

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
課題番号 21KA3008

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 3 年度～令和 4 年度

総合研究報告書

研究代表者 西崎 雄三 国立医薬品食品衛生研究所

令和 5 (2023) 年 3 月

I. 総合研究報告

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

10

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）

総合研究報告書（令和3～4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 相反定理に基づいて、90°パルス幅（pw90）校正を利用した外部標準法定量NMR（EC-qNMR）の高度化及び標準化に関する研究を実施した。具体的には、①EC-qNMR自動測定スクリプトの開発及び②自動測定スクリプトを用いた共同試験を実施した。先行研究において、研究代表者はEC-qNMRの測定手順及び測定条件を最適化しており、これらの手順及び条件を踏襲できる自動測定スクリプトを開発した（→①）。この自動化スクリプトを用いて、6機関のEC-qNMR共同試験を実施した。最適化した測定手順及び測定条件に従って実施した。分析種及び外部標準は、それぞれ安息香酸及びジメチルスルホンを用いた。各機関が算出したBAの純度は全て参照値との誤差が2%以内に収まる良好な結果であった（→②）。このことから、EC-qNMRは十分に高度化できたといえた。本研究班の成果をもとに、EC-qNMRの標準化、さらにEC-qNMRの社会実装が期待できる。

A. 研究目的

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）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、「90°パルス幅（pw90）×ピーク面線／プロトン数／モル濃度」の値、すなわち、1プロトン当たりの感度係数（Q値）は試料間で一定となる。塩濃度の高い試料の場合、ピーク面積は小さくなるが、その分pw90は長くなるので、Q値は一定のままである。Q値を表す式のうち、pw90に注目したい。EC-qNMRを高精度に実施するには試料毎にpw90の校正が必要となる。例えば、200 mM NaClを含有する試料ではNaClを含まない試料と比べてpw90が約1.1倍長くなる¹⁾。もし、pw90を校正しないまま両試料を分析した場合、定量計算に10%の誤差が生じることとなる。このことから、EC-qNMRの正確性の担保にpw90校正が重要であることがわかる。EC-qNMRの測定手順として以下の手順が推奨されている：①試料投入、②

温度安定化、③シム調整、④T&M、⑤pw90校正、⑥qNMR測定。なお、シム調整とT&Mの順番は逆になっても良い¹⁾。

上述の①～⑥の測定手順に従う場合、オペレータは試料毎にpw90を校正し、この校正したpw90の値を次のqNMR測定に反映させる必要がある。この間、オペレータはNMR装置の前に拘束されることになるため、EC-qNMRを通常の研究業務に導入することができない。そこで本研究では、まずEC-qNMR測定の自動化について検討することとした。具体的には、上述の①～⑥の測定手順を踏襲できる自動測定スクリプトの開発を行うこととした。また、正確な定量結果を得るために、オペレータが変更可能なパラメータについて検討することとした。さらに、開発した自動測定スクリプトを用いて、EC-qNMR共同試験を実施し、EC-qNMRの標準化にあたり、さらに検討すべき項目がないか整理することとした。

B. 研究方法

B-1) EC-qNMR 自動測定スクリプト

日本電子(株)と共同で開発した。なお、本研究で開発するスクリプトは日本電子製のNMR分光計で動作する。他社のNMR分光計は検討していない。

B-2) EC-qNMR 共同試験

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-2-1) 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-2-2) 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) は富士フィルム和光純薬(株)から購入した。

B-2-3) 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-2-4) 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

C-1) EC-qNMR 自動測定スクリプト

図1に示す測定手順を踏襲する自動測定スクリプトを開発した。NMRでは照射中心のピーク強度を pw に応じてプロットすると、減衰する正弦波が描かれる²⁾。この特性を利用し、 $pw90$ の校正方法は、分光計が $pw90$ を自動計算できるカーブフィッティング (CF) 法を採用した。この方法は $pw10\sim pw450$ の範囲で pw を変化させる連続測定を行い、このアレイデータに対して、減衰する正弦波を描くモデル関数を適用し、CFから $pw90$ を算出する方法である³⁾。 pw を変化させる連続測定条件は $pw90$ 校正を精度良く実施するためにオペレータが任意に設定できるように設計した (パラメータ: **start90**, **end90**, **step90**, **calc90_relax_delay**)。

C-1-1) アレイデータの描く正弦波が歪む問題の対策

当初、 pw 連続測定の照射中心は、連続測定の前に積算1回の 1H 測定を行い (scout_scan 測定)、スペクトル上で最も高いピークが選択されるように設計した。しかしながら、連続測定中に、化学シフトの動きやすいピークが選択されると、アレイデータの描く正弦波が歪んだ (図2) このことから、 pw 連続測定の照射中心は化学シフトに堅牢なピークを選択することが望ましいと考えられた。具体的には測定溶媒の溶媒ピークが望ましい (NMRはこのピークをロックして、磁場を補正しているため)。そこで、オペレータが任意のピークを pw 連続測定の照射中心に設定できるようにスクリプトを改良することにした。具体的には、照射中心ピークを探す範囲を限定するパラメータ: **search_offset_90** 及び **search_sweep_90** を設けることにした。例えば、**search_offset_90: 3 ppm** 及び **search_sweep_90: 0.1 ppm** と設定した場合、照射中心ピークは 2.95 ppm~3.05 ppm の範囲で最も高いピークが選択される。

C-1-2) アレイデータの描く正弦波の位相が反

転する問題の対策

NMRでは照射中心のピーク強度を pw に応じてプロットすると、減衰する正弦波が描かれる。具体的にはアレイデータの全スライスデータに対して統一した位相補正を行えば、 $pw0\sim pw180$ の範囲でピーク強度は正、 $pw180\sim pw360$ の範囲でピーク強度は負となる。この時の統一した位相補正のパラメータ (Φ_0 , Φ_1 , Φ_p) は、全スライスデータのうち $pw0\sim pw180$ の正の強度を示すスライスデータを基準として設定する必要がある。しかし、もし $pw180\sim pw360$ のスライスデータを基準にして位相補正のパラメータ (Φ_0 , Φ_1 , Φ_p) を設定した場合、本来は正の強度となるスライスデータは負となり、本来は負の強度となるスライスデータは正となる。すなわち、正弦波の位相は反転する。

当初、スクリプトは「奇数番目のスライスデータのうち、符号関係なく強度が最大となるピークを持ったスライスデータを抽出し、このスライスデータを基準にして位相補正のパラメータを設定する」仕様であった。しかし、この奇数番目の制約が設定されていることにより、いくつか測定データでアレイデータが反転することがあった。そこで、奇数番目の制約を外し、「全スライスデータのうち、符号関係なく強度が最大となるピークを持ったスライスデータを抽出し、このスライスデータを基準にして位相補正のパラメータを設定する」仕様に変更した。

C-1-3) 開発したスクリプトの中で編集可能なパラメータ

最後に、開発したスクリプトの中でオペレータが編集可能なパラメータを図3に示す。 pw 連続測定用のパラメータとして **start90**, **end90**, **step90**, **calc90_relax_delay** を用意した。また、先行研究に従い¹⁾、これらの推奨条件は、プローブに記録されている $pw90$ の値を基準にして **start90** (初期値): $pw10$ に相当する pw , **end90** (終了値): $pw450$ に相当する pw , **step90** (間隔): $pw40$ に相当する pw , **calc90_relax_delay** (遅延時間): 60秒とした。

さらに、連続測定 of 照射中心を任意に選択できるように、**search_offset_90** 及び **search_sweep_90** を用意した。照射中心は溶媒ピークが適切であり、例えば DMSO-*d*₆ の場合は、**search_offset_90** : 2.5 ppm, **search_sweep_90** : 0.1 ppm と設定すると良い。

その他のパラメータは qNMR 用のパラメータである。これらのパラメータは、食品添加物公定書、日本薬局方や日本産業規格 (JIS) などを参考に用意した。

C-2) EC-qNMR 共同試験

開発したスクリプトを用いて共同試験を実施することとした。参加機関には共同試験のマニュアルを配布した。最適化した測定手順、最適化した pw90 校正条件及び qNMR 測定条件をマニュアルに記載し、参加機関はこれらに従って EC-qNMR を実施することとした。共同試験の結果を図 4 に示す。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 4 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。

図 1 に示したように、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 4, 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 自動測定スクリプトを開発した。これにより、誰もが簡便に EC-qNMR を実施できるようになった。さらに、開発した自動測定スクリプトを用いて、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。最適化した測定手順、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) Keifer P.A: 90° Pulse width calibrations: How to read a pulse width array. *Concepts Magn. Reason.*, 11(3), 165–180 (1999).
 - 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: 外部標準法定量NMR (EC-qNMR) の紹介. Japan Analytical Instruments Active users Network (JAIAN) (2021年5月26日)
- 2) 西崎雄三: 外部標準法定量NMRのすすめ. 国立衛研例会 (2022年1月25日)
- 3) 西崎雄三, 建部千絵, 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市販試薬の純度測定. 日本農芸化学会2022年度大会 (2022年3月17日)
- 4) 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
- 5) 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)
- 6) 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時の補正について. 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) Giancaspro G, Adams K.M, Bhavaraju S, Corbett C, Diehl B, Freudenberger J.C, Fritsch K, Krishnamurthy K, Laatikainen P, Martos G,

Miura T, Nam J, Niemitz M, Nishizaki Y, Sugimoto N, Obkircher M, Phansalkar R, Ray G.J, Saito T, Sørensen D, Urbas A, Napolitano J.G, Tadjimukhamedov F, Bzhelyansky A, Liu Y, Pauli G.F: The qNMR Summit 5.0: Proceedings and Status of qNMR Technology, *Analytical Chemistry*, 93(36), 12162–12169 (2021).

- 2) 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.
- 3) 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

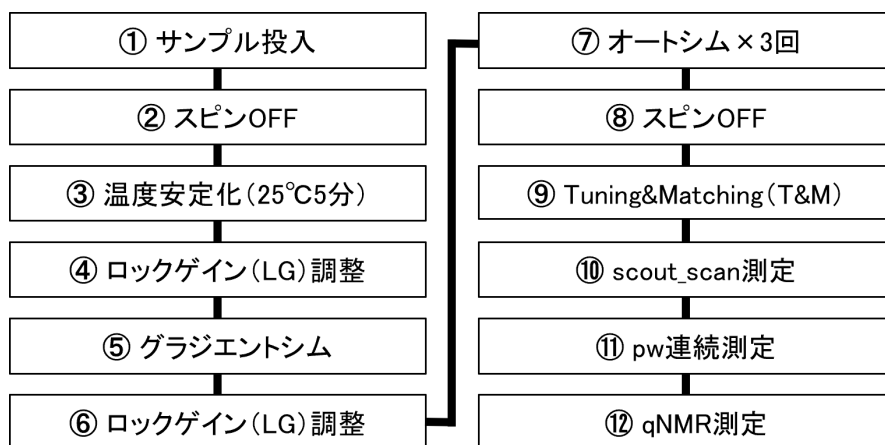


図 1 : EC-qNMR 測定手順

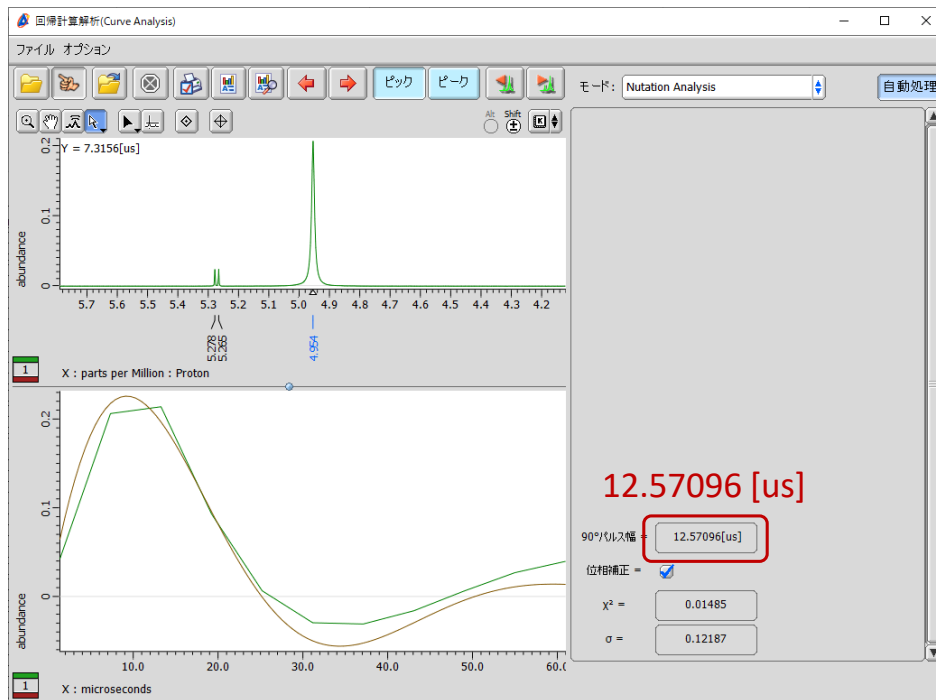


図 2 : 正弦波が歪んだ際のアレイデータ

▶	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 3 : EC-qNMR 測定条件の設定画面

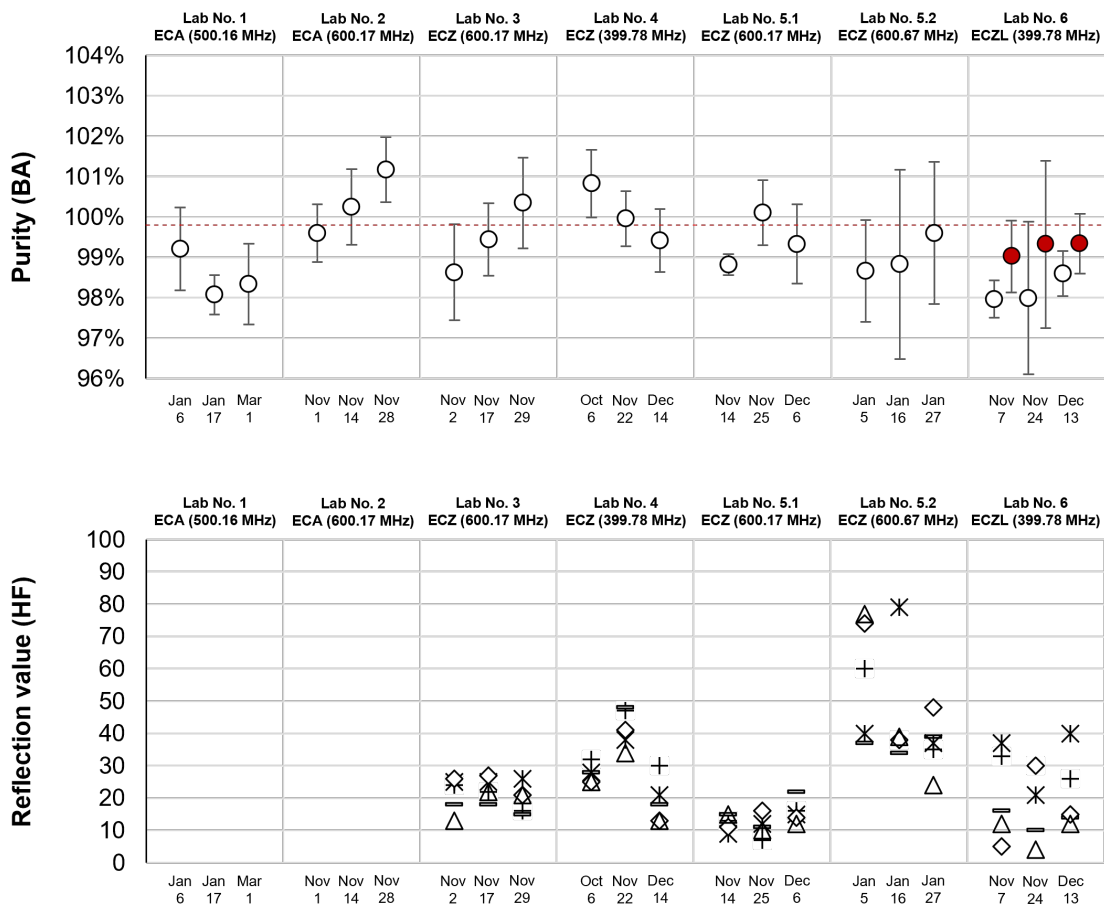


図4 EC-qNMR 共同試験の結果

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。

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
Giancaspro G, Adams K.M, Bhavaraju S, Corbett C, Diehl B, Freudenberger J.C, Fritsch K, Krishnamurthy K, Latikainen P, Martos G, Miura T, Nam J, Niemitz M, <u>Nishizaki Y</u> , Sugimoto N, Obkircher M, Phansalkar R, Ray G. J, Saito T, Sørensen D, Urbas A, Napolitano J.G, Tadjimukhamedov F, Bzhelyansky A, Liu Y, Pauli G.F	The qNMR Summit 5.0: Proceedings and Status of qNMR Technology	<i>Analytical Chemistry</i>	93 (6)	12162-12169	2021
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。

