

Spinsolve 80^{ULTRA}

溶媒の抑制: 試料を測定するための鍵

合成中にいつでも必要な測定が出来ます



図 1. 化学実験室で製品の迅速な分析に利用されている Spinsolve NMR 分光法。サンプルに含まれる典型的なプロトン化した溶媒が試料中に存在するため溶媒抑制法やカーボンデカップリング法を用いて目的の分析対象物のスペクトルを取得する必要がある。

化学実験室における NMR 分光法

ベンチトップ NMR 分光法は化学研究室で化学者がサンプルを製造しながら迅速に分析するために開発されたものである。これらのコンパクトな NMR システムは ケミストリーベンチやヒュームフード内に簡単に設置でき、合成の進行に合わせてリアルタイムに生成物を同定または定量することが出来ます。プロセスから取り出した試料を測定する場合、製品が通常のプロトン溶媒に溶解していることが重要な問題となる。迅速なサンプル分析のためにはサンプル前処理を最小限にすることが重要である。例えば溶媒の交換に必要な面倒な作業は要求されません。プロトン化した溶媒が試料中に存在する状態で NMR スペクトルを得るには溶媒の大きなシグナルを減衰させる方法が必要であり、それは生成物のシグナルに比べて最大で 4 桁も大きくなりやすい。高磁場 NMR で知られている解決策は NMR 信号を取得する前に溶媒の信号を選択的に減衰させる溶媒抑制法を適用することである。しかしこれらの方法は選択的な周波数励起をベースにしているため、磁石の発生する磁場が均質である場合のみに効率的に動作させることが出来ます。均一磁場中では特定の化学グループの原子核は全て同じ共鳴周波数を持っており、信号の中心波数で励起すると効率よく減衰させることが出来る。Magritek は要求される基準を満たすために Spinsolve ULTRA モデルを導入しました。これらの機種はピーク高さの 50%, 0.55%, 0.11% でライン形状を規定する超電導マグネットの規格に匹敵する均質性を実現した唯一のベンチトップ型分光器です。

効率的な溶媒抑制

Spinsolve ULTRA 分光器に実装したWE T溶媒抑制法の性能を実証するためにニート水に 10mM の濃度で溶解したヒスチジンの試料を使用した。ニート水は 1H 濃度が 110 モル（1 分子当たり 2 H）であり、単一のピークに寄与している。フルスケールと拡大したスペクトル（図 2 a, 2 b）は標準スペクトル（黒）と溶媒を抑制して得られたスペクトル（赤）の比較を示している。溶質が溶媒よりも 4 桁も小さい濃度であることを考慮すると、ヒスチジンのシグナルを見るためには大きな垂直方向のズームが必要である（図 2 b 参照）。標準スペクトルではヒスチジンのシグナル（図 2 b 黒）が水ピークのスペクトルの大部分を占めるテール部に現れるため定量は殆ど不可能である。尚 Spinsolve 卓上NMRは測定する試料とは無関係に動作する外部ハードウェアロックシステムを備えているので試料に D_2O は必要ありません。

