

2014年度 分子機能化学特論 第2回目 4月17日

2. 多核多次元NMRによる生体関連物質の分子構造解析

担当: 生物応用化学専攻 前田史郎

【授業の目標】

化学・生化学の分野で広く用いられているNMR法の原理と、タンパク質およびその生体関連物質との分子間相互作用を解明するのに用いられている各種NMR法を理解する。

【授業の内容（進展度合等）】

1. NMRの発展史 - どのように発展し、何を知ることができるか -
2. **NMRの原理と装置** - 量子力学的な基礎と測定装置のしくみ -
3. 2次元NMRの原理と応用 - COSY, J-分解, NOESYなど -
4. 多核2次元NMRの原理と応用 - HETCOR(CH-COSY)など -
5. インバース法の原理と応用 - HSQC, HMQC, HMBCなど -
6. 多核多次元NMRによる生体関連物質の分子構造解析
7. 固体高分解能NMRの基礎・固体NMRによる高分子化合物の物性評価

1

Q. この授業で取り扱ってほしいことがあれば書いてください。

A. 基礎を中心に。

実際に測定して、その読み方の講義

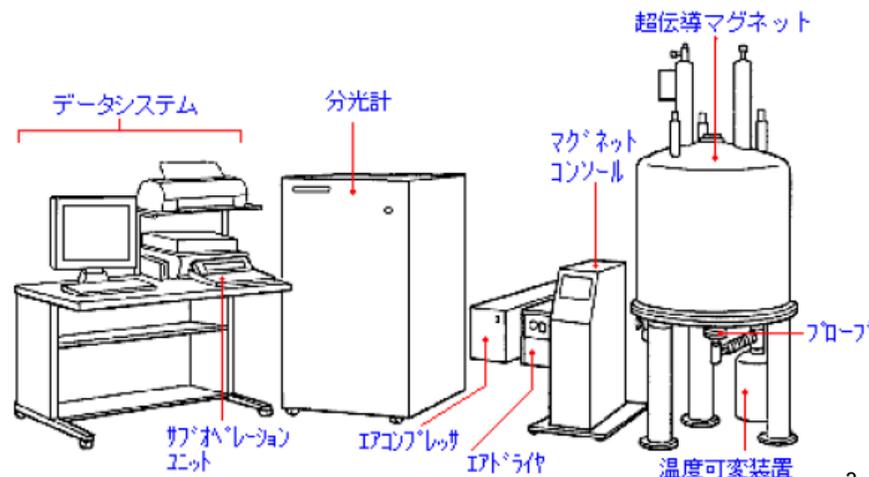
具体的な応用例

現在のNMRで分からないこと

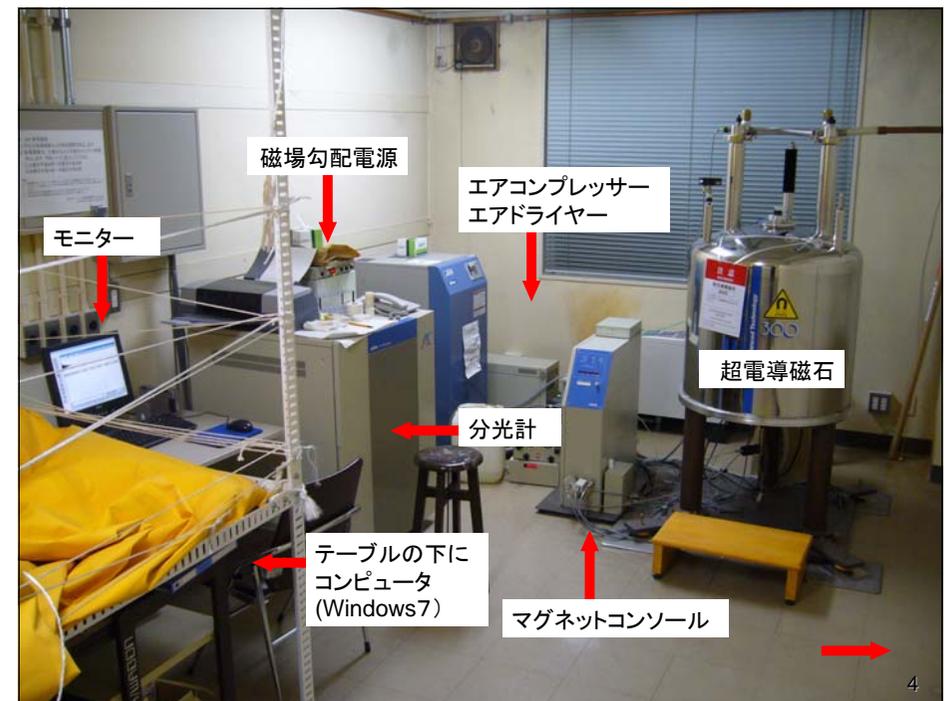
NMR分光計とは、どんなものか 日本電子 AL-300

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。



3



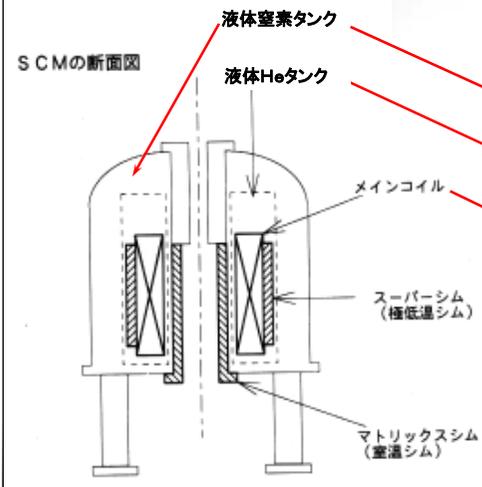
4



サンプルはSCMの上から入れる

2004 2 16

AL-300 液体N₂:69L, 液体He:76L
 運転電流: ~90A



高分解能NMR用超伝導磁石

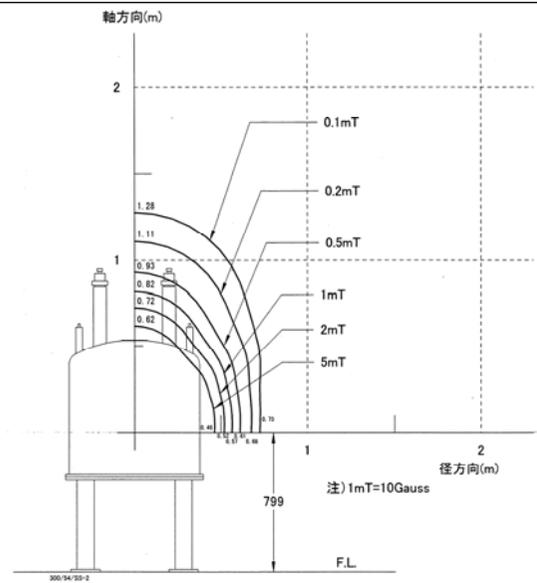
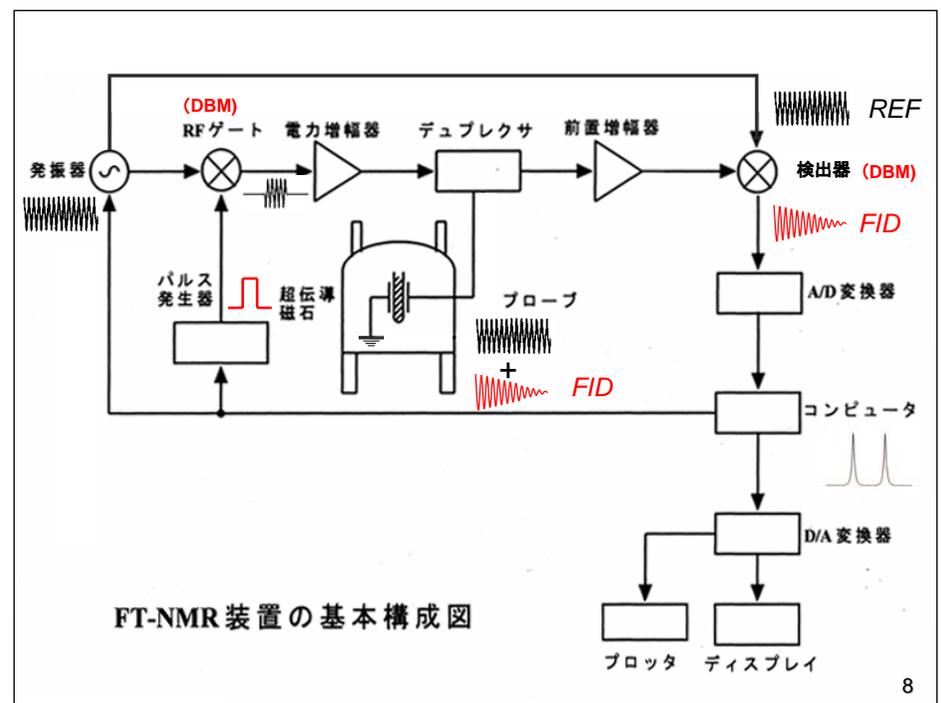


