

C H E M I S T R Y

化学

JANUARY
2017
Vol.72

1

新春インタビュー・Interview

破壊的イノベーション を目指せ!

日本化学会会長 山本尚先生に聞く

解説・Research article

生物に学ぶものづくり

連載・Series

四季のカガク

温泉に魅せられて



ポリマーの微細構造を正確に解析！

— 微量な末端基や部分構造の観測が可能な Multiple WET-NMR 法

大内宗城¹・田中紀美子²

¹理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター・²(株)三井化学分析センター

ポリマーの性質を知るうえで、その末端基や部分構造の情報は欠かせない。しかし、従来の NMR では主鎖や溶媒の影響で極微量の末端基や部分構造の NMR 信号の検出が困難であった。Multiple WET-NMR 法を用いて主鎖や溶媒由来の複数の巨大な NMR 信号を消去することにより、これらの微細構造の信号を高感度で観測することができ、この結果、微量な末端基や部分構造の詳細な解析が可能となった。

多くのポリマーは、小さな単位分子（モノマー）が鎖状に繰り返し結合した構造をしている〔通常 $(M)_n$ で表され、 n は重合度、つまり繰り返しの数〕。この主構造（主鎖） M とともに、ポリマーを構成する微細構造（末端基や主鎖 M の一部が異なった部分構造）は結晶性・熱安定性・加水分解性などのポリマーの性質を反映するため、その構造を知ることは産業利用にとって非常に重要である。

ポリマーの構造解析において、溶液の核磁気共鳴法（NMR）は重要な手段であり、一般的な解析手法として用いられている¹⁾。しかし微量な末端基などの NMR 信号は、主鎖に比べて非常に小さく、NMR 測定にはさまざまな課題がある¹⁾。たとえば ¹³C NMR においては、検出器（プローブ）・前増幅器を極低温に冷却した NMR 装置で信号が高感度で検出できるようになったが、大量生産の商品ポリマーでは ¹³C ラベ

ル体をつくるのが難しい。また天然存在比が約 1% と低く、しかも成分が微量なため信号の検出が困難なことも多くある。より高感度な ¹H NMR においても、末端基などの NMR 信号は主鎖の数千～数万分の 1 程度ときわめて小さな信号であり、ゴースト信号の発生やダイナミックレンジが原因の感度低下、巨大な信号の裾への重なりなどの課題がある。さらに、測定の際にポリマーを溶かす溶媒由来の信号も重大な障害となる。そのため、¹H NMR におけるこれらの課題を克服し、ポリマーに含まれる極微量の末端基や部分構造を観測して構造解析する方法が望まれていた。

¹H NMR における課題の解決方法の一つは、主鎖や溶媒の巨大な信号を消去することである。狭い選択範囲で効率よく溶媒消去する手法として、LC-NMR でよく用いられている WET (water suppression enhanced through T_1 effects)-NMR 法がある²⁾。筆者らは WET-NMR 法を発展させ、複数の周波数成分をもった特殊なパルスを使用する Multiple WET-NMR 法 (MWET-NMR 法) を用いて主鎖や溶媒に由来する複数の巨大な NMR 信号を消去し、極微量の末端基などの信号を観測した³⁾。さらに、MWET-NMR 法と二次元や三次元 NMR を組み合わせた MWET-多次元 NMR 法により、モデル化合物やオリゴマーなどを使用した既存法とは異なるアプローチで商品 PET であるポリエチレンテレフタレートの詳細な構造解析を可能にした。ここでは MWET-NMR 法の詳細と応用例を紹介する。

微量末端基の測定における ¹H NMR の課題

¹H NMR における装置上の課題としては、主鎖などの複数の巨大な NMR 信号が原因で次のような現象が現れる点あげられる。図 1 (a) にナイロン 66 (ポリアミド 66; PA66)

おおうち・むねき ● 国立研究開発法人理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター構造・合成生物学部門 NMR 施設技師、愛媛大学理学部卒業、農学博士

