

蛋白質の NMR
- ^{13}C 検出への期待 -

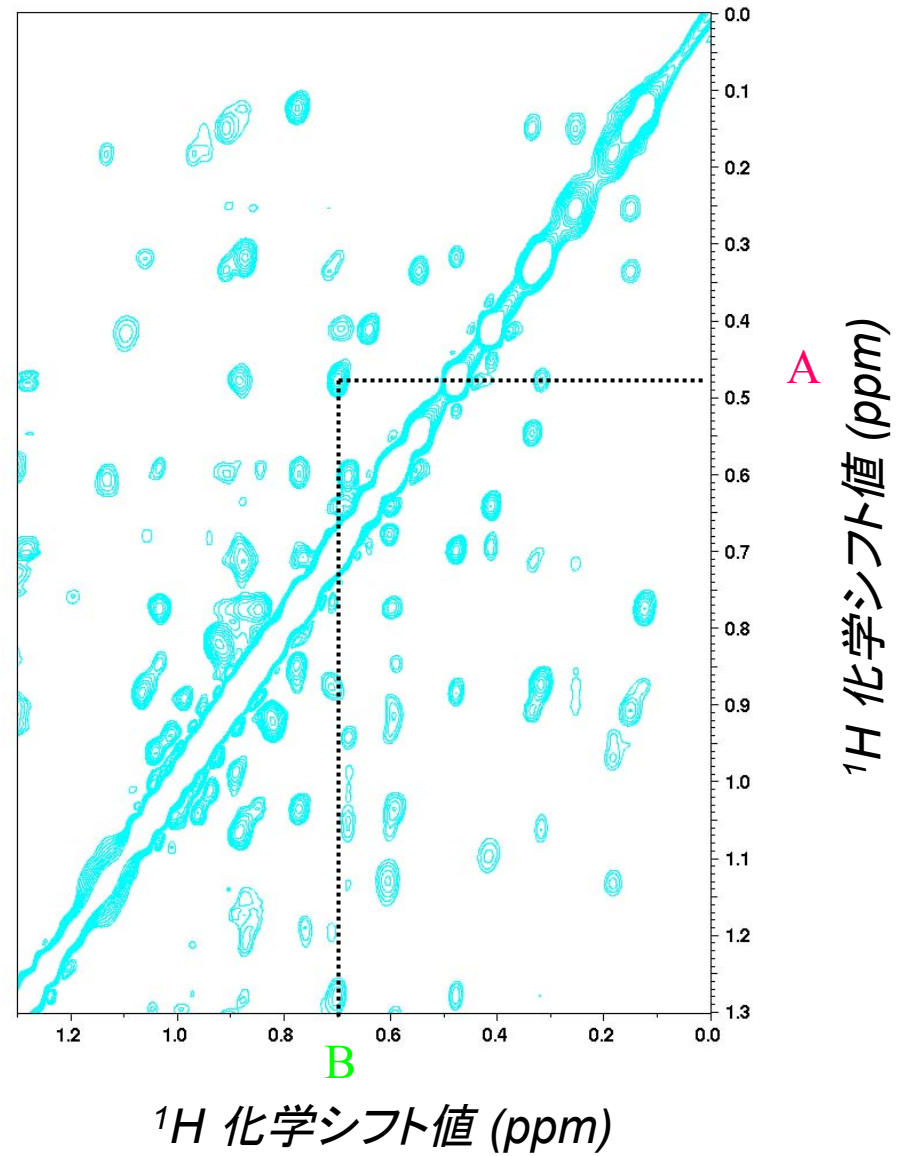
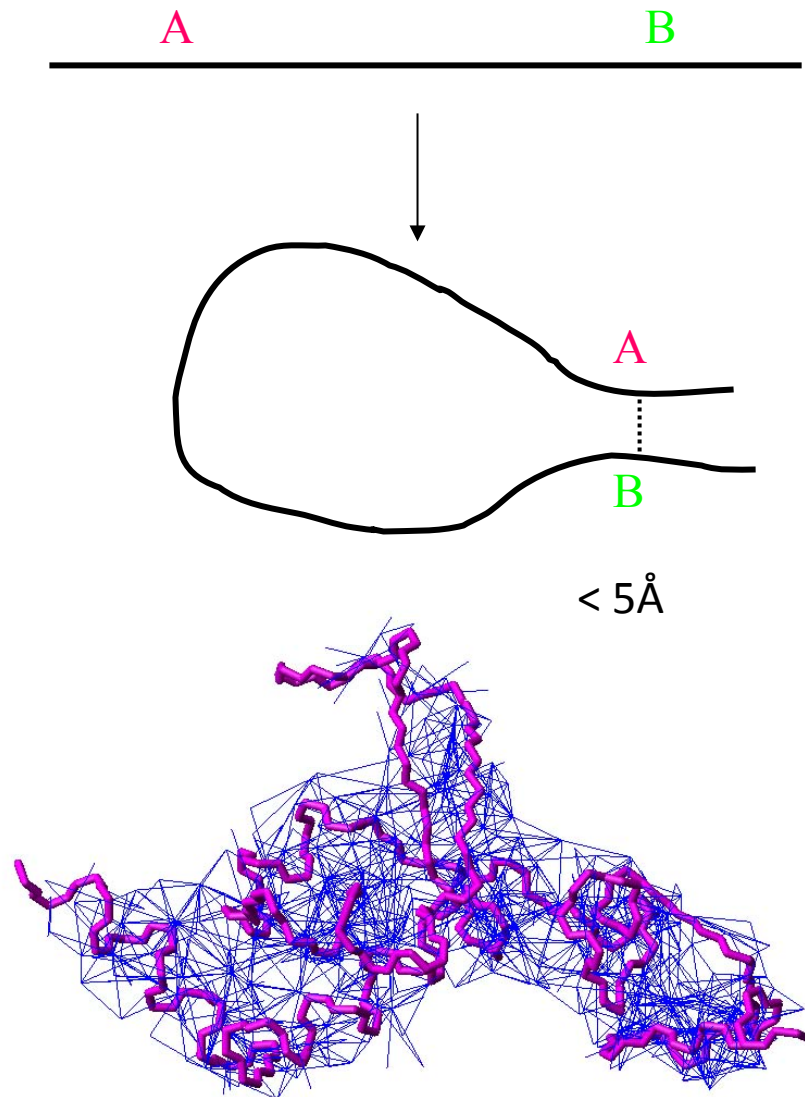
2011年7月20日(水)
東京大学薬学部西講義室
日本分光学会主催「NMR 講習会」

核磁気共鳴装置



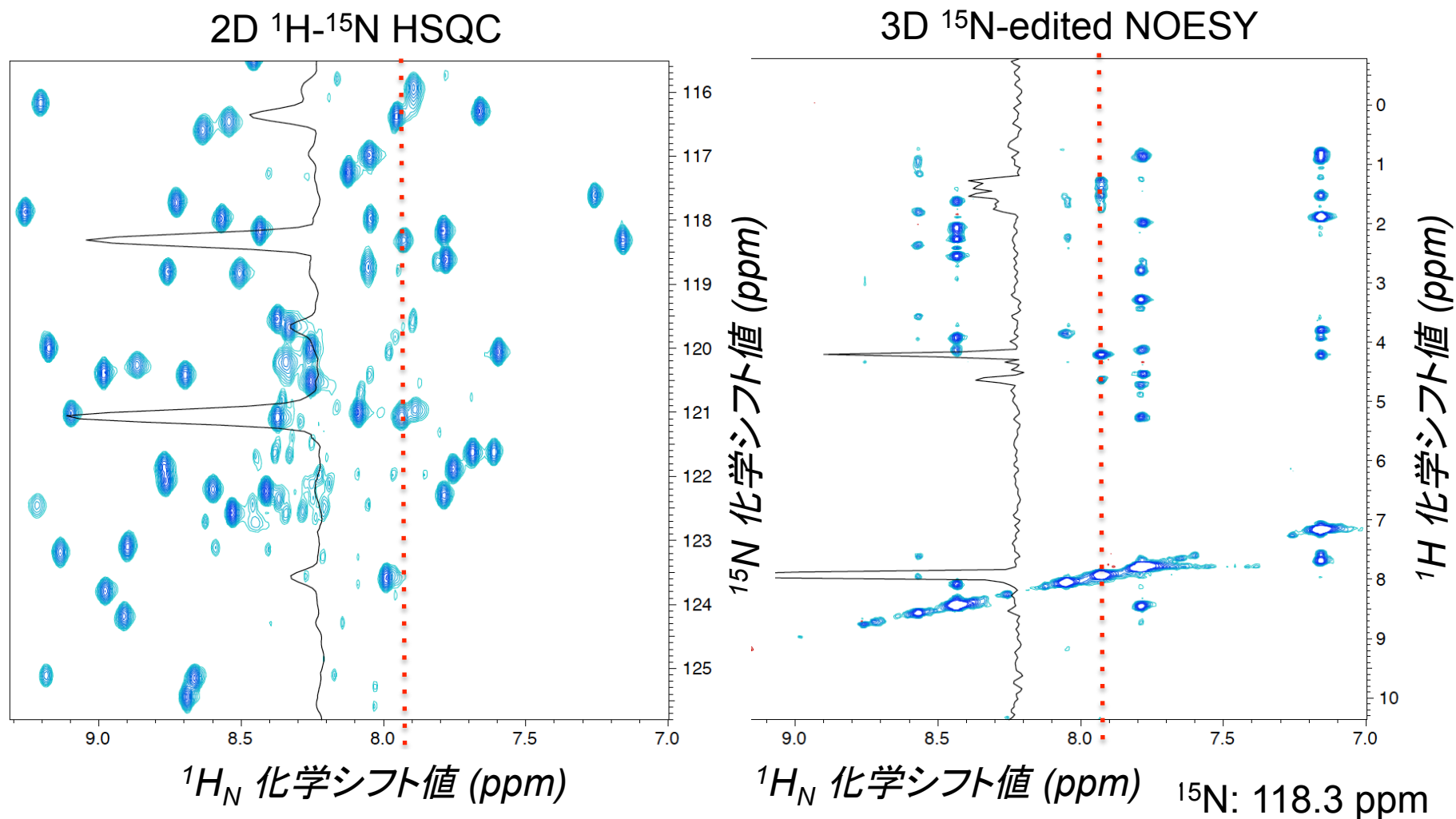
大阪大学蛋白質研究所
構造プロテオミクス研究系
池上貴久

距離情報である NOE を拾うにも
事前に共鳴値の帰属が必要



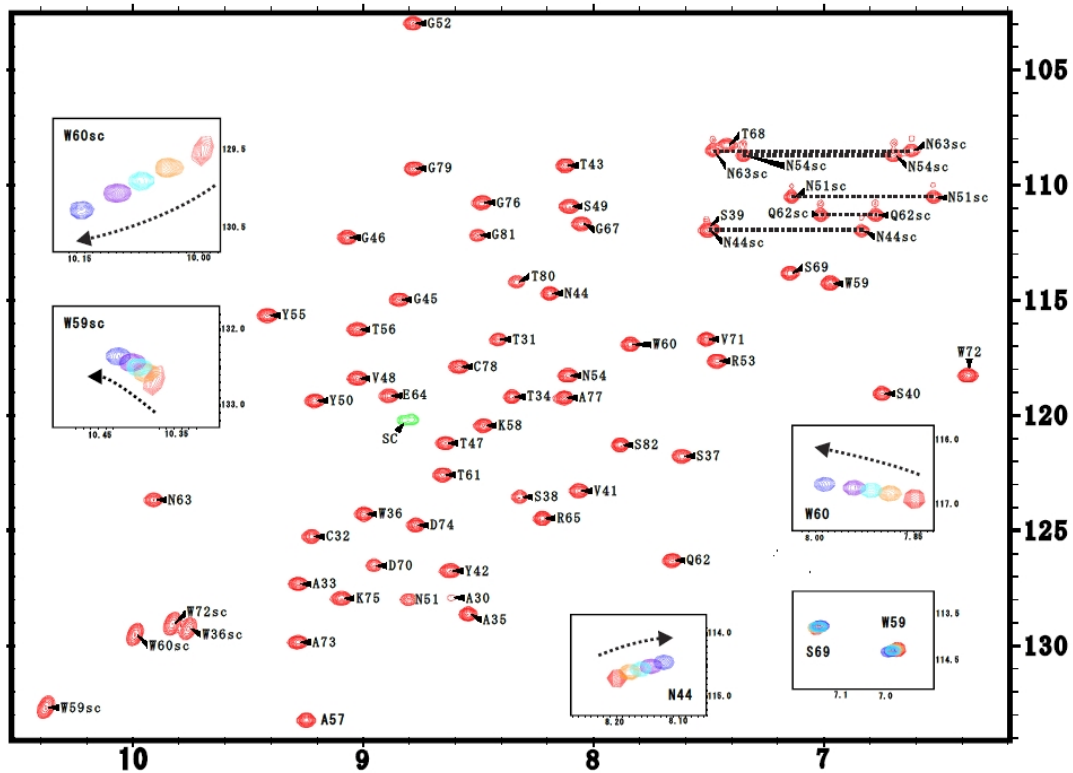
^1H 核だけでなく、それが共有結合している ^{13}C や ^{15}N 核の化学シフト値も帰属されたい

^1H が多数あり過ぎて、同じ「名札」を付けた ^1H どうしを区別するのは難しい。



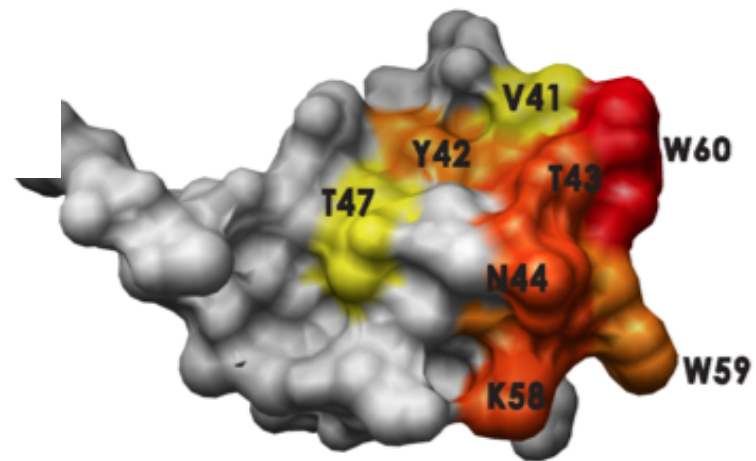
蛋白質と相互作用する低分子を探すにも、事前に帰属データが欲しい

2D ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル



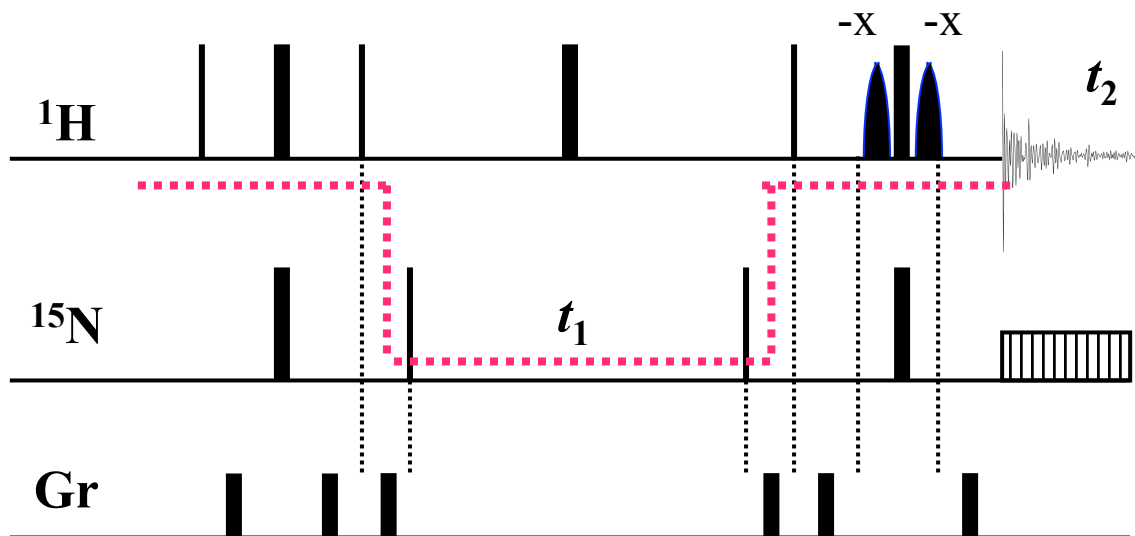
$^1\text{H}_\text{N}$ 化学シフト (ppm)

^{15}N 化学シフト (ppm)



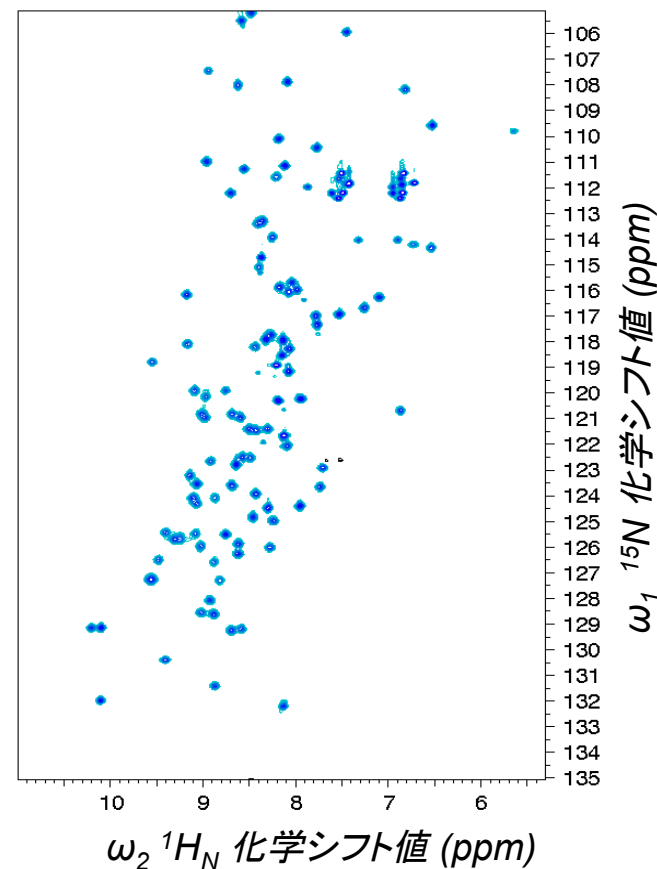
化学結合に存在する 1J , 2J , 3J -coupling を通して、磁化 (コヒーレンス) を移動させ、共鳴値どうしの相関を見つける

correlation

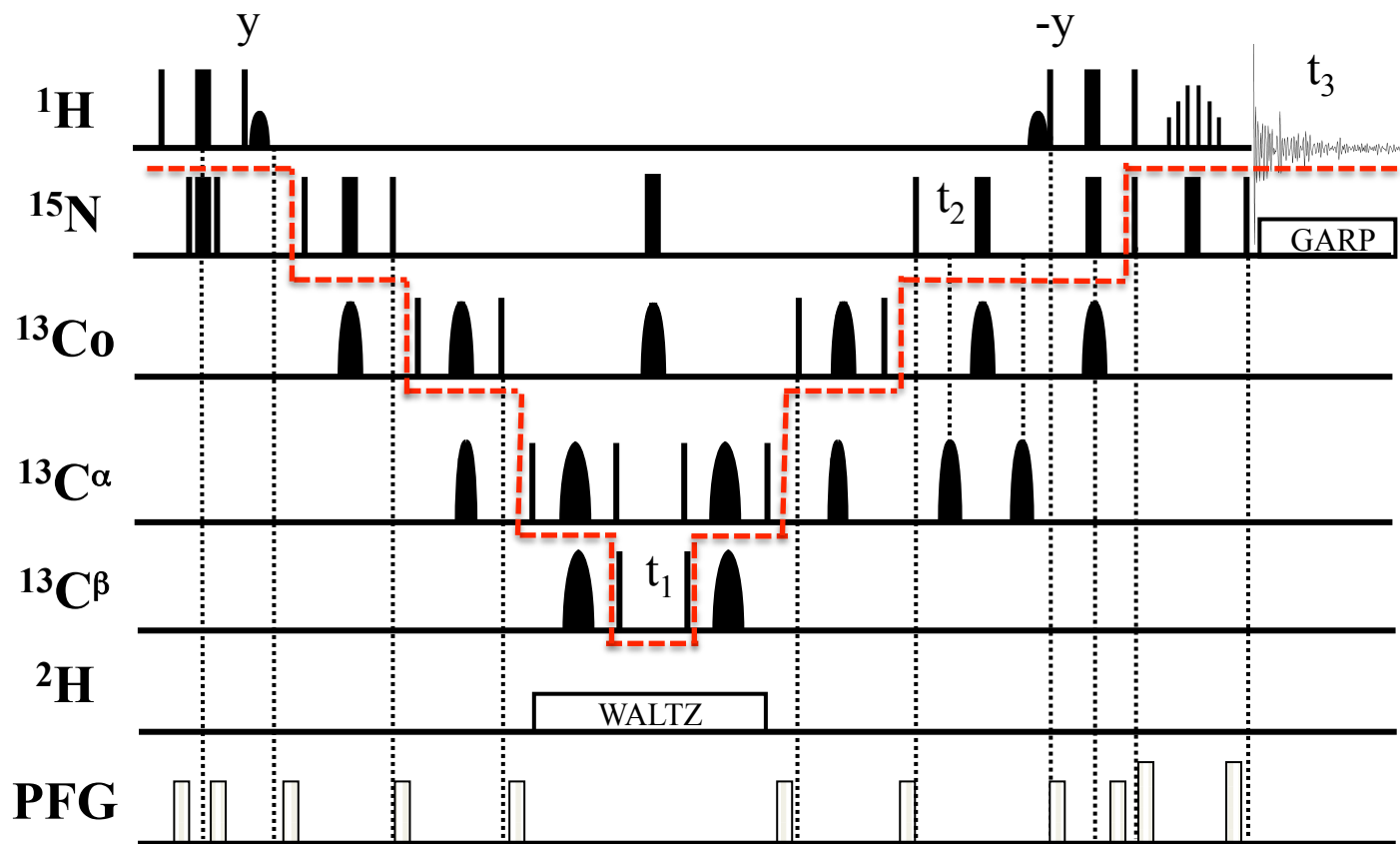


磁化移動の基本は
たまたに

INEPT (J)
TOCSY (J)
NOESY (dd)
CRIPT (dd/csa)

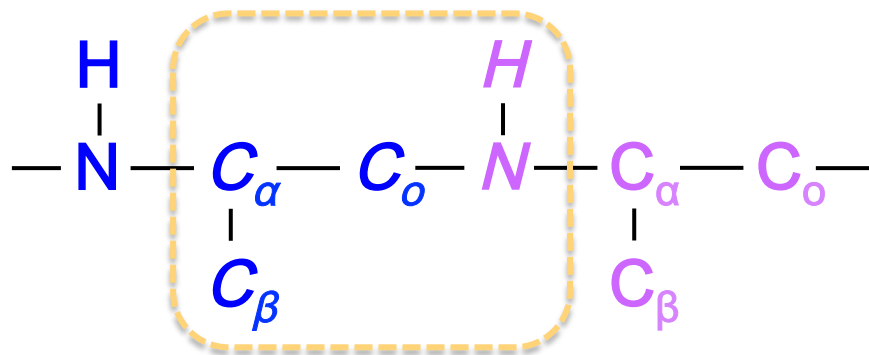


化学結合に沿って、INEPT でどんどん繋げていく



3D HN(COCA)CB

magnetization transfer
coherence transfer



次元数 相関する核の数 例

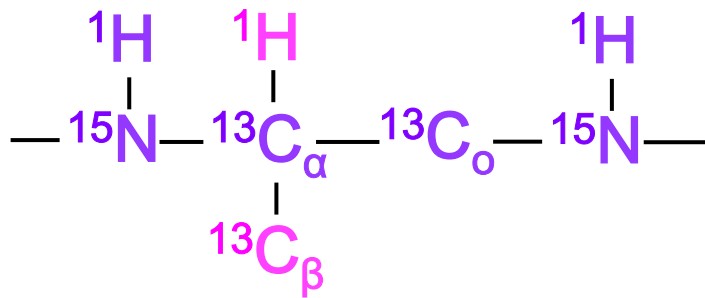
1 1 ^1H

2 2 $^1\text{H}-^{13}\text{C}$

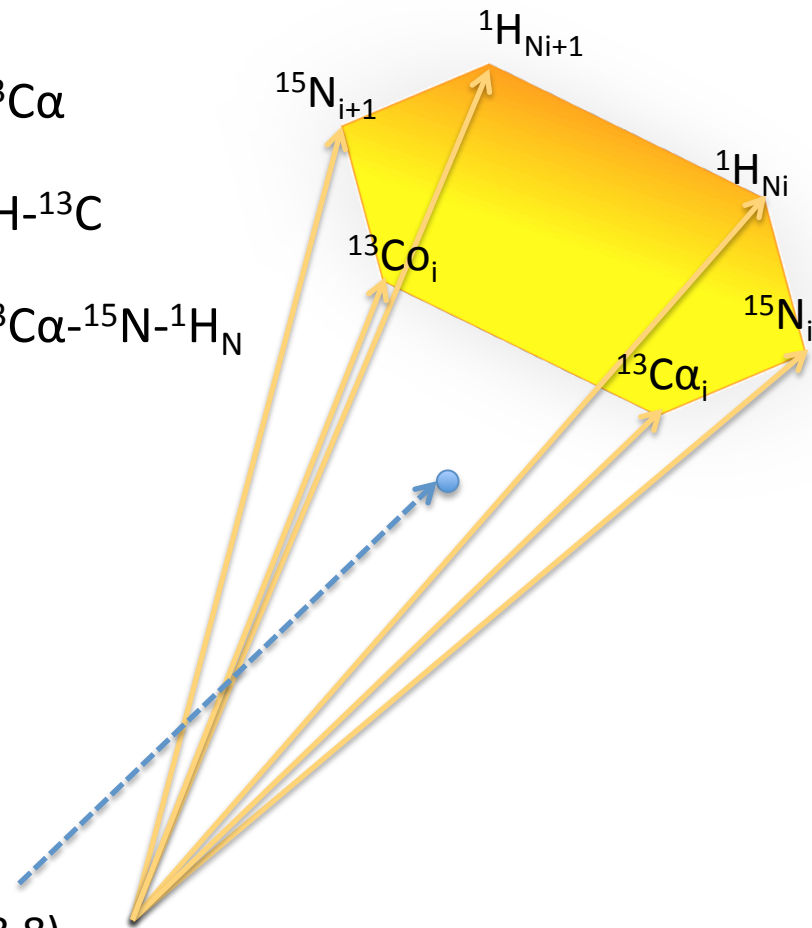
3 3 $^1\text{H}_\text{N}-^{15}\text{N}-^{13}\text{C}_\alpha$

4 4 $^1\text{H}_\text{N}-^{15}\text{N}-^1\text{H}-^{13}\text{C}$

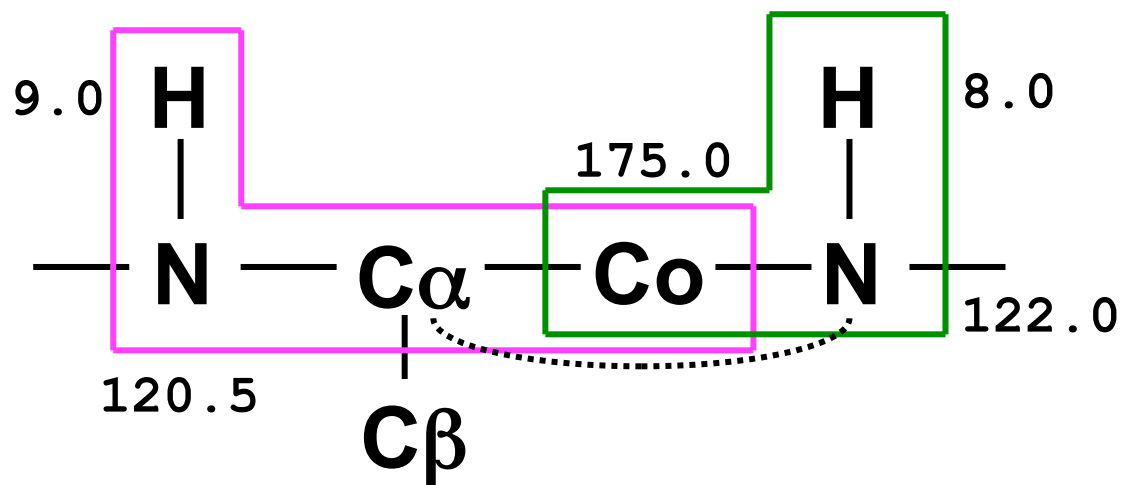
5 5 $^1\text{H}_\text{N}-^{15}\text{N}-^{13}\text{C}_\alpha-^{15}\text{N}-^1\text{H}_\text{N}$



$(^1\text{H}_\text{N}-^{15}\text{N}-^{13}\text{C}_\text{o}-^{13}\text{C}_\alpha-^{15}\text{N}-^1\text{H}_\text{N})$
 $= (7.5, 119.3, 175.2, 55.2, 118.3, 8.8)$



この場合は ^{13}Co が糊代

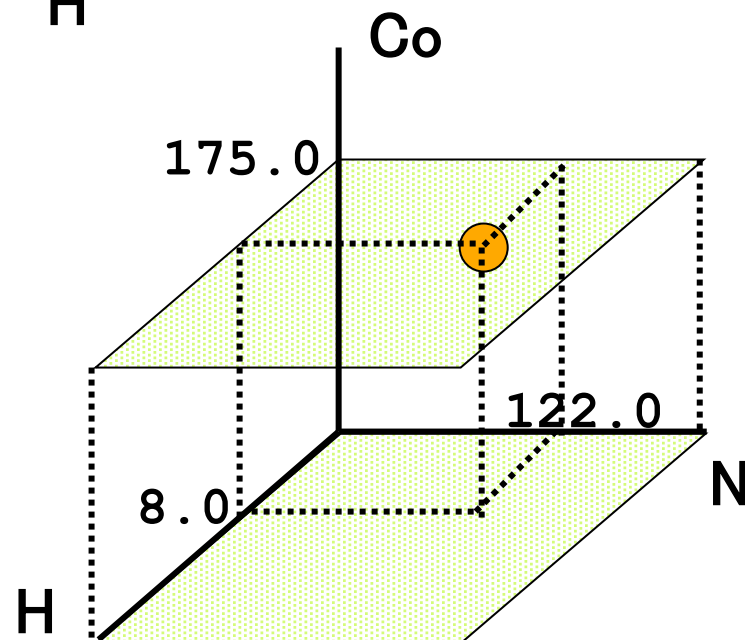
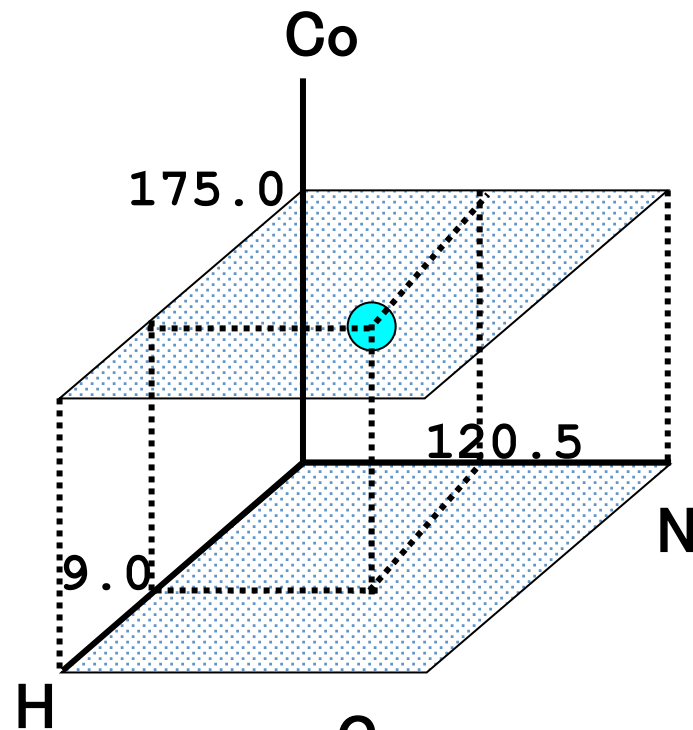


