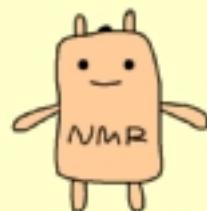


蛋白質の NMR
- ^{13}C 検出への期待 -

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」

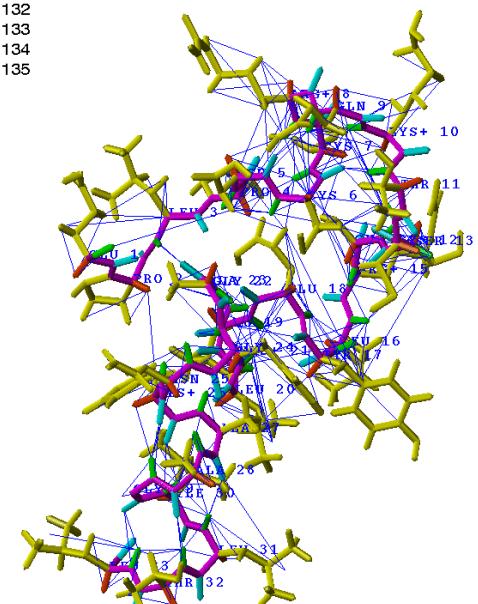
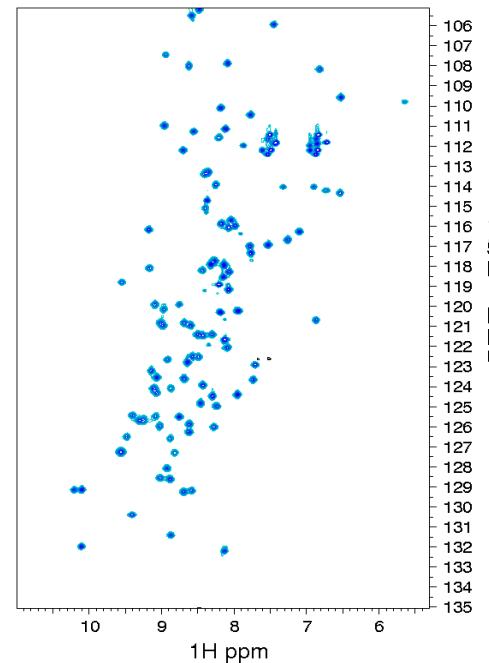
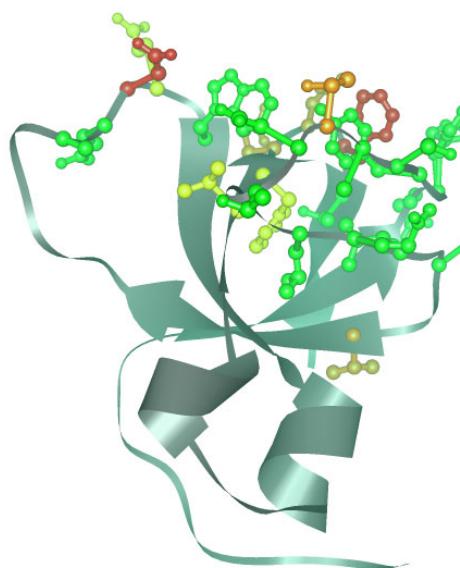
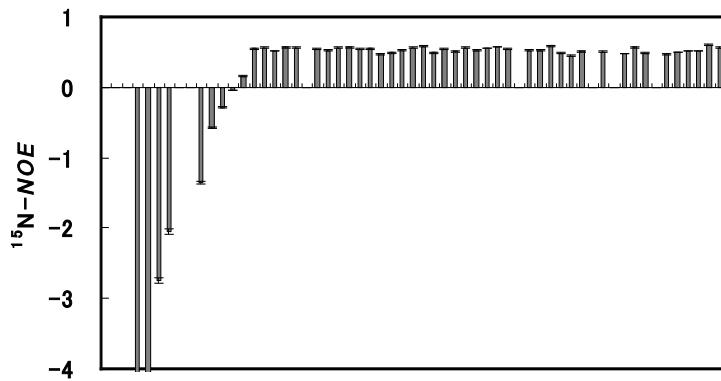
核磁気共鳴装置



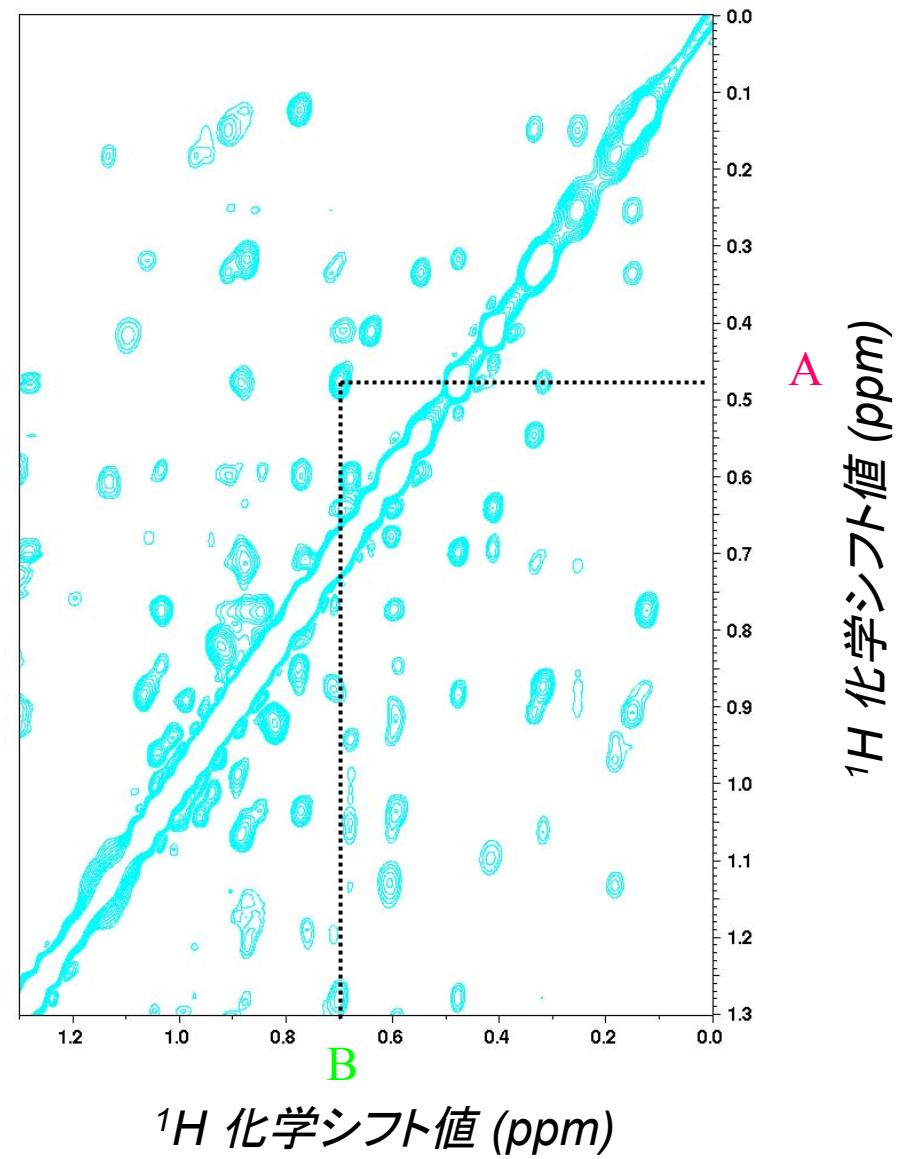
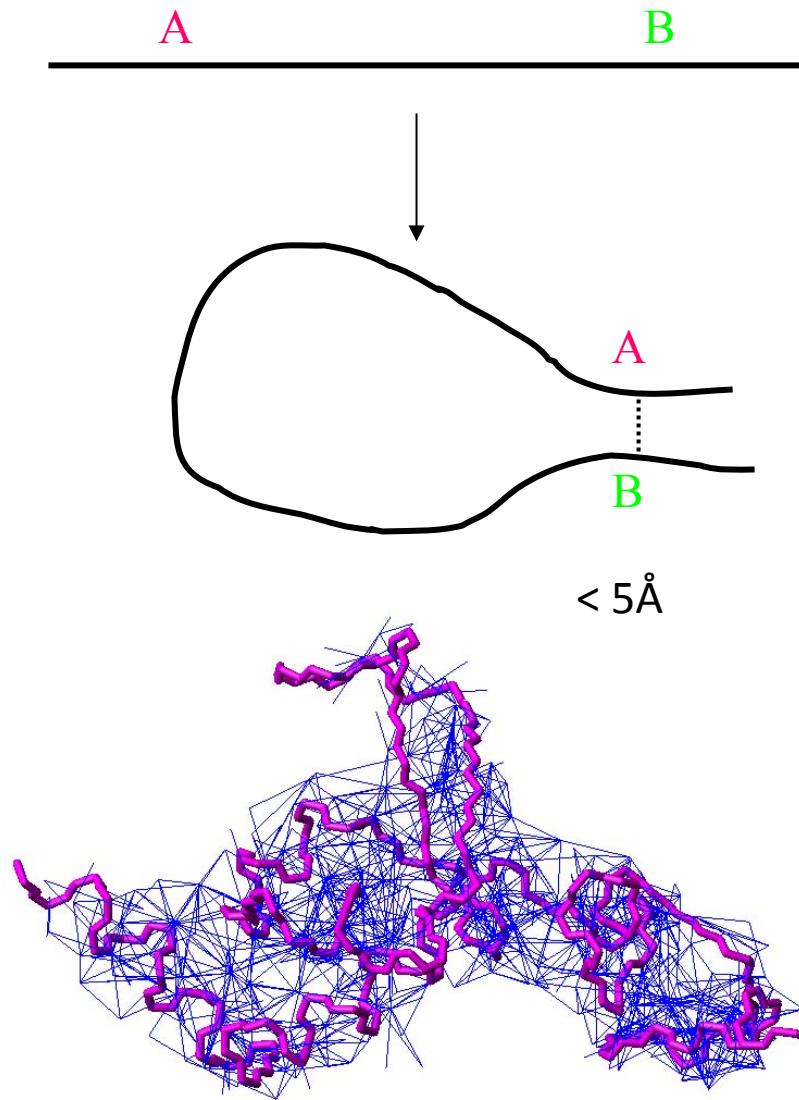
大阪大学蛋白質研究所
構造プロテオミクス研究系
池上貴久

NMRによる蛋白質の解析

- 化学シフト値の帰属
- 立体構造の計算
- 動的構造、柔軟性の解析
- 相互作用部位の検出



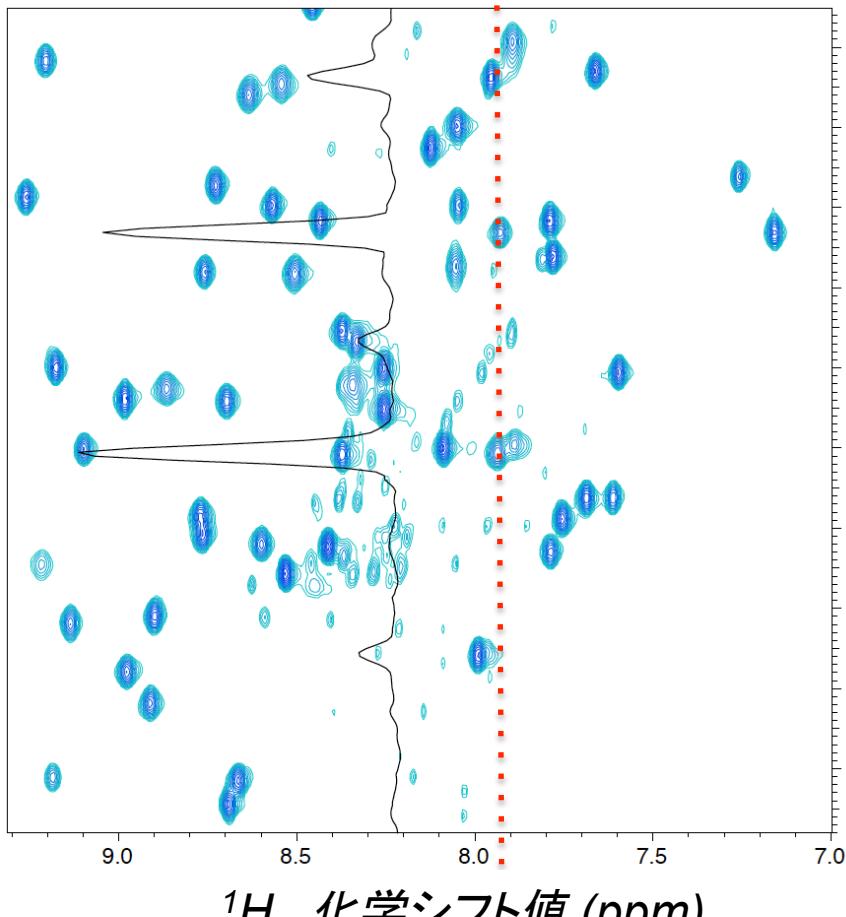
距離情報である NOE を拾うにも
事前に共鳴値の帰属が必要



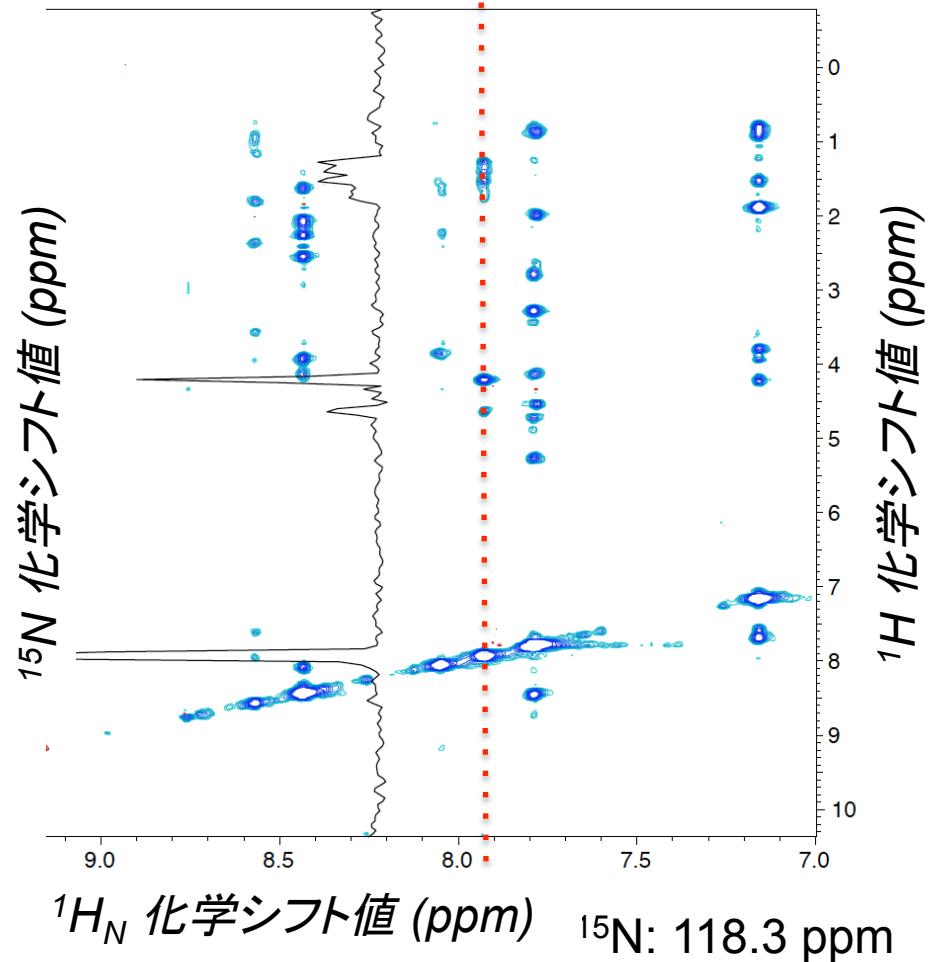
^1H 核だけでなく、それが共有結合している ^{13}C や ^{15}N 核の化学シフト値も帰属されていったい

^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。

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

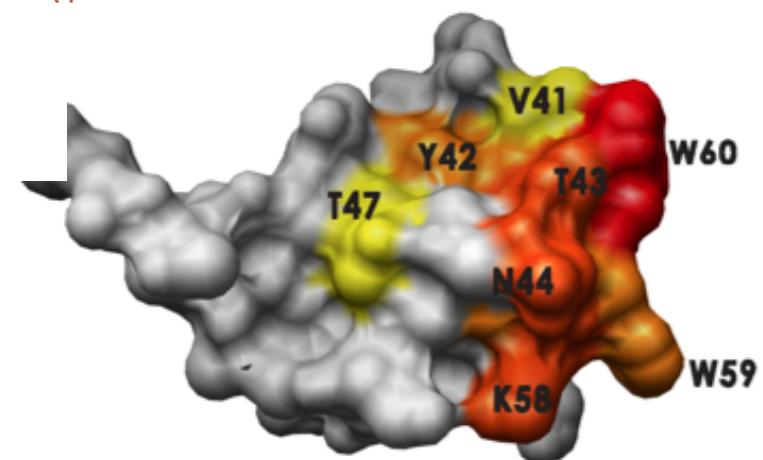
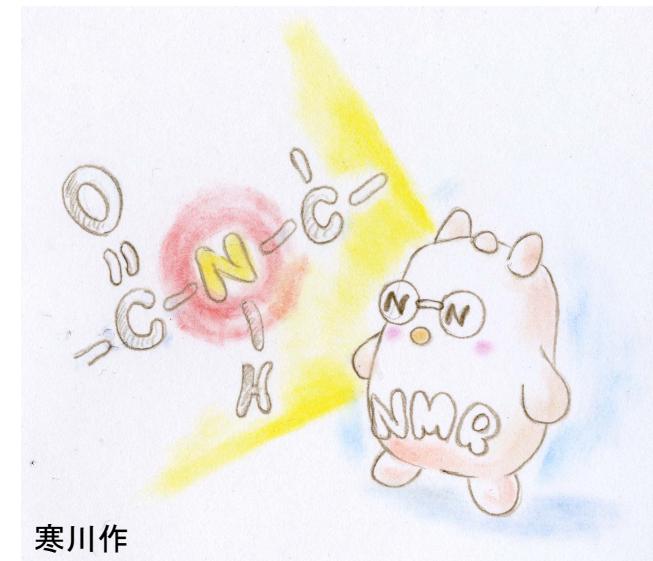
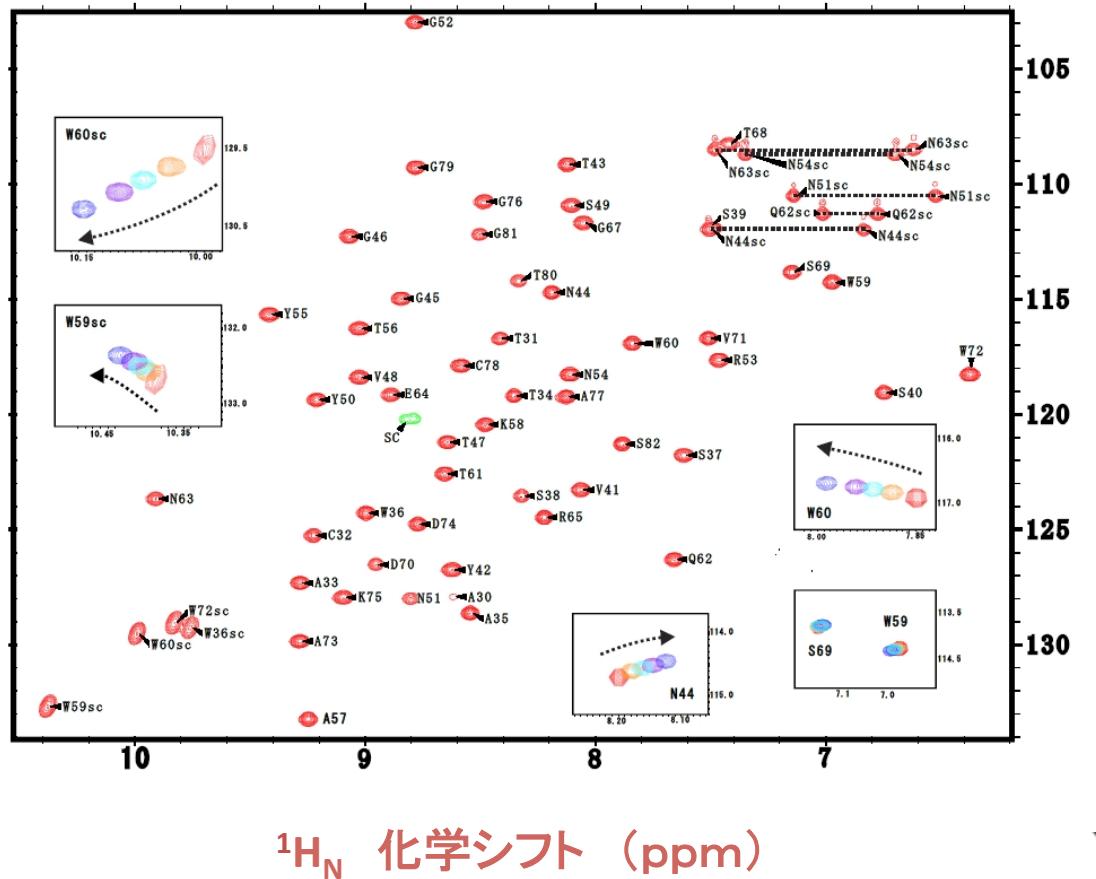


3D ^{15}N -edited NOESY

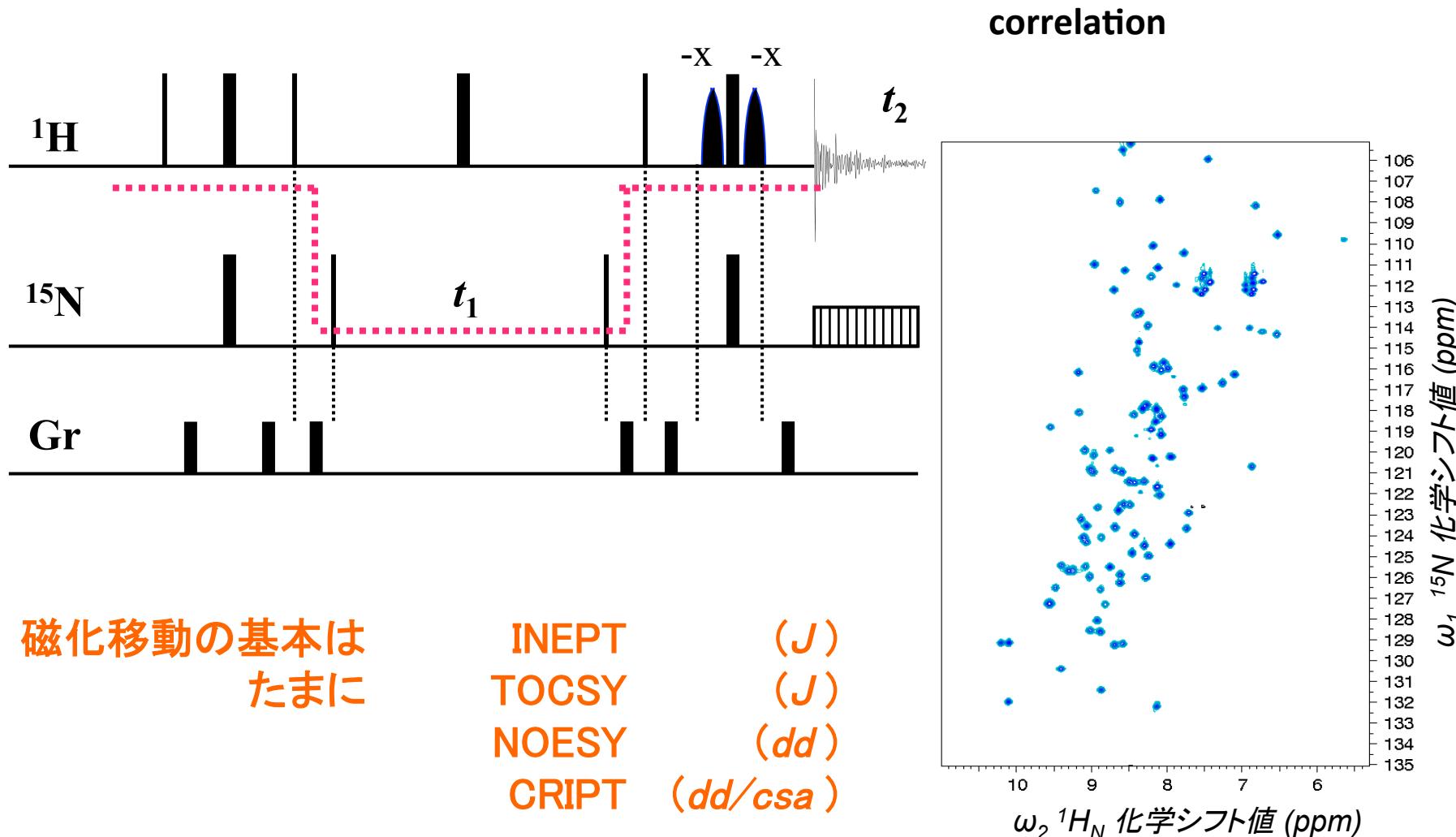


蛋白質と相互作用する低分子を探すにも、事前に帰属データが欲しい

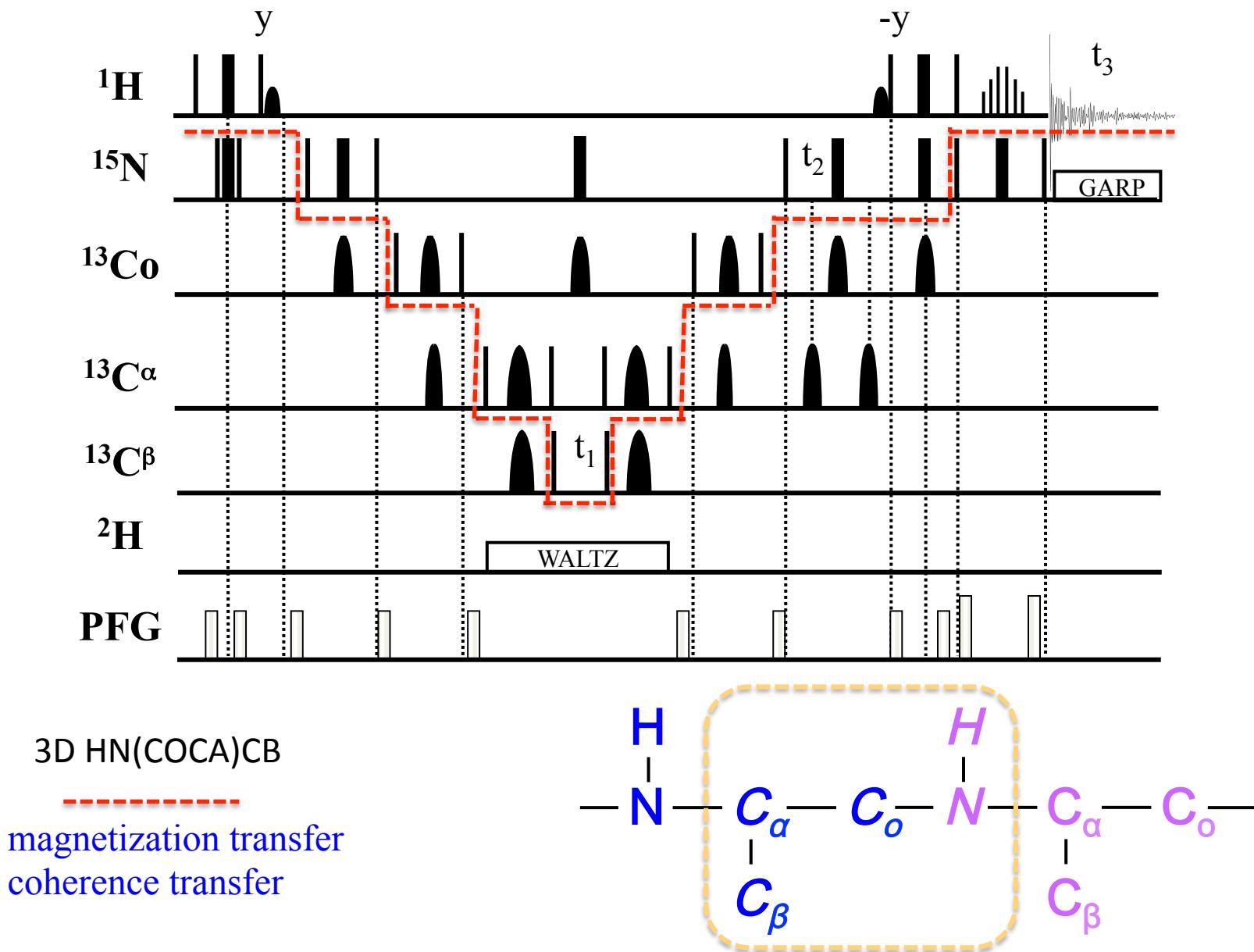
2D ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル



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

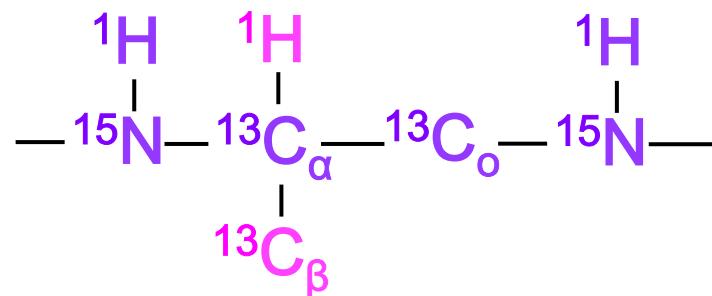


化学結合に沿って、INEPT でどんどん繋げていく

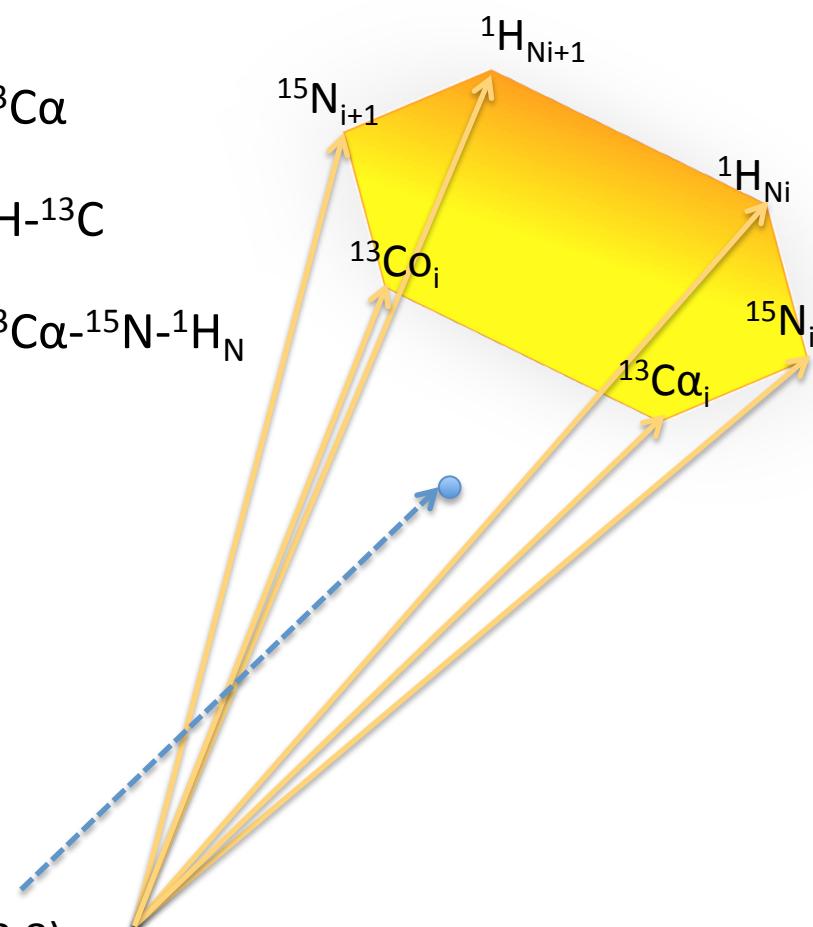


次元数 相関する核の数 例

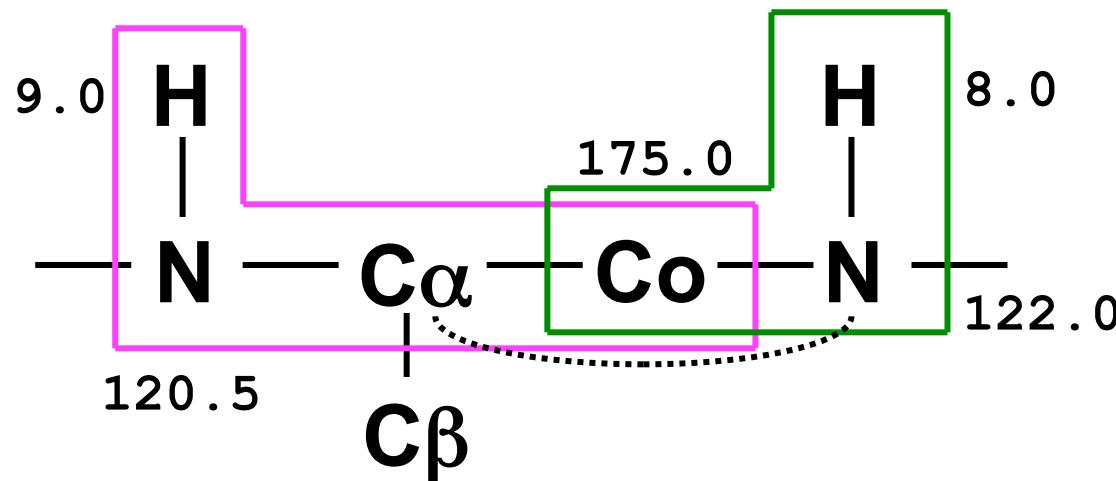
1	1	^1H
2	2	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$
3	3	$^1\text{H}_N-^{15}\text{N}-^{13}\text{Ca}$
4	4	$^1\text{H}_N-^{15}\text{N}-^1\text{H}-^{13}\text{C}$
5	5	$^1\text{H}_N-^{15}\text{N}-^{13}\text{Ca}-^{15}\text{N}-^1\text{H}_N$



$$\begin{aligned}
 & ({}^1\text{H}_N-{}^{15}\text{N}-{}^{13}\text{C}_o-{}^{13}\text{C}_\alpha-{}^{15}\text{N}-{}^1\text{H}_N) \\
 & = (7.5, 119.3, 175.2, 55.2, 118.3, 8.8)
 \end{aligned}$$



この場合は ^{13}Co が糊代



HN(CA)CO

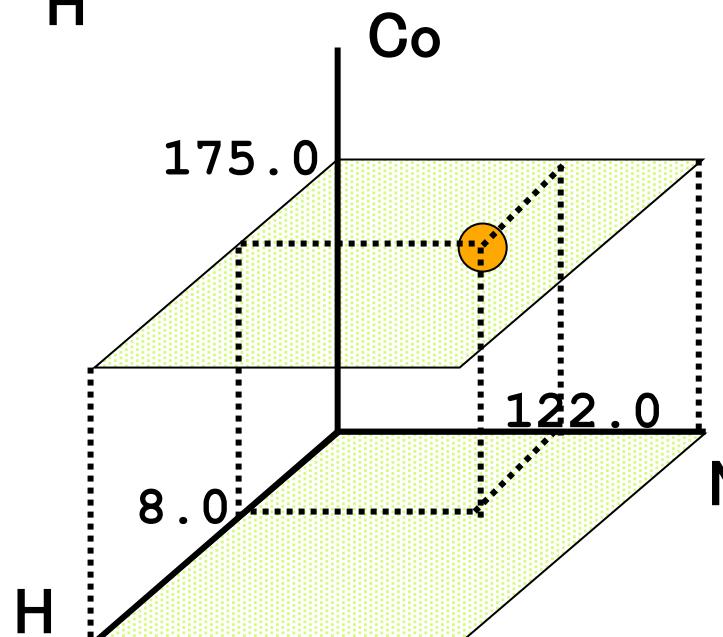
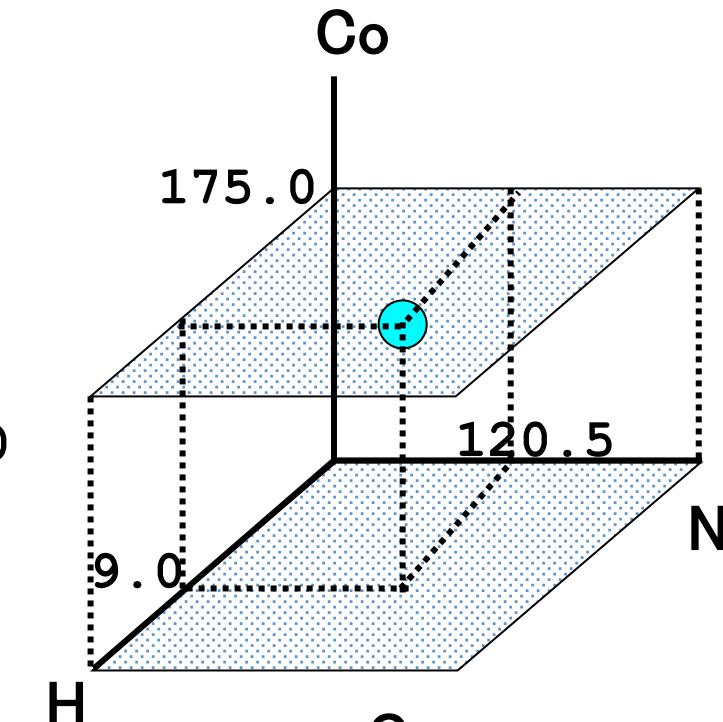


$$\begin{aligned} & (x, y, z) \\ & = (9.0, 120.5, 175.0) \end{aligned}$$

HNCO

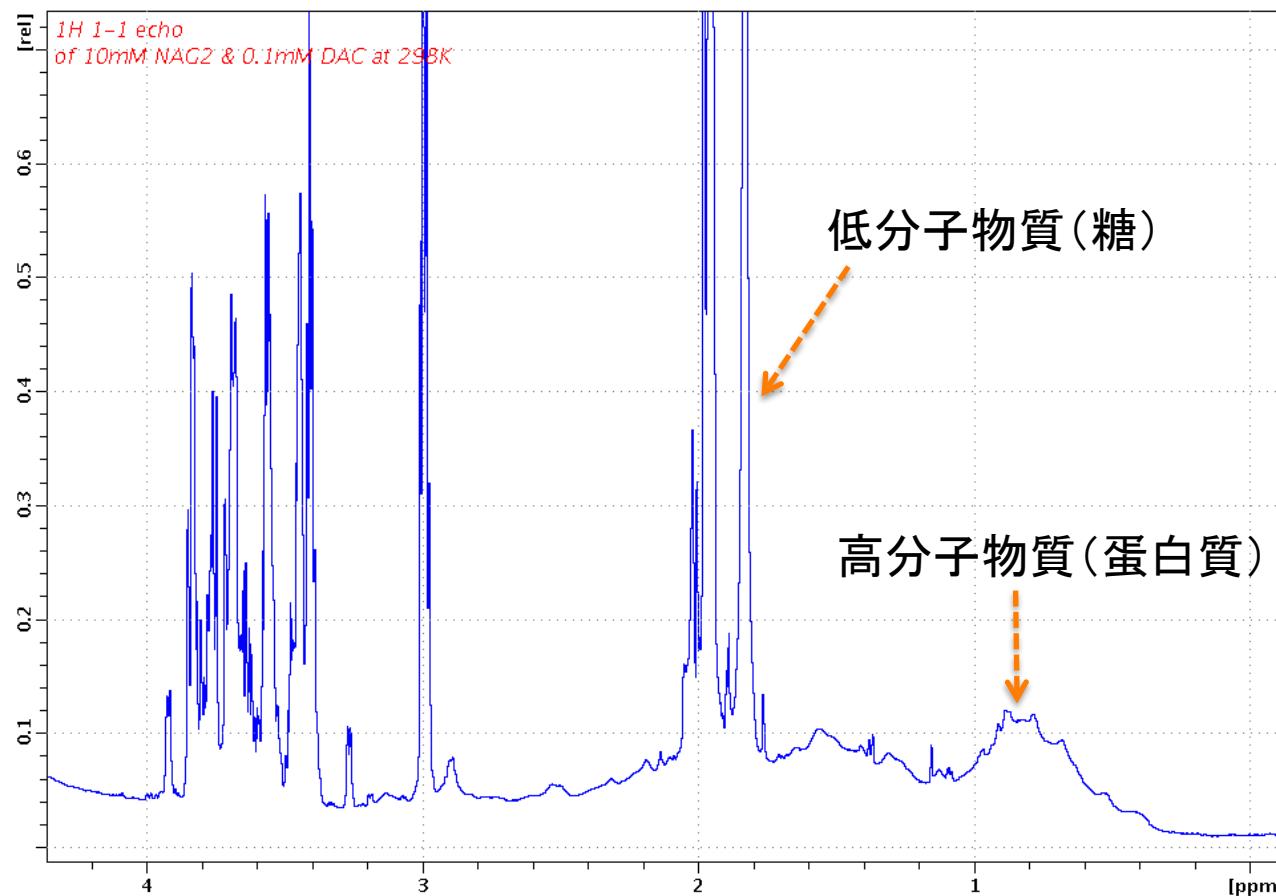


$$\begin{aligned} & (x, y, z) \\ & = (8.0, 122.0, 175.0) \end{aligned}$$



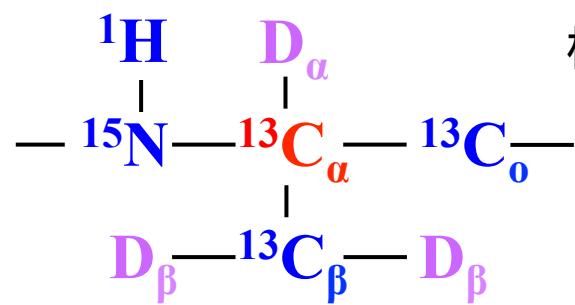
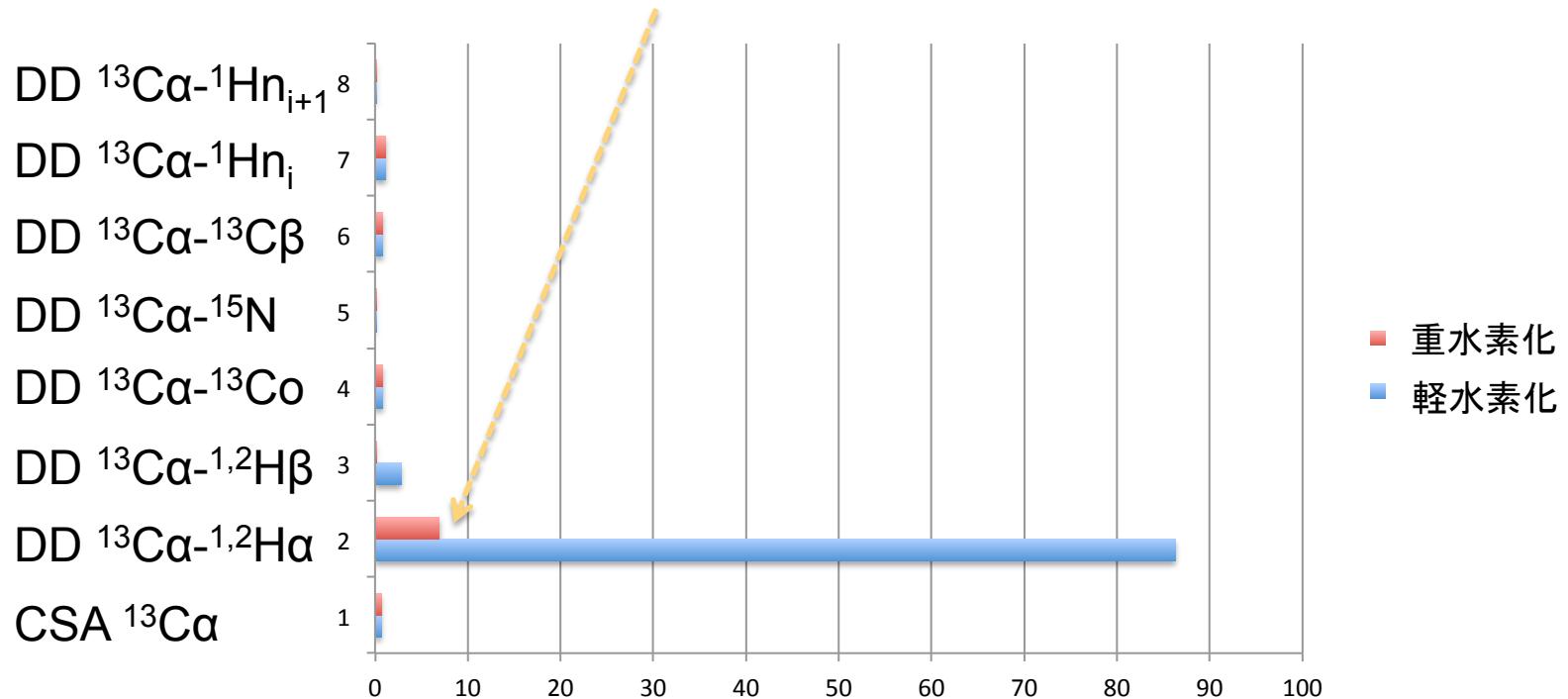
蛋白質の共鳴ピークは幅広（横緩和時間が短い）

重水素化 deuteration
TROSY (cross-correlated-relaxation)
選択的標識 selective-labeling



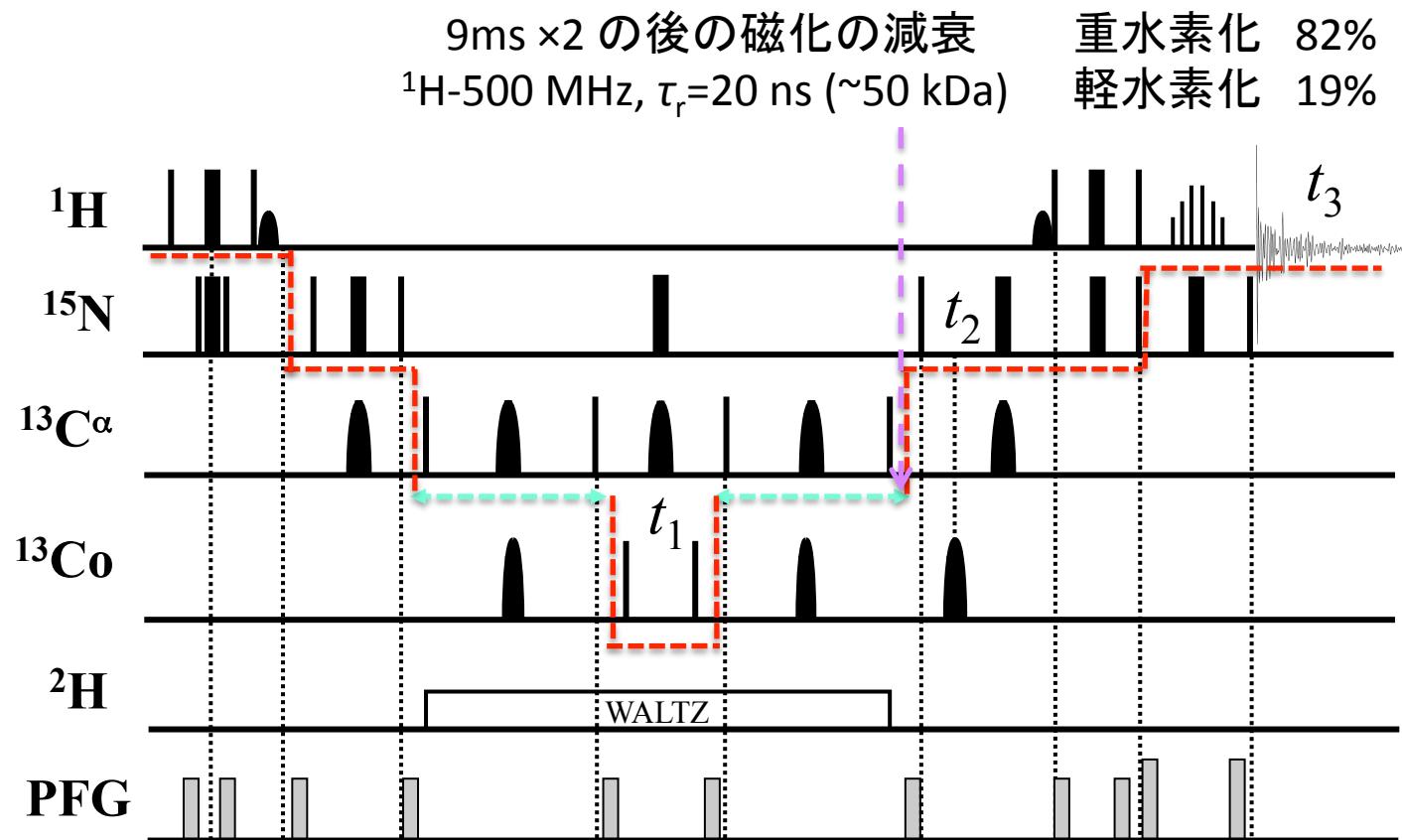
重水素化により、特に ^{13}C , ^1H 核の横緩和時間が長くなる

$^2\text{H}\alpha$ により ^{13}Ca 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)

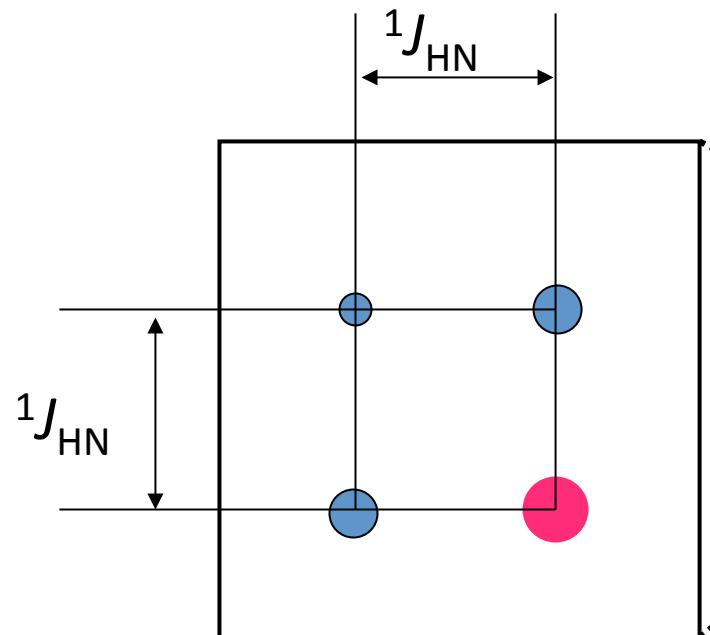
重水素化により、線形が先鋭になるだけでなく、
磁化移動の delay での減衰が小さくなる



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

(ただし、 ${}^{13}\text{C}^\alpha$ の anti-phase の緩和を除く)

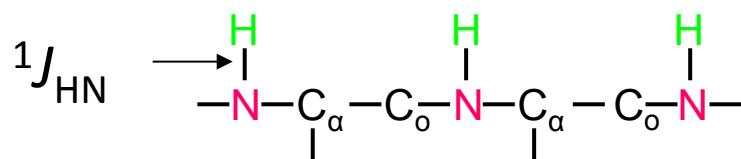
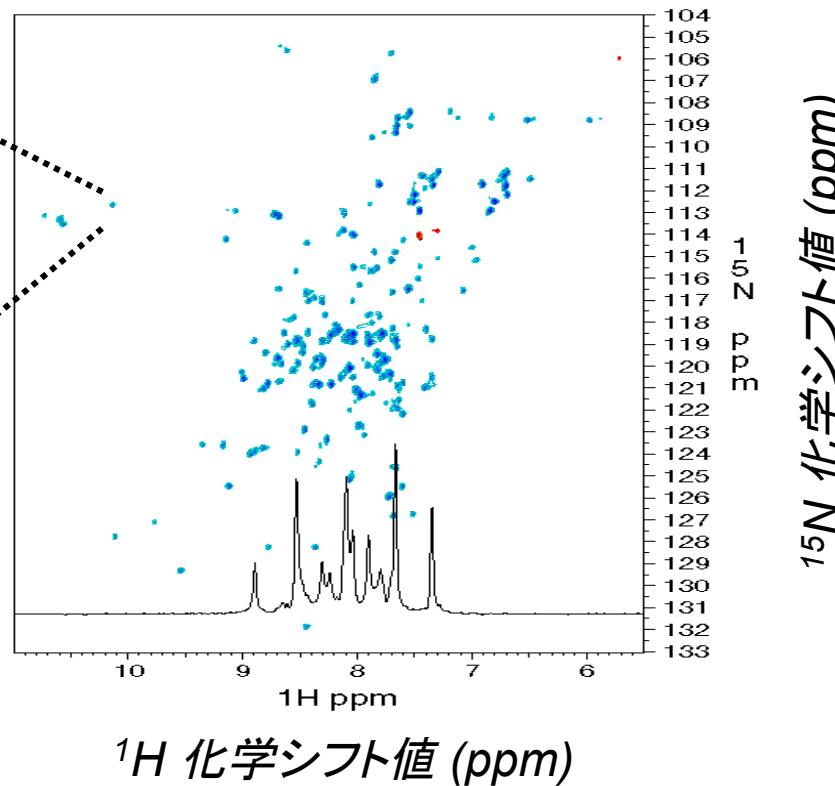
TROSY パルス系列による高分子量への挑戦



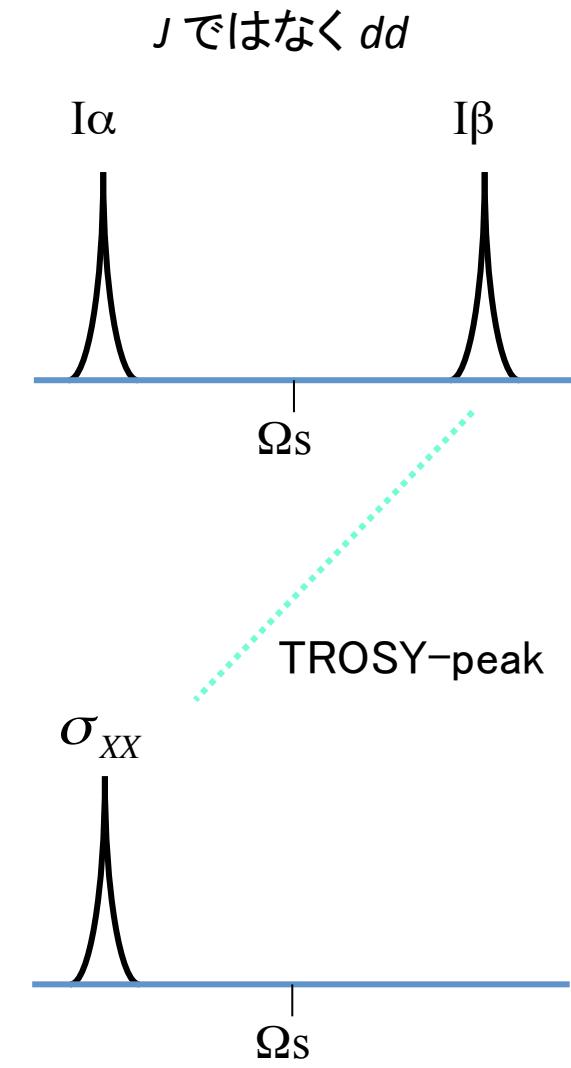
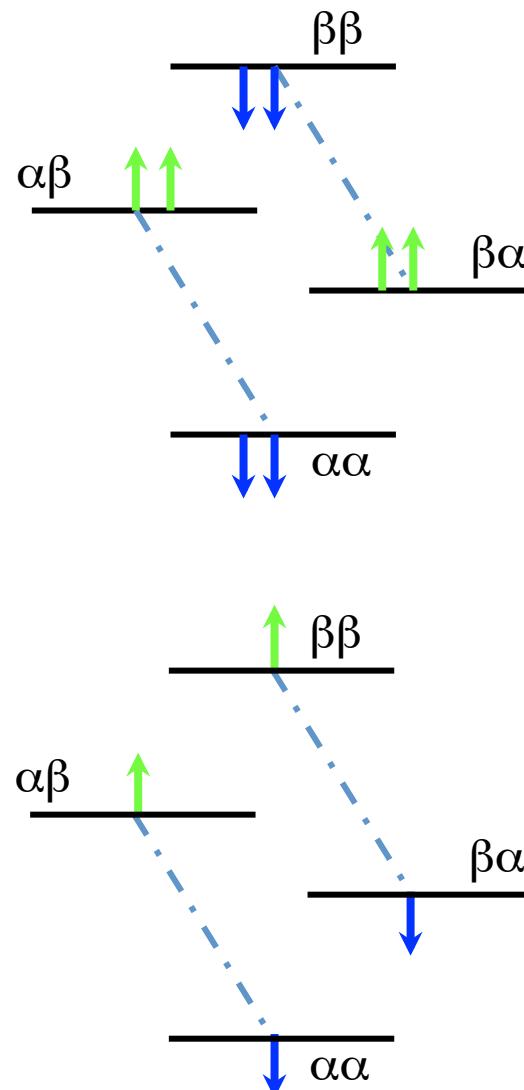
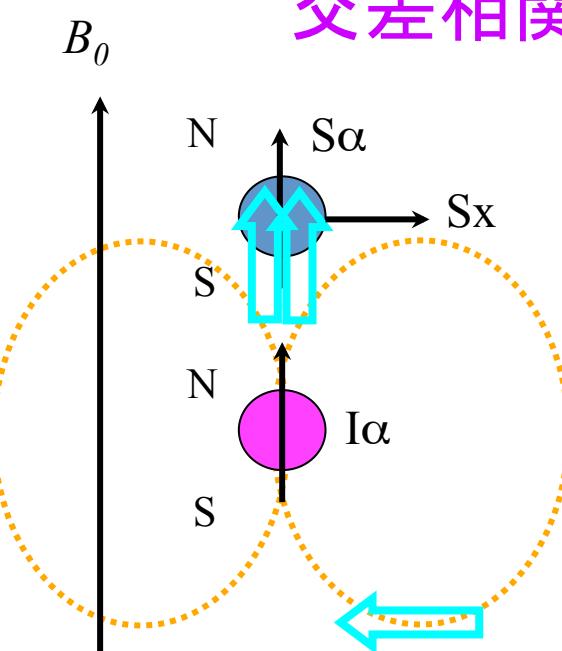
800 kDa 高分子量でも観測可
1 GHz NMR が理想的？

アミド基、メチル基、芳香環に適用可

二次元 ^1H - ^{15}N 相関スペクトル

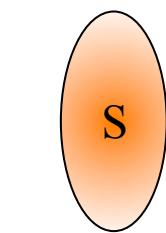


交差相關 cross-correlation between DD and CSA

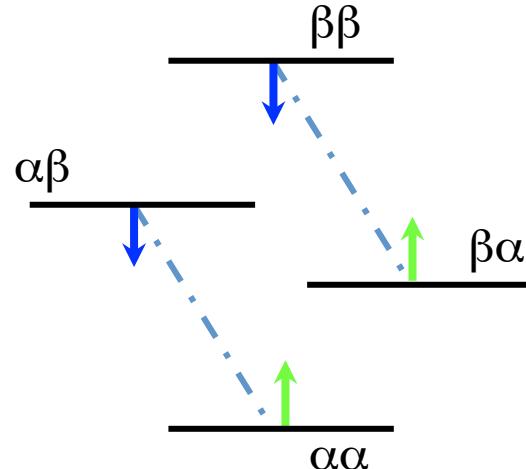


分子が 90° 回転して I-S 結合が横を向くと ...

