

核磁気共鳴 (NMR) の分析試験への利用

はじめに

核磁気共鳴 (NMR : Nuclear Magnetic Resonance) 分光法は原子核のスピン状態を調べる測定法です。今日では、有機化合物の同定や構造解析をはじめとした様々な用途に活用されています。

今回は、NMR の原理と応用、特に溶液 NMR による分析試験についてご紹介します。

NMR を観測できる原子核と感度

水素核 (^1H) や炭素核 (^{13}C) など、核スピン量子数が $1/2$ の原子核は、シャープな NMR 信号を観測することができます (表-1)。一方で、四極子核 (核スピン量子数が 1 以上) は、NMR 信号が広幅化するため測定には向きません。また、原子番号と質量数がともに偶数の原子核 (核スピン量子数はゼロ) は、磁性を持たないことから測定することはできません (表-1 の ^{12}C)。

原子核の感度は、磁気回転比の 3 乗に比例します。例えば、 ^{13}C を ^1H と比較した場合、 ^{13}C の感度は表-1 から ^1H の約 64 分の 1 となり、さらに、天然存在比を考慮すると ^1H の約 6000 分の 1 に過ぎないことがわかります。感度を改善する解決策の 1 つは、NMR (装置) の磁石を強くすることにあります (図-1)。また、装置の高磁場化はスペクトルの分解能向上にも有効です。

表-1 原子核の測定可否及び物理定数

核種	原子番号	質量数	測定可否	核スピン量子数	磁気回転比 [MHz/T]	共鳴周波数* [MHz]	天然存在比
^1H	1	1	可	$1/2$	42.58	500	99.985
^{12}C	6	12	不可	0	—	—	98.9
^{13}C	6	13	可	$1/2$	10.71	125	1.1
^{23}Na	11	23	可	$3/2$	11.26	132	100

* 共鳴周波数 = 磁気回転比 × 磁場強度 (表中は磁束密度が 11.74T (テスラ) の場合)

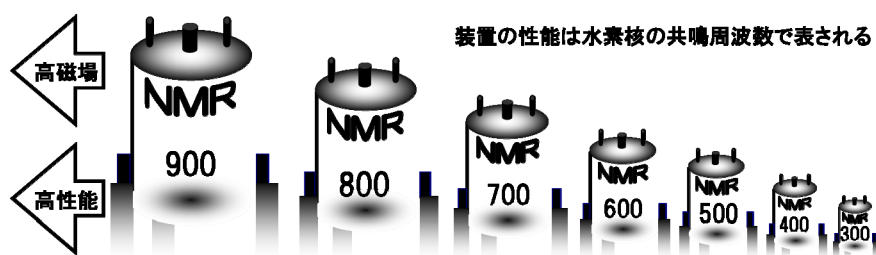


図-1 NMR 装置の性能 (単位 : MHz)

NMR スペクトルの読み方 (^1H -NMR (プロトン NMR) スペクトル)

NMR スペクトルでは、ピークの位置、ピーク面積比及びピーク形状を確認します。

NMR では電子密度が濃い官能基ほどスペクトルの右側 (高磁場側) に観測されます。例えば、右からメチル基 (CH_3)、メチレン基 (CH_2)、メチン基 (CH) の順に観測されます (図-2)。

