

報 文

セミクロ液体クロマトグラフィーを用いる液体
クロマトグラフィー/プロトン核磁気共鳴法の検討福原 忠雄^{R*}, 小松 一男^{*}, 山本 信也^{*}, 高松 翼^{*}On-line system combining semimicro LC with ¹H-NMR spectrometryTadao FUKUHARA, Kazuo KOMATU, Shinya YAMAMOTO and Tasuku TAKAMATU^{*}^{*}Safety & Analytical Research Center, R&D Headquarters, Shiseido Co., Ltd.,
1050, Nippa-cho, Kohoku-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 223

(Received 19 October 1995, Accepted 29 January 1996)

An on-line system combining semimicro liquid chromatography (LC) and 400 MHz proton nuclear magnetic resonance spectrometer (¹H-NMR) with flow cells (2 mm i.d., detection volume 40 μ l, total volume 400 μ l) was devised. The LC column was a polymer coated ODS silica semimicro column, CAPCELL PAK C₁₈ (1.5 mm i.d. $\times$ 250 mm) and the mobile phase consisting of deuterium oxide (D₂O)/acetonitrile-d₃ (CD₃CN)=7 : 3 (v/v) flowed at a rate of 100 μ l/min. The effect of flow rate on T_1 and signal width was not observed under semimicro LC flow rates of 100~200 μ l/min. The sensitivity of ethyl *p*-hydroxybenzoate was *ca.* 7 μ g for the methyl group at an *S/N* ratio of 3, which was comparable with those reported for ordinary LC/NMR systems. This system required only 6 ml/h of expensive deuterated solvents, significantly improving cost-efficiency and allowing the use of a deuterated organic solvent so that solvent signals could be easily minimized. In addition, the detectable window for NMR signals of sample was further expanded, and the results fully supported the practical value of the semimicro LC/¹H-NMR system.

Keywords : semimicro LC; ¹H-NMR; hyphenated system.

1 緒 言

混合物中の微量未知物質の同定には、各種クロマトグラフィーと構造解析機器との結合、いわゆる“hyphenated technique”が極めて重要である。有力な構造解析機器の一つである質量分析計 (MS) は、ガスクロマトグラフ (GC) と結合された GC/MS が既にはん用化されて久しく、最近では高速液体クロマトグラフ (HPLC) との結合 (LC/MS) もその領域に近付きつつ

ある。

一方、核磁気共鳴分光計 (NMR) は、MS と並ぶ有力な構造解析機器であるにもかかわらず、結合型分析機器としての普及には今一步の感がある。しかし、¹H-NMR とクロマトグラフィーの結合に関する検討は、LC との結合^{1)~7)}、ゲル透過クロマトグラフィー (GPC) との結合⁸⁾、超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) との結合⁹⁾へと進み、最近ではキャピラリー電気泳動 (CE)¹⁰⁾との結合に関する報告も見られている。中でも、LC/NMR の検討例は豊富であり、その数も年々増加傾向をたどり、総説¹¹⁾なども見られるように

* 資生堂研究開発本部安全性・分析センター: 223 神奈川県横浜市港北区新羽町 1050

なった。このような状況に反し、LC/NMR のはん用化が進んでいない原因としては、NMR 自体の感度が MS 等比べて極端に低いという問題がまず挙げられる。そればかりでなく、実用面においては、LC 移動相に水素を全く含まない特殊なハロゲン化溶媒、あるいは、高価な重水素化溶媒を多量に用いる必要があるという LC 側の問題のほうが大きいものと考えられる。LC では用される逆相モードでは、主に水とメタノール、アセトニトリル等の有機溶媒との混合移動相が用いられるが、LC/NMR 分析^{5)~7)}では、水に重水、有機溶媒に通常の軽溶媒を用いて、重水をロック溶媒とし、HDO シグナルと有機溶媒シグナルをサプレッションする方法が用いられているため、通常の 500~1000 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流量では、高価な重水を大量に用いる必要があることがはん用化の大きな障害となっている。しかし、尿中の薬物代謝の追跡、特に不安定なグルクロン酸抱合体の同定を行った例^{5)~7)}等も報告されており、結合型分析機器としての有用性には捨てがたいものがある。

