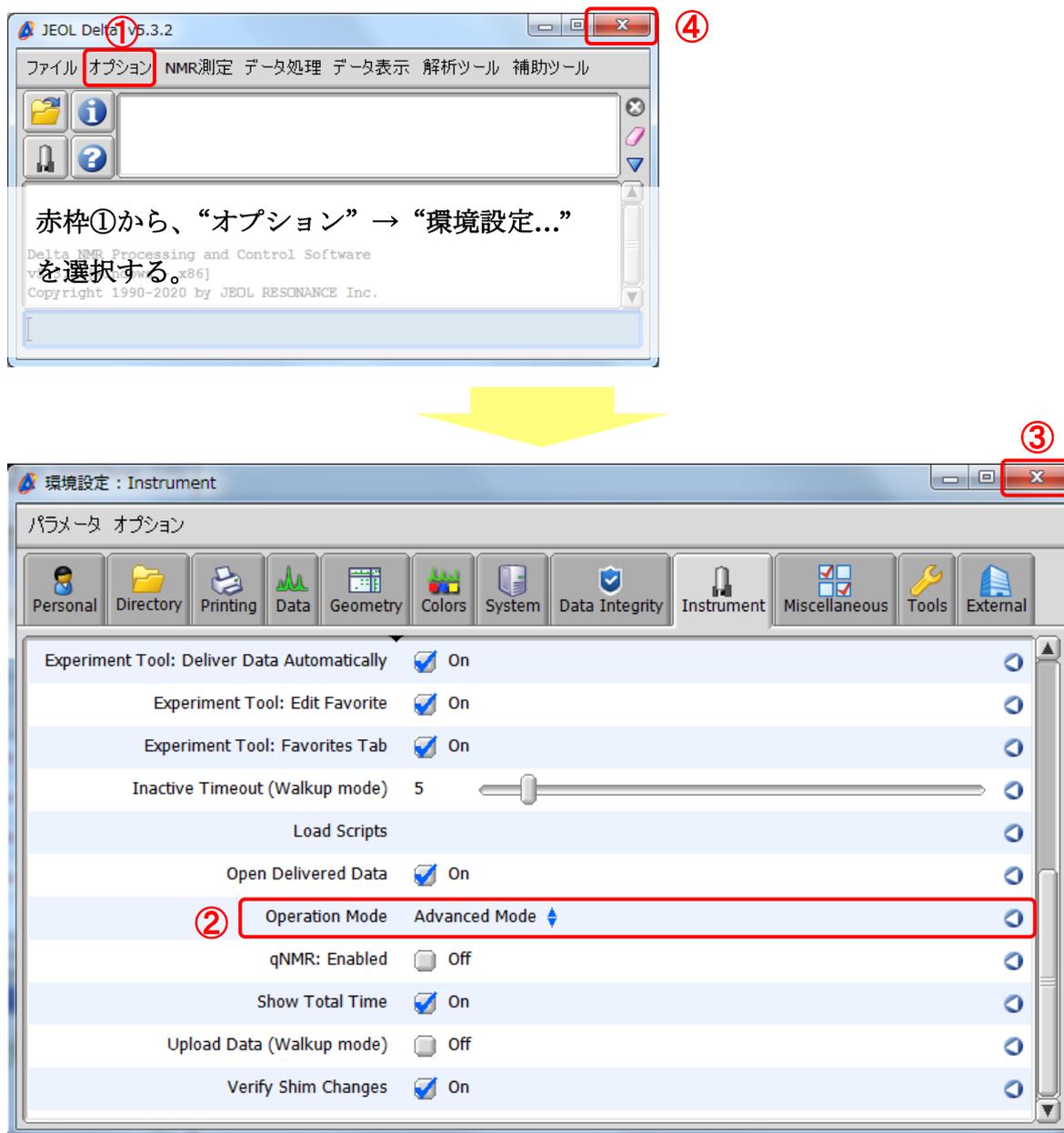


図 15 (3/3) : 分光計へのプロセスリストのアップロード

付属 4 : Delta を Advanced モードに変更する方法

図 16 に示す①～④の順で変更する。



Instrument タブの赤枠②を Advanced Mode に変更する。赤枠③→④の順で画面を閉じて、Advanced モードを反映させる。

図 16 : Delta を Advanced モードに変更する方法

付属 5 : 測定 Method に Utilities を表示させる方法

図 17 に示す①～③の順で表示させる。

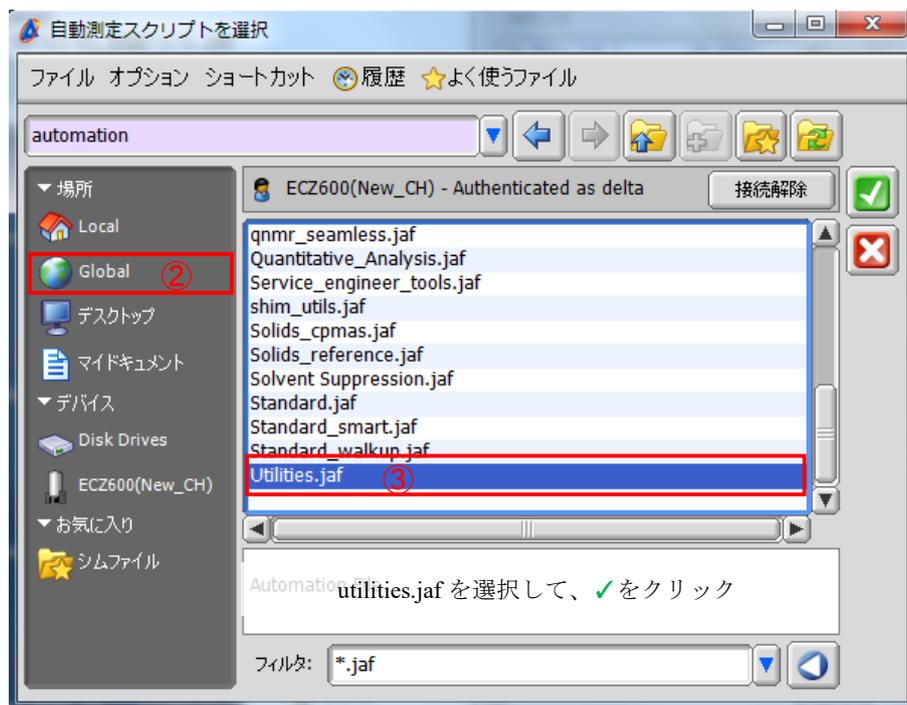
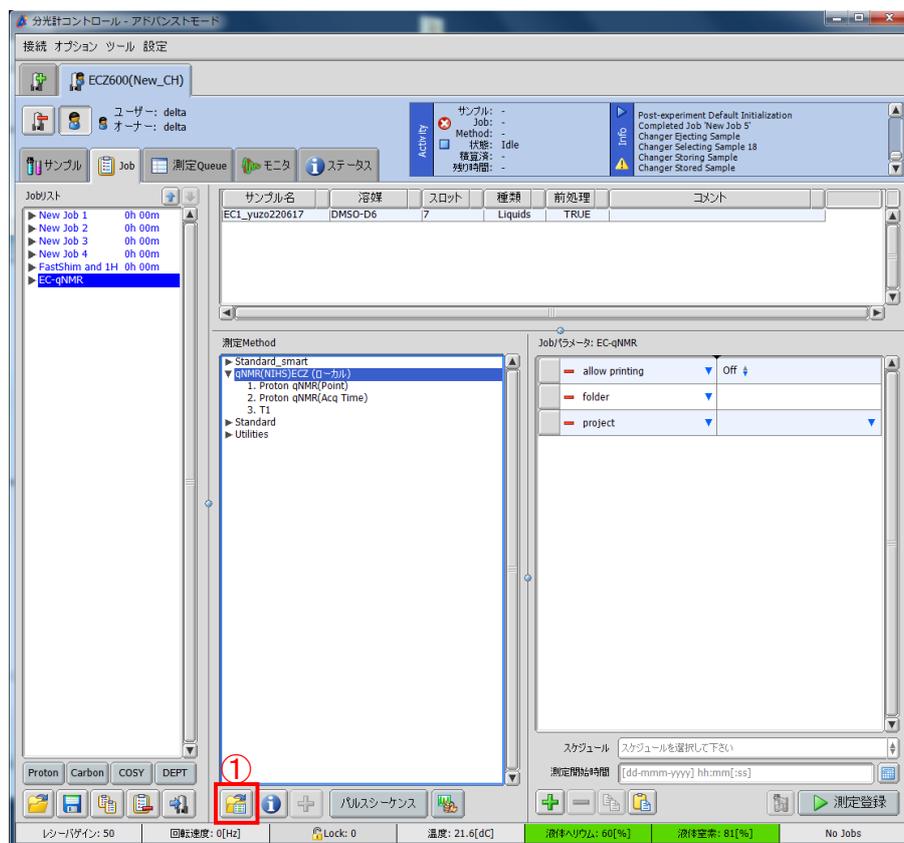


