

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）

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和2年度研究分担報告書

試験法及び分析法の開発

～外部標準法定量 NMR の自動化スクリプトの作成～

研究分担者 西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 研究員

研究要旨 既存添加物は多成分系からなる天然の添加物であり、成分規格の作成にあたっては、含有成分の含量や物性に関する科学的根拠データを用いて、試験法の設定を行う。各種成分の根拠データを定量的に扱うためには、対象成分それぞれの標準品の純度評価が必要不可欠である。既存添加物の研究業務で取り扱う標準品は希少なものが多く、純度測定終了後に試料汚染がなく全量回収可能な外部標準法定量NMR（EC-qNMR）は、既存添加物の成分規格化を迅速化する強力な純度測定法と言える。本研究では、EC-qNMRを完全自動化するスクリプトを開発した。開発したスクリプトは、Tuning&Matching（T&M）が90°パルス幅校正前後で、重複して実行する不具合があったが、複数のJobを組み合わせることで、この問題を回避し、適切な手順にそったEC-qNMRが実行可能であることを確認できた。また、スクリプトを実行した際のEC-qNMRの精度について、3台のNMR装置を用いて検証した。プローブの応答能であるQ値をプロットしたところ、装置によって2.5%程度のQ値の変動が確認されたが、測定回数を増やして平均値を採用すれば、正確な純度を算出できることが示された。

研究協力者

末松孝子 株式会社 JEOL RESONANCE

石附京子 国立医薬品食品衛生研究所

中島馨 国立医薬品食品衛生研究所

増本直子 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

て、単一の成分としたものがほとんどである。これらの標準品に記載されている純度は、クロマトグラフ法で算出された相対純度であり、クロマトグラム上に現れない水分や不純物の含量は、無視されることが多い。既存添加物の成分規格試験法の作成にあたっては、根拠データを定量的に扱う必要があり、すなわち、標準品を個別に用意することに加えて、これらの絶対純度についても考慮する必要がある。

絶対純度の算出方法としては、¹H核を対象とする内部標準法定量 NMR（IC-qNMR：internal calibration quantitative NMR）が広く利用されている。IC-qNMRでは、低分子化合物の場合、約1～5 mg程度の分析種（用意した標準品）および internal calibrant (IC) を精密に量り込み、NMR測定用重溶媒に溶かしたものを NMR 用試料液とする。この NMR 用試料液を、定量用に最適化した NMR 測定条件下で測定すると、得られるスペクトルには、分析種および IC に由来するシグナルが共鳴周波数に応じて出現する。こ

A. 研究目的

既存添加物は多成分系からなる天然の添加物である。既存添加物の品質を確認するための成分規格試験法の作成にあたっては、実際に流通している添加物製品を入手し、含有成分の含量や物性に関する科学的根拠データに基づき、試験法を設定する必要がある。したがって、根拠データの取得にあたっては、既存添加物中の指標となる成分たちの標準品やそれに準ずるものを個別に用意する必要がある。

既存添加物の場合、天然に由来する成分が指標となるため、試薬メーカーが販売しているこれらの標準品も、天然原料から精製を繰り返し

のとき、それぞれのシグナルの積分強度は、由来する物質の物質量および（分子上の）プロトン数の積と相関するため、純度が明らかな IC を基準として用いれば、分析種の純度を算出することが可能である。現在、国際単位系 (SI) にトレーサブルな IC が試薬メーカーから販売されており、これらの IC を基準にして qNMR から算出された絶対純度は、SI トレーサブルな純度値として認識される。そのため、食品添加物公定書や日本薬局方における一部の定量用標準品は、IC-qNMR を用いて規格化されており、これらの定量用標準品は、試薬メーカーによって IC-qNMR で純度が値付けされた後、分析者たちに販売される体制がすでに整備されている。しかしながら、試薬メーカーが qNMR で値付けする標準品は、法規制上重要となる物質のみである。そのため、既存添加物の根拠データを取得する際、指標成分の候補となる成分たちの標準品については、qNMR を用いて自ら純度を算出する必要がある。

試薬メーカーから購入する天然由来の標準品は高価で、¥30,000/mg に達するものもある。さらに、標準品が販売されていない場合は、自ら単離精製して用意する必要がある。このように、既存添加物の根拠データを取得する際に必要となる標準品は、高価で希少な物質が多い。そのため、qNMR で絶対純度を算出する際、IC を添加しても良い、あるいは IC-qNMR 測定後に NMR 用試料液を捨てて良いと判断できるほど、すべての標準品に対して、十分な量を用意することは、金額・時間および労力が必要となり、非常に困難である。以上のことから、qNMR 測定時に IC による試料汚染もなく、100% の回収が可能な外部標準法 qNMR (EC-qNMR : external calibration qNMR) は、根拠データを取得するための研究業務を迅速化できる方法として、大いに期待できる。

EC-qNMR では、NMR 試料管間の環境差を相殺する必要があり、その方法として相反定理が良く用いられる¹⁾。ここでいう相反定理とは、「信号の強度（またはプローブの品質係数 Q 値）がパルス幅に反比例する」を意味する。NMR 試

料管中の成分組成により誘電率は異なるため、最適なパルス幅の値も異なってくる。したがって、EC-qNMR では、各 NMR 試料管に対して①ラジオ波 (rf) をラーモア周波数にチューニング、②インピーダンスを 50Ω までマッチング、③正確な 90°パルス幅 (90PW) 測定および④校正した 90PW を qNMR に適用することが、相反定理を成立させる上で（正確な定量値を導く上で）、重要となってくる。このとき、NMR 試料管中の分析種の濃度は次のように示すことができる。

$$\text{Molar Conc.}_A = \text{Molar Conc.}_C \times S_A/S_C \times H_C/H_A \times 90PW_A/90PW_C \quad \text{— equation (1)}$$

A, Analyte; C, Calibrant; Molar Conc., concentration; S, absolute integral value; H, number of protons; 90PW, 90° pulse width

このように EC-qNMR は、特定の装置やソフトウェアに依存せず、誰でも実施可能であるが、一般に、IC-qNMR と比べると、精度が大きく劣ると認識されてきた。しかし、著者らは EC-qNMR で分析値にバラつきを与える要因を抽出した結果、Fig. 1 (A) に示す適切な手順で実施した場合、得られる測定値の誤差は 1% 以内に収束することを証明した²⁾。この精度は、既存添加物の根拠データを定量的に扱う上で十分な精度である。しかしながら、Fig. 1 (A) に示した手順を完全自動化するスクリプトは開発されておらず、オペレーターは、NMR 試料管ごとに、校正した 90PW を qNMR の測定条件に入力することが強いられ、装置から離れることができないでいた。そこで、本研究では Fig. 1 (A) に示した手順を完全自動化するスクリプトを開発することを目的とした。また開発したスクリプトを実行した際に確認された不具合などを抽出した。なお、本研究で開発するスクリプトは日本電子製の NMR のみに対応可能であり、Bruker 製の NMR については検討していない。

B. 研究方法

B-1) 装置

日本電子 (株) 製の 600MHz (¹H) の装置とし

て, JNM-ECA600 および ECZ600 を 2 台用いた. JNM-ECA600 には室温の Royal プローブが, ECZ600 の 2 台には UltraCOOL の CH プローブが備え付けられている. ECZ600 の 2 台については, 以降, 国立衛研での通称名である FullJEOL と NewCH と記載する.

B-2) 試料及び試薬

認証標準物質 (CRM) である DSS- d_6 (Cat No 044-31671, 92.4%) およびマレイン酸 (MA, Cat No 135-17951, 99.9%), NMR 用重溶媒 DMSO- d_6 (Cat No 11560-23) および NMR 試料管 (Cat No 293-47953) は, 全て富士フィルム和光純薬 (株) より購入した.

