

# 機器分析分野の研究支援(NMR, MS)に関する報告

○沢田 義治

岐阜大学 研究推進・社会連携機構 科学研究基盤センター 機器分析分野

## 概要

機器分析分野では、岐阜大学の共同利用施設として大型分析機器と周辺機器を含め約 70 種類所有し、管理運営を行っている。現在、教員 2 名、技術職員 1 名、技術補佐員 2 名の 5 人体制に加え、各学部の協力員の教員と共に、当分野に関する管理運営、導入機器の検討、並びに、現在機器に関するメンテナンス、使用方法の説明、利用者からの相談への対応、安全教育等を行っている。

今回、当分野の核磁気共鳴装置 (NMR) の 5 機種、質量分析装置 (MS) の 5 機種について、それらの概略、並びに、利用頻度、トラブルと使用方法改良に関する支援業務の報告、各種測定例について報告する。

## 1. 管理運用する NMR, MS

### 1-1. 核磁気共鳴装置 (NMR)

現在、柳戸地区では日本電子製 400, 500, 600 MHz の 3 機種、医学地区ではブルカー製 600, 800 MHz の 2 機種の NMR を管理している。前述の 3 機種は ① $^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{27}\text{Al}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{34}\text{Se}$  の他多くの測定可能核が測定できる。②温度可変範囲 (-100~150°C) ③固体 (CP/MAS) プローブ (4 mm  $\phi$ ) とインバースプローブを装備している (500 MHz のみ)。後述の 2 機種は測定可能核が  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$  (800 MHz のみ) と制限されるもののクライオプローブを装備しているため、感度の良い測定ができるという特徴を有している。共に PFG による 2 次元測定 (cosy, HMQC, HMBC, NOESY, ROESY, DOSY etc.) が簡便に行える。

### 1-2. 質量分析装置 (MS)

当分野では以下の 5 機種の MS、日本電子製の JMS-700、GC-mate II、JMS-K9、JMS-T100LP および島津製作所製の AXIMA-Resonance を管理運用している。

MS は物質の分子量を計測する装置であるが、構成として大きくイオン化部と検出部に分かれており、いずれの部位も高真空下で運用されている。これは特に検出部において、イオンの進路上に他の分子が存在するとイオンが散乱され、感度が下がってしまうためである。

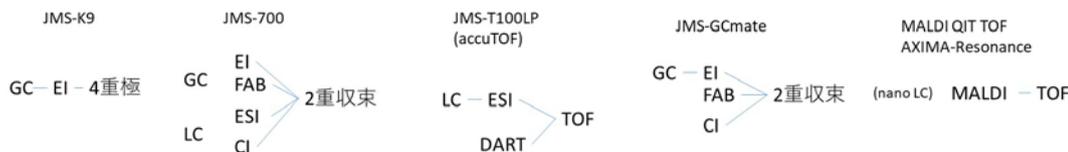


図 1 当分野運用の MS におけるイオン化部と検出部の組み合わせ

検出部における計測法は磁場-電場、4 重極、飛行時間型 (TOF) などがあり、当分野においてもこの 3 検出方法にて測定が可能である。試料をイオン化する方法は様々あるが当分野では電子衝撃イオン化法、高速原子衝撃法、電子スプレーイオン化法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法および DART 法にて測定が可能である。当分野において TOF 型の使用頻度が高い傾向にある。

使用時は推奨する試料濃度を設定している。例えば、JMS 700 では濃度 1.0 mg/ml のサンプルを 1.0  $\mu$ l 導入することを推奨している。これは分子量 500 の物質を使用した場合、2 nmol をイオン化部に導入する計算だが、装置が新しくなるほど検出感度が高くなる傾向にある。最近の装置は pmol (ピコモル)、fmol (フェムトモル) のオーダーにて検出が可能であるため、装置の使用にあたっては、キャリーオーバーしないよう、より細心の注意が必要である。

## 2. 利用頻度

当分野の NMR (5 機種)、MS (5 機種) についての過去 5 年間の装置毎の利用時間の推移を図 2 に示した。各装置を使用する研究グループの増減や研究の志向性により増減があるがクライオプローブ仕様の 800 MHz の利用頻度は下がってきている。MS では GC-MS の利用頻度が下がっていたが持ち直し傾向にある。

