

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、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、卓上NMRにおける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Quantum Mechanics qNMR (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を高精度に定量可能であった。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由来信号がAITC由来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。

研究協力者

西川拓海

東洋大学 食環境科学部食環境科学科

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。近年では quantitative NMR (qNMR) として定量分析にも広く応用されている。定量に際しては、純度及び秤量値が既知の内標準物質と分析対象物の ¹H 信号をそれぞれ積分し、その信号面積比に基づいて含量を算出する方法 (INT-qNMR) が一般的である。しかし、NMR スペクトル上で ¹H 信号が近接または重複する場合には正確な積分が困難となるため、INT-qNMR による正確な定量には高いスペクトル分解能が求められ、一般に高磁場 NMR 装置を用いる方が有利である。一方、近年では小型・低磁場の NMR 装置 (卓上 NMR) が

開発されている。卓上 NMR は高磁場装置と比較して設置が容易であり、導入コスト及びランニングコストが低い。さらに、クエンチリスクがなく、冷媒補充を必要としないなど維持管理が簡便である。このような利点から、食品や医薬品の品質管理分野への応用が期待されている。しかしながら、低磁場であるがゆえに ¹H 信号の重複が生じやすく、INT-qNMR による正確な解析は、比較的高純度な化合物を対象とした場合などに限定される。

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、理論的には磁場強度に依存しない。したがって、磁場強度

の異なる NMR 装置間であっても、¹H スピン情報を活用することにより、分子スペクトルの再構築や重なり合ったシグナルの分離定量が同等の精度で行うことが可能となる。

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。最近では、NMR solutions 社が開発したソフトウェア『Cosmic Truth』を例に、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、短時間での収束計算が可能となった。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。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 qNMR (QM-qNMR) と呼ばれている。

1)

本研究では、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(図 1)、卓上 NMR における QM-qNMR の定量精度を検証するとともに、現行の定量法であるガスクロマトグラフィー (GC) との比較を行った。

B. 研究方法

B-1) 試薬及び試料

カラシ抽出物及びセイヨウワサビ抽出物は、日本食品添加物協会を通じて入手した。AITC (Cat. No. I0185) は東京化成工業 (株) 製を使用した。重アセトン (Cat.No.01053-96, 99.9%D) は関東化学 (株) から購入した。ジメチルスルホン (DMSO₂; Cat. No. 048-33271, 99.9% mass fraction), シクロヘキサン (Cat. No. 034-05006) 及びデカン (Cat. No. 040-21602) は富士フイルム和光純薬 (株) から購入した。

B-2) qNMR 測定

高磁場 NMR 装置 (Bruker 社製, ¹H 共鳴周波数 400 MHz) 及び卓上 NMR 装置 (Magritek 社製, 60 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-3) 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。Exponential 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。ただし、INT-qNMR と HifSA においては、Exponential を適用しなかった。以降、全ての測定データに対して、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-4) INT-qNMR

ウルトラマイクロ天秤で量りとった DMSO₂ 約 2 mg とセミマイクロ天秤で量りとった試料約 100 mg を重アセトン 1 mL に溶解したのち、NMR 試料管に 0.6 mL を移し封管し、qNMR 測定に付した。DMSO₂ のメチル基に対する AITC の H₃ の積分比を用いて、以下の式により AITC 含量を算出した。

$$Cont_{AITC} = \frac{A_{AITC}}{A_{IC}} \times \frac{H_{IC}}{H_{AITC}} \times \frac{M_{AITC}}{M_{IC}} \times \frac{m_{IC}}{m_S} \times P_{IC}$$

ここで、添字は分析種 (AITC)、内標準 (IC) 及び試料 (S)。Cont : 含量, A : 積分した面積値, H : プロトン数, M : モル質量, m : 秤量値。

B-4) 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。約 100 mg の AITC を量りとり、重アセトン 1.0 mL を加えて溶解させ、qNMR 測定を行った。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 AITC 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-5) QM-qNMR

B-4) で調製したものを qNMR 測定に付した。窓関数は以下の通り適用した : Exponential 0.2 Hz。NMR スペクトルと 2 種の mol ファイル

(AITC 及び DMSO₂) 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、AITC 及び DMSO₂ のスピンスピン結合定数の値は **B-4)** 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、AITC の含量を求めた。

$$Cont_{AITC} = \frac{Po_{AITC}}{Po_{IC}} \times \frac{M_{AITC}}{M_{IC}} \times \frac{m_{IC}}{m_S} \times P_{IC}$$

