

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 12 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590127

研究課題名(和文)qNMR 多変量解析を用いた水環境中の有害化合物のモニタリング技術の開発

研究課題名(英文)Development of monitoring technique using qNMR multivariate analysis for hazardous compounds in water

研究代表者

杉本 直樹 (SUGIMOTO NAOKI)

国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部第2室・室長

研究者番号：50300918

研究成果の概要(和文)：

水環境中の有害化合物の包括的な定量分析が可能であり、また得られた分析値の信頼性を確保した分析法として、定量 NMR (qNMR) を用いた絶対定量法の微量分析及び多変量解析への応用を検討した。その結果、コールドプローブ付 600 MHz NMR の定量下限(誤差±10%)は 10-40 ppm であった。また、農薬標準品 41 製品の絶対純度を測定した結果、試薬メーカーの表示値を下回る純度値のものが認められた。さらに qNMR 多変量解析用に約 100 種の有害化合物の qNMR スペクトルをデータベース化した。

研究成果の概要(英文)：

To develop novel monitoring technique using NMR multivariate analysis for hazardous compounds in water environmental, sensitivity and accuracy of 600 MHz NMR instrument with cold probe were tested. The determination limit was estimated to be 10-40 ppm with a margin of error of 10 %. The absolute purities of 41 pesticide commercial standards were determined using qNMR. The result showed that the several standards had lower purities than the labeled values by manufacturers. In addition, qNMR spectra of about 100 hazardous compounds were stored in the database for multivariate analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	0	1,400,000
2011 年度	1,000,000	0	1,000,000
2012 年度	900,000	0	900,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学，環境系薬学

キーワード：環境分析，環境政策，多変量解析，NMR，絶対定量

## 1. 研究開始当初の背景

水環境水中の農薬等の有害化合物のモニタリングや定量分析には、相対分析法の一種であるクロマトグラフ法が正確な分析値を求められるものとして一般的に利用されて

いる。クロマトグラフ法で厳密に信頼性が確保された分析値を得るためには、測定対象の物質と同一の標準物質が不可欠である。しかし、現状では、国際単位系(SI)にトレーサブルに正確に値付けされた標準物質はほとん

ど供給されていない。実際に、水道水質基準の水質管理目標設定項目に記載されている農薬(102種)(現時点では237種:健水発0328第4号)のみでも、厳密に値付けされた標準物質はほとんど供給されていない。一方、試薬市場には「〇〇標準品」と名付けられたいわゆる市販標準品が流通しているが、これらは試薬メーカーが独自の品質管理の目的で行ったクロマトグラフ法により観察されたピーク面積百分率等をカタログ値として示しただけであって、物質の絶対量または絶対純度を示してはいるわけではない。すなわち、市販標準品を用いてクロマトグラフ法により求められる分析値は決して真値を示しているものではなく、場合によっては真値から大きく外れている可能性も否定できず、その信頼性は事実上保証できていないのが現状である。したがって、通常広範囲で行う環境モニタリングにおいても同様に測定誤差要因となっている。

このような背景から、水環境中の有害化合物を包括的に定量分析が可能であり、また得られた分析値の信頼性を確保した次世代の分析法として、定量 NMR (qNMR)を用いた絶対定量法の微量分析への適用と NMR 多変量解析の技術開発を行うこととした。

## 2. 研究の目的

水環境中の農薬等の有害化合物は環境影響が大きいと予想されることから、包括的なモニタリング結果が要求されている。しかし、現行のクロマトグラフ法では、すべての物質の存在量を正確にモニタリングすることは事実上不可能であり、この問題を抜本的に解決した基準分析法の開発が望まれている。そこで、精密且つ包括的な定量分析法として定量 NMR (quantitative NMR: qNMR)による絶対定量法の応用を試みた。すなわち、国際単位系(SI)にトレーサブルにあらゆる物質の絶対量の測定を NMR 現象を利用して可能とする方法を、次世代の環境モニタリング手法に応用することを目的とした。

qNMR の環境モニタリング手法への応用においては、微量分析への対応が必要である。よって、より高感度測定が可能なコールドプローブを導入した NMR 装置を用いた qNMR 条件の最適化を行うと共に、固相抽出法を利用した濃縮方法を検討し、現状の装置限界から予想される 0.5 ppb 程度の定量下限値を目指した。また、存在量が変動する特異的な成分を効率的に検出するための方法論として多変量解析を応用すると共に、有害化合物の同定については、qNMR スペクトル上に観察されるシグナルの帰属が必須であることから、農薬を中心に qNMR スペクトルデータベースを整備した。