図 3-1 300/54/SS漏洩磁場

作成 2000/5/23

AL-300の超伝導磁石は自己遮蔽型(SS型)である。SS型では、漏洩磁場を打ち消す磁場を発生させて漏洩磁場を小さくすることができる。

漏洩磁場が5G(0.5mT)の位置に警告の標識を立てるのが世界標準である。しかし、SS型の場合は漏洩磁場が小さく、磁石の外側から50cm程度離れたら5G以下であり、設置室外にまで漏れることはない。



FT-NMR装置の基本構成図

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。

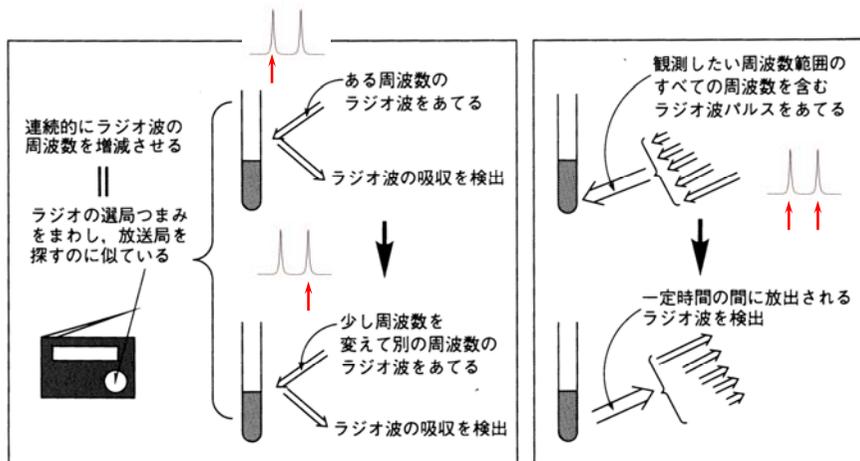
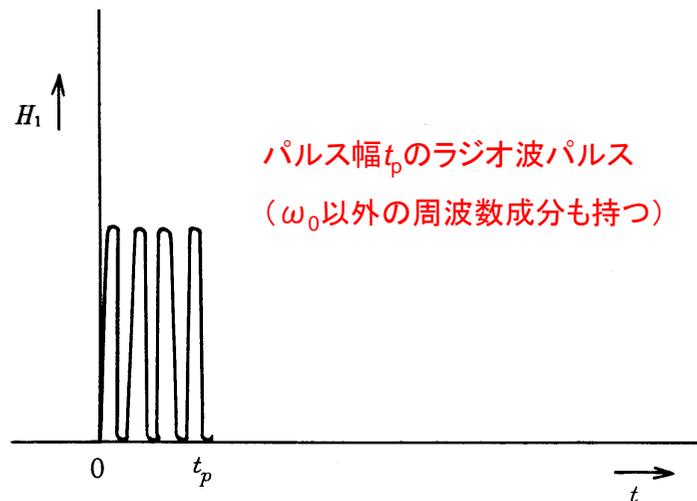


図3-1 昔のCW-NMR装置のしくみ(左)と現在のFT-NMR装置のしくみ(右)

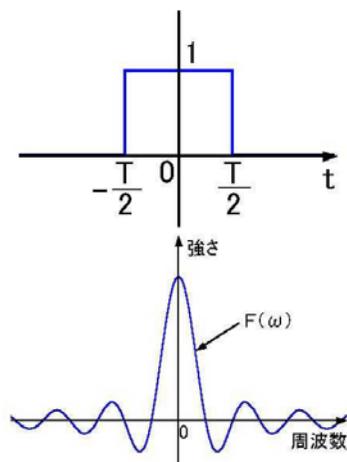
「これならわかるNMR」安藤・宗宮著、化学同人(1997) 9



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)

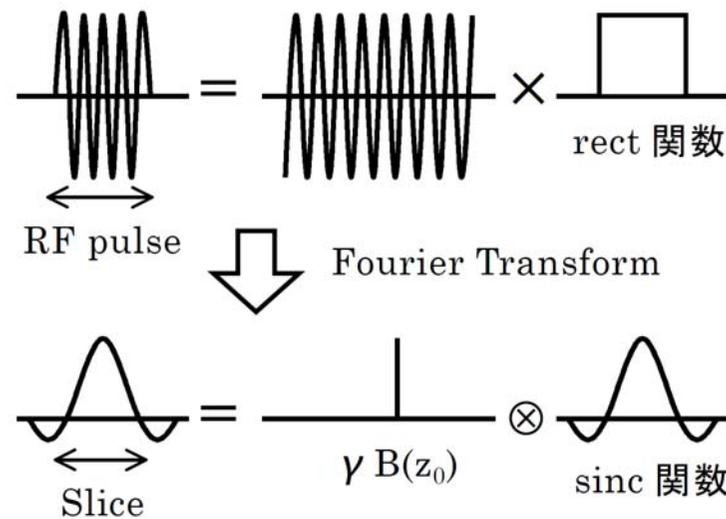
矩形波のフーリエ変換



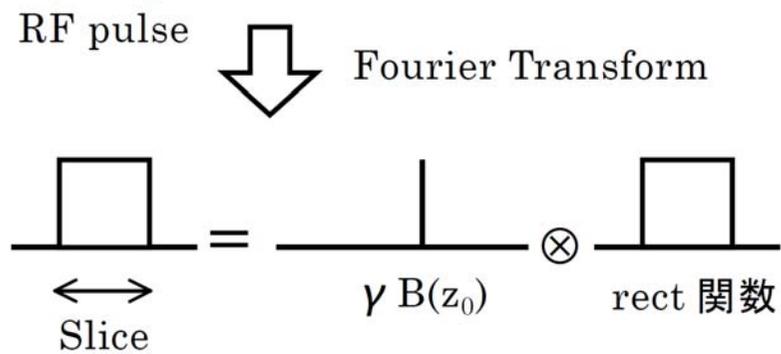
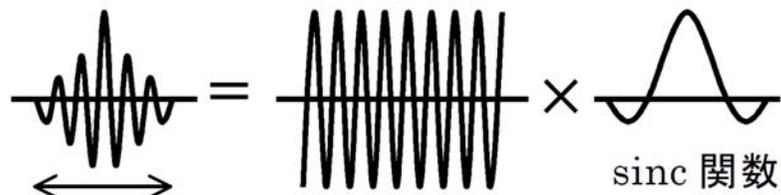
矩形波のフーリエ変換

