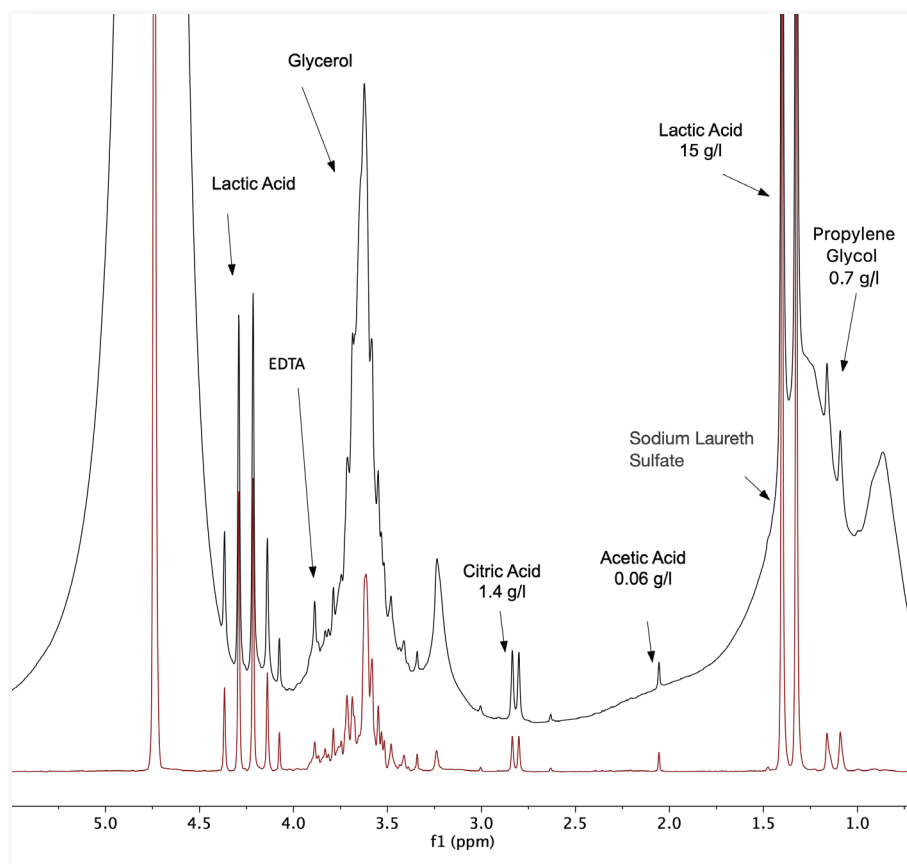


複雑な成分中に存在する 微小分子のNMRスペクトルを分析する



複雑な成分中に存在する微小分子のNMRシグナルは、通常の溶媒の大きなシグナルや高分子の幅広いシグナルの中に隠されていることがあります。このアプリケーションノートでは、効率的な溶媒抑制機能と緩和フィルターを組み合わせる事によって、隠されてしまっている微小分子のスペクトルの特定が可能となる事を説明します。Spinsolve ULTRAモデルで提供されるWET溶媒抑制モジュールとCPMGエコートレインシーケンスとを組み合わせせた、“新”WET-CPMGシーケンスは、シグナル取得前のT2緩和フィルターの導入によって可能となった、幅広いシグナル中に隠されている微小分子NMRシグナルを特定できる非常に効果的な方法です。高分子シグナルは低分子シグナルより急速に減衰する為、CPMGシーケンスの時間を適切に設定する事によって、高分子シグナルのフィルタリングを可能にします。

