

定量 NMR 法(qNMR)による純度の確認試験のご案内

核磁気共鳴(NMR)スペクトル測定法は、有機化合物の同定や構造解析などの定性面におけるアプローチが有名ですが、定量 NMR 法(qNMR と呼ばれる。)は SI トレーサブルな定量が可能な測定法として、昨今注目を集めています。その大きな特徴は、クロマトグラフ法が同一分子の標準品を必要とするのに対して、定量 NMR 法では定量対象物質とシグナルが分離する任意の物質を標準に設定できる点にあります。

弊財団では定量 NMR 法による有機物標準品等の純度の確認試験を受託致しておりますので、以下に詳細をご案内申し上げます。

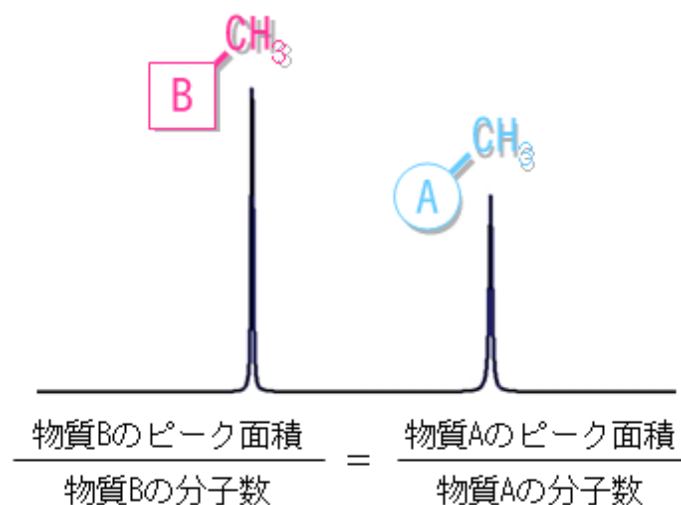
詳細

定量 NMR 法の原理

NMR は HPLC や GC といったクロマトグラフ法のように多成分を分離できないため一斉分析は困難であり、また検出感度についても及びません。しかしながら NMR は、「官能基レベルで水素原子核数を直接かつ正確に量ることができる。」という長所を持っています。以下に NMR による定量原理を図示しました。

2 つの物質(A 及び B)のメチル基のシグナルを図示していますが、それぞれのシグナル強度(面積)は水素原子核数に比例しますので、2 つのシグナルの面積比からそれぞれの物質のモル比を求めることができます。例えば、物質 A 及び B を同一モル濃度で混合した溶液の NMR スペクトルを測定した時、各物質のメチル基に由来するシグナルの面積比は等しくなります。

この原理を利用して、物質 A のメチル基のシグナルを内標準として物質 B そのものを定量することができます。



NMR法の定量原理

定量 NMR 法による有機標準品等の純度確認試験

定量 NMR による有機物質標準品の純度測定は、こうした NMR の特色をうまく利用した方法です。

上図の物質 A に認証標準物質を使用することで、物質 B の定量を SI トレーサブルに実施することができます。

内標準法では以下の計算式から純度を求めています。

$$\text{純度\% (sample)} = \frac{\text{面積比 (sample)}}{\text{面積比 (内標準)}} \times \frac{\text{水素数 (内標準)}}{\text{水素数 (sample)}} \times \frac{\text{分子量 (sample)}}{\text{分子量 (内標準)}} \times \frac{\text{重量 (内標準)}}{\text{重量 (sample)}} \times \text{純度\% (内標準)}$$

多くの成分分析がクロマトグラフ法などの機器分析に依存している今日では、標準品純度の正確さは、成分の定量値を左右する極めて重要なファクターの 1 つと言えます。現在流通している標準品は様々な方法で値付けされておりますが、必ずしも物質量にトレーサブルとは限りません。

本法は製品開発や品質管理などの各種分析試験に使用している標準品の純度確認にご利用いただけます。また、自家製標準品の純度を確認する手段としてもご活用下さい。

測定対象検体

有機化合物の標準品または標準品に準ずるもので以下条件を満たしているもの。

- ◎化学構造が既知の物質
- ◎分子量の上限が 800 程度までの物質。

保有機器

- ◎核磁気共鳴分光装置 : Varian NMR System 500 [バリアン社]
- ◎ウルトラマイクロ天秤 : MSE2-7S-000-DM [ザルトリウス社]

お問合せ

試験の手順や試験の進め方についてご提案致します。その他、お困りの場合もお気軽にお問合せください。

目的成分の情報をご記入の上、メールでお問合せください。

定量 NMR 測定例

all-trans-アスタキサンチン標準品の純度確認

アスタキサンチンは分解しやすいため、以下の点を配慮しました。

- ◎アスタキサンチンは光感受性が高いことから、全ての操作は遮光下で実施。
- ◎重水素化クロロホルムは希釈直前にアルミナカラム処理を行ったものを使用。

分解物由来のシグナルとの分離が良好なことからシグナル(A 及び B)を定量シグナルとしました。

学会発表

「アスタキサンチンシス体吸光係数の決定」

日本食品科学工学会 第 58 回大会 (平成 23 年 9 月 宮城)

