

定量 NMR による砂糖調製品中のスクロースの定量

松本 健志*, 野澤 和也*, 榎本 康敬*, 野口 大*

Determination of the sucrose content of sugar preparations by quantitative NMR analysis

Tsuyoshi MATSUMOTO*, Kazuya NOZAWA*, Yasuyuki ENOMOTO* and Hiroshi NOGUCHI*

*Tokyo Customs Laboratory, 2-7-11, Aomi, Koto-ku, Tokyo 135-8615 Japan

Recently, proton quantitative NMR (^1H -qNMR) has become widely used as an absolute quantitative method to determine the purities or the contents of an analyte without a standard analyte material and calibration curve. In this study, we determined the sucrose contents of two kinds of sugar preparations (The mixture of sugar/sorbitol, and sugar/salt) by two methods using ^1H -qNMR and HPLC analysis. For the ^1H -qNMR quantitative analysis method, we used calcium formate and potassium hydrogen phthalate as a standard qNMR reference material. As a result, we got about the same value for the sucrose contents between the ^1H -qNMR and HPLC analyses.

1. 緒 言

プロトン核磁気共鳴分光法 (^1H -NMR) は、分子中の水素核 (プロトン) を直接観測する手法であり、 ^1H -NMR スペクトルの測定条件及び解析条件を最適化することにより、検出される信号の強度比は各信号に対応するプロトンのモル比と等しくなる。 ^1H -NMR のこの定量性は、同一分子内の信号間だけでなく、異なる分子の信号間においても成り立つものである。したがって、測定対象成分 (Analyte) を含有する試料 (Sample) と、純度既知の物質 (以下、「定量用基準物質 (qNMR reference)」という。) の両方を含む溶液を調製して ^1H -NMR スペクトルを測定すれば、各物質に由来する信号の強度比から測定対象成分の含有量を算出することができる。これが ^1H 核定量核磁気共鳴分光法 (以下、「 ^1H -qNMR」という。) の原理である¹⁻³⁾。

^1H -qNMR は、2014 年 2 月に第 16 改正日本薬局方第二追補で生薬試験法に、2018 年 1 月に日本工業規格 (JIS) の通則に収載される等、近年広がりを見せている定量手法であり、高速液体クロマトグラフ法 (HPLC 法) やガスクロマトグラフ法 (GC 法) に代表されるクロマトグラフ法を用いた定量と比較して、①測定対象成分の標準品が不要である、②検量線の作成が不要な一次標準比率法 (物質量の基準となる別の化学物質を用い、それとの比較において目的の化学物質の物質量を測る方法) であり迅速性に優れる、③定量用基準物質に認証標準物質 (Certified reference material) を用いることで国際単位系 (SI) トレーサブルな信頼性の高い定量が可能である、④装置の汚染がない、⑤HPLC 法よりも廃液量が少ないため環境負荷が小さい等、様々なメリットがある¹⁻³⁾。したがって、 ^1H -qNMR を税関における食品成分の定量に利用するこ

とができれば、迅速性や測定値の信頼性等において、非常に有用であると考えられる。

一般に ^1H -qNMR の測定溶液の調製においては、数 mg の精確な秤量が求められ、ウルトラマイクロ天秤 (最小表示値 0.0001 mg) またはマイクロ天秤 (最小表示値 0.001 mg) が必要である¹⁻³⁾。例えば第十七改正日本薬局方の「ペオノール、定量用」や「マグロール、定量用」では、ウルトラマイクロ天秤を用いて、試料 5 mg、定量用基準物質 (通常は認証標準物質) として 1,4-BTMSB-*d*₄ 1 mg を精密に量り取ることが規定されている。東京税関分析部門 (以下、「当部門」という。) では、これらの精密な天秤を所有していないため、セミマイクロ天秤 (最小表示値 0.01 mg) を用いて秤量することになるが、セミマイクロ天秤を数 mg オーダーの秤量に用いた場合、繰返し精度 (Repeatability) において問題があると考えられる。また、食品試料は不均質であることが多いため、秤量値が小さいと定量結果に大きなばらつき (あるいは偏り) が生じる可能性が高い。これらの理由から、当部門での ^1H -qNMR の利用において、数 mg の秤量は不相当であると考えられる。

そこで本研究においては、試料及び定量用基準物質を数 mg より大幅に増やして秤量し、重水素化溶媒に溶解した後、その溶液 (以下、「一次溶液 (Primary sample solution)」という。) の一部を採取して希釈したものを測定溶液 (test sample) とすることとした。また、高価な認証標準物質の使用量を抑えるため、認証標準物質及び測定対象成分のいずれとも異なる物質 (以下、「仲介物質」という。) を準備し、仲介物質の純度を認証標準物質により測定した後、この仲介物質を定量用基準物質として用いることにした。

本研究では、税関における食品成分の分析で HPLC 法による定量を行う頻度が高い砂糖調製品中のスクロース (Fig.1) を測定対

* 東京税関業務部 〒135-8615 東京都江東区青海 2-7-11

象成分に選択し、 ^1H -qNMR 及び HPLC 法の二つの手法により定量を行い、比較を行ったので報告する。

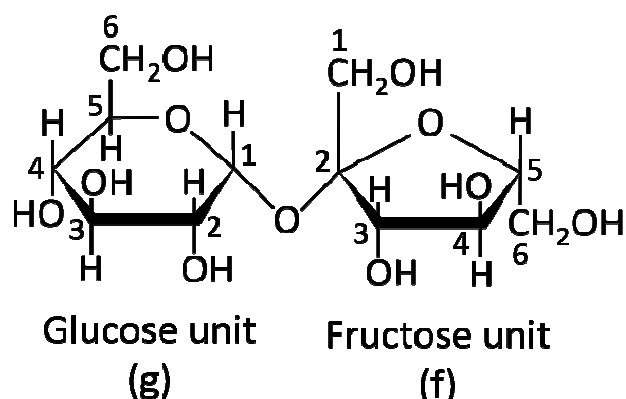


Fig.1 Chemical structure of sucrose

2. 実 験

2.1 試料

本研究には、以下の2種類の試料を用いた(いずれも輸入品で、関税率表第2106.90号の物品である)。

試料A：砂糖(約83%)とソルビトール(約17%)の混合物

試料B：砂糖(約83%)と食塩(約17%)の混合物

2.2 試薬

2.2.1 認証標準物質

仲介物質の純度測定のための定量用基準物質として、SIトレサブルな値付けがなされた認証標準物質(Certified Reference Material: CRM)であるジメチルスルホン(SIGMA-ALDRICH社製、規格: Standard for quantitative NMR, TraceCERT®, Product No: 41867-1G, 純度: $99.96 \pm 0.15\%$)を用いた。