また、ピークの面積比は ^1H の数を反映しており、そのピーク形状は、近傍の ^1H との共鳴

によって変化することから、ピークの形状は構造を解く上で大切な手がかりとなります。

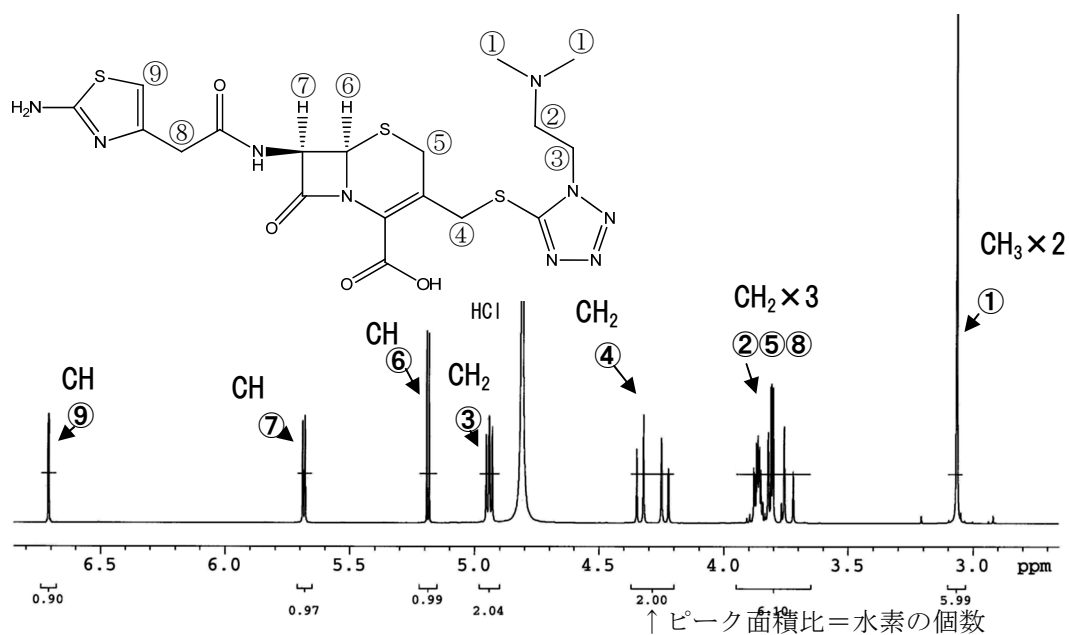


図-2 日本薬局方セフォチアム塩酸塩標準品の ^1H -NMR

NMR の分析試験への活用例

○有機化合物の異性体の識別

NMR による構造解析の特長として、シス・トランス体、アキシアル・エクアトリアル位、オルト・メタ・パラ位のような異性体を区別できる点が挙げられます。例えばシクロヘキサン環の ^1H の立体配置は、単結合上の 2 個の ^1H 間の J 値(ピークの分裂幅)を計算することで推測することができます(図-3)。

