

# 2014年度 分子機能化学特論 第7回目 5月29日

## 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。

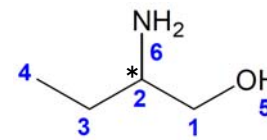
### 【授業の内容（進展度合等）】

1. NMRの発展史 ーどのように発展し、何を知ることができるかー
2. NMRの原理と装置 ー量子力学的な基礎と測定装置のしくみー
3. 2次元NMRの原理と応用 ーCOSY, J-分解, NOESYなどー
4. 多核2次元NMRの原理と応用 ーHETCOR(CH-COSY)などー
5. インバース法の原理と応用 ーHSQC, HMQC, HMBCなどー
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

1

5月22日

2-amino-1-butanolの<sup>1</sup>H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。



C<sub>2</sub>が不斉炭素なので、H<sub>1</sub>とH<sub>3</sub>が非等価である。

(R)-2-amino-1-butanolのNewman投影図を示す。

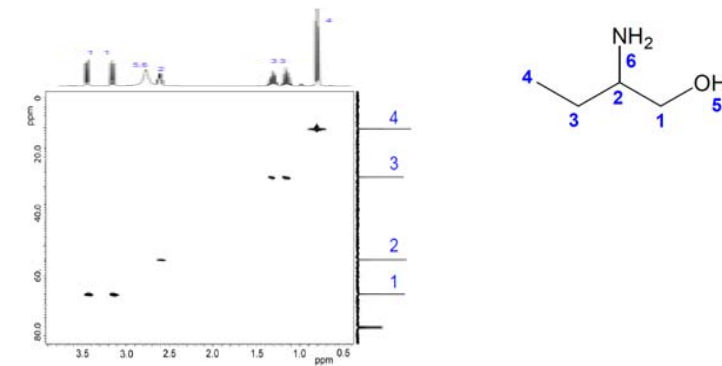
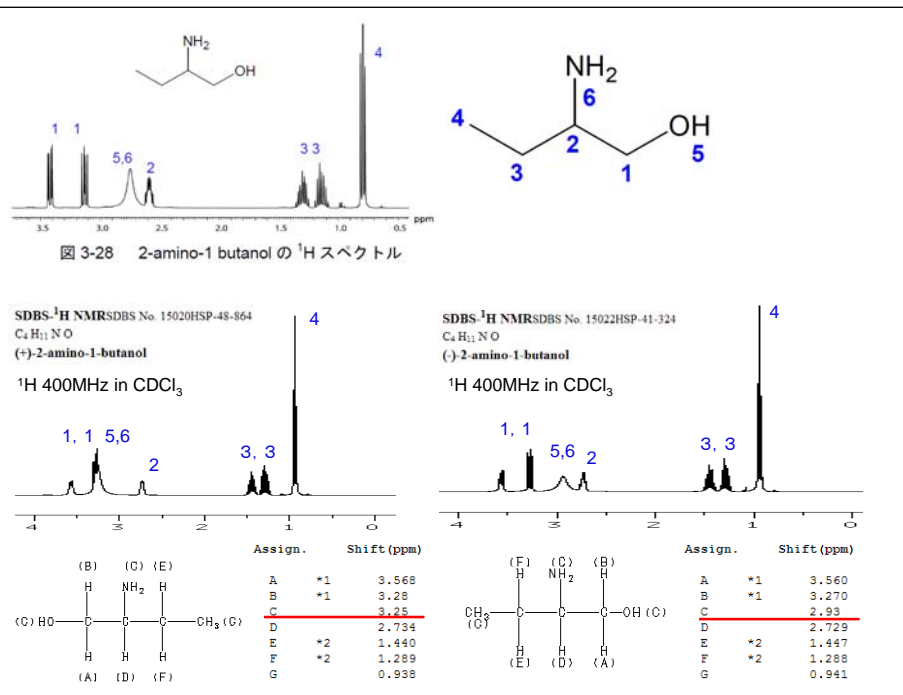
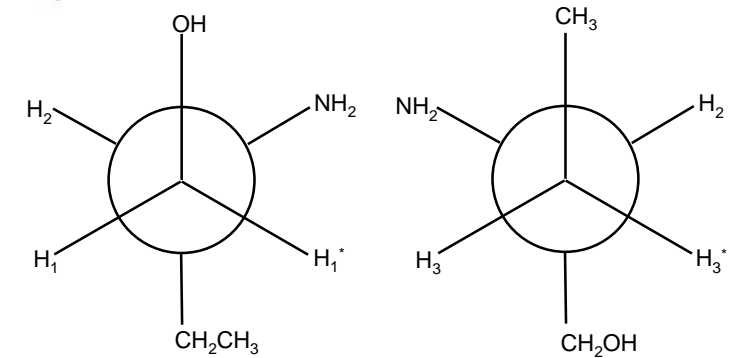
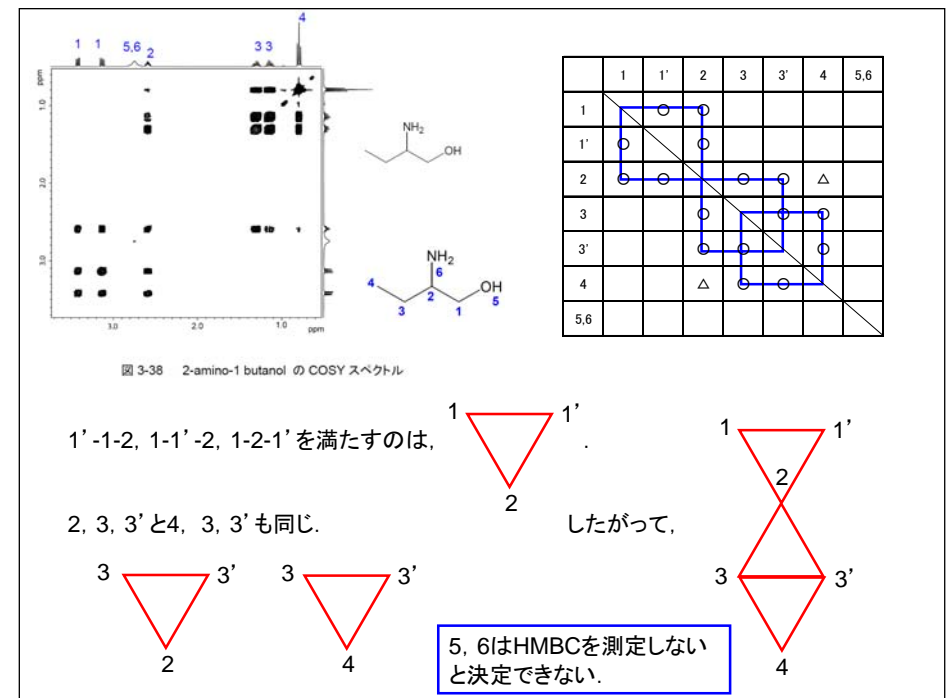
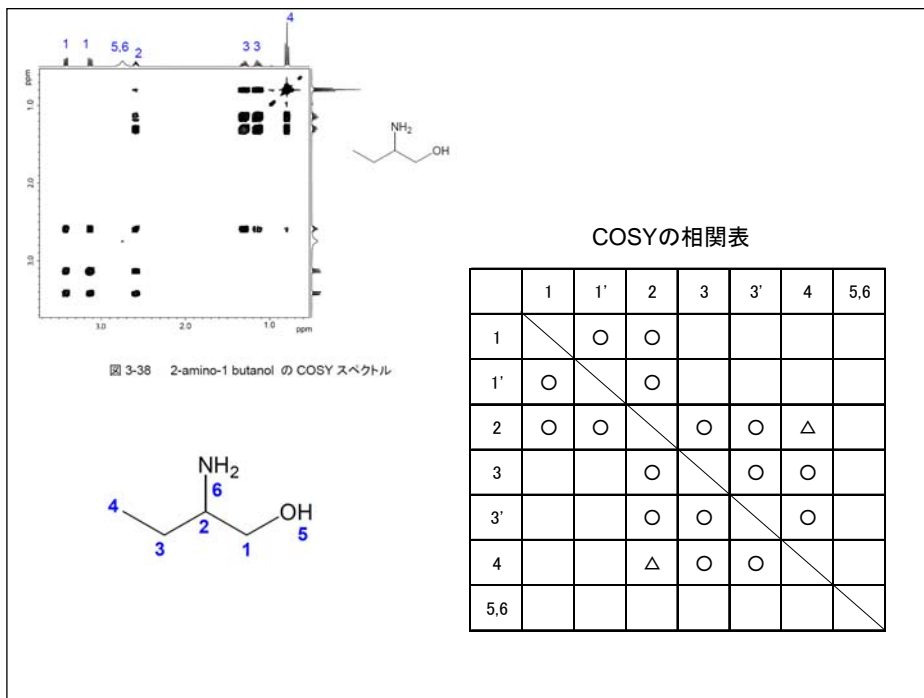


