

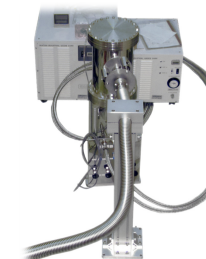
岡山大学自然生命科学研究支援センター 共同利用機器 講習会
最新型 JEOL 600MHz NMRセミナー

2020.10.13
日本電子株式会社
科学・計測機器営業本部 朝倉克夫

SuperCOOLプローブ



- 観測核種: ^{31}P ~ ^{15}N , ^1H , ^{19}F
- ^{13}C : 3倍, ^1H : 3倍以上*の高感度
*同型室温プローブと比較して
- 感度が3倍 = **測定時間が1/9**
- 試料温度範囲: $-40 \sim 150 \text{ }^\circ\text{C}$
- 冷却水循環装置不要
- プローブアームによる、比較的容易なプローブ交換を実現



ECZ600R w/ SuperCOOLプローブ



SuperCOOLプローブで高温測定をする際の注意

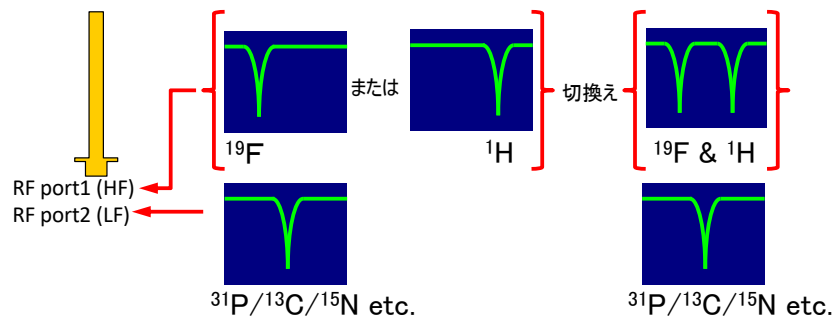


100°C以上の高温測定時には、
専用のローターを使用します。

※通常のローターを使用すると、高温時に
試料回転やEjectができない場合があります。

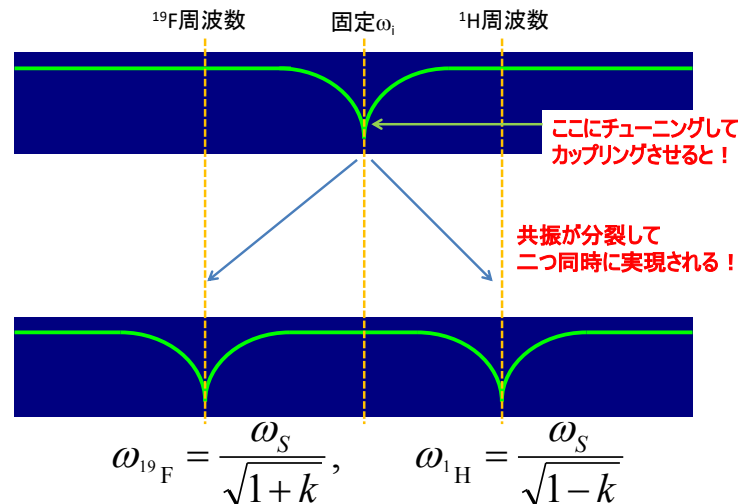
ROYAL HFX プローブ

2ports 2重共鳴、3重共鳴切換え型ROYAL HFXプローブの例



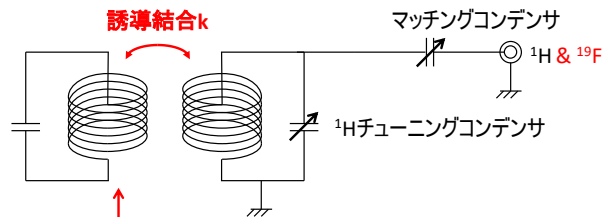
新技術ROYAL HFX プローブ切換え原理

まとめると



新技術ROYAL HFX プローブ切換え原理

1port 2重共振回路ROYAL HFXプローブ



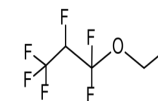
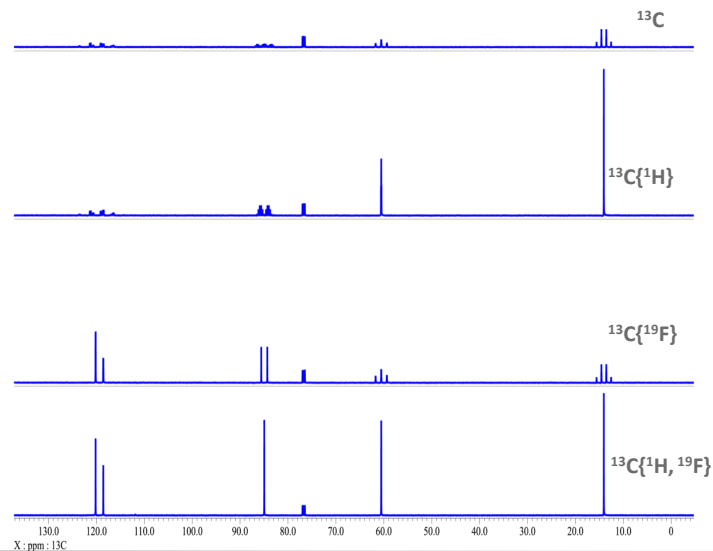
High Qの並列共振回路のIdlerコイル

と、

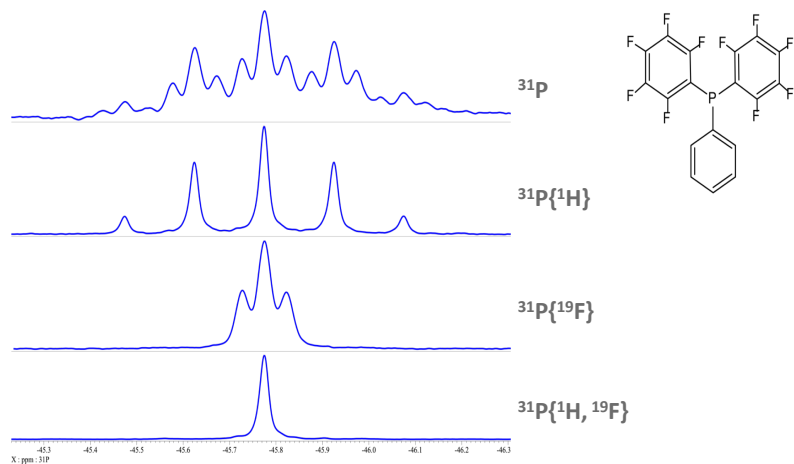
サンプルコイルを誘導結合させる。

特許出願済: PCT/US16/26604

ROYAL HFX プローブ - 13C{1H, 19F}



ROYAL HFX プローブ - $^{31}\text{P}\{^1\text{H}, ^{19}\text{F}\}$

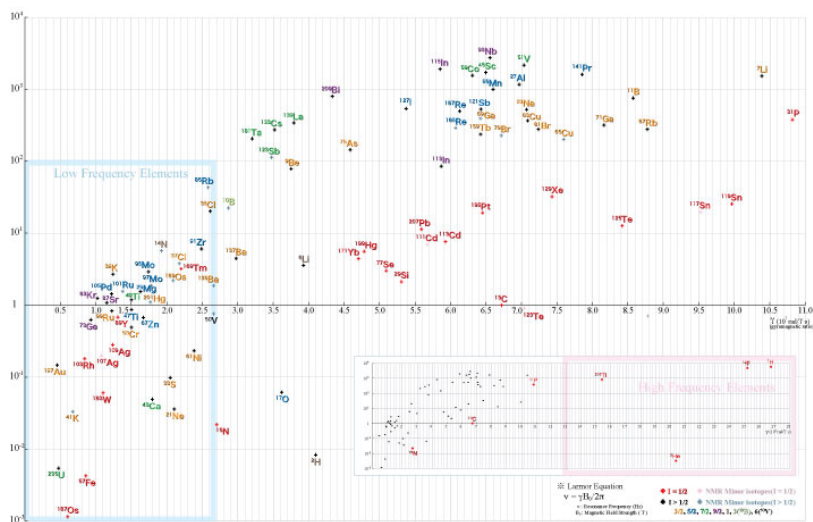


1次元および2次元NMR測定

設定すべきパラメータとは



Φ 10mm 低周波数プローブ



測定パラメータ

Header	Instrument	Acquisition	Pulse	ダイアグラム	★ Favorites
storage_filename	\$(SAMPLE)_proton	\$(SAMPLE)_\$(EXP.filename)			
filename	proton				
comment	single_pulse				
auto_filter	<input checked="" type="checkbox"/>				
auto_gain	<input type="checkbox"/>				
filter_limit	8				
force_tune	<input type="checkbox"/>				
save_aborted	<input checked="" type="checkbox"/>				
fsqd_factor	1				

¹H NMR



¹H NMRから得られる情報

- 積分値 ¹Hの数の帰属
- スピン結合 構造のつながりの帰属
- 化学シフト 置換基の帰属
- (重水素交換) 交換性¹Hの帰属

¹H NMR

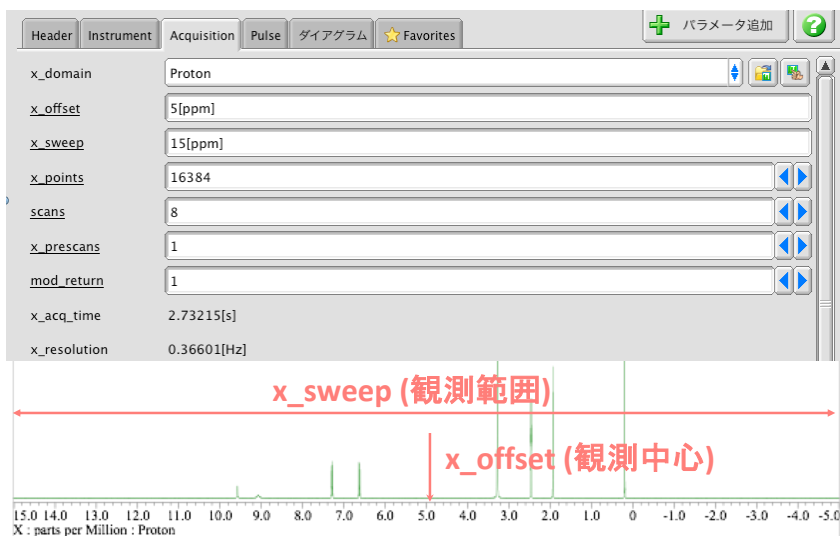


観測範囲

信号取得時間 (FIDの長さ)
= (x_points - 1) / x_sweep

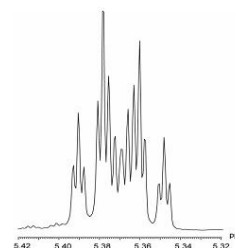
デジタル分解能 (FT後のデータ点の間隔)
= x_sweep / (x_points - 1)

