

6.2 NMR測定と温度管理

平成21年度 機器・分析技術研究会 実験実習技術研究会 in 琉球 (2010.3.4-5)

NMR測定と温度管理

工学研究科技術部報告集バージョン

国立大学法人京都大学大学院
工学研究科技術部 分析・解析技術室

原田 治幸

1

NMR測定と温度管理

1. はじめに

2. NMR装置における温度制御について
3. サンプル温度の温度校正について
4. プローブ内温度計の製作
5. プローブ温度の安定性問題と対策
6. 室内温度の安定性問題と対策

2

1. はじめに

ヘム蛋白質について



ミオグロビン

補欠分子族として、ヘムと呼ばれる鉄ポルフィリン錯体を持つ蛋白質の総称です。

多くのヘム蛋白質でヘム周辺が活性中心となっています。

中心金属である鉄の電子状態がヘム近傍の磁気的環境に影響して周辺の原子についてユニークなNMRシグナルを与えます。

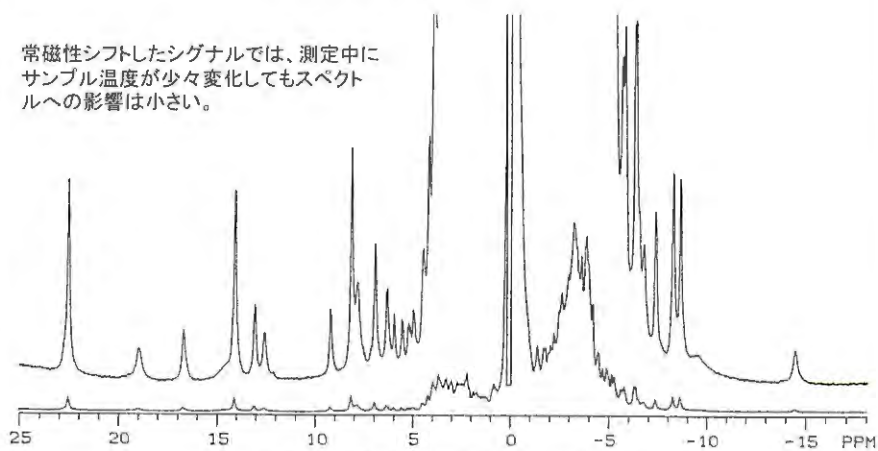
就職してからの数年は、主に常磁性シフトしたスペクトルの測定をしていました。

3

1. はじめに

ヘム蛋白質の常磁性シフト スペクトル

常磁性シフトしたシグナルでは、測定中にサンプル温度が少々変化してもスペクトルへの影響は小さい。



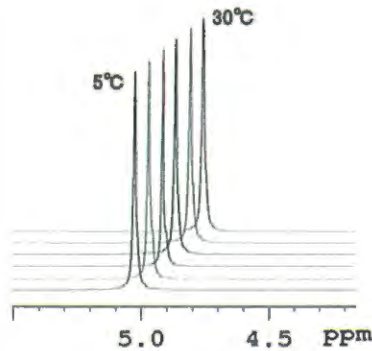
ミオグロビンCN体の300MHzスペクトル

この当時は温度の管理にはまったく注意をはらっていませんでした。

4

1. はじめに

温度による水シグナルの化学シフト変化



5°C	↔	30°C
5.02ppm		4.76ppm
△ 0.26ppm		

ロックに使用している重水のシグナルが温度変化により移動してしまうので、シグナルへの影響は無視できない。

