

Návod pro NMR měření na Varian Inova 400 MHz

Obecný postup

1. Překontrolovat zapojenou sondu
2. Vložit vzorek
3. Nastavit teplotu
4. Ladění sondy - tune a match
5. Lockování a optimalizace homogenity pole - lock a shim
6. Vlastní měření (kalibrace pulsů)

Sondy

1. ASW sonda ve 4-jaderném módu
Lze měřit jen 1H, 19F, 13C a 31P. POZOR: sonda se neladí! (tj. nedělá se tune a match)
Rozsah teplot: -80°C až +130°C
z-Gradient: ANO
2. ID-PFG, sonda pro nepřímou detekci a 2D experimenty
Lze měřit 1H (největší citlivost), druhý kanál laditelný v rozsahu
Rozsah teplot: 0°C až +50°C
z-Gradient: ANO
3. BB-SW 5 mm, širokopásmová sonda
Lze měřit jádra s frekvencemi od 31P (161.9 MHz) do 15N (40.5 MHz), druhý kanál je 1H
Rozsah teplot: -150°C až +200°C
z-Gradient: NE
4. BB-SW 10 mm, širokopásmová sonda na velké 10 mm kyvety
Lze měřit jádra s frekvencemi od 31P (161.9 MHz) do 15N (40.5 MHz), druhý kanál je 1H
Rozsah teplot: -150°C až +200°C
z-Gradient: NE

Zapojení sondy

- Vyndat vzorek (příkazy e a i; záložka Start, panel Standard: Eject a Insert)
- Vypnout regulaci teploty (záložka Start, panel Spin/Temp: Temp off)
- Odpojit kabely a hadice
- Odšroubovat sondu a vysunout, uložit do skříně
- Zasunout druhou sondu, přišroubovat, přitlačit upper barrel
- Zapojit kabely a hadice
- Definovat zapojenou sondu ve Vnmrj (dolní lišta: Probe, vybrat z menu Select Probe)
- Resetovat ovládání regulace teploty, nastavit požadovanou teplotu (záložka Start, panel Spin/Temp: Reset VT, počkat na info o skončení na dolní liště, pak Regulate Temp)

Vkládání vzorku

- zasunout kyvetu do rotorku
- aktivovat vysunutí vzorku (pustit vzduch): příkaz e; záložka Start, panel Standard: Eject
- uložit rotorek se vzorkem do upper barrelu - ujistit se, že drží nahoře, až pak pustit rotorek
- aktivovat zasunutí vzorku: příkaz i; záložka Start, panel Standard: Insert

Ladění sondy

- Ladění nahrubo pomocí qtune
 - zapojit kabel příslušného kanálu od sondy (1H nebo X) k Tune Interface – Probe (vlevo dole u magnetu, zepředu)
 - spustit qtune: příkaz qtune; dolní lišta: Probe, Tune sweep
 - vybrat jádro ze seznamu nebo zadat požadovanou frekvenci: záložka Start, panel Probe tune, menu Select center frequency nebo políčko vedle
 - nastavit rozsah pro zobrazení ladící křivky (wobble curve): položka Span (40 MHz při hledání nového jádra, postupně zjemnit na 10 nebo 5 MHz)
 - nastavit položky Power a Gain na 30 (pro některá jádra a sondy lze power zvýšit na 35)
 - Start Probe Tune (zobrazí se ladící křivka), Autoscale (optimalizuje zobrazení)
 - Otáčením Tune kolíku na sondě hledat minimum ladící křivky - pomocný ukazatel je hodnota čítače na sondě (viz tabulka na sondě), otáčením Match kolíku se minimum prohlubuje. Tune a Match jsou na sobě závislé, nastavování je třeba kombinovat a opakovat
 - Zúžit rozsah ladící křivky (Span) na 5 MHz a nastavit Tune a Match na sondě tak, aby minimum křivky bylo uprostřed a bylo co nejhlubší (až na dno)
 - Stop tune, Quit qtune
 - přepojit kabel od sondy zpátky dozadu na magnet leg (na správné místo!)
- Jemné ladění na magnet leg
 - připravit experiment s definovanými jádry pro oba kanály (transmitter a decoupler), poslat konfiguraci spektrometru - příkaz su, kontrola frekvencí přiřazených kanálům 1 a 2 - příkaz spcfrq (výstup: záložka Process, panel Text Output)
 - zapojit kabel příslušného kanálu od sondy (1H nebo X) k Tune Interface – Probe (vlevo dole u magnetu, zepředu)
 - nastavit čítač CHAN na příslušnou hodnotu (číslo kanálu shodné s výstupem příkazu spcfrq)
 - Otáčením Tune a Match kolíků nastavit minimální hodnotu na displeji magnet leg. Obecný postup: pomocí Match minimalizovat a zapamatovat si hodnotu na displeji, otočit Tune kousek jedním směrem, minimalizovat pomocí Match; je-li nová hodnota menší než předchozí, otočit Tune stejným směrem, je-li vyšší, otáčet Tune na druhou stranu. Opakováním lze dosáhnout hodnoty pod 10 (i pod 5)
 - Nastavit CHAN zpět na 0, přepojit kabel od sondy zpátky dozadu na magnet leg (na správné místo!)

