

1 5.01 生薬試験法

2 10. 核磁気共鳴(NMR)法を利用した生薬及び漢方処方エキスの 3 定量指標成分の定量の項を次のように改める(一部意見募集済)。

4 10. 核磁気共鳴(NMR)法を利用した生薬及び漢方処方エキスの 5 定量指標成分の定量

6 10.1. 核磁気共鳴(NMR)法を利用した定量技術の原理

7 物質を溶液に溶解し、水素核検出核磁気共鳴(^1H NMR)を測
8 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
9 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
10 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
11 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
12 となどから、物質の化学構造の決定に強力な分析法として多く
13 利用されてきた。

14 NMRスペクトルでは、同一分子内の異なる環境にある水素
15 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ー
16 クとして観測されるため、化学シフトが異なる二つのピーク
17 強度を比較することが可能となり、それぞれのピークの面積 S_i
18 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
19 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} 、
20 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

$$21 \quad S_i \propto N_i \frac{m}{VM} p \sin \beta \frac{1 - e^{-T_r/T_{1i}}}{1 - e^{-T_r/T_{1i}} \cos \beta} M_0 \quad (1)$$

22 で示されることになる。ここで、添え字の i は異なるピークを
23 示し、緩和時間は ^1H の環境によって異なる。NMRは一般に測
24 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
25 信号雑音比(SN比)を向上させる。このとき、測定対象物質の中
26 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
27 象となる化合物の全てのピークに対して $1 - e^{-T_r/T_1} \approx 1$ の条件を
28 満たすことが可能である。構造解析に利用する場合には、遅延
29 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多く
30 する条件、すなわち、検出感度優先の測定が行われているた
31 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い
32 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い、
33 この関係を分子間に対して応用すれば、それぞれの分子数に応
34 答した面積比が得られることになる。

35 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
36 を示す共鳴ピーク(i, j)の面積を比較すると、

$$37 \quad \frac{S_i}{S_j} = \frac{N_i}{N_j} \quad (2)$$

38 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
39 れる。

40 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
41 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
42 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
43 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
44 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
45 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
46 象物質と仲介物質(内標準物質)を示す)。

$$47 \quad P_a = \frac{S_a}{S_s} \frac{N_s}{N_a} \frac{M_a}{M_s} \frac{m_s}{m_a} P_s \quad (3)$$

48 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
49 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
50 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
51 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
52 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、
53 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
54 ^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
55 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
56 物質が国際単位系(The International System of Units : SI)へ
57 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
58 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
59 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
60 合、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
61 実の作業として、二つの化合物の質量をそれぞれ精密に量り取
62 り、NMR測定溶媒に溶解させることが精度の高い測定のため
63 の重要な要素となる。

64 10.2. 定量NMR用基準物質と定量ソフトの供給

65 前述した原理による定量を定量NMR(qNMR)と呼ぶ。
66 qNMR用基準物質は、公的な機関より供給される認証標準物
67 質(NMIJ CRM)からSIトレーサブルな値付けをされたものが
68 市販されている。取り扱いの容易な固体化合物として、 ^1H
69 NMRで特異的な化学シフトに鋭い1本のピークを示す有機溶
70 媒用の1,4-ビス(トリメチルシリル)ベンゼン- d_6 (1,4-
71 BTMSB- d_6)、メタノール、ジメチルスルホキシド及び水系用
72 の3-(トリメチルシリル)-1-プロパンスルホン酸- d_6 -ナト
73 リウム塩(DSS- d_6)、マレイン酸、ジメチルスルホンがある。
74 また、NMRメーカーより、qNMRが容易に実施できるような
75 測定ソフトも供給されている。

76 10.3. 日本薬局方における生薬・漢方処方エキス中の定量指標 77 成分と定量分析用標品の設定

78 前述した原理に基づき、生薬中の定量指標成分として使用さ
79 れる試薬に対してqNMRを用いて正しい含量を値付けするこ
80 とができれば、その試薬を計量トレーサビリティが保証された
81 分析用標品として利用することが可能となる。バリデーション
82 実験によれば、分子量300程度の測定対象化合物の場合、測定
83 に10 mg程度使用すれば、使用機器間誤差を含めても通常の実
84 験室レベルで、有効数字2桁を保証しながら値付けが可能であ
85 る。通常、生薬中の定量指標成分の含量は最大でも数%であり、
86 規制値も0.1%が最小単位であることから、天然物である生薬
87 ごとのばらつきを考慮すれば、定量分析用標品の含量精度は有
88 効数字2桁の保証で十分と考えられる。

