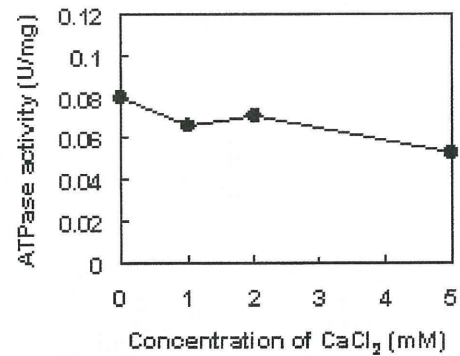
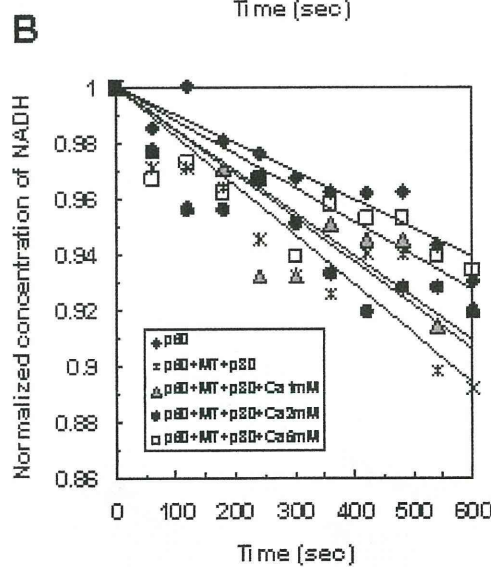
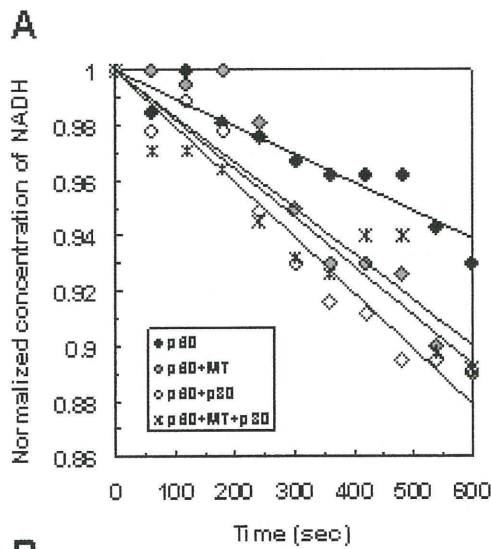


11282528_File000004_208922474.doc12/22/2011

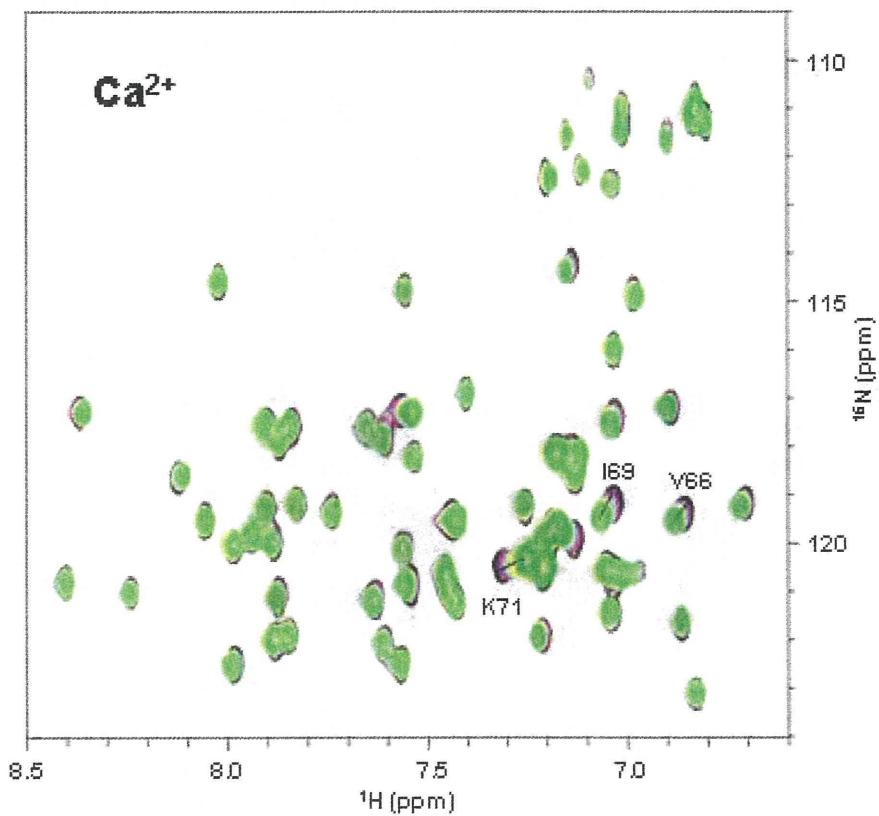
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Supplementary Figure 2

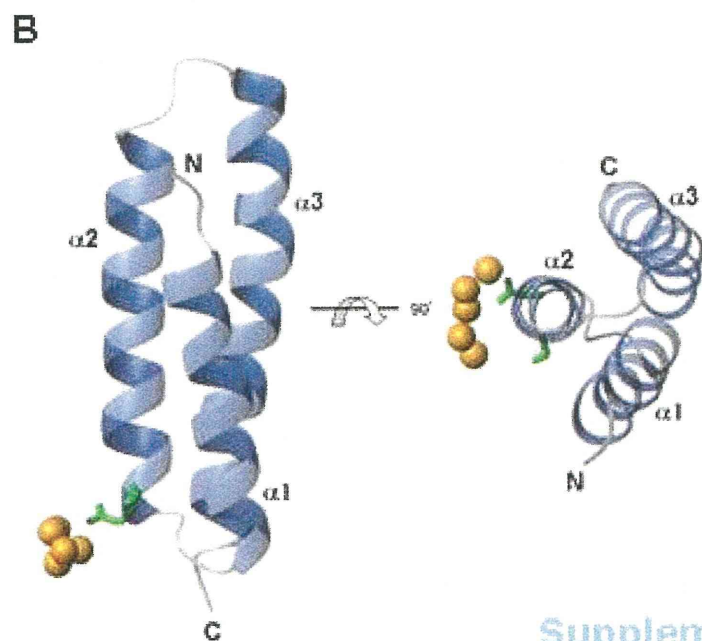
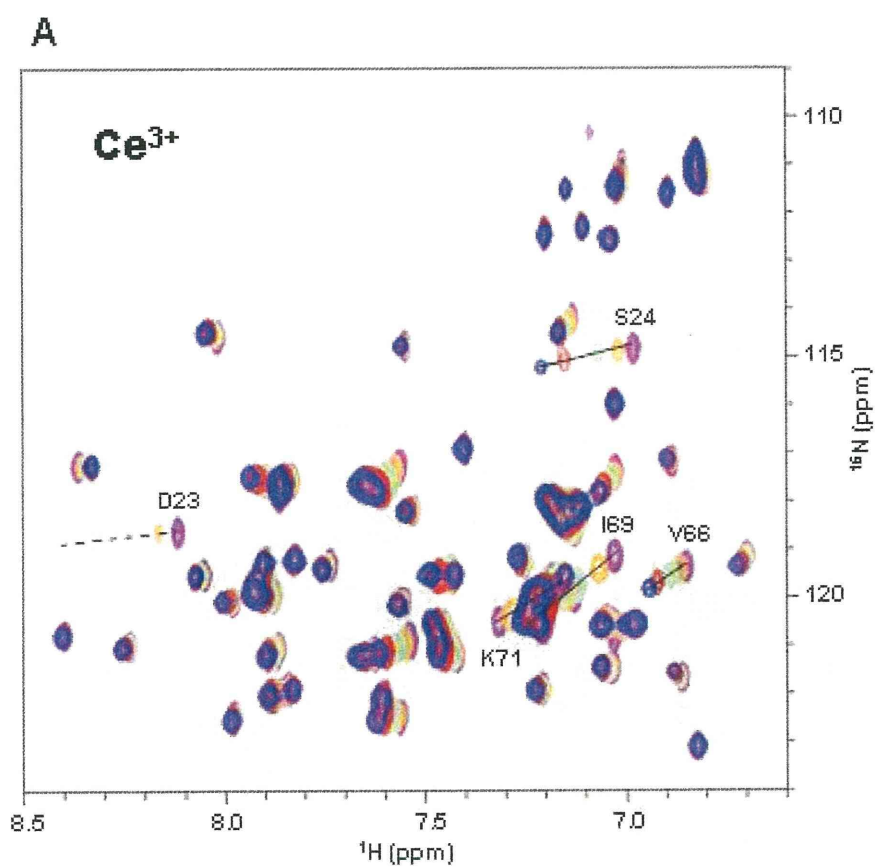
11282528_File000004_208922474.doc12/22/2011

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Supplementary Figure 3

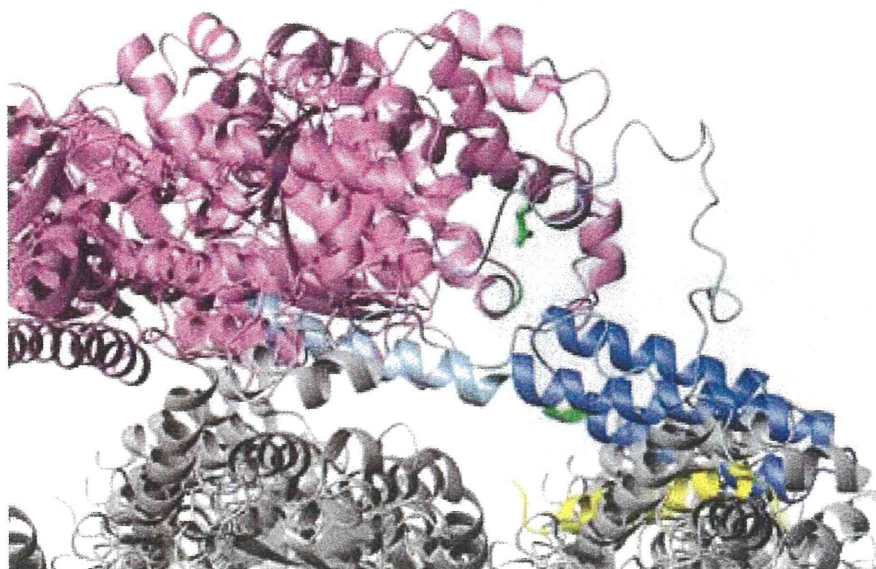
11282528_File000004_208922474.doc12/22/2011

