

1 ¹Hスピン情報に基づいた参照NMRスペクトルと 2 日本薬局方試薬への応用〈G5-9-190〉

3 医薬品等の定量又は定性試験においては、当該試験の用途
4 に相応しい品質を有する日本薬局方標準品が設定されている。
5 生薬等においては、生薬等に含有する指標成分を対象とした各
6 種理化学試験が設定されており、これらの試験のために指標成
7 分について日本薬局方標準品を設定することが望まれる。しか
8 しながら、参考情報「核磁気共鳴(NMR)法を利用した定量技
9 術と日本薬局方試薬への応用〈G5-5-170〉」に記載されている
10 とおり、生薬等の指標成分は天然物であり、標準品の設定には
11 様々な課題がある。

12 日本薬局方では多くの場合、その時点で試薬として入手可
13 能な指標成分の規格を試薬・試液(9.41)の項で定め、分析用
14 の標準物質として規定している。しかしながら、これらの試薬
15 には、指標成分の類縁物質が含まれている場合がある。このた
16 めこれらの試薬の規格では、確認試験に加えて不純物を確認す
17 る純度試験が設定される。純度試験は、多くの場合、クロマト
18 グラフィーが設定されているが、ジアステレオマーなどの不純
19 物は、同法で指標成分との分離が難しい場合がある。一方、こ
20 の種の識別に有用な分光学的手法として核磁気共鳴スペクトル
21 測定法(2.21)がある。ジアステレオマーなどの非常に構造が
22 類似した不純物を含む場合においても、現在一般的に利用され
23 ている超電導磁場を用いた¹H NMR測定では、試薬に含まれる
24 指標成分と不純物の構造が異なる部分を中心として、¹H核に
25 由来するシグナルが測定スペクトル上に明確に異なって観察さ
26 れる。したがって、確認試験に¹H NMRが設定されていれば、
27 得られたスペクトルから容易に試薬中の不純物の存在を確認す
28 ることができる。

29 本来、¹H NMRスペクトルから観測される化学シフト及び
30 スピンスピン結合定数のような¹Hスピン情報は、NMR装置
31 の磁場の大きさに依存しない化合物に固有の情報である。加え
32 て、測定された¹H NMRスペクトルから正確な¹Hスピン情報
33 を得るための反復計算ソフトウェアが利用可能なため¹⁾、純度
34 の非常に高い試薬の¹H NMRスペクトルから、その試薬に含ま
35 れる指標成分の正確な¹Hスピン情報を得ることが可能である。
36 さらに、その¹Hスピン情報から求める磁場サイズにあったス
37 ペクトルを表示させるソフトウェアも存在しているため²⁾、あ
38 らゆる磁場強度に合った参照NMRスペクトルを容易に作成す
39 ることができる。したがって、日本薬局方に正確な¹Hスピン
40 情報を規定すれば、参照赤外吸収スペクトルと同様に、スペク
41 トルの直接比較による確認試験の実施が可能となる。さらに、
42 スペクトルの比較から、構造類似不純物が存在することによる
43 スペクトルの歪みや不要なシグナルを確認することで、純度試
44 験としても利用可能となる。以下に、¹Hスピン情報の詳細と
45 参照NMRスペクトルを用いた確認試験の留意点について説明
46 する。

47 1. ¹Hスピン情報

48 ¹Hスピン情報は、一般に、スペクトルから直接得られるシ
49 グナルの位置及び多重度(ピークパターン)を測定し、それぞれ
50 を化学シフト及びスピンスピン結合定数として明示すること
51 ができる。¹Hスピン情報は、当該物質に含まれる全てのプロ
52 トンのシグナルについて明らかにしておくことが望ましい。し

53 かしながら、純度が非常に高い物質の場合でも、限られた観測
54 範囲ではシグナルが重なり合い、極めて複雑なピークパターン
55 となることがある。そのため、視覚的なスペクトル解析では、
56 これらのシグナルについて多重線(マルチプレット)のシグナル
57 と表現するに留まり、正確な¹Hスピン情報を得ることが難し
58 く、また正確な参照NMRスペクトルを作成することができな
59 い。

60 このような複雑なピークパターンを示すスペクトルから正確
61 な¹Hスピン情報を得るためには反復計算を用いた方法が有効
62 である。既に¹Hスピン情報に基づいてスペクトルを表示させ
63 るソフトウェアが存在し、それに加えて反復計算機能を搭載し
64 たものが簡便に利用できるようになった。この方法では、当該
65 物質の実測スペクトルから計算スペクトルの¹Hスピン情報(化
66 学シフトとスピンスピン結合定数)の値を得るために線形フ
67 イッティングを行いながら反復的に調整する。反復計算が収束
68 し、計算スペクトルが実測スペクトルに一致すると、この際に
69 得られる¹Hスピン情報は正確な解に限りなく近づいたものと
70 見なすことができる。この¹Hスピン情報を規定することによ
71 り、参照NMRスペクトルを用いた試験が可能となる。

