講座

ライフサイエンスのための安定同位体利用技術(Ⅸ)

NMR による安定同位体の測定†

瀬戸 治 男

東京大学応用微生物研究所

113 東京都文京区弥生1-1-1

Key Words: nuclear magnetic resonance, biosynthesis, stable isotopes

1. はじめに

^1H , ^{13}C 等のスピン量子数 $I \neq 0$ の原子核は、特有の核磁気モーメントを持っており、これを磁場の中におくと、電磁波を吸収して共鳴現象が起こる。この共鳴電磁波を測定するのが核磁気共鳴 (NMR, nuclear magnetic resonance) である。

NMR は分子の構造について非常に多くの情報を与えるため、有機化学のみならず物理化学、生物化学の分野において多用されている。また、その有用性のために ^1H -NMR, ^{13}C -NMR は構造解析の最も重要な手法と考えられ、測定装置が高価であるにもかかわらず広く普及している。さらに最近の技術面での進歩——とくにフーリエ変換 (FT, Fourier transform)-NMR および超伝導磁石の採用による感度の増大、シグナルの分離のよさ——は ^1H , ^{13}C 核以外の核種の測定をも容易にした。本文ではライフサイエンスに関係する同位体として、 ^2H , ^{13}C , ^{15}N をとりあげる (^{17}O も NMR によって観測し得る安定同位体であるが、生合成研究への応用例はほとんどないので、本文では省略する)。なお、 ^{18}O のように核スピンを持たない同位元素は NMR の観測の対象とならないが、後述する同位体シフトを利用すれば間接的に ^{13}C -NMR によって観測することが可能である。

表1にこれら同位体のNMRに関する性質を示した。現在普及している装置は、 ^{13}C と ^1H のみが観測できるようになっているものが大部分である。したがって表

1から分かるように、核によって共鳴周波数が異なるため、 ^1H , ^{13}C 以外の核を観測するためには、特別のアクセサリーを必要とする。

表 1 NMR で測定し得る核

核種	スピン	共鳴周波数*	存在比	相対感度**
^1H	$\frac{1}{2}$	100.00MHz	99.985%	1.00
^2H	1	15.35	1.5×10^{-2}	9.65×10^{-3}
^{13}C	$\frac{1}{2}$	25.14	1.11	1.59×10^{-2}
^{15}N	$-\frac{1}{2}$	10.13	0.37	1.04×10^{-3}
^{17}O	$-\frac{5}{2}$	13.56	3.7×10^{-2}	2.91×10^{-2}

* 23.5 kG の磁場における値

** ^1H を 1 とする相対値

本講座で取り上げられた安定同位体 (SI) の測定法——たとえば ^{18}O の放射化分析法、あるいは発光分析法による ^{15}N の精密測定法——が特定の原子核を対象にした特殊なものであるのに対し、NMR は前述したように多くの分野で使われている普遍的な分析手段であり、その原理、測定装置はすでに多くの成書^{1)~6)} で説明されているので本文では簡単に触れ、応用的な面について詳しく説明することにする。

2. NMR を用いる安定同位体の測定法の特徴

標識した前駆体の生体による代謝を追跡する場合、代謝産物中でのラベルの分布を知ることはきわめて重要である。NMR はこの目的には最適の手段であるといえよう。なぜならば構造決定に使用されていることから分かるように、有機化合物中の個々の炭素、水素、窒素等が化学シフトの異なった別々のシグナルとして観測されるから、構造とシグナルの対応がつけば (これをシグナルの帰属という)、ラベルの取り込まれ

† Use of the Stable Isotopes in Life Science (Ⅸ) Detection of Stable Isotopes by NMR. Haruo SETO: Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo, 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113.

