

1 核磁気共鳴(NMR)法を利用した定量技術と日 2 本薬局方試薬への応用

3 1. 核磁気共鳴(NMR)法を利用した定量技術の原理

4 物質を溶液に溶解し、水素核検出核磁気共鳴(¹H NMR)を測
5 定して得られるスペクトルは、測定した物質の化学構造によっ
6 て異なる化学シフトに共鳴ピークを与えること、化学結合を通
7 して隣接する炭素に結合する¹Hの数などに応じてピークが分
8 裂を示すこと、信号強度(面積)が共鳴する¹Hの数に比例するこ
9 と等から、物質の化学構造の決定に強力な分析法として多く利
10 用されてきた。

11 NMRスペクトルでは、同一分子内の異なる環境にある水素
12 核が、共鳴周波数に応じて異なる化学シフトを持つ分離したピ
13 ークとして観測されるため、化学シフトが異なる2つのピーク
14 強度を比較することが可能となり、それぞれのピーク的面積 S_i
15 は、共鳴する¹H核の数 N_i 、溶液体積 V 、試料の質量 m 、分子量
16 M と純度 p 、励起パルス角 β 、信号を与える核の縦緩和時間 T_{1i} 、
17 繰り返し積算を行う際の遅延時間 T_r と平衡磁化 M_0 から

$$18 \quad S_i = N_i \frac{m}{VM} p \sin \beta \frac{1 - e^{-T_r/T_{1i}}}{1 - e^{-T_r/T_{1i}} \cos \beta} M_0 \quad (1)$$

19 で示されることになる¹⁾。ここで、添え字の*i*は異なるピークを
20 示し、緩和時間は¹Hの環境によって異なる。NMRは一般に測
21 定感度が良くないことからスペクトルを取得する際に積算して
22 信号雑音比(SN比)を向上させる。このとき、測定対象物質の
23 中で最も長い T_1 より十分長い遅延時間 T_r で積算すると、測定対
24 象となる化合物のすべてのピークに対して $1 - e^{-T_r/T_1} \approx 1$ の条件
25 を満たすことが可能である。構造解析に利用する場合には、遅
26 延時間を十分長く取らず、SN比を向上するために積算回数を
27 多くする条件、すなわち、検出感度優先の測定が行われている
28 ため、分子内のピーク面積と¹Hの数の比は精密に求められて
29 いない。しかしながら、定量性が確保される条件下で測定を行
30 い、この関係を分子間に対して応用すれば、それぞれの分子数
31 に応答した面積比が得られることになる。

32 この定量性を確保できる条件下で分子内の異なる化学シフト
33 を示す共鳴ピーク的面積を比較すると、

$$34 \quad \frac{S_i}{S_j} = \frac{N_i}{N_j} \quad (2)$$

35 となり、ピーク面積が共鳴する¹Hの数に比例することが示さ
36 れる。

37 このようなピーク面積と¹Hの数の比例関係は、異なる2分子
38 間に由来するピークにも適用することができる。この場合、試
39 料溶液を測定する際の励起パルス角や溶液の体積は化合物によ
40 らず一定と考えられるので、得られる面積 S が測定対象の分子
41 の純度、分子量、質量など測定する化合物のみに依存する値に
42 比例した式(3)が得られることになる(a , s は、それぞれ測定対
43 象物質と仲介物質(内標準物質)、 i , j はそれぞれの物質の異な
44 るピークを示す)。

$$45 \quad P_a = \frac{S_{ai} N_{sj} M_a m_s}{S_{sj} N_{ai} M_s m_a} P_s \quad (3)$$

46 それぞれの分子が溶液中で反応などの相互作用を起こさない
47 こと、異なる化学シフトに分離したピークを有することなど必
48 要な条件はあるものの、この条件下で¹H NMR測定を行うこと
49 で、純度既知の標準物質があれば、測定対象物質の純度を評価
50 できることになる。言い換えれば、正確な純度が付与された、
51 分子量が既知の基準物質が上位標準として用意されれば、溶液
52 ¹H NMRを用いることで、同時に測定された同一溶液内の他の
53 化合物の純度が決定できることを示している。この場合、基準
54 物質が国際単位系(The International System of Units: SI)へ
55 の計量トレーサビリティを確保している場合には、これを上位
56 標準物質として測定対象化合物の純度をSIにトレーサブルな
57 値として間接的に算出することができる。このような測定の場合、
58 それぞれの試料を同じ溶媒中に溶解することになるが、現実の
59 作業として、2つの化合物の質量をそれぞれ精密にはかり
60 取り、NMR測定溶媒に溶解させることが精度高い測定のため
61 の重要な要素となる。

62 2. NMR用基準物質と定量ソフトの供給

63 近年、日本の国家計量機関である独立行政法人産業技術総合
64 研究所計量標準総合センター(AIST NMIJ)より供給される認
65 証標準物質(NMIJ CRM)である1,4 - ジクロロベンゼンからSI
66 トレーサブルな値付けをされ、取り扱いの容易な固体化合物と
67 して、¹H NMRで特異的な化学シフトに鋭い1本のピークを示
68 す有機溶媒用の1,4 - ビス(トリメチルシリル)ベンゼン -
69 d_6 (BTMSB - d_6)、水系用の3 - (トリメチルシリル) - 1 - プロパ
70 ンスルホン酸 - d_6 - ナトリウム塩(DSS - d_6)が容易に入手可
71 能となった。また、NMRメーカーより、前述した原理に基づ
72 く定量(定量NMR, qNMR)が容易に実施できるような測定ソフ
73 トも供給されるようになり、日本薬局方で使用される試薬に関
74 し、容易に定量NMRを実施できることになった。

