

NMRにおけるサンプリングの検討

○沢田義治^{A)}、山田莉緒^{A)}、高濱謙太郎^{A)}、尾山公一^{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)} 分析・物質技術支援室

概要

核磁気共鳴装置（NMR）における測定形態は溶液、固体、半固体と多岐にわたる。これらのうち固体や半固体 NMR の高分解能測定では、マジックアングルスピンニング（MAS）が必須であり、サンプルの入るサンプルローター径が測定結果に大きな影響を与える。サンプルローター径は各種存在するが、サンプリングの容易さや感度などの総合的な観点から 3.2 mmφ と 4.0 mmφ が最もよく使用されている。東海国立大学機構統括技術センターにて重点運用機器として学内外共用されている AVANCE NEO 500 では、4.0 mmφ ローターと固体汎用プローブを用いた固体測定をデフォルトとして運用しており、必要に応じて他のセットアップ条件を用いた測定も行っている。現状の運用では、感度の高い ^1H 、 ^{31}P 、だけでなく感度の低い ^{13}C や緩和時間の影響で測定時間が長くなる ^{29}Si の測定にも対応している。現場の対応で最も問題になるのは、サンプル量の少ないものが持ち込まれたときであり、感度の確保に工夫をする必要がある。以上の背景から、固体測定に加えて溶液測定、半固体測定の少量サンプル測定における感度確保のための測定条件検討実験を行ったのでこれを報告する。

1. コアファシリティ重点運用機器の紹介

東海国立大学機構は令和 3 年度に文部科学省「先端研究基盤共用促進事業（コアファシリティ構築支援プログラム）」に採択され、コアファシリティ化を進めている。コアファシリティ構築支援プログラムは、大学・研究機関が組織として継続的に、優れた研究設備・機器を戦略的に整備・活用し、全ての研究者がより研究に打ち込める環境を実現するために、新たな共用システムの成果を発展させ、研究機関全体の研究基盤として戦略的に導入・更新・共用する仕組みを強化（コアファシリティ化）するとともに、研究設備・機器のサポート・維持管理に必要不可欠な技術職員の組織的な育成・確保に取り組んでいく事業である^[1]。現在、コアファシリティ重点運用機器として 5 台の装置が導入されており、これらの装置は、名古屋大学全学技術センターが管理運用する装置として技術職員が主体となって運用し、稼働時間のほぼ全てが共用に供されている。これらの中で、AVANCE NEO 500 は、重点運用機器の 1 台として 2021 年度に導入された。



図 1 AVANCE NEO 500 MHz NMR

現在までの成果を報告する。（図 1）

2. AVANCE NEO 500 の紹介、利用実績、利用促進

2.1 AVANCE NEO 500 の紹介

核磁気共鳴装置（NMR）は主に、強磁場を発生するマグネット（SCM）、NMR 信号の送受信を行う分光器、サンプルに対しパルスを与え、受け取るプローブから構成され、操作 PC により測定が行われる。AVANCE NEO 500 は、分光器は 2 チャンネルしかないが、後に紹介する拡散係数測定を可能とする高出力アンプを装備している。この Ascend シリーズ NMR の SCM は、漏洩磁場が横方向で 0.6 m 以内に遮蔽され、ヘリウム（He）の自然蒸発が非常に抑えられたマグネットである。また、本装置の最大の特徴は測定対象が固体、液体、半固体と多岐にわたり可能なことであり、4 mmφ、1.3 mmφ のサンプルローターを使用することが可能である。4 mmφ では最大 15 kHz、1.3 mmφ では最大 67 kHz のマジックアングルスピンング（MAS）をかけることができる。液体用プローブの低周波側では ^{109}Ag までを対象とし、固体－液体の中間的な半固体サンプルでも専用プローブ（HR-MAS probe）により高感度かつ高分解能で測定が可能である。さらに拡散係数測定では、最大勾配磁場強度 1,700 G/cm をかけることができる。前述の特徴を有することから重点運用機器の中で、固体、液体、半固体サンプルの原子核を対象として非破壊で分析ができる唯一の装置であり、導入から 3 年間の間に徐々に装置の存在が知られるようになり、これに比例して成果数も上昇してきた。

