

食品・環境中の有害成分分析のための有機標準物質の拡充

— 定量 NMR 法による効率的な計量トレーサビリティの実現 —

井原 俊英^{*1}、齋藤 剛¹、杉本 直樹²

食品や環境中の有害成分の正確な分析には標準物質が不可欠であるが、特に有機化合物に関しては、多様かつ急増するニーズに標準物質の供給が追いつかない状況にある。そこで、分析技術を高度化することによって、1つの基準となる物質から多様な有機化合物の定量を可能とする方法を開発した。具体的には、水素原子を対象とする核磁気共鳴法に着目し、異なる化学シフトの水素原子の信号量を精密に比較できるように改良することで、水素原子の基準から多様な有機標準物質に対して実用的な不確かさでの校正を可能とした。この成果により、国家標準物質の種類を最小限にできる効率的な計量トレーサビリティの実現の見通しを得た。

キーワード: 化学計量、トレーサビリティ、標準物質、核磁気共鳴法、一次標準測定法

Expansion of organic reference materials for the analysis of hazardous substances in food and the environment

– Realization of an efficient metrological traceability using the quantitative NMR method –

Toshihide Ihara^{*1}, Takeshi Saito¹ and Naoki Sugimoto²

Reference materials are indispensable for accurate analysis of hazardous substances in food and the environment. For organic substances, however, the dissemination of reference materials is hopelessly unable to catch up with today's rapidly proliferating analytical needs. To solve this problem, analytical techniques were improved to develop a method in which a single primary reference material could provide accurate quantitative measurements for a wide variety of organic compounds. In pursuit of this goal, we turned our attention to the ¹H NMR method. We improved upon the method to allow precise comparisons of signal quantities from protons with different chemical shifts, enabling calibration at an acceptable level of uncertainty for a variety of organic reference materials using a primary reference material for protons. This result opens the prospect of highly efficient metrological traceability, reducing the required number of national reference materials to a minimal level.

Keywords: Chemical metrology, metrological traceability, reference material, nuclear magnetic resonance spectroscopy, primary method of measurement

1 はじめに

今日、私たちは様々な化学物質に囲まれて生活を営んでいる。それら化学物質をより安全に使用し、人の健康を損ねたり環境に悪影響を与えたりしないよう、種々の法律が定められている。特に近年は国民の安全・安心への意識の高まりから、規制対象となる化学物質の種類を増加させたり規制値をより厳しくするなど、規制強化が加速している。例えば食品衛生法では、2006年5月に食品残留農薬に関してポジティブリスト制度^{用語1}が施行され、これまでの約250種類から国内外で流通する約800種類の農薬等が規制の対象となる大幅な規制強化が図られた。それとあわせて、規制物質を測定するために必要な新たな分析技術が公定分析法^{用語2}として次々と制定され、食品分析や環境

分析においてガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) や液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS) などの多成分同時測定が可能な高度な分析機器を用いるケースが急速に増えている。これを受けて、化学物質の検査・試験機関においても GC/MS や LC/MS の導入が加速している。

これらの分析機器は多成分の化学物質を同時測定できるという機能を有する一方、分析結果の信頼性を確保するためには、測定試料の分析対象成分毎に機器の感度を校正する必要がある。そのためには、「ものさし」の役割を果たす標準物質を分析対象成分の種類だけ用意することになる。検査・試験結果の正しさが特に問われるこの種の分析においては、「ものさし」の信頼性はきわめて重要であり、認証標準物質^{用語3} またはそれに準じた標準物質の使

1 産業技術総合研究所 計測標準研究部門 〒305-8563 つくば市梅園 1-1-1 中央第3、2 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部 〒158-8501 世田谷区上用賀 1-18-1

1. National Metrology Institute of Japan, AIST Tsukuba Central 3, Umezono 1-1-1, Tsukuba 305-8563, Japan *E-mail: t.ihara@aist.go.jp, 2. Division of Environmental Chemistry, National Institute of Health Sciences Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku 158-8501, Japan

Received original manuscript October 6, 2008, Revisions received December 26, 2008, Accepted December 26, 2008

用が強く推奨されるため、規制対象物質の増加にあわせてそれら標準物質の整備を急ぐべき状況にある。

2 現行の標準物質の問題

標準物質の計量学的に妥当な手順による値付けは、国際単位系の定義（この場合、物質質量）へのトレーサビリティ^{用語4}を確保した測定法によって実現される。この作業は、通常、各国の国家計量標準機関^{用語5}によって行われており、生産される標準物質は国家標準物質と呼ばれる。国家標準物質は一般に、最高の正確さを持ったものであるため、労力、時間、経費をかけて周到に整備される。分析を実際に行う検査・試験機関に国家標準物質そのものを直接供給することは、通常、量的にも経済的にも合理的ではないので、国家標準物質で二次標準物質を校正し、さらに二次標準物質で実用標準物質を校正するといったピラミッド型構造を利用して上位標準から下位標準を多数生産することで、ねずみ算的に標準物質の数（量）を増やし、正しい「ものさし」が多くの実用者に行き渡るトレーサビリティ体系が構築されている。このような概念は、例えば、天秤の校正に用いる分銅のトレーサビリティ体系と基本的には同じであり、標準物質に特有のものではないが、現在の標準物質のトレーサビリティ体系には分銅とは異なる次のような特徴がある。

図1に我が国で行われている河川水・水道水の水質試験等に用いられる揮発性有機化合物分析用の標準物質のトレーサビリティ体系を示した。国家標準物質は揮発性有機化合物23種類を成分に含む溶液の形で製造され、国際単位系へのトレーサビリティは凝固点降下法により値付けされた成分毎の純物質を介して確保される。二次標準物質および実用標準物質も国家標準物質と同様に揮発性有機化合物23種類を成分に含む溶液であるが、上位標準から下位標準への校正は成分毎に行われるため、トレーサビリティ体系は一対一対応になっており、

標準物質の種類に関してはピラミッド型構造をしていない。すなわち、ある成分の国家標準物質で同じ成分の二次標準物質を校正し、さらにこの二次標準物質で同じ成分の実用標準物質を校正する。同じ化学物質同士の一対一の校正であるため、ガスクロマトグラフ法のような市販機器による分析技術を用いて実用標準物質までの校正を高い信頼性で行うことができ、このメリットにより、現在、世界中でこのようなトレーサビリティ体系が運用されている。

一方、このトレーサビリティ体系では、分析を行う化学物質それぞれに対応して多種類の国家標準物質を揃えなくてはならないため、特に多大な時間と労力、経費を要する国家標準物質の開発がトレーサビリティ体系の整備のボトルネックになっている。したがって、先に述べたポジティブリスト制度のように化学物質の規制強化によって急増する標準物質のニーズに機動的に対応するには、新たな発想に基づく効率的なトレーサビリティ体系の構築が必要である。

3 研究の目標—効率的なトレーサビリティ体系の構築

現在の標準物質のトレーサビリティ体系は、国家標準物質をよりどころとし、同じ化学物質どうしの校正の連鎖によって成り立っているために、多種類の化学物質の分析に標準物質の整備が迅速に対応できない問題があることを前章で述べた。この問題は、多種類の実用標準物質の校正を最小限の種類の上位標準で行うことができれば解決するが、現行の同じ化学物質どうしの校正を前提とした校正技術では対応できず、新たな校正技術の開発と導入が必要である。すなわち、分子構造によらずに化学物質の量を測れるようなユニバーサルな校正技術が求められる。

