

平成30年度 物理化学概論

磁気分光学：NMR(2)

九州工業大学 竹中繁織

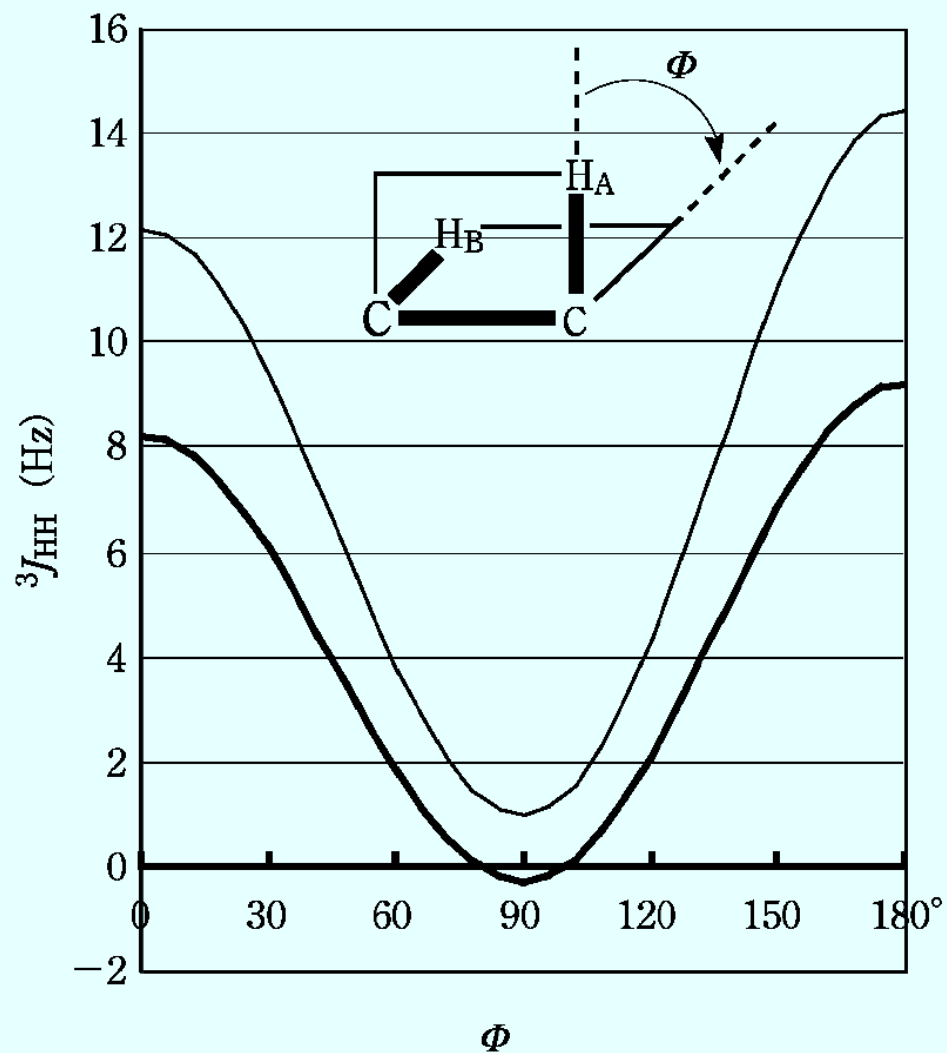


図2 二面角 ϕ と Karplus 式との関係

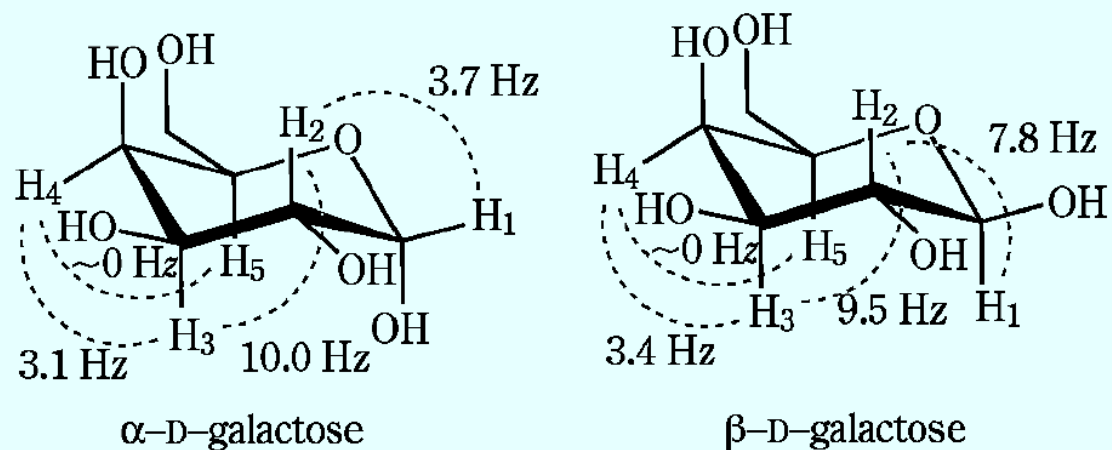


図3 ガラクトースの結合定数



図4 ^{13}C とプロトンとのビシナル結合定数

核オーバーハウザー効果 (NOE) とは

あるスピンの磁気共鳴の遷移を共鳴周波数の電磁波を照射したときに、そのスピンと磁氣的な相互作用している別のスピンの磁気共鳴の強度が変化する現象のこと

特徴

- ・感度の低いスピンのシグナルを増強することが可能
- ・化学結合では近傍にないが、空間的には近傍にあるようなスピンの対を知ることができる

NOE 差スペクトルとは

特定のプロトン照射したスペクトルからスペクトルのシグナルがない領域を照射した¹Hスペクトルを差し引いたスペクトルのことで、このように差をとることにより強度が増加した吸収だけが残る。