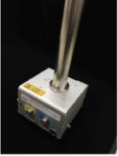
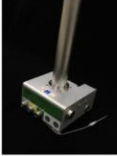
					
	iProbe CPMAS	iProbe HRMAS	1.3 mm DVT	iProbe Smart	DIFFBB
検出器	4 mm	4 mm	1.3 mm	5 mm	5 mm
形状	固体	半固体	固体	溶液	各種
核種	^1H , ^{19}F , ^{31}P - ^{15}N	^1H , ^{13}C , ^2H	^1H , ^{19}F , ^{31}P - ^{15}N	^1H , ^{19}F - ^{199}Hg , ^{17}O - ^{109}Ag	^1H , ^{19}F , ^{31}P - ^{15}N
勾配磁場強度		50 G/cm		50 G/cm	1,700 G/cm
温度範囲	-80 - 200 °C	-20 - 80 °C	-30 - 70 °C	-150 - 150 °C	-40 - 150 °C

図 2 AVANCE NEO 500 MHz NMR で使用可能なプローブ

2.2 利用実績

AVANCE NEO 500 の担当者として 2023 年に着任したが、現場技術者やまたコアファシリティアドミニストレーター（CFA）として、他の CFA とも連携して学内外の研究にコミットし、本装置を使用した測定を研究成果に結びつけて研究支援を行っている。その結果、利用開始した 2022 年度は利用グループ数が 4 件だったが、2024 年度は 13 件へと増加し、現在では利用件数は 100 件を超えるようになった。利用グループ数は決して多くないが、利用件数が多いことからリピートして利用されている。また、東海国立大学機構のコアファシリティ重点運用機器として、同じ機構内でシームレスに利用可能であることからアクセスのしやすい岐阜大学からの利用も伸びつつある。さらに、複数の民間企業からの利用もあり、外部利用の実績も伸びている。

2.3 利用促進の取り組み

AVANCE NEO 500 の運用で CFA と連携した利用促進の取り組みには次のようなものがある。まず、測定事例を「アプリケーションノート」や「Data Report」として取りまとめて東海国立大学機構統括技術センターのホームページに掲載し、メールによる配信、SNS を使用した宣伝を行なっていることがあげられる。また、東海国立大学機構設備・機器共用システム (TESS) に装置情報を掲載し、装置の認知向上に努めている。これらにより NMR を利用した測定に関する問い合わせが増加し、実際の利用増加につながっている。実際の依頼測定業務の中での取り組みでは、研究者との技術相談や議論を大切にして、研究に必要とされる測定を十分に理解して測定を遂行し、必要ならば構造解析のサポートを行う手厚い研究者支援を実施している。

3 核磁気共鳴装置におけるサンプリングの検討

3.1 溶液プローブのサンプルチューブの違いにおける感度比較

溶液 NMR では図 3 のようなサンプルチューブを使用することが多い。そこで今回は、測定サンプルとしてストリキニーネ 0.1 mg / 0.6 ml 重クロロホルム溶液を用いて、NMR 測定で最も汎用される 5 mmφ の標準サンプルチューブとマイクロボトムチューブと呼ばれる下部外径が 1.7, 2.0, 2.5, 3.0, 4.1 mmφ のサンプルチューブ、さらに外径が 5 mmφ 対称マイクロセルを用いて検討を行った。対称マイクロセルでは、パルスが照射されるサンプル部分の上端と下端に溶媒と同じ磁化率で調整したガラス材を使用することでサンプルの溶液量を減らすことのできるサンプルチューブであり、サンプル濃度を稼ぐことができる。