そこで本研究では、新たな校正技術を開発することで、化学物質毎の国家標準物質を整備することなく、分析現場で使用する多種類の実用標準物質までのトレーサビリティを確保できる効率的な体系の構築を目標とした。具体的には、近年の規制強化における化学物質のほとんどが有機化合物であることを踏まえ、有機化合物を対象としたユニバーサルな校正技術の開発を行った。

4 目標を実現する分析方法—定量NMR法

4.1 求められる校正技術

物質質量の絶対値は、国際単位系にトレーサブルな測定によって得られる。このような測定法は一次標準測定法^{用語6}と呼ばれている。一次標準測定法の資格を有する分析法には表1に示すものがあり、一次標準直接法と一次標準比率法に分類される。一次標準直接法は、「物質質量の基準となる他の化学物質を用いずに、自分自身で目的の化学物質の物質質量を測れる方法（絶対測定法）」であり、電量分析

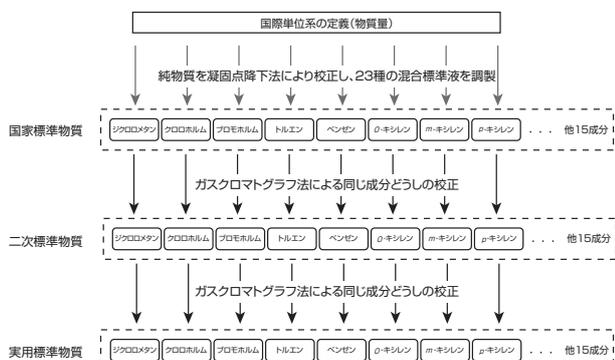


図1 揮発性有機化合物分析用の標準物質のトレーサビリティ体系

法^{用語7}、重量分析法^{用語8} および凝固点降下法^{用語9}がある。これらの分析法は物質量の絶対値が得られるので国家標準物質の値付けには適しているが、一般に分析の迅速性に欠け、また分析できる物質の種類が限られるなど、本研究で目標とするユニバーサルな校正技術としては適格とは言えない。一方、一次標準比率法は、「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れる方法」であり、すでに実用化されているものに滴定法^{用語10}及び同位体希釈質量分析法^{用語11}がある。また、分析技術として十分に確立されていないものの、原理的に一次標準比率法の資格を有する分析法として、定量核磁気共鳴法（定量 NMR 法）がある。

以上の測定法について、多様な実用標準物質の校正という視点で見直した場合、①市場の要求する不確かさを満足しつつ迅速性や簡便性などに優れること、②様々な化学物質（本研究では有機化合物全般）に適用可能な高い汎用性を有すること、などが要件となる。そこで、現在十分に確立されていないものの、①、②の要件をクリアするという課題に関しては、定量 NMR 法が最も可能性が高いと考え、有機化合物における実用標準物質のユニバーサルな校正技術として確立を図ることとした。

4.2 定量NMR法の原理

核磁気共鳴（NMR）法は化学物質の分子構造を決定するための代表的な分析法の1つであり、タンパク質の解析

等、分子構造の決定に多くの成果を上げている。NMR で得られる化学シフト（原子の結合状態や環境に依存する共鳴ピークの位置）やスピン結合（化学結合の数、結合次数及び結合角に依存するピークの分裂）の情報は、その化学種や近傍の環境を示唆する。これらに加え、化学シフトの異なる各ピークの面積比は、一般にそのピークに寄与する原子の数の比を示すので、特に水素原子の核磁気共鳴に着目した¹H NMR では図2に示すように、有機化合物の定性分析に重要な各炭素に結合する水素原子の数の比を簡単に確認することができる。

従来、この NMR の特性はもっぱら分子構造の決定に使われており、水素原子の数を整数比で確認するに留まっている。しかし、発想を逆転して、もし有機化合物の分子構造が分かった状況であれば、各共鳴周波数のピークに寄与する水素原子の数が明確なため、化学物質の定量分析に応用することが可能であると考えられる。すなわち、測定対象物質が含まれている試料溶液中に別の基準となる化学物質を加えて¹H NMR 測定を行うと、図3に示すように2種類の化学物質のスペクトルが混ざって得られる。このとき、加える化学物質（以下、基準物質という）の質量（秤量値）、分子量、純度が既知であれば、図中のピーク I の面積に相当する物質質量（分子数）が分かるので、これを基準として測定対象物質の分子数を求めることができる。具体的には、例えば基準物質の水素原子 I と測定対象物質

表1 一次標準測定法の分類とその特徴

分析法	一次標準直接法			一次標準比率法		
	電量分析法	重量分析法	凝固点降下法	滴定法	同位体希釈質量分析法	(定量核磁気共鳴法)
測定法の概要	特定の物質を電気分解させたときの電気量を測定	溶液中での特定の物質の沈殿量を測定	融点付近における融解量と温度の関係を測定	化学反応を用いて特定の物質を測定	安定同位体を用いた質量分析	化学シフトの異なる ¹ Hピーク的面積比を測定
主な対象物質	金属元素	無機塩	高純度有機化合物	酸、塩基、元素	微量金属、微量有機化合物	有機化合物
基準となる物質	不要	不要	不要	滴定原理に即した基準が必要	対象物質毎に必要	¹ Hの基準となるものが必要
不確かさ(1%未満)	○	○	○	○	○	△(未知数)
迅速性	×	×	×	×	○	○
汎用性	×	×	×	×	×	○

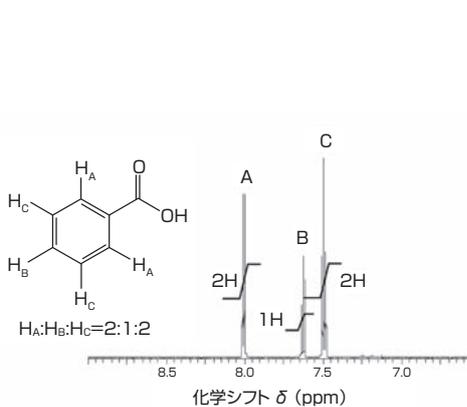


図2 ¹H NMRによる化学物質の定性分析

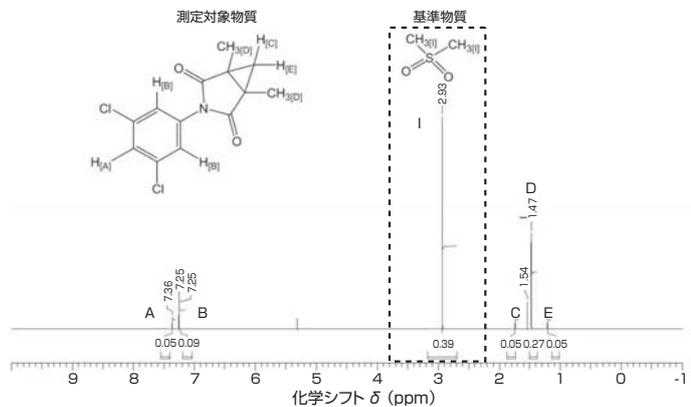


図3 ¹H NMRによる化学物質の定量分析

の水素原子 D の 1 分子当たりの数は同じ（どちらも 6）なので、ピーク I の面積とピーク D の面積比がそれぞれの分子数の比になる。ゆえに、 $[\text{ピーク I の面積}] / [\text{基準物質の分子数}] = [\text{ピーク D の面積}] / [\text{測定対象物質の分子数}]$ 、という関係が成り立ち、基準物質の分子数が既知であるので、測定対象物質の分子数が得られ、測定対象物質の質量（秤量値）と分子量から測定対象物質の純度が求まる^[3]。したがって、定量 NMR 法は、原理的に測定試料中にある水素原子の数、言い換えれば物質中にトレーサブルな測定値を得ることが可能な一次標準比率法である。