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Supplementary Figure 4

11282528_File000004_208922474.doc12/22/2011

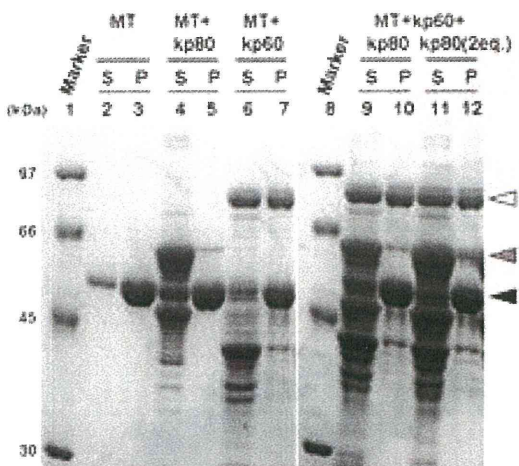
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Supplementary Figure 5

11282528_File000004_208922474.doc12/22/2011

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Supplementary Figure 6

1.1 はじめに— NMR 発展の歴史とノーベル賞—

いくつかの原子核は強い磁場中に置かれると、特定のエネルギーの電磁波を吸収するような性質をもつようになる。核磁気共鳴法 (nuclear magnetic resonance, NMR) はこの性質を利用した分光法である¹⁾。近年、分光分析法における NMR の重要性は、ますます増加しつつあるが、にもかかわらず初心者（特に化学系や生物系の学生で物理や数学が苦手な人たち）が学ぶには敷居が高いことは否めない。一つには NMR の発見の歴史から見て明らかのように、1940～1950年代にかけて、核スピンや電子スピンと NMR 現象が発見された当初、NMR の話題の中心が物理学と量子力学であっ

表 1.1 ノーベル賞から見た NMR 発展の歴史

	受賞理由	受賞者	受賞したノーベル賞
物理の時代	核スピン・電子スピンの発見	W. Pauli	ノーベル物理学賞 (1945)
		P. Kusch	ノーベル物理学賞 (1955)
	NMR 現象の発見	I. I. Rabi	ノーベル物理学賞 (1944)
		E. M. Purcell	ノーベル物理学賞 (1952)
	超伝導現象の発見	F. Bloch	ノーベル物理学賞 (1952)
		H. K. Onnes	ノーベル物理学賞 (1913)
	J. Bardeen ら	ノーベル物理学賞 (1972)	
時代の化学	二次元 NMR	R. R. Ernst	ノーベル化学賞 (1991)
医学・生物学の時代	タンパク質の NMR による立体構造決定	K. Wüthrich	ノーベル化学賞 (2002)
	MRI による画像解析法	P. Mansfield	ノーベル生理学・医学賞 (2003)
		P. Lauterbur	ノーベル生理学・医学賞 (2003)

たためであらう。その後、半世紀以上にわたる技術革新と装置の高度化が続けられてきた結果、高分解能 NMR 技術は 20 世紀後半に爆発的に発展した。こうした、NMR が「化学の時代」を経て「医学・生物学の時代」へと遷移しながら発展を続けているという経緯は、NMR 現象に関連のある成果に対して授与されたノーベル賞のリストからも見て取れる（表 1.1）。2002 年の K. Wüthrich 博士、2003 年の P. Mannsfeld 博士、P. Lauterber 博士らの NMR に関連する応用研究が二年連続してノーベル賞に輝いたことは記憶に新しい。

現在、NMR は溶液中の分子構造決定をはじめとして、固体物性研究のための固体 NMR や、生体分子を解析する構造生物学、代謝産物の混合物を網羅的に解析するメタボロミクス、画像診断を通じた医療への応用へと幅広い広がりを見せており、分光法の中でも特別な地位を占めている。その一方で、NMR 現象は、強い磁場中に置かれた原子核と電磁波の相互作用を利用した分光法であり、核スピンの量子力学的なふるまいについて、理論と実験がきわめてよく一致する方法論である。たとえば、測定中に各核スピンにおける量子力学的重ね合わせ状態を人工的に実現でき、しかもそれを任意に操作することができるので量子コンピューティングの装置としても注目されている。しかし、限られたスペースで、初学者の理解を優先するために、難しい量子力学や数学の話は他の成書³⁻⁵⁾に譲ることとして、本書では NMR を使ううえでの最低限の注意事項などを中心に説明することにする。実際、筆者の実感としては、後述する分極移動の項以外は、量子力学をほとんど知らなくても（古典的なモデルのみで）NMR 現象の概要が理解できる。

1.2 NMR の原理

1.2.1 核スピンとは

NMR とは核スピンの状態を観測する計測手法である。核スピンとは、原子や電子の状態を記述する波動方程式に出てくる量子数のうち、主量子数 n 、方位量子数 l 、磁気量子数 m の後に見出された第四の量子数（スピン量子数 s ）に由来する物理量のことであり、記号 I で表す。スピンを古典力学的にイメージしようとするならば、荷電粒子がそれ自体で「自転」するときに生じる磁気モーメントに対応し、原子核だけでなく電子にも存在する。電子のスピンは $1/2$ であり、外部の静磁場により $+1/2$ と $-1/2$ の 2 つのエネルギー準位に分裂する（Zeeman 分裂）。2 つのエネルギー差に相当する周波数の電磁波を照射されると、電子スピンは共鳴して、安定状態から励起状態

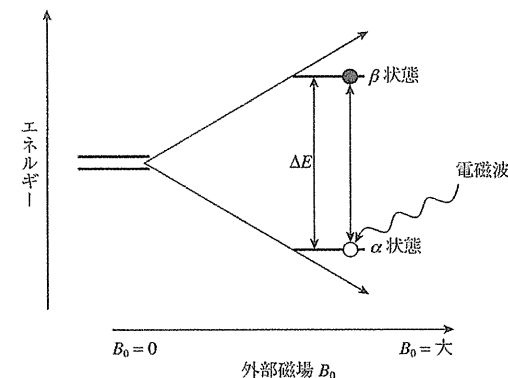


図 1.1 Zeeman 分裂

外部磁場により縮重していた核スピンの 2 つのエネルギー状態が分裂し、エネルギー差に相当する電磁波を吸収するようになる。

に遷移する（図 1.1）。この原理を利用した測定法が電子スピン共鳴法（electron spin resonance, ESR）であり、遷移金属化合物やラジカル分子の電子的性質を調べるのに用いられている。同様に、核スピンは $1/2, 1, 3/2, 2, \dots$ のように半整数または整数のとびとびの値をもち、エネルギー準位の分裂が起き、エネルギー差に相当する電磁波を吸収して核のスピン状態が変化する。これが核磁気共鳴法（NMR）である。装置開発の歴史的な経緯から、ESR では照射する電磁波の周波数を固定して外部の磁場の強さを変えていくのに対し、NMR では磁場の強さを一定にしておいて、周波数を変化させる方法が採られ、その後、一度吸収された電磁波が再放出される過程を計測するパルスフーリエ変換（Fourier transform, FT）-NMR へと変化した（後述）。

1.2.2 NMR で観測可能な核種

さて、原子はそれぞれの原子核の原子番号と質量数に応じて、固有の核スピン値をもっている。一般的には、質量数が奇数の原子は $1/2, 3/2, 5/2$ などの半整数の値を、質量数が偶数かつ原子番号が奇数の原子は $1, 2, 3$ などの整数の値をとる。質量数が偶数かつ原子番号が偶数の原子ではスピンは 0 となる。NMR 現象は、この核スピンの 0 でないすべての原子において可能である。しかし、 $I \geq 1$ の核では NMR の吸収線の線幅の広幅化が起るため高分解能 NMR に適さない。一方、特に $I = 1/2$ の核種では線幅の鋭い信号が得られるため、理論的取り扱いが容易なことも相まって、よく利用されるようになった。化学・生物学分野でよく利用される原子核の例を表 1.2 に

表 1.2 NMR で観測可能ないくつかの核の性質

核	原子番号	質量数	スピン	天然存在比 (%)	磁気回転比 ($10^7 \text{ rad s}^{-1} \text{ T}^{-1}$)
中性子 (n)	0	1	1/2	0	-18.325
^1H	1	1	1/2	99.9	26.752
$^2\text{H(D)}$	1	2	1	0.01	4.107
^{13}C	6	13	1/2	1.07	6.728
^{15}N	7	15	1/2	0.368	-2.712
^{19}F	9	19	1/2	100	25.162
^{23}Na	11	23	3/2	100	7.081
^{31}P	15	31	1/2	100	10.839
^{51}V	23	51	7/2	99.8	7.046
^{111}Cd	48	111	1/2	12.8	-5.698
^{113}Cd	48	113	1/2	12.2	-5.961
^{129}Xe	54	129	1/2	26.4	-7.452

示す。核によっては、特定の同位体（放射能をもたない同位体＝安定同位体）のみが NMR で観測可能である。たとえば ^{13}C と ^{15}N は天然存在比が小さいが（約 1% と 0.4%）、十分量の試料を準備するか安定同位体で標識した試料を用いれば、NMR が観測可能である。

1.2.3 NMR の原理の古典的モデルによる説明 —巨視的磁化は小さな自転する棒磁石—

前述のように、原子核がもっている電荷は原子核のある軸に沿って回転運動することにより、あたかも微小な磁気双極子を生じているようにふるまい、いわば自転している小さな磁石とみなすことができる（古典的モデル）。それぞれのスピンのもつ磁石の大きさを電荷になぞらえて磁荷（magnetization；磁化と表記することが多い）と呼ぶ。外部磁場がないときには、この小さな磁石の回転軸はランダムな方向を向いているが、外部磁場（静磁場） B_0 が与えられると、静磁場に平行な軸の回りに歳差運動する（図 1.2）。この運動を Larmor 歳差運動と呼び、その周波数（Larmor 周波数） ω と外部磁場の強さには以下の式で与えられる比例関係がある。

$$\omega = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (1.1)$$

この比例定数 γ のことを磁気回転比と呼び、個々の原子核は固有の磁気回転比 γ の値をもっている（表 1.2）。Larmor 歳差運動を行っている核スピンの対し、Larmor 周波

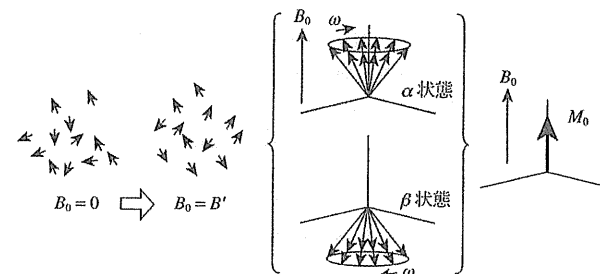


図 1.2 個々のスピンと巨視的な磁化

それぞれのスピンは α または β 状態であるが全体としては B_0 方向の巨視的な磁化をもつようになる。

数に等しい電磁波が外部から照射されると、核スピンは磁気共鳴し、その電磁波を吸収する。たとえば、11.7 T（テスラ）の磁場中では、 ^1H 、 ^{13}C 、 ^{15}N はそれぞれおよそ 500 MHz、125 MHz、50 MHz の周波数をもつ電磁波で共鳴する。