B_0



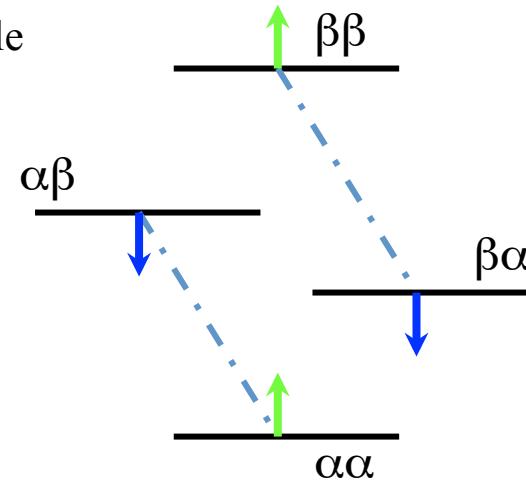
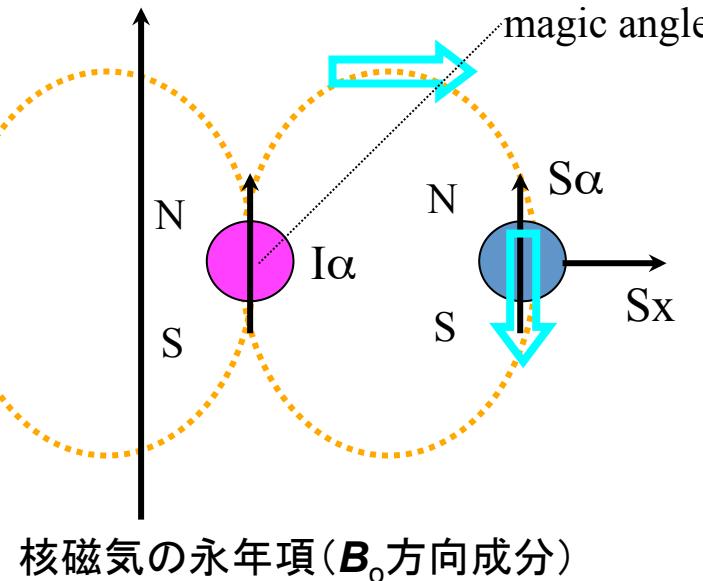
$\sigma_{zz}(\theta = 0)$



σ_{zz}

Ω_s

TROSY-peak



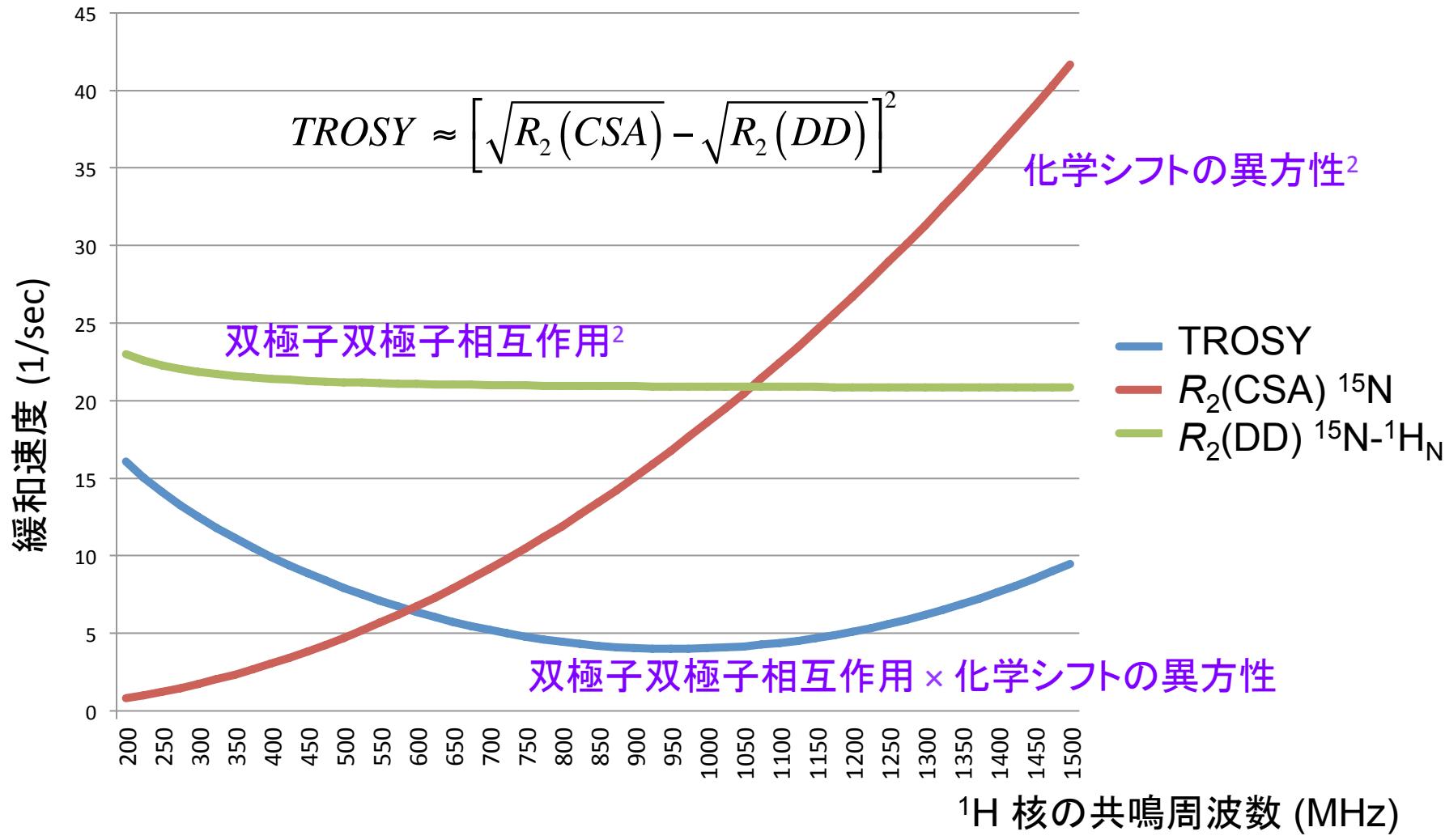
$I\beta$

$I\alpha$

Ω_s

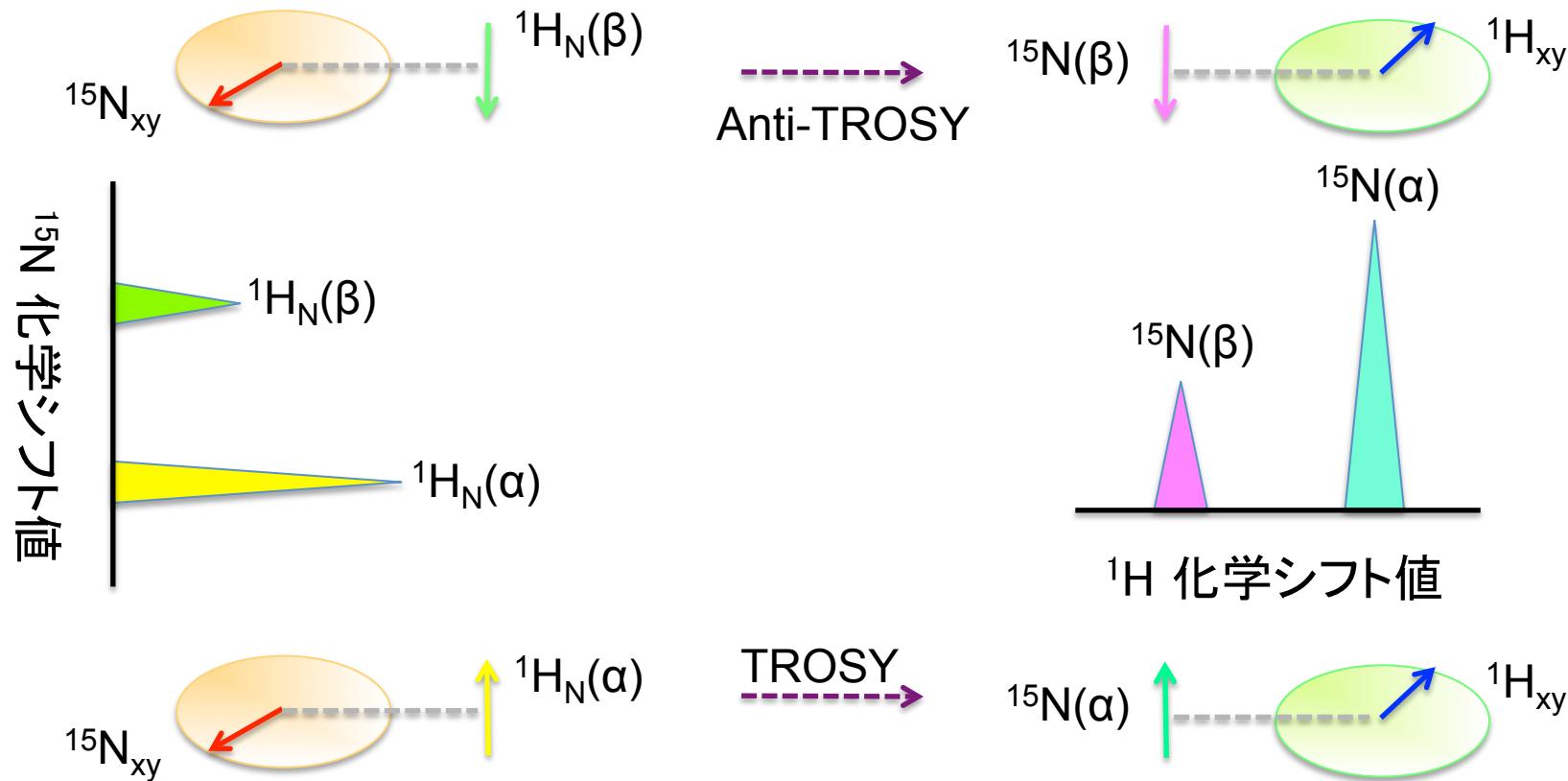
J ではなく dd

$^{15}\text{N}-^1\text{H}$ 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

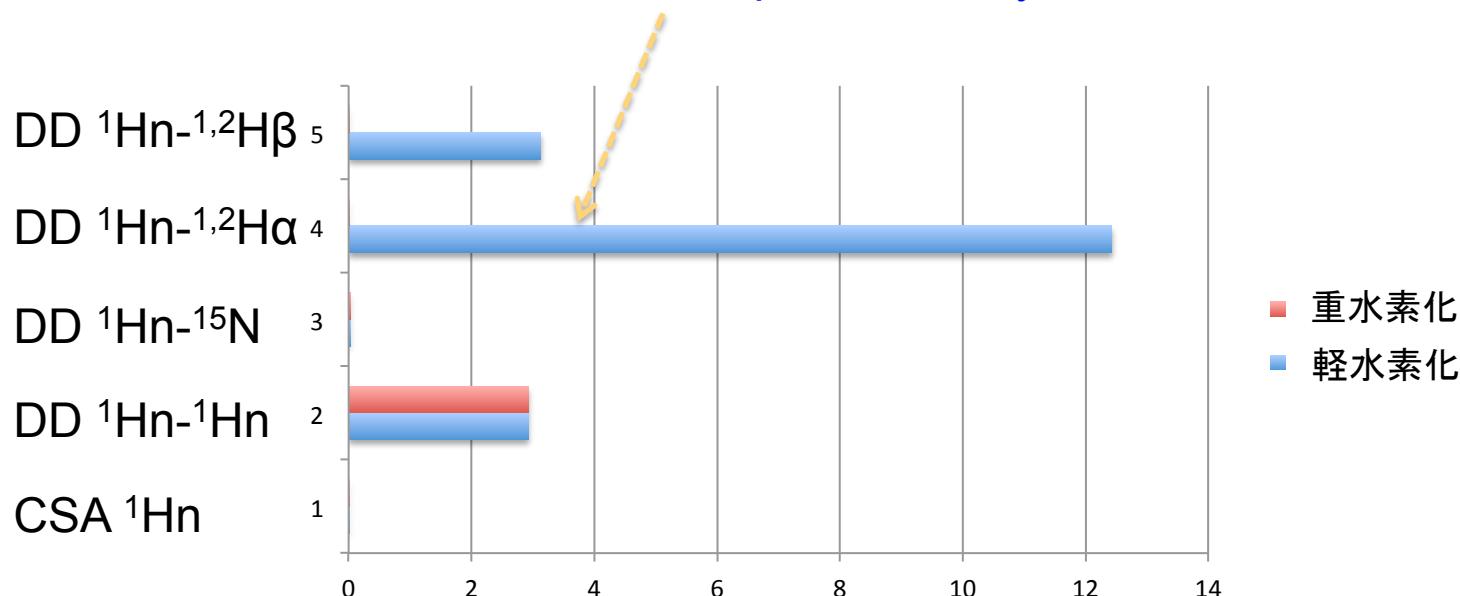


$^1\text{H}_N(\alpha) \longleftrightarrow ^1\text{H}_N(\beta)$ のランダムな交換を無くしたい

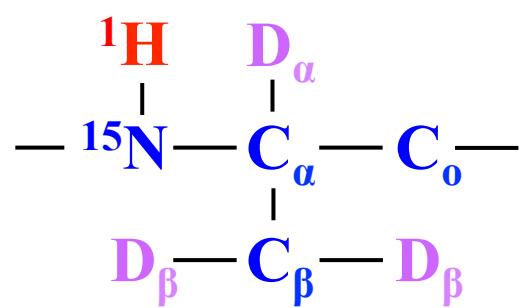
$^1\text{H}_N$ の緩緩和を出来るだけ遅くする $\rightarrow \text{H}\alpha$ などの重水素化

重水素化により $^1\text{H}_\text{N}$ 核の縦緩和が遅くなる

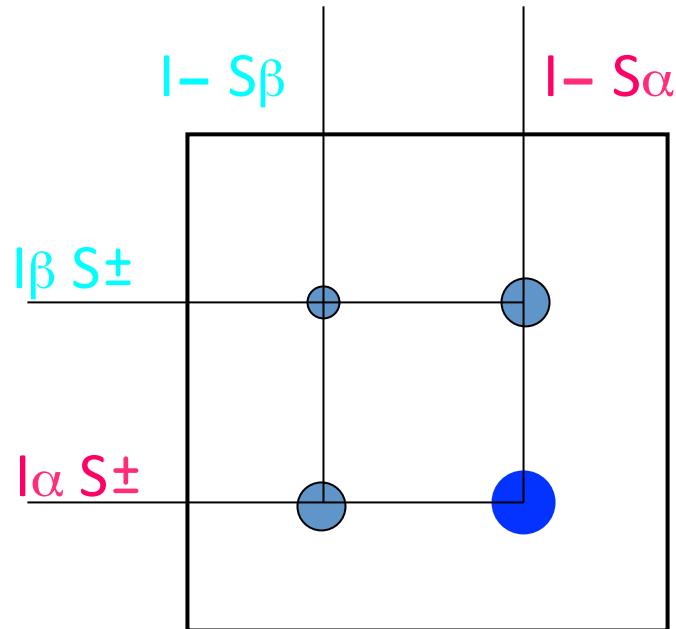
$\text{H}\alpha$ との dd 縦緩和速度が $1/7000$ になる?
(欠点) repetition-delay を長くしないといけない



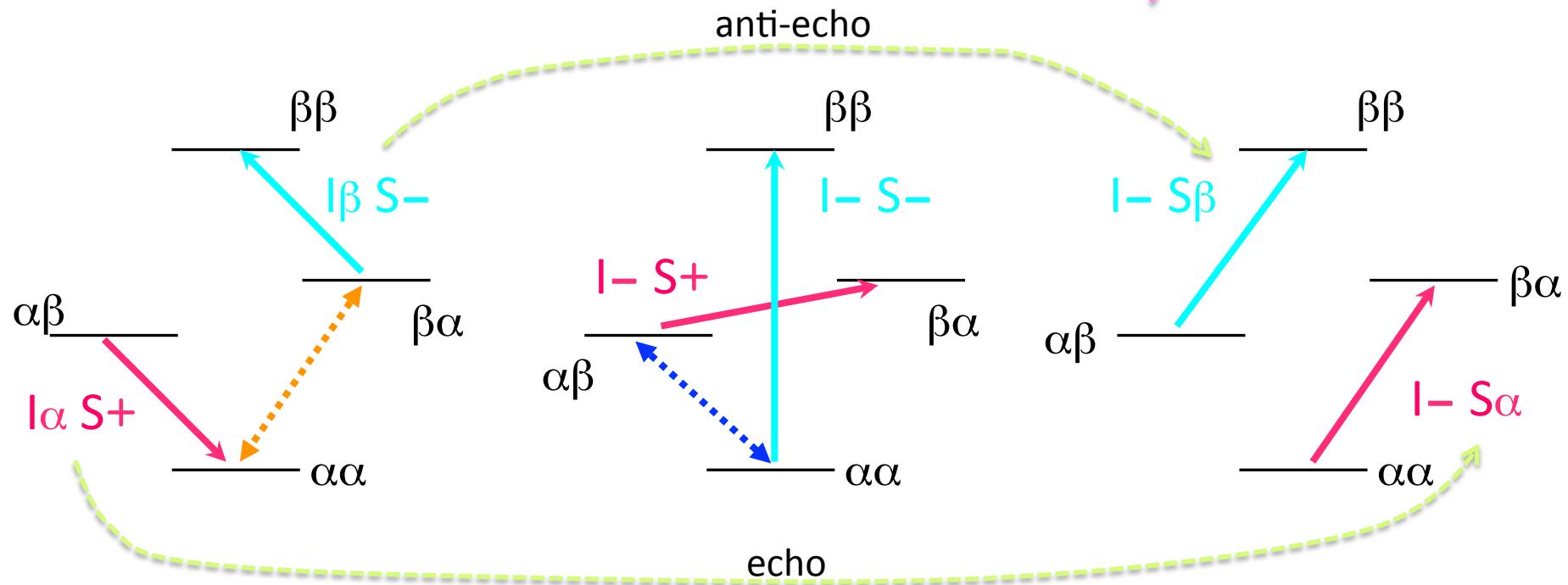
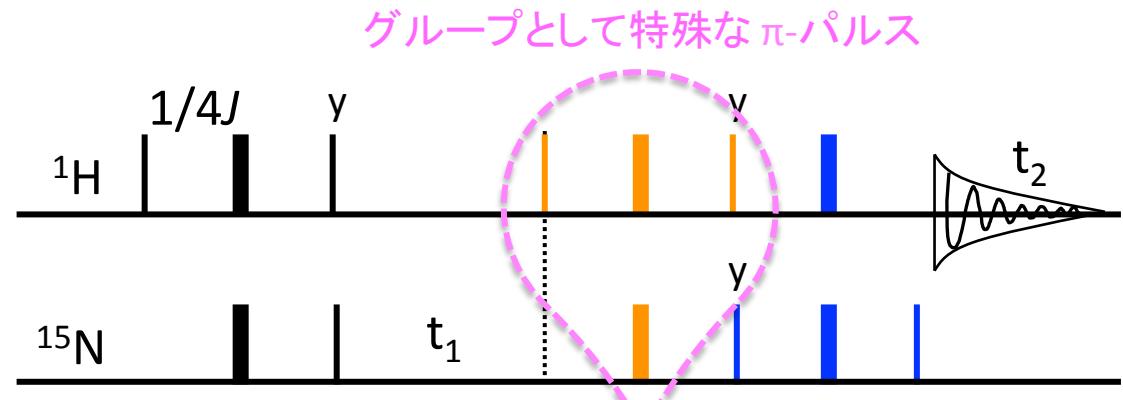
自己縦緩和速度 ρ_1 (1/sec) (ただし、交差緩和は無視)
(500 MHz ^1H) $\tau_r=20$ ns (~ 50 kDa)



^{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 $^1\text{H}_\text{N}(\alpha)$ と $^1\text{H}_\text{N}(\beta)$ が維持される

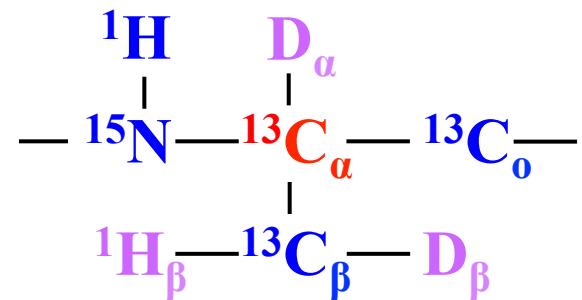


TROSY パルス系列における スピン状態選択的磁化移動



超高磁場 NMR (800–1100 MHz) では $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ 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 \leftarrow [^1H , ^{13}C]-glucose, 100% D_2O

$\text{H}\alpha$ 重水素化率: 95%

$\text{H}\beta$ 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

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

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

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

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



磁気回転比 $\gamma_{^{13}\text{C}}$ は $\gamma_{^{1\text{H}}}$ の $1/4$

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

(核ボーラ磁子)

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 $27 \text{ Hz} = 0.18 \text{ ppm}$
aliphatic ^{13}C : $10\text{~}80 \text{ ppm}$ とすると、 0.0026

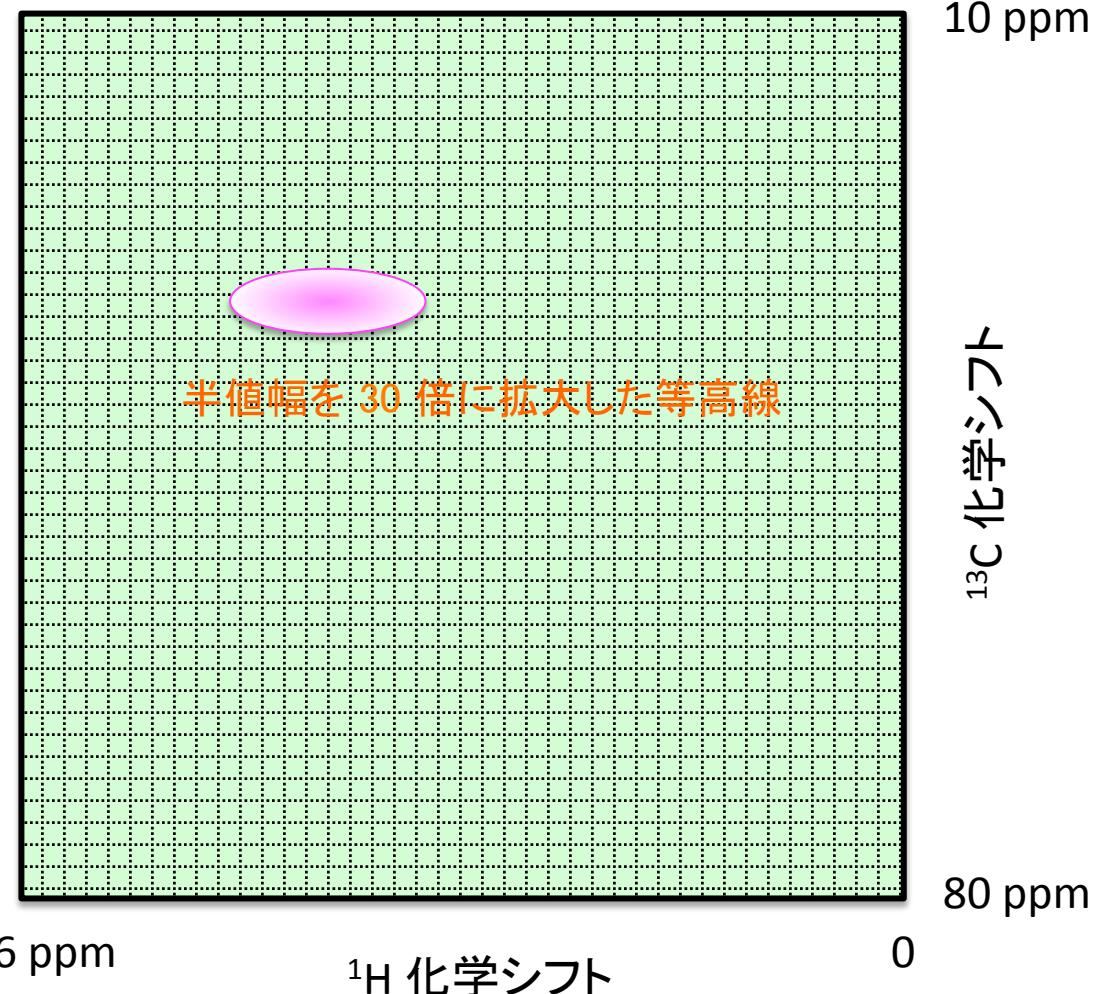
^{13}C - ^1H の双極子双極子 ^1H 横緩和
半値幅 $27 \text{ Hz} = 0.046 \text{ ppm}$
aliphatic ^1H : $0\text{~}6 \text{ ppm}$ とすると、 0.0077

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。

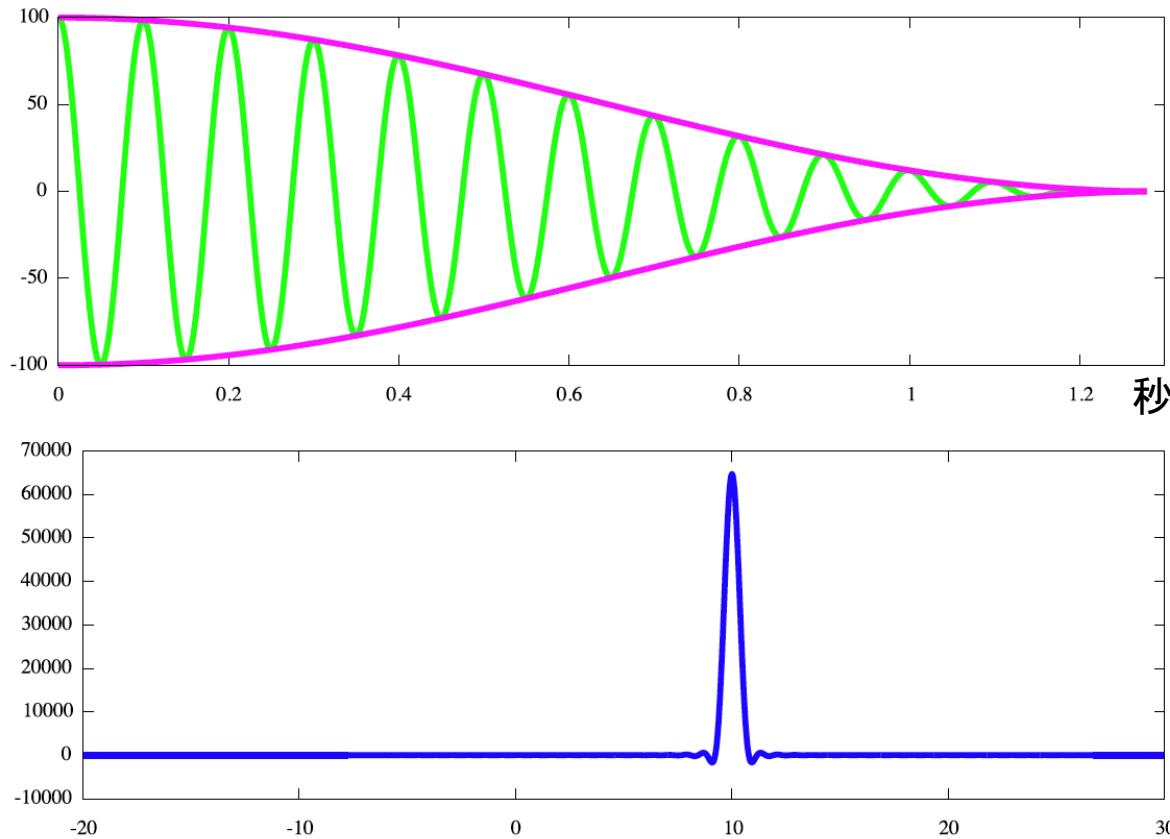
^{13}C - ^2H の双極子双極子 ^{13}C 横緩和
半値幅 $2 \text{ Hz} = 0.015 \text{ ppm}$
aliphatic ^{13}C : $10\text{~}80 \text{ ppm}$ とすると、 0.0002

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 , $\tau_r=20 \text{ ns}$ ($\sim 50 \text{ kDa}$) ^{13}C - $^{1,2}\text{H}$ (1.08 \AA)



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

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

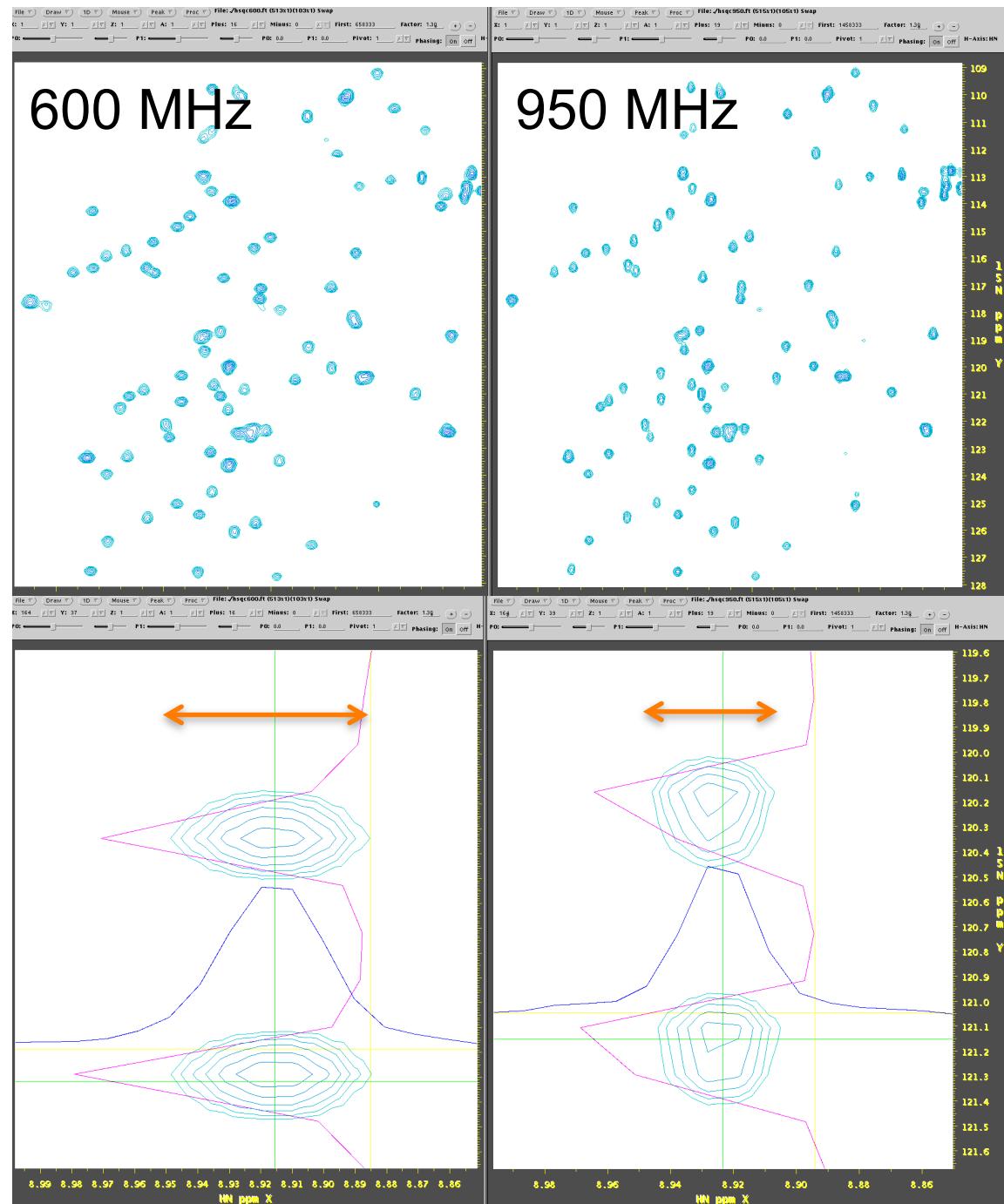
0.77 Hz → 0.002 ppm (^1H on 400MHz NMR)

