

機器分析特論

核磁気共鳴分光法

NMR2010

工学研究科生物応用化学専攻 前田史郎

本日のトピックス

- (1) NMRって何？
- (2) NMR装置ってどんなもの. 日本最大の装置は？世界最大は？
- (3) NMRの基礎
- (4) 固体NMRの材料科学への応用

1

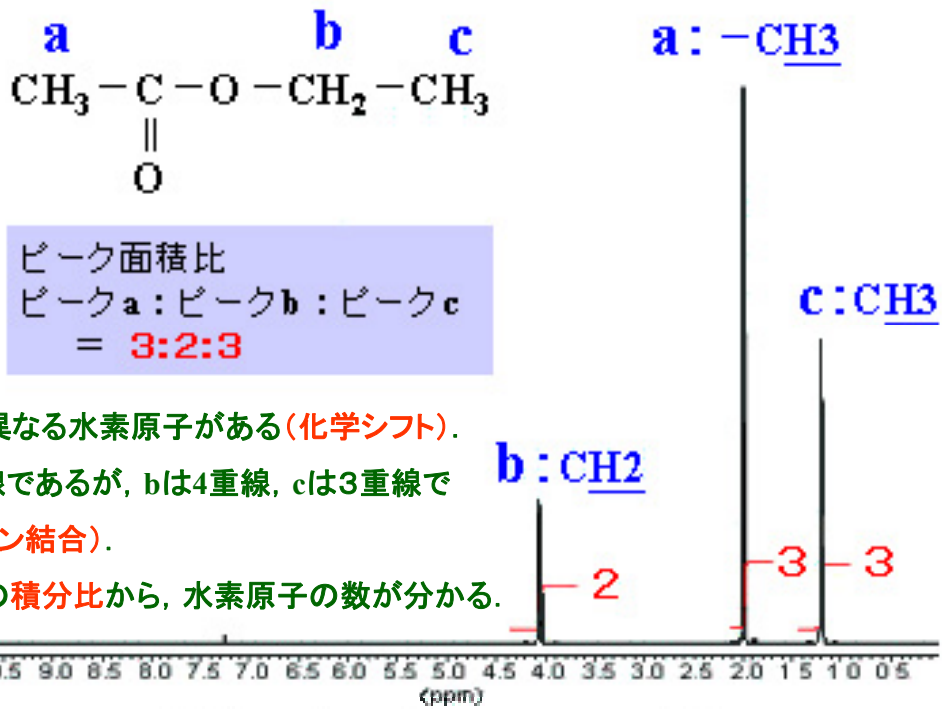
核磁気共鳴(NMR)分析装置

核磁気共鳴(NMR)は医学, 物理学, 生物学, 化学など幅広い分野で利用されているが, 本授業では主に分子構造解析を主目的とした高分解能NMRについて解説します.

核磁気共鳴は, 磁場中に置かれた原子核スピんに電磁波を照射するとエネルギー準位間の遷移が生じる現象である. 現在では, 超伝導磁石を用いることが多く, NMR装置の名称として磁場強度を用いて, たとえば23T(テスラ, $1\text{T}=10^4\text{G}$)装置などと呼ぶが, 分析用NMR装置は, 慣習として, 水素原子核 ^1H (プロトン)の共鳴周波数を用いる. たとえば, 福井大学には, 500MHzおよび300MHz液体NMR装置と300MHz固体NMR装置の3台が設置されている.

2

溶液NMRスペクトルとは, どんなものか



- (1) 3種類の異なる水素原子がある(化学シフト).
- (2) aは単一線であるが, bは4重線, cは3重線である(スピン結合).
- (3) 各ピークの積分比から, 水素原子の数が分かる.

酢酸エチルの ^1H NMRスペクトル

3

^1H NMR (NON)

Fig.2-1 に ^1H NMR のパルス系列を示す. 1 回 90° パルスをかけ, すぐに FID を取り込んでいる. ^1H NMR スペクトルからは, 化学シフト値, J_{HH} 値, 積分値(相対強度比)が得られる.

磁場中に置かれた原子核に, 共鳴周波数のラジオ波パルス照射して得られる自由誘導減衰信号(FID)をフーリエ変換すると核磁気共鳴スペクトル(NMRスペクトル)が得られる.

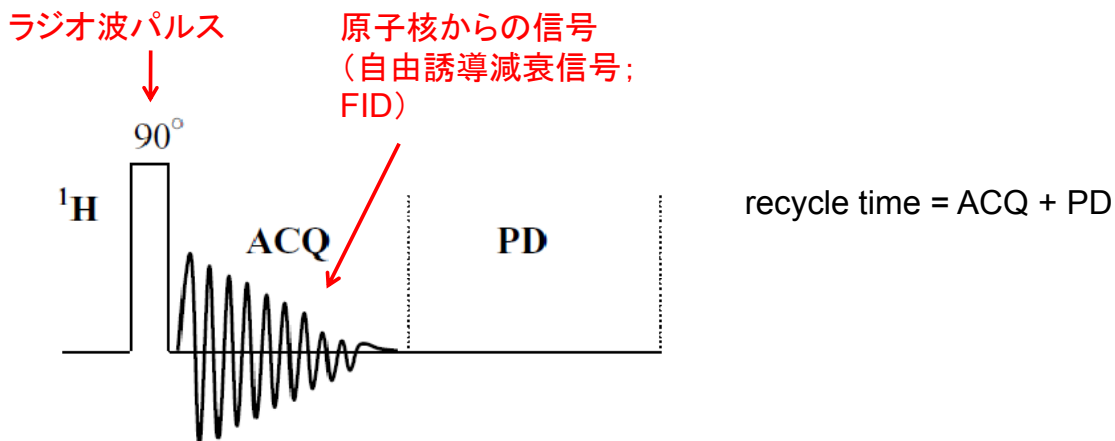
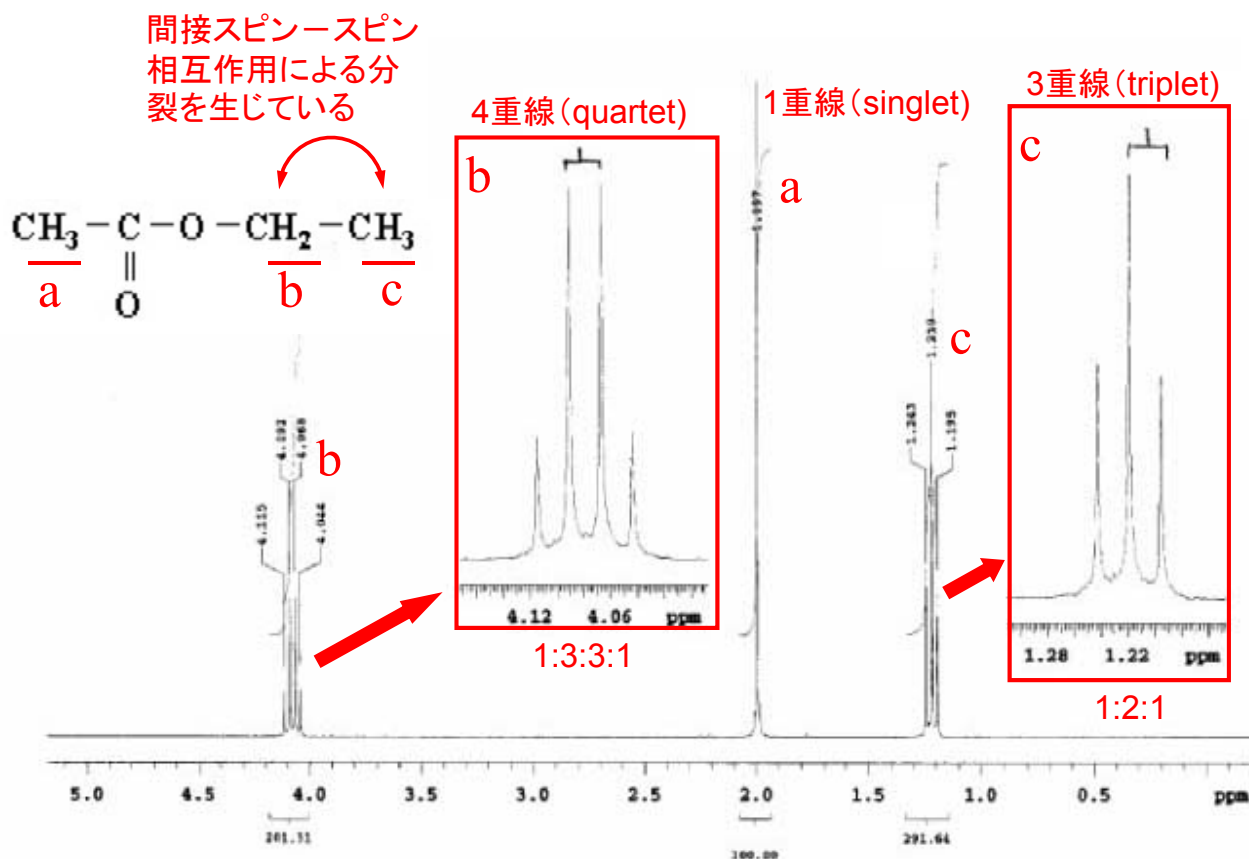


Fig.2-1 Pulse sequence of ^1H NMR. (NON)

4



酢酸エチル CH₃COOCH₂CH₃ の¹H NMRスペクトル

5

液体 NMR スペクトルから得られる情報

(1)化学シフト δ ……官能基, 原子団等は特徴的な異なる位置で信号を与える
本来はテンソル量であるが, 液体ではスカラー量である等方平均シフトが測定される. 基準物質の共鳴位置からの相対位置で示す. 通常はテトラメチルシラン (Me₄Si)が基準として用いられる. 化学シフトは静磁場の大きさに比例する.

$$\text{化学シフト } \delta = \frac{V_{\text{sample}} - V_{\text{Me}_4\text{Si}}}{V_{\text{Me}_4\text{Si}}} \times 10^6$$

(2)間接スピンスピン結合 J ……化学結合を通したスピンスピン相互作用のために, 隣の炭素に結合している¹Hの数をnとすると, 吸収線はn+1本に
—例えば, エチル基のCH₃は3本に分裂する. Jは静磁場に関係しない.

(3)積分強度比 ……¹Hの場合は, ¹Hの数の相対比を与える.

6

福井大学産学官連携本部計測・技術支援部NMR装置

(1) フーリエ変換核磁気共鳴分析装置(液体用)



日本電子(株)
LA-500 ;11.7T
 ^1H :500MHz
 ^{15}N (50MHz)~ ^{31}P (202MHz)
(^{13}C :125MHzが含まれる)
1997年2月設置

(2) フーリエ変換核磁気共鳴分析装置(液体用;主に大学院生用)



日本電子(株)
AL-300 ;7.05T
 ^1H :300MHz, ^{13}C :75MHz
(2核専用装置)
2004年2月設置

7

(3) フーリエ変換核磁気共鳴分析装置(固体用)



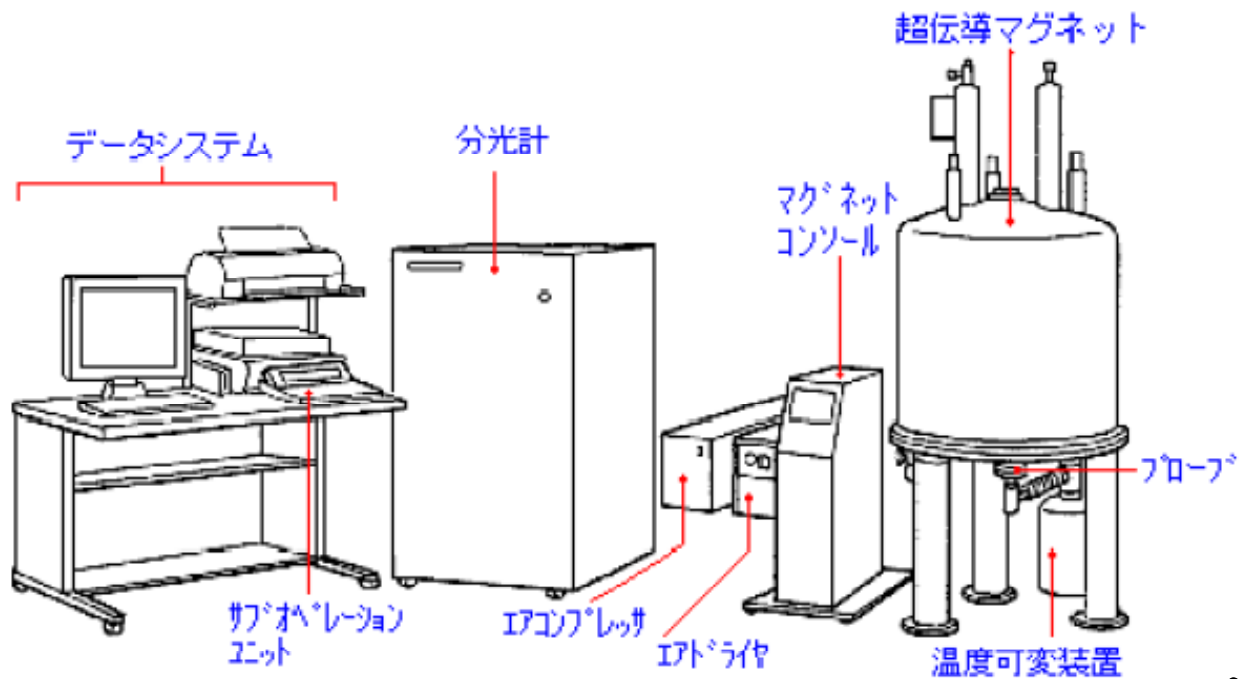
日本電子(株)
(Chemagnetics社, その後
Varian社, 現在はAgilent社)
CMX Infinity 300 ;7.05T
 ^1H :300MHz
 ^{15}N (30MHz)~ ^{31}P (121MHz)
(^{13}C :75MHzが含まれる)
1997年2月設置

8

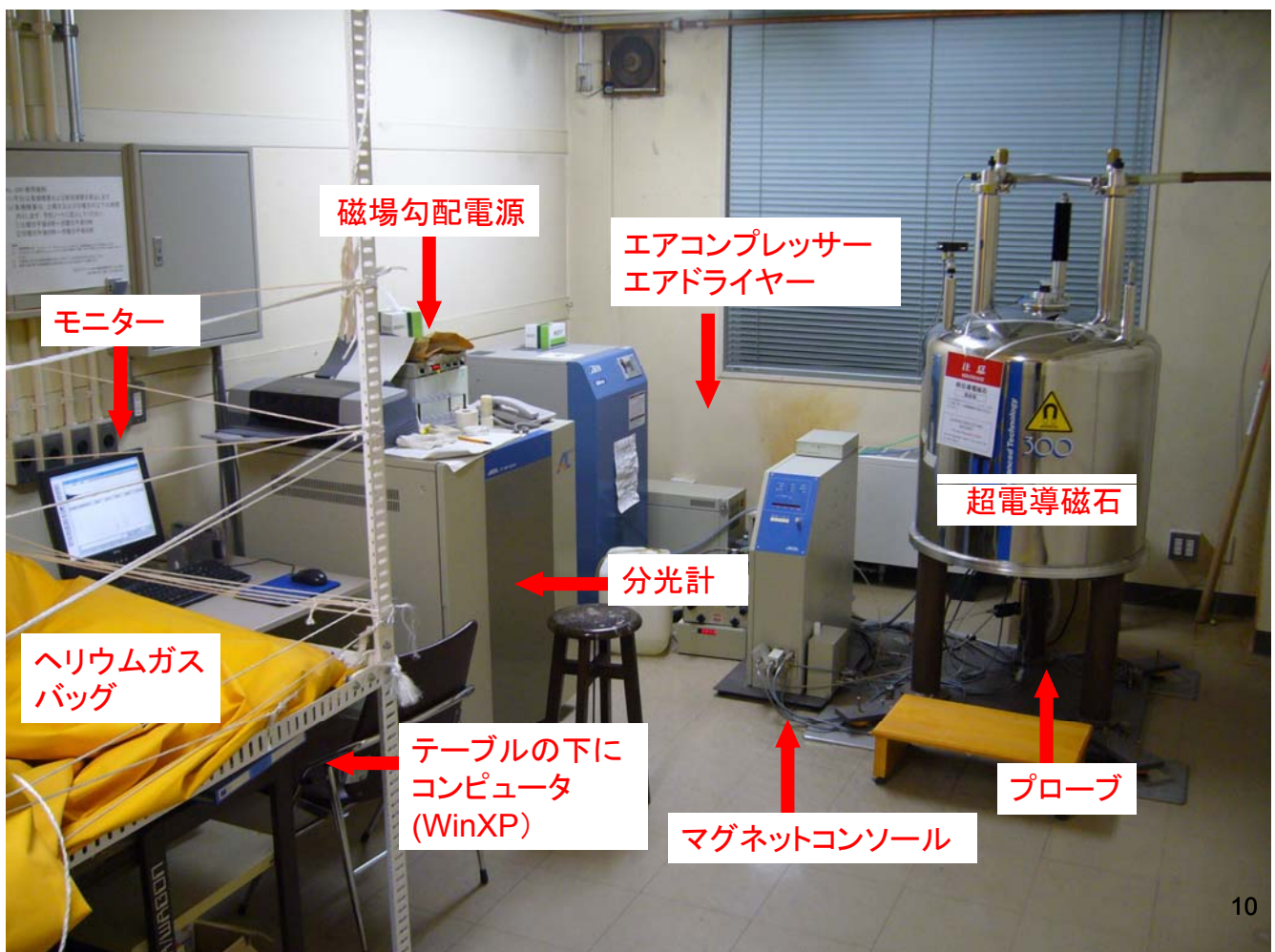
JEOL AL-300 NMR分光計

各部の説明・準備操作

操作に必要なつまみや表示ランプその他を列記しその機能、用途を説明します。

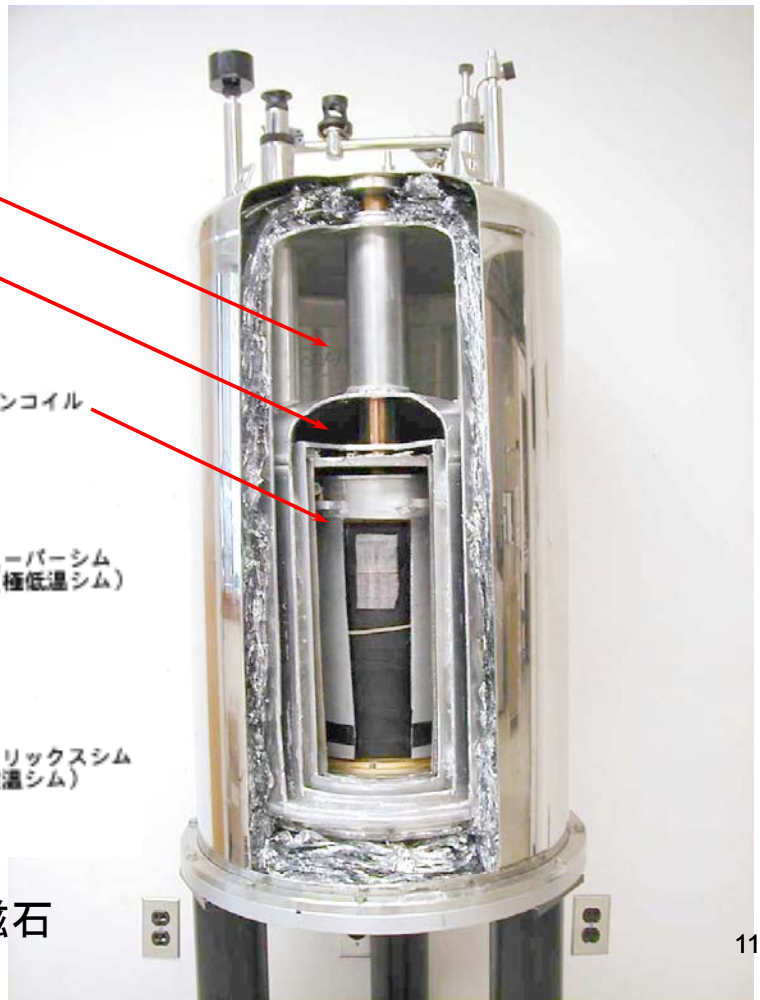
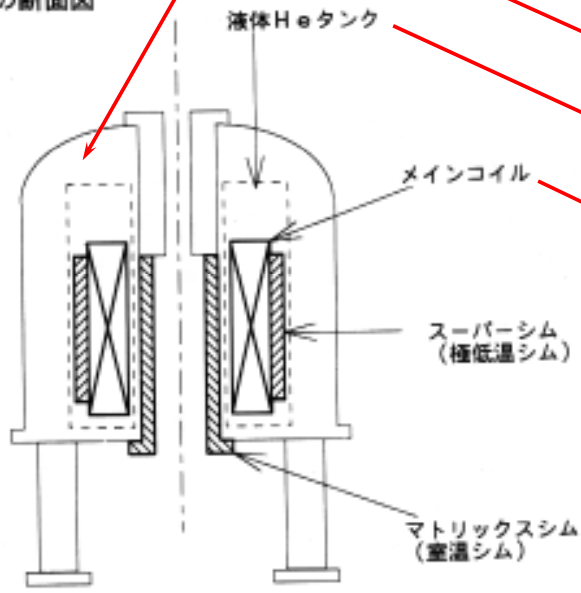


9



10

SCMの断面図



高分解能NMR用超伝導磁石

液体用NMR試料管は外径5mmのガラス管



日本で最大の实用NMR装置は？

茨城県つくば市にある独立行政法人物質・材料研究機構(物材研；NIMS)に、2004年に設置された930MHz固体専用NMR装置(21.9T)が現在実用的に用いられている最大のNMR装置である。



世界で最大の实用NMR装置は？

2009年7月CNRS(フランス)に設置されたBruker社製 AVANCE 1000(1000MHz, 23.5T).



