

1. 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. インパ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の基礎およびその高分子化合物の物性評価への応用

NMR基礎講座 ～ 構造解析 はじめの一步 ～

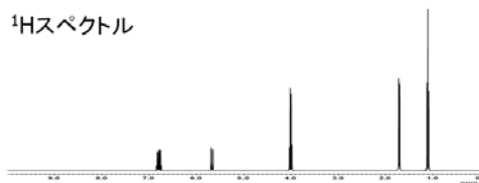


 JEOL RESONANCE

構造解析の一例

1次元スペクトルを使う

^1H スペクトル



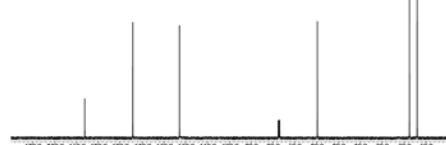
^1H 情報

化学シフト

積分値

信号の分裂

^{13}C スペクトル



^{13}C 情報

化学シフト

☆ 信号の数が多く、カップリングが複雑、など難しい場合も・・・

2次元スペクトルの利用



2次元スペクトルを使う

- 1) 初心者がパズルを解くように機械的に解析が行える方法
- 2) 解析対象物によらず構造解析の基本的なスキームとなる方法

ご紹介する内容

解析手法

スピン-スピン結合（スピン結合）相関を中心とした解析法

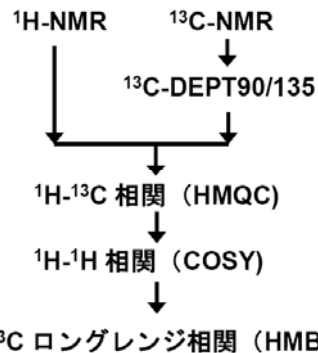
1次元スペクトルの詳細な解析はせずに
2次元スペクトルの解析が中心



スピン結合相関を中心とした構造解析



<測定法>



<解析手順>

- (1) ^{13}C のラベル付け(STEP1)
- (2) 原子団の判別 (STEP2)
まとめ(1) : 原子団及び官能基の推定
- (3) ^1H のラベル付け(STEP3)
- (4) ^1H がついた ^{13}C のつながりを見る(STEP4)
まとめ(2) : 部分構造の決定
- (5) 部分構造のつながりを見る(STEP5)
まとめ(3) : 部分構造の結合

平面構造の確定

サンプル・装置

サンプル : 分子式 $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2$ (分子量 114)

20mg 重クロロホルム溶液

5mm管サンプルチューブに調製

NMR装置 : ECX400

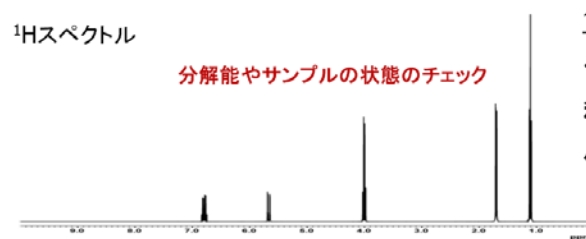
TH5ATFG2 (5mm FG付 チューナブルプローブ)

$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ 測定へ

$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_2$ の $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -NMR

^1H スペクトル

分解能やサンプルの状態のチェック



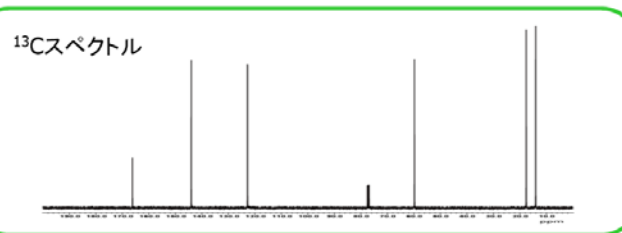
^1H 情報

化学シフト

積分値

信号の分裂

^{13}C スペクトル



STEP1 ^{13}C のラベル付け

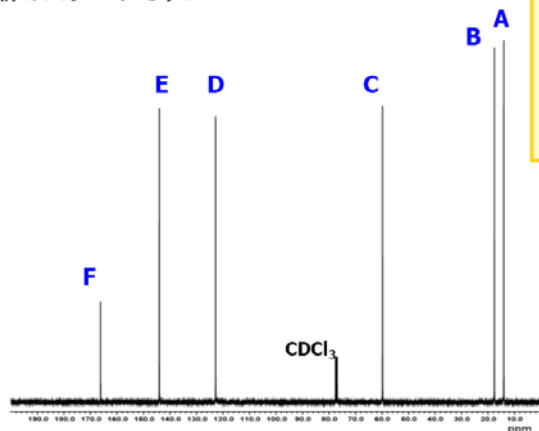
解析のスタートです!

