

定量 NMR について

はじめに

NMR (Nuclear Magnetic Resonance, 核磁気共鳴) は、磁場を利用して物質の分子構造や立体構造を詳しく調べることができる分析方法です。物質の構造解析や定性試験の中心的手法として、有機化学、天然物化学、分子生物学、材料化学などの分野に幅広く普及しています。一方で、NMR は定量試験法としても使用されてきました。こちらは定性試験とは区別して、「定量 NMR (もしくは qNMR)」と呼ばれています。

今回は定量 NMR の特徴から方法、さらには、その活用例について紹介します。

定量 NMR の特徴

定量 NMR は「ユニークな定量法」あるいは「精確な定量法」などと呼ばれていますが、これは、NMR 分光法に特有な 2 つの特徴によります。

- ① 測定成分の一部の構造について定量できる。

クロマトグラフィーは成分単位の定量法ですが、NMR は測定成分を官能基ごとのシグナルに分けて測定することができます。

- ② シグナルの面積比が物質質量 (モル, mol) の比に等しい。

NMR のシグナル面積は原理的に原子核の数に比例します。2 つ以上のシグナルを比べて、それぞれに起因する官能基の量 (モル比) を直接求めることができます。

エタノールのプロトン NMR ($^1\text{H-NMR}$) スペクトル (図-1) では、 CH_3 基、 CH_2 基及び OH 基の 3 つのシグナルを示しますが、それぞれの面積比 (3:2:1) は、正しく水素の個数を反映していますので、シグナル面積比/水素数から官能基のモル比 (1:1:1) を求めることができます (相対定量法)。こうした官能基を識別して定量できる特徴は、NMR の大きな利点であり、天然成分