B-3) スクリプトの作成

(株) JEOL RESONANCE で作成した. スクリプトのファイル, 自動測定の際に使用する FID 処理ファイルなどを分光計にインストールしてスクリプトを実行させた.

B-4) EC-qNMR 用試料の調製

DSS- d_6 約 16 mg および MA 約 60 mg を同一のバイアルに精密に量りこみ, DMSO- d_6 15 mL を加えて溶解させたものを NMR 用試料液とした. この液を 0.6 mL ずつ, 18 本の NMR 試料管に分注し, すべてトーチバーナーで封管した. ECA600 用, FullJEOL 用, NewCH 用として各 6 本ずつ使用した. 測定していない期間は, 冷蔵庫に保管した.

B-5) EC-qNMR の測定条件

下記のスクリプト測定条件にしたがって EC-qNMR を実行した.

```
calc90_relax_delay, 30 sec ; receiver_gain, 30 ;
scans, 8 ; dummy_scans, 4 ; x_offset, 5 ppm ;
x_sweep, 20 ppm ; data_points, 65536 ;
relaxation_delay, 30 sec.
```

90PW 校正パラメーターには, 精度良く校正するため, 分光計に記録されている初期値の 90PW に対して, 10PW~450PW 間の 10 ポイントをアレイ測定するスクリプト条件とした. 以

下, 分光計ごとにその条件を示す.

ECA600 : start90, 1.1 μ sec ; end90, 42 μ sec ;
step90, 4.5 μ sec.

FullJEOL : start90, 2 μ sec ; end90, 76 μ sec ;
step90, 8.2 μ sec.

NewCH : start90, 1.4 μ sec ; end90, 54 μ sec ;
step90, 5.78 μ sec.

B-6) qNMR 測定データの処理

Delta v5.3.2 で処理した. 取得した FID に対して, 窓関数の設定を外し, ゼロフィルでポイント数を 4 倍に増やした. フーリエ変換を行った後, 位相とベースライン (Akima) をマニュアルで補正し, qNMR スペクトルとした. FullJEOL で得られた NMR 試料管 1 本目のスペクトルを参考に, DSS- d_6 および MA の積分範囲を決定した. この積分範囲を Delta v5.3.2 の積分範囲移植ツールを用いて, ECA600, NewCH および FullJEOL で得られた残りの qNMR スペクトルに対して積分を行った. すなわち, 全ての qNMR スペクトルで得られたシグナルの積分範囲は統一された.

プローブの応答能を示す Q 値は, 以下の式 (2) から算出した.

$$Q \text{ value} = S \times 90PW/H/\text{Molar Conc.} - \text{equation (2)}$$

S , absolute integral value; $90PW$, 90° pulse width; H , number of protons; Molar Conc. , concentration (mmol/L).

C. 結果及び考察

C-1) 開発するスクリプトの対象範囲

Fig. 1A に示す手順の内, Step 1~Step 3 は, Delta ソフトウェア上のサンプル定義からコントロール可能なため, 本研究で開発するスクリプトの対象範囲から除いた. 具体的には, Fig. 2 に示すように, サンプル定義にグラジエントシム, プローブの設定温度, 安定化時間を入力して, 定義したサンプルに対して適当な Job を測定登録すると, Step 1→Step 2→Step 3→Job の順に測定が実行される. この時, Job の測定 Method に高速シムを選択して測定登録すると, Fig. 1A

に示された Step 1→Step 2→Step 3→Step 4 (高速シム) の順に測定が実行される。なお、qNMR 測定ではスピニングサイドバンドの影響をなくすために、サンプルの回転を止めて測定するのが一般的であり、サンプル定義の spin_state は SPIN OFF としている。

よって、本研究で作成するスクリプトの対象範囲は、Step 5～Step 7 とした。また、国立衛研では、旧型分光計 ECA で制御された NMR 装置 (ECA600) と、新型分光計 ECZ で制御された NMR 装置 (FullJEOL および NewCH) が稼働しているため、両分光計で実施可能なスクリプトを開発することとした。

C-2) 90PW 校正方法の検討

90PW 校正は、EC-qNMR を精度よく実施するための重要な手順である。90PW は、プローブを最適化した状態で実施する必要があり、すなわち、チューニングおよびマッチング (T&M) を実行した後に 90PW を校正する必要がある。一般に 90PW の校正には、緩和時間 T_1 の影響が小さい 360PW 付近をアレイ測定し、手動でヌルポイントを探す方法が一般的だが、この方法は、EC-qNMR の完全自動化という本研究の目的から脱線しているため、採用しないこととした。そこで、Kurimoto らが報告したカーブフィッティングによるパルス幅校正法 (MUSASHI) を採用することとした³⁾。具体的には、10PW～450PW をアレイ測定した後、分光計が各パルス幅におけるシグナル強度をプロットし、正弦曲線とのフィッティングを行うことで、自動的に 90PW が校正するようにした。アレイ測定時は、オフレゾナンス効果による正弦曲線の歪みを除去するため、任意のシグナルを照射中心として設定する必要がある。理論的には、どのシグナルを照射中心として設定しても、得られる 90PW は同じである。そこで、分光計がアレイ測定時の照射中心を簡単に選択できるようにするため、アレイ測定前に Scout scan (1 スキャンの ^1H 測定) を実行させて、このときに得られるスペクトル上の、最も S/N の大きいシグナルが照射中心となるように、スクリプトを開発す

ることとした (Fig. 1B, C)。

C-3) 90PW 校正時の Scout scan およびアレイ測定条件の検討

90PW 校正の際に実行される、Scout scan およびアレイ測定の両パルスシーケンスについて、測定条件の検討を行うこととした。

Scout scan では、 ^1H 核の共鳴周波数領域を網羅できるように、照射中心を 5 ppm、観測幅を 25 ppm (データクリップ後 20 ppm) とした。データポイント数は 16,384 とし、積算回数は 1 回に設定した。これらの測定条件は、オペレーターが変更できない固定のパラメーターとした。また、 ^{13}C デカップリングの有無は、Scout scan の S/N の大きいシグナルを見つけるという目的と関係がなく、また ^{13}C デカップリング時の熱の発生をなくすため、常に OFF となるよう固定した。上記測定条件下での FID 取り込み時間 (AQ) は、400MHz、600MHz および 800MHz の装置でそれぞれ 1.64 sec、1.09 sec および 0.82 sec である。一部のシグナルでは、FID が減衰しきらないと想定されるため、FID の処理として、窓関数は台形関数のみを適用することとした。

アレイ測定では、照射中心は Scout scan で選択された最も S/N の大きいシグナル、観測幅 1.25 kHz (データクリップ後 1 kHz) とした。データポイント数は 1,024 とし、積算回数は各 1 回に設定した。熱の発生により、アレイ測定後に描かれる正弦曲線が歪む可能性があるため、 ^{13}C デカップリングは常に OFF とした。これらの測定条件は、Scout scan と同様に、固定のパラメーターとした。このときの AQ は、磁場に関係なく 0.82 sec となり、窓関数は Scout scan と同様に、台形関数のみの適用とした。

C-4) アレイ測定時の遅延時間 D_1 の検討

式 (1) に示すように、相反定理に基づく EC-qNMR では、計算式に校正後の 90PW の値が組み込まれている。すなわち 90PW の校正精度が、EC-qNMR の測定値に対して、直接的に影響を与えるため、開発するスクリプトの 90PW 校正精度を、どのようにして担保するのか検討を行