- フーリエ変換
- →時間領域から周波数領域への演算

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



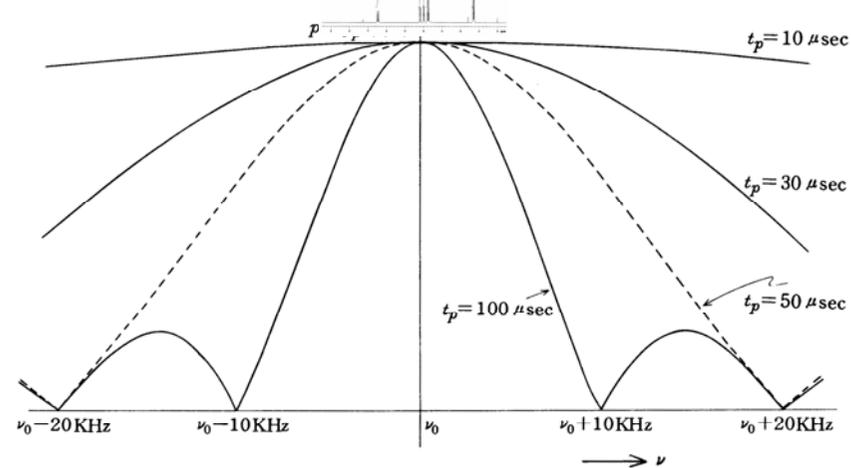
矩形波のRFパルスは、sinc関数($\text{sinc}x/x$)で表される周波数帯域を持つ。



sinc関数の形をしたパルスをDDS(direct digital synthesis)で合成すると、非常に狭い範囲しか励起しない選択的パルスを作れる。

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 でおよそ8kHzの周波数分布域がほぼフラットになる。

¹³Cでは25kHz(200ppm)程度なのでパルス幅は10μs程度以下でなければならない。

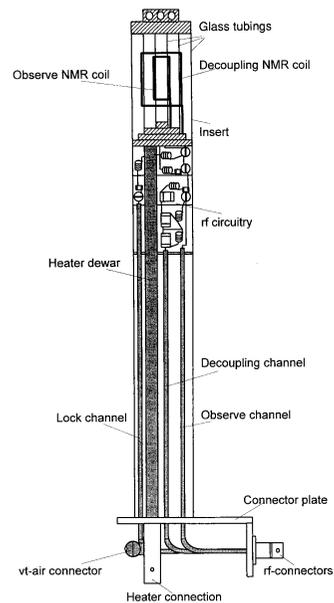


図A1.3 周波数 ν_0 をもつ rfパルスの周波数分布

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

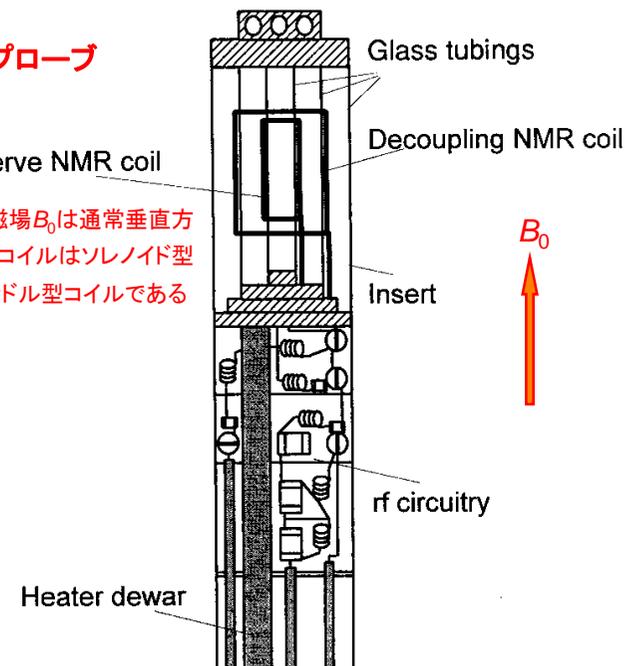


NMR プローブ(検出器)

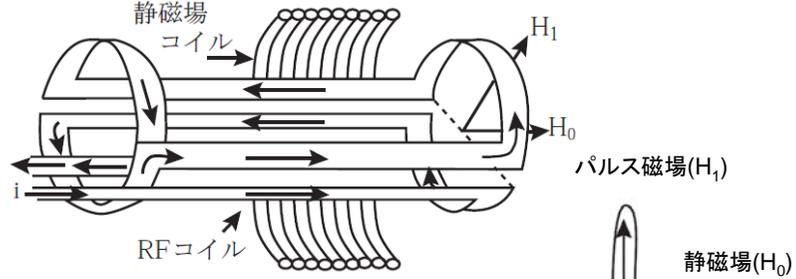


液体NMRプローブ

超伝導磁石の静磁場 B_0 は通常垂直方向であるから、RFコイルはソレノイド型コイルではなく、サドル型コイルである

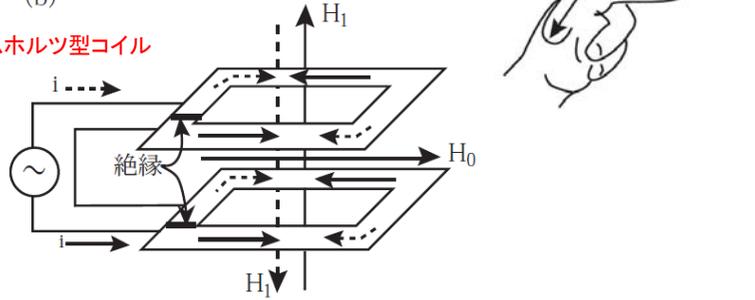


サドル型コイル

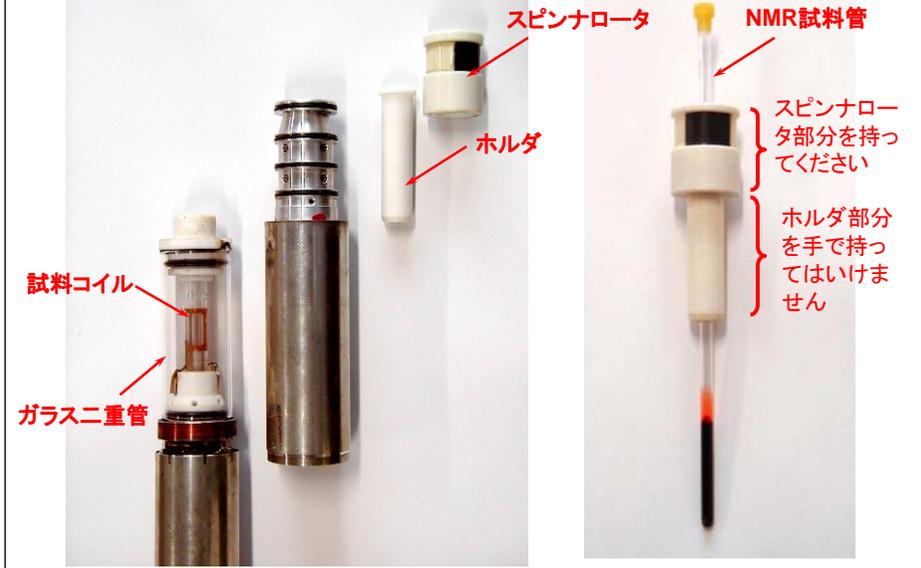


(b)

ヘルムホルツ型コイル



液体NMRプローブ(検出器)



プローブ先端部分

試料管をセットしたところ

チューナブル
(TH5)プローブ

外側は
 ^1H 用コイル

内側は
 ^{13}C 用コイル

試料管とコイルボジンの
間に隙間はほとんどない

試料管は圧縮空気
で少し浮いて回転
する



プローブ(検出器)全体



納入時は滑らかだった上部に深いミゾ
が刻まれています。少しゴミが固まって
付着しています。



ゴミが固まって付着しています

回転不良の原因はプローブヘッドに付着した手垢とゴミ

¹Hルーチン測定に用いられるパルスシーケンス

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。

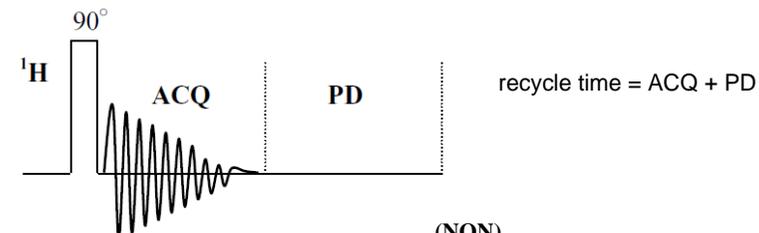
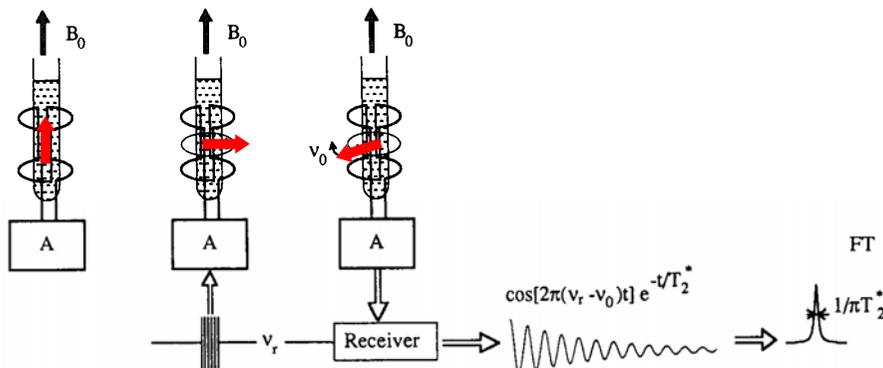


