

核磁気共鳴法

化合物の同定, 定量分析, 構造やダイナミクスの解析

佐藤 一

1 はじめに

核磁気共鳴 Nuclear Magnetic Resonance (NMR) 法は原子一個の分離能を有する分光法である。分光分析法の中では低感度であるにもかかわらず、試料が溶液または固体の状態で測定できるので、有機化合物、生体分子、材料などの分野に携わる研究者や分析者にとって欠くことのできない分析法となっている。

NMR のハードウェアの進歩によりスペクトルの感度と分解能が向上した。また、ソフトウェアの改良により NMR 実験の自動化が進んだ。その結果、今や誰もが高品質の NMR スペクトルを容易に測定できるようになってきている。

NMR 解析はシグナルを誤りなく帰属することから始まる。既知化合物のスペクトルにおいて、シグナルが分離して観測されると、ほとんどの場合、シグナルを帰属することができる。しかし、シグナルが狭い範囲に重なり合って観測される場合や未知化合物の場合、シグナルを誤って帰属する恐れがある。誤りなく帰属を進めるために、様々な種類の NMR スペクトルを測定し、帰属の曖昧さをなくす必要がある。

NMR シグナルの帰属が完了すると、化合物の同定や定量だけでなく、立体配置や立体配座、ダイナミクスや分子間の相互作用などを調べることができる。

NMR スペクトルの測定はほとんどルーチン化され、成熟していると言える。本稿では、種々の NMR スペクトルの説明に重きを置きたい。

2 一次元 (1D) スペクトル

NMR を用いて様々な核種のスペクトルを測定することができる。感度やシグナルの線幅により NMR に向いている核種とそうでない核種が存在する。通常の測定のほかに、やや特殊な用途の測定がある。また、この章で述べる一次元 (1D) スペクトルは最も測定される次元であるが、低分子の有機化合物などでは次章で述べる二次元 (2D) スペクトルの測定もよく利用される。さらに、タンパク質や核酸などの生体高分子では、三次元 (3D) またはそれ以上の次元のスペクトルが測定され

る。これについては説明を省略する。

2・1 ^1H スペクトル

2・1・1 ルーチン測定

元素の中で最も感度の高い核種であり、最も汎用的に用いられている核種である。厳密には、 ^3H が一番感度の高い核種であるが、用途や設置環境が限定されているので一般的に普及していない。

図 1 に示したように、 ^1H スペクトルでは化学シフト値から脂肪族性や芳香族性などの官能基を推定する。芳香族性のシグナルはスペクトルの左側 (低磁場側または高周波数側と言う) に観測され (図 1B)、また、脂肪族性のシグナルはスペクトルの右側 (高磁場側または低周波数側と言う) に観測される (図 1C および D)。

次に、シグナルの強度比 (積分比とも言う) から水素

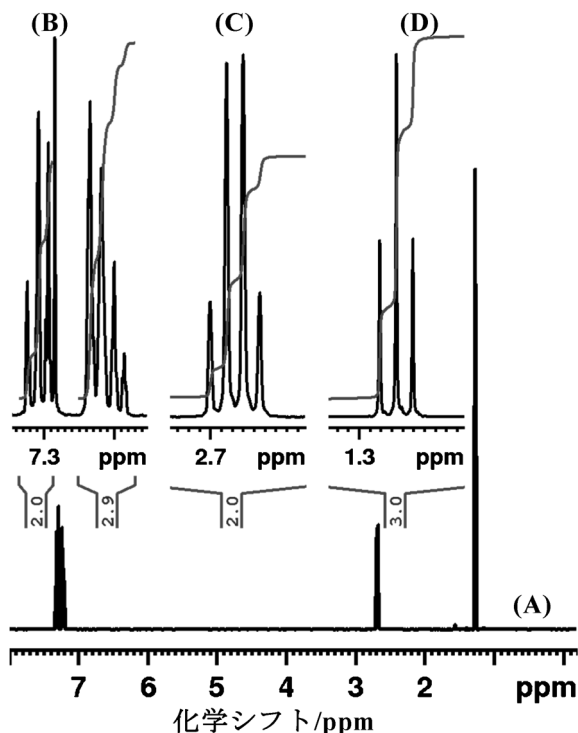


図 1 エチルベンゼンの 1D ^1H スペクトル
全体図 (A)、芳香族の領域 (B)、メチレン (C)、メチル (D) 由来のシグナル。

の個数を推定できる。図1のエチルベンゼンでは、積分比が図1Bでは水素が4.9個、図1Cでは水素が2.0個、また、図1Dでは水素が3.0個となった。したがって、図1B、図1C、または、図1Dはそれぞれ、芳香族、メチレン、または、メチル由来のシグナルであると考えられる。積分範囲の取り方や積算の繰り返し時間などが原因で、実際には、5:2:3のような整数比にならないことがある。その場合、経験的に、小数点以下を切り上げる、切り捨てる、または、四捨五入することとなる。

次節で説明する定量NMR用のパラメータを用いることにより、上述の積分比が整数比にならないという問題は改善する。

2.1.2 定量

NMRスペクトルは元来、定量性を議論できる分析手法である。近年、定量NMRまたはqNMRという呼び名で脚光を浴びている。

2016年に日本薬局方(JP17)や2018年に日本産業規格(K0138)に公定書として発行された。その内容はおおよ次の通りである。装置(^1H の周波数400MHzまたは300MHz以上の分光計)、デジタル分解能(0.25Hz以下)、スペクトル幅(-5ppmから15ppmを含む20ppm以上)、試料管の回転数(0Hz)、パルスのフリップ角(90度)、 ^1H のFID取り込み中に ^{13}C デカップリングあり、遅延時間(積算の繰り返し待ち時間、60秒以上または T_1 緩和時間の7倍以上)、積算回数(8回以上または S/N 100以上を示す積算回数)、ダミーキャン(2回以上)、測定温度(20~30°Cの一定温度または任意の一定温度)。ユーザーは公定書に記載されている通りにパラメータを設定すればよい。

上述の方法は内部標準法と呼ばれ、分析対象化合物に基準物質を加えて溶液とする。両者の重さを量り取り、得られたシグナル強度から純度が計算される。一つの試料管に調製したサンプルを用いて測定した一つのスペクトルで解析するので、誤差の要因が少なく再現性が高いとされている。試料の溶液は三種類調製し、また、それぞれの溶液サンプルに対してNMRスペクトルを3回測定する。これにより、試料調製またはNMR実験のどちらに誤差の要因があるかがわかる。このように、内部標準を用いた定量NMRの手順は確立している。強いて問題点を挙げるならば、測定時間が長いことである。積算の繰り返し待ち時間を60秒以上に設定して、合計九つのスペクトルを測定するからである。

