

九州大学中央分析センター

71

平成12年12月

目 次

分析機器解説シリーズ (69)	1
固体高分解能 NMR	
トピックス	6
新規導入 400MHz NMR の紹介	
お知らせ	11

固体高分解能 NMR

理学研究院 町田光男

1. はじめに

以前は、固体 NMR と言うと広幅 NMR を意味し、固体スペクトルの分解能は随分と低かった。高分解能を達成上で障害となるのは、まず核スピン間の双極子-双極子相互作用である。また、粉末を測定試料とする場合には、さらに化学シフトの異方性も分解能を下げる 1 つの要因となる。

近年、固体の世界でも高分解能と言う言葉を良く耳にするようになり、固体粉末試料でも液体試料に迫る高分解能な NMR スペクトルが得られるようになった。固体高分解能 NMR では、主に $I=1/2$ の核を対象とし、双極子-双極子相互作用による線幅を高出力デカップリング、化学シフトの異方性による線幅を MAS (magic angle spinning) により消去している。本ニュースでは、理学研究院に設置されている CMX-300 とそれによる ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{31}P 核の測定例を紹介する。

2. CMX-300 と測定方法

CMX-300 は Chemagnetics 社製の固体 NMR 専用機であり、プロトンに対する共鳴周波数は 300MHz である。プローブとしては、CP/MAS プローブ、D 核専用広幅プローブ、CRAMPS プローブ、プロトン専用広幅極低温プローブを現有している。

CP/MAS プローブは、30MHz 以上の共鳴周波数の核に対して MAS と高出力デカップリングを併用した測定ができる。MAS を使用した場合の測定温度の下限は 150K 程度である。ここで紹介するのは、この CP/MAS プローブで測定した結果であり、固体試料は粉末にして測定した。また、全ての測定において、高出力デカップリングでプロトンの影響をスペクトルから消去した。

3. 測定例

3-1. ^{15}N 核

^{15}N 核の天然存在比は約 0.4% であり、共鳴周波数も 30.5MHz と低い。また、一般にスピン格子緩和時間 T_1 も非常に長く、天然存在比の状態では測定するのは困難な核である。このような核を天然存在比の状態では測定するには CP/MAS 法¹⁾が有効な手段となる。

一般に、CP/MAS 法は交差分極 (CP: cross polarization) と MAS の両方を用いる測定手法であり、プロトンを含む系に対して用いられる。まず、CP により、磁氣的に平衡な状態にあるプロ

トンの分極を測定核に移動し、次にプロトンをデカップルしながら測定核の FID (free induction decay) を観測する。この CP を用いることにより積算の待ち時間はプロトンの T_1 の値に設定でき、また 100% の CP 効率が達成されれば、 ^{15}N 核の場合、10 倍の信号強度の増大が期待される。ただし、運動性が高まると CP 効率は低下するので、液体などのように運動が激しい系では CP は殆どかからない²⁾。

$(\text{CH}_3\text{NH}_2)_3\text{BiBr}_6$ は 188 K で 1 次の強弾性相転移を起す。高温相では、 CH_3NH_2 イオンはその配向が動的に乱れた無秩序状態にあり、1a サイトと 2d サイトに存在している。1a サイトと 2d サイトの分子数の比は 1 : 2 である。

室温では、 CH_3NH_2 イオンの配向運動が早いため CP は殆どかからないが、転移点近傍になると配向運動が比較的遅くなるため CP/MAS 法でスペクトルが測定できるようになる。転移点近傍で測定した $(\text{CH}_3\text{NH}_2)_3\text{BiBr}_6$ の ^{15}N 核の CP/MAS スペクトル (MAS=3 kHz) を図 1 に示す。高温相のスペクトルは強度比が 2 : 1 の 2 つの共鳴線から成り立っている。強い共鳴線が 2d サイトの ^{15}N 核、弱い共鳴線が 1a サイトの ^{15}N 核に対応する。また、低温相に転移すると、2d サイトの共鳴線の位置は殆ど変化しないが、1a サイトの共鳴線は高 ppm 側に移動する。Torchia 法³⁾ (T_1 が非常に長いときに有効) で決定した ^{15}N 核の T_1 の温度依存性を図 2 に示す。2d サイトの T_1 は高温相から低温相に向かって単調に減少している。一方、1a サイトの T_1 は高温相で減少し、低温相で増加しており、このサイトの CH_3NH_2 イオンの運動状態が相転移の前後で大きく変化していることが解る。

