



# 核磁気共鳴 (NMR) の効率良い使い方

2012年11月29-30日 (木.金)  
京都大学講演会

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

核磁気共鳴（NMR）装置を使う際、試料が蛋白質であって有機低分子であっても、基礎となる操作法はほとんど似ています。その使い方は、かなり自動化が進んだとはいえ、やはりまだ研究室秘伝のようなところも残っています。今回の講習会では、主に学生さんを対象に、あまり教科書には載っていないような「**コツ**」も交え、なかなか先生や先輩に尋ねづらいような項目についても詳しく見ていきたいと思います。およそ、以下のようなどちらかと言うと**実用的な項目**を想定しています。

試料調製、温度設定、チューニング・マッチング、シム合わせ、 $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  90° パルス幅の測定、二次元スペクトルでのパラメータの設定、フーリエ変換でのパラメータの設定

# **1. NMR の基礎**

## **2. NMR の一次元測定**

## **3. NMR の二次元測定**

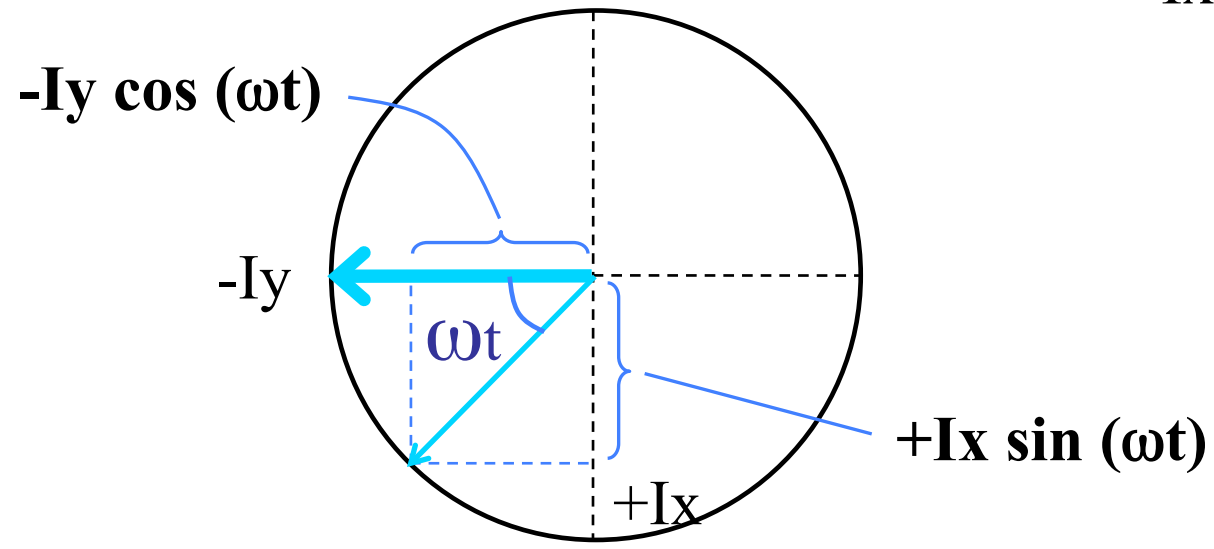
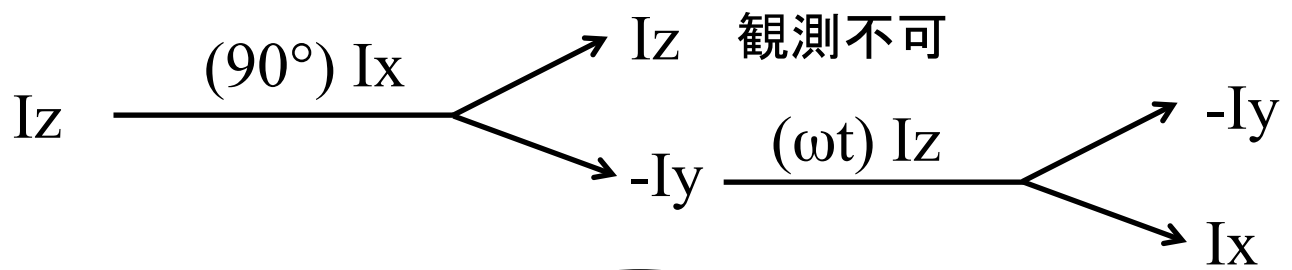
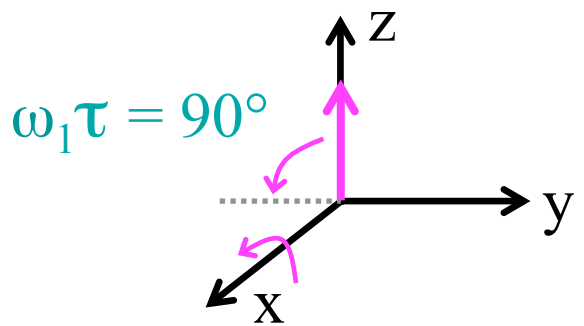
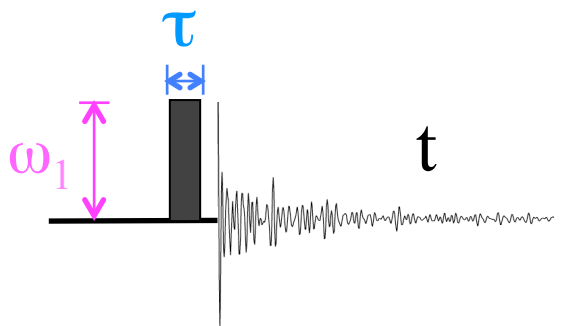
## **4. データ処理**

## **5. 定性的な蛋白 NMR と定量的な有機 NMR**

## **6. 今後の NMR 展開**

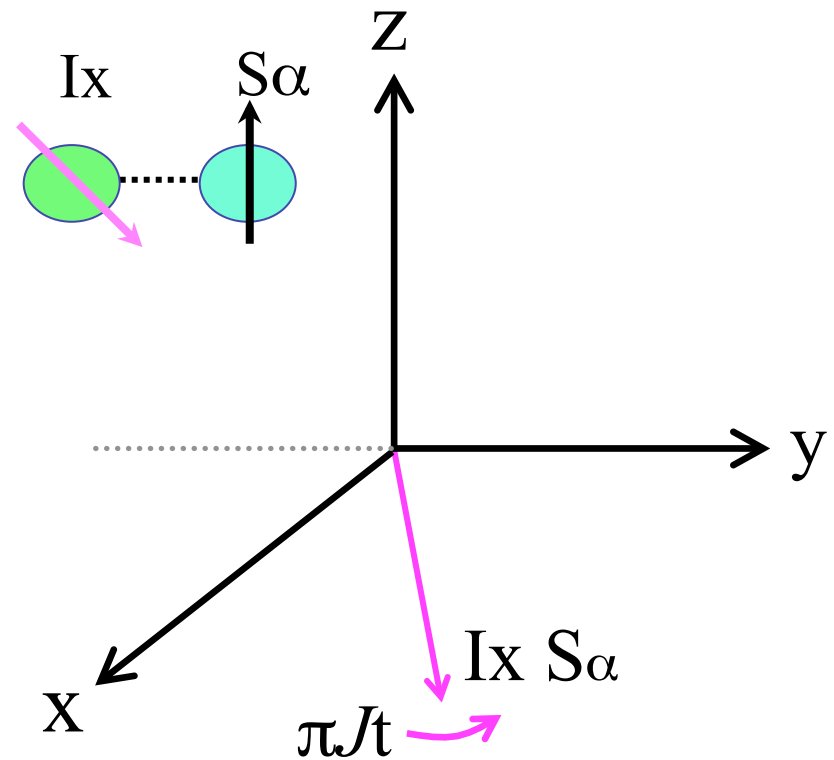
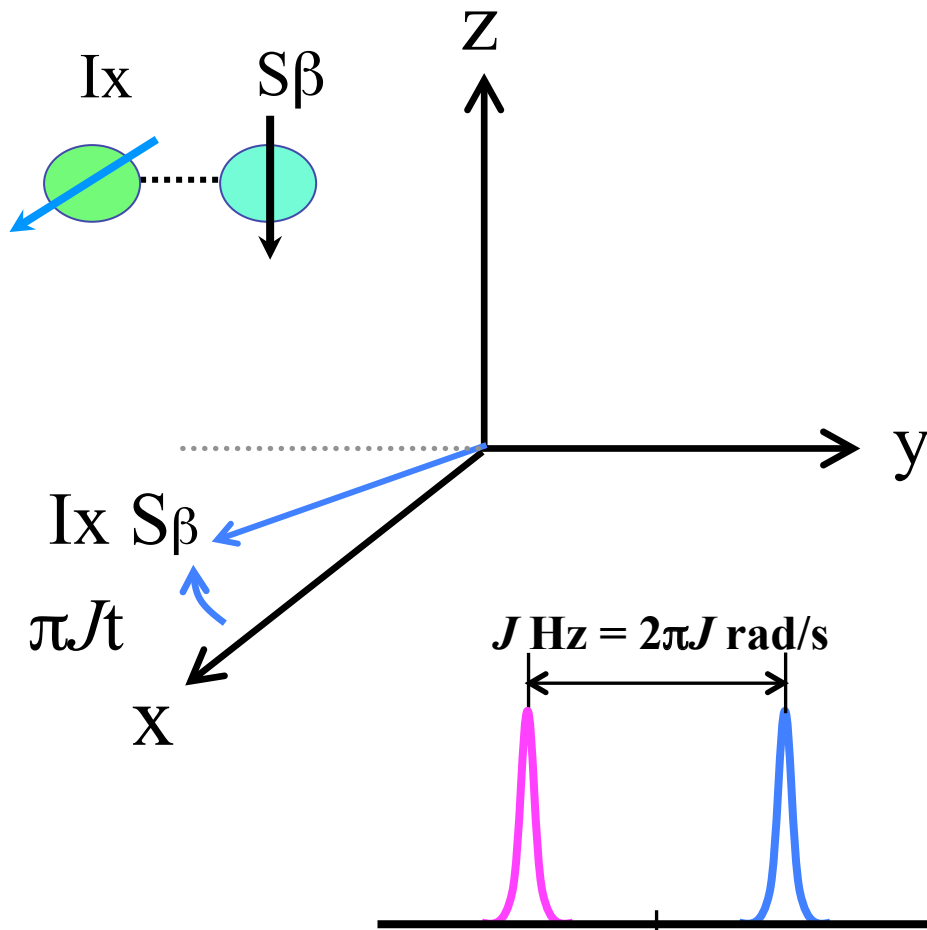
# 1-1 化学シフト

# 1 パルス → 検出の例



## 1-2 Jスカラー結合

$$\pm \frac{J}{2} (\text{Hz}) = \pm \pi J \left( \frac{\text{rad}}{\text{s}} \right)$$



$$I_x S_\beta \rightarrow I_x S_\beta \cdot \cos(\pi J t) - I_y S_\beta \cdot \sin(\pi J t)$$

$$I_x S_\alpha \rightarrow I_x S_\alpha \cdot \cos(\pi J t) + I_y S_\alpha \cdot \sin(\pi J t)$$

## J - 結合の直積演算子

$$I_x S_\alpha \rightarrow I_x S_\alpha \cos(\pi Jt) + I_y S_\alpha \sin(\pi Jt)$$

$$+ ) \quad I_x S_\beta \rightarrow I_x S_\beta \cos(\pi Jt) - I_y S_\beta \sin(\pi Jt)$$

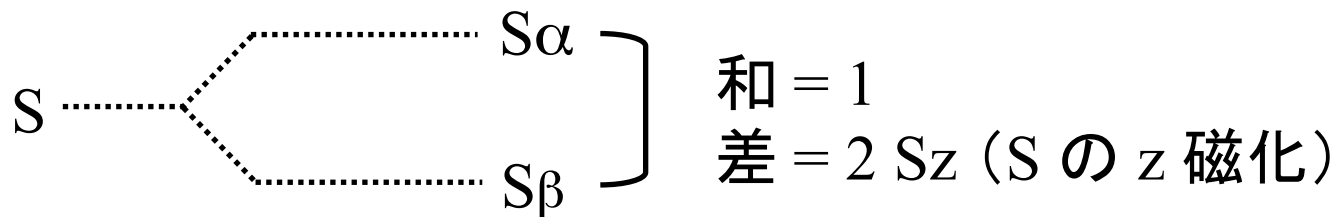

---

$$I_x (S_\alpha + S_\beta) \rightarrow I_x (S_\alpha + S_\beta) \cos(\pi Jt) + I_y (S_\alpha - S_\beta) \sin(\pi Jt)$$

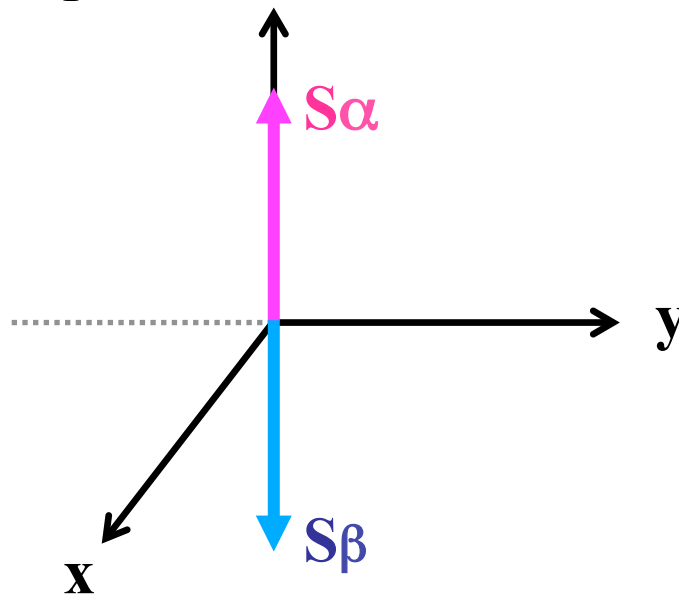
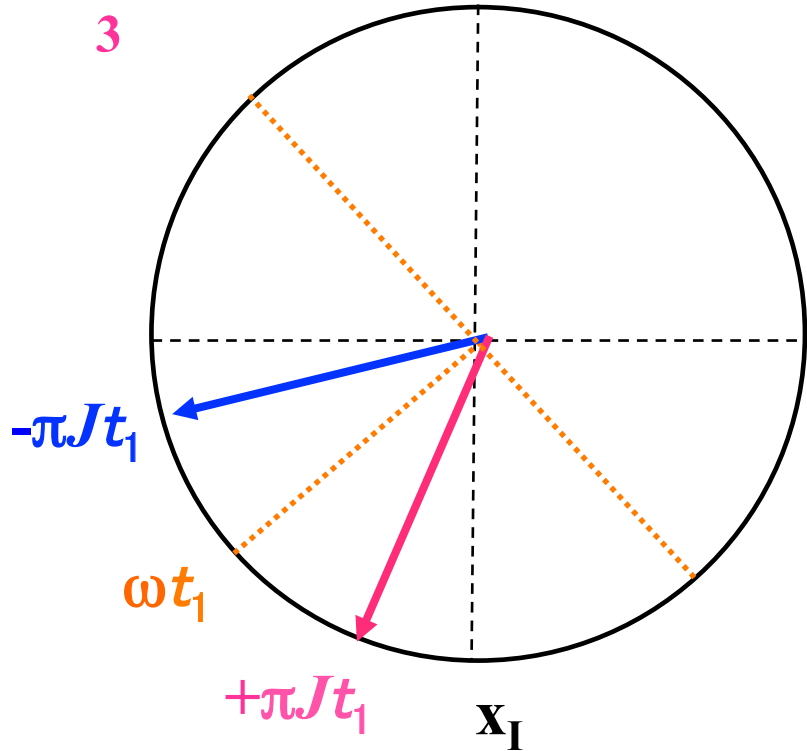
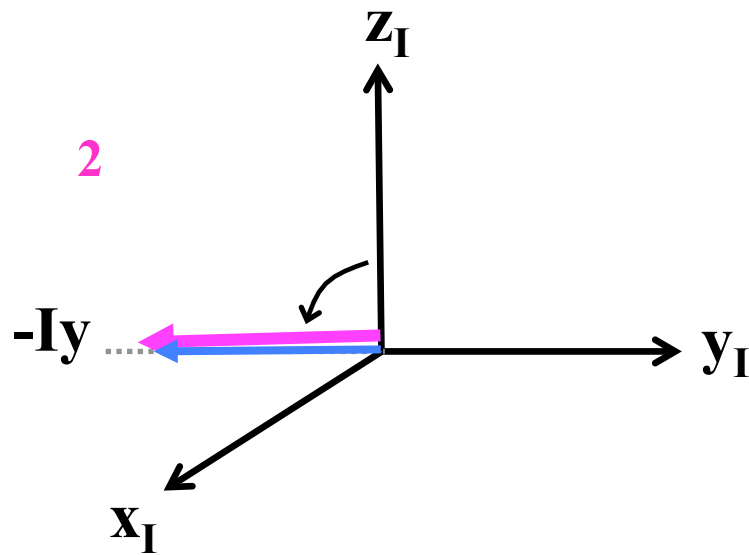
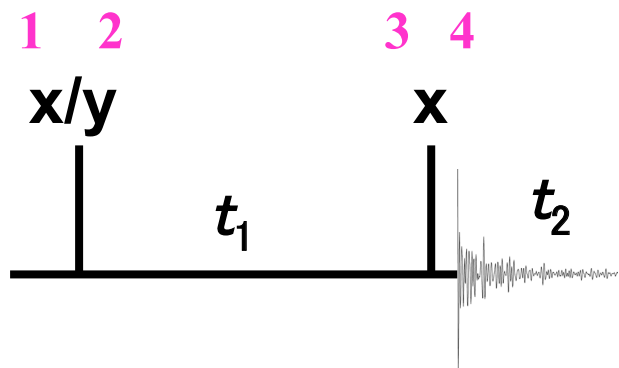
$$S_\alpha + S_\beta = 1$$

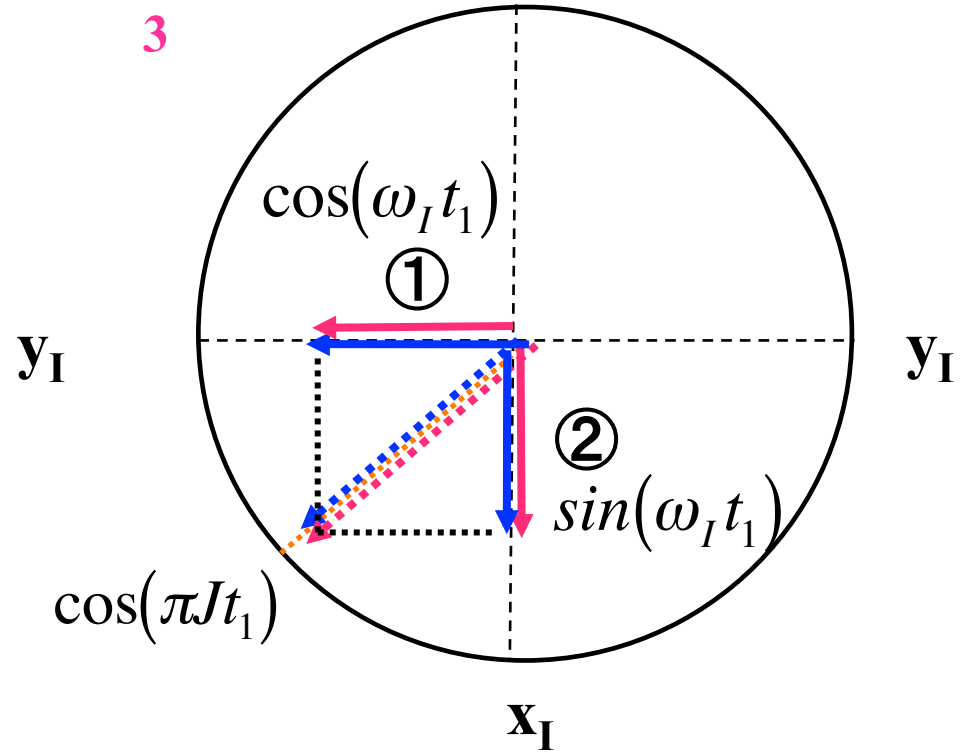
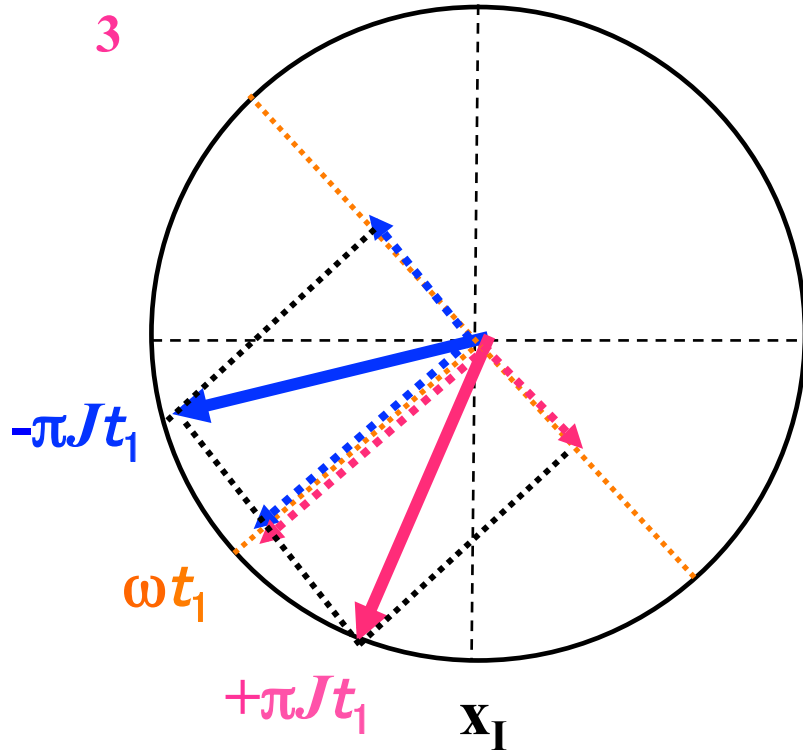
$$S_\alpha - S_\beta = 2 S_z$$

$$\underline{I_x \longrightarrow I_x \cos(\pi Jt) + 2 I_y S_z \sin(\pi Jt)}$$



# 1-3 COSY





4

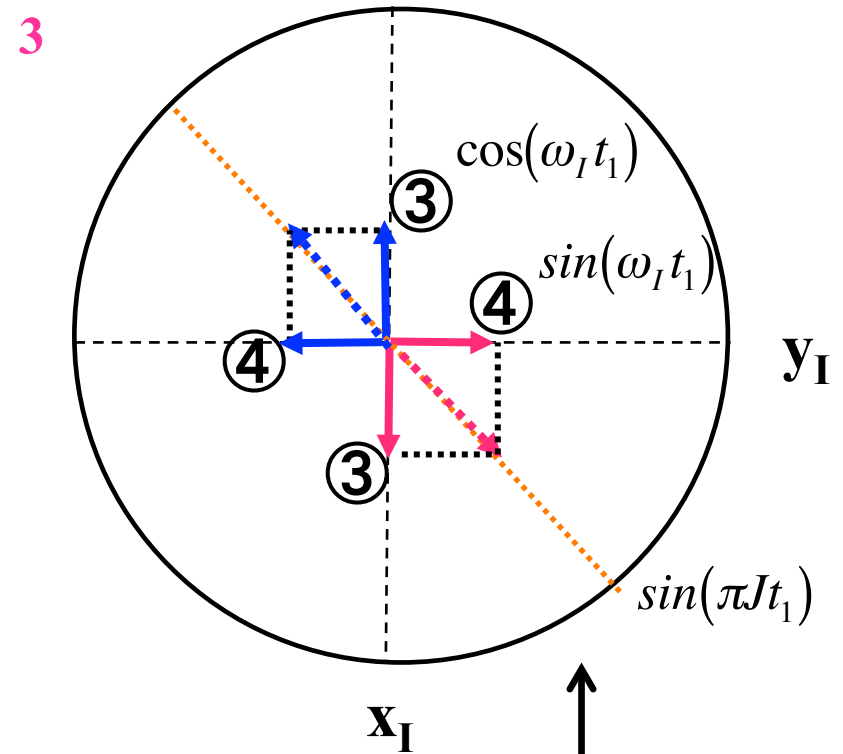
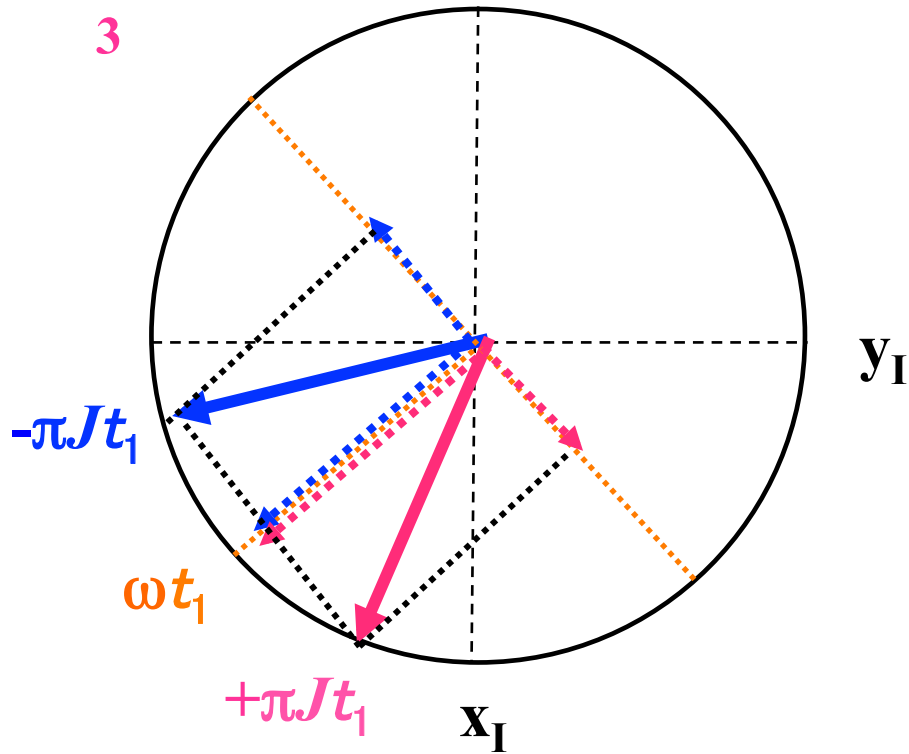
$$-I_z \cos(\omega_I t_1) \cos(\pi J t_1)$$

$$+ I_x \sin(\omega_I t_1) \cos(\pi J t_1)$$

① 観測付加

② 対角ピーク  
(in-phase)





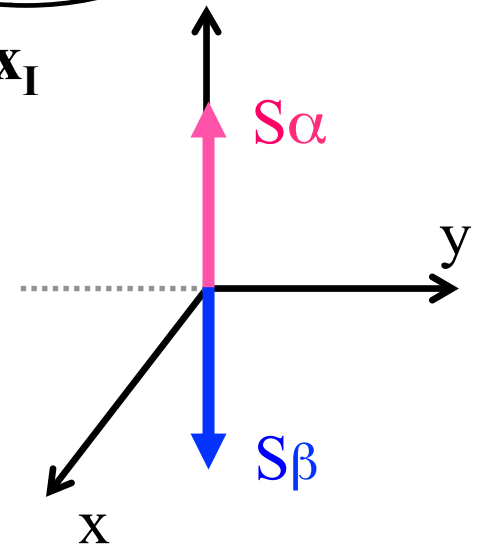
4

$$-2I_x S_y \cos(\omega_I t_1) \sin(\pi J t_1) \quad \textcircled{3}$$

$$-2I_z S_y \sin(\omega_I t_1) \sin(\pi J t_1) \quad \textcircled{4}$$

観測付加

交差ピーク  
(anti-phase)



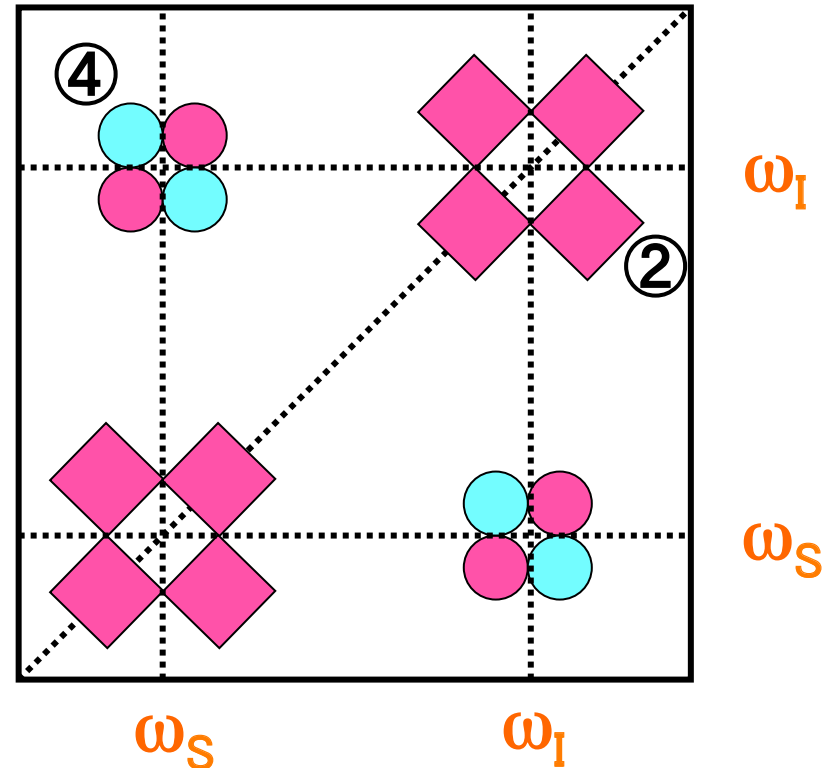
$$+ I_x \sin(\omega_I t_1) \cos(\pi J t_1) \quad \textcircled{2} \text{ 対角ピーク}$$

$$\Rightarrow I_y \sin(\omega_I t_1) \cos(\pi J t_1) \sin(\omega_I t_2) \cos(\pi J t_2)$$

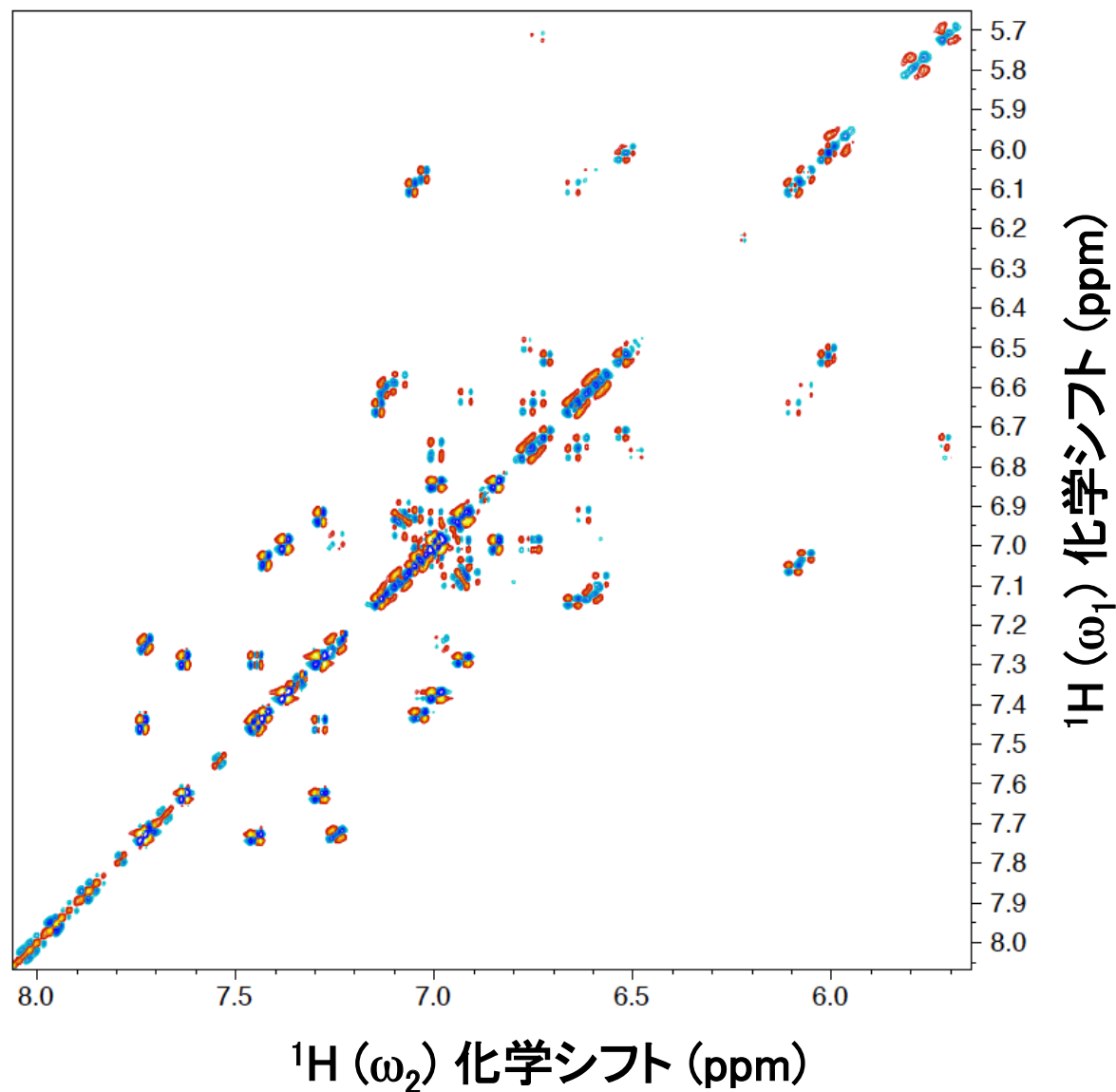
$$- 2I_z S_y \sin(\omega_I t_1) \sin(\pi J t_1) \quad \textcircled{4} \text{ 交差ピーク}$$

$$\Rightarrow S_y \sin(\omega_I t_1) \sin(\pi J t_1) \sin(\omega_S t_2) \sin(\pi J t_2)$$

対角ピークが分散波形のため、裾野が広く、対角線近くにある交差ピークの解析が困難



# 2D DQF-COSY (Double-Quantum Filtered COrrrelation SpectroscopY)

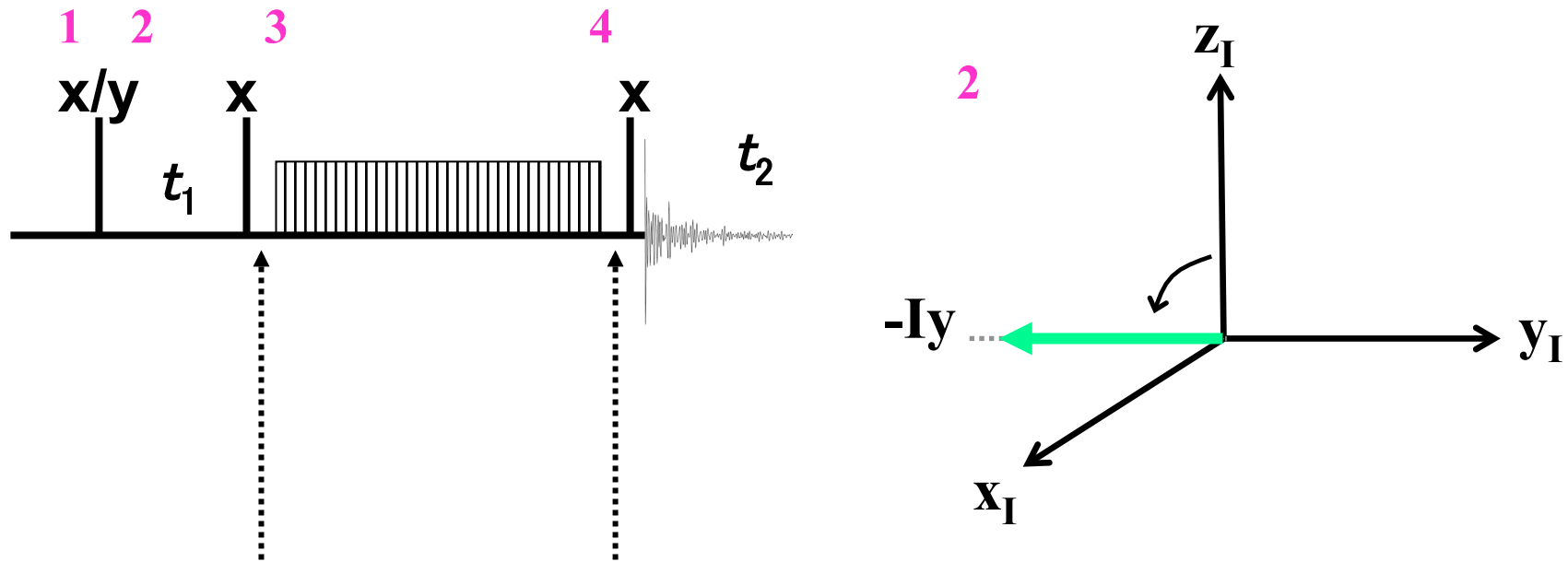


感度は落ちるが、対角ピークが吸収波形であるので、解析しやすい。

1.35mM non-labeled Chi18aC  
in 20mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ - $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 6.0),  
0.02%  $\text{NaN}_3$ , 1mM DTT, and 10%  $\text{D}_2\text{O}$

5120\* x 900\* on DRX-600 at 303K

## 1-4 TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY)

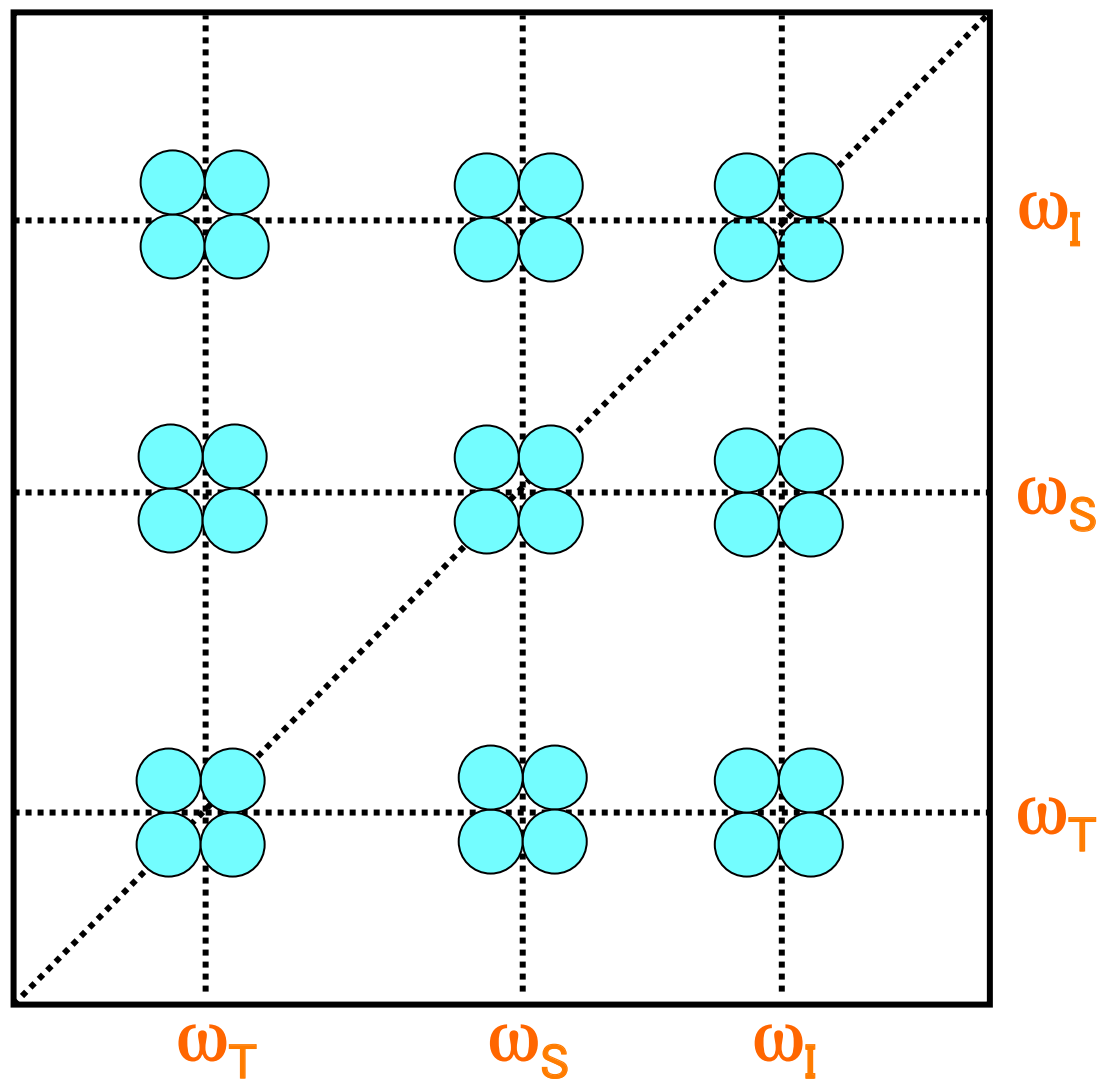
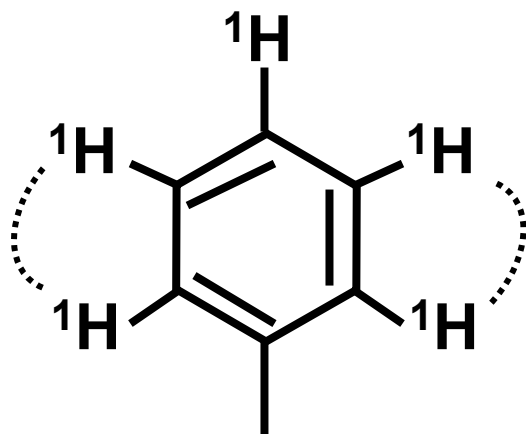
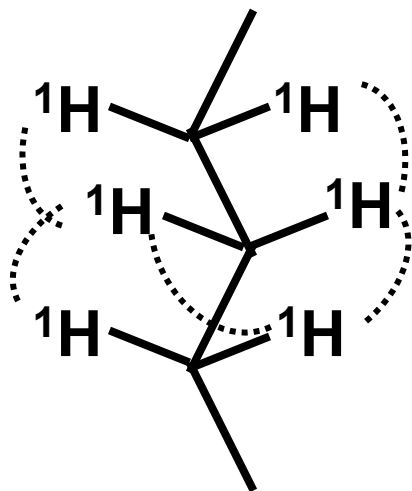


- $I_z$  あるいは  $S_z$  だけに絞るために、gradient をかける。
- $I_z$  あるいは  $S_z$  だけに絞るために、数 ms の delay をおく。
- $I_y$  あるいは  $S_y$  だけに絞るために、両端の  $90^\circ$  パルスの代わりに数 ms の spin-lock をかける。

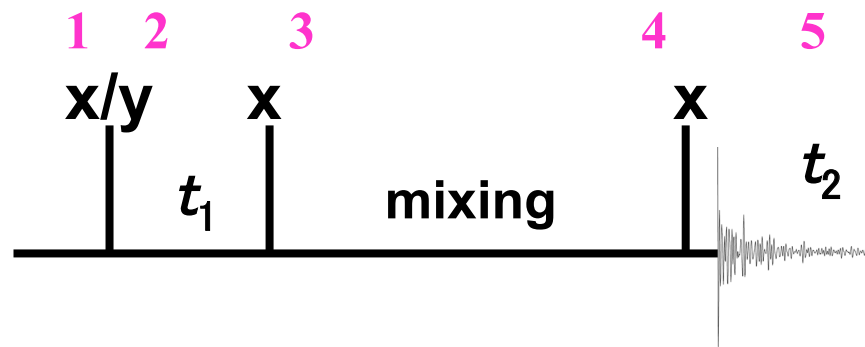
$$-I_z \cos(\omega_I t_1) \cos(\pi J_{IS} t_1) \Rightarrow a S_z \cos(\omega_I t_1) \cos(\pi J_{IS} t_1)$$

$$aS_z \cos(\omega_I t_1) \cos(\pi J_{IS} t_1) \Rightarrow$$

$$- aS_y \cos(\omega_I t_1) \cos(\pi J_{IS} t_1) \cos(\omega_S t_2) \cos(\pi J_{IS} t_2)$$

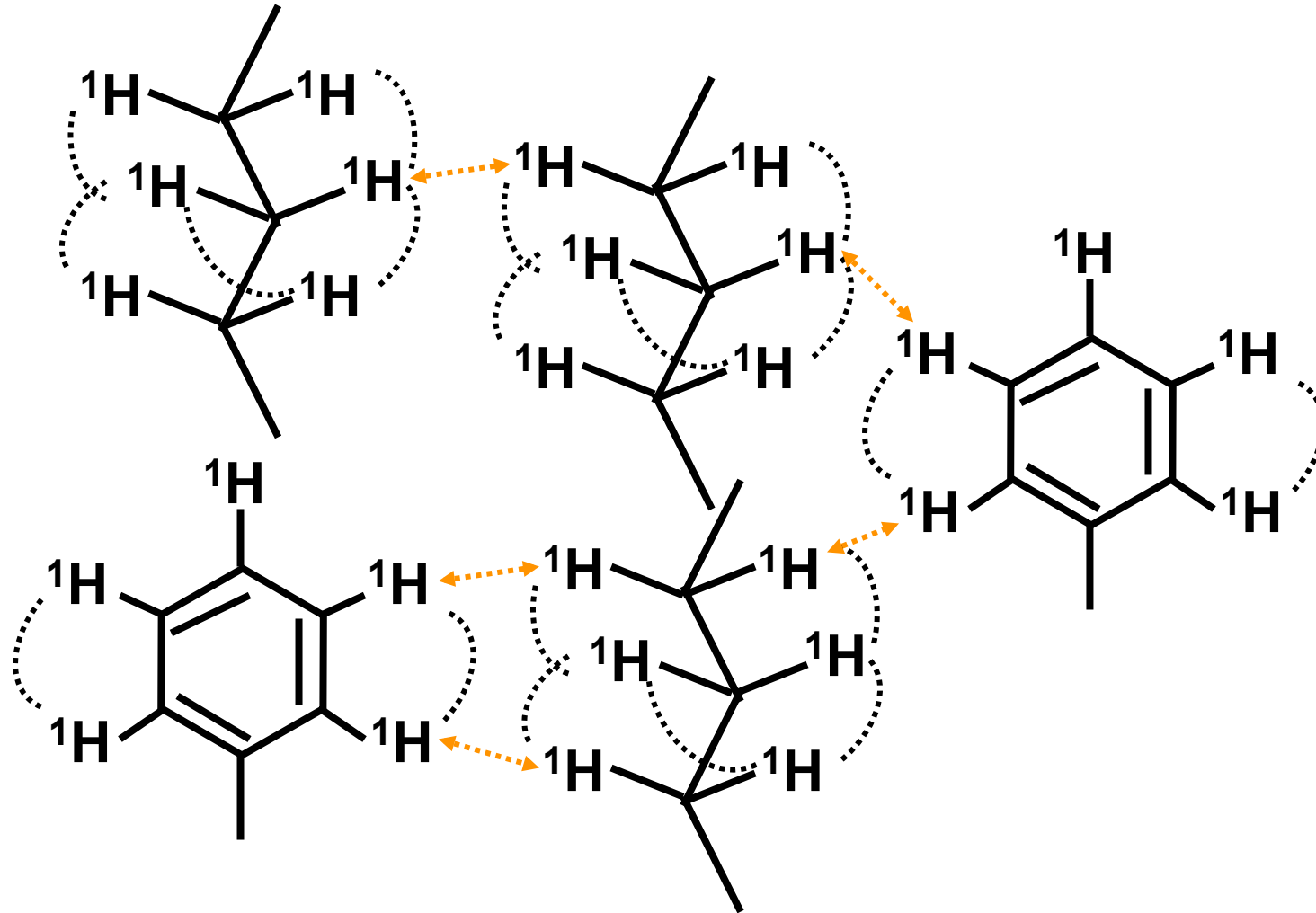


## 1-5 NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)



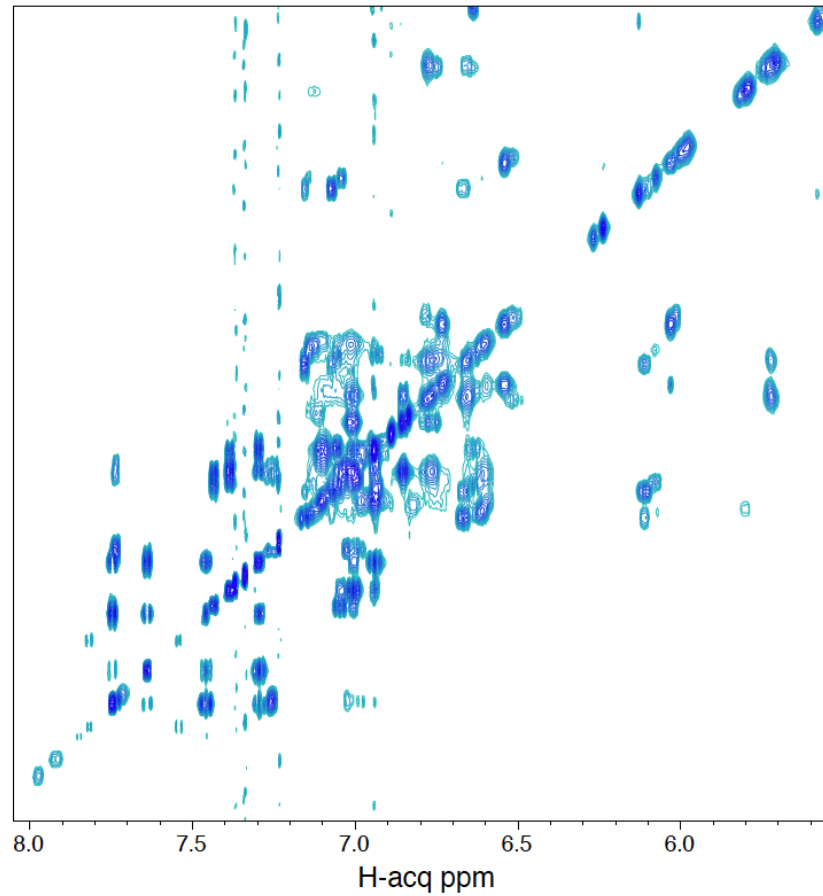
$$\begin{aligned}
 & \overset{3}{-I_z} \cos(\omega_I t_1) \cos(\pi J_{IS} t_1) \Rightarrow \overset{4}{aS_z} \cos(\omega_I t_1) \cos(\pi J_{IS} t_1) \\
 & \overset{5}{\Rightarrow} -aS_y \cos(\omega_I t_1) \cos(\pi J_{IS} t_1) \cos(\omega_S t_2) \cos(\pi J_{IS} t_2)
 \end{aligned}$$

高分子量であれば、見かけ上、  
TOCSY と同様のピークが現れる。



空間上  $5\text{\AA}$ 以内の距離に2つの  $^1\text{H}$  があれば、異なる分子間でも NOE ピークが生じる。

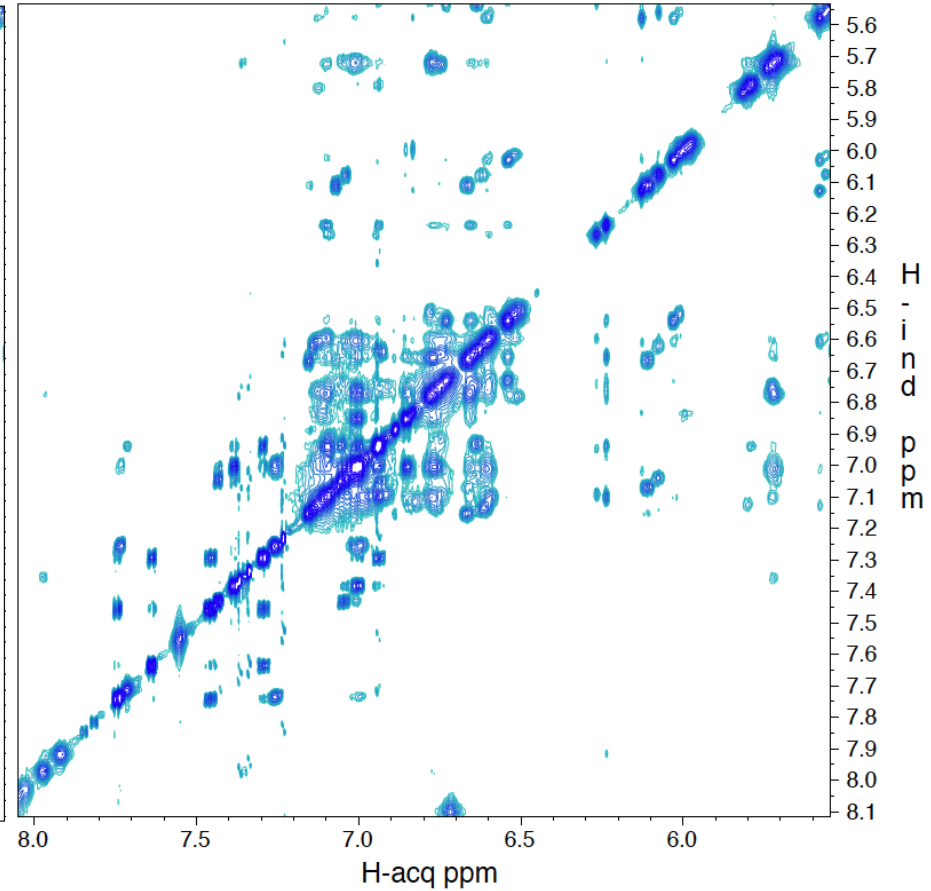
## 2D TOCSY (mix. 40ms)



5120\* x 500\* on DRX-600 at 303K

1.35mM non-labeled Chi18aC  
in 20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH  
6.0), 0.02% NaN<sub>3</sub>, 1mM DTT, and  
100% D<sub>2</sub>O

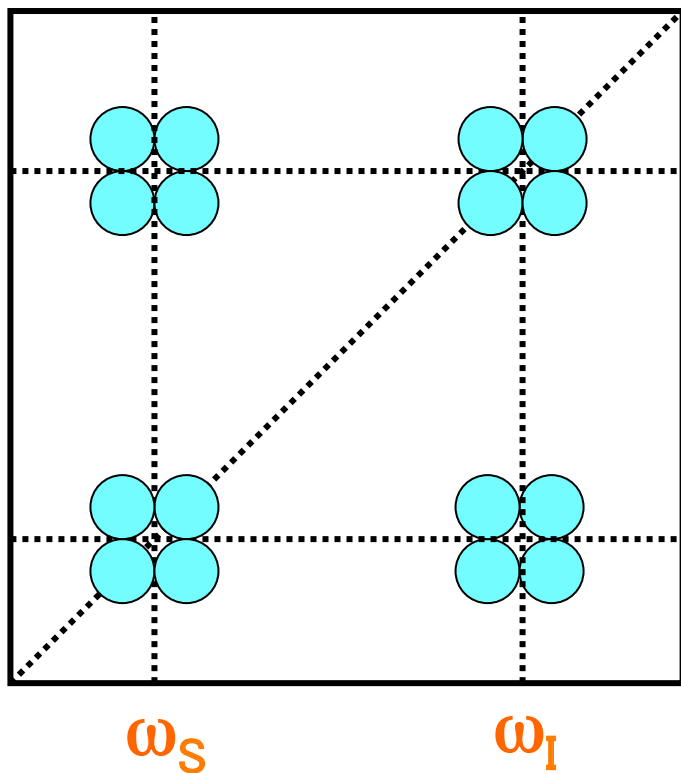
## 2D NOESY (mix. 100ms)



5120\* x 900\* on DRX-600 at 303K

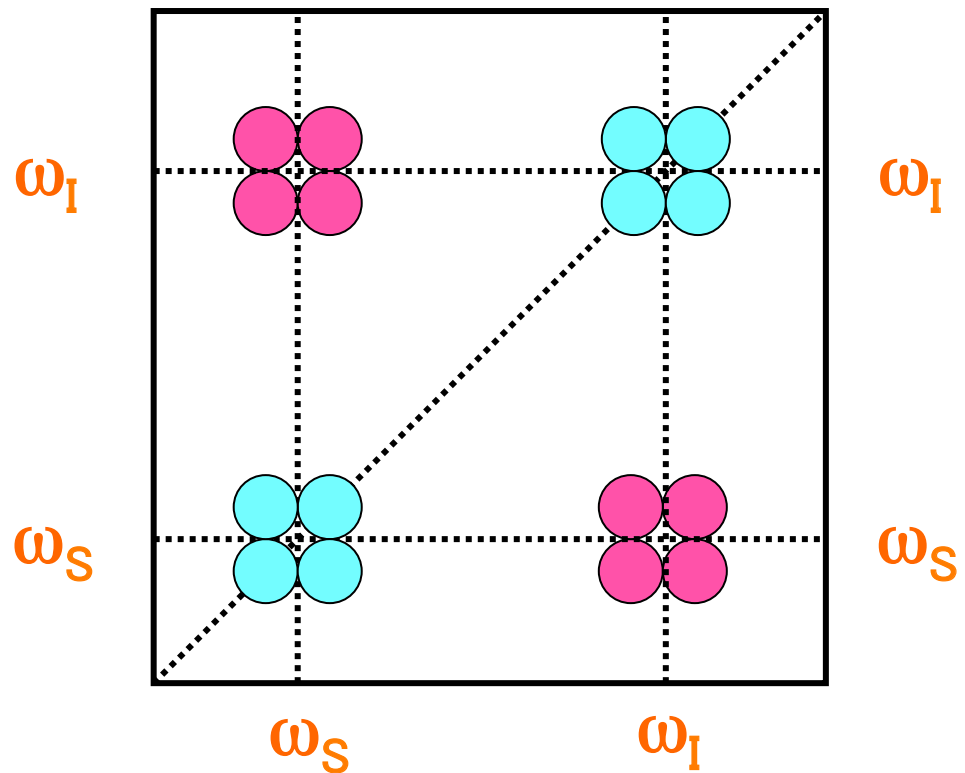
蛋白質の場合、NOE 交差  
ピークは対角ピークと同符号





### 負の NOE

- 高分子量
- 化学交換
- 構造交換
- spin-diffusion

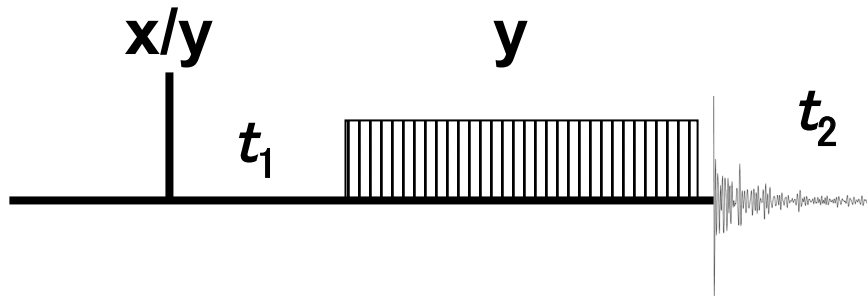


### 正の NOE

- 低分子量
- 柔軟な構造の部位

## 1-6 ROESY

(Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy)