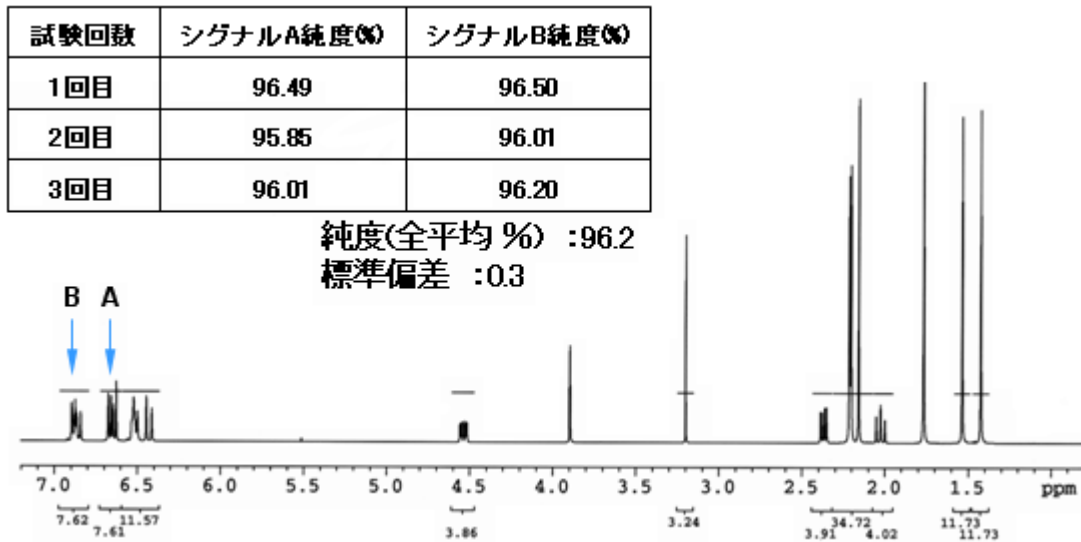
定量対象：アスタキサンチン(分子量：596.84)

内標準物質：ジメチルスルホン認証標準物質(純度：99.66%)

希釈溶媒：重水素化クロロホルム

試験溶液濃度：25 mg/mL(アスタキサンチン)

1 mg/mL(ジメチルスルホン)



イソクエルシトリン標準品の純度確認

水酸基(OH)はプロトン交換性があり、面積強度比が正確ではない可能性があることから定量シグナルから外しています。

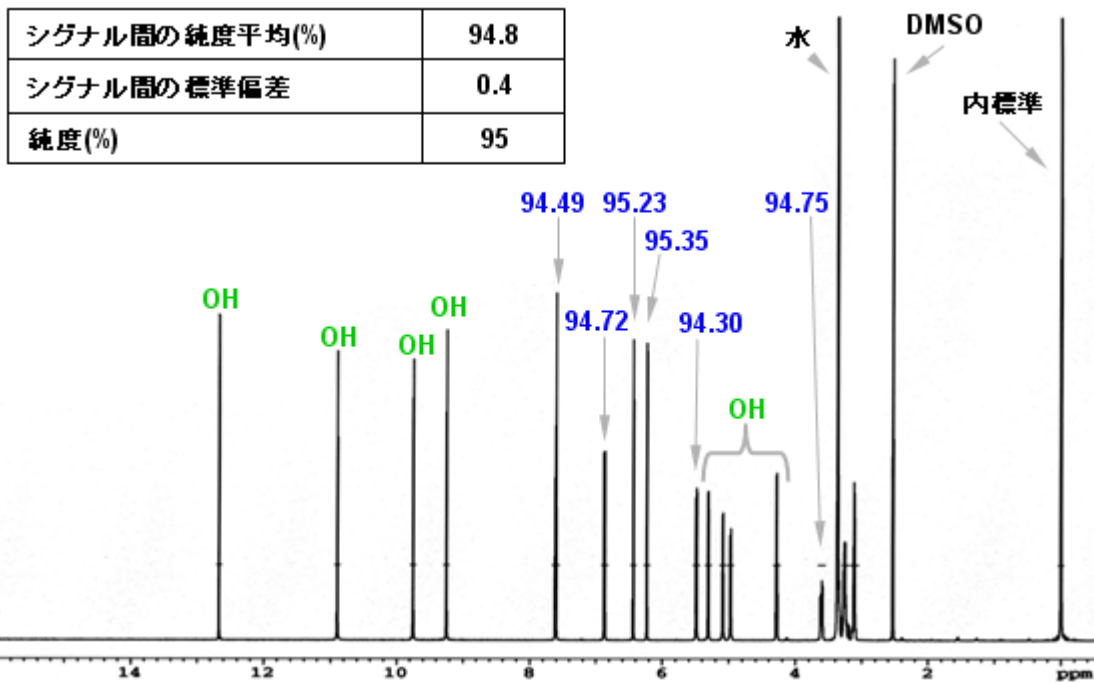
定量対象：イソクエルシトリン(分子量：464.38)