Fig.2-1 Pulse sequence of ¹H NMR. (NON)



(1) 試料を磁石の中に入れて磁化させる。

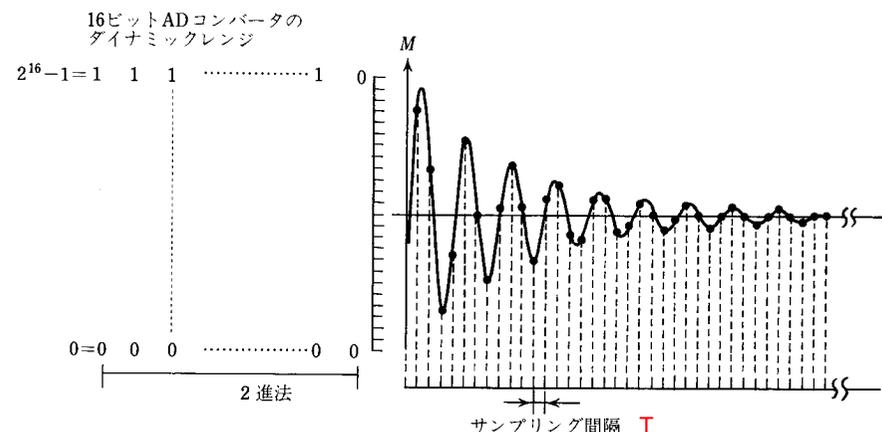
(2) 試料の磁化と直角に 90° パルスを加えて、磁化を横向き (x,y 面内) にする。

(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 T₂ 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。

デジタルサンプリングとスペクトル幅



サンプリングレート T

図 1・11 FID のデジタル化

$$f_{\max} = 1/2T$$

SPD の場合 スペクトル幅 = 1/2T (0 ~ f_{max})

QPD の場合 スペクトル幅 = 1/T (-f_{max} ~ 0 ~ f_{max})

デジタルサンプリングとスペクトル幅

$f - \delta$ と $f + \delta$ を
区別できない

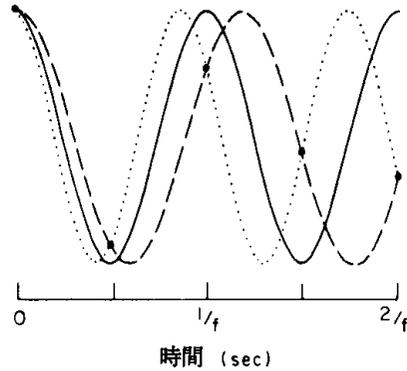
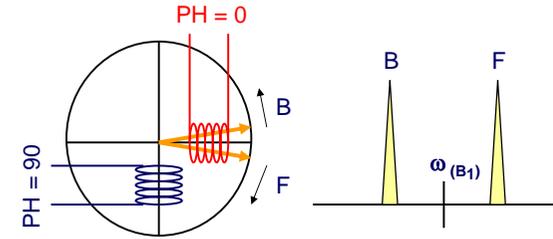
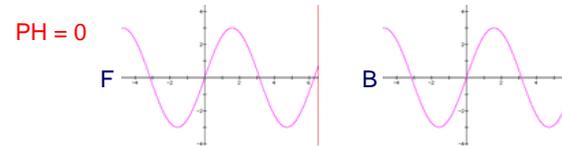


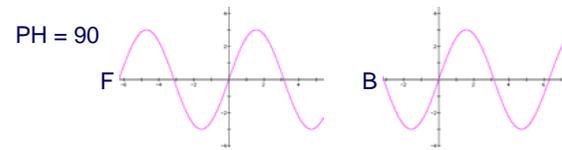
図 5-2 サンプリング速度の半分より大きな周波数の折り返しの説明。(—) 周波数 f ヘルツの正弦波; (---) 周波数 $(f - \delta)$ の正弦波; (····) 周波数 $(f + \delta)$ の正弦波. サンプリング速度を図に示すように $2f$ ポイント/秒とすると, $(f + \delta)$ について得られる値と $(f - \delta)$ について得られる値とは同一である.



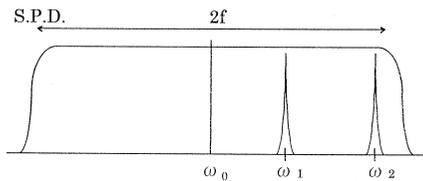
ラジオ波照射中心が2本のピークFとBの真ん中にある場合、FとBは逆方向に回転する。



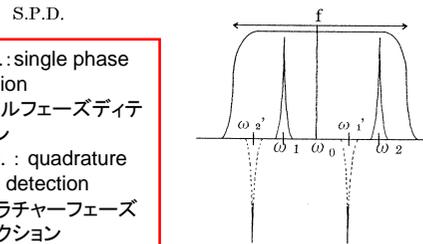
上から見るだけではBとFを区別できない(SPDの場合と同じ)



横から見るとBとFの回転方向が逆であることが分かるので、BとFを区別できる。

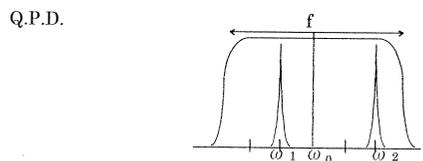


SPDでは、折り返しを避けるためにスペクトル幅を広く取る必要があり、S/Nが良くない。

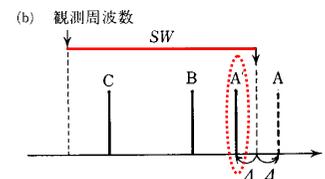
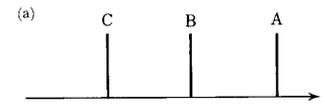


単にスペクトル幅を狭くするだけではピークの折り返し(aliasing)が生じるのでQPDという技術を用いて折り返しを相殺して消去する。

S.P.D.: single phase detection
シングルフェーズディテクション
Q.P.D.: quadrature phase detection
クワドラチャーフーズディテクション

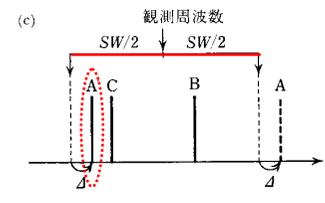


QPDでは、スペクトル幅を1/2に狭く取ることができるので、S/Nが $\sqrt{2}$ だけ向上する。



SPDでは、スペクトル幅(SW)よりも外側にあるAのピークだけ折り返しが生じている。

折り返しピークは中心周波数を動かしたときに、正しいピークとは逆の方向に動くので簡単に判別できる。



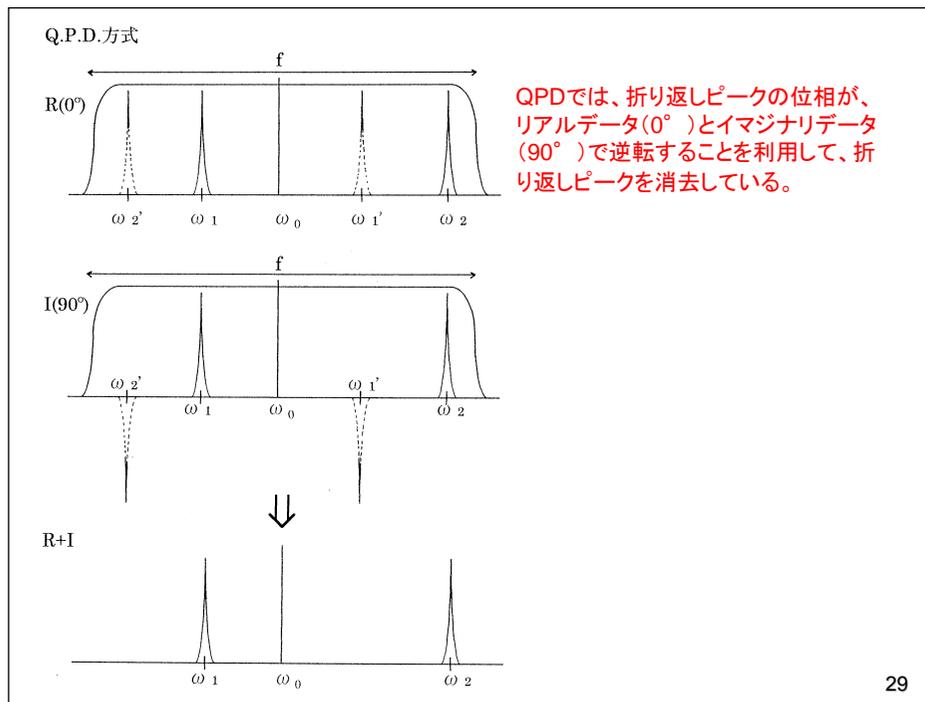
QPDでも、スペクトル幅(SW)の1/2 (SW/2)よりも外側にあるAのピークだけ折り返しが生じている。しかし、SPDの場合とは現れる位置が異なる。