0.77 Hz → 0.001 ppm (^1H 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

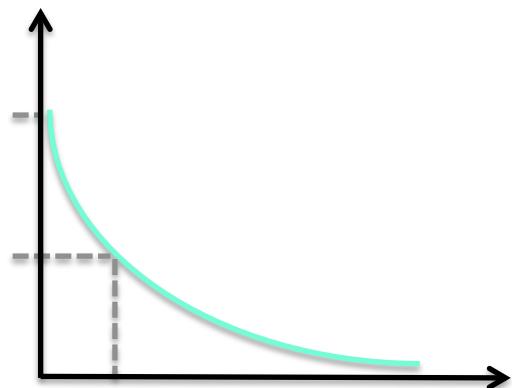
間接測定軸 (^{15}N 核)
測定時間に支配されてしまい、分解能(@ppm)を上げられない。

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

$$R\left(\frac{1}{\text{sec}}\right) = \frac{1}{T(\text{sec})} \quad \exp(-R_a t) * \exp(-R_b t) = \exp\{- (R_a + R_b)t\}$$

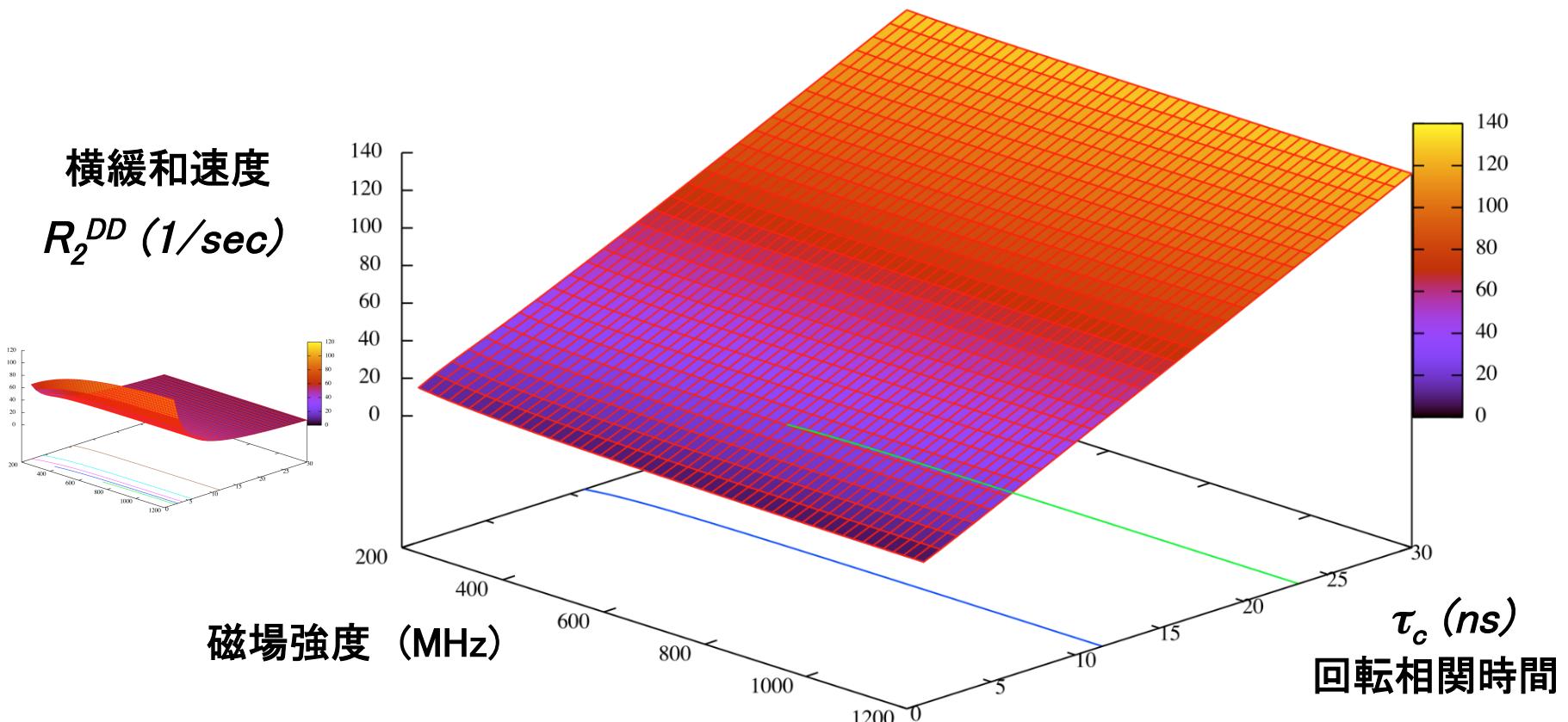


- ✗ $T_{total} = T_a + T_b + T_c + \dots$
- $R_{total} = R_a + R_b + R_c + \dots$
- $\frac{1}{T_{total}} = \frac{1}{T_a} + \frac{1}{T_b} + \frac{1}{T_c} + \dots$

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



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

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

I (^{13}Ca) 側を観測

FID のように、充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}Ca - $^{1}\text{H}\alpha$ 2スピン系 1.09 Å
双極子相互作用のみを考慮

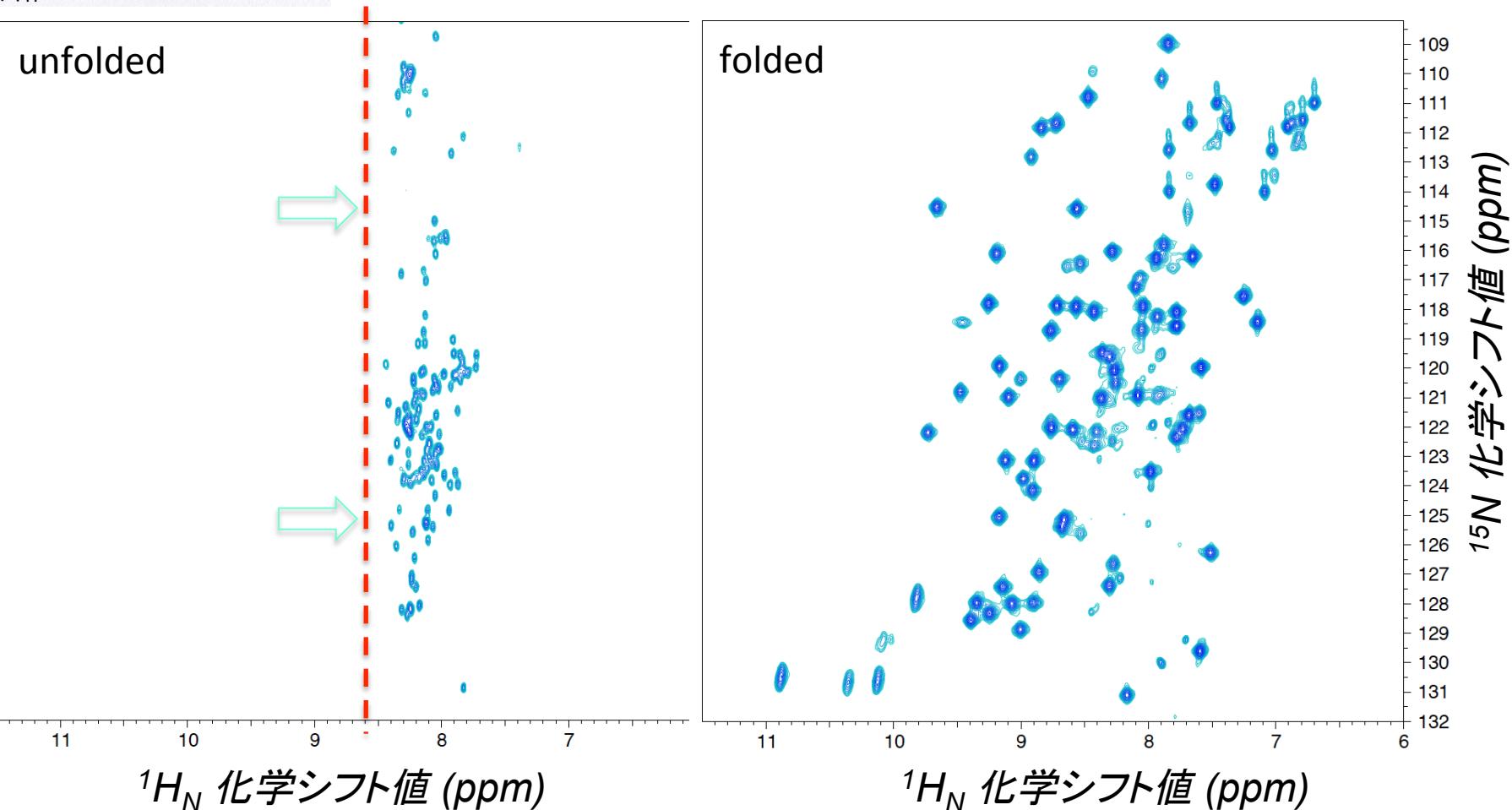


寒川作

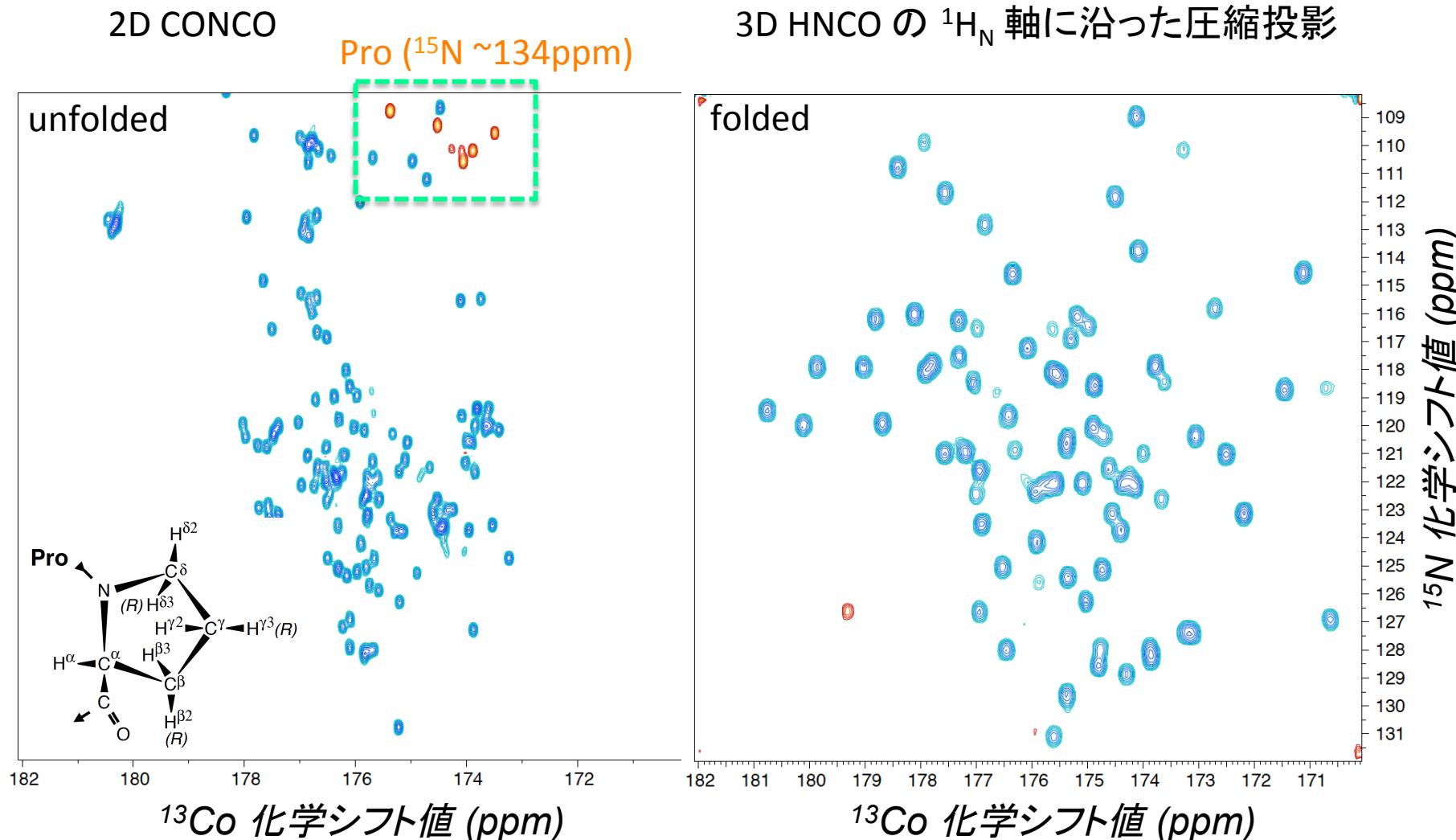
立体構造を保持していない蛋白質では、
 $^1\text{H}_\text{N}$ の化学シフトの散らばりは小さい

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

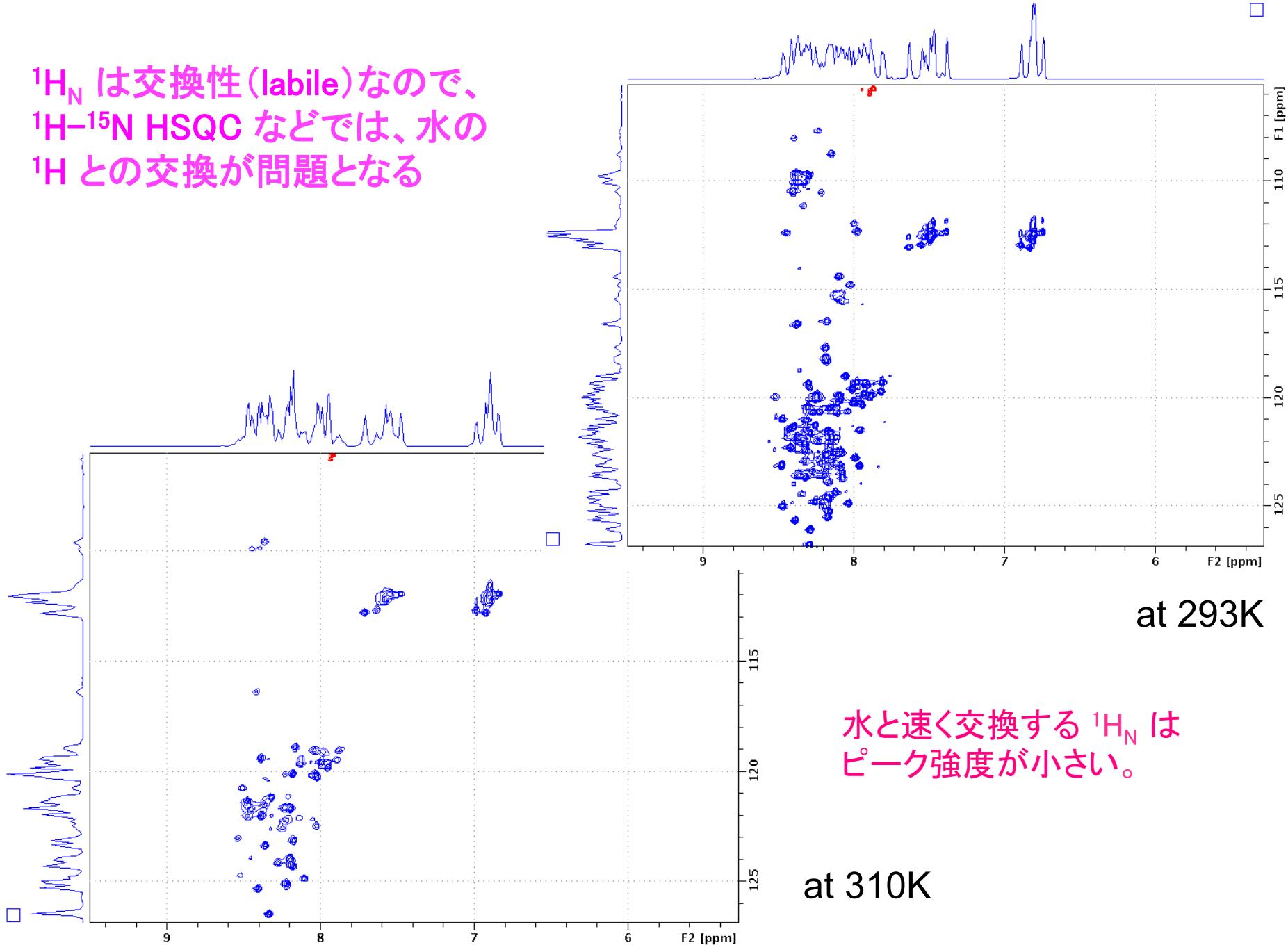
いわゆる? ハムの崖



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



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



^{13}C -検出に伴う感度の低下

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

磁化移動の開始: ^1H

FID 検出: ^1H

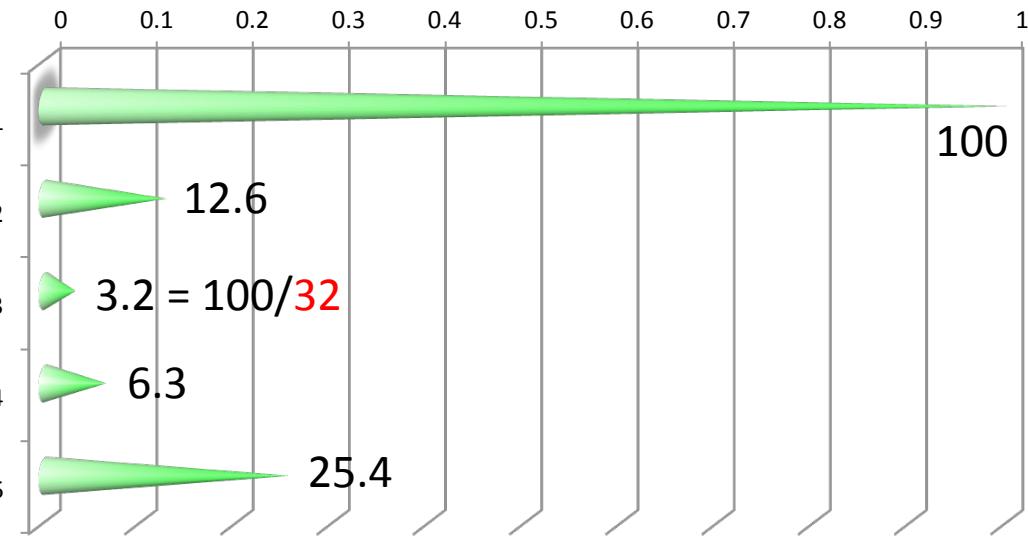
B_0 : 600 MHz
プローブ: 室温

FID 検出: ^{13}C

磁化移動の開始: ^{13}C

B_0 : 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 \times)

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 $\propto B_0^{1/2}$

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

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

$$\omega_0 = -\gamma B_0$$

直接測定軸(FID)における分解能の増加

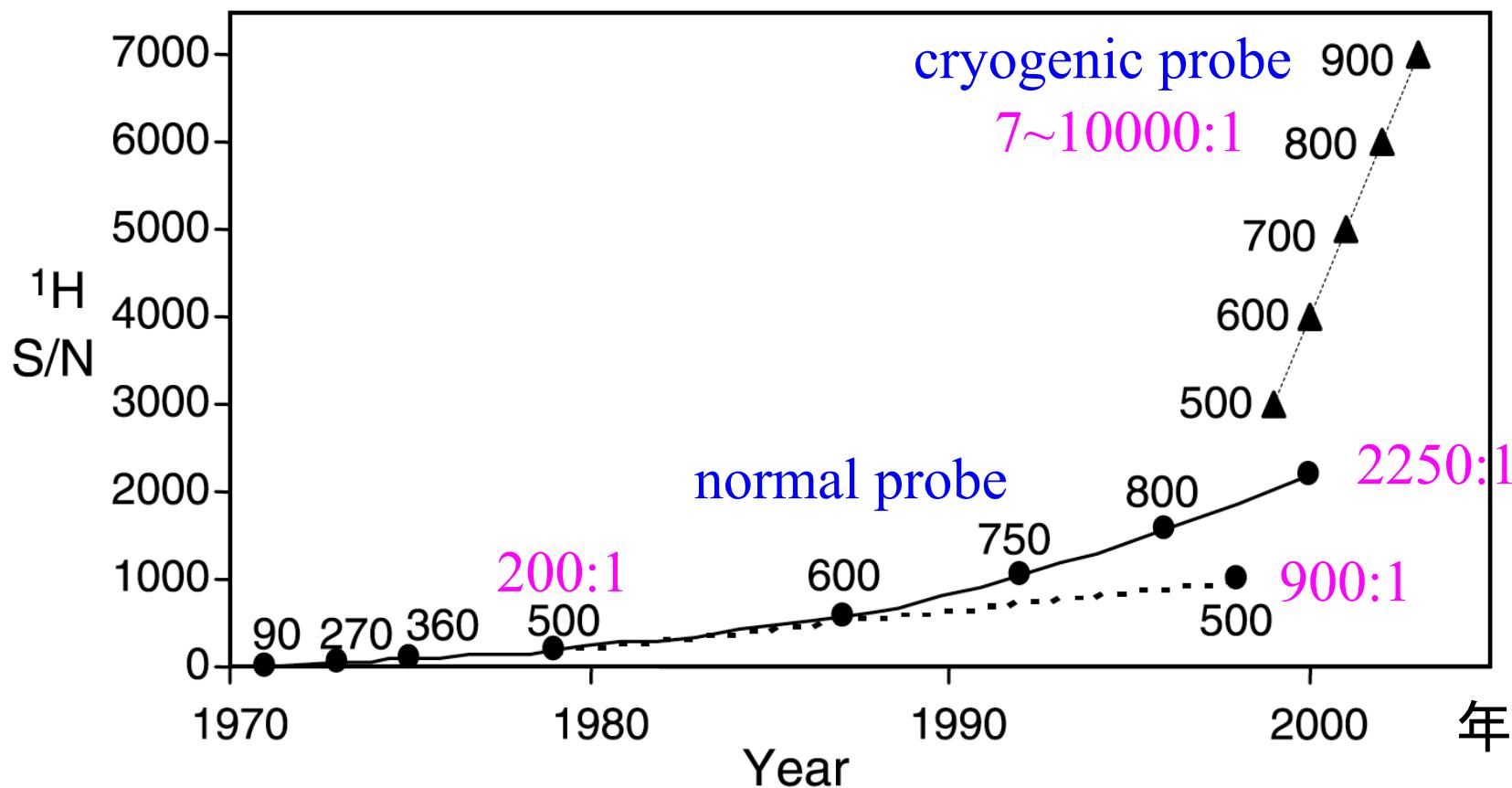
$^1\text{H}-^{15}\text{N}$ TROSY 効果

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

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

感度 $\times 4$
=
時間 $\times 1/16$

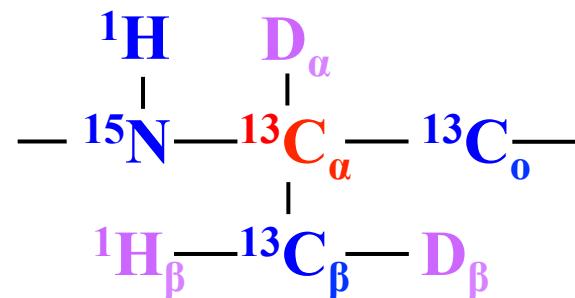


^{13}C -極低温検出器により ^{13}C -直接 FID 検出が実現可能に
→ 分解能の向上 (測定時間に支配されない)

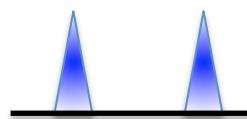
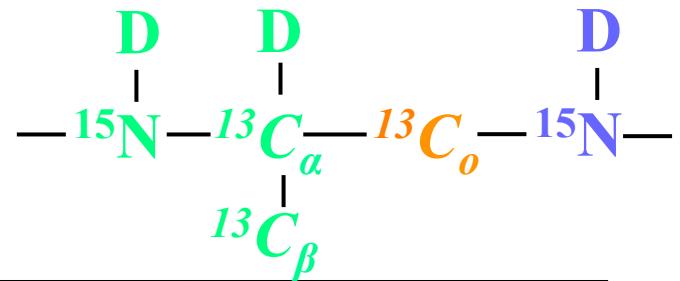
超高磁場

→ 感度の上昇
分解能(@ppm)の向上 (磁場が高い程良い)

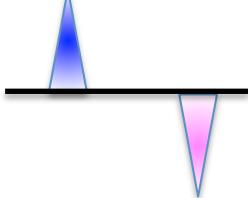
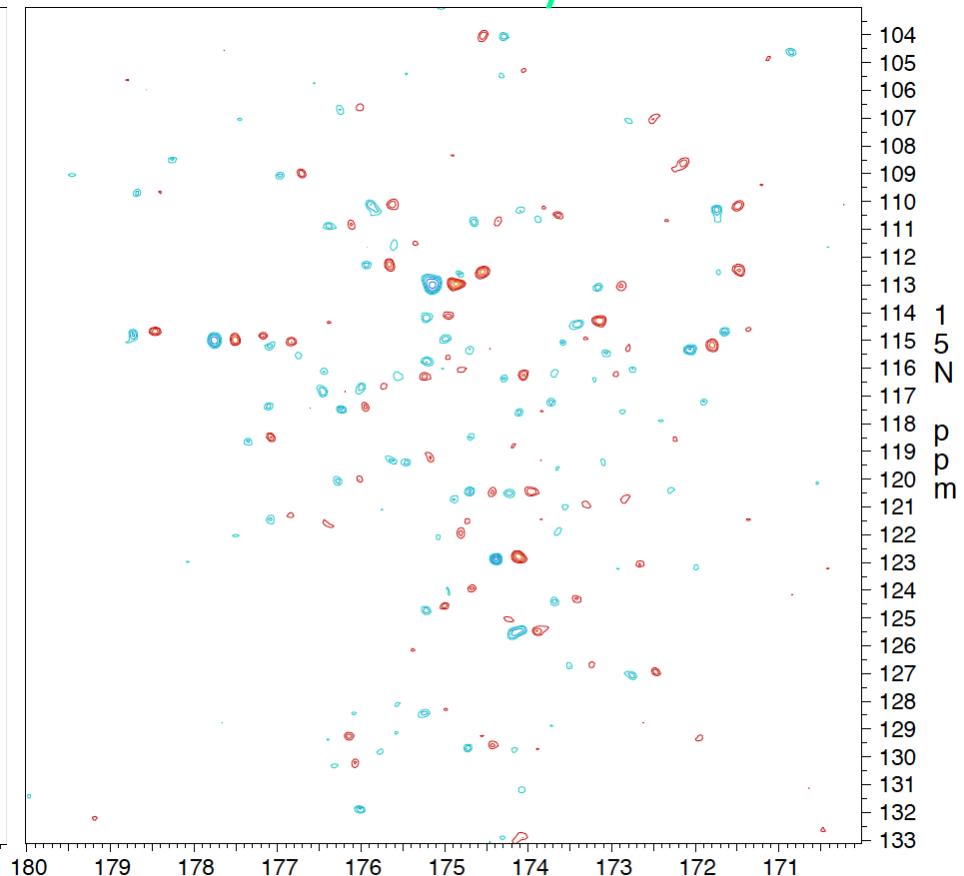
^{13}C の化学シフト値のスペクトル分布は、 ^1H よりも広いので、 ^{13}C の線幅は ^1H の線幅の 1/3 になったかのように見える。



^{13}C -検出 FID の IPAP-process

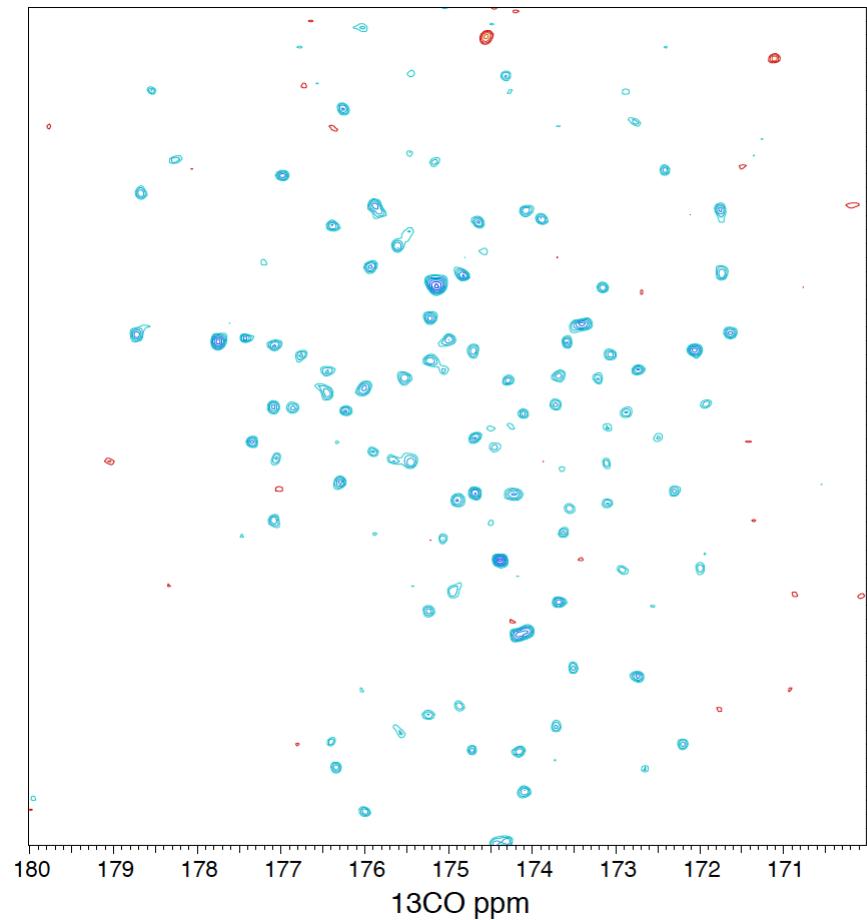


in-phase

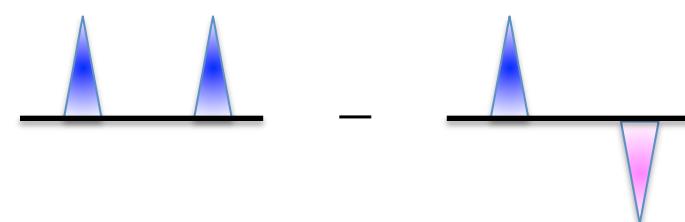
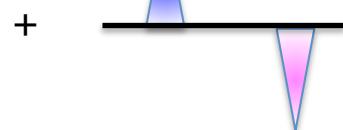
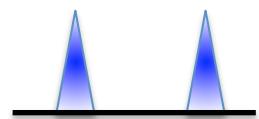
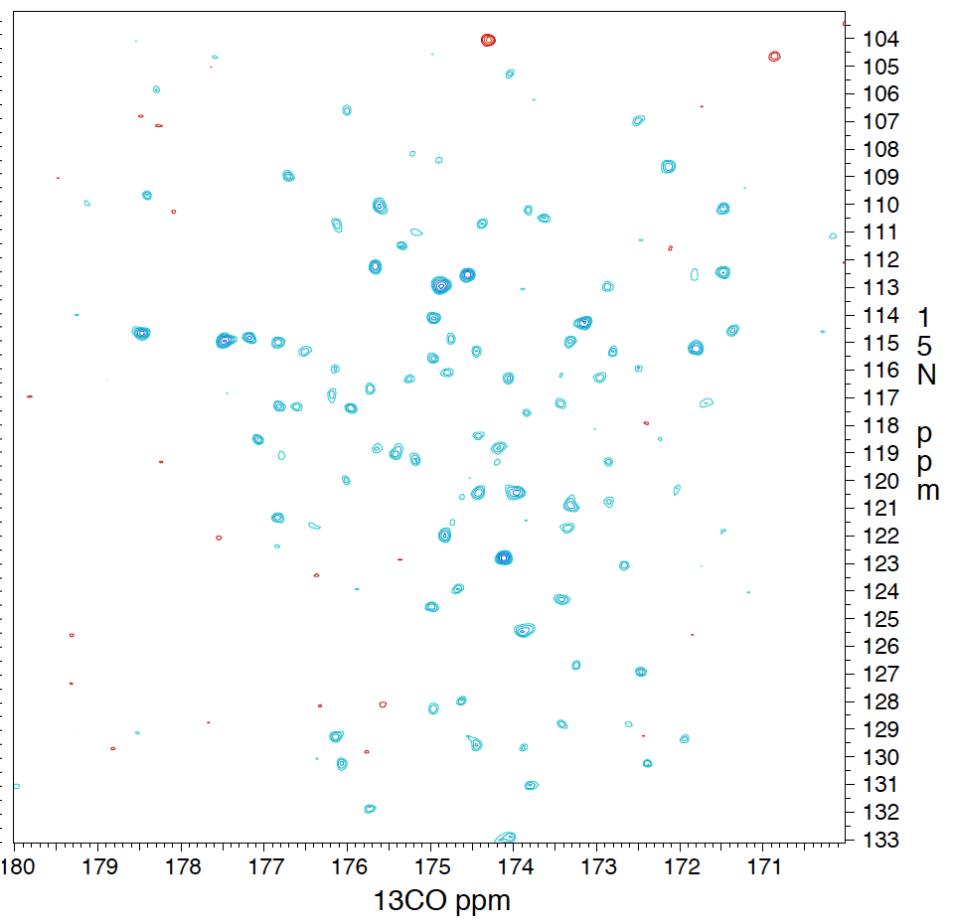


