

九州大学中央分析センター

20

センター
ニュース

昭和 63 年 3 月

目 次

| | |
|---------------------------|---|
| 分析機器解説シリーズ (20) | 1 |
| 超伝導NMR | |
| トピックス | 7 |
| 吸着クロマトグラフィーによる細胞分離 | |
| お知らせ | 9 |
| ・ 集中法粉末 X 線回折計の修理について | |
| ・ 熱分析装置の修理について | |
| ・ 超伝導核磁気共鳴装置について | |

1. 概要

有機化合物の同定や構造解析においてNMR(核磁気共鳴)スペクトルは、赤外吸収スペクトル、質量分析、元素分析と並んで、有機化合物を扱う化学者にとって、なくてはならない存在となっている。さらに近年は ^1H 、 ^{13}C 以外に ^{15}N やほとんどの核スピンを持つ元素のNMRの測定が可能となってきており、無機化学者にとっても利用価値の高いものとなってきている。

さて、NMRの基本的な原理については色々な文献に記載があるので、それを参考にさせていただきたい。^{1),2)} また、本センターニュース(1、2号)にも紹介があるので、ここでは工学分室に設置されるフーリエ変換NMR(FT-NMR)セカンドシステム(観測周波数400MHz:日本電子製)について、従来の60MHz、90MHzのFT-NMR装置と異なる点について主に述べることにする。

従来の100MHz以下のNMRは磁石として電磁石や永久磁石を使用していたため、せいぜい2.5T(1T=10000 Gauss, ^1H の共鳴周波数にして約100MHz)の磁場強度しかだせなかったが、超伝導磁石の発達にともない14T程度(^1H の共鳴周波数にして600MHz)の磁場強度がだせるようになり、400-600MHzのNMRの測定が可能となった。この超伝導磁石の特長は次の通りである。

(1)鉄心を使わないので強磁場が出せる(飽和がない)。(2)永久電流なので一度励磁すると電力が不要である。(3)永久磁石のように室温や経年による磁場強度、均一性が変化することがほとんどない。欠点として超伝導にするため4 Kに保たねばならず液体Heを必要とする、ことなどである。

一般的にNMRはより高磁場(すなわち、より高周波数で測定)を使う方向にある。高磁場でNMRを測定するメリットとして次のようなことがあげられる。

(1)測定感度(S/N比)が向上する。これは、核スピンのエネルギー準位の差が大きくなり、熱平衡時の分布(ボルツマン分布)の差が大きくなることに起因する。

(2)ピークの分離がよくなる。これはピーク幅が核の緩和時間に依るが、これは磁場強度にはあまり影響されないのでHz単位で変化しない。一方ケミカルシフト差()はHz単位で観測周波数に比例するからである。

(3)カップリングによる分裂パターンが明瞭になる。これは上記で述べたように に対してカップリング定(J)が不変であることによる。従って多くの場合、一次解析(隣に ^1H が一個存在するとピークが2本に分裂するといった単純な解析法)の条件である $|J| > 10$ を満足する。これによって3スピン系以上の場合(ABCスピン系など)にも容易にピークの解析ができるようになる。

2. 装置

測定装置は図1に示すように液体He(2重ジュワーに入れてある)中に水平に置かれた超伝導コイルとその中心にあるプローブと、照射パルス発生器と検出器、及びデータ処理コンピュータ等によ