スペクトル幅を狭く取れるのでS/Nが向上する。

折り返しピークは中心周波数を動かしたときに、正しいピークとは逆の方向に動くので簡単に判別できる。

AはピークAの折り返しピーク

図 1-13 SPD法とQPD法における折返しピーク
(a) 正しいスペクトル
(b) SPD法 (c) QPD法

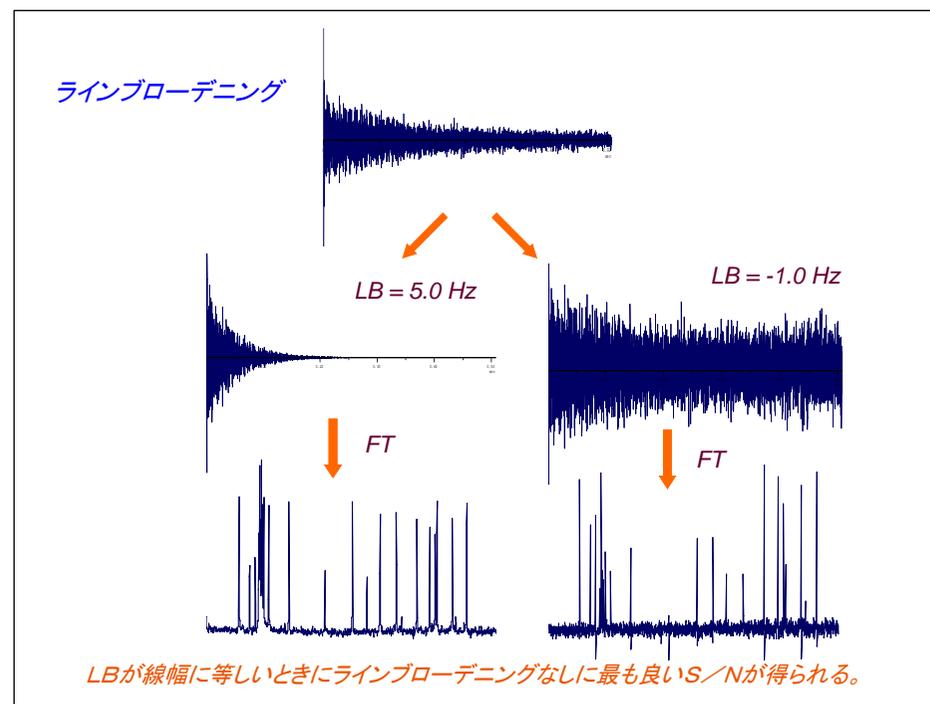
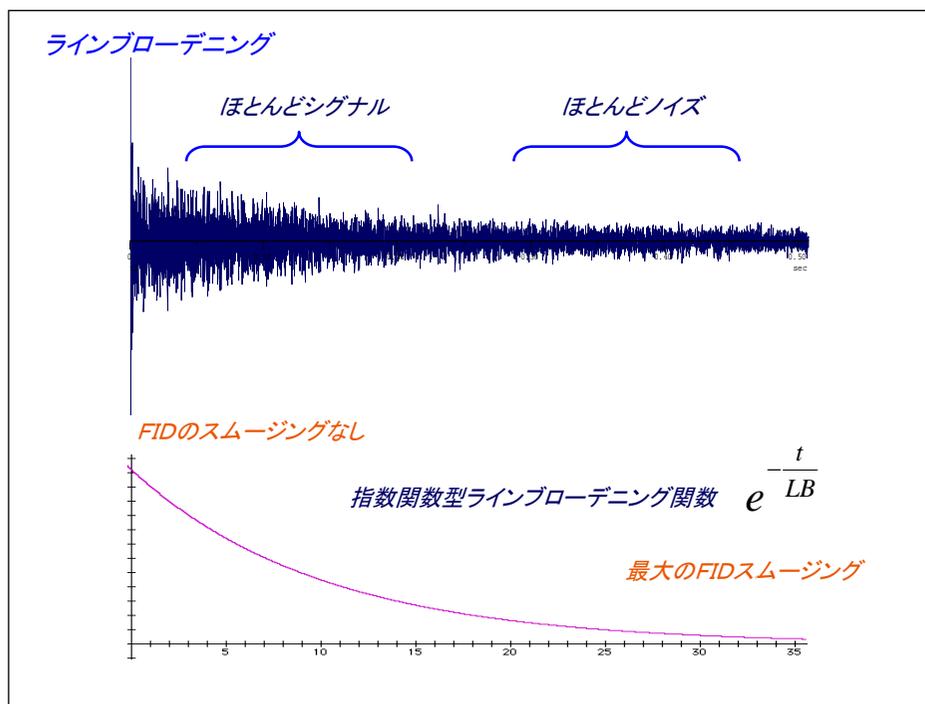


【信号の検出方法】

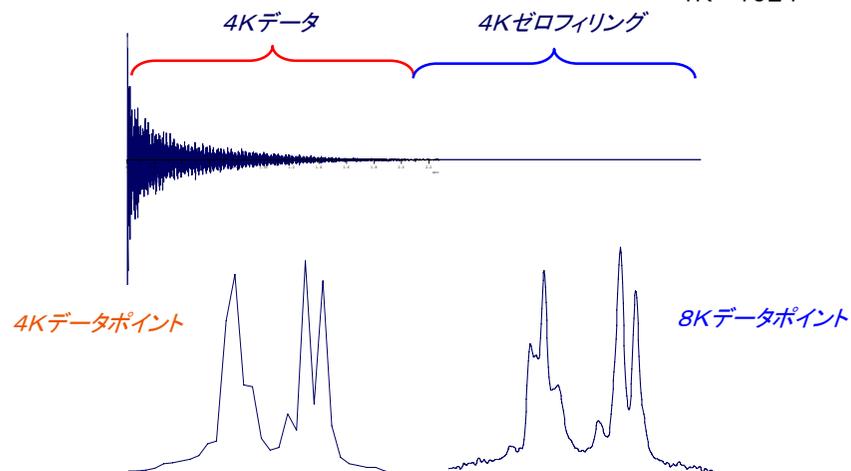
基準周波数 ω_0 をスペクトルの中心に置くために用いられる方法とその利点

	1次元 NMR	2次元 NMR
検出方法	Q.P.D.方式を用いる。	位相回しを行う。 FG法を用いる。
利点	①帯域幅が半分になる。 → S/Nは $\sqrt{2}$ 倍向上する。 → 積算回数が半分で済む。 ②デジタル分解能は2倍向上する。	

30

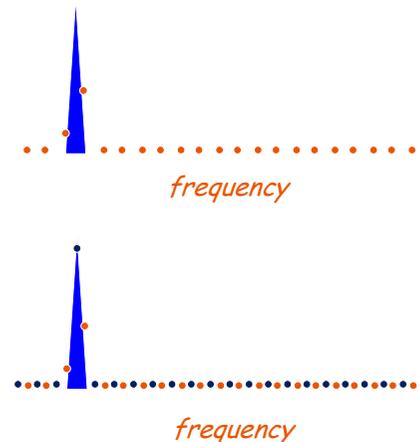


ゼロフィリング



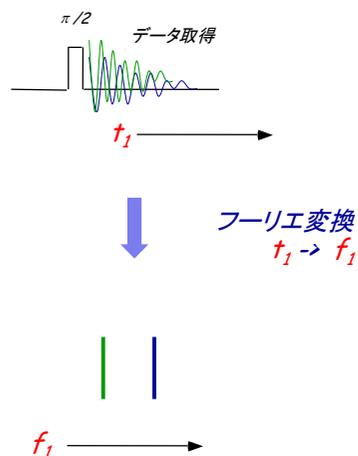
データポイント数が少ないと、FIDがゼロに減衰するまでデータサンプリングしても、ピークトップを明確にすることはできない。ゼロフィリングをしてデータポイント数を増やすと正しいピーク線形を得ることができる。