13



茨城県つくば市，独立行政法人物質・材料研究機構(NIMS)にある930MHz固体専用NMR装置(21.9T)．NIMSが理研，日本電子，神戸製鋼の協力で開発した(2004年)．

14



(各試料管: 左は窒化ケイ素製, 右はジルコニア製)

10数億円もする巨大な超伝導磁石の中で測定される試料を入れる試料管は1円玉と同じくらいの大きさです。

例えば,
 外径 2.5mm
 最高回転数 35kHz
 試料体積 $17\mu\text{l}$ ($=0.017\text{cm}^3=17\text{mm}^3$)

外径	6mm	4mm	3.2mm
最高回転数	12kHz	19kHz	24kHz
試料体積	$166\mu\text{l}$	$37\mu\text{l}$	$27\mu\text{l}$

こんなに小さな試料管を用いる理由は、磁場強度が大きくなると化学シフトが大きくなり超高速回転が必要となるからです。

15

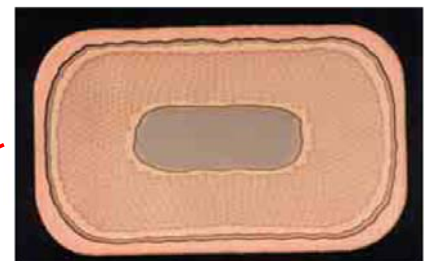
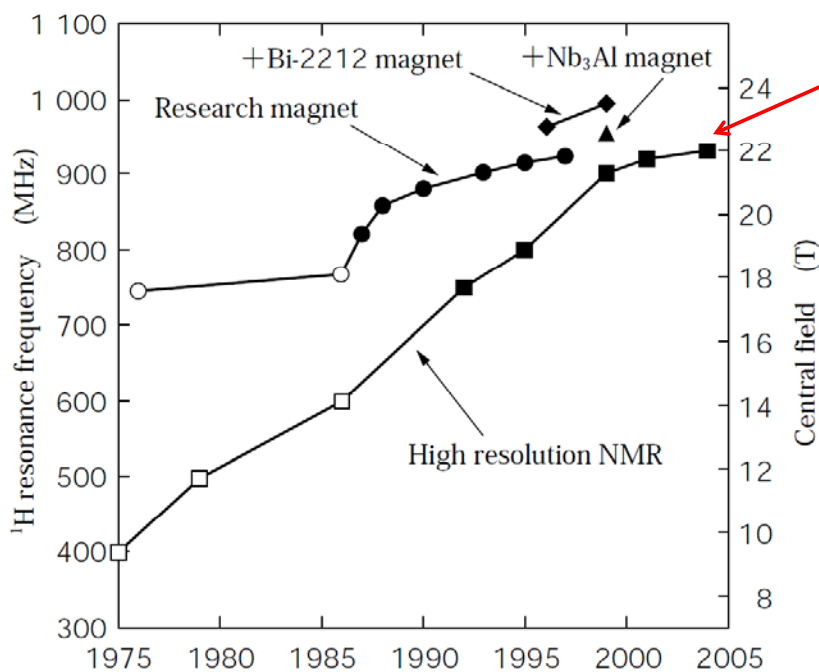
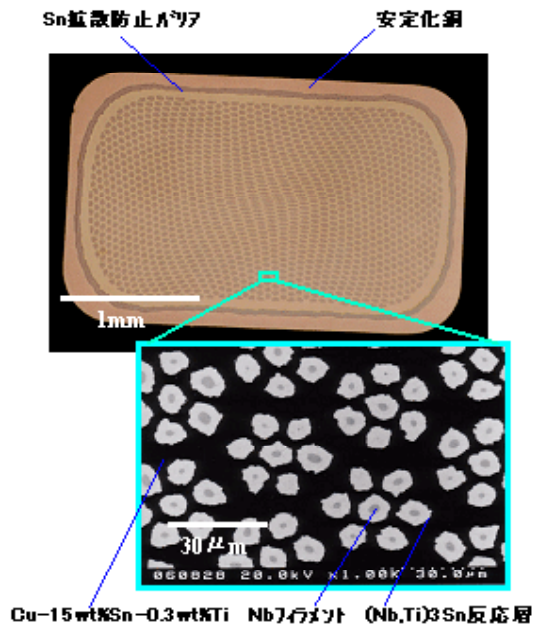


写真1 Ta 補強 Nb₃Sn 線材の断面

図2 超伝導マグネットの磁場変遷



神戸製鋼で製造されている
Ni₃Sn超伝導線材

NIMSで開発中の超1GHzNMR装置

17



NIMS強磁場共用ステーション(930MHz装置と合わせて1つの建屋に入っている). 500MHz固体高分解能NMR装置および270MHz広幅NMR装置など

18



2002年当時，世界最大磁場強度であった920MHz装置（＊）

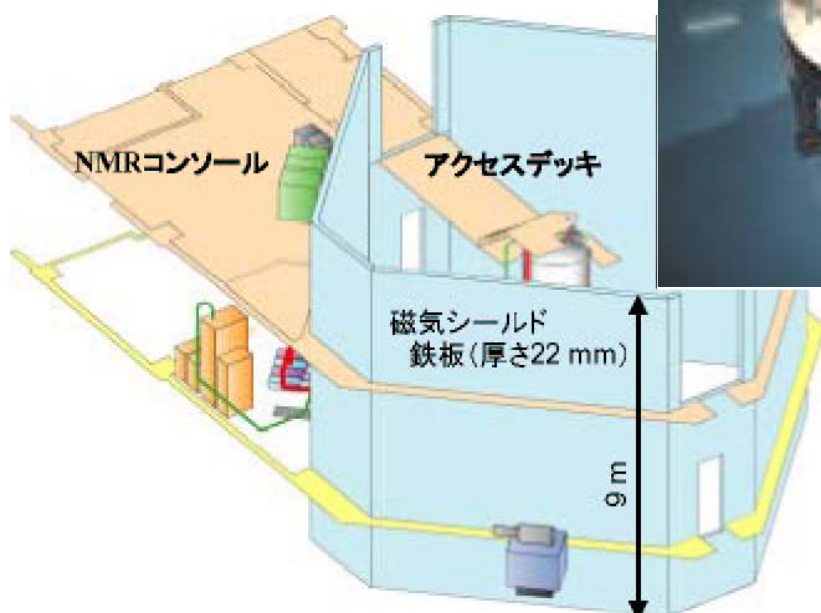


愛知県岡崎市の分子研にある920MHz装置2号機

（＊ 理研と日本電子の協力を得て平成14年8月稼動開始， ）

920MHz装置を設置してある建屋

NMR装置1台のためだけに一棟の建屋が建設されている





2006年当時世界最大の高分解能NMR用超伝導磁石

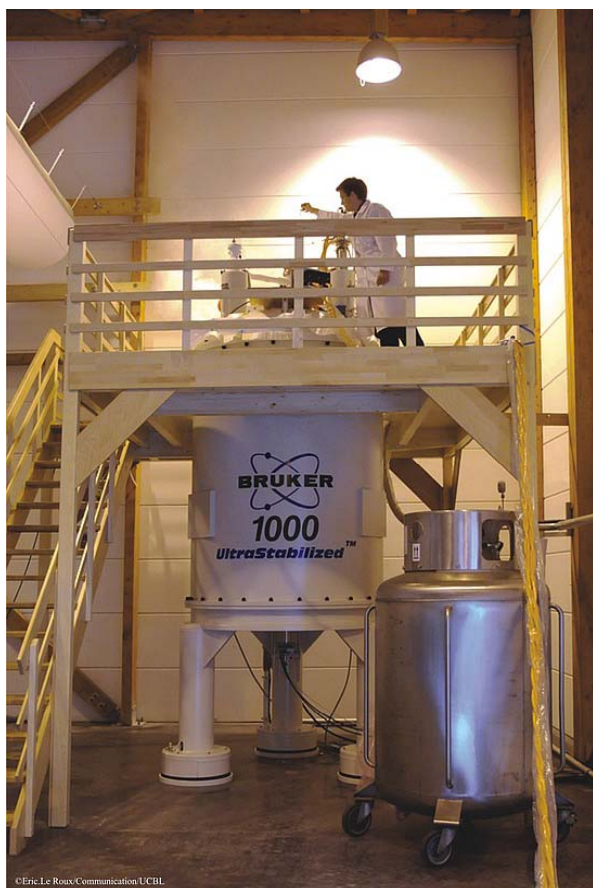
(2006年4月)

Bruker社製 950 US²:22.3T

¹H:950MHz

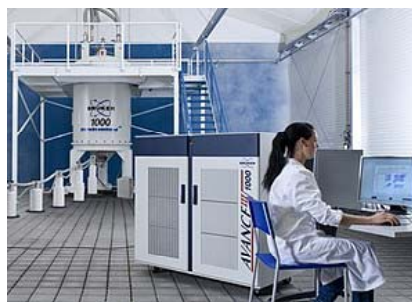
950US²型はアクティブシールドであり, 950US²型装置の設置面積は56m². 一方, シールドなしの950MHz装置の設置面積は334m².

21



最初の1GHzNMR装置
Bruker AVANCE 1000
磁場強度 23.5T
ボアサイズ 54mm
2009年7月CNRSに設置された

納期18-24ヶ月
標準価格 11.7million EUR
\$ 16million (USD)
1USD=JPY100として16億円



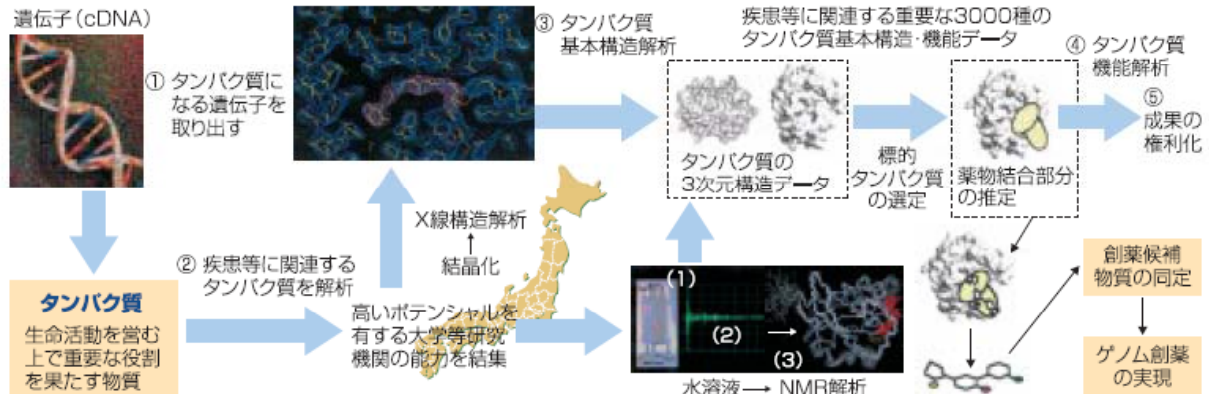
22

タンパク3000プロジェクト

<http://www.mext-life.jp/protein/>

プロジェクトの概要と目的

わが国発のゲノム創薬の実現等を目指し、世界最先端設備（NMR、大型放射光施設等）を駆使し、産官学の研究能力を結集して平成18年度までに生命を司るのに重要なタンパク質のうち1/3に相当する約3000種類以上のタンパク質の基本構造およびその機能の解析を行う。それに基づく薬剤設計や解析結果の特許化等を図ることにより、わが国発のバイオテクノロジーを駆使するゲノム創薬の実現に貢献し、ひいては医薬品生産額の増加や国際協力の強化等によりわが国の経済発展に資する。



プロジェクトの必要性と背景

タンパク質の構造・機能解析は熾烈な国際競争が起こっている分野であり、知的財産に結びつく可能性が高いことから、わが国としても早急に取り組み、進めなければ社会的・経済的にも大きな不利益を生ずることになる。このため、わが国のもてるポテンシャルを最大限に活用するとともに、産官学のセクターを超えた能力を結集し、明確な国家目標の下で効果的・効率的に事業を推進することがきわめて重要である。

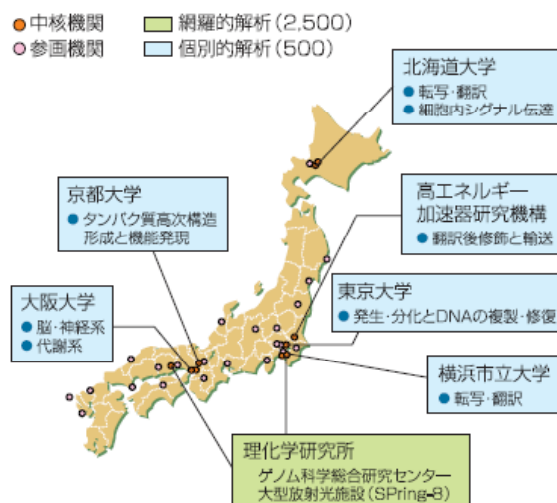
実施体制

中核機関

- 理化学研究所……………網羅的解析
- 北海道大学……………転写・翻訳、細胞内シグナル伝達
- 高エネルギー加速器研究機構……………翻訳後修飾と輸送
- 東京大学……………発生と分化とDNAの複製・修復
- 横浜市立大学……………転写・翻訳
- 京都大学……………タンパク質高次構造形成と機能発現
- 大阪大学……………脳・神経系、代謝系

推進体制

関係機関や産業界から専門家・有識者からなる「タンパク3000プロジェクト推進委員会」を設置し、評価委員会からの助言に基づきプロジェクトの進捗状況、連帯推進および改善方策の提示等を行っている。また、知財・産業連携等、プロジェクト全体に共通する課題等はワーキンググループを設置して横断的に対応している。



PDB (Protein DataBank)

世界中で解析されたタンパク質の立体構造は、国際的なデータベースのPDB (Protein DataBank) に登録され、誰でも無料で利用できる。日本では、日本蛋白質構造データバンク (PDBj; <http://www.pdbj.org>) が、登録とデータのダウンロード、その他の解析サービスを行っている。



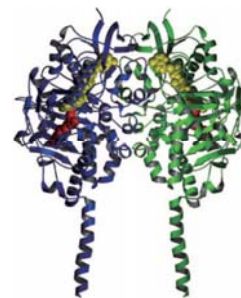
数字で見るタンパク3000プロジェクトの成果

構造解析されたタンパク質の数 (基本構造として)	4517 4187)
PDB 登録数	3923
出願特許数	403
発表論文数	4195

平成 19 年 3 月 31 日時点のデータ



GatA (青色の部分) でつくられたアンモニアが、オレンジ色の通路を通過して GatB (緑色の部分) に達し、グルタミン酸に結合する。



この酵素は、2つの分子 (青色と緑色) が会合して存在している。図の下側に伸びた長い1本のαヘリックスで隣に結合しており、酵素反応は分子の上側で行われる。黄色の球で示したのは補酵素で、赤色の球で示したのは阻害物質。

平成 19 年度から 23 年度

プロジェクトの予算

平成 14 年度から 18 年度までに総額約 580 億円の予算が投じられました。

平成 14 年度	平成 14 年度補正	平成 15 年度	平成 16 年度	平成 17 年度	平成 18 年度	合計
118 億円	91 億円	91 億円	91 億円	98 億円	86 億円	約 580 億円

平成 19 年度	平成 20 年度
55 億円	52 億円



理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター(理研GSC)
(2008年3月に解散した)

http://protein.gsc.riken.go.jp/Research/index_at.html



理研横浜研究所NMRパーク NMR棟



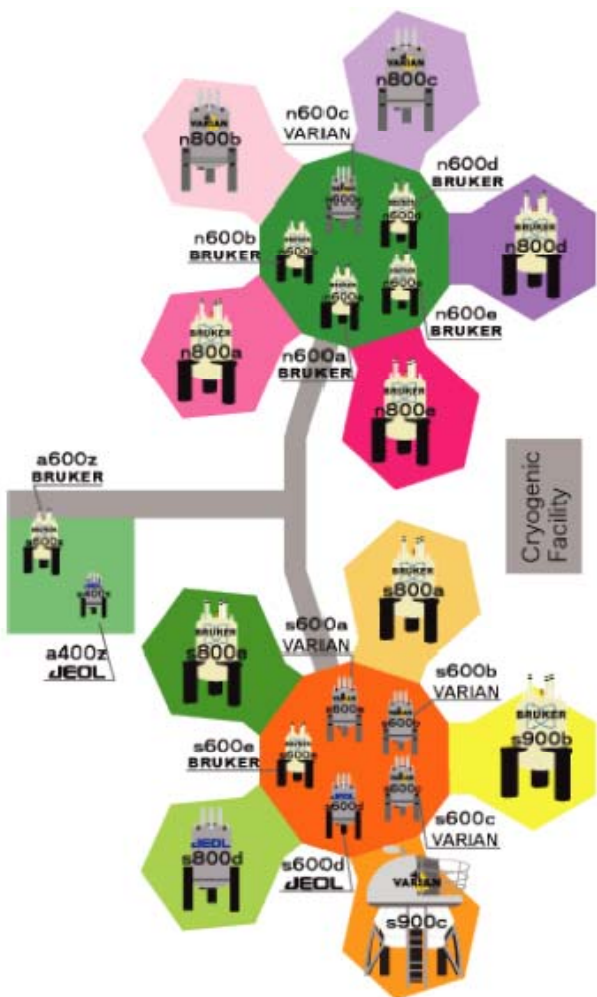


Table 1: The number of the GSC NMR instruments (by frequency)

Frequency (MHz)	
400	1
500	1
600	17 (cryo probe 8 + cold probe 1)
700	6 (cryo probe 2)
800	14 (cryo probe 1 + cold probe 1)
900	2 +1
Total	41 +1

西NMR棟

床面積;4,100m²

各ドームは直径15m,

高さ11.5m.

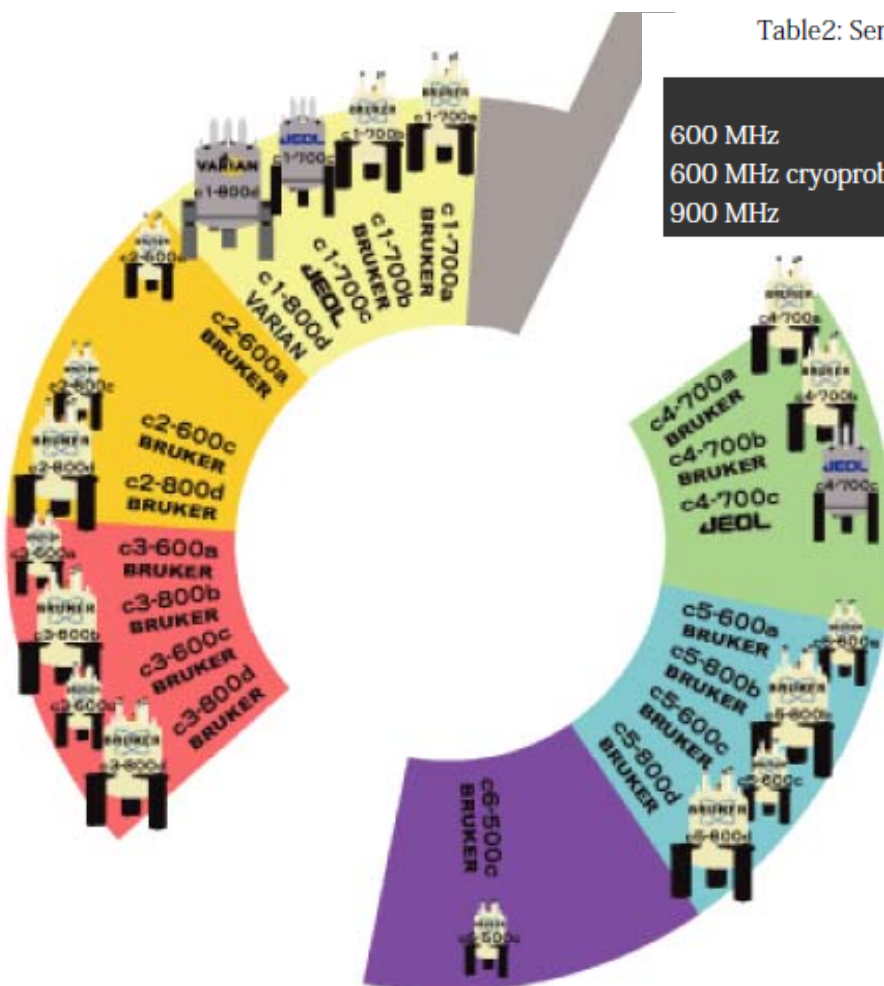


Table2: Sensitivity of NMR instruments

1H sensitivity sample		
600 MHz	1068 : 1	0.1% Ethylbenzene
600 MHz cryoprobe	5156 : 1	0.1% Ethylbenzene
900 MHz	2024 : 1	0.1% Ethylbenzene

中央NMR棟

床面積;2,000m²

直径63m, 高さ7.9m.