スピン量子数 I をもつ原子核の核運動量 p と磁気モーメント μ の間には、前述の磁気回転比に関連して以下の関係が成り立っている。

$$p = I \frac{h}{2\pi} = I\hbar \left[\hbar = \frac{h}{2\pi} \right] \quad (1.2)$$

$$\mu = \gamma p \quad (1.3)$$

ここで、 h は Planck 定数である。スピン量子数 I をもつ原子核の静磁場 B_0 中でのエネルギー準位は量子化されており、 $2I + 1$ 個に分裂する。エネルギー準位 E_m は量子状態 m の値 ($-I, -I + 1/2, \dots, 0, I - 1/2, I$) に従い、

$$E_m = -\gamma \hbar m B_0 \quad (1.4)$$

となる。 $I = 1/2$ の核 (^1H 、 ^{13}C 、 ^{15}N など) では $m = 1/2$ と $-1/2$ の 2 つの状態のみが存在し、それぞれを α 状態と β 状態と呼ぶ。図 1.2 に示したように、個々のスピンは α 状態または β 状態の 2 つの状態の量子力学的重ね合わせである。それぞれの状態のスピンは、いずれもそれぞれの状態に対応する円錐上で歳差運動をしている。

1.2.4 NMR 測定の感度が悪いのはなぜか：スピン数

現実に NMR 装置が観測するのは、多くのスピンのアンサンブルを平均したものである。これを巨視的な磁化（熱平衡磁化）という。巨視的な磁化は静磁場方向 (z 軸) の成分 M_z をもち、一方、 xy 平面方向成分 M_x 、 M_y はそれぞれ平均化されてゼロになっている。この巨視的な z 磁化は α 、 β の 2 つの状態の占有率の差とスピン 1 個当たり

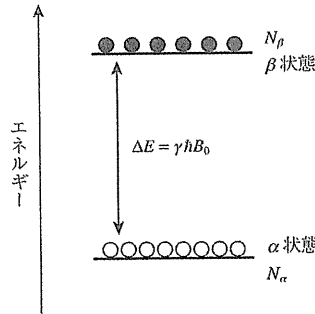


図 1.3 スピンの異なる 2つの状態とその占拠数の模式図

スピンの 2つの状態にはエネルギーの差があり、それぞれの状態を占拠するスピンの数が異なる。

の磁気モーメントの z 成分 m_z より

$$M_z = (N_\alpha - N_\beta)m_z \quad (1.5)$$

と表される。ただし N_α, N_β はそれぞれのスピンの占有率で、 $N_\alpha + N_\beta = 1$ である (図 1.3)。熱平衡状態における占有率の差を Boltzmann 分布の式から計算すると、

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = \exp(\Delta E/k_B T) \approx 1 - \Delta E/k_B T \quad (\Delta E/k_B T \ll 1) \quad (1.6)$$

$$N_\alpha - N_\beta \approx 2 \Delta E/k_B T \quad (1.7)$$

となる。 ^1H の共鳴周波数が 500 MHz (外部磁場 11.7 T) のとき、両状態のエネルギー差 ΔE はわずか $2.0 \times 10^{-4} \text{ kJ mol}^{-1}$ にすぎないので、式 (1.7) に室温での $k_B T$ (2.5 kJ mol^{-1}) を代入することにより両状態の占有率の差はおよそ 10^{-5} であることがわかる。言い換えれば、巨視的な磁化として観測されているものは 10 万個のプロトンのうちのわずか 1 個分であることを意味している。他の分光法に比較して NMR の感度が低い理由はここにある。その反面、物質に吸収されるエネルギーが非常に少ないということは、NMR や MRI のもつ低い侵襲性につながっているともいえる。

一方、巨視的な磁化 M_z の大きさは

$$M_z = \frac{\gamma^2 \hbar^2 I(I+1)}{3k_B T} B_0 \quad (1.8)$$

となる。この式から磁気回転比が大きく外部磁場強度が強ければ強いほど、磁化が強くなり (感度が良くなり)、また温度が低ければ低いほど感度が上がることが予測される。

1.3 パルス FT-NMR 装置

1.3.1 原理

さて、こうして得られた巨視的な磁化 $M = M_z$ が z 軸に平行な静磁場 B_0 中で、さらに z 軸に垂直に振動磁場 B_1 を掛けたときにどのように時間変化をするのかについて解析する。一般に核磁気モーメントの運動方程式は、核磁気に作用する磁場 B (ベクトル量であることに注意) について

$$\frac{d\mathbf{M}}{dt} = \gamma \mathbf{M} \times \mathbf{B} \quad (1.9)$$

と記述できる。この式を x, y, z の 3 成分に分けて書き、それぞれに xy 平面での巨視的な磁化の減衰を表す項 T_2 (横緩和) と z 軸上での磁化の回復を表す項 T_1 (縦緩和) を含めた運動方程式のことを Bloch 方程式といい、以下のように表される。

$$\frac{dM_z}{dt} = \gamma(\mathbf{M} \times \mathbf{B})_z - (M_z - M_z^0)/T_1 \quad (1.10)$$

$$\frac{dM_x}{dt} = \gamma(\mathbf{M} \times \mathbf{B})_x - M_x/T_2 \quad (1.11)$$

$$\frac{dM_y}{dt} = \gamma(\mathbf{M} \times \mathbf{B})_y - M_y/T_2 \quad (1.12)$$

さて、周波数 ω_1 で振動する磁場 B_1 は xy 平面上を時計回りに角速度 ω_1 で回転する成分と反時計回りに ($-\omega_1$) で回転する成分のベクトル和であると考えられる。いま、振動磁場は実験室固定の座標系 (実験室座標系) で見ているが、それとは別に z 軸に沿って振動磁場と同じ角速度で回転する座標系 (回転座標系) x', y', z を導入すると、上記の回転磁場は、たとえば回転座標系における x' 軸に沿って掛けられた磁場として記述できる (図 1.4)。この回転座標系内の磁化 \mathbf{M} の運動方程式は

$$\begin{aligned} \left(\frac{d\mathbf{M}}{dt} \right)_{\text{rot}} &= \gamma \mathbf{M} \times (\mathbf{B} + 2\pi\omega_1/\gamma \cdot \mathbf{z}) \\ &= \gamma \mathbf{M} \times (B_0 \cdot \mathbf{z} + B_1 \cdot \mathbf{x} + 2\pi\omega_1/\gamma \cdot \mathbf{z}) \\ &= \gamma \mathbf{M} \times \{ 2\pi(\omega_1 - \omega)/\gamma \cdot \mathbf{z} + B_1 \cdot \mathbf{x} \} \end{aligned} \quad (1.13)$$

で表される。ここで \mathbf{x}, \mathbf{z} は x' 軸と z 軸の単位ベクトルである。つまり、周波数が $\omega_1 = \omega$ となるように振動磁場を与えると、回転座標系では磁化 \mathbf{M} はあたかも静磁場 B_0 を感じていないかのようにふるまい、その運動は振動磁場の強度 B_1 によって回転運動することがわかる。すなわち $\omega_1 = \omega$ が共鳴条件である。 $B_1/\gamma = \theta$ とおくと

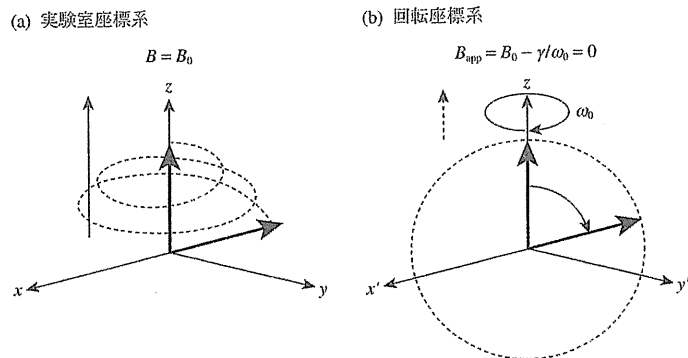


図 1.4 実験室座標系と回転座標系

z 軸に沿って Larmor 周波数で回転する回転座標系を導入すると、スピンは見かけ上外部磁場がゼロになったようにふるまう。

$$\left(\frac{\partial \mathbf{M}}{\partial t}\right)_{rot} = \theta(\mathbf{M} \times \mathbf{x}) \quad (1.14)$$

となり、回転座標系における $y'z'$ 平面上での角速度 θ での回転運動であることがわかる。つまりパルス B_1 を掛けている時間 t_p に応じて、磁化 \mathbf{M} の向きは $z \rightarrow y' \rightarrow -z \rightarrow -y'$ と変化していく。磁化の回転角 ($= \theta t_p$) をパルスのフリップ角 (flip angle) といい、磁化の向きを $90^\circ (= \pi/2)$ だけ変化させるパルスを 90° ($\pi/2$) パルス、 $180^\circ (= \pi)$ 変化させるパルスを 180° (π) パルスと呼ぶ。ところで、このパルスを与えるための振動磁場は y' 軸に平行な方向からも掛けられる。(あるいは $x'y'$ 平面上の任意のどの方向でも掛けることができる。これは単にプローブコイルに流す RF (radio frequency) パルスの正弦波の位相で制御できる。) x, y など、パルスを与える方向をパルスの位相と呼び、 $90(x), 180(y)$ のように表記する (一般に $90^\circ_x, (90^\circ)_x, (\pi/2)_x$ などとも表記される)。

このようにして、パルスを掛けた後に生じてくる磁化 \mathbf{M} の x' 成分 M_x , y' 成分 M_y をそれぞれ x 磁化, y 磁化と呼び、横磁化と総称する。横磁化はパルスを切った後、Larmor 周波数で z 軸の回りに歳差運動を続けるので、観測コイルに誘導電流を発生する。パルス FT-NMR とは、熱平衡磁化にパルスを与えて横磁化を生じさせ、それを振動電流として観測し、フーリエ変換してその周波数成分を解析する NMR の方式である。

1.3.2 ハードウェアの構成²⁾

NMR の装置には粉末や固体試料を対象とする固体 NMR 専用の装置と溶液試料を対象とする溶液 NMR 専用の装置の 2 種類がある。現在用いられている高分解能の装置のほとんどは、パルス FT-NMR 方式を採用している。つまり、静磁場中の試料に電磁場のパルス当てて吸収させ、スピンを励起した後、そのスピンの熱平衡状態に戻る過程で放出する電磁波を観測し、フーリエ変換してスペクトルを得ている。装置は、静磁場を発生させる超伝導磁石、電磁波 (パルス) の照射と、信号電流の観測を担当するアンテナに相当するプローブコイル、試料に磁場勾配 (グラディエント) を掛けるためのグラディエント装置、パルスを発生させるトランスミッター、アンプ、レシーバー (受信器)、AD 変換器 (analog-to-digital converter) およびそれらをコントロールしデータを蓄積するコンピュータから構成されている (図 1.5)。発信と受信を同じコイルで行い、また発生しているキャリア周波数が数十 MHz ~ 数百 MHz であり、そのキャリア周波数によって運ばれる情報がちょうど数十 kHz までのオーディオ信号と同程度の周波数帯であることを考えると、NMR 装置に最も原理的に似ているものは FM トランシーバーであろう。

