



Institute of Macromolecular Chemistry ASCR, v.v.i.
Heyrovského nám. 2
CZ-162 06 Praha 6
Czech Republic

**a . Základní postup při ovládnání NMR spektrometru
pevného stavu**

b. Nastavení a optimalizace základních parametrů

c. Zpracování spektra

Martina Urbanová a Jiří Brus

(Verze 1.2.-2011)

(neupravená a neúplná, za případné nedostatky se omlouváme a připomínky vítáme)

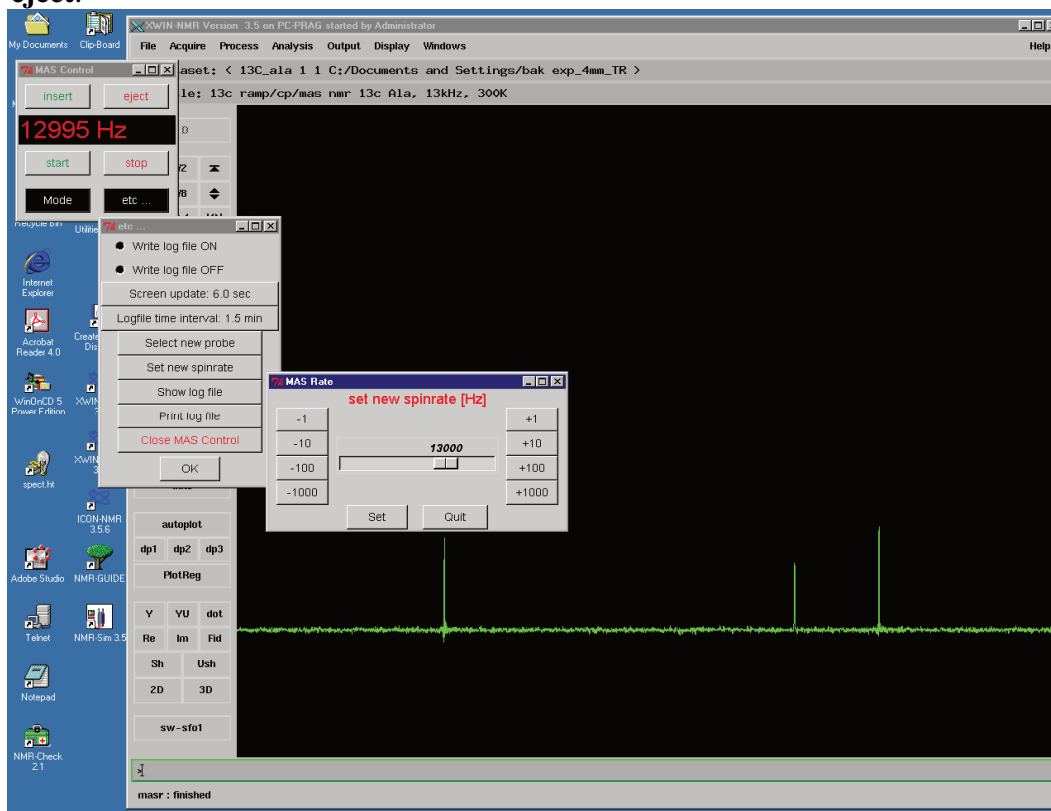
Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Heyrovského nám. 2, Praha 6 - Petřiny
162 06
e-mail: brus@imc.cas.cz