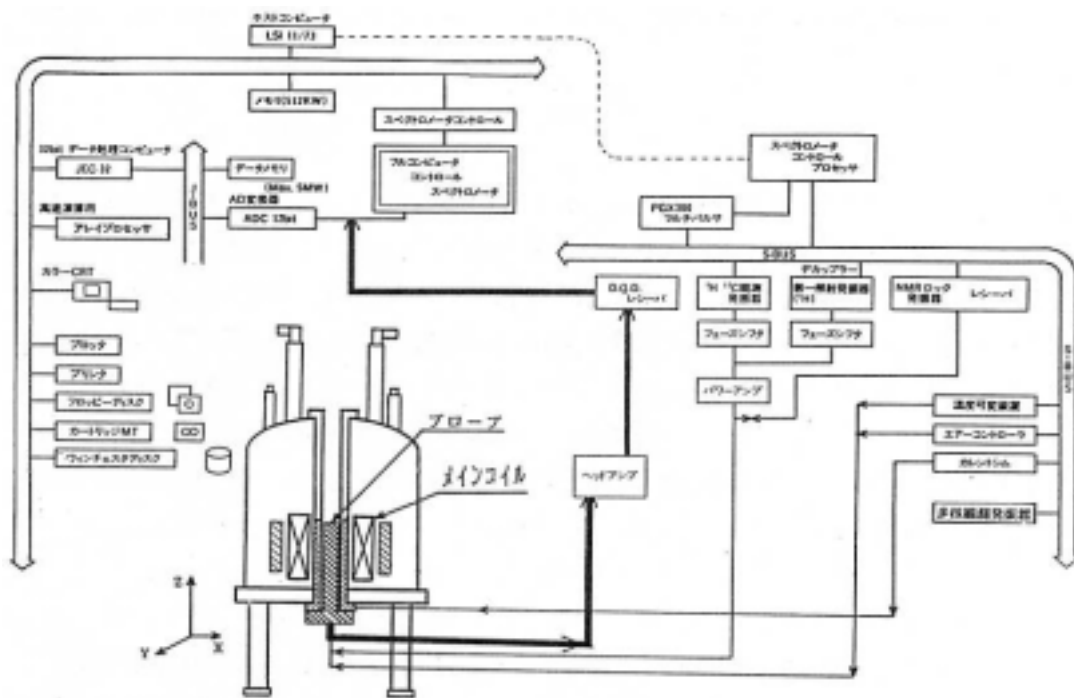


図 1. 超伝導 FT-NMR のデータ・ブロック図

り構成されている。磁界の方向 (Z 軸) は垂直方向でスピニングの軸と同方向で、100MHz 以下の装置とは異なる。

プローブは直径 5mm サンプル管を使用する ^1H 、 ^{13}C 共通プローブと、10mm 管用の多核種プローブが使用できる。後者は ^{31}P から ^{103}Rh までの全核種 (^{19}F を除く) の測定が可能である。観測範囲は A/D コンバーターの変換速度 (100KHz) で決っており測定核種にかかわらず Hz 単位で最大 100KHz、すなわち ^1H では最大 250ppm の範囲に、 ^{13}C では最大 1000ppm となる。通常の試料で

はこの範囲に十分おさまる。他の核種においてはケミカルシフトが広範囲に及ぶものもあるので、この範囲を越える場合は十分注意する必要がある (折返しピークなど)。また、測定温度は -100 ~ 180 まで変えることができる。

照射パルスは付属のマルチパルサーによって種々のパルス系列を発生させることができるが、パルスの位相は $\pm x$ 、 $\pm y$ だけである。観測側 (検出器) の位相 (参照波の位相) は 30° と 45° きざみで設定できる。これにより後述する各種 2 次元スペクトルの測定が可能となる。

検出器はデジタル Quadrature detection 法 (注) を採用しており、観測範囲と感度において高効率のデータ取り込みを行っている。

このようにして取り込まれた信号を A/D 変換器を経てコンピュータに取り込みデータ処理を行い、結果をプロッタに描き出すようになっている。コンピュータには高速でフーリエ変換を行うアレイプロセッサを併用して、以前はかなりの時間を要していたフーリエ変換の高速化を図ってい

る。さらに、分解能調整やパルス幅の設定などはコンピュータ化されていて、容易に調整、設定ができる。

3. 試料

試料管は ^1H 及び ^{13}C の測定には直径5mmのNMR用サンプル管を、それ以外の核種の測定には直径10mmのサンプル管をそれぞれ用いる。

試料は、重水素の共鳴信号を磁場ロックのために使用する関係上、重水素を含んだ溶媒(CDCl_3 、 D_2O 、 C_6D_6 等)を用いて均一な溶液とする必要がある。四塩化炭素のように重水素を含まない溶媒のときには特別な工夫が必要である。また、ごみ、綿くずや固体の混入は、分解能の低下をまねくので避けなければならない。これらの注意は従来のNMRの測定の場合と全く同様である。

