



InsightMR を使った反応モニタリング

ブルカー・バイオスピン株式会社 アプリケーション部
佐藤 一
堤 遊

The "InsightMR" logo is centered on a background of chemical structures and a blue-to-green gradient. The word "Insight" is in a black, sans-serif font. The "MR" is enclosed in a blue circular emblem with a white highlight, and the letters "M" and "R" are in a bold, black, sans-serif font.

InsightMR

Would you like to learn more? Contact a customer service representative.



- InsightMRの概要
- InsightMRフローセルの紹介
- InsightMR制御ソフトウェアの紹介
- アプリケーション例

リアルタイム反応モニタリングの目的



- 目的:

- 反応進行・完了の確認
- *In-situ*での収率の確認
- 反応メカニズムの理解
- 定量的な経時データからの反応速度パラメータの解析
- 化合物の安定性、分解の確認
- 溶解過程の観測
- 生化学反応の追跡
- ...



様々な反応モニタリングの手法

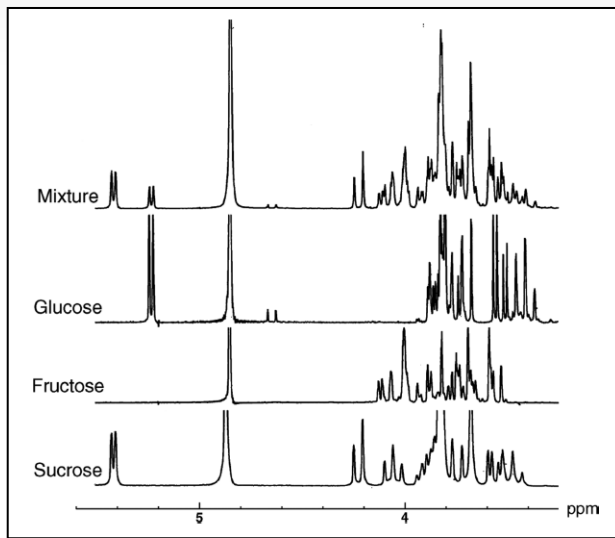


- 熱分析
- LC-UV
- MS, GC, GC-MS
- IR
- **核磁気共鳴 (NMR) 分光法**
 - 基本的に定量分析が可能
相対量の分析ならばキャリブレーションは不要
 - 情報量が豊か
官能基や構造の情報が得られる。
中間体や生成物に関する情報がスペクトルから見て取れる。
またそれぞれの経時変化を追跡できる

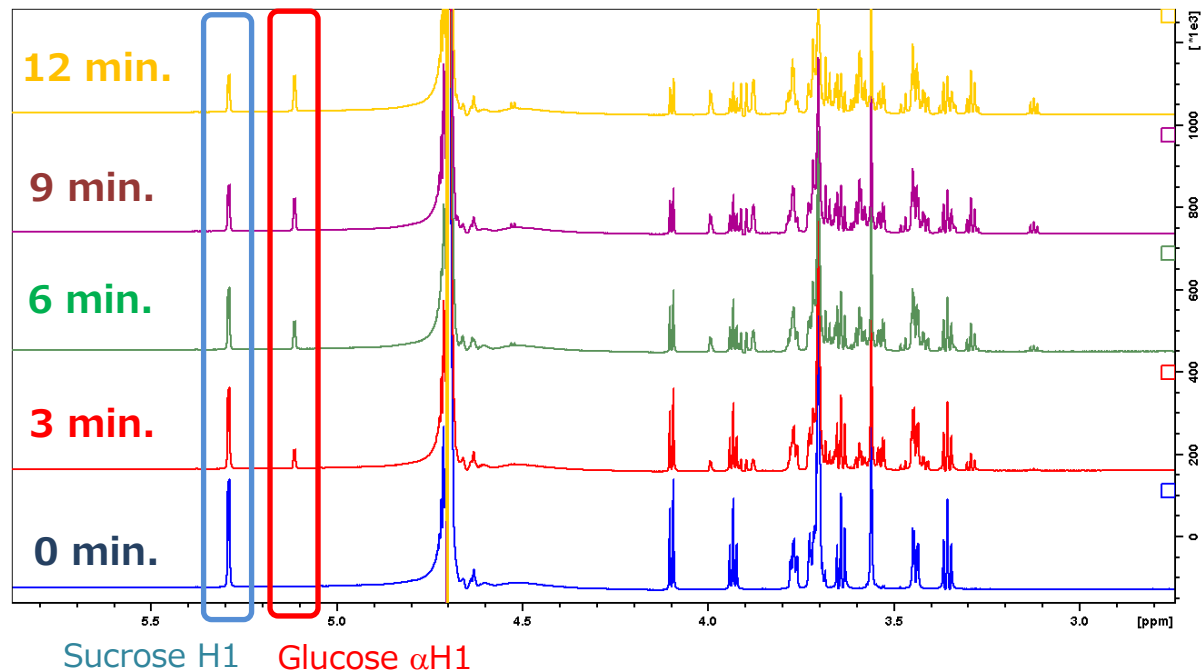
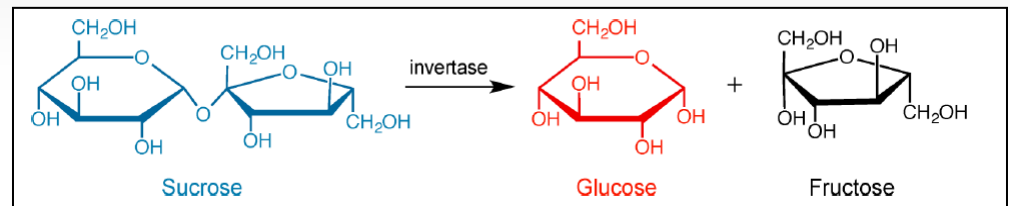
NMRスペクトルの反応による経時変化