Takto vypadá NMR spektrometr



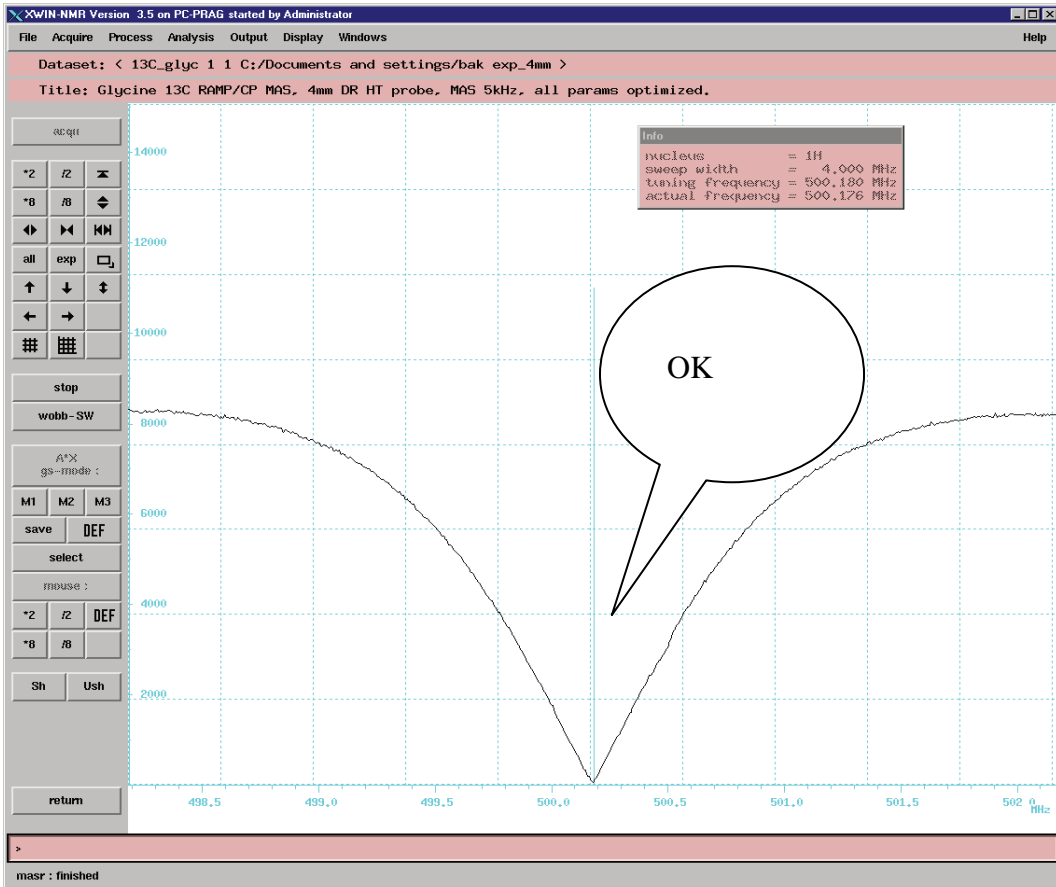
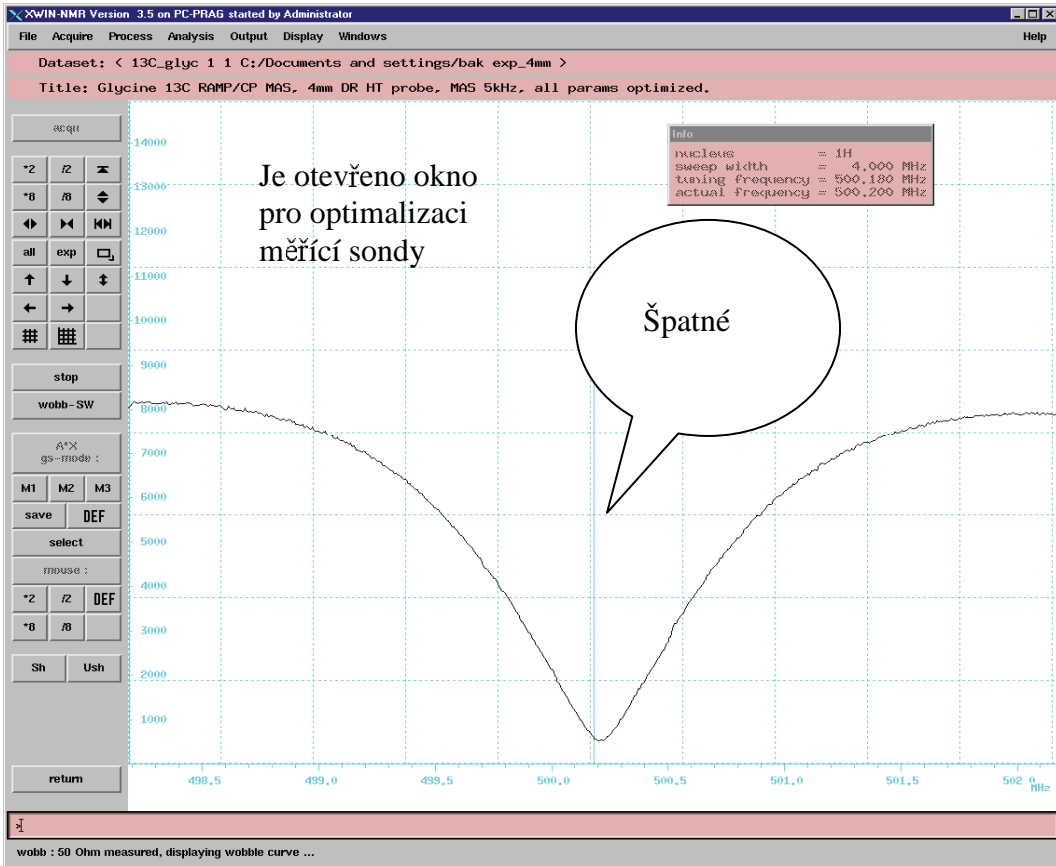
1) Vkládání a rotace vzorku pod magickým úhlem

Po naplnění a povrchovém očištění kyvety (musí být dokonale čistá a odmaštěná) a jejím označení (značení na spodní hraně kyvety), je možno kyvetu vložit do stroje. Na obrazovce zaktualizujeme okno **MAS control** a zmáčkneme **LT insert**, nyní máme 10 s na vložení vzorku, pak je automaticky zastaven přívod vzduchu, vzorek vkládáme čepičkou nahoru. Po vložení je nutno nastavit rotaci vzorku (je-li vyšší než 5 kHz nastavujeme postupně!!! - nejdříve 5 kHz a přidáváme asi po 3 kHz), zmáčkneme **etc...** a rozbalí se nám nabídkové okno, najedeme si **set new spinrate** a nastavíme rotaci, **OK** a **start** – vzorek by měl začít rotovat – (sledujeme kontrolní okénko), pokud se neroztočí – **stop** – **eject** – **insert** – **start** (je totiž možné, že vzorek špatně zapadnul). Chceme-li vzorek vyndat používáme tlačítko **eject**.



2) Ladění sondy – wobb

Po vložení vzorku do sondy a jeho roztočení na danou rotaci musíme provést naladění sondy. Do příkazového řádku zadáme příkaz **w**. Nejdříve začínáme ladit ^1H -kanál. Posun ladící frekvence sledujeme na obrazovce, objeví se **V** signál, jehož střed nastavuji na referenční frekvenci – pomocí táhla na konci sondy označeného **tuning (TH)**, která je indikována svíslou čarou. Minimum signálu nastavuji na spodní okraj okna – **matching (MH)**. Po vyladění musí být diody na předzesilovači zelené. Změnu frekvence provedu kliknutím **LT** – **wobb-sw** (v levé části obrazovky), pak se objeví okno s otázkou zda změnit jádro. Odpověď je **yes**. Nyní provedu stejným způsobem ladění jádra **X (MX, TX)**. Ještě jednou zkontroluji ^1H -kanál a je-li vše v pořádku zastavuji **wobble** příkazem **s**.



