

LC-SPE-NMR による 複合系微量有機物の構造解析

大阪ラボラトリー 章 宏

LC-NMR 分析法は、混合物の分離と同時に各成分の核磁気共鳴 (NMR) スペクトルが得られるハイスループットの分析手法として利用されているが、感度不足や溶媒由来シグナルの影響が課題となっている。LC-SPE-NMR 分析法は、固相抽出法 (SPE: Solid Phase Extraction) にて目的成分を濃縮することにより、高感度かつ溶媒の影響を低減した測定ができる微量有機物の構造解析においても有力なツールである。本稿ではこの手法について紹介する。

1 はじめに

複合系における微量有機物の構造決定は、古くから大きな挑戦課題であった。有機化合物の構造解析では NMR 法が有力な手段となるが、LC-MS 等の分析法と比較すると感度が低く、また、副成分が存在する場合、信号が重なり解析が困難となる。そのため、従来は目的成分の分離・精製プロセスを経た後、NMR を測定していたが、膨大な労力、時間、経費を費やすこととなっていた。

近年の技術の目覚ましい進化によって、NMR の検出コイルを極低温にするクライオプローブ法や高磁場マグネット等の高感度化技術が登場し、NMR の感度が大幅に向上した。これにより、分析に必要な試料量が従来の mg オーダーから μg オーダーまで低減可能となった。この高感度 NMR 技術を基に、NMR と高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を直結した LC-NMR 分析法が実用化された。LC-NMR 分析法は、自動化への適応性が高く、分離精製の労力や時間を大きく低減でき、天然物、医薬品、代謝物、工業製品等に広く応用されてきている。

しかしながら、LC-NMR 分析法は移動相をそのまま LC-NMR プロブ (フローセル) へ導入し、NMR 測定を行うというシステムのため、溶媒由来のシグナル消去の影響や感度不足により適応困難なケースが少なくない。

一方、LC-SPE-NMR 分析法は、HPLC 分画した成分を SPE カートリッジにて濃縮・洗浄し、溶媒置換させる工程をオンラインで自動化することが出来る。これにより、LC-NMR 分析法よりも

さらに高感度かつ妨害シグナルの少ない分析が可能となり、LC-SPE-NMR 分析法はサンプルの適用範囲の拡大からも注目を集めている。

本稿では、LC-SPE-NMR 分析方法及び当社応用事例を紹介する。

2 LC-SPE-NMR 分析法の原理と分析の流れ

LC-SPE-NMR 分析法の実施例は 1986 年に報告されている¹⁾。当時、各ステップの実験操作はオフラインでの実施であったが、原理的には現在のオンライン LC-SPE-NMR 分析法と同じであった。LC-NMR 分析法が実用化され始めた 2001 年にオンライン LC-SPE-NMR 分析法の文献が初めて報告された²⁾。現在、代表的な LC-SPE-NMR 分析法の装置構成は、NMR 装置の前に SPE カートリッジシステムが配置され (図 1)、LC-NMR と同一のインター



図1 カートリッジ分取処理装置

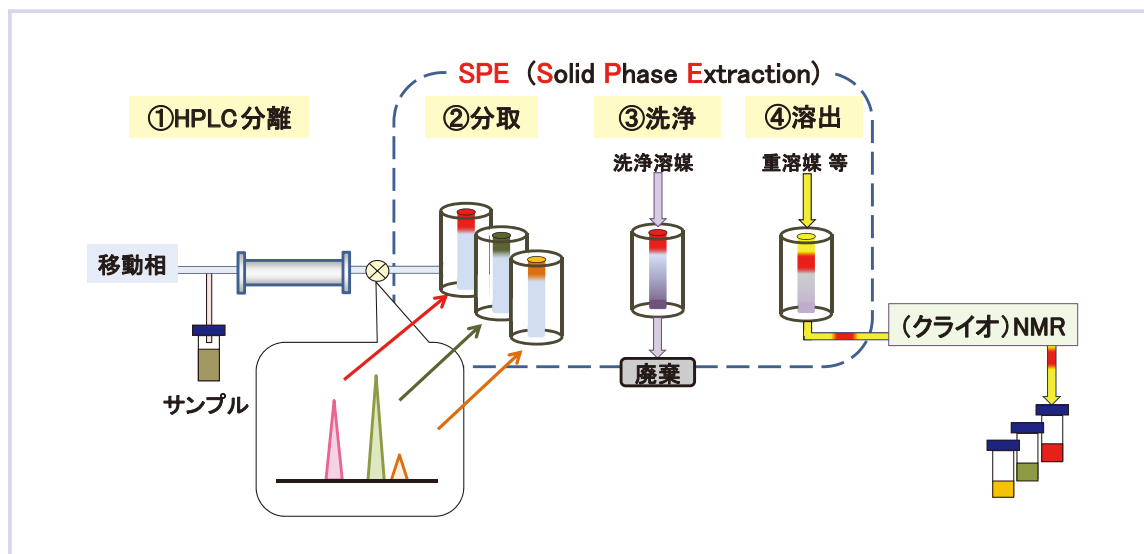


図2 LC-SPE分取処理の原理

フェースを介して制御される。試料注入から目的成分の分離やNMR測定までの一連の分析は、オンラインで全自動にて実施できる。LC-SPE分取処理の原理は図2のとおりである。

