Fourier 80

Fourier 80 の温度調節機能を用いた加水分解反応の熱力学的および速度論的特性解析

Niels Karschin

Innovation with Integrity

はじめに

卓上型核磁気共鳴 (NMR) 分光計は、構造の解析と確認、反応のモニタリング、品質管理に使用できる多用途ツールです。高磁場装置と比較すると、取得コストや、運用コストを抑えることができ、ラボのインフラストラクチャーも最小限しか必要としません。卓上型 NMR 分光計は、高磁場装置と比べると性能で劣る面もありますが、さまざまなアプリケーションにおいて十分な有用性を発揮し、これにより NMR 法がより幅広いユーザー層に利用されるようになります。

高磁場装置のあまり知られていない利点の 1 つは、広範囲の温度で実験を行えることです。可変温度ユニット (VTU) が Bruker 分光計の標準になっており、室温 iProbe は、デフォルトで -150 ℃ ～ 150 ℃ の温度に対応することができます。卓上型装置の状況がこれとは異なる理由は、卓上型装置で使用される永久磁石が温度変化に非常に敏感である (100 ppm/K 程度) ためです。磁石の温度調節は、このようなデバイスを設計する際の重要な課題の 1 つであり、温度が変化するサンプルキャビティがあるとさらに困難になります。Bruker 社の Fourier 80 には、温度調整 (AT) 機能を搭載することができます。この機能により、磁石の温度を 25 ℃で安定に保つと同時に、さまざまな温度で NMR スペクトルを取得することができます。

AT機能を搭載した Fourier 80 では、サンプルキャビティの温度を 25 ℃ ～ 60 ℃ の間で自由に調節できます。温度を変更すると、温度差に応じて磁石が新しい温度に適応するのに時間が必要です。2 点の温度間で温度を変化させると、温度幅によっては数時間必要ですが、一連の温度分布を取得し、増分を小さくすることで (たとえば、ステップ間で 5 K) 時間短縮をできる場合があります。サンプルの温度安定性と再現性は 100 mK のオーダーです。必要な追加のインフラストラクチャーは、窒素ガスまたは圧縮空気の供給のみです。流入ガスのガス流量を調節するガスフローボックスがシステムに付属します。さらに、AT 機能を搭載した Fourier 80 はすべて、自動サンプルチェンジャーの利用も可能です。分光計の側面にある追加のインレットを利用し、AT 機能を備えた Fourier 80 で反応モニタリング (フロー分析) も可能です。

ポリマー科学から反応モニタリング、酵素反応速度論まで、さまざまなアプリケーション利用がありますが、このアプリケーションノートでは、エステル加水分解反応の速度論的・熱力学的特性をいくつか測定することによって、この装置がもつ可能性をお伝えします。

実験内容

ここでは、酢酸メチルの酸触媒加水分解反応を追跡します。酢酸メチルは水存在下でメタノールと酢酸に分解され化学平衡状態になります。

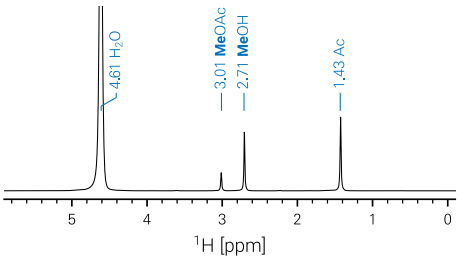

図 1: 1:4 (v/v) MeOAc/1M HCl の 25 ℃ での加水分解平衡状態におけるプロトン NMR スペクトル

$$MeOAc + H_2O \rightleftharpoons MeOH + AcOH$$

酸触媒として塩酸を使用し、データ解析の手順を単純にするために過剰量の水を使用しました。反応物の濃度を、卓上型 NMR Fourier 80 を使用したプロトン NMR 分光法によって決定することができます。酢酸メチルのアセチル基と酢酸のアセチル基はほぼ同じ化学シフト (1.43 ppm) に観測されますが、酢酸メチルのメトキシ基とメタノールのメトキシ基は 80 MHz のスペクトルで明確に区別することができます (それぞれ 3.01 ppm と 2.71 ppm、図 1 参照)。したがって、これらのメトキシ基のピークを使用して反応の進行をモニターすることが可能です。