しかし、0から10ppm付近の通常シグナルを相手にするようになり、温度の問題に気づかされました。

5

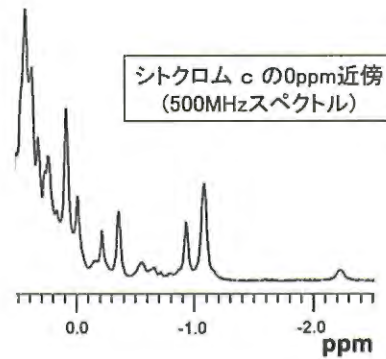
1. はじめに

化学シフトの基準物質

水系サンプルの基準物質としては0ppmにシグナルを与えるTSP やDSSなどが使用されます。

しかし

ヘム蛋白質のスペクトルでは0ppm付近にも複雑なシグナルが存在するので基準物質を使用しないで測定することがあります。



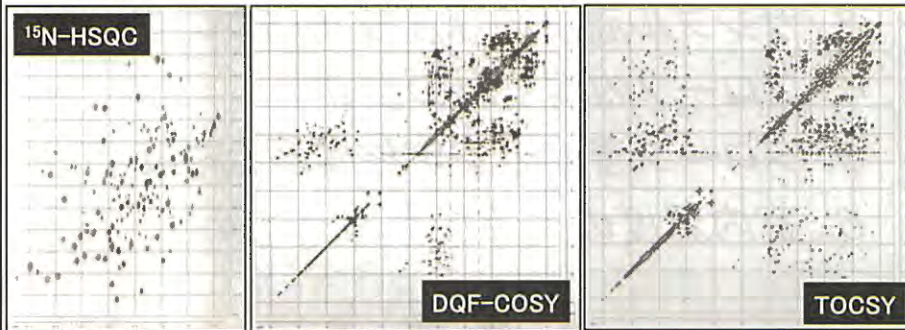
6

蛋白質の立体構造決定について

化学シフトの帰属

蛋白質の立体構造を決定するには、まず、下に示したような二次元スペクトルの測定を行います。

次にどのアミノ酸残基のどの部分のシグナルかを化学シフトを基に帰属します。



各種二次元NMRスペクトル(ブチダレドキシ 500MHz)

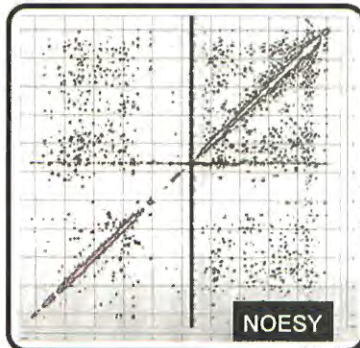
7

蛋白質の立体構造決定について

距離情報の収集と構造計算

帰属した化学シフトを基にNOESYスペクトルからアミノ酸残基どうしの距離情報を収集します。

収集した距離情報を基にコンピュータ上で構造計算を実施します。



測定ごとにサンプル温度が違うとスペクトル間の化学シフト値が一致せず、帰属が困難になります。

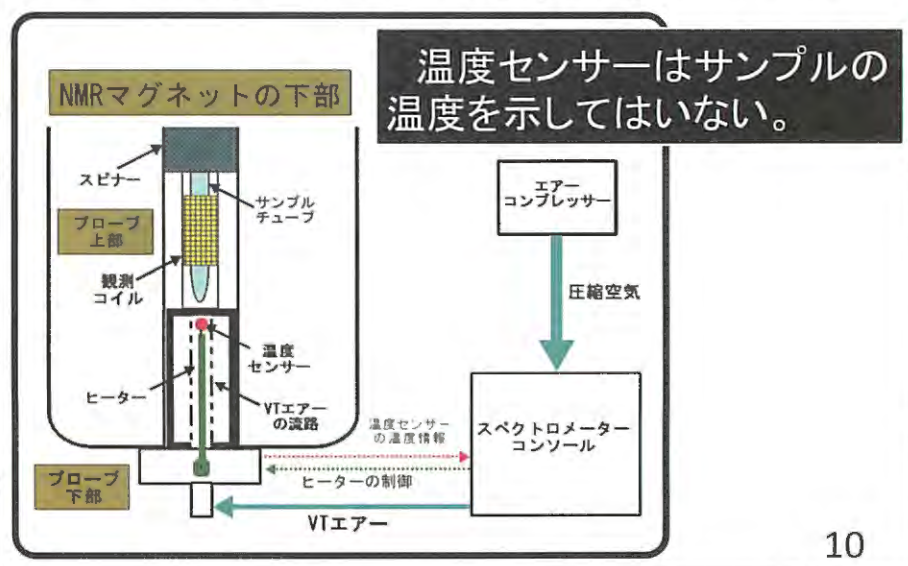
8

NMR測定と温度管理

1. はじめに
2. NMR装置における温度制御について
3. サンプル温度の温度校正について
4. プローブ内温度計の製作
5. プローブ温度の安定性問題と対策
6. 室内温度の安定性問題と対策