STEP1

- ① 高磁場側からA~Fとラベルします。
- ② 化学シフトを読み取ります。

^{13}C スペクトルの情報

ラベル	化学シフト
A	14.1 ppm
B	17.6 ppm
C	59.8 ppm
D	122.8 ppm
E	144.0 ppm
F	166.2 ppm

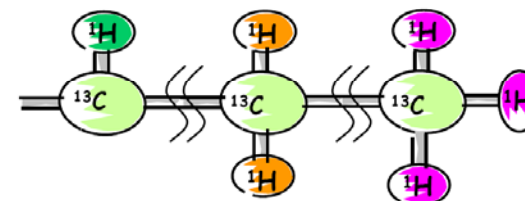


^{13}C -DEPT測定へ

^{13}C -DEPT測定

DEPT: *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*

直接結合した水素の数わかります。(原子団の判別)



測定パラメータに応じて3種類(DEPT135, DEPT90, DEPT45)の測定法があります。

信号の現れる向きで炭素の種類(原子団)を判別します。

4級炭素は観測されません。

DEPTの信号出現パターン

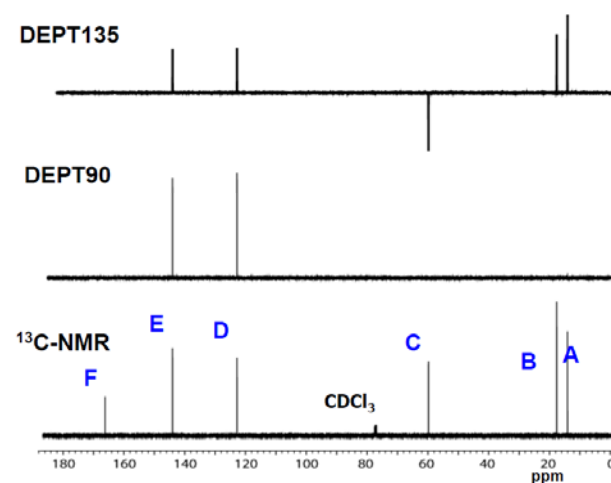
測定法	炭素の種類(原子団)			
	$>\text{C}<$	$-\text{CH}<$	$-\text{CH}_2-$	$-\text{CH}_3$
DEPT45°	—	⊥	⊥	⊥
DEPT90°	—	⊥	—	—
DEPT135°	—	⊥	⊥	⊥