液量は高さにして40mm(5mm管のとき640 μl)であることが望ましいが、それ以下(30mm)でも可能であるが、分解能の点から好ましくない。

4. 2次元NMRスペクトル^{3,4)}

NMRの高磁場化、高周波数化に伴い、前述したように $\nu/J > 10$ をほとんどの場合満足するようになってきたこと、高感度になり積算回数が少なくなってきたことから、従来のCW法では考えられなかった色々な測定法が発達してきた。2次元NMRスペクトル法もそのひとつである。これは、積算回数の減少(S/N比の向上)とともに、コンピュータの高速、大容量化と、フーリエ変換の高速化が寄与するところも大きい。このFT-NMRで初めて可能となった2次元NMRがどんなものであるか、簡単に紹介してみよう。

通常のFT-NMR測定では 90° パルスのすぐ後からFID信号(t_2 時間軸)をコンピュータに取り込み、これをフーリエ変換するのであるが、2次元スペクトルを測定する場合には本装置に付属しているマルチパルサーによって種々のパルス系列(パルス角度、種類、間隔を色々組み合わせたもの)を、FIDシグナル取り込み以前に加える(図2)。このFID取り込み前のパルス系列に

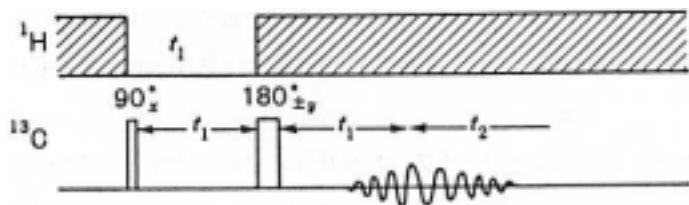


図2. C-H J分解のパルス系列

よってFID信号は、強度や位相に変調を受ける。この変調のモードは、変調の原因(例えばカップリング(J)、NOE等)によって決まるが、またパルス系列中の時間(t_1)によっても変わる。

t_1 を少しずつ変化させながらFID信号を取り込むと t_1 軸、 t_2 軸に展開されたFIDデータが得られる。時間 t_1 と t_2 は全く独立であるので、それぞれ独立にフーリエ変換でき、これによって2次元化したNMRスペクトル(横軸に $F_2(t_2)$ が縦軸に $F_1(t_1)$)が得られる。 t_2 軸から得られる F_2 軸は通常のNMRスペクトルを表わすが、 t_1 軸にどのような情報(前述の変調の原因)を入れるかで F_1 軸に引き

出される情報が決定される。

一例を示すと ^{13}C の測定において、 $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ のカップリング定数 J の周波数で FID 信号が変調を受けるようにパルス系列を組むと F_1 軸には J によって分裂したピークが、 F_2 軸にはデカップルされた ^{13}C のピークが投影される (図 3)。