ここで、添字は AITC, DMSO₂ (IC) 及び試料 (S)。Po : モル比

B-6) GC

GC 測定は、食品添加物公定書第 9 版のカラシ抽出物及びセイヨウワサビ抽出物の定量法を参考にして実施した。デカン約 1400 mL を量りとり、シクロヘキサンを加えて正確に 200 mL としたものを定量用内標準液とした。試料 (カラシ抽出物/セイヨウワサビ抽出物) または AITC 約 150 mg を精密に量りとり、定量用内標準液 10 mL を正確に加えたのち、シクロヘキサンを加えて正確に 20 mL としたものを GC 測定に付した。GC 測定後、AITC の秤量値を INT-qNMR による定量値で補正した後に、以下の式により試料中の AITC 含量を算出した。

$$Cont_{AITC} = \frac{m_{AITC}}{m_S} \times \frac{Q_S}{Q_{AITC}} \times P_{AITC}$$

ここで、添字は AITC 及び試料 (S)。Q : AITC ピーク面積のデカンのピーク面積の比。

GC 測定条件

検出器 : 水素炎イオン化検出器

カラム : 内径 0.25 mm, 長さ 60 m のフューズドシリカ管の内面に、ガスクロマトグラフィー用ジメチルポリシロキサンを 0.25 μm の厚さで被覆したもの

カラム温度 : 80 °C から毎分 4 °C で 180 °C まで昇温した。

注入口温度 : 100 °C

検出器温度 : 250 °C

キャリアーガス : 窒素

流量 : AITC の保持時間が 7~8 分になるように調整する。

注入方式 : スプリット スプリット比 : 1 : 50

測定時間 : 30 分

C. 結果及び考察

C-1) AITC 標準試薬の qNMR 純度

本研究で用いる AITC 標準品の絶対純度を INT-qNMR で求めることとした。NMR 装置は、現有機器の中で最も高磁場である ¹H 共鳴周波数 400 MHz の NMR 装置を使用した。試料調製は 2 回実施し、各試料について qNMR 測定を 2 回行った。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シル (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。両化合物ともに不純物と重複が最も少ない H3 由来の ¹H 信号を用いて定量計算することとし (図 2), その結果、AITC 94.7% (RSD 0.2%), ATC 4.0% (RSD 0.3%) であった。本研究で用いる AITC 標準品は、¹H スピン情報を決定する上で十分に高純度な試料であると判断した。

C-2) AITC 及び ATC の HifSA

AITC に対して HifSA を実施し、AITC の ¹H スピン情報を明らかにすることとした。NMR 装置は、先の INT-qNMR と同様に、現有機器の中で最も高磁場である ¹H 共鳴周波数 400 MHz の NMR 装置を使用した。NMR スペクトル上には、ATC も観測されることから、ATC の ¹H スピン情報も明らかにすることとした。CT から得られた ¹H スピン情報を表 1 にまとめた。試料調製は 6 回実施し、各試料について qNMR 測定を 2 回行ったため、計 12 の NMR スペクトルが得られることとなる。これら 12 のスペクトルから得られた ¹H スピン情報は、反復計算間でのバラつきは最大で RSD 0.4% と、非常に再現性が高く安定した値であった。したがって、以降の解析では、これらの平均値を ¹H スピン情報の鋳型として用いることとした。

C-3) 参照値の決定

QM-qNMR の定量精度の確認に先立ち、カラシ抽出物及びセイヨウワサビ抽出物中の AITC 及び ATC 含量の参照値を求めることとした。現行の公定法で採用されている GC を用いて定量分析することとした。標準品の秤量値は、**C-1)**

で求めた AITC 及び ATC の qNMR 純度で補正した。カラシ抽出物及びセイヨウワサビ抽出物の試料調製は 2 回実施し、各試料について GC 測定を 2 回行った。その結果、カラシ抽出物は AITC 含量 91.7% (RSD 0.2%) 及び ATC 含量 3.9% (RSD 1.3%)、セイヨウワサビ抽出物は AITC 含量 85.3% (RSD 0.4%) 及び ATC 含量 4.1% (RSD 1.5%) であった。QM-qNMR の定量精度の確認では、これらを参照値として用いることとした。