● インベルターゼを使ったsucroseの加水分解反応

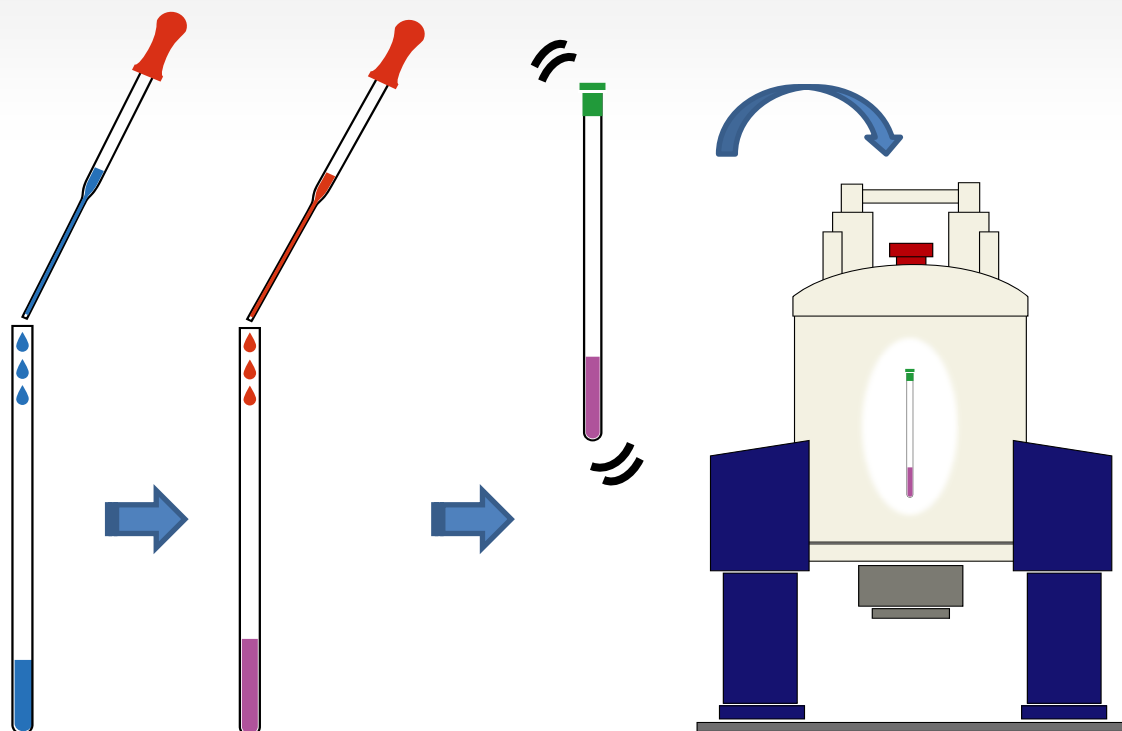


S.J.Kohler, J. Chem. Educ., 2014, 91



- ✓ 複数の化合物を区別して定量できる。
- ✓ NMRで観測可能な核を含む化合物はすべて見える。
- ✓ 積分値を規格化することで反応を定量的に追跡できる

NMRを使った反応モニタリングの実際



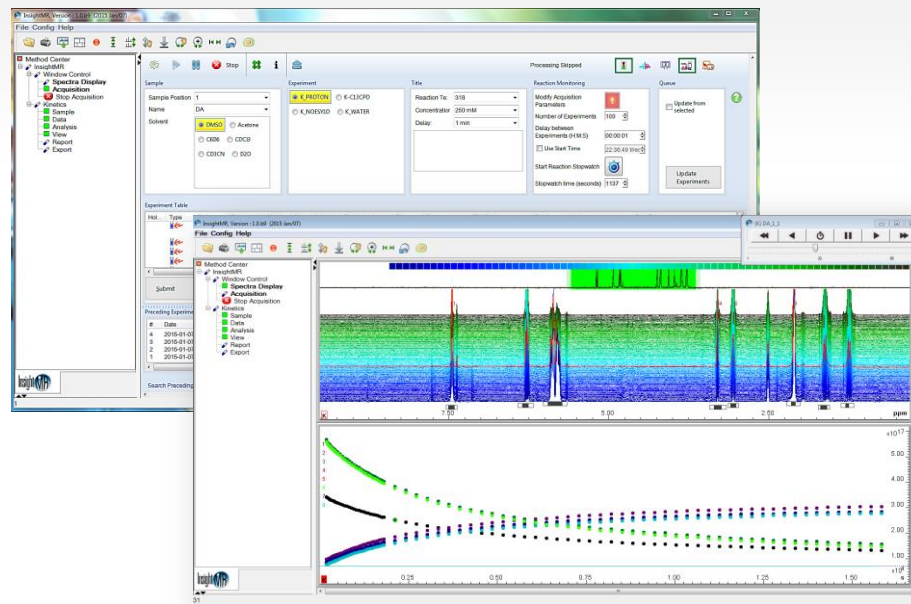
- ① 反応液の一部をサンプル管に入れておく
- ② 反応開始剤を入れる **反応開始**
- ③ 急いで蓋をして、よく混ぜる
- ④ 急いで磁石の中にサンプル管を入れる
- ⑤ 急いで測定の準備をする
 - ロック
 - 温調
 - チューニング
 - シミング
- ⑥ 経時変化スペクトルを測定する

- × 反応開始から測定開始までのオーバーヘッドが大きい
- × 最初に混ぜる以外に系を均質に保つ方法がない
- × 反応液の反応途中を抜き取り、他の分析をおこなうことができない



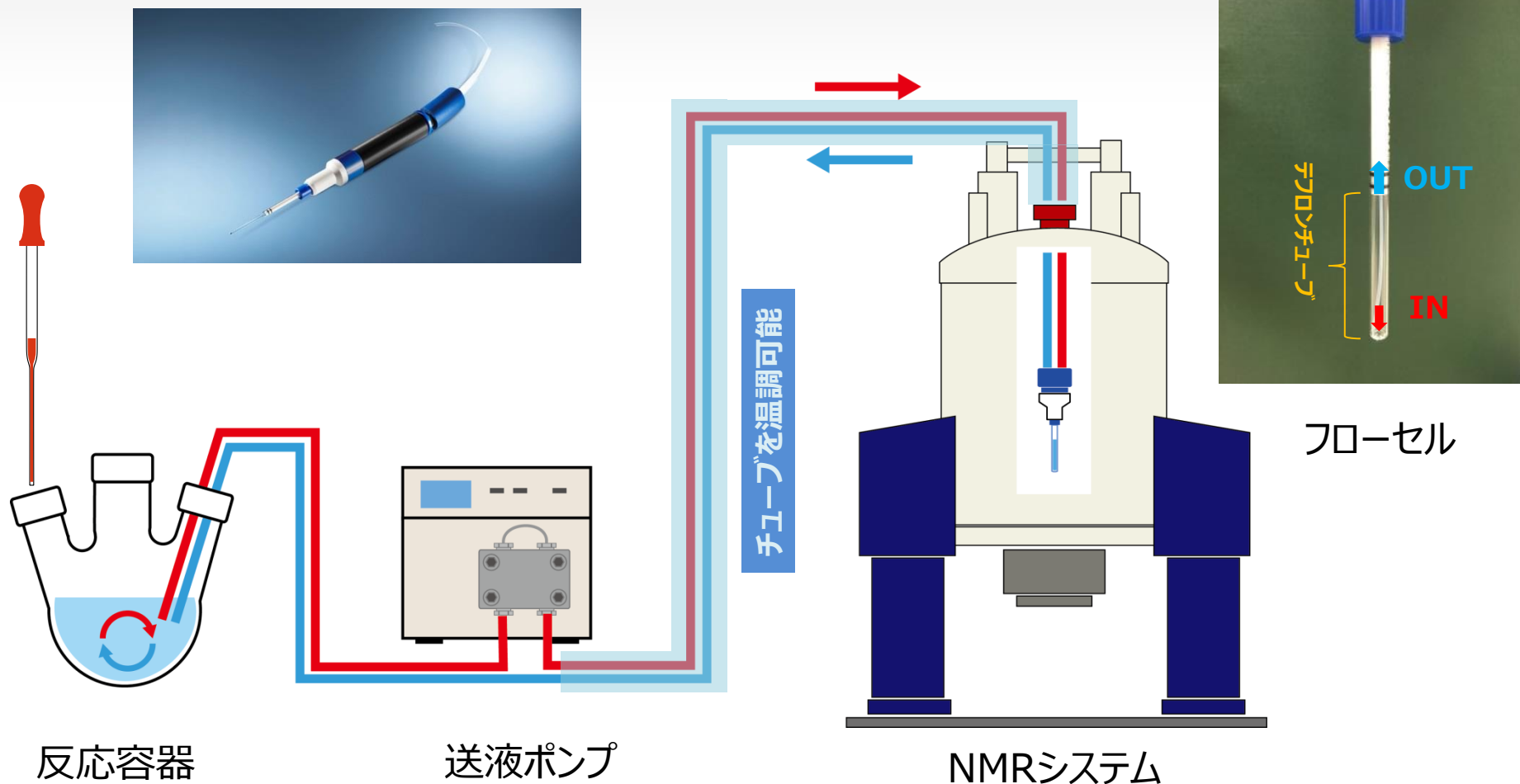
InsightMR フローセル

- フローセルと反応液を磁石に入れて測定の準備を事前におこなえる
- 反応開始剤は手元の反応容器で入れられる
- 反応容器からトランスファーチューブ、フローセルまですべて温調可能
- 継続的に攪拌をおこない、系を均質に保てる
- 反応途中で反応液を抜き取り、他の分析をおこなえる
- 一定時間ごとの測定をオートメーションで実行
- 溶媒信号の消去などの設定も自動でおこなう