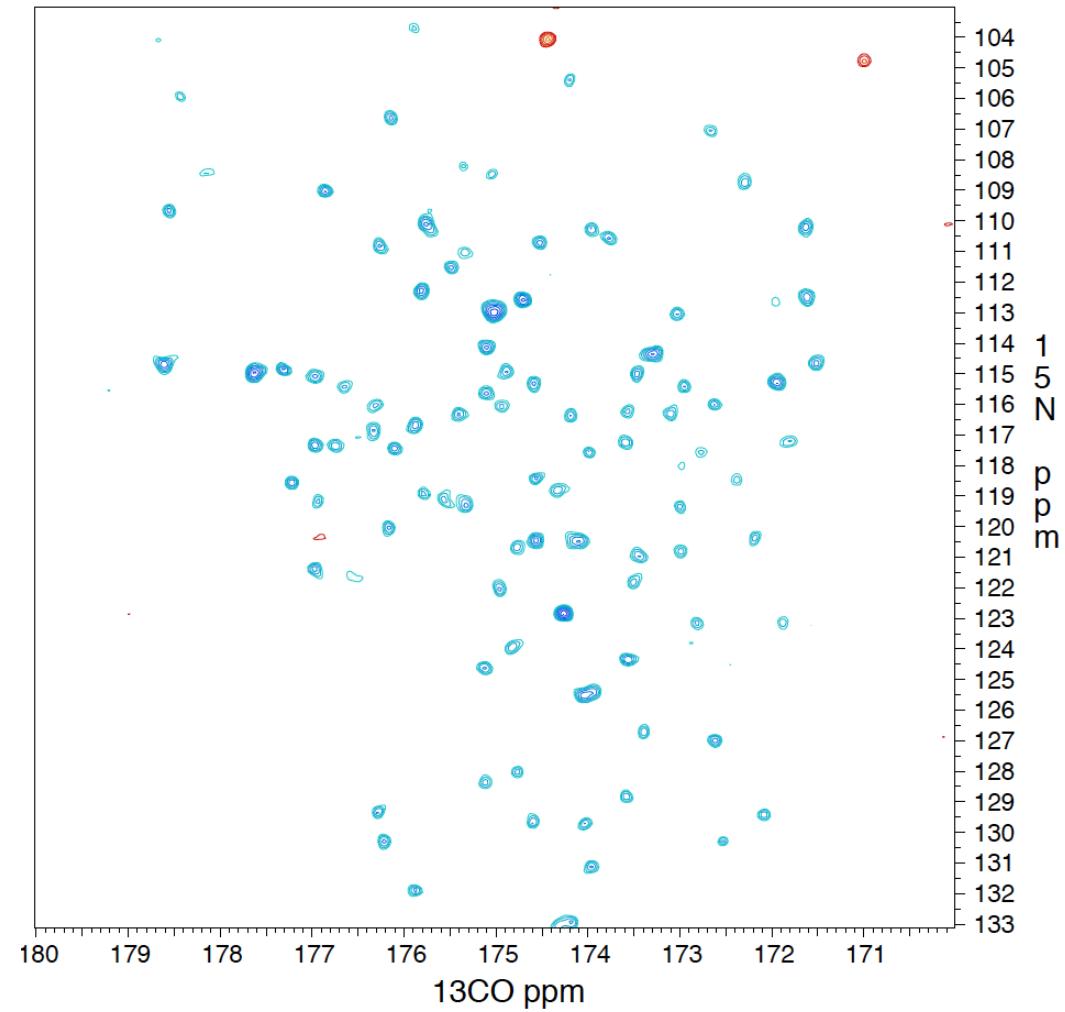
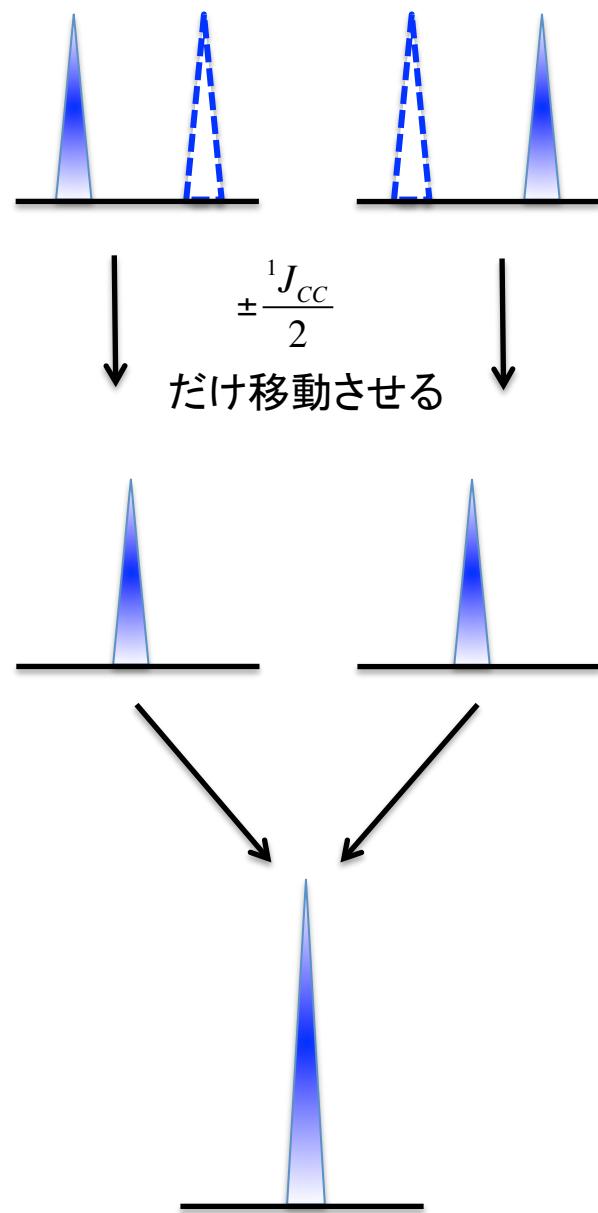
anti-phase

in-phase + anti-phase

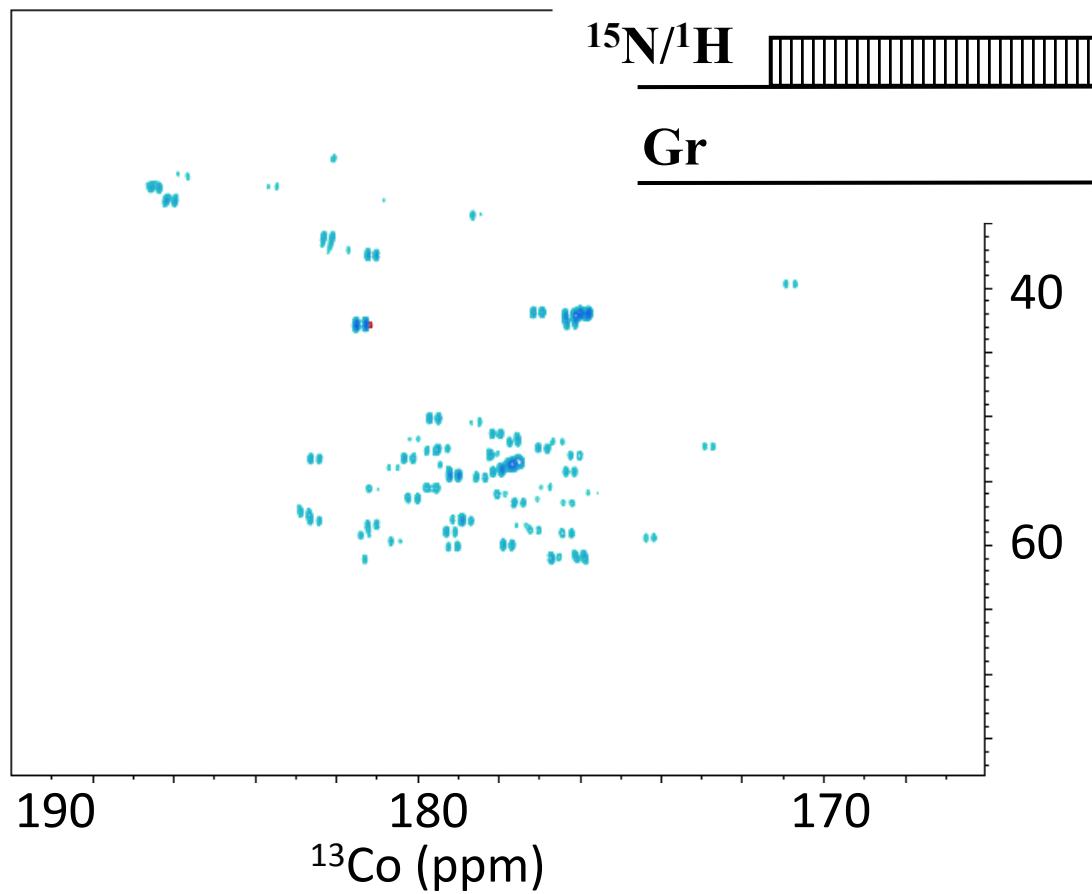


in-phase - anti-phase

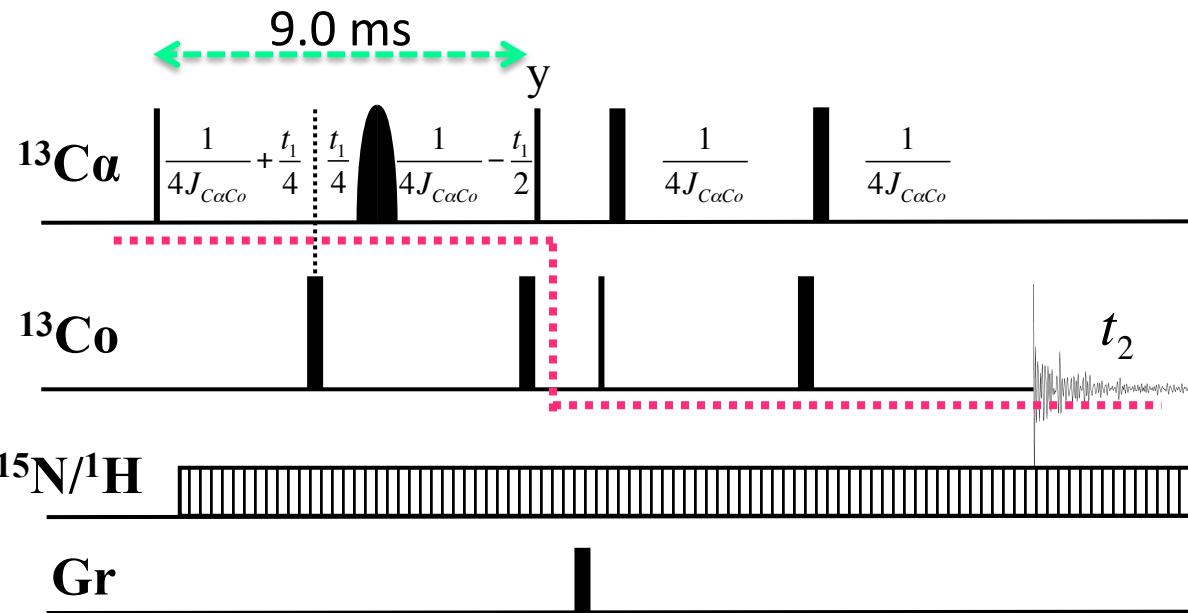




SQ-CT CACO



9.0 ms



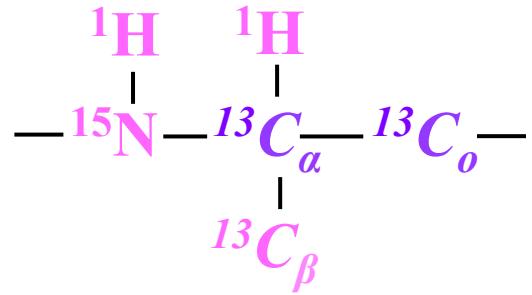
^{13}Ca (ppm)

40

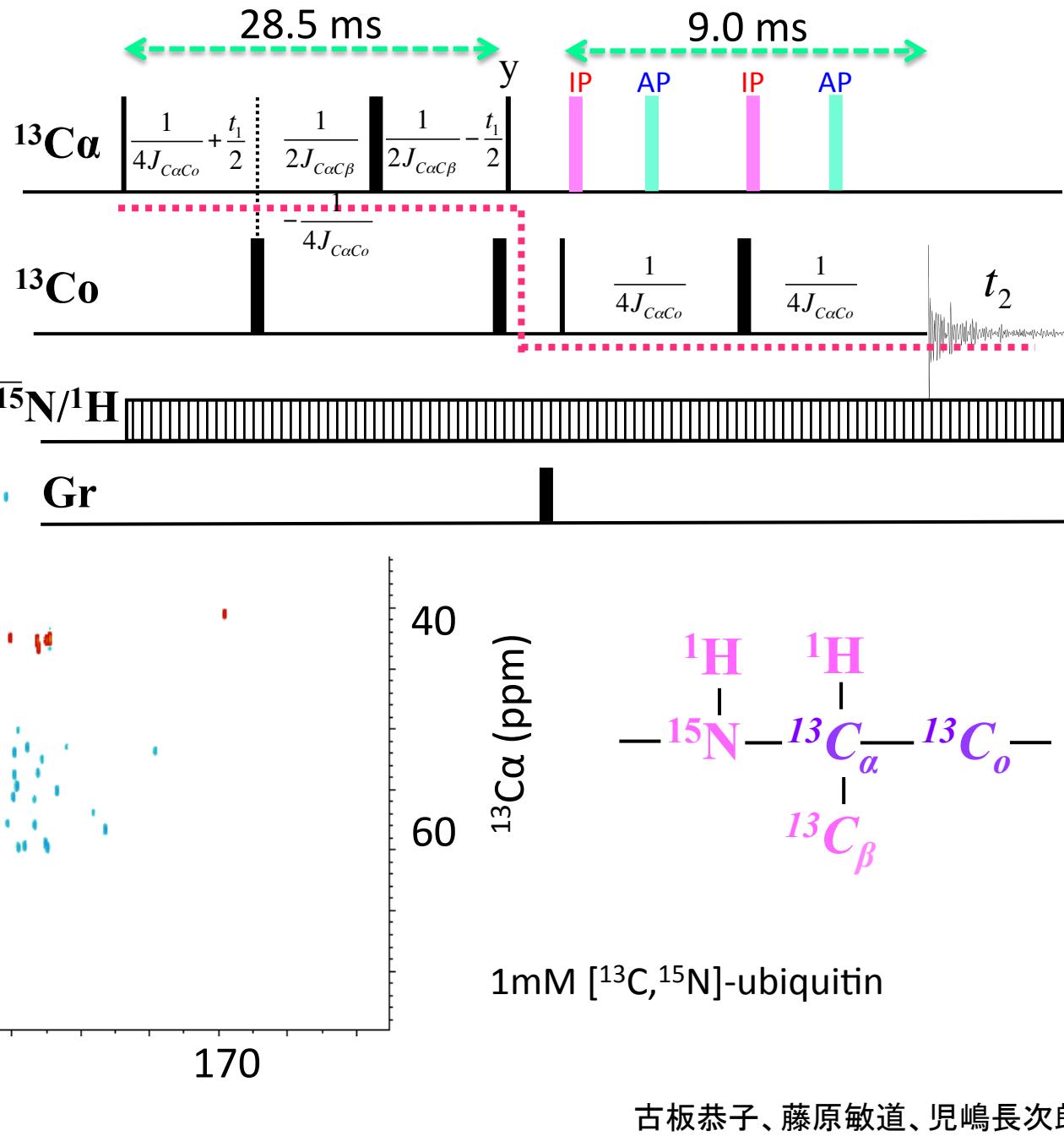
60

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

古板恭子、藤原敏道、児嶋長次郎

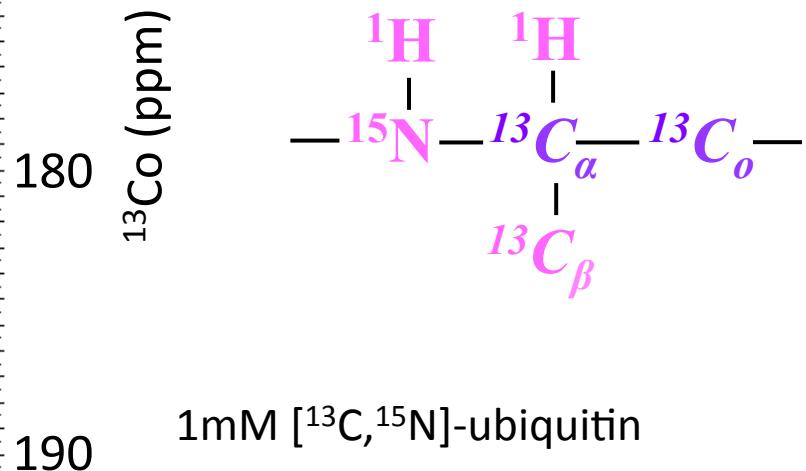
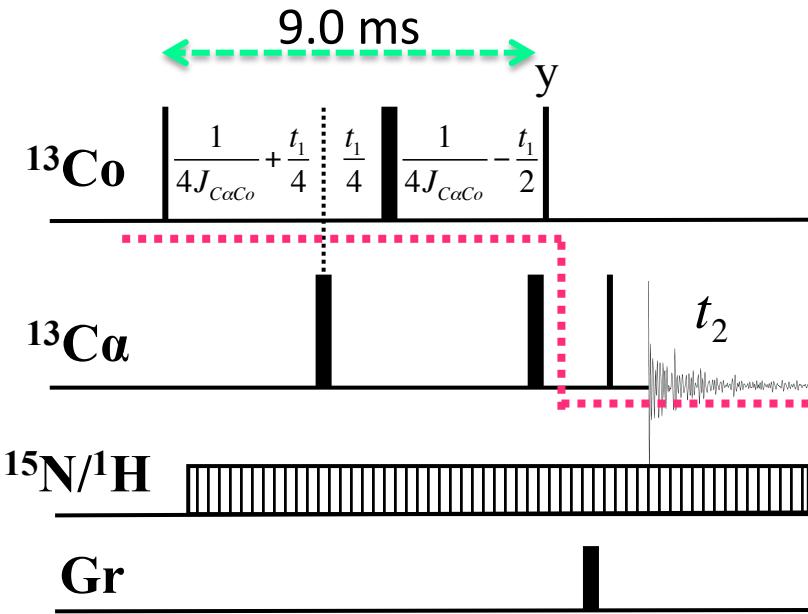
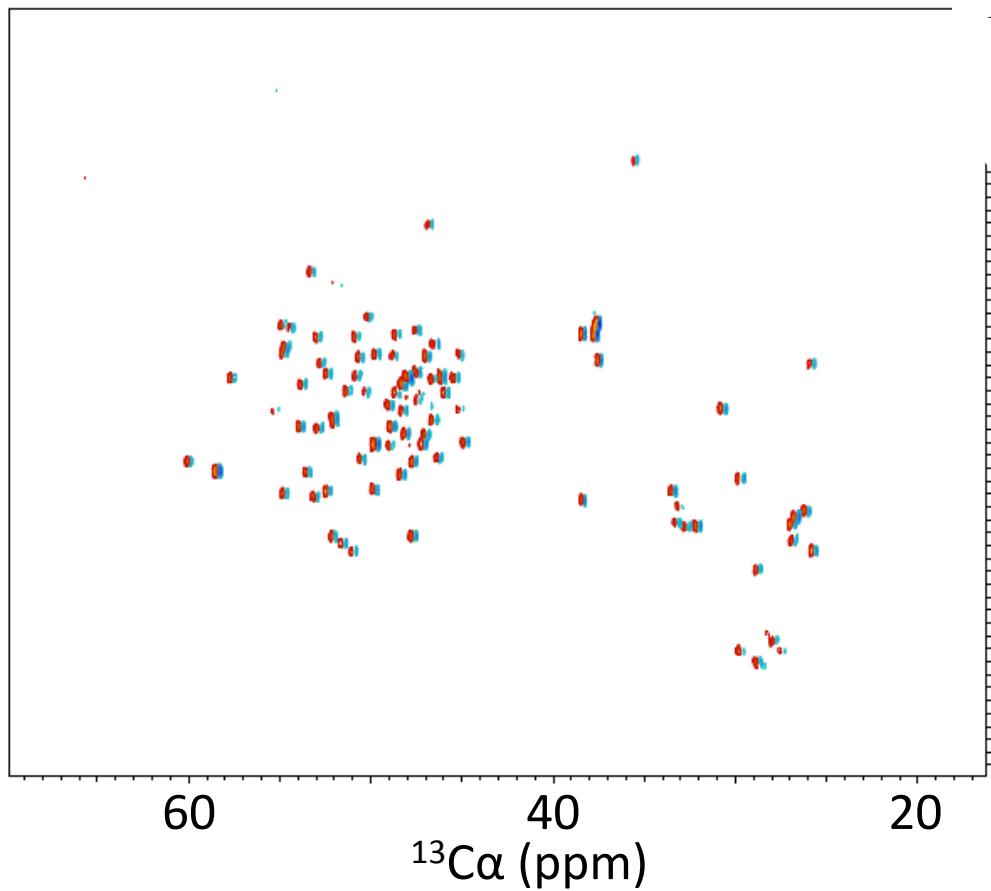


SQ-CT(β) CACO with IPAP



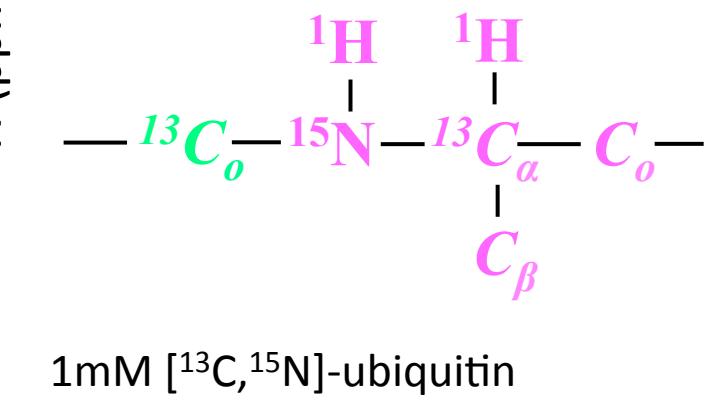
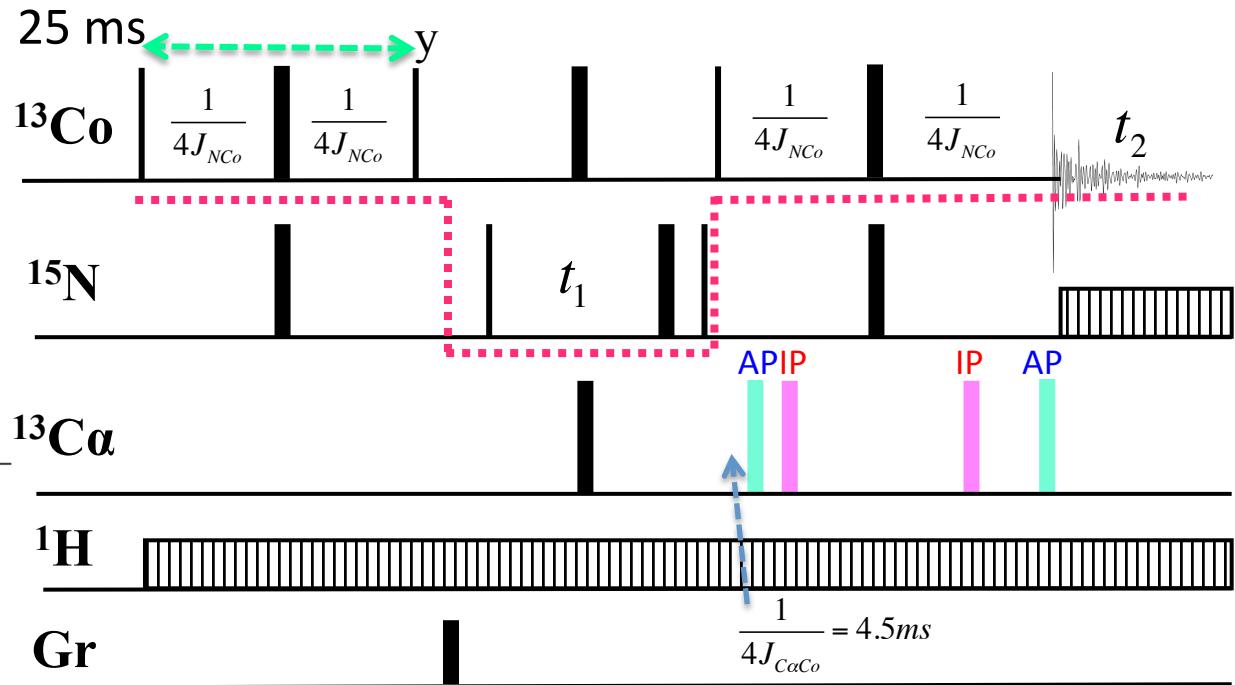
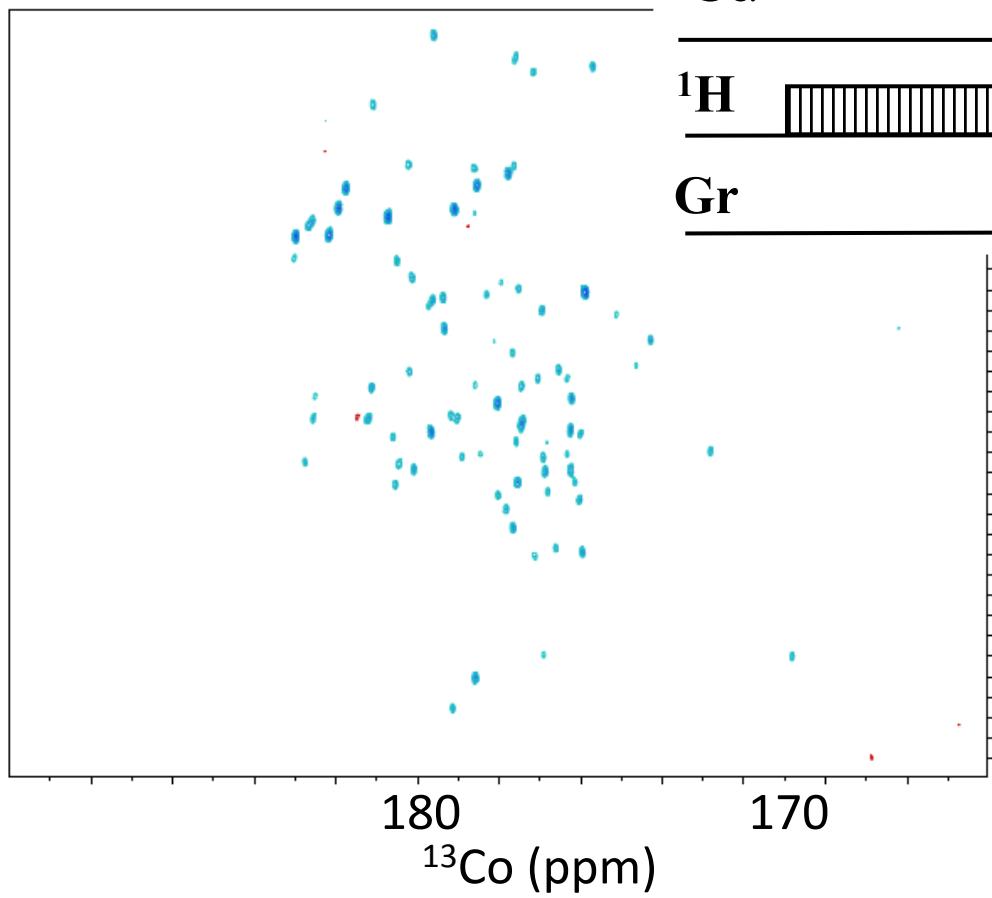
SQ-CT COCA