た位置は、シグナル強度の増大によって容易に決定できるからである。質量スペクトルは多少ともこのような性質を備えているが、特定の部分だけを観測するためにフラグメンテーションを自由に変えることは不可能であるから、選択性という点ではNMRにははるかに及ばない。他の分析手段は測定に先立ち、化学分解によって代謝産物を簡単な化合物に分解するものが多く、感度面では非常に優れているものの選択性はほとんど失われる。

3. NMR による安定同位体の測定

NMR による研究が最もさかんに行われているSIは ^{13}C 核であるので、測定方法はこの核について説明する。

NMR の測定装置は、試料に磁場をかける磁石部、共鳴電磁波を発信する分光器部、および測定したデータを積算、処理するコンピュータ部から成立している。さらにFT-NMR 装置では μ 秒単位で種々の装置（パルス発振器、受信ゲートの開閉など）を正確に制御しなければならないが、この役割もコンピュータが受け持っている。磁石は電磁石を使用した装置(23kG)が今までは一般的であったが、感度、分離能ともに優れた液体ヘリウムを使用する超伝導磁石(46~115kG)が急速に普及しつつあり、NMR的に感度の悪い ^{15}N 核や、シグナルの分離が悪い ^2H 核の測定に威力を発揮

するようになった(図1)。多くの情報が得られるという反面 ^{13}C 核に限らず、NMRはSIの検出には最も効率が悪い測定手段であるので、この欠点を補うためにつぎのような操作が不可欠である^{1)~4)}。

3.1 積算

^1H -NMR の場合を除き、通常1回の測定では信号-雑音比(S/N)のよいスペクトルが得られないので測定を繰り返して行い、得られたデータをコンピュータ中で積算する。S/Nは積算回数の平方根に比例して改善されるので、試料の量が少ない、あるいはラベルの取り込み率が悪いときは測定に長時間を要する。磁場の安定性を考えると、実用的には積算時間の限度は2~3日程度であろう。このことからNMRがいかにも感度の悪い分析手段であるか理解していただけたと思う。

3.2 プロトンノイズデカップリング

有機化合物中の炭素はほとんどの場合、直接、あるいは2~3個の結合を隔てて水素と結合しているため、 ^{13}C - ^1H 間のスピン結合によって ^{13}C シグナルは複雑に分裂する。その結果、スペクトルの解析が困難になるとともに、見かけのS/Nが低下する。この現象を防ぐためには、雑音変調した電磁波で ^1H の全部の共鳴領域を一挙に照射し、 ^{13}C - ^1H 間のスピン結合を切断する。この場合各炭素シグナルは一重線になる。これをプロトンノイズデカップリング、または完全デカップリングと呼ぶが、プロトン照射による nuclear Overhauser effect (NOE, 最高3倍に達する)が生ずることもS/Nを改善するうえで有利に働く(負のスピンを有する ^{15}N の場合は例外である)。図2bとcは、プロトンノイズデカップリングとプロトン非照射の条件下に測定したスペクトルを比較したものであり、S/Nを改善するうえで本方法がきわめて有力な手段であることが容易に理解されよう。

図1 FT-NMRの測定装置¹⁾

図 2 酢酸エチル ^{13}C -NMR スペクトル

3.3 オフレゾナンスデカップリング

^{13}C -NMR においては、プロトン非照射条件下で測定したスペクトルが最も多くの情報を含んでいる。プロトンノイズデカップリング法では、S/Nを改善する代償としてこの貴重な情報を失ってしまう。オフレゾナンスデカップリング法はこの欠点を補い、シグナルの帰属を容易にするための手段である。プロトンデカップル用の周波数を、プロトンの共鳴領域からある程度ずらし（プロトンの共鳴周波数が100MHzの場合1kHz, 400MHzの場合4kHz程度）、単一周波数で照射すると、 ^{13}C - ^1H 間のスピン結合による分裂の大きさが減少したスペクトルが得られる（図2d）。この結果、メチル、メチレン、メチン、第四級炭素はそれぞれ四

図 3 抗生物質モノエンシンの ^{13}C -NMR スペクトル

重線、三重線、二重線、一重線に分裂するので、これらの炭素を容易に識別し得る。この技術は ^{13}C -NMR スペクトルの帰属を行ううえで有用である。

最近、同じ目的に使用し得る INEPT (insensitive nuclei enhanced by polarization transfer) という測定手段が開発された⁷⁾。測定条件を変えることによりメチンおよびメチルが上向きで、メチレンが下向き（図3d）、あるいはメチンのみが上向きとなるスペクトル（図3c）を得ることができる。原理は省略するがこの方法には、①S/Nが非常によくなる、②シグナルがすべて一重線となるので解析が容易となる、という長所があり、とくに磁場が低い電磁石（23kG）を用いる測定装置で威力を発揮する。

