

LC-NMR：最近の進歩

住友化学(株) 有機合成研究所
徳永隆司
岡本昌彦

Recent Progress in LC-NMR

Sumitomo Chemical Co., Ltd.
Organic Synthesis Research Laboratory
Takashi TOKUNAGA
Masahiko OKAMOTO

LC-NMR has been noted as a practical method for mixture analysis in recent years. Technical backgrounds of high performance LC-NMR are discussed from the point of view of NMR, chromatography and related technologies. Constituent profiling and LC-2D NMR are introduced as practical applications. Further hyphenated techniques such as LC-NMR/MS and chiral LC-CD-NMR are also described.

はじめに

クロマトグラフとスペクトロメーターをオンラインでつなぐ分析手法は、ハイフネーテッド技術 (Hyphenated technique) と呼ばれ¹⁾、混合物の分離と同時に各成分のスペクトルが得られるハイスループット分析手法として近年注目されている。中でも高速液体クロマトグラフ (HPLC) と、核磁気共鳴分光計 (NMR) を組み合わせた LC-NMR (Fig. 1) からは、詳細な構造

情報が得られるため、1978年の最初の報告²⁾以来、医薬品の不純物や代謝物、天然物や合成ポリマーなど、未知成分を含む複雑な混合物の分析に幅広く適用されてきた^{3), 4)}。一方、メーカーにおける研究開発への適用という観点から見ると、これまで感度面や操作面で実用性が十分とはいえず、LC-MSが日常的に活用されているのに対して、大きく遅れを取っていた。

しかし、2000年代に入ってこの状況は大きく好転し、現在ではクロマトグラフィー側の高感度化技術、

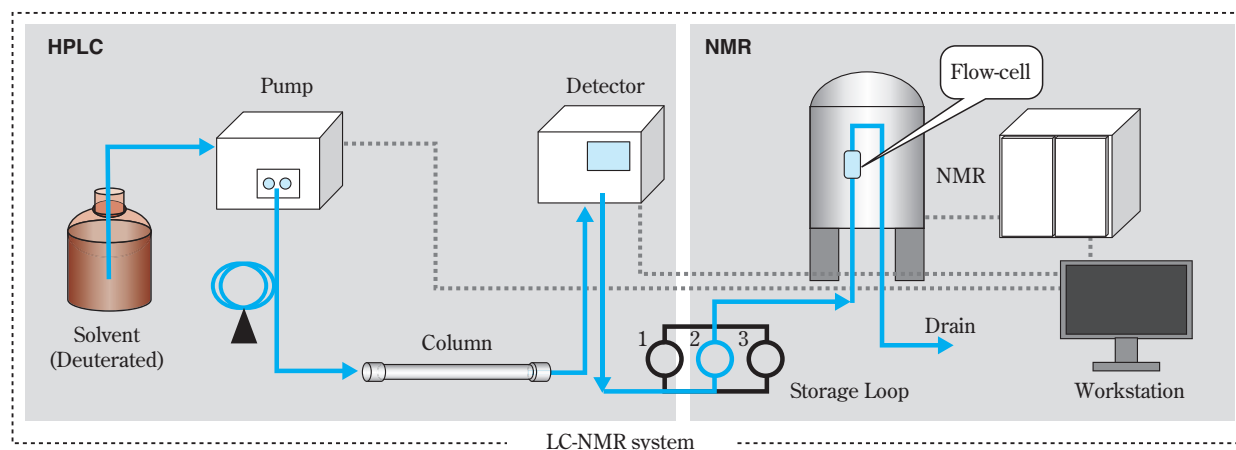


Fig. 1 Schematic view of conventional LC-NMR system

高磁場マグネットや高感度プローブなどのNMR装置側の高感度化技術と、溶媒消去技術や多成分分析に適した自動測定ソフトウェアなどの周辺技術の成熟によって、LC-NMRは感度面と操作面のいずれにおいても実用性の高い分析手法となっている。

本稿では、実用レベルに達した最新の高性能LC-NMR (Fig. 2) の性能向上の要素技術を解説するとともに、医薬品や農薬をはじめとするファインケミカルの研究開発への適用事例について紹介したい。また、近年LC-NMRにその他の検出器をさらに連結する複合技術が登場し、LC-NMRを中心として、複数のスペクトルを同時に取得することも可能となってきた。後半では、これら技術の最近の動向についても紹介する。



800 MHz magnet

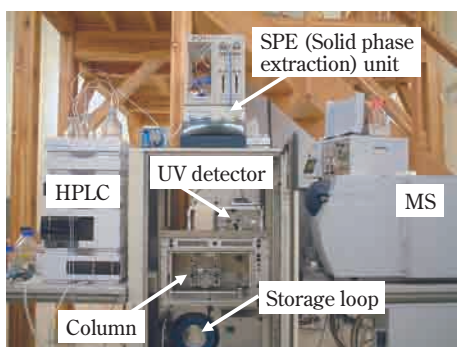


Photo at National Institute of Biomedical Innovation

Fig. 2 High performance LC-NMR system (800 MHz LC-SPE-NMR/MS equipped with cryogenic probe)

高性能LC-NMR

1. 高性能LC-NMRの要素技術

LC-NMRの特徴については、これまでも度々論じられてきた。NMRを検出器とした場合に得られる豊富な構造情報は、化学に携わるものであれば誰も納得する点であろう。また一方で、感度が低いという点についても、十分に認識されているに違いない。LC-NMRの感度面でのブレイクスルーは、一つの革

新的な技術によって達成されたのではなく、さまざまな高感度化技術の積み重ねによってなされた。まずこれらの高感度化技術について、クロマトグラフィーとNMR装置の両面から見ていきたい。

