

NOESY T₁簡易測定 (Delta v5)

2018年7月17日

北海道大学大学院工学研究院

工学系技術センター技術部

木村 悟

NOESYの概要

NMRと立体化学

NMRでは化合物の平面、**立体**の構造情報を取得可能！！

【NMRで解析される立体化学の例】

1) 分子全体の構造（立体配座：コンフォメーション）

低分子：シクロヘキサン環のいす型、ふね型の解析

高分子：タンパク質の二次構造、三次構造の解析

2) 立体異性体（立体配置）

低分子：cis – transの解析



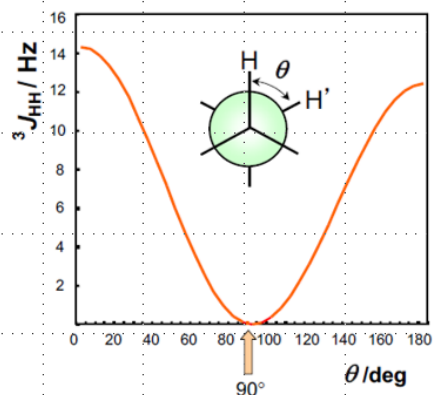
どのように？

1. スピン - スピン結合定数
2. 化学シフト計算
3. NOE (Nuclear Overhauser effect:
核オーバーハウザー効果)

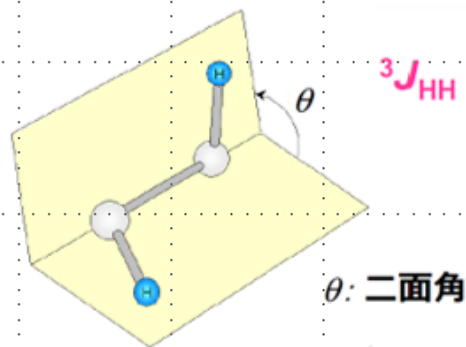
NMRと立体化学

1) スピン-スピン結合定数 : 単にスピン結合定数とも言う。J (Hz)で表す。

- ・ 相互作用する核の種類によって、およその範囲が決まる。
- ・ 核間の化学結合距離や幾何学的関係にも依存 (カープラス測)
- ・ カップリングが複雑な場合、読み取り難い。



$^3J_{HH}$ と二面角の関係



	ベンゼン	誘導体
	$^1J_{CH} = 159$ (Hz)	
	$^2J_{CH} = 1.0$ (Hz)	1-4 (Hz)
	$^3J_{CH} = 7.6$ (Hz)	7-10 (Hz)

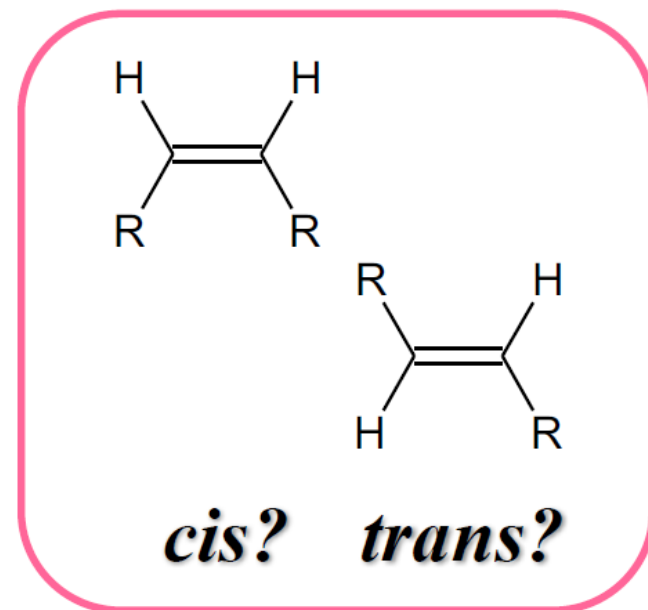
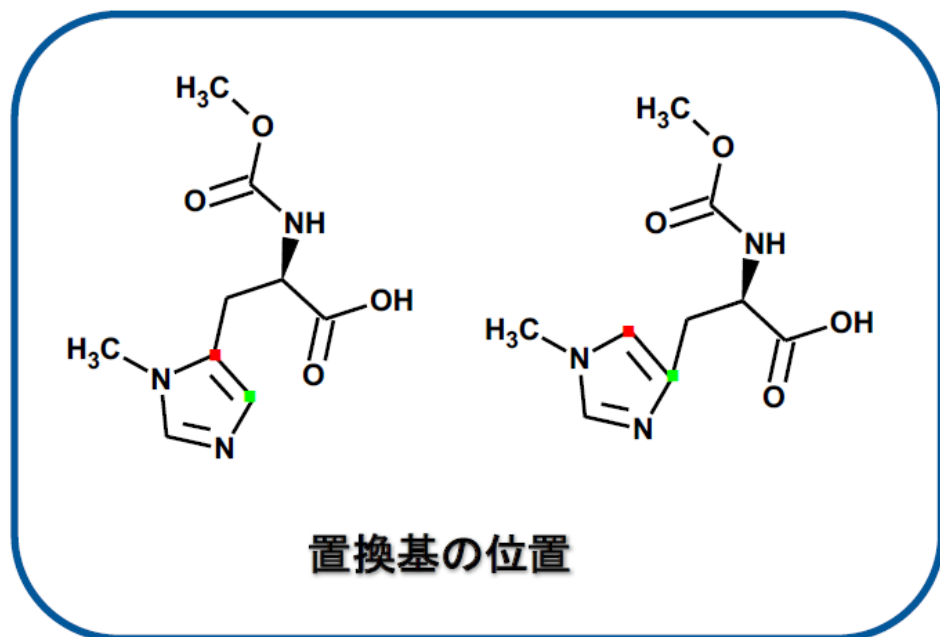
2) 化学シフト計算 :

- ・ 様々な計算ソフトウェアを利用して化合物から化学シフトを予測
- ・ あくまで計算なので、通常は確認用として使用

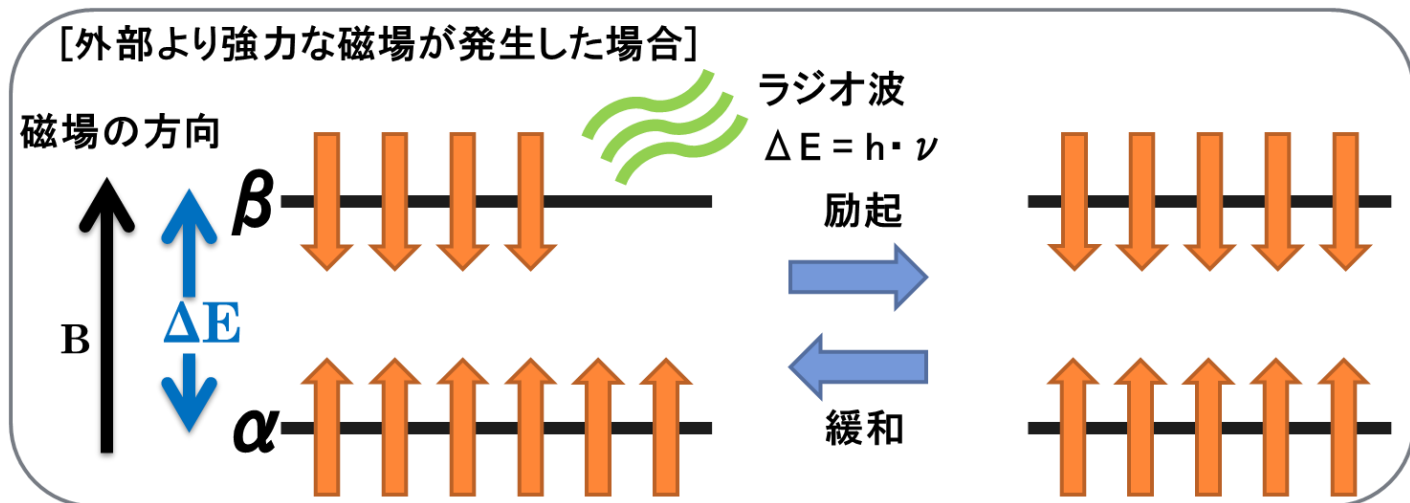
NOEを利用した立体化学的考察

3) NOE : 化学結合に関わらない空間を介した相互作用を利用

- ・ スピン結合定数を読み取ること、面倒な計算が不要
- ・ 空間的に近い原子核同士(6 Å以内)をスペクトルで確認できる。
- ・ 有用なスペクトルを得るには、測定パラメータ設定が重要
- ・ 緩和と深いつながりがある。



NMR現象の中の緩和機構



【緩和機構（縦緩和）】

・双極子-双極子緩和(交差緩和)

→ 溶液状態の有機化合物の緩和機構の主な部分。NOEでもメインになる。

・化学シフト違法性緩和

→ 核のまわりの電子の運動

・スピン回転緩和

→ 置換基の回転によって生じる磁気モーメントによる。

・四極子緩和

→ $I > 1/2$ 核の電荷分布による。

双極子相互作用の緩和

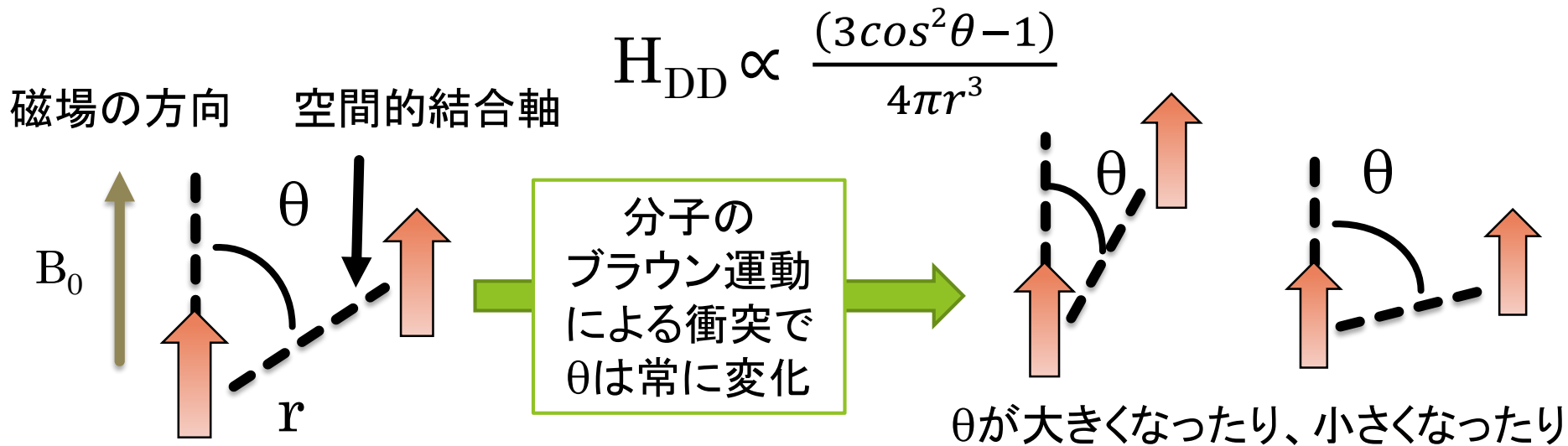
・双極子-双極子緩和

振動磁場の周期がNMRの共鳴周波数に近ければ、共鳴現象で得られた余剰エネルギーが熱エネルギーに変換されて発生する緩和

→余剰エネルギーを受け取る相手(核)がないと、緩和が起こらない！！

・双極子相互作用

同じ分子内で2つの核スピンの空間的に近い距離にあると、外部磁場以外に相手の核スピンから生じる小さな磁場(局所磁場: H_{DD})の影響を受ける。



・振動磁場

H_{DD} の変動(ブラウン運動による)が双極子相互作用の絶え間ない変化により発生。

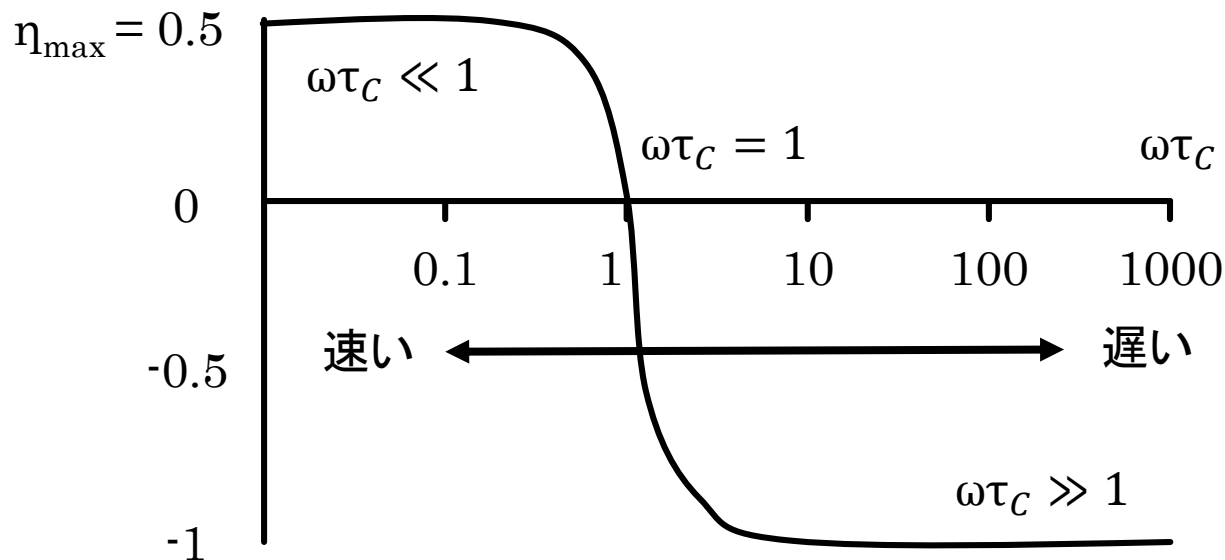
分子運動と共鳴周波数(ω)及びNOE強度の関係

・相関時間(τ_C): ブラウン運動による分子と分子の衝突する平均時間

→ NOE強度 η は共鳴周波数 ω と相関時間 τ_C の積であり、以下の関係性を示す。

- 1) $\omega\tau_C \ll 1$ (充分速い) → NOEは正、ブラウン運動の活発な低分子
- 2) $\omega\tau_C = 1$ (同じくらい) → NOEはゼロ、自分自身の磁化だけで緩和
- 2) $\omega\tau_C \gg 1$ (充分遅い) → NOEは負、高分子など

※ 運動の速い、遅いは共鳴周波数に対する相対速度で考えます。



NOEの種類

NOE	測定法
定常状態NOE(steady state NOE)	差NOE
過度的NOE(transient NOE)	2D NOESY
	1D NOESY(DPFGSE NOE)

【定常状態NOE】

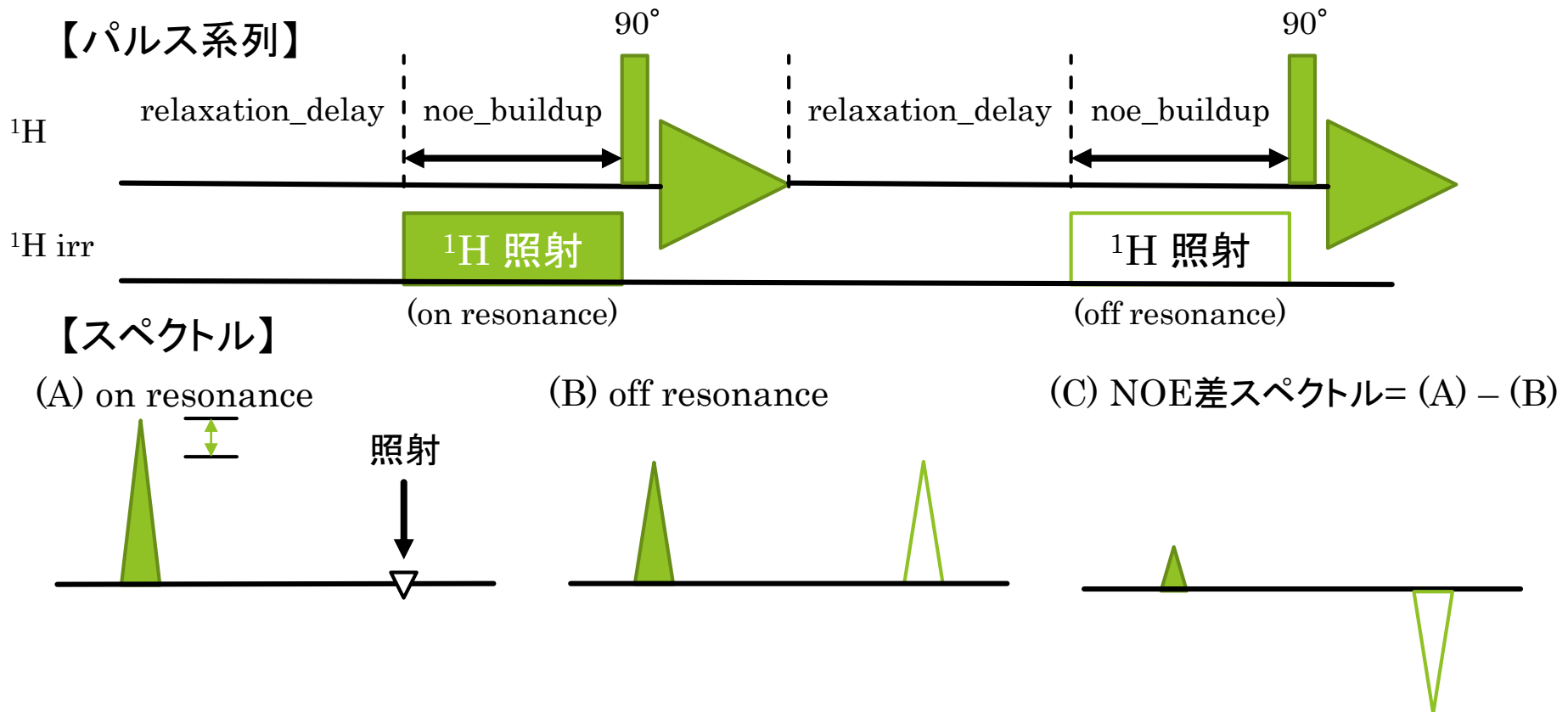
特定の信号を飽和させて、その飽和状態における新たな平衡状態を観測します。
 ^1H の照射時間を変化させた場合、照射の影響が観測するスピン全体に広がり、
信号の変化が起きなくなったところ(定常状態)を測定。

【過度的NOE】

短時間に占有数に変動を与え、その後再び熱平衡状態に戻る過程を観測します。
測定パラメータである混合時間の間、NOEを成長させ、スピン格子緩和によって
最終的にはNOEが消滅しますが、この成長過程を観測します。

NOE測定法の特徴

◆ 差NOE (Delta v5:difference_noe_1d.jxp / v4:difference_noe_1d.ex2)
特定の信号を飽和させ、その飽和状態における新たな平衡状態(定常状態)を観測する。



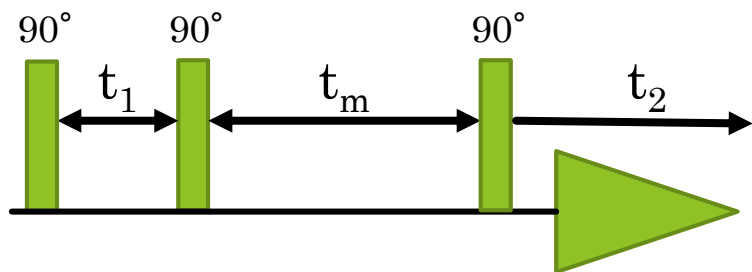
- ・ 2D NOESYに比べてデジタル分解能が良い。
- ・ 条件設定が適切でなければ、信号の差し引きにより「**消え残り**」が発生する。
- ・ 条件設定を適切にすると、1D NOESYよりS/Nが良い。