NMRによる複雑な組成の製剤成分の定量は、製剤に含まれる複数の化合物のシグナルの重なりによって制限される事があります。特に、試料に高分子量の分子が含まれる場合、状況は複雑になります。高分子はスペクトルの大部分を占める幅広いシグナルを持ち、微小分子のシグナルを覆い隠してしまう為、定量測定が非常に困難・不正確になります。このような複雑な混合物の例として、シャンプー、洗剤、石鹸などの家庭用品や化粧品があります。これらの製品には、界面活性剤、香料、染料、増粘剤、加湿剤、防腐剤等、特定の機能を持つ成分が含まれており、通常は水やアルコールの混合物に溶解しています。図1は一般的な液体石鹸の¹Hスペクトルを示します。最初に直面する問題は、水の巨大なシグナルが、定量を目標とする成分のシグナルの一部と重なっている事です。

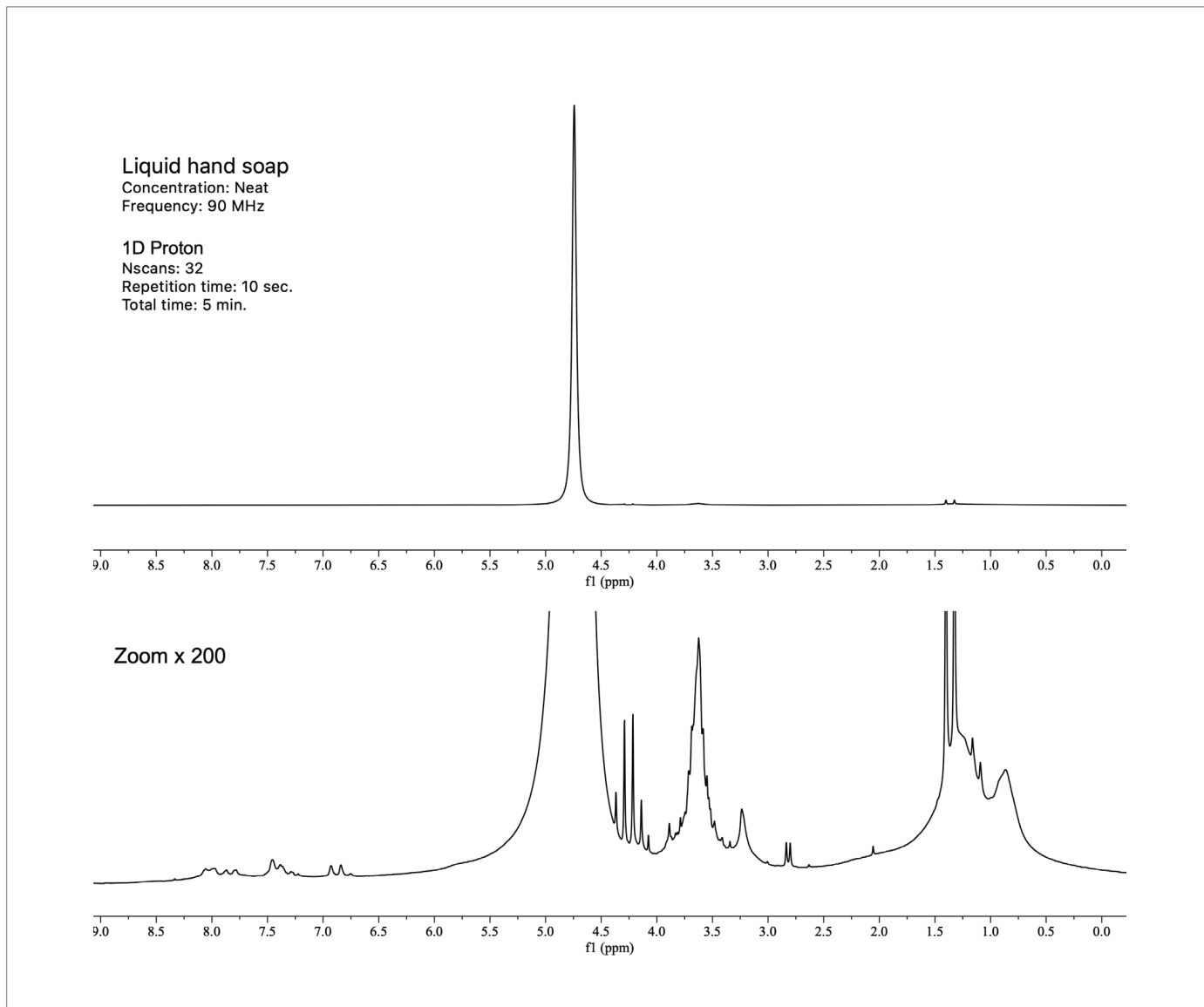


図1: Spinsolve 90 ULTRAで測定した手洗い用液体石鹸のスペクトル(前処理なし)。このスペクトルは、5分間、32回のスキャンで取得された。フルスケールでは、水のシグナルが主成分として表示され、他の成分は少なくとも2桁小さいシグナルで現れる。スペクトルを200倍に拡大すると、試料に含まれる複数の成分から生じているシグナルが示される。

