

AVANCE NEO

Beginners Guide

● Podręcznik dla początkujących użytkowników
spektrometru AVANCE

Podręcznik użytkownika
Version 001



Copyright © by Bruker Corporation

Wszelkie prawa zastrzeżone. Żadnej części niniejszej publikacji nie można powielać, przechowywać w systemie, z którego można ją wyodrębnić, ani przekazywać w jakiegokolwiek formie ani jakimkolwiek sposobem bez uprzedniej zgody wydawcy. Wykorzystywane nazwy produktów stanowią znaki towarowe lub zastrzeżone znaki towarowe ich odpowiednich właścicieli.

© sierpnia 21, 2018 Bruker Corporation

Numer dokumentu: 10000061276

Nr kat.: H171804PL

Spis treści

1	Wstęp	5
1.1	Źródła zagrożeń	5
1.2	Wersja oprogramowania i składnia poleceń	5
2	Bezpieczeństwo	7
2.1	Bezpieczeństwo magnetyczne.....	7
2.1.1	Bezpieczeństwo kriogeniczne.....	7
2.2	Bezpieczeństwo elektryczne.....	8
2.3	Bezpieczeństwo chemiczne.....	8
2.4	Świadectwo CE.....	8
3	Wstępne informacje teoretyczne i terminologia	9
3.1	Analiza NMR chloroformu	11
3.2	Związki odniesienia, herce, ppm.....	13
3.3	Protonowa spektroskopia NMR – przesunięcie chemiczne	14
3.4	Widmo protonowe benzenu	15
3.5	Widmo protonowe octanu benzylu.....	16
3.6	Widmo protonowe etylobenzenu ze sprzężeniem spinowo-spinowym	18
3.7	Rozprężanie.....	20
3.8	Sygnał FID a widmo.....	22
4	Opis systemu	23
4.1	Przegląd budowy systemu AVANCE	24
4.1.1	Konsola operatora i podłączenia.....	24
4.2	Konsola	24
4.3	Łącze między komputerem głównym a systemem AQS.....	25
4.4	Magnes, układ kompensacyjny (shimów), HPPR i sonda.....	26
4.5	Magnes oraz naczynie Dewara magnezu.....	27
4.5.1	Otwór o temperaturze pokojowej	28
4.5.2	Zbiornik z helem.....	28
4.5.3	Zbiornik z azotem.....	29
4.6	Wprowadzenie do układu blokującego	29
4.7	Sondy.....	30
4.8	Sonda szerokopasmowa.....	32
4.9	iProbe.....	33
4.10	Wymiana sondy	34
5	Procedury podstawowe	35
5.1	Okno programu TOPSPIN	35
5.1.1	Tworzenie nowego zbioru danych	36
5.1.2	Przygotowywanie próbek	38
5.2	Wprowadzanie próbki z elementem obrotowym do magnezu	39
5.3	Lock próbki.....	39
5.4	Strojenie i dopasowanie sondy	41
5.4.1	Sondy wyposażone w ATM (procedura strojenia automatycznego).....	41

5.4.2	Sondy wyposażone w ATM (procedura strojenia ręcznego).....	41
5.5	Obracanie próbki.....	44
5.6	Kompensacja	44
5.6.1	Kompensacja rutynowa za pomocą procedury TopShim.....	44
5.7	Ustawianie parametrów zależnych od sondy i rozpuszczalnika	45
5.8	Regulacja wzmocnienia odbiornika.....	45
5.9	Uruchamianie rejestracji	45
5.10	Przetwarzanie danych.....	45
6	Przygotowanie do rejestracji, parametry związane z częstotliwością.....	47
6.1	Częstotliwość	47
6.2	Wyjaśnienie częstotliwości nadawanej, podstawowej i przesunięcia na wartościach liczbowych.....	47
7	Próbka do badania metodą spektrometrii NMR.....	51
7.1	Wybór rozpuszczalnika	51
7.2	Probówka na próbkę	52
7.3	Postępowanie z próbką.....	53
8	Widmo protonowe	55
8.1	Ustawienie eksperymentu	56
8.2	Akwizycja	59
8.3	Przetwarzanie	60
8.4	Całkowanie	61
8.5	Wykreślanie widma protonowego 1D.....	64
8.6	Optymalizacja szerokości przemiatania.....	65
9	Widmo ¹³C z odsprzęgnięciem protonów	67
9.1	Ustawienie eksperymentu	68
9.2	Akwizycja	70
9.3	Przetwarzanie	70
9.4	Wybieranie pików	72
9.5	Wykreślanie widma węglowego 1D	73
10	Kontakt	75
	Rysunki.....	77
	Tabele	79
	Słowniczek	81
	Indeks	83

1 Wstęp

Celem niniejszego podręcznika jest opisanie podstawowych elementów spektrometru firmy Bruker, ich działania oraz sposobu, w jaki są one wykorzystywane przez oprogramowanie TopSpin do pozyskiwania danych NMR. Powinno to umożliwić stosunkowo niedoświadczonemu użytkownikowi przeprowadzenie szeregu podstawowych eksperymentów 1D (jednowymiarowych) NMR w dużej rozdzielczości. Jako przykład wybrano antranilan mentylu. Zostaną opisane widma protonowe oraz węglowe z odsprężaniem protonów. Aby pomóc użytkownikowi, zostaną użyte standardowe zestawy parametrów dostarczone z każdym pakietem oprogramowania TopSpin. Ogranicza to czas potrzebny do przeszkolenia użytkowników na samym spektrometrze, szczególnie w przypadku, gdy szkoli się stosunkowo dużą liczbę studentów. Według tego scenariusza przetwarzanie można łatwo przeprowadzić na oddzielnym komputerze, korzystając z samouczków dostarczonych wraz z dokumentacją spektrometru.

Do potrzeb instrukcji zakłada się, że użytkownik:

- Ma podstawową wiedzę na temat pakietu oprogramowania TopSpin.
- Posiada sondę lub sondy do rejestracji widm protonowych i węglowych z odsprężaniem protonów.
- Ma podstawową wiedzę na temat korzystania z zakładki i przycisków przepływu w oknie TopSpin.

Chociaż dołożono wszelkich starań, by rzeczywiście zapewnić instrukcje krok po kroku, nowi użytkownicy zawsze będą mieli jakieś pytania, a co za tym idzie będą potrzebować okazjonalnej pomocy ze strony bardziej doświadczonego użytkownika. Celem niniejszego podręcznika jest, o ile to możliwe, umożliwienie użytkownikom samodzielnej pracy i uzyskanie podstawowej wiedzy na temat obsługi systemu. Mamy nadzieję, że czas poświęcony na szkolenie nowych użytkowników zostanie znacznie ograniczony dzięki wykorzystaniu tego podręcznika.

1.1 Źródła zagrożeń

W rozdziale dotyczącym bezpieczeństwa omówiono bardziej szczegółowo kwestie związane z zagrożeniami; już teraz, w ramach wstępu, należy jednak wymienić potencjalne zagrożenia występujące podczas użytkowania spektrometru NMR. Mimo że mamy do czynienia z niezwykle złożonym systemem, niedoświadczony użytkownik ma zaskakująco niewiele możliwości jego uszkodzenia, dlatego wymieniono kilka najważniejszych. Najbardziej prawdopodobne przyczyny uszkodzeń przy normalnym użytkowaniu są następujące:

- Wyjmowanie próbki z magnesu, kiedy otwór pozostaje zamknięty.
- Wprowadzenie próbki do magnesu, w którym brak jest ochronnej poduszki powietrznej.
- Przekazywanie mocy RF po niepodłączonych przewodach lub nieprawidłowo zamontowanych sondach.

Zalecamy, aby nowi użytkownicy zapoznali się z powyższymi zagrożeniami przed rozpoczęciem pracy. Zalecamy, aby osoby zarządzające systemem sprawdziły, czy nowi użytkownicy mają wiedzę o powyższych zagadnieniach.

1.2 Wersja oprogramowania i składnia poleceń

Ta instrukcja dotyczy oprogramowania TopSpin w wersji 4.0. W podręczniku zostaną przedstawione procedury wprowadzania różnych poleceń.

2 Bezpieczeństwo

W odniesieniu do bezpieczeństwa elementem odróżniającym spektrometry NMR od większości innych urządzeń laboratoryjnych jest występowanie stosunkowo silnego magnesu. Należy na to zagadnienie zwrócić największą uwagę przy projektowaniu laboratorium NMR bądź szkoleniu osób pracujących w laboratorium lub w jego pobliżu. Jeśli przestrzega się odpowiednich procedur, praca w pobliżu magnesów nadprzewodzących jest całkowicie bezpieczna i nie występują żadne znane efekty uboczne wpływające na zdrowie. Nieprzestrzeganie zaleceń może jednak powodować poważne wypadki.

Magnes stanowi potencjalne źródło zagrożenia z następujących względów:

- Duża siła przyciągania, którą magnes działa na przedmioty ferromagnetyczne.
- Znaczna ilość ciekłego azotu i helu.

2.1 Bezpieczeństwo magnetyczne

Pole magnetyczne otacza magnes ze wszystkich stron. Pole to, noszące nazwę pola rozproszonego, jest niewidoczne, dlatego osoba odpowiedzialna za urządzenie powinna w odpowiednich miejscach umieścić informacje ostrzegawcze. Obiekty wykonane z materiałów ferromagnetycznych, np. żelaza, stali itd., są przez magnes przyciągane. Jeśli obiekt ferromagnetyczny znajdzie się zbyt blisko, może zostać nagle przyciągnięty przez magnes ze znaczną siłą. Wskutek tego może dojść do uszkodzenia magnesu lub obrażeń u osób znajdujących się na drodze przedmiotu.

Jest niezwykle istotne, aby osoby pracujące w pobliżu magnesu były w pełni świadome potencjalnych zagrożeń. Podstawowe znaczenie ma, aby w pobliże magnesu nigdy nie dopuszczać osób, którym wszczepiono rozruszniki serca lub metalowe implanty.

Ponieważ natężenie pola rozproszonego znacznie zmniejsza się w miarę wzrostu odległości od magnesu, ważne jest, aby z przełożonym omówić bezpieczeństwo pracy w pobliżu magnesów.

2.1.1 Bezpieczeństwo kriogeniczne

Magnes zawiera stosunkowo dużą ilość ciekłego helu i azotu. Ciecze te, noszące nazwę cieczy kriogenicznych, mają utrzymywać bardzo niską temperaturę rdzenia magnesu.

Ponieważ ciecze kriogeniczne mają bardzo niską temperaturę, podczas pracy z nimi należy zawsze **nosić rękawice, koszulę z długim rękawem** lub **fartuch laboratoryjny** oraz **gogle ochronne**. Bezpośredni kontakt z takimi cieczami może spowodować odmrożenia. Osoba zarządzająca spektrometrem powinna regularnie sprawdzać i upewniać się, czy parujące gazy mogą swobodnie ulatniać się z magnesu, czyli czy zawory wylotowe nie są zablokowane. Nie wolno uzupełniać helu i azotu w magnesie, jeśli dana osoba nie została przeszkolona w zakresie odpowiedniego postępowania.

Hel i azot są gazami nietoksycznymi. Ze względu jednak na możliwość **rozładowania magnesu**, w przypadku którego może nastąpić nagłe wypełnienie pomieszczenia odparowanymi gazami, zawsze włączona musi być odpowiednia wentylacja.

2.2 Bezpieczeństwo elektryczne

Elementy spektrometru nie są bardziej ani mniej niebezpieczne niż wszelkie inne typowe urządzenia elektroniczne lub pneumatyczne i należy z nimi odpowiednio postępować. Nie wolno zdejmować pokryw ochronnych z poszczególnych modułów. Zostały one zamontowane w celu zabezpieczenia; mogą zostać otwarte wyłącznie przez wykwalifikowany personel obsługi lub autoryzowany serwis. Pokrywą główną znajdującą się z tyłu konsoli można zdejmować za pomocą dwóch śrub szybkozłącznych, jednak może tego dokonywać wyłącznie wykwalifikowany personel lub autoryzowany serwis. Należy pamiętać, że wentylatory chłodzące, które znajdują się na pokrywie tylnej, będą pracować nawet po jej zdjęciu, chyba że zostaną odłączone.

2.3 Bezpieczeństwo chemiczne

Użytkownicy powinni mieć pełną świadomość wszelkich zagrożeń związanych z próbkami, z którymi pracują. Związki organiczne mogą być wysoce łatwopalne, żrące, rakotwórcze itd.

2.4 Świadectwo CE

Wszystkie główne jednostki znajdujące się w konsolach AVANCE, a także urządzenia peryferyjne, takie jak HPPR, systemy shim'ów i sonda są zgodne z Deklaracją zgodności WE. Odnosi się do poziomu jakiegokolwiek rozproszonego promieniowania elektromagnetycznego, które może być emitowane, jak również standardowych zagrożeń elektrycznych. Należy pamiętać, że drzwi konsoli powinny być zamknięte, a tylna obudowa zamontowana w celu przeciwdziałania wyciekowi promieniowania.



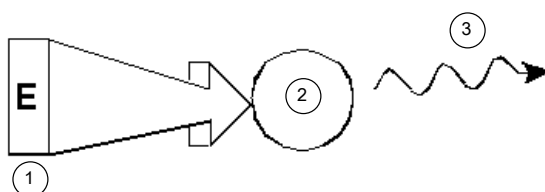
Uwaga: Dodatkowe informacje na temat bezpieczeństwa systemów AVANCE można znaleźć w podręczniku *Ogólne uwagi dotyczące bezpieczeństwa systemów AVANCE* (P/N Z31836) dostępnym na płycie BASH DVD.

3 Wstępne informacje teoretyczne i terminologia

NMR jest techniką stosowaną do analizy struktury wielu cząsteczek chemicznych, przede wszystkim związków organicznych. Typowy związek może składać się z atomów węgla, wodoru i tlenu.

W najprostszej postaci eksperyment NMR składa się z trzech kroków:

1. Umieszczenia próbki w statycznym polu magnetycznym.
2. Wzbudzenia jąder w próbce za pomocą impulsu o częstotliwości radiowej.
3. Pomiaru częstotliwości sygnałów emitowanych przez próbkę.



Rysunek 3.1: Wzbudzenie i reakcja na wzbudzenie

1.	Impuls wzbudzający	2.	Atom
3.	Emitowany sygnał		

W oparciu o emitowane częstotliwości można wyciągnąć wnioski o wiązaniu i rozmieszczeniu atomów w próbce. Znajdujące się w próbce jądra aktywne w spektrometrii NMR rezonują z różnymi częstotliwościami radiowymi zwanymi **częstotliwościami rezonansowymi**. Są to częstotliwości emitowane przez jądra po ich wzbudzeniu przez wysłany impuls o częstotliwości radiowej. Wartość częstotliwości rezonansowej zależy od dwóch czynników:

1) Rodzaju jądra:

Każdy izotop składa się z określonej liczby protonów i neutronów znajdujących się w jego jądrze atomowym. Struktura jądra w znacznym stopniu określa wartość częstotliwości rezonansowej. Każdy izotop charakteryzuje się **podstawową częstotliwością rezonansową**. Jądra ^{13}C będą miały inną podstawową częstotliwość rezonansową w porównaniu do jąder ^1H itp. Należy pamiętać o dużej zmienności podstawowej częstotliwości rezonansowej dotyczącej różnych izotopów wymienionych w poniższej tabeli:

Jądro	Aktywność w spektroskopii NMR	Podstawowa częstotliwość rezonansowa (przybliżona) [MHz]	Abundancja naturalna [%]
^1H	tak	500	99.98
^2H	tak	77	0.015
^3H	tak	533	Ślady (ok. 10^{-18})
^{12}C	nie	---	98.89
^{13}C	tak	126	1.11
^{35}Cl	tak	49	75.77
^{37}Cl	tak	41	24.23

Tabela 3.1: Tabela z danymi dotyczącymi różnych izotopów (częstotliwości podano dla magnesu 11,7 T)

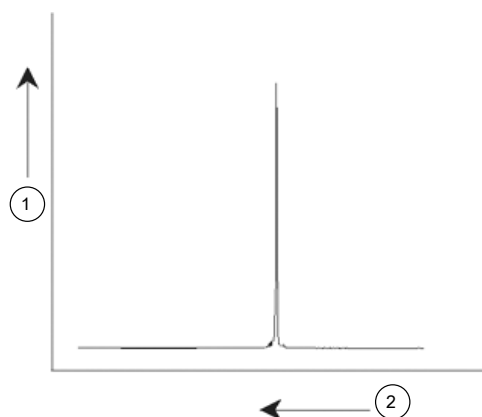
2) Lokalnego otoczenia atomowego:

Na podstawową częstotliwość rezonansową nakłada się efekt lokalnego otoczenia atomowego, w którym znajduje się określony izotop. Dokładna wartość częstotliwości rezonansowej jądra ^1H w danym związku chemicznym zależy od atomów, z którymi jądro jest połączone wiązaniami i które je otaczają. Jądro jest otoczone elektronami, które mogą być postrzegane jako ruchome ładunki elektryczne z towarzyszącymi im polami magnetycznymi. Elektrony te stanowią źródło ekranowania jądra magnetycznego. Zakres ekranowania zależy od dokładnego lokalnego środowiska atomowego. Wielkość typowych lokalnych zmian pola (które spowodują zmianę częstotliwości) zależy od izotopu i natężenia pola magnetycznego, w którym umieszczona jest próbka. Poniższa tabela pokazuje typową zmienność częstotliwości dwóch najczęściej stosowanych w spektroskopii NMR jąder ^1H i ^{13}C . Oczywiście jest, że lokalne otoczenie atomowe ma stosunkowo niewielki wpływ na podstawową częstotliwość rezonansową.