図 17 : 測定 Method に Utilities を表示させる方法

付属 6 : 測定 Method に qNMR(NIHZ)ECZ (ローカル) を表示させる方法

図 18 に示す①～③の順で表示させる。

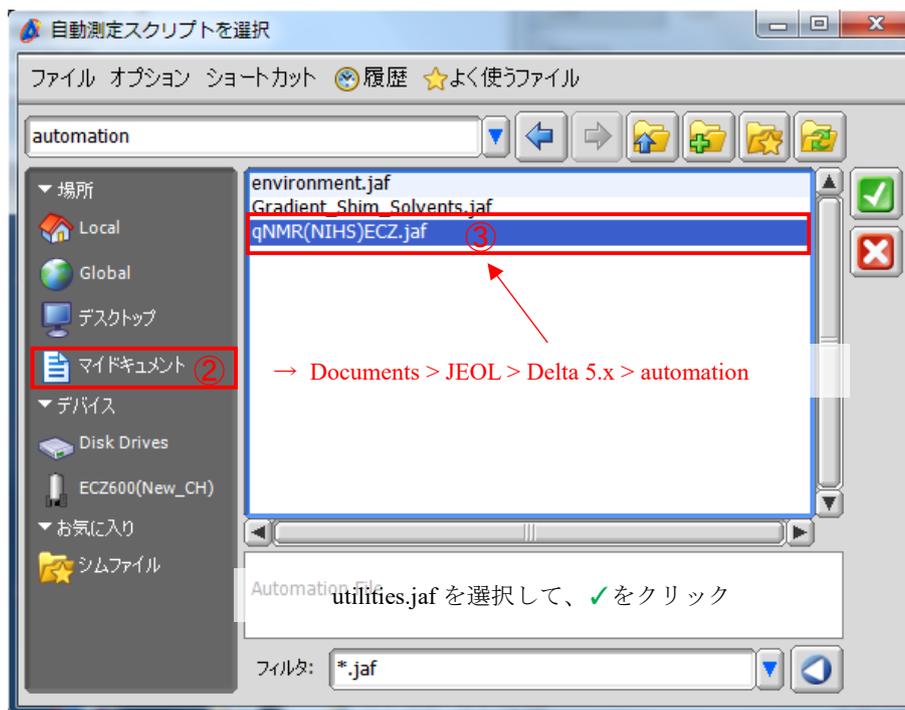
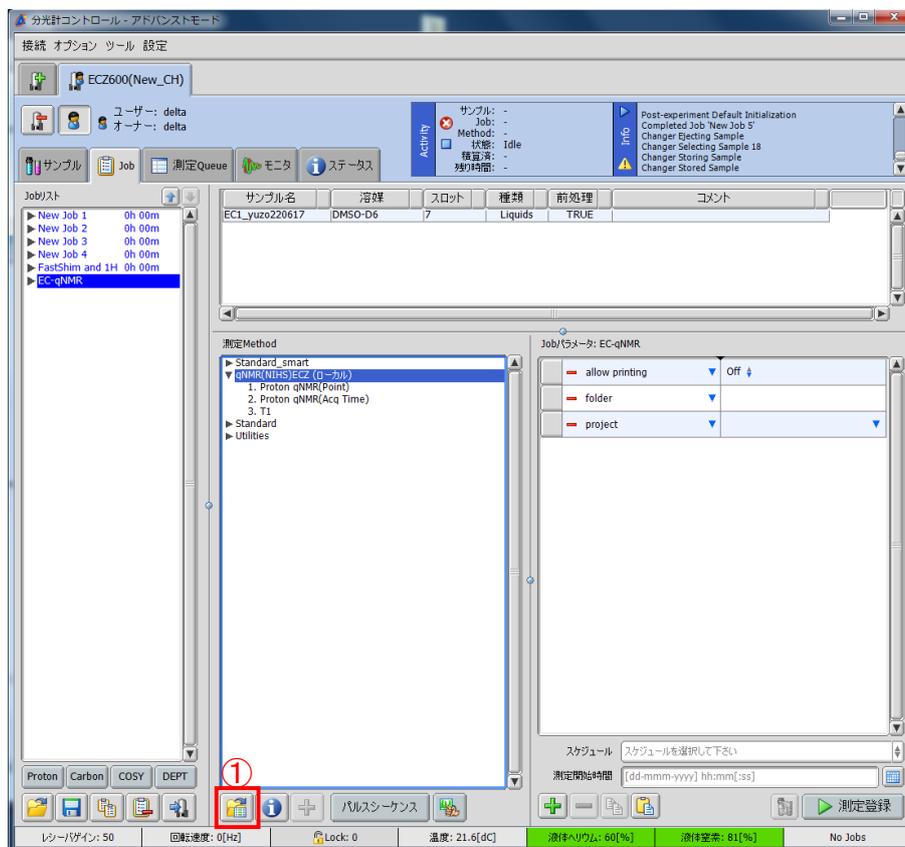


図 18 : 測定 Method に qNMR(NIHZ)ECZ (ローカル) を表示させる方法

付属 7：溶媒ピークの化学シフト及びレシーバーゲイン（RG）の確認方法

図 19 に示す手順で実施する。

The figure consists of three screenshots of the NMR software interface, illustrating the steps to confirm solvent peak chemical shift and receiver gain (RG).

Step 1: The first screenshot shows the sample list table. The sample 'EC_dimethylsulfone_500ugmL_yuzo220803_No7HFX' is selected (highlighted in green). A yellow arrow points to the '投入' (Load) button.