核オーバーハウザー効果 (NOE) について

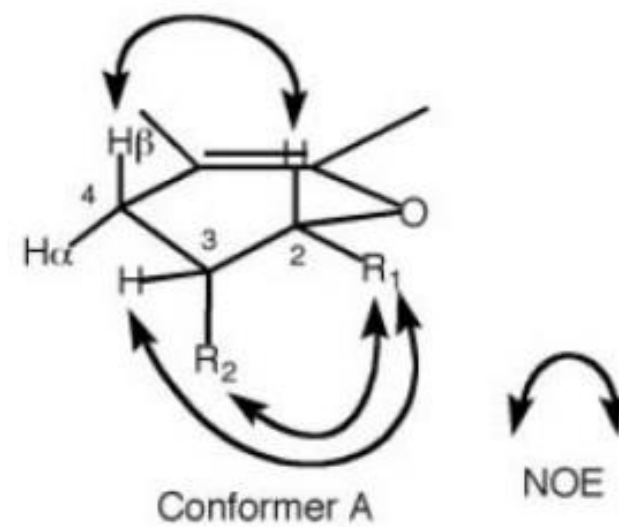
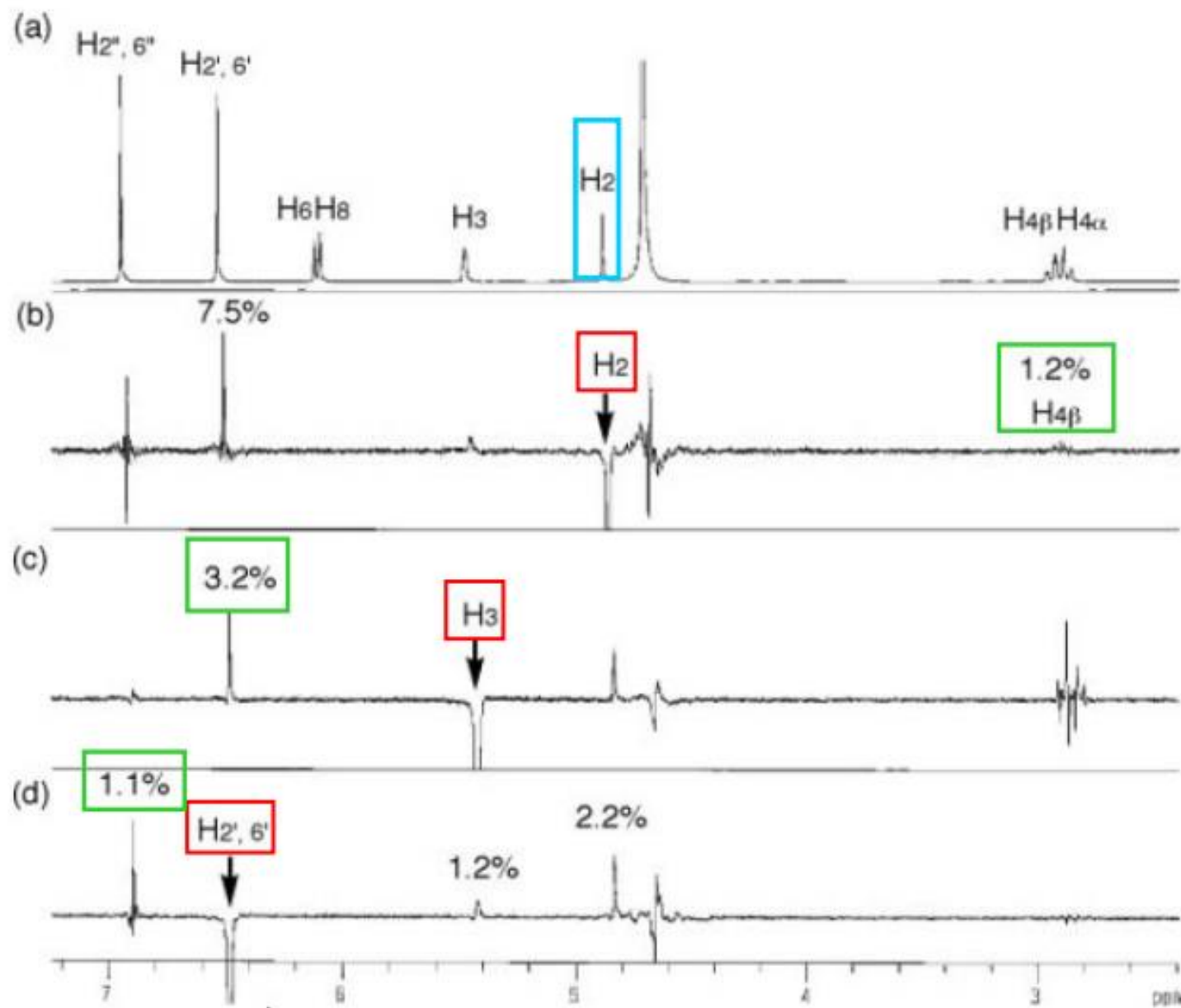

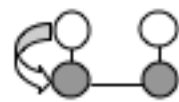




Figure 5. 1H NMR and NOE differential spectra of a solution containing EGCg (43.5 mM) in D_2O at $35^\circ C$: (a) EGCg, (b) irradiation of H_2 , (c) irradiation of H_3 , (d) irradiation of $H_{2', 6'}$.

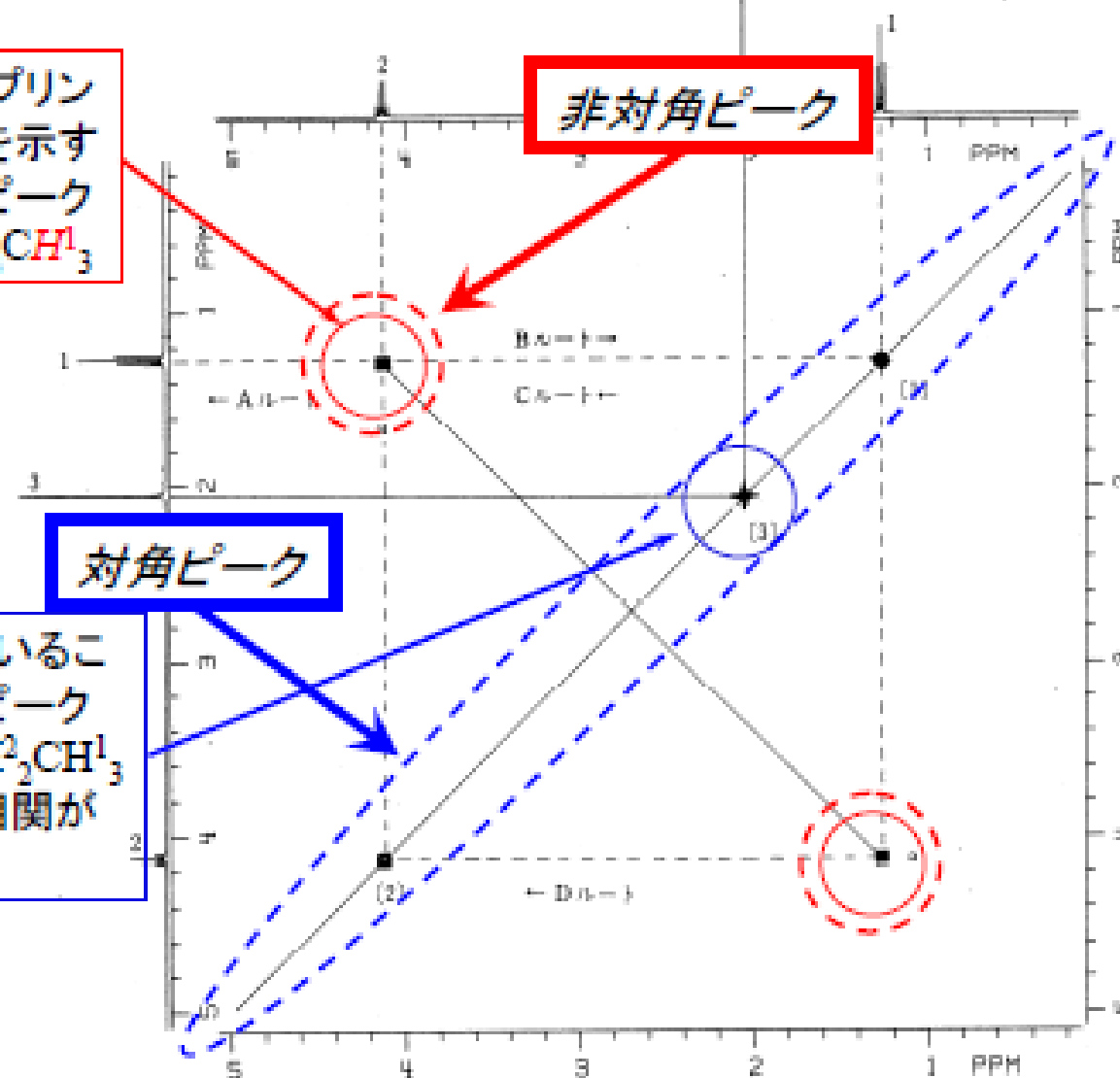
表1 各種2次元NMR法の相関と説明

手法	相関 (○は ^1H を、● は ^{13}C を示す)	説明
$^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY		<p>2~3本の結合を隔てたJカップリングを有するプロトンの同種核シフト相関を示します (左の相関図の\curvearrowright)</p>
$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC		<p>プロトン観測による結合1本を隔てた異種核カップリング (ここでは$^1\text{H}-^{13}\text{C}$) を示します</p>
$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC		<p>プロトン観測によるロングレンジ異種核カップリングを示します ($^1\text{H}-^{13}\text{C}$の場合は2~3結合隔てた核間の相関が検出されます)</p>
$^1\text{H}-^1\text{H}$ TOCSY		<p>カップリングしているスピン系中のプロトンJカップリングリレー、カップリングネットワークがあれば、遠くにあるプロトンの相関を検出できます</p>