STEP2 原子団の判別

DEPT135

DEPT90

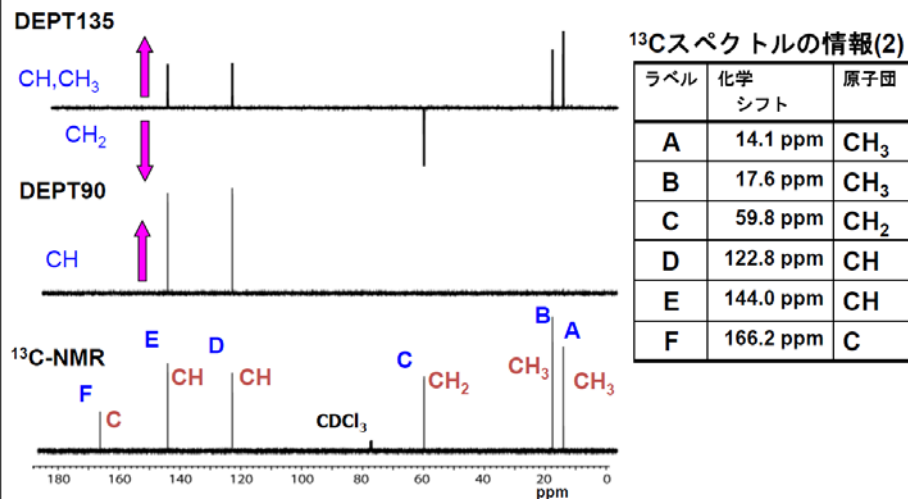
^{13}C -NMR



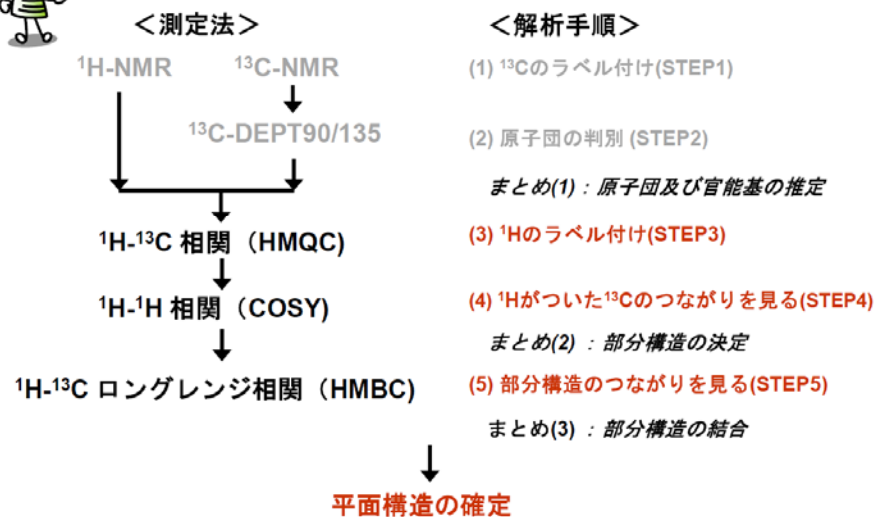
STEP2

信号出現パターンと照らし合わせて原子団の判別を ^{13}C スペクトルに記入します。

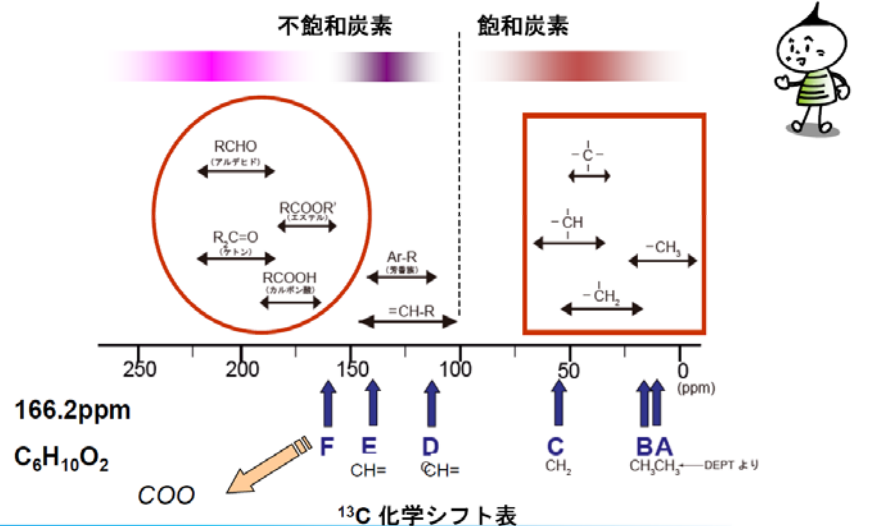
STEP2 原子団の判別



スピン結合相関を中心とした構造解析



まとめ(1):原子団及び官能基の推定



まとめ(1):原子団及び官能基の推定

¹³Cスペクトルの情報(3)

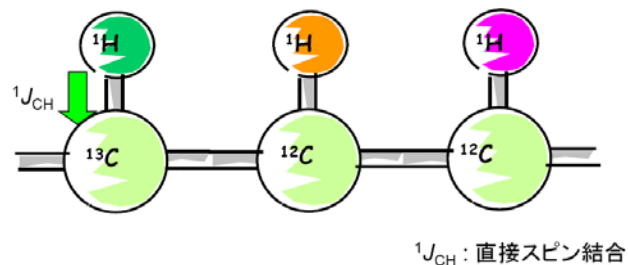
ラベル	化学シフト	原子団
A	14.1 ppm	CH ₃
B	17.6 ppm	CH ₃
C	59.8 ppm	CH ₂
D	122.8 ppm	CH=
E	144.0 ppm	CH=
F	166.2 ppm	COO