3.4 FT-NMR

NMR がSIの検出手段となり得たのは、FT-NMR⁸⁾ が出現したためといっても過言ではないほど、この手法による感度の増大は大きい。

^{13}C -NMR 観測用の 25.2 MHz（磁場の強さが 23kG の場合）の単一周波数の電波を、きわめて短時間（数～数10 μ 秒）パルス状にして照射すると、この電波は固有周波数を中心として数～数 10kHz の幅をもつようになる。 ^{13}C 核のシグナルは通常 6 kHz 以内に分布しているから、試料中のすべての ^{13}C 核は同時に励起される。このとき吸収されるエネルギーは、自由誘導減衰 (free induction decay, FID) として観測されるので（図2a参照）、コンピュータによりフーリエ変換 (Fourier transformation, FT) すると、通常見慣れた周波数領域のスペクトルが得られる（図2b）。測定する化合物の構造、試料の濃度等によって最適条件は異なるが、FID の 1 回の取得時間は 1～4 秒程度であるから、FT 法以前の古典的な掃引法に比較して測定時間を著しく短縮することが可能となる。FT 法による感度の改善は約 100 倍ぐらいといわれている。

3.5 試料の調製

^2H -NMR を測定する場合以外、試料は重水素化した溶媒 (CDCl_3 , CD_3OD , $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, D_2O 等) に溶かし、ガラスの試料管に入れて測定する。固形物、とくに金属粉などが混入すると分解能が著しく低下するので、脱脂綿等でろ過することが必要である。機種によって異なるが、試料管は外径 5 mm (液量約 0.3 ml), 10 mm (約 1.5 ml), 15 mm (約 3 ml) 等があり、試料の量、溶解度の程度によって使い分ける。測定は一般に高濃度で行った方が効率がよいから、微量試料の場合は小口

径、逆に試料の量が多く溶解度が限られている場合は大口径の試料管を使用する。化学シフトを算出するための内部基準としては、テトラメチルシラン (TMS) を使用する。水溶液の場合は一般にジオキサンが用いられる。

3.6 化学シフト

有機化合物中へ取り込まれた ^{13}C -ラベルの位置を決定するには、 ^{13}C 核の化学シフトに関する知識が必要となる。 ^{13}C 核の化学シフトは、分子構造によって大きな影響を受けるが、その範囲は通常の有機化合物で約 220ppm である。飽和の炭素は高磁場側に、不飽和炭素は低磁場側に表れ、とくにカルボニル炭素は最も低磁場側に認められる。実際のシグナルの帰属にあたっては、種々の置換基効果を考慮し、モデル化合物と比較検討し、さらに帰属のための ^{13}C -NMR の種々の技法を活用することが必要である。詳細については成書¹¹⁻¹⁴⁾、チャート集⁹⁾、スペクトルデータ集¹⁰⁾を参照することが望ましい。

3.7 ^{13}C 以外の核の測定

感度上の理由と、NMR の研究対象が主として有機化合物であるために、 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMRを測定できる装置が、現在、広く普及している。これ以外の核は多核 (multi nuclei) と呼ばれる。表 1 に示したようにこれらの核は共鳴周波数が異なるので、観測目的の核に合わせた発振器、受信器が多核の測定には必要である。ただし個々の核専用の装置を多数そろえるのは高価になりすぎるので、現在の NMR 装置には 1 台で多核の観測を可能にする周波数シンセサイザー、広帯域ローカルオシレータ、マルチプローブを使用するものが多い。

4. ^2H 核の測定

^1H 核に比較して ^2H 核は共鳴周波数が低く (表 1 参照)、シグナルの分離が極端に悪い、スピンの 1 であり四重極モーメントをもっているためにシグナルが幅広くなるという欠点がある。しかし超伝導磁石の採用によって高い磁場が容易に得られるようになり、この問題はあまり深刻でなくなった。たとえば 92kG の磁場での共鳴周波数は 60 MHz であり、簡易型の ^1H -NMR 装置と同じになる。一方、 ^2H 核は緩和時間が短いので、単位時間当たりの積算回数を大幅に増やすことが可能であり、研究の最も進んでいる ^1H -NMR のデータをそのまま応用できるので解析が容易という長所が