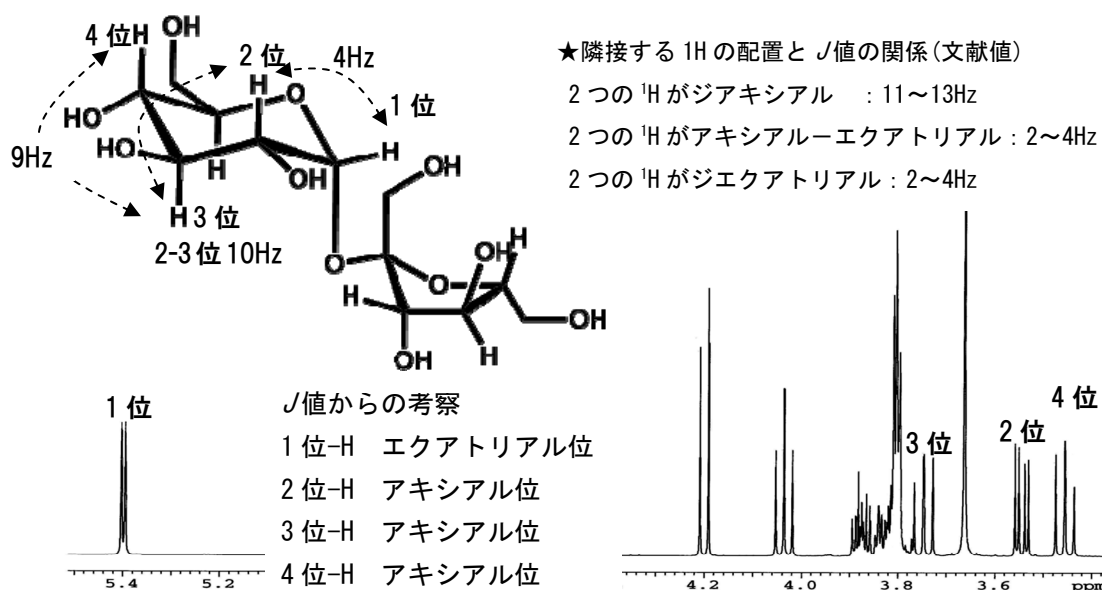


図-3 ショ糖の ^1H -NMR スペクトルとグルコース部分の官能基の配置

○定量 NMR

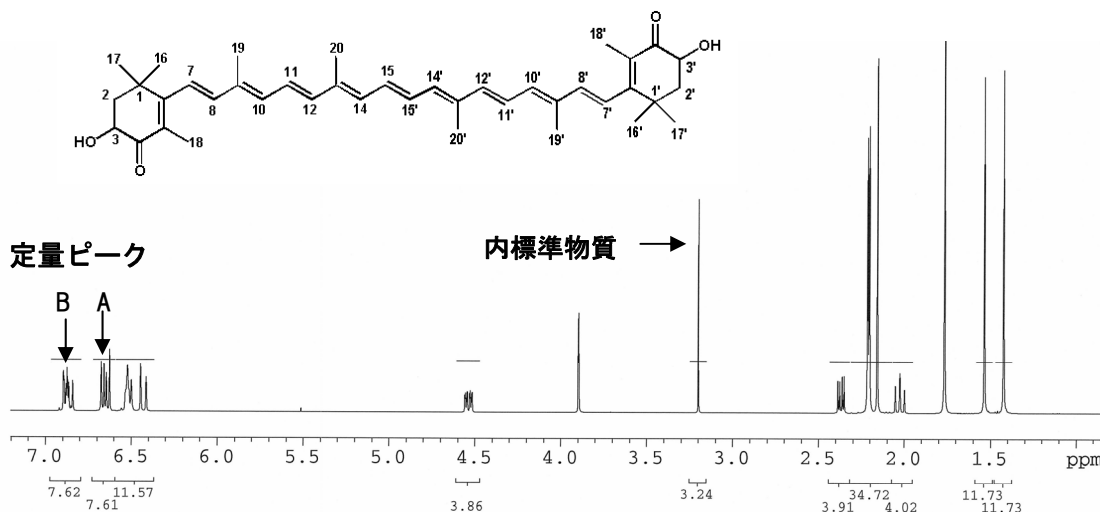
NMR では定量試験も可能です。定量 NMR (qNMR: quantitative NMR) は、クロマトグラフ法とは異なる原理の定量分析法として、以下のような特徴を持っています。

- NMR スペクトルのピーク面積は、物質の原子核数をそのまま反映していることから、検量線を作成せずに、測定値からの四則演算によって定量値を求めることが可能です。
- NMR は原子核レベルで物質を認識できることから、使用する標準品は測定対象と同一物質である必要はありません (1 つの標準品から多数の物質の定量が可能)。
- 定量 NMR は、一次標準測定法における一次比率法の資格を原理的に有していると言われています。認証標準物質 (CRM: Certificate Reference Material) など、計量トレーサビリティの確保された物質を内標準物質として使用することで、より正確な定量を可能とします。
- NMR (装置) を定量条件で操作する場合の定量不確かさは、概ね 1% 以内と言われています。

このような特色を生かして、定量 NMR は標準品の純度確認 (図-4)、標準品が存在しない成分の定量などに利用されており、今後の普及が期待される測定法です。

定量 NMR の計算式

$$\text{sample 純度 (\%)} = \frac{\text{面積強度比 (sample)} / \text{水素数 (sample)}}{\text{面積強度比 (内標準)} / \text{水素数 (内標準)}} \times \frac{\text{分子量 (sample)} / \text{秤量重量 (sample)}}{\text{分子量 (内標準)} / \text{秤量重量 (内標準)}} \times \text{内標準純度 (\%)}$$



定量ピーク	A	B	平均 (A, B)
試験 1 回目	96.495	96.508	96.501
試験 2 回目	95.850	96.010	95.930
試験 3 回目	96.011	96.206	96.108



