

Technical Review

液体クロマトグラフィー核磁気共鳴 (LC-NMR) の 有効な使い方 ——医薬品の類縁物質および代謝物の構造決定を目指して——

川口 謙、中野 隆行、木村 一雄

How do you use liquid chromatography-nuclear magnetic resonance (LC-NMR) effectively for structural determinations of pharmaceutical impurities and metabolites?

Ken Kawaguchi, Takayuki Nakano and Kazuo Kimura

Toray Research Center, Inc., Biological Science Labs.

10-1 Tebiro 6-chome, Kamakura-shi, Kanagawa-ken 248-0036, Japan

Abstract

Structural determinations of pharmaceutical impurities called as related substances and its metabolites are required in the process of new pharmaceuticals developments. Liquid chromatography-nuclear magnetic resonance (LC-NMR) is a powerful tool for the structural determinations in spite of its low sensitivity. In the case of low molecular weight compounds, amount of target sample needed for LC-NMR measurement using stop-flow method is 1-5 μg per a target peak. The amount is too small for NMR but too large for HPLC. To use LC-NMR effectively for the purpose, some points to keep in mind for selecting mobile phase will be provided besides those for injection of the large amount into column and analysis approach.

Keywords: liquid chromatography-nuclear magnetic resonance (LC-NMR), structural determination, pharmaceutical impurity, related substance, metabolite, high performance liquid chromatography (HPLC)

1. 緒言

新規医薬品の開発において、不純物や代謝物の構造決定は製造販売承認の申請で避けて通れない。本稿で対象としている医薬品は合成低分子医薬品であり、その不純物の化学的実態は、主に薬効主成分の熱または光分解物や添加剤との反応

物などで、類縁物質と呼ばれており、主として医薬品の保存中に生じてくるものである。医薬品の種類にもよるが、代表的な例では、原薬中で0.10%を越える含有量の不純物について構造決定の努力が義務付けられる。薬効主成分に対して約0.1%の含有量は、核磁気共鳴 (NMR) 測定にとっては極微

株式会社東レリサーチセンター生物科学研究部
〒248-0036 神奈川県鎌倉市手広六丁目10番1号
TEL: 0467-32-9807
FAX: 0467-32-0414
E-mail: Ken_Kawaguchi@trc.toray.co.jp

量のため、測定が著しく困難になる。

不純物および代謝物の構造決定は、まず感度のよい液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) から実施することが多いが、LC-MS ですべてが解決するわけではなく、未解決の成分は NMR 分析で解決を目指すことが多い。従来の方法では各成分を分離、精製してから NMR 分析をしていたが、精製する段階で苦勞することが多い。分取した目的の不純物や代謝物を乾燥 (または濃縮) する段階で分解したり、乾燥後に溶媒に不溶となったりするためである。

液体クロマトグラフィー核磁気共鳴 (LC-NMR) は、このような分取の労力を大きく低減できるため大変有用であるが [1]、まだ感度面での制約も多い。本講ではそのような制約の中で、医薬品分析においてどのように LC-NMR を有効に活用するかを解説する。

2. LC-NMR 実用化の技術的背景

LC-NMR は液体クロマトグラフィーと NMR を直結した分析機器であり、最初の報告は1978年にさかのぼる [2]。しかし実用的な分析方法となったのは1990年代半ばである。

LC-NMR の実用化の背景には、900MHz 装置などに代表される NMR 用磁石の高磁場化や検出器の改良による高感度化、及び溶媒消去技術がある。特に溶媒消去技術は、HPLC 移動相に由来する NMR シグナルを大幅に軽減し、LC-NMR の実用化に大きな力となった。以下、LC-NMR に不可欠な

技術である溶媒シグナルの消去法について述べる。

LC-NMR では溶媒シグナルの消去法として通常、WET 法 (water suppression enhanced through T1 effect) を用いて溶媒消去を行なっている [3]。WET 法を用いると、Figure 1 に示すように、溶媒がたとえ軽水であっても溶媒消去を効率的に行なうことが可能になる。以下に WET 法について説明する。

WET 法は、Figure 1 中央左の挿入図の ^1H と Gz で示したように、「選択励起パルス—pulsed-field gradient pulse」の繰り返しで構成されている (以下 pulsed-field gradient pulse を PFG と略す)。Figure 1 挿入図の ^1H と Gz は、それぞれプロトン選択励起パルス及び PFG を表している (ただし ^1H の最後の四角形は通常の励起パルスである)。挿入図の ^{13}C は下で説明するように炭素核のデカップリングパルスである。この pulse train は、消去したい溶媒プロトンシグナルを選択励起し、PFG で dephase させて溶媒シグナルをつぶし、溶媒シグナルが観測されないようにするものである。

WET 法の大きな特徴は、この pulse train を複数用いる際に、フリップアングルを調節した選択励起パルスを用いることである [3,4]。この方法により、回転磁場の不均一性やシグナル間で異なる縦緩和時間の影響をキャンセルでき、効率の優れたシグナル消去が可能になる。筆者らは、フリップアングルがそれぞれ約 (98° 、 80° 、 75° 、 152°) の 4 pulse version の WET 法を用いて溶媒消去を行なっている。