Lockování

Slouží k udržení časové stability magnetického pole, sleduje se signál deuteria v rozpouštědle.

Ručně: záložka Start, panel Lock

- Nahrát si aktuální shimy pro danou sondu: příkaz rts('jmeno_souboru'); menu File-Open- /home/vnmr1/vnmrsys/shims/...
- Nastavit lock Power, Gain a Phase na rozumné hodnoty - viz tabulka, případně je lze měnit během hledání z0 v následujícím bodu.
- Nastavit Lock Off (chceme Status: off), aktivovat Lock Scan (zobrazí FID signálu deuteria) a měnit Z0 s cílem nastavit signál deuteria on resonance, tj. FID ztratí oscilace a je v podstatě jen rovná čára. Směr změny Z0 určíme podle prodlužování (správně) nebo zkracování (špatně) periody oscilací FIDu.
- Máme hotovo, deaktivovat Lock Scan, aktivovat Lock On (chceme Status: Regulated) a optimalizovat lock Phase - maximalizovat hodnotu Lock Level. Případně upravit lock Power a Gain, aby hodnota locku byla 25-30 (ale moc na tom nezáleží).

Automaticky: záložka Start, panel Lock

- Kliknout na Find z0 a počkat, až vše doběhne (spektrometr změří deuteriové spektrum a v něm najde pozici maxima, tu pak přepočítá na z0). Překontrolovat výsledek. Optimalizovat lock Phase, případně lock Power a Gain.

Optimalizace homogenity pole - shim

Homogenita pole se dostavuje změnami proudu v shimovacích cívkách, které vytvářejí gradient magnetického pole určitého tvaru a směru. Pro dostavování homogenity ve směrech x a y (a odvozených) je nutné vypnout rotaci vzorku! Je dobré kontrolovat vzhled ¹H spektra a zhodnotit, zda shimování již postačuje (lze shimovat minuty, hodiny, ...). Hodnoty shimů lze uložit na disk příkazem svcs('jmeno_souboru') a znovu nahrát příkazem rts('jmeno_souboru').

Ručně: záložka Start, panel Shim

- měnit Z1 tak, aby se maximalizoval Lock Level (zobrazený též jako budík), pak měnit Z2 a maximalizovat Lock Level
- vrátit se k Z1 a vše opakovat, dokud hodnota locku roste
- zkusit měnit postupně X, Y, XZ a YZ - vždy maximalizovat Lock Level
- vrátit se zpátky k Z1 a Z2, vše opakovat, dokud hodnota locku roste (lze měnit i vyšší řády, mají ale menší význam a netriviální projevy ve spektrech)

Automaticky - lze využít jen na sondách se z-gradientem a jen pro shimy v ose z!

- nastavit experiment gradientního shimování: příkaz gmapz
- záložka Acquire, panel Defaults : nastavit relaxační periodu (Relaxation Delay) a počet skenů (Numbr of Scans) podle rozpouštědla
- záložka Acquire, panel Gradient Shim : nastavit aktuální shimovací mapu pro danou sondu přes menu Load map, nastavit vyhodnocovací okno Window Size (lze přesně změřit pomocí Find Window)- viz tabulka
- záložka Acquire, panel Gradient Shim : spustit shimovací protokol Gradient Autoshim on Z. Provádí se 5 iterací, kontrolovat chybu fitu, aby byla pod 1 v záložka Process, panel Text Output.
- Možno ručně donastavit optimální hodnoty pro x, y, xz a yz a znovu spustit gradientní shimování.