図 3-29 2-amino-1 butanol の HMQC スペクトル

(1)1と3はCH<sub>2</sub>である。

(2)5と6は炭素ではなく、ヘテロ原子に結合している。



### (1) 固体NMRと溶液NMRの違い

①溶液NMRの吸収線幅は固体NMRに比べると、はるかに狭く高分解能である。固体では分子運動が制限されているのに対して、溶液では速い等方的な分子運動が起きていて、化学シフト相互作用とスピン結合相互作用以外の相互作用が消失しているために線幅がきわめて狭い。

②固体では、分子運動が制限されるために、これらの相互作用の他に、磁気双極子相互作用、核四極子相互作用などが働くために、ほとんど構造のない幅の広い吸収線を与える。

### (2) 固体NMRで用いられる主な方法

#### ①マジック角度試料回転(MAS, magic angle spinning)

試料を、静磁場と54.7度の角度をなす軸の周りに高速回転させることをいう。MASによって化学シフト異方性が消失するため、溶液NMRと同じような高分解能スペクトルが得られる。

#### ②交差分極(CP, cross polarization)(交差緩和ともいう)

磁気回転比が小さく、自然存在比も少ないために感度が低い核種、たとえば<sup>13</sup>Cでも、最も感度が良い<sup>1</sup>HとHartman-Hahn条件  $\gamma_C H_{1C} = \gamma_H H_{1H}$  を満たすように回転系二重共鳴を行うと、磁気回転比  $\gamma$  の比、 $\gamma_H / \gamma_C$  倍感度が向上する。さらに、短い<sup>1</sup>Hの緩和時間で測定を繰り返すことができるために積算効率が向上する。

### ③CPMAS法

交差分極CPとマジック角度試料回転MASを組み合わせた測定方法をCPMASという。一般に磁気回転比が小さく、天然存在比も少ない核種に対して用いられる。

$^1\text{H}$ など、同種核間双極子相互作用が非常に強いアバンドント(豊富)スピンに対しては、多重パルス法とMASを組み合わせたCRAMPS法が用いられてきた。しかし、最近、直径が数mm以下の小さな試料管を用いて数10kHz以上のMAS回転数を実現できるようになったために、MASで同種核間双極子相互作用を消去して高分解能スペクトルを測定できるようになった(HR-MAS)。

固体専用NMR装置は、液体用NMR装置と外観が異なるだけでなく操作も大きく違っている。

#### 固体専用NMR装置 CMX-300

- (1)試料管はプローブの内部に直接手で入れる。
- (2)プローブを手で持ち上げてSCMの中心位置に合わせる。
- (3)NMRロックは使わない。
- (4)化学シフト基準を試料に入れない。試料の測定前後に基準となるHMBやアダマンタン試料を別途測定する(外部基準)。
- (5)試料は静磁場と $54.7^\circ$ (マジック角度)をなす軸の回りに数kHz~数十kHzで高速回転させる。化学シフト異方性を消去するのが試料回転の主な目的である。

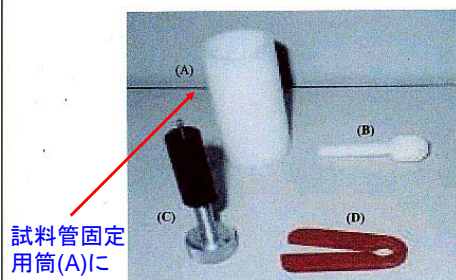
#### 液体NMR装置 JEOL AL-300

- (1)試料管はSCMの上部にエアで浮かせるおき、空気圧でプローブ内部に入れる。
- (2)プローブは固定されている。
- (3)NMRロックを利用するために高価な重水素化溶媒を用いる。
- (4)TMSやTSPのような化学シフト基準を試料に直接溶解させる(内部基準)。
- (5)試料は垂直な軸の回りに約10Hzの低速で回転させる。磁場を均一にして分解能を上げるのが試料回転の目的である。

10

### 固体NMR用試料管とアクセサリ類

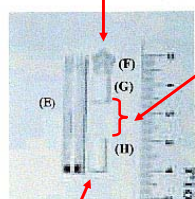
ドライブチップには斜めに溝が刻まれていて圧縮空気で回転させる。



試料管固定用筒(A)にエンドキャップを外した試料管を差し込む。試料がこぼれないように、上部はすり鉢状になっている。

#### アクセサリ類

- (A) 試料管固定用筒
- (B) 試料充填用押し棒
- (C) エンドキャッププラー
- (D) ドライブチッププラー



#### 7.5mm $\phi$ CPMAS用試料管

- (E) ロータースリーブ (ZrO<sub>2</sub>製)
- (F) ドライブチップ (Kel-F製)
- (G) ボトムスペーサー (テフロン製)
- (H) エンドキャップ (テフロン製)

上部のスペーサー(エンドキャップ)には中心に貫通穴があり、ネジが刻まれている。エンドキャップにエンドキャッププラー(C)をねじ込んで取り外す。

試料は上下のスペーサーに挟まれた長さが10数mmの空間に入れる。

11

## 固体NMRと液体NMRを区別する理由

(1)装置(ハードウェア)が異なる。

高出力電力増幅器, マジック角度試料回転, 高出力パルス

(2)測定原理が異なるので、用いるパルス系列(ソフトウェア)も異なる。

交差緩和(CP), 多重パルス

(3)測定の目的・用途が異なる。

結晶多形(医薬品), 相構造(高分子), 導電性, 不溶不融物質, 四極子核( $^2\text{D}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{23}\text{Na}$ など多数の核種)

(青字は、固体NMRに特徴的な事項を示している。)

12

## 固体NMR特有の問題点

(1) 液体では速い等方的な回転運動によって平均化されてゼロになっている磁気双極子相互作用や核四極子相互作用が、固体では極めて大きな線幅の原因となる。

磁気双極子相互作用に起因する線幅は数十kHz, 核四極子相互作用に起因する線幅は数百kHzにおよぶことがある。アバダントスピン( $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$ など)では同種核間磁気双極子相互作用が極めて大きく高分解能測定には特殊な方法が必要である。レアスピン( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ など)では、同種核間相互作用は無視できる。四極子核の高分解能測定には特殊な方法が必要である。

(2) 液体では速い等方的な回転運動によって平均化されて化学シフトは等方平均値(スカラー)しか観測されない。一方、固体では化学シフトはテンソルであり、試料と静磁場とのなす角度に依存している(化学シフト異方性)。試料の対称性に依存したパウダーパターンと呼ばれる特徴的な幅広い線形を与える。

(3) 液体では速い運動によってスピン-格子緩和時間 $T_1$ は数秒程度と短い。一方、有効な緩和機構が存在しない場合、固体では $T_1$ が極めて長く、数千秒にもおよぶことがある。

13

## 3. 固体NMRの基礎

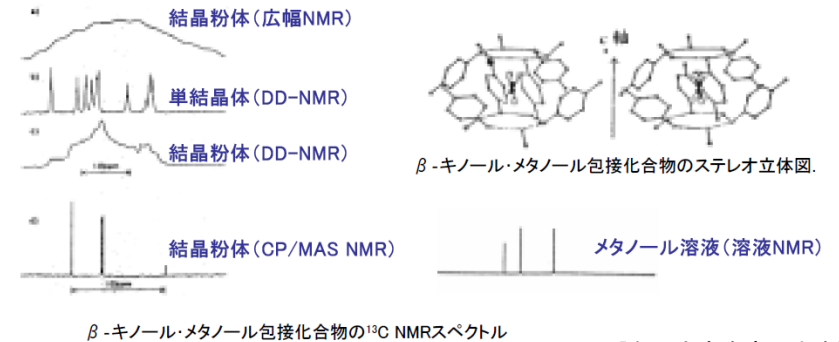
固体高分解能NMRスペクトルの測定には、様々な工夫が凝らされている!!

