

食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）
食品添加物の試験法の検討及び摂取量に基づく安全性確保に向けた研究
令和 6 度分担研究報告書

卓上 NMR を用いた規格試験の開発に関する研究
ーピーク高さ法及びピークフィッティング法による qNMR 解析ー
研究分担者 西崎雄三 東洋大学食環境科学部

研究要旨 高磁場 NMR に対してスペクトル分解能が低い卓上 NMR においては、対象物質に応じて最適なスペクトル解析手法を選択することが重要である。本研究では、NMR スペクトル上で (2*RS*, 4*RS*) 体及び (2*RS*, 4*SR*) 体の 2 種のジアステレオマー混合物として観測されるジフェノコナゾール (DFZ) をモデル化合物とし、卓上 NMR (80 MHz) におけるピーク高さ法 (PH 法) 及びピークフィッティング法 (PF 法) の定量精度を検証した。高磁場 NMR (600 MHz) では、PH 法・PF 法ともに、従来法である積分法 (INT 法) と同等の精度 (誤差 $\pm$ 2%以内) でジアステレオマー比の算出が可能であった。一方、卓上 NMR ではジアステレオマー同士のピークの重なりが顕著であり、積分法による解析は困難であった。そこで、PH 法及び PF 法でスペクトル解析を実施したところ、誤差 $\pm$ 10%以内でジアステレオマー比の算出が可能であった。このことから、PH 法及び PF 法は、卓上 NMR においても一定の精度で重なり合うピークの分離解析が可能な手法であることが確認された。卓上 NMR を用いた規格試験への応用に向けた有用な知見が得られた。

A. 研究目的

定量 NMR (qNMR) は、我が国の食品及び医薬品の品質に関する公定法として、食品添加物公定書及び日本薬局方において、定量用標準品の規格試験に採用されている。これらの試験では、 ^1H 共鳴周波数が 400 MHz 以上の高磁場 NMR 装置の使用が求められている。しかし、高磁場 NMR は装置が大型で導入コストが高く、さらに液体ヘリウムの充填等に係る維持費も高額であるため、すべての分析機関が常設しているわけではなく、qNMR を実施可能な機関は限定的である。

NMR は高い定性能力と定量精度を併せ持つ分析手法であり、NMR 装置の普及が進めば、定量用標準品にとどまらず、食品添加物の各条品目に対する規格試験への応用も期待される。近年、海外で卓上型 NMR 装置の開発が進んでおり、これらは LC/MS や GC/MS と同程度のコストで導入可能である。また、液体ヘリウムを必要としない点でも利便性が高く、将来的にはすべての分析機関に NMR 装置が 1 台以上常設されることが期待される。

そこで本研究では、卓上 NMR を用い

た規格試験の実用化を見据え、NMR スペクトルの解析手法、具体的にはピーク高さ法 (Peak Height 法、以下 PH 法) 及びピークフィッティング法 (Peak Fitting 法、以下 PF 法) による定量精度の検証を目的とした。

一般に、qNMR スペクトルの解析には積分法 (INT 法) が用いられるが、これは定量対象プロトンのピーク面積を積分する手法であり、他のピークと十分に分離していることが前提条件となる。一方、PH 法及び PF 法では、信号のピークトップがわずかに分離していれば、ピーク高さの比較またはフィッティングにより、重なり合うピークの分離定量が可能となる (図 1)。これらの解析手法は、ピークの重なりが顕著な卓上 NMR において特に有用であると考えられる。しかし、PH 法及び PF 法の定量精度に関する報告は少ない。

そこで本研究では、モデル化合物としてジフェノコナゾール (DFZ) を用い (図 2)、PH 法及び PF 法による異性体比の定量精度を検証した。DFZ は、2 位及び 4 位に不斉中心を持つため、NMR スペクトル上では (2*RS*, 4*RS*) 体及び (2*RS*, 4*SR*) 体の 2 種のジアステレオマーが観測される。両者のプロトンは非常に近接した位置に共鳴を示すため、卓上 NMR では積分法による分離定量が困難である。そこで、PH 法及び PF 法により異性体比を算出し、別に高磁場 NMR を用いて得た結果と比較することで、両解析手法の定量精度を評価したので報告する。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