Jądro	Typowa zmiana podstawowej częstotliwości rezonansowej skutkiem lokalnego otoczenia atomowego.
^1H	6 kHz
^{13}C	30 kHz

Tabela 3.2: Zmiany częstotliwości (podano dla magnesu 11,7 T)

Sygnaly NMR są zazwyczaj wykreślane w postaci widm i analizowane w odniesieniu do dwóch wielkości tj. **częstotliwości** i **intensywności**. Zgodnie z konwencją stosowaną w przypadku spektroskopii NMR częstotliwość wykreśla się na osi poziomej, przy czym wzrasta ona w lewo.



Rysunek 3.2: Widmo NMR

1.	Intensywność
2.	Częstotliwość

Jak wspomniano powyżej, częstotliwość dostarcza jakościowych informacji dotyczących lokalnego otoczenia atomowego. **Zintegrowana intensywność** sygnału jest **miarą siły sygnału** i jest wyznaczana przez całkowanie pola powierzchni pod pikiem sygnału. Całka jest wprost proporcjonalna do liczby jąder, które składają się na sygnał o określonej częstotliwości (pod warunkiem, że wszystkie jądra zostały wzbudzone w takim samym stopniu), a zatem dostarcza informacji ilościowych dotyczących struktury chemicznej związku.

Aby wzbudzić dane jądro w eksperymencie NMR, częstotliwość impulsu wzbudzającego powinna ściśle odpowiadać częstotliwości rezonansowej jądra. Ta częstotliwość jest określana jako **częstotliwość nośna**. Oznacza to, że jeśli eksperymenty są przeprowadzane przy pomocy magnesu 11,7 T, jądra ^1H wymagają częstotliwości nośnej wynoszącej w przybliżeniu 500 MHz, a jądra ^{13}C wymagają częstotliwości nośnej bliskiej 126 MHz. Częstotliwość nośna jest określona przez parametr SFO1. Jądro wzbudzone przez tę częstotliwość nośną jest określane jako **jądro obserwowane**.

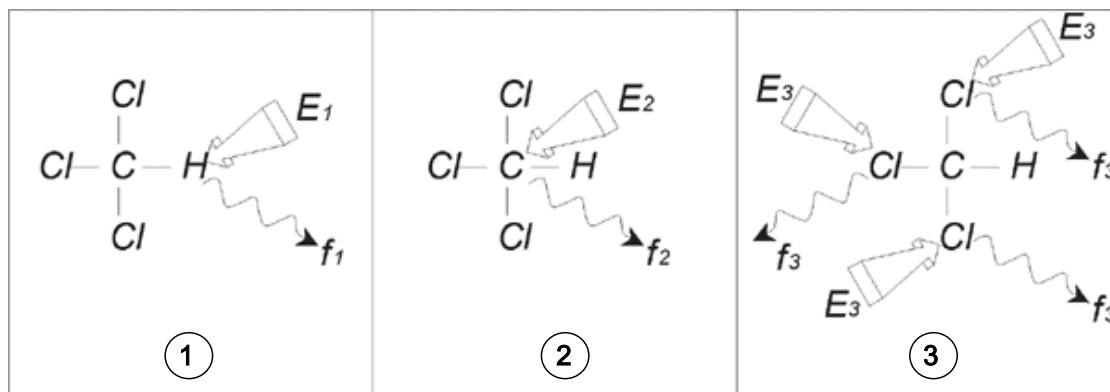
Należy zauważyć, że istnieją eksperymenty, w których pobudza się więcej niż jedno jądro, np. podczas przeniesienia polaryzacji lub odsprzęgania. W tych przypadkach istnieje więcej niż jedna częstotliwość nośna, ale nadal tylko jedna częstotliwość obserwacji.

Nie wszystkie **izotopy** reagują na impulsy o częstotliwości radiowej, to znaczy nie wszystkie są **aktywne w NMR**. W przyrodzie występują trzy izotopy wodoru: ^1H (wodór), ^2H (deuter) i ^3H (tryt, promieniotwórczy!). Abundancja naturalna (obfitość występowania) tych izotopów wynosi odpowiednio 99,98%, 0,015% i 0,005%. Wszystkie trzy izotopy są aktywne w NMR, chociaż jak pokazano w tabeli 3.1, wszystkie wykazują dużą zmienność częstotliwości rezonansowej. Aby przeprowadzić analizę próbki pod kątem wodoru, wzbudza się izotop ^1H , ponieważ występuje w największej ilości. Spośród izotopów węgla występujących w przyrodzie tylko jeden jest aktywny w NMR. Najczęściej występujący izotop ^{12}C (98,89% abundancji naturalnej) jest nieaktywny. Dlatego analiza NMR związków organicznych pod kątem węgla opiera się na sygnałach emitowanych przez izotop ^{13}C , którego abundancja naturalna wynosi tylko 1,1%. Oczywiście analiza NMR węgla jest trudniejsza niż, na przykład, ^1H (istnieją inne czynniki wpływające na czułość, które zostaną omówione w następujących częściach tego rozdziału).

Na podstawie tego krótkiego wprowadzenia do techniki NMR opisanego powyżej warto wykonać ćwiczenie i zastanowić się, w jaki sposób można wykorzystać tę metodę do analizy składu chloroformu (CHCl_3).

3.1 Analiza NMR chloroformu

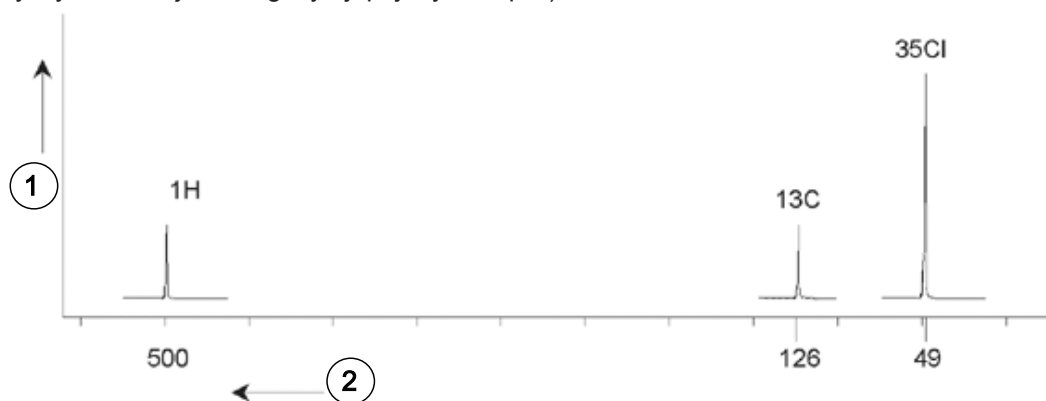
Jak przedstawiono na poniższym rysunku, można przeprowadzić trzy oddzielne eksperymenty odpowiadające trzem możliwym do obserwacji jądrom ^1H , ^{13}C i ^{35}Cl .



Rysunek 3.3: Analiza NMR CHCl_3

1	Wzbudzenie E_1
2	Wzbudzenie E_2
3	Wzbudzenie E_3

W stronę próbki są kierowane trzy impulsy wzbudzające (E_1 , E_2 , E_3) z odpowiednią częstotliwością nośną. E_1 odpowiada częstotliwości rezonansowej ^1H , E_2 częstotliwości ^{13}C frequency, a E_3 częstotliwości ^{35}Cl . Zakładając, że trzy izotopy zostały wzbudzone, próbka będzie emitować sygnały o trzech częstotliwościach f_1 , f_2 i f_3 , które zostają zarejestrowane na trzech odrębnych widmach. Jeśli emitowane sygnały zostaną pokazane na jednym wykresie, można spodziewać się widma podobnego do przedstawionego na rysunku poniżej (należy zauważyć, że podane częstotliwości sygnałów dotyczą magnesu 11,7 T i wszystkie sygnały zostały wykreślone jako singlety, tj. pojedyncze piki).



Rysunek 3.4: Sygnały MRJ emitowane przez CHCl_3

1	Intensywność
2	Częstotliwość (MHz)

To sztuczne widmo pokazuje trzy piki odpowiadające trzem izotopom. Biorąc pod uwagę względną liczbę trzech izotopów, można oczekiwać, że intensywność sygnałów chloru, wodoru i węgla będzie pozostawać w stosunku 3:1:1. Jednakże należy również uwzględnić abundancję naturalną trzech izotopów, co daje stosunek 227:100:1. Użytkownik może sprawdzić, że określone doświadczalnie stosunki intensywności pików nie zgadzają się z tymi wartościami. Przyczyną tego stanu jest charakterystyczna czułość w metodzie NMR każdego izotopu. Czułość ^1H jest 63 razy większa w metodzie NMR niż w przypadku ^{13}C . Oznacza to, że nawet jeśli próbka zawiera dokładnie taką samą liczbę jąder ^1H co ^{13}C , intensywność sygnałów ^1H będzie 63 razy większa niż ^{13}C .

W przypadku wykresu, takiego jak na powyższym rysunku, wszelkie szczegółowe informacje zostaną utracone, a precyzyjne określenie częstotliwości będzie niemożliwe. Mówi się wtedy, że widmo takie odznacza się niską rozdzielczością (rozdzielczość pozioma widma jest miarą stopnia rozróżniania dwóch sygnałów o zbliżonej częstotliwości na widmie).

Kolejną komplikacją jest ogromny zakres skali na osi pionowej. Zmienność naturalnej czułości w metodzie NMR w połączeniu ze zmianami abundancji naturalnej często uniemożliwia wykreślenie sygnałów różnych izotopów na jednym widmie. W rzeczywistości rozdzielczość pionowa widma będzie bardzo niska (rozdzielczość pionowa, tj. stosunek sygnału do szumu widma jest miarą czułości).

Jeśli nasza analiza chloroformu wygląda na dość skomplikowaną, to dlatego, że próbujemy porównać sygnały trzech różnych obserwowanych jąder na jednym widmie (ignorujemy tutaj wszelkie ograniczenia sprzętowe/elektroniczne). Dlatego w praktyce eksperymenty NMR wykonuje się dla jednego jądra obserwowanego. Chociaż można wzbudzić więcej niż jeden izotop jednocześnie, stosując więcej niż jedną częstotliwość nośną (np. eksperymenty z odsprężaniem), obserwuje się zawsze sygnały jednego izotopu. Dzięki temu znacznie upraszcza się analizę widma.

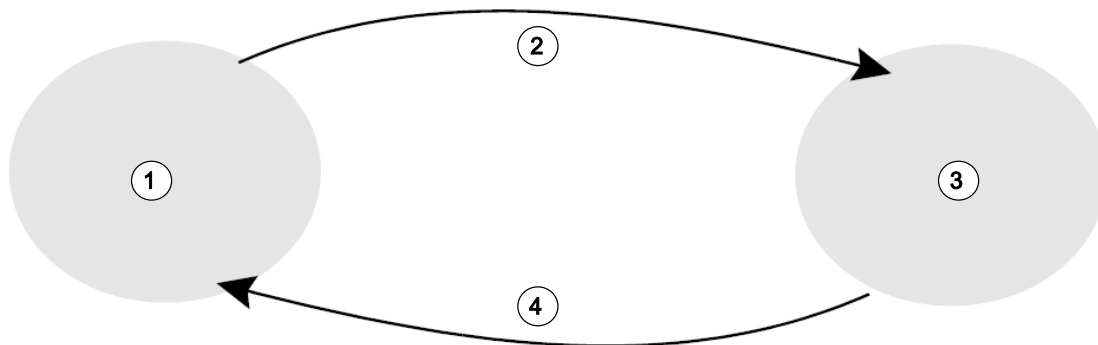
Wspomniano już wcześniej, że zmiany podstawowej częstotliwości rezonansowej, będącej efektem lokalnego otoczenia atomowego są zazwyczaj stosunkowo małe. Oznacza to, że na widmie nie występują duże zakresy spektralne. Co więcej, abundancja naturalna i naturalna czułość będą zawsze takie same dla danego izotopu. W związku z tym względna intensywność na przykład dwóch sygnałów emitowanych przez izotopy ^1H w danym widmie zależy jedynie od liczby atomów składających się na sygnał. To znacznie upraszcza analizę widm i uzyskanie informacji ilościowych. Zanim przejdziemy dalej do bardziej szczegółowego opisu techniki NMR, czytelnik powinien zapoznać się z pojęciem pomiaru sygnałów w *ppm* (ang. parts per million, ppm) (części na milion) względem sygnału odniesienia.

3.2 Związki odniesienia, herce, ppm

Jak już stwierdzono wcześniej, sygnały NMR są analizowane w odniesieniu do dwóch wielkości tj. intensywności i częstotliwości. Częstotliwość bezwzględną mierzy się w hercach (Hz — cykle na sekundę) lub w megahercach (MHz). Podawanie zmierzonych sygnałów jest uproszczone, jeśli wszystkie pomiary częstotliwości są wykonywane w odniesieniu do wzorca. W przypadku metody ^1H NMR zalecanym wzorcem jest związek chemiczny o nazwie tetrametylosilan (TMS). Jeśli rejestruje się widmo ^1H lub ^{13}C , obecność TMS prowadzi do powstania pojedynczego, łatwo identyfikowalnego pików. Pikowi temu przypisano wartość zero i częstotliwości wszystkich pozostałych pików podaje się jako częstotliwość względną w odniesieniu do częstotliwości TMS. Tak więc możemy mówić o sygnale znajdującym się 2,5 kHz *powyżej* pików TMS. Jest to lepszy sposób niż podawanie częstotliwości bezwzględnej sygnału, która może na przykład wynosić 500,1325 MHz.

Odnoszenie sygnałów do pików TMS wyraźnie zmniejsza liczbę cyfr potrzebną do opisu częstotliwości sygnału. Jednak można to jeszcze bardziej uprościć, jeśli zamiast herców zastosuje się jednostkę ppm. Jednostka ppm odpowiada częstotliwości wyrażonej w postaci ułamka bezwzględnej częstotliwości rezonansowej zależnej od siły pola magnetycznego danego magnesu. Zaletą jednostki ppm jest to, że pomiary częstotliwości są niezależne od siły pola magnetycznego danego magnesu. To znacznie upraszcza porównanie widm uzyskanych na różnych spektrometrach.

Współczynniki przeliczeniowe, które należy zastosować przy przeliczaniu wartości w hercach na ppm i odwrotnie, pokazano na poniższym schemacie.



Rysunek 3.5: Przeliczanie herców i ppm

1	Herc	3	ppm
2	Podzielić częstotliwość nośną (SFO1) w MHz	4	Pomnożyć częstotliwość nośną (SFO1) w MHz

Zalety stosowania jednostki ppm najlepiej ilustruje praktyczny przykład.

Załóżmy, że zarejestrowano sygnał ^1H 2,5 kHz powyżej sygnału TMS korzystając z częstotliwości nośnej (SFO1) wynoszącej 500 MHz. Częstotliwość każdego emitowanego sygnału NMR jest wprost proporcjonalna do siły pola magnetycznego danego magnesu. Ten sam sygnał pojawiłby się przy wartości 3,0 kHz powyżej sygnału TMS w przypadku spektrometru 600 MHz i przy wartości 2,0 kHz powyżej sygnału TMS w przypadku spektrometru 400 MHz. Pojedyncze przeliczenie nie stanowi dużej niedogodności, ale musi być wykonane dla każdego pików w każdym systemie. A teraz weźmy pod uwagę ten sam sygnał wyrażony w jednostkach ppm.

Częstotliwość w hercach podzielona przez SFO1 = częstotliwość w ppm.

Przykłady:

$$2500 \text{ Hz} / 500 \text{ MHz} = 5 \text{ ppm}$$

$$3000 \text{ Hz} / 600 \text{ MHz} = 5 \text{ ppm}$$

$$2000 \text{ Hz} / 400 \text{ MHz} = 5 \text{ ppm}$$

Można teraz powiedzieć, że sygnał ^1H znajduje się 5 ppm *powyżej* (tj. w dół pola) od pików TMS niezależnie od częstotliwości spektrometru.

Doświadczeni użytkownicy zawsze posługują się jednostką ppm, a widma zamieszczane w czasopiśmie naukowych mają skalę poziomą wyrażoną w ppm, a nie w hercach.

Czytelnik powinien mieć świadomość pewnych uproszczeń, które zostały zastosowane w powyższym przykładzie. Wartość częstotliwości nośnej ^1H w przypadku spektrometru 500 MHz nie wynosi dokładnie 500 MHz. Częstotliwość nośna wykorzystywana do obliczenia wartości w ppm powinna być dokładną wartością przypisaną parametrowi SF01. Podobnie w przypadku spektrometrów 600 MHz i 400 MHz, o których mowa powyżej, częstotliwość nośna ^1H nie wynosi dokładnie 600 MHz i 400 MHz.

Należy również zauważyć, że dodatnia wartość w ppm oznacza częstotliwość większą od TMS, którą zdefiniowano jako *w dół pola* względem TMS.