また、外部標準法を用いた定量NMRがある¹⁾。分析対象化合物の溶液と基準物質の溶液をそれぞれ別の試料管に調製し、それぞれのスペクトルを測定する。したがって、内部標準法より誤差の要因が多いとされる。しかし、分析対象化合物の溶液に基準物質を加える必要が

ないので、簡便に定量分析を進めることができる。また、過去に測定したスペクトルの定量分析ができる。

2.2 ^{13}C スペクトル

^{13}C の天然存在比はわずか約1.1%なので、 ^{13}C スペクトルの測定は低感度と言える。しかし、有機化合物の解析をするために必須の測定法である。試料の濃度を上げたり、NMR分光計や検出器の感度を上げたりすることにより、測定時間を短縮できる。 ^1H スペクトルと同じように、芳香族性のシグナルはスペクトルの低磁場側または高周波数側に観測され、また、脂肪族性のシグナルはスペクトルの高磁場側または低周波数側に観測される。

2.2.1 高感度モード

Power Gated ^1H デカップリングというモードで ^{13}C スペクトルを測定する。積算の待ち時間から ^{13}C のFID取り込み時間まで ^1H デカップリングする。 ^{13}C と空間的に近くにある ^1H からのNOE効果により、 ^{13}C の感度が向上する。 ^{13}C 観測の測定法の中で最もよく利用されている。高感度に測定できるが、シグナル強度に定量性はない。経験的に四級炭素は ^1H からのNOE効果が得られないので、そのシグナル強度は他の級数の炭素と比べて弱い。しかし、空間的に、四級炭素の近くに ^1H があれば、その限りではない。図2にエチルベンゼンの ^{13}C スペクトルを示した。

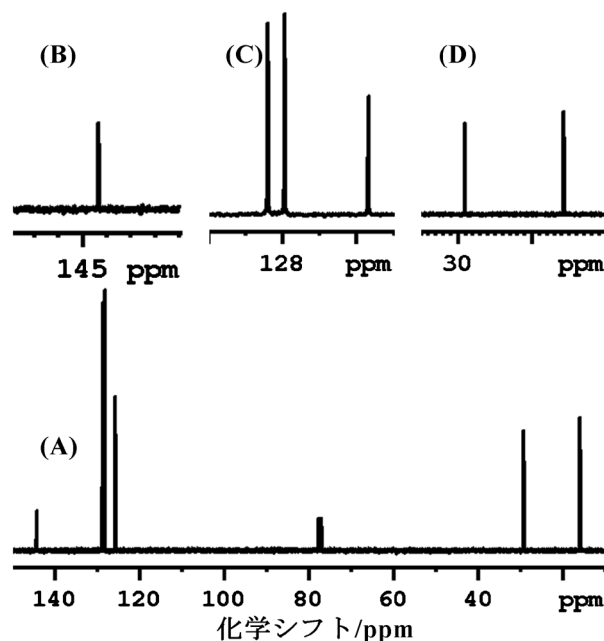


図2 エチルベンゼンの ^{13}C NMRスペクトル
全体図(A)、四級炭素(B)、芳香族(C)、メチレンとメチル(D)由来のシグナル。

2・2・2 定量モード

Inverse Gated ^1H デカップリングというモードで ^{13}C スペクトルを測定する。 ^{13}C の FID 取り込み中のみ ^1H デカップリングする。シグナル強度に定量性はあるが、Power Gated ^1H デカップリングを用いた測定法と比べると感度は劣る。

2・2・3 DEPT スペクトル

DEPT スペクトルは炭素の級数を調べるための実験である²⁾。DEPT45 では一級、二級、および、三級炭素が観測される。DEPT90 では三級炭素のみが観測される。DEPT135 では二級炭素が一級および三級炭素と異符号に観測される。これら三種類のスペクトルと通常の ^{13}C スペクトルを比較することにより、炭素の級数を同定することができる。図 3 にエチルベンゼンの DEPT スペクトルを示した。

また、DEPT-Q という実験がある³⁾。上述の DEPT スペクトルでは、四級炭素が観測されないが、DEPT-Q では四級炭素が観測される。二級および四級炭素由来のシグナルが一級および三級炭素と異符号に観測される。このスペクトル一枚で炭素の級数を同定できる可能性がある。図 4 にエチルベンゼンの DEPT-Q スペクトルを示した。

2・3 ^{19}F スペクトル

^{19}F は天然存在比 100 % であり、 ^1H に次ぐ高感度な核種である。有機化合物、材料や生体分子の解析に応用されている。シグナルの化学シフトはおよそ 2000 ppm

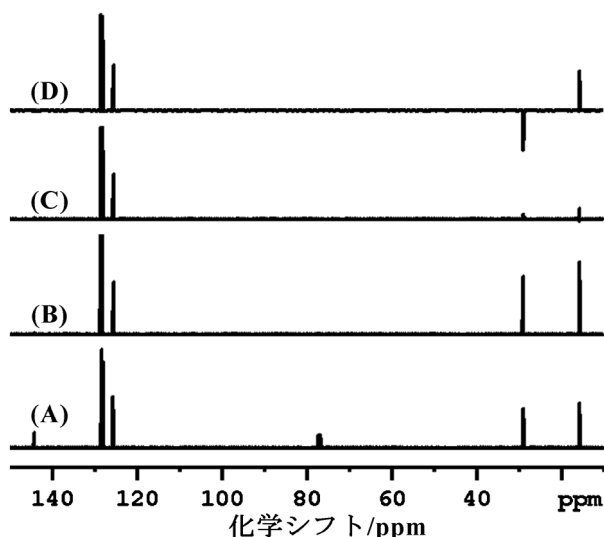


図 3 エチルベンゼンの DEPT スペクトル
通常の ^{13}C (A), DEPT45 (B), DEPT90 (C), DEPT135 (D) スペクトル。A ではすべての級数が観測される。B では一級、二級、および、三級炭素が同符号に観測される。C では芳香族 (三級炭素) のみが観測される。D ではメチレン (二級炭素) がメチル (一級炭素) および芳香族 (三級炭素) と異符号に観測される。

の範囲にわたって観測される。 ^{19}F スペクトルに観測されるシグナルの数が少ないこと、また、官能基により化学シフトが敏感に変化することから、 ^{19}F スペクトルは分離能が高い。したがって、 ^{19}F スペクトルの解析は ^1H や ^{13}C スペクトルのそれと比べて簡単であると言える。