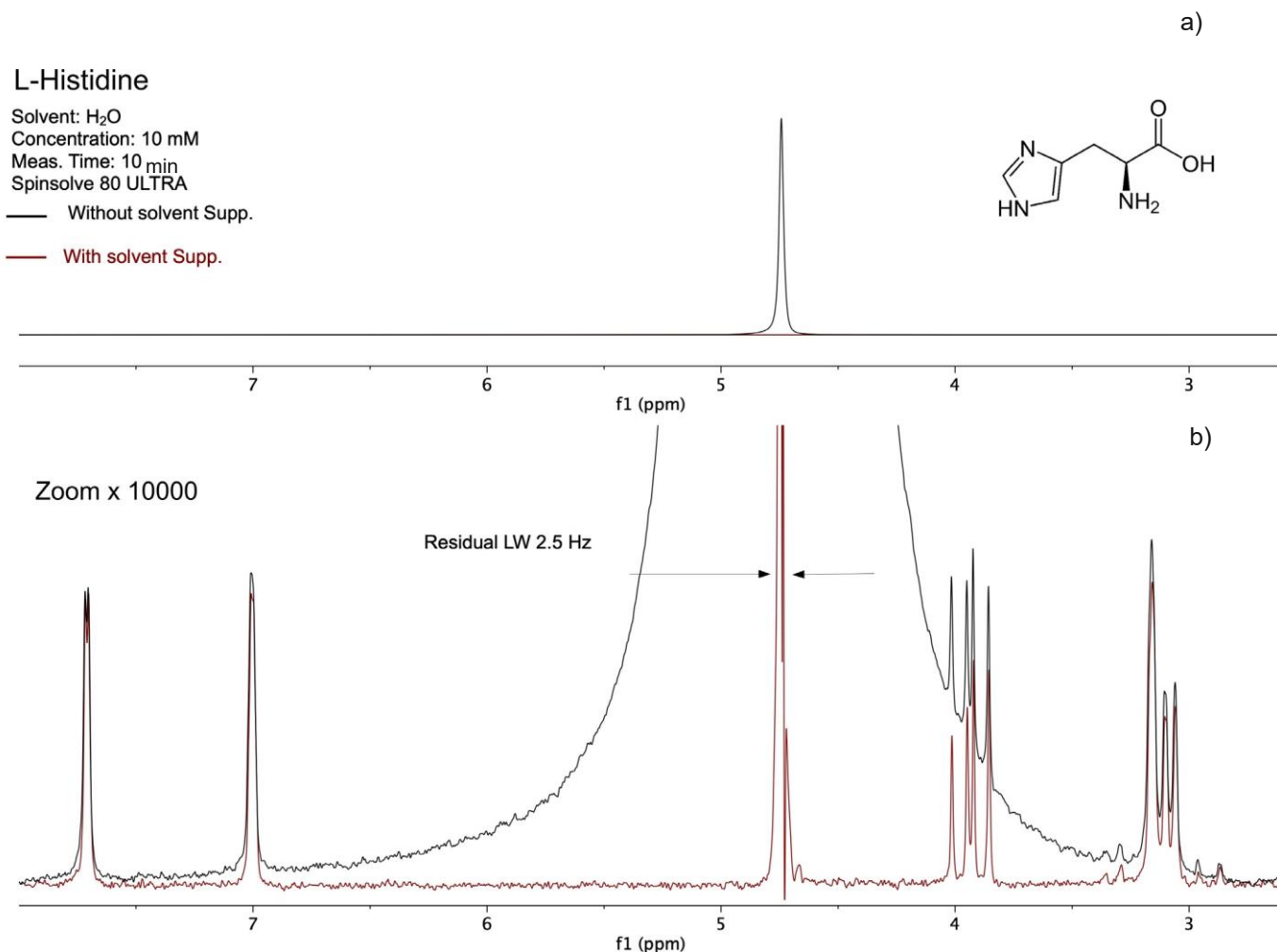


図 2. ヒスチジンを 10mM の濃度で水に溶解し、標準シーケンス（黒）と WE T 溶媒抑制シーケンス（赤）で取得したスペクトル。a) フルスケールのスペクトル。水の濃度が 55 モル (1H は 110 モル) であるため水の信号だけが見えている。b) a) のスペクトルを垂直方向に 10000 倍拡大したもの。このスケールでは標準実験ではヒスチジンのシグナルが巨大な水のピークのテールと重なる（黒）が、溶媒抑制法で得られたスペクトルでは全て非常によく分解できる事が観察される（赤）。水のピークはヒスチジンのシグナルとは異なる共鳴周波数に現れるためテールを効率的に除去する所まで減衰していることが観察される。b) のスペクトルは Spinsolve 80 MHz Carbon ULTRA で 64 スキャン、10 秒の繰り返しで取得された。

水のピークはスペクトルの広い範囲に広がっていますが、ピークを中心波数にWETモジュールを適用することで強く減衰させることが出来ます。溶媒を抑制して取得したスペクトルを図 2a, 2b に赤で示す。この実験では水のピークが約 1000 倍に減衰したが、ヒスチジンに対応するシグナルは影響を受けず正確に定量することが出来る。