Bruker 800MHz

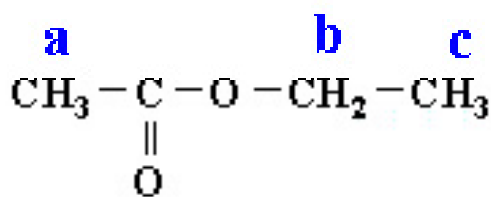


Varian 900MHz



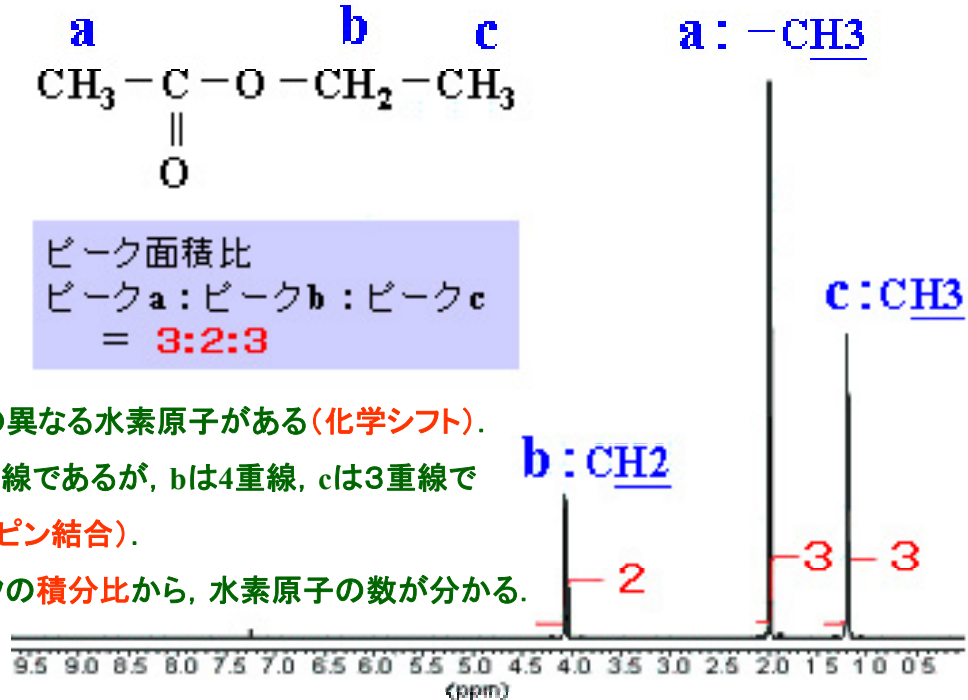


溶液NMRスペクトルとは, どのようなものか



ピーク面積比
 ピークa : ピークb : ピークc
 = **3:2:3**

- (1) 3種類の異なる水素原子がある(化学シフト).
- (2) aは単一線であるが, bは4重線, cは3重線である(スピン結合).
- (3) 各ピークの積分比から, 水素原子の数が分かる.



酢酸エチルの¹H NMRスペクトル

¹H NMR (NON)

Fig.2-1 に ¹H NMR のパルス系列を示す. 1 回 90° パルスをかけ, すぐに FID を取り込んでいる. ¹H NMR スペクトルからは, 化学シフト値, J_{HH} 値, 積分値(相対強度比)が得られる.

磁場中に置かれた原子核に, 共鳴周波数のラジオ波パルス照射して得られる自由誘導減衰信号(FID)をフーリエ変換すると核磁気共鳴スペクトル(NMRスペクトル)が得られる.

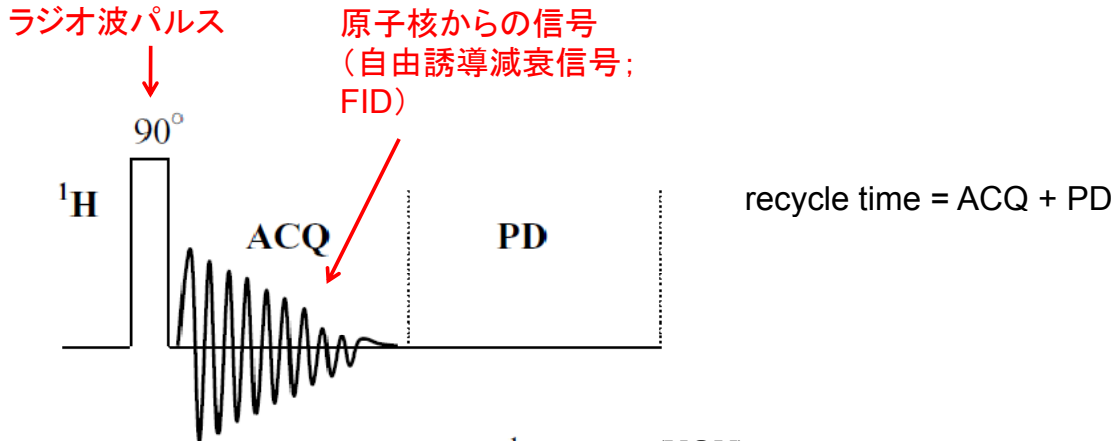
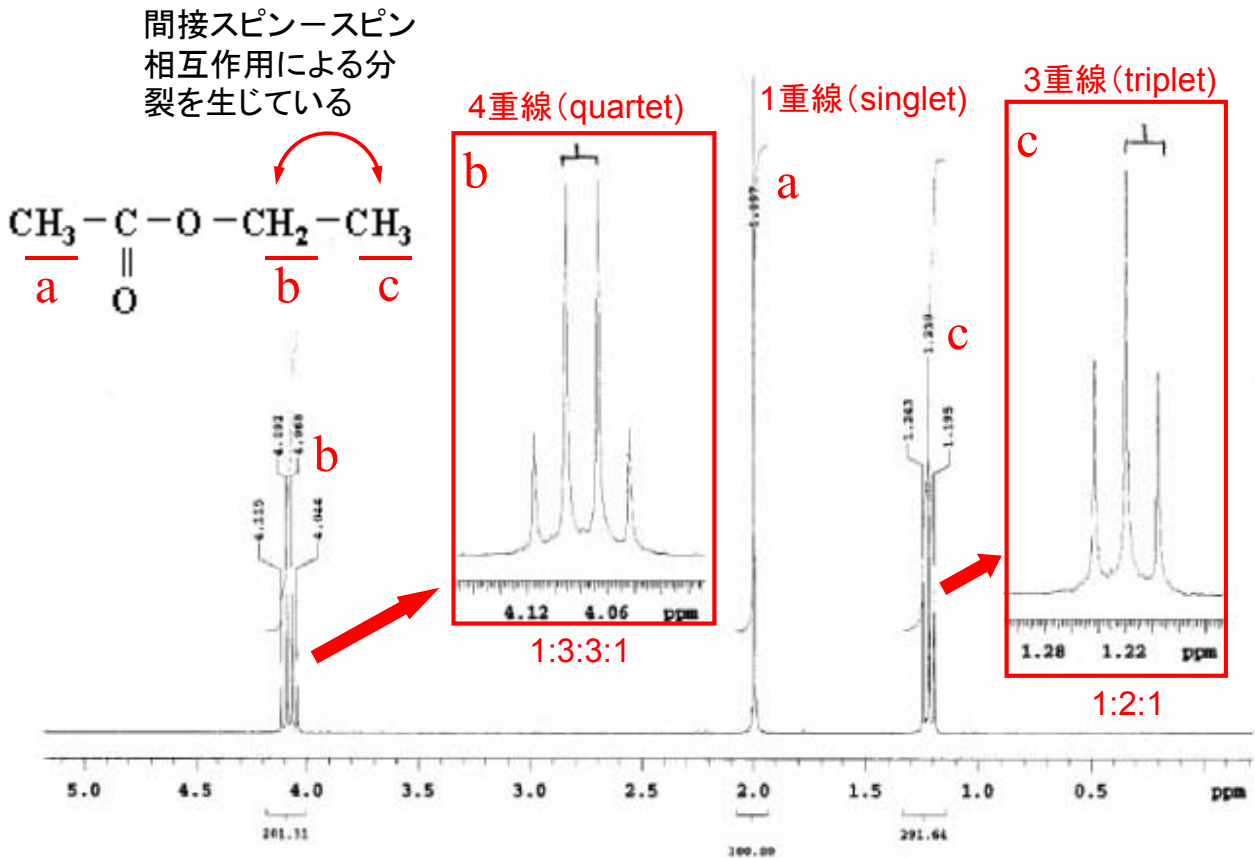


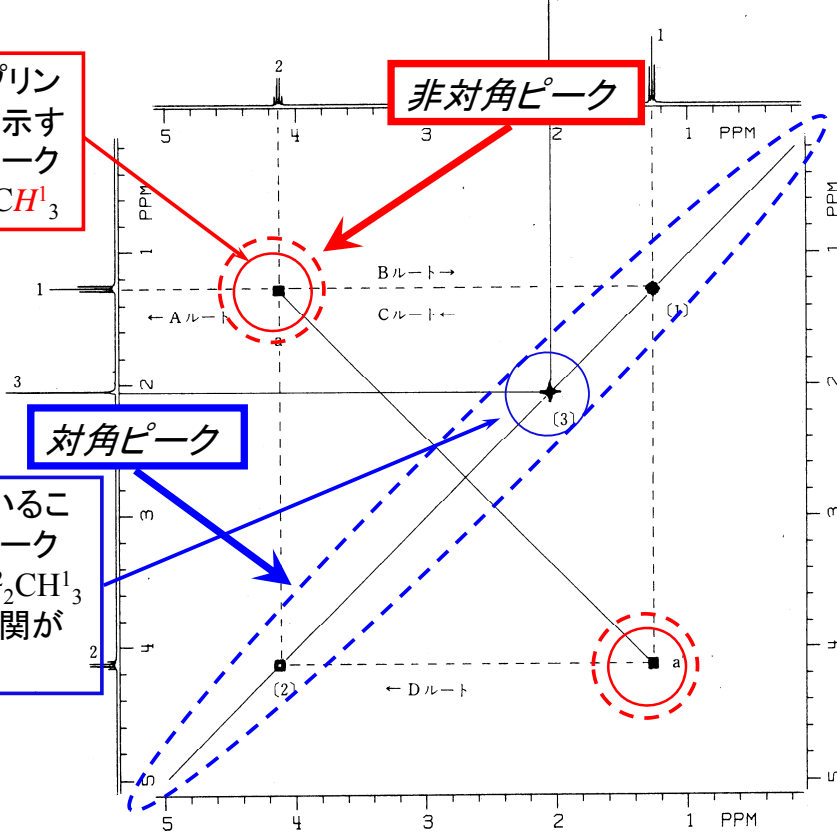
Fig.2-1 Pulse sequence of ¹H NMR. (NON)



酢酸エチル CH₃COOCH₂CH₃ の¹H NMRスペクトル

多次元NMR: 酢酸エチルのCOSY(シフト相関) 2次元NMRスペクトル

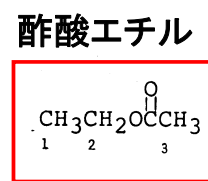
H¹ と H² がカップリングしていることを示す相関(非対角)ピーク
 $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}^1_3$



非対角ピーク

対角ピーク

H³ が孤立していることを示す対角ピーク
 $\text{CH}^3_3\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}^1_3$
 他のピークと相関がない。



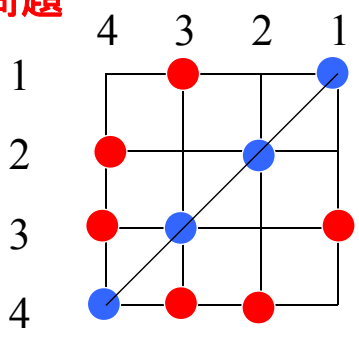
```

COSY (P-TYPE)
NA=3 OR 16.00+0.00 AB--
IB=CH
P2= 7.20 USEC
DF= 1.00 SEC
DB= 580.00 USEC
IB= 580.00 USEC
NA = 16
SIZE = 1024
AT = 286.72 MSEC
QSD ON 1
ABC ON
BUTTERWORTH FILTER ON
DR ATT= 3
ADC = 12 BITS
AI = 8
SM = +/- 092.957
DH = 580
RG = 10 USEC
DE = 580 USEC
TL HIGH POWER ON
F2= 360.006314
BB MODULATION OFF
DF= 994.11
SF= 360.054917

SCALE 89.28 HZ/CM
CONTOUR LEVEL=10
(Y5=13878)
    
```

360MHz ¹H-NMR (CDCl₃)

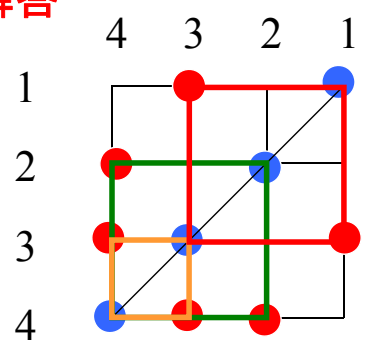
問題



左図のようなCOSY相関パターンから1~4の連鎖はどういうパターンが考えられるか。

● 相関ピーク ● 対角ピーク

解答

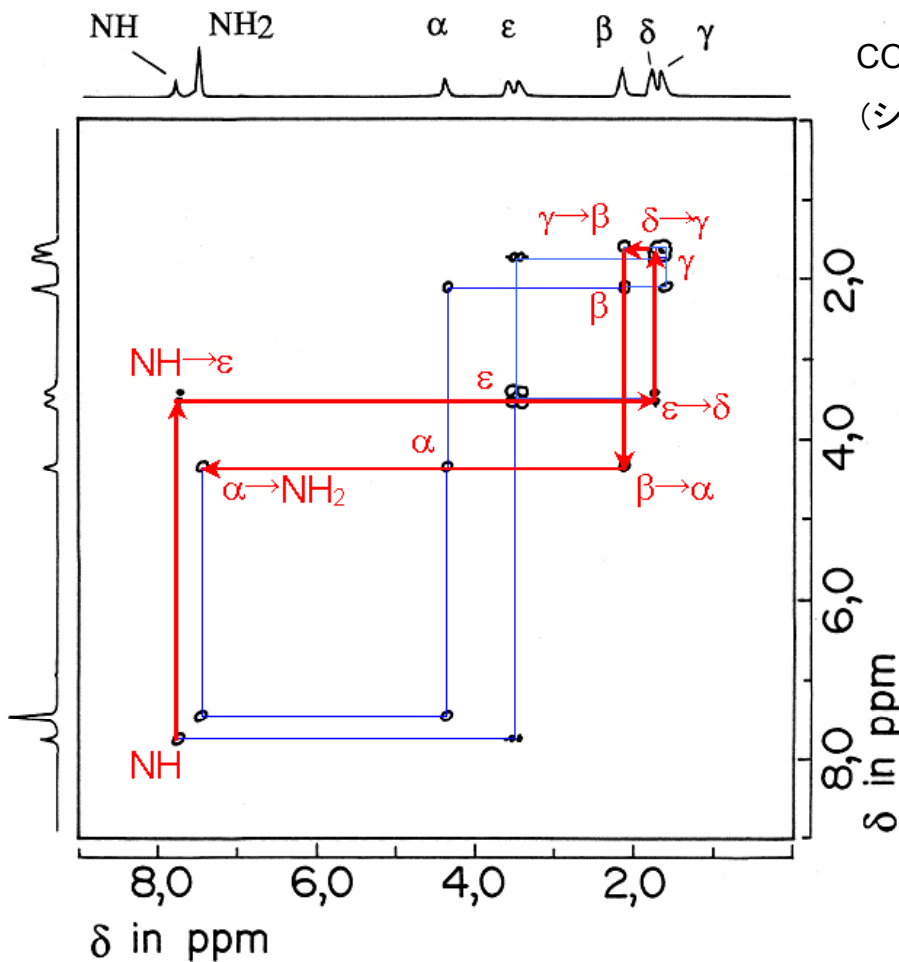


COSY相関は 1-3 2-4 3-4 の3つ。
 これを満足する連鎖は

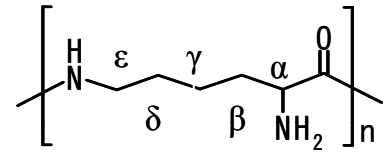
1-3-4-2

の1通りしかない。1-3と3-4のリンクが、4のところで4-2のリンクとつながっている。

COSY相関には端(1と2)がある。



COSY
(シフト相関2次元¹H NMR)



poly(ε-L-Lysine)

放線菌が産出する生分解性高分子。

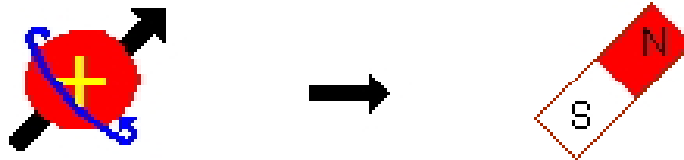
前田史郎他, 高分子加工, 52, 516-522(2003).

S. Maeda, et al., *J. Mol. Struct.* **655**, 149-155(2003).

S. Maeda, et al., *Polym. Bull.*, **53**, 259-267(2005).

NMRの原理

原子核の中には、水素原子核(陽子)のように**小さな磁石としての性質(磁気モーメント)**を持っている原子核がある。このような原子核は、コマのように軸を中心に自転する性質(**スピン**)を持っている。



そして、小さな磁石である原子核を含む分子に磁場を作用させると、分子と磁場の間に磁気的な相互作用が生じ、原子核はいくつかのエネルギー状態を持つようになる。そして、これらの状態間の遷移にともなって電波の吸収が観測される。

質量数 A, 原子番号 Z と核スピン I の関係および代表的な核種

質量数 A	原子番号 Z	核スピン I	核種の例
A が奇数		$I = (2n+1)/2^*$	$^1\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}, ^{19}\text{F}, ^{31}\text{P}$
	Z が奇数	$I = n + 1$	$^2\text{H(D)}, ^{14}\text{N}$
A が偶数			
	Z が偶数	$I = 0$	$^{12}\text{C}, ^{16}\text{O}$

*n=0,1,2,...

