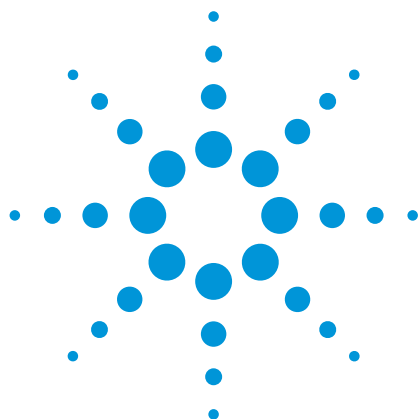




簡単、精密で正確な定量を実現する NMR

アプリケーションノート

著者

Ronald Crouch
David Russell
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara CA 95051
USA

概要

VnmrJ 3.1 ソフトウェアの新しい qNMR ツールと外部標準によるキャリブレーションを用いた、きわめて高い確度と精度の定量 NMR を実施しました。定期的キャリブレーションにより、99.9 % という高い確度と 0.59 % という優れた精度が得られます。また、一連の測定ごとにキャリブレーションを実施すれば、100 % の確度と 0.35 % の精度が得られます。

はじめに

小分子有機化合物の定量分析には、さまざまなテクニックを使用できます。もっとも一般的なテクニックは、クロマトグラフィ分離後に分光学的検出 (UV 可視、蒸発光散乱など) や質量分析検出 (質量分析など) により分析対象物を検出する方法です。それぞれの検出メソッドには、使用上、いくつかの面で利点がありますが、いずれのテクニックにも、レスポンスファクター即ちマトリックス効果などの障壁があります。汎用的なクロマトグラフィ検出手法は存在していません。

構造解析でもっとも頻繁に使用される NMR は、定量に不可欠なツールとして重視されるようになってきました。共鳴シグナルの積分強度がそのシグナルで表される原子核数に直接比例するため、NMR は定量的に用いた場合にもっとも効果を発揮します。また、スペクトル全体のすべての水素原子が同じ感度を持つため、定量結果の算出にあたって、化合物に特化した減衰係数やキャリブレーションを必要としません。NMR は合成物質や生合成物質、ファインケミカル、医薬品のほか、体液中の代謝物、異化生成物、内因性化合物の濃度測定に用いられています¹。定量 NMR (qNMR) は、メタボロミクス、創薬および医薬品分析、天然物質分析で特に効果があることが明らかになっています²。



Agilent Technologies

定量 NMR は、多くの分析ラボでルーチン定量ツールとして使用するために必要な確度と精度を備えています。内部標準による化学参照テクニックは正確な定量が可能ですが、このテクニックは時間がかかるうえに、サンプルの汚染も生じます。確度と精度の高い定量結果を得るために、ERETIC (Electronic Referencing to access in vivo Concentrations)、PIG (Pulse Into Gradient)、ARTSI (Amplitude-corrected Referencing Through Signal Injection)、QUANTAS (Quantification by Artificial Signal) といった複数の電気シグナルを標準にするアプローチも報告されています。しかし、これらのメソッドは、対象範囲やエラー発生率などの面で制約があります³⁻⁷。

確度と精度の高い小分子有機化合物の qNMR は、外部濃度標準と 1D スペクトルの積分値のみを用いて、容易に実現できます。ただしそのためには、安定性と直線性の優れた NMR プラットフォームが必要となります。このアプリケーションノートでは、Agilent NMR システムの独自機能を用いれば、ほぼすべての有機化学サンプルにおいて、簡単に正確な絶対定量が可能になることを紹介します。Agilent VnmrJ 3.1 ソフトウェアと OneNMR プローブ、DirectDrive コンソールを用いて小分子有機化合物の定量をおこなう方法を説明します。OneNMR プローブは、溶媒や誘電性に加え、サンプル液高の変化に対する耐性がきわめて優れています。1 回のキャリブレーション測定のみで、96.98~102.12 % という確度 (実際濃度の %) と、0.59~1.07 % という精度 (% 標準偏差) が得られます。一連測定の一部としてキャリブレーションデータを採取し、ラボ環境の微細な変化を考慮に入れば、さらに高い確度と精度 (99.48~100 % および 0.35~0.60 %) が得られます。