ゼロフィリング



ゼロフィリングすることによって増えたデータポイントは、真のデータポイントの間に現れて、デジタル分解能を向上させる。

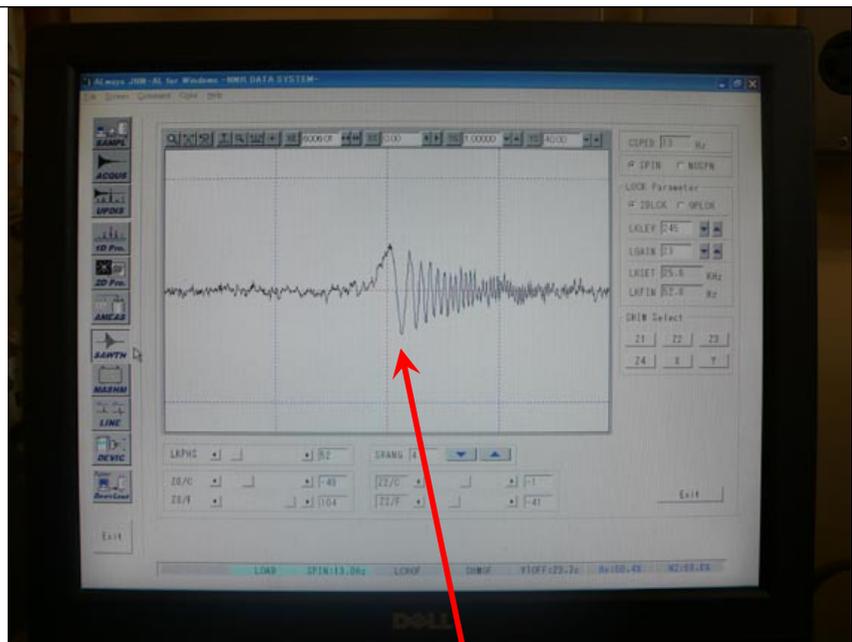
一般的な1次元NMR



フーリエ変換することによって、時間領域で重なっている多重周波数信号を分解することができる。

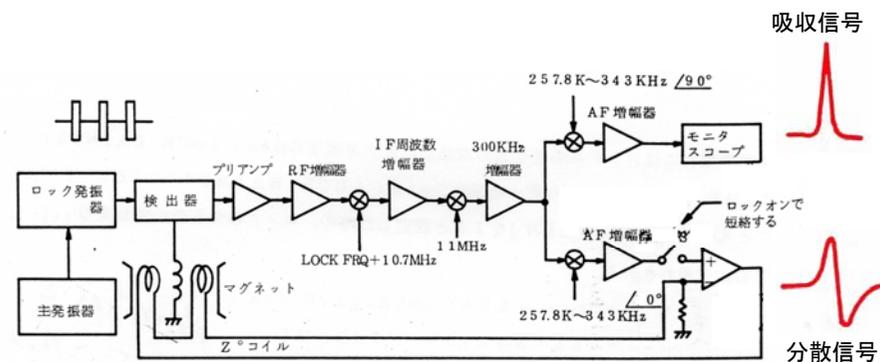
Q. 溶液NMR用の試料には、なぜ重水素化溶媒を用いるのか？

A. (1)溶液NMRの測定には 10^{-9} (0.001ppm)以上の安定度が必要であり、溶媒の重水素NMR信号を利用したNMRロックを掛けるため、NMR装置において時間的な変動の要因となる磁場および周波数シンセサイザの両方を独立に 10^{-9} 以上の安定度に保つことは容易でない。NMR室内に人が入ることによる室温の変動や超伝導磁石の近くを人が動くだけで磁場が乱れてしまう。ラジオ波周波数または磁場のどちらかが変動しても、両者の相対的な関係で表される共鳴条件 $\omega=\gamma H$ 、を高精度で制御するように工夫されたのがNMRロック機構である。また、(2)試料だけでなく、溶媒にも ^1H が含まれる。大きな溶媒の信号をなくすため。



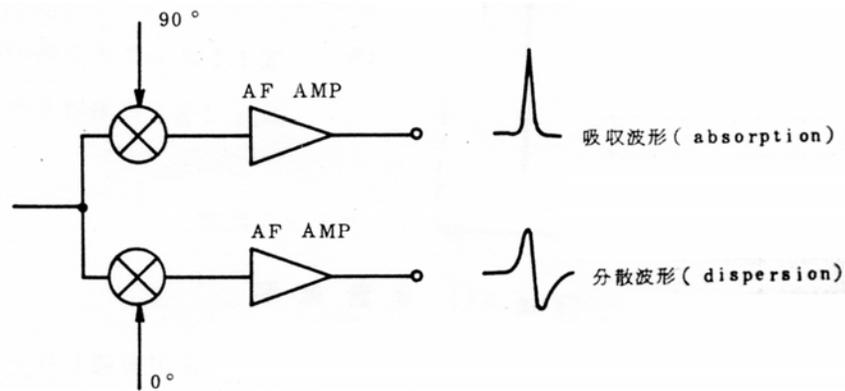
SAWTOOTHパターン

重水素化溶媒の²DのNMRシグナル



(Fig. 35) ロック系のブロック図

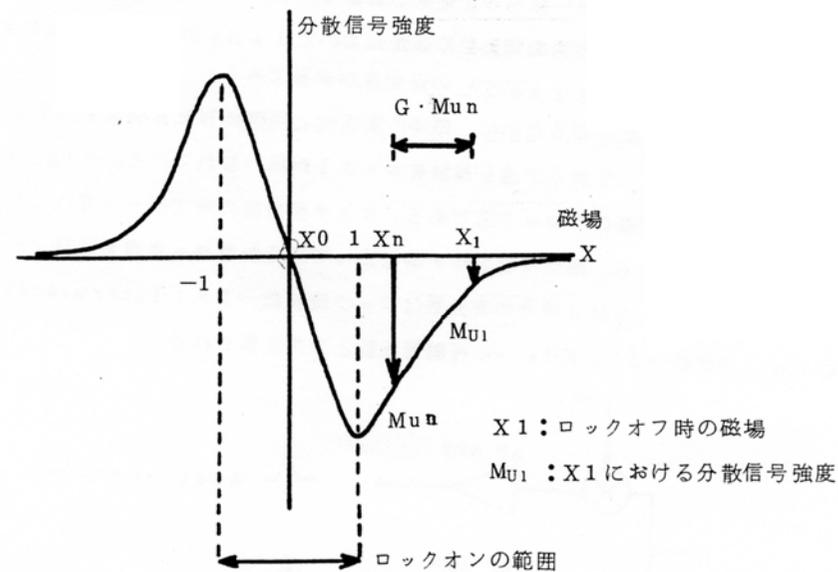
日本電子(株)技術資料より



(Fig. 36) ロック用受信器のAF段

AF: audio frequency 可聴周波数, ヒトが聞くことができる20~20kHzの周波数信号

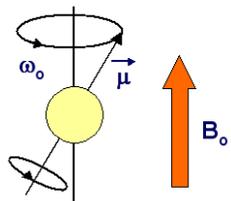
日本電子(株)技術資料より



(Fig. 37) 分散波形

日本電子(株)技術資料より

スピンの運動方程式 (Bloch方程式)



静磁場 B_0 中におかれた磁気モーメント μ の核は、 B_0 と相互作用する。この相互作用による運動は角運動量 J の時間変化と考えると、

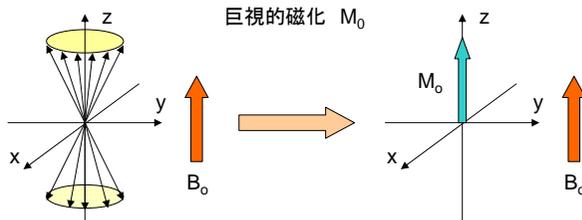
$$\frac{d\vec{J}}{dt} = \vec{\mu} \times \vec{B}_0 \quad \text{と表される。}$$