C-4) 高磁場 NMR 装置における QM-qNMR の定量精度

C-2) で求めた ^1H スピン情報を基準にした QM-qNMR から、カラシ抽出物及びセイヨウワサビ抽出物中の AITC 含量及び ATC 含量を求めることにした。内部標準には先の INT-qNMR と同じく、様々な重溶媒に溶解することが可能で、単純なシングレットを示す DMSO_2 を用いることとした。試料調製は 2 回実施し、各試料について qNMR 測定を 2 回行った。QM-qNMR で得られる定量結果の再現性を向上させるためには、測定ごとのスペクトルの線幅をある程度揃える必要があると判断し、窓関数を適用することとした。今回は、Exponential 0.2 Hz を検討することとした。NMR 装置は、 ^1H 共鳴周波数 400 MHz の NMR 装置を使用した。NMR スペクトル、AITC と ATC 及び DMSO_2 の 3 つの mol ファイルを CT にアップロードして、反復計算を実施したところ、カラシ抽出物中の AITC 含量及び ATC 含量は、それぞれ 92.0% (RSD 0.9%) 及び 3.9% (RSD 1.9%) であった。GC で求めた参照値と比較した際の AITC 含量及び ATC 含量の真度は、それぞれ 100.3% (RSD 0.9%) 及び 100.1% (RSD 1.9%) であった (表 2)。現行の GC を用いた公定法では、AITC 含量のみを規定しているため、QM-qNMR における反復計算の際、ATC の mol ファイルを除いて反復計算を実施してみた。その結果、AITC 含量の真度は、101.2% (RSD 0.5%) であった (表 2)。同様にセイヨウワサビ抽出物についても実施した結果、AITC 及び ATC を対象に QM-qNMR を実施すると、AITC 含量及び ATC 含量の真度は、それぞ

れ 101.8% (RSD 0.6%) 及び 103.0% (RSD 1.0%) であった。AITC のみを対象とした際の真度は 102.2% (RSD 0.2%) であった (表 2)。

C-5) 卓上 NMR 装置における QM-qNMR の定量精度

C-4) と同様の検討を卓上 NMR 装置を用いて実施することとした。カラシ抽出物では、AITC 及び ATC を対象とした際の QM-qNMR の真度は、それぞれ AITC 102.3% (RSD 0.6%)、ATC 114.5% (RSD 1.0%) であった (表 3)。AITC のみを対象とした際の真度は 105.8% (RSD 0.6%) であった。セイヨウワサビ抽出物では、AITC 及び ATC を対象に QM-qNMR を実施すると、AITC 含量及び ATC 含量の真度は、それぞれ 103.8% (RSD 0.9%) 及び 135.7% (RSD 0.9%) であった。AITC のみを対象とした際の真度は 107.9% (RSD 0.8%) であった (表 3)。

卓上 NMR においてはカラシ抽出物及びセイヨウワサビ抽出物ともに ATC 含量の真度は参照値と比べて 10%以上の誤差が確認された。参考までに ATC の H_3 に由来する ^1H 信号の S/N 比を確認したところ、S/N 比は 100 程度であった。一方で、C-4) 高磁場 NMR における S/N 比は 2500 程度であった。このことから、卓上 NMR ではノイズの影響を多分に受けて、真度が悪化したと考察した。

また、卓上 NMR では、AITC のみを対象として QM-qNMR を実施した場合、AITC と ATC を同時に対象とした場合と比較して、AITC 含量の真度が悪化する傾向が認められた。この原因について考察した。

卓上 NMR では、AITC の H_1 及び H_2 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。さらに ATC 含量は AITC のスペクトルに著しい変化を与えるほどの含量はなく、その結果、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。

特になし

D. 結論

本研究では、カラシ抽出物及びセイヨウワサビ抽出物中のAITCをモデル化合物とし、卓上NMRにおけるQM-qNMRの定量精度を検証した。その結果、卓上NMRでは、解析対象に含める化合物の設定が定量精度に大きく影響することが明らかとなった。具体的には、試料中に含まれるAITCの構造類縁体であるATCを解析対象から除外した場合、ATC由来の信号がAITC由来の信号に重複した形で反復計算が収束し、AITC含量が高値を示す傾向が認められた。一方、スペクトル分解能の高い高磁場NMRでは、AITC及びATC由来の信号を識別可能であり、ATCを解析対象に含めるか否かに関わらず、AITCを高精度に定量することが可能であった。以上より、卓上NMRにおけるQM-qNMRでは、試料中に存在する構造類縁体や、 ^1H 信号が完全に重複する成分を適切に考慮しない場合、定量値が高値を示す危険性があることが明らかとなった。

E. 参考文献

- 1) Nishizaki Y, Lankin D. C, Chen S, Pauli G. F, Analytical Chemistry 2021; 93 (5): 2733-2741.