3) Optimalizace parametrů pro měření spekter s amplitudově modulovanou cross-polarizací (RAMP/CP/MAS)

Základní parametry:

Pulsy

- i) parametry **p1** a **p2** udávají délku rf 90° a 180° pulsu pro přímo pozorovaná jádra v mikrosekundách. Obvykle nepřevyší 8 μ s. (**p – pulse**)
- ii) parametry **p3** a **p4** udávají délku rf 90° a 180° pulsu pro dekaplované jádro (^1H) v mikrosekundách. Obvykle nepřevyší 8 μ s.
- iii) parametr **p15** udává délku cross-polarizační periody. Obvykle mezi 500 až 2000 μ s.
- iv) parametr **p31** udává délku speciálního dekaplovačského pulsu pro jádro (^1H) v mikrosekundách. Obvykle nepřevyší 5.5 μ s.

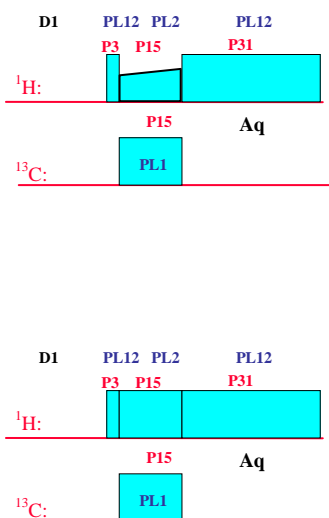
Amplitudy

- i) parametr **pl1** udává amplitudu 90° a 180° a cross-polarizačního pulsu (obecně všech pulsů) pro přímo pozorovaná jádra v dB. Udáváno jako útlum a tak nejnižší nulová amplituda odpovídá 120 dB. Obvykle není menší jak **4 dB**. (**pl – power level**)
- ii) parametr **pl2** udává amplitudu cross-polarizačního a excitačních pulsů pro dekaplované jádro (^1H) v dB. Obvykle není menší jak **10 dB**.
- iii) parametr **pl12** udává amplitudu dipolárního dekaplinku pro dekaplované jádro (^1H) v dB. Obvykle není menší jak **6 dB**.

Prodlevy

- i) parametr **d1** udává dobu mezi po sobě následujícími excitacemi (4-10 s). Parametr **aq** udává dobu snímání dat a zároveň i dobu, kdy je zapnutý dipolární dekaplink. Doba nesmí převyšit 50 ms. (**d – delay**).

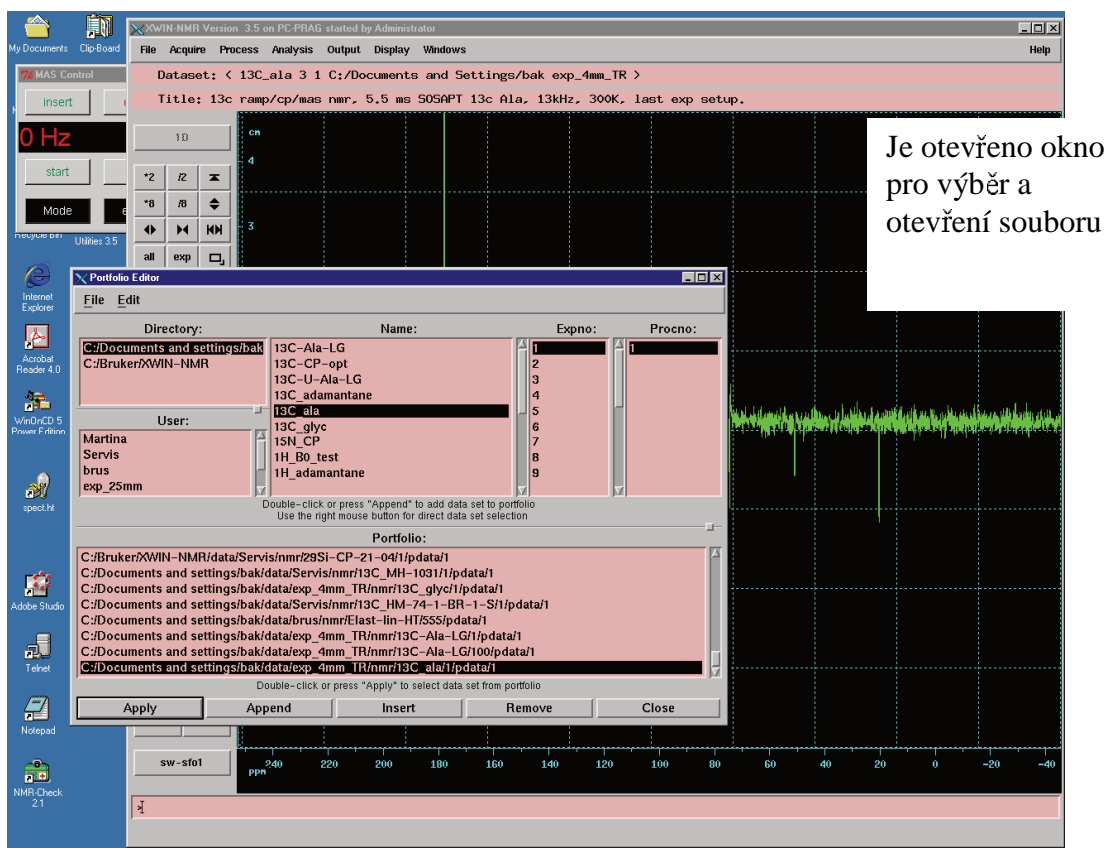
Blokové schéma dvou základních pulsních sekvencí, které jsou používány pro měření NMR spekter látek v pevném stavu. V prvním případě je pro přenos polarizace užit amplitudově tvarovaný puls o délce **p15 ms** a střední amplitudě **pl2 dB** (to je vhodné zvláště pro vysoké frekvence rotace – název pulsního programu“: **cp.av**, dnes je to standardně používaná sekvence). Ve druhém případě je použit pravidelný obdélníkový puls s konstantní amplitudou. (Starší typ experimentu s cross-polarizací: název pulsního programu“: **lgcp.jb**).