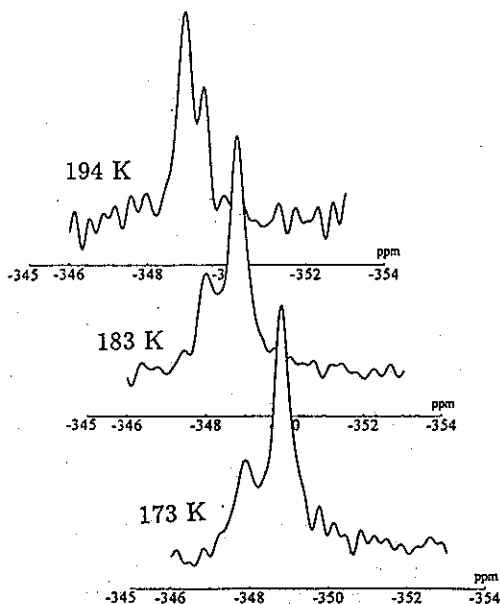


図 1 $(\text{CH}_3\text{NH}_2)_3\text{BiBr}_6$ の ^{15}N 核の CP/MAS スペクトルの温度依存

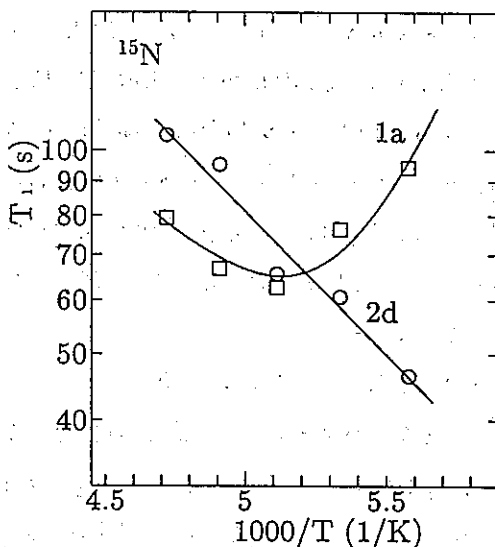


図 2 $(\text{CH}_3\text{NH}_2)_3\text{BiBr}_6$ の ^{15}N 核のスピ格子緩和時間 T_1 (s) の温度依存

3-2. ^{13}C 核

^{13}C 核の天然存在比は約1%、共鳴周波数は75.6MHzであり、 ^{13}C 核は比較的低感度な核である。ただし、 T_1 がそれ程長くなく簡単な分子であればCPを用いなくてもスペクトルは容易に観測できる場合が多い。

ここでは、強誘電性液晶 $\text{C}_6\text{H}_5\text{C}_6\text{H}_4\text{OCOC}_6\text{H}_4\text{C}_6\text{H}_5$ $\text{OC}(\text{CH}_3)\text{C}_6\text{H}_5$ (C:不斉炭素) の測定結果を紹介する。この液晶は温度の上昇に伴い固体、 S_C 、 S_A 、 N^* 、液体 (Liq) 相へと転移する。転移温度はそれぞれ328、343、352、361Kである。

図3は液体相と液晶相で測定したフェニル炭素のスペクトルを示したものである。フェニル炭素には、水素が1つ結合したものと結合してないものがあり、これらの炭素核のCP効率とは異なると考えられる。従って、スペクトルはCPを用いなくて、プロトンをデカップルしながら $\pi/2$ パルスで測定した。また、MASによりスペクトルを先鋭化すると液晶の配向に関する情報が消失するのでMASもかけていない。液体相から N^* 相へ転移すると線幅は広がり、僅かに配向秩序が発生するため共鳴線の位置が高ppm側に移動する。また、 S_A 相や S_C 相で共鳴線が大幅に高ppm側に移動するのは、液晶分子が磁場配向するからである。特に、 S_A 相では、分子長軸は静磁場と平行になっている。

N^* 相におけるスペクトルは、軸対称な化学シフトによる粉末パターンが分子長軸の配向運動で先鋭化されたものに相当する。図4に緩和の理論に基づいて計算したスペクトルの τ_0 依存性を示す。ただし、 τ_0 は液晶分子が配向を変える運動の相関時間である。 $\tau_0=1\text{s}$ では軸対称な粉末スペクトル