Probíhá měření deuteriového spektra v přítomnosti lineárního gradientu magnetického pole (proto široké spektrum s rohy, důkazem to nelinearity z-gradientu sondy). V daném vyhodnocovacím okně se diferenční fáze spekter převede na informaci o lokálním magnetickém poli, to se pak fituje závislostmi ze shimovací mapy (mapa dává do souvislosti proud v příslušné shimovací cívce a změnu lokálního magnetického pole)

Rotace vzorku

Spin/Temp panel - Regulate speed. Doporučená hodnota frekvence otáčení je 20 Hz.

Měření ¹H experimentu

- Nastavení: hlavní menu Experiments - Proton; nahrát starý experiment; nahrát parametry z /home/vnmr1/vnmrsys/parlib/Proton_(sonda)
- Definovat rozpouštědlo v záložce Start, panel Standard, menu Solvent (*důležité pro automatické hrubé referencování spektra*).
- Napsat vlastní komentář pro identifikaci měření (název vzorku atp) v záložce Start, panel Standard, položka Comment

Důležité parametry pro měření

tn	měřené jádro, má být H1
tpwr	transmitter power, výkon pulsu, jiný pro každou sondu, obvykle 52 až 56
pw	délka excitačního pulsu, kalibrace viz tabulka, používají se snížené hodnoty pro optimalizaci relaxační prodlevy
d1	relaxační prodleva mezi opakovanými měřeními. Musí být dostatečně dlouhá, aby nedocházelo ke zkreslení integrálů (5 s je dobrý odhad, pro methyly ale i 30s)
tof	transmitter offset definuje střed spektra. Nastavení: kurzor ve spektru nastavit na požadované místo, pak příkaz movetof
sw	spektrální šířka
np	počet bodů fidu, určuje spolu s sw jeho délku (např. 32000)
at	délka fidu v sekundách, akviziční doba (lze přičíst k d1 při nastavování optimální relaxační prodlevy)
nt	počet opakování měření pro zvýšení poměru signál-šum, záleží na koncentraci vzorku
bs	počet opakování, po kterém se data (fid) zapíše na disk a lze si prohlédnout spektrum
gain	zesílení signálu fidu před detekcí. POZOR: nemělo by docházet k chybě "Receiver overflow", spektrum bude porušené

Důležité parametry pro zpracování

fn	počet bodů ve spektru, rozlišení lze navýšit doplněním fidu nulami
lb	line broadening, při potlačení šumu apodizací (za cenu rozšíření čar)

Důležité příkazy a manipulace

jexp2	přechod do příslušného „experimentu“ (experiment buffer directory), zde 2
go	odstartuje měření
aa	ukončí měření
wft	provede apodizaci a Fourierovu transformaci fidu na spektrum
aph	automatická fázová korekce.
ff	zobrazí celé spektrum
vsadj	optimalizuje vertikální škálu pro zobrazení nejintenzivnějšího signálu
rfr	reference na signál rozpouštědla (kurzor nastavit přibližně na střed signálu, na který

	referencujeme)
nl	kurzor poskočí na maximum nejbližší rezonance ve spektru
rl(2.7p)	reference aktuální polohy kurzoru (bude nastavena na 2.7 ppm)
th	pro nastavení hodnoty threshold
dpf	zobrazí posuvy signálů nad definovaným threshold
cz	zruší předchozí rozdělení integrační křivky
dpirn	zobrazí hodnoty integrálů
vp=12	nastaví vertikální pozici spektra na 12 jednotek, posun spektra nahoru po obrazovce
ds	zobrazí spektrum
df	zobrazí fid
dscale	zobrazí škálu, osu x
axis='h'	zobrazí škálu v Hz; možnosti jsou 'p' - ppm, 'h' - Hz, 'k' – kHz
bc	korekce baseline

Fázování

Automaticky: příkaz aph

Ručně: kliknout na ikonu fázování, kliknout v pravé části spektra a táhnutím myši sfázovat tuto oblast, pak kliknout v levé části spektra a stejně dotáhnout fázi i zde, kliknout ikonu pro ukončení (3 zelený čáry v trojúhelníku).

