

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<sup>1)</sup>。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<sup>1)</sup>。

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), DMSO<sub>2</sub> (Cat No. 048-33271, 99.9% mass fraction), 重ジメチルスルホキシド (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 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*<sub>6</sub> に溶解させた 2.0506 mg/mL の BA 及び 0.4959 mg/mL の DMSO<sub>2</sub> 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 DMSO<sub>2</sub> 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 (<sup>1</sup>H 核) 及び LF コイル (<sup>13</sup>C 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<sup>3)</sup>。

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, <sup>13</sup>C 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、DMSO<sub>2</sub> 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, DMSO<sub>2</sub> のピーク面積；H, A に由来するプロトン数 (DMSO<sub>2</sub> 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<sup>2)</sup>。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<sup>3)</sup>。  $pw$  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 ( $\Phi_0$ ,  $\Phi_1$ ,  $\Phi_p$ ) 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 ( $\Phi_0$ ,  $\Phi_1$ ,  $\Phi_p$ ) 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<sup>1)</sup>、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*<sub>6</sub> 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*<sub>6</sub>) 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 DMSO<sub>2</sub> (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

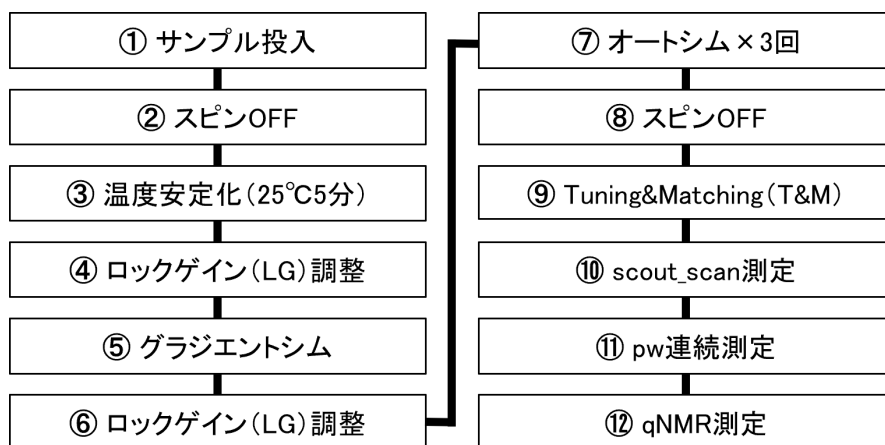


図 1 : EC-qNMR 測定手順

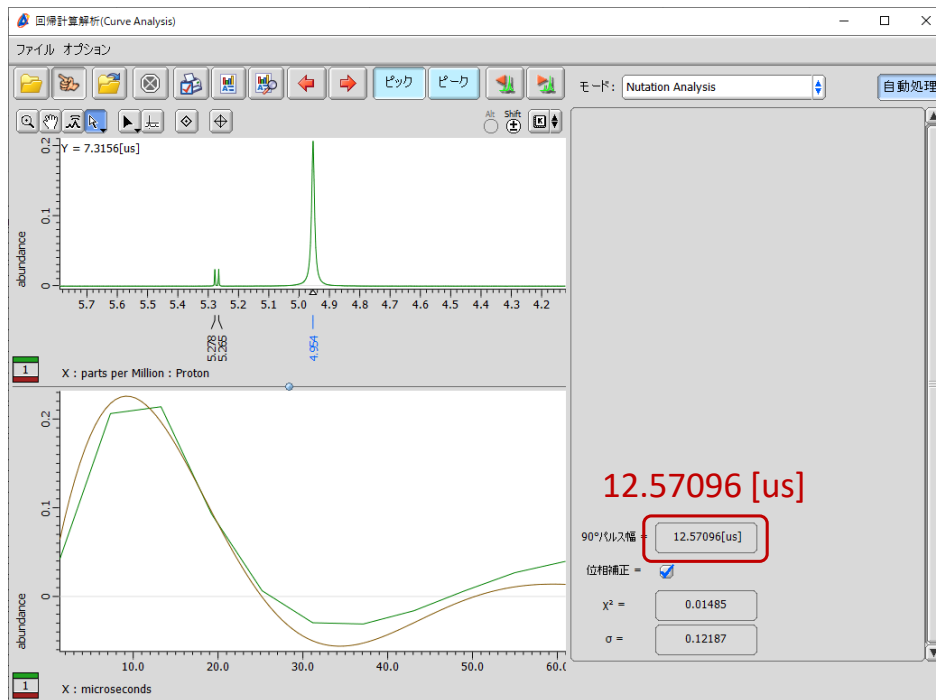


図 2 : 正弦波が歪んだ際のアレイデータ

▶	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



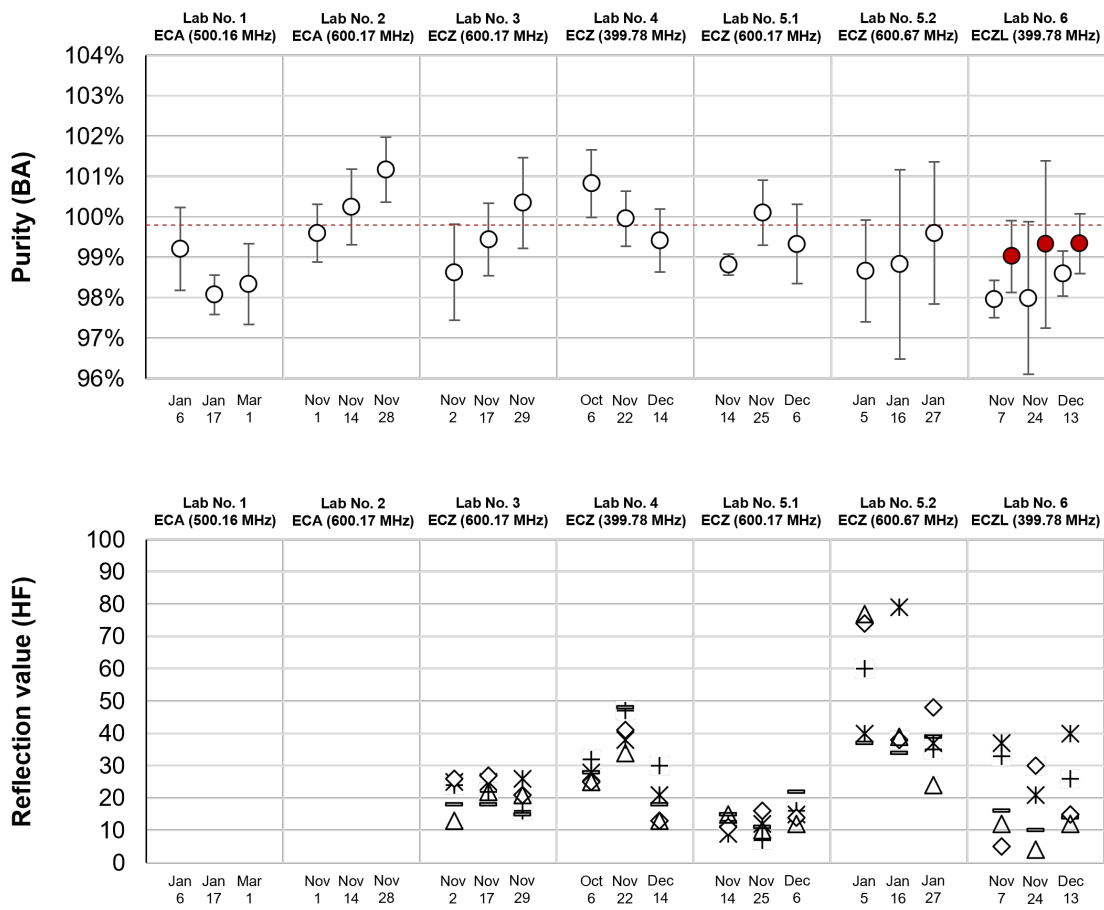


図4 EC-qNMR 共同試験の結果

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