¹H NMR

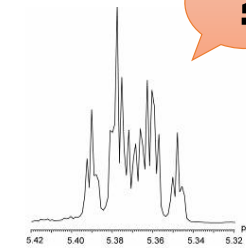


Q. 400 MHz と 600 MHzの装置を使っています。
同じ条件で測定したら600の方が分解能が悪いみたい？

¹H NMR

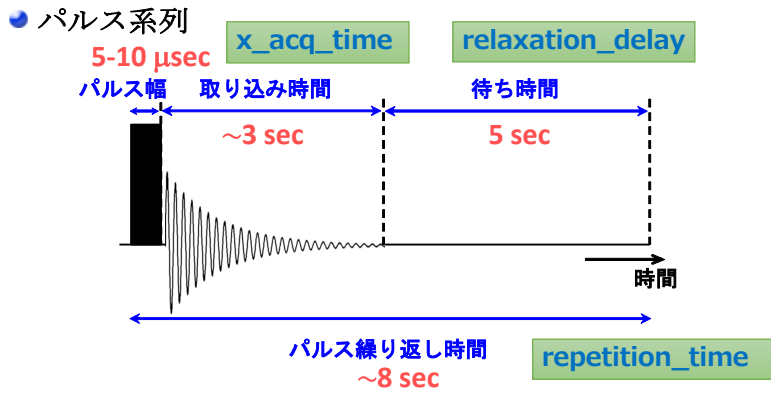


400 MHz



600 MHz

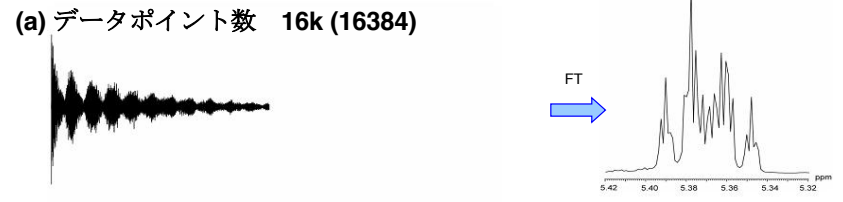
シングルパルス測定



$$\star \text{取り込み時間 (sec)} = \frac{\text{データポイント数}}{\text{観測範囲 (Hz)}} = \frac{1}{\text{デジタル分解能 (Hz)}}$$

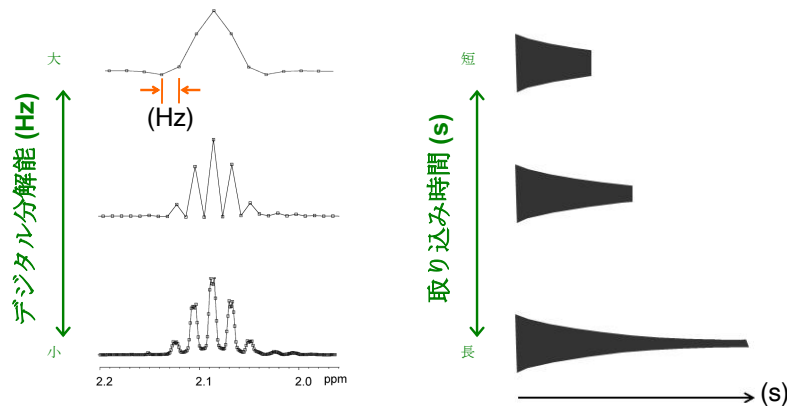
デジタル分解能と取り込み時間

$$\star \text{取り込み時間 (s)} = \frac{\text{データポイント数}}{\text{観測範囲 (Hz)}} = \frac{1}{\text{デジタル分解能 (Hz)}}$$



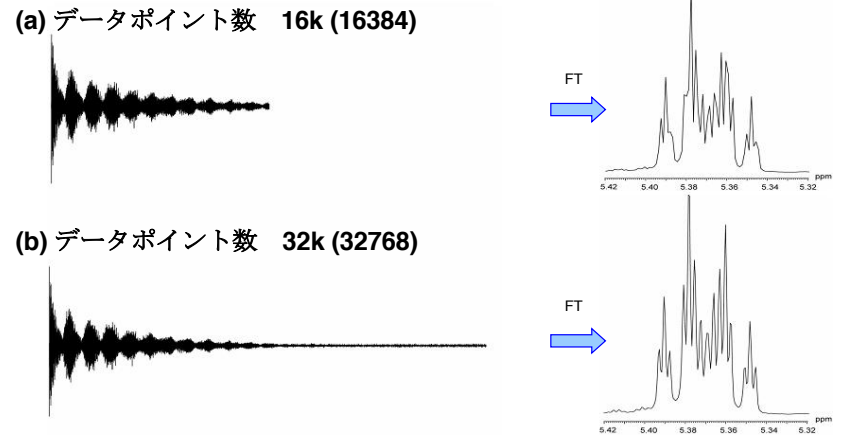
デジタル分解能と取り込み時間

$$\star \text{デジタル分解能 (Hz)} = \frac{\text{観測範囲 (Hz)}}{\text{データポイント数}} = \frac{1}{\text{取り込み時間 (s)}}$$



取り込み時間とデジタル分解能

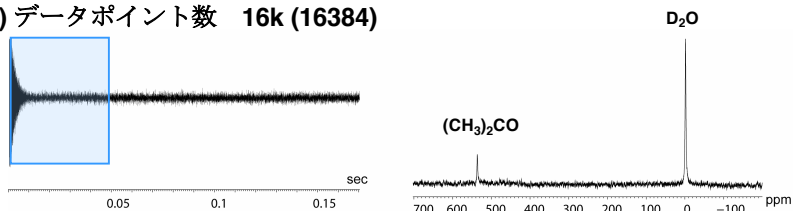
$$\star \text{取り込み時間 (s)} = \frac{\text{データポイント数}}{\text{観測範囲 (Hz)}} = \frac{1}{\text{デジタル分解能 (Hz)}}$$



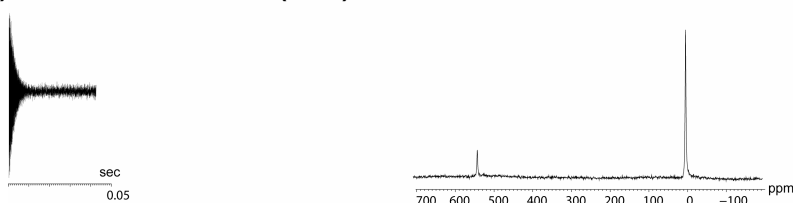
取り込み時間とデジタル分解能 (^{17}O NMRの場合)

アセトン (D_2O 溶液)

(a) データポイント数 16k (16384)

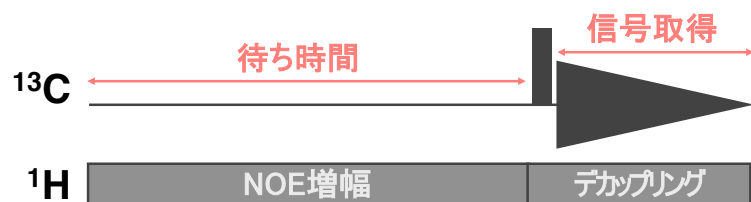


(b) データポイント数 4k (4096)



21

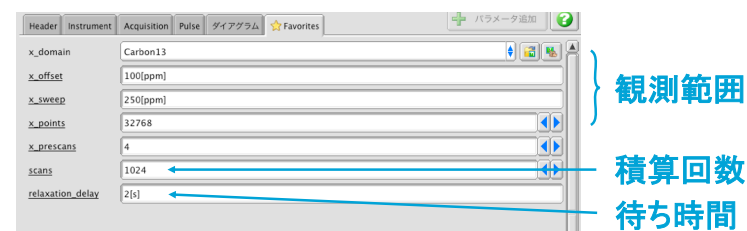
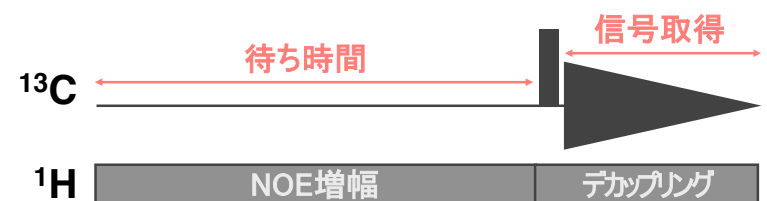
^{13}C NMR



^{13}C NMRから得られる情報

- 信号の数 ^{13}C の数の帰属
- 化学シフト 置換基の帰属

^{13}C -NMRのパラメータ

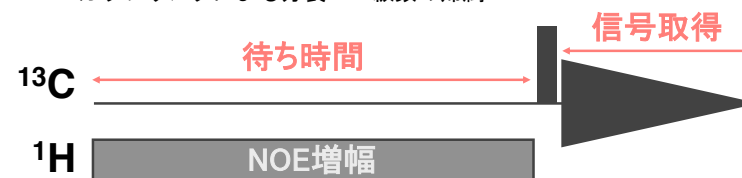


Solutions for Innovation JEOL

ちょっと特殊な ^{13}C NMR

ゲート付きデカップリング

- ^1H カップリングによる分裂 → 級数の帰属



逆ゲート付きデカップリング

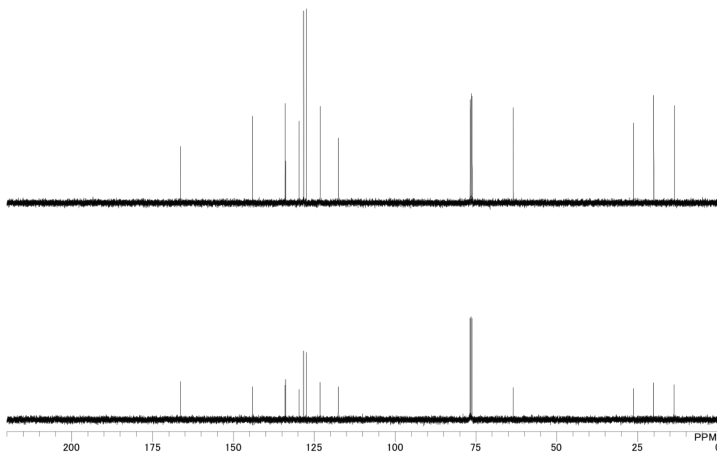
- 定量的 ^{13}C 測定



Solutions for Innovation JEOL

Solutions for Innovation JEOL

逆ゲート付きデカップリング



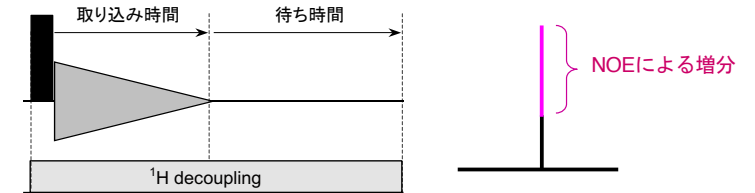
初期設定（デフォルト条件）で測定した¹³Cスペクトルに定量性はありません。

25

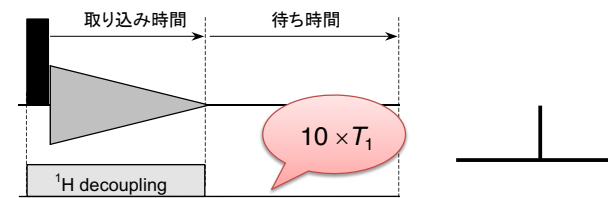
Solutions for Innovation JEOL

¹³C の 信号強度とNOE

(a) 通常測定 (NOE あり)