(1) クロマトグラフィー側の高感度化技術

LC-NMRでは、クロマトグラフィーによる分離が測定感度に与える影響を考慮する必要がある。LC-NMRの観測部はフローセル (Flow-cell, Fig. 1 参照) と呼ばれ、この部分にHPLCで分離された成分が導入されてNMR測定が行われる。最も高い感度が得られるのは、分離した成分の全量がフローセルに導入されたときであるが (Fig. 3(A))⁵⁾、HPLCカラムで分離した成分のピーク容量は、フローセル容量 (通常、30 μ L ~ 120 μ L程度) よりも大きいため、実際には成分の一部しか測定の対象とならない。汎用的な内径4.6 mmのコンベンショナルカラムで通常用いられる流速1 mL/minでは、120 μ Lのフローセルに相当するピーク幅はわずか8秒であり、ピーク幅が40秒程度でも、フローセルに60%程度しか導入されないことになる⁶⁾ (Fig. 3(B))。このため、いかにピークを先鋭化して、効率的にフローセルに導入できるかが高感度測定のポイントとなる。

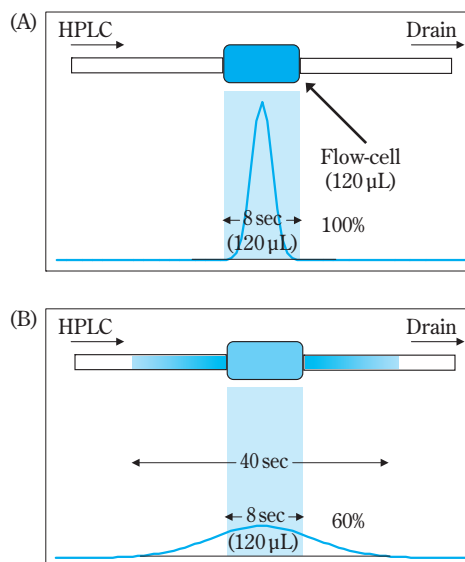


Fig. 3 Peak width and sample concentration in a flow-cell

セミマイクロカラムと呼ばれる内径が2 mm前後のカラムを用いる手法は、LC-NMRに適したピーク濃縮法である。セミマイクロカラムは、容量がコンベンショナルカラムの1/5程度であり、溶出に必要な溶媒量もこれに比例して減少することから、LC-NMRに高濃度の試料溶液を導入することができる。セミミ

クロカラムで一般的に用いられる流速0.2 mL/minとした場合、120 μ Lのフローセルに相当するピーク幅は40秒程度まで広がり、ピークの全量をフローセルに入れることが可能となる。しかし、セミマイクロカラムでは、コンベンショナルカラムよりもサンプル負荷容量が小さく、コンベンショナルカラムの試料量をそのまま導入するとオーバーロードによって分離が悪化し、期待した濃縮効果が得られない場合がある。

ここで重要になるのが、前処理で目的成分以外の不要な画分を効率的に取り除き、目的成分のみをカラムに導入し、オーバーロードを抑えることである。前処理手法としては、LC-NMR測定前に、分取HPLCやSPE (Solid phase extraction：固相抽出) などを用いて、目的成分をオフラインで粗精製して、LC-NMRを測定する方法などが用いられるが、現在では、これらをオンラインで実施することが主流となっている。

オンラインSPE法は、微量成分の濃縮方法として、



1: Organizer
2: HPD LC-SPE-NMR Dispenser
3: ACE LC-SPE-NMR Interface
4: Dilution pump



SPE cartridge
(Spark Hyspher Resin GP10, 96 cartridges, volume 30 μ L)



SPE unit (96 cartridges \times 2)

Photo at National Institute of Biomedical Innovation

Fig. 4 Spark PROSPEKT·2™ SPE system

LC-NMRで近年広く用いられている手法である⁷⁾。Spark社のSPEシステム (Fig. 4) は、LC-NMRと同一のインターフェースを介して制御可能で、SPEカートリッジに指定したピークを吸着させ、窒素ガスで乾燥後に、数十 μ Lの少量の溶媒で溶出させることで、高濃度の目的成分をフローセルに導入することができる。複数の成分を異なるカートリッジに連続して分取することも可能であり、後述する組成プロファイリングのような一斉分析との相性が良い。

オンラインカラムトラッピング法もLC-NMRで用いられるピーク濃縮法である。本手法では、コンベンショナルカラムによる分離後、トラップカラムで一旦濃縮し、これをセミマイクロカラムで再度分離して、NMRに導入する。この手法の濃縮効果は高く、これまで感度面から困難であった微量成分の二次元NMR測定 (DQF-COSY、HMBC) が達成されている⁸⁾ (後述)。現在では、カラムメーカー各社より、コンベンショナルカラムと同一の充填剤のセミマイクロカラムが入手可能であり、コンベンショナルカラムと分離パターンも変化しないため、流速をあわせる以外は特別な条件検討をする必要がない点でも、適用しやすい手法である。また、オンラインカラムトラッピング法として、分取カラムで分離した成分をトラップカラムで濃縮し、コンベンショナルカラムで分離後にLC-NMRに導入する手法も知られている⁹⁾。

前処理にSPEやセミマイクロカラムを用いた場合には、高価な重水素化溶媒の使用も少量で済み、さらに軽溶媒由来のシグナルによる妨害も最小限に抑えられるので、溶媒除去効率が向上する点もメリットである。