第二の例として図 3 は 20mM のスクロースを水に溶かしたサンプルに対する溶媒抑制法の性能を示したものである。このサンプルは 5.4PPM のアノメリックプロトンのシグナルに影響を与えずに水のピークを飽和させるための溶媒抑制の選択制をテストするための標準として使用されています。このピークは標準測定では水のピークのテールと完全に重なっているが（黒）、溶媒を抑制して測定したスペクトルでは完全に分解されている（赤）。

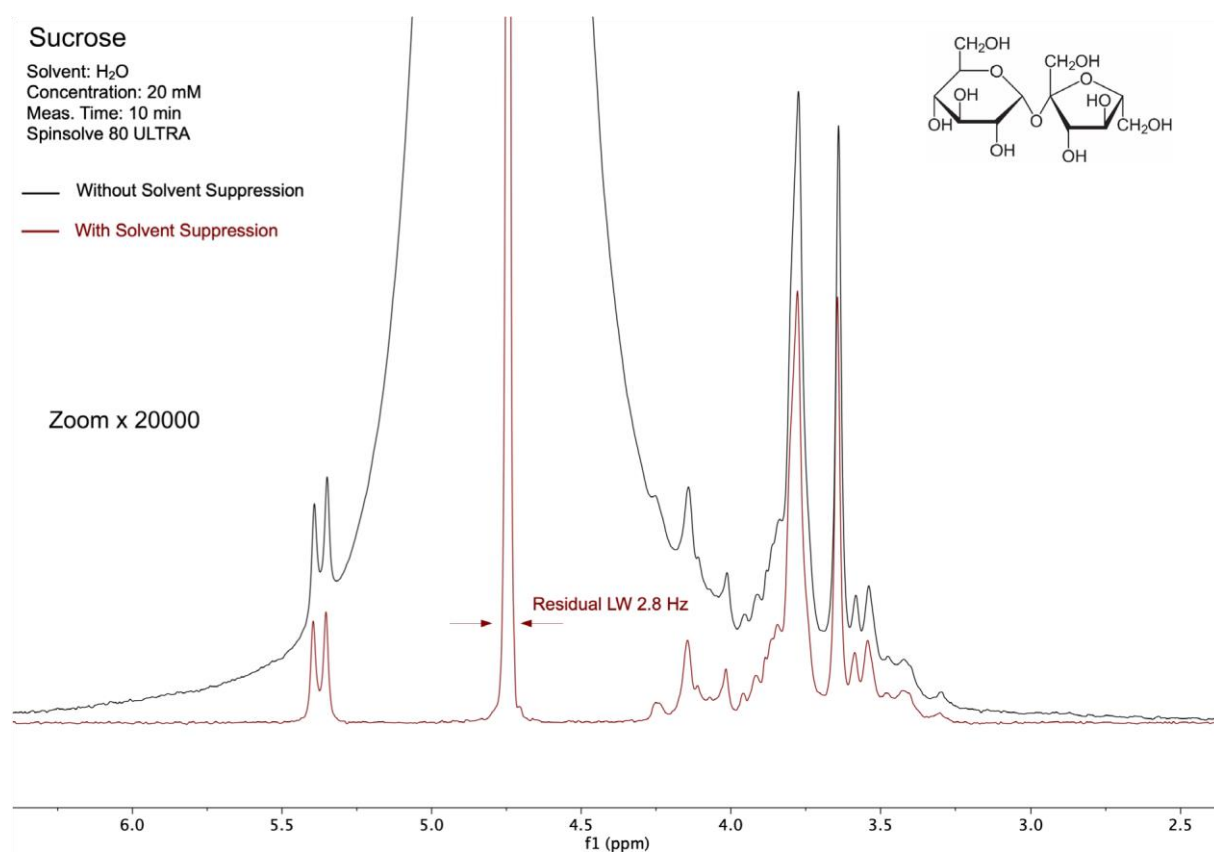


図 3. スクロースを 20mM の濃度で水に溶かした時のスペクトルを標準パルスシーケンス（黒）と溶媒抑制法（赤）で取得した。スペクトルは Spinsolve 80 MHz Carbon ULTRA で 64 スキャン、10 秒間の繰り返しで取得した。