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



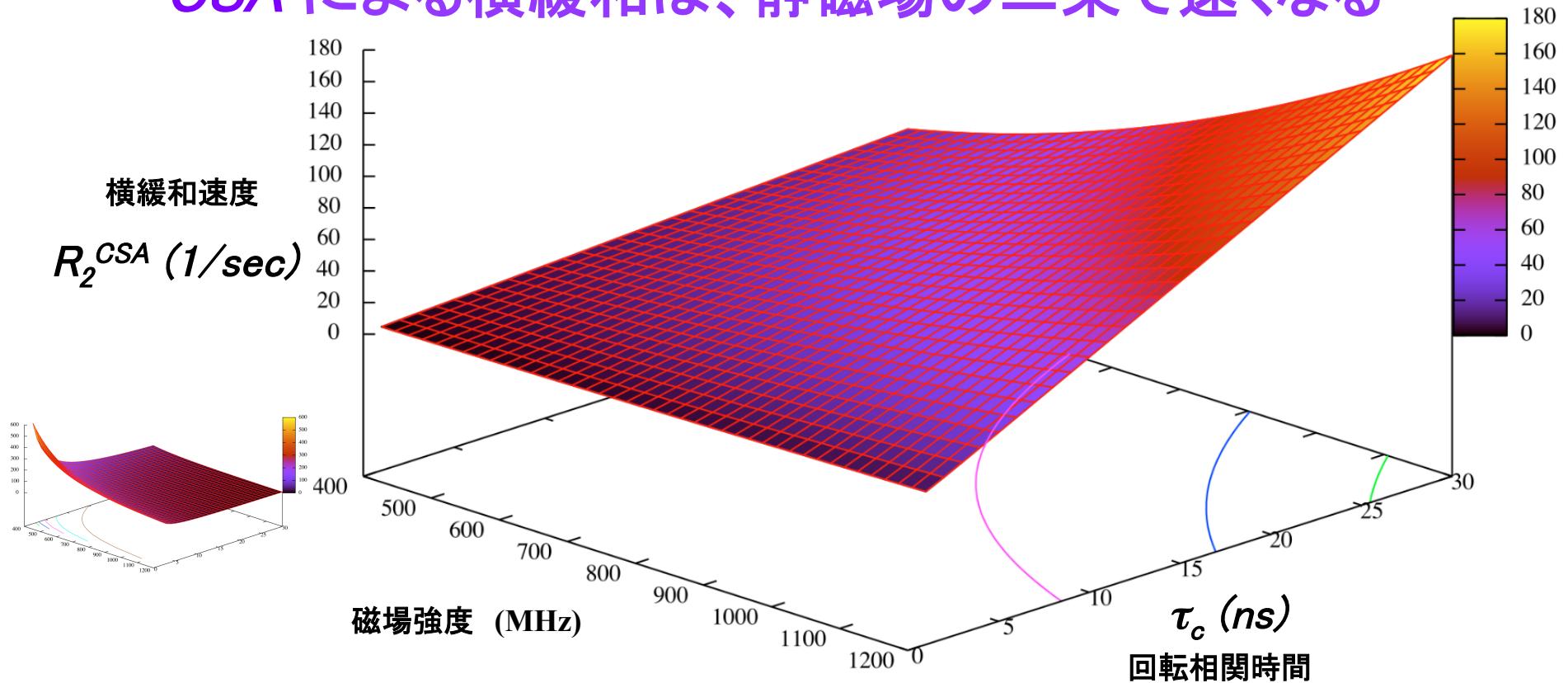
古板恭子、藤原敏道、児嶋長次郎

SQ CON with IPAP



古板恭子、藤原敏道、児嶋長次郎

CSA による横緩和は、静磁場の二乗で速くなる



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

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

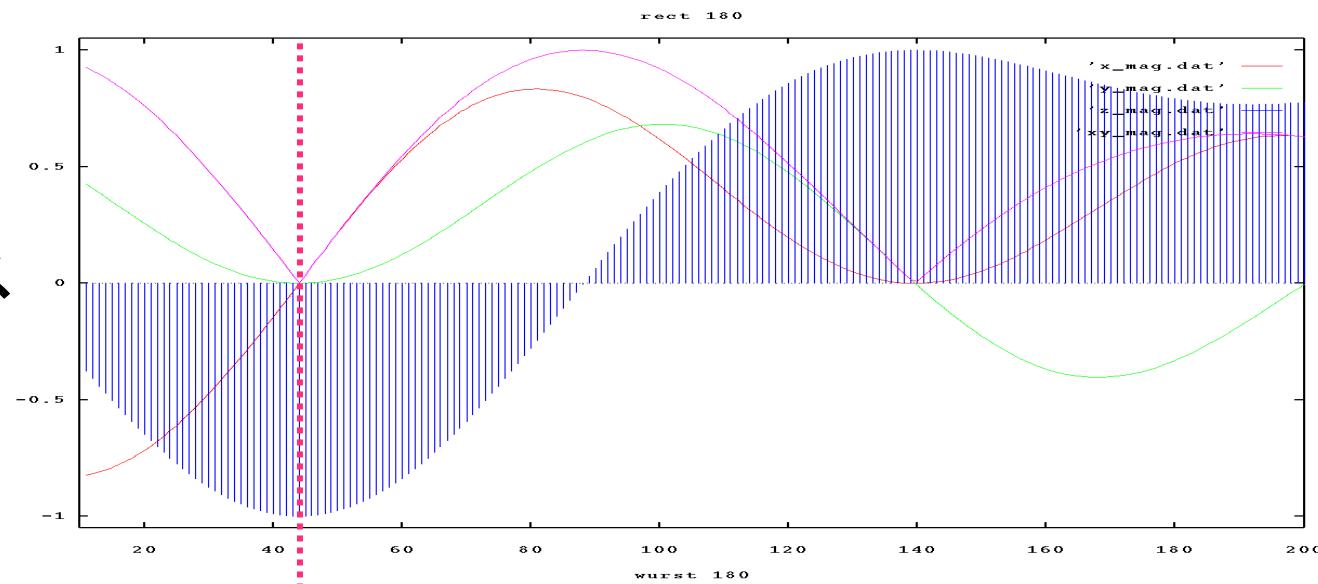
^{13}Co 化学シフトの異方性のみ考慮

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

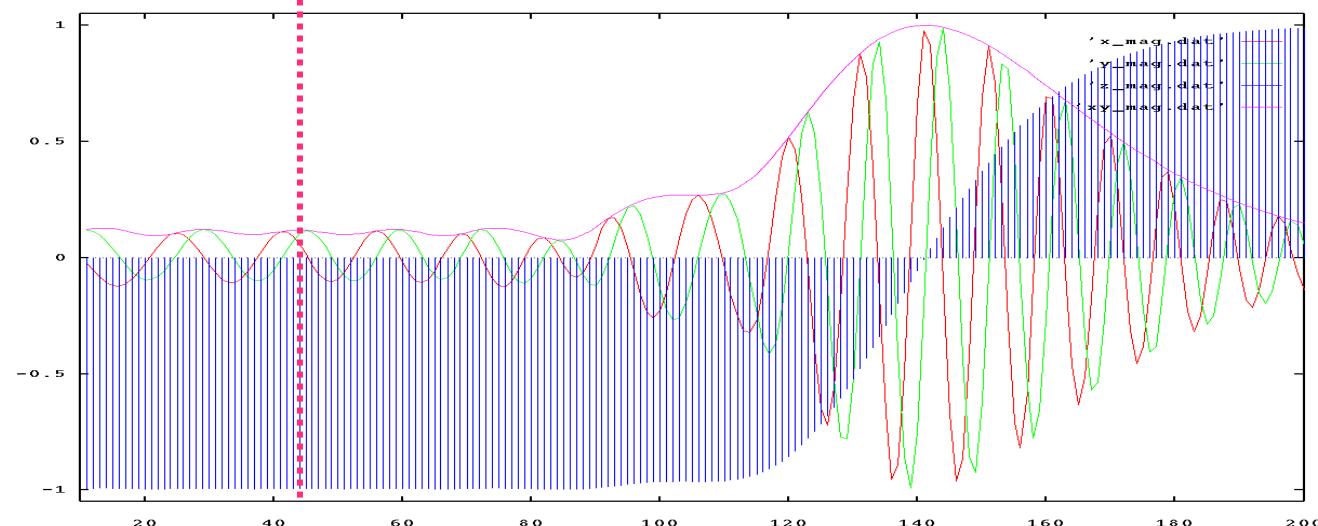
Trozy 効果、方向情報など
positive な面を逆に利用する。

反転 π パルスの励起分布

矩形波パルス
 $36 \mu\text{s}$



Wurst-20
60kHz sweep
 $500 \mu\text{s}$



1GHz NMR

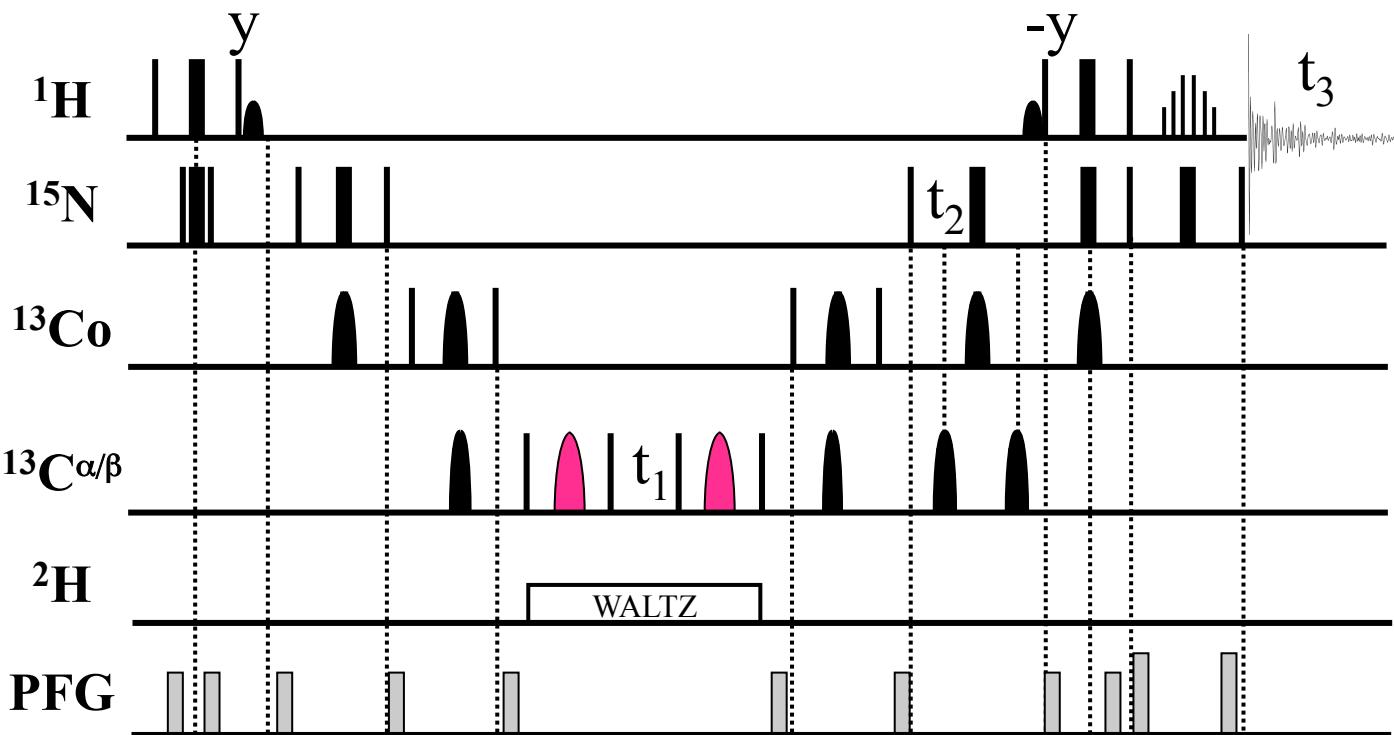
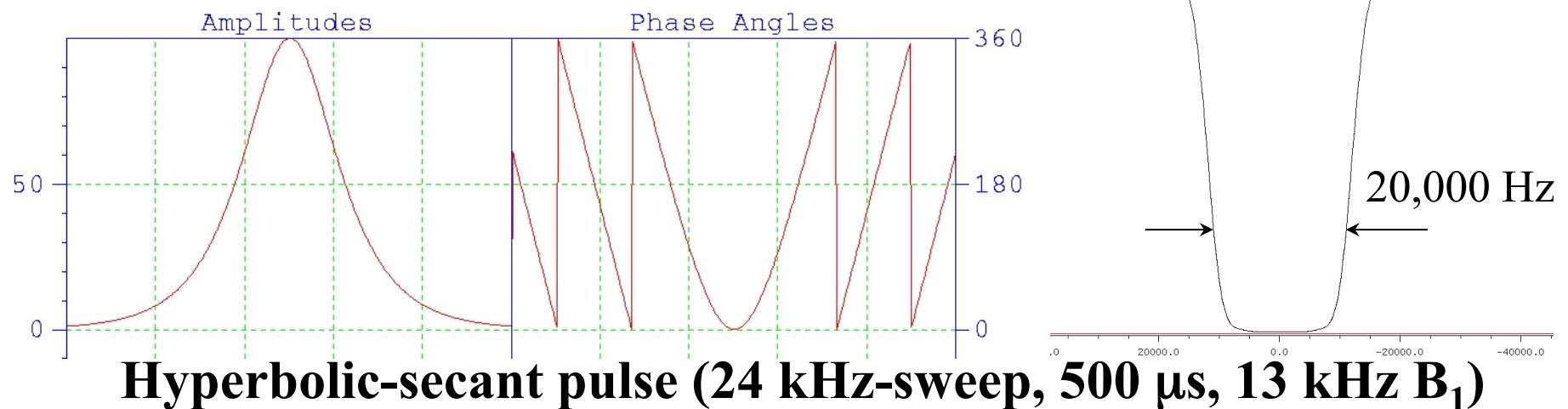
aliphatic

aromatic

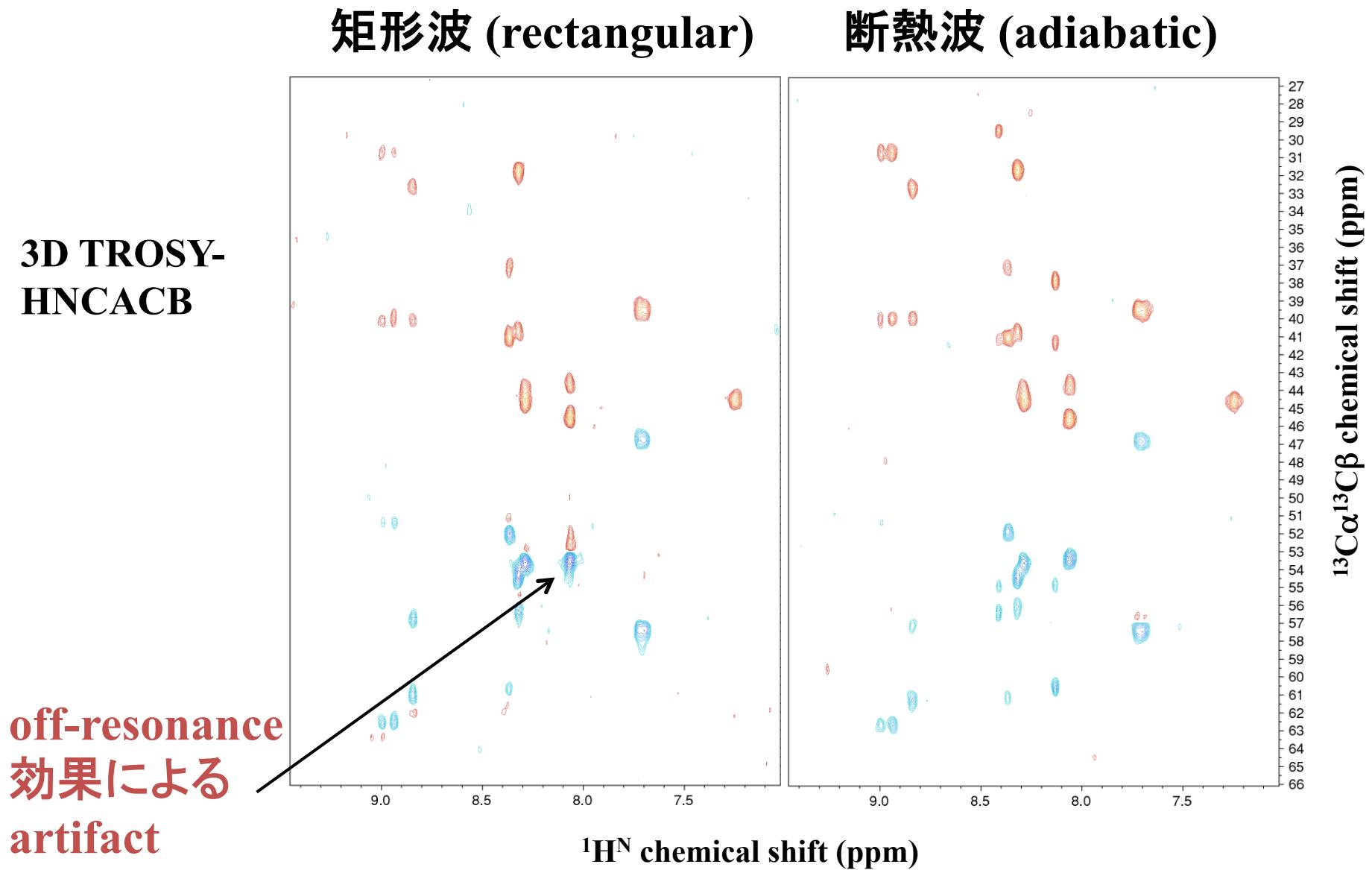
carbonyl

Adiabatic パルスを含んだ 3D TROSY-HN(CO)CACB

hsec24k500u



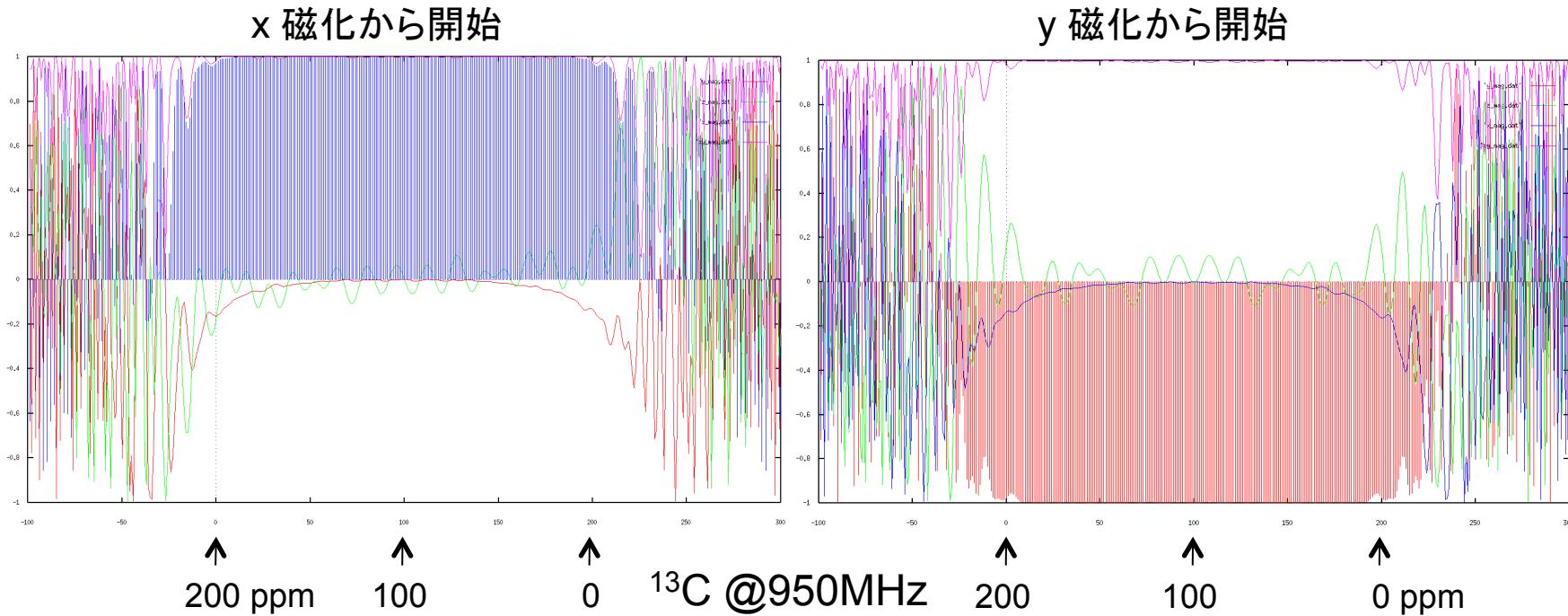
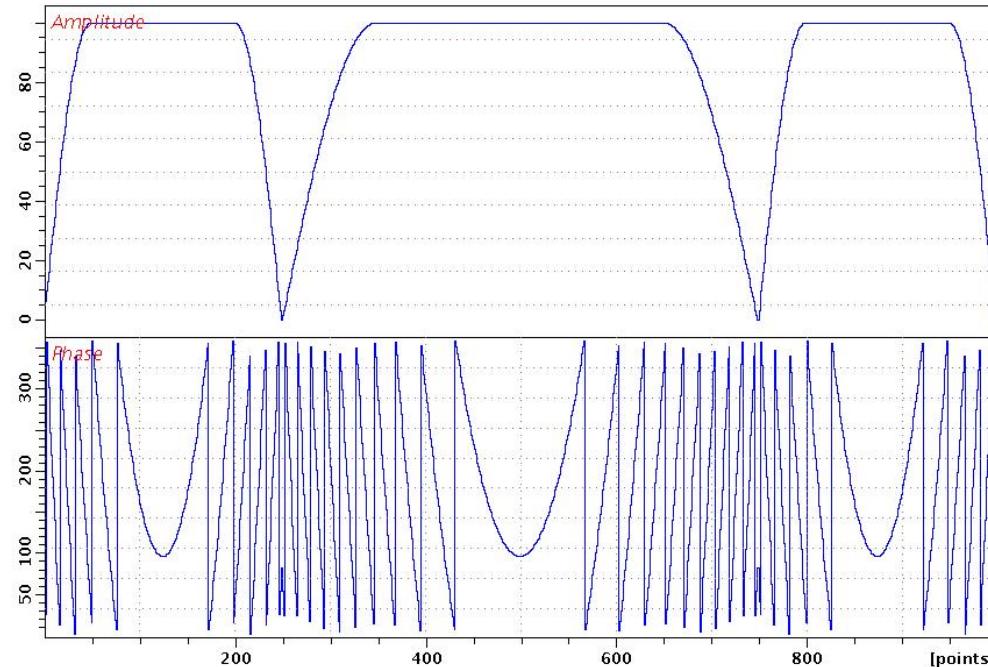
Adiabatic pulse の使用による off-resonance 効果の解消



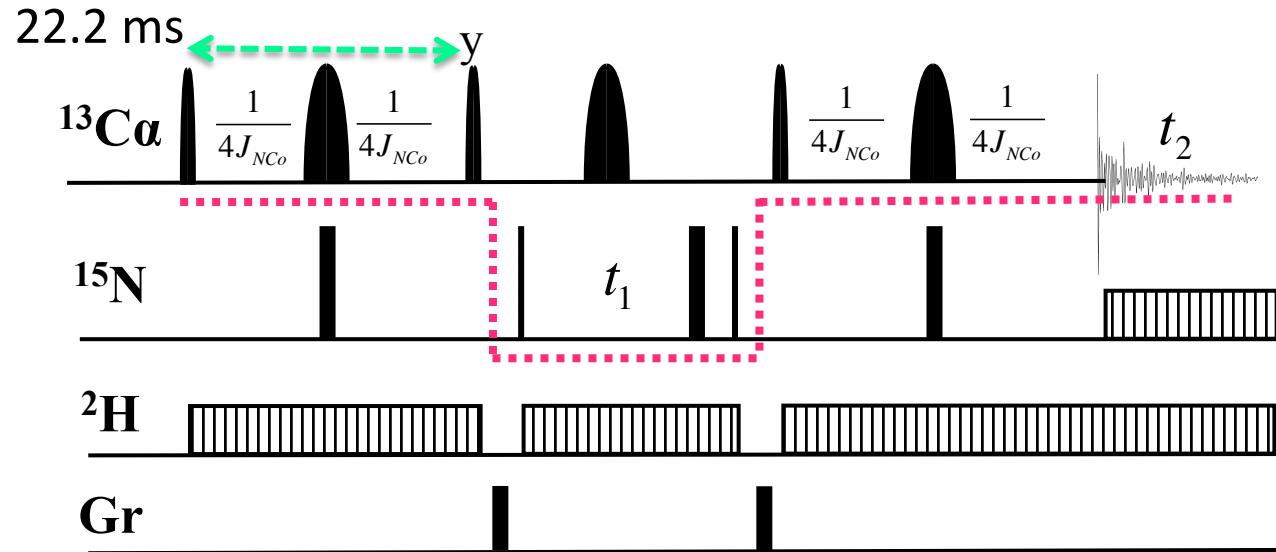
Smoothed chirp composite pulse

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)



2D SQ CAN

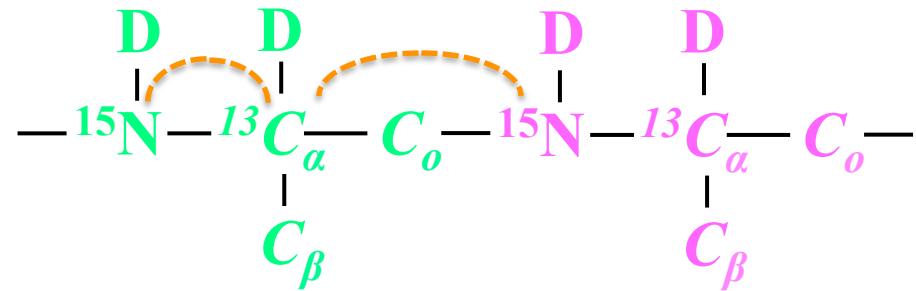


大腸菌培養のための M9-最少培地

[2- ^{13}C]-glycerol (or [1,3- ^{13}C]-glycerol)

