

別添 1

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

NMR に基づく化学物質のデジタル化とその利活用に関する研究

令和 5～7 年度 総合研究報告書

研究代表者 西崎雄三 東洋大学・食環境科学部

目次

I. 総合研究報告

NMRに基づく化学物質のデジタル化とその利活用に関する研究 1

西崎雄三

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5～7年度）

NMRに基づく化学物質のデジタル化とその利活用に関する研究

研究代表者 西崎雄三 東洋大学 食環境科学部食環境科学科 准教授

研究要旨 本研究では、 ^1H スピン情報を基準としたQuantum Mechanics qNMR（QM-qNMR）について、（1）含有成分が明らかな場合の定量精度及び（2）夾雑成分を含む多成分系試料を対象とした際の定量精度を検証した。

検証（1）では、NMRスペクトル上で2種のジアステレオマー混合物として観測される農薬ジフェノコナゾール（DFZ）をモデル化合物として検証した。NMR反復計算ソフトウェアを用いて、化学シフト及びスピンスピン結合定数から構成される ^1H スピン情報を明らかにし、このスピン情報を基準としたQM-qNMRを実施した。その結果、NMR装置の磁場強度に依存することなく、検討したすべての ^1H 共鳴周波数（80～800 MHz）のNMR装置において、DFZ含量及びジアステレオマー比を誤差2%以内で分離定量することができた。さらに、キラルシフト試薬を用いることでエナンチオマー分離にも成功し、4種のDFZ異性体を一斉定量する手法を確立した。

検証（2）では、食品添加物として流通するカラシ抽出物及びセイヨウワサビ抽出物中の主成分であるイソチオシアン酸アリル（AITC）をモデル化合物とし、QM-qNMRの定量精度を検証した。まず、高磁場NMR装置を用いて、AITC及びその構造類縁体であるチオシアン酸アリル（ATC）の ^1H スピン情報を決定した。その後、400 MHz高磁場NMR装置及び60 MHz卓上NMR装置を用いてQM-qNMRを実施し、ガスクロマトグラフィー（GC）により求めた参照値との比較を行った。また、QM-qNMRでは、解析対象として設定した化合物の ^1H スピン情報に基づいて反復計算が行われることから、AITCに加えてATCを解析対象に含める条件と、ATCを除外する条件でQM-qNMRを実施した。その結果、高磁場NMRでは、ATCを解析対象から除外した場合でもAITCを高精度に定量することができた。一方、卓上NMRでは、ATCを解析対象から除外した場合にAITC含量が高値を示す傾向が認められた。これは、卓上NMRではAITC及びATC由来の ^1H 信号が完全に重複していたため、ATC由来の信号がAITC由来の信号に加算された状態で反復計算が収束したためと考察した。

以上の結果から、 ^1H スピン情報を基準とするQM-qNMRでは、試料中の構成成分を十分に把握している場合には、従来のクロマトグラフィー法と同等の精度で定量できることを確認した。一方で、十分に把握できていない成分が存在する場合には、これらの成分の ^1H 信号が加算された状態で反復計算が収束し、定量値が高値を示す可能性があることが明らかとなった。したがって、QM-qNMRを実施する際には、定量対象成分だけでなく、夾雑成分も可能な限り評価し、これらを含めた一斉定量法を行うことが重要であると考えられた。以上の知見は、 ^1H スピン情報をQM-qNMRにおけるデジタル標準として活用できる可能性を示すものであり、化学物質のデジタル化及びデジタル標準に基づく新たな分析基盤の構築に寄与するものと考えられる。

A. 研究目的

核磁気共鳴分光法 (NMR) は、 ^1H などの原子核を直接観測する分析手法であり、主に化学構造解析に用いられてきた。化学物質の ^1H 信号は、その分子内に存在する ^1H 核の化学的環境に応じて特定の位置に観測され、これは化学シフトと呼ばれる。また、隣接核とのスピン-スピン相互作用により信号が分裂し、その分裂幅はスピン結合定数 (J 値) として表される。これらの化学シフト及びスピン結合定数から構成される ^1H スピン情報は、量子力学に基づく分子固有の物理量であり、理論的には NMR 装置の磁場強度に依存しない。

したがって、分析者が使用する NMR 装置の磁場強度が異なっていたとしても、 ^1H スピン情報が規定されていれば、それぞれの磁場強度に対応した参照 NMR スペクトルをシミュレーションできる。また、スペクトル上で重なり合う ^1H 信号を分離して定量することも可能である。

