

溶液 NMR 測定における磁場と分解能および感度の比較検討

○尾山 公一^{A)}、沢田義治^{B)}

A) 分析・物質技術支援室 組成分析・構造解析技術グループ

B) 国立大学法人東海国立大学機構岐阜大学 高等研究院全学技術センター科学研究基盤技術支援室

概要

400、500、600、800 MHz の核磁気共鳴装置 (NMR)を用いて、磁場、分解能および感度の比較検討を行った。2022 年現在で稼働している装置で、低分子有機化合物の ¹H および ¹³C の測定においてこれらの選択がどのように測定結果に影響するのかに興味を持ち調べた。いくつかの有機化合物を測定したが、入手が容易で重クロロホルム (CDCl₃)に良く溶けて室温で安定かつ適度に複雑なスペクトルパターンを与える β-D-glucose pentaacetate を主に用いて系統的に 1 次元と 2 次元の測定を行った。

1. はじめに

400、500、600 および 800 MHz の核磁気共鳴装置 (NMR)を用いて、溶液 NMR の磁場の大きさの違いによる分解能および感度の比較検討を行なった。装置は名古屋大学と岐阜大学の NMR を用いた(図 1, 2)。名古屋大学の NMR は、物質科学国際研究センター化学測定機器室の日本電子製の 400、500 および 600 MHz の装置を用いた。岐阜大学の NMR は、高等研究院科学研究基盤センター機器分析分野の Bruker 社製の 600 と 800 MHz の装置を用いた。大学における溶液 NMR 測定では図 3 の



図1. 名古屋大学の核磁気共鳴装置 JNM-ECA 600とJNM-ECZ400 (JEOL)



図2. 岐阜大学の核磁気共鳴装置 AVANCE III (Bruker)

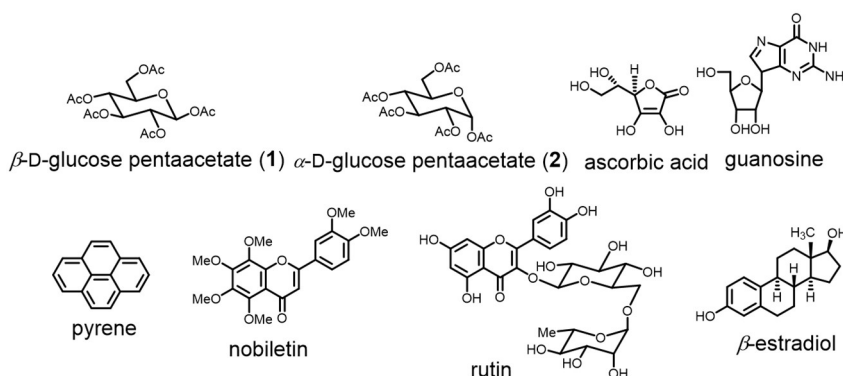


図3. 溶液NMRで測定される有機化合物の例

ような有機化合物の測定に使用されることが多い。NMR 測定では、サンプル量は常に十分な測定量があるとは限らない上、サンプルの性質が測定上問題となることがある。どの

程度の濃度で測定するか、どの溶媒を使用するか、どのくらいの磁場の大きさのどのような測定方法を選択するかが測定データの質を大きく左右する。例えば、化合物の溶解度の特性上サンプル濃度を上げられないときは濃度の問題が重大な問題となる。また、4級炭素は感度が低いことや立体的に混み入った構造では予想外の挙動を示すことなどを考慮した化合物の構造の特性を見極めた測定方法の選択が重要になることもある。研究のスピードに直結する積算回数の選択も重要な測定ファクターである。本調査研究では、測定条件の違いとしてサンプル濃度、磁場の大きさおよび積算回数に特に焦点を当てて行った。また、NMRの世界二大メーカを比較検討できたのも特徴である(図1,2)。NMR測定では低温で測定すると感度が向上することが知られている。クライオプローブを用いた測定を行うことができたので600 MHzのNMRを用いて感度の限界にも挑戦した。測定化合物は、図3の β -D-glucose pentaacetate (**1**)を主に用いて行った。2022年現在で稼働しているNMR装置を用いて実測のデータを取得して測定の傾向や限界の実際について比較検討し、最新の溶液NMRの測定指針の参考となる情報を得たので報告する。