しかし、スペクトル幅が広いので、測定に用いた励起パルスが広帯域に励起できていることに留意する必要がある。また、励起の問題で、シグナル強度の定量性を議論するときは注意する必要がある。さらに、スペクトル幅が広いので、 ^1H や ^{13}C スペクトルのときより、位相補正やベースライン補正がやさしくないことがある。図 5 に 2-クロロ-4-フルオロトルエンと 2,4-ジクロロベンゾトリフルオリドの混合物の ^{19}F スペクトルを示した。

2・4 ^{31}P スペクトル

^{31}P は天然存在比 100 % であり、幅広い分野で利用されている。リンは五価と三価があり、それぞれが観測さ

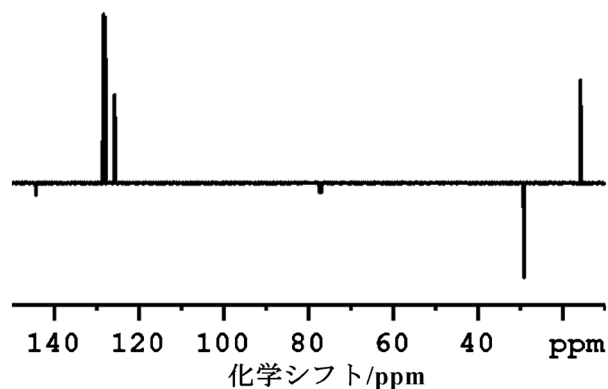


図 4 エチルベンゼンの DEPT-Q スペクトル
メチレン (二級炭素) および四級炭素由来のシグナルがメチル (一級炭素) および芳香族 (三級炭素) と異符号に観測される。

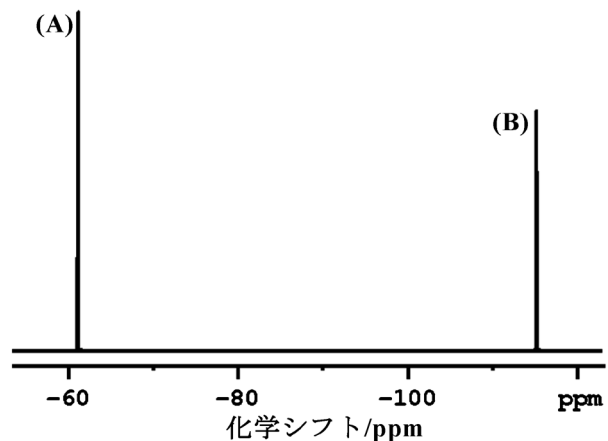


図 5 2-クロロ-4-フルオロトルエン (A) と 2,4-ジクロロベンゾトリフルオリド (B) の混合物の 1D ^{19}F スペクトル

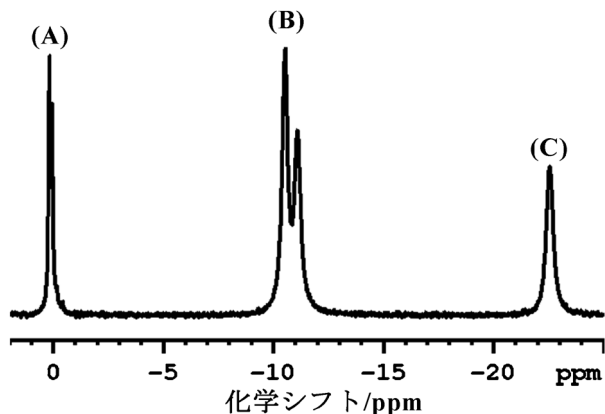


図6 アデノシン三リン酸の³¹P スペクトル
A, B または C はそれぞれ, γ 位, α 位または β 位由来のシグナル。

れる NMR シグナルの領域は大きく異なるので, 容易に区別できる。図 6 にアデノシン三リン酸の³¹P スペクトルを示した。

2.5 ²⁹Si スペクトル

²⁹Si は天然存在比約 4.7 % である。材料関連の試料を用いて測定されることが多く, 溶液と固体状態で応用されている。Si を中心とした四面体に, 酸素, ケイ素または置換基が結合した数により, 観測される²⁹Si シグナルの化学シフトの領域が確立している。

²⁹Si は T_1 緩和時間が長いために, 積算の効率が悪いので, ²⁹Si スペクトルの測定は時間のかかる実験と言える。積算の繰り返し時間を十分長く設定することによりシグナルの定量性を議論できるようになる。図 7 にヘキサメチルジシロキサン²⁹Si スペクトルを示した。

2.6 チューニング可能な核種

NMR の検出器 (プローブ) は ¹H と ¹⁹F のほかに, 多核にチューニングすることができる。一例であるが, 例えば, ³¹P から ¹¹⁹Hg までと ¹⁷O から ¹⁰⁹Ag までの合計 84 個の核種の周波数にチューニングすることができる。

2.7 T_2 フィルタを用いた測定

T_2 緩和時間の違いを利用して, 低分子と高分子の混合物から低分子のみのシグナルを検出する。主に, ¹H や ¹⁹F が用いられる。実験のパルスシーケンスは後述する CPMG 法を用いた T_2 緩和時間測定⁴⁾の 1D 版である。

低分子由来のシグナルは高分子由来のブロードなシグナルに埋もれてしまい解析が困難な場合がある。ここで, パルスシーケンスにおける T_2 フィルタの間に, T_2 緩和時間の短い高分子由来のシグナルは減衰し, シグナル強度はほぼゼロとなる。それに対して, 低分子由来のシグナルは T_2 緩和時間が長いので, T_2 フィルタの時

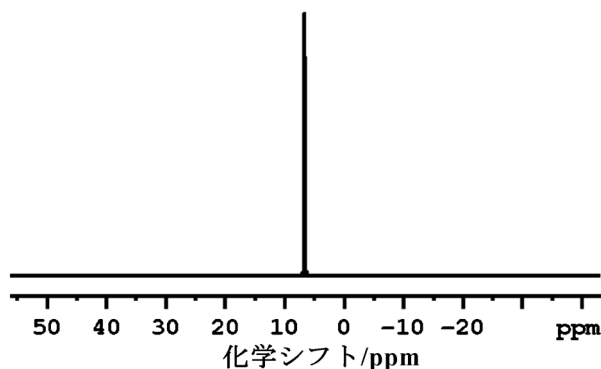


図7 ヘキサメチルジシロキサンの²⁹Si スペクトル

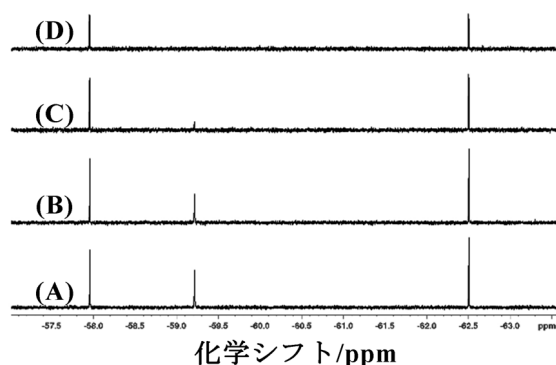


図8 タンパク質と低分子三種類の混合物の T_2 フィルタを用いた¹⁹F スペクトル
 T_2 フィルタの時間を 10 ミリ秒 (A), 100 ミリ秒 (B), 500 ミリ秒 (C), 1000 ミリ秒 (D) と変化させた。 T_2 フィルタの時間を長くすることによりシグナル強度が減衰したピーク由来の低分子がタンパク質と相互作用していると考えられる。

