

溶液 NMR でまずは二次元 HSQC をとってみる
～ 測定とプロセスの基礎 ～

池上貴久（横浜市立大学）

2017 年 1 月 27 日

14 : 45～16 : 15

北海道大学・理学部本館 N308 講義室

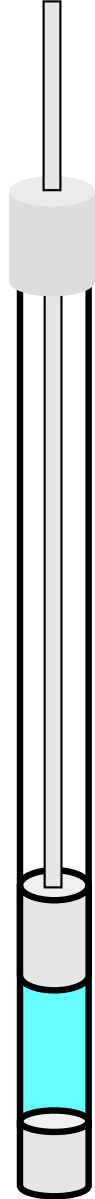
目次

1. 試料管
2. 測定温度
3. ロック
4. チューニング・マッチング
5. シム
6. 測定
7. プロセス

NMR 試料管

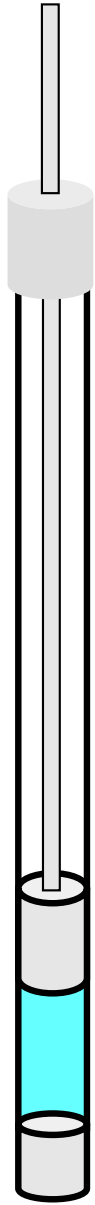


- 安価である（安過ぎるのは同心円柱ではない）。
- 溶液を充分量入れれば、シムが調整しやすい。逆に溶液量が少なければ、シムを合わせにくい（最低 500~600 μL は欲しい）。
- 溶液量が多過ぎると、上下で実際の温度が異なる。さらに対流や滴の落下が起き易い。
- パルスの照射、検出の B_1 -inhomogeneity が起き易い（90° パルス長が長くなる）。
- 泡が溜まりにくいのは良い。ただし、長時間の測定では蒸発するため、自動シム調整を同時に作動させるとよい。
- 滴定実験には適している。

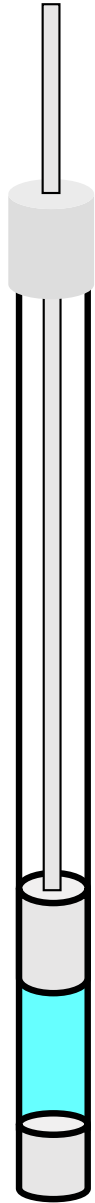


- 試料の量が 300 μ L 程度で最適！（2.0 cm 高さ）
- 各溶媒の磁化率に合わせたガラス製品を使うとよい。
- 溶液量が少ないので、実際の温度が上下で比較的均一であり、対流が小さい。
- パルス照射、検出や静磁場の B_1 - B_0 -inhomogeneity が起き難い。特に溶媒信号を消去しやすい。
- 泡が生じてシムが台無しになることが多い。
- アダプターを抜き差しすると溶液量が減るので、滴定実験には適していない。
- 高価であるので多数の試料には痛い（硼珪酸ガラス）。
- Topshim(gradshim) では、シゲミであることを知らせる。

試料管に関するその他の注意事項

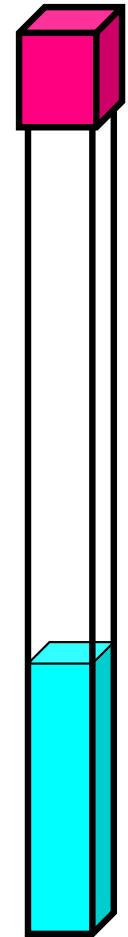


- 洗剤で洗う。簡単なすすぎ装置が役に立つ。
- シリコンでコーティングするとプラス荷電性の分子がガラス表面に引っ付き難くなる。
- 長めの特注パスツールピペットを使うと、試料の出し入れが簡単。手回し遠心機を使うより安全である。
- 脱気後に窒素ガスを詰めて封管できれば、試料を酸化から守ることができ、さらに線形が細くなる。ただし、封管時の加熱は試料管の形を歪める。
- クロロホルムなどは蒸発に注意する（液高が変わるとシムが変わる）。

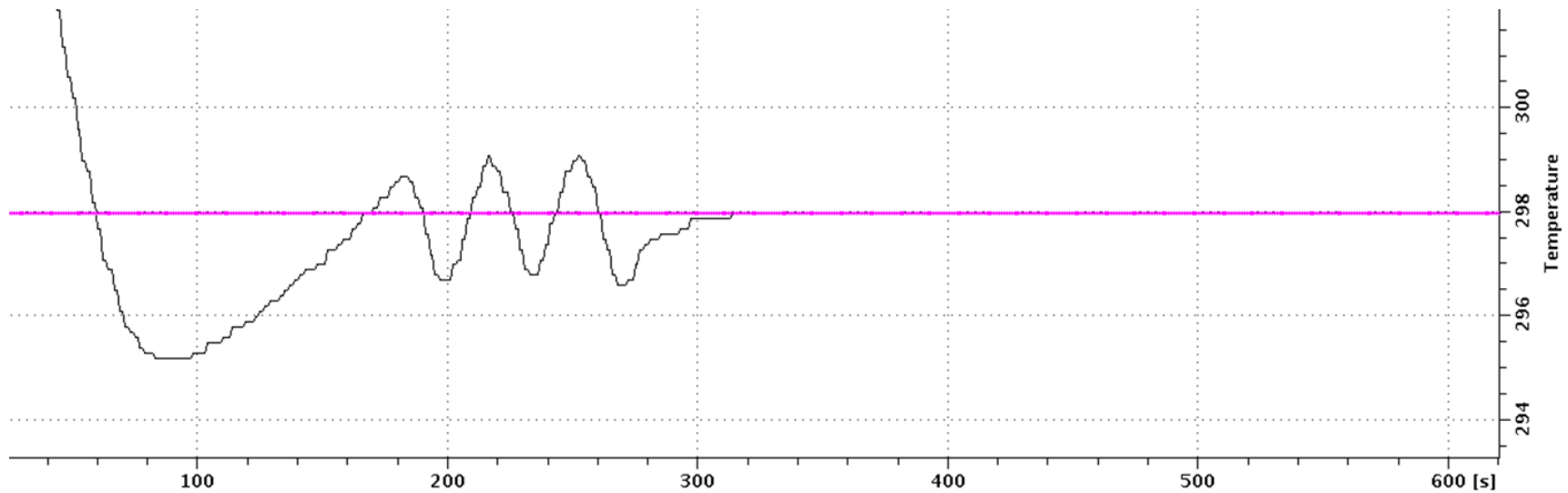


- 水溶液が凍ると、やはり試料管は割れ、プローブの洗浄が必要になる。
- 時々、EDTA 溶液を通すと、常磁性緩和のもととなる遷移金属を除去できる。金属はガラス表面によく付着する。
- ガラス表面には水分子が多数ついているので、軽水の信号を極力少なくしたい場合には、目的の重水素溶媒で軽くすすぐ。
- シゲミ試料管は、スピニングをしない（アダプターにより傷がつくため）。
- スピナーの位置合わせは、できるだけ正確に行う。Topshim(gradshim)の結果に多いに影響する。
- アダプターの上部には、十分量（1mm 程度）の溶液を載せる。
- 半日後にもう一度、磁石から取り出して泡を抜く。

- 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られるので、塩濃度が濃くても測定が可能となる。あるいは、3mm, 4mm 内径の試料管を使う。
- 限外濾過器（アミコンウルトラ）は一晩は 1L 水に浸け、セルロースのフィルターに塗られているグリセロールを除いておく。5回すすぐだけでは不十分。

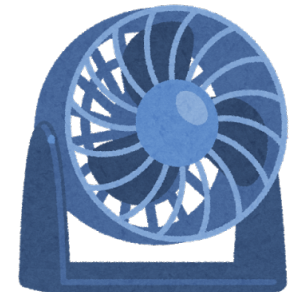


測定温度を安定に保つことは大変重要



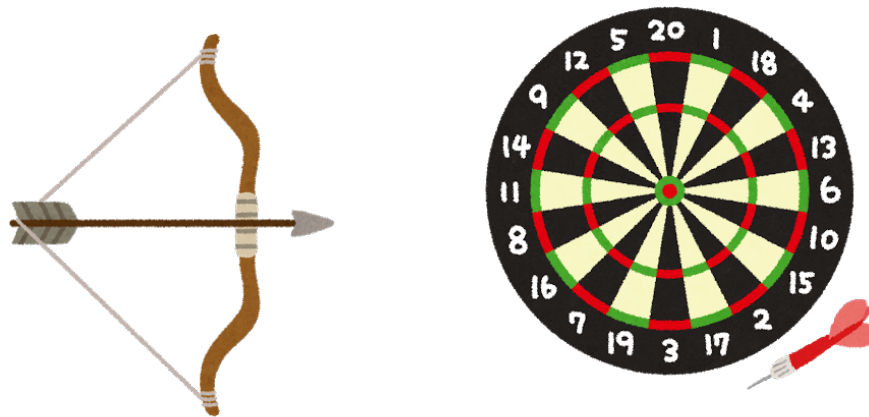
EDTE 画面 (Topspin, BrukerBioSpin)

- 設定温度を変えた時には、ヒーターパワーを調整する（冷却器も）。
- ダミースキャンを十分にとる（64~128）。
- パルス繰り返し時間を十分にとる（> 1.5 秒）。
- メタノールなどを使って、実測温度をキャリブレーションする。
- 磁石の下部は、エアコンの乾いた風が来るように工夫する（扇風機）。



重水素ロックの設定

lock : 鍵をかける



lock on: ミサイル攻撃などで、照準で自動捕捉する場合などに使われる。

NMR 全体を統制するメトロノーム、指揮者のような働き



さまざまな重水素化溶媒による ^2H ロックがあるので最適な溶媒を選ぶ。

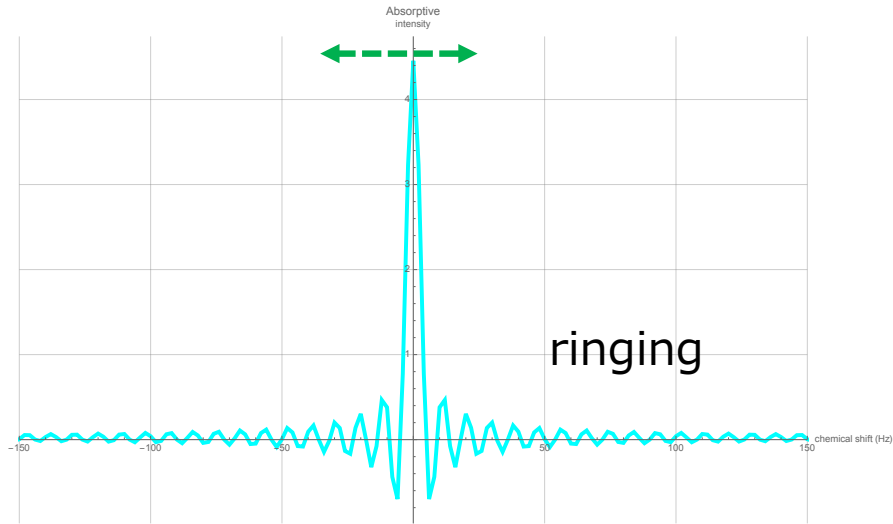
The screenshot displays the Bruker Topspin software interface. The 'Solvents table' window is open, showing a list of solvents and their descriptions. The entry 'H2O+D2O' is highlighted in red, with the description '90%D2O and 10%D2O'. Other solvents listed include Acetic, Acetone, C6D6, CD2Cl2, CD3CN, CD3CN, SPI, CD3OD, SPI, CDCl3, CD3CN-D2O, CD3OD-D2O, D2O, Dioxane, DMI, DMSO, EtOH, H2O+D2O, h5, D2O, h5, D2O-D2O, Juices, MeOH, Plasma, Pyr, T, D2O-D2O-Me4NCI, T, D2O-D2O-NaAc, T, D2O-D2O-Pivalate, T, MeOH, TFE, THF, ti, D2O-D2O, ti, D2OandD2O, Tol, and Urine.

Solvent	Description
Acetic	acetic acid-d4
Acetone	acetone-d6
C6D6	benzene-d6
CD2Cl2	dichloromethane-d2
CD3CN	acetonitrile-d3
CD3CN, SPI	LC, SPI: Solvent (Acetonitrile)
CD3OD, SPI	LC, SPI: Solvent (Methanol-d4)
CDCl3	chloroform-d
CD3CN-D2O	HLPC Solvent (Acetonitril/D2O)
CD3OD-D2O	HLPC Solvent (Methanol/D2O)
D2O	deuteriumoxide
Dioxane	dioxane-d8
DMI	dimethylformamide
DMSO	dimethylsulfoxide-d6
EtOH	ethanol-d6
H2O+D2O	90%D2O and 10%D2O
ti,DMSO	90%DMSO and 10%DMSO-d6
h5, D2O	D2O
h5, D2O-D2O	D2O-D2O
Juices	fruit juices
MeOH	methanol-d4
Plasma	blood plasma
Pyr	pyridine-d6
T, D2O-D2O-Me4NCI	(CD3)4NCl in 90%D2O and 10%D2O, for NMR thermometer
T, D2O-D2O-NaAc	sodium acetate in 90%D2O and 10%D2O, for NMR thermometer
T, D2O-D2O-Pivalate	pivalate-d9 in 90%D2O and 10%D2O, for NMR thermometer
T, MeOH	methanol-d4, for NMR thermometer
TFE	trifluoroethanol-d3
THF	tetrahydrofuran
ti, D2O-D2O	
ti, D2OandD2O	tiik. parameters
Tol	toluene-d8
Urine	urine

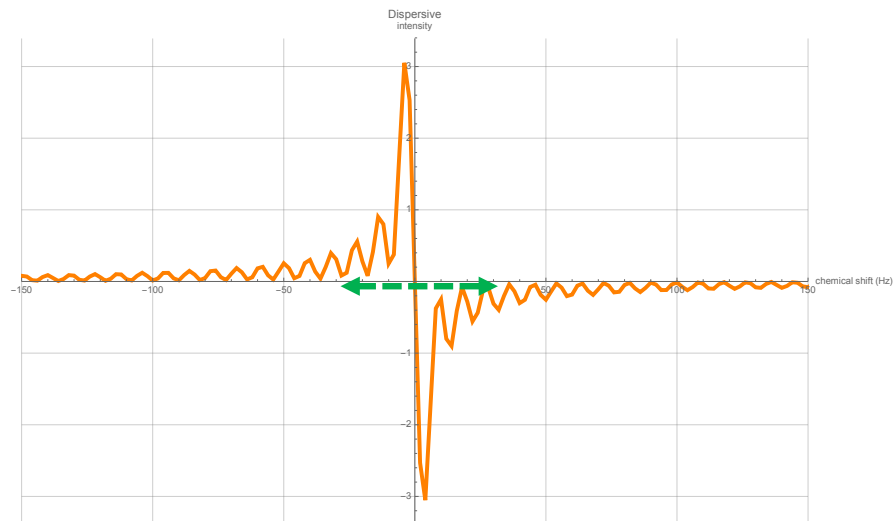
Lock 画面 (Topspin, BrukerBioSpin)

同じ D_2O ロックでも、10% D_2O と 100% D_2O とでは、ロックのパラメータが少し違うので使い分ける。

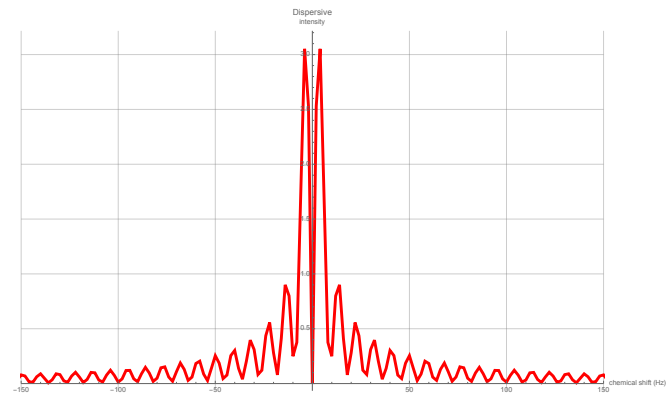
重水素ロック： ^2H 信号の分散波形を観る



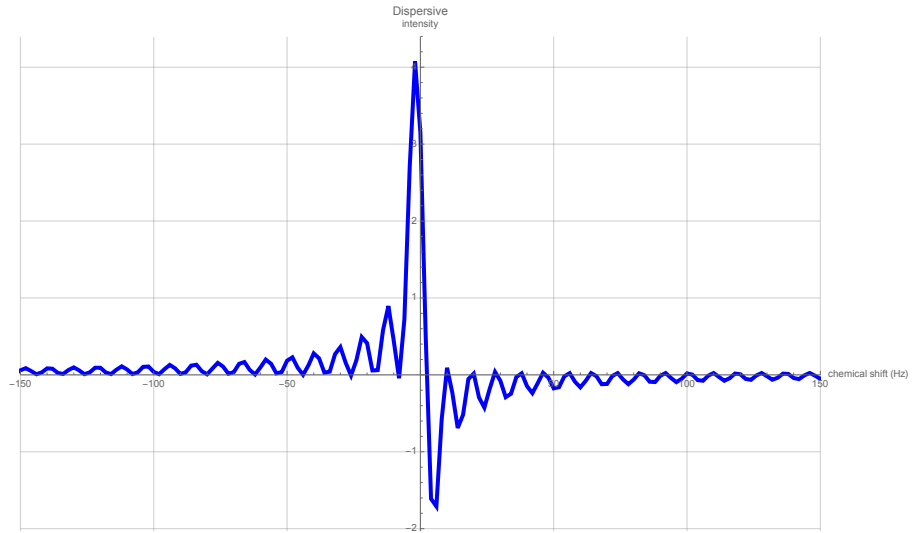
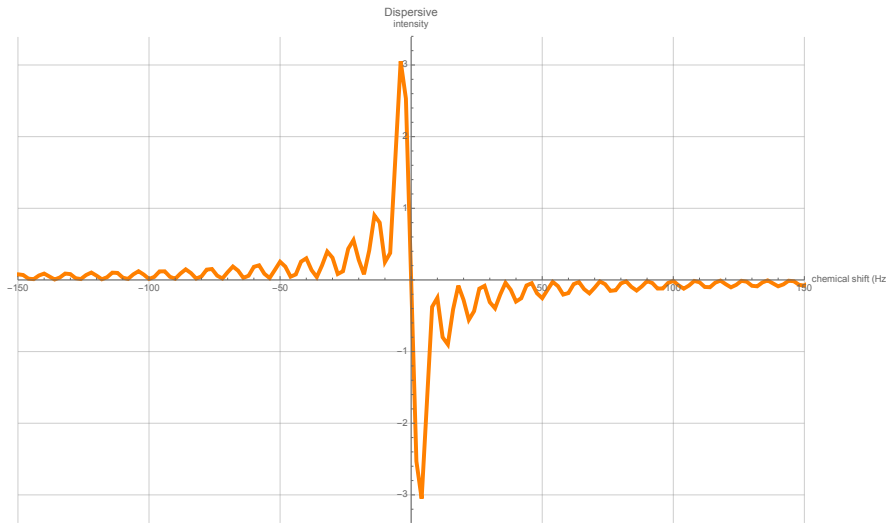
吸収波形：左右のどちらに静磁場がずれたのかが不明



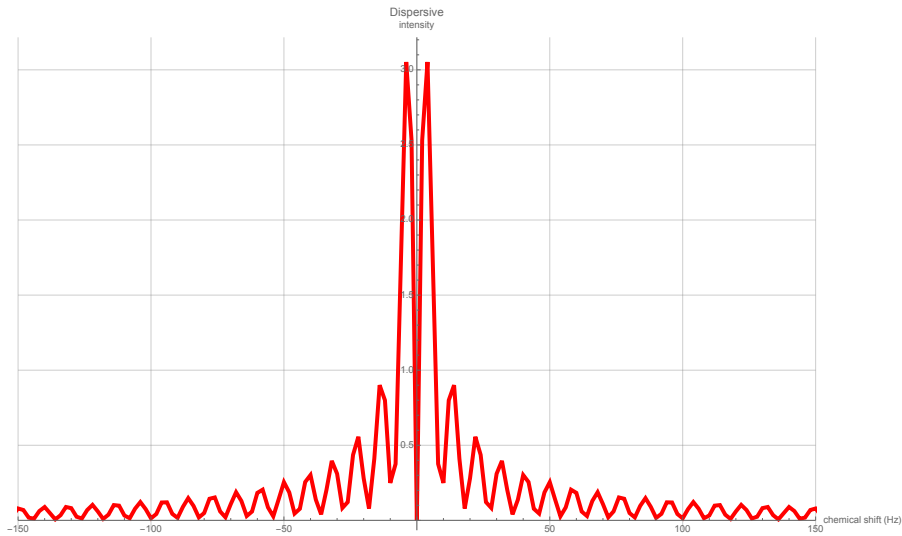
分散波形：勾配から静磁場がどちらにずれたかが分かる。



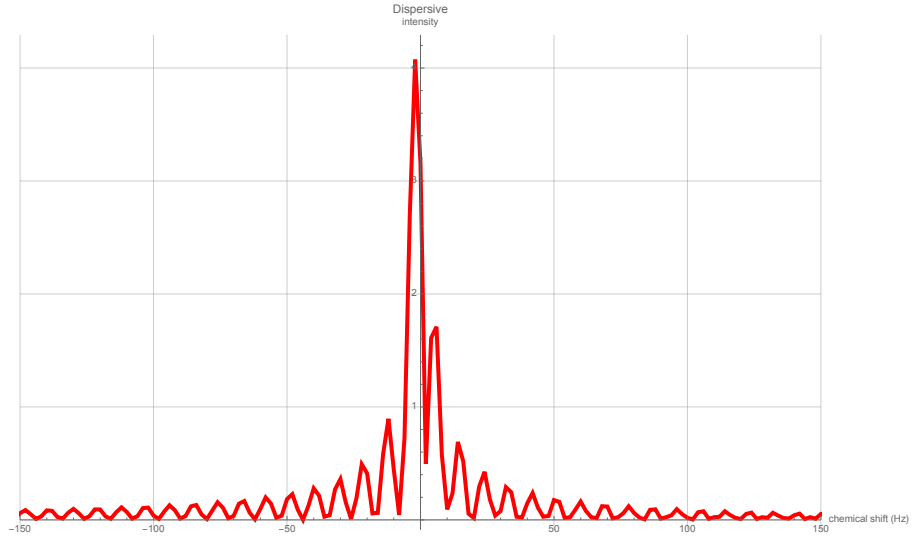
重水素ロックの位相は大切



位相の合った分散波形



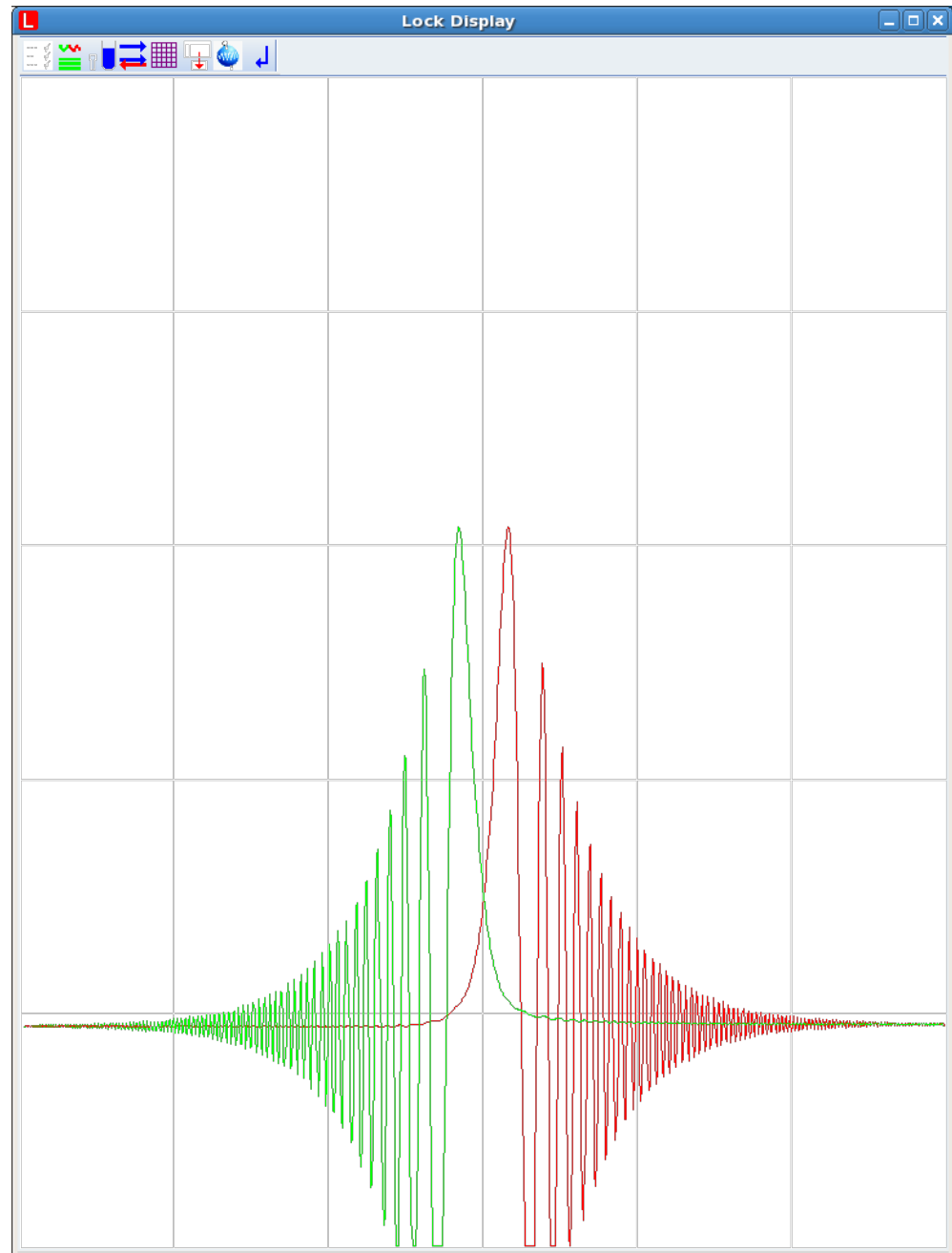
位相のずれた分散波形



^2H ロック信号

シム
位相
 z^0 磁場

が合っている場合には、
きれいな ^2H ロック信号
が観られる。



Lock-display 画面 (Topspin, BrukerBioSpin)