著者らは、通常の LC の 1/10 程度の溶媒で操作し得る、市販のセミマイクロ LC 装置で、溶媒のプロトンシグナルによる試料シグナルに対する妨害を最小にする方法で、セミマイクロ LC/NMR の実用性を検討した。その結果、有用な知見、並びに良好な結果が得られたので報告する。

2 実 験

2.1 装 置

セミマイクロ LC 装置は、ポンプに資生堂製ナノスペース SI-1/2001、マニュアルインジェクターにレオダイン製 7125、セミマイクロ ODS カラムに資生堂製 CAP-CELL PAK C₁₈ UG120 (内径 1.5 mm, 長さ 250 mm)、紫外検出器に資生堂製ナノスペース SI-1/2002 (検出波長 290 nm, セル容量 3 μL)、インテグレーターに島津製作所製 C-R3A を用いて組み立てた。NMR 装置としては、日本電子製 GX-400 (プロトン核の共鳴周波数 400 MHz)、プローブに日本電子製 NM-40H5X (LC) (内径 5 mm) を用い、これに組み込むフローセルとしては、特にことわりがない場合、Fig. 1(a) に示した、外径 5 mm, 内径 2 mm, 長さ 130 mm, セル容量約 400 μL のガラス製の GPC/NMR 用セルを用いた。一部の実験には、Fig. 1(b) に示した、外径 5 mm, 内径 2 mm の部分の長さ 40 mm, 全長 130 mm, セル容量約 125 μL のガラス製セルを用いた。これらのフローセルの、発振コイル長に対応する検出部容量は約 40 μL であった。紫外検出器とプローブは、長さ 2 m, 内径 0.3 mm のテフロン

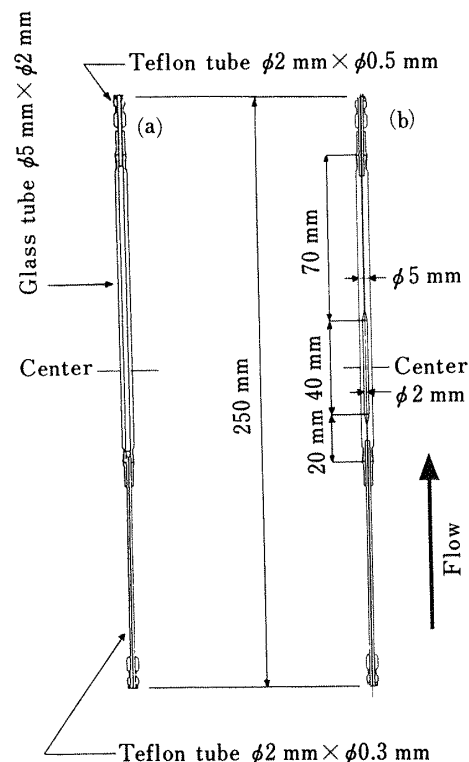


Fig. 1 Schematic diagram of the NMR flow cells (a): cell volume *ca.* 400 μL ; (b): cell volume, *ca.* 125 μL

ン製チューブで接続した。

2.2 試料及び試薬

試料には、東京化成製試薬特級のパラヒドロキシ安息香酸メチル (MP), パラヒドロキシ安息香酸エチル (EP) を用いた。MP, EP は、移動相中の水及び有機溶媒が適度な比率で溶出し、かつ分離状態を観察するのに必要な分離を示す 2 種のモデル化合物として選択した。LC 移動相には、Isotec 製の重水 (D_2O) と、Aldrich 製の重アセトニトリル (CD_3CN) を、容量比 7 : 3 で混合したものを用いた。

2.3 実験操作

2.3.1 流量とスピン-格子緩和時間、シグナル線幅の関係の検討 セミマイクロ LC 装置から、インジェクターとカラムを取り外し、EP を LC 移動相で 0.2% (w/v) に調製した溶液を巡回させ、0~1000 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流量で測定を行った。スピン-格子緩和時間 (T_1) の測定は、反転回復法により、観測周波数 4000 Hz, データポイント 16 K で、HDO シグナルをホモゲートデカッ

プリング法でサプレッションしながら 1 スキャンで行った. シグナル線幅検討用の ¹H-NMR 測定は, 90° パルスを用いて, 観測周波数 4000 Hz, データポイント 16 K で, HDO シグナルをホモゲートデカップリング法でサプレッションしながら 1 スキャンで行った.