No.	サンプル名	溶媒	スロット	種類	共有	パリティ	エラー	オーナー
1	ss_1% CHCl3	Acetone-D6 Chloroform-D	1	Liquids	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		console
2	ss_0.1% EB		2	Liquids	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		console
3	ss_10% EB	Chloroform-D	3	Liquids	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		console
4	blank_DMSOd6_yuzo220803_No7HFX	DMSO-D6	11	Liquids	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		delta
5	EC_dimethylsulfone_500ugmL_yuzo220803_No7HFX	DMSO-D6	12	Liquids	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		delta
6	BA_benzoicacid_2000ugmL_yuzo220803_No7HFX	DMSO-D6	13	Liquids	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		delta

Step 2: The second screenshot shows the manual control interface. The 'SPIN ON' button is clicked, and then the 'SPIN OFF' button is clicked. The 'TEMP ON' button is also clicked, setting the temperature to 25.0[dC].

Step 3: The third screenshot shows the manual control interface with the '自動グラジエントシム' (Auto Gradient Shim) button clicked. The 'Gain' is set to 17, 'Level' to 160, and 'Phase' to 243.3[deg].

①EC を選択して、②投入をクリック。
 マニュアル制御画面に移り、③スピン ON→④スピン OFF にする。これで、サンプル定義にスピン OFF が有効になる。次に⑤TEMPON をクリックして 25℃ に設定する。次に、⑥→⑦でグラジエントシムを実行する。グラジエントシムの条件はデフォルトの設定を採用すること。このとき、グラジエントシムは、スピン OFF かつ 25℃ で実施される。

図 19 (1/3)：溶媒ピークの化学シフト及びレシーバーゲイン（RG）の確認方法

ユーザー: delta
オーナー: delta

Activity: サンプル: EC_dimethylsulfone_500ug/mL
Job: -
Method: -
状態: Idle
積算回数: -
残り時間: -

Info: Waiting to reach Lock State 'AUTOLOCK'
Reached Lock State 'AUTOLOCK'
Increasing Lock Gain to reach Lock Achieve Point of 1500
Lock Gain was increased to 9
Reached Lock Achieve Point
Completed Job '1D グラジエントシム'

No.	サンプル名	溶媒	スロット	種類	共有	ペリファイ	エラー	オーナー
1	ss_1% CHCl3	Acetone-D6	1	Liquids	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		console
2	ss_0.1% EB	Chloroform-D	2	Liquids	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		console
3	ss_10% EB	Chloroform-D	3	Liquids	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		console
4	blank_DMSOd6_yuzo220803_No7HFX	DMSO-D6	11	Liquids	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		delta
5	EC_dimethylsulfone_500ug/mL_yuzo220803_No7HFX	DMSO-D6	12	Liquids	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		delta
6	BA_benzoicacid_2000ug/mL_yuzo220803_No7HFX	DMSO-D6	13	Liquids	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		delta

グラジエントシム終了後に、①EC を選択して、②例えば「check」という Job を作成する。

現在のスロット: 12
定義済み: 12
測定待ち: 12
使用不可: 12
エラー発生: 12
ペリファイ済み: 12
選択されたスロット: 12

Jobの作成: Open Job Jobの更新

作成するJobの名前: check
Jobの命名に開帳を使用する:

Job番号をJob名に追加:
 必要な場合のみ
 常に追加

Jobを作成



ユーザー: delta
オーナー: delta

Activity: サンプル: EC_dimethylsulfone_500ug/mL
Job: -
Method: -
状態: Idle
積算回数: -
残り時間: -

Info: Waiting to reach Lock State 'AUTOLOCK'
Reached Lock State 'AUTOLOCK'
Increasing Lock Gain to reach Lock Achieve Point of 1500
Lock Gain was increased to 9
Reached Lock Achieve Point
Completed Job '1D グラジエントシム'

Jobリスト	サンプル名	溶媒	スロット	種類	前処理	コメント
check 0h 05m	EC_dimethylsulfone_500ug/mL_yuzo220803_No7HFX	DMSO-D6	12	Liquids	TRUE	
Proton 0h 05m						

測定Method: Standard
Proton
Fluorine
Carbon
Quantitative Carbon
Phosphorus
Proton and Carbon
DEPT
Edited Dept
Presaturation
Watergate
COSY
DQF COSY
TOCSY
NOESY
ROESY
HMQC
Edited HSQC
HMBC
Selective NOESY 1D
Selective TOCSY 1D
Selective ROESY 1D

Method/パラメータ: Proton

return_data_to_screen	<input checked="" type="checkbox"/>	
calculate_proton_90	<input type="checkbox"/>	← 必ず外す
comment		
force_tune	<input checked="" type="checkbox"/>	← 必ず
dual_tuned	<input type="checkbox"/>	
proton_autogain	<input checked="" type="checkbox"/>	← 必ず
proton_receiver_gain	0	
proton_scans	1	← 1でOK
proton_dummy_scans	0	← 0でOK
proton_tip_angle	90[deg]	
proton_x_offset	5[ppm]	
proton_x_sweep	15[ppm]	
proton_collection_mode	Acq Time	ECqNMR条件に合わせる
proton_points_or_acq_time	4.5[s]	
proton_relaxation_delay	60[s]	
email_raw_data	<input type="checkbox"/>	
email_pdf	<input type="checkbox"/>	

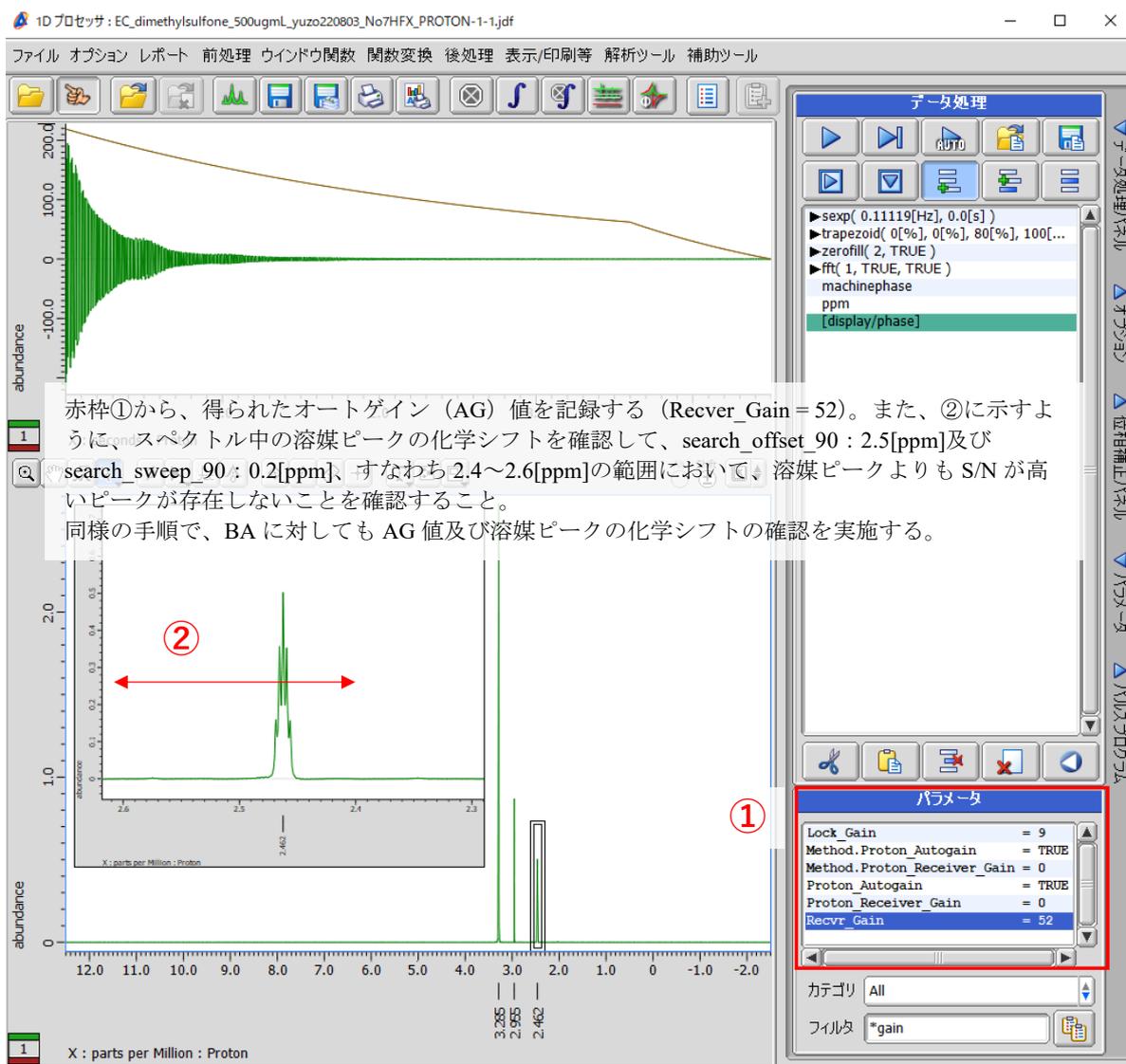
「Job : check」の中に、③Standard 測定 Method の Proton を追加する。Method パラメータは④の赤枠に従い、観測範囲、取り込み時間、遅延時間を EC-qNMR 条件に合わせる。積算回数は 1 回で良い。ダミースキャンはいらない。この状態で⑤測定登録する。