^2H ロック信号

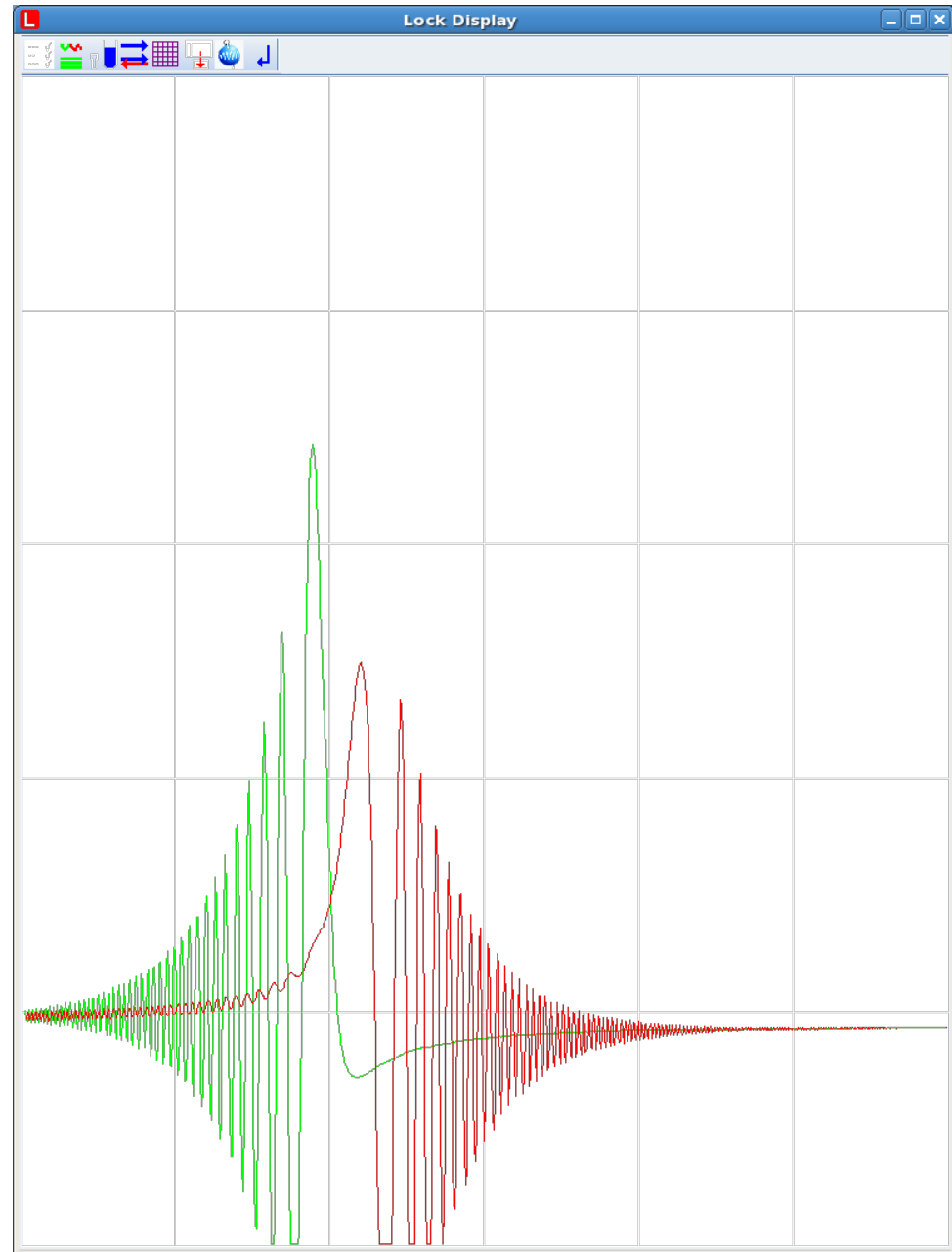
シムは合っているが、

位相
 z^0 磁場

が合っていない場合には、歪んだ ^2H ロック信号となる。

何とかロックを掛けてから、ロックレベルが最大になるようにシムと ^2H 信号の位相を合わせてもよい。

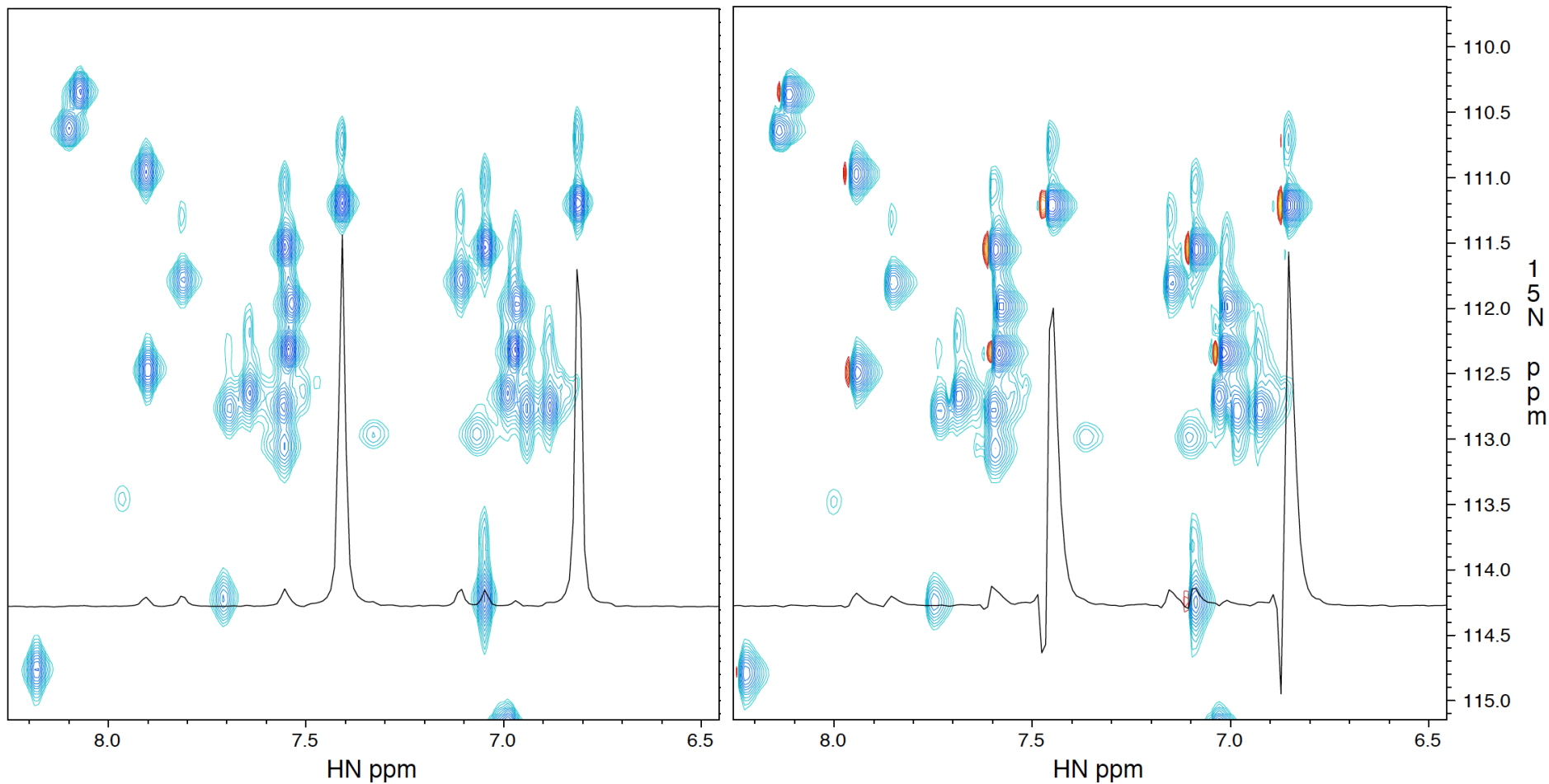
数か月、数年のうちに静磁場が弱まってドリフトするので、 z^0 -field 値も時々登録しなおす。



Lock-display 画面 (Topspin, BrukerBioSpin)

重水素ロックの位相が大切

D₂O ロックの位相を 76° ずらすと ...



processed by NMRPipe (Dr. F. Delaglio)

重水素のチューニング・マッチングは？
B₀ ドリフト値は登録されている？

^2H ロック信号

位相は合っているが、シムがずれている場合には、コブのような ^2H ロック信号になることがある。

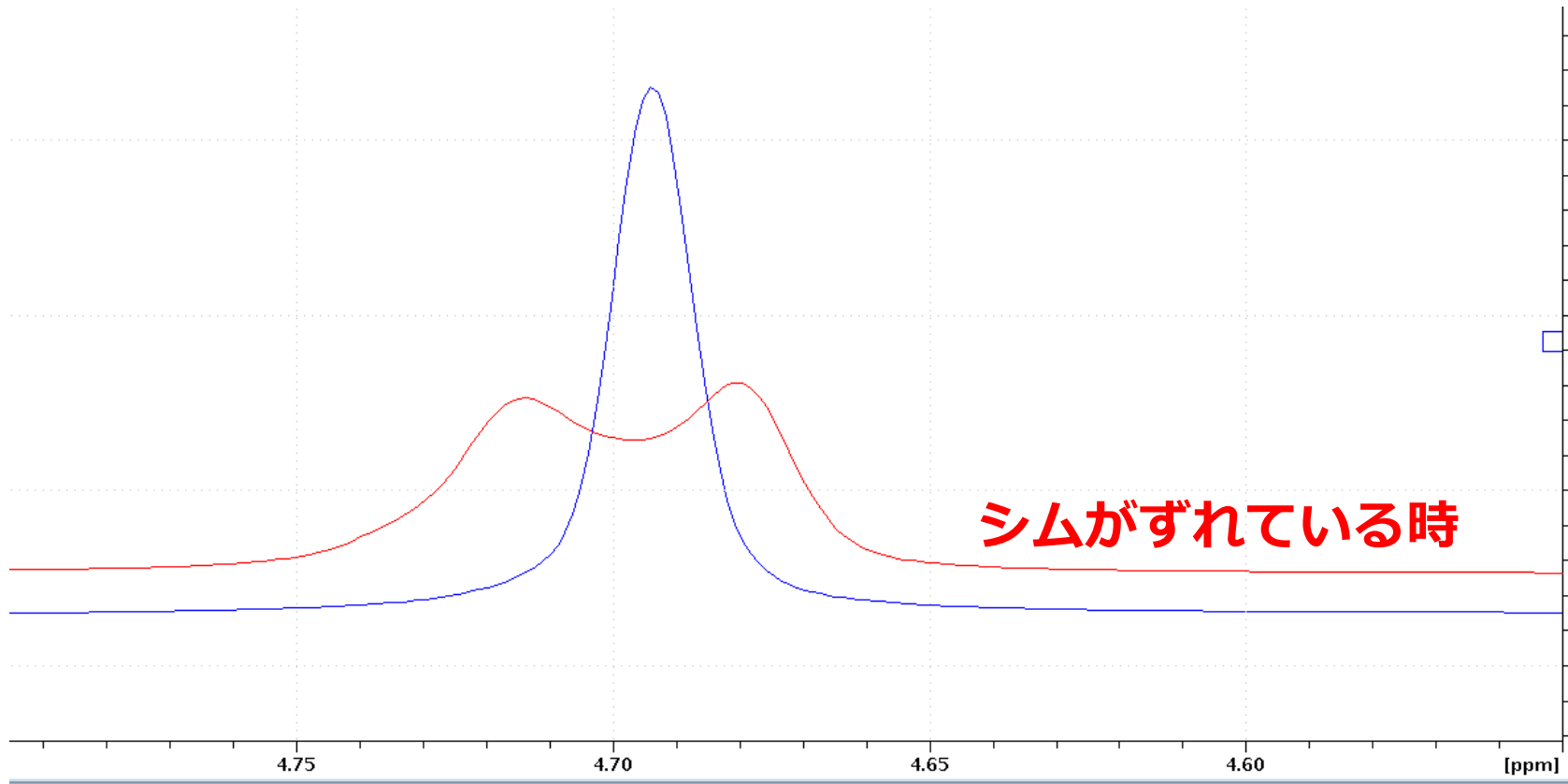
うまくロックが掛からない

→ シムが合っている時のシム値をプローブや試料ごとに保存しておき、それをロードしてみる。



Lock-display 画面 (Topspin, BrukerBioSpin)

^2H 一次元測定

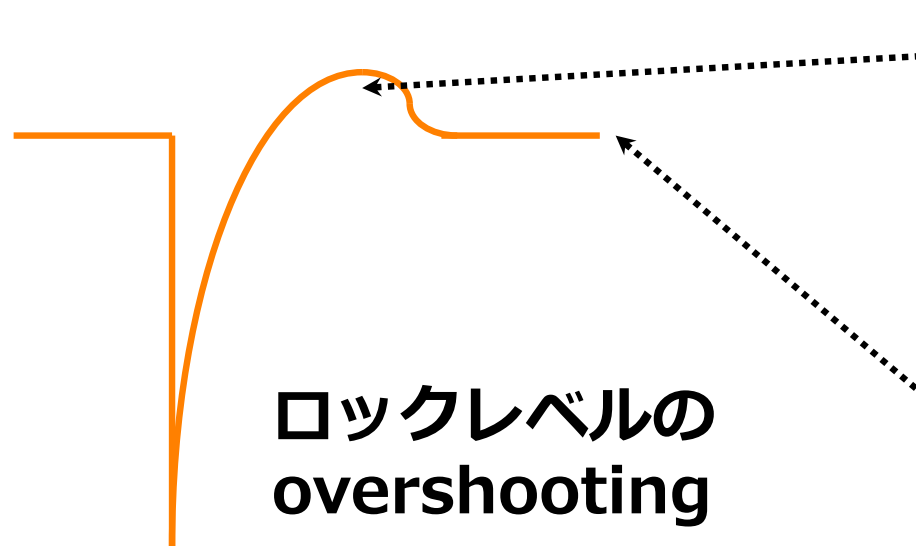
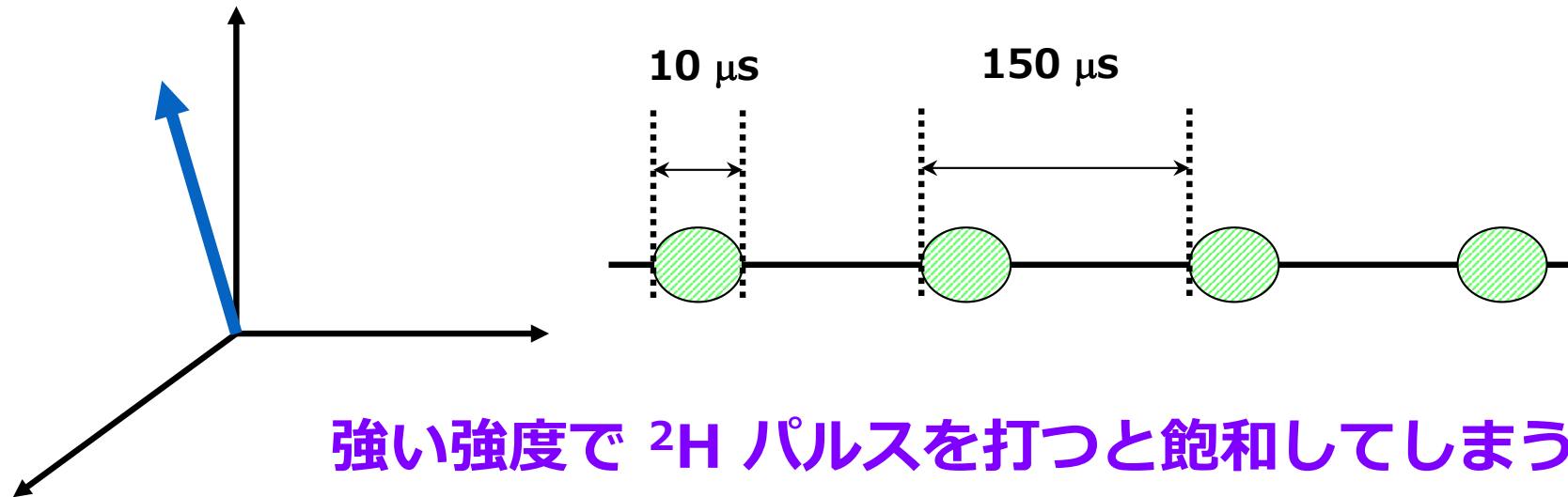


Spectra 画面 (Topspin, BrukerBioSpin)

シムがずれている場合には、重水 $^2\text{H}_2\text{O}$ の信号が歪む。

実際には ^2H の分散波形が検出されている。

重水素ロックのパルス強度 -- 強すぎず弱すぎず --



Gradient によりスペクトル幅が広がり、選択パルスを打った時のような感じとなる。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 ^2H 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 ^2H 信号強度となっている。

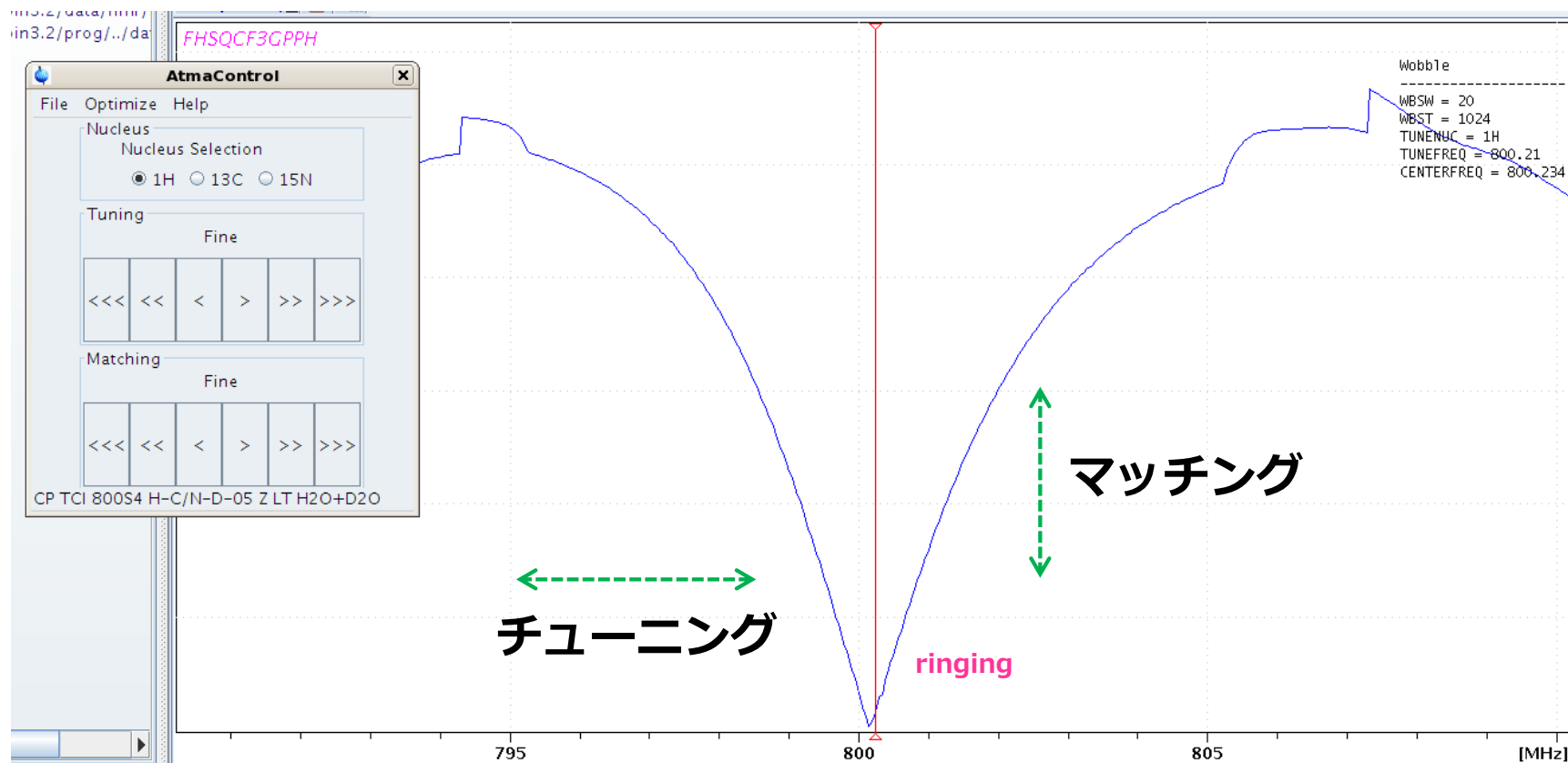
チューニング・マッチング

ラジオの選局：チューニングが合う程、はっきりと聞こえる。



NMR でもチューニング・マッチングが合う程、 90° パルス長は短くなり（発熱も少ない）、FID 信号も感度よく検出できる。また、probe からの反射も小さくなる。