実験手法

標準と試薬

Sigma-Aldrich からイブプロフェンを購入し、DMSO-d₆ (重水素原子 6 個を含むジメチルスルホキシド) を用いて濃度 200.00 mg/mL (969.5 mM) で原液を作成しました。この原液を希釈し、濃度 515 μM までの 9 種類のサンプルを作成しました。サンプルセットには、DMSO-d₆ 溶媒のみを含むブランクサンプルも含まれています。Sigma-Aldrich からカフェインを購入し、D₂O を用いて 52.11 mM の原液を作成しました。D₂O を用いて原液を希釈した溶液を作成しました。

機器

イブプロフェン定量実験には、5 mm OneNMR プローブと 7600-AS サンプルチェンジャーを備えた Agilent 500 MHz DirectDrive NMR スペクトロメータを使用しました。すべてのサンプルを 25 °C に温度調節し、データを採取しました。プローブは初めにキャリブレーション標準にあわせてチューニングし、それ以後のすべての測定においてこの状態を維持しました。カフェイン定量実験には、5 mm OneNMR プローブと 7600-AS サンプルチェンジャーを備えた Agilent 400 MHz DirectDrive NMR スペクトロメータを使用しました。各実験前に、キャリブレーション標準にあわせてプローブをチューニングしました。

分析パラメータ

各機器に用いたパラメータを表 1 に示しています。

表 1. Agilent NMR スペクトロメータ条件

シングルキャリブレーション	
機器	Agilent Direct Drive 500 MHz NMR、5 mm OneNMR™ プローブ搭載
励起パルス	12.1 μs @ 57 dB; 90° ティップアングル
レシーバゲイン	各サンプルで自動調整
スキャン回数	1
動作周波数	499.86 MHz
取り込み時間	3.0 秒
フーリエ数	256k
アポダイゼーション	指数関数、0.3 Hz 線幅広がり
マルチキャリブレーション	
機器	Agilent Direct Drive 400 MHz NMR、5 mm OneNMR™ プローブ搭載
励起パルス	11.5 μs @ 59 dB; 90° ティップアングル
レシーバゲイン	20 dB
スキャン回数	1
動作周波数	399.92 MHz
取り込み時間	4.0 秒
フーリエ数	256k
アポダイゼーション	指数関数、0.3 Hz 線幅広がり

結果と考察

外部標準キャリブレーション

アジレントのコンソールでは、レシーバパスでの直接シグナルデジタル化が採用されています。この設計アーキテクチャにより、内部参照シグナルを使わずに、外部標準キャリブレーションのみを用いて、高品質の絶対定量データを得るのに必要な安定性と直線性を実現しています。

キャリブレーションには、10~100 mM の任意の既知濃度サンプルを使用で

きます。サンプルには、他のすべてのシグナルと良好に分離できる適度なシャープさのシグナル、またはシグナルグループが含まれている必要があります。また、キャリブレーションに使用されるシグナル原子核の総数が既知でなければなりません。その後、90 度のパルスを用いた 1 回のスキャンにより 1D スペクトルを採取し、キャリブレーションに使用されるシグナルを含む領域を積分します。サンプル濃度と原子核数の積を算出し、得られた積を Integral Value フィールドに入力し、Set Integral Value ボタンをクリックして (図 1)、こ

の積分領域の値を手動で設定します。その後、qEstimate コマンドを用いれば、未知サンプルの濃度測定に必要なすべてのパラメータをプローブファイルに導入できます。

これらの値がプローブファイルに導入されたら、キャリブレーションが完了し、クリック 1 回でサンプル濃度にアクセスできるようになります。キャリブレーションプロセスの詳細な説明については、VnmrJ 3.1 オートメーションユーザーガイドの定量ツールの章に記載されています。