HMQC測定へ

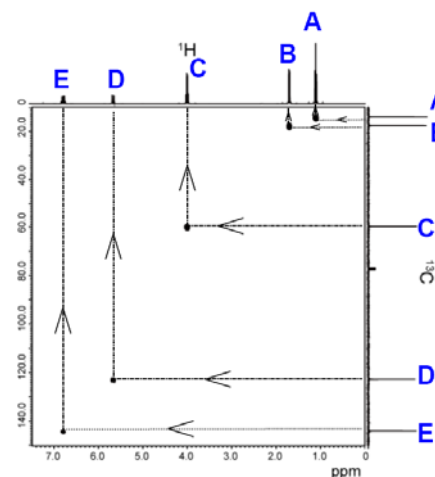
HMQC測定

HMQC: *Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*

直接結合している ^1H と ^{13}C の組み合わせがわかります。



STEP3 ^1H のラベル付け



STEP3

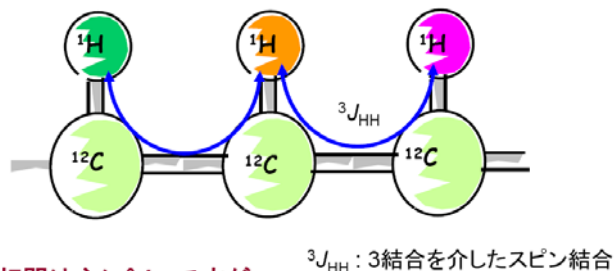
- ① Y軸のスペクトルにSTEP 1と同じラベルを付けます。
- ② ^{13}C 信号から相関信号へ線を引き直接結合している ^1H を確認します。
- ③ 対応する ^1H 信号に ^{13}C と同じラベルを付けます。