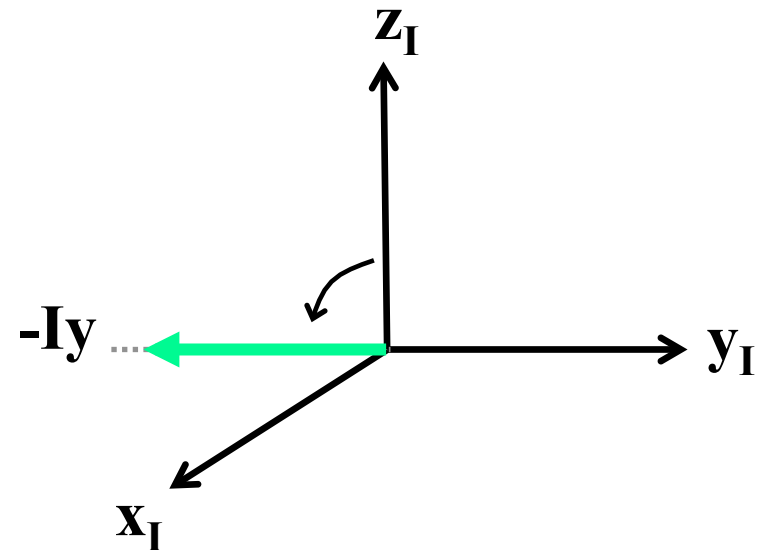


TOCSY と比べて、spin-lock  
の強度が弱いだけ。

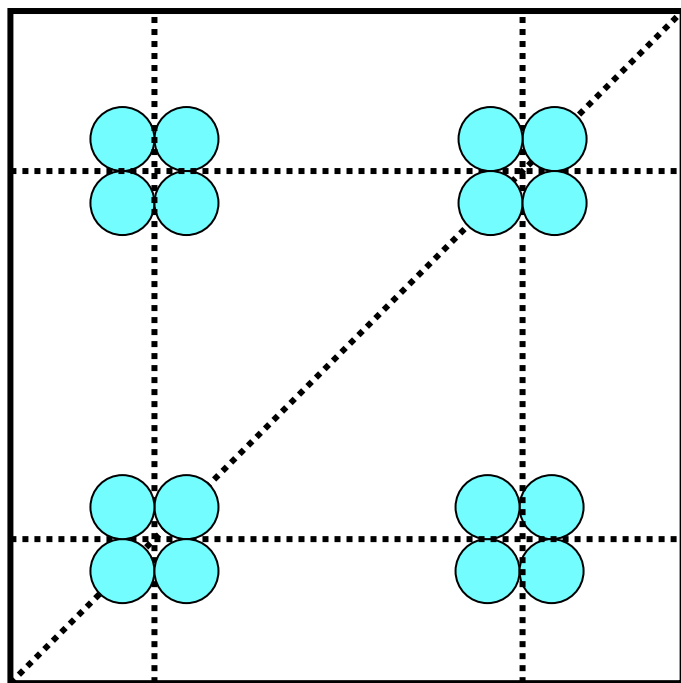
空間における磁化の交換

NOESY — 縦磁化

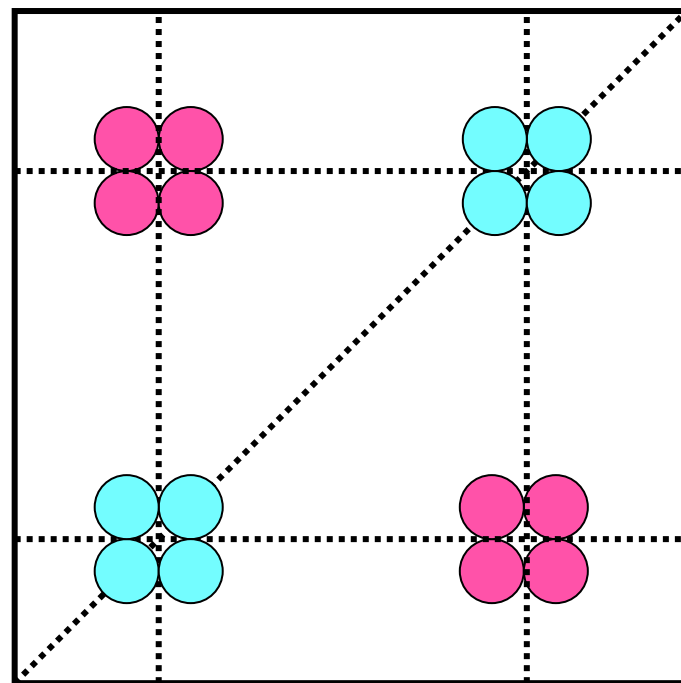
ROESY — 横磁化



蛋白質などの高分子では、横緩和が速いので、感度が低い。

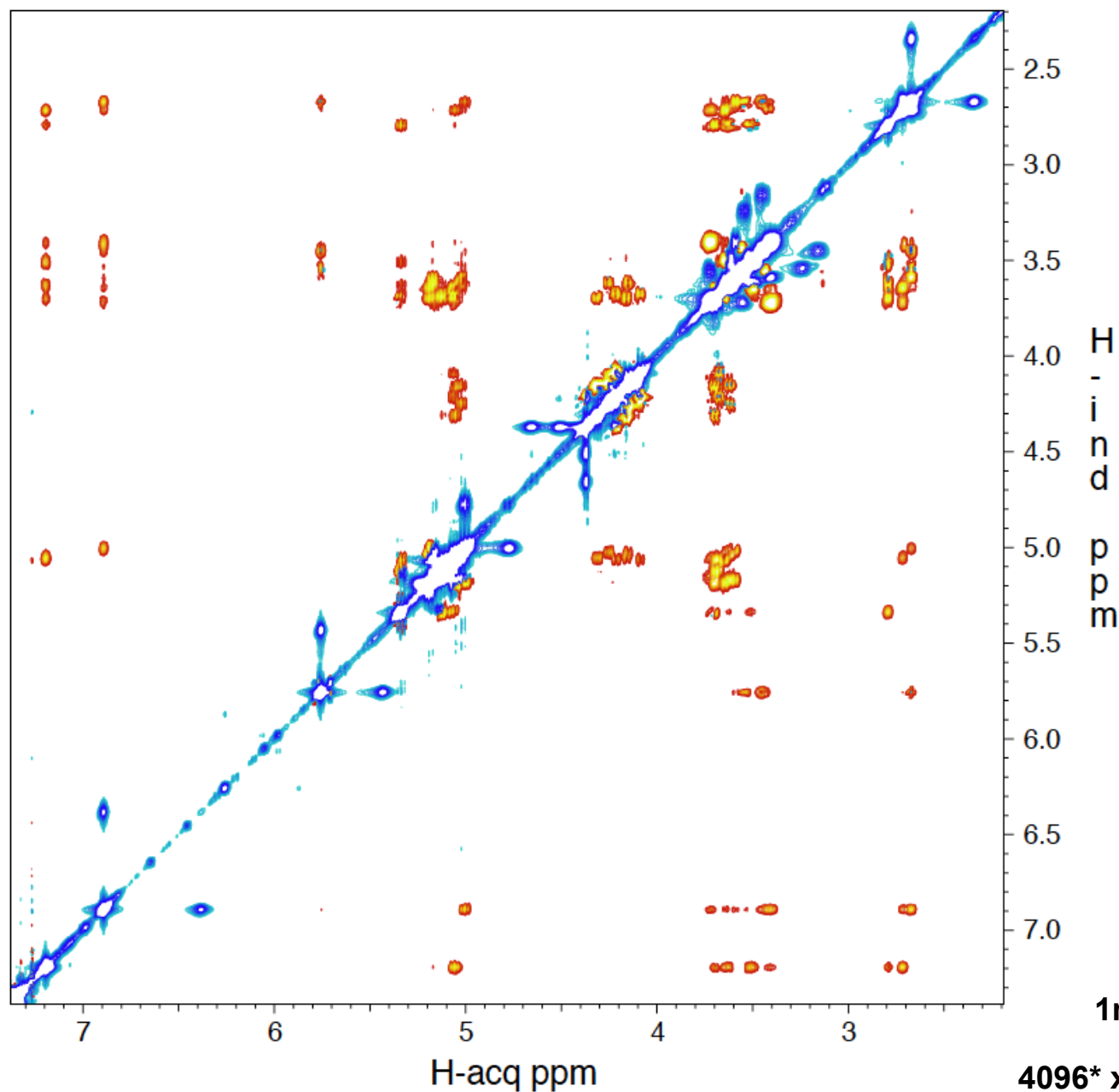


TOCSY  
 NOESY(高分子)  
 Exchange Spectroscopy



ROESY

- 交換ピークと区別が可能
- TOCSY ピークと区別が可能
- spin-diffusion との区別が可能



2D ROESY  
(mix. 200ms)

対角線近くに  
TOCSY ピークが  
出ることが多い。

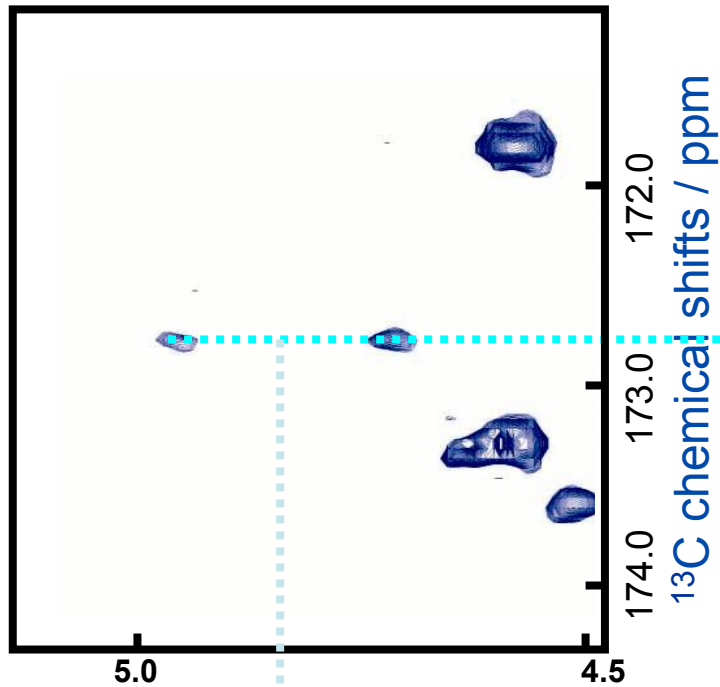
1mM 糖ペプチド in  $\text{CDCl}_3$

4096\* x 600\* on DRX-500 at 298K

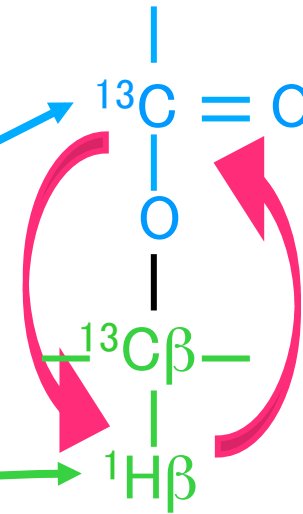
# 1-7 HMBC

## Determination of the place of the ester bond

2D HMBC spectrum

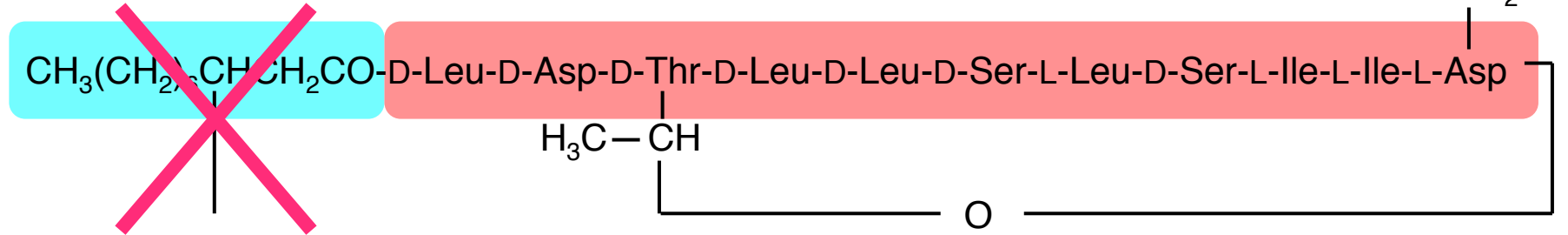


Asp-11  
main chain  
carboxyl  
carbon

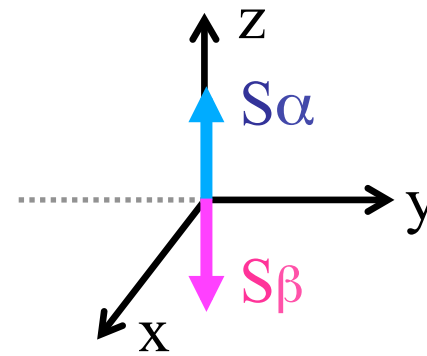
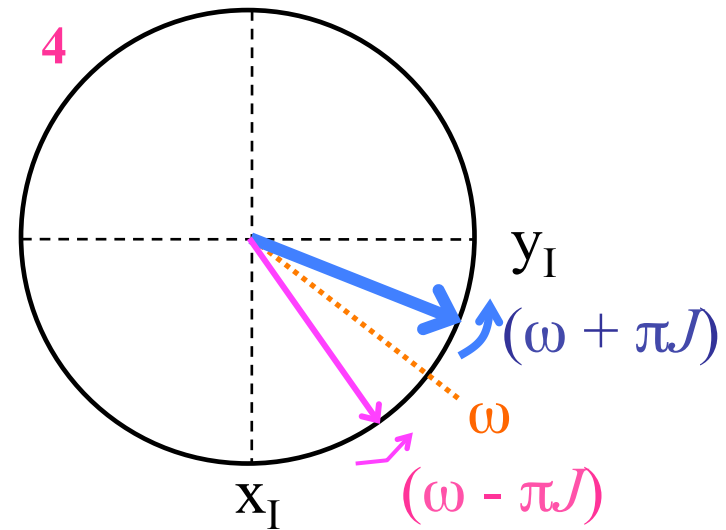
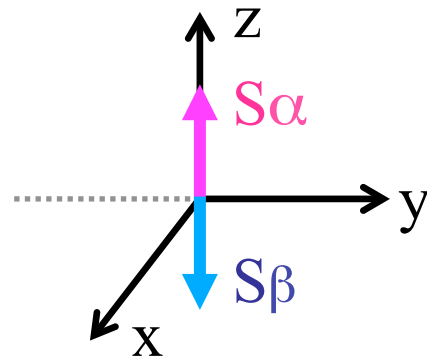
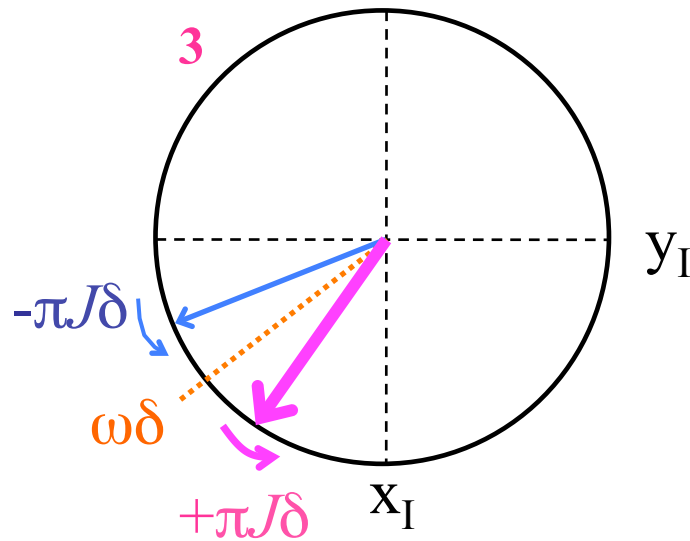
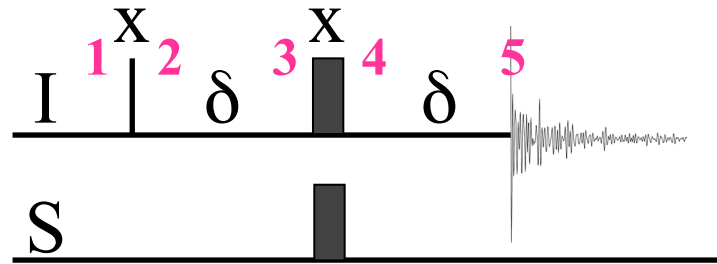


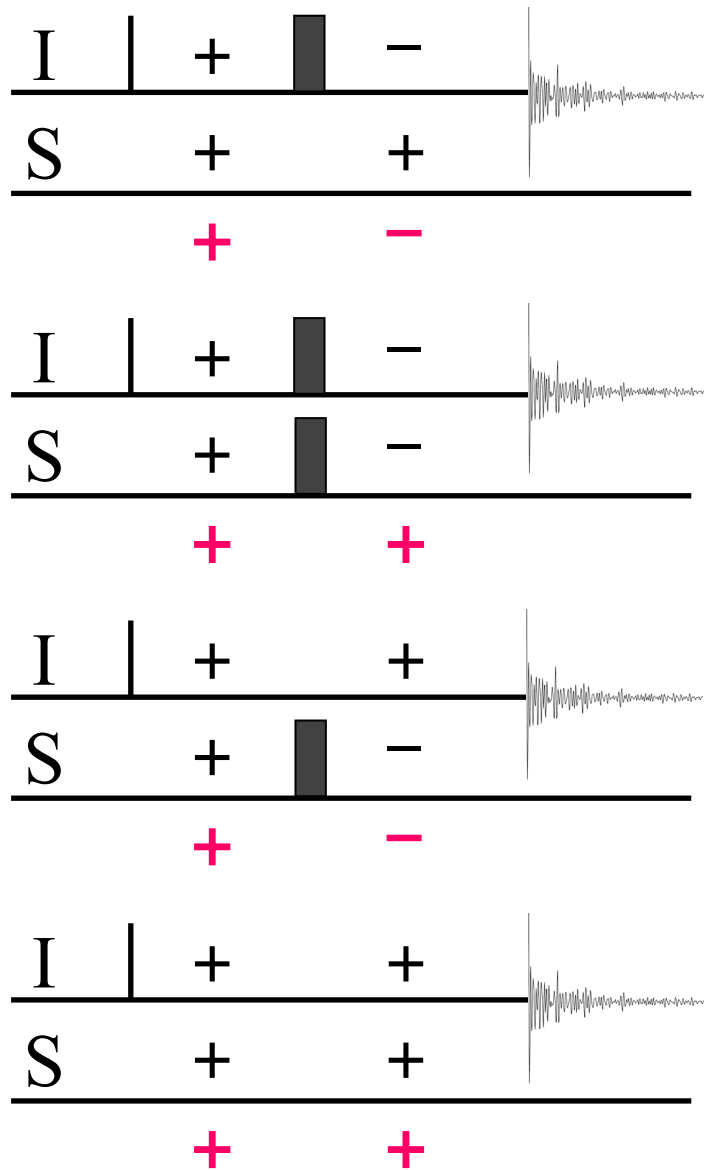
$^1\text{H}$  chemical shifts / ppm

Thr-3  $^1\text{H}_\beta$



# S側にも $\pi$ パルスを打つと $J$ が収束しない





$\omega I_z$   
I の化学シフト  $\delta$

$\pi J 2 I_z S_z$   
I-S の  $J$  カップリング

—

—

—

○

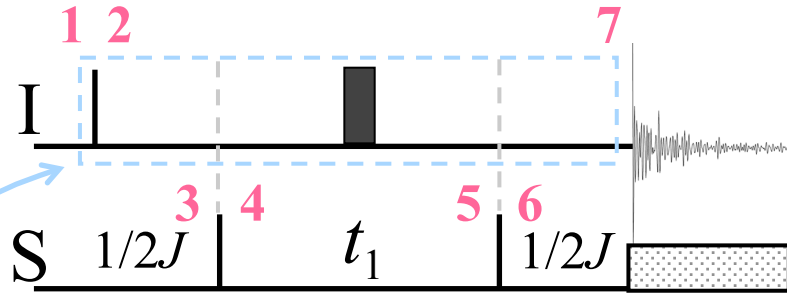
○

—

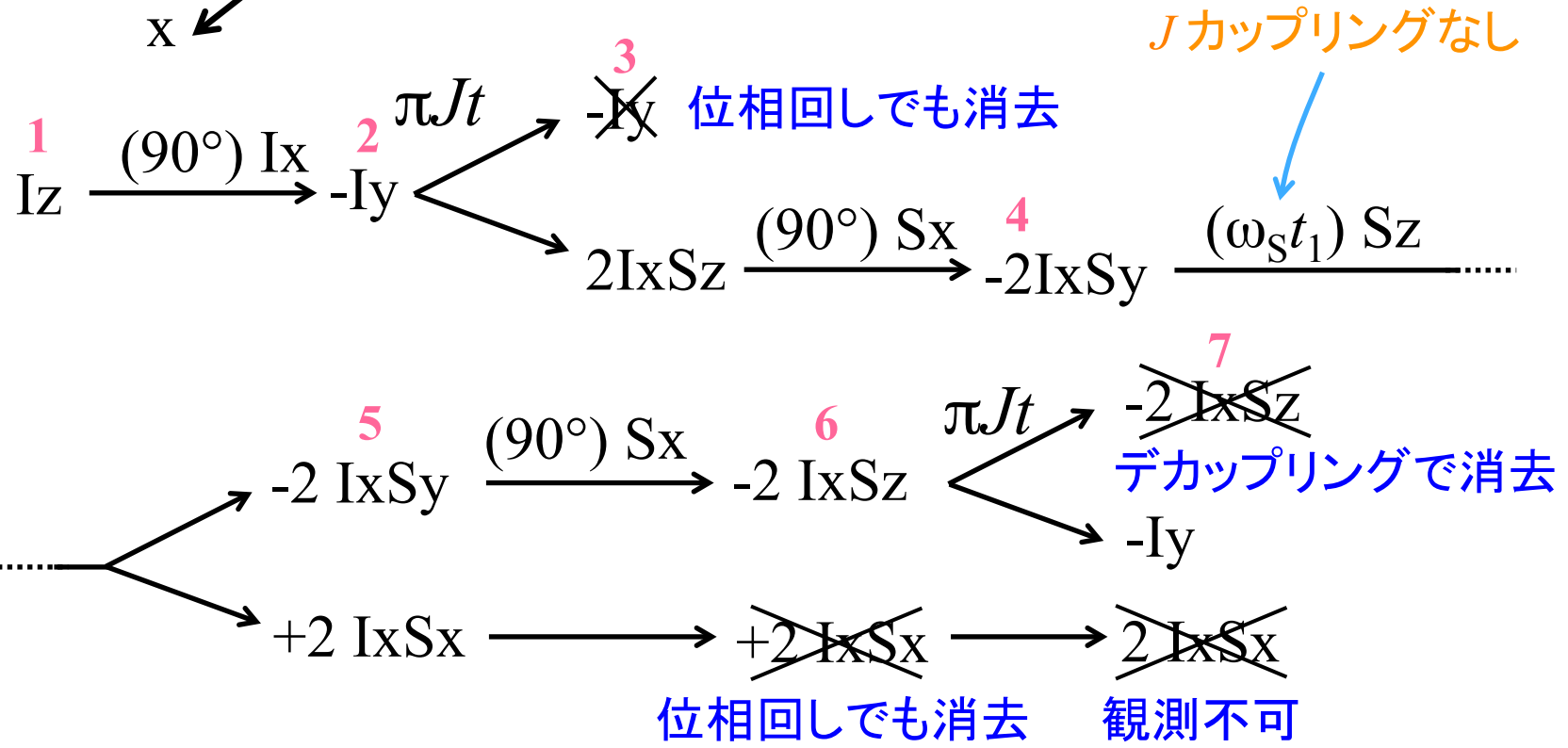
○

○

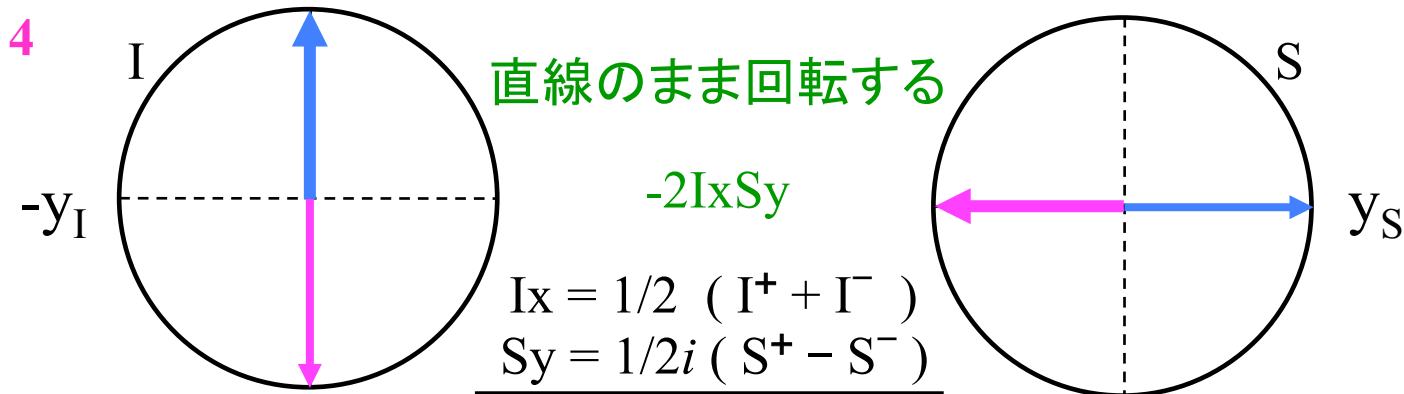
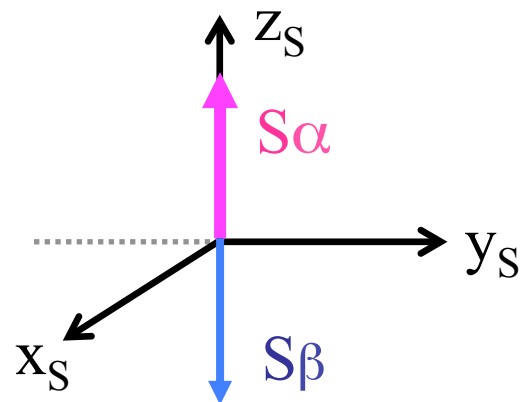
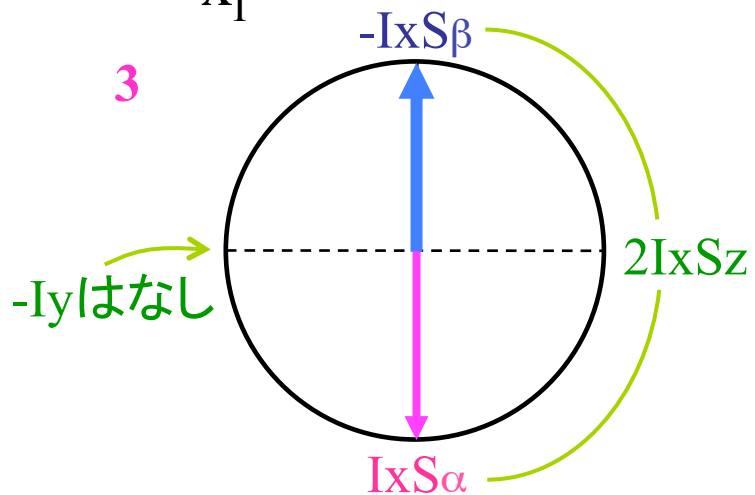
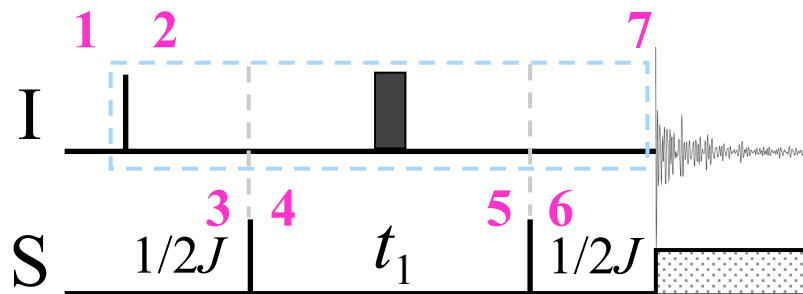
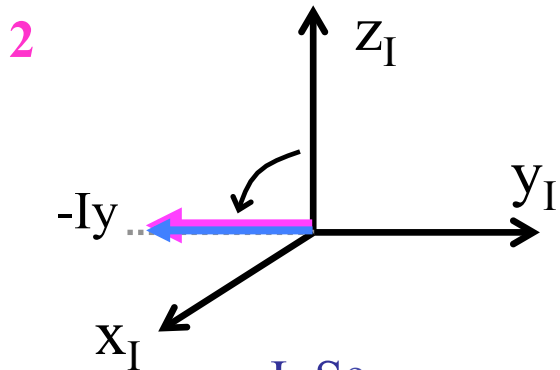
# 1-8 HMQC



Iはエコー ⇒ 化学シフトはなし!





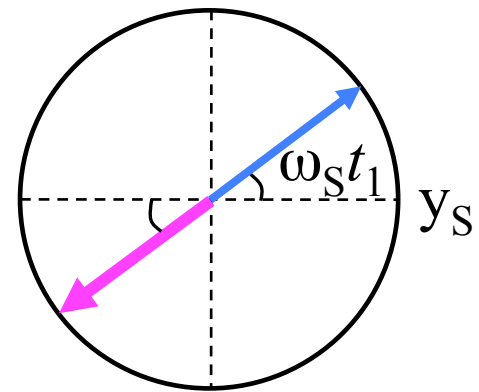
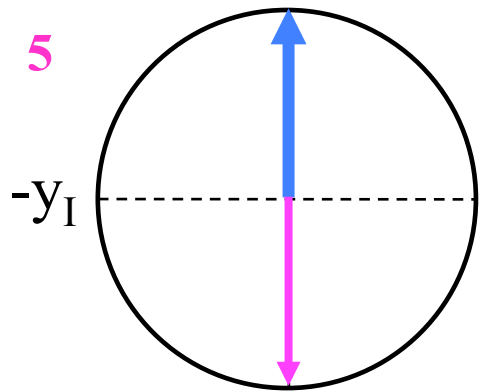


直線のまま回転する

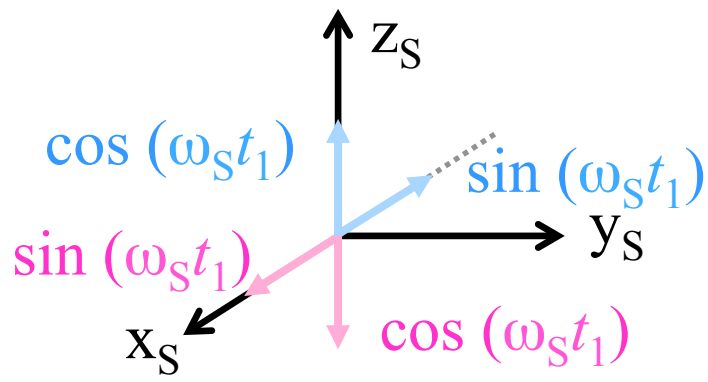
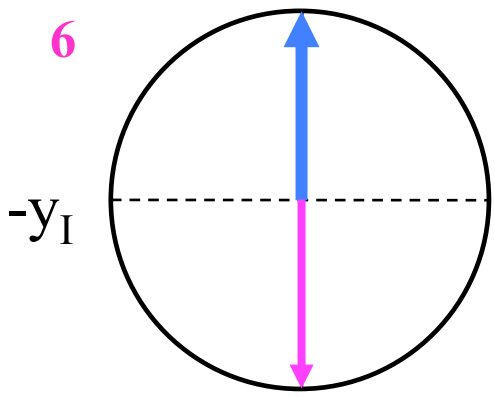
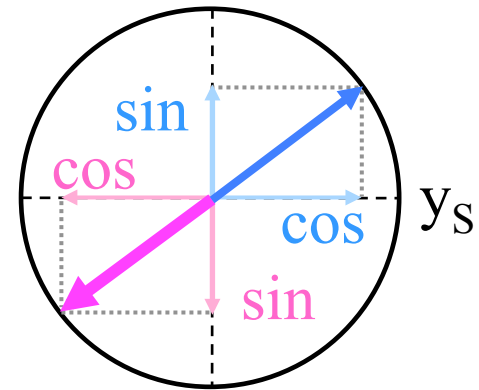
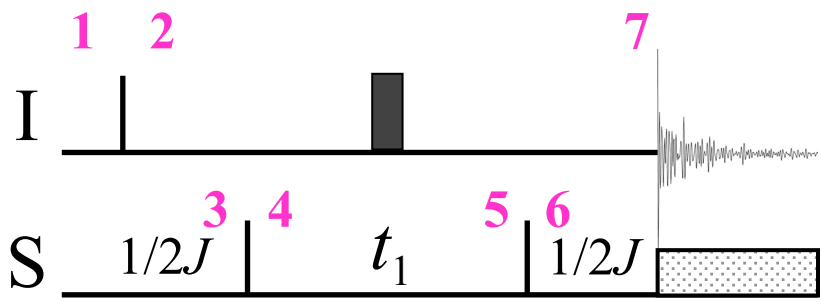
$$I_x = 1/2 (I^+ + I^-)$$

$$S_y = 1/2i (S^+ - S^-)$$

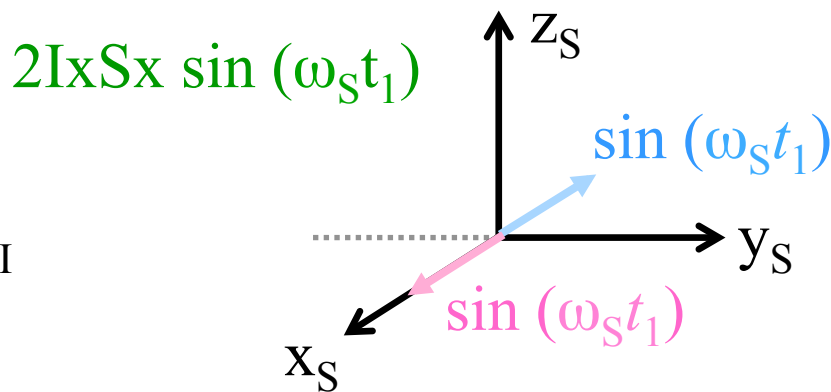
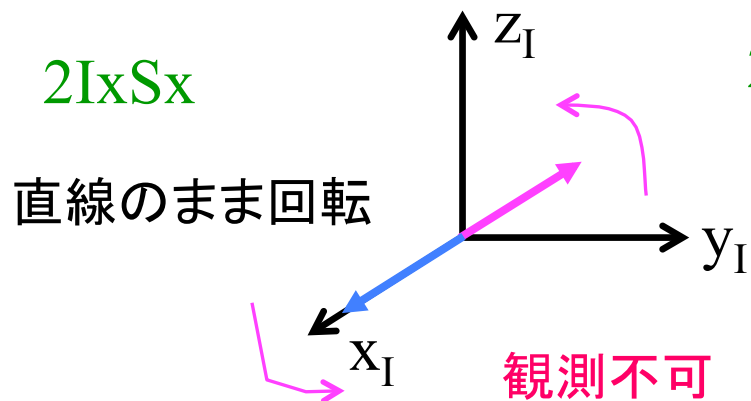
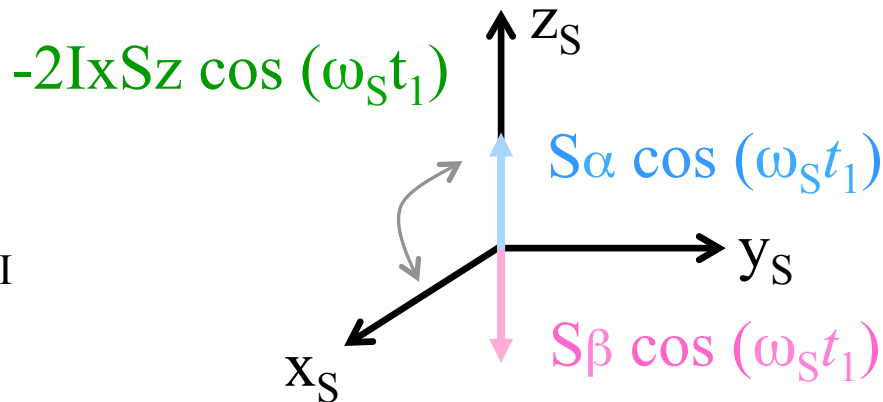
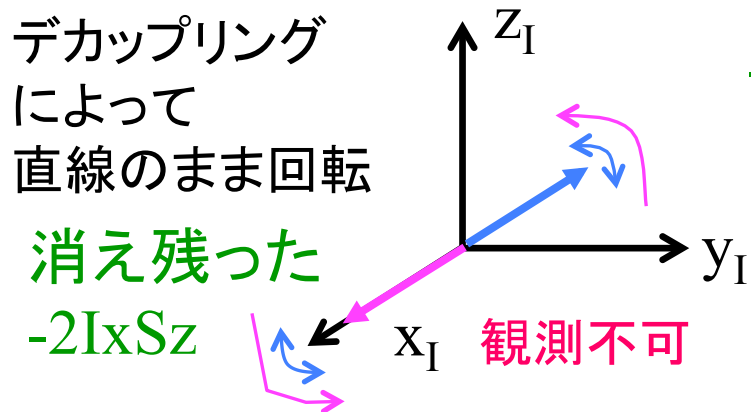
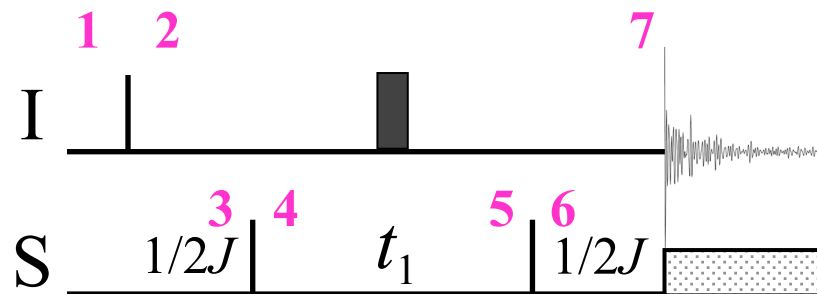
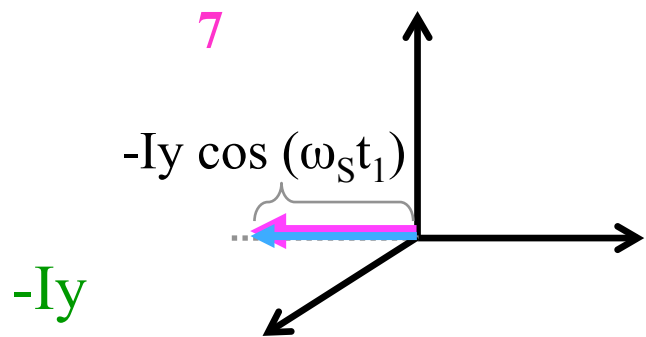
$$2I_x S_y = 1/2i (I^+ S^+ - I^- S^- - I^+ S^- + I^- S^+)$$



$$-2I_x S_y \cos(\omega_S t_1) + 2I_x S_x \sin(\omega_S t_1)$$

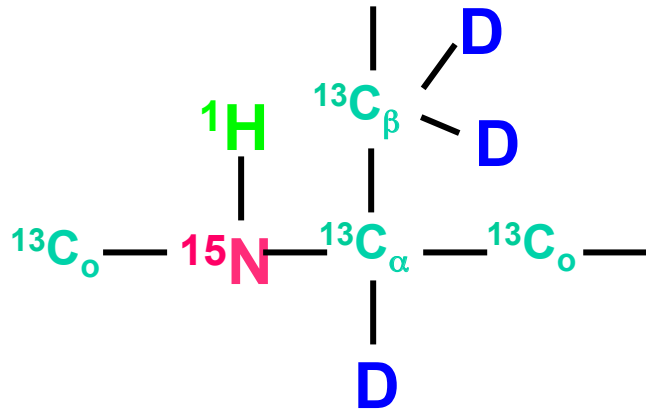


$$-2I_x S_z \cos(\omega_S t_1)$$



# 核磁気共鳴の測定や解析の実際

## NMR で観られる安定同位体



アミド基  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  は孤立しており、何かと理想的。

メチル基  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}_3$  なら、natural-abundance でも測定可能かも。

$^1\text{H}$	99.98 %	無尽蔵
$^2\text{H}$	0.015	原発からのおこぼれ
$^3\text{H}$	0	放射能汚染
$^{13}\text{C}$	1.108	何とか安く！
$^{15}\text{N}$	0.37	空気には一杯
$^{19}\text{F}$	100	無尽蔵だが稀 (故に貴重)
$^{31}\text{P}$	100	無尽蔵 (核酸に多数)

# 1L M9 medium for $^{15}\text{N}$ ( $^{13}\text{C}$ ) culture

## (1) 10 x salt

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
 $\text{NaCl}$

autoclave **separately!**

7.0 g      **should adjust moles if you use hydrated ones**  
3.0 g      pH becomes **7.15** automatically  
0.5 g      the total concentration becomes 130 mM

## (2) vitamin & nucleic-acids

thymidine (T)  
adenosine (A)  
guanosine (G)  
cytidine (C)  
thiamine  
biotin  
10 mM  $\text{FeCl}_3$   
1M  $\text{MgSO}_4$   
50 mM  $\text{MnCl}_2$

autoclave **separately!**

20 mg      nucleosides (need not be nucleotides)  
20 mg  
20 mg  
20 mg  
20 mg      vitamin  $\text{B}_1$   
20 mg      vitamin H (difficult to be dissolved in water)  
1.0 mL  
2.0 mL      not  $\text{MgCl}_2$  !  
1.0 mL

## (3) stable-isotope

$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$   
 $^{13}\text{C}$ -glucose  
 $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -glucose  
---  $\text{D}_2\text{O}$

filter

1.0-2.0 g  
1.0-4.0 g  
1.0-4.0 g      only for  $^2\text{H}$ -labelling  
50-100%      only for  $^2\text{H}$ -labelling

(4) 50mM  $\text{CaCl}_2$

2.0 mL

(5) glycerol

1/1000 (=1mL)

only for  $^{15}\text{N}$ -single-labelling

(6) ampicillin

50-100 ug/mL

(7)  $\text{ZnCl}_2$

20 uM

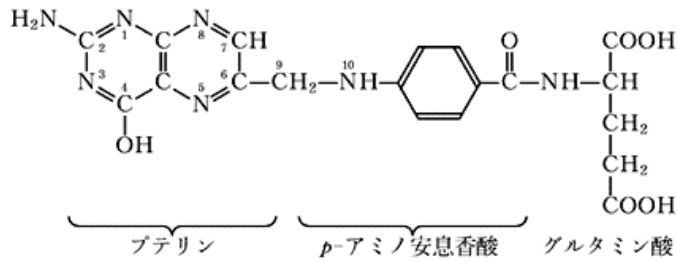
only for **zinc-finger** proteins

**Never mix (1)-(7) up while they are still hot!**

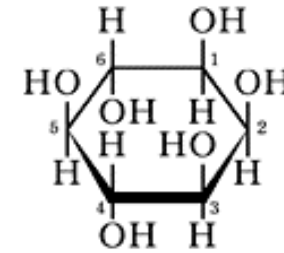
When you culture with  $^{13}\text{C}/^2\text{H}$  (1-2g/L glucose and no glycerol), it would be recommended to add these vitamins because the amount of carbons in media is less than with only  $^{15}\text{N}$  (4g/L glucose and 0.1% glycerol).

(1) folic acid (folate)	(vitamin M)	1mg
(2) choline chloride	(vitamin B)	1mg
(3) nicotin-amide	(vitamin B)	1mg
(4) D-pantothenic acid	(vitamin B)	1mg
(5) pyridoxal	(vitamin B <sub>6</sub> )	1mg
(6) riboflavin	(vitamin B <sub>2</sub> ,G)	
0.1mg		
(7) inositol		2mg

These vitamins should be dissolved in filtered 1mL H<sub>2</sub>O (D<sub>2</sub>O), and stored frozen as aliquot (eppendorf) for each usage.

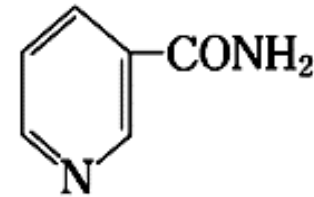
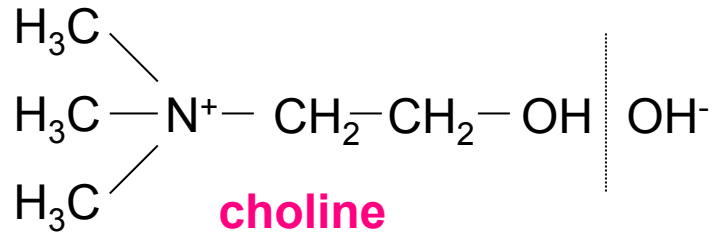


**folic acid**

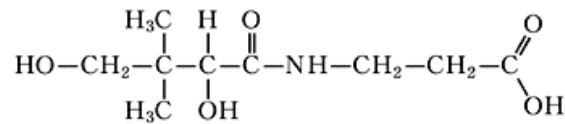


*myo*-イノシトール

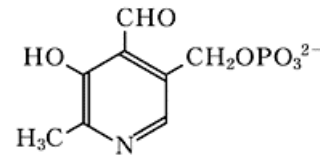
**inositol**



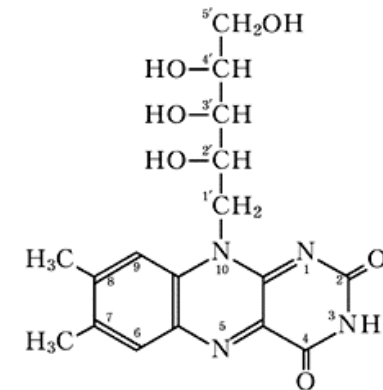
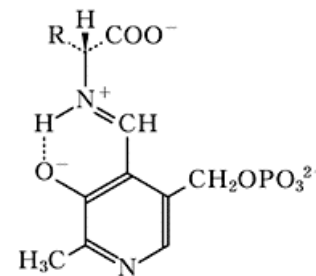
**nicotin-amide**



**D-pantothenic acid**



**pyridoxal**



**riboflavin**



もしかして、次のようなミネラルも効く？

ZnSO<sub>4</sub>  
CoCl<sub>2</sub>  
Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>  
CuCl<sub>2</sub>  
H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

左記ミネラルは、5 μM 程度入れる。各 50 mM ストックを作成しておき、1 万分の 1 を加える。

クエン酸か EDTA (25 μM) などのキレート剤が培地に必要  
(さんまにレモン効果)

大腸菌は寒天プレートに蒔いておいて、元気なのを拾う



グリセロールストックは弱り切っていて駄目

## 大腸菌は薄め過ぎないように注意して植え次ぐ

グリセロールストックを寒天プレートに蒔く。

↓ overnight

コロニーを幾つか拾って 3mL (LB) で育てる。

↓ 3 hr.

100mL (M9) に入れて育てる。

↓ overnight (25°C) 適応 adaptation

1L (M9) に入れて育てる。

↓ 4 hr. (37°C)

対数増殖期に発現誘導をかける。

↓ 2 hr. ~ overnight (15~37°C)

集菌して冷凍保存する。

codon-usage を大腸菌に最適化して合成したプラスミドでは、発現し過ぎて困るので、温度を下げる。

## 遠心限外濾過濃縮器を一晩以上水に漬ける



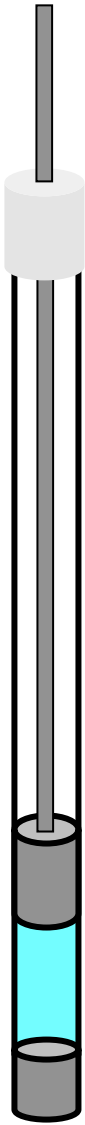
プロトコール通りに5回水で濯いだだけだと、  
せっかくの NOESY が台無しに。

## 試料調製

## -- 試料の分量は？ --



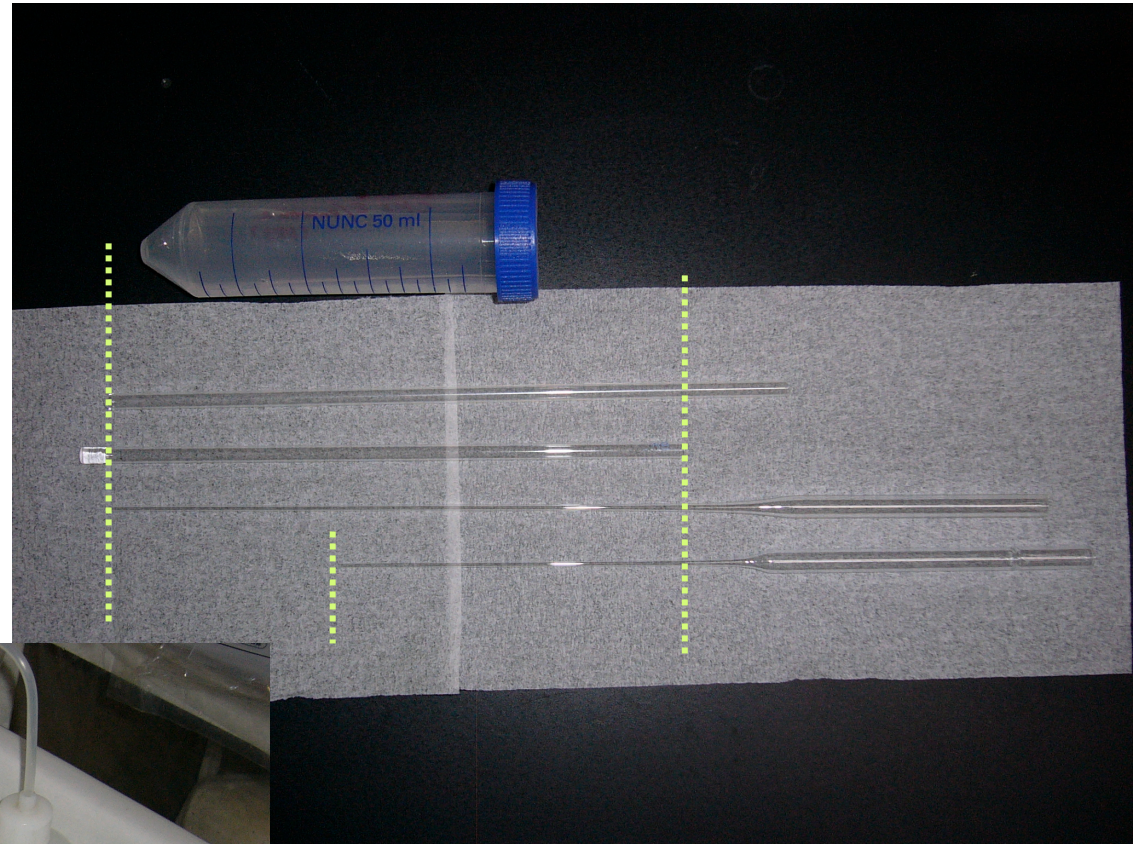
- **安価**である。（安過ぎるのは同心円柱ではない。）
- 溶液を充分量入れれば、**シム**が調整しやすい。逆に溶液量が少なければ、シムを合わせにくい。（最低 500~600  $\mu\text{L}$  欲しい）
- 溶液量が多過ぎると、上下で実際の温度が異なる。さらに**対流**や滴の落下が起き易い。
- pulse-照射、検出や静磁場の **inhomogeneity** が起き易い。（90° パルス長が少し長くなる？）
- 泡が溜まりにくいのは良い。ただし、長時間の測定では蒸発するため、自動シム調整を同時に作動させるとよい。
- 滴定実験には適している。



- 試料の量が **300  $\mu$ L** 程度で最適！（1.9 cm 高さ）
- 各溶媒の**磁化率**に合わせたガラス製品を使うとよい。
- 溶液量が少ないので、実際の**温度**が上下で比較的均一であり、対流が小さい。
- pulse-照射、検出や静磁場の **inhomogeneity** が起き難い。特に**溶媒信号の消去**には効果が高い。
- **泡**が生じてシムが台無しになることが多い。
- ピストンを抜き差しすると溶液量が減るので、滴定実験には適していない。
- **高価**であるので多数の試料には痛い（dispo ではない）
- Topshim(gradshim) では、シゲミであることを知らせる。

## 長いパストツール

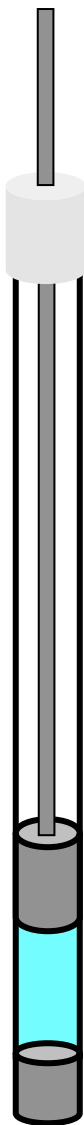
試料を泡立てずに試料管の底に「置く」ことができる。また、回収率も高い。



## 便利で簡単なすすぎ装置

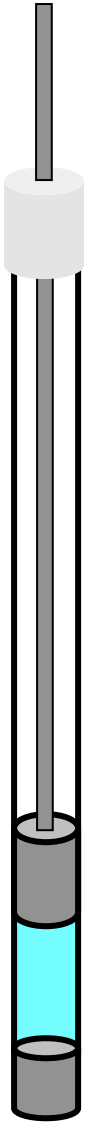
汚れた試料管に EDTA、その後、  
(ママレモンなどの) 洗剤を入れた後、水でよくすすぐ。

## 試料管に関するその他の注意事項

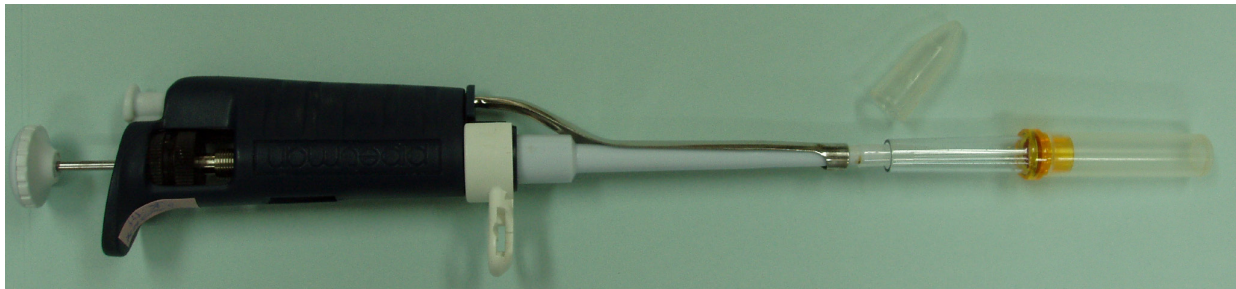
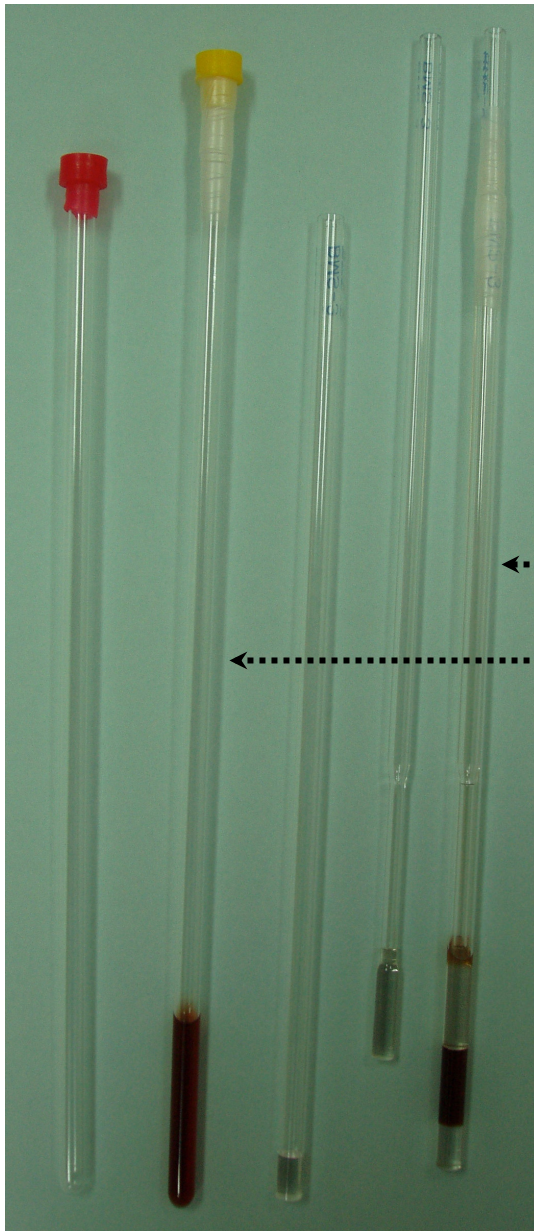


- 洗剤で洗う。簡単なすすぎ装置が役に立つ。
- シリコンでコーティングするとプラス荷電性の分子がガラス表面に引っ付き難くなる。
- 長めの特注パスツールピペットを使うと、試料の出し入れが簡単。手回し遠心機を使うより安全である。
- 脱気後に窒素ガスを詰めて封管できれば、試料を酸化から守ることができ、さらに線形が細くなる。ただし、封管時の加熱は試料管の形を歪める。
- NMR で窒素ガスを使用している場合は、むしろ蓋をしない方が得か？ その代わりに試料の蒸発が激しいので、シムが変動しやすい。
- クロロホルムなどは蒸発に注意する。