図 3 の例は、測定対象物質および基準物質それぞれを純物質とし、それらを質量比で混合後に重水素化溶媒に溶解させて定量 NMR 法による測定を行い、測定対象物質の純度を求めたものであるが、実用標準物質は溶液状態で供給されるものも少なくない。ある程度の濃度（0.1 % 程度）であれば、適切な重水素化溶媒に実用標準物質を溶解することによって定量 NMR 法が適用でき、得られた測定対象物質の分子数、加えた試料溶液の質量および測定対象物質の分子量から、実用標準物質の濃度を求めることも可能である。

4.3 定量 NMR 法の可能性

定量 NMR 法の一次標準比率法としての可能性については、ドイツの連邦材料・試験研究所 (BAM) が早くから着目しており、当所を含め物質質量諮問委員会^{用語 12}のメンバーである各国の計量標準機関が興味を示していた。そこで、2001 年にイギリスの国立化学研究所 (LGC) と BAM が幹事機関となり、主要国から 10 機関が参加して水溶液中のエタノールの定量分析に関する国際比較^{用語 13}が行われた際に、ガスクロマトグラフ法 (GC) など従来からの測定とあわせて定量 NMR 法による測定も同じ試料について実施された^[4]。試料は幹事機関の LGC において精密な質量測定により調製され、エタノールの濃度は 1.072 mg/g ±

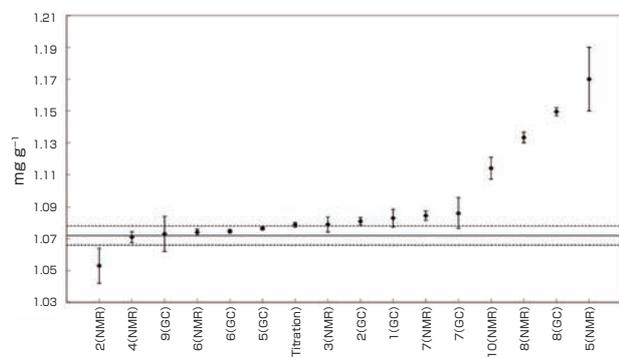


図 4 水溶液中のエタノールの定量分析に関する国際比較の結果
図中の実線が調製値、点線が調製値の不確かさ、当所の結果は No. 6 参加機関 (順不同) : BAM (独)、KRIS (韓)、LGC (英)、LNE (仏)、NIST (米)、NMI (蘭)、NMIJ (日)、NRC (加)、NRCCRM (中)、VNIM (露)

0.006 mg/g であったが、この調製値は伏せられた形で参加機関に試料が配布された。また、定量 NMR 法による測定を行うことを表明した参加機関には BAM から濃度が既知の基準物質 (3-トリメチルシリルプロピオン酸ナトリウム- d_4) の重水溶液が別途配布された。

測定結果は幹事機関に個別に報告され、図 4 はそれらをまとめたものである。各データ点が報告値であり、それに付随するエラーバーは、それぞれの参加機関が見積もった測定の不確かさ (95 % 信頼区間) である。定量 NMR 法の結果に関しては、ほとんどの機関で不確かさが % レベルであり、調製値から大きく外れる機関も散見されるなど、GC など従来からの分析技術と比べて正確さは劣るものであった。したがって、この国際比較の結果からは、定量 NMR 法は技術的に未だ十分に確立されたものとは判断されず、その後、国際的には特に注目されることなく今日に至っている。

一方、図 4 を見ても分かるように、当所の報告した測定結果は調製値と良く一致し、不確かさも他の参加機関の定量 NMR 法と比べて十分に小さかったことから、我々は定量 NMR 法に対して異なる見解を持つに至った。国際比較の際に当所が幹事機関に報告した定量 NMR 法の不確かさが図 5 である。不確かさの要因ごとにその大きさを評価したものであるが、最も大きい要因は幹事機関から配布された ^1H の基準物質の濃度の不確かさである。当所における定量 NMR 法の測定の不確かさはそれよりも小さいことから、より正確な基準物質を当所が自ら用意すれば測定の不確かさをさらに小さくできる見込みがあることが明瞭になった。

ここで注目すべき点は、国際比較に用いられた GC など従来からの分析技術は同じ種類の化学物質の間でのみ濃度を比較する校正技術であるために、被測定物質と同じ種類の基準物質が必要であるのに対して、定量 NMR 法は異なる種類の化学物質の間で物質質量を比較できる校正技術であるために、基準物質は測定対象物質と同じ種類の

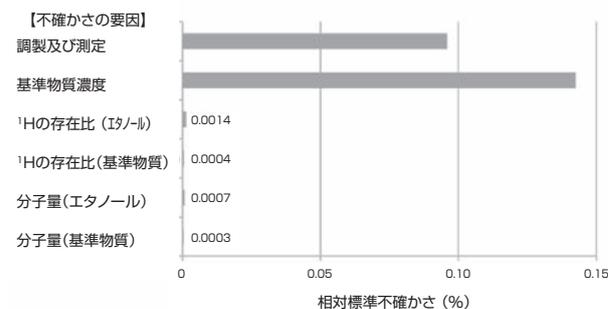


図 5 水溶液中のエタノールの定量分析に関する国際比較における ^1H NMR の不確かさ

化学物質である必要がないという点である。このことから、定量 NMR 法は ^1H の基準となる化学物質が最低限 1 種類は必要であるが、水素を含む有機化合物であれば基本的に測定可能であることから、広範囲な適用可能性が期待できる。そこで筆者らは、定量 NMR 法に特化した要素技術を開発し、それらを統合することで、実用標準物質の校正に広く用いることができると考えた。

5 定量NMR法の実現のための要素技術とその統合

5.1 コアとなる要素技術

定量 NMR 法をユニバーサルな実用標準物質の校正技術として実現するために、筆者らが行った要素技術の開発とそれらの統合プロセスを図 6 に示す。定性分析に目的を特化して分析技術を開発する場合と、定量分析に特化する場合には、NMR に求める要件に大きな差がある。定量 NMR 法では、測定の迅速性や信号の S/N 向上よりも、分析しようとする原子の数に信号強度が正確に比例することを最優先に考え、コアとなる要素技術を選択し、条件設定を見直した。