$\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$

D_2O



アミド ^1H の存在しない Pro でも問題無し

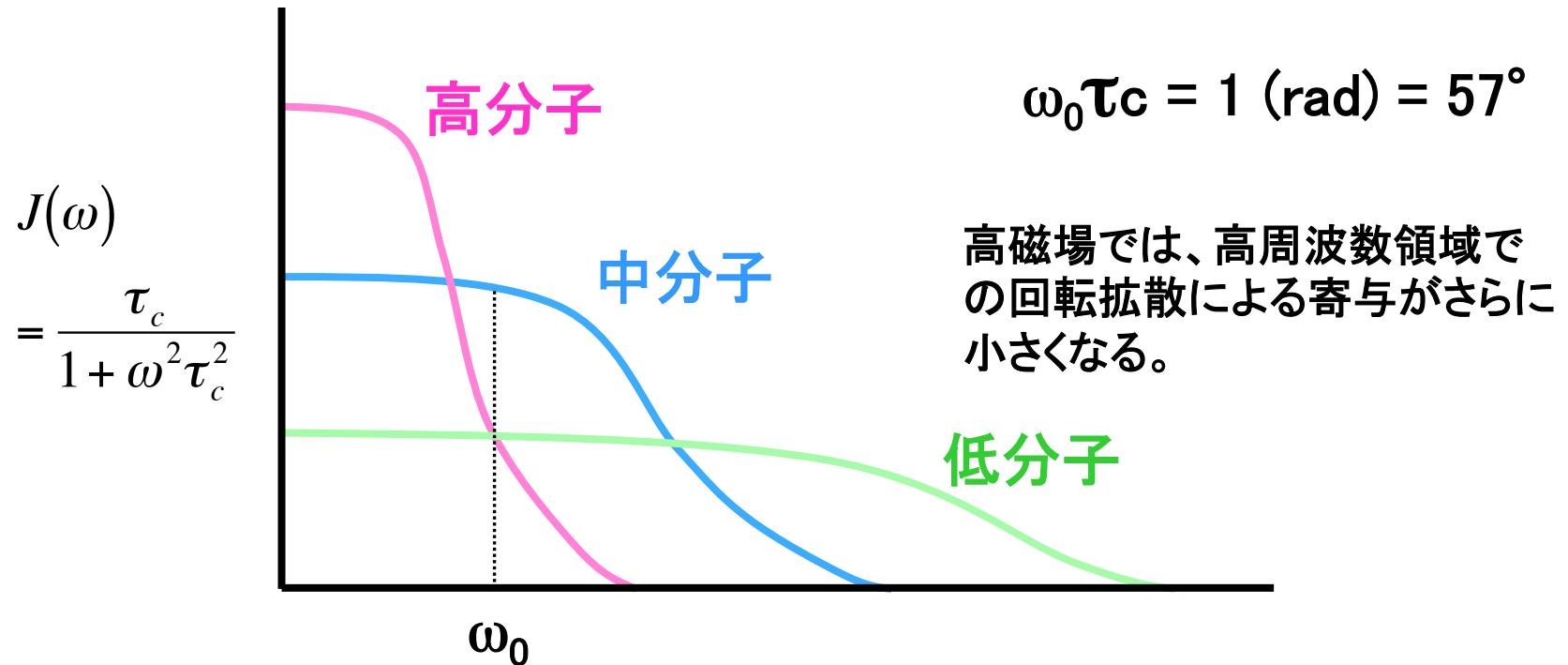
$^{13}\text{C}\alpha$ -FID での IPAP 不要

$^1J_{\text{C}\alpha\text{C}\beta}$ カップリングによる損失無し

$^{13}\text{C}\alpha$ の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

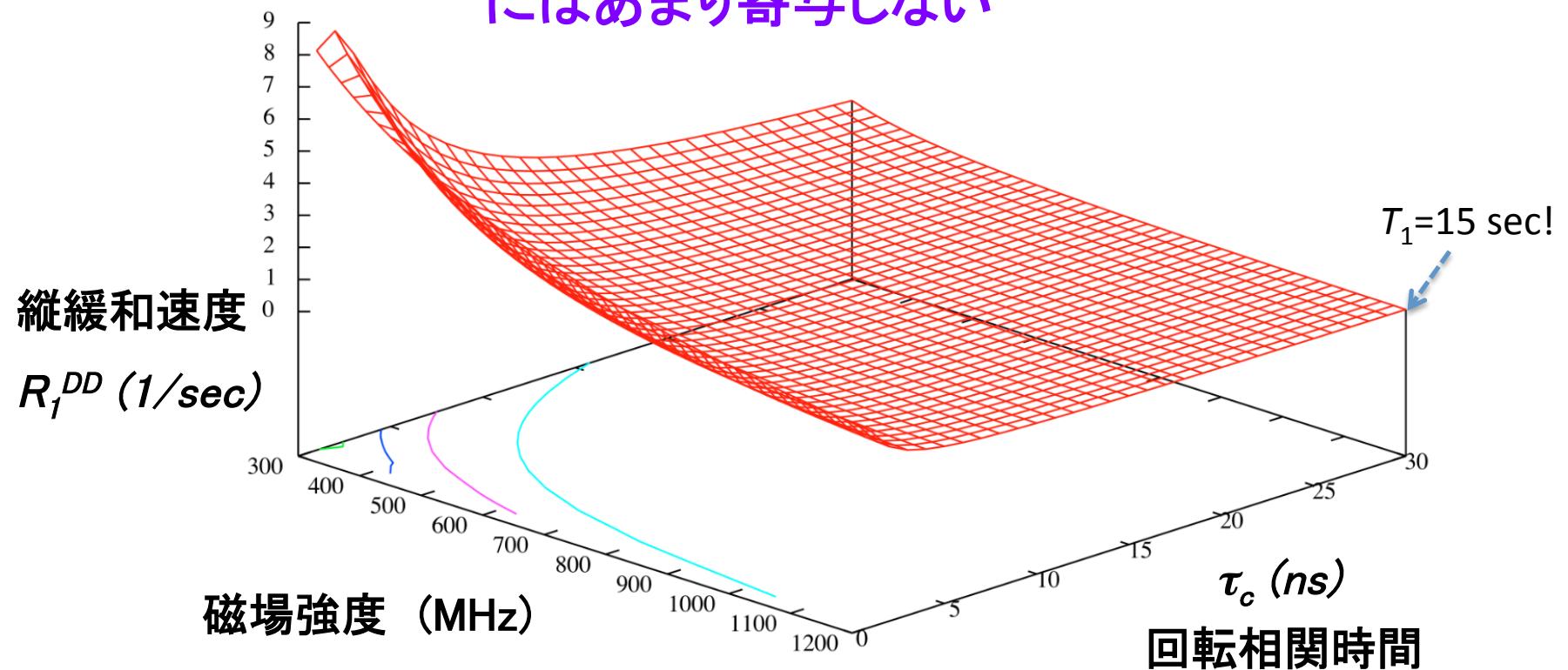
低分子と高分子では ω_0 で回転している分子数が少ない

||

T_1 が遅い

注: 同種核の dd 緩和

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



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

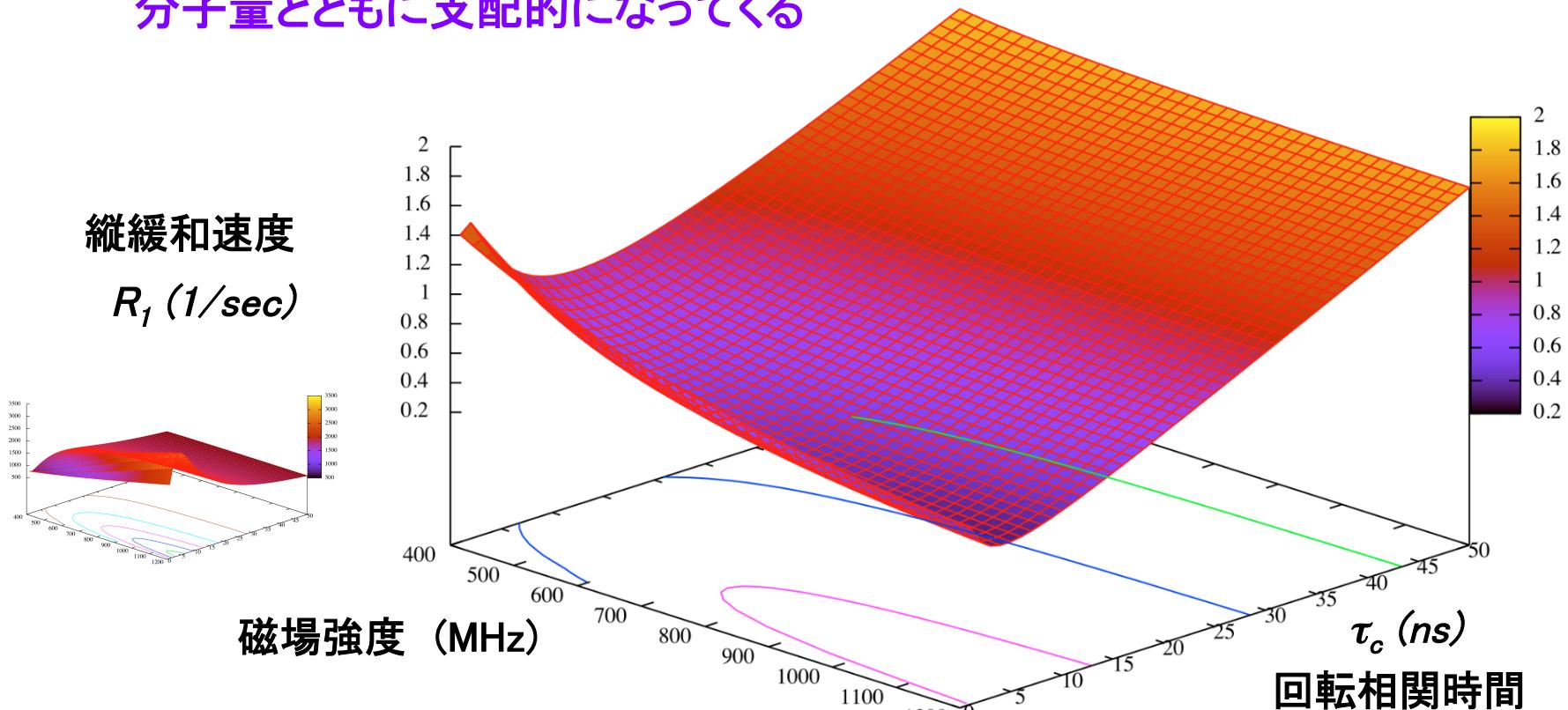
$$J(\omega) = \frac{2}{5} \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2}$$

$I(^{13}\text{Ca})$ 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。

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

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



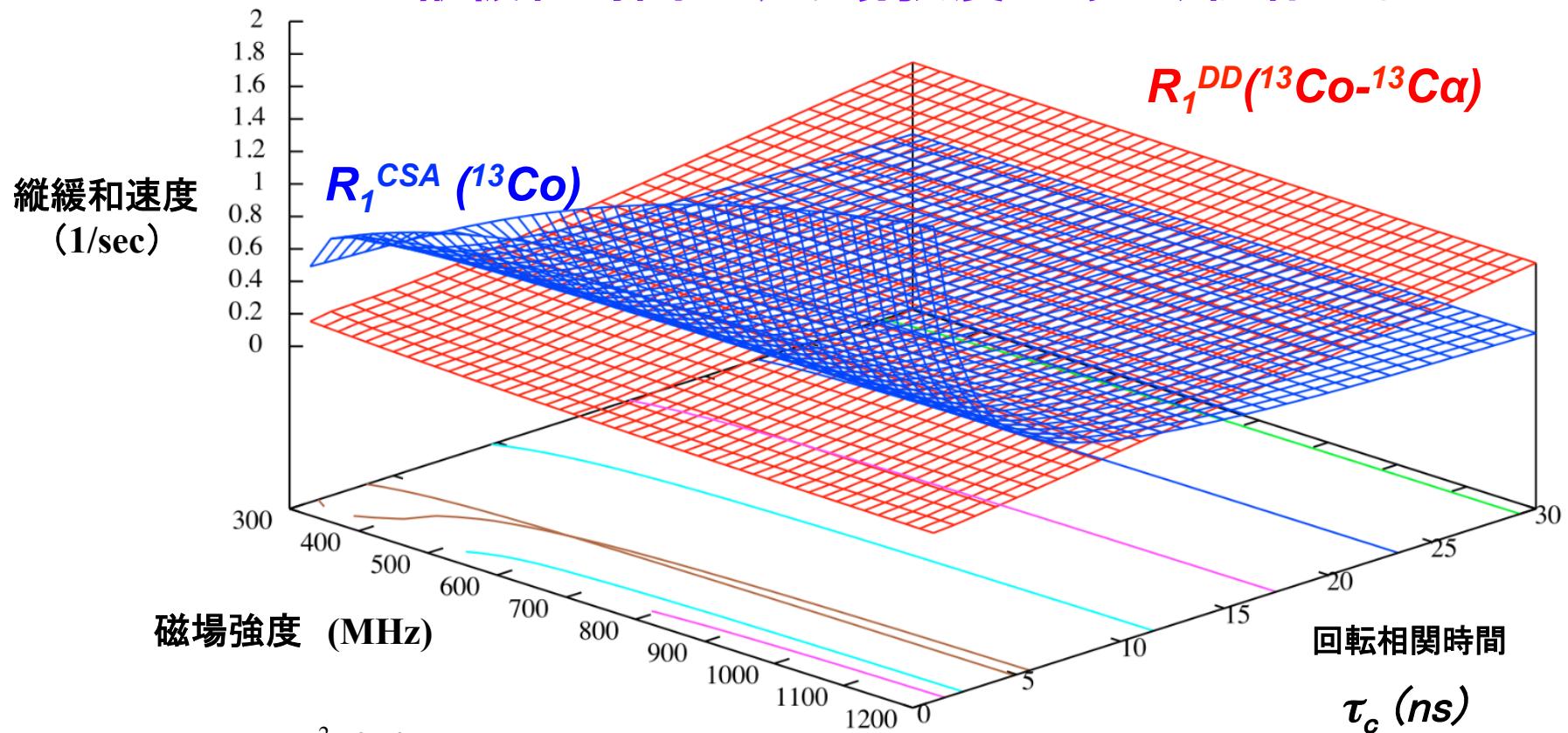
$$\rho_1^{DD} = \frac{\hbar^2 \gamma_I^4}{4r^6} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \{ J(0) + 3J(\omega_I) + 6J(2\omega_I) \}$$

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

重水素化された ^{13}Ca を観測
交差緩和を無視

^{13}Co , $^{13}\text{C}\beta$ 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}Ca - $^1\text{H}\alpha$) は R_1 緩和の $1/4$ 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



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

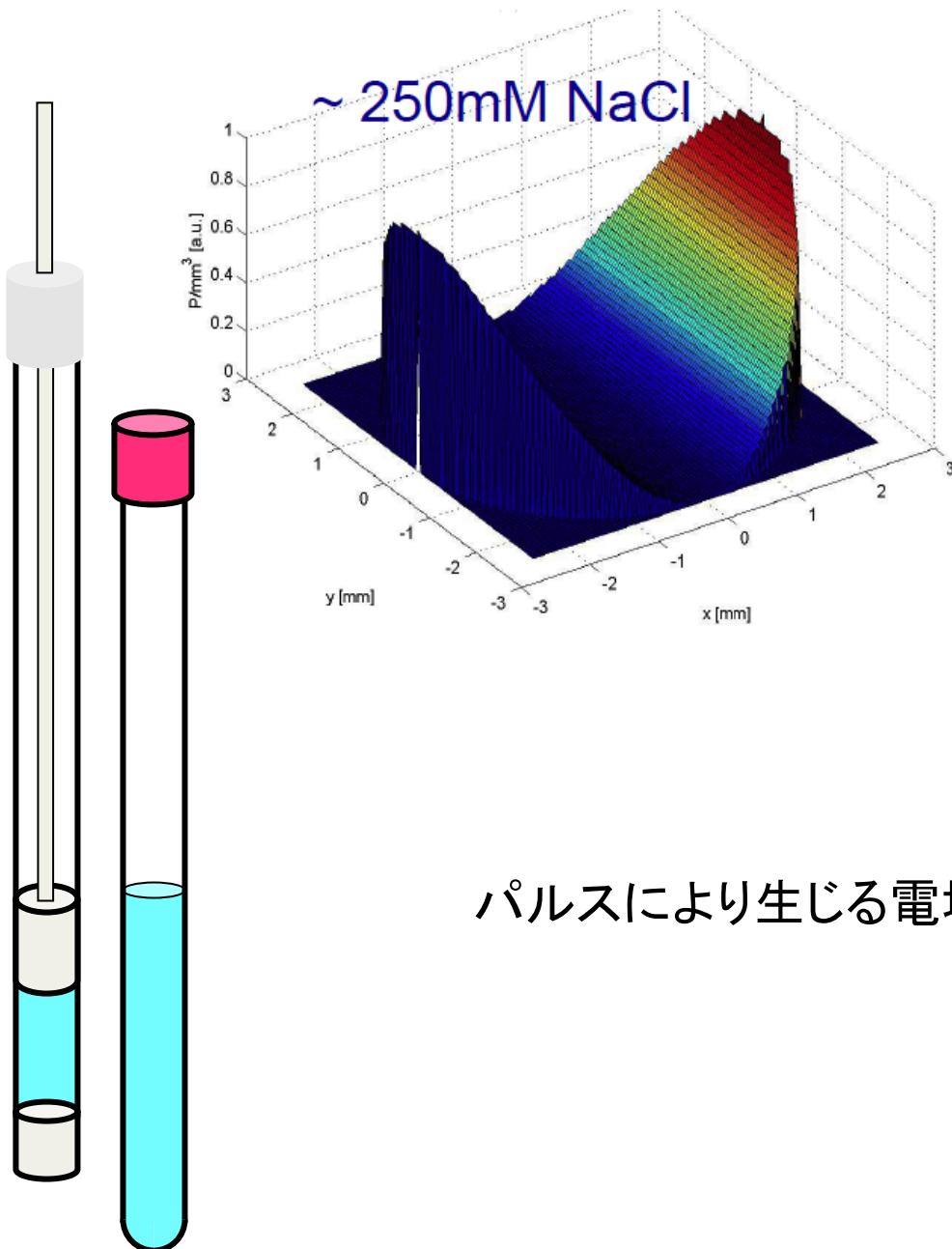
$$J(\omega) = \frac{2}{5} \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2}$$

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

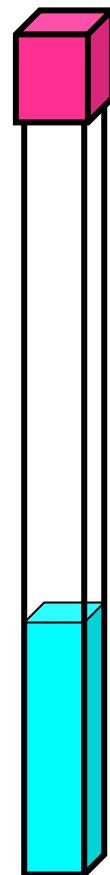
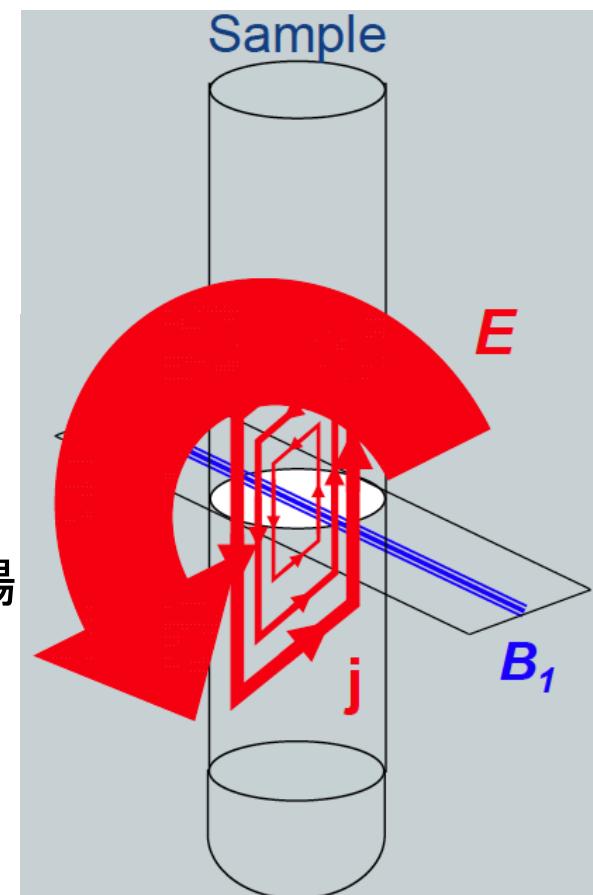
dd ($^{13}\text{Ca}-^{13}\text{Co}$) が分子量とともに効いてくる。

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

^{13}Ca を z に flip-back すると仮定

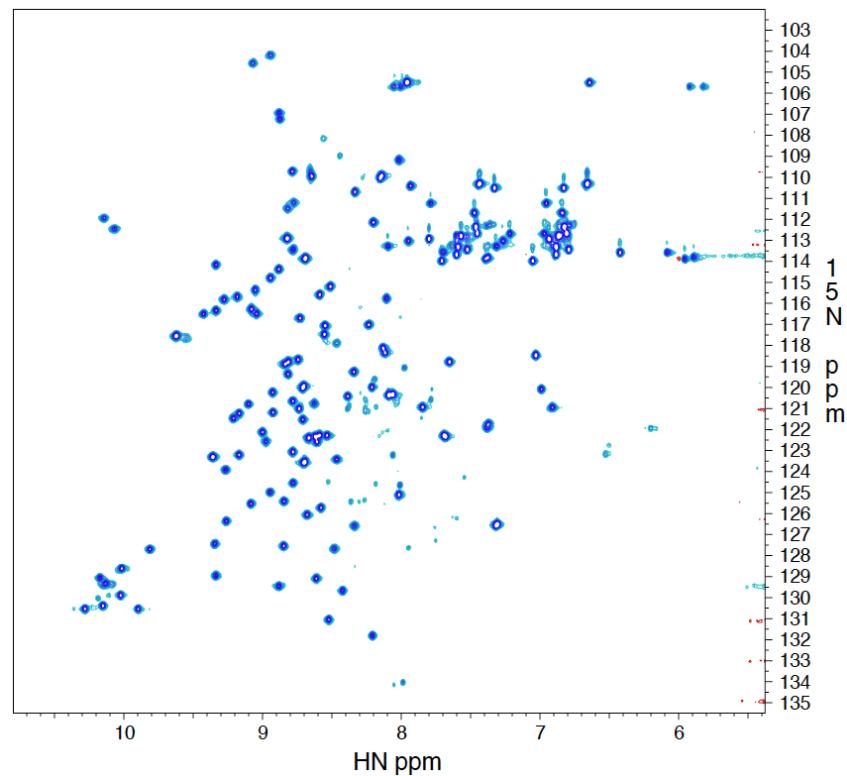


極低温プローブは
塩辛いのが嫌い

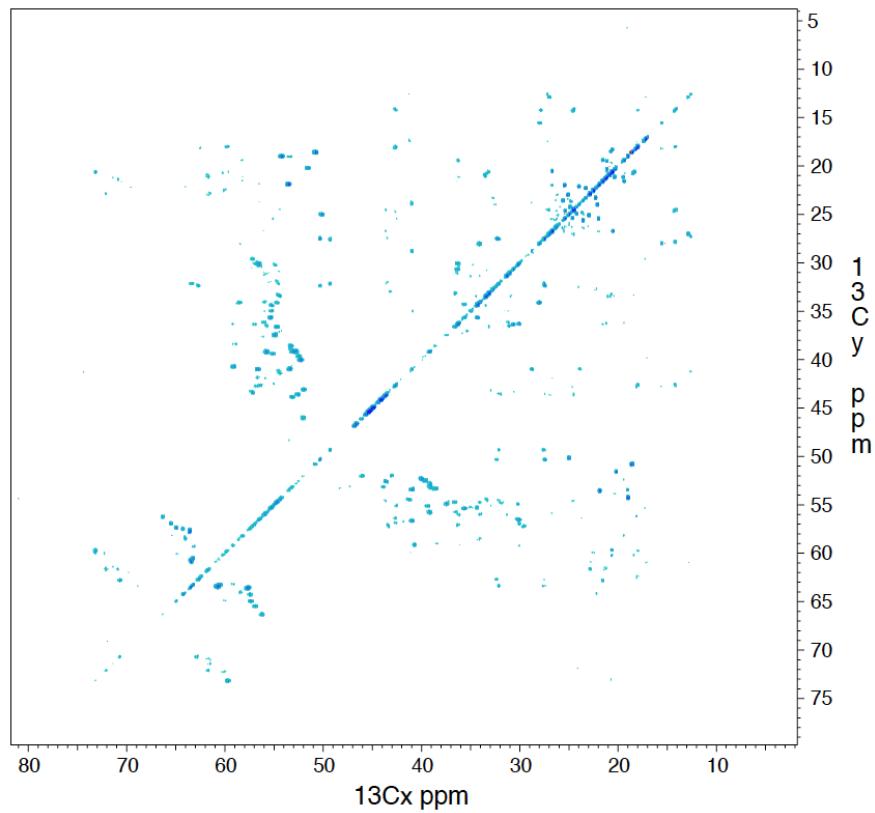


Data courtesy of Dr. Rainer Kümmerle, Bruker Biospin AG

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。

逆に ^{13}C -NMR の方が不利な点

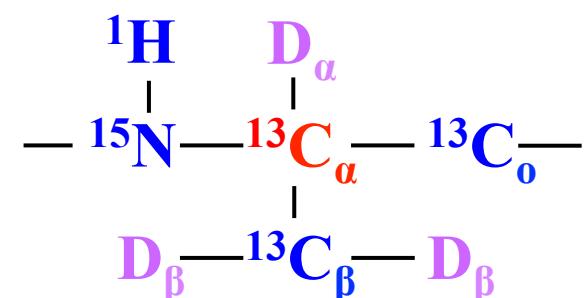
- $\gamma_{^{13}\text{C}}$ が小さいので、感度が小さい。
- FID の検出の際に、 $^1J_{^{13}\text{C}-^{13}\text{C}}$ を除く必要がある。
- T_1 緩和が長いので、interscan-delay を長く待つ必要がある。



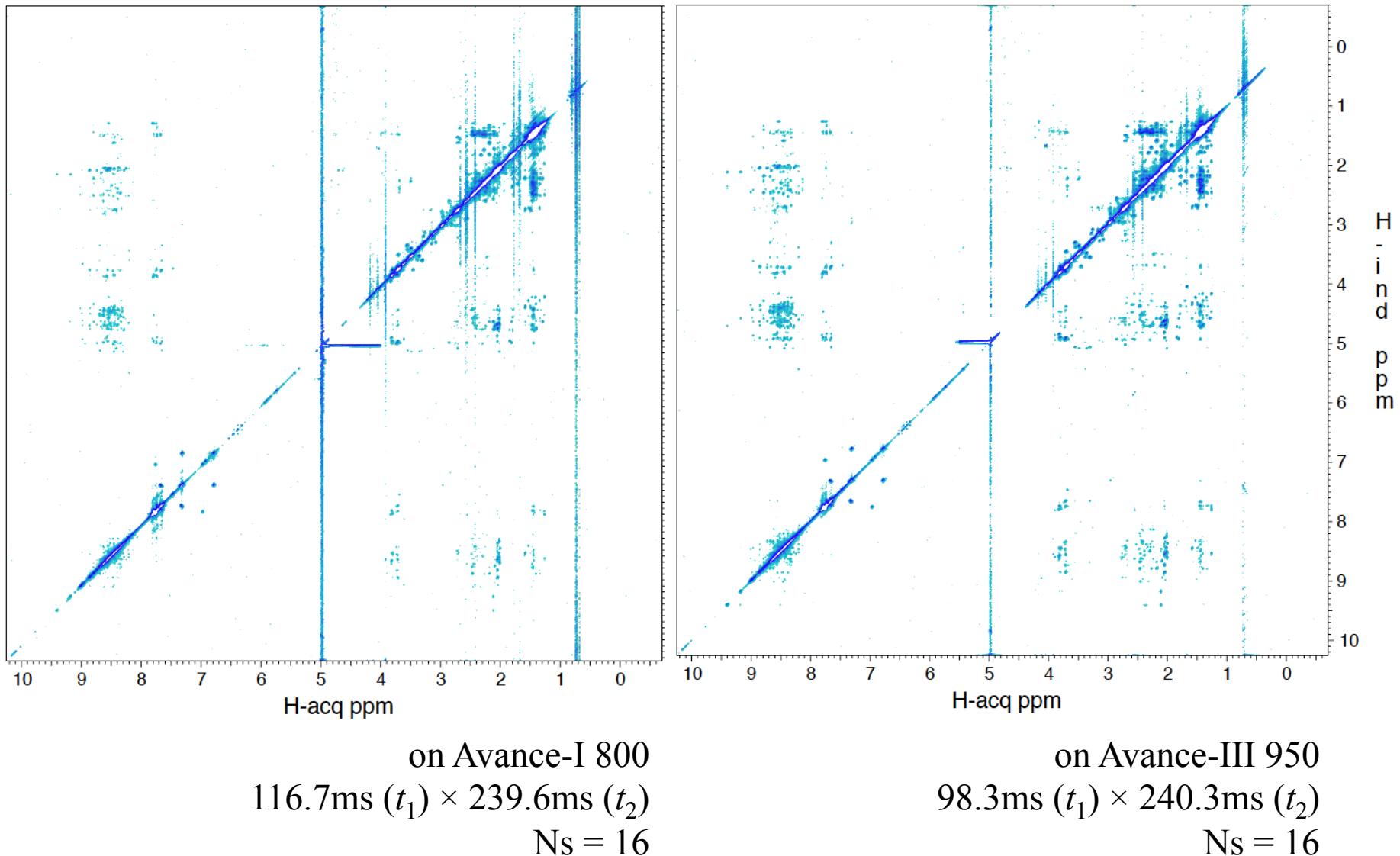
寒川作

^{13}C -NMR の将来

- 重水素化した高分子量の蛋白質を高磁場で ^{13}C -検出するのが適しているであろう(水素が ^2H 化されているので、 dd による T_2 緩和は遅く、線形が先鋭化される)。
- 現時点での感度を考慮すると、 $^1\text{H}^N$ から磁化移動を開始し、 ^{13}C で検出するのが妥協策か？(その方が interscan-delay も短くて済む？)

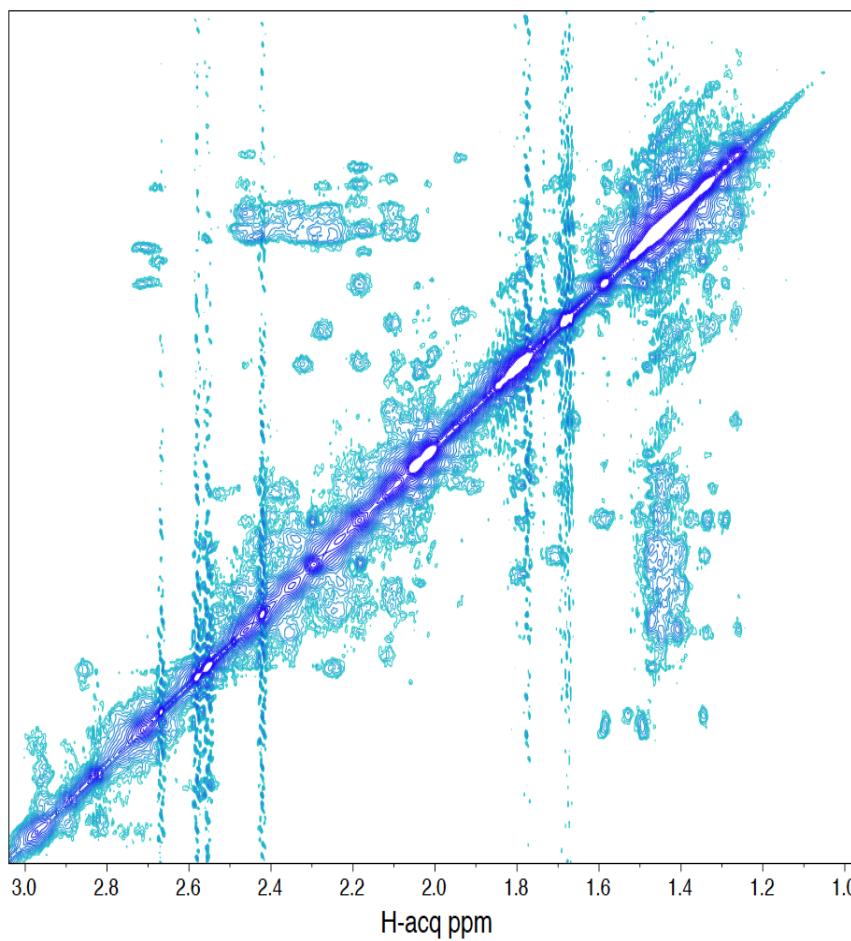


2D NOESY watergate (a mixing time of 100ms)

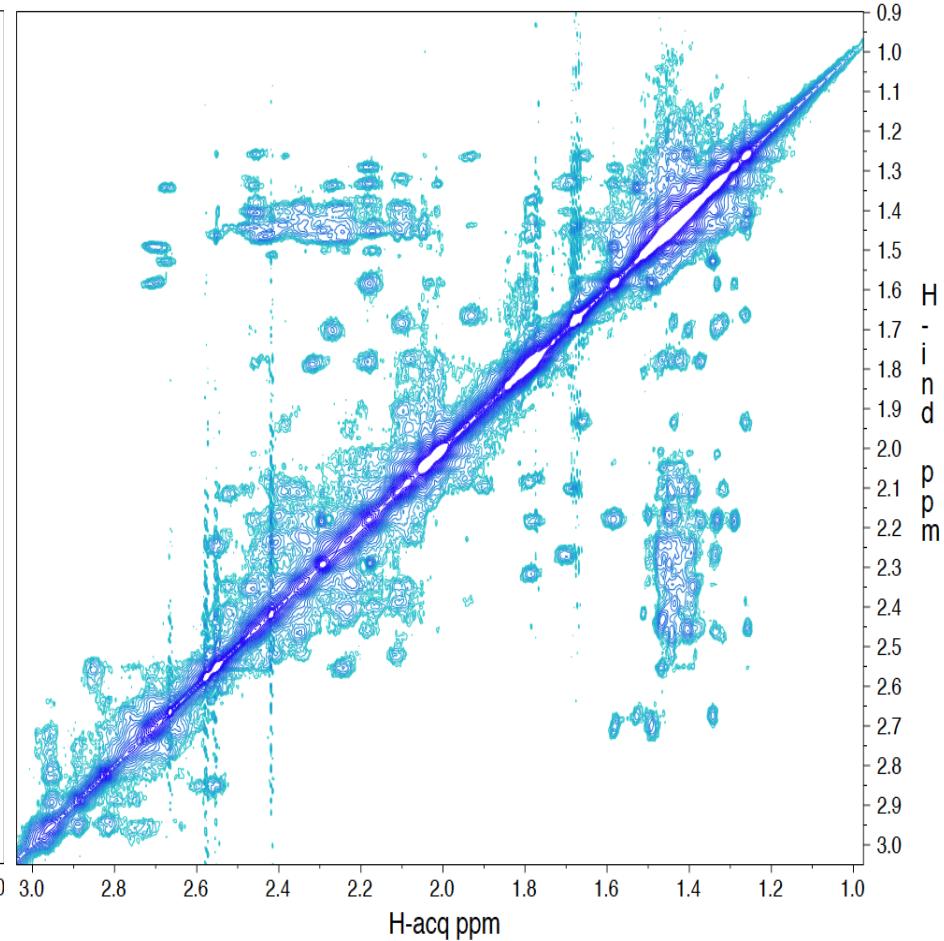


A 0.1mM synthesized membrane protein (75 a.a.) in 60% HFIP-*d*2 and 40% H₂O at 298K