72 2. 参照NMRスペクトルを用いた確認試験

73 試料について規定の条件で¹H NMR測定を行い、得られたス
74 ペクトルを試料のNMRスペクトルとする。試験対象の成分に
75 ついては、その正確な¹Hスピン情報が明らかとなるとき、ソフ
76 ツウェアを介して上記測定と同じ磁場の参照NMRスペクトルを
77 作成することができる。このとき、試料のNMRスペクトルと
78 確認しようとする物質の参照NMRスペクトルを比較し、両者
79 のスペクトルが同一化学シフトのところに同様の多重度及び面
80 積強度比のシグナルを与えるとき、試料と確認しようとする物
81 質の同一性が確認され、確認試験に適合すると判断される。な
82 お、この同一性の確認においては以下について留意する必要が
83 ある。

84 2.1. シグナルの半値幅について

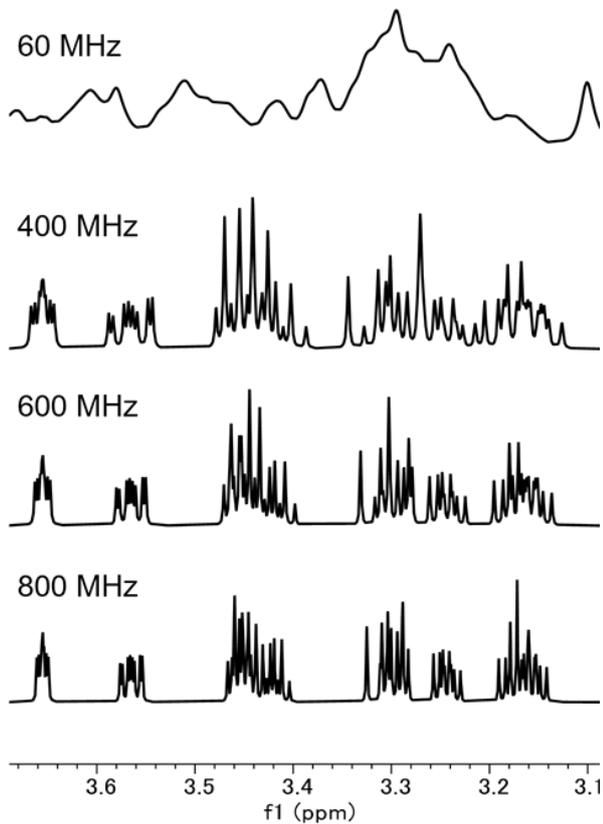
85 ¹H共鳴周波数が60, 400, 600, 800 MHzの条件下でのヘス
86 ペリジンの参照NMRスペクトルの一部を図1に示す。磁場の
87 大きさの違いにより、スペクトルのピークパターンが異なるこ
88 とが分かる。これらのピークパターンは、それぞれの磁場にお
89 けるヘスペリジンに固有であるが、ピークが近接している観測
90 領域においては、シグナルの半値幅が変わることによりピーク
91 パターンが変化することに留意する必要がある。なお、図1の
92 参照NMRスペクトルの作成に際して、シグナルの半値幅は1
93 Hzに統一されている。

94 試料のスペクトルにおいては、装置のシム調整又は分解能調
95 整により試料のシグナルの半値幅が変わる。そのため、試料の
96 NMRスペクトルとヘスペリジンの参照NMRスペクトルの同一
97 性を確認する際は、参照NMRスペクトルのシグナル半値幅を
98 試料のそれらに合わせるか、又は両スペクトルに対して2 Hz
99 程度のブロードニングファクターを適用することが望ましい。

100 2.2. 重水素化溶媒及び水に由来するシグナルについて

101 試料のNMRスペクトル上には、試料を溶解させるために用
102 いた重水素化溶媒の残留プロトン及び残存した水に由来するシ
103 グナル、また化学シフト基準物質を用いた際には、化学シフト
104 基準物質由来のシグナルが観察される。これらのシグナルが試
105 料中の指標成分のシグナルと重なる場合は、この領域を参照
106 NMRスペクトルとの同一性を確認するための判定に使用して

107 はならないことに留意する。また、重水素化溶媒中の僅かな不
108 純物のシグナルが観察されることもあるため、事前に重水素化
109 溶媒のみのブランクを測定し、不純物のシグナルが観察される
110 範囲や強度について確認しておくことが望ましい。また、容器
111 を開封してからしばらく経過した吸湿性の高い重水素化溶媒に
112 ついては、水に由来するシグナルが大きくなる傾向がある。し
113 たがって、開封して間もない重水素化溶媒又はアンプルタイプ
114 の重水素化溶媒を使用することが望ましい。



115

116 図1 ^1H 共鳴周波数が60, 400, 600, 800 MHzの条件下でのヘ
117 スペリジンの参照NMRスペクトル(重水素化ジメチルスルホキシ
118 ド中)

119

120 3. 参考資料

121 1) P.S. Achanta, et al., J. Pharm. Biomed. Anal., 192,
122 113601 (2021).

123