チューニング・マッチング



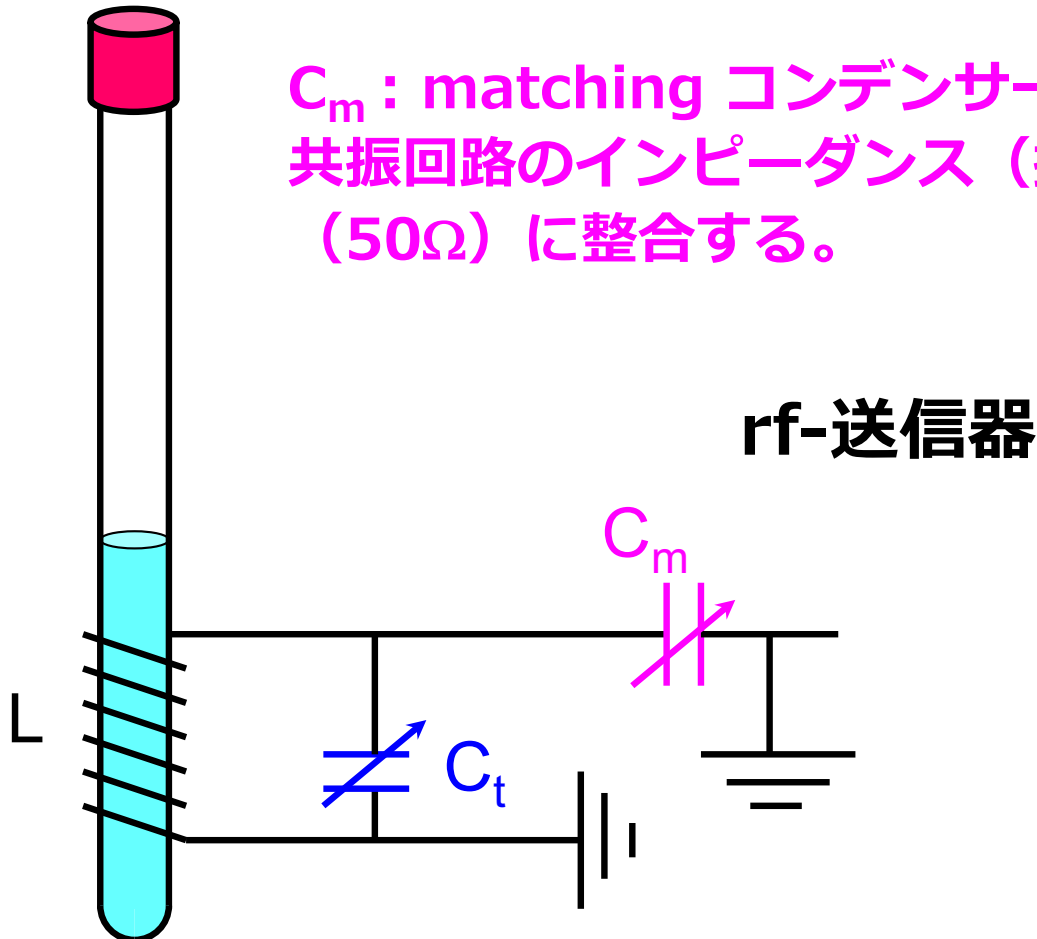
atmm 画面 (Topspin, BrukerBioSpin)

- ロックをかけてから調整する。
- どの核種から調整するとよいかはプローブによって異なる。
- 異なる核種の周波数どうしで干渉し合っているなので、何周かチェックする (シム調整の後に最終チェックするのもよい)。

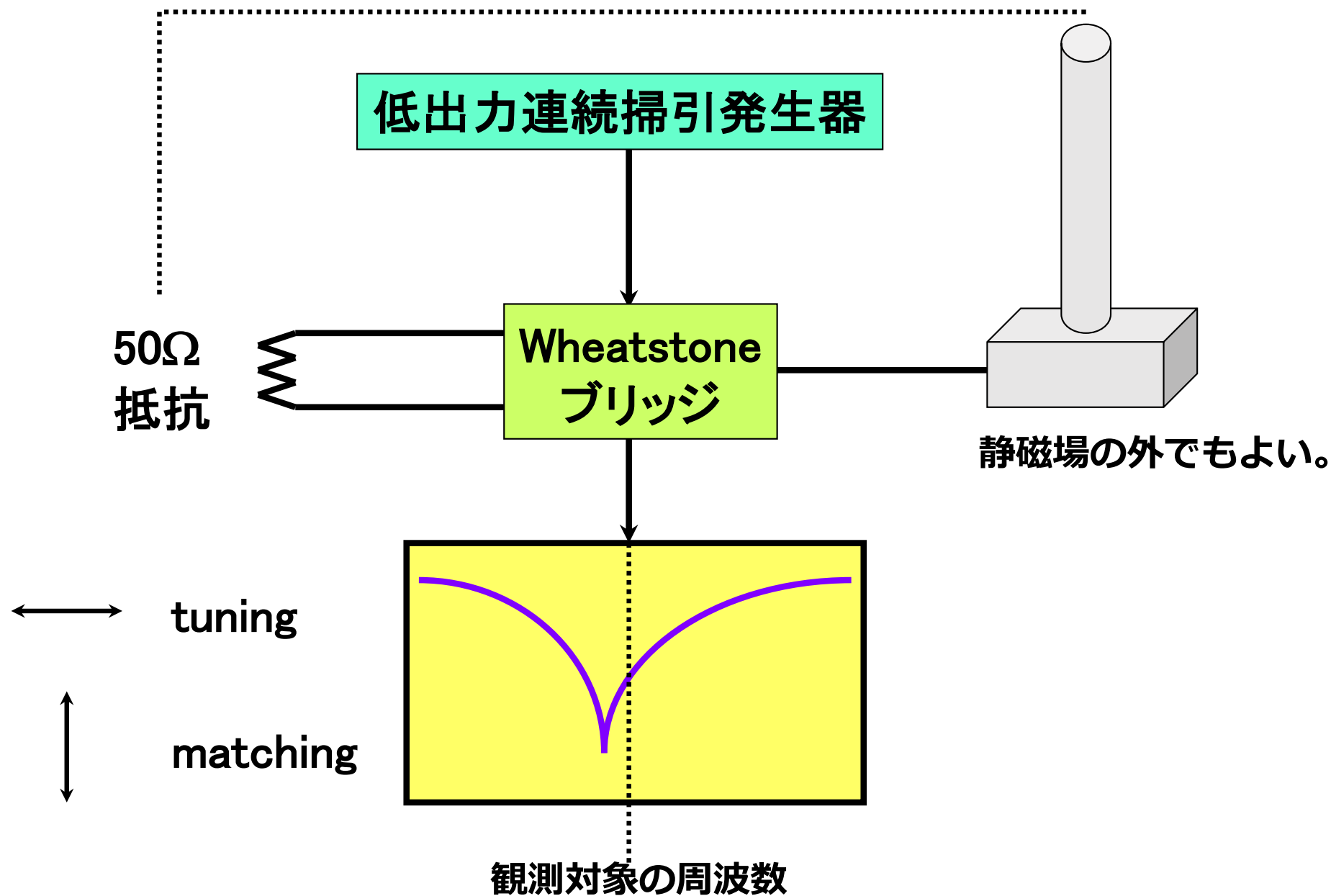
チューニング・マッチングの調整

C_t : tuning コンデンサーの電気容量を調整して、共鳴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（ 50Ω ）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

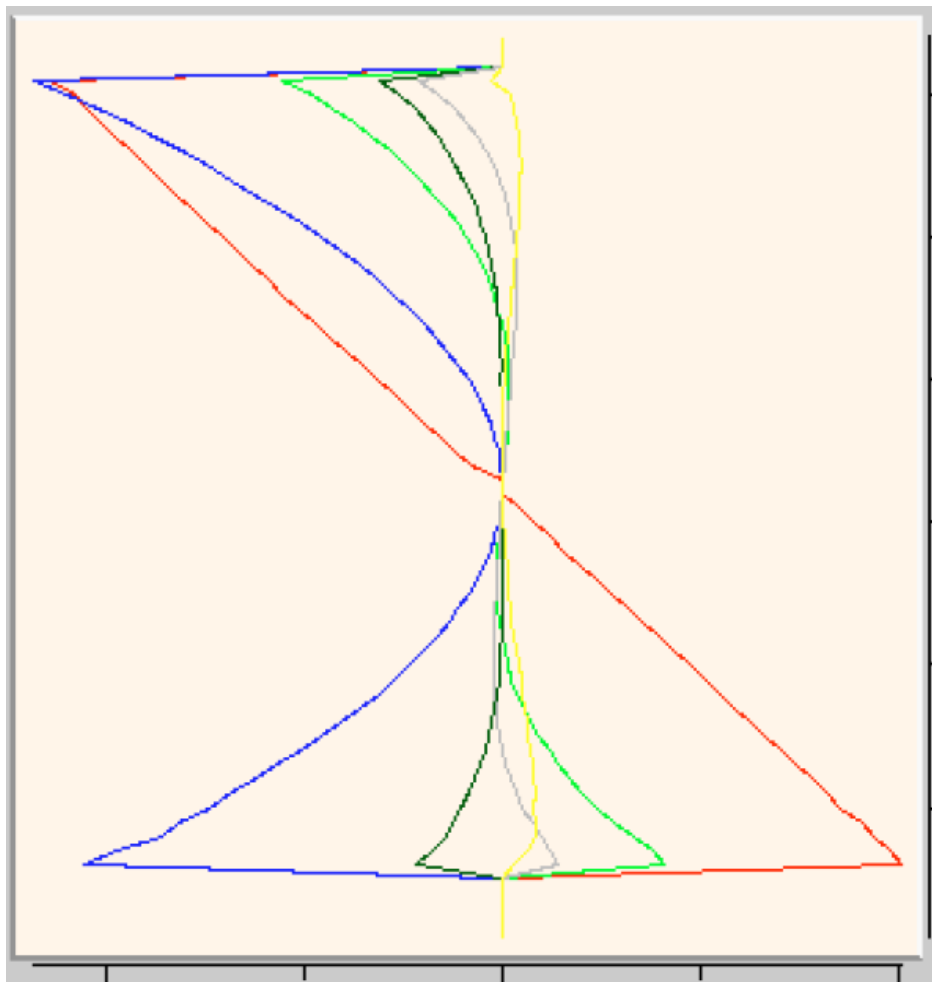


シム: くさび

水の ^1H (重溶媒の ^2H) の信号をもとに試料部分の一種の MRI 画像をとっている。

シムを合わせると、 ^2H のピークがシャープになりロック信号が高くなるので、ロックゲインを画面の 70% ぐらいになるように下げる。

シムマップ：あるシムコイルの電流値を一定量だけずらした時に、シムプロファイルが場所ごとにどのように変わるかが登録されている。



Gradshim 画面 (Xwinmr, BrukerBioSpin)

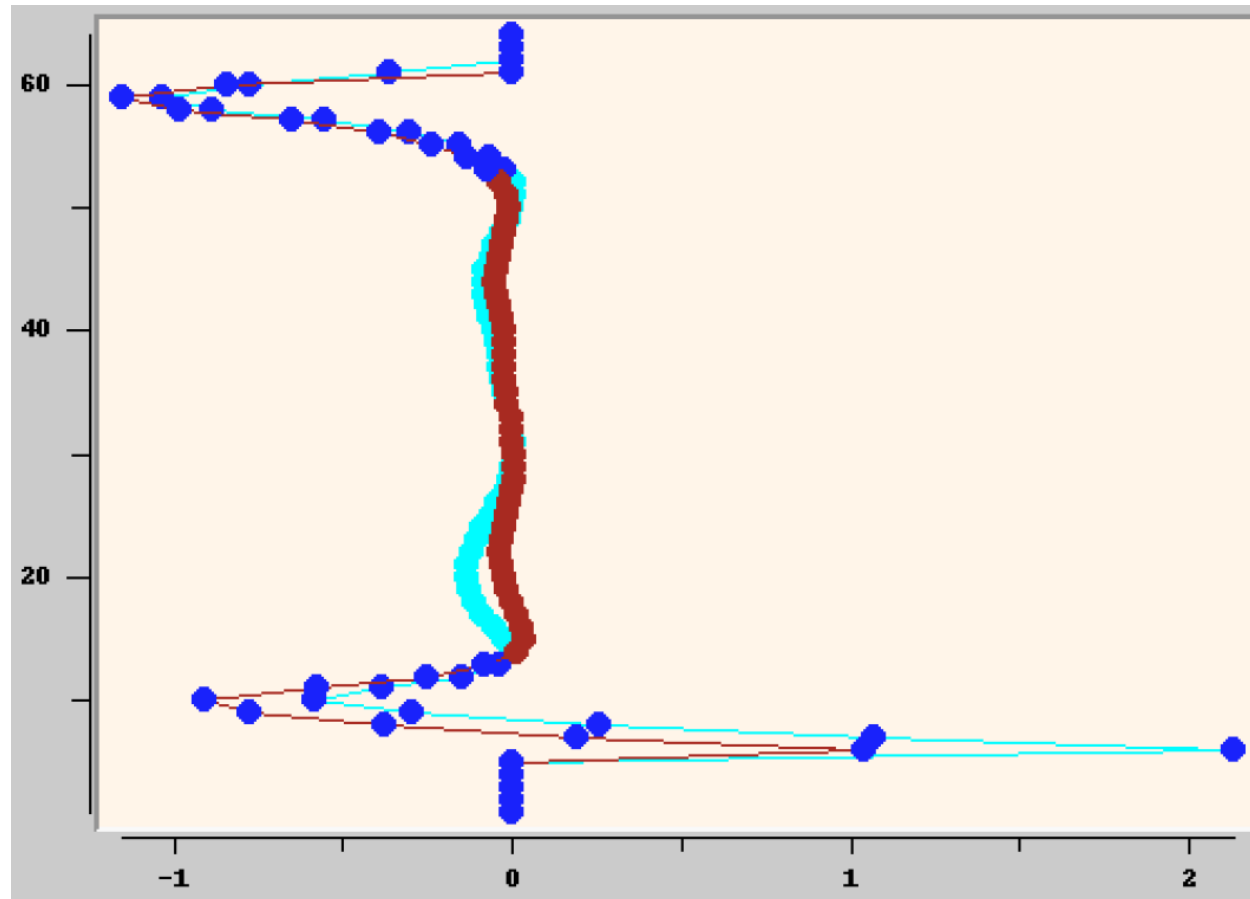
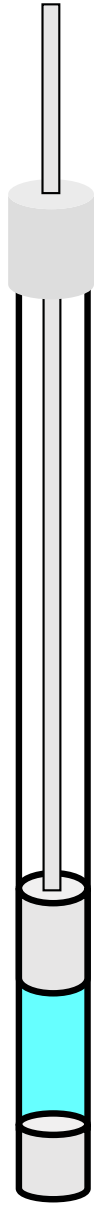
↓

ある試料管のシムプロファイル
を場所ごとにできるだけ
たくさん得る（グラジエントに
より可能）。

↓

どのシムコイルの電流をどれ
だけずらせばよいか計算で
きる。

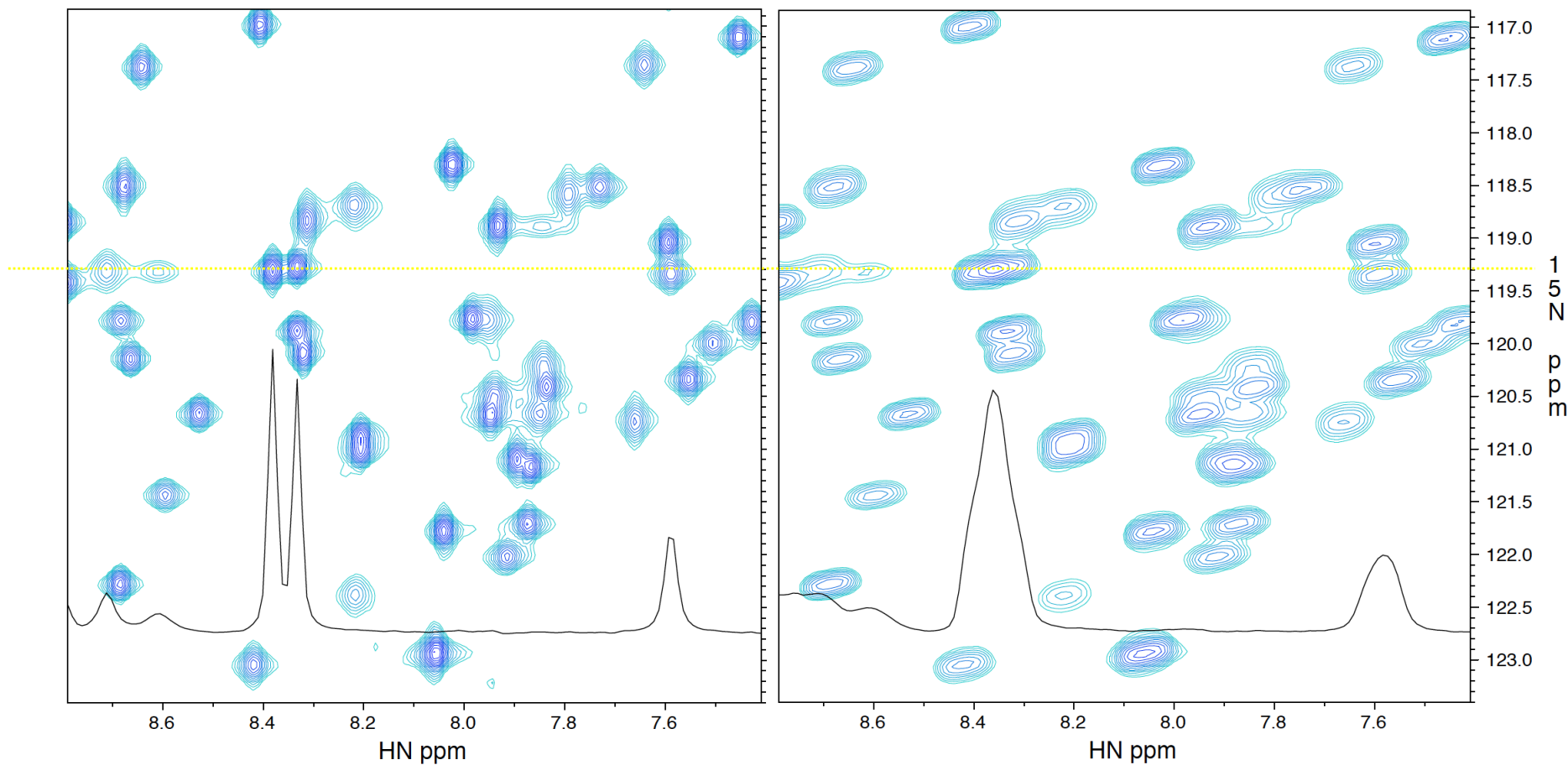
シゲミ管にはアダプターがあるので、溶液とガラスとの境界面で磁化率が不連続となり、高次の関数のパラメータが大きくなってしまふことが多い。



Gradshim 画面 (Xwinmr, BrukerBioSpin)

z-シムさえきっちり合わせれば x, y 方向のシムは適当でよい？

x, y シムを 2,700 unit ずつずらすと

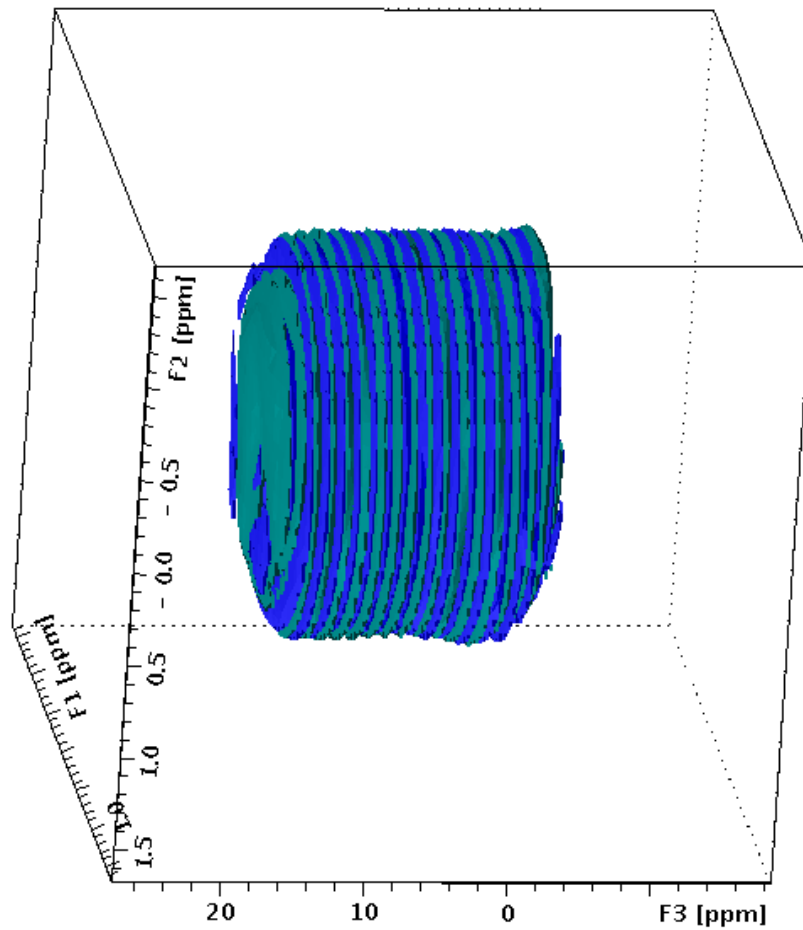


processed by NMRPipe (Dr. F. Delaglio)