I=0 の核種はNMR現象を起こさないのでNMR信号を観測することができない。

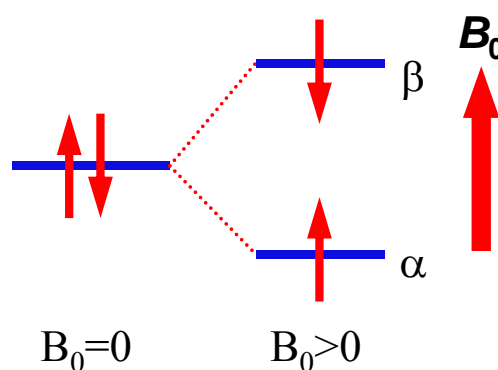
^1H は核スピンI=1/2であり、天然存在比はほぼ100%である。 ^1H は感度が最も高い。

一方、 ^{13}C もI=1/2であるが、天然存在比はほぼ1%である。 ^{13}C は感度が低い。

炭素原子のほぼ99%は、I=0であり、スピンを持たない ^{12}C である。炭素原子全部が ^{13}C なら、複雑なスピン間相互作用のためにスペクトルが解析困難であったらう。

41

スピン $\frac{1}{2}$ の核は 2 つの状態を持ち、“up” または “down” スピンと呼ばれることもあるが、通常は “ α ” または “ β ” スピンと呼ばれる。これらの状態は磁場 (B_0) の中ではエネルギーが異なるが、磁場がない状態では縮重している。



$$I_z |\alpha\rangle = -\frac{1}{2} \hbar |\alpha\rangle$$

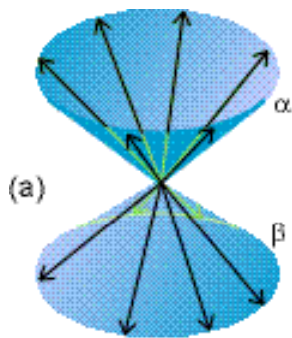
$$I_z |\beta\rangle = \frac{1}{2} \hbar |\beta\rangle$$

$$\mathbf{I} \cdot \mathbf{I} |\alpha\rangle = \hbar^2 [I(I+1)] |\alpha\rangle$$

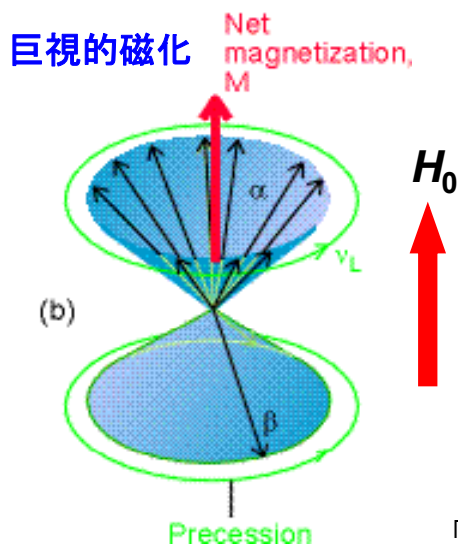
$$\mathbf{I} \cdot \mathbf{I} |\beta\rangle = \hbar^2 [I(I+1)] |\beta\rangle$$

α スピンと β スピンはエネルギーは異なるが、角運動量の大きさは等しい。

42



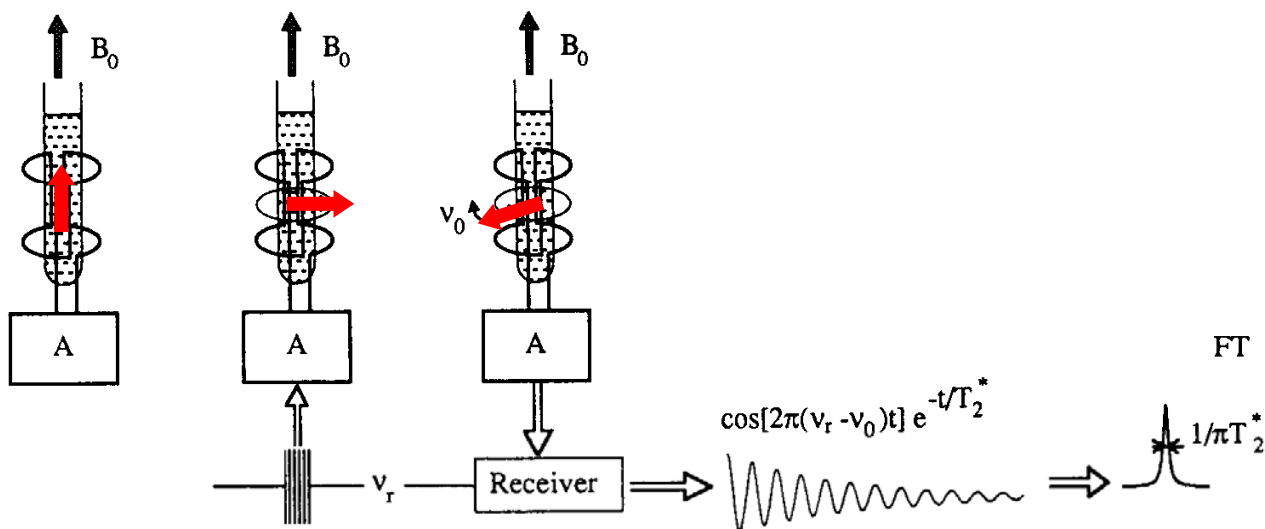
- (a) 外部磁場 H_0 がない場合、 α スピンと β スピンが等しい数だけ存在し、外部磁場方向である z 軸周りの角度はばらばらであり、磁化はゼロである。
(量子化軸が存在しないので、正確には、 α スピンと β スピンの区別はない)



- (b) 外部磁場 H_0 があるとき、スピンはそのコーンに沿って才差運動する。そして、 α と β の状態の間にエネルギー差が存在する。 α スピンは β スピンとくらべると g ごとくわずかに多い。その結果、 z 軸方向に正味の巨視的磁化が現れる。

スピンの核からなる試料の磁化は、それぞれの磁気モーメントの合成である。

「アトキンス物理化学」, 東京化学同人, 図18-27 (第6版, 1980)



(1) 試料を磁石の中に入れて磁化させる。

(2) 試料の磁化と直角に 90° パルスを加えて、磁化を横向き (x, y 面内) にする。

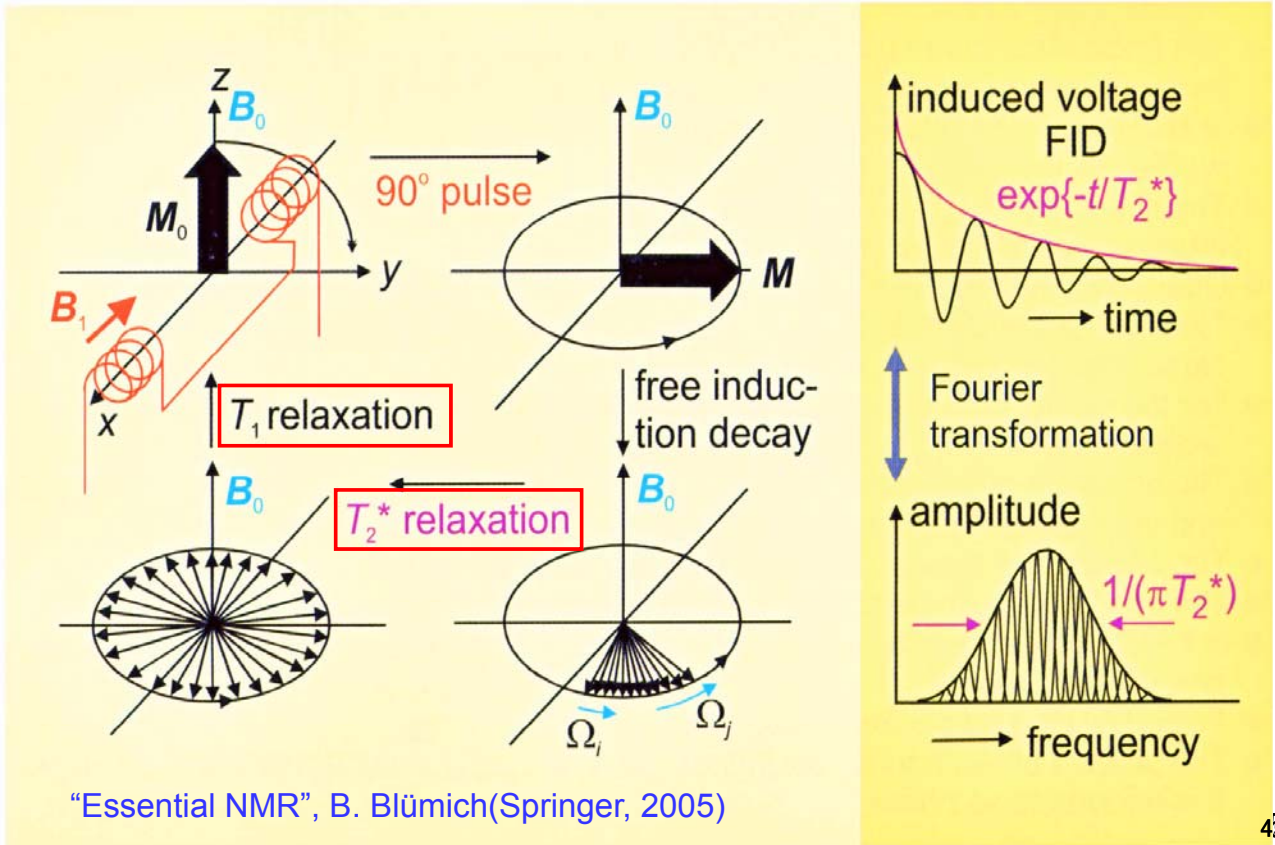
(3) 試料の磁化が x, y 面内を回転する。検出コイルを横切るたびにコイルに誘起起電力が生じる。

(4) 時定数 T_2 で指数関数的に減衰する信号が検出コイルで感知される。

(5) フーリエ変換して周波数スペクトルに変換する。

Fourier NMR

下図は回転座標系で表わされているのでコイルと静磁場 B_0 は実際にはないことに注意！



NMRの特徴

(1)感度が低い

低分子量物質で数 mg, 高分子量物質で数十 mg の試料が望ましい。
質量分析やガスクロマトグラフィーに比べて2~3桁感度が低い。

(2)緩和時間が長い

他の分光法に比べて緩和時間が長いので繰り返し測定(積算)に時間がかかる。

(1), (2)のために, 寿命の短い反応中間体や, 不安定な化合物の測定は難しい。

(3)周波数が低いので, コヒーレントな多重パルス実験が容易に実現できる。

種々の相互作用を測定する, さまざまなパルス系列が考案されている

^{13}C 溶液NMRのパルステクニック

(1)種々のデカップリングモード

(2)スペクトル編集

(3)DEPT

47

^{13}C gated decoupling with NOE (^{13}C BCM ; Bilevel CoMplete decoupling)

Fig.2-2 に一般的に用いられる ^{13}C NMR 測定(gated decoupling with NOE)のパルス系列を示す. FID の取り込み時間に ^1H 核をデカップルすることにより ^1H - ^{13}C 間のスピン結合相互作用を無視することができ, 待ち時間の間は ^1H 核に弱いラジオ波を照射することにより NOE (核オーバーハウザー効果 ; nuclear Overhauser effect) による S/N 比の向上を図っている. しかし, ^{13}C の環境によって NOE の大きさが異なるためにシグナル強度に定量性はない.

^{13}C gated decoupling with NOE スペクトルからは, 化学シフトの情報が得られる.

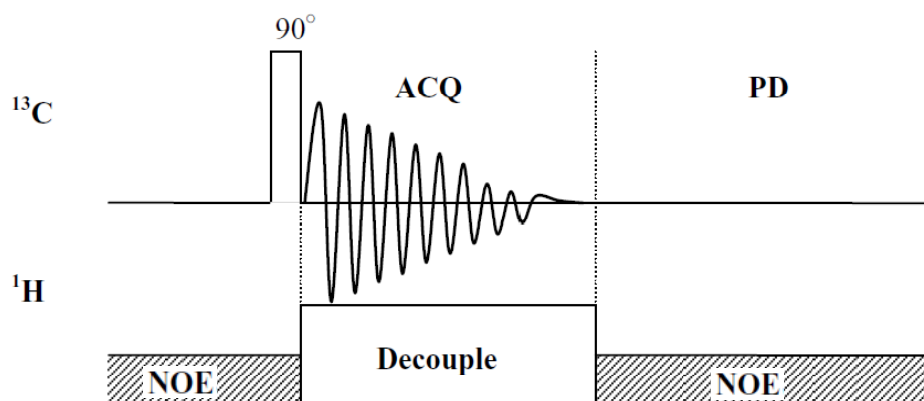


Fig.2-2 Pulse sequence of ^{13}C gated decoupling with NOE (^{13}C BCM).

48

^{13}C inverse gated decoupling without NOE

(^{13}C NNE ; Non Nuclear Overhauser Effect NMR)

Fig.2-3 に ^{13}C inverse gated decoupling without NOE のパルス系列を示す。FID の取り込み時間に ^1H 核をデカップルすることにより ^1H - ^{13}C 間のスピン結合相互作用を無視することができる。gated decoupling with NOE との違いは、待ち時間の間に ^1H にラジオ波を照射していないので NOE による効果がないことである。したがって十分な待ち時間をとることで定量的なスペクトルを得ることができ、gated decoupling with NOE よりも正確な ^{13}C の数を見積もることができる。

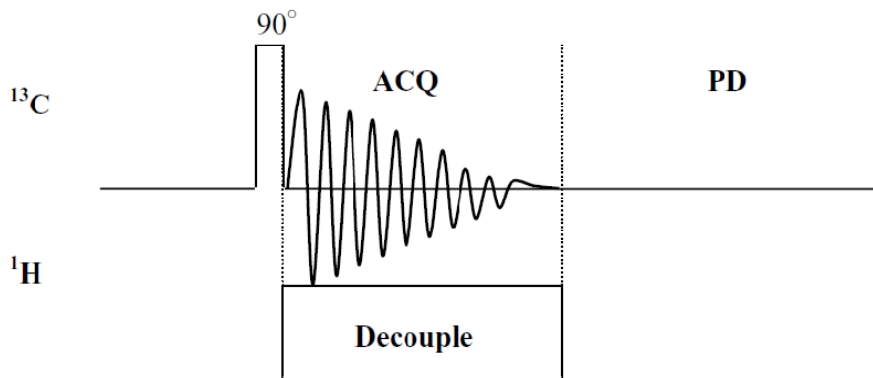


Fig.2-3 Pulse sequence of ^{13}C inverse gated decoupling without NOE (^{13}C NNE).

^{13}C NNE スペクトルからは、化学シフト、積分値より ^{13}C 核の数についての情報が得られる。

49

^{13}C NOE (Nuclear Overhauser Effect) NMR

Fig.2-4 に ^{13}C NOE のパルス系列を示す。FID の取り込み時間に ^1H 核をデカップルしていないので ^1H - ^{13}C 間のスピン結合相互作用に関する情報が得られる。また待ち時間の間 ^1H 核を弱いラジオ波で照射することで NOE による S/N 比の向上を図っている。

得られるスペクトルのシグナルは直接結合している水素数より 1 本多いシグナルに分裂する。

^{13}C NOE スペクトルからは、炭素の多重度、 J_{CH} の値を得ることができる。

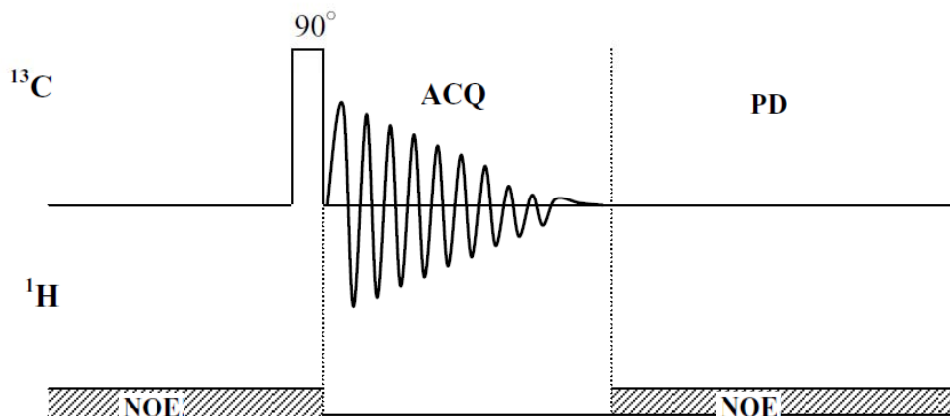
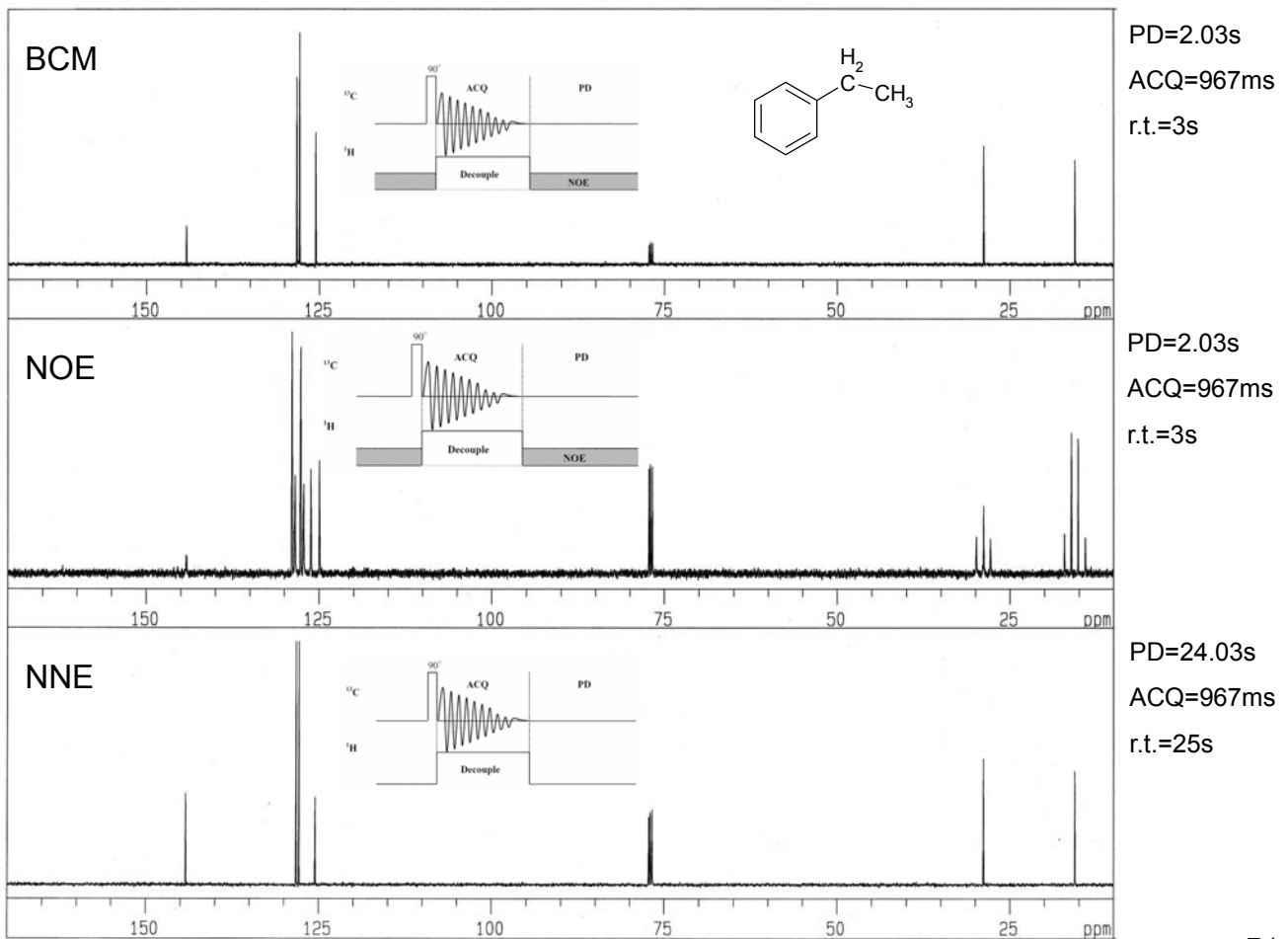


Fig.2-4 Pulse sequence of ^{13}C NOE.

50



51

DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)

Fig.2-5 に DEPT のパルス系列を示す. パルス系列の遅延時間 T_D を $(2J_{CH})^{-1}$ に設定し, θ パルスの幅を調整することで炭素の多重度を区別することができる. 具体的には θ パルスの幅が 45° であるときには, CH_3 , CH_2 , CH は上向きに現れ, θ パルスの幅が 90° であるときには, CH_3 , CH_2 は現れず, CH が上向きに現れ, θ パルスの幅が 135° であるときには, CH_3 , CH は上向きに現れ CH_2 は下向きに現れることで多重度の区別を行う. 多重度を区別する方法にはこの他に, ^{13}C NOE 法やオフレゾナンス法があるが, これらの方法は ^{13}C スペクトルのシグナルの分裂数によって多重度を区別するため, 何らかの理由で ^{13}C のシグナルが複雑に重なっているときには有効に使用することができない. またシグナルの分裂により S/N 比が低下するために測定時間が長くなる. しかし DEPT ではシグナルの符号によって多重度を区別するため, このような条件でも有効に使用することができる.

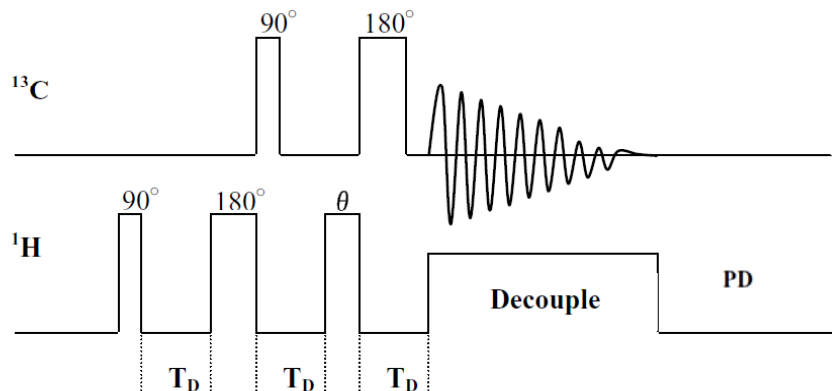


Fig.2-5 Pulse sequence of DEPT.