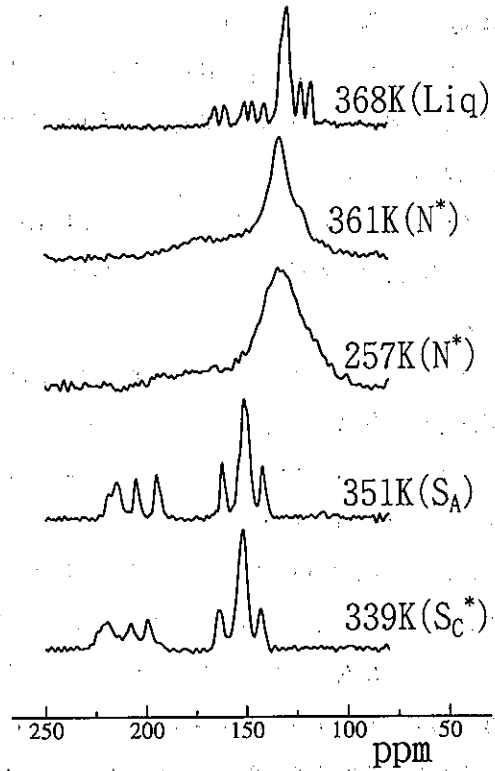


図3 $\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{O}_2$ の液体(Liq)相と液晶(S_C 、 S_A 、 N^*)相におけるフェニル炭素のスペクトル

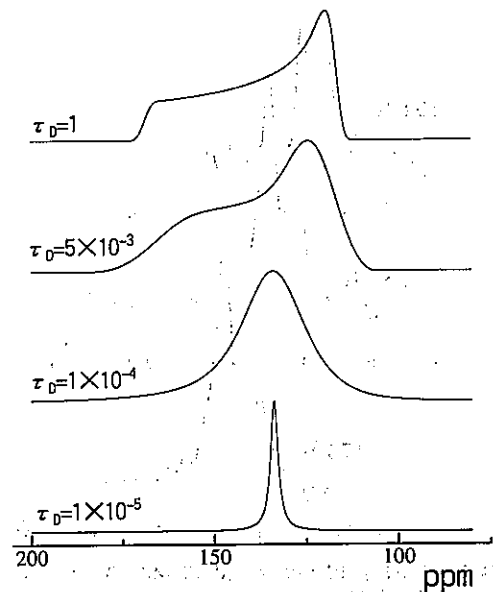


図4 軸対称粉末スペクトルの τ_0 (s)依存

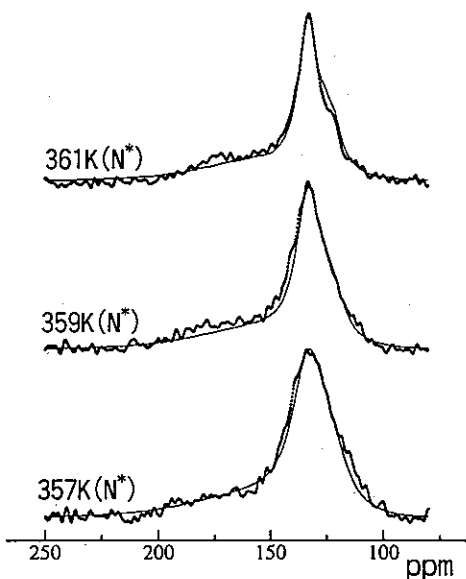


図5 $C_{12}H_{16}O_3$ の N' 相におけるフェニル炭素のスペクトルの実測値(点)と計算値(実線)