Spinsolve ULTRAモデルは、WETシーケンスの適用により、溶媒シグナルの効率的抑制が可能です。図2は、溶媒を抑制した場合と抑制しなかった場合のスペクトルの比較です。溶媒のシグナルを大きく減衰する事によって、水ピークとその近辺のピークの重なりを除去できます。これらの例は、芳香族の領域や乳酸のカルテットの位置で観察されます。しかし、WETシーケンスを適用する事によって、脂肪族領域全体に見られる複数の広いシグナル(主に界面活性剤の様な大きな分子のシグナル)が、サンプル中に存在する複数の成分に起因する小さいシグナルと重なっている事が簡単に確認できます。

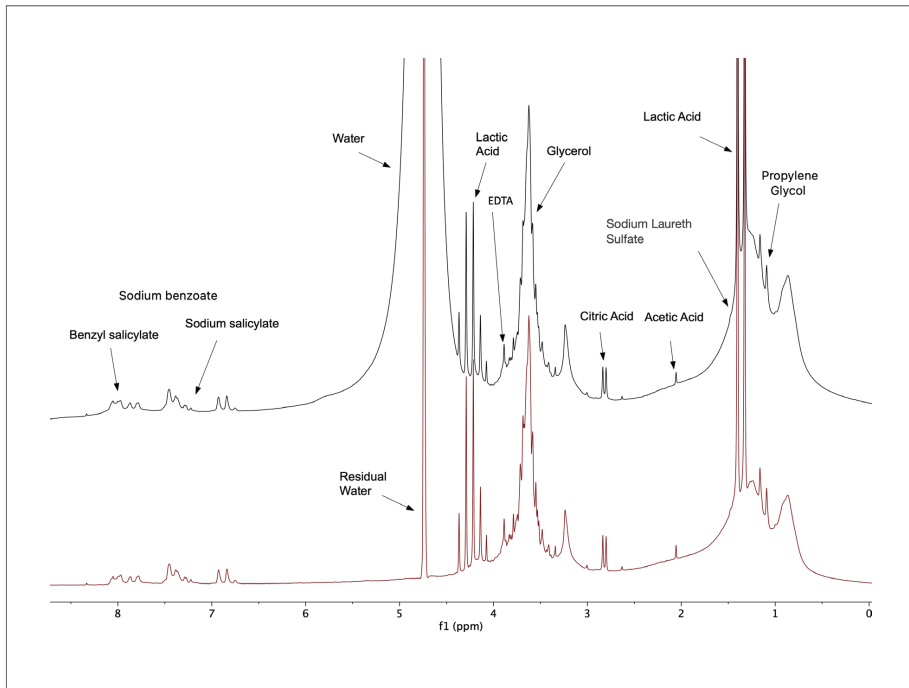


図2:溶媒を抑制した場合(赤)と抑制しない場合(黒)のスペクトル比較。4.74ppmの水シグナルを選択的に励起できるWETシーケンスを適用する事によって、大きな溶媒ピークを効率的に減衰させる事ができる。この方法は、溶媒ピーク周辺のスペクトルを明確にするのに役立ち、赤(溶媒抑制)スペクトルでは主要成分のシグナルが重なって現われている事が観察できる。