った。

先行研究では²⁾、緩和時間 T_1 の長いシグナルを照射中心とした場合、アレイ測定後の正弦曲線が歪み、フィッティングが機能せず、正しい 90PW が算出されないことを報告している (Fig. 3)。C-2) および C-3) で説明したように、本研究で開発するスクリプトでは、Scout scan 時に S/N の大きいシグナルがアレイ測定の照射中心となる。希少な試料である場合、高濃度の NMR 用試料液を調製できず、Scout scan 時に T_1 の長い溶媒シグナルがアレイ測定の照射中心となることが想定された。そこで、C-3) で固定した測定条件の他に、アレイ測定ではパルス幅の配列パラメーターおよび遅延時間 D_1 を任意に設定できるようにした (Fig. 4)。Fig. 4 に示した「start90」、「end90」、「step90」が配列パラメーターに相当し、「calc90_relax_delay」がアレイ測定時の D_1 に相当する。先行研究では、プローブの 90PW 初期値に対して、10~450PW の範囲を 10 ポイントでアレイ測定し、 D_1 は対象シグナルの $T_1 \times 2$ 倍以上で設定すると精度良く 90PW を校正できたと報告している²⁾。このポイント数で D_1 を 10 sec, 30 sec, 60 sec, 120 sec と設定したときのアレイ測定時間は、それぞれ 2 分, 5 分, 10 分, 20 分となる。¹H 核の場合、アレイ測定時の D_1 を、60 sec 以上に設定しておけば、ほとんどのシグナルに対して精度良く 90PW が校正できる。なお、照射中心を決定する Scout scan の D_1 は、「calc90_relax_delay」が反映されるように設計した。

C-5) qNMR 測定条件の検討

開発するスクリプトには、qNMR 測定条件として、「force_tune」、「autogain」、「receiver_gain」、「scans」、「dummy_scans」、「x_angle」、「x_offset」、「x_sweep」、「data_points」、「relaxation_delay」、「inv_gated_noe」、「decoupling」、「decoupling_modulation」、「spinner_frequency」、「spinner_state」、「turn_off_spin」を設けて、柔軟に測定条件を変更できるようにした (Fig. 4)。EC-qNMR の場合、分析種と EC のスペクトルデータを、同じゲイン値で比較する必要があるた

め、ほとんどの場合、「autogain」は OFF にして、共通のゲイン値を「receiver_gain」に入力することになるが、「autogain」も選択できるようにしてある。

C-6) 開発したスクリプトの動作確認

ECA600, FullJEOL および NewCH に対して、開発した EC-qNMR のスクリプトを実行し、動作に問題がないか確認した。EC-qNMR では、T&M をとった後に 90PW を校正する必要があるため、Fig. 5A に示すパターン①のように、パラメーターの「force tune」にチェックを入れて、「decoupling」を外した測定条件を実行させた。すると、まず HF1 (¹H 核) の T&M が実行され、90PW 校正が行われたが、校正終了後に 2 回目の HF1 の T&M が実行され、qNMR 測定となった。

次に、パラメーター中の「force tune」および「decoupling」にチェックを入れたパターン②を実行させたところ、HF1 の T&M が実行された後、90PW の校正が行われ、次に LF1 (¹³C 核) と HF1 の T&M が実行され、qNMR 測定となった。パターン③のように、「force tune」のチェックを外すと、T&M は実行されず、90PW の校正の後、qNMR 測定となった。このように、開発したスクリプトでは、パラメーターに「force tune」のチェックを入れると、90PW 校正の前後で T&M が実行された。90PW 校正は、T&M でプローブを最適化した後に実施するが、校正終了後に再度の T&M を実施すると、プローブの状態が変わってしまうため、90PW の値とプローブの状態との関係性が崩れてしまう。特にパターン②のように、¹³C デカップリングを適用して qNMR 測定する場合、90PW 校正前に HF1 だけを T&M したプローブ状態と、校正終了後に LH1 および HF1 を T&M したプローブの状態は異なる。

また、もう一つの不具合として、ECA600 では、スクリプトの qNMR パラメーターである「inv_gated_noe」と「decoupling」のチェックを外しても、qNMR 測定で AQ と D_1 中に ¹³C デカップリングが適用されていた。そこで、詳細メ

ソッドパラメーターを確認したところ、「noe」と「decoupling」にチェックが入っており (Fig. 5B), 入力したスクリプトのパラメーターが, qNMR パルスシーケンスに反映されていなかった。そこで, 詳細メソッドパラメーターの「noe」と「decoupling」のチェックを外したところ, ^{13}C デカップリングなしに qNMR 測定となったため, ECA600 でスクリプトを実行する際は, 詳細メソッドパラメーターの「noe」と「decoupling」もあわせて確認をとる必要がある。なお, ECZ では上記の問題は確認されなかった。

以上のことから, 開発したスクリプトは以下の点について改善すべきである。

- スクリプトのパラメーターに「force tune」のチェックを入れた際, 90PW 校正終了後の T&M を実行しないよう改善する。
- スクリプトのパラメーターに「force tune」と「decoupling」にチェックを入れたとき, LF1 と HF1 を対象に T&M を 90PW 校正前に実行し, 校正終了後は 90PW 校正を実行しないよう改善する。
- ECA 分光計について, スクリプトの qNMR 測定パラメーター中の「inv_gated_noe」と「decoupling」について, qNMR のパルスシーケンスに反映されるよう改善する。

C-7) 開発したスクリプトで得られる EC-qNMR の精度

ECA600, FullJEOL および NewCH の 3 台の NMR 装置上で, 開発したスクリプトを用いて, EC-qNMR を実施し, その際に得られる測定値の精度について検証することとした。検証にあたっては, DSS- d_6 および MA 混合液を 6 本の NMR 試料管に分注し, それぞれの試料管から得られる DSS- d_6 および MA シグナル由来の Q 値をプロットして, その変動を確認した。また, DSS- d_6 を基準として MA を値付けし, MA の認証値と比較することで, IC-qNMR の精度を確認した。qNMR 測定中の ^{13}C デカップリングの有無 (AQ のみ適用) についても検証した。デカップリング方法として GARP, MPF8 および

MPF10 の 3 種を用いることとした。

NMR 試料溶液中の DSS- d_6 , MA および DMSO- d_5 それぞれの T_1 は, 3 sec, 3 sec および 15 sec であった。本研究では, 90PW 校正時間を短くして効率よく検証を進めるために, Scout scan で常に T_1 が短い MA が選択されるように, MA の濃度を意図的に濃くした。90PW アレイ測定の PW ポイント数および D_1 は, 先行研究と同様に²⁾, 10PW~450PW の間を 10 ポイント, 30 sec ($T_1 \times 2$ 倍以上) とした。qNMR 測定時の D_1 は, 30 sec とした。

Fig.1 にそった手順で EC-qNMR が実行されるように, Fig. 6 に示す 3 つの Job を組み合わせた。まず, Fig. 2 に示すようにサンプル定義に必要事項を入力し, さらに高速シムを選択した Job①を測定登録することで, Step 1~Step 4 を実行させた。なお, C-6) において, 開発したスクリプトでは「force tune」にチェックを入れると, 90PW 校正終了後に 2 回目の T&M が実行されたため, 「force tune」にはチェックを入れず, スクリプトの前に, T&M を実行する 1 スキャンのダミーパルスを選択した Job②を測定登録した。 ^{13}C デカップリングで qNMR 測定する場合は, このダミーパルスに single_pulse_dec を用いて, LF1 および HF1 に対して T&M が実行されるようにした。なお, このダミーパルスのフリップ核と D_1 は, それぞれ 10PW と 30 sec 程度に設定し, パルス照射後, すぐに平衡状態に戻るようにした。最後に, 本研究で開発したスクリプトを選択した Job③を測定登録し, Fig.1 にそった手順の EC-qNMR を実行させた。