NOE測定法の特徴

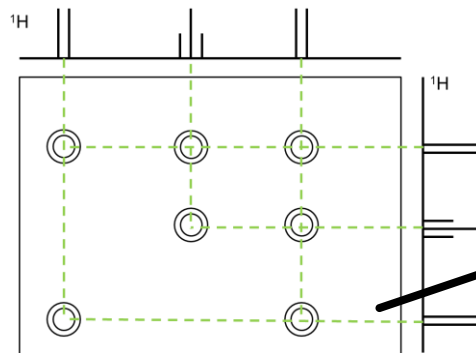
◆2D NOESY (Delta v5 : noesy.jxp / v4 : noesy_phase.jxp)

短時間にスピン占有数に変動を与え、その後再び熱平衡状態に戻る過程を観測

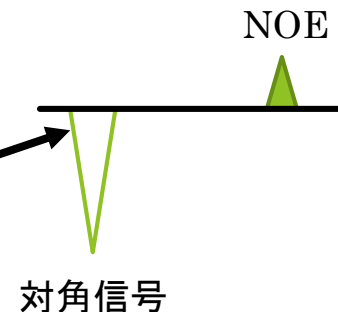
【パルス系列】



【2D NOESY模式図】



1D スライス



【混合時間 t_m (mixing time)】

- ・混合時間が不適切だとNOE相関信号が弱くなる。
- ・ ^1H の緩和時間 T_1 程度に設定する。

- ・絶対値法に比べてS/N,相関信号の分離が良い
- ・位相情報(NOEの正負の判定)が得られる。
- ・対角信号の位相を下向き(↓)に合わせると、以下のように観測される。

正のNOE相関信号 : 上向き

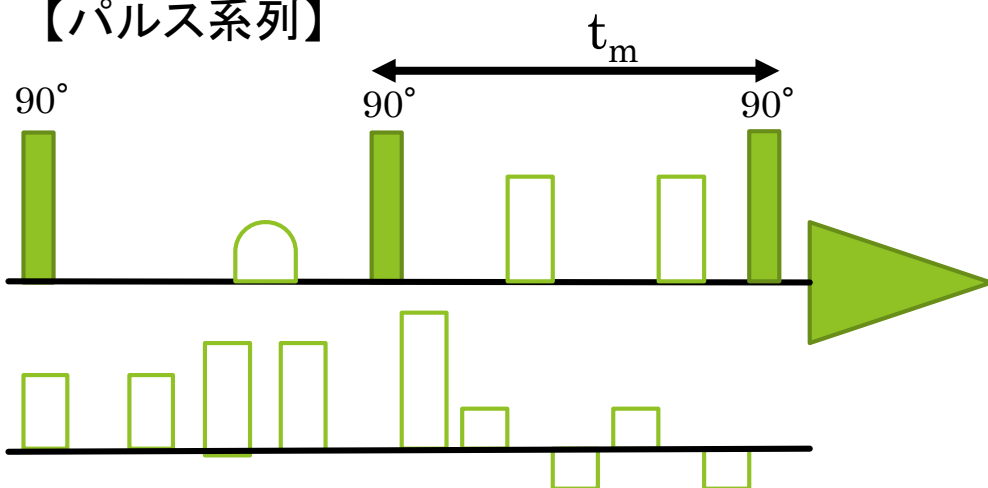
負のNOE相関信号、間接的NOE、化学交換による相関信号 : 下向き

スピン結合に由来するもの : 上下

NOE測定法の特徴

- ◆ 1D NOESY(DPFGSE NOE) (Delta v5: noe_1d.jxp / v4: noe_1dpgfse.ex2)
ある¹H信号を選択的に励起し、この¹HとのNOEだけを観測する。

【パルス系列】

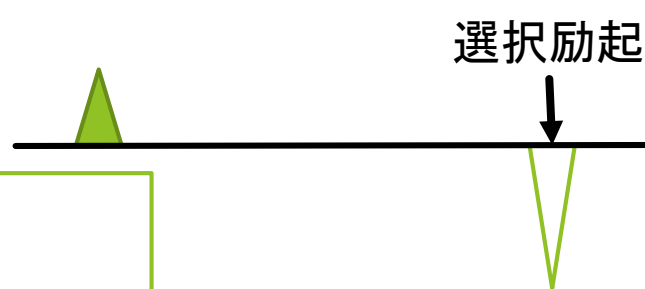


【1D NOESY 模式図】

1D スペクトル



1D NOESYスペクトル



【選択励起の条件】

パルス波形: GAUSS

パルス幅(obs_sel_180): 長くすると選択性が上がる。

パルス出力(obs_sel_atn): パルス出力を計算ツールで求めた値

オフセット(obs_sel_offset): ピークの重心を指定

- ・2D NOESYに比べてデジタル分解能が良い。
- ・信号の差し引きによる「消え残り」が現れない。
- ・ある程度の帰属がついている必要がある。

NOE測定法の選択

◆ 分子量1000以下の場合

- ・差NOE、1D NOESY、2D NOESYの全てで問題無く測定できます。
- ・1D NOESYが、測定条件設定が比較的容易で、スペクトルがきれいに得られる。
- ・2D NOESYは測定分子の信号帰属が確かでない場合や、化合物全体のNOE相関を一度に見たいときに使用する。

◆ 分子量1000～2000の場合

- ・ $\omega\tau_C \approx 1$ の条件になる可能性が高く、NOEが観測されにくい可能性がある。
- ・分子量800～3000の試料の場合、ROESYのほうが有効な場合がある。

◆ 分子量2000以上の場合

- ・過渡的NOE (1D NOESY、2D NOESY)を選択します。

サンプル調整

◆ ^1H 測定サンプル程度の濃度にする。

- ・濃度が濃いと分子間相互作用の影響でNOE強度が小さくなる。
- ・溶液粘度が影響し、NOE強度を弱める可能性も。
- ・NOEは非常に弱い信号なので、サンプル調整の以下の操作を厳密に行う。
→ サンプル管の傷チェック、サンプル溶け残り、溶液高さ調整(4cm)など。

◆常磁性物質が含まれないこと

- ・未脱気試料でNOE信号を観測できなければ、脱気する。
→ 試料中の溶存酸素が持っている不対電子が、分子内の双極子相互作用の比率を小さくする。すなわちNOE強度が弱くなる。
- ・簡便な脱気方法として、試料管内の試料溶液にアルゴンガスや窒素ガスを毛細管で吹き込んで置換する。置換後は、密栓するか熔封すると良い。
- ・実験室の鉄サビなどが混入しないように気を付ける。

NOE測定の流れ

1) ^1H 測定

- ・装置調整作業（シム調整、チューニング、試料温度調整）
- ・測定パラメータの確認（Receiver Gain）
- ・高分解能1D NMRデータの取得と分解能、観測範囲が適切であるか確認

2) T_1 簡易測定（時間があるなら、NOESY測定前に確認すること推奨）

- ・適切な混合時間（mixing time）を求める

3) NOE測定

- ・目的に応じた測定法を選択する。



NOEを観測できなかつたら・・・

・分子の運動性(τ_c)を変える。

→ 試料の条件・・・測定温度（溶媒の沸点以下）、溶媒の変更、濃度の変更






・共鳴周波数を変える。

→ 磁場の異なる装置を利用

・ROESYを測定してみる。


(装置調整のための)¹H測定

サンプルセット

- 1)  を起動し、分光計  に接続する。
- 2)  を押し、「サンプル名」「溶媒」を選択し、ベリファイにチェックを入れる。
- 3) 「サンプル」→「マニュアル制御」を選択する。
- 4) ロード  → スピン  を押し、スピン数15Hzになるまで待つ。





【測定温度を制御する場合】

- 1) 「Target」に測定温度を入力し、
 をクリックして10分程待つ。

※プローブは、室温±5°Cの保持はし難い。

サンプルセット

- 5) グラジエントシム  を起動し、LOCK信号メーターの数値を600付近にする。
・LOCK信号メーターが600程度にならなければ、「Gain」の数値を変更し、調整する。
- 6) スピンを停止  させて、LOCK信号メーター値が30%以上減衰しないか確認する。

例) LOCK信号メーターの数値がスピン時600であり、スピンを停止したときに

・数値が420以上(30%未満の減衰)の場合 → OK 再度、スピン  を押す。

・数値が420以下(30%以上の減衰)の場合 → NG

スピンOFFのまま、シムグループより「X Y」を選択し、「オートシム」を押す。

※NOESY測定は、スピンOFFで行うのでXYシムがずれていると、分解能が低下します。





The screenshot shows the NMR control software interface with several key elements highlighted by red boxes and numbered callouts:

- 5)** Lock signal meter (Lock信号メーター) showing a value of 49.
- 6)** Spin stop button (スピンを停止) in the Spinning Control panel.
- 6)** The 'Auto Shim' (オートシム) button in the bottom control bar.
- 5)** The 'Gain' parameter in the Lock Control panel, set to 26.

Other visible interface elements include:

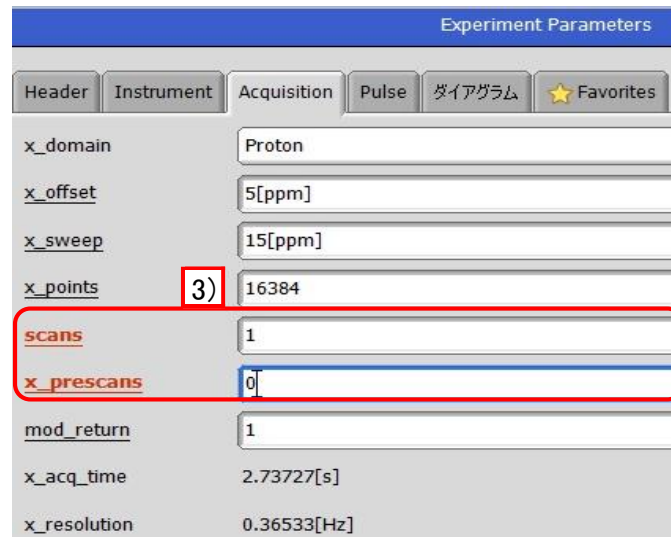
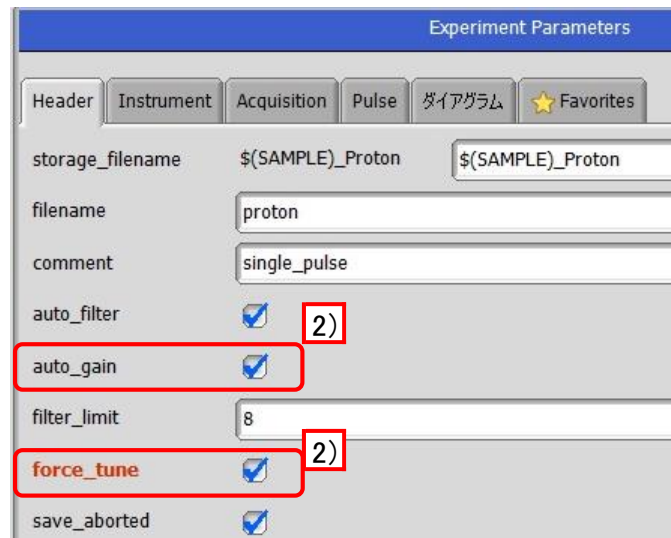
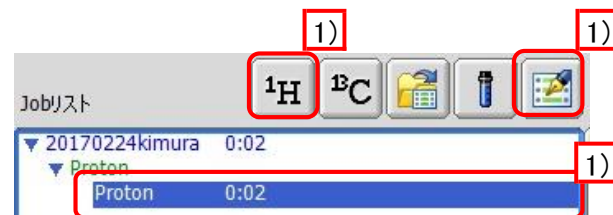
- Sample Control: Solvent (CHLOROFORM-D), Start/Stop buttons.
- Spinning Control: Current (15[Hz]), Target (15[Hz]), SPIN ON button.
- Temperature Control: Current (30.3[dC]), Target (30.0[dC]), TEMP ON button.
- Lock Control: Status (LOCK OFF), AUTOLOCK, Gradient Shim (自動グラジエントシム) checkbox, Gain (26), Level (180), Phase (338.9[deg]), Offset (7.26[ppm]).
- Simulation Groups: Z1 (95.14[Hz]), Z2 (-40.36[Hz]), Z3 (56[Hz]), Z4 (-59.14[Hz]).
- Buttons: 自動シム停止, 高速シム, シムトラック, オートシム.
- Zoom controls: +5x, +10x, +50x, -5x, -10x, -50x for each simulation group.

^1H 測定


1) ^1H 測定  →ジョブリストの[Proton]を選択しパラメータ編集  を押す。

2) [Experiment Parameters]-「Header」にて、「force tune」「auto_gain」を☑

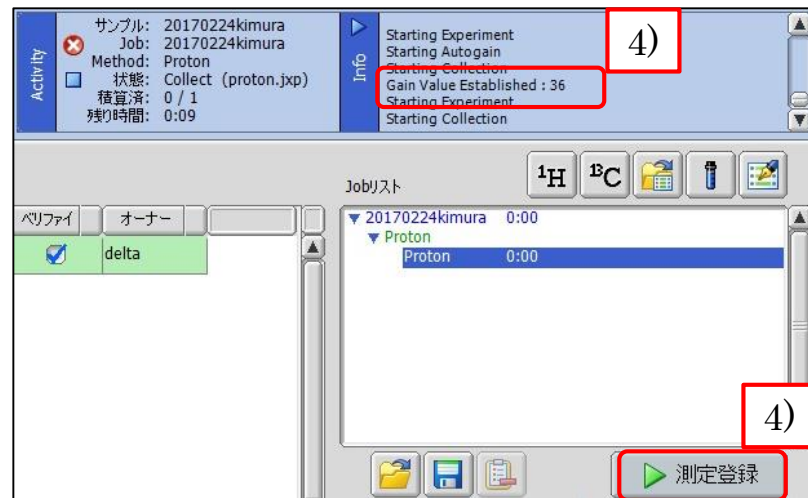
3) [Experiment Parameters]-「Acquisition」 「Scans」を1、「x_prescans」を0にする。



^1H 測定

4)  を押して、 ^1H 測定を起動すると、
[info]の欄にて、Receiver gainを確認する。

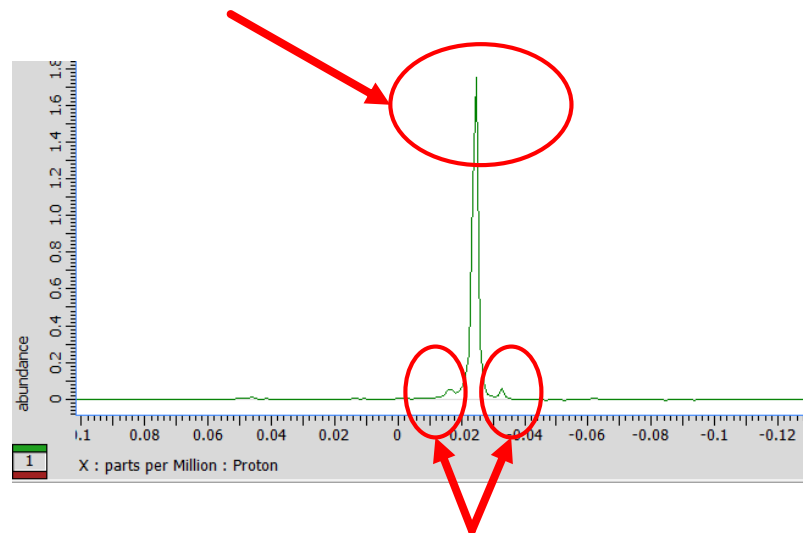
※Receiver gain値はサンプルにより異なる。
今回は、「36」を使用する。



^1H スペクトルで以下を確認する。

- ・ピーク割れの有無 (TMSなどのピーク)
- ・S/Nが悪くないか?

ピーク割れは無いかな?

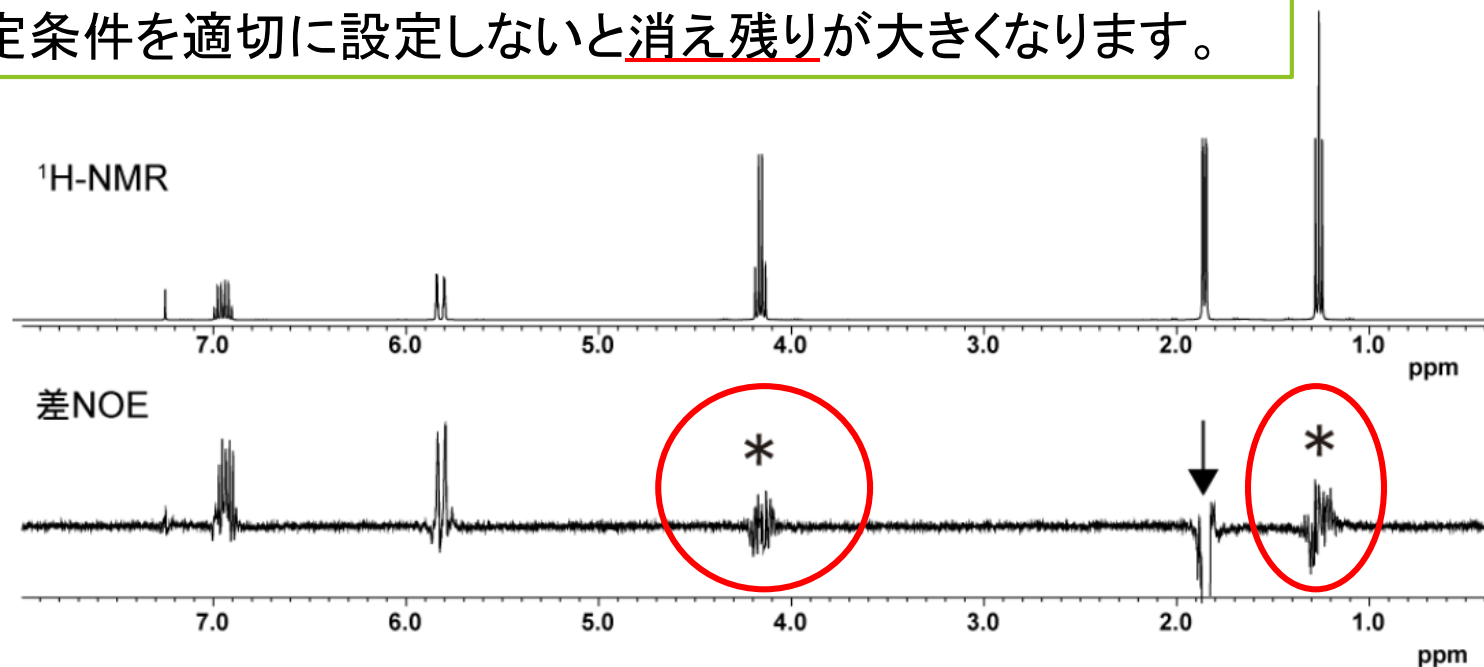


シリコンサテライトがあるかな?