<工夫が必要な原因>

- 双極子-双極子相互作用
- 化学シフトの異方性
- 長い $T_1$

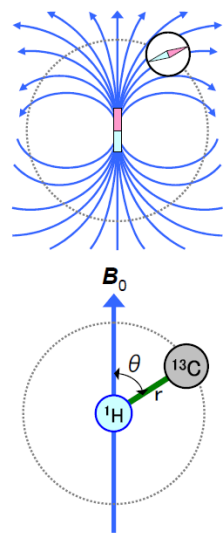
<工夫されたテクニック>

- ★ 高出力デカップリング(DD)
- ★ マジック角高速回転(MAS)
- ★ 交差分極(CP)



[名工大吉水広明先生]

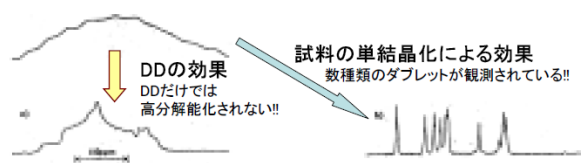
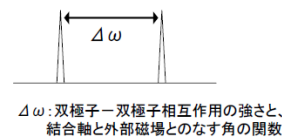
## 双極子-双極子相互作用



$$B_H = \frac{\mu_H}{r^3} (3 \cos^2 \theta - 1)$$

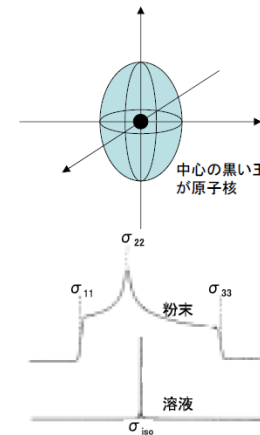
上式に従えば、 $\theta$ が一様に分布しているとすると、およそ60kHzに相当する線幅の増大が見込まれる。 $^1\text{H}$ 核に対し、 $B_1$ 磁場が、 $\omega_1 > 60\text{kHz}$ となるような、高出力rfを照射すると、 $B_H$ の時間平均を0にできる。(高出力デカップリング; DD)

ただし、単結晶試料や一軸配向試料などで、 $\theta$ が一定値をとる場合、 $\pm B_H$ に従い、ダブルレットになる。

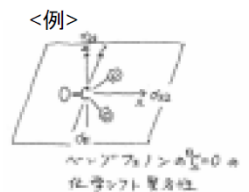


[名工大吉水広明先生]

## 化学シフトの異方性(CSA)



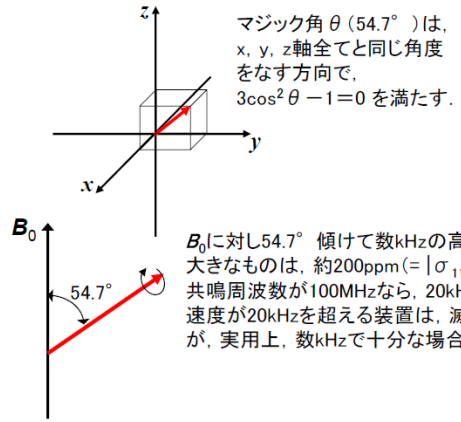
化学シフトの起源は、電子の磁気遮蔽効果。電子は電子雲として核の周りに存在する。この電子雲が左図のように真球でないとき、 $B_0$ の方向により遮蔽効果が異なるので、化学シフトに異方性が生まれる。テンソル量で表すべきものであることが理解できよう。テンソルは、三つの主値( $\sigma_{11}$ ,  $\sigma_{22}$ ,  $\sigma_{33}$ )で表現される。この主値と分子構造上の座標軸との対応付けがあれば、詳細な構造解析が可能である。



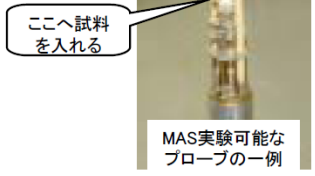
粉末試料などで、分子の向きが全くランダムなときの化学シフト異方性に基づく、テント様なスペクトル線形の模式図。一方、溶液では分子自身のランダムで速い運動のため、時間平均として異方性は消失し、等方平均化学シフト値:  $\sigma_{iso} = (\sigma_{11} + \sigma_{22} + \sigma_{33})/3$  が得られる。



# マジック角高速回転(MAS)



マジック角  $\theta$  ( $54.7^\circ$ ) は、  
x, y, z 軸全てと同じ角度  
をなす方向で、  
 $3\cos^2\theta - 1 = 0$  を満たす。

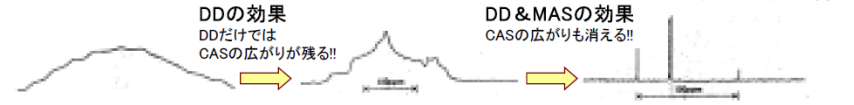


MAS実験可能な  
プローブの一例



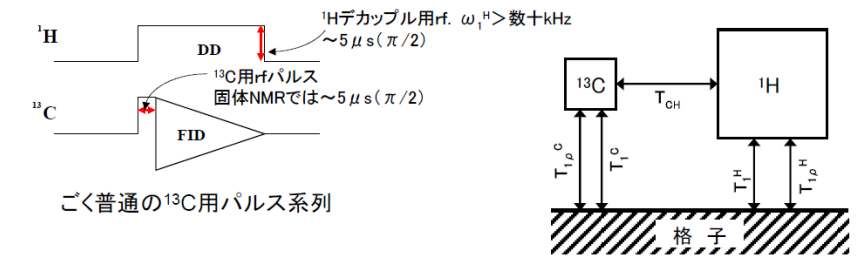
MAS実験用の試料管  
(ローター)の一例

$B_0$  に対し  $54.7^\circ$  傾けて数kHzの高速回転を行う。CSAの  
大きなものは、約200ppm ( $= |\sigma_{11} - \sigma_{33}|$ ) もあり、 $^{13}\text{C}$ 核の  
共鳴周波数が100MHzなら、20kHzの広がりである。MAS  
速度が20kHzを超える装置は、滅多にお目にかかれな  
いが、実用上、数kHzで十分な場合がほとんどである。

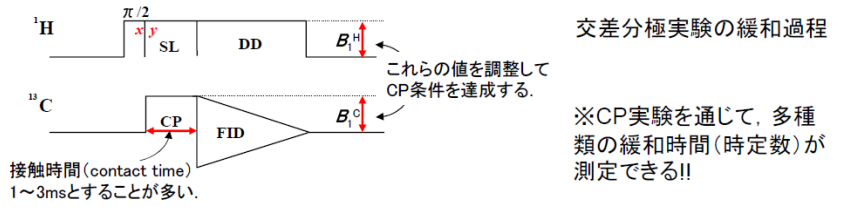


[名工大吉水広明先生]

# 交差分極(CP)



ごく普通の $^{13}\text{C}$ 用パルス系列



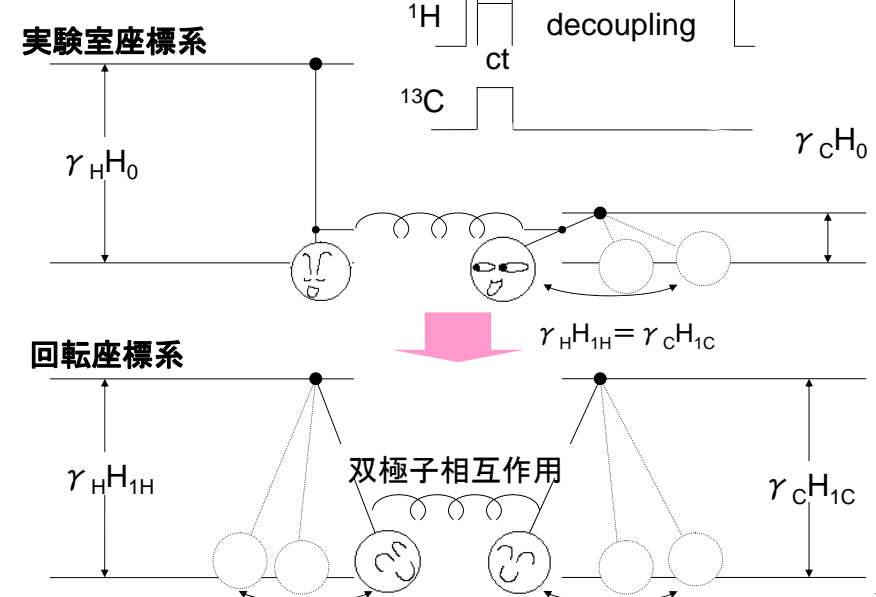
交差分極実験の緩和過程

※CP実験を通じて、多種  
類の緩和時間(時定数)が  
測定できる!!