COSY測定へ

COSY測定

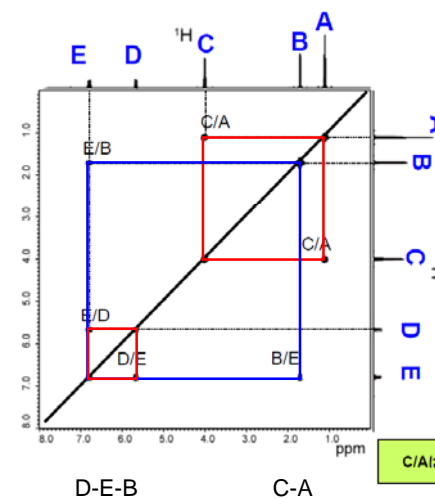
COSY: *CORrelation SpectroscopY*

スピン結合している ^1H のつながりがわかります。



観測される相関は主に $^3J_{\text{HH}}$ ですが、測定条件などによりそれ以外も観測されます。

STEP4 ^1H のついた ^{13}C のつながりを見る

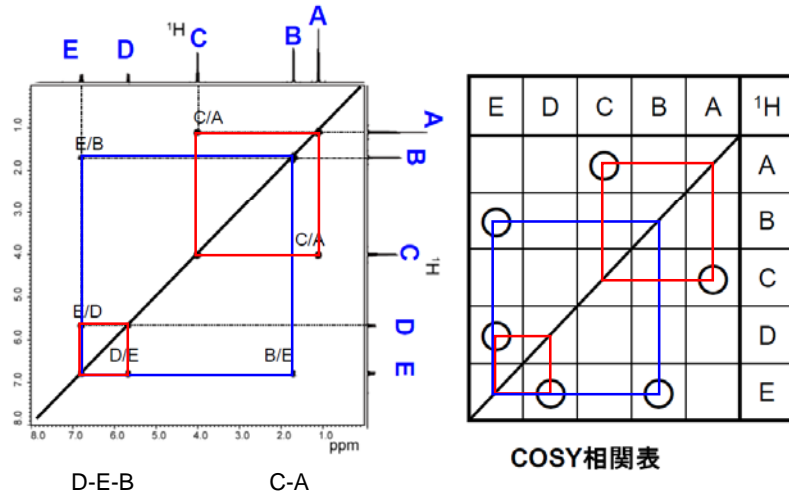


STEP4

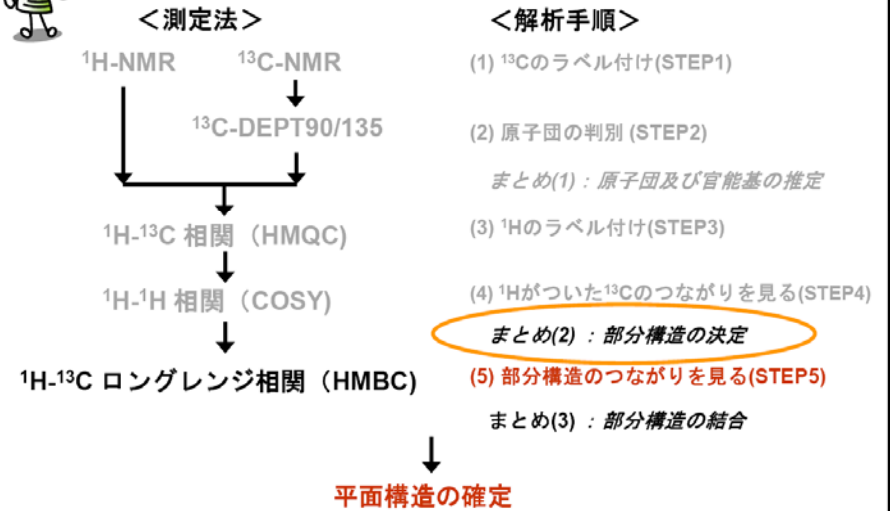
- ① X軸、Y軸のスペクトルにラベルを付けます。
- ② X軸とY軸から相関信号に線を引き、ラベルを付けます。
- ③ 相関表を作成します。

C/AはCとAの ^1H が $^3J_{\text{HH}}$ スピン結合していることを表します。

STEP4 ^1H のついた ^{13}C のつながりを見る

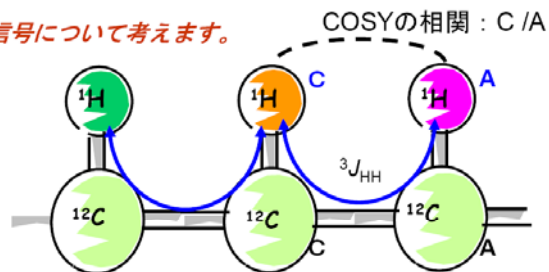


スピン結合相関を中心とした構造解析



まとめ(2): 部分構造の決定

COSYの相関信号について考えます。



相関信号C/AはCとAの炭素が隣り合っていることを示しています。

COSYで得られる $^3J_{\text{HH}}$ の相関信号は相関のある ^1H が結合している炭素同士が隣り合っていることを意味します。

($^3J_{\text{HH}}$: 3結合を介したスピン結合)

部分構造を見ていきます。

まとめ(2): 部分構造の決定

^{13}C 情報(3)

^{13}C ラベル	化学シフト	原子団
A	14.1 ppm	CH_3
B	17.6 ppm	CH_3
C	59.8 ppm	CH_2
D	122.8 ppm	CH=
E	144.0 ppm	CH=
F	166.2 ppm	COO

COSY相関表

	E	D	C	B	A	^1H
A			○			A
B	○					B
C					○	C
D	○					D
E			○	○		E

COSY相関表より

A-C、B-E-D

^{13}C 情報と組み合わせて

→ $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$ 、 $\text{CH}_3\text{-CH=CH-}$

まとめ(2):部分構造の決定

¹³C情報(3)

¹³ Cラベル	化学シフト	原子団
A	14.1 ppm	CH ₃
B	17.6 ppm	CH ₃
C	59.8 ppm	CH ₂
D	122.8 ppm	CH=
E	144.0 ppm	CH=
F	166.2 ppm	COO

部分構造1 CH₃-CH₂-

部分構造2 CH₃-CH=CH-

+

COO

この化合物には3つの部分構造があります。

まとめ(2):部分構造の決定

¹³C情報(3)

¹³ Cラベル	化学シフト	原子団
A	14.1 ppm	CH ₃
B	17.6 ppm	CH ₃
C	59.8 ppm	CH ₂
D	122.8 ppm	CH=
E	144.0 ppm	CH=
F	166.2 ppm	COO