グラジエントシムのマップはどの位の頻度で更新されている？

三次元グラジエントシム

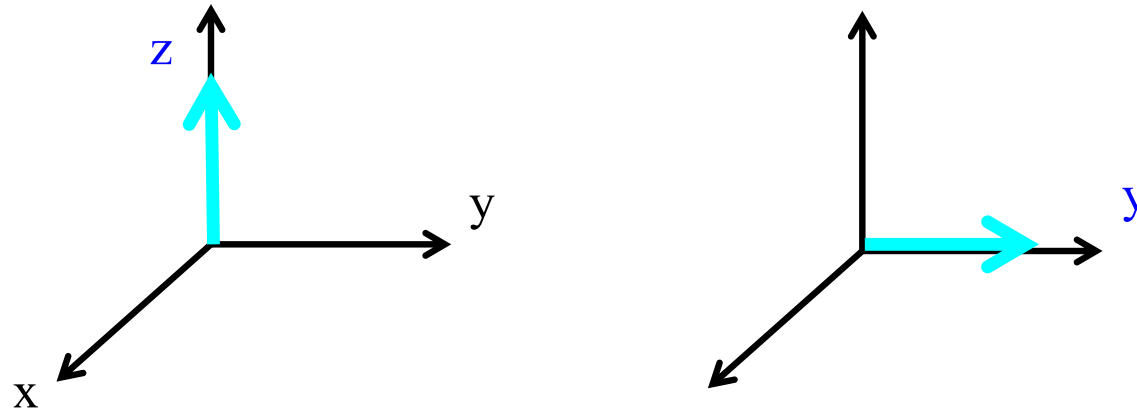
水の ^1H の信号をもとに試料管の溶液部分の MRI 画像をとっている。



3D Topshim 画面 (Topspin, BrukerBioSpin)



^1H 核の 90° パルス幅の決定



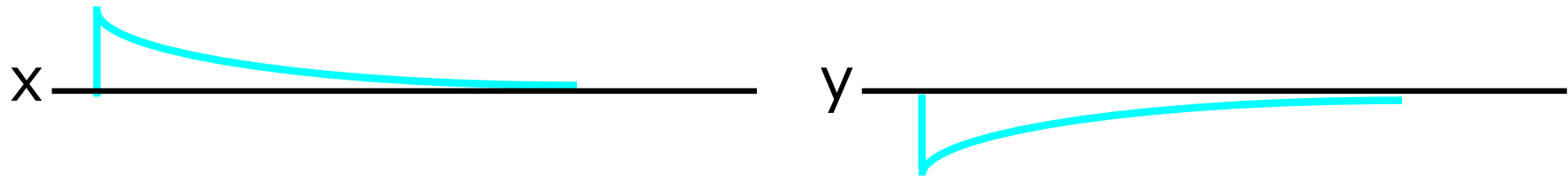
180° よりも 360° 回転の方がよい。



**Radiation damping の影響を受けにくい。
 T_1 緩和の時間を待つ必要がほとんどない。**

水信号を使つての ^1H 核 90° パルス幅の決め方

- (1) on-resonance に合わせる ($\sim 4.7\text{ppm}$) 。
- (2) $1\ \mu\text{s}$ 程度のパルスを打つ。

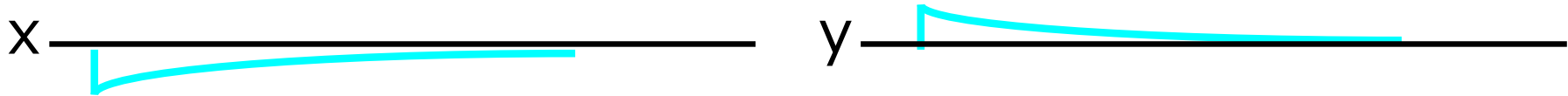


もし、振動していたら off-resonance から打っていることを示す。

- (3) \cos^2 -window を掛ける ($\text{ssb}=2, \text{qsin}$) 。
- (4) 0-fill を足し、フーリエ変換してみる。
- (5) 位相をきっちりと合わせておく。



(6) 360° に相当しそうなパルスを打つ (例: $4 \times 10 \mu\text{s}$)。

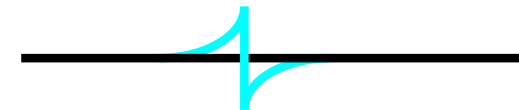


$1 \mu\text{s}$ を打った時の FID と比べる。
もし、正負が逆ならば、 360° に足りていない。

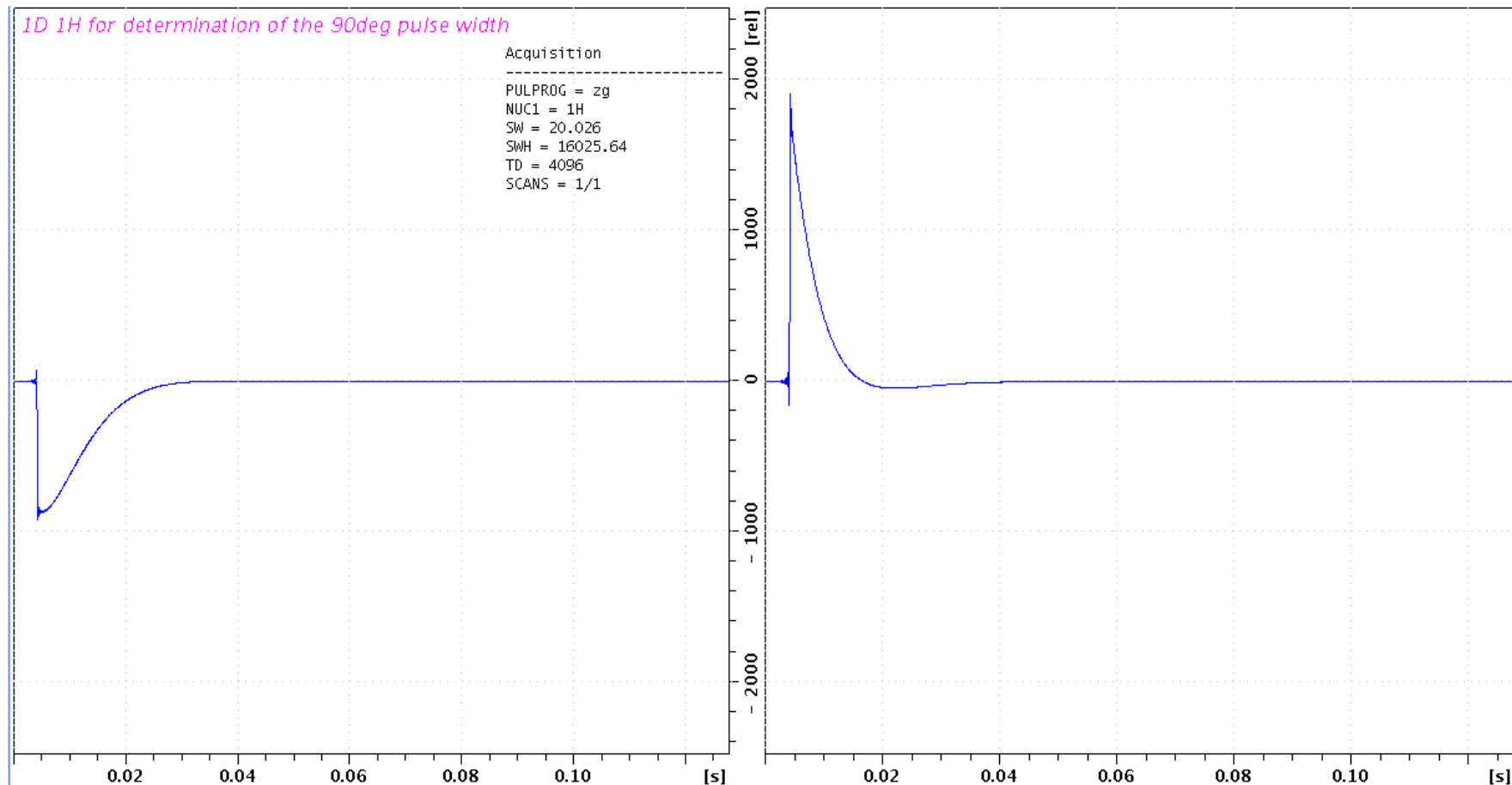
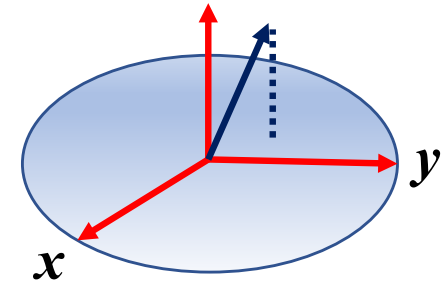
(7) FID の最初の信号強度が 0 になるまで (6) を試す。



(8) 最終確認のためにフーリエ変換してみる。
位相は $1 \mu\text{s}$ の時の値で合わせる。



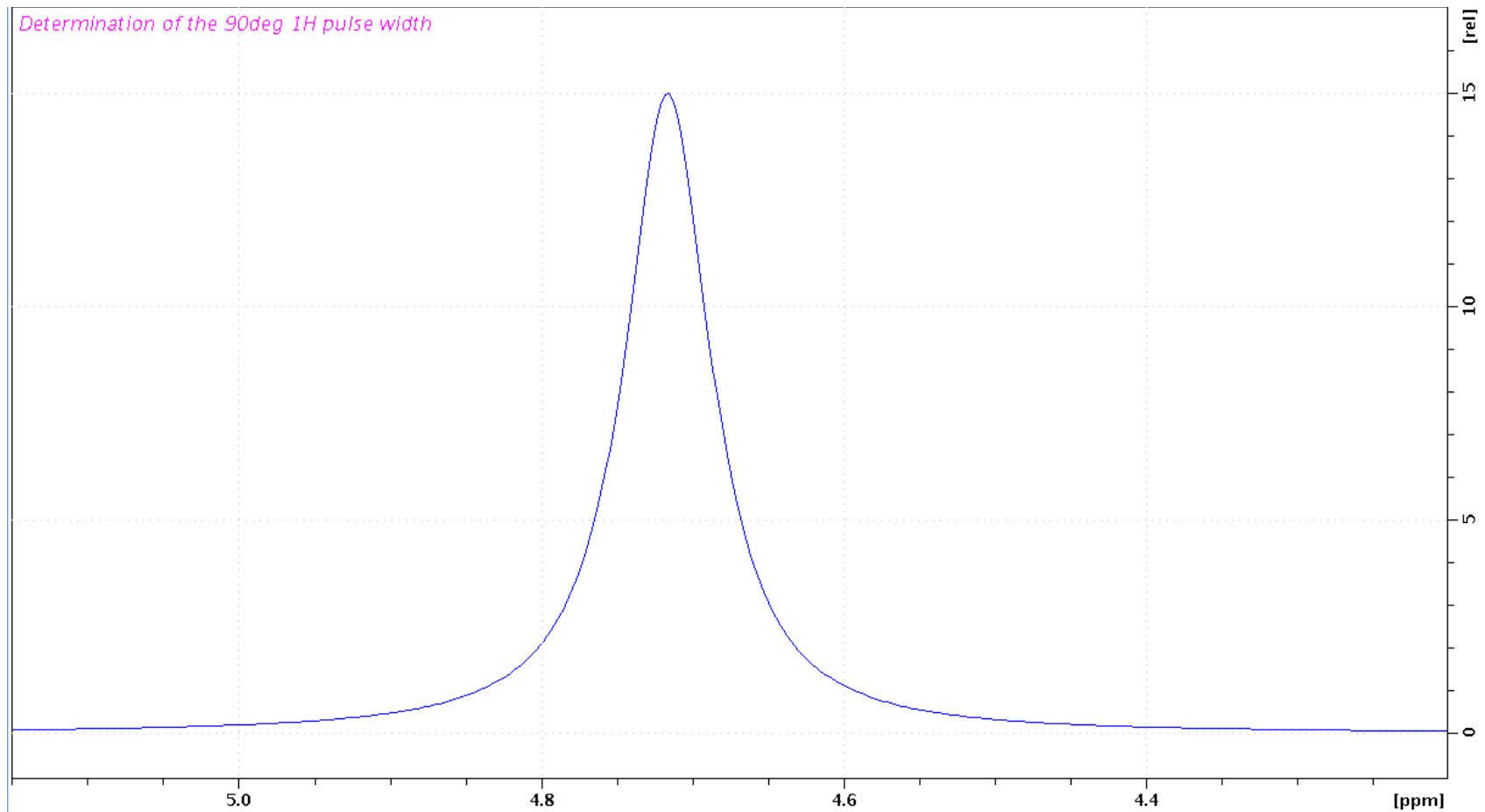
1 μs の ^1H パルスを打った時の FID 信号 (x, y)



FID 画面 (Topspin, BrukerBioSpin)

Radiation damping が顕著ではないので、きれいな T_2 緩和の FID が観られる。

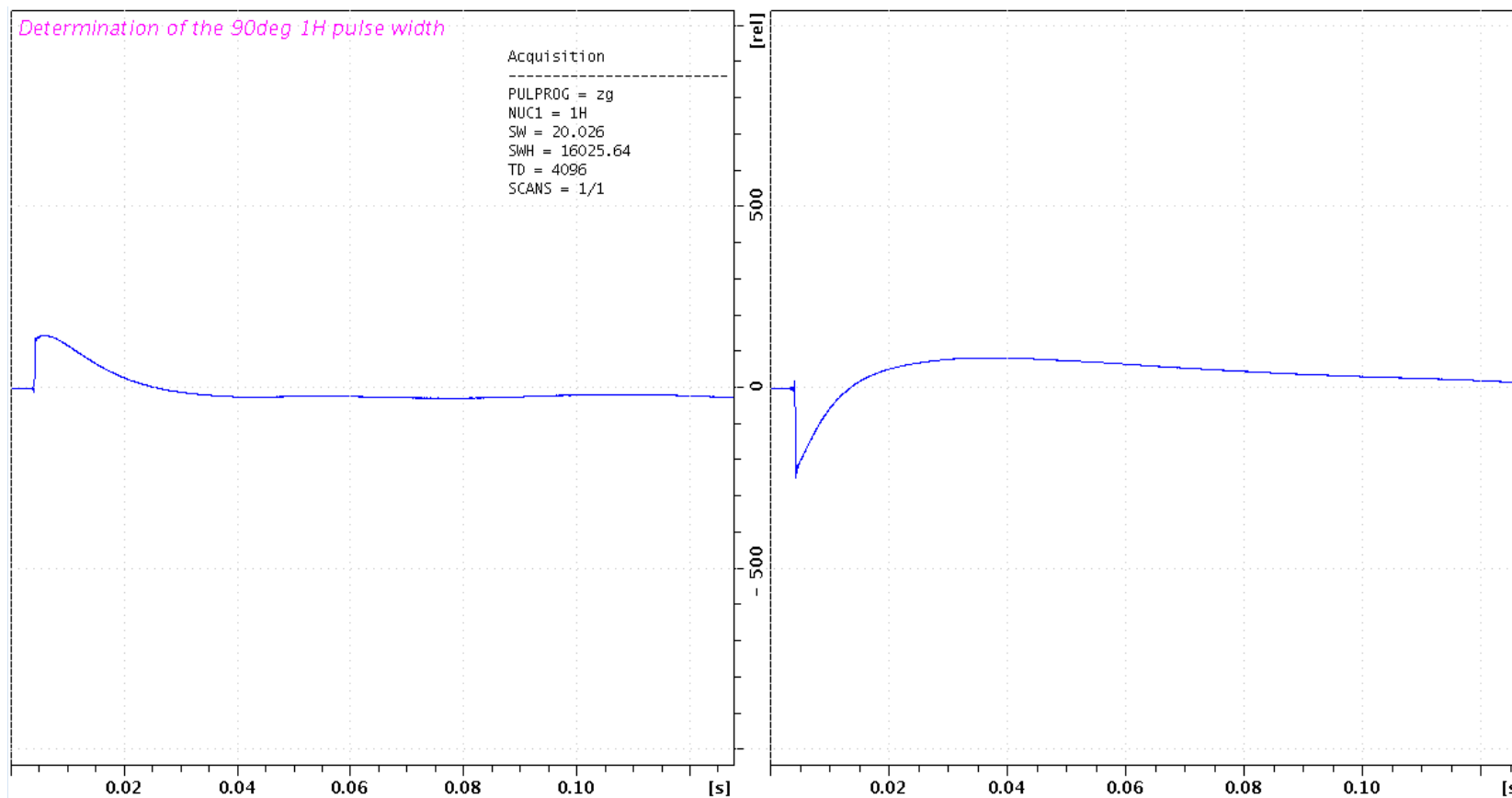
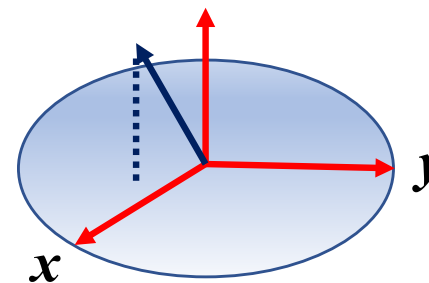
1 μs の ^1H パルスを打った時のフーリエ変換後のスペクトル



Spectra 画面 (Topspin, BrukerBioSpin)

- 左右対称のきれいな $^1\text{H}_2\text{O}$ の信号が 4.7 ppm 付近に観えるか？
- 他に軽水素の物質がコンタミしていないか？
- DSS, TMS などが入っていれば、0 ppm reference を測っておく。

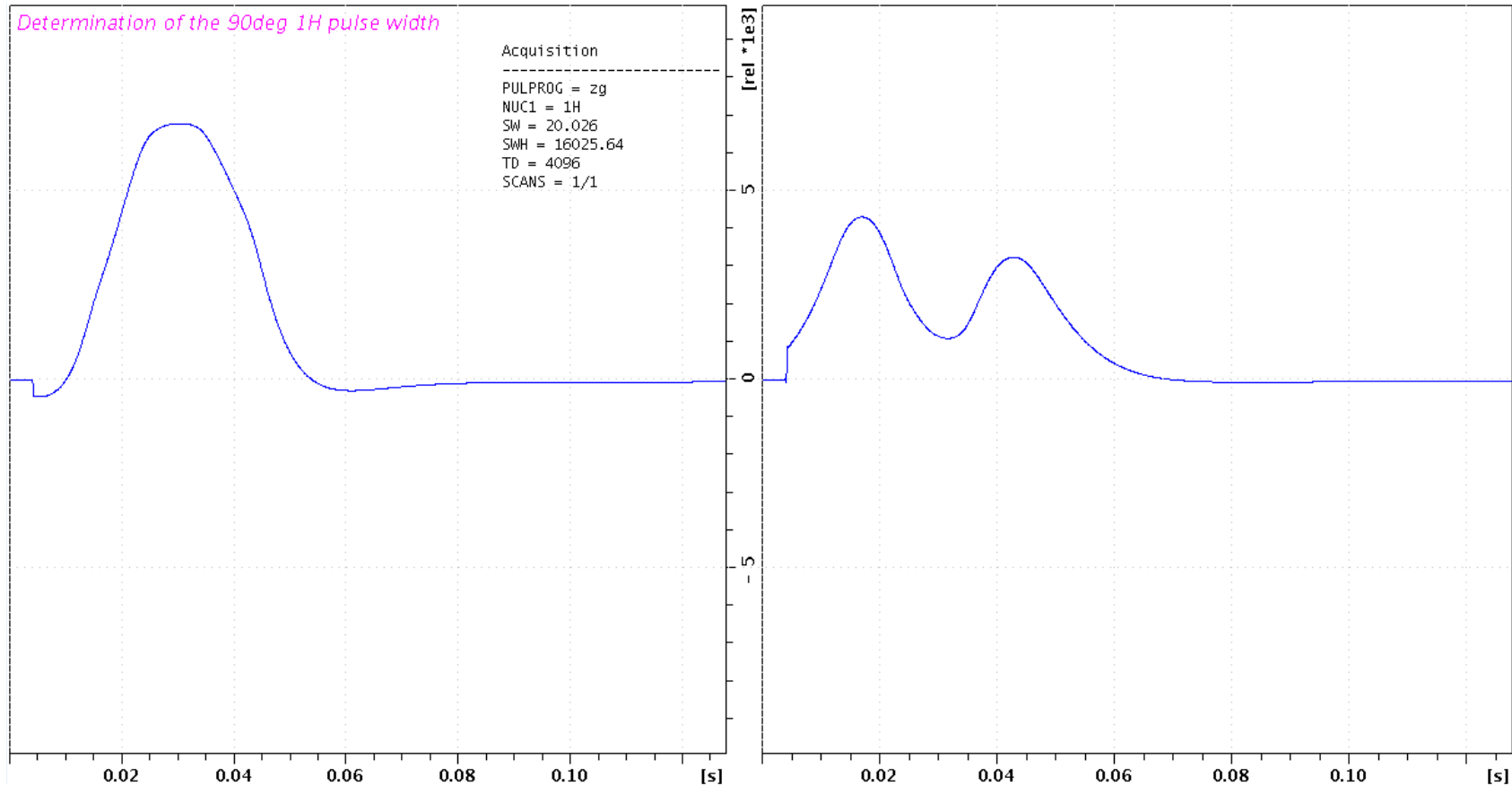
< 360° の ¹H パルスを打った時の FID 信号



FID 画面 (Topspin, BrukerBioSpin)

時間 0 の時の信号強度を観る。1 μ s を打った時とは逆向きであるので、¹H 磁化ベクトルの回転は 360° に達しなかったことが分かる。

180° になるように ^1H パルスを打った時の FID 信号



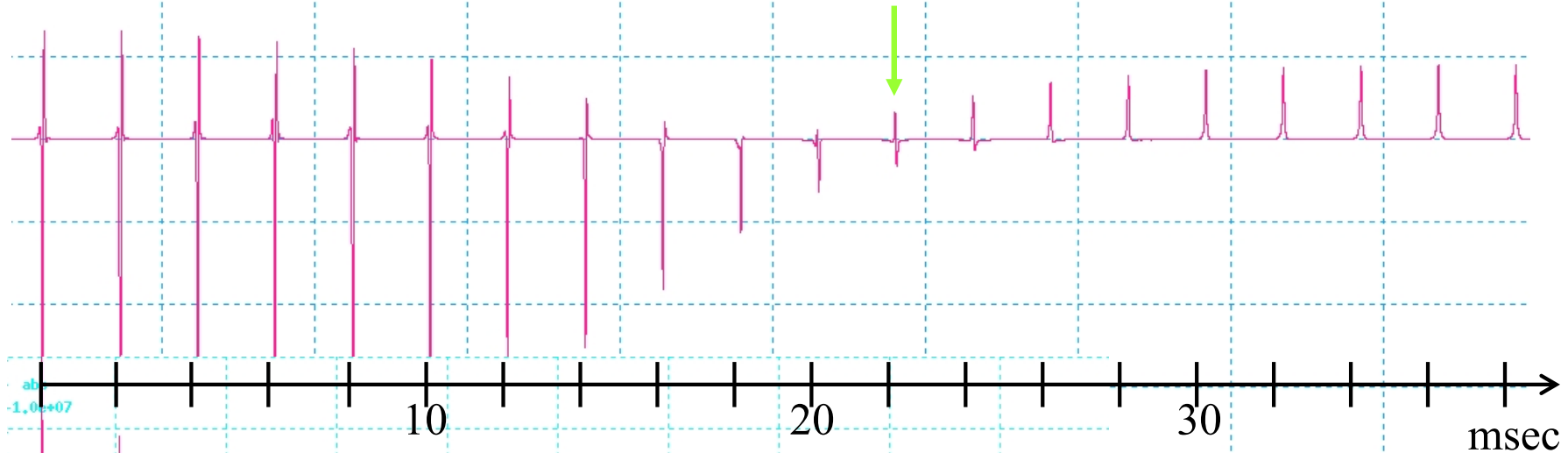
FID 画面 (Topspin, BrukerBioSpin)