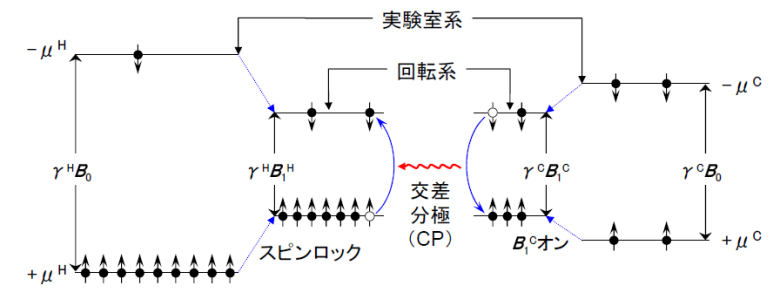
交差分極のパルス系列

[名工大吉水広明先生]

# 交差分極(cross polarization)



# 交差分極(CP)



実験系と回転系におけるゼーマン分裂と交差分極。

CP条件(Hartmann-Hahnの条件):  $\gamma^H B_1^H = \gamma^C B_1^C$  ( $\omega_1^H = \omega_1^C$ )

**CP法の第二の利点!!**  
 $^{13}\text{C}$ 核の $T_1$ 緩和が完了していなくても、 $^1\text{H}$ 核の $T_1$ 緩和が完了していれば、  
 CPIによって同じ強度の $^{13}\text{C}$ 核磁化が再び得られる。 → **長い $T_1^C$ の克服**

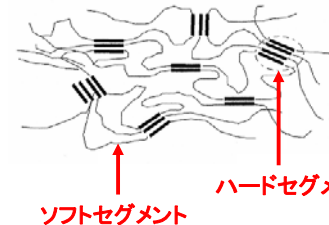
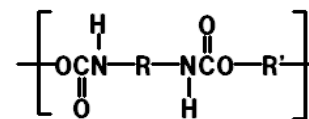
### ○重なったピークの検出および多成分分離測定

運動性の異なる数種類の成分のピークが重なっている場合には、運動性を反映する $T_1$ の測定によって成分の数と比率を求めることができる。また、 $T_1$ の違いを利用した分離測定によって各成分の分離測定が可能となる。

水素原子との結合様式の異なる炭素原子のピークが偶然重なっている場合には、炭素原子と水素原子の間の磁気双極子相互作用の大きさを反映する $T_\rho$ の測定によって成分の数を求めることができる。また、 $T_\rho$ の違いを利用した分離測定によって各成分の分離測定が可能となる。

### 参考:ポリウレタンの基本構造

ジイソシアネート、鎖伸長剤、ポリオールから構成されたブロック共重合体である。  
 (1) **ハードセグメント**: 鎖伸長剤とジイソシアネートからなり結晶相を構成する。  
 (2) **ソフトセグメント**: ポリオールからなり非晶相を構成する。

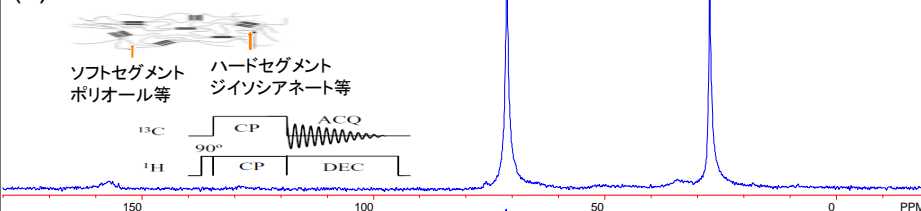


ハードセグメント ソフトセグメント

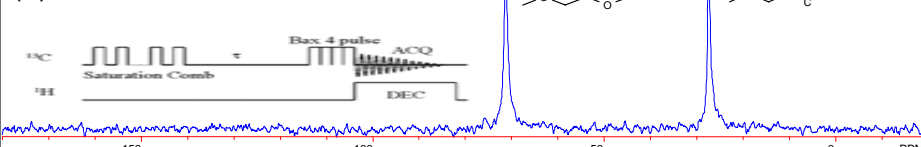
- 原料
- ◎イソシアナート
  - ◎ポリオール
  - ◎鎖伸長剤
    - ・ジオール類
    - ・アミン類
  - ◎その他(内部乳化成分)

図1. ポリウレタンのマイクロ相分離構造

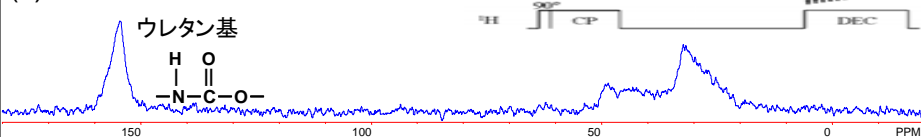
### (a)通常のCPMAS



### (b)ソフトセグメント選択

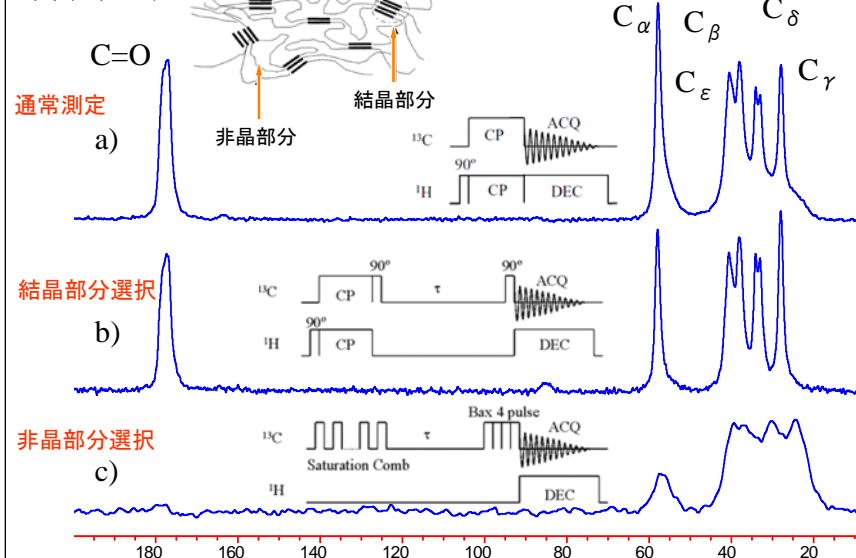


### (c)ハードセグメント選択



ポリウレタンの固体NMR [試料提供: 日華化学(株)]

### ポリ(ε-リジン)



結晶相と非晶相の分離測定. (a) 通常測定, (b) 結晶相選択, (c) 非晶相選択

Solid-State <sup>13</sup>C NMR Analyses of the Structure and Chain Conformation of Thermotropic Liquid Crystalline Polyurethane Crystallized from the Melt through the Liquid Crystalline State

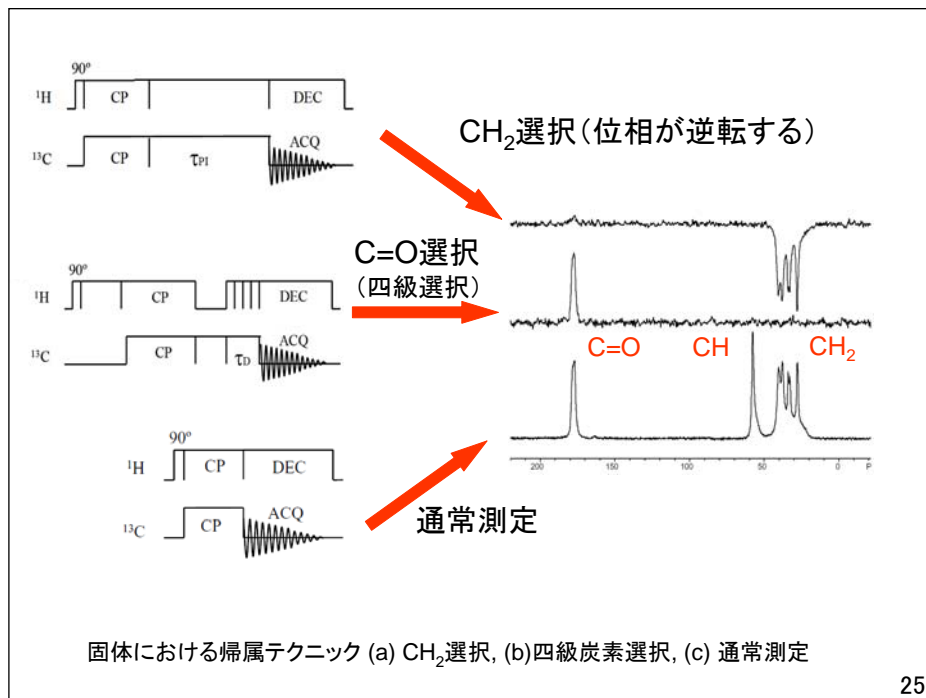
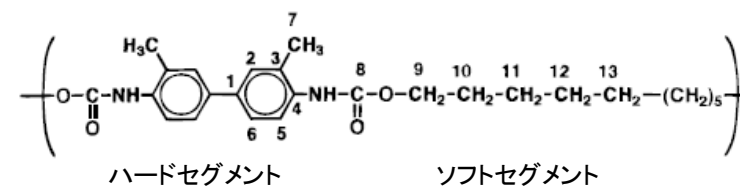
Hiroyuki Ishida, Hironori Kaji, and Fumitaka Horii\*

Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611, Japan

Received March 11, 1997; Revised Manuscript Received June 10, 1997

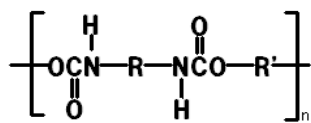
固体<sup>13</sup>C NMRを用いた液晶性ポリウレタンの構造とコンフォーメーション解析

Chart 1



ポリウレタンの基本構造

ジイソシアネート、鎖伸長剤、ポリオールから構成されたブロック共重合体である。  
 (1) **ハードセグメント** 鎖伸長剤とジイソシアネートからなり結晶相を構成する。  
 (2) **ソフトセグメント** ポリオールからなり非晶相を構成する。



ハードセグメント      ソフトセグメント

- 原料
- ◎イソシアナート
  - ◎ポリオール
  - ◎鎖伸長剤(CHain EXtender, CHEX)
    - ・ジオール類
    - ・アミン類
  - ◎その他(内部乳化成分)

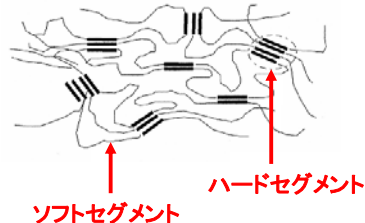


図1. ポリウレタンのマイクロ相分離構造

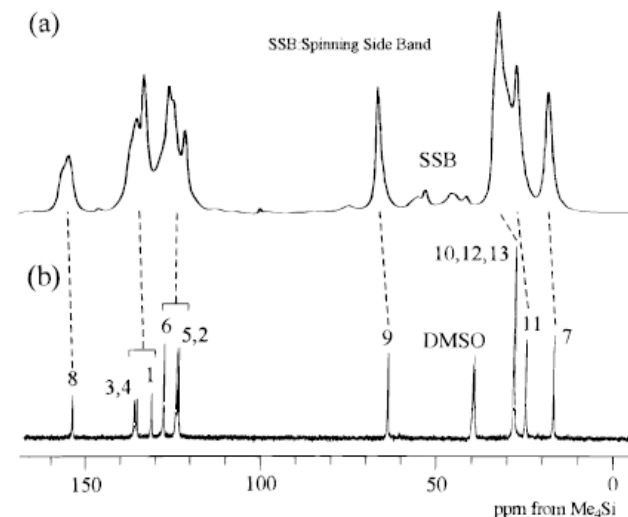
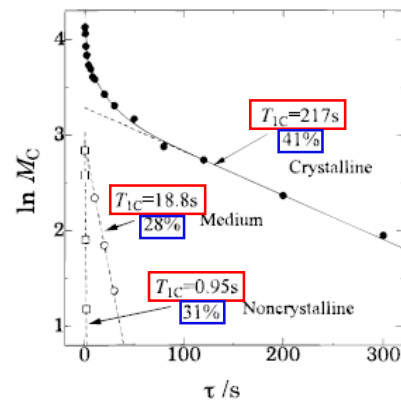


Figure 3. <sup>13</sup>C NMR spectra of PDBDM: (a) 50 MHz CP/MAS spectrum measured at room temperature; (b) 100 MHz solution state spectrum measured at 100 °C.



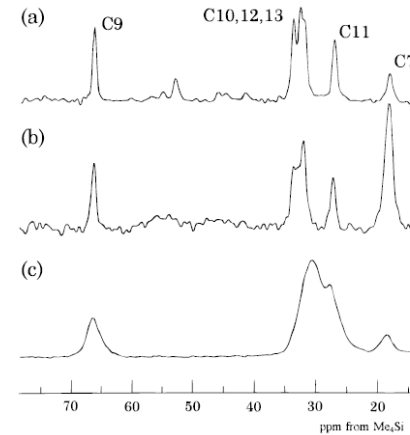
単一成分であれば、緩和は単一の指数関数減衰、すなわち1本の直線で表される。

しかし、このポリウレタン試料では、緩和曲線は3つの指数関数減衰の和で表される。すなわち、この試料には、運動性が異なる3つの成分（結晶成分、中間成分、非晶成分）が含まれていることを示しており、成分比率も求めることができる。

Figure 4. <sup>13</sup>C spin-lattice relaxation process for the C9 methylene carbon measured by the CPT1 pulse sequence.

Table 1. <sup>13</sup>C Spin-Lattice Relaxation Times of PDBDM Measured at Room Temperature

|                | $T_{1C}/s$ |        |         |      |           |      |      |
|----------------|------------|--------|---------|------|-----------|------|------|
|                | C8         | C1,3,4 | C,2,5,6 | C9   | C10,12,13 | C11  | C7   |
| crystalline    | 210        | 217    | 233     | 243  | 201       | 217  | 160  |
| medium         | 25.4       | 22.3   | 26.5    | 23.4 | 17.0      | 18.8 | 21.5 |
| noncrystalline | 3.3        | 0.49   | 0.47    | 3.3  | 0.60      | 0.95 | 4.3  |

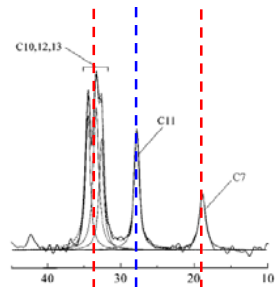
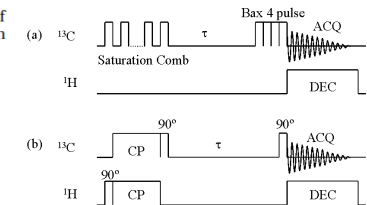


結晶成分選択スペクトル  
CPT1実験,  $\tau = 100s$

中間成分選択スペクトル  
CPT1実験,  $\tau = 8s$ のスペクトルを $\tau = 100s$ のスペクトル(結晶成分選択スペクトル)から引き算する。

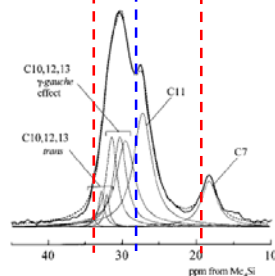
非晶成分選択スペクトル  
Saturation recovery法,  $\tau = 2s$

Figure 5. <sup>13</sup>C NMR spectra of different components of PDBDM: (a) the crystalline component; (b) the medium component; (c) the noncrystalline component.



結晶成分のCH<sub>2</sub>吸収線の線形解析

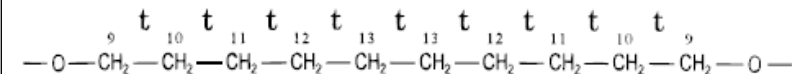
Figure 6. Line shape analysis for the methylene resonance lines of the crystalline component.



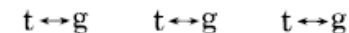
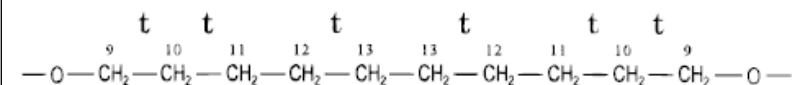
非晶成分のCH<sub>2</sub>吸収線の線形解析

$\gamma$ 位の炭素原子または原子団がゴーシュ位置にあると約5ppm高磁場シフトする( $\gamma$ -ゴーシュ効果)ことが知られている。

Figure 7. Line shape analysis for the methylene resonance lines of the noncrystalline component.