1.3.3 超伝導磁石

高磁場の NMR 装置でまず目につくのが巨大な磁石である。強力かつ均一で時間変動の少ない外部磁場を発生する磁石として、超伝導磁石の普及が進んだ。NiTi や Ni₃Sn などの線材からなるコイルを液体ヘリウムで冷却し、永久電流を蓄えることで磁石とする。磁石は二重の魔法瓶の内部に設置されており、外側に液体窒素、内側に液体ヘリウムが入っている。超高磁場 (800 MHz ~) を達成するためには、その液

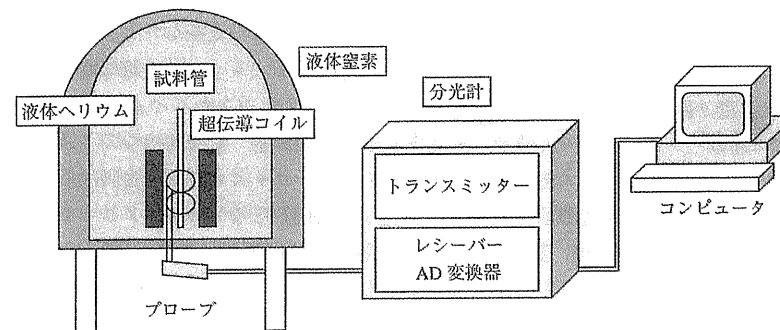


図 1.5 FT-NMR 装置の概略

1 NMR の原理

体ヘリウムを特殊なバルブとポンプで減圧しながら、4.4 K よりもさらに低温にする必要がある。磁石の中央には空洞（ボア）があり、プローブコイルが設置される。また主磁場を発生する超伝導磁石の内側に、磁場を均一にするための小型の磁石群（シムコイル）が装備されている。

1.3.4 プローブ

NMR の装置では、電磁波（RF）パルスの照射と信号観測の双方を同一のプローブコイルで行う（MRI 装置では異なるコイルを使うことも可能である）。プローブコイルには一般的にソレノイド型またはサドル型の形状のコイルが用いられる。多重共鳴の実験などでは複数の周波数を照射する必要があるが、装置のスペースの関係上、プローブ中に設置できるコイルの数は限られている。そのため通常プローブ内に設置できる RF コイルは 2 個までであり、それぞれのコイルは 2 種類の共鳴周波数に共鳴するようにチューニングしてある。たとえば、三重共鳴（triple-resonance）実験に用いられるプローブは、試料に近い側の内側のコイルを ^1H と ^2H に、外側のコイルを ^{13}C と ^{15}N にそれぞれダブルチューニングしている。それぞれのコイルには共鳴周波数チューニング用の可変コンデンサーとインピーダンスマッチング用の可変コンデンサーが付いていることが多く、試料ごとに最適なところに調整する（しばしば、この可変コンデンサーのネジを限界以上に廻して壊す事故があるので、取り扱いには注意が必要である）。試料に近い側のコイルのほうがパルス励起時のロスが少なく、検出感度も高い。したがって、 ^{13}C 用や多核用のプローブでは ^1H を照射するためのコイルが外側に巻いてある。一方、三重共鳴実験用のプローブでは、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ の磁化を磁化移動により ^1H に移して観測を行うので、 ^1H 用コイルが内側に巻いてある。こうしたプローブのことをインバースプローブと呼ぶ。

溶液 NMR 用の測定には、通常は直径 5 mm のガラス試料管に適した内径をもつプローブ（5 mm プローブ）が使われる。しかし、希薄試料（溶解度が限られているため濃度を上げることはできないが量としては十分にある試料）の測定のために 10 mm プローブや 8 mm のプローブが、微量試料の測定のために 1 mm や 3 mm のプローブがそれぞれ作られている。また、高速液体クロマトグラフィーに直結して、分離・分析を行うことのできるようなフローセルプローブも入手可能である。

NMR の観測感度を向上させる方法の一つとして、コイルの抵抗を小さくすることが考えられる。コイル線材を超伝導体になると同時にプローブの内側のコイルとプリアンプ部分を極低温に冷却することにより、プローブ感度を 1 桁程度向上させる技術が実用化されている（cryogenic probe）。

1.3.5 分光計

NMR 装置の磁石の側に設置してある中型のキャビネットの中に収めてあるのが、NMR の分光計である。分光計は、装置制御系、パルス系、磁場勾配系、観測系のそれぞれのユニット群からなる。装置制御系ユニットは、分解能調整、ロック信号の検出、試料の回転制御、温度コントロールなどを行う。パルス系ユニットには RF パルスを発生させるための発振器、周波数シンセサイザー、波形ジェネレーター、位相コントローラ、パワーアンプなどが含まれる。これらのユニットは、励起する核種の数だけ（発生させる周波数帯域のチャンネルの数だけ）必要である。たとえば、重水素デカップリング（核どうしの相互作用をなくすこと、3.8.1 項参照）を行いながら $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ の三重共鳴実験を行うときには、4 チャンネルのユニットが必要となる。それとは別に磁場勾配ユニットとして、磁場勾配を制御するための発振器とパワーアンプが必要である。観測系ユニットにはレシーバー、信号増幅用のプリアンプ、周波数変換機、中間周波数増幅用のアンプ、最終周波数用のアンプと AD 変換器が含まれる。

1.4 溶液 NMR 測定の流れ

1.4.1 サンプルの調製

NMR 測定を行う試料は、低分子の場合は重水素 (^2H あるいは D) 化された有機溶媒、たとえば重クロロホルム (C^2HCl_3) や重ジメチルスホキシド（重 DMSO, $\text{d}_6\text{-DMSO}$ ）などに溶解させる。試料が生体分子（タンパク質・核酸・ペプチド・糖）などの場合は重水に溶解させるが、NH 基などの交換性のプロトンの観測が特に重要な意味をもつ場合には、90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ $^2\text{H}_2\text{O}$ などに溶解させる。水系の溶媒では、pH が NMR 信号の位置（化学シフト、後述）に影響を与えることがあるので、 NaOH や ^2HCl を用いてあらかじめ pH を調整しておくか、リン酸緩衝液などプロトンを含まない緩衝液を用いるとよい。試料調製中に生じた不溶物はフィルターなどで取り除く。また、試料に遷移金属イオンや金属粉が混入すると、NMR 信号が広幅化したり化学シフトの位置が変化するので、イオン交換樹脂などで前処理をする。試料溶液には、0.1 ~ 1 mM 程度の化学シフト標準物質（テトラメチルシラン；TMS など）を入れて、化学シフトの校正に用いる。そして、試料溶液をガラス管に入れて封をする。5 mm の試料管で 0.5 ~ 0.6 mL の試料溶液を用いるのが一般的である。後述する NOE（核オーバーハウザー効果）の測定の場合には、溶媒中の溶存酸素の常磁性効果がデータに影響を与えることがあるので、減圧状態で超音波を掛けるなどの脱気操作も必要である。

1.4.2 サンプルの装置への導入

このようにして試料溶液を入れた NMR 試料管を、サンプルホルダー（スピナー）にセットする。試料管は、圧縮空気によってプローブの上部にわずかに浮いた状態でセットされ、15 Hz 程度の回転状態で測定される。スピナーにセットする際に、試料管ゲージを利用して、試料管の底がプローブの底に当たらないよう、また試料がプローブコイルの中心になるように注意する。NMR 装置の試料導入のスイッチを排出側にすると圧縮空気が送られるので、試料をスピナーごと磁石上部の穴に浮かせるように置く。そして導入スイッチを導入側にすると試料がプローブ内部にゆっくりと下りていく。

1.4.3 装置のパラメータの設定と調整

A. 溶媒ロック

試料を装置に導入したら、まず溶媒ロックを行う。溶媒ロックとは、測定中の温度や磁場の変動を検出して発振器・レシーバーの周波数を補正するために、目的とする NMR 信号よりもはるかに低い周波数で共鳴する重水素の NMR 信号に着目して、その周波数を同時に観測し、基準とする技術のことである。この目的のために、 ^1H 観測用のコイルがしばしば ^2H にダブルチューニングされている。通常、低分子化合物の NMR 試料は、重水素化溶媒に溶解するので、その溶媒の ^2H シグナルをロックに用いる。生体分子が試料である（水溶液）場合には 5～10% の $^2\text{H}_2\text{O}$ を溶媒に添加する。コンピュータ画面より適切なロック溶媒を選んで、ロックを ON にすると、画面またはインジケータにロック信号の強さが表示される。まれに、装置の分解能調整値が大幅に違っているとロックが掛からないことがある。その場合には後述の分解能調整操作を行ってからもう一度ロックを掛けることを試みる。

B. プローブのチューニング・マッチングと分解能調整

NMR の共鳴条件は試料により（より正確には試料溶液の磁化率・誘電率の違いにより）異なる。それを補正し測定を高感度で行うために、多核測定用のプローブのみならず、いわゆる専用プローブにも共鳴周波数を微調整するための可変コンデンサーが装備されており、それを調整する必要がある。この操作をチューニング・マッチングと呼ぶ。たとえば、 $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ の三重共鳴実験用プローブには、ロック用の重水信号の分まで含めると最大で 8 つの可変ノブがあるので、それぞれの核ごとに調整する必要がある。その後、分解能調整を行う。分解能調整とは、試料が感じる磁場を試料の全領域でなるべく均一にすることである。具体的には、シムコイルに流す電流を外側から調整することで試料を取り巻く磁場の均一性を上げる。その結果、試料全域で

の共鳴信号の周波数も均一となり、スペクトル線幅が狭く高分解能の測定が可能となる。一方、分解能調整がおろそかだと、NMR の信号線の線幅が広がったり、線形が左右対称でなかったり、ベースラインがうねったりして、解析に支障が出る。分解能調整は試料を交換するごとに毎回行う必要がある。

C. パルス・delay・その他のパラメータの適切な設定

上で述べた事項を調整した後、これからどのような測定を行うのかに応じて、必要なパルスプログラムとパラメータファイルを読み込み、値を設定する。測定時に特に重要なパラメータ（通常はパラメータファイルにあらかじめ設定してある）として、スペクトルの中心周波数、 $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ の基準パルス長とパルス強度、測定を行うためのパルスプログラム、パルスプログラムごとに設定を要する各変数（各パルスのパルス長とパルス強度の設定、delay の長さ、ループの繰り返し回数など）の設定がある。このうち、測定ごと・試料ごとに毎回確認すべきものは、 ^1H 核の 90° パルスのパルス長とパルス強度である。さらに、測定を行う繰り返し回数、ダミースキャン（装置が定常状態になるまでデータ取り込みをせずにパルスを照射すること）の数、繰り返し実験の間の待ち時間に相当する delay などの値は、試料濃度と利用可能な測定時間の兼ね合いにより適切に設定する。また、測定データの取り込み時における信号のオーバーフローを避けるために、適切なレシーバーの増幅率（receiver gain: ゲイン値）を設定する。それらの設定がすべて完了したら、いざ測定スタートである。