2.2.2 仲介物質

試料中のスクロース含有量測定のための定量用基準物質(仲介物質)として、ギ酸カルシウム(SIGMA-ALDRICH社製、規格: BioUltra, Product No: 21134-250G-F)及びフタル酸水素カリウム(SIGMA-ALDRICH社製、規格: BioXtra, Product No: P1088-100G)を用いた。

2.2.3 その他の試薬(重水素化溶媒, HPLC測定用移動相等)

^1H -qNMR測定用の重水素化溶媒として、重水(ISOtec/SIGMA-ALDRICH社製、Product No: 151882-100G-N, 重水素化率: 99.9%), HPLC測定用の移動相としてアセトニトリル(純正化学社製、高速液体クロマト用)、試料AのHPLC測定の内標準物質としてグリセリン(富士フィルム和光純薬社製、試薬特級)、試料BのHPLC測定の内標準物質としてD-(-)-ソルビトール(富士フィルム和光純薬社製、和光一級)を用いた。

2.3 天秤

XP205DR(メトラートレド社製、最小表示値0.01 mg)

2.4 器具

5mg標準分銅(村上衡器製作所社製, JCSS校正証明書付き)

マイクロピペット(ニチヨー社製, Nichipet EX, 容量範囲: 1000~5000 μL , 100~1000 μL , 20~200 μL)

5 mm NMR 試料管(シゲミ社製, EC-57)

15 mL バイアル瓶(日電理科社製, SV-15)

50 mL 遠沈管(AGCテクノグラス社製, IWAKI)

1.5 mL マイクロチューブ(ワトソン社製)

2.5 NMR装置及び ^1H -qNMRの測定・解析条件

2.5.1 NMR装置

装置: JNM-ECZ400S(日本電子社製, 400 MHz)

プローブ: 5 mm FG/RO デジタルオートチューンプローブ(日本電子社製)

2.5.2 ^1H -qNMR測定条件

2.5.2 (1) 共通パラメータ

全測定に共通する ^1H -qNMR測定のパラメータは、以下のとおり。

観測スペクトル幅	: -5~15 ppmを含む40 ppm
デジタル分解能	: 0.25 Hz
試料管スピン	: なし
フリップ角	: 90°
取り込み時間	: 4 秒
^{13}C デカップリング	: なし
ダミーキャン	: 2 回
積算回数	: 8 回
温度	: $20 \sim 30^\circ\text{C}$ (室温)

2.5.2 (2) 個別パラメータ

定量用基準物質と測定対象成分の組み合わせによって設定を変更したパラメータは、以下のとおり。

①観測中心

- ・定量用基準物質がジメチルスルホン(CRM)、測定対象成分がギ酸カルシウムである場合 : 5.7 ppm
- ・定量用基準物質がジメチルスルホン(CRM)、測定対象成分がフタル酸水素カリウムである場合 : 5.3 ppm
- ・定量用基準物質がギ酸カルシウム、測定対象成分がスクロースである場合 : 6.8 ppm
- ・定量用基準物質がフタル酸水素カリウム、測定対象成分がスクロースである場合 : 6.4 ppm

②繰返し待ち時間

スクロース、ギ酸カルシウム及びフタル酸水素カリウムのプロトンの縦緩和時間(T_1)を反転回復法により測定し、パルス繰返し待ち時間(= 繰返し待ち時間+取り込み時間4秒)が T_1 の7倍以上になるように繰返し待ち時間を設定した(T_1 の7倍の場合、磁化が99.9%回復する¹⁾)。

- ・定量用基準物質または測定対象成分のいずれかがギ酸カルシウムである場合 : 120 秒
- ・定量用基準物質及び測定対象成分のいずれもギ酸カルシウムではない場合 : 60 秒

2.5.3 解析条件

2.5.3 (1) 共通項目

¹H-NMR スペクトルの解析条件は、以下のとおり

解析ソフトウェア	: Delta v5.1.3 (日本電子社製)
窓関数処理	: なし
ゼロフィリング	: 2 倍
位相補正	: マニュアル法
ベースライン補正	: マニュアル法
積分	: マニュアル法
積分範囲	: ¹³ C サテライトシグナルの外側 約 30Hz (0.075ppm) を目安とした

2.5.3 (2) 化学シフト値

化学シフト値の基準を以下のように設定した。

- ・定量用基準物質にジメチルスルホンを用いた場合：
ジメチルスルホンのメチル基のプロトン 3.0 ppm
- ・定量用基準物質にギ酸カルシウムを用いた場合：
ギ酸カルシウムのホルミル基のプロトン 8.3 ppm
- ・定量用基準物質にフタル酸水素カリウムを用いた場合：
フタル酸水素カリウムの低周波数側の芳香族プロトン 7.5 ppm

2.5.4 計算式

下記の式により、仲介物質の純度及び試料中のスクロース含有量を算出した。

$$P_a = (I_a / I_{rf}) \times (H_{rf} / H_a) \times (M_a / M_{rf}) \times (W_{rf} / W_{sample}) \times P_{rf} \quad (\text{Eq.1})$$

ここで、

P	: 純度または含有量 (単位: %)
I	: シグナル強度 (積分値)
H	: 水素数 (官能基の水素の数)
M	: モル質量 (単位: g/mol)
W	: 質量 (秤量値) (単位: mg)
a	: 測定対象成分
$sample$: 測定対象成分を含有する試料
rf	: 定量用基準物質

である。また、 H (水素数) 及び M (モル質量) は、

ジメチルスルホン ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2\text{S}$)	: $H=6$, $M=94.13$
ギ酸カルシウム ($\text{C}_2\text{H}_2\text{CaO}_4$)	: $H=2$, $M=130.11$
フタル酸水素カリウム ($\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$)	: $H=4$, $M=204.22$
スクロース ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)	: $H=1$, $M=342.30$