この高性能な溶媒抑制は磁場が高度に均一の場合のみ達成され卓上型ではチャレンジングな事です。卓上型分光器に設計された永久磁石は可能な限り小型で最強の磁場を発生させることが要求されます。また、5mm 径の NMR チューブを使用するため試料容積に制約があります。このような最適化プロセスにおいて最も問題となるのは磁場の均一性です。一般に管の中心部では適度な均質性が得られるが、管の壁に近づくとも均質になる傾向があり半分の高さでは比較的狭い線形になるがピークの底ではテールが非常に広くなることがある。この場合溶媒を抑制する方法が正しく機能しません。

これはこの方法で用いる選択的励起はピークを中心に近い共鳴周波数を持つ原子核のみを飽和させるからである。テールは単に磁場の強さが異なる所にある原子核の信号なので、管の壁際などの磁場の強さが異なる場所にある核は均一系核の信号と共鳴周波数が異なるため効率よく飽和することはない。磁場の不均一性による周波数の広がりによっては選択励起部分がピークを中心に飽和させ中心を焼くことになるが、極端な話テール部分は影響を受けない。そのためピークを中心は減衰できてもテールの重なりは残ってしまい、溶媒の抑制には何のメリットもない。

磁場の均一性はスペクトルのピークの形を決定するため、磁石の均一性を特定する方法として標準クロロホルム試料のNMRピークの異なる高さでの線幅（LW）を測定することが一般的である。ピークの50%付近のLWを主な指標とするのが一般的ですが、実は溶媒抑制法に期待できる性能を決めるのは底辺のLWです。高磁場システムでは線幅は通常ピーク高さの50%、0.55%、0.11%で指定されます。最高のパフォーマンスを実現するために溶媒の抑制が必要なアプリケーションにおいて、Magritekは2017年に Spinsolve ULTRA というモデルを発売しました。Spinsolve のクラシックバージョンは、今日のベンチトップ市場で最高の均質性を提供していますが（LW <0.4Hz at 50%, <16Hz at 0.55% of ピーク高さ）、Spinsolve 80 ULTRA モデルは更に優れた線幅（0.25Hz at 50%, <10Hz at 0.55%, <20Hz at 0.11% of ピーク高さ）を指定し、高磁場マグネットがもたらす均質性と同等の品質を提供しています。図4は標準クロロホルム試料を用いた場合の線形の一例である。ここで重要なのは Spinsolve ULTRA は市場で唯一LWを0.11%に設定しているモデルであるということです。ULTRAは超高磁場均質性により他のベンチトップ装置では不可能な溶媒シグナルに近い微少シグナルの解像が可能になりました。