1.4.4 測定スタート

測定をスタートさせるコマンドを打ち込む。これで、測定が終了するまでは何も触れる必要がない。しかし、複雑なパルスを用いた測定を行うときには、測定直後にプローブを破壊する過電流が流れていないか、試料に温度上昇が起こっていないかなどを確認しなければならない。測定開始直後は、装置のエラー表示画面などに眼を配り、異常を発見した場合には速やかに測定を停止する。なお、多くの装置では、測定中に別のコンピュータのディスク領域を利用して、データの処理や別の測定のためのパラメータ設定などができる。

1.4.5 データの保存と管理

測定が終了したらデータを保存する。その際、データのみならず、測定時に用いたパラメータのファイルも保存しておく。よく起きやすいのは、測定済みのデータが格納されている記憶領域に、新規に測定したデータを上書きして以前のデータが消えるという事故である。NMR 装置を制御するコンピュータのシステムのデータ構造やディレクトリ階層の構成を正確に理解していることが望ましい。

1.5 FID の観測およびデータ処理方法^{4,5)}

1.5.1 デジタルサンプリング

パルス FT-NMR において、NMR データはすべて AD 変換器を通じてデジタルデータとしてコンピュータに記録される。パルスにより誘起された xy 平面上の磁化は、プローブコイルに電流を誘導し、Larmor 周波数 ω にスペクトルの情報 ($\Delta\omega$) を上積みした周波数で ($\omega + \Delta\omega$)、一定の時間 (通常 1 秒以内) で自由減衰する微弱な振動電流となる。この減衰していく信号のことを自由誘導減衰 (free induction decay, FID) 信号と呼ぶ。数百 MHz の周波数の信号は、一度数十 MHz 程度の間周波数の信号 ($\omega_{IF} + \Delta\omega$) に変換されてから増幅され、最終的にスペクトル情報の周波数成分 ($\Delta\omega$) のみを取り出される。スペクトル情報の周波数帯域は核種にもよるが、せいぜい数十 kHz 程度、つまりオーディオ信号程度の周波数領域である。高感度に信号を検出する目的で、中間周波数をオーディオ波に変換する過程において位相敏感検波 (phase sensitive detection, PSD) が行われる。これは、一般的な二重平衡変調器 (double-balanced mixer) 回路に、観測信号と中間周波数の基準となる信号を入れ、両者の積に相当する信号を取り出し、中間周波数を中心とするバンドパスフィルターを通すことでノイズ成分をカットする方法である。さらに、位相を 90° だけずらした基準信号についても同じことを行って取得したデータも取り込む。この 2 つのデータのことを FID データの実部 (real) と虚部 (imaginary) と呼ぶ。線幅の狭い純吸取型のスペクトルを得るためにはこれら両方が必要である。最終的に中間周波数成分を取り除かれたスペクトルデータはさらに増幅され、適当な時間間隔を開けてデジタルサンプリングされ、AD 変換器を介してデジタルデータに変換される。この FID データ (縦軸が電流強度、横軸が時間) を解析して、横軸が周波数 (化学シフト)、縦軸が各周波数成分の強度である。いわゆるスペクトルデータを得るために、フーリエ変換の操作が用いられるのである (図 1.6)。

1.5.2 ゼロフィリング処理とウィンドウ関数

FID データをフーリエ変換する際に、主に解析をやすくする目的で、いくつかのデジタル信号解析技術が用いられる。たとえば、FID 信号のサンプリング時に過剰なサンプリング (オーバーサンプリング) を行い、デジタルフィルターによって目的帯域のみを切り出すことで、単なる信号対雑音比 (signal-to-noise ratio, SN 比) の改善のみならず、溶媒由来の不要な信号の除去などを行う。また、FID 信号から適当なベ-

スライン関数を差し引くことによっても、溶媒由来の信号を低減させることが可能である。さらに FID 信号に適当なウィンドウ関数を掛けることで、フーリエ変換後のスペクトルの線形を見かけ上変化させ、線幅を鋭くして解析を容易にすることができる。また FID データの時間軸の後ろの部分は信号が減衰しきってノイズ成分のみが含まれていることも多い。その場合、その部分のデータをウィンドウ関数によって切り捨てて、空のゼロデータを付加する (ゼロフィリング; zero filling) ことで、フーリエ変換後のスペクトルの SN 比とデジタル分解能の両方を改善させることも可能である (図 1.6)。

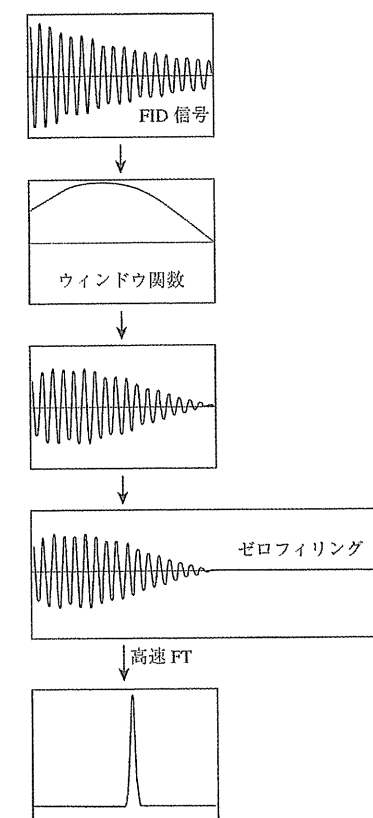


図 1.6 FT-NMR のデータ処理の流れ

FID 信号にウィンドウ関数を掛け合わせ、ゼロデータを後半に補った後、フーリエ変換することでスペクトルが得られる。

1.5.3 位相補正とベースライン補正

ゼロフィリング処理やウィンドウ関数による処理などの FID 信号に対する前処理が終わったら、フーリエ変換を行う。フーリエ変換を行った後にまず行わなければならない処理が、位相補正である。位相に関する補正には 0 次と 1 次の補正值（単位は度）があり、それらを適宜に変化させながら、すべてのシグナルが上を向くように設定する。その後、シグナルのない領域のシグナル強度がゼロになるように、ベースラインを補正する。

1.5.4 化学シフトの補正

NMR から得られる情報のなかで最も重要なものは共鳴周波数であり、通常は後述する化学シフトの形で表記する。化学シフトの単位は無名数である ppm である。試料調製時に化学シフトが既知の標準物質を入れておき、その化学シフトが 0 ppm になるようにデータ処理を行うときに校正するのが一般的である（内部標準という）。

1.5.5 シグナルの積分による定量

（通常の一次元の）NMR スペクトルにおいて、シグナルの強度は、通常、そのシグナルを与える原子核の個数に比例する。たとえば、エタノール ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$) のプロトンスペクトルにおいて、メチル基、メチレン基、水酸基のシグナル強度比は 3:2:1 になる。t-ブタノール ($(\text{CH}_3)_3\text{-C-OH}$) ではメチル基と水酸基のシグナル強度比は 9:1 となる。こうした情報は、スペクトルの帰属や化学構造の決定に役立つので、測定後のスペクトルについてはそれぞれのシグナル強度の積分を行う。

1.6 NMR で何がわかるか—NMR が与える情報^{5~8)}—

溶液 FT-NMR 測定で得られる情報のうち、最もよく解析に用いられるものは、共鳴周波数（化学シフト）とカップリング定数である。ほかに緩和時間、核オーバーハウザー効果、残余双極子相互作用などもあるが、本節では前記の二つについて述べる。

1.6.1 化学シフト

A. 原理と定義

核スピンの共鳴周波数は、核に働いている（核スピンの感じる）磁場の強さに比例していることはすでに述べた。実際の化学物質中の ^1H や ^{13}C などの原子核は、原子核を取り巻く電子雲に覆われているが、その電子が軌道上で運動することにより

生じる局所的な磁場が外部磁場を打ち消すように作用したり（遮蔽）、場合によっては強めたり（反遮蔽）するため、実際に原子核が感じている磁場と外部磁場との間にずれが生じる。そのためそれぞれの原子核の共鳴周波数は、核の置かれた化学的環境、たとえばその原子核がどのような化学結合をしているか、などを反映する。たとえば、ある静磁場中で、分子中のある位置に存在する ^1H 核は 100.0000 MHz で歳差運動するのに対して、別の位置にある ^1H 核は 100.0002 MHz で歳差運動するとする。その差は非常に小さいので、便宜上、差の割合を 100 万倍して ppm という単位で表す ($(100.0002 - 100.0000 \text{ MHz}) / 100.0 \text{ MHz} \times 1,000,000 = 2 \text{ ppm}$)。このように共鳴周波数と基準となる周波数とのずれを基準周波数で割った値を化学シフト δ と呼ぶ。符号は基準周波数より共鳴周波数が低い場合を + と取る。化学シフトの基準として、 ^1H 、 ^{13}C -NMR ではテトラメチルシラン (tetramethylsilane, TMS) のメチル基の信号を 0 ppm とするのが一般的である。このようにして定められた化学シフトの値は、測定する他の条件が同じであるならば、個々の化合物の原子団についてほぼ一定の値を示し、その値は外部磁場の強度によらない。そのためそれぞれの原子核の化学シフトの情報に基づき、その共鳴線が化合物のどの原子団に属するのかを帰属 (assignment) でき、化学構造の決定が可能となる。図 1.7 に一次元 (1D) NMR スペクトルの一例を示した。

B. 磁氣的等価性

さて、化学物質において、単結合はその結合を挟んだ原子の二面角 (dihedral angle) が可動である、ということを知っているであろうか？ 温度にもよるが、溶媒に溶けた化学物質のメチル基は、メチル基の根元の単結合の回りで高速に回転していると考えてよい。すると、メチル基についているそれぞれの ^1H は、回転がゆっくりならば区別することに意味があるが、NMR 現象を観測する時間 (数十 ms から数秒)