Set_State_MAS Set_State

パルスシーケンス

測定登録

図 19 (2/3) : 溶媒ピークの化学シフト及びレシーバーゲイン (RG) の確認方法

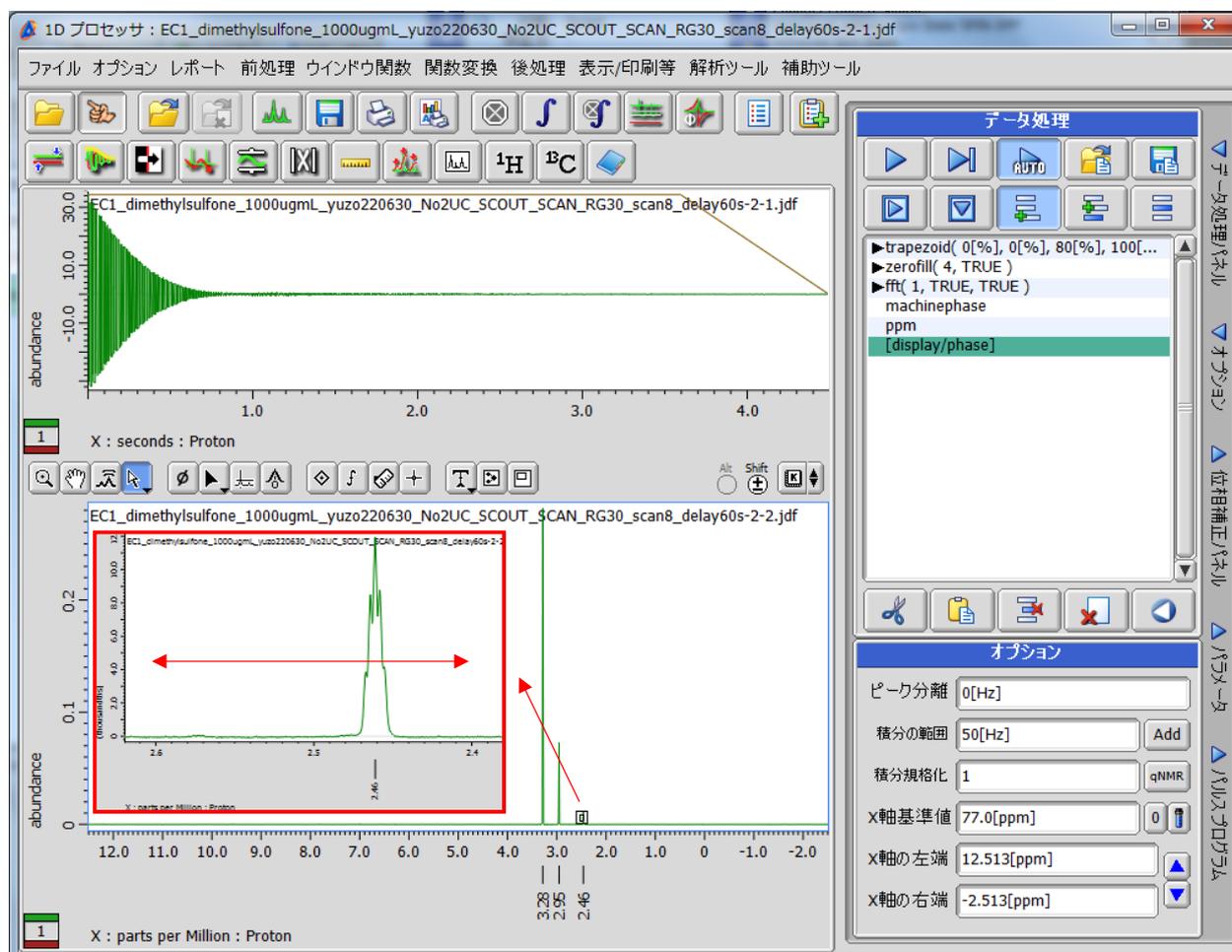


例えば、EC の AG 値 52、BA の AG 値 46 の場合は、、、
 BA の AG 値 : 46 を基準にして、 $46 - 6 = 40$ 、すなわち、ECqNMR 測定のレーザーゲインは 40 に統一すること。

図 19 (3/3) : 溶媒ピークの化学シフト及びレーザーゲイン (RG) の確認方法

付属 8 : scout_scan 測定データの分光計内部処理方法

scout_scan は積算回数の 1 回の ^1H 測定である。EC-qNMR スクリプトの Method パラメータで設定した search_offset_90 及び search_sweep_90 のパラメータに従い、この範囲内で最も S/N 比の良いピークを探す (図 20)。pw 連続測定は、この最も S/N 比の良いピークを照射中心にして実施される。