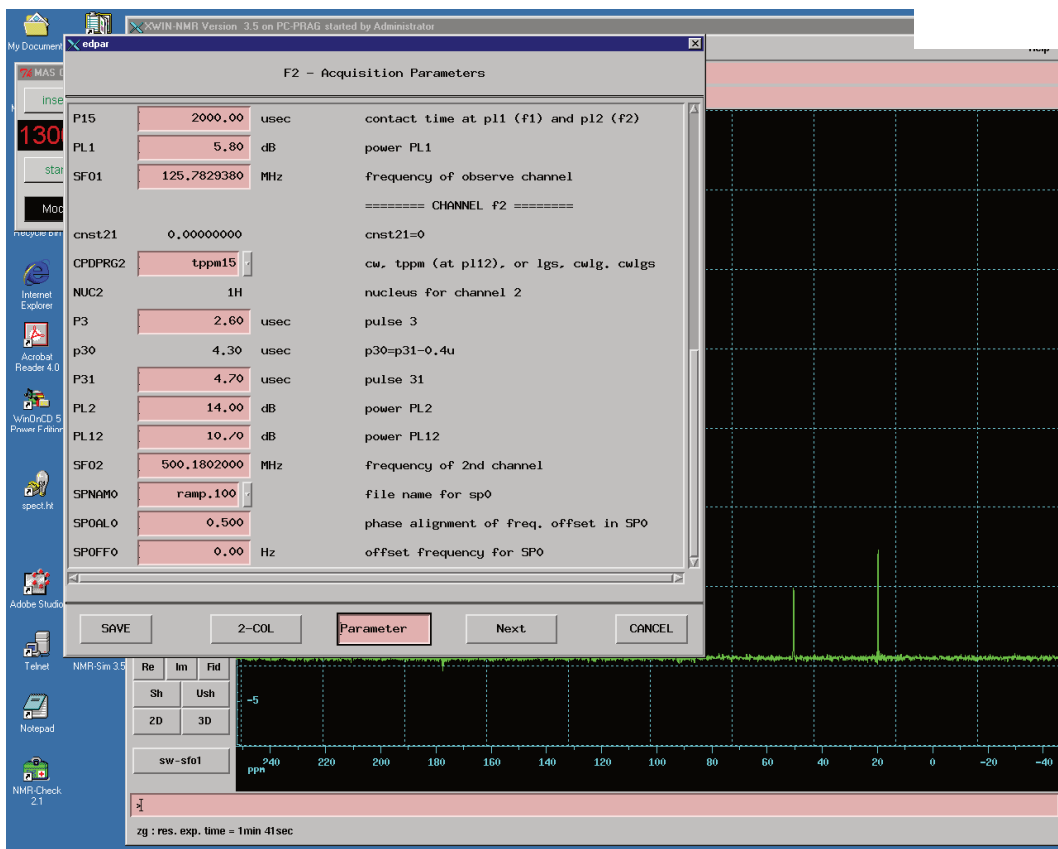
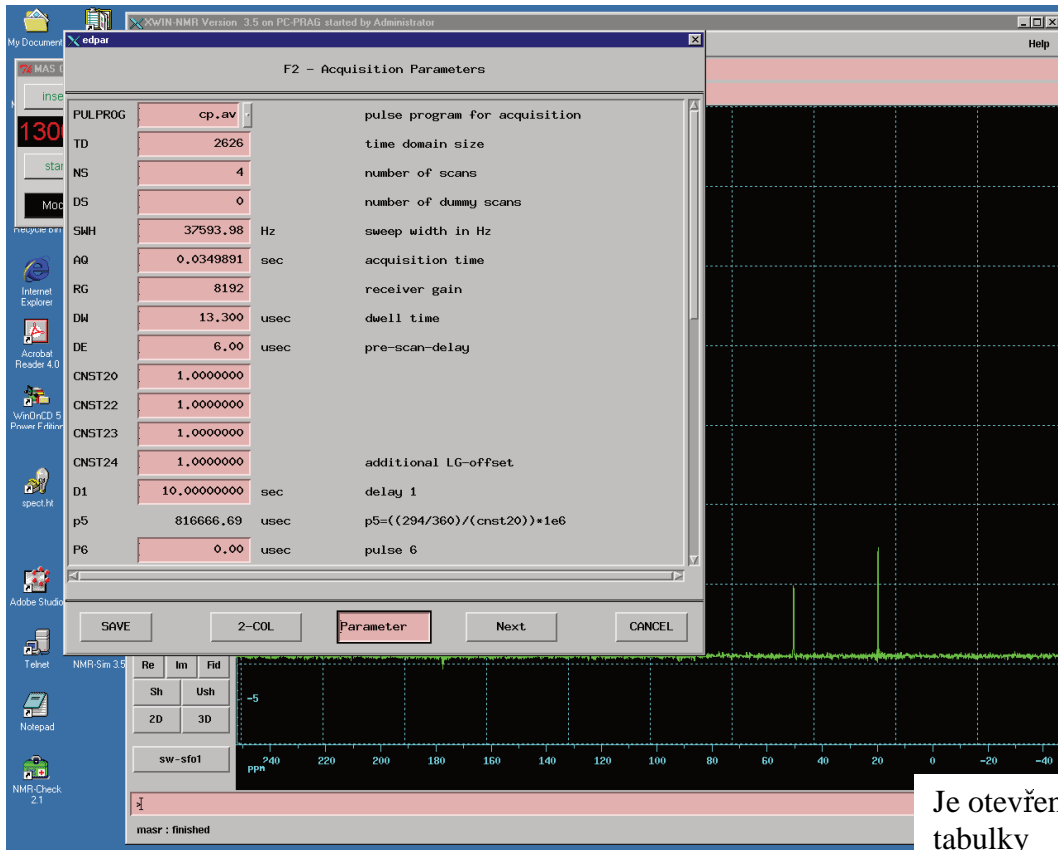
Než lze provést experiment na neznámém vzorku nejdříve je nutno změřit standard a na něm zoptimalizovat a nastavit parametry budoucího experimentu. U ^{13}C jader se optimalizace