HN(CA)CO ●

$$\begin{aligned} & (\mathbf{x}, \mathbf{y}, \mathbf{z}) \\ = & (9.0, 120.5, 175.0) \end{aligned}$$

HNCO ●

$$\begin{aligned} & (\mathbf{x}, \mathbf{y}, \mathbf{z}) \\ = & (8.0, 122.0, 175.0) \end{aligned}$$

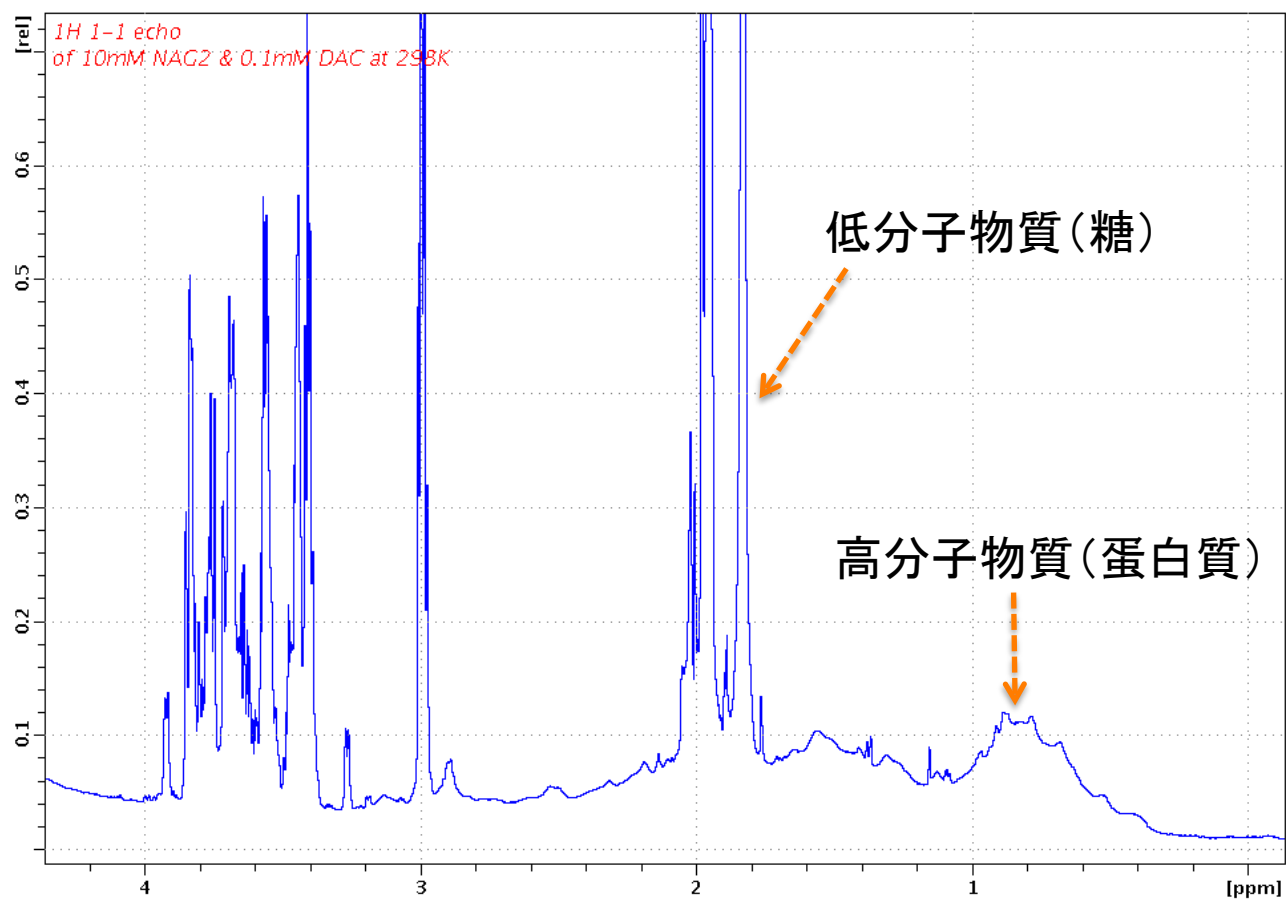


蛋白質の共鳴ピークは幅広（横緩和時間が短い）

重水素化 deuteration

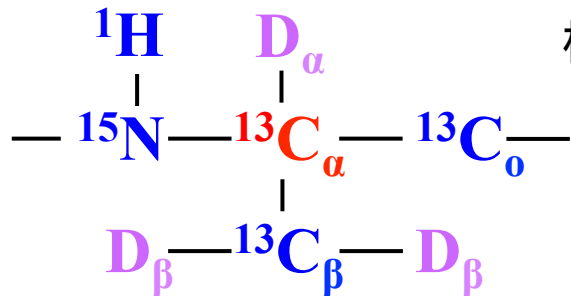
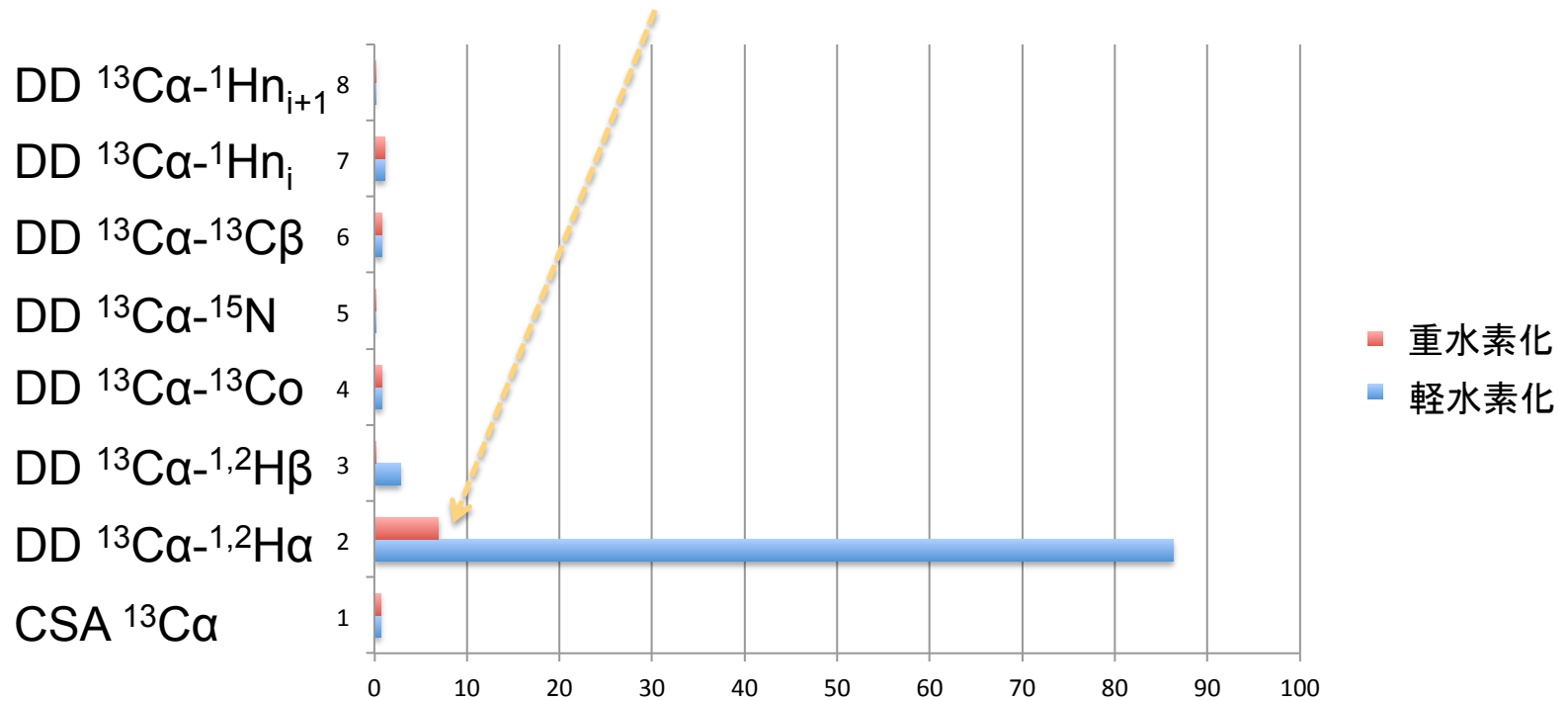
TROSY (cross-correlated-relaxation)

選択的標識 selective-labeling



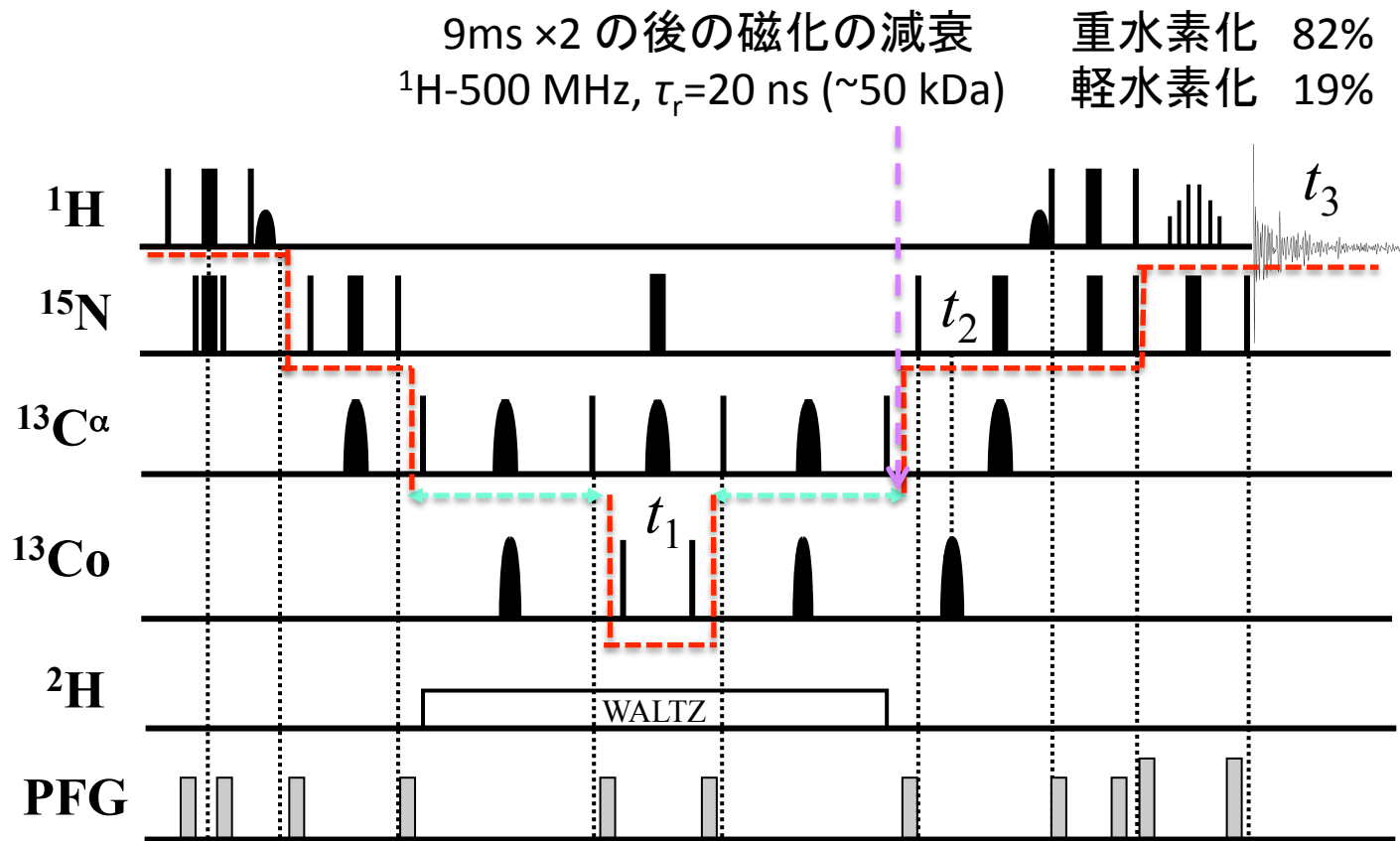
重水素化により、特に ^{13}C , ^1H 核の横緩和時間が長くなる

$^2\text{H}_\alpha$ により $^{13}\text{C}_\alpha$ の横緩和速度が $1/12 \sim 1/16$ になる。



横緩和速度 R_2 (1/sec) (500 MHz ^1H) $\tau_r=20$ ns (~ 50 kDa)

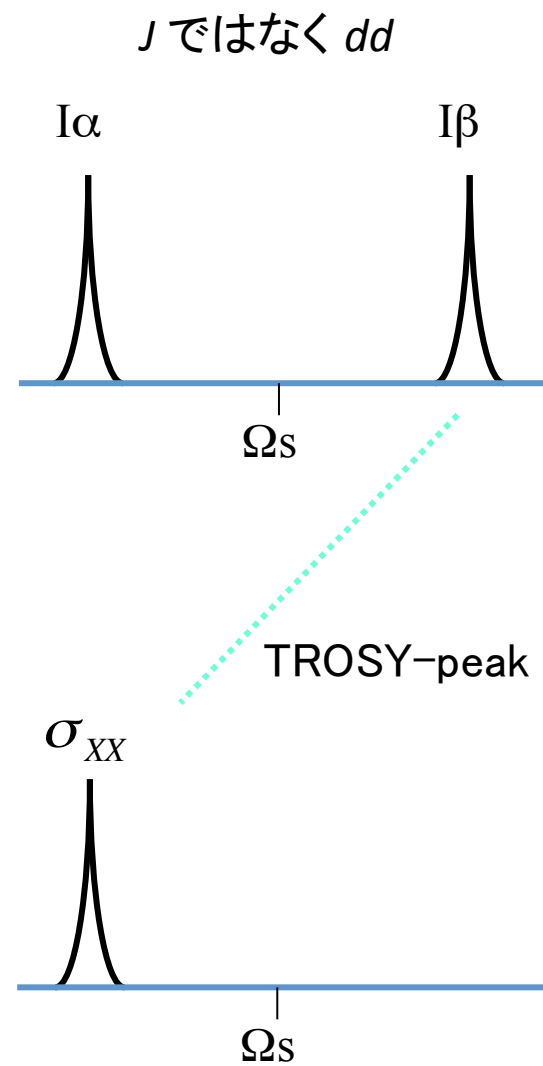
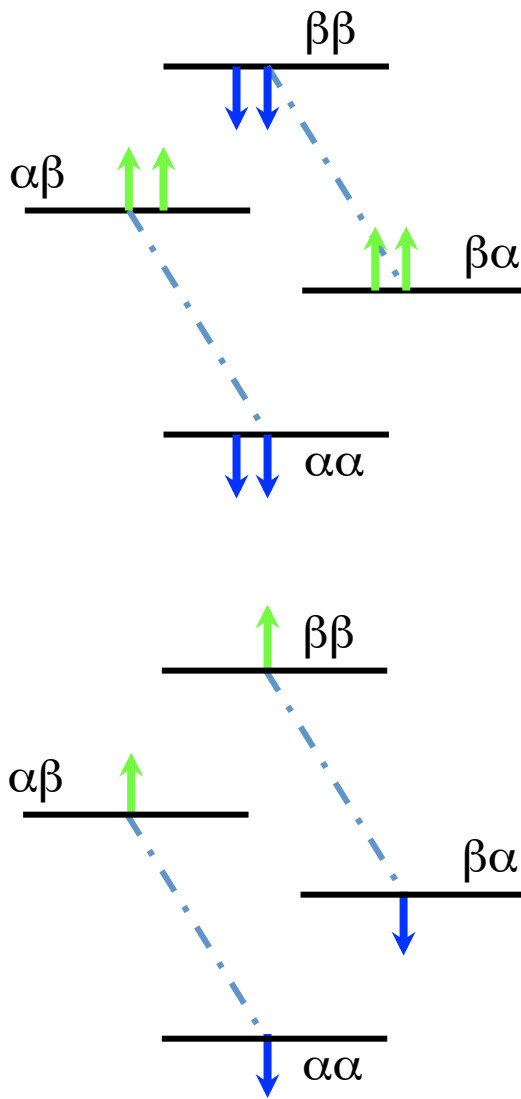
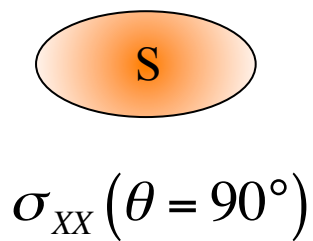
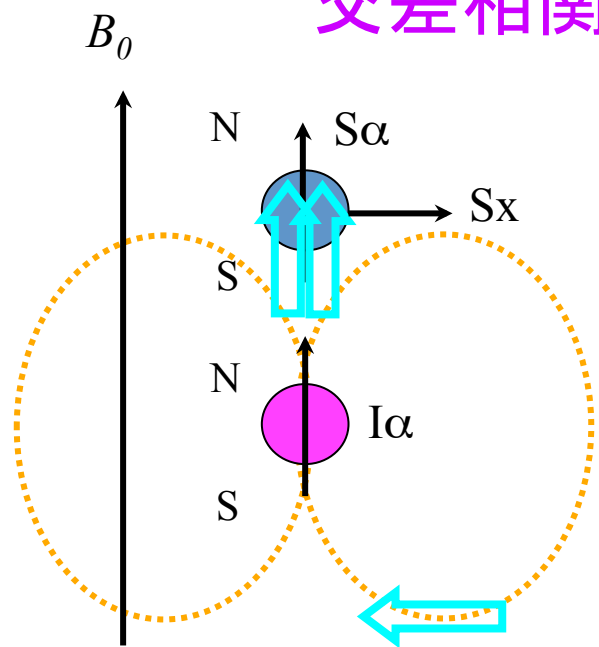
重水素化により、線形が先鋭になるだけでなく、
磁化移動の delay での減衰が小さくなる



$$\frac{1}{2 \times J_{co-\alpha}} = 9ms, \exp(-93 \times 0.009) = 0.433, \exp(-11 \times 0.009) = 0.906$$

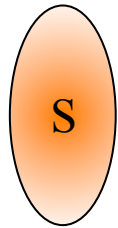
(ただし、¹³Cα の anti-phase の緩和を除く)

交差相関 cross-correlation between DD and CSA

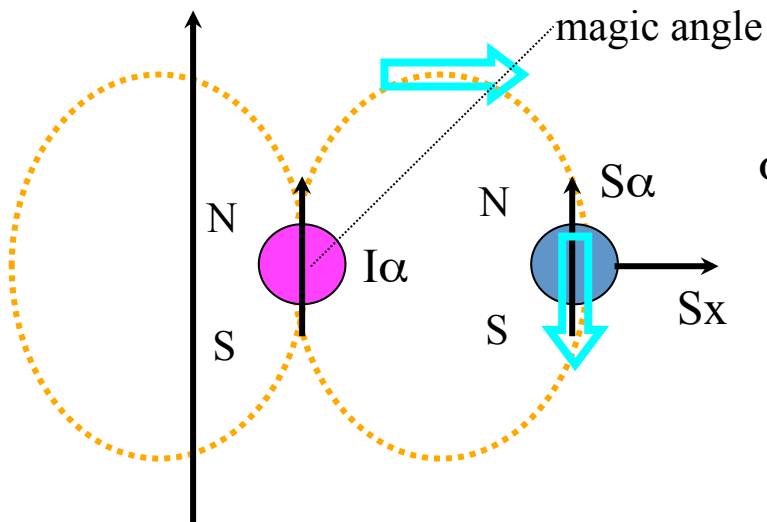
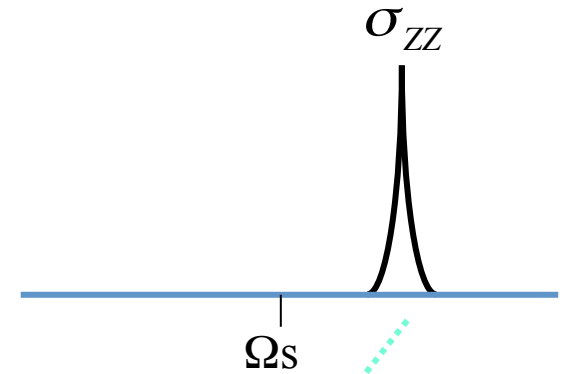
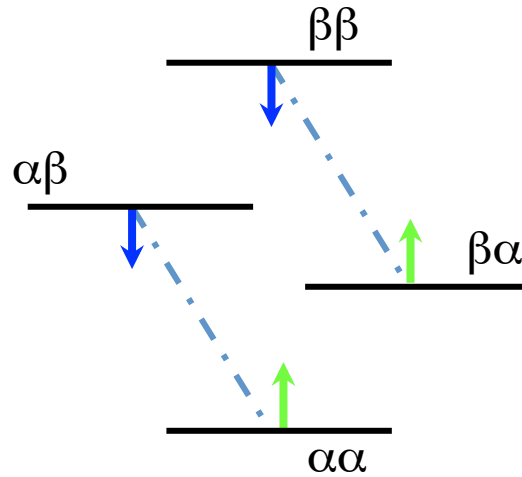


分子が 90° 回転して I-S 結合が横を向くと ...

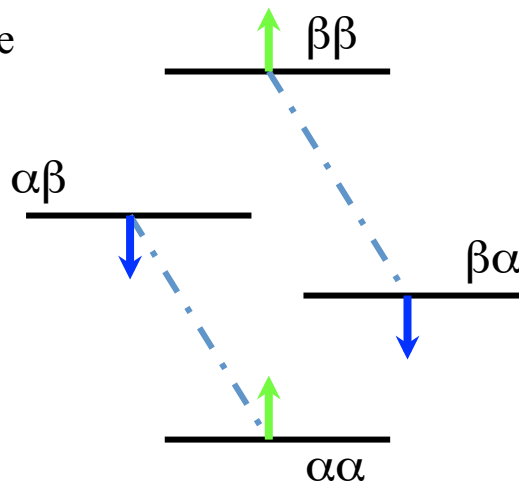
B_0



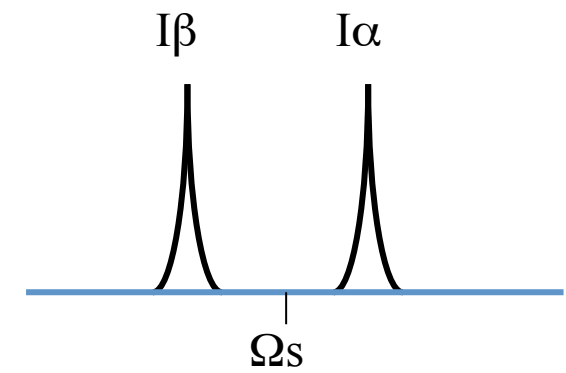
$\sigma_{ZZ} (\theta = 0)$



核磁気の永年項 (B_0 方向成分)

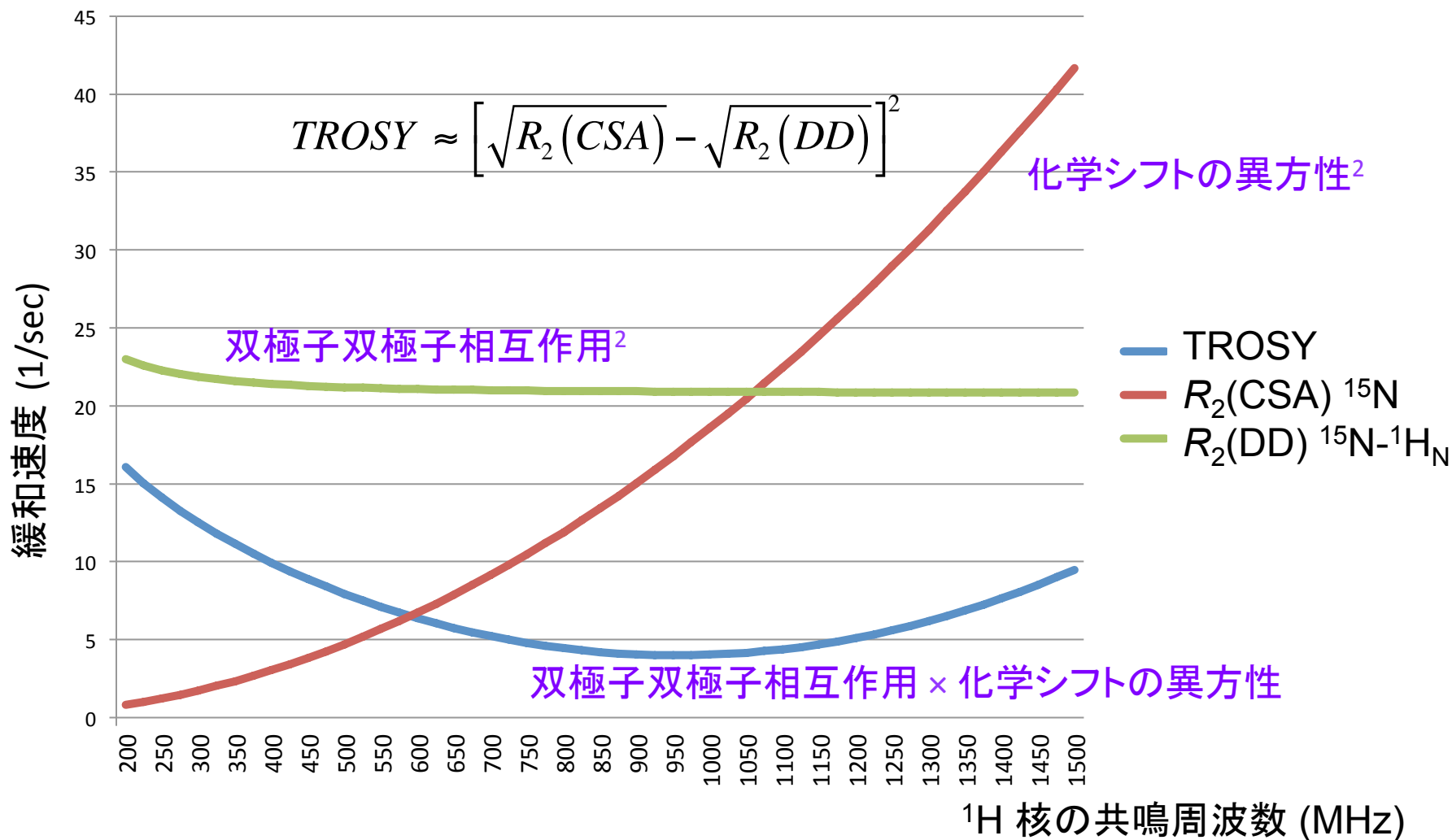


TROSY-peak



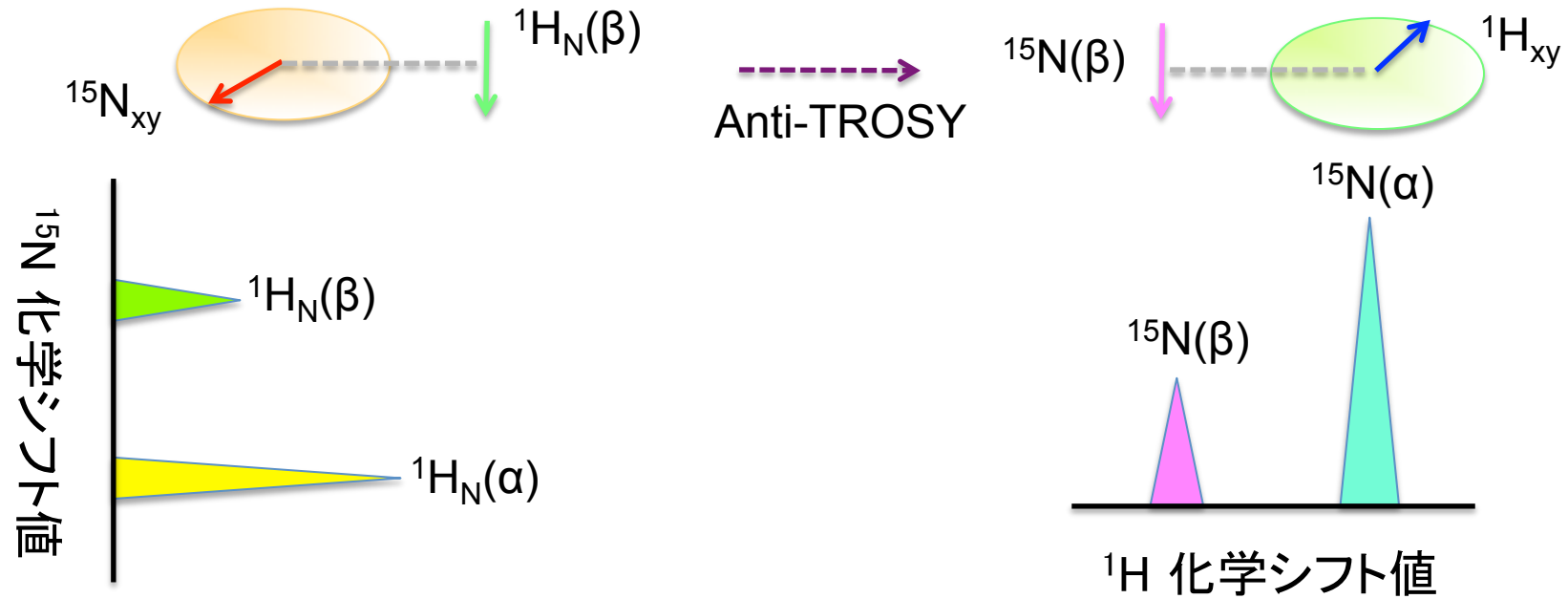
J ではなく dd

$^{15}\text{N}-^1\text{H}$ の dd/csa TROSY 効果は静磁場強度 B_0 に依存する



$\tau_r = 20 \text{ ns}$ ($\sim 50 \text{ kDa}$), $\vartheta_{\text{csa-dd}} = 15^\circ$