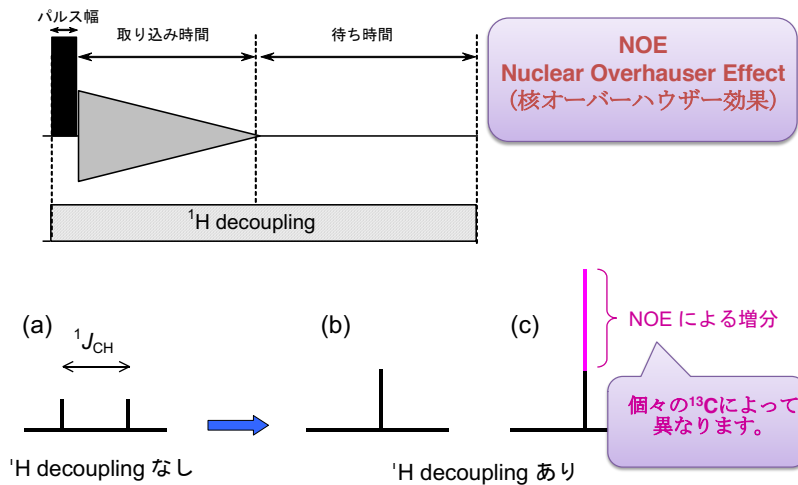
(b) 逆ゲート付き デカップリング (NOE を抑える)



27

Solutions for Innovation JEOL

¹³C の 信号強度

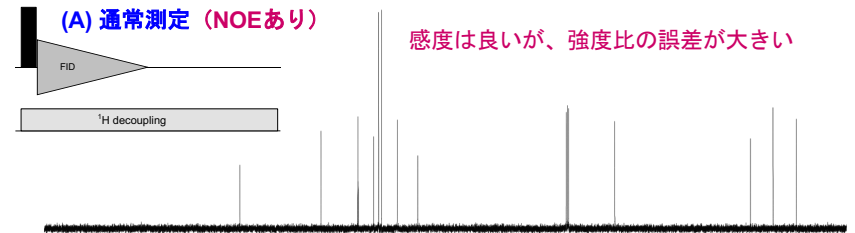


26

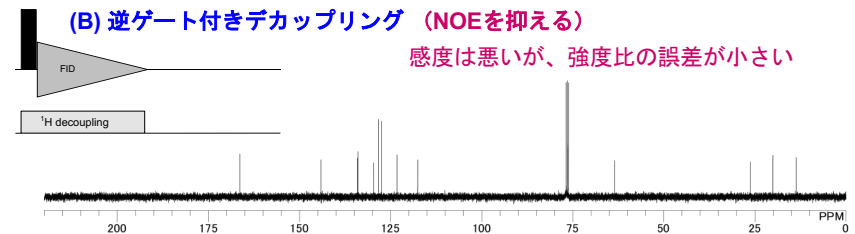
Solutions for Innovation JEOL

¹³C の 信号強度とNOE

(A) 通常測定 (NOEあり)



(B) 逆ゲート付きデカップリング (NOEを抑える)



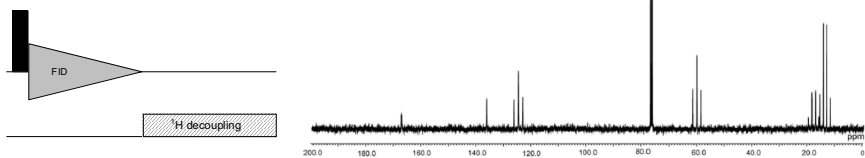
28

Solutions for Innovation JEOL

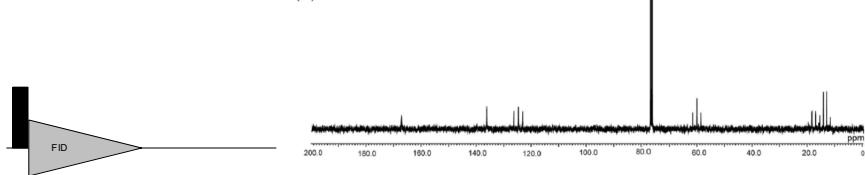
ちょっと特殊な ^{13}C 測定

(C) ゲート付きデカップリング

(C) ゲート付き ^1H デカップリング法



(D) ^1H デカップリング OFF



メタクリル酸エチル (10% CDCl_3 溶液) の ^{13}C スペクトル

※オフレゾナンスデカップリング法を使う場合もある

^{13}C -DEPT NMR

^{13}C -DEPT NMRから得られる情報 - 各炭素の級数の帰属

	1 級炭素	2 級炭素	3 級炭素	4 級炭素
	$-\text{CH}_3$	$-\text{CH}_2$	$-\text{CH}$	$-\text{C}-$
DEPT45	↑	↑	↑	—
DEPT90	—	—	↑	—
DEPT135	↑	↓	↑	—

ちょっと特殊な ^{13}C NMR

DEPTのパラメータ

選択角
(45, 90, 135)

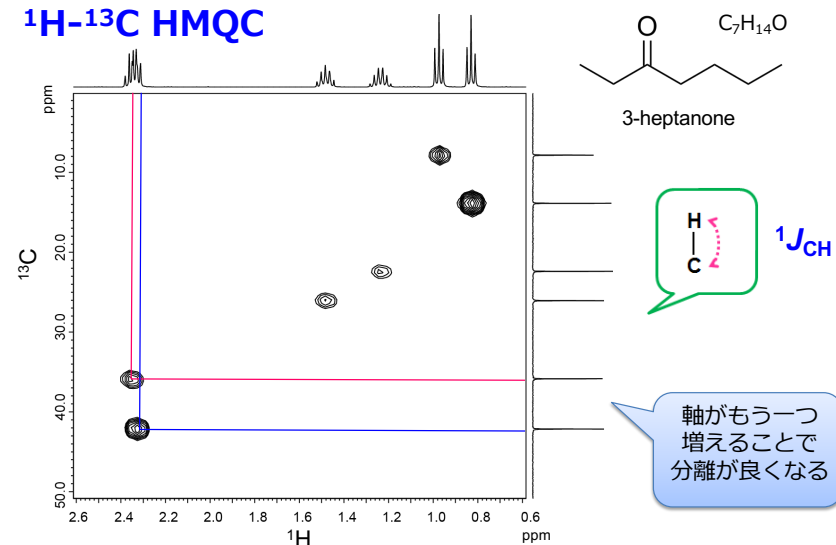
※試料回転

試料回転して測定するのは1次元測定だけ！

- 1次元であっても、マルチパルス実験では原則として試料回転はおこなわない。
- 感度 (S/N) 低下の原因になります。
- 不要信号 (アーティファクト) の原因にもなり得ます。

2次元スペクトルの便利なところは？

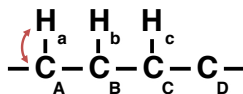
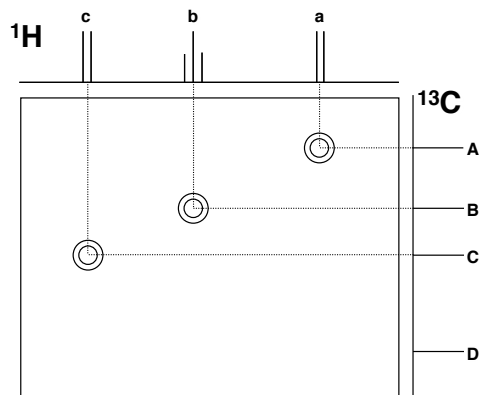
¹H-¹³C HMQC



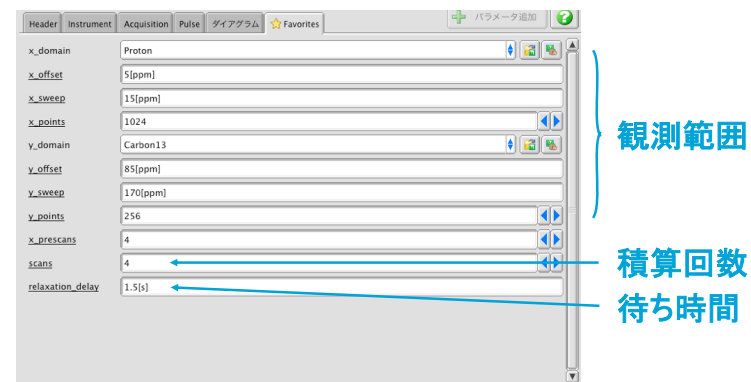
CH関連スペクトル

HMQC, HSQC, CH-COSY

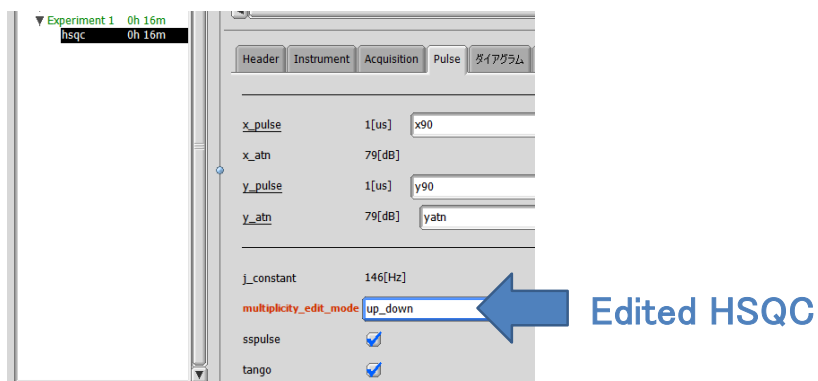
- 直接結合した炭素と水素を帰属する



HMQCのパラメータ

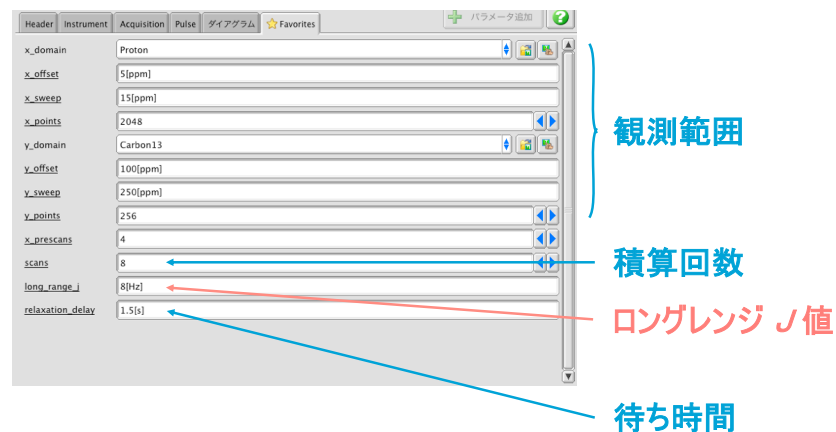


HSQCのパラメータ



DEPT測定同様、CH₃,CHの信号とCH₂の信号の符号が逆転する(色が変わる)。

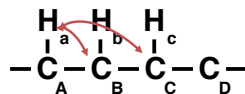
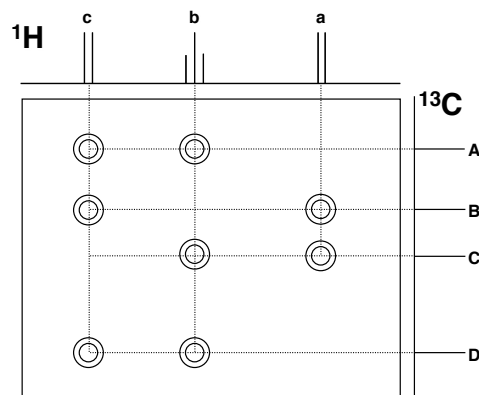
HMBCのパラメータ