(2) NMR装置側の高感度化技術

次に、NMR装置側の進歩について見ていきたい。近年の高性能LC-NMRの実現に装置面で大きく貢献したのは、高磁場マグネットと高感度プローブである。NMRの検出感度は磁場強度の $3/2$ 乗に比例し、外部磁場が強いほど感度は高くなる¹⁰⁾。

そのため、LC-NMRにおいても、磁場強度の向上は中心的な課題として継続的に研究が進められてきた (Fig. 5)。現在の磁場強度は800 MHz¹¹⁾以上に達しており、1978年当時の60 MHzの装置に比べて、50倍もの感度向上が図られたことになる。

また、プローブ側の感度向上も忘れてはならない重要な技術である。コイルに超伝導材料を用いて冷却することで、NMRシグナルの検出時に発生する熱雑音を低減するクライオジェニックプローブ¹²⁾と呼ばれる高感度プローブを用いれば、4倍程度の感度向上効果が得られる。高磁場マグネットとクライオ

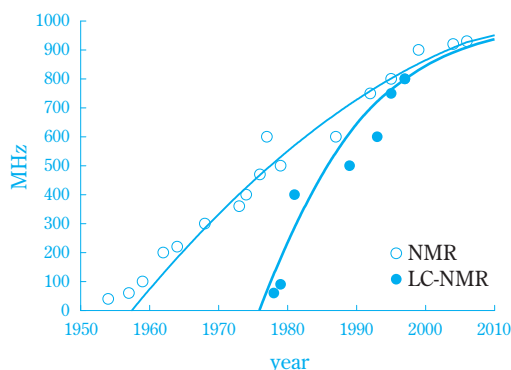


Fig. 5 Magnetic field strength in NMR and LC-NMR

ジェニックプローブは、現在の高性能LC-NMRの実現に、欠かせない要素技術となっている。

クライオジェニックプローブを備えた800 MHzのLC-NMRでは、どの程度のパフォーマンスが得られるのだろうか。ここでは、実際のサンプルを用いた測定の結果を示した (Fig. 6)。含量0.1% (試料導入量は約1 μg) の微量成分の ^1H NMRスペクトルを取得するのに必要な積算時間は、既存の500 MHzの装

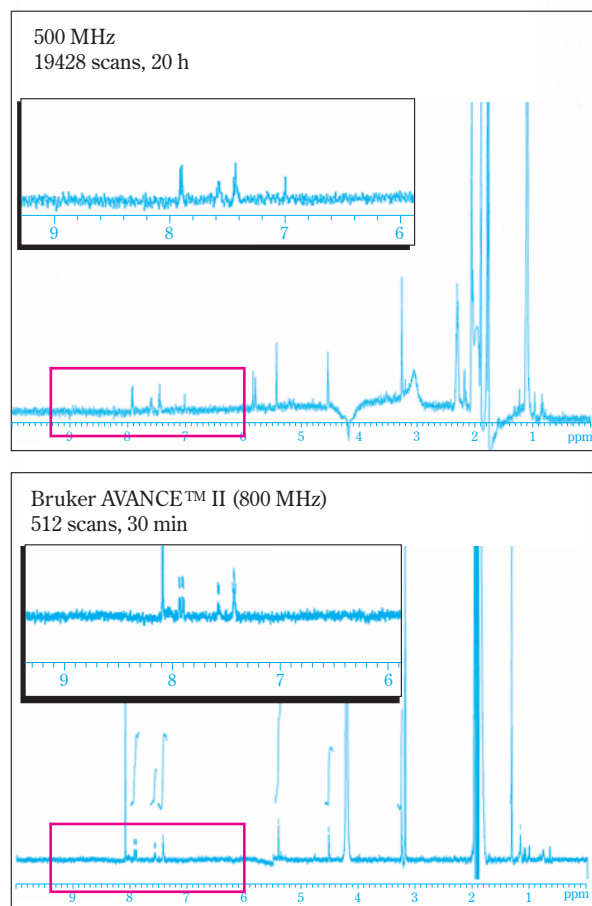


Fig. 6 ^1H NMR spectrum of a 0.1% component with an 800 MHz LC-NMR equipped with cryogenic probe.

置では、20時間以上を要したのに対して、800 MHzの装置ではわずかに30分程度と、感度向上により大幅な測定時間の短縮ができた。この感度であれば、数%レベルの成分の測定に必要な実験時間は1分以内であり、複雑な混合物を粗精製なく測定する場合でも実用的な時間内に全ての成分を一斉に分析可能である。また、高磁場化に伴ってシグナルの分解能が向上し、より複雑なスペクトルを与える化合物でも、容易に構造解析が可能である。

(3) 溶媒消去技術

クロマトグラフィーやNMR装置の進歩と並んで、溶媒消去技術の進歩もLC-NMRの可能性を大きく広げた。LC-NMRの初期には、プロトンのシグナルが測定を妨害するため、移動相として水素原子を含まない四塩化炭素、テトラクロロエチレンやフロンなどを用いる順相系に分離モードが限定されており、分析対象は低極性化合物のみであった。その後、汎用性の高いODSカラムを用いる逆相モードが一般のHPLC分析で広く普及すると、LC-NMRにも用いられるようになったが、移動相である重水、アセトニトリルやメタノール由来のシグナルによる妨害が問題となり、1990年代前半までの報告では、移動相溶媒のシグナルとの重なりが少ない芳香族化合物への適用が多い傾向が見られた。