- FID の最初の信号は0であるが、その後 radiation damping によって磁化ベクトルは急速に $-z$ から xy 平面を経て $+z$ に帰る。
- $+z \rightarrow -z$ と $-z \rightarrow +z$ とでは、前者の方がパワーが必要。

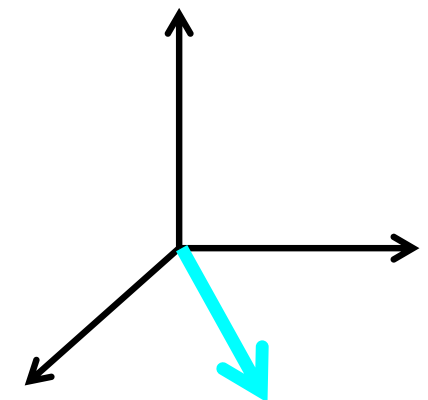
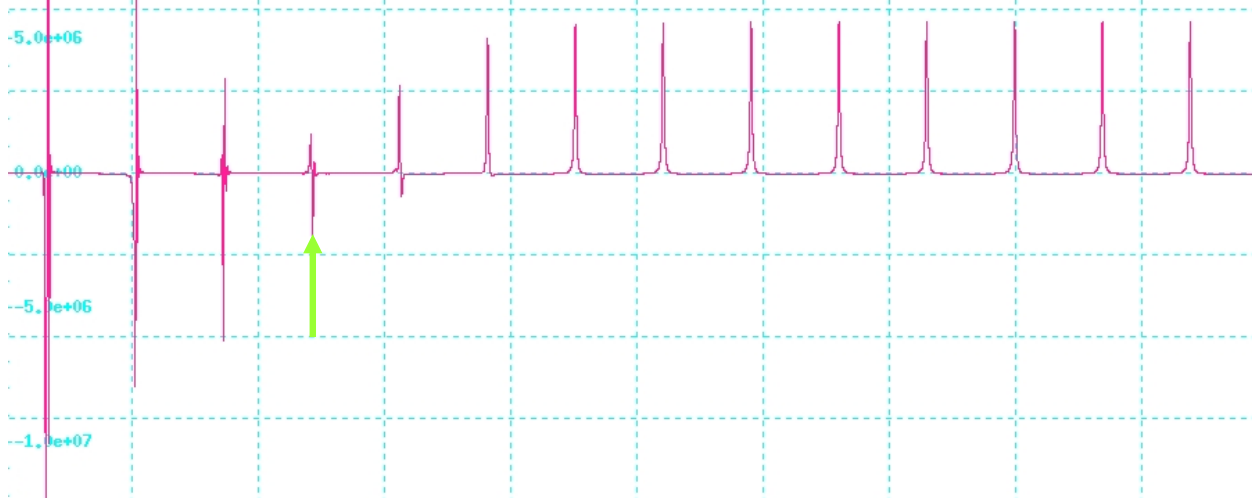
水の radiation-damping (放射減衰)

Spectra 画面 (Xwinnmr, BrukerBioSpin)

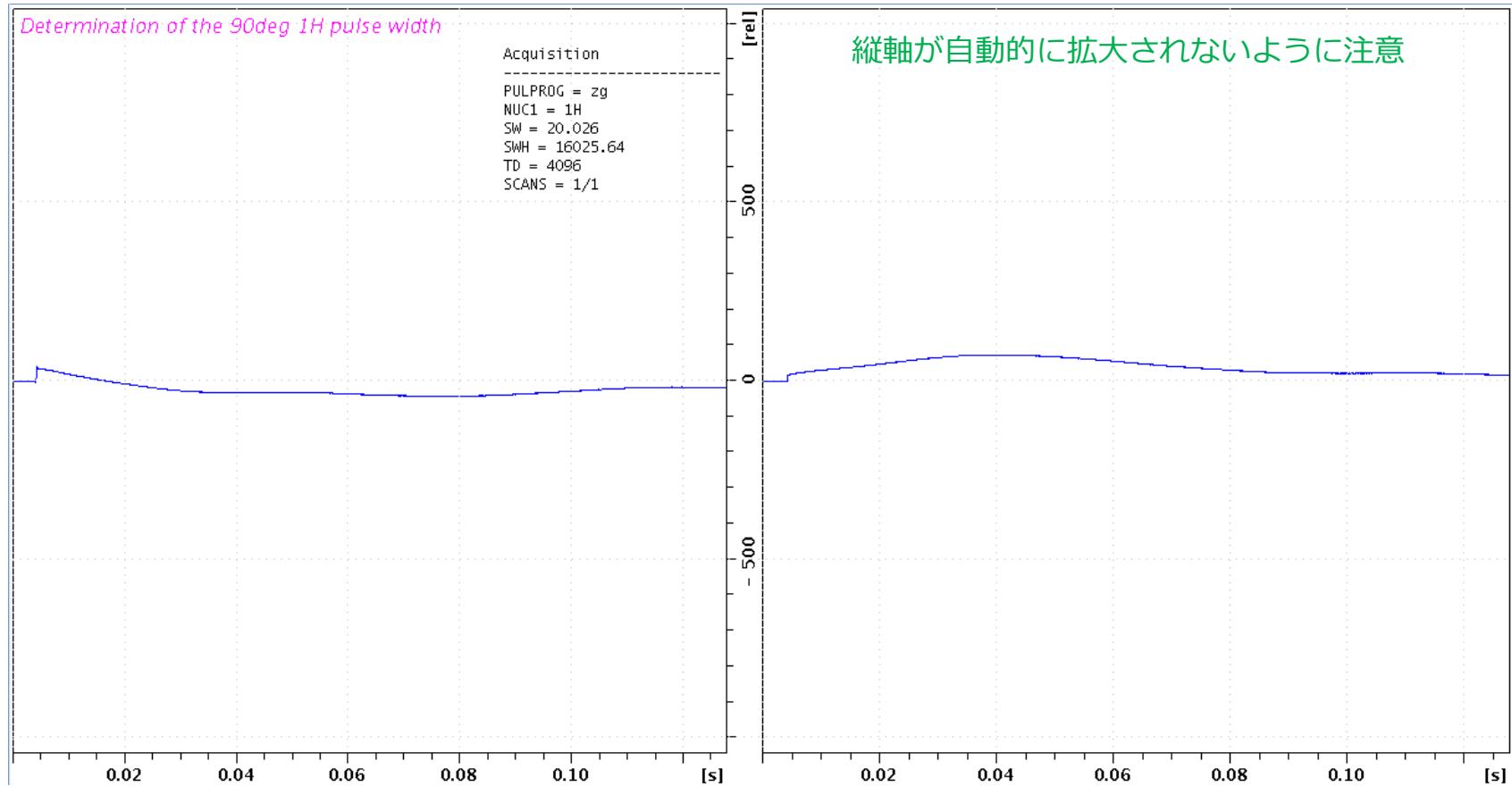
Normal probe 室温検出器 (500 MHz)



Cryogenic probe 極低温検出器 (800 MHz)



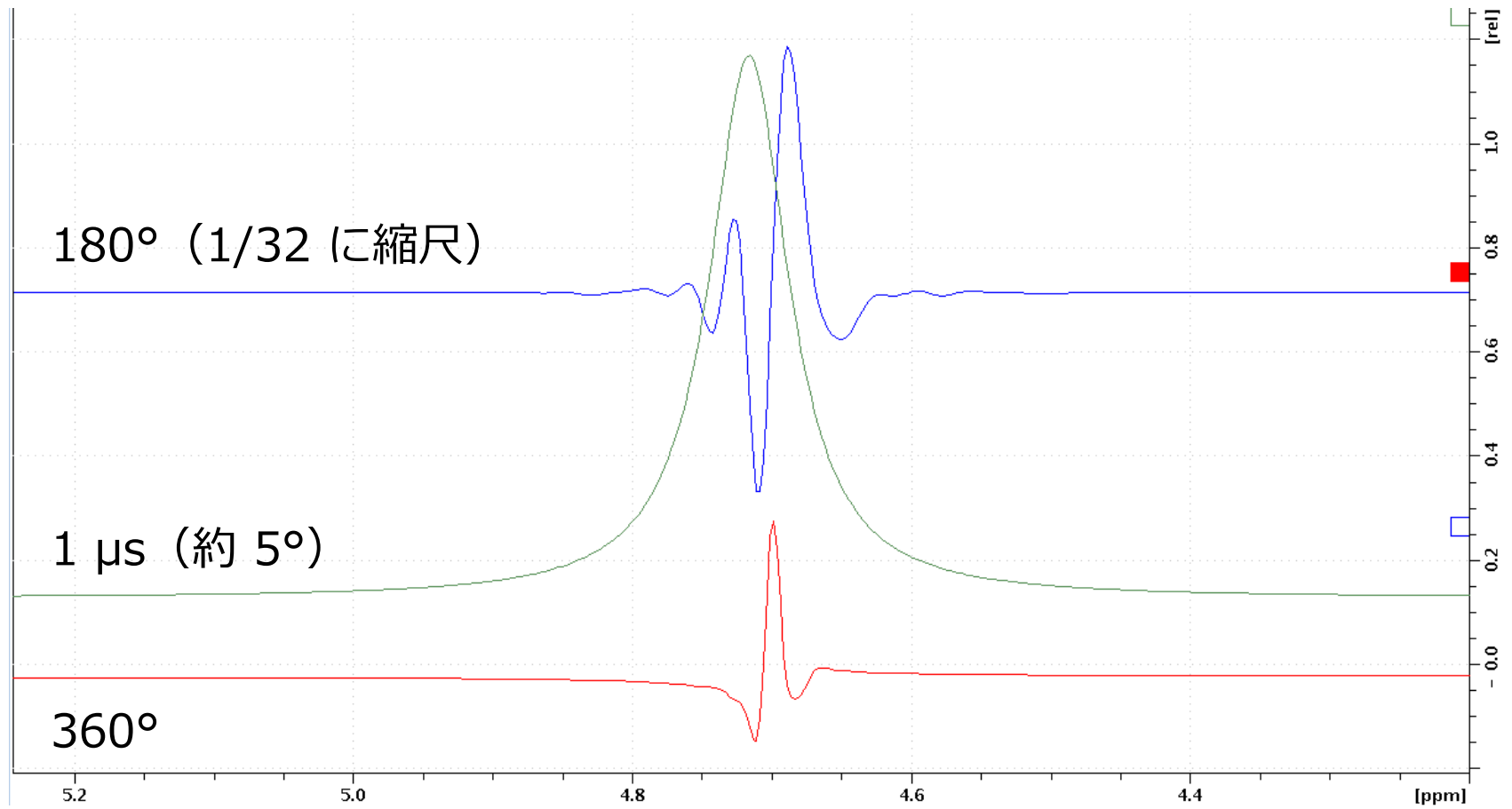
360° になるように ^1H パルスを打った時の FID 信号



FID 画面 (Topspin, BrukerBioSpin)

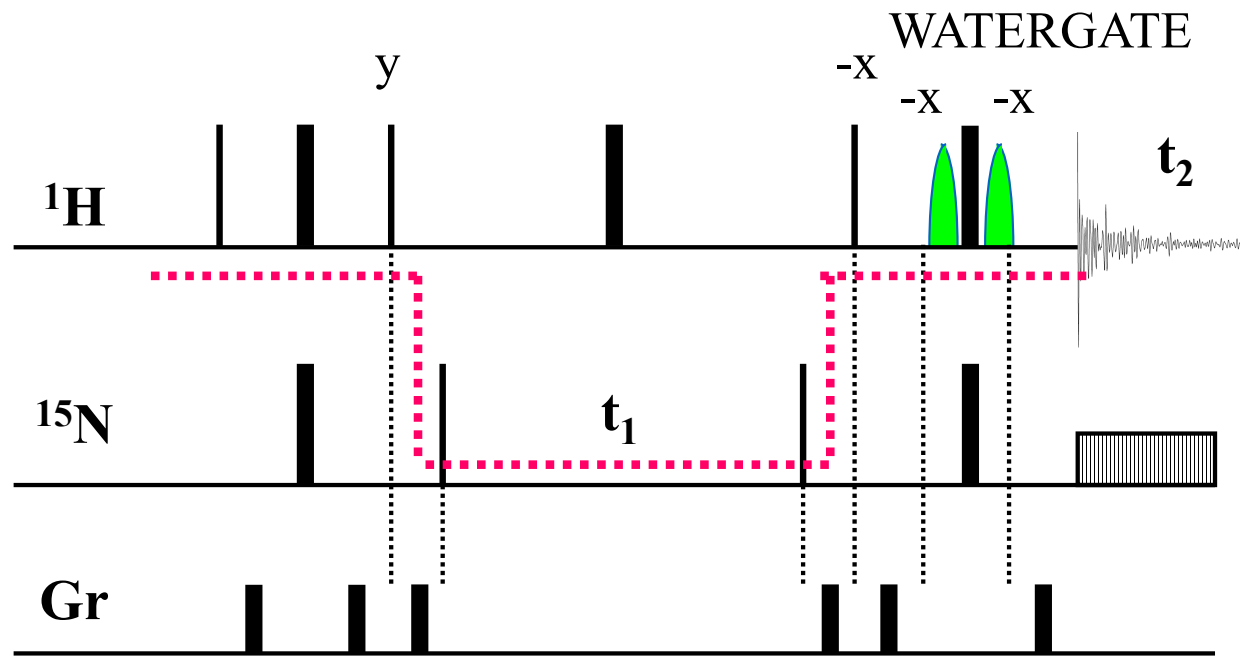
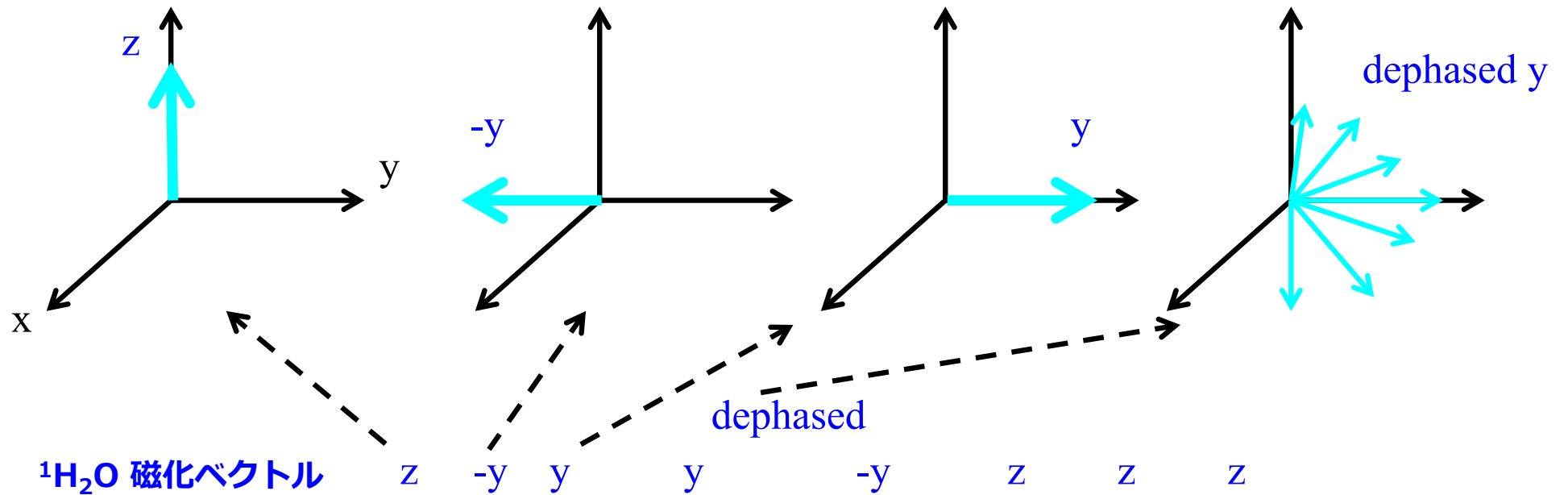
- Radiation damping があまり無いので FID はフラット。
- あまり時間を置かずに、次のパルスを打って試すことができる。

さまざまな長さの ^1H パルスを打った時のスペクトル

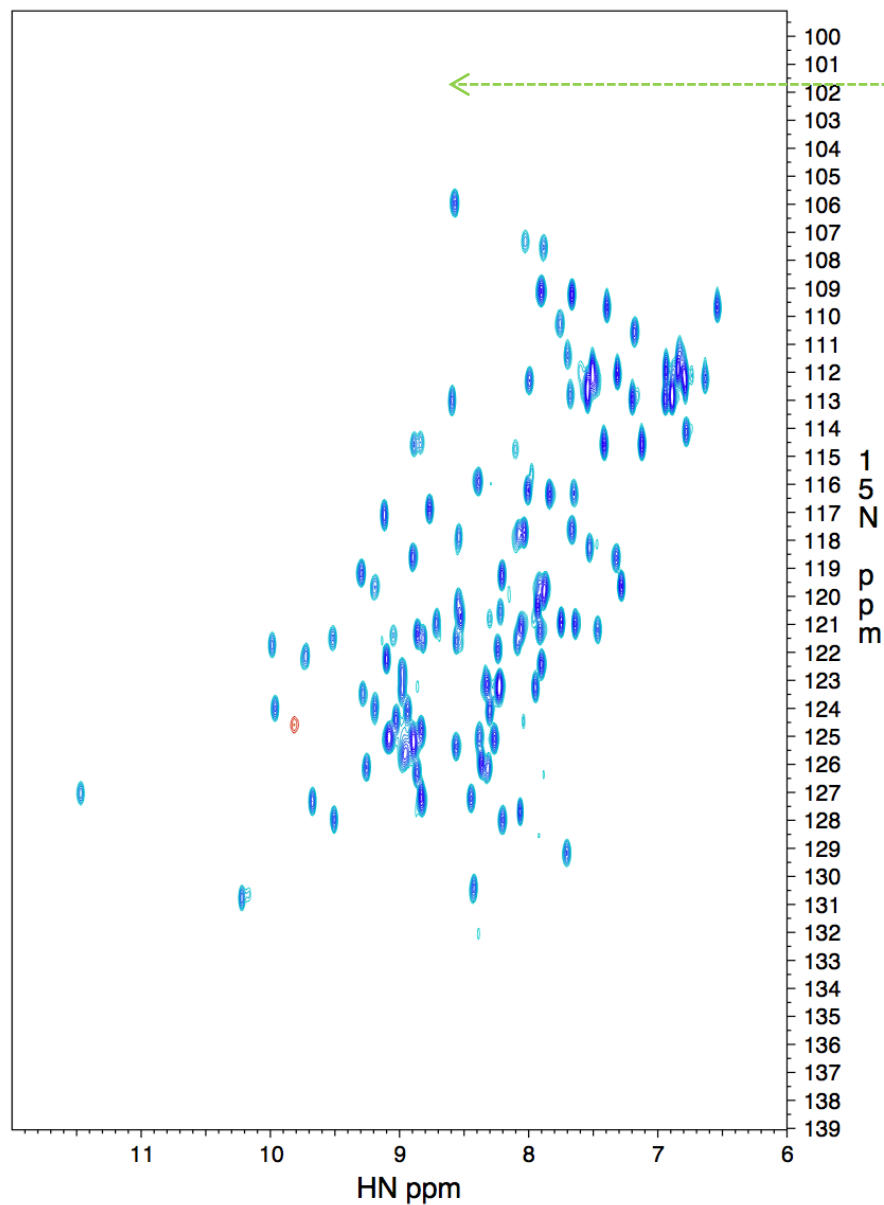


Spectra 画面 (Topspin, BrukerBioSpin)