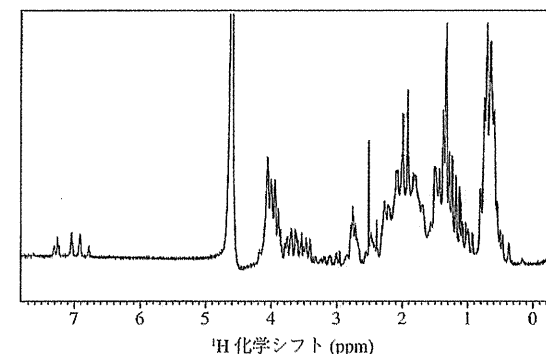


図 1.7 ^1H -NMR スペクトルの例（試料はペプチド）

4.7 ppm 付近の大きなピークは溶媒 D_2O 中に混入している H_2O 由来のシグナルである。

の間で高速に入れ替わっているような場合には区別できない。区別できないので、同じ化学シフトに1本のシグナルが観測される^{*1}。このような状態を磁氣的に等価であるという。磁氣的等価性は、化学シフトを解析してシグナルを帰属するときの重要な概念の一つであり、¹H-NMR だけではなく、¹³C-NMR や ¹⁵N-NMR においても普遍的に成立する概念である。たとえば、前述のt-ブタノールについて考えてみると、各メチル基を構成するプロトンどうしは磁氣的に等価である。しかし、さらにその3つのメチル基どうしもまた、磁氣的に等価である。メチル基のように立体化学的に回転対称である官能基の磁氣的等価性はわりと理解しやすい。では回転軸をもたないメチレンや、フェニル基のような芳香環についてはどうであろうか？ これらについても、単結合回りの回転運動が十分速い運動であれば、個々のプロトンが感じる磁場は、やはり時間平均される。したがって、メチレン基の2つのプロトンや、フェニル基の2つのオルト位プロトンどうし、メタ位プロトンどうしも磁氣的に等価である。また、このとき磁氣的に等価な核どうしでは後述するスピнкаップリングが出ないので要注意である。

C. ¹Hの化学シフト

化合物の種類によって化学シフトの広がりが多い核種ほど、情報量が豊富であり、研究が盛んに行われている。最も汎用である¹H-NMRでは¹Hの化学シフトはおおよそ-2~15 ppm までの広がりをもつ。¹Hは軌道電子を1個しかもたないため、それに直接結合した原子団の電子密度や電気陰性度の影響を最もよく受ける。具体的には電子の豊富な第一級炭素に結合している¹H、とりわけメチル基が最も高磁場側に観測され、飽和炭素においてはメチル→メチレン→メチンの順に低磁場側にシフトする。また飽和炭素→不飽和炭素→芳香族炭素の順に低磁場側にシフトする。酸素、窒素、硫黄、リンなどに結合した¹Hは、それぞれ結合した原子の電気陰性度により、電子が少なければ少ないほど低磁場側にシフトする。直近の炭素や窒素に置換基がある場合にもその影響を受ける。生体分子のNMRにおいて、溶媒である水の¹Hの化学シフトが約4.7 ppmであるということは覚えておいて損のない値である。飽和炭素に結合している¹Hであれば、水よりも低磁場側に観測されることはめったにない。一方、不飽和炭素に結合した¹Hや芳香環に結合した¹Hは6 ppmよりも低磁場側に観測されることが多い。

^{*1} もし、何らかの理由があって、メチル基の回転が止まっており、また特定の位置における3つのプロトンの化学シフトが異なるとする。それぞれの化学シフトをたとえば、0.9 ppm, 1.0 ppm, 1.1 ppmとする。しかし、その3つのプロトンは、高速回転によって、常にそれぞれが場所を入れ替わっているとすると、観測されるシグナルは3つのプロトンの化学シフトの平均値が観測される。そのためシグナルは1本になる。

化学シフトに影響を及ぼす効果がいくつかある。そのうち最も効果が大きく劇的なものは、測定対象である化合物または測定試料中に含まれる物質の対電子の影響であろう。対電子、特に常磁性の遷移金属イオンがもつ対電子は、常磁性シフトと呼ばれる化学シフトの大きな移動を生み出す。常磁性シフトには、(1)核磁気モーメントと結合を通じて対電子が核の中心に電子密度をもつことにより核を直接遮蔽するコンタクトシフトと、(2)核スピンと電子スピンの双極子相互作用や核スピンと電子の軌道角運動量をもつ磁気モーメントの相互作用により空間を通じて遮蔽する擬コンタクトシフト、の2種類がある。

化合物の結合に含まれる非局在性の電子もまた、磁場と相互作用してその運動を変え環電流を発生し、外部磁場を打ち消すような局所磁場を生み出す。そのため芳香環や長い共役結合に対し立体的に近い位置にある核スピンは、遮蔽を受けたり、位置によっては反遮蔽を受けて化学シフトが大きく変化する。この効果を環電流効果と呼ぶ。

D. ¹³Cの化学シフト

¹³Cの化学シフトの広がりには-10~220 ppm程度である。¹³Cと後述する¹⁵Nの場合には、それぞれの核がもつ電子の混成軌道の状態により $sp^3 \rightarrow sp^2 \rightarrow sp$ の順に低磁場側へとシフトしていき、さらに結合核の歪みなどの影響も受ける。また、 sp^3 軌道をもつ炭素(飽和炭素)の場合には、第一級炭素→第二級炭素→第三級炭素→第四級炭素の順に低磁場側へとシフトする。具体的には、メチル基炭素は通常0~40 ppm、メチレン・メチン炭素は30~70 ppm、第四級炭素は40~90 ppmで観測されることが多い。一方、アルケンや芳香環の炭素となると110~140 ppm、カルボニル基の炭素などでは150~220 ppmと、化学構造に応じて非常に大きく変化する。

E. ¹⁵Nの化学シフト

¹⁵Nは¹Hに比べて磁気回転比が小さく、共鳴周波数がおおよそ1/10で、また天然存在比も0.4%と低いことから、これまで低分子のNMRによる構造解析ツールとしては注目を浴びてこなかった。しかし一方で、化学シフトの広がり¹H、¹³Cよりもさらに広く、0~500 ppmである。生体分子、特にタンパク質と核酸のNMR解析において、¹⁵Nの安定同位体標識が容易になってきたことにより、¹⁵Nに対応するプローブなどの普及も進みつつある。特に窒素は水素結合のドナーであったりアクセプターであったり、電子供与基や電子求引基として働くなど、化学的に非常に特徴のある官能基に含まれているため、その情報は有用である。一般に化学シフトは脂肪族アミンやアンモニウムイオンなどの窒素は0~80 ppmという高磁場で観測される。一方、アミドでは100 ppm前後、イミドでは180 ppm前後、含窒素芳香環では200~400 ppmと大きく変化する。ニトロ基やニトロソ基に至っては、500 ppmを超える低磁場にまで及ぶこともある。

F. ^{31}P の化学シフト

^{31}P は天然存在比が100%に近く、化学シフトの広がりが $-300 \sim 300$ ppmときわめて広いこともあり、NMRの対象としてよく研究されている。化学的には3価と5価のリンがあるが、むしろリンに直接結合している他の原子の原子種と個数によって、その化学シフトのバリエーションが生まれているようである。たとえば PMe_3 の化学シフトは -62 ppmであるが、 PMeF_2 は 245 ppm、 PF_5 や PCl_5 でおおよそ -80 ppm、 $[\text{PCl}_6]^-$ では -295 ppmである。生体分子の解析においては、核酸(DNA, RNA)の糖リン酸骨格の ^{31}P -NMRの研究が詳細になされている。また、ATPやクレアチンリン酸などの細胞内における高エネルギーリン酸化合物の研究にも多用されており、*in vivo* NMRやfMRIといった生体機能イメージングへと幅広い応用を見せている。

1.6.2 カップリング定数とスピнкаップリング

孤立した核スピンの与えるNMRシグナルは一重線であるが、1～3結合距離以内に別の核スピンの存在する場合、核間の磁氣的相互作用によって共鳴線が分裂する。これは、いま着目している核スピンの α , β の状態のエネルギー準位と、それに影響を与える核スピンの α , β の状態がそれぞれ相互作用することで新しいエネルギー準位が生じるからである(図1.8)。この2つの核スピンの相互作用であるスピнкаップリング(spin coupling; スピン結合, スカラーカップリング)は前述の化学シフトとは異なり、主磁場 B_0 には依存しない一定の値であり、しかも化学的(磁氣的)に非等価の核スピンの間でのみ観測される。その結果、スピン I の核とスピнкаップリングしたシグナルは $2I+1$ 本に分裂する。また磁氣的に等価な n 個のスピン $1/2$ の核とカップリングしたシグナルは、 $n+1$ 本に分裂する。分裂した信号の間隔をカップリング定数(結合定数) J と呼び、単位はHzで表す。2つの核スピンの相互作用する経路としては、

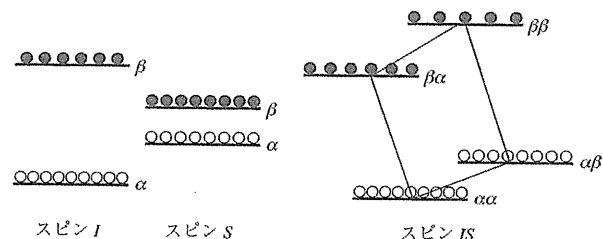


図1.8 スピнкаップリングによるエネルギー準位の変化
スピン I とスピン S がスピнкаップリングすることで、それぞれのエネルギー準位が変化し、それに伴い占有率も変化する。

(1) 核スピン→電子の軌道核運動量→核スピン

(2) 核スピン→電子スピン→核スピン

の二つがある。スピнкаップリングの相互作用が強ければ強いほどエネルギー差が大きくなり、カップリング定数も大きくなる。また、 ^{13}C や ^{15}N と ^1H のカップリング定数の大きさは、結合に関与している原子の混成軌道の s 性に直線的に依存している。たとえば sp^3 軌道をもつ ^{13}C と ^1H の単結合におけるカップリング定数 J_{HC} は $100 \sim 120$ Hzであるに対し、 sp 軌道におけるそれは $210 \sim 250$ Hzである。 sp^2 軌道をもつ ^{15}N と ^1H の間の単結合を介したカップリング定数 J_{HN} は $80 \sim 100$ Hzであり、それぞれ比較的大きな値をもっている。結合を隔てる数が多くなるにつれてカップリング定数は小さくなっていく。3つの単結合で隔てられた核スピン間で観測されるカップリング定数はその単結合の二面角 ϕ と関係づけることができる。このことを最初に定式化したKarplusの名前をとって、二面角依存性を表す関係式

$$^3J_{\text{HH}'} = A + B \cos \phi + C \cos^2 \phi \quad (1.17)$$

のことをKarplus式と呼ぶ。

スピнкаップリングが見られる核スピンの間では、後述する化学相関スペクトルなどで見られるように、分極移動によってある核スピンの磁化を結合相手の核スピンの磁化に「移す」ことができる。カップリング定数が大きということとはエネルギー準位の差が大きく、したがって、平衡状態における占有率の差も大きいということにつながる。したがって、分極移動の効率も良い。