選択的励起パルスとPFG (Pulsed Field Gradient) を組み合わせたWET法¹³⁾は、複数の溶媒ピークを消去できることからLC-NMRでは現在広く用いられる溶媒消去法である。この手法の登場によって、逆相ODSカラムを用いた場合でも、溶媒シグナルの影響の少ない測定が可能となり、LC-NMRはより汎用的な分析法となった。溶媒シグナルが直接測定対象のシグナルと重ならない場合でも、巨大な溶媒シグナルを消去しない場合、ダイナミックレンジの影響で微量成分のシグナルは検出されないため、溶媒消去は高感度測定の面でも重要な技術である。

また、溶媒消去法と合わせて、先述のSPEやカラムトラッピングで、重水素化率の高い溶媒を溶出に用いれば軽溶媒のシグナルを小さくし、溶媒消去効率をさらに高めることができる。

(4) 多成分測定技術の進歩

ここまで述べてきた高感度化技術の積み重ねによって、一成分あたりの測定時間は大幅に短縮され、混合物中の全成分を一斉に測定することもマシンタイム上は現実的になった。一方で、このようなハイスループット分析では、膨大なサンプルを処理するための効率化の工夫が不可欠となる。この点についても触れておきたい。

多成分の一斉分析には、ループストレージ法と呼ばれる測定モードが用いられる。この手法は、カラムクロマトグラフィーで分離した全成分を一旦サンプルループに分画し、順番にループからフローセルへ移送して測定する方式である (Fig. 1)。クロマトグラフィーの流れを止めずに分離ができることや、分離した各成分を個別に扱えるため、自動測定との組み合わせが容易であり、また測定時間が長くなっても拡散の影響を受けないので、積算による微量成分の分析にも適している。市販の自動測定ソフトウェアでは、成分毎に測定手法や積算回数を一度設定すれば、測定は自動で行われるため、実験時間が大幅に短縮できる。

2. 高性能LC-NMRの適用例

(1) 組成プロファイリング

高性能LC-NMRの登場により、混合物中に含まれるすべての成分について、含有量と構造を明らかにする組成プロファイリングが実用レベルとなってきた。これを化学工業や医薬品、農薬開発に応用すれば、不純物組成の網羅的な解析から、不純物生成メカニズムや反応阻害要因などが特定でき、製造プロセスの開発に有用な知見が得られると期待される。

以下に、著者らが高性能LC-NMRを用いて行った測定について紹介する。0.1%レベルの未知不純物を

含む全15成分を一回のHPLC分離でサンプルループに分画後、含有量に合わせて積算時間を成分毎に設定し、 ^1H NMRの自動測定を実施した。この測定開始までに要した時間は、クロマトグラフィーによる分離と測定条件設定を合わせて1時間程度であり、約20時間で全成分の ^1H NMRスペクトルを取得し (Fig. 7)、得られたスペクトルを解析して、各成分の構造を得ることができた。

これまで0.1%レベルの未知不純物の構造は、一成分ずつ数週間から数ヶ月間かけて分取し、その後NMR測定をすることで解析していたが、この例のように高性能LC-NMRを用いれば大幅な迅速化が可能である。

(2) LC-2D NMR (LC-NMRによる二次元NMR測定)

分析対象化合物には、ヘテロ環化合物や縮環化合物などのプロトン数が少ない、もしくは、スピンスがつかっていない化合物も多い。これらの化合物の解析には、 ^1H - ^{13}C 相関を観測する二次元NMR (HSQC、HMBC等) スペクトルが有用である。HSQCスペクトルは、プロトン-プロトンが直接結合する炭素間の相関 ($^1J_{\text{CH}}$) を、HMBCスペクトルは、更に遠隔にある炭素との相関 ($^2J_{\text{CH}}$ 及び $^3J_{\text{CH}}$) を観測する手法であり、得られた炭素の化学シフト情報と結合情報は、構造解析にきわめて有用である。特にHMBCは、ヘテロ原子を挟んでいても相関が観測されるため、部分構造同