とした (フタル酸水素カリウムの H は芳香族プロトンの数、スクロースの H はグルコースユニットのアノメリックプロトン g1 の数である)。

2.6 天秤の最小計量値の測定

公称値 5 mg の標準分銅の質量を 10 回繰返し測定し、セミミクロ天秤の最小計量値 (Minimum weight) W_{min} を次式によって算出した⁵⁾。

$$W_{min} = \sigma \times 2000 \quad (\text{Eq.2})$$

ここで、

σ : 標準分銅の質量を 10 回繰返し測定して得られた標準偏差 (standard deviation)

2000: 包含係数 2 を計量精度の許容範囲 (0.10 %) で除した値 (計算式: $2/(0.10/100)=2000$)

2.7 仲介物質の純度の測定

2.7.1 ギ酸カルシウムの純度の測定

ジメチルスルホン (CRM) 約 100 mg 及びギ酸カルシウム約 200 mg を 15 mL バイアル瓶に秤量し、重水 2 mL を加えて密栓し、振とうした。両物質が完全に溶解したことを目視で確認した後、当該溶液 120 μL を NMR 試料管に移し入れ、重水 480 μL を添加して希釈した後に試料管を密栓し、よく混合したものを測定溶液とし、¹H-qNMR 測定を行った。

2.7.2 フタル酸水素カリウムの純度の測定

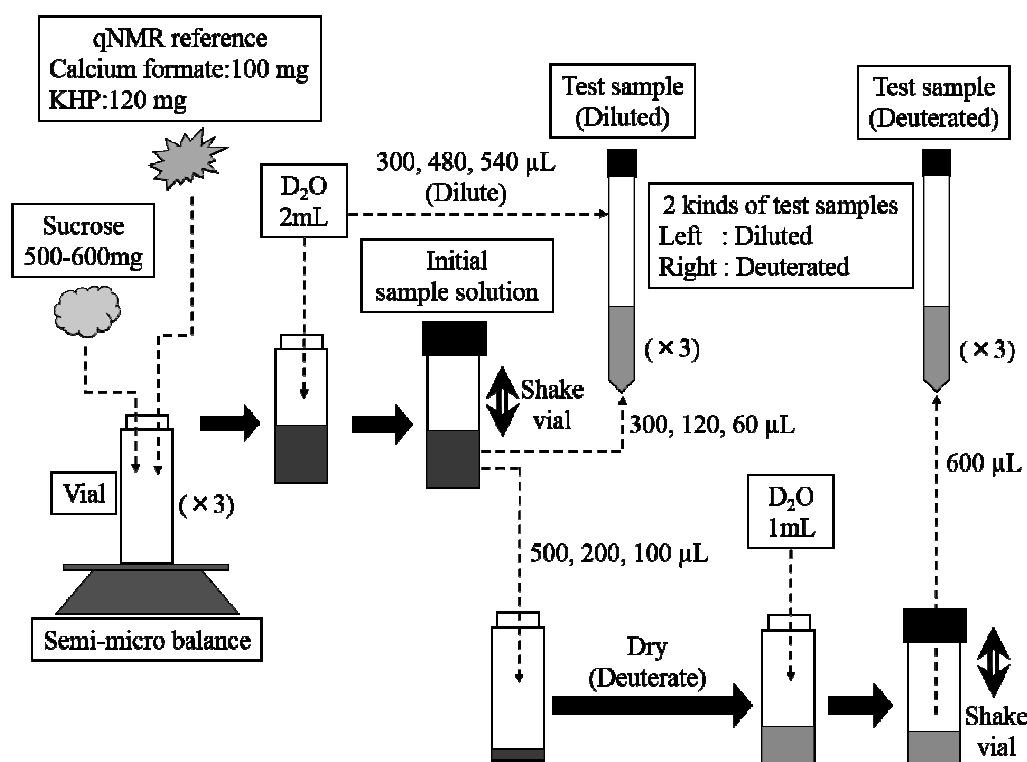
ジメチルスルホン (CRM) 約 100 mg 及びフタル酸水素カリウム約 300 mg を 15 mL バイアル瓶に秤量し、重水 4 mL を加え密栓し、振とうした。両物質が完全に溶解したことを目視で確認した後、当該溶液 120 μL を NMR 試料管に移し入れ、重水 480 μL を添加して希釈した後に試料管を密栓し、よく混合したものを測定溶液とし、¹H-qNMR 測定を行った。

2.8 標準スクロースを用いた qNMR 測定条件の検討

2.8.1 測定濃度及び水由来シグナルの対処法の検討

交換性プロトンを持たない有機化合物の ¹H-qNMR 測定では、測定溶液の濃度を高くするほど S/N 比 (Signal/Noise ratio) が良くなり、繰返し精度の点において有利となる⁹⁾。しかし、試料 A 及び B は、いずれも 1 分子中に 8 個もの交換性プロトン (水酸基) を有するスクロースを主成分とするものであり、多量の試料を重水 (D_2O) に溶解することにより、スクロースの水酸基の水素 (H) と重水の重水素 (D) が交換反応を起こし、多量の H_2O (あるいは HDO) が生じることになるため、高濃度に調製して S/N 比を高くしても、水由来のシグナルによって定量が妨害される恐れがある。そこで、標準スクロースを用いて、¹H-qNMR によるスクロース定量の最適濃度を検討した。

また、食品は水分を含有するものが多く、試料をそのまま用いると、¹H-qNMR スペクトルに水由来の巨大なシグナルが現れ、上記と同様に定量の妨げとなるため⁹⁾、水由来のシグナルへの対処法を検討しておくことは、今後、¹H-qNMR の利用を砂糖調製品以外の試料及びスクロース以外の測定対象成分へと拡大していく際に有益であると考えられる。水由来のシグナルの影響を低減させるためには、試料と定量用基準物質を一度重水に溶解した後に減圧乾燥し、 H_2O 及び HDO を除去する手法 (重水素化: Deuteration) が有効であると考えられるが、この手法を用いると、測定対象成分であるスクロースまたは定量用基準物質 (若しくはその両方) を損失し、定量値に偏りが生じる可能性がある。そこで、重水素化を行った場合の標準スクロースの純度を測定し、同操作が定量に与える影響を調査した。測定溶液の調製方法の概略図を Fig.2 に示す。

Fig.2 Preparations of test samples for examination of ^1H -qNMR conditions of sucrose.