角運動量の時間変化はトルクに等しい。トルクとは、回転運動における回転軸まわりのモーメントであり、回転力を表す。

$\vec{\mu} = \gamma \vec{J}$ だから、

$$\frac{d\vec{\mu}}{dt} = \gamma \vec{\mu} \times \vec{B}_0$$

ここで $\sum \vec{\mu}$ を考えてみる。

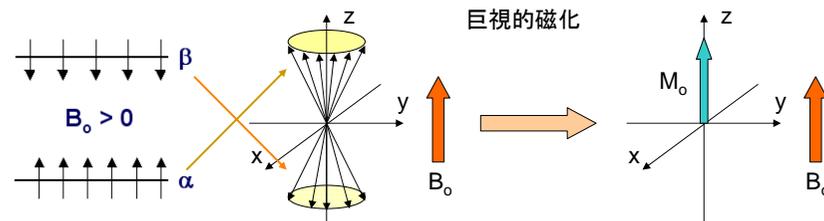


巨視的磁化 (スピンの集合) の運動方程式 (Bloch方程式)

$\sum \vec{\mu} = \mathbf{M}_0$ であるから、 $\frac{d\vec{\mu}}{dt} = \gamma \vec{\mu} \times \vec{B}_0$ を M_0 で表すと、

$$\frac{d\mathbf{M}_0}{dt} = \gamma \mathbf{M}_0 \times \mathbf{B}_0 \quad \text{ここで、太字はベクトルを表す。}$$

スピン分布と巨視的磁化との対応 (共鳴現象の視覚化)



Bloch 方程式

$$\frac{d\mathbf{M}_0}{dt} = \gamma \mathbf{M}_0 \times \mathbf{B}_0$$



Felix Bloch
Stanford University
Stanford, CA, USA
1905 - 1983

この方程式は何を意味しているのか？

$B=(0,0,B_0)$ というように磁場 B を適当に選ぶことにより、この方程式は核磁化が周波数 $\omega_0 = \gamma B_0$ で永久に歳差運動し続けることを示している。この式の中には磁化を熱平衡状態へ緩和させる項は含まれていない。

しかしながら、現実にはNMR実験は緩和する。

Bloch 方程式

そこで、Felix Bloch は基礎方程式に次のような修正を加えた。

$$\frac{d\mathbf{M}(t)}{dt} = \mathbf{M}(t) \times \gamma \mathbf{B}(t) - \mathbf{R}(\mathbf{M}(t) - M_0)$$

熱平衡状態の磁化、 M_0 と異なる磁化に対して“緩和行列” \mathbf{R} が作用するように経験的な修正を加えた。

Bloch方程式は現象論的な方程式であり、理論的に導かれたものではない。

Bloch 方程式

そこで, Felix Bloch は基礎方程式に次のような修正を加えた.

$$\frac{d\mathbf{M}(t)}{dt} = \mathbf{M}(t) \times \gamma \mathbf{B}(t) - \mathbf{R}(\mathbf{M}(t) - M_0)$$

熱平衡状態の磁化, M_0 と異なる磁化に対して“緩和行列” \mathbf{R} が作用するように経験的な修正を加えた.

Bloch方程式は現象論的な方程式であり, 理論的に導かれたものではない.

Bloch 方程式

$$\frac{d\mathbf{M}(t)}{dt} = \mathbf{M}(t) \times \gamma \mathbf{B}(t) - \mathbf{R}(\mathbf{M}(t) - M_0)$$

この方程式は, 容易に行列の成分に分けることができる.

$$\frac{dM_z(t)}{dt} = \gamma[M_x(t)B_y(t) - M_y(t)B_x(t)] - \frac{M_z(t) - M_0}{T_1}$$

z-軸方向の成分

$$\frac{dM_x(t)}{dt} = \gamma[M_y(t)B_z(t) - M_z(t)B_y(t)] - \frac{M_x(t)}{T_2}$$

x-軸方向の成分

$$\frac{dM_y(t)}{dt} = \gamma[M_z(t)B_x(t) - M_x(t)B_z(t)] - \frac{M_y(t)}{T_2}$$

y-軸方向の成分

2つの緩和時間 T_1 と T_2 は, それぞれ縦緩和時間, 横緩和時間と呼ばれている.

○原子核スピンの運動

核スピン I を持つ原子核は角運動量 L と核磁気モーメント μ を持つ.

$$\mu = \gamma L$$

γ : 磁気回転比

$$L = \hbar I$$

$\hbar = \frac{h}{2\pi}$, h : プランク定数

したがって,

$$\mu = \gamma \hbar I$$

核スピンは量子化されており, 固有関数を $|Im\rangle$ とすると,

$$I^2 |Im\rangle = I(I+1) |Im\rangle,$$

$$I_z |Im\rangle = m |Im\rangle$$

ここで, $m = -I, -I+1, \dots, I-1, I$

m は $2I+1$ 個の値をとる. I_z は I の z 成分であり, 通常静磁場 H_0 の方向を z 軸に取る.

角運動量 L は次のように定義される. $L = r \times p$

両辺を t で微分すると

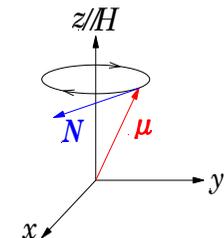
$$\begin{aligned} \frac{dL}{dt} &= \frac{dr}{dt} \times p + r \times \frac{dp}{dt} \\ &= v \times mv + r \times \frac{d(mv)}{dt} \end{aligned}$$

$$= 0 + r \times m \frac{dv}{dt}$$

$$= r \times ma$$

$$= r \times F$$

$$\therefore \frac{dL}{dt} = N$$



角運動量 L の時間変化はトルク ($N = r \times F$) に等しい.

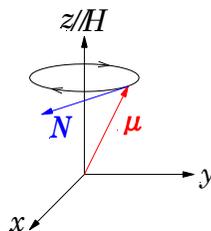
静磁場 H_0 の中に置かれた磁気モーメント μ にはトルク N が働く。

$$N = \mu \times H_0$$

$$\frac{dL}{dt} = \mu \times H_0$$

ところで、 $\mu = \gamma L$ であるから、

$$\frac{d\mu}{dt} = \mu \times \gamma H_0$$



j 個の核からなる系の巨視的磁化 M は、個々の核磁気モーメント μ_j の和で表わされる。

$$M = \sum_j \mu_j$$

[参考] ニュートンの運動方程式

$$\frac{dM}{dt} = M \times \gamma H_0$$

$$F = ma = m \times \frac{dv}{dt} = \frac{d(mv)}{dt} = \frac{dp}{dt}$$

○基準回転系(回転座標系)

パルス NMR を記述するときに、磁化 M の運動を実験室に固定した座標系 (fix) を基準にするよりも、磁気モーメント μ の歳差運動と同じ方向に H_0 のまわりを回転する座標系 (rot) を基準にすると便利である。

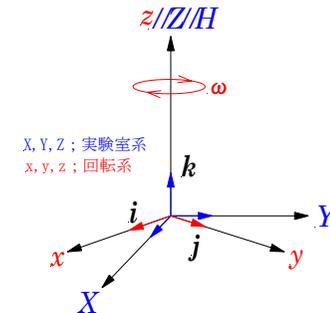
$$\left(\frac{dM}{dt} \right)_{\text{fix}} = \gamma M \times H_0$$

磁化ベクトル $M = Mx i + My j + Mz k$ の微分は次式で表される。

$$\frac{dM}{dt} = \left(\frac{\partial Mx}{\partial t} i + \frac{\partial My}{\partial t} j + \frac{\partial Mz}{\partial t} k \right) + \left(Mx \frac{\partial i}{\partial t} + My \frac{\partial j}{\partial t} + Mz \frac{\partial k}{\partial t} \right)$$

ここで、単位ベクトル i, j, k の回転は、角速度ベクトル ω を用いると次のようになる。

$$\frac{\partial i}{\partial t} = \omega \times i, \quad \frac{\partial j}{\partial t} = \omega \times j, \quad \frac{\partial k}{\partial t} = \omega \times k$$



したがって、

$$\left(\frac{dM}{dt} \right)_{\text{fix}} = \left(\frac{\partial M}{\partial t} \right)_{\text{rot}} + \omega \times (Mx i + My j + Mz k) = \left(\frac{\partial M}{\partial t} \right)_{\text{rot}} + \omega \times M$$

上の式と比べて書き換えると、

$$\gamma M \times H_0 = \left(\frac{\partial M}{\partial t} \right)_{\text{rot}} + \omega \times M$$

$$\left(\frac{\partial M}{\partial t} \right)_{\text{rot}} = \gamma M \times H_0 - \omega \times M = \gamma M \times \left(H_0 + \frac{\omega}{\gamma} \right)$$