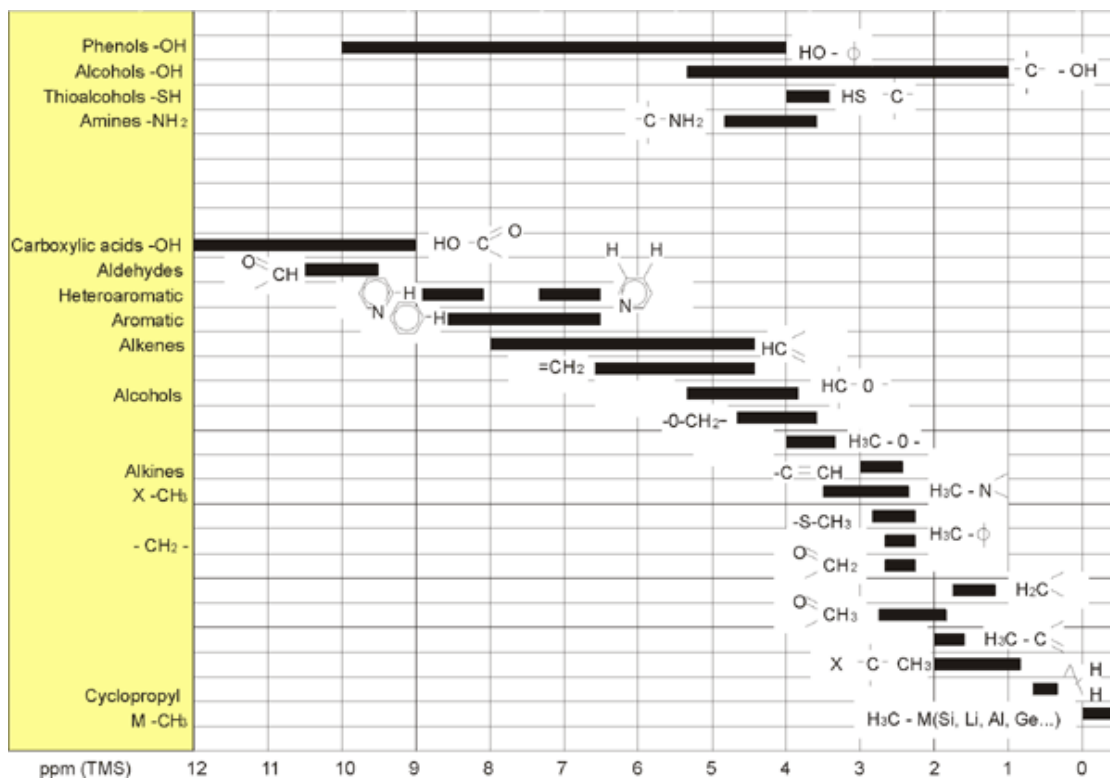
3.3 Protonowa spektroskopia NMR – przesunięcie chemiczne

Ponieważ ^1H jest najczęściej obserwowanym izotopem w eksperymentach NMR, zostanie on omówiony bardziej szczegółowo. Jądro ^1H zawiera jeden proton i dlatego widma, w których obserwowane jest jądro ^1H zwykle określa się jako widma protonowe.

Wspomniano już wcześniej, że proton w magnecie 11,7 T charakteryzuje się podstawową częstotliwością rezonansową w przybliżeniu 500 MHz, ale dokładna częstotliwość rezonansowa zależy od lokalnego otoczenia atomowego. Proton w cząsteczce chloroformu rezonuje z nieco inną częstotliwością w porównaniu do protonu w cząsteczce benzenu (C_6H_6). Dlatego emitowana częstotliwość jest w pewnym sensie znacznikiem, dostarczającym analitykom informacji jakościowych na temat lokalnego otoczenia atomowego, w którym znajduje się proton. To jest podstawa spektroskopii NMR.

Zmiana dokładnej wartości częstotliwości rezonansowej nosi nazwę *przesunięcia chemicznego*. Częstotliwość rezonansowa ulega przesunięciu na skutek oddziaływania sąsiednich atomów i wielkości ekranowania magnetycznego przez elektrony znajdujące się w pobliżu, co omówiono wcześniej. Wielkość przesunięcia jest zwykle mierzona w jednostce ppm względem pików TMS, któremu przypisano wartość 0 ppm.

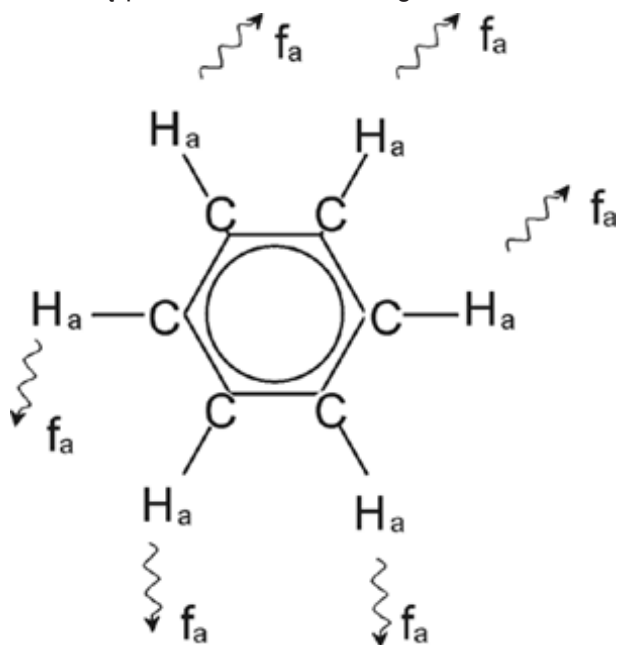
Większość protonów, niezależnie od związku organicznego, w jakim się znajdują, charakteryzuje się przesunięciem chemicznym w zakresie 14 ppm od TMS. Poniższy rysunek ilustruje typowe przesunięcia chemiczne protonów w związkach organicznych.



Rysunek 3.6: Przesunięcia chemiczne ¹H w związkach organicznych

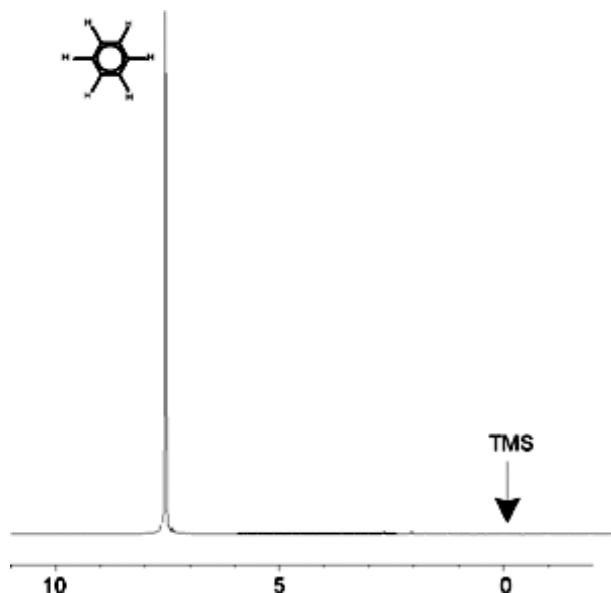
3.4 Widmo protonowe benzenu

Strukturę pierścienia benzenowego zilustrowano na poniższym rysunku:



Rysunek 3.7: Pierścień benzenowy

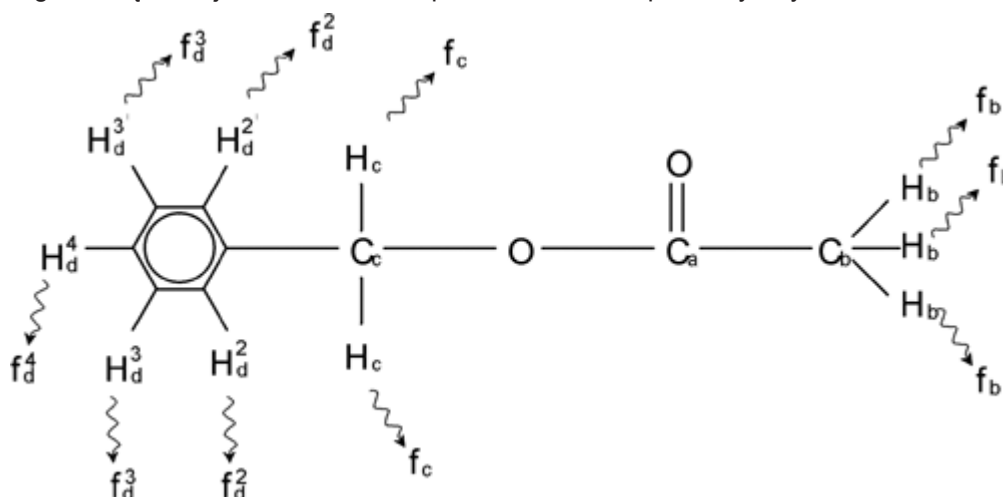
Wszystkie sześć protonów (oznaczonych jako H_a) można uznać za identyczne. Każdy z nich jest związany wiązaniem pojedynczym z atomem węgla. Z kolei każdy atom węgla tworzy dwa wiązania aromatyczne z sąsiadującymi z nim atomami węgla. Stąd każdy z sześciu protonów znajduje się w identycznym otoczeniu chemicznym i mówi się o nim, że jest *chemicznie równoważny*, a w tym przypadku nawet *magnetycznie równoważny*. Wszystkie atomy będą rezonować przy dokładnie tej samej częstotliwości f_1 , równocześnie nie wykazując efektu sprzężenia. Dlatego w przypadku czystego benzenu można oczekiwać pojedynczego sygnału. Poniższy rysunek przedstawia widmo benzenu w acetonie- d_6 , które pokazuje, że sygnał znajduje się przy 7,5 ppm.



Rysunek 3.8: Widmo benzenu

3.5 Widmo protonowe octanu benzylu

Octanu benzylu ($C_6H_5 - CH_2 - O - CO - CH_3$) jest bardziej skomplikowaną cząsteczką organiczną, której struktura została przedstawiona na poniższym rysunku:



Rysunek 3.9: Octanu benzylu

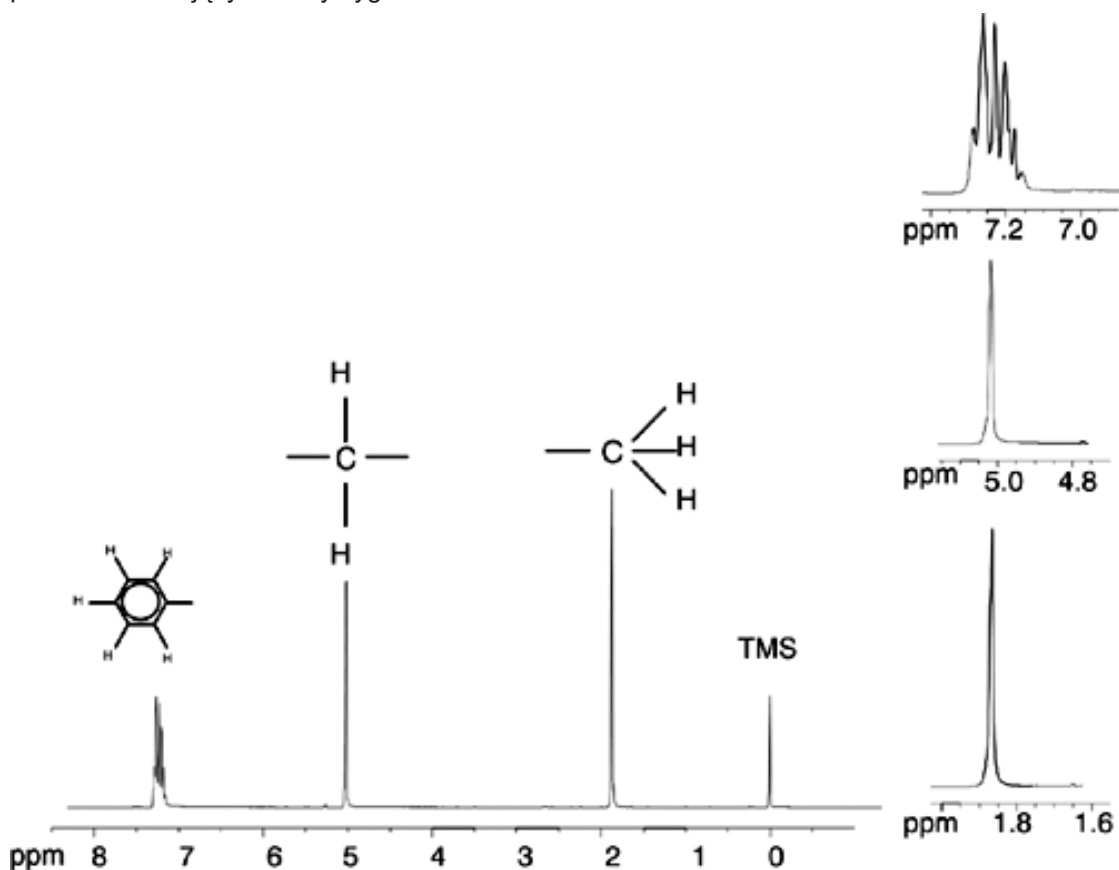
Możemy teraz rozróżnić trzy różne grupy protonów, które zostały odpowiednio oznaczone. Na przykład trzy protony oznaczone H_b niewątpliwie znajdują się w odmiennym otoczeniu atomowym od otoczenia dwóch protonów oznaczonych H_c .

Trzy protony H_b są związane z atomem węgla C_b , który z kolei jest połączony wiązaniem pojedynczym z innym atomem węgla C_a . Dwa protony H_c są związane z atomem węgla C_c , który z kolei jest połączony wiązaniem pojedynczym z pierścieniem benzenowym i atomem tlenu. Trzecią grupę protonów stanowi pięć protonów H_d samego pierścienia benzenowym. Poniższy rysunek przedstawia widmo protonowe octanu benzylu w acetonie- d_6 . W tym widmie należy oczekiwać trzech sygnałów odpowiadających trzem grupom protonów.

Należy zauważyć, że nastąpiło niewielkie przesunięcie położenia sygnałów protonów pierścienia benzenowego od 7,5 ppm (na rysunku przedstawiającym widmo benzenu) do około 7,2 ppm (na rysunku poniżej).

Protony pierścienia benzenowego nie są już magnetycznie równoważne, a w pewnym stopniu nie są nawet chemicznie równoważne i zostały odpowiednio oznaczone. Z rysunku 3.10 wyraźnie wynika, że sygnał emitowany przez protony H_d jest multipletem; tego typu informacje szczegółowe zostaną omówione w następnej części. Trzy piki protonów przedstawione na tym rysunku różnią się wyraźnie intensywnością.

Analiza ilościowa widma jest względnie prosta, ponieważ wszystkie sygnały są emitowane przez ten sam izotop 1H tzn. abundancja naturalna oraz naturalna czułość w metodzie NMR są identyczne dla każdego pik. W związku z tym pole powierzchni pod pikami benzenu, grupy CH_2 i CH_3 powinno pozostawać w stosunku odpowiednio 5:2:3 zgodnie z liczbą protonów emitujących dany sygnał.



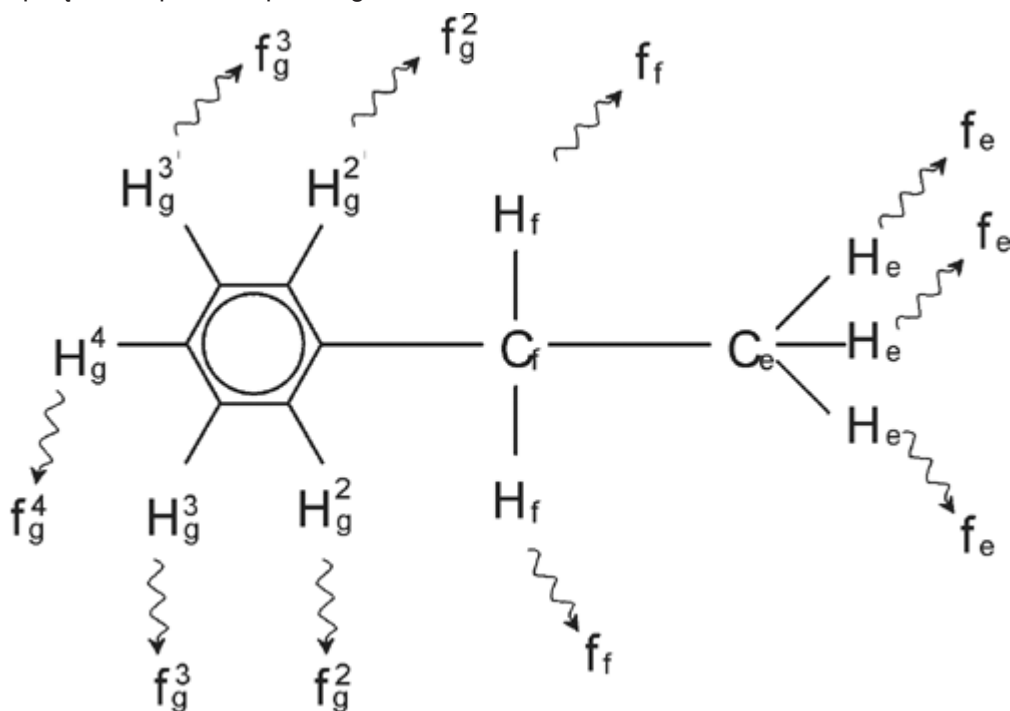
Rysunek 3.10: Widmo protonowe octanu benzylu

3.6 Widmo protonowe etylobenzenu ze sprzężeniem spinowo-spinowym

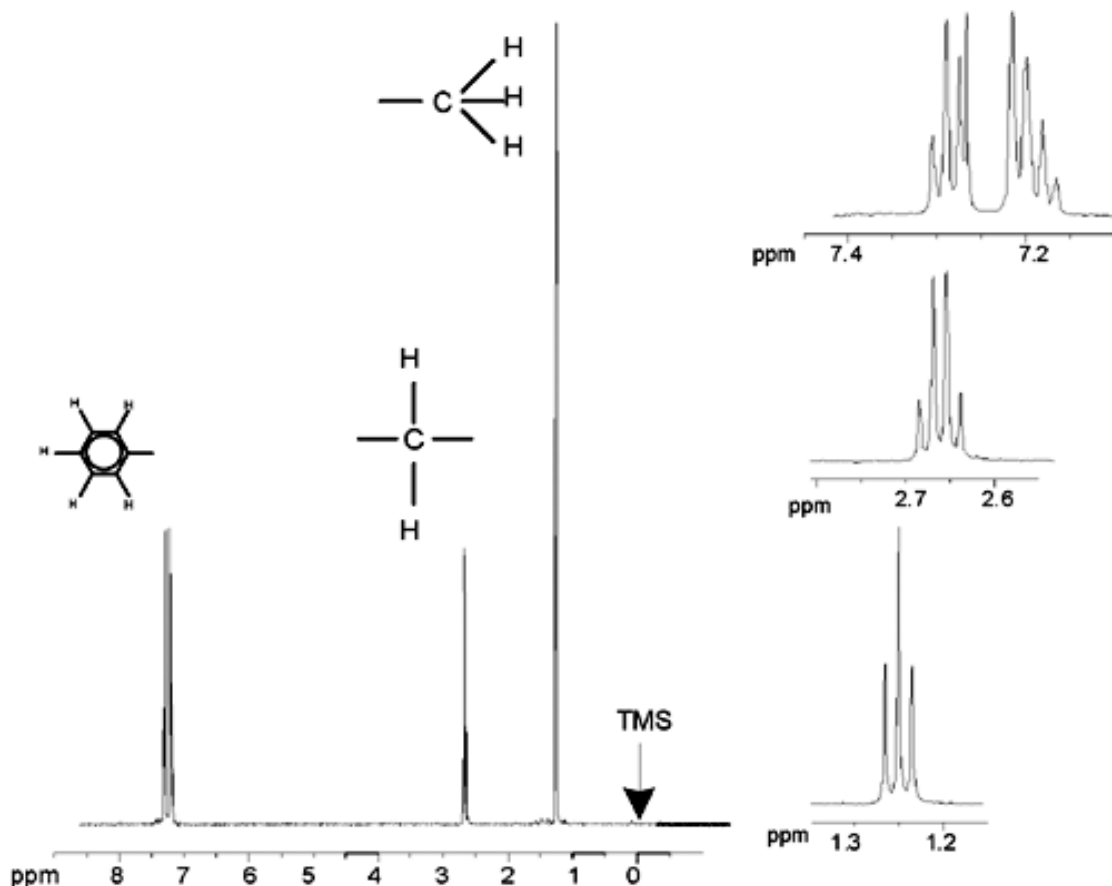
Opis widm protonowych NMR był dotąd znacznie uproszczony przez fakt, że wszystkie sygnały, z wyjątkiem sygnałów pierścienia benzenowego w octanie benzylu, były singletami. Strukturę związku organicznego etylobenzenu i odpowiadające mu widmo protonowe zilustrowano odpowiednio na rysunkach przedstawiających etylobenzen i widmo etylobenzenu. Tak jak poprzednio protony zostały oznaczone jako trzy odrębne grupy odpowiadające trzem podstawowym otoczeniom atomowym.