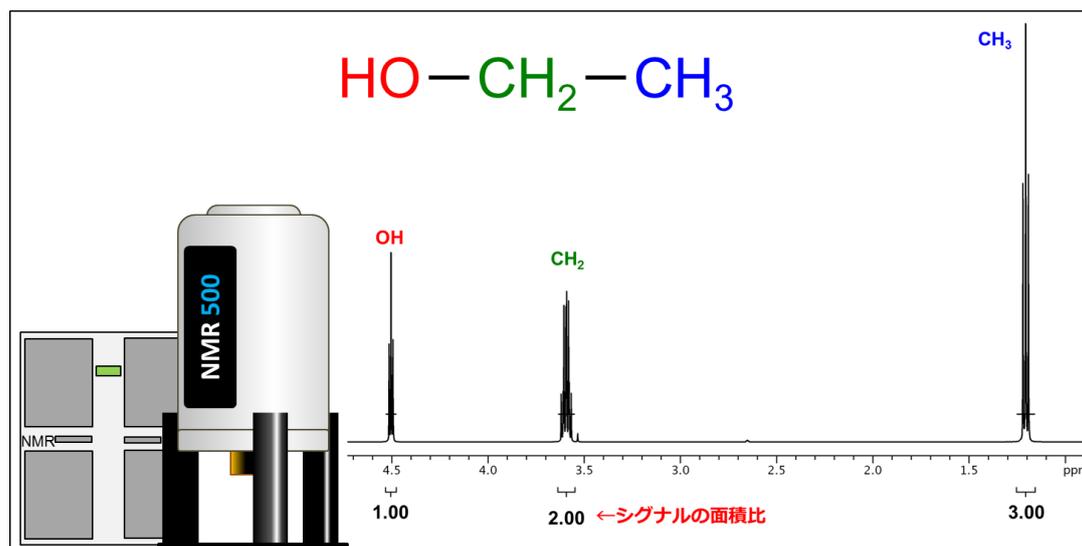


図-1 エタノールの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおける各官能基のシグナルと面積比

及び化学合成成分における官能基の含量や分布を評価する規格試験に採用されています。

定量 NMR による規格試験

公定規格における NMR に基づいた定量試験を表-1 に示しました。日本薬局方や米国薬局方 (USP) では、¹H-NMR を測定して、ヘパリンに偽和物 (過硫酸化コンドロイチン硫酸 ; OSCS) が含まれていないことを確認する純度試験が設定されています。OSCS の *N*-アセチル基のシグナルは、ヘパリンのそれとは分離することから、混入を検出することができます。また、欧州薬局方 (EP) では、炭素核の NMR (¹³C-NMR) を使用して、魚油 (サケ) に含まれるトリアシルグリセロールを解析し、その sn-2 位に結合する DHA や EPA 等の高度不飽和脂肪酸量を規格化しています。なお、魚油に含まれる DHA は、トリアシルグリセロールの sn-2 位に選択して結合する傾向にあることが知られています。表-1 における規格試験のうち、ヘパリンナトリウム及び加工デンプンの定量試験を除く規格試験は、部分構造のモル比を求める相対定量法です。

表-1 定量 NMR による規格試験の一例

規格名	内容	測定方法
ASTM F2260-03	キトサン塩の脱アセチル化の程度を決定する。	¹ H-NMR
NF Poloxamer Monograph EP Poloxamers Monograph	ポリオキシエチレンとポリオキシプロピレンから成るコポリマー (ポロキサマー) のオキシエチレン含量を求める。	¹ H-NMR
日局 ヘパリンナトリウム 各条 USP Heparin Sodium Monograph	ヘパリンへの偽和物 (過硫酸化コンドロイチン硫酸) の混入の有無を確認する。	¹ H-NMR
EP Salmon Oil, Farmed Monograph	トリアシルグリセロールの sn-1, 3 位及び 2 位に結合する高度不飽和脂肪酸の比率を求める。	¹³ C-NMR
ISO 21561:2005 Styrene-butadiene rubber (SBR)	スチレンブタジエンゴムにおけるスチレン含量とブタジエン含量を求める。	¹ H-NMR
ISO 11543:2000 Modified starch	加工デンプンにおけるヒドロキシプロピル基含量を求める。	¹ H-NMR

AQARI による物質純度の測定

近年、国内で開発された定量 NMR の手法 (AQARI; Accurate Quantitative NMR with Internal reference substance, 内標準法) が、標準品の値付け法として用いられるようになり、第十七改正日本薬局方にも収載されました。また、2017 年度末には、JIS 規格に qNMR 通則の収載も予定されています。本法は前述の部分分子構造のモル比による相対定量法とは異なり、濃度既知の別物質 (内標準物質) と比較することで、定量対象の質量を求めることができる絶対定量法です。さらに、内標準物質には定量 NMR 用の認証標準物質 (計量学的に妥当な手順によって値付けされ、規定特性の値及びその不確かさ、並びに計量計測トレーサビリティを記載した認証書が付いている標準物質¹⁾) が供給されており、これを利用することで、定量値に国際単位系 (SI) 系へのトレーサビリティを付与することも可能です。定量 NMR における標準物質とは、必ずしも定量対象と同一分子構造を持つ必要は無く、正確な原子核の数を示す物質という位置付けです。したがって、1 つの認証標準物質を不特定多数の物質の定量に使用できるパワフルさも AQARI は兼ね備えています (図-2)。