(a) 結晶および中間成分はall-transコンフォメーション



(b) 非晶成分はgaucheコンフォメーションを含む

Figure 8. Conformations for the methylene sequences in different components in PDBDM: (a) crystalline and medium components; (b) noncrystalline component (frozen liquid crystalline component).



# 固体高分解能 $^{13}\text{C}$ NMR法による ポリマーブレンドの相溶性解析

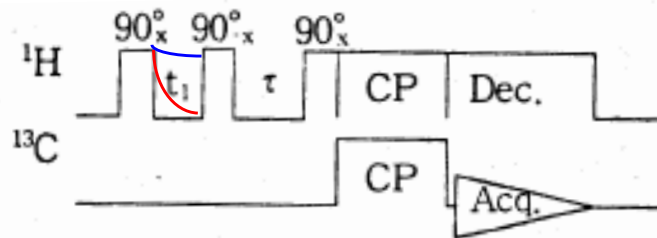
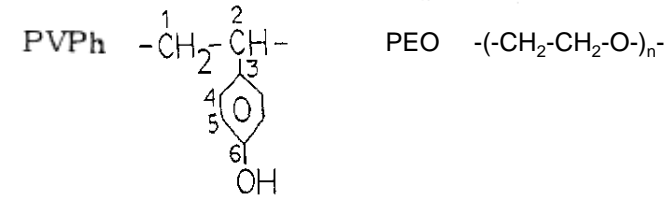
浅野 敦志\* 引地 邦男\* 竹腰 清乃理\*\*

表面, 31(11), 835-845(1993)

ポリマーブレンドは不均一な非晶性の固体であることが多く、適用できる分光法は少ない。このようなポリマーブレンドに対して固体NMR法は特に有効である<sup>2,3)</sup>。固体高分解能  $^{13}\text{C}$  NMR法はポリマー残基を区別して観測できるので、各成分ポリマーを個別に調べることができる利点がある。ここでは固体高分解能  $^{13}\text{C}$  NMR法を用いて2成分ポリマーから成るポリマーブレンドの相溶性について解説する。

## 4. Glodman-Shen 実験によるスピン拡散の 時間変化から見たポリマーブレンドの相溶性<sup>9)</sup>

ポリビニルフェノール/ポリエチレンオキシド (PVPh/PEO)ブレンドは、PEOが結晶性ポリマーであるため組成比によって相溶性が異なる。PVPhの含有量が多いときは20~30Å領域で均一に混ざるが、PEOの含有量が60%以上になるとPEO結晶相と非晶相が現れる。これらのことは前の章で説明した緩和時間の測定やCP/MASスペクトルから見いだすことができる。



Goldman-ShenパルスとCPを組み合わせたシーケンス。

$T_2$ が大きく異なる2成分系で有効である。 $T_2$ の短い成分は $t_1$ の間に、xy面内で減衰して信号が消失する。一方 $T_2$ の長い成分は $t_1$ 時間経っても信号が残っている。2つ目の $90^\circ$ パルスで磁化をz方向に戻す。時間 $\tau$ の間に、 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ 間スピン拡散によって、 $T_2$ の短い成分への磁化移動が生じる。Goldman-Shenパルスの3番目の $90^\circ$ パルスを通常のCPシーケンスの $90^\circ$ パルスとして利用することによって、 $^1\text{H}$ の磁化を $^{13}\text{C}$ に移動させて観測する。

ブレンド中のPEOとPVPhの $T_2$ 値は、それぞれ185 $\mu\text{s}$ と17 $\mu\text{s}$ である。 $t_1$ をPVPhの $T_2$ よりも長い40 $\mu\text{s}$ に設定すると、PEO成分だけが残る。そのままCPMAS測定するとPEOの信号だけが観測されるが、時間 $\tau$ の間にスピン拡散を起こさせると、 $\tau$ が長くなるにつれてPEO成分は減衰し、PVPh成分は増大する。

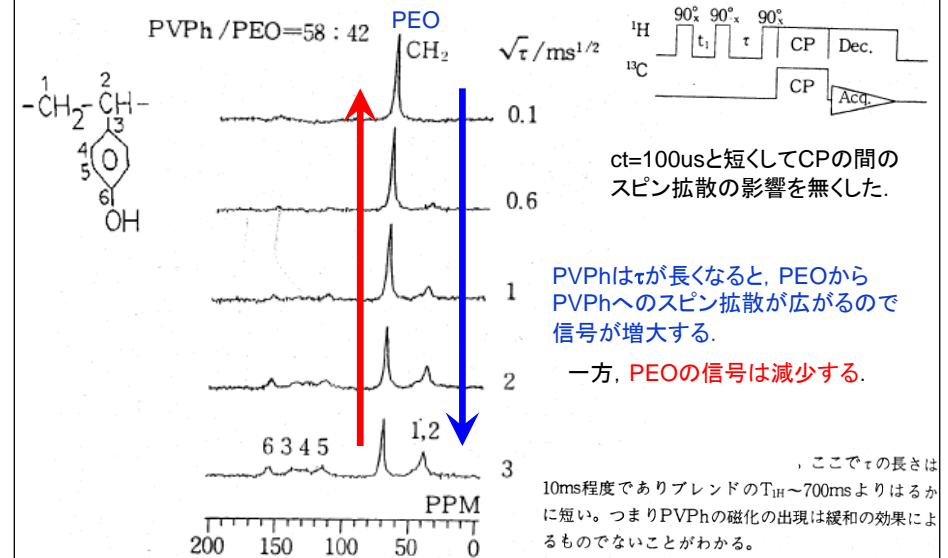
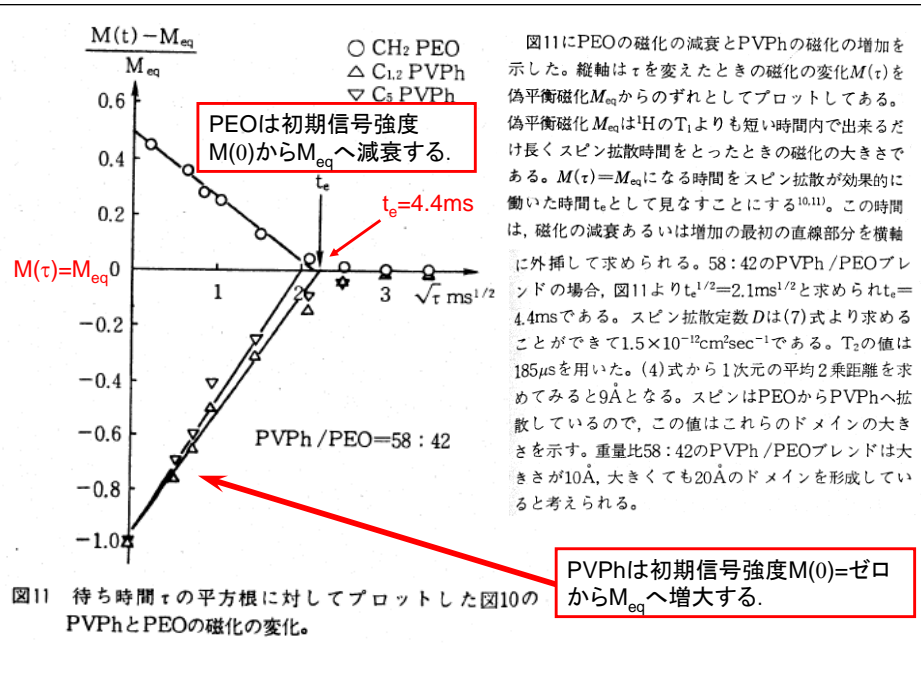


図10 重量比58:42のPVPh/PEOブレンドの $t_1=40\mu\text{s}$ とした時のGoldman-Shen法を用いて得られた38 $^\circ\text{C}$ のCP/MASスペクトル。