1. β -D-glucose pentaacetate (**1**)の1次元測定について

最も汎用的に使用されている400 MHzのNMR (JNM-ECZ400, JEOL)を用いて、 β -D-glucose pentaacetate (**1**) (図3)の ^1H -NMR (図4)と ^{13}C -NMR (図5)を測定した。測定サンプルは、0.6 mLの CDCl_3 に20 mgの**1**を溶かして調整した。それぞれのスペクトルの帰属は、図4と図5に示す通りである。

磁場の大きさの違いによる**1**の5位のプロトンのシグナルの比較を行った(図6)。磁場が大きくなるにつれて分解能がよくなっているのが分かる。分解能がよくなると重なったピークが分離できる様子がよく分かる例として、 α -D-glucose pentaacetate (**2**)の2位と4位のプロトンのスペクトルを図7に示す。400 MHzのNMRでは重なっていた

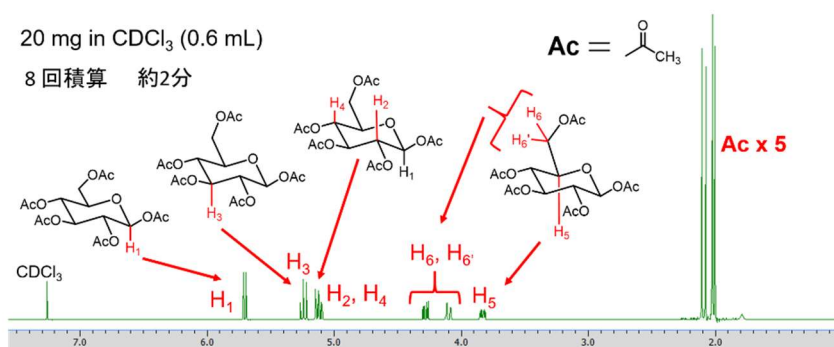


図4. β -D-glucose pentaacetate (**1**)の ^1H -NMR スペクトル (JNM-ECZ400, JEOL)

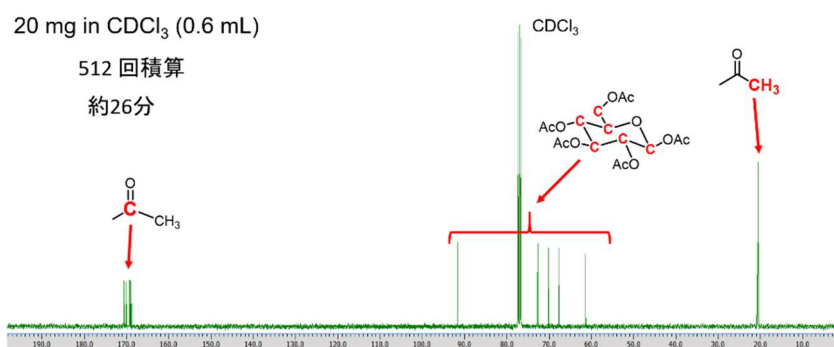


図5. β -D-glucose pentaacetate (**1**)の ^{13}C -NMR スペクトル (JNM-ECZ400, JEOL)

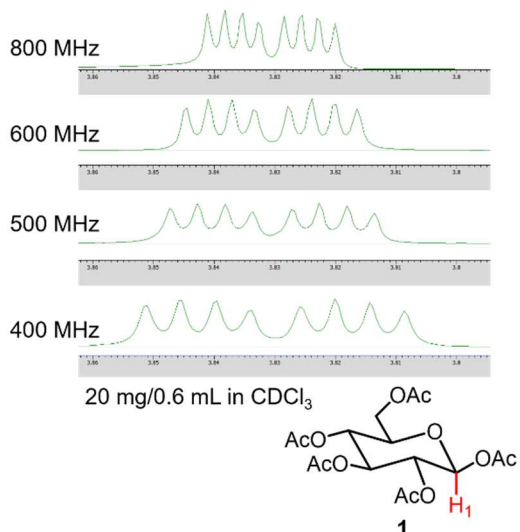


図6. 磁場の大きさによる¹H-NMRのスペクトルの比較 (1)