provádí na vzorku glycinu, při rotaci 5 kHz. Nejprve nastavíme parametry experimentu s amplitudově modulovanou cross-polarizací (pulprog - **cp.av**).

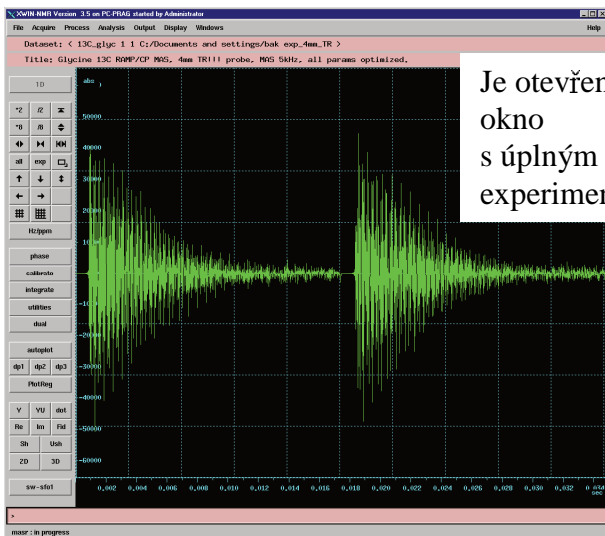
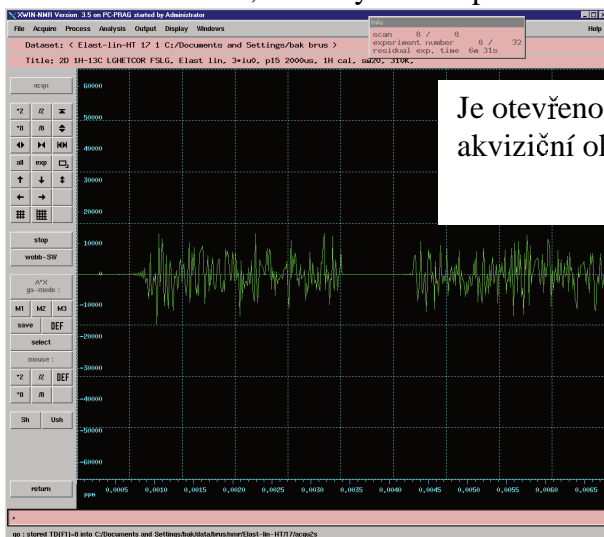
Ze složky **Portfolio** (zaktualizuju z dolní lišty) vyberu experiment pro ladění glycinu, označím si jej LT a **apply**, tímto příkazem se otevře daný experiment. Název experimentu je **13C_gly 1 1**.



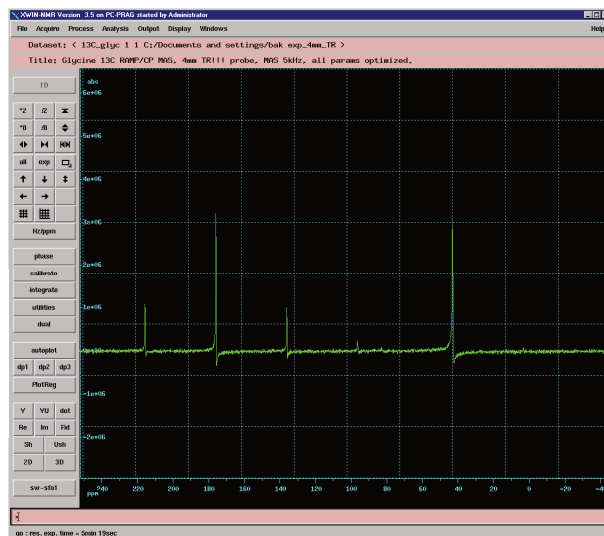
Příkazem **ased** (otevře se redukovaná tabulka parametrů pro daný experiment či pulsní program, která obsahuje kolem 40-50 parametrů) zkontroluji parametry – srovnám s minulými, které jsou uvedeny v deníku Parametry – zvláště zkontroluji **aq** a **D1**.- relaxační delay musí být **20-násobkem akvizice aq!!!!!!** Pokud bychom chtěli nějaký parametr změnit, tak LT klikneme do příslušného okénka a přepíšeme jej a potvrdíme **entrem**. Je-li vše v pořádku, okno zavíráme příkazem **save**.