## 3. 研究の方法

NMR による定量分析(qNMR)は、クロマトグラフ法が分子の特性値(イオン化率、吸光係数など)を定量分析の指標としているのに対し、分子上の原子核を測定対象とした方法である。<sup>1</sup>H-NMR スペクトル上において観察されるプロトンシグナル面積値の比が各化合物の置換基のプロトン数に対応することを利用した方法であり、本法では、一方の化合物の観察されるプロトンシグナルの帰属とその純度あるいは濃度さえ既知であれば、得られた特定シグナルの積分値と分子量及び秤量値の関係式から同時に存在するもう一方の化合物の絶対純度あるいは試料中の絶対量を極めて効率的に決定できる。理論的には、qNMR は測定対象以外のたった一つの純度既知の標準物質を設定するのみで、それぞれの測定対象と同一の標準物質を全く必要とせず、あらゆる化合物の絶対純度や絶対含量を求めることを可能とする。よって、qNMR を応用することで従来法とは全く発想のモニタリング手法が開発可能であると考えられる。

環境モニタリングのための微量分析に対応するために、コールドプローブを備えた 600 MHz NMR による qNMR 条件の確立、次いで固相抽出法による濃縮を検討し、定量下限値 0.5 ppb の達成を目指した。さらに多変量解析による変動成分の検出法について検討した。同時に、水環境中の有害化合物(主に農薬類)について qNMR スペクトルデータベースを構築し、個々の測定対象の化合物の標準物質を全く必要とせず、データベースを参照だけで化合物の同定と絶対定量が可能である従来型とは全く原理の異なる環境モニタリングシステムの開発とその有効性について検証した。対象化合物として、水環境中の監視対象とされている農薬を中心に、毒性、使用量、検出頻度、検出濃度等を考慮して有害化学物質 50~100 種を選定し、これらの市販標準品(市場に流通していない場合は対応する市販試薬)について、qNMR スペクトルを測定し、それをデータベースに登録した。NMR 測定には ECA-600 (600 MHz NMR JEOL RESONANCE)を、NMR 解析には同社のソフトウェアを用いた。

## 4. 研究成果

水環境中の微量有害化合物の包括的な新規定量分析法の開発を目指し、定量 NMR (qNMR)による絶対定量法と多変量解析について検討した。具体的には、以下の3点について検討した。

### (1) qNMR の微量分析への応用

認証標準物質(CRM)ジエチルフタレート(DEP)をモデル化合物試料とし、NMR (600MHz)

で得られる NMR スペクトルの定量精度を検証した。その結果、標準プローブ付 600MHz NMR で 1.1~2.1 mM, コールドプローブ付 600MHz NMR で 0.23~0.46 mM の試料濃度があれば、誤差±1%以内で精度良く定量分析が可能であることを見出した。この濃度は、測定対象化合物の分子量を 200 と仮定したとき、それぞれ 210~420 ppm ( $\mu\text{g/mL}$ ) および 46~92 ppm ( $\mu\text{g/mL}$ ) に相当する。当初より、コールドプローブ付 600 MHz NMR 自体の定量下限(誤差±10%)の理論値は 10-40 ppm になると試算していたが、実測よりそれを実証できた。

### (2) 軽溶媒中の化学物質の分析への応用

軽水及び軽溶媒中の微量化学物質を NMR を用いて定量分析する場合、NMR スペクトル上に観察される不要な軽水等のプロトンシグナルがその分析を妨害する問題について検討した。NMR スペクトルで不要なプロトンシグナルについて Water suppression Enhanced through T1 effect (WET) 法で消去し、NMR スペクトルのダイナミックレンジを有効に活用することでさらに高感度・高精度化が可能であるか検討した。その結果、現状のパルス系列では高い定量精度が得ることができなかった。したがって、WET-qNMR による高感度・高精度化については、パルス系列全体の見直しが必要であることがわかった。

### (3) qNMR による有害物質等の純度決定とデータベース化

qNMR により有害化合物(主に農薬類)の純度検定を行った。41 品目の市販農薬標準品又は市販試薬についてその絶対純度を測定した結果、その約 25% の製品の絶対純度が 95% を下回ることがわかった。この結果より、市販標準品にラベル付けられている純度が絶対量を必ずしも示しているわけではないことが明らかとなった。市販製品には純度値が 50% を下回るものも数品目観察され、このような製品を定量用標準品として用いた場合には、大きな測定誤差を生じていることが示唆された。