予備実験で、すべての温度において反応をリアルタイムにモニターできる程度に反応が遅く、尚且つ時間がかかりすぎない程度に反応が速くなるように、酸の濃度を調整しました。1 M HCl と酢酸メチルの体積比が 4:1 の場合、加水分解は 60 ℃ と 25 ℃ において、いずれもで 30 分～ 8 時間の間に完了したので、この体積比を適切と判断しました。

データ取得

各データポイントにおいて、装置で目的の温度を設定し、温度平衡化の間にシム調整のルーチンを実行しました。次に、99.8% メタノール-d_4 のスペクトルを測定し、このリファレンスサンプルに含まれるメチル基シグナルおよびヒドロキシ基シグナルの間のケミカルシフトの差について既知の関係を利用し、温度校正を行いました[1]。センサーの温度とサンプル内部の温度の差に対処するためにはこの温度校正操作が必要ですが、どの装置に対しても 1 度のみ行えば繰り返し校正を実施する必要はありません。

次に、約 1M の HCl のストック溶液 500 µL を酢酸メチル 120 µL に加えました。(この際、秤量も行うことで正確な量を確認しました。)この混合液を、蒸発を防ぐために PTFE バルブが付いた NMR チューブに移し、卓上型 NMR Fourier 80 に挿入した後、測定を行いました。Fourier 80 では個々のサンプルにおいてチューニング/マッチング、ロック、シム調整の操作は行わないため、反応開始から NMR 測定開始までの時間を 1 分未満に抑えることができます。ここでは、30 秒毎に積算回数 1 回でプロトン NMR スペクトルの測定を連続的に行いました。

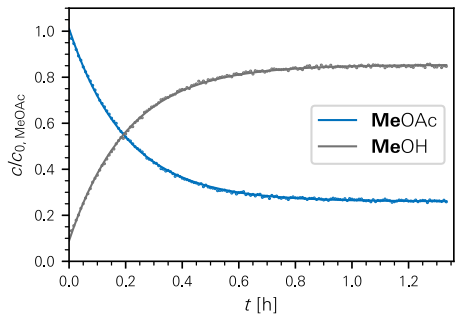

図 2: 初期エステル濃度にスケーリングした酢酸メチルとメタノールの濃度データおよび指数近似関数。反応温度：約 50℃

データ解析

データ処理および解析方法にはさまざまなものがあります。今回は、ネットワークインターフェースを介して TopSpin と通信する Python のインターフェースを使用することにしました。これにより、時間依存的な濃度の変化をピークピッキングや積分をもとにフィッティングを行い、温度依存による熱力学的・速度論的パラメータの決定までの全プロセスを自動化するだけでなく、解析を希望通りにカスタマイズできるようになりました。簡単に説明すると、このプログラムでは、各スペクトルのメトキシ基のピークピックを行い、これら 2 つのピーク領域に対しそれぞれ積分を取得しました。エステルの濃度変化の速さは、水、酸、エステルの濃度に一次関数的に依存すると仮定しました。