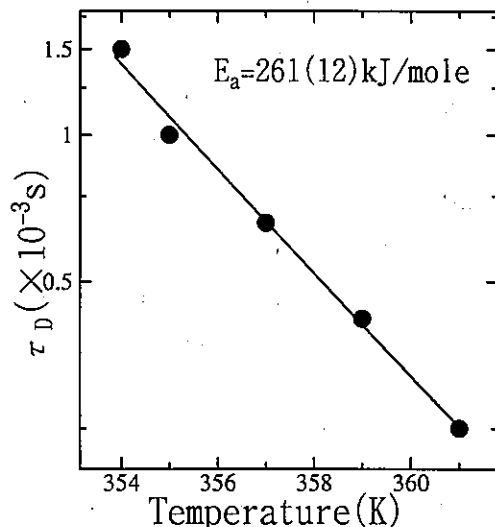


図6 N' 相における $C_{12}H_{16}O_3$ の τ_D (s)の温度依存

になっている。一方、配向運動が速くなり、 $\tau_0=1 \times 10^{-5}$ になると粉末スペクトルは極端に先鋭化されている。次に、このスペクトルの重ね合わせから N' 相におけるフェニル炭素のスペクトルをつくり実測値にフィットした。その結果を図5に示す。また、図6に N' 相のスペクトル解析から得られた τ_0 の温度依存を示す。 τ_0 の温度依存としてアレニウス型を仮定すると配向運動の活性化エネルギーが得られる。得られた活性化エネルギーは 261 (12) kJ/mole である。

3-3. ^{31}P 核

最後に、 ^{31}P 核の T_1 の測定例について述べる。この核の天然存在比は 100%、共鳴周波数は 121.7MHz であり高感度な核である。

$(\text{CH}_3)_3\text{NCH}_2\text{COOH}_3\text{PO}_3$ は $T_{c1}=355\text{K}$ と $T_{c2}=218\text{K}$ でそれぞれ 2 次の相転移を起す。この物質では、亜リン酸イオン (HPO_3^{2-}) を介した擬 1 次元的な水素結合鎖が形成されている。 T_{c1} 以上の高温相では、水素結合のプロトンと亜リン酸イオンの各原子は 2 つの平衡位置を持つ無秩序な状態にある。温度の低下に伴って、まず T_{c1} で亜リン酸イオン、 T_{c2} で水素結合のプロトンが秩序化するとされている。この物質の ^{31}P 核に対して測定した T_1 の温度依存を図7に示す。

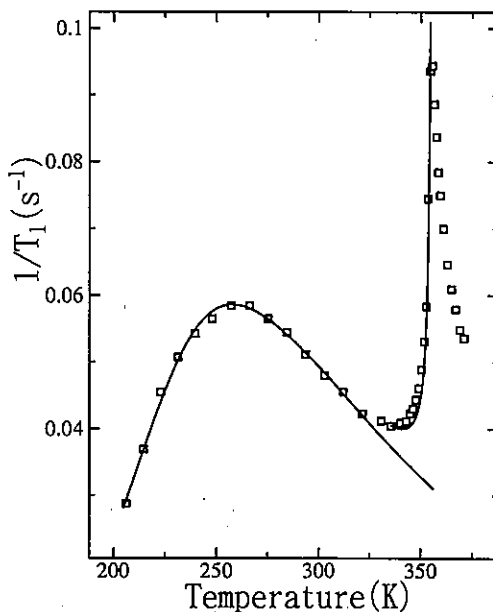


図7 $(\text{CH}_3)_3\text{NCH}_2\text{COOH}_3\text{PO}_3$ の ^{31}P 核に対して測定したスピン格子緩和時間の逆数 $1/T_1$ (s)の温度依存

T_1 は inversion recovery 法で決定した。ただし、スペクトルは MAS と CP を用いないで測定した。転移点 T_{cl} の近傍で T_1 が発散的に減少している。これは転移点で亜リン酸イオンの運動の相関時間が発散する現象、即ち critical slowing down が起こっていることを示している。

4. おわりに

^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{31}P 核の測定例を簡単に紹介したが、このほかに ^{29}Si も天然存在比の状態では頻りに測定される核である。また、天然存在比が低く低感度な核はエンリッチする事で問題は解消される。さらに、VAS を用いたりすると半整数のスピンを持つ四極子核も固体高分解能 NMR の対象となる。

高分解能にすると、分子内の各サイトを分離して調べることが可能となり、大きなメリットとなる。しかし、MAS などを用いてスペクトルを人為的に先鋭化すると、分子の配向や分子間の情報が失われることがあるので、分子のダイナミクスを調べるときには注意が必要である。

参考文献

- 1) 藤戸輝昭、ふんせき、5, 282 (1982).
- 2) J.Schaefer, E.O.Stejskal, Topics in Carbon-13 NMR Spectroscopy, 3, p. 284, Wiley-Interscience (1979).
- 3) D. A. Torchia, J. Magn. Reson., 30, 613 (1978).