Zkusmo změříme jedno spektrum. Zadáním příkazu **zg** spustíme příslušný experiment, pokud bychom chtěli experiment zastavit, zadáme příkaz **s**, data se však neuloží, chceme-li data uložit, je třeba zadat příkaz **halt** (odentrovat při lichém scanu!!!), data se zapíší, jestliže chceme pokračovat v experimentu zadáváme příkaz **go**, experiment začne znovu a data se načítají k předchozím. Pokud se potřebujeme podívat, jak probíhá experiment zadáváme příkaz **tr**, tím se zapíší data po nejbližším scanu na disk a s těmito daty můžeme dále pracovat – provedeme Fourierovu transformaci **ft** případně částečně zřázujeme pomocí **fp** (fázování viz níže). Průběh FIDU sledujeme v tzv. akvizičním okně, které vyvoláme příkazem **a**. Je vhodné otevřít akviziční okno před spuštěním experimentu zadáním příkazu **zg**, ale není to nezbytné. Po proběhnutí experimentu zadáváme příkaz pro Fourierovu transformaci **ft** nebo **fp**, nyní se nám zobrazí spektrum, které je ještě třeba dále zpracovat. Spektrum zřázujeme.



Je otevřeno akviziční okno s úplným FID na konci experimentu

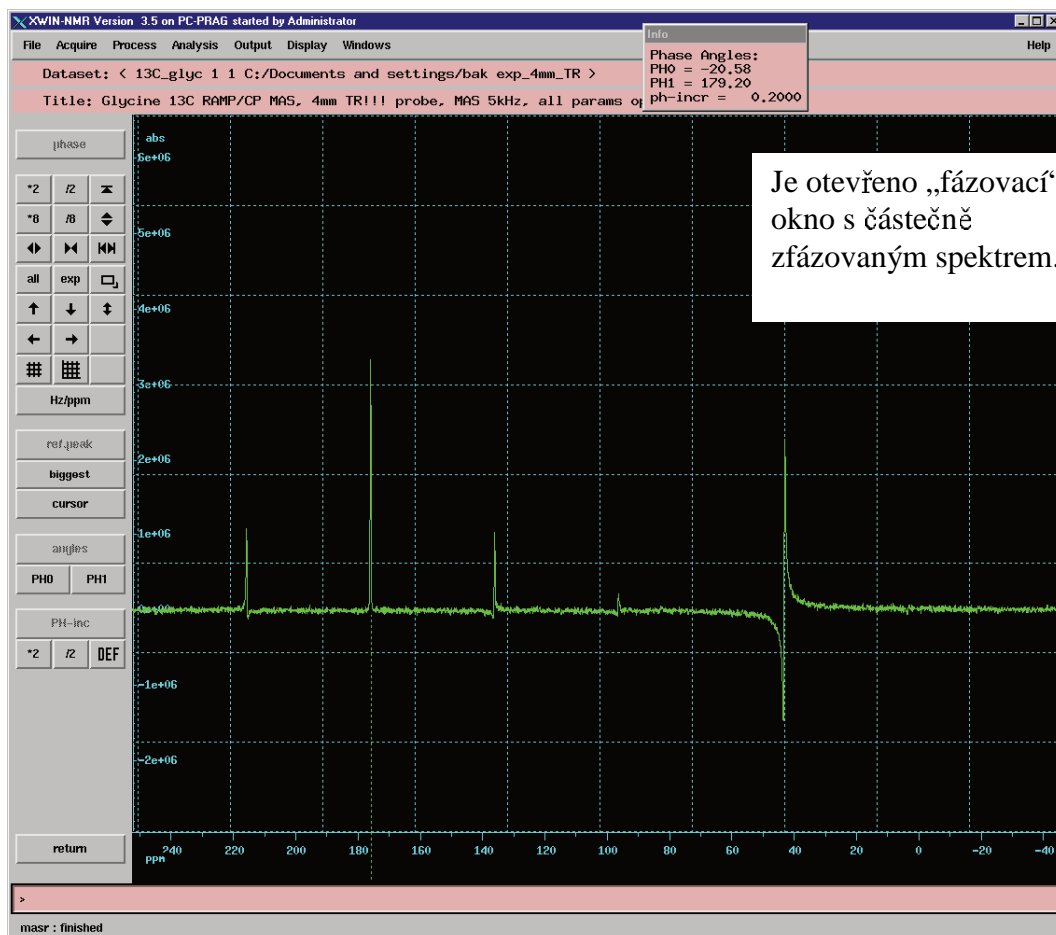


Je otevřeno okno se spektrem pro provedení FT (nezfázované)