2.8.2 定量用基準物質にギ酸カルシウムを用いる場合

2.8.2 (1) 重水素化しない場合

ギ酸カルシウム約 100 mg 及び標準スクロース約 600 mg を 15 mL バイアル瓶に秤量し、重水 2 mL を加えて密栓し、振とうした。両物質が完全に溶解したことを目視で確認した後、当該溶液 300 μL 、120 μL 及び 60 μL をそれぞれ別の NMR 試料管に移し入れ、合わせて 600 μL になるように重水を加えて希釈した後に密栓し、よく混合したものを測定溶液とし、 ^1H -qNMR 測定を行った。

2.8.2 (2) 重水素化する場合

上記 2.8.2 (1) の溶液 500 μL 、200 μL 及び 100 μL を 15 mL 容バイアル瓶に移し入れ、60 $^{\circ}\text{C}$ で 30～90 分間減圧乾燥を行った後、重水 1 mL を加えて溶解し、当該溶液 600 μL を NMR 試料管に移し入れて密栓したものを測定溶液とし、 ^1H -qNMR 測定を行った。

2.8.3 定量用基準物質にフタル酸水素カリウムを用いる場合

2.8.3 (1) 重水素化しない場合

フタル酸水素カリウム約 120 mg 及び標準スクロース約 500 mg を 15 mL バイアル瓶に秤量し、重水 2 mL を加えて密栓し、振とうした。両物質が完全に溶解したことを目視で確認した後、当該溶液 300 μL 、120 μL 及び 60 μL をそれぞれ別の NMR 試料管に移し入れ、合わせて 600 μL になるように重水を加えた希釈した後に密栓し、よく混合したものを測定溶液とし、 ^1H -qNMR 測定を行った。

2.8.3 (2) 重水素化する場合

上記 2.8.3 (1) の溶液 500 μL 、200 μL 及び 100 μL を 15 mL バイアル瓶に移し入れ、60 $^{\circ}\text{C}$ で 30～90 分間減圧乾燥を行った後、重

水 1 mL を加えて溶解し、当該溶液 600 μL を NMR 試料管に移し入れて密栓したものを測定溶液とし、 ^1H -qNMR 測定を行った。

2.9 試料の測定

2.9.1 定量用基準物質にギ酸カルシウムを用いる場合

2.9.1 (1) 重水素化しない場合

ギ酸カルシウム約 100 mg 及び試料約 700 mg を 15 mL バイアル瓶に秤量し、重水 2 mL を加えて密栓し、振とうした。試料等が完全に溶解したことを目視で確認した後、当該溶液 60 μL を NMR 試料管に移し入れ、重水 540 μL を加えた後に密栓し、よく混合したものを測定溶液とし、 ^1H -qNMR 測定を行った。

2.9.1 (2) 重水素化する場合

上記 2.9.1 (1) の溶液 200 μL を 15 mL バイアル瓶に移し入れ、60 $^{\circ}\text{C}$ で 60 分間減圧乾燥を行った後、重水 1 mL を加えて溶解し、当該溶液 600 μL を NMR 試料管に移し入れて密栓したものを測定溶液とし、 ^1H -qNMR 測定を行った。

2.9.2 定量用基準物質にフタル酸水素カリウムを用いる場合

2.9.2 (1) 重水素化しない場合

フタル酸水素カリウム約 120 mg 及び試料約 600 mg を 15 mL バイアル瓶に秤量し、重水 2 mL を加えて密栓し、振とうした。試料等が完全に溶解したことを目視で確認した後、当該溶液 60 μL を NMR 試料管に移し入れ、重水 540 μL を加えた後に密栓し、よく混合したものを測定溶液とし、 ^1H -qNMR 測定を行った。

2.9.2 (2) 重水素化する場合

上記 2.9.2 (1) の溶液 200 μL をバイアル瓶に移し入れ、60 $^{\circ}\text{C}$ で

60 分間減圧乾燥を行った後、重水 1 mL を加えて溶解した後、600 μ L を NMR 試料管に移し入れて密栓したものを測定溶液とした。

2.10 HPLC の装置及び測定条件

2.10.1 装置

Agilent 1200 Series (Agilent Technologies 社製)

2.10.2 測定条件

カラム : Asahipak NH2P-50G 4A (内径 4.6 mm×長さ 10 mm, 粒径 5 μ m)+Asahipak NH2P-50 4E(内径 4.6 mm×長さ 250 mm, 粒径 5 μ m) (いずれも昭和電工社製)

カラム温度 : 35 $^{\circ}$ C

移動相 : アセトニトリル:水 = 70:30

流速 : 1 mL/min

検出器 : 示差屈折計 (35 $^{\circ}$ C)

2.11 HPLC 測定溶液の調製

試料約 1 g を 50 mL 遠沈管に秤量した。試料 A には 15 % (wt/vol) グリセリン溶液 4 mL (グリセリン 0.6 g 相当) を、試料 B にはソルビトール 0.6 g を内標準物質として添加 (秤量) した後、水約 40 mL を加えて密栓し、20 分間攪拌した。試料等が完全に溶解したことを目視で確認した後、当該溶液 600 μ L を 1.5 mL マイクロチューブに移し入れ、アセトニトリル 600 μ L を添加した。10 分間攪拌した後、0.45 μ m メンブランフィルターに通液したものを HPLC 測定溶液とした。

検量線用の標準スクロース溶液については、スクロース約 0.4 g, 0.8 g 及び 1.2 g を 50mL 遠沈管にそれぞれ秤量し、試料 A 用には 15 % (wt/vol) グリセリン溶液 4 mL (グリセリン 0.6 g 相当) を、試料 B 用にはソルビトール 0.6 g を内標準物質として添加 (秤量) し、試料の測定溶液と同様に調製した。

3. 結果及び考察

3.1 天秤の最小計量値の測定結果

セミマイクロ天秤の最小計量値は 35.34 mg であり、セミマイクロ天秤を用いて秤量する場合、数 mg では不適當であることが確認された。本研究においては、有効桁数を増やすために、最小計量値よりもさらに増やし、100 mg 以上秤量することとした。

3.2 1 H-qNMR による仲介物質の純度の測定結果

ジメチルスルホン (CRM, 純度 99.96 ± 0.15 %) を定量用基準物質として、ギ酸カルシウム及びフタル酸水素カリウムの純度の測定を行った結果、ギ酸カルシウムの純度は 99.90 %, フタル酸水素カリウムの純度は 99.75 % で、いずれも相対標準偏差 (RSD) が 0.1 % 未満の良好な結果が得られた (Table 1)。以下、この二つの物質を定量用基準物質として、試料中のスクロース含有量を測定した。

Table 1 Results of 1 H-qNMR analysis of calcium formate(CF) and potassium hydrogen phthalate(KHP) in D_2O (\dagger^1)

Analyte	Chemical shift (ppm) (\dagger^1)	Number of H	Calculated purity (%) (\dagger^2)	RSD(%) (\dagger^3)
CF	8.3	2	99.90	0.081
KHP	7.5	4	99.75	0.052

\dagger^1 Chemical shift reference : Dimethyl sulfone ($CH_3 \times 2$) $\delta 3.0$ ppm

\dagger^2 qNMR reference : Dimethyl sulfone (CRM) 99.96 ± 0.15 %

\dagger^3 RSD (Relative standard deviation) were calculated from nine data that were obtained by three test samples (= three sample preparations) and three times measurements for each test sample.