2・3・2 フローインジェクション測定による解析限界の検討 セミマイクロ LC 装置から, カラムを取り除き, 流量を 100 μl/min とし, EP の注入量が 10~50 μg になるように, LC 移動相で 0.05~0.25% (w/v) に調製した EP 溶液をそれぞれ 20 μl 注入し, NMR 測定を行った. あらかじめ紫外検出器でピークが検出されてから, プローブに到達するまでの時間 (約 4 分) を測定しておき, この時間を考慮して, 目的物質のスペクトルを測定した. ¹H-NMR 測定は, 45° パルスを用いて, 観測周波数 4000 Hz, データポイント 8 K で, HDO シグナルをホモゲートデカップリング法でサプレッションしながら, 繰り返し時間 1.2 秒で 128 回積算して行った.

2・3・3 on-flow, stop-flow 測定の検討 流量を 100 μl/min に設定し, MP と EP を LC 移動相で, それぞれ 0.25% (w/v) になるように調製した試料溶液を 20 μl 注入して測定を行った. ¹H-NMR 測定条件及び測定のタイミングは, 2・3・2 と同じ条件を用いた.

2・3・4 フローセル内での試料の拡散に関する検討 上記 on-flow 測定法で, MP と EP を LC 移動相で, それぞれ 0.5% (w/v) になるように調製した試料溶液を

20 μl 注入し, 20 秒間隔で ¹H-NMR スペクトルを測定した. セル容量約 125 μl のフローセルについても, 同様の測定を行った. ¹H-NMR 測定は, 積算回数を 16 回に設定した以外は 2・3・2 と同じ条件を用いた. 測定終了後, ¹H-NMR スペクトルにおける MP と EP のメチル基のシグナルの積分値をプロットしてクロマトグラム (protonogram) を作成した.

3 結果と考察

3・1 流量とスピン-格子緩和時間 (T_1), シグナル線幅の関係の検討

Zhernovoi¹²⁾ の検討により, T_1 と流量は式 (1) の関係にあり, 流量の増加に伴い T_1 が短くなることが知られている.

$$(1/T_{\text{OBS}}) = (1/T_{\text{STATIC}}) + (1/Z) \quad (1)$$

$$Z = V_{\text{CELL}}/V$$

T_{STATIC} ; 移動相停止時の T_1

V_{CELL} ; 発振コイル長に対応するフローセル容量

V ; 移動相の流量

流量と T_1 の関係は Fig. 2 に示したとおりであり, 実測値(a), 式(1)による理論値(b)共に全体的な傾向は一致したが, セミマイクロ領域の 0~200 μl/min の流量における T_1 の実測値は, 流量の低下に対し指数的な増加傾向を示す理論曲線とは異なり, 一種の飽和的傾向を示した. 又, この傾向は観測したすべてのシグナルで同