$$\frac{d[MeOAc]}{dt} = -k[H_2O][H^+][MeOAc]$$

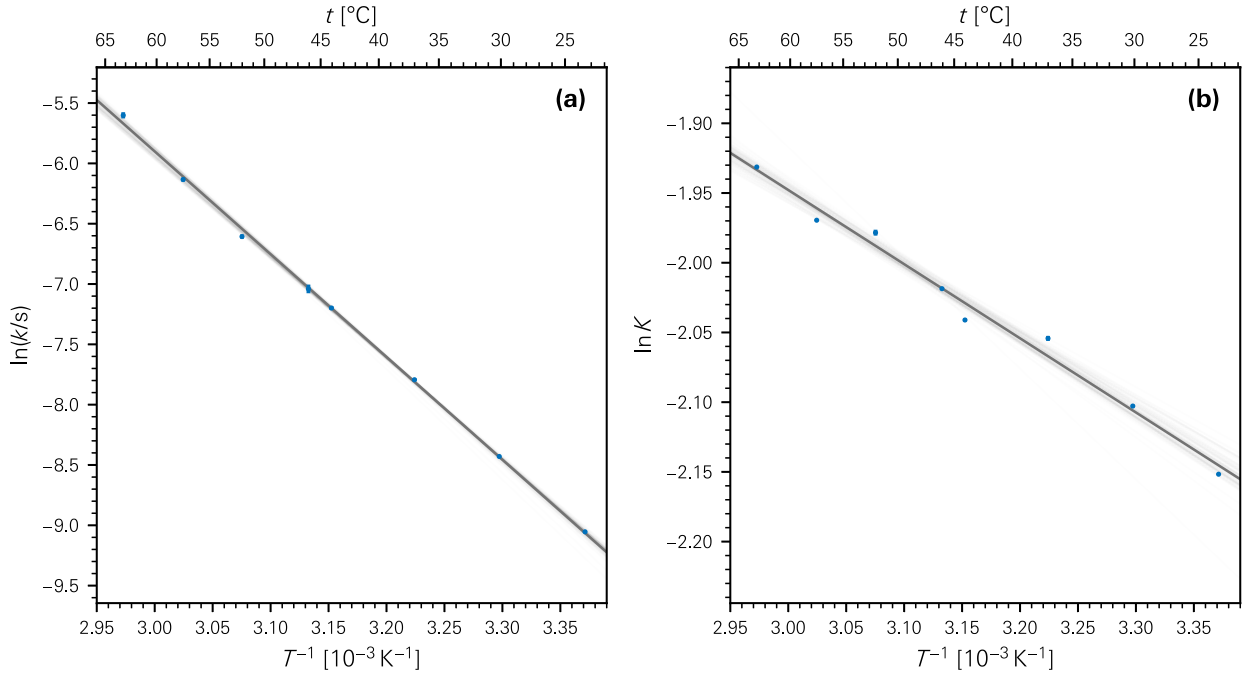

図 3: (a) ln(*k*) 対 1/*T* のアレニウスプロットおよび(b) ln(*K*) 対 1/*T* のファントホッフプロット。濃い灰色の線は最小二乗線形近似、薄い灰色の線はブートストラップ再サンプリング法で得られた一連の近似。

反応中に酸は消費されず、約 18 倍過剰量の水が存在するため、その濃度は一定と仮定しました。これにより、正反応の一次反応速度式（指数関数的減少）に従うとみなされます。平衡状態では、エステルよりも約 3 倍多くの生成物が得られました。このことは逆反応がかなり遅いことを示しています。したがって、ここでは二次的性質を無視し、濃度曲線にオフセットを与えて指数関数的減少を当てはめることにしました。

$$c(t) = (c_0 - c_\infty)\exp(-kt) + c_\infty$$

ここで、$c(t)$ は時間の関数としての濃度で、c_0 と c_∞ はそれぞれ $t = 0$ と平衡状態での濃度、k は速度定数です。例として、50 ℃でのこれらの指数関数的近似を含むデータを図 2 に示します。この近似から、平衡定数 K も決定することができます。

$$K = \frac{[\mathrm{MeOH}][\mathrm{AcOH}]}{[\mathrm{MeOAc}][\mathrm{H_2O}]} = \frac{c^2_{\infty,\mathrm{MeOH}}}{18.21 \cdot c_{\infty,\mathrm{MeOAc}}\,(c_{\infty,\mathrm{MeOAc}} + c_{\infty,\mathrm{MeOH}})}$$

この変換では、実験の設計上の選択をいくつか利用しました。まず、メタノールと酢酸は加水分解のみから生じるため、その量が等しくなければなりません。次に、エステルの初期濃度はエステルとメタノールの最終濃度の合計に等しくなるはずなので、反応系を秤量することで、水とエステルの初期モル比は 18.21 であることがわかります。最後に、遊離体の数は生成物の数と等しいため、この計算では絶対濃度の利用を気にする必要はなく、NMR 強度を直接利用できます。

さまざまな温度で得られたこのデータを使用できるようになったことで、この反応のいくつかの普遍的な特性を測定できるようになりました。温度の逆数に対する反応速度 k の対数プロットは、アレニウスプロットとして知られ、傾きとして活性化エネルギー E_a / R が得られます[2]。