^1H スピン情報は、反復計算を介して精確に求めることができる。近年では、NMR Solutions 社が開発したソフトウェア『Cosmic Truth』などにより、高性能な計算環境を必要とせず、汎用的な PC 環境においても安定して動作し、短時間で収束計算を行うことが可能となった。このように、反復計算を介して ^1H スピン情報を求める手法は、HifSA (^1H iterative functionalized Spin Analysis) と呼ばれる。¹⁾

また、HifSA を通じて得られた ^1H スピン情報を基準とする定量分析法は、Quantum Mechanics-based qNMR (QM-qNMR) と呼ばれている。このように、 ^1H スピン情報というデジタル情報を基準として、定性試験及び定量試験を実施することが可能である。

定性試験については、 ^1H スピン情報に基づく参照 NMR スペクトルを作成し、この参照 NMR スペクトルと実測スペクトルを照合することで、精確な確認試験が可能となる。第十九改正日本薬局方では、「ヘスペリジン、定量用」に対してヘスペリジンの ^1H スピン情報を規定し、参照 NMR スペクトルとの照合を確認試験として採用している。²⁾ また、USP においても、抗

ウイルス薬レムデシビルに対して同様の確認試験が採用されている。³⁾

このように、 ^1H スピン情報に基づく定性試験については、いくつかの社会実装がなされている。一方で、定量試験については、公的試験法として活用していくための検証が十分になされていないのが現状である。

そこで本研究では、(1) 含有成分が明らかな場合の QM-qNMR の定量精度、(2) 夾雑成分を含む多成分系試料を対象とした際の QM-qNMR の定量精度、すなわち定量対象以外の成分が明らかでない場合の定量精度、について検証することとした。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

検証 (1) には食品添加物として流通するジフェノコナゾール (DFZ) を試料とした。検証 (2) では、同じく食品添加物として流通するカラシ抽出物及びセイヨウワサビ抽出物を試料とした。

上記試料中の定量対象の標準品はいずれも試薬会社より購入したものをを用いた。また、qNMR に際しての基準物質は、すべて認証標準物質を用いた。

B-2) 試料調製

温度 20~25°C、相対湿度 40~80% の環境下で試料調製を行った。冷蔵庫から取り出した試薬及び試料は、シリカゲルデシケター内で室温に戻した後、蓋を緩めて天秤台の上で 30 分静置させた。ウルトラマイクロ天秤 (XP2U; Mettler Toledo) を用いて精密に量りとり、NMR 測定溶媒を加えて溶解し、NMR 用試料液とした。

B-3) qNMR 測定

高磁場 NMR 装置として、日本電子 (株) 製の ^1H 共鳴周波数 600 MHz 及び Bruker 社製の ^1H 共鳴周波数 400 MHz を用いた。卓上 NMR は、マグリテック社製の ^1H 共鳴周波数 60 MHz 及び Bruker 社製の 80 MHz を用いて測定した。qNMR 測定条件 (高磁場 NMR/卓上 NMR)

取り込み時間 : 4 秒/3.2 秒

遅延時間 : 60 秒/60 秒

積算回数：8回／16回
パルス幅：90°／90°
¹³C デカップリング：適用／適用
サンプル回転：無し／無し

B-4) NMR データ処理

NMR 測定で得られた FID は、MestReNova v14.2.1 (Mestrelab Research) を用いてデータ処理した。必要に応じて Exponential (LB) と Gaussian (GB) を用いて、ゆるやかなブロードニングファクターを適用した。その後、512K データポイントまで zero filling し、手動位相補正及び 5th-order polynomial のベースライン補正を適用した。

B-5) HifSA

NMR 反復計算ソフトウェアには、NMR Solutions Ltd 製の Cosmic Truth (CT) を使用した。B-3) で得られた qNMR スペクトルを MestReNova v14.2.1 を用いて JCAMP ファイルに変換した。この JCAMP ファイルと解析対象化合物の mol ファイルを CT にアップロードし、計算スペクトルが実測スペクトルと一致するまで、化学シフト、スピンスピン結合定数及び半値幅を最適化した。