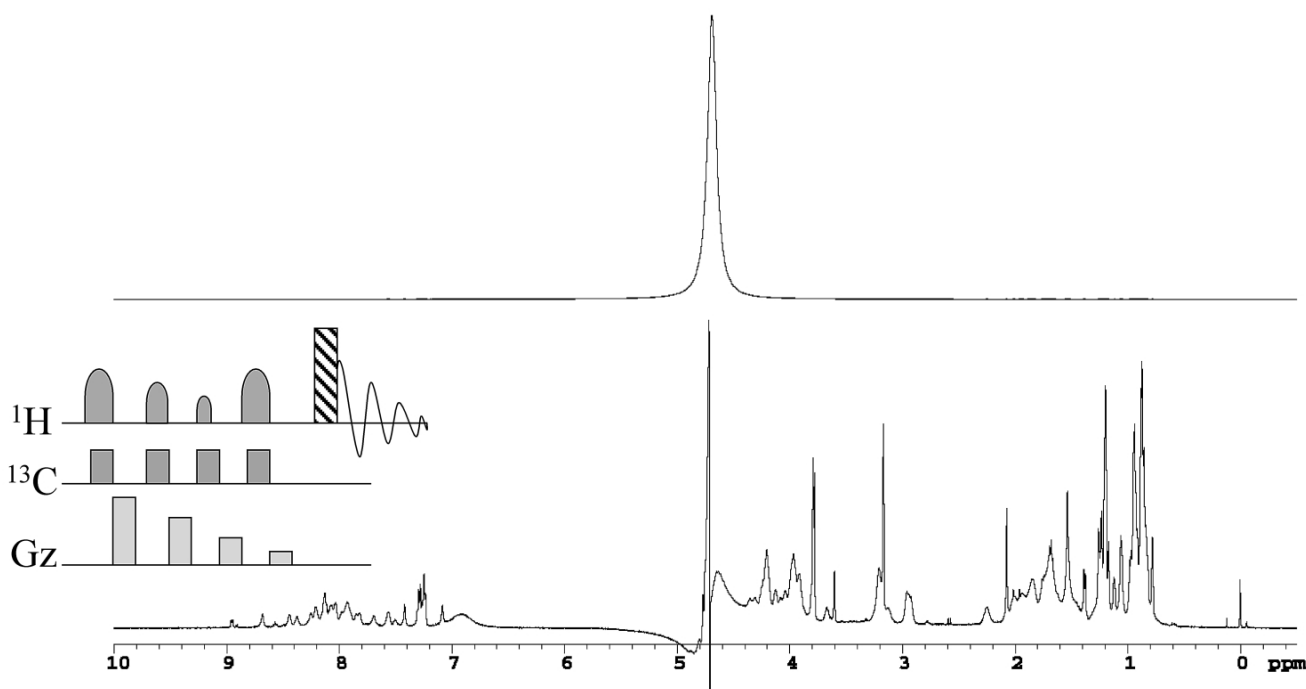


Figure 1 Solvent suppression by WET method.

(Upper) Conventional ^1H NMR measurement.

(Lower) ^1H NMR measurement by WET. WET pulse sequence is shown on the middle left-hand side (see text for details).

Sample: 2 mg/mL peptide solution in 90% H_2O , 10% D_2O .

次に PFG 強度についてであるが、溶媒シグナルから生成されるエコーシグナルを抑えるために（すなわち溶媒シグナルの消え残りを抑えるために）、PFG の強度は、前の PFG 強度の1/2（または2倍）に調節して用いている[5]。4 pulse version の WET 法では、この方法を用いると、観測パルス直前の PFG の強度は、最初に用いた PFG の強度の1/8になり、eddy-current effect（渦電流効果）による磁化成分への余分な付加を防ぎ、NMR シグナルへの悪影響を抑えるためにも有利になる。

最後に溶媒消去に用いる選択励起パルスについてであるが、選択励起パルス内の位相を周期的に変化させたパルス（SLP）を組み合わせて用いることにより[6]、観測中心（通常は水）から外れた溶媒シグナルの消去も同時に行うことができる。これによって水／アセトニトリルなどの混合溶媒であっても複数の溶媒シグナルを同時に消去できる。分子内に炭素を含んだ物質を溶媒として用いる際には、選択励起パルスの間に、 ^{13}C デカップリングを行なうことで、溶媒の ^{13}C サテライトシグナルも同時に消去することが可能である。 ^{13}C サテライトシグナルはメインのプロトンシグナルの1.1%のシグナル強度のため、通常の ^1H NMR 測定では妨害となることはほとんどないが、微量成分の LC-NMR 測定では、目的物の ^1H NMR シグナルよりも溶媒の ^{13}C サテライトシグナルの方が大きくなるので、消去が必要となる。

3. LC-NMR 装置と測定の実際

LC-NMR の構成は、通常の NMR 装置に HPLC と LC-NMR プローブ、制御用ソフトウェア、PFG ユニット、選択励起ユニットなどを追加して構成されている（Figure 2）。LC-NMR システムの最も大きな特徴は、LC-NMR プローブが、HPLC と直結されている事である。従って、サンプルが移動相と共に直接検出器に流れこむため、NMR 試料管が不要なシステムとなっている。また LC-NMR プローブは PFG を装備した ^1H インパルス検出タイプであるため、stop-flow 法（下記(2)参照）を用いると、 ^1H NMR 測定以外に2次元 NMR 測定（理想的には HSQC 測定などの異種核相関も含む）も可能である。

LC-NMR 測定における HPLC の条件の詳細は後述するが、通常用いられている逆相系条件のほとんどが適用可能である（ただし水の代わりに重水を用いる）。なお、LC-NMR 測定は、移動相の流れを止めるかどうかで、次の on-flow 法と stop-flow 法の2通りに大きく分けられる。

(1) on-flow 法

on-flow 法は、LC の移動相を流したまま NMR 測定を行なう方法である。NMR 測定は8回積算程度で行い、NMR 化学シフト軸と LC 保持時間軸の2次元表示で示される。この方法は、UV 吸収のない成分の検出や一斉分析で試料の全体像を把握するのに適している。しかし、8回程度の積算