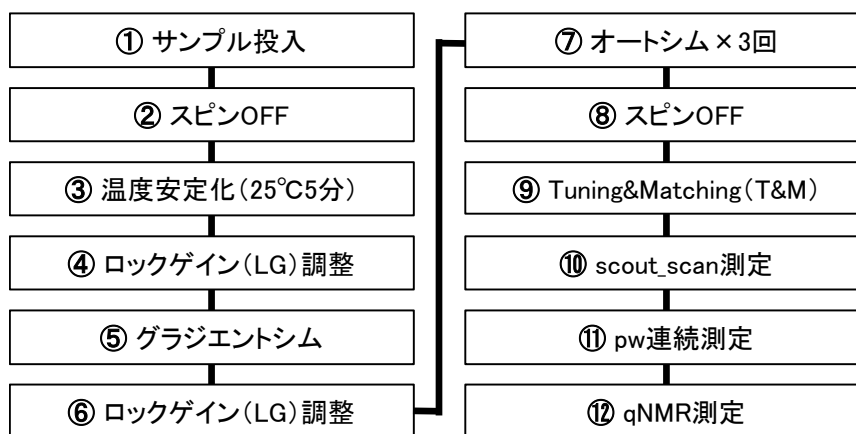


図 1 : EC-qNMR 測定手順

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。

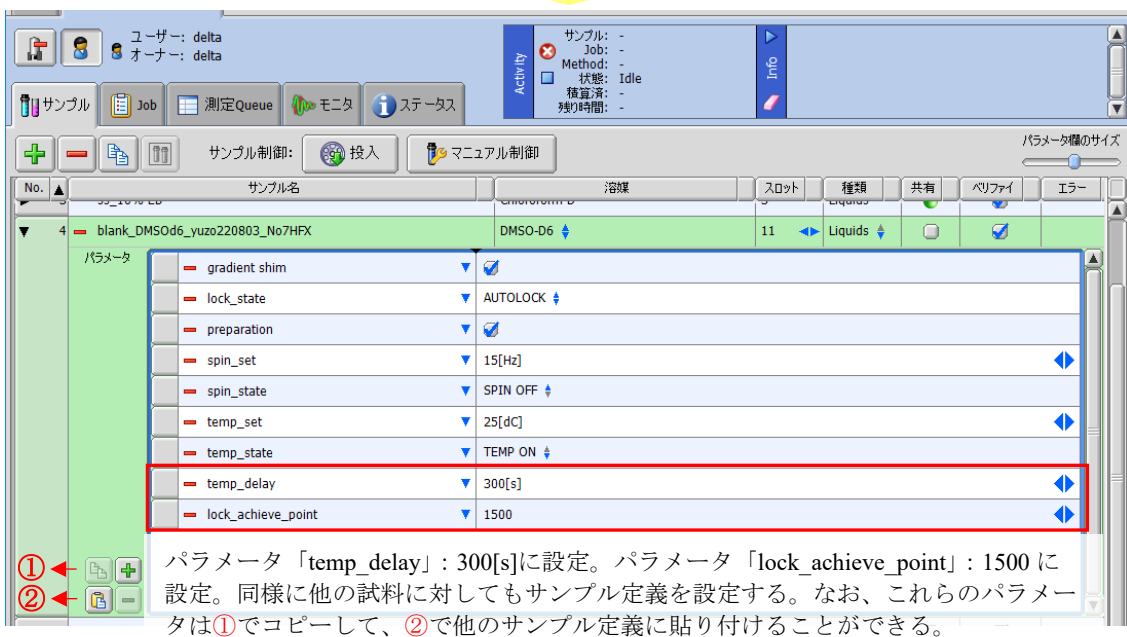
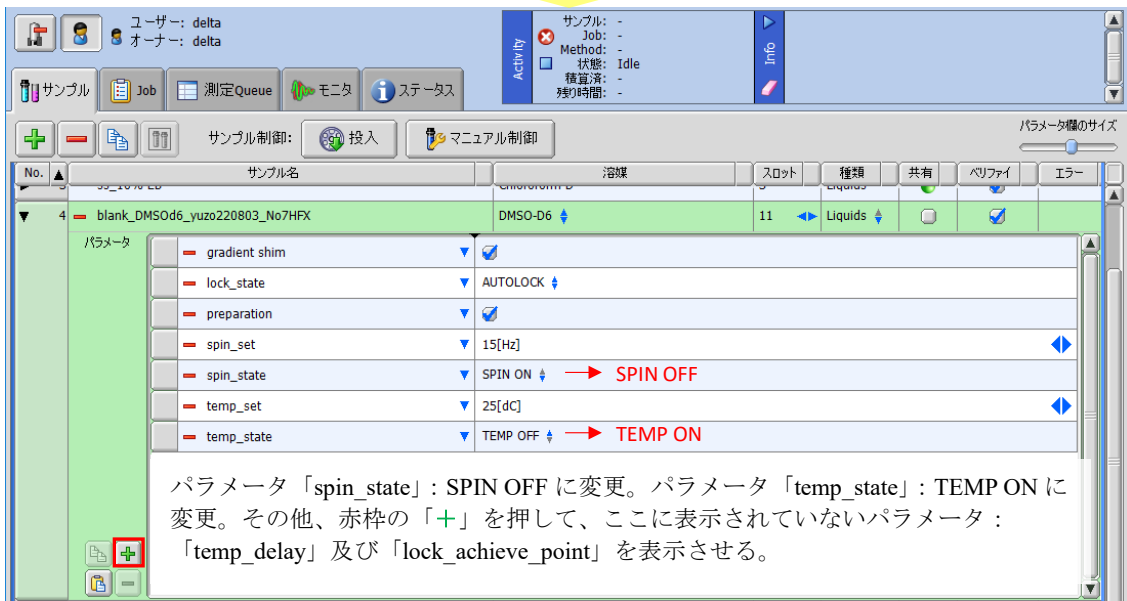


図 2 : サンプル定義の設定

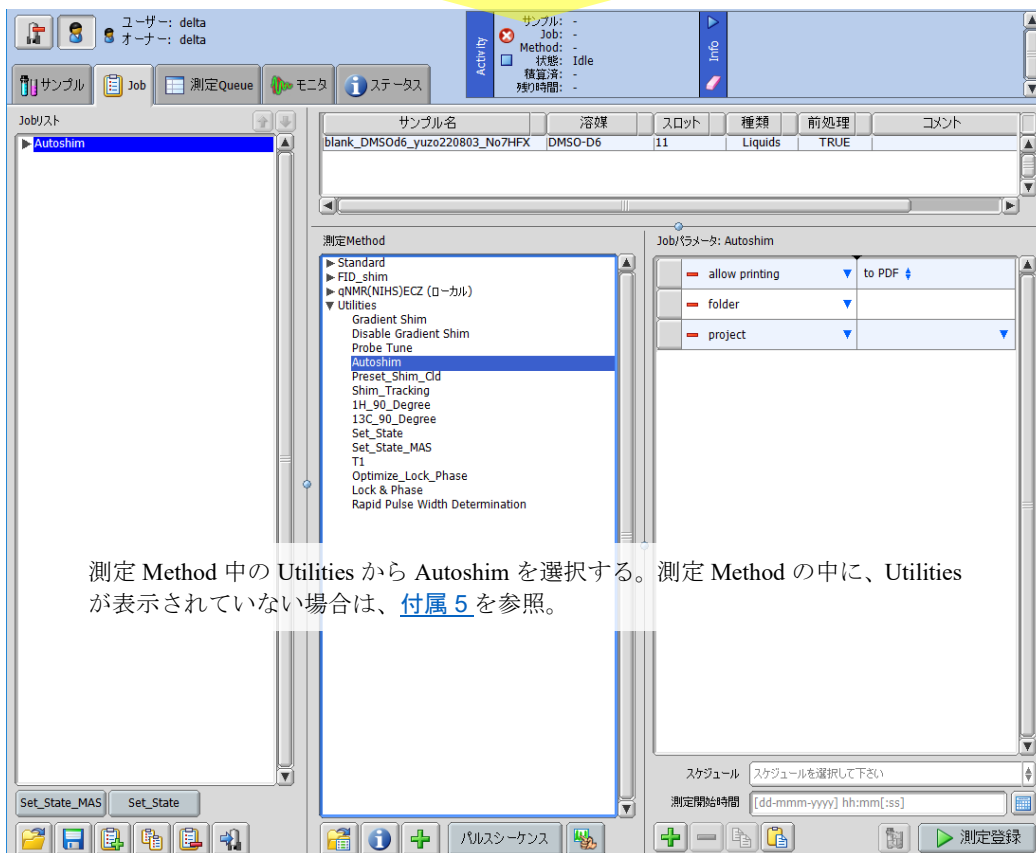
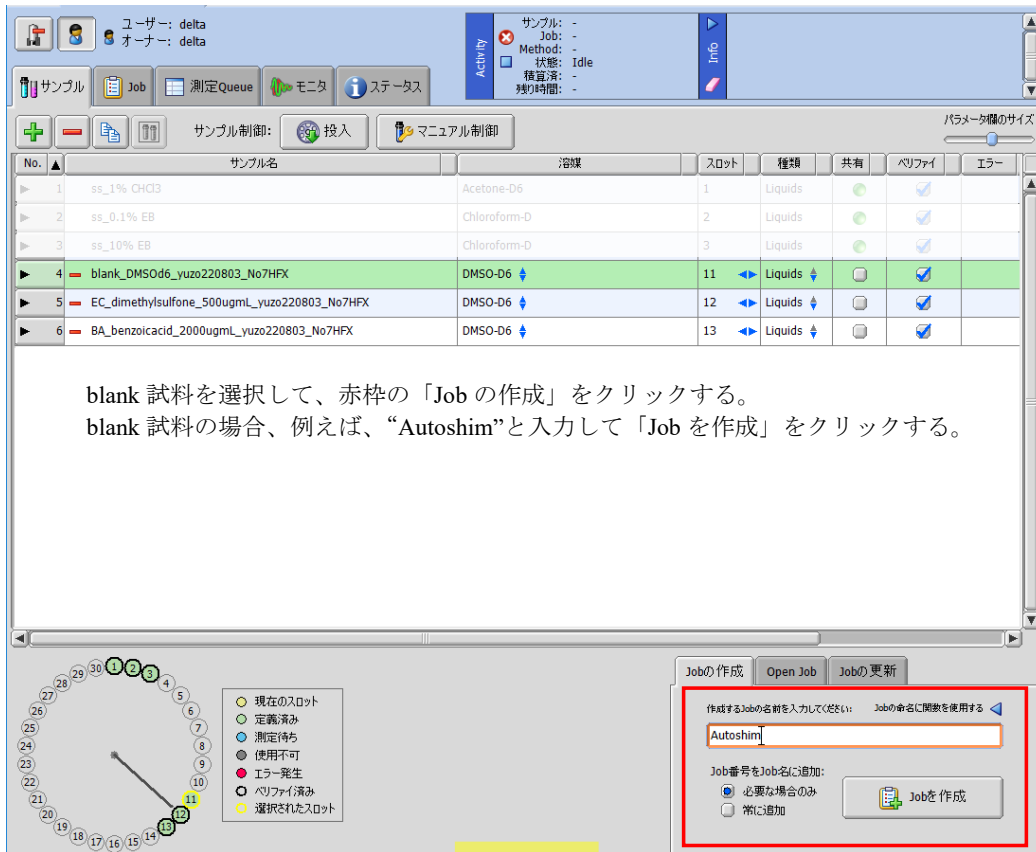
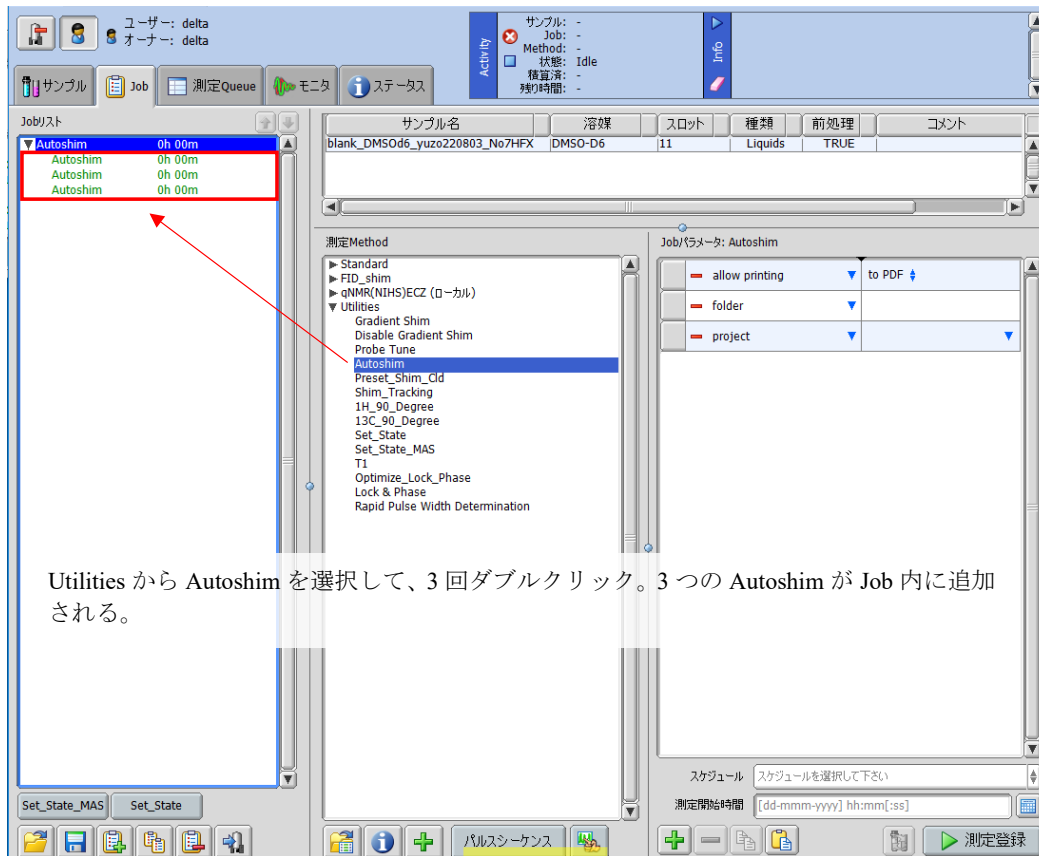
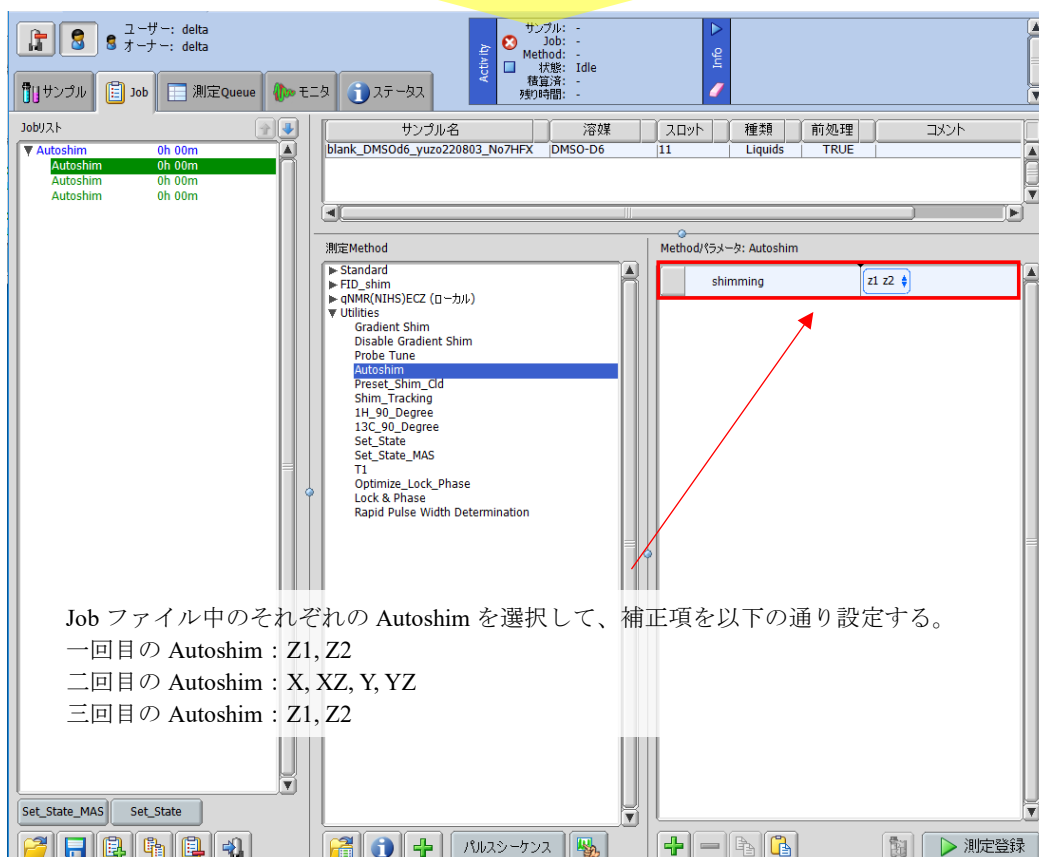


図 3 (1/2) : Blank 用の Job ファイルの設定 (ECZ 利用者のみ)



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)

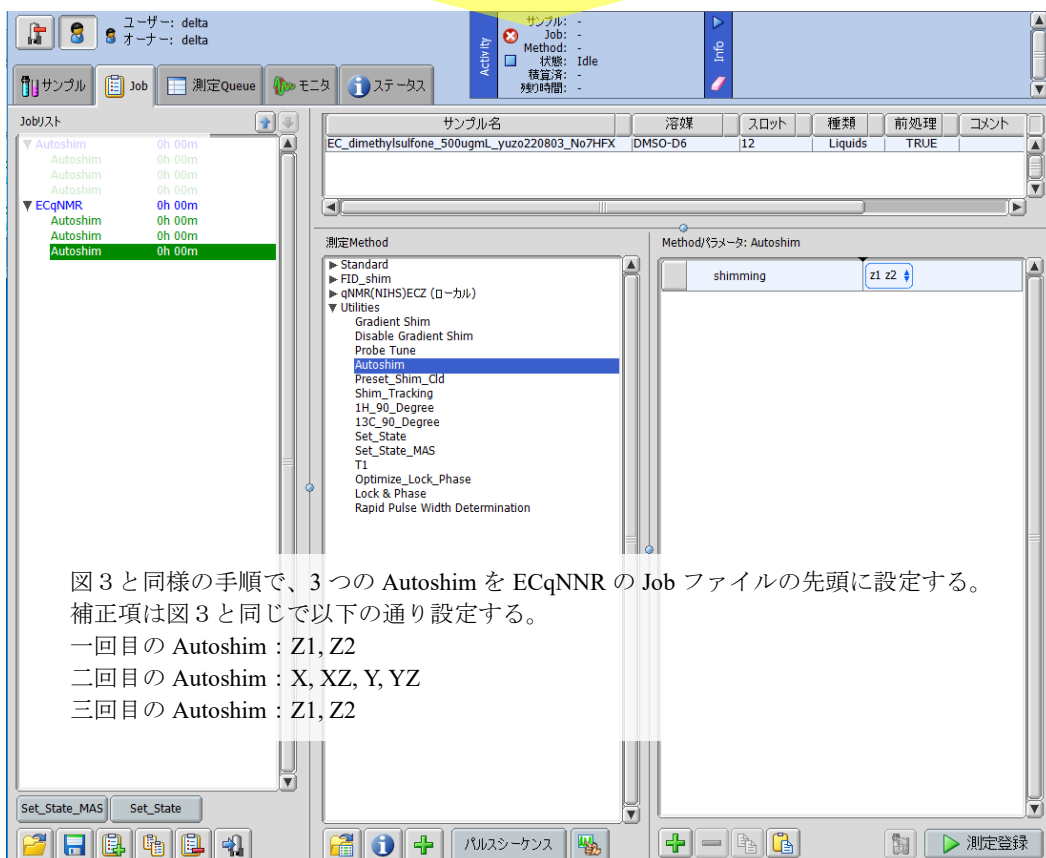
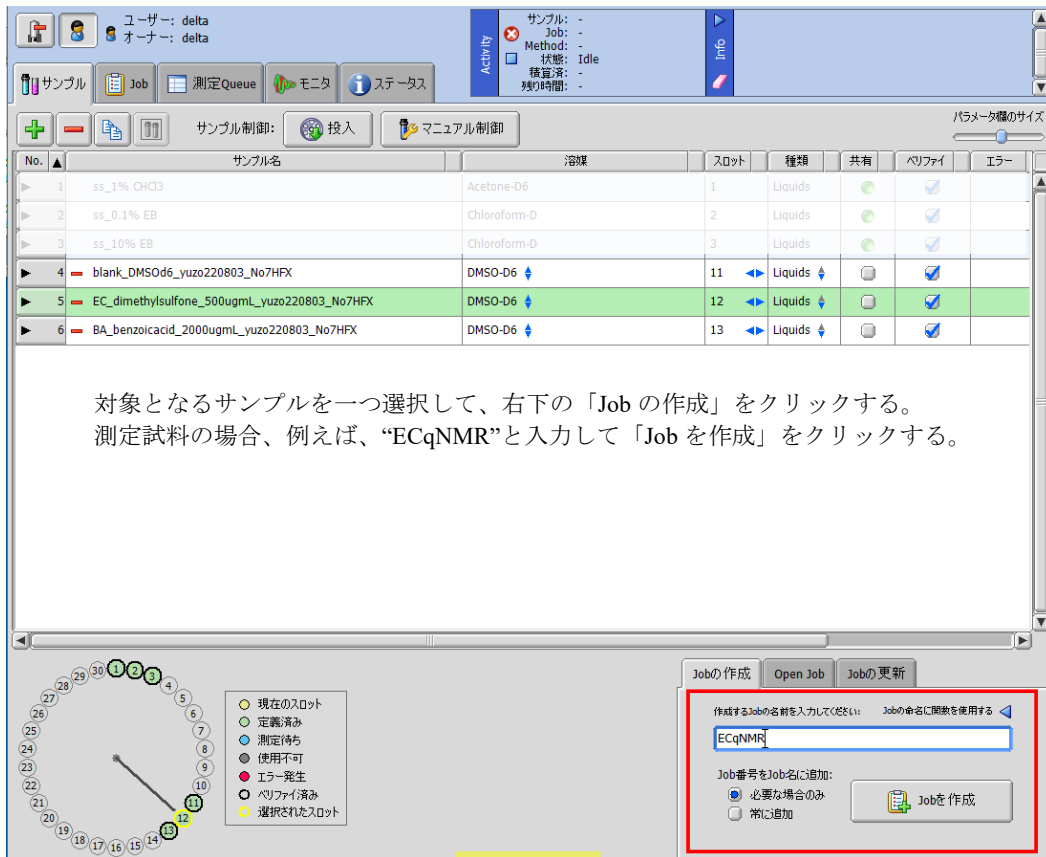