InsightMR ソフトウェア

InsightMR 概念図



反応容器

送液ポンプ

NMRシステム

フローセル

構成品一覧



- **NMRシステム**
磁場やプローブは問わない
制御ソフトウェアはTopSpin 3.5以上



- **反応容器**
とくに反応条件を制御しなければフラスコなどの容器だけで十分



- **InsightMR フローセル**



- **チラー**
フローセルの温調をする場合に必要

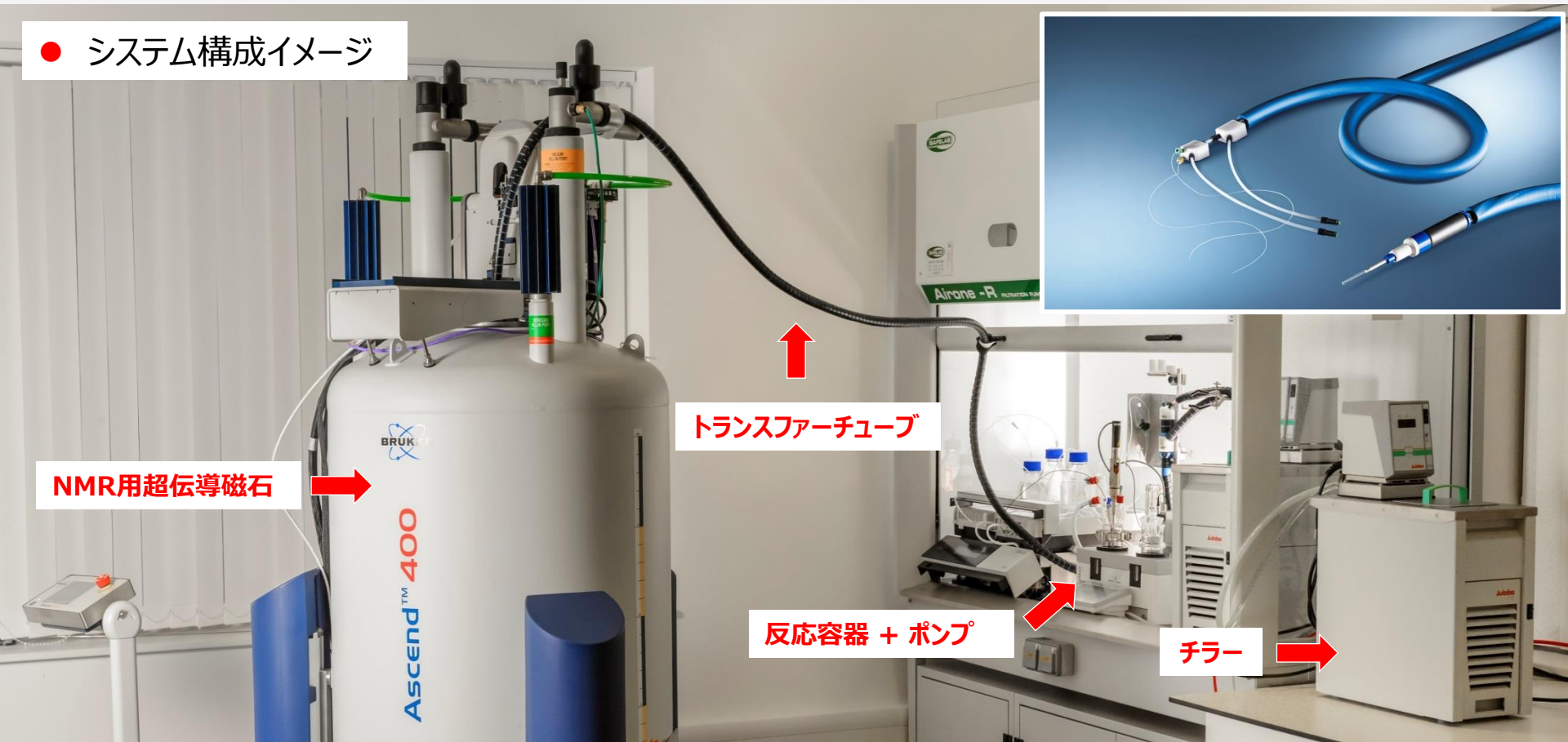


- **送液ポンプ**
シングルのプランジャーポンプなど
送液速度によってはペリスタティックでも可

実験室でのセットアップ例



● システム構成イメージ

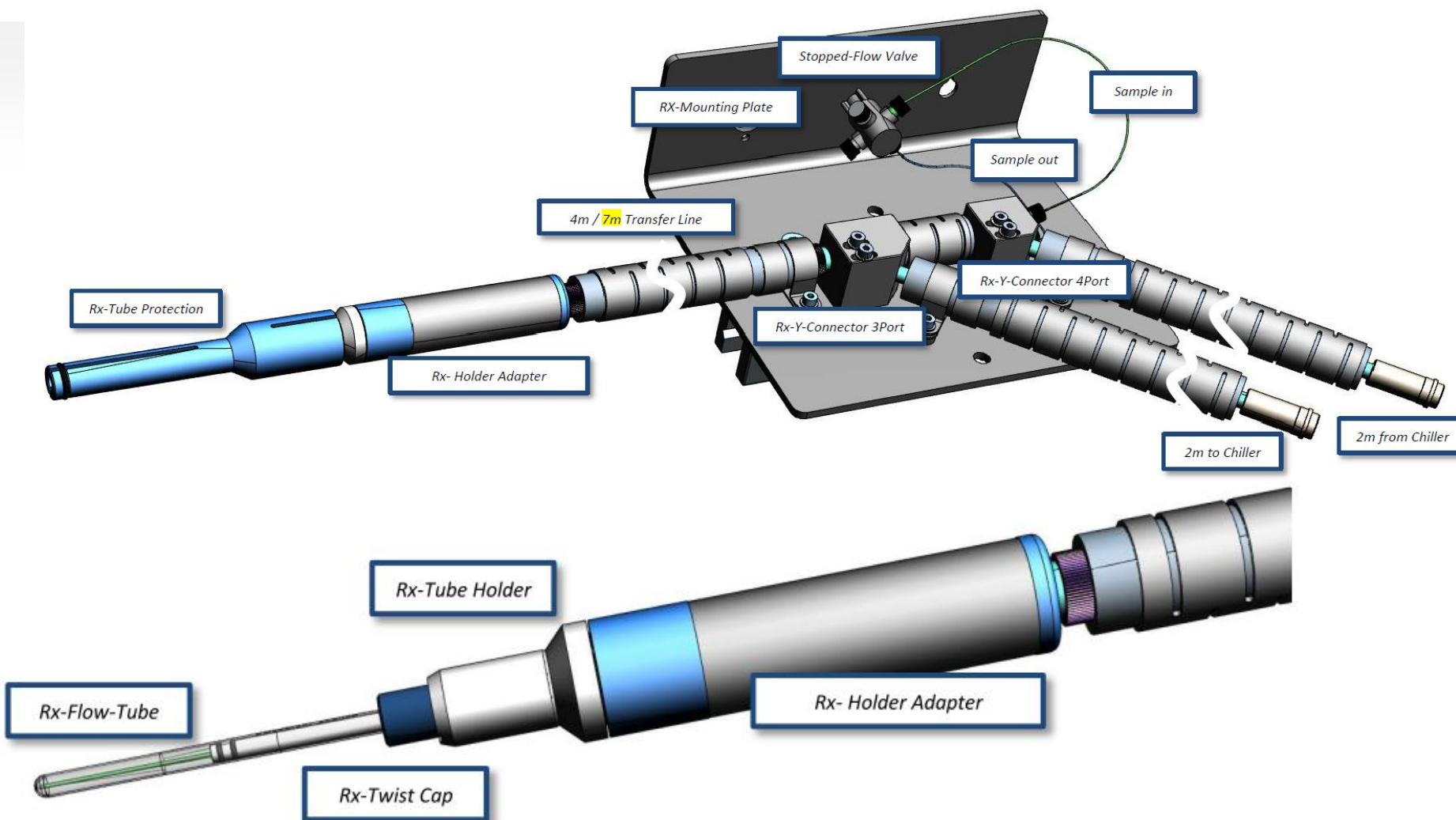


このWebinarの内容



- InsightMRの概要
- InsightMRフローセルの紹介
- InsightMR制御ソフトウェアの紹介
- アプリケーション例

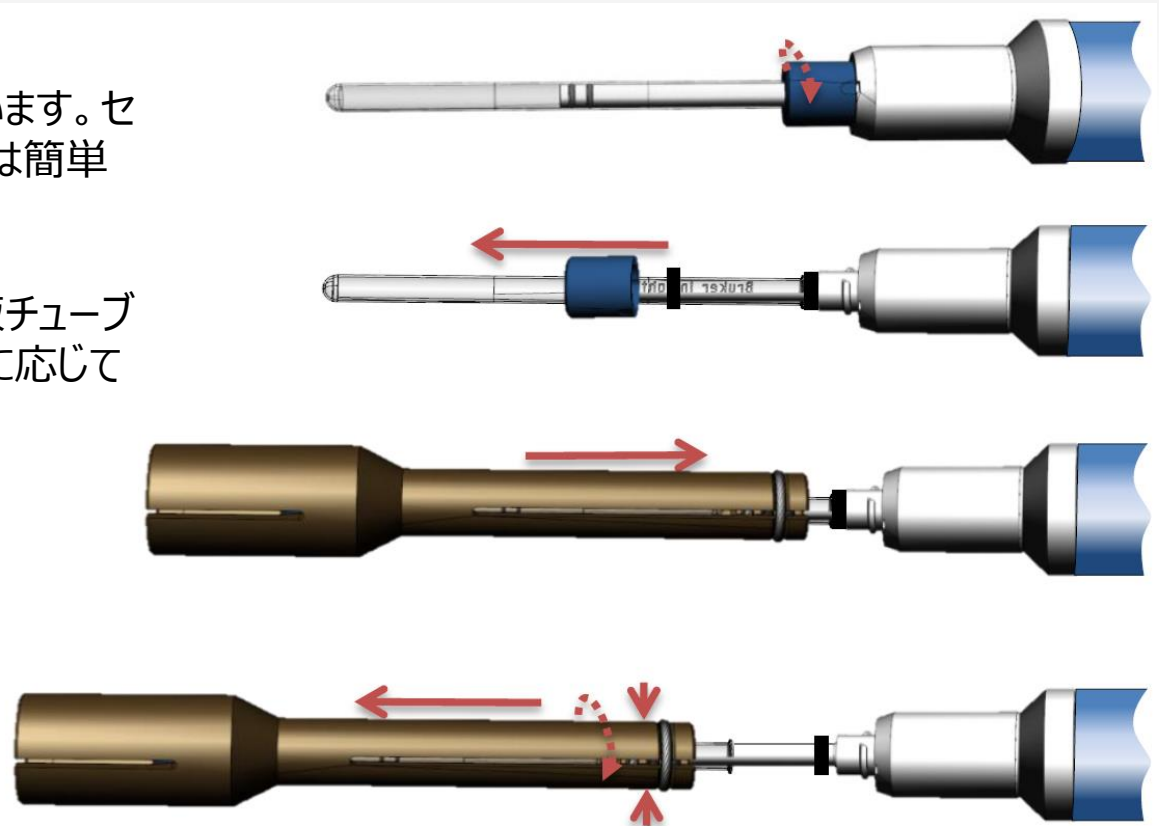
フローセルの構成詳細図



フローセルのメンテナンス



- セルは取り外し可能となっています。セル内に汚れなどがある場合には簡単に取り外し、交換ができます。
- テフロンチューブの内径や送液チューブ全体の長さもアプリケーションに応じて変更可能。