たなか・きみこ ● (株)三井化学分析センター構造解析研究部主席研究員、青山学院大学理工学部卒業

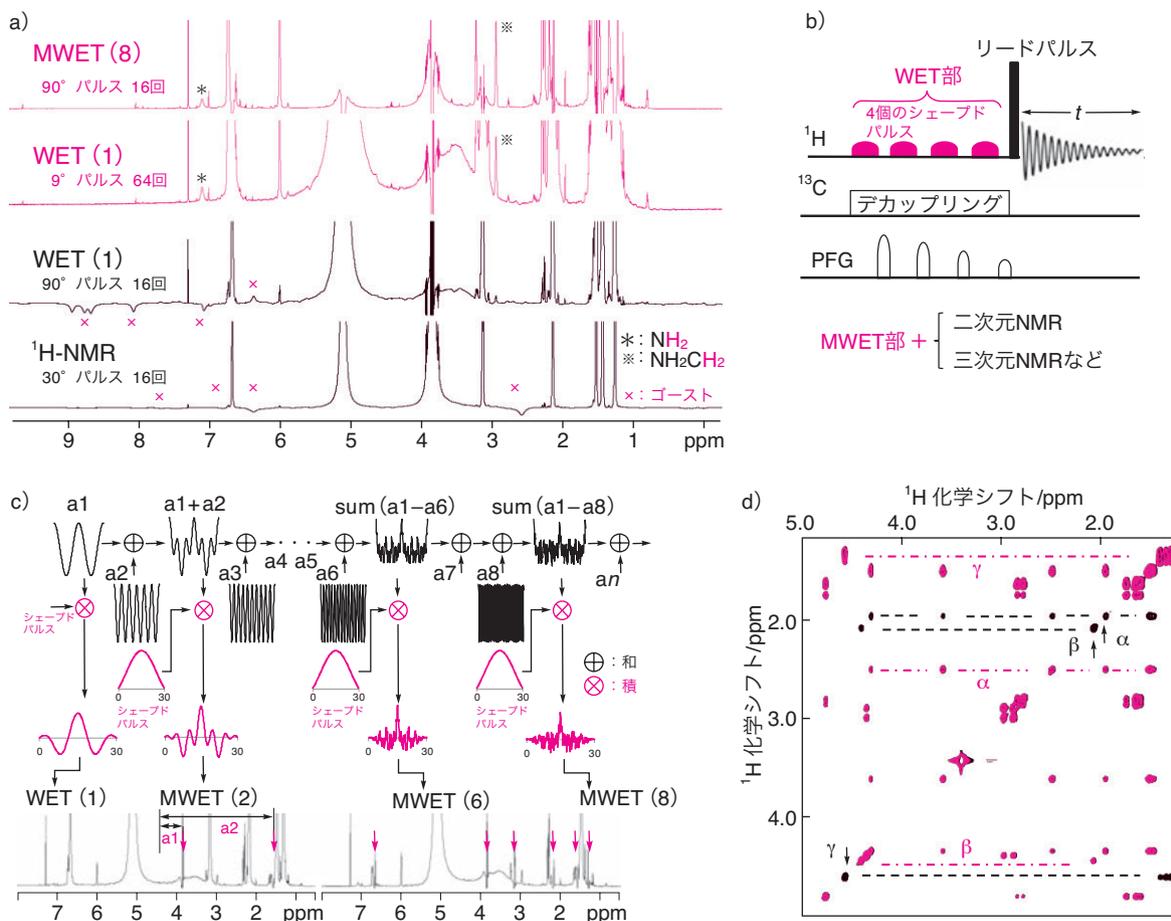


図1 WET-NMR法とMWET-NMR法

a) WET-NMR法とMWET-NMR法の比較, b) WET-NMR法のパルス系列, c) MWET用シェードパルスの作り方とその結果, d) 通常のTOCSY(黒)にMWET(3)-TOCSY(赤)を重ねたスペクトル。

をトリフルオロエタノール (TFE) と CDCl_3 (重クロロホルム) 混合溶媒に溶解したスペクトルを示した。図1 (a) 下段は通常の ^1H NMRスペクトル, 中段二つはTFEのメチレン基 CH_2 を消去したWET-NMR法, 上段は後述のMWET-NMR法のスペクトルである。下段と中段下は×で示したゴースト信号の発生でアミン末端 NH_2 の信号が確認できない。一方, 上段(リードパルス 90° で16回積算)と中段上(前増幅器の飽和を避けるためリードパルス 9° で4倍の64回積算)のスペクトルでは, *で示したアミン末端 NH_2 の信号が δ_{H} 7.1付近に観測されている(δ_{H} は ^1H の化学シフト, δ_{C} は ^{13}C の化学シフトで単位のppmは省略)。