F. 研究業績

学会発表

- 1) Yuzo Nishizaki, A Case Study on Validation of External Calibration qNMR (EC-qNMR), qNMR summit 2025 (2025.6).
- 2) 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

特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況

表 1

表 1 CT を用いて明らかにした AITC 及び ATC の ¹H スピン情報

AITC		Chemical Shifts (ppm)				Coupling Constants (Hz)					
		3a,3b	1a	1b	2	2J	2J	3J	3J	3J	4J
						1a-1b	3a-3b	1a-2	1b-2	2-3a,2-3b	1a-3a,1a-3b
調製1	NMR測定1	4.29852	5.26962	5.38356	5.95845	0.933	-13.072	10.276	16.965	4.877	-1.653
	NMR測定2	4.29857	5.26967	5.38361	5.95851	0.934	-13.072	10.276	16.967	4.874	-1.653
調製2	NMR測定1	4.29851	5.26960	5.38355	5.95846	0.933	-13.072	10.274	16.967	4.876	-1.657
	NMR測定2	4.29851	5.26960	5.38355	5.95846	0.935	-13.072	10.276	16.968	4.875	-1.654
調製3	NMR測定1	4.29852	5.26960	5.38355	5.95847	0.926	-13.072	10.271	16.967	4.873	-1.657
	NMR測定2	4.29850	5.26959	5.38354	5.95846	0.931	-13.072	10.274	16.967	4.874	-1.655
調製4	NMR測定1	4.29831	5.26959	5.38355	5.95833	0.931	-13.072	10.273	16.969	4.874	-1.658
	NMR測定2	4.29829	5.26956	5.38351	5.95829	0.928	-13.072	10.271	16.968	4.877	-1.655
調製5	NMR測定1	4.29852	5.26959	5.38354	5.95844	0.931	-13.072	10.272	16.967	4.875	-1.655
	NMR測定2	4.29854	5.26959	5.38353	5.95847	0.933	-13.072	10.272	16.969	4.874	-1.655
調製6	NMR測定1	4.29844	5.26964	5.38358	5.95841	0.928	-13.072	10.271	16.965	4.871	-1.655
	NMR測定2	4.29839	5.26961	5.38356	5.95839	0.929	-13.072	10.273	16.969	4.874	-1.655
平均		4.29847	5.26961	5.38355	5.95843	0.931	-13.072	10.273	16.967	4.874	-1.655
RSD		0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	-0.1%

ATC		Chemical Shifts (ppm)				Coupling Constants (Hz)					
		3a,3b	1a	1b	2	2J	2J	3J	3J	3J	4J
						1a-1b	3a-3b	1a-2	1b-2	2-3a,2-3b	1a-3a,1a-3b
調製1	NMR測定1	3.73651	5.30563	5.39689	5.98335	1.246	-14.872	9.983	16.878	7.268	-0.735
	NMR測定2	3.73655	5.30570	5.39695	5.98343	1.245	-14.872	9.978	16.877	7.271	-0.733
調製2	NMR測定1	3.73648	5.30562	5.39688	5.98331	1.257	-14.872	9.994	16.878	7.268	-0.738
	NMR測定2	3.73648	5.30562	5.39689	5.98330	1.252	-14.872	9.995	16.880	7.268	-0.733
調製3	NMR測定1	3.73650	5.30562	5.39689	5.98331	1.243	-14.872	9.996	16.878	7.269	-0.731
	NMR測定2	3.73649	5.30560	5.39686	5.98332	1.255	-14.872	9.996	16.882	7.267	-0.730
調製4	NMR測定1	3.73629	5.30563	5.39684	5.98325	1.256	-14.872	9.994	16.879	7.266	-0.737
	NMR測定2	3.73626	5.30560	5.39681	5.98325	1.256	-14.872	9.993	16.879	7.268	-0.734
調製5	NMR測定1	3.73650	5.30562	5.39688	5.98335	1.245	-14.872	9.982	16.879	7.267	-0.731
	NMR測定2	3.73650	5.30561	5.39688	5.98331	1.253	-14.872	9.994	16.879	7.266	-0.737
調製6	NMR測定1	3.73643	5.30566	5.39692	5.98331	1.246	-14.872	9.994	16.878	7.270	-0.736
	NMR測定2	3.73639	5.30563	5.39688	5.98328	1.246	-14.872	10.000	16.879	7.266	-0.733
平均		3.73645	5.30563	5.39688	5.98331	1.250	-14.872	9.992	16.879	7.268	-0.734
RSD		0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.4%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	-0.4%