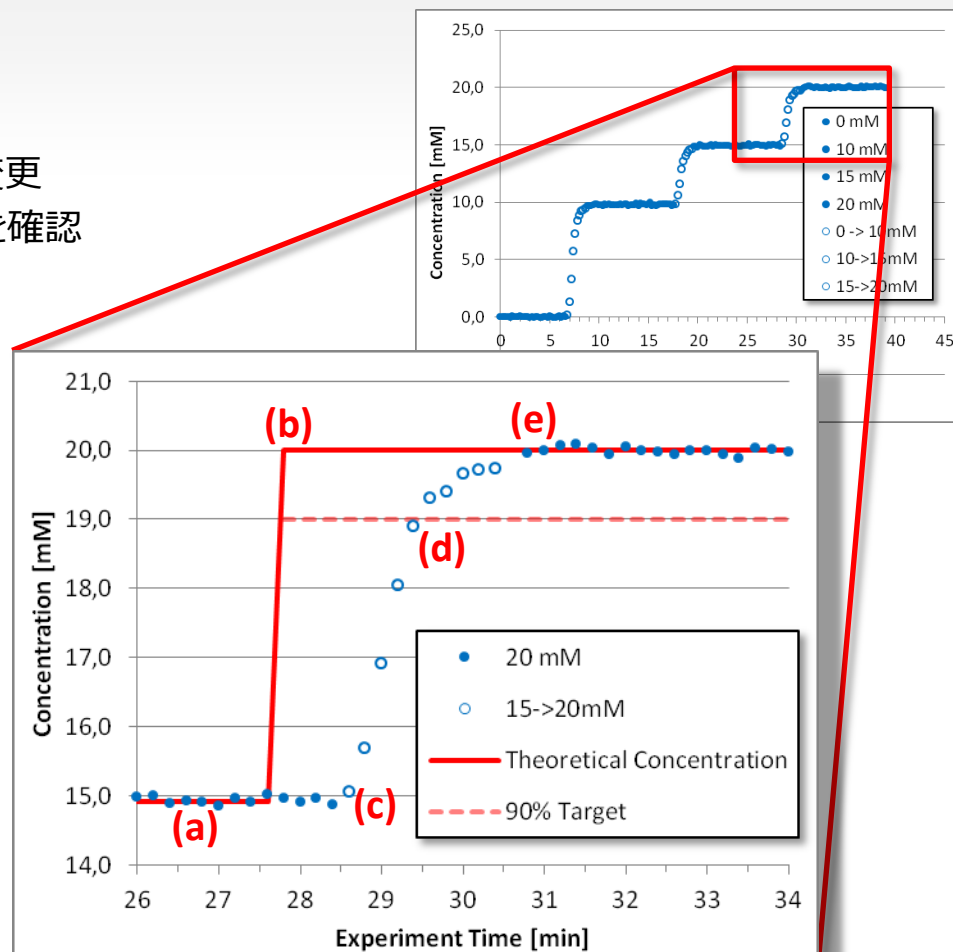


フローセルの送液の特性

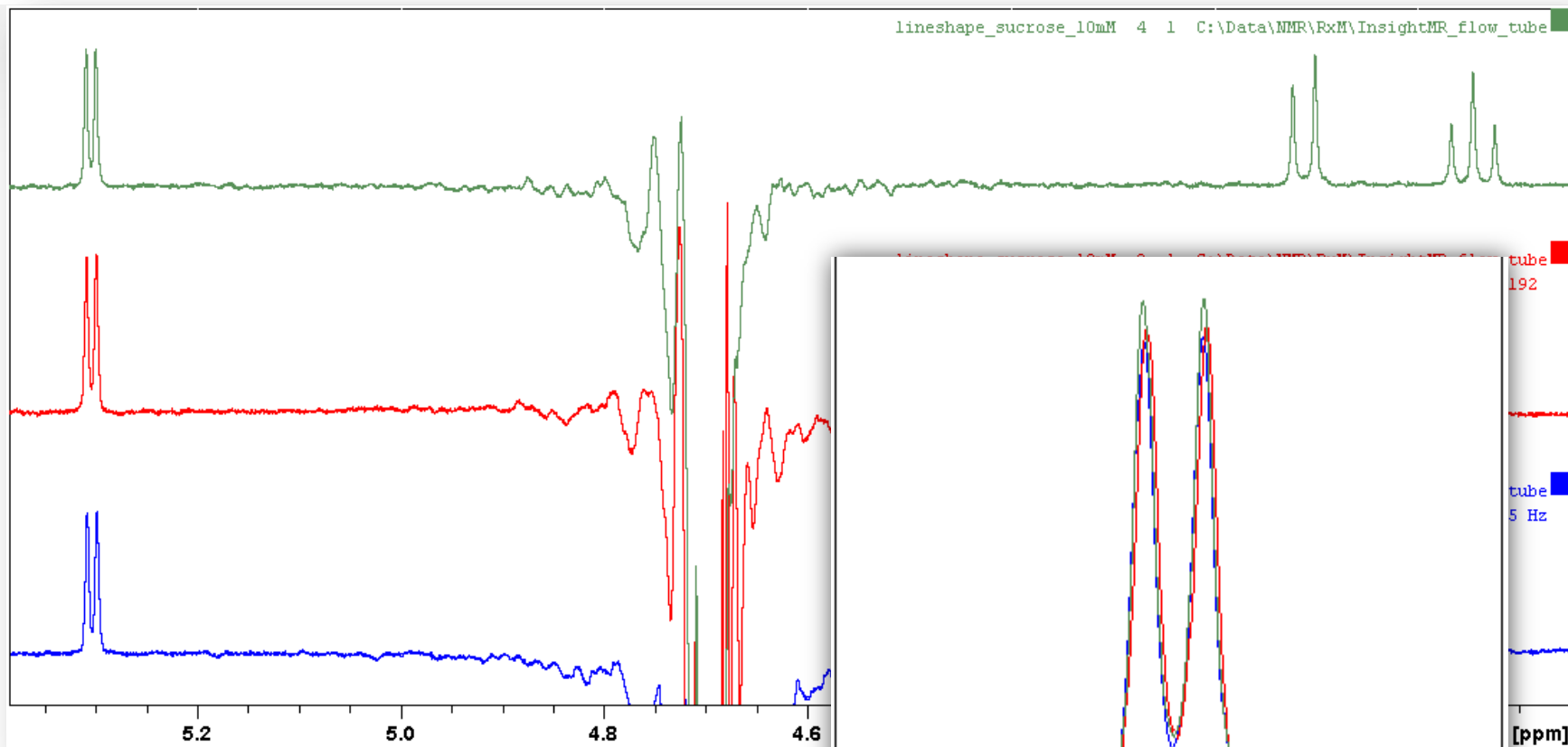


- 遅延時間
 - (a) 15 mMの時点から出発 (1ml/min. 送液)
 - (b) @27.75 min にポンプ側で20 mMの溶液に変更
 - (c) 1 min後 (@ 28.75 min.) NMR上で変化を確認
 - (d) 1.75 min.後 (@ 29.5 min) 目標の20 mMの90%に到達
 - (e) 3 min後 (@ 30.5 min) 目標の20 mMの~100%に到達

- 送液速度を2-3ml/min程度に調整することで < 1 min.程度にデッドタイムを調整可能
- 必要に応じてチューブの内径と長さを変更可能
標準は4 m length, 0.5 mm i.d.