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT}$$

ここで R は気体定数、A は頻度因子です。このプロットは図 3a に示しています。単純なブートストラップ再サンプリングにより、データ内のエラーの性質と分布に関する仮定を必要とせずに、これらの結果の不確かさを推定できます[3]。結果として、E_a = 70.8 ± 1.2 kJ/mol が得られました。同様に、$1/T$ に対する $\ln K$ のファントホッププロットで、反応の標準エンタルピーとエントロピーの変化 ($\Delta_r H^0$ および $\Delta_r S^0$) を決定することができます[2]。

$$\ln K = -\frac{\Delta_r H^0}{RT} + \frac{\Delta_r S^0}{R}$$

ファントホッププロットでは、反応エンタルピーは傾きで、反応エントロピーは垂直切片、そしてここでも気体定数 R でスケーリングされています。このプロットは図 3b に示しています。この分析の結果は $\Delta_r H^0$ = 4.42 ± 0.21 kJ/mol および $\Delta_r S^0$ = − 2.93 ± 0.67 J/mol/K です。

より洗練されたデータ解析の例

すべてのデータ処理は大がかりな SciPy エコシステムを使用して Python で行っているため[4]、かなり簡単に正反応と逆反応の両方の真の二次的性質を組み込むように分析を修正することができます。c_0 をエステルの開始濃度、f = 18.21 を水に対する水の過剰量とすると、エステルの濃度 c_e の速度法則は次のようになります。

$$\frac{dc_e}{dt} = -k_1[\mathrm{MeOAc}][\mathrm{H_2O}] + k_2[\mathrm{MeOH}][\mathrm{AcOH}] = -k_1 c_e (f c_0 - c_0 + c_e) + k_2 (c_0 - c_e)^2$$

$$\frac{dc_e}{dt} = (k_2 - k_1) c_e^2 + ((1-f) k_1 - 2k_2) c_0 c_e + k_2 c_0^2$$

ここで、k_1 と k_2 はそれぞれ、正方向 (加水分解) と逆方向 (エステル化) の反応速度です。同様に、メタノール濃度 c_m の速度法則は、次のように導き出すことができます:

$$\frac{dc_m}{dt} = (k_1 - k_2) c_m^2 - (1+f) k_1 c_0 c_m - f k_1 c_0^2$$

これらは解が既知の二次一次微分方程式です:

$$\frac{dc}{dt} = \alpha c^2 + \beta c + \gamma$$

$$c(t) = -\frac{1}{2\alpha}\left(k_{\mathrm{eff}} \tanh\left(\frac{1}{2} k_{\mathrm{eff}}(t - t_0)\right) + \beta\right), \qquad \text{with } k_{\mathrm{eff}} = \sqrt{\beta^2 - 4\alpha\gamma}$$

これらの結果を踏まえ、SciPy の最適化モジュールの非線形解法を使用して両方の濃度曲線の同時近似を行い、パラメータ k_1、k_2、c_0、t_0 の大域的最適解を得ることができます。平衡定数はこれで、単純に 2 つの速度の比 $K = k_1 / k_2$ になります。ここで、再びアレニウスプロットとファントホッププロットを作成することができます (図 4)。その結果、E_{a1} = 73.0 ± 1.4 kJ/mol、E_{a2} = 68.3 ± 1.4 kJ/mol、$\Delta_r H^0$ = 4.64 ± 0.16 kJ/mol、$\Delta_r S^0$ = − 1.91 ± 0.49 J/mol/K になります。これにより、両者の混合があまり明確に定義されていない状況ではなく、両方向の障壁の高さによってエネルギー状況を適切に特徴付けることができます。反応エンタルピーは明らかに両者の差であって独立してはいませんが、k_1 および k_2 における誤差相関による絶対的な不確かさははるかに小さくなっています。全体として、この分析により、反応のエンタルピーとエントロピーの不確かさがわずかに小さくなることもわかります。