間にシグナルは減衰しきらない。したがって, 低分子と高分子の混合物から, 低分子のみのシグナルを観測することができるようになる。

また, この方法を用いて, 低分子と高分子の相互作用を解析することができる⁵⁾。低分子のシグナルが T_2 フィルタにより, 減衰しない場合と減衰する場合がある。前者では低分子は高分子に結合していないと考えられ, また, 後者では低分子は高分子に結合していると考えられる。製薬業界では Fragment-Based Screening の一つの方法として利用されている⁶⁾。図 8 にタンパク質と低分子三種類の混合物の T_2 フィルタを用いた¹⁹F スペクトルを示した。

2.8 拡散係数を用いた測定

拡散係数の違いを利用して, 高分子と低分子の混合物から, 拡散係数に相当するシグナルを検出する⁷⁾。この実験のシーケンスは後述する DOSY 法の 1D 版である。

溶液 NMR では重水素化溶媒を用いるのが一般的であるが, 試料にもともと別の溶媒が含まれることがある。通常, 溶媒ピークを照射して消去する実験を行うが, そ

の溶媒ピークの近くに注目するピークが存在する場合、溶媒ピークを照射すると注目するピークも照射してしまうこととなる。試料の拡散係数に最適化した条件で測定することにより、注目するピークに影響することなく溶媒ピークを消去することができる⁸⁾。

2・7で述べた T_2 フィルタの実験と同じように、低分子と高分子の相互作用解析に利用できる⁹⁾。高分子に最適化された条件で測定した結果、低分子のピークが観測された場合、その低分子は高分子に結合していると考えられる。

3 二次元 (2D) スペクトル

1D スペクトルではカップリング定数やシグナルの分裂パターンを観察しながら解析を進める。しかし、1D スペクトルにおいて、シグナルが分離して観測されないとその解析を進められないことがある。この問題を解決するために、2D スペクトルを測定する。

次元を増やすことにより分離能が向上するので、1D よりも簡便に解析を進められるようになる。しかし、2D スペクトルは 1D より測定時間が長くなる。

2D スペクトルでは化学結合を介した相関、または、空間的に距離の近い原子間の相関が得られる。また、同種核または異種核の 2D スペクトルがある。

3.1 同種核 2D スペクトル

3.1.1 COSY スペクトル

COSY は COrrrelation SpectroscopY の略で、2D スペクトルの中で最も汎用的に用いられている測定法の一つである⁹⁾。化学結合を介したカップリングを利用して、隣同士の相関ピークが交差ピークとして得られる。1D

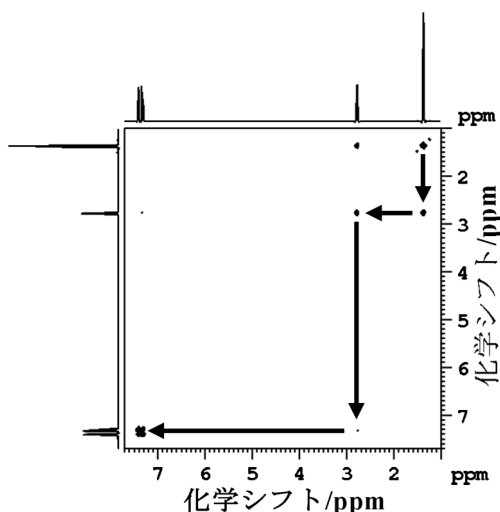


図9 エチルベンゼンの COSY スペクトル
高磁場側のメチル由来の対角ピークから交差ピークへ、ついで、交差ピークからメチレン由来の対角ピークへつなぐことにより隣の水素へと連鎖的に帰属した。ついで、メチレンからオルト位の水素へつながった。

スペクトルに対応する対角ピークと交差ピークを交互につなぐことにより、シグナルを連鎖的に帰属することができる。比較的単純な低分子に利用されることが多いと考えられる。図9にエチルベンゼンの COSY スペクトルを示した。

3.1.2 TOCSY スペクトル

TOCSY は TOrtal COrrrelation SpectroscopY の略であり、COSY と同じように、カップリングを利用する測定法である¹⁰⁾。混合時間を短く設定すると 3-bond の相関が、また、長く設定すると 4-bond, 5-bond またはそれより遠隔の相関が得られる。解析は COSY と同じように、対角ピークと交差ピークを交互につなげて、シグナルを連鎖的に帰属する。比較的複雑な低分子、タンパク質、核酸や糖鎖に利用されることが多いと考えられ

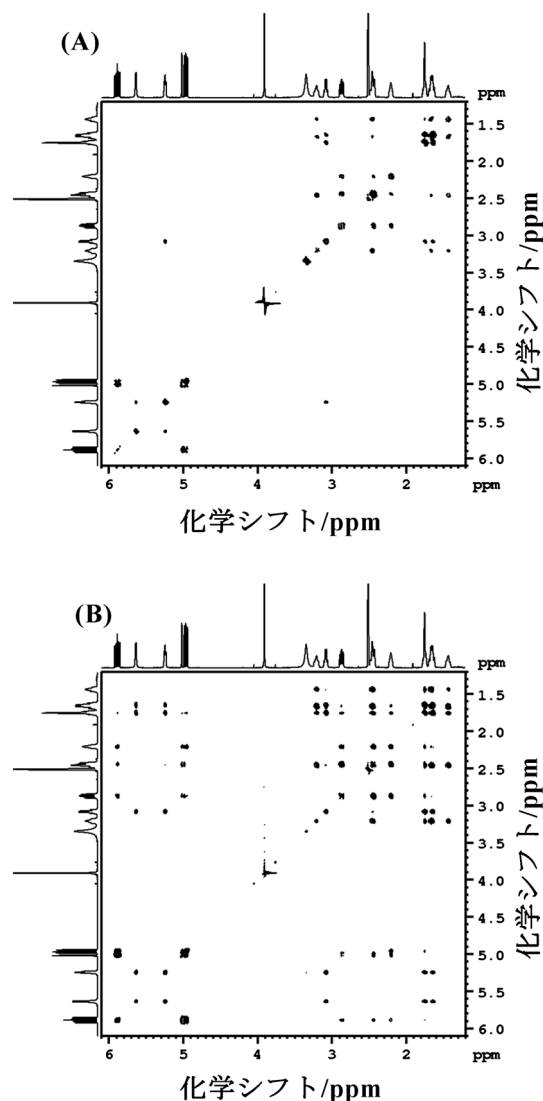


図10 キナーネの TOCSY スペクトル
混合時間を 10 ミリ秒 (A)、または、150 ミリ秒 (B) に設定した。前者では主に 3-bond の相関が観測され、また、後者では、より遠隔の相関が得られ、相関ピークの数が多く観測された。