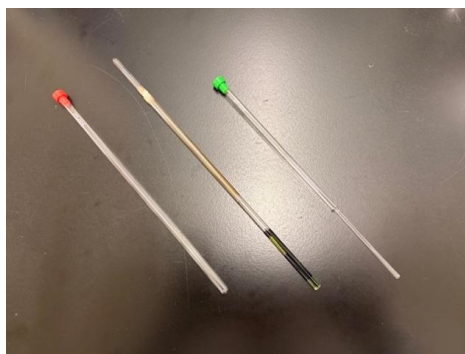


図 3 溶液 NMR において使用されるサンプルチューブの例

測定前の装置調整（特にシム調整）は、ノーマルチューブ、対称マイクロセル、外径 3 mmφ 以上のマイクロボトムチューブでは 3 分以内に終了した。しかし、外径 2.5 mmφ 以下のマイクロボトムチューブでは 10 分以上かかった。特に 1.7 mmφ 径では 15 分経っても調整が完了せず、この重溶媒での測定には適さないと判断し、以降の測定は行わなかった。測定した 6 つの結果では、サンプルチューブの外径が太くなるとともに感度が上昇した。また、対称マイクロセルの結果は外径 4.1 mmφ と 3.0 mmφ のマイクロボトムチューブを用いて得られる結果の中間的感度であることがわかった。

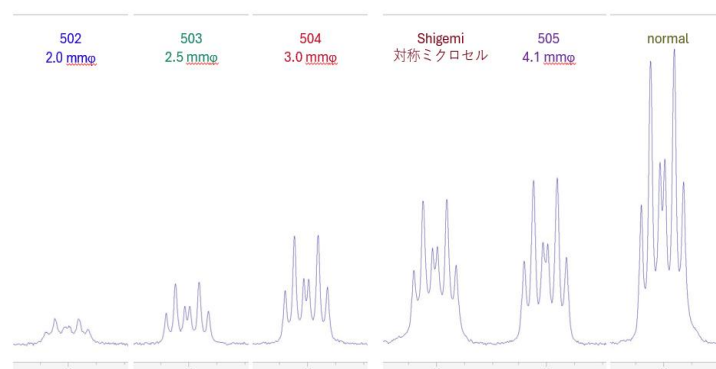


図 4 各サンプルチューブを用いて得られた 1 つのピークの感度

（左から外径 2.0, 2.5, 3.0 mmφ, 対称マイクロセル, 4.1, 5.0 mmφ）

3.2 固体プローブのサンプル位置の違いによる感度比較

固体 NMR では各種サンプルローターが供給されているが、当センターは 4 mmφ ローターと 1.3 mmφ ローターによる測定が可能である。4 mmφ ローターの場合、調整可能なサンプルのフルボリュームは 110 μ L、80 μ L、50 μ L の 3 種類があるが、実際に依頼測定として持ち込まれるサンプル量では、既定のサンプル量に達しない場合が多数ある。サンプル量が少ない場合、サンプルを充填できないサンプルローターの空間はスペーサーで埋めて測定するが、サンプルローター内でのサンプルの位置が測定感度に影響する重要なファクターとなる。そこで、110 μ L サイズのサンプルローターで、ローター内部のサンプルとスペーサーの配置を様々に変更して測定し、最も感度よく測定できる配置を検討した。