フローセルのLineshape -10 mM sucrose



- Stopped flow, 16%
- Flow 1 ml/min, 17%
- Flow 1 ml/min, after re-shimming, 15%

このWebinarの内容



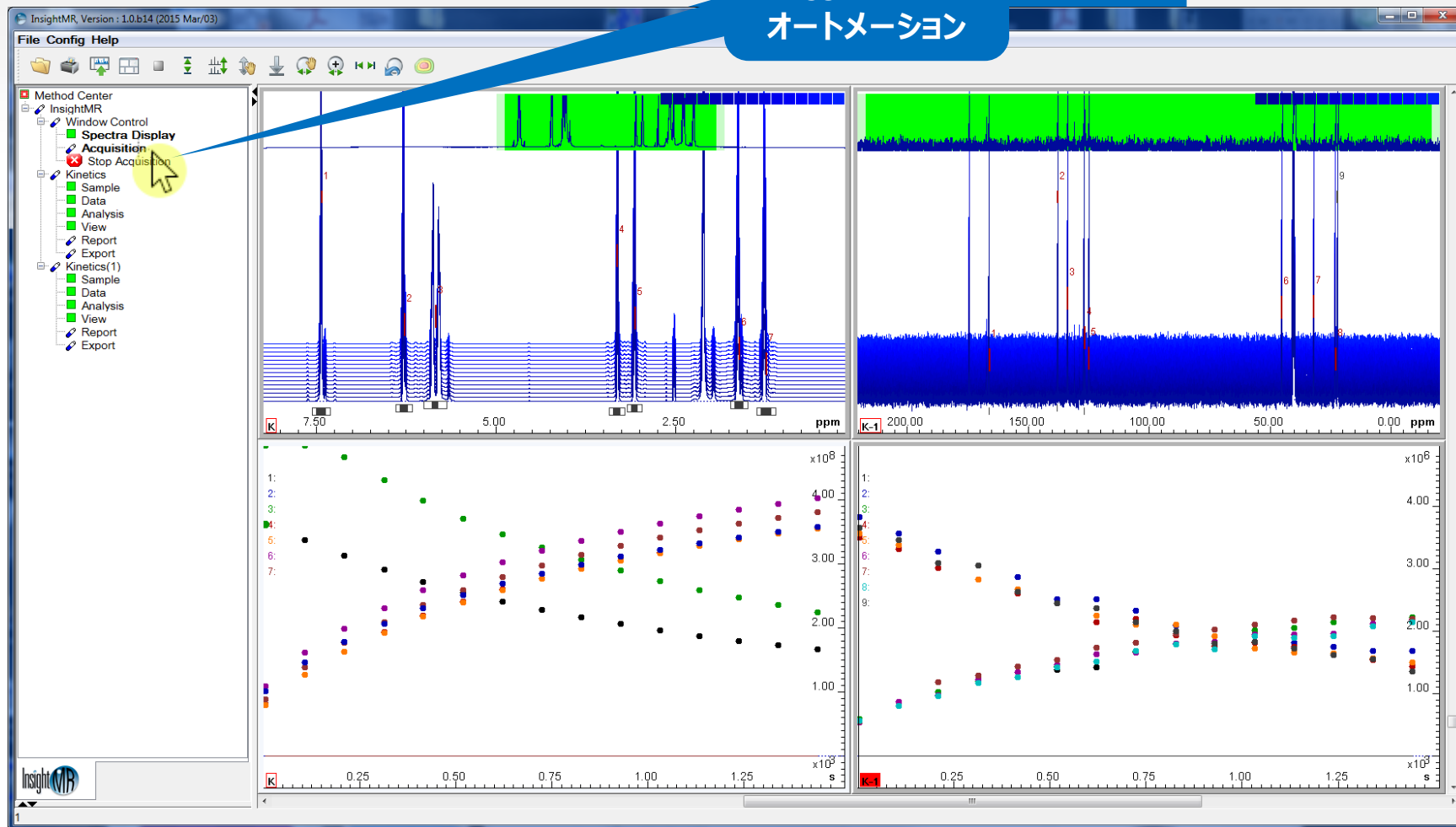
- InsightMRの概要
- InsightMRフローセルの紹介
- InsightMR制御ソフトウェアの紹介**
- アプリケーション例

リアルタイムで測定-データ処理するための ソフトウェア機能



測定を表示
Icon NMR
オートメーション

Method Center



測定開始までの詳細①



InsightMR, Version : 1.0.5 (2016 Feb/15)

Help

Method Center
InsightMR
Window Control
Kinetics

Start

Sample

Sample Position 1

Name

Solvent

- Acetone
- D2O
- CD3CN
- DMSO
- EtOD

Experiment

- K_PROTON
- K_NOESY1D

Title

Reaction Monitoring

Modify Acquisition Parameters

Number of Experiments 1

00:00:10

13:17:07 Thr

Start Reaction Stopwatch

seconds) 0

Queue

- Persistent sample
- Update from selected

Queue Experiments

データの保存先名を指定

溶媒の選択

Experiment Table

Submit Cancel Edit Delete Add 1 Copy 1 Change User

Preceding Experiments

#	Date	Holder	Name	No.	Experiment	Load	ATM	Rotation	Lock	Shim	Ac	
<												>

Search Preceding

Flow Tube (InsightMR) Busy until: No Jobs! Day: 00:00 Night: 00:00 User: ReactionMonitoring

測定開始までの詳細②



InsightMR, Version : 1.0.5 (2016 Feb/15)

Help

Method Center
InsightMR
Window Control
Kinetics

Start

Sample
Sample Position 1

Experiment
 K_PROTON
 K_NOESY1D
 K_WATER
 K_WET
 K_WETDC
 CD3CN
 DMSO
 EtOD

Title

Reaction Monitoring
Modify Acquisition Parameters
Number of Experiments 1
Exp. between
Exp. between
 Use Start
Start Reaction
Stopwatch time

Queue
 Persistent sample
 Update from selected

測定の種類の選択

メモ書きやタイトルなどの情報を入力

Experiment Table
Submit Cancel Edit Delete Add 1 Copy 1 Change User

Preceding Experiments

#	Date	Holder	Name	No.	Experiment	Load	ATM	Rotation	Lock	Shim	Ac	
<	[Empty Table]											>

Search Preceding

Flow Tube (InsightMR) Busy until: No Jobs! Day: 00:00 Night: 00:00 User: ReactionMonitoring

測定開始までの詳細③



The screenshot shows the InsightMR software interface. A 'Reaction Monitoring' dialog box is open, displaying various acquisition parameters. Blue callout boxes point to specific features: '測定条件の変更' (Change measurement conditions) points to the '=' icon; '経時変化を何点測定するかを指定' (Specify the number of measurements for time change) points to the 'Number of Experiments' field; '測定の時間間隔の指定' (Specify the measurement time interval) points to the 'Delay between Experiments (H:M:S)' field; '反応開始時間のセット' (Set reaction start time) points to the 'Start Reaction Stopwatch' button; and '実験のセット' (Set experiment) points to the 'Queue Experiments' button.

Parameter	Value
RG	8
DS	0
NS	1
SW	40.0552 [ppm]
O1P	4.700 [ppm]
D1	1 [sec]
TE	298 [K]
L30	1

Reaction Monitoring Parameters:

- Number of Experiments: 1
- Delay between Experiments (H:M:S): 00:00:10
- Use Start Time: (Time: 13:17:07 Thu)
- Start Reaction Stopwatch:
- Stopwatch time (seconds): 0

Buttons: Submit, Cancel, Edit, Delete, Copy, Queue Experiments, OK, Update from selected



測定開始までの詳細④



測定がキューされる

The screenshot shows the InsightMR software interface. The top panel displays configuration for a sample named 'Apr07-2016-ReactionMor' with solvent 'THF-H8' and experiment 'K_WET'. The bottom panel shows a queue of 19 experiments, all with a status of 'Queued'. A blue callout bubble points to the queue, indicating that the measurement is queued.