図 4 (1/2) : EC 及び BA 用の Job ファイルの設定

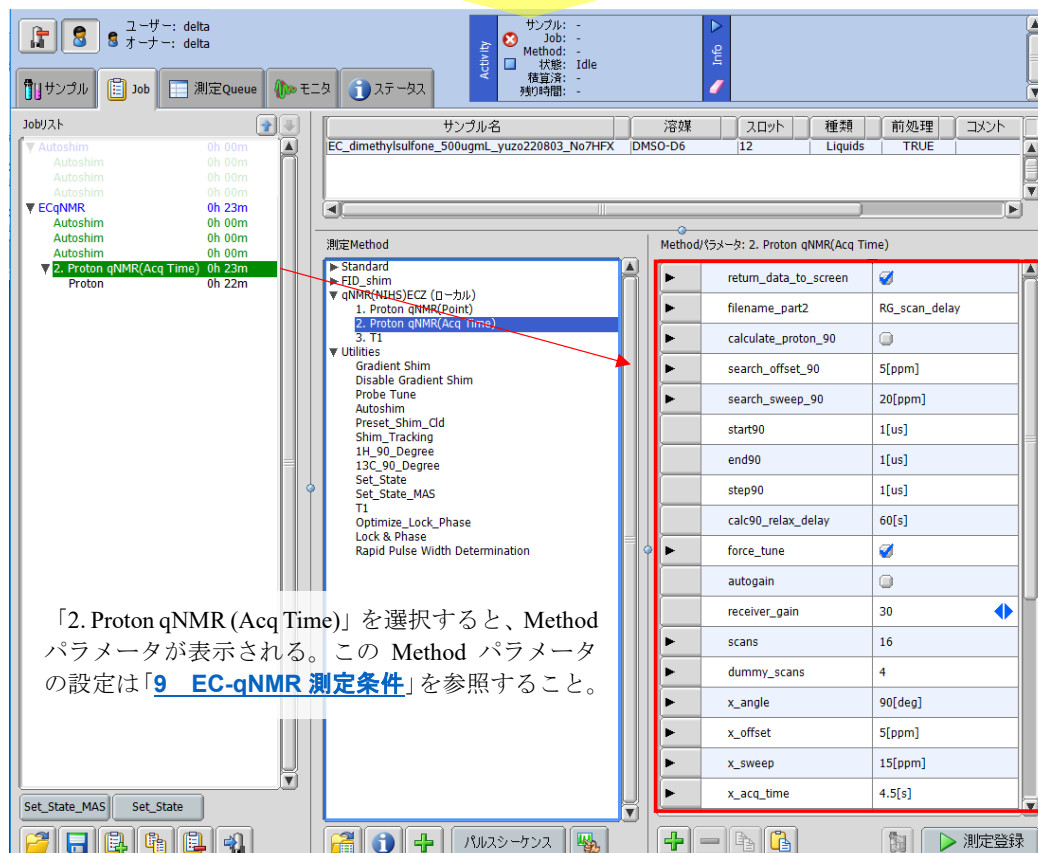
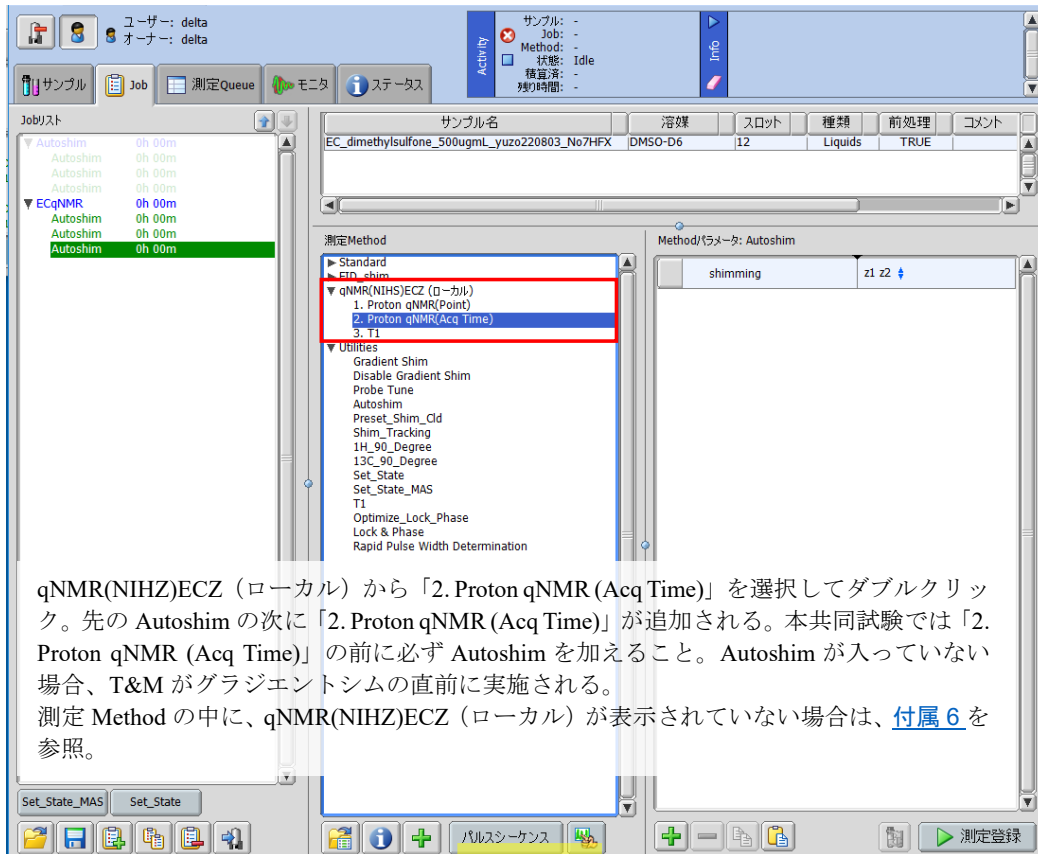


図 4 (2/2) : EC 及び BA 用の Job ファイルの設定

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。

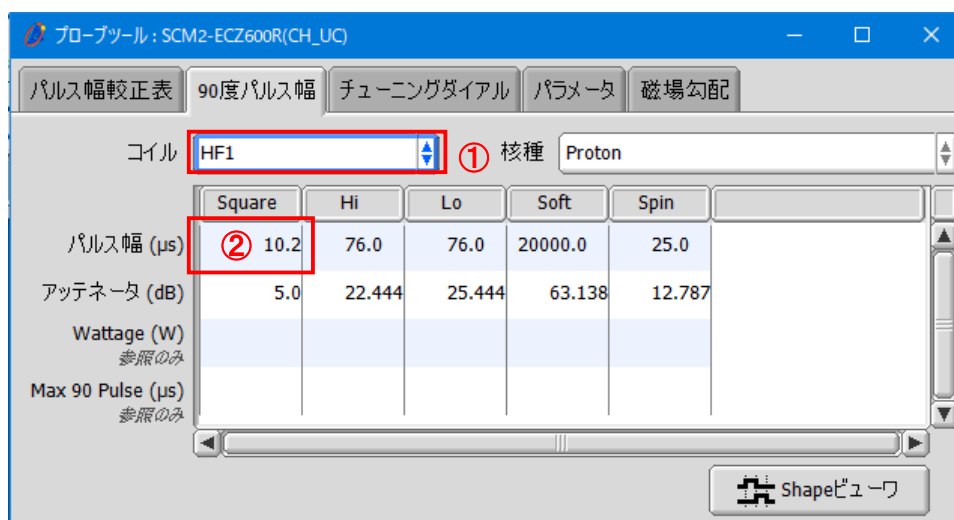
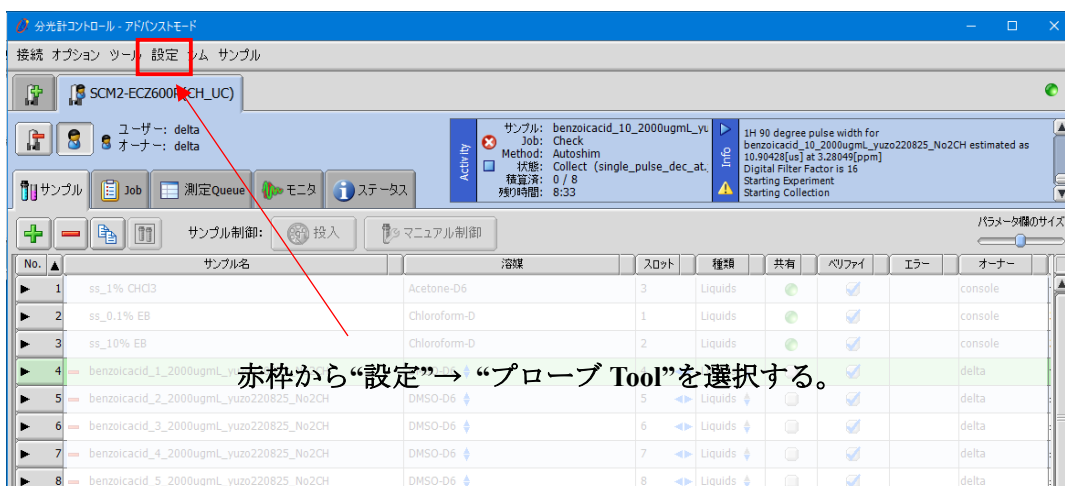
▶	return_data_to_screen	<input type="checkbox"/>
▶	filename_part2	RG30_scan8_delay60s
▶	calculate_proton_90	<input checked="" type="checkbox"/>
▶	search_offset_90	2.5[ppm]
▶	search_sweep_90	0.2[ppm]
	start90	0.92222222[us]
	end90	41.6[us]
	step90	3.68888889[us]
	calc90_relax_delay	60[s]
▶	force_tune	<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。

表 2 : EC-qNMR Method パラメータの設定根拠		
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

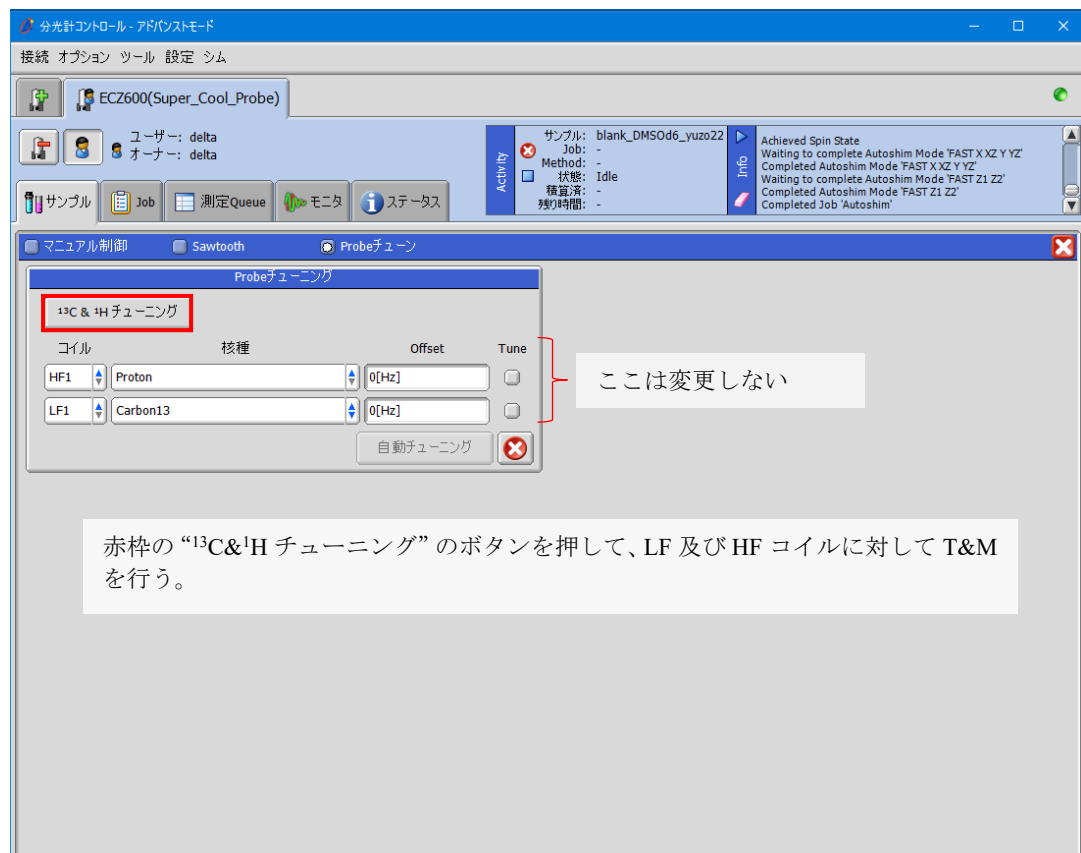
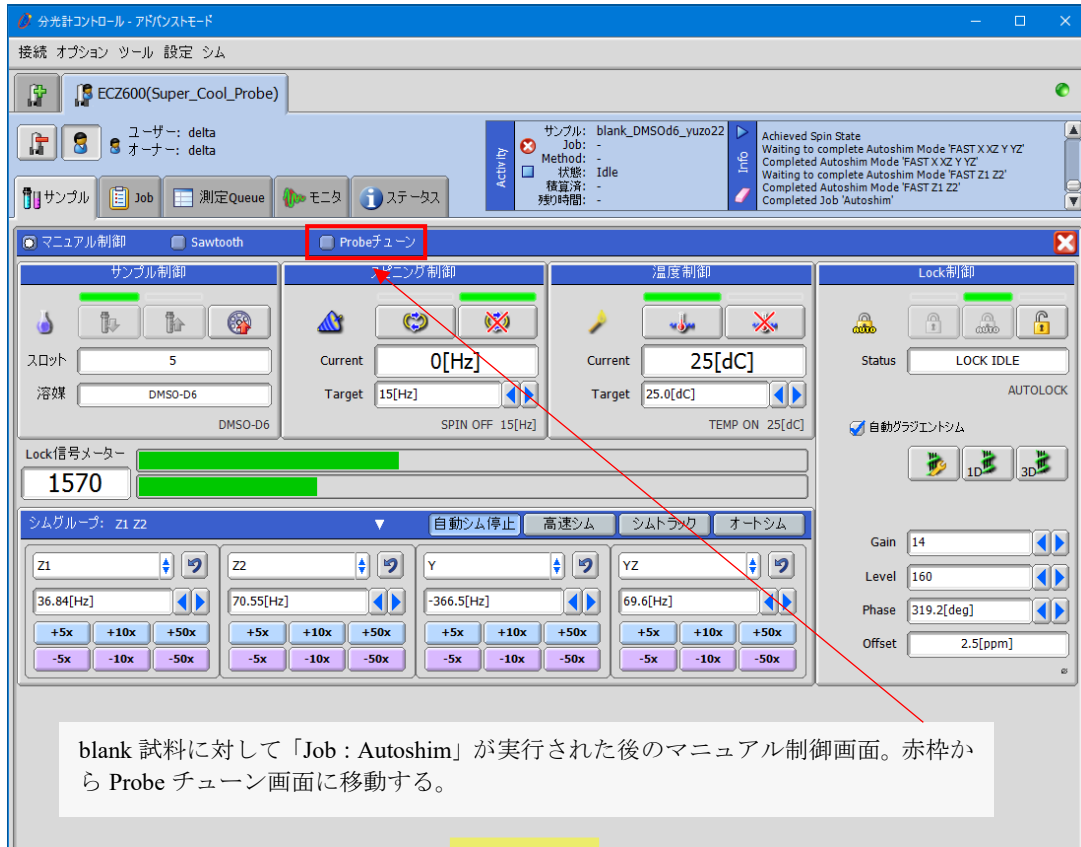
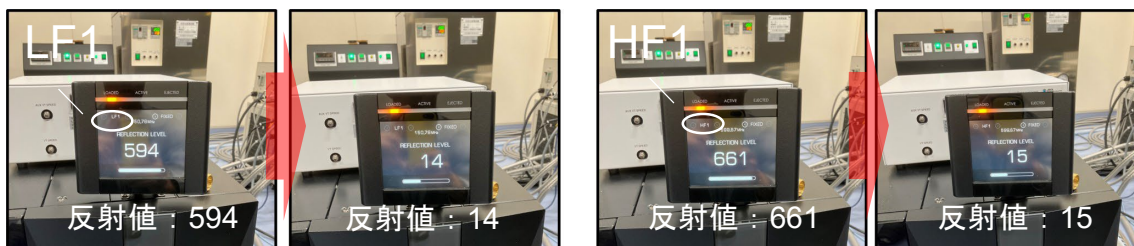