高分子の幅広いシグナルの除去に活用される強力な方法として、NMRを使用したメタボローム解析で利用されているのは、シグナル取得前に適用するT2フィルターとして機能するCPMG(Carr-Purcell-Meiboom-Gill)シーケンスとWET溶媒抑制モジュールとを組み合わせたものです。(図3 [1-3] 参照)。このような組み合わせでは、CPMGモジュールによるT2フィルターの不完全性を回避する為の高い溶媒抑制性能が要求されます。

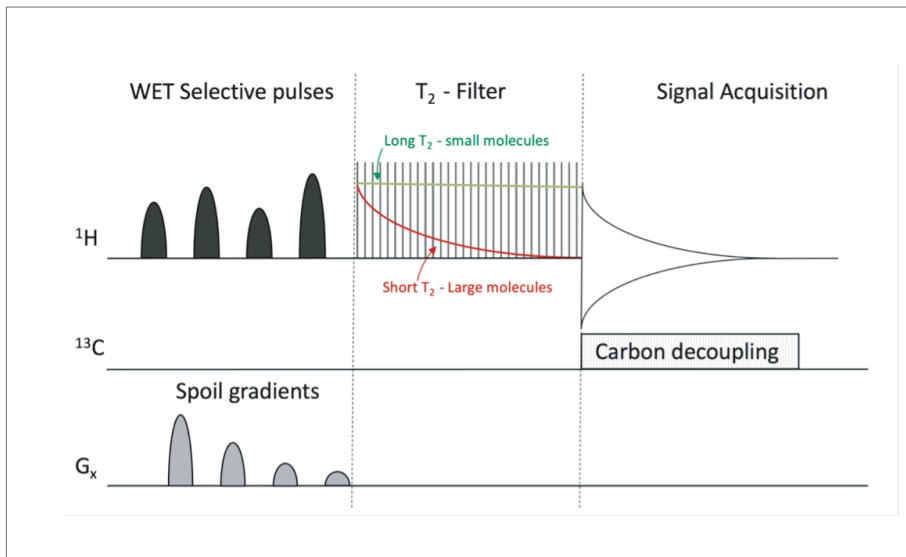


図3:WET溶媒抑制モジュールとCPMG T2-filterシーケンスを組み合わせたパルスシーケンス。CPMGエコートレインの時間を設定する事で、サンプル中に存在する大きな分子からの高速減衰シグナル(赤色の指数関数)を除去する事が出来る一方で、T2が長い低分子のシグナルは殆ど影響を受けずに、フィルター期間の最後に取得される。Spinsolve ULTRAのWET-CPMGシーケンスでは、最大3つの溶媒ピークを抑制し、カーボンデカップリング下で1Hシグナルを取得する事が可能である。

このアプリケーションノートでは、WET-CPMGシーケンスを組み入れたSpinsolve ULTRAモデルで、複雑な混合物のスペクトルを効果的な方法で簡略化できる事を示します。CPMGモジュール適用中のシグナルは、分子の緩和時間T2に応じて速く(赤)または遅く(緑)減衰するので、T2の短い高分子のシグナルはCPMG継続時間を適切に設定する事によってフィルタリングする事が可能です。図4は、CPMGモジュールの継続時間を変えて収集した複数のスペクトルの重ね合わせです。これらの複数のスペクトルの比較によって、フィルター時間の長さに応じて幅広いシグナルが急激に減衰する事が良く理解できます。このサンプルの場合、正確な積分を行う為に小さいシグナルをベースライン上で解析するには、300 msのフィルター時間で十分です。この短いフィルター時間で、微小分子のシグナルは殆ど影響を受けず、簡単に定量する事ができます。

図4:フィルター時間; 0、20、50、75、100、300、500、1000msに設定した場合のWET-CPMGシーケンスで取得したノート液体石鹸サンプルのスペクトル。フィルター時間300msでは、ほとんどの幅広いシグナルが除去された明確なスペクトルが得られる。各スペクトルは、10秒間の繰り返し時間、32回スキャンで収集され、1スペクトルあたりの総測定時間は約5分である。水のシグナルを減衰させる為には溶媒抑制を行い、乳酸のサテライトを除去する為には¹³C-decouplingを使用しています。