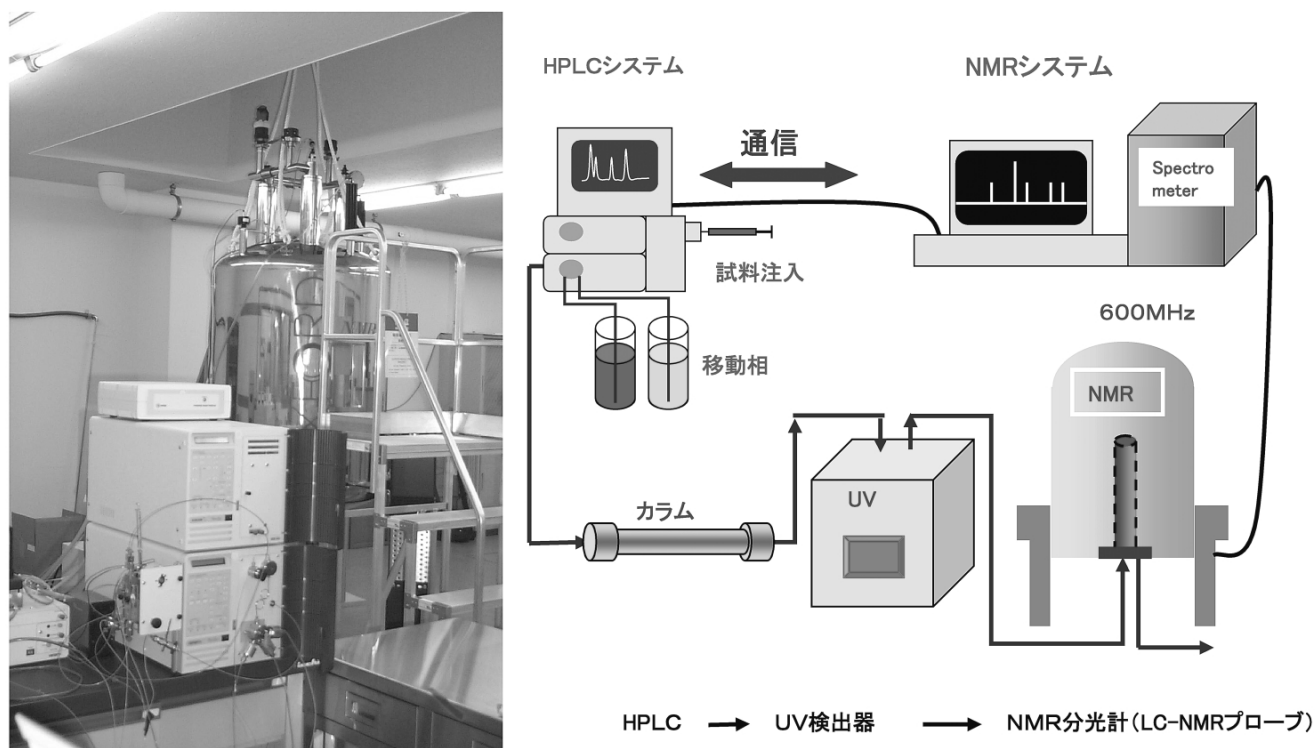


Figure 2 Schematic diagram of LC-NMR system (right) and a photograph of HPLC and magnet of LC-NMR apparatus (left).

で ^1H NMR 測定を繰り返し行うため、シグナルを検出するためには、比較的高濃度の試料が必要になる。LC-NMR 測定は、通常、目的成分が微量である試料について行う事が多いため、大部分は次に述べる stop-flow 法で測定することになる。

(2) stop-flow 法

stop-flow 法は、HPLC ピークが LC-NMR プローブに到着した時点で移動相の流れを止め、測定を行う方法である。stop-flow 法が on-flow 法と大きく異なる点は、stop-flow 法は移動相の流れを止めて測定を行うため、時間のかかる測定が可能である点である。従ってこの方法を用いれば、長時間積分を必要とする微量成分の ^1H NMR 測定や 2 次元 NMR 測定も可能になる。on-flow 法が試料の全体像を把握するのに適しているに対し、stop-flow 法は、目的成分について詳しく構造情報を得られる特徴がある。

次に stop-flow 法における測定の流れについて説明する。まず HPLC の UV 検出器でピークが観測されると、ピークが LC-NMR プローブに到達した時点で、HPLC のポンプが止まる（自動停止可能）。ポンプが止まるタイミングは、ピークが UV 検出器から NMR プローブに到達するまでの時間の遅れを考慮している。次に、ポンプを止めた状態で NMR 測定を開始することになるが、HPLC のクロマトパターンに対する拡散などの影響は、数時間以内の NMR 測定であればほとんど影響ない。Figure 3 に stop-flow 法の測定例を示す。Figure 3 のクロマトグラムは、「P1 で停止—NMR 測定—流れを再開—P2 で停止—……」と P3 まで繰返して NMR を測定した結果であるが、拡散などの影響をほとんど受けていないことがわかる。

Figure 3 の NMR 測定では、内径 4.6mm の逆相カラムと、通常の HPLC 溶媒であるアセトニトリルを使用しているが、溶媒由来のシグナルは、WET 法を用いて消去しているので、NMR スペクトルの重大な妨害にはなっていない。しかし、アセトニトリルのシグナル (1.92ppm) から約 ± 0.2 ppm の領域に検出される成分のシグナルは、アセトニトリルのシグナルと共に消去されるので観測が困難となる。その場合は、溶媒を重アセトニトリルにする、あるいは重メタノール等に変えるなどの対処方法が考えられる。

なお、stop-flow 法は、溶媒消去技術が必要になる事以外は、通常の NMR と変わらないため、2 次元 NMR 測定も可能である。ただし、感度面の制約がある。

4. LC-NMR を有効に使うために

医薬品の不純物や代謝物の LC-NMR 測定では、ともかく目的成分が微量であることが、最大の難関となる。その一方で、移動相については LC-MS よりも有利な点もある。以下に有効に使うための留意点などについて述べる。

(1) LC-NMR の感度

筆者の研究室で使用している LC-NMR は、600MHz 装置に常温 LC プローブ（すなわち極低温プローブではない）を装着した構成であり、 ^1H NMR を観測するためには、目的成分が HPLC の 1 ピークあたりに 1~5 μg 以上存在することが必要である（低分子化合物を想定した場合）。この量で ^1H NMR の測定時間は数時間から 15 時間程度かかる。したがって各 LC ピークで送液を停止して stop-flow モードで測定する。また、 ^1H - ^1H 2 次元 NMR を測定するためには、約