- 試料管のロットによっては、どうしてもアーティファクトのピークを消せない場合がある。（返品できる？）
- 水溶液が凍ると、やはり試料管は割れ、プローブの洗浄が必要になる。
- 時々、EDTA 溶液を通すと、常磁性緩和のもととなる遷移金属を除去できる。金属はガラス表面によく付着する。
- ガラス表面には水分子が多数ついているので、軽水の信号を極力少なくしたい場合には、目的の重水素溶媒ですすぐ。
- シゲミ試料管は、スピニングをしない（ピストンにより傷がつくため）。
- スピナーの位置合わせは、できるだけ正確に行う。Topshim (gradshim) の結果に多いに影響する。
- ピストンの上部には、十分量の溶液を載せる。
- 半日後にもう一度、磁石から取り出して泡を抜く。



限外濾過器のセントリコン（フィルター付近を泡立てないように注意しながら、ピペティングを行った後、エッペンドルフ管に試料を移す。）

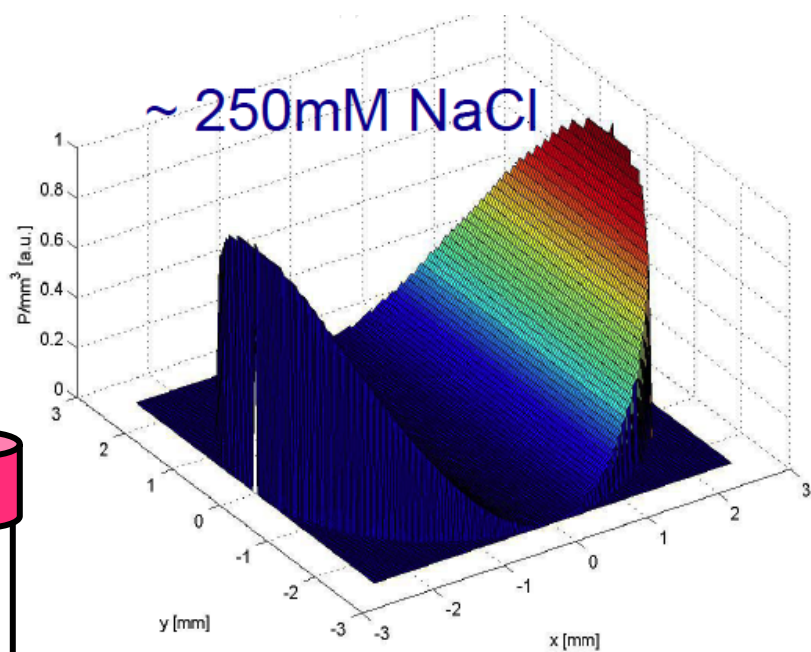
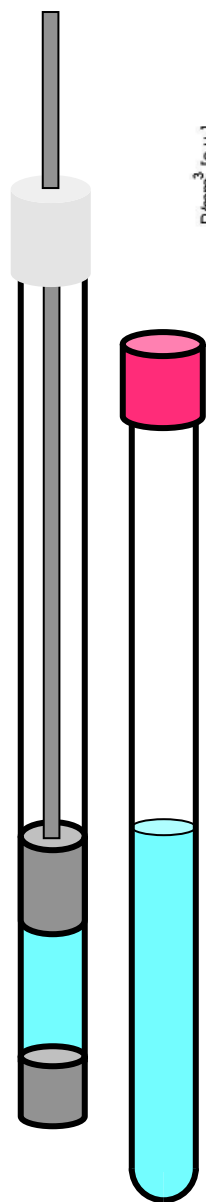
←..... 5mm 直径のシゲミ社製試料管

←..... 5mm 直径の Wilmad 社製丸底試料管

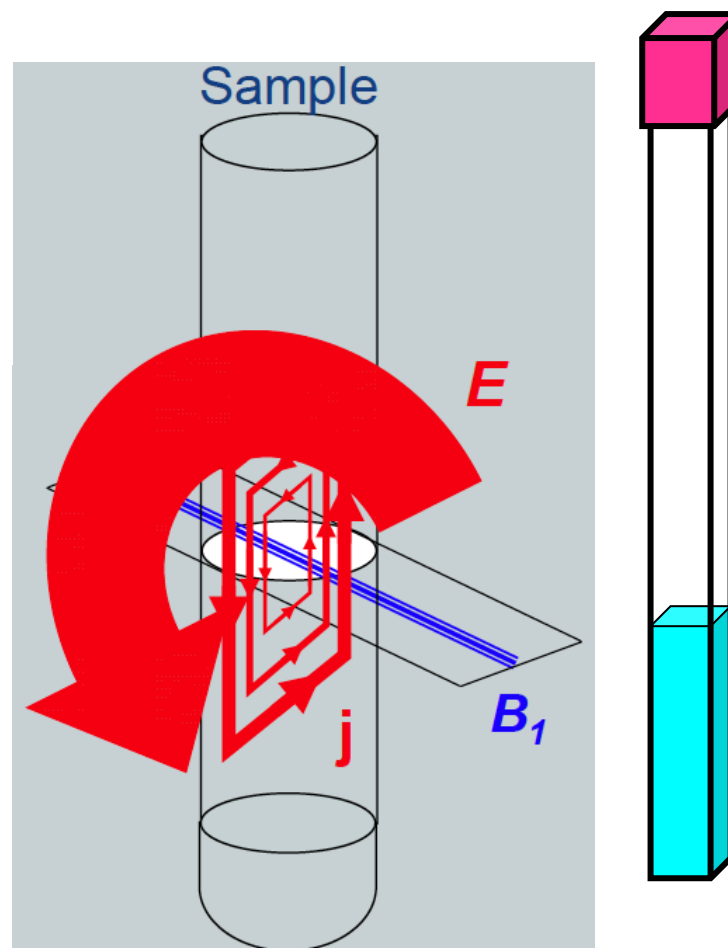
HPLC などを使用するポリエチレンチューブ  
ソフトなチューブで接続する。



- 四角い試料管は、パルスによって発生する電場の効果を避けれるので、塩濃度が濃くても測定が可能となる。
- 丸い試料管があれば、溶媒の磁化の偏りを無くせるのだが。
- アルミナの試料管を使うと、疎水性分子が試料管の内側に引っ付くのを防げるかも。しかし、外側からは溶液量が見えないのが難点である。
- 限外濾過器（アミコンウルトラ）は一晩は 1L 水に浸け、グリセロールを除いておく。5回すすぐだけでは不十分。



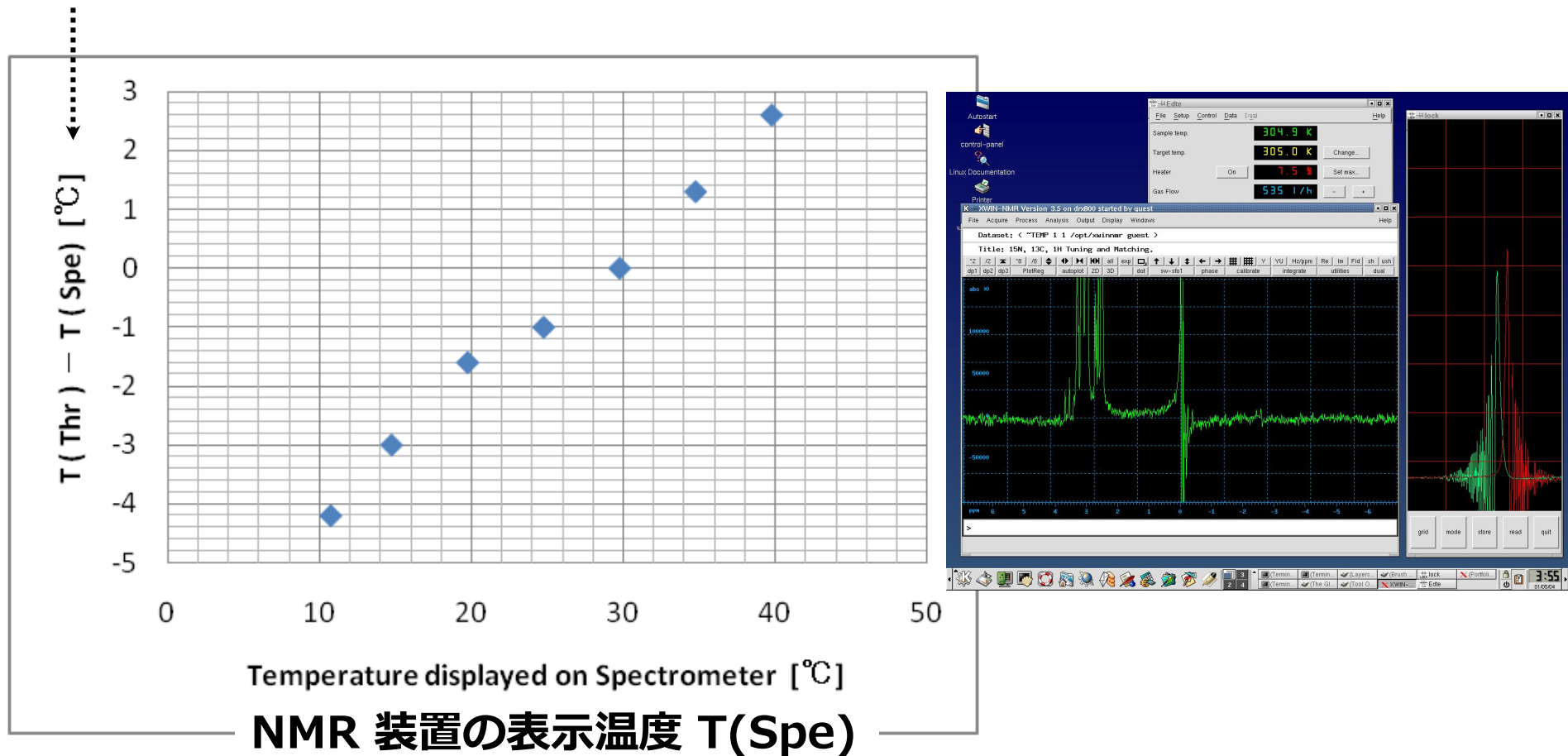
パルスにより生じる電場



Data courtesy of Dr. Rainer Kümmerle, Bruker Biospin AG

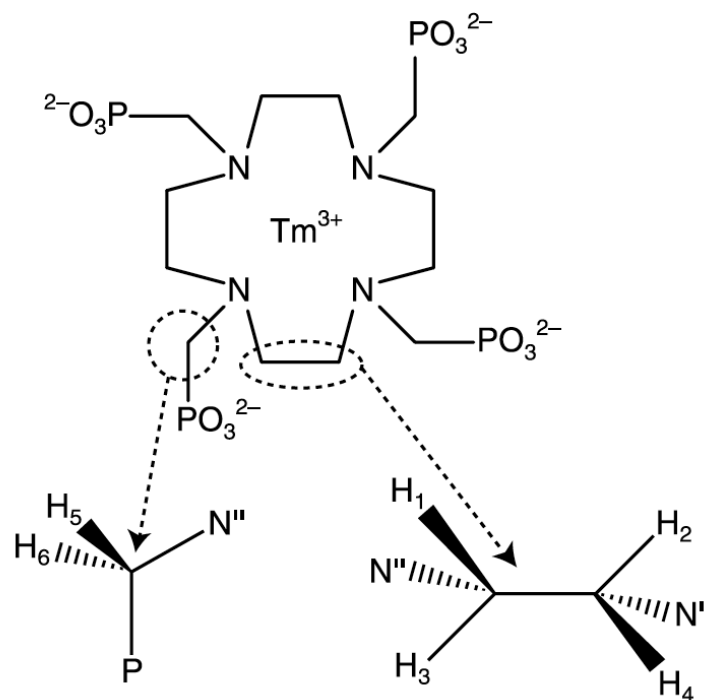
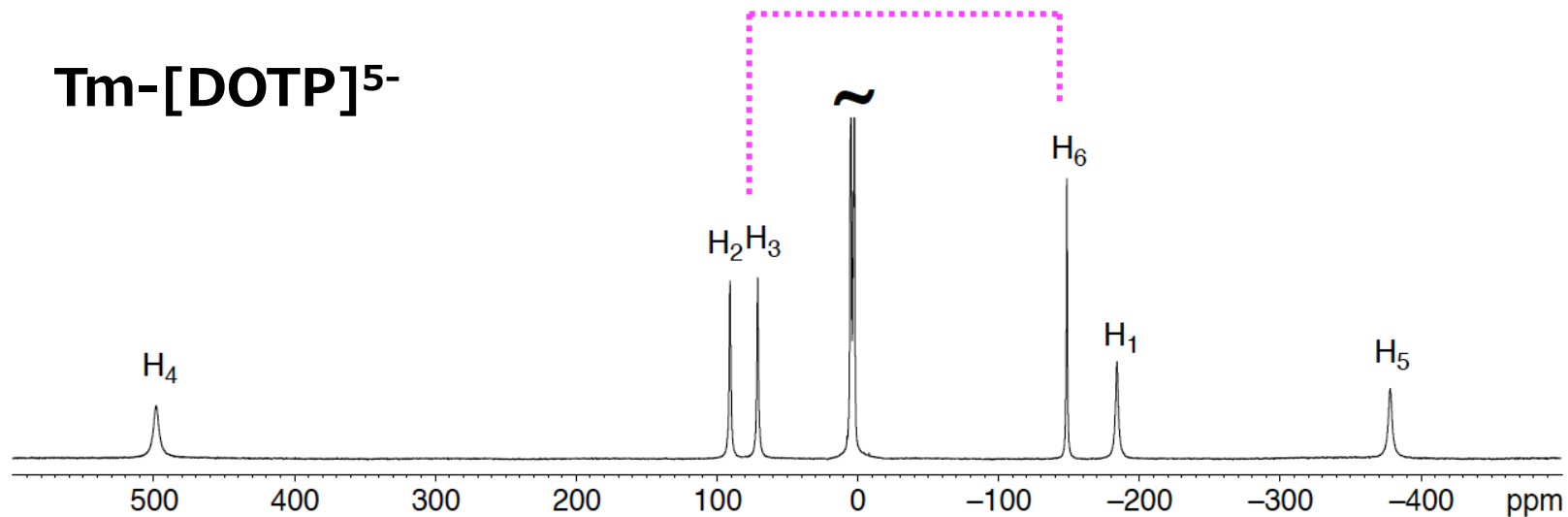
# 温度設定 -- 表示温度は本当に正しい? --

熱電対での測定温度  $T(\text{Thr})$  - NMR 装置の表示温度  $T(\text{Spe})$



6 °C程度もずれているかもしれない。

# Tm-[DOTP]<sup>5-</sup>

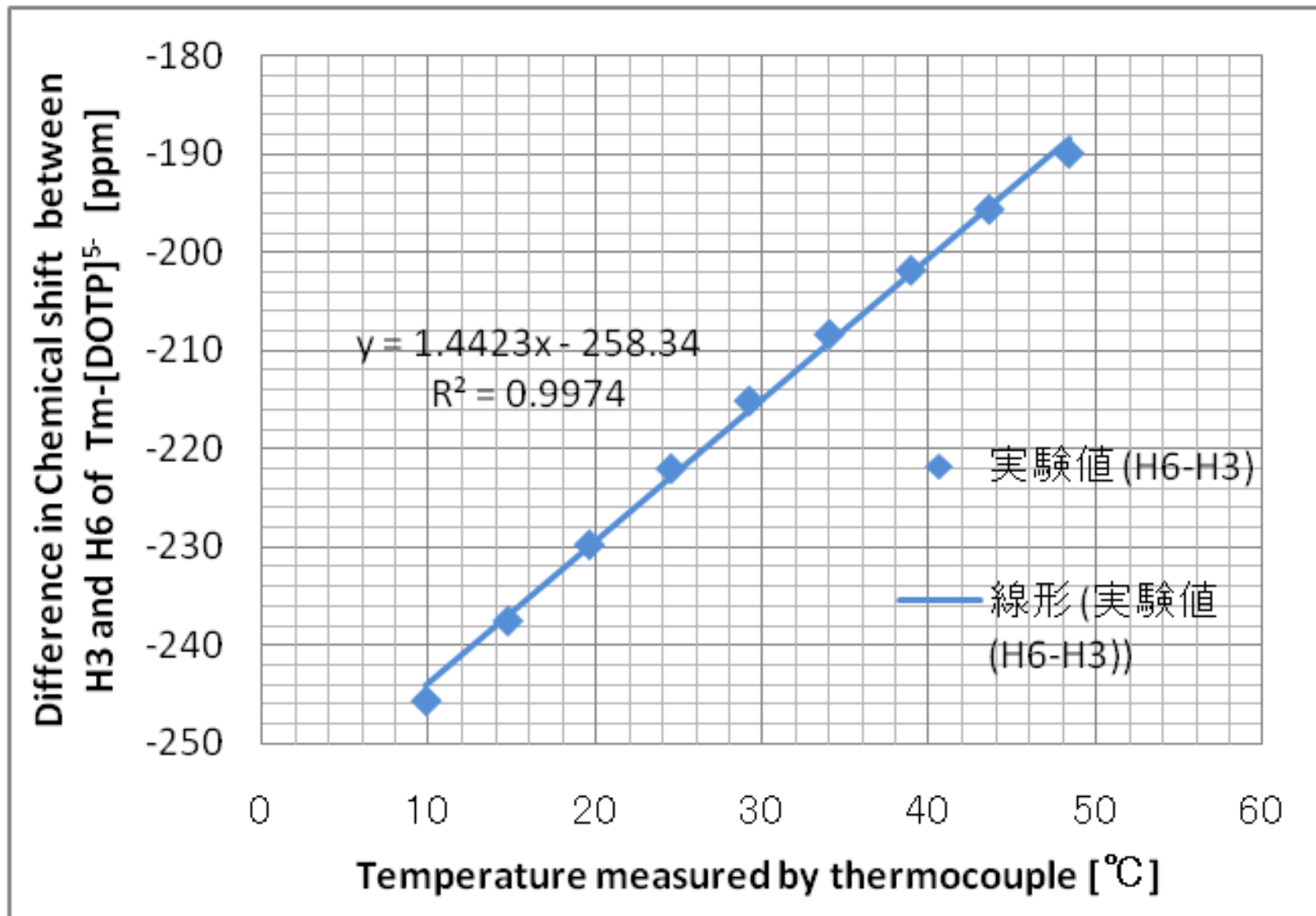


**1 °Cにつき 1.29ppm の変化**

**メタノールやエチレングリ  
コール (< 0.01 ppm/°C) よりも精密**

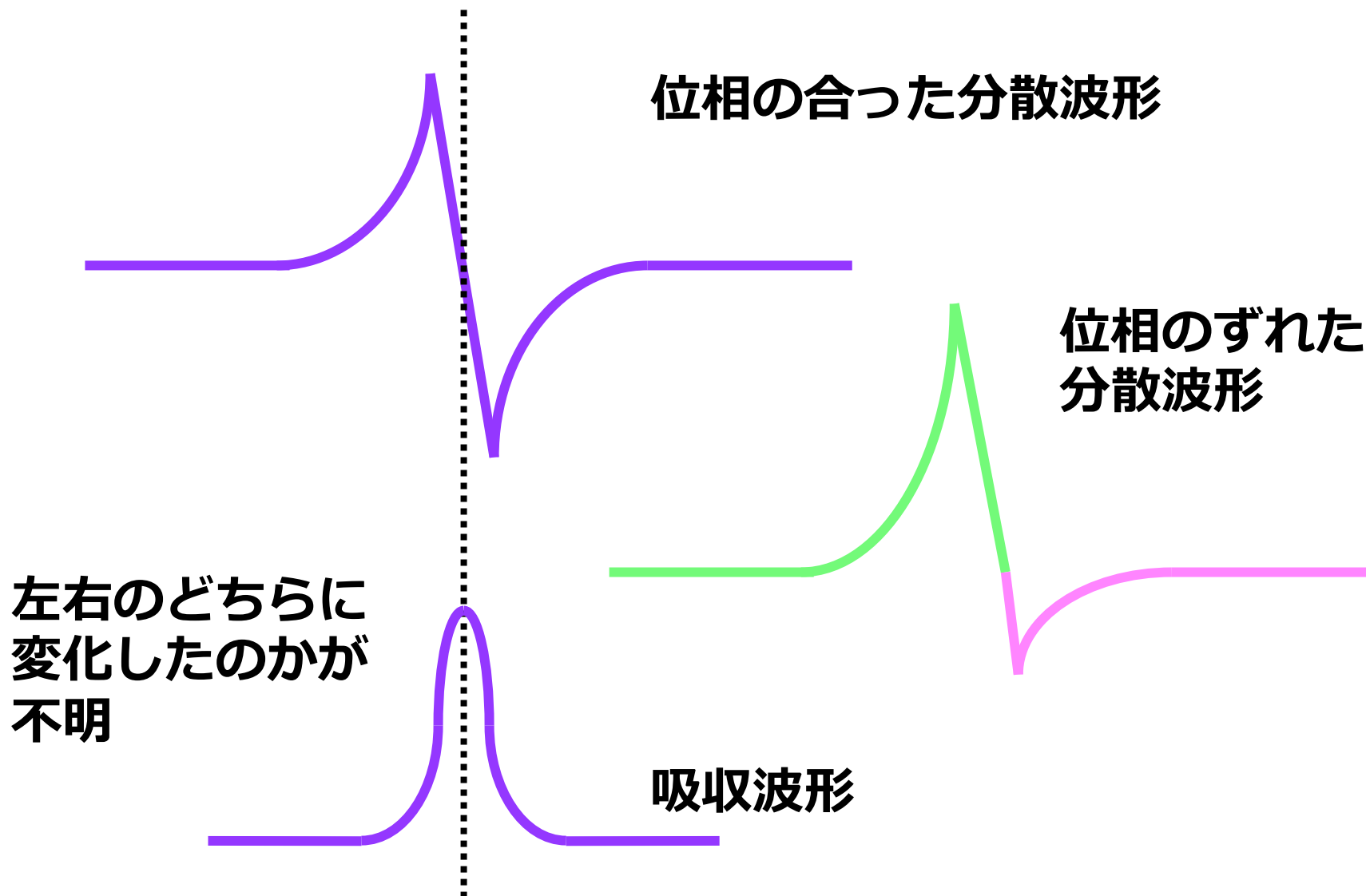
Zuo, C.S. *et al.* (1998) *J. Magn. Reson.* **133**, 53-60.

Loening, N.M. *et al.* (2002) *J. Magn. Reson.* **159**, 55-61.



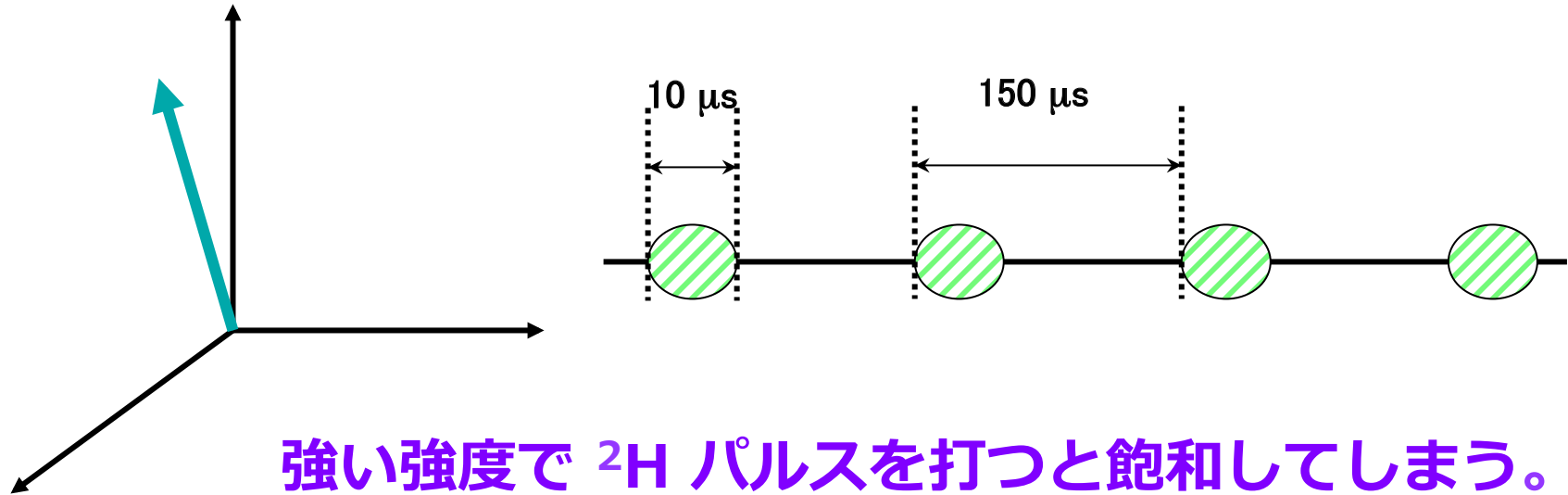
10-50°C の範囲内での Tm-[DOTP]<sup>5-</sup> の化学シフト差 ( $\delta$  (H6)- $\delta$ (H3)) 変化の温度依存性 (@ 400MHz NMR)

# 重水素ロックの設定

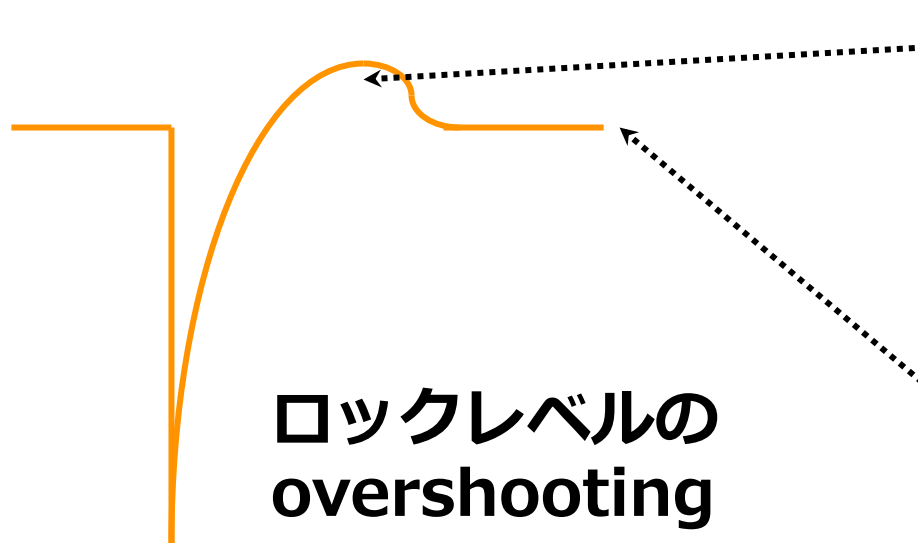




# 重水素ロックのパルス強度 -- 強すぎず弱すぎず --



強い強度で  $^2\text{H}$  パルスを打つと飽和してしまう。



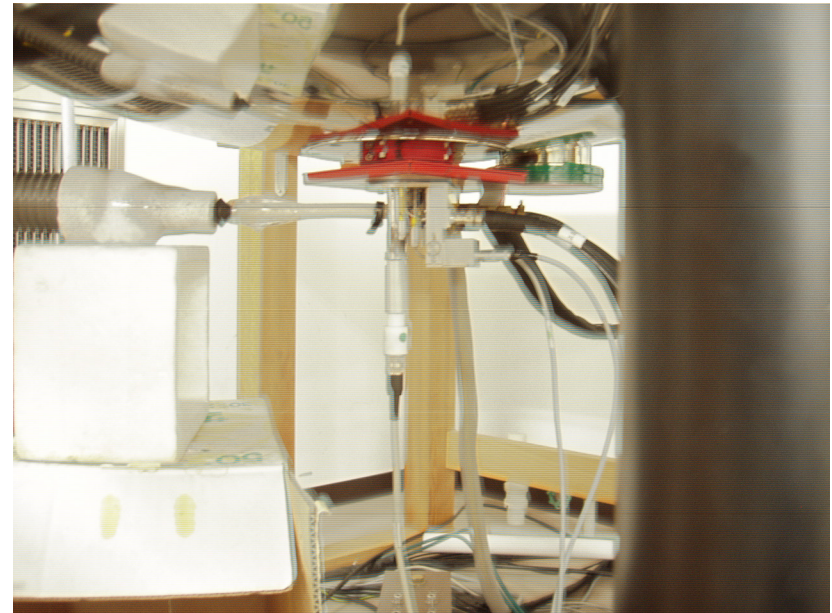
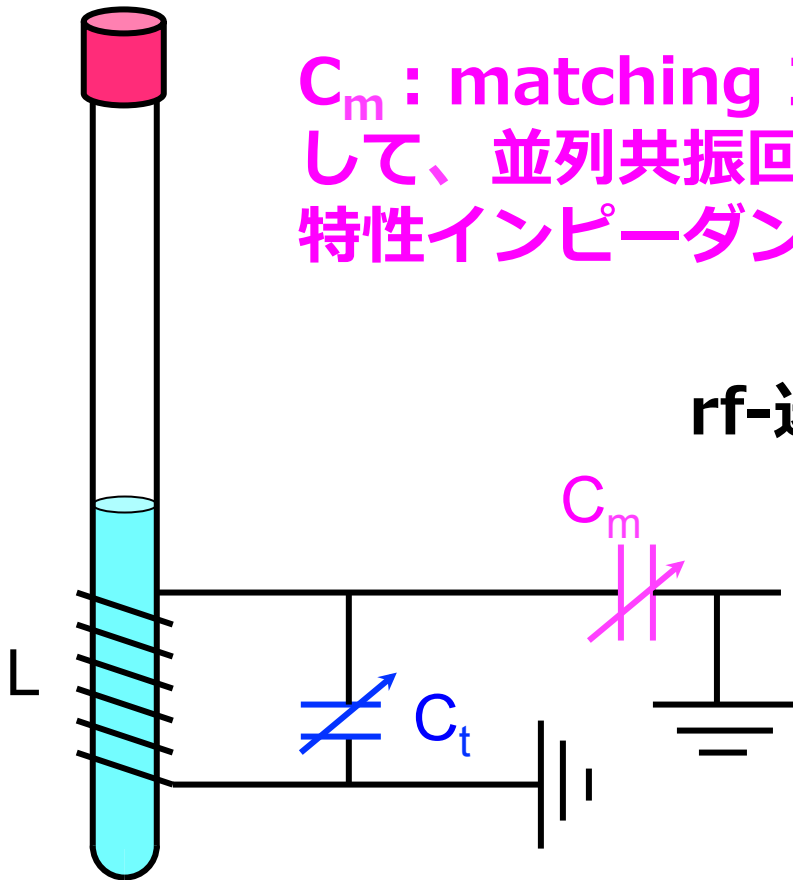
Gradient によりスペクトル幅が広がり、選択パルスを打ったような感じとなる。そのため、パルスの影響を受けなかった外側の周波数領域の  $^2\text{H}$  が飽和状態から脱し、強度が上がった。

常に飽和してしまっているために、正常時よりも弱い  $^2\text{H}$  信号強度となっている。

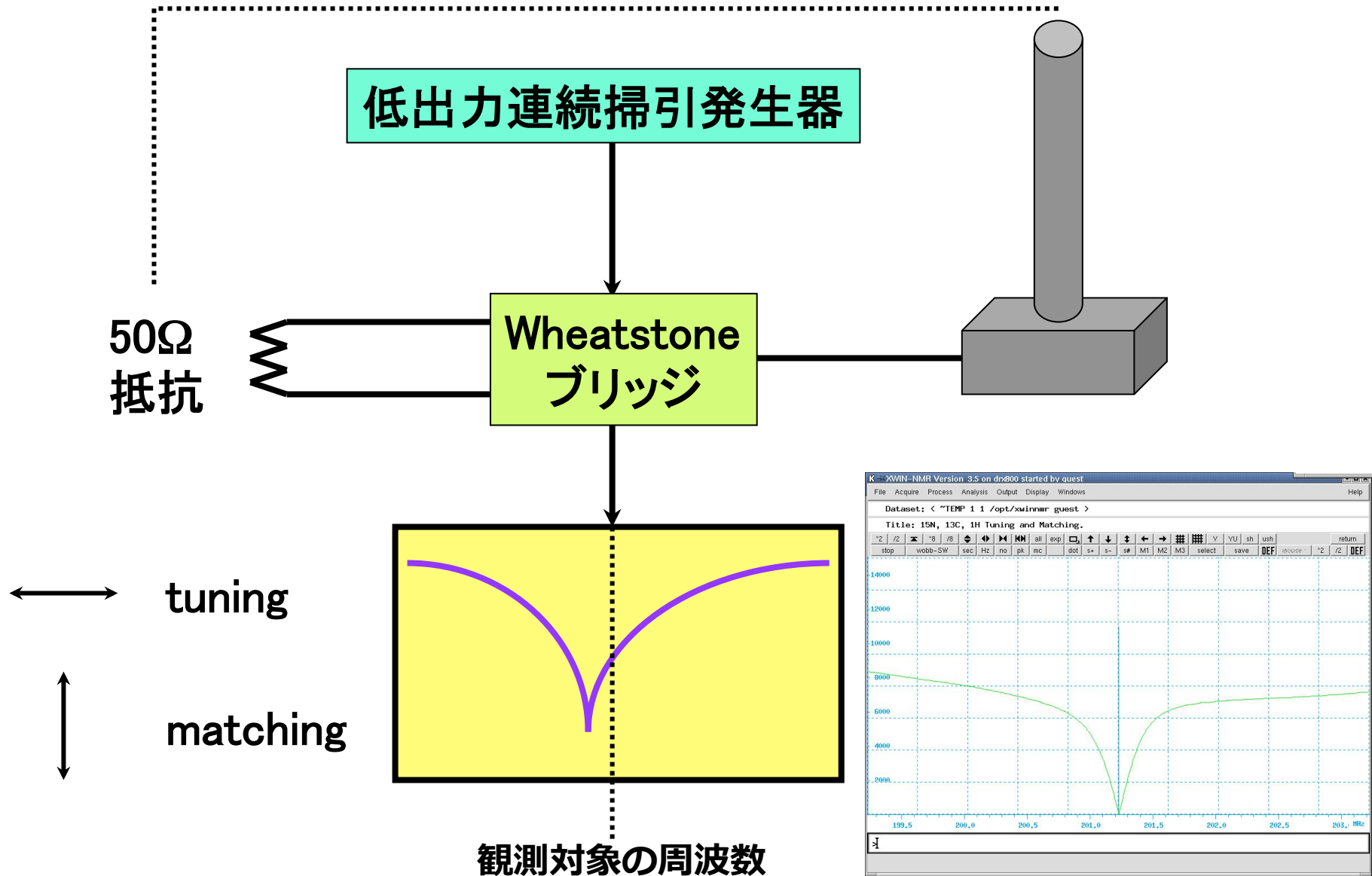
## チューニング・マッチングの調整

$C_t$  : tuning コンデンサーの電気容量を調整して、共振周波数を測定対象核の周波数に同調する

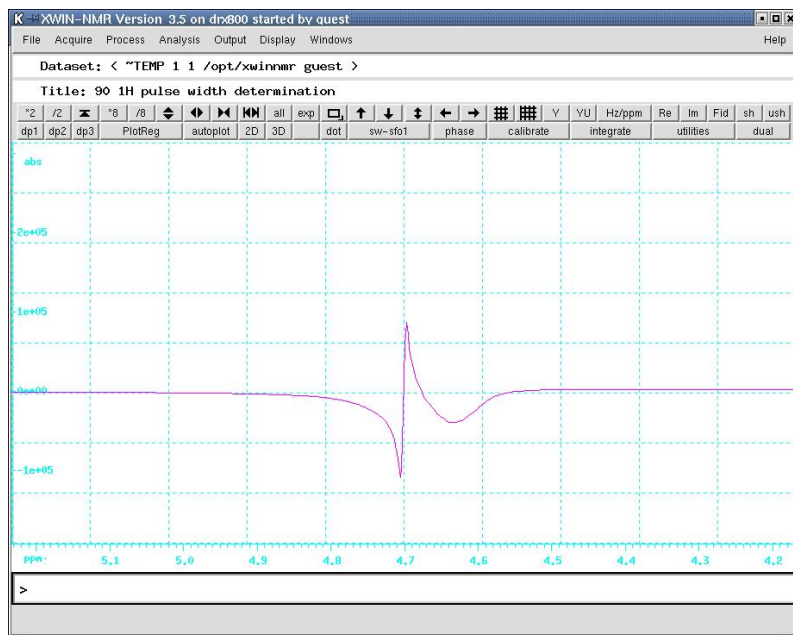
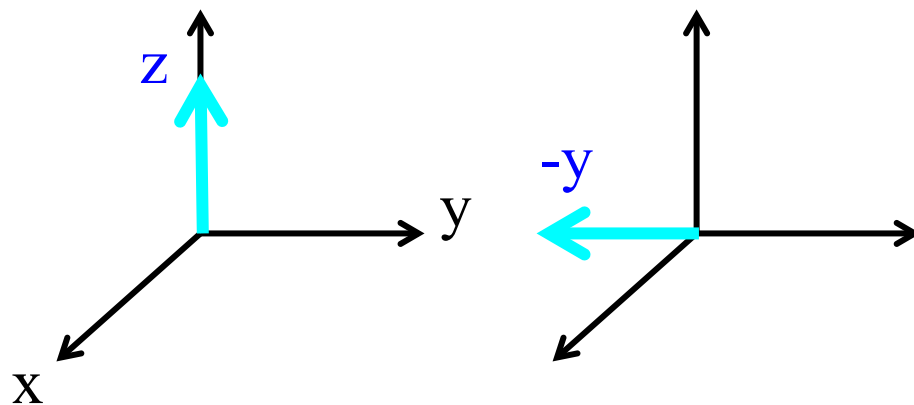
$C_m$  : matching コンデンサーの電気容量を調整して、並列共振回路のインピーダンス（抵抗）を特性インピーダンス（ $50\Omega$ ）に整合する



両者のインピーダンスが一致（整合）すれば出力が最低となる



# $^1\text{H}$ 核の $90^\circ$ パルス幅の決定

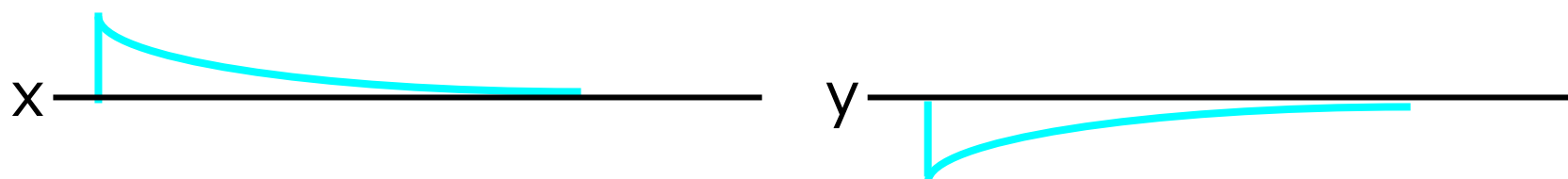


**Radiation damping を防ぐためには  $180^\circ$  よりも  $360^\circ$  回転の方がよい。**

**それに、 $T_1$  緩和の時間をほとんど待つ必要がない。**

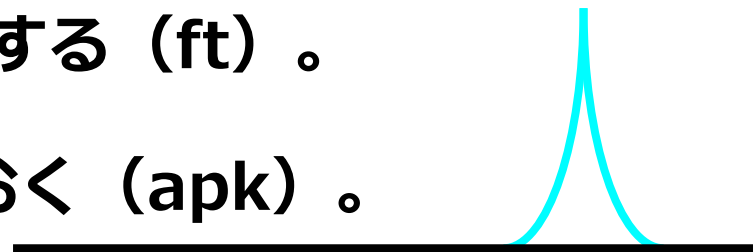
## 水信号を使つての $^1\text{H}$ 核 $90^\circ$ パルス幅の決め方

- (1) on-resonance に合わせる (o1p=4.7)。
- (2)  $1 \sim 3 \mu\text{s}$  程度のパルスを打つ (p1=1u, zg)。

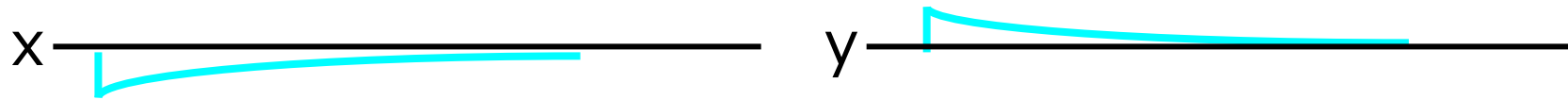


もし、振動していたら off-resonance から打っている。

- (3)  $\cos^2$ -window を掛ける (ssb=2, qsin)。
- (4) 0-fill を足し、フーリエ変換する (ft)。
- (5) 位相をきっちりと合わせておく (apk)。



(5)  $360^\circ$  に相当するパルスを打つ (例:  $4 \times 10 \mu\text{s}$ )。



$3 \mu\text{s}$  を打った時の FID と比較する。  
もし、正負が逆ならば、 $360^\circ$  に足りていない。

(6) FID の最初の信号強度が 0 になるまで試す。



(7) 最後に確認のためにフーリエ変換してみる。  
位相は  $3 \mu\text{s}$  の時の値で合わせる (pk)。



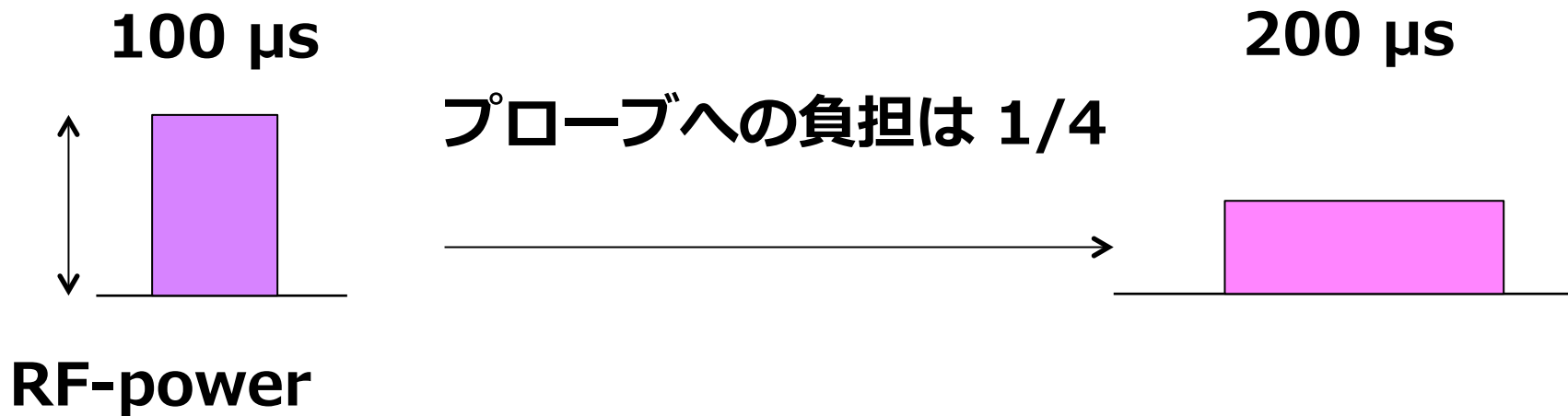
パワーには、RF-field-power(Hz) と W-power がある

$$dB_1 - dB_2 = -10 \cdot \log_{10} \frac{P_1^w}{P_2^w} \quad \text{電力 (W)}$$

$$dB_1 - dB_2 = -20 \cdot \log_{10} \frac{P_1^{RF}}{P_2^{RF}} \quad \text{電圧 (V)}$$

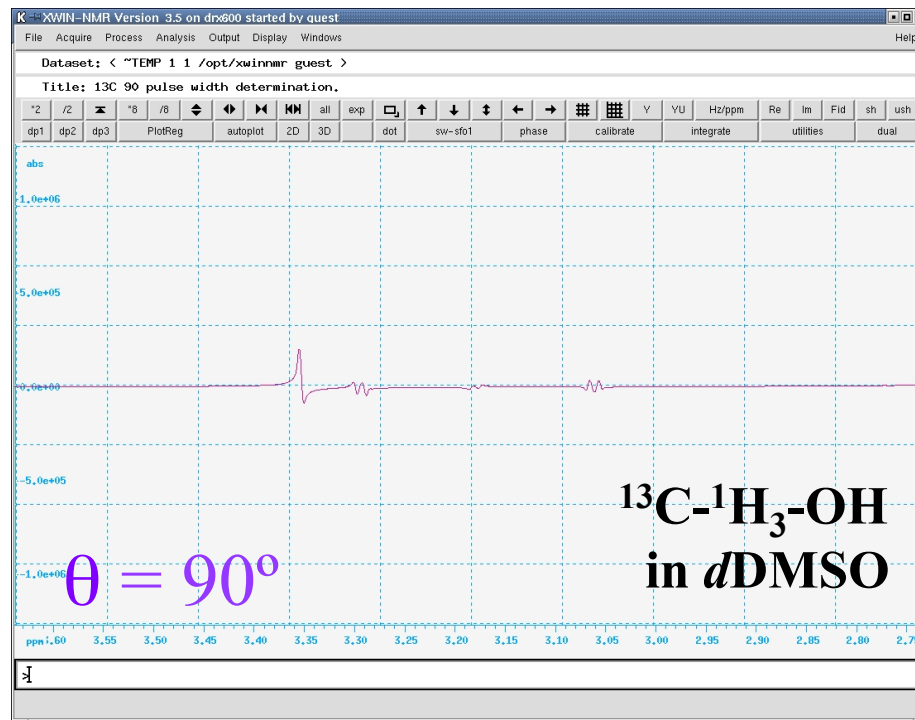
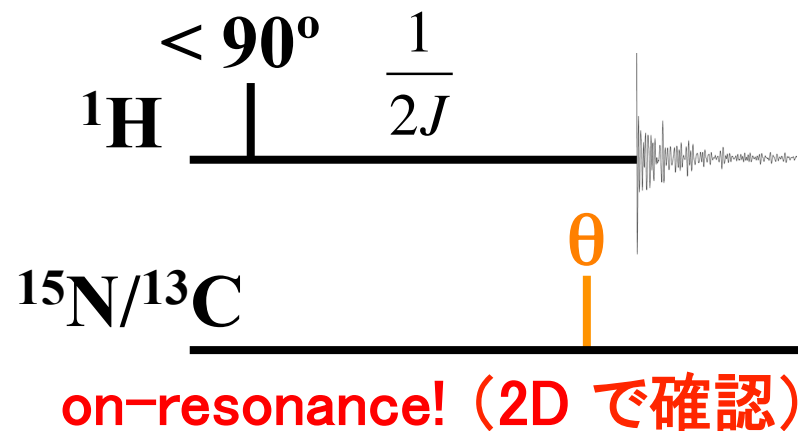
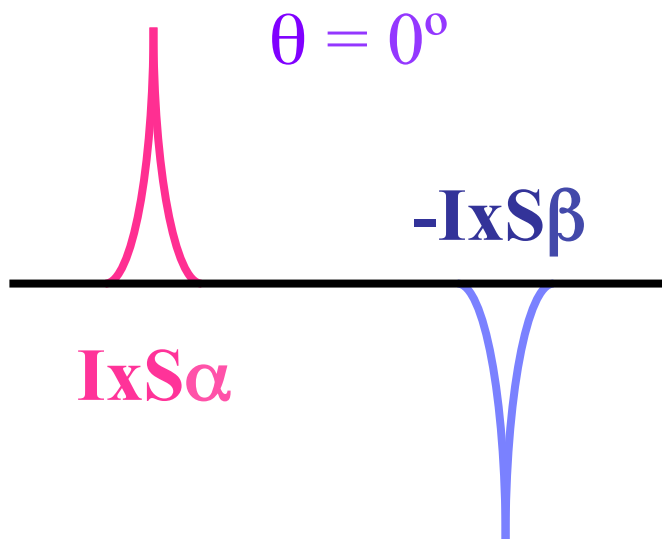
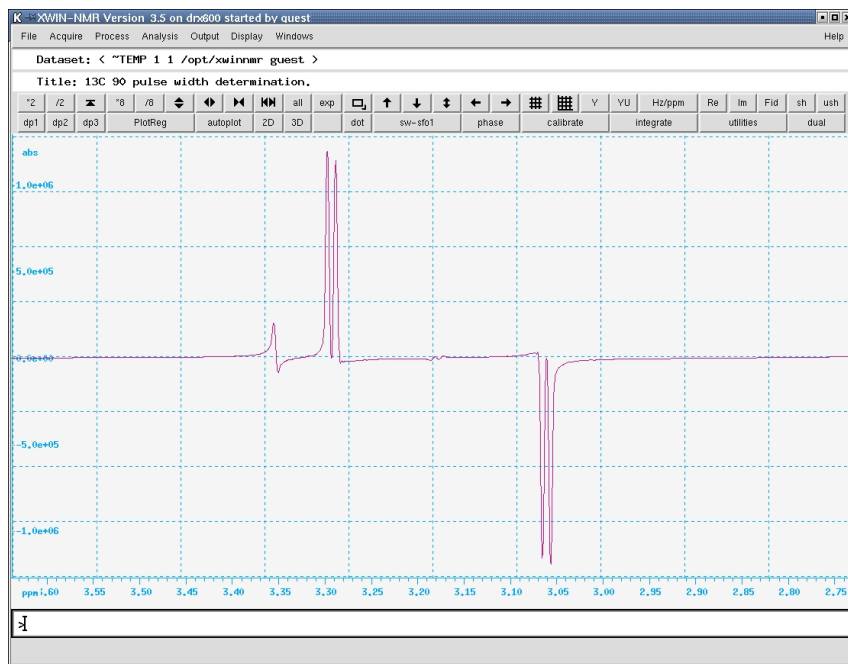
**-20 dB = 100 W**  
**0 dB = 1 W**

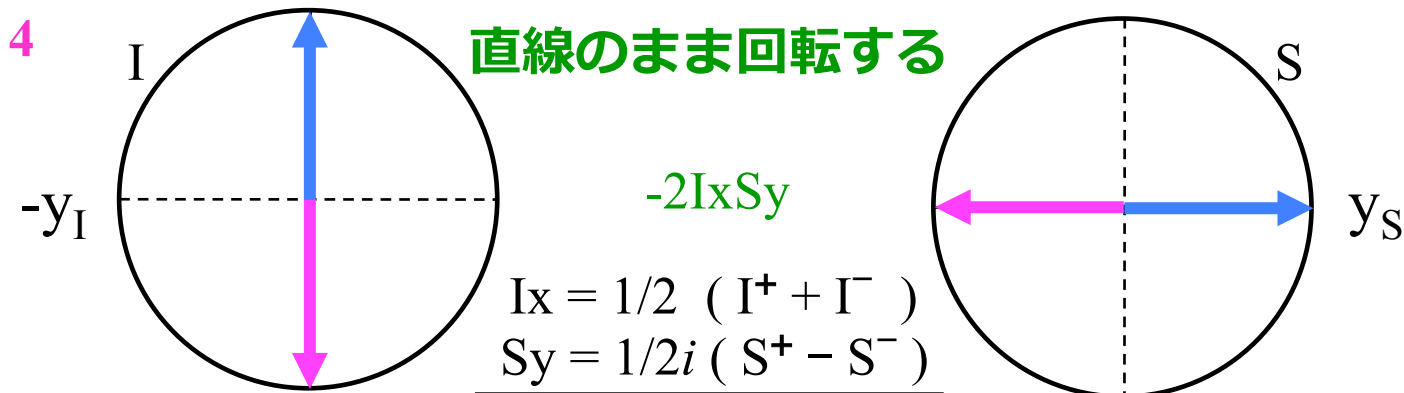
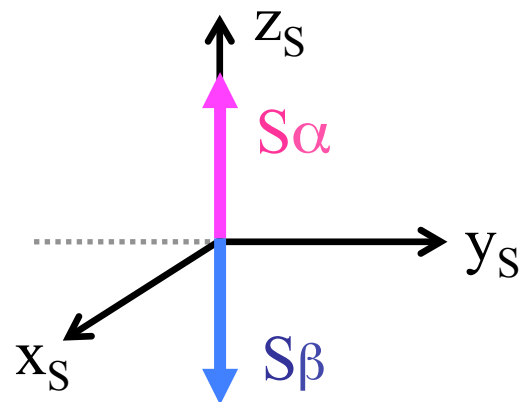
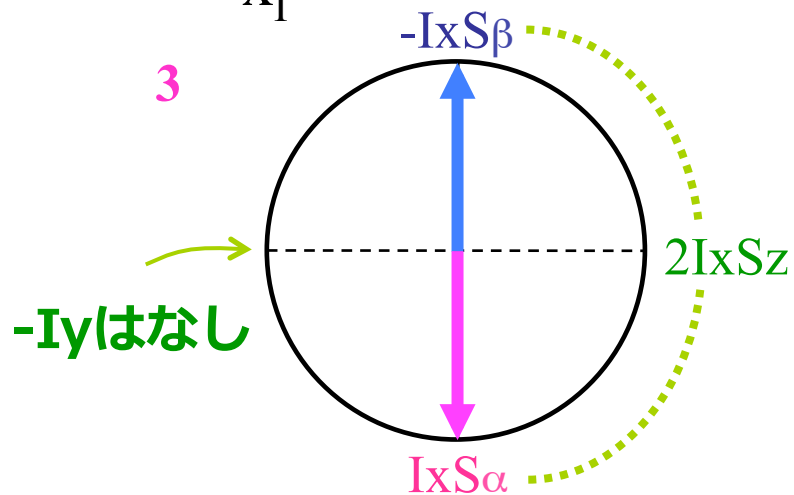
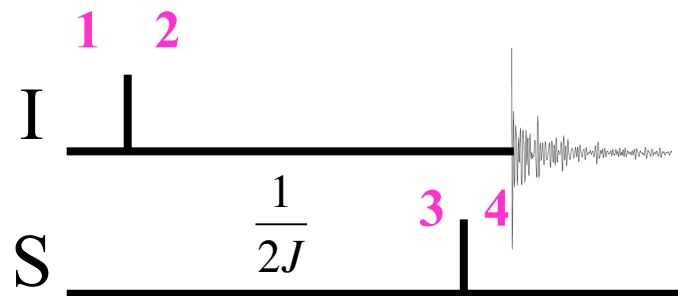
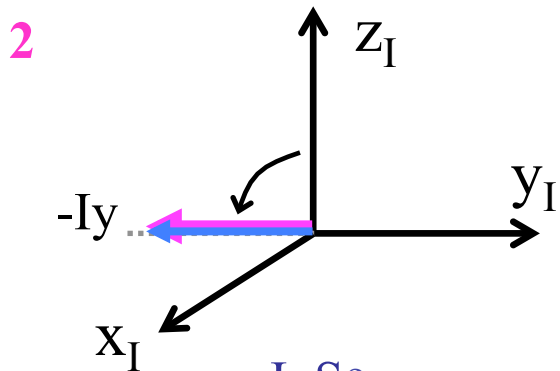
**RF-power が 1/2 になれば、**  
 **$\Delta$ dB: +6 dB**  
**パルス幅:  $\times 2$**   
**W-power:  $\times 1/4$**