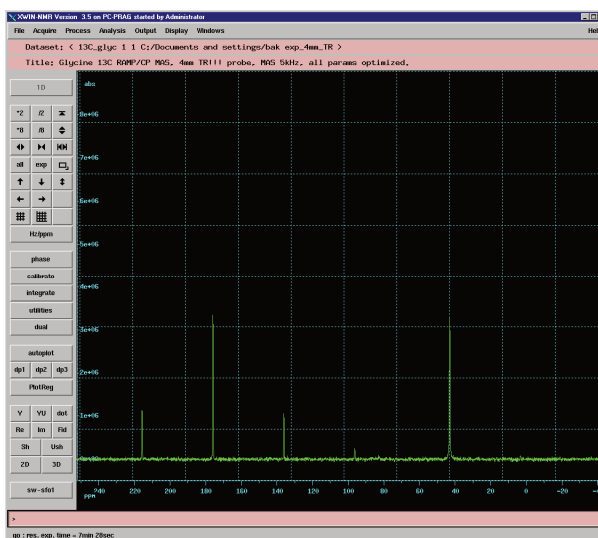
Fázování

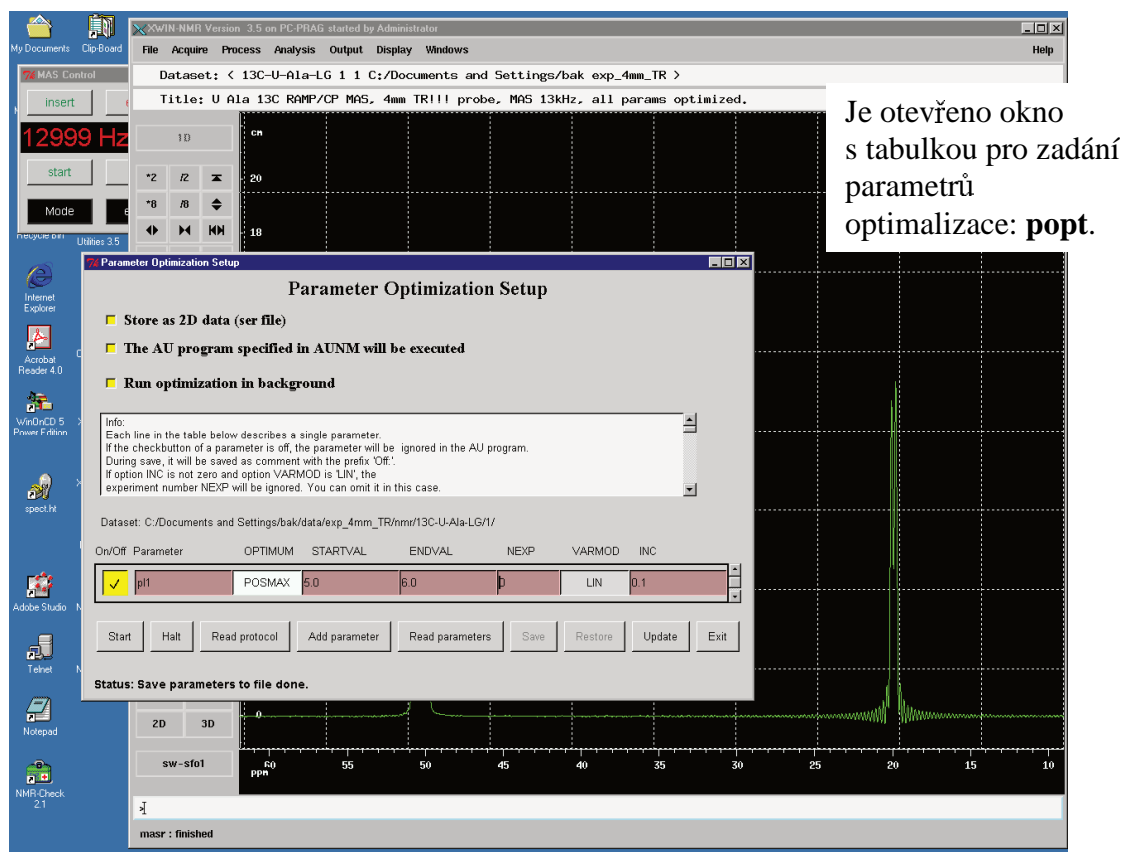
Pomocí tlačítka **phase** (v levé části okna), pak tlačítka **biggest** (vybere největší signál) a pomocí okének **ph0** (klikneme **LT** a po kliknutí stále držet levé tlačítko a pohybem nahoru dolů upravit fázi) a **ph1** spektrum zřídíme. Po provedené operaci, **return** (stále levá část obrazovky) a z nabídky vyberem **save and return**.

Příkazem **abs** se provede automatická korekce základní linie a zároveň integrace každého píku.



Plně zřídované
spektrum
glycinu.





Optimalizace se provádí u parametrů: **p11**, **p1**, **p3** a **o2**.

Parametry **p11** a **p3** se optimalizují pro signál 176 ppm a parametry **p31** a **o2** pro signál 40 ppm. Nejdříve optimalizujeme parametry **p11** a **p3**, **LT** vybereme signál 176 ppm **LT** klikneme na spektrum před začátkem signálu – objeví se šipka, kterou potvrdíme stiskem kolečka myši – posunem myši po podložce se dostaneme na konec signálu, který potvrdíme opět stiskem kolečka, tím máme vybraný daný signál (roztáhne se na obrazovce), **LT** uvolníme myš a klikneme na **dp1** (levé okno obrazovky), vše postupně odentrujeme a můžeme začít optimalizovat. Pak se zadá příkaz **popt** a otevře se nám okno pro nastavení optimalizačního experimentu – zadáme příslušné kroky optimalizace – **save** – **start** (spuštění optimalizace). Při optimalizačním procesu se nám postupně zobrazují jednotlivě naměřené kroky, v závěru si počítač vybere maximální hodnotu (která se automaticky uloží do tabulky parametrů). Po zoptimalizování změříme závěrečné spektrum – signály by měly mít téměř stejnou intenzitu a pološířky signálu by měly odpovídat pološířkám uvedeným v deníku parametry. Pološířky zjistíme vybráním signálu a příkazem **hwcal**. Nakonec je velice důležité nakalibrovat změřené spektrum. Vyberem si signál s hodnotou 176 ppm (viz.výše) a poté pomocí (levá lišta na obrazovce) **calibrate** nastavíme hodnotu **176,03 ppm**. Nakonec zkontrolujeme parametr **sr** (příkaz **sr**) a zapíšeme jeho hodnotu , stejně jako **sino** (poměr signál/šum) – toto je informační hodnota, kterou pak již nikde nenastavujeme, jen nás informuje o kvalitě experimentu, na rozdíl od **sr** (tento parametr slouží pro kalibraci NMR škály a nastavujeme jej při dalších experimentech stejně jako další parametry).