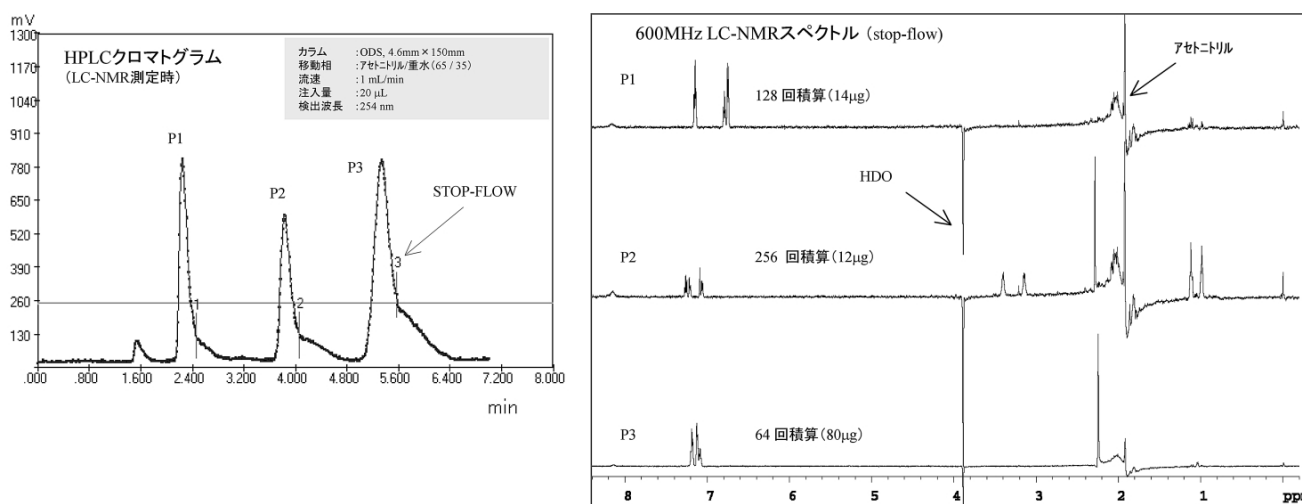


Figure 3 LC-NMR (stop-flow method).

(Left) HPLC chromatogram when LC-NMR was measured. Flow of mobile phase was stopped at position 1, 2, 3 and re-flow after NMR measurements.

(Right) LC-NMR spectra by stop-flow method (^1H NMR, 600MHz).

P1: Phenol (14 μg), P2: *N,N*-diethyl-*m*-toluamide (12 μg), P3: toluene (80 μg).

15~20 μ g 以上が必用である。なお、極低温プローブ（クライオプローブ）を装着した装置では、感度は上記の3~5倍程度になる（ただし塩が含まれる場合は感度上昇率が下がる）。

ところで、上記の感度では0.1%含有の不純物について、1回の注入ではLC-NMR (^1H NMR) を直接観測できない。そのために、目的成分を予備分取あるいは予備濃縮してから注入することになる。経験的に直接観測できる含有量は約0.6%以上の場合である。

なお、HPLCの1つのマイナーピークに1~5 μ gという量は、NMRにとっては微量でも、HPLCにとっては過剰注入となることが多いため、大量に注入してもクロマトグラムのピークパターンが再現するかの確認が必要となる（ピーク形状が多少悪くても目をつぶる）。まさに“too small for NMR but too large for HPLC”である。

(2) LC-NMRの移動相について

LC-NMRで用いる移動相の選択基準は、 ^1H NMRスペクトルの妨害にならないことである。そのために ^1H シグナルの種類が少ない溶媒が望ましい。例えば、水、アセトニトリルなどである。ヘキサンやイソプロピルアルコールはNMRシグナルが複数の場所に観測されるので適していない。

一方、NMR装置の分解能調整や少しでも溶媒シグナルの妨害を減らしたい事情から、重水素化溶媒を使うことが多い。原理的にはすべてを重水素化溶媒にする必用はないが、微量測定のためには実用上は必要となる。そのような溶媒の種類としては、重水、重アセトニトリルを使用することが多い。メタノールは、HPLCの配管などにかかり長期にわたって吸着するため使いづらく、また、重メタノールはコストがかさむので、できれば避けたい。

添加塩や緩衝液についても、 ^1H NMRスペクトルの妨害にならなければ使用できる。例えばリン酸緩衝液はLC-MSには向かないがLC-NMRには適している。また酢酸塩よりもギ酸塩の方がNMRスペクトルの妨害となりにくい。

移動相にグラジエントを用いる場合も、急勾配なグラジエント以外は問題ない。通常は毎分2%以下が望ましい。急勾配な場合は、LC-NMRのセル内（通常60~120 μ L）の上下で濃度差が生じ、NMRの分解能が上がらなくなるためである。

なお、重水素化溶媒を移動相に使うと保持時間が遅くなると言われているが、いまだ確認されていないと思われる。これは筆者が10年ほど前にNMRメーカー（当時はバリアン）のユーザーズミーティングで話題にしたことがきっかけの一つと考えているが、当時も検証されていたわけではない。

5. 構造解析

LC-NMRではほとんどの場合 ^1H NMRのみで解析することになるが、幸い、類縁物質でも代謝物でも、未変化体（薬効

成分主成分）の一部分のみが構造変化した場合が多いので、未変化体とのスペクトル及び帰属を比較することで、 ^1H NMRとLC-MSだけで解析できることが多い。以下に構造解析の例を示す。