差NOE 測定操作

差NOE測定

測定条件を適切に設定しないと消え残りが大きくなります。

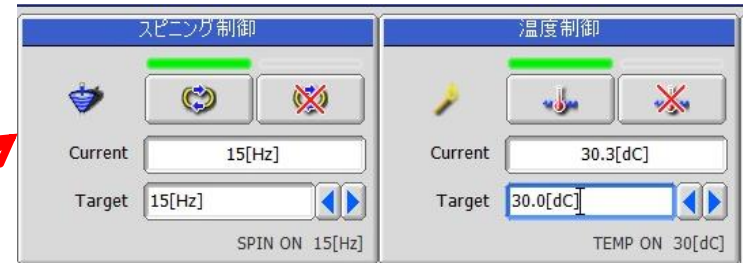



- ① NMRロック条件 → ^2H ロック信号のS/Nを上げてノイズによる時間変動を少なくする。
 - ・通常の分解能調整後、ロック信号メータの数値が変動しないか確認する。
 - ・ロックレベルをロック信号が飽和する直前まで上げる。
 - ・ロックゲインをロック信号強度が500~1000程度になるまで下げる。
- ② 測定温度 → 室温の変動がスペクトルに影響を及ぼす。
 - ・室温+5~10°Cくらいで温調する。(試料が熱の影響を受ける場合を除く。)
- ③ スピニング → 測定前にスピニングを停止する。

差NOE測定

※測定前の注意点※

- ・測定前にスピニングを止める
 - ・測定温度を一定にする。
- ピークの消え残りの原因になるため。



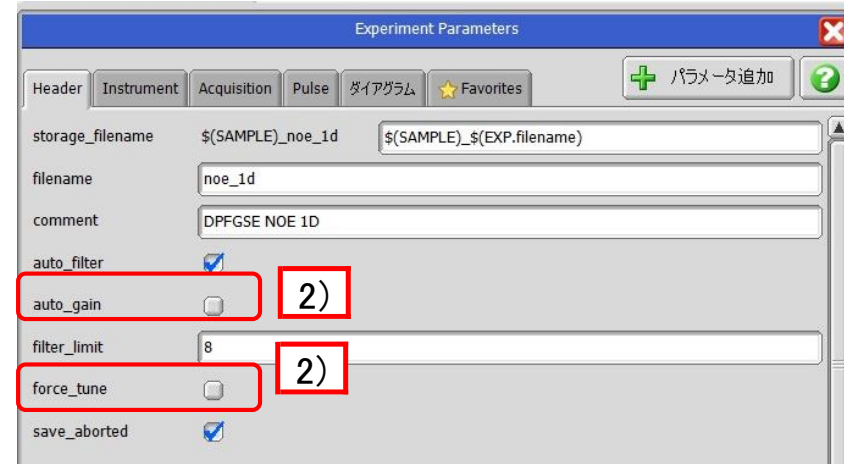
- 1)  → [パルスシーケンスを選択]にて [noe] → [difference_noe_1d.jxp] をダブルクリックする。



Delta v4: difference_noe_1d_.ex2

- 2) [Experiment tool]の[Header]にて、「auto_gain」「force_tune」の☑を外す。


※「force_tune」は、¹H測定で行っていれば不要。



差NOE測定

3) [Experiment tool]の[Instrument]で、「recvr_gain」に ^1H 測定の数値を入力する。

4) [Acquisition]はデフォルトで良い。

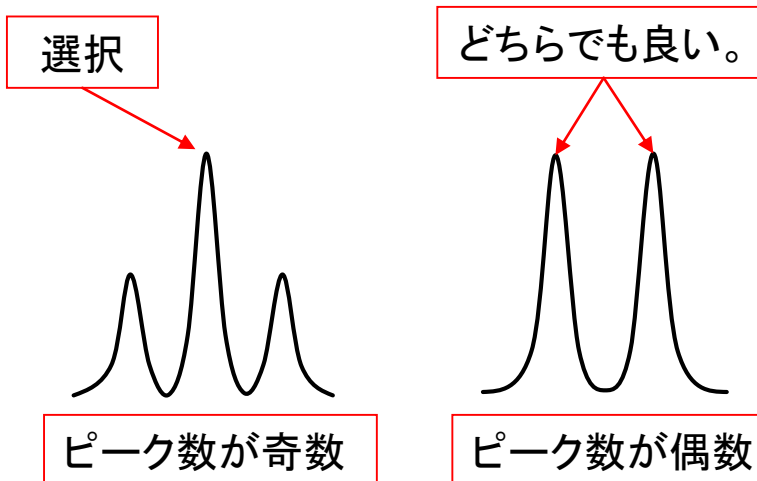
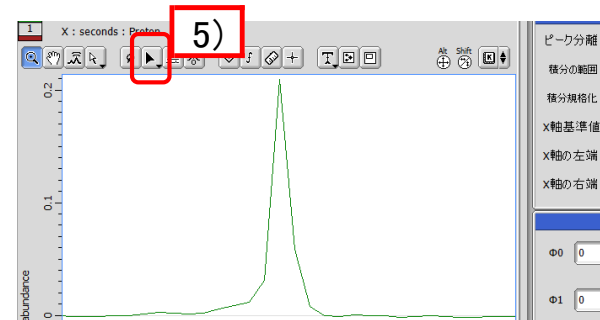
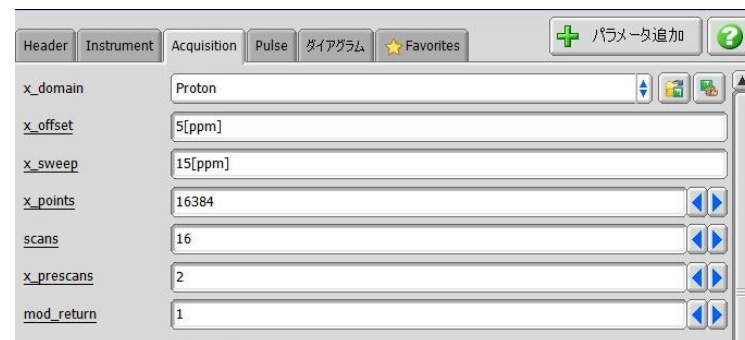
5) [1D プロセッサ]で ^1H データの選択励起したいピークを拡大し、 を選択する。



クリックした位置の一番近くのピークの位置情報をコピーする。

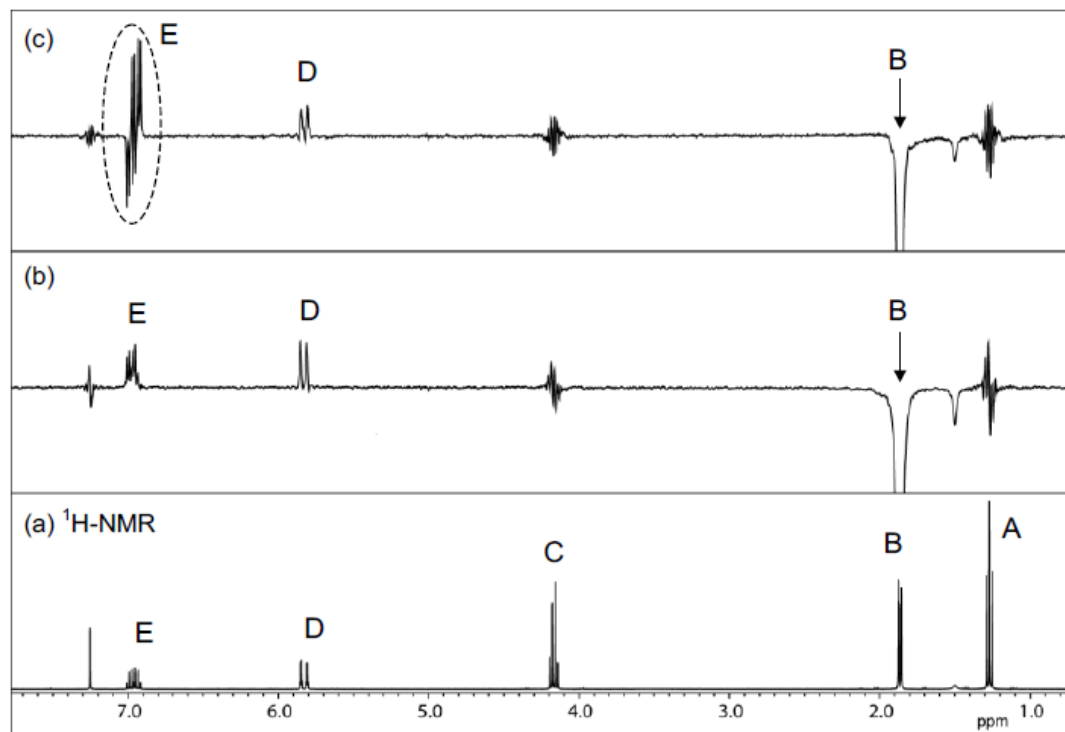
[照射位置の選び方]

ピークトップを選択する。

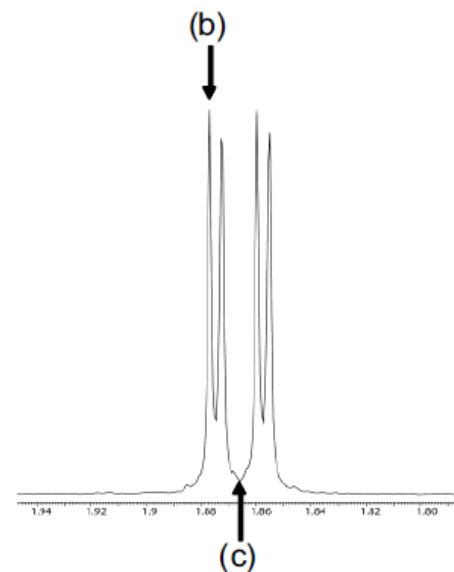
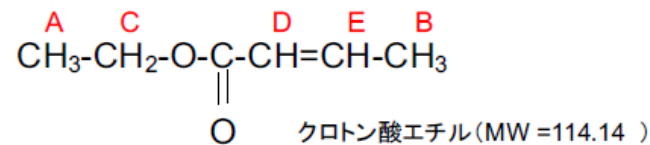


ピークトップを照射位置にしないと . . .

→ スピン結合の影響でシグナル形状が変わります。



クロトン酸エチルの差NOEスペクトル



メチルプロトンBの照射位置

(オフセット)

[その他に気を付けること]

- ・測定前にプローブチューニングを取り、90°パルスを正確に設定する。
- ・積算回数を4の倍数に設定する。

差NOE測定

6) [Pulse]で、「on resonance」に、
選択照射する位置情報を入力。
「off_resonance」はデフォルトでOK。

7) 照射出力(attenuator)は
デフォルト(80db)が良い。

8) 照射時間(noe_builup)を
 T_1 の5倍以上にする。

【 T_1 が分からない場合】
デフォルト設定で一度試してみるか、
簡易 T_1 測定で求めてみる。

9)  を押して、測定を行う。

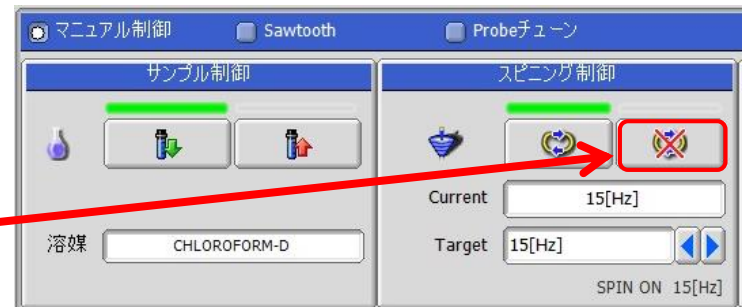
Header	Instrument	Acquisition	Pulse	ダイアグラム
<u>x_pulse</u>		6.6[us]	x90	
<u>x_atn</u>		1[dB]		
<u>on_resonance</u>		0[ppm]	6)	
<u>off_resonance</u>		-10[ppm]		
<u>noe_builup</u>		5[s]	8)	
<u>attenuator</u>		80[dB]	7)	
<u>relaxation_delay</u>		7[s]		
<u>repetition_time</u>		9.73727[s]		
<u>dante_presat</u>		<input type="checkbox"/>		
<u>presat_time</u>		7[s]	relaxation_delay	
<u>dante_pulse</u>		2[us]		


1D NOESY 測定操作

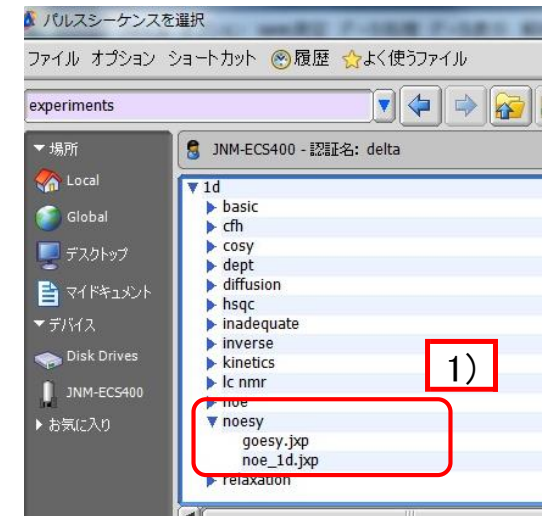
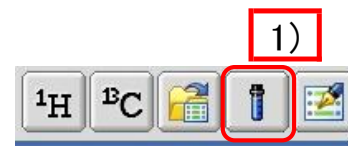
1D NOESY測定

※注意※

測定前にスピニングを止める



- 1)  → [パルスシーケンスを選択]にて [1d]→[noesy]→[noe_1d.jxp]をダブルクリックする。

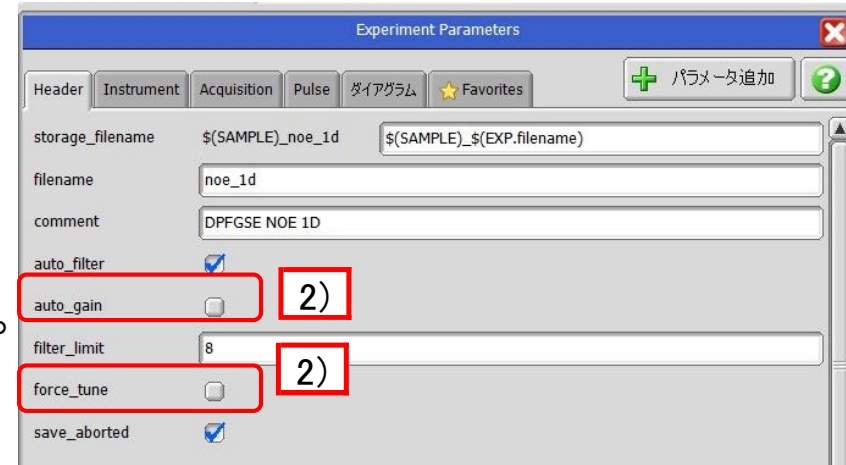


Delta v4: noe_1d_dpfgse.ex2

- 2) [Experiment tool]の[Header]にて、「auto_gain」「force_tune」に☑を外す。

※「auto_gain」は、1D NOESYで行えない。

※「force_tune」は、¹H測定で行った場合は不要。



1D NOESY測定

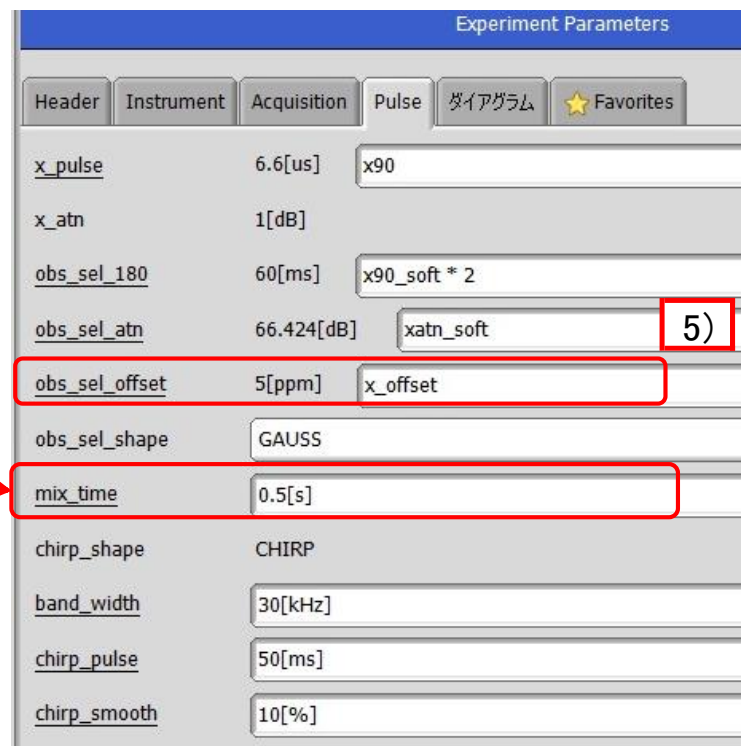
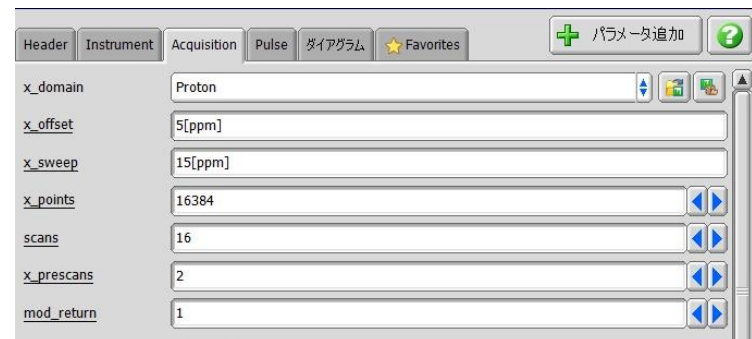
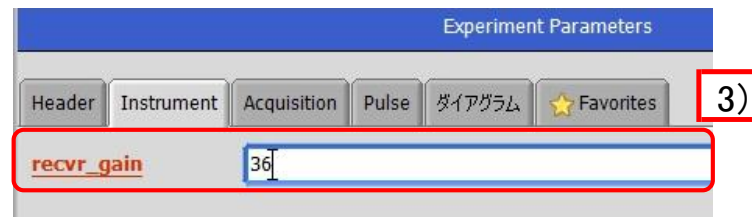
3) [Experiment tool]の[Instrument]で、「recvr_gain」に ^1H 測定の数値を入力する。

4) [Acquisition]はデフォルトで良い。

5) [Pulse]で、「obs_sel_offset」に、選択照射する位置情報を入力する。
入力方法を次ページで紹介。

※デフォルトの「mix_time」でNOE信号が弱い場合、感度向上のために、 T_1 簡易測定で求めた値を「mix_time」に使用する。

※「relaxation_delay」もデフォルト(1.5s)が良い。NOE信号が弱い場合は、2[s]、3[s]と長くするとノイズを抑えることができる。



1D NOESY測定

6) [1D プロセッサ]で¹Hデータの選択励起したいピークを拡大する。

7) ツールバーの  を選択する。



クリックした位置の一番近くのピークの位置情報をコピーする。



+ Shiftキー : クリックした場所の位置情報をコピーする。

[照射位置の選び方]

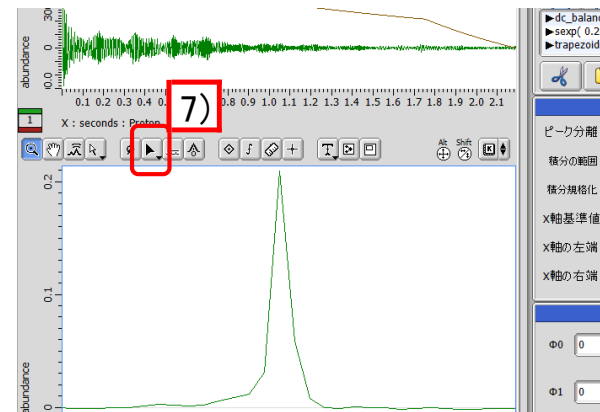
- ・ピークの重心を選択する。
- ・差NOEとはピーク位置の選択位置が異なる。