3.3 標準スクロースを用いた qNMR 測定条件の検討結果

3.3.1 スクロースの定量用シグナルの検討結果

標準スクロースの 1 H-NMR スペクトル及びシグナルの帰属を Fig.3 に示す。スクロースは、グルコース (Glucose/g) 及びフルクトース (Fructose/f) からなる二糖であり、グルコースユニットのアノメリックプロトンのシグナル (g1) のみが水由来のシグナルよりも高周波数側に検出され、それ以外のプロトンは全て、水由来のシグナルよりも低周波数側に検出された。これらの低周波数側のシグナル群は、通常スケールの 1 H-NMR スペクトルでは分離しているように見えるが、Y 軸を拡大してみると、シグナル同士が近接しており、十分な積分範囲が取れないことが確認された。よって、本研究ではスクロースの g1 シグナルのみを定量に用いることとした。

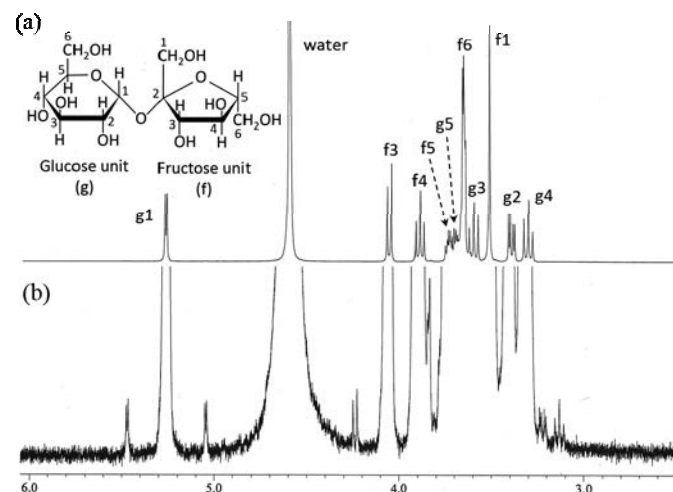


Fig.3 1 H-NMR spectrum of standard sucrose in D_2O .

3.3.2 測定濃度の検討結果

3.3.2.1 重水素化しない場合

1 H-qNMR スペクトルの測定例として、定量用基準物質にギ酸カルシウムを用いた場合の 1 H-qNMR スペクトルを Fig.4-1 (Y 軸フルスケール) 及び Fig.4-2 (Y 軸拡大) に示す。また、標準スクロースの純度の測定結果を Table 2 に示す (重水素化を行った場合も含む)。

測定溶液 (test sample) の濃度が高くなると、S/N 比 (Signal/Noise ratio) が向上するが、同時に水由来のシグナルがブロードになり、

^1H -qNMR スペクトルの Y 軸を拡大してみると、水由来のシグナルの立ち上がりがスクロースの g1 シグナルと重なることが確認された。このため、 ^{13}C サテライトシグナルの外側 0.075ppm を目安とする広い積分範囲を取ると、積分のベースライン（直線）とシグナルのベースライン（曲線）との間で不一致（Gap）が生じ、積分に含まれるべきシグナルの一部分が積分から外れ、適切な積

分が行えないことが判明した（Fig.5）。

今回検討した濃度のうち、一次溶液 60 μL を NMR 試料管に移し、重水 540 μL で 10 倍に希釈した場合に、水由来のシグナルの立ち上がりとスクロースの g1 シグナルのオーバーラップがほとんど観測されなくなったことから、この濃度を試料 A 及び B の測定溶液とすることとした。

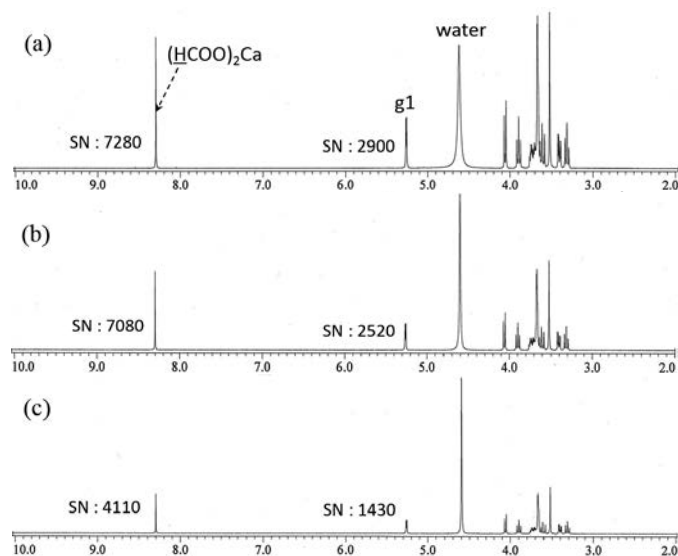


Fig. 4-1 ^1H -qNMR spectra of the mixture of standard sucrose and calcium formate in D_2O (Y axis: Full scale).