(1) 酢酸ゲラニルに見出された不純物

市販試薬（酢酸ゲラニル）にLC-NMRを適用した例を示す[1]。市販試薬の酢酸ゲラニルは、HPLC分析から、主成分の酢酸ゲラニル以外に不純物が含まれていることが分かっていた。そこで、主成分および不純物ピークについてstop-flow法で ^1H NMRスペクトルを測定した。Figure 4に市販試薬（酢酸ゲラニル）のLC-NMRスペクトルを示す。酢酸ゲラニルと不純物のNMRスペクトルを比較すると、不純物のスペクトルでは、二重結合性プロトンが1個無くなると共にメチルピークの化学シフトが変化し、さらにメチレン・メチンピークが新たに出現したことがわかる。変化したメチルピークのシグナル形状もシングレットからダブルレットピークに変化していた。これらの結果から、不純物は酢酸ゲラニルの中央付近の二重結合が還元された構造と解析できる。この結果は高分解能LC-MSでも確認された。一般的に不純物の構造解析は、未変化体のNMR帰属やLC-MSの結果が事前に分かっているとうまくできることが多い。

(2) Diclofenac sodiumの光分解物

原薬であるDiclofenac sodiumとその光分解物のLC-NMRを解析した結果をFigure 5に示した。光分解物では、低磁場側にシフトした2種類のシグナルがあり、また、原薬のIに相当するシグナルが消失していることが特徴的であった。一方、光分解物についてのLC-MSの結果から、塩素2個が脱離していること、さらにLC-MS/MSの結果からカルボキシル基の構造は保存されていることが推測されていた。以上のことから、Figure 5に示すような分子の中央で環化した構造が光分解物であると推定された。この結果は、NMRの化学シフト予測によっても妥当性が確認された。

(3) 極低温プローブの利用

上記と同じ原薬Diclofenac sodiumのアルカリ熱分解物に含まれる0.05%含量の不純物について、700MHz装置に極低温プローブを装着してLC-NMR測定で直接観測を試みた例がFigure 6である。直接観測というのは、濃縮操作などの前処理なく、試料溶液をそのままLC-NMRに注入して観測することを指している。

通常は0.1%レベルの不純物では何らかの濃縮操作を行ってからLC-NMRに導入するが、極低温LC-NMRプローブを利用すれば、感度が従来よりも3~5倍程度向上する。このプローブを備えた700MHz NMR装置を利用して0.05%前後の含有量ピークに対して直接観測することに成功した[7]。ただし、ここで測定したHPLCピークには2成分以上が含

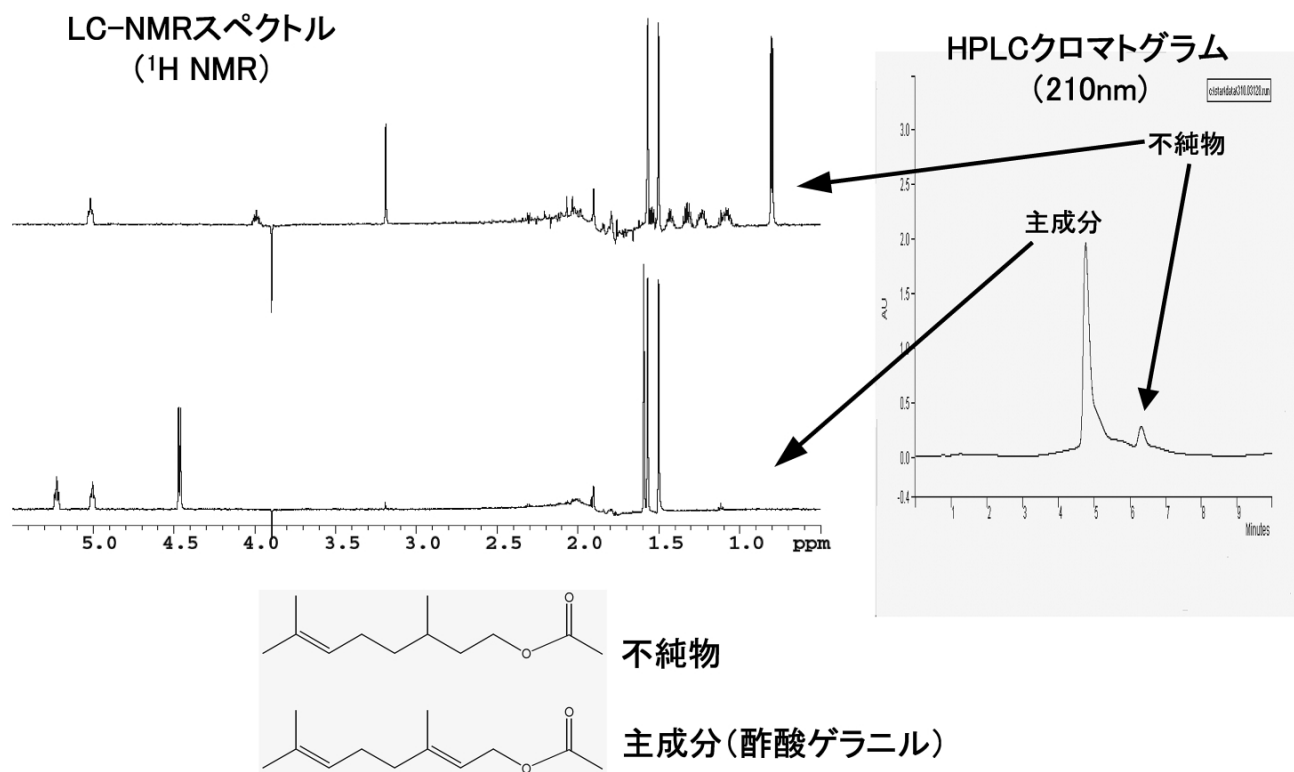


Figure 4 LC-NMR analysis of an impurity found in Geranyl acetate.