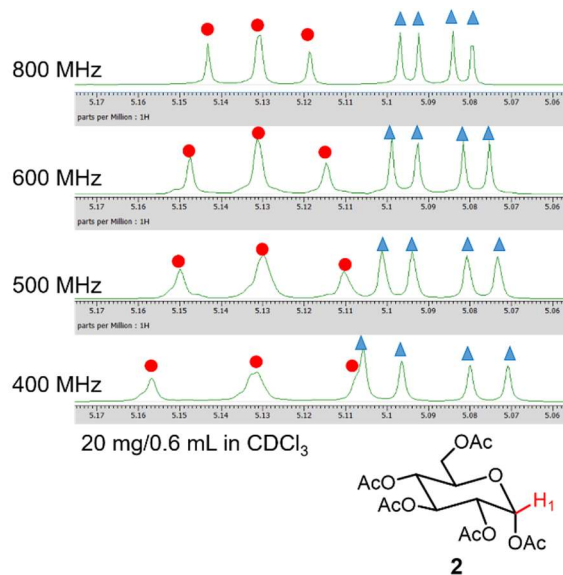


図7. 磁場の大きさによる¹H-NMRのスペクトルの比較 (2)

ピークが、磁場が大きくなるにつれて徐々に分離して行く様子が良く分かる。600 MHzで完全に分離し、800 MHzではピークの間には空間が出来るほど離れている。

1の濃度依存性について調べた。0.6 mLのCDCl₃に0.2 mg、1 mg、5 mg、10 mg、20 mgの1を溶解して¹H-NMRを測定した。リファレンスには、溶媒のピークを用いた。1の5位のプロトンのシグナルの変化を図8に示す。濃度が濃くなると徐々に高磁場シフトしているのを確認することができる。

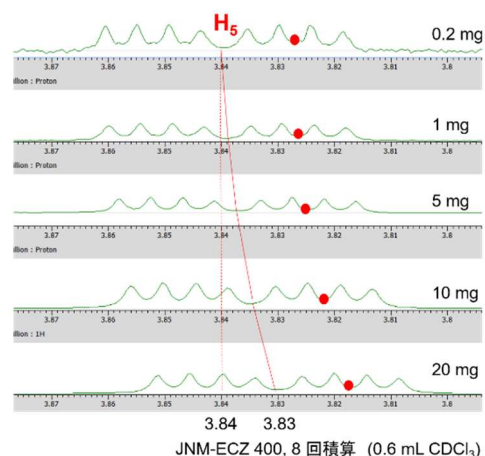


図8. 1の¹H-NMRのスペクトルの濃度依存性

1の測定溶媒の違いによる¹H-NMRのスペクトルの変化を比較した。溶媒には、CDCl₃とDMDO-d₆を用いて測定した(図9)。CDCl₃を用いた時よりDMDO-d₆を用いたときに、1位、3位、5位のプロトンのシグナルは低磁場シフトし、2位、4位、6位、6'位のプロトンのシグナルは高磁場シフトした。

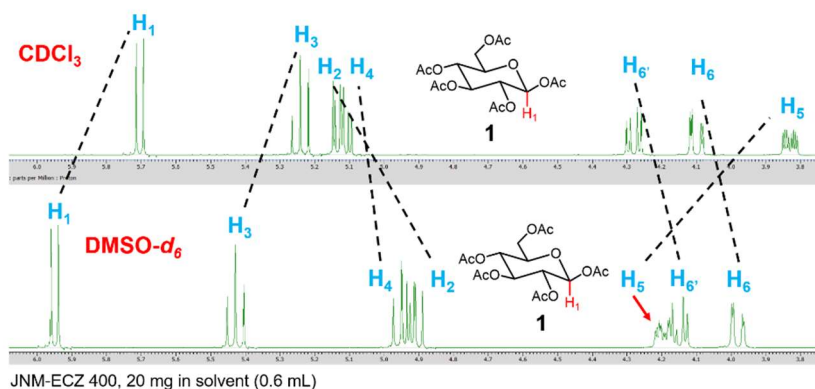


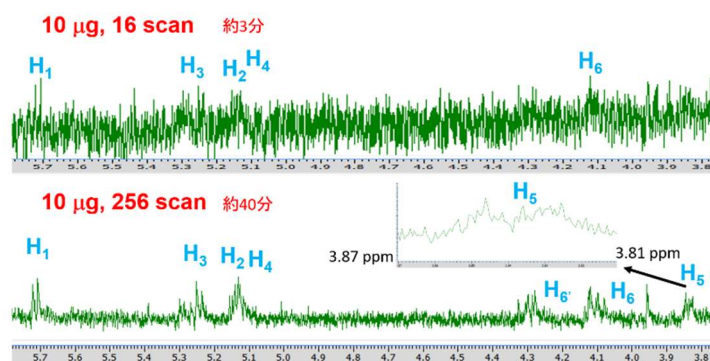
図9. 1の溶媒の違いによる¹H-NMRスペクトルの変化 (2)