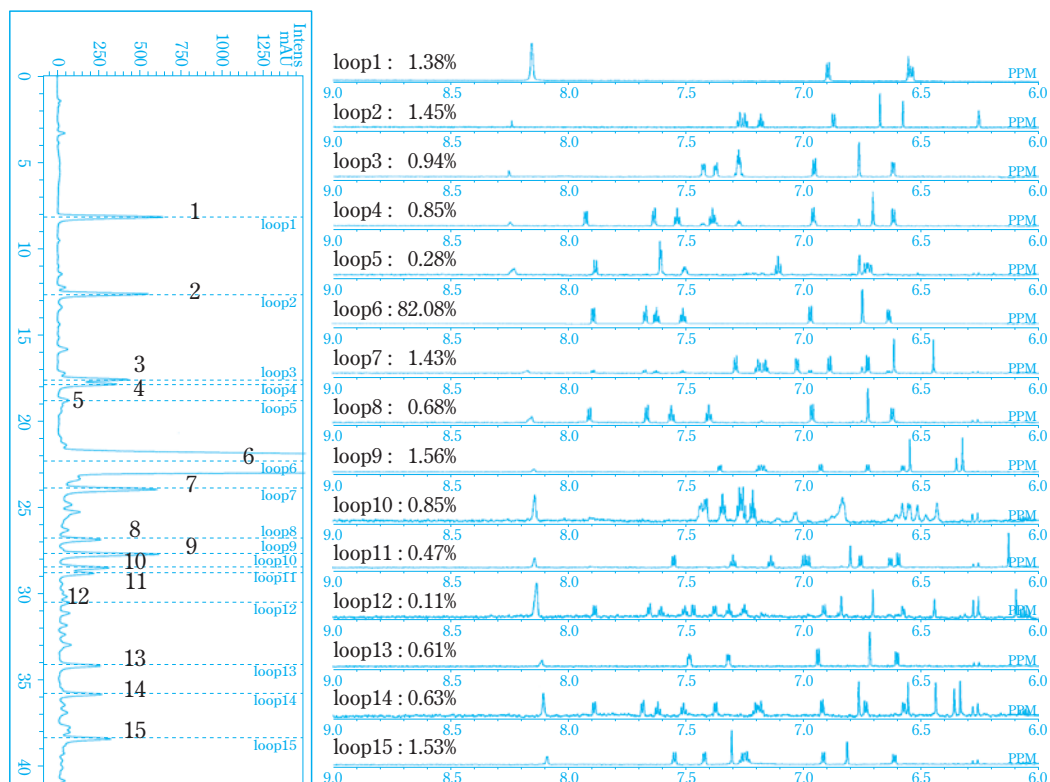


Fig. 7 Constituent profiling by ^1H LC-NMR (aromatic region)

士をつなぎ合わせるのに用いられる。しかし、これらの測定手法は ^1H NMR測定よりも低感度であるため、これまでLC-NMRでは一般的ではなかった。

著者らの検討では、高性能LC-NMRとSPEの組み合わせによって、実際のサンプル中の数十%オーダー(試料導入力にして300 μg 程度)の成分のHMBCスペクトルが測定できた(Fig. 8)。本検討では、SPEへの濃縮回数は3回であったが、SPEでの濃縮を繰り返すことや、セミアミクロカラムを組み合わせることで、数%オーダー、さらにそれ以下の成分のHMBCスペクトルの取得も可能と考えられる。

近年、SPE等を組み合わせる手法によって、 ^{13}C 情報が得られるHSQCやHMBCなどの報告も数は少ないながらも、見られるようになってきた(Table 1)。今後、同様の報告は増加していくものと考えられる。

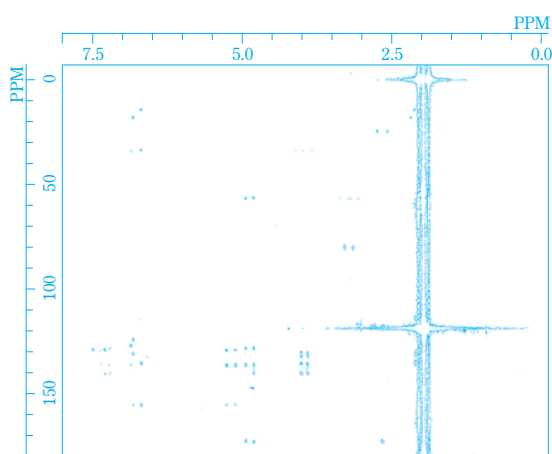


Fig. 8 HMBC spectrum with LC-SPE-NMR (800 MHz, cryogenic probe)

Table 1 HMBC and HSQC experiments by LC-NMR

Sample	Frequency (MHz)	Cryogenic probe	SPE	Other techniques	Experiment	Reference
Plant extract	Major component	500			NOESY, HSQC, HMBC	a)
Plant extract	Major component	600	✓	✓	HMQC, HMBC	b)
Plant exudate	Major component	500		✓	COSY, TOCSY, HSQC, HMBC	c)
Plant extract	Major component	600		✓	COSY, HSQC, HMBC	d)
Plant extract	Major component	400		✓	COSY, TOCSY, HMBC	e)
Synthetic peptides	Major component	600		Capillary LC-NMR	COSY, HSQC, HMBC	f)
Model mixture	Minor component	500		Semi-preparative LC-SPE-NMR	TOCSY, HMBC	g)
Drug degradation products	Minor component	600	✓	Column trapping	COSY, HMBC	h)

a) E. Garo, J. Wolfender, K. Hostettmann, W. Hiller, S. Antus and S. Mavi, *Helv. Chim. Acta*, **81**, 754 (1998).

b) V. Exarchou, M. Godejohann, T. A. van Beek, I. P. Gerothanassis and J. Vervoort, *Anal. Chem.*, **75**, 6288 (2003).

c) G. Karagianis, A. Viljoen and P. G. Waterman, *Phytochem. Anal.*, **14**, 275 (2003).

d) C. Clarkson, D. Stark, S. H. Hansen and J. W. Jaroszewski, *Anal. Chem.*, **77**, 3547 (2005).

e) A. Pukalskas, T. A. van Beek and P. de Waard, *J. Chromatogr. A*, **1074**, 81 (2005).

f) P. Hentschel, M. Krucker, M. D. Grynbaum, K. Putzbach, R. Bischoff and K. Albert, *Magn. Reson. Chem.*, **43**, 747 (2005).

g) F. Xu and A. J. Alexander, *Magn. Reson. Chem.*, **43**, 776 (2005).

h) T. Murakami, N. Fukutsu, J. Kondo, T. Kawasaki and F. Kusu, *J. Chromatogr. A*, **1181**, 67 (2008).