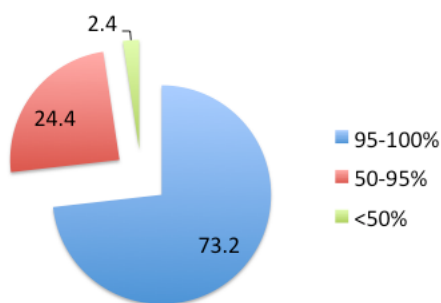


図 1 市販農薬標準品(41 製品)の絶対純度の分布

また、qNMR を微量成分のモニタリングや多変量解析に応用するに当たり、検出感度以外にも以下の問題がある。試料中に観察される測定対象化合物とそれ以外の化合物のシグナルの重複の取扱に関する問題である。すなわち、質量分析計(MS)では、測定対象の分子イオンを指標にした同定・定量が可能であるのに対し、NMR では、分子上の原子核の構造情報が複雑なスペクトルとして観察されるため、測定対象の化合物の化学シフトやスピン結合等の情報がない場合や数種の化合物が混合している場合には、NMR 単独での同定・定量が非常に困難である点である。この問題は、化合物ライブラリーの拡充により解決可能であると考えた。qNMR スペクトルでは、測定対象の化合物の分子構造に関わらず、分子内の化学シフトの異なる各プロトンシグナルの高さおよび面積比はすべて定量的に観測される。そこで、各測定対象化合物のスペクトル情報のライブラリーを作成した。混合物中の化合物の同定だけでなく定量を視野に入れ、多くの既存 NMR データベースで採用されている化学シフトおよびスピン結合情報以外に、観察されたすべてのシグナルについての分子内強度比、濃度等を入力し、各化合物の化学シフト(ppm)と分子内シグナル強度比(signal top int. %)を XY 座標に展開した 2 次元データとのフィッティングの度合いにより、混合物中の化合物の同定・定量を可能とする化合物ライブラリーとした。数種の化合物を混合したモデル試料を用いて検証実験を行った。実測スペクトル上の各シグナル頂点の化学シフト(ppm)とシグナル強度比(signal top int. %)を抽出し、化合物ライブラリーとのフィッティング条件として 3 点以上のシグナル頂点の XY 座標がほぼ一致するものを候補化合物とした結果、複数成分を同定・同時定量することが可能であることが確認された。

現在までに、qNMR スペクトルデータベースに農薬を中心として約 100 種の有害化合物を登録した。qNMR 多変量解析で検出された化合物の同定には、NMR スペクトル解析に関する専門的な知識を要求するが、このデータベースを用いることで、登録された化合物については簡便に同定・定量可能となると思われる。

本研究課題により得られた成果は、関連する学会・論文等を通じて順次発表しており、国内外より注目されている。実際に、本法の一部の成果については、バリデーションを実施し、食品添加物公定書の標準品の純度試験法として採用され、また、第 16 改正日本薬局方第一追補の参考情報に qNMR の手法が記載されるに至っている。更に qNMR を用いた標準物質の供給体制の整備が進み、現在では国内外の試薬メーカーより本手法を応用し

て純度検定された標準品の供給が開始されている。今後、NMR を用いた定量分析法やモニタリング技術の発展が期待されている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① 杉本直樹, 田原麻衣子, 末松孝子, 三浦亨: NMR による有機化合物の絶対定量の可能性. 食品衛生学雑誌, 総説査読有, 52, J228-J233 (2012).  
<http://www.shokuhineisei.jp/journal/j5302jp.html>
- ② 田原麻衣子, 末松孝子, 早川昌子, 合田幸広, 小西良子, 杉本直樹: 定量 NMR によるトリコテセン系マイコトキシン類市販試薬の純度決定. *Mycotoxins*, 査読有, 62, 111-119 (2012).  
DOI: 10.2520/myco.62.111
- ③ 田原麻衣子, 杉本直樹, 大槻崇, 多田敦子, 穂山浩, 合田幸広, 西村哲治: 定量分析値の信頼性確保のための qNMR を用いた市販試薬の純度決定. *環境化学*, 査読有, 22, 33-41 (2012).  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jec/22/1/22\\_33/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jec/22/1/22_33/_pdf)
- ④ 杉本直樹: 分析対象の有機化合物の純度は大丈夫ですか? 定量 NMR による絶対純度測定法の開発. *日本薬理学雑誌*, 総説査読有, 137, 232-236 (2012).  
DOI: 10.1254/fpj.137.232
- ⑤ 杉本直樹, 多田敦子, 末松孝子, 有福和紀: 定量 NMR を用いた有機化合物の絶対定量法の開発と食品分析の信頼性の確保. *FFI ジャーナル*, 総説査読有, 215, 129-136 (2010).  
[http://www.ffcr.or.jp/zaidan/FFCRHOMEN.nsf/pages/ffij-j215\(2\)](http://www.ffcr.or.jp/zaidan/FFCRHOMEN.nsf/pages/ffij-j215(2))