一般に NMR の信号は、スピン-格子緩和時間 (T_1) と呼ばれる寿命で緩和する（すなわち励起状態から基底状態に戻る）が、 T_1 は水素原子の周囲の環境（結合状態など）によって異なる。定性分析を目的とした NMR の場合は、信号の S/N を向上させるために高い頻度でマイクロ波パルス照射し、信号を積算する。しかし、そのような場合にはしばしば遅延時間が T_1 よりも短くなり、必ずしも全ての水素原子が基底状態に戻らないうちに再励起することになる。その結果、測定対象物質と基準物質のそれぞれ着目した水素原子の T_1 に差がある場合、それぞれの原子の数に正確に比例したピーク面積が得られない。そこで、遅延時間とピーク面積の関係を測定したところ、測定対象の水素原子の T_1 の 6 倍以上の遅延時間をとることで、NMR 信

号の 99.9 % 以上が緩和し、安定したピーク面積比が得られることを実験的に確認した^[5]。測定対象の水素原子のうち最も長い T_1 よりも十分に長い遅延時間を取ることで、これまでよりも数倍の測定時間が必要となったものの、水素原子の T_1 によらないピーク面積比が得られた。

また、通常、NMR では信号の S/N を向上させるために、オーディオフィルタを用いて測定の帯域幅を狭めることが行われる。ところが、フィルタは帯域幅の全域でフラットな感度特性を示すわけではなく、特にフィルタ帯域の端で感度低下が著しく、化学シフトによっては数%以上の感度低下を生じる。したがって、測定対象物質と基準物質の着目した水素原子の化学シフトの差が大きいほど、正しいピーク面積比が得られにくい。そこで、化学シフトによらないフラットな感度を得るために、オーディオフィルタに関しては、これまでの定性的な NMR では 10 ppm ~ 20 ppm であったスペクトルの観測幅を 100 ppm 程度に広げるとともに、その 60 % ~ 70 % がカバーされるフィルタを設定した。帯域幅の広いフィルタを設定することで、 ^1H NMR 信号の存在する範囲（通常、0 ppm ~ 10 ppm）についてはフィルタ特性が十分に平坦な部分を使い、期待したようにフラットな感度が得られた。このようなフィルタの設定は一方で、大量のデータを取り込まなければならないので、通常の NMR では考えられない設定ではあるが、測定値の正確さを最優先してこれまでの常識にとらわれないアプローチにより問題点を解決した^[5]。

なお、上記 2 つの要素技術以外に、位相補正の仕方、ベースラインの引き方や積分範囲の設定などに注意することが測定値の再現性を向上する上で重要であった。

5.2 仲介物質の活用

定量 NMR 法による測定では ^1H の基準物質を必要とするが、それは測定対象と同じ化学物質である必要はない。基準物質（ここでは純物質に限定）に求められる要件は、

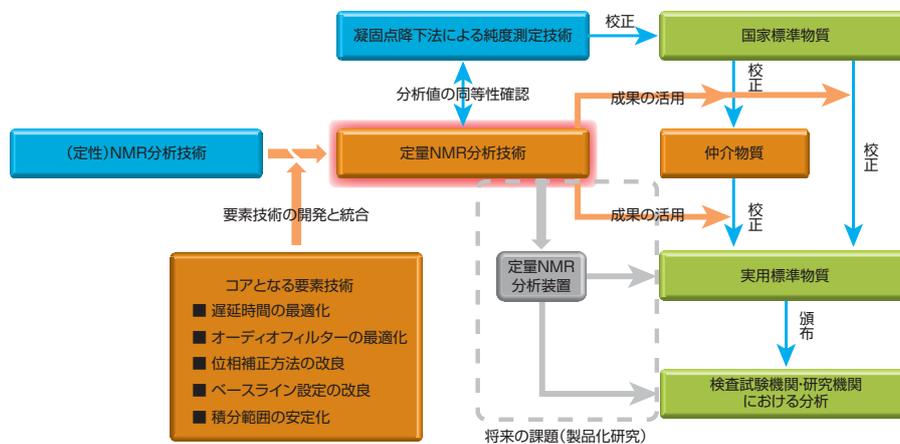


図 6 ユニバーサル校正技術構築のための要素技術の開発とそれらの統合プロセス

①可能な限り不純物が少なく、不確かさの小さな純度値が付与されていること、②できるだけ多種類の溶媒に溶け易く、溶液中で安定なこと、③揮発性（昇華性）や吸湿性が低く質量測定（秤量）がしやすいことであるが、さらに、④測定対象物質と化学シフトが重ならないことである。現有の国家標準物質の中にも基準物質としての条件を満たしているものがあるが、②に関しては基準物質と測定対象物質の両者が溶解する適切な溶媒が見つからない場合があり、④に関しても測定対象物質に依存することから、測定対象物質によって基準物質を使い分けなくてはならない。

測定対象物質に合わせていくつもの基準物質を用意するのは、実質的に国家標準物質の数を減らすことができない。そこで、定量 NMR 法の特徴を生かし、図 7 のような校正方法でこの問題を解決した。すなわち、基準物質および測定対象物質と化学シフトが重ならない化学物質を仲介物質として選定し、ステップ 1 として、基準物質（国家標準物質）を用いて定量 NMR 法により仲介物質中の特定のピークを校正する。ステップ 2 として、校正された仲介物質の特定のピークを基準に測定対象物質の校正を行った。この二段階の校正方法をとれば、トレーサビリティの基点となる国家標準物質の種類をできるだけ少なくとどめることができる。また、仲介物質は標準物質の要件である均質性や長期の安定性を必ずしも確保する必要がないため、測定対象物質の測定に適した物質を幅広く選定できる。定量 NMR 法における仲介物質の導入は、要素技術を統合する過程で重要な技術開発であった。

5.3 統合した技術の評価

5.1 節と 5.2 節で述べたように要素技術を統合して定量 NMR 法による校正技術を構築したが、その技術の信頼性を従来から確立されている方法と比較することにより検証した。まず、市販されている高純度の有機化合物から何種

類かを測定試料として選択し、従来から確立されている一次標準直接法であり、かつ当所で国家標準物質の値付けに用いている凝固点降下法（表 1 参照）によって純度値を求めた。次に同じ試料を今回開発した定量 NMR 法で測定して純度値を求め、両者の測定値が互いの不確かさの範囲内で一致するかどうかを確認した。

一連の定量 NMR 法による測定の基準物質には、米国国立標準技術研究所 (NIST) から頒布されている国家標準物質である安息香酸 (NIST SRM 350a, 99.9958 % ± 0.0027 %) を用いた。安息香酸を基準物質としたときに主な化学シフトのピークが重なってしまう測定対象物質に関しては、ジメチルスルホン又は 1,4-BTMSB- d_4 (1,4-ビス-トリメチルシリルベンゼン- d_4) を仲介物質として用いる二段階校正とした。なお、基準物質と測定対象物質を溶かす溶媒には、溶媒自身および溶媒中の不純物に含まれる水素原子による妨害の少ない重水素化溶媒の中から、基準物質および測定対象物質の溶解性等を考慮し、それぞれ適切と思われるものを選び、1000 mg/L 程度の濃度の溶液を調製した。

得られた測定結果を表 2 に示すが、定量 NMR 法で測定した純度値の多くは凝固点降下法で測定した結果よりも不確かさが大きかったものの、両者の値は不確かさの範囲内でおおよそ一致し、定量 NMR 法による校正技術が十分な信頼性を持っていることが検証された^[6]。また、定量 NMR 法の測定の不確かさは 0.3 % ~ 1.2 % ($k=2$: 95 % 信頼区間) の間にあり、純度の測定技術としては凝固点降下法と比べて精度の点ではやや劣るものの、凝固点降下法では測定できない物質に対しても校正が可能であるなど広範な有機化合物に対して適用でき、かつ市場が実用標準物質に要求する不確かさを満足する水準である。