LC-NMRとその他の検出器の複合技術の現状

高性能LC-NMRと併せて、LC-NMRにその他の検出器をさらに組み合わせた複合的な構造解析手法の実用化も進んでいる。これらの手法は、NMRとは異なる原理の検出器を組み合わせることで、LC-NMR単独では得られない構造情報を取得し、多面的な構造解析を可能にするものである。ここでは、ファインケミカルの分析で特に有用な、MSを組み合わせたLC-NMR/MSと、光学活性な化合物を区別することが可能なキラルLC-CD-NMRに焦点あてて紹介したい。

1. LC-NMR/MS

NMRとMSが同時に測定できれば、ほとんどの有機化合物の構造を一義的に決定することが可能である。このため、LC-NMR/MSの登場は比較的早く、1990年代後半にはPfizer社の研究グループによって報告がなされている¹⁴⁾。しかし、初期のLC-NMR/MSは、LCの下流にスプリッターを配置して、NMRスペクトルとマススペクトルを同時に取得する方式であり、重水素化溶媒を移動相としていたため、交換性プロトンを持つ化合物では水素原子が重水素原子で置換された分子イオンが観測され、マススペクトルの解析が困難であるという弱点があった。

その後、ExarchouによってSPEを組み込んだLC-SPE-NMR/MS (Fig. 9)が開発されることでこの問題は解決された¹⁵⁾。この手法を用いると、重水素化溶媒はSPEからNMRへの溶出にのみ使用され、NMRスペクトルと同時に重水素置換のない通常のマスペクトルが得られる。

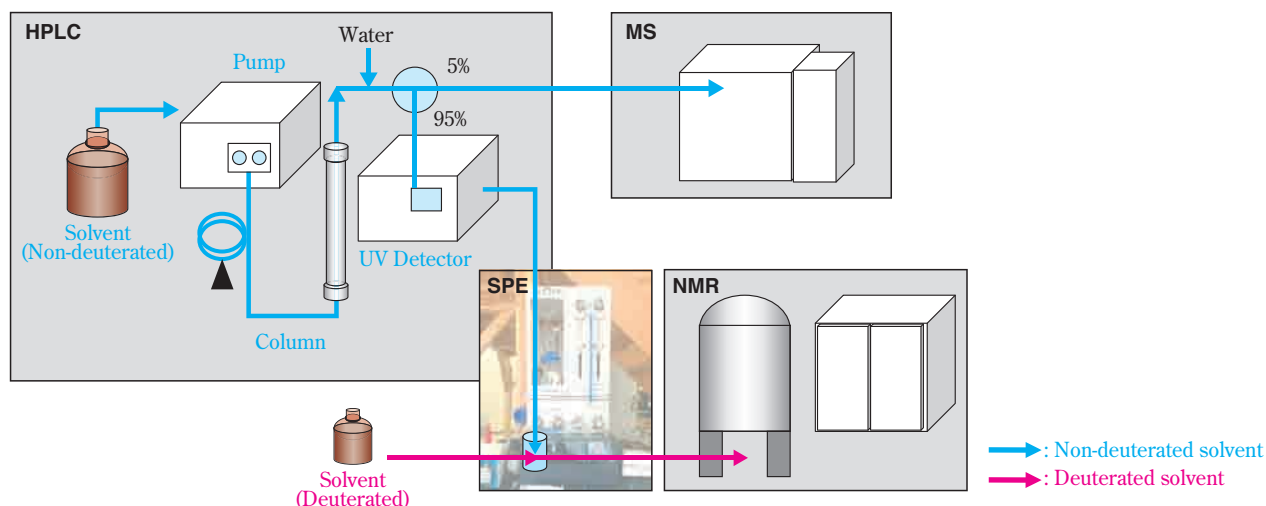


Fig. 9 Schematic representation of the LC-UV-SPE-NMR/MS

このシステムを用いることによって、LC-NMR単独では得られない構造情報が得られる場合が少なくない。NMR-silentなハロゲン原子を含む部分構造に有する化合物は、マスペクトルから有用な情報が得られる好例である。含ハロゲン化合物は、含まれるハロゲン原子の種類と数を、特徴的な同位体パターンから特定することができる¹⁶⁾。また、繰り返し構造を有する化合物もNMRで区別することは困難であるが、分子量情報からの推定は比較的容易である。このように、NMRとMSの組み合わせはこれからのハイフネーテッド技術の主流となっていくものと期待される。

2. キラルLC-CD-NMR¹⁷⁾

最後に、著者らが開発したキラルLC-CD-NMR法について紹介したい。この手法では、LC-NMRとCD

(Circular Dichroism、円二色性) 検出器を連結することによって、まったく新しい効果が得られる。

光学活性な化合物は、鏡像関係にある異性体（以下、エナンチオマー）が望まない活性を有することや不活性である場合が知られているため、医薬品や農薬の安全性や品質の観点から、光学異性体の分析は非常に重要度の高い分析項目となっている。近年、これらの分析法として広く用いられているのは、光学活性な認識剤を充填したキラルカラムを用いて分離を行うキラルLC（直接）法である。キラルLC法では、不純物や複数の異性体を含む混合物でもそのまま分析できるという利点がある一方で、標準品の調製とピークの同定に基づく分析条件の最適化が必要であり、これらに多大な労力を必要とする難点があった。