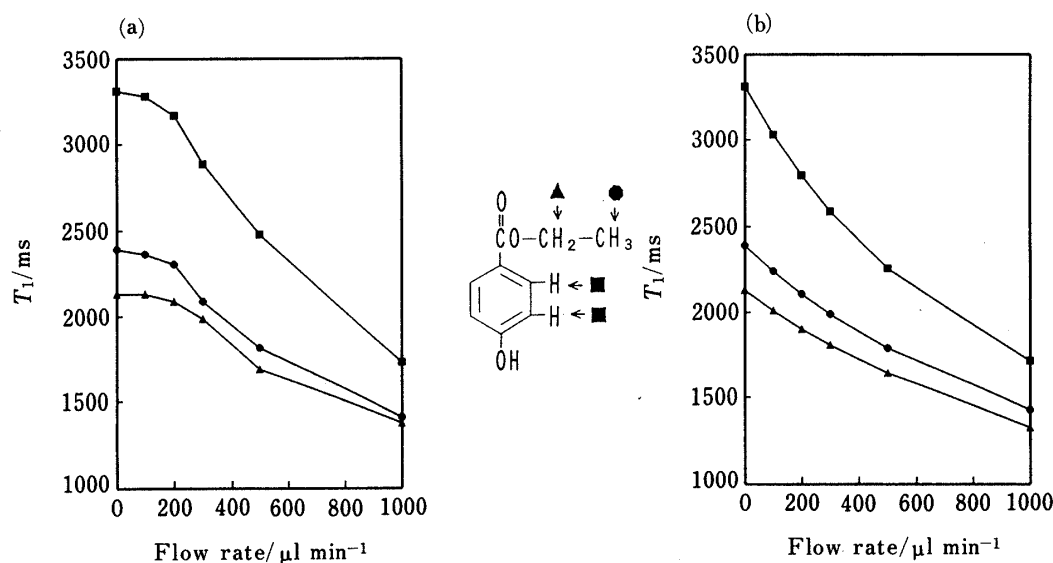


Fig. 2 The effect of flow rate on T_1

(a): experimental plot of T_1 vs. flow rate; (b): theoretical plot of T_1 based on Eq. (1) vs. flow rate

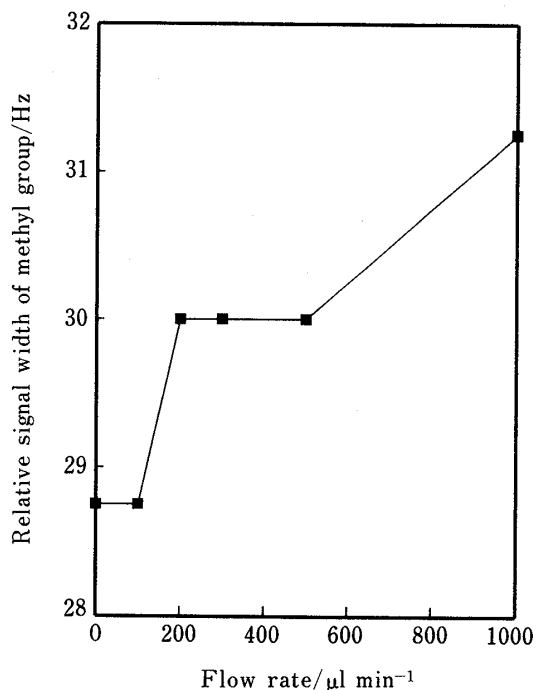


Fig. 3 The effect of flow rate on signal width

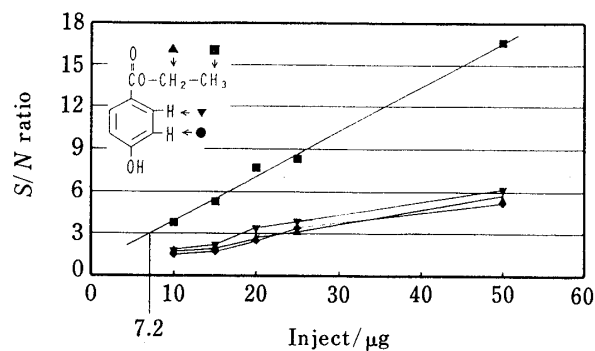


Fig. 4 System sensitivity for EP

Flow rate: 100 $\mu\text{l/min}$, 128 scans

様であった。流量が 200 $\mu\text{l/min}$ 程度まで T_1 が低下しない理由としては、フローセルの内径が影響しているものと考えられた。すなわち、流量が 100 $\mu\text{l/min}$ のときを例にとると、フローセル内での移動相の線速度は約 0.53 mm/s となり、この程度の線速度で観測される T_1 は、移動相停止時とほとんど変わらないのではないかと考察された。