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

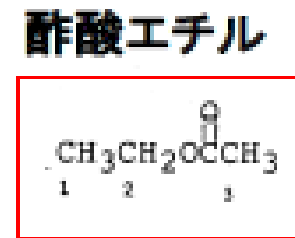
H¹とH²がカップリングしていることを示す相関(非対角)ピーク
 $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2^2\text{CH}^1_3$

非対角ピーク



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。

対角ピーク

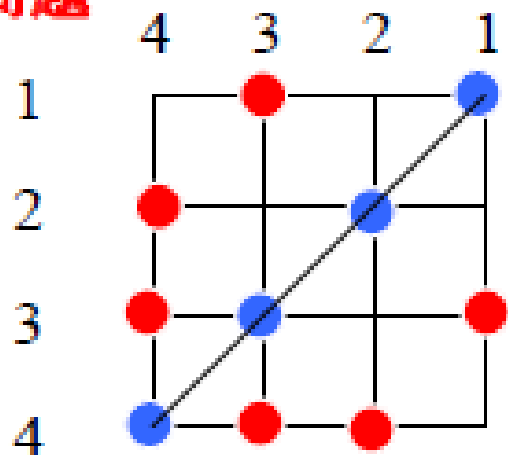


```

NAME: (1)F001
EXPNO: 01
PROCNO: 1
PROCPS: 1.00
SOLVENT: CDCl3
AQ: 1.00
RG: 655.00
SI: 655.00
SF: 360.13
WDW: EM
SSB: 0
LB: 3.00
GB: 0
PC: 1.00
SC: 0
RC: 0
WD: 0.00
WDW: EM
SSB: 0
LB: 3.00
GB: 0
PC: 1.00
SC: 0
RC: 0
WD: 0.00
WDW: EM
SSB: 0
LB: 3.00
GB: 0
PC: 1.00
SC: 0
RC: 0
WD: 0.00
SCALE: 99.28
CONTour LEVEL: 0.00
(1)F001
    
```

360MHz ¹H-NMR (CDCl₃)

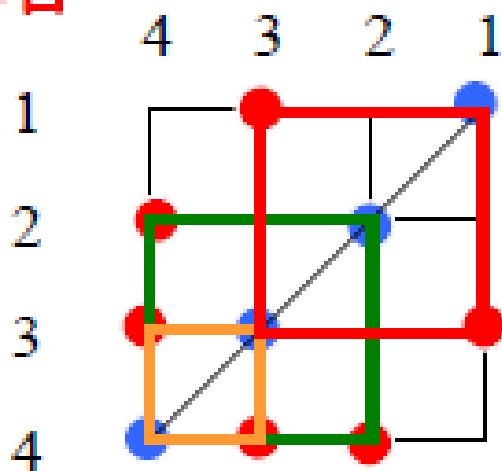
問題



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

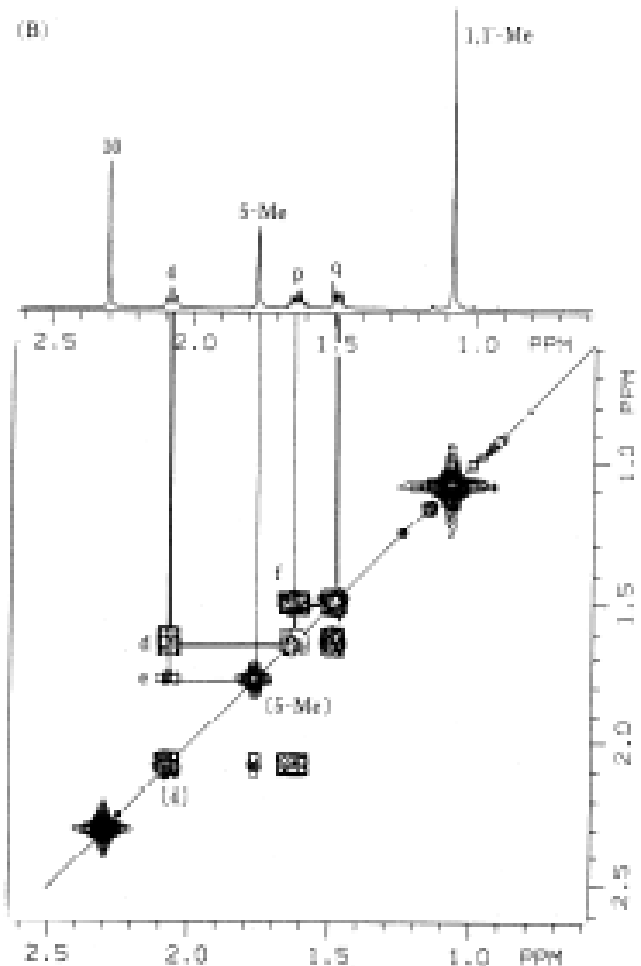
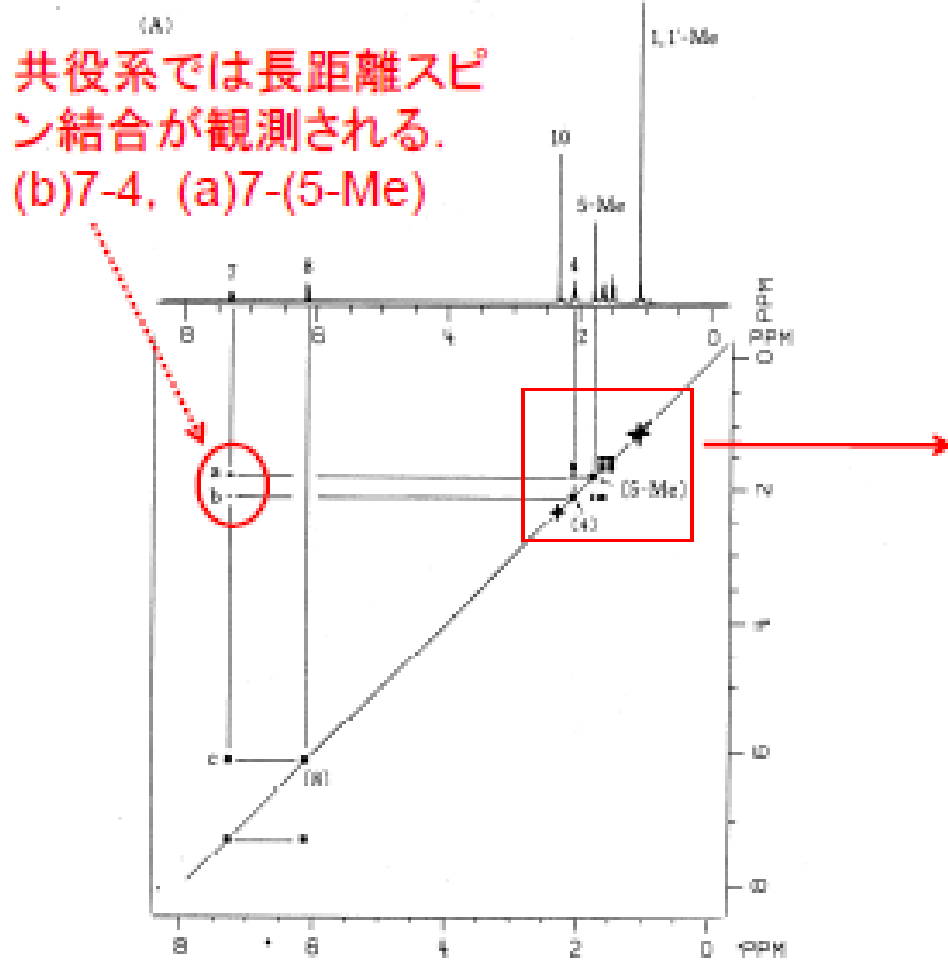
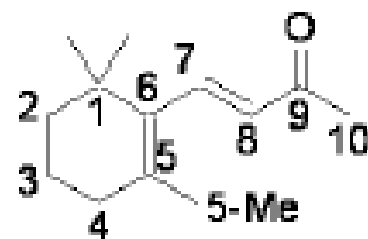
1-3-4-2

