有機粉末構造解析をはじめよう！(7)

実験室系回折データを用いた粉末構造解析

(株)リガク 佐々木明登

Akito SASAKI: *Ab Initio* Structure Analysis Using Laboratory Powder Diffraction Data

Today, laboratory X-ray diffractometers are seeing increasingly wide use in the *ab initio* crystal structure analysis of organic powder samples. This is because optics and optical devices have been improved, making it possible to obtain precise integrated intensities of reflections in high 2-theta ranges. Another reason is that one can use direct-space methods, which do not require “high-resolution diffraction data”, much more easily than before. Described here are some key points to remember when performing *ab initio* crystal structure analysis using powder diffraction data from organic compounds.

1. はじめに

「有機化合物の粉末結晶構造解析」について、その手法や最近の研究動向を、初心者向けにわかりやすく紹介するというで始まった本連載も、本稿が最終回となる。これまで、測定から解析までの流れ、粉末構造解析ならではの難しさとその対処方法などはひととおり説明されているので、読者の皆様は、有機化合物の未知粉末結晶構造解析について、大枠は理解されていることであろう。そこで本稿では、測定から解析までの各ステップにおける細かな注意点やノウハウについて紹介する。必ずしもすべてのケースにおいて効果的であるとは限らないが、発展途上にある未知粉末結晶構造解析では、試すことができる手法やテクニックの数が多いほど、正解にたどりつく確率が高くなると考えられるため、紙面の許す限りお伝えしようと思う。なお、本稿では、実験室系回折データに基づき、弊社の開発した統合粉末X線解析ソフトウェアPDXL[®]で解析した例を紹介している。PDXLは指数付け、Pawley法またはLe Bail法による全パターン分解(強度分解)、実空間法、直接法およびチャージフリップング(以下、「CF」と略す)による構造決定、リートベルト法による構造精密化というひと通りの未知粉末結晶構造解析が可能なソフトウェアとなっている。

2. 実験室系X線回折装置と光学系

粉末回折データでは、三次元的な回折ピーク情報が一次元回折パターンに圧縮されているため、ピークの重なりが顕著であり、正確なピーク位置および積分強度を求めることが、特に高角になるほど困難である。実験室系X線回折

装置において、この問題を克服するために最もよいとされている光学系の1つは、ヨハンソン型結晶を用いて $K\alpha_1$ 線に単色化し、それを集光した入射X線を用いる「 $K\alpha_1$ 集光ビーム光学系(以下、「集光光学系」と呼ぶ)」であろう(図1)。 $K\alpha_1$ 線に単色化することで回折ピークの本数を半分にし、ピークの重なりを抑え、集光することで回折強度を高くすることができる。また、さらに角度分解能を高めるため、入射X線、回折X線の軸発散成分を抑制するSollerスリットを使用する。一般的な粉末X線回折測定では開口角度が 5° 程度のものを用いることが多いが、未知粉末結晶構造解析が目的の場合は、 1° 程度のものを使用するとよい。得られる回折積分強度は5～10分の1になるが、ピーク幅は半分に抑えられる。

集光光学系では、X線は試料を透過し検出器面で集光される透過法配置での測定となる。試料は、フィルムなどに挟むこともできるが、粗大粒子の効果や選択配向を抑制するために、キャピラリに充填した試料を回転させながら測定するのがよい(連載第2回を参照)。キャピラリの径はピークの角度分解能に影響するため、細いキャピラリを使用して、できるだけ角度分解能を高くすることが望ましい。

図1 $K\alpha_1$ 集光ビーム光学系。($K\alpha_1$ focusing beam optics.)