Najbardziej oczywistą różnicą między sygnałami występującymi w tym widmie oraz sygnałami w widmie octanu benzylu jest rozszczepienie na **multiplety**. Sygnał emitowany przez protony z grupy CH_3 jest **trypletem**, a sygnał protonów z grupy CH_2 jest **kwartetem**. Należy również zauważyć, że położenia sygnałów nie nakładają się. Protony grupy CH_3 w octanie benzylu emitują sygnał przy 1,85 ppm, a odpowiednie protony grupy CH_3 w etylobenzenu emitują sygnał przy 1,25 ppm będący trypletem. Nie jest to zaskakujące, ponieważ dwie grupy CH_3 znajdują się w różnych otoczeniach chemicznych.

Przyczyną rozszczepienia multipletu jest zjawisko znane jako sprzężenie spinowo-spinowe. Pełny opis tego zjawiska wykracza poza zakres tego podręcznika, czytelnik zaś powinien zapoznać się ze standardowym podręcznikiem poświęconym spektroskopii NMR w celu uzyskania szczegółowych informacji. Na potrzeby niniejszej instrukcji wystarczy krótki opis sprzężenia spinowo-spinowego.



Rysunek 3.11: Etylobenzen



Rysunek 3.12: Widmo etylobenzenu

Rozszczepienie sygnałów NMR na rysunku przedstawiającym etylobenzen wynika z oddziaływania magnetycznego między sąsiednimi protonami. Dwa protony H_f są magnetycznie równoważne i nie oddziałują ze sobą. Podobnie trzy protony H_e są magnetycznie równoważne i nie wpływają na siebie nawzajem. Ale dwa protony H_f i trzy protony H_e znajdują się w różnych otoczeniach lokalnych i są ze sobą „sprzężone” poprzez elektrony wiążące. Wynik wypadkowy tego sprzężenia to rozszczepienie sygnałów NMR na skutek oddziaływania dwóch grup ze sobą.

Dwa protony H_f mogą w sumie występować w trzech możliwych stanach magnetycznych (wynika to z orientacji spinów, stąd też nazwa sprzężenie spinowo-spinowe). W wyniku sprzężenia sygnały NMR emitowane przez protony H_e rezonują przy trzech możliwych częstotliwościach i obserwuje się triplet.

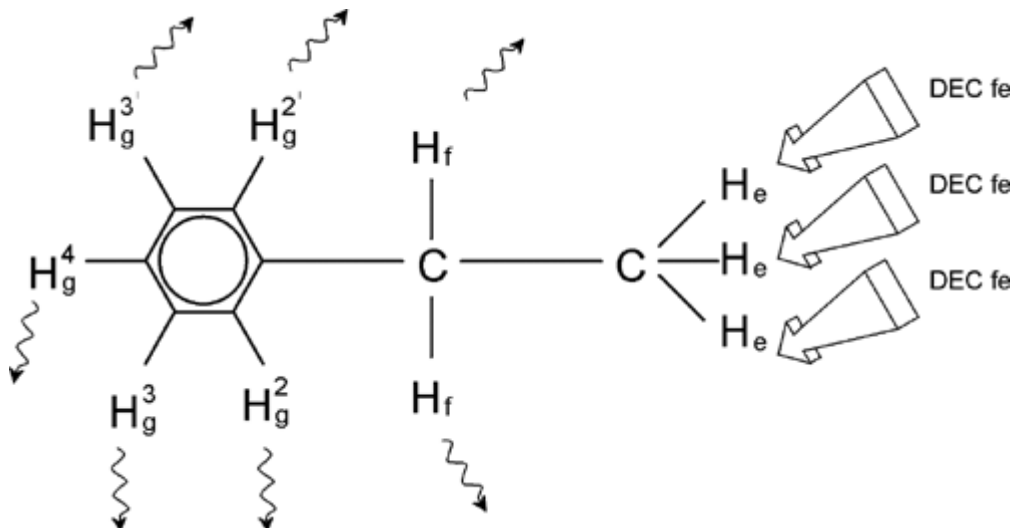
Podobnie działanie protonów H_e powoduje rozszczepienie sygnałów H_f. Trzy protony H_e mogą w sumie występować w czterech możliwych stanach magnetycznych. W rezultacie protony H_f rezonują przy czterech możliwych częstotliwościach, rozszczepiając sygnał na kwartet.

Sygnały protonów pierścienia benzenowego zostały również rozszczepione w wyniku braku równoważności magnetycznej i wynikającego z niego sprzężenia spinowo-spinowego. Powstaje pytanie, dlaczego protony CH₂ i CH₃ w cząsteczce etylobenzenu oddziałują ze sobą, a dwie porównywalne grupy protonów w octanie benzylu tego nie robią. Odpowiedzią jest liczba wiązań oddzielających obie grupy. W cząsteczce etylobenzenu obie grupy protonów są przyłączone do sąsiednich atomów węgla i można oczekiwać, że będą na siebie oddziaływać w wystarczającym stopniu. Natomiast w przypadku octanu benzylu oba atomy węgla C_c i C_b są połączone poprzez dwa dodatkowe wiązania między atomem tlenu a kolejnym atomem węgla. W wyniku tego grupy protonów są zbyt oddalone od siebie, aby wystąpiło istotne sprzężenie spinowo-spinowe.

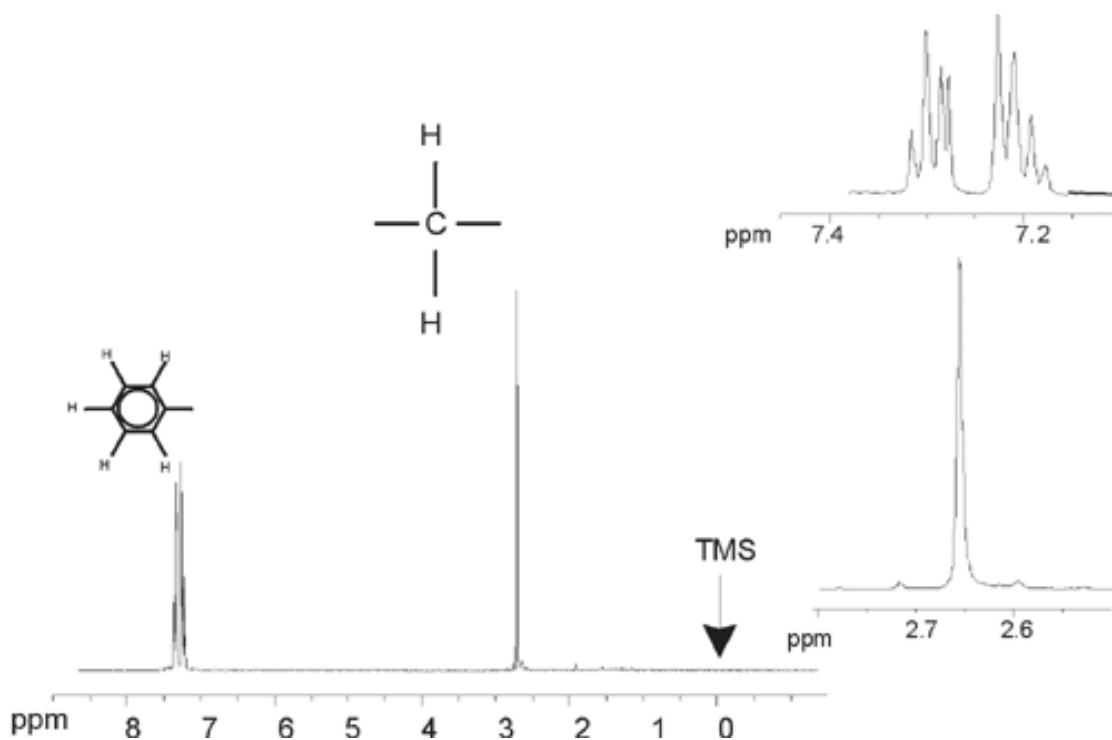
3.7 Rozprężanie

Efekt sprzężenia spinowo-spinowego można usunąć za pomocą techniki zwanej „odsprężaniem”. Odsprężanie polega na maskowaniu występowania określonej grupy protonów, np. protonów H_e na rysunku przedstawiającym cząsteczkę etylobenzenu. A zarejestrowane widmo wygląda tak, jak gdyby protony H_e nie występowały! Efekt ten uzyskuje się poprzez wysłanie sekwencji impulsów odsprężających o częstotliwości rezonansowej f_e protonów H_e , zmieniając w sposób trwały orientację spinów tych protonów. W przypadku widma zilustrowanego na rysunku widma etylobenzenu częstotliwość odsprężania wynosi 1,25 ppm powyżej pików TMS.

Impulsy odsprężające są zwykle dłuższe i słabsze niż impulsy wzbudzenia. Na poniższym rysunku przedstawiono eksperyment z odsprężaniem, a rysunek z widmem etylobenzenu z odsprężaniem homojądrowym pokazuje widmo po odsprężeniu. Kwartet CH_2 stał się teraz **singletem**. Specjaliści zajmujący się spektroskopią mówią wtedy o redukcji kwartetu do singletu. Ponadto pole powierzchni pod singletem powinno być równe polu pierwotnego kwartetu (należy porównać wysokości względne pików grupy CH_2 i pierścienia benzenowego na obu rysunkach). W widmie odsprężonym brak sygnału grupy CH_3 przy 1,25 ppm, gdyż impulsy odsprężające skutecznie znoszą wpływ występowania protonów CH_3 .



Rysunek 3.13: Eksperyment z odsprężaniem



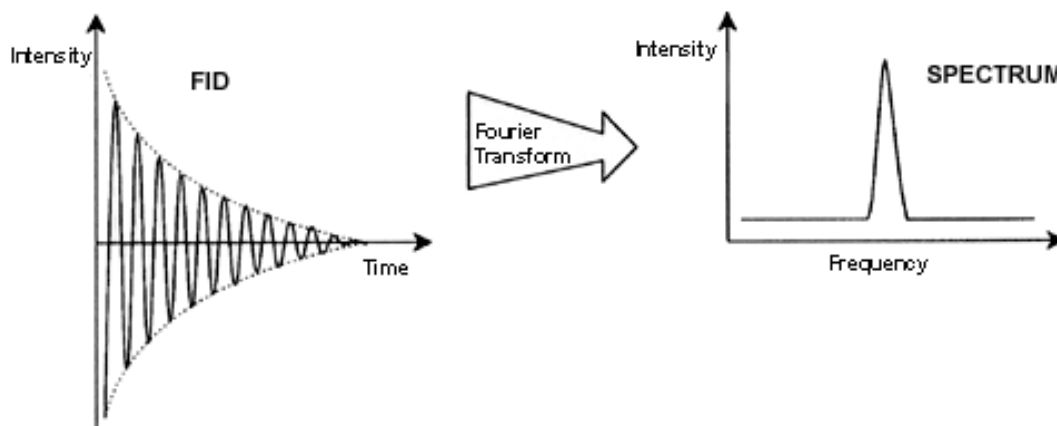
Rysunek 3.14: Widmo etylobenzenu z odsprężaniem homojądrowym

Powyżej opisany eksperyment stanowi przykład odsprężania homojądrowego, ponieważ rejestruje się i odspręża ten sam izotop tj. ^1H . Odsprężanie heterojądrowe ma miejsce wtedy, gdy izotop rejestrowany jest różny od izotopu ulegającego odsprężeniu. W rozdziale „[Widmo \$^{13}\text{C}\$ z odsprężaniem protonów \[67\]](#)” niniejszej instrukcji zostanie przeprowadzony eksperyment z odsprężaniem heterojądrowym, w którym rejestruje się ^{13}C , a rozpręża ^1H . Spektrometry AVANCE umożliwiają wykonanie bardzo skomplikowanych rodzajów eksperymentów w zależności od liczby zainstalowanych kanałów. Spektrometr czterokanałowy można wykorzystywać do obserwacji jednego jądra i odsprężania trzech innych jąder. Zakres eksperymentów, które można wykonać jest niezwykle szeroki, dzięki możliwości zainstalowania maksymalnie ośmiu niezależnych kanałów. Użytkownik powinien pamiętać, że obecnie czynnikiem ograniczającym nie jest wytwarzanie impulsów wzbudzających o częstotliwości radiowej i odsprężających, ale przesyłanie tych impulsów do próbki za pośrednictwem sond i do pewnego stopnia przez przedwzmacniacze. Drogę sygnału w ramach wykonywanego eksperymentu określa się w menu „edasp”. Więcej informacji szczegółowych można znaleźć w podręczniku „Polecenia i parametry akwizycji” (P/N H9775SA3).

3.8 Sygnał FID a widmo

Sygnały emitowane przez atomy wzbudzone w próbce zostają zarejestrowane w spektrometrze i poddane transformacji Fouriera przez oprogramowanie zainstalowane w komputerze do obsługi danych. Proces odbierania sygnałów NMR nosi nazwę rejestracji. Mówi się, że dane są rejestrowane. Należy wprowadzić rozróżnienie między dwoma terminami: sygnał FID (domena czasu) i powiązane z nim widmo (domena częstotliwości).

Jeśli prowadzona jest rejestracja, zapisane zostają dane surowe, zaś odebrany sygnał określa się jako FID (sygnał zaniku swobodnej precesji). Typowy sygnał FID pokazano na rysunku poniżej.



Rysunek 3.15: Transformacja Fouriera

Zanim sygnał FID będzie mógł zostać przeanalizowany, należy wpiery dokonać jego przekształcenia w domenę częstotliwości. Następuje to za pomocą transformacji Fouriera. **Transformacja Fouriera** jest operacją matematyczną, w trakcie której sygnał **FID** przekształca się w widmo częstotliwości. Sygnał FID jest sygnałem, którego natężenie zmienia się w funkcji czasu, zaś widmo pokazuje, w jaki sposób natężenie zależy od częstotliwości. Transformacja Fouriera jest najważniejszą spośród operacji przetwarzania, które normalnie wykonuje się na danych surowych.

4 Opis systemu

Spektrometr składa się z następujących podjednostek:

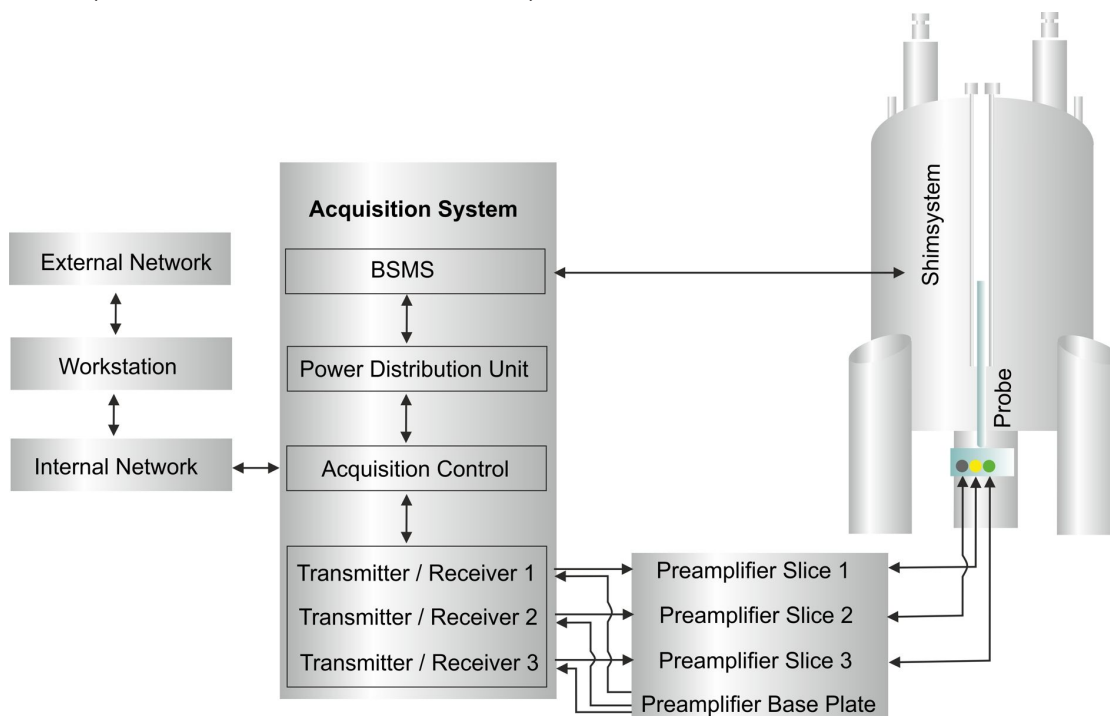
- **Konsola operatora** zawierająca komputer, monitor i klawiaturę.
- **Konsola** zawierająca sprzęt elektroniczny.
- **Układ magnesu** zawierający system shim'ów i sondę.