食品添加物として流通している DFZ 製品 (FA255~257) は、日本食品添加物協会を通じて入手した。比較用の DFZ 標準品として、林純薬工業 (Cat. No. 99053174; RM001) 及び富士フイルム和光純薬 (Cat. No. 042-25241; RM002) から市販品を購入した。

重アセトン (Cat. No. 012-26681, 99.9% D) は富士フイルム和光純薬から購入した。

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 DFZ 試料は、シリカゲルデシケー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。ウルトラミクロ天秤 (XP2U; Mettler Toledo) を用いて、DFZ 試料約 40 mg を精密に量りとり、重アセトン 1.0 mL を加えて完全に溶解させ、NMR 用試料液とした。

B-3) NMR 装置

高磁場 NMR 測定には日本電子 (株) 製 JNM-ECZ600R/S1 (¹H 共鳴周波数 600 MHz) を、卓上 NMR 測定には Bruker 社製 Bruker Fourier 80 (80.15 MHz) を用いた。両 NMR 装置の測定温度は 25°C に制御した。qNMR 測定における取り込み時間 (AQ) 及び遅延時間 (*D*₁) は、それぞれ 4.5 秒と 60 秒に統一した。

B-4) NMR データ処理

NMR 測定で得られた自由誘導減衰 (FID) は、MestReNova v14.2.1 (Mestrelab Research) を用いて処理した。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：LB / GB = 0.1 Hz / 1.0 Hz を適用した。次に、データポイント数を 512K まで zero filling し、自動位相補正及び自動ベースライン補正を行ったものを、NMR 解析用のスペクトルとした。

B-5) PH 法及び PF 法

「B-4) NMR データ処理」で得られた NMR スペクトルに対して、MestReNova v14.2.1 に搭載されている「Auto Peak Picking」機能及び「Auto Line Fitting」機能を用いて、PH 法及び PF 法による解析を実施した。PH 法では、検出されたピークトップの高さを記録した。PF 法では、ピーク形状を Lorentzian-Gaussian 形状と仮定したフィッティングにより波形分離させた。

B-6) 参照値

DFZ のジアステレオマー比 (DF) に関しては、既報のキラル HPLC 分析結果を参照した(表 1)。¹⁾ すなわち、(2R, 4R) 体、(2R, 4R) 体、(2R, 4S) 体及び (2S, 4R) 体のピーク面積を用い、以下の式により DF を算出した。

$$DF = \frac{A_{(2R,4R)} + A_{(2S,4S)}}{A_{(2R,4R)} + A_{(2S,4S)} + A_{(2R,4S)} + A_{(2S,4R)}}$$

ここで、添字は DFZ の異性体。A：ピーク面積。

(倫理面への配慮)

本研究は、倫理面にかかわる事項はない。

C. 結果及び考察

C-1) 解析に用いるプロトンピークの選定

PH 法及び PF 法の定量精度を適切に評価するため、解析に用いるプロトンは多重度が少なく、ピーク分離が明瞭なプロトンを選定した。検討の結果、DFZ の H5'' 及び H3'' に由来するプロトンピークを用いることとした。これらのピークは、いずれも 0.5 Hz 以下のスピン-スピン結合により生じる ddd 型のピーク形状を示すが¹⁾、ブロードニングファクター (LB = 0.1 Hz、GB = 1.0 Hz) を適用することにより、Lorentzian-Gaussian 型のシングレット (s) に近似可能と判断し、PH 法及び PF 法の解析対象ピークとした (図 3)。

C-2) 積分法 (INT 法) の定量精度

まず比較基準として、高磁場 NMR 装置 (600 MHz) で得られたスペクトルに対して、INT 法を実施し、ジアステレオマー比 (DF) の算出を試みた。解析を行った結果、H5'' において参照値との差が 2.1% 以内、H3'' において 1.4% 以内の精度で DF を求めることができた (表 2)。

一方、卓上 NMR 装置 (80 MHz) では、H5'' 及び H3'' において (2RS, 4RS) 体と (2RS, 4SR) 体のプロトンピークが重なり合い、ピークの明確な分離が得られなかった。そのため、積分法による定量は困難であり、以降の解析では PH 法及び PF 法により定量精度の検証を進めることとした。