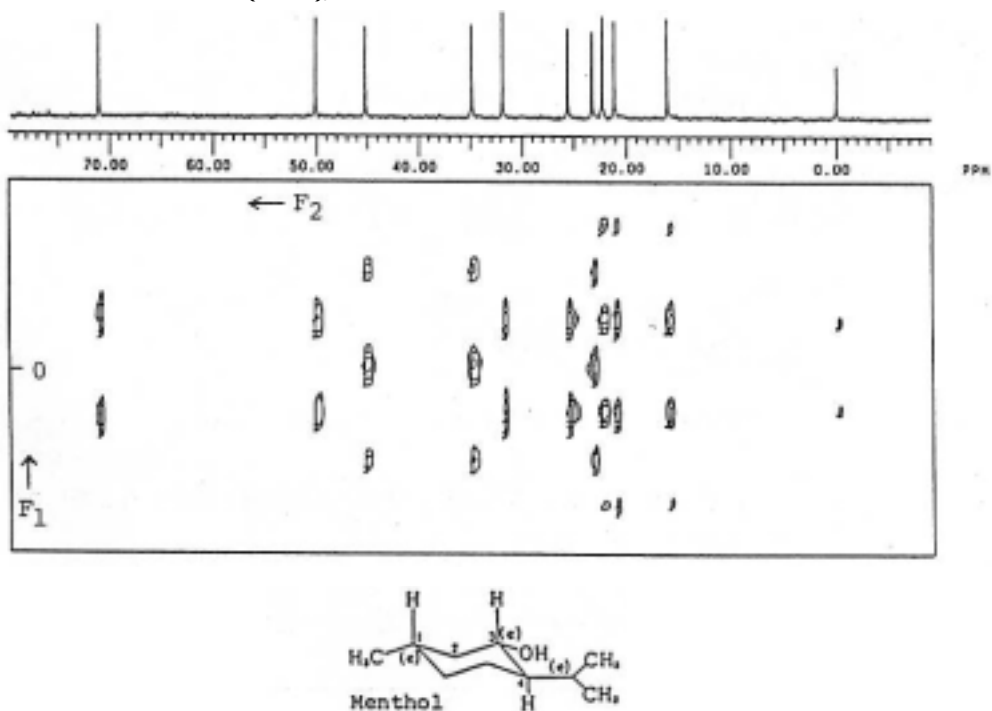


図 3. C-H J 分解スペクトル

このようにスペクトルの 2 次元化は、スペクトルの持つ 2 つ以上の情報 (例えばケミカルシフトとカップリング定数など) を 2 つの座標に分離することになり、解析を非常に容易にすることができる。一方、2 次元化のもうひとつの重要な効果としてピークとピークの相関関係 (2 つの核が「カップリングしている」、「近い距離にある」など) がスペクトル上に表現できることである。

2 次元 NMR については現在 100 以上の方法が考えられている。そのうち代表的な測定法をその目的とともに表 1 に示しておいた。特に COSY スペクトルは、スペクトルを帰属するうえで非常に有用であり、以前の選択的デカップリングによって相関関係を見つけていた時に較べ一目瞭然で簡単になった。また C-H J 分解は従来法で言うと OFF-RESONANCE 法による炭素の級数の決定法に相当するが、スペクトルの重なりがなく解析が容易である。さらに 2 次元 INADEQUATE 法は炭素骨格のつながりを決定するうえで現在最良の方法といえるが、測定にかなりの時間を要するのが欠点である。

以上のように 2 次元 NMR を利用すれば非常に容易にスペクトルの帰属ができることは、有機化合物の構造決定のうえで強力な武器になると考えられる。

表1. 2次元NMRスペクトルの代表例

| 名 称 | 情 報 |
|------------|---|
| C - H J分解 | F ₂ 軸に ¹³ Cのケミカルシフト、 F ₁ 軸にC - H間のカップリング定数J (図3) |
| H - H J分解 | F ₂ 軸に ¹ Hのケミカルシフト、 F ₁ 軸にH - H間のカップリング定数J |
| H - C COSY | F ₂ 軸に ¹³ Cのケミカルシフト、F ₁ 軸に ¹ Hのケミカルシフト。 交点はカップリングがあるC - Hの関係を示す。(図4) |
| H - H COSY | F ₁ 、F ₂ 軸とも ¹ Hのケミカルシフト、対角線外の交点はカップリングがあるH - Hの関係を示す。 |
| COSY - 45 | H - H COSYと同様であるが、Jの符号もわかる。 |
| NOESY | F ₁ 、F ₂ 軸とも ¹ Hのケミカルシフト、対角線外の交点は近距離にあるH - Hの関係を示す。 |
| INADEQUATE | 隣同士が ¹³ C - ¹³ Cである組合せのみ選び出すので炭素骨格がわかる。 |