B-6) QM-qNMR

B-3) で得られた qNMR スペクトルに対してブロードニングファクターを適用した。この qNMR スペクトルと解析対象化合物及び内標準物質の mol ファイルを CT にアップロードし、実測スペクトルと一致するまで反復計算を行った。この際、解析対象化合物のスピンスピン結合定数の値は B-5) で決定した値に固定したまま反復計算を行った。反復計算で得られた存在比 (モル比) を以下の式に代入し、解析対象化合物の含量を求めた。

$$Cont._T = \frac{Po_T}{Po_{IC}} \times \frac{M_T}{M_{IC}} \times \frac{m_{IC}}{m_S} \times P_{IC}$$

ここで、添字は解析対象化合物 (T)、内標準物質 (IC) 及び試料 (S)。Cont：含量、M：モル質量、m：秤量値、P：絶対純度、Po：モル比

C. 結果及び考察

検証(1) 含有成分が明らかな場合の QM-qNMR

の定量精度

DFZ をモデル化合物として、QM-qNMR の定量精度を検証することとした。DFZ は、2 位及び 4 位に不斉炭素を有する。このため、(2R,4R) 体、(2S,4S) 体、(2R,4S) 体及び (2S,4R) 体が存在する。

キラルクロマトグラフィーを用いて、QM-qNMR の試料として用いる DFZ 並びに ¹H スピン情報の決定に用いる DFZ 標準品を分析したところ、いずれにおいても 4 種の異性体が確認された。このうち、(2R,4R) 体と (2S,4S) 体、並びに (2R,4S) 体と (2S,4R) 体はそれぞれエナンチオマーの関係にある。したがって、NMR スペクトル上では、(2RS,4RS) -DFZ 及び (2RS,4SR) -DFZ の 2 種の異性体混合物として観測されることとなる。実際に qNMR 測定を行ったところ、すべての DFZ 試料において、(2RS,4RS) -DFZ 及び (2RS,4SR) -DFZ に由来する ¹H 信号が観測された。そこで、DFZ の絶対純度、ジアステレオマー比及びエナンチオマー比を求め、以降これらを参照値として用いた。

標準試薬 DFZ を試料として、¹H 共鳴周波数 600 MHz の NMR 装置を用いて qNMR 測定を行った。得られた qNMR スペクトルに対して反復計算を実行し、(2RS,4RS) -DFZ 及び (2RS,4SR) -DFZ の ¹H スピン情報を明らかにした。得られた ¹H スピン情報から 80, 400, 600 及び 800 MHz の参照 NMR スペクトルを作成し、それぞれの磁場における実測スペクトルと照合した結果、すべての磁場で参照スペクトルと実測スペクトルが一致した。このことから、¹H スピン情報を精密に決定できたこと、また ¹H スピン情報が磁場強度に依存しない情報であることが確認された。

続いて、(2RS,4RS) -DFZ 及び (2RS,4SR) -DFZ の ¹H スピン情報を基準とした QM-qNMR を実施した。これらの化合物は NMR スペクトル上で重複しているが、¹H スピン情報に基づくことで分離定量が可能であり、両ジアステレオマーを良好に分離定量することができた。定量分析は 80, 400, 600 及び 800 MHz で実施し、すべての磁場において参照値との誤差 2% 以内

で、(2RS,4RS) -DFZ 及び (2RS,4SR) -DFZ を定量することができた。

以上のとおり、QM-qNMR では ^1H スピン情報が既知である限り、当該成分同士が NMR スペクトル上で重複していても高精度に分離定量できることを示した。今回の検証では、

(2RS,4RS) -DFZ 及び (2RS,4SR) -DFZ の 2 成分を対象としたが、さらに詳細な分離定量が可能か検証することとした。具体的には、キラルシフト試薬を用いて NMR スペクトル上でエナンチオマーを分離し、(2R,4R) 体、(2S,4S) 体、(2R,4S) 体及び (2S,4R) 体の 4 種の異性体を分離定量できるか検証した。

本研究では Chirabite-AR を用いてエナンチオマー分離を試みたところ、 ^1H 共鳴周波数 600 MHz においてエナンチオマーを識別することができた。なお、Chirabite-AR の ^1H スピン情報は事前に明らかにしておいた。また、エナンチオマー同士のスピンスピン結合定数は同一であることから、先に求めた ^1H スピン情報を基準とした。すなわち、(2RS,4RS) -DFZ のスピンスピン情報を (2R,4R) 体及び (2S,4S) 体に、(2RS,4SR) -DFZ のスピンスピン情報を (2R,4S) 体及び (2S,4R) 体に適用した。QM-qNMR の結果、(2R,4R) 体、(2S,4S) 体、(2R,4S) 体及び (2S,4R) 体の真度は 99.7~100.9% であり、非常に高精度に分離定量できることを確認した。しかしながら、同じ試料を卓上 NMR で測定した場合、エナンチオマー同士の識別できるだけのスペクトル分解能を有していなかったことから、定量することが困難であり、QM-qNMR の精度を評価することはできなかった。