が、細すぎると回折に寄与する結晶粒子が少なくなり、得られる回折強度が低くなってしまふ。回折装置における試料から検出器までの距離が300 mm、受光スリット幅が0.1 mmであると仮定すると、SeやBrなどの重元素を含まない一般的な有機化合物であれば、0.3～0.5 mm程度の径のキャピラリーを使用するのがよいだろう。

回折ピークの形状(幅)は、理論的には、光学系由来のピーク形状と、試料の結晶性や結晶子サイズなどに由来するピーク形状との畳み込みで記述される²⁾。光学系の分解能をどんなに高くしても、結晶性の悪い試料や、結晶子サイズの小さな試料を用いた場合は、回折ピークの幅はある程度以下には小さくならない。角度分解能を高めるためには、「沈降法」や「再沈法」など(連載第2回を参照)を用いて得られる、結晶性の高い試料のままで測定を行う必要がある。逆に、どうしても結晶性のよい粉末試料が得られない場合、その試料に対しては、光学系の分解能を程々にして、強度を高くすることがよい方法であると考えられる。一般的な粉末X線回折測定では、最大ピーク強度が5000～10000カウントになるようにスキャン速度や計数時間を設定することが多いが、未知粉末結晶構造解析が目的の場合は、さらに2～3倍程度の強度が得られるようにしたい。試料の結晶性やキャピラリーの径にもよるが、前述の集光光学系を用いて $2\theta = 90^\circ$ まで測定を行う場合、1～3時間程度を要することが多い。

表1に、いくつかの有機化合物の解析例と測定光学系を示す。連載第4回の記述にあった「非対称単位中の原子数50以下、自由度15以下なら、比較的簡単に解析できる」を支持する結果となっている。着目してほしいのは、測定に使用した光学系である。分解能の高い集光光学系ばかりでなく、平行スリットアナライザーを用いた光学系や、チャンネルカット結晶と高速一次元検出器を使ったデバイ

シェラー光学系など、特別な光学素子を使用しなくても構造解析できている化合物は多い。未知粉末結晶構造解析の中で、高い角度分解能を特に必要とするのは指数付けである。指数付けは、低角側から20本前後のピーク位置を使用するため、格子が比較的小さい($\sim 400 \text{ \AA}^3$)か、対称性が比較的高い空間群である場合は、低角側のピークに元々あまり重なりが見られないことが多く、さほど高い角度分解能を必要としない。また、構造解析が主たる目的である場合は、微小単結晶を使用して決定した格子定数を利用する方法もある。まずは、お手持ちのX線回折装置を使ってトライしてほしい。

3. 既知結晶相の同定と指数付け

粉末回折パターンにおいて、被検成分の微小ピークと微量不純物のピークは見分けがつかない。指数付けには、被検成分のピークのみを選択しなければならず、不純物が混合している場合は指数付けが非常に困難になる。ITO⁴⁾などの指数付けプログラムは、選択したピークから弱いピークをランダムに除外して指数付けを行うため、不純物ピークが混在していても正しい解が得られることがあるが、帰属されないピークが残った場合、得られた最終結果(結晶構造)が正しいかどうかの判定が非常に困難になる。そのため、原則として被検成分のみからなる純粋な粉末試料を調製する必要がある。

もし、なんらかの手段や知見から、試料に存在する不純物を特定できた場合は、不純物が混合されたままの状態でも測定し、構造解析を行うことができる。図2に、フルフェナム酸とサリチル酸の共結晶の粉末回折パターンを示す。この共結晶は、フルフェナム酸、サリチル酸を有機溶媒に加熱溶解し、攪拌しながら冷却することで得られた。つまり、不純物として考えられるのは、原料であるフルフェナ

表1 有機化合物の未知結晶構造解析例。(Examples of organic compounds whose crystal structures were successfully solved using their powder diffraction data.)「自由度」:実空間法で設定した自由度。「原子数」:非対称単位中の非水素原子数。「測定光学系」の“PB-Ge (220)” :入射2結晶Ge (220)と高速一次元検出器を用いたデバイシェラー光学系,“PB/PSA” :受光平行スリットアナライザーを用いたデバイシェラー光学系。「FOM」:指数付けの際の $F(20)$ ³⁾の値。「 R_{wpd} 」:全パターン分解後の R_{wp} の値。