^1H NMRにおける解決方法

a) WET-NMR法^{2,4)}

WET-NMR法はOggらが提案し, Smallcombeらが改良した測定法(NMRの場合パルス系列ともいう)で, 図1 (b)

のように4個の選択励起パルス(一般に矩形波パルスを除いたものをシェードパルスという), 横磁化消去用のパルス状の磁場勾配(PFG), ^{13}C サテライト信号消去用のデカップリングから構成されている^{2,4)}。4個のシェードパルスとPFGにより消去したい信号の磁化を消去したのち, リードパルス(一般的には矩形波の非選択的励起ハードパルス)で残りのすべての磁化を励起してNMR信号を観測する方法である。シェードパルスについては教科書を参照していただきたいが⁵⁾, ガウス型, Sinc型, Seduce型など多くの型が存在するので目的に合わせて使用する。さらにSmallcombeらはLC-NMRに適用し, 二次元NMRにWET部を加えたパルス系列を提案している^{4,6)}。

b) Multiple WET-NMR法(MWET-NMR法)³⁾

WET-NMR法では, 特殊な場合を除き励起範囲が数十Hzと狭いシェードパルスを使用するため, 複数の周波数成分

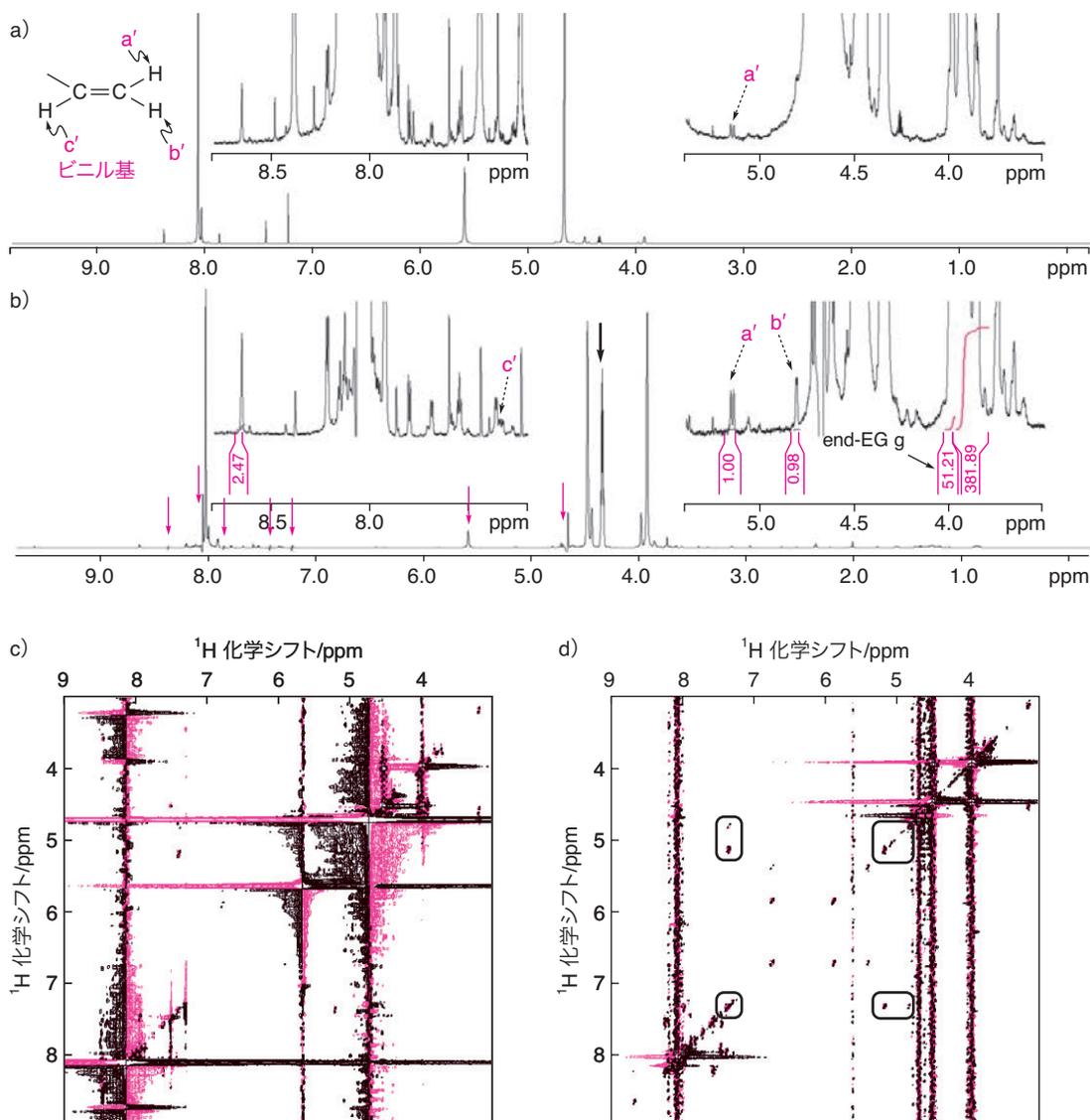


図2 ポリエチレンテレフタレートへの MWET-NMR 法の応用

a) HFIP-d₂ (ヘキサフルオロイソプロパノール) と CDCl₃ の混合溶媒に C₅D₅N (重ピリジン) を添加した PET 溶液の通常の ¹H NMR スペクトル. b) MWET(7)-¹H NMR スペクトル. 赤矢印は消去点. c) 通常の DQF-COSY スペクトル. d) (b) に HFIP (黒太矢印) を追加し 8 点消去の MWET(8)-DQF-COSY スペクトル. K. Tanaka et al., *Macromolecules*, **49**, 5750 (2016) よりアメリカ化学会 (ACS) の許可を得て転載し、一部改変.

をもったシェードパルスで複数の信号を消去する MWET-NMR 法で測定すれば、高感度で微量な微細構造の検出が可能となる。なお、この手法で測定したデータについて、消去点数を n とした MWET(n) と表現することを筆者らは提案しており、以下、この表記を用いる。

複数の周波数成分をもったシェードパルスは、図 1 (c) のように周波数 (= 消去する信号の共鳴周波数 - 基準周波数) を加算して作成する。単一の周波数 a_1 を使用したシェードパルスで WET 法を行うと、一つの信号を消去した図 1 (a) 中段の WET (1) のスペクトルになる。2 個の周波数

を加算 ($a_1 + a_2$) すると図 1 (c) の MWET (2) になる。さらに、8 個の周波数を加算すると図 1 (a) 上段の MWET (8) のスペクトルになり、* で示したアミン末端基 NH₂CH₂ の ¹H 信号が高感度で観測される。実際の消去プロファイルは、筆者らの論文³⁾ で詳細に説明しているので参照されたい。MWET-NMR 法の二次元・三次元 NMR 測定のパルス系列は、NOESY など一部例外はあるものの、図 1 (b) のようにリードパルスを二次元や三次元 NMR などの測定法に置き換えればよく、そのパルスプログラムは公開されているので、それを使用もしくは改良すると便利である³⁾。

図1(d)に通常の TOCSY (黒)に MWET-TOCSY (赤)を重ねたグラミシジン S (土壌細菌 *B. brevis* が生産する環状ペプチド抗生物質) の部分スペクトルを示したが, MWET 法 (赤)では消去した信号 (矢印)からの相関信号 (黒色破線上)は検出されないので注意が必要である. ただし, MWET 法 (赤)でも消去していない信号からの相関信号 (赤色一点鎖線上)は検出されるので, 消去していない信号からの相関信号を使用し, スペクトル解析をすることが望ましい.

ポリエチレンテレフタレートへの応用例

筆者らは, ペットボトルなどに使用されているものと同種のポリエチレンテレフタレート (PET) の極微量成分の信号を, 超高磁場 900 MHz NMR 装置を使用した MWET-NMR 法により, 高分解能・高感度で観測を行った³⁾. さらに MWET-NMR 法を二次元 NMR や三次元 NMR に応用した MWET-多次元 NMR 法を用いて, 以下のようにこの商品 PET の微細構造を詳細に解析した.