差NOE → ピークトップを選択

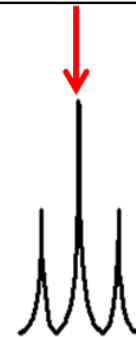
1D NOESY → ピークの重心

8) [obs_sel_offset]入力欄にカーソルを合わせて、マウスを右クリックして、ペーストを選択する。

9)  を押して、測定を行う。

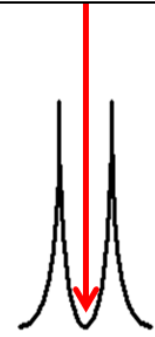


選択位置

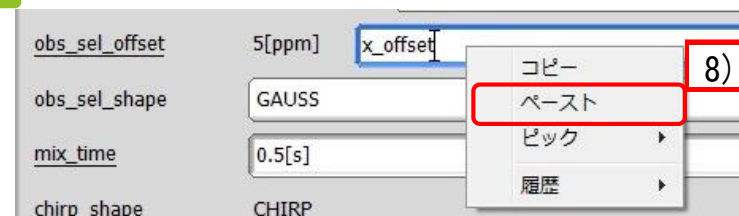


ピーク数が奇数

選択位置

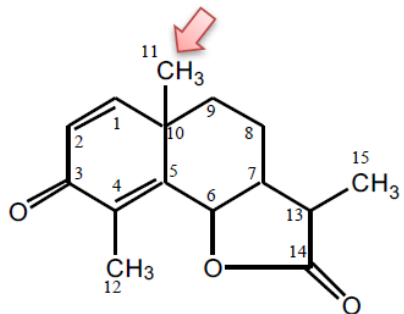


ピーク数が偶数



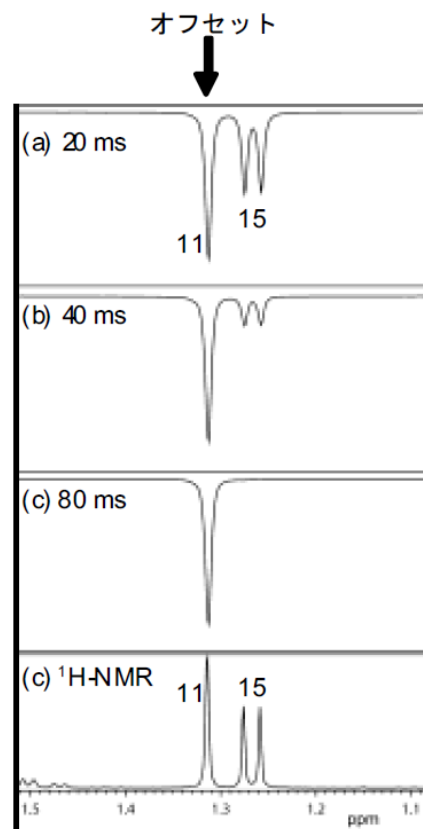
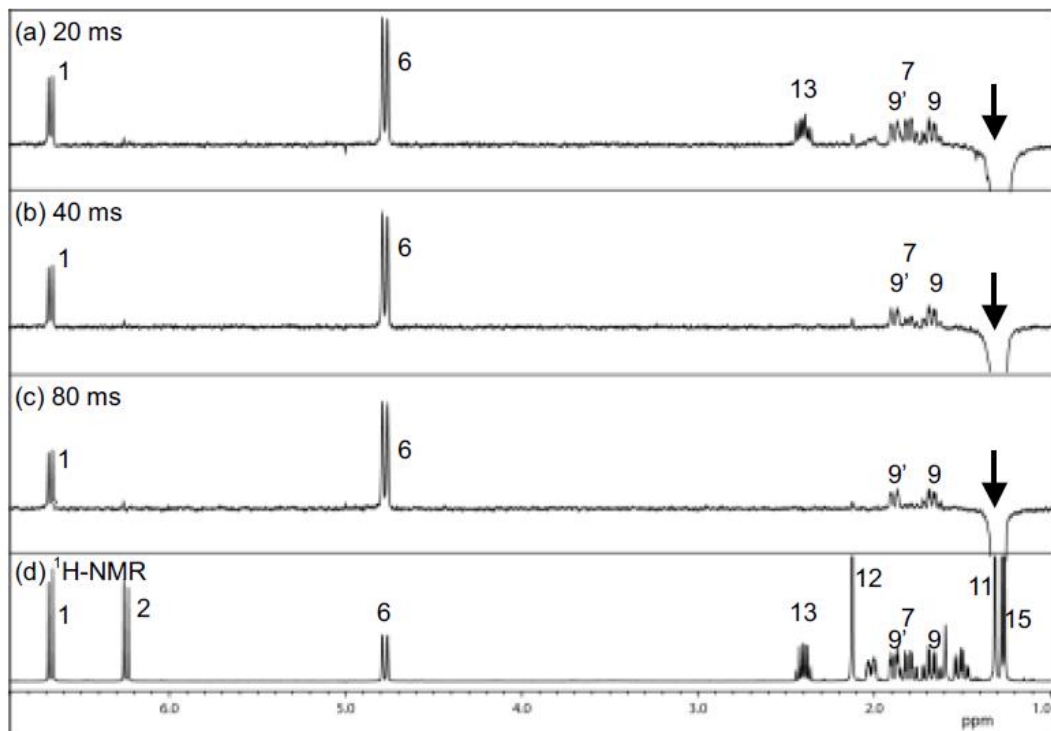
^1H ピークが密集している場合

→ 選択的 180° パルス(obs_sel_180)を長くします。



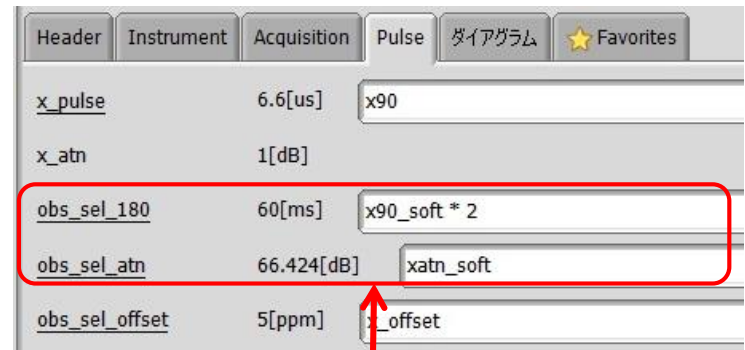
α -サントニン (MW =246)
(10 mg / 0.6 ml CDCl_3)

α -サントニンの1D NOESY
選択的 180° パルスのパルス幅を
(a)20ms (b) 40ms (c) 80ms



obs_sel_180の変更方法

「obs_sel_180」を変更するときは、
「obs_sel_atn」を以下の方法で変更します。



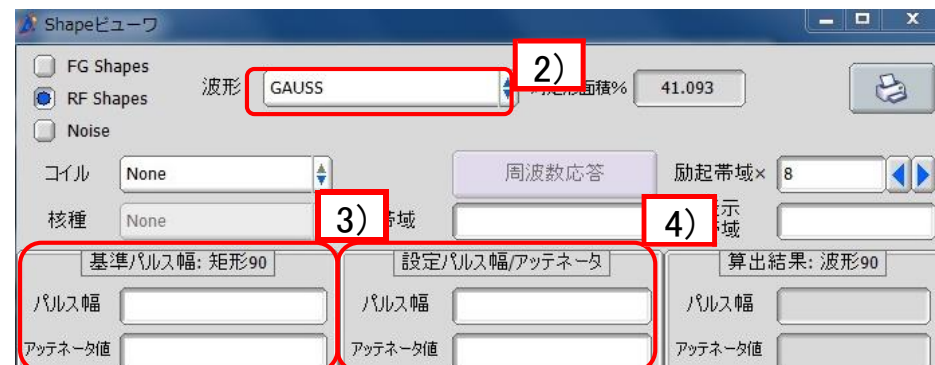
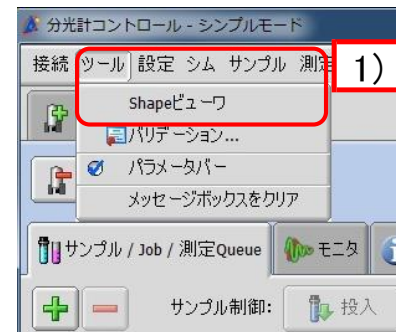
ここを変更する。
「obs_sel_180」を長くしても、
解決しない場合もある。

1) [分光計コントロール]ウィンドウより
[ツール]→[Shape ビューワ]をクリックする。

2) [波形]を[GAUSS]にする

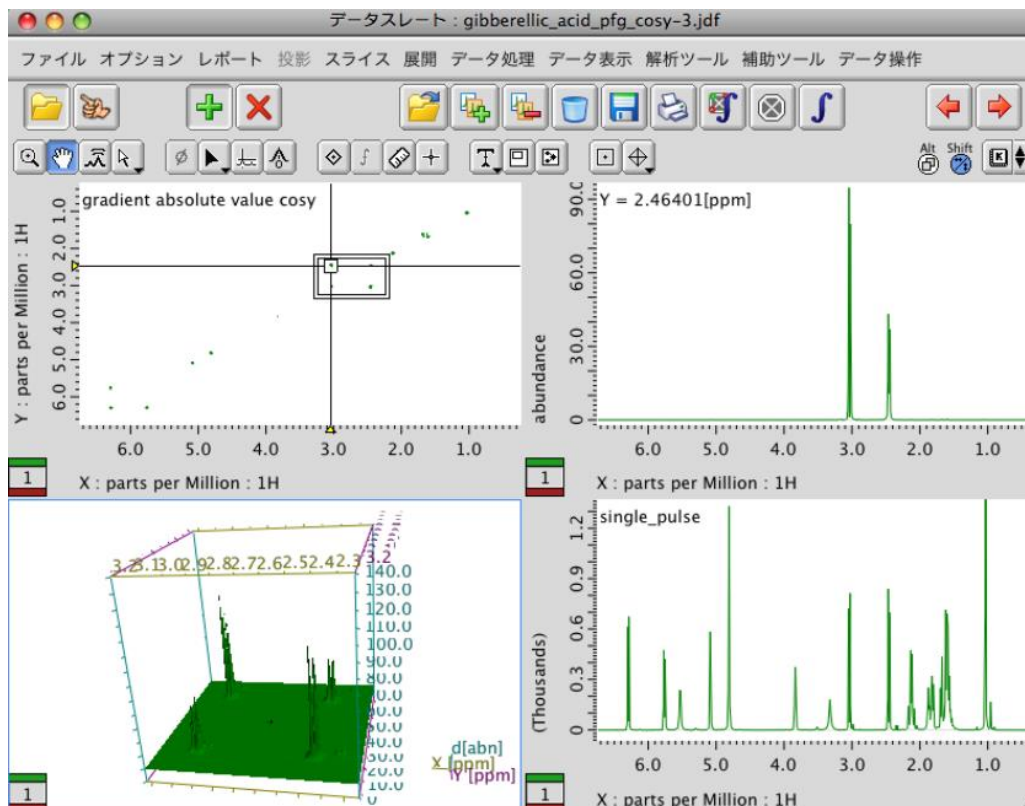
3) [基準パルス幅 矩形 90]にて
パルス幅 → abs_sel_180
アッテネータ値 → abs_sel_atn
これらのデフォルト値を入力

4) [設定パルス幅/アッテネータ]に
設定したいパルス幅の値を入力すると、
アッテネータ値が自動で計算されるので、
これを使用する。



差NOE、1D NOESYのデータ処理後


→ データスレートを利用すると、複数のスペクトルを一覧表示できます。




データスレートの使い方は、「NMR基礎講習2」をご覧ください。

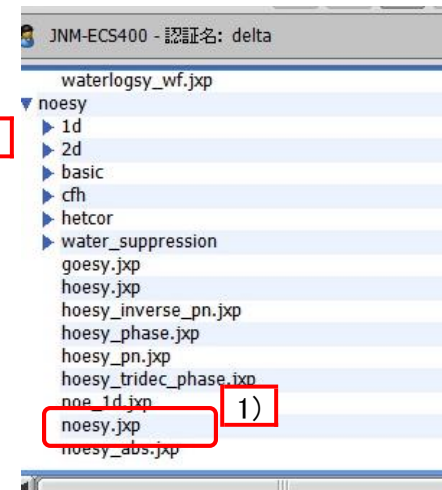
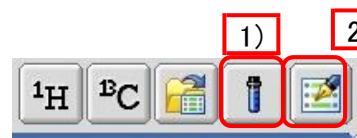
2D NOESY 測定操作

2D NOESY測定


※ 「サンプル」→「マニュアル制御」にて
 を押してスピニングを止める。

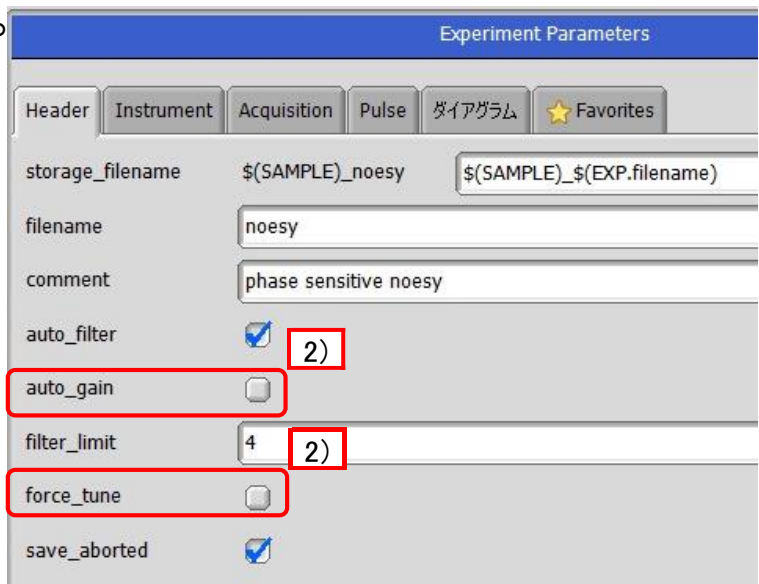


1)  → [パルスシーケンスを選択]にて
「noesy」→[noesy.jxp]をダブルクリックする。



Delta v4: noesy_phase.ex2
or noesy_phase_zqf_pfgzz.ex2


2) Jobリスト [noesy.jxp]を選択し、 をクリック。
[Experiment parameters]の[Header]にて、
「auto_gain」「force_tune」にを外す。

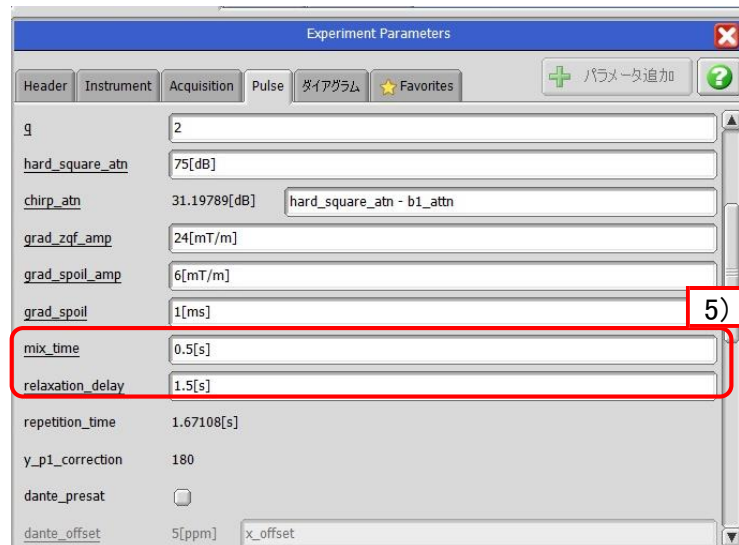
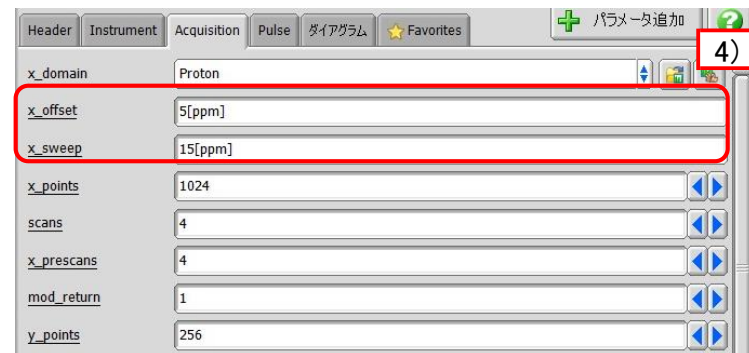
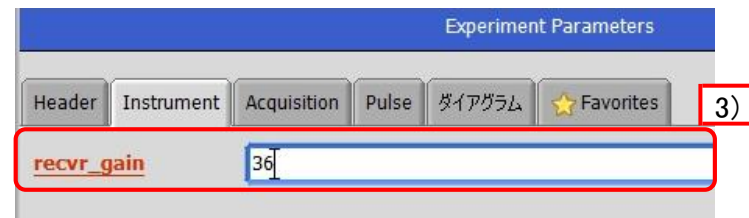


※「auto_gain」は、2D NOESYで行えない。

※「force_tune」は事前にチューニングしていれば
不要


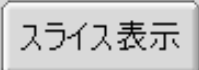
2D NOESY測定

- 3) [Experiment parameters]-[Instrument]で、「recvr_gain」に ^1H 測定の数値を入力する。
- 4) [Acquisition]はデフォルトで良い。
※ 「x_offset」「x_sweep」に、 ^1H 測定でシグナルを検出した範囲を指定することで、デジタル分解能が向上し、ピークが混んでいる場合、有効である
- 5) [Pulse]にて、「mix_time」をサンプルの T_1 程度の長さに設定する。
サンプルの T_1 が不明な場合、 T_1 簡易測定を行う。
※ 「relaxation_delay」もデフォルト(1.5s)で良い。
NOE信号が弱い場合は、2[s]、3[s]と長くするとノイズを抑えることができる。
- 6)  を押して、測定を行う。



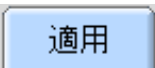


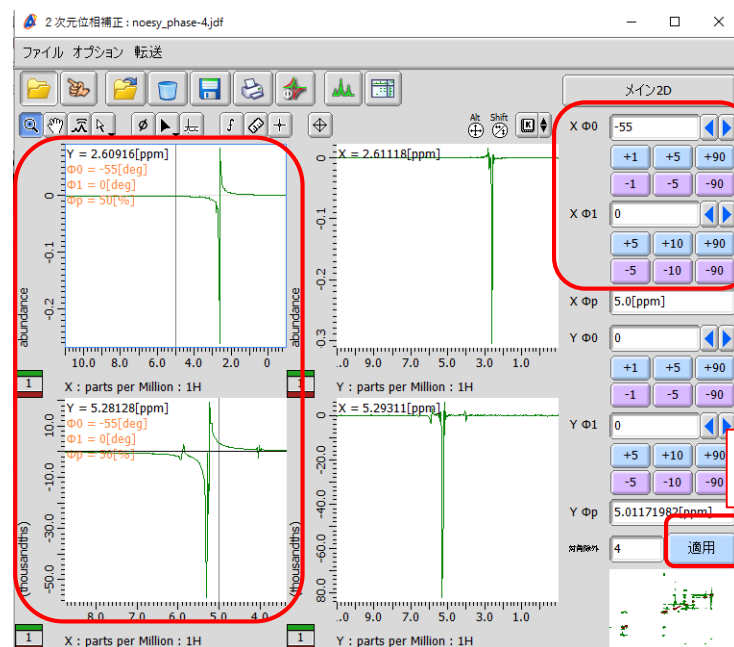
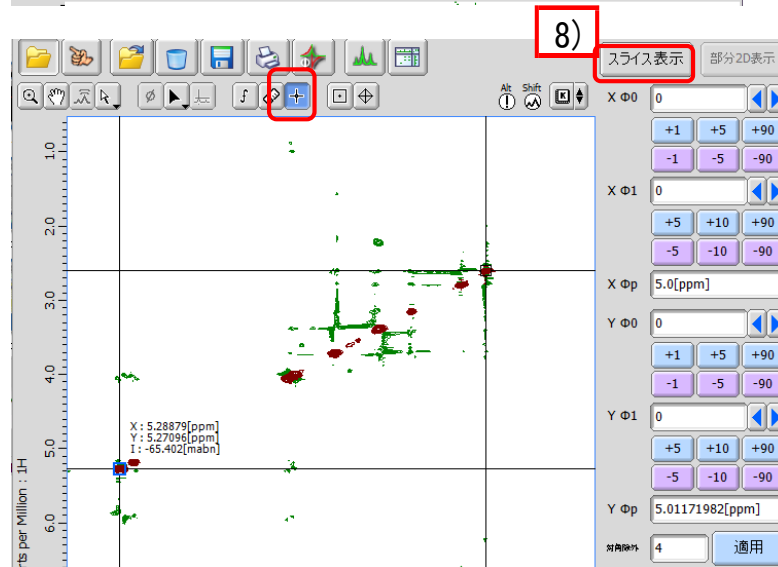
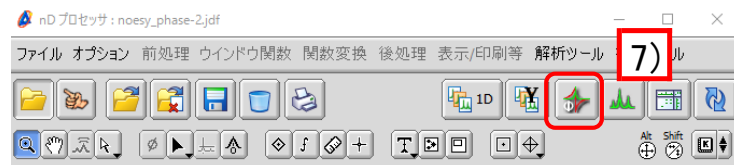
2D NOESY測定