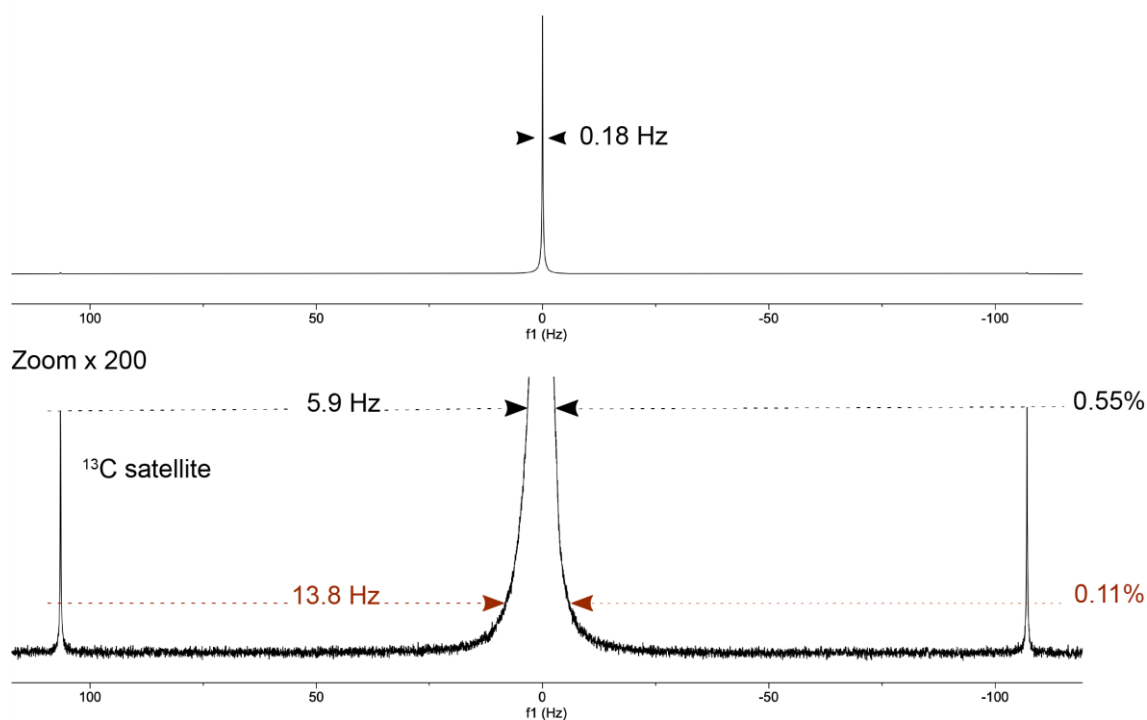


図 4. 重水素化アセトンに 20%の濃度で溶解した基準クロロホルム試料のスペクトル。上部の図は線幅がピーク振幅の 50%で測定される全ての線形である。拡大されたスペクトルはクロロホルムのカーボンサテライトを示していますが、このスペクトルを参考にピーク高さの 0.55%を確認できる。ピーク基部の線幅も 0.11%で示されている。

有機溶媒中における多重線と ^{13}C サテライトの抑制

これまでは溶媒として水を使用していました。しかし試料の溶解度や反応によってはスペクトルに複数の線を持つ有機溶媒がよく使われる。図 5a は濃度 170mM でエタノールに溶解したパラセタモールのフルスケールのスペクトルを示しています。エタノールの濃度は約 17 モルなので溶媒の信号だけがフルスケールで表示されます。100 倍ズームによりパラセタモールのシグナルが大きな溶媒ピークの根元にあることが確認できる (図 5b)。この例から Spinsolve 受信機がサチレーションの影響を受けることなく、また感覚を損なうことなくニート溶媒の信号を取得できることが改めて確認できました。3 つの溶媒信号のそれぞれの中心で溶媒抑制を行った結果は図 5c のようになる。スペクトル取得前の WE T モジュールで適用した選択励起パルスは約 300 倍の飽和を達成し溶媒のピークはパラセタモール信号と同等の振幅になった。