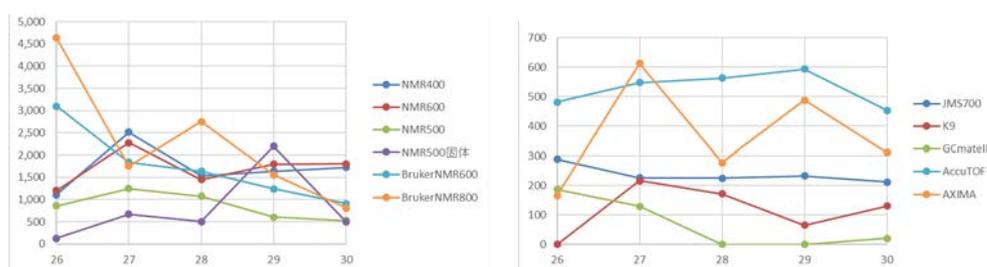


図 2 過去数年間の NMR, MS の利用時間の推移

## 3. トラブルと使用方法改良に関する支援業務の報告

NMR ではサンプルを回転させて測定することが多いが、回転不良トラブルがしばしば起きる。多くはサンプルチューブの外壁の汚れによることが多いが、サンプルチューブの破片がプローブ内に落下して抵抗となり回転しないことがあった。サンプルチューブ内の試料溶液近傍にはプローブの送受信コイルが設置されており、重要な部分を傷つける可能性がある。サンプルチューブの取り扱いは注意が必要である。

NMR の測定において積算回数を「もっと稼ぎたい」、といった要望がよくある。合成した生成物の溶解度が低いために完全に溶解していないことが多く、使用する重水素化溶媒 (重溶媒) の変更や試料の加温などの対処により溶解させれば測定時間を短縮することができる。中には、天然化合物の測定の際、サンプル量を確保できない事例もある。一方、クライオプローブを使用することで感度良く測定することができる。ストリキニーネ 0.01 mg/ $\text{CDCl}_3$  0.6 ml 溶液を多核プローブにより積算 256 にて測定した場合と同じサンプル溶液をクライオプローブにより積算 4 で測定した結果を図 3 に示した。測定時間は前者で 15 分ほど必要としたが、後者は 15 秒にて完了し、測定感度も良い。

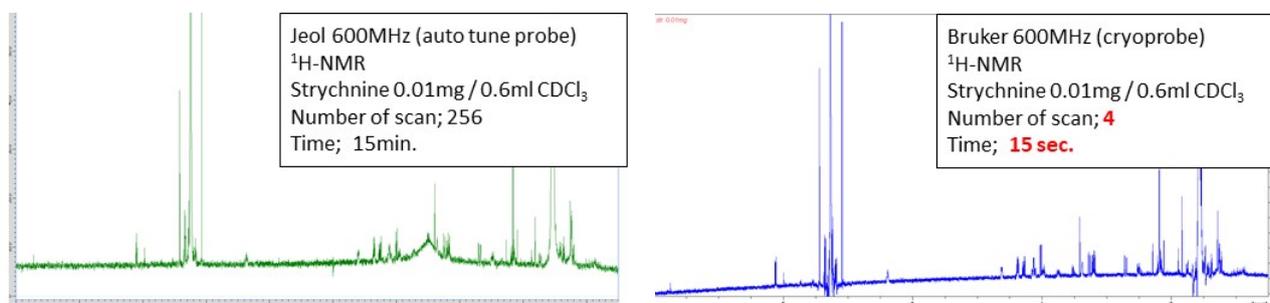


図 3 多核プローブ (左)、極低温プローブ (右) により得られる  $^1\text{H-NMR}$  データの比較

また、サンプルチューブも重要である。以下はストリキニーネの濃度を 0.1 mg/ $\text{CDCl}_3$  0.5 ml に設定し、同

じ積算回数にてサンプルチューブの差異を検討したものである。普段よく使用されるサンプル管 (a) では約 0.6 ml 程度の重溶媒を必要とするが、ガラスの厚みの厚いものを使用することで使用する重溶媒量を少なくすることができる (b, c)。上記はサンプル溶液の横方向について減容したものであるが、縦方向についてできるサンプル管 (d) も使用可能である。a に対し b, c は明らかな感度低下が認められるが、d では a とほとんど同程度の感度で測定できた。サンプル量に限りがある際、サンプルチューブを選ぶことは有効な手段である。

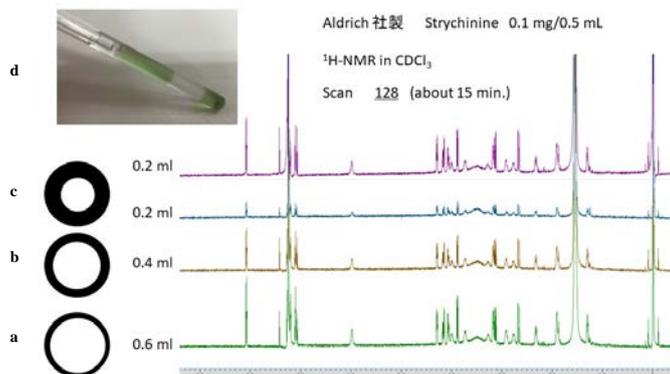


図 4 サンプルチューブの差異により得られる  $^1\text{H-NMR}$  データの比較

JMS-T100LP (AccuTOF) では、ESI 法による分析を行う場合にネブライザーが詰まり、試料溶液が流れないトラブルがしばしば起こる。その都度、詰まりを解消して使用するが、何が原因で詰まりが起こるのか調査を行った。詰った物質を回収し走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察を行ったところ、非常に細かな繊維状の物質であることが判った (図 5 左)。このことから、試料溶液をあらかじめ限外ろ過しておくことは非常に重要である。