に外挿して求められる。58:42のPVPPh/PEOブレンドの場合、図11より $t_e^{1/2} = 2.1 \text{ms}^{1/2}$ と求められ $t_e = 4.4 \text{ms}$ である。スピンドット定数 $D$ は(7)式より求めることができ $1.5 \times 10^{-12} \text{cm}^2 \text{sec}^{-1}$ である。 $T_2$ の値は $185 \mu\text{s}$ を用いた。(4)式から1次元の平均2乗距離を求めてみると $9 \text{\AA}$ となる。スピンドットはPEOからPVPPhへ拡散しているの、この値はこれらのドメインの大きさを示す。重量比58:42のPVPPh/PEOブレンドは大きさが $10 \text{\AA}$ 、大きくても $20 \text{\AA}$ のドメインを形成していると考えられる。

$$(7) \quad D = 2.74 \times 10^{-10} / T_2$$

$$= 2.74 \times 10^{-10} / 185$$

$$= 1.48 \times 10^{-12} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$$

$$(4) \quad \langle x^2 \rangle = \frac{4}{3} Dt = 1.48 \times 10^{-12} \times 4.4 \times 10^{-3} \text{cm}^2 \text{s}^{-1} \text{s}$$

$$= 8.7 \times 10^{-15} \text{cm}^2$$

$$\sqrt{\langle x^2 \rangle} = \sqrt{8.7 \times 10^{-15}} \text{cm}$$

$$= 9.3 \times 10^{-8} \text{cm} \cong 9 \text{\AA}$$

### 超高速試料回転によって可能になった

(1)  $^1\text{H}$ 一次元固体高分解能NMR  
 (2)  $^1\text{H}$ - $^{14}\text{N}$ 二次元固体NMR

JEOLアプリケーションノート Application Note NM100001

## 80 kHzの超高速試料回転を可能とする 1 mm MASシステムのご紹介

世界最高速となる80 kHzの超高速magic angle spinning (MAS)を実現する1mm MASシステムの開発状況をご紹介します。試料管外径は1mmであり、試料の有効体積は0.8 $\mu\text{l}$ を確保しました。1 kHzの低速から80 kHzの最高速にいたるまで連続的に安定した試料回転を実現します。回転数の安定度はいずれの試料回転速度でも $\pm 5 \sim 10 \text{Hz}$ を確保しました。

**回転システムの概要**

### 1. 試料回転の高速化と静磁場の高磁場化による $^1\text{H}$ NMRへの影響

$^1\text{H}$  NMRスペクトルは試料回転の高速化または静磁場の高磁場化によって分解能が大幅に向上します。

|                  | 70 kHz | 110 kHz |
|------------------|--------|---------|
| 18.8 T (800 MHz) |        |         |
| 14.1 T (600 MHz) |        |         |
| 11.7 T (500 MHz) |        |         |

高磁場 (High magnetic field) and 高速回転 (High speed rotation) are indicated by red arrows pointing to the 110 kHz column.

上図: L-ヒステジン塩酸塩の $^1\text{H}$  NMRスペクトル

東北大学巨大分子解析研究センターホームページより <http://www.kiki.chem.tohoku.ac.jp/800nmr.html>

NC(Cc1c[nH]n1)C(=O)O

• HCl



800 MHz NMRスペクトロメータ

800 MHz NMRスペクトロメータ建屋外観

巨大分子解析研究センターは株式会社JEOL RESONANCEと連携し、ナノテクノロジープラットフォーム事業に参画し、800 MHz NMRの共同利用を開始しました。

本設備は東北地区最大で唯一の大型NMR装置であり、同ブロックに開放し、共同利用設備として活用されます。そのため、同地域の化学・材料科学・生物科学研究における中核的な拠点として、本装置が果たす役割は大きいと期待されます。特に本装置には世界に先駆けて世界最高速クラスの80 kHzでmagic angle spinningを実現する外径1 mm試料管の固体NMRシステムを導入しており、超高感度で極微量サンプル(試料の有効体積:0.8  $\mu$ L)の測定が可能です。

2012年7月2日より依頼測定を受け付けております。

東北大学巨大分子解析研究センターホームページ  
<http://www.kiki.chem.tohoku.ac.jp/800nmr.html>

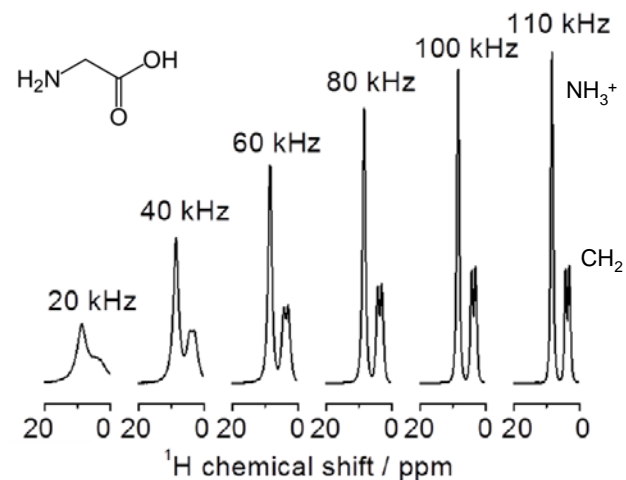


Figure 3 グリシンの  $^1\text{H}$  NMR スペクトル。外径 0.75mm 試料管の MAS システムと、JNM-ECA600 スペクトロメータを用い、14.1T の磁場のもとで測定を行いました。

### 1mm $\phi$ プローブでの 固体プロトンNMR測定例

アラニントリペプチドの平行  
 $\beta$ シート構造と反平行 $\beta$ シート  
構造の違いが明らかです。

Yazawa, *et al.*,  
*Chem. Comm.*, 2012, **48**, 11199

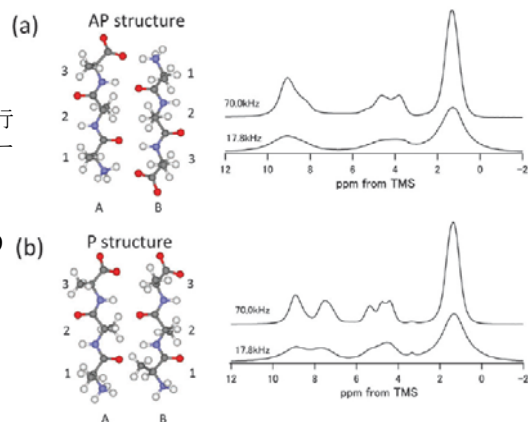


Fig. 1 Geometry optimized (CASTEP) (a) AP and (b) P  $\beta$ -sheet structures of  $\text{Ala}_3$ , and their  $^1\text{H}$  solid state NMR spectra with MAS rates of 17.8 and 70.0 kHz. Both structures have two different molecules per unit cell.

Determination of accurate  $^1\text{H}$  positions of an alanine tripeptide with anti-parallel and parallel  $\beta$ -sheet structures by high resolution  $^1\text{H}$  solid state NMR and GIPAW chemical shift calculation†

Koji Yazawa,<sup>a</sup> Furitsu Suzuki,<sup>b</sup> Yusuke Nishiyama,<sup>c</sup> Takuya Ohata,<sup>a</sup> Akihiro Aoki,<sup>a</sup> Katsuyuki Nishimura,<sup>d</sup> Hironori Kaji,<sup>b</sup> Tadashi Shimizu<sup>e</sup> and Tetsuo Asakura<sup>a\*</sup>

### (2) $^1\text{H}$ - $^{14}\text{N}$ 二次元固体NMR

#### 何故これまでは $^{14}\text{N}$ ではなく $^{15}\text{N}$ だったの？

これまで NMR では非常に高い天然存在比 (99.63%) を持つ  $^{14}\text{N}$  ではなく、天然存在比たった 0.37% の  $^{15}\text{N}$  が観測に用いられてきました。これは  $^{14}\text{N}$  が整数スピンであることおよび核四極子相互作用<sup>\*8</sup>を持つことにより、測定が困難であったためです。溶液 NMR では  $^{14}\text{N}$ -NMR は四極子緩和<sup>\*9</sup>によりスペクトルが広幅化し、固体 NMR では観測できる単量子 (SQ) 遷移が1次の四極子相互作用の影響を受けるため、線幅が数 MHz にも及ぶことが測定及び解析を難しくしていました。このためわざわざ  $^{15}\text{N}$  に標識した試料を作成してまで  $^{15}\text{N}$  が用いられてきました。





### Very fast magic angle spinning $^1\text{H}$ - $^{14}\text{N}$ 2D solid-state NMR: Sub-micro-liter sample data collection in a few minutes

Yusuke Nishiyama<sup>a,\*</sup>, Yuki Endo<sup>a</sup>, Takahiro Nemoto<sup>a</sup>, Hiroaki Utsumi<sup>a</sup>, Kazuo Yamauchi<sup>b,1</sup>, Katsuya Hioka<sup>a</sup>, Tetsuo Asakura<sup>b</sup>