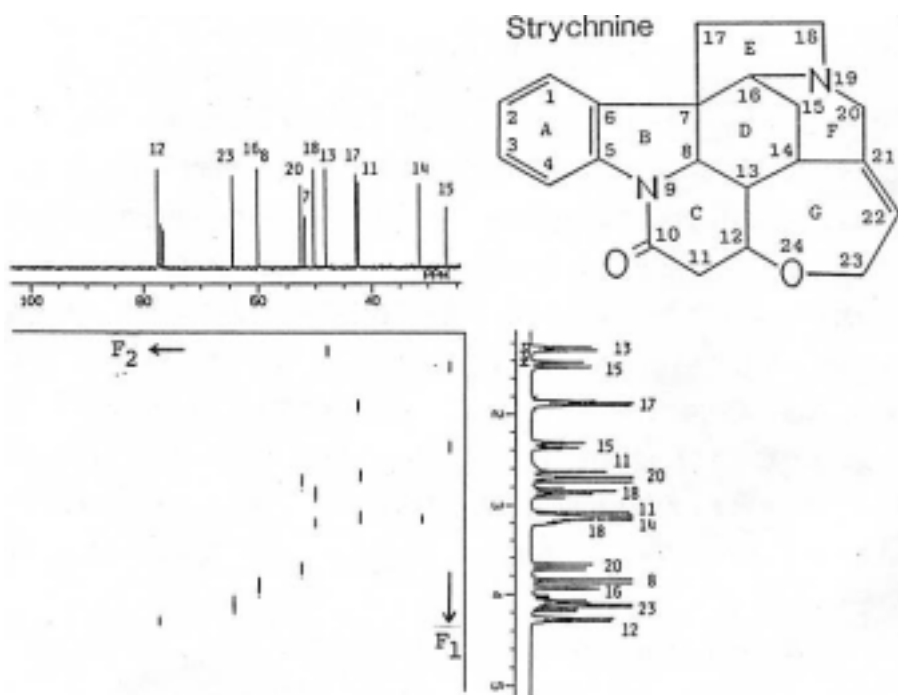


図-4. H-C COSYスペクトル

注) QUADRATURE DETECTION 法

初期の FT - NMR の検出器は図 1 に示す x 軸方向のみからの観測 (y 軸方向の振動磁場) のみしか行っていなかった。これによって得られる FID 信号をフーリエ COSIN 変換すると、実数部に吸収型スペクトルが得られる。しかし、データのサンプリング間隔を t (dwell time) とすると、スペクトルの観測範囲は $0 \sim f/2$ Hz (但し $f = 1/t$) に限られ、この範囲外 (負または $f/2$ より大きい場合) にピークがあると、それは折返しピークとして現れ (fold back) 誤った解析結果を与えることがある。これに対して QUADRATURE DETECTION 法では y 軸方向からの観測も同時に行い (図 5)、これを虚数部とし、x 軸方向からのデータを実数部として複素フーリエ

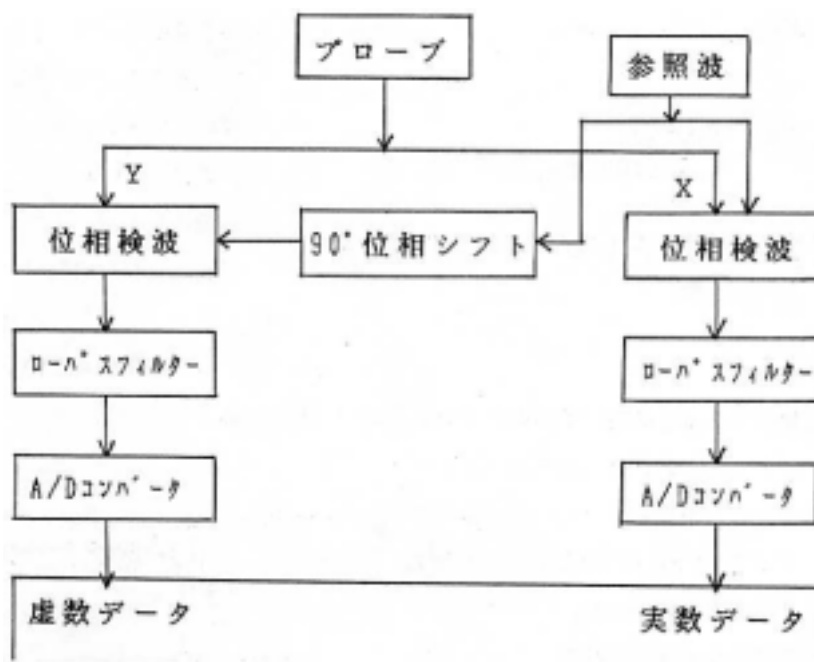


図 5. Quadrature Detection 法

変換を行ないスペクトルを得る。この方法では同じ t でも観測範囲が 2 倍の $0 \sim f$ または $-f/2 \sim f/2$ (通常は後者を使用する) となり、折返しピークが混入する可能性が少なくなる。ただし、この範囲を越えるとやはり折返しが起こるので、あらかじめオペレータに予想ピークの範囲を知らせておく必要があることは従来と変わらない。