る。図 10 にキニーネの TOCSY スペクトルを示した。

3・1・3 INADEQUATE スペクトル

INADEQUATE は Incredible Natural Abundance Double QUAntum Transfer Experiment の略である¹¹⁾。隣り合う ^{13}C 同士の相関を得る実験であり、NMR 実験の中で最も低感度な実験と言われている。天然存在比約 1.1 % の ^{13}C の隣に同じく天然存在比約 1.1 % の ^{13}C が存在する確率は非常に低いので、高濃度の試料を調製するか、または、高感度な分光計を用いることが必須である。低感度な測定法であるが、INADEQUATE スペクトルが得られると、相関ピークを辿ることにより化合物の炭素骨格を簡便に解析することができる。図 11 に 3-(4-イソプロピルフェニル) イソブチルアルデヒドの INADEQUATE スペクトルを示した。

3・1・4 NOESY スペクトル

NOESY は Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy の略であり、空間的に距離の近い原子間の相関が得られる¹²⁾。低分子の NOE は正の符号で観測され、また、高分子の NOE は負の符号で観測される。分子量が 1000 程度の化合物では NOE の強度がゼロとなる。NOE の強度や符号は静磁場の大きさ、温度や溶媒により変化する。

NMR シグナルの帰属が完了すると立体構造解析へ進

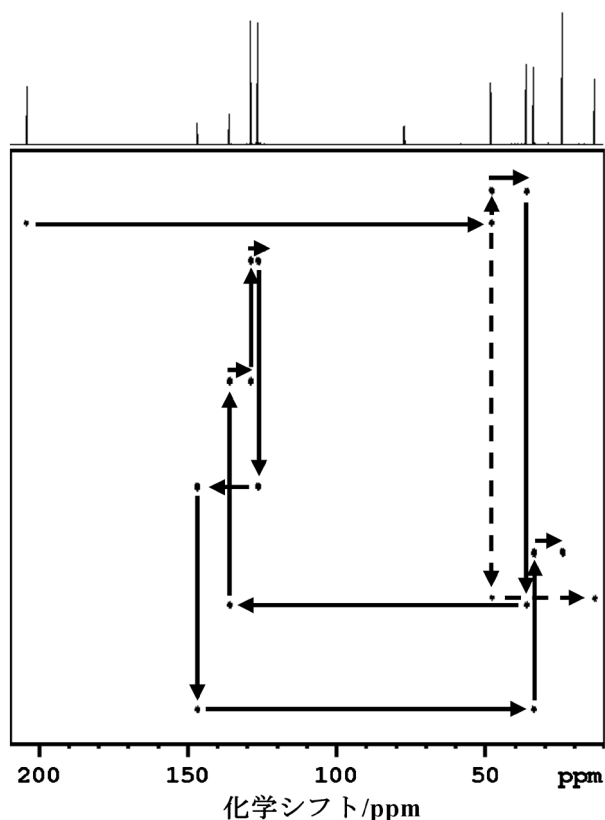


図 11 3-(4-イソプロピルフェニル) イソブチルアルデヒドの INADEQUATE スペクトル

む道がある。NOE のピーク強度を大・中・小などと大別し立体構造を計算する。NOESY スペクトルの解析の進め方は、COSY や TOCSY と同じである。空間的に距離の近い ^1H 間に NOE 相関が交差ピークとして観測される。NOE の情報をもとに立体配置や立体配座がわかる。図 12 にキニーネの NOESY スペクトルを示した。

また、NOESY は分子間の相互作用解析に用いられる。低分子のみの試料で NOESY スペクトルを測定すると、正の NOE が観測される。この試料にタンパク質を加えて NOESY スペクトルを測定した際、得られた NOE が負の符号を持つとき、この低分子はタンパク質に結合していると考えられる。これは Transferred-NOE (TRNOE) 効果と呼ばれる¹³⁾。

3・1・5 ROESY スペクトル

ROESY は Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy の略であり、NOESY と同じように、空間的に距離の近い原子間の相関が得られる¹⁴⁾。ROESY では分子の大きさに関係なく正の符号で観測される。NOESY では分子量が 1000 程度の化合物では NOE の強度がゼロとなるが、ROESY ではこの問題は起こらない。解析の進め方は NOESY と同じである。

3・2 異種核 2D スペクトル

3・2・1 HSQC スペクトル

HSQC は Heteronuclear Single Quantum Coherence の略であり、1-bond の ^1H - ^{13}C のカップリングを利用して相関を得る測定法である¹⁵⁾。一つの軸が ^1H の代わりに、 ^{13}C となるので、同種核 ^1H - ^1H 2D スペクトルより分離能は高い。