Fig. 7 に, ECA600, FullJEOL および NewCH で行った検証結果を, 比較できるようにまとめた。全ての ^{13}C デカップリングパターンで, ECA600 の Q 値の変動が大きかった (non-dec, 1.0%; GARP, 1.3%; MPF8, 2.5%; MPF10, 1.9%)。また, 同じ時間軸で測定を行った IC-qNMR についても, ECA600 の RSD (%) が最も大きかった。すなわち, この変動の結果から判断すると, ECZ 分光計で制御された FullJEOL および NewCH の方が, 装置の安定性が高く, qNMR 測定に適した装置と言える。ただし, 複数の NMR

試料管から得られた IC-qNMR の MA 純度結果を平均すれば、その結果は真値 (MA の認証値) と 1%以内で一致するので、ほとんどの研究分野において十分な精度であり、研究業務を進めるうえでまったく問題にはならない。さらに、本報告書では詳細を説明しないが、シム調整の簡便さ、シグナルの裾がシャープに減衰する綺麗さは、ECA600の方が優れており、例えば、シグナルが混雑するような化合物の場合、ECA600の方がqNMRに適した装置といえる。Fig. 8に示すように、FullJEOLおよびNewCHで、特に¹³Cデカップリング時に、シグナルの裾がなぜ左右対称にならないのかは、プローブにコールドシステムを採用している両装置の宿命なのか、あるいは国立衛研の地盤や、近接する羽田空港から離陸する飛行機の騒音などを、感度の良いコールドシステムがシグナルとして検出しているのか、はっきりしていない。この点は、より良いqNMRスペクトルを取得するために、改善すべき問題である。

D. 結論

既存添加物の成分規格作成に関する研究業務の迅速化を目指し、EC-qNMRを完全自動化するスクリプトを開発した。開発したスクリプトでは、90PW校正の前後でT&Mを重複して実行してしまうなどの不具合が確認されたが、複数のJobを組み合わせることでこの問題を回避し、先行研究で示された適切な手順²⁾に沿ったEC-qNMRの完全自動化が可能となった。また、開発したスクリプトを実行した際のEC-qNMRの精度は、装置によってRSDが2.5%となる場合もあったが、測定回数を増やすことにより、正確な絶対純度を算出できると思われる。

本研究で開発したスクリプトには、オペレーターが柔軟に、90PW校正やqNMRの測定条件を変更できるように、編集可能なパラメーターが残されている。これらのパラメーターは、EC-qNMRの精度に大きな影響を与えるため、スクリプトの使用に当たっては、利用者が各パラメーターの役割などを十分理解しておく必要がある。

EC-qNMRの完全自動化スクリプトは、既存添加物の研究業務に限らず、あらゆる分野の研究業務の効率化に寄与できると大いに期待できる。

E. 参考文献

- 1) Burton I.W., Quilliam M.A., Walter J.A.: Quantitative ¹H NMR with External Standards: Use in Preparation of Calibration Solutions for Algal Toxins and Other Natural Products. *Anal. Chem.*, 2005; 77(10):3123-3131.
- 2) Nishizaki Y, Lankin D, Chen SN, Pauli G: Accurate and precise external calibration enhances the versatility of quantitative NMR (qNMR). *Anal. Chem.*, 2021; 93(5):2733-2741.
- 3) Kurimoto T, Asakura K, Yamasaki C, Nemoto N: MUSASHI: NMR Pulse Width Determination Method by Nonlinear Least Square Curve Fitting. *Chem. Lett.* 2005; 34, 540-541.

F. 研究業績

1. 学会発表等

- 1) 西崎雄三, 石附京子, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 精油除去ウイキョウ抽出物の成分規格作成に向けた基礎的検討. 日本食品化学学会第26回総会・学術大会 (2020.5.28)(誌上発表)
- 2) 中島馨, 増本直子, 西崎雄三, 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 既存添加物「カラシ抽出物」および「セイヨウワサビ抽出物」に含まれるイソチオシアン酸アリル定量法の改良. 日本食品化学学会第26回総会・学術大会 (2020.5.28)(誌上発表)
- 3) 西崎雄三, 石附京子, 中島馨, 増本直子, 末松孝子, 杉本直樹, 佐藤恭子: ¹³C-CP/MASを用いた食品添加物キトサンの脱アセチル化度の測定. 第2回日本定量NMR研究会年会 (2020.12.4)(神奈川)
- 4) 石附京子, 建部千絵, 西崎雄三, 窪崎敦隆, 多田敦子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 外部標準法qNMRの自動化スクリプトの作成. 第2回日本定量NMR研究会年会 (2020.12.4)(神奈川)

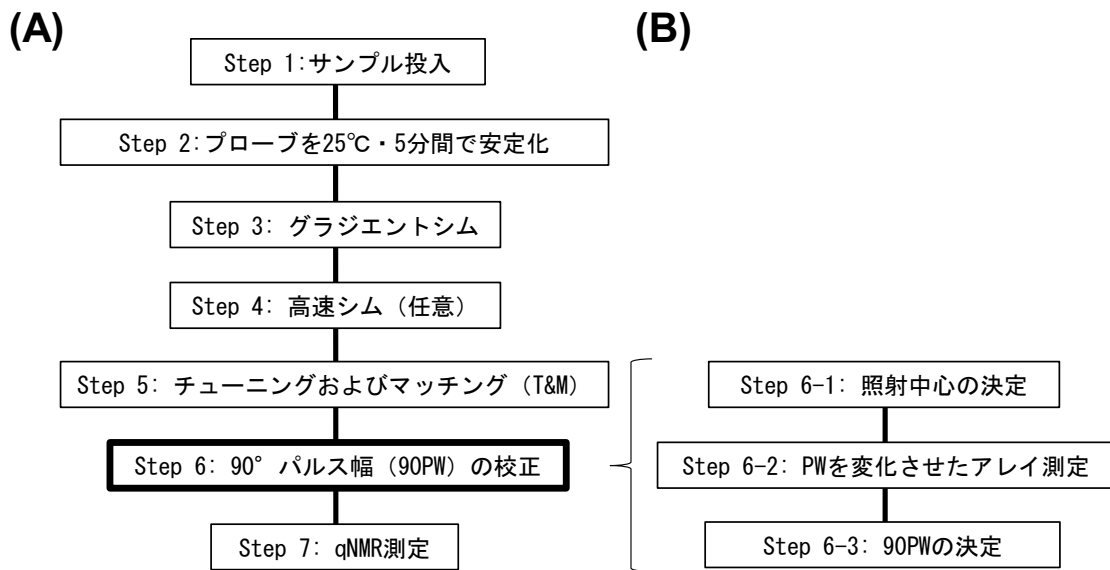
- 5) 高橋未来, 高木映里, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一: シングルリファレンスHPLCによるクルクミン類の定量法の検討. 第2回日本定量NMR研究会年会(2020.12.4)(神奈川)