52

DEPT

CH : $Sx \sin\theta$

CH₂ : $Sx \sin\theta \cos\theta$

CH₃ : $Sx \sin\theta \cos^2\theta$

(θはパルスのフリップアングル)

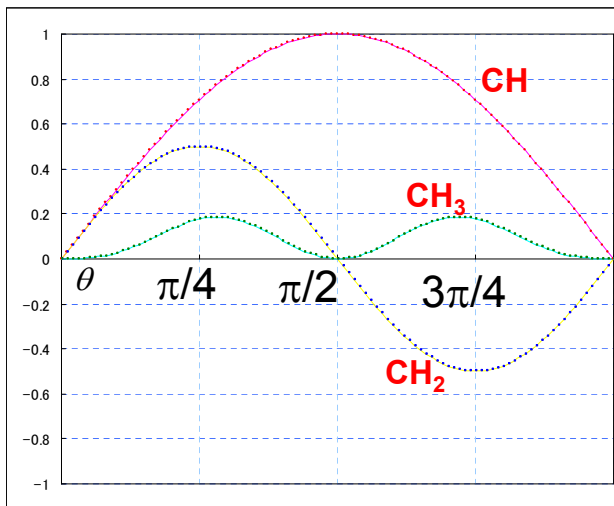
θ

45° 90° 135°

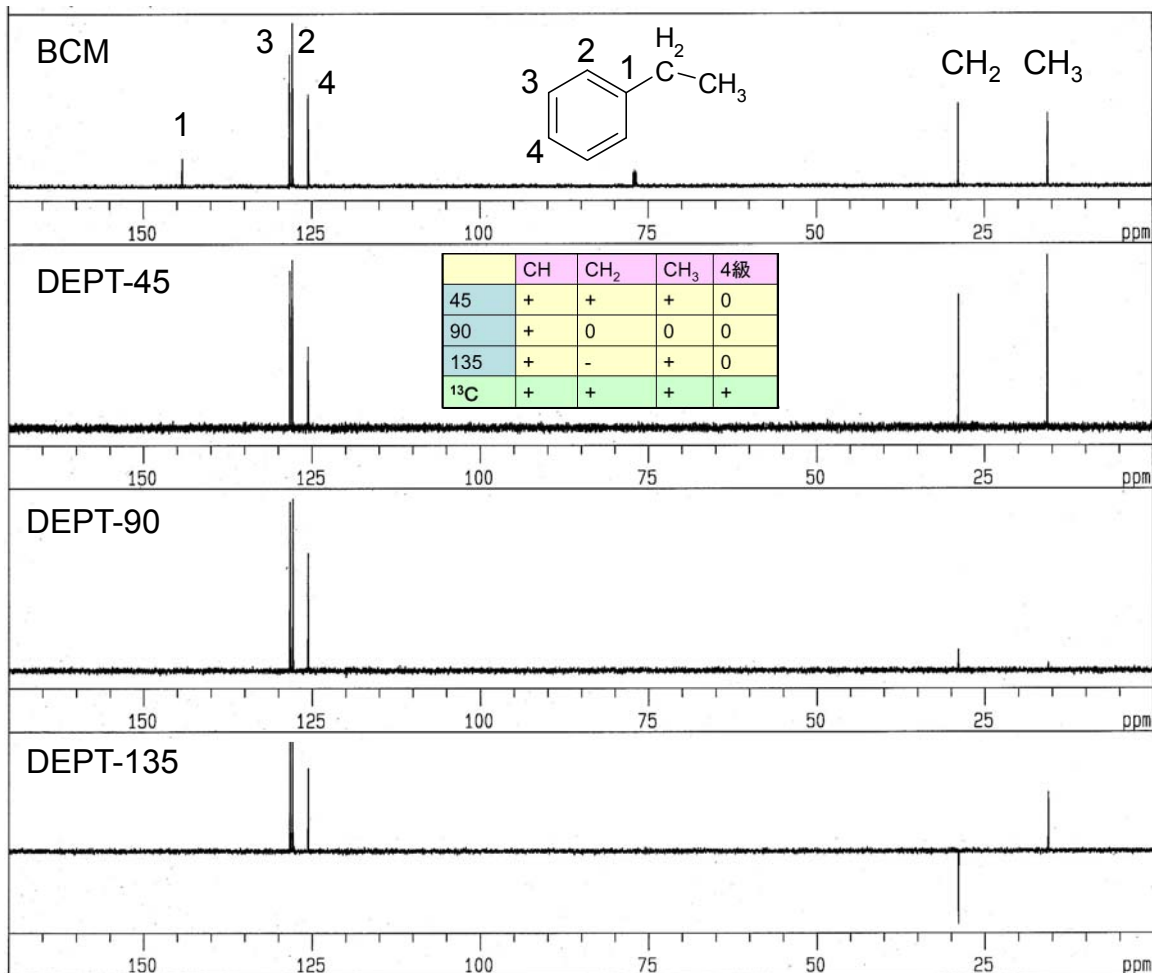
CH : $\frac{1}{\sqrt{2}} Sx$ Sx $\frac{1}{\sqrt{2}} Sx$

CH₂ : $\frac{1}{2} Sx$ 0 $-\frac{1}{2} Sx$

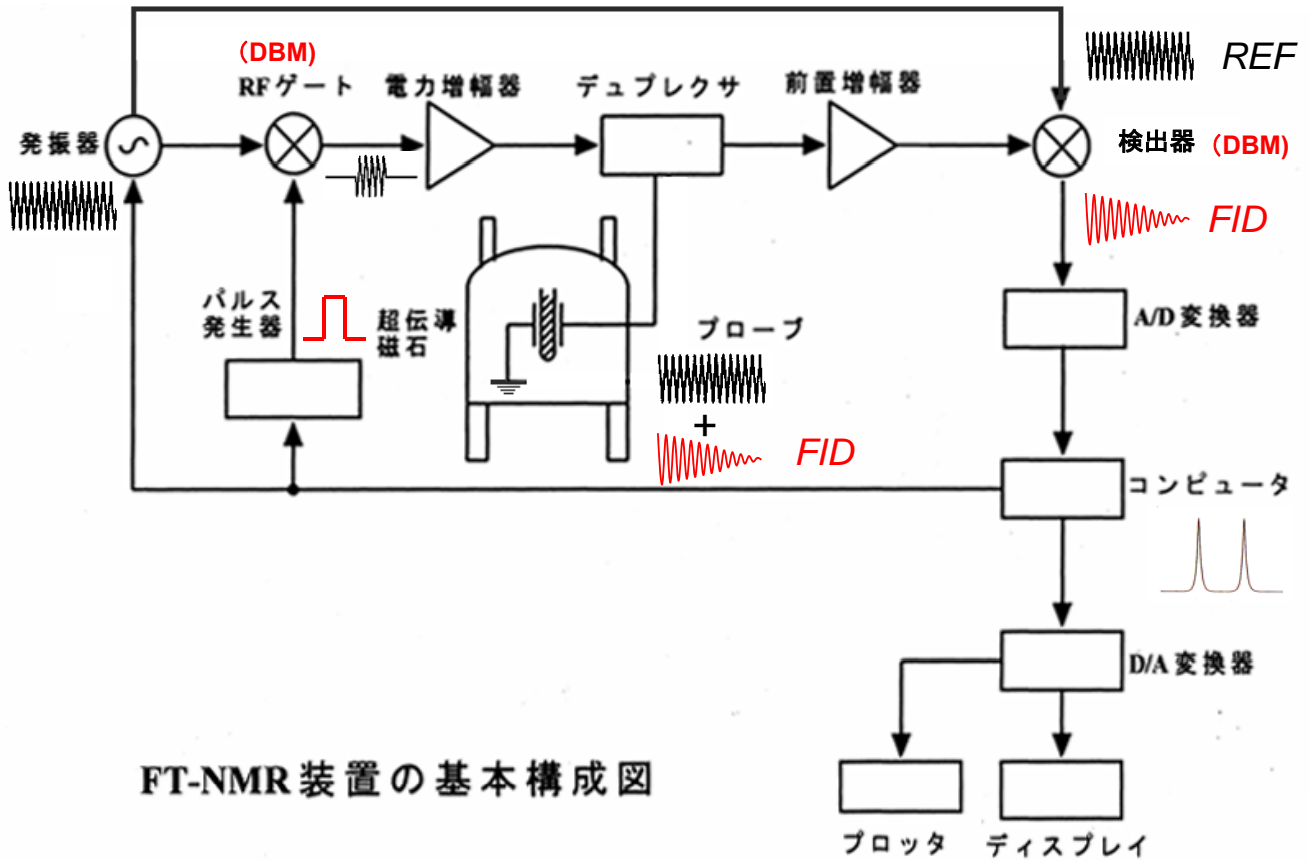
CH₃ : $\frac{1}{2\sqrt{2}} Sx$ 0 $\frac{1}{2\sqrt{2}} Sx$



	CH	CH ₂	CH ₃	4級
45	+	+	+	0
90	+	0	0	0
135	+	-	+	0
¹³ C	+	+	+	+



NMR装置のブロックダイアグラム (1chのみ表示; 実際は, 2または3chある)



当初は連続波法 (CW) NMR装置が圧倒的に多かったが、コンピュータの小型化・低価格化してきてNMR装置に付属できるようになった1970年代からパルスフーリエ変換法NMR装置にとって代わられるようになり、現在はほぼ完全にPFT装置である。

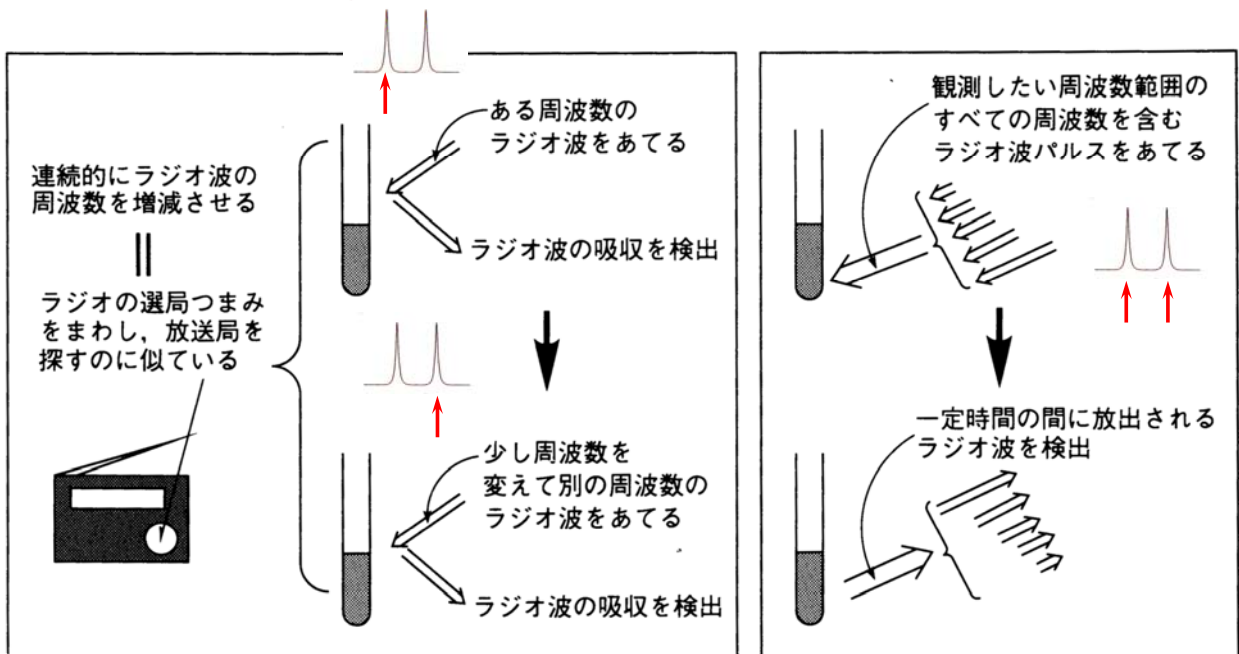
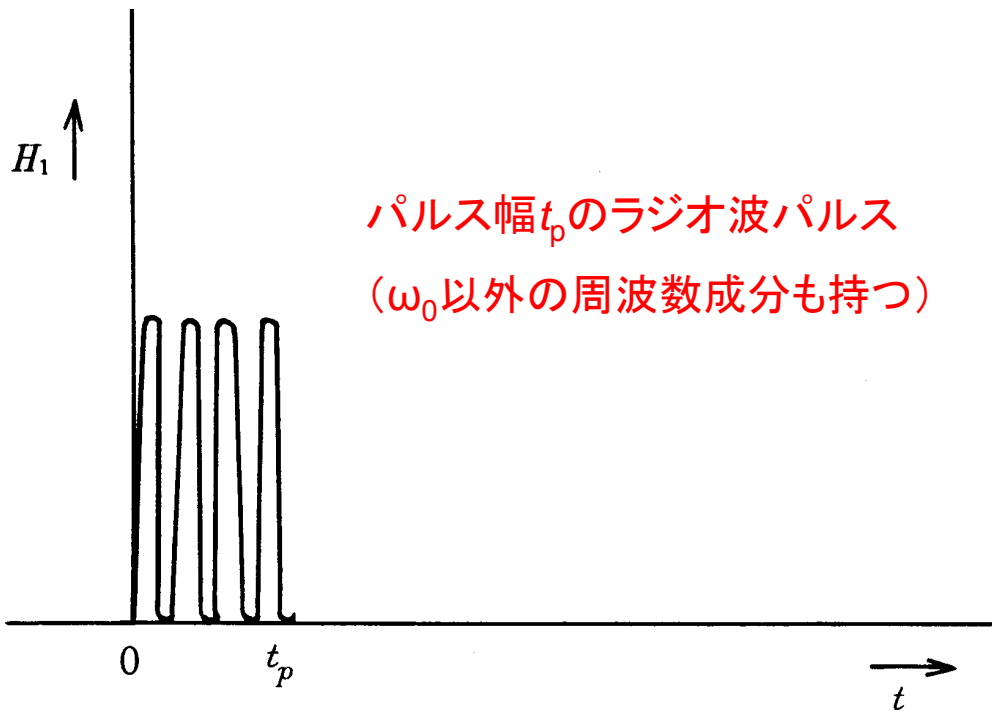


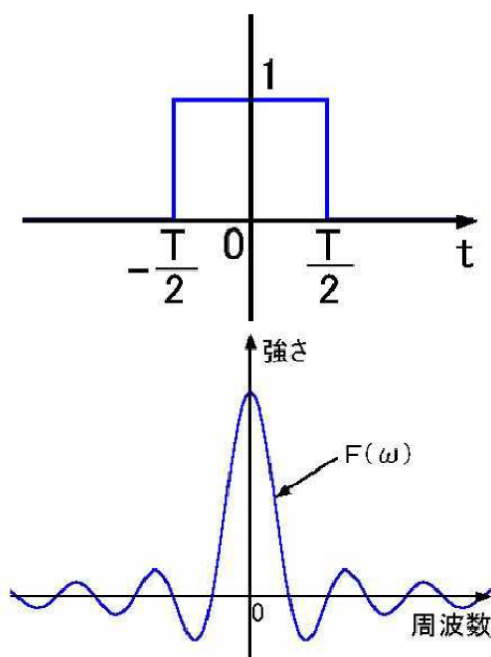
図 3-1 昔の CW-NMR 装置のしくみ (左) と現在の FT-NMR 装置のしくみ (右)



図A1・2 周波数 ω_0 をもった rf パルス

パルスおよびフーリエ変換NMR—理論および方法への入門—ファラー，ベッカー著，赤坂一之，井元敏明訳（吉岡書店，1979）

矩形波のフーリエ変換



矩形波のフーリエ変換

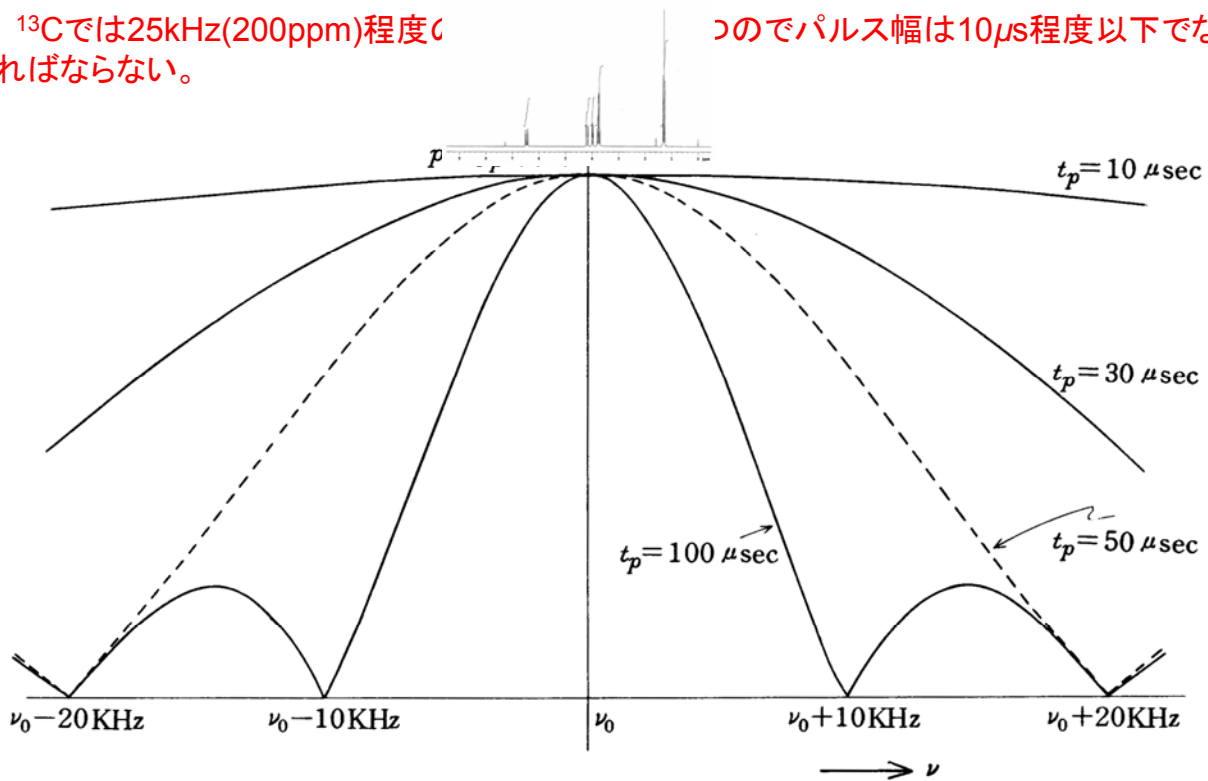
- フーリエ変換
- →時間領域から周波数領域への演算

$$\begin{aligned}
 \underline{F(\omega)} &= \int_{-\infty}^{\infty} f(t) \cdot \exp(-j\omega t) dt \\
 &= 2 \int_0^{T/2} 1 \cdot \cos(\omega t) dt \\
 &= \frac{2}{\omega} \sin\left(\frac{\omega T}{2}\right) = \frac{\sin\left(\frac{\omega T}{2}\right)}{\frac{\omega T}{2}} \\
 &= \underline{T \cdot \text{sinc}\left(\frac{\omega T}{2}\right)}
 \end{aligned}$$

500MHz装置で液体試料の ^1H は約5kHz(10ppm)のスペクトル幅を持つ。パルス幅20 μs でおおよそ8kHzの周波数分布域がほぼフラットになる。

^{13}C では25kHz(200ppm)程度と

るのでパルス幅は10 μs 程度以下でなければならない。



図A1.3 周波数 ν_0 をもつ rfパルスの周波数分布

パルスおよびフーリエ変換NMR—理論および方法への入門—ファラー, ベッカー著, 赤坂一之, 井元敏明訳(吉岡書店, 1979)

代表的な核の性質

核種	自然存在比 /%	核スピン I	NMR 周波数 /MHz	磁気回転比 γ / $10^7\text{radT}^{-1}\text{s}^{-1}$	核四極子モーメント Q / 10^{-30}m^2
^1H	99.985	1/2	500.000	26.7510	—
^2H	0.015	1	76.755	4.1065	0.277
^{13}C	1.108	1/2	125.725	6.7283	—
^{14}N	99.63	1	36.13	1.9331	0.16
^{15}N	0.37	1/2	50.685	-2.7116	—
^{17}O	0.037	5/2	67.78	-3.6264	-0.26
^{19}F	100	1/2	470.47	25.181	—
^{31}P	100	1/2	202.405	10.8289	—

1) $I \geq 1$ の核種は核四極子モーメントを持つ。

2) 磁気回転比 γ は、核種に固有な定数であり、核スピン I と磁気モーメント μ の比である。

$$\mu = \gamma \hbar I$$
 プロトン ^1H は、最も γ が大きい。

NMRの歴史

NMRは元来, 原子核の性質(核磁気モーメントなど)を精密に測定するために試みられた. しかし, 化学シフトやスピンスピン結合の発見により, 分子構造解析, 分子運動の研究(緩和時間測定)など, 化学, 生化学などの分野で発展してきた. また, *in vivo* 測定, イメージング(MRI)など医学分野でも利用されている.