キラルLC-CD-NMR（Fig. 10）は、標準品を用いずに光学異性体や不純物を同時に解析できる画期的な

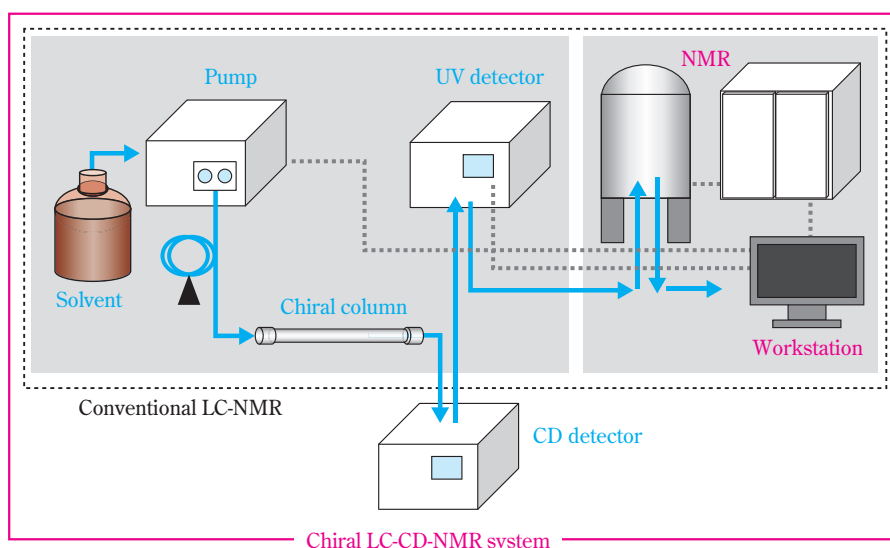


Fig. 10 Schematic view of chiral LC-CD-NMR system

システムである。本手法では、未精製の光学活性体、いわゆる原薬や原体中に副生成物として微量に含まれる光学異性体や不純物をCDスペクトルとNMRスペクトルから同定し、それらの溶出位置を特定することを特徴としている。

ここからは、本手法でピリジルアラニン誘導体の原体を分析した実際の例で説明したい。Fig. 11(A)で示したように、通常のUV検出で原体を分析すると、主成分と8本の微量成分由来のピークが観測され、どのピークが何であるか、それぞれのピークが単一成分のものであるのかどうかはわからない。このため分離の確認には、エナンチオマー、ジアステレオマーや不純物を合成して溶出位置から成分の同定を行う必要がある。これに対してキラルLC-CD-NMRでは原体のUVクロマトグラムと同時に、CDクロマトグラム及びNMRスペクトルを取得する。得られたCDクロマトグラム (Fig. 11(B)) からは、対掌体対は互いに逆符号に検出されるという特性を利用して、主ピークの

正に対して逆符号の負のピーク5、6、8のいずれかがエナンチオマーであると絞り込める。さらに、各ピークについて、同時に取得しておいた¹H NMRスペクトル (Fig. 11(C)) を確認し、主成分とスペクトルパターンが一致するものを特定する。このようにして得られた情報からCDスペクトルが逆符号で¹H NMRスペクトルが等しいもの、今回であればピーク6がエナンチオマーであると一義的に特定できる。本手法では、NMRスペクトルを元に、鏡像関係にない立体異性体であるジアステレオマーとそのエナンチオマー、更には不純物についても同様に構造を特定していくことが可能である。UVスペクトルとNMRスペクトルのみでは、エナンチオマー同志の分離が不完全で一つのピークとして検出されるようなケースで、エナンチオマーを特定することはできないが、このようなケースでもCDクロマトグラムでは、符号の反転の有無からエナンチオマーを判別することが可能である。

キラルLC-CD-NMR法を用いれば、キラルLC条件を変えても、試料を一度分析するだけで、条件ごとに主成分とエナンチオマー、その他の不純物の溶出位置を特定することができる。またこの手法を活用すれば、キラルLC条件の最適化が効率的に行える。例として、3種類のキラルカラムで原体を分析し、それぞれエナンチオマーの溶出位置を特定して、主成分とエナンチオマーの分離度を算出した (Table 2)。比較の結果、カラムCの分離度が大きく、最適なカラムであると容易に決定できた。同様に移動相、カラム温度や流速などの条件を順次変更し、分離度を指標として最適化を進めることが可能であり、一条件ごとにすべての標準品で位置確認が必要である既存法よりも、大幅な効率化が達成できた。

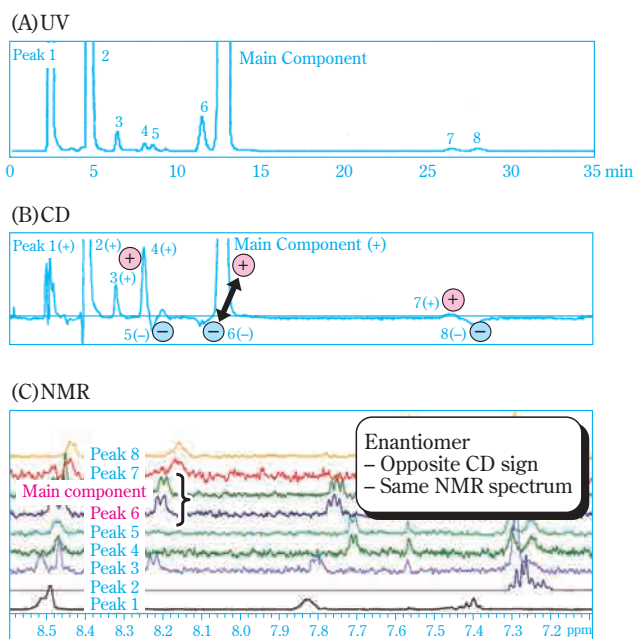


Fig. 11 Chiral LC-CD-NMR analysis of pyridylalanine derivative

LC-NMRの現在と今後の展望

ここまで述べてきたように、現在のLC-NMRは、高磁場マグネットや高感度プローブ、各種クロマトグラフィー側の高感度技術、溶媒消去技術、自動測定ソフトなどの組み合わせによって、感度面や操作

Table 2 Comparison of *R_s* Values between Chiral Columns

	Major component		Enantiomer		<i>R_s</i>
	Retention time(min)	Peak width(min)	Retention time(min)	Peak width(min)	
Chiral column A	11.56	0.84	12.83	1.46	1.10
Chiral column B	25.98	0.87	28.34	7.87	0.54
Chiral column C	28.50	1.69	32.88	2.82	1.94

↓
- Column
- Solvent
- Flow rate
- Column temperature etc.