# 異種核の 90° パルス長の決定





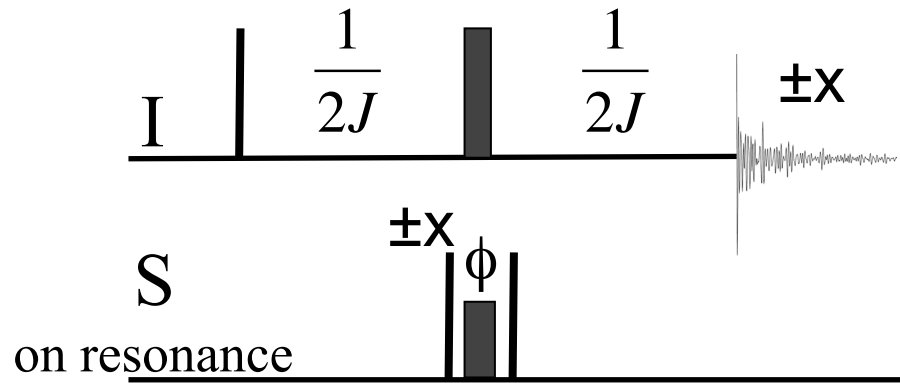
$$I_x = 1/2 ( I^+ + I^- )$$

$$S_y = 1/2i ( S^+ - S^- )$$


---

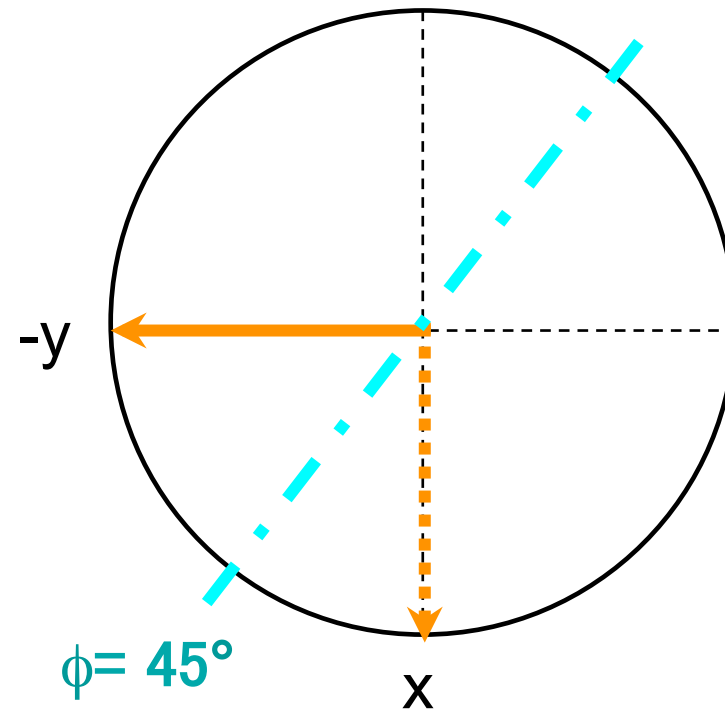
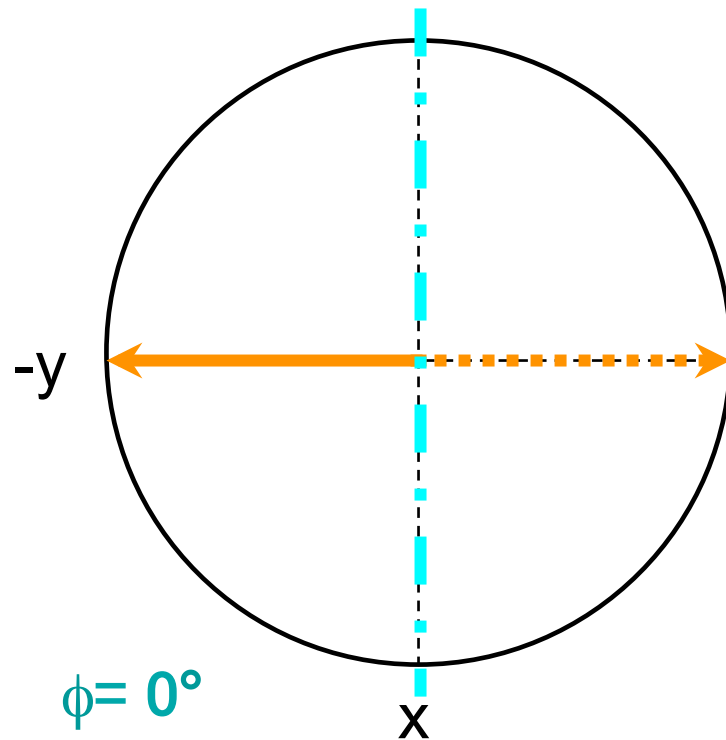

$$2I_x S_y = 1/2i ( I^+ S^+ - I^- S^- - I^+ S^- + I^- S^+ )$$

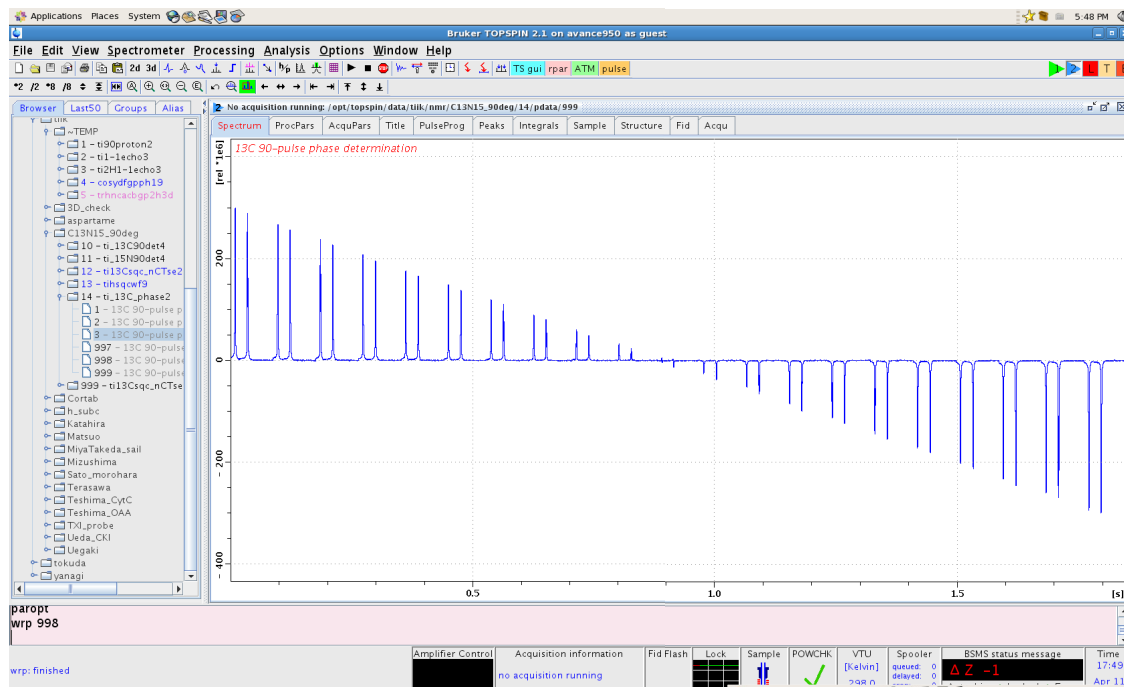
# 位相は大丈夫？



HMQC を使って  
位相を調べる。

$\phi = 45^\circ$  の時、  
信号が 0 となる。



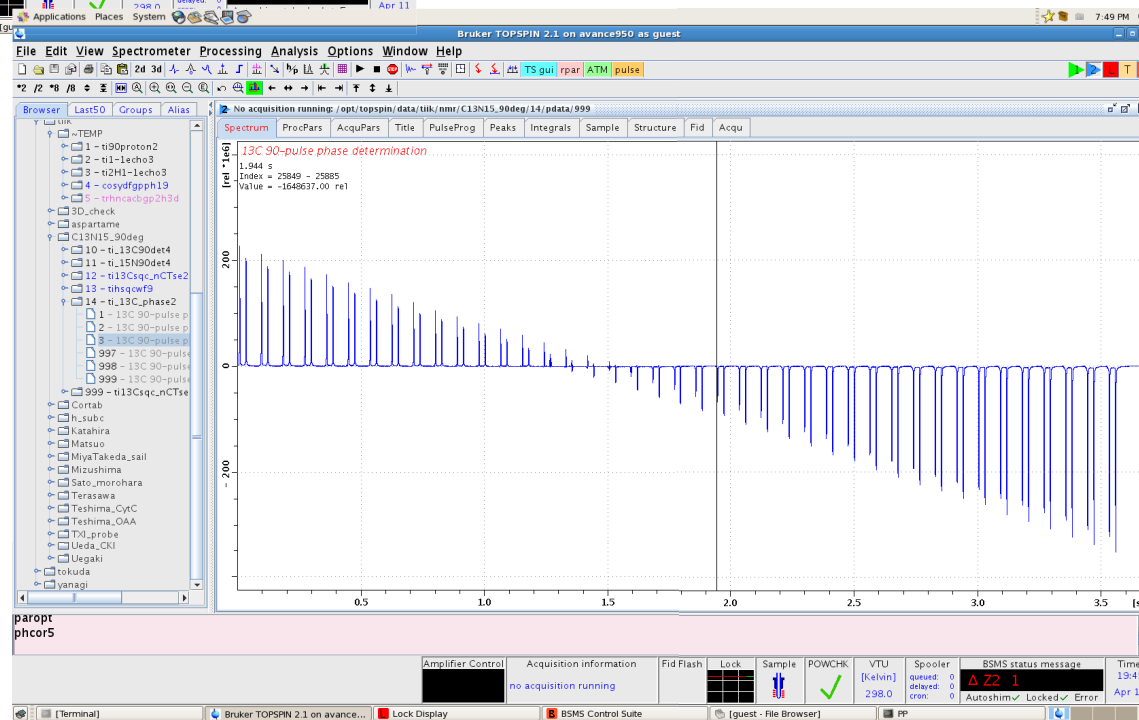


20 $\mu$ s @ -0.2dB での参照実験

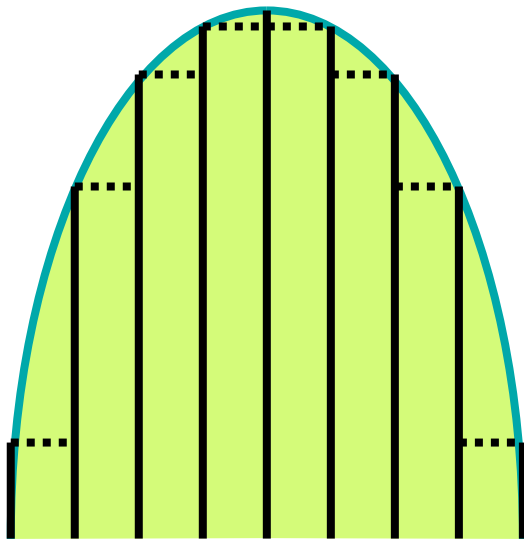
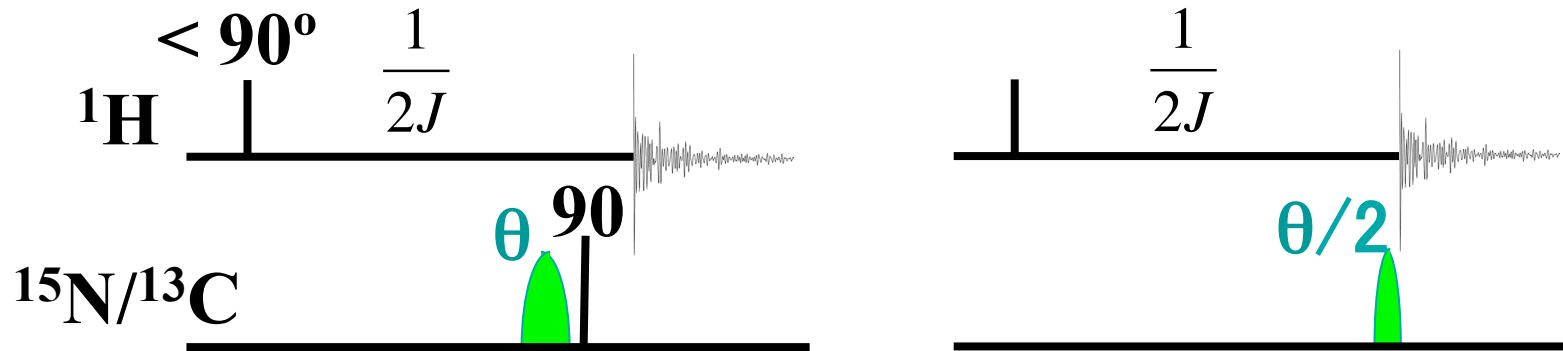
真ん中で強度0となっている。

250 $\mu$ s @ 22dB との比較

+1.3 度の位相のずれ  
(phcor = -1.3 にて補正可)



# 選択 180° パルス長の決定

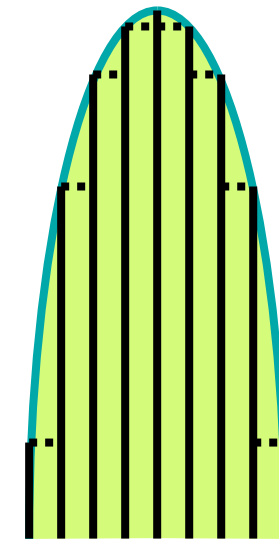


$180^\circ$

短冊の数が同じであれば、  
パルスによる回転角は  
比較的、パルス長に比例する



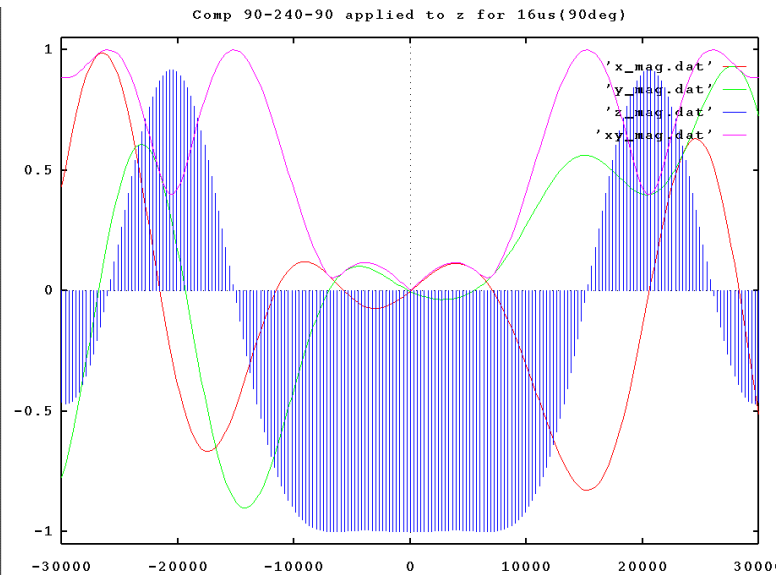
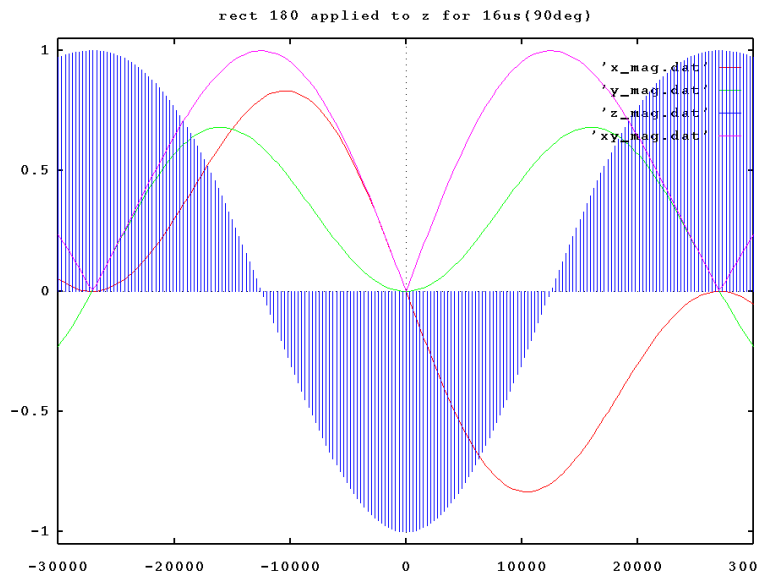
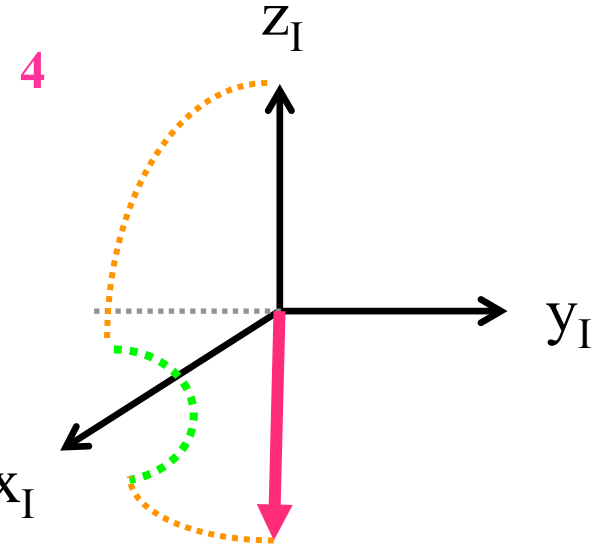
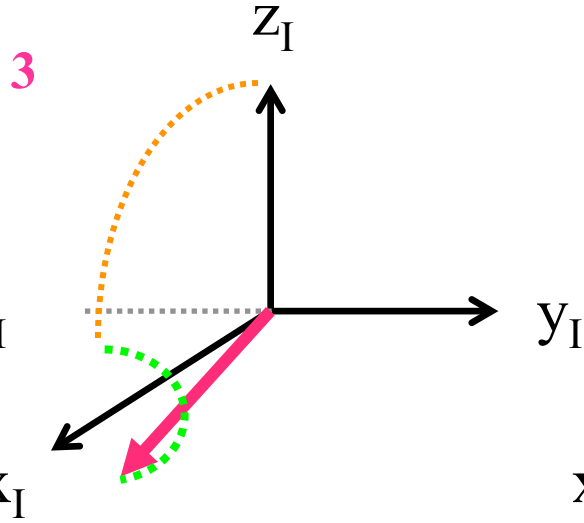
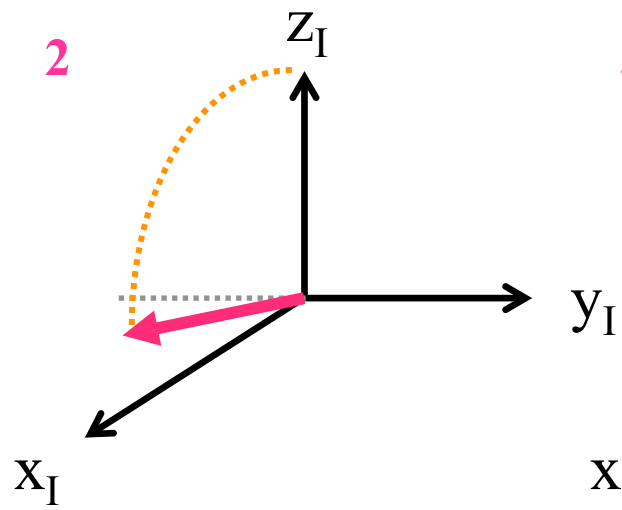
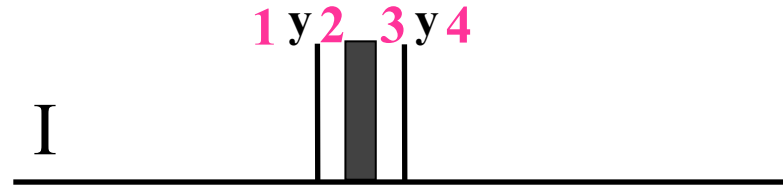
1/2 強度を基に見積もりし、  
後で強度を2倍にする (-6dB)  
よりは良い。



$90^\circ$

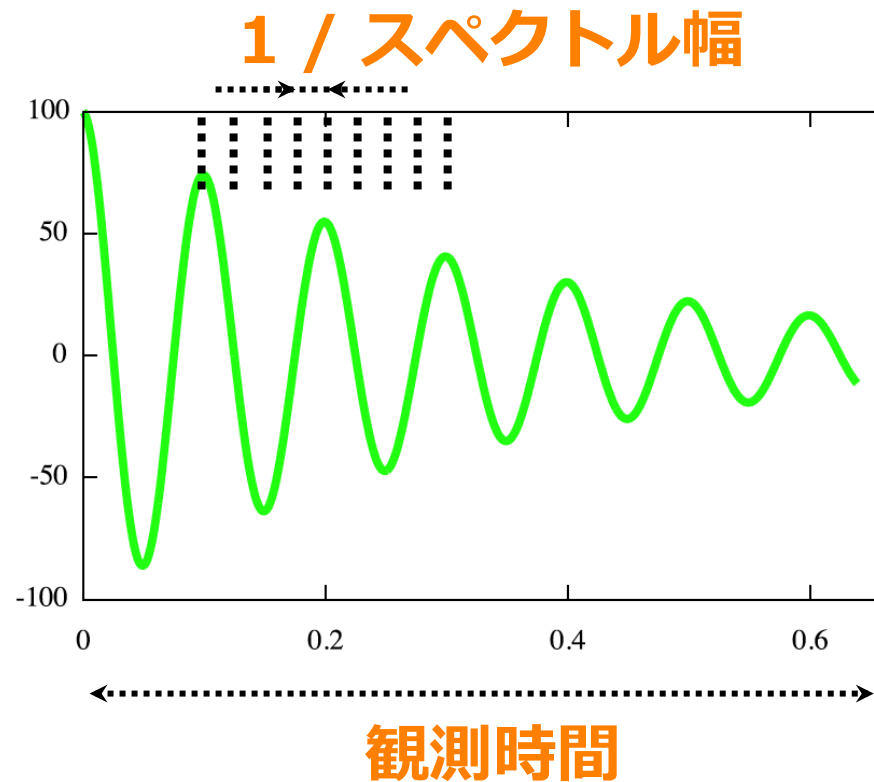
各短冊で位相が揃っているかどうか？

# パルスの設定誤差を補正する



# 分解能とスペクトル幅の関係

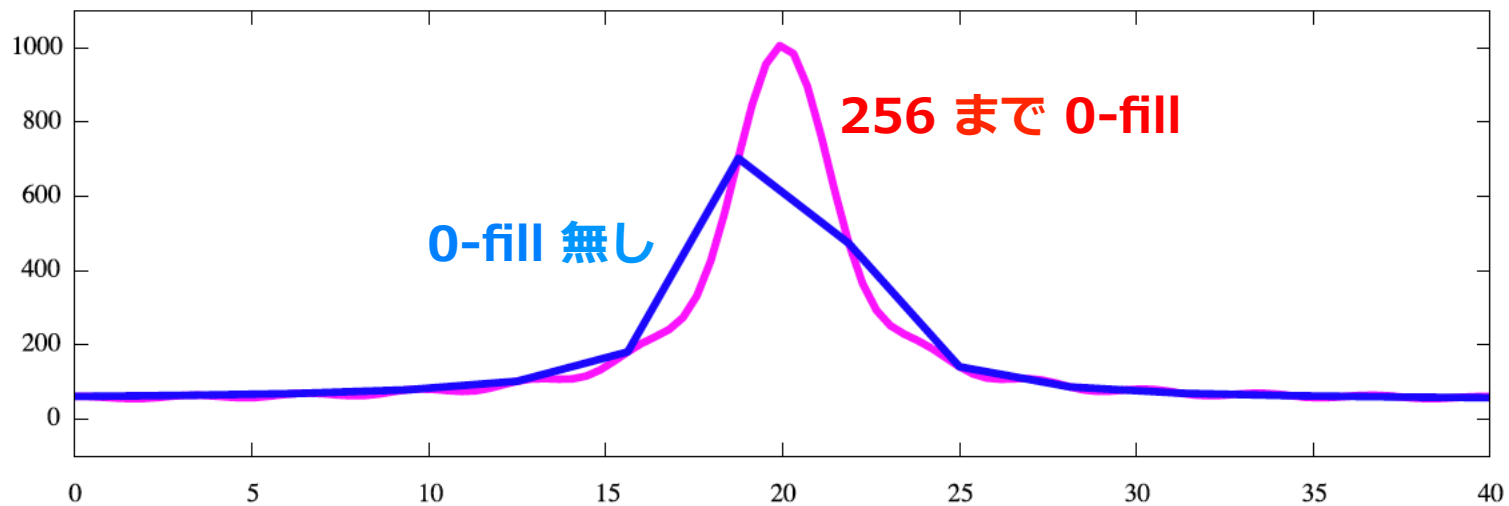
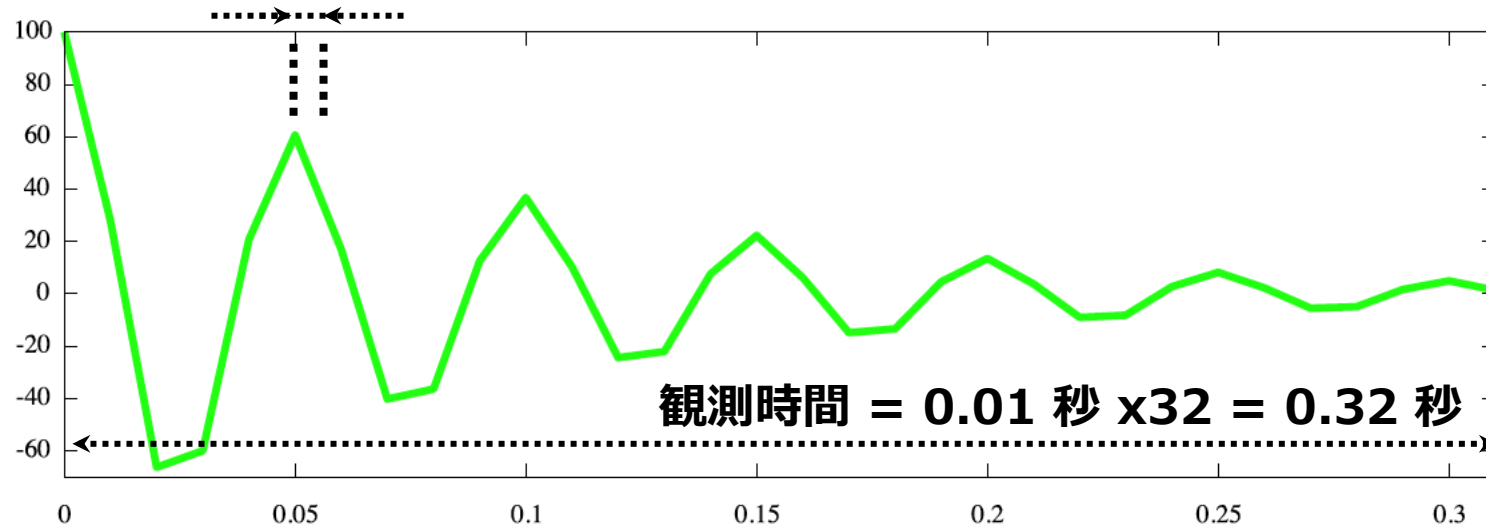
$$acquisition\ time = \frac{point\ number}{spectral\ width} = \frac{1}{resolution}$$



# 0-fill は線幅を変えずに、ぎざぎざを無くす → 安全

一方、LP は FID を人工的に伸ばして、線幅を細くする。

1 / スペクトル幅 = 0.01 秒





# オーバーサンプリング・デジタルフィルター

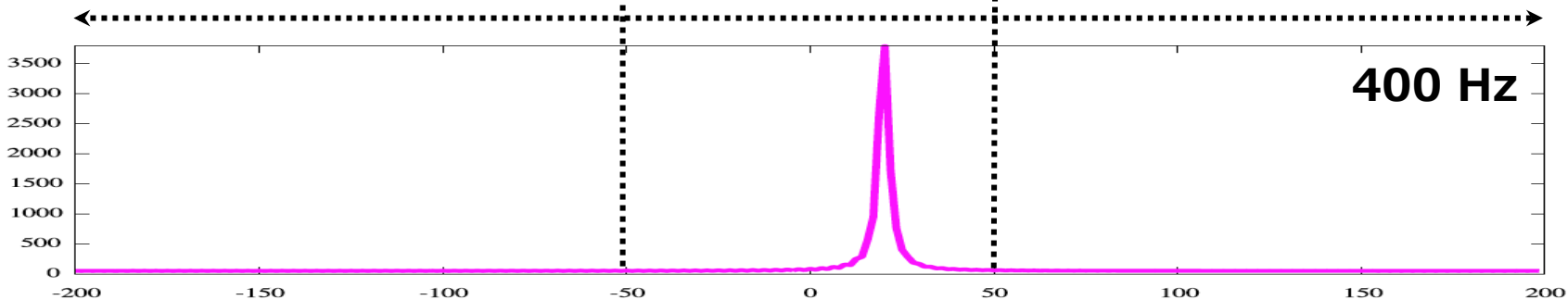
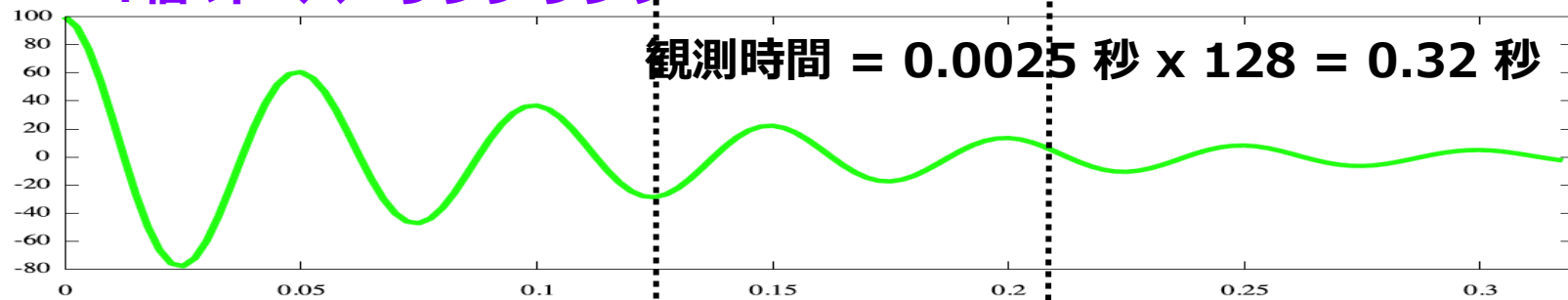
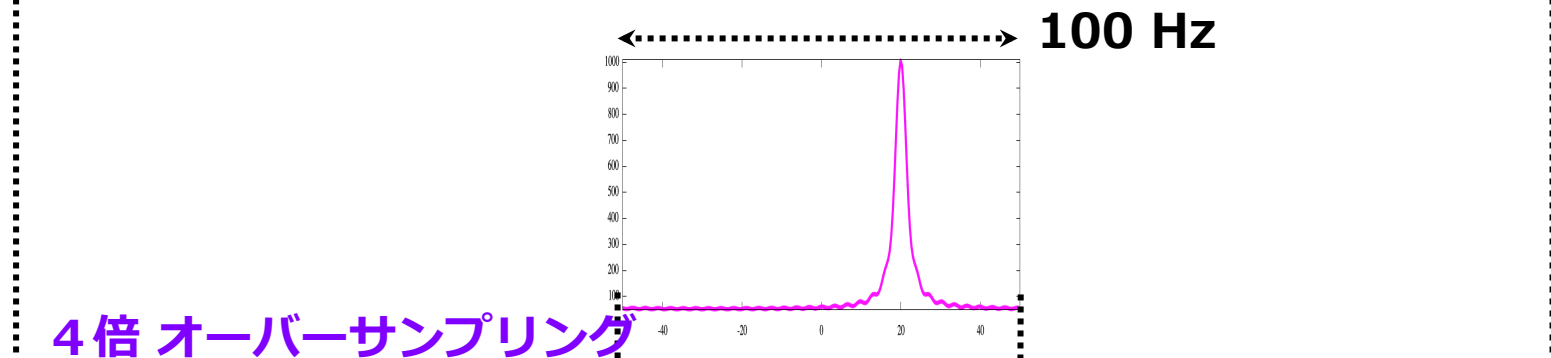
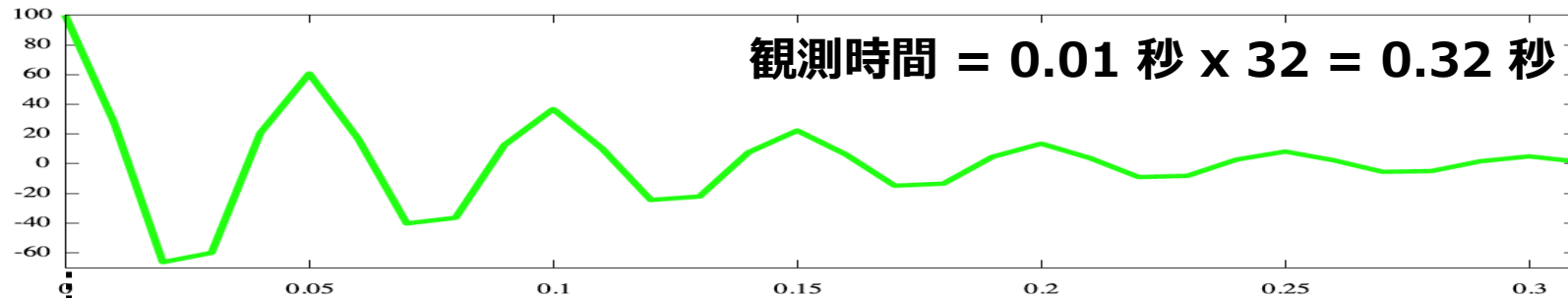
## CD プレーヤーの宣伝文章より

新開発の 16 ビット 4 倍オーバーサンプリング LSI を投入しており、176.4kHz で動作することで、4 倍オーバーサンプリング方式本来の優れた位相特性と通過帯域 30kHz に及ぶ高い過渡応答特性を得ています。

20 ビット 8 倍オーバーサンプリングデジタルフィルター採用。低レベルでの徹底した音質の向上を図るため、エンファシス演算精度を改善したデジタルフィルターを採用。さらに正確な再生を可能にするとともに、デジタル段階で出力レベルを 12 段階まできめ細かくコントロール。出力レベルでの音質劣化が無く、鮮やかな響きを実現します。

## N 倍オーバーサンプリング

通常よりも N 倍速く（短い間隔で）検出する。



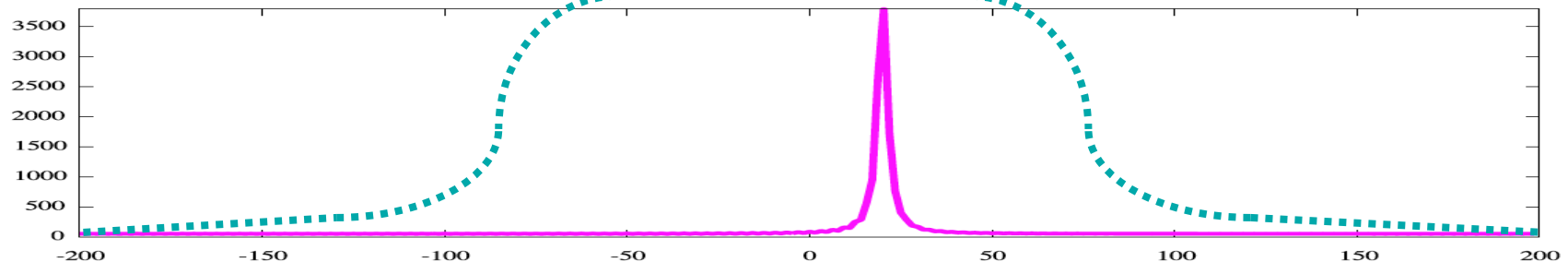
## N 倍オーバーサンプリング

通常よりも N 倍速く（短い間隔で）検出する。

スペクトル幅が N 倍に広がる。

ノイズを分散できる。

折り返しが起こらないように、高周波数と低周波数を削らないといけませんが、スペクトル幅が広いので、無理の無いフィルターをかける。



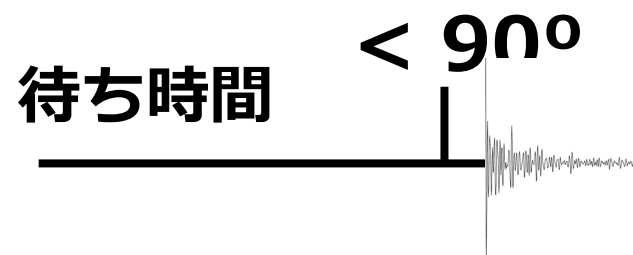
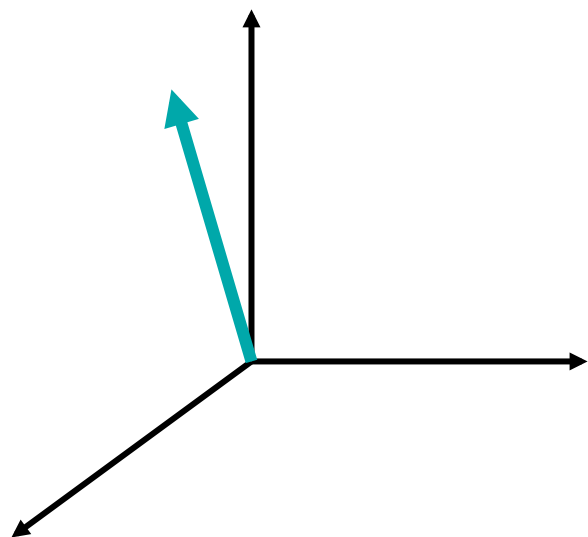
## デジタルフィルター

FID データを一つずつずらしながら、重みをかけて、足し算し、平均値を求める。

$$\begin{array}{l} \text{data (i)} \quad \cdots \times a \quad \cdots \rightarrow \\ \text{data (i-1)} \quad \cdots \times b \quad \cdots \rightarrow \\ \text{data (i-2)} \quad \cdots \times c \quad \cdots \rightarrow \\ \text{data (i-3)} \quad \cdots \times d \quad \cdots \rightarrow \\ \text{data (i-4)} \quad \cdots \times e \quad \cdots \rightarrow \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} \text{data (i)} \\ \text{data (i-1)} \\ \text{data (i-2)} \\ \text{data (i-3)} \\ \text{data (i-4)} \end{array}} \right\} \text{重み平均値}$$

波形が滑らかになる効果 = 高周波数を削る効果  
low-pass filter

## 待ち時間の設定

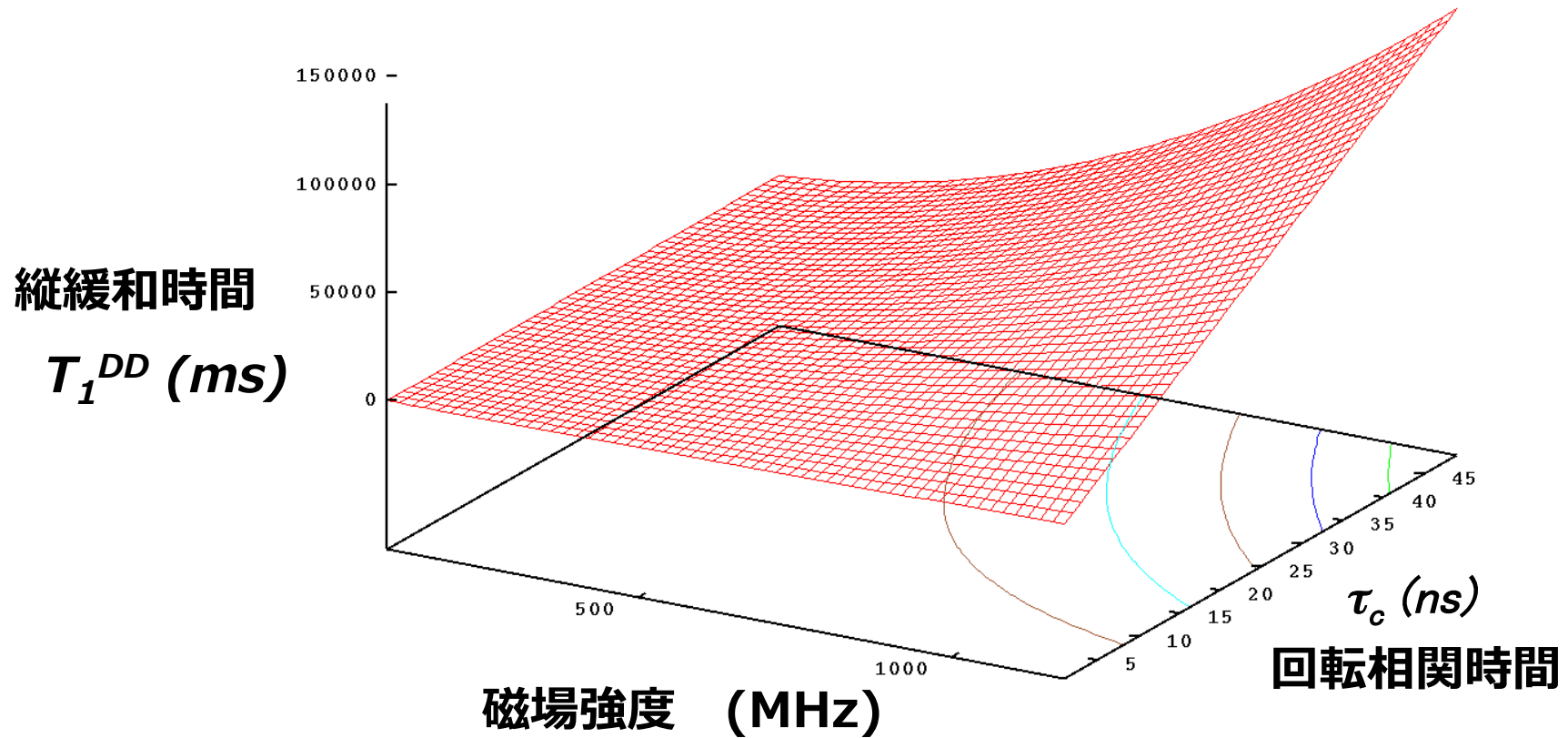


one-shot パルスの場合は、  
5-10° に設定することも多い。

$T_1$  緩和時間をもとに決める。  
短過ぎると、分光計にも負担が重い。  
分子量、静磁場の規模、温度、濃度、標識によって変わる。  
磁化移動の出発の核の  $T_1$  のみに依存する。

溶液系での有機低分子や蛋白質の  $^1\text{H}$ : 1.0-2.5 秒  
重ベンゼンの  $^{13}\text{C}$ : 3分

# 磁場強度と $DD$ による縦緩和時間の関係

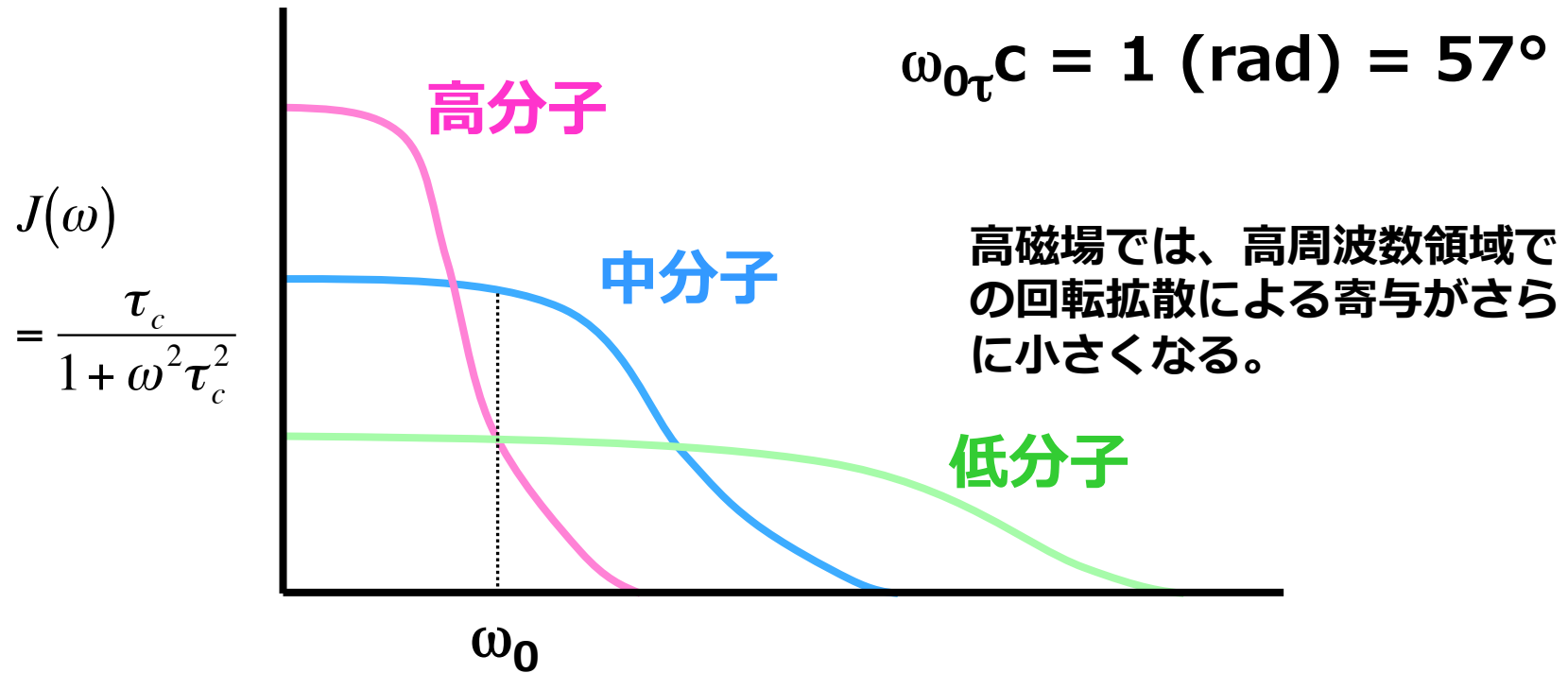


$$R_1^{DD} = \frac{\hbar^2 \gamma_I^2 \gamma_S^2}{4R^6} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \left\{ J(\omega_I - \omega_S) + 3J(\omega_I) + 6J(\omega_I + \omega_S) \right\} \quad \text{I } (^{13}\text{C}) \text{ 側を観測}$$

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

$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  2スピン系  
 双極子相互作用のみ縦緩和に作用すると仮定

# 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の割合が大きい

||

$T_2$  が短い

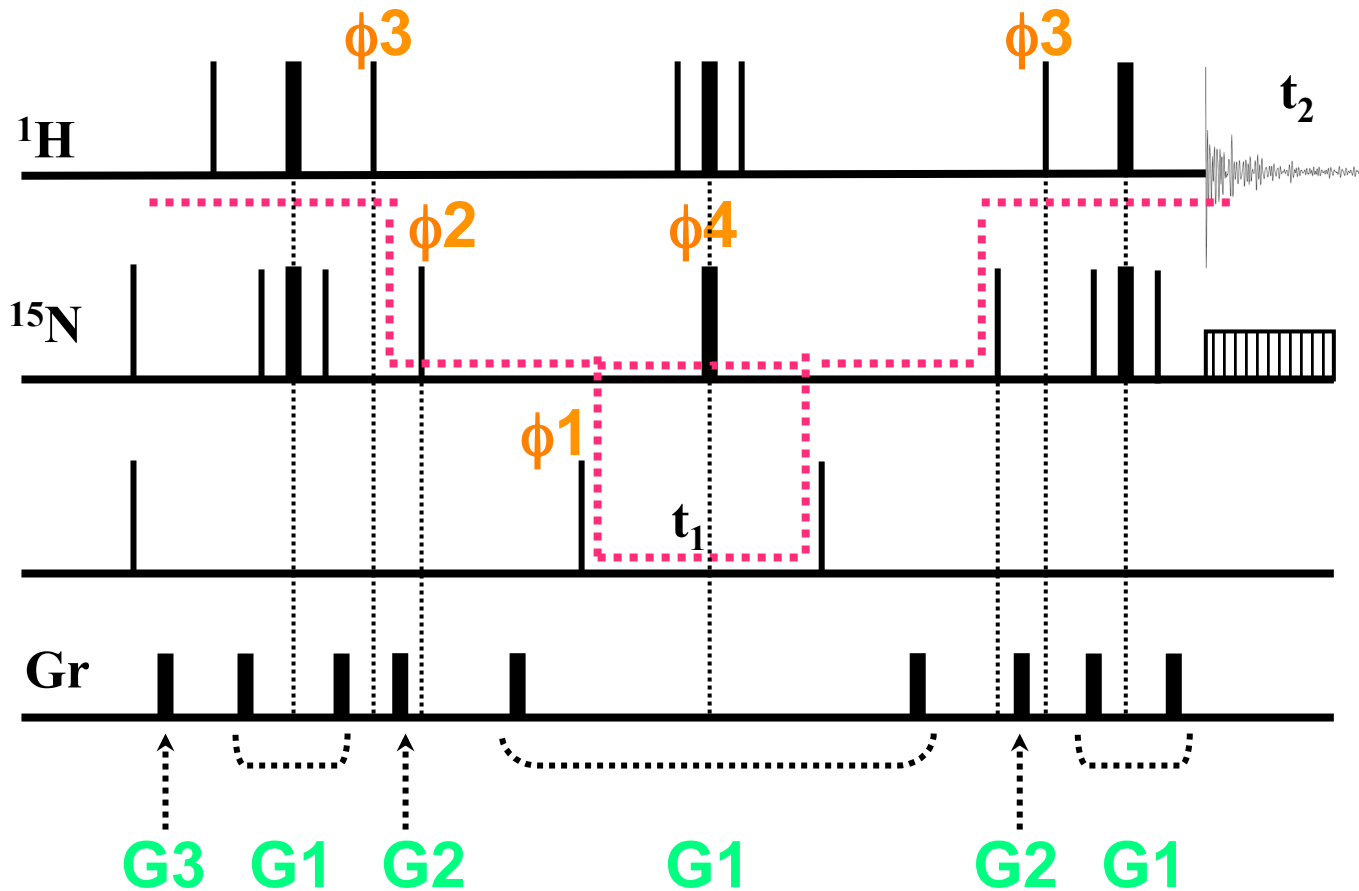
低分子と高分子では  $\omega_0$  で回転している分子の割合が小さい

||

$T_1$  が長い

## 2-10 積算回数の設定

— 位相回しの優先度を考慮して —



E-COSY, DQF-COSY, NOESY などではコヒーレンス  
選択のための位相回しを優先する。



$t_1, t_2$  など化学シフトの展開のある箇所の  $90^\circ$  パルスは必ず回す。  $\phi 1$

磁化移動の真上にある  $90^\circ$  パルスについても、できるだけ  $\pm x$  ( $\pm y$ ) と回す。  $\phi 2$

INEPT の幅が  $1/(2J)$  より短い箇所を回す。  $\phi 3$

HMQC 型では、 $t_1$  最中の  $180^\circ$  パルスを回す。その場合 FID へは2倍の位相シフトが起こる。  $\phi 4$

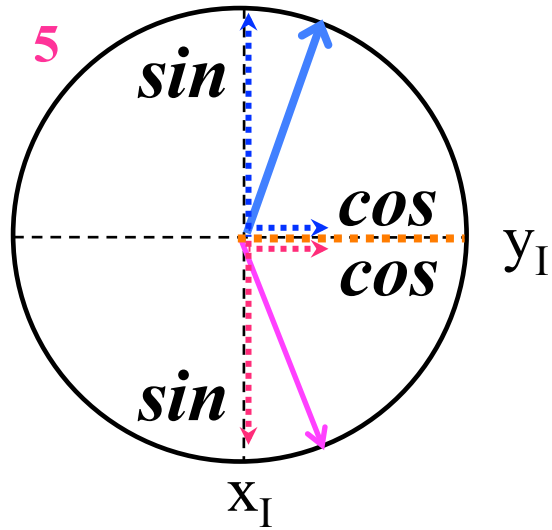
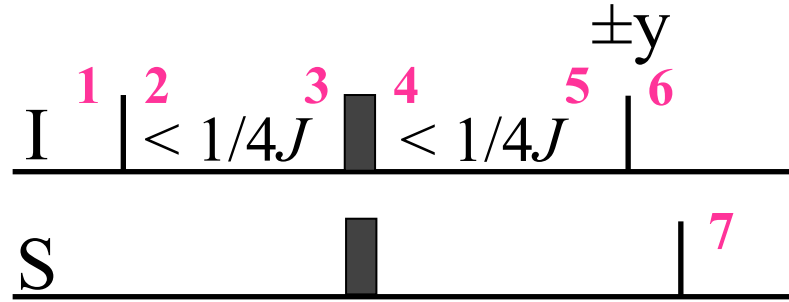
弱い gradient-pulse を利用して、位相回しの代わりにする。

ZZ 2-spin-order の状態の時に  $G 2$

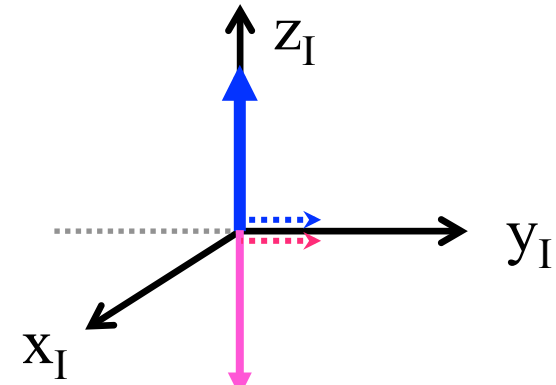
$180^\circ$  パルスの両側に  $G 1$

異種核の初期磁化が直接入ってくる箇所に  $G 3$

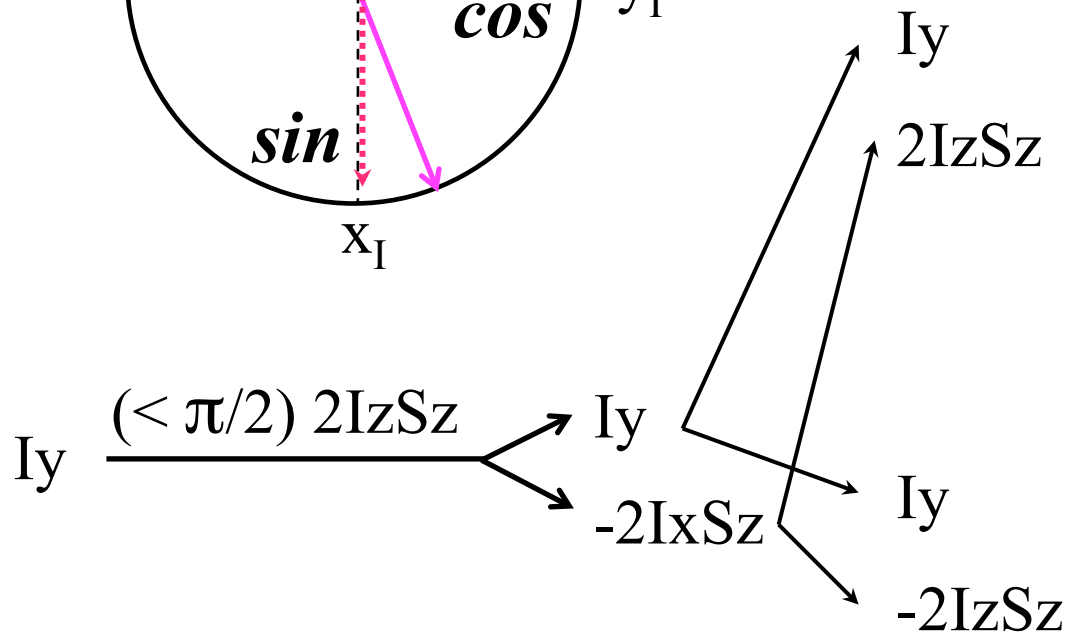
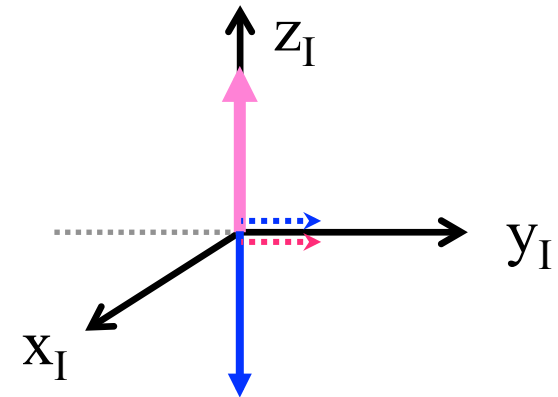
# 欲しくない磁化のみを打ち消す



6 +y から打った場合



-y から打った場合

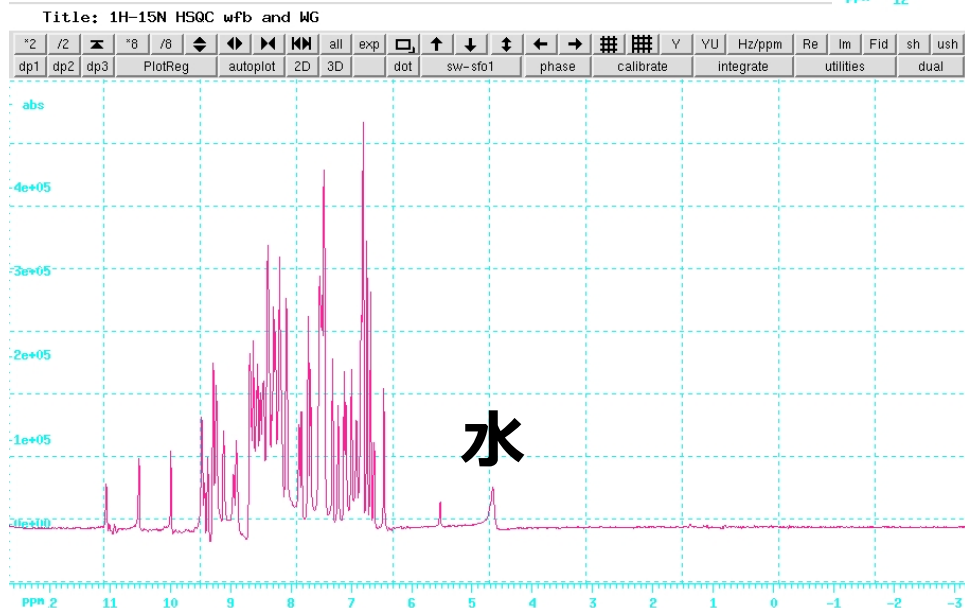
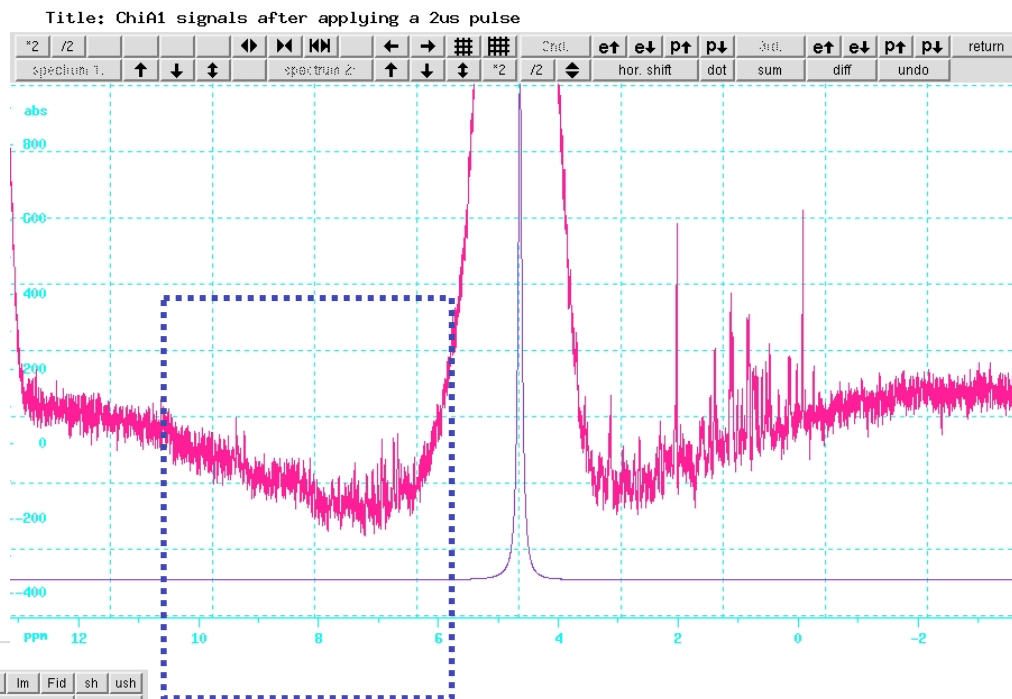