流量とシグナル線幅の関係は、流量の増加、すなわち検出セル内での測定対象物質の滞留時間が短くなると増加することが知られている¹¹⁾。流量とメチル基のシグ

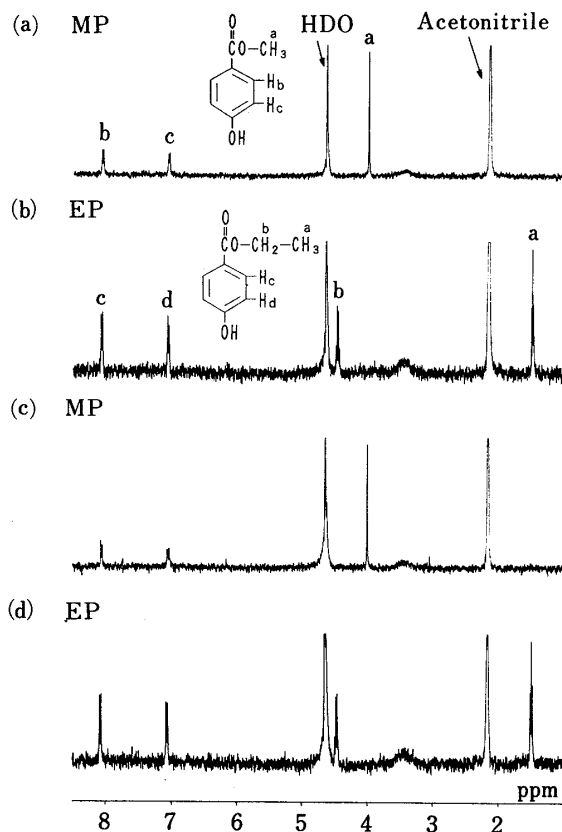


Fig. 5 Semimicro LC/ ^1H -NMR spectra

50 μg each of MP and EP were injected to the column. Column: CAPCELL PAK C_{18} UG120 (250 $\times$ 1.5 mm i.d.); Flow rate: 100 $\mu\text{l/min}$, 128 scans.

(a): on-flow spectrum of MP; (b): on-flow spectrum of EP; (c): stop-flow spectrum of MP; (d): stop-flow spectrum of EP

ナルの線幅の関係は、EP のメチル基のトリプレットシグナルの線幅を調べることで、便宜的に検討した。その結果を Fig. 3 に示すが、流量の増加に伴うシグナルの線幅の増加はほとんど認められず、特にセミマイクロ領域の 0~200 $\mu\text{l/min}$ の流量における増加は移動相停止時に比較して約 4% と少なく、実的には問題のないものであった。

以上の検討の結果、セミマイクロ領域の 100~200 $\mu\text{l/min}$ の流量範囲では、流量の増加に伴う T_1 の減少がほとんど見られず、又流量の増加に伴う線幅の増加もほとんど見られなかったことから、中間流量域である 500~1000 $\mu\text{l/min}$ に比較して、より安定な測定が可能と考えられた。従って、流量は内径 4.6 mm のカラムを 1000 $\mu\text{l/min}$ の流量で用いたとき、線流速がほぼ等しくなる 100 $\mu\text{l/min}$ を用いることとし、以下の検討を行