7) [nD Processor]にて、 を選択する。


8) [2次元位相補正]にて、 を選択し、右図のように対角ピーク(赤いピーク)の2点を選択して、 をクリックする。

9) [Phase 2D]で左側2つのスライスデータの位相のずれを確認。

位相がずれている場合は、  の数値を変更し、位相があったところで、 を押す。

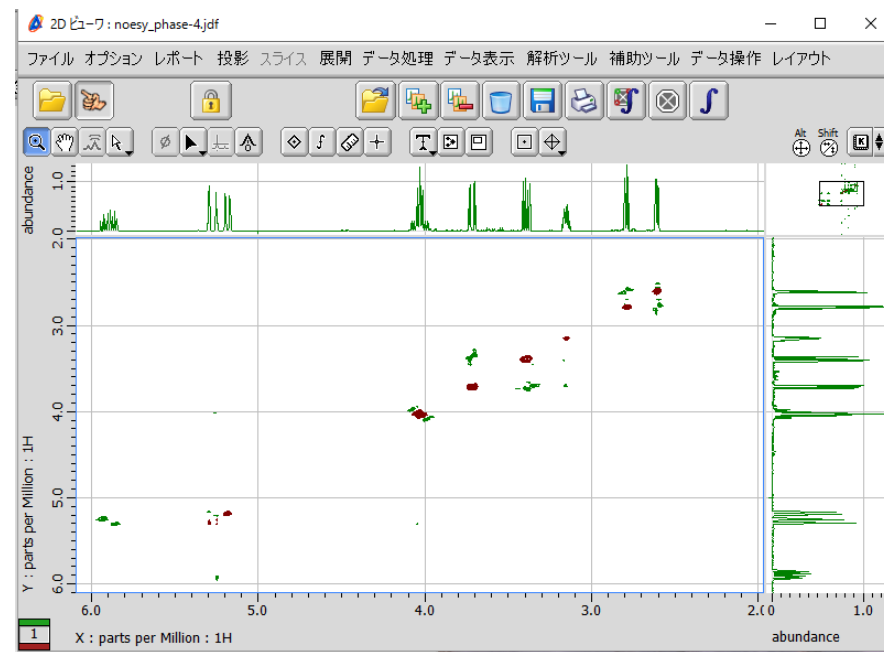
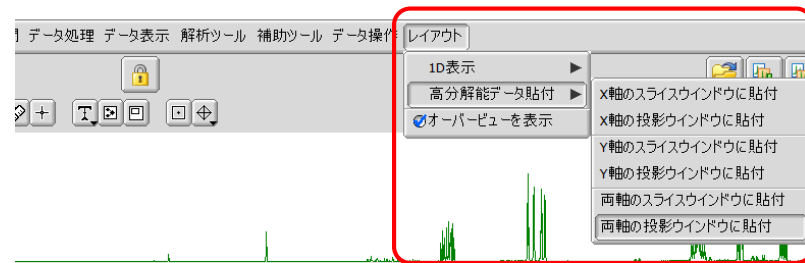


2D NOESY測定

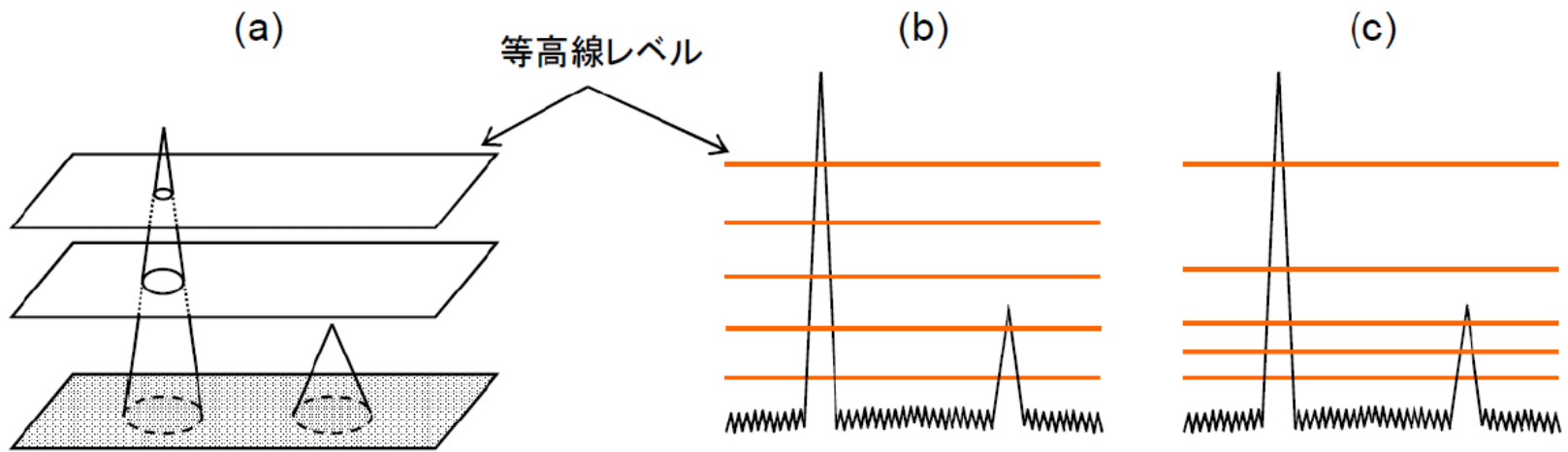
- 10) [2D ビューワ]にて、 を選択し、
「レイアウト」→「高分解能データを貼り付け」
→「両軸の投影ウィンドウに貼り付け」を
選択すると、
カーソルが指マークになる。
 ^1H データを指マークでクリックすると、
高分解能 ^1H データをX,Y投影ウィンドウに
貼り付けることができる。

- 11) キーボードにて「Alt + G」を押すと、
右図のようにグリッドを引くことができる。

- ※ 1次元スペクトルでピークの無いところに、
2次元スペクトルでピークがある場合、
本来のピークではないので、等高線調整
ツールピーク表示を調整します。



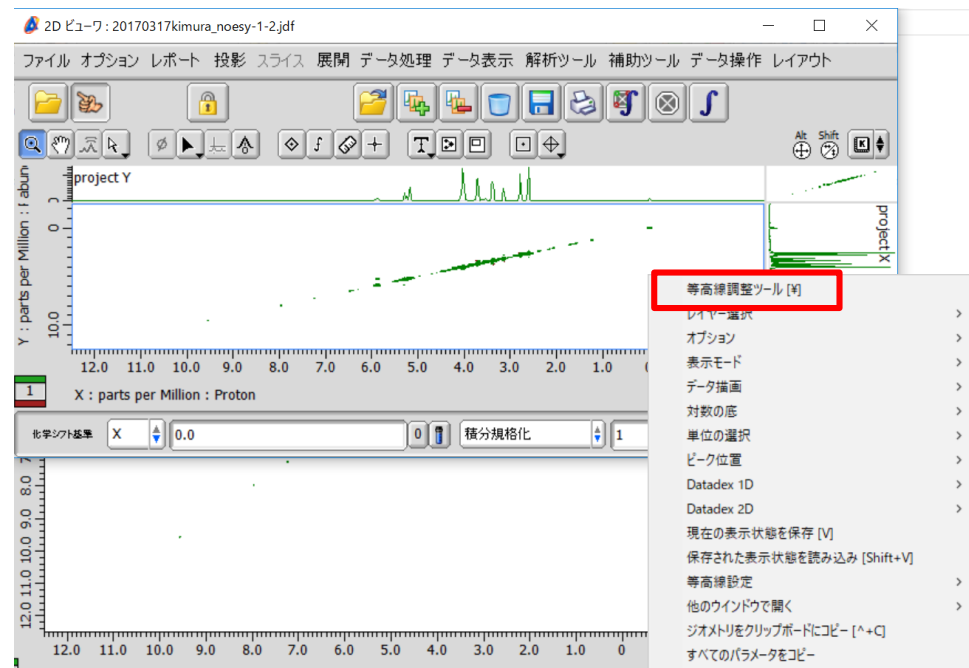
等高線の調整



- ・初期条件は、(b)のように強度の強いピークを基準として等間隔で等高線を描いている
- ・スペクトル全体のピーク強度に合わせて、等高線の間隔を(c)のように調整する。
- ・ノイズに等高線を多く描くとデータ量が膨大になり処理速度が遅くなるので注意する。

等高線の調整

- 1) [2D ビューワ]の2次元データ表示領域で長押し右クリックするとポップアップメニューが表示される。
- 2) ポップアップメニューより等高線調整ツールを選択する。



等高線の調整

◆プリセットボタン

等高線の本数を指定します。
2,4,6,8,12,16,24より指定できます。

◆Topスライダー

等高線の最高強度を決定します。

◆等高線レベルボタン

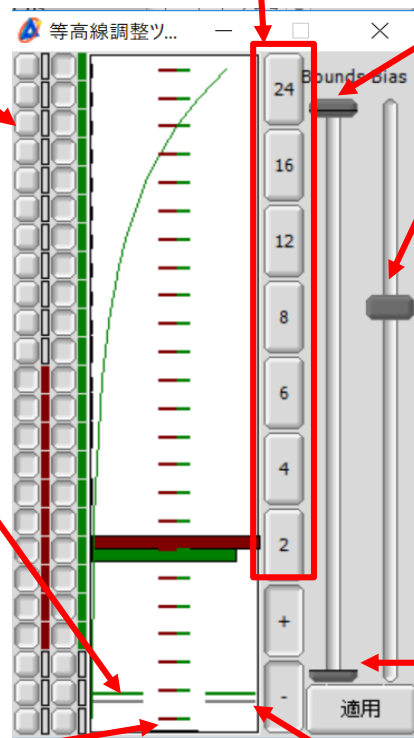
各ボタンをクリックして反転させることによって表示するレベルを指定させます。

◆スレッシュホールドレベル

データ処理後に自動設定。
2次元ピークピック処理に使用します。

◆ベースレベル

信号強度ゼロの位置です。
等高線調整ウィンドウの最下位に設定します。



◆バイアススライダー

TopスライダーとBottomスライダーの間で表示する信号強度を決定。バイアススライダーを移動すると、図中央の曲線の傾きが変わります。バイアススライダーを上部に移動すると信号強度の低い位置に多くの等高線がひかれることとなります。

◆Bottomスライダー

等高線の最低強度を決定します。

◆ノイズレベル

データ処理後に自動設定されます。

等高線の調整

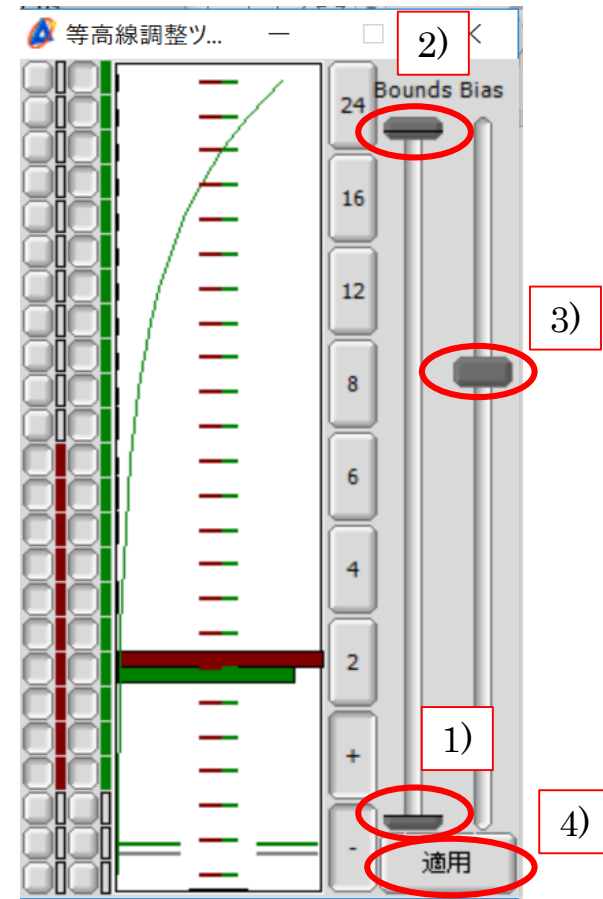
・通常、ノイズレベルを目安に最低強度を設定し、最高強度との間に何本の等高線を、どのように描くかを設定します。

- 1) Bottomスライダーで等高線レベルの下の位置を決める。
- 2) Topスライダーで等高線レベルの上の位置を決める。
- 3) プリセットボタンで表示する等高線の本数を決定する。
- 4) 「適用」ボタンをクリックする。

【注意点】

・ノイズレベル以下に多くの等高線を設定しないこと

→ノイズによる等高線が表示されシステムのメモリ消費量が激増し、プログラム処理速度が低下します。

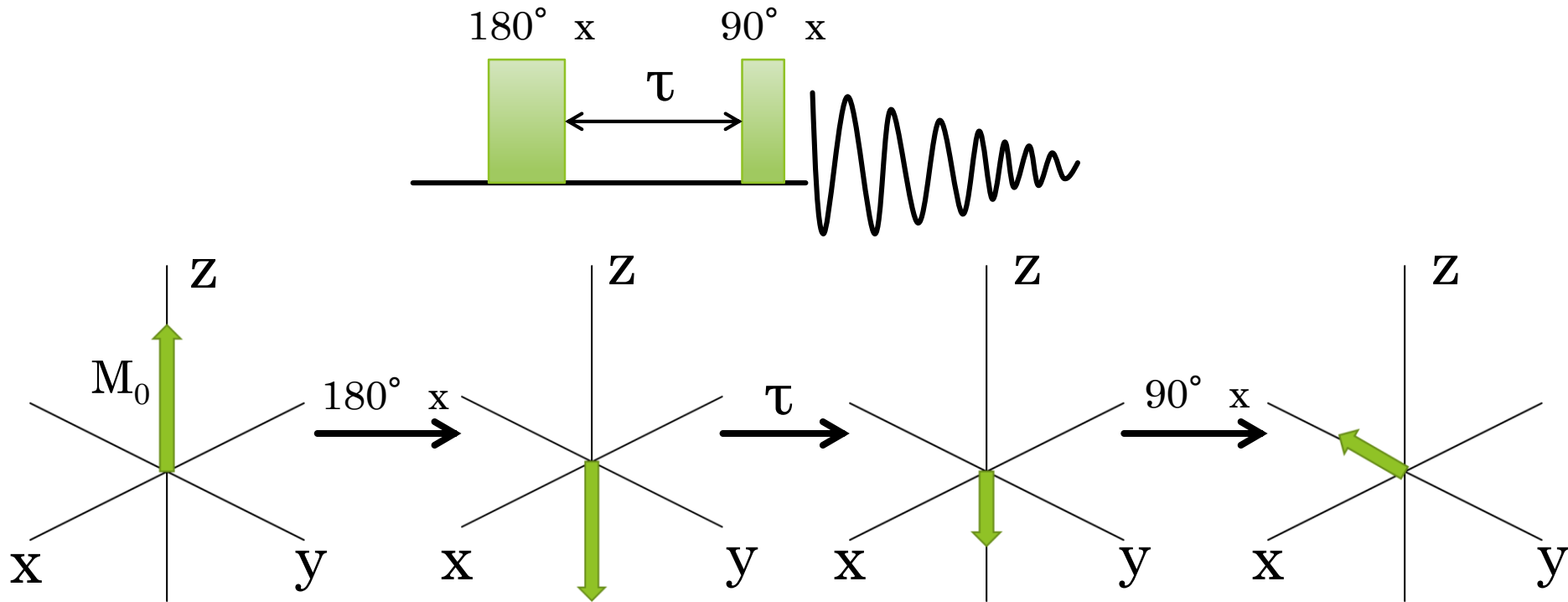


T_1 簡易測定 測定操作

T₁簡易測定

- NOE測定では、分子の平均的なT₁値を利用
→ T₁は分子内の個々のプロトンによって異なる。

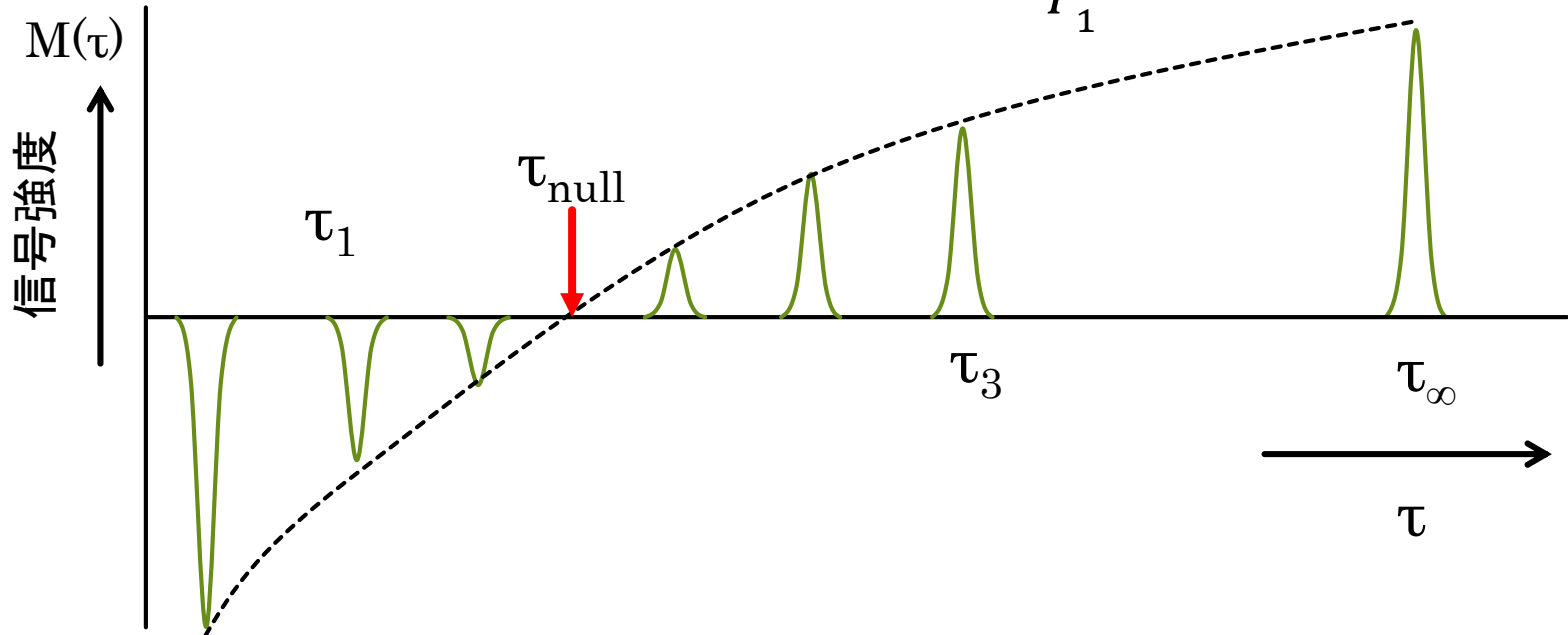
[反転法] Delta v5: double_pulse.jxp / v4: double_pulse.ex2