キャリブレーション標準の簡単な積分

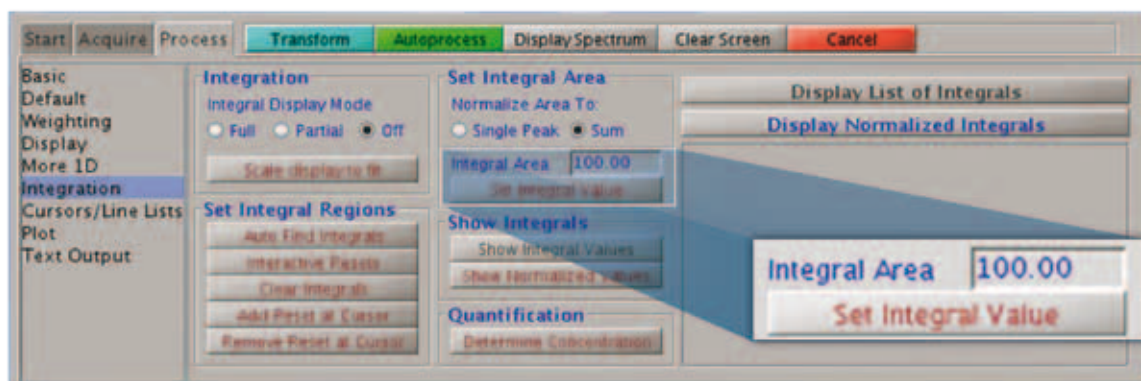


図 1. Process タブの Integration パネルにある積分領域設定用のインターフェースツール

ルーチン qNMR 用の定期的キャリブレーション

新しい qNMR ツールを用いて、許容範囲の確度と精度でサンプルを定量するためには、最低 1 回のプローブのキャリブレーションが必要となります (または、90 度パルス幅で定期的キャリブレーションをおこなう必要があります)。積分エラーは $0.25 + (100/\text{SN})^8$ という方程式により概算できるため、積分エラーを 1 % 未満にするためには、最低 150/1 のシグナル/ノイズ比 (S/N) が求められます。確度と精度が重要となる場合には、キャリブレーションおよび各分析に用いるスペクトルの S/N を考慮する必要があります。

ルーチン qNMR におけるシングルキャリブレーションの利用を説明するために、DMSO-d₆ を用いて濃度 15.17 mM のイブuproフェンのキャリブレーション標準を作成し、5 mm NMR チューブに入れました。また、濃度 132 mM ~ 500 μM の 9 種類のサンプルも作成しました。標準サンプルの濃度と 1.33 ppm におけるメチル二重線の強度をインプットとして用いて、qEstimate キャリブレーションをおこないました (図 2)。

プローブのキャリブレーションが完了したのち、一連の濃度のサンプルの自動取り込みをおこないました。システムがルーチンオートロック、オートシム、オートゲイン機能を実行したのち、各サンプルのシングルスキャン ¹H NMR スペクトルを採取しました。各サンプルで順番にデータを採取してから、一連のサンプル全体を繰り返し分析し、各サンプルにつき最低 20 回分のデータを採取しました。

適切な外部標準スペクトルピークを積分するキャリブレーションステップ

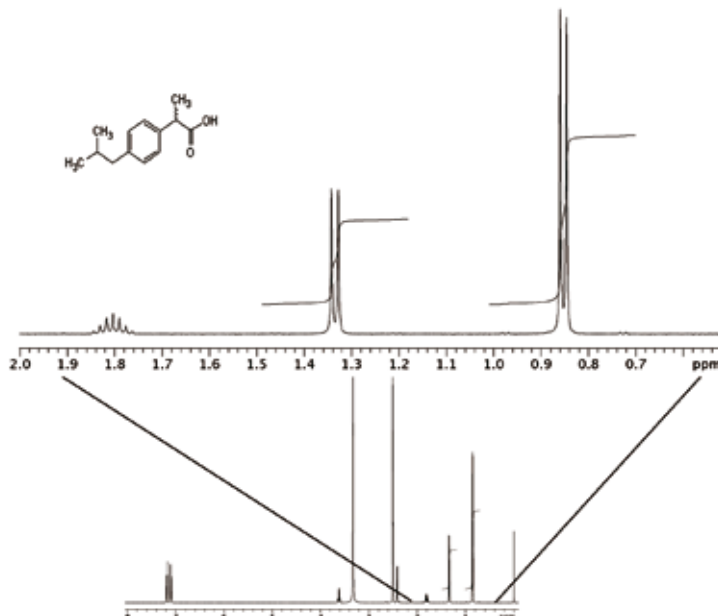


図 2. 表 2 で示した濃度のイブuproフェンのキャリブレーションおよび定量に用いたイブuproフェンの ¹H NMR スペクトル (下図) と、0.5~2 ppm の領域の拡大図 (上図)。1.33 ppm でメチル二重線が、0.84 ppm まででイソブチルメチル二重線が観測されています。イブuproフェンの構造も示しています。