●末端ビニル基

PET の製造過程で熱分解により生成される末端ビニル基の ^1H NMR 信号の一部はすでに報告されているが, その報告ではビニル基の 3 個のうち一つの ^1H 信号は, 主鎖の信号と重なり観測されていない^{7,8)}. 一方, 今回測定した図 2 (a) の PET 溶液の通常の ^1H スペクトルでは, 主鎖と溶媒由来の信号が大きく, ビニル基 a' の δ_{H} 5.16 の信号しか観測できなかった. 7 点消去した図 2 (b) の MWET (7) では, 主鎖信号の裾に重なっていたビニル基 b' の信号 δ_{H} 4.82 は, δ_{H} 5.16 の信号とほぼ同じ積分値 (0.98 : 1.00) で, ビニル基 c' も δ_{H} 7.34 に感度よく検出されている. MWET (7) で観測した δ_{H} 5.16 の信号強度が通常のスペクトルの約 3 倍に向上していることから, MWET-NMR 法は高感度で観測でき, ダイナミックレンジの問題を克服できたといえる. 図 2 (c) と (d) に通常の H-H 相関二次元 NMR (DQF-COSY) と 8 点消去した MWET (8)-DQF-COSY スペクトルを示した. 図 2 (d) の MWET 法において, 黒枠内のように 3 個の ^1H 信号が観測