部分構造1 CH₃-CH₂-

部分構造2 CH₃-CH=CH-

+

COO

この化合物には3つの部分構造があります。

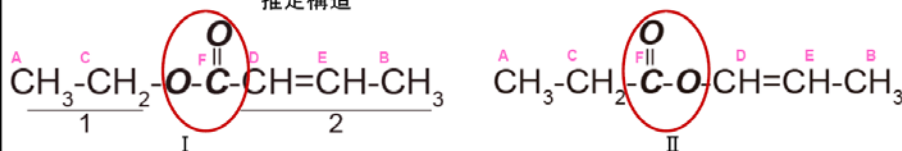
まとめ(2):部分構造の決定

部分構造1 CH₃-CH₂-

部分構造2 CH₃-CH=CH-

COO

推定構造



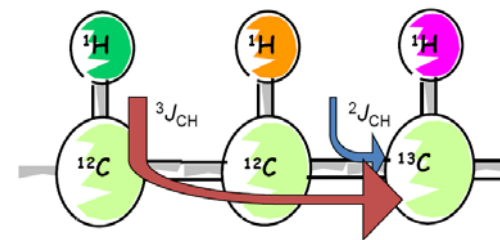
COOに関するロングレンジスピ結合を観察します。

HMBCを測定へ

HMBC測定

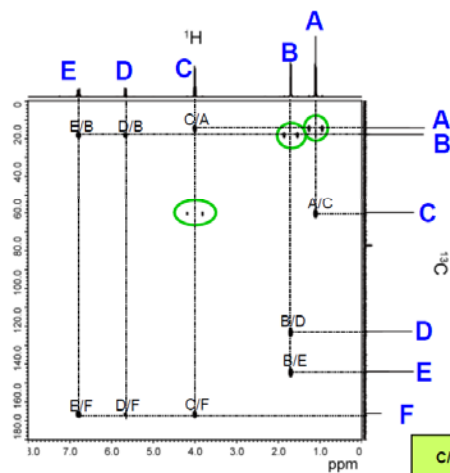
HMBC: *Heteronuclear Multiple Bond Connectivity*

ロングレンジスピ結合している¹Hと¹³Cがわかります。



ⁿJ_{CH}: n結合を介したロングレンジスピ結合

STEP5 部分構造のつながりを見る



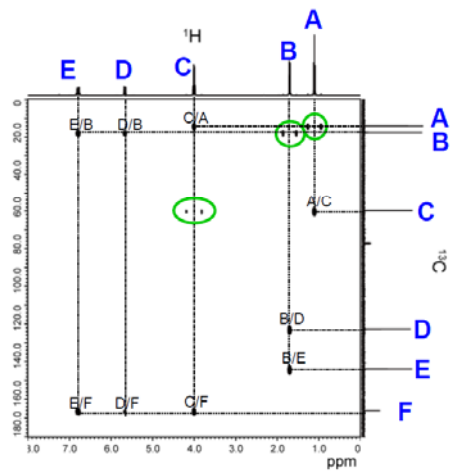
STEP5

- ① X軸、Y軸のスペクトルにラベルを付けます。
- ② X軸とY軸から相関信号に線を引き、ラベルを付けます。
- ③ 相関表を作成します。

○ は直接結合です。

C/AはCとAが $^1J_{CH}$ のスピ結合していることを表します。

STEP5 部分構造のつながりを見る



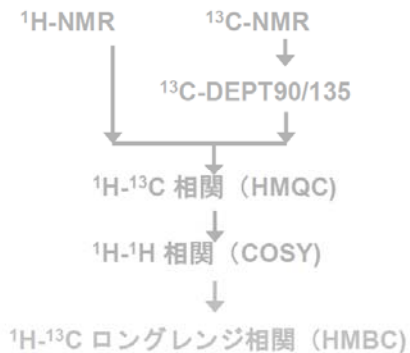
E	D	C	B	A	¹ H \ ¹³ C
		○			A CH ₃
○	○				B CH ₃
				○	C CH ₂
			○		D CH=
			○		E CH=
○	○	○			F COO

HMBC 相関表

○ は直接結合です

スピ結合相関を中心とした構造解析

<測定法>



<解析手順>

- (1) ¹³Cのラベル付け(STEP1)
- (2) 原子団の判別(STEP2)
まとめ(1): 原子団及び官能基の推定
- (3) ¹Hのラベル付け(STEP3)
- (4) ¹Hがついた¹³Cのつながりを見る(STEP4)
まとめ(2): 部分構造の決定
- (5) 部分構造のつながりを見る(STEP5)
まとめ(3): 部分構造の結合