6 今後に残された課題

国家標準物質をよりどころとし、同じ物質どうしで一对一の校正を行うトレーサビリティ体系から、一对多の校正が可能なトレーサビリティ体系への転換を図るため、中核技術として多種類の有機化合物に適用できるユニバーサルな校正技術の開発を行った。定量 NMR 法を有望な方法としたシナリオを設定し、照射パルスの遅延時間やオーディオフィルタを最適化することなどにより要素技術を開発し、市場の要求する不確かさを満足する校正技術としての適格性を検証した。このとき、仲介物質を活用することで、物質量の基準となる国家標準物質の種類を最小限にできることが分かり、最終的に図 8 に示すような効率的なトレーサビリティ体系の実現の見通しが得られた。

本体系は、国家標準物質から実用標準物質まで同じ物

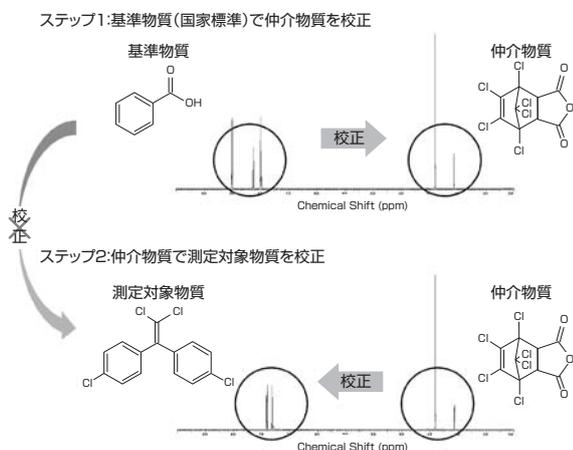


図 7 定量 NMR 法における仲介物質の活用

質を一对一に整備する必要のないきわめて効率的なトレーサビリティ体系であり、標準物質に関しては世界的にも類を見ない新しい発想である。したがって、多くの実証実験を通して広く成果を公表するとともに、本体系の中核である定量 NMR 法に関しては、分析法の標準化を進めることに加え、新たに国家計量標準機関間の国際比較を実施することなどにより定着させることが必要である。

同時に、社会で必要とされる多様な実用標準物質の校正を産業界自身で行える体制に早期に移行するためのインフラ整備も重要である。このためには、定量 NMR 法の基準物質となる使いやすい国家標準物質を実際の適用事例とともに供給することに加え、定量 NMR 法による測定のパラメータセットからデータ解析に至るまでの自動化ツールなどを用意することも必要である。

7 将来の展開

定量 NMR 法は、今後、測定装置の製品化を伴うことにより大きな市場性を有すると思われる（図 6：将来の課題）。すなわち、定量 NMR 法に特化した安価で使いやすい装置の開発や¹H 以外の他の核種への応用などにより、実用標準物質の校正技術に留まらず、検査・試験機関や研究機関などにおける幅広い分野での有機化合物の定量分析に活用が期待される。

また、例えば、生理活性物質や生薬などの天然物に含まれる有効成分の定量的評価は、自ら単離した有効成分や対応する市販試薬を標準として使う場合が多いが、その純度（あるいは濃度）評価が不十分であることから測定値の信頼性が十分ではない。定量 NMR 法はこのように適切な標準が得にくい場合にも信頼性の高い有力な定量分析法になりうる（図 9）^[7]。

表 2 定量 NMR 法による有機化合物の純度測定結果

対象物質	凝固点降下法		定量 NMR 法				
	参照値 (%)	不確かさ (% $k=2$)	分析値 (%)	不確かさ (% $k=2$)	基準物質	仲介物質	溶媒
<i>trans</i> -Nonachlor	99.6	0.2	99.5	0.6	安息香酸	----	アセトン- <i>d</i> ₆
<i>cis</i> -Nonachlor	99.8	0.2	99.9	0.5	安息香酸	----	ジクロロメタン- <i>d</i> ₂
Oxychlorthane	99.9	0.1	99.3	0.5	安息香酸	----	ジクロロメタン- <i>d</i> ₂
Endrin	99.7	0.2	99.2	0.8	安息香酸	----	ジクロロメタン- <i>d</i> ₂
<i>trans</i> -Chlordane	99.8	0.3	99.5	0.6	安息香酸	----	ジクロロメタン- <i>d</i> ₂
<i>cis</i> -Chlordane	99.7	0.4	99.1	0.5	安息香酸	----	ジクロロメタン- <i>d</i> ₂
Trichlorfon (DEP)	99.7	0.3	99.6	0.5	安息香酸	----	ジクロロメタン- <i>d</i> ₂
Heptachlor	99.7	0.3	99.3	0.3	安息香酸	----	ジクロロメタン- <i>d</i> ₂
4,4'-DDT	99.6	0.3	99.9	1.2	安息香酸	ジメチルスルホン	アセトニトリル- <i>d</i> ₃
4,4'-DDE	99.7	0.3	99.8	0.7	安息香酸	ジメチルスルホン	アセトニトリル- <i>d</i> ₃
4,4'-DDD	99.8	0.2	99.9	0.6	安息香酸	ジメチルスルホン	アセトニトリル- <i>d</i> ₃
Procymidone	99.9	0.2	99.3	0.5	安息香酸	ジメチルスルホン	ジクロロメタン- <i>d</i> ₂
Fenobucarb (BPMC)	99.8	0.2	99.8	0.7	安息香酸	1,4-BTMSB- <i>d</i> ₄	ジクロロメタン- <i>d</i> ₂
Fenitrothion (MEP)	99.8	0.3	99.6	0.6	安息香酸	1,4-BTMSB- <i>d</i> ₄	ジクロロメタン- <i>d</i> ₂
α -HCH	99.6	0.3	99.2	0.6	安息香酸	----	ジクロロメタン- <i>d</i> ₂
β -HCH	熱分解のため測定不可		99.5	0.3	安息香酸	----	ジクロロメタン- <i>d</i> ₂
Atrazine	熱分解のため測定不可		99.7	0.7	安息香酸	1,4-BTMSB- <i>d</i> ₄	ジクロロメタン- <i>d</i> ₂
EPN	凝固しないため測定不可		99.4	0.7	安息香酸	1,4-BTMSB- <i>d</i> ₄	ジクロロメタン- <i>d</i> ₂
Diazinon	凝固しないため測定不可		99.8	0.7	安息香酸	1,4-BTMSB- <i>d</i> ₄	ジクロロメタン- <i>d</i> ₂
Malathion	凝固しないため測定不可		99.5	0.7	安息香酸	----	ジクロロメタン- <i>d</i> ₂
Etofenprox	凝固しないため測定不可		99.5	0.5	安息香酸	ジメチルスルホン	ジクロロメタン- <i>d</i> ₂