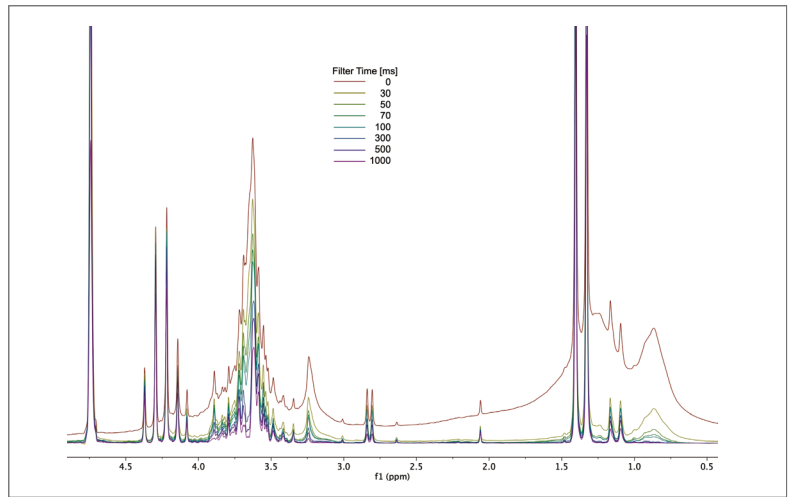


図.5はフィルター時間300msを用いたWET-CPMGシーケンスで取得したスペクトルを示します。脂肪族領域において、クエン酸、酢酸、乳酸、プロピレングリコール等のシグナルが重なり合う事無く分析されており、高分子シグナルのフィルタリング方法としてのWET-CPMGシーケンスの有効性が理解できます。これらのシグナルは、化合物を既知の濃度で溶解させた参考標準を使用する事によって、製品中の化合物の濃度を定量するために使用されています。この定量法によって得られた結果はスペクトルの中に示されます。乳酸の含有量が15 g/lであるのに対し、酢酸はわずか0.06 g/lである事が解ります。Spinsolveの高感度によって、驚くほど低い検出限界を実現する事ができています。例えば、わずか5分の測定時間での酢酸の検出限界は約3mg/l(3ppm)です。

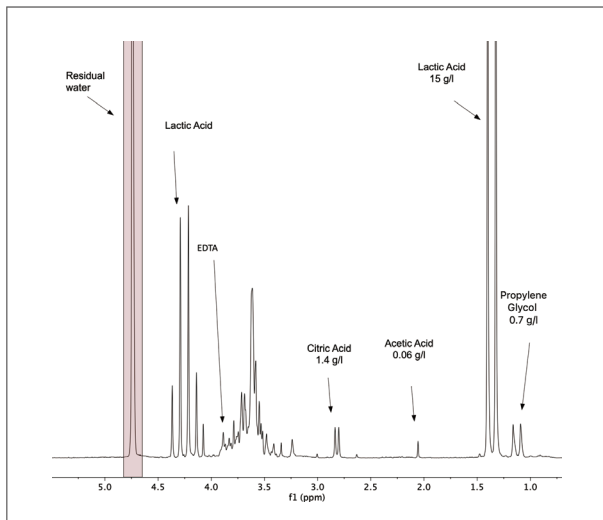


図5:フィルター時間300msのWET-CPMGシーケンスで取得した液体ハンドソープの1Dスペクトル。溶媒抑制とT2フィルターの組み合わせは複数成分のシグナルを分離して正確に定量できる事を示しています。

製造元



販売元



海外事業部 海外事業課 (東京デモルーム)
〒103-0023 東京都中央区日本橋本町2-8-8
宇津共栄ビル3F
TEL: 03-3527-2745

<https://dsd.nakayama-co.jp>

Webサイトはこちら