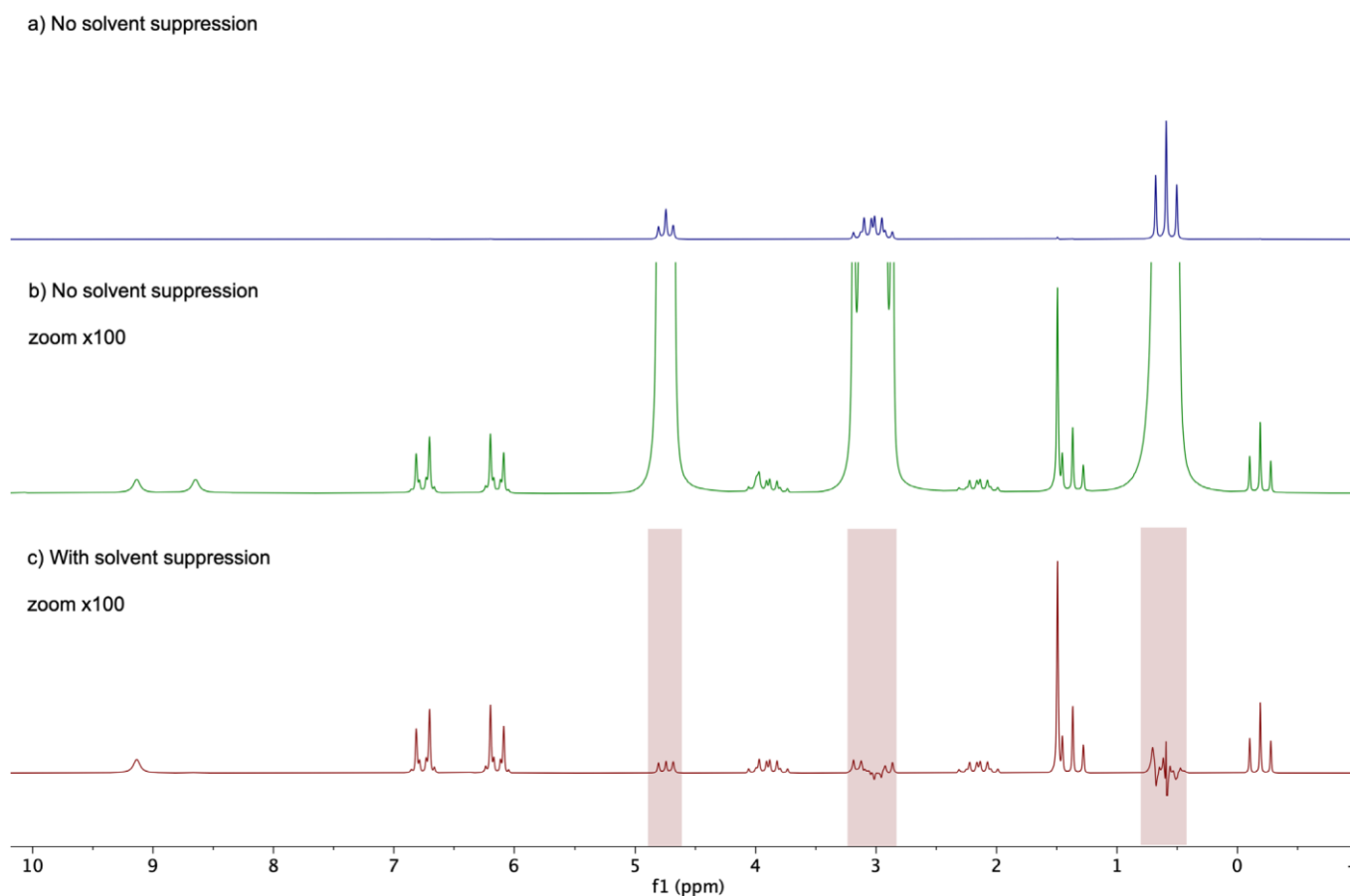


図 5。a) パラセタモールを 170mM 濃度でエタノールに溶解したスペクトル。b) a) のスペクトルの 100 倍ズーム。パラセタモールのシグナルは可視化され、エタノールのピークの炭素サテライトのシグナルと同様の強さで現れる。c) エタノールの 3 つの主要なシグナルを飽和させるマルチピーク WE T 溶媒抑制法を用いて取得したパラセタモール試料のスペクトル。

溶媒抑制シーケンスでは溶媒のピークのテールを除去する一方で、有機溶媒によってもたらされる新たな問題を素早く特定することが出来ます。溶媒が異なる C-H 基を持つためこれらの基の炭素サテライトがスペクトルに現れる。13C の自然存在量は約 1% なので 17 モルの濃度で 13C の核を持つエタノール分子が 170mM 存在することになる。この例ではサンプルに含まれるパラセタモールと同じ濃度である。ここで使用した濃度は一般的な反応で想定される濃度に近いものであり、カーボンサテライトは有機溶媒を使用する際に想定される一般的な問題であることが確認できた。スペクトルからサテライトを除去する強力な NMR 手法として炭素デカップリングが知られています。溶媒抑制期間中または信号の取得中に 13C 核の連続励起が必要です。図 6 は 2 番目のオプションを Spinsolve Carbon ULTRA システムに実装した場合の結果である。このシステムでは 1H 信号の取得とカーボンチャンネルへの励起を同時に行うことが出来ます。このことからカーボンチャンネルを持つ装置は反応モニタリングのアプリケーションにも有効であると結論付けることが出来る。13C は通常フローアプリケーションで検出しようとする核種ではありませんが（これは 13C 測定に必要な測定時間が長いからです）。