ソフトウェアで簡単に濃度測定にアクセス

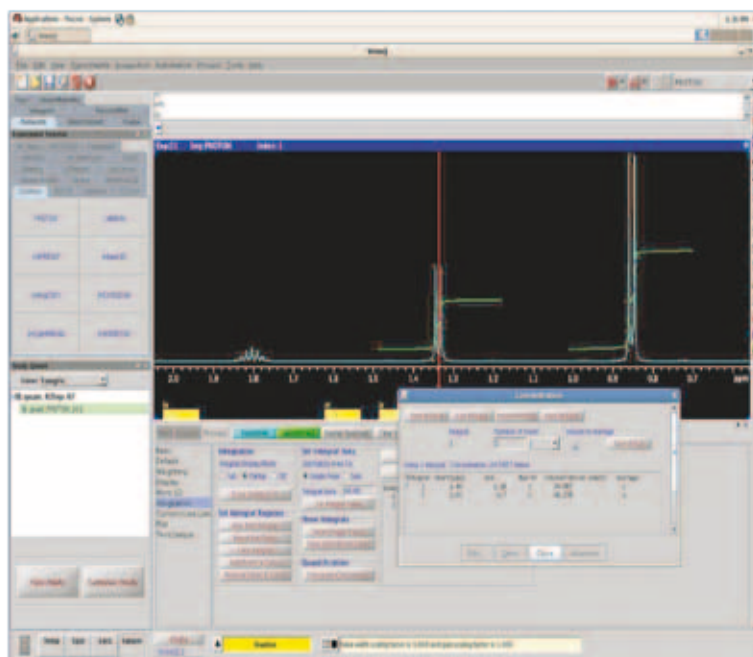


図 3. **Determine Concentration** ボタンを用いて、Concentration ポップアップウィンドウを開きます。このツールを使えば、双方向的にスペクトル内の各積分領域の多重度を決めて、濃度の最終的な計算に含める領域を選択できます。

図 3 は、Process タブの Integration パネルにある Determine Concentration ボタンから **Determine Concentration** ツールにアクセスした場合に表示されるウィンドウを示しています。スペクトルの各積分領域が表示されます。また、適切な多重度を双方向的に決めたあとに、各積分領域を濃度計算用のリストに追加することもできます。単一サンプルの分析の場合は、このワークフローを手動で導入する方法が、シンプルで簡単、かつ迅速な方法です。

今回の実験は 180 を超えるスペクトルで構成されるため、自動処理マクロを用いて、1.3 ppm 近傍のメチル二重線と 0.8 ppm 近傍のイソブチル二重線にあたる領域を選択し、多重度 (それぞれ 3 および 6 プロトン) をもとにこれらの領域の積分をスケールリングし、これら 2 つのシグナルをもとにサンプルの濃度を算出したのち、得られた結果をカンマ区切りスプレッドシート (csv) ファイルに書き込みました。このマクロの例は、ソフトウェアのユーザーライブラリ (/vnmr/userlib/mac/lib/qEst2csv など) にあります。一連の測定では、データ解析のために、各ピークを独立した濃度測定として処理しました。

結果を表 2 に示しています。標準偏差は濃度範囲全体で 1 % 未満でした。この結果は、ほぼ 3 桁に及ぶ濃度範囲全体で高い直線性 ($R^2=0.9995$) が得られることを示しています (図 4)。

表 2. 一連の濃度のイブプロフェンの定量における確度と精度、シングルポイントキャリブレーションを使用

実際濃度 (mM)	平均測定濃度 (mM)	標準偏差 (mM)	確度* (実際濃度の %)	精度 (%SD)
0.515	0.531	0.006	96.98%	1.07%
1.03	1.049	0.008	98.13%	0.79%
2.06	2.098	0.012	98.14%	0.59%
4.12	4.171	0.024	98.77%	0.57%
8.24	8.269	0.048	99.65%	0.58%
16.49	16.571	0.103	99.51%	0.62%
32.98	33.014	0.293	99.90%	0.89%
65.97	67.813	0.492	97.21%	0.73%
131.94	129.141	1.091	102.12%	0.84%
総計			98.46%	0.74%

* きわめて高い濃度や低い濃度のサンプルでは、確度のロスが予想されることに注意してください。低い濃度では、取り込みシングルスキャンを使用したため S/N 比が悪くなり、積分エラーが予想されます。また、きわめて高い濃度のサンプルでは、放射減衰 (radiation damping) が影響を与える可能性があります。