TROSY では doublet ピークがランダムに入れ替わってはいけない

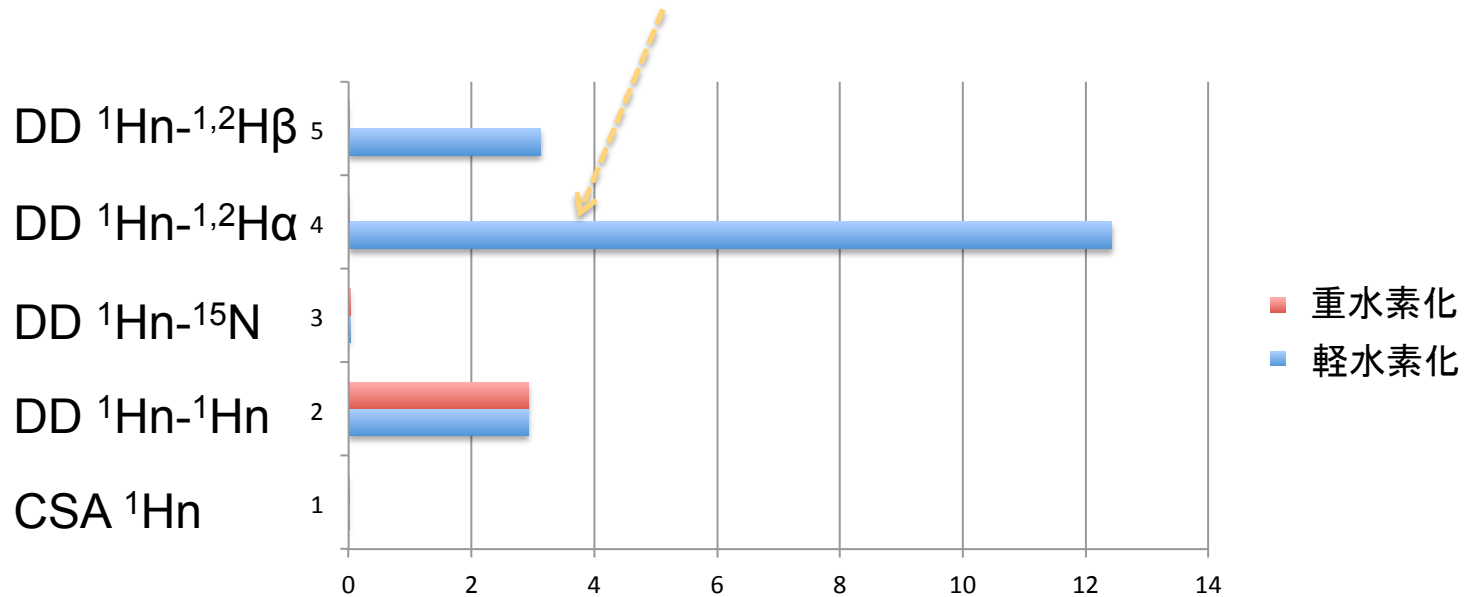


$^1\text{H}_N(\alpha) \leftrightarrow ^1\text{H}_N(\beta)$ のランダムな交換を無くしたい

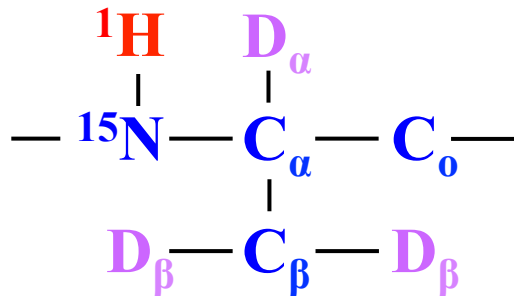
$^1\text{H}_N$ の縦緩和を出来るだけ遅くする \rightarrow $\text{H}\alpha$ などの重水素化

重水素化により $^1\text{H}_N$ 核の縦緩和が遅くなる

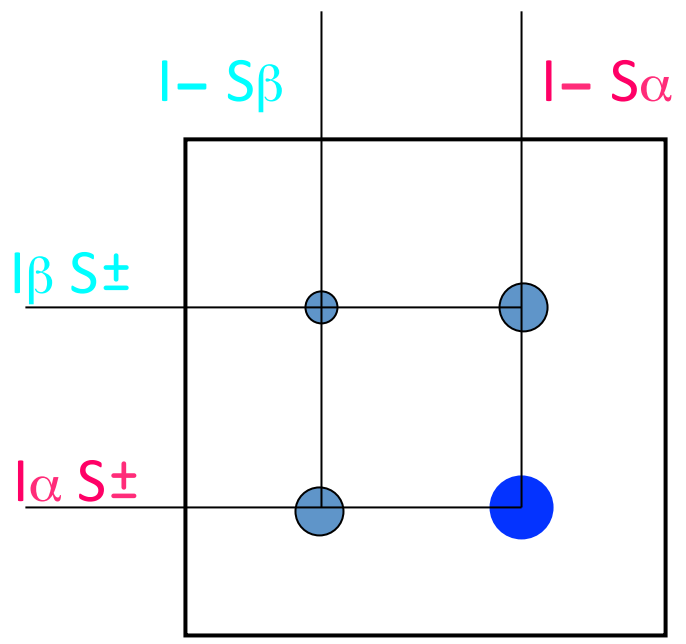
$\text{H}\alpha$ との dd 縦緩和速度が $1/7000$ になる？
 (欠点) repetition-delay を長くしないとイケない



自己縦緩和速度 ρ_1 (1/sec) (ただし、交差緩和は無視)
 (500 MHz ^1H) $\tau_r=20$ ns (~ 50 kDa)

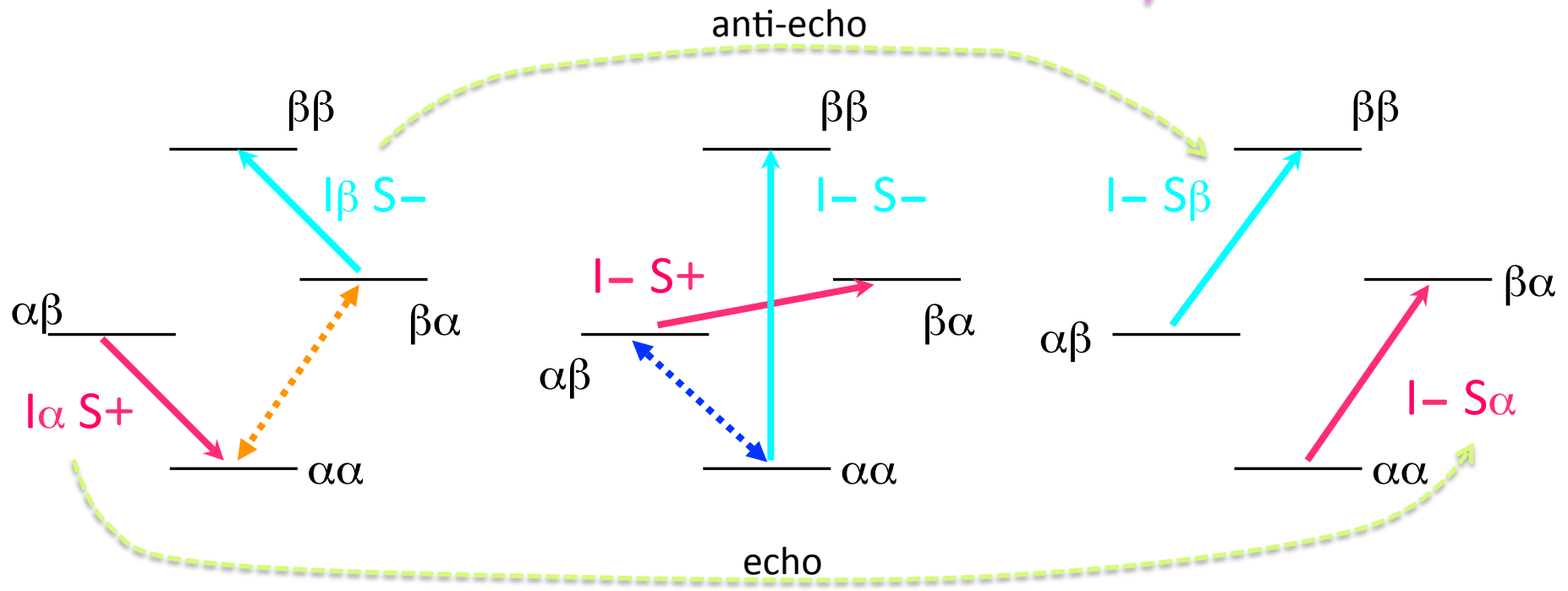
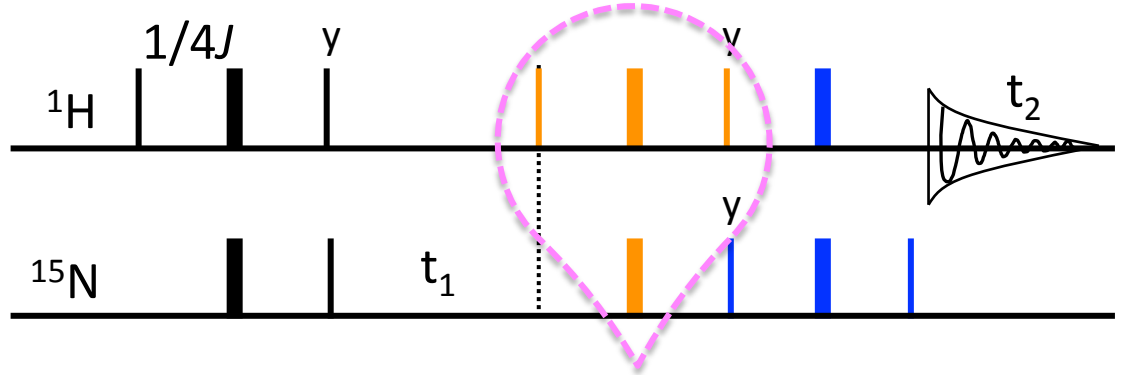


^{15}N の展開時間を 50ms とすると
 $\exp(-18 \times 0.05) = 0.41$, $\exp(-3 \times 0.05) = 0.86$
 の割合で $^1\text{H}_N(\alpha)$ と $^1\text{H}_N(\beta)$ が維持される



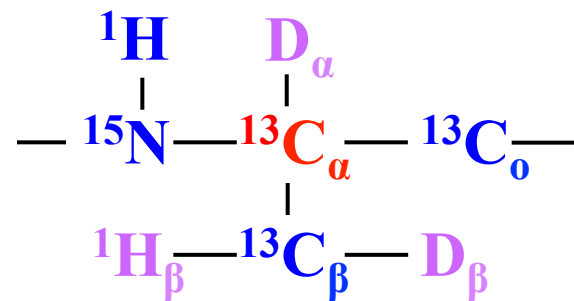
TROSYパルス系列における
スピン状態選択的磁化移動

グループとして特殊なπ-パルス



超高磁場 NMR (800–1100 MHz) では ^{15}N - ^1H の TROSY が有効

少なくとも $^2\text{H}_\alpha$ 化しないと効果は小さい。



M9 最少培地 ← [^1H , ^{13}C]-glucose, 100% D_2O

H_α 重水素化率: 95%

H_β 重水素化率: 80%

メチル基は CHD_2 の割合が多く、十分観測可能

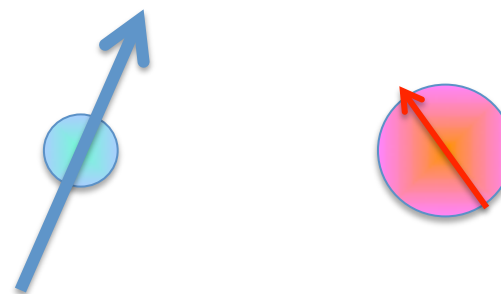
^{13}C 核の直接測定 (FID) の長所と短所

$$\gamma_{1H} = 26.75 \times 10^7 \left(\frac{1}{\text{T} \cdot \text{s}} \right)$$

$$\gamma_{13C} = 6.73 \times 10^7 \left(\frac{1}{\text{T} \cdot \text{s}} \right)$$

$$\mu_{1H} : 2.79 \mu_N$$

$$\mu_{13C} : 0.70 \mu_N$$



磁気回転比 γ_{13C} は γ_{1H} の 1/4

$$\mu_N : \text{the nuclear magneton} = 5.05 \times 10^{-27} \left(\frac{\text{J}}{\text{T}} \right)$$

(核ボア磁子)

長所 → 双極子相互作用による T_2 緩和が遅い (特に ^2H が付いている場合)。したがって、線幅が狭く、高分子や常磁性金属を配位した蛋白質に適している。

$$R(dd) \propto \gamma_I^2 \cdot \gamma_S^2 \cdot S(S+1)$$

短所 → 感度が小さい。

→ T_1 緩和も遅いので、repetition-delay を長く待つ必要がある。

^{13}C 核の化学シフト値の広い分布により、線形が先鋭に見える

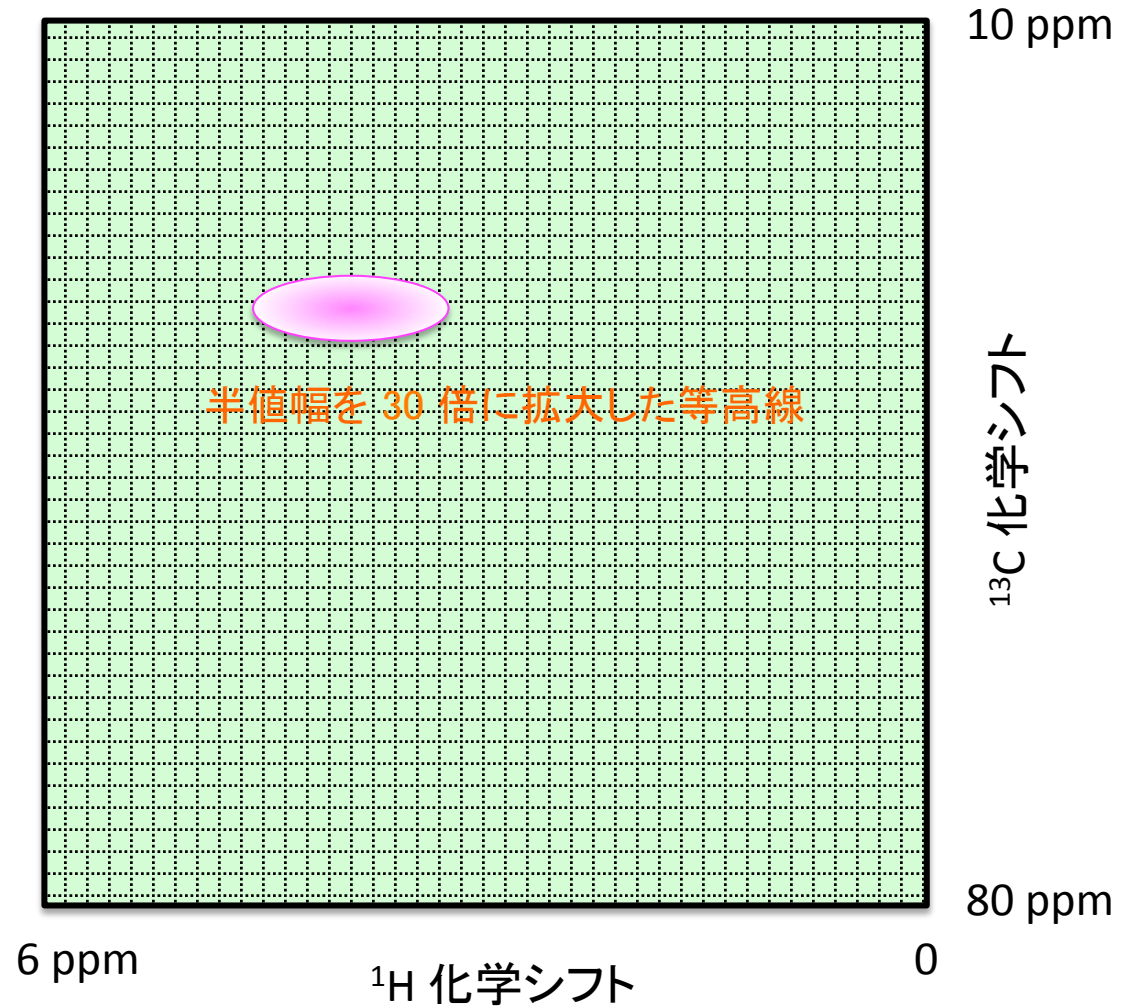
^{13}C - ^1H の双極子双極子 ^{13}C 横緩和
半値幅 27 Hz = 0.18 ppm
aliphatic ^{13}C : 10~80ppm とすると、0.0026

^{13}C - ^1H の双極子双極子 ^1H 横緩和
半値幅 27 Hz = 0.046 ppm
aliphatic ^1H : 0~6ppm とすると、0.0077

化学シフト分布の広がりを考慮すると、 ^{13}C よりも ^1H のピークの方が3倍幅が広く見える。

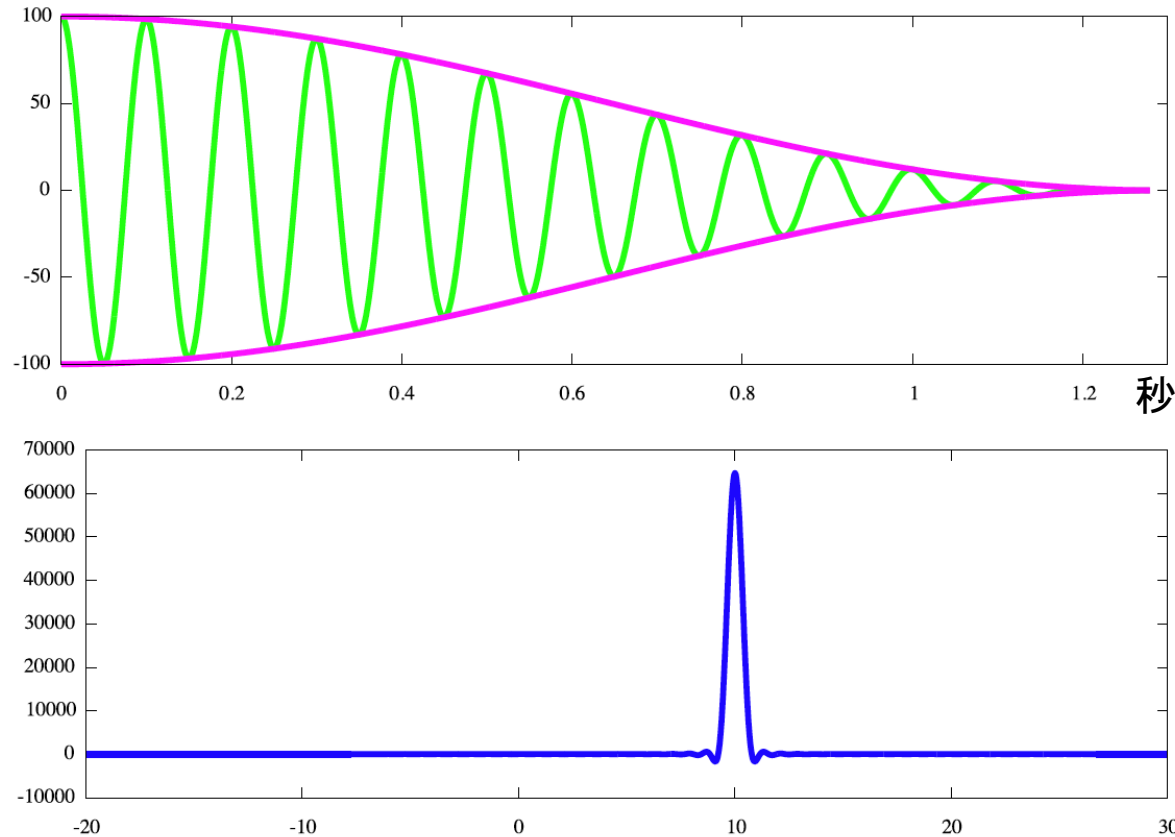
^{13}C - ^2H の双極子双極子 ^{13}C 横緩和
半値幅 2 Hz = 0.015 ppm
aliphatic ^{13}C : 10~80ppm とすると、0.0002

重水素化により、 ^{13}C の線幅は、さらに 1/12 程度に細く見える。



600 MHz ^1H , $\tau_r=20$ ns (~ 50 kDa) ^{13}C - $^1,^2\text{H}$ (1.08 Å)

直接観測軸 (FID 側) における分解能 (@ ppm) は、静磁場強度に比例して増す



測定時間が限られている



間接測定軸の acquisition 時間 (サンプリング数) をあまり長くとれない



分解能が悪い

$$\text{分解能} = 1 / (1.3 \text{ s}) = 0.77 \text{ Hz}$$

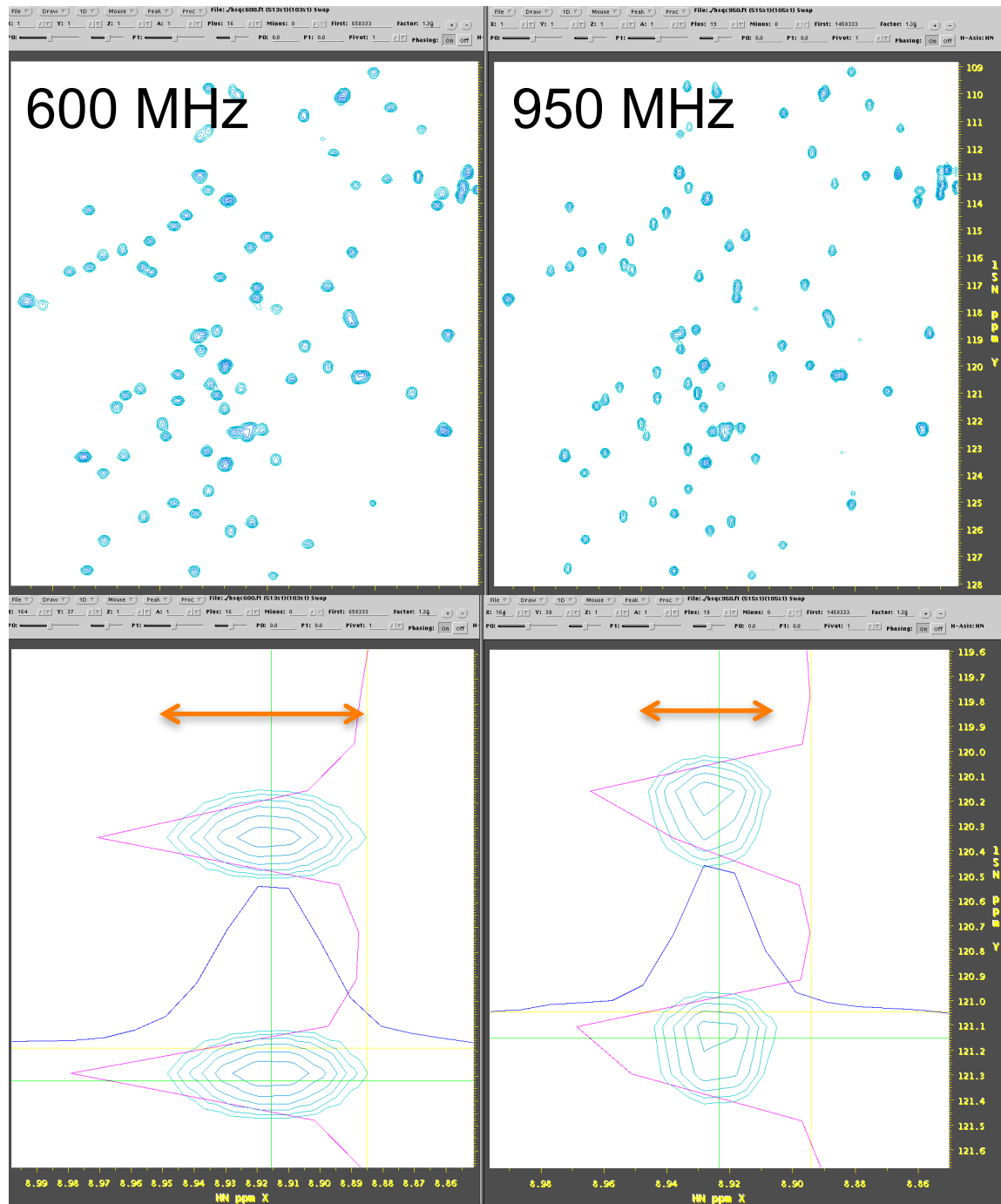
$$0.77 \text{ Hz} \rightarrow 0.002 \text{ ppm (} ^1\text{H on 400MHz NMR)}$$

$$0.77 \text{ Hz} \rightarrow 0.001 \text{ ppm (} ^1\text{H on 800MHz NMR)}$$

^{13}C 核を間接測定から
直接測定 FID に移すこと
により、静磁場強度に
比例した分解能の向上
を得ることができる

間接測定軸 (^{15}N 核)
測定時間に支配されてし
まい、分解能 (@ppm) を上
げられない。

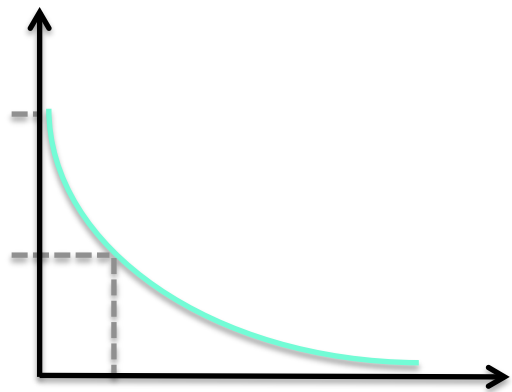
直接測定軸 ($^1\text{H}_\text{N}$ 核)
測定時間に支配されずに、
高磁場による分解能
(@ppm) の向上を享受でき
る。



- 緩和速度 R どうしは足せるが、
緩和時間 T どうしは足してはいけない

$$R\left(\frac{1}{\text{sec}}\right) = \frac{1}{T(\text{sec})}$$

$$\exp(-R_a t) * \exp(-R_b t) = \exp\{-(R_a + R_b)t\}$$



- × $T_{total} = T_a + T_b + T_c + \dots$

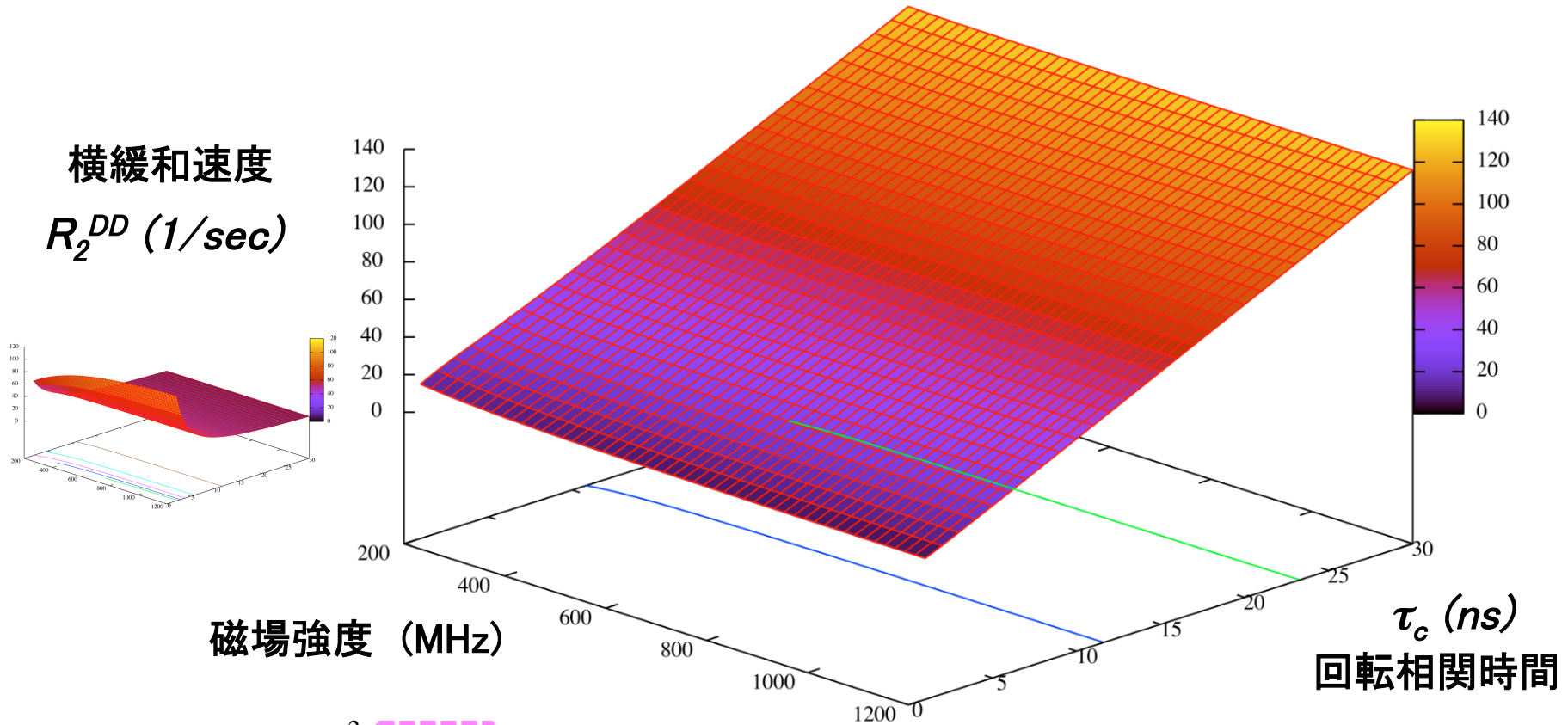
- $R_{total} = R_a + R_b + R_c + \dots$

- $\frac{1}{T_{total}} = \frac{1}{T_a} + \frac{1}{T_b} + \frac{1}{T_c} + \dots$

緩和時間： 1/2.7 (=37%) に落ちるまでにかかる時間

半減期： 1/2.0 (=50%) に落ちるまでにかかる時間

DDによる横緩和は、静磁場強度にそれほど依存しない



$$R_2^{DD} = \frac{\hbar^2 \gamma_I^2 \gamma_S^2}{8r^6} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \{ 4J(0) + J(\omega_I - \omega_S) + 3J(\omega_I) + 6J(\omega_S) + 6J(\omega_I + \omega_S) \}$$