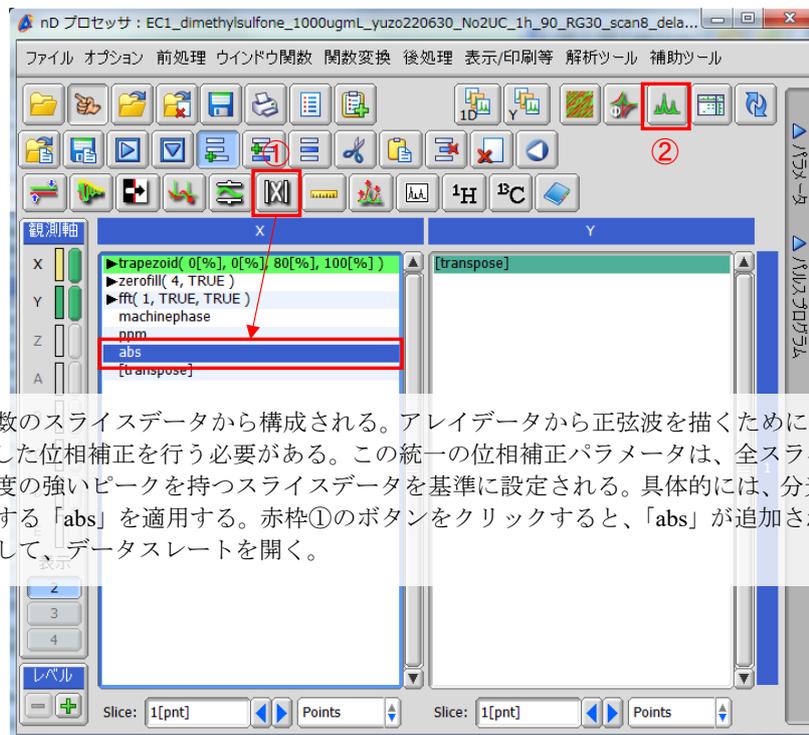
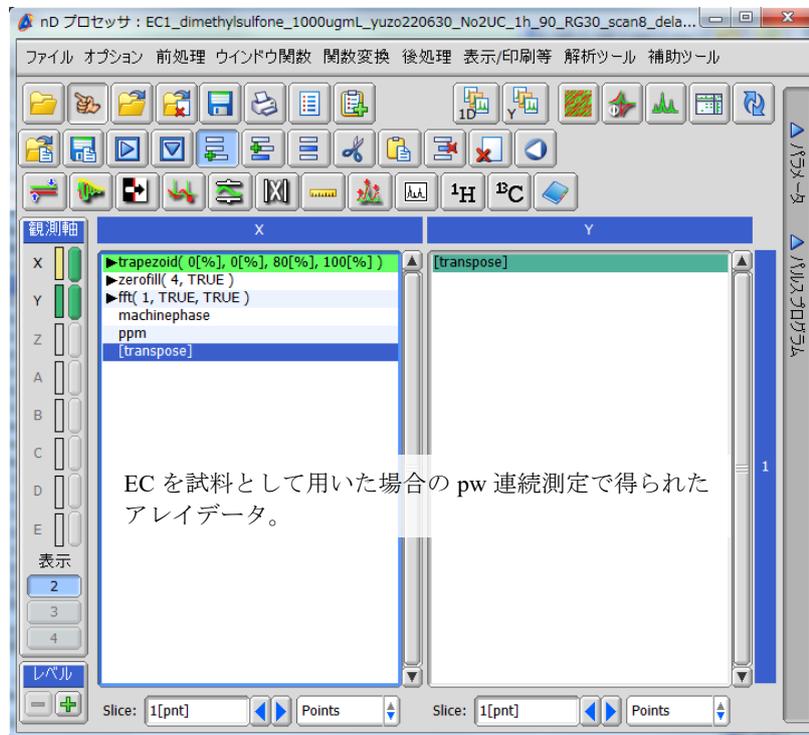


EC を試料として用いた場合の scout_scan スペクトルデータ。search_offset_90 : 2.5[ppm]、search_sweep_90 : 0.2[ppm] に設定した場合、赤両矢印の範囲内 (2.4~2.6 ppm) で最も S/N 比の良いピークを探す。この場合、溶媒ピークである DMSO-*ds* の 2.46 ppm のピークが、pw 連続測定の照射中心に設定される。

図 20 : scout_scan 測定データの分光計内部処理方法

付属 9 : pw 連続測定データの分光計内部処理方法

pw 連続測定から得られるアレイデータにつき、縦軸を照射中心ピークの強度、横軸をパルス幅 (pw) としてプロットすると、減衰する正弦波が描かれる。この減衰する正弦波に対して分光計がカーブフィッティング (CF) を行い、pw90 を算出する (図 21)。



アレイデータは複数のスライスデータから構成される。アレイデータから正弦波を描くためには、全スライスデータに対して、統一した位相補正を行う必要がある。この統一の位相補正パラメータは、全スライスデータの内、符号関係なく最も強度の強いピークを持つスライスデータを基準に設定される。具体的には、分光計はピーク強度を強制的に正の値にする「abs」を適用する。赤枠①のボタンをクリックすると、「abs」が追加される。次に赤枠②のボタンをクリックして、データスレートを開く。

図 21 (1/6) : pw 連続測定データの分光計内部処理方法

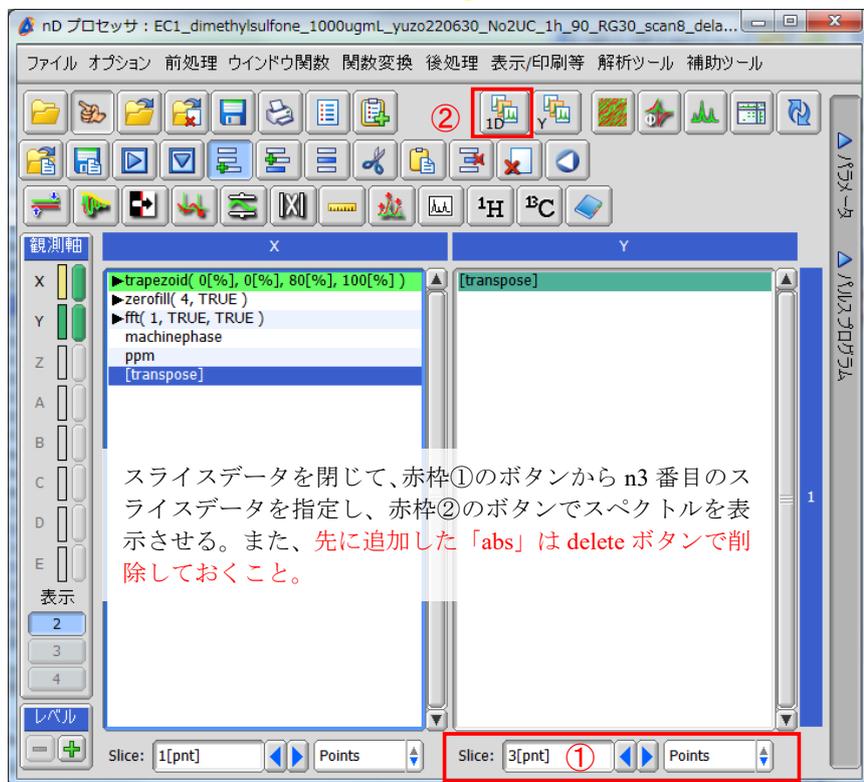
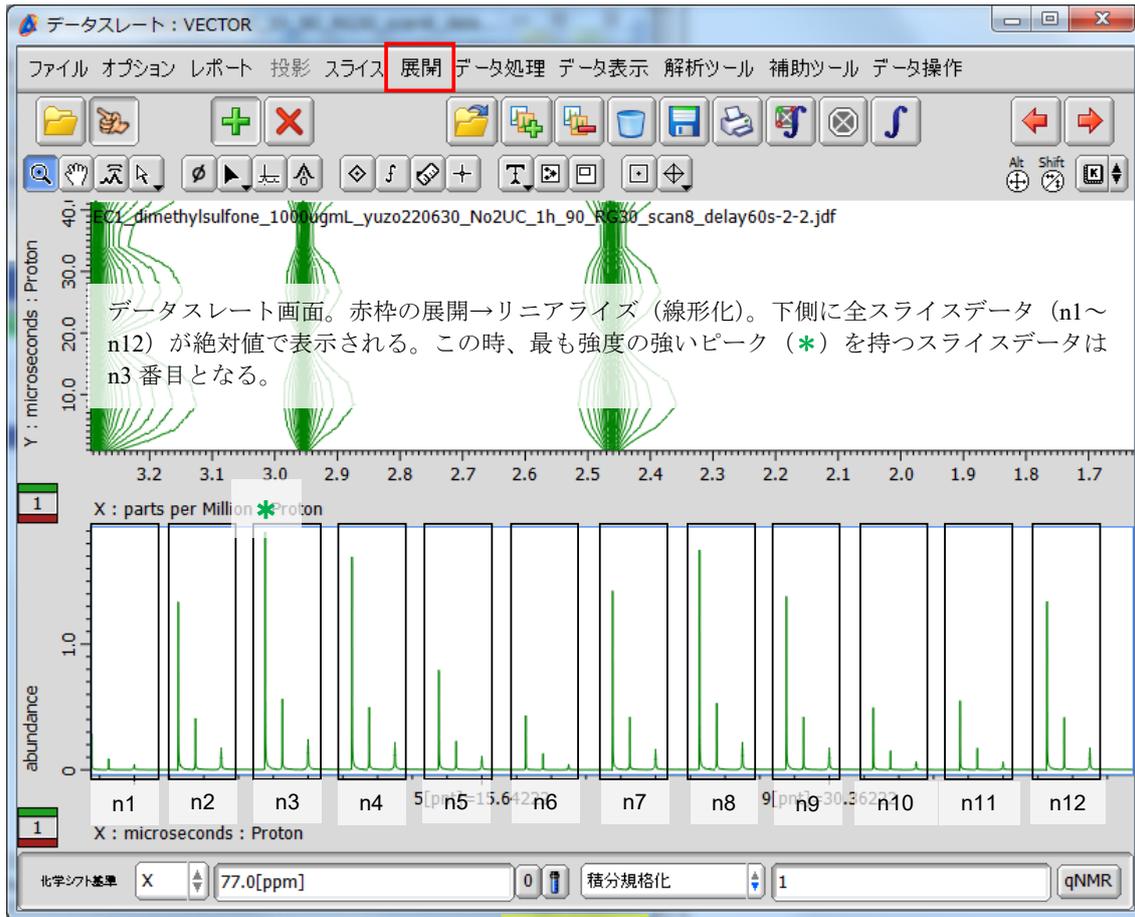