Long Range CH関連スペクトル

HMBC, COLOC

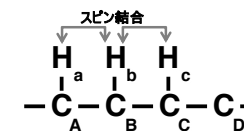
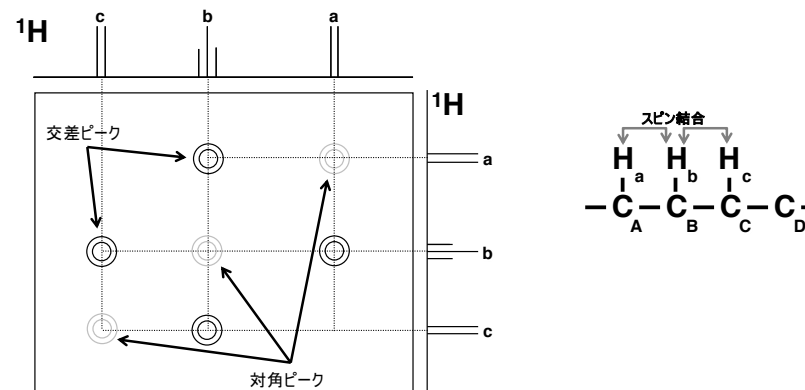
- 2結合以上離れた炭素と水素を帰属する



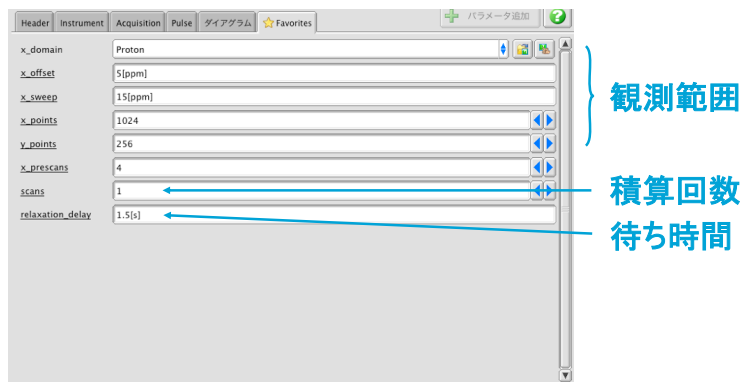
HH関連スペクトル

HH-COSY

- スピン結合した水素同士を帰属する(¹³Cのつながり)



COSYのパラメータ

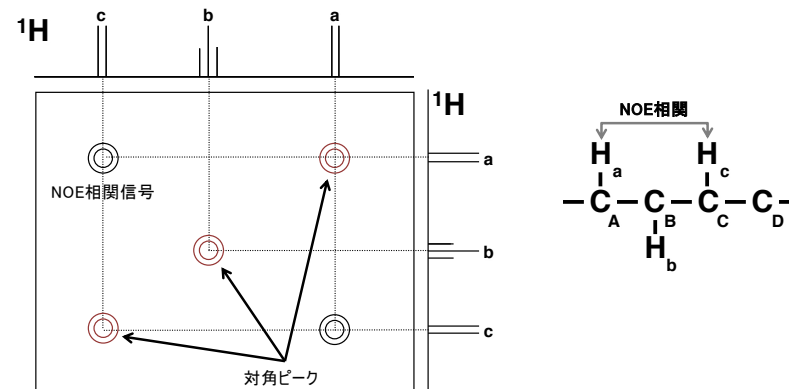


41

NOE関連スペクトル

HH-NOESY

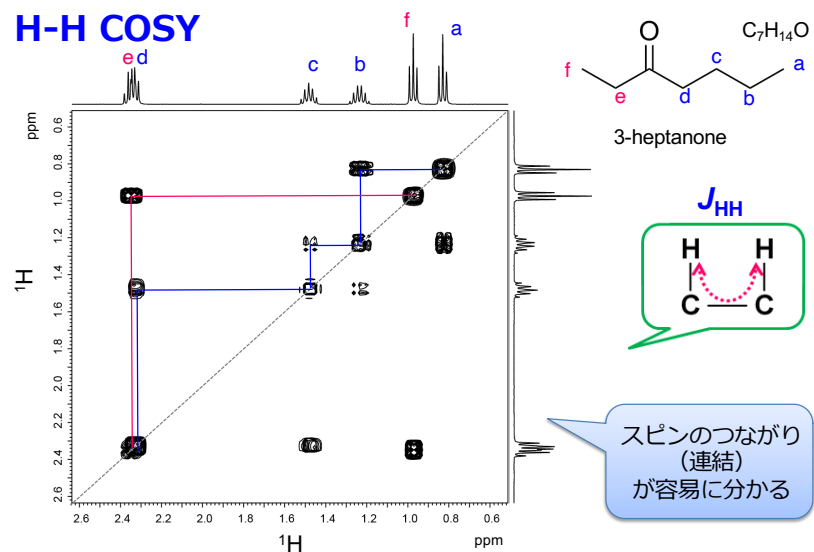
- 空間的に近い水素同士 (6Å以内) を帰属する



43

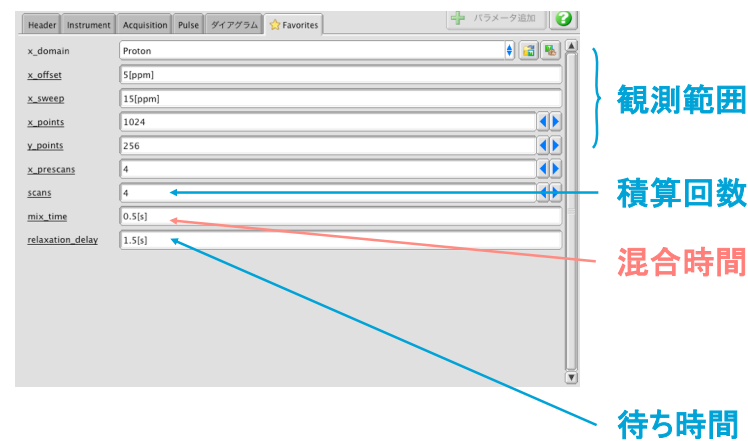
2次元スペクトルの便利なところは？

H-H COSY



42

NOESYのパラメータ



44

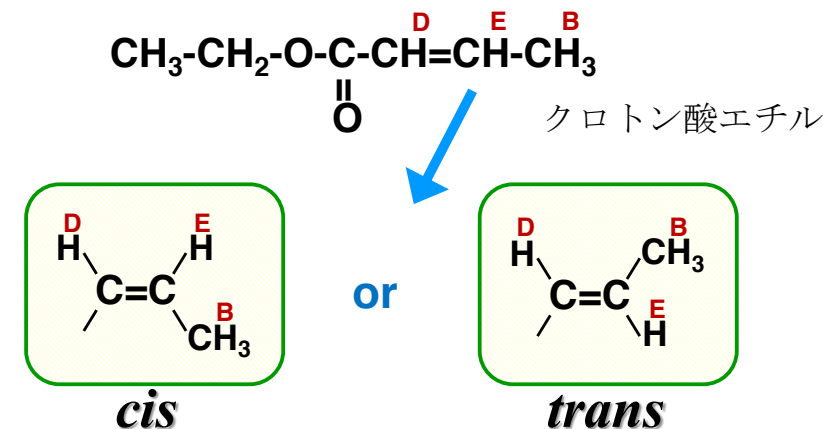
NOE測定
～立体化学への手引き～

NOESY & ROESYの概要と使い方



はじめに

cis か *trans* を決めたい



差NOE法によってCH₃(B)に注目してNOEを観察する。

47

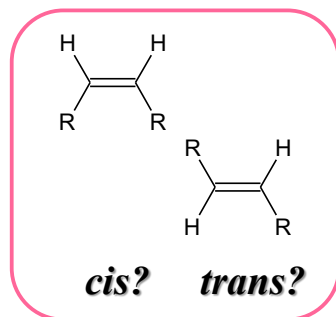
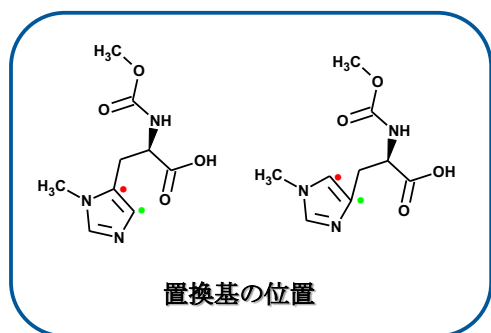
Solutions for Innovation JEOL

はじめに

NOEを利用した立体化学的考察

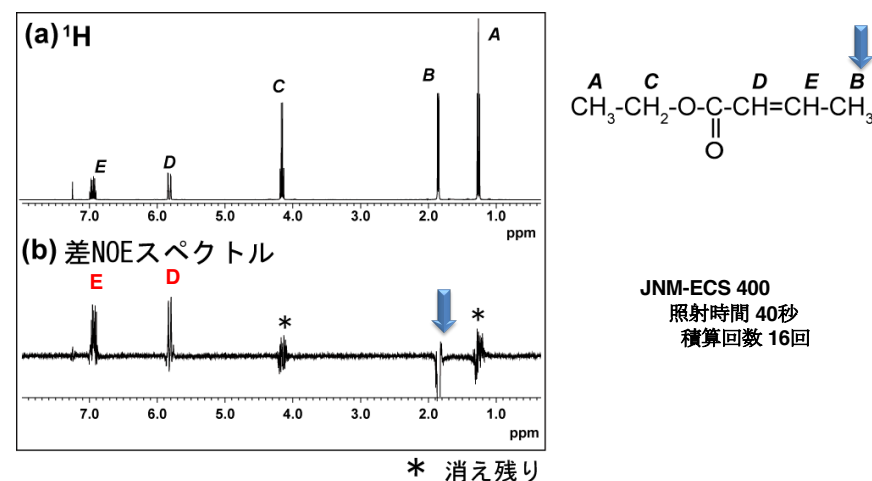
NOE : Nuclear Overhauser Effect

空間的に近い距離にある¹Hを確認できる



はじめに

差NOEスペクトル



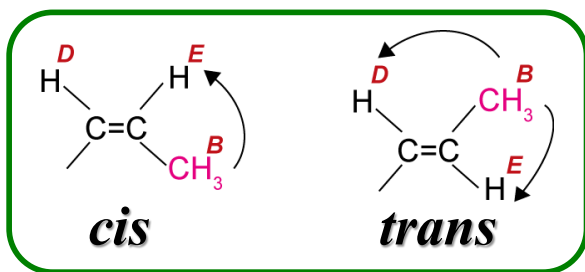
46

Solutions for Innovation JEOL

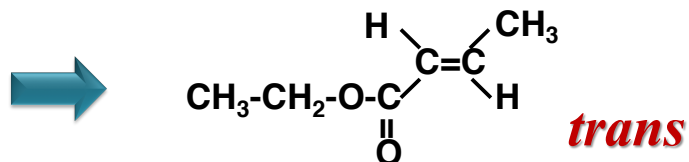
48

Solutions for Innovation JEOL

差NOE測定結果



Bを照射してDとEにNOEが見られる



NOEを観測するNMR法について

NOEの種類	測定名
定常状態NOE (steady state NOE)	差NOE
過渡的NOE (transient NOE)	2D-NOESY
	1D-NOESY (DPFGSE-NOE)

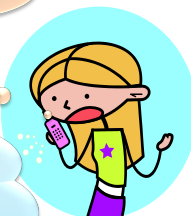
NOE測定で困った!! と思うこと

NOEが出ないんです!!