表 2

表 2 400 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 3

表 3 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。

図 1

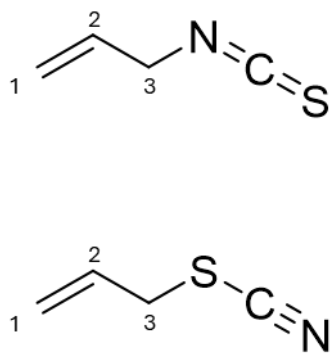


図 1 イソチオシアン酸アリル (AITC) 及びチオシアン酸アリル (ATC) の化学構造

図 2

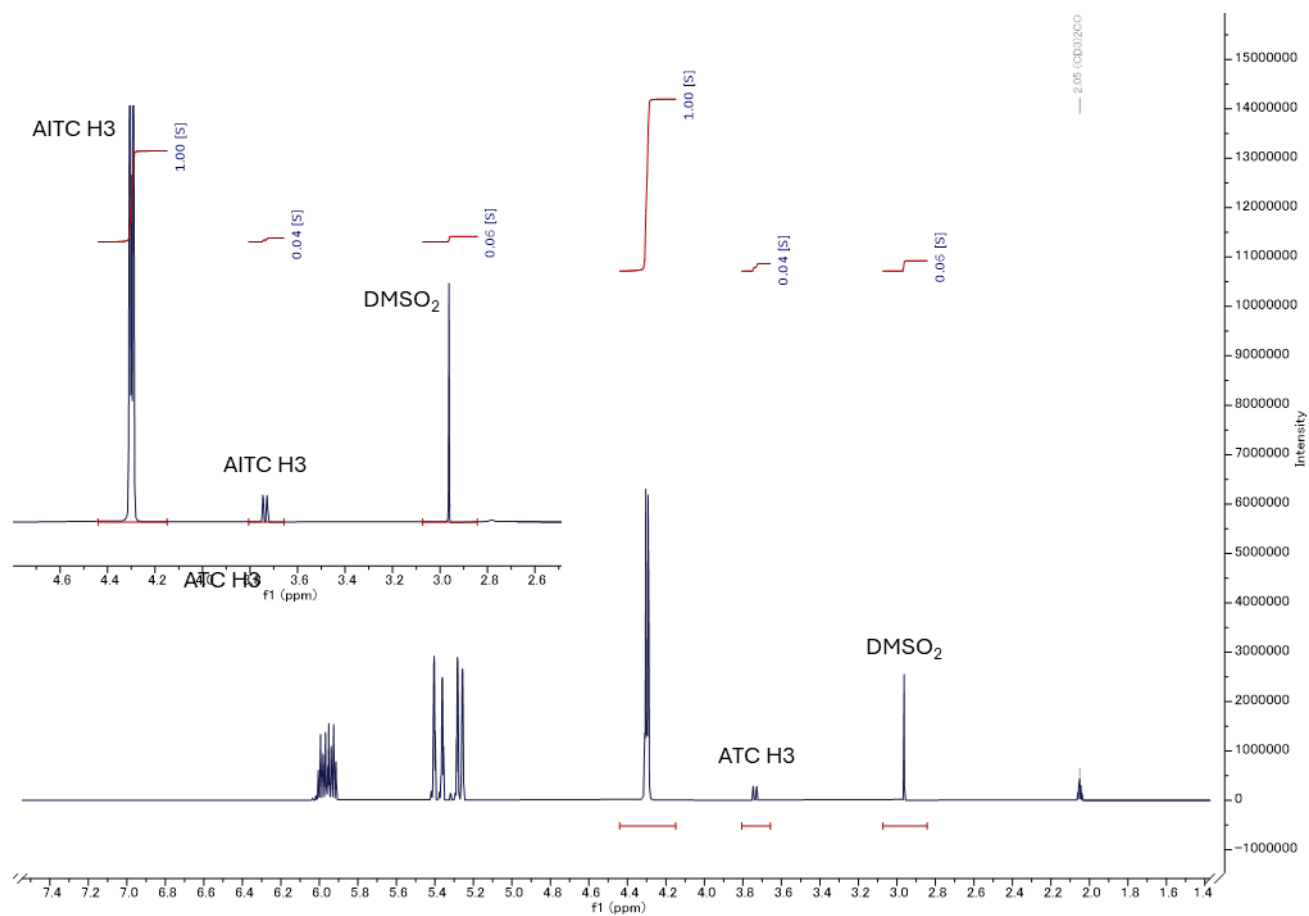


図 2 AITC 標準品の INT-qNMR