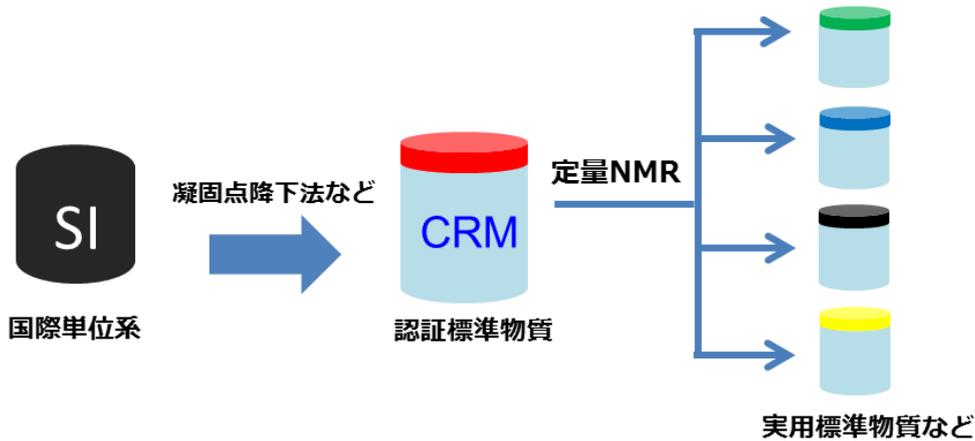


図-2 不特定多数の物質に SI 単位系へのトレーサビリティを付与した定量の概念図

貝毒標準品の値付け

AQARI などの定量 NMR 法の普及により、入手可能な標準品の成績書等に記載されている純度の算出方法として「NMR」の表記を見かけるようになりました。そうした標準品の一例として、下痢性貝毒オカダ酸群の標準品があります。近年、マウスバイオアッセイに代わる貝毒のモニタリング法として、高速液体クロマトグラフ-質量分析装置 (LC/MS) を用いた機器分析法への転換が世界的に進められていますが、普及のためには信頼性の高い標準品が必要となります。従来、オカダ酸群は毒化した貝類からの抽出・精製品のためとても希少な物質でしたが、下痢性貝毒を製造する国家プロジェクトにおいて、高濃度にオカダ酸群を生成する藻類の探索及びその培養に成功し、国内においても 2016 年 4 月から国産の下痢性貝毒認証標準物質の販売が開始されるようになりました。本標準物質は、先端的な藻類の培養技術や抽出・精製技術によって開発されていますが、AQARI についても分子量の大きいオカダ酸群を適切に定量するために最適化が施されており、定量の不確かさを抑えるための研究は現在も続いています。標準物質の供給開始にともない、マウスバイオアッセイを廃止して機器分析法をモニタリング法とする通知が発出されました²⁾。

定量 NMR の応用

これまで、定量 NMR の特徴、特に物質の純度を決定できる精確さについて解説して参りました。定量 NMR は、食品や医薬品等の成分分析への活用も期待されています。ここでは定量 NMR の活用例について解説します。

① 原料，原体，製剤もしくはこれらを高含量に含むものの定量分析

他の機器分析でも分析は可能ですが、検量線を使わずに定量値を導き出せる AQARI の方がより精確に含量を求めることができるケースとなります。AQARI の定量値は水分を含まないことから、水和物などは水分をカールフィッシャー法により測定して評価を行います。

② 繰り返し構造を持つ高分子の定量分析

構成糖が判明しているグルカンなどの多糖類 (図-3) においては、その総量や結合様式ごとの含量を定量できる可能性があります。また、ブロック共重合体についても、適切な溶媒に溶解できるものは定量対象となります。