低分子や天然物の解析には、一級および三級炭素が正

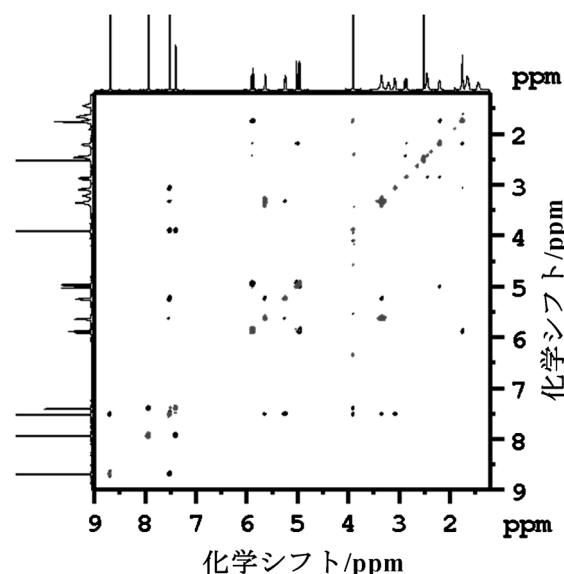


図 12 キニーネの NOESY スペクトル

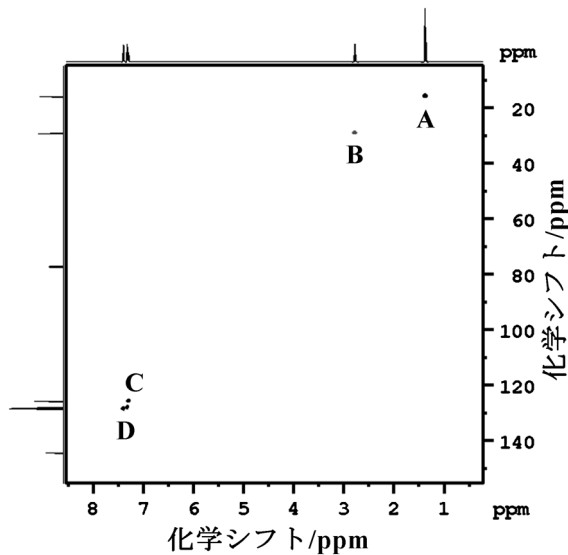


図 13 エチルベンゼンの ^1H - ^{13}C HSQC スペクトル
A, B, C および D はそれぞれメチル, メチレン (異符号), オルト位, パラ位およびメタ位由来のシグナル。

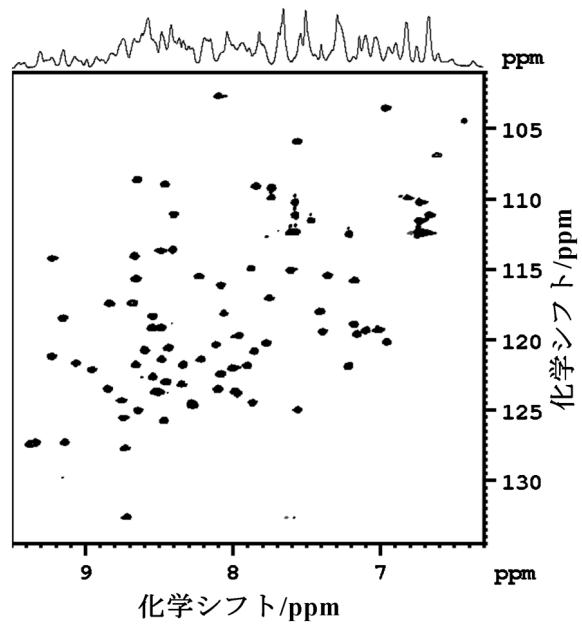


図 14 コビキチンの ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル
一つの相関ピークがアミノ酸一残基分に相当する。

の符号で観測され、また、二級炭素の相関ピークが負に観測されるシーケンスが利用される¹⁶⁾。このスペクトル一枚で炭素の級数と 1-bond の ^1H - ^{13}C 相関が得られるので有用である。図 13 にエチルベンゼンの HSQC スペクトルを示した。

タンパク質、ペプチドまたは核酸の試料では、 ^1H - ^{15}N HSQC 相関も利用される。 ^{15}N の天然存在比は約 0.37% であり、 ^{13}C より低い。生体分子の試料調製では ^{13}C や ^{15}N を用いた安定同位体標識が確立されている。試料を安定同位体標識することにより感度を大幅に向上させることができる。

タンパク質やペプチドを用いた ^1H - ^{15}N HSQC では、一つの相関ピークがアミノ酸一残基分に相当する。また、核酸では、一つの相関ピークが一組の塩基対に相当する。 ^1H - ^{15}N HSQC 相関は ^1H - ^{13}C HSQC 相関よりも分離能が高く、かつ、一つの相関ピークが有する情報が解析を進める上で有益である。図 14 にコビキチンの HSQC スペクトルを示した。

3.2.2 HMQC スペクトル

HMQC は Heteronuclear Multiple Quantum Coherence の略であり、HSQC と同様に 1-bond の相関を得る測定法である¹⁷⁾。展開方向の (たとえば、 ^{13}C) 分解能が HSQC よりもやや低い。

3.2.3 HMBC スペクトル

HMBC は Heteronuclear Multi-Bond Correlation の略であり、 ^1H - ^{13}C のロングレンジのカップリングを利用して相関を得る測定法である¹⁸⁾。四級炭素との相関が 1D ^{13}C スペクトルより高感度で得られるので、低分

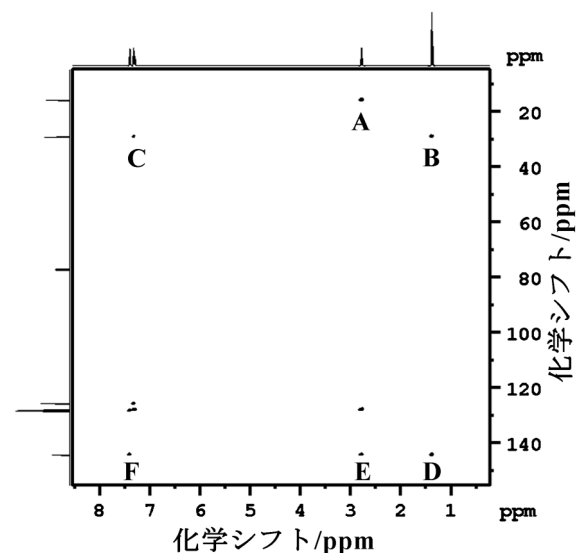


図 15 エチルベンゼンの ^1H - ^{13}C HMBC スペクトル
A, B, C, D, E および F はそれぞれ、メチレン水素とメチル炭素、メチル水素とメチレン炭素、オルト位の水素とメチレン炭素、メチル水素と四級炭素、メチレン水素と四級炭素、メタ位の水素と四級炭素との相関ピークを示す。

子や天然物の解析で広く利用される。図 15 にエチルベンゼンの HMBC スペクトルを示した。

試料を高濃度に調製したり、感度の高い分光計を用いたりすることにより、 ^1H - ^{15}N HMBC スペクトルがルーチン的に測定されるようになってきている。以前は化合物中に窒素を含むと解析が難しいということがあったが、今日では ^1H - ^{15}N 相関を積極的に解析に取り入れている。図 16 にストリキニーネの HMBC スペクトルを示した。