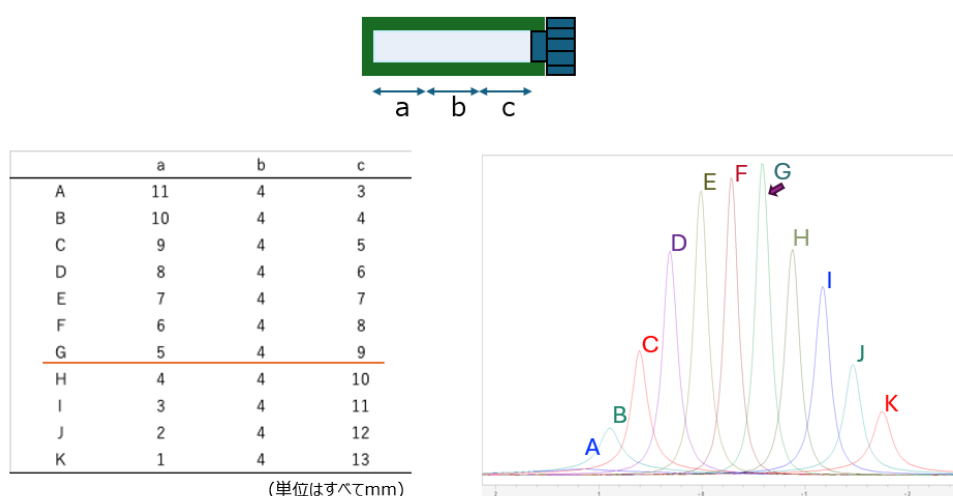


図 5 固体 4 mmφ ローターを用いた固体サンプルの感度比較検討

検討の結果、G 配置のようにボトムより、5 mm のスペーサー、4 mm のサンプル、9 mm のスペーサーとした際に最も感度よく測定できることがわかった。

3.3 半固体プローブの測定サンプル回収

半固体プローブを用いた測定では、溶媒によって膨潤したゲル状のサンプルや固体成分が混じった液体サンプルでも ^1H や ^{13}C -NMR 測定において、溶液 NMR と同程度のシャープなスペクトルを得ることが可能である。しかし、これらのサンプルを通常の固体用サンプルローターにサンプリングするとサンプルが漏洩する可能性が否定できず測定は困難であり実用的ではない。この問題を解決するために、ブルカー社よりディス

ポーサブルインサートチューブが提供されており、これを利用すると簡便に試料調整をすることができる。構造の概略は、図 6 の通りである。テーパ状のインナーキャップにより密封し、スクリューキャップによりインナーキャップが外れることを防止している構造となっている。従って、このサンプリングでは、サンプルの回収は想定されていなくサンプル回収はできない。しかし、依頼サンプルでは、天然から得られたサンプルで微量であるなどの理由のために、測定サンプルを回収して実験に再使用したいとの要望があることがある。そこでサンプルを回収する方法を検討したところ、図のように小さいチューブカッターと万力を使用することで、サンプルの散逸を防いだ回収方法を次のように見つけることができた。インサートチューブが小さいために指先でインサートチューブを持って固定することができなかつたので、万力を使用してチューブを固定し、模式図の矢印の位置になるようにチューブカッターの刃の位置を設定し少しずつチューブを切った。最後に、刃が入ったところでゆっくりと「く」の字にチューブを折ることでサンプルを散逸することなく取り出すことが出来た。この方法は再現性があり、貴重なサンプルのサンプル回収が可能となった。

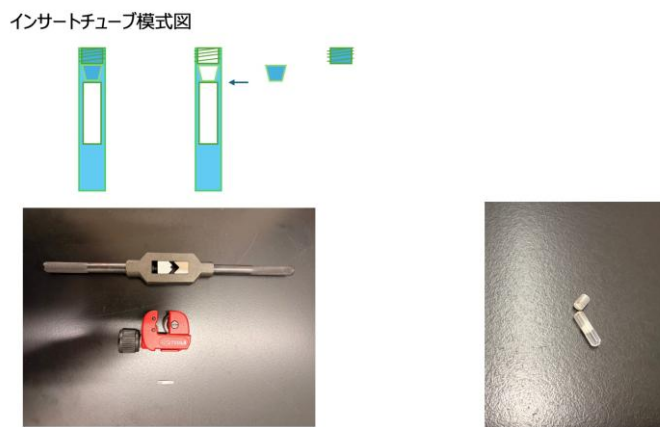


図 6 半固体測定のサンプル回収の例

まとめ

溶液 NMR 測定の少量サンプル測定では、デフォルトの測定として下部 3 mmφのサンプルチューブを用いて来たが、今回系統的に検証した結果、このサンプル管の使用が感度と測定のトータル時間のバランスがよく最も実用的であることを再確認できた。固体 NMR の少量サンプル測定では、4 mmφローター中でのサンプルの最適な調整位置を確認できたので、今後このサンプリング条件を使用して測定して行きたい。半固体 NMR 測定では、インサートチューブを用いた ^1H -MAS NMR 測定でサンプル回収に問題であったが、工夫することで回収方法を確立することができた。

参考文献

- [1] 令和 3 年度「先端研究基盤共用促進事業（コアファシリティ構築支援プログラム）」の公募について
文部科学省 https://www.mext.go.jp/b_menu/boshu/detail/mext_00113.html （2025 年 3 月 1 日最終閲覧）

謝辞

本発表は、令和 6 年度名古屋大学全学技術センター自発的技術研鑽助成プログラム（採択番号 2024-04 番）の支援を受けたものです。また、本稿作成にあたり CFA チームの後藤 伸太郎 技師には固体サンプル用調整ジグの作成にて多大なるご協力を賜りました。心よりお礼申し上げます。`