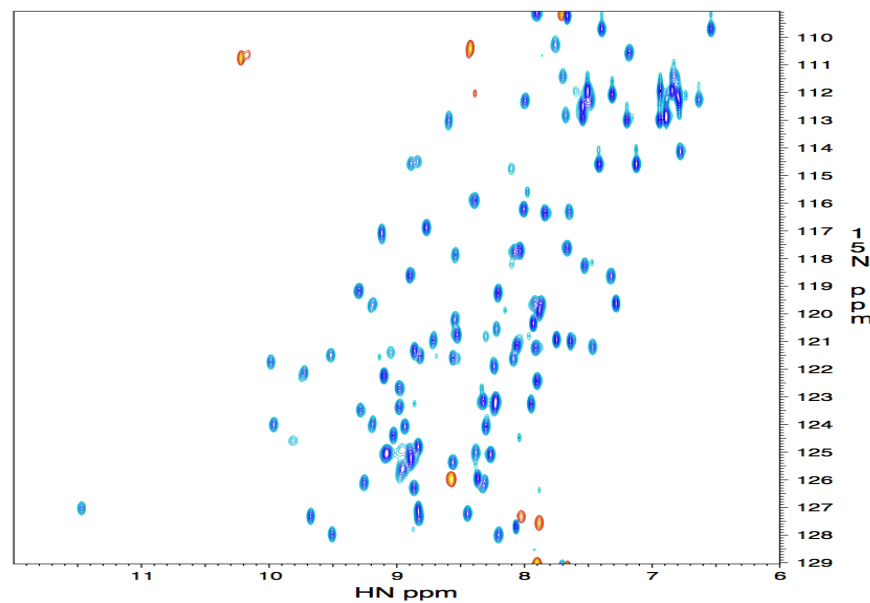
Water flip-back & WATERGATE ^1H - ^{15}N HSQC



fhsqcf3gpph

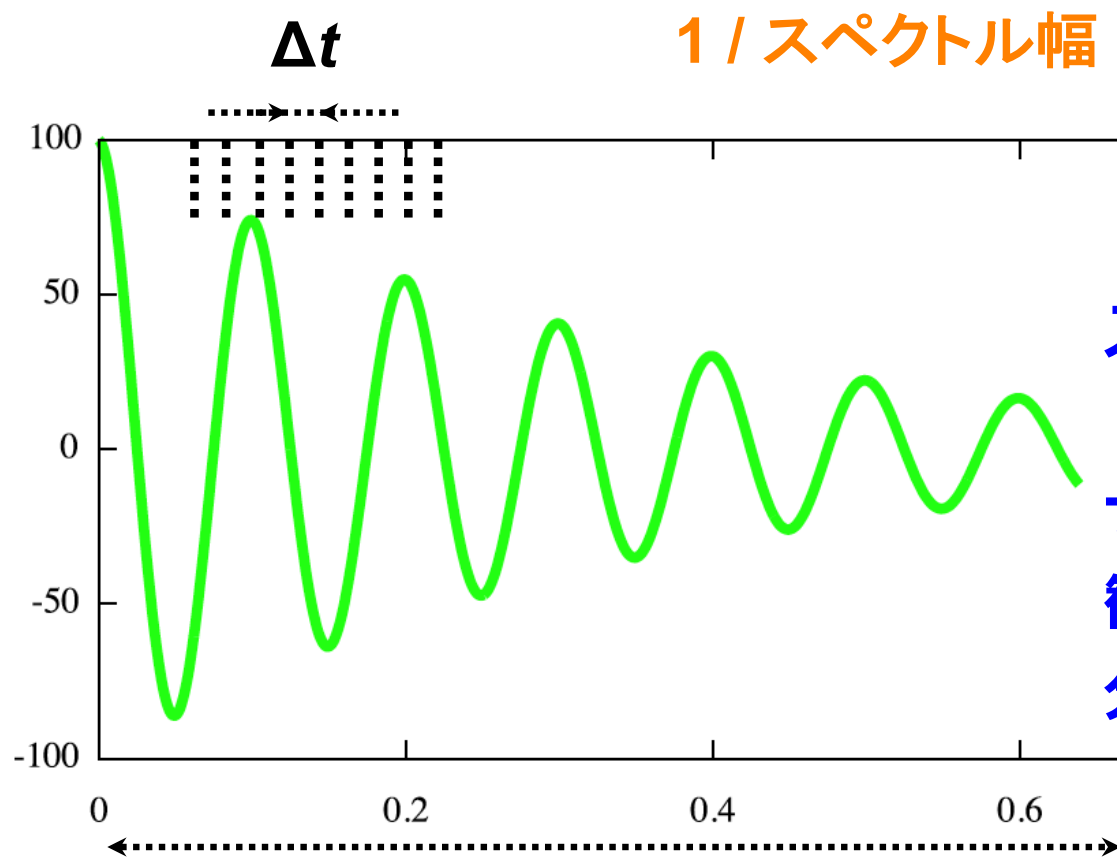


この領域を観測するのは
かなり時間を無駄にする。



最初の1枚は ^{15}N 次元にスペクトル幅を広くとっておく。

スペクトル幅を狭めることによる効果



1 / スペクトル幅 = サンプリング間隔 Δt

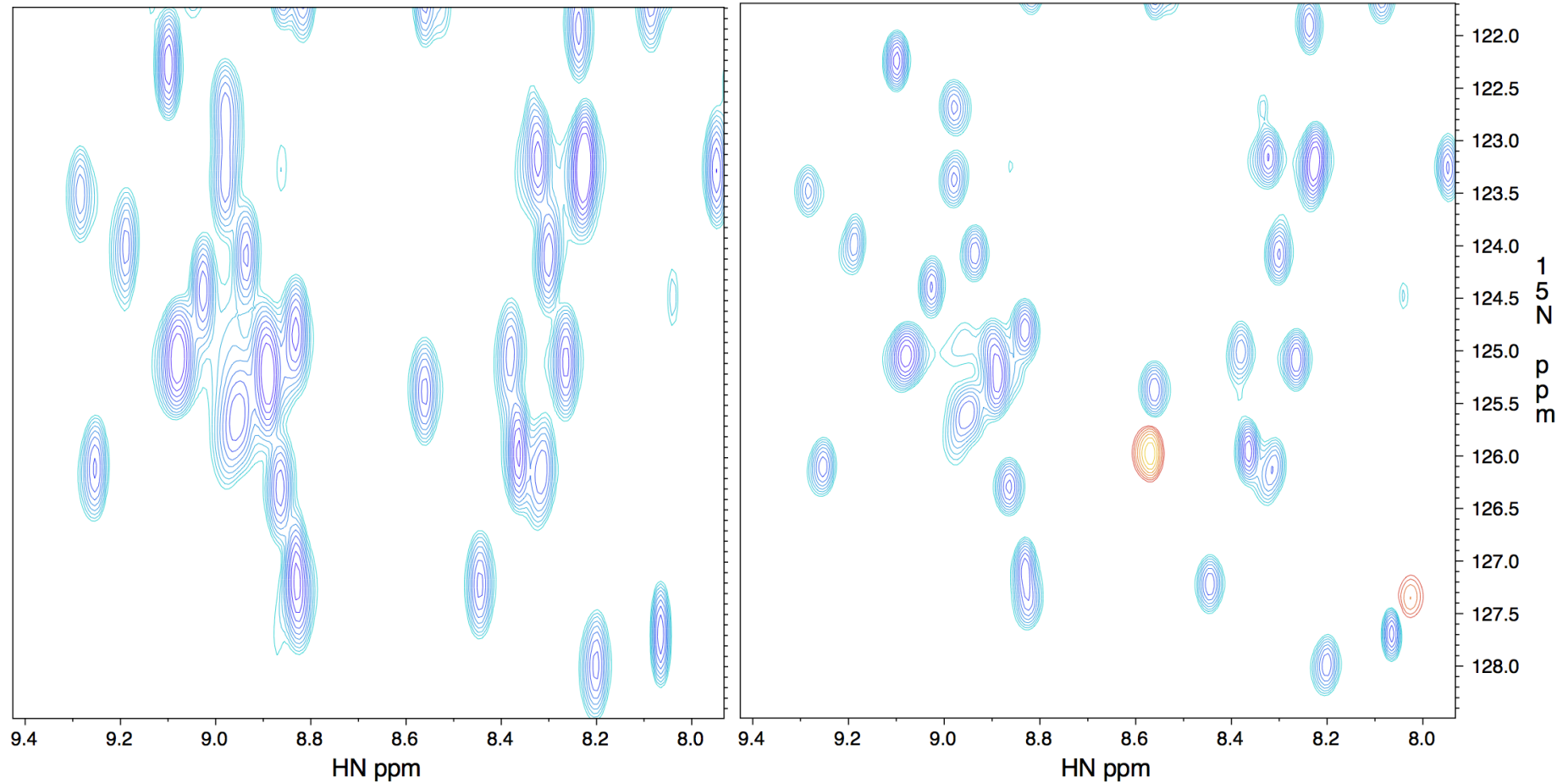
スペクトル幅を狭める



サンプリング間隔が広がる。
観測時間が長くなる。
分解能が上がる。

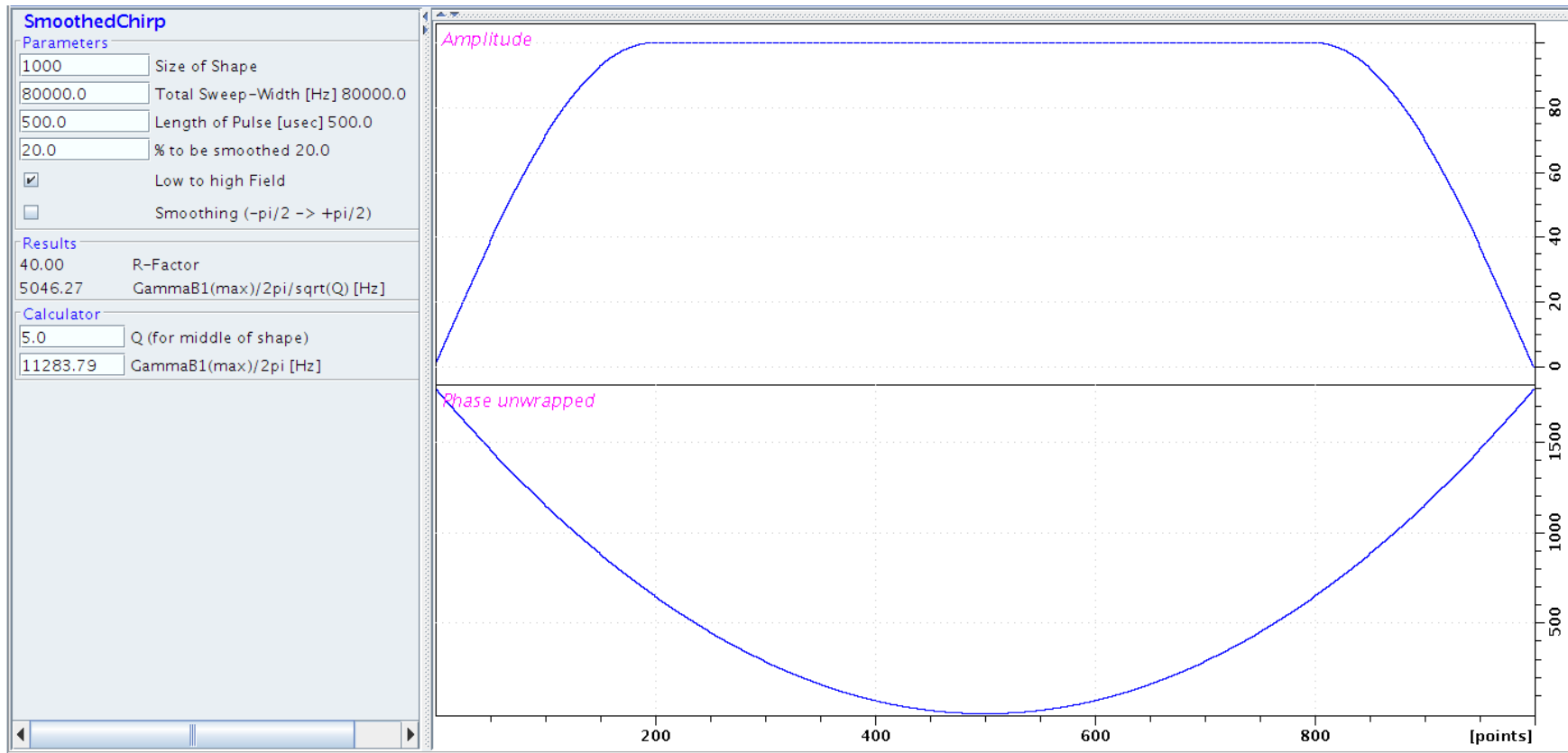
観測時間 = 1 / 分解能

同じ測定時間でも分解能がかなり異なる



3次元測定では二つの間接測定軸 (t_1, t_2) のスペクトル幅を半分ずつにすれば測定時間は $1/4$ になる (濃度を二倍に濃くしたのと同じ)。

^{13}Ca , ^{13}Co デカップリング用の断熱パルス

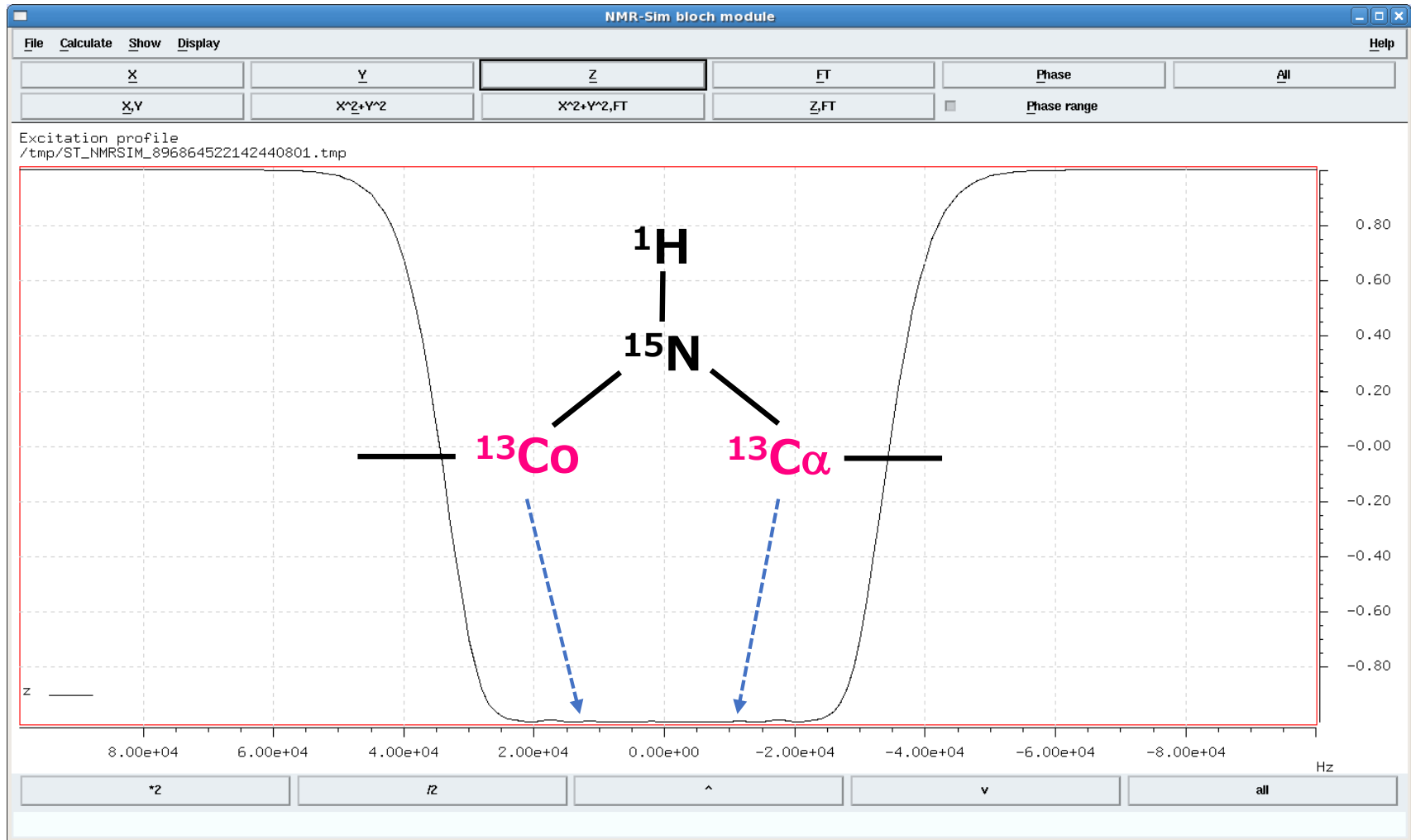


Shape-tool 画面 (Topspin, BrukerBioSpin)

前半の位相は正負が逆 (amp. < 0)

Adiabatic Chirp (Wurst) pulse (80kHz sweep, 500 μs)

理想のパワー (Q=5) より少し弱くても可能な場合が多い。



NMR-Sim 画面 (Topspin, BrukerBioSpin)

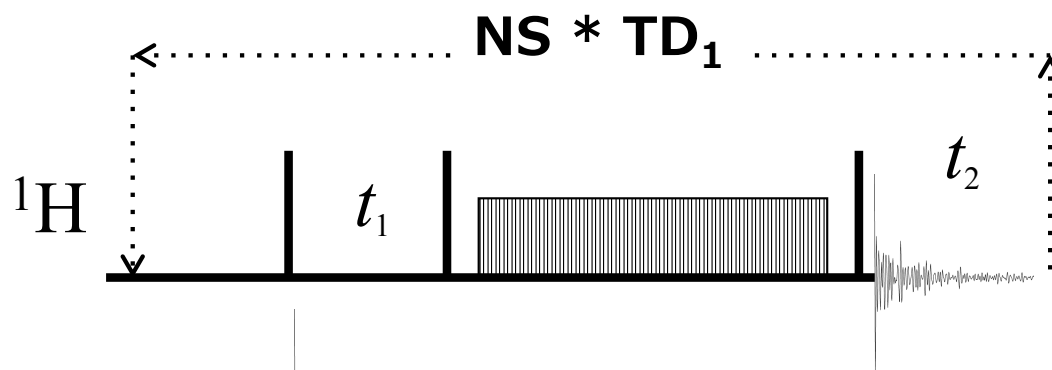
- Adiabatic Chirp pulse の中心を 113 ppm におく。
- $25,000 / (800.13 * 0.25145) = 124$ であるので
113 ± 124 ppm の ^{13}C 核スピンを inversion できる。

感度 sensitivity とは？

感度 (S/N) $\propto \sqrt{N_s} \propto \sqrt{\text{測定時間}} \propto \text{試料濃度}$

積算回数だけを2倍にしても、感度は $\sqrt{2}$ 倍にしかない。
しかし、測定時間は2倍になってしまう。

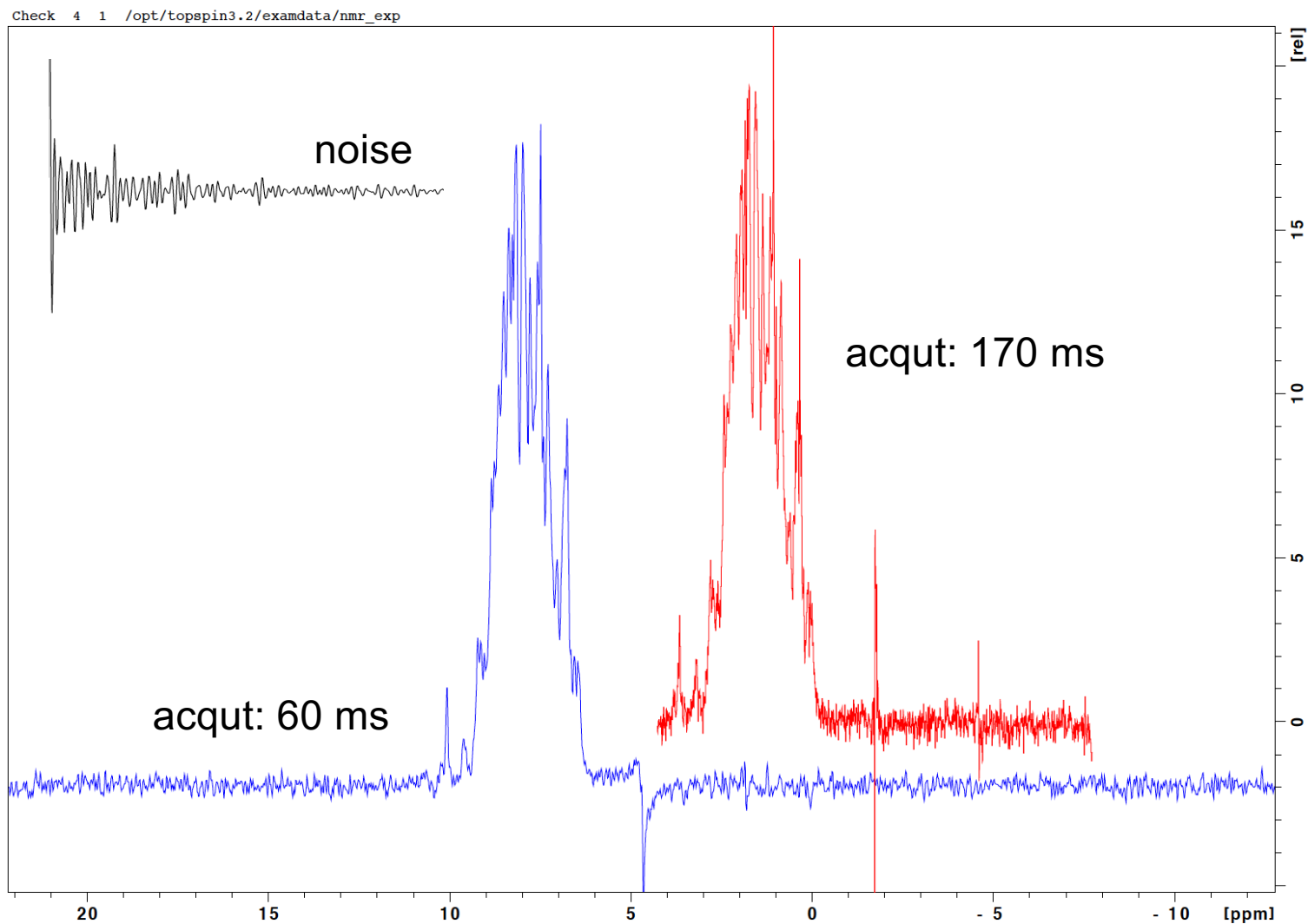
測定時間が同じであれば、感度は一定である（ただし、緩和を無視）。



間接測定軸の TD_1 は測定時間にほぼ比例する。

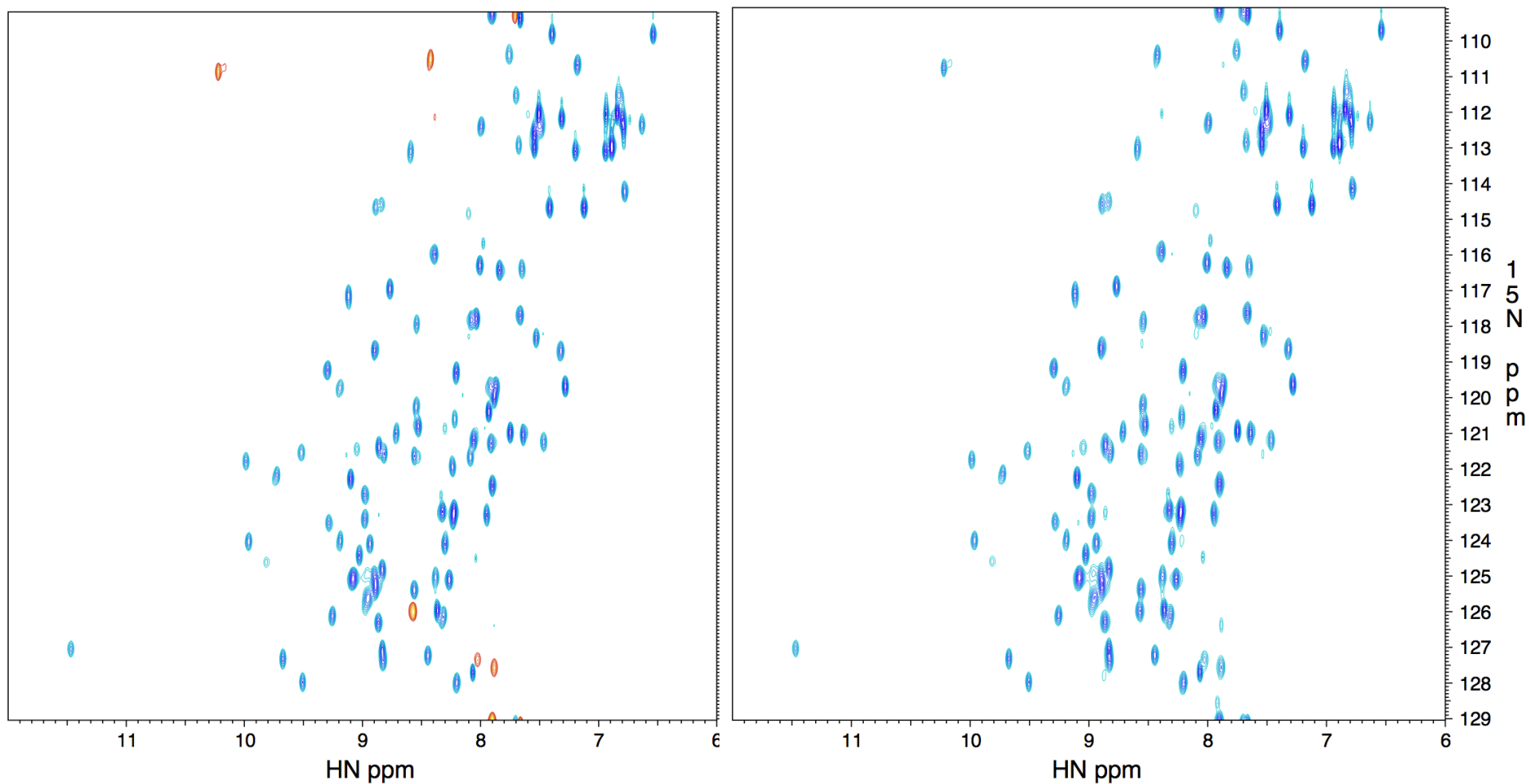
直接測定軸の TD_2 を増やしたり、FID の観測時間を延ばしても測定時間はほとんど同じ。