- (a) Sucrose: ca. 150 mg/mL, Calcium formate: ca. 25 mg/mL
 (b) Sucrose: ca. 60 mg/mL, Calcium formate: ca. 10 mg/mL
 (c) Sucrose: ca. 30 mg/mL, Calcium formate: ca. 5 mg/mL

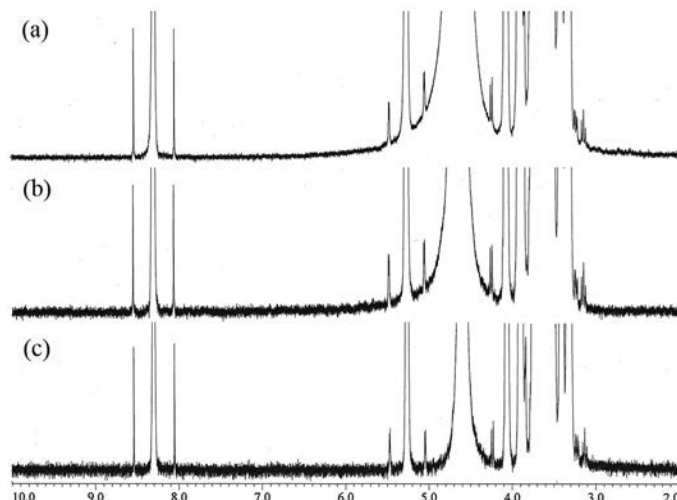


Fig. 4-2 ^1H -qNMR spectra of the mixture of standard sucrose and calcium formate in D_2O (Y axis: Expanded).

- (a) Sucrose: ca. 150 mg/mL, Calcium formate: ca. 25 mg/mL
 (b) Sucrose: ca. 60 mg/mL, Calcium formate: ca. 10 mg/mL
 (c) Sucrose: ca. 30 mg/mL, Calcium formate: ca. 5 mg/mL

Table 2 Results of ^1H -qNMR analysis of standard sucrose in D_2O

qNMR reference	Primary concentration (mg/mL)	Transferred volume of the primary sample solution (μL)	Deuteration (\dagger^1)	Added volume of D_2O (μL)	Concentration of the test sample (mg/mL)		Signal/Noise ratio		Calculated purity (%) (\dagger^2)	RSD (%) (\dagger^3)
					qNMR reference	Sucrose	qNMR reference	Sucrose (g1 signal)		
Calcium formate	qNMR reference: 50 mg/mL	300 μL to NMR tube	No	300 μL to NMR tube	25	150	7280	2900	-	-
		120 μL to NMR tube	No	480 μL to NMR tube	10	60	7080	2520	-	-
		60 μL to NMR tube	No	540 μL to NMR tube	5	30	4110	1430	99.85	0.15
	Sample : 300 mg/mL	500 μL to vial	Yes	1000 μL to vial	25	150	11660	5170	99.70	0.062
		200 μL to vial	Yes	1000 μL to vial	10	60	6280	2660	99.98	0.12
		100 μL to vial	Yes	1000 μL to vial	5	30	3450	1450	99.86	0.21
Potassium hydrogen phthalate	qNMR reference: 60 mg/mL	300 μL to NMR tube	No	300 μL to NMR tube	30	125	2120	4140	-	-
		120 μL to NMR tube	No	480 μL to NMR tube	12	50	1200	2110	-	-
		60 μL to NMR tube	No	540 μL to NMR tube	6	30	590	1150	99.80	0.31
	Sample: 250 mg/mL	500 μL to vial	Yes	1000 μL to vial	30	125	2990	4740	99.66	0.10
		200 μL to vial	Yes	1000 μL to vial	12	50	1380	2310	99.78	0.068
		100 μL to vial	Yes	1000 μL to vial	5	30	610	1120	99.92	0.19

\dagger^1 Deuteration conditions: The primary sample solutions were dried for 30-90 minutes at 60 $^\circ\text{C}$ in vacuum oven.

\dagger^2 Hyphen (-) means that accurate integral of sucrose g1 signal were impossible because the foot of water signal and sucrose g1 signal were overlapped.

\dagger^3 RSD (Relative standard deviation) were calculated from nine data that were obtained by three test samples and three times measurements for each sample.

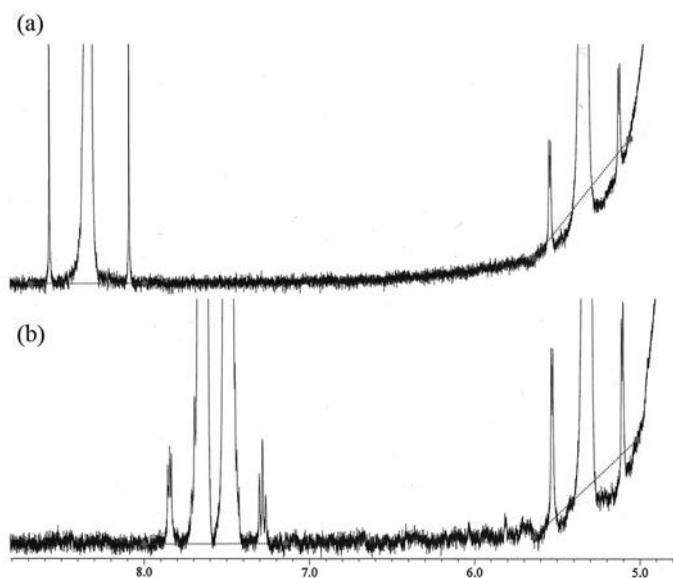


Fig. 5 Gap between signal baseline and integral baseline
(a) Sucrose: ca. 150 mg/mL, Calcium formate: ca. 25 mg/mL
(b) Sucrose: ca. 125 mg/mL, KHP: ca. 30 mg/mL

3.3.2.2 重水素化する場合

重水素化を行った場合、測定溶液の濃度によって得られた結果（純度と相対標準偏差）に顕著な差は見られないが、一次溶液 500 μ L を乾燥させて重水素化した場合に純度が僅かに小さくなった。これは、重水素化の操作が 1 回のみでは不十分であり、重水化しない場合と同様に、積分のベースライン（直線）とスクロースの g1 シグナルのベースライン（曲線）との間に僅かに不一致が生じたためと考えられる。また、一次溶液 100 μ L を乾燥して重水素化を行った場合、僅かに相対標準偏差が大きくなった。これは、濃度が薄いために S/N 比が小さくなり、繰返し精度が低下したためと考えられる。

また、定量用基準物質にフタル酸水素カリウムを用い、一次溶液を 500 μ L 乾燥して重水素化した場合にのみ、スクロース g1 の ^{13}C サテライトシグナルの近傍に、 ^{13}C デカップリングで消失しないシグナルが検出された (Fig.6)。この一次溶液の pH を測定したところ 4.0 と酸性であったことから、このシグナルは、スクロースの加水分解物に由来するものと考えられた。この溶液に微量の標準グルコースを添加して再度 ^1H -qNMR スペクトルを測定したところ、当該シグナル強度が強くなったことから、当該シグナルはグルコース由来と判断した（定量用基準物質にギ酸カルシウムを用いた場合、一次溶液の pH は 6.6 とほぼ中性であったため、加水分解しなかったと考えられる）。このグルコース由来のシグナルの積分値が全積分値（ ^{13}C サテライトシグナルの外側約 0.075 ppm を積分範囲にした場合の積分値）に占める割合を算出したところ、0.06 % と極僅かであり、純度 (%) に換算しても 0.06 % しか影響がない（グルコースのシグナルを減算した場合の純度：99.60 %、グルコースのシグナルを減算しなかった場合の純度：99.66 %）ことから、当該シグナルは積分範囲に含め、かつ、減算処理も行わないこととした。