図 21 (2/6) : pw 連続測定データの分光計内部処理方法

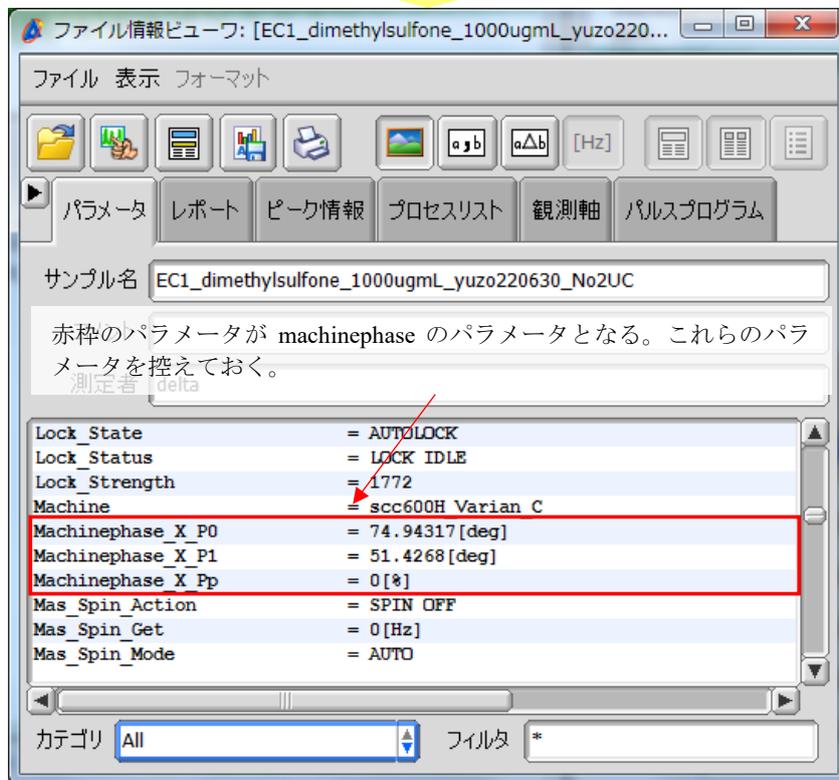
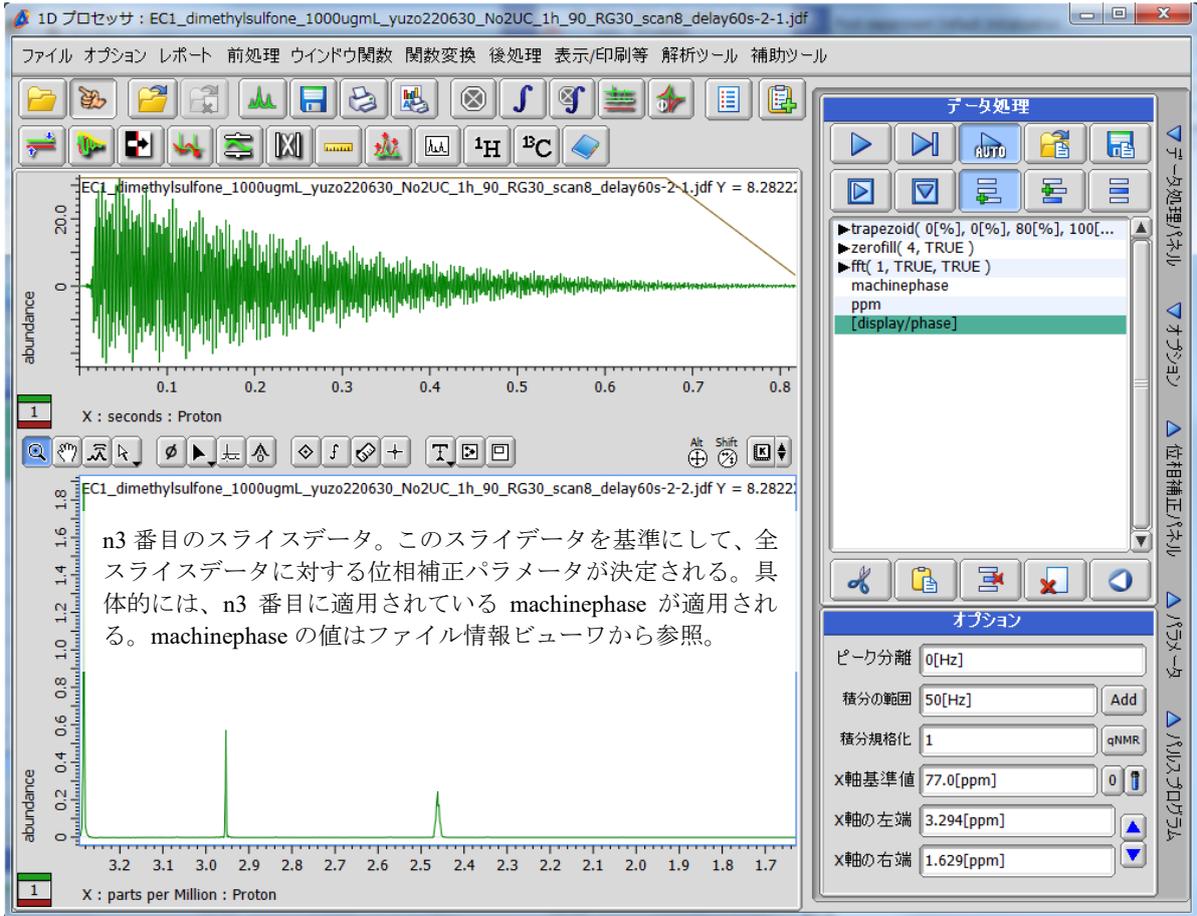