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2}$$

I ($^{13}\text{C}\alpha$) 側を観測

FIDのように、十分に長くサンプリングを行えば、Hertzで表した線幅は磁場強度によってあまり変化しないため、ppm表示での分解能が上昇する。

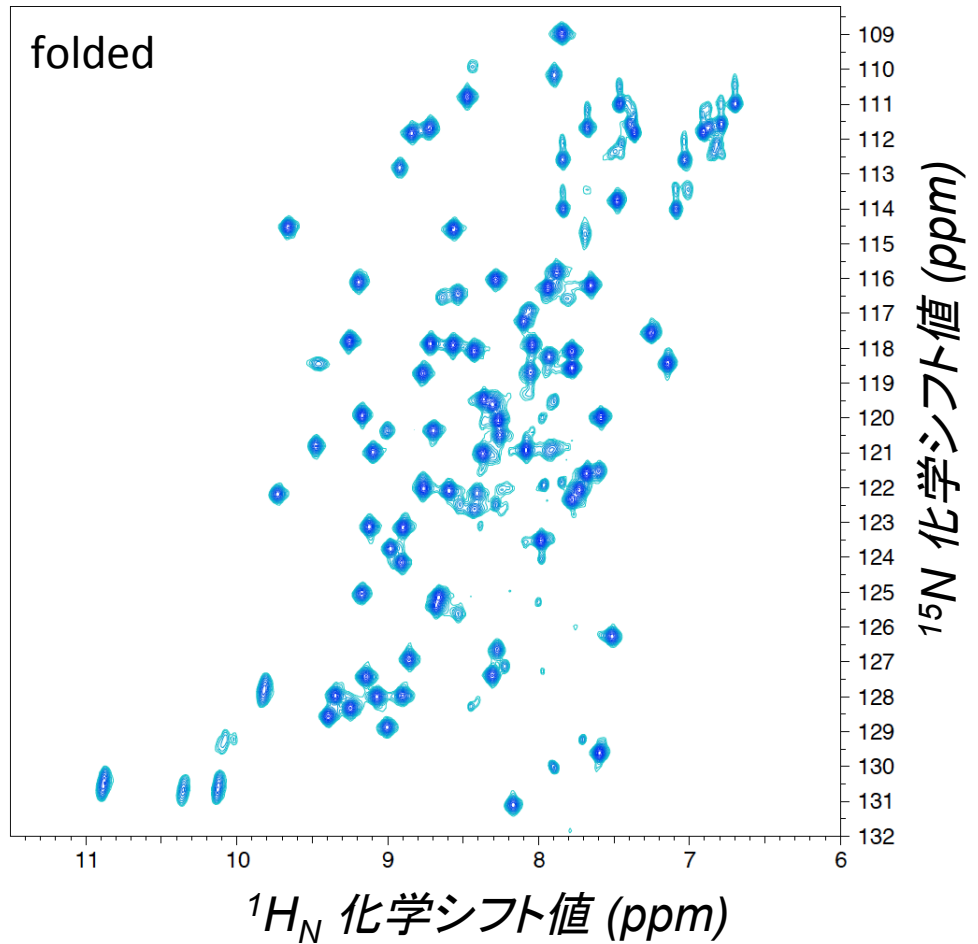
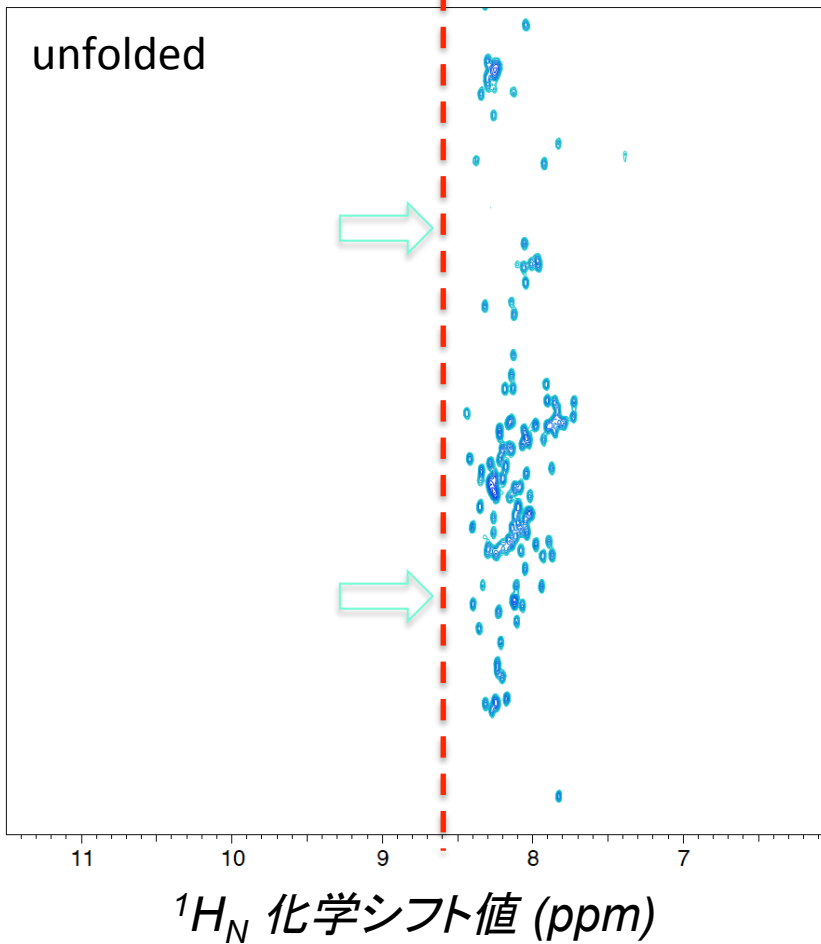
$^{13}\text{C}\alpha$ - $^1\text{H}\alpha$ 2スピン系 1.09 Å
双極子相互作用のみを考慮



立体構造を保持していない蛋白質では、
 $^1\text{H}_\text{N}$ の化学シフトの散らばりは小さい

2D ^1H - ^{15}N HSQC

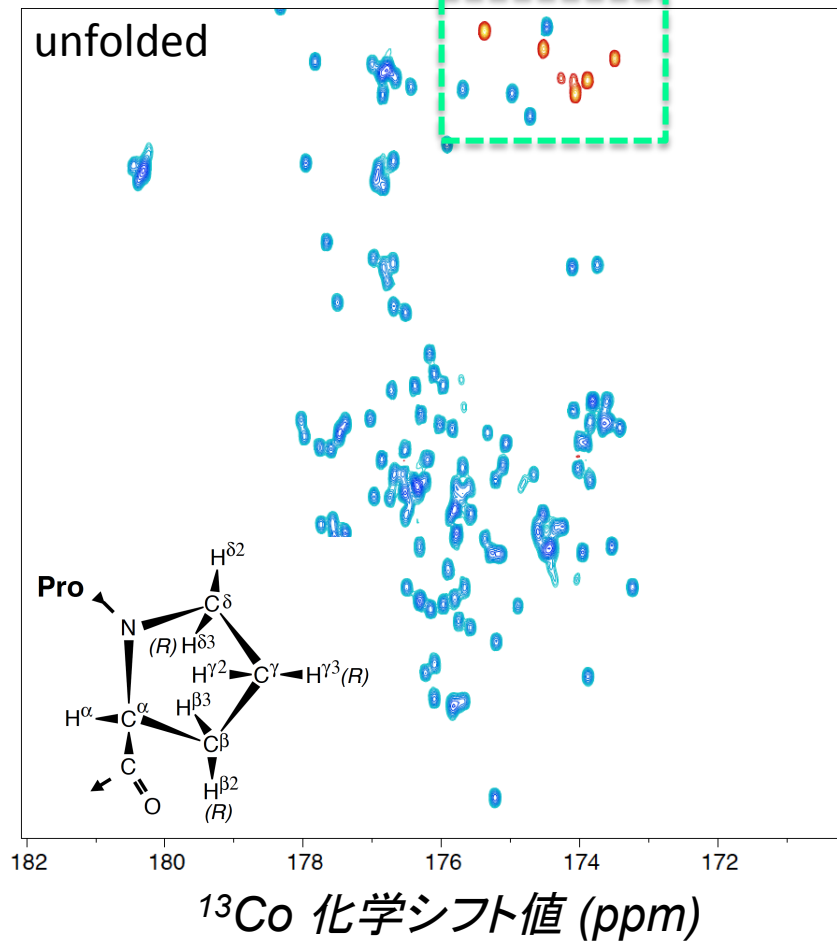
いわゆる？ハムの崖



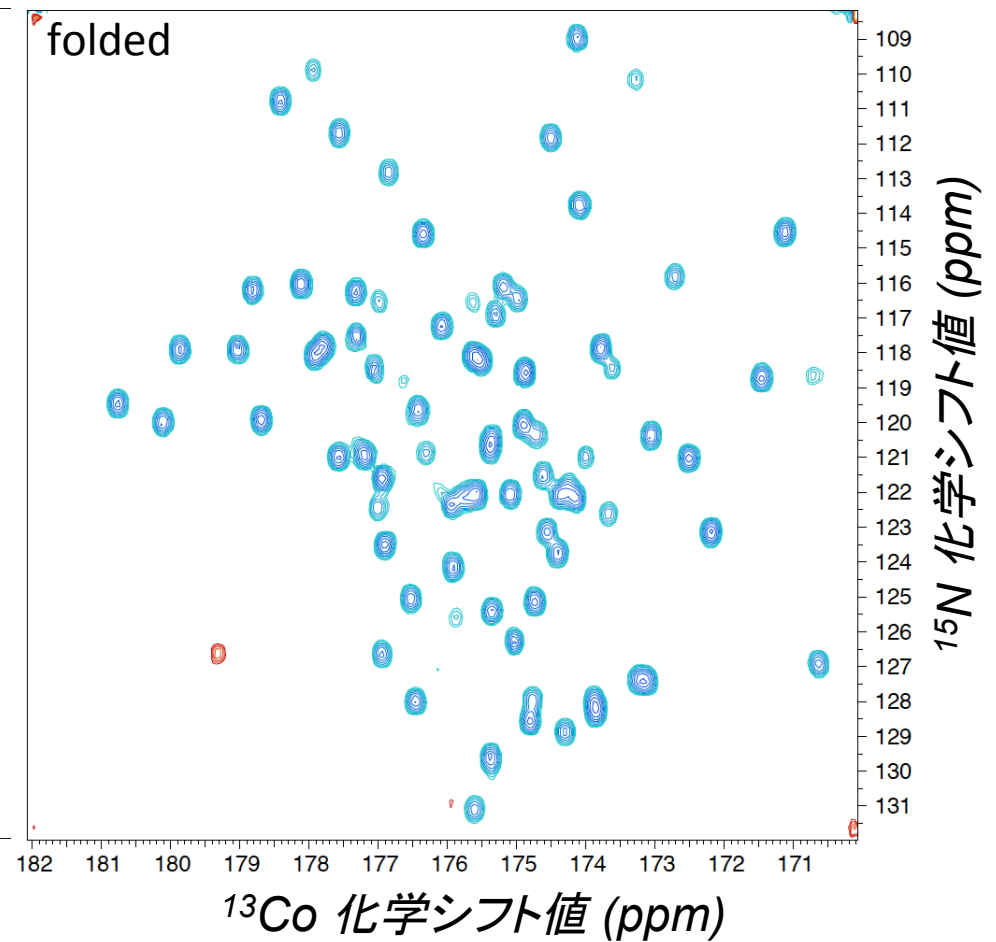
たとえ立体構造の無い蛋白質でも
 ^{15}N や ^{13}C などの異種核では、化学シフトがまだ散らばる

2D CONCO

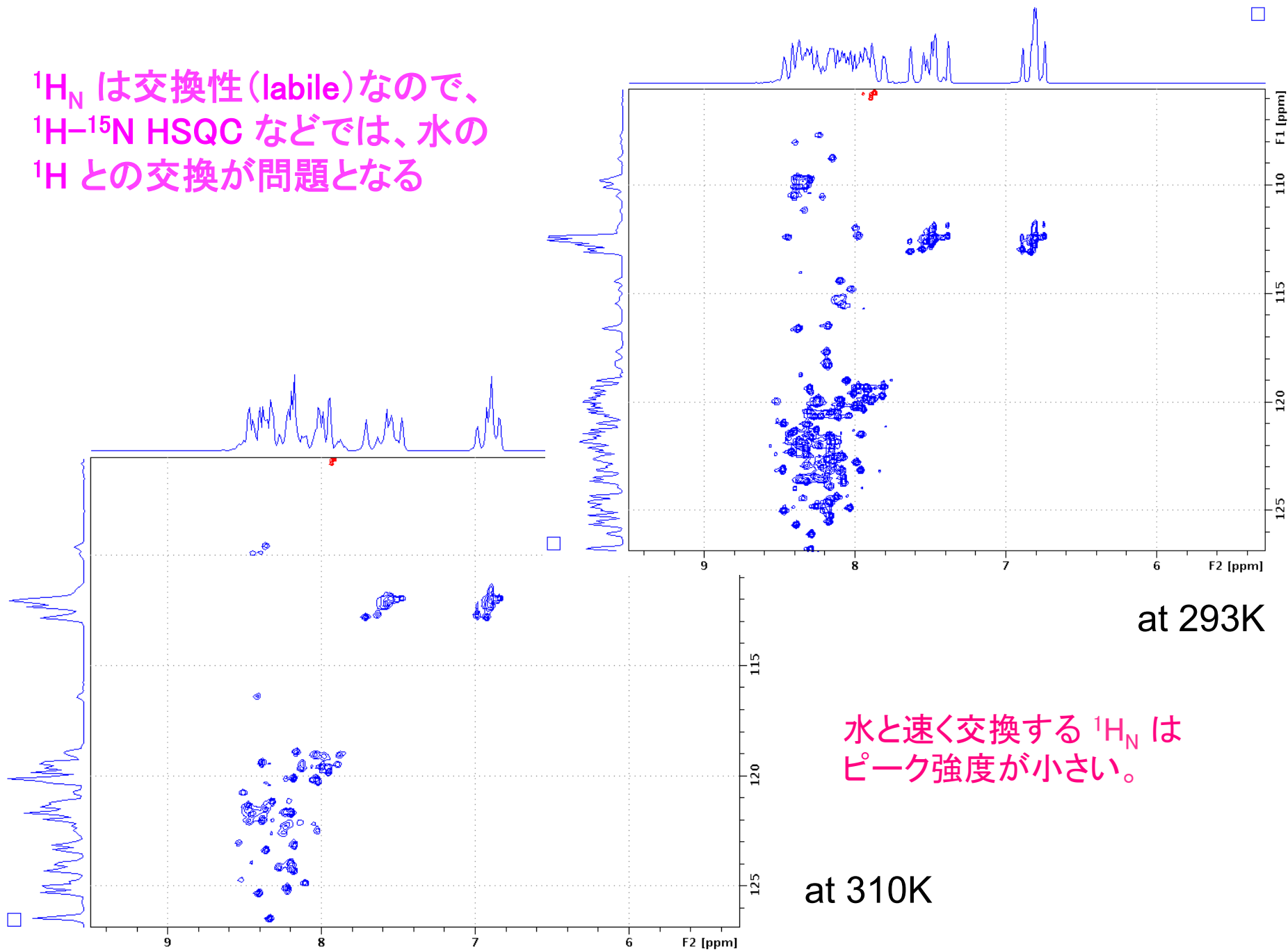
Pro (^{15}N ~134ppm)



3D HNCO の $^1\text{H}_\text{N}$ 軸に沿った圧縮投影



$^1\text{H}_\text{N}$ は交換性 (labile) なので、
 ^1H - ^{15}N HSQC などでは、水の
 ^1H との交換が問題となる



¹³C-検出に伴う感度の低下

$$\frac{S}{N} \propto Conc \cdot \gamma_{exc} \cdot \gamma_{obs}^{\frac{3}{2}} \cdot B_0^{\frac{3}{2}} \cdot N_{scan}^{\frac{1}{2}}$$

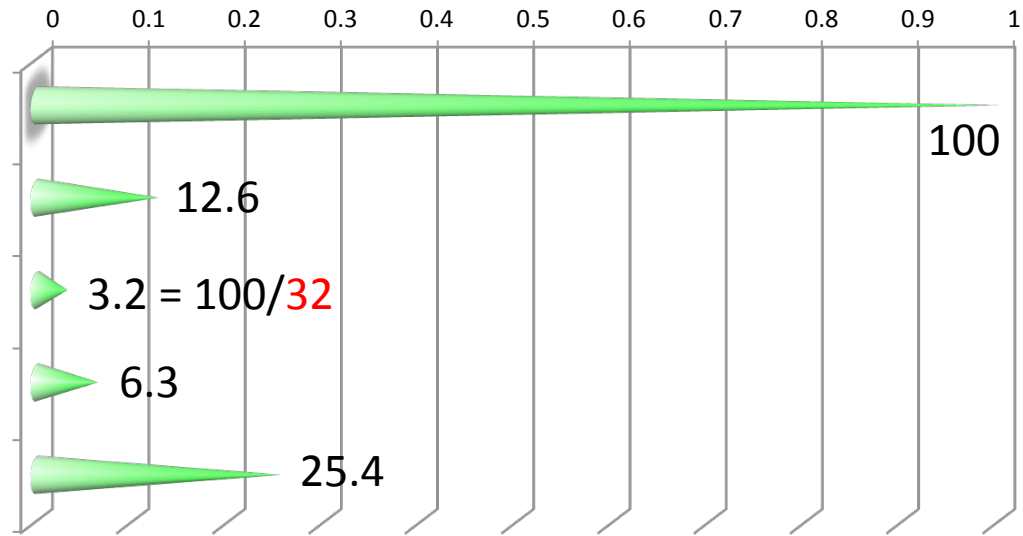
磁化移動の開始: ¹H
 FID 検出: ¹H
 B₀: 600 MHz
 プローブ: 室温

FID 検出: ¹³C

磁化移動の開始: ¹³C

B₀: 950 MHz

プローブ: 極低温
 (inverse かどうかは無視)



濃度を4倍に濃くする

or

積算時間を16倍にする

or

磁化移動を ¹H から始める (100% 重水素化では×)

NMR の高磁場化に伴う利点

感度の上昇 $\propto B_0^{3/2}$

磁気モーメント $\propto B_0$

ラーモア周波数 $\propto B_0$

ノイズレベル $\propto B_0^{1/2}$

$$(S/N)_{950\text{MHz}} / (S/N)_{600\text{MHz}} = 2$$

$$\bar{M}_z = \frac{N\gamma^2\hbar^2 I(I+1)}{3kT} B_0$$

$$\omega_0 = -\gamma B_0$$

直接測定軸(FID)における分解能の増加

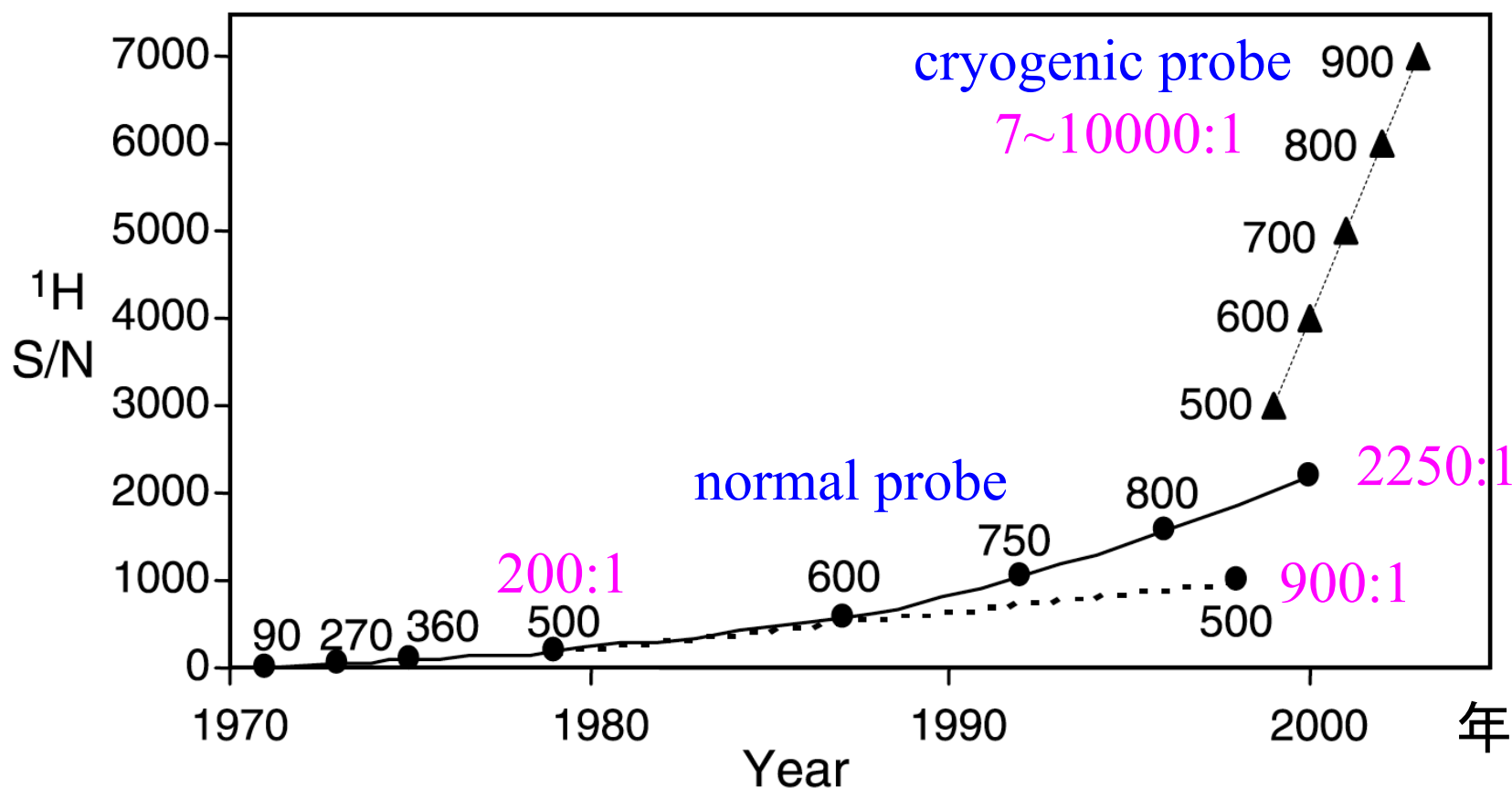
^1H - ^{15}N TROSY 効果

磁化率の異方性による磁場配向の増加

NMR 感度の上昇の過程

$$\frac{\text{感度} \times 4}{\text{時間} \times 1/16} =$$

$$\frac{S}{N} \propto \frac{U_I}{U_N} \propto \frac{N \times \gamma_e \sqrt{\gamma_d^3 \times B_0^3} \times (B_1/I_{\text{coil}})}{\sqrt{4k_B \times \Delta f \times (R_c(T_c + T_a) - R_s(T_s + T_a))}}$$



Kovacs, H., et al. (2005) *Progr. NMR Spectr.* **46**, 131.

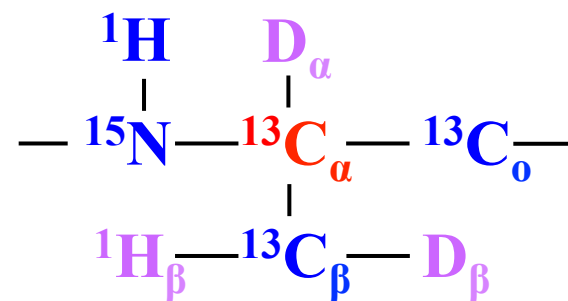
^{13}C -極低温検出器により ^{13}C -直接 FID 検出が実現可能に

→ 分解能の向上 (測定時間に支配されない)

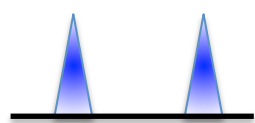
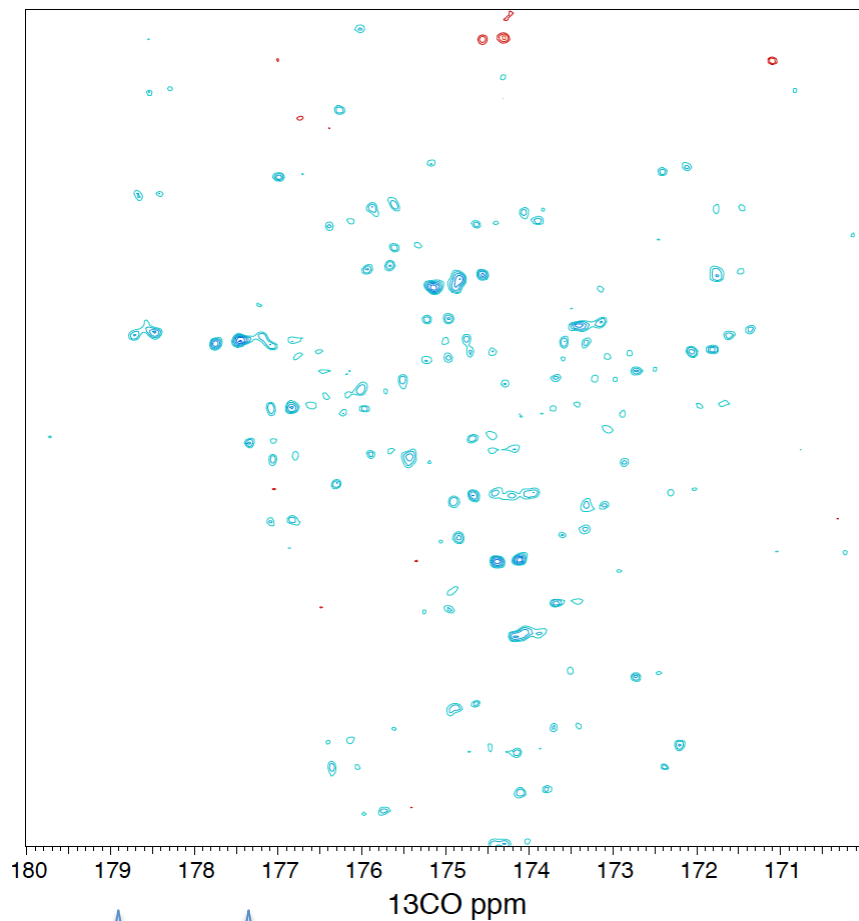
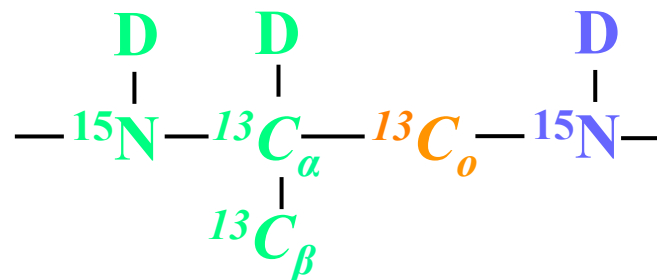
超高磁場

→ 感度の上昇
分解能 (@ppm) の向上 (磁場が高い程良い)

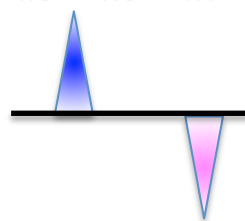
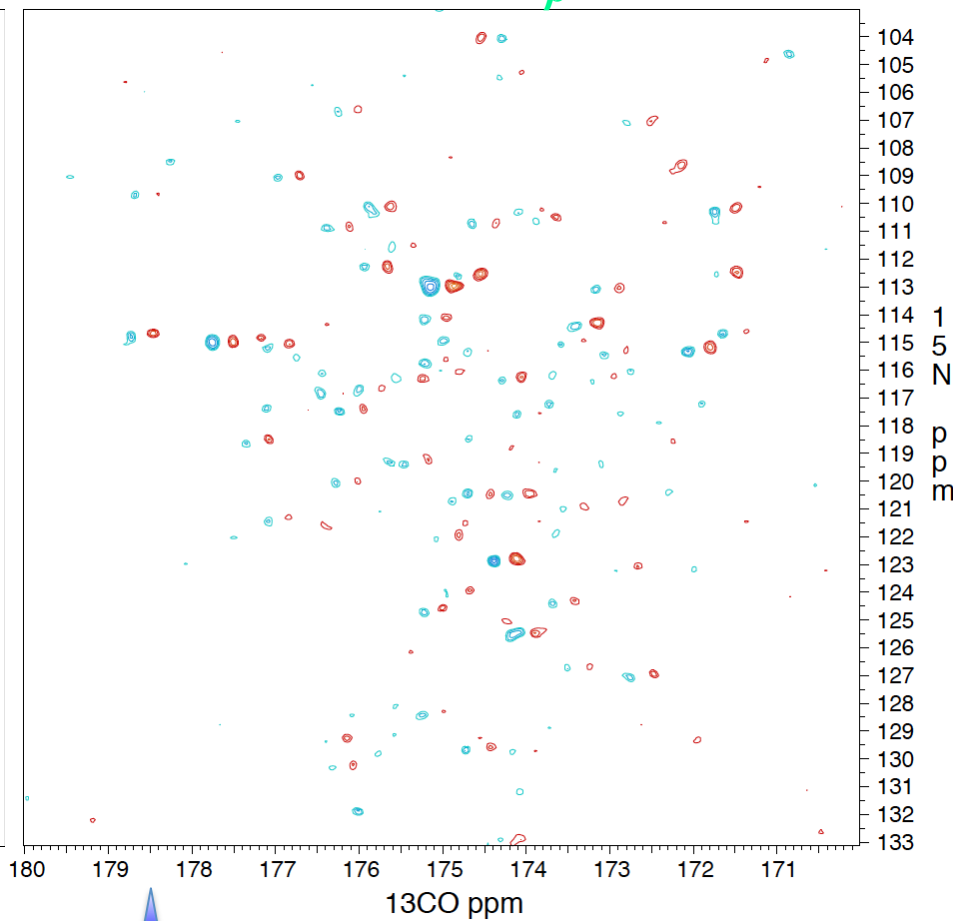
^{13}C の化学シフト値のスペクトル分布は、 ^1H よりも広いので、 ^{13}C の線幅は ^1H の線幅の 1/3 になったかのように見える。



^{13}C -検出 FID の IPAP-process



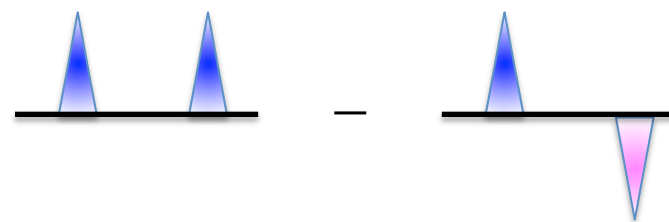
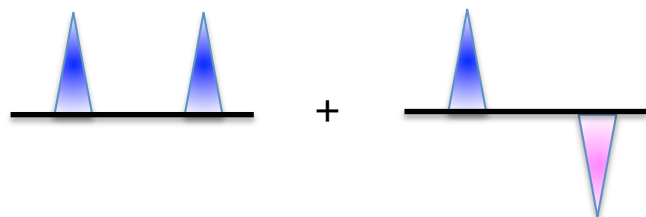
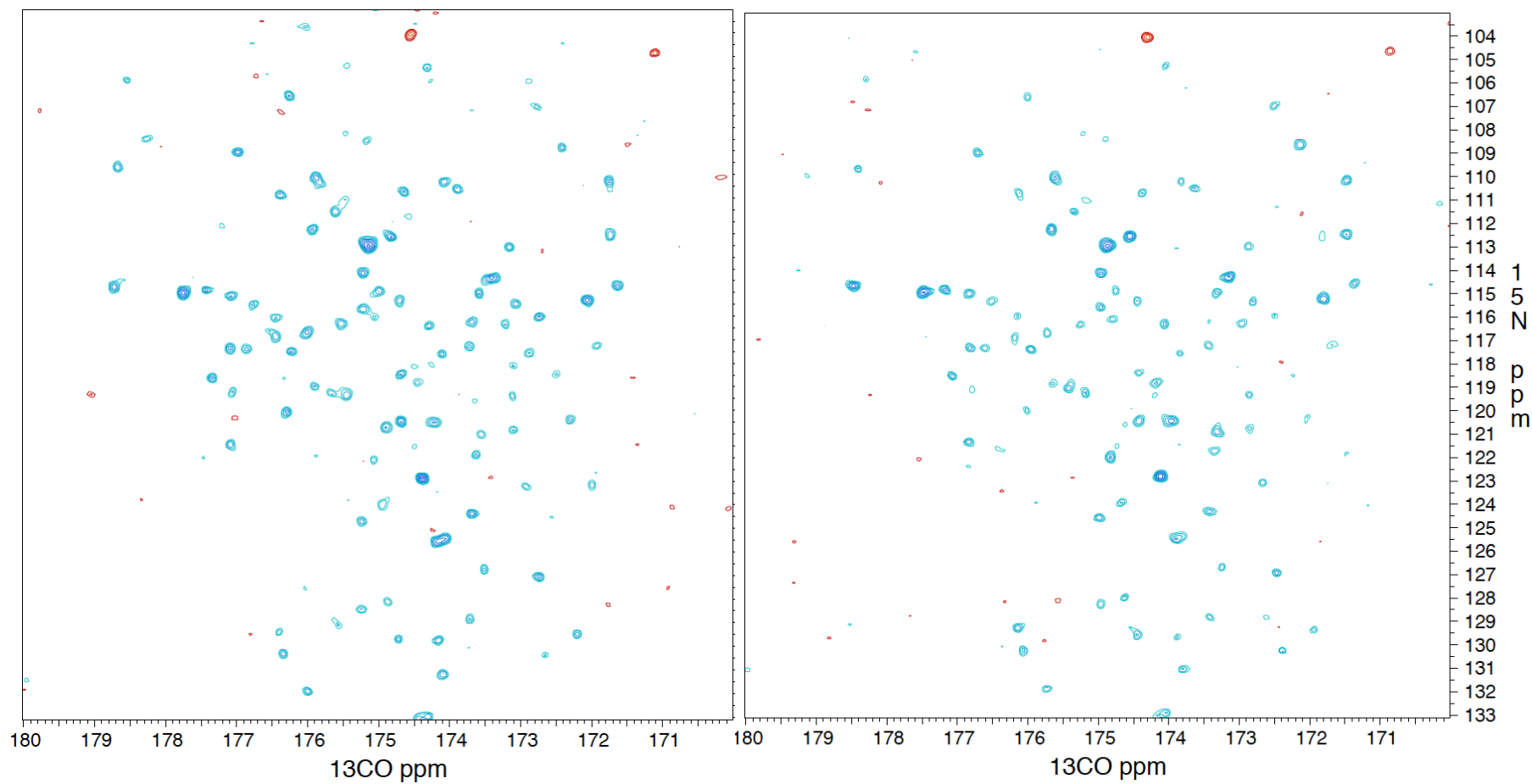
in-phase