Rysunek 4.1: Konsola AVANCE NEO i magnes Ascend

4.1 Przegląd budowy systemu AVANCE

Poniższy rysunek pokazuje w sposób uproszczony budowę systemu AVANCE NEO. Więcej informacji dotyczących systemu AVANCE i elementów składowych podano w podręczniku BASH (Bruker Advanced Service Handbook).



Rysunek 4.2: Przegląd budowy systemu AVANCE NEO

4.1.1 Konsola operatora i połączenia

Wszystkie aspekty działania spektrometru są sterowane z konsoli operatora. Projektowanie i wykonywanie eksperymentów, a także analiza danych są kontrolowane za pomocą poleceń wprowadzanych przez operatora na konsoli. Podzespoły konsoli operatora obejmują:

Komputer główny: Jest to komputera osobisty. Komputer główny uruchamia program TopSpin i obsługuje całą analizę danych oraz ich przechowywanie. Wszystkie operacje związane z akwizycją danych są kontrolowane przez drugi system obliczeniowy o nazwie AQS umieszczony w samej konsoli.

Połączenie Ethernet z komputera głównego do AQS: Służy do przesyłania danych i instrukcji między komputerem głównym a AQS.

4.2 Konsola

Jednostka ta może występować w różnych konfiguracjach, takich jak NanoBay, OneBay lub TwoBay w zależności od systemu i mieści większość elementów elektronicznych wbudowanych w nowoczesny spektrometr cyfrowy. Głównymi jednostkami są **AQS**, **BSMS** (Bruker Smart Magnet System), a także różne wzmacniacze i wzmacniacze gradientowe (w przypadku mikroobrazowania lub dyfuzji).

AQS: Różne jednostki znajdujące się w systemie AQS generują impulsy o częstotliwości radiowej wykorzystywane do wzbudzenia próbki, a także odbierania, wzmacniania i digitalizacji sygnałów NMR emitowanych przez próbkę. Dla każdego kanału częstotliwości radiowej istnieje nadajnikoodbiernik (**TRX 1200**), który interpretuje program impulsów, zamienia go na sygnały o częstotliwości radiowej, a także zawiera odbiornik, digitalizator

i cyfrowe filtrowanie danych. Oznacza to, że konsola AVANCE posiada system wielu odbiorników, a ich liczba odpowiada liczbie nadajników. Gradienty pola magnetycznego są generowane przez dodatkową jednostkę o nazwie **GTU** (ang. Gradient and Trigger Unit). Jednostka ta generuje również pulsy wyzwajające w czasie rzeczywistym wykorzystywane do synchronizacji innych jednostek i odbiera sygnały wyzwajające (np. wyzwalacz rotora MAS). Wspólny sygnał zegara dla wszystkich kanałów jest dostarczany przez płytę REF (Reference). W związku z tym wszystkie częstotliwości w łańcuchu częstotliwości radiowych są uzyskiwane z jednego precyzyjnego oscylatora kwarcowego, aby zapewnić całkowitą synchronizację i niski poziom szumu. System AQS mieści również jednostkę **EPU**. Jest to potężny komputer, który zarządza spektrometrem AVANCE, przesyła informacje o programie impulsowym do jednostek TRX i GTU, zapewnia kontrolę akwizycji i komunikuje się z zewnętrznymi stacjami roboczymi do przetwarzania danych. Ostatni etap filtrowania cyfrowego odbywa się w jednostce EPU, a także gromadzenie danych FID. Informacje są następnie przesyłane przez sieć Ethernet do zewnętrznego komputera głównego w celu dalszego przetwarzania i przechowywania. Należy podkreślić, że jednostka EPU ma całkowitą kontrolę nad działaniem spektrometru w czasie trwania eksperymentu. Ma to zapewnić nieprzerwane działanie i zagwarantować integralność akwizycji.

BSMS: Ten system jest kontrolowany przez oprogramowanie wykorzystujące polecenie „bsmsdisp” i wykorzystywany do sterowania systemami lock'owania i shim'ów, a także kontrolowania podnoszenia i rotacji próbki. Jednostka **BSVT** jest również włączona do systemu BSMS. Jej funkcją jest zmiana temperatury próbki w kontrolowany sposób lub utrzymywanie temperatury na stałym poziomie. Ponadto we wnętrzu systemu BSMS można umieścić maksymalnie trzy płyty **GAB/3**. Zapewniają gradienty pola magnetycznego dla sond wysokiej rozdzielczości i są kontrolowane przez jednostkę **GTU**.

Wzmacniacze, znane także jako **nadajniki**. Do wzbudzenia próbki NMR niezbędne są często sygnały mające stosunkowo dużą amplitudę, dlatego konieczne jest zastosowanie wzmocnienia sygnałów o częstotliwości radiowej z jednostek TRX. Wzmacniacze mogą być wewnętrzne (wtedy znajdują się we wnętrzu systemu AQS) lub zewnętrzne (jednostki odrębne i samodzielne). Przewody biegnące bezpośrednio z wyjść wzmacniacza do **HPPR** (Przedwzmacniacz o dużej wydajności) przekazują sygnał o częstotliwości radiowej do próbki. Chociaż istnieje szeroki zakres dostępnych wzmacniaczy (w tym wzmacniacze monolityczne), dwie główne kategorie to:

Wzmacniacze selektywne, na przykład wzmacniacze selektywne ^1H , ^{19}F , ^{13}C lub ^{31}P zaprojektowane specjalnie do wzmocniania wyższych częstotliwości powiązanych z ^1H , ^{19}F , ^{13}C lub ^{31}P .

Wzmacniacze szerokopasmowe (określane także jako wzmacniacze X) projektuje się w celu wzmocnienia szerokiego zakresu częstotliwości. Są one stosowane do wzbudzania tak zwanych jąder X (tj. zazwyczaj wszystkich z wyjątkiem ^{19}F i ^1H).

Należy pamiętać, że nowe wzmacniacze szerokopasmowe obejmują również jądro ^{19}F do 600 MHz, co upraszcza stosowanie sond SMART oraz BBFO, w których szerokopasmową cewkę X można dostroić do jądra ^{19}F .

PDU: Jednostka dystrybucji mocy (ang. Power Distribution Unit, PDU) z tyłu konsoli służy do zasilania spektrometr w kontrolowany sposób. Możliwe jest włączenie/wyłączenie systemu AVANCE za pomocą instrukcji oprogramowania TopSpin. Jednostka PDU dba o to, aby wszystkie urządzenia były włączane/wyłączane we właściwej kolejności i aby jednostki dużej mocy były włączane z odpowiednimi opóźnieniami w celu ograniczenia prądu rozruchowego systemu.

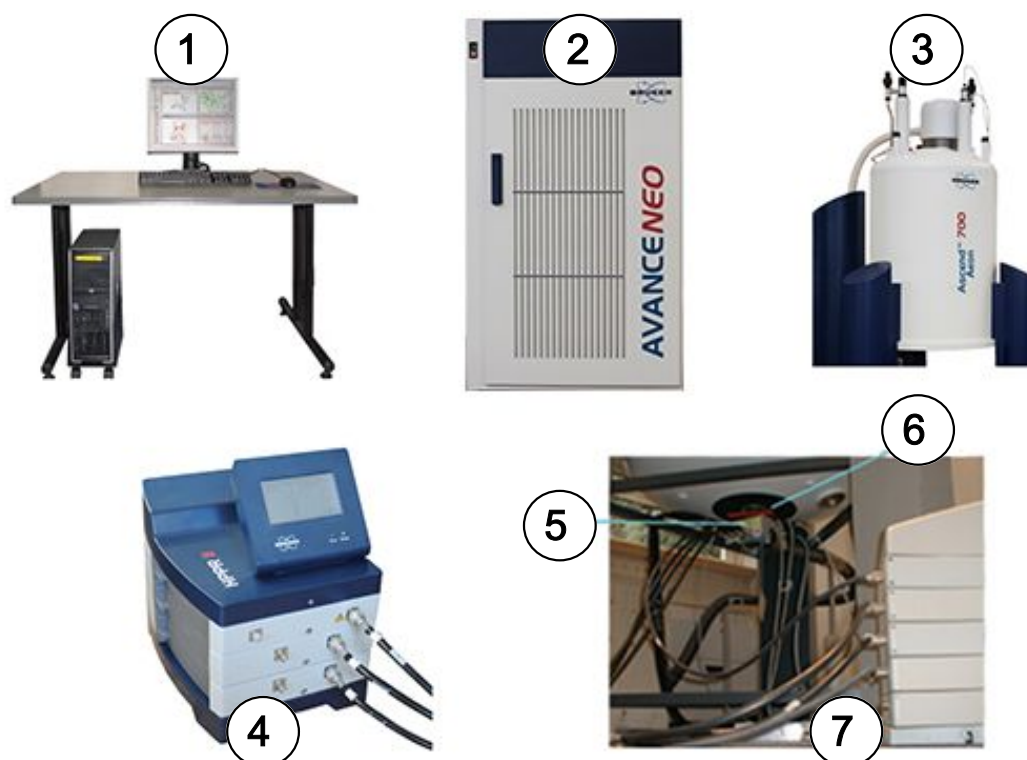
4.3 Łącze między komputerem głównym a systemem AQS

Chociaż podczas typowej sesji w programie TopSpin łącze to jest wykorzystywane w sposób ciągły i jest w praktyce niewidoczne dla użytkownika, jest ono przerwane w dowolnym momencie, gdy komputer główny lub konsola zostają wyłączone i musi zostać nawiązane ponownie po ich włączeniu. Zostanie to wykonane automatycznie.

4.4 Magnes, układ kompensacyjny (shim'ów), HPPR i sonda

magnes wytwarza pole magnetyczne niezbędne do indukowania przejść NMR. Aby utrzymać nadprzewodnictwo w systemie, rdzeń magnesu jest chłodzony do bardzo niskiej temperatury za pomocą ciekłego azotu i helu (więcej informacji szczegółowych można znaleźć w części [Magnes oraz naczyne Dewara magnesu \[27\]](#)).

System shim'ów w temperaturze pokojowej zainstalowany w dolnej części magnesu stanowi grupa cewek (shim'ów), przez które przepływa prąd, wykorzystywanych do maksymalnego zwiększenia jednorodności pola przez zrównoważenie wszelkich występujących niejednorodności. Prąd elektryczny płynący w cewkach shim'owych o temperaturze pokojowej (określa się je w ten sposób, ponieważ nie są chłodzone przez zanurzenie w ciekłym helu) jest sterowany przez system BSMS i można go skorygować z poziomu wyświetlacza BSMS w celu optymalizacji sygnału NMR. Ma to duży wpływ na rozdzielczość i czułość sygnału. Działanie polegające na regulacji prądu elektrycznego w cewkach shim'owych o temperaturze pokojowej nosi nazwę **shim'owania** magnesu.



Rysunek 4.3: Zdjęcia magnesu, systemu shim'ów, sondy i HPPR

1	Konsola operatora	5	Sonda
2	Konsola	6	System shim'ów
3	Magnes	7	Sonda i system shim'ów
4	Moduł HPPR/2 Cover 2 z połączeniami do sondy		

Chociaż przedwzmacniacz **HPPR/2** (przedwzmacniacz o dużej czułości) przekazuje nadawany sygnał do próbki, jego głównym zadaniem jest wzmacnianie stosunkowo słabych sygnałów emitowanych przez próbkę. Znajduje się on u podstawy magnesu, aby wzmocnić sygnał NMR jak najwcześniej, a tym samym zminimalizować straty na długości przewodu. Po wzmocnieniu sygnału za pomocą przedwzmacniacza HPPR/2 wszelkie późniejsze straty na przewodach mają mniejsze znaczenie. Przedwzmacniacz HPPR/2 nadaje ponadto i odbiera sygnały lock'owania deuteru (lub fluoru) oraz jest wykorzystywany w procedurze dostrajania.

Można skonfigurować do 8 (**HPPR/2**) indywidualnych modułów (oprócz modułu górnego, który występuje zawsze). Jedną z najbardziej typowych konfiguracji składa się z trzech odrębnych modułów **protonowego**, **X-BB** i **2H** wraz w modulem górnym.

Sonda jest wprowadzana do systemu shim'ów u podstawy magnesu i zasadniczo składa się z różnych cewek używanych do przesyłania impulsów wzbudzających do próbki, jak również do odbioru sygnału wyemitowanego. Ponadto sonda przekazuje i odbiera sygnał lock'owania.

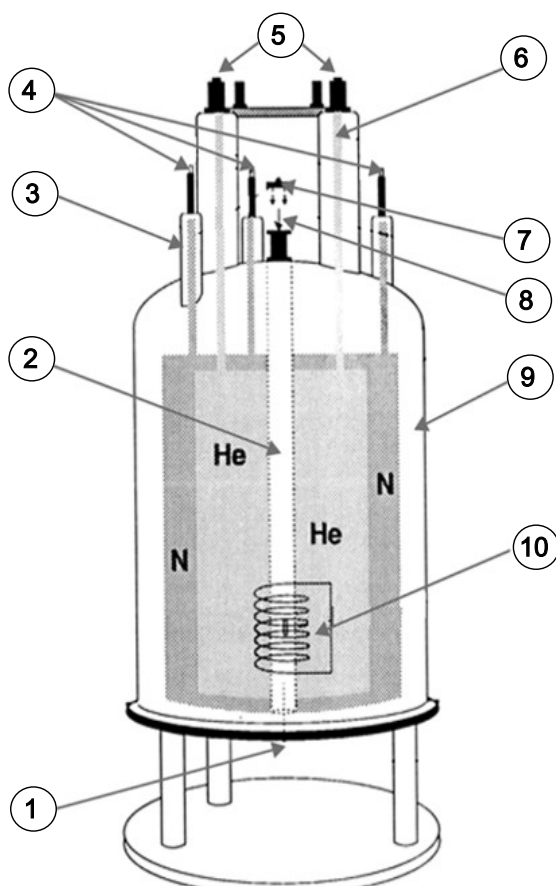
4.5 Magnes oraz naczynie Dewara magnesu

Dostępnych jest wiele rodzajów magnesów o różnej sile pola magnetycznego. **Siłę pola magnetycznego** określa się w oparciu o częstotliwość sygnałów NMR emitowanych przez atomy wodoru. Im silniejsze pole magnetyczne, tym wyższa częstotliwość dla wodoru. Na przykład magnes 500 MHz (11,7 T) oznacza, że jeśli próbkę chemiczną umieści się w magnecie w celu wykonania analizy, atomy ^1H w próbce będą emitować sygnały o częstotliwości bliskiej 500 MHz. Firma Bruker oferuje magnesy w zakresie 300–1000 MHz.

Magnesy nadprzewodzące są **elektromagnesami** i jako takie wykorzystują fakt, że prąd elektryczny wytwarza pole magnetyczne. **Rdzeń magnesu** składa się z dużej cewki w kształcie solenoidu, zbudowanej z drutu nadprzewodzącego, przez który płynie prąd. W środku cewki występuje bardzo silne statyczne pole magnetyczne. Próbkę do analizy umieszczana jest wewnątrz tego pola magnetycznego.

W bardzo niskich temperaturach niektóre materiały wykazują niezwykłą właściwość — nadprzewodnictwo. Drut nadprzewodzący przenosi energię elektryczną bez potrzeby jakiegokolwiek napędu (tj. akumulatora lub zasilania sieciowego). Po włączeniu prądu pętla nadprzewodząca będzie działać w nieskończoność. Magnesy firmy Bruker składają się z takiej pętli nadprzewodzącej. Jedyną czynnością konserwacyjną niezbędną przy magnecie jest utrzymanie cewki w ciekłym helu.

Magnes składa się z kilku części. Z obudowy zewnętrznej magnesu usunięto powietrze, zaś powierzchnie wewnętrzne są posrebrzane (zasada działania jest ta sama jak w przypadku termosu). Następnym elementem jest kąpiel azotowa, dzięki której temperatura spada do $-195,8^\circ\text{C}$ (77,35 K), i wreszcie zbiornik z helem, w którym zanurzona jest cewka nadprzewodząca. Zbiornik jest izolowany termicznie od kąpeli azotowej przez drugi element, z którego usunięto powietrze (patrz rysunek poniżej).



Rysunek 4.4: Magnes nadprzewodzący

1	Umieścić sondę w tym miejscu	6	Wieża helowa
2	Otwór	7	Zatyczka metalowa
3	Wieża azotowa	8	Umieścić próbkę w tym miejscu
4	Porty zbiornika azotu	9	Komora próżniowa
5	Porty zbiornika helu	10	Magnes

4.5.1 Otwór o temperaturze pokojowej

Zbiorniki helu i azotu otaczają kolumnę centralną noszącą nazwę otworu magnesu. Górną część otworu zamyka zazwyczaj zatyczka metalowa. Dostępne są magnesy o standardowej (54 mm) lub zwiększonej (89 mm) średnicy otworu. Próbkę do analizy wprowadza się do magnesu przez górną część otworu. Sondy, w których znajduje się próbka i które przekazują sygnały do próbki i z próbki, wprowadza się od dołu.