信号が速く緩和する場合は観測時間を長くするほど感度は落ちる。



分子量が大きい時は FID を短めにする
(or プロセス時に window 関数で FID を絞る)。

Spectra 画面 (Topspin, BrukerBioSpin)

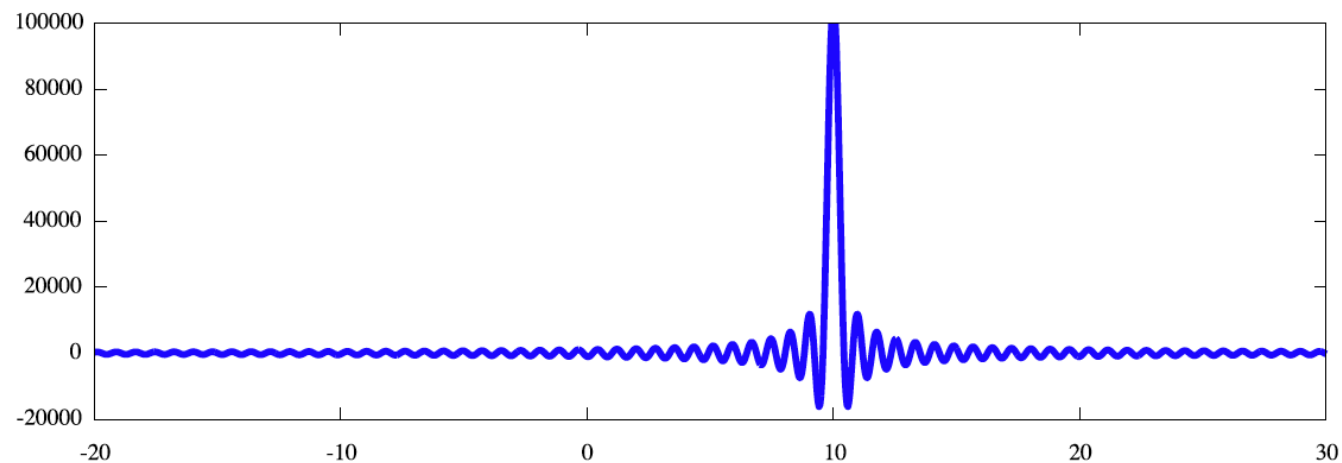
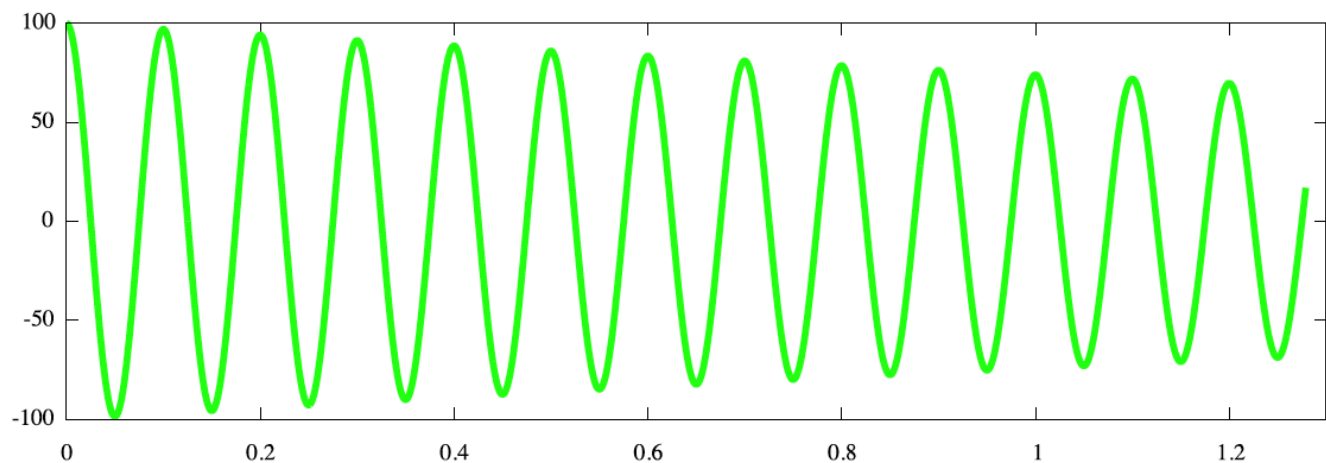


t_1 の初期値を $\Delta t_1/2$ に設定すると 折り返ったピークは負となるので分かり易い。また スペクトル幅を少しだけ変えて測定してもよい。

(注) 中心周波数をずらしても、どれが折り返ったピークか判らない。。。

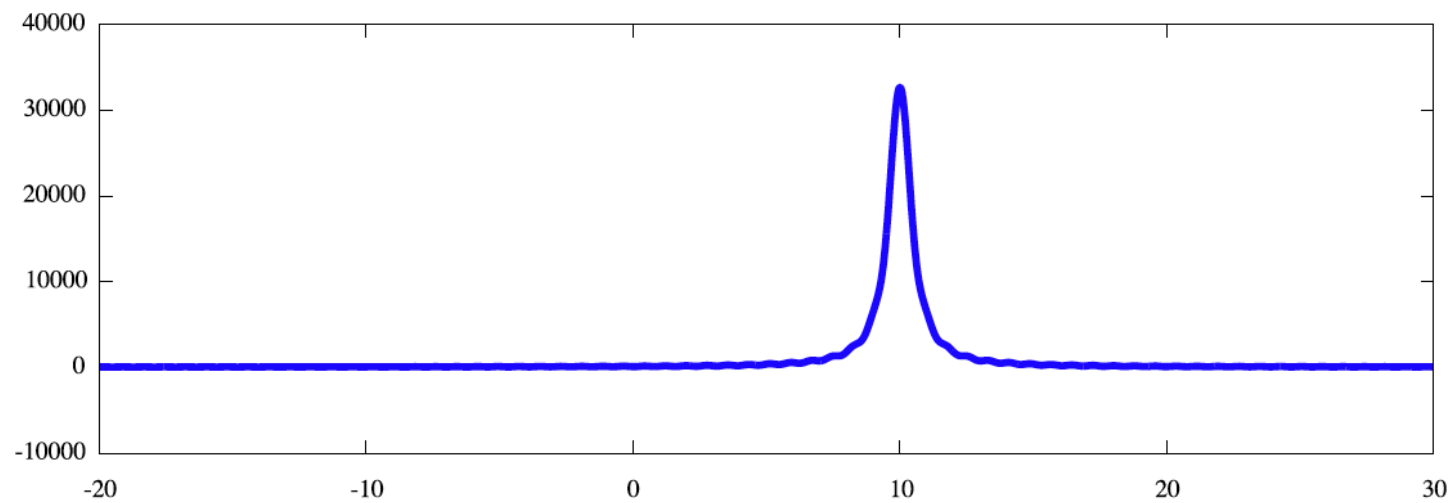
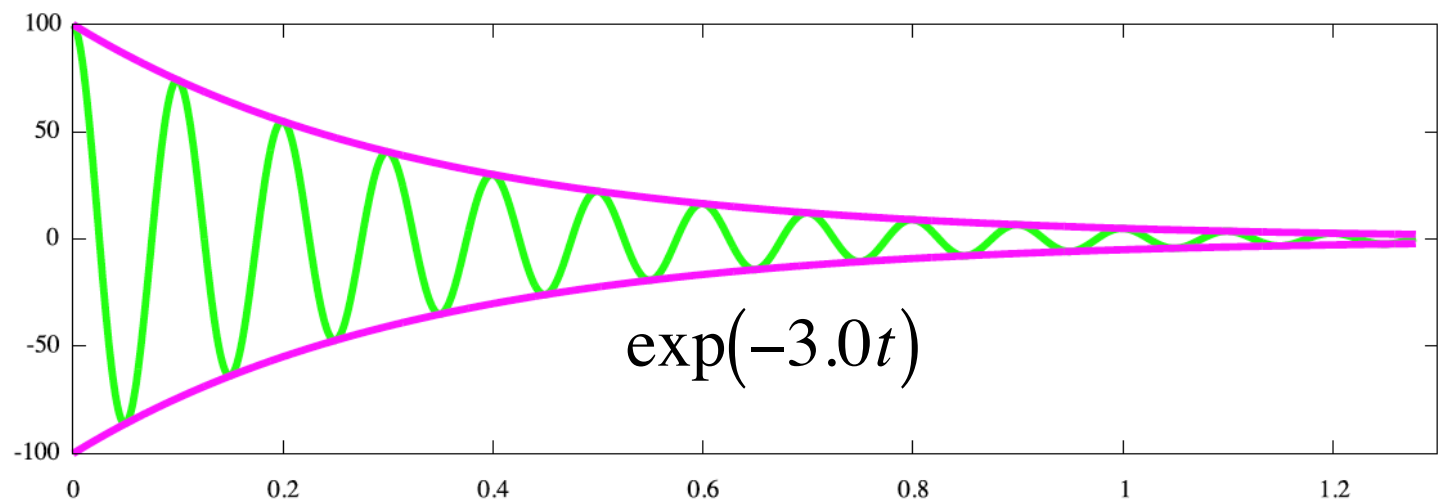
Window 関数の適用

FID の右端に値が残っていると ...



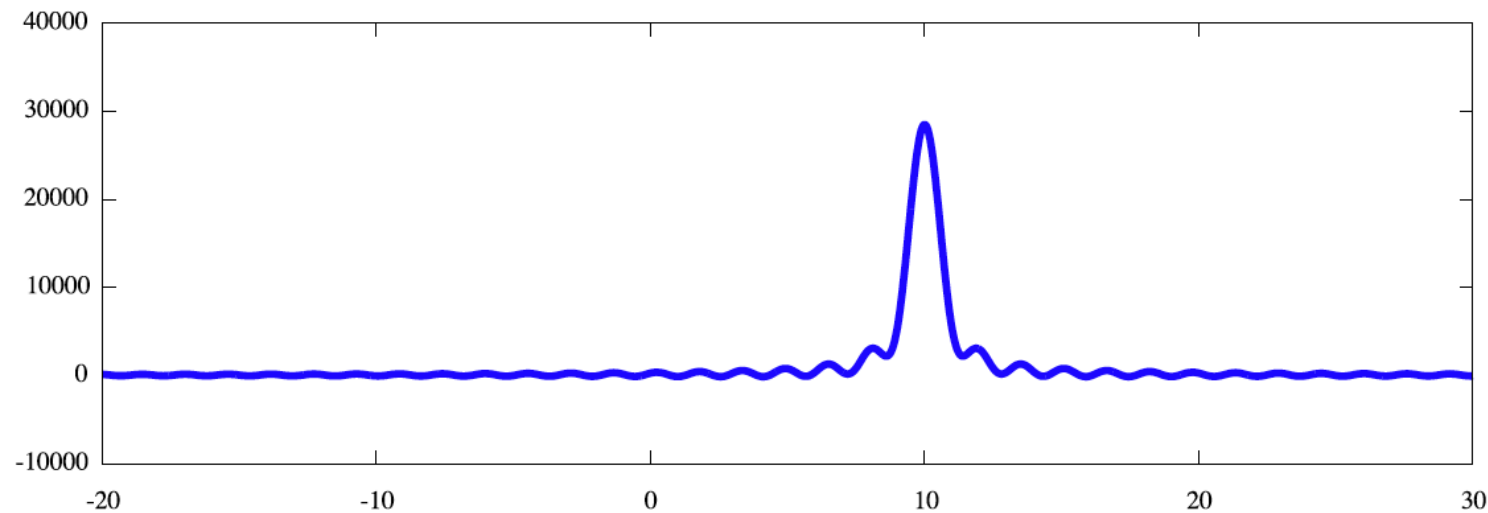
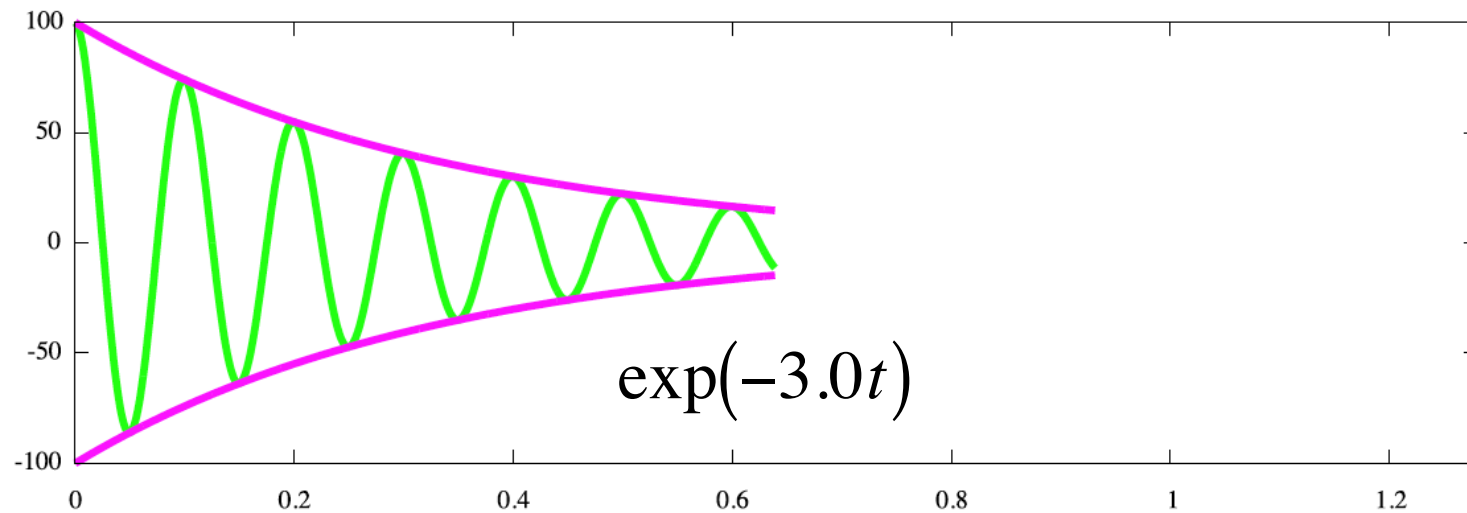
フーリエ変換後に wiggle (波) が出てしまう。

FID の終端が0になるように整形すると ...



フーリエ変換後の wiggle (波) は消える。

FID の長さを半分にして、同じ window をかけると ...



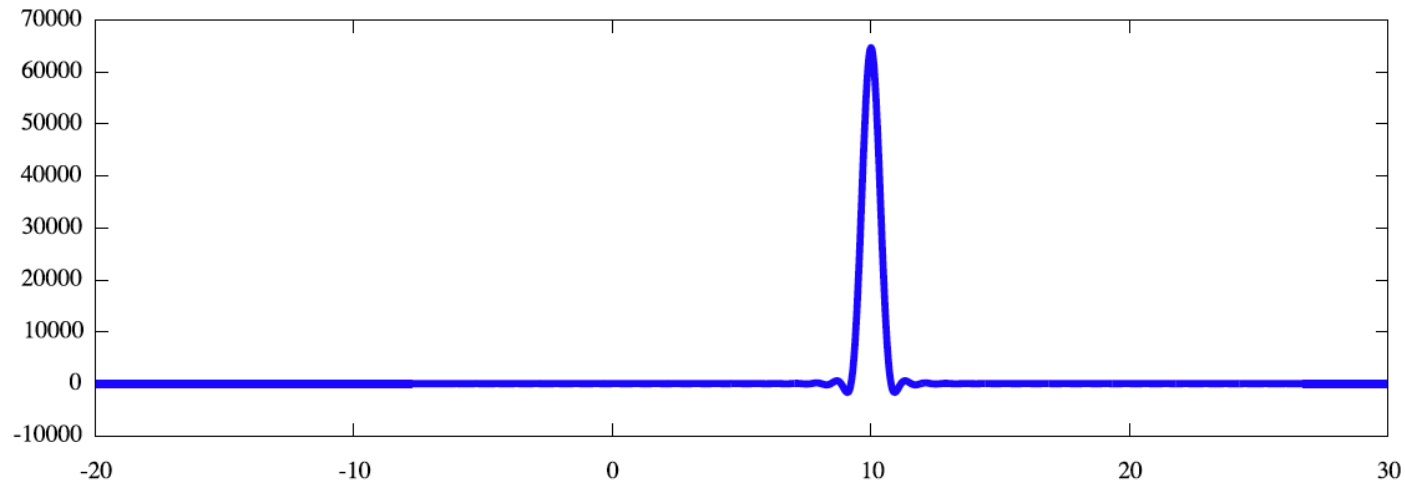
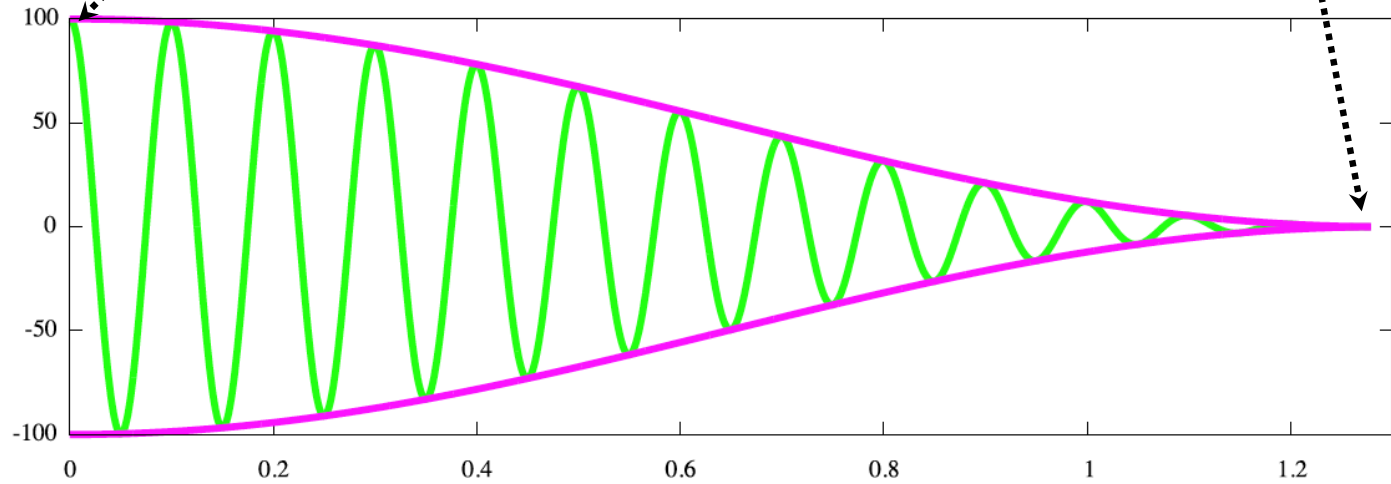
再び wiggle (波)が出てしまう。

Exp window 関数は FID の長さに応じて調整が必要

\cos^2 window 関数はなかなか便利

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

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



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

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

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

電力 (ワット, W) は、電圧 (ボルト, V) の二乗に比例する。

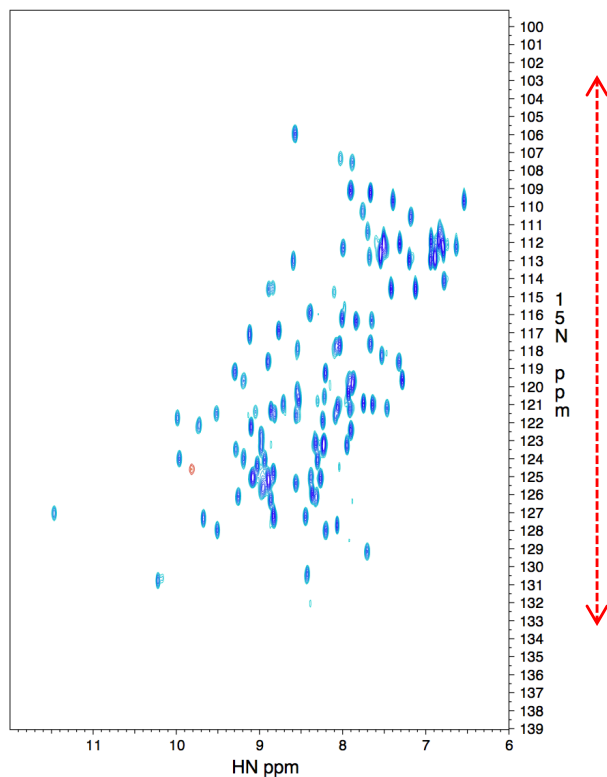
0.1 W	=	10	dB
1 W	=	0	dB
10 W	=	-10	dB
100 W	=	-20	dB
200 W	=	-23	dB
400 W	=	-26	dB



RF-磁場強度 (V, パルス長から計算) が半分になれば 6 dB 足す。
電力パワー (W) が半分になれば 3 dB 足す。



Decoupling の 90° パルス長は幾らに？ - ¹⁵N 編 -



¹⁵N saturation の範囲

= 118 ± 16 ppm

→ 32 ppm * 600MHz * 0.1013

= 1,945 Hz

WALTZ-16 の figure of merit : 1.8

→ RF-field : 1,945/1.8 = 1,081 Hz

→ 10⁶/1,081/4 = 231 μs (@ 90°)

GARP-4 の figure of merit : 4.8

→ RF-field : 1,945/4.8 = 405 Hz

→ 10⁶/405/4 = 617 μs (@ 90°)

あまり長くし過ぎるとサイドバンドが入ってきてしまう。

2D ^1H - ^{15}N HSQC の測定用のパラメータの設定

FHSQC (Mori, S. *et al.* (1995)
J. Magn. Reson. B108, 94.