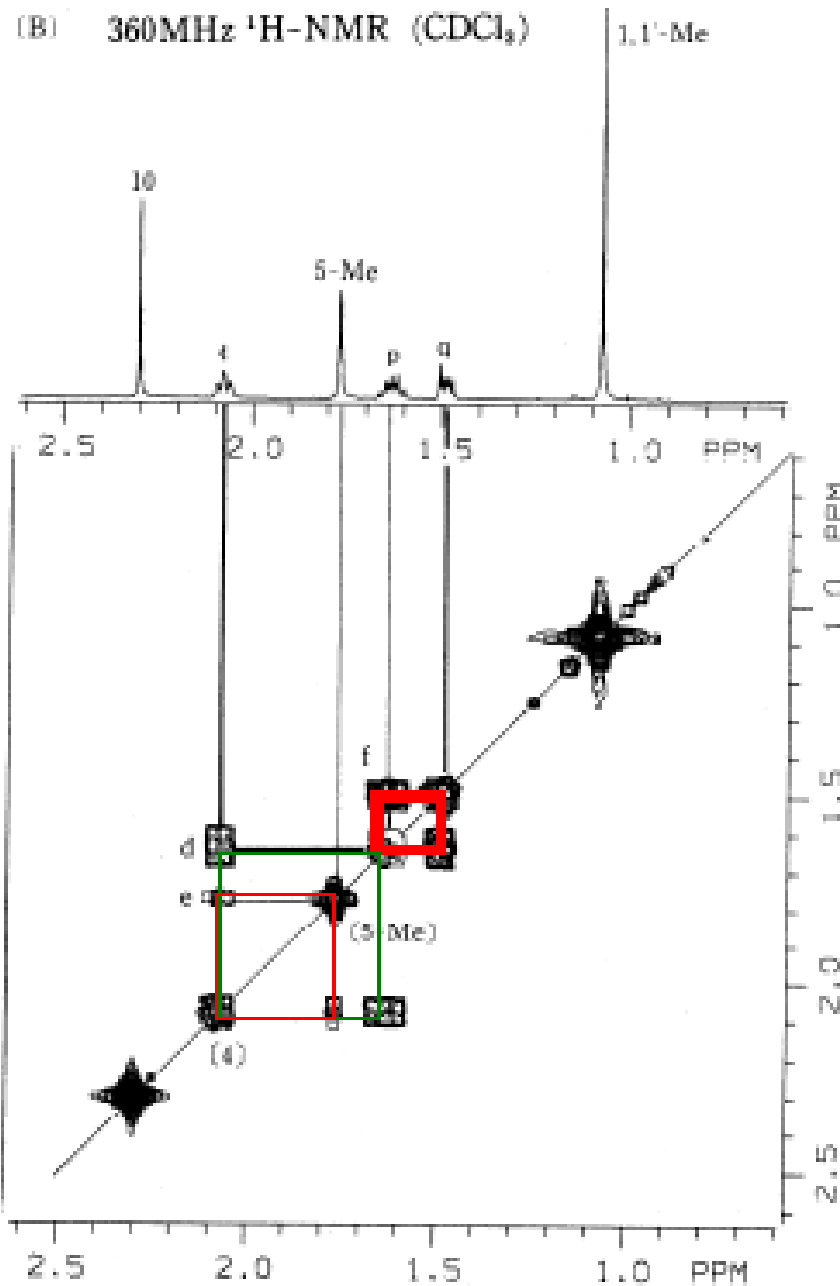
の1通りしかない. 1-3と3-4のリンクが、4のところで4-2のリンクとつながっている.

COSY相関には端(1と2)がある.

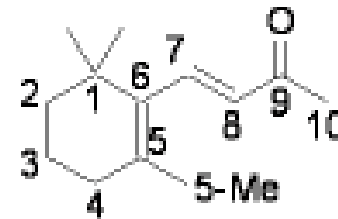
β-ヨノンの H-H COSY スペクトル

H-H COSY: 隣の炭素についている H はどれか





β-ヨノンの H-H COSY スペクトル
 H-H COSY: 隣の炭素についている H
 はどれか



4-5-Me, 4-p, p-q

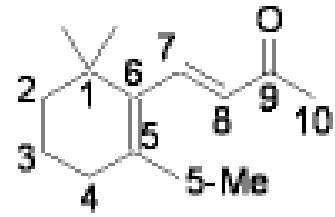
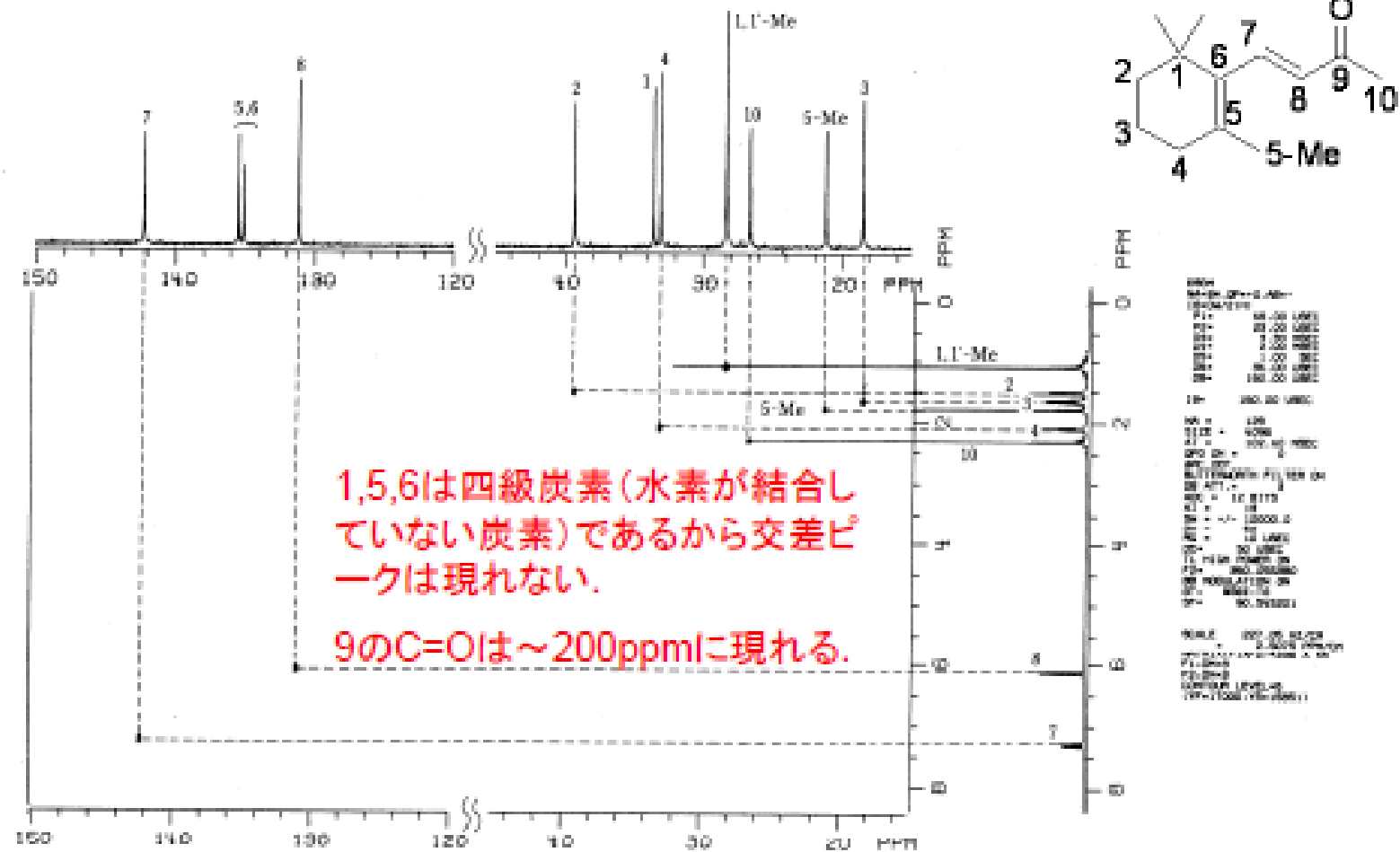
の相関が現れている。