ここで、 $\frac{\omega}{\gamma}$ は、座標回転の効果から生じる**仮想的な磁場**である。

有効磁場 $H_{\text{eff}} = H_0 + \frac{\omega}{\gamma}$ を用いると、

$$\left(\frac{\partial M}{\partial t} \right)_{\text{rot}} = \gamma M \times H_{\text{eff}}$$

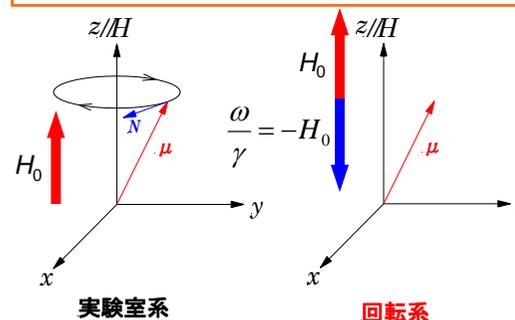
共鳴条件 $\omega_0 = -\gamma H_0$ では、

$$H_{\text{eff}} = H_0 + \frac{\omega_0}{\gamma} = 0$$

すなわち、**角速度 ω_0 で回転する回転系では、静磁場 H_0 は存在しない。**

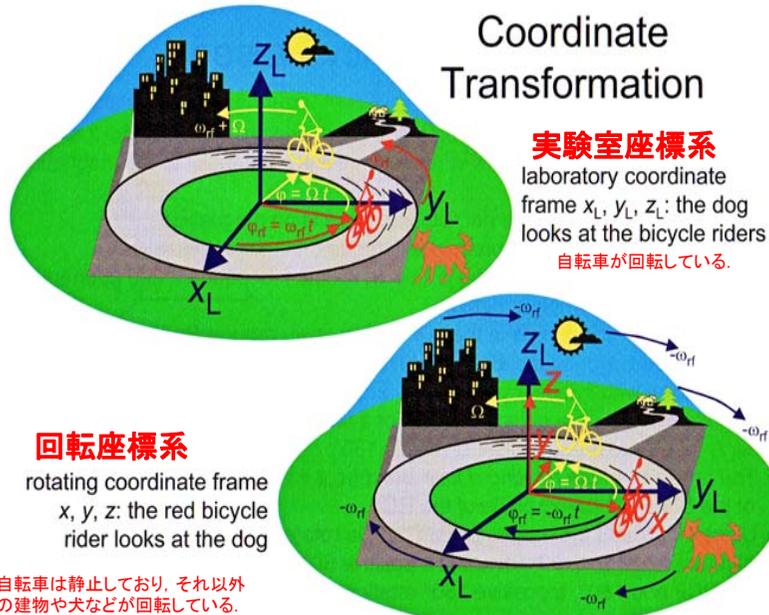
したがって、**回転系では磁気モーメント μ は静止している。**

パルスNMRにおいて、ラジオ波パルスによる磁化(磁気モーメント)の運動は回転座標系で記述される。



回転座標系では、外部静磁場は存在しないので、パルスによる磁化の運動を簡単に表わすことができる。例えば、 $90^\circ(x)$ パルスを加えると、 x 軸のまわりに 90° 回転し、磁化は z 方向から、 y 方向に向きを変える。

Coordinate Transformation



実験室座標系
laboratory coordinate frame x_L, y_L, z_L : the dog looks at the bicycle riders
自転車が回転している。

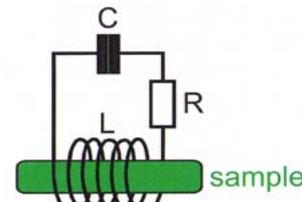
回転座標系
rotating coordinate frame x, y, z : the red bicycle rider looks at the dog

自転車が静止しており、それ以外の建物や犬などが回転している。

Bernhard Blumich, "Essential NMR: For Scientists And Engineers", Springer(2003)

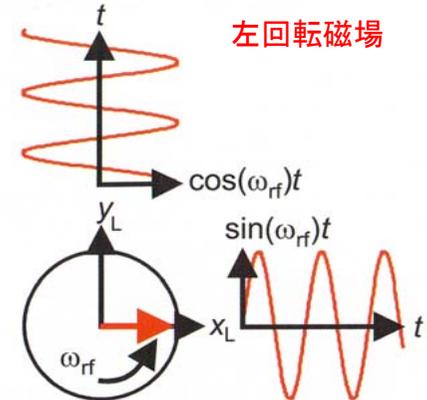
Magnetic Fields in an Oscillator Circuit

直線振動磁場



$2 B_1 \sin(\omega_{rf} t)$
magnetic field B_1 oscillating with frequency ω_{rf}

左回転磁場



$\exp\{i\omega_{rf} t\} = \cos(\omega_{rf} t) + i \sin(\omega_{rf} t)$

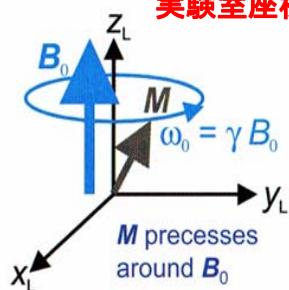
$$2 B_1 \sin(\omega_{rf} t) = -i B_1 [\exp\{i\omega_{rf} t\} - \exp\{-i\omega_{rf} t\}]$$

直線振動磁場は、左回転磁場と右回転磁場の重ね合わせである。

Action of rf Pulses

laboratory coordinate frame

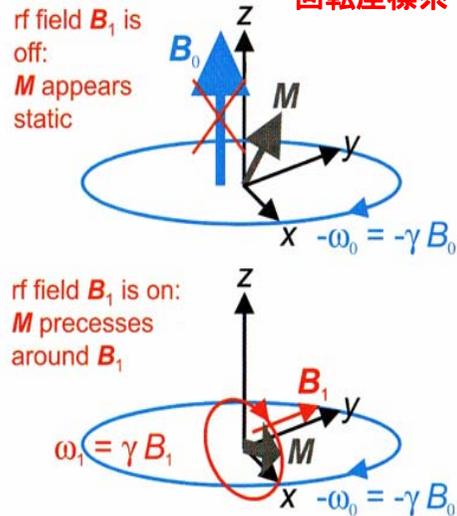
実験室座標系



90° pulse: $\omega_1 t_p = \pi/2$
180° pulse: $\omega_1 t_p = \pi$

rotating coordinate frame

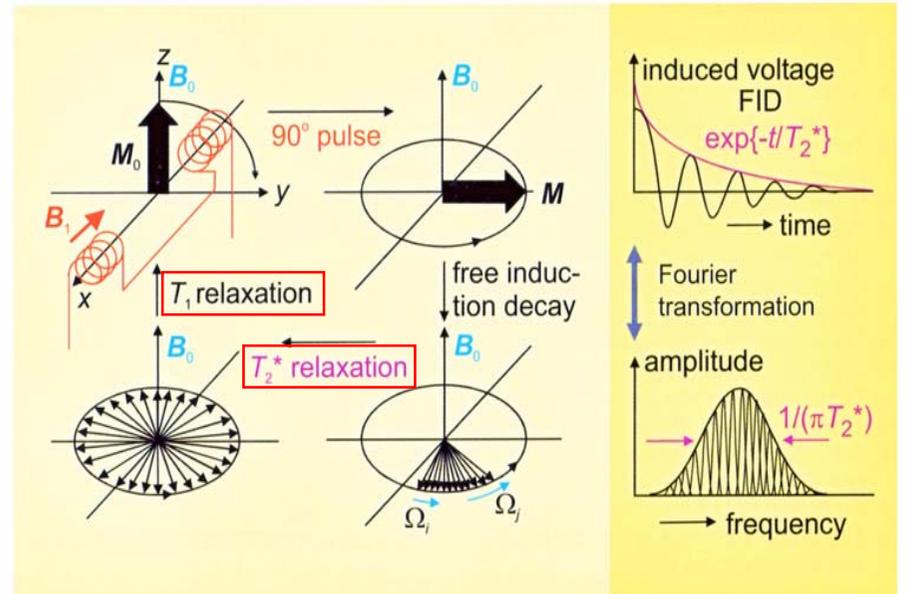
回転座標系



回転座標系では B_1 は静止している。

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！



4月17日, 学生番号, 氏名

(1) 溶液NMR測定の際に, 重クロロホルムに代表される重水素化溶媒を用いる理由を説明せよ.