Holder	Type	Status	Disk	Name	No.	Solvent	Experiment	Pri	Par	Title/Orig
1	1	Queued	C:\Data	Apr07-2016-ReactionMoni 10		THF-H8	tetra: N_K_WET	☆	🟡	🟢🟢🟢🟢
		Queued	C:\Data	Apr07-2016-ReactionMoni 11		THF-H8	tetra: N_K_WET	☆	🟡	🟢🟢🟢🟢
		Queued	C:\Data	Apr07-2016-ReactionMoni 12		THF-H8	tetra: N_K_WET	☆	🟡	🟢🟢🟢🟢
		Queued	C:\Data	Apr07-2016-ReactionMoni 13		THF-H8	tetra: N_K_WET	☆	🟡	🟢🟢🟢🟢
		Queued	C:\Data	Apr07-2016-ReactionMoni 14		THF-H8	tetra: N_K_WET	☆	🟡	🟢🟢🟢🟢
		Queued	C:\Data	Apr07-2016-ReactionMoni 15		THF-H8	tetra: N_K_WET	☆	🟡	🟢🟢🟢🟢
		Queued	C:\Data	Apr07-2016-ReactionMoni 16		THF-H8	tetra: N_K_WET	☆	🟡	🟢🟢🟢🟢
		Queued	C:\Data	Apr07-2016-ReactionMoni 17		THF-H8	tetra: N_K_WET	☆	🟡	🟢🟢🟢🟢
		Queued	C:\Data	Apr07-2016-ReactionMoni 18		THF-H8	tetra: N_K_WET	☆	🟡	🟢🟢🟢🟢
		Queued	C:\Data	Apr07-2016-ReactionMoni 19		THF-H8	tetra: N_K_WET	☆	🟡	🟢🟢🟢🟢
2		Available						☆	🟡	🟢🟢🟢🟢

測定開始までの詳細④



測定開始

- 測定開始と反応開始の時間差はストップウォッチで管理され、自動的にプロットに反映される

InsightMR, Version : 1.0.5 (2016 Feb/15)

Method Center
InsightMR
Kinetics

Sample Position
Name
Solvent

Flow Tube (InsightMR)

First sample 1

First sample in the magnet (locked, shimmed, tuned and matched?)

Start Cancel

Experiment Table

Holder	Type	Status	Date	Name	No.	Experiment	Load	ATM	Rotation	Lock	Shim
1	1	Queued	C:\Date Apr07-2016-ReactionMoni 10	THF-H8	tetraH N K_WET	☆	☆	☆	☆	☆	☆
		Queued	C:\Date Apr07-2016-ReactionMoni 11	THF-H8	tetraH N K_WET	☆	☆	☆	☆	☆	☆
		Queued	C:\Date Apr07-2016-ReactionMoni 12	THF-H8	tetraH N K_WET	☆	☆	☆	☆	☆	☆
		Queued	C:\Date Apr07-2016-ReactionMoni 13	THF-H8	tetraH N K_WET	☆	☆	☆	☆	☆	☆
		Queued	C:\Date Apr07-2016-ReactionMoni 14	THF-H8	tetraH N K_WET	☆	☆	☆	☆	☆	☆
		Queued	C:\Date Apr07-2016-ReactionMoni 15	THF-H8	tetraH N K_WET	☆	☆	☆	☆	☆	☆
		Queued	C:\Date Apr07-2016-ReactionMoni 16	THF-H8	tetraH N K_WET	☆	☆	☆	☆	☆	☆
		Queued	C:\Date Apr07-2016-ReactionMoni 17	THF-H8	tetraH N K_WET	☆	☆	☆	☆	☆	☆
		Queued	C:\Date Apr07-2016-ReactionMoni 18	THF-H8	tetraH N K_WET	☆	☆	☆	☆	☆	☆
		Queued	C:\Date Apr07-2016-ReactionMoni 19	THF-H8	tetraH N K_WET	☆	☆	☆	☆	☆	☆
2		Available									

Submit Cancel Edit Delete Add 1 Copy 1 Change User

Preceding Experiments

#	Date	Holder	Name	No.	Experiment	Load	ATM	Rotation	Lock	Shim
---	------	--------	------	-----	------------	------	-----	----------	------	------

Search Preceding BACS/SampleCase/Pro (RS232) Busy until: No Jobs! Day: 00:00 Night: 00:00 User: ReactionMonitoring

このWebinarの内容



- InsightMRの概要
- InsightMRフローセルの紹介
- InsightMR制御ソフトウェアの紹介
- アプリケーション例

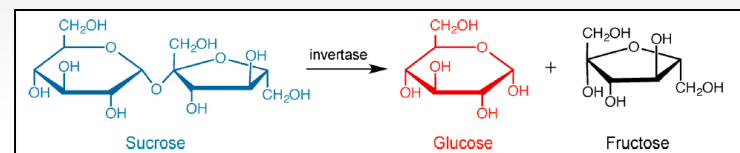
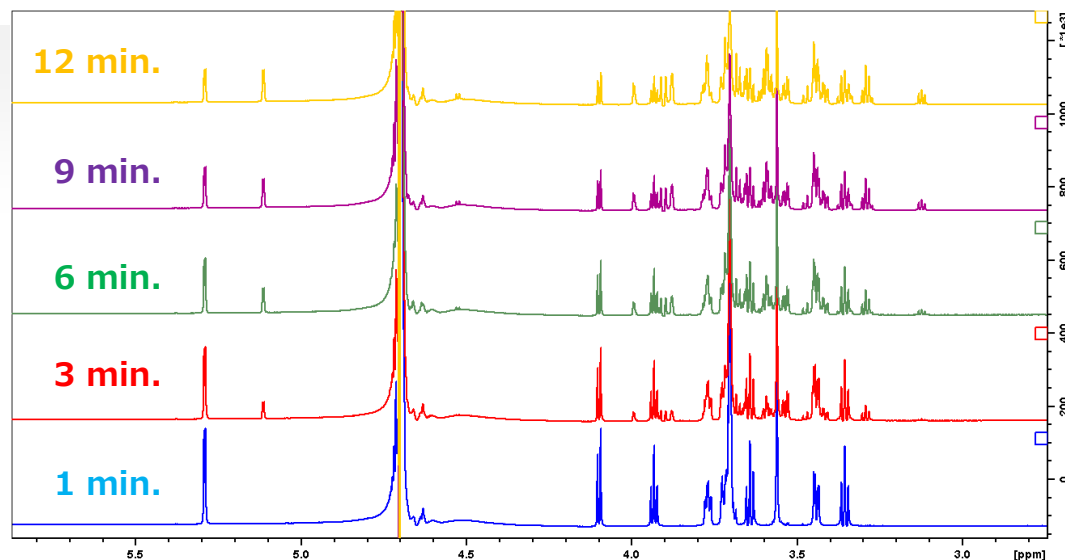
InsightMRで使える自動測定



- ✓ 次の測定がデフォルトで対応している
 - **水消しなし¹H一次元** (K_PROTON (zg30))
 - **Presaturation** (K_WATER (zgcppr))
 - **1D NOESY** (K_NOESY1D (noesypr1d))
 - **WET** (K_WET & K_WETDC (wetdc; 重溶媒不要、ロックなし測定))
 - ユーザは消したい溶媒信号の数を指定して測定を実行
 - 次の機能が自動化されている
 - ① ¹H核を使った選択励起シミング
 - ② 予備測定で溶媒信号を探す
 - ③ 溶媒信号の消去条件 (shaped pulseのパワーなど) を自動で計算
 - ④ 溶媒消去を実行
 - ⑤ 自動ケミカルシフト補正

スペクトル例①

Invertaseによるsucroseの加水分解

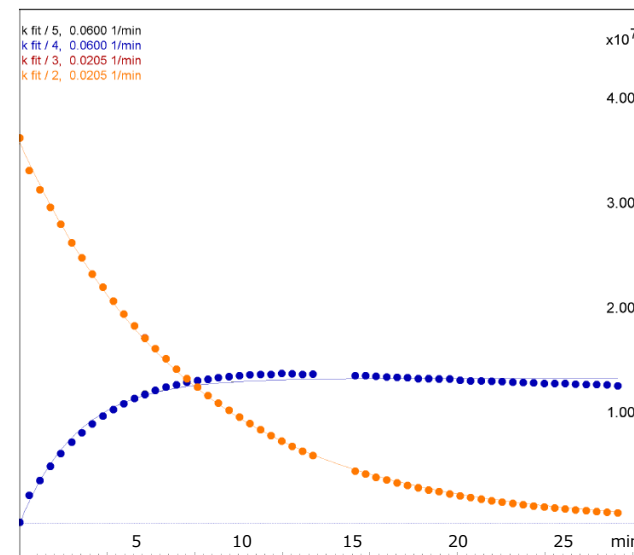


□ 反応条件

- 軽水のみpH6.5のリン酸バッファー50 mL
- Sucrose 1 mg/mlとInvertase (和光純薬) を4 μ unit (1 μ unit和光純薬の規定では30 min.でsucrose 1 mgを加水分解する酵素量)
- 室温