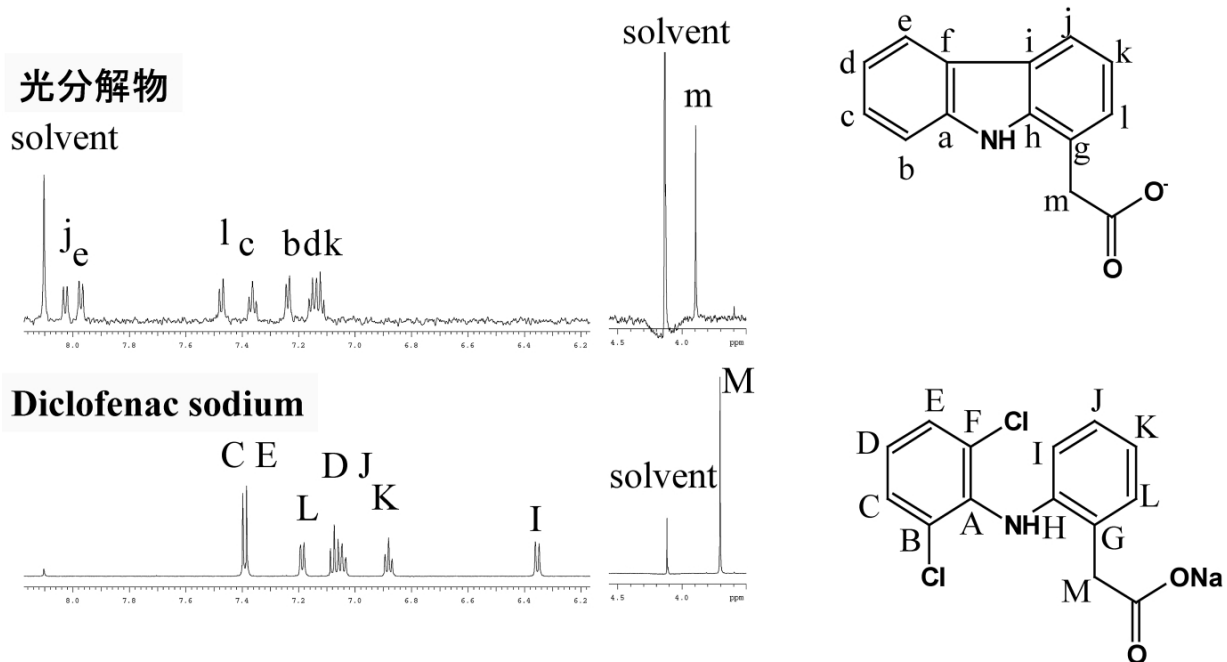


Figure 5 LC-NMR analysis of a photolyte of Diclofenac sodium.
(Upper) LC-NMR spectrum of the photolyte and the estimated structure.
(Lower) LC-NMR spectrum and the structure of Diclofenac sodium.

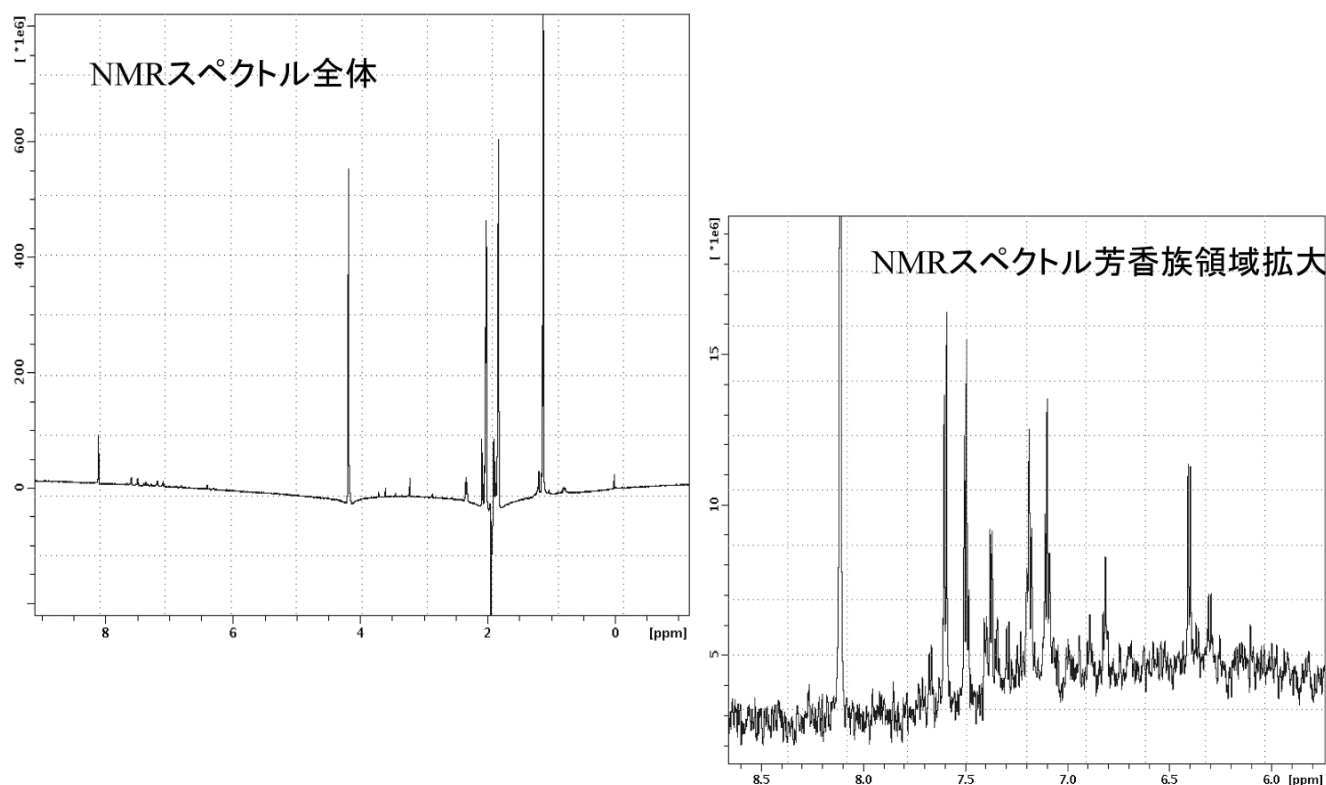


Figure 6 A trial measurement of a 0.05% content impurity by direct injection of alkaline thermal degradation products of Diclofenac sodium by using cryo-LC probe with 700 MHz NMR [7].