測定サンプルの緩和時間 (T_1) をはかってください!

差NOEでは照射時間を T_1 の5倍以上

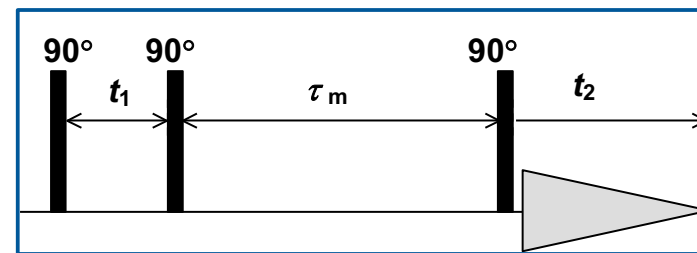
NOESYでは混合時間を T_1 程度



2D-NOESY

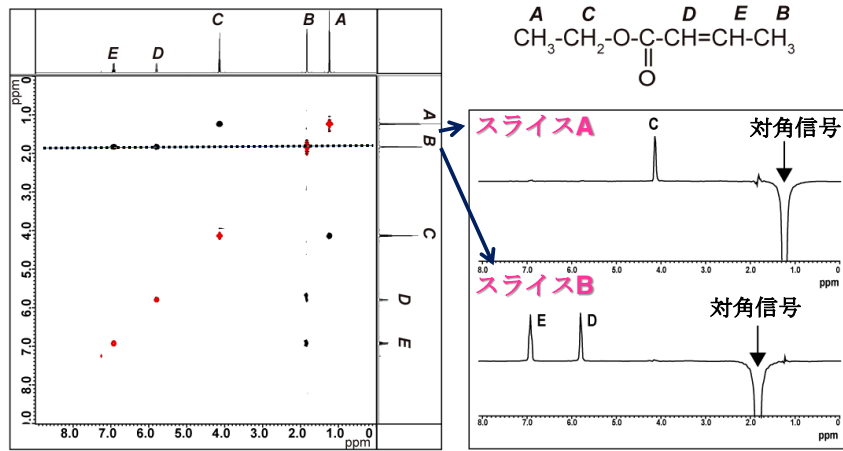
過渡的NOE (transient NOE)

展開時間(t_1)の直後にでスピン占有数に変動を与えて
混合時間(τ_m)の間でNOE成長させる

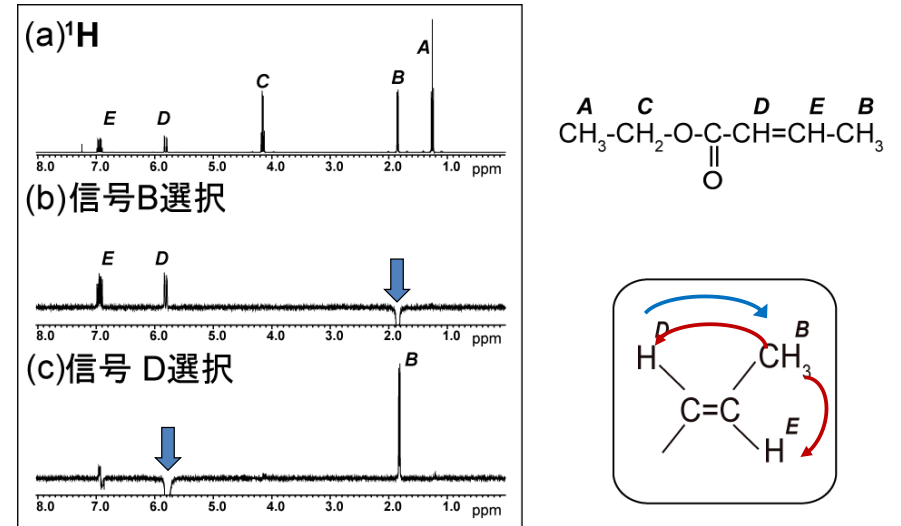


2D-NOESYのパルスシーケンス

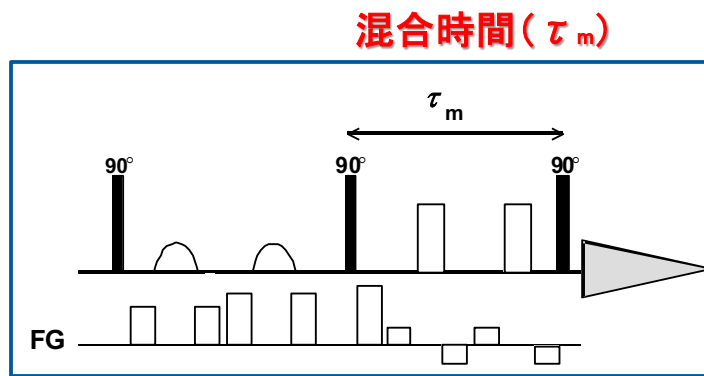
2D NOESYスペクトル



1D NOESYスペクトル

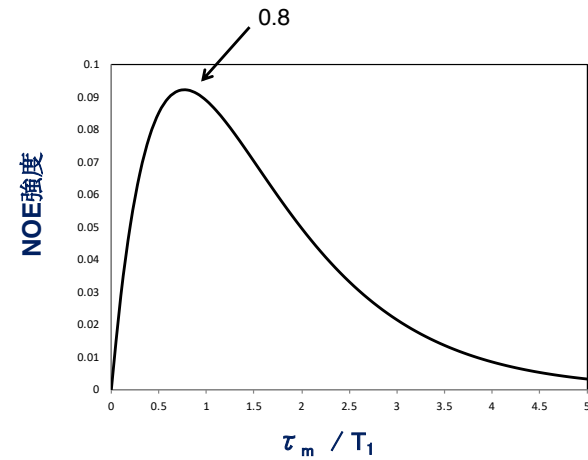


1D-NOESY



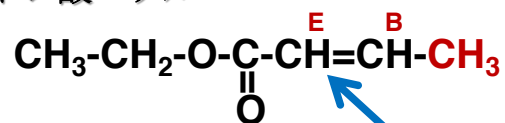
1D-NOESYのパルスシーケンス

過度的NOE強度と混合時間 (τ_m)



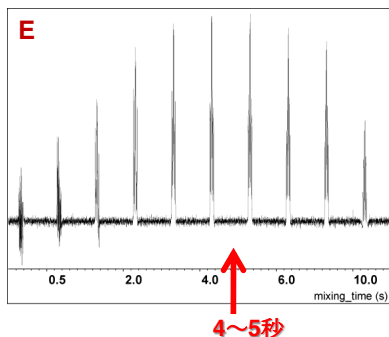
*双極子緩和とそれ以外の緩和が等しい時

クロトン酸エチル

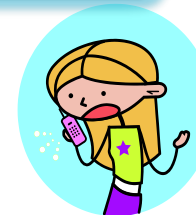


T₁=5.9秒

T₁から予測できる混合時間
4.7秒 (5.9×0.8)



サンプル調製の注意点は?



NOE測定の違い方

どれ??

- 分子全体のNOEの観測
 - 帰属が確かでないとき
- 2D-NOESY**

- 注目信号のNOEの観測
- 1D-NOESY**
差NOE



サンプル調製で気をつけること

- ① 濃度
極端に濃くしない
分子間の緩和
- ② 常磁性物質
酸素、金属イオンに注意。
常磁性物質との緩和

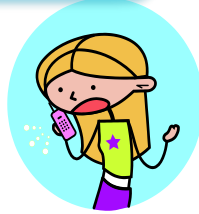
$$\eta_i \{S\} = \left[\frac{W_2 - W_0}{W_0 + 2W_1^I + W_2 + \alpha} \right]$$

NOE強度を弱める

NOE測定で困った!!
知っておきたいこと

NOEが出ないんです!!

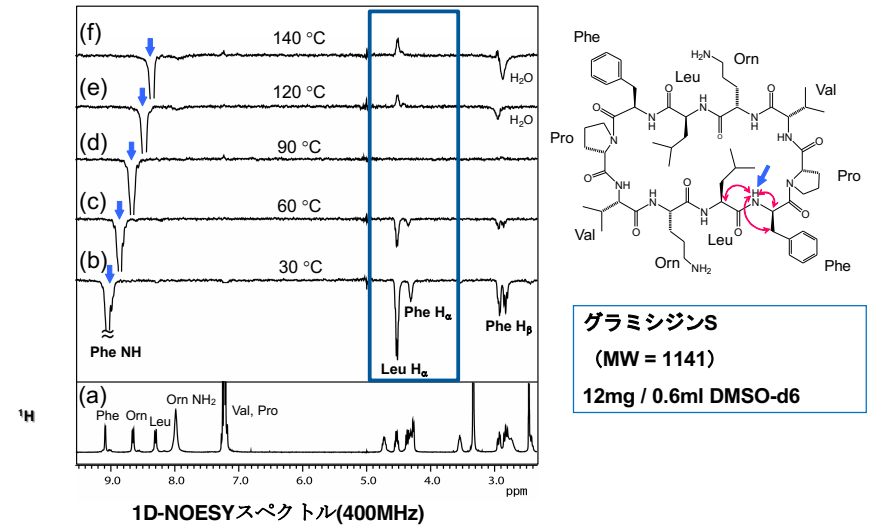
測定条件OK
試料調製OK
なのに、...



双極子相互作用は分子運動に依存する

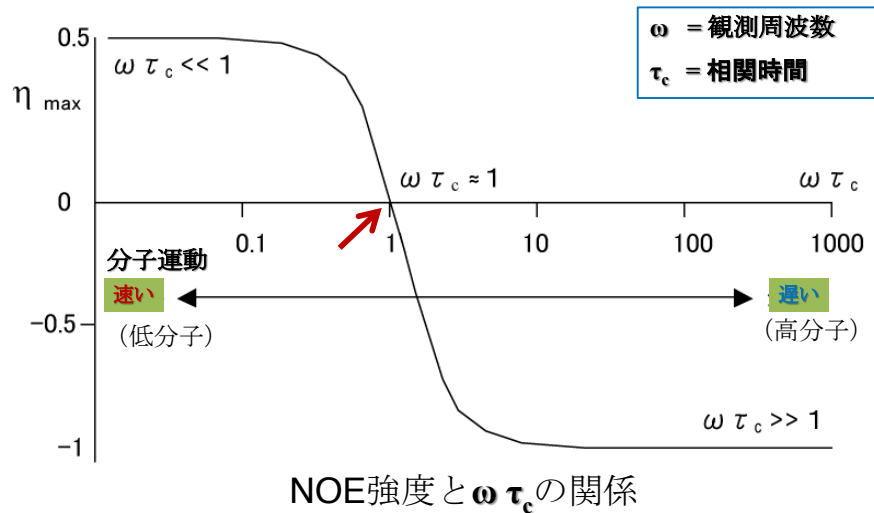
61

NOEが観測されないとき(1)
~分子の運動性を変えてみよう!!