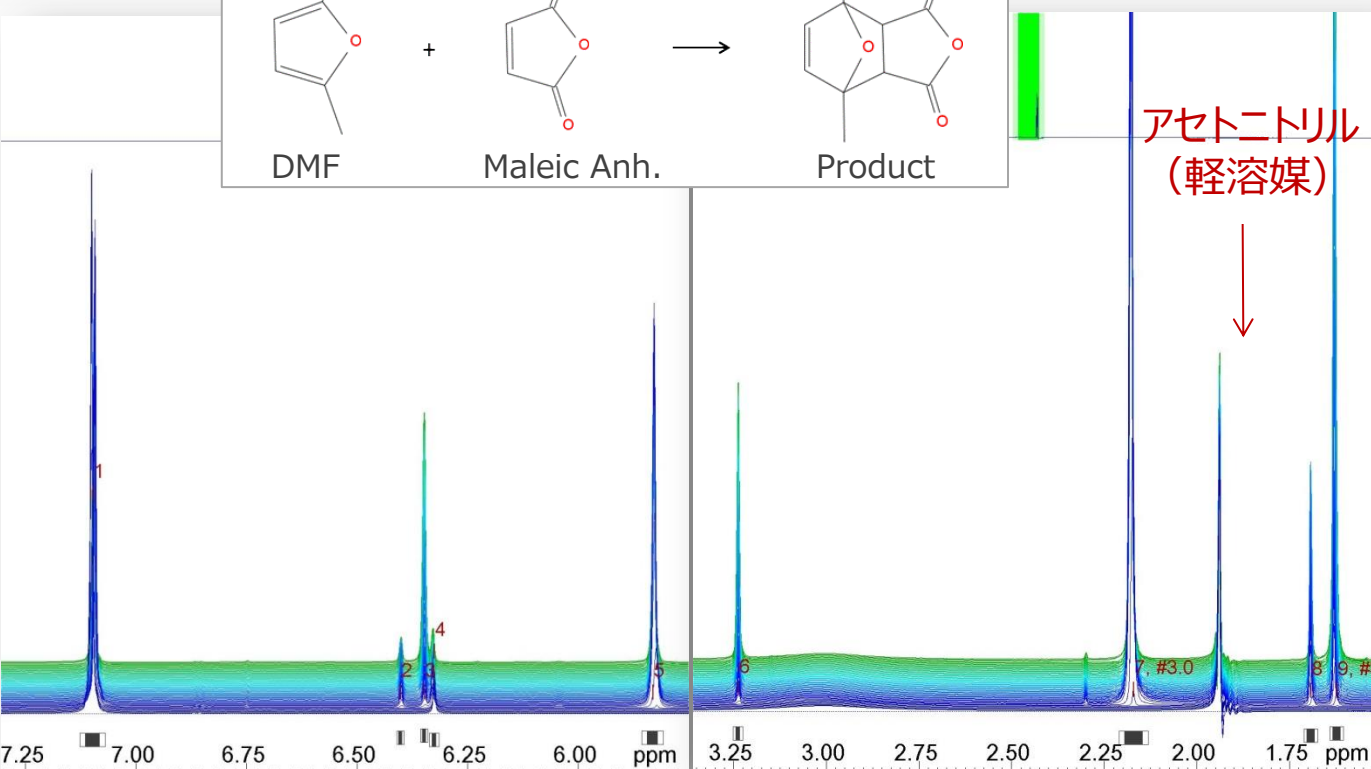
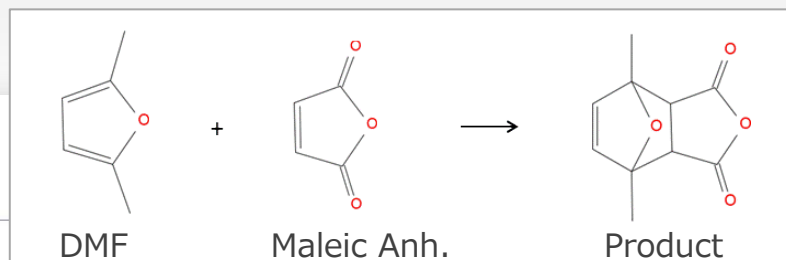
□ 測定条件

- 送液は1 ml/min
- Avance III HD 950 MHzでTCI CryoProbeを使って測定
- NMR測定には ^1H の1DをWET法による溶媒消去をしながらおこない、一回の測定を4回積算 (30秒の測定時間) でおこない経時変化を追跡した。



スペクトル例②

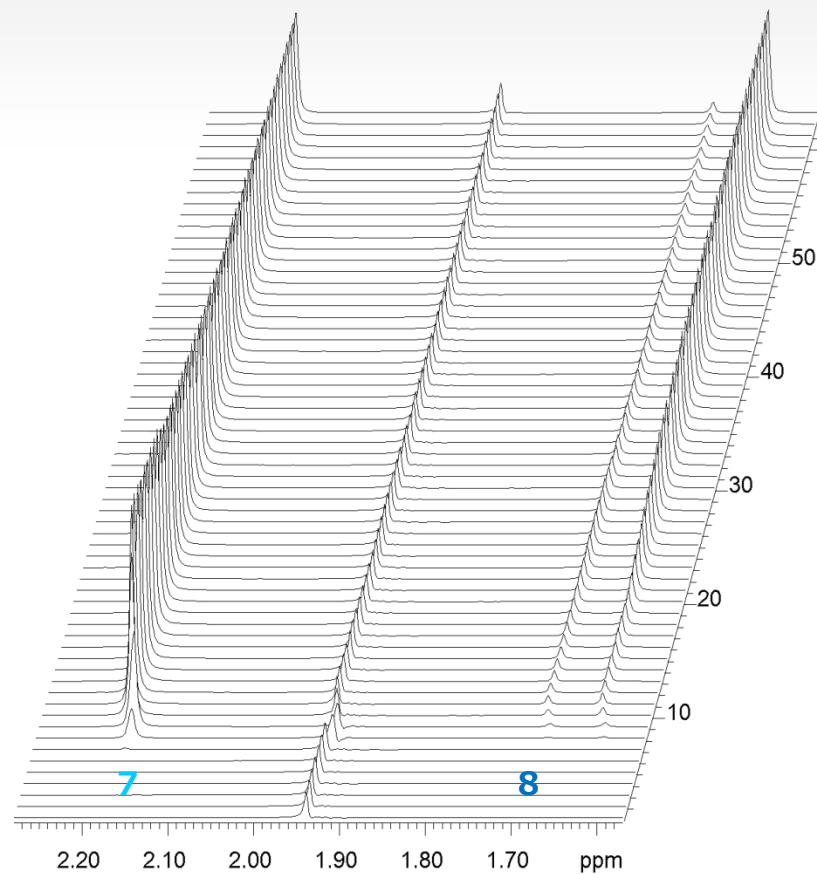
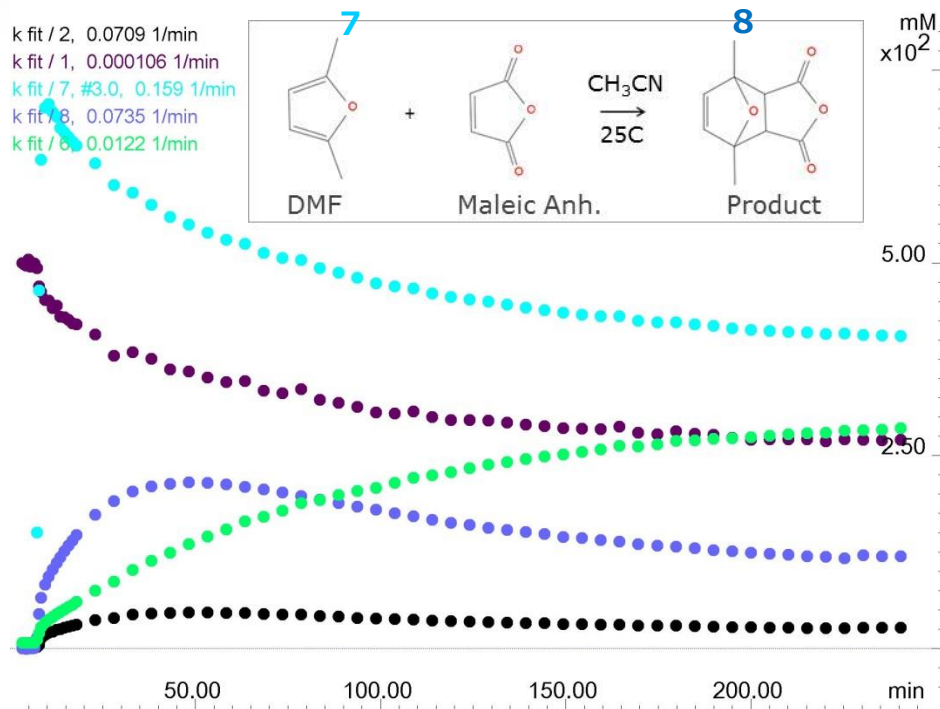
ディールス・アルダー反応, 軽溶媒条件下