# 溶媒信号の消去

溶質（蛋白質）のピーク強度と溶媒（水）のピーク強度の比較

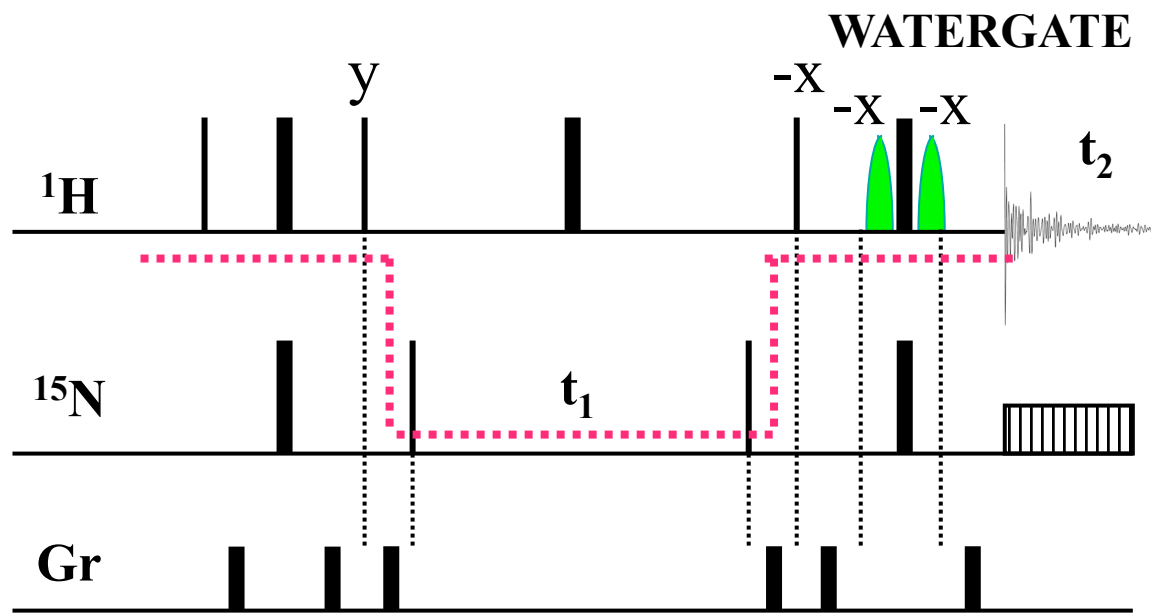
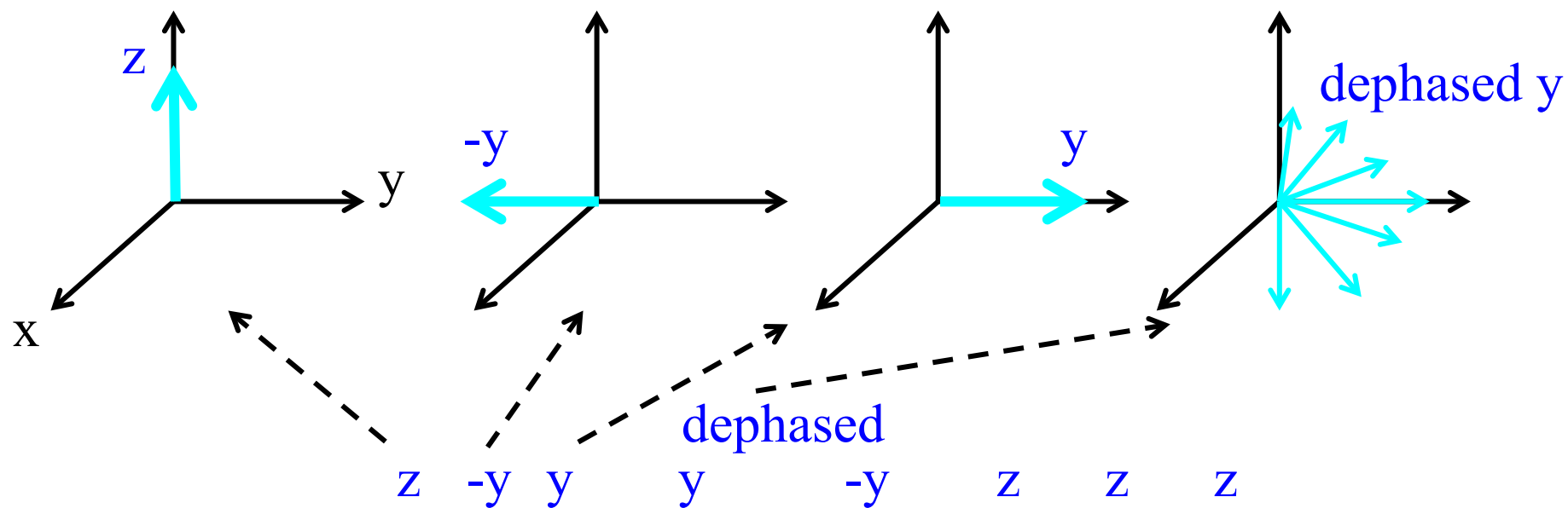
[<sup>15</sup>N]-蛋白質 (8 scans)

# アミド基水素領域 (-<sup>1</sup>H<sup>15</sup>N)

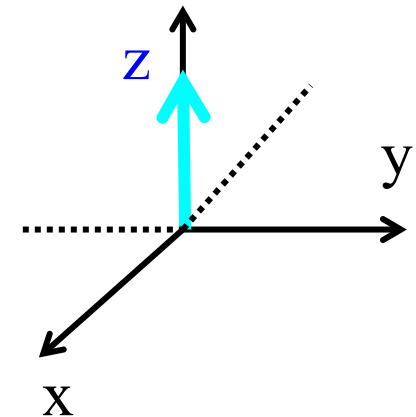
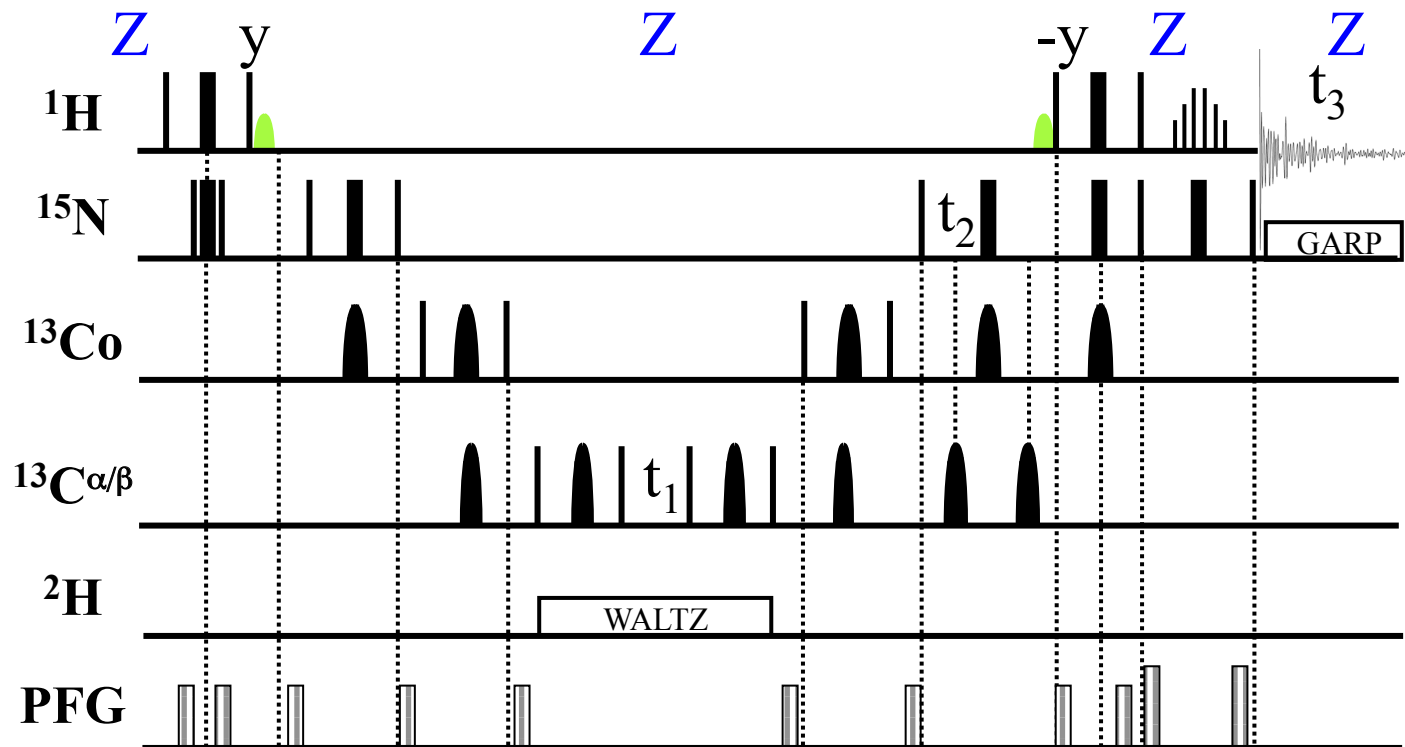
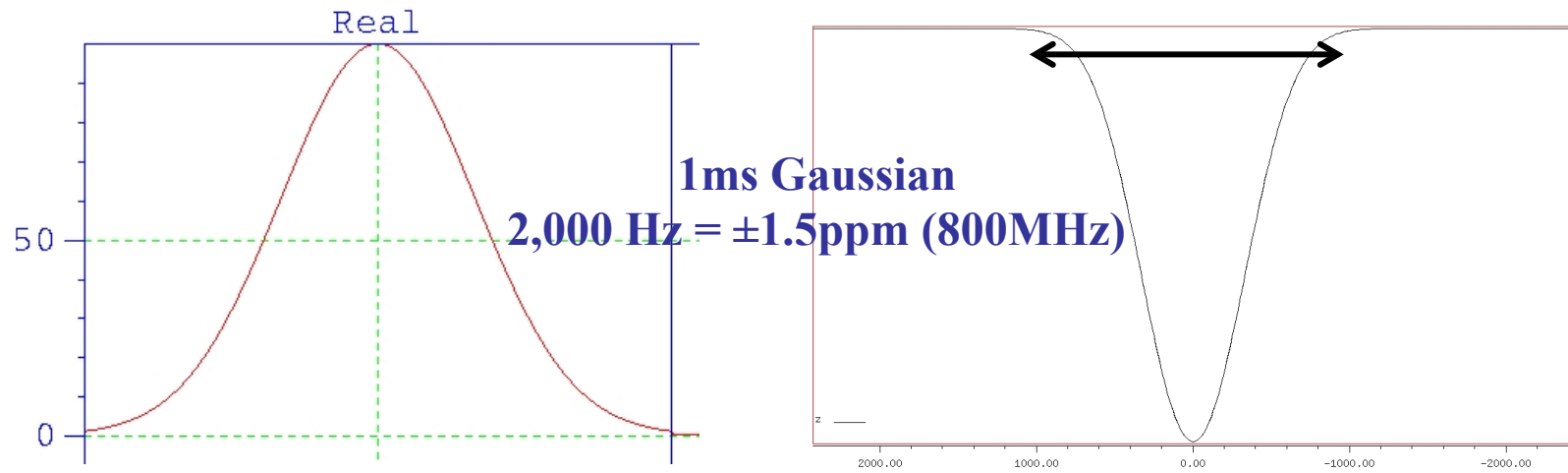


H<sub>2</sub>O:  
分子量 = 18 g/mol  
比重 = 1,000 g/L  
濃度 = 1,000 / 18 = 55.6 mol/L  
<sup>1</sup>H の濃度 = 110 M  
蛋白質の濃度 < 1 mM

# Water flip-back & WATERGATE $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC

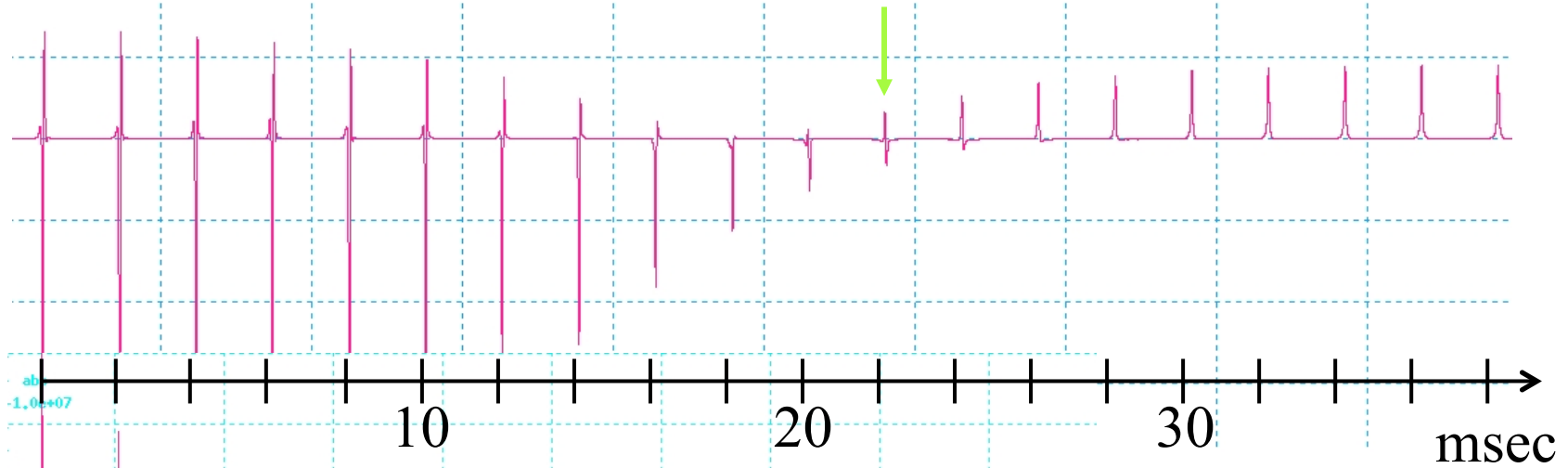


# 選択パルスによる water-flip-back 3D TROSY-HN(CO)CACB

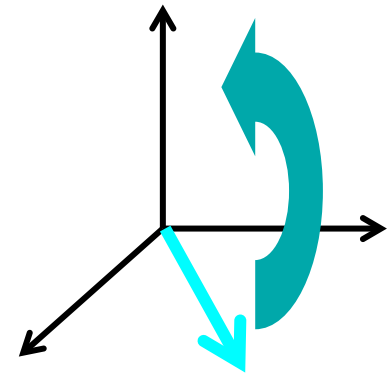
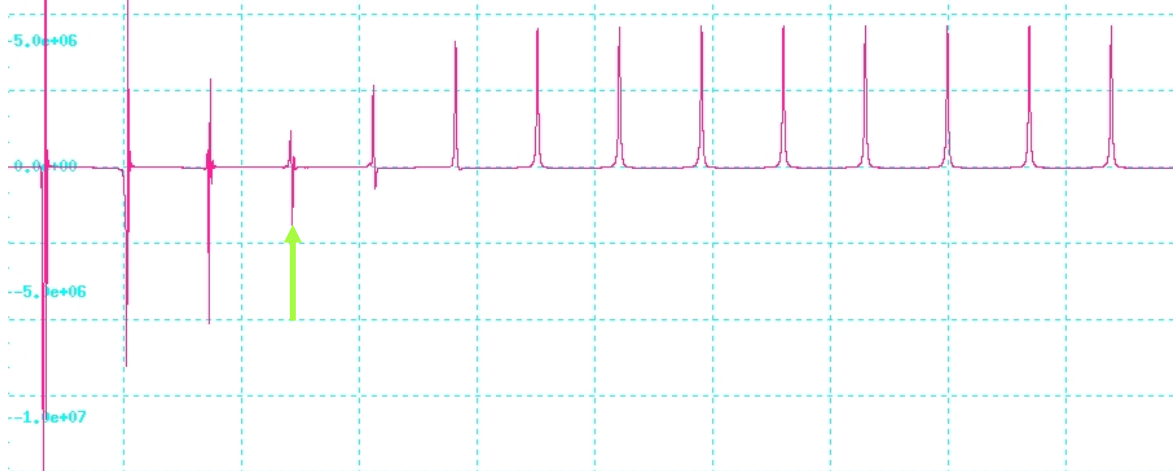


# 水の radiation-damping (放射減衰)

Normal probe 室温検出器 (500 MHz)



Cryogenic probe 極低温検出器 (800 MHz)



1. NMR の基礎

2. NMR の一次元測定

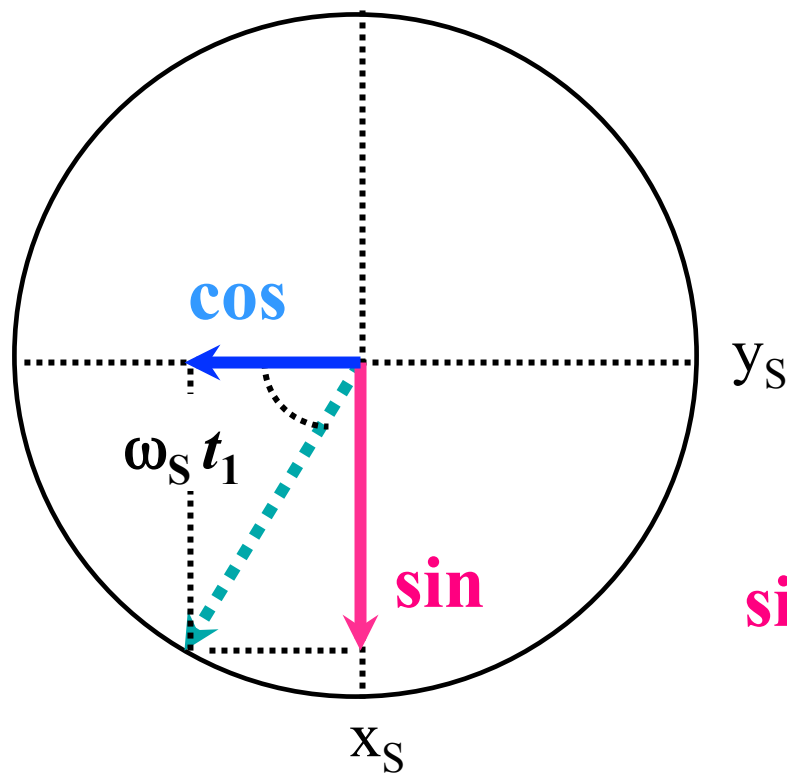
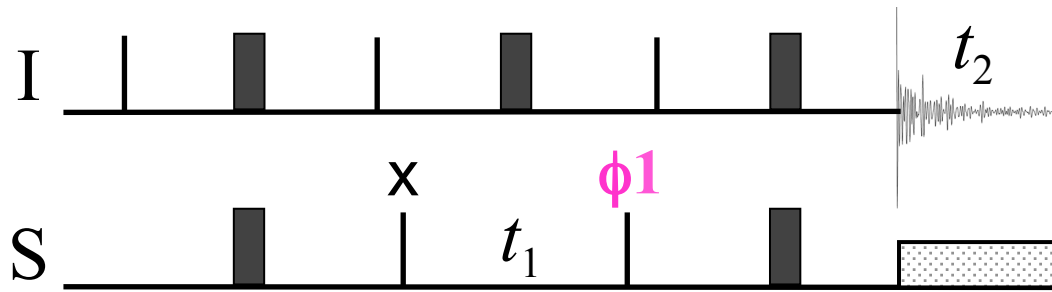
3. NMR の二次元測定

4. データ処理

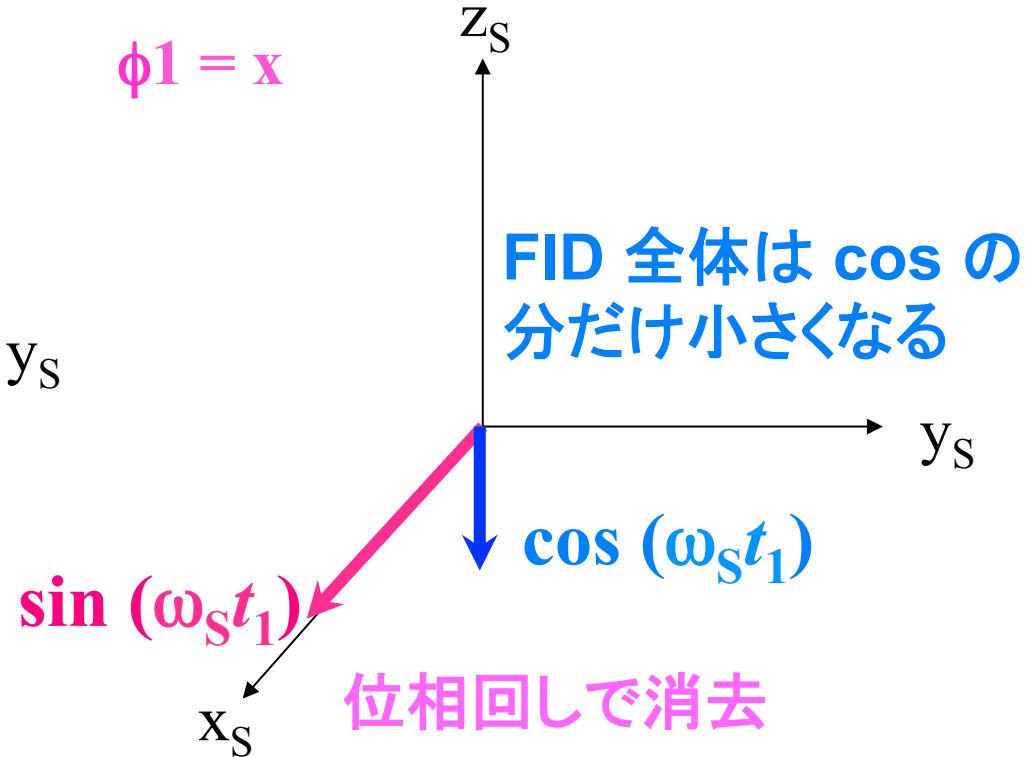
5. 定性的な蛋白 NMR と定量的な有機 NMR

6. 今後の NMR 展開

### 3-1 間接観測次元の測定の実理



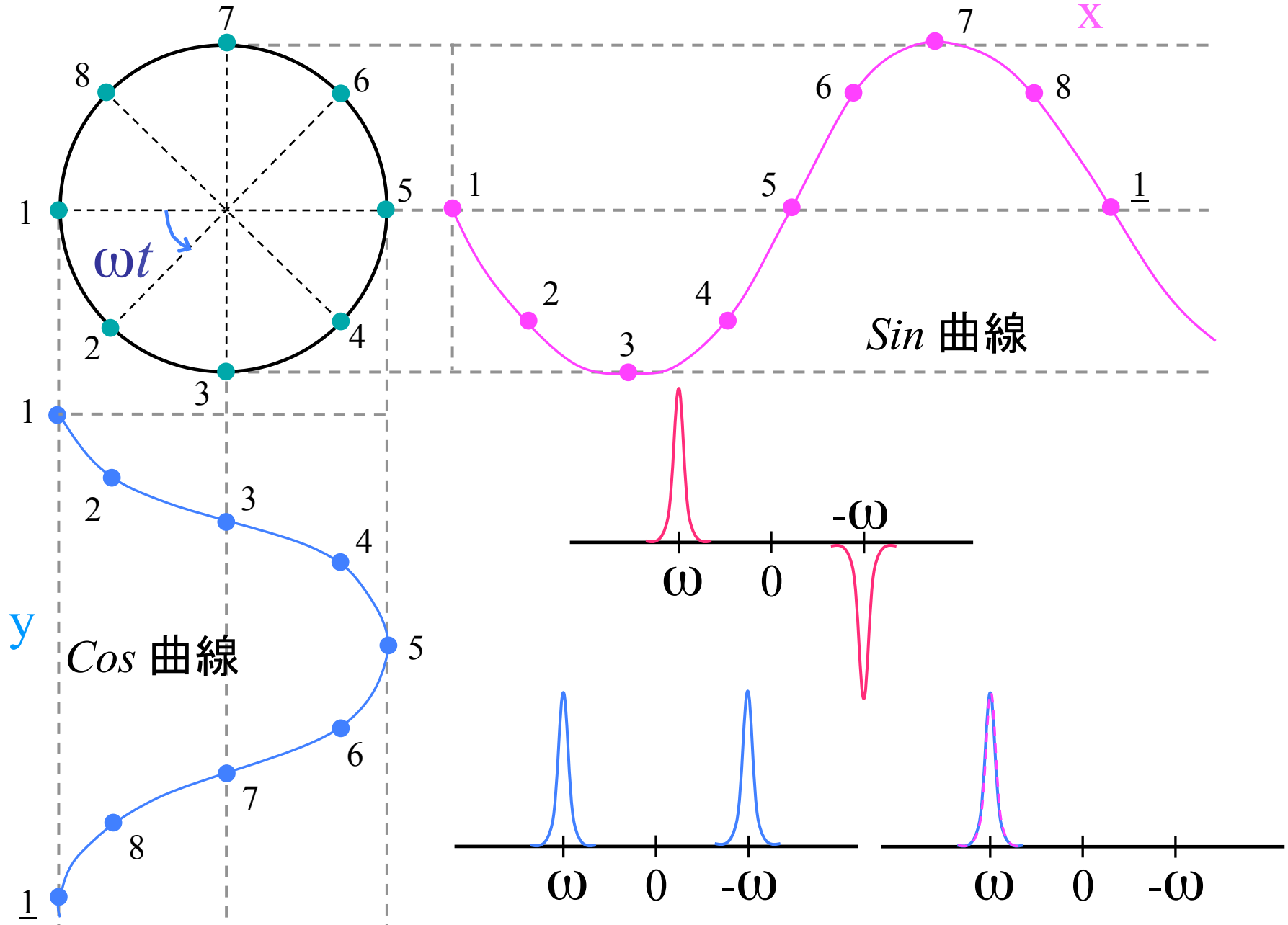
$$\phi 1 = x$$





### 3-2 直交検波

### 直接測定で検出される信号 FID



1. NMR の基礎

2. NMR の一次元測定

3. NMR の二次元測定

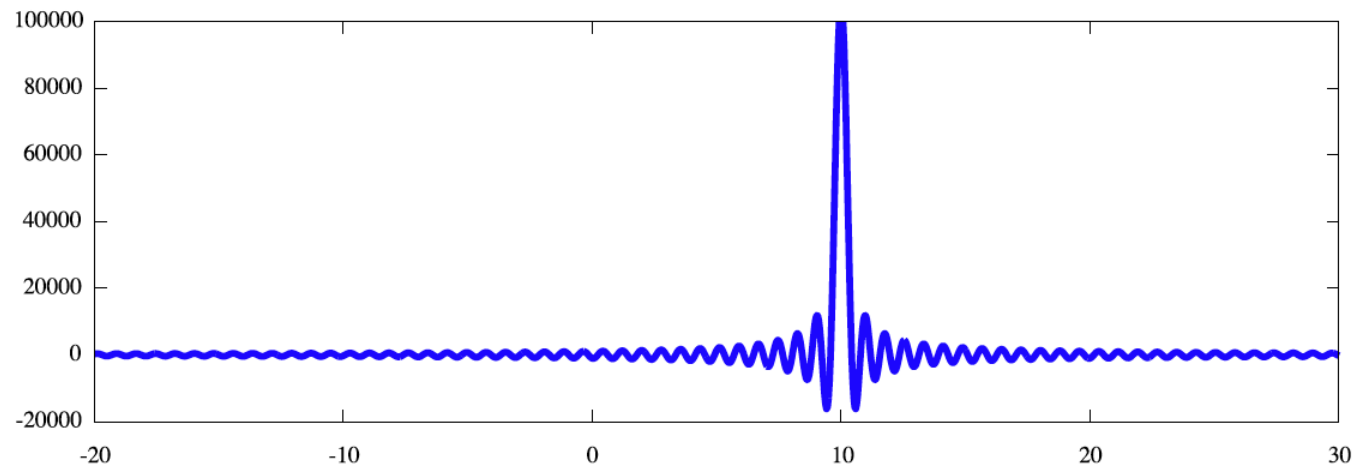
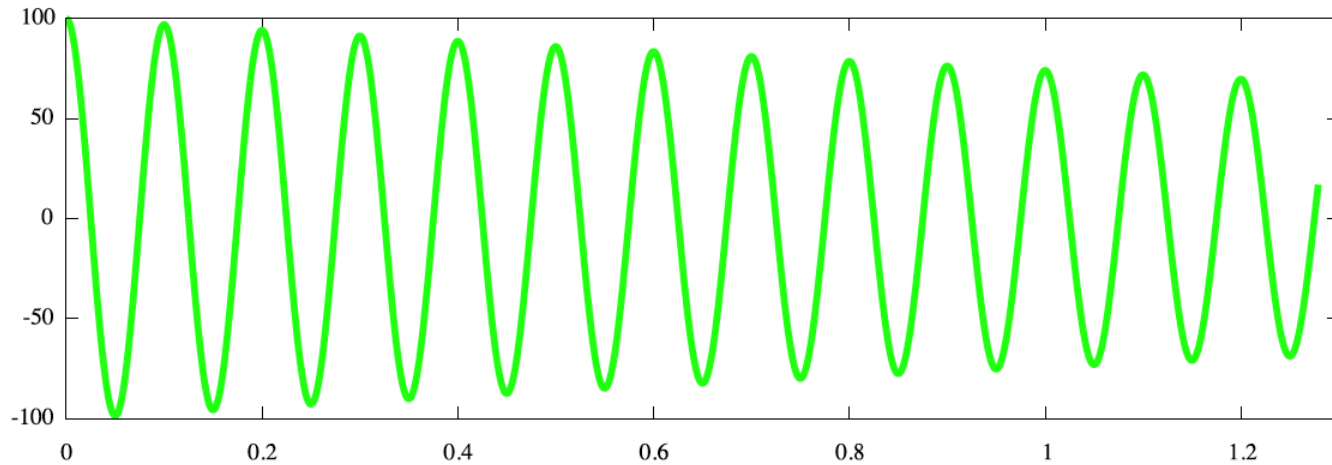
4. データ処理

5. 定性的な蛋白 NMR と定量的な有機 NMR

6. 今後の NMR 展開

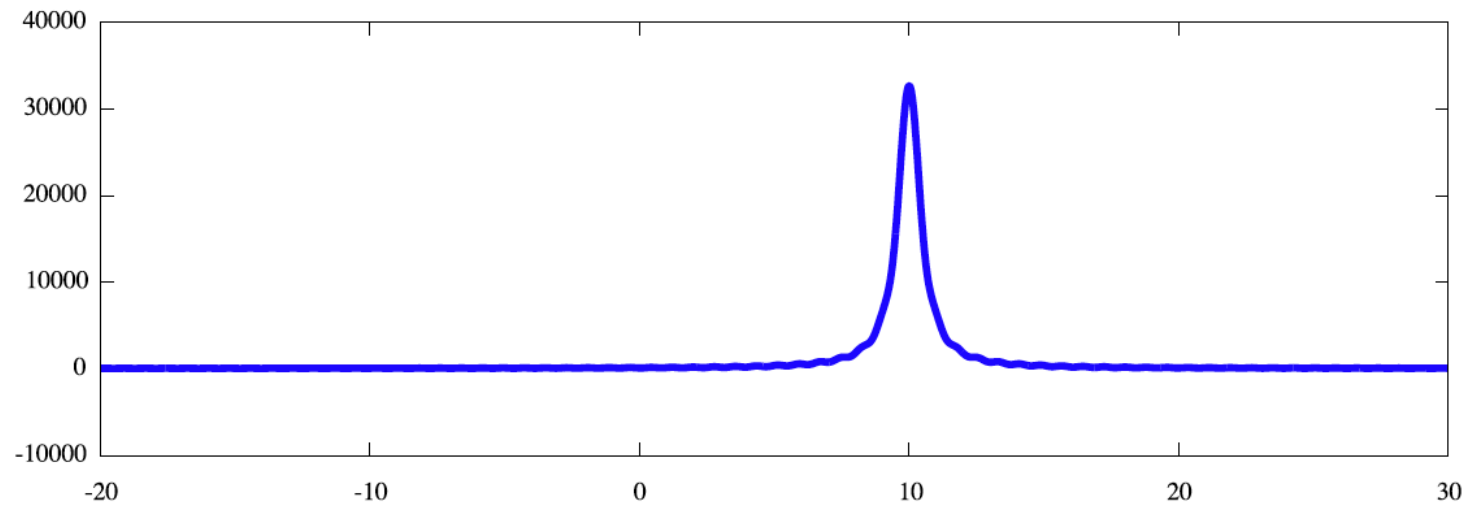
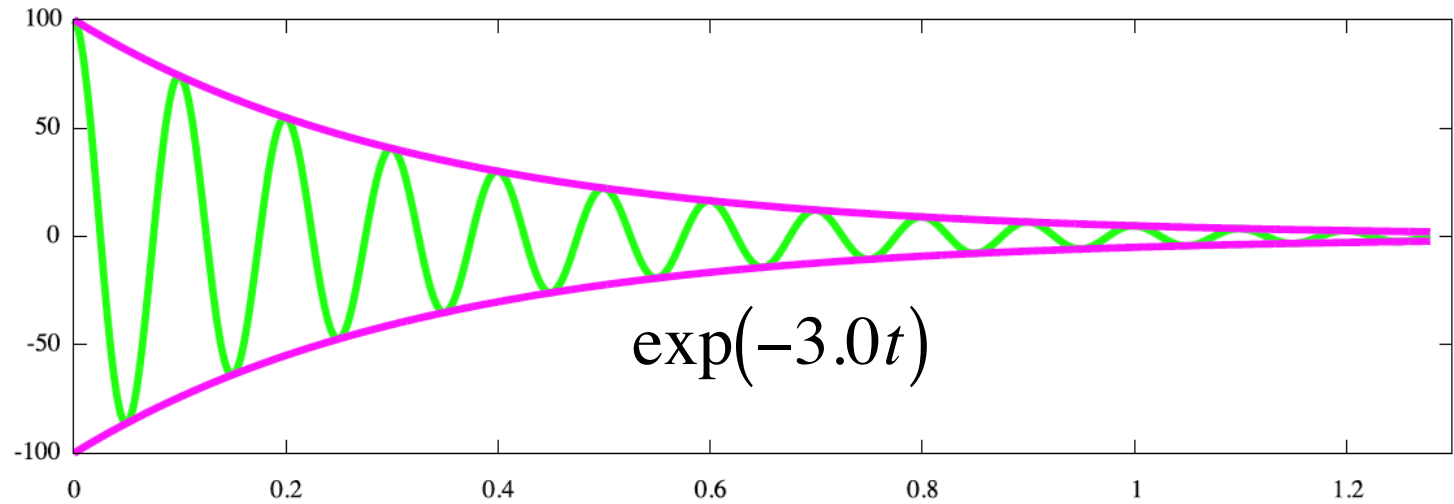
# Window 関数の適用

FID の右端に値が残っていると ...



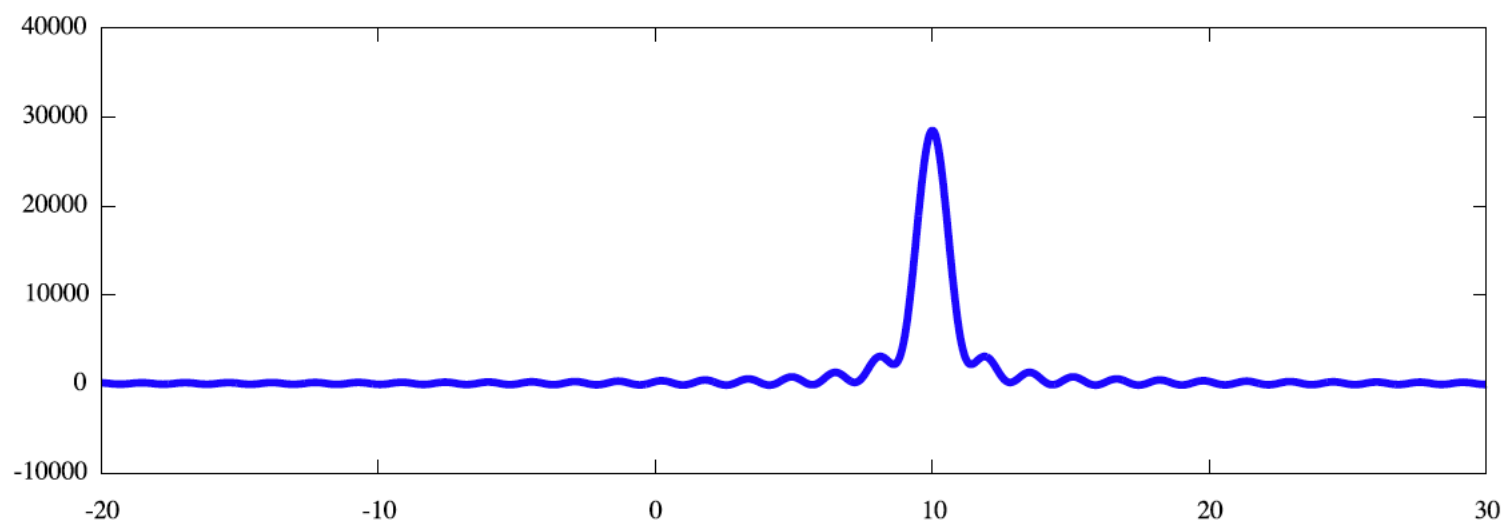
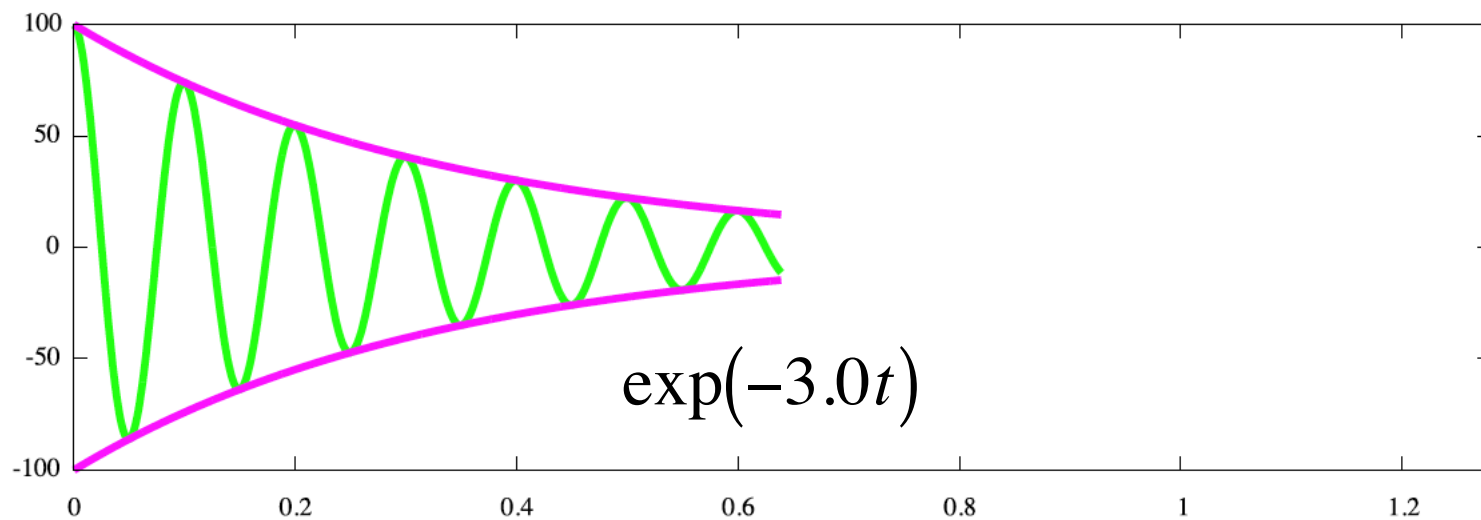
フーリエ変換後に wiggle (波) が出てしまう。

## FID の右端が0になるように整形すると ...



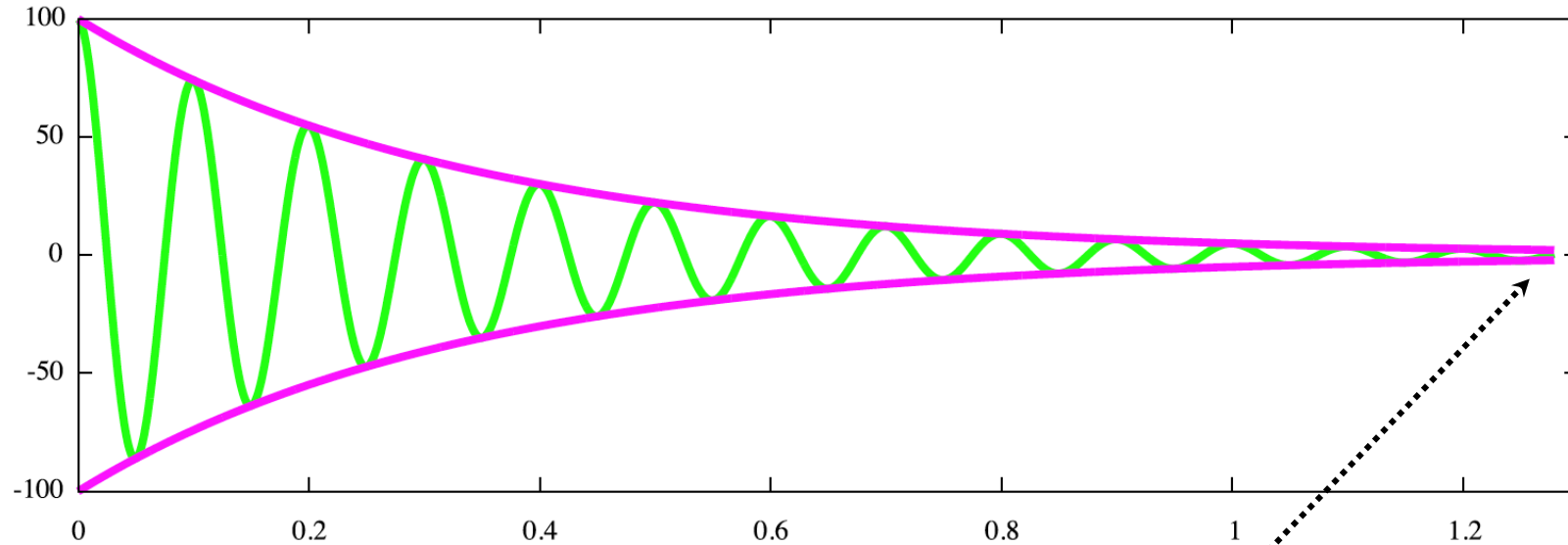
フーリエ変換後に wiggle (波) は消える。

FID の長さを半分にして、同じ window をかけると ...



再び wiggle (波)が出てしまう。

## exp 関数の window を使う時は注意



Acquisition time での値が0に近くなるように  
この変数を調整しなければならない。

$$\exp(-3.0t)$$

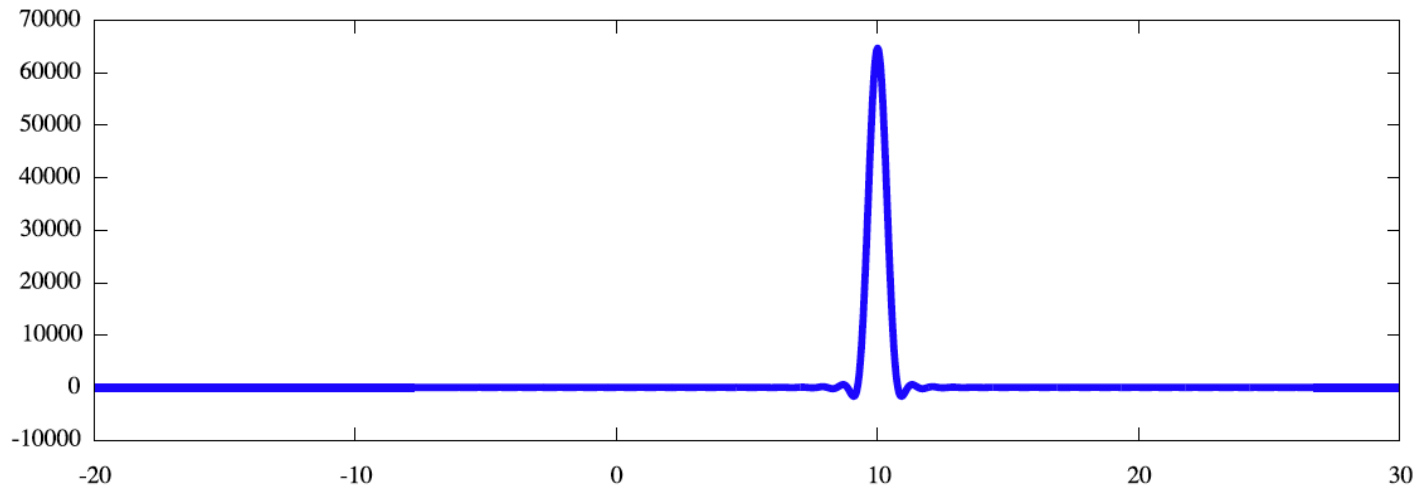
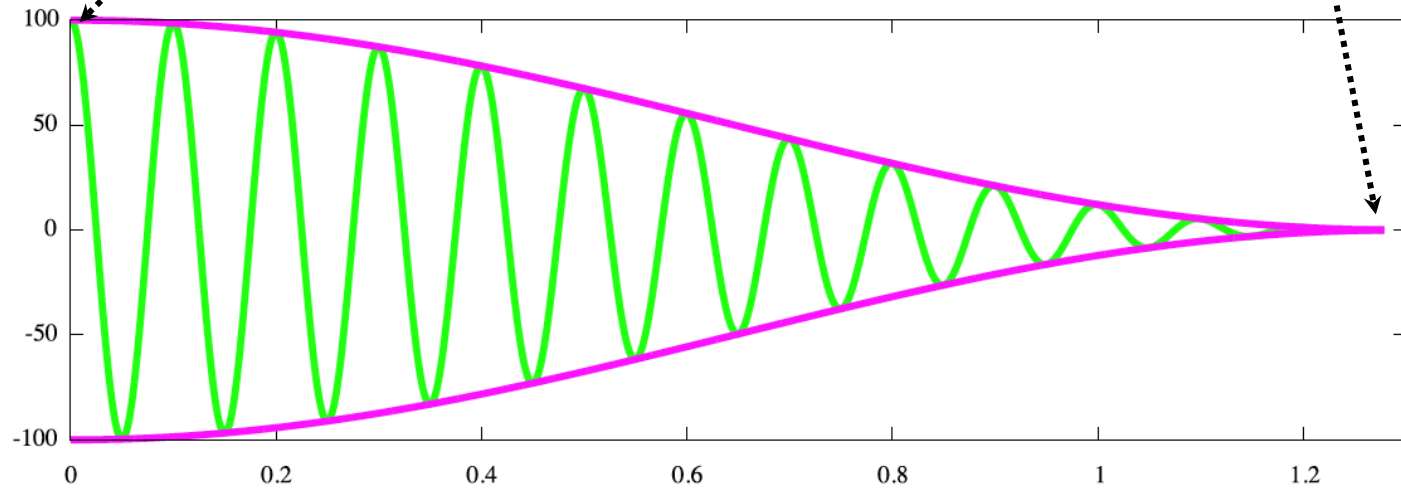
$$\sin^2(0.99\pi) = \frac{1}{1000}$$

程度であれば安全

# $\sin^2(\cos^2)$ window 関数はなかなか便利

$$\sin^2(0.5\pi) = 1$$

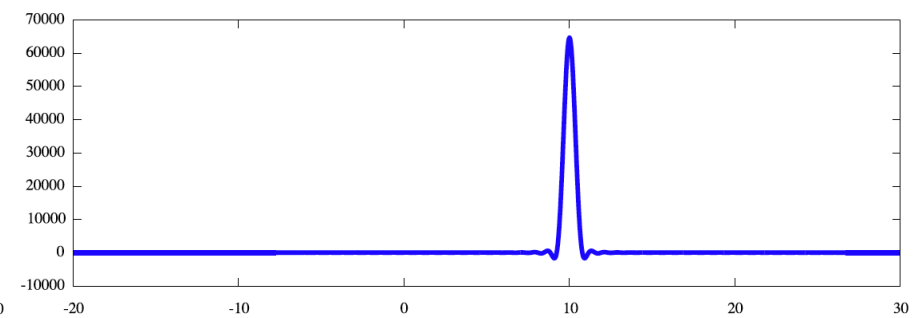
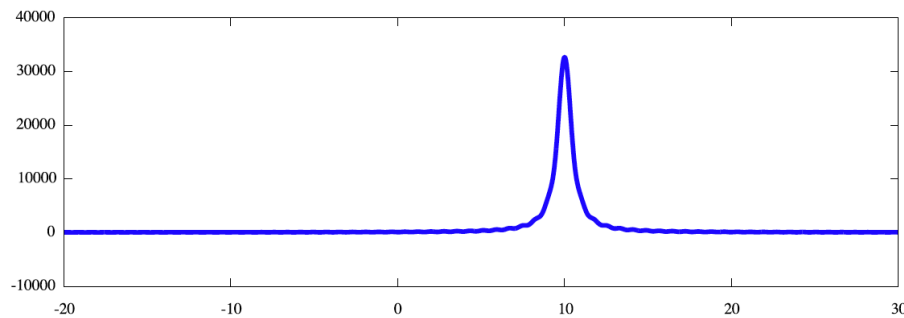
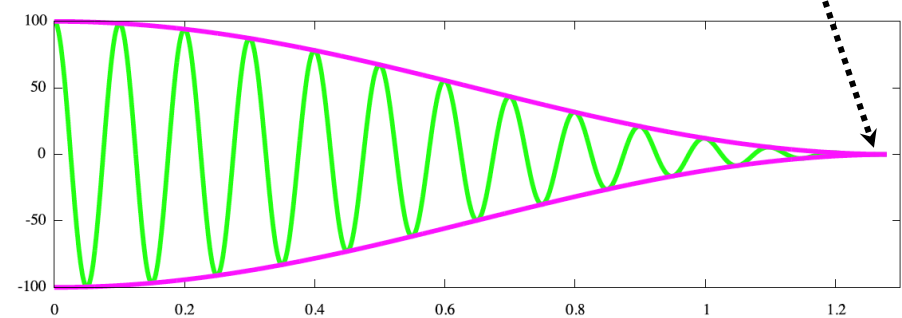
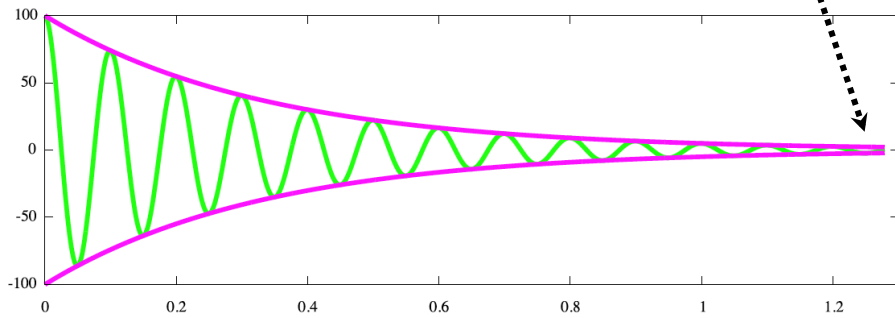
$$\sin^2(0.99\pi) = \frac{1}{1000}$$



$\sin^2$  ( $\cos^2$ ) window 関数は、  
線幅もそれほど広げない。

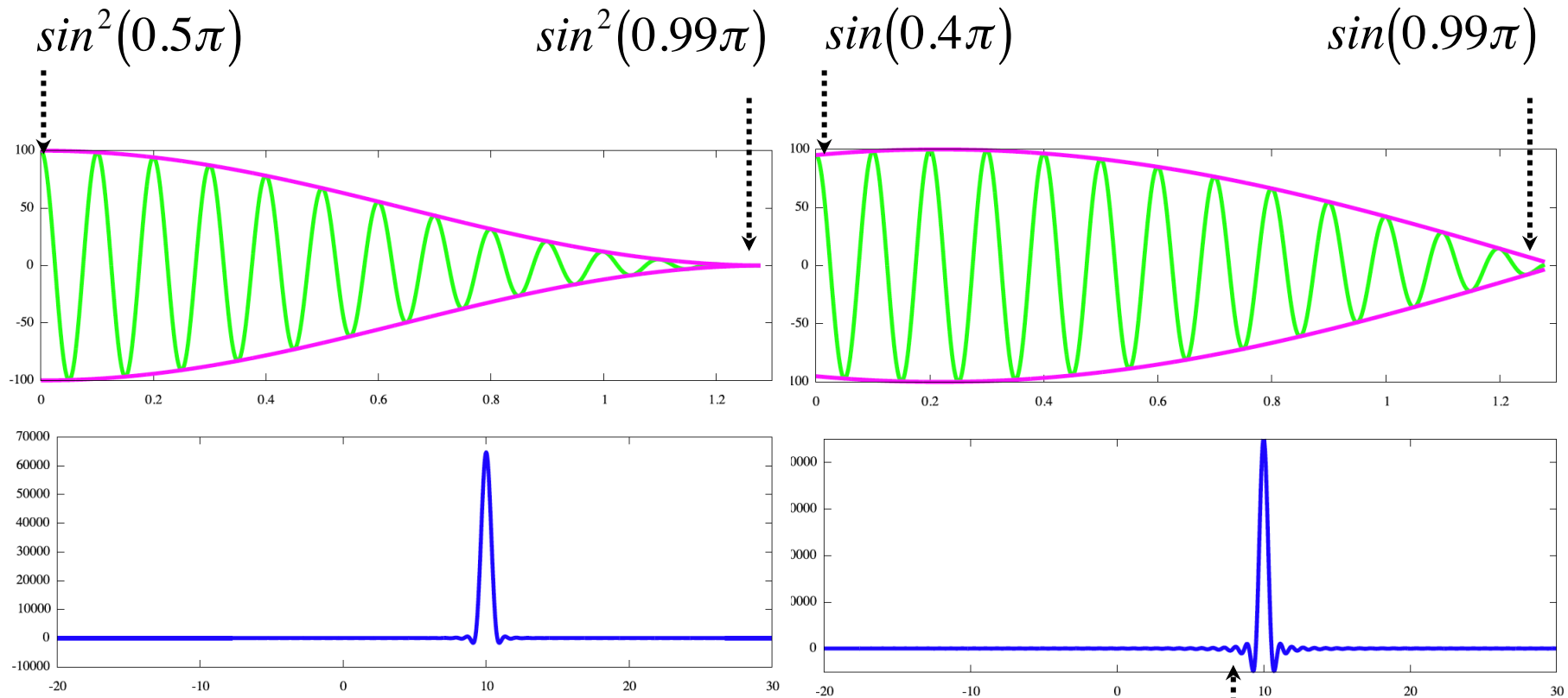
$$\exp(-3a_q) = 0.02$$

$$\sin^2(0.99\pi) = \frac{1}{1000}$$





ポイント数の少ない間接測定軸には、  
 $\sin$  ( $\cos$ ) window 関数を使えば、  
分解能をそれほど落とさずに済む。

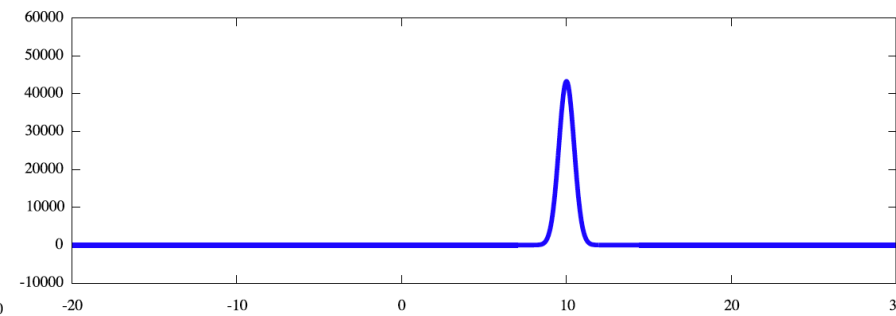
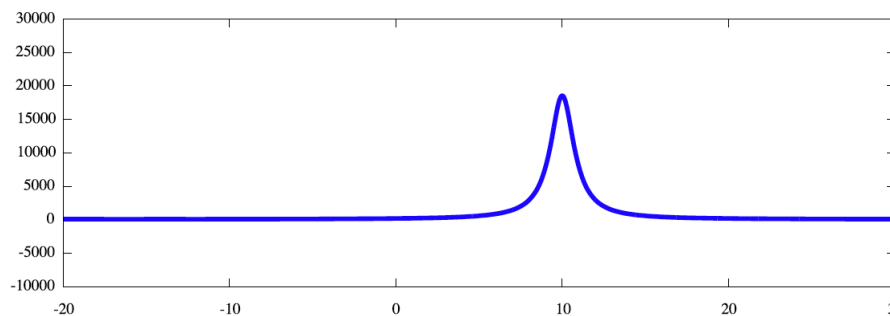
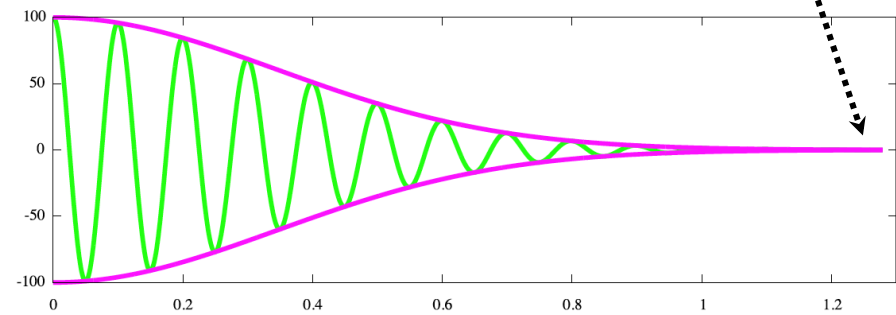
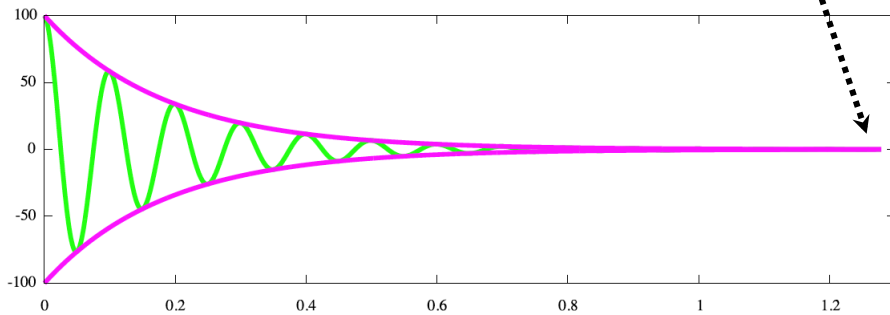


しかし、着地が急激な分、少し wiggle が ...