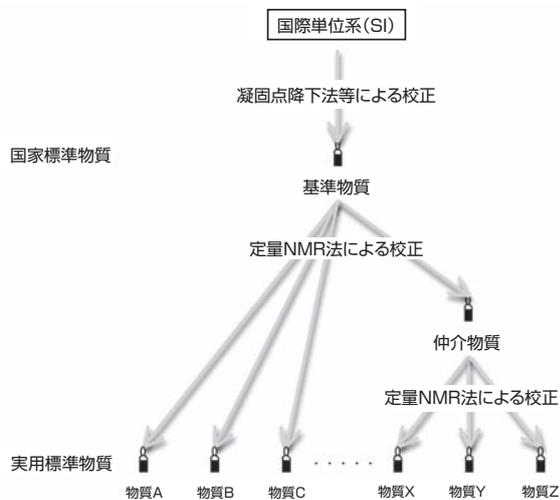


図 8 定量 NMR 法を中核技術とする効率的なトレーサビリティ体系

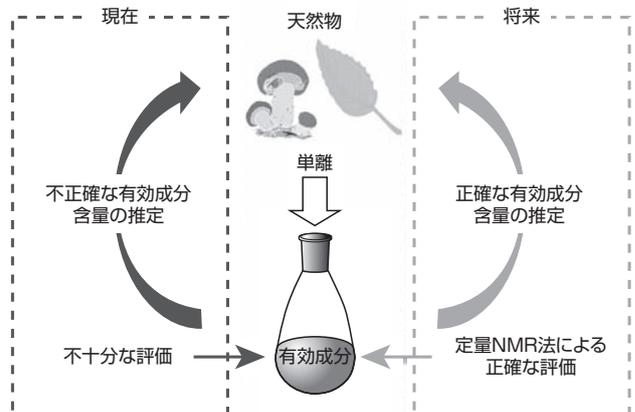


図 9 定量 NMR 法による天然物中の有効成分の定量的評価

さらに、ここで述べた有機化合物の校正技術における効率的なトレーサビリティ体系は、広がる標準物質のニーズに機動的に応えるための有力なスキームである。その中核技術としては、今のところ定量 NMR 法以外に可能性を示せていないが、合理的なトレーサビリティ体系を構築するためのユニバーサルな校正技術は他にも考えられるであろう。本論文がそのようなユニバーサルな校正技術開発の出発点になることを期待する。

謝辞

本研究成果のうち、有機塩素系化合物における測定結果は、中小企業知的基盤整備事業「ハロゲン系有機汚染物質の標準物質作成のための研究開発」によって得られたものであり、共同研究者である藤峰慶徳氏、平井哲也氏、能勢和聡氏（以上、大塚製薬株式会社）、小池昌義博士（産業技術総合研究所）に謝意を表します。また、農薬類における測定結果は、和光純薬工業株式会社からの委託研究である「トレーサビリティの確保された食品残留農薬関連標準物質の供給に関する研究」によって得られたものであり、試料の提供および評価等にご協力いただいた山田裕子氏、中尾慎治氏（以上、和光純薬工業株式会社）に謝意を表します。さらに、本論文における 6 章および 7 章で提案した内容は、共同研究「qNMR 標準化のための測定法の確立」ならびに「qNMR 普及のためのインフラの整備」によるものであり、西村哲治博士、棚元憲一博士、山崎 壮博士、多田敦子博士（国立医薬品食品衛生研究所）、末松孝子博士（日本電子株式会社）、有福和紀氏（日本電子データム株式会社）、上森仁志氏、大野桂二氏、吉田雄一博士（以上、和光純薬工業株式会社）、千葉光一博士、前田恒昭博士（以上、産業技術総合研究所）に謝意を表します。

最後に、本論文の執筆内容について、多くの貴重なご助言をいただいた衣笠晋一博士（産業技術総合研究所）に深く感謝いたします。

用語説明

用語 1: ポジティブリスト制度：一定量を超えて農薬等が残留する食品の販売等を禁止する目的で、食品衛生法の改正に基づいて 2006 年に施行された制度。人の健康を損なうおそれのない量（残留基準）が定められている農薬等はその基準値に従い、定められていないものは 0.01 ppm の一律基準が適用される。

用語 2: 公定分析法：試験機関や検体間における分析結果の比較を可能とするために、化学物質等の法規制とあわせて公示される公的な分析法。日本工業規格 (JIS)、日本農林規格 (JAS)、日本薬局方 (JP) などがあり、

堅牢性や汎用性などを重視して制定される。

用語 3: 認証標準物質：標準物質に関する国際的な指針である ISO ガイド 35 において、「一つ以上の規定特性について、計量学的に妥当な手順によって値付けされ、規定特性の値及びその不確かさ、並びに計量学的トレーサビリティを記載した認証書が付いている標準物質」と定義されている。

用語 4: トレーサビリティ：切れ目のない校正の連鎖を通して、参照標準（通常は国家標準）に関係づけることができる測定結果の性質のこと。食品等の流通の履歴管理と区別する意味で国際計量用語集第 3 版では「計量トレーサビリティ」と改訂されている。

用語 5: 国家計量標準機関：国の定める計量の標準を設定する研究機関で、我が国では産業技術総合研究所計量標準総合センターが該当する。

用語 6: 一次標準測定法：「最高の計量学的な特性をもち、その方法の操作が完全に記述され理解されるものであり、その不確かさが SI 単位を用いて完全に記述される方法」と定義されている分析法であり、国家標準物質の値付け等に利用される。

用語 7: 電量分析法：ファラデーの法則に基づき、特定の物質を電気分解させたときの電流および時間の測定から物質量を測定する方法。金属元素などの無機イオンの分析の他、微量水分の分析などにも用いられる。

用語 8: 重量分析法：試料中の目的成分のみが特異的に反応する試薬等を用いて分離し、得られた質量から目的成分を定量する分析法。一般的には、溶液中の特定成分を沈殿として分離する手法であるが、試料中の特性成分を気体として分離し吸着剤に吸収させて、その吸着量を質量として求める方法もある。

用語 9: 凝固点降下法：試料中に存在する不純物が凝固点を下げる効果を利用し、試料の凝固点降下度を温度および熱量の測定から求めることにより、試料中の不純物の物質分率を求める分析法。一般に高純度有機化合物の純度測定に用いられる。

用語 10: 滴定法：狭義には容量分析法のことを指し、試料と反応する基準となる物質を含む溶液を試料溶液中に滴下し、ある平衡点まで達するまでに消費した基準物質の量から試料溶液中の目的成分を定量する分析法。利用する化学反応によって、中和滴定（酸塩基滴定）、酸化還元滴定、錯滴定、沈殿滴定などがある。

用語 11: 同位体希釈質量分析法：目的成分を安定同位体でラベル化した成分を定量的に試料に加え、得られた目的成分およびその安定同位体成分の質量スペクトルの強度比から試料中の目的成分量を得る分析法。目的成分とその安定同位体の化学的性質がほぼ同じであることから、夾雑物の多い試料の精製工程の影響を排

除することができる（目的成分とその安定同位体成分の強度比が維持される）とされる。なお、目的成分の基準となる物質で安定同位体成分の濃度をあらかじめ得ておく必要がある。

用語 12:物質質量諮問委員会：メートル条約に加盟する機関からなる国際度量衡委員会傘下の諮問委員会の1つで、化学計量に関する問題を審議する委員会として1993年に設置された。

用語 13:国際比較：国家計量標準機関の校正測定能力および標準物質に付与する値の同等性の程度を確認するための試験所間比較。通常は研究的な国際比較（パイロットスタディ）から始められ、ある程度の技術的基盤が構築された後に、正式な国際比較である基幹比較に移行する。