ある。 ^1H -照射によって NOE が生じないので定量的なスペクトルが得られるという利点もある。

さらに天然存在比が小さい (0.0148%) ので、標識実験のさいに取り込み率がかなり悪くても確実な結果が得られるという点、 ^{13}C 核 (天然存在比 1.1%) と比較して有利であるといえよう。

測定は ^{13}C -NMR の場合と同様に行えるが、現在市販されている測定装置は ^2H をロックシグナルとして使用しているものが多いので、 ^2H -NMR の測定はノーロックで行わなければならないことがあるのに注意する必要がある。

使用する溶媒は、他の場合と異なり重水素化していないものでなければならない。化学シフトは、溶媒中に微量に存在する天然存在比の重水素化された分子に由来するシグナルを内部基準にして表す。

^2H -NMR の測定に関しては斎藤¹¹⁾による詳細な解説書を参考にすることが望ましい。

5. ^{15}N 核の測定

^{15}N 核はスピン $I = -\frac{1}{2}$ であり、測定に関する注意は ^{13}C -NMR と基本的には同じと考えてよい。ただし ^{15}N 核は一般に緩和時間が長いのでパルスの繰り返し時間を長めにとらなければならない、単位時間内の積算回数は必然的に小さくなり、S/N の改善が効率よく行えない。また、プロトン照射による NOE が負 (最大 -4.93) であるので、信号が相殺されて零となることもあるのに注意する必要がある。したがって ^{15}N -NMR の測定は ^{13}C -, ^2H -NMR より一般に難しいといって差し支えない。前述した INEPT 法⁷⁾ は感度の悪い核 (たとえば ^{15}N) と感度のよい核 (ほとんどの場合 ^1H である) がスピン結合をしている場合に感度のよい核のスピン分極を他方に移すことにより、感度の悪い核の感度向上を行う方法である。INEPT 法による ^{15}N -NMR の感度の向上の程度は ^1H と ^{15}N の磁気回転比の割合 $\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{N}} \approx 10$ と考えられるから、 ^{15}N の測定に特に適した手段であるといえよう。さらにパルスの繰り返し時間は、緩和時間の短いプロトンによって決まるので、単位時間当たりの積算回数を多くすることができるといいうメリットもある。化学シフトはニトロメタンを基準にして表すのが最も一般的であるが、水と混合しないこと、溶媒の種類によってシフトが起こることなどから、 CD_3NO_2 中に溶かした $\text{CH}_3^{15}\text{NO}_2$ を毛细管に封入したものを、外部基準として使用することが望ましいとされている。 ^{15}N -NMR は成書^{12), 13)}によって詳細に説明されている。

6. 標識実験への応用

6・1 ^{13}C -NMR による生合成研究

^{13}C -NMR による生合成研究法は、① ^{13}C -NMR スペクトルのシグナル強度の増大によって、標識した前駆体の取り込み位置を決定するシングルラベル法と、② ^{13}C - ^{13}C スピン結合を利用するダブルラベル法¹⁴⁾とに大別される。

6・1・1 シングルラベル法

この方法は、ラベルしてない試料とラベルした試料の ^{13}C -NMR スペクトルを比較し、シグナル強度の増大によって同位体の取り込み位置を決定するものである。 ^{13}C -NMR ではシグナルの相対強度が、サンプル濃度、測定条件によって大幅に変化するので、比較するスペクトルは完全に同一条件下において測定したものであることが望ましい。シグナル強度はコンピュータのデータポイントの数によっても影響されるので、厳密な比較が必要なときは、シグナル面積を測定しなければならない。種々の原因による実験誤差が大きいことを考えると、シグナル強度は最低 1.5 倍程度増大していない限り、信頼し得る結論を出すことが困難である。