2. 論文発表等

- 1) Nishizaki Y, Ishizuki K, Masumoto N, Tada A, Sugimoto N, Sato K: HPLC determination of quercetin using relative molar sensitivity to methylparaben as a single reference. *Jpn. J. Food Chem. Safety*, 2020; 27(2): 42-52.
- 2) Miura T, Sugimoto N, Bhavaraju S, Yamazaki T, Nishizaki Y, Liu Y, Bzhelyansky A, Amezcua C, Ray J, Zailer E, Diehl B, Gallo V, Todisco S, Ofuji K, Fujita K, Higano T, Geletneky C, Hausler T, Singh N, Yamamoto K, Kato T, Sawa R, Watanabe R, Iwamoto Y, Goda Y: Collaborative study to validate purity determination by ¹H quantitative NMR spectroscopy by using internal calibration methodology. *Chem. Pharm. Bull.*, 2020; 68(9):868-878.
- 3) Ohtsuki T, Matsuoka K, Fujii Y, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N, Sato K, Matsufuji H: Development of an HPLC method with relative molar sensitivity based on ¹H-qNMR to determine acteoside and pedaliin in dried sesame leaf powders and processed foods. *PLoS ONE.*, 2020; e0243175:1-12.
- 4) 酒井有希, 増本直子, 西崎雄三, 大槻崇, 松藤寛, 杉本直樹, 佐藤恭子: 相対モル感度を用いた single-reference HPLC 法が定量値に影響を及ぼす要因の検討と機能性表示食品中のルテイン定量への応用. *日本食品化学学会誌*, 2020; 27(3): 123-134.
- 5) 西崎雄三, 石附京子, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 既存添加物である精油除去ウイキョウ抽出物中に含まれる主成分の抗酸化能評価. *日本食品化学学会誌*, 2020; 27(3): 164-172.
- 6) Masumoto N, Ishizuki K, Nishizaki Y, Ohtsuki T, Kuroe M, Yamazaki T, Numata M, Matsufuji H, Sugimoto N, Sato K: Determination of mogroside V in luohanguo extract for daily quality control operation using relative molar sensitivity to single-reference caffeine. *Chem. Pharm. Bull.*, 2021; 69(1):18-25.
- 7) Nishizaki Y, Lankin D, Chen SN, Pauli G: Accurate and precise external calibration enhances the versatility of quantitative NMR (qNMR). *Anal. Chem.*, 2021; 93(5):2733-2741.
- 8) Kuroe M, Numata M, Masumoto N, Nishizaki Y, Sugimoto N, Itoh N: Use of relative molar sensitivity as a specific value for evaluating heptaoxyethylene dodecyl ether concentrations in methanol solution. *Anal. Sci.*, in press.
- 9) Takahashi M, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N, Sato K, Inoue K: Quantification of tea - derived catechins without the requirement for respective calibration curves by single reference liquid chromatography based on relative molar sensitivity. *J. Sci. Food Agric.*, in press.

G. 知的財産権の出願. 登録状況

なし



(C)

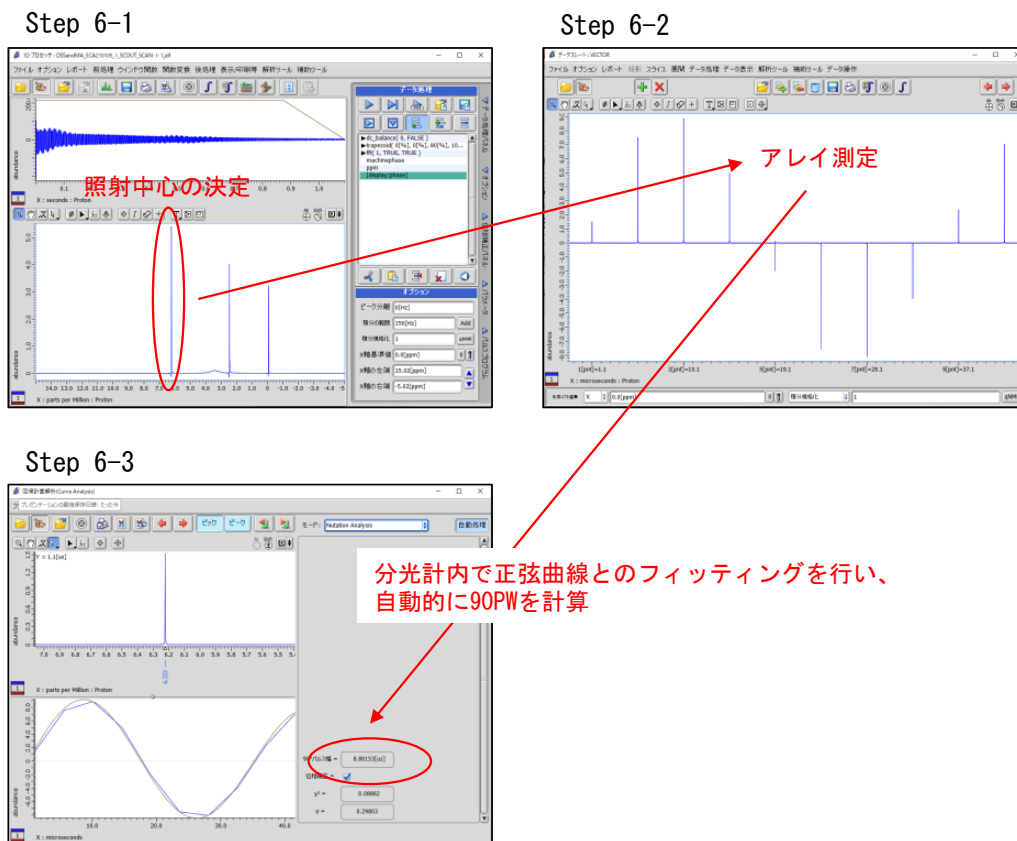


Fig. 1 EC-qNMR の手順

(A)および(B) 先行究²⁾で示された適切な EC-qNMR の測定順序

(C)90PW 校正のイメージ



Fig. 2 Delta ソフトウェア上のサンプル定義

Fig. 1 の Step1～Step 3 をここで設定できる. temp_delay は 300[s]以上が望ましい²⁾.