LC-SPE-NMR分析法は、一般的にはLC-NMR分析法と同様に逆相系のカラムを用いる。また、HPLCの溶出液は、LC-NMR分析法と異なり、そのままフローセルへ導入されることがないため、移動相として高価な重水素化溶媒を使用する必要がない。指定ピークの溶出開始から終了まで、溶出液に水をポスト添加して有機溶媒濃度を希釈し、指定のSPEカートリッジに通液する。これによって目的物質のみをSPEカートリッジ内に吸着させる。分画が終了したら、カートリッジを窒素ガスで乾燥後、目的成分を重水素化アセトニトリルや重

水素化メタノールで溶出させ、フローセルに導入し、NMRを測定する。

3 LC-SPE-NMR分析法の利点

(1) フローセルへの目的物質の導入率向上

LC-SPE-NMR分析法は、一般的に2 mm Φ × 10 mm SPEカートリッジを使用する。SPEカートリッジのベッドボリュームはわずか31 μ Lであるため、溶離度の高い重水素化溶媒を通液すると、カートリッジに吸着された目的物質が数十 μ Lの極少量の溶媒でフローセルに導入できる。フローセルの容量制限により、LC-NMR分析法ではピーク全量をフローセルに導入することが困難であるため(図3)、ピーク幅が広いほど、導入率が