図 8 (1/3) : T&M の再現性の確認方法

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

自動グラジエントシム: 1D, 3D

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

シムグループ: z1 z2

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

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

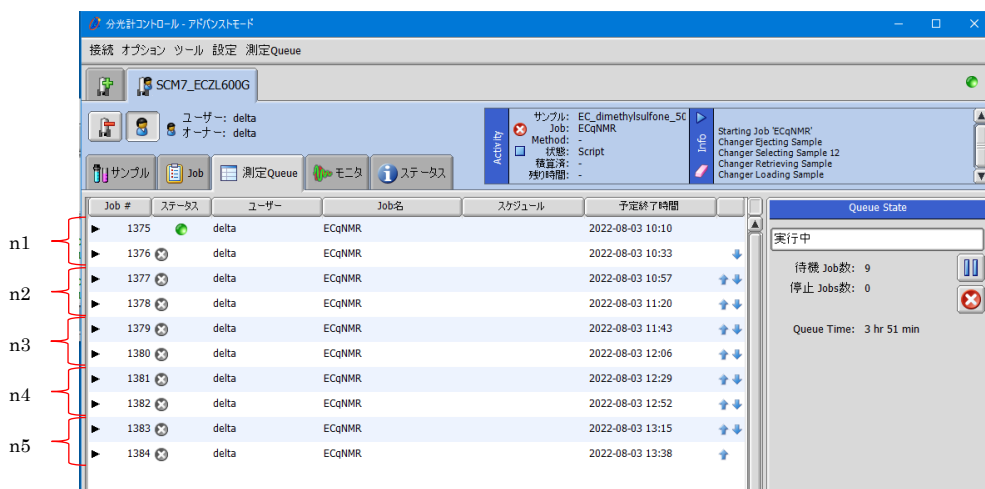
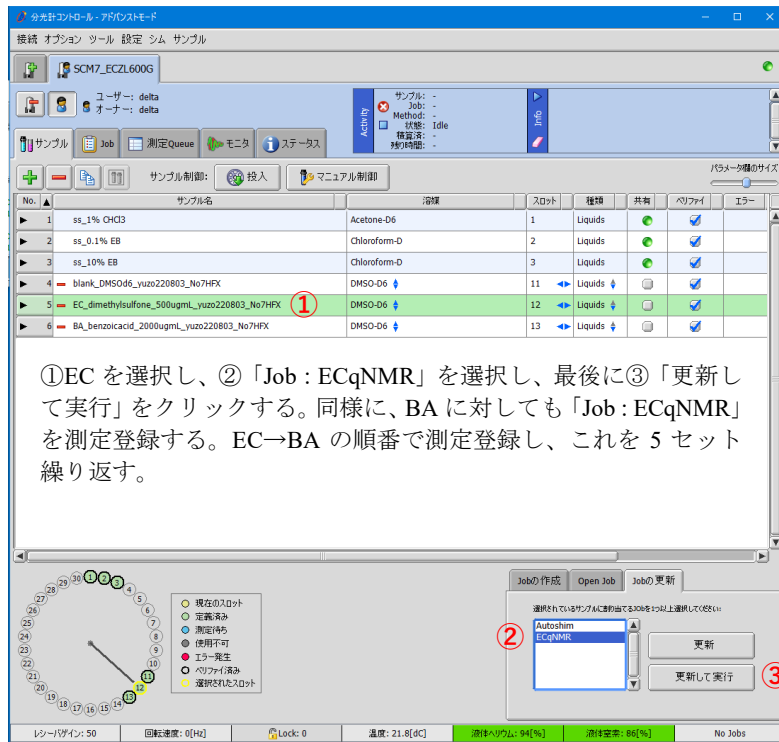
① 回転を止める
 ② シムグループ : Z1 Z2 を選択
 ③ 高速シムのボタンを押す

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 organized into two columns, with 12 numbered steps (① to ⑫) corresponding to the legend provided at the bottom of the window.

Left Column Log:

- 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'

Right Column Log:

- 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...
- nutatation_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'

Legend:

- ① サンプル投入
- ② スピンOFF
- ③ 温度安定化
- ④ LG調整
- ⑤ Gradinetshim
- 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）。

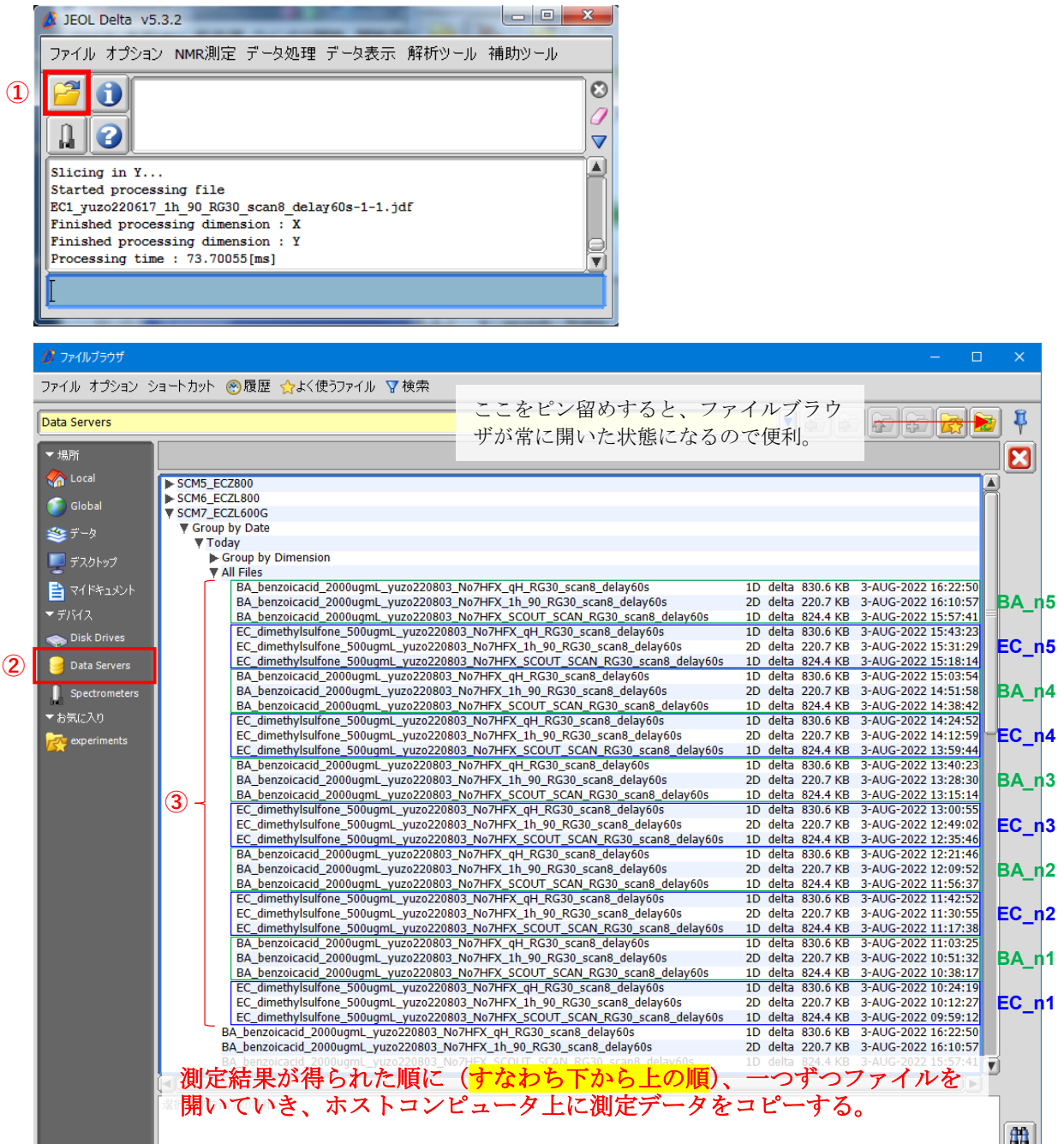
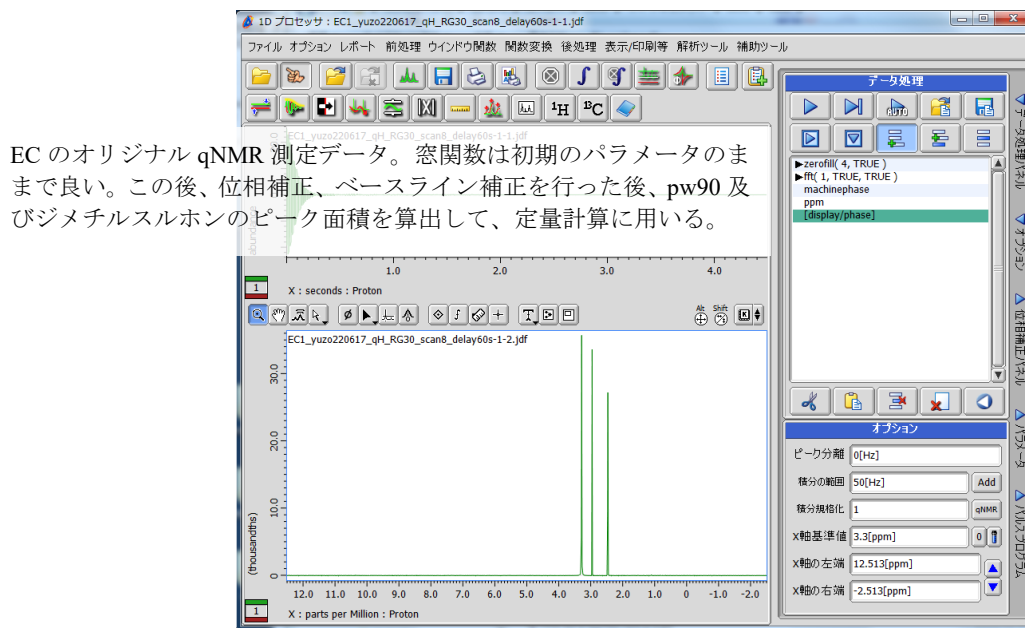


図 11 : EC-qNMR 測定データの取得方法

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）。



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。

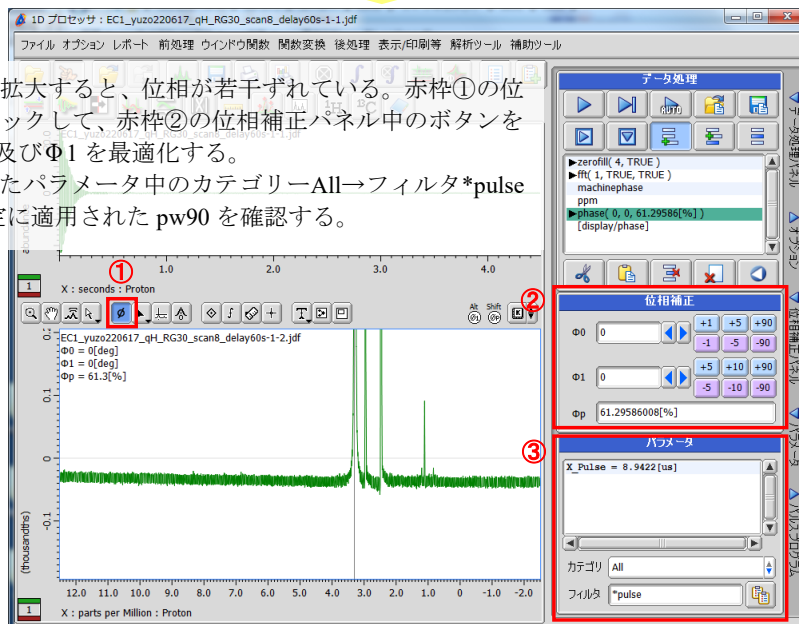
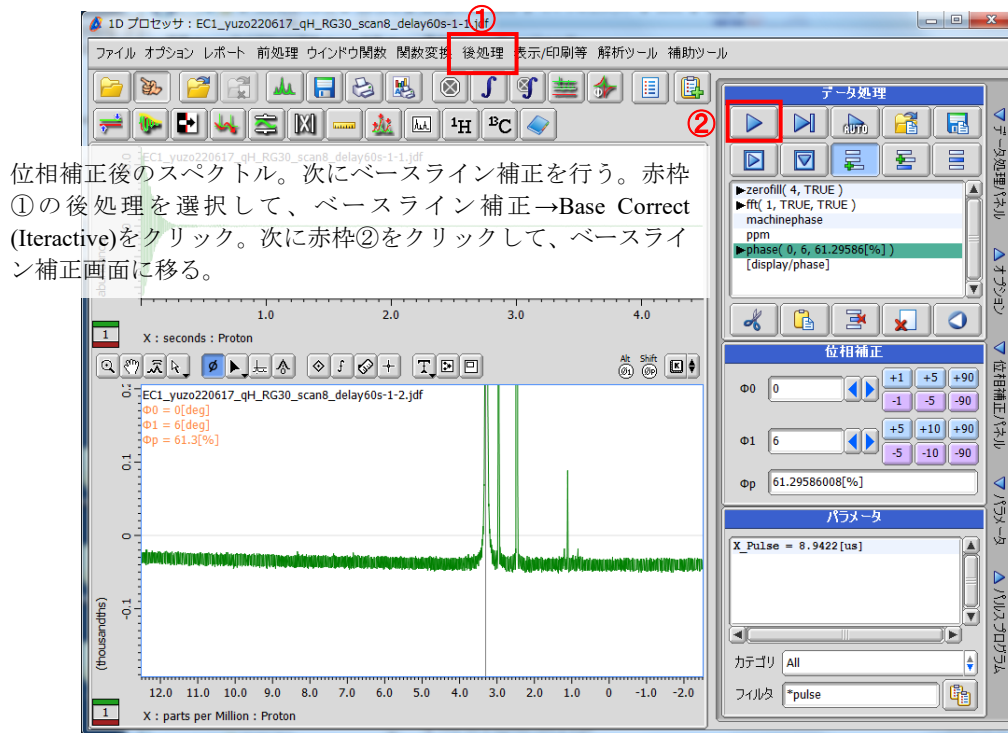
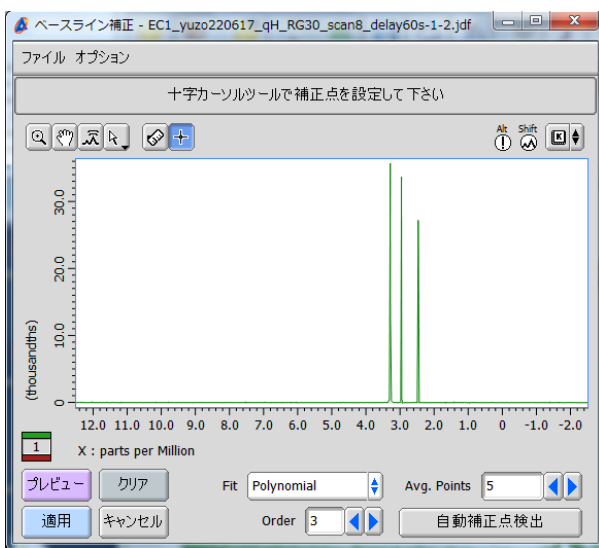


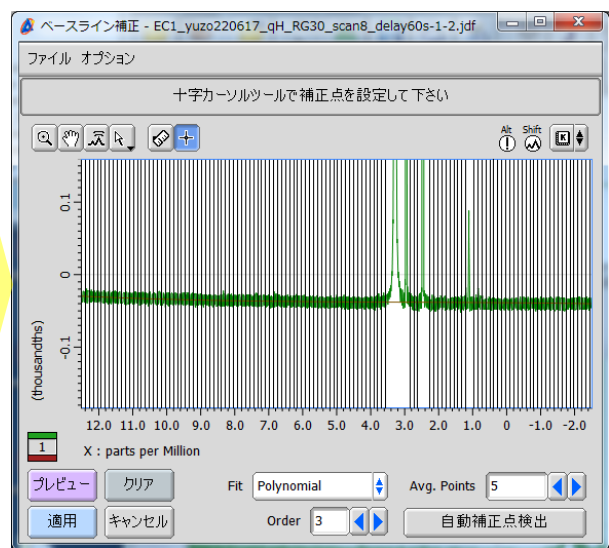
図 12 (1/3) : EC-qNMR 測定データの解析方法



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。

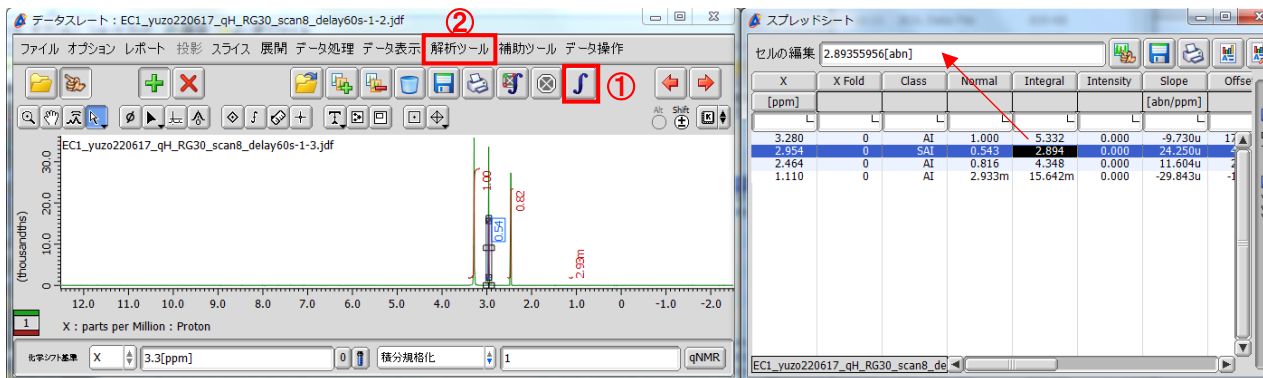
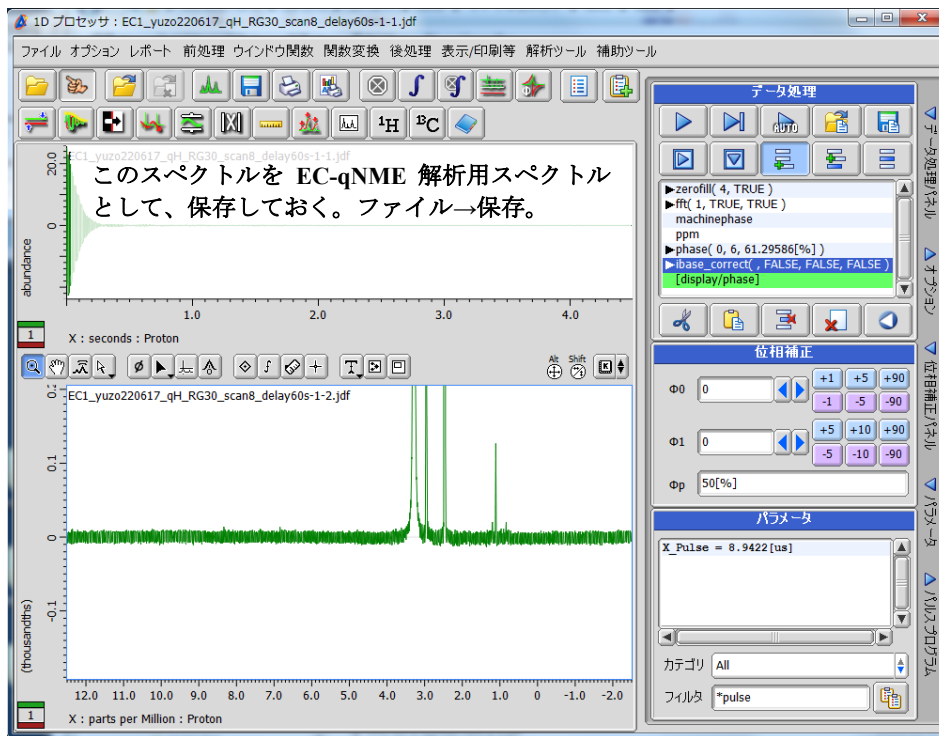