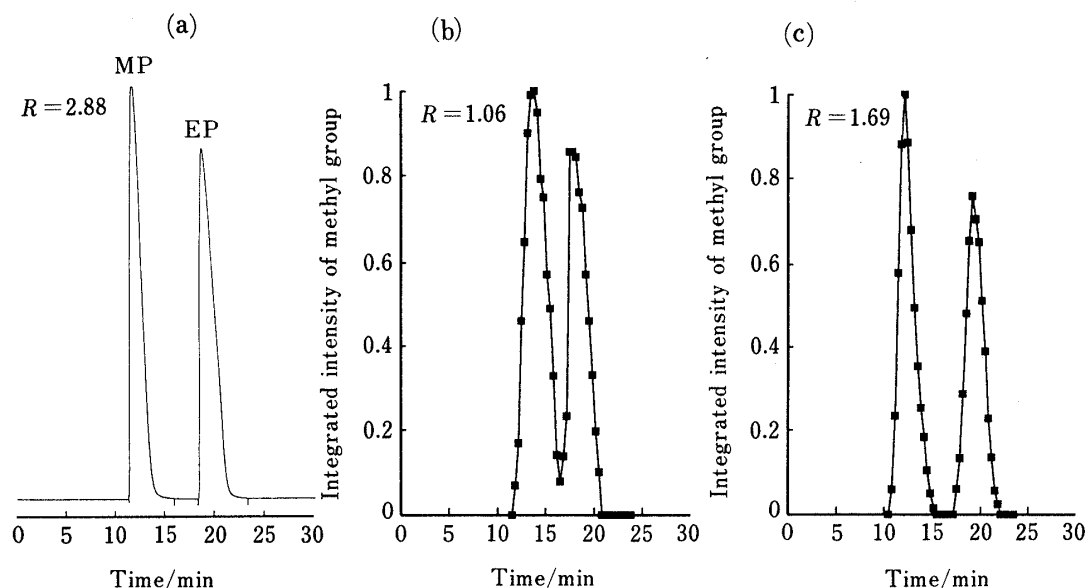


Fig. 6 Separation of MP and EP at two different flow cells (125 μl and 400 μl)
 100 μg each of MP and EP were injected to the column. Flow rate: 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ (*
 R =resolution). (a): UV chromatogram (290 nm); (b): plot of integrated intensity of
 methyl group vs. accumulation start time (each accumulation time is 20 s) at a 400 μl
 flow cell; (c): plot of integrated intensity of methyl group vs. accumulation start time
 (each accumulation time is 20 s) at a 125 μl flow cell

った。

3・2 フローインジェクション測定による解析限界の検討

フローインジェクション測定における, 注入量と EP の各シグナルの SN 比との関係を Fig. 4 に示した. 各シグナルの SN 比は注入量に対し, ほぼ直線的に増加したが, すべてのシグナルの SN 比が 3 以上となる注入量を解析限界と定義すると, 本システムでの EP の解析限界は約 25 μg であった. 又, Fig. 4 のメチル基のデータには, 回帰分析を行った結果を併せて示したが, 回帰式から算出した SN 比 3 を与える注入量は 7.2 μg であり, LC/NMR で従来より報告されている検出限界の数 μg ¹¹⁾と比較しても遜色のないものであった.

3・3 on-flow, stop-flow 測定の検討

MP, EP 混合溶液の on-flow, stop-flow 測定結果は Fig. 5 に示すとおりであり, MP, EP 共に良好なスペクトルが得られた. それぞれのスペクトルにはサプレッションを行った HDO シグナルの消え残りと, CD_3CN 中に含まれる D 置換が不完全なアセトニトリルのシグナルが観測されたが, 有機溶媒に CD_3CN を用いたた

めに, 移動相シグナルの影響によるシグナル観測が不可能になる領域を最小に抑えることができた. 又, on-flow と stop-flow 測定のスペクトルを比較すると, ^1H -NMR 測定条件が同一であることから, 大きな違いは認められず, stop-flow 測定により生じるフローセル外への試料の拡散はほとんどないことが示唆され, 二次元 NMR への応用も期待できた.

3・4 フローセル内での試料の拡散に関する検討

フローセル内で試料の拡散の状況を検討するため, protonogram と紫外検出器によるクロマトグラムを比較した. 又, 今回の検討に主として用いた容量が 400 μl のセルに対し, 容量が 125 μl のセルで測定した protonogram を比較することにより, セル容量が試料の拡散に及ぼす影響の検討を行った. 紫外検出器によるクロマトグラム, 紫外検出器からフローセルへの到達時間を考慮し保持時間を補正した protonogram, 及び分離度 (R) を Fig. 6 に示すが, 紫外検出器によるクロマトグラムは R が 2.88 であり, 完全に二つのピークが分離されているのに対し, セル容量が約 400 μl の protonogram は R が 1.06 であり, 二つのピークに重なりが認められ, 明らかにフローセル内での試料の拡散が示唆さ