まれていることが判明し、推定構造を得るには至っていない。

(4) Long range COSY の利用

これまで述べてきたように LC-NMR では微量成分を測定するため、通常の構造解析では威力を発揮する HMBC (異種核遠隔結合相関 2 次元 NMR) などの測定法が感度不足のため利用できない。そこで筆者らが着目したのが Long range COSY 法である。この方法は、HMBC が登場する以前である 1980 年代前半までは利用されていたものである。感度も HMBC や NOESY よりは高く、LC-NMR の測定法 (pulse sequence) に組み込むのも比較的簡単である。Figure 7 で示したように、15 μ g のイノシンで糖部分の 1' 位プロトンと塩基の 8 位プロトンの遠隔相関が観測できた[8]。このように HMBC や NOESY の測定が感度面で難しい場合でも利用でき、構造解析に大変有用であり、まさに温故知新である。

6. LC-NMR-DOSY への展開

LC-NMR-DOSY 法は、その名の通り LC-NMR 法と DOSY 法を組み合わせたもので、筆者らが開発した方法である[9]。LC-NMR 法が HPLC の保持時間で混合物のシグナルを分離するのにに対し DOSY 法 (Diffusion Ordered Spectroscopy) は、分子の自己拡散係数の違いによって混合物の NMR シグナル

を分離する方法である[10,11]。DOSY 法に比較して、LC-NMR 法は分離能力、感度ともに優れているが、1 本の HPLC ピーク内に複数の成分が含まれる場合、LC-NMR 法で混合物のシグナルを分離するためには、HPLC 条件を再検討することが必要になる。しかし、DOSY 法を併用すれば HPLC 条件を変えることなく、それらも分離することが可能なケースがある。

一般に DOSY 法を用い混合物のシグナルを分離するためには、試料に関して、拡散係数に大きな差があること、シグナルが重なっていないこと、濃度が高いこと (高いシグナルの S/N 比) などが要求される。これらの条件は、LC-NMR-DOSY 法を用いる際にも要求される。このため、LC-NMR-DOSY 法は、混合物を分離して観測する能力に関して言えば、適用範囲は限られる。しかし HPLC で分離が困難なケースでは、LC-NMR-DOSY 法は試してみる価値のある測定法と考えられる。

以下に LC-NMR-DOSY 法を応用した例を示す[1]。LC-NMR-DOSY 測定は、LC-NMR を用いて DOSY 測定を行うため、WET 法を組み込んだ BPPLD 法 (bipolar LED sequence) [12]を作成して行った。試料は、トルエンとトルアミドの混合試料を用い、LC 条件をあえて保持時間が重なるように調整し行った。Figure 8 に LC-NMR-DOSY 測定結果を示す。トルエンとトルアミドのシグナルが良く分離していることが

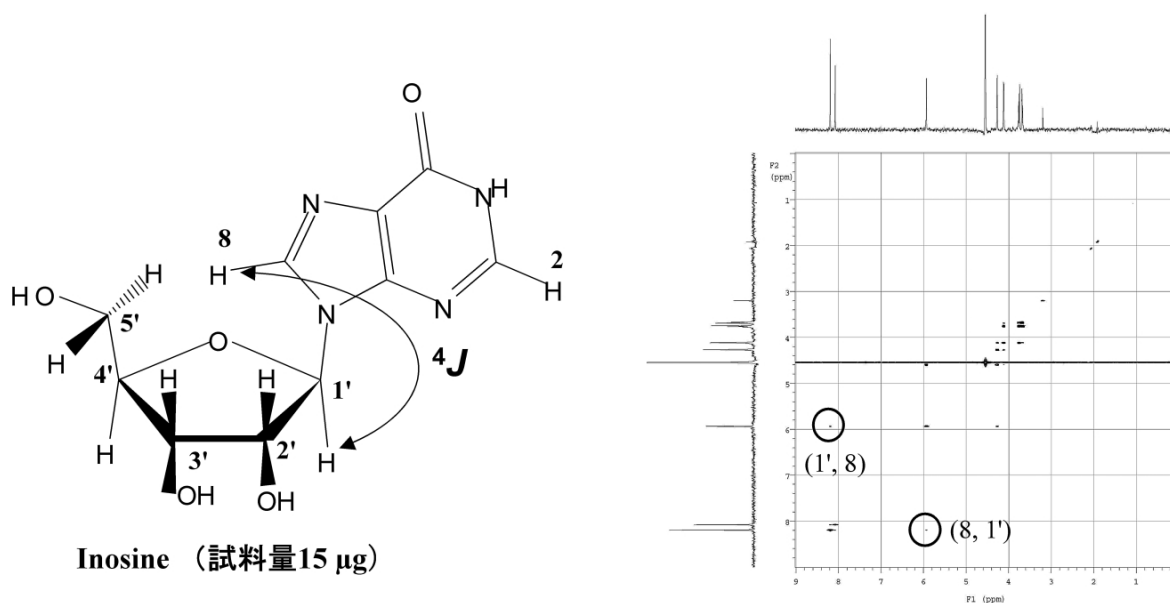


Figure 7 Long range COSY spectrum of Inosine.

The correlation between position 1' and 8 is observed by long range COSY, but can not by HMBC under small amount of sample.