参 考 文 献

- 1) 藤原鎮男、中川直哉、清水 博 「高分解能核磁気共鳴 - 化学への応用 - 」 丸善 (1962)。
- 2) 森島 績 「新実験化学講座 - 3」 “基礎技術 2”、p353 [核磁気共鳴] 丸善 (1976)。
- 3) 斉藤 肇、森島 績 “現代化学” 増刊 11、「高分解能 NMR - 基礎と新しい展開 - 」東京化学同人 (1987)。
- 4) 日本化学会編 “化学総説 No. 49” 「新しい磁気共鳴と化学への応用」学会出版センター (1986)。

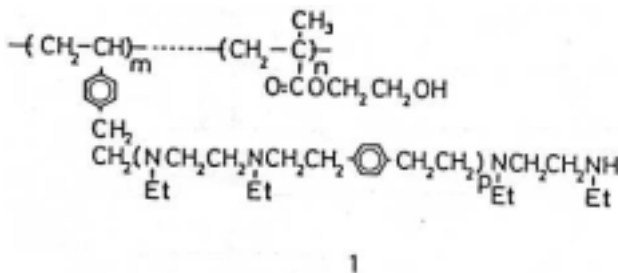
トピックス

吸着クロマトグラフィーによる細胞分離

工学部 前田 瑞夫

クロマトグラフィーは分離・分析の代表的手段として、あらゆる分野で利用されている。最近、クロマト的手法を用いてリンパ球亜集団を簡便かつ効率的に分離しうるシステムが開発された¹⁾。ここに紹介したい。

弱塩基性のアミノ基を有する新しい高分子材料 1 がこのシステムの鍵である。1 は親水性の幹部、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、と枝部ポリアミンから成るくし形(グラフト)コポリ



マーである。1 の特徴は、これを膜にした場合、幹部と枝部が別々に集合し、いわゆるマイクロドメイン構造を形成する点である²⁾。

対象とされた細胞は、免疫学やバイオテクノロジーの分野で分離法の確立が望まれているリンパ球で

ある。この亜集団である B 細胞と T 細胞を分離するのが目的である。

1 を 48~60 メッシュのガラスビーズ表面にコーティングする。これを吸着体とし、ポリ塩化ビニル製チューブ(内径 3mm)に充填してカラムとする。システムの概要を図に示した。

ラットの腸間膜リンパ節より採取したリンパ球を用いた場合、カラム中には B 細胞が優先的に吸着し、カラムからの流出分として、95%以上の純度を有する T 細胞が 60%以上の収率で得られたという。分離は 4~37 の範囲のいずれの温度でも可能であり、しかも分離に要する時間はわずか 5 分である。

報告¹⁾では分離のメカニズムについても詳しく議論されている。細胞を懸濁させるメediumの

pH、イオン強度を系統的に変化させた実験の結果から、1 上へのリンパ球の吸着は主としてイオン性相互作用に基づくことが示されたという。すなわち、細胞膜表面はシアル酸等の酸性解離基を有するため、全体として弱酸性を有する。一方、1 表面には弱塩基性のアミノ基があり、これが一種のイオン交換カラムの吸着体として働く。B 細胞と T 細胞の酸性度が異なる (B 細胞の方が強酸

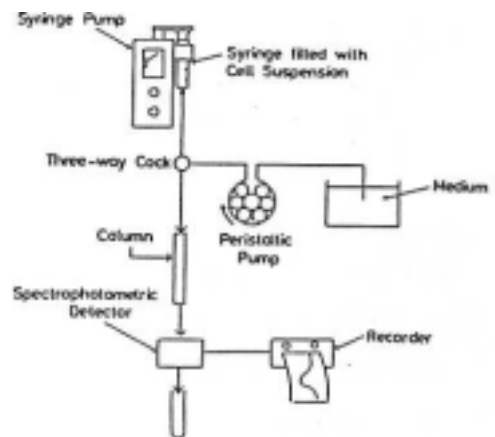


図 細胞分離用吸着クロマトグラフィー

性)ため、選択的吸着が達成されたものと考察されている。

カラム内に吸着したB細胞は、軽いピペッティングでほぼ80%の収率で回収できたという。その生存率は95%以上であり、本方法は細胞に対する損傷の極めて少ない方法であると主張されている。その理由は、吸着体1の表面がつくるマイクロドメイン構造にあると考察されている。