C-3) ピーク高さ法 (PH 法) の定量精度

PH 法によりジアステレオマー比 (DF) を算出した結果、600 MHz では H5'' で参照値との差が 1.9% 以内、H3'' で 1.5% 以内

と、INT 法と同等の精度が得られた（表 2）。

一方、80 MHz においては、H5"で 5.9% 以内、H3"で 4.4%以内の精度であり、PH 法は高磁場装置に比べて精度がやや劣る結果となった。

この原因として、高磁場 NMR では分離されていた不純物由来のピークが、卓上 NMR では H5"及び H3"のピークと一部または完全に重なっていたことが挙げられる（図 4）。特に (2*RS*,4*RS*) 体側のピークとの重なりが顕著であった。その結果、DF の値が参照値よりも全体的に高くなる傾向が見られた。

C-4) ピークフィッティング法 (PF 法) の定量精度

PF 法による解析では、600 MHz のスペクトルにおいて、H5"で 0.8%以内、H3"で 1.3%以内の精度でジアステレオマー比 (DF) を得ることができ、INT 法及び PH 法と同等の高い定量精度が確認された（表 2）。一方、80 MHz では、H5"で 18.1% 以内、H3"で 4.2%以内と、特に H5"において定量精度の著しい低下が見られた。

そこで、PF 法による解析結果の詳細、具体的には波形分離された各ピークの半値幅を確認した。600 MHz においては、H5" における (2*RS*, 4*RS*) 体 及 び (2*RS*,4*SR*) 体の半値幅はともに約 1.4 Hz に収束し、H3"においても両異性体で約 1.4 Hz に収束していた。既報によれば、H5"及びH3"の (2*RS*,4*RS*) 体と(2*RS*,4*SR*) 体は、同程度の半値幅を示すことが報告されている。¹⁾ 本研究の 600 MHz スペクトルにおいても両異性体の半値幅は同じ値：1.4 Hz に収束していたことから、PF

法による波形分離が適切に行われ、精度の高い DF が得られたと考えられる。これに対して、80 MHz では、H5"において (2*RS*,4*RS*) 体の半値幅が約 2.0 Hz、(2*RS*,4*SR*) 体が約 1.6 Hz に収束し、H3"においては、それぞれ約 1.9 Hz 及び 1.8 Hz に収束していた。(2*RS*, 4*RS*) 体と(2*RS*, 4*SR*) 体の異性体間で明らかな半値幅の差を示しており、PF 法の結果の信頼性に疑問が生じた。

このように、解析上はピーク分離が達成されているものの、実際には重なり合うピークが正確に分離されていない可能性があり、これが 80 MHz における PF 法の定量精度低下の一因であると考えられた。

C-5) PF 法 (再解析) による定量精度の改善

「C-4) ピークフィッティング法 (PF 法) の定量精度」で示したとおり、80 MHz における PF 法では、600 MHz と比較して定量精度の大幅な低下が観察された。特に、PF 後の異性体間においてピークの半値幅に差が生じていたことから、波形分離の信頼性に課題があると考えられた。そこで、PF 法の際、解析対象ピークの半値幅を固定することにより、PF 法の定量精度を改善できるかどうかを検討した。

まず、600 MHz のスペクトルにおける溶媒ピークの半値幅は 1.10 ± 0.01 Hz、80 MHz では 1.55 ± 0.06 Hz であった。このことから、80 MHz スペクトルでは 600 MHz と比べて、ピークの線幅が約 1.4 倍拡大していると推測された。そして、600 MHz での PF 法解析では、H5"及び H3"の各異性体の半値幅がいずれも約 1.4 Hz で

あった。これらの結果を踏まえて、80 MHz における PF 法解析においては、H5" 及び H3" の半値幅を 1.96 Hz (1.4×1.4 Hz) に固定することが妥当と考えた。

この仮定に基づき、H5" 及び H3" のピーク半値幅を 1.96 Hz に固定して、80 MHz における PF 法の再解析を実施したところ、全体の定量誤差は 10% 以下にまで改善され、先の PH 法と同程度の精度に収束した。

以上の結果から、PF 法における定量精度は、ピーク形状、なかでも半値幅の設定に大きく依存することが明らかとなった。

D. 結論

本研究では、DFZ をモデル化合物として、卓上 NMR (80 MHz) における PH 法及び PF 法の定量精度を検証した。高磁場 NMR (600 MHz) では、PH 法・PF 法ともに、従来法である INT 法と同等の精度 (誤差 $\pm 2\%$ 以内) でジアステレオマー比 (DF) を算出することができた。一方、卓上 NMR においても PH 法・PF 法の両手法による解析は可能であったが、精度は 600 MHz と比較して劣る結果となり、誤差は $\pm 10\%$ 以内であった。この精度低下の要因として、600 MHz スペクトルでは分離していた不純物由来のピークが、80 MHz においては対象ピークと完全に