89 qNMRによりSIトレーサブルな定量値(純度)が値付けされ、
90 試薬・試液の項に規定された試薬は、定量分析用日本薬局方試
91 薬として利用可能である。さらに、qNMRによって値付けさ
92 れた試薬をHPLCなどの定量分析用標品として利用し、値付け
93 された試薬の純度(%)を換算し、対象化合物の定量値の算出に
94 組み込んだ場合には、得られた定量値は、SIトレーサブルな
95 値として扱うことが可能となる。なお、qNMRにより値付け
96 された試薬をHPLCによる定量分析用の標準物質として利用す
97 る場合は、定量分析の条件において、試薬の定量対象成分のピー
98 クに不純物が認められないことが前提であり、別途、フォト
99 ダイオードアレイ検出器、質量分析計などで確認しておく必要
100 がある。

101 10. 4. qNMR実施の際の注意事項

102 qNMRを実施するには、不純物のピークとの分離に要する
103 分解能、更には検出感度を考慮して、少なくとも ^1H 核で400
104 MHz以上の共鳴周波数を持つ磁場で、 ^{13}C 核について精度良く
105 ゲート付きデカップリングできる機器が必要である。また、プ
106 ローブのチューニングとシムが最適に調整され、受信機の受信
107 感度が適正な条件で測定する必要がある。

108 qNMRの実施対象となる定量用試薬については、9.41試薬・
109 試液の項に試薬とqNMR用基準物質の採取量が規定されてい
110 る。両者の秤量には高い精度が求められることから、採取量は、
111 天びんの最小計量値以上でなければならない。規定された両者
112 の採取量は、ウルトラマイクロ化学はかりを使用してバリデート
113 された現実的な最低量を記載したものである。したがって、両
114 者が完全に溶解できる場合には、量比を保った上、増量して測
115 定した方が、スペクトルのSN比が改善され、ほとんどの場合
116 より精度が高い測定となる。また、なるべく多い積算回数で測
117 定する方が、スペクトルのSN比が改善され、より精度が高い
118 測定となるが、数時間以上の測定となる場合には、磁場と機器
119 の安定性を考慮する必要がある。また、重水素化率が高い重溶
120 媒を使用する方が、若干ではあるが感度が向上する。さらに
121 SN比が改善されると、スペクトル上これまで見えていなかった
122 不純物シグナルが検出される場合がある。このような不純物
123 に由来するシグナルの存在が明確になったときは、そのシグナ
124 ルが存在する化学シフトの範囲は、絶対に積分対象としてはな
125 らない。また、NMR測定用重水素化溶媒やqNMR用基準物質
126 の1,4-BTMSB- d_4 やDSS- d_6 においても、僅かな不純物のシ
127 グナルが観測されており、これらの不純物シグナルの範囲を、
128 qNMRの測定の前に把握しておくことが重要である。さらに、
129 測定溶媒中に長時間保存すると、僅かずつではあるが不純物シ
130 グナルが増えることが確認されており、qNMRの測定は、試
131 料調製後、直ちに実施すべきである。なお、不純物シグナルの
132 確認にはqNMR条件でNMRを測定する必要はないが、スピニ
133 ングを行わず、 ^{13}C 核のデカップリング条件下で測定した方が、
134 サテライトシグナルとの区別が容易である。また、qNMRで
135 使用するqNMR用基準物質1,4-BTMSB- d_4 やDSS- d_6 は、テ
136 トラメチルシラン(有機溶媒中)やDSS (重水中)を化学シフト
137 (δ)の基準としたとき、それぞれ0.2 ppm, 0.1 ppm程度の化
138 学シフト値を持つが、qNMRを測定する際には、便宜上、こ
139 れらのqNMR用基準物質の化学シフトを0 ppmとして、他のシ
140 グナルの化学シフトを示している。

141 なお、NMRで用いられる信号のSN比計算は信号強度/(2×
142 雑音強度)の式で行われ、この雑音強度はノイズ領域の個々の
143 ノイズ強度を二乗平均平方根で求めた値である。

144

145