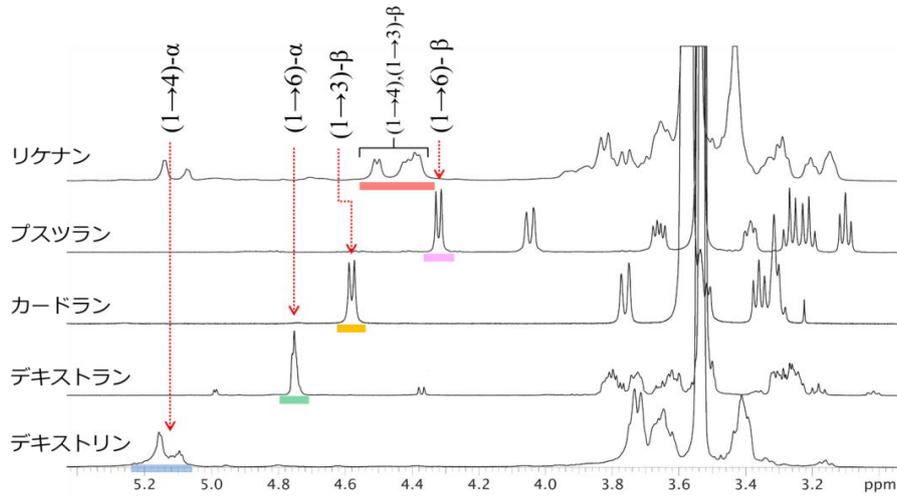


図-3 グルカン標準品の ¹H-NMR

③ リン脂質の個別定量

オキアミ油の品質規格である USP Krill Oil Monograph は、2013 年に改訂され、リン核の定量 NMR (³¹P-NMR) により全リン脂質含量とその主要なリン脂質成分であるホスファチジルコリンを定量する試験が加わりました。リン脂質は界面活性作用や機能性により食品及び化粧品の添加物、さらには栄養補助食品や医薬品成分としての需要が高まっており、³¹P-NMR は天然物に由来するリン脂質の複雑な組成を個別に識別できる優れた技術として注目されています (図-4)。

- | | |
|-------------------------|--------------------|
| ① : 1-リゾホスファチジルエタノールアミン | ⑤ : ホスファチジルセリン |
| ② : 2-リゾホスファチジルエタノールアミン | ⑥ : 2-リゾホスファチジルコリン |
| ③ : ホスファチジルエタノールアミン | ⑦ : ホスファチジルイノシトール |
| ④ : 1-リゾホスファチジルコリン | ⑧ : ホスファチジルコリン |

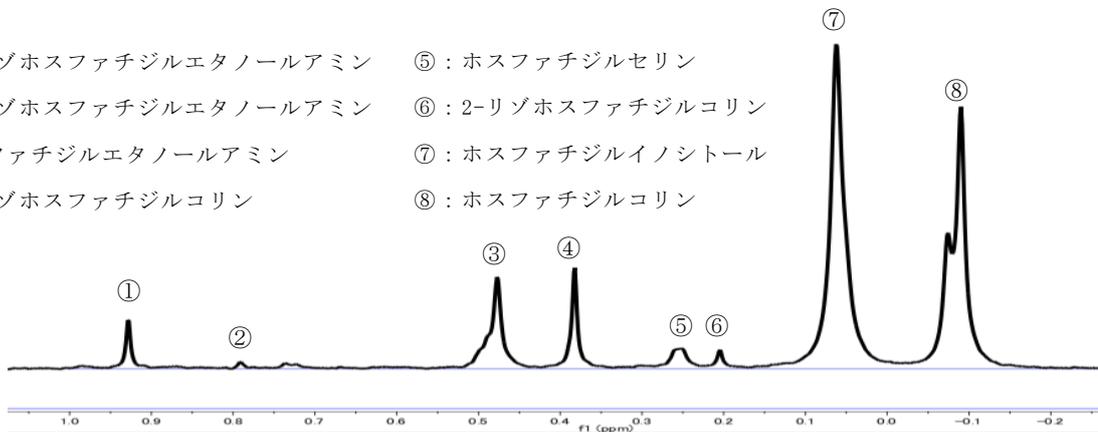


図-4 酵母抽出極性脂質の ³¹P-NMR

おわりに

分析結果には高い信頼性が求められています。定量 NMR による標準品の純度校正試験は、そうしたご要望への一助となり得る技術です。当財団では、NMR のユニークな定量特性によってクロマトグラフ法などの汎用機器による定量が苦手とする領域を補完することで、品質管理をはじめとする様々な場面において総合的な分析サービスの向上を目指しています。

参考文献

- 1) 日本工業規格 JIS Q 0034:2012, 標準物質生産者の能力に関する一般要求事項
- 2) 平成 29 年 3 月 8 日, 生食基発 0308 第 2 号, 生食監発 0308 第 9 号, 「下痢性貝毒 (オカダ酸群) の検査について」の一部改正について