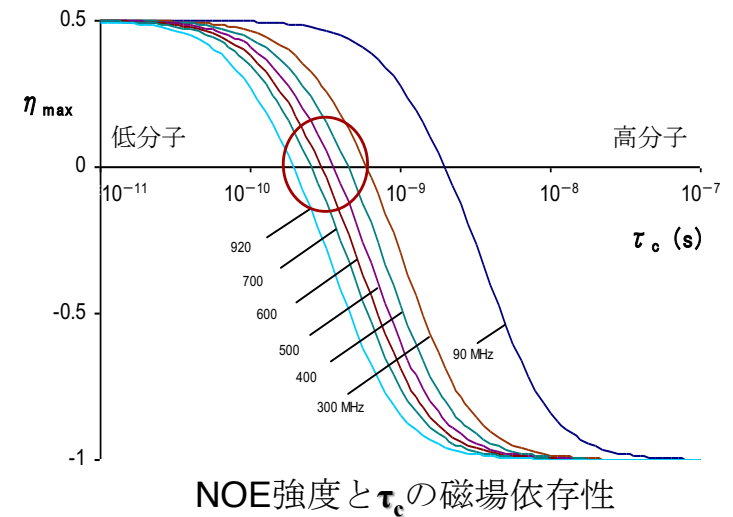
63

NOE強度と分子運動



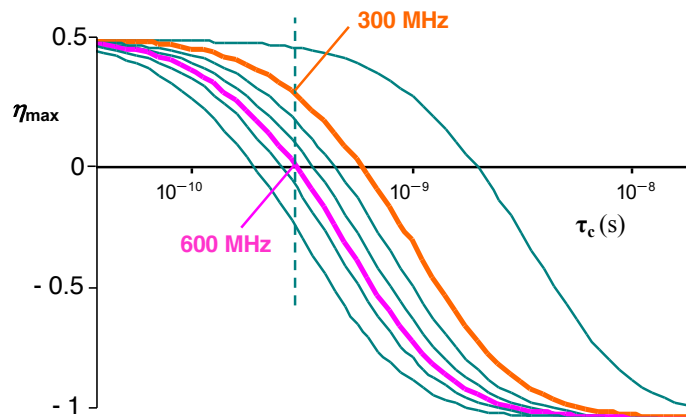
62

NOEが観測されないとき(2)
~測定磁場を変える



64

NOEが観測されないとき(2)
～測定磁場を変える



NOE強度と τ_c の磁場依存性 (拡大)

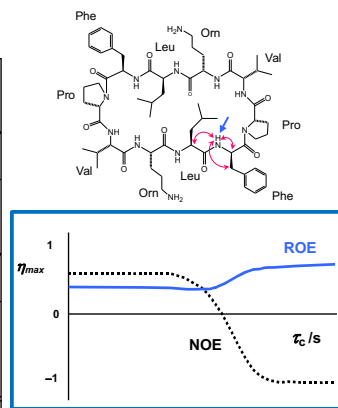
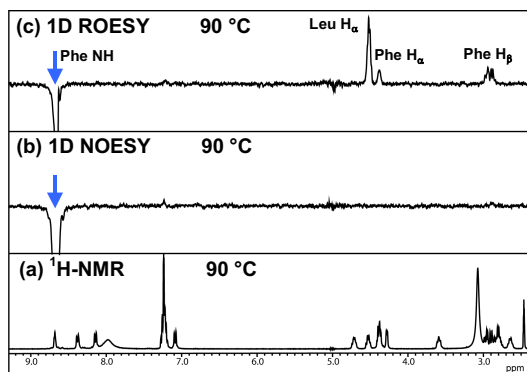
NOEが観測されないとき
～まとめ～

試料調整・測定条件を最適化してもまだ出ないとき

- ★ 分子の運動性(τ_c)を変える
→ 温度、溶媒 (粘性)
- ★ 共鳴周波数(ω)を変える
→ 異なる磁場で測定
- ★ 測定法を変える → ROESY法

NOEが観測されないとき(3)
～ROESYの出番

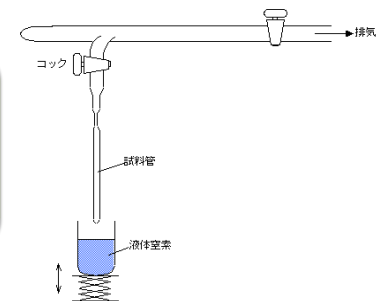
Rotating frame nuclear Overhauser Effect Spectroscopy



Q. 試料は脱気しないとイケないの？

- A. 脱気(脱ガス)とは、溶液中の溶存酸素を取り除くことです。溶存酸素の影響を考慮しなければいけないのは、低分子試料において非常に弱いNOEを観測する場合です。まずは未脱気の試料で測定を行って、うまくNOEが観測されなかったときに脱気を行うとよいでしょう。

本格的に行うのはかなり大がかりな操作になります。簡便法として、試験管内の試料溶液に N_2 ガスや Ar ガスを毛細管で吹き込み、溶存酸素と置換する方法があります。

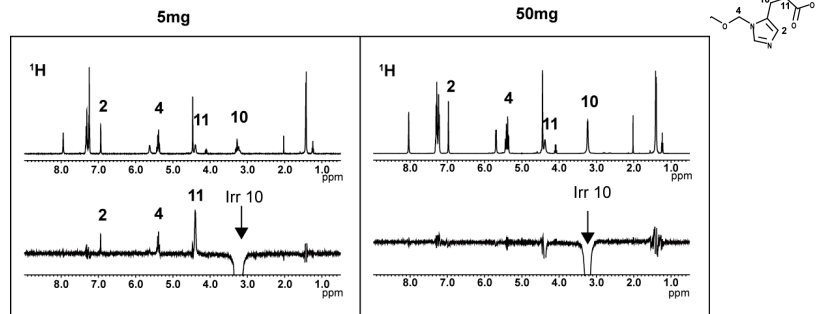


真空ラインによる脱気



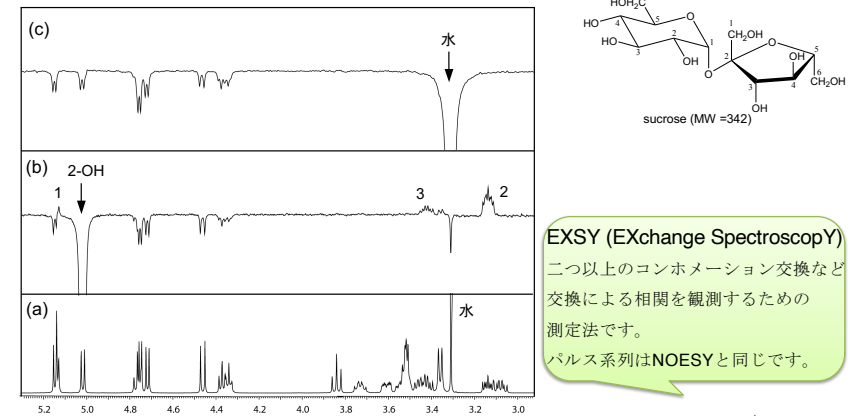
Q. 試料濃度はどのくらいがよい？

- A. 濃度を極端に濃くするのは避けた方がよいでしょう。NOE測定は弱い信号を検出する測定ですから、試料濃度が低いと多くの積算が必要となりますが、あまり濃度を高くすると逆効果になることもあります。



差NOEスペクトル（濃度の異なる試料の比較） 400 MHz

Q. 低分子なのに負のNOEが出るのはなぜ？(1)



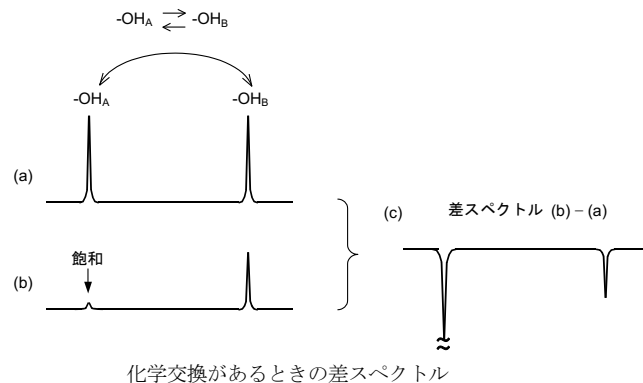
EXSY (EXchange Spectroscopy)
二つ以上のコンホメーション交換など交換による相関を観測するための測定法です。
パルス系列はNOESYと同じです。

Sucroseの1D NOESYスペクトル(10 mg/ 0.6 ml DMSO-d₆, 400 MHz)



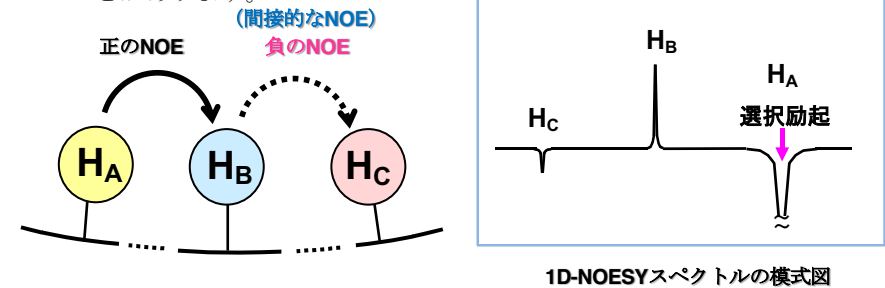
Q. 低分子なのに負のNOEが出るのはなぜ？(1)

- A. 低分子試料の差NOEスペクトルで、照射した信号と同じ向き（負のNOEの向き）に信号が観測されることがあります。これは交換性プロトン（OH, NH, NH₂, COOHなど）を照射したときによく見られ、NOEとは別の現象です。



Q. 低分子なのに負のNOEが出るのはなぜ？(2)

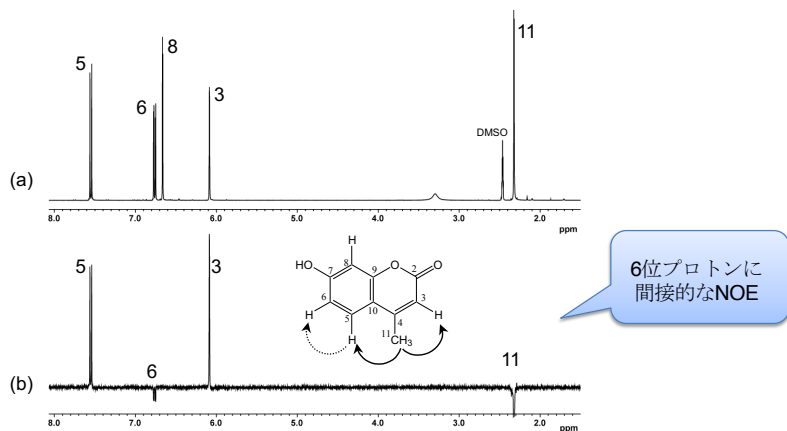
- A. 間接的なNOE（3スピン効果）と呼ばれる現象で、低分子化合物においてプロトン同士が特別な位置関係にあるとき、観測されることがあります。