q-p-4-(5-Me)と考えられるので、

qは2, pは3と帰属できる

β-ヨノンの C-H COSY スペクトル

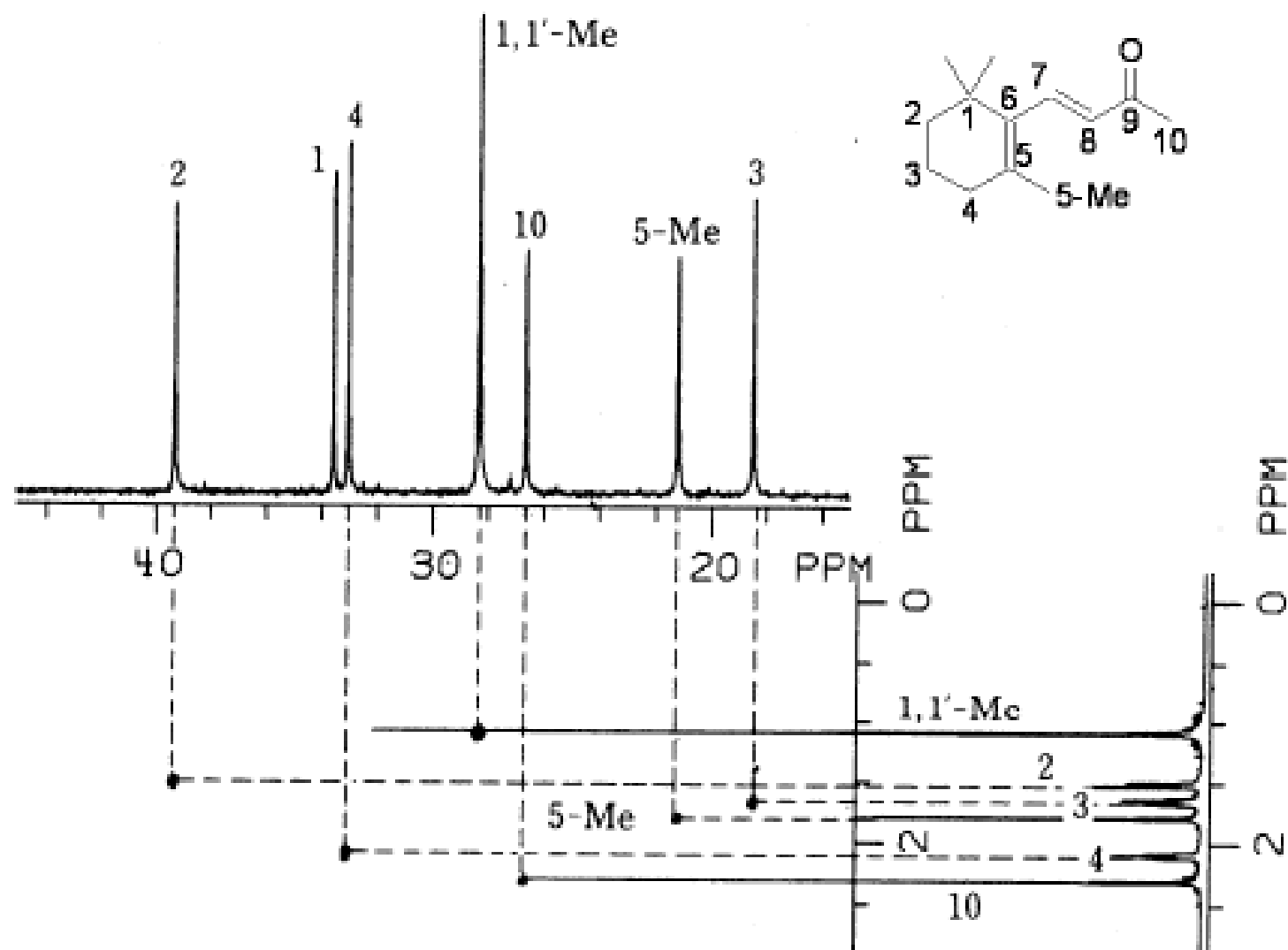
C-H COSY: どの水素がどの炭素に結合しているか



Peak	Chemical Shift (ppm)	Integration
1	1.5	1.00
2	1.8	1.00
3	2.1	1.00
4	2.3	1.00
5	2.5	1.00
6	2.7	1.00
7	6.5	1.00
8	6.8	1.00
9	200	1.00
10	2.3	1.00

β-ヨノンの C-H COSY スペクトル

C-H COSY: どの水素がどの炭素に結合しているか



^{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。

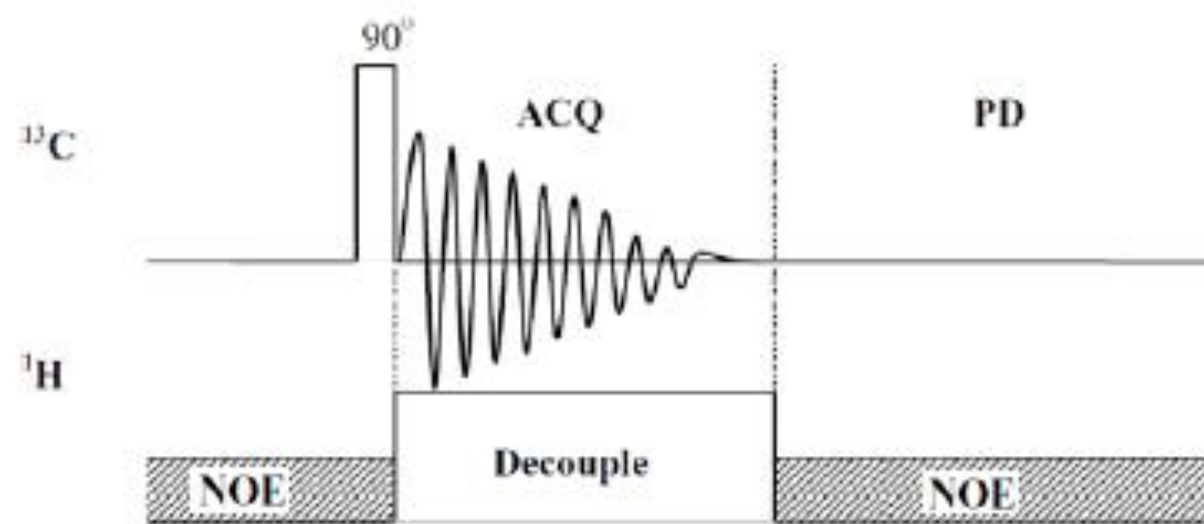


Fig.2-2 Pulse sequence of ^{13}C gated decoupling with NOE (^{13}C BCM).

