

# LC-NMR における $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ロングレンジカップリングを利用した微量試料の構造解析例

(株)東レリサーチセンター 生物科学研究部

○中野隆行、木村一雄、川口謙

The application of small amount sample analysis by using  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  long range spin coupling in LC-NMR

Biological Science Laboratories, Toray Research Center, Inc. ○Takayuki Nakano, Kazuo Kimura, Ken Kawaguchi

In the structural analysis by NMR, HMBC is commonly used to connect sub-structures that are bonded through hetero-atom (oxygen, nitrogen). But HMBC measuring is inapplicable for the analysis of very small amount sample (for example, impurities or metabolites of drug substances).

In this research, we tried to detect the long-range correlation through nitrogen atom by using LC-NMR. 15  $\mu\text{g}$  of inosine was analyzed as a model sample. On the long range COSY spectrum, the correlation between proton 8 and 1' was clearly observed.

## 【序論】

NMR を用いて化合物の分子構造を決定する際、通常、N 原子や O 原子が途中に挟まれた箇所の結合を繋ぐためには HMBC 測定法が用いられる。しかし、医薬品の不純物や代謝物など試料が微量な場合は、感度が悪い HMBC 測定法を用いることが困難になる。

本研究では、LC-NMR を用いて N 原子を含む微量化合物の NMR シグナルを帰属することを試みた。モデル化合物としてイノシンを用い (Fig.1), HMBC 測定法の代わりに  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ロングレンジカップリングを利用した  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  long range COSY 測定法を用いた。

## 【実験】

1mg/mL に調製したイノシン重水溶液 15  $\mu\text{L}$  を LC-NMR 付属の HPLC に注入した。HPLC の移動相は重水：重アセトニトリル /9 : 1, 流速 1 mL/min で行った。

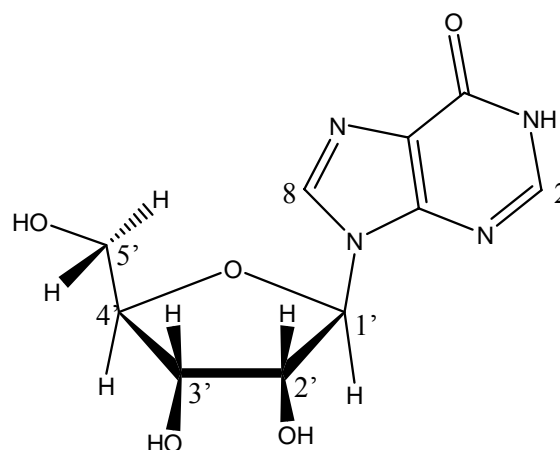


Fig.1 structure of inosine

キーワード：LC-NMR,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  long range COSY, 微量試料

著者ふりがな：なかのたかゆき, きむらかずお, かわぐちけん

イノシンのクロマトピークが観測されたところで，HPLC の送液を止めて目的成分を NMR プローブ内に閉じ込めた．続いて， $^1\text{H}$  NMR,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  Long range COSY 測定を実施した．溶媒シグナルは WET 法により消去した．

### 【結果】

得られた  $^1\text{H}$  NMR スペクトル及び  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  Long range COSY スペクトルを Fig. 2 及び Fig. 3 に示した．帰属を図中に示した．帰属には Fig. 1 に示した炭素番号を用いた．Fig. 3 に示した通り，8 位と 1' 位のプロトン相関が観測された．この様に 15  $\mu\text{g}$  の試料量で N 原子を介した結合を繋ぐことに成功した．

この方法は，LC-NMR の様な微量成分の構造解析において， $^1\text{H}$  NMR のみから構造を推定する際に有効な方法であると考えられる．

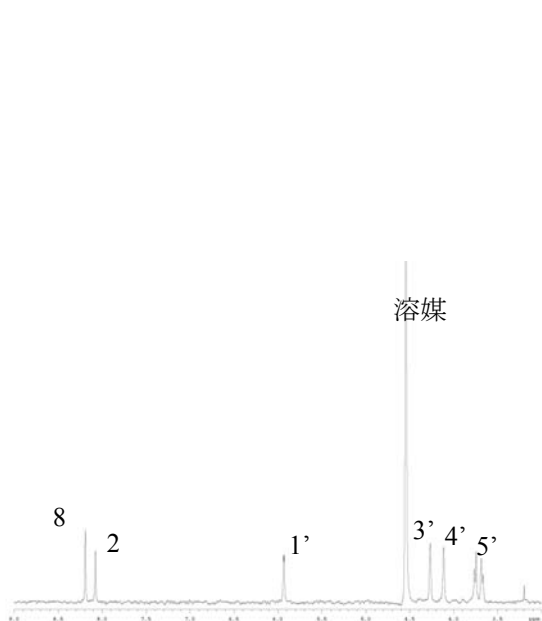


Fig. 2  $^1\text{H}$  NMR spectrum of inosine  
(experiment time 1.5 hr, line broadening 5 Hz)

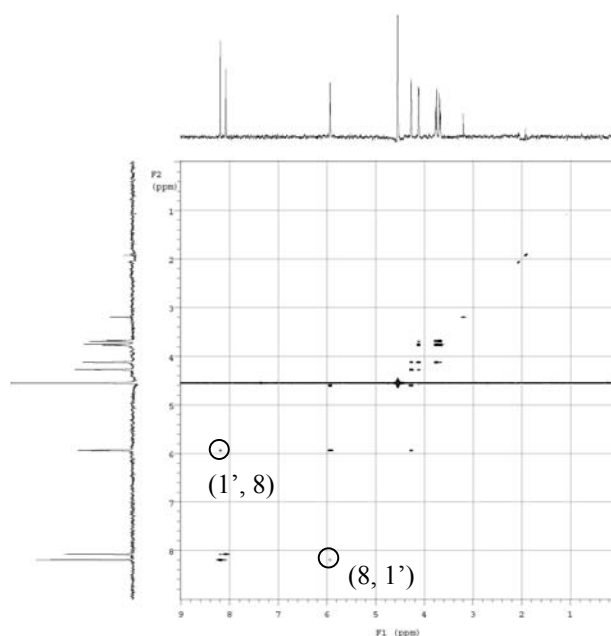


Fig. 3  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  long range cosy spectrum of inosine  
(experiment time 20 hr)