ベースライン補正画面。Fit : polynomial (おすすめ) を選択した後、自動補正点検出をクリック。Avg.Points 及び Order は各自で最適化する。



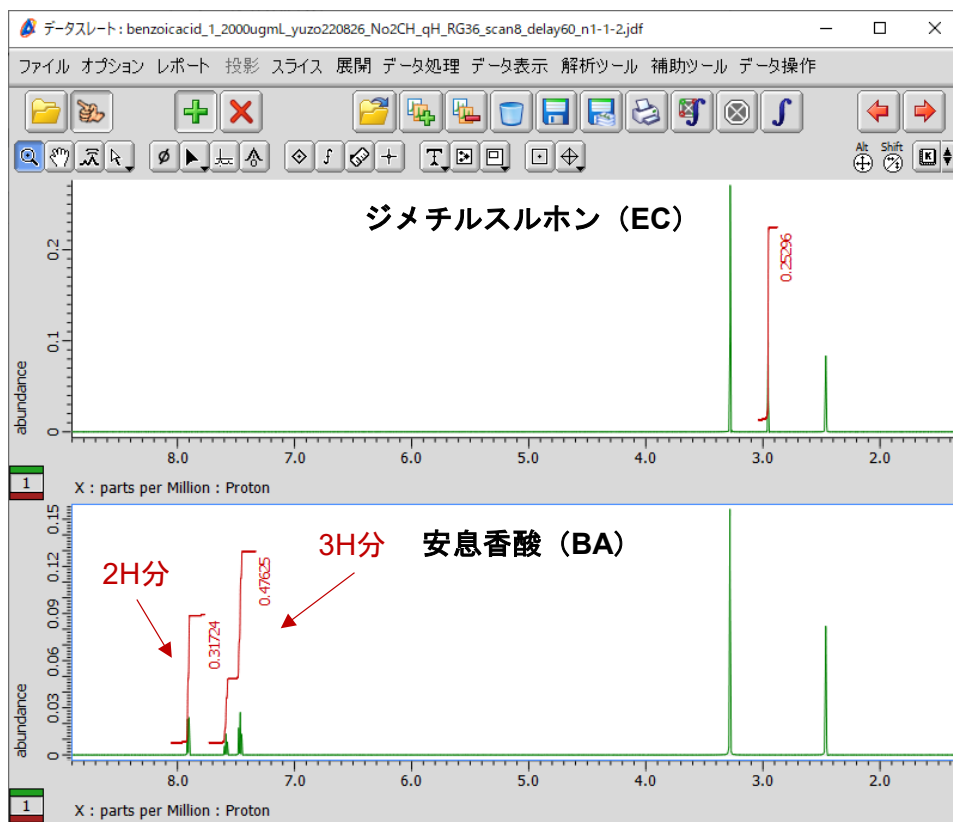
自動補正点が表示される。不必要な補正点は端に寄せるか、削除する。自動補正点を確認した後、適用をクリック。

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		
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_n5		
1						#DIV/0!			Blank_n6		
2						#DIV/0!			Blank_n7		
3	2022/mm/dd	15.000				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	Blank_n8		
4						#DIV/0!			Blank_n9		
5						#DIV/0!			Blank_n10		

① 測定データ記入欄_1日目
 ② AVE

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。

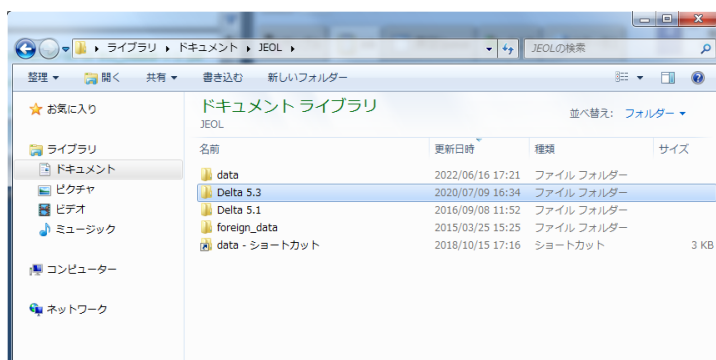
EC 原液 及び **EC 希釈液** は 3 本の NMR 管に移して封管し、国立衛研に配布する。国立衛研は **EC 原液**、**EC** 及び **EC 希釈液** を用いて、NMR 装置の直線性を確認する。

付属 3 : EC-qNMR スクリプトのセットアップ

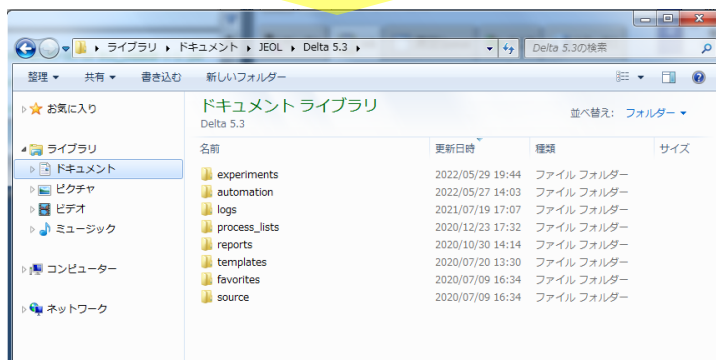
EC-qNMR 自動測定スクリプトのセットアップ方法について説明する。本セットアップは、「[1 ホストコンピュータへのスクリプトファイルのコピー](#)」、「[2 ホストコンピュータへの experiment ファイルのコピー](#)」及び「[3 分光計へのプロセスリストのアップロード](#)」からなる。**重要！！→すべての作業を終えた後は、一度 Delta ソフトウェアを閉じて、分光計をオーナー接続すると変更が更新される。**

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

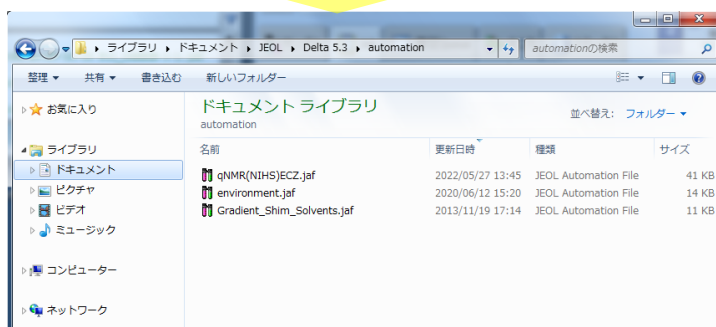
1. Windows OS に delta ユーザーでログインする。
2. セットアップ CDROM をドライブにセットする。
3. エクスプローラーより CDROM を開き、[automation]フォルダを開く。
4. 「qNMR(NIHS)ECZ.jaf」または「qNMR(NIHS)ECA.jaf」を装置機種に合わせて以下のフォルダにコピーする。C > Users > delta > Documents > JEOL > Delta 5.X > automation
5. 「Gradient_Shim_Solvents.jaf」、「environment.jaf」も同様のフォルダにコピー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

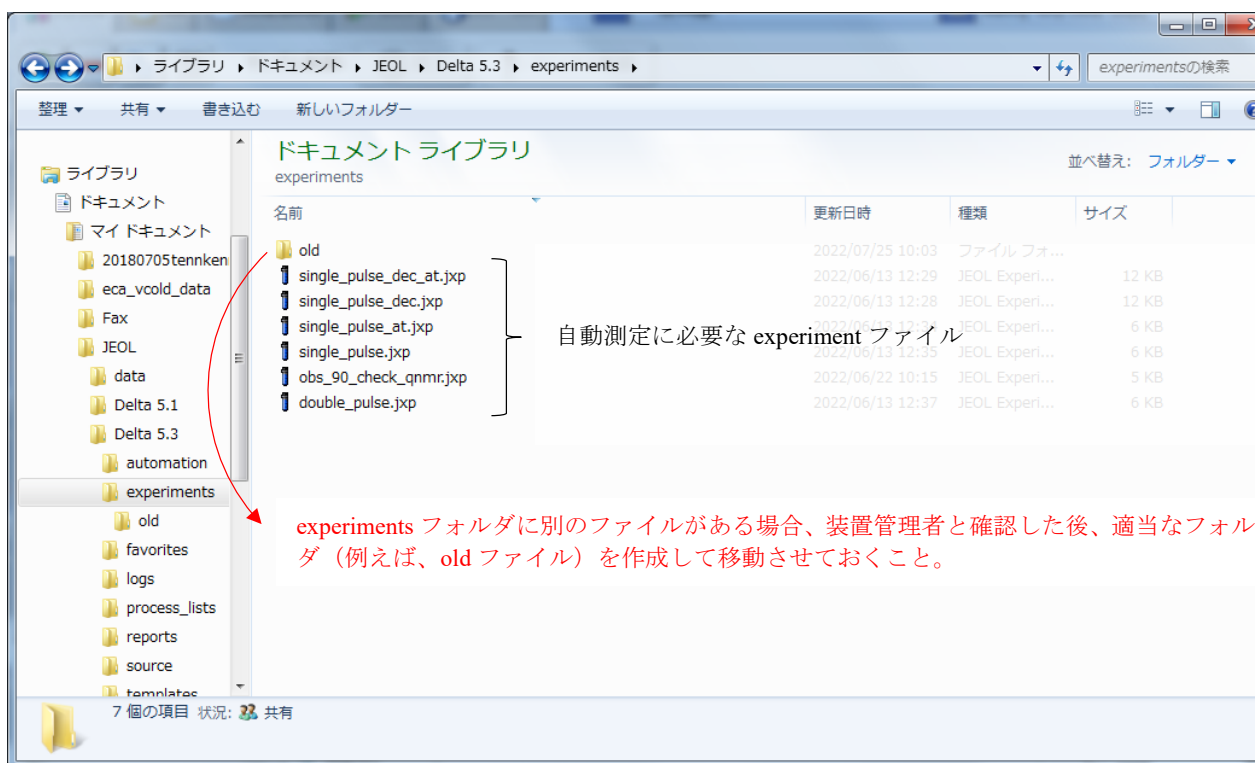


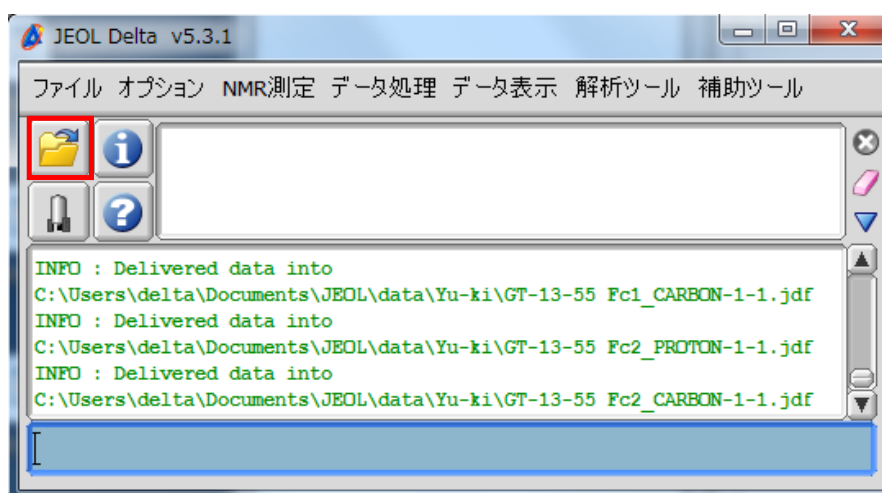
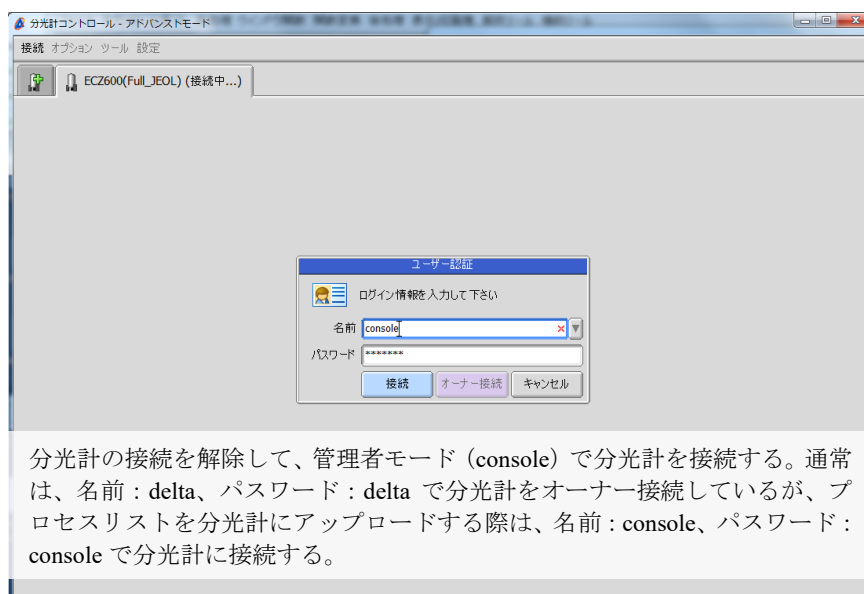
図 14 : ホストコンピュータへの experiment ファイルのコピー

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

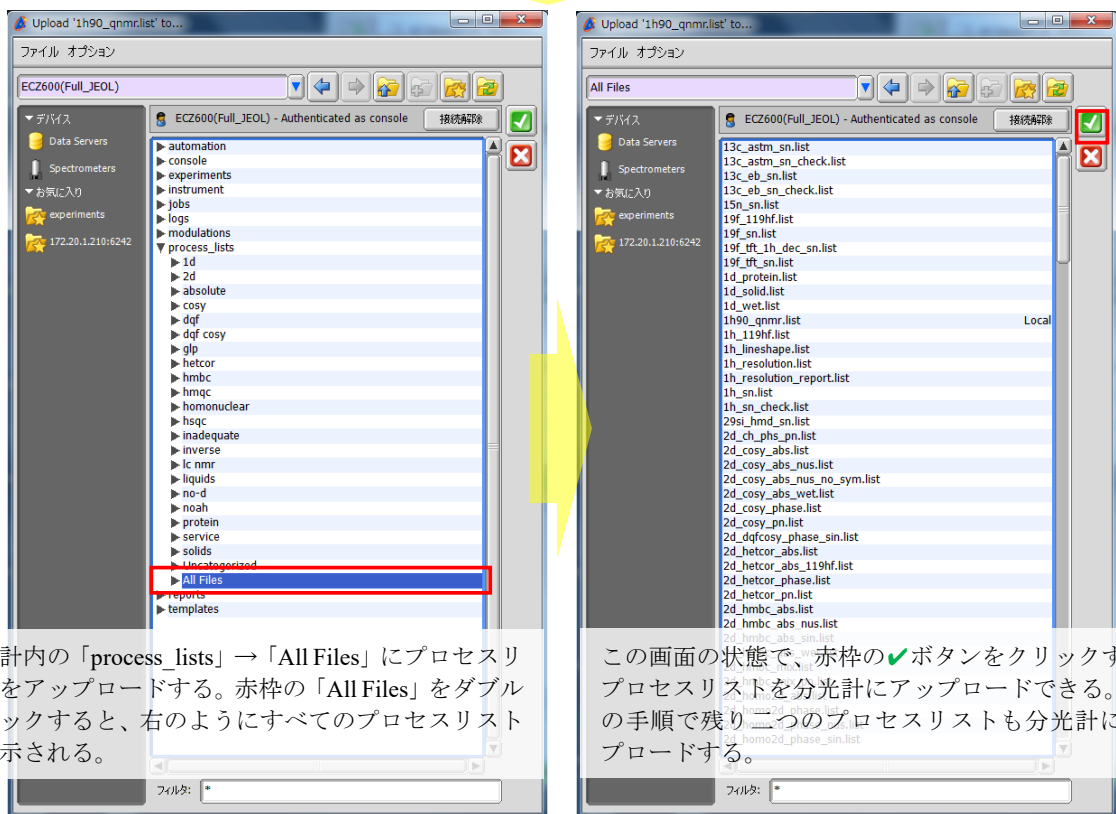
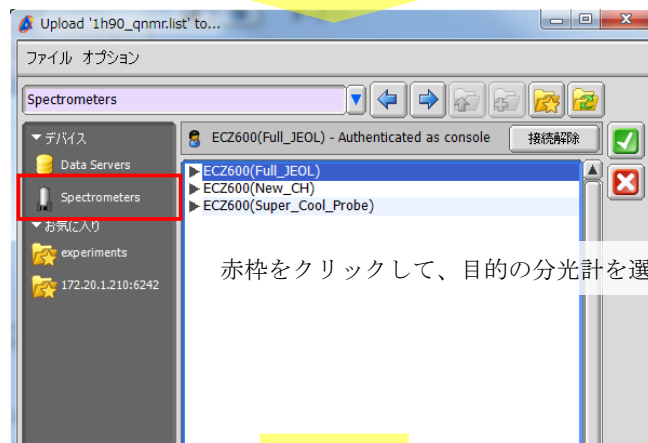
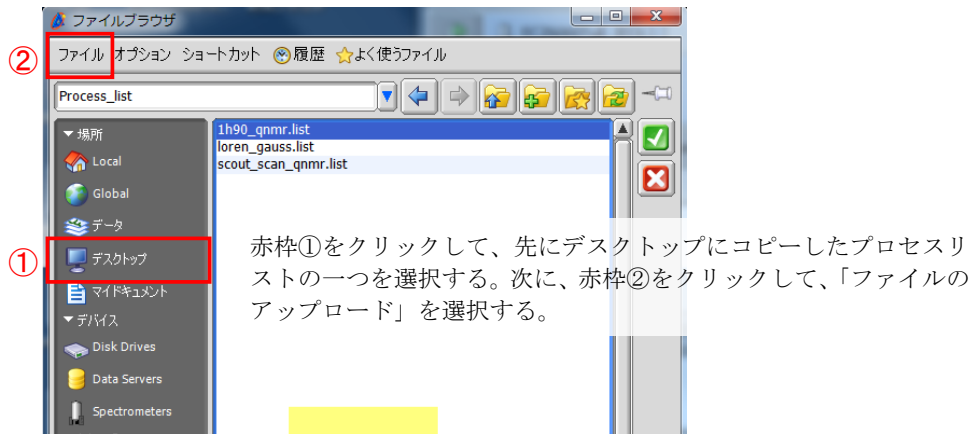
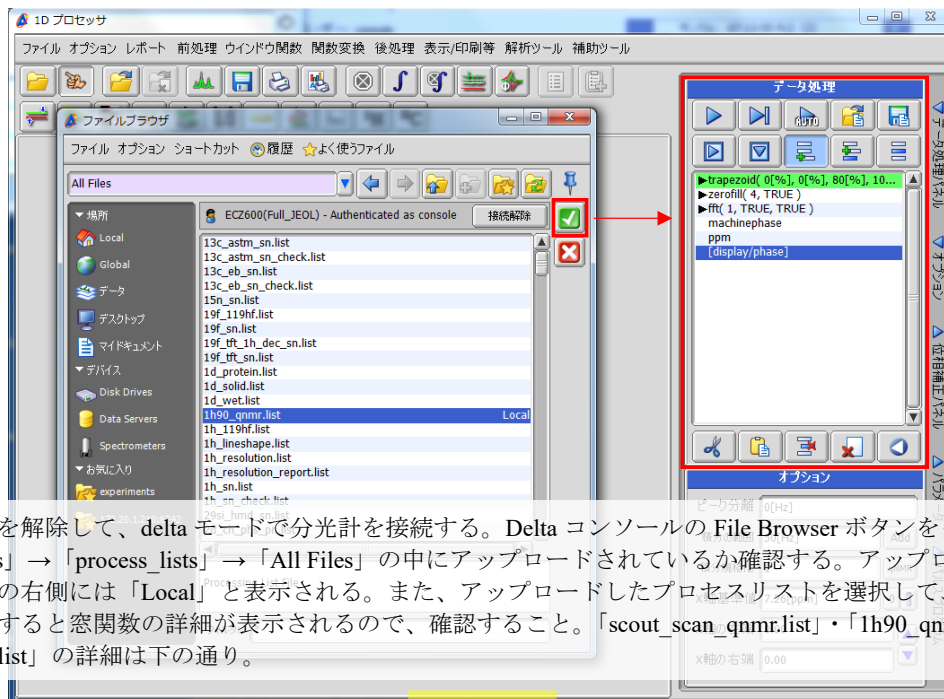
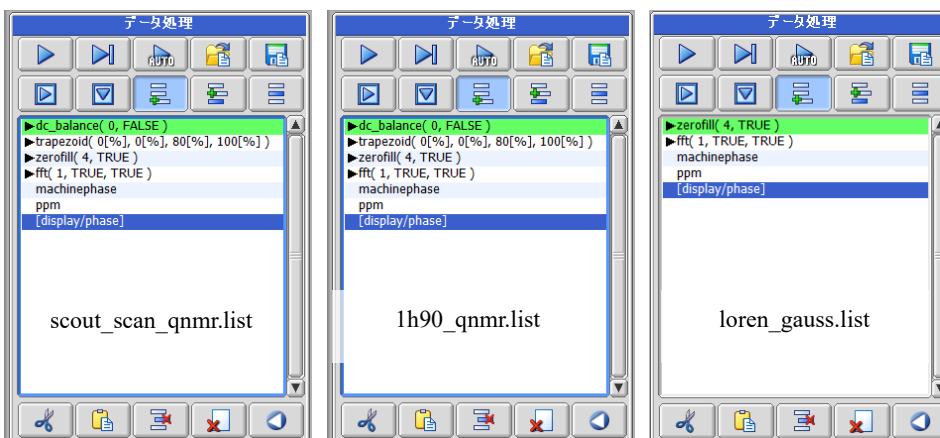