参考文献

- [1] ISO Guide 35: *Reference materials – General and statistical principles for certification*, p.2, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland (2006).
- [2] 日本分析化学会編: *分離分析化学事典*, p.350, 朝倉書店 (2001).
- [3] G. Maniara, K. Rajamoorthi, S. Rajan and G. W. Stockton: Method performance and validation for quantitative analysis by ^1H and ^{31}P NMR spectroscopy. Applications to analytical standards and agricultural chemicals, *Anal. Chem.*, 70, 4921-4928 (1998).
- [4] 齋藤 剛, 井原俊英, 佐藤浩志, J. Harald, 衣笠晋一: ^1H 核磁気共鳴法による水溶液中のエタノールの定量に関する国際比較, *分析化学*, 52, 1029-1036 (2003).
- [5] T. Saito, S. Nakaie, M. Kinoshita, T. Ihara, S. Kinugasa, A. Nomura and T. Maeda: Practical guide for accurate quantitative NMR analysis, *Metrologia*, 41, 213-218 (2004).
- [6] T. Saito, T. Ihara, M. Koike, S. Kinugasa, Y. Fujimine, K. Nose and T. Hirai: A new traceability scheme for the development of international system-traceable persistent organic pollutant reference materials by quantitative nuclear magnetic resonance, *Accred. Qual. Assur.*, in press.
- [7] 杉本直樹, 末松孝子, 内海博明, 齋藤 剛, 井原俊英, 小島 豊, 伊藤澄夫, 佐藤恭子, 山崎 壮, 棚元憲一: qNMRを用いた天然色素カルミン酸の絶対定量, *日本生薬学会第55回年会講演要旨集*, 298 (2008).

執筆者略歴

井原 俊英 (いはら としひで)

1994年東京都立大学大学院工学研究科博士課程修了。1996年工業技術院物質工学工業技術研究所入所、揮発性有機化合物等の有機標準物質開発に従事。2002年～2003年NIST(米国標準技術研究所)にて、健康食品関連標準物質開発に従事。2005年～2006年BIPM(国際度量衡局)にて、有機化合物の純度評価技術開発に従事。2006年より、産業技術総合研究所計測標準研究部門標準物質システム科(現、計量標準システム科)に所属し、環境、食品、臨床検査分野における新たな標準供給システムを研究、現在に至る。本論文では、化学計量における新たなトレーサビリティ体系を構想、具体的なアプローチ手法を設計した。

齋藤 剛 (さいとう たけし)

2000年工業技術院物質工学工業技術研究所入所。有機化合物のスペクトルデータベース(SDBS)の高度化研究に従事し、現在はSDBSを統括している。入所以来、NMRを利用した研究を行っており、NEDO委託事業「ナノ計測基盤」では、NMRを利用した液中粒径計測の研究に従事した。現在は、NMRを用いた定量技術の高精度化研究と、この技術の汎用化に向けた課題に取り組んでおり、本論文では定量NMR法に関わる基礎的な技術構築を行った。

杉本 直樹 (すぎもと なおき)

1997年金沢大学大学院自然科学研究科博士課程修了。1997年国立衛生試験所(現、国立医薬品食品衛生研究所)入所、食品添加物等の規格設定に従事。2005年～2006年FDA(米国食品医薬品局)、CFSSAN(食品安全応用栄養センター)にて、国際標準化を目指した食品添加物の複合分析法の開発研究に従事。2008年より、国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部第三室長として、水道水質に関わる化学物質の規格基準の設定、分析法の開発に従事。本論文では定量NMR法の応用技術を担当、本技術を社会で広く活用するために必要な自動化ツールを提案した。

査読者との議論

議論1 全体的評価

コメント(小野 晃)

食品や環境中に含まれる有害な有機化合物を正確に分析する技術は、現在多様なニーズに追いつけず、困難な状況にあると思います。本研究で開発した定量NMR法とそれに基づく新しい効率的なトレーサビリティ体系はこの困難を打ち破るもので、大きな革新につながる可能性があるかと期待されます。

当初、従来からある定性を目的としたNMR装置を使って定量分析を始めたと思いますが、必要な要素技術に立ち戻って定量NMR法のコア技術を完成させた点で、本研究は優れた第2種基礎研究だと思います。

コメント(一條 久夫)

校正技術主体の効率的なトレーサビリティ体系への転換という大目標へ向け、シナリオを描きつつ着実に研究開発を続けられていることが、分かり易く記述されていると思います。

議論2 記述内容の絞り込み

質問・コメント(小野 晃)

定量NMR法は新しいトレーサビリティ体系を提唱するものであり、これだけでも十分な成果ですので、これを分かりやすく記述することに集中したほうが良いと思われます。凝固点降下法は、純物質の純度測定に使われるものとして簡単に記述してはどうでしょうか。

質問・コメント(一條 久夫)

本論文は、目標、社会とのつながり、要素等が明確に記されていると思います。「定量NMR法は適切(多くの物質に適用可能で市場の要求する不確かさの範囲)」、「凝固点降下法は不適(結晶化の問題)」と判断されたわけですが、判断の理由(結晶化の難しさや対象物質に限られる等)について、本研究を通して得られた知見をもとに若干説明を加えられた方が理解し易いように感じます。

回答(井原 俊英)

凝固点降下法と対比した論理展開を変更し、定量NMR法についての技術構築に絞り込む内容に書き改めました。なお、凝固点降下法については既に確立した技術として位置づけ、定量NMR法の妥当性検証のためとして記述しました。

議論3 シナリオと統合の明示

質問・コメント(小野 晃)

分野外の読者にも分かりやすいように、第2種基礎研究としての本

研究のシナリオと要素技術の統合を示す図を追加してください。

回答（井原 俊英）

ユニバーサルな校正技術構築のための要素技術の統合プロセスとして図6を作成しました。

議論4 基準物質の選択

質問・コメント（小野 晃）

表2の測定において、定量NMR法の基準物質に米国NISTの国家標準物質である安息香酸を用いていますが、産総研で既に多数整備した高純度の有機化合物の国家標準物質を使わなかった理由は何ですか。

回答（井原 俊英）

基準物質に求める要件は、5.2節で説明した通りですが、使用した米国NISTの国家標準物質である安息香酸（NIST SRM 350a）は、本文中に示した要件①～③に優れるという点で、現有する国家標準物質の中では定量NMR法に最適であると考えました。要件①に関しては、産総研の国家標準物質であるフタル酸水素カリウム（NMIJ CRM 3001-a）や1,4-ジクロロベンゼン（NMIJ CRM 4039-a）も匹敵する品質ですが、フタル酸水素カリウムに関しては有機溶媒に溶解しにくい点で要件②の点で不十分と判断し、一方、フタル酸ジエチルに関しては昇華性が高いため要件③の点で不十分と判断しました。現在、定量NMR法のために開発された国家標準物質はないので、要件①～③に加えて要件④にも優れる産総研の国家標準物質の開発を進めています。

議論5 最終的な基準物質の姿

質問・コメント（小野 晃）

定量NMR法を活用した場合、原理的には、最終的な基準物質となる国家標準物質は1種類でよいと述べられていますが、将来新しいトレーサビリティ体系が完成したときに、現実に国家標準物質は何種類くらい必要と予想していますか。そのとき具体的にどのような有機化合物が国家標準物質の有力候補と考えていますか。