Lorentz-to-gauss window 関数を使えば、  
裾野が尾を引かない。

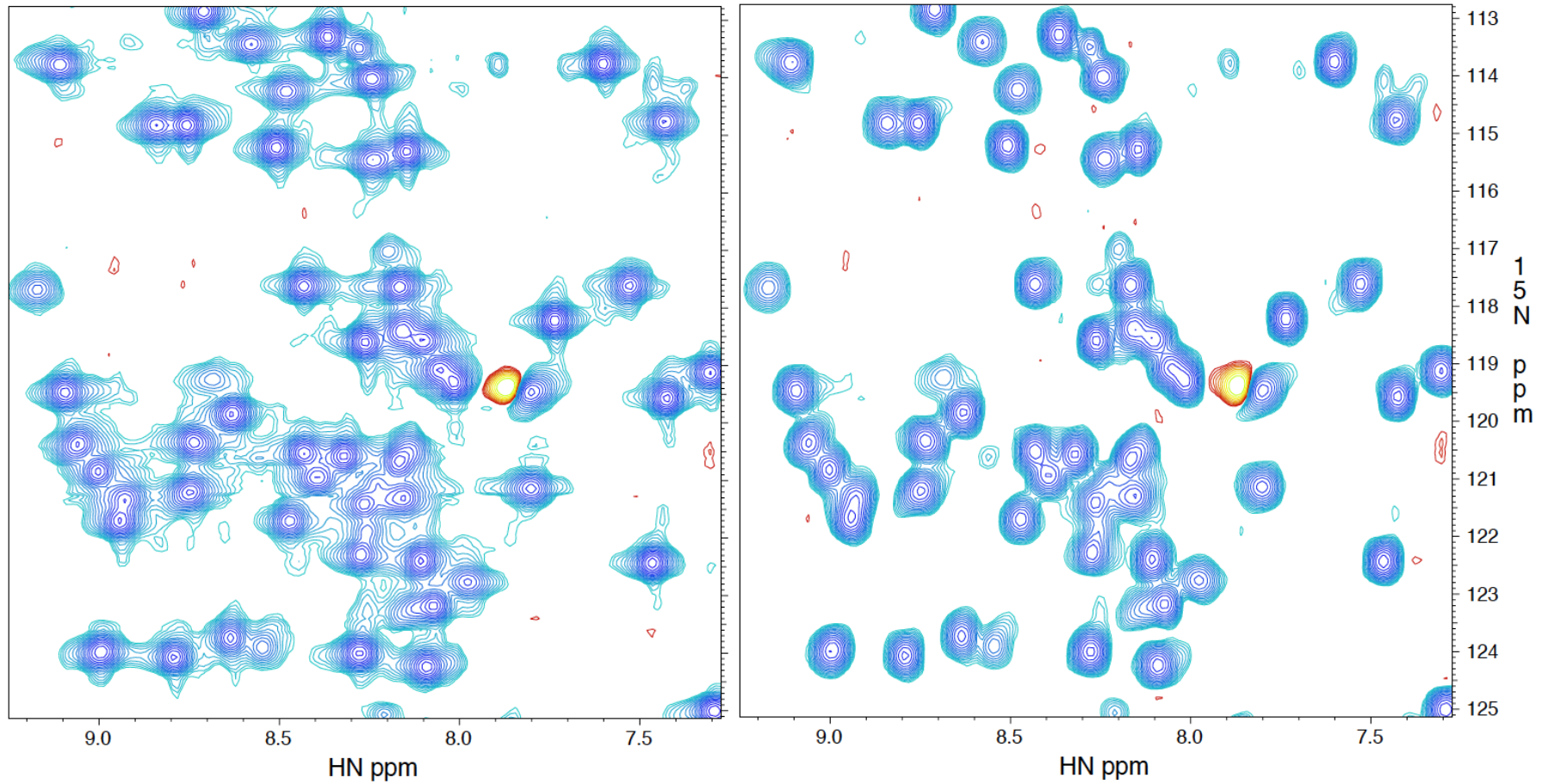
$$\exp(-5.4a_q) = 0.001$$

$$\exp\left(+R_2a_q - \frac{\sigma^2}{2}a_q^2\right) = 0.001$$



分解能が向上した交換条件として、少し感度を失う。

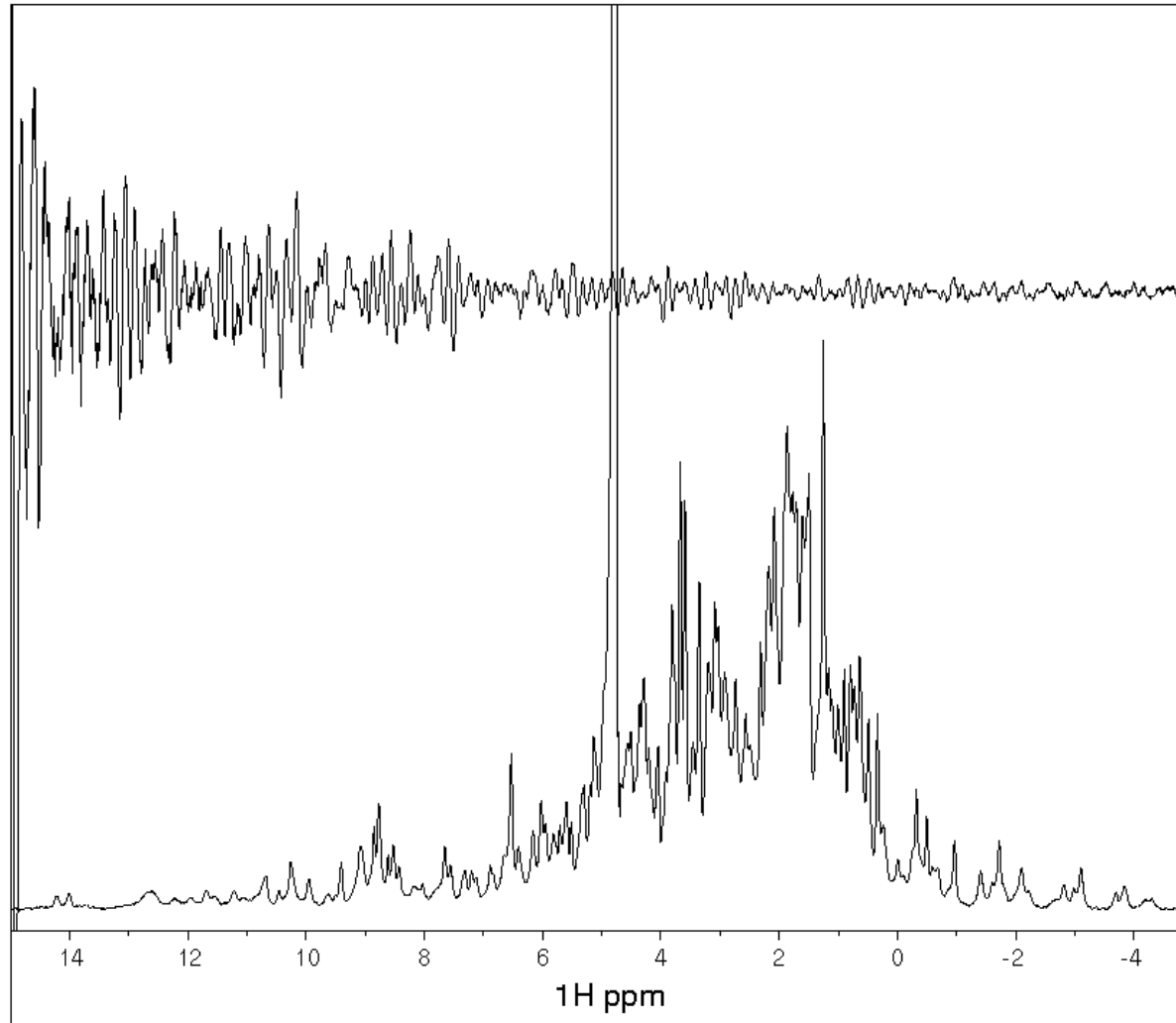
感度が許せば、lorentz-to-gauss window 関数は  
 $\cos^2$  window 関数よりもよい。



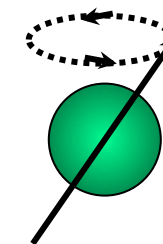
$^1\text{H}/^{15}\text{N}$  次元ともに  $\cos^2$

$^1\text{H}/^{15}\text{N}$  次元ともに Lorentz-to-gauss

# フーリエ変換



$^1\text{H}$  スピンの回転速度を表す

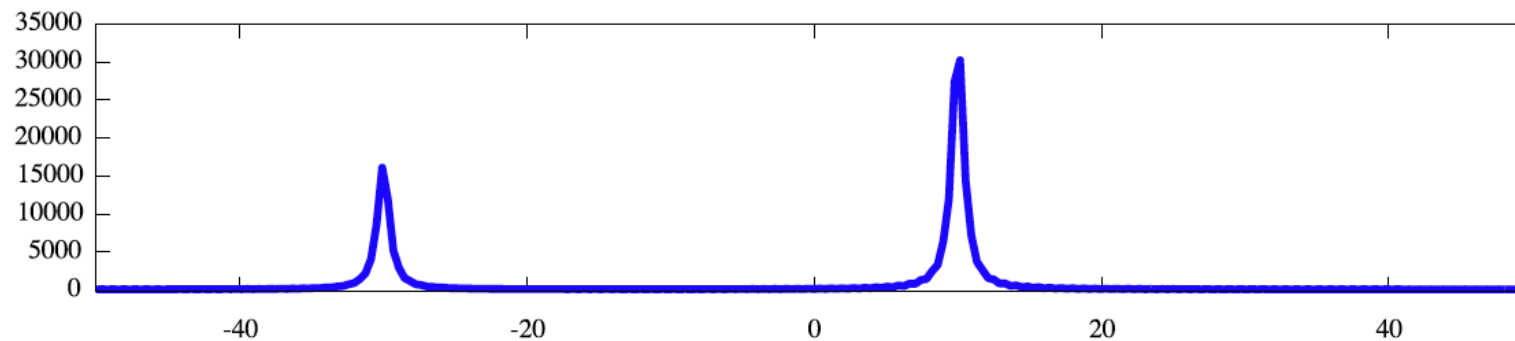
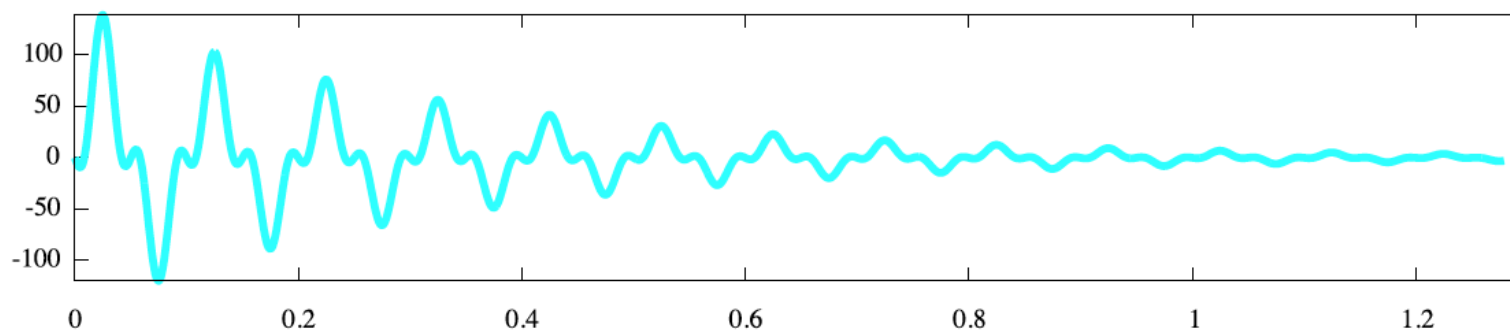
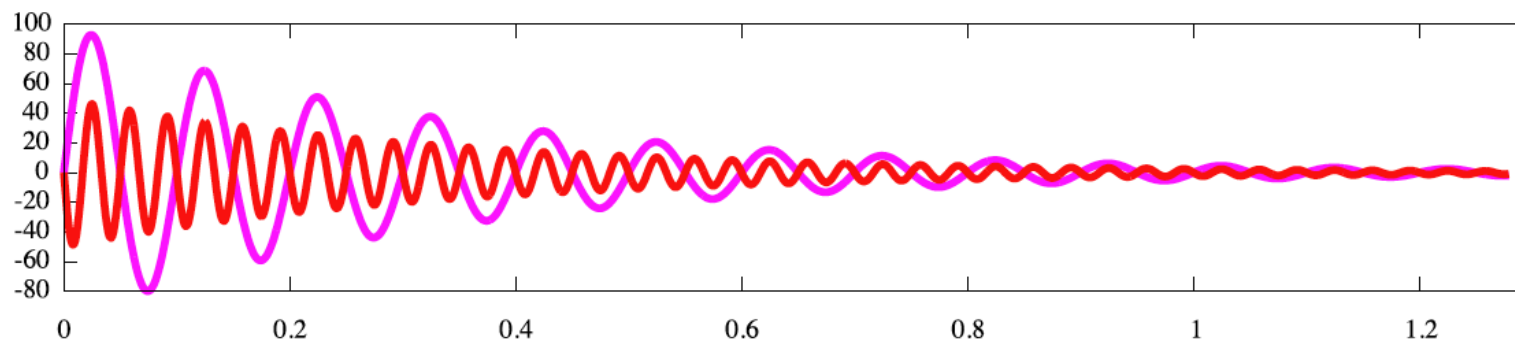


FID  
(時間軸データ)

フーリエ変換後

スペクトル  
(周波数軸データ)

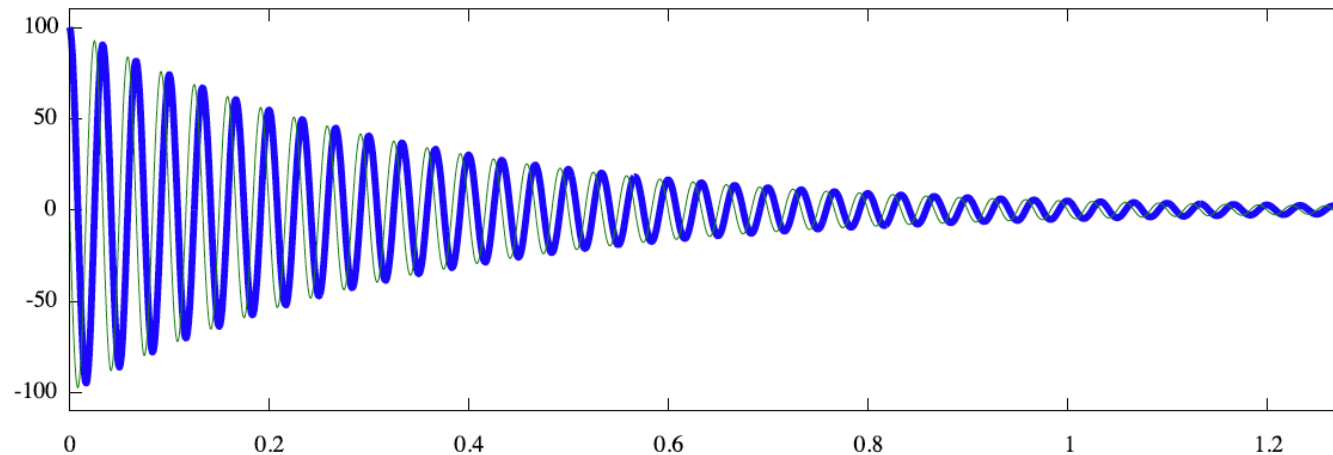
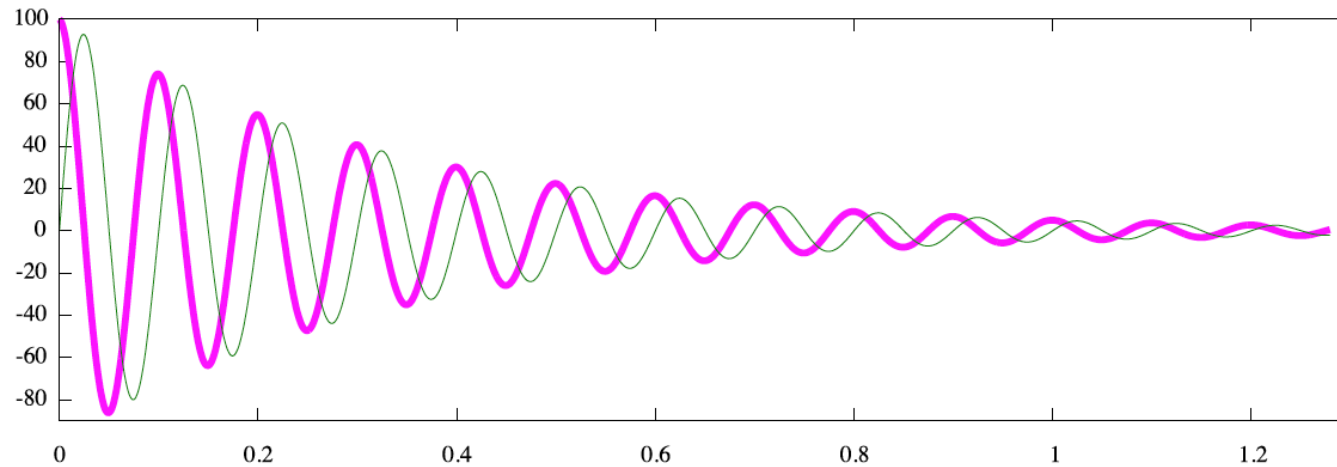
もう一つ、1秒間に30回、しかも、逆向きに回転していたら ....



10 Hz と -30Hz の位置にピークが出た。

$$S(\nu) = \int_{-\infty}^{\infty} S(t) \exp(-i\omega t) dt = \int_{-\infty}^{\infty} S(t) \exp(i(-\omega)t) dt$$

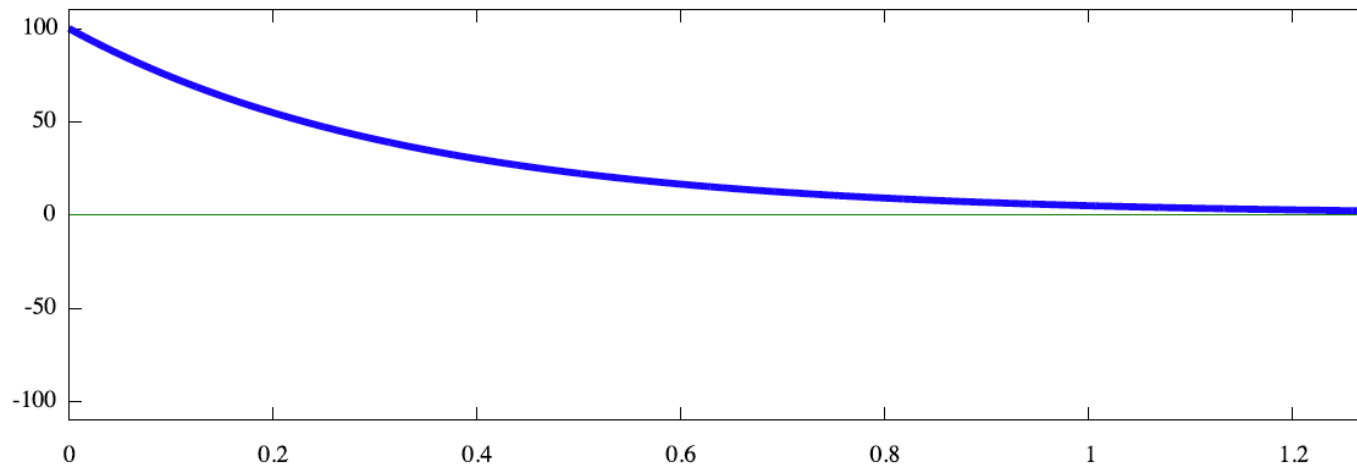
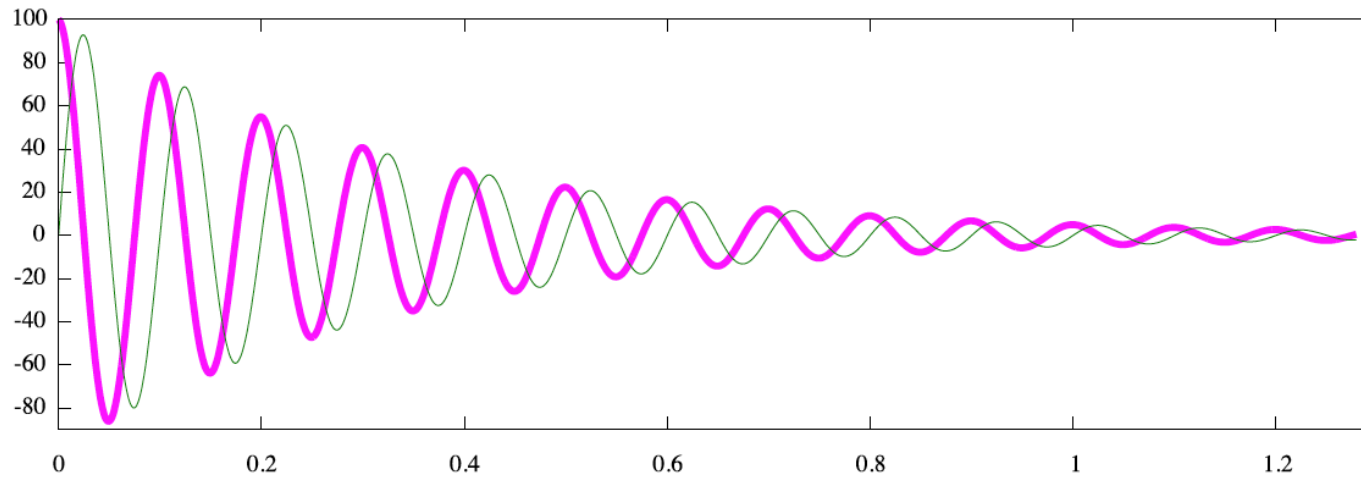
それでは、毎秒 40 回転で巻き戻してみよう。



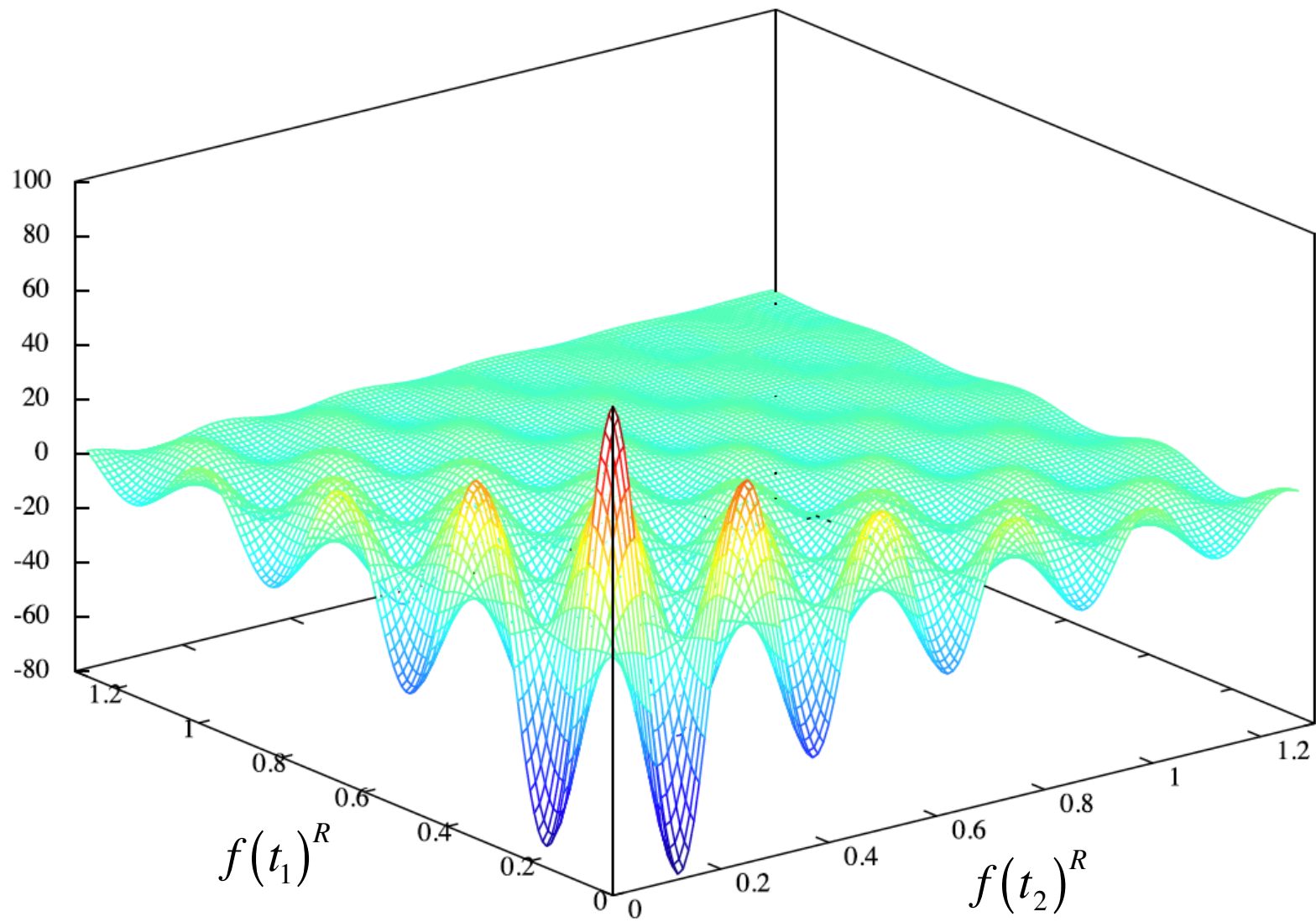
$\exp(i * 40 * t)$  で割ることは、40 Hz で巻き戻すことと同じ。

$$S(\nu) = \int_{-\infty}^{\infty} S(t) \exp(-i\omega t) dt = \int_{-\infty}^{\infty} S(t) \exp(i(-\omega)t) dt$$

毎秒 10 回転で巻き戻してみれば ...

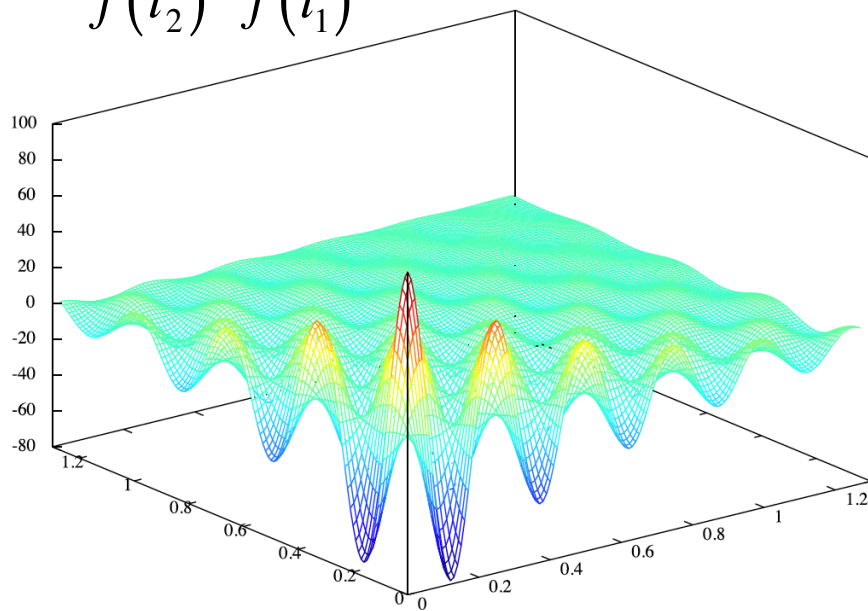


振動が消え去って、積分値は0でなくなった。

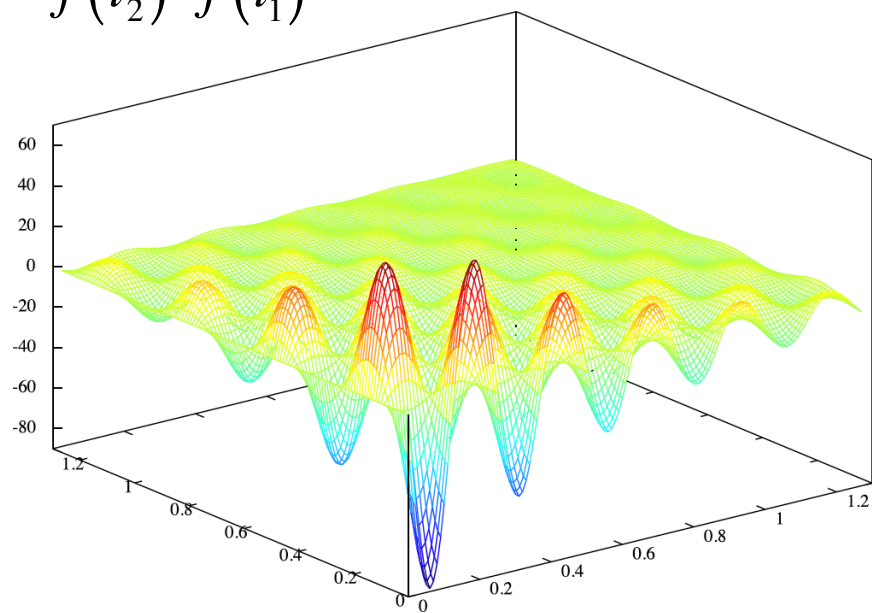




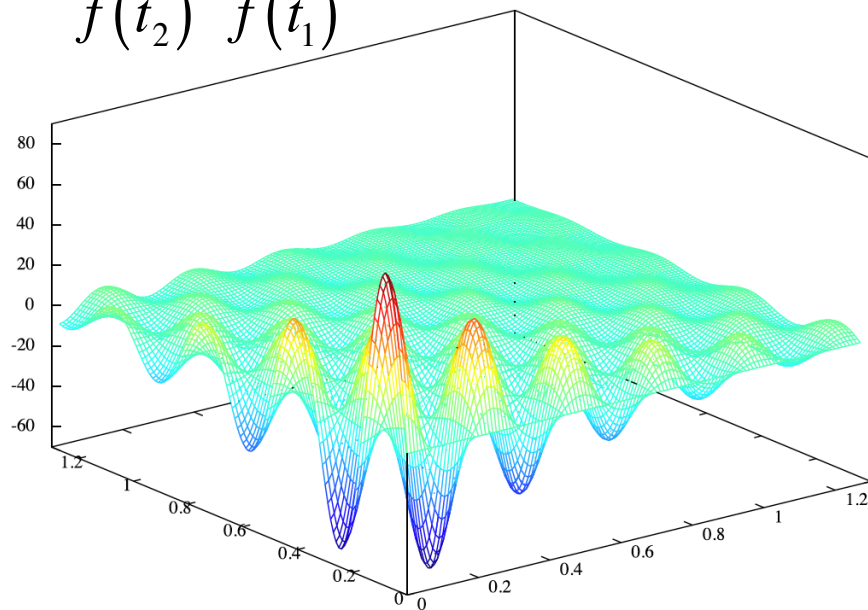
$$f(t_2)^R f(t_1)^R$$



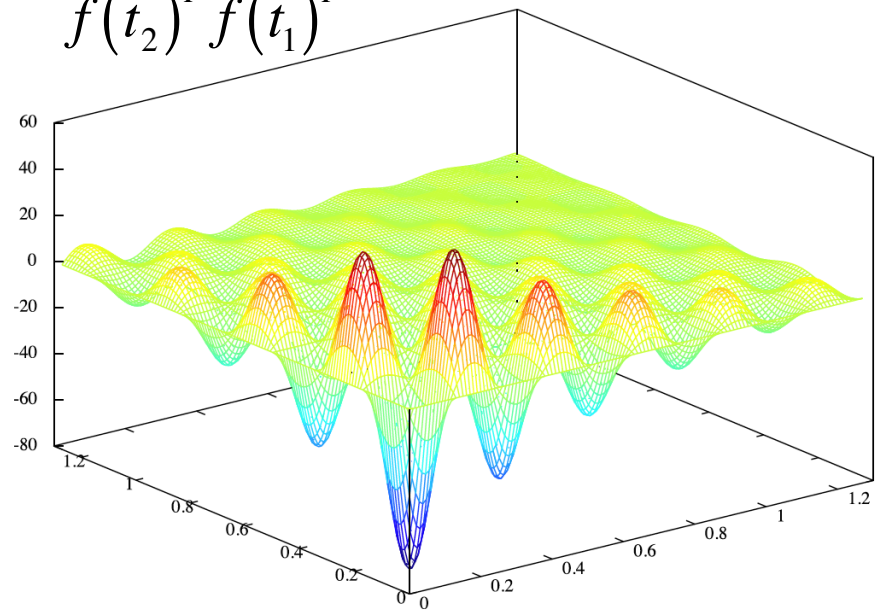
$$f(t_2)^I f(t_1)^R$$



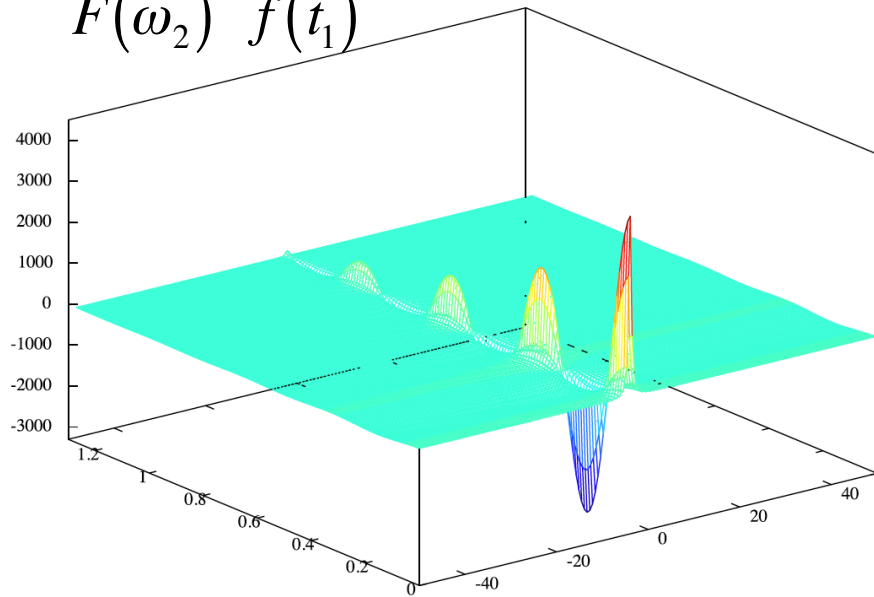
$$f(t_2)^R f(t_1)^I$$



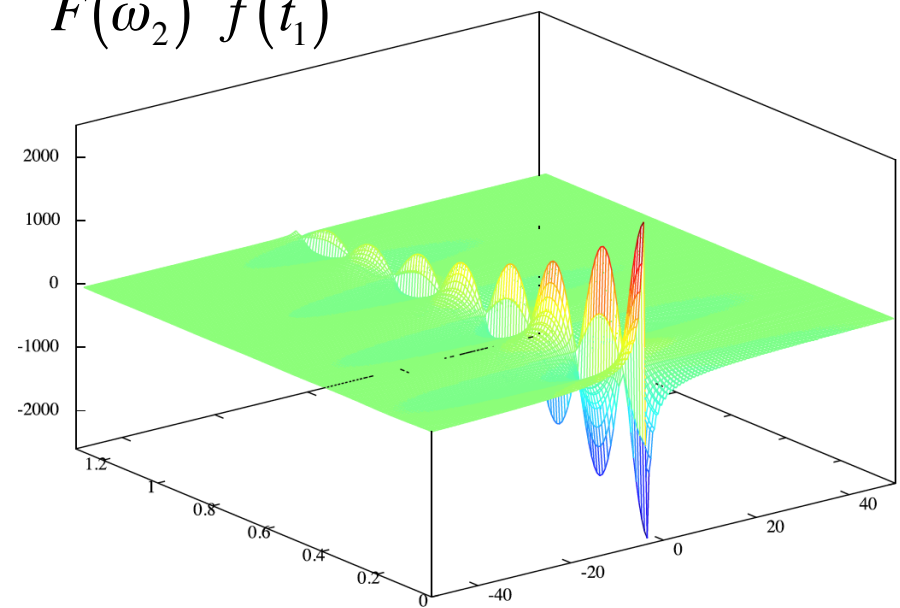
$$f(t_2)^I f(t_1)^I$$



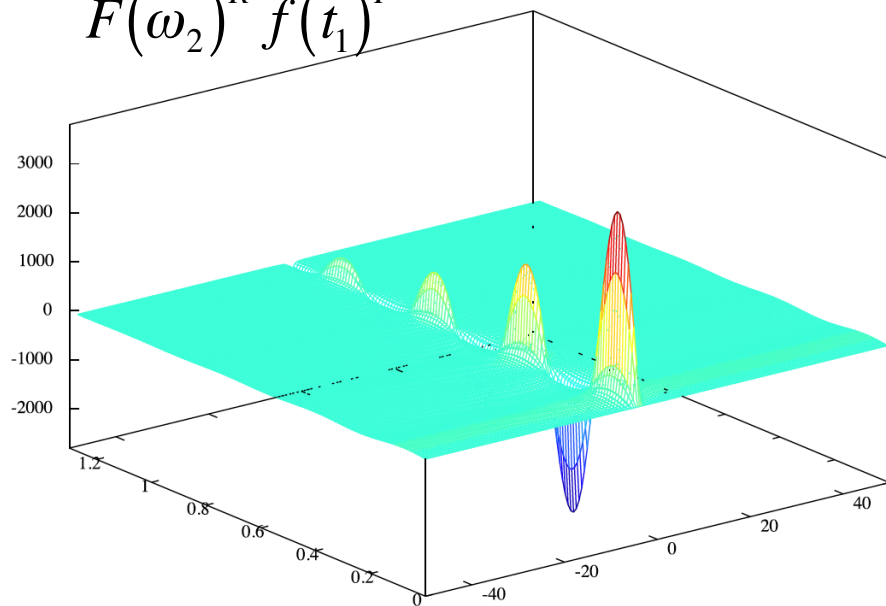
$$F(\omega_2)^R f(t_1)^R$$



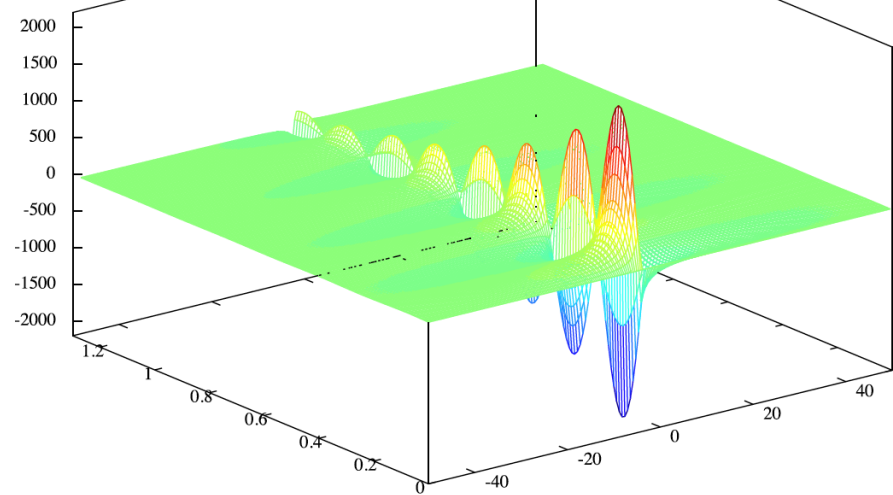
$$F(\omega_2)^I f(t_1)^R$$

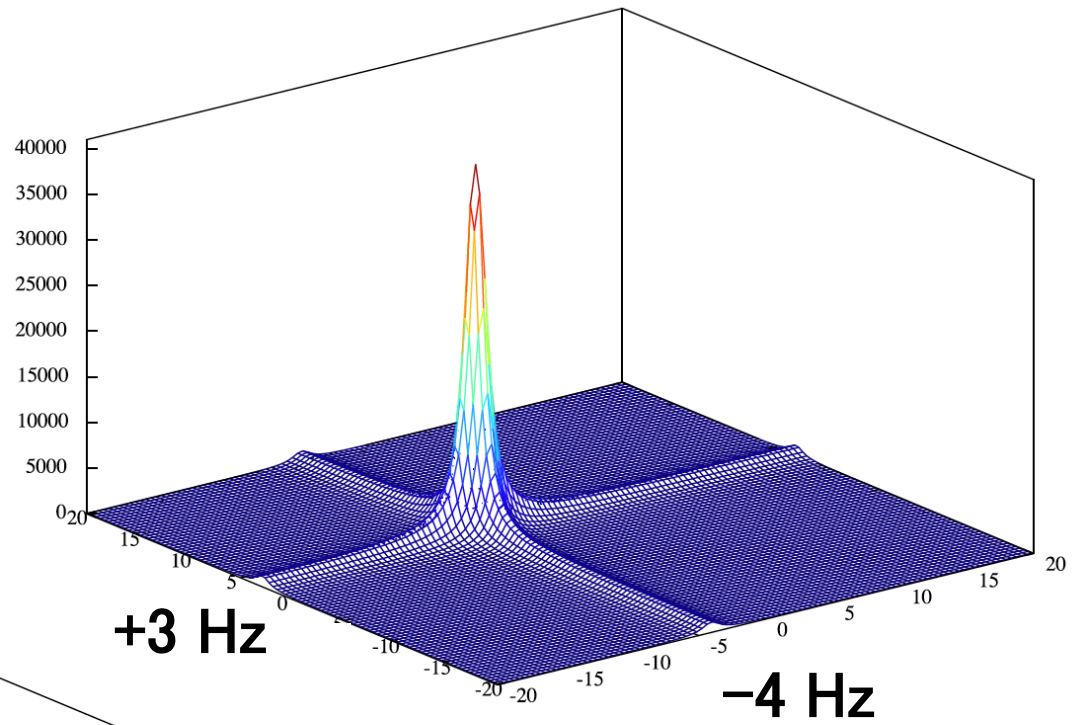


$$F(\omega_2)^R f(t_1)^I$$

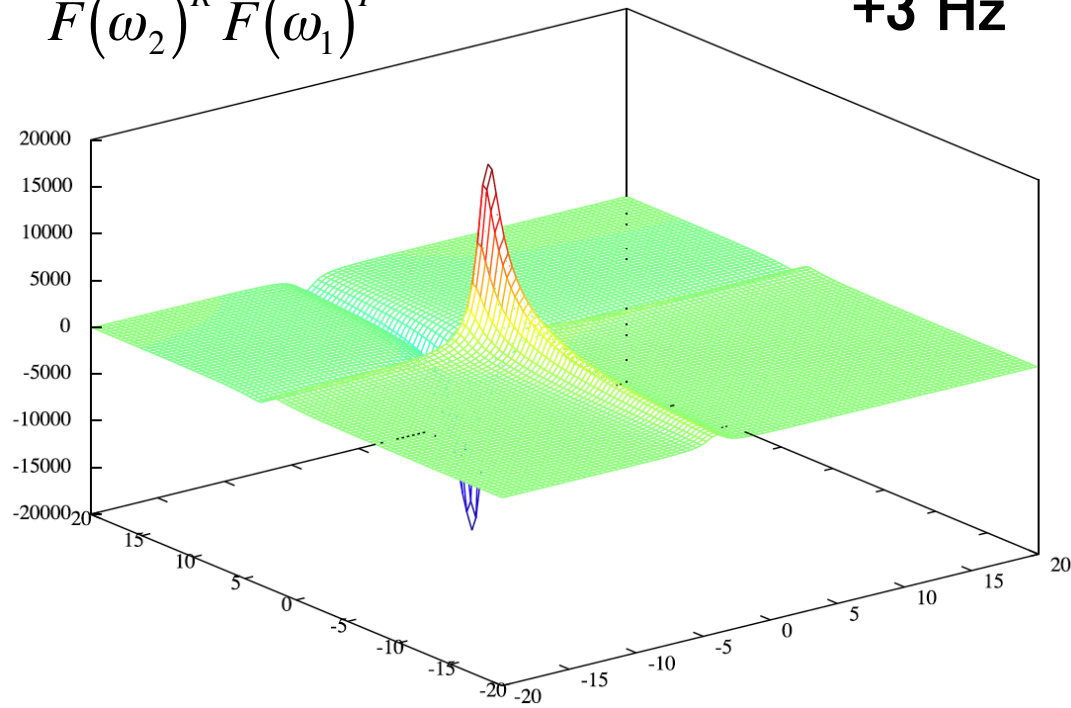


$$F(\omega_2)^I f(t_1)^I$$



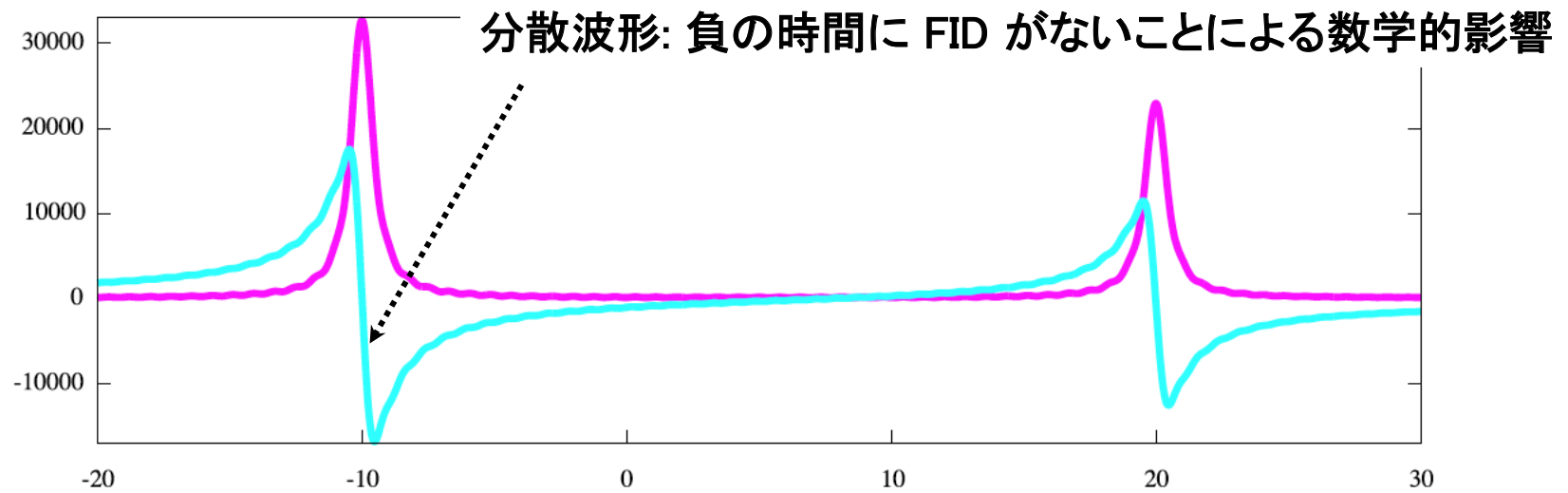
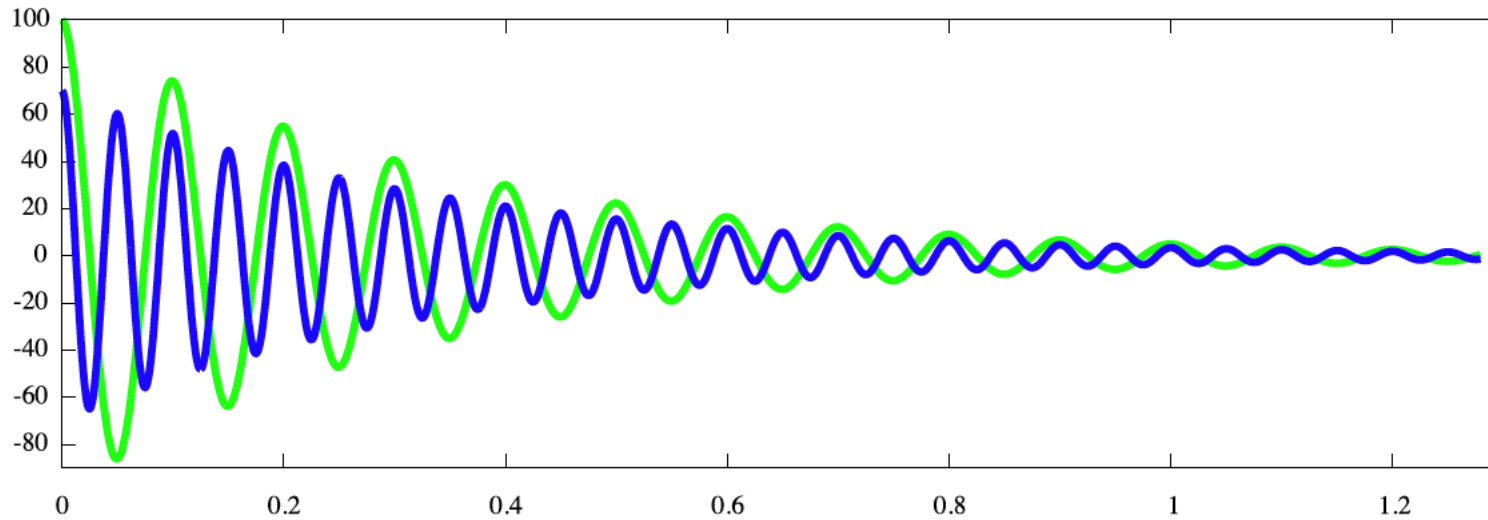


$$F(\omega_2)^R F(\omega_1)^I$$

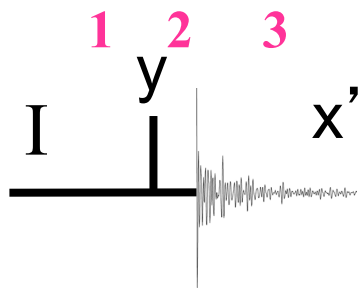


$$F(\omega_2)^R F(\omega_1)^R$$

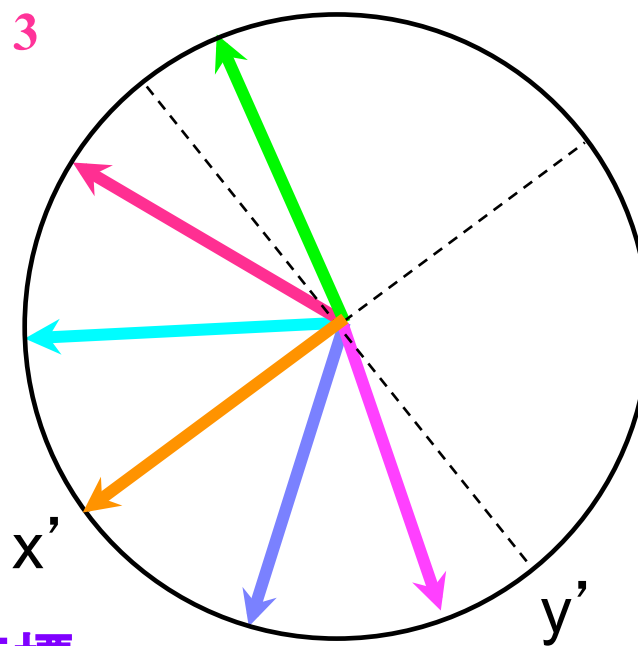
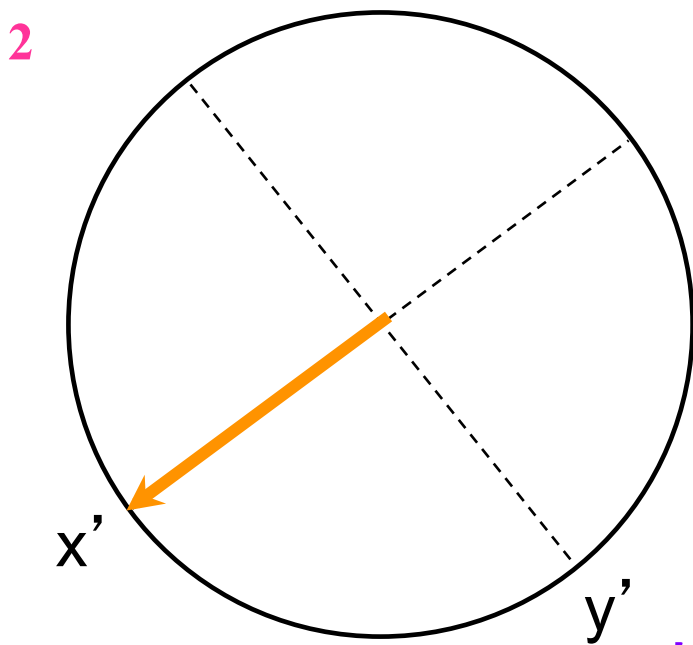
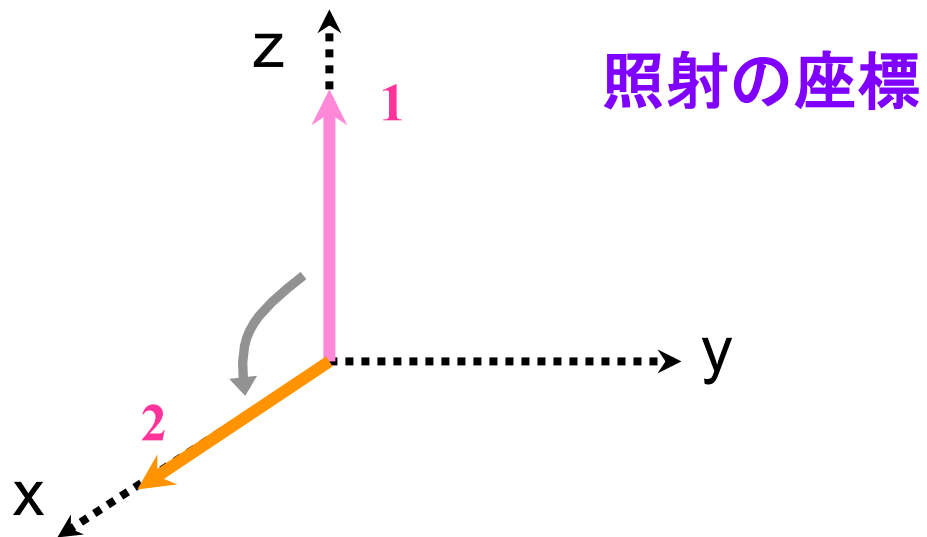
## 4-3 位相の調整



吸収波形と分散波形にきっちりと分かれる。

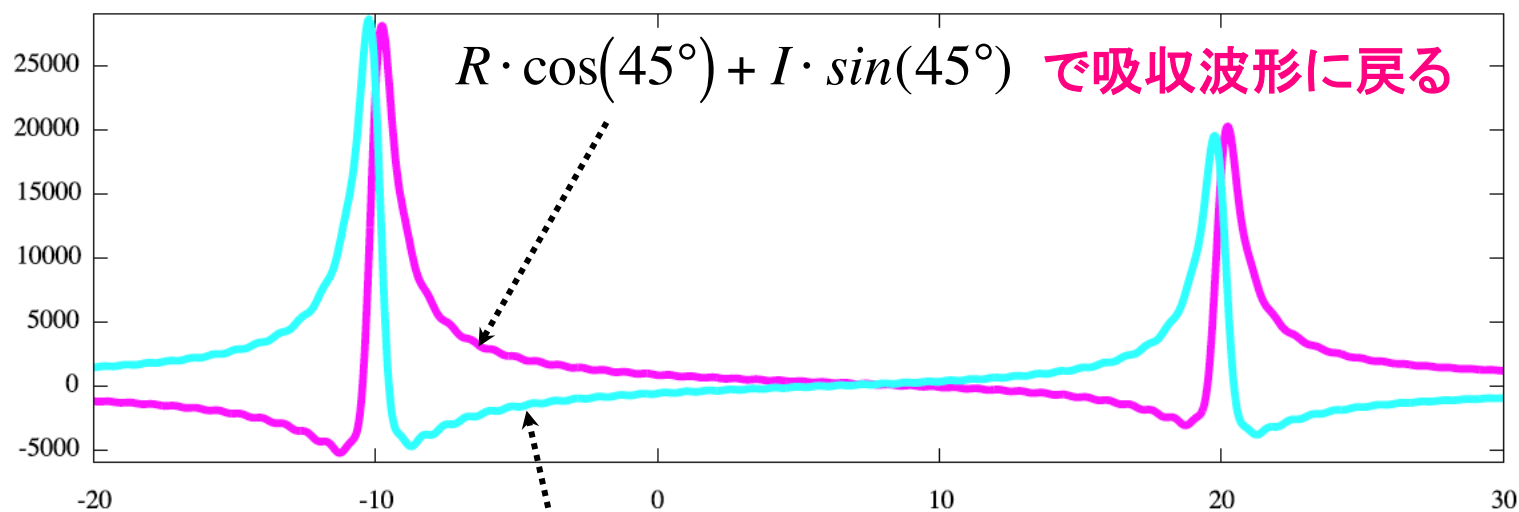
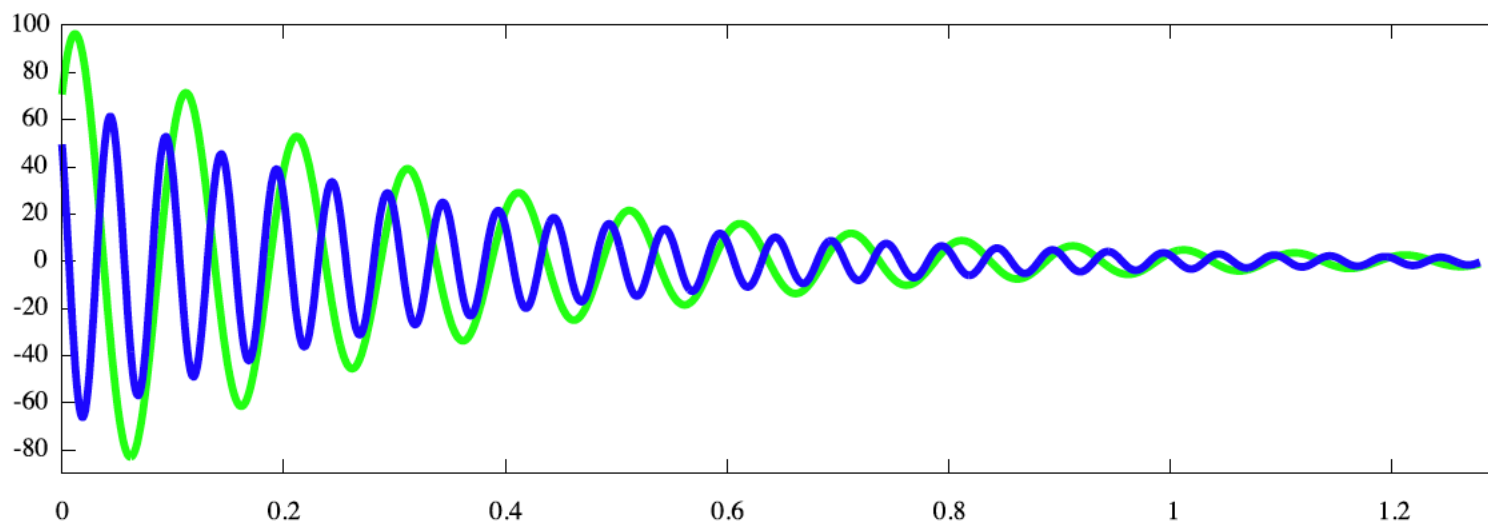


照射の座標の  $x$   
 $\neq$   
 検出の座標の  $x'$



検出の座標

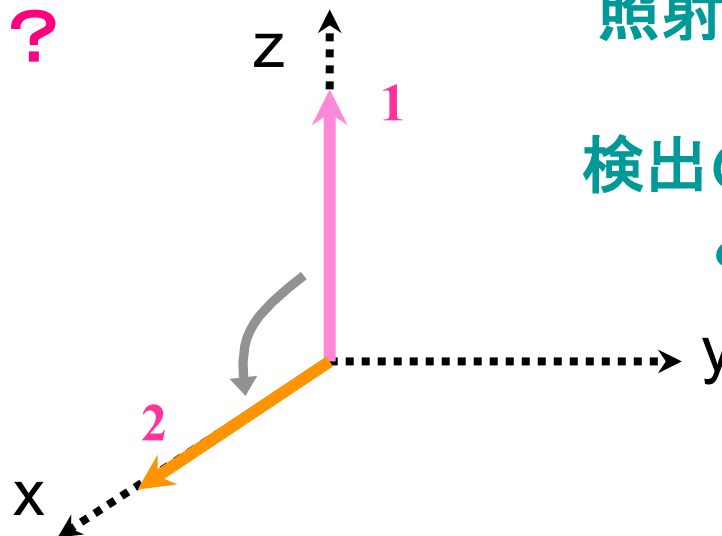
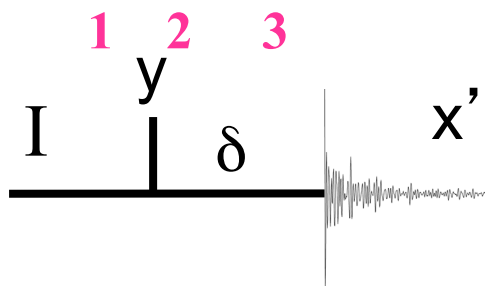
## 照射の座標と検出の座標が 45 度ずれていると ...