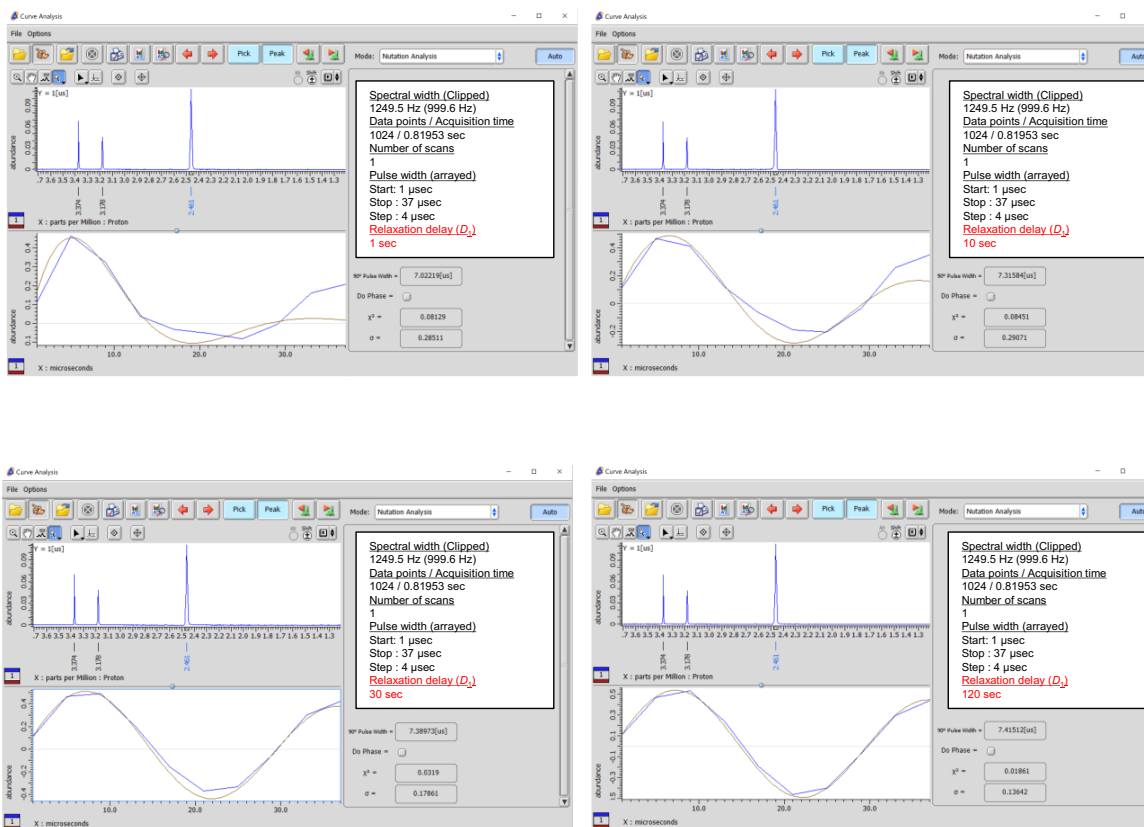
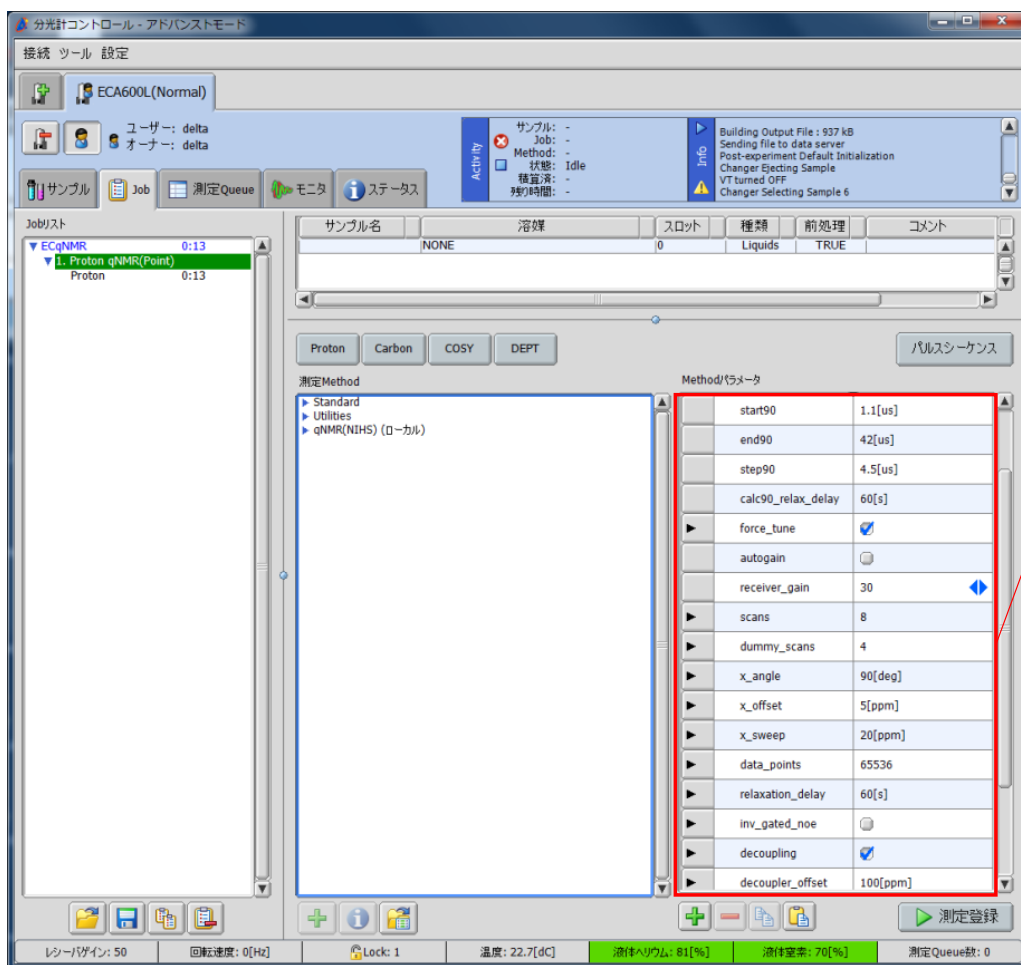


Fig. 3 T_1 が長いシグナルを照射中心とした時のPWアレイ測定結果

アレイ測定中の D_1 が短いと、アレイ測定後の正弦曲線が歪み、フィッティングが精度良く機能しない²⁾。照射中心、 T_1 が15secのDMSO-d₅ (溶媒シグナル)。左上→右上→左下→右下の順に、アレイ測定中の D_1 がそれぞれ1 sec, 10 sec, 30 sec, 120 sec。アレイ測定中の D_1 が長いほど、綺麗にフィッティングする。



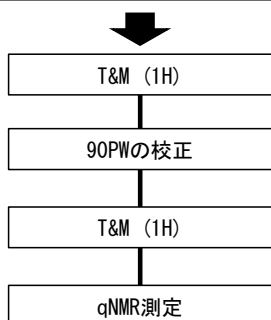
| | | |
|---|-----------------------|-------------------------------------|
| ▶ | return_data_to_screen | <input checked="" type="checkbox"/> |
| ▶ | filename_part2 | qH |
| ▶ | calculate_proton_90 | <input checked="" type="checkbox"/> |
| | start90 | 1.1[us] |
| | end90 | 42[us] |
| | step90 | 4.5[us] |
| | calc90_relax_delay | 10[s] |
| ▶ | force_tune | <input checked="" type="checkbox"/> |
| | autogain | <input type="checkbox"/> |
| | receiver_gain | 30 |
| ▶ | scans | 8 |
| ▶ | dummy_scans | 4 |
| ▶ | x_angle | 90[deg] |
| ▶ | x_offset | 5[ppm] |
| ▶ | x_sweep | 20[ppm] |
| ▶ | data_points | 65536 |
| ▶ | relaxation_delay | 30[s] |
| ▶ | inv_gated_noe | <input type="checkbox"/> |
| ▶ | decoupling | <input checked="" type="checkbox"/> |
| ▶ | decoupler_offset | 70[ppm] |
| ▶ | decoupler_modulation | MPF8 |
| | spinner_frequency | 15[Hz] |
| | spinner_state | SPIN OFF |
| ▶ | turn_off_spin | <input checked="" type="checkbox"/> |

Fig. 4 開発したスクリプトで編集できる測定条件

(A)

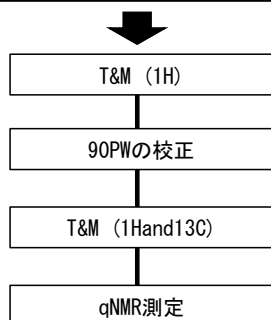
パターン①

| | |
|-----------------------|-------------------------------------|
| return_data_to_screen | <input checked="" type="checkbox"/> |
| filename_part2 | qH |
| calculate_proton_90 | <input checked="" type="checkbox"/> |
| start90 | 1.1[us] |
| end90 | 42[us] |
| step90 | 4.5[us] |
| calc90_relax_delay | 10[s] |
| force_tune | <input checked="" type="checkbox"/> |
| autogain | <input type="checkbox"/> |
| receiver_gain | 30 |
| scans | 8 |
| dummy_scans | 4 |
| x_angle | 90[deg] |
| x_offset | 5[ppm] |
| x_sweep | 20[ppm] |
| data_points | 65536 |
| relaxation_delay | 30[s] |
| inv_gated_noe | <input type="checkbox"/> |
| decoupling | <input checked="" type="checkbox"/> |
| decoupler_offset | 70[ppm] |
| decoupler_modulation | MPF8 ↓ |
| spinner_frequency | 15[Hz] |
| spinner_state | SPIN OFF ↓ |
| turn_off_spin | <input checked="" type="checkbox"/> |