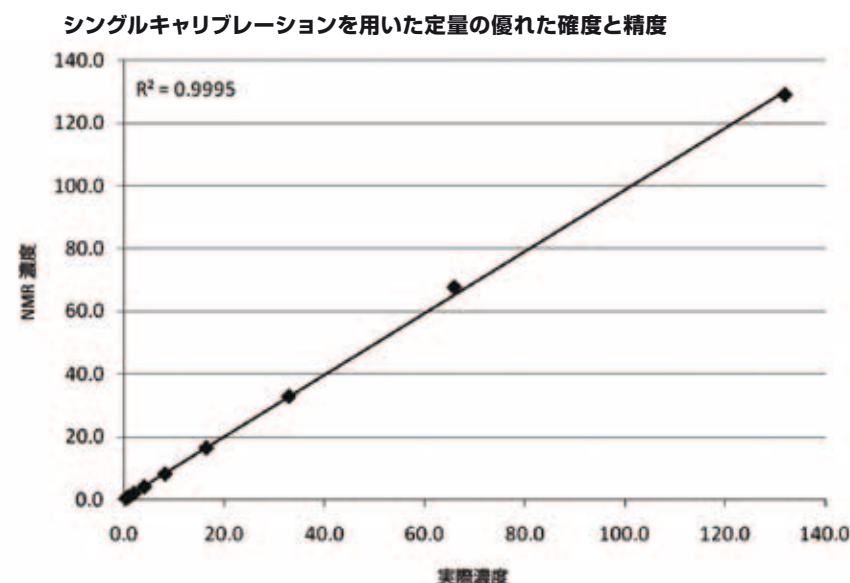


図 4. 3 桁を超えるダイナミックレンジにわたる濃度で、迅速で簡単、かつ正確なイブプロフェン測定が実現しています。実際濃度と測定濃度の相関性を示す R^2 値は 0.9995 です。

より高い確度と精度が得られる ランタイムキャリブレーション

各サンプル分析の前にキャリブレーションをおこなえば、より高い確度と精度の定量が行えます。この方法では、ラボ環境の変化に起因する安定性の微細な変動を補正することができます。キャリブレーション標準と分析対象サンプルで同じゲイン値を使えば、さらなる改良が実現します。分析対象サンプルにカフェインを用いて、3種類の濃度の標準を作成し、この方法で確度と精度の水準が高くなることを証明しました。各サンプルは 50.44 mM、51.91 mM、52.11 mM になるように調製しました。サンプル全体での濃度差は、3.3 % にとどまっています。3 個のサンプルの分析では、外部標準 (D₂O 中の 54.11 mM カフェイン) のオートキャリブレーション後に、各サンプルの定量をおこないました。シリーズとして 7 回の qNMR 分析をおこないました。このシリーズを繰り返すように NMR コンソールを設定し、3 時間ごとに全部で 630 回 (各濃度で 210 回ずつ) の分析を実施しました。表 3 に示すように、定量の全体的な確度は 99.94 %、全体的な精度は 0.51 % でした。この結果は、3 個のサンプルの濃度におけるごくわずかな差を認識できることを示しています。

次に、NMR チューブ内のサンプル液高が定量結果に与える影響を評価しました。前回の実験で用いた各チューブからサンプルを除去し、各チューブ内のサンプル液高をそれぞれ 48、35、30 mm としました (表 4)。その後、同じシリーズを繰り返すようにスペクトロメータを設定し、3 時間ごとに 16 時間にわたって、各サンプルについて全部で 35 回の分析をおこないました (qNMR 分析 7 回、各分析において、外部標準を用いたオートキャリブレーション後に 3 種類のサンプル定量を実施)。OneNMR プローブを用いれば、

表 3.3 種類のカフェイン濃度の定量における確度と精度、複数のランタイムキャリブレーションを使用

実際濃度 (mM)	サンプル液高 (mm)	平均測定濃度 (mM)	標準偏差 (mM)	確度 (実際濃度の %)	精度
52.11	54	52.16	0.27	99.85%	0.52%
50.44	45	50.70	0.21	99.48%	0.42%
51.91	37	51.99	0.31	99.90%	0.60%
総計				99.74%	0.51%