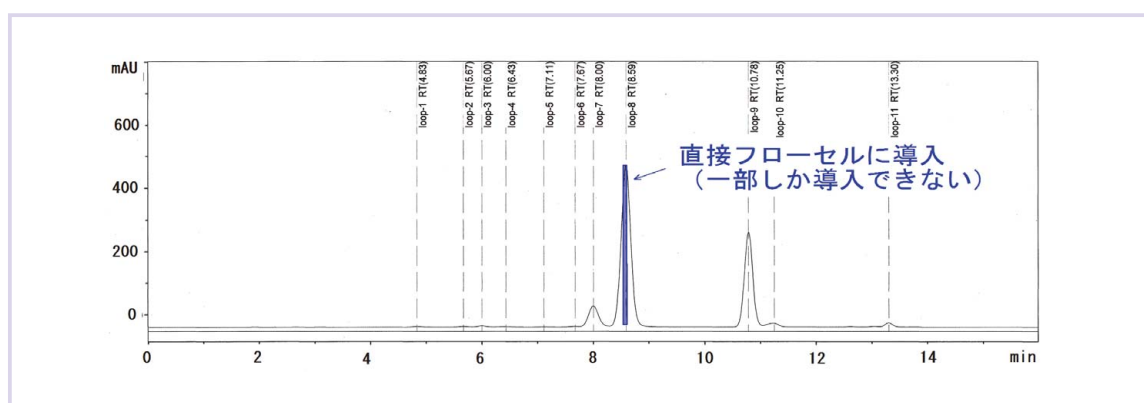


図3 LC-NMR分析法の分画例

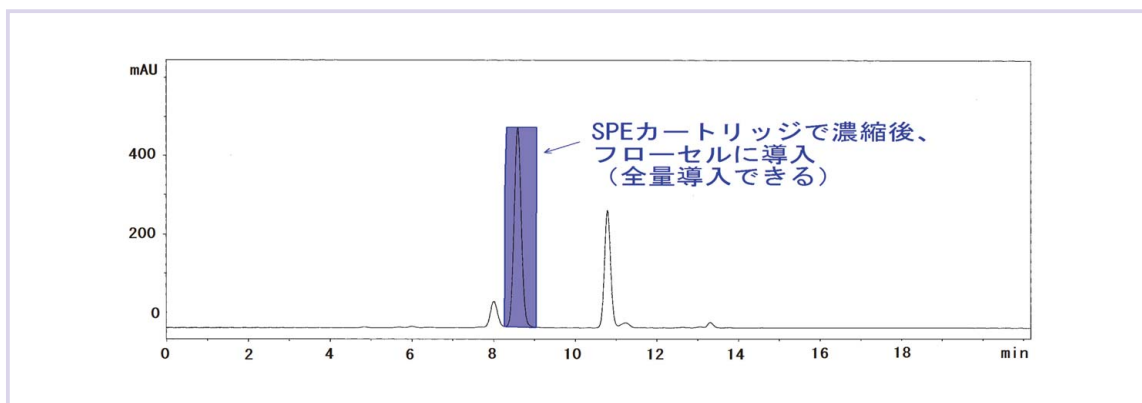


図4 LC-SPE-NMR分析法の分画例

低下するのに対し、LC-SPE-NMR分析法ではピーク幅と関係なく、ピーク全量をフローセルに導入できることから（図4）、高濃度での測定が可能となる。

(2) 試料負荷量の増加による感度向上

LC-SPE-NMR分析法では、(1)で述べた利点により、通常ピークがブロード化してしまう負荷許容量の大きいカラムを使用することが可能である。例えば、カラムの内径を4.6 mmから10 mmへ変更する場合、試料負荷量を約4倍増加させることができる。これを全量フローセルに導入できるため、試料負荷量の増加に相応する感度向上が期待できる。

(3) 繰返分画による感度向上

分画で得られた指定成分を、同一のカートリッジに繰返し吸着させれば、微量成分を増倍できる³⁾。特に含量が0.1%以下の

微量成分の分析や各種2次元NMR測定を実施する場合、この方法が良く用いられる。LC-SPE分画は全自動であり、一回の分画時間が1時間とすれば、24時間かけて分画しても作業者の工数はほとんど増えないが、得られた物質量は24倍に増加する。NMR測定におけるS/N比は試料量に比例、積算時間の平方根に比例するため、NMR測定時間を大幅に短縮でき、質の良いスペクトルも得られることから、構造解析もスピーディに達成できる。