1を用いて、¹H-NMR測定のサンプル濃度の限界について調べた。JNM-ECA600 (600 MHz)を用いて、0.6 mLのCDCl₃に1 mg、

200 μg、50 μg、10 μgの1を溶解して¹H-NMRを測定した。10 μgを用いた測定では、16回

の積算 (約 3 分) ではピークがほとんど検出できなかった。しかし、256 回の積算 (約 40 分) を行うと、解析するのに十分な形状ではないが全てのピークを確認できることが分かった (図 10)。さらに検討を重ねた結果、JNM-ECZ400 (400 MHz) でよりピーク形状が向上し、クライオプローブを用いた AVANCE III (600 MHz) の測定では、解析可能なスペクトルが得られることが分かった (図 11)。

^{13}C -NMR についても **1** を用いてサンプル濃度の限界について調べた。種々検討した結果、AVANCE III (600 MHz) でクライオプローブを用いて 1 mg を 0.6 mL の CDCl_3 に溶かして 32,000 回積算すれば、投稿論文に十分なスペクトルが得られることが分かった (図 12)。



JNM-ECA 600, 10 µg in CDCl_3 (0.6 mL)

図10. 600MHz NMRによる**1**の微量サンプルの ^1H -NMRスペクトル

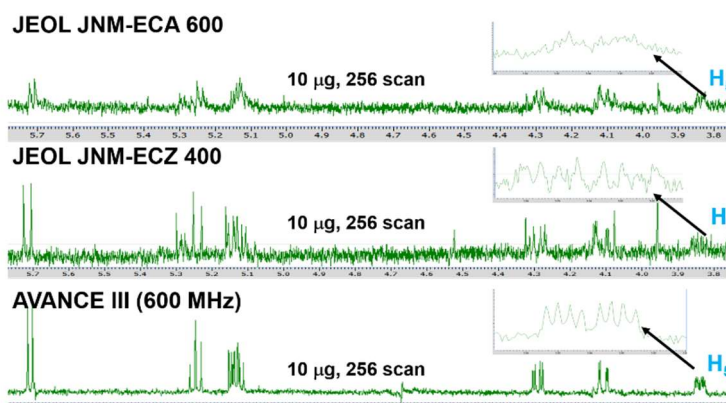


図11. **1**の ^1H -NMRスペクトル測定における感度の比較

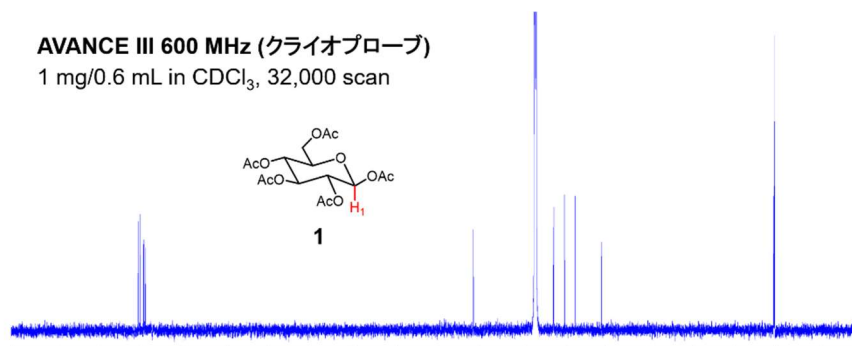


図12. **1**の600 MHzクライオNMRによる ^{13}C -NMRスペクトル

2. β -D-glucose pentaacetate (**1**)の2次元測定について

JNM-ECA600 (600 MHz)を用いた **1** (20 mg/0.6 mL)の COSY 測定は、1 回の積算では 5 位と 6 位の相関を得ることが出来なかった (図 13、左)。他の相関は全て 1 回の積算で相関が得られた。積算の効果は大きく 8 回積算すれば 5 位と 6 位でも十分な相関を得ることができた (図 13、右)。これらのことから、**1** の測定では溶媒に $\text{DMSO-}d_6$ を用いて COSY 測定を行うと 5 位と 6 位の相関が出にくいことが分かった。一方、溶媒に CDCl_3 を用いると **1** の 5 位と 6 位の COSY の相関は 1 回の積算で確認することができ、溶媒に CDCl_3 を用いると相関は出やすいことが分かった。これらのことから、溶媒を変化させることで二次元測定の相関の得られやすさが変化することが分かった。溶媒に CDCl_3 を用いた場合、AVANCE