States-TPPI が今は一般的

**FID の長さ (50-90 ms)
 ^1H のスペクトル幅を狭め
すぎないように (^{15}N -
decoupling パルスのプ
ローブへの負担大)。**

**^{15}N 核スピンの T_2 緩和
を考慮する。**

**ダイナミックレンジが大
きい場合には、小さめの
値でも感度よく測定でき
る (溶媒が RG を超えて
しまわないように注意)。**

EDA 画面 (Topspin, BrukerBioSpin)

	F2	F1	Frequency axis
Experiment			
PULPROG	fhscqf3gpqh	...	Current pulse program
AQ_mod	DQD		Acquisition mode
FnTYPE	traditional(planes)		nD acquisition mode for 3D etc.
FnMODE		States-TPPI	Acquisition mode for 2D, 3D etc.
TD	2048	256	Size of fid
DS	64		Number of dummy scans
NS	32		Number of scans
TD0	1		Loop count for 'td0'
TDav	0		Average loop counter for nD experiments
Width			
SW [ppm]	16.0210	31.8631	Spectral width
SWH [Hz]	12820.513	2583.979	Spectral width
IN_F [μsec]		387.00	Increment for delay
AQ [sec]	0.0798720	0.0495360	Acquisition time
FIDRES [Hz]	12.520032	20.187338	Fid resolution
FW [Hz]	125000.000		Filter width
Receiver			
RG	64		Receiver gain
DW [μsec]	39.000		Dwell time
DWOV [μsec]	0.025		Oversampling dwell time
DECIM	1560		Decimation rate of digital filter
DSPFIRM	sharp(standard)		DSP firmware filter
DIGTYP	DRU		Digitizer type
DIGMOD	digital		Digitization mode
DR	22		Digitizer resolution
DDR	10		Digital digitizer resolution
DE [μsec]	12.50		Pre-scan delay
NBL	1		Number of blocks (of acquisition memory)

NUC1	1H	<input type="button" value="Edit..."/>	15N	Observe nucleus
O1 [Hz]	<input type="text" value="3761.08"/>		<input type="text" value="9649.31"/>	Transmitter frequency offset
O1P [ppm]	<input type="text" value="4.700"/>		<input type="text" value="119.000"/>	Transmitter frequency offset
SFO1 [MHz]	800.2337611		81.0962513	Transmitter frequency
BF1 [MHz]	800.2300000		81.0866020	Basic transmitter frequency

NUC2	13C	<input type="button" value="Edit..."/>		2nd nucleus
O2 [Hz]	<input type="text" value="22737.63"/>			Frequency offset of 2nd nucleus
O2P [ppm]	<input type="text" value="113.000"/>			Frequency offset of 2nd nucleus
SFO2 [MHz]	201.2407316			Frequency of 2nd nucleus
BF2 [MHz]	201.2179940			Basic frequency of 2nd nucleus

NUC3	15N	<input type="button" value="Edit..."/>		3rd nucleus
O3 [Hz]	<input type="text" value="9649.31"/>			Frequency offset of 3rd nucleus
O3P [ppm]	<input type="text" value="119.000"/>			Frequency offset of 3rd nucleus
SFO3 [MHz]	81.0962513			Frequency of 3rd nucleus
BF3 [MHz]	81.0866020			Basic frequency of 3rd nucleus

L	<input type="button" value="Edit..."/>	Loop counter
CNST	<input type="button" value="Edit..."/>	Constant used in pulse programs
CPDPRG	<input type="button" value="Edit..."/>	Composite pulse decoupling program (cpd)
PHCOR [degree]	<input type="button" value="Edit..."/>	Correction angle for phase program
SUBNAM	<input type="button" value="Edit..."/>	Name of subroutine
ZGOPTNS	<input type="text" value="-DLABEL_CN"/>	Acquisition (zg) options

本来は温度に応じて D₂O
 ロックの共鳴周波数はずれて
 いくはずであるが、マシンに
 よっては常に 4.7ppm とし
 て固定されている場合がある。
 その場合は、フーリエ変換の
 後に ppm (Hz) 値をずらし
 て補正する。

Wurst, Chirp などの断熱パ
 ルス 1 個を使って、¹³C_α,
¹³Co の両方を ¹⁵N からデ
 カップルする場合には、その
 中心である 113ppm にパル
 ス中心を置く。

¹³C_α, ¹³Co デカップル用 π パルスを打つかどうかを選択する。

プロセス用のパラメータの設定

	F2	F1	Frequency axis
Reference			
SI	2048	512	Size of real spectrum
SF [MHz]	800.2300000	81.0866020	Spectrometer frequency
OFFSET [ppm]	12.71052	134.93350	Low field limit of spectrum
SR [Hz]	0	0	Spectrum reference frequency
HZpPT [Hz]	6.260016	5.046834	Spectral resolution
SPECTYP	UNDEFINED		Type of spectrum e.g. COSY, HMQC, ...
Window function			
WDW	QSINE	QSINE	Window functions for trf, xfb,...
LB [Hz]	0.30	0.30	Line broadening for em
GB	0	0.1	Gaussian max. position for gm, 0<GB<1
SSB	2	2	Sine bell shift SSB (0,1,2,..)
TM1	0	0.1	Left limit for tm 0<TM1<1
TM2	0	0.9	Right limit for tm 0<TM2<1
Phase correction			
PHC0 [degrees]	-158.800	0	0th order correction for pk
PHC1 [degrees]	0	0	1st order correction for pk
PH_mod	pk	pk	Phasing modes for trf, xfb, ...

直接測定軸とは異なり間接測定軸はサンプリング数が少ないため、十分な 0-fill を施すことによって、線形が滑らかになる。半値幅は変わらない。

DSS などの標準物質を使って ppm 値を校正する。

SSB=2, qsin と設定することによって、単純な \cos^2 の窓関数となる。

t_1 の初期値が 0 になるように設定されている場合は $ph0=0$, $ph1=0$ となる。一方、初期値が $\Delta t_1/2$ に設定されている場合は $ph0=90$, $ph1=-180$ となる (よって、折り返ったピークは負となる)。

Baseline correction

ABSG	5	5	Degree of polynomial for absf (0..5)
ABSF1 [ppm]	12.00000	1000.00000	Left limit for absf
ABSF2 [ppm]	6.00000	-1000.00000	Right limit for absf, abs1, abs2
BCFW [ppm]	1.00000	1.00000	Filter width for bc (sfil/qfil)
COROFFS [Hz]	0	0	Correction offset for BC_MOD=sapol etc.
BC_mod	qfil	no	Fid baseline modes for em, ft, xfb,...

Fourier transform

TDeff	0	0	Number of fid data points used by ft
STSR	0	0	First output point of strip transform
STSI	0	0	Total number of output points of strip transform
ME_mod	no	LPfc	Linear prediction for ft, xfb, ...
NCOEF	0	32	Number of LP coefficients
LPBIN	0	0	Number of output points for LP
TDoff	0	0	Number of back-predicted points
REVERSE	FALSE	FALSE	Reverse spectrum during transform
FCOR	0.5	0.5	Weighting factor for first fid point
PKNL	TRUE		Group delay compensation
FT_mod	fqc	fqc	Fourier transform mode for trf, xtrf*
MC2		States-TPPI	Acquisition mode (FnMODE) for 2D, 3D, etc.

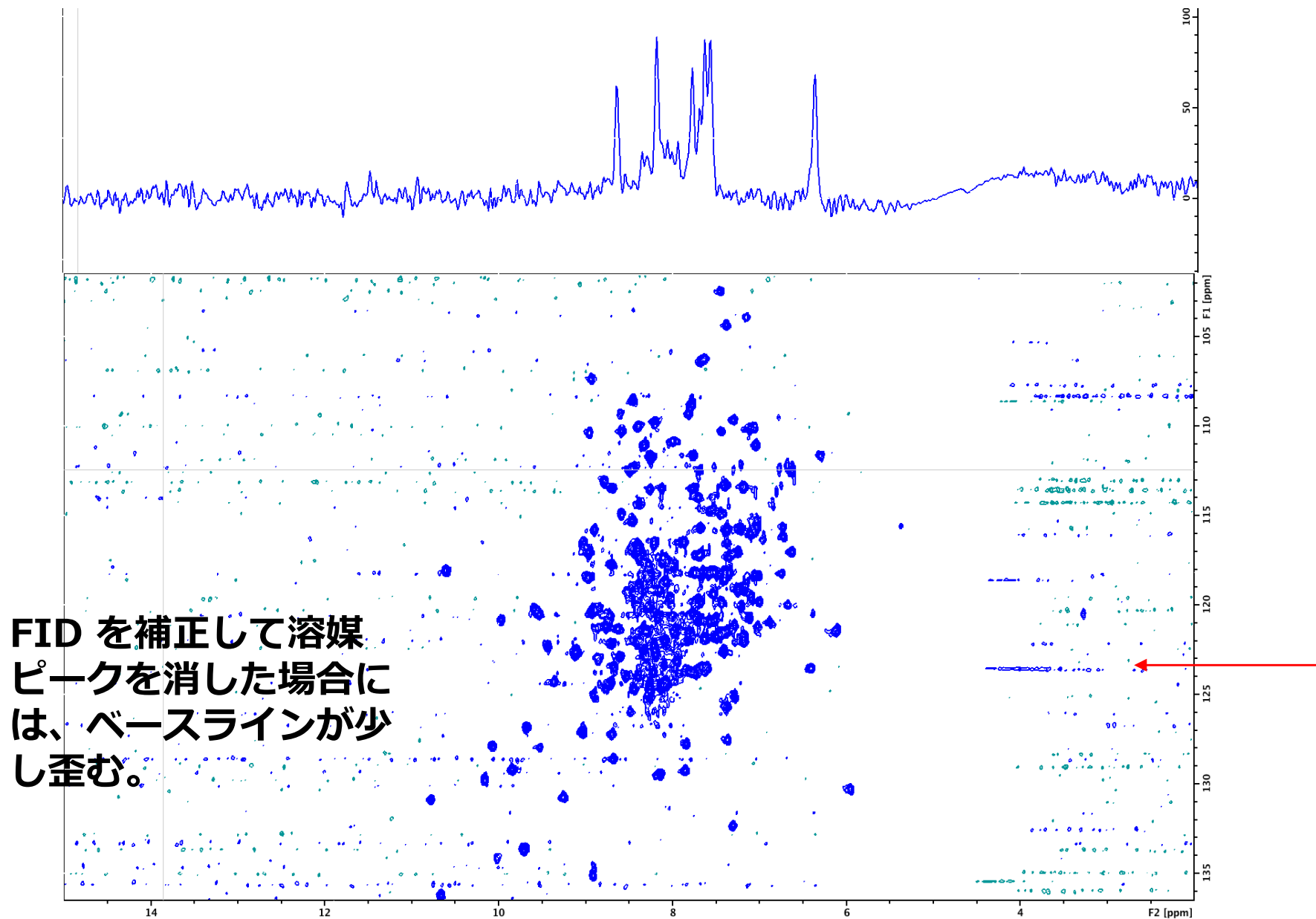
FT 前の FID に施す溶媒ピーク消しは、FT 後のスペクトルへのベースライン補正がうまく行かなかった場合に試してみるとよい。

間接測定軸へのベースライン補正が必要となった場合は、測定が間違えていないかを確認する。

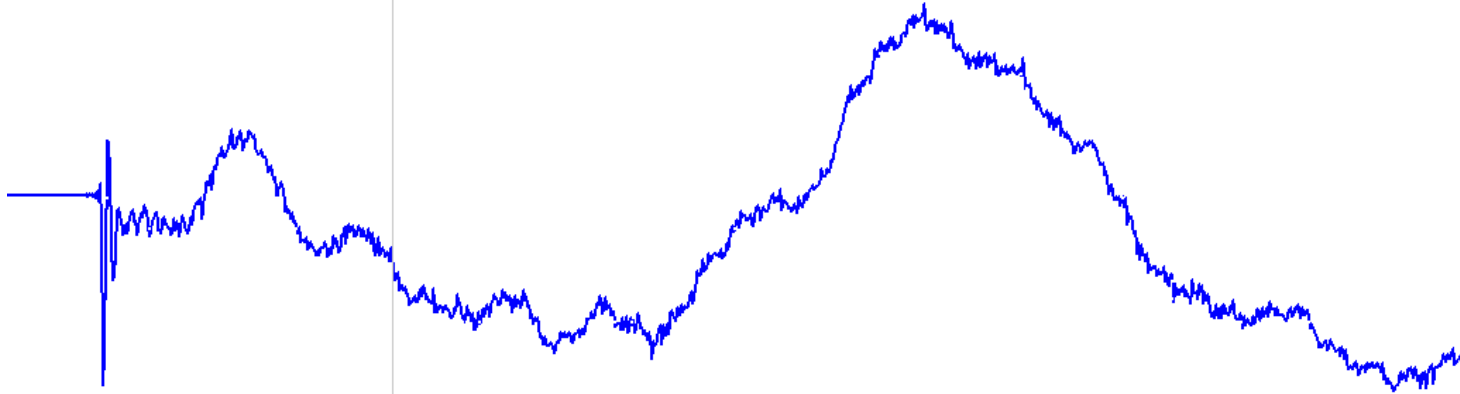
間接測定軸の観測時間が短い場合には、線形予測 (LP) をかけるのもよい。NMRPipe の NUS-Zero-Fill が強力。

t_1 の初期値が 0 になるように設定されている場合は最初のポイントを半分にする。一方、初期値が $\Delta t_1/2$ に設定されている場合はそのまま (FCOR=1)。

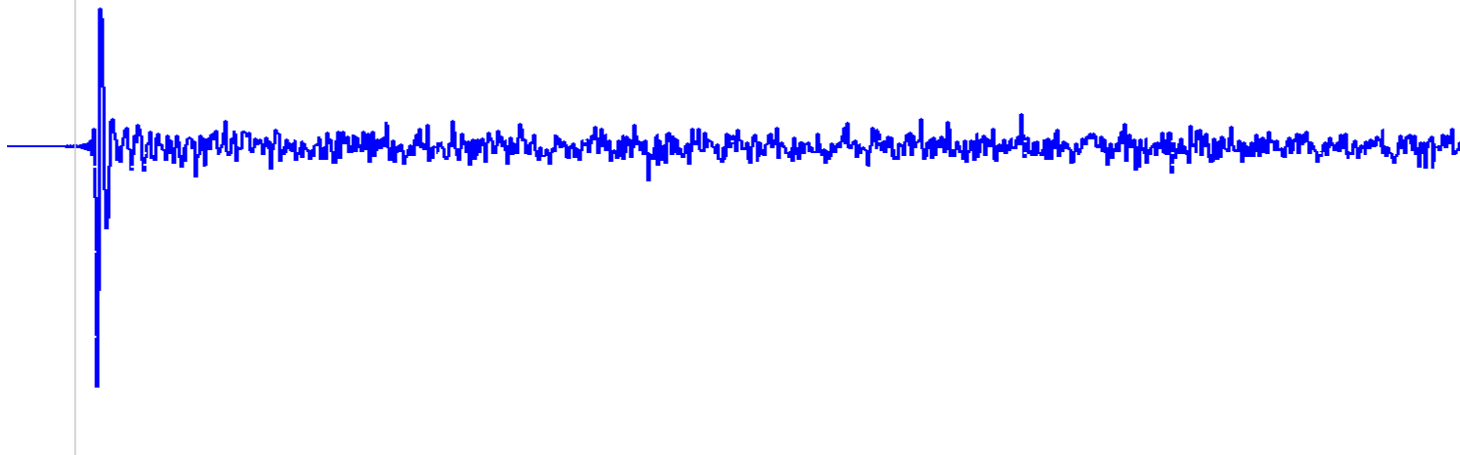
FID に ガウシアンフィルター (*qfil*, 1ppm) をかけてみる。



FID に ガウシアンフィルター (*qfil*, 1ppm) をかけてみる。

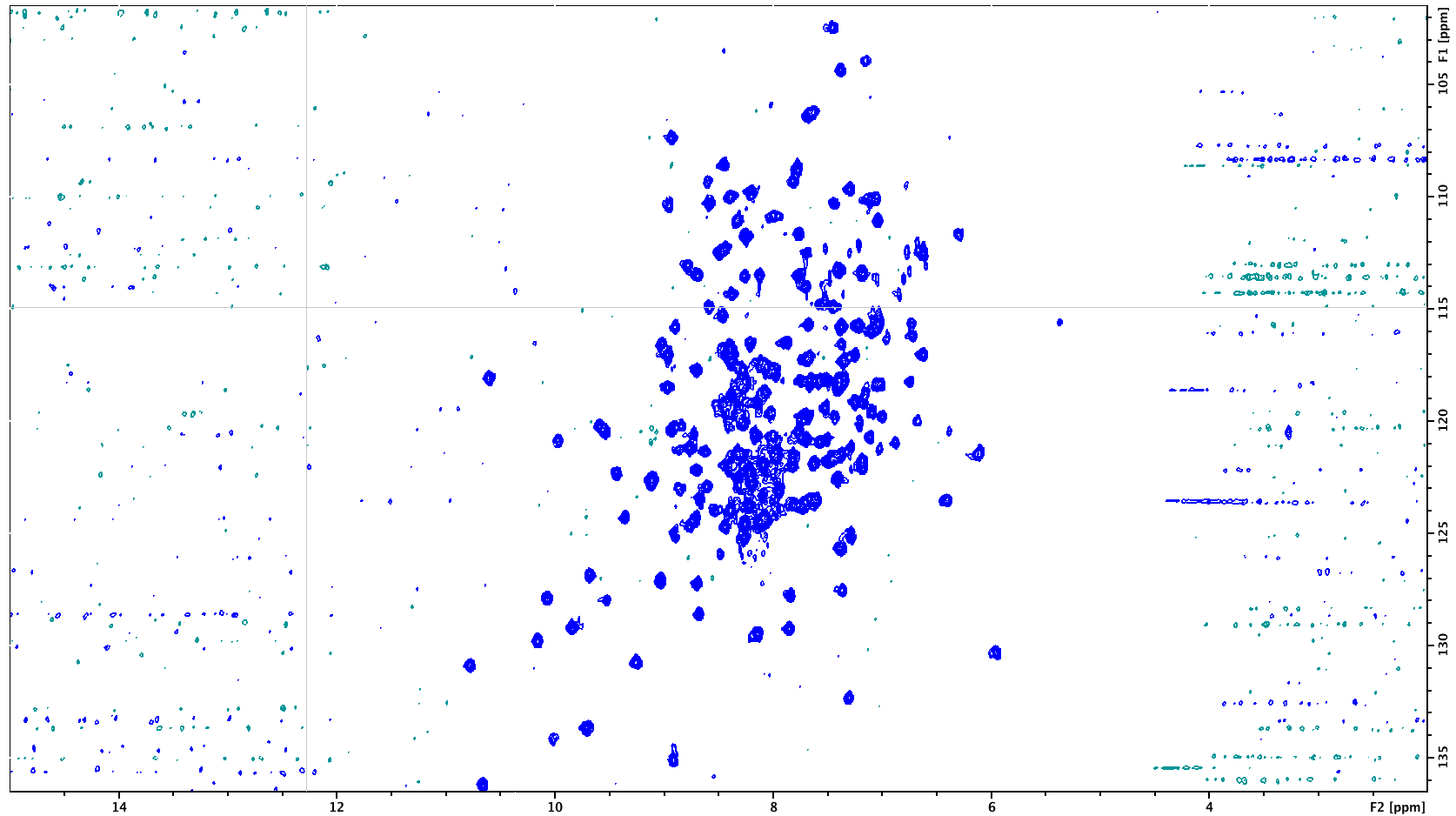


低い周波数を消し、高い周波数のみを残す high-pass filter である。



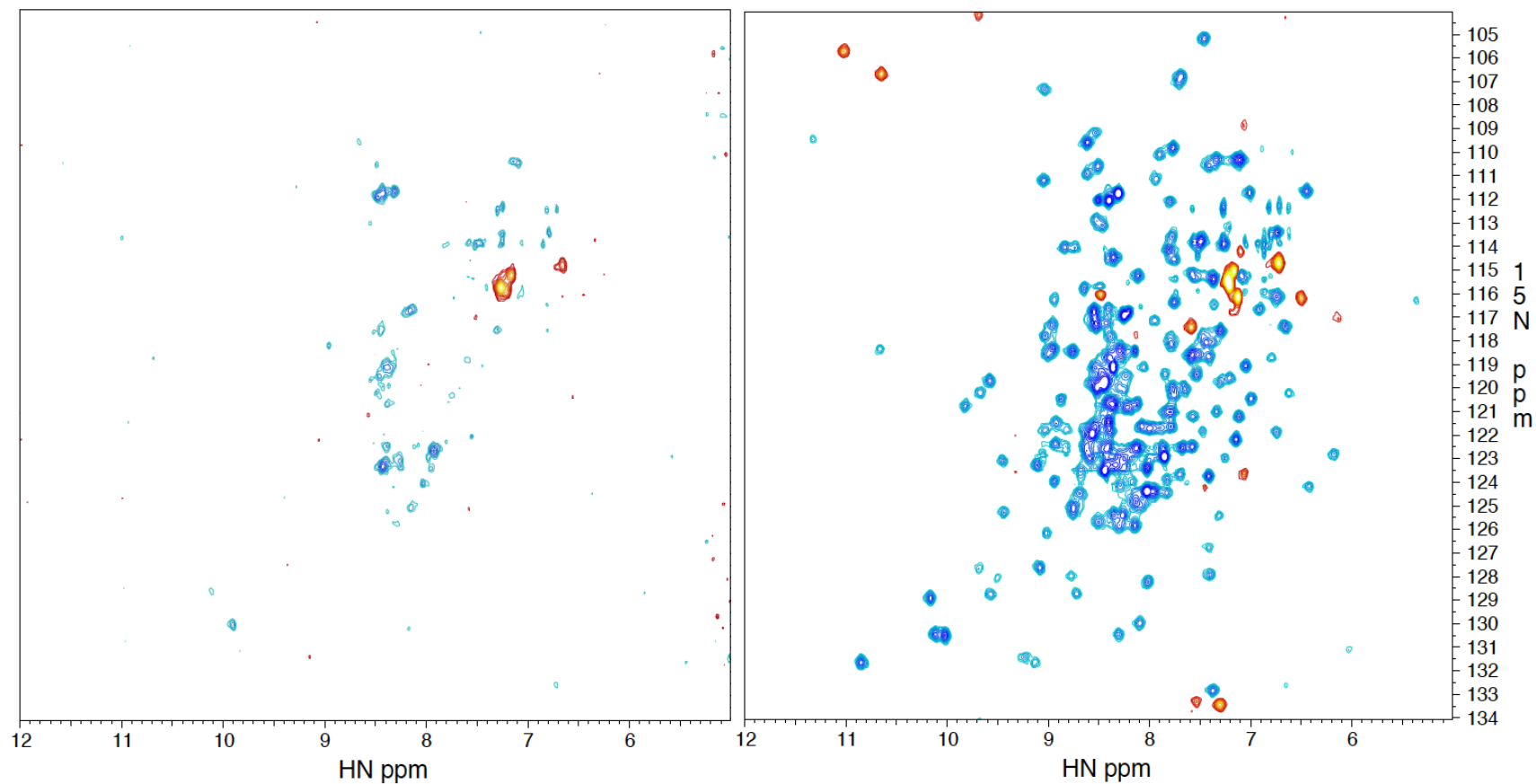
→ スペクトル中心の大きなピークを除く。

さらに 5.5~12.0 ppm で多項式補正 (次数: 5) をかけた。



ベースラインがまっすぐにならない場合には、FID への補正をやめたり、作用させるスペクトル幅を変えてみる。

こうなってしまうと NMR だけの力ではどうしようもない。。。。



pH 6.0

pH 4.0

蛋白質どうしのかすかな（非特異的な）凝集が化学シフト値を平均化し、 R_{ex} を増大させてしまう。

● 謝 辞

- ブルカー・バイオスピン株式会社

堤様には数多くの Topspin の画像を使わせていただきました。

- 日本電子株式会社

NMR 学会誌「NMR のハードウェアに関するメモ」（根本暢明様の連載）を多いに参考にさせていただきました。

- NMR 共用プラットフォーム

いつも NMR マシンを最高の状態に調整していただいています。

- 北海道大学オープンコースウェア
出村先生、相沢先生、大貫様