T₁簡易測定

◆ 時間 τ 後の信号強度M(τ)



$$M(\tau) = M_0 \left\{ 1 - 2 \exp \left(-\frac{\tau}{T_1} \right) \right\}$$



時間 τ を変えた複数の測定を行い、 τ_{null} (null point)を求める。

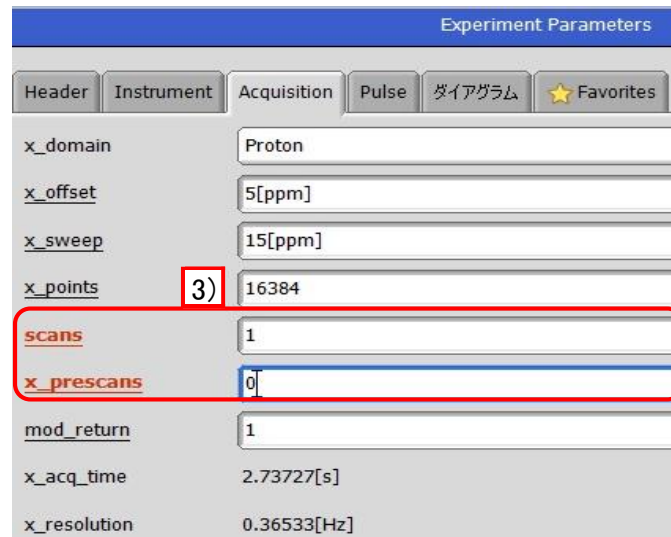
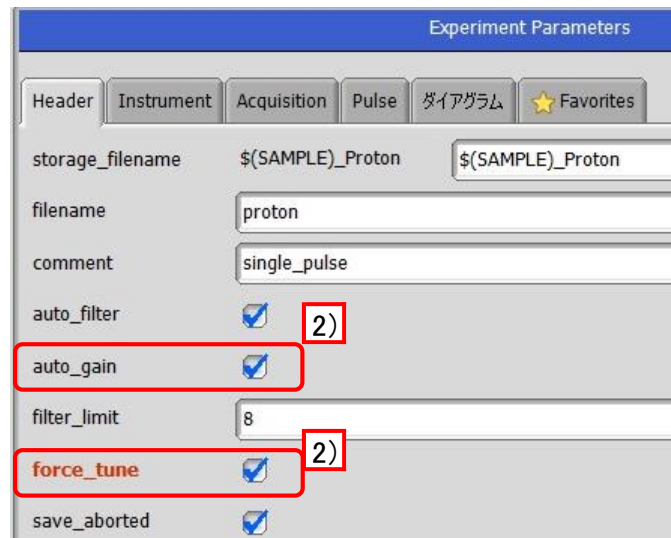
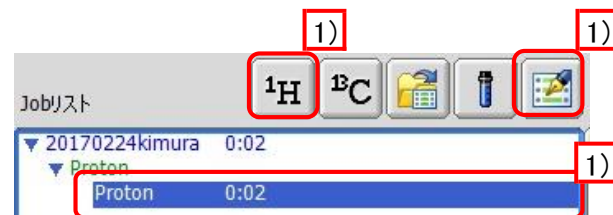
$$T_1 \approx \tau_{\text{null}} \times 1.44$$

^1H 測定

1) ^1H 測定  →ジョブリストの[Proton]を選択しパラメータ編集  を押す。

2) [Experiment Parameters]-「Header」にて、「force tune」「auto_gain」を☑

3) [Experiment Parameters]-「Acquisition」 「Scans」を1、「x_prescans」を0にする。

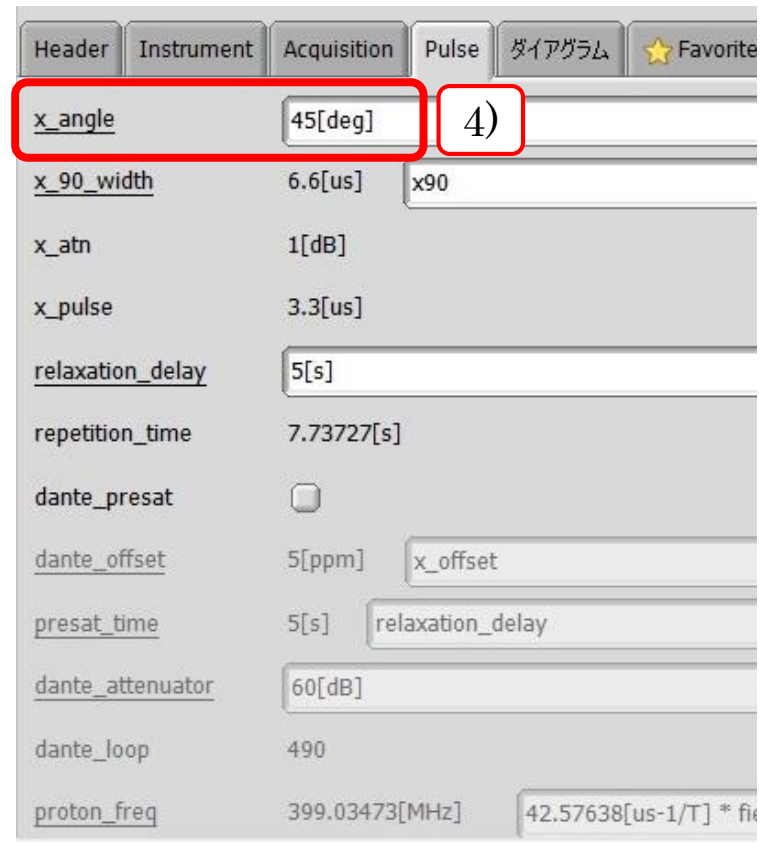


^1H 測定


4) [Pulse]タブにて、「x_angle」を45[deg]から90[deg]に変更する。

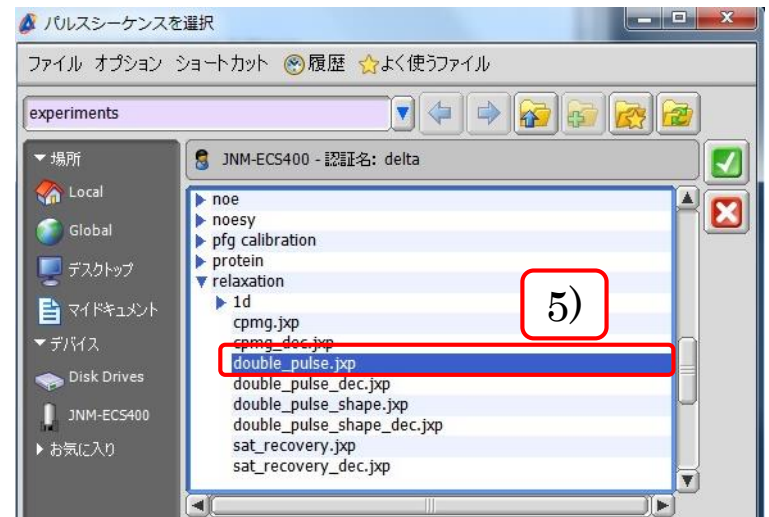
※45[deg]のまま、測定してしまった場合
→ 45[deg]で得られたreceiver_gainの値に2~4くらい増やしてみる。

※Receiver gainは、サンプルの ^1H 濃度により異なるので、サンプル毎に測定が必要。



T₁簡易測定

5) [分光計コントロール]にて、 を選択。
[パルスシーケンスを選択]にて、
「relaxation」→[double_pulse.jxp]を
ダブルクリックする。



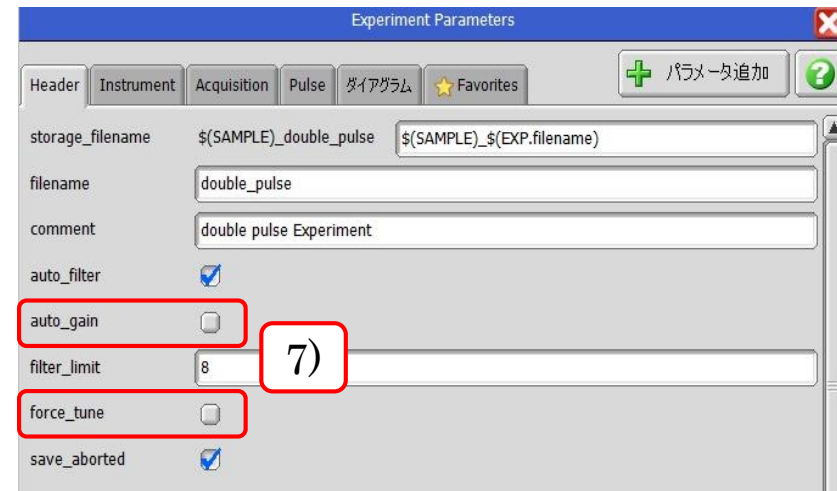
6) [job リスト]で「double_pulse」を選択する。



7) [Experiment Parameters]の[Header]で
「auto_gain」「force_tune」にを外す。

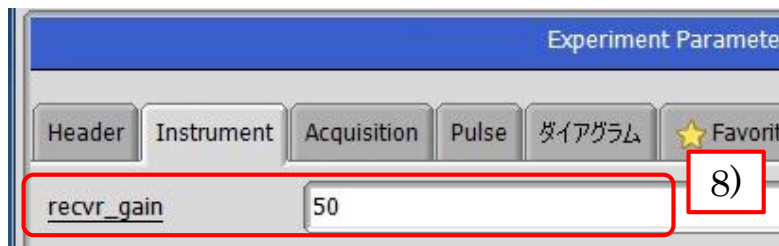
※「auto_gain」は、アレイ測定で行えない。

※「force_tune」は、¹H測定で行ったので不要。



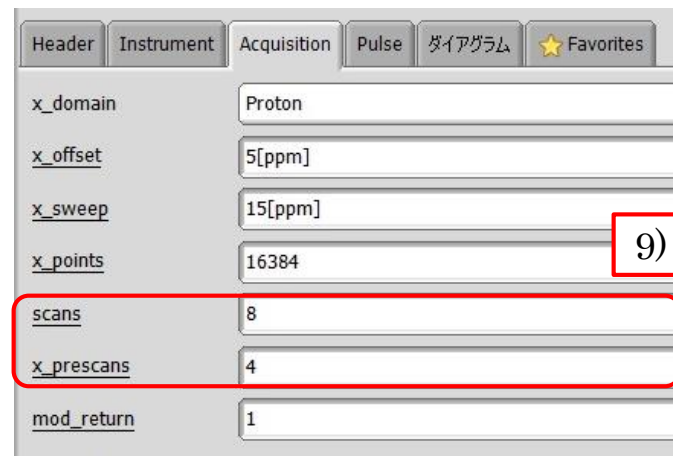
T₁簡易測定

8) [Experiment tool]の[Instrument]で、「recvr_gain」に¹H測定の数値を入力する。

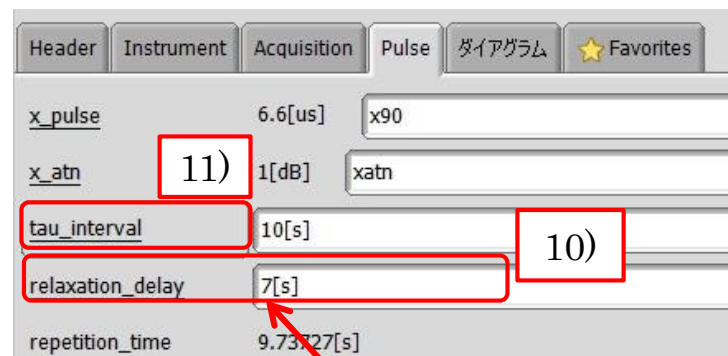


9) [Acquisition]にて、T₁簡易測定では、「scans」1 「x_prescans」0 とする。

※T₁をより正確に測定したい場合は、「scans」8 「x_prescans」4 とすると良いが、NOE測定の場合、
「scans」1 「x_prescans」0 で問題無い。



10) [Pulse]で、「relaxation_delay」を30[s]にする。
※最も長いと予想されるT₁の10倍が目安であるが、30[s]にしておけば、概ね問題無い。



【参考】T₁の目安は、分子量300～500くらいでは、約0.5～5秒。一般的に分子量が小さいとT₁は長くなる。

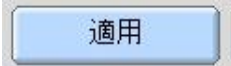
11) [pulse]で、「tau_interval」をクリックする。

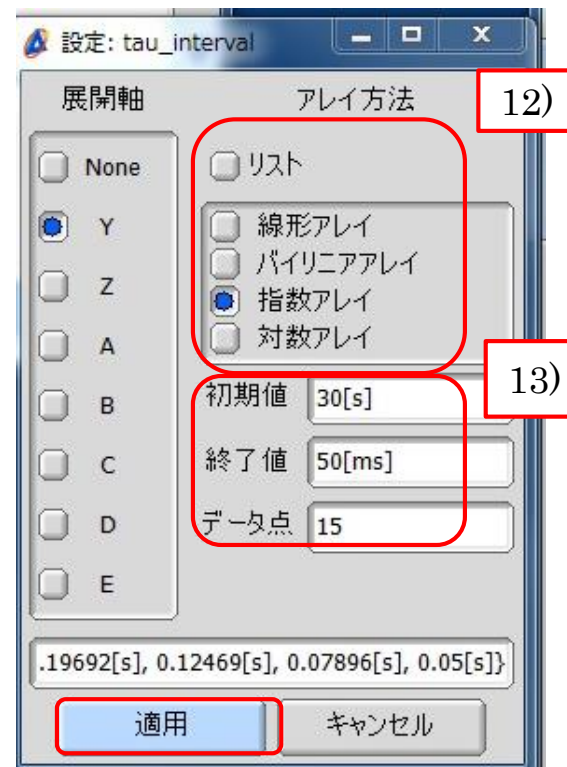
30(s)にしておけば、概ね問題無い。

T₁簡易測定

12) [設定 tau_interval]の[アレイ方法]で、
「リスト」の☑を外し、「指数アレイ」を☑する。

13) 「初期値」 予想されるT1の10倍くらいの値を入力
30(s)くらいにしておけばOK
「終了値」 予想されるT1の1/10くらいの値を入力
0.05(s)くらいにしておけばOK
「データ点」 アレイ測定する点数(10~15点)を入力