- 反応条件
 - アセトニトリル 50 mL
 - DMF 500 mM
 - 無水マレイン酸500 mM
 - 25°C
- 測定条件
 - 送液は1 ml/min
 - Avance III HD 400 MHz BBFO SMARTプローブで測定
 - NMR測定には¹Hの1DをWET法による溶媒消去をしながらおこない、一回の測定を4回積算（30秒の測定時間）でおこない経時変化を追跡した。

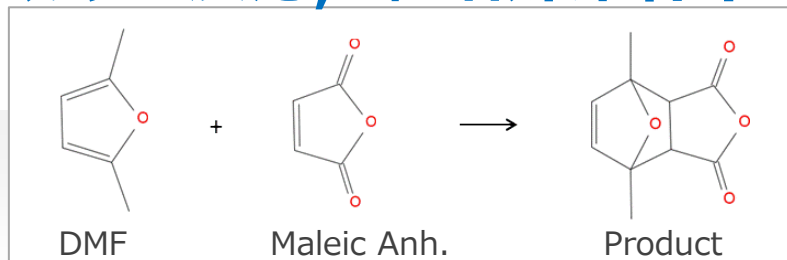
スペクトル例②

ディールス・アルダー反応, 軽溶媒条件下

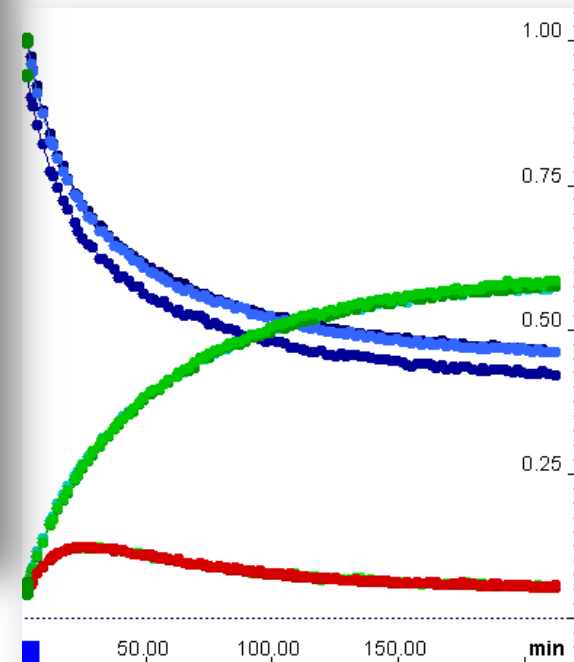
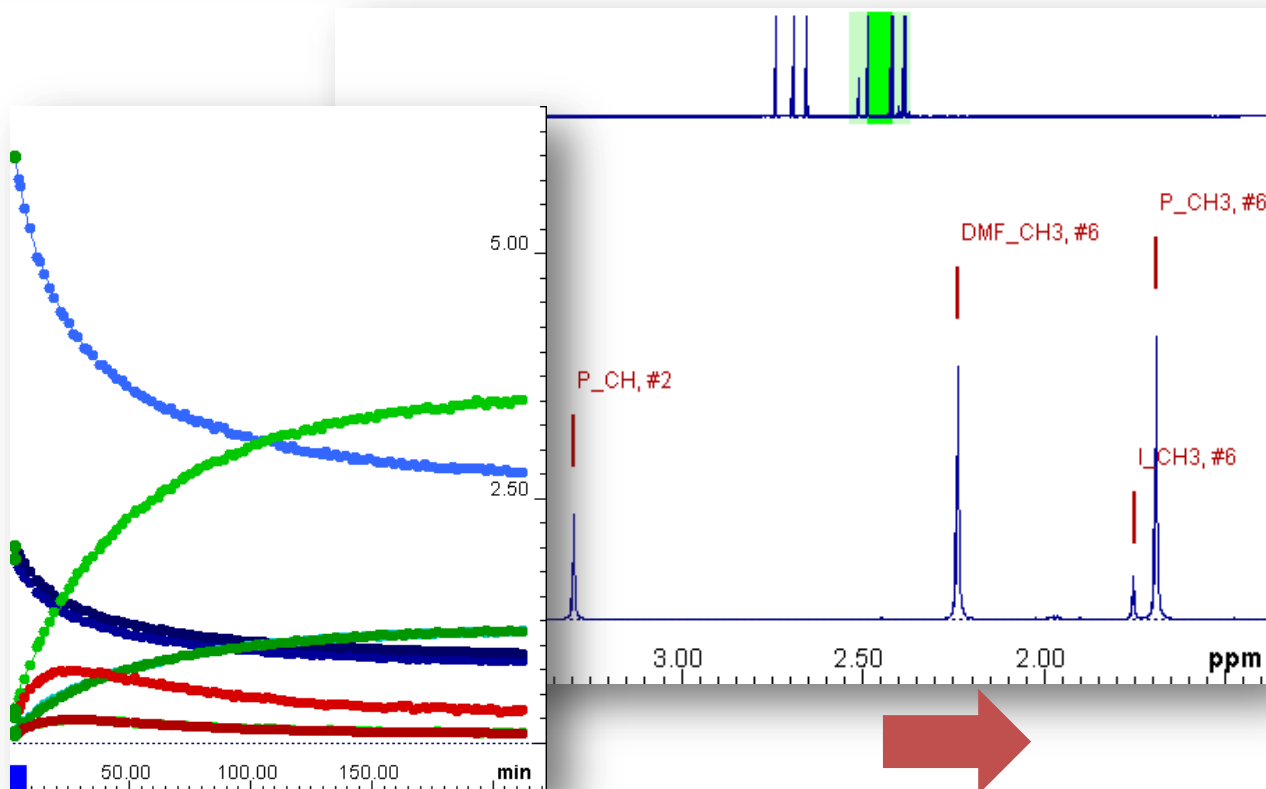


スペクトル例②

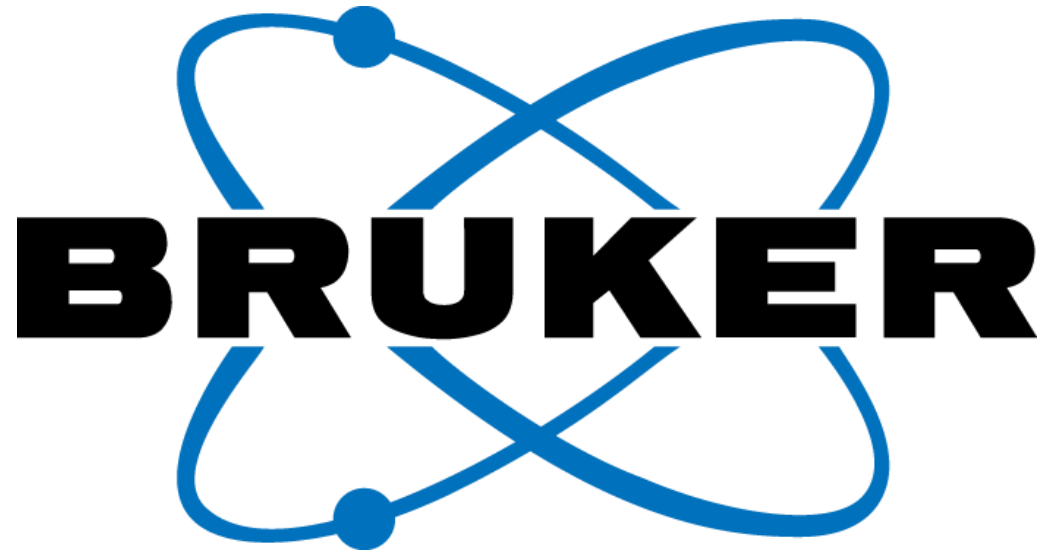
ディールス・アルダー反応, 軽溶媒条件下



NMRの信号は定量的であるため、
キャリブレーションすることなく
信号の積分値を規格化し、相対的
な濃度変化のプロットとして反応を
観測することができる。



- NMRでは反応溶液をそのまま測定することが可能であり、また本質的に定量性のある分光法であるため、信号強度を相対的な濃度に変換することが容易である。
- このためNMRは従来から反応を観測するのに適した手法であったが、ツールの不足により使い勝手が悪い側面があった。InsightMR™はブルカー・バイオスピンのNMRシステムに合うようにフローセルとソフトウェアを設計することで、統合された使いやすいアプリケーションを提供する。
- ハードウェア面では、従来法とはことなり、反応容器をから環流させてNMRを観測する方法をとることで、①測定開始までのオーバヘッドを減らし、②反応およびその解析の自由度をあげることが可能となっている。
- ソフトウェア面ではIconNMRのオートメーションとDynamics Centerによるon-the-flyの反応解析を組み合わせることで、より使いやすく視覚的に反応をとらえられるようになっている。



Innovation with Integrity

Would you like to learn more? Contact a customer service representative.