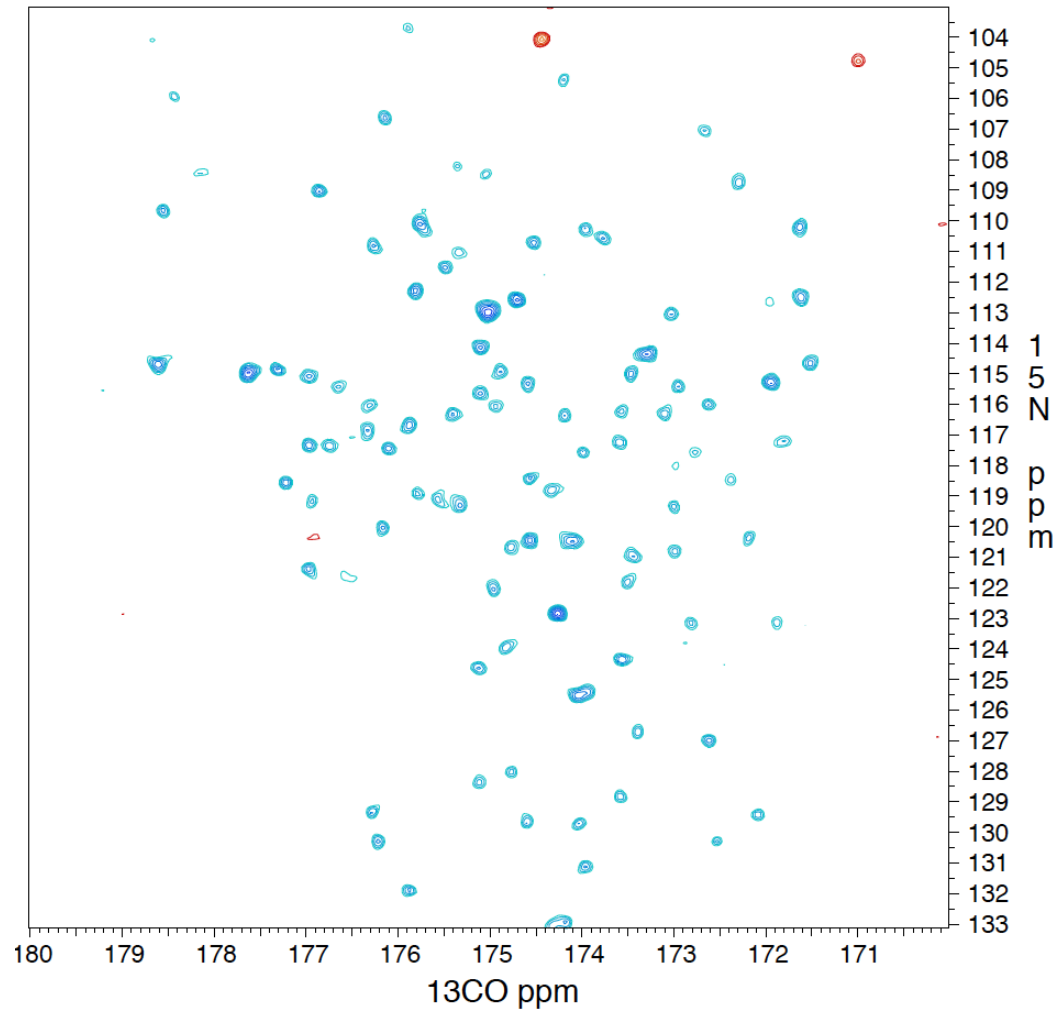
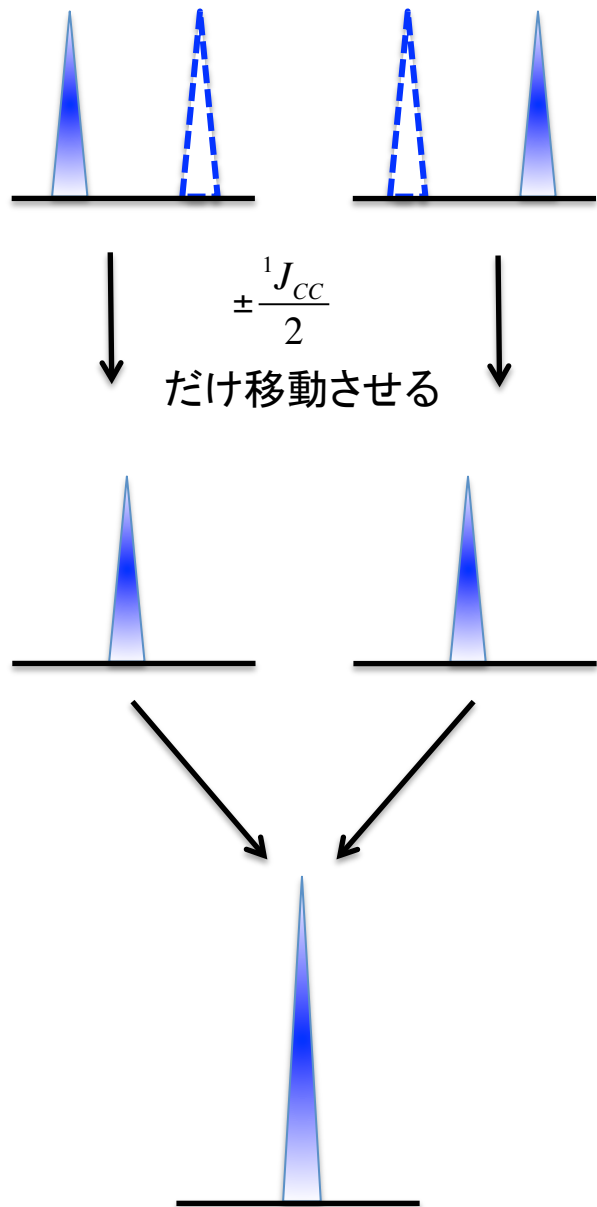


anti-phase

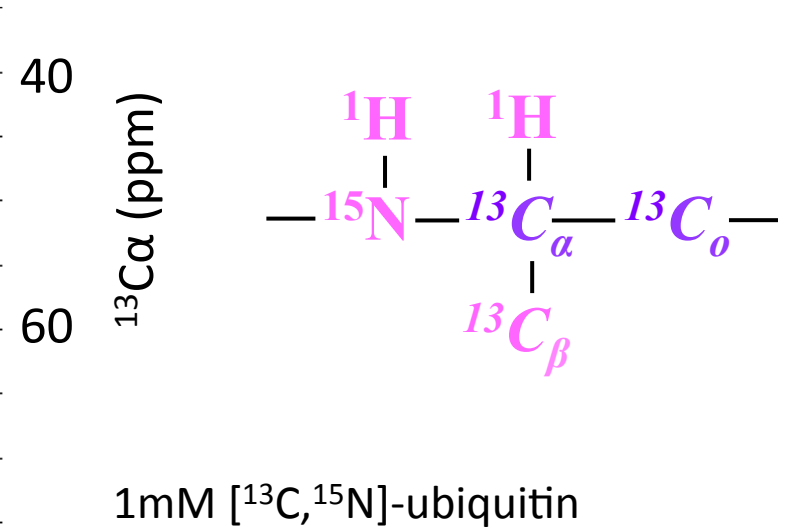
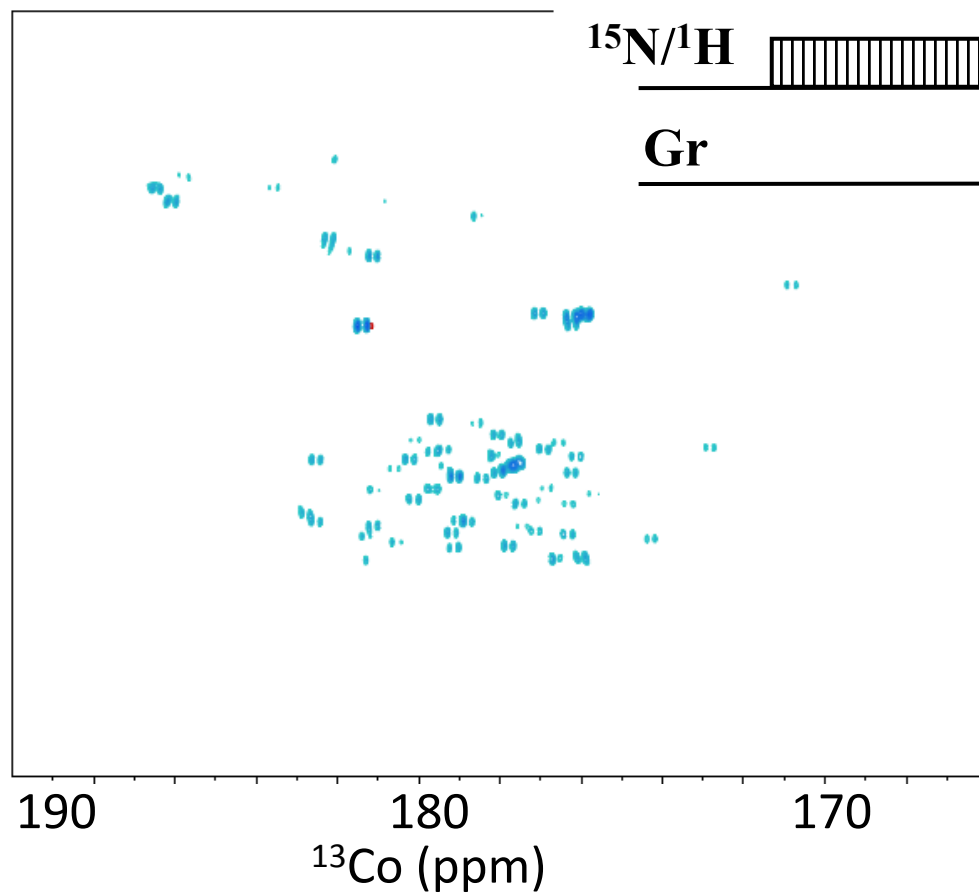
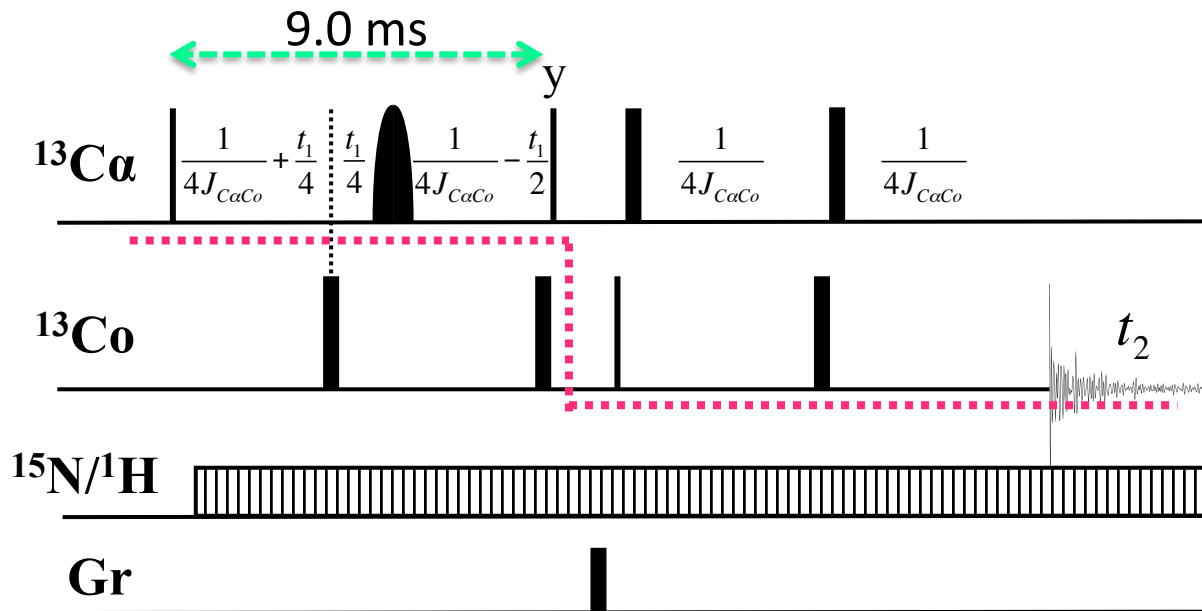
in-phase + anti-phase

in-phase - anti-phase

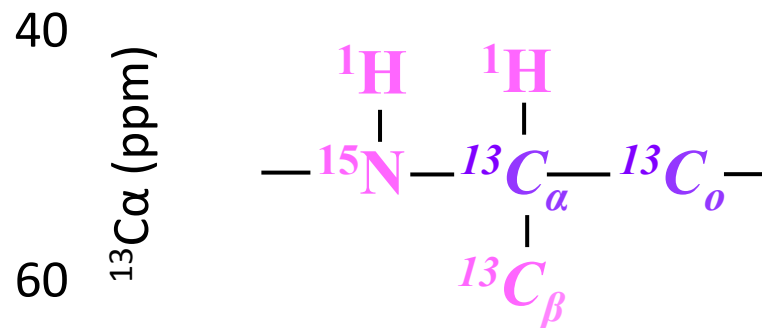
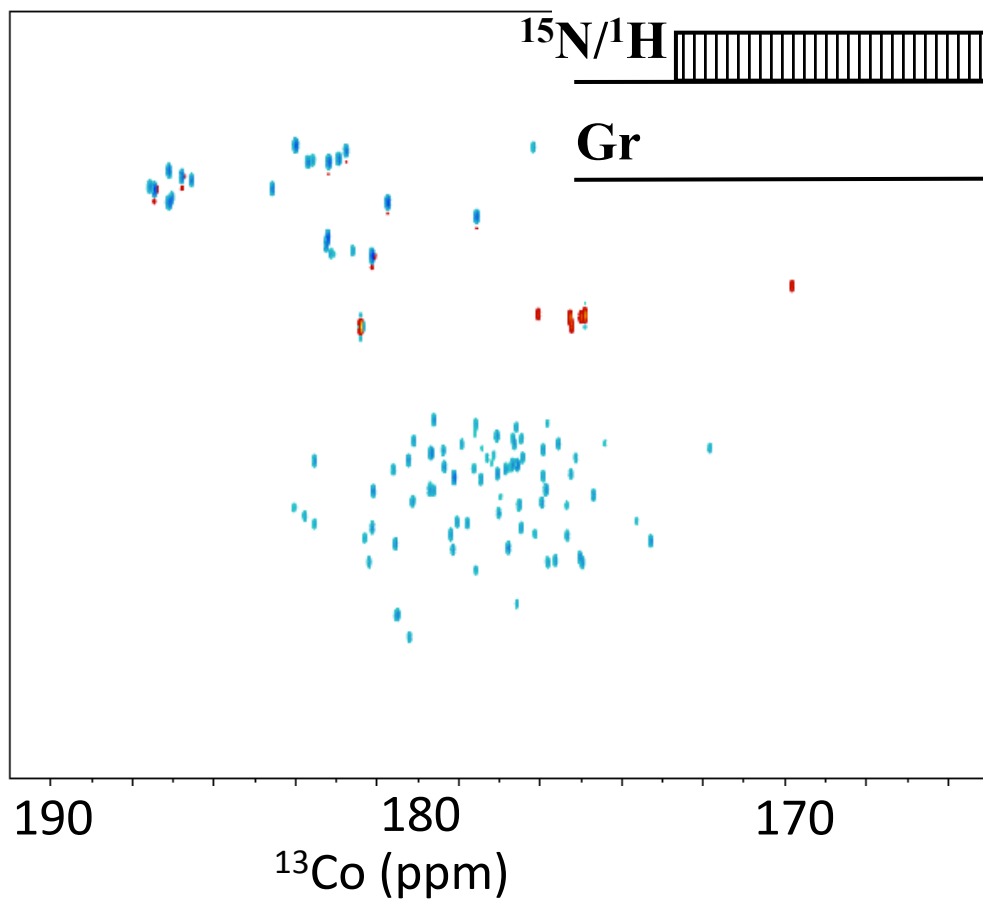
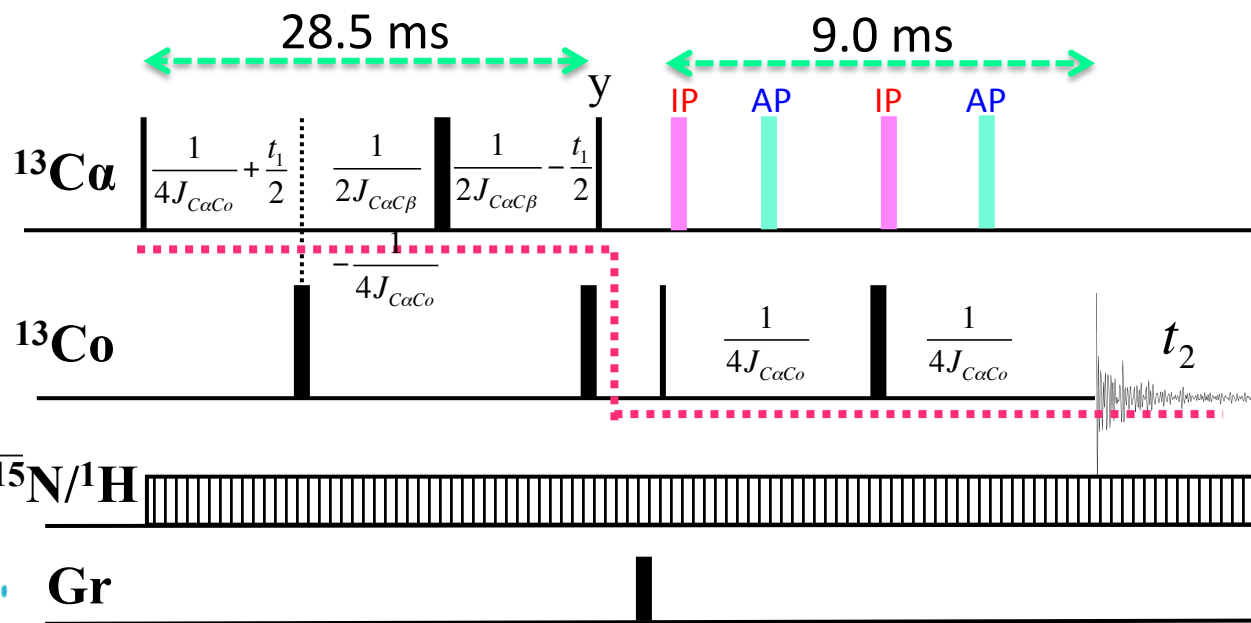




SQ-CT CACO



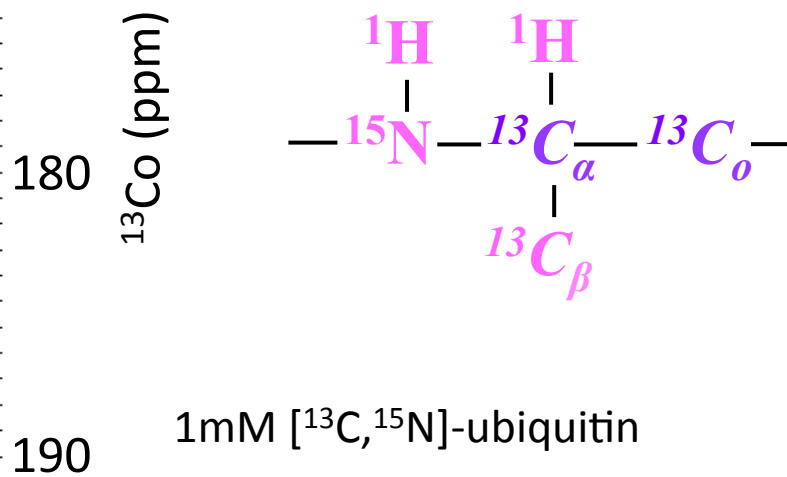
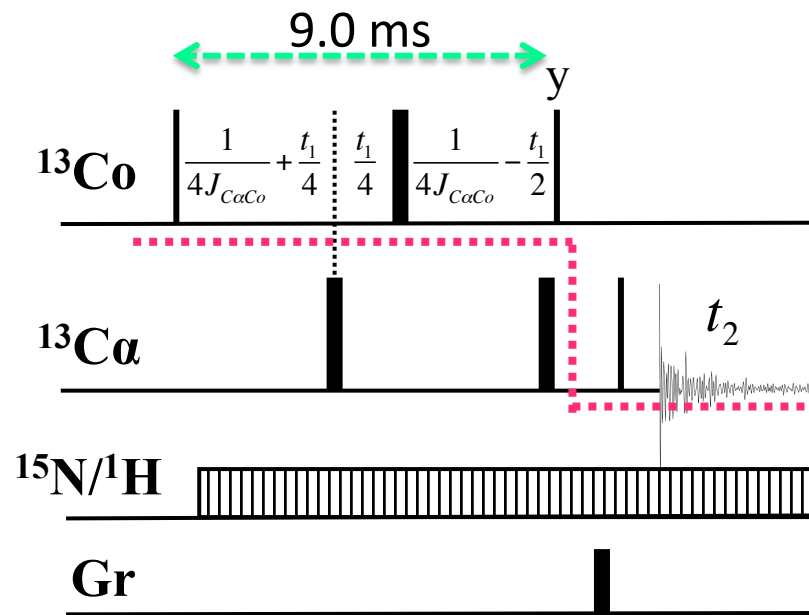
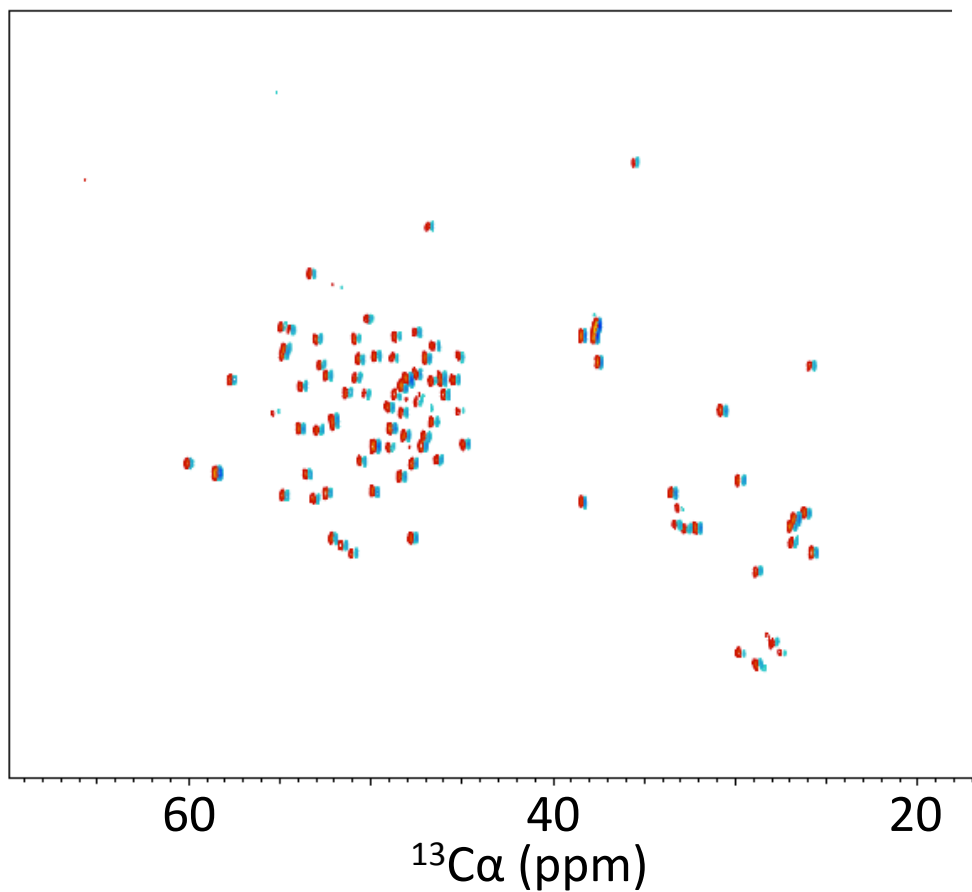
SQ-CT(β) CACO with IPAP



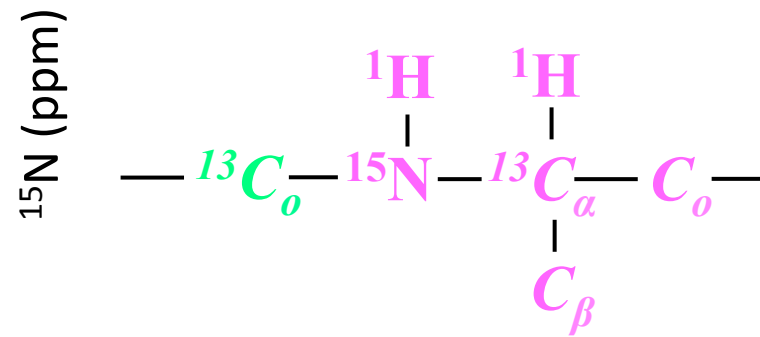
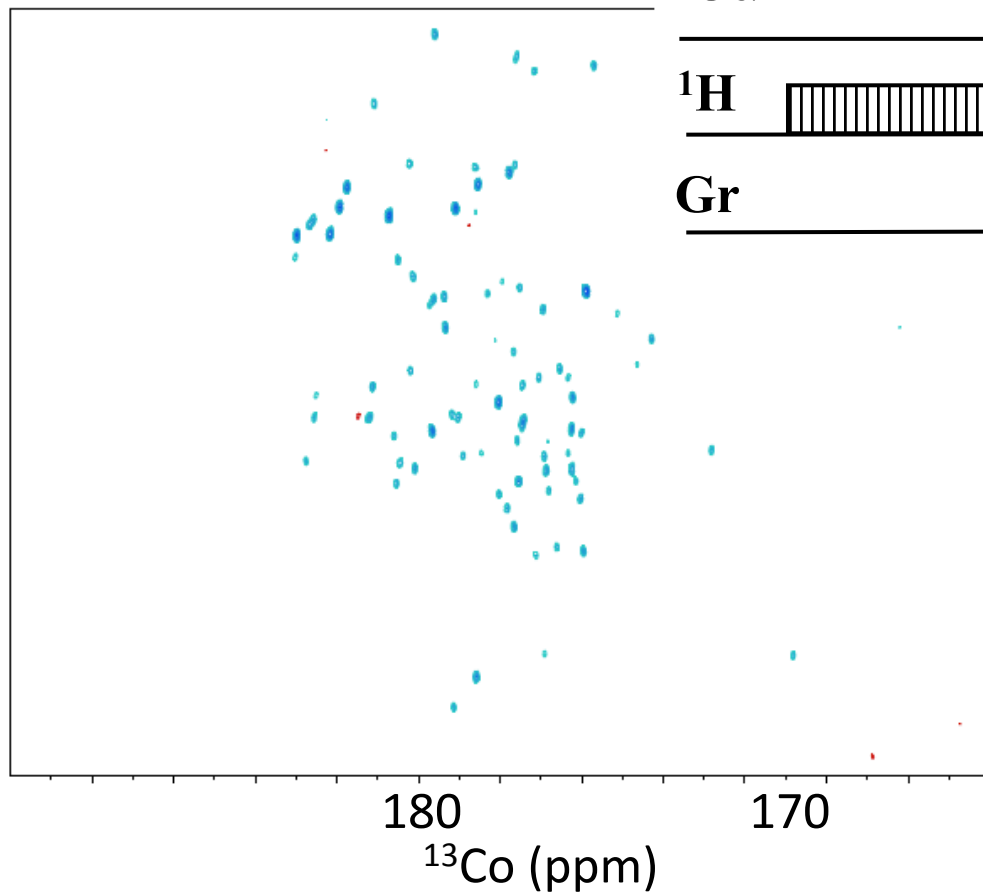
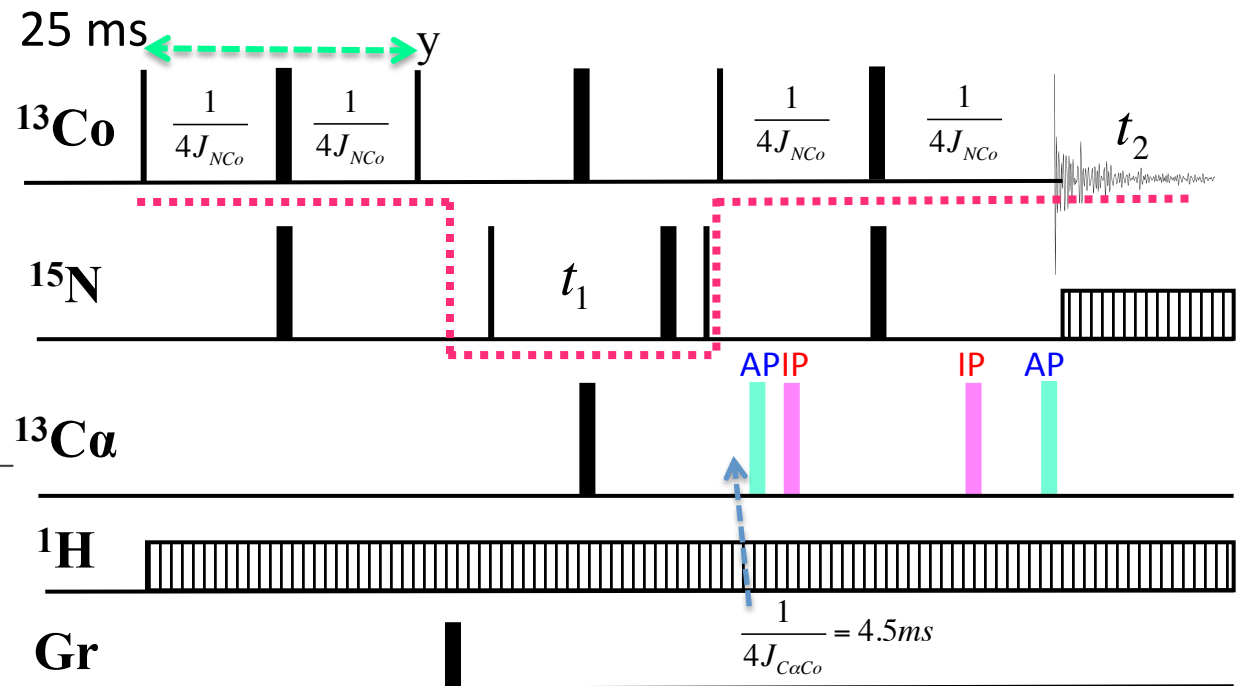
1mM [^{13}C , ^{15}N]-ubiquitin

SQ-CT COCA

$^{13}\text{C}\alpha$ - $^{13}\text{C}\beta$ -- inphase
 $^{13}\text{C}\alpha$ - $^{13}\text{C}\gamma$ -- antiphase