1.7 直積演算子

1.7.1 この項目を読むときの注意

非常に心苦しいことではあるが、この項目だけは少々理解するのに時間が掛かる内容を紹介させていただく。すなわち、核スピンの量子力学的性質と、それをより簡便に取り扱う数学的記法、直積演算子についてである。だが安心してほしい。もし、この節の前半の量子力学的内容がほとんどピンとこなくても、機械的に後半部分の直積演算子の記法と公式だけを丸暗記すれば、大多数の多重共鳴NMRのバルスプログラムが理解できるようになる。そして、仮にそれが理解できなかったからといって、実際のNMRスペクトルを帰属解析するにはほとんど支障がないのである。

1.7.2 核スピンの量子力学的モデルと密度行列^{2,4,8,9,10)}

多重共鳴NMRの原理を理解するために、これまで説明してきた古典的モデルの背

景に、核スピンを記述する波動関数の摂動現象があることを思い出して欲しい。つまり、1個のスピンの、化学結合している1組のスピンの対における核スピンのふるまいを考察するときには、それぞれの核スピンの状態に対応する波動関数 $|\phi\rangle$ と、それに摂動を与えるハミルトニアンを用いて、状態の時間変化を解析することになる。状態の時間変化は

$$\frac{d|\phi\rangle}{dt} = -iH|\phi\rangle \quad (1.18)$$

で表すことができる。

一方、NMR現象で観測の対象になる巨視的な磁化を理論的に解析したい場合、たとえば、あるパルスの後の時間展開を計算するといった場合には、

$$\sigma = \sum_i p_i |\phi_i\rangle\langle\phi_i| = \overline{|\phi\rangle\langle\phi|} \quad (1.19)$$

で表される全体のスピンの平均の状態である密度行列 σ について取り扱っていくことになる。ただし $|\phi_i\rangle$ は出現確率が p_i である i 番目の状態の状態ベクトルである。したがって、運動方程式は次式のように書くことができる。

$$\frac{d\sigma}{dt} = \sum_i p_i (-iH) |\phi_i\rangle\langle\phi_i| + \sum_i p_i i |\phi_i\rangle\langle\phi_i| H = -i[H\sigma - \sigma H] \quad (1.20)$$

核スピンはそのエネルギー準位差が小さく、他の現象との相互作用により遷移が起きる確率が低い。そのためパルスを掛けた後の核スピンの、その量子状態が比較的一定に揃った状態に保たれやすい。この波動が揃っている状態のことをコヒーレンス（可干渉性）という。90(x)パルスを与えて生じた y 磁化 $-M_y$ は、 α/β 状態の分布は等しく（そのため z 方向に巨視的な磁化を生じない）、 y 軸方向にコヒーレントな核スピンの集団をもつ巨視的な磁化である。

1.7.3 直積演算子^{2,4,9,10)}

さて、いろいろな状態の密度行列に対して、いくつかの適当な直交する基底行列の組を定めれば、すべての状態をこれら基底行列の和として表現することが可能である。詳細は省くが、主に2スピン系での磁化の時間展開とコヒーレンス移動を直観的に記述し理解する目的で、直積演算子（プロダクトオペレータ；product operator）の記法が発明された。1スピン系においてスピン I を表現する密度行列の基底は、 I_x, I_y, I_z および $1/2E$ であり、 S についても同様 (S_x, S_y, S_z および $1/2E$) である。ところが、さらに2スピン系 (I, S) における密度行列についてさまざまな状態の基底を求めると、たとえばスピン I と S がそれぞれ x 軸上にあるときに生じる二量子コヒーレンスに対応する密度行列が、

$$\sigma(I_x, S_x) = \sigma(I_x) \times \sigma(S_x) \quad (1.21)$$

で表されるように、各々の1スピン系の密度行列の直積（product）で記述できる。そこでこれを単純に $I_x S_x$ と記述する。これらの密度行列の理論的取り扱いには成書に譲るとして、注目すべきはこの記法を導入すると、スピンの状態に対応する直積演算子と化学シフトによる時間展開、パルス、スピнкаップリングを表すハミルトニアンに対応する直積演算子が数学的に同じ形式で書き下せることである。たとえば90(x)パルスに対応するハミルトニアンは

$$H = \frac{\pi}{2} I_x \quad (1.22)$$

であり、スピン I とスピン S の間のスピнкаップリングのハミルトニアンは、カップリング定数を J_{IS} として

$$H_{IS} = \pi J_{IS} I_x S_x \quad (1.23)$$

と記述できる。表1.3に2スピン系のすべての基底行列と、主要なハミルトニアンによるそれらの展開についてまとめておく。直積演算子の取り扱いに慣れると、複雑なパルスシーケンスにおいて各時点で生じているコヒーレンスやその移動が追跡できる。

表 1.3 2スピン系における基底となる直積演算子とその変化

ユニット演算子	$1/2E$
単一のスピン演算子	$I_x, I_y, I_z, S_x, S_y, S_z$
2スピン演算子	$2I_x S_x, 2I_x S_y, 2I_x S_z$ $2I_y S_x, 2I_y S_y, 2I_y S_z$ $2I_z S_x, 2I_z S_y, 2I_z S_z$
パルスによる直積演算子の変化	$I_z \xrightarrow{\Omega_{B_1} t_{x,y}} I_z \cos \Omega_{B_1} t \pm I_{y,x} \sin \Omega_{B_1} t$ $I_{x,y} \xrightarrow{\Omega_{B_1} t_{x,y}} I_{x,y}$ $I_{x,y} \xrightarrow{\Omega_{B_1} t_{x,y}} I_{x,y} \cos \Omega_{B_1} t \mp I_z \sin \Omega_{B_1} t$
化学シフト	$I_z \xrightarrow{\Omega_{B_1} t_z} I_z$ $I_{x,y} \xrightarrow{\Omega_{B_1} t_z} I_{x,y} \cos \Omega_{B_1} t \pm I_{y,x} \sin \Omega_{B_1} t$
スピнкаップリング	$I_z \xrightarrow{\pi J_{IS} t_z S_z} I_z, S_z \xrightarrow{\pi J_{IS} t_z S_z} S_z$ $2I_x S_x \xrightarrow{\pi J_{IS} t_z S_z} 2I_x S_x, 2I_z S_z \xrightarrow{\pi J_{IS} t_z S_z} 2I_z S_z$ $I_{x,y} \xrightarrow{\pi J_{IS} t_z S_z} I_{x,y} \cos \pi J_{IS} t \pm 2I_{y,x} S_z \sin \pi J_{IS} t$ $2I_{x,y} S_z \xrightarrow{\pi J_{IS} t_z S_z} 2I_{x,y} S_z \cos \pi J_{IS} t \pm I_{y,x} \sin \pi J_{IS} t$

1.8 磁化移動とコヒーレンス

いま、核スピン I と S がスピンカップリングにより相互作用しているとすると、それぞれの波動関数 $|I\rangle$ および $|S\rangle$ は外部磁場やパルスによるハミルトニアンのおかげに、スピンカップリング由来のハミルトニアンの影響を受ける。スピン I にパルスを与えてコヒーレントな状態を作り出したとすると、ハミルトニアン H_{IS} を通じてその状態はスピン S の状態にも影響を与える。2つの核のスピンカップリングのハミルトニアンを解析して、適切なパルスを組み合わせて与えることで、スピン I のコヒーレンスをスピン S のコヒーレンスに反映させることが可能である。このことをコヒーレンス移動 (coherence transfer) と呼ぶ。コヒーレンス移動を、巨視的な磁化に着目して NMR におけるシグナル観測の現象論としてとらえると、あたかもスピン I の磁化がスピン S に移ったように見えるので、磁化移動 (magnetization transfer) や分極移動 (polarization transfer) と呼ぶこともある (図 1.9)。

再び前述したような直接結合している ^1H と ^{13}C のスピンカップリングを通じた分極移動の例を説明する。図 1.9 および図 1.10 のパルスシーケンスは、いずれもおおよそ 4 倍の感度向上につながるので INEPT (insensitive nuclei enhancement polarization transfer) 法と呼ばれる。図 1.9 のパルスでは観測される磁化は反位相なので、それをリフォーカス (再結像) させたものが図 1.10 である。

図 1.10 の①~⑥の各時点での密度行列 $\sigma_1 \sim \sigma_6$ (ただし時点⑥ではスキャンごとに

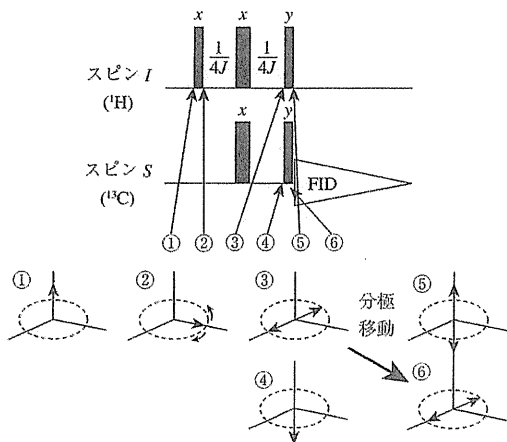


図 1.9 分極移動の古典的モデルによる説明の例 (INEPT 法)

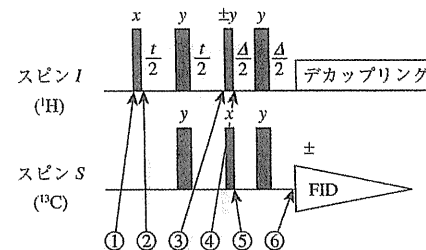


図 1.10 INEPT 法のパルスシーケンス

図 1.9 に示したパルスに、さらに磁化をリフォーカスさせるためのパルス・ブロックが付加されている。

パルスの位相を $y \rightarrow -y$ と変化させたときの差をとることとして σ_6 について) を直積演算子を用いて計算すると

$$\sigma_1 = I_z \quad (1.24)$$

$$\sigma_2 = -I_y \quad (1.25)$$

$$\sigma_3 = -I_y \cos \pi J t + 2I_x S_z \sin \pi J t \quad (1.26)$$

$$\sigma_4 = -I_y \cos \pi J t \mp 2I_z S_x \sin \pi J t \quad (1.27)$$

$$\sigma_5 = -I_y \cos \pi J t \pm 2I_z S_y \sin \pi J t \quad (1.28)$$

$$\sigma_6 = 2S_x \sin \pi J t \sin \pi J \Delta \quad (\text{CH グループについて}) \quad (1.29)$$

$$\sigma_6 = 2S_x \quad (t = \Delta = 1/(2J) \text{ のとき}) \quad (1.30)$$

ここで得られた S_x は I_z 由来の分極の占有率の差から派生しているため、結果として磁気回転比が小さく、占有率の差が小さいため感度が悪い ^{13}C 核に対して占有率の差の大きい ^1H の分極が移動することで、 ^{13}C 核由来の S_x をそのまま観測するときと比べて $\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{C}}$ だけ大きい。さらに、INEPT 法は設定した delay の長さ (Δ) と ^{13}C に直接結合している ^1H の数によって、その ^{13}C のシグナル強度が異なる。これを利用して、有機化合物の構造決定に用いられる。また、異種核間での磁化 (一量子コヒーレンス) を別の核に移動するためのパルスユニットとして、三次元 (3D) NMR 実験のパルスシーケンス内に多く用いられている。