応用例-1: ジヒドロレイタムサイジン(I)¹⁵⁾

ジヒドロレイタムサイジン(I) (図4) は、放線菌の1菌株によって生産される抗生物質である。 CH_3 - $^{13}\text{CO}_2\text{Na}$ によってラベルした試料のスペクトル (図5a) をラベルしてない試料 (図5c) と比較すると、図5a ではC-2, 4, 6, 7a, 8のシグナル強度が約10倍に増大しており、これらの炭素が酢酸のカルボニル基に由来することが判明した。

図4 ジヒドロレイタムサイジンの生合成経路

一方、 $^{13}\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$ でラベルしたスペクトル (図5b) では、反対にC-3, 4a, 5, 7, 9のシグナルが強くなっており、図4に示すような酢酸の縮合様式が証明された。なお、図5cでC-4a, 5の水素と結合していない炭素のシグナル強度が弱いのは、緩和時間が長い¹¹⁻¹⁴⁾ためであり、異なるスペクトル間でのシグナル強度の比較にあたっては、十分な注意が払われなければならないことが理解されよう。

(a) $\text{CH}_3^{13}\text{CO}_2\text{Na}$ でラベルした試料
(b) $^{13}\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$ でラベルした試料
(c) ラベルしてない試料

図5 ジヒドロレイタムサイジンの ^{13}C -NMR スペクトル

6・1・2 ダブルラベル法¹⁴⁾

核スピンを有する複数の核が、同一分子中の隣接する位置に存在するとスピンの結合という現象が生じ、NMR シグナルに変化が生じる。

酢酸を例にとってみると、 $^{13}\text{CH}_3^{13}\text{CO}_2\text{H}$ のシグナルは、図6bに示すように ^{13}C - ^{13}C スピン結合によって分裂し、ラベルしてない(あるいはシングルラベルの)酢酸 (図6a) と著しい対照をなしている。このスピンの結合による分裂は、炭素-炭素結合が切断されない限り、酢酸分子がどのような化合物に変換されても観測される。したがって、このダブルラベル法は前駆体中の共有結合をラベルする方法とみなすことができるから、転位、あるいは脱炭酸等の共有結合の切断を伴う反応機構の解明に絶大な威力を発揮する。

図6 酢酸の ^{13}C -NMR スペクトル

ダブルラベル法のもう1つの利点は、測定感度が改善されるということである。前述したように ^{13}C -NMRではシグナル強度が種々の要因によって変化するから、シグナル強度の増大が不十分な場合(たとえば ^{13}C の天然存在比1.1%から1.2%への増加)、それが真の増加であるのかどうか結論することができない。

一方、ダブルラベルの前駆体を使用すれば、未標識試料のスペクトルでは見られなかった位置に新しくシグナルが生ずるために、 ^{13}C -ラベルの取り込みが起こっているかどうかの判定ははるかに容易になる。これは ^{13}C の高いバックグラウンド値が一挙に低下したことに相当する。

応用例-2: ジヒドロレイタムサイジン(I)¹⁴⁾

$^{13}\text{CH}_3^{13}\text{CO}_2\text{Na}$ を利用して、応用例1と同様にラベルした(I)の ^{13}C -NMRスペクトルを図7に示す。シングルラベルの場合と異なり、すべてのシグナルは三重線に分裂している(この三重線は、実際には ^{13}C - ^{13}C スピン結合によって分裂した二重線と、ラベルされていない試料に基づく一重線が重なったものである)。

図7 $^{13}\text{CH}_3^{13}\text{CO}_2\text{Na}$ でラベルしたジヒドロレイタムサイジンの ^{13}C -NMR スペクトル

スピン結合の大きさ($J_{\text{C-C}}$ で表す)は、構造依存性であり、その大きさを調べることで、スピン結合している相手の炭素を知ることが可能である。図7においてC-2と3($J_{\text{C-C}}=35\text{ Hz}$), 4と4a(31 Hz), 5と6(53 Hz), 7と7a(43 Hz), 8と9(45 Hz)はスピン結合の大きさが同じであり、同一の酢酸分子に由来することが証明された。この種の情報は、他のいかなる手段によっても得ることができないものであり、 ^{13}C -NMRの生合成研究における有用性を一段と高めたのが理解できよう。