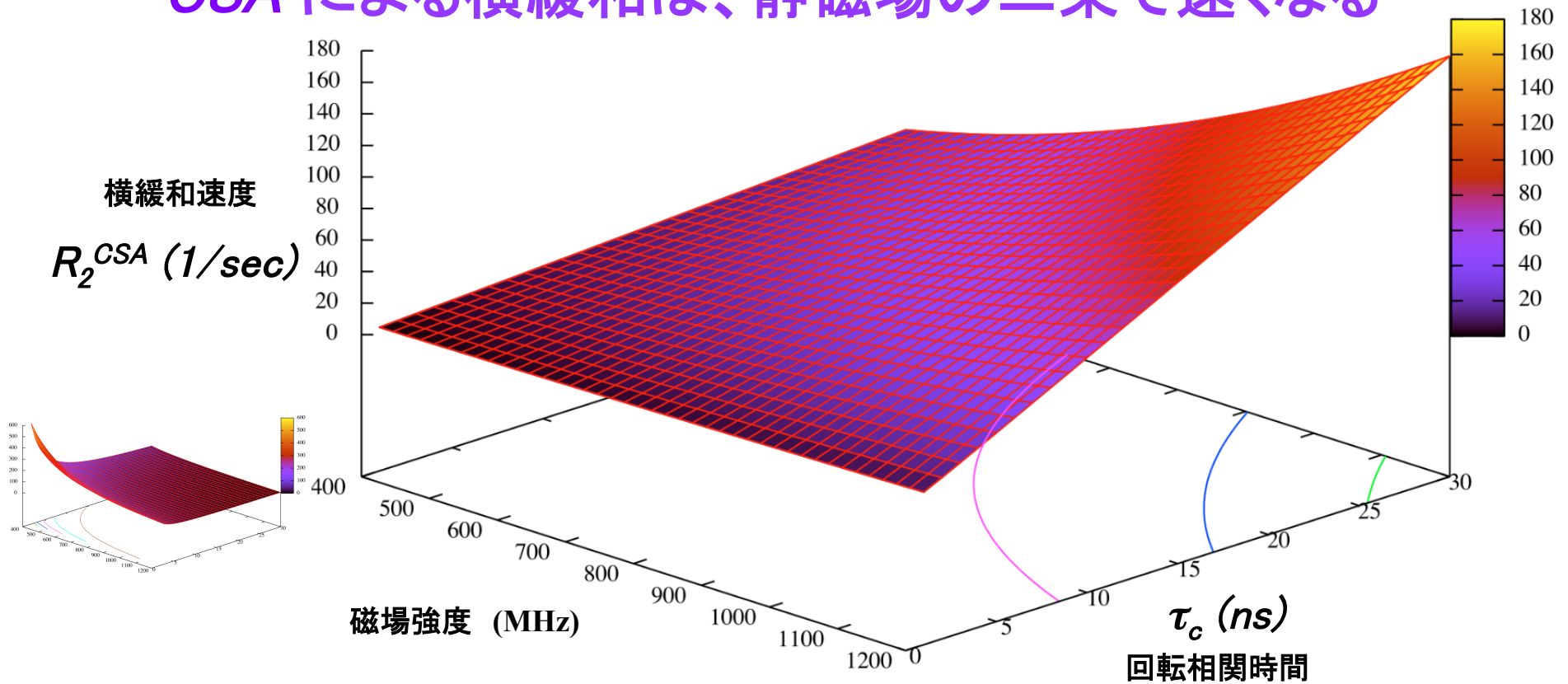


SQ CON with IPAP



1mM [^{13}C , ^{15}N]-ubiquitin

CSA による横緩和は、静磁場の二乗で速くなる



$$R_2^{CSA} = \frac{(\sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp})^2 \gamma_I^2 B_0^2}{18} \{4J(0) + 3J(\omega_I)\}$$

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2}$$

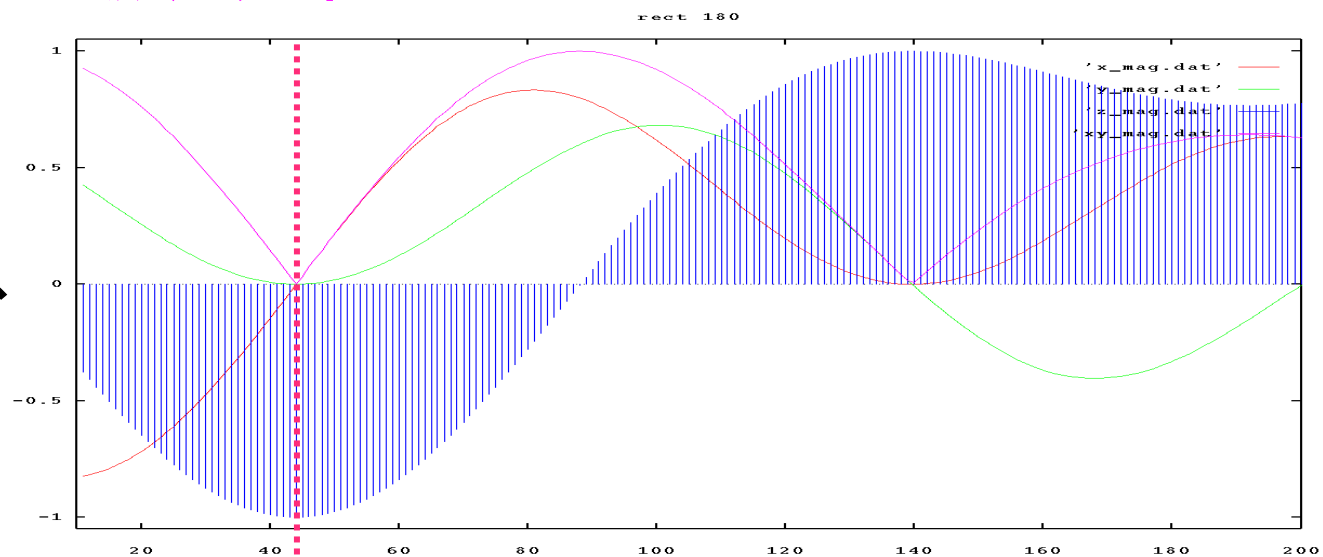
Trosy 効果、方向情報など
 positive な面を逆に利用する。

$^{13}\text{C}_\alpha$ 化学シフトの異方性のみ考慮

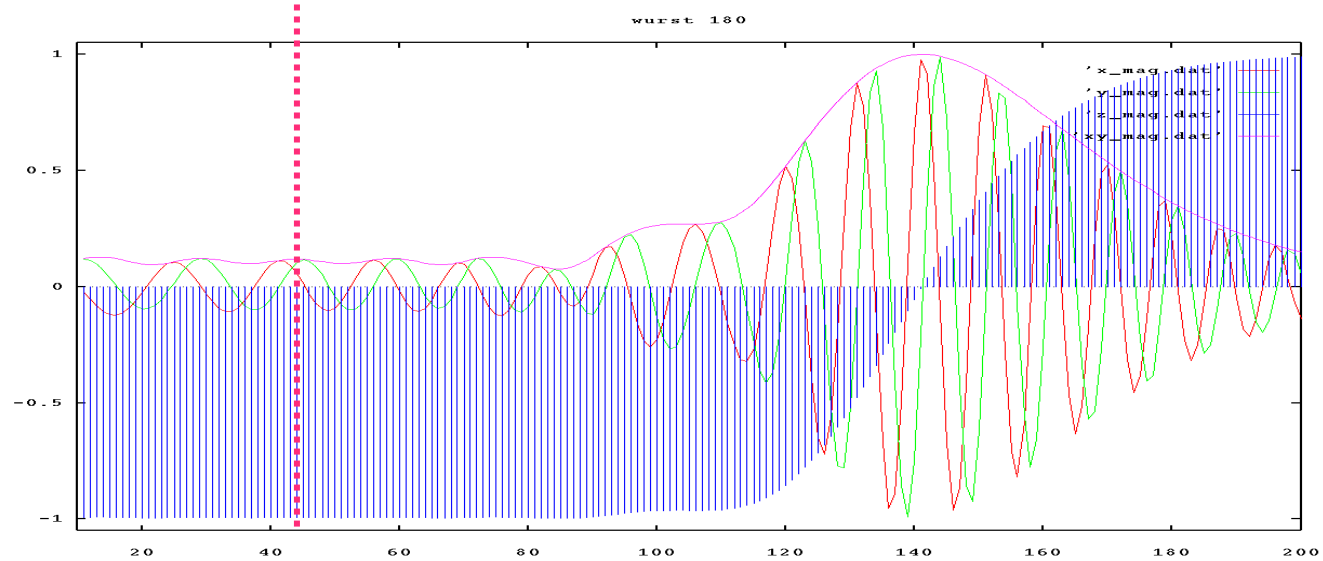
$$\delta_{xx} = -115.6 \text{ ppm}, \delta_{yy} = -48.6 \text{ ppm}, \delta_{zz} = 40.6 \text{ ppm}$$

反転 π パルスの励起分布

矩形波パルス
36 μs



Wurst-20
60kHz sweep
500 μs



1GHz NMR

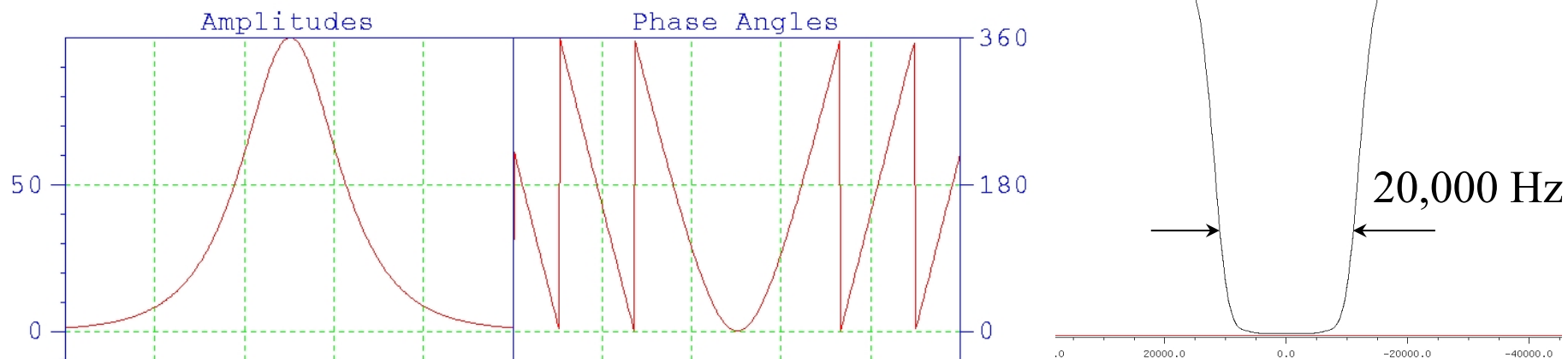
aliphatic

aromatic

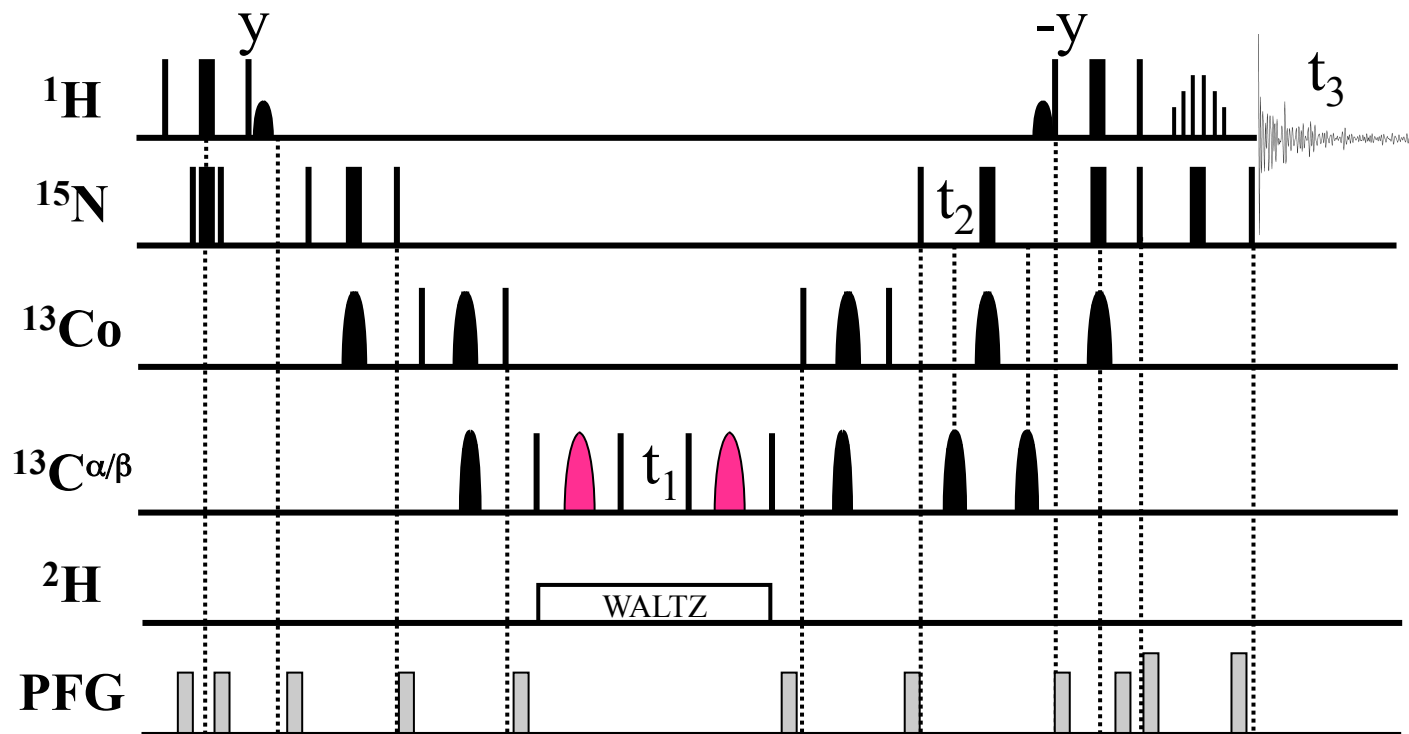
carbonyl

Adiabatic パルスを含んだ 3D TROSY-HN(CO)CACB

hsec24k500u



Hyperbolic-secant pulse (24 kHz-sweep, 500 μ s, 13 kHz B_1)



Adiabatic pulse の使用による off-resonance 効果の解消

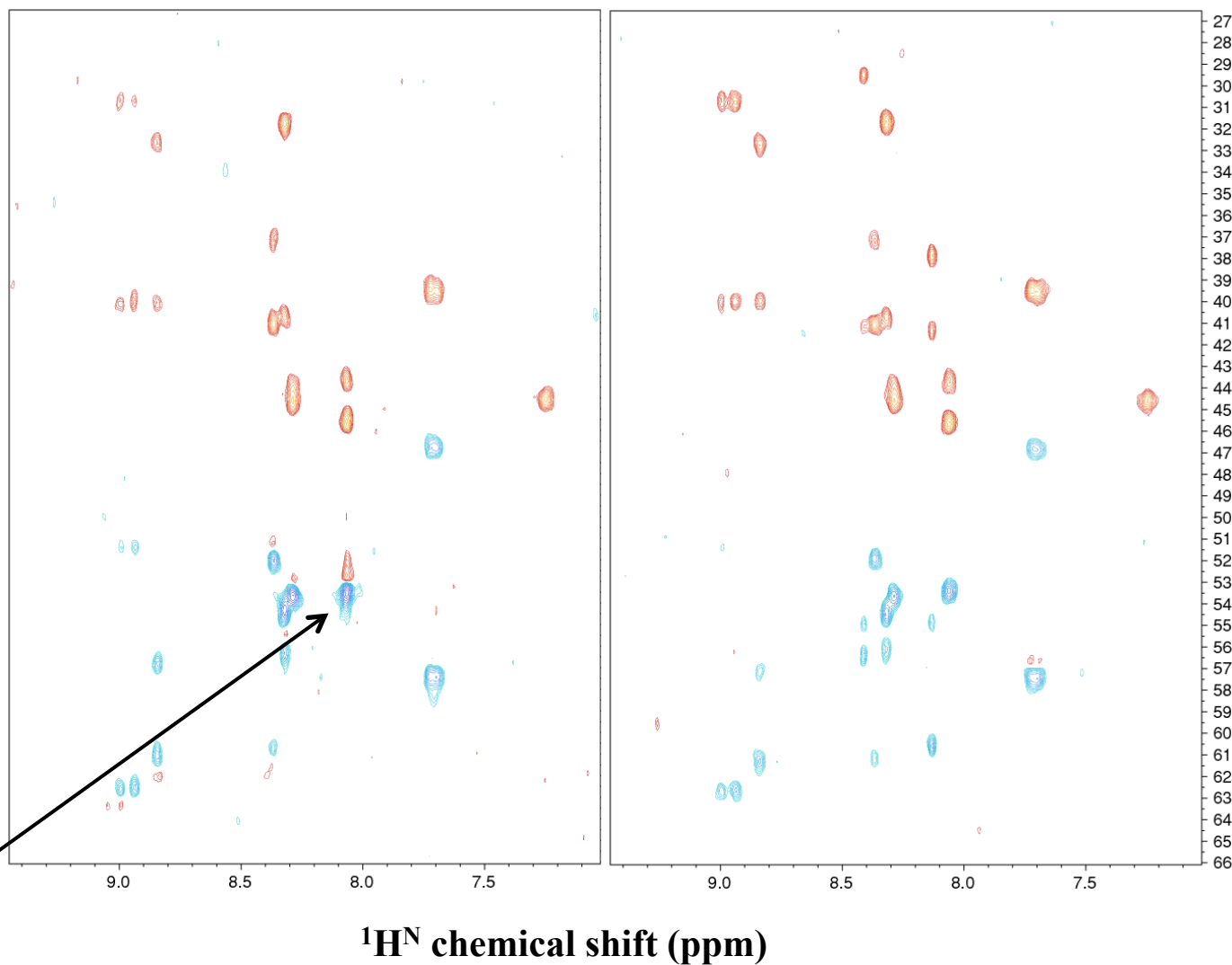
矩形波 (rectangular)

断熱波 (adiabatic)

3D TROSY-
HNCACB

$^{13}\text{C}\alpha^{13}\text{C}\beta$ chemical shift (ppm)

off-resonance
効果による
artifact



Smoothed chirp composite pulse

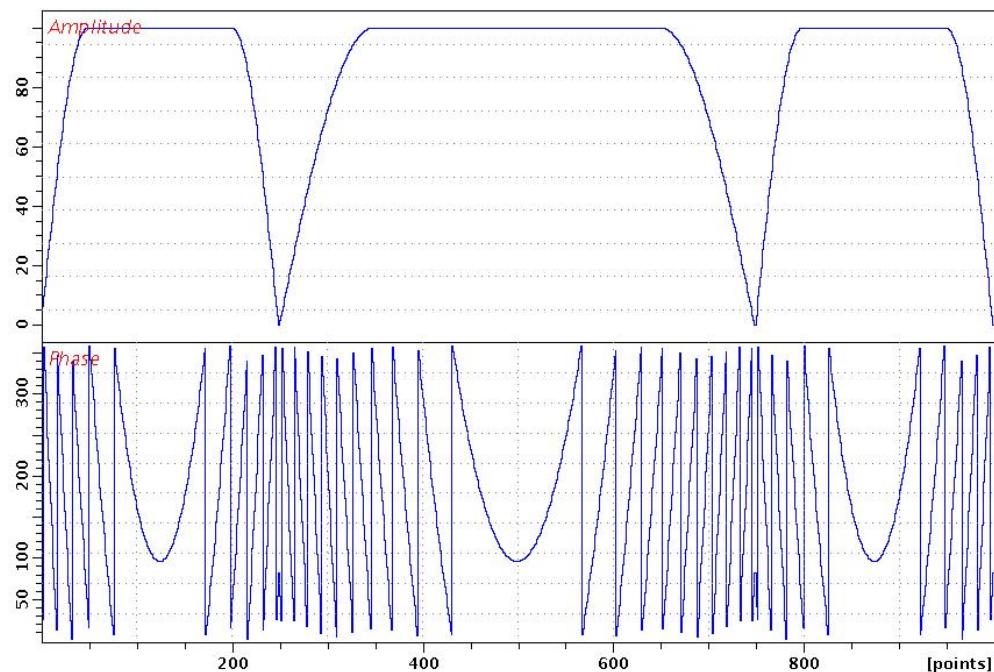
80 kHz sweep

2 ms length

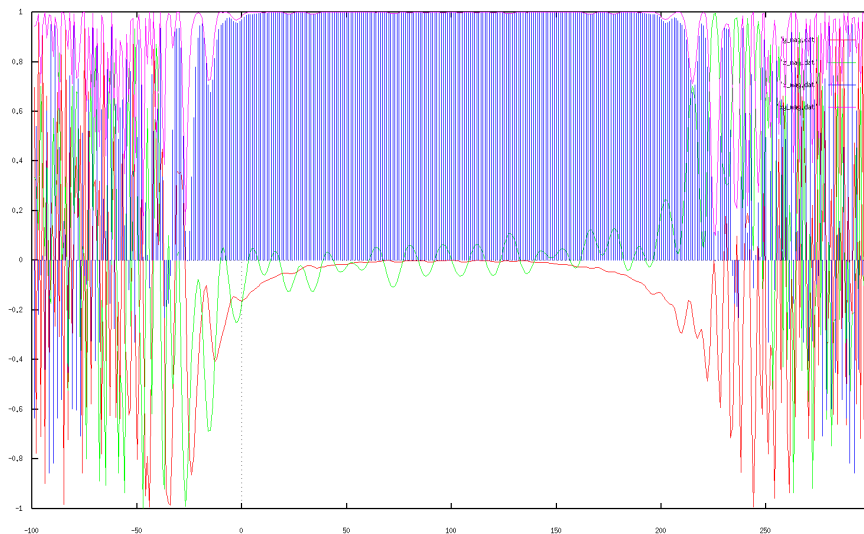
11,261 Hz B_1 max (22 μ s @90°)

reverse-pulse

(位相のずれも少ない)



x 磁化から開始



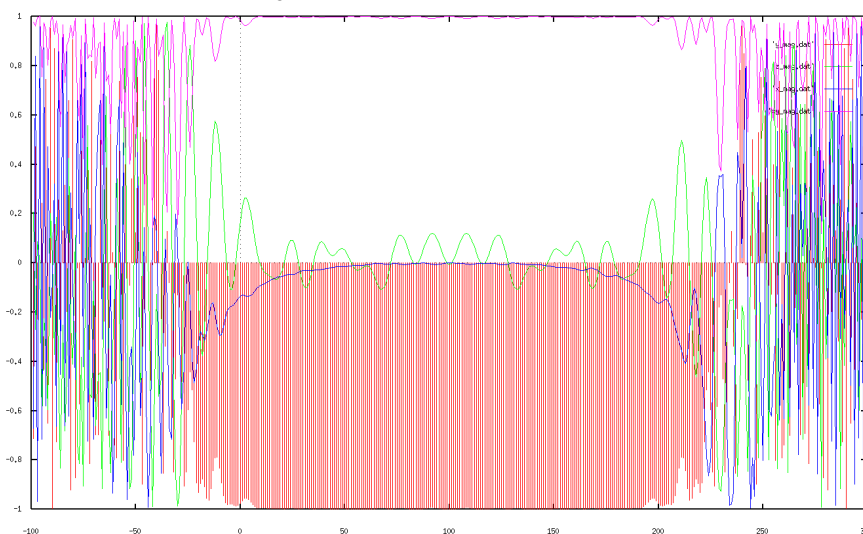
↑
200 ppm

↑
100

↑
0

¹³C @950MHz

y 磁化から開始

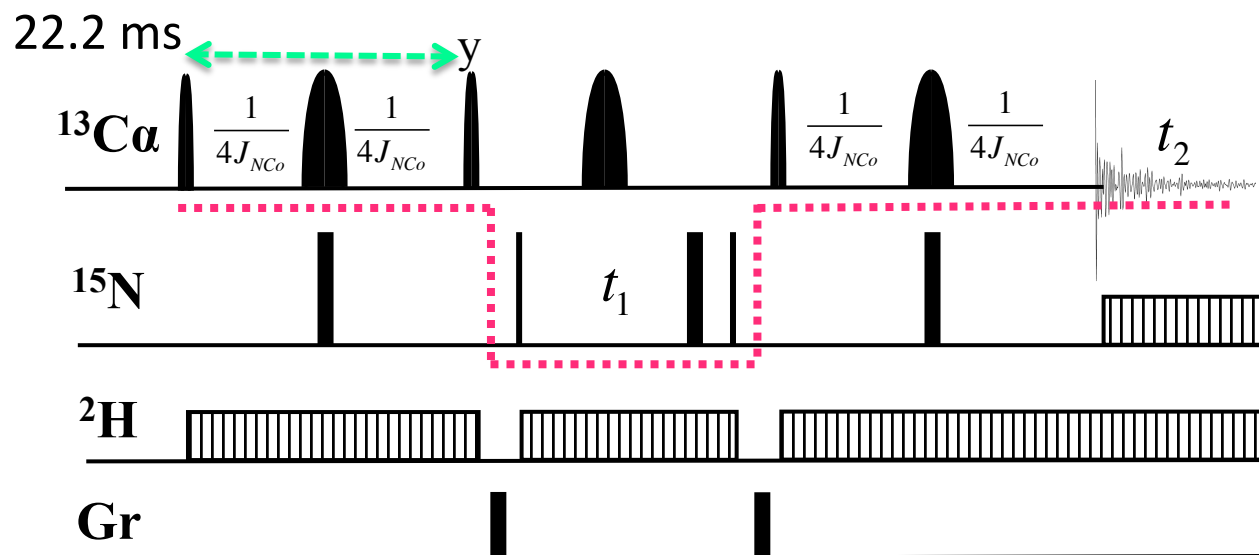


↑
200

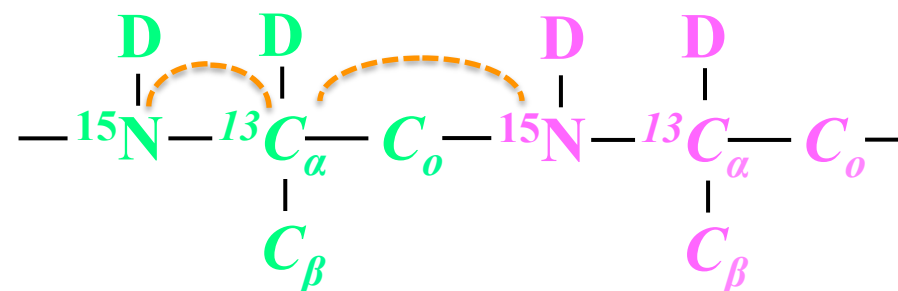
↑
100

↑
0 ppm

2D SQ CAN



大腸菌培養のための M9-最少培地
 [2-¹³C]-glycerol (or [1,3-¹³C]-glycerol)
 NaH¹³CO₃
 D₂O



アミド ¹H の存在しない Pro でも問題無し

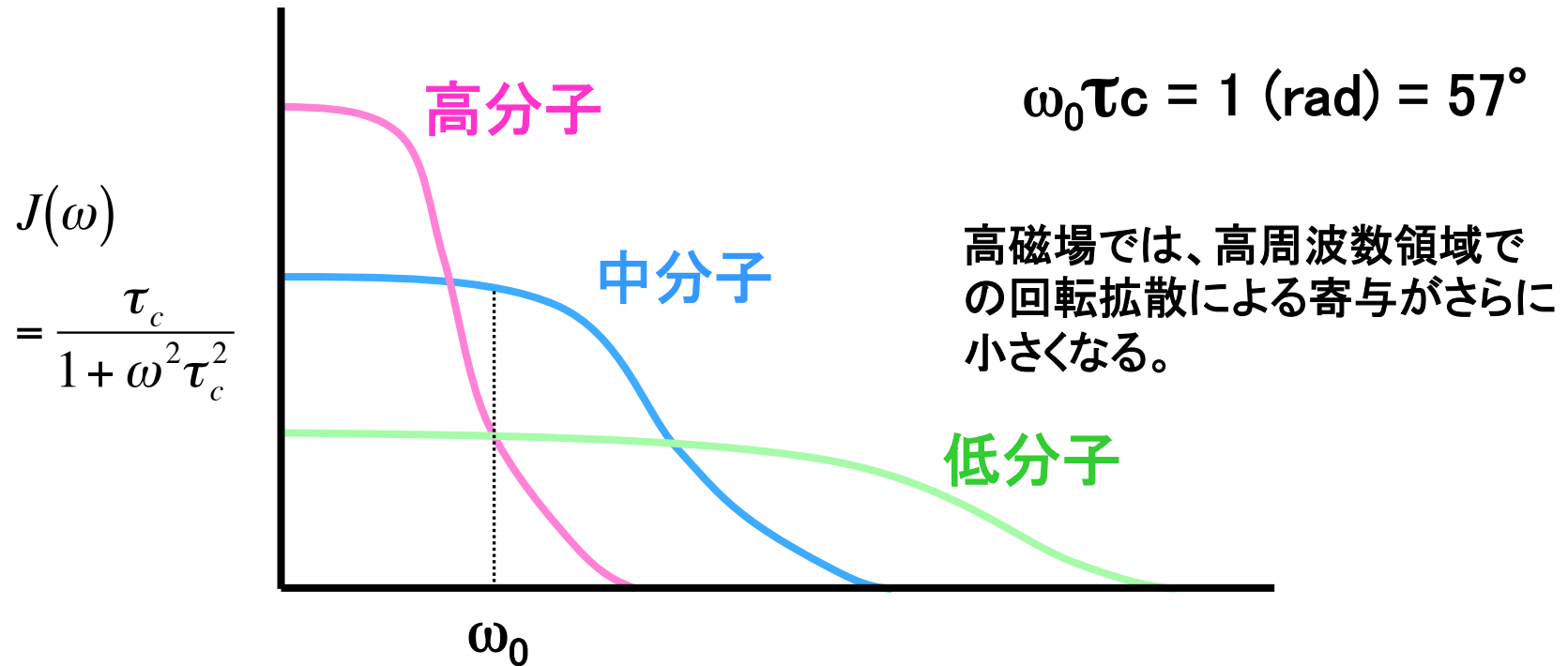
¹³Cα-FID での IPAP 不要

¹J_{CaCβ} カップリングによる損失無し

¹³Cα の縦緩和速度を金属で促進

2D COCA と組み合わせて、主鎖の連鎖帰属が可能。

分子運動の回転の速さの分布



高分子ではゆっくり回転している分子数が多い

||

T_2 が速い

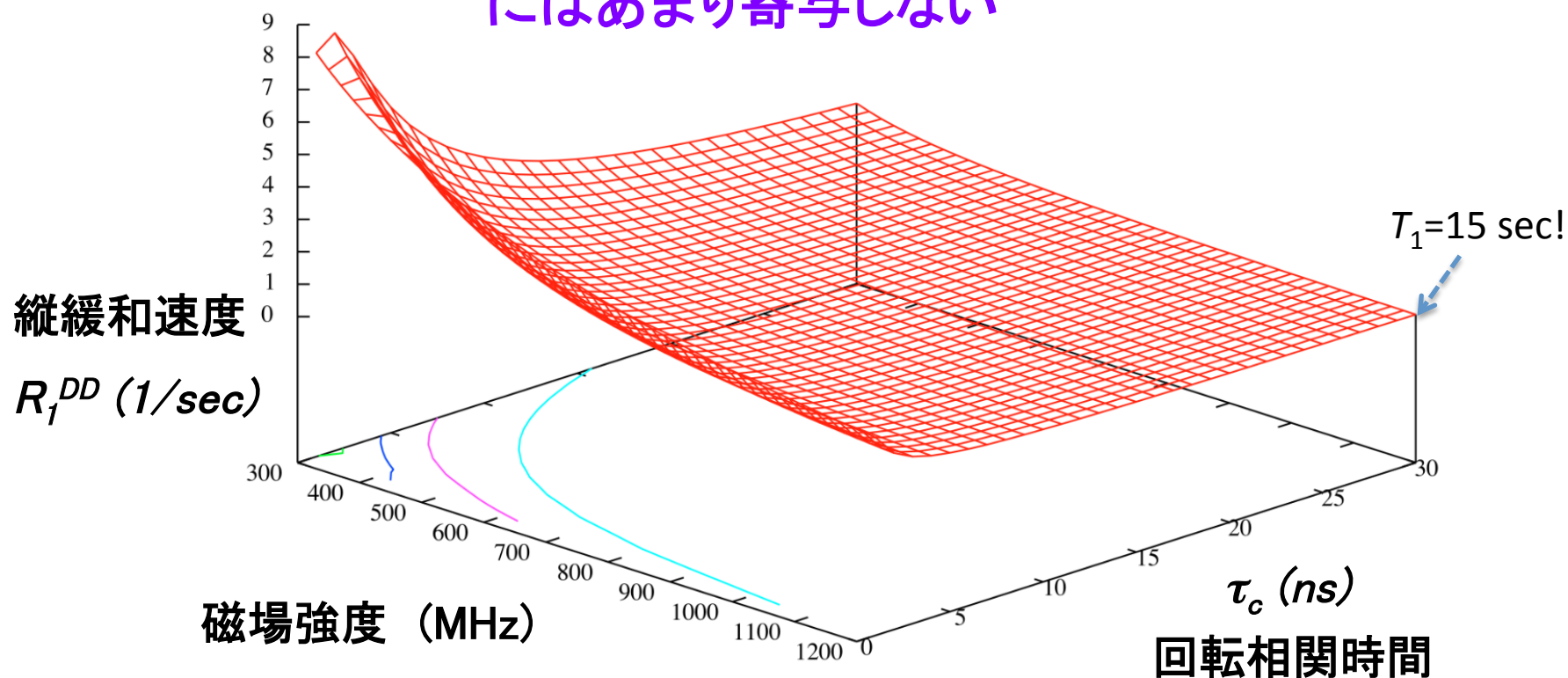
低分子と高分子では ω_0 で回転している分子数が少ない

||

T_1 が遅い

注: 同種核の dd 緩和

高磁場、高分子量では、 $dd(^{13}\text{C}\alpha-^1\text{H}\alpha)$ は $^{13}\text{C}\alpha$ の縦緩和にはあまり寄与しない



$$R_1^{DD} = \frac{\hbar^2 \gamma_I^2 \gamma_S^2}{4r^6} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \{ J(\omega_I - \omega_S) + 3J(\omega_I) + 6J(\omega_I + \omega_S) \}$$