純度 : 96.2 % (N=3)
標準偏差 : 0.3 % (N=3)

ピーク A: olefin H-8, 8', 12, 12'

ピーク B: olefin H-11, 11', 15, 15'

図-4 全トランス-アスタキサンチン標準品の定量 NMR による純度検定

○魚油のトリグリセリド分子種 DHA 及び EPA の結合比率の推定

^{13}C -NMR スペクトルでは、トリアシルグリセロールにおける DHA 及び EPA の結合部位の違いを、カルボニル炭素の観測位置から見分けることが可能です。 α 位及び β 位に結合した DHA (あるいは EPA) のカルボニル炭素に由来するピークの面積比を求めることで、DHA (あるいは EPA) の α 位及び β 位への結合比率の推定が可能となります。

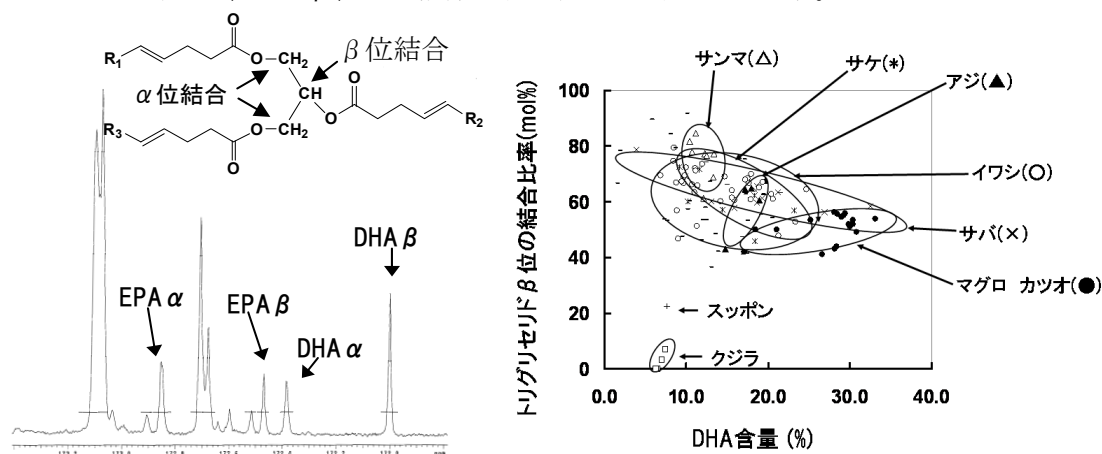


図-5 水産物抽出油脂における DHA 含量とトリグリセリド β 位への結合比率(右)及び魚油の ^{13}C -NMR (左)

○規格試験

原料の構造が相違ないことを確認する試験には赤外や紫外可視吸収スペクトルによる試験が設定されますが、より精細な構造情報の取得が必要とされる場合には NMR による規格試験が設定されています。

日本薬局方では一般試験法に NMR 測定法が記載されているほか、セフェム系抗生物質などの各条には NMR による確認試験が設定されています(図-2 のセフォチアム塩酸塩では①と⑨のピークを確認に利用)。また、ヘパリンナトリウム及びヘパリンカルシウムの各条では、酷似した偽成分である過硫酸化コンドロイチン硫酸の混入を検出するために NMR による純度試験が設定されています。

おわりに

NMR は定性から定量まで、幅広く応用が可能な測定法です。ここにご紹介した内容以外にも、弊財団では二次元 NMR の各種測定による構造解析も行っております。

参考資料

- ・ 小林久芳ら：ぶんせき，118-124(2005)
- ・ 杉本直樹ら：Foods & Food Ingredients J. Jpn.，**215**, 2, 129-136(2010)
- ・ 北川進，水野元，前川雅彦共著：多核種の溶液および固体NMR，三共出版(2008)
- ・ 朝倉哲郎：広がるNMRの世界 40人の研究者からの熱いメッセージ，コロナ社(2011)
- ・ 五十嵐友二：(DHA・n-3系脂肪酸のNMR分析) 機能性脂質の新展開，145-157，シーエムシー(2001)