Best separation with Chiral column C

面のいずれにおいても、十分な実用性を備えるまでに成熟した。現在では、これらの技術を組み込んだ LC-NMR をメーカーから購入することが可能であり、多方面で活用されていくものと期待される。

実際の測定においては、これまで感度面の制約により実現できなかった組成プロファイリングや、LC-2D NMR 測定が実用的なレベルとなり、また、LC-NMR/MS やキラル LC-CD-NMR など、LC-NMR を中心としたハイフネーテッド技術の更なる発展により、分取精製操作の単純なオンライン化にとどまらない豊富な情報が得られるようになった。今後の発展によっては、ハイフネーテッド技術の創成期に考えられていたような複数の検出器を並列で連結する手法¹⁸⁾の実現もそう遠くないかもしれない。また、最近ではオンラインでプレカラム反応を LC-NMR に組み合わせた報告¹⁹⁾や、フロー NMR を用いて生物検定と NMR を直接連結するような試み²⁰⁾もみられ、分析だけにとどまらない反応、分離・分析、生物検定法の集積化の可能性も今後期待される。また、高性能 LC-NMR の高い分解能は、合成高分子やタンパク質などの生体高分子の微細構造の解析にも適しており、低分子のみならず高分子への適用拡大も期待できる。

今回、組成プロファイリングでは、高感度化と自動測定ソフトウェアによって、ハイスループット分析が実現したが、今後は解析が律速となるため、スペクトルデータベースの活用と充実、解析支援もしくは自動解析プログラム²¹⁾の利用が期待される。高性能 LC-NMR を最大限活用するためには、測定上のノウハウの習得や感度向上技術の積み重ねの継続が不可欠であろう。特に、クロマトグラフィーを側からのアプローチがますます重要性を増してくるはずである。当所で蓄積してきたクロマトグラフィー技術を駆使して、LC-NMR の性能を最大限に引き出し、研究開発に活用していきたいと考えている。

謝辞

本研究を実施するにあたり、神戸薬科大学 杉浦眞喜子准教授及び独立行政法人医薬基盤研究所 赤木謙一博士に学術的、技術的なご指導を快く引き受けていただいた。ここに感謝する。

引用文献

- 1) D. L. Norwood, J. O. Mullis and T. N. Feinberg, *Sep. Sci. Technol.*, **8**, 189 (2007).
- 2) N. Watanabe and E. Niki, *Proc. Jpn Acad.*, **54**, 194 (1978).
- 3) K. Albert Ed., "On-line LC-NMR and Related Techniques", John Wiley & Sons Ltd. (2002).
- 4) H Pasch, L. C. Heinz, T. Macko and W. Hiller, *Pure Appl. Chem.*, **80**, 1747 (2008).
- 5) 岡本 昌彦, 木村 雅晴, 高橋 謙一, 瀧本 善之, *ぶんせき*, **11**, 897 (1997).
- 6) G. J. Sharman and I. C. Jones, *Magn. Reson. Chem.*, **41**, 448 (2003).
- 7) J. A. de Koning, A. C. Hogenboom, T. Lackner, S. Strohschein, K. Albert and U. A. T. Brinkman, *J. Chromatogr. A*, **813**, 55 (1998).
- 8) T. Murakami, N. Fukutsu, J. Kondo, T. Kawasaki and F. Kusu, *J. Chromatogr. A*, **1181**, 67 (2008).
- 9) A. J. Alexander, F. Xu and C. Bernard, *Magn. Reson. Chem.*, **44**, 1, (2006).
- 10) T. D. W. Claridge, "High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry", Elsevier Science Ltd. (1999), p. 228.
- 11) U. G. Sidelmann, U. Braumann, M. Hofmann, M. Spraul, J. C. Lindon, J. K. Nicholson and S. H. Hansen, *Anal. Chem.*, **69**, 607 (1997).
- 12) C. A. Scott, D. A. Cragg, F. Row, D. J. White and P. C. J. White, *J. Magn. Reson.* **60**, 397 (1984).
- 13) S.H. Smallcombe, S.L. Patt and P.A. Keifer, *J. Magn. Reson. A*, **117**, 295 (1995).
- 14) K.I. Burton, J.R. Everett, M.J. Newman, F.S. Pullen, D.S. Richards and A.G. Swanson, *J. Mass Spectrom.*, **32**, 64 (1997).
- 15) V. Exarchou, M. Godejohann, T. A. van Beek, I. P. Gerothanassis and J. Vervoort, *Anal. Chem.*, **75**, 6288 (2003).
- 16) J.H. Beynon, R.A. Saunders and A.E. Williams, "The Mass Spectra of Organic Molecules", Elsevier (1968).
- 17) T. Tokunaga, M. Okamoto, K. Tanaka, C. Tode and M. Sugiura, *Anal. Chem.*, **82**, 4293 (2010).
- 18) H.C. Dorn, *Anal. Chem.* **56**, 747A (1984).
- 19) Y. Kashima and Y. Okabayashi, *Chem. Pharm. Bull.*, **58**, 423 (2010).
- 20) Y. Lin, S. Schiavo, J. Orjala, P. Vouros and R. Kautz, *Anal. Chem.*, **80**, 8045 (2008).
- 21) M.E. Elyashberg, A.J. Williams and G.E. Martin, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **53**, 1 (2008).

PROFILE



徳永 隆司
Takashi TOKUNAGA

住友化学株式会社
有機合成研究所
研究員 博士 (理学)



岡本 昌彦
Masahiko OKAMOTO

住友化学株式会社
有機合成研究所
上席研究員
グループマネージャー 農学博士