9

2. NMR装置における温度制御について



10

NMR測定と温度管理

1. はじめに
2. NMR装置における温度制御について
3. サンプル温度の温度校正について
4. プローブ内温度計の製作
5. プローブ温度の安定性問題と対策
6. 室内温度の安定性問題と対策

11

3. サンプル温度の温度校正について

- 1) メタノール(CH₃OH) のNMRスペクトルを観測して、CH₃シグナルとOHシグナルの化学シフトの差分 Δ ppmを求める。
- 2) 差分 Δ ppmを次式に代入して計算するとサンプル温度が得られる。

$$T(K) = 409.0 - 36.54(\Delta) - 21.85 (\Delta)^2$$

一度の実験で、数十回以上も温度校正をする経験をして、プローブ内温度計を作成することを考えました。

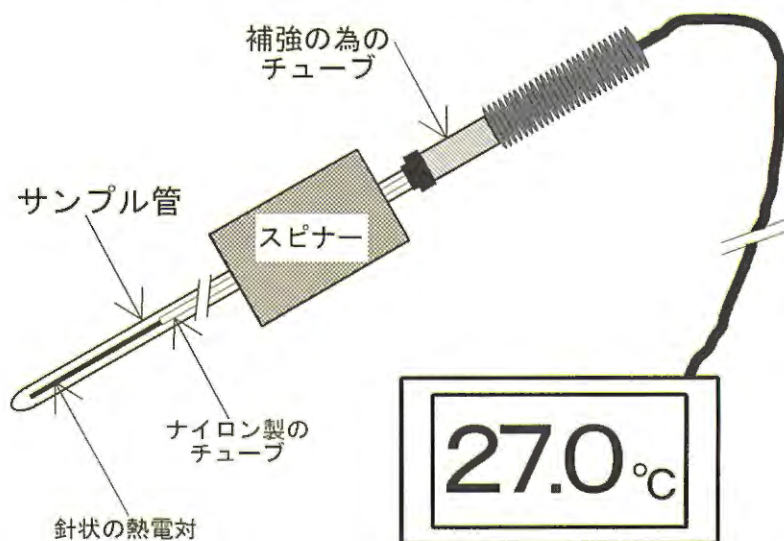
12

NMR測定と温度管理

1. はじめに
2. NMR装置における温度制御について
3. サンプル温度の温度校正について
4. プローブ内温度計の製作
5. プローブ温度の安定性問題と対策
6. 室内温度の安定性問題と対策

13

4. プローブ内温度計の製作



14

NMR測定と温度管理

1. はじめに
2. NMR装置における温度制御について
3. サンプル温度の温度校正について
4. プローブ内温度計の製作
5. プローブ温度の安定性問題と対策
6. 室内温度の安定性問題と対策

15

5. プローブ温度の安定性問題と対策

ある院生からの報告で問題が判明しました。

- ① 温度を上昇させながら数点の温度で測定した。
- ② 数時間かけて測定をした後、確認の為に最初の温度に設定を戻して測定した。
- ③ 同じ温度で測定したので同一のスペクトルが得られるはず。しかし、最初に測定したスペクトルとは各シグナルの化学シフト値が一致しない。

16

5. プローブ温度の安定性問題と対策

以下のように現象の確認作業をしました。

- ① 温度を27°Cに設定。温度表示が設定温度を示した後に1時間放置する。
- ② 温度を17°Cに設定しなおし。温度表示が設定温度を示した後、メタノールを測定してサンプル温度を検証する。
- ③ 測定を繰り返しサンプル温度の時間変化を追跡する。

17

5. プローブ温度の安定性問題と対策

確認作業の結果、以下のことが判明しました。

- ① コンソールの温度表示は設定温度(17°C)を示したまま変動しなかった。
- ② 最初のサンプル温度は表示温度(17°C)からずれている。
- ③ 時間が経過するにともなってサンプル温度が下がる。
- ④ 6時間かけて50回以上の測定を繰り返したが、サンプル温度は安定しない。

