



学位論文要旨

氏名 加藤 毅



題目 Development of absolute quantification method by nuclear magnetic resonance using internal reference substance with SI traceability
(内部標準を利用する NMR 分光法による絶対定量法の開発)

要約

1 章

Absolute Quantification of Lipophilic Shellfish Toxins by Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Using Removable Internal Reference Substance with SI Traceability

脂溶性貝毒オカダ酸 (OA) を、信頼性の高い機器分析用標準品を作製するために、内標準法による水素核定量核磁気共鳴スペクトル (qNMR) を用いて精確に定量した。オカダ酸標準品の汚染を避けるために、あらかじめ、マレイン酸認証標準物質を内標準に用いた qNMR により値付けしたピリジン- d_6 及びメタノール- d_4 中の残存プロトンを、除去可能な内部標準として使用した。これにともない、SI 単位系にトレーサブルな OA の濃度を求めることができた。OA のオキシ炭素及び不飽和炭素上のプロトンに由来するシグナルから精確に面積を求めて定量計算に使用した。適切な繰り返し精度は、OA を 4 mg 以上使用して求めたスペクトルを解析して、シグナルの ^{13}C サテライト間から求めた面積を計算に使用することによって得られた。最良の純度は、20 mg の OA を使用した場合に 97.4% (0.16%RSD) であった。ほぼ同一のスペクトルが得られる OA のメチル化類縁体であるジノフィジリストキシン-1 も同じ方法によって定量した。

2 章

Quantification of Representative Ciguatoxins in the Pacific using Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

太平洋海域におけるシガテラ魚中毒 (CFP) に関与する毒素の絶対定量を、qNMR によって行った。シガトキシン-1B (CTX1B), 52-エピ-54-デオキシシガトキシン-1B (エピデオキシ CTX1B), シガトキシン-3C (CTX3C), 51-ヒドロキシシガトキシン-3C (51OHCTX3C), およびシガトキシン-4A (CTX4A) の 5 種類を対象毒素とした。あらかじめ、1, 4-BTMSB- d_4 認証標準物質を用いてピリジン- d_6 の残存プロトンを qNMR により値付けしたものを除去可能な内標準として使用した。前述のピリジン- d_6 を用いて毒素溶液を調製し、 ^1H NMR を測定した。ピリジン- d_6 の残存プロトン (内標準) と、毒素のプロトン間のシグナル強度を比較することにより、絶対定量を行った。定量計算に用いたシガトキシン (CTX) のプロトンシグナルは、不純物のシグナルから十分に分離しており、有効な強度を示すものを注意深く選択した。CTX1B およびその同族体を定量する上で、側鎖中のオレフィンプロトンは、定量計算への使用に適切であると判断した。定量化はナノモル溶液で達成可能であった。それぞれの毒素の定量値における推定誤差は、3~16%であった。NMR 管から試料溶液を回収し、メタノールで希釈したものを LC/MS 用の標準溶液として使用した。

(別紙様式第6号)

3章

Quantitative ^{31}P NMR Method for Individual and Concomitant Determination of Phospholipid Classes in Polar Lipid Samples

リン脂質クラスの個別定量を達成するために、内標準を使用する定量 ^{31}P NMR 法を検討した。既報で報告された方法に基づいて、EDTA を含むアニオン性界面活性剤（コール酸ナトリウム）溶液にリン脂質標準物質もしくは健康食品を分散させ、試験溶液を調製した。各リン脂質クラスは、中性付近の試験溶液 $\text{pH}6.90 \pm 0.04$ および温度 $30.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ で再現性のある化学シフトを示した。 ^{31}P NMR を使用して測定した合成ホスファチジルコリンの含量は、 ^1H NMR によって測定して得た定量値と一致した。 ^{31}P NMR の測定条件（パルス遅延時間および積算回数）は、大豆及び卵黄レシチンの主要なリン脂質クラスであるホスファチジルコリンだけでなく、リゾリン脂質を含むマイナーなリン脂質も同時に定量できるように最適化した。ブタの脳、酵母および大豆由来の市販の極性脂質試料中のリン脂質クラスを、上記の条件を用いて個別に定量した。ホスホセリン標準物質を内標準として使用することにより、決定したリン脂質クラスの絶対モル量には、SI 単位系へのトレーサビリティを付与することができた。次いで、各リン脂質クラスが 2 分子のステアリン酸を構成脂肪酸として含有すると仮定して、リン脂質クラスの本モル量を絶対量 (wt%) に変換した。 ^{31}P NMR により求めた各リン脂質クラスの総量は、モリブドブルーによる比色定量によって得られたものと良好に一致した。 ^{31}P NMR によって得られた極性脂質試料における主要リン脂質クラスの定量値は、既存法である二次元薄層クロマトグラフィー (2D-TLC) を用いた分取精製による定量法と幅広い目線では一致していたが、 ^{31}P NMR の方がより分離が良いと判断された。 ^{31}P NMR は試験操作が簡便であり、分析者を選ばないだけでなく、そのスペクトルからは 2D-TLC よりも有益な情報を得られるなどの優位性を有していた。

(備考) 日本語 (2000 字以内) または英語 (500 ワード以内) にまとめて記載してください。