4) Nastavení amplitudy rf pole pro dosažení 90° ^{13}C pulsu

Ze složky portfolio vyberu správný experiment, **13C_gly 1 2** u tohoto experimentu budu optimalizovat parametr **p11** – ne však přes okno **popt**, jako v minulém experimentu.

Nejdříve změřím experiment s **p1 = 0,1 μs** , toto spektrum zřáduji (viz. předchozí úloha) (spektrum má výrazné signály) a poté nastavíme **p1 = 4 μs** , pro tuhle hodnotu doladujeme puls p11. Snažíme se, aby na změřeném spektru nebyl žádný signál (potom je nastaven 90° puls).

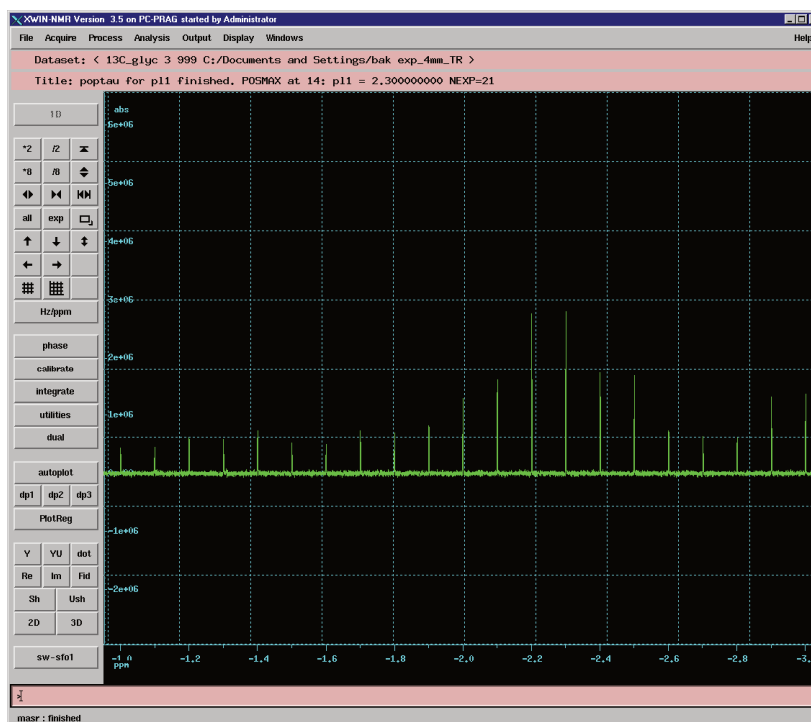


5) Optimalizace parametrů pro měření spekter standardní Hartmann-Hahn cross-polarizací (CP/MAS)

Obdobně jako v prvním případě se optimalizuje výkon radio-frekvenčního ^{13}C pole pro cross-polarizaci. Jde tedy o nastavení Hartman-Hahn podmínky, kdy cross-polarizační puls má konstantní amplitudu **p11**. Použitý pulsní program je **lgcp.jb**. Optimalizace se provádí na vzorku glycinu, při rotaci 10 kHz.

Ze složky **Portfolio** (zaktualizuju z dolní lišty) vyberu experiment pro ladění glycinu, označím si jej L.T. a **apply**, tímto příkazem se otevře daný experiment. Název experimentu je **13C_gly 1 3**.

Pak se nastaví všechny potřebné parametry z experimentu **13C_gly 1 1** a optimalizuje se parametr **p11** přesně podle bodu 3.



6) Editace ^{13}C signálů – rozlišení CH_3 , CH_2 , CH a C signálů.

Princip tohoto experimentu je velmi jednoduchý a založený na rozdílné dynamice, tedy rychlosti přenosu polarizace během cross-polarizace. Jedná se v podstatě o velmi jednoduchou modifikaci standardní cross-polarizace s konstantní amplitudou ^{13}C pole. Název tohoto experimentu je cross-polarization polarization-inversion (CPPI) ze kterého je zřejmé, že v určitém okamžiku se obrátí směr přenosu magnetizace, a jádra pro která je rychlost přenosu polarizace rychlá budou ve výsledném spektru mít negativní signály.

V tomto případě se optimalizuje doba depolarizace, tedy délka pulsu **p10**. Amplitudy obou polí jsou stejné jako v předchozím případě. Použije se optimalizační procedury **popt.J**. Minimální doba je $5\ \mu\text{s}$ a maximální $100\ \mu\text{s}$. Hledá se největší negativní signál $\text{C}\alpha$ Gly při frekvenci rotace $10\ \text{kHz}$.