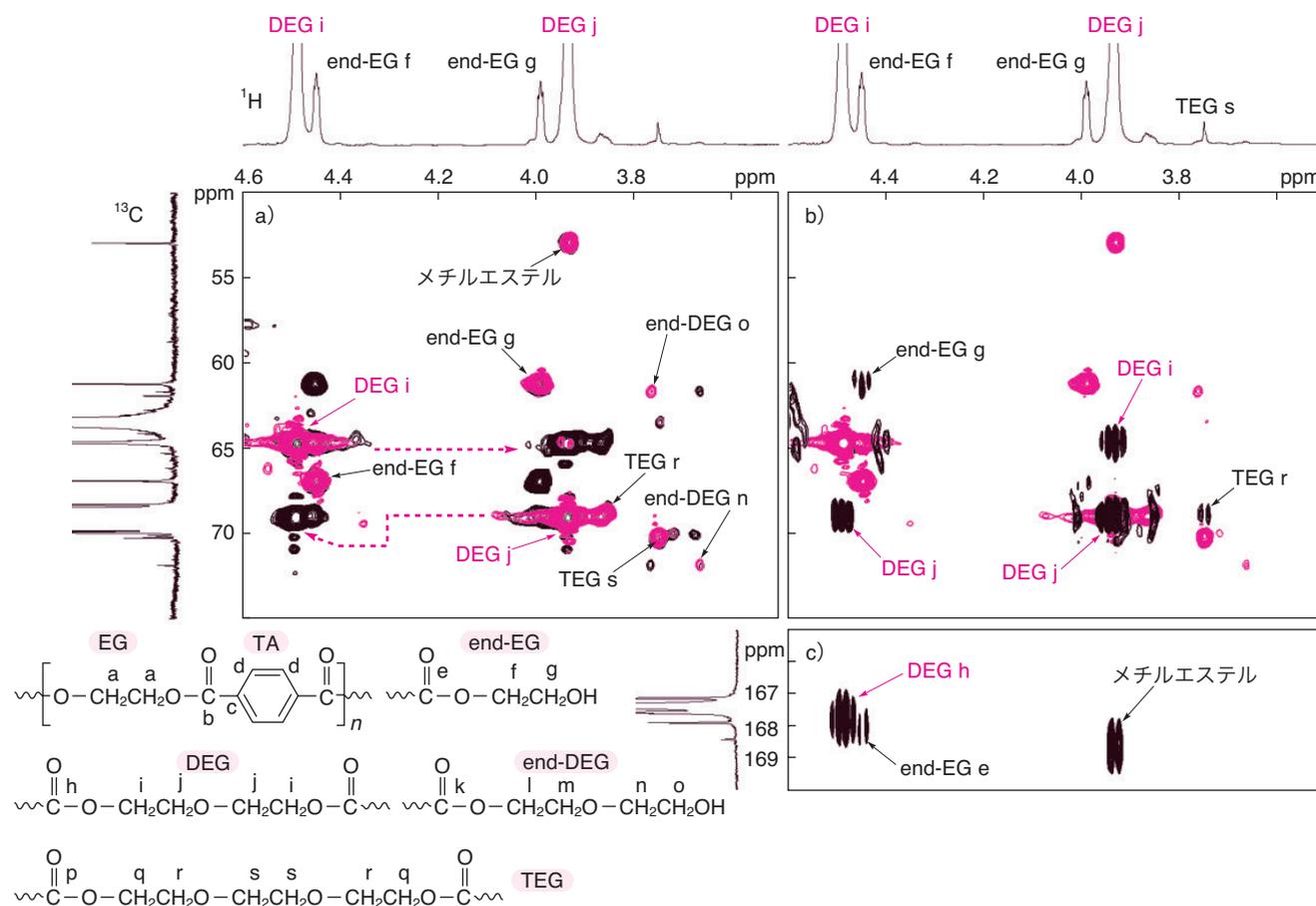


図3 PET 溶液の MWET (8)-HSQC (赤), MWET (8)-HSQC-TOCSY (a: 黒), MWET (8)-HMBC (b,c: 黒) のスペクトル HFIP を含む 8 点消去. K. Tanaka et al., *Macromolecules*, **49**, 5750 (2016) よりアメリカ化学会 (ACS) の許可を得て転載し, 一部改変.

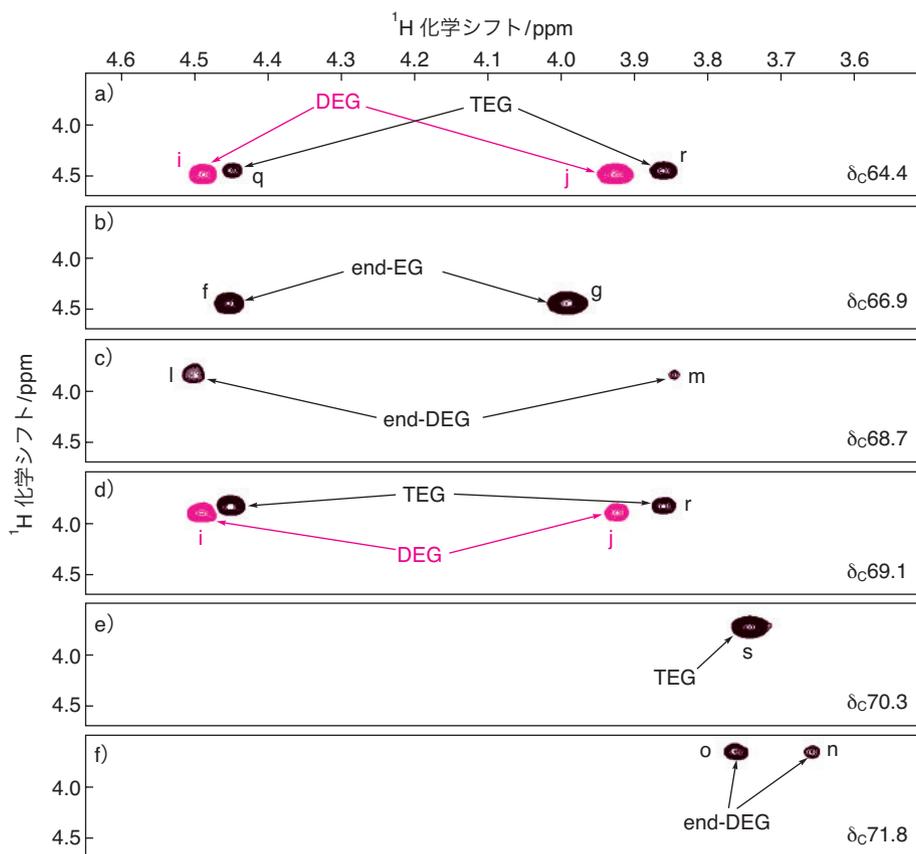


図4 PET溶液のMWET(10)-三次元HSQC-TOCSYの¹³C軸に対応するTOCSYスペクトル

図2(d)にDEG 2点を追加し合計10点消去。筆者らの論文³⁾より¹³C軸の観測幅を半分、データポイントを約1.9倍に測定条件を変更し、¹³C軸の分解能を4倍にしている。K. Tanaka et al., *Macromolecules*, **49**, 5750 (2016) よりアメリカ化学会(ACS)の許可を得て転載し、一部改変。

され、さらにその相関から末端ビニル基と帰属できる。この結果、今回測定した商品PETの一部の末端はビニル基になっており、その量は通常の末端基(図3のend-EG)の積分値(図2bのend-EG gの矢印、-CH₂で2個分)と比較して、約25分の1と極微量であることがわかった。

●末端基(EG・DEGや部分構造DEG・TEG)の解析

PETの主鎖であるエチレンテレフタレート(EG-TA)以外に、図3に示した末端エチレングリコール基(end-EG)、末端ジエチレングリコール基(end-DEG)、部分構造ジエチレングリコール基(DEG)および部分構造トリエチレングリコール基(TEG)が従来法により解析されている⁹⁾。一方、筆者らはMWET-多次元NMR法により次のように解析をした。その化学シフト値は論文を参照していただきたい³⁾。また、これら以外に末端メチルエステル基・イソフタレート(IA)の存在も報告している。