平面構造の確定

まとめ(3): 部分構造の結合

E	D	C	B	A	¹ H \ ¹³ C
		○			A CH ₃
○	○				B CH ₃
				○	C CH ₂
			○		D CH=
			○		E CH=
●	●	●			F COO

HMBC 相関表

○ はすでに解析済みの結合です。

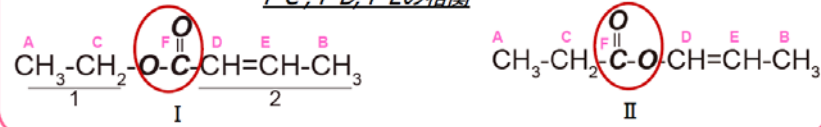
F (COO)の相関信号●に注目します。

FはC,D,Eとロングレンジスピ結合している。

まとめ(3):部分構造の結合

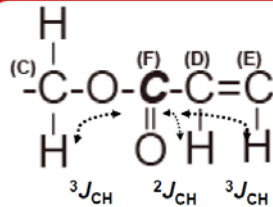
推定構造

F-C, F-D, F-Eの相関

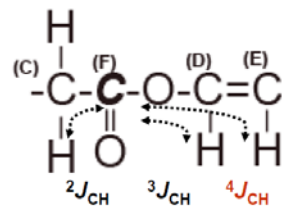


Fとの相関を観察します。

${}^4J_{\text{CH}}$ が観測される可能性は低い。



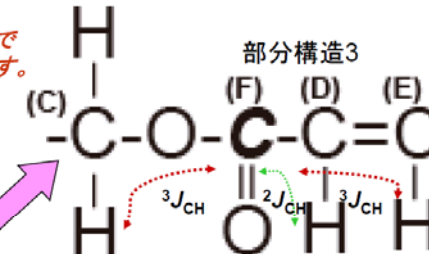
部分構造3



部分構造3'

まとめ(3):部分構造の結合

特異的な化学シフトで構造をチェックします。



CのCH₂は酸素と結合している。

¹³C化学シフトは59.8ppm

CH₂の¹³C化学シフト

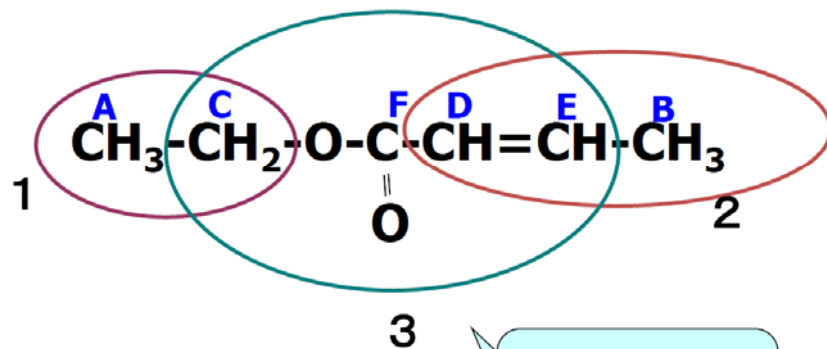
	化学シフト
-CH ₂ -	20-45 ppm
-CH ₂ O-	40-70 ppm

酸素と結合すると低磁場にシフトする。

最後に1次元スペクトルの情報と照らし合わせるチェックは重要です。

平面構造の確定

これまでの結果をまとめます。



推定構造 I

Ethyl Crotonate
(クロトン酸エチル)

スピン結合相関を中心とした構造解析

パズルを解くような解析法ということで

パズルアサイメント法

<測定法>

<解析手順>



平面構造の確定

5月22日 番号 氏名

2-amino-1-butanolの¹Hスペクトル、COSYスペクトル、HMQCスペクトルを示す。
これらのスペクトルから1～6の各吸収線を各水素原子に帰属せよ。