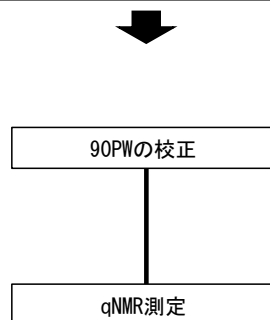
パターン②

| | |
|-----------------------|-------------------------------------|
| return_data_to_screen | <input checked="" type="checkbox"/> |
| filename_part2 | qH |
| calculate_proton_90 | <input checked="" type="checkbox"/> |
| start90 | 1.1[us] |
| end90 | 42[us] |
| step90 | 4.5[us] |
| calc90_relax_delay | 10[s] |
| force_tune | <input checked="" type="checkbox"/> |
| autogain | <input type="checkbox"/> |
| receiver_gain | 30 |
| scans | 8 |
| dummy_scans | 4 |
| x_angle | 90[deg] |
| x_offset | 5[ppm] |
| x_sweep | 20[ppm] |
| data_points | 65536 |
| relaxation_delay | 30[s] |
| inv_gated_noe | <input type="checkbox"/> |
| decoupling | <input checked="" type="checkbox"/> |
| decoupler_offset | 70[ppm] |
| decoupler_modulation | MPF8 ↓ |
| spinner_frequency | 15[Hz] |
| spinner_state | SPIN OFF ↓ |
| turn_off_spin | <input checked="" type="checkbox"/> |



パターン③

| | |
|-----------------------|-------------------------------------|
| return_data_to_screen | <input checked="" type="checkbox"/> |
| filename_part2 | qH |
| calculate_proton_90 | <input checked="" type="checkbox"/> |
| start90 | 1.1[us] |
| end90 | 42[us] |
| step90 | 4.5[us] |
| calc90_relax_delay | 10[s] |
| force_tune | <input type="checkbox"/> |
| autogain | <input type="checkbox"/> |
| receiver_gain | 30 |
| scans | 8 |
| dummy_scans | 4 |
| x_angle | 90[deg] |
| x_offset | 5[ppm] |
| x_sweep | 20[ppm] |
| data_points | 65536 |
| relaxation_delay | 30[s] |
| inv_gated_noe | <input type="checkbox"/> |
| decoupling | <input checked="" type="checkbox"/> |
| decoupler_offset | 70[ppm] |
| decoupler_modulation | MPF8 ↓ |
| spinner_frequency | 15[Hz] |
| spinner_state | SPIN OFF ↓ |
| turn_off_spin | <input checked="" type="checkbox"/> |



(B)

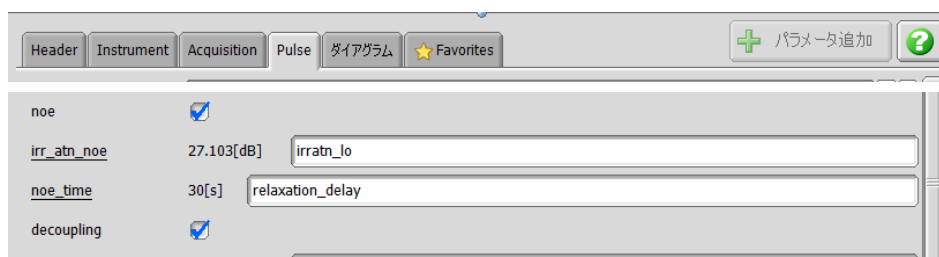


Fig. 5 スクリプトの動作確認

(A) スクリプトの測定条件を変更した際の分光計の挙動。

(B) 詳細メソッドパラメーター. ECA600では, スクリプトの測定条件 ^{13}C デカップリングを外しても, 詳細メソッドの *noe*, *decoupling* のチェックが外れているか, 確認する必要がある.

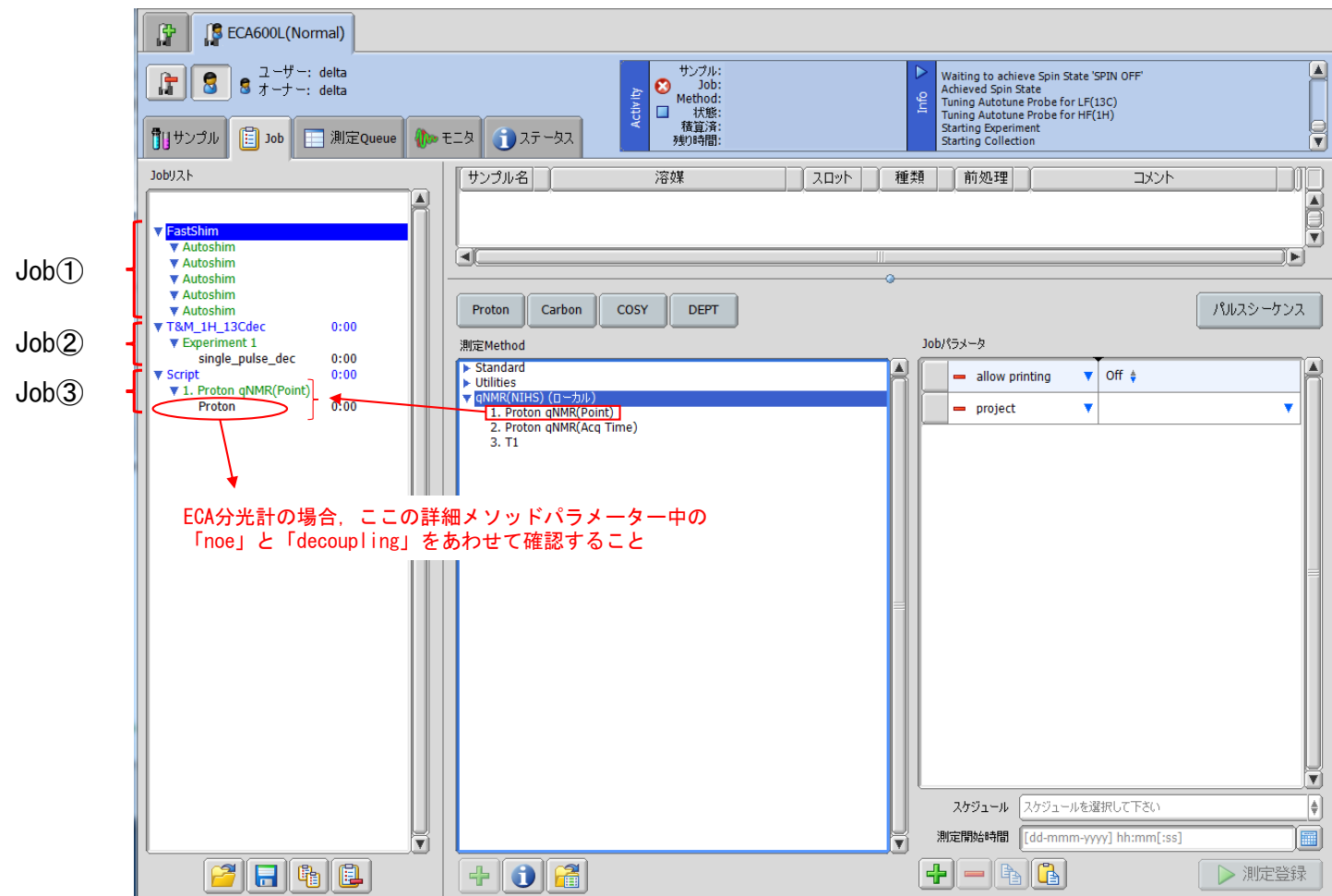


Fig. 6 Fig. 1 に示した手順に沿った EC-qNMR を実施するための Jon の組み合わせ.