図 15 (2/3) : 分光計へのプロセスリストのアップロード



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

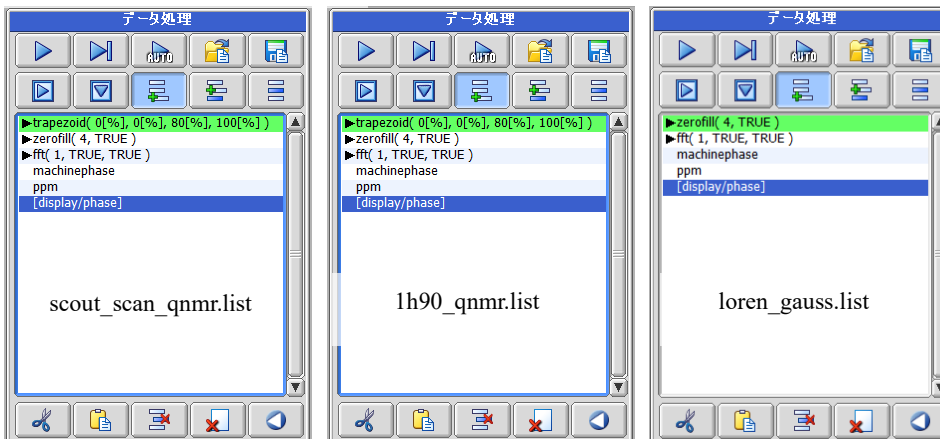
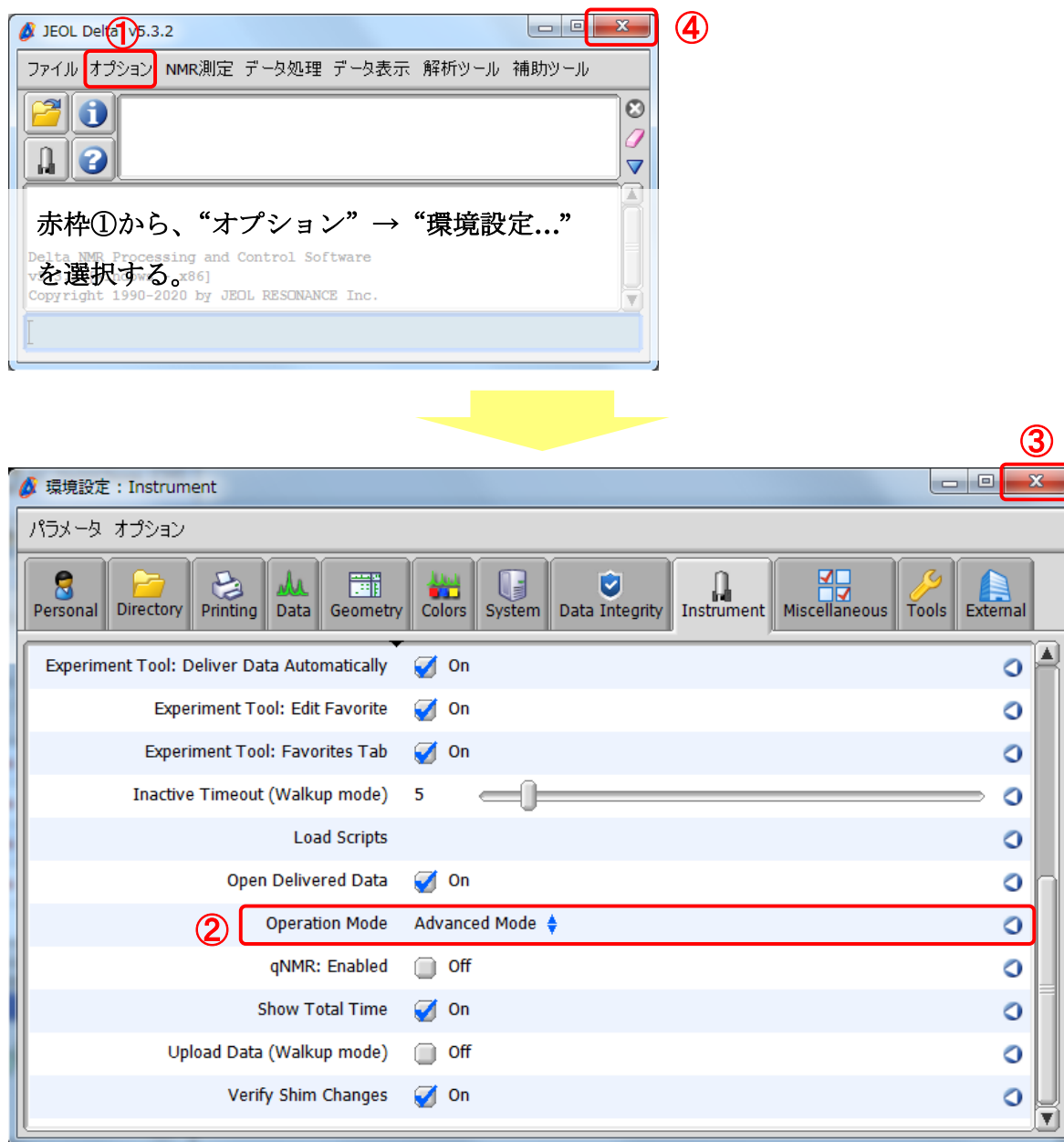


図 15 (3/3) : 分光計へのプロセスリストのアップロード

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。

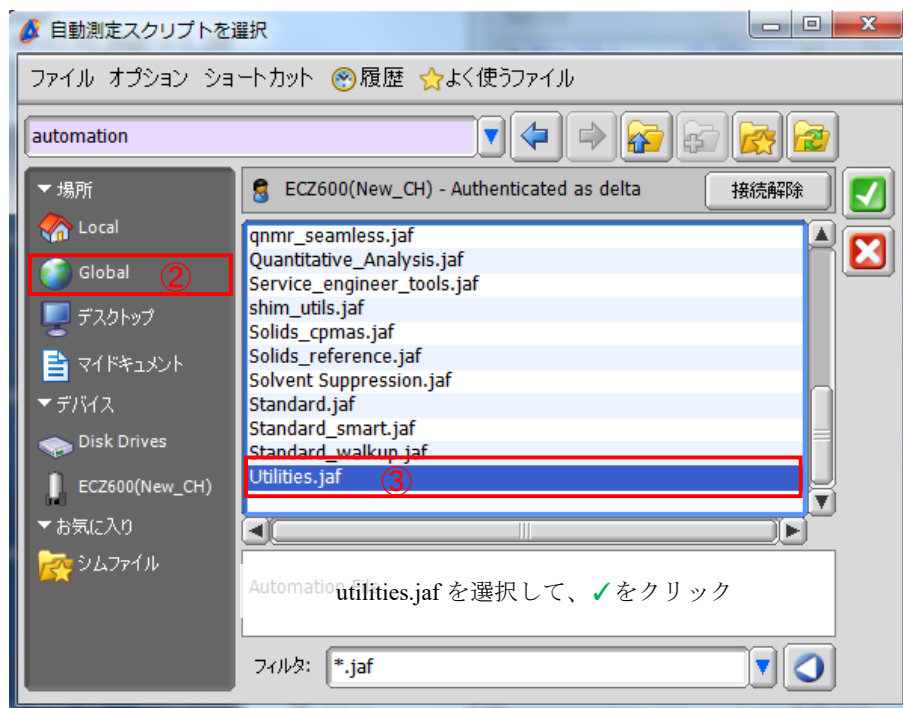
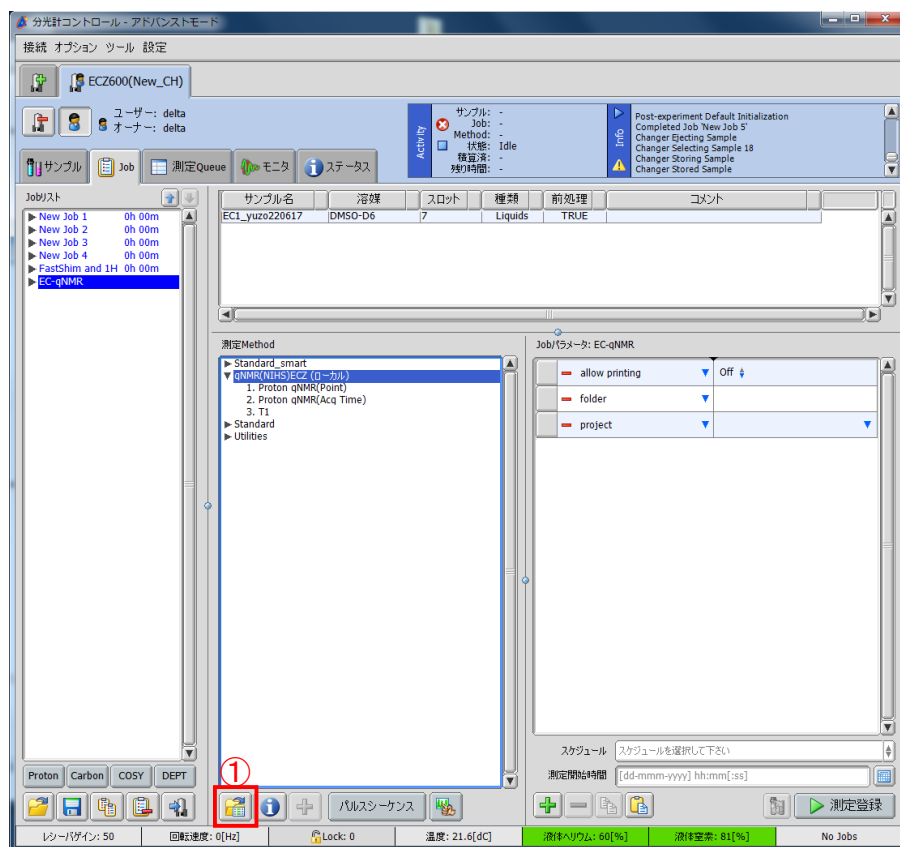


図 17 : 測定 Method に Utilities を表示させる方法

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。

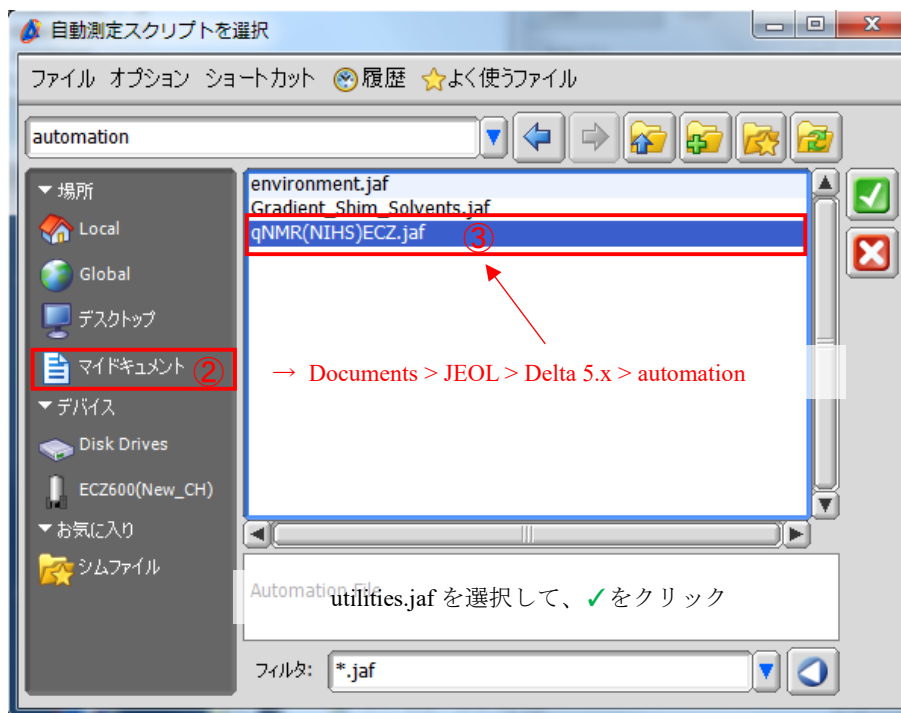
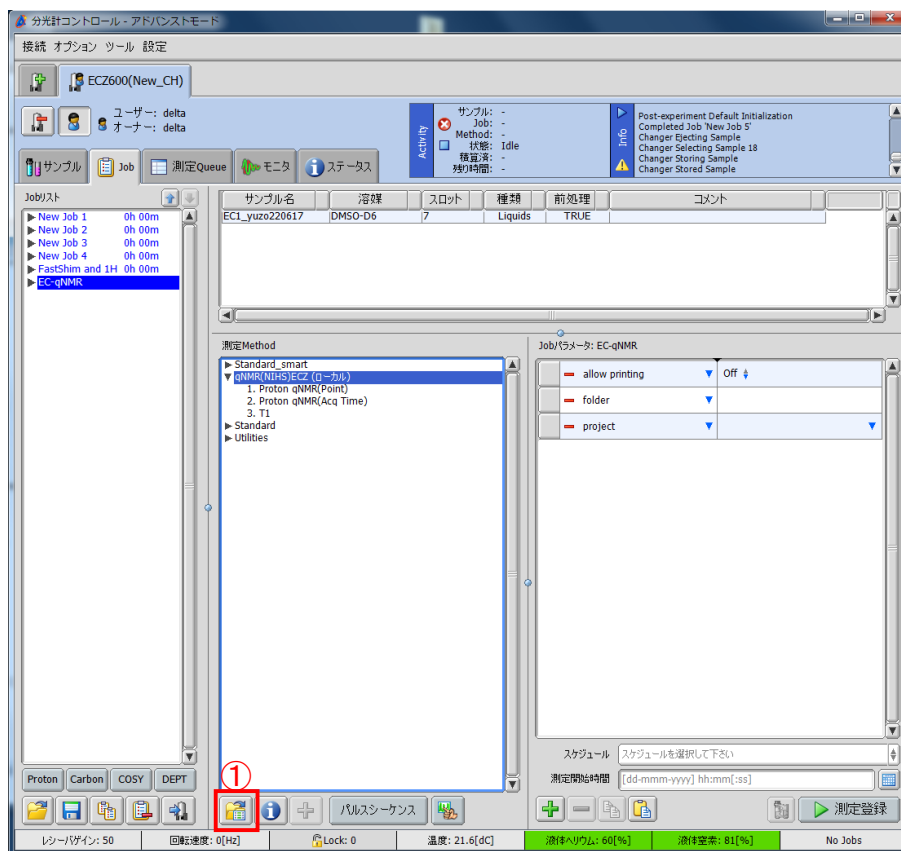