図 21 (3/6) : pw 連続測定データの分光計内部処理方法

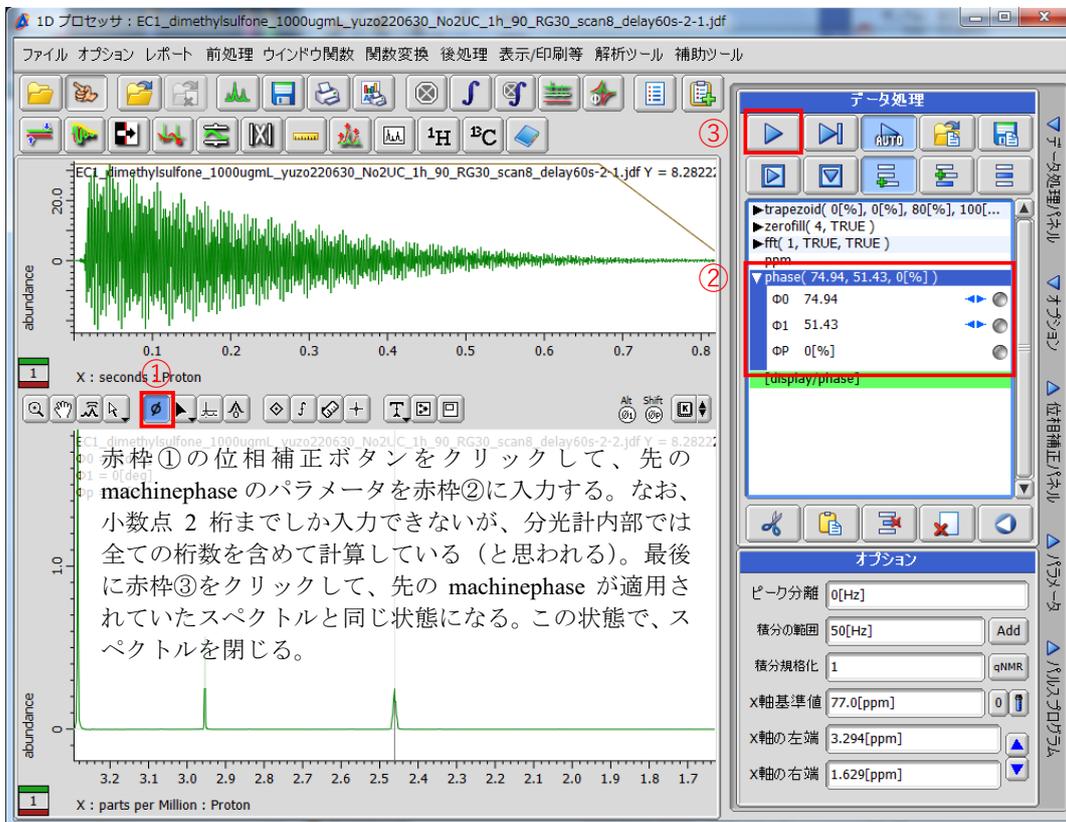
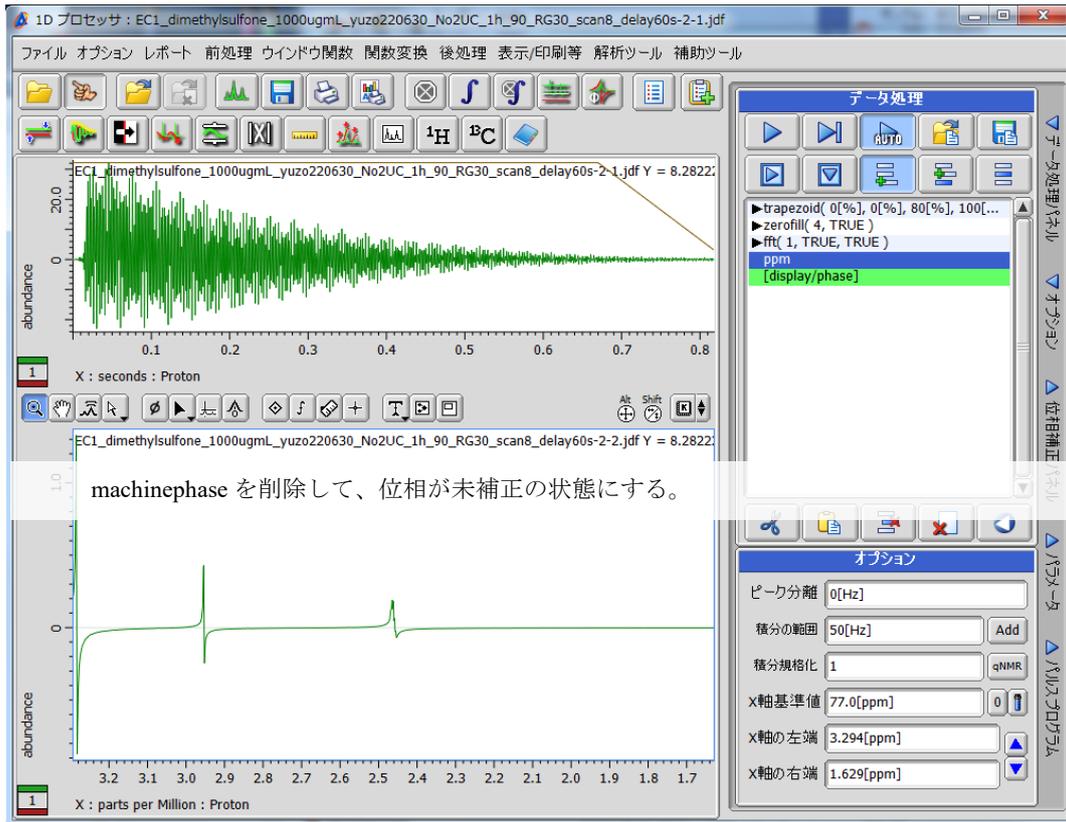
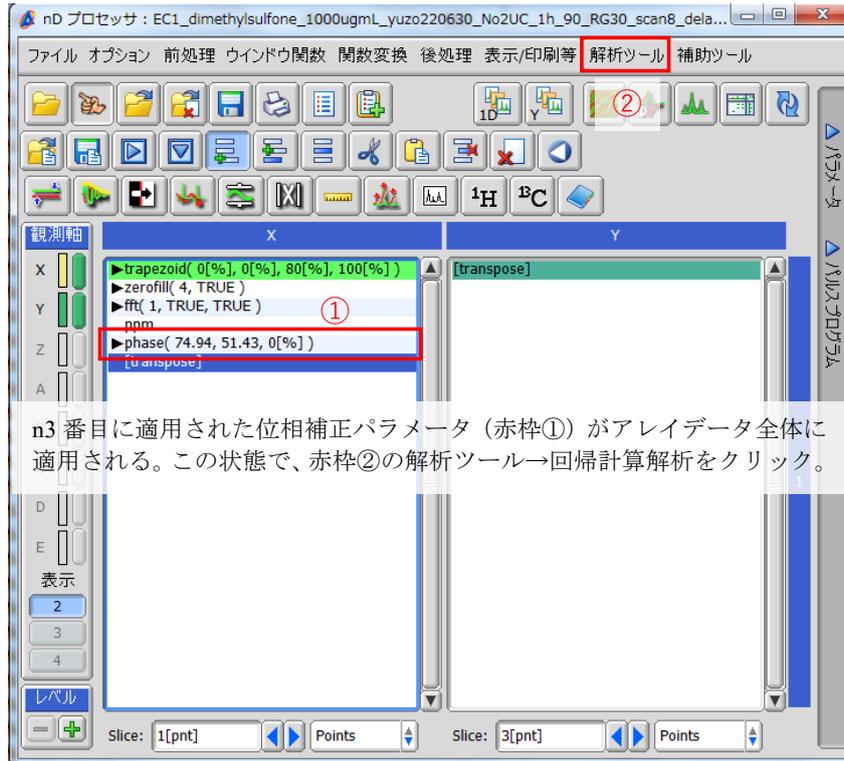
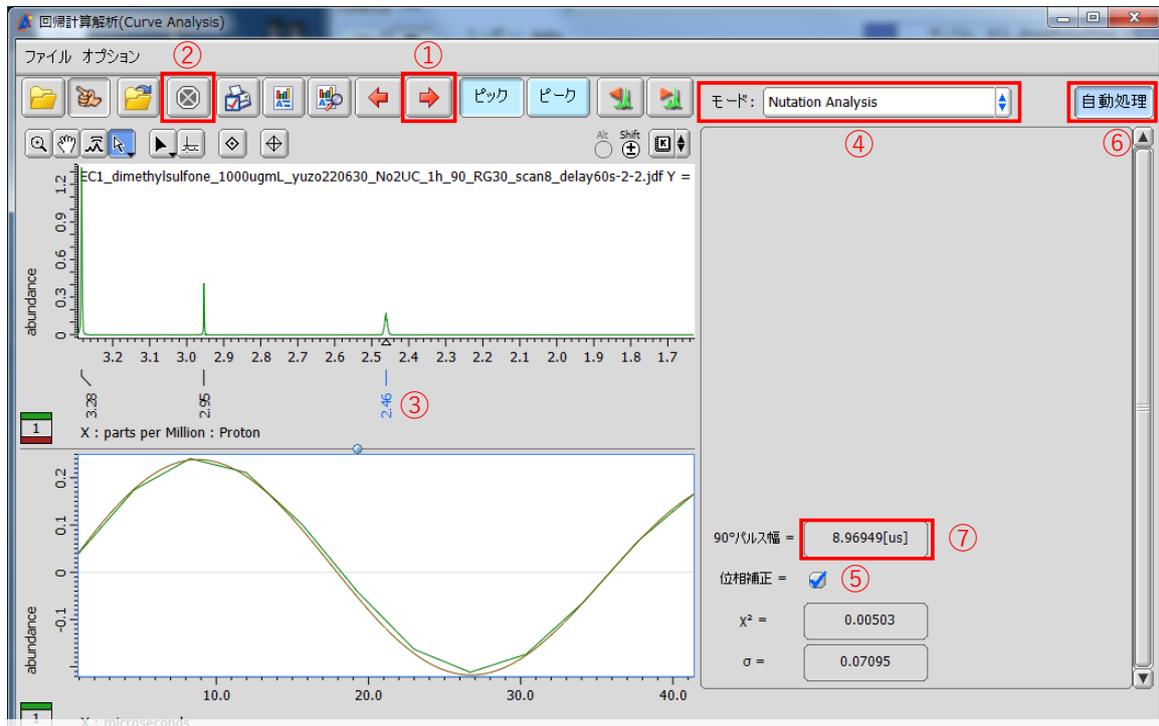