4.5.2 Zbiornik z helem

Zbiornik z helem w magnecie standardowym jest zawieszony na dwóch sztykach wystających wysoko nad magnesem. Dostęp do zbiornika jest możliwy przez dwa wloty. Jeden z nich umożliwia uzupełnianie ciekłego helu, a także wprowadzanie **czujnika poziomego helu**. Drugi wlot wykorzystuje się jedynie w przypadku ładowania lub rozładowywania magnesu. W sztykach na zbiorniku helu może znajdować się więcej zaworów sterujących uwalnianiem niewielkich ilości helu, z których odparowywanie jest nieuniknione.



Uwaga: Wyłącznie osoby przeszkolone mogą manipulować zaworami i napełniać magnes ciekłym heliem.

4.5.3 Zbiornik z azotem

Trzy krótsze wyloty znajdujące się nad magnesem zapewniają dostęp do zbiornika z azotem.

4.6 Wprowadzenie do układu blokującego

W tym punkcie podano podstawowe informacje dotyczące zasady działania układu blokującego. Kwestie praktyczne dotyczące postępowania przy blokowaniu próbki zostaną omówione w punkcie .

Zadaniem układu blokującego jest doprowadzenie do tego, aby natężenie pola magnetycznego otaczającego próbkę nie zmieniało się w trakcie eksperymentu oraz aby nie następowały jego wahania wskutek zakłóceń zewnętrznych. Analiza metodą NMR obejmuje dokładny pomiar częstotliwości sygnałów emitowanych przez próbkę. Częstotliwość tych sygnałów jest wprost proporcjonalna do natężenia pola magnetycznego, jeśli więc następują wahania natężenia, wpływa to na częstotliwość emitowaną. W związku z tym użytkownik musi mieć pewność, że natężenie pola magnetycznego będzie zawsze miało tę samą wartość, co określa się nazwą **blokowania** próbki. **Układ blokujący** jest zasadniczo odrębnym spektrometrem zaprojektowanym do rejestracji deuteru. Należy wspomnieć o tym, że sygnały emitowane przez deuter zazwyczaj nie są znacznie oddalone od częstotliwości rejestrowanych. Jeśli jednak częstotliwość deuteru nie jest odpowiednia, można zastosować **blokowanie fluorem** (^{19}F). Ponieważ blokowanie deuterem wykorzystuje się najczęściej, w tym miejscu zajmiemy się jedynie tą metodą; warto jednak zauważyć, że zasady blokowania deuterem i fluorem są identyczne.

W przypadku spektrometrów AVANCE układ BSMS zapewnia elementy sprzętowe niezbędne do blokowania, zaś odrębny moduł deuterowy w przedwzmacniaczu HPPR wysyła i odbiera sygnały blokowania. Rzecz jasna do analizowanych próbek należy wprowadzić pewną ilość deuteru. Można tego dokonać w najprostszy sposób rozpuszczając próbkę w rozpuszczalniku deuterowanym. *Rozpuszczalnik deuterowany* to rozpuszczalnik, w którym znaczna część atomów wodoru została zastąpiona deuterem. Najczęściej wykorzystywane rozpuszczalniki deuterowane to aceton- d_6 , benzen- d_6 i chloroform- d i DMSO- d_6 , jednak dostępnych jest wiele innych. Próbką, którą w tej instrukcji wykorzystano do zilustrowania podstawowych technik NMR, jest antranilan mentylu w DMSO- d_6 .

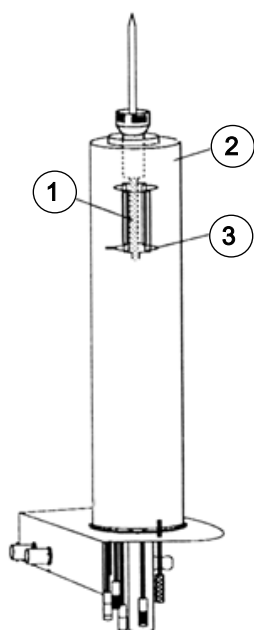
Częstotliwość sygnałów emitowanych przez deuter dla magnesu o konkretnej wielkości jest dokładnie znana. W związku z tym, jeśli natężenie pola magnetycznego jest odpowiednie, każde jądro deuteru w próbce powinno emitować dokładnie taką częstotliwość. Jeśli zmienia się natężenie pola magnesu, wpływa to odpowiednio na częstotliwość deuteru. Układ blokujący wykorzystuje odbiornik (znajdujący się we wnętrzu modułu BSMS) monitorujący częstotliwość deuteru, który wprowadza odpowiednie korekty natężenia pola magnetycznego.

Odbiornik w układzie blokującym został zaprojektowany w taki sposób, że jeśli natężenie pola jest prawidłowe (tzn. zostanie wykryta prawidłowa częstotliwość deuteru), nie są wprowadzane korekty pola. Jeśli jednak nastąpi zmiana natężenia pola (przesunięcie), natężenie prądu ulega zmianie w specjalnej cewce (cewka H_0) w układzie kompensacyjnym magnesu, wskutek czego natężenie pola powraca do wartości prawidłowej. Częstotliwość deuteru mierzy się kilka tysięcy razy na sekundę. W związku z tym przez cały czas blokowania układu użytkownik ma pewność, że podczas rejestracji utrzymywane jest stałe natężenie pola.

4.7 Sondy

Sondę projektuje się w tym celu, aby utrzymywała próbkę, wysyłała sygnały o częstotliwości radiowej, które wzbudzają próbkę, i odbierała sygnały emitowane. Nadawanie sygnałów i ich odbiór odbywa się za pomocą specjalnie zaprojektowanych cewek częstotliwości radiowej (RF).

Sondę umieszcza się w dolnej części magnesu; znajduje się ona wewnątrz cewek shim'owych o temperaturze pokojowej. Przewody koncentryczne przenoszą sygnały wzbudzające ze wzmacniaczy w konsoli do sondy, a sygnał NMR z próbki do odbiornika. Przewody są poprowadzone przez zestaw przedwzmacniaczy (HPPR), które znajdują się obok podstawy magnesu, a w przypadku systemów NanoBay wbudowane są w konsolę. **Przedwzmacniacze** są potrzebne do wzmocnienia sygnałów NMR, które są zazwyczaj bardzo słabe.

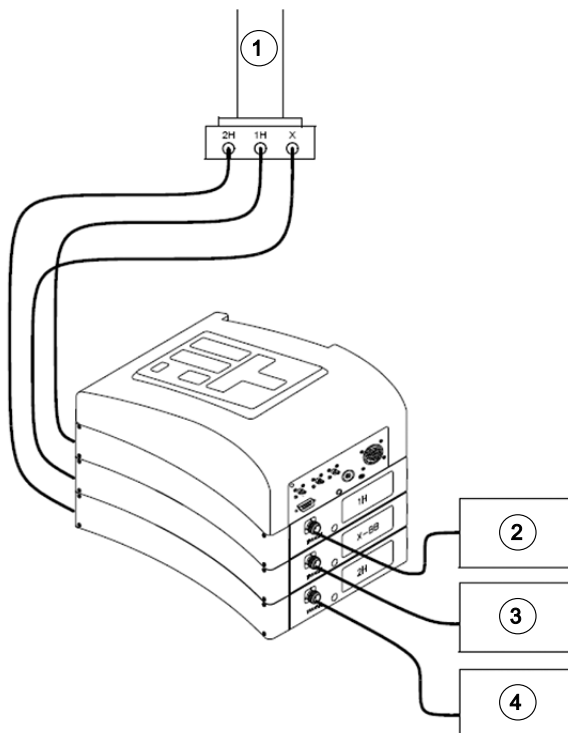


Rysunek 4.5: Próbką umieszczona w sondzie

1	Próbka	3	Cewki
2	Sonda		

Dostępne są sondy w różnych rozmiarach i różnego typu. Wielkość sondy podawana jest w odniesieniu do wielkości probówek, które może pomieścić, przy czym najpopularniejsze są średnice probówek 5 mm i 10 mm. W zależności od rodzaju eksperymentu stosuje się różne typy sond. **Sondy selektywne** zostały specjalnie zaprojektowane w celu obserwacji konkretnych jąder, np. ^{13}C , zaś sondy do rejestracji wielu jąder (X-BB lub szerokopasmowe) można wykorzystywać do badania szerokiego zakresu jąder. Liczba i budowa cewek wewnętrznych to parametry odróżniające fizycznie poszczególne rodzaje sond. Ponadto średnica zewnętrzna i długość sondy są zgodne ze specyfikacjami poszczególnych magnesów (średnica duża lub standardowa; różna długość od dna do środka pola magnetycznego w przypadku magnesów o różnym natężeniu pola).

Sygnały wchodzą i opuszczają cewki sondy przez wyraźnie oznakowane złącza, które umieszczono u podstawy sondy. Ten sam przewód służy do przesyłania sygnału do sondy i z niej. Każda sonda posiada cewkę wewnętrzną (**cewkę rejestracyjną**). Cewka ta znajduje się możliwie najbliżej próbki, aby zwiększyć czułość do maksimum. Oznakowanie kolorami złącz BNC cewki wewnętrznej jest zgodne z prostym schematem. Ma zawsze ten sam kolor co prostokątny pasek umieszczony bezpośrednio nad złączami BNC. Poniższy rysunek pokazuje oznakowanie sondy do obserwacji wielu jąder. W tym przypadku cewka szerokopasmowa jest cewką wewnętrzną.



Rysunek 4.6: Typowe okablowanie HPPR

1	Sonda	3	Podłączenie do wzmacniacza X
2	Podłączenie do wzmacniacza protonów	4	Podłączenie do nadajnika BSMS 2H

4.8 Sonda szerokopasmowa

Jednym z rodzajów sond, który zostanie opisany w niniejszej części jako przykład typowej sondy, jest 5 mm sonda BBO Smart. Jak sama nazwa wskazuje, ta sonda jest przeznaczona dla użytkowników, którzy są zainteresowani analizą próbek zawierających różne jądra. Zakres częstotliwości X obejmuje zazwyczaj od ^{15}N do ^{31}P , w tym ^{19}F .

Lewe złącze BNC oznaczono ^2H (patrz poniższy rysunek) i jest wykorzystywane do przesyłania sygnału lock'u. Pozostałe dwa połączenia są związane z sygnałami ^1H i jąder X i zostały odpowiednio oznakowane. Przewody wychodzące ze złącz BNC odpowiadających ^1H , X i ^2H podłączono do przedwzmacniaczy.



Rysunek 4.7: Przykład sondy szerokopasmowej

Sondy zaprojektowano tak, aby umożliwić kontrolowanie temperatury próbki NMR. Do kontroli temperatury próbki służy **grzałka** w połączeniu z linią transferową powietrza/ N_2 . **Termopara** jest wykorzystywana jako termometr do monitorowania temperatury próbki. Wszystkie te urządzenia są przymocowane do podstawy sondy i są łatwo dostępne. Jednostka sterowania temperaturą (**VTU**), która znajduje się wewnątrz konsoli stale monitoruje odczyt termopary i wprowadza korekty mocy grzałki, aby utrzymać odpowiednią temperaturę.

Prawie wszystkie sondy o wysokiej rozdzielczości są wyposażone w cewki gradientowe, a złącze znajduje się z boku podstawy sondy.

W czarnej skrzynce u podstawy sondy znajdują się elementy do strojenia i dopasowywania. Służą one do precyzyjnej regulacji sondy w celu optymalizacji wydajności. Podczas analizy związku zostaje on wzbudzony sygnałami o określonej częstotliwości (częstotliwości rezonansowej). Różne jądra ulegają wzbudzeniu przez odmienne częstotliwości; strojenie oznacza korektę w obwodach sondy, dzięki czemu jej czułość jest największa przy odpowiedniej częstotliwości. Ponadto następuje dopasowanie sondy, dzięki czemu odbita (czyli stracona) zostaje możliwie najmniejsza część sygnałów wzbudzających i sygnałów FID. Zarówno strojenie, jak i dopasowywanie przebiegają interaktywnie, co oznacza, że nie można ich ustawić niezależnie od siebie.

Sondę należy dostroić i dopasować przy każdej zmianie próbki w magnesie. Każda cewka w sondzie zostaje dostrojona i dopasowana oddzielnie za pomocą procedury „atma” lub „atmm”, co opisano w części [Strojenie i dopasowanie sondy](#) [41].

Wymiana sondy wymaga jej ponownego podłączenia z przedwzmacniaczami.

4.9 iProbe

Innym rodzajem sondy jest nowa platforma iProbe, następna generacja sond SmartProbe™, do detekcji sygnałów NMR. Ta nowa technologia sond NMR umożliwia nie tylko zwiększenie stosunku sygnału do szumu oraz szybsze i dokładniejsze dostrajanie częstotliwości radiowej, ale zapewnia również bardziej elastyczną konstrukcję, która pozwala na łatwiejszą personalizację sond NMR do aplikacji dedykowanych. Pierwsze sondy wprowadzone na tej platformie obejmują wiodące w branży sondy SmartProbe iProbe, dostępne od 400–600 MHz i oferujące wzrost czułości do 10%.



Rysunek 4.8: Platforma iProbe firmy Bruker

4.10 Wymiana sondy

W przypadku wymiany sondy należy postępować zgodnie z poniższą procedurą. Sondy są delikatne i drogie, dlatego przed przystąpieniem do wymiany sondy należy skontaktować się z osobą zarządzającą systemem. Magnes, a zwłaszcza prądy wirowe mają duży wpływ na ruch mechaniczny sondy. Podczas wyjmowania sondy z magnesu należy spodziewać się nagłego przyspieszenia jej ruchu, kiedy znajdzie się na dolnym krańcu otworu magnesu. Należy ponadto być przygotowanym na pewien opór, kiedy umieszcza się sondę w magnesie.

Procedura wymiany sondy:

1. Sprawdzić, czy nie trwa rejestracja widma klikając przycisk STOP na górnym pasku narzędzi okna programu TopSpin lub wpisując „stop” w wierszu poleceń.
2. Wyłączyć **grzanie** lub **chłodzenie** systemu, jeśli jest włączone. Użyć polecenia „edte”, aby wyłączyć grzałkę. Pozostawić sondę do osiągnięcia temperatury pokojowej. Nie wyłączać samego systemu!
3. Usunąć podłączenie powietrza/N₂ u podstawy sondy.
4. Upewnić się, czy otwór magnesu nie jest zamknięty, a następnie wyjąć próbkę, która może znajdować się w magnesie, klikając przycisk **LIFT** w oknie systemu BSMS.
5. Wyłączyć przycisk LIFT.
6. Odłączyć wszystkie przewody BNC od podstawy sondy.
7. Odłączyć termoparę, grzałkę oraz wszelkie połączenia gradientów lub PICS.
8. Za pomocą dołączonego śrubokrętu zwolnić dwie śruby mocujące sondę w magnesie.
9. Opuścić sondę prosto w dół i wyjąć ją z magnesu.
10. Włożyć nową sondę i umocować ją za pomocą dwóch śrub.
11. Ponownie podłączyć przewody koncentryczne, termoparę, grzałkę, przewody chłodzące oraz wykonać wszelkie inne potrzebne podłączenia.
12. Ponownie włączyć grzałkę.

Film przedstawiający tę procedurę jest dostępny na [stronie internetowej firmy Bruker](#)..

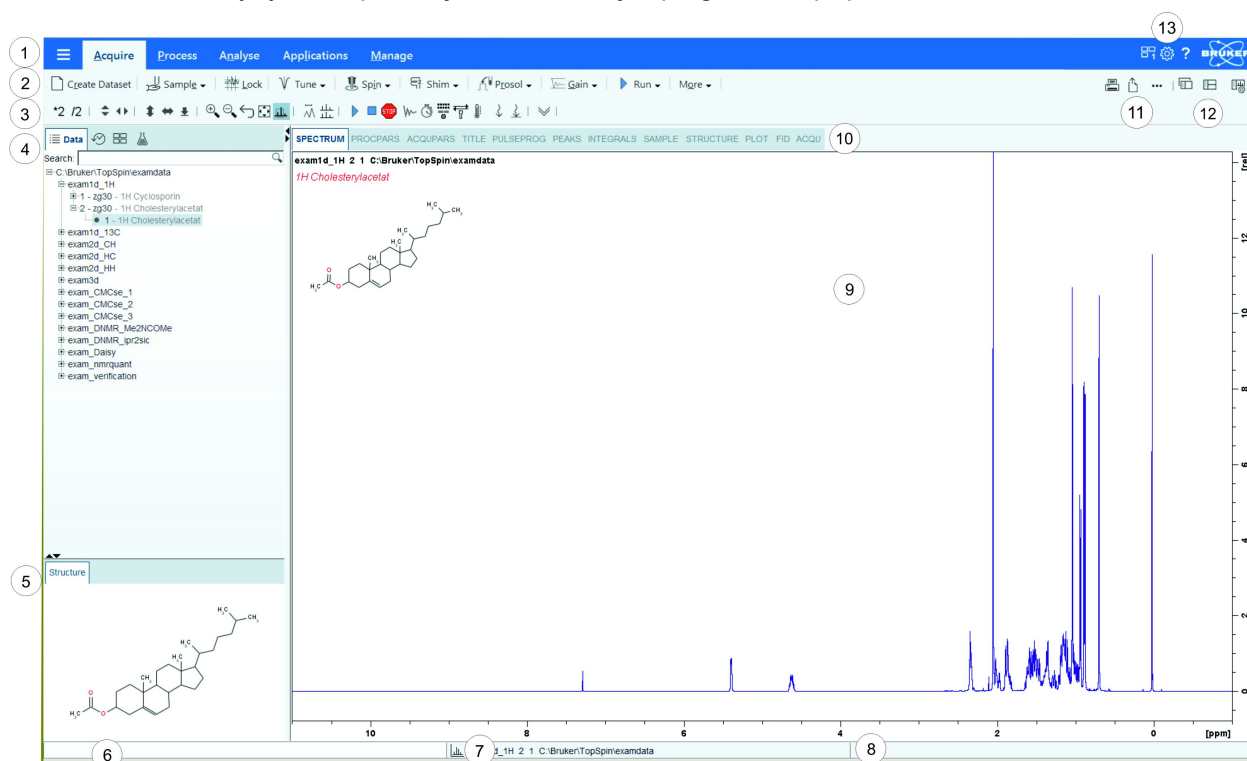
5 Procedury podstawowe

W niniejszym rozdziale opisano czynności podstawowe, które zawsze się wykonuje podczas rejestracji widma. Oprogramowanie TopSpin posiada łatwy w obsłudze interfejs oparty na sekwencji czynności, który przeprowadzi użytkownika przez wszystkie niezbędne kroki służące do rejestracji widma. Wszystkie czynności są kontrolowane przez oprogramowanie i można je wybrać przez kliknięcie myszą zakładki dotyczących kolejnych czynności (patrz punkt 1. na rysunku przedstawiającym interfejs programu TopSpin), dzięki czemu wyświetla się rząd przycisków odpowiadających czynnościom (patrz punkt 2. na rysunku przedstawiającym interfejs programu TopSpin).