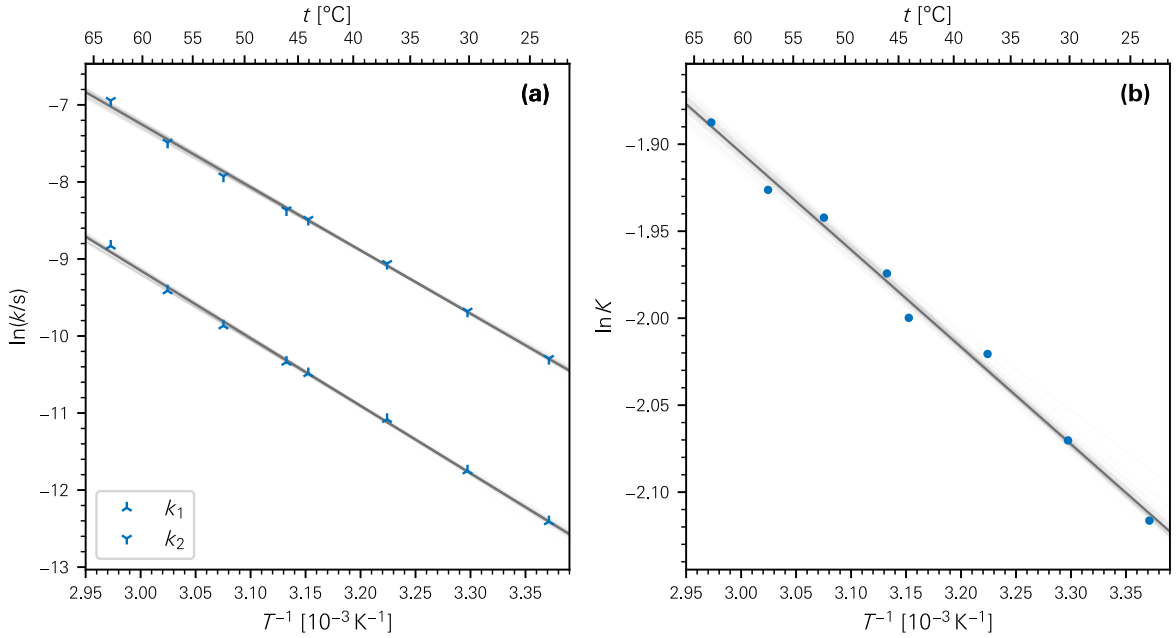

図 4: (a) k_1 および k_2 のアレニウスプロットおよび (b) ファントホッフプロット。反応の二次的性質を考慮した近似から得られたデータ。

結論

この事例では、温度調整 (AT) 機能を備えた卓上型 NMR Fourier 80 の 1 つの使用例を示しています。さまざまな温度での反応を追跡することで、この反応におけるいくつかの熱力学的・速度論的パラメータを決定することができました。これらの実験により、卓上型 NMR Fourier 80 に優れた温度安定性 (一旦平衡状態に達するとサンプル温度は変動しないこと) と再現性 (異なる温度間を行ったり来たり変えても平衡温度は常に同じであること) が確認されました。AT 機能を備えた卓上型 NMR Fourier 80 では、VT ユニットを備えた高磁場装置と比較すると温度範囲は狭いものの、温度可変の実験によって熱力学・速度論的パラメータの正確な測定が完璧に行え、卓上型 NMR 分光計の有用性が大幅に向上します。

参考文献:

1. Karschin, N.; Krenek, S.; Heyer, D.; Griesinger, C. Extension and improvement of the methanol-d_4 NMR thermometer calibration. *Magn. Reson. Chem.* **2022**, *60*, 185-270. DOI: 10.1002/mrc.5216
2. Atkins, P.; de Paula, J. *Physical Chemistry, 8th Edition*; Oxford University Press, **2006**.
3. Efron, B. Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife. *Ann. Statist.* **1979**, *7*, 1–26. DOI: 10.1214/aos/1176344552
4. Virtanen, P.; et al. SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nat. Methods* **2020** *17*, 261–272. DOI: 10.1038/s41592-019-0686-2

Bruker BioSpin is continually improving its products and reserves the right to change specifications without notice. BS-100025 05/2024 Bruker BioSpin.

Bruker BioSpin
info@bruker.com

bruker.com

顧客サポート
https://www.bruker.com/en/services/support.html

オンライン情報
bruker.com/