^{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、待ち時間の中に ^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。

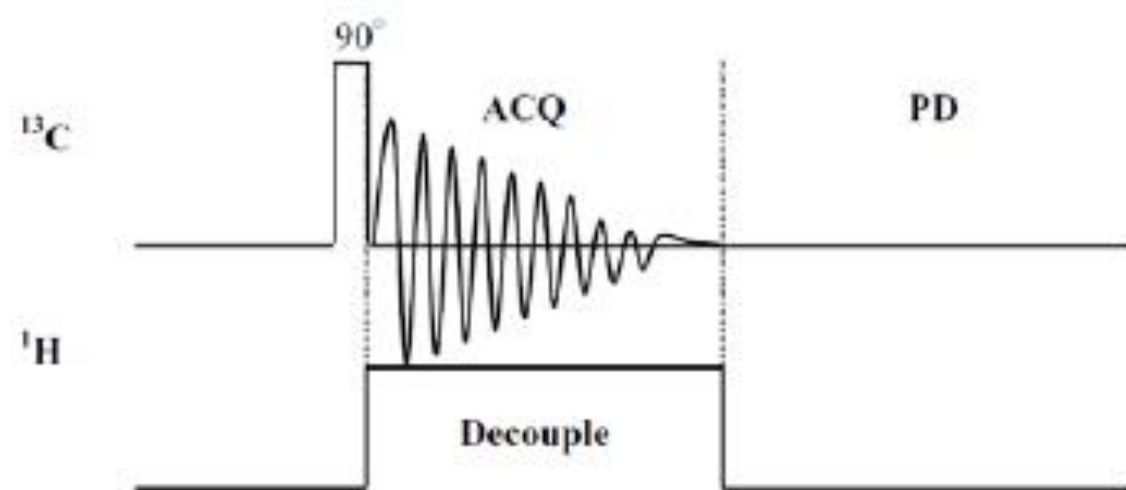


Fig.2-3 Pulse sequence of ^{13}C inverse gated decoupling without NOE (^{13}C NNE).

^{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。

^{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.

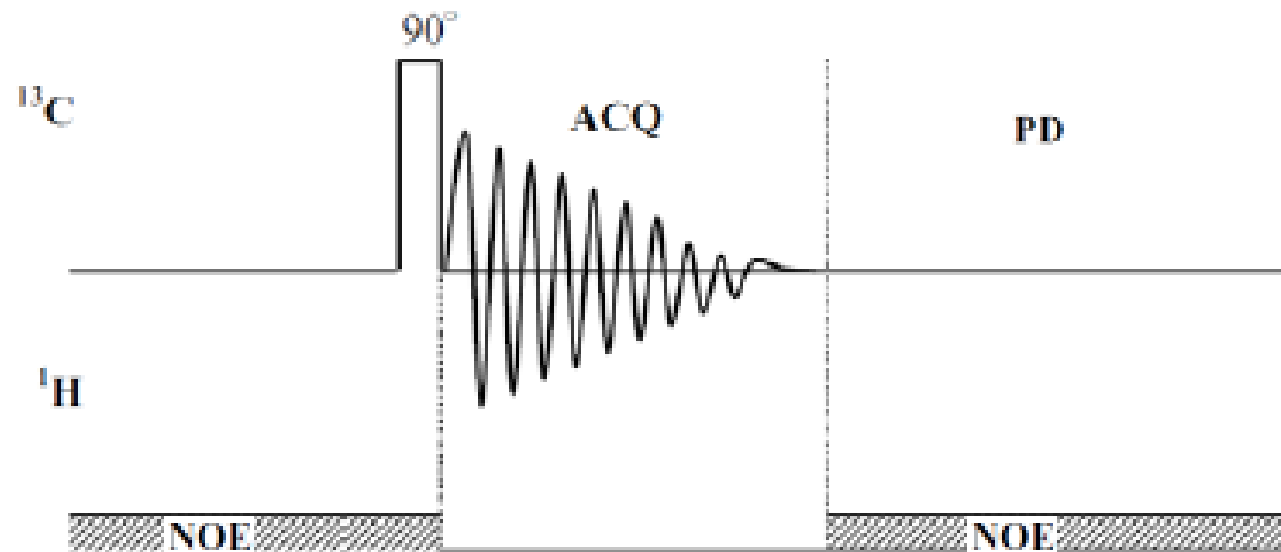
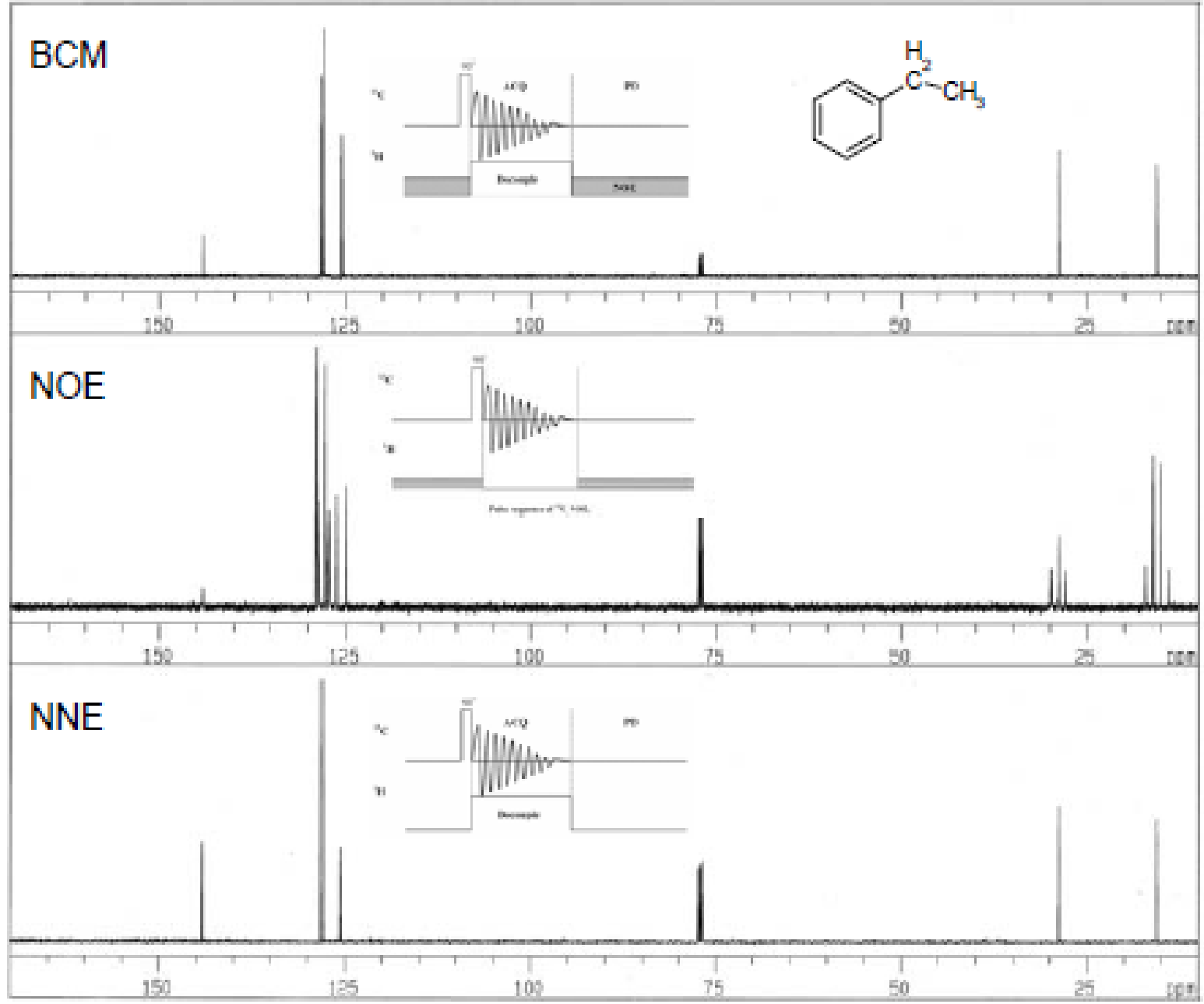


Fig.2-4 Pulse sequence of ^{13}C NOE.