検証 (2) 夾雑成分を含む多成分系試料を対象とした際の QM-qNMR の定量精度

検証 (1) では、DFZ のような不純物をほとんど含まない高純度化合物をモデルとして用いた。検証 (2) では、天然由来の多成分系から成る食品添加物を試料として用いることとした。具体的には、カラシ抽出物及びセイヨウワサビ抽出物中の主成分であるイソチオシアン酸アリル (AITC) をモデル化合物として選定した。カラシ抽出物及びセイヨウワサビ抽出物は食

品添加物公定書に成分規格が収載されている添加物であり、ガスクロマトグラフィー (GC 法) による AITC の定量法が規定されている。そこで、カラシ抽出物及びセイヨウワサビ抽出物中の AITC を QM-qNMR により定量し、現行法である GC 法との比較を行った。また、QM-qNMR において、AITC 以外の微量不純物の存在が AITC の定量値に与える影響について評価した。

はじめに、高磁場 NMR 装置 (400 MHz) を用いて AITC 標準品の絶対純度を INT-qNMR で求めたところ、NMR スペクトル上には AITC の構造類縁体であるチオシアン酸アリル (ATC) も観測されたことから、AITC 及び ATC の純度を求めることとした。両化合物とも、不純物との重複が最も少ない H3 由来の ^1H 信号を用いて定量計算した結果、AITC 94.7% (RSD 0.2%)、ATC 4.0% (RSD 0.3%) であった。

別に試料として用いるカラシ抽出物及びセイヨウワサビ抽出物について定性的な NMR 測定を実施したところ、AITC 標準品と同様に、主成分 AITC に加えて ATC の ^1H 信号も観測された。このため、AITC 標準品に対して HifSA を実施したところ、AITC の ^1H スピン情報に加えて ATC の ^1H スピン情報も明らかとなった。

次に、得られた ^1H スピン情報を基準として、カラシ抽出物及びセイヨウワサビ抽出物中の AITC を QM-qNMR により定量した。NMR 装置は検証 (1) と同様に、高磁場 NMR (400 MHz) 及び卓上 NMR (60 MHz) を用いた。現行の公定法である GC 法では AITC のみを定量対象としており、ATC は定量対象外である。このため、QM-qNMR は AITC のみを対象とする場合と、AITC に加えて ATC も定量対象とする場合の 2 条件で実施した。結果を表 1 及び表 2 に示す。

卓上 NMR における QM-qNMR では、AITC のみを定量対象とした場合と比較して、AITC 及び ATC を定量対象とした場合の方が AITC の真度は良好であった。一方、高磁場 NMR では、いずれの条件においても AITC の真度に大きな違いは認められなかった。この原因として、卓上 NMR では AITC の H1 及び H2 に由来するすべての ^1H 信号が ATC 由来の ^1H 信号と完全に

重複していたことが挙げられる。さらに、ATC 含量は AITC のスペクトル形状に著しい変化を与えるほど高くなかったため、ATC 由来の信号面積が AITC 由来の信号面積に加算された状態で CT の反復計算が収束し、AITC 含量の真度が悪化したものと考察した。一方、高磁場 NMR ではピークトップが完全には重複しておらず、ATC 由来の信号を独立した信号として識別することが可能であった。したがって、高磁場 NMR では AITC のみを定量対象とした場合でも、真度が大きく低下しなかったものと考察した。

D. 結論

本研究では、DFZ及びAITCをモデル化合物としてQM-qNMRの定量精度を検証した。DFZを対象とした検証では、試料が高純度であり、DFZ以外の成分の混在がほとんど認められなかったことから、卓上NMRから高磁場NMRまで、使用するNMR装置の磁場強度に依存することなく高精度な定量が可能であった。一方、AITCを対象とした検証では、試料として用いたカラシ抽出物及びセイヨウワサビ抽出物中にAITC以外の成分が混在しており、これらの成分を把握し、QM-qNMRの定量対象に含めるか否かによって定量精度が大きく異なった。具体的には、定量対象として考慮されていない成分が定量対象成分として加算され、定量値が高値を示す傾向にあり、この傾向はスペクトル分解能の低い卓上NMRにおいて特に顕著であった。