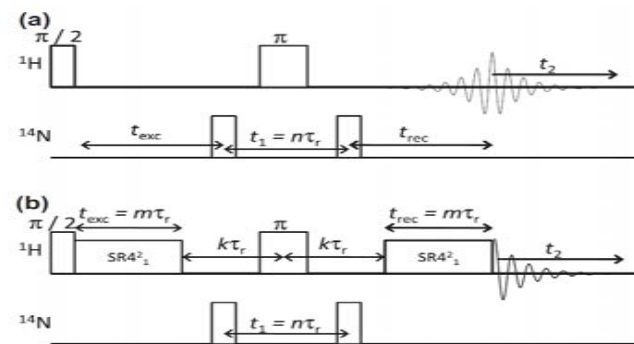
<sup>a</sup>JFOL Ltd., 3-1-2 Masushino, Akikihira, Tokyo 196-8558, Japan

<sup>b</sup>Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo 184-8588, Japan

超高速マジック角度回転 $^1\text{H}$ - $^{14}\text{N}$ 固体NMR: 1マイクロリットル以下の試料を数分で測定できる

(日本電子) 西山裕介, (東京農工大) 朝倉哲郎, 他

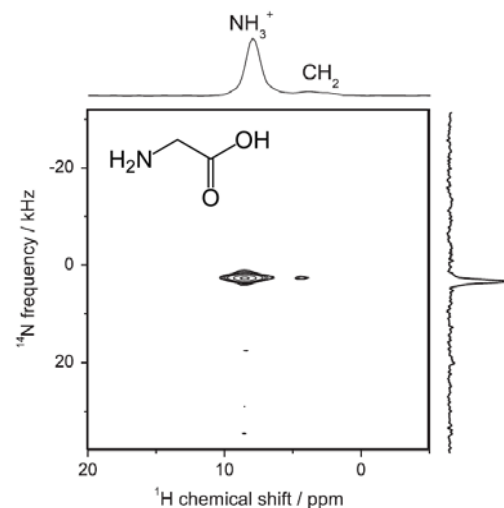
80kHzの超高速試料回転が可能な1mmMASプローブ(日本電子)を用いて、0.8  $\mu\text{L}$ のペプチド(グリシル-L-アラニン)の $^1\text{H}$ - $^{14}\text{N}$ 二次元固体NMR測定が2分の測定時間で実現する。核スピンの $1/2$ であり測定が容易な $^{15}\text{N}$ の天然存在比は0.37%しかないので、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ 二次元固体NMRは事実上実現不可能である。 $^{14}\text{N}$ の天然存在比は99.6%であるが、核スピンの $1$ であり、核四極子を持つために一般にNMR測定が困難である。



**Fig. 1.**  $^1\text{H}$ - $^{14}\text{N}$  correlation pulse sequence for J-HMQC (a) and D-HMQC (b).  $^{14}\text{N}$  SQ coherences are selected by phase cycling of  $^{14}\text{N}$  pulses in the both sequences. In D-HMQC experiment, SR4<sub>1</sub> spanning  $m\tau_r$  is applied during excitation and reconversion periods. Interval between SR4<sub>1</sub> sequence and  $\pi$  pulse,  $k\tau_r$ , must be precisely synchronized with the rotor period to maximize echo. The evolution time  $t_1$  must also be rotor-synchronized.

(a)はJ-HMQC(通常のHMQC), (b)はD-HMQCパルスシーケンス。 $^{14}\text{N}$ のSQコヒーレンス選択のために $^{14}\text{N}$ パルスの位相回しを行う。D-HMQC実験では、 $m\tau_r$ の間SR4<sub>1</sub>が励起と再転換期間に加えられる。エコー強度を最大にするために、SR4<sub>1</sub>シーケンスと $\pi$ パルスの間隔 $k\tau_r$ は、試料回転と正確に同期していなければならない。展開時間 $t_1$ もまた試料回転と同期していなければならない。

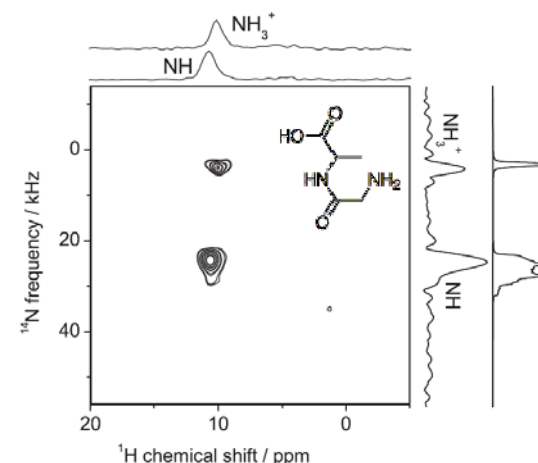
SR4<sub>1</sub>は $^1\text{H}$ 同種核間双極子相互作用をデカップリングし、 $^1\text{H}$ - $^{14}\text{N}$ 異種核間双極子相互作用をリカップルするために照射されている。



**Fig. 5.**  $^1\text{H}$ - $^{14}\text{N}$  D-HMQC spectrum of glycine at 70 kHz MAS at 11.7 T. Single quantum coherences were selected in the  $^{14}\text{N}$  dimension. An SR4<sub>1</sub> recoupling period of  $18\tau_r$  (257  $\mu\text{s}$ ) was applied during both the excitation and reconversion periods. 128 rotor-synchronized  $t_1$  increments ( $\Delta t_1 = 1/\nu_r = 14.3 \mu\text{s}$ ) with 2 scans per  $t_1$  point were collected. The total number of scans was 512. The  $^{14}\text{N}$  pulse widths were 11.5  $\mu\text{s}$ , applied at 2.9 kHz (81 ppm). Slices along  $^1\text{H}$  and  $^{14}\text{N}$  dimensions are also shown.

グリシンの  
 $^1\text{H}$ - $^{14}\text{N}$  D-HMQC  
スペクトル  
試料量: 0.8  $\mu\text{L}$   
1mmMASプローブ  
MAS: 70kHz  
 $H_0$ : 11.7T  
積算回数: 512回

直接結合している $\text{NH}_3^+$ だけでなく、2結合離れた $\text{CH}_2$ プロトンでも相関が見られている。



**Fig. 7.**  $^1\text{H}$ - $^{14}\text{N}$  D-HMQC spectrum of glycyl-L-alanine at 70 kHz MAS at the magnetic field of 11.7 T. Single quantum coherences were selected in the  $^{14}\text{N}$  dimension. An SR4<sub>1</sub> recoupling period of  $8\tau_r$  (114  $\mu\text{s}$ ) was applied during both the excitation and reconversion periods. 16 rotor-synchronized  $t_1$  increments ( $\Delta t_1 = 1/\nu_r = 14.3 \mu\text{s}$ ) with 2 scans per  $t_1$  point were collected. Total number of scans was 64. The  $^{14}\text{N}$  pulse widths were 7  $\mu\text{s}$  and applied at 21.0 kHz (581 ppm).  $^1\text{H}$  slices through the two  $^1\text{H}$ - $^{14}\text{N}$  resonances, and experimental and calculated  $^{14}\text{N}$  projections are also shown. Calculated spectra were obtained using the previously reported values (qcc = 3.25 MHz,  $\eta = 0.4$  for NH and qcc = 1.25 MHz,  $\eta = 0.51$  for  $\text{NH}_3^+$ ) [25].

グリシル-アラニンの  
 $^1\text{H}$ - $^{14}\text{N}$  D-HMQCスペクトル  
試料量: 0.8  $\mu\text{L}$   
1mmMASプローブ  
MAS: 70kHz  
 $H_0$ : 11.7T  
積算回数: 64回  
積算時間: 2分

2つの化学的に非等価なNサイトがある: $\text{NH}_3^+$ とNHでは、NHの方が四極子結合が大きい。 $^{14}\text{N}$ 次元のピーク位置は2次の等方的四極子シフトによって支配されており、ピーク間隔が30kHzにもおよんでいる。非常に広いスペクトル幅を持つ超高速MASによって、 $^{14}\text{N}$ 次元でのシグナルの重なりがない。

5月29日, 番号, 氏名

(1)NMRに関する授業を次年度以降も行うとしたら, どのように改善すれば, より良く理解できるようになるかを, 自分の研究でNMRを利用している立場あるいは, 全く利用していない立場から提案して下さい。

(2)レポート課題 [1]NMRが利用されている論文の要約をA4版2枚にまとめる. 文章だけでなく, NMRスペクトルなどの図も載せて下さい。

締切:7月29日(火) 提出場所:4号館316号室前, あるいはpdfファイルかWordファイルをメール添付で送付する.

送付先アドレス:smaeda@u-fukui.ac.jp