種々の細胞混合系から、特定の細胞種だけを分離することは、基礎・応用の両面から重要な課題である。古くから様々な手法が考案されてきたが、細胞の体積や密度に基づく方法(例えば遠心分離)が最も一般的に用いられている。一方、細胞の免疫学的性質や磁場・電場中での挙動の違いを利用した装置(電気泳動法、蛍光活性化細胞分離法など)も開発され、より精緻な細胞分離に威力を発揮している。また、アフィニティークロマトの手法も細胞に対して応用されている³⁾。しかし、これらの手法は高価な装置を必要としたり、操作が煩雑であること、細胞に対する標識などの前処理が必要であることなどの欠点も有している。

これに対し、ここで紹介した吸着クロマトグラフィーは、個々の細胞集団が有する細胞表面の物理化学的な性質に基づいて細胞を分離する方法であり、装置ならびに操作が実に簡便である。この方法のポイントは、言うまでもなく吸着体である高分子材料をいかに設計していくかであろう。

実はこうしたカラムクロマト的手法は古くから細胞分離に応用され、事実リンパ球のB細胞、T細胞の分離にナイロンファイバークラムが実験室、検査室で用いられている。しかし、この方法では胎児血清によるカラムの前処理が必要であり、また有効な分離を達成するための温度(37℃)や分離時間(30~60分)などに制約がある。さらに、もともと経験的に材料や条件が決められていることから、原理についてはほとんど議論されておらず、他の細胞系への応用がきかない。分離の効率や生存率も必ずしも満足のいくものではなかった³⁾。

本報告¹⁾の著者らは、細胞を生き物としてでなく物理化学的にとらえることにより分離の原理を一般化し、しかも生き物としての特性を保ったままの分離に成功した。彼らの成功の前半は、弱塩基性アミノ基を有する材料を選んでアミノ基量、アミノ基のプロトン化度などを系統的に変化させ「化学的」考察した点にある。一方、後半の生存率については1の形成するマイクロドメイン構造が大きく寄与していると考えられる。マイクロドメイン構造を有する高分子材料は、血小板活性化抑制材料として人工血管への応用が試みられているのを始め、広く細胞の活性化を抑えることが本論文の著者らを中心に実験的に証明されている⁴⁾。

「分離・分析」というととかく既存原理の組み合わせや借り物の材料を基にした実学であるとの誤解を受けやすいが、新しい分離・分析法の開発にはやはり新原理と新材料が大切であることを改めて感じた次第である。

文 献

1) a) 片岡一則、化学と教育、35、119 (1987)。

b) A. Maruyama, et al., Makromol. Chem., Rapid. Commun., 8, 27 (1987)。

2) A. Maruyama, et al., Makromol. Chem., 187, 1895 (1986)。

- 3) 竜田禎二、「バイオマテリアルサイエンス第2集」、鶴田禎二、桜井靖久編、化学の領域増刊
135号、南江堂東京、1982、p.155。
- 4) 岡野光夫、他、同上、p.57。

お 知 ら せ

集中法粉末X線回折計 (STOE) の一次元カウンターと高圧電源回路の修理を行いました。
長期間御迷惑をおかけしました。

熱分析装置 (セイコー電子) の修理を行いました。

超伝導核磁気共鳴装置 (日本電子製 JNM - GX500) が3月7日に搬入されます。そのため
現在磁気シールドの工事その他を行っておりますが、工事は3月3日に完了の予定です。NMR
は立ち上げに約2ヶ月かかる見通しです。

超伝導核磁気共鳴装置 (日本電子製 JNM - GSX400) が3月7日工学分室118号室に搬入さ
れます。励磁、分解能調整等の後、4月中旬より利用可能となる予定です。詳細は次号センター
ニュースでお知らせ致します。