[学会発表] (計 12 件)

- ① 杉本直樹: <sup>1</sup>H NMR の公定書への関わり. 定量 NMR クラブ第 1 回会合(招待講演) (2012. 12, 東京)
- ② 杉本直樹, 田原麻衣子, 大槻崇, 多田敦子, 佐藤恭子, 河村葉子, 合田幸広, 五十嵐良明, 穂山浩: qNMR スペクトルデータベース構築の検討. 第 49 回全国衛生化学技術協議会年会 (2012. 11, 高松)
- ③ 永津明人, 山崎満里奈, 仁田朱音, 長谷部裕子, 田中理恵, 水上元, 羽佐田桂子, 山崎壮, 杉本直樹, 西村哲治: qNMR を用いた生薬成分の定量. 第 40 回生薬分析シンポジウム (2011. 12, 大阪)
- ④ 杉本直樹: 核磁気共鳴 (NMR) 法を利用した定量技術と日本薬局方試薬への応用

-NMR による天然有機化合物の定量分析とその役割. 第 40 回生薬分析シンポジウム (招待講演) (2011. 12, 大阪)

- ⑤ 杉本直樹: 定量 NMR の天然物分析への応用. 平成 23 年度試験検査センター技術研修会 (招待講演) (2011. 12, 東京)
- ⑥ 杉本直樹: qNMR の食品・天然物分析への応用～波及効果と現状～. 第 4 回食品薬学シンポジウム (招待講演) (2011. 10, 東京)
- ⑦ 杉本直樹, 田原麻衣子, 久保田領志, 小林憲弘, 清水久美子, 合田幸広, 西村哲治: NMR による汚染物質のモニタリング技術の検討. 第 48 回全国衛生化学技術協議会年会 (2011. 11, 長野市)
- ⑧ 田原麻衣子, 小林憲弘, 久保田領志, 清水久美子, 杉本直樹, 合田幸広, 西村哲治: NMR による環境汚染物質市販標準品の純度評価. 環境科学会 2011 年会 (2011. 9, 西宮)
- ⑨ 河野桂子, 吉田貴光, 杉本直樹, 山崎壮, 西村哲治, 永津明人, 水上元: qHNMR 法による「ベニバナ赤色素」中の carthamin の定量. 日本食品化学学会第 17 回総会・学術大会 (2011. 5, 東京)
- ⑩ 恩智弘和, 田原麻衣子, 久保田領志, 清水久美子, 山形一雄, 杉本直樹, 西村哲治: qNMR による残留農薬試験用標準品の純度検定に関する研究. 第 45 回日本水環境学会年会 (2011. 3, 札幌)
- ⑪ 杉本直樹, 田原麻衣子, 多田敦子, 久保田領志, 清水久美子, 山崎壮, 河村葉子, 合田幸広, 西村哲治: qNMR に基づく有機化合物の微量分析の検討. 第 47 回全国衛生化学技術協議会年会 (2010. 11, 神戸)
- ⑫ Sugimoto, N.: Innovation of Analytical Technique for food Chemistry and Safety. 第 10 回国際計量シンポジウム (招待講演) (2010. 5, 東京)

[その他]

日本環境化学会論文賞受賞(平成 25 年 7 月)  
田原麻衣子, 杉本直樹, 大槻崇, 多田敦子, 穂山浩, 合田幸広, 西村哲治: 定量分析値の信頼性確保のための qNMR を用いた市販試薬の純度決定. *環境化学*, 22, 33-41 (2012).  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jec/22/1/22\\_33/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jec/22/1/22_33/_pdf)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

杉本直樹 (SUGIMOTO NAOKI)

国立医薬品食品衛生研究所・食品添加物部第 2 室・室長

研究者番号: 50300918