一方で、測定するサンプルが詰まってしまうと分析に支障があるが、1 回のサンプル導入量を少なくして分析できれば、使用量も抑え、かつ、詰まるリスクを下げるのが可能である。これまでのサンプルの導入方法は、試料溶液をシリンジに入れ、シリンジポンプにより大量にネブライザーへ導入してきたが (pulse injection 方式)、この経路途中でレオダイン社製のサンプルインジェクターを組み込んだ。これはシリンジポンプによりシリンジからは溶媒のみを送液し、レオダインインジェクターを介してマイクロシリンジにより試料溶液を数  $\mu\text{l}$  導入する方法である (infusion 方式)。この方式にて標準物質のレセルピンを 2~6  $\mu\text{l}$  程度導入し、イオンピーク  $m/z = 609$  を再現よく検出できた (図 5 右)。この方法によりサンプルの消費量と装置の汚れを低減できると考えている。

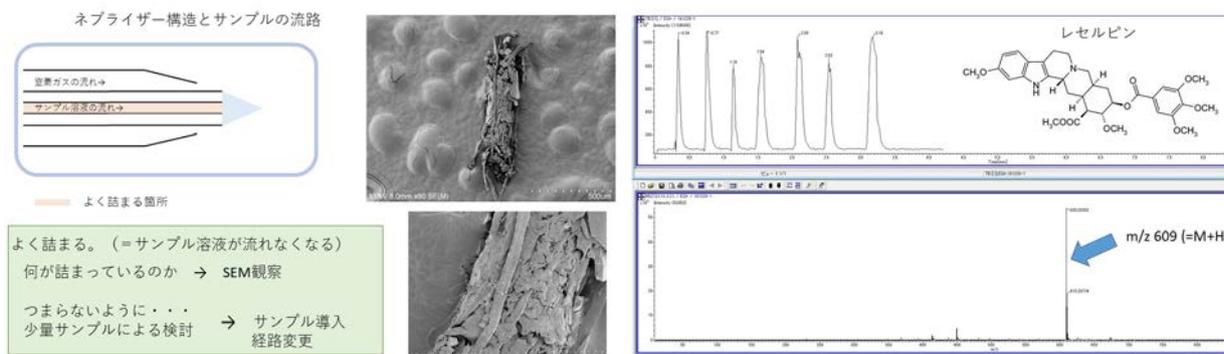


図 5 AccuTOF (ESI) のつまりと infusion 方式によるレセルピンの測定結果

#### 4. 各種測定例

NMR はサンプルを重溶媒に溶かしサンプルチューブ中に調整する非破壊分析であるため、分析機器を汚しにくいという特徴がある。一方、AccuTOF に設置されている DART イオン源は電極からの放電でヘリウム (He) をイオン化し、次いで空気中の水がイオン化され、サンプルをイオン化するため、イオン源は真空条件下にはない。特徴として固体・液体・気体のサンプルを直接分析可能である。

そこで今回、サンプルとしてコーヒー、紅茶、緑茶の抽出液を用い、それぞれのデータを比較した。これらの抽出液はカフェインが入っており、記憶力や運動持続力を向上させる効果や疲労回復作用があると言われている。また、コーヒーはダイエット効果があると言われるクロロゲン酸を、紅茶は抗菌・抗ウイルス効果のあるテアフラビンを、緑茶はカテキンを含有している。

商品に指定されている方法にてコーヒー、紅茶、緑茶を抽出し、AccuTOF (DART) を使用して、飲料サンプルをそのまま測定して得られたマスペクトロメトリーを図 6 に示す。紅茶、緑茶に比べ、コーヒーではメインピークを除いて出現したピークの数非常多い。これは焙煎の過程における熱の影響により種々の反応が起きたため、それらのピークが分散して検出されているのではないかと考えられる。