1.9 NMR のパルスシーケンス—パルスシーケンスの読み方—

前述のように、スピンカップリングを介した 2 つの核スピンの間で、磁化移動 (ま

たはコヒーレンス移動)や、NOE(後述)のような空間を介した交差緩和現象を用いて、2つの核スピンのシグナル強度に変調を加えることが可能である。これを実現するためには、適切なタイミングで適切なフリップ角をもつパルスを、各核種に、順番に、系統的に与えていく操作が必要である。このパルスを与えるタイミングをすべて記述したもの(または概念図)がパルスシーケンスである(図1.9, 1.10)。パルスシーケンスには、各RFパルスのフリップ角、それを照射するチャンネル、パルスの位相、パルスとパルスの間隔(delay)が記述されている。さらにグラディエントパルスの相対強度、レシーバーで信号を観測する際の位相情報なども重要な情報である。これは、複数のパートに分かれた音楽の楽譜、たとえば弦楽四重奏の楽譜のように考えればよい。各パートが ^1H や ^{13}C などの励起チャンネルに対応する。パルスシーケンスは、横軸が時間軸であり、音符に対応するパルスと休符に対応するdelayが記載されているのである。こうした概念的なNMR実験を実際に行うことを、NMR装置に理解させるためのプログラムがパルスプログラムである。特別な場合を除いて、パルスシーケンスに現れるほとんどのパルスは 90° パルスと 180° パルスであり、図中ではそれぞれ細い矩形と太い矩形で示される。(そのため、細い矩形が 90° パルスで太い矩形が 180° パルスを示すという但し書きがしばしば省略されていることすらある。)複数の段のパルスが縦のラインで揃っている場合には、異なるチャンネルから同時に異なる周波数のパルスが照射されることを意味する。パルスとパルスの間隔がdelayに対応する。delayのほとんどは下記のいずれかに分類できる。すなわち、

- (i) 磁化や装置の平衡化を行うためにユーザーが任意に設定できるもの
- (ii) 磁化の交換や磁化移動(またはコヒーレンス移動)を行うためにユーザーが任意に設定できるもの
- (iii) 磁化移動(またはコヒーレンス移動)を行うために J の逆数の整数分の1を設定するもの
- (iv) それらのdelayやパルスの時間差を調整するための差分

である。実際のパルスプログラムにおいては、その他に各チャンネルの出力や位相を切り替えるために設定されているdelayも記述されているが、これらは装置ごとにほぼ決まった値であり、パルスシーケンス図の上では省略されている。図1.9と図1.10は感度の悪い核スピン(たとえば ^{13}C)の磁化を感度良く観測するためのパルスシーケンスINEPT法の例である。

実際に測定を行う際には、これらのパルスシーケンスの各パルスならびにdelayに適切な値を設定しなければならない。こうしたパラメータは、測定対象の試料や溶媒条件、個々の装置によって異なるので、実験ごとに設定しなければならない。

1.10 よく使われる二次元NMRの原理の紹介¹¹⁾

1.10.1 二次元NMRとは

二次元(2D)NMRの原理は第2章で述べるとして、ここでは二次元NMRがNMRデータ解析の現場でどのように用いられるのかについて述べる。前述のINEPT法などの方法を用いれば、スピンカップリングまたは双極子相互作用のあるスピン I と S について、複数の適当なパルスを組み合わせて、スピン I の磁化の分極の変化をもう一方のスピン S の磁化の分極に移動することができる。そこで、スピン I に与えるパルスを系統的に変化させることで、スピン I の励起状態をスピン I の共鳴周波数を反映するようにしておき(このことを「周波数でラベルする」という)、スピン S のNMR信号に対してスピン I の周波数に応じた強度または位相の変調を加えることが可能である。こうして得たスペクトルを相関スペクトルと呼ぶ。このことを利用してある原子と別の原子の間の相関を調べるのが二次元(三次元・四次元)NMRである。このため相関スペクトルを測定したデータは、複数(数十本から数千本)の一次元NMRのFIDの一連のデータとなっている。実際にFID信号を観測する核(この場合はスピン S)のことを直接観測次元、間接的に周波数の変調を掛ける次元(スピン I)の間接観測次元と呼ぶ。最も簡単なパルスシーケンスの例として、多核のスピンエコー実験のパルスと、それを二次元に展開したものに相当する異種核多量子相関

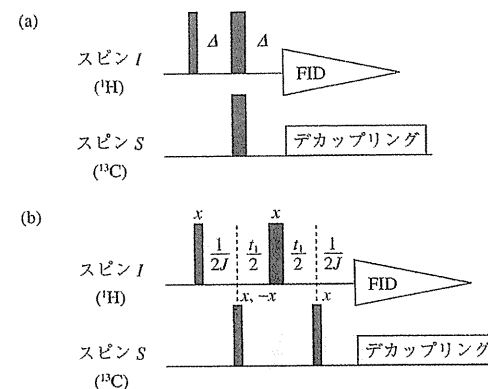


図1.11 スピンエコー(a)とHMQC(b)のパルスシーケンス
スピンカップリングしているスピン I とスピン S の間のスピンエコーを観測するパルス(a)をわずかに変更するだけで、スピン I とスピン S の化学シフト相関を測定するHMQCのパルスシーケンスができる(b)。

(heteronuclear multiquantum coherence spectroscopy, HMQC) のパルスの比較を挙げておく (図 1.11). 直観的に, ^{13}C 核に対する 180° パルスを展開時間 t_1 (実験中に可変な delay) を間に挟んだ 2 つの 90° パルスに置き換えたことで, 特定の ^{13}C 核が周波数により標識されることが見て取れると思う. 実際, この例に限らず, 多次元 NMR のほとんどのパルスシーケンスは, 特定のスピニングや NOE などを通じたコヒーレンス移動の観測を目的とした一次元 NMR のパルスシーケンスの一部を, 「展開期」と呼ばれるスピン I に周波数ラベルを与えるパルスのユニットに置き換えたものであると考えると理解しやすい. このように整理すると, 複雑なパルスシーケンスはすべて準備期-展開期-混合期-検出期の 4 つの部分からなっており, しかも準備期や混合期の大部分は磁化移動の効率を最適化するための delay であったり, delay 中に展開してしまった化学シフトを 180° パルスを与えることでリフォーカスするためのものであることが多い. 図 1.11 を参考に二次元 NMR のパルスプログラムの成り立ちを見ると,

(i) 準備期

相関を測定したい第一の核を励起するための準備を行い, 不要な磁化を消去したりする時期.

(ii) 展開期

第一の核が励起された状態で, 実験ごとに異なる可変の delay (t_1) を含み, この間に第一の核の共鳴周波数で標識が行われる.

(iii) 混合期

第一の核と相互作用のある第二の核へエネルギーを移動させる期間で, ほとんどの測定は以下の 3 つのタイプに分類可能である. すなわち, 交差緩和 (NOESY, ROESY), 交差分極移動 (cross polarization, CP または Hartmann-Hahn 遷移), 分極移動 (INEPT, DEPT, TROSY または CRINEPT) である.

(iv) 検出期

第二の核 (直接観測核) からの FID 信号を測定する期間であり, 一次元 NMR と同じように観測し, t_1 を変化させるごとに別々の記憶領域にデータを蓄える.

の 4 つに分かれているとわかる.

展開期に含まれる可変の delay の長さを変えていくと, 第一の核に照射された 90° パルスによって生じた横磁化は一定時間後に再び 90° パルスが与えられるため, その周波数によりあるときには完全に励起され, またあるときはまったく励起されないといった具合に, その磁化の位相または磁化の z 成分に変調を受ける. そうして変調を受けた磁化が展開期を通じて観測核 (第二の核) に移動された後, 今度はその観測核の FID 信号の強度 (または位相) に第一の核の変調が掛かっている状態のデータを

取得することができる. つまり, 直接観測核の FID 信号を, まずフーリエ変換した後のデータを t_1 の時系列に沿って並べてみると, t_1 軸に対して第二の核のシグナル強度 (または位相) が第一の核の周波数で振動していることがわかる. このデータを t_1 軸に沿ったデータとして並べ直してさらにフーリエ変換することで, 相互作用しているもう 1 つの核の共鳴周波数を得ることができる. 具体的には二次元フーリエ変換をした後に, 両方の核の周波数 (化学シフト) に対応する交点に交差ピーク (クロスピーク) が現れる.

以上のように, 個々の信号の化学シフトや微細構造, スピニングなどの「一次元」の情報に加えて, 二次元化学シフト相関スペクトルから得られる情報は, その信号の帰属の正確さを増すとともに化合物の構造決定に役立つ.

1.10.2 COSY/TOCSY

低分子化合物の解析においては, 互いにスピニングしている隣り合った ^1H シグナルどうしの組み合わせを決定することで, シグナルの帰属と解析が進む. この情報を 1 回の二次元 NMR 実験で, すべての ^1H のシグナルの組について調べることができるのが, 相関分光法 (correlation spectroscopy, COSY) である. 最も簡単な COSY のパルスシーケンスは, 2 つの 90° パルスと展開時間の delay のみで構成される. COSY では, 一部の例外を除いて, 隣り合った ^1H どうし, つまり 2-bond (vicinal) か 3-bond (geminal) の ^1H 間の相関のみが観測される. COSY には, 対角ピークの反位相成分由来のスペクトルのうねりを消すための工夫 (二量子フィルター COSY; double-quantum filtered COSY, DQF-COSY) や, 遠位のカップリングによる相関を観測するための工夫 (遅延 COSY; delayed COSY) など多くの変法が開発されている. 一方, 最初の 90° パルスによって生じた横磁化に, スピンロックパルスを掛けることで横磁化どうしの交差磁化移動を行わせることによっても, スピニングのある核間の相関スペクトルを得ることができる. この場合, ある ^1H の磁化はスピニングが与えられている時間中に, その隣の ^1H に移動し, さらにその ^1H とカップリングのある隣の ^1H へと, 5-bond を超えるような速くの核にまで移動していく. そのため, 磁化移動にスピニングを使用した二次元相関スペクトルでは, ある一つの ^1H の周波数に対して, その ^1H が属しているスピニング系すべての ^1H の周波数との間で相関ピークが観測される. そのためこの実験法は全相関分光法 (totally correlated spectroscopy, TOCSY) と呼ばれる. スピニングによる磁化移動は発見者の名前にちなんで Hartmann-Hahn 遷移と呼ばれており, 同種核 (homonuclear) の頭文字と合わせて HOHAHA 実験と称されることもある.

COSY も TOCSY も ^1H 核どうしの相関なので, 同種核シフト相関実験に分類される.