以上の結果から、重水素化を行う場合、スクロースの純度がやや低くなる 500 μ L、S/N 比が小さく相対標準偏差がやや大きくなる 100 μ L ではなく、回収率及び S/N 比のバランスに優れていると考えられる 200 μ L の減圧乾燥を行うこととした。

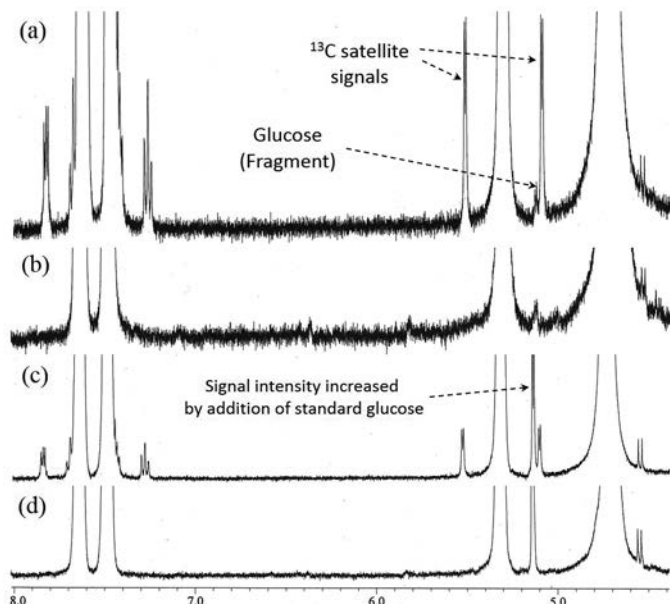


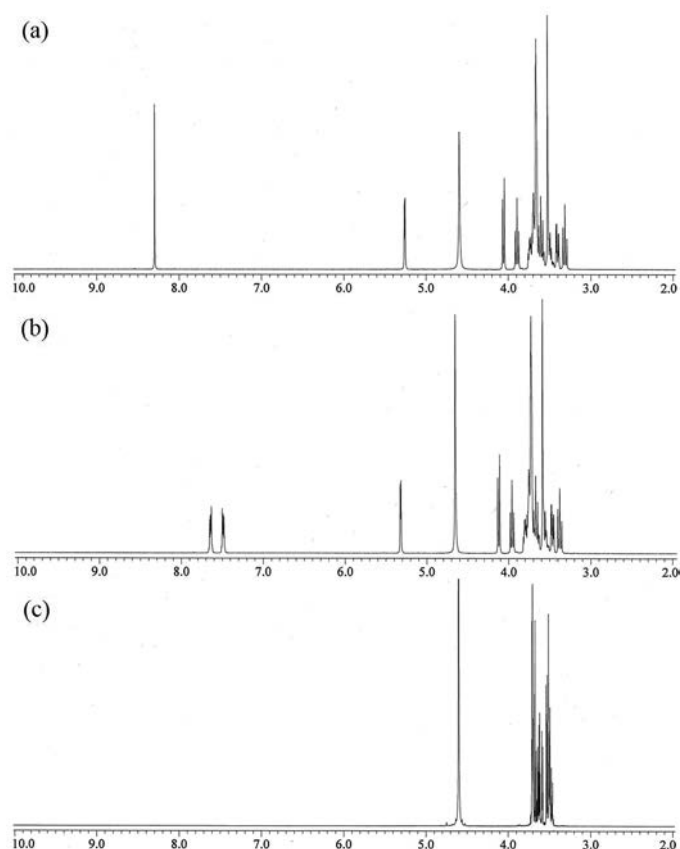
Fig. 6 Fragment signal in the mixture of standard sucrose and potassium hydrogen phthalate (KHP) in D_2O after deuteration

- (a) ^{13}C decoupling: OFF
- (b) ^{13}C decoupling: ON (Decoupling offset: 130 ppm)
- (c) After addition of standard glucose (^{13}C decoupling: OFF)
- (d) After addition of standard glucose (^{13}C decoupling: ON)

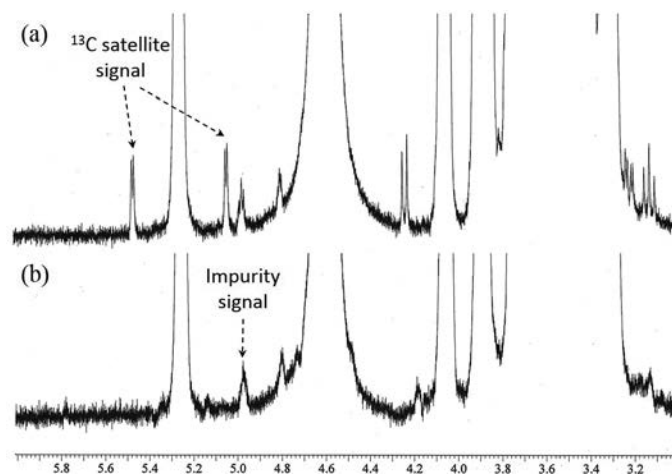
3.4 ^1H -qNMR による試料中のスクロースの定量

試料の ^1H -qNMR スペクトルの測定例として、重水素化を行った場合の試料 A の ^1H -qNMR スペクトルを Fig.7 に示す。試料 A の ^1H -qNMR スペクトルの Y 軸を拡大すると、スクロース g1 シグナルの ^{13}C サテライトシグナルの僅かに外側に、 ^{13}C デカップリングによって消失しないシグナルが確認された (Fig.8)。このシグナルは試料中の夾雑物に由来すると考え、当該夾雑物シグナルは積分範囲から除外した。試料 B については、g1 シグナル及び定量用基準物質のいずれのシグナルの近傍にも夾雑物由来のシグナルが検出されなかったことから、標準スクロースの純度測定と同様に、積分範囲は ^{13}C サテライトシグナルの外側 0.075 ppm とした。