図 18 : 測定 Method に qNMR(NIHZ)ECZ (ローカル) を表示させる方法

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。

①EC を選択して、②投入をクリック。

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	1	Liquids				console
2	ss_0.1% EB	Chloroform-D	2	Liquids				console
3	ss_10% EB	Chloroform-D	3	Liquids				console
11	blank_DMSOd6_yuzo220803_No7HFX	DMSO-D6	11	Liquids				delta
12	EC_dimethylsulfone_500ugmL_yuzo220803_No7HFX	DMSO-D6	12	Liquids				delta
13	BA_benzoicacid_2000ugmL_yuzo220803_No7HFX	DMSO-D6	13	Liquids				delta

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°C 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°C で実施される。

③ ④ ⑤ ⑥ ⑦

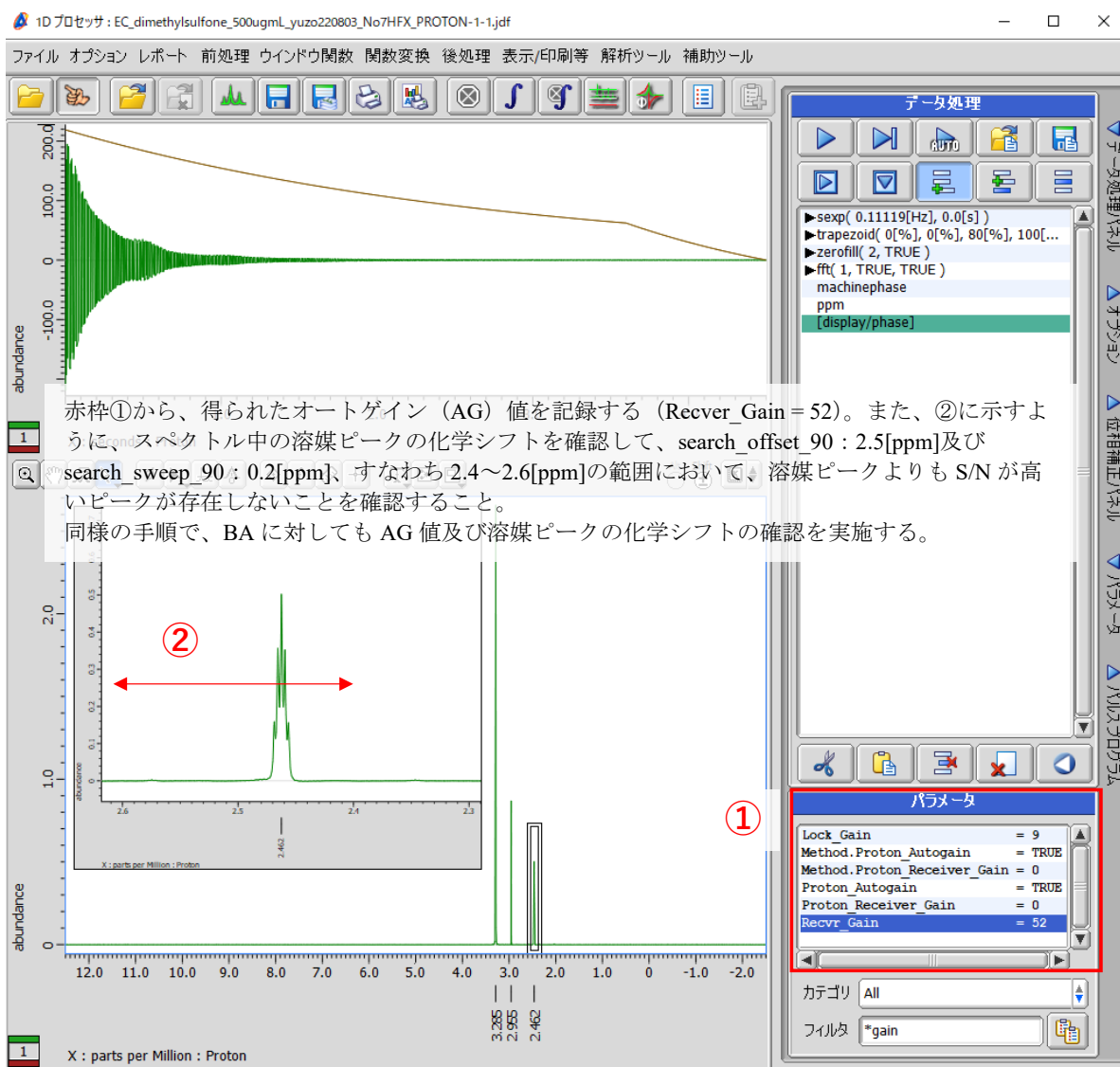
図 19 (1/3)：溶媒ピークの化学シフト及びレシーバーゲイン（RG）の確認方法

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。

「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。

ECqNMR 条件に合わせる

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

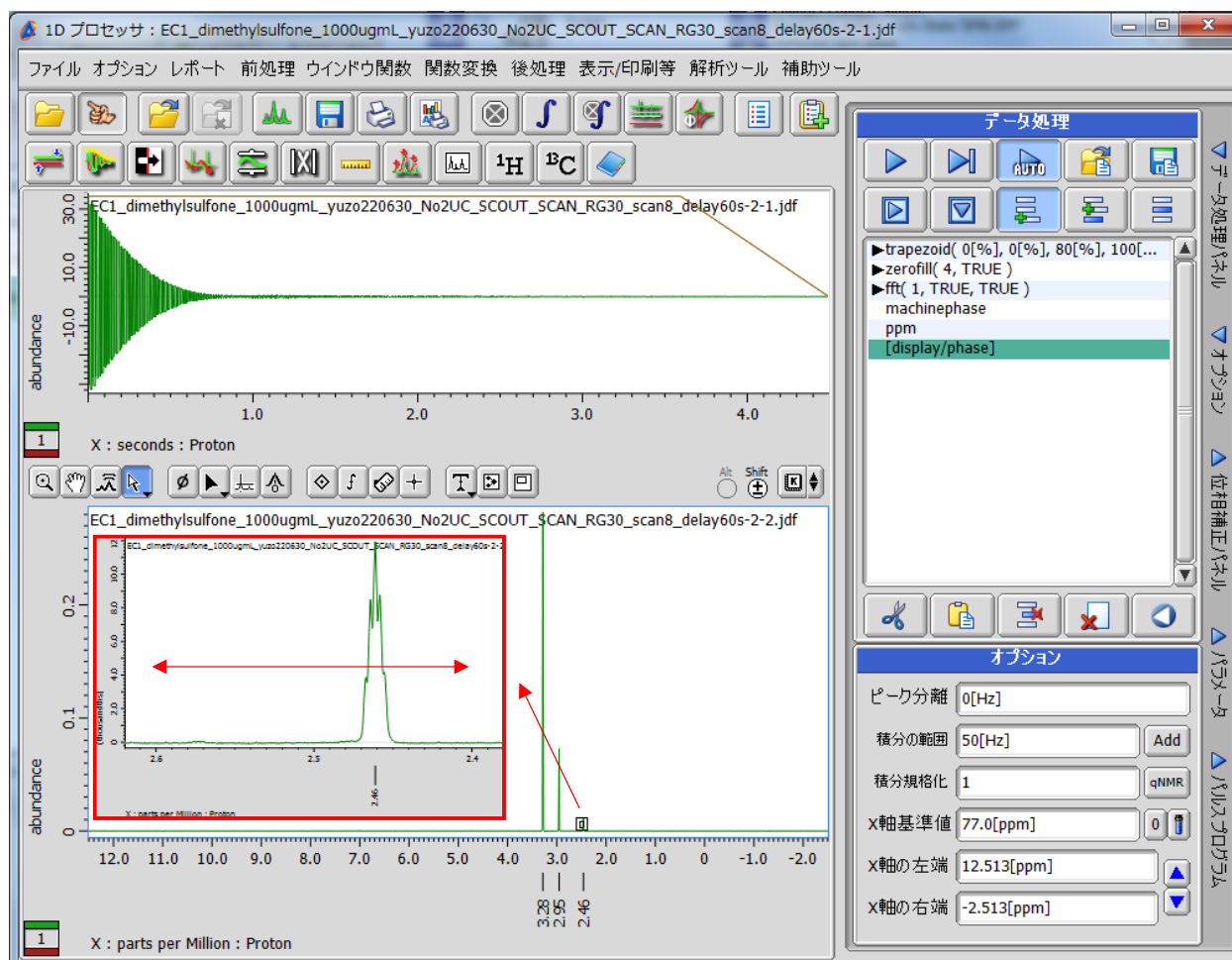


例えば、EC の AG 値 52、BA の AG 値 46 の場合は、、、
 BA の AG 値 : 46 を基準にして、 $46 - 6 = 40$ 、すなわち、ECqNMR 測定のリシーバゲインは 40 に統一すること。

図 19 (3/3) : 溶媒ピークの化学シフト及びリシーバゲイン (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。

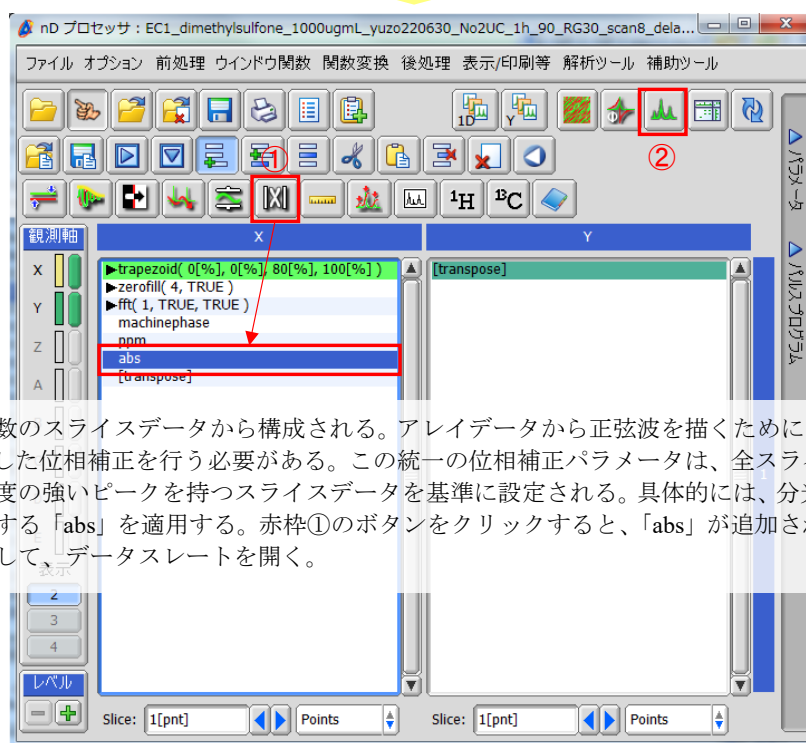
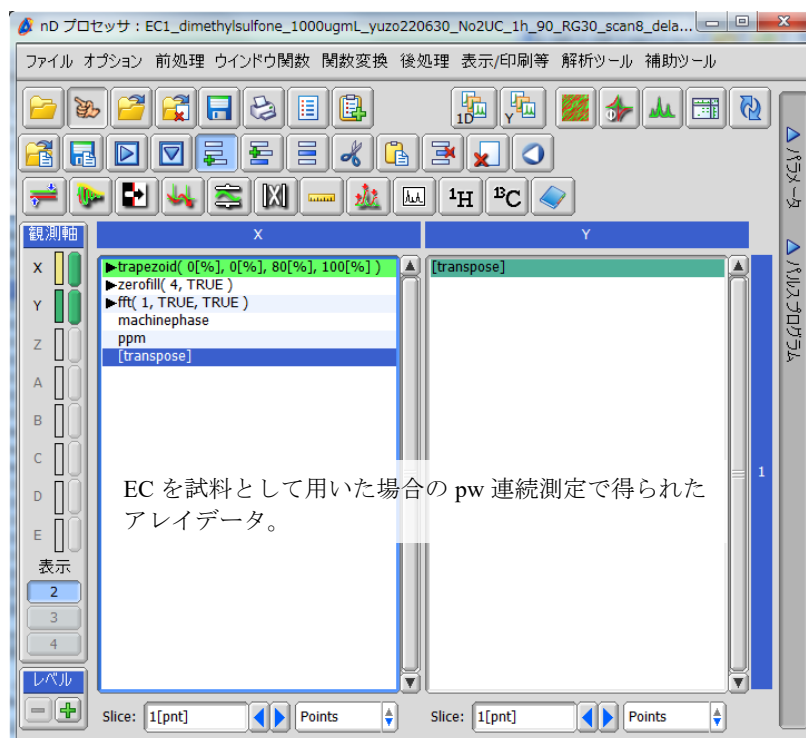


EC を試料として用いた場合の scout_scan スペクトルデータ。search_offset_90 : 2.5[ppm]、search_sweep_90 : 0.2[ppm] に設定した場合、赤両矢印の範囲内 (2.4~2.6 ppm) で最も S/N 比の良いピークを探す。この場合、溶媒ピークである DMSO-*ds* の 2.46 ppm のピークが、pw 連続測定の照射中心に設定される。

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

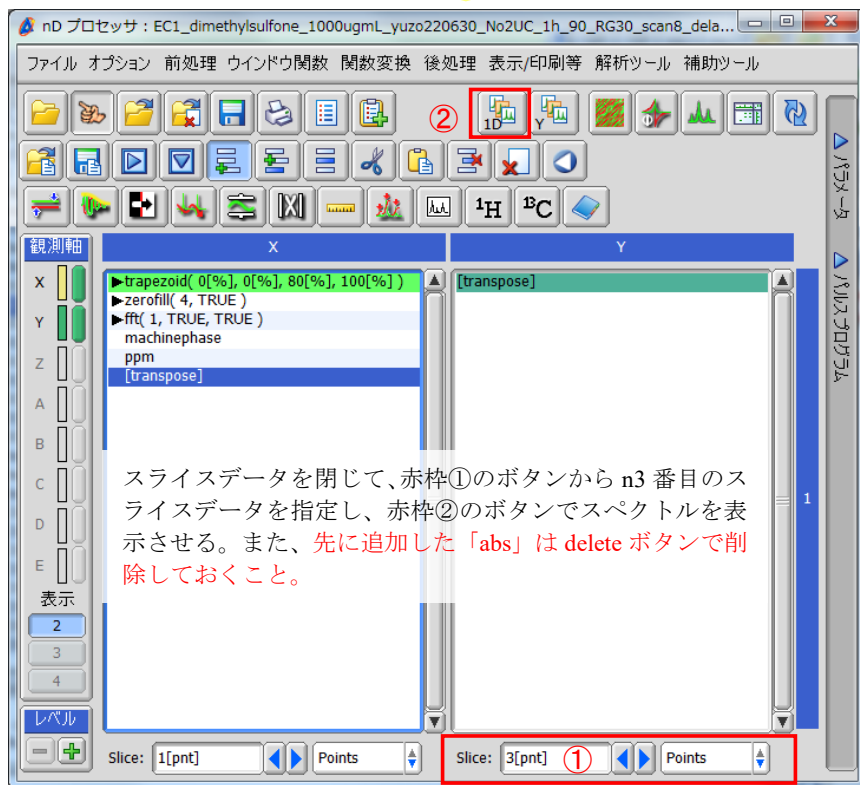
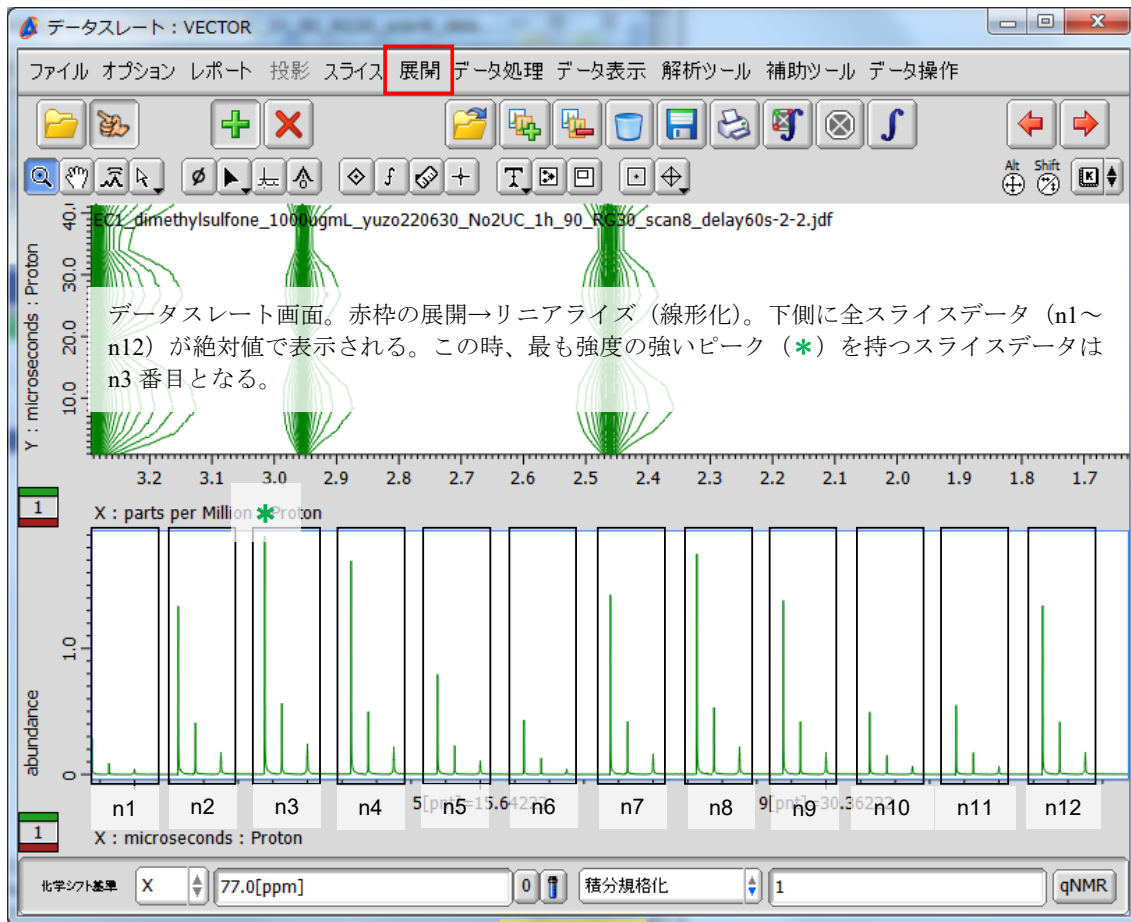