応用例-3: 立体化学の問題——ペニシリン(II)¹⁶⁾

^{13}C -NMRでは、隣接する置換基との立体的な関係の相違が化学シフトによく反映されることが知られている¹¹⁻¹³⁾。たとえば、(II)のC-2位の2個のメチル基は環境がよく似ているために、化学分解によって区別して取りだすことはほとんど不可能であるが、 ^{13}C -NMRではC-3位の置換基であるカルボン酸と空間的に近い α -メチル基が立体圧縮効果(γ -効果とも呼ばれる)¹¹⁻¹³⁾により高磁場側に移動するので、容易に区別できる。

一方のメチル基のみを立体特異的にラベルした(2S, 3S)-[4- ^{13}C]バリンによってラベルした(II)の ^{13}C -NMRスペクトルでは、高磁場側の27.3 ppmの α -メチル基のシグナル強度は約20倍に増大したが、 β -メチル基(30.9 ppm)には変化が認められなかった。この実験によって、バリンはgemジメチル基の立体配位を保持したまま(II)に取り込まれるということが証明された(図8)。

図8 ペニシリンへの(2S, 3S)-[4- ^{13}C]バリンの取り込み

6・2 ^2H -NMRによる生合成研究

応用例-4: リボスタマイシン(III)¹⁷⁾

リボスタマイシン(III)は放線菌によって生産される抗生物質で、リボース、ネオサミンCおよび2-デオキシストレプタミンと呼ばれる疑似糖から成っている。 ^{13}C -NMRを用いた実験によりグルコースの6位の炭素は、図9aに示すようにネオサミンCの6位、2-デオキシストレプタミンの2位、リボースの5位に取り込まれることが証明されている。ここで問題となるの

図 9 (a) リボスタマイシンの生合成経路 (●は glucose の C-6 が取り込まれる位置を示す)
 (b)~(d) それぞれ $[6,6-^2\text{H}_2]$, $(6S)-[6-^2\text{H}]$, $(6R)-[6-^2\text{H}]$ グルコースでラベルしたリボスタマイシンの ^2H -NMR スペクトル。リボスタマイシンへの取り込み位置は Δ , $\blacktriangle$, $\square$ で示してある。

は、①グルコースの6位の水素 ($-\text{CH}_2\text{H}_5\text{OH}$) がそのまま保持されて取り込まれるか、②一方の水素が失われるとしたら H_R と H_S のいずれか、③グルコースの6位の立体はそのまま保持されて取り込まれるか、という点である (一見同じように見える H_R と H_S は立体的な環境が異なるから、酵素はこの2個の水素を区別していると予想される)。

まず $[6,6-^2\text{H}_2]$ -グルコースによって (III) をラベルしたところ、図 9 b の ^2H -NMR スペクトルで示すように 2-デオキシストレプタミンの6位およびリボースの5位には ^2H が2個ずつ取り込まれるが、ネオサミンCの6位には1個しか取り込まれないことが判明した。これはネオサミンCの生合成中間体では6位がアルデヒドになるために ^2H が1個失われるためであろう。

つぎに、 $(6R)$ -および $(6S)-[6-^2\text{H}]$ -グルコースを用いて実験したところ、図 9 c, 9 d に示すような結果が得られた。このことにより、酵素がグルコースの6位の2個の水素を明確に区別していることが証明され、またグルコースから (III) が生合成されるさいの反応の立体化学に関する機構が解明された。