図 21 (4/6) : pw 連続測定データの分光計内部処理方法



n3 番目に適用された位相補正パラメータ (赤枠①) がアレイデータ全体に適用される。この状態で、赤枠②の解析ツール→回帰計算解析をクリック。



赤枠①のボタンを1回クリックして、n2 番目のスライスデータを表示させる。この状態で赤枠②のボタンを押してピークピックを行う。EC-qNMR スクリプトの search_offset_90 及び search_sweep_90 パラメータに従い (それぞれ、2.5 ppm 及び 0.2 ppm)、この範囲内で最も S/N 比の良いピークを選択する。すなわち、③のピークがカーブフィッティングの対象となる。次に、赤枠④からモード: Nutation Analysis を選択し、⑤の位相補正に を入れる。最後に赤枠⑥の自動処理ボタンを押すと、pw90 が算出される (赤枠⑦: 8.96949[us])。

図 21 (5/6) : pw 連続測定データの分光計内部処理方法

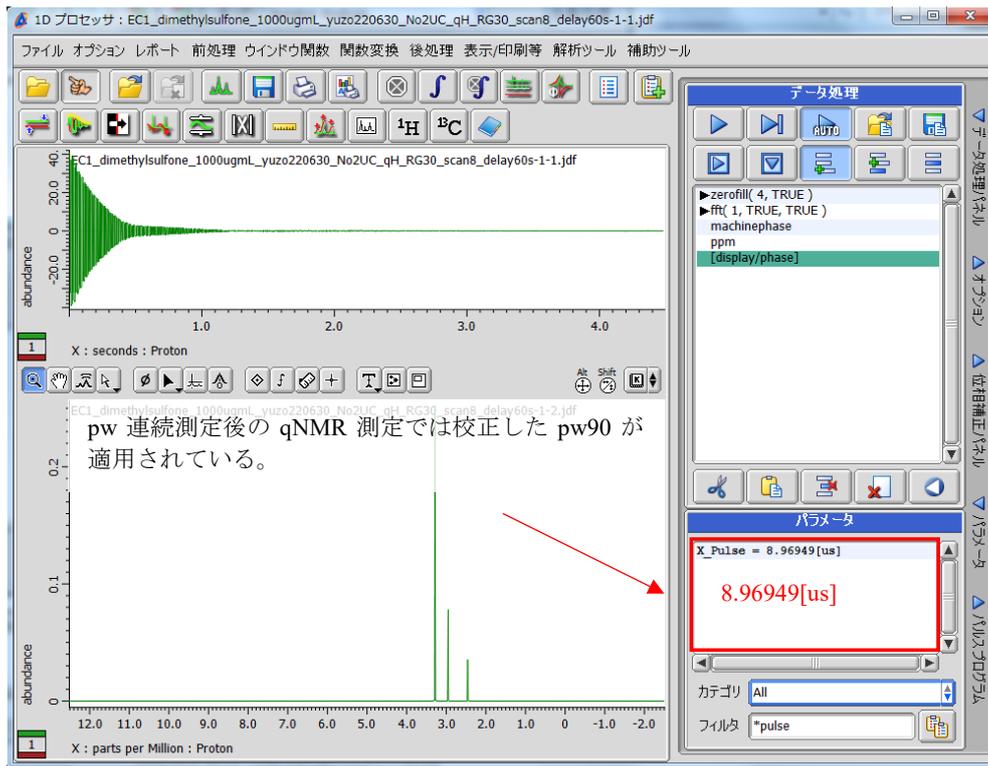


図 21 (6/6) : pw 連続測定データの分光計内部処理方法

令和5年 3月 30日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 食品分析の信頼性確保に資する外部標準法定量 NMR (EC-qNMR) の高度化及び標準化に関する研究 (21KA3008)
3. 研究者名 (所属部署・職名) 食品添加物部 主任研究官
(氏名・フリガナ) 西崎 雄三 (ニシザキ ユウゾウ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
			審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。