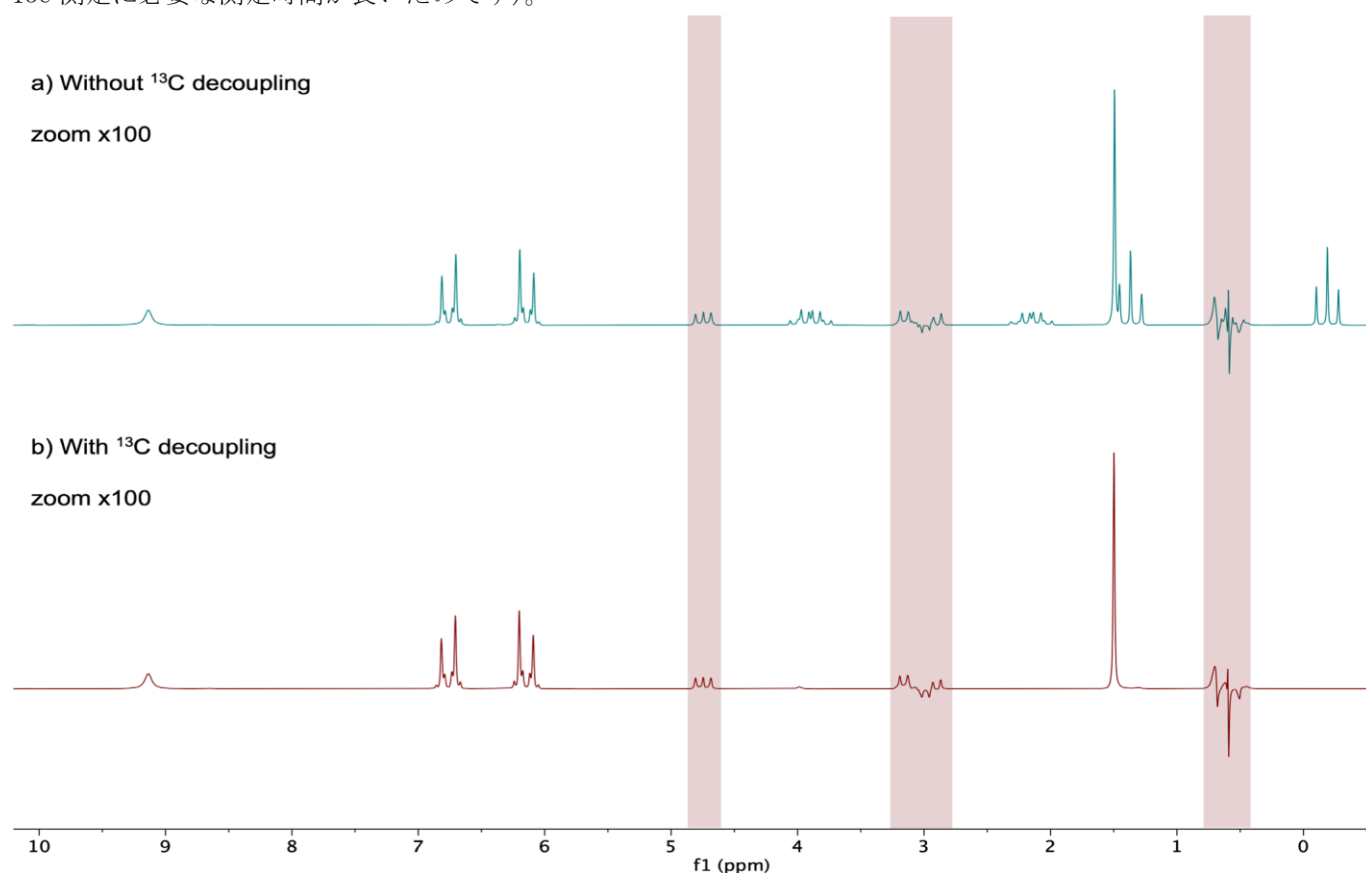


図 6。カーボンデカップリングを行った場合(a)と行わなかった場合(b) のスペクトルの比較。カーボンデカップリングの存在下で信号を取得することにより 13C サテライトが完全に除去され積分する必要のある製品の信号との重なりがなくなりました。

卓上型 NMR の詳細についてはお問い合わせください。

株式会社朝日ラボ交易

〒650-0046 兵庫県神戸市中央区港島中町4丁目1-1 ポートアイランドビル10F

TEL: 078-335-8613 FAX: 078-335-8614

Email: info@asahilab.co.jp

Website: www.asahilab.co.jp/