内標準物質：DSS-d6 認証標準物質(純度：92.2%)

希釈溶媒：重水素化ジメチルスルホキシド

試験溶液濃度：9 mg/mL(イソクエルシトリン)

10 mg/mL(DSS-d6)



デスモシン標準溶液の濃度確認

デスモシン標準品は、微量の凍結乾燥物で秤量が困難であったことから、全量を重水に溶解し、その濃度を定量 NMR 法によって求めました。デスモシン標準品 A にはリジンが含まれており、スペクトル上にリジンのシグナル(ピンクの帯)が認められました。一方の標準品 B については明確なリジンのシグナルは認められませんでした。リジンのシグナルが認められる付近のシグナルからは高めの定量値(赤字)が得られました。面積比/水素数の比が最も低磁場側(最も左側)のシグナルと比べて 1.0 以内のシグナルを定量シグナルとしました。

学会発表

「NMR によるデスモシン標準品の純度確認と不純物の同定」

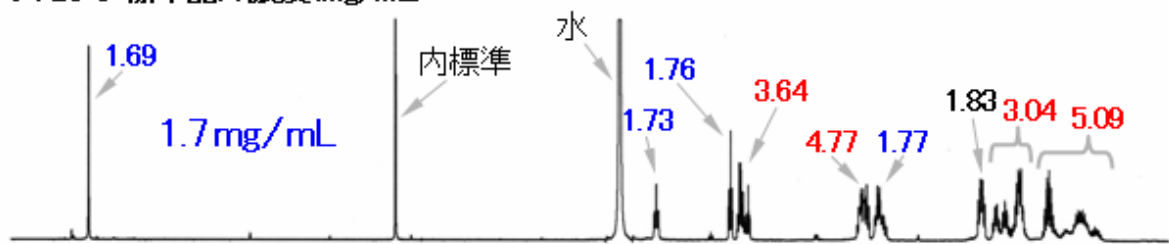
日本分析化学会 表示・起源分析技術研究懇談会 第 6 回講演会 (平成 23 年 12 月 東京)

定量対象：デスモシン(分子量：562.06)

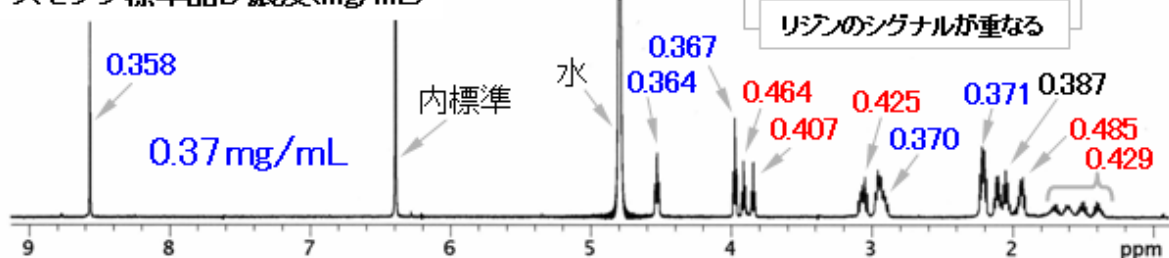
内標準物質：マレイン酸認証標準物質(純度：99.78%)

希釈溶媒：重水

デスモシン標準品A 濃度(mg/mL)



デスモシン標準品B 濃度(mg/mL)



貝毒標準品の純度確認

世界的に希少な下痢性貝毒標準品について定量 NMR 法によって値付けを行いました。希少性が高いことから、測定操作中の標準品の汚染を回避し、測定後に標準品を全て回収する必要がありました。定量 NMR 法では内標準物質を必要としますが、汚染を回避する観点から工夫が必要でした。このため、以下の 3 種の方法によって値付けを行いました。さらに、得られた定量値について、国内で現在、値付け法として採用されている重量測定法との一致性についても検証を行いました。

- ①重水素化メタノール中の残存プロトンを標準とした内標準法
- ②揮発性物質であるピリジンを標準とした内標準法
- ③同軸二重 NMR 試験管を用いた外標準法

いずれの方法についてもほぼ同等の定量値が得られましたが、その中でも、①の方法が操作性及び汚染回避の観点で優れていました。また定量 NMR 法と重量測定法の定量値は良好な一致性を示しました(下記ポスター参照)。

学会発表

「定量 NMR 法を用いた貝毒 DTX1 の値付けに関する検討」

平成 24 年度 日本水産学会 春季大会 (平成 24 年 3 月 東京)

「Accurate quantification of DTX1 standard by quantitative Nuclear Magnetic Resonance」
The 15th International Conference on Harmful Algae (2012 年 10 月 韓国)