新規導入400MHz NMRの紹介

工学研究院 応用化学部門 林 高史

1. 概要

核磁気共鳴装置(NMR)の開発には、数十年の歴史があるが、20年ほど前から超伝導マグネットが導入され、高磁場化により分解能と感度が一気に向上し、一般的な有機化合物の構造解析のみならず、様々な分野で利用されるようになった。また、2次元NMR測定の普及は、複雑な未知の有機化合物や天然物の同定にも大きく貢献した。本学分析センターの500MHz及び400MHz NMRはそれぞれ10年ほど前に設置された機器であり、当時のNMRの技術進歩の恩恵に授かり、研究が飛躍的に進展したことを実感した人も多いに違いない。しかしながら、その後、生化学、分子生物学の方面からもNMR測定の必要性が急激に増加し、ここ数年NMRの技術は、さらに格段に向上した。特に生体分子(蛋白質、核酸、糖など)の測定に対する要求(i)微量サンプルに対する感度の確保、(ii)水中での測定への対応、(iii)2次元NMRの強化)に沿って、様々な技術開発がみられる。また近年のコンピューターの進歩によるデータのデジタル化、データポイントの増加、解析速度の短縮化、複雑な測定の制御などが可能となり、またソフ

表1 比較表

	JNM-ECP400 (新規導入機種)	JNM-GSX400 (従来の機種)
プローブ	・オートチューン5 mmFG /THチューナブルプローブ ・5 mmFG /HXインバースプローブ	・5 mmCHプローブ ・10 mmチューナブル プローブ
測定核種	1H, 19F, 31P - 15N	1H, 13C (5 mm プローブ) 31P - 15N (10 mm プローブ)
防振台	有	無
オートチューニング	有	無
フィールドグラジエント ユニット	有	無
長時間低温空気供給装置	有	無
液体窒素自動供給装置	有	無

ト面での改良が進み、分子力場計算と組み合わせたペプチド・タンパク質の3次元立体構造の解析にも寄与するようになってきている。従来の分析センター所有の装置では、これらの最先端の測定技術を用いることは困難であったが、今回導入される最新鋭の400MHz NMR (JNM-ECP400: 日本電子製) では容易に測定が可能となる。新機種の主な特徴は、フィールドグラジエント (FG) ユニットが設置されること、多核の観測が容易になったこと、制御・解析コンピューターの能力が飛躍的に改良されたことがあげられる。以下、本レポートでは新しく導入されるNMRについてこれまでの現有機器と比較しながら (表1)、簡単に紹介したい。また、NMRの原理、超伝導NMRの仕組みは、過去の本センターニュース (例えば20号) を参照されたい。

2. プローブと測定核種

まず、NMRの心臓ともいえるプローブについて説明したい。新機種には最先端の2本のプローブを準備している。1本目のプローブでは、水素核 ^1H 及び ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{29}Si , ^{31}P , などの核種の測定がすべて5mm径のチューブで可能になったことである。これまでの機種に装着しているプローブでは、 ^{19}F の観測ができなかったこと、また ^{13}C を除く核種は感度の問題で10mm径のサンプルチューブを用いなければならず、高価な重溶媒を大量に必要としていたため、極めて不都合であった。また、多核測定の際の周波数のチューニングがマニュアルであったため、S/N値を最適にするためにある程度の熟練を要したが、新機種のプローブはオートチューニング機能が搭載されている。新機種の導入により、多核の測定が容易になったことは、大きなメリットである。2本目のプローブは、ここ数年で開発されたインバースプローブである。これは、従来の多核プローブとは逆に、プロトン観測コイルが内側に、多核コイルが外側に巻かれており、水素核の感度がさらに向上しているため、微量のサンプルに適しているとともにインバース測定 (HMBC, HMQC: 後述) などの測定用である。また、10年前のプローブに比べて、プローブ自身の改良もかなり進んでおり、全体的な感度も向上していると聞く。したがって、当然、同じS/N値のスペクトルを得るのに、単純に考えてもかなり積算時間が大きく短縮されると期待される。さらに、2本のプローブとも後で説明するフィールドグラジエント測定用のコイルを装着している点も特徴である。