重なっていたことが挙げられる。また、PF 法においては、解析対象ピークの半値幅を固定しない場合、定量誤差が 10% を超えるなど、参照値とはかけ離れた結果となる可能性が示唆された。この点は、PF 法を規格試験に導入する際に、解析条件として十分な検討を要する事項である。

以上の結果より、PH 法及び PF 法は、卓上 NMR においても一定の定量精度を確保できる解析手法であることが確認された。本研究成果は、卓上 NMR を用いた規格試験法の開発に資する知見を提供するものである。

E. 参考文献

- 1) Nishizaki, Y., Sugimoto, N., Miura, T., Asakura, K., Suematsu, T., Korhonen, S.P., Lehtivarjo, J., Niemitz, M., Pauli, G.F. *Anal. Chem.*, (2024) 96, 9790-9798.

F. 研究業績

論文発表等

なし

学会発表等

なし

G. 知的財産権の出願、登録状況

なし

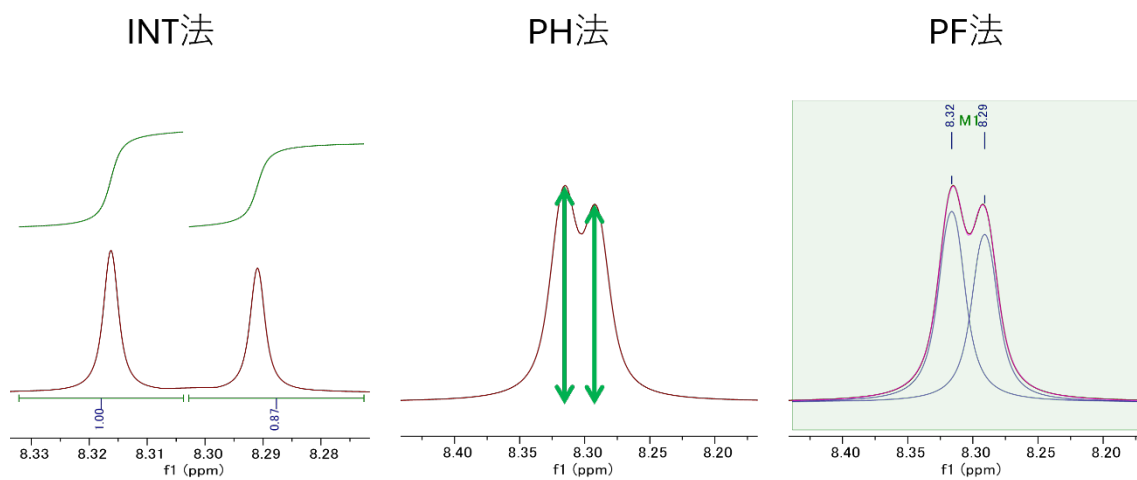


図1 INT法、PH法、PF法

INT法：積分法、PH法：ピーク高さ法、PF法：ピークフィッティング法

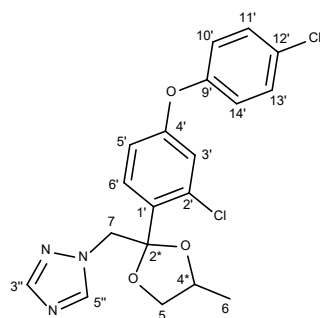


図 2 DFZ の化学構造
2 位と 4 位に不斉中心を持つ。

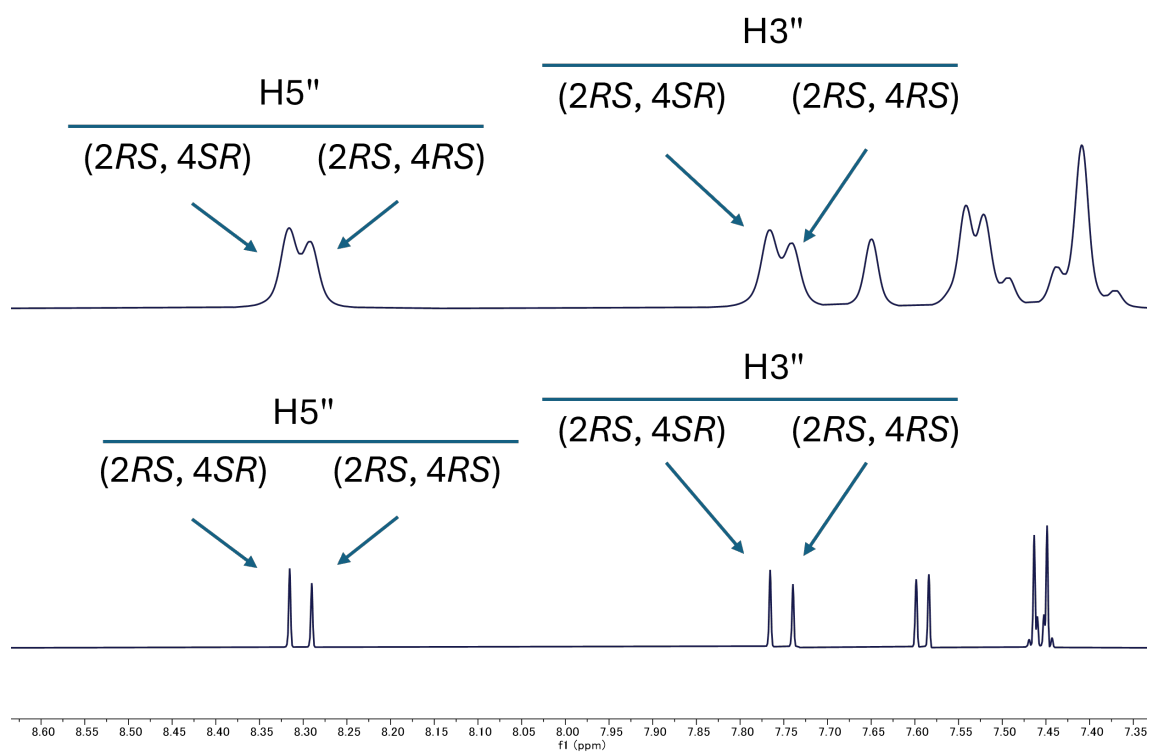


図3 80 MHz (上) 及び 600 MHz (下) における DFZ (RM002) の NMR スペクトル
ブロードニングファクター (LB = -0.1 Hz、GB = 1.0 Hz) を適用したスペクトル。