同時に導入した別のタイプのプローブでも同様の確認作業を行いましたが、問題の現象が生じ無いことを確認できました。

18

5. プローブ温度の安定性問題と対策

以下のように考えました。

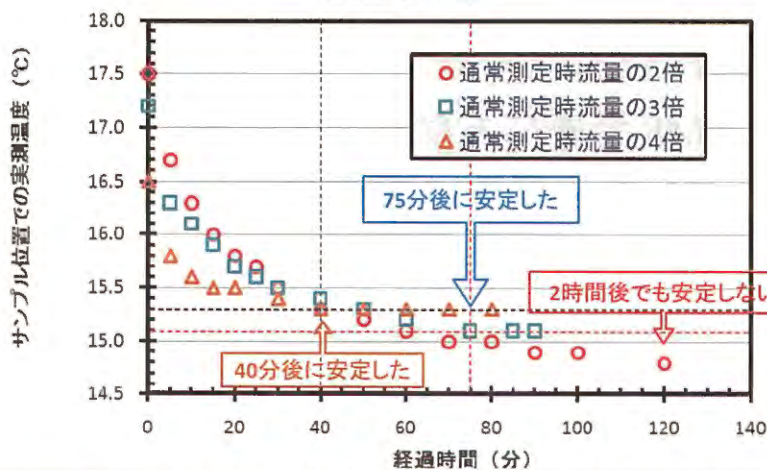
- ① 温度センサーはVTエアーの温度を示していると思われる。
- ② VTエアーとプローブ間での熱交換の効率が低い為にプローブの温度が安定せずサンプル温度も安定しないのではないか。

VTエアーの流量を増やして、熱交換の効率を向上させることを試みることにしました。

19

5. プローブ温度の安定性問題と対策

VTエアーの流量とサンプル位置での温度の時間変化
(設定温度 17°C)



VTエアーの流量を増加させることで、プローブ温度を比較的に短時間で安定させることは可能であると考えました。

20

5. プローブ温度の安定性問題と対策

以下のように温度設定のプロトコルを作成しました。

- ① VTエアーの流量を最大に設定する。
- ② プローブ内温度計の温度表示が常に目標温度を示すように設定温度を調節する。
- ③ VTエアーの流量を徐々に減らしていく。
- ④ VTエアーが通常測定の流量になり、プローブ内温度計の温度表示が目標温度で安定するまで②と③の操作を繰り返し行なう。

◎ プローブ内温度を1時間程度で目標温度に設定することが可能になりました。

◎ このプローブの長所として、プローブ内温度が安定した後では室温が変動しても影響をほとんど受けないことが判明しました。

21

NMR測定と温度管理

1. はじめに
2. NMR装置における温度制御について
3. サンプル温度の温度校正について
4. プローブ内温度計の製作
5. プローブ温度の安定性問題と対策
6. 室内温度の安定性問題と対策

22

6. 室内温度の安定性問題と対策

新プローブの温度安定性

- ① 同じタイプのプローブを新たに導入した。S/Nが450から900になり、感度が倍に向上した。
- ② 新プローブではプローブ内温度は短時間で安定する。改善されているようであった
- ③ 温度センサーの表示温度が室温の変動に伴い変化する。
- ④ プローブ内温度も室温変動の影響を受けて変化する。

新プローブに問題があるのではなく、室温のコントロールに問題があると判断しました。

23

6. 室内温度の安定性問題と対策

NMR室の温度安定性の問題

- ① NMR室の空調は老朽化しており、温度コントロールの精度に難がある。
- ② 2時間程度の測定の間でも室温の変動は5°C以上あり無視できない。

24

6. 室内温度の安定性問題と対策

新しいNMR室の仕様

新キャンパスへの移転が予定されていたので、新しいNMR室の要求仕様を室温の安定を重点とすることにしました。

- ① マグネットのみを恒温室に入れることでコンソール、コンピュータなどの熱源から絶縁しました。
- ② 騒音源となるコンプレッサーなどを機械室にまとめた。
- ③ 測定室では通常のエアコン設定をして測定者の身体的負担を軽減しました。

25