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2}$$

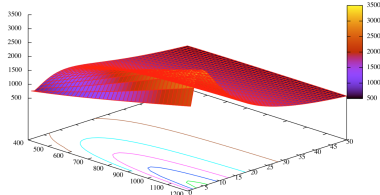
I ($^{13}\text{C}\alpha$) 側を観測

^{13}C -開始よりも、縦緩和の速い ^1H -開始測定の方が有利では？しかし、重水素化試料では駄目。

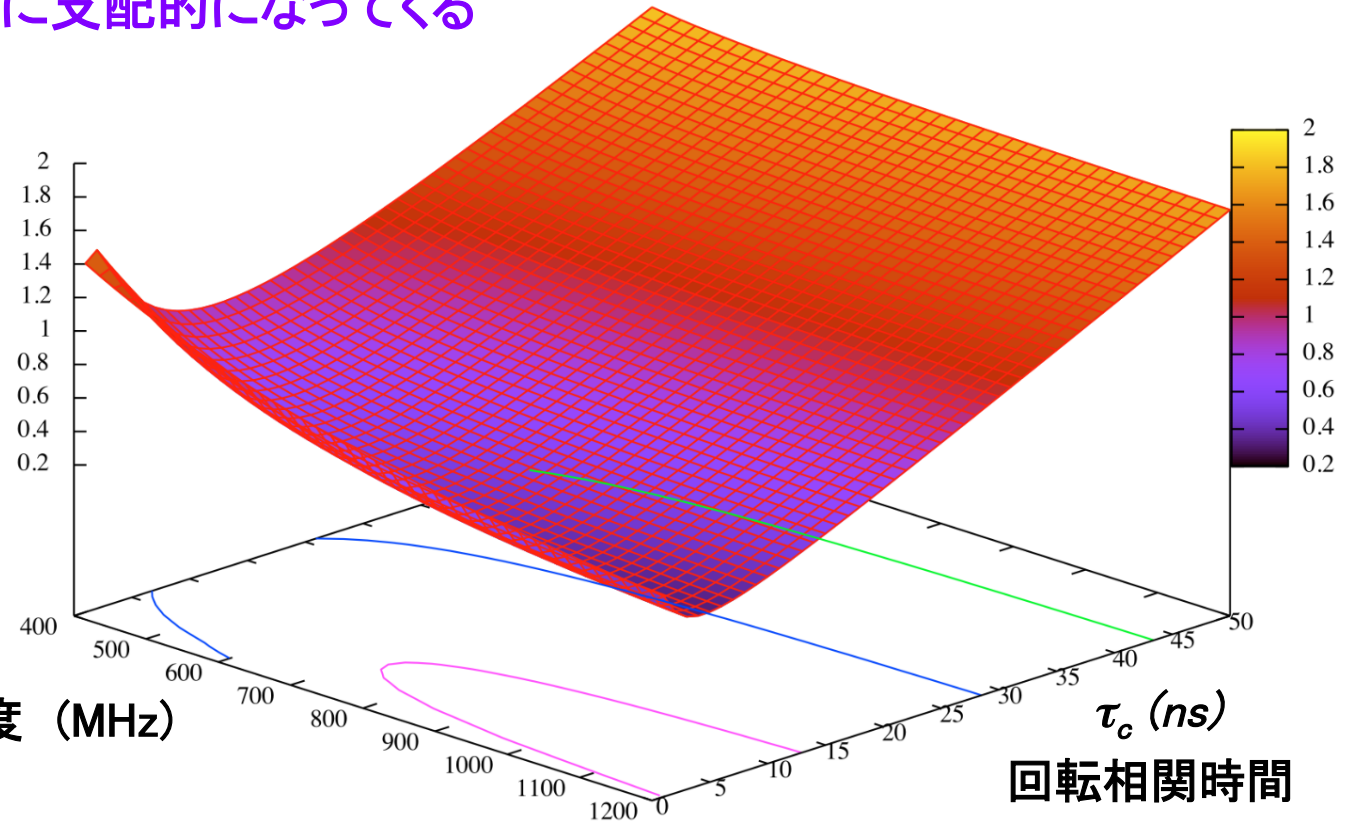
$^{13}\text{C}\alpha-^1\text{H}\alpha$ 2スピン系
双極子相互作用のみ考慮

$^{13}\text{C}\alpha$ の縦緩和では、同種核の $dd (^{13}\text{C}\alpha-^{13}\text{C}\alpha)$, $dd (^{13}\text{C}\alpha-^{13}\text{C}\beta)$ が分子量とともに支配的になってくる

縦緩和速度
 R_1 (1/sec)



磁場強度 (MHz)



回転相関時間 τ_c (ns)

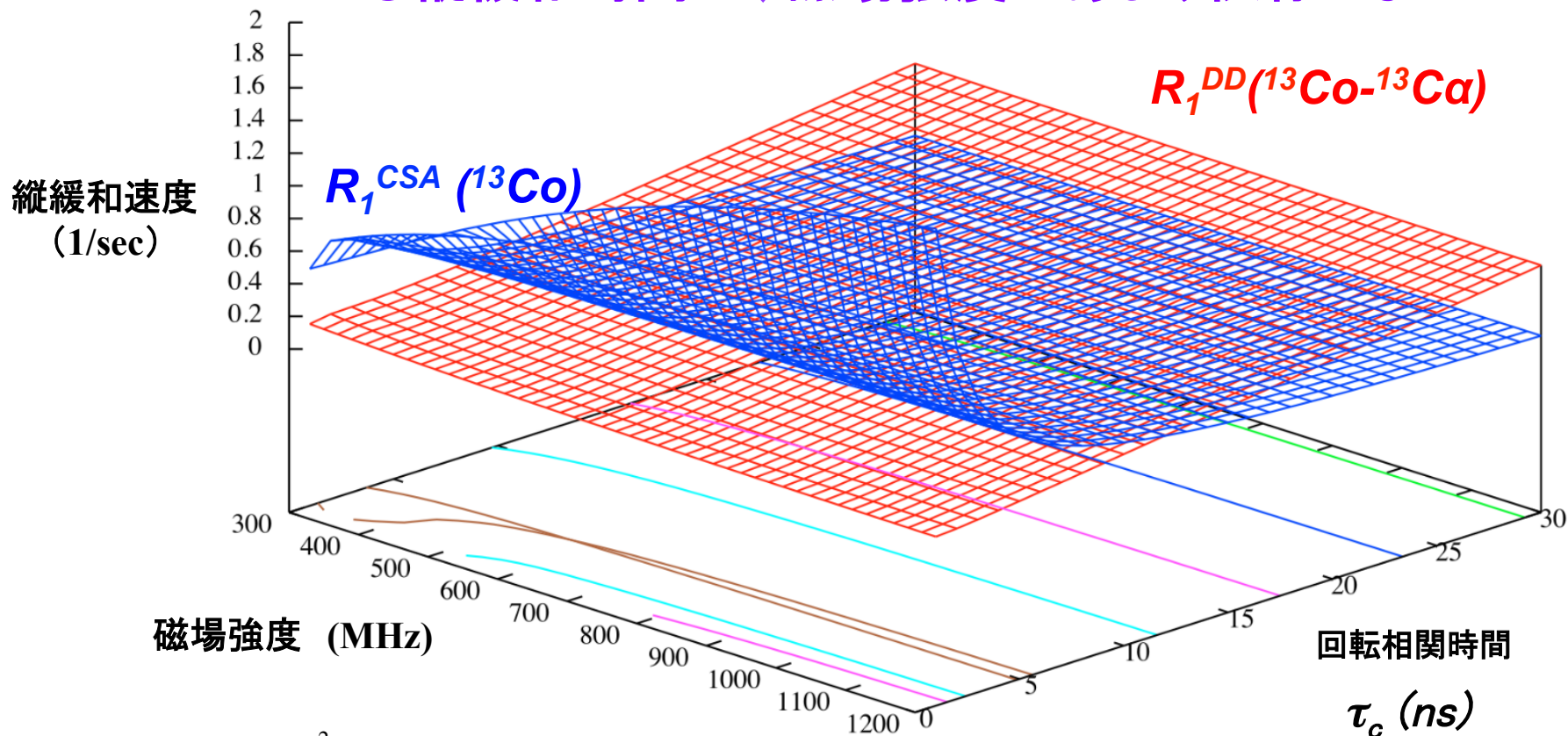
$$\rho_1^{DD} = \frac{\hbar^2 \gamma_I^4}{4r^6} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \{J(0) + 3J(\omega_I) + 6J(2\omega_I)\}$$

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2}$$

重水素化された $^{13}\text{C}\alpha$ を観測
交差緩和を無視

$^{13}\text{C}\alpha$, $^{13}\text{C}\beta$ を z に flip-back すると、SOFAST の ^{13}C 版が可能
重水素化による影響は小さい ($dd (^{13}\text{C}\alpha-^1\text{H}\alpha)$ は R_1 緩和の $\frac{1}{4}$ 程度の寄与)

CSA による縦緩和時間は、磁場強度にあまり依存しない



$$R_1^{CSA} = \frac{(\sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp})^2 \gamma_I^2 B_0^2}{3} J(\omega_I)$$

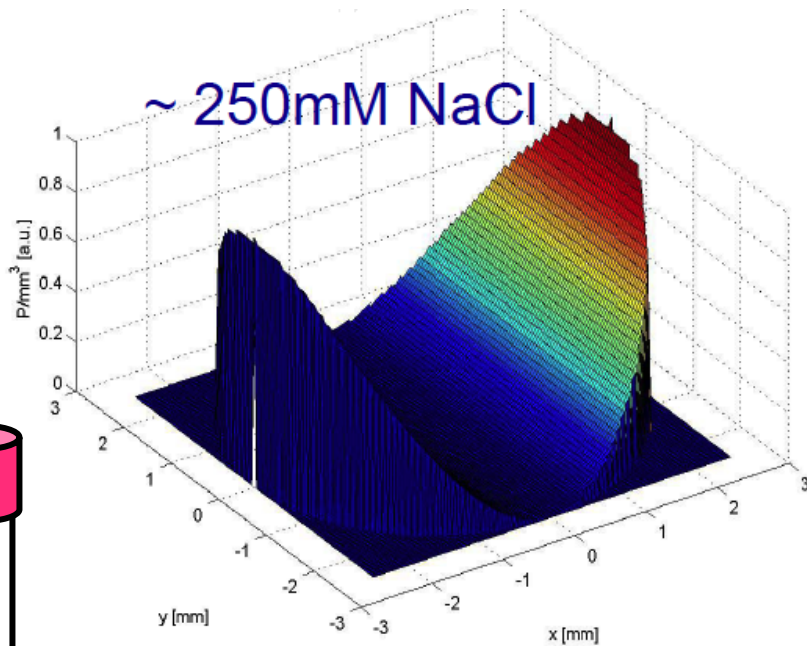
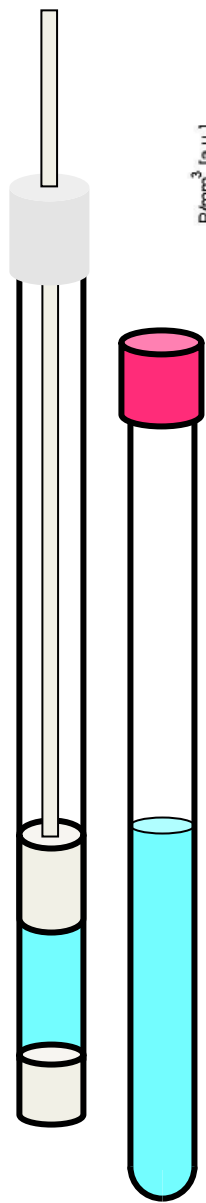
$$J(\omega) = \frac{2}{5} \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2}$$

$dd (^{13}\text{C}\alpha-^{13}\text{Co})$ が分子量とともに効いてくる。

^{13}Co 化学シフトの異方性 あるいは $^{13}\text{Co}-^{13}\text{C}\alpha$ の双極子相互作用を考慮

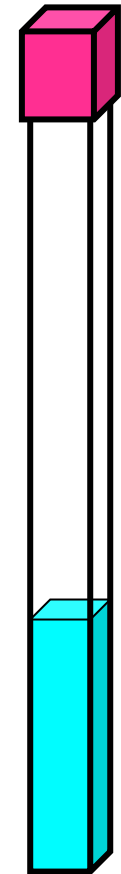
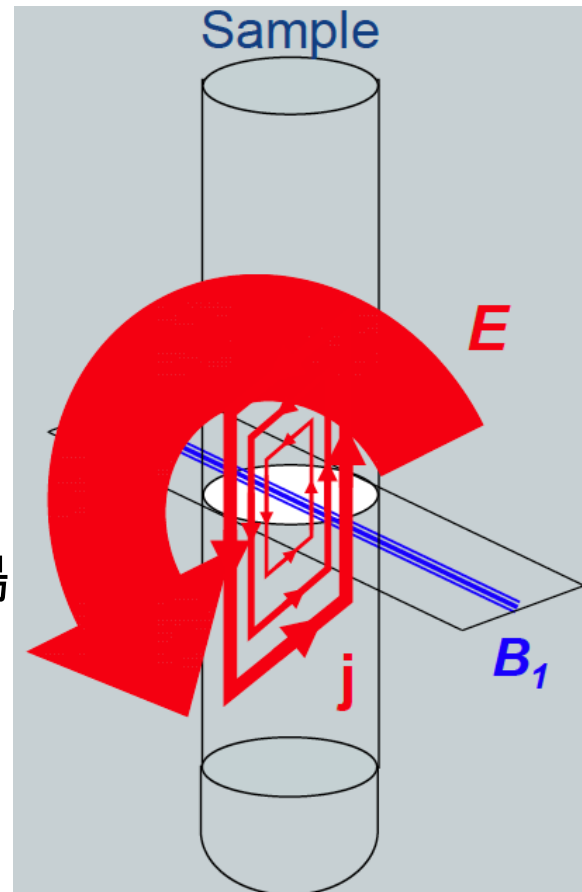
$$\delta_{xx} = -115.6 \text{ ppm}, \delta_{yy} = -48.6 \text{ ppm}, \delta_{zz} = 40.6 \text{ ppm}$$

$^{13}\text{C}\alpha$ を z に flip-back すると仮定



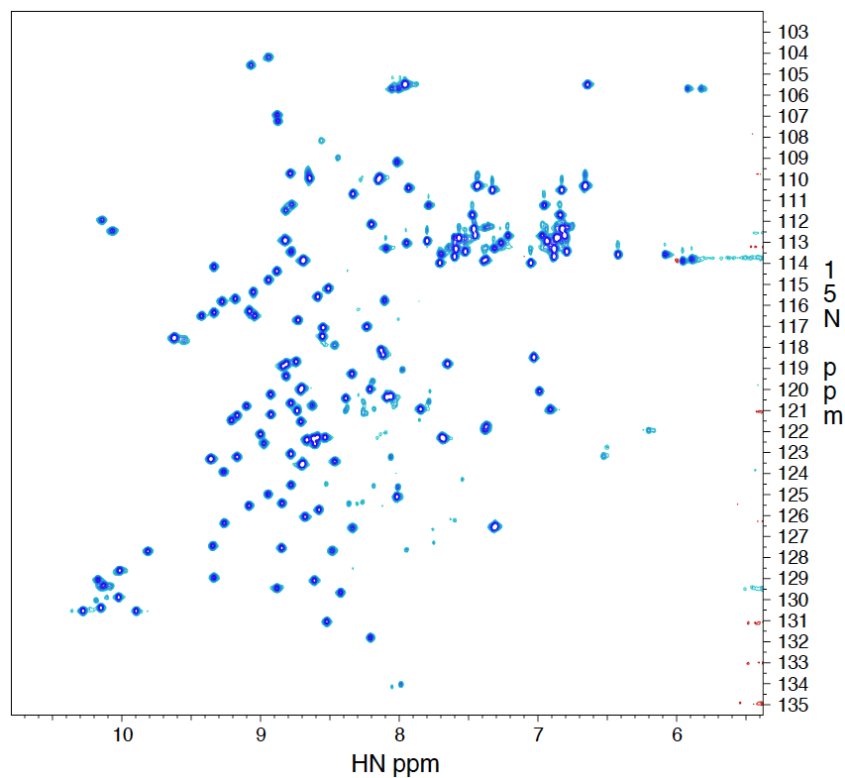
極低温プローブは
塩辛いのが嫌い

パルスにより生じる電場

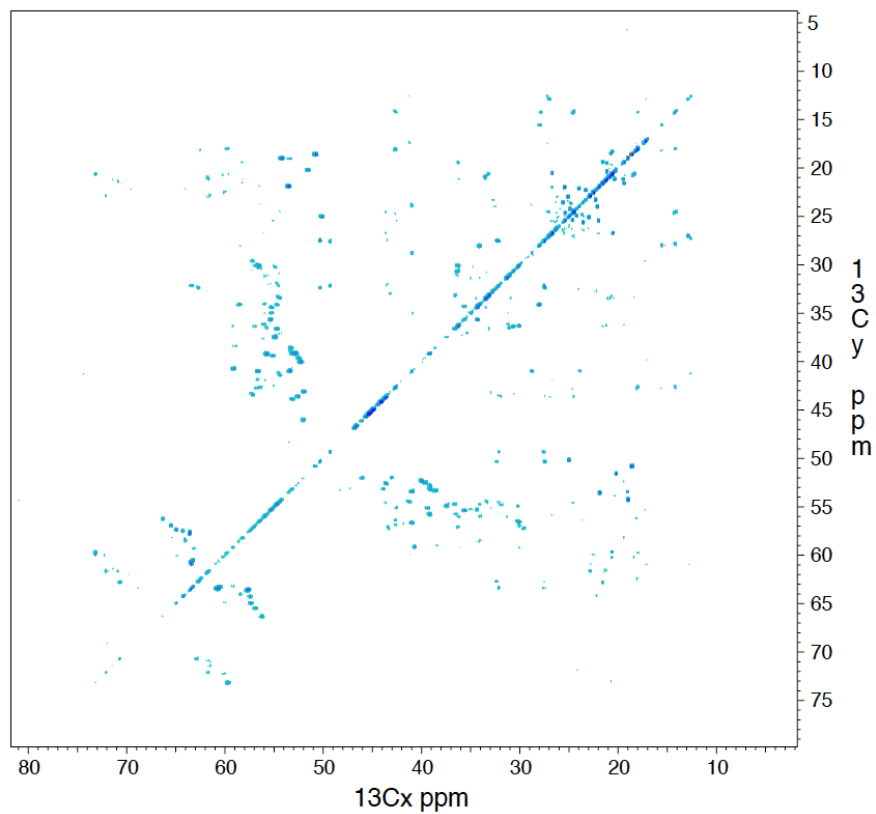


Data courtesy of Dr. Rainer Kümmerle, Bruker Biospin AG

0.12 mM [^{15}N , ^{13}C]-protein (132 a.a.) in H_2O (90%)
Avance-III 950MHz at 298K
[salt] = 200 mM (pH 7.5) in a normal Shigemi tube



2D ^1H - ^{15}N HSQC

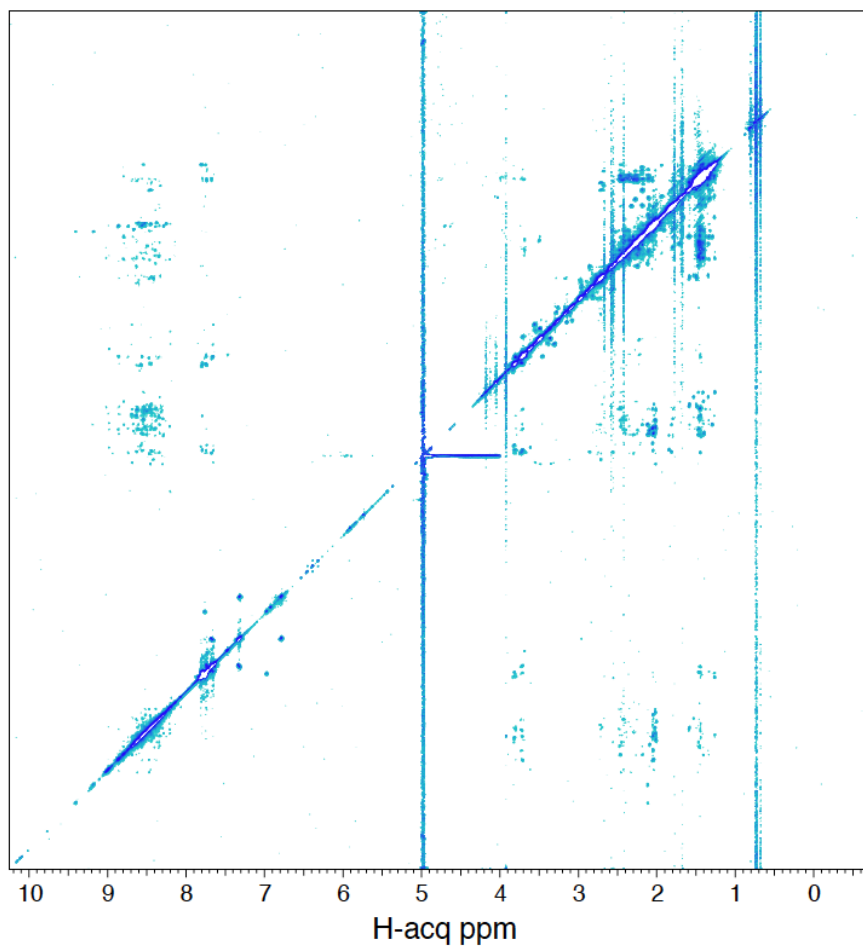


2D ^{13}C - ^{13}C TOCSY (18ms-flopsy16)

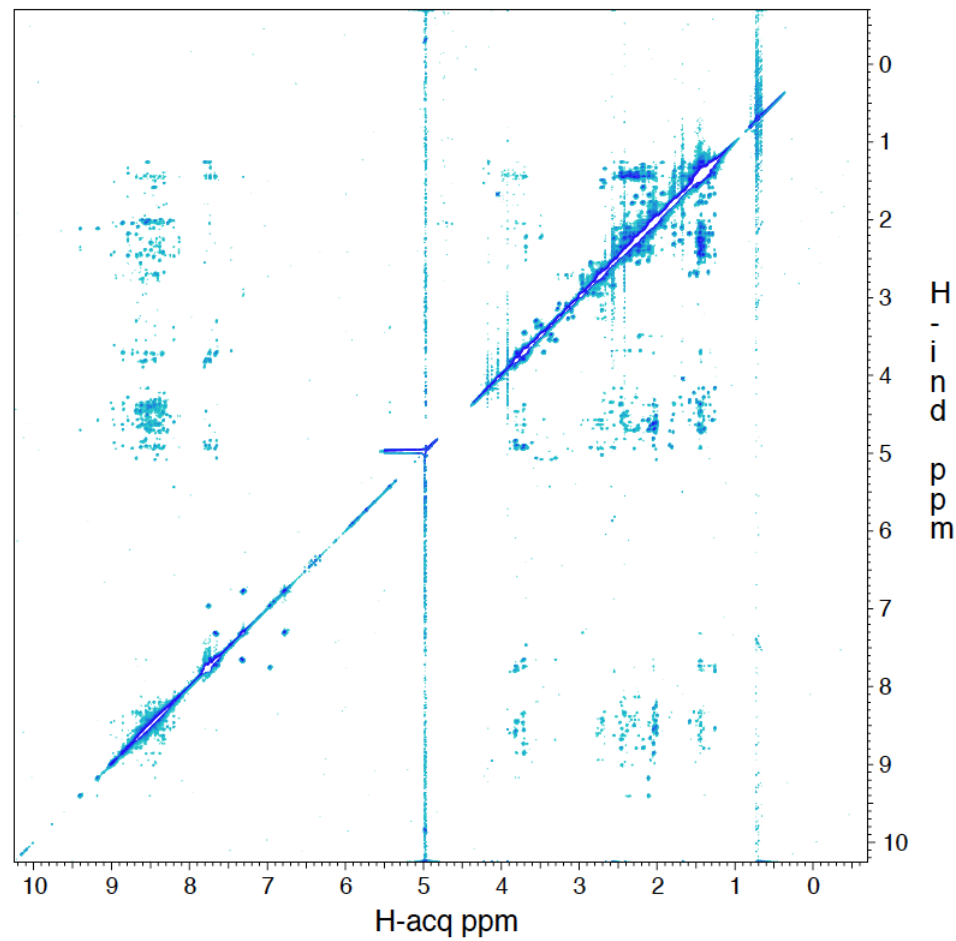
^1H -NMR よりも ^{13}C -NMR が有利な場合

- ◆ $\gamma_{^1\text{H}}$ は大きいので、それに伴って双極子相互作用による緩和も大きい。 $\gamma_{^{13}\text{C}}$ は小さいので、線幅が狭く、高分子や常磁性金属を配位した蛋白質に適している。
- ◆ 重水素化した大きな蛋白質では検出すべき ^1H の数が少ない。四級炭素からも情報を得れる。
- ◆ 構造をとっていないような蛋白質においては、 ^1H の化学シフト値の散らばりが小さいのに対して、 ^{13}C ではそれほどでもない。
- ◆ 水溶液の場合、水の信号を消す努力が不要。したがって、水消しに伴うアーティファクが無い。
- ◆ ^1HN は labile なので、 ^1H - ^{15}N -HSQC などでは、水との交換が問題となる。例えば、水と速く交換する ^1HN は感度が悪い。
- ◆ 化学交換や構造交換においても、 ^1H は幅広化が顕著な場合が多い。
- ◆ 双極子相互作用による横緩和は、磁場強度にあまり依存しないので、高磁場の直接測定 (FID) による高い感度と分解能を享受できる。
- ◆ 高塩濃度による感度の低下の率が小さい。

2D NOESY watergate (a mixing time of 100ms)