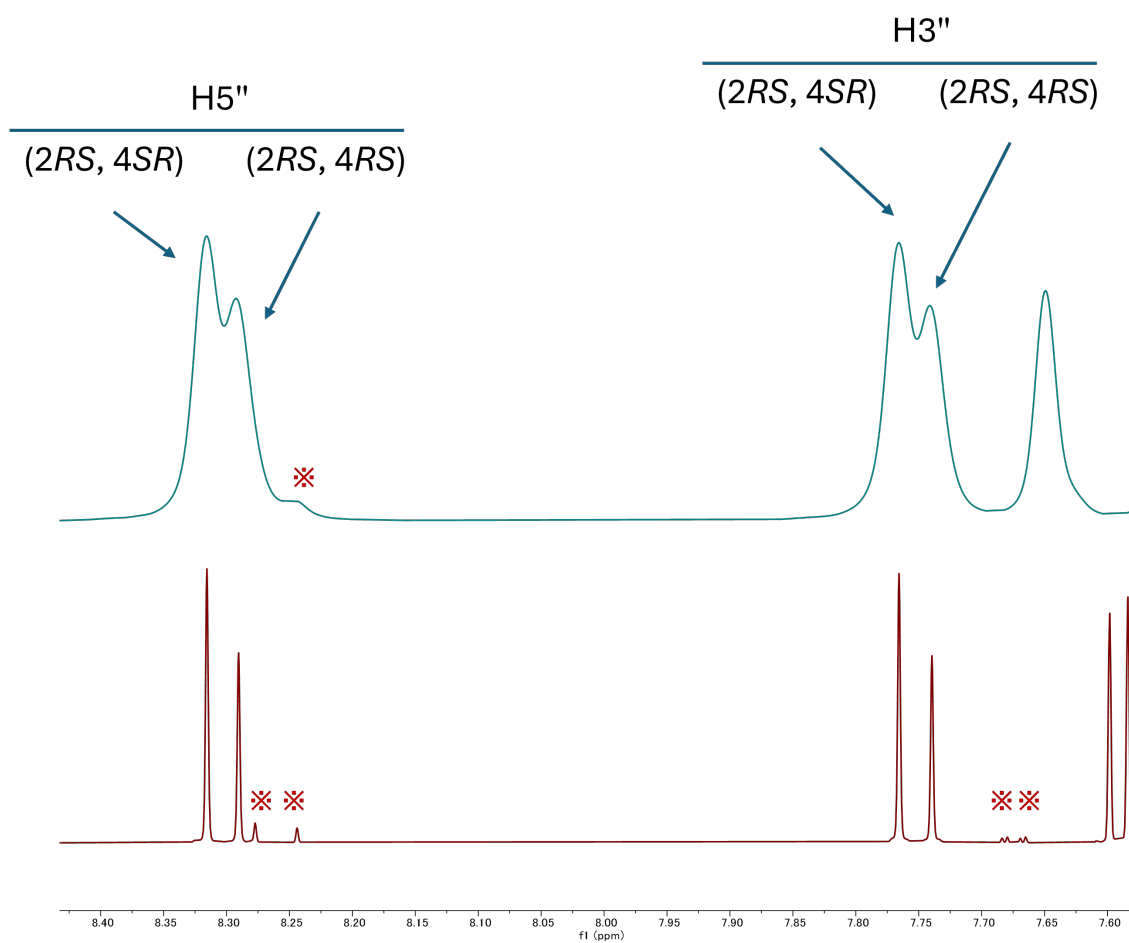


図 4 80 MHz (上) 及び 600 MHz (下) における DFZ (FA255) の NMR スペクトル
※は不純物由来のプロトンピーク。

表 1 本研究で用いた DFZ 試料の参照値

Sample	DFZ 含量	DF
FA255	95.8%	0.412
FA256	95.4%	0.428
FA257	95.7%	0.411
RM001	99.0%	0.544
RM002	99.7%	0.448

表 2 積分法 (INT 法)・ピーク高さ法 (PH 法)・ピークフィッティング法 (PF 法) から求めた DFZ のジアステレオマー比の定量精度 (%)

DFZ	600 MHz						80 MHz					
	INT 法		PH 法		PF 法		PH 法		PF 法		PF 法 (再解析)	
	H5"	H3"	H5"	H5"	H5"	H3"	H5"	H3"	H5"	H3"	H5"	H3"
FA255	99.0 ± 0.2	99.7 ± 0.2	99.5 ± 0.1	100.0 ± 1.1	100.2 ± 0.2	99.9 ± 0.1	105.9 ± 0.5	104.4 ± 0.3	118.1 ± 2.7	103.6 ± 0.3	108.2 ± 3.8	99.9 ± 0.2
FA256	98.9 ± 0.2	99.3 ± 0.2	98.8 ± 0.3	98.9 ± 0.4	100.0 ± 0.2	99.5 ± 0.2	105.2 ± 0.7	103.3 ± 0.7	117.3 ± 1.7	101.8 ± 0.5	105.2 ± 0.6	97.5 ± 0.6
FA257	97.9 ± 0.1	98.6 ± 0.2	98.1 ± 0.6	98.5 ± 1.2	99.2 ± 0.1	98.7 ± 0.1	103.2 ± 0.6	101.5 ± 0.3	114.5 ± 1.2	97.6 ± 1.2	102.7 ± 0.7	93.2 ± 1.1
RM001	99.0 ± 0.1	99.6 ± 0.1	100.4 ± 1.0	100.1 ± 0.4	99.7 ± 0.1	99.9 ± 0.2	101.4 ± 0.1	103.1 ± 0.3	105.7 ± 1.8	100.5 ± 1.6	105.6 ± 2.1	99.0 ± 1.6
RM002	99.8 ± 0.2	100.3 ± 0.1	100.9 ± 1.1	100.3 ± 0.1	100.1 ± 0.1	100.4 ± 0.1	98.5 ± 0.6	99.8 ± 0.1	96.5 ± 2.1	95.8 ± 1.6	95.9 ± 2.2	95.2 ± 1.4

表 1 の参照値に対する相対値を示した。試料調製 1 回、NMR 測定 3 回