水素の代謝の研究に多用されている ^3H の場合、存在位置を知るためには分解反応が必須であり、このような立体化学の研究には応用しにくいことが明らかである。

6・3 ^{15}N -NMR による生合成研究

応用例-5: ペニシリン (II)¹⁸⁾

有機化合物中の窒素原子は、一般にアミノ酸に由来するものが多く、生合成的には炭素や水素の場合ほど興味を持たれていないため研究例は数少ない。前述し

図10 (a) ラベルしていないペニシリン G
 (b) ^{15}N -バリンでラベルしたペニシリン G の ^{15}N -NMR スペクトル

たような原因で、 ^{15}N -NMR の測定が困難であることもその理由の 1 つであろう。

(Ⅱ) の 6-アミノペニシラン酸部分の炭素骨格は、バリンおよびシステインに由来することが判明していたが(図 8)、アミノ酸の窒素が(Ⅱ)にそのまま取り込まれるかどうかの証明はなされていなかった。Booth ら¹⁸⁾は ^{15}N -バリンを使用して(Ⅱ)の生合成を研究した。図 10 b に示すようにバリンでラベルした試料では、 N^{α} に由来するシグナルの強度が N^{β} に比較して増大しており、窒素を含めたバリンの骨格がそのまま(Ⅱ)に取り込まれていることが明らかである。 ^{15}N の分析に関しては、高感度な方法が開発されているが(本誌 Vol.31, No.4, pp. 212~21 参照)、分子中に複数の窒素原子を含有する化合物に関しては、分解を必要としない ^{15}N -NMR が有用な方法であろう。

6・4 同位体シフトの利用

議論を簡略化するために、以下 ^{13}C 核について説明する。 ^{13}C 核に結合している軽い原子 (^1H , ^{12}C , ^{14}N , ^{16}O など。以下 X_L で表す) を、重い同位体 (^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O など。以下 X_H で表す) で置換すると ^{13}C -NMR スペクトルに、①スピン結合、および②同位体シフトという現象が表れる(図 11 のクロロホルムを参照)。スピン結合は核スピンを持った核 (^2H , ^{13}C , ^{15}N) の間でのみ観測され、これを利用したものが前述した ^{13}C -NMR におけるダブルラベル法である。一方、同位体シフトは核スピンを持っていない核 (^{16}O) についても生ずるから、NMR で直接観測できない ^{18}O を ^{13}C -NMR によって間接的に見ることが可能となる。

図 11 クロロホルムの ^{13}C -NMR スペクトル

応用例-6: シトリニン (Ⅳ)¹⁹⁾

シトリニン(Ⅳ)はカビによって生産される著名なマイコキシンであり、これまでの実験により 5 モルの酢酸と 3 モルの C_1 単位(メチオニンのメチル基)の縮合によって生成されることが判明していた(図 12)。

図 12 シトリニンの生合成

図 13 $\text{CH}_3\text{-}^{13}\text{C}^{18}\text{O}_2\text{Na}$ でラベルしたシトリニンの ^{13}C -NMR スペクトル。C-3, 6, 8 が 2 本ずつに分裂していることに注意

環形成の詳細な機構を明らかにするために、 $\text{CH}_3\text{-}^{13}\text{C}^{18}\text{O}_2\text{Na}$ で(Ⅳ)をラベルし、 ^{13}C -NMR を測定したところ図 13 に示すスペクトルが得られた。C-3, 6, 8 が二重線となったのは、酢酸中の $^{13}\text{C}\text{-}^{18}\text{O}$ 結合がそのまま保持されたため、 $^{13}\text{C}\text{-}^{18}\text{O}$ (天然存在比の酢酸)と $^{13}\text{C}\text{-}^{16}\text{O}$ の環境の異なる 2 種類の ^{13}C が観測されたためである。この結果は(Ⅳ)の 2 位の酸素は、C-9, C-3 位に取り込まれた酢酸分子中に含有されていたものであり、C-1 に結合していた酢酸中の酸素はエーテル環形成時に失われたことを示している。

応用例-7: アスコクロリン (Ⅴ)²⁰⁾

^{13}C 核に ^2H が結合すると、同位体シフト、スピン結合が生じるほかに、 ^{13}C 核の緩和時間が著しく長くなるという現象が生ずる。この 3 つの効果の総合的な作用の結果、 ^{13}C 核のシグナル強度が著しく減少する(実質的には消失するといって差し支えない)ので、この現象を利用することによって ^{13}C -NMR で ^2H の結合部位を知ることが可能である。