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。

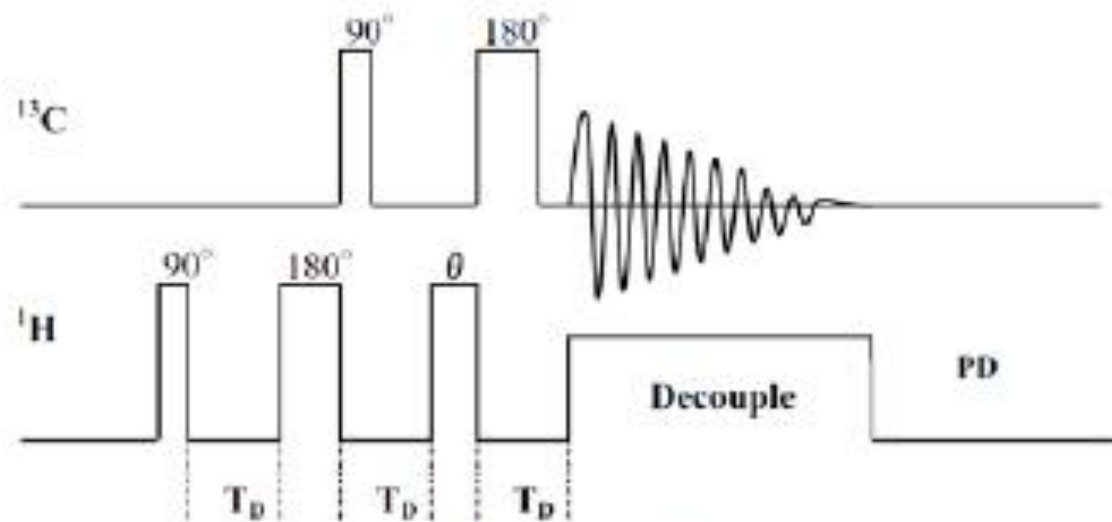


Fig.2-5 Pulse sequence of DEPT.

DEPT

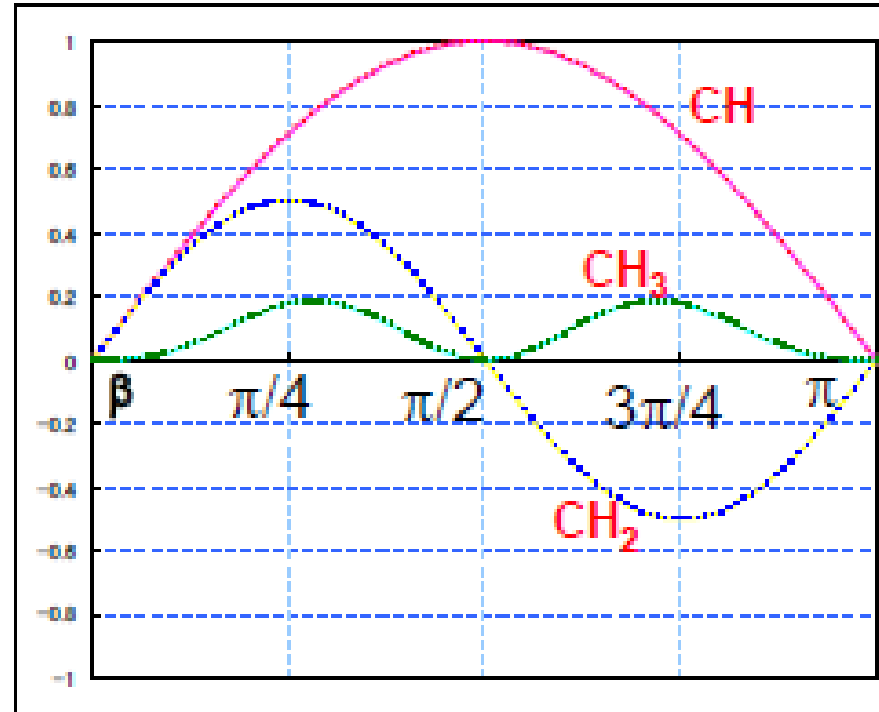
直積演算子による解析

$$\text{CH} : S_x \sin \beta$$

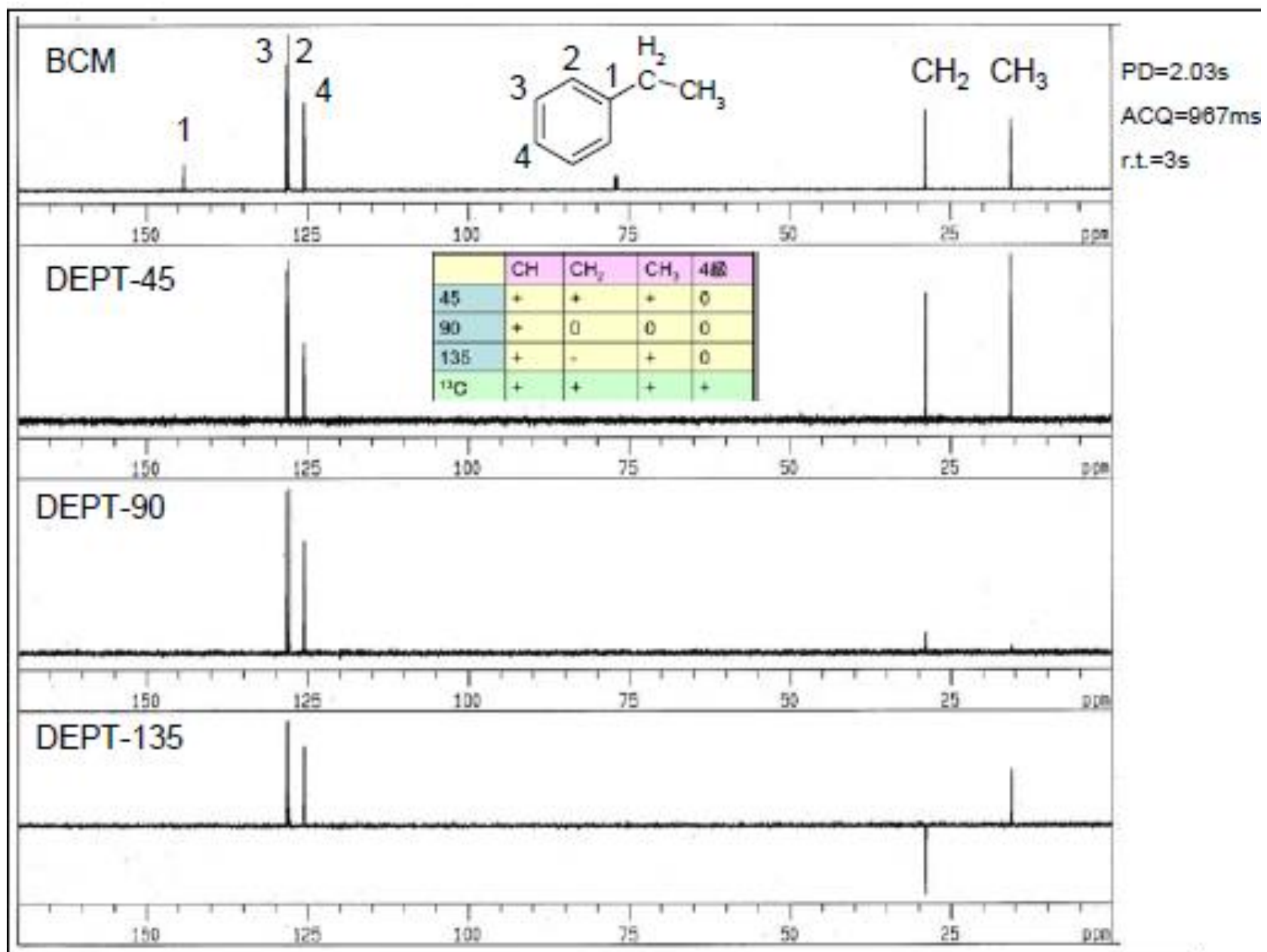
$$\text{CH}_2 : S_x \sin \beta \cos \beta$$

$$\text{CH}_3 : S_x \sin \beta \cos^2 \beta$$

	β		
	45°	90°	135°
CH :	$\frac{1}{\sqrt{2}} S_x$	S_x	$\frac{1}{\sqrt{2}} S_x$
CH ₂ :	$\frac{1}{2} S_x$	0	$-\frac{1}{2} S_x$
CH ₃ :	$\frac{1}{2\sqrt{2}} S_x$	0	$\frac{1}{2\sqrt{2}} S_x$



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



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(Me_4Si)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 …化学結合を通じ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 CH_3 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.