61

1- i) NMRの歴史(1)

- 1936年 **Negative result of an Attempt to Detect Nuclear Magnetic Spins**, *Physica*, III, p. 995
Cornelius J. Gorter (オランダ)の失敗,
1.4Tの磁場, 20MHz, 熱測定, ^1H (ミョウバン), ^7LiF , 長い緩和時間
- 1942年 **Negative result of an Attempt to Observe Nuclear Magnetic Resonance in Solids**, *Physica IX*, p.591, Gorter and Broer (オランダ)の失敗
凝縮系のNMR, $^7\text{LiCl}$, K^{19}F , 低温, 長い緩和時間

1938年 分子線の磁気モーメント測定



Columbia University
New York, NY, USA
1898 - 1988

Isidor Isaac Rabi



The Nobel Prize in Physics 1944

"for his resonance method for recording the magnetic properties of atomic nuclei"

原子線の磁氣的性質を記録するための共鳴法

62

1- i) NMRの歴史(2)

1946年 硝酸第二鉄水溶液(Bloch)やパラフィン(Purcell)において
水素核(^1H)磁気共鳴の検出に成功



Felix Bloch

Stanford University
Stanford, CA, USA
1905 - 1983



Edward Mills Purcell

Harvard University
Cambridge, MA, USA
1912 - 1997



The Nobel Prize in Physics 1952

"for their development of new methods for nuclear magnetic precision measurements and discoveries in connection therewith"

1966-76年

フーリエ変換NMR法・2次元
NMR法の開発と確立

Eidgenössische Technische
Hochschule
(Federal Institute of Technology)
Zurich, Switzerland 1933 -



Richard R. Ernst



The Nobel Prize in Chemistry 1991

"for his contributions to the development of the methodology of high resolution nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy"

63

1- i) NMRの歴史(3)

2002年度ノーベル化学賞



Kurt Wüthrich

Eidgenössische
Technische
Hochschule (Swiss
Federal Institute of
Technology)
Zürich, Switzerland
1938 -

• 1986年

タンパク質の構造決定



The Nobel Prize in Chemistry 2002

「生体高分子の同定および構造解析のための手法の開発」

"for the development of methods for identification and structure analyses of biological macromolecules"

「溶液中の生体高分子の立体構造決定のためのNMRの開発」

"for his development of nuclear magnetic resonance spectroscopy for determining the three-dimensional structure of biological macromolecules in solution"

64

1- i) NMRの歴史(4)

2003年度ノーベル医学生理学賞



Paul C. Lauterbur
University of Illinois
Urbana, IL,
USA
b. 1929



Sir Peter Mansfield
University of Nottingham,
School of Physics and
Astronomy
Nottingham, United
Kingdom
b. 1933



The Nobel Prize in Medicine 2003

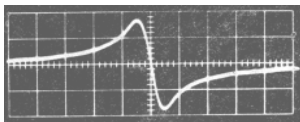
"for their discoveries concerning magnetic resonance imaging"

「磁気共鳴イメージング(MRI)に関する発見」

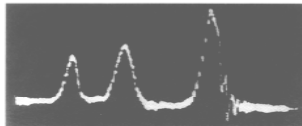
NMR装置の変遷

1961年、世界最初の市販装置 : Varian A-60

初期の頃のシグナル



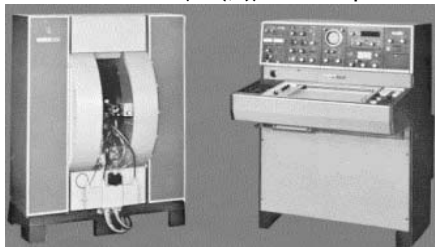
微分形のシグナル



最初の化学シフトの発見



JEOL FX100 (FT法): 1971年



Bruker WP60 (CW法): 1984年



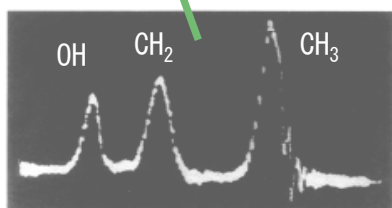
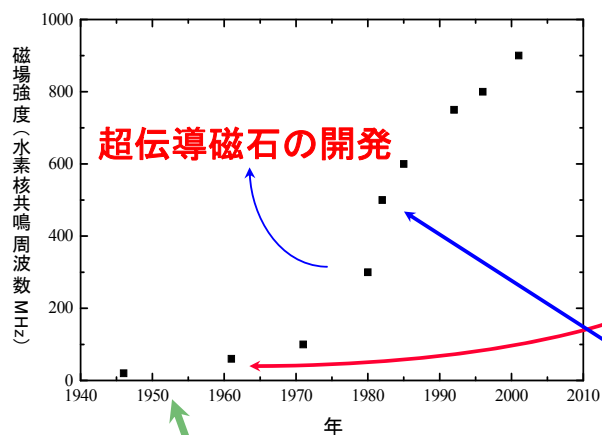
Bruker DRX300 : 1993年



Varian Inova 900 : 2001年

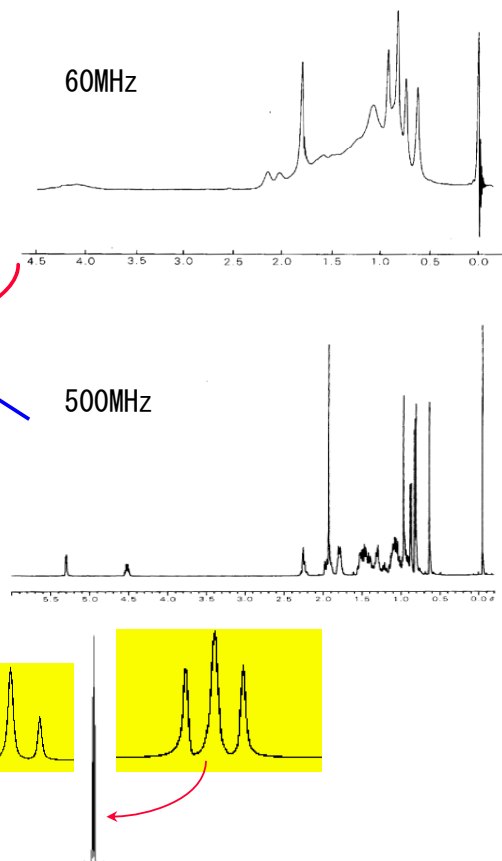


磁場の強さの変遷



CH₃CH₂OHのシグナル

酢酸コレステリルの ¹H NMRスペクトル



化学への応用として見たNMR法の発展(1)

- ・ 1951年
化学シフトの発見

ProctorとYu (アメリカ)

NH₄NO₃水溶液の¹⁴Nスペクトルが2本に分裂した。¹⁴Nの核磁気モーメントの正確な測定という当初の目的には失敗したが、化学シフトを発見することとなった。

- ・ 1951年
スピン結合(J結合)の発見

ProctorとYu, GutowskyとMcCall (アメリカ)

- ・ 1953年
核オーバーハウザー効果 (NOE)の発見

Overhauser (アメリカ)

強い電磁波によって電子スピン共鳴を飽和すると、核スピンのスピン分極が著しく増大することを理論的に示した。

Wüthrichによる「タンパク質の構造決定」に応用されている。

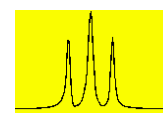
→2002年ノーベル化学賞

- ・ 1960年代 スペクトルの計算

- ・ 1969年
常磁性シフト試薬の発見

- ・ 1950年代後半～60年代前半
多量の試料の利用ならびに、コンピュータによるシグナルの積算(CWなのでCAT)

- ・ 1964年 プロトン(¹H)完全デカップリング法の開発
炭素核(¹³C)の測定



化学への応用として見たNMR法の発展(2)

- ・ 1969年 パルス、フーリエ 変換法の開発
- ・ 1970年代後半 マルチパルス法の開発
- ・ 高磁場装置 の導入(超伝導磁石)
- ・ 2次元NMR法 の開発



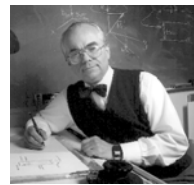
Richard R. Ernst

固体高分解能

- ・ 1970年代後半 マジック角回転法の開発(GP/MAS法)



E. R. Andrew



E. O. Stejskal
J. Schaefer



E. L. Hahn



A. Pines

MRI

- ・ 1972年
ズームグラフィの提案



R. V.
Damadian



P. C.
Lauterbur

生体系

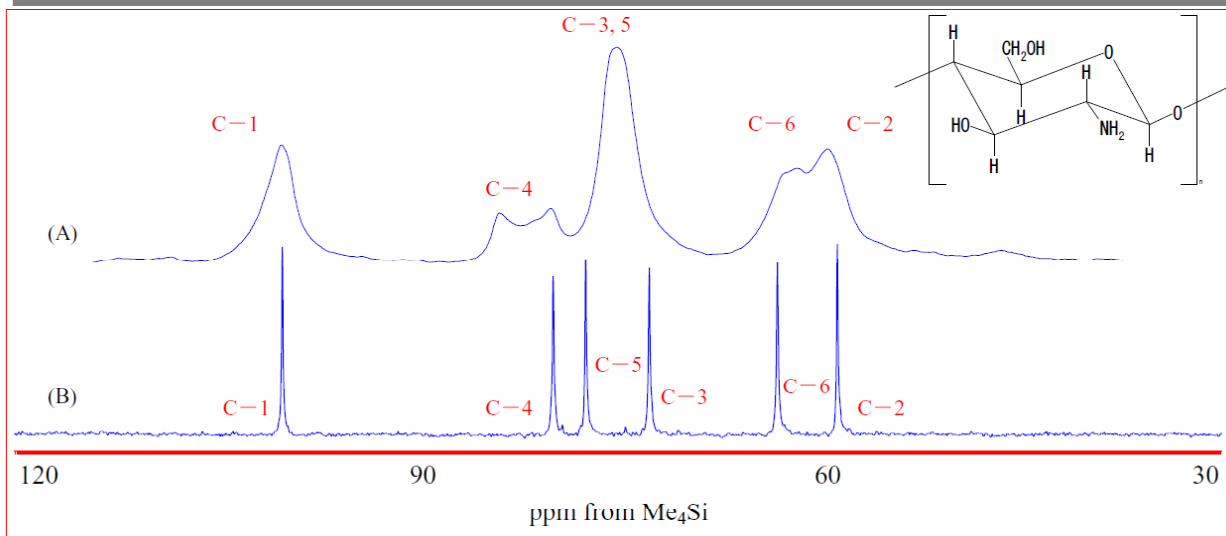
- ・ 1986年
タンパク質の構造決定



Kurt Wüthrich

69

キトサンの(A) 固体高分解能 NMR スペクトルと(B) 液体 NMR スペクトルの違い



固体高分解能NMRは、固体高分子等の詳細な分子構造解析のための唯一と
 いうほど不可欠な手段である。しかし、(A) (B)の違いから分かるよう
 に、化学シフトの分布などの原因で、吸収線の線幅が広くなる。また、溶液
 と固体のスペクトルでは化学シフトが少し異なることがある。

70

固体NMRによる医薬品の結晶多形解析

医薬品の結晶構造を制御することは製剤技術として大変重要であるが、固体NMRは薬剤の固体構造を調べる有用な分析手法である。

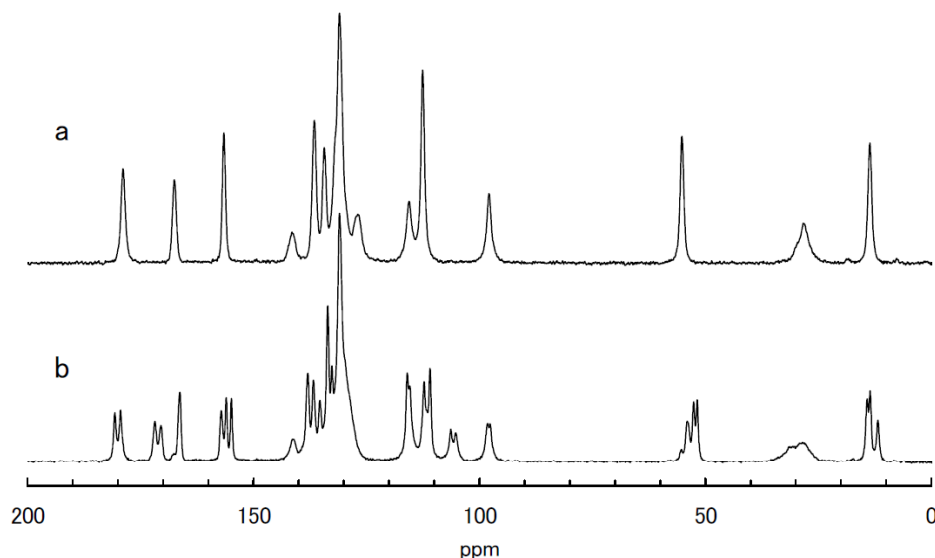


図4a. インドメタシンの固体¹³C-NMRスペクトル (a) γ 形、(b) α 形

「三菱化学科学技術研究センター 技術レポート No.45(2003)」

71

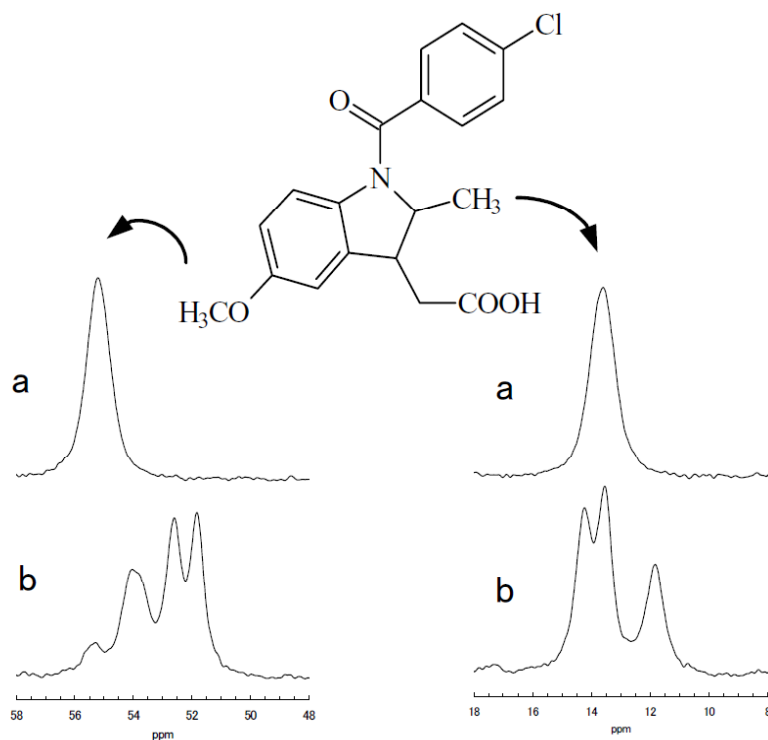


図4b. インドメタシンの固体¹³C-NMRスペクトル
OCH₃とCH₃領域の拡大: (a) γ 形、(b) α 形

インドメタシンは安定結晶である γ 形のみ単結晶構造解析が得られていますが、 α 形に関する報告はありません。固体NMRにて測定すると、 γ 形は各炭素に1本ずつのピークが観測されるのに対して、 α 形では各炭素に複数本のピークが観測されています。このことから α 形結晶は複数のコンフォメーションから成ると推定されます(図4)。

72

固体材料の解析例(旭化成基盤技術研究所)

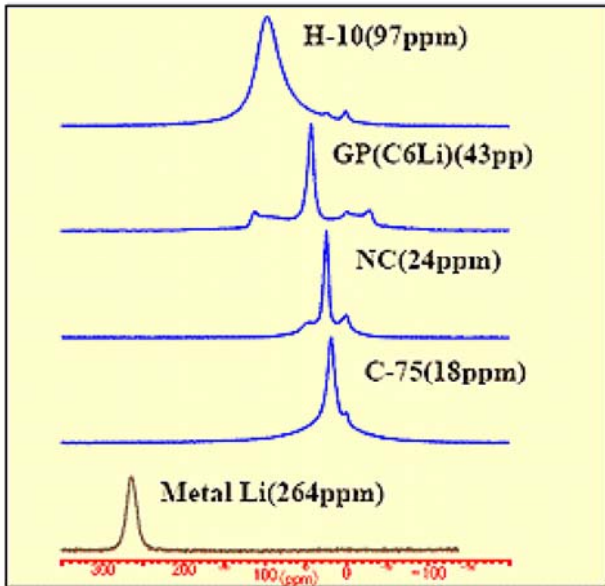


図3 負極炭素中のリチウムのNMRスペクトル

1. 負極炭素中のリチウム状態の解析
 リチウムイオン二次電池の、負極炭素に取り込まれたリチウムの⁷Li固体NMRを測定した。炭素の種類によって、シグナルのシフト値やサテライトピークの形が異なり、リチウム状態の違いが分かる。充放電にともなうリチウム状態の変化や温度可変測定などにより、炭素のリチウム吸蔵のメカニズムを解析した。

http://www.asahi-kasei.co.jp/akasc/equipment/yuki_nmr.htm

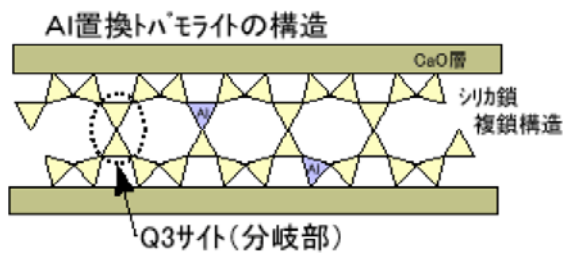


図4 ALCの化学構造

2. 軽量気泡コンクリート(ALC)の化学構造
 旭化成のヘーベルハウス等に使用されているALCはトバモライトからなる軽量コンクリートである。固体NMRの測定により、セメントの水和過程やシリカ鎖の構造、またセメントなど原料に含まれるアルミの化学構造変化が解析でき、ALC生成過程の解明に活用された。

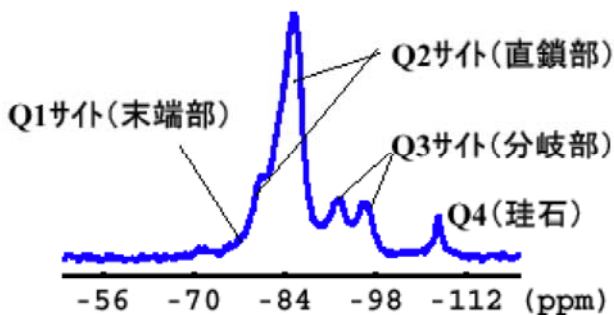


図5 ALC中のSiのNMRスペクトル

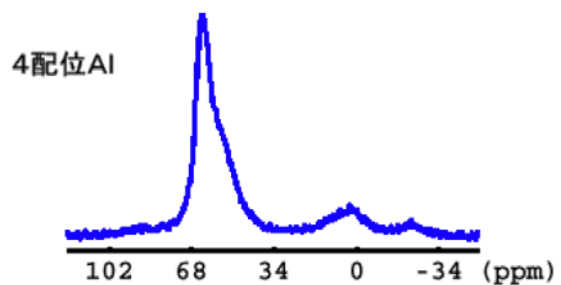
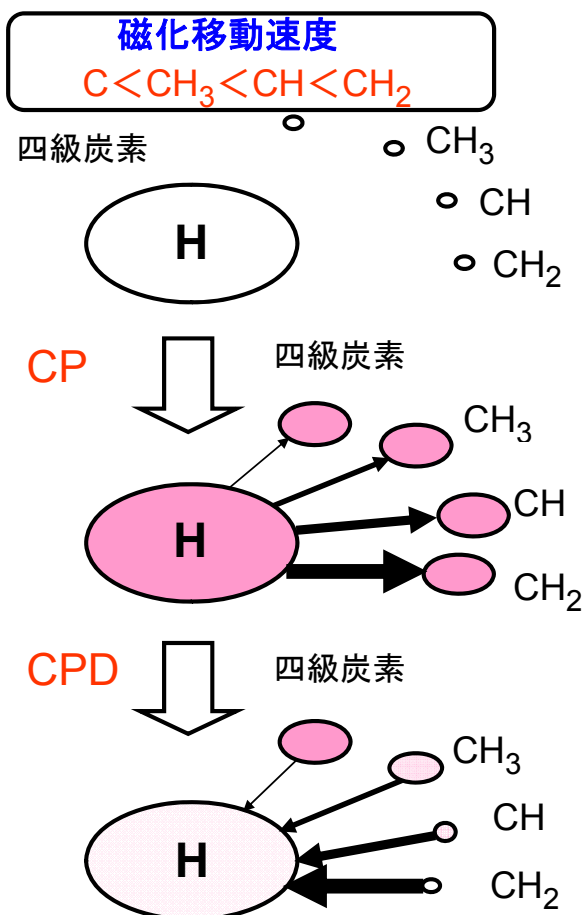


図6 ALC中のAlのNMRスペクトル

固体高分解能NMRスペクトルの帰属

- 1) 溶液NMR測定が可能ならば, 溶液のNMRスペクトルを参考にする.
- 2) 溶液NMRで用いられるDEPTシーケンスのようなスペクトル編集テクニックを利用する.
- 3) 熱硬化物試料の場合は, 硬化前の試料(液体またはゲルである場合がある)のNMRスペクトルを参考にする.
- 4) ポリマーブレンドの場合は成分ホモポリマーの固体NMRあるいは溶液NMRスペクトルを参考にする.
- 5) Gaussianのような量子化学計算を利用する.