図3(a)のMWET(8)のHSQCスペクトル(赤)において、DEG iはδ_C 64.6/δ_H 4.49(縦/横軸に対応:ここでは¹³C/¹H)に、DEG jはδ_C 69.0/δ_H 3.93に相関信号が検出されている。図3(a)のMWET(8)-HSQC-TOCSYスペクトル(黒)において、DEG iの信号は破線赤矢印のように追加の相関信号が

DEG jのδ_H 3.93に表れている。DEG jも相関信号がDEG iのδ_H 4.49に表れているので、DEG iとjは解析できたことになる。次に、δ_H 4.49のDEG iは図3(c)のMWET(8)-HMBC(黒)でδ_C 167.6のDEG hと相関があり、DEG hのエステル結合の存在がわかる。さらに、δ_H 3.93のDEG jは図3(b)のMWET(8)-HMBC(黒)で、エーテル結合による相関信号CH₂(j)-O-C(j)H₂がδ_C 69.0に観測されている。以上からDEGユニットの構造解析を正確に行うことが可能である。同様に、end-EG、TEG sとend-DEG nとoについても化学シフトおよび相関より帰属できる。しかし、TEG qとrおよびend-DEG lとmは¹³Cおよび¹Hに信号の重なりがあり、二次元NMRでは明確な帰属ができなかった。

図4にMWET(10)-三次元HSQC-TOCSYの¹³C軸に対応するH-H面のスライススペクトル(TOCSYスペクトルに対応)を示した。図4(a)にあるδ_C 64.4(DEG iとTEG q)のTOCSYスペクトルの正の信号(黒)はδ_H 4.46とδ_H 3.87に相関があり、この相関はTEG qとrに対応した信号でありTEGも帰属できる。なお、赤の信号は負の信号、すなわち消え残りの信号でDEGに対応する。さらに、図3および図4(e)のδ_H 3.75のTEG sは図3(b)のMWET(8)-HMBCで、

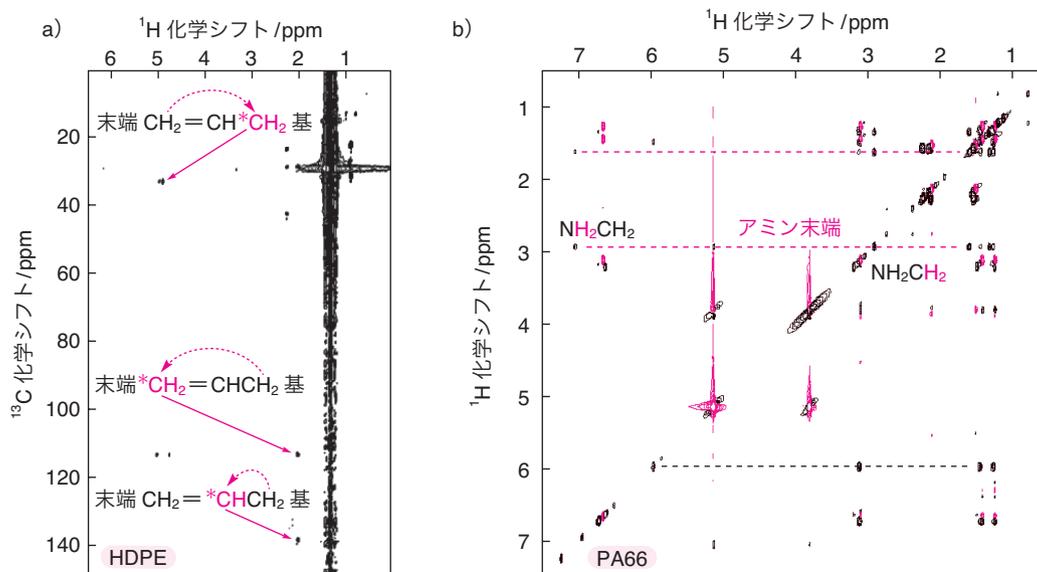


図5 その他のポリマーへの MWET 法の応用

a) 600 MHz で測定した HDPE の MWET (3)-HMBC スペクトル (ODCB の 2 か所と主鎖の合計 3 か所を消去, 120 °C). b) 900 MHz で測定した PA66 溶液の MWET (8)-TOCSY スペクトル (図 1 a 上段と同じ信号を消去).