表 4. 確度と精度におけるサンプル液高の影響

実際濃度 (mM)	サンプル液高 (mm)	平均測定濃度 (mM)	標準偏差 (mM)	確度 (実際濃度の %)	精度
52.11	48	52.13	0.19	99.96%	0.35%
50.44	35	50.44	0.17	100.00%	0.49%
51.91	30	—	—	—	—
総計				99.98%	0.42%

分析結果の確度や精度を悪化させずに、サンプル液高を 35~54 mm の範囲で変更できることを確認しました (表 4)。サンプル 3 では、サンプル液高 (30 mm) が低すぎてルーチンシムを実行できなかったため、有用なデータは得られませんでした。

この 2 つ目の実験をサンプル 1 とサンプル 2 で繰り返し、取り込み中にバイレブルブロードバンド ¹³C ディカップリングを用いて、¹³C サテライトピークを消去しました⁹。各シリーズを繰り返すようにスペクトロメータを設定し、2 時間ごとに 28 時間にわたって、各サンプルについて全部で 98 回の分析をお

こないました (qNMR 分析 7 回、各分析において、外部標準を用いたオートキャリブレーション後に 2 種類のサンプル定量を実施)。図 5 の下図は、¹³C をディカップルしない参照スペクトルを示しています。¹³C サテライトと ¹²C シグナルが明確に分離しているのがわかります。図 5 の上図では、¹³C サテライトが完全にデカップリングされて、¹²C メインシグナルに統合されているのがわかります。ブロードバンド ¹³C ディカップリングに起因するノイズ/エラーが生じる可能性があるにもかかわらず、定量の確度と精度は依然としてきわめて良好でした (表 5)。

表 5. 確度と精度における ¹³C ディカップリングの影響

実際濃度 (mM)	サンプル液高 (mm)	平均測定濃度 (mM)	標準偏差 (mM)	確度 (実際濃度の %)	精度
52.11	54	52.09	0.20	99.96%	0.37%
50.44	35	50.44	0.17	100.00%	0.49%
総計				99.98%	0.43%

¹³C ディカップリングでも高い定量精度と精度を維持

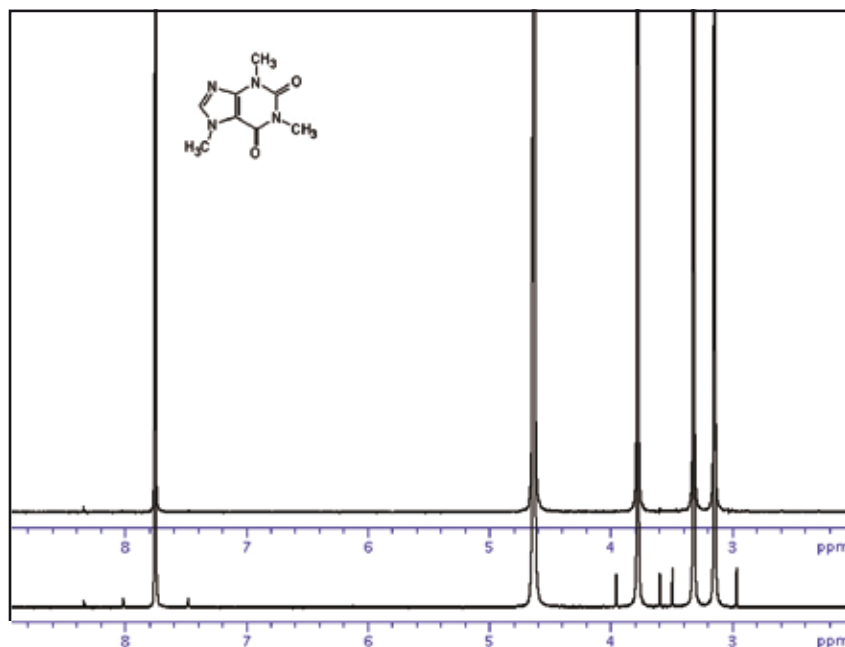


図 5. ¹³C ケミカルシフト領域 240 ppm をディカップリングできるバイレベルブロードバンド ¹³C ディカップリングを用いた場合 (上) と用いない場合 (下) に得られたカフェインサンプル (構造も示しています)。いずれの実験でも、プロトン NMR 取り込み時間を 3.6 秒としました。ディカップリングは、Experiment Selector の Std1D タブにある BilevelDEC 実験プロトコルを用いておこないました。