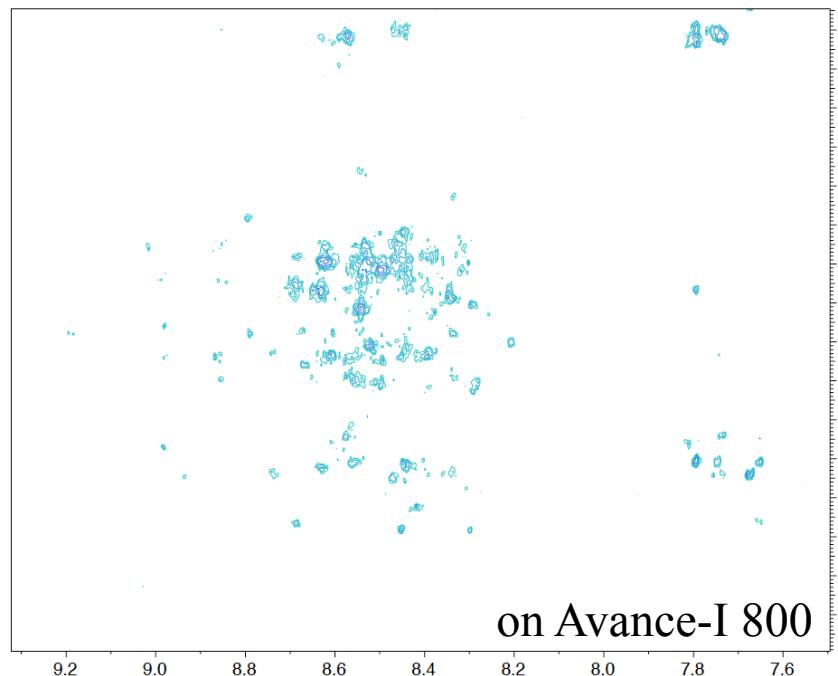
Comparison of particular regions in the 2D NOESY spectra



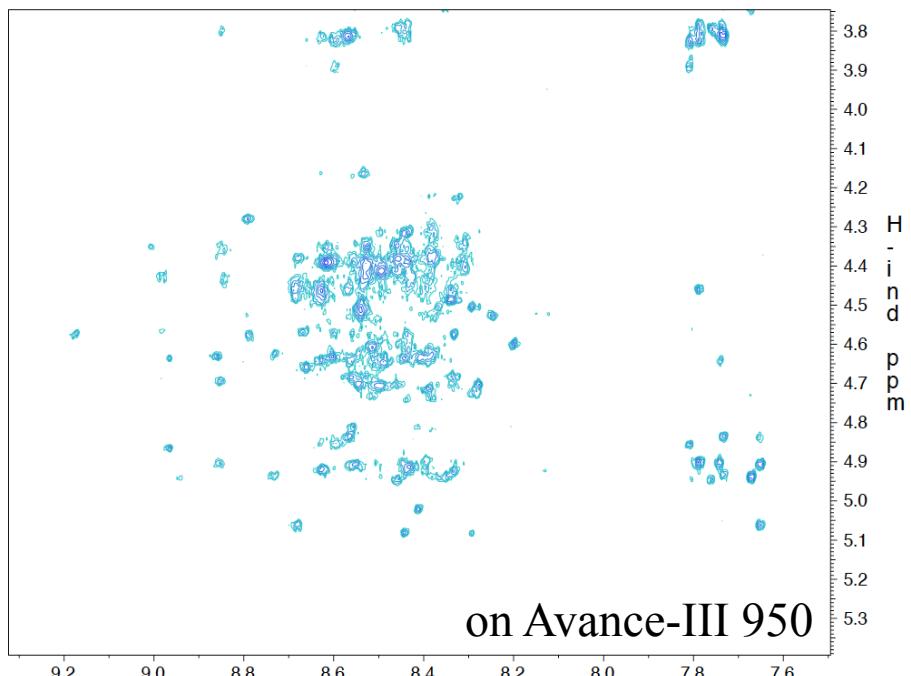
on Avance-I 800
116.7ms (t_1) \times 239.6ms (t_2)
Ns = 16



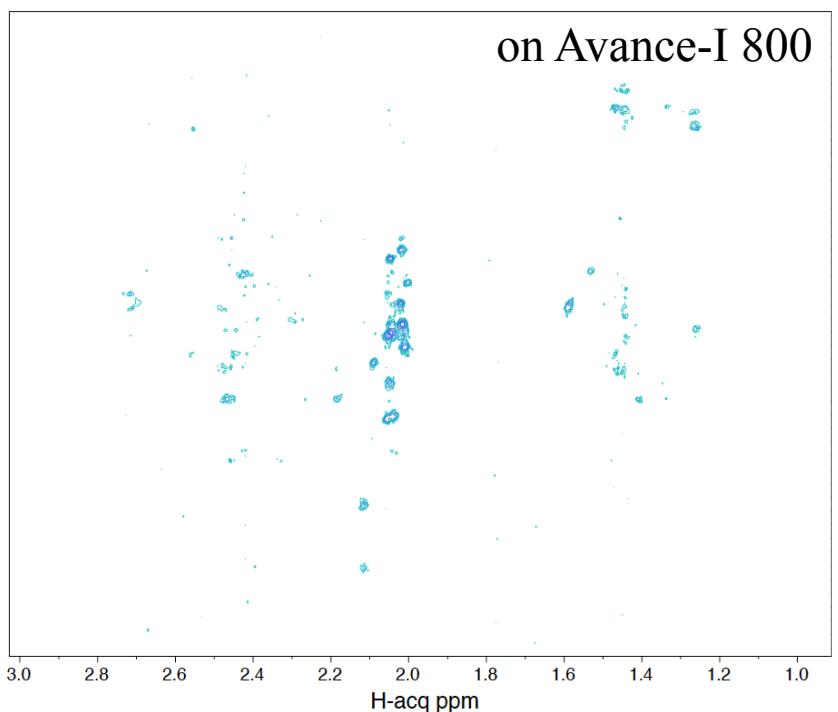
on Avance-III 950
98.3ms (t_1) \times 240.3ms (t_2)
Ns = 16



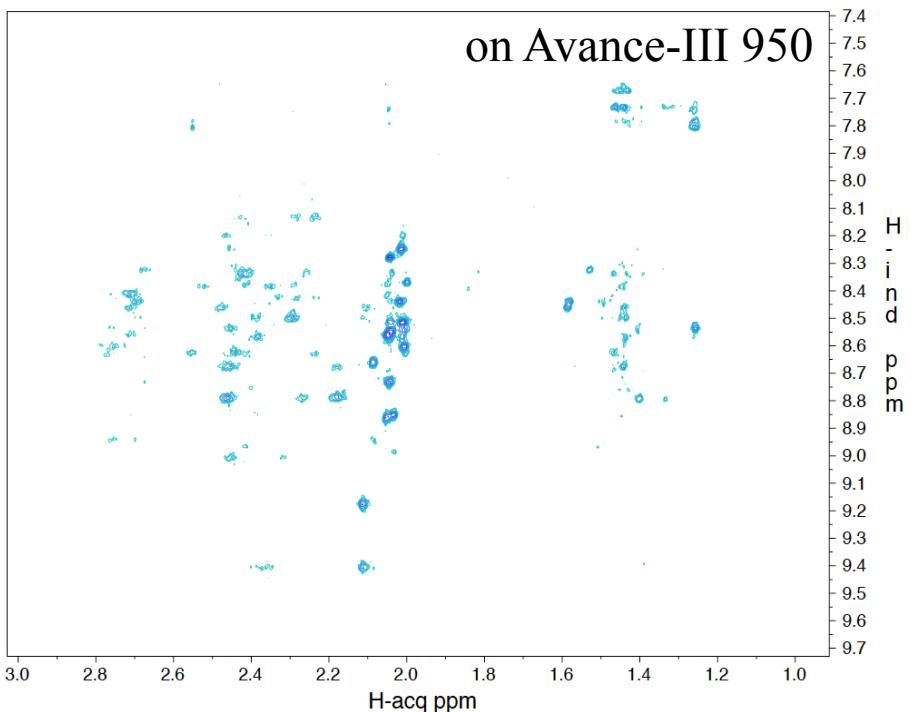
on Avance-I 800



on Avance-III 950

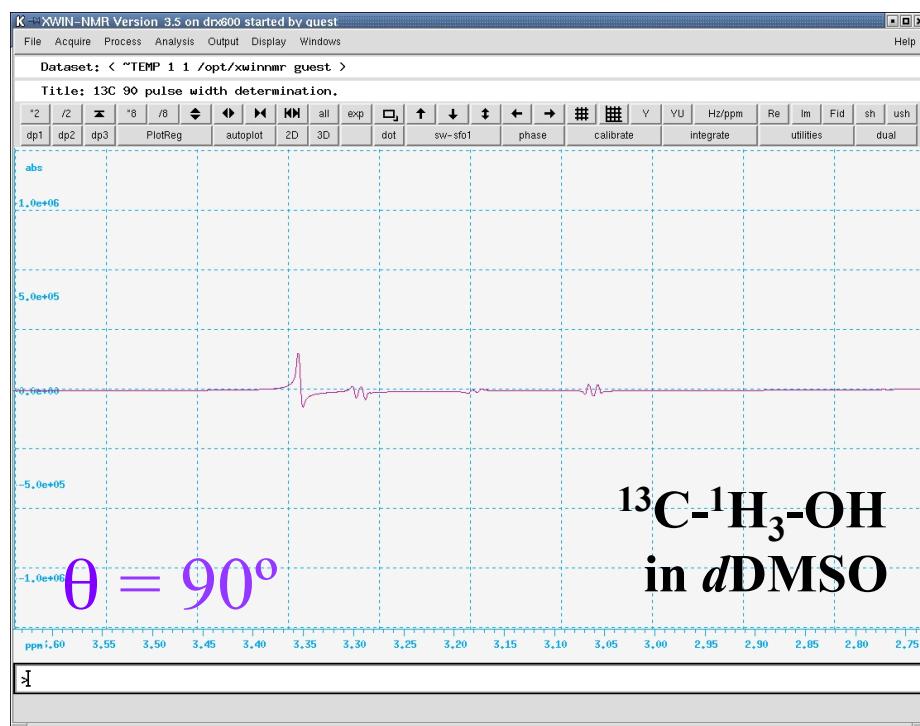
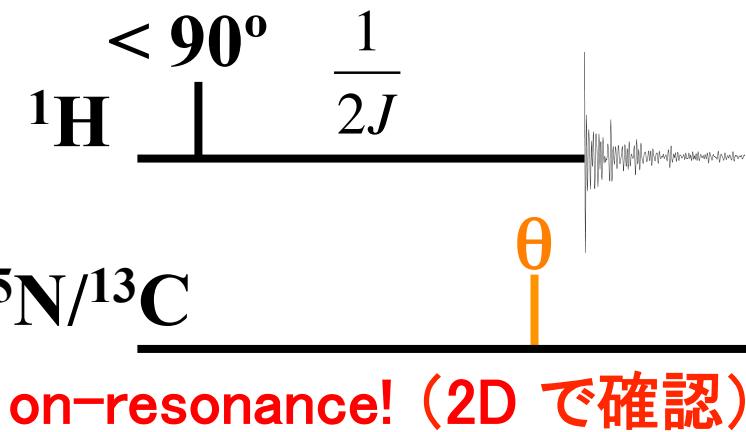
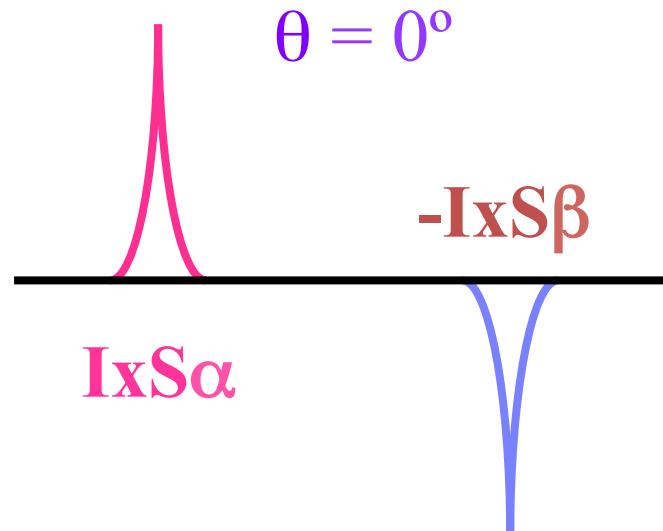
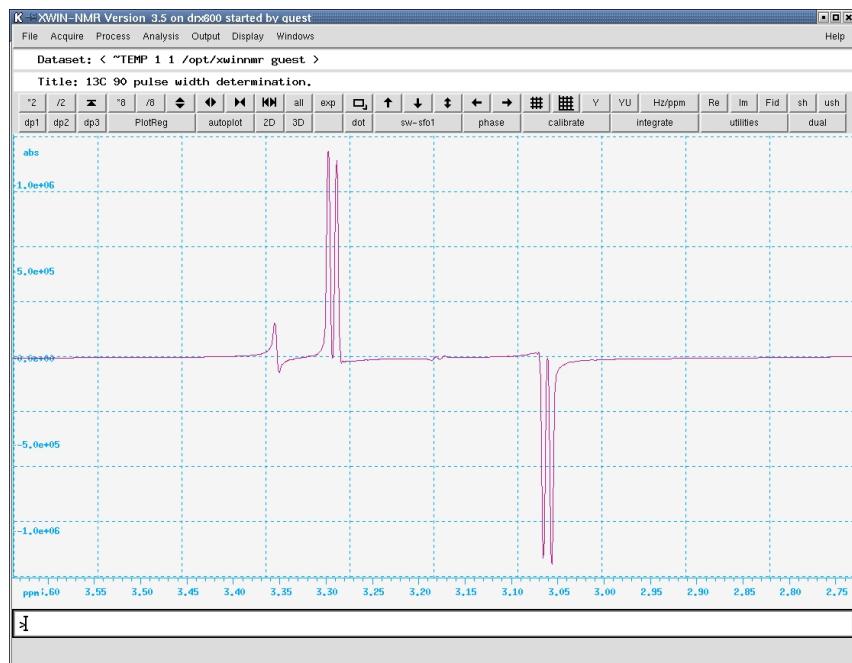


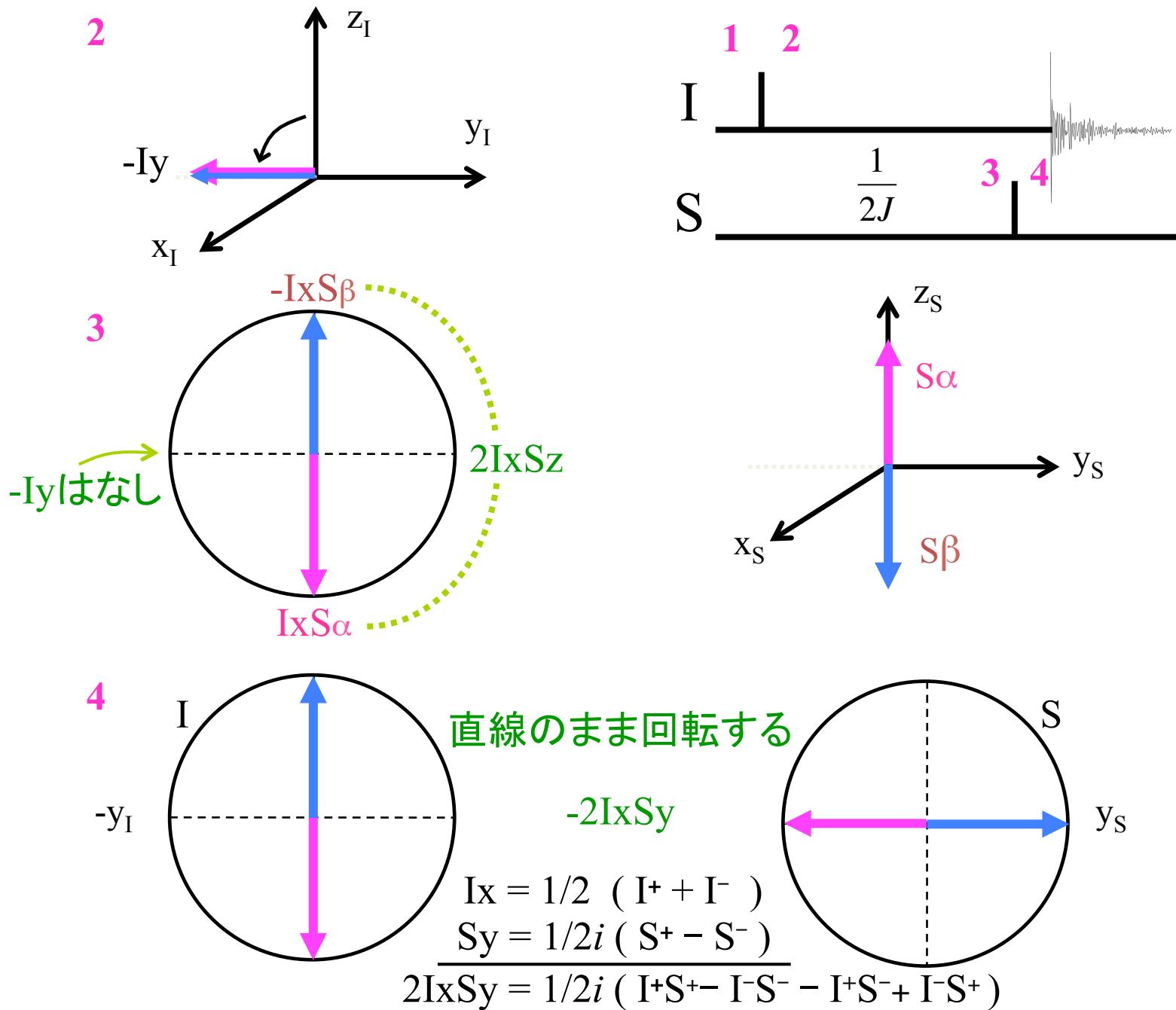
on Avance-I 800



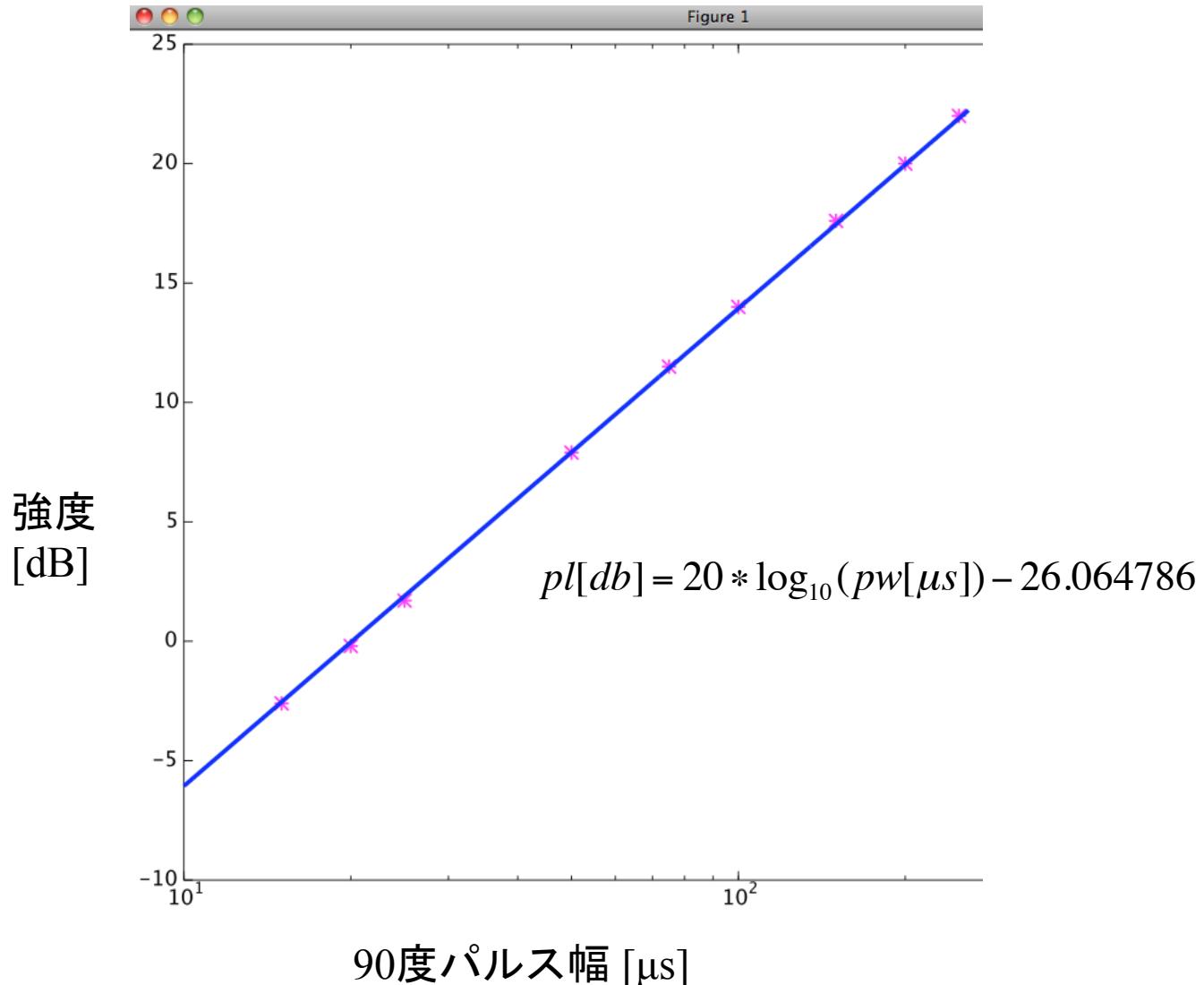
on Avance-III 950

異種核の 90° パルス長の決定

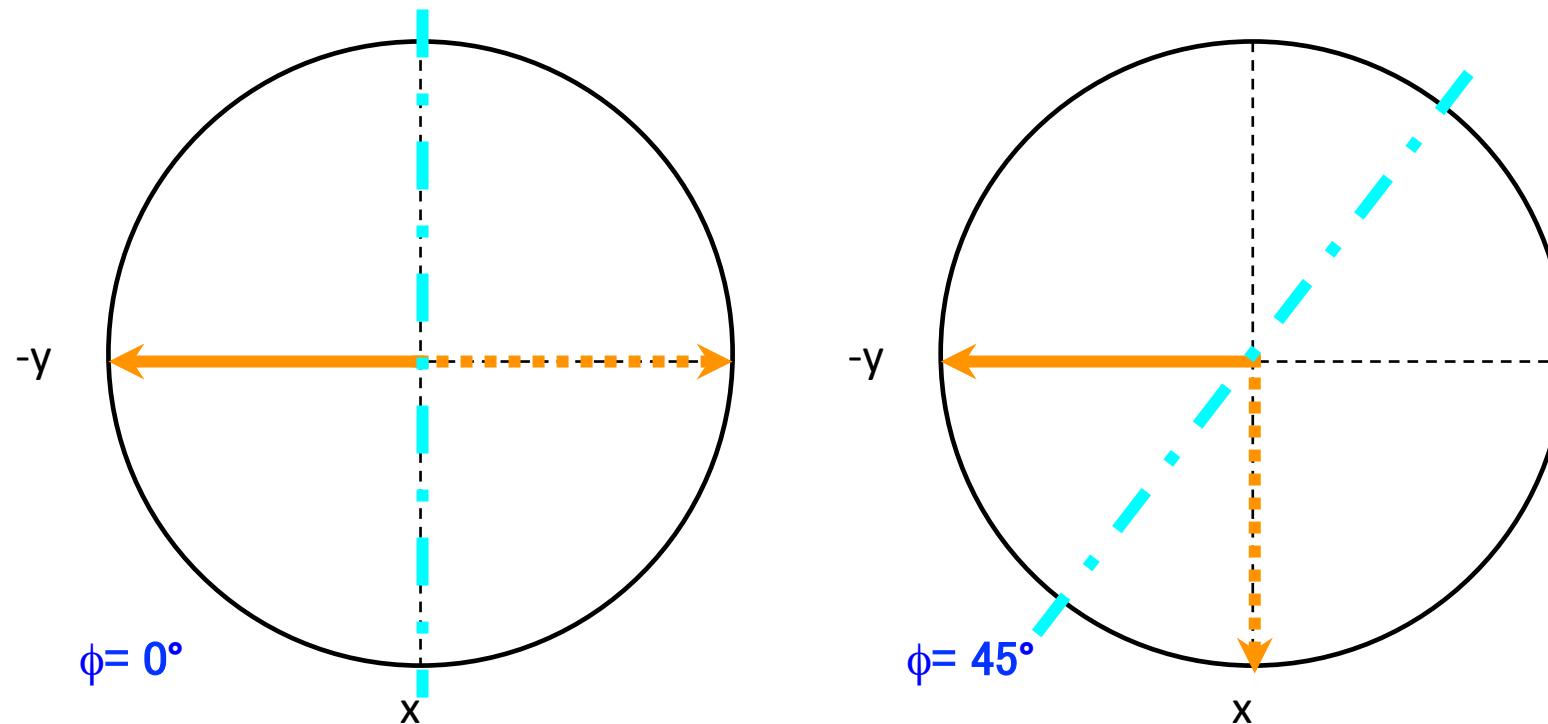
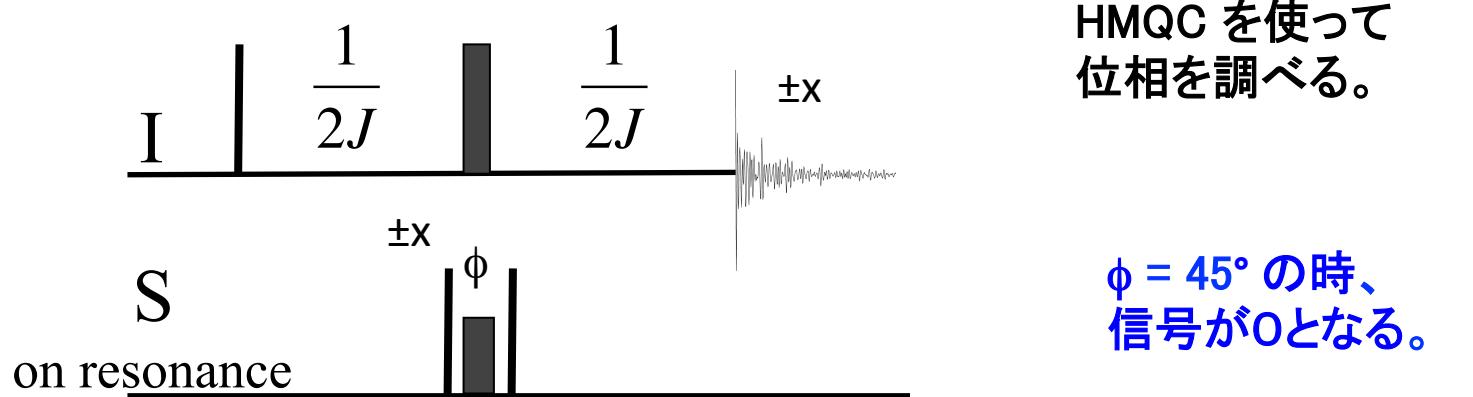


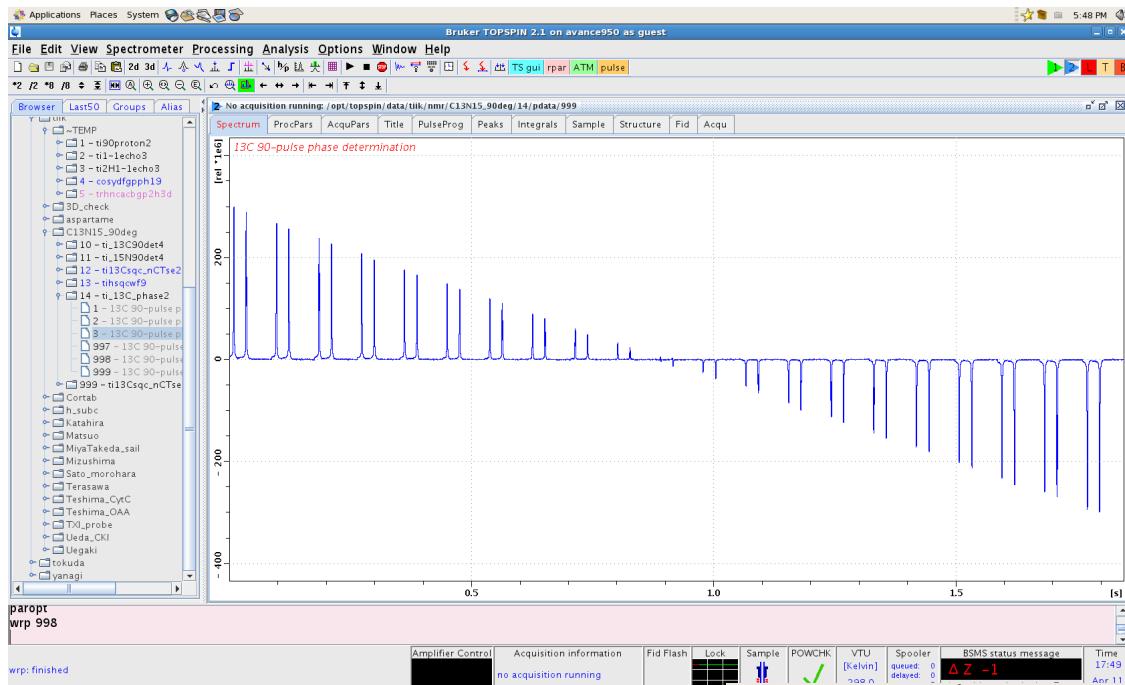


Avance-III 950MHz ^{13}C ($f2$) 90°パルス幅



位相は大丈夫？





20μs @ -0.2dB での参照実験

真ん中で強度0となっている。