エーテル結合 $\text{CH}_2(\text{s})-\text{O}-\text{C}(\text{r})\text{H}_2$ による相関が TEG r の δ_{C} 69.2 にあり, TEG ユニットすべての帰属ができる. 同様に, 図 4 (c) の δ_{C} 68.7 (end-DEG m) の TOCSY スペクトルより, end-DEG l と m も帰属できる.

その他のポリマーへの MWET-NMR 法の応用例

紙幅の関係上, 詳細な説明は省略するが, 図 5 (a) にオルトジクロロベンゼン (ODCB) と C_6D_6 (重ベンゼン) 混合溶媒に溶解した比較的分子量の高密度ポリエチレン (HDPE) の MWET (3)-HMBC スペクトルを示した. 図中に示したように, 末端ビニル基と結合しているメチレン基の確認もできた. 図 5 (b) の PA66 溶液では, 図 1 (a) 上段と同じ信号を消去した MWET (8)-TOCSY スペクトルより, 図中に示したようにアミン末端 $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\cdots$ などのつながりも確認している.

MWET-NMR 法により主鎖や溶媒由来の複数の巨大な NMR 信号を消去して, 微量末端基や部分構造の信号を高感度で観測することが可能になる. そして筆者らが提案した MWET-多次元 NMR 法で, ^1H NMR にて商品 PET の微量末端基と部分構造の信号を観測し詳細な構造解析を行っている. この手法を用いれば, ポリマーの微細構造の正確な解析が可能となる. さらに ^{13}C NMR を併用することにより, ポリマーのさらなる詳細な構造解析もできる. この MWET-NMR 法はポリエステルやポリアミドなどほかのポリマーにも応用が

可能だと考えられ, 大量生産におけるポリマーの品質管理や, より高品質のポリマー開発などに役立つことが期待される. なお, この測定法は消去範囲がシェパードパルスにより決まるため, 一般的に化学シフトが広がる周波数の高い超高磁場 NMR 装置が有利である.

謝辞: 理化学研究所 NMR 施設では, 高感度・超高磁場 NMR 装置を外部利用に開放している. 本稿の内容は, この一環として実施した文部科学省「先端研究施設共用・プラットフォーム形成事業 NMR 共用プラットフォーム (平成 27 年度)」の課題の成果の一部を解説したものである. 本研究にかかりました (株) 三井化学分析センター構造解析研究部の脇 浩部長, 理化学研究所 NMR 施設長の前田秀明博士, NMR 利用支援特別ユニットリーダーの林 文晶博士, また, PA66 の試料・データを提供していただきました (株) 三井化学分析センター構造解析研究部の前田真実氏に感謝いたします.

参考文献

- たとえば: 高分子学会 編, 『新高分子実験学 第 5 巻 高分子の構造 (1) 磁気共鳴法』, 共立出版 (1995); 日本化学会 編, 『実験化学講座 (第 5 版) 8 NMR・ESR』, 丸善 (2006).
- R. J. Ogg, P. B. Kingsley, J. S. Taylor, *J. Magn. Reson. Series B*, **104**, 1 (1994).
- K. Tanaka, M. Oouchi, F. Hayashi, H. Maeda, H. Waki, *Macromolecules*, **49**, 5750 (2016).
- S. H. Smallcombe, S. L. Patt, P. A. Keifer, *J. Magn. Reson. Series A*, **117**, 295 (1995).
- たとえば: T. D. W. クラリッジ 著, 竹内敬人, 西川実希 訳, 『有機化学のための高分解能 NMR テクニック』, 講談社 (2004).
- 岡田明彦, 滝川宏司, 岩田進睦, 白崎美佳, 藤原 豊, 佐々木俊夫, 住友化学技術誌, **1**, 4 (2002).
- A. M. de Ilarduya, S. Muñoz-Guerra, *Macromol. Chem. Phys.*, **215**, 2138 (2014).
- T. Amari, K. Nishimura, K. Minou, A. Kawabata, Y. Ozaki, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **39**, 665 (2001).
- S. Amiya, K. Mathumura, T. Taniguchi, *Anal. Sci.*, **7**(Supple), 1649 (1991).