回答（井原 俊英）

本研究では、開発に時間や経費を要する国家標準物質の種類を最小限にすることを優先したことから、仲介物質を用いた多段階の校正手法を提案し、これまで測定した有機化合物ではすべて安息香酸を基準物質としています。したがって、¹H NMR測定が可能な有機化合物に対しては、1種類の国家標準物質からトレーサビリティ体系を構築することは実際に可能であると考えています。

一方、このようなトレーサビリティ体系は、多段階の校正によって不確かさや手間が増えるというデメリットがあるので、高精度あるいは迅速分析のニーズが高いユーザが多ければ、極性や化学シフトの異なる何種類かの国家標準物質を用意し、可能な限り一段階の校正とする方向性も考えられます。

なお、水素原子を持たない有機化合物にも対応すべく、リンやフッ素など他の核種の定量NMR法の開発とそれに合わせた基準物質となる国家標準物質が必要と考えています。

議論6 仲介物質の調製と使用方法

質問・コメント（小野 晃）

仲介物質の使い方について質問します。将来新しい効率的なトレーサビリティ体系が完成したときに、仲介物質は産総研が整備・保管して適宜頒布するのでしょうか。あるいは仲介物質は、実用標準物質を調製する機関がそれぞれ調製するときに合わせて自分で適宜作成し、調製が終了したら廃棄するといったやり方を想定していますか。

回答（井原 俊英）

本論文では、仲介物質について、実用標準物質を開発・供給する

機関（標準物質生産者）が目的に応じて用意するものと位置付けています。この際、適切に評価を行うことで、試験の度に調製するのではなく、標準物質生産者自らの責任で一定期間保管することも可能と思われる。

また、7章で述べたように、定量NMR法が有機化合物の定量分析法として様々な機関で活用されるようになれば、用時調製的な仲介物質の運用にとどまらず、使いやすい仲介物質を標準物質として、産総研もしくは標準物質生産者が頒布することも考えられます。

議論7 定量NMR法と凝固点降下法の比較

質問・コメント（小野 晃）

表2の測定値に関して質問します。凝固点降下法では、純度の測定値が不確かさの上限で100%を超えるものは少ないのに対して、定量NMR法では多くのもので、不確かさの上限が100%を超えるという合理的でない結果になっています。凝固点降下法は、純物質に対してその不純物の量を直接測定する方法なので、100%を超えることが少ないと思いますが、一方、定量NMR法では、純物質をいったん1000 mg/L程度の濃度に薄めたのち、主成分の測定を行っています。これが100%を超えやすい原因ではないでしょうか。定量NMR法は溶媒中の成分の測定に適しており、純物質の純度測定にはむしろ向かない方法といえませんか。その意味では、図6の破線で囲った製品化研究では、定量NMR法は最も期待されるころと思いますが、著者はどのように考えますか。

回答（井原 俊英）

図5に示した定量NMR法の不確かさの要因では、調製の不確かさと測定の不確かさを分離して表していませんが、調製の不確かさは相対的に小さいものではありません。したがって、純度測定に適用する場合には、直接測定できる凝固点降下法と比べて溶液調製を伴う定量NMR法が不確かさの点で不利になることは否定できず、結果として不確かさの上限で100%を超える純度が得られることがあるのはご指摘の通りです（ただし、純度値に偏りがあるわけではないと考えています）。

一方、溶液の成分濃度測定には凝固点降下法は適用できないので、本来、定量NMR法の特徴が生かせる応用例であることもご指摘の通りですが、多くの有機溶媒が水素を含むので、水素原子を対象とするNMRにおいては、この影響の抑制が大きな課題となります。定量NMR装置の開発を含めた製品化研究において、溶媒中の水素原子の問題を解決し、溶液の成分濃度測定を実用レベルで可能とすることが、定量NMR法の定着の鍵を握っているかもしれないと考えています。

議論8 ユニバーサルな校正技術の他の可能性

質問・コメント（小野 晃）

7章「将来の展開」の中で、定量NMR法以外にもユニバーサルな校正技術がありうるという示唆をしていますが、現時点で可能性がありそうな校正技術には何があると考えますか。

回答（井原 俊英）

4.1節でユニバーサルな校正技術には、原理的に一次標準比率法物質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れる方法（の資格を有する分析法が必要であると述べています）。

分析技術として確立しているわけではありませんが、筆者らが検討しているその種の分析法の1つにクロマトグラフ法と発光分光分析法を組み合わせた手法があります。この分析法は、目的成分を含む試料をクロマトグラフ法により時間的・空間的に分離した後、化学物質ごとに高温のプラズマ中に導入、炭素原子、水素原子、酸素原子などに原子化し、例えば分光された炭素原子の発光量を測定するというものです。あらかじめ試料中に、一定量の炭素を含む基準物質を加えておくことで、基準物質自体も原子化されるので、物質量と炭素

の発光量が結びつけられ、目的成分の物質量が求められます。ポイントは分子種に依存しない原子化効率ですが、ガスクロマトグラフ法とヘリウムプラズマの発光分光分析法との組み合わせにおいて、現状では5%程度の不確かさ(95%信頼区間)であり、実用化には更なる改良が必要と考えています。

議論9 溶媒の重水素化の理由

質問・コメント (小野 晃)

4.2節に重水素化溶媒が用いられたことが記述されています。定量NMR法で溶媒を重水素化する理由をご説明ください。通常の水素の溶媒を使った場合には、定量NMR法はほとんど使えないと考えてよいのでしょうか。

回答 (井原 俊英)

本研究のように、測定核種として ^1H (プロトン)を利用する場合、通常の水素である ^1H を含む溶媒を用いると、溶媒由来の ^1H 信号が定量したい化合物の ^1H 信号と比較して非常に強くなり、装置のダイナミックレンジの関係で定量したい化合物の信号を精密に測定できないという問題があります。そこで、定量NMR法に限らず ^1H NMR測定では、通常、重水素化によって ^1H を無くした溶媒を用いること

で、この問題を解決しています。

一方、4.3節で例示したエタノールの定量分析に関する国際比較における測定試料の溶媒は、重水(D_2O)ではなくほぼ軽水(H_2O)なので、通常の測定条件設定では上述した問題が生じます。このような場合、溶媒(水)由来の水素原子共鳴位置に比較的強度の低いラジオ波を照射してこの信号を飽和させた直後に、通常と同様なパルス測定を行うプレサチュレーション法と呼ばれる技術を適用することで、妨害ピークを消去することができます。ただし、ここで利用したラジオ波のピーク選択性が低いため、照射位置と定量したい試料由来の信号の共鳴位置が近い場合には定量値の正確性が失われます。それ以外の場合でも、正確な定量値を得るためには照射強度や時間などを適切に設定することが必要なため、可能な場合は重水素化溶媒の使用が簡便かつ安全です。

なお、NMR測定では磁場の安定性を得るために、一般的に重水素化溶媒からの信号周波数が一定になるように磁場強度の調整を随時行っています(重水素ロック)。定量NMR法を含め、比較的長時間にわたる測定が必要で、かつ分解能の高いスペクトルを得るためには重水素ロックが不可欠であり、このため試料溶液が重水素化されていない場合は、重水素化溶媒の添加が必要です。