No.	化合物名(日本語)	分子量	自由度	原子数	Z	V	測定光学系	構造決定法	空間群	FOM	$R_{\text{wpd}}(\%)$	$R_{\text{wp}}(\%)$	S
1	シチジン	243.2	12	17	4	1057.7	PB-Ge (220)	実空間法	$P2_12_12_1$	31.8	3.69	3.78	0.96
2	アセトアミノフェン	151.2	—	11	4	774.8	PB/PSA	直接法, CF	$P2_1/n$	18.1	4.36	4.51	1.15
3	カフェイン-水和物	212.2	9	15	4	983.8	PB/PSA	実空間法	$P2_1/c$	11.9	3.77	4.31	1.49
4	酒石酸水素アンモニウム	167.1	—	11	4	666.8	PB/PSA	直接法	$P2_12_12_1$	9.2	3.80	4.14	1.26
5	シメチジン	252.3	—	17	4	1279.1	PB-Ge (220)	直接法	$P2_1/c$	41.1	3.75	3.97	0.98
6	インドメタシン	357.8	11	25	2	867.1	PB/PSA	実空間法	P-1	29.2	3.29	3.75	1.30
7	フェノールレッド	354.4	10	25	8	3270.7	PB/PSA	実空間法	Pbca	8.5	3.73	3.99	1.18
8	4-ヒドロキシフェニルアセトアミド	151.2	—	11	4	746.5	PB/PSA	直接法, CF	$P2_12_12_1$	13.4	5.35	5.51	1.08
9	酒石酸アンモニウム	184.1	14	12	2	382.3	PB/PSA	実空間法	$P2_1$	17.5	3.63	3.94	1.28
10	L-バリン	117.1	15	16	4	615.3	PB-Ge (220)	実空間法	$P2_1$	36.6	5.40	6.59	1.24
11	4-ニトロアニリン塩酸塩	160.6	—	11	4	758.6	PB/PSA	CF	$P2_1/n$	11.6	6.07	6.47	1.10
12	メスタロン・サリチル酸共結晶	442.6	13	32	4	2437.1	$K\alpha_1$ 集光光学系	実空間法	$P2_12_12_1$	10.5	6.31	7.06	1.18
13	トラザミド	300.4	—	21	2	782.4	$K\alpha_1$ 集光光学系	直接法	P-1	31.9	2.66	3.42	1.94

図2 フルフェナム酸-サリチル酸共結晶の粉末回折パターンおよび指数付け結果。(Powder diffraction pattern of flufenamic acid – salicylic acid cocrystals, and the indexing result.)

ム酸とサリチル酸のみである。結晶構造のわかっているフルフェナム酸、サリチル酸それぞれの粉末回折パターンは計算によって求めることができ、これらを共結晶の回折パターンから差し引けば、共結晶のみの回折パターンが得られる。不純物として、両方または一方が含まれているか、あるいはどちらも含まれていないかは、PDXLなど、市販されている粉末回折ソフトウェアで確認することができる。図2のデータを解析したところ、フルフェナム酸は含まれておらず、サリチル酸がわずかに含まれていることがわかった。なお、この解析の検証のために、粉末試料を顕微鏡で観察したところ、結晶形状の異なる2種類の化合物が含まれていることがわかった。一方は解析できなかったが、他方はサリチル酸の格子定数と一致することを単結晶回折データによって確認できた。実際の未知結晶構造解析では、このようにほかの分析結果に基づく検証が非常に重要になることは言うまでもない。不純物を同定した後は、不純物由来の回折ピーク強度を測定データから差し引き、残ったピーク位置を使って指数付けを行った。サリチル酸を同定する前は、3つのプログラム(DICVOL06,⁵⁾ ITO13,⁴⁾ N-TREOR⁶⁾)のどれを用いても解が得られなかったが、同定後はDICVOL06で解を得ることに成功した。

このように、2種類の有機化合物AとBの混合物がある場合、構造解析を行いたいAは単離できず、別の合成方法でBは単離することができるとき、化合物Bの回折パターンを測定(Bの結晶構造がわかっている場合は回折パターンを計算)し、これをAとBの混合物から得られた回折パターンから差し引けば、化合物Aの構造解析が可能である。このことは、測定・解析に耐え得る質と大きさをもつ単結晶が得られず、粉末試料しか得られない場合に、大きな特長になると考えられる。

4. 直接法とチャージフリップング(CF)