III (600 MHz)でクライオプローブを用いると10 $\mu\text{g}/0.6\text{ mL}$ の濃度でも4回の積算で十分な相関が得られた(図14)。

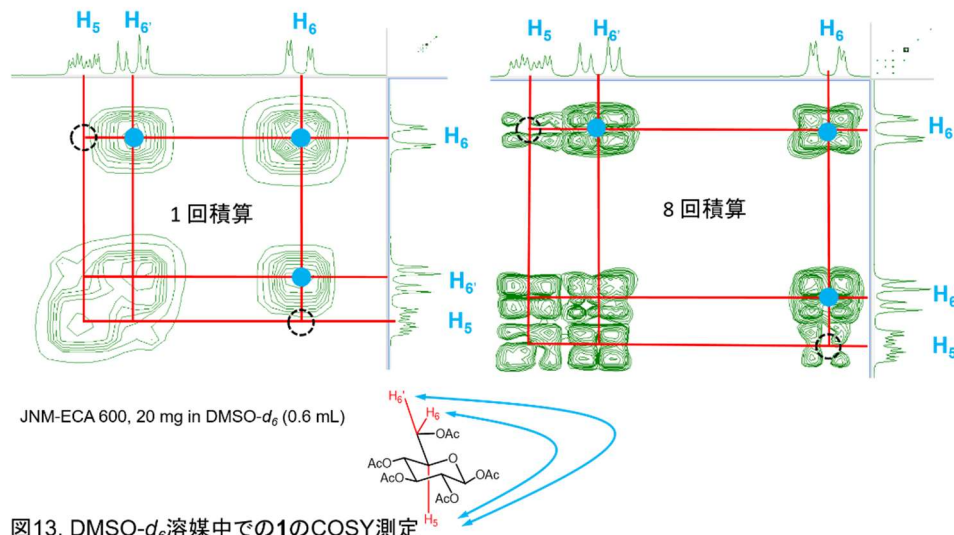


図13. DMSO- d_6 溶媒中での1のCOSY測定

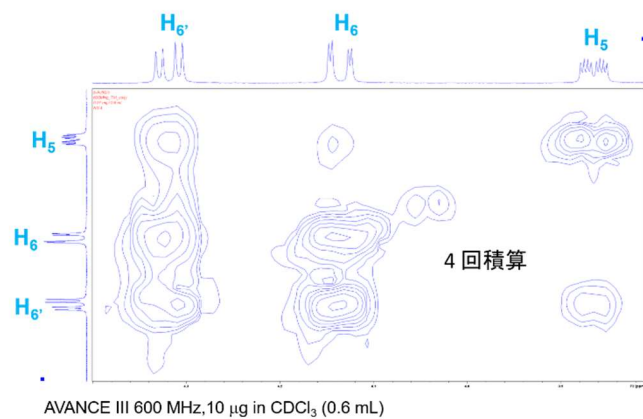


図14. 600 MHzクライオNMRによる1のCOSY測定

3. まとめ

600 MHz クライオ NMR を使用した場合、 ^1H -NMR 測定では 10 μg 程度のサンプルがあれば、2次元測定までできることが分かった。また、 ^{13}C -NMR 測定では、1 mg 程度のサンプルがあれば論文に投稿できるデータが得られることが分かった。DMSO- d_6 を溶媒に用いた β -D-glucose pentaacetate (**1**)の COSY 測定では、5位と6位のプロトンの相関のうちカップリング定数が小さい方のプロトンとの相関が出にくいことが分かった。溶媒に CDCl $_3$ を用いるとこの相関は出やすかった。これらのことから、溶媒を変化させると二次元測定の相関の得られやすさが変化することが分かった。これらの測定結果は、NMR 測定のユーザーのための測定の指針や参考データとして活用できると考えている。