Czytelnicy mogą pominąć ten rozdział, jeśli znają już te operacje.

5.1 Okno programu TOPSPIN

Poniższy rysunek pokazuje układ interfejsu programu TopSpin.

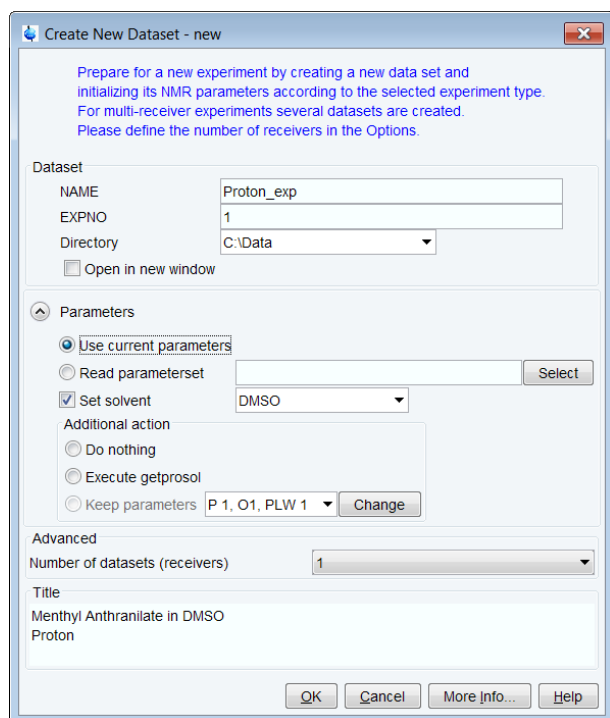


1	Pasek menu	8	Pasek wyświetlania statusu
2	Pasek przycisków czynności	9	Okno zestawu danych
3	Pasek narzędzi	10	Zakładki okna zestawu danych
4	Przeglądarka i okno wyszukiwania	11	Drukowanie, eksportowanie i publikowanie
5	Okno struktury	12	Opcje wyświetlania
6	Wiersz poleceń	13	Przełącznik okna, preferencje konfiguracji i pomoc
7	Pasek aktualnego zestawu danych		

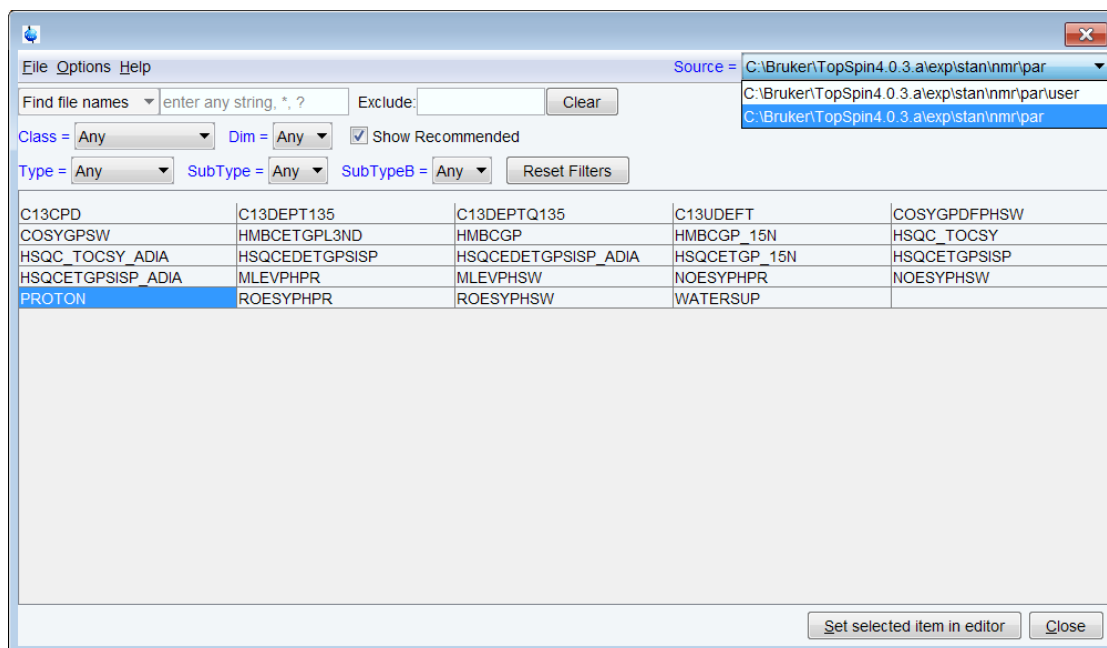
5.1.1 Tworzenie nowego zbioru danych

Regularne korzystanie ze spektrometru wkrótce doprowadzi do nagromadzenia dużych ilości danych. Użytkownicy będą chcieli przechowywać dane w plikach o nazwach ułatwiających identyfikację, aby mogli później łatwo uzyskać dostęp do swoich danych. Jest to szczególnie istotne, jeśli z systemu korzysta wielu użytkowników. Po zarejestrowaniu zestawu danych można go przechowywać w tak zwanym **zbiorze danych**. Każdy zbiór danych musi mieć unikalny deskryptor (identyfikator), aby można było rozróżnić różne zbiory danych. Pełny deskryptor zbioru danych wymaga użycia trzech parametrów: NAME, EXPNO i Directory.

- Na pasku menu kliknąć **Acquire|Create Dataset**, aby otworzyć okno Create New Dataset.



- Można teraz utworzyć własny zbiór danych. W przypadku parametru NAME można wpisać ciąg maksymalnie 13 znaków. W przypadku parametru EXPNO należy wpisać „1” lub inną odpowiednią liczbę. Wybrać ścieżkę do katalogu (na przykład: C:\Data).
- W obszarze Parameter kliknąć opcje **Read parameterset** i **Select**, aby otworzyć okno rpar.



- Zaznaczyć opcję **Show Recommended**, aby uzyskać listę typowych eksperymentów uwzględniających małe cząsteczki.
- Upewnić się, że katalog źródłowy to:
`<Topspin>\exp\stan\nmr\par`
 a nie:
`<Topspin>\exp\stan\nmr\par\user`
- Wybrać eksperyment (np. Proton) i kliknąć polecenie **Set selected item in editor**.
- W oknie Create New Dataset zaznaczyć opcję **Set solvent** i na liście rozwijanej wybrać rozpuszczalnik swojej próbki, np. DMSO.
- Kliknąć **OK**.

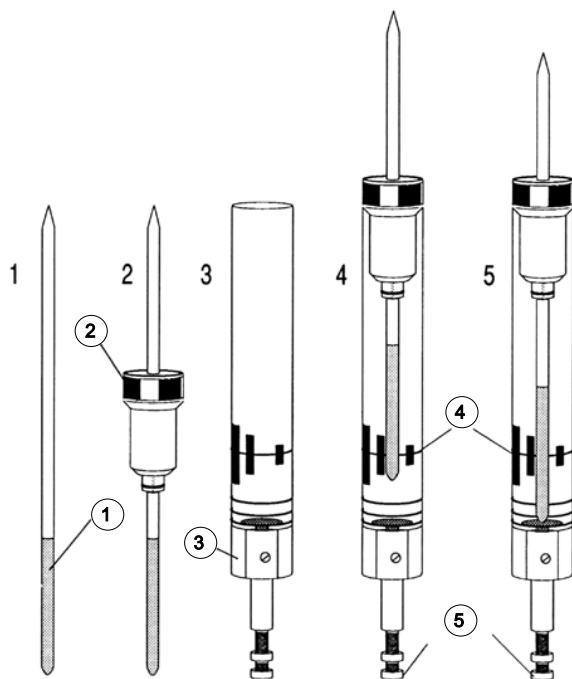


Uwaga: Nowo utworzony zbiór danych jest teraz bieżącym zbiorem danych, a szczegółowe dane deskryptora będą przechowywane na dysku twardym w folderze: DIR\NAME\EXPNO, gdzie każdy parametr EXPNO odpowiada całkowicie niezależnemu zbiorowi danych. W tym przykładzie dane będą przechowywane w katalogu **C:\Data\Proton_exp1**. Ścieżka dostępu pojawi się także na pasku tytułu w oknie danych programu TopSpin.

5.1.2 Przygotowywanie próbek

- Korzystać z czystych i suchych probówek na próbki.
- Stosować probówki na próbki średniej lub wysokiej jakości.
- Zawsze filtrować roztwór próbki.
- Zawsze używać tej samej objętości próbki lub wysokości roztworu.
- Objętość napełniania probówek o średnicy 5 mm wynosi 0,6 ml lub 5 cm.
- Objętość napełniania probówek o średnicy 10 mm wynosi 4 ml lub 5 cm.
- Użyć miernika głębokości próbki do korekty głębokości próbki.

Rodzaj probówki na próbkę	CryoProbes	Probówki RT	Stare probówki RT
Standardowa probówka na próbkę o średnicy 5 mm z zaokrąglonym końcem.	19 mm	20 mm	18 mm
Probówka Shigemi firmy Bruker.	17 mm	20 mm	18 mm



Rysunek 5.1: Umieszczanie próbki w spinnerze

1	Próbka	4.	Linia środkowa
2	Spinner	5.	Śruba regulacji głębokości
3	Miernik głębokości		

- Probówka na próbkę powinna być dobrze osadzona w spinnerze.
- Przed włożeniem do magnesu wytrzeć probówkę do czysta.

5.2 Wprowadzanie próbki z elementem obrotowym do magnesu

Podnoszenie i opuszczanie próbki kontrolowane jest strumieniem sprężonego powietrza. Przed umieszczeniem próbki na górze otworu sprawdzić, czy włączony został przepływ powietrza (jest on dosyć głośny) i wyjąć próbkę, jeśli unosi się do góry otworu.

- Na pasku menu kliknąć zakładkę **Acquire**.
- Na przycisku **Sample** kliknąć strzałkę **w dół**, aby wyświetlić więcej opcji.
- Z listy wybrać opcję **Eject sample manually (ej)**. Przepływ sprężonego powietrza podnoszącego próbkę jest włączony.



Poczekać na włączenie przepływu sprężonego powietrza podnoszącego próbkę i wyjąć próbkę, która może znajdować się w magnecie.

- Umieścić próbkę ze spinnerem na górze magnesu.
- Na przycisku **Sample** kliknąć strzałkę **w dół**, aby wyświetlić więcej opcji.
- Z listy wybrać opcję **Insert sample manually (ij)**.

5.3 Lock próbki

Rozpuszczalniki deuterowane są wykorzystywane do generowania sygnału, który ma zostać wykryty i monitorowany przez układ lock'owania. Częstotliwość i moc tego sygnału będą zależą od użytego rozpuszczalnika. Główną funkcją procedury lock'owania w oprogramowaniu TopSpin jest dostosowanie wartości parametrów, na przykład mocy lock'u, wzmacnienia i częstotliwości do odpowiedniego rozpuszczalnika. Jeśli te ustawione wartości domyślne są zbliżone do oczekiwanych dla danego rozpuszczalnika, system BSMS może szybko zlokalizować i „zallokować” sygnał rozpuszczalnika przez przemiatanie zakresu częstotliwości lub wartości pola magnetycznego. Parametry zależne od rozpuszczalnika są wczytywane z tabeli „edlock”.

- Na pasku przycisków czynności kliknąć opcję **Lock**.
- Na liście w tabeli Solvents table zaznaczyć **DMSO** i kliknąć **OK**.

Solvent	Description
Acetic	acetic acid-d4
Acetone	acetone-d6
C6D6	benzene-d6
CD2Cl2	dichloromethane-d2
CD3CN	acetonitrile-d3
CD3CN_SPE	LC-SPE Solvent (Acetonitrile)
CD3OD_SPE	LC-SPE Solvent (Methanol-d4)
CDCl3	chloroform-d
CH3CN+D2O	HPLC Solvent (Acetonitril/D2O)
CH3OH+D2O	HPLC Solvent (Methanol/D2O)
D2O	deuteriumoxide
D2O_salt	deuteriumoxide with salt
Dioxane	dioxane-d8
DMF	N,N-dimethylformamide-d7
DMSO	dimethylsulfoxide-d6
EtOD	ethanol-d6
H2O+D2O	90%H2O and 10%D2O
H2O+D2O_salt	90%H2O and 10%D2O with salt
HDMSO	90%DMSO and 10%DMSO-d6
Juice	fruit juice
MeOD	methanol-d4
Plasma	blood plasma
Pyr	pyridine-d5
T_H2O+D2O+Me4NCl	(CD3)4NCl in 90%H2O and 10%D2O, for NMR thermometer
T_H2O+D2O+NaAc	sodium acetate in 90%H2O and 10%D2O, for NMR thermometer
T_H2O+D2O+Pivalate	pivalate-d9 in 90% H2O and 10% D2O, for NMR thermometer
T_MeOD	methanol-d4, for NMR thermometer
TFE	trifluoroethanol-d3
THF	tetrahydrofuran-d8
Tol	toluene-d8
Urine	urine

Lock nucleus: 2H

Rysunek 5.2: Tabela rozpuszczalników



Uwaga: Jeśli lock'owanie powiodło się, sygnał powinien mieć postać linii poziomej z pewnym powiązaniem z nim szumem lub pulsacją (patrz rysunek poniżej). Wysokość tej linii nosi nazwę poziomu lock'u.

Rysunek 5.3: Wyświetlanie lock'u po zalock'owaniu próbki

5.4 Strojenie i dopasowanie sondy

Czułość każdej sondy zmienia się wraz z częstotliwością sygnału do niej wysyłanego. Ponadto występuje częstotliwość, przy której sonda ma największą czułość. Co więcej, tę częstotliwość można regulować w pewnym zakresie za pomocą kondensatorów służących do strojenia, które wbudowano w elektronikę sondy. Strojenie obejmuje regulację elektroniki sondy w taki sposób, aby odpowiednią częstotliwością nadawaną była częstotliwość, przy której czułość jest największa (SFO1, SFO2 itd.). **Strojenie** i dopasowywanie każdej cewki w sondzie przebiega oddzielnie. Jeśli nastąpiła zmiana sondy lub znaczna zmiana częstotliwości nadawanej, może wystąpić konieczność ponownego strojenia sondy. W przypadku pracy rutynowej przy użyciu rozpuszczalników organicznych z sondami selektywnymi jest mało prawdopodobne, aby nastąpiły większe zmiany wartości częstotliwości nadawanych. W związku z tym po pierwszym dostrojeniu sondy niewielkie wahania częstotliwości nie będą wymagały ponownego strojenia. Zazwyczaj należałoby zmienić częstotliwość nadawaną o co najmniej 100 kHz, aby konieczne było ponowne strojenie. W przypadku sond szerokopasmowych nadawane częstotliwości w znacznym stopniu zmieniają się w zależności od jądra, dlatego strojenie sondy jest konieczne przy każdej zmianie wybranego jądra. Ponadto przy każdym strojeniu sondy należy przeprowadzić jej dopasowywanie. **Dopasowywanie** obejmuje doprowadzenie do tego, aby do cewki znajdującej się w górnej części sondy była przekazywana maksymalna część mocy podawanej do podstawy sondy. Dzięki temu minimalna część mocy podawanej do podstawy sondy zostaje odbita z powrotem w stronę wzmacniaczy (a więc zostaje utracona).



Uwaga: Firma Bruker oferuje dwa różne rodzaje korekty przy strojeniu i dopasowaniu. Oprócz korekty ręcznej kondensatorów do strojenia i dopasowywania sondy mogą być wyposażone w moduł strojenia automatycznego (ATM). W zależności od wyposażenia należy postępować zgodnie z poniższymi punktami.

5.4.1 Sondy wyposażone w ATM (procedura strojenia automatycznego)

- Na pasku przycisków czynności kliknąć opcję **Tune**.