以上を入力後、 を押し、
測定登録を行う。

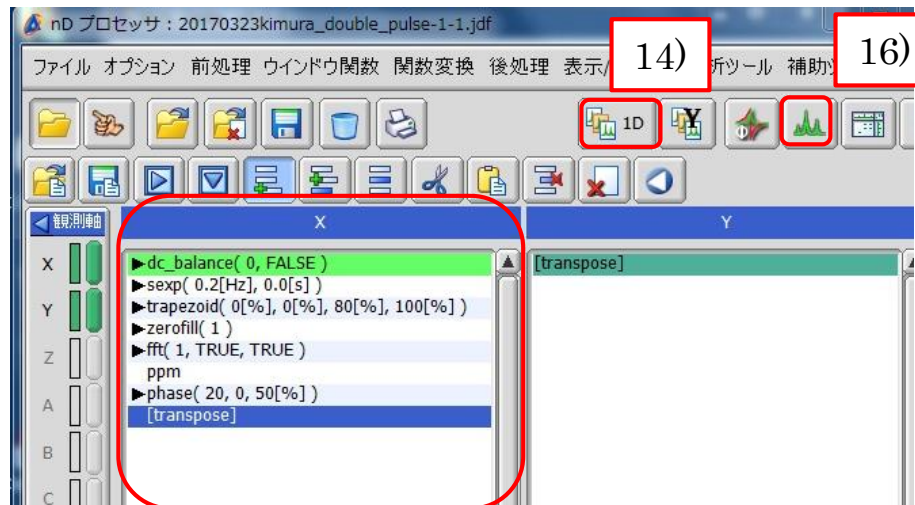


T₁簡易測定

14) [nD Processor]でx軸欄を選択し、

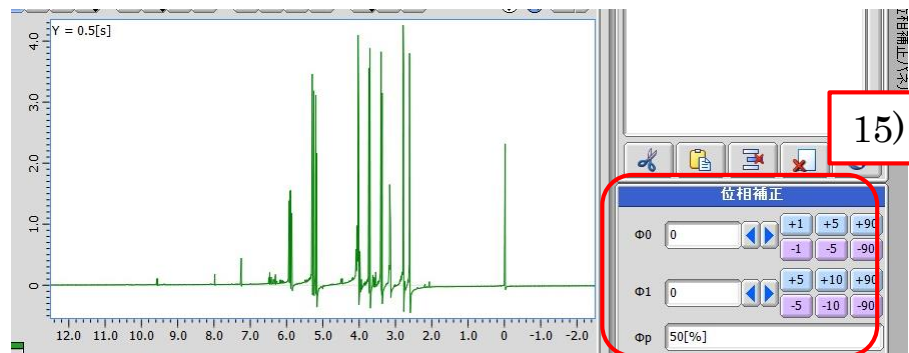


をクリックする。



15) [1D Processor]で¹Hスペクトルの位相を確認し、位相ずれがあれば、 ϕ_0 , ϕ_1 の数値を変更し、位相補正を行う。

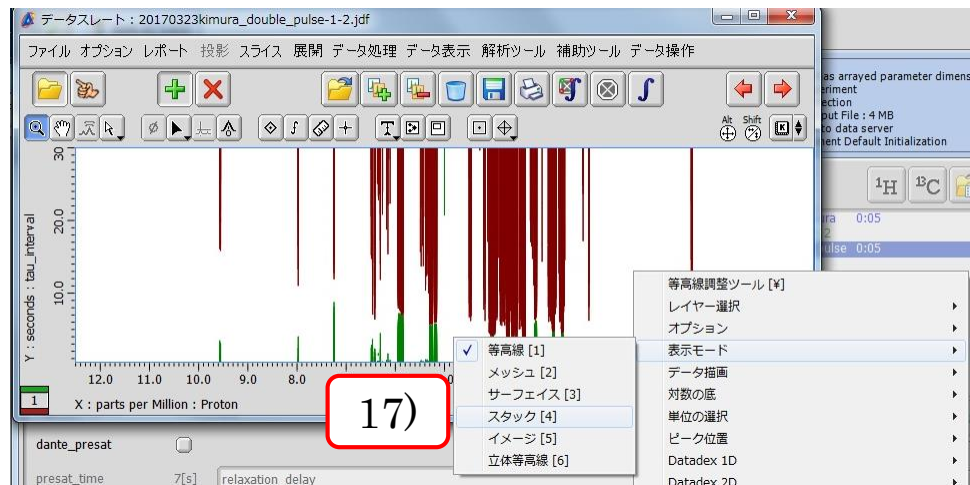
位相補正後、[1D Processor]を閉じる。



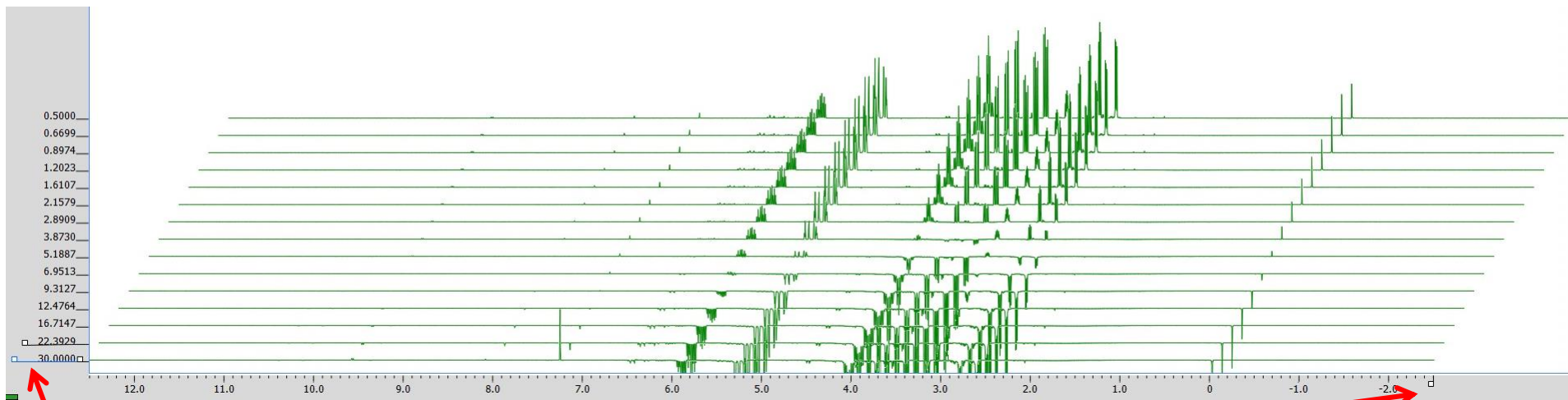
16) [nD Processor]で  をクリックする。

T₁簡易測定

- 17) [データスレート]のスペクトル表示欄で右クリックを長押しする。メニューが表示されるので、[表示モード]→[スタック]を選択。



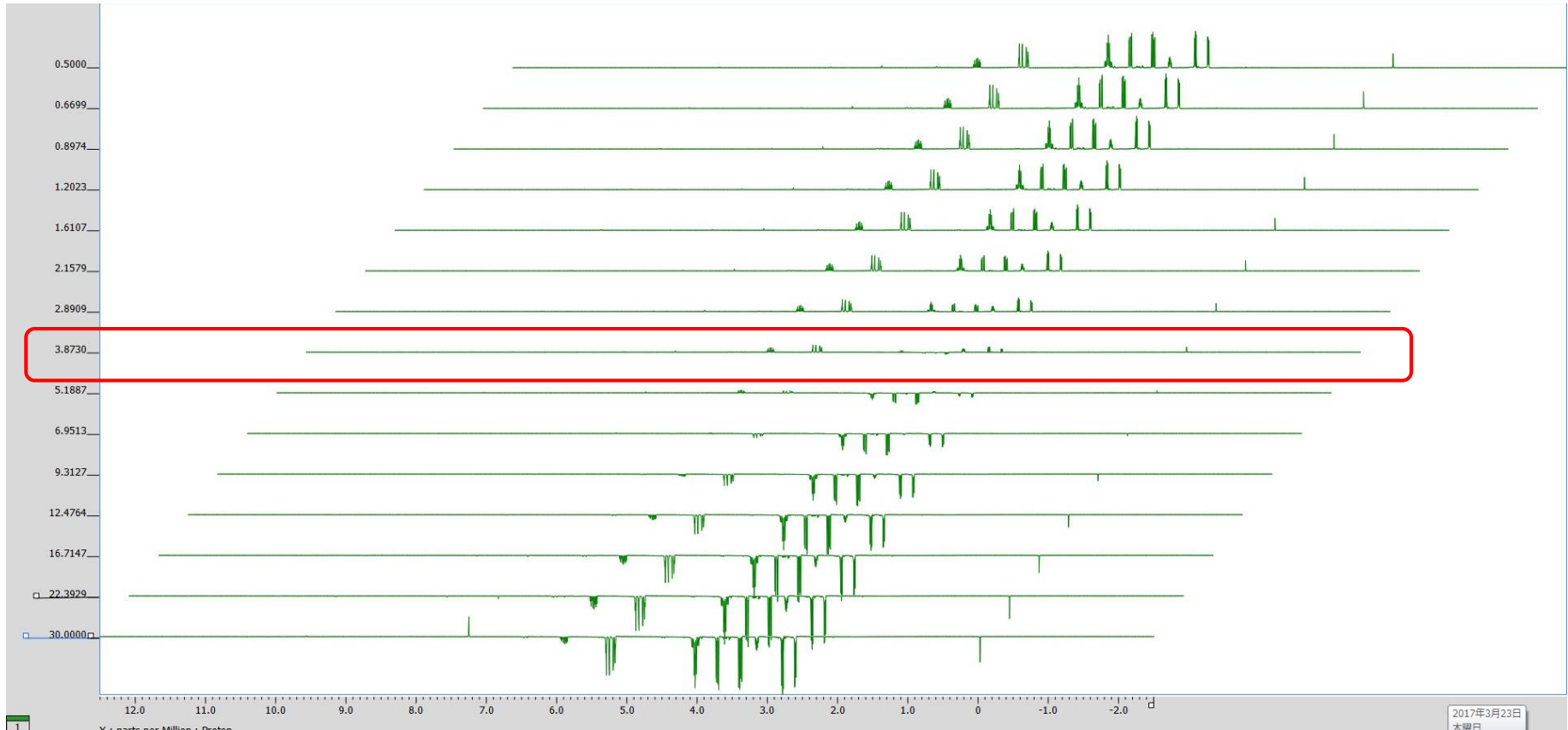
- 18) X軸、Y軸横の「□」を上下左右に動かし、スペクトル全体が見やすい位置を探す。



これをクリックしながら上下に動かす

これをクリックしながら左右に動かす

T₁簡易測定



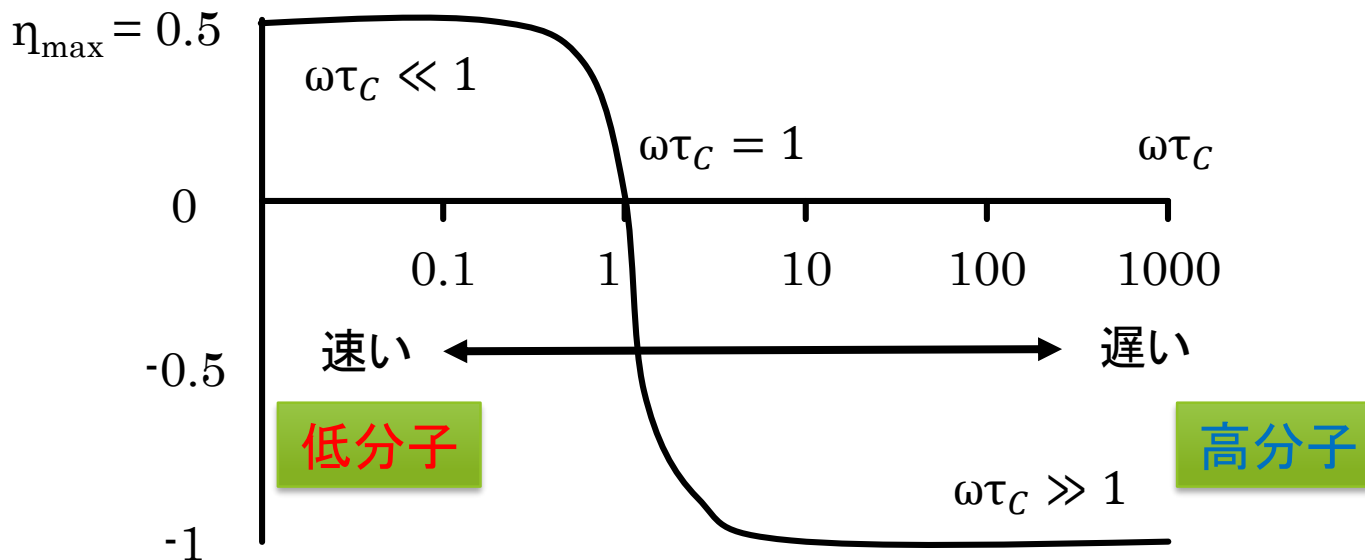
19) 全体のピーク強度が小さく、上向きと下向きのピークが半々くらいなところを探す。
上図の場合は、3.8730[s]

20) 17)で求めた値を1.44倍して、おおよその平均的T₁を求める。
上図の場合、おおよその平均的 T₁ : $3.8730 \times 1.44 = 5.573$ [s]

NOEで知っておきたいこと

NOEが出ないとき① 分子の運動性を変える

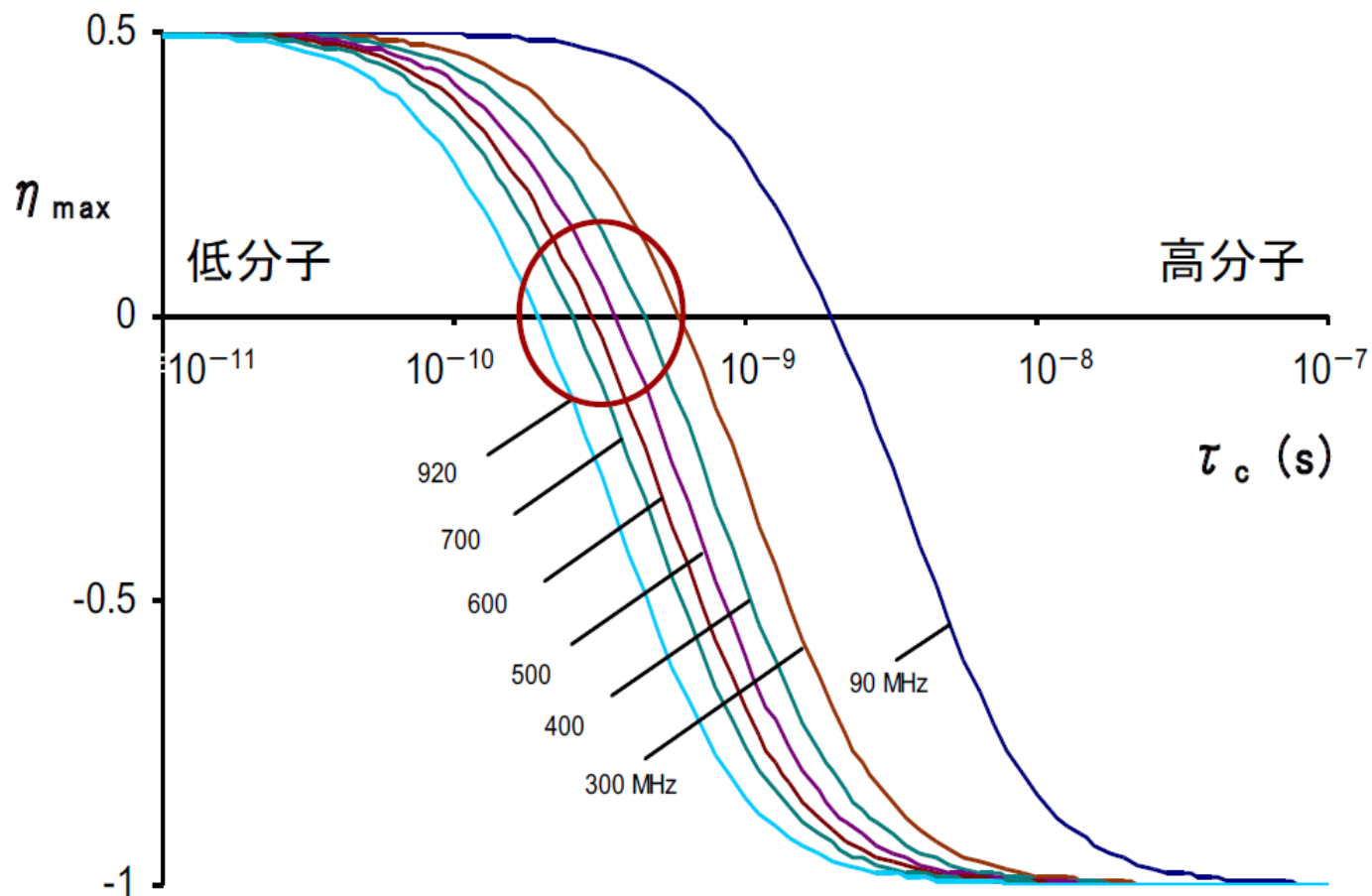
相関時間 τ_C or 観測周波数 ω を変えるとNOEが出るかも...



相関時間 τ_C を変化させるには...

- ◆ 測定温度と溶媒粘性を変えてみる。
→ 温度を変えると溶媒の粘度も大きく変わる。
- ◆ 溶媒を変更してみる。
→ 有機溶媒も溶媒により、粘度が異なる。

NOEが出ないとき② 共鳴周波数を変える



NOE強度と τ_c の磁場依存性

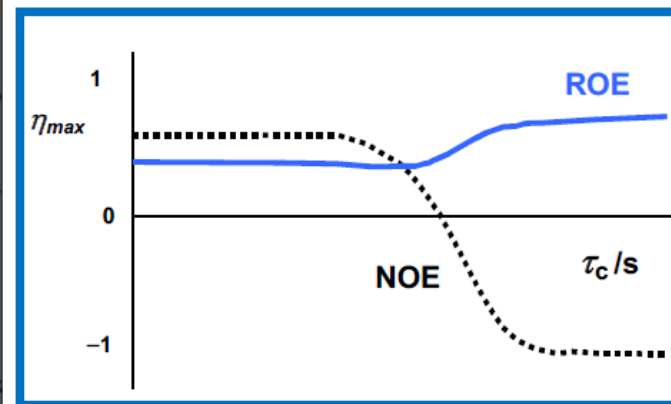
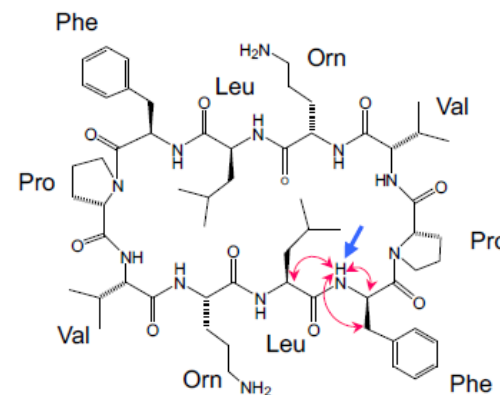
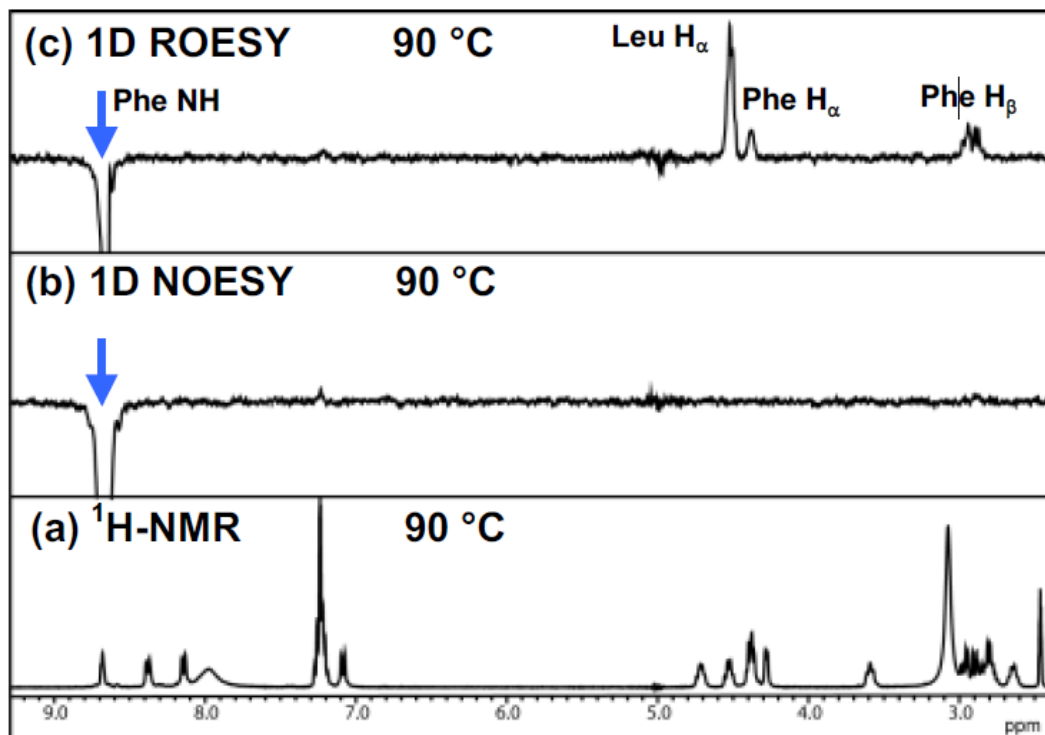
◆ 高磁場になるほど、NOEがゼロになる τ_c が短い

→ 低分子(溶液中での運動が早い)は磁場が高いと正のNOEが弱くなる。

NOEが出ないとき③ ROESY

Rotating - frame Overhauser Effect Spectroscopy

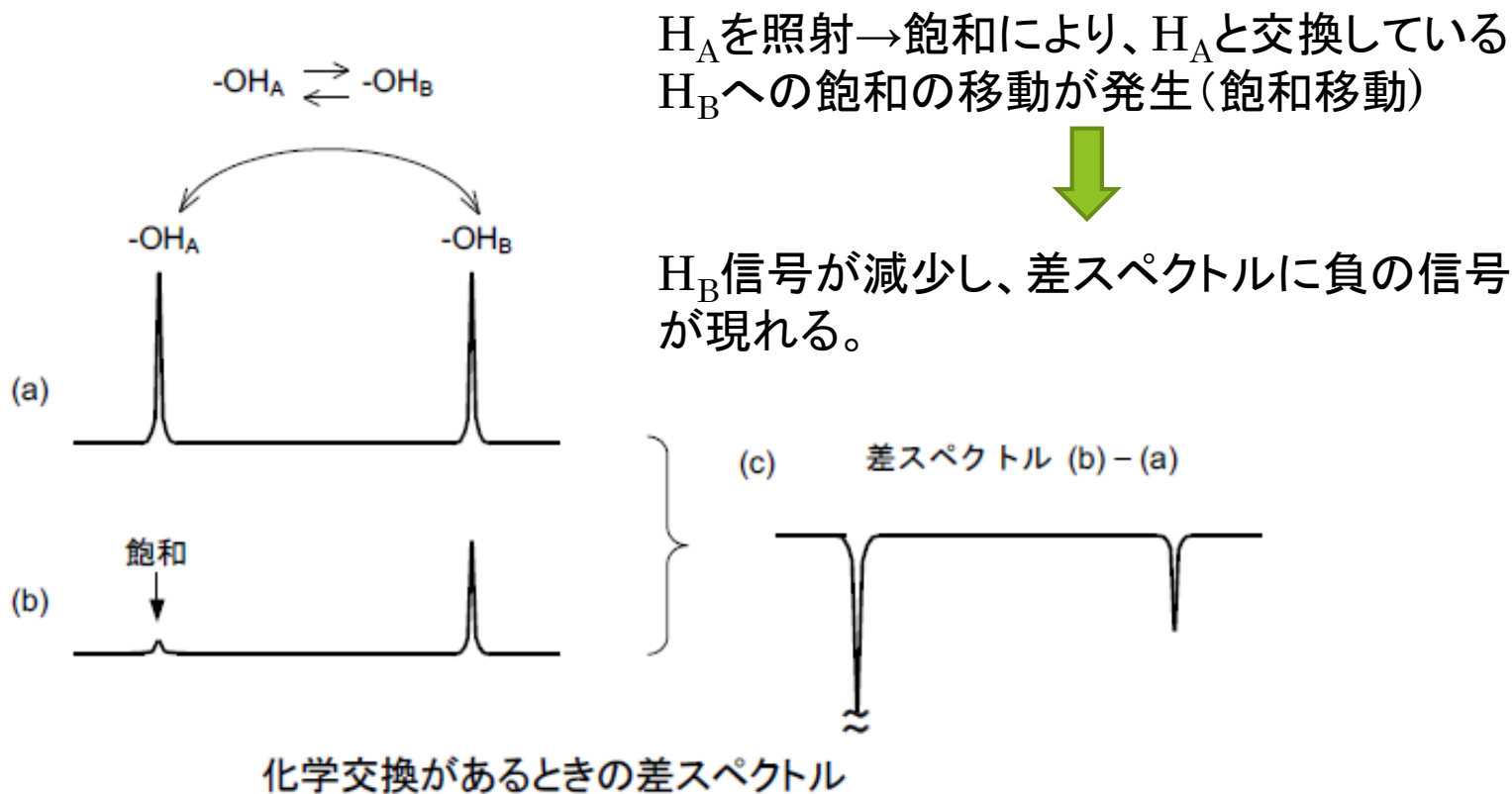
- ・ROESYで得られるNOE信号をROEと呼ぶ
- ・ROEシグナルは常に正となるが、不要信号が出やすい。
- ・ROESYは、NOESYがうまくいかないときに使う。