75 3. 日本薬局方における生薬中の定量指標成分と定量分析用標 76 品の設定

77 日本薬局方における生薬、漢方処方エキスにおいて、定量値
78 を規定する場合、定量指標成分が天然物であるため、多くの化
79 学医薬品と同様に日本薬局方標準品を設定し用意するには、以
80 下のような課題がある。

81 化学医薬品と異なり、生薬・漢方処方エキスは非常に多くの
82 化合物の混合物であり、医薬品(生薬・漢方処方エキス)中の
83 0.1% ~ 数%程度の含量の化合物を定量指標成分として設定す
84 る必要があるが、多くの場合これらの化合物の合成は容易では
85 ない。したがって、天然物より、十分な純度を持つ化合物を精
86 製、単離することになる。この場合、多大な労力が必要となり、
87 標準品を準備する経済的コストが多大となる。また、原料の差、
88 抽出、精製、単離工程の差により、不純物の構成が異なること
89 になり、ロット間格差が合成品と比較して大きく、公的な標準
90 品として純度コントロールが難しい。また天然物の場合、最大
91 の不純物は水である場合が多いが、厳密に水分含量を測定しよ
92 うとすると、カールフィッシャー法を利用することになり、水
93 分含量規定のために貴重な化合物を別途消費することになる。

94 このような隘路があるため、局方の生薬、漢方処方エキス各
95 条規格では、多くの場合、日本薬局方標準品の設定が難しく、
96 便宜上その時点で市販されている試薬、あるいは市販可能な試
97 薬について規格を局方の試薬・試液の項で定め、その物質を分
98 析用標品と規定し、定量法と含量規格を規定している。ところ
99 が、このような試薬を定量分析用標品とした場合、得られた定

100 量値は計量学的に値付けが行われていないものであるため、厳
101 密に議論すると、その信頼性が問題となる。

102 4. 生薬・漢方処方エキス分析に用いる定量分析用標品への 103 定量NMRの応用

104 このような天然物に由来する試薬の純度の問題は、定量
105 NMRを用いることで解決することが可能である。すなわち、
106 前述した原理に基づき、これらの試薬に対して定量NMRを用
107 いて正しい含量を値付けすることができれば、試薬を計量トレ
108 ーサビリティが保証された分析用標品として利用することが可
109 能となる。

110 現在、このような試薬に対する定量NMRは、順次実施され
111 ており、試薬の定量値付けの際、考慮すべき点を考察した論文
112 が公表²⁾されている。また、HPLCによる定量分析用標品とし
113 て使用される可能性の高い物質を使用して、定量NMRのバリ
114 デーション実験も行われており、分子量300程度の測定対象化
115 合物で、測定に10 mg程度使用すれば、使用機器間誤差を含め
116 ても通常の実験室レベルで、有効数字2桁を保証しながら値付
117 けが可能であることが示されている³⁾。通常、生薬中の定量指
118 標成分の含量は最大でも数%であり、規制値も0.1%が最小単
119 位であることから、天然物である生薬ごとのばらつきを考慮す
120 れば、定量分析用標品の含量精度は有効数字2桁の保証で十分
121 と考えられる。

122 これらのことを考慮すると、試薬を定量分析用標品として使
123 用して得られた分析値の曖昧さは、定量NMRによって値付け
124 された試薬をHPLC等の定量分析用標品として使用し、値付け
125 された試薬の純度を定量値の算出に組み込むことで、現実的に
126 回避することができる。例えば、局方「サンシシ」では、ゲニ
127 ボシドの含量をHPLC分析に基づき3.0%以上と規定している
128 が、定量分析用標品となる定量用ゲニボシドとして使用可能な
129 試薬について定量NMRを実施すると、絶対純度は92%程度で
130 あることが前述した論文で示されている。したがって、この試
131 薬の純度を100%と仮定して定量分析用標品としHPLCを実施
132 した結果、定量値が3.0%と導かれる場合、定量NMRによる絶
133 対純度と計量トレーサビリティの確保を考慮した定量値は、
134 2.8%であることになる。

135 5. 定量NMRで値付けされた試薬の供給

136 現在、独立行政法人製品評価技術基盤機構認定センター(IA
137 Japan)の認定プログラム(ASNITE)において、試薬の値付けを
138 行う機関に対する認定をどのように行うか検討が開始されてい
139 る。更にIA Japanでは、試験方法区分への「定量NMR分析」
140 の追加を予定している。したがって、近い将来、試薬会社はこ
141 の認定を受けて試薬の値付けを行うことが可能となる。この場
142 合、SIトレーサブルな値を得るために、試薬ユーザーが個々
143 に定量NMRを実施する必要がなくなる。更に、機器間誤差(機
144 器間誤差を含む)は無視できることになり、試薬に表示された
145 値を指標成分の定量値の算出の際に組み込むことで、より精度
146 の高い値付けを行えることになる。

147 6. 参考資料

- 148 1) T. Saito *et al.*, *Accred. Qual. Assur.* **14**, 79-86 (2009)
- 149 2) Hosoe J. *et al.*, *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*,
150 **41**, 960-970 (2010)
- 151 3) Hosoe J. *et al.*, *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*,
152 投稿中