図 21 (2/6) : pw 連続測定データの分光計内部処理方法

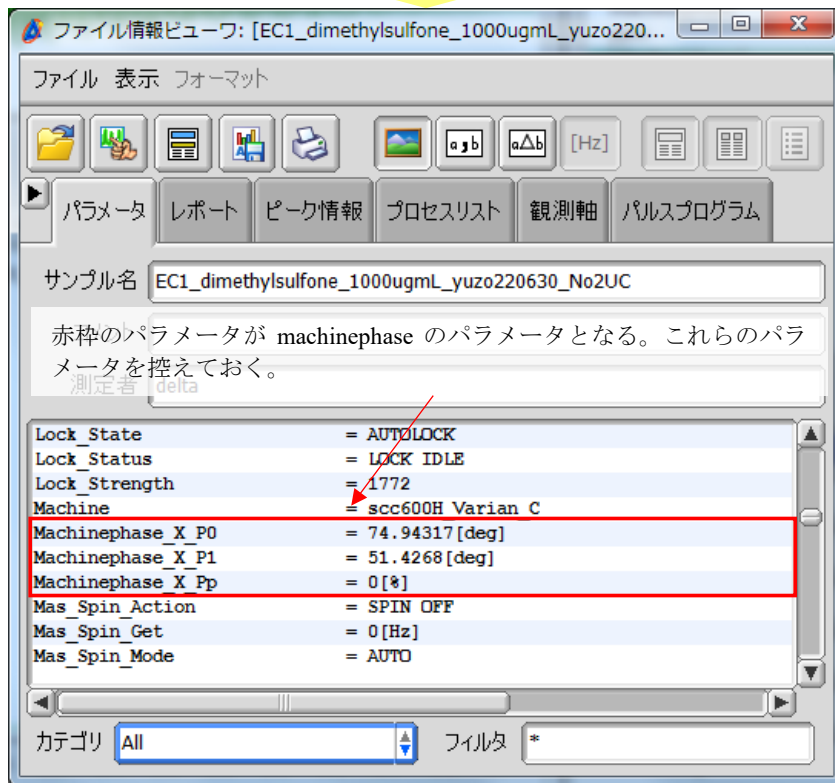
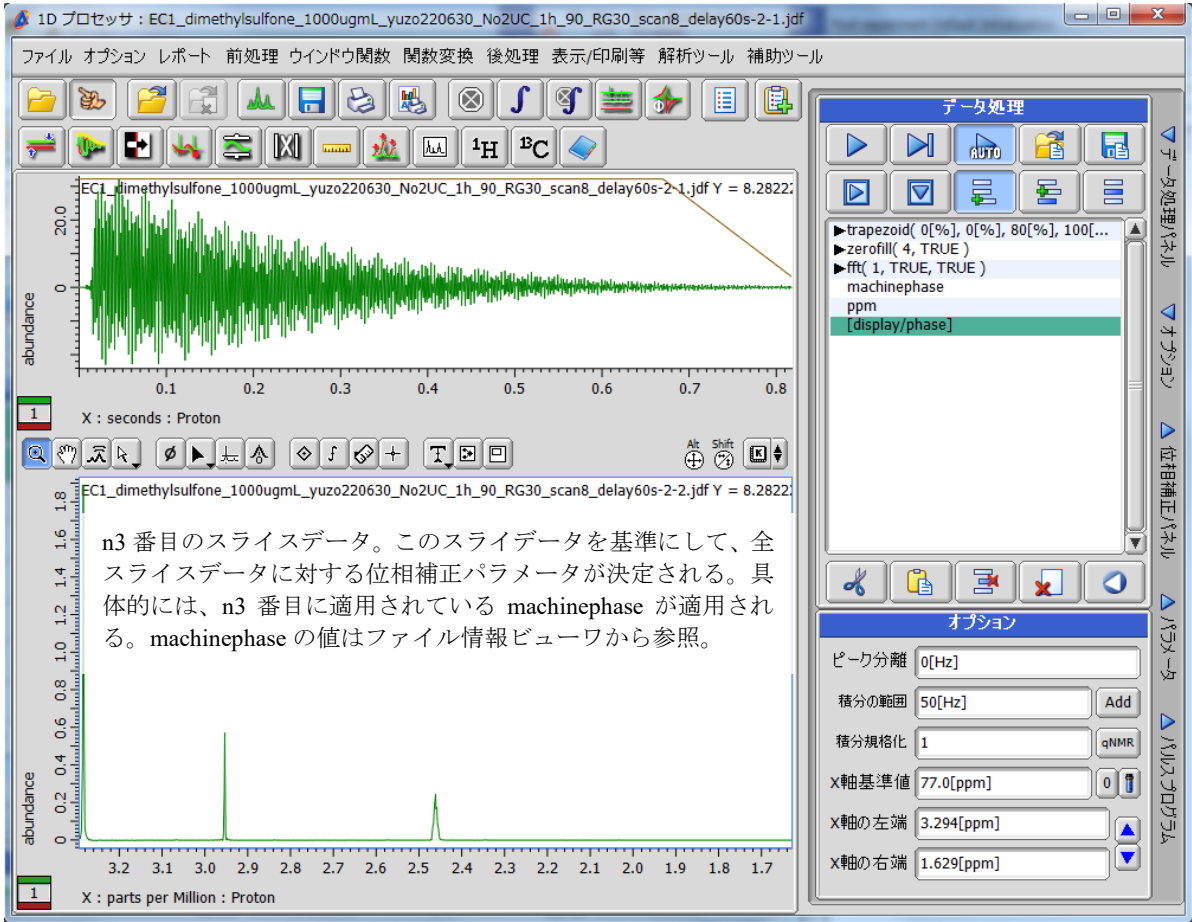


図 21 (3/6) : pw 連続測定データの分光計内部処理方法

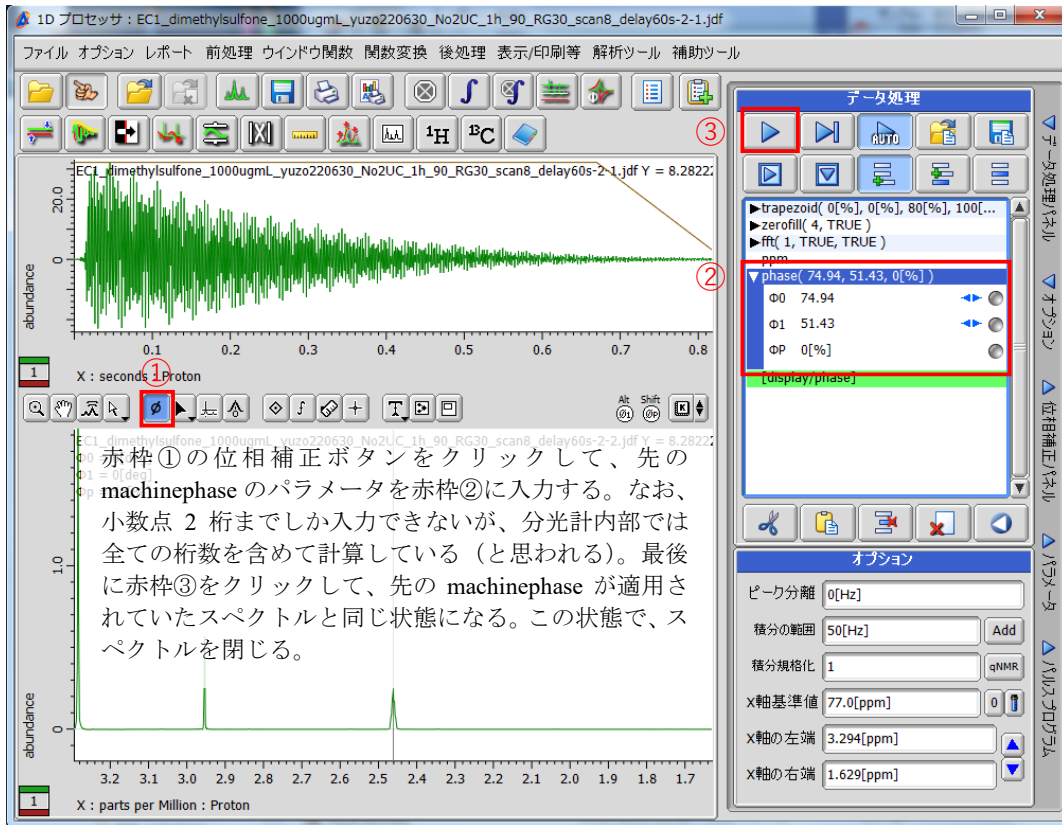
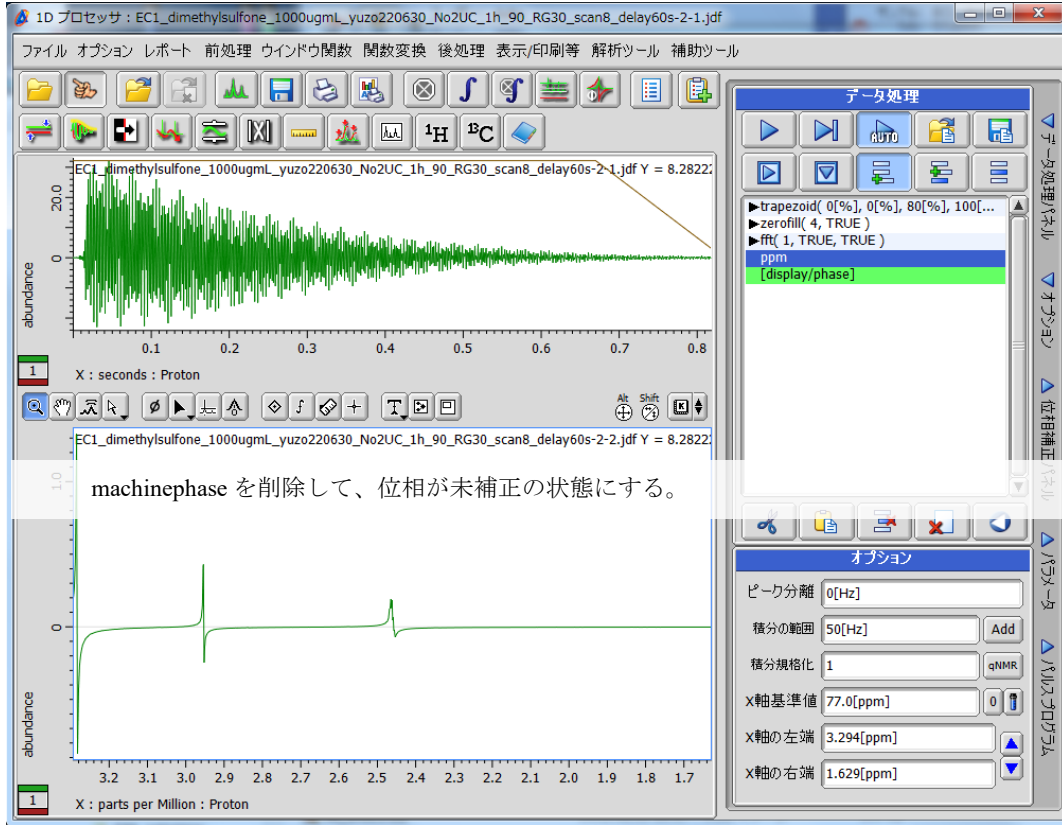
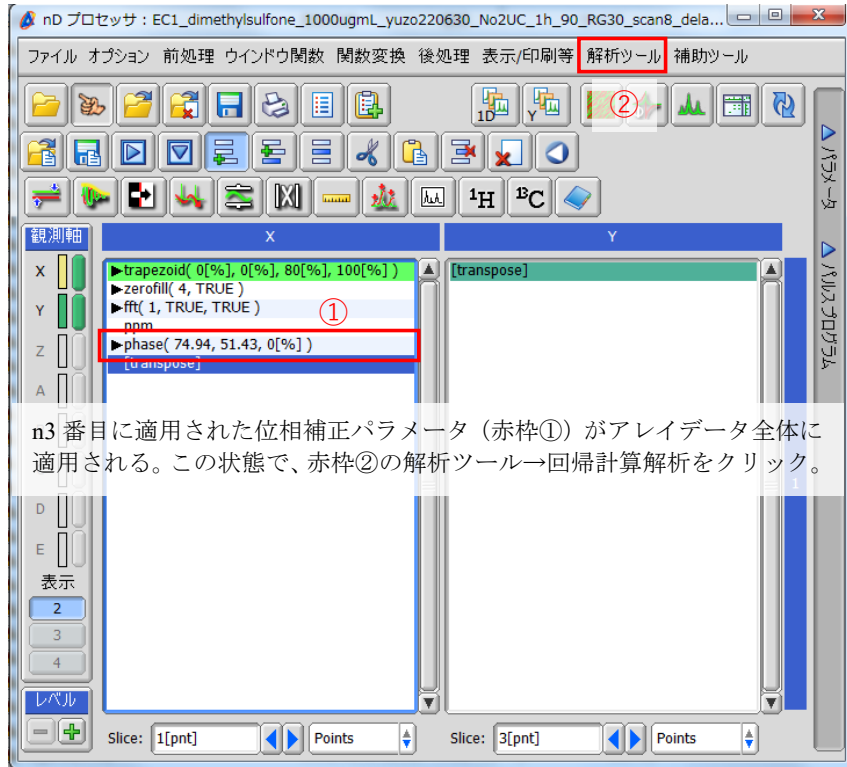
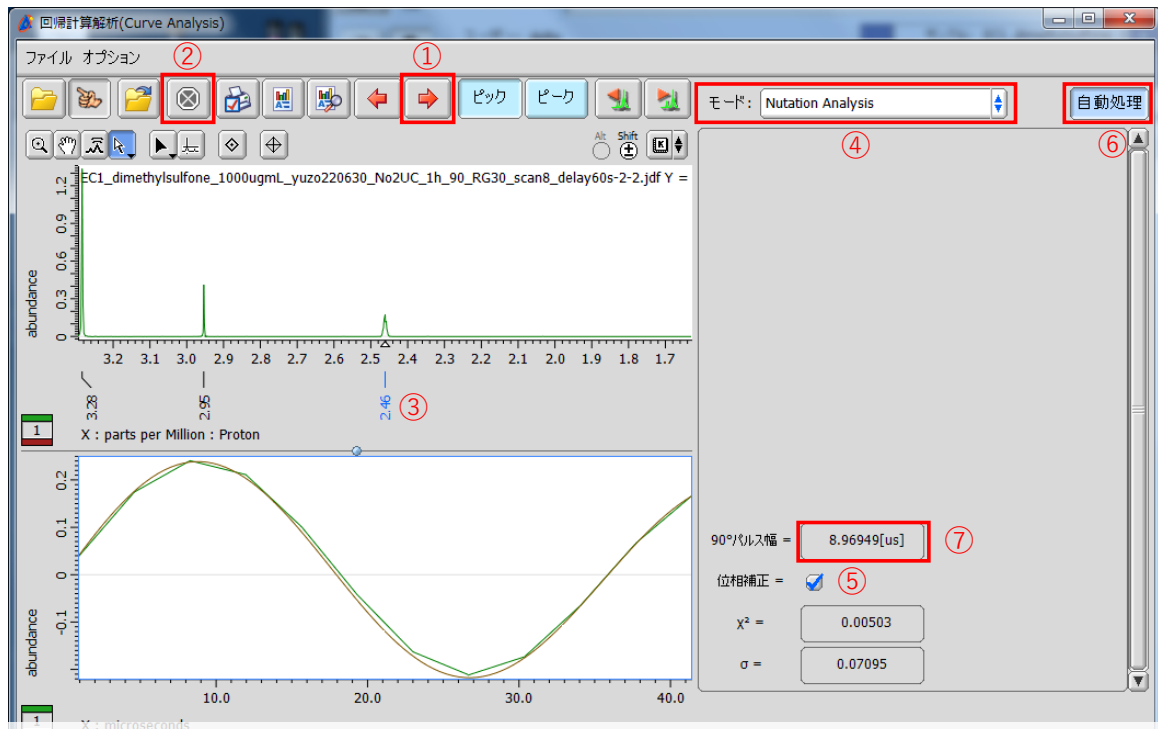


図 21 (4/6) : pw 連続測定データの分光計内部処理方法



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

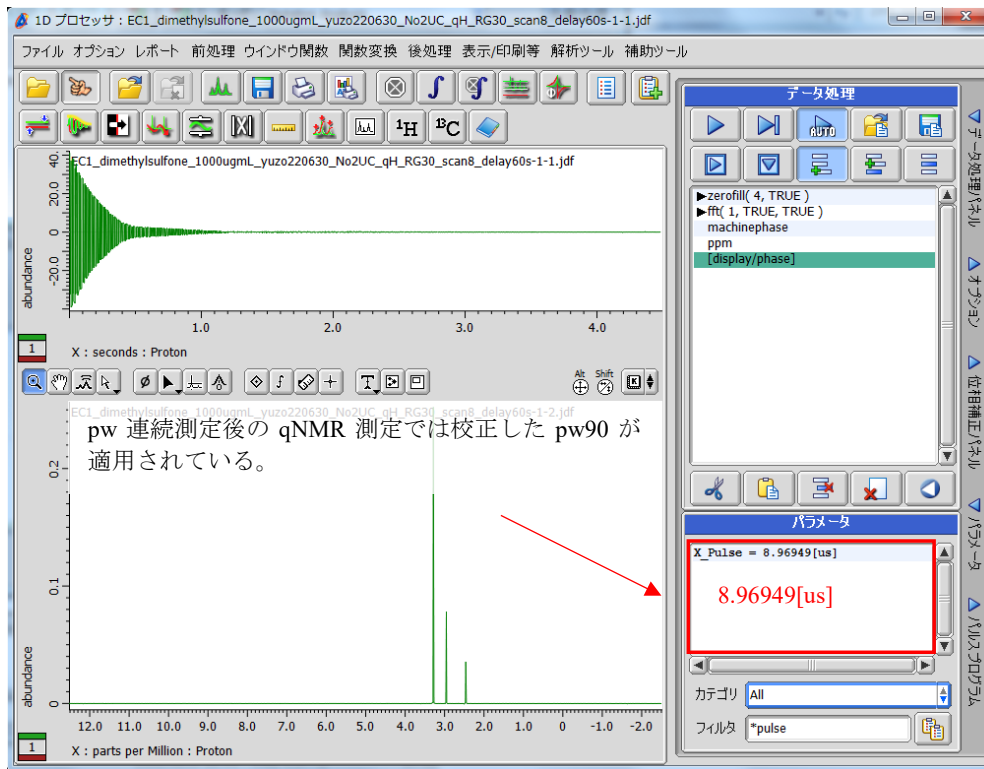


図 21 (6/6) : pw 連続測定データの分光計内部処理方法

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
Giancaspro G, Adams K.M, Bhavaraju S, Corbett C, Diehl B, Freudenberger J.C, Fritsch K, Krishnamurthy K, Laatikainen P, Martos G, Miura T, Nam J, Niemitz M, Nishizaki Y, Sugimoto N, Obkircher M, Phansalkar R, Ray G.J, Saito T, Sørensen D, Urbas A, Napolitano J.G, Tadjimukhammadov F, Bzhelyansky A, Liu Y, Pauli G.F	The qNMR Summit 5.0: Proceedings and Status of qNMR Technology	<i>Analytical Chemistry</i>	93 (6)	12162-12169	2021
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