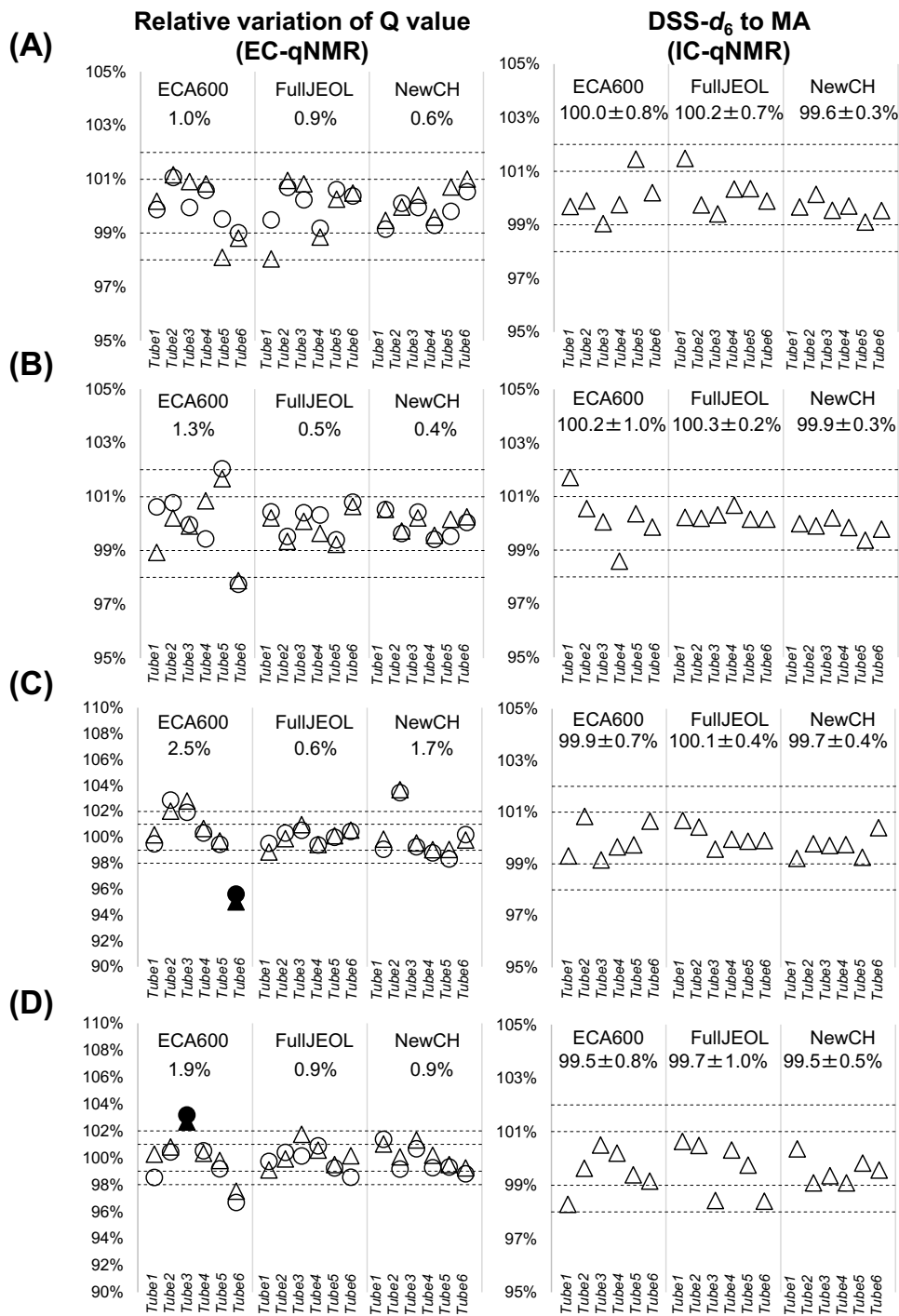
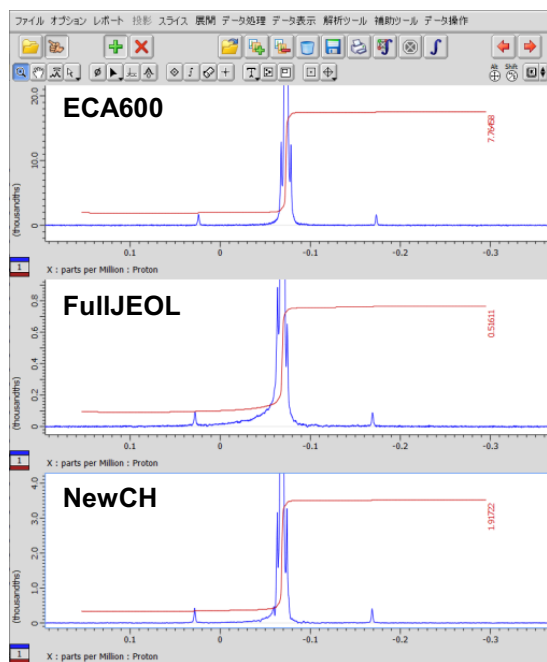


Fig. 7 Fig. 6 に示した Job の組み合わせで実行した EC-qNMR の精度.

(A) non-¹³Cdecoupling. (B) GARP-¹³Cdecoupling. (C) MPF8-¹³Cdecoupling. (D) MPF10-¹³Cdecoupling. 黒いマーカーは、著しくシムが悪かったスペクトル. IC-qNMR では、MA の認証値に対する相対純度をプロットした.

○, DSS-d₆ ; △, MA.

(A)



(B)

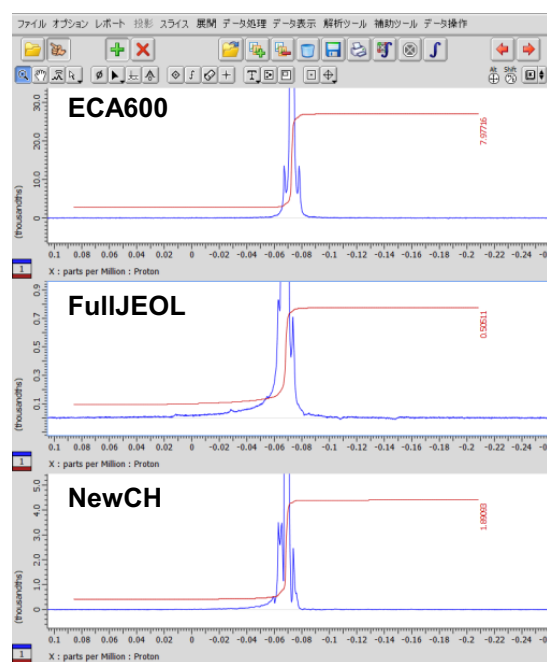


Fig. 8 ECA600, FullJEOL および NewCH でのスペクトル (裾部分) の拡大.

(A) non-¹³Cdecoupling. (B) MPF8-¹³Cdecoupling.