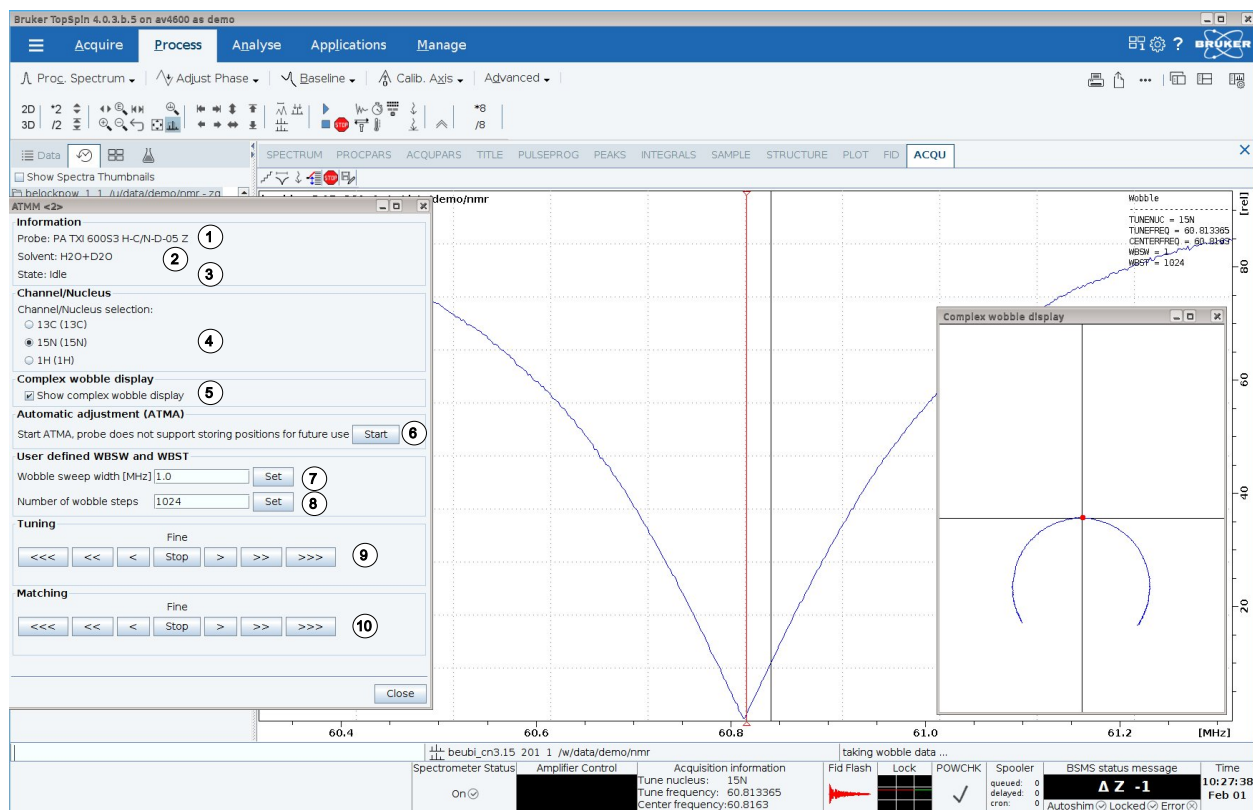
Wyświetlacz przełączy się automatycznie na okno akwizycji i wyświetli krzywą strojenia. Strojenie i dopasowywanie odbywa się automatycznie. Jeśli w zestawie parametrów, takich jak C13CPD itp. wykorzystywanych jest wiele częstotliwości, ATMA rozpocznie najpierw regulować najniższą częstotliwość, a następnie przejdzie automatycznie do częstotliwości wyższej.

5.4.2 Sondy wyposażone w ATM (procedura strojenia ręcznego)

- Na przycisku **Tune** kliknąć strzałkę **w dół**, aby wyświetlić więcej opcji.
- Z listy wybrać opcję **Tune/match ATM probe manually**.



Uwaga: Pojawi się okno ATMM Probe Tuning/Matching window (poniższy rysunek) oraz okno wyświetlające krzywą strojenia.



Rysunek 5.4: Okno ATMM Probe Tuning/Matching

1.	Typ sondy.
2.	Używany rozpuszczalnik.
3.	Stan aktualny.
4.	Wybór kanału/jądra
5.	Zaznaczyć, aby wyświetlić złożony ekran krzywej strojenia.
6.	Kliknąć, aby uruchomić ATMA, podczas gdy optymalne pozycje są przechowywane do wykorzystania w przyszłości.
7.	Zdefiniowana przez użytkownika szerokość przemiatania krzywej strojenia.
8.	Zdefiniowana przez użytkownika liczba kroków krzywej strojenia.
9.	Przyciski do przesuwania i wyświetlania wyśrodkowanej krzywej strojenia.
10.	Przyciski do regulacji nachylenia krzywej strojenia do najniższej pozycji.

- W oknie kontroli ATMM kliknąć przyciski **Tuning**, aby przesunąć i wyświetlić wyśrodkowaną krzywą strojenia.
- W oknie kontroli ATMM kliknąć przyciski **Matching**, aby dopasować nachylenie krzywej strojenia do najniższej pozycji.

Bardzo wygodnie jest patrzeć na złożony ekran krzywej strojenia. Jeśli okrąg z czerwoną kropką jest za duży lub za mały, należy najpierw wyregulować dopasowanie. Gdy okrąg przejdzie przez środek układu współrzędnych, należy przenieść czerwoną kropkę do środka, dostosowując strojenie. W istocie, krzywa „mówi”, w jakiej kolejności wyregulować strojenie i dopasowanie.

Uwaga: Ustawienia T/M zostaną zapisane po kliknięciu przycisku **Start**.

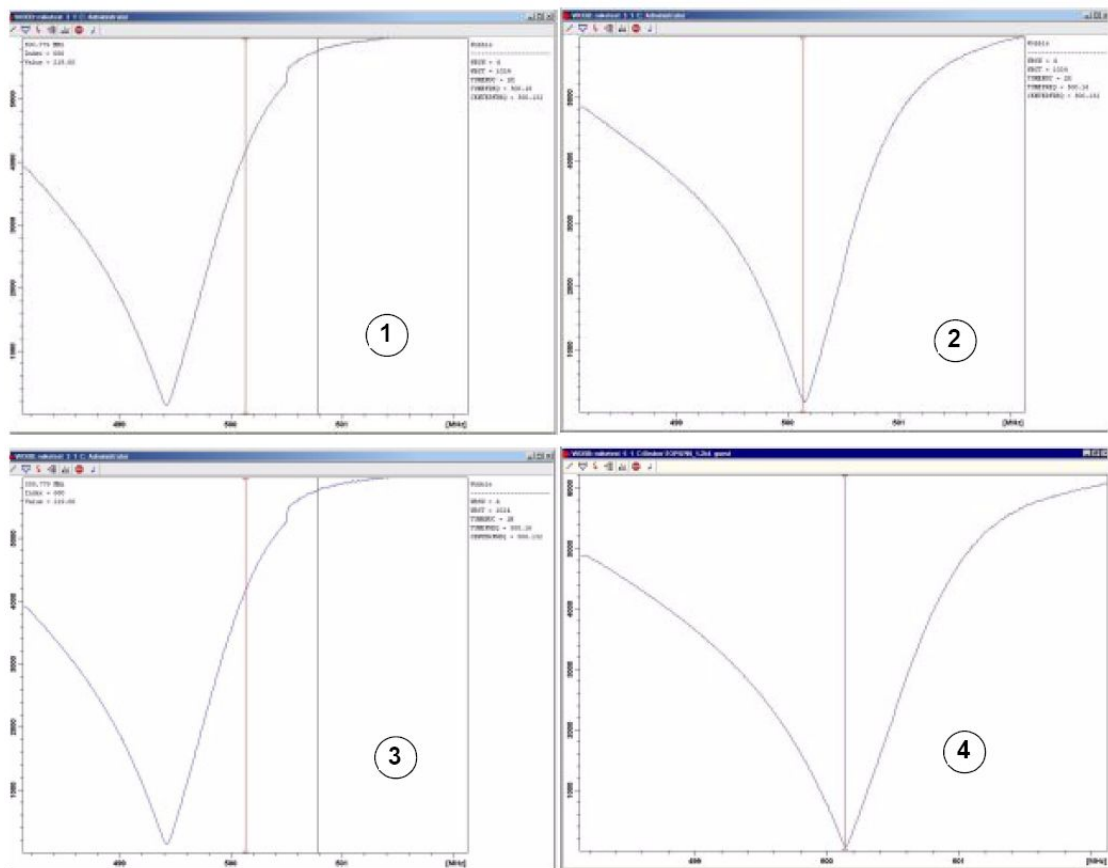


Ponieważ strojenie i dopasowanie są od siebie zależne, konieczne jest powtarzanie wszystkich kroków, aby uzyskać idealne dostrojenie i dopasowanie. Jeśli w zestawie parametrów, takich jak C13CPD wykorzystywanych jest wiele częstotliwości, należy użyć przycisków radiowych **Nucleus Selection** w oknie kontrolnym ATMM, aby przełączyć się na inne jądro i powtórzyć strojenie i dopasowanie.

Procedura **wobble** polega na nadawaniu słabego sygnału w kierunku sondy oraz porównywaniu impedancji sondy i przewodu z wartością odniesienia 50 omów w przedwzmacniaczu HPPR. Nadawana częstotliwość jest wyśrodkowana na SFO1, SFO2 itd., jednak „przemiatanie” obejmuje zakres zależny od wartości parametru WBSW (patrz poniżej). Otrzymywana krzywa to znana krzywą odpowiedzi obwodu rezonansowego i jest po prostu miarą amplitudy sygnału odbitego (oś pionowa) względem częstotliwości (oś pozioma).

Dopasowanie oznacza regulację sondy w taki sposób, aby minimum krzywej strojenia znajdowało się u podstawy wykresu (czyli aby stykało się z osią poziomą częstotliwości). Stanowi to minimalne odbicie nadawanego sygnału.

Strojenie polega na sprawdzeniu, czy następuje to przy częstotliwości nadawania znajdującej się w środku skali poziomej ekranu. Należy jednak zauważyć, że regulacje w ramach strojenia i dopasowywania są od siebie zależne i wartości należy zmieniać jednocześnie. Jeśli minimum krzywej strojenia jest wyśrodkowane i znajduje się u podstawy wykresu, oznacza to, że sonda została dostrojona i dopasowana w sposób optymalny.



Rysunek 5.5: Przykłady krzywych strojenia przy różnych parametrach strojenia i dopasowywania

1.	Niewłaściwe dopasowanie i dostrojenie.	3.	Właściwe dopasowanie, niewłaściwe dostrojenie.
2.	Niewłaściwe dopasowanie, właściwe dostrojenie.	4.	Właściwe dopasowanie i dostrojenie.

Jeśli użytkownik zechce zoptymalizować sondę dla kilku jąder (np. eksperymenty z odsprzęganiem), można wybrać następną jądrowo w oknie ATMM Probe Tuning/Matching.

5.5 Obracanie próbki

Drugą funkcją sprężonego powietrza jest umożliwienie obracania się próbki. Obracanie próbki ma na celu „wyrównanie” pewnych niejednorodności, które mogą występować w polu magnetycznym w środku magnesu.



Uwaga: Próbki badane w eksperymentach, takich jak 2-D, 3-D, SELECTIVE, NOEDIFF, T1 i za pomocą wszystkich sond typu inverse zazwyczaj nie są obracane.

Zalecane szybkości obrotowe:

- 20 Hz dla sondy 5 mm
- 12 Hz dla sondy 10 mm
- Na przycisku **Spin** kliknąć strzałkę **w dół**, aby wyświetlić więcej opcji.
- Z listy wybrać opcję **Turn sample rotation on (ro on)**.

5.6 Kompensacja

Kompensacja jest procesem, w którym wprowadza się niewielkie korekty pola magnetycznego, aż jego jednorodność (równomierność) zostanie zoptymalizowana. Zwiększenie jednorodności ma korzystny wpływ na rozdzielczość widmową. Przy każdej zmianie sondy lub próbki konieczne jest wykonanie ponownej kompensacji. Jeśli odpowiednie wartości kompensacji zostaną zapisane przez osobę odpowiedzialną za system (w tak zwanych plikach kompensacji) dla każdej sondy, znacznie zmniejszy się niezbędny czas kompensacji przy zmianie sondy.

5.6.1 Kompensacja rutynowa za pomocą procedury TopShim

Jest to shim'owanie rutynowe, którą należy wykonywać początku każdej sesji pracy ze spektrometrem NMR, a także w przypadku zmiany próbki w magnecie. Shim'owanie rutynowe polega na dokładnej regulacji parametrów kompensacji Z, Z², Z³, Z⁴ i Z⁵. Niektóre magnesy o większym natężeniu pola mogą wymagać shim'ów Z wyższego rzędu. Osoba odpowiedzialna za system zaprogramowała procedurę TopShim, aby uzyskać największą jednorodność dla każdej próbki i procedura ta jest w pełni automatyczna.

Podstawową metodą procedury TopShim jest shim'owanie gradientowe. Kryterium jakości dotyczące ostatecznego kształtu linii zapewnia najlepsze wyniki w każdej sytuacji.

W przypadku wszystkich rozpuszczalników deuterowanych procedura TopShim wykorzystuje metodę shim'owania gradientowego ²H, a w przypadku innych rozpuszczalników, w szczególności H₂O, metodę shim'owania gradientowego ¹H.

- Na pasku przycisków czynności kliknąć opcję **Shim**.

Shim'owanie rozpocznie się natychmiast i powinno zająć mniej niż minutę.

5.7 Ustawianie parametrów zależnych od sondy i rozpuszczalnika

Parametry takie jak impuls 90° lub długość impulsu odsprzęgającego z powiązanymi poziomami mocy można zapisać dla danego jądra w dowolnym dostępnym kanale. Wartości te zostały wprowadzone przez instalatora lub osobę odpowiedzialną za system i można je wczytać automatycznie za pomocą przycisku **Prosol**.

- Na pasku przycisków czynności kliknąć opcję **Prosol**.

5.8 Regulacja wzmocnienia odbiornika

Wzmocnienie odbiornika jest bardzo ważnym parametrem używanym do dopasowania amplitudy sygnału FID do zakresu dynamicznego digitalizatora. Wzmocnienie można ustawić automatycznie za pomocą przycisku **Gain**.

- Na pasku przycisków czynności kliknąć opcję **Gain**.

Regulacja wzmocnienia odbiornika rozpocznie się natychmiast i powinna zająć mniej niż minutę.

5.9 Uruchamianie rejestracji

Proces odbierania sygnałów NMR nosi nazwę akwizycji. Mówi się, że uzyskano dane. Podczas akwizycji zbierane są dane „surowe”, a pozyskiwany sygnał nosi nazwę FID (sygnał zaniku swobodnej precesji). Wielkość punktu cyfrowego sygnału FID określa się jako TD, domenę czasu.

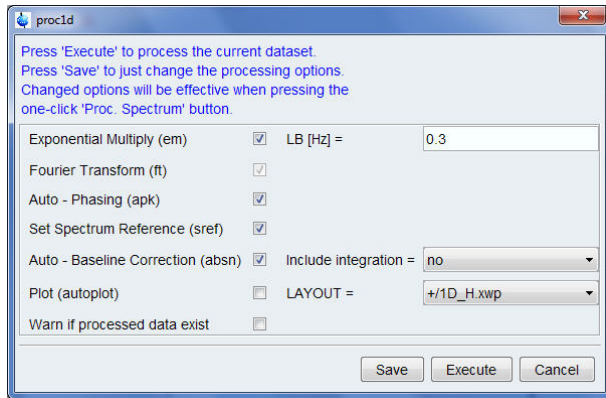
- Na pasku przycisków czynności kliknąć opcję **Run**.

Przed uruchomieniem ustawionej liczby skanów spektrometr wykonuje pewną liczbę skanów pozornych określoną domyślnie dla wybranego eksperymentu.

5.10 Przetwarzanie danych

Transformacja Fouriera jest wykorzystywana do przekształcenia sygnału FID w widmo częstotliwości. Liczba punktów wykorzystywanych do utworzenia widma wynikowego jest określona przez parametr SI (rozmiar). Sygnał FID zostaje przekształcony w widmo składające się z punktów danych SI w części rzeczywistej i punktów danych SI w części urojonej. Normalne ustawienie parametru SI to $SI = TD/2$. Jeśli użytkownik wczytał zestaw parametrów „PROTON”, można łatwo sprawdzić, że $TD = 64K$ i $SI = 32K$.

- Na pasku menu kliknąć zakładkę **Process**.
- Na przycisku **Proc Spectrum** kliknąć strzałkę **w dół**, aby wyświetlić więcej opcji.
- Z listy wybrać opcję **Configure Standard Processing (proc1d)**.



Rysunek 5.6: Okno proc1d

- W oknie proc1d wybrać opcje:
 - Exponential Multiply (em)**
 - Auto – Phasing (apk)**
 - Set Spectrum Reference (sref)**
 - Auto – Baseline Correction (absn)**
- W oknie proc1d kliknąć polecenie **Execute**.
- W oknie proc1d kliknąć przycisk **Save**, aby zapisać wybrane ustawienia przetwarzania.

6 Przygotowanie do rejestracji, parametry związane z częstotliwością

W tym rozdziale zostaną omówione dwa najważniejsze parametry przy rejestracji widma NMR. Przed przypisaniem wartości poszczególnym parametrom ważne jest, aby użytkownik rozumiał koncepcję zbiorów danych, ponieważ grupy parametrów są z nimi nierozdzielnie powiązane.

6.1 Częstotliwość

Częstotliwość sygnałów nadawanych w kanałach pierwszym, drugim, trzecim itd. określa się parametrami odpowiednio SFO1, SFO2, SFO3 itd. Częstotliwości tych nie można jednak ustawić bezpośrednio (można sprawdzić, że nie jest możliwe ich zaznaczenie za pomocą myszy).

Częstotliwości nadawane kontroluje się ustawiając przesunięcia częstotliwości podstawowych BF1, BF2, BF3 itd.

W przypadku kanału obserwacji:

- $SFO1 = BF + \text{przesunięcie (O1)}$

Częstotliwość nadawana zostaje ustawiona automatycznie przez użytkownika.

Podobnie w przypadku kolejnych dwóch kanałów rozprężania:

- $SFO2 = BF2 + \text{przesunięcie (O2)}$
- $SFO3 = BF3 + \text{przesunięcie (O3)}$

Jeśli wybrane zostanie określone jądro, automatycznie ustawiona zostaje właściwa częstotliwość podstawowa. Po wczytaniu standardowego zbioru parametrów, odpowiednio zostanie ustawiona częstotliwość podstawowa. Konieczna jest jedynie korekta wartości przesunięcia.