Referencování

Posadit kurzor na požadovanou pozici nebo využít příkaz nl. Pak příkaz rl(0p) nebo jakákoli jiná hodnota.

Vyhledání píků

Kliknout na ikonu , nastavit hodnotu threshold (horizontální čára) na minimální intenzitu píku (opětovně kliknutí na ikonu pro opuštění). Pak příkaz dpf.

Integrace

Kliknout na ikonu integrace, rozbalí se podnabídka a zobrazí se integrační čára. Příkaz cz zruší její dělení. Pokud integrační čára není rovná mezi signály, kliknout na ikonu a táhnutím myši korigovat. (ikona ukončení). Kliknout na ikonu a rozstříhat integrační čáru na jednotlivé integrály. Opakované klikání na ikonu vede k různým módům zobrazení. Příkaz dpirn zobrazí hodnoty integrálů, nastavení vp=12 posune spektrum nahoru. Kalibrace hodnot integrálů příkazem $ins=ins/(původní\ hodnota) \cdot (nová\ hodnota)$, znovu zobrazit spektrum (ds) a integrály (dpirn).

Korekce baseline

Nejprve definovat integrály přes signály ve spektru. Tím definujeme, které oblasti spektra se budou uvažovat ve fitování (oblasti signálů se vynechají). Pak příkaz bc.

Tisk spektra

Příkaz print, zodpovědět otázky a spektrum vyjede z tiskárny.

Záložka Process, panel Plot: postupně klikat Plot Spectrum, Plot Spectrum Scale, vybrat zobrazení

parametrů v Plot Parameter Templates (Basic), Plot Integral, Integral Values **Plot Normalized**, Plot Page. Jak to funguje: postupně naklikat co se má vytisknout, poslední je tlačítko Plot Page - odeslání na tiskárnu.

Pomocí příkazů: pl pscale pap pirn ppf pltext page

Pozn.: tisk do souboru lze provést např. příkazem page('soubor.ps'). Možnosti formátů zřejmě jen postscript.

Uložení spektra

Hlavní menu File, Save as

Kalibrace pulsu

- Vybrat si ze spektra signál, který ke kalibraci použijeme (rozpouštědlo není příliš vhodné, protože má obvykle dlouhou relaxační dobu). Nastavit offset na tento signál (viz parametr tof). Nastavit dlouhé d1, aby výsledek nebyl zkreslen neúplnou relaxací. Nastavit výkon pulsu tpwr.
- Vytvořit array pro parametr pw: hlavní menu Acquisition – Parameter arrays a vyplnit tabulku, nebo příkaz array a odpovědět na otázky, nebo zadat pw=2,4,6,8,10,12,14,16. Je vhodné kalibrovat 180° nebo 360° puls, tomu uzpůsobit hodnoty v pw array.
- Změřit (go), zpracovat (wft), zobrazit jedno spektrum ze série příkazem ds, např. ds(5) zobrazí 5. spektrum. Sfázovat, zobrazit jen jeden pík, pro který kalibrujeme.
- Zobrazit všechna spektra v sérii příkazem dssh, příkaz dssl je očísluje, příkaz da vypíše položky v array (výstup v záložce Process, panel Text Output).
- Intenzita píku by měla opisovat sinusovou křivku v závislosti na délce pulsu pw, hledáme její průsečík s nulou, tj. 180° nebo 360° puls. Kalibrovaná délka 90° pulsu při daném výkonu tpwr je polovina, respektive ¼ z takto získaného času pw.

Měření 13C experimentu

Nastavení: hlavní menu Experiments - Carbon; nahrát starý experiment; nahrát parametry z /home/vnmr1/vnmrsys/parlib/Carbon_(sonda)

Důležité parametry stejné jako pro vodíky, ale navíc:

dn	jádro pro decoupler, má být H1
dof	offset pro decoupler, optimálně střed vodíkového spektra změřeného předem
dm	schema spuštění dekaplingu dle sekcí ABC pulsní sekvence (viz dps); dekaplovat vždy 'yyy', nedekaplovat 'nnn'
dpwr	výkon dekapleru dle tabulky (32-36dB)
dmm	dekaplovací program, pro vodíky 'w'

Dále je třeba nastavovat parametr dmf, to se ale lépe dělá přes záložku Acquire, panel Channels, políčko 90 Degree at Pwr – nastavit příslušnou délku 90° pulsu na dekaplovacím výkonu (dle tabulky)

Měření 19F experimentu

Nastavení: hlavní menu Experiments - Proton; nahrát starý experiment; nahrát parametry z /home/vnmr1/vnmrsys/parlib/Fluorine_(sonda)

Důležité parametry stejné jako pro vodíky. Musí být tn='F19'.