わかる（拡散係数の小さい方がトルアミド）。このように、LC-NMR-DOSY法を用いると、スペクトル上ではあるが、混合物のシグナルを分離して観測することが可能なことがわかる。

7. まとめ

医薬品不純物や代謝物のLC-NMRは、感度ぎりぎりのところで分析しているのが現状である。

^1H NMR測定に必用な感度は $1 \sim 5 \mu\text{g/peak}$ 、 ^1H - ^1H 二次元NMRでは $15 \sim 20 \mu\text{g/peak}$ である（極低温プローブの利用によって、この感度は理想的には3～5倍向上することが期待される）。移動相としては水—アセトニトリル系が適しており、メタノールはできるだけ避けたい。また、LC-MSと異なりリン酸緩衝液は問題なく使用できる。

未変化体（薬効成分主成分）の ^1H NMRスペクトルの帰属が完了していることが前提となるが、未変化体と目的不純物や代謝物のスペクトルとを比較することにより、また、LC-MSの情報も総合して構造解析が達成できる。

文献

- [1] 川口 謙, 広がるNMRの世界—40人の研究者からの熱いメッセージ—; 朝倉哲郎編著; コロナ社, 2011; p 130.

- [2] Watanabe, N.; Niki, E. *Proc. Japan Acad.* **1978**, 54, Ser. B, 194.
 [3] Smallcombe, S. H.; Patt, S. L.; Keifer P. A. *J. Magn. Reson. A* **1995**, 117, 295.
 [4] Ogg, R. J.; Kingsley, P. B.; Taylor, J. S. *J. Magn. Reson. B* **1995**, 104, 1.
 [5] Moonen, C. T.; van Zijli, P. C. M. *J. Magn. Reson.* **1990**, 88, 28.
 [6] Patt, S. L. *J. Magn. Reson.* **1992**, 96, 94.
 [7] 川口 謙, 超高磁場超高感度NMR装置利用による化合物のスクリーニング; 横浜市立大学; 平成22年利用成果報告.
 [8] 中野隆行, 木村一雄, 川口 謙, 第47回NMR討論会講演要旨集; 2008; p 270.
 [9] 川口 謙, 木村一雄, 第39回NMR討論会講演要旨集; 2000; p 202.
 [10] Morris, K. F.; Jonson, C. S. *J. Am. Chem.* **1993**, 115, 4291.
 [11] Barjat, H.; Morris, G. A.; Smart, S.; Swanson, A. G.; Williams, S. C. R. *J. Magn. Reson. B* **1995**, 108, 170.
 [12] Wu, D.; Chen, A.; Johnson, C. S. Jr. *J. Magn. Reson. A* **1995**, 115, 260.

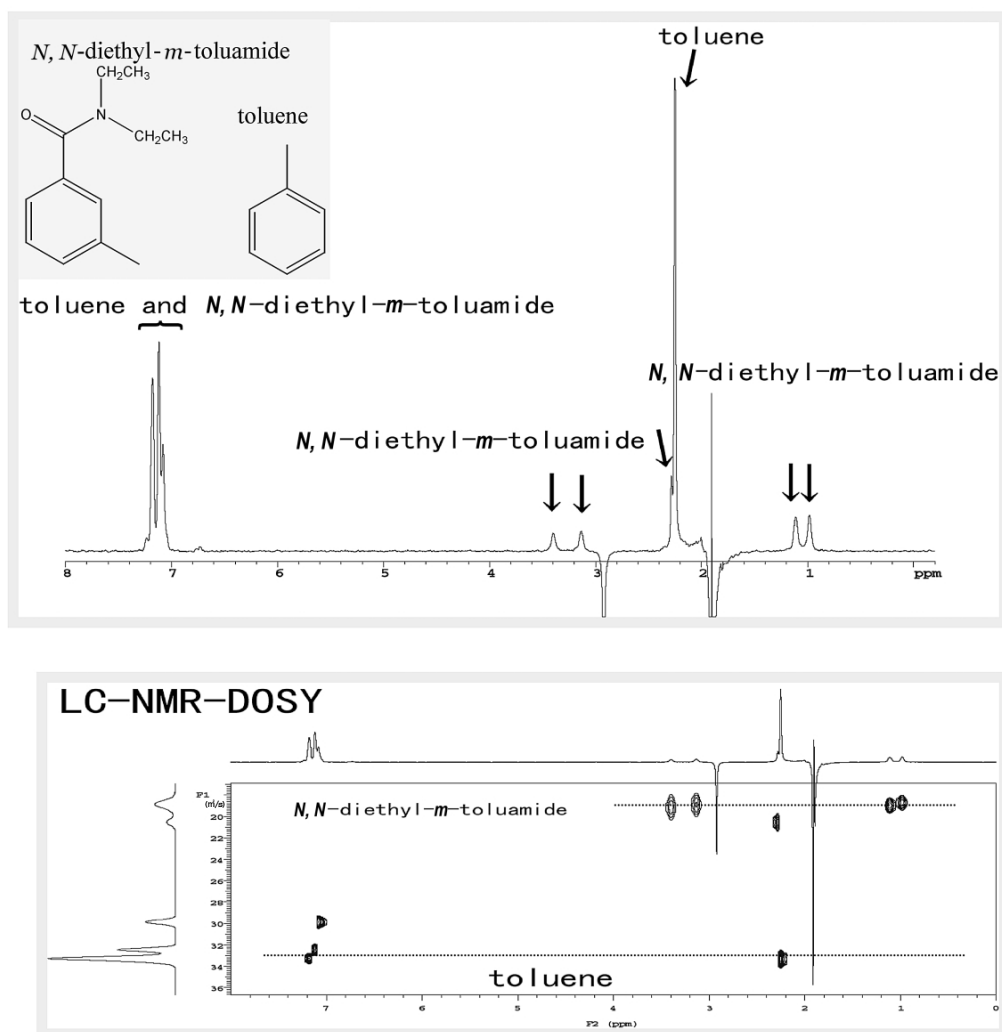


Figure 8 LC-NMR-DOSY.

(Upper) Stop-flow LC-NMR spectrum measured from a single peak.

(Lower) LC-NMR-DOSY spectrum measured from the upper spectrum.

Vertical axis: diffusion coefficient, horizontal axis: NMR chemical shift. Two mixed components in the upper spectrum are separated in the lower one by difference of diffusion coefficient.