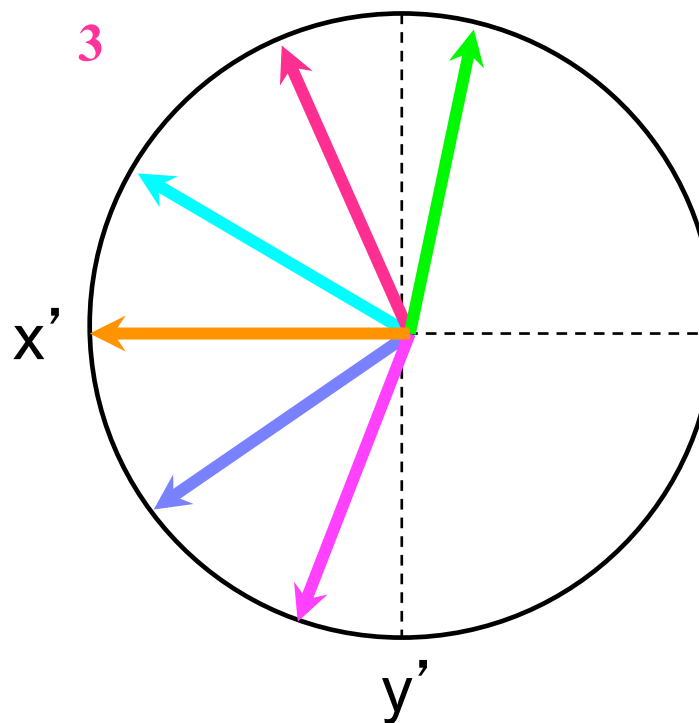
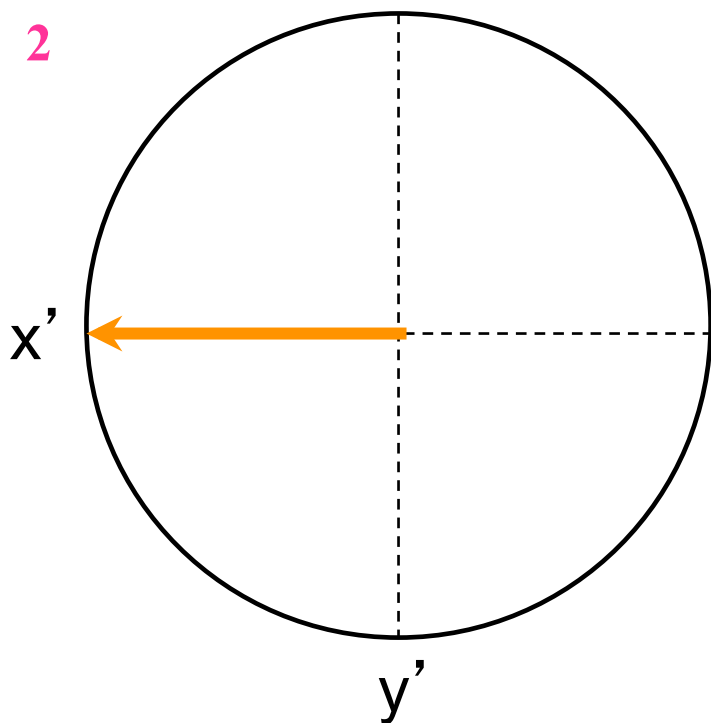
$R \cdot \cos(45^\circ) + I \cdot \sin(45^\circ)$  で吸収波形に戻る

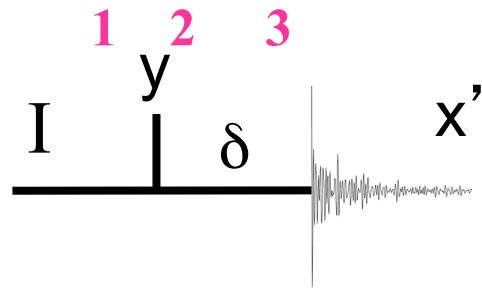
$I \cdot \cos(45^\circ) - R \cdot \sin(45^\circ)$  で分散波形に戻る

# 一次補正は何故必要？

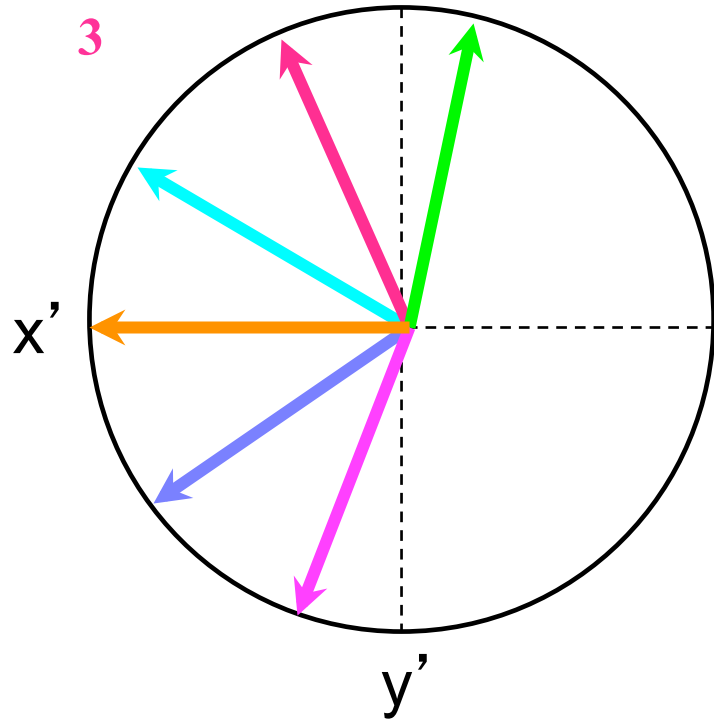
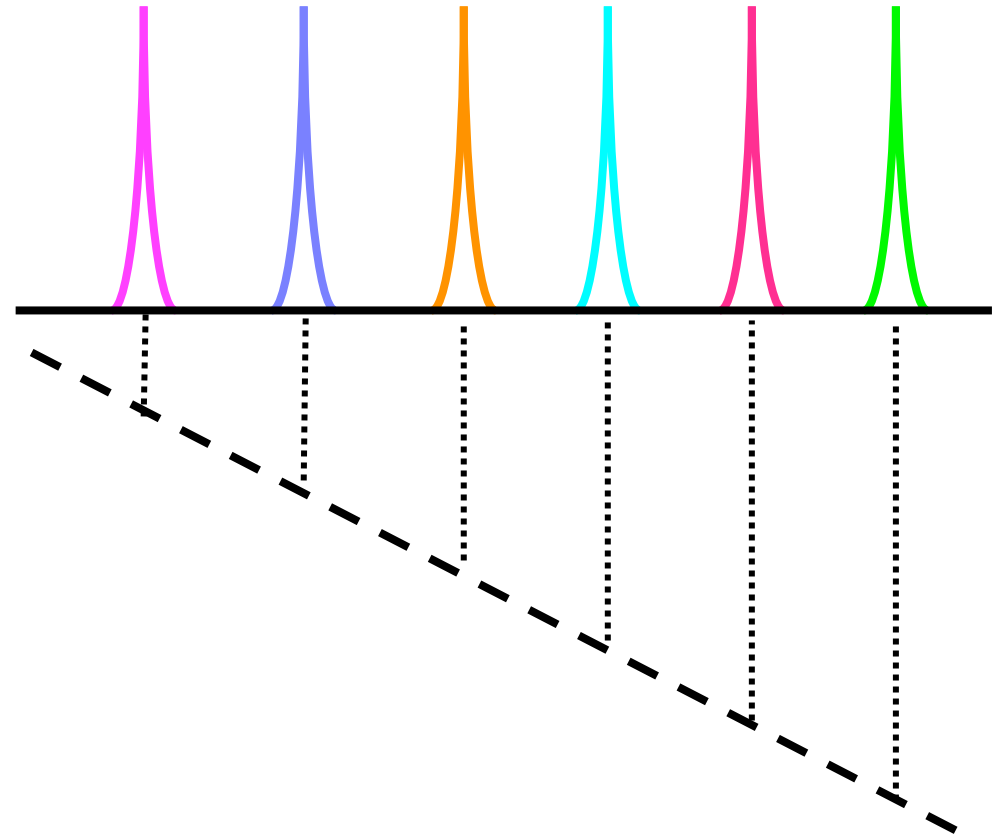


照射の座標の  $x$   
=  
検出の座標の  $x'$   
とする。





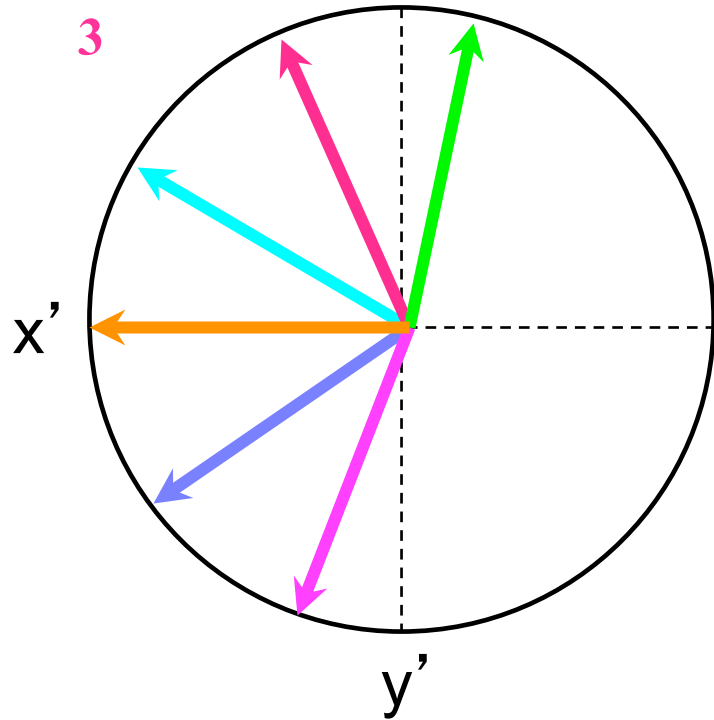
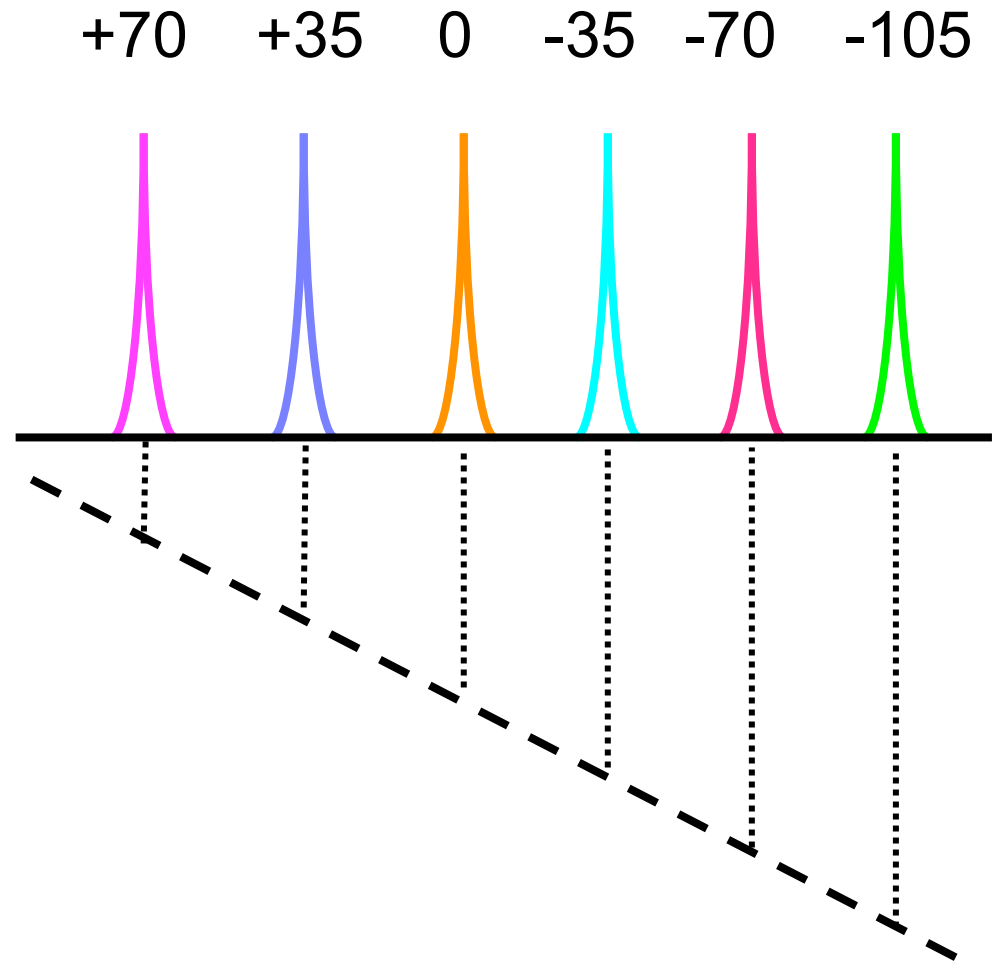
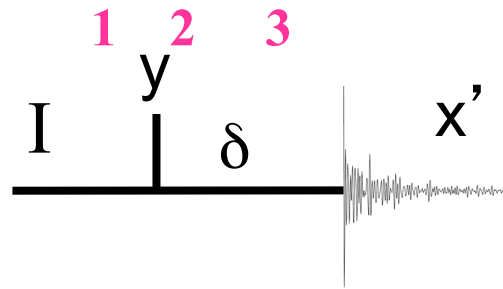
+70 +35 0 -35 -70 -105



これが FID の開始時点

スペクトルでの共鳴位置に従って位相がずれる。

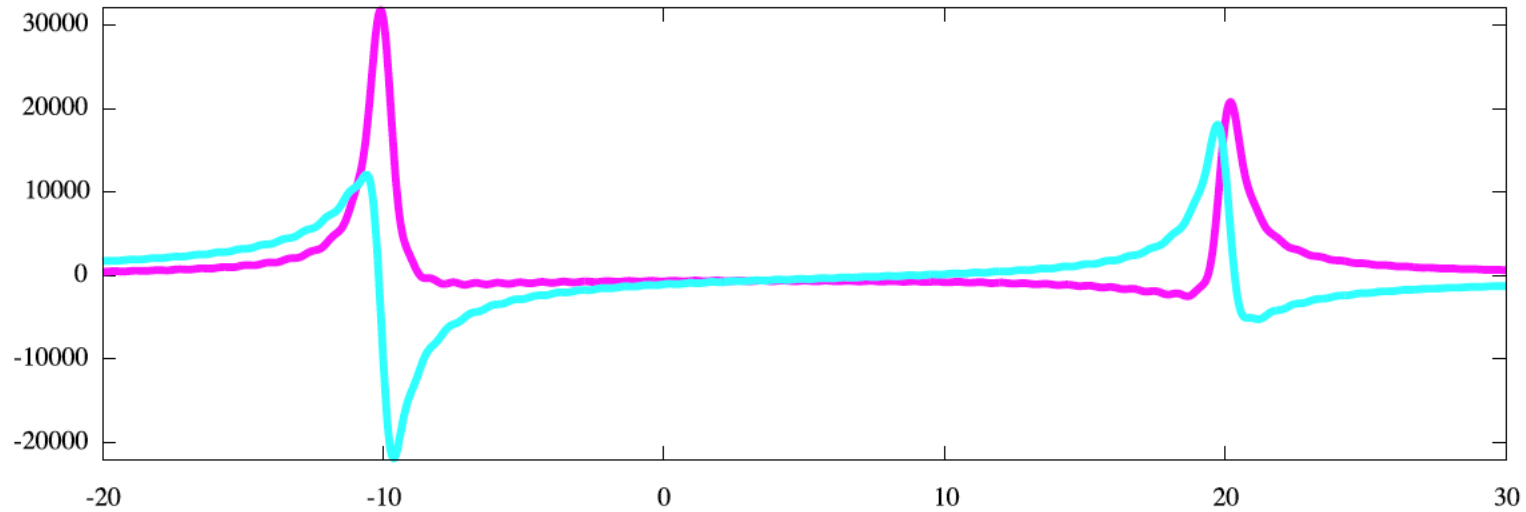




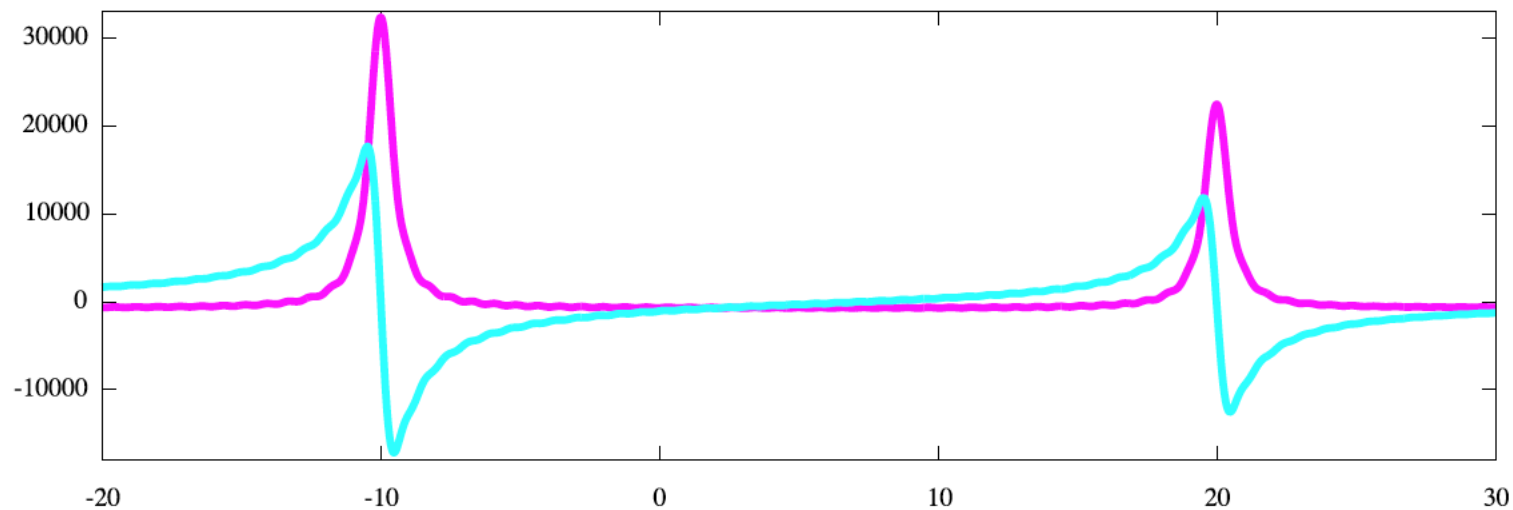
これが FID の開始時点

スペクトルでの共鳴位置に従って位相がずれる。

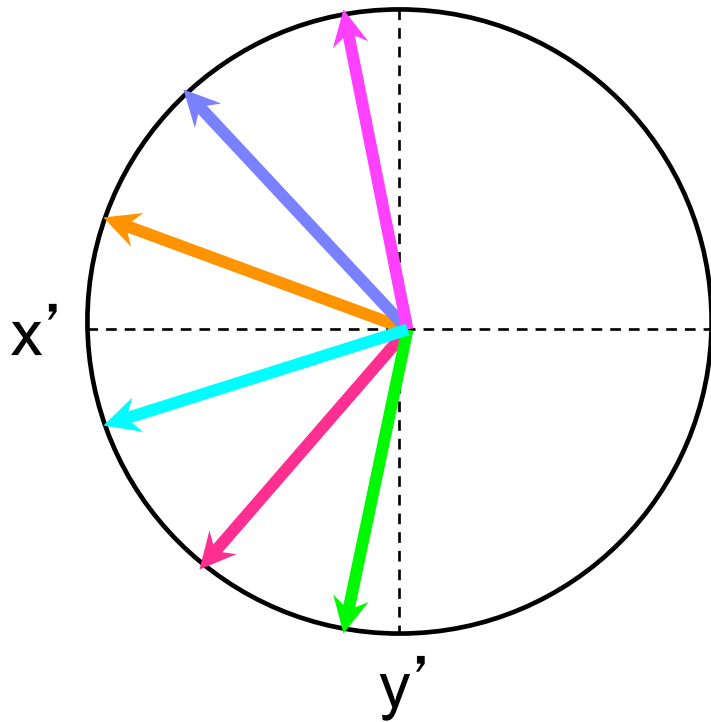
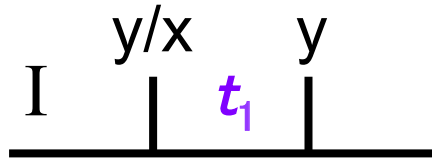
## FID の開始が 5ポイント(1ms x5)遅れると ...



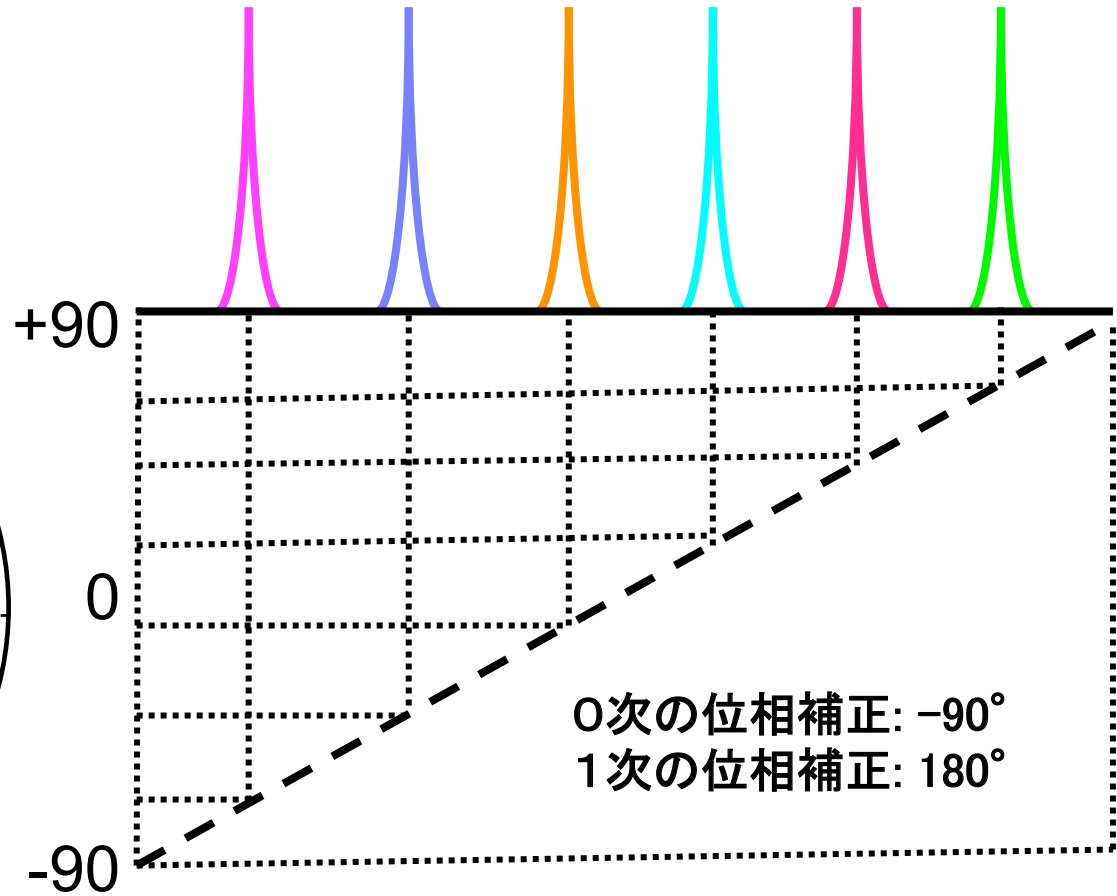
$$R \cdot \cos\left(360^\circ \times 5 \times \frac{n_i}{n_T}\right) + I \cdot \sin\left(360^\circ \times 5 \times \frac{n_i}{n_T}\right) \text{ で吸収波形に戻る}$$



$t_1$  の開始が  $0.5 \Delta t_1$  分だけ遅れると ...



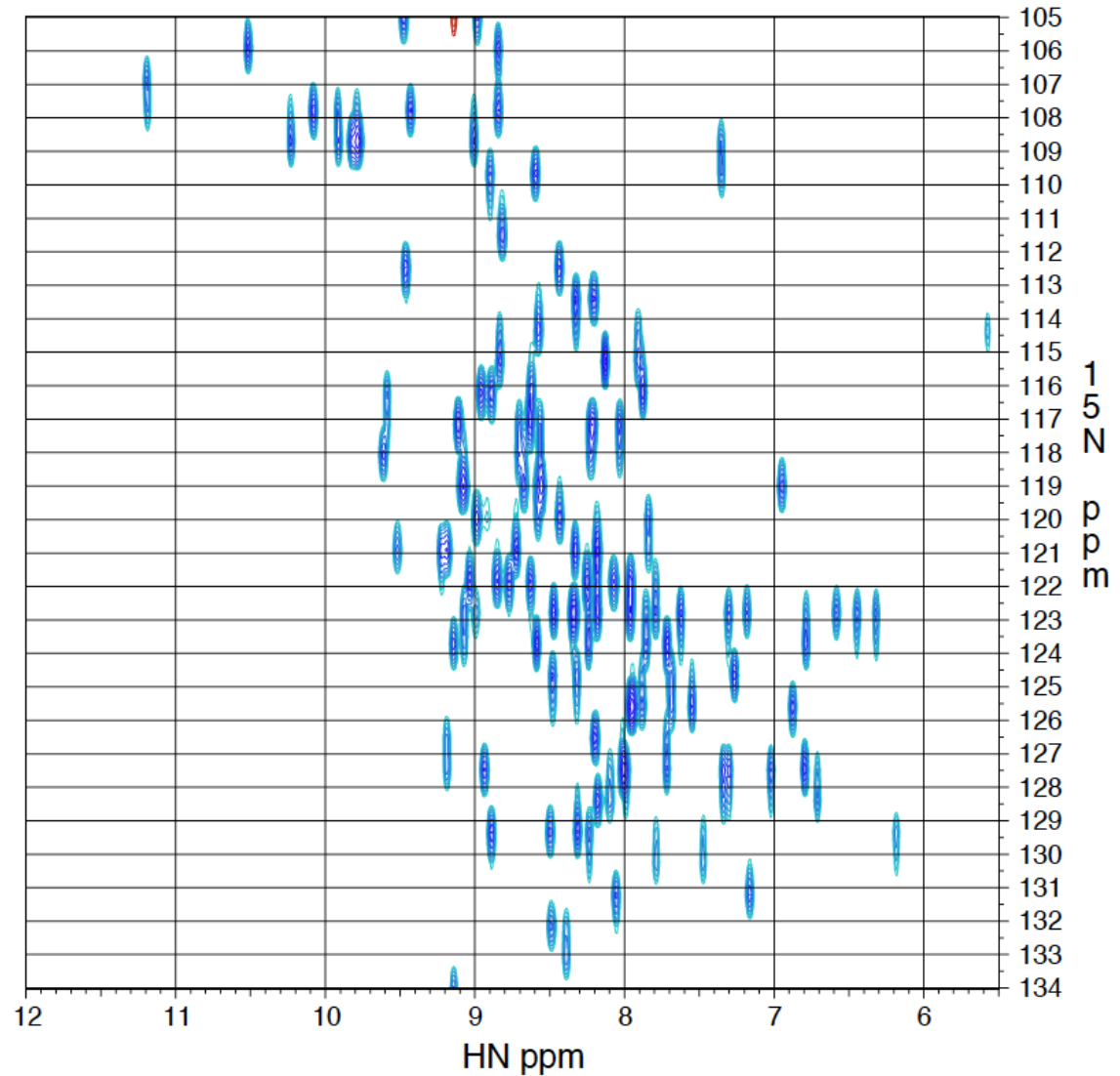
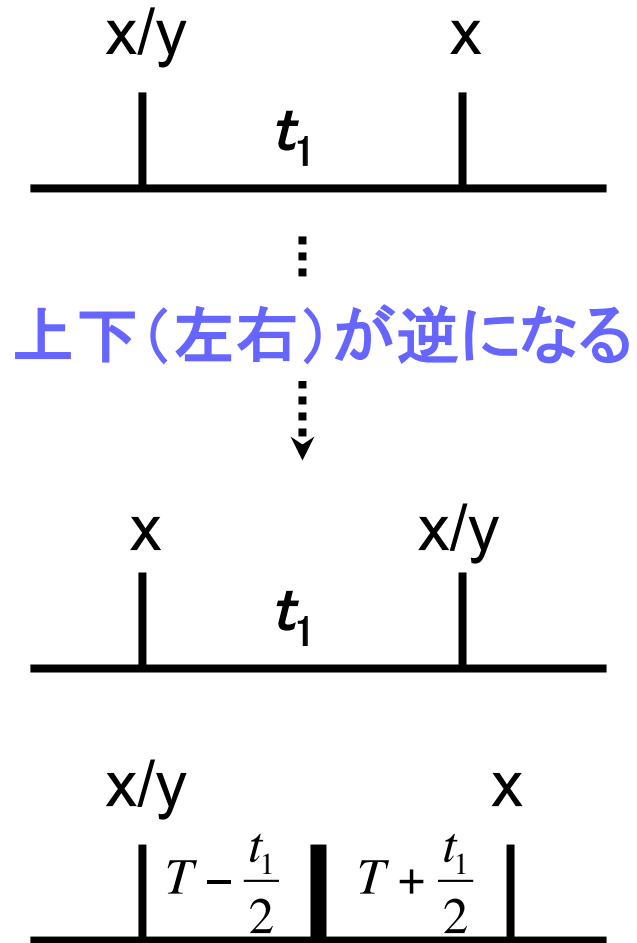
これが  $t_1$  の開始時点



$$R \cdot \cos\left(360^\circ \times 0.5 \times \frac{n_i}{n_T}\right) + I \cdot \sin\left(360^\circ \times 0.5 \times \frac{n_i}{n_T}\right)$$

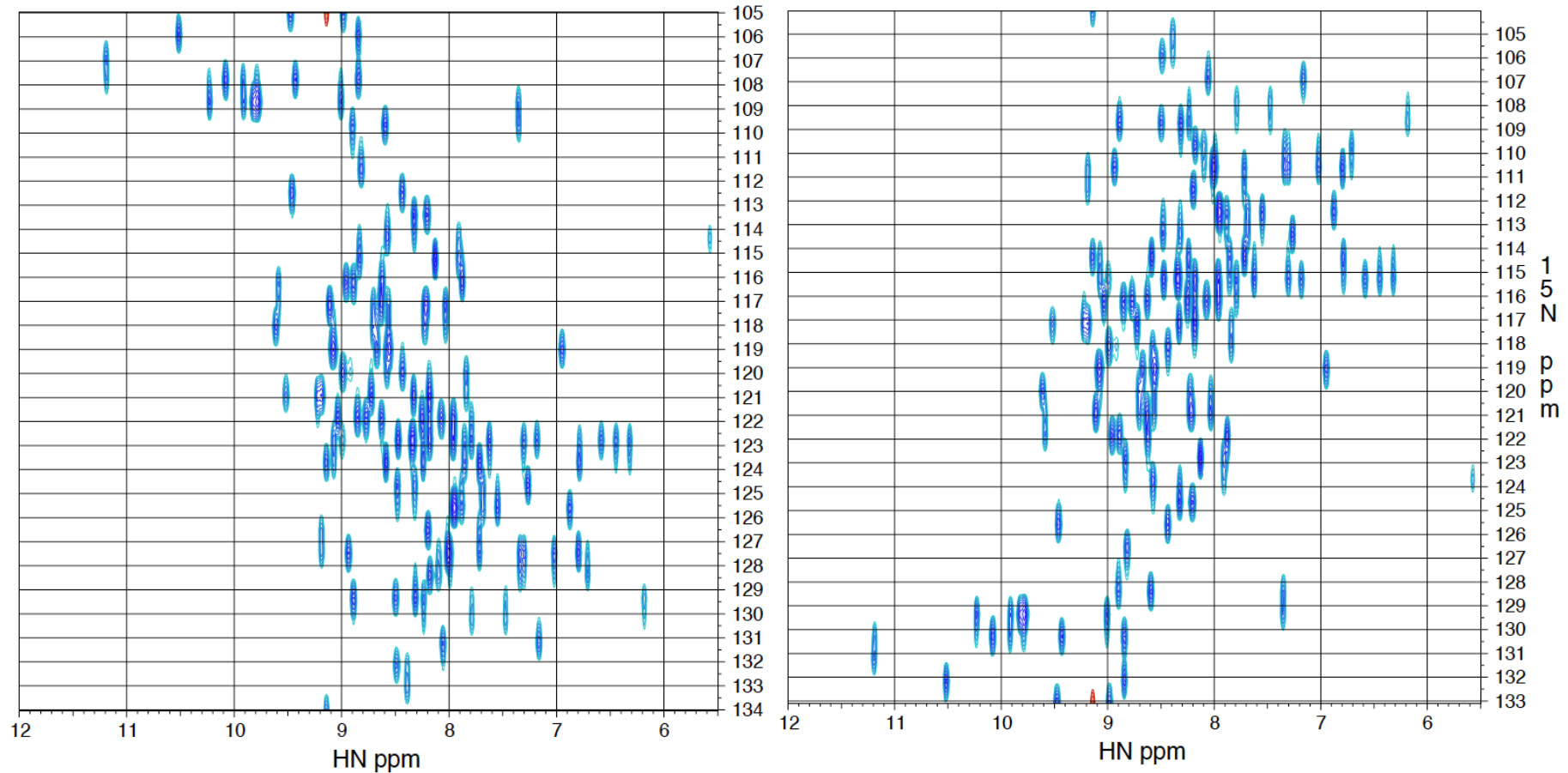
で吸収波形に戻る

## 4-4 スペクトルが逆さまの時の処理



次元の周波数を逆転する操作を行うと...

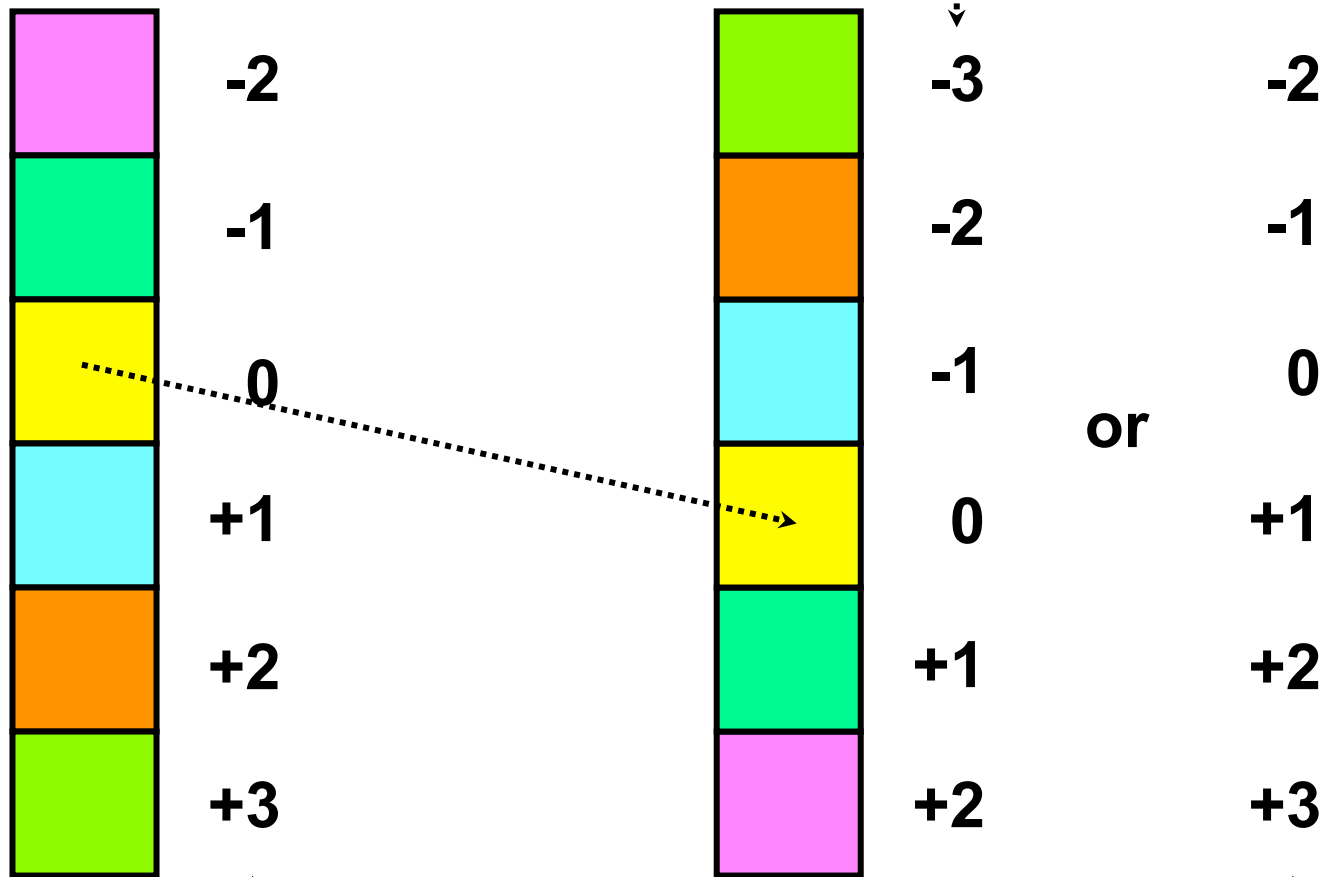
**nmrPipe -fn REV -sw**



画像が上下で入れ替わったが、  
 $^{15}\text{N}$  の周波数の上限と下限も変化してしまった。

# 上限と下限値が測定時の設定からずれてしまった

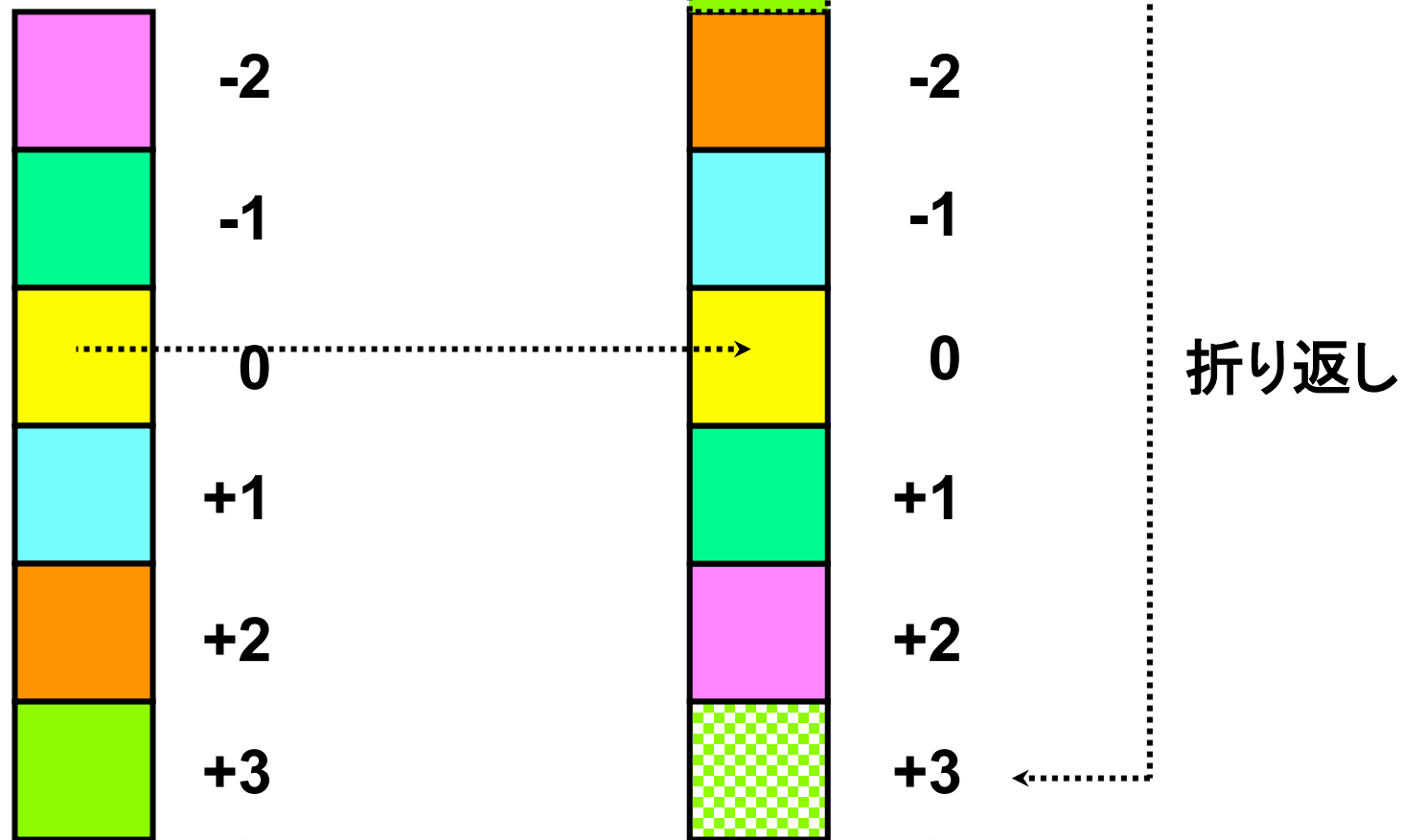
偶数のデジタルが原因



測定時に設定したはずの周波数

周波数そのものがずれてしまった

本当に正確に逆転させるには



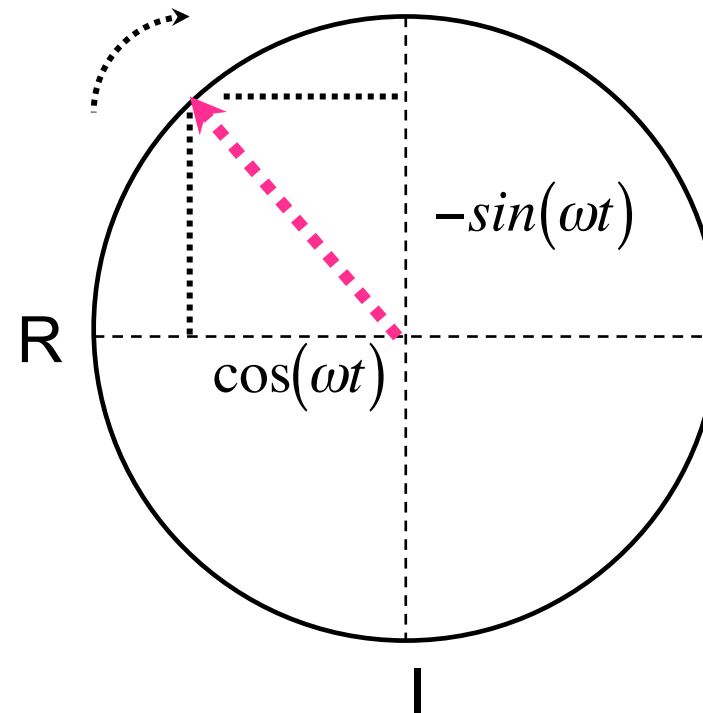
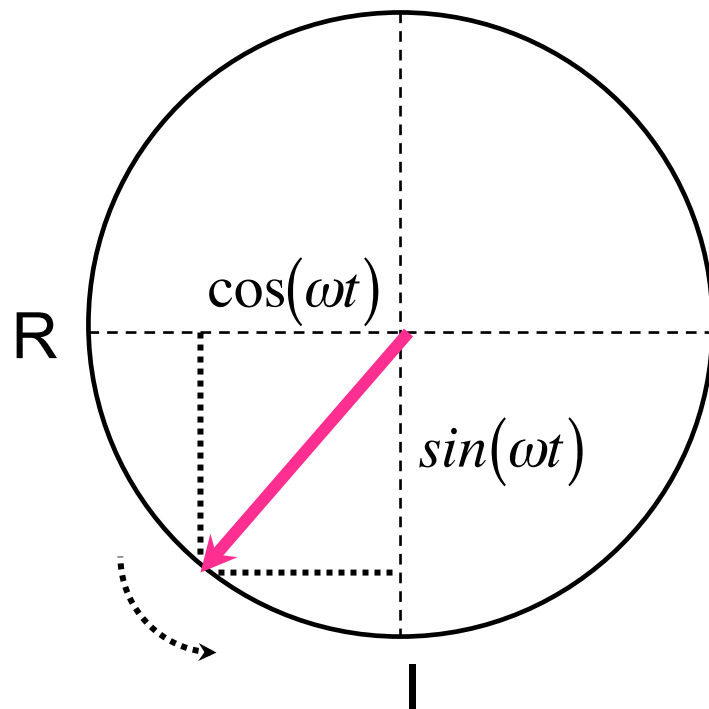
測定時に設定した周波数

上限と下限値も測定時の設定と同じ

周波数を逆転させるには、フーリエ変換での符号を逆転させる

$$\exp(i\omega t) = \cos(\omega t) + i \cdot \sin(\omega t)$$

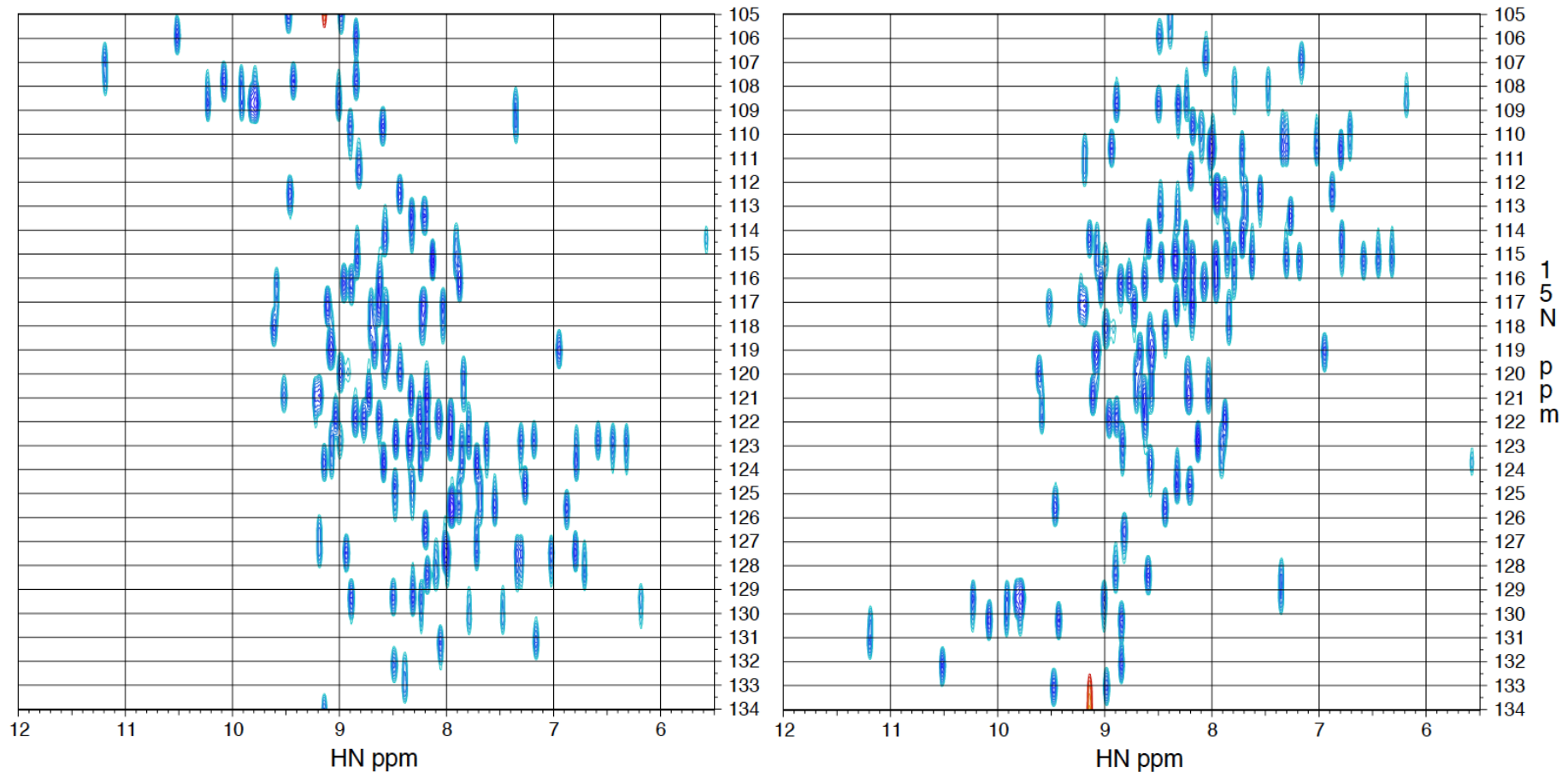
$$\begin{aligned}\exp(-i\omega t) &= \cos(-\omega t) + i \cdot \sin(-\omega t) \\ &= \cos(\omega t) - i \cdot \sin(\omega t)\end{aligned}$$





次元の周波数を正確に逆転する操作を行うと...