直接法もCFも、測定データから求めた各指数反射の積

分強度をフーリエ合成することによって電子密度分布を求め、その極大値を与える位置を結晶中における原子の位置として構造を解く手法である。いずれの手法も、高角側($d_{\min} < 1.2 \text{ \AA}$)での、より正確な積分反射強度を必要とする。そのため、特に直接法やCFで初期構造を決定する場合は、試料の調製から気を配り、結晶性のよい試料を作製したうえで、角度分解能の高い光学系を選択し、より高角側まで広い範囲を測定しなければならない。ところが、有機化合物の場合、軽元素で構成されていることや、分子性結晶であるがゆえに結晶性が悪いことなどが原因で、高角側におけるピーク強度がほとんどなくなってしまう。そのため、有機化合物の未知結晶構造解析においては、高い角度分解能だけでなく、時間をかけて測定し、ピークの積分強度を高めることも、非常に重要な要素となる。強度の誤差は、一般に、計数型の検出器(シンチレーションカウンタなど)なら強度の平方根、積算型の検出器(イメージングプレートなど)なら強度の平方根のほぼ定数倍となる。つまり、得られた強度が高ければ高いほど、そのピークの積分強度の誤差は相対的に小さくなる。限られた時間の中で効率良く測定するためには、強度の高い低角側の測定にはあまり時間をかけず、強度の低い高角側の測定に時間をかけるのがよい方法である。一般的な有機化合物の場合、 2θ が60ないし70°程度までしかピークが観測されないことが多いため、例えば 2θ が40°までは速く、40~60°まではゆっくりと、60~90°まではほぼバックグラウンドレベルしか観測されないため少し速く測定する。もう1つの方法は、ピークの積分強度の精度を高くしたい範囲を何度か繰り返して測定することである。繰り返し測定後、すべてのデータを積算し、CPS単位など強度を時間で規格化した単位でデータを変換し、その後の解析処理に使用すればよい。ただし、リートベルト解析など最小二乗法を用いる場合、規格化した強度から、重みを直接求められないことに注意して計算を行う必要がある。

さて、有機化合物の未知結晶粉末構造解析における初期構造決定法には、多くの場合、「実空間法」が用いられる。その理由は、各指数の反射強度の曖昧さ、および、データの空間分解能が低い(測定範囲が狭い)ことによって、直接法やCFでの初期構造決定が困難だからである。しかしながら、例えば重原子がある場合などは、直接法やCFによって重原子の位置だけは比較的精度良く決定できる場合が多い。その重原子の位置を基準原子として固定し、その周りに分子を回転させて分子の向きを探索すれば、実空間法において自由度(パラメーター)の数を3つ減らしたことになる。探索時間を大幅に短縮できる可能性がある。また、得られた電子密度分布における電子密度ピークの位置は、個々には曖昧であっても、全体としてはなんとなく分子の形を表しているように見える場合がある。もし分子構造がわかっているのであれば、得られたすべての電子密

図3 *p*-ニトロアニリン塩酸塩(塩化物イオンを除く)の初期構造。(Initial structure of *p*-nitroaniline hydrochloride.) (a) CFで得られた電子密度ピークに原子を割り当てたもの。分子の形がいびつである。(b) CFと実空間法を組み合わせたハイブリッド法によって得られたもの。

度ピークに対して最もよくフィットするような分子の位置と向きを、実空間法によって探索すれば、これもまた探索時間を大幅に短縮できる可能性がある(図3)。

以上のように、最近では、直接法やCFなどの“逆空間法”と、“実空間法”を組み合わせたハイブリッドな方法も検討されており、EXPO2009⁷⁾やPDXLといったソフトウェアには、上で述べた機能が搭載されている。

5. 実空間法(直接空間法)

実空間法は、現在、有機化合物の初期構造決定において、最も頻繁に使用されている手法である。リートベルト法が最小二乗法による「精密化」であるのに対して、実空間法は、SA (Simulated Annealing), GA (Genetic Algorithm), PT (Parallel Tempering) などのアルゴリズムによって行われる「大域最適化」である。現在、主に用いられている3つの大域最適化アルゴリズムの違いと使用されているソフトウェアを表2にまとめる。3つの手法に優劣はなく、ユーザーは、使用するアルゴリズムによって、この違いを把握して解析を行ってほしい。また、可能であれば、指数付けと同じように、複数のプログラム(アルゴリズム)を使って初期構造決定を行い、得られた初期構造のクロスチェックを行うのがよい。