Hunter ら²⁰⁾は $[3\text{-}^{13}\text{C}, 4\text{-}^2\text{H}]$ メパロン酸を合成し、カビの代謝産物であるアスコクロリン(Ⅴ)の生合成のさいにおこる水素の転位反応を鮮やかに証明した。まず $[3\text{-}^{13}\text{C}]$ メパロン酸を用いてラベル実験を行い、(Ⅴ)

の ^{13}C -NMR スペクトルにおいてC-1, 5, 9 のシグナル強度が増大することを確認した。つぎに前記標識化合物を用いてラベルしたところ、C-1 および C-5 のシグナル強度が著しく減少した。これは図14に示す機構で隣接位に存在した ^2H がC-1 と5 に転位したためである。 ^{13}C -前駆体がよく取り込まれていることは、C-9 のシグナル強度が減少していないことから証明された。

以上の他に、 ^{13}C - ^{15}N スピン結合を利用した研究²¹⁾も報告されており、複数の核種を組み合わせた生成実験は、詳細な反応機構の解明にとって欠くべからざる手段となりつつある。測定面でもまったく新しい概念に基づく2次元 NMR 法²²⁾あるいはその応用である ^{13}C - ^{13}C スピン結合したシグナルのみ観測する INADEQUATE 法²³⁾など生成反応にとっても重要な新手法が続々と開発されており、SI を検出する手段としてのNMRの地位はますます重要なものとなっていくと思われる。

文 献

- 1) 竹内敬人, 石塚英弘: 「C-13 NMR 基礎と応用」, 講談社サイエンティフィク, 東京 (1976)
- 2) G.C. Levy and G.L. Nelson (田中誠之訳): 「炭素-13 核磁気共鳴」, 東京化学同人, 東京 (1973)
- 3) G.C. Levy, et al.: "Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy", 2nd Edition, Wiley-Intersciences, New York (1980)
- 4) R.J. Abraham and P. Loftus (竹内敬人訳): 「 ^1H および ^{13}C NMR 概説」化学同人, 京都 (1979)
- 5) 吉岡亨, 今成司: 「ライフサイエンスのためのNMR」, 産業図書, 東京 (1982)
- 6) 麻生芳郎, 他編: 「安定同位体のライフサイエンスへの応用」, 講談社サイエンティフィク, 東京 (1981)
- 7) G.A. Morris and R. Freeman: *J. Amer. Chem. Soc.*, **101**, 760 (1979)
- 8) D. Shaw: "Fourier Transform N.M.R. Spectroscopy", Elsevier Scientific Publishing Co., New York (1976)
- 9) L.F. Johnson and W.C. Jankowski: "Carbon-13 NMR Spectra", Wiley-Intersciences, New York

図14 アスコクロリンの生合成機構

- (1972)
- 10) E. Breitmaier, et al.: "Atlas of Carbon-13 NMR data", IFI/Plenum Press, New York (1980)
- 11) 齊藤肇: 「安定同位体のライフサイエンスへの応用」麻生芳郎, 他編, p. 122, 講談社サイエンティフィク, 東京 (1981)
- 12) G.C. Levy and R.L. Lichter: "N-15 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy", Wiley-Intersciences, New York (1979)
- 13) G.J. Martin, et al.: " ^{15}N -NMR Spectroscopy", Springer-Verlag, Berlin (1981)
- 14) H. Seto, et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **95**, 8461 (1973); *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 1667 (1975)
- 15) H. Seto, et al.: *J. Antibiotics*, **26**, 609 (1973)
- 16) H. Kluender, et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **95**, 6149 (1973)
- 17) K. Kakinuma, et al.: *ibid.*, **103**, 5614 (1981)
- 18) H. Booth, et al.: *J.C.S. Chem. Comm.*, **1976**, 110
- 19) U. Sankawa, et al.: *Heterocycles*, **16**, 1115 (1981)
- 20) R. Hunter and G. Mellows: *Tetrahedron Lett.*, **1978**, 5051 (1978)
- 21) A.M. Nadzan and K.L. Rindharte, Jr.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **99**, 4647 (1977)
- 22) 永山国昭: 化学と工業, **33**, 527 (1980); 日本物理学会誌, **37**, 450 (1982)
- 23) A. Bax, et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **102**, 4849 (1980); **103**, 2102 (1981)