**nmrPipe -fn FT -neg**



正確に周波数を逆転させた結果は、  
単なる画像の上下(左右)入れ替えではない。

1. NMR の基礎

2. NMR の一次元測定

3. NMR の二次元測定

4. データ処理

5. 定性的な蛋白 NMR と定量的な有機 NMR

6. 今後の NMR 展開

# 蛋白質を発現させる 大腸菌を培養するた めの培地

最少培地なら透明



# 蛋白質を精製するた めのカラムとポンプ

Akta が無くてもペリスタと  
HiTrap-カラム(手詰めカラム  
も)で頑張る。

1. NMR の基礎
2. NMR の一次元測定
3. NMR の二次元測定
4. データ処理
5. 定性的な蛋白 NMR と定量的な有機 NMR
6. 今後の NMR 展開

## 6-1 高磁場化

### 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  $\propto B_0^{1/2}$

$$(S/N)_{1\text{GHz}} / (S/N)_{500\text{MHz}} = 2.8$$

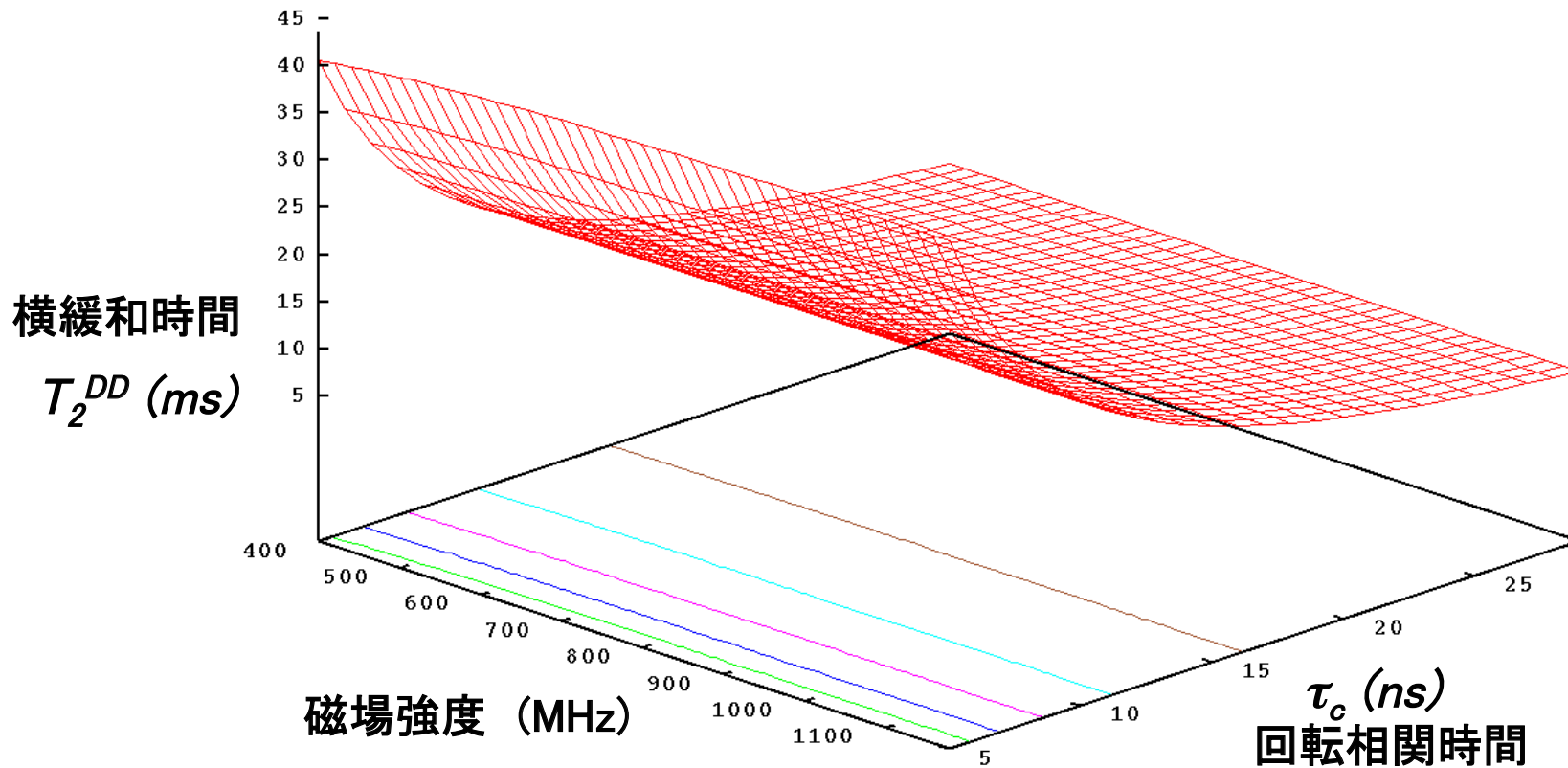
### TROSY 効果

化学シフト異方性による緩和への寄与  
≈ 双極子相互作用による緩和への寄与

磁化率の異方性による磁場配向の増加

直接測定軸(FID)における分解能の増加

# 磁場強度と $DD$ による横緩和時間の関係



かなりが  $J(0)$  による寄与のため、磁場強度にそれほど依存しない。

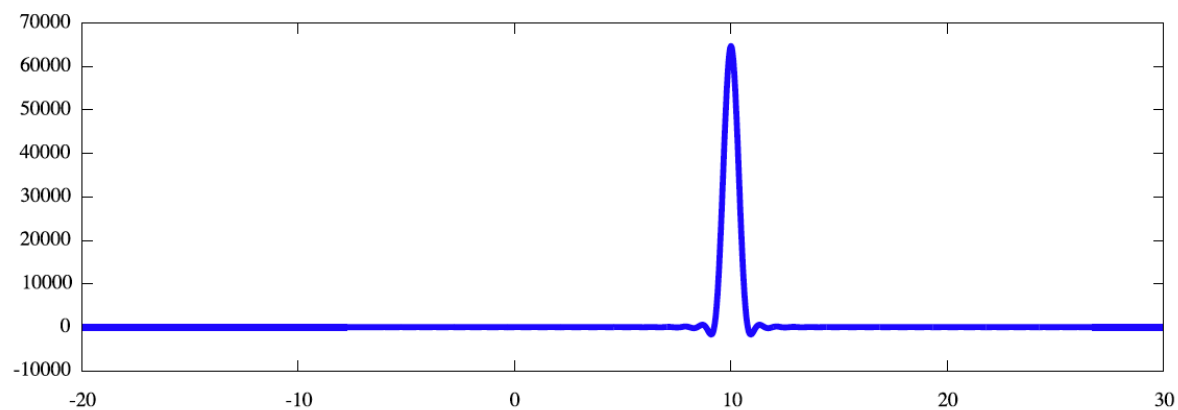
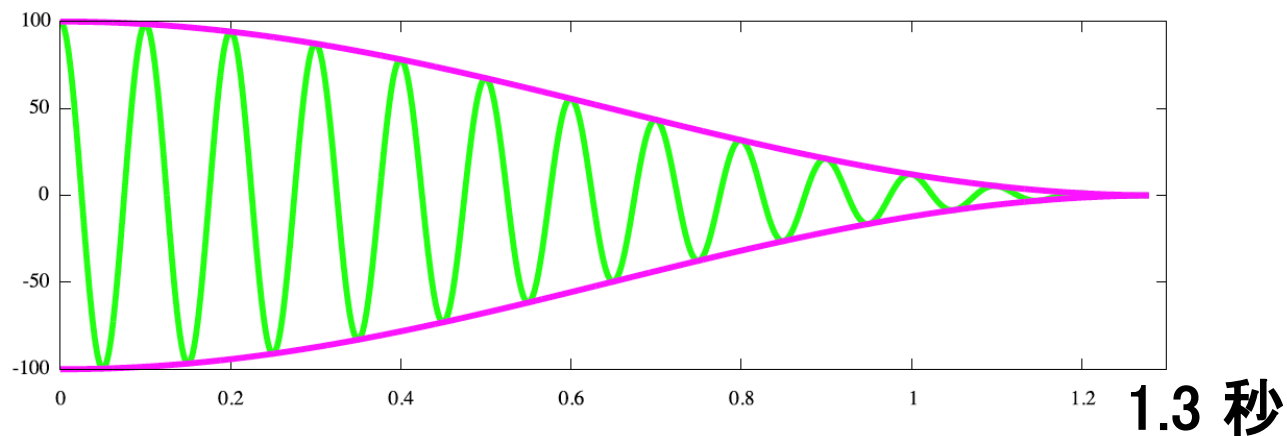
$$R_2^{DD} = \frac{\hbar^2 \gamma_I^2 \gamma_S^2}{8R^6} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \left\{ 4J(0) + J(\omega_I - \omega_S) + 3J(\omega_I) + 6J(\omega_S) + 6J(\omega_I + \omega_S) \right\}$$

FID のように、十分に長くサンプリングを行えば、Hertz における分解能は磁場強度によって変化しないため、ppm 表示での分解能が上昇したように見える。

I ( $^{13}\text{C}$ ) 側を観測

$^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  2スピン系  
双極子相互作用のみ横緩和に作用

## 直接観測軸 (FID 側) における分解能の増加

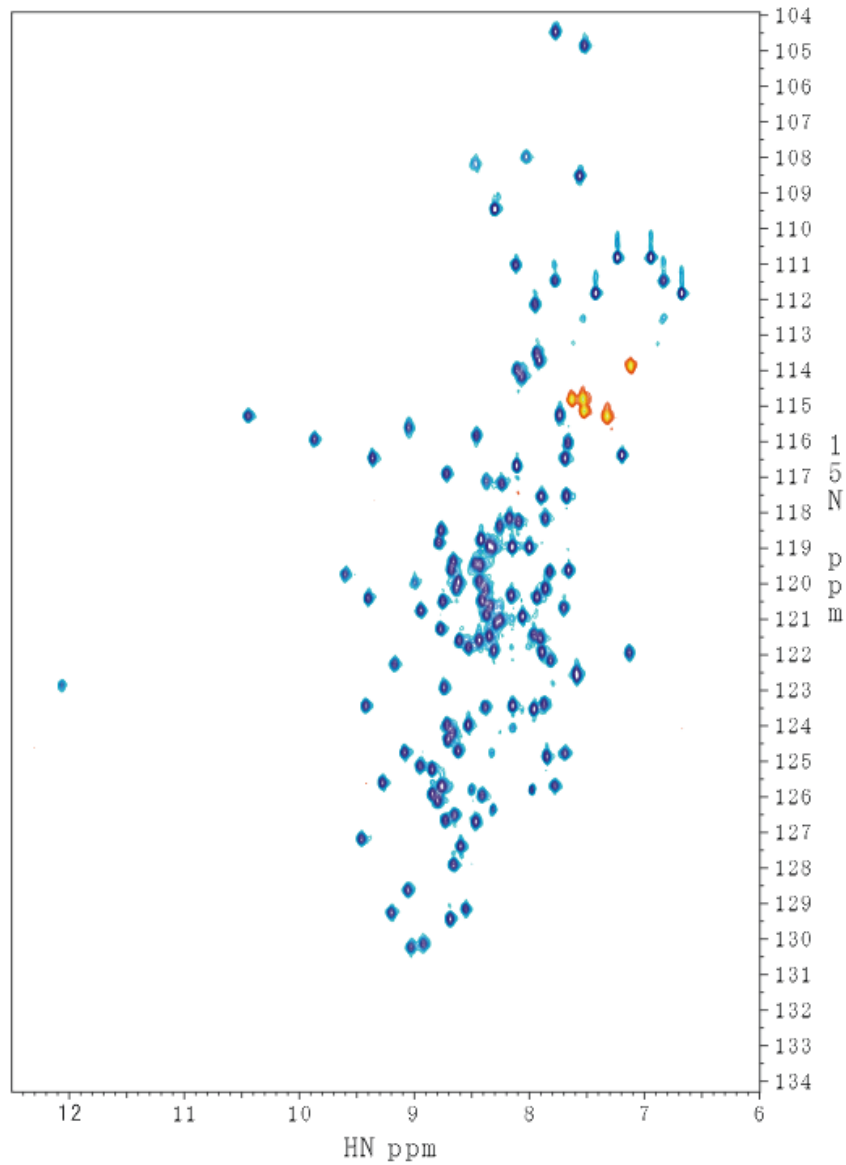


$$\text{分解能} = 1/(1.3 \text{ s}) = 0.77 \text{ Hz}$$

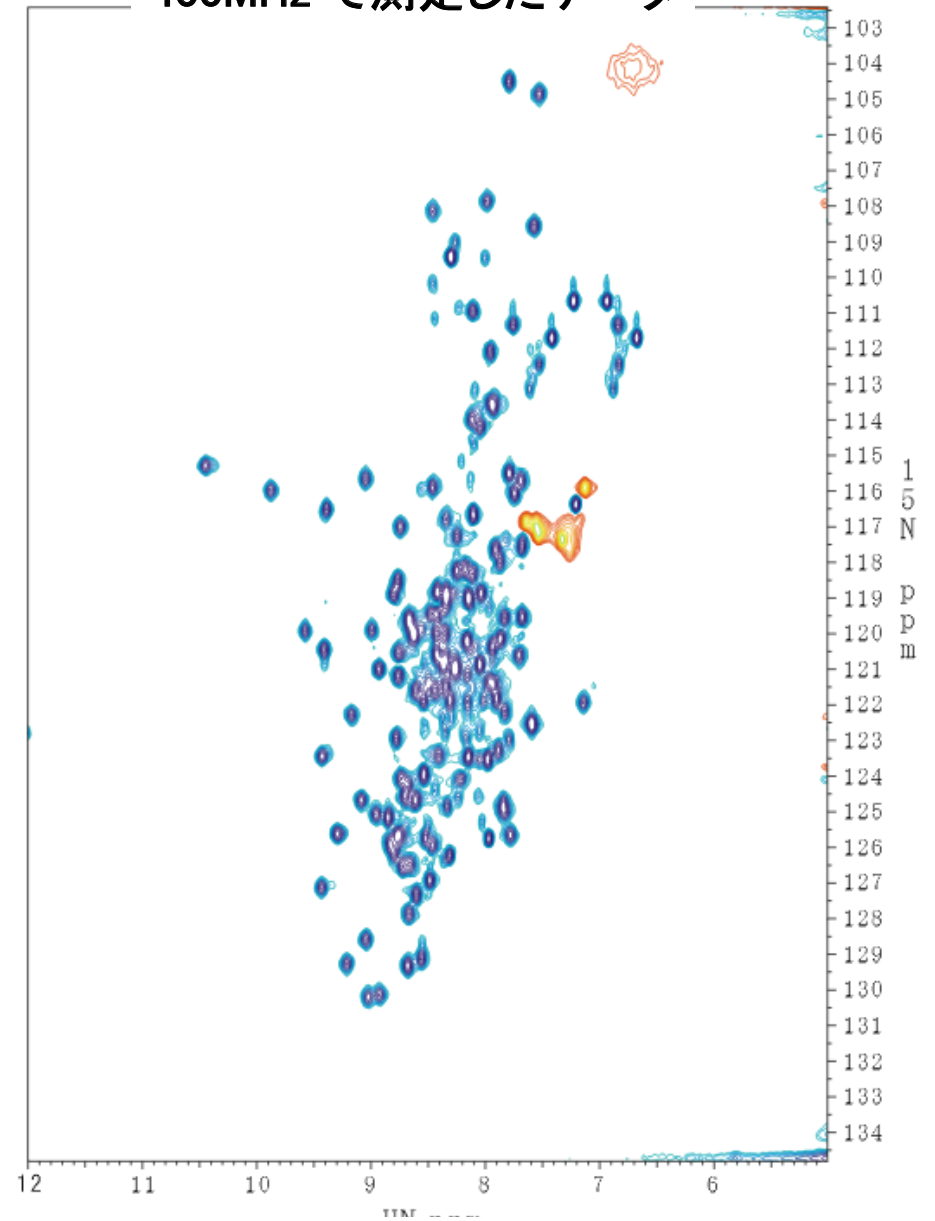
$$0.77 \text{ Hz} \rightarrow 0.002 \text{ ppm (on 400MHz NMR)}$$

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

600MHz で測定したデータ



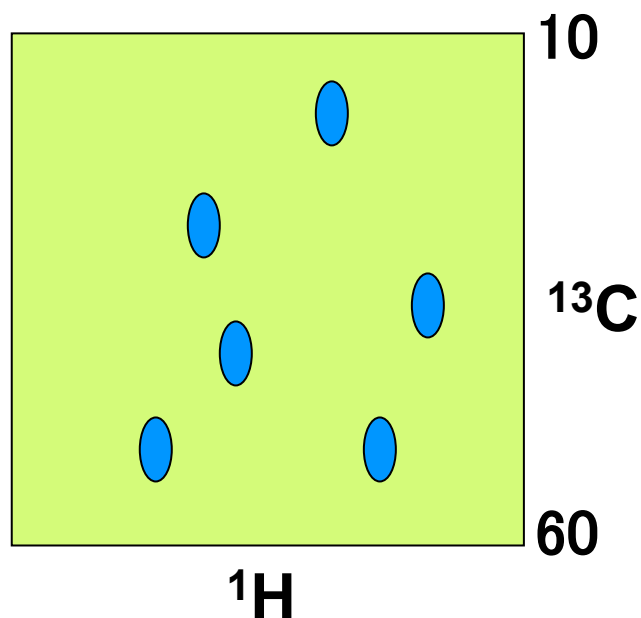
400MHz で測定したデータ



同じ試料を異なる磁場の NMR で測定した。高磁場になる程、分解能と感度が上昇する。



## 間接測定軸 (interferogram) における分解能



$^{13}\text{C}$  間接観測次元を 50ppm のスペクトル幅で測定したい。ただし、測定時間の制限により 100\* ポイントがせいぜい。

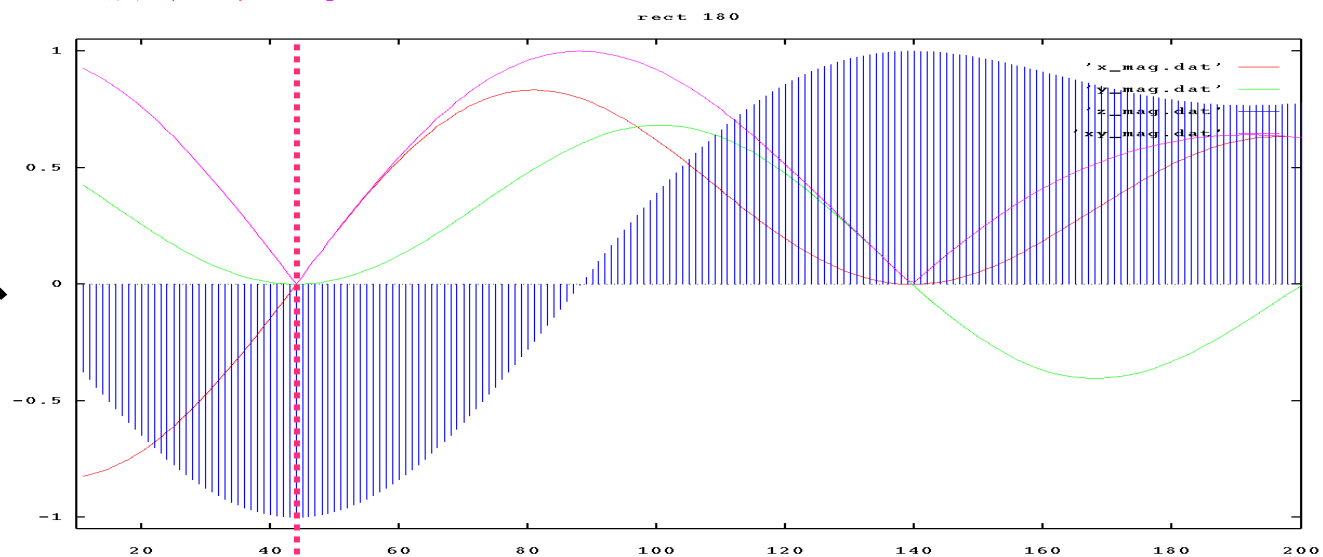
	400MHz	800MHz
SW (Hz)	5,000	10,000
$\Delta t_1$ ( $\mu\text{s}$ )	200	100
Aq (ms)	20	10
Res. (Hz)	50	100
間接観測次元 (サンプリング数が律速) Res. (ppm)	0.5	0.5

ppm 値での分解能は同じ

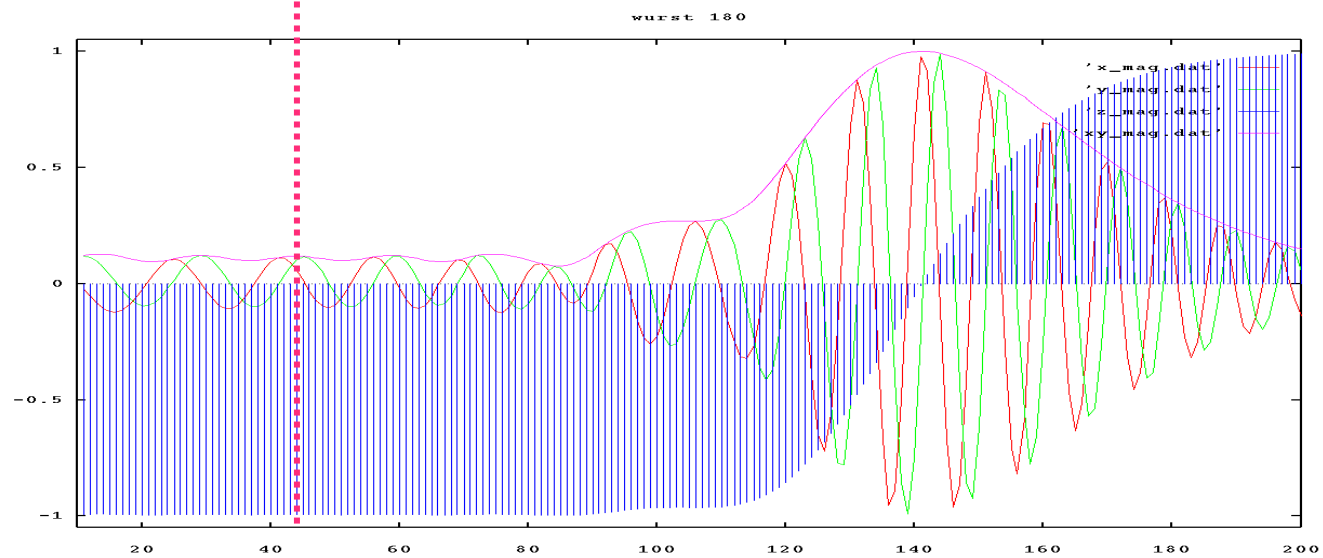
J-coupling を観たい場合は低磁場が有利

# 反転 $\pi$ 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

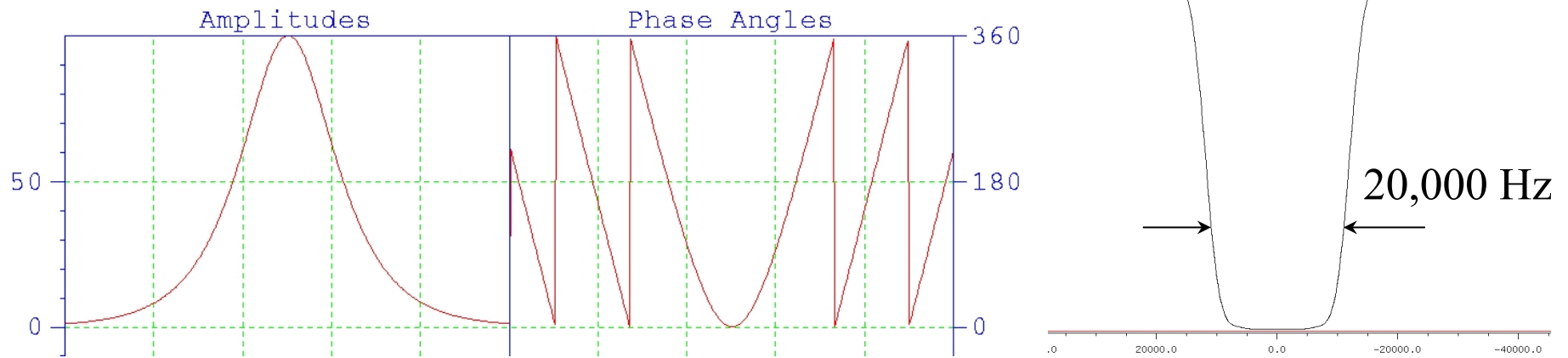
aliphatic

aromatic

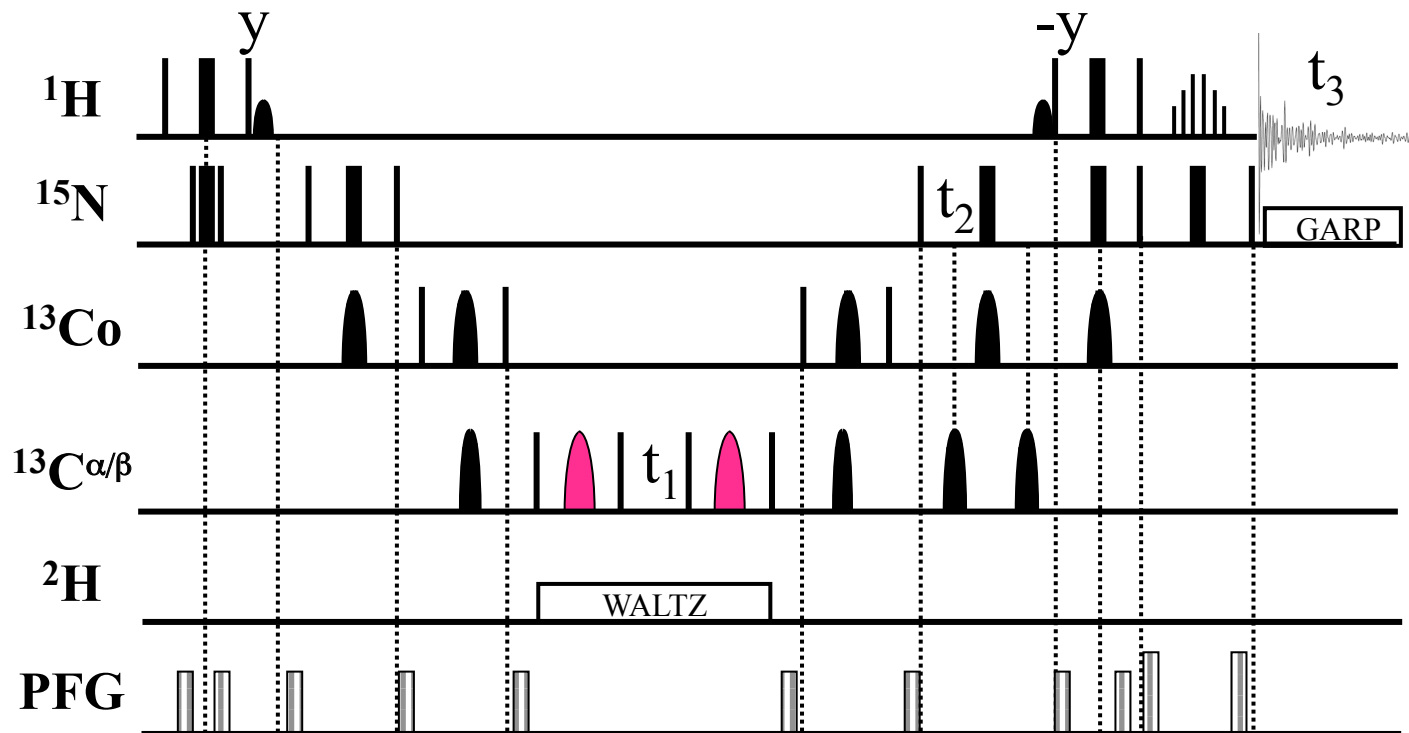
carbonyl

# Adiabatic パルスを含んだ 3D TROSY-HN(CO)CACB

hsec24k500u



**Hyperbolic-secant pulse (24 kHz-sweep, 500  $\mu$ s, 13 kHz  $B_1$ )**



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

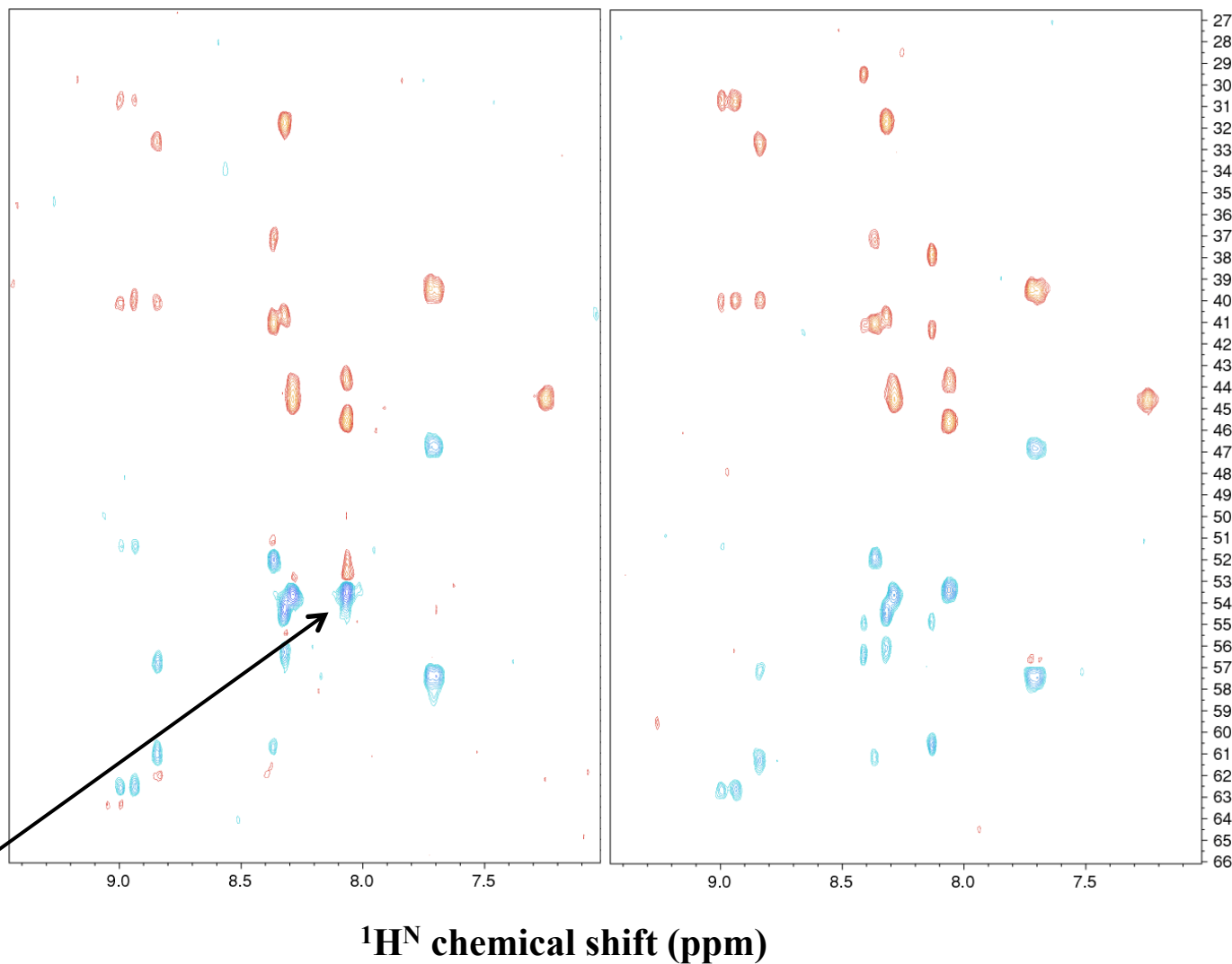
矩形波 (rectangular)

断熱波 (adiabatic)

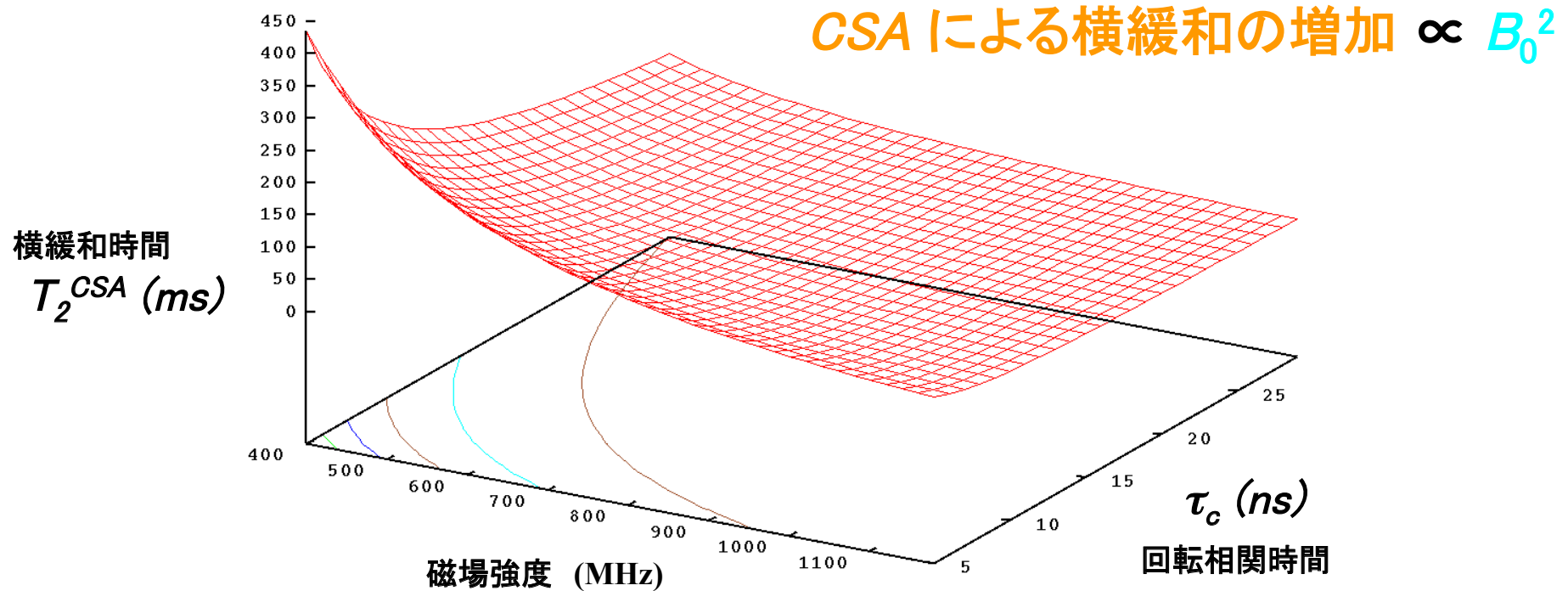
3D TROSY-  
HNCACB

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

off-resonance  
効果による  
artifact



# 磁場強度とCSAによる横緩和時間の関係



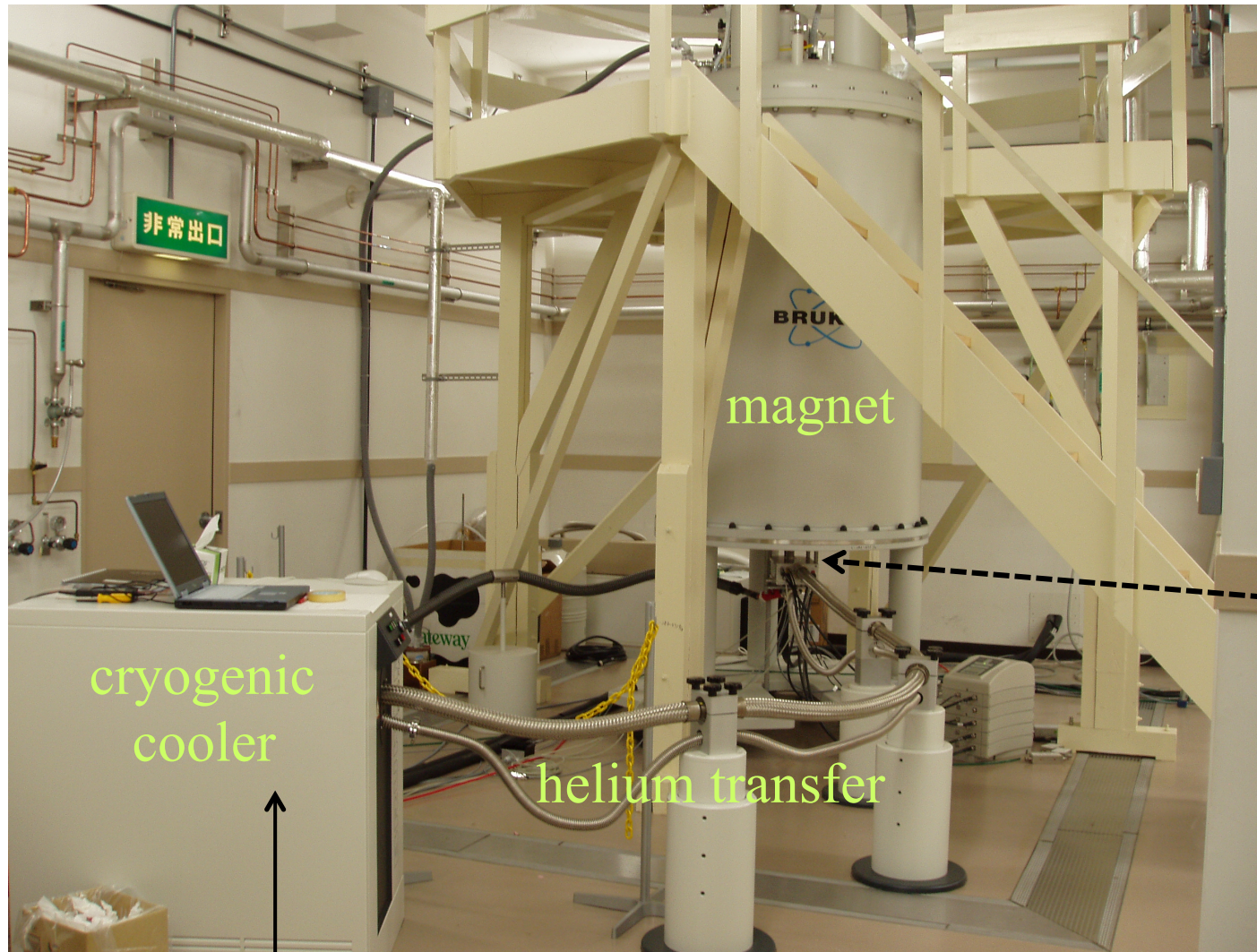
$$R_2^{CSA} = 1/18 (\sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp})^2 \gamma_I^2 B_0^2 \{ 4J(0) + 3J(\omega_I) \}$$

$$J(\omega) = 2/5 \tau_c / (1 + \omega^2 \tau_c^2)$$

$^{13}\text{C}_o$  1スピン系  
化学シフトの異方性 (110ppm) のみ緩和に作用

## 6-2 極低温検出器による高感度化

受信回路の熱雑音や抵抗値が減少



cold-head (断熱膨張)

cryogenic  
probe

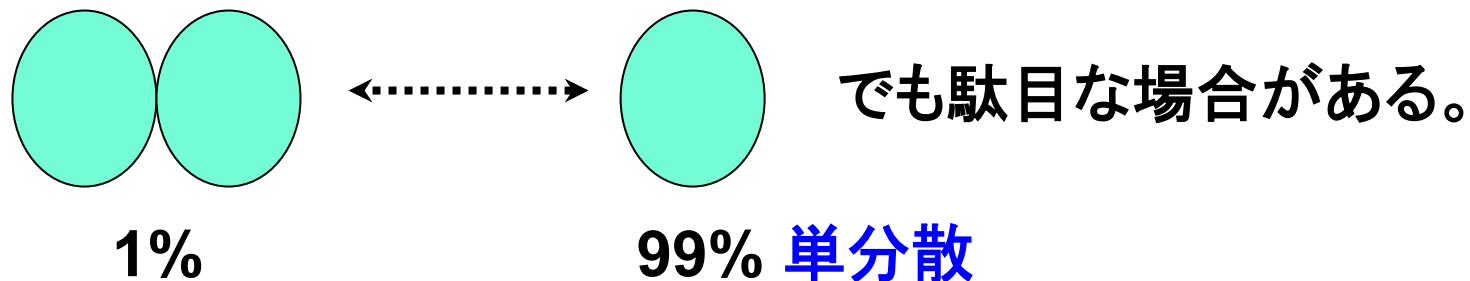
helium  
compressor

## 6-3 NMR 解析で本当に力を入れないといけない事

試料調製  
精製度  
溶媒条件 (pH、塩濃度、添加物)

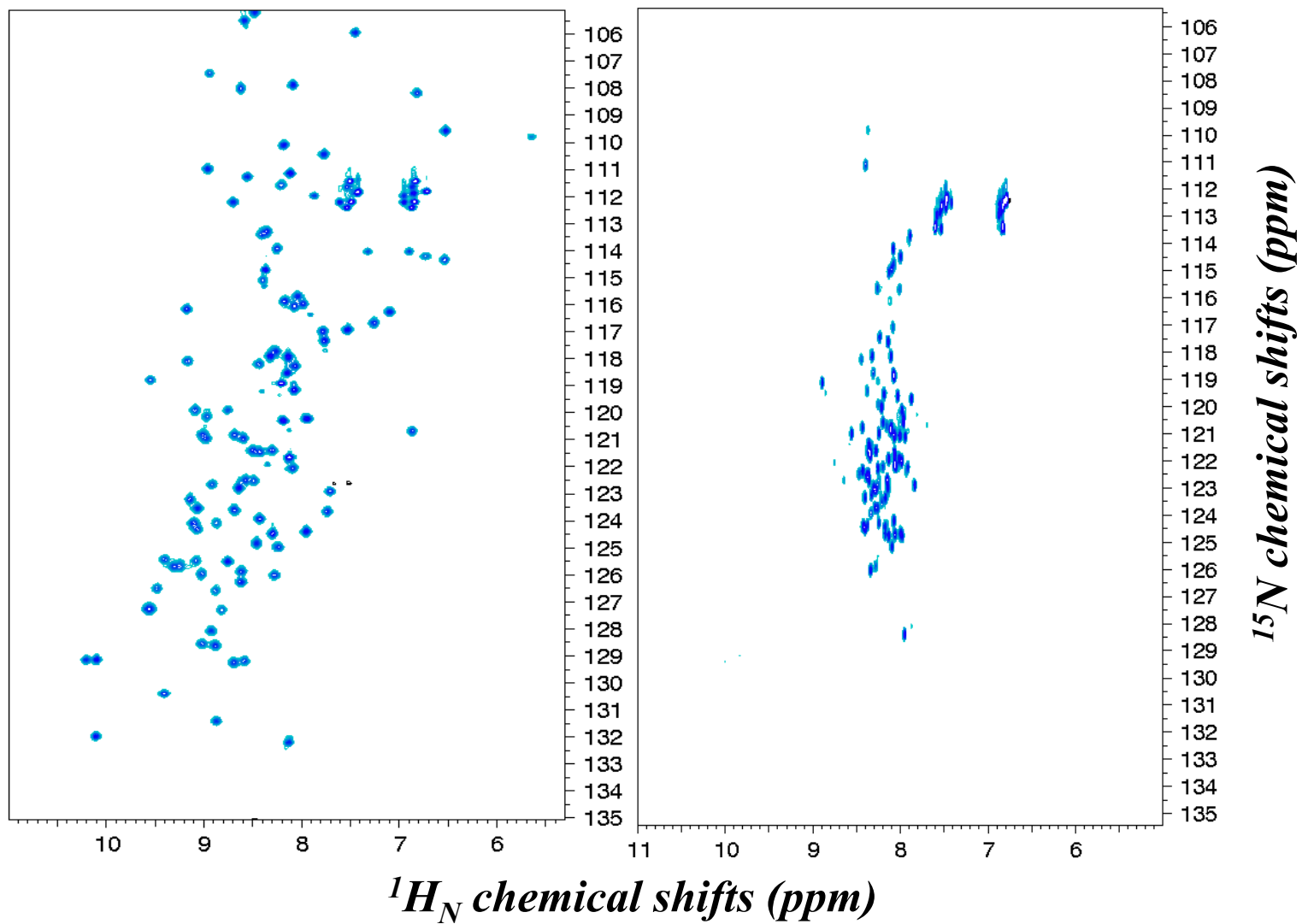
現在の蛋白 NMR での最大の問題点

非特異的に起こる疎水的相互作用によるかすかな凝集



150-200 種類の蛋白質を測定した結果、上例が >90% を占める。

## $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ 相関 (HSQC) スペクトルにみる蛋白質の状態

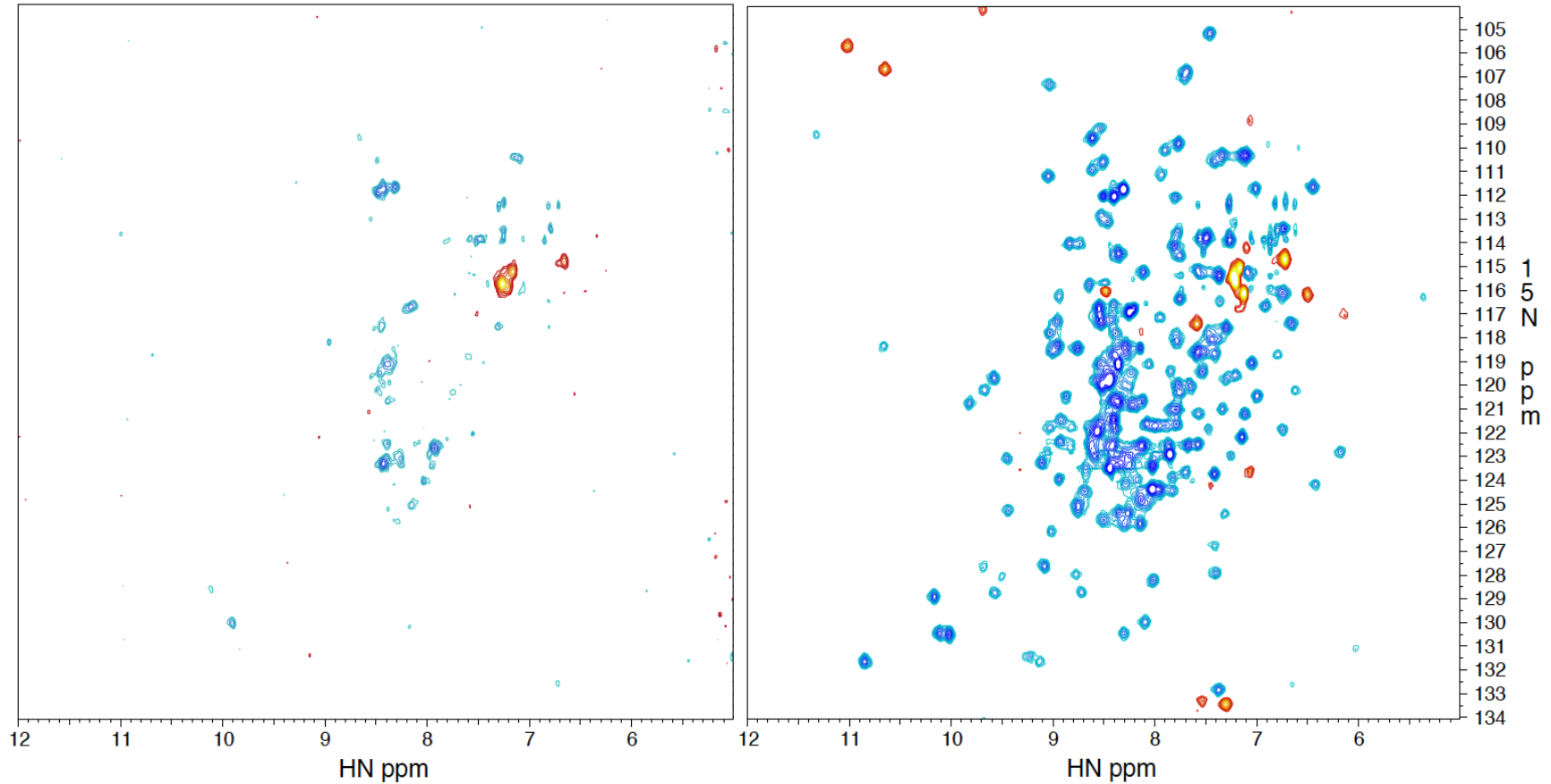




# pH によるスペクトルの変化

pH 6.0

pH 4.0



100  $\mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -labeled in 20 mM Na-Pi  
(pH 6.0) and 10%  $\text{D}_2\text{O}$

170  $\mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -labeled in 20 mM Na-  
acetate (pH 4.0) and 10%  $\text{D}_2\text{O}$

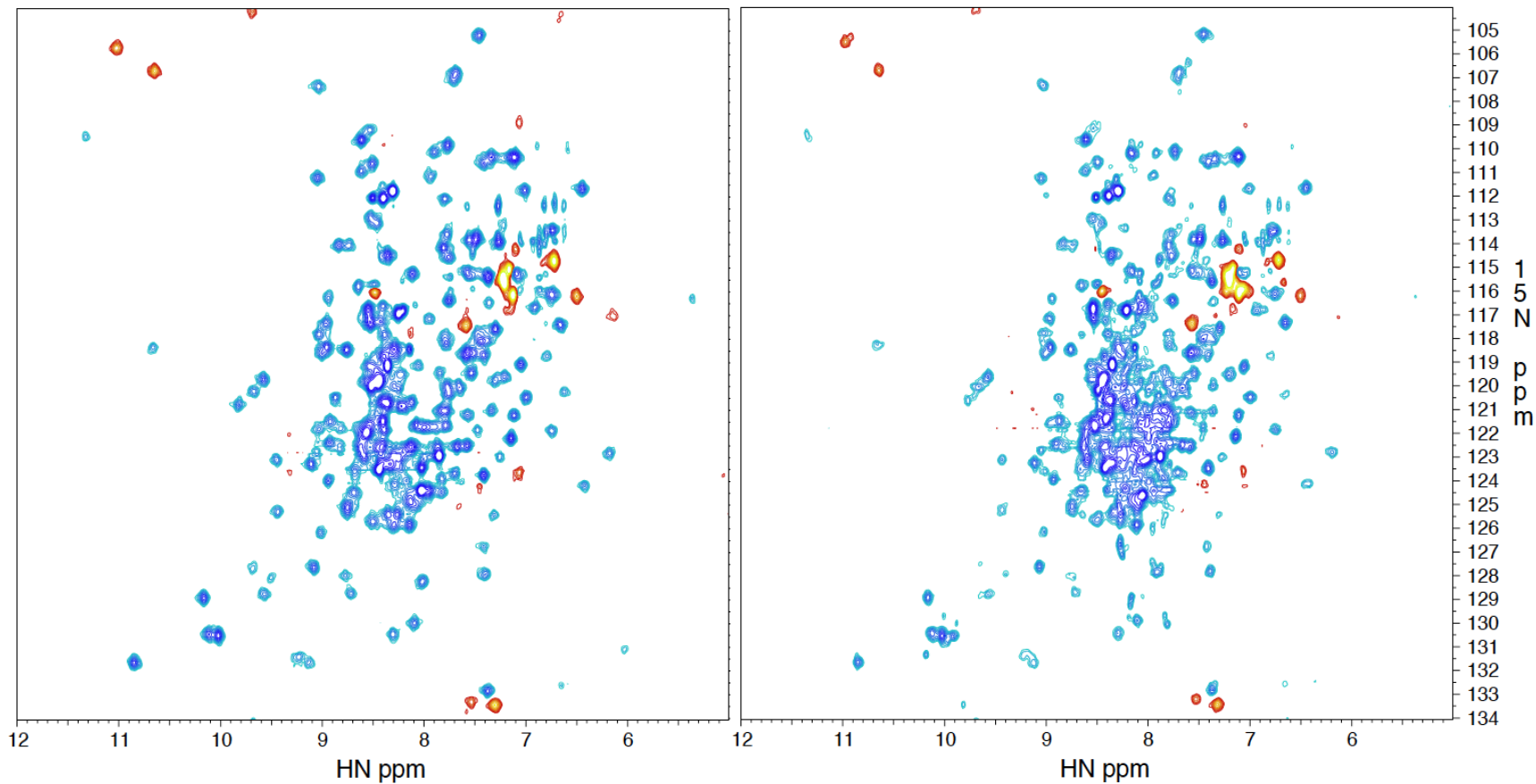
2D FHSQC-TROSY wfb and WG at 298K on 400MHz (1024\* x 128\*)

pH 8.0 では、全くピークが出なかった。

## pH によるスペクトルの変化(2)

pH 4.0

pH 3.2



**170  $\mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -labeled in 20 mM Na-acetate (pH 4.0) and 10%  $\text{D}_2\text{O}$**

**146  $\mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -labeled in 20 mM Acetate (pH 3.2) and 10%  $\text{D}_2\text{O}$**

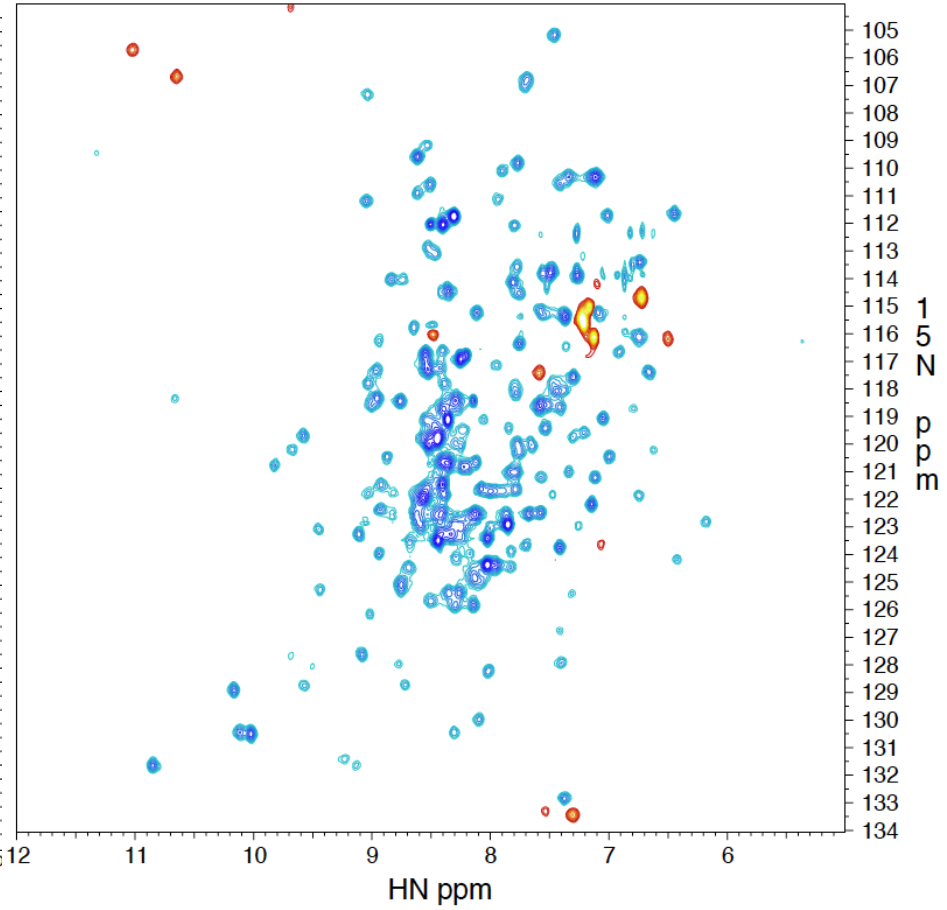
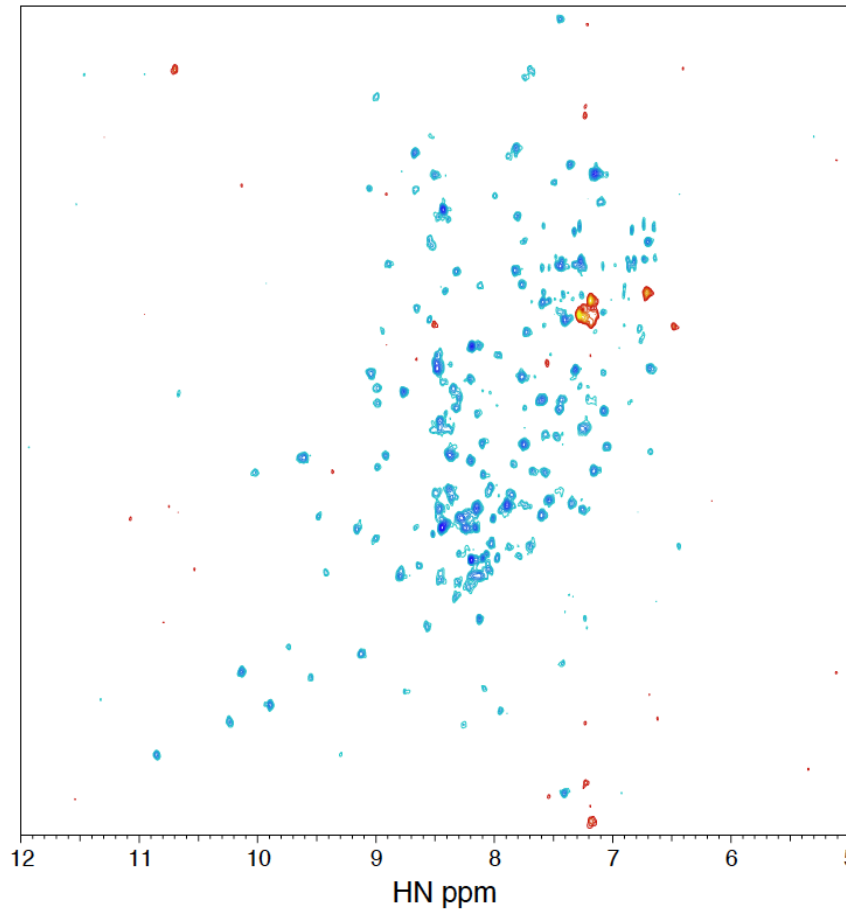
**2D FHSQC-TROSY wfb and WG at 298K on 400MHz (1024\* x 128\*)**

pH を 3.2 まで下げ過ぎると、逆にスペクトルの質が悪くなった。

# 添加物によるスペクトルの変化

pH 6.0

pH 4.0



**~80  $\mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -labeled in 50mM Glu- and 50mM Arg+**

**170  $\mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -labeled in 20 mM Na-acetate (pH 4.0) and 10%  $\text{D}_2\text{O}$**

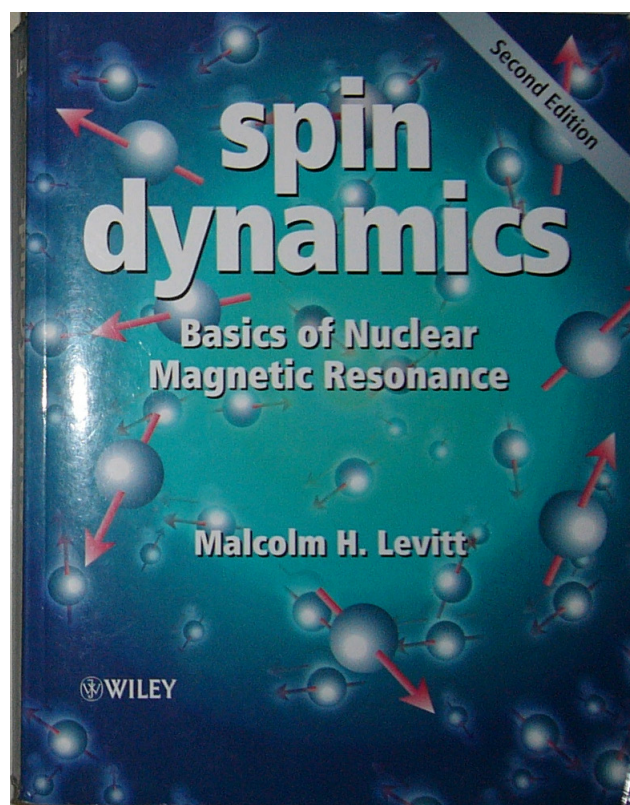
**2D FHSQC-TROSY wfb and WG  
at 298K on 600MHz (1024\* x 100\* LP)**

**2D FHSQC-TROSY wfb and WG  
at 298K on 400MHz (1024\* x 128\*)**

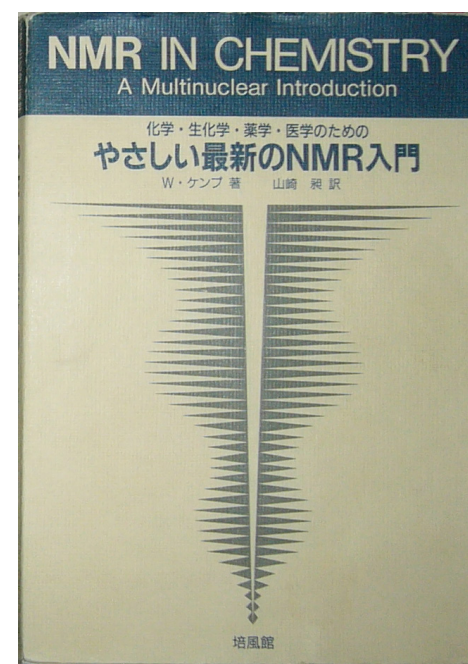
## 6-4 「これはよく書けている」と感心した本



絶対にお勧め  
最新情報もハードも網羅

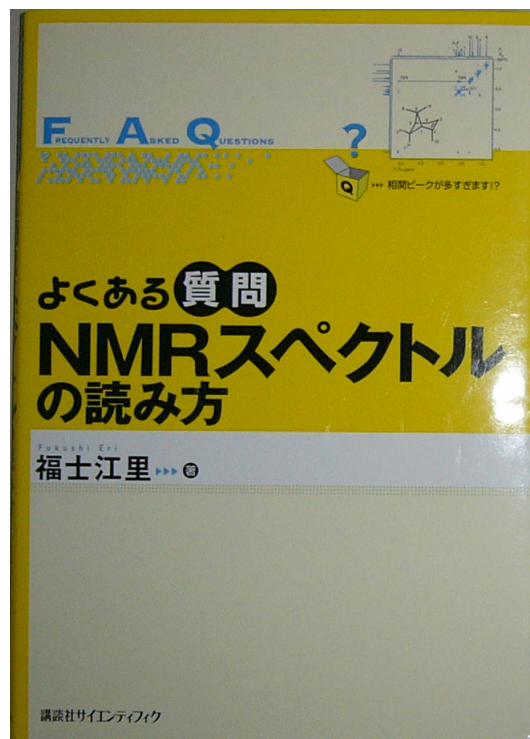


理論的にばっちり。  
理論的な絵が素晴らしい！

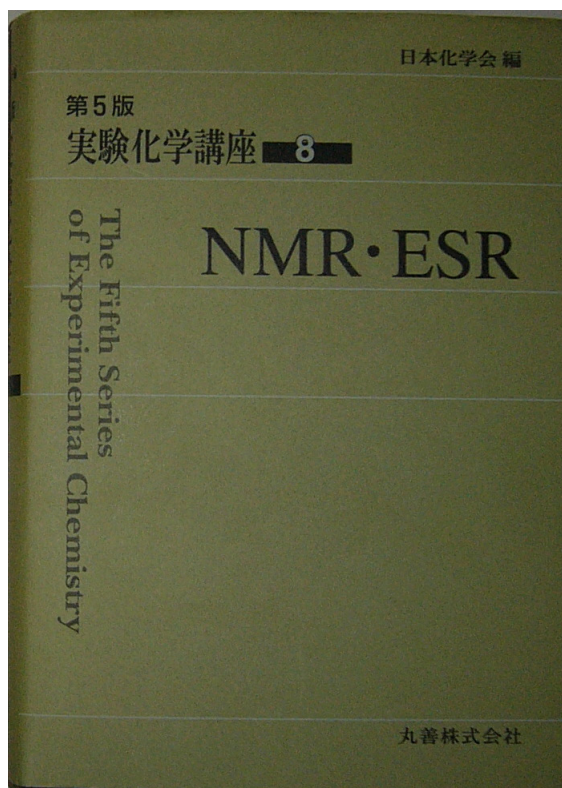


こんなに素晴らしい入門  
書が何故絶版に。。

## 6-4 最近出版された NMR の学習書



有機 NMR には実践で  
役立ちます。



かなり分厚いので、しっか  
り勉強できます。



説明文は絶対に分かるよう  
に書いたつもりですが、絵  
が少なかったのは反省。