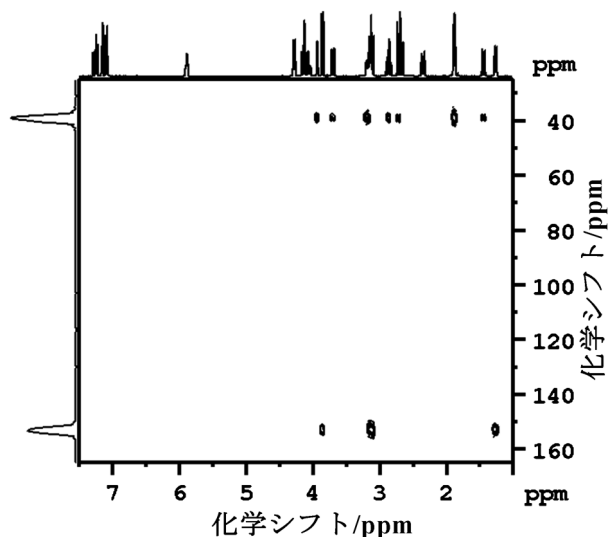


図 16 ストリキニーネの ^1H - ^{15}N HMBC スペクトル

4 ダイナミクスの解析

NMR シグナルの帰属が完了すると、立体構造解析へ進む道のほかに、ダイナミクスを解析する道がある。分子の運動性、分子の硬い部分や柔らかい部分がわかるようになる。

4.1 緩和時間の解析

4.1.1 T_1 緩和時間

T_1 緩和時間は縦緩和時間とも言い、縦緩和またはスピン-格子緩和と呼ばれる時定数である¹⁹⁾。熱平衡状態にあるスピン系に、180 度パルスにより反転させた後、熱平衡状態（静磁場方向）に向かって回復する過程のことである。

NMR は原子レベルの分離能を有するので、ある化合物の原子一つ一つの緩和時間を調べることにより、分子のダイナミクスを議論できる。

また、 T_1 緩和時間がわかると積算の繰り返し時間の参考となる。90 度パルスで励起する場合、積算の待ち時間は T_1 緩和時間の 5~7 倍に設定する。30 度パルスで励起する場合、積算の待ち時間は T_1 緩和時間の 1~2.5 倍に設定する。

2.7 で述べた Fragment-Based Screening の方法の一つに、 T_1 緩和時間を用いて解析することもできる。図 17A にアミノ酸（トリプトファン（Trp）とリジン（Lys）の混合物）の T_1 緩和時間（A）と A にタンパク質（BSA）を加えたときの T_1 緩和時間（B）を示した。

4.1.2 T_2 緩和時間

T_2 緩和時間は横緩和時間とも言い、横緩和またはスピン-スピン緩和と呼ばれる時定数である⁴⁾。磁化ベクトルの横軸成分が指数関数的に減衰して、熱平衡状態に

(A)

F2 [ppm]	T1 [s]
7.666	2.62
7.646	2.50
7.471	5.12
7.451	5.06
7.240	6.73
7.224	2.77
7.221	2.68
7.207	2.81
7.204	2.74
7.186	2.73
7.183	2.66
7.139	2.45
7.137	2.38
7.119	2.47
7.117	2.51
7.102	2.53
7.100	2.38
3.996	2.79
3.983	2.82
3.975	2.82
3.963	2.82
3.691	2.87
3.675	3.04
3.660	2.94
3.434	0.749
3.423	0.592
3.396	0.705
3.384	0.649
3.257	0.717
3.237	0.688
3.219	0.817
3.199	0.719
2.963	1.33
2.944	1.36
2.925	1.35

(B)

F2 [ppm]	T1 [s]
7.665	2.24
7.645	2.25
7.470	3.72
7.450	3.57
7.240	4.47
7.223	2.44
7.203	2.28
7.185	2.21
7.138	2.06
7.118	2.05
7.100	2.02
3.995	1.98
3.982	1.96
3.975	1.94
3.962	1.87
3.691	2.16
3.675	2.43
3.660	2.10
3.628	0.635
3.435	0.610
3.423	0.578
3.397	0.640
3.384	0.657
3.257	0.724
3.237	0.676
3.219	0.688
3.199	0.638
2.963	1.17
2.944	1.21
2.925	1.15
1.834	1.05
1.826	0.798
1.818	0.778
1.801	0.794
1.686	0.994

図 17 T_1 緩和時間の解析

Trp と Lys の混合物の T_1 緩和時間（A）と A に BSA を加えたときの T_1 緩和時間（B）を示した。Lys の T_1 緩和時間は A と B の両者において、ほとんど変化がなかった。Trp の T_1 緩和時間は B は A より短くなった。これらの観察から Trp は BSA に結合し、Lys は BSA に結合していないと考えられた。

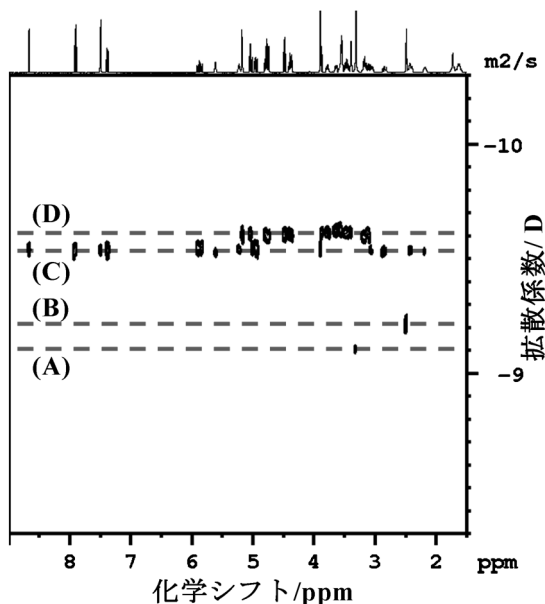


図 18 キニーネとスクロースの混合物の DOSY スペクトル
拡散係数の違いを利用して混合物から水 (A)、DMSO
溶媒 (B)、キニーネ (C) およびスクロース (D) を分
離した。

近づいていく過程のことである。NMR の分離能を利用
して、 T_1 緩和時間と同じように、原子一つ一つの T_2
緩和時間を調べることができる。

また、 T_2 緩和時間がわかると FID の取り込み時間の
参考となる。低分子の場合、 $T_2 \approx T_1$ となる。

4・2 拡散係数の解析

DOSY (Diffusion-Ordered Spectroscopy) 法と呼ば
れる。DOSY スペクトルを測定することにより、拡散
係数を求めることができる²⁰⁾。NMR 試料管において、
鉛直方向の運動性を議論できる。混合物の場合、拡散係
数の違いによりシグナルを分離できる。同じ分子であっ
ても、分子が伸びているか、または、丸まっているか推
測することができる。図 18 にキニーネとスクロースの
混合物の DOSY スペクトルを示した。

5 おわりに

本稿では種々の NMR スペクトルについて説明した。
シグナルを誤りなく帰属するために、いろいろな 1D や
2D スペクトルを測定して、シグナルの帰属を再確認し
ていく。シグナルの帰属が完了すると、これを用いて化
合物の同定や定量分析をすることができる。また、立体
構造、分子間の相互作用、または、ダイナミクスを解析
することができる。