ほぼ直線で並ぶ3つの¹H

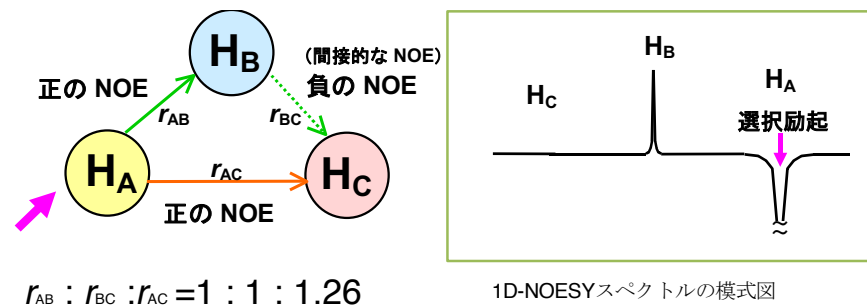
3スピン効果

Q. 低分子なのに負のNOEが出るのはなぜ？(2)



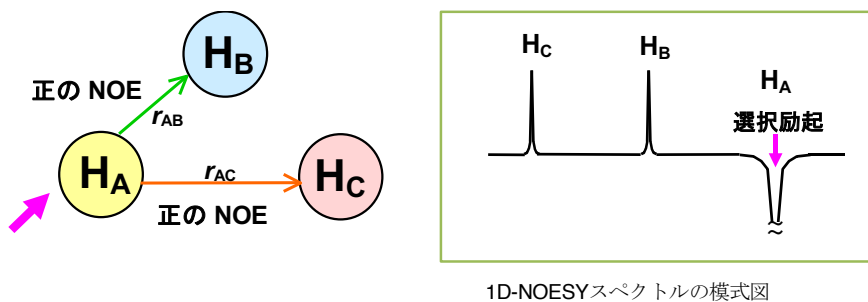
1D NOESY メチルウンベリフェロン (10 mg / 0.6 ml DMSO-d₆, 400 MHz)
 (a) 通常スペクトルと (b) 11位プロトンを選択励起したときの1D NOESYスペクトル

三角問題



空間的に近くてもNOEが観測されないこともある！

三角問題



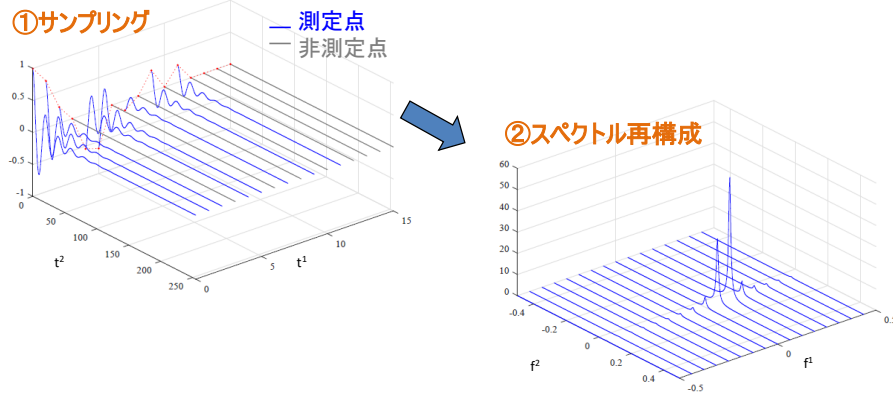
1D-NOESYスペクトルの模式図

Non-Uniformed Sampling (NUS)

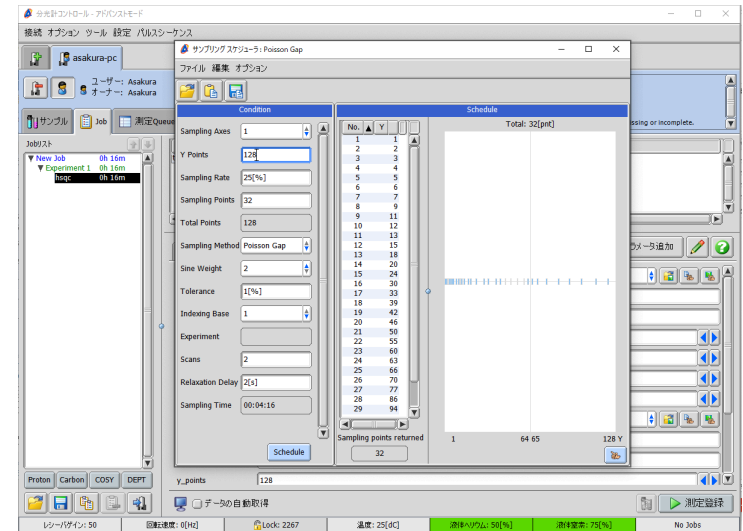
NUSとは

間接次元方向に

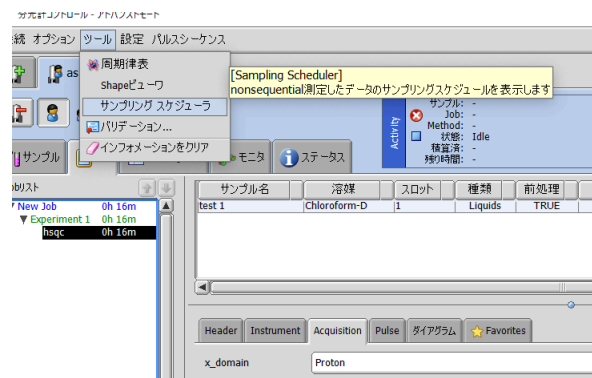
- ① 非等間隔 (non-uniform) かつ疎らに測定 (sampling) して、
- ② 数学的な手段によってスペクトルを推定 (再構成) する測定/解析手法。



サンプリングスケジューラー



NUS測定



NUSパラメータを作成するための、サンプリングスケジューラーを開きます。

NUS再構成処理 (NUS_RECONSTRUCTION)

Compressed Sensing (CS) 法に基づくスペクトル再構成法を採用しています。

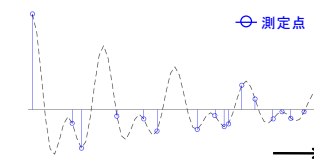
CS法

信号のスパース性の仮定の下、少ない観測データから信号を得る方法。スパース最適化の枠組みの一つ。

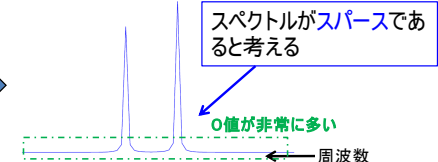
0を多く持つ性質

NUSでは...

インターフェログラム (間接軸方向のFID信号)

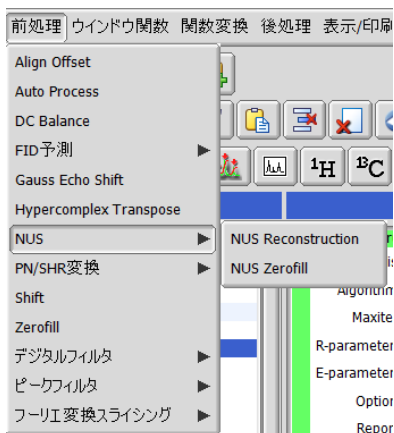


得ない信号 (スペクトル)



Delta NMR SoftwareのNUS再構成処理

Delta NMR Software では、NUS_RECONSTRUCTIONを用いることでNUSデータの再構成スペクトルをおこないます。前処理としてNUS_ZEROFILLをおこないます。



NUS_ZEROFILL:
NUS再構成の為の前処理。

NUS_RECONSTRUCTION:
NUS_ZEROFILL処理後のデータから、再構成スペクトルを求める。

2D信号の再構成 - 実行と実行後 -

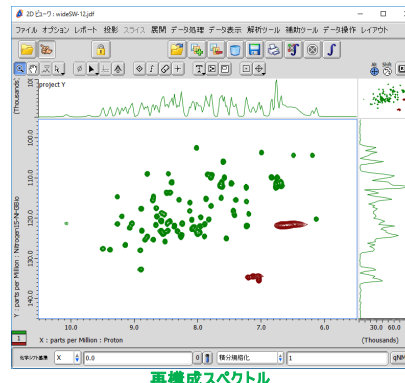
実行

- 実行ボタンまたは実行アイコンで実行されます。

実行後

以下のような、スペクトルが得られます(左図)。

Reportにチェックが入っている場合、コンソールに以下が出力されます(右図)。



```

NUS Reconstruction Report
algorithm      : ist
basis         : fft
reg. value(init) : 7.50000E-01 [s]
reg. value(min)  : 1.00000E-03 [s]
stop criteria   : diff
               : - value : 1.00000E-03
= Algorithm Part
maxiter       : 100
lambda(step)  : 7.50000E-01
= Results Part
final eval. value(mean) : 6.56001E-04
final iteration(mean)   : 25
final iteration(var)    : 1
maximum iteration count : 0
Process time           : 0.174854459 [s]
    
```

処理情報

結果情報一覧

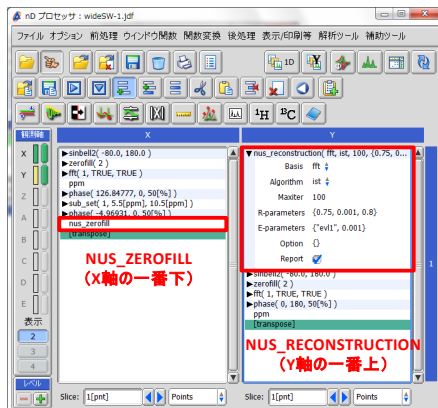
¹⁵N-HSQC spectrum (¹⁵N-labeled ubiquitin)
X*Y: 1024*64, NUS = 50%

再構成スペクトル

2D信号の再構成 - 実行前 -

プロセスリスト

- NUS_ZEROFILLをX軸の一番下に挿入する
- NUS_RECONSTRUCTIONをY軸の一番上に挿入する



NUS用のProcess Listも用意してあります (ex. 2d_inverse_phase_nus.list)

*例として上手くいかないパラメータを敢えて利用した。

Example 1. 再構成が上手くいかないパラメータ例(収束条件, 1/2)

処理条件*

```

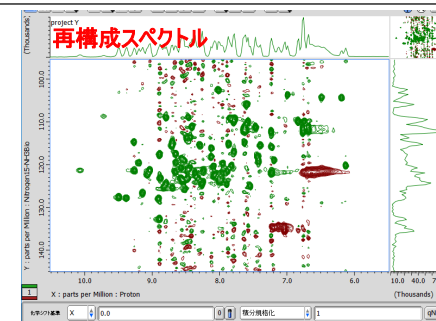
▼ nus_reconstruction(fft, ist, 10, {0.1, 0.0...}
Basis  fft
Algorithm  ist
Maxiter  10
R-parameters  (0.1, 0.001, 0.2)
E-parameters  ("ev1", 0.001)
Option  ()
Report  [x]
▶ sinbellz(-80.0, 180.0)
▶ zerofill(2)
▶ fft(1, TRUE, TRUE)
▶ phase(0, 180, 50[%])
[transpose]
    
```