実空間法は、大域最適化法によって分子の位置と向きを探索する手法である。市販されているソフトウェアでは、ほぼ自動で分子内自由度(パラメーター)が決定されるが、最終的にはユーザーが自由度を決定する必要がある。例えば、CSD⁸⁾で検索すると、オルト位が無置換の安息香酸やニトロベンゼンのうち、カルボキシ基やニトロ基とベンゼン環とのねじれ角が30°以内の化合物が99%以上を占める。つまり、これらの化合物では、該当するね

表2 大域最適化アルゴリズムの違いと使用されているソフトウェア。(Difference between SA and GA, PT.)

SA	格子が大きい場合や、自由度の大きな分子の場合、局所解にたどり着く場合が多い。 回避するために、リーズナブルな初期構造が得られるまで解析を繰り返す。 EXPO, PSSP, DASHなどで採用されている。
GA, PT	格子が大きい場合や、自由度の大きな分子の場合でも、計算時間(計算回数)を大きく設定することで、正解を探し続けることができる。 GA: Crystal Profiler PT: FOX, PDXLなどで採用されている。

図4 実空間法で使用するシチジンの初期構造。(Initial structure of cytidine to be given for direct-space methods.) 分子モデル計算やデータベースから得られたシチジンの分子構造の、5員環の▲印の結合を切断し、*印の炭素原子を基準原子に設定する。

じれ角の探索範囲を±30°程度に設定すればよい。このように、CSDなどのデータベースも駆使して、できるだけパラメーター数や探索範囲を減らすことで、探索時間を短くすることができる。同時に、正解にたどり着く可能性も高くなる。

実空間法では、原子の位置を、分率座標ではなく、基準原子から順番に、原子間距離、結合角度、ねじれ角度、を使って分子の形を表現するZ-matrixと呼ばれる座標で表す。Z-matrixで表された分子の位置と向きを、単位格子中(または非対称単位中)で探索するのであるが、この方法では、環構造の配座を決定できないという欠点がある。6員環のように、平面構造(ベンゼン環など)または椅子型配座(シクロヘキサン環など)に一義的に決まるものならば、この構造を固定して実空間法を実行すればよいが、5員環や7員環などのように配座がわからないものに関しては、正しい配座を探索する必要がある。どうすればよいのか?

以下に、1つの解決方法を述べるので参考にしてほしい。
①まず、環を切断する。その際、Z-matrixの基準原子として分子の中心や重心に近い原子を選択し、基準原子からできるだけ遠い結合を切断する。

②次に、切断した結合の距離に対して、弱いリストレインを設定する。例えば、PDXLの場合、経験的もしくは理論的な結合距離±数Åとする。

③最後に、1つの結合が切断されたことにより2つの側鎖が増えたため、この側鎖に対して、結合角度とねじれ角度を探索するように設定を変更する(環構造の場合、ソフトウェアによっては、環の結合角度やねじれ角度は固定するように設定されるため)。

このように設定して実空間法を実行し、切断した結合の結合距離が経験的・理論的結合距離にほぼ等しくなれば正しい配座が得られたと考えられる。図4に、例としてシチジンの場合の考え方を示す。

6. 結晶構造の精密化

初期構造が得られたら、分子構造を完成させた後、結晶構造の精密化に進む。分子構造を完成させるには、単結晶の場合、通常差フーリエ合成などが行われるが、粉末回折データからの構造決定の場合、水素原子はもとより、ほかの原子でも見つけることが難しい場合が多々ある。分子構造の大半が決定できているなら、幾何学的な位置を計算して求め、精密化の段階で最適な位置へ動かすことが得策であろう。アルキル鎖のような炭化水素直鎖のように、さまざまな配座をとることが考えられる場合は、いくつかの代表的な配座を初期値としてそれぞれ精密化を実行するか、MEMから得られる電子密度分布の様子からおおまかなアルキル鎖の配座を決定しておき、その後の精密化で最適な位置へ動かすことで解が得られる可能性がある。