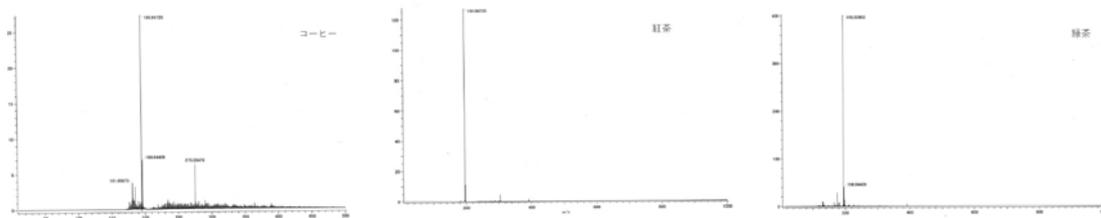


図 6 AccuTOF (DART) により各種抽出物を測定した結果

次に、これらの抽出物を NMR にて測定した。通常 NMR ではすべて重水素化した溶媒で測定することが多いが、これらのサンプルを重水で抽出することは厳しい。そこで、熱水にてそれぞれを抽出し、NMR にてロックをかけるため重水を少量加えて均一な水-重水溶液とした。これらの溶液をそのまま  $^1\text{H-NMR}$  測定するとほとんど水ピークしか見えないが、水位置にパルスを当てる、または、この位置にパルスを当てないことで水のピークが消えた  $^1\text{H-NMR}$  結果を得ることができる。実際に得られた結果が図 7 である。

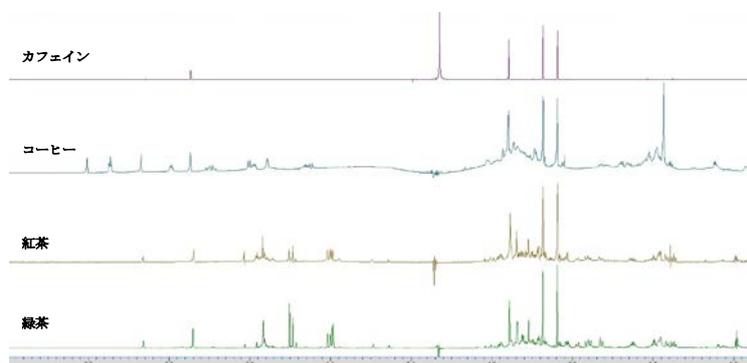


図 7 NMR (water gate 法) による各種抽出物測定結果

カフェイン等のデータと比較することでコーヒー、紅茶、緑茶のデータよりいずれもカフェインを検出できた。また、先に挙げた生理活性物質であるクロロゲン酸やテアフラビンは検出されなかった。

ここまで、抽出物として紅茶やコーヒーに含まれるカフェインなどについて検出の可否を述べたが、純粋なカフェインを、JMS-700 を用いて EI 法により MS 測定した結果について示す。カフェインの  $m/z$ ; 194 が検出されているが、EI

法はハードなイオン化方法であるために、3つのメチル基がはずれたフラグメント  $m/z$ ; 149 や、C-N2 重結合部分が切断されたフラグメント  $m/z$ ; 167 などが検出されている。このカフェインは高分解能 MS を測定では計算精密質量の値に対し 0.6 mmu の誤差にて検出できた。

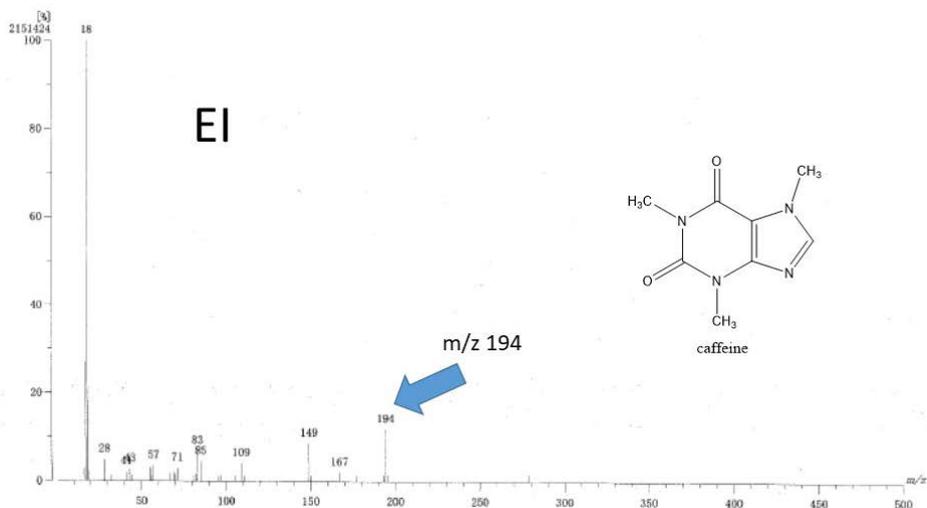


図8 カフェインをEI法により測定して得られるマスペクトロメトリー

Accu TOF を用いてイオン源を ESI と DART を用いて測定したところ、ESI では検出できず DART では  $[M+H]^+$  ; 195 を検出した。MS の測定においてイオン化法を選択することは重要なことである。

以上、当分野の管理運営する NMR と MS を用いた事例について紹介した。