*上手くいかないパラメータを敢えて利用した。

処理結果

```

NUS Reconstruction Report
algorithm      : ist
basis         : fft
reg. value(init) : 5.00000E-02 [s]
reg. value(min)  : 1.00000E-03 [s]
stop criteria   : diff
               : - value : 1.00000E-03
= Algorithm Part
maxiter       : 10
lambda(step)  : 5.00000E-01
= Results Part
final eval. value(mean) : 1.02976E-03
final iteration(mean)   : 10
final iteration(var)    : 1
maximum iteration count : 266
Process time           : 0.075043866 [s]
    
```



問題点

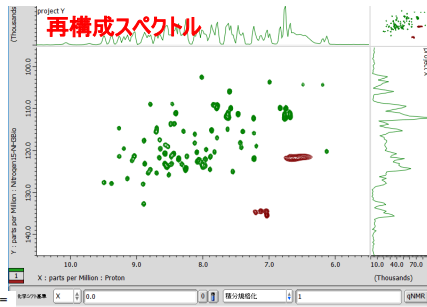
maximum iteration count: 最大試行回数で未収束
X軸が512点あるなか266点の再構成において収束していない

解決案

↓
最大試行回数を増やす

Example 1. 再構成が上手くいかないパラメータ例(収束条件, 2/2)

処理条件



処理結果

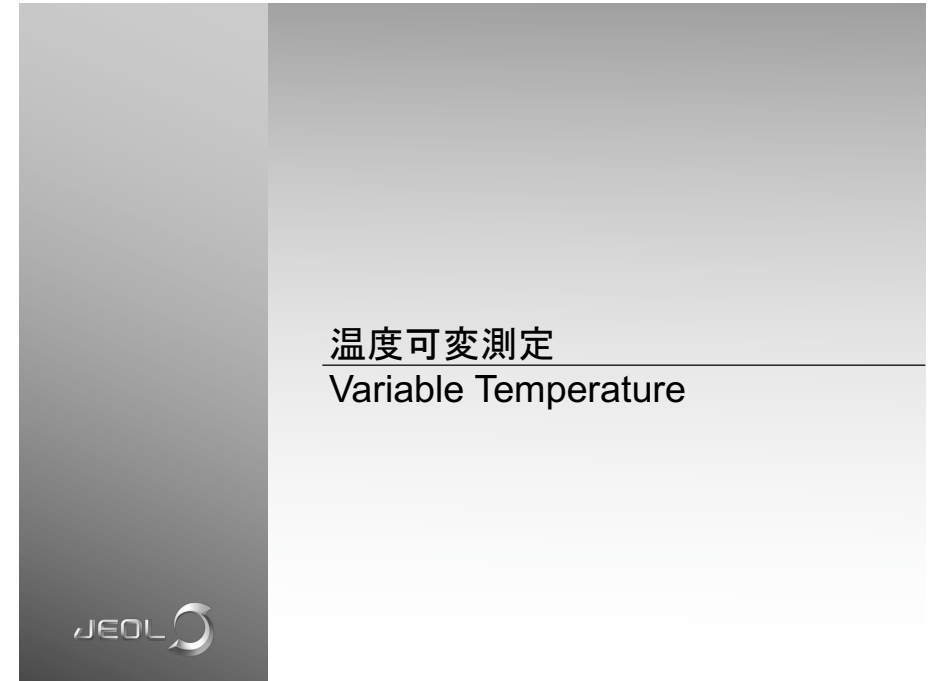
```

===== NUS Reconstruction Report =====
algorithm      : ist
basis          : fft
reg. value(init) : 1.00000E-01 [%]
reg. value(min)  : 1.00000E-03 [%]
stop criteria   : diff
- value        : 1.00000E-03

===== Algorithm Part =====
maxiter        : 1000
lambda(step)   : 2.00000E-01

===== Results Part =====
final eval. value(mean) : 9.12914E-04
final iteration(mean)   : 34
final iteration(var)    : 44
maximum iteration count : 0
Process time           : 0.240789723 [s]
    
```

平均で34試行で収束
すべてのデータが収束



NUSのまとめ

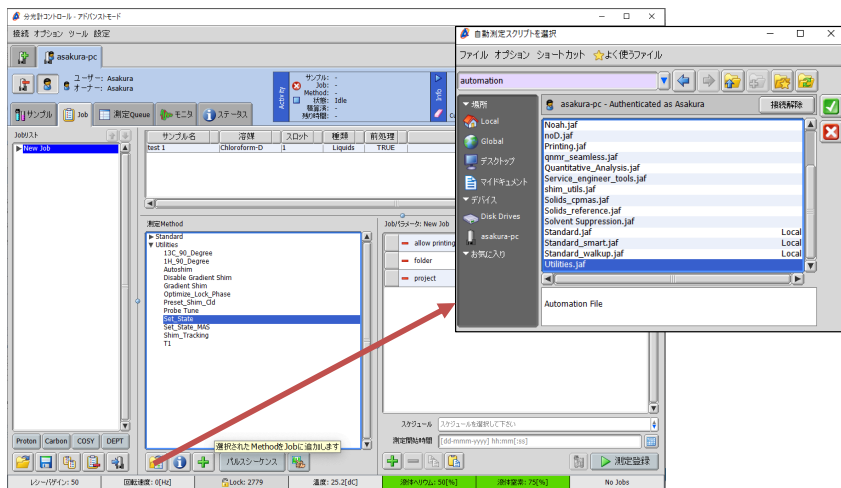
- CS法(スパース性に基づく信号復元)は, NUSに限らず画像処理や音声信号処理などで広く用いられているアプローチです。
- 調整パラメータが存在し, この値によって少なからず結果が変わります (といってもめったに問題になりません)。
そのため, FFTと同じ感覚では使うことは出来ないことを認識ください。

適切に使用すればNUSは非常に強力なツールになります。Delta NMR Softwareでは二次元, 三次元ともに非常に簡単にNUSを利用できます。この機会に是非ご活用して頂ければ幸いです。

サンプル定義における測定温度設定

※SuperCOOL プローブの温度可変範囲は-40°C~150°Cです。

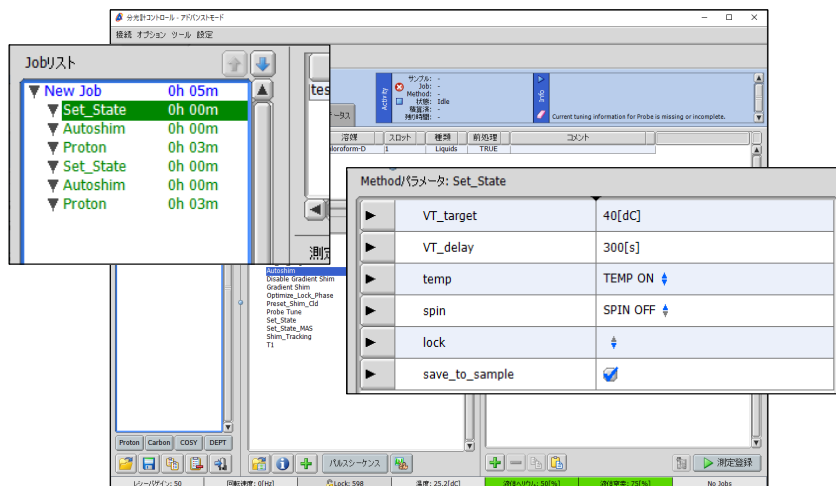
Utilities/Set_State Method



No-D NMR

~重水素溶媒を用いない測定法~

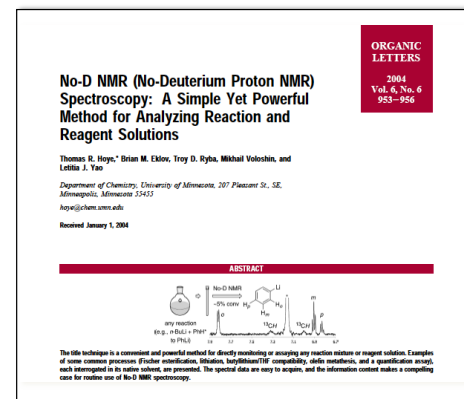
Utilities/Set_State Method



プログラマブルな温度可変測定が可能です。

No-D NMRとは

Organic Letterで2004年に紹介されている重水素溶媒を必要としない方法。



分解能調整

¹H選択的グラジエントシム

グラジエントシムが利用可能な条件

→ 観測される信号が1本であること
(通常は重溶媒の²H信号か軽水の¹H信号を利用)

そのままでは利用できないケース

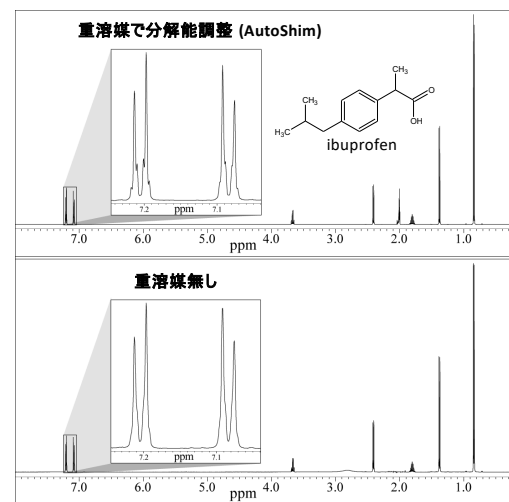
- 信号が複数ある溶媒: MeOH-*d*₄, Toluene-*d*₆, DMF-*d*₇, THF-*d*₈ etc.
- ¹H信号を使う場合

選択励起により、信号を1本と見なす。

→ 選択的グラジエントシム

No-D NMRでは溶媒信号を用い、¹H選択的グラジエントシムによって分解能調整を行う。

分解能調整

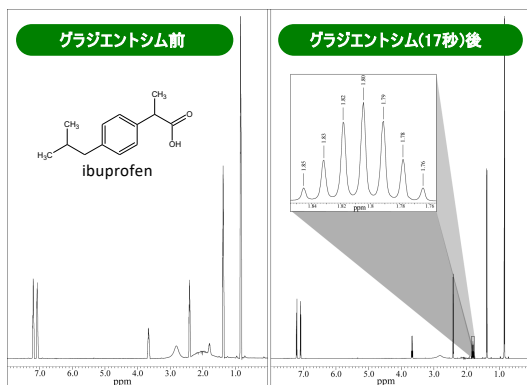


論文掲載のための測定では重水素化溶媒を使うことが望ましいが、実験段階での構造確認や反応の進行状況確認には十分である。

分解能調整

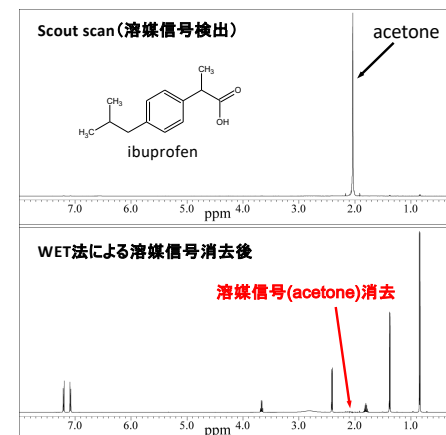
¹H選択的グラジエントシム

イブプロフェンのアセトン溶液のスペクトル



溶媒信号消去

WET去



全自動 No-D NMR