低分子なのに負のNOEとなる理由①

差NOEで照射信号と同じ向きの信号が観測される場合がある。

- ・交換性プロトン(OH, NH, NH₂, COOH)の場合に、よく見られる。
- ・これはNOEとは別現象
- ・1D NOESY、2D NOSEYにも同様に現れ、複数のコンフォメーションを観測されることもある。



低分子なのに負のNOEとなる理由①

水を選択励起

負のNOE: 全てのOHプロトン

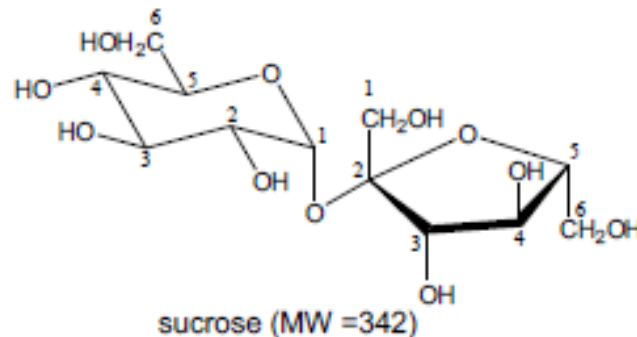
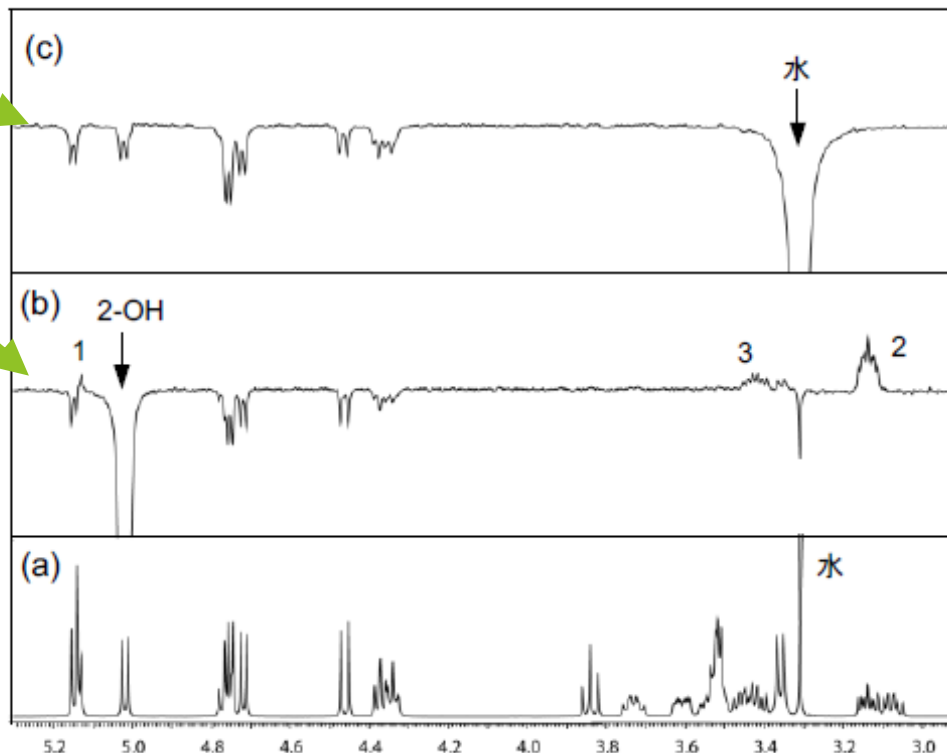
グルコースの2位のOHプロトンを選択励起

正のNOE: 距離的に近い1~3位のプロトン

負のNOE: 全てのOHプロトン & 水

EXSY(Exchange Spectroscopy)

- ・交換による相関を観測する測定法 (2つ以上のコンホメーションの交換など)
- ・NOESYと同じパルス系列
- ・NOESYと目的が異なるため、区別して標記

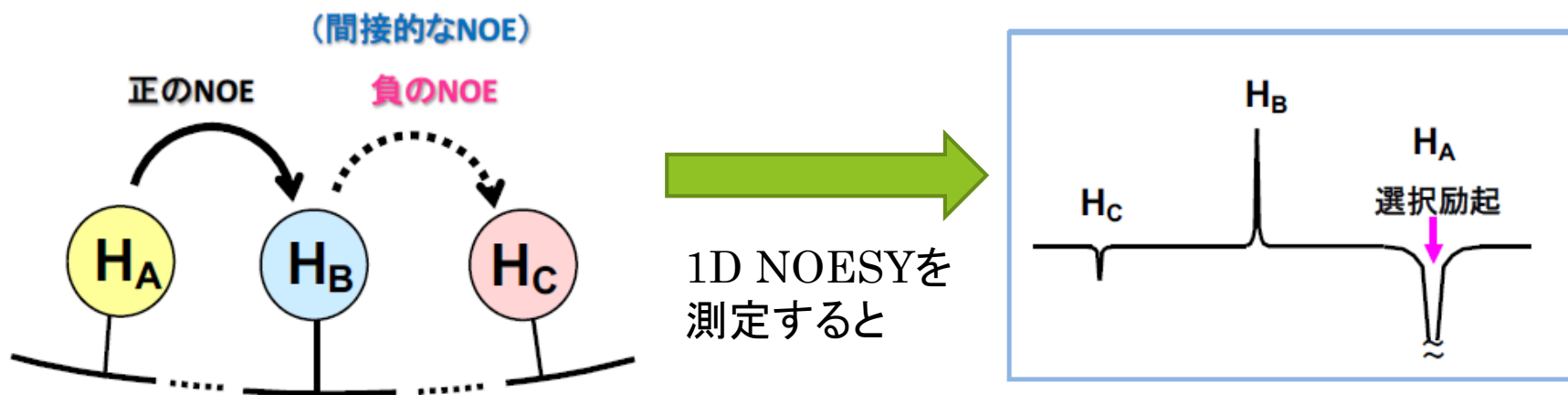


10mg / 0.6ml DMSO-d₆, 400MHz

低分子なのに負のNOEとなる理由②

プロトン同士が特別な位置関係にあるとき間接的なNOEを観測する。

- ・3つのプロトンが直線的に並ぶ立体構造のときに最も生じやすい(3スピン効果)
- ・間接的なNOEはプロトン間の距離が近いことを示さないので要注意

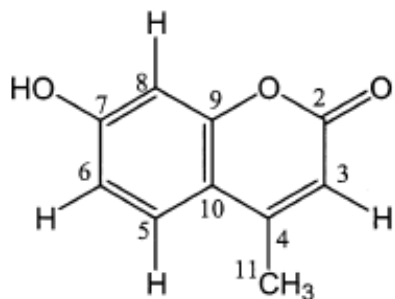


- $\omega\tau_C < 1 \rightarrow$ 間接的NOEは真のNOEと反対方向のため、区別が容易
- $\omega\tau_C > 1 \rightarrow$ 同じ向きに信号が現れるので区別ができない

・スピン拡散

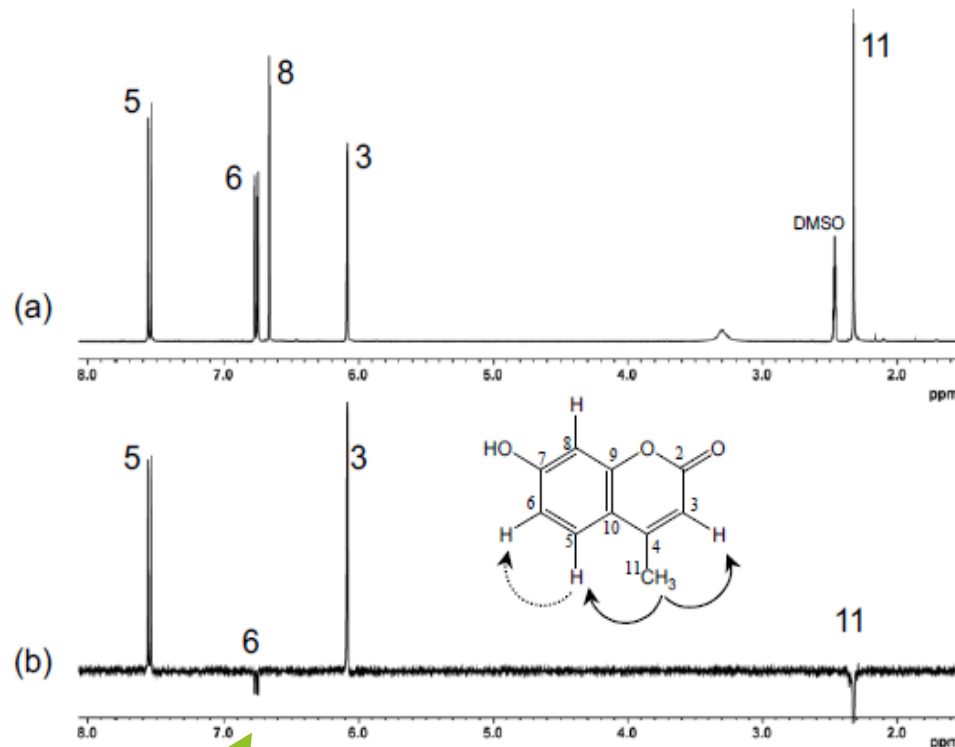
生体高分子などで、はじめに2つのスピン間で生じたNOEが近傍のプロトンを介して離れたプロトンまで広がっていく現象

低分子なのに負のNOEとなる理由②



4-methyl umbelliferylone (MW =176.17)

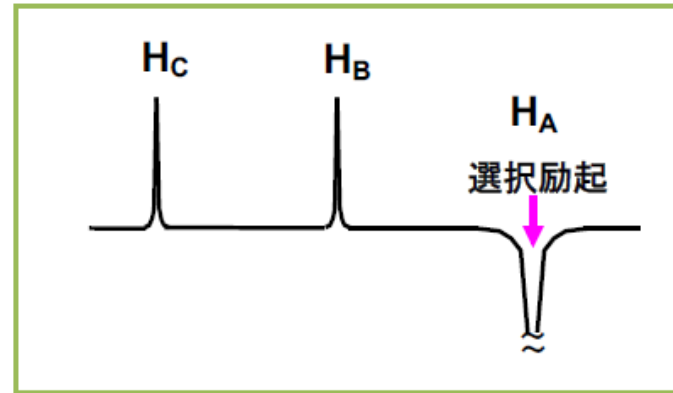
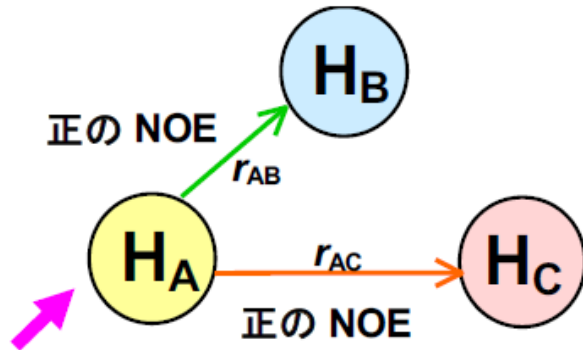
10mg / 0.6ml DMSO-d₆, 400MHz



11位プロトンを選択励起
5位プロトンを経由して6位プロトンに負のNOE

三角問題

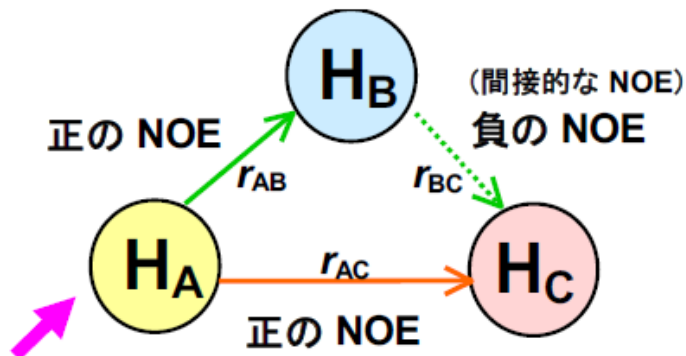
H_A を選択励起させると → 距離の近い H_B と H_C の正のNOEが観測されるはず！！



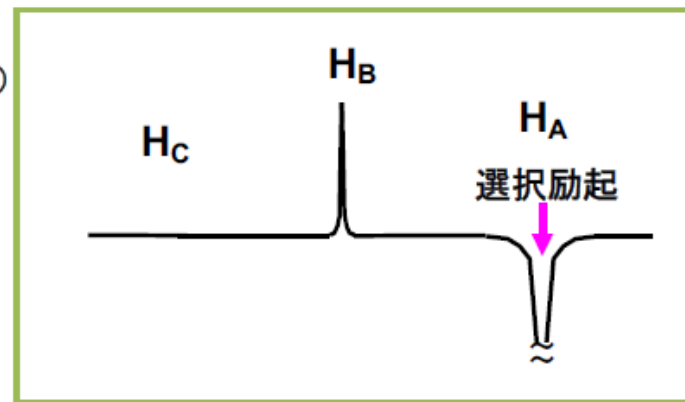
1D-NOESYスペクトルの模式図

核間距離 r が $r_{AB}:r_{BC}:r_{AC}=1:1:1.26$ となる場合

→ H_B の間接的なNOE(負のNOE)が H_C の正のNOEを打ち消し、
NOEピークがゼロになる場合がある。



$$r_{AB}:r_{BC}:r_{AC}=1:1:1.26$$



1D-NOESYスペクトルの模式図

NOESY信号強度から¹H間の距離が分かる？

距離が既知のプロトン(メチレンや芳香環のオルト位プロトンなど)のNOE強度を基準として、強度比より目的のプロトン間距離を計算する方法があります。



ただし・・・

- ・NOE強度(相関信号の体積積分より算出)を厳密に求めることが難しい。
→データ解析者による誤差が生じやすい。
- ・重なり合った信号の積分を取ることも難しい。



核間距離を求めたとしても・・・

定量的に扱うのは、十分な注意が必要です。

[低分子の場合]

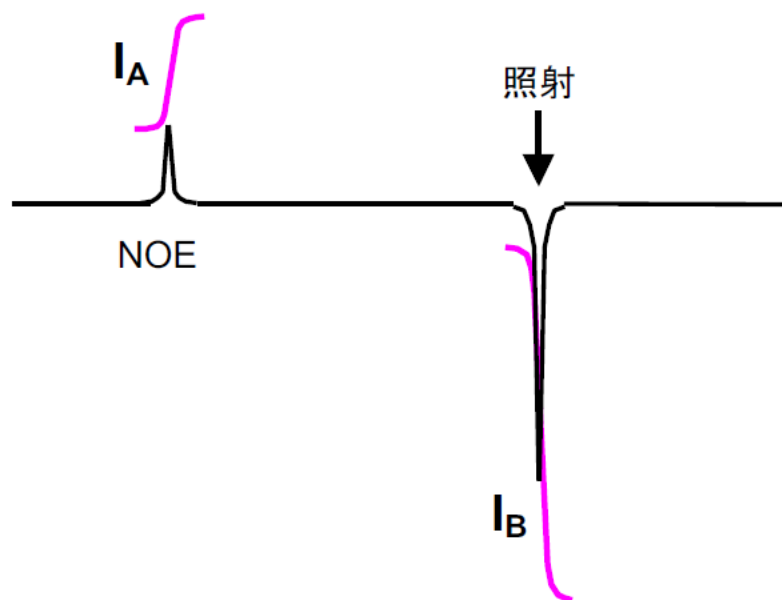
- ・複数の立体配座が平均化される場合、NOE強度が距離に依存しなくなる。

[生体高分子の場合]

- ・NOE強度を積分でなく相関信号の高さで半定量的に大別する場合があります。
例) strong: 3 Å以内 medium: 4 Å以内 weak: 5 Å以内など

NOESY信号強度から¹H間の距離が分かる？

差NOEスペクトルで積分を取ってNOE強度を%表示することがあります。
→定性的な解釈で使うものです。
%の大小だけで核間距離は議論できません。



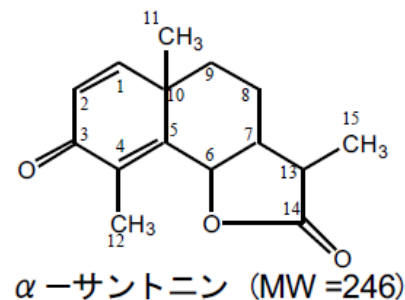
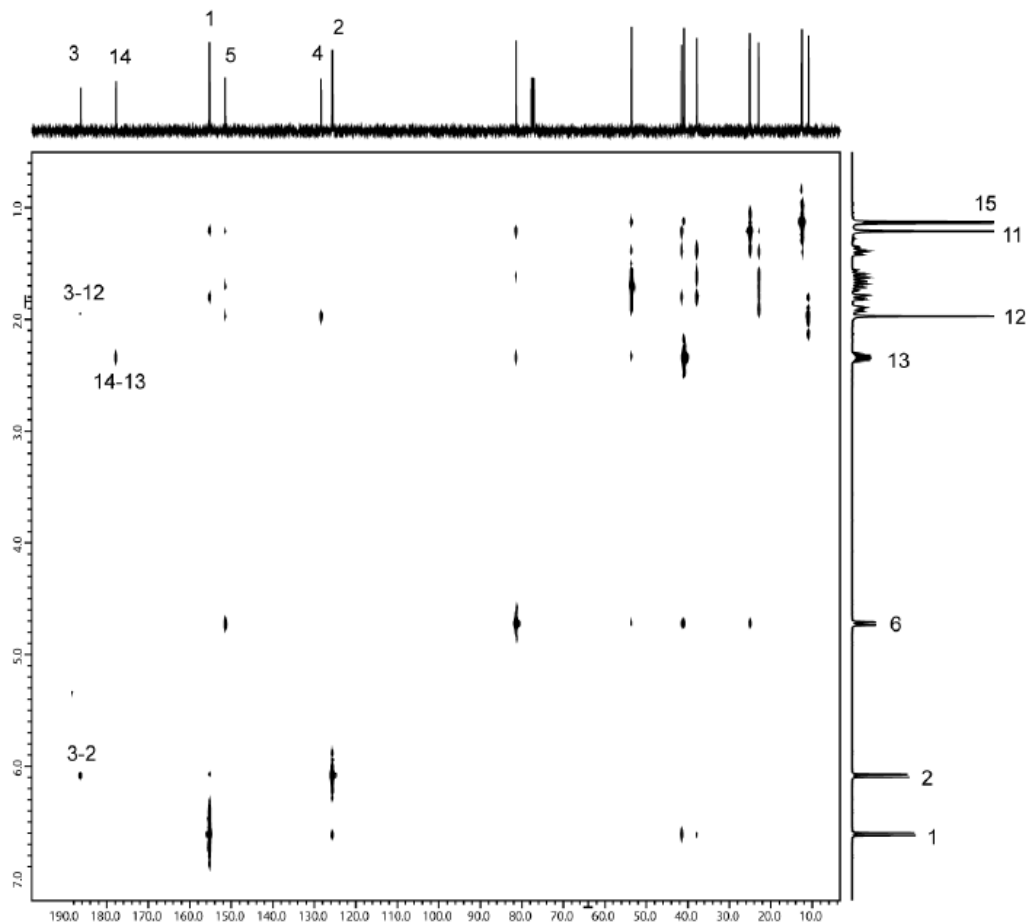
$$\left(I_A \times \frac{1}{n_A} \right) \div \left(I_B \times \frac{1}{n_B} \right) \times 100 (\%)$$

I_A 、 I_B : NOE信号の積分値
 n_A 、 n_B : A、Bのプロトンの数

差NOEの積分(模式図)

^1H と ^{13}C のNOESYは測定できるのか？

異種核間NOE測定法HOESY (測定時間: デフォルトで6時間くらい)



α -サントニンのHOESYスペクトル
(150 mg / 0.6 ml CDCl_3 , 400MHz)
192 scans, mixing time 2 秒

- ・ ^1H の付いていない四級炭素やカルボニル基などの構造情報が得られる。
- ・測定したいNOEが小さいことが多く、あまり実用的ではない。