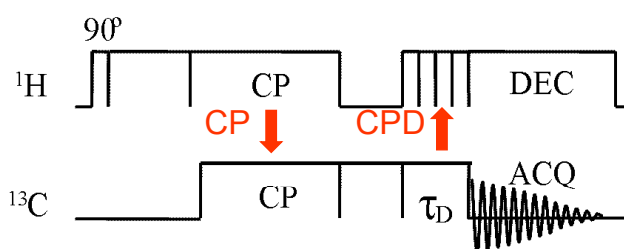
スペクトル編集テクニック: 脱分極CPDと反転分極CPPI

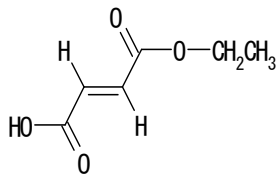


交叉分極CPはスピロックしている期間に磁化移動過程 $^1H \rightarrow ^{13}C$ を起こす機構である. 一方, 脱分極CPDは脱分極期間に磁化移動過程 $^{13}C \rightarrow ^1H$ を起こす機構である. 両方の過程は磁気双極子-双極子相互作用を通して起こる.

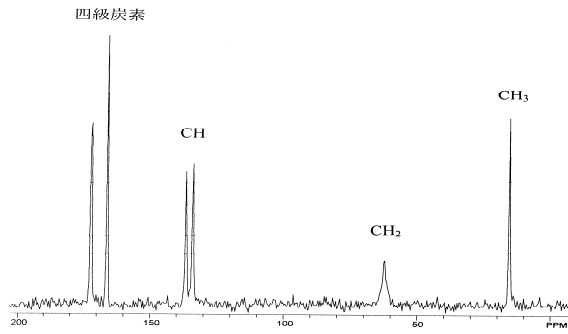
CP と CPD 過程の速度は 左図の矢印で示すように $CH_2 > CH > CH_3 > C$ (四級炭素)の順である.

CP 過程が完全に終了した後に脱分極CPD過程が続く. もし, τ_D が十分長ければ, 水素原子と結合した炭素原子のシグナルは消失し, 水素原子と結合していない炭素とメチル炭素のシグナルのみが観測される.



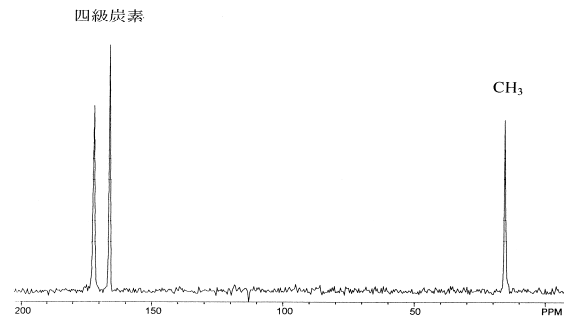
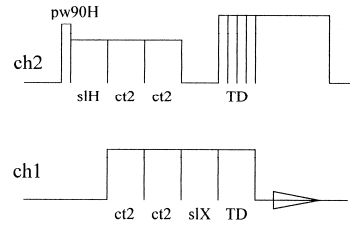


fumaric acid monoethyl ester



fumaric acid monoethyl esterの
cpスペクトル

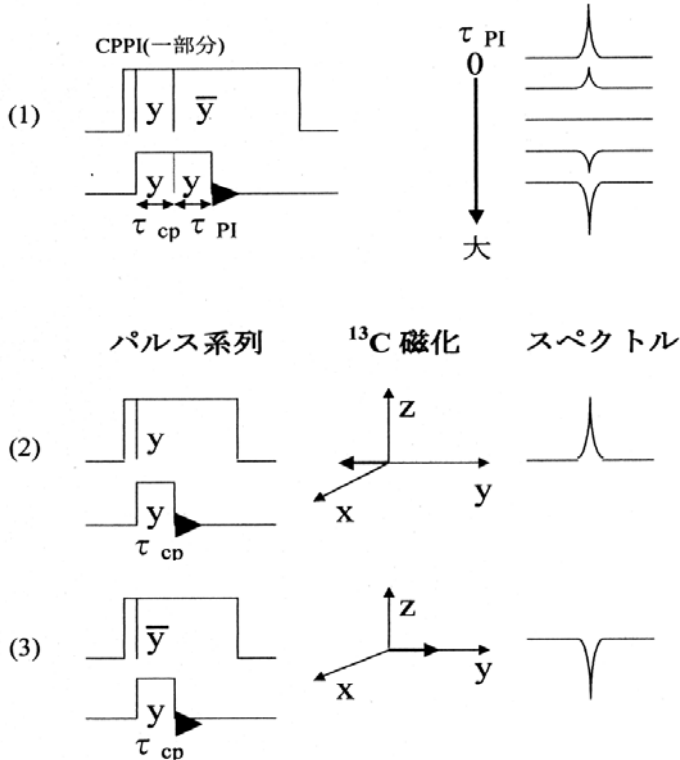
3. cp_slcpd



fumaric acid monoethyl esterの
cpdスペクトル

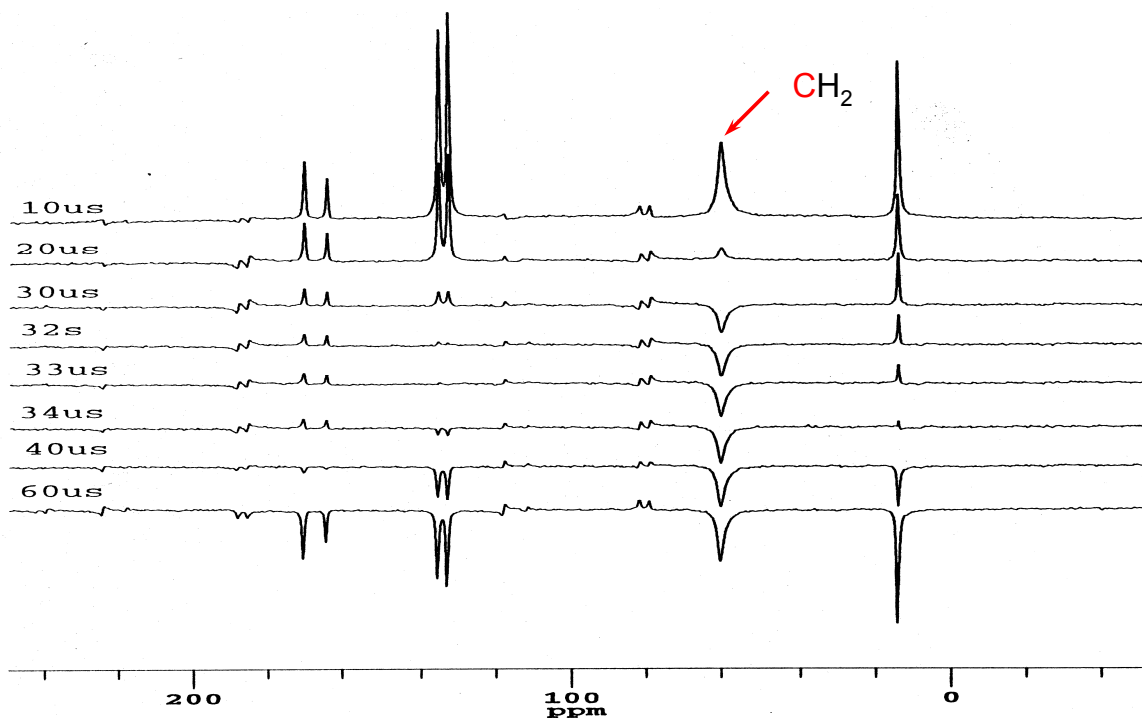
CPDスペクトルでは4級炭素とメチル炭素の信号のみが観測されている。

分極反転



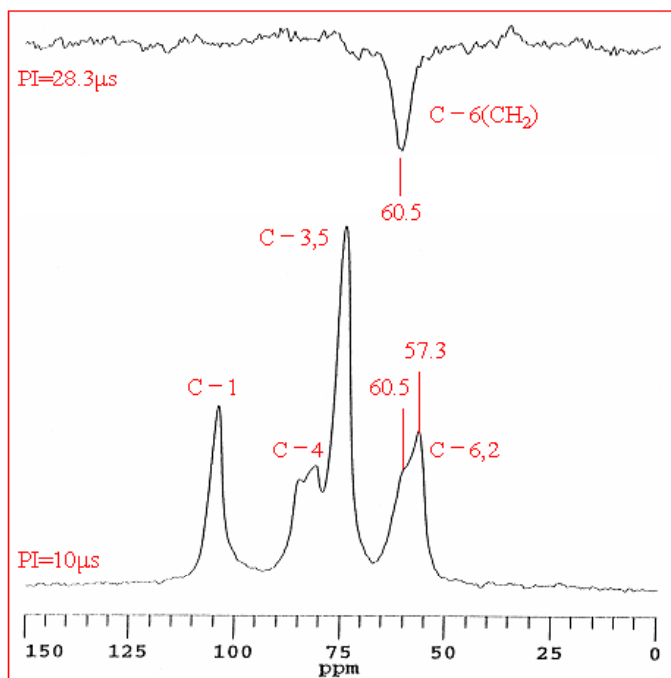
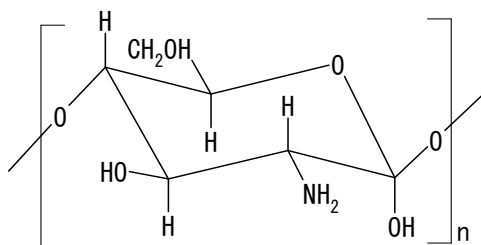
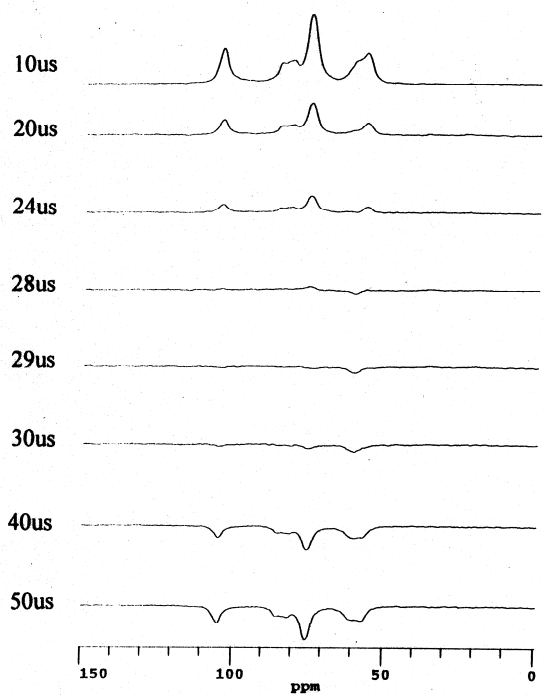
(1)のように、交差分極で磁化を作り、その後、交差分極の向きを反転させる。(2)と(3)に示すようにスピロックする ^1H の位相が逆転すると、 ^{13}C 核の磁化が誘起される方向が逆転する。(2)と(3)を組み合わせたものが(1)で、初めの交差分極時間 τ_{CP} を一定にして、反転時間 τ_{IP} を変えていくと、 $\tau_{\text{IP}}=0$ のとき上を向いている吸収線が、 τ_{IP} が長くなるにしたがって強度が減少し、 τ_{IP} が十分長いと下を向き(1)の右上のようになる。

CH_2 と CH では CH_2 の方が磁化移動速度が速いので、 $\tau_{\text{IP}}=0$ から少しずつ τ_{IP} を長くして行った一連のスペクトルを測定すると、 CH の磁化がゼロとなる τ_{IP} が存在する。このとき CH_2 のみの磁化が下向きに観測されるので、 **CH_2 だけのスペクトルを測定することができる。**



fumaric acid monoethyl esterのcppiスペクトル

cppi (cp with phase inversion): τ_{CP} を40usで一定にし、 τ_{IP} を10us、20us、30us、32us、33us、34us、40us、60usと変えて測定したスペクトルである。CH₂は回転速度が速いため他の炭素よりも早く符号が反転している。



cppiを用い chitosan を $\tau_{CP}=40\mu\text{sec}$ で一定、 $\tau_{PI}=10\mu\text{sec}$ 、 $28.3\mu\text{sec}$ で測定したものである。
60.5ppmにあるC-6のピークが下に出てきていることからCH₂であることがわかり、スペクトルが重なっているC-6とC-2の区別をすることができた。

○重なったピークの検出および多成分分離測定

運動性の異なる数種類の成分のピークが重なっている場合には、運動性を反映する T_1 の測定によって成分の数と比率を求めることができる。また、 T_1 の違いを利用した分離測定によって各成分の分離測定が可能となる。

水素原子との結合様式の異なる炭素原子のピークが偶然重なっている場合には、炭素原子と水素原子の間の磁気双極子相互作用の大きさを反映する T_ρ の測定によって成分の数を求めることができる。また、 T_ρ の違いを利用した分離測定によって各成分の分離測定が可能となる。

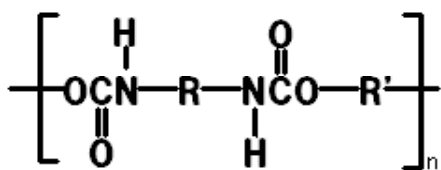
81

参考:ポリウレタンの基本構造

ジイソシアネート、鎖伸長剤、ポリオールから構成されたブロック共重合体である。

(1) **ハードセグメント** 鎖伸長剤とジイソシアネートからなり結晶相を構成する。

(2) **ソフトセグメント** :ポリオールからなり非晶相を構成する。



ハードセグメント ソフトセグメント

原料

◎イソシアナート

◎ポリオール

◎鎖伸長剤

・ジオール類

・アミン類

◎その他(内部乳化成分)

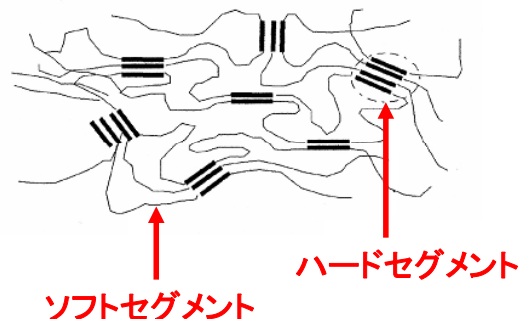
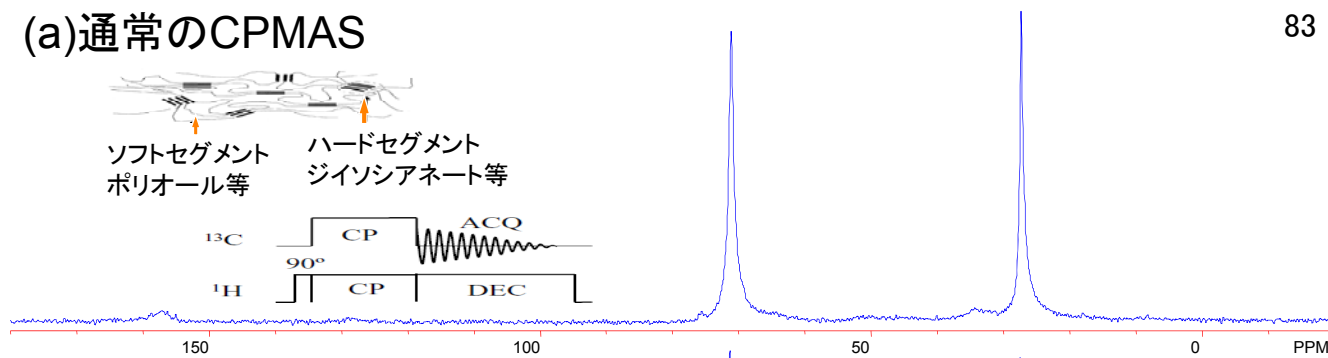


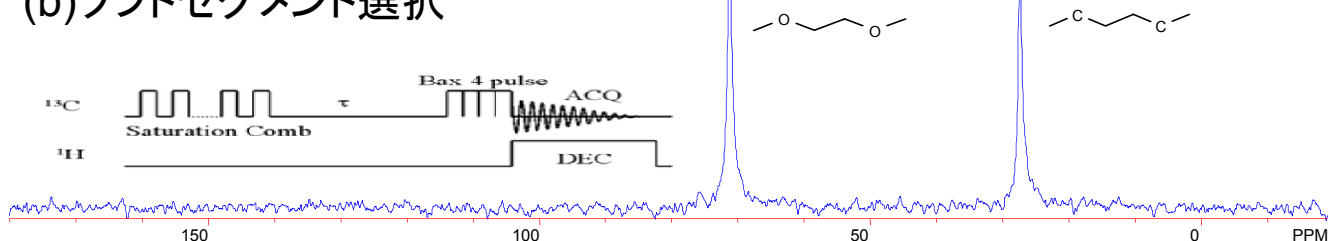
図1. ポリウレタンのマイクロ相分離構造

82

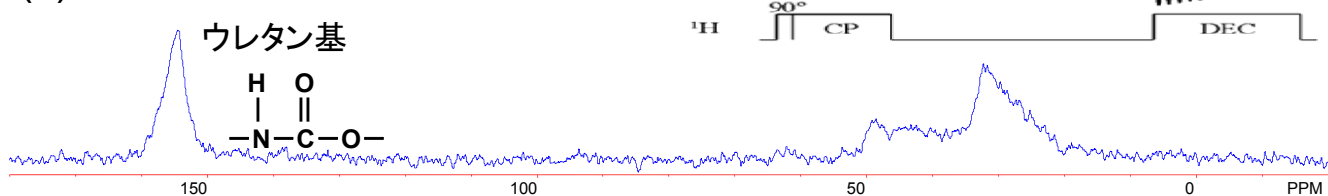
(a) 通常のCPMAS



(b) ソフトセグメント選択



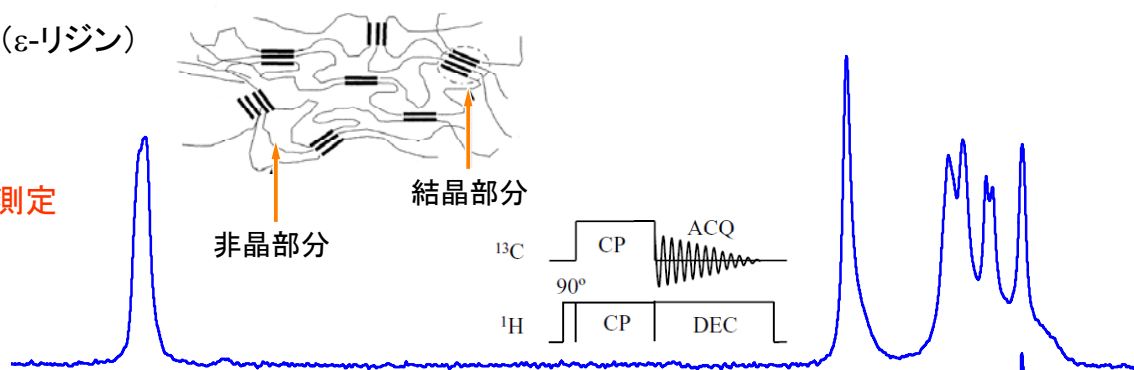
(c) ハードセグメント選択



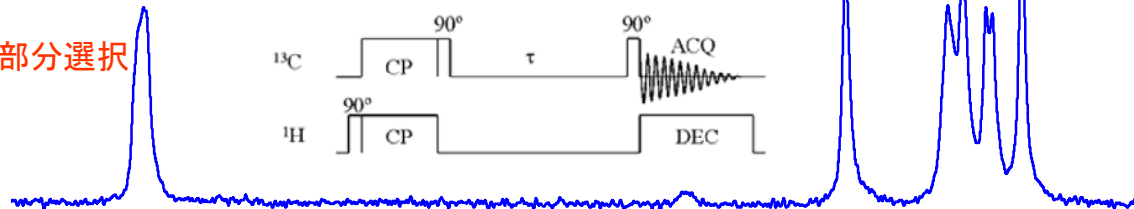
ポリウレタンの固体NMR [試料提供: 日華化学(株)]

ポリ(ε-リジン)