Měření 31P experimentu

Nastavení: hlavní menu Experiments - Proton; nahrát starý experiment; nahrát parametry z /home/vnmr1/vnmrsys/parlib/Phosphorus_(sonda)

Důležité parametry jako pro uhlík. Musí být tn='P31' a dn='H1'. Pro vypnutí vodíkového dekaplingu zadat dm='n'.

Měření 1D experimentu obecného izotopu

Lze vyjít z jakéhokoli 1D experimentu. Změnit jádro zadáním tn='Ga71'. Překontrolovat, že dn='H1', jinak to nic nenaměří. Naladit sondu. Používat tpwr maximálně 56-58. Kalibrovat délku pulsu pw. Nastavit spektrální šířku a offset podle dostupných informací o NMR daného jádra. Překontrolovat počet bodů a délku fidu, aby nedošlo k ořezání nebo zbytečnému měření šumu.

Měření DEPT experimentu

Dvourozměrná spektra

Doporučuje se vždy použít sondu PFG-ID

Nastavení: nahrát starý experiment; nahrát parametry z /home/vnmr1/vnmrsys/parlib/(navez)_(sonda); postup přes hlavní menu Experiments lze použít jen pokud víte, jak má sekvence vypadat.

Upravit d1, nt, gain, počet bodů v nepřímé doméně (ni). Příkaz time spočítá celkovou dobu měření. U heteronukleárních experimentů je důležité používat správný vodíkový puls. Proto se doporučuje provádět kalibraci pw pomocí 1D spektra pro každý vzorek.

Experiment COSY

Homonukleární korelace vodík-vodík, informace o J-interakcích přes 3 chemické vazby, tj. o sousedních vodících.

Výchozí parametry v home/vnmr1/vnmrsys/parlib/gCOSY_PFG_ID;

Experiment HSQC

Heteronukleární korelace např. uhlík-vodík, informace o J-interakcích přes jednu chem. vazbu, tj. o přímo vázaných vodících daného uhlíku. Složitější experiment, ale teoreticky lepší spektrum.

Výchozí parametry v home/vnmr1/vnmrsys/parlib/gHSQC_PFG_ID;

Experiment HMQC

Heteronukleární korelace např. uhlík-vodík, informace o J-interakcích přes jednu chem. vazbu, tj. o přímo vázaných vodících daného uhlíku. Jednodušší experiment, ale teoreticky horší spektrum.

Výchozí parametry v home/vnmr1/vnmrsys/parlib/gHMQC_PFG_ID;

Experiment HMBC

Heteronukleární korelace např. uhlík-vodík, informace o J-interakcích přes více než jednu chem. vazbu (2-3), tj. o vzdálenějších uhlících (např. i kvartérních, které nejsou v HSQC/HMQC).

Výchozí parametry v home/vnmr1/vnmrsys/parlib/gHMBC_PFG_ID;

Experiment NOESY

Homonukleární korelace vodík-vodík, informace o blízkosti v prostoru (nerozhoduje počet chem.

vazeb), možnost rozlišení diastereomerů, informace o prostorové struktuře.

Věnujte pozornost nastavení směšovacího času. Pro malé molekuly 0.5s až 1s, pro velké méně (0.2s)

Experiment ROESY

Homonukleární korelace vodík-vodík, informace o blízkosti v prostoru (nerozhoduje počet chem. vazeb), možnost rozlišení diastereomerů, informace o prostorové struktuře. Vhodné pro "středně velké" molekuly, pro které může být NOE efekt nulový z důvodu jejich relaxačních vlastností.

B1 = 2-3kHz, mix 0.3-0.5s

Experiment TOCSY

Homonukleární korelace vodík-vodík, informace o J-interakcích přes 3 chemické vazby, tj. o sousedních vodících. Krospíky vznikají mezi všemi vodíky v daném systému J-vazeb, vhodné pro identifikaci postranních řetězců.

mix 80-150ms, B1=4-8kHz (pro DIPSI-MLEV)

Zpracování 2D spekter