れた。又、セル容量が約 125 μl の protonogram の R は 1.69 となり、大幅な改善が認められたものの、紫外検出器での分離を再現するには至らなかった。

LC/ ^1H -NMR 法にセミマイクロ LC を適用するため検討を行った結果、EP のメチル基の検出限界は 7.2 μg であり、従来の LC/NMR の報告とほぼ同等であった。一方、セミマイクロ LC にとっては過量の試料負荷となり、かつフローセル内での試料の拡散が認められたことから、フローセルの最適化等により試料の拡散を改善する必要が示唆された。しかし、使用する溶媒の量は通常の LC の 1/5~1/10 の 6 ml/h であるため、有機溶媒に高価な重水素化溶媒を使用することが可能となり、そのため容易に溶媒シグナルをサプレッションすることができた。その結果、試料シグナルの検出可能領域を拡大することができ、本セミマイクロ LC/NMR システムの価値を示すことができた。

本研究を行うにあたり、プローブを貸与していただいた日本電子(株)に深謝いたします。

(1994 年 2 月, Separation Sciences '94 で一部発表)

文 献

- 1) N. Watanabe, E. Niki: *Proc. Japan Acad.*, **54**, 194 (1978).
- 2) D. A. Laude Jr., C. L. Wilkins: *Anal. Chem.*, **56**, 2471 (1984).
- 3) D. A. Laude Jr., R. W. K. Lee, C. L. Wilkins: *Anal. Chem.*, **57**, 1464 (1985).
- 4) A. Klaus, M. Kunst, B. Ernst: *J. Chromatogr.*, **463**, 355 (1989).
- 5) M. Spraul, M. Hofmann, P. Dvortsak, J. K. Nicholson, I. D. Wilson: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **10**, 601 (1992).
- 6) M. J. Seddon, M. Spraul, I. D. Wilson, J. K. Nicholson, J. C. Lindon: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **12**, 419 (1994).
- 7) M. Spraul, M. Hofmann, J. C. Lindon, J. K. Nicholson, I. D. Wilson: *Methodol. Surv. Bioanal. Drugs*, **23**, 21 (1994).
- 8) K. Hatada, K. Ute, M. Kashiya, M. Imanari: *Polym. J.*, **22**, 218 (1990).
- 9) K. Albert, U. Braumann, L. H. Tseng, G. Nicholson, E. Bayer, M. Spraul, M. Hofmann, C. Dowle, M. Chippendale: *Anal. Chem.*, **66**, 3042 (1994).
- 10) K. Albert: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **34**, 641 (1995).
- 11) K. Albert: *J. Chromatogr. A*, **703**, 123 (1995).
- 12) A. I. Zhernovoi, G. D. Latyshev: "NMR in a Flowing Liquid", (1995), (Consultants Bureau, New York).

要 旨

NMR に、市販のセミマイクロ LC を接続し、外径 5 mm、内径 2 mm、検出部容量 40 μl 、総容量 400 μl のガラス製フローセルにより、セミマイクロ LC/ ^1H -NMR 法の検討を行った。流量と T_1 、流量とシグナルの線幅の関係は、流量が 0~200 $\mu\text{l}/\text{min}$ のセミマイクロ領域では変化がなく、流量の影響はほとんど認められなかった。分離カラムに内径 1.5 mm、長さ 25 cm のポリマーコートシリカ ODS を、移動相に重水と重アセトニトリルの混液を流量 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ で用い、パラヒドロキシ安息香酸エチルのメチル基の検出限界を求めたところ約 7 μg となり、通常の LC で報告されている数 μg とほぼ同等であった。本装置では、使用する溶媒量が従来の 1/5~1/10 の 6 ml/h であり、高価な重水素化溶媒を大量に用いることによって生じる費用面の問題が緩和されたため、有機溶媒にも重水素化溶媒を用いることができ、容易に溶媒シグナルの影響を減少させることが可能となった。又、試料シグナルの検出可能領域も拡大することができ、セミマイクロ LC/ ^1H -NMR の実用的価値を示すことができた。