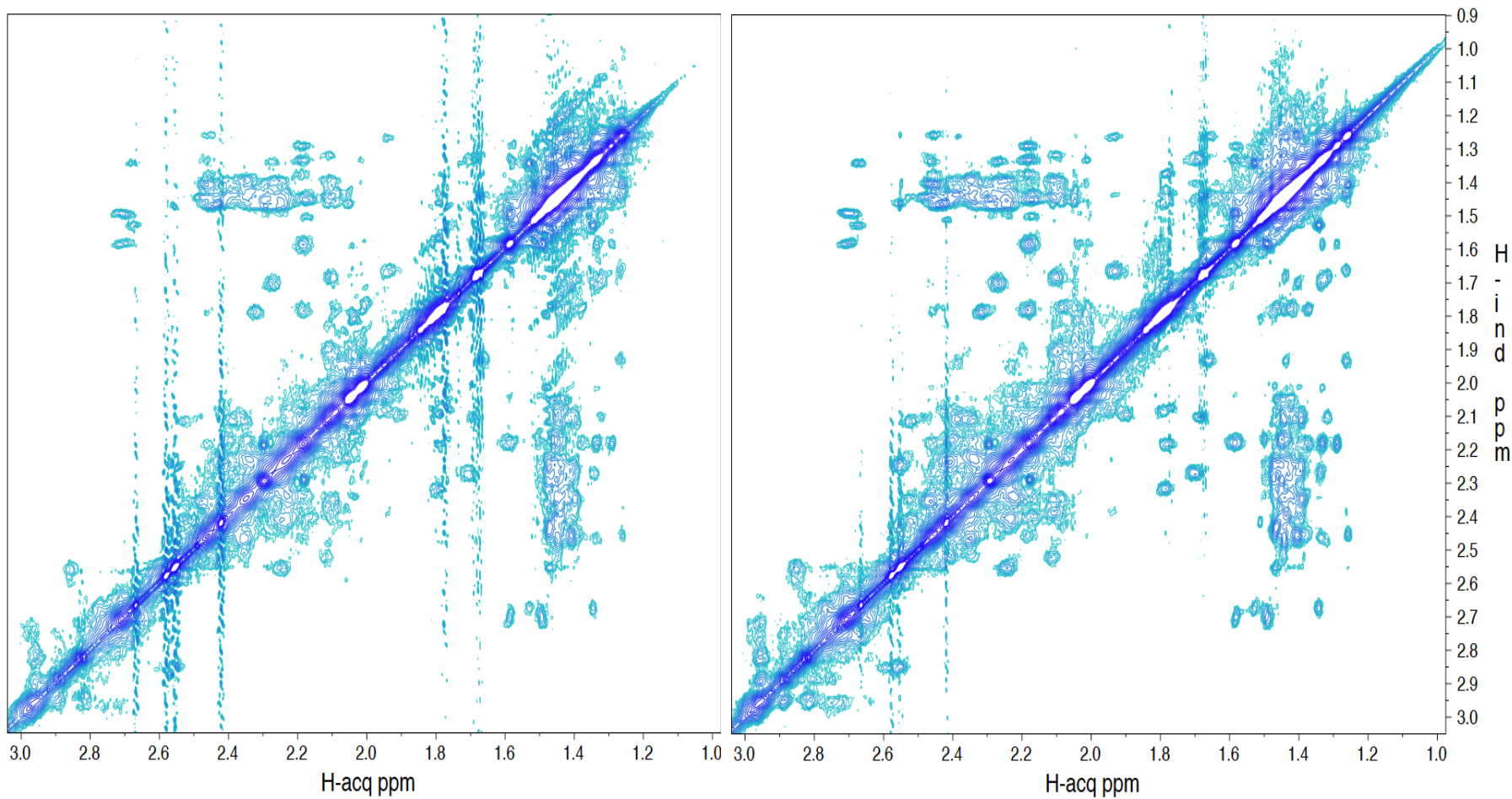
on Avance-I 800
116.7ms (t_1) \times 239.6ms (t_2)
 $N_s = 16$



on Avance-III 950
98.3ms (t_1) \times 240.3ms (t_2)
 $N_s = 16$

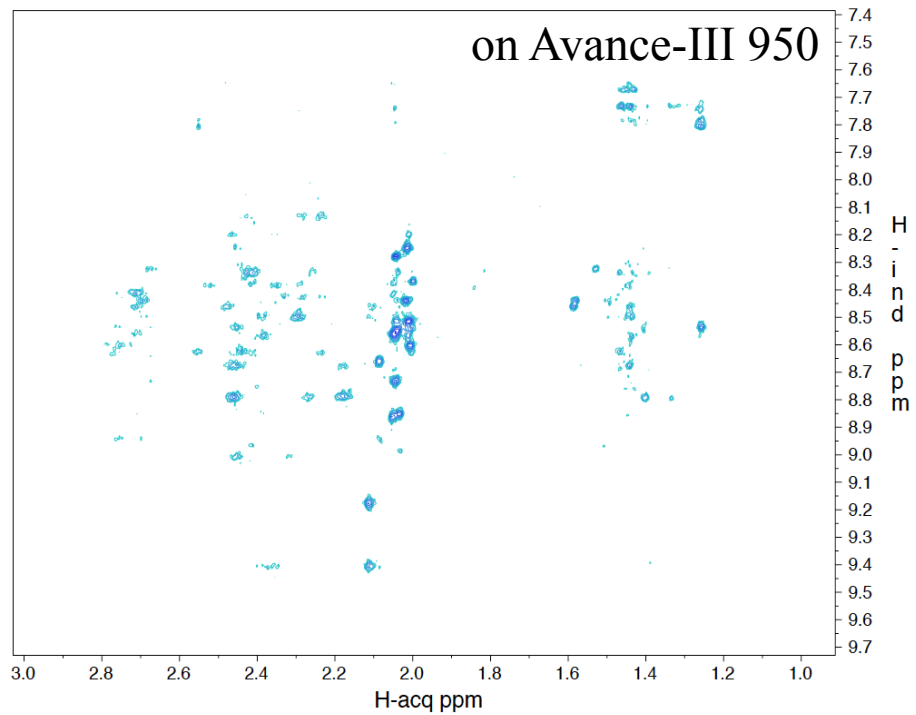
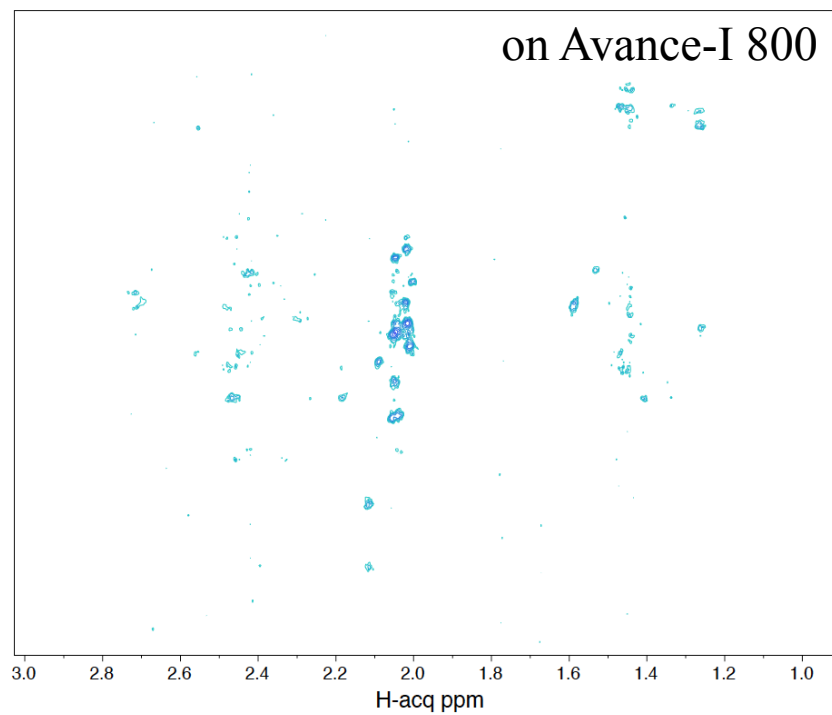
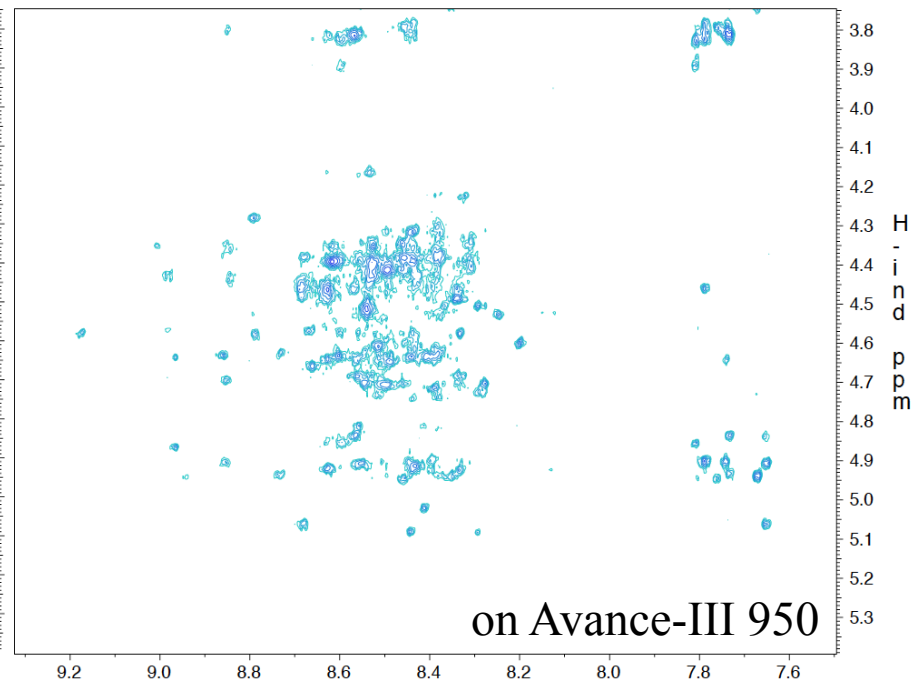
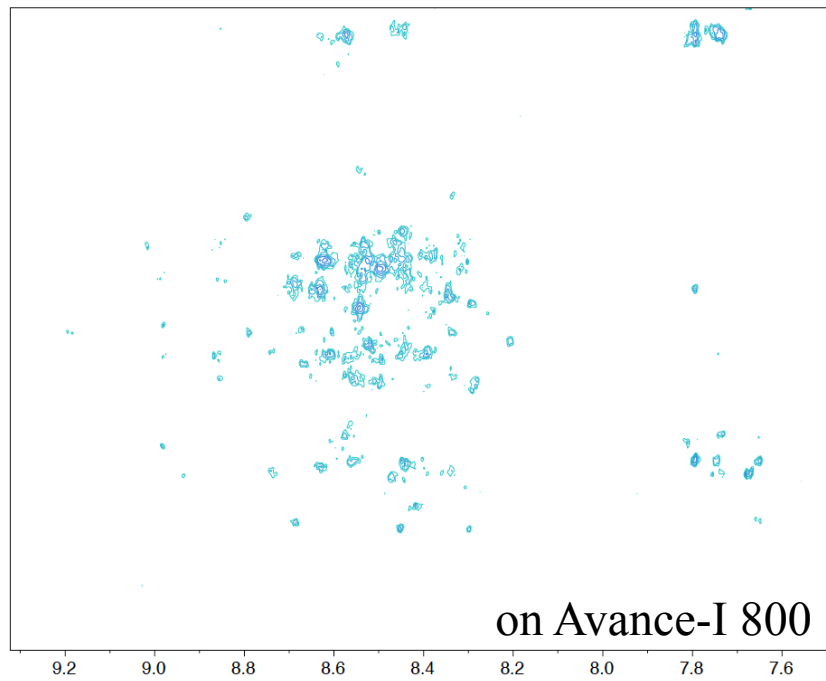
A 0.1mM synthesized membrane protein (75 a.a.) in 60% HFIP- d_2 and 40% H₂O at 298K

Comparison of particular regions in the 2D NOESY spectra

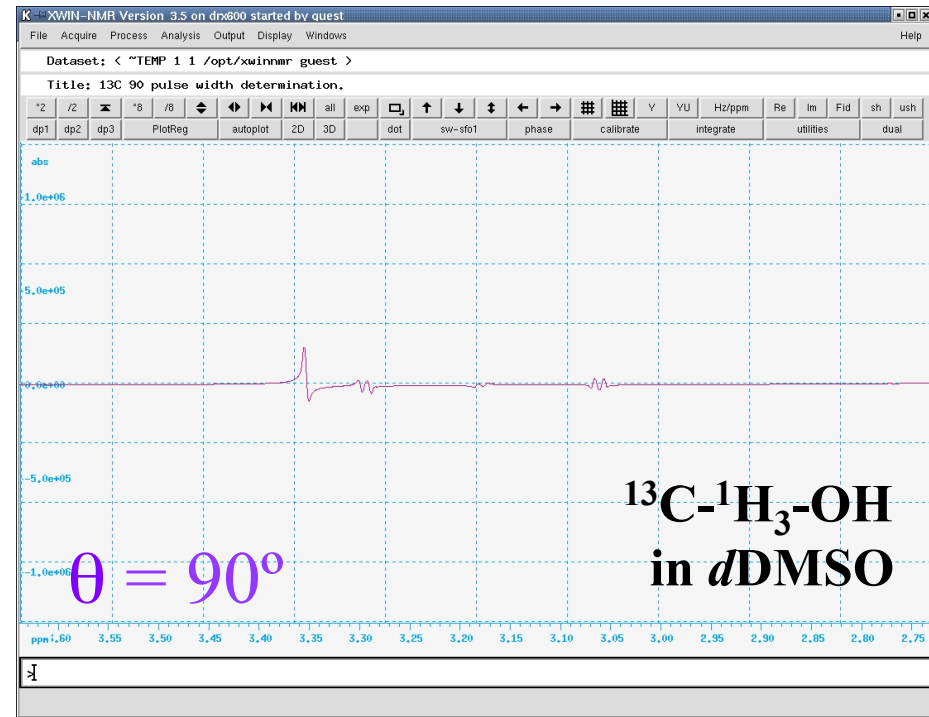
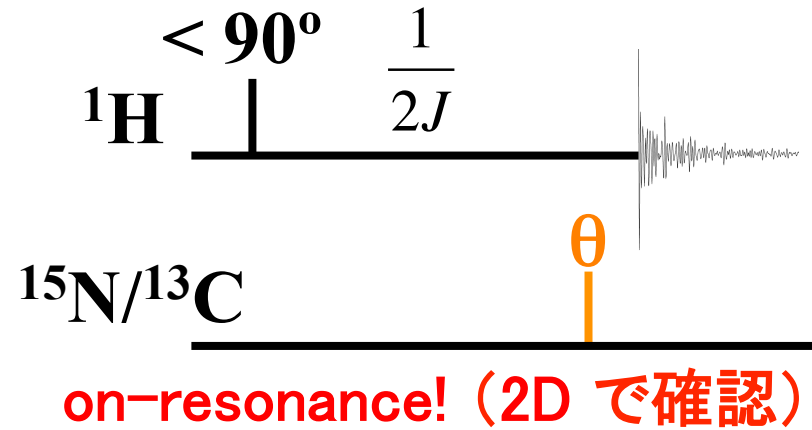
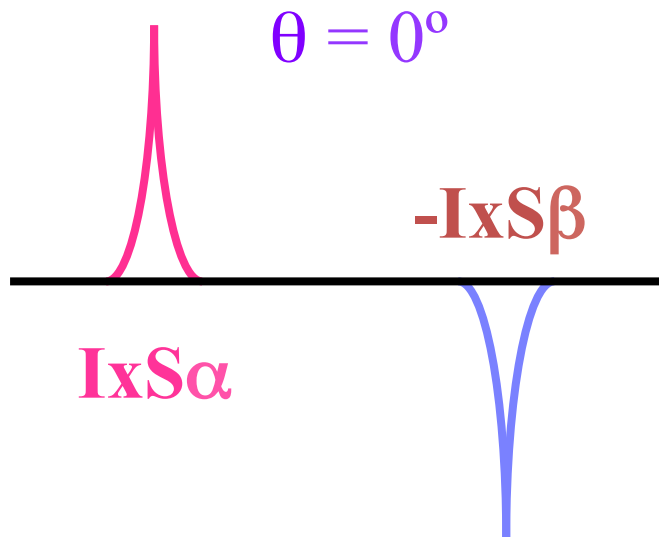
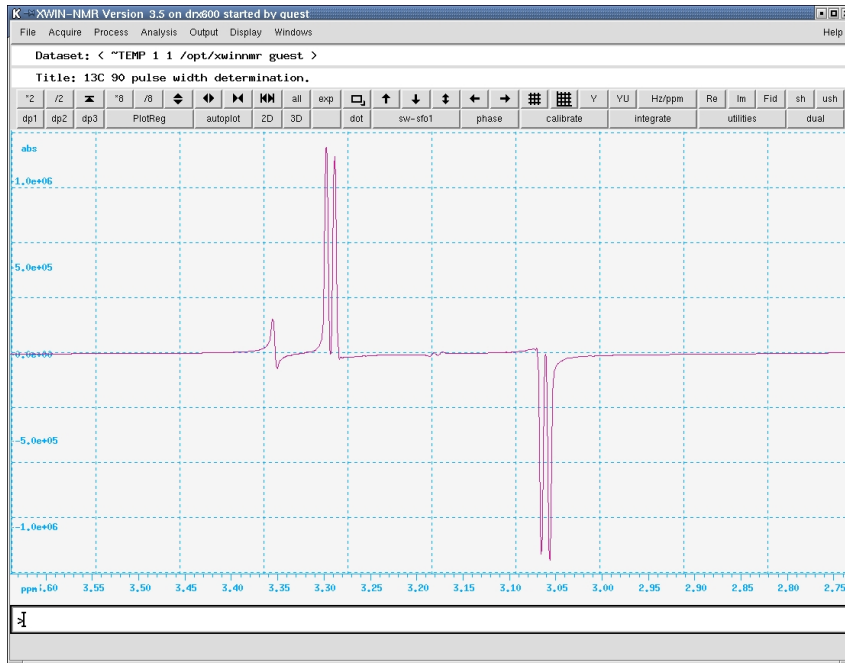


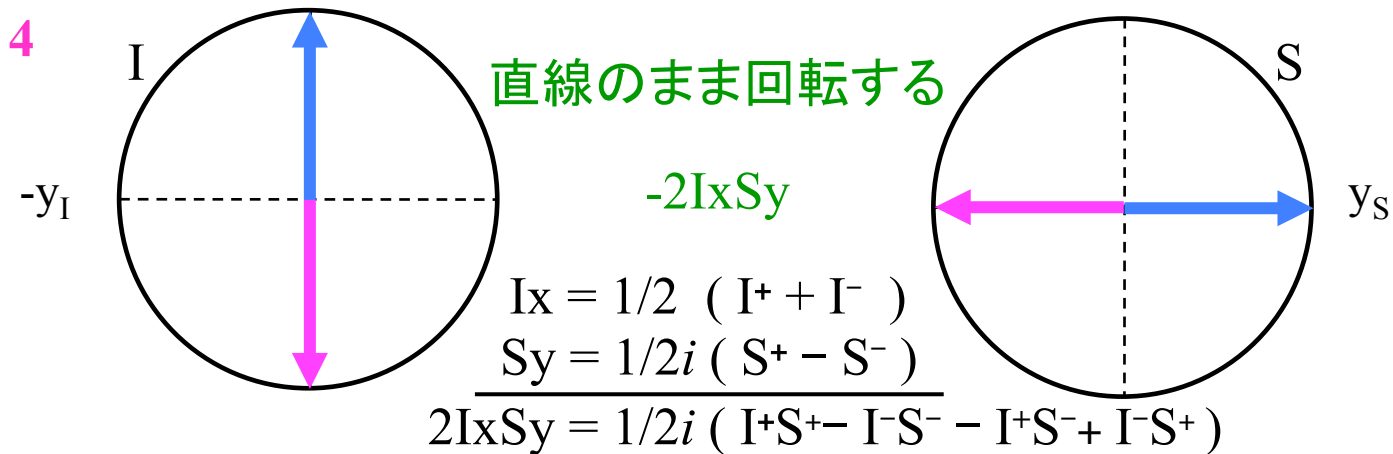
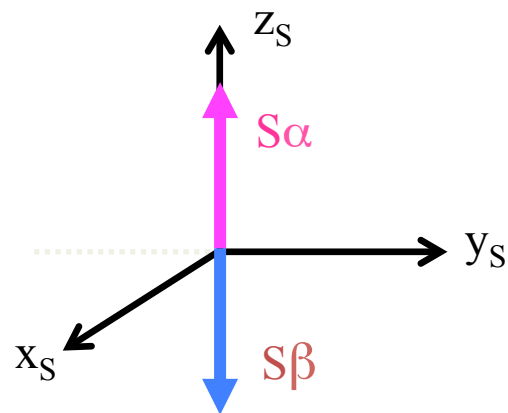
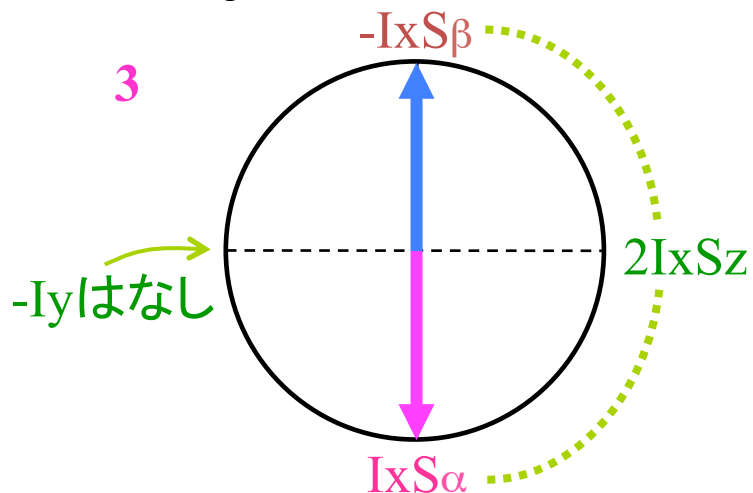
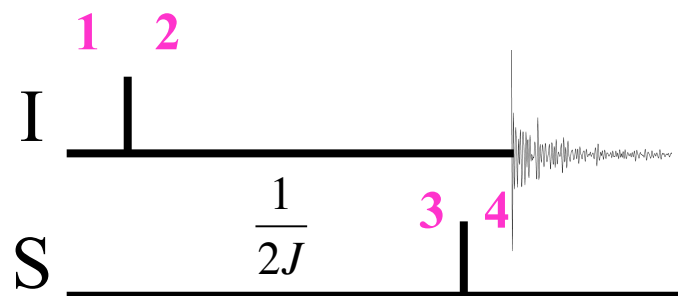
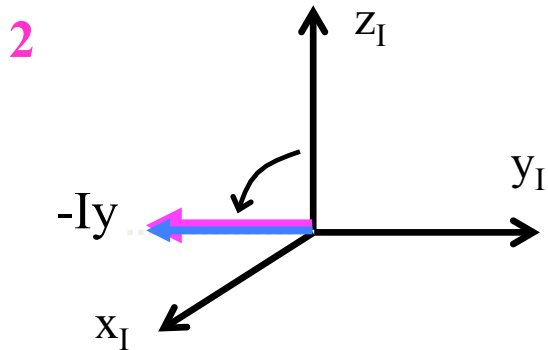
on Avance-I 800
116.7ms (t_1) \times 239.6ms (t_2)
Ns = 16

on Avance-III 950
98.3ms (t_1) \times 240.3ms (t_2)
Ns = 16

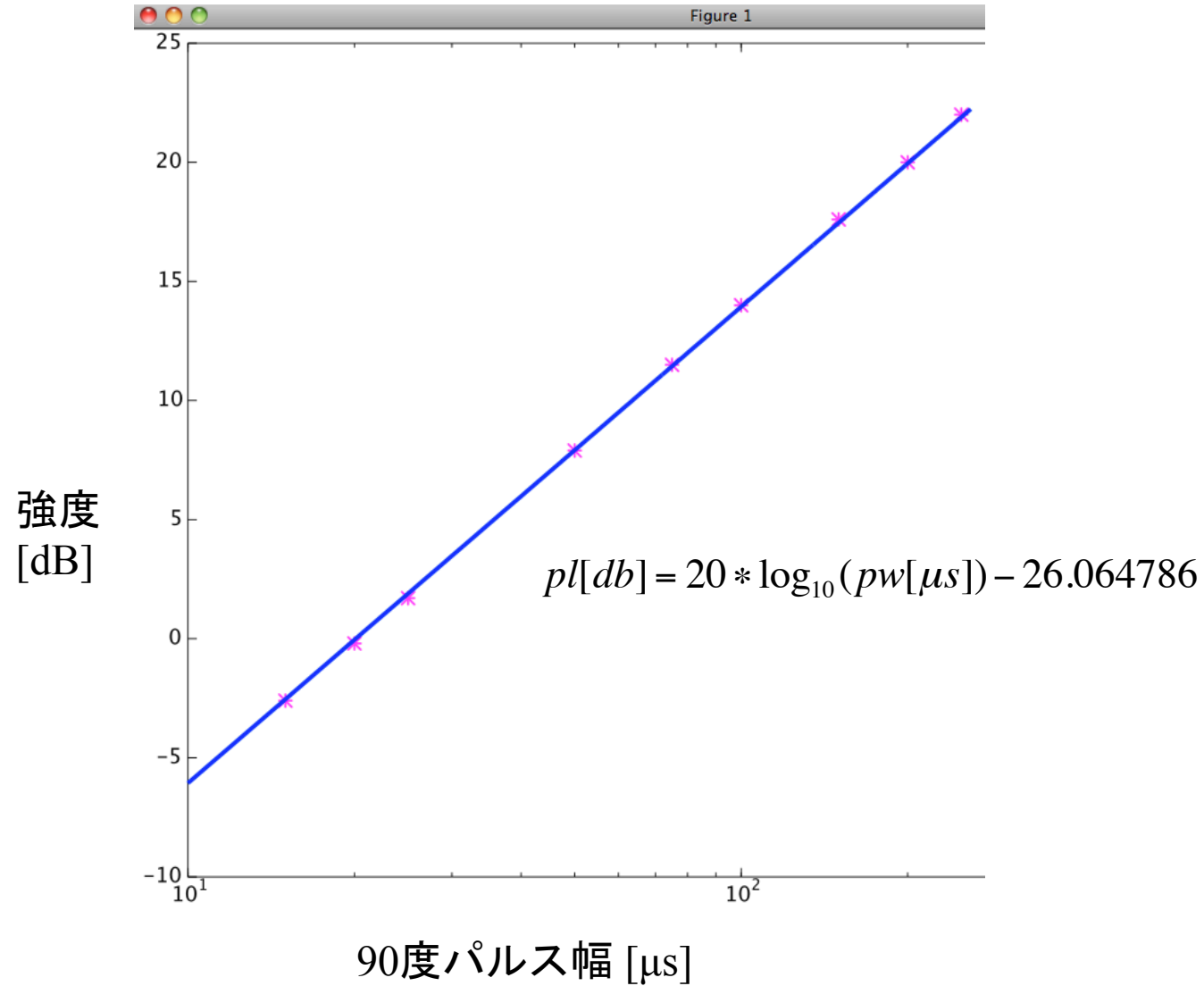


異種核の 90°パルス長の決定

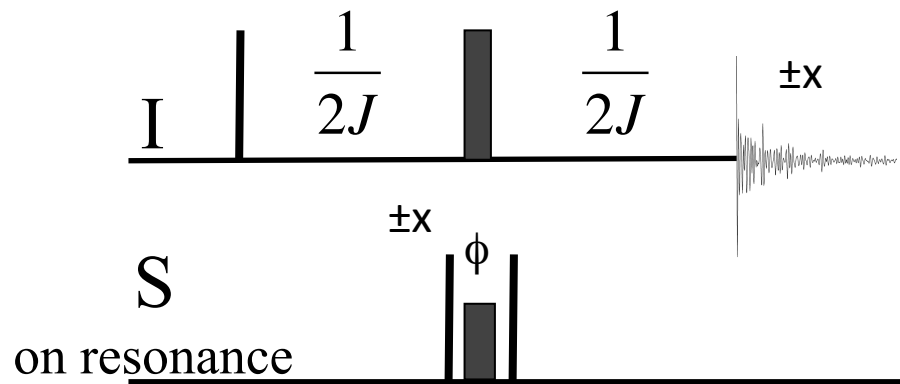




Avance-III 950MHz ¹³C (f2) 90°パルス幅

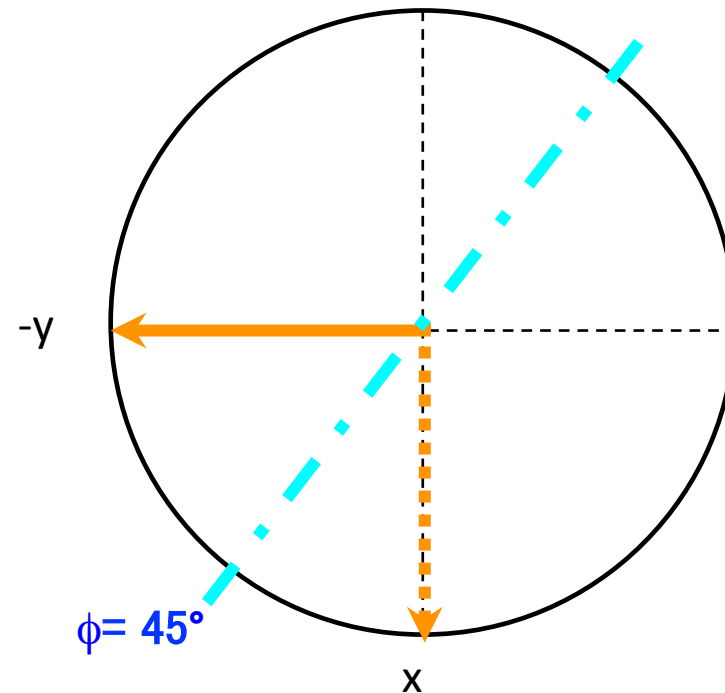
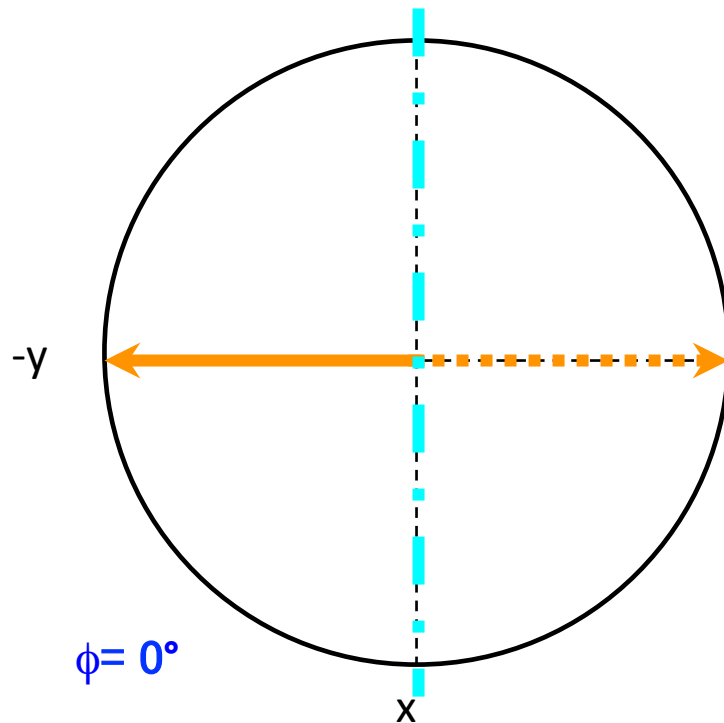


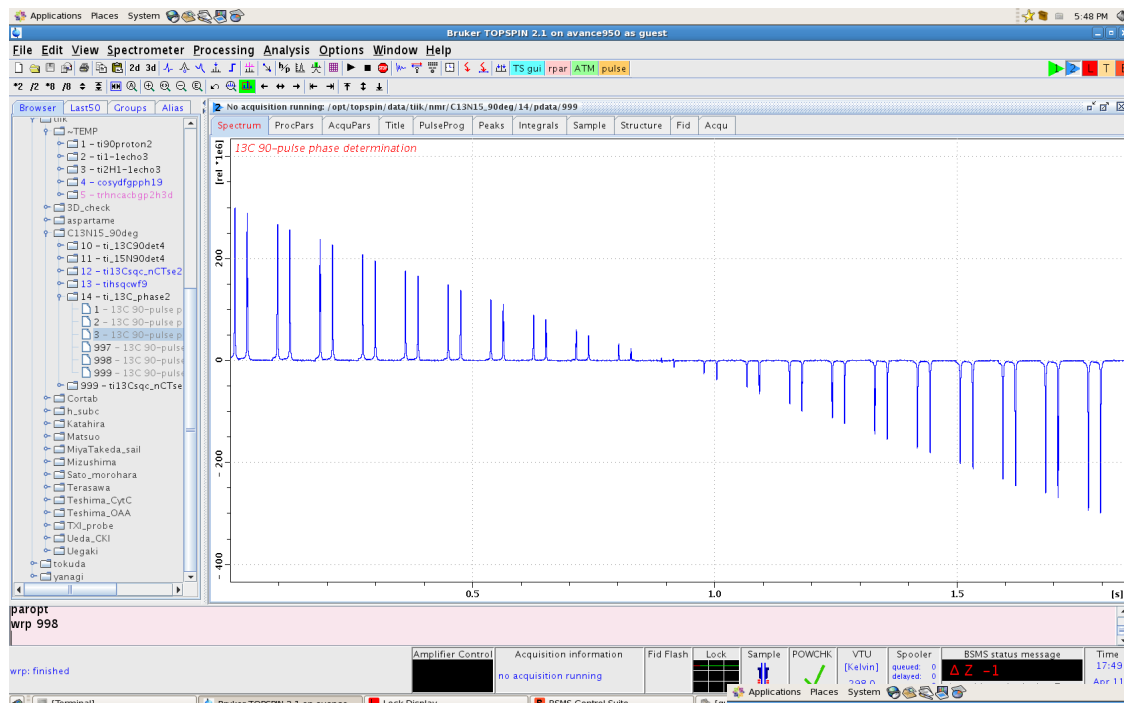
位相は大丈夫？



HMQC を使って
位相を調べる。

$\phi = 45^\circ$ の時、
信号が0となる。





20 μ s @ -0.2dB での参照実験

真ん中で強度0となっている。

250 μ s @ 22dB との比較

+1.3 度の位相のずれ
(phcor = -1.3 にて補正可)