以上の結果から、QM-qNMRは試料中の構成成分を十分に把握し、適切な¹Hスピン情報を整備できる場合には、磁場強度の異なるNMR装置間においても高精度な定量分析法として活用できることが示された。一方で、未知成分や未考慮成分が存在する場合には、それらの信号が定量対象成分に加算されることで定量誤差を生じる可能性があることから、適用に際しては試料中の構成成分を可能な限り明らかにし、一斉定量系としてQM-qNMRを実施することが重要であると考えられた。

E. 参考文献

- 1) Achanta P.S, et al., Quantum mechanical NMR full spin analysis in pharmaceutical identity testing and quality control, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 192, 113601 (2021).
- 2) *USP Methods to Assist in Detecting Falsified Remdesivir*. <https://www.usp.org/covid-19/remdesivir> (accessed 2024-4-26)

F. 研究業績

学会発表等

1. 西崎雄三: ¹Hスピン情報による化学物質のデジタルリファレンススタンダード(dRS)化: dRSを基準にしたqNMR. 第5回 日本定量NMR研究会 年会 (2023.12)
2. 西崎雄三, 石附京子, 杉本直樹. ¹Hスピン情報に基づいたクロロゲン酸類のデジタルリファレンススタンダード (dRS) の作成. 日本食品化学学会第30回総会・学術大会 (2024.5)
3. Yuzo Nishizaki, A Case Study on Validation of External Calibration qNMR (EC-qNMR), qNMR summit 2025 (2025.6).
4. 西川拓海, 阿部裕, 杉本直樹, 西崎雄三: 卓上NMRを用いた¹Hスピン情報に基づくqNMRによるカラシ抽出物の定量法の検討, 第7回日本定量NMR研究会年会 (2025.11)

論文発表等

1. 西崎雄三, ¹Hスピン情報に基づいた化学物質のデジタルリファレンススタンダード, 食品衛生学雑誌, 65(2) J17-J21
2. Nishizaki Y, Sugimoto N, Miura T, Asakura K, Suematsu T, Korhonen, S.P, Lehtivarjo J, Niemitz M, Pauli G.F: Quantum Mechanical Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Enables Digital Reference Standards at All Magnetic Fields and Enhances qNMR Sustainability, *Analytical Chemistry*, 2024; 96: 9790-9798. 2.
3. 西崎雄三, 田中誠司, 参考情報「¹Hスピン

情報に基づいた参照 NMR スペクトルと
日本薬局方試薬への応用」の新規作成につ
いて, 日本薬局方フォーラム, 2024; 33: 189
192.

G. 知的財産権の出願. 登録状況
特になし

表 1

表 1 400 MHz における QM-qNMR の定量精度

	カラシ抽出物		セイヨウワサビ抽出物	
	AITC	ATC	AITC	ATC
AVE	100.3% (101.2%)	100.1%	101.8% (102.2%)	103.0%
RSD	0.9% (0.5%)	1.9%	0.6% (0.2%)	1.0%

括弧内の値は、ATCを除いてAITCのみを定量対象とした際の真度及びRSD。

表 2

表 2 60 MHz における QM-qNMR の定量精度

カラシ抽出物		セイヨウワサビ抽出物	
AITC	ATC	AITC	ATC
AVE 102.3% (105.8%)	114.5%	103.8% (107.9%)	135.7%
RSD 0.6% (0.6%)	1.0%	0.9% (0.8%)	0.9%

括弧内の値は、ATCを除いてAITCのみを定量対象とした際の真度及びRSD。

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
Nishizaki Y, Sugimoto N, Miura T, Asakura K, Suematsu T, Korhonen, S.P, Lehtivarjo J, Niemitz M, Pauli G.F	Quantum Mechanical Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Enables Digital Reference Standards at All Magnetic Fields and Enhances qNMR Sustainability	Analytical Chemistry	96	9790-9798	2024
西崎雄三	¹ Hスピン情報に基づいた化学物質のデジタルリファレンススタンダード	食品衛生学雑誌	65(2)	J17-J21	2024
西崎雄三, 田中誠司	参考情報「 ¹ Hスピン情報に基づいた参照 NMR スペクトルと日本薬局方試薬への応用」の新規作成について	日本薬局方フォーラム	33	189-192	2024