3. インバースプローブを用いたHMQC、HMBC測定

2章で簡単に紹介した、2本目のインバースプローブを用いることによって、HMQC、HMBC測定が容易となる。この測定は、大まかには従来から知られている (現有のGSX400でも測定が可能であった) C-H COSY ---水素核を照射しながら ^{13}C を測定し、炭素と水素の相関 (カップリング $J^{13}\text{C-H}$) を求める---のデータと同様な情報を与える。要するに、どの水素がどの炭素に結

合しているか、という情報が得られるわけであり、複雑な未知の有機化合物の同定に大いに役立つ。しかし、従来の C-H COSY と HMQC の大きな違いは、前者が水素核を照射しながら ^{13}C を観測するのに対し、後者は ^{13}C を照射しながら、 ^1H を測定する点にある。従って、一見同じように見えるが、水素核と炭素核の感度の差は顕著に違うため、HMQC を用いれば、従来の C-H COSY に比べ、数倍から十数倍の積算時間の節約ができ、いかに早く測定が終了するか、NMR になじみのある方にはおわかりいただけると思う。実際、筆者もかつて C-H COSY を測定した経験があるが、だいたいサンプル量は数十ミリグラムを投入して、1 昼夜連続測定をしてようやく、満足できるスペクトルが得られた。しかし、インバースプローブを用いた HMQC であれば、数ミリグラムのサンプル量でも、数時間あれば、水素と炭素の詳細な相関が得られる。例えば、図 1 に示したようにストリキニーネの HMQC 測定の場合、サンプル量が 10mg で、わずか 1 回のスキャン (2.1min) でこれだけ S/N 値の良いデータが得られるわけである。

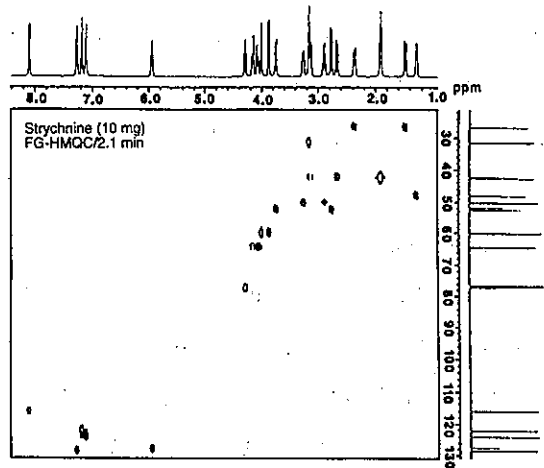


図1 10mg / 0.3mL CDCl₃ ストリキニーネの FG-COSY スペクトル 1 scan --- 積算時間 : 2.1min.

4. フィールドグラジエント測定

フィールドグラジエント (FG—磁場勾配) 測定は、ここ数年で開発された技術であり、今回導入される新機種における、もっとも特徴的な機能である。通常サンプルはマグネットの中で均一の磁場環境 (静磁場) にあるが、FG手法とは、プローブの観測コイルの外側に、もう一つ Z 軸方向のコイルを巻き、測定中のある短時間だけ不均一磁場、即ち磁場勾配を発生させるものである。その原理については、説明が長くなるので、いくつかの成書や論文を参照していただくことにし、ここでは FG 測定のメリットを 2 点紹介したい。

(1) 2次元 NMR の測定時間の短縮

これまでの均一磁場での 2 次元 NMR は、例えば単純な COSY 系でも、3 種類のゴヒーレンスの足し合わせになってしまうため、実際のスペクトルを得るには、実質上 unnecessary な 2 つの成分を除去するために、最低 4 回の位相回しと呼ばれるパルスを経なければならぬ。したがって、積算回数も $4 \times N$ 回必要になる。一方、FG 測定では、展開用の 90 度パルスの前後に FG パルスを照射することにより、一つの位相成分のみ、rephase させることが可能となるため、位相回しが不必要となり、4 回一組積算の COSY 測定が 1 回に短縮され、測定が簡略化される。

(2) T1ノイズの消去

これまで、2次元NMRの測定を経験した人にとっては、少なからずT1ノイズに悩まされていたことと思う。このT1ノイズは特に、溶媒や強いピークがF1軸に沿って現れるものである（図2(b)）。これは、先ほど述べたように、位相回しの消し残りによって生じてしまうノイズである。FGの場合には、位相回しの操作がないために、全くT1ノイズのない綺麗なスペクトルが得られる（図2(a)）。