NMRを用いたタンパク質の高次構造決定法

2002年度ノーベル化学賞



Kurt Wüthrich (クルト・ビュートリッヒ)

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

1938 -

• 1986年

NMRを用いた
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」

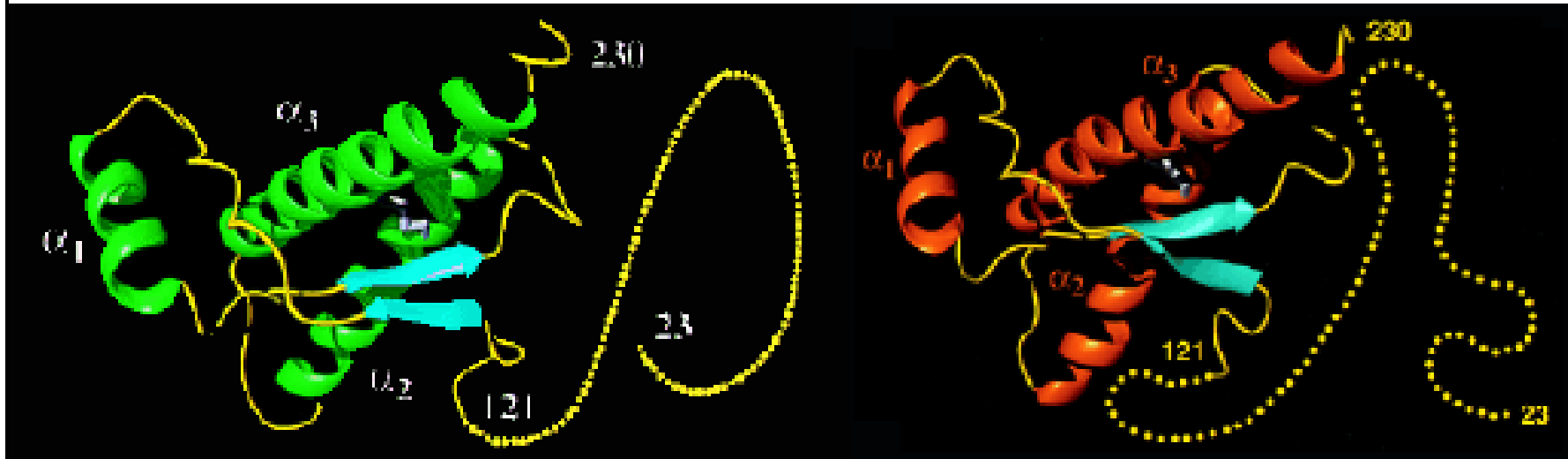
"for the development of methods for identification and structure analyses of biological macromolecules"

「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"

ウシ・プリオンのNMR構造

ヒト・プリオンのNMR構造



F.L.García, R. Zahn, R.Riek, and K.Wüthrich (2000).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(15), 8334-8339

R.Zahn, A.Liu, T.Lühns, R.Riek, C.Schroetter, F.L. Garcia,
M.Billeter, L.Calzolari, G.Wider, K.Wüthrich (2000).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(1), 145-150.

NMRによって決定されたプリオンの3次元構造

α -ヘリックス構造: 緑色またはオレンジ色

β -シート構造: 水色

C末端ドメインの不規則な二次構造: 黄色

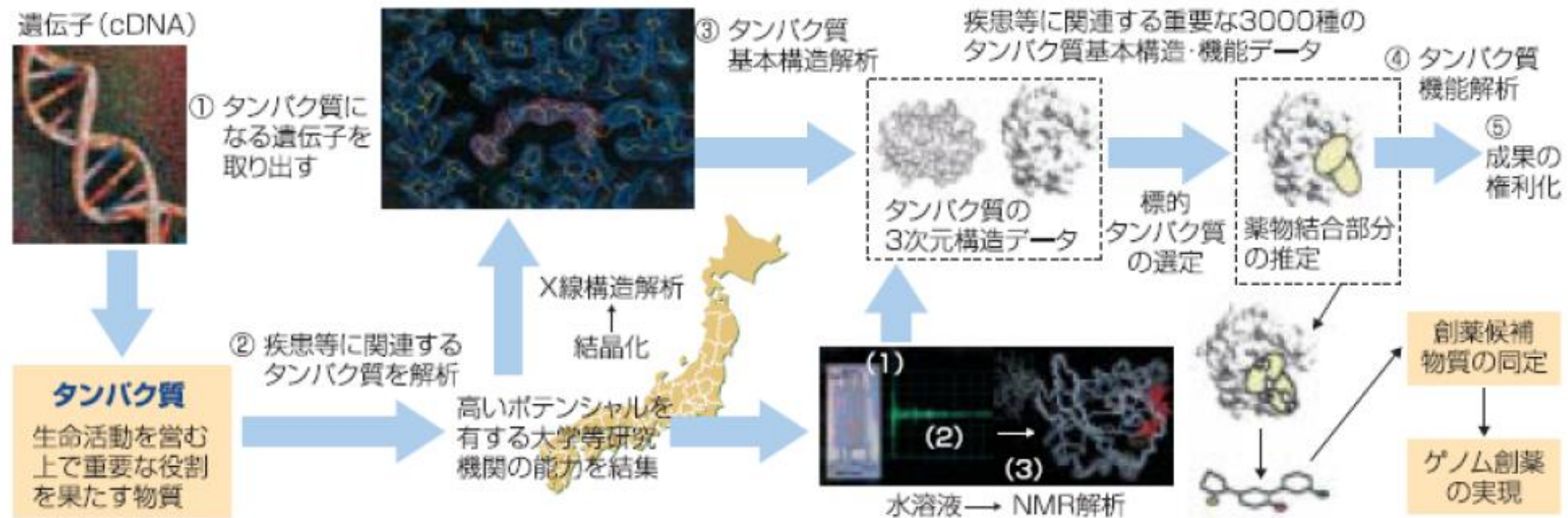
フレキシブルな「しっぽ」: 黄色の点線

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

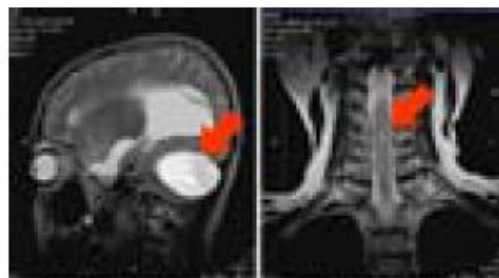
わが国発のゲノム創薬の実現等を目指し、世界最先端設備（NMR、大型放射光施設等）を駆使し、産官学の研究能力を結集して平成18年度までに生命を司るのに重要なタンパク質のうち1/3に相当する約3000種類以上のタンパク質の基本構造およびその機能の解析を行う。それに基づく薬剤設計や解析結果の特許化等を図ることにより、わが国発のバイオテクノロジーを駆使するゲノム創薬の実現に貢献し、ひいては医薬品生産額の増加や国際協力の強化等によりわが国の経済発展に資する。



磁気共鳴の活躍の場：医療



MRIの装置と画像診断の例
(日立メディコ社).



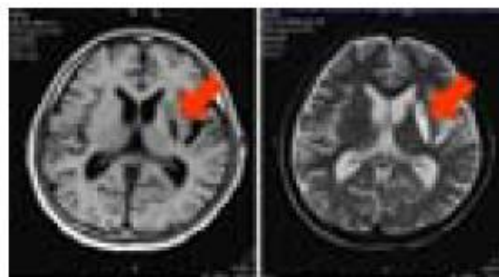
血管芽細胞腫

脊髄狭窄症例



腰椎間椎板ヘルニア

半月板断裂



T1強調像

T2強調像

MRI (Magnetic Resonance Imaging)は、磁気共鳴を画像解析に応用したもので、病院等で用いられています。磁場の勾配を作ることにより、3次元空間を認識します。

課題レポート

NMRについて記載されている論文を選び、その概要を日本語でレポートせよ。