(4) 同時分析成分数の向上

SPEでは多くのカートリッジを同時にセットできるため、多成分を全自動で分画でき、多成分一斉分析に有効である。

4 LC-SPE-NMR分析法の実施例

フェキソフェナジン塩酸塩を過酸化水素で処理した反応生成物のHPLCクロマトグラムを図5に示す。反応生成物の構造を

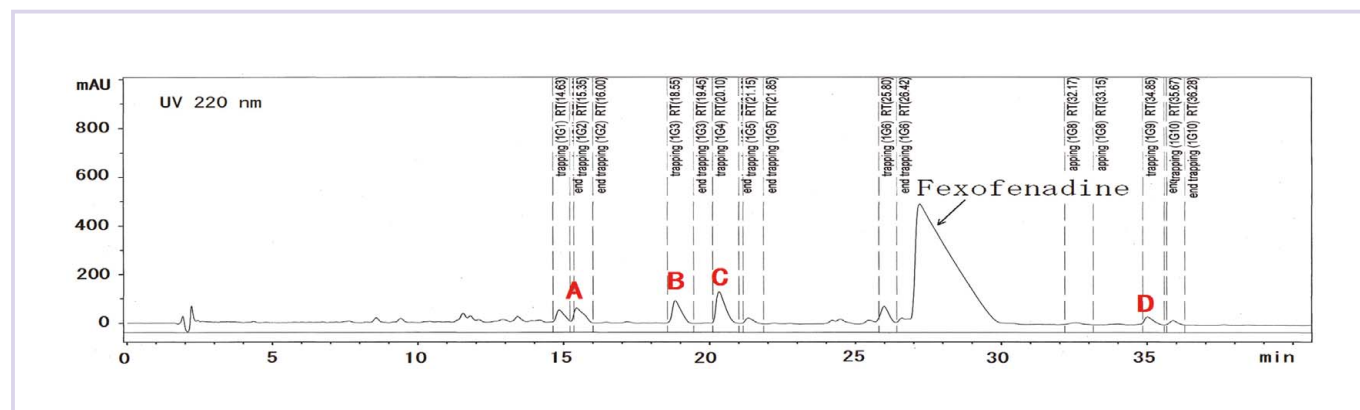


図5 フェキソフェナジン塩酸塩の過酸化水素処理反応生成物のHPLCクロマトグラム

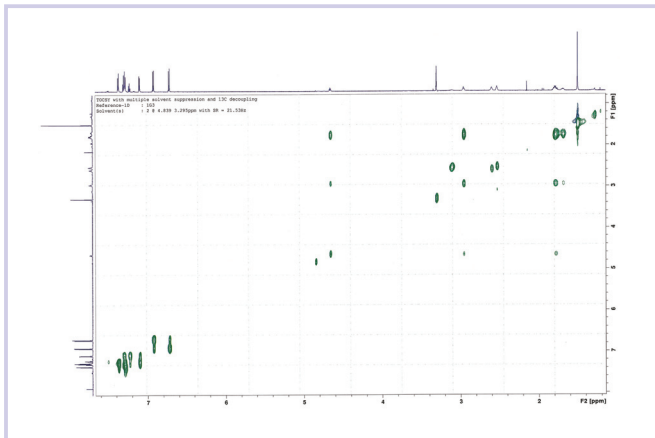


図6 反応生成物BのTOCSYスペクトル

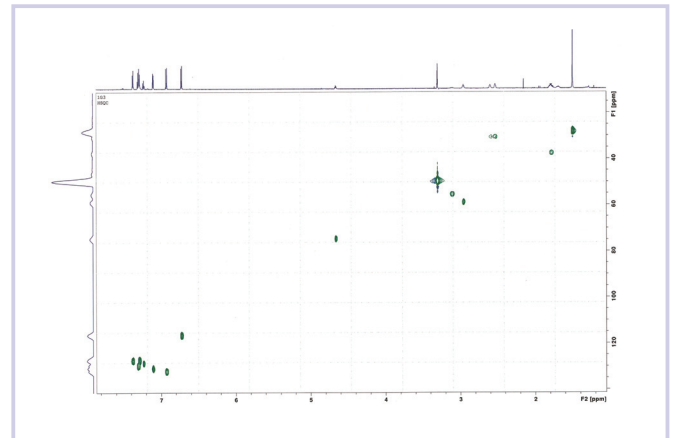


図7 反応生成物BのHSQCスペクトル

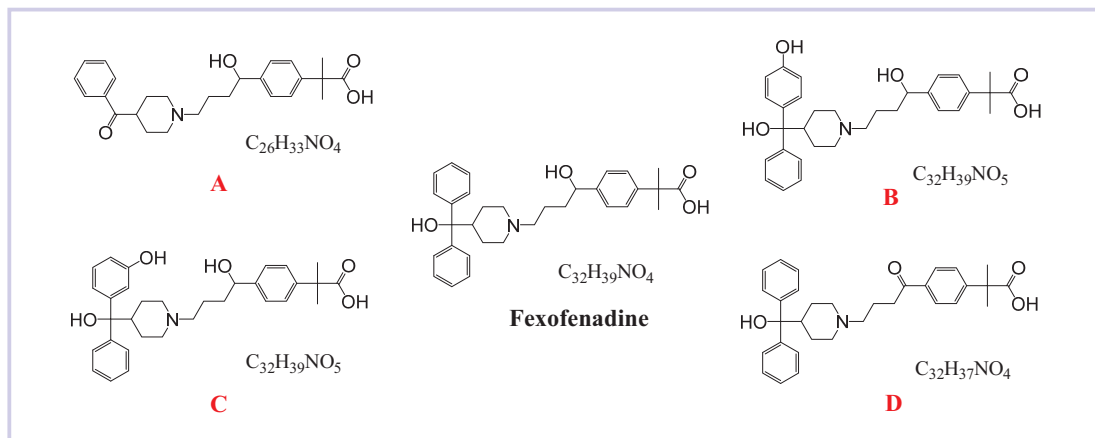


図8 フェキソフェナジン及び過酸化水素処理反応生成物の推定構造

解析するために、LC-NMR分析法で ^1H NMR及び各種2次元NMRを測定した。試料の溶解度及びピーク形状の制限より、1回の注入によるサンプルの導入量は100 μg 、各目的成分の導入量に換算すると約0.5～3 μg と極微量であった。そこで、LC-SPE-NMR分析法で、分画物を同じSPEカートリッジに20回繰返し吸着させた後、目的物質を溶出させ、NMRを測定した。二次元NMRの測定例を図6、7に示す。各種NMRを取得でき、短時間で各種反応生成物の構造を確認することができた(図8)。

5 終わりに

SPEの濃縮・洗浄により、LC-SPE-NMR分析法は、LC-NMR分析法と比較し数十倍以上の感度向上が可能である。一方で、SPEカートリッジにトラップが困難、または乾燥過程で分解する成分については、LC-NMR分析法が有効な手段となる。微量

有機物を効率的に分析するため、試料に応じて適切な分析法を選択することも重要である。

文献

- 1) C. D. Wilcox, R. M. Phelan : *J. Chromatogr. Sci.*, **24**, 130 (1986) .
- 2) N. T. Nyberg, H. Baumann, L. Kenne : *Magn. Reson. Chem.*, **39**, 236 (2001) .
- 3) M. Lambert, D. Staerk, S. H. Hansen, M. Sairafianpour, J. W. Jaroszewski : *J. Nat. Prod.*, **68**, 1500 (2005) .



章 宏
(い こう)
大阪ラボラトリー