5. 水系の測定

近年、生体分子の構造解析としてNMRがきわめて有効な手段であることが明らかになってきた。しかしながら、蛋白質などは極めて複雑なスペクトルを呈するだけでなく、微量かつ水（特に軽水）中で測定しなければならず、以前では測定及び解析が極めて困難とされていた。中でも、特に

水のピークの選択的消去は重要な課題であり、これまで様々な工夫が検討されている。今回導入される機種では、プローブの改良による分解能の向上、水消去専用のパルスシーケンス、FGパルスを用いた水のノイズ消去に加え、長時間低温空気が供給装置を装着し、サンプル温度を精度良く一定に保つことにより、水の照射を確実にする（温度変化に敏感な水のピークのシフトを防ぐ）ことに心がけている。この様な数々の工夫により、新機種では水分子のピークにじゃまされずに複雑な生体分子のプロトンの検出及びS/N値の向上が十分期待される。

6. コンピューター

今回導入するECP-400では、シリコングラフィクス社製のSGI O2が搭載される。UNIXで動作し、学内LANに接続する予定である。したがって、測定者の研究室に独自のNMR解析ソフトを所有していれば、データを転送し、各研究室の手持ちのコンピューターで測定の解析が可能となる。また、最近開発が進んでいる、化合物の構造予測計算ソフトにNMR測定から得られたNOE情報を加えることにより、より可能性の高い立体構造が予測できる利点がある。

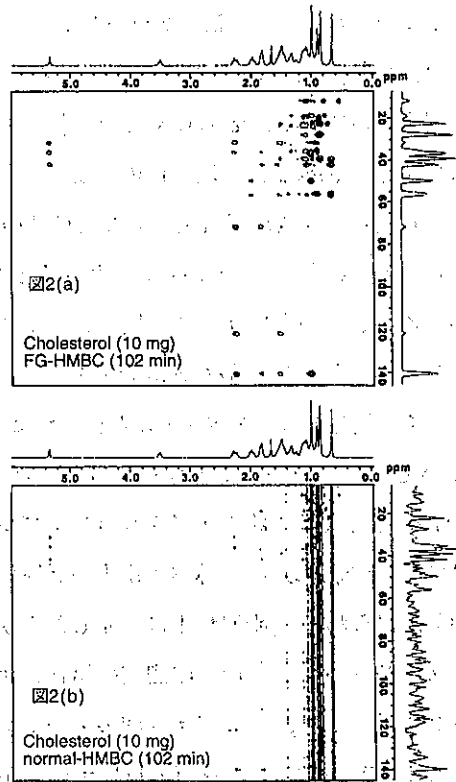


図2 10mg / 0.3mL CDCl₃ コレステロールのHMBCスペクトル

7. おわりに

約10年前の分析センターへの導入以降、NMRはハード、ソフトとも格段の技術進歩があり、現在では一般的になっている Phased Sensitive 2次元 NMR測定、FG測定、インバース測定などが全く実施できない状況であった。従って今年度新たに導入される最新鋭の機種には大きな期待が寄せられる。新機種導入に尽力を注がれた関係の先生方、分析センターの皆様にご感謝するとともに、本機器が全学に広く活用され、充実した機能を十分に発揮する事を希望する。最後に、本レポート作成に際し、資料を提供して下さった日本電子株式会社九州支店 内田耕次氏にこの場を借りてお礼申し上げます。

★★★ お 知 ら せ ★★★

1. 平成12年11月30日(木)に宮崎大学において第3回九州・山口地区機器・分析センター会議が開催され、九州・山口地区での装置の共同利用、ネットワーク化の問題、地域における機器・分析センターの役割等について議論されました。
2. 当センターの X線回折装置、蛍光 X線分析装置を利用するには、放射性同位元素取扱者の登録手続きが必要です。利用の予定がある方で、登録手続きをまだされていない方は、忘れずに行ってください。
3. 工学分室(箱崎地区)では、ホームページを公開しています。利用予約もできますのでご利用下さい。

<http://www.bunseki.cstm.kyushu-u.ac.jp>

4. 工学分室では今年度中に 400MHz NMRが更新され、300MHz 固体 NMRが新規に設置されます。いずれの装置も登録装置としての扱いになりますが、共同利用は可能です。利用詳細については次号でお知らせする予定です。