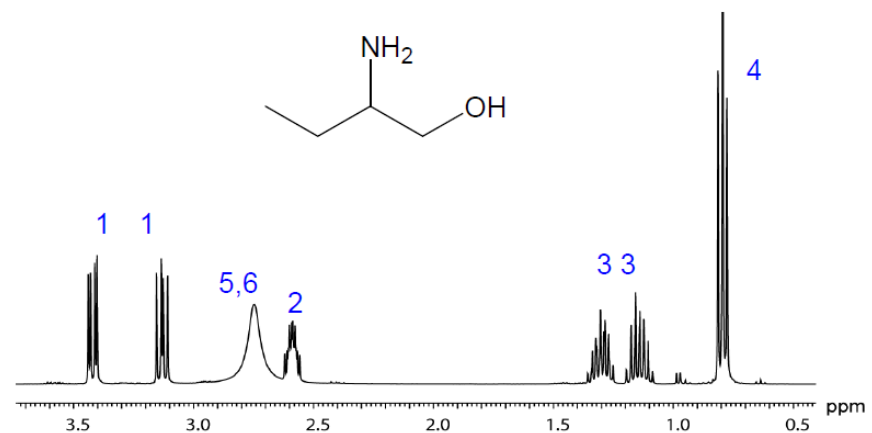
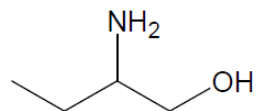


図 3-28 2-amino-1 butanol の ¹H スペクトル

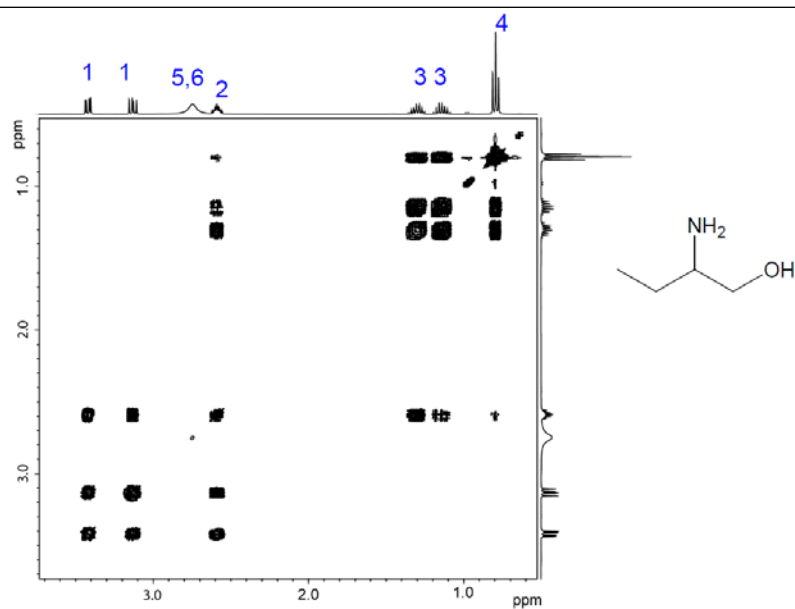


図 3-38 2-amino-1 butanol の COSY スペクトル

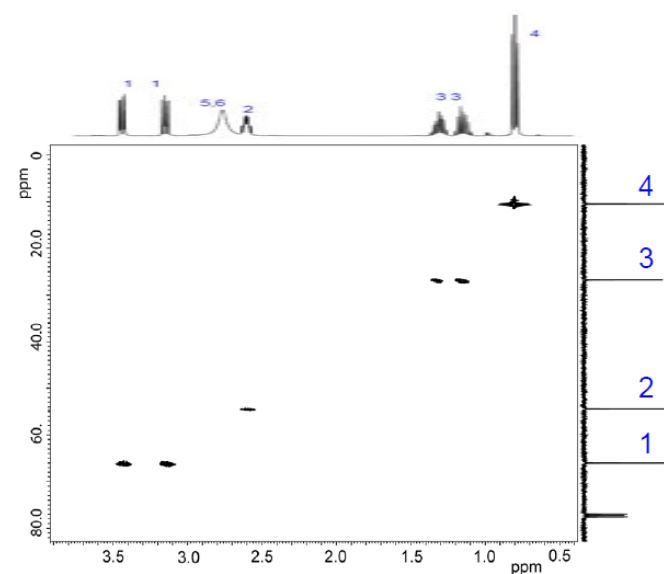


図 3-29 2-amino-1 butanol の HMQC スペクトル