結晶構造解析の最終段階は「リートベルト法による結晶構造の精密化」である。精密化に関しては、本稿の1つ前の連載第5回で詳しく述べられているので、ここでは省略するが、未知粉末結晶構造解析では、局所解に陥らないようにパラメーターを少しずつ精密化し、ゆっくりと解に近づけていくことが重要なポイントである。パラメーターを少し動かしては、分子構造・結晶構造を確認し、結合距離や角度が経験値・理論値から外れてきたら、精密化前の値に戻し、その結合距離や角度を固定するかリストレインを設定して、再度精密化を実行する。精密化がほぼ完了したことを示す指標として、統計的に考えられるR因子の最小値 R_e と R_{wp} との比であるS(GOF: Goodness Of Fitとも呼ばれる)がよく利用されるが、このほかに、全パターン分解を行ったときの R_{wp} (表1の R_{wpd})との差も、1つの指標として用いるとよいだろう。ただし、最小二乗法による精密化ゆえ、R因子やSが十分に下がっても、偽の解に陥っていることがよくある。精密化後の原子座標

を用いてパッキング図を描画し、①得られた分子構造が妥当か、②短すぎる原子間距離がないか、③予想以上に大きな空隙が存在しないか、④水素結合などによる分子間力を合理的に説明できるか、などの評価を十分に行わなければならない。リートベルト法を用いた結晶構造の精密化は、細心の注意を払って丁寧に行いたい。

7. まとめ

有機化合物の未知結晶構造解析はまだまだ発展途上の段階にある。現在は、どんな場合でも通用する万能なソフトウェアや手順はまだない。解析を成功させるためには、1つのソフトウェアや手法に固執せず、いろいろなソフトウェア、いろいろな手法を試すのがよい。また、粉末回折データからの未知結晶構造解析では、結果の評価・吟味をしっかりと行ってほしい。吟味の際には、粉末結晶構造解析という手法そのものにも固執せず、単結晶から得られた格子定数や熱分析による結晶水と水の有無など、ほかの分析手法による結果も可能な限り利用してほしい。粉末回折データを用いて、これまで解析することができなかった有機化合物の結晶構造が、数多く解析されることにより、有機化合物が用いられるさまざまな分野で、これまで以上のブレイクスルーが近い将来起こることを期待している。

文 献

- 1) 佐々木明登, 姫田章宏, 小中 尚, 室山知宏: リガクジャーナル, **40** (2), 10 (2009).
- 2) R. W. Cheary and A. Coelho: *J. Appl. Cryst.* **25**, 109 (1992).
- 3) G. S. Smith and R. L. Snyder: *J. Appl. Cryst.* **12**, 60 (1979).
- 4) J. W. Visser: *J. Appl. Cryst.* **2**, 89 (1969).
- 5) A. Boulif and D. Louër: *J. Appl. Cryst.* **37**, 724 (2004).
- 6) A. Altomare, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, A. G. G. Moliterni, R. Rizzi and P. -E. Werner: *J. Appl. Cryst.* **33**, 1180 (2000).
- 7) A. Altomare, M. Camalli, C. Cuocci, C. Giacovazzo, A. Moliterni and R. Rizzi: *J. Appl. Cryst.* **42**, 1197 (2009).
- 8) F. H. Allen: *Acta Cryst.* **B58**, 380 (2002).

プロフィール

佐々木明登 Akito SASAKI

(株)リガク X線解析事業部 アプリケーション・ソフトウェア開発部

Appliaction & Software Development Department, X-ray Analysis Division, Rigaku Corporation

〒196-8666 東京都昭島市松原町3-9-12

3-9-12 Matsubara-cho, Akishima, Tokyo 196-8666, Japan

e-mail: a-sasaki@rigaku.co.jp

最終学歴: 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻博士課程修了

専門分野: 有機化学

現在の研究テーマ: 未知粉末結晶構造解析

趣味: サッカー