本稿で紹介しきれない NMR 実験が多く存在し、ま
た、今なお新しい実験が開発されている。私たちは数多
くの NMR 実験の中から、自身の試料を解析するために
適切なパルスシーケンスを選ぶ必要がある。また、複数

個の NMR スペクトルを測定する際に、スペクトルごと
の感度の高さやスペクトルから得られる情報量の多さを
加味して、測定の順番を決めることになる。

NMR 分光計とソフトウェアの進歩により、ほとんど
すべての NMR 実験を簡便に測定できるようになってき
ている。最近では、ブルカー社製ソフトウェア Top-
Spin に、機械学習を取り入れた位相補正、ベースライ
ン補正や積分範囲の検出を実装するようになった。これ
らは定量分析をする際に留意すべき処理であるが、自動
で再現性の高い結果を得られるようになる。また、位相
補正やベースライン補正が難しい多核 NMR スペクトル
において威力を発揮する。ハードウェアとソフトウェア
のさらなる改善は我々 NMR メーカーの責務である。

ユーザーにもできることがある。測定に適切なサンプ
ルの濃度、溶媒、温度などを検討することである。
NMR はこれらの条件を容易に変化させることができる
ので、生体分子の生理的な条件で測定したり、合成ポリ
マーなどの材料をそれらの機能を発揮する条件で測定し
たりすることができる。ここが NMR の面白いところな
のである。今後も様々な分野で NMR が活躍することを
期待する。

文 献

- 1) S. Akoka, L. Barantin, M. Trierweiler : *Anal. Chem.*, **71**, 2554 (1999).
- 2) D. M. Doddrell, D. T. Pegg, M. R. Bendall : *J. Magn. Reson.*, **48**, 323 (1982).
- 3) R. Burger, P. Bigler : *J. Magn. Reson.*, **135**, 529 (1998).
- 4) S. Meiboom, D. Gill : *Rev. Sci. Instrum.*, **29**, 688 (1958); A. Abragam : *"Principles of Nuclear Magnetism"*, p.15 (1961), (Clarendon Press, Oxford).
- 5) P. J. Hajduk, E. T. Olejniczak, S. W. Fesik : *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 12257 (1997).
- 6) A. Vulpetti, U. Hommel, G. Landrum, R. Lewis, C. Dalvit : *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 12949 (2009).
- 7) D. Wu, A. Chen, C. S. Johnson Jr. : *J. Magn. Reson.*, **A115**, 260 (1995).
- 8) P. C. M. Zijl, C. T. W. Moonen : *J. Magn. Reson.*, **87**, 18 (1990).
- 9) W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst : *J. Chem. Phys.*, **64**, 2229 (1976).; K. Nagayama, A. Kumar, K. Wuethrich, R. R. Ernst : *J. Magn. Reson.*, **40**, 321 (1980).
- 10) A. Bax, D. G. Davis : *J. Magn. Reson.*, **65**, 355 (1985).
- 11) A. Bax, R. Freeman, S. P. Kempell : *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 4849 (1980); A. Bax, R. Freeman, T. A. Frenkiel : *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 2102 (1981); J. Buddrus, H. Bauer : *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **26**, 625 (1987).
- 12) J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann, R. R. Ernst : *J. Chem. Phys.*, **71**, 4546 (1979); D. Neuhaus, M. P. Williamson : *"The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis"*, (1989) (VCH, New York); R. Wagner, S. Berger : *J. Magn. Reson.*, **A123**, 119 (1996).
- 13) G. M. Clore, A. M. Gronenborn : *J. Magn. Reson.*, **48**, 402 (1982).
- 14) A. Bax, D. G. Davis : *J. Magn. Reson.*, **63**, 207 (1985); M.

- Rance : *J. Magn. Reson.*, **74**, 557 (1987); J. Cavanagh, J. Keeler : *J. Magn. Reson.*, **80**, 186 (1988).
- 15) G. Bodenhausen, D. J. Ruben : *Chem. Phys. Lett.*, **60**, 185 (1980); A. L. Davis, J. Keeler, E. D. Laue, D. Moskau : *J. Magn. Reson.*, **98**, 207 (1992).
- 16) W. Willker, D. Leibfritz, R. Kerssebaum, W. Bermel : *Magn. Reson. Chem.*, **31**, 287 (1993).
- 17) A. Bax, R. H. Griffey, B. L. Hawkins : *J. Magn. Reson.*, **55**, 301 (1983).
- 18) H. Kogler, O. W. Sorensen, G. Bodenhausen, R. R. Ernst : *J. Magn. Reson.*, **55**, 157 (1983); A. Bax, M. F. Summers : *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 2093 (1986); R. E. Hurd, B. K. John : *J. Magn. Reson.*, **91**, 648 (1991).
- 19) R. L. Vold, J. S. Waugh, M. P. Klein, D. E. Phelps : *J. Chem. Phys.*, **48**, 3831 (1968).
- 20) D. Wu, A. Chen, C. S. Johnson Jr. : *J. Magn. Reson.*, **A115**, 260 (1995).



佐藤 一 (Hajime SATO)
 ブルカージャパン株式会社 (〒221-0022
 横浜市神奈川区守屋町3-9)。博士 (理
 学)。《現在の研究テーマ》高分子の
 NMR解析。《趣味》わかさぎ釣り和田園
 風景の中の自転車乗り。
 E-mail : hajime.sato@bruker.com

会社ホームページ

URL : www.bruker.com

関連製品ページ

URL : <https://www.bruker.com/ja/products-and-solutions/mr.html>

原稿募集

「技術紹介」の原稿を募集しています

対象：以下のような分析機器、分析手法に関する紹介・解説記事

- 1) 分析機器の特徴や性能および機器開発に関わる技術、
- 2) 分析手法の特徴および手法開発に関わる技術、
- 3) 分析機器および分析手法の応用例、
- 4) 分析に必要な試薬や水および雰囲気などに関する情報・解説、
- 5) 前処理や試料の取扱い等に関する情報・解説・注意事項、
- 6) その他、分析機器の性能を十分に引き出すために有用な

情報など

新規性：本記事の内容に関しては、新規性は一切問いません。新規の装置や技術である必要はなく、既存の装置や技術に関わるもので構いません。また、社会的要求が高いテーマや関連技術については、データや知見の追加などにより繰り返し紹介していただいても構いません。

お問い合わせ先：

日本分析化学会『ぶんせき』編集委員会
 [E-mail : bunseki@jsac.or.jp]