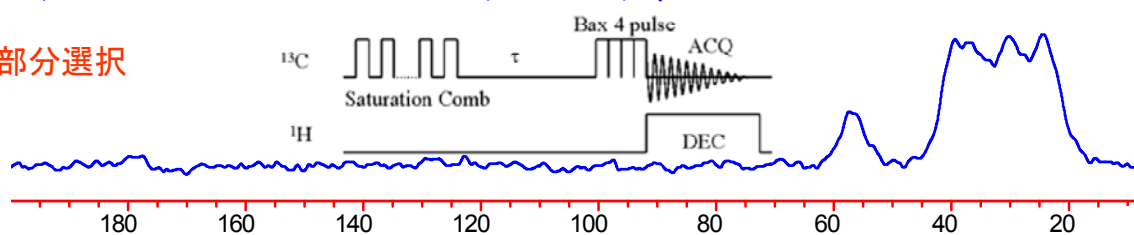
通常測定



結晶部分選択

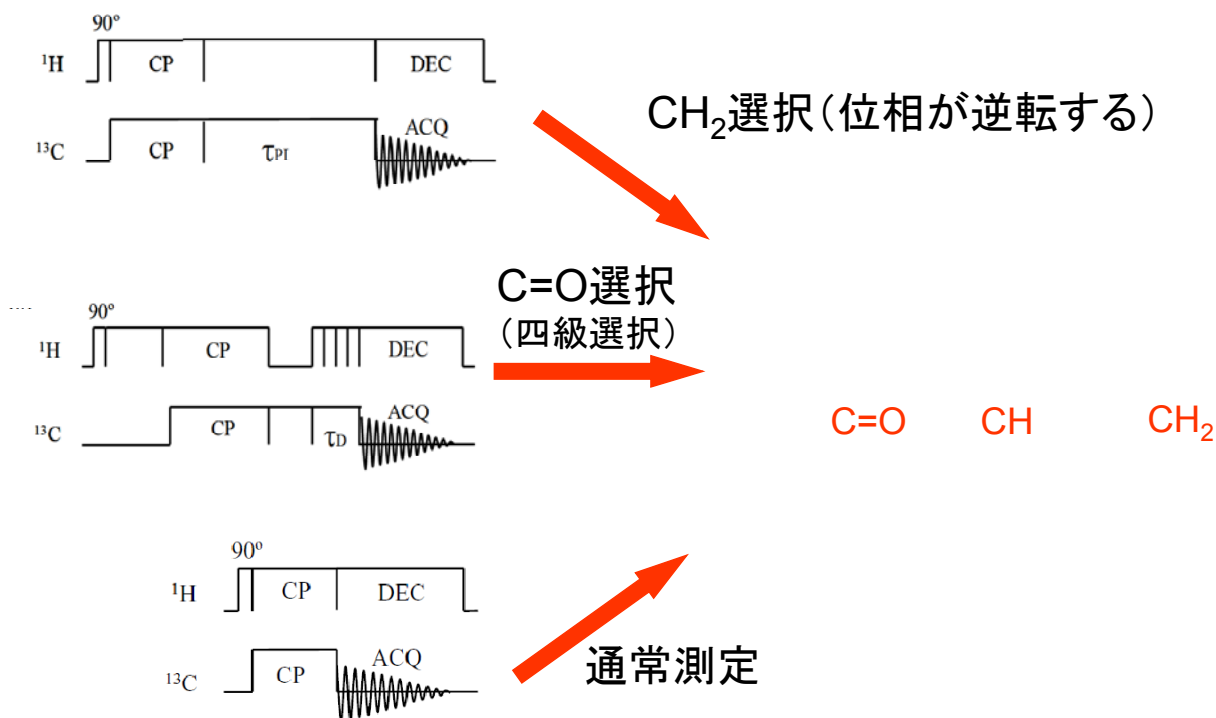


非晶部分選択



結晶相と非晶相の分離測定. (a) 通常測定, (b) 結晶相選択, (c) 非晶相選択

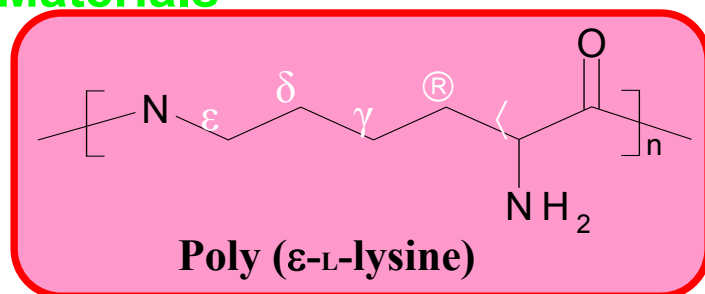
(a) normal CP/MAS. (b) TICP experiment; $\tau = 7$ sec. (c) Saturation recovery experiment; $\tau = 200$ ms. 84



固体における帰属テクニック (a) CH₂選択, (b)四級炭素選択, (c) 通常測定

85

Materials

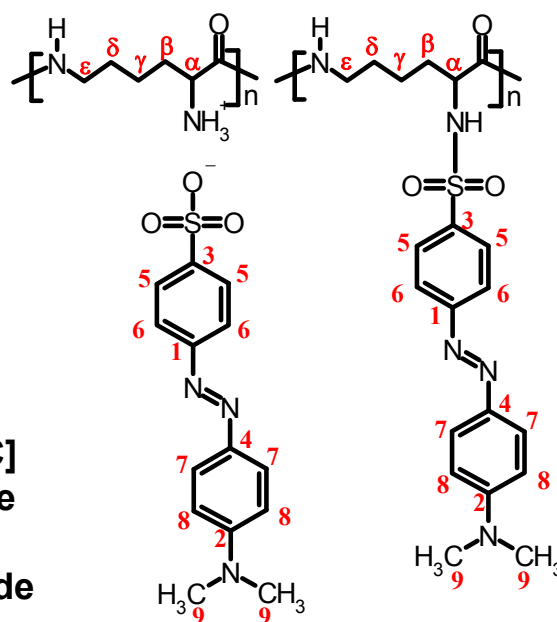


Poly (ε-L-lysine) (MPL) (Chisso Co. Ltd.)

[Mn: 4,090 ; Tg: 88 °C ; Tm: 172.8 °C]

MPL azo dye derivative with methyl orange (MPL/MO)

MPL azo dye derivative with dabsyl chloride (MPL/DC)



The chemically modified MPL's, MPL/MO and MPL/DC, exhibit ¹⁵N NMR signals characteristic of the binding mode at the α-amino groups. The spectral analysis reveals that the MPL/DC sample contains a small amount of ion complexes with MO.

NMR Instrument

Chemagnetics CMX Infinity 300 : 75.7 MHz for ¹³C

86

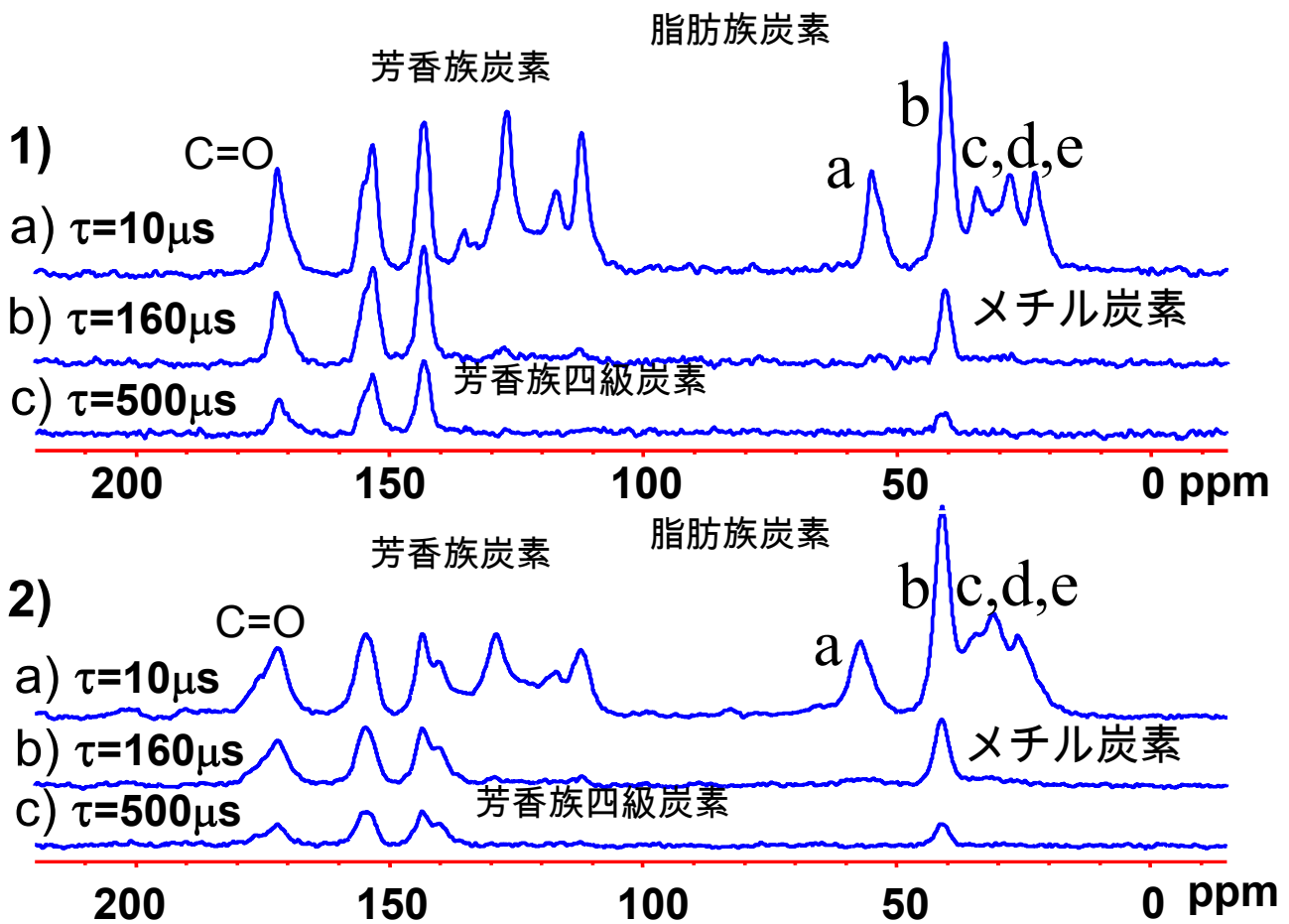


Fig. 3. 部分的緩和 ^{13}C CPDスペクトル 1) MPL/MO および 2) MPL/DC

87

Solid-State ^{13}C NMR Analyses of the Structure and Chain Conformation of Thermotropic Liquid Crystalline Polyurethane Crystallized from the Melt through the Liquid Crystalline State

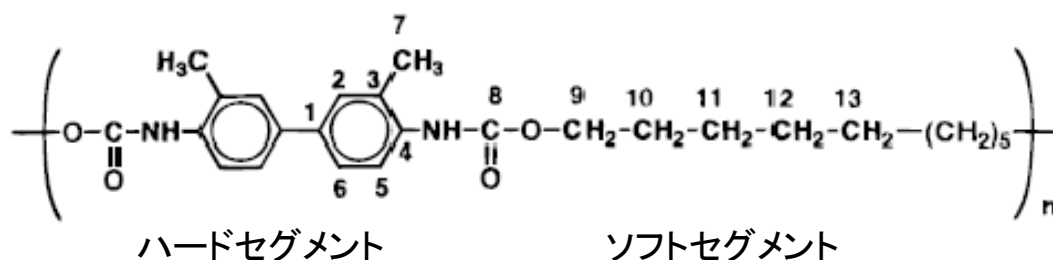
Hiroyuki Ishida, Hironori Kaji, and Fumitaka Horii*

Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611, Japan

Received March 11, 1997; Revised Manuscript Received June 10, 1997^o

固体 ^{13}C NMRを用いた液晶性ポリウレタンの構造とコンフォーメーション解析

Chart 1



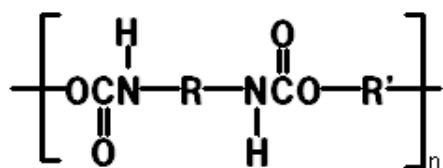
88

参考:ポリウレタンの基本構造

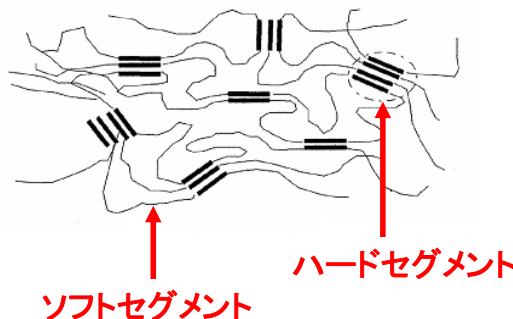
ジイソシアネート、鎖伸長剤、ポリオールから構成されたブロック共重合体である。

(1) **ハードセグメント** 鎖伸長剤とジイソシアネートからなり結晶相を構成する。

(2) **ソフトセグメント** :ポリオールからなり非晶相を構成する。



ハードセグメント ソフトセグメント



原料

◎イソシアナート

◎ポリオール

◎鎖伸長剤

・ジオール類

・アミン類

◎その他(内部乳化成分)

図1. ポリウレタンのマイクロ相分離構造

89

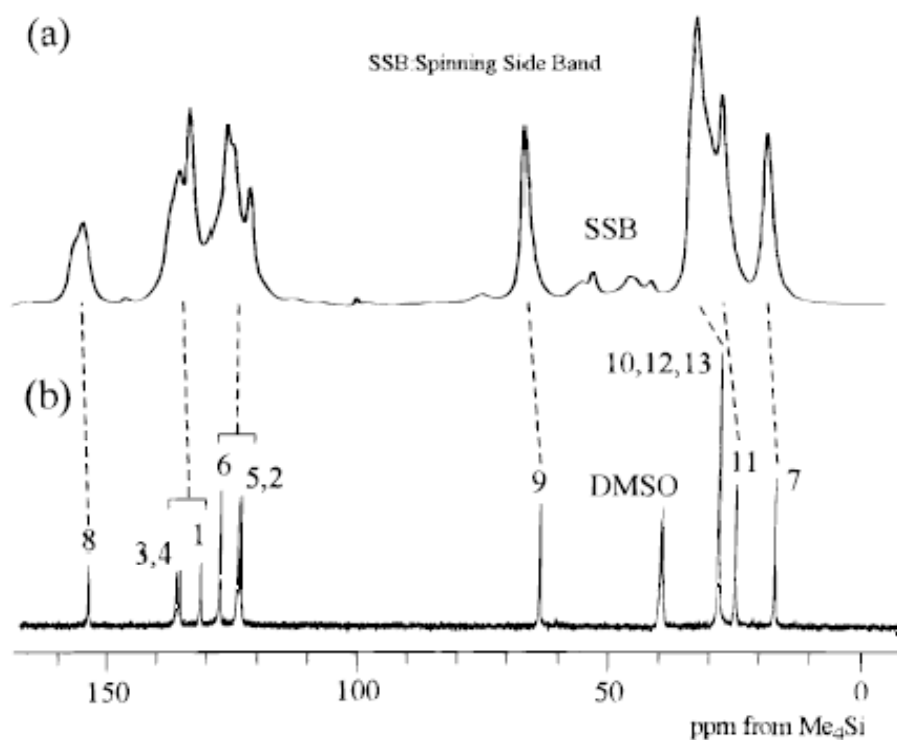
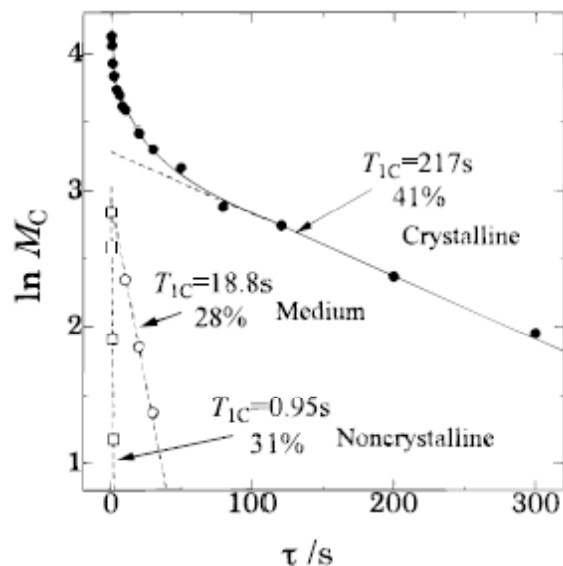


Figure 3. ^{13}C NMR spectra of PDBDM: (a) 50 MHz CP/MAS spectrum measured at room temperature; (b) 100 MHz solution state spectrum measured at 100 °C.

90



単一成分であれば、緩和は単一の指数関数減衰、すなわち1本の直線で表される。

しかし、このポリウレタン試料では、緩和曲線は3つの指数関数減衰の和で表される。すなわち、この試料には、運動性が異なる3つの成分(結晶成分, 中間成分, 非晶成分)が含まれていることを示しており、成分比率も求めることができる。

Figure 4. ¹³C spin-lattice relaxation process for the **C9** methylene carbon measured by the CPT1 pulse sequence.

Table 1. ¹³C Spin-Lattice Relaxation Times of PDBDM Measured at Room Temperature

	<i>T_{1c}</i> /s								
	C8	C1,3,4		C2,5,6		C9	C10,12,13	C11	C7
crystalline	210	217	233	243	201	217	227	191	160
medium	25.4	22.3	26.5	23.4	17.0	18.8	22.6	13.3	21.5
noncrystalline	3.3	0.49	0.47	3.3	0.60	0.95	1.0	0.48	4.3

91

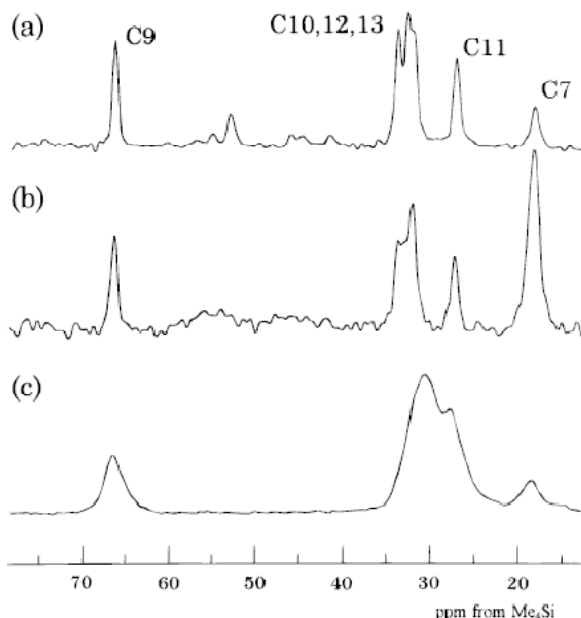


Figure 5. ¹³C NMR spectra of different components of PDBDM: (a) the crystalline component; (b) the medium component; (c) the noncrystalline component.

結晶成分選択スペクトル

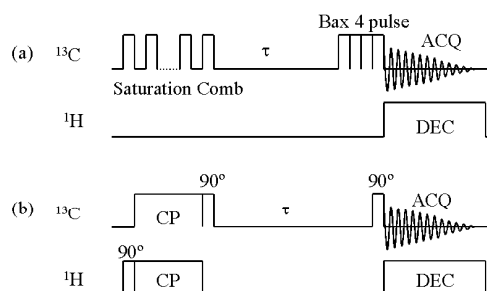
CPT1実験, $\tau = 100\text{s}$

中間成分選択スペクトル

CPT1実験, $\tau = 8\text{s}$ のスペクトルを $\tau = 100\text{s}$ のスペクトル(結晶成分選択スペクトル)から引き算する。

非晶成分選択スペクトル

Saturation recovery法, $\tau = 2\text{s}$



92

Web上に多数のNMR解説ページがありますが、その中からいくつか紹介します。

(1)京都大学大学院理学研究科化学専攻 分子構造化学研究室(竹腰清乃理教授)
固体NMRチュートリアル <http://bake.kuchem.kyoto-u.ac.jp/bun/tutorial/tutorial.html>

(2)防衛大学校応用科学群応用化学科 浅野敦志准教授
NMR基礎講座 http://www.nda.ac.jp/cc/users/asanoa/lectures/lec_by_asano.html

(3)北海道大学 引地邦男名誉教授
NMRノート http://www.h6.dion.ne.jp/~k_folder/

(4)Queen's University, "NMR course for the WEB"
Advanced NMR course
<http://www.chem.queensu.ca/FACILITIES/NMR/nmr/webcourse/index.htm>

(5)University of Cambridge, Lectures by James Keeler
<http://www-keeler.ch.cam.ac.uk/lectures/index.html>
Web上に公開された解説が次の著書になって出版されています。
"Understanding NMR Spectroscopy" 2nd. Ed., Wiley(2005)