試料 A 及び B の ^1H -qNMR 測定結果及び並行して行った HPLC 法によるスクロースの定量結果の詳細を Table 3（試料 A）及び Table 4（試料 B）に示す。 ^1H -qNMR 測定は、いずれの場合も測定溶液を 3 つ調製し、非連続で 3 回繰返し測定を行った。HPLC 測定は、試料の測定溶液を検量線用の測定溶液で挟み込むように、3 回（検量線用の測定溶液は 4 回）繰返し測定を行った。 ^1H -qNMR によって測定したスクロース含有量は、重水素化の有無や定量用基準物質の違いによる顕著な差はなく、いずれの場合も HPLC 法による定量値とほぼ一致するという結果が得られた。

Fig. 7 ^1H -qNMR spectra of sample A (sugar / sorbitol) after deuteration

- (a) qNMR reference: Calcium formate
 (b) qNMR reference: potassium hydrogen phthalate (KHP)
 and (c) ^1H -NMR spectrum of standard sorbitol

Fig. 8 Impurity signal of ^1H -qNMR spectra of sample A (sugar / sorbitol) after deuteration

- (a) ^{13}C decoupling: OFF
 (b) ^{13}C decoupling: ON (Decoupling offset: 140 ppm)

Table 3 Results of ^1H -qNMR and HPLC analysis of sample A

Sample	Analysis method	Deuteration (\dagger^1)	Repetition measurement for each test sample						Whole 3 test samples		
			Test sample number	Run1	Run2	Run3	Average (%)	RSD (%)	Average of 3 test samples (%)	SD (\dagger^2)	RSD (%) (\dagger^2)
A Sugar and sorbitol	qNMR (qNMR reference : Calcium formate)	No	①	83.72	83.74	83.60	83.69	0.091	82.91	0.819	0.99
			②	82.74	83.04	83.38	83.05	0.39			
			③	81.32	82.20	82.41	81.98	0.71			
		Yes	①	82.79	82.48	82.42	82.56	0.24	82.37	0.193	0.23
			②	82.23	82.37	82.24	82.28	0.095			
			③	82.25	82.14	82.42	82.27	0.17			
	qNMR (qNMR Reference : Potassium hydrogen phthalate)	No	①	82.57	82.33	82.30	82.40	0.18	82.70	0.598	0.72
			②	83.17	83.57	83.63	83.46	0.30			
			③	82.42	82.35	81.99	82.25	0.28			
		Yes	①	81.86	82.17	81.89	81.97	0.21	81.97	0.208	0.25
			②	81.78	81.75	81.76	81.76	0.019			
			③	82.30	82.16	82.09	82.18	0.13			
	HPLC	No	①	82.73	82.86	82.84	82.81	0.086	82.84	0.390	0.47
			②	82.54	82.20	82.55	82.43	0.24			
			③	83.49	83.18	83.14	83.27	0.23			

\dagger^1 Deuteration conditions : 200 μL of the primary sample solutions were dried for 60 minutes at 60 $^\circ\text{C}$ in vacuum oven.

\dagger^2 SD (Standard deviation) and RSD (Relative standard deviation) of whole three test samples were calculated from nine data that were obtained by three test samples and three times measurements for each sample.

Table 4 Results of ¹H-qNMR and HPLC analysis of sample B

Sample	Analysis method	Deuteration († ¹)	Repetition measurement for each test sample						Whole 3 test samples		
			Test sample number	Run1	Run2	Run3	Average (%)	RSD (%)	Average of 3 test sample (%)	SD († ²)	RSD (%) († ²)
B Sugar and salt	qNMR (qNMR reference : Calcium formate)	No	①	81.12	81.41	81.33	81.29	0.18	81.38	0.141	0.17
			②	81.36	81.25	81.51	81.37	0.16			
			③	81.41	81.61	81.40	81.47	0.15			
		Yes	①	82.03	82.27	82.15	82.15	0.15	81.75	0.731	0.89
			②	80.78	80.87	80.70	80.78	0.11			
			③	82.39	82.22	82.31	82.31	0.10			
	qNMR (qNMR Reference : Potassium hydrogen phthalate)	No	①	81.69	81.94	81.74	81.79	0.16	82.08	0.296	0.36
			②	82.41	82.58	82.26	82.42	0.19			
			③	82.06	81.93	82.09	82.03	0.10			
		Yes	①	81.46	81.62	81.50	81.53	0.10	81.53	0.817	1.0
			②	82.46	82.46	82.48	82.47	0.014			
			③	80.57	80.49	80.70	80.59	0.13			
	HPLC	No	①	81.97	82.27	81.91	82.05	0.24	81.78	0.421	0.52
			②	81.27	81.12	81.48	81.29	0.22			
			③	81.66	82.32	81.98	81.99	0.40			

†¹ Deuterating conditions : 200 μL of the primary sample solutions were dried for 60 minutes at 60 °C in vacuum oven.

†² SD (Standard deviation) and RSD (Relative standard deviation) of whole three test samples were calculated from nine data that were obtained by three test samples and three times measurements for each sample.

4. 要 約

標準スクロースを用いて ¹H-qNMR の測定条件を検討し、2 種類の砂糖調製品中のスクロースの定量を行った結果、測定前の重水素化の有無や定量用基準物質にかかわらず、HPLC による定量値とほぼ一致する結果が得られた。¹H-qNMR は、

¹H-qNMR スペクトルの精緻な解析を 1 測定ごとにマニュアル法で行う必要があるため、解析に手間がかかるが、測定溶液の調製が簡便で検量線の作成が不要であり、迅速に測定できるというメリットがあるため、特に検体数が少ない場合には、砂糖調製品中のスクロースの定量において有用な手法であると言える。

文 献

- 1) 「qNMR プライマリーガイド」ワーキング・グループ：“qNMR プライマリーガイド 基礎から実践まで”，2015，共立出版
- 2) 第十六改正日本薬局方第二追補（平成 26 年 2 月 28 日，厚生労働省告示第 47 号）(2014)
- 3) JIS K 0138, 定量核磁気共鳴分光法通則（qNMR 通則）(2018)
- 4) 井原俊英, 齋藤剛, 杉本直樹：Synthesiology, vol.2, No.1, p.12(2009)
- 5) 三浦亨ら：薬学雑誌, 137, 12, p.1543(2017)