結論

この NMR 分析は、定量測定に求められるあらゆる特性を持っています。特異性、選択性、感度、直線性、広いダイナミックレンジ、単位当たりの反応係数、そしてもっとも重要である、プロトンを持つあらゆる有機化合物に対応できる汎用的な検出を備えています。定量分析で NMR を用いる場合のおもな障壁は、市販 NMR ハードウェアの直線性が低いことでした。サンプル毎のエラーを補正することは可能ですが、その場合は、内部標準物質の追加か、実験データへの外部参照シグナルの導入が必要となります。内部標準は使用には手間がかかり、別の測定エラーの原因となります。一方、外部標準シグナルを用いる手法は、対象範囲やエラー発生率などの面で大きな制約があります。

Agilent NMR システムは、レーザーのシグナルパスが完全にデジタル化された独自の設計で、幅広いサンプル濃度で比類のないシグナル直線性を実現します。OneNMR プローブも、溶媒や誘電性、サンプル液高の変化に対する耐性がきわめて高くなっています。アジレントはこの高水準のハードウェアと洗練されたソフトウェアを組み合わせ、定量分析用の優れたツールを開発しました。VnmrJ 3.1 ソフトウェアと既知濃度の外部標準による 1 回のキャリブレーション測定を行えば、確度と精度の高い絶対積分による NMR 定量を簡単かつ迅速におこなうことが可能です。小分子有機化合物では、96.98~102.12 % の確度と、0.59~1.07 % の精度が得られます。各サンプル分析でランタイムキャリブレーションをおこない、ラボの環境に伴う安定性の微細な変動を考慮に入れば、さらに高い確度と精度 (99.48~100 % および 0.35~

0.60 %) が得られます。それどころか、この測定では、ブロードバンド ¹³C ディカップリングでさえ、エラー発生率に大きな影響を及ぼしません。キャリブレーションパラメータの採取および保存、定量分析の設定やスケジュール決定、カスタムレポートの作成に対応するソフトウェア機能を使えば、この高い水準の確度と精度を簡単かつ迅速に実現し、レポートを作成することができます。

このアプリケーションノートは、プロトン NMR データを用いた定量についてのみ説明していますが、ここで紹介した新しい qNMR ツールは、周波数に依存しない設計になっています。任意の適当な原子核 (³¹P、¹⁹F、¹³C など) を用いて同じタイプのキャリブレーションをおこない、そうした原子核で採取したデータについて、同じワークフローを導入することも可能です。

参考文献

1. R. Espina, et al. "Nuclear magnetic resonance spectroscopy as a quantitative tool to determine the concentrations of biologically produced metabolites: implications in metabolites in safety testing", *Chem Res Toxicol.* **22**, 299-310 (2009).
2. G. F. Pauli, B. U. Jaki, D. C. Lankin. "Quantitative ¹H NMR: development and potential of a method for natural products analysis.", *J Nat Prod.* **68**, 133-49 (2005).
3. K.I. Marro, et al., "Synthetic signal injection using inductive coupling." *J Magn Reson* **194**, 67-75 (2008).
4. F. Ziarelli, et al., "General implementation of the ERETIC method for pulsed field gradient probe heads." *J Magn Reson* **194**, 307-12 (2008).
5. Mehr, K., et al., "Electronic referencing techniques for quantitative NMR: pitfalls and how to avoid them using amplitude-corrected referencing through signal injection.", *Anal Chem* **80**, 8320-8323 (2008).
6. Upton, R. in ENC. 2008. Asilomar, California USA.
7. I.W. Burton, et al. "Quantitative ¹H NMR with external standards: use in preparation of calibration solutions for algal toxins and other natural products." *Anal Chem* **77**, 3123-31 (2005).
8. F. Malz and H. Jancke. "Validation of Quantitative nuclear magnetic resonance." *J. Pharm. Biomed. Anal.* **38**, 813-823 (2005).
9. E. Kupce, R. Freeman, G. Wider, K. Wüthrich, "Suppression of Cycling Sidebands using Bi-level Adiabatic Decoupling." *J. Magn. Reson. A* **122**, 81-84 (1996).

詳細情報

ホームページ:

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ:

0120-477-111

本書に記載の製品仕様および説明は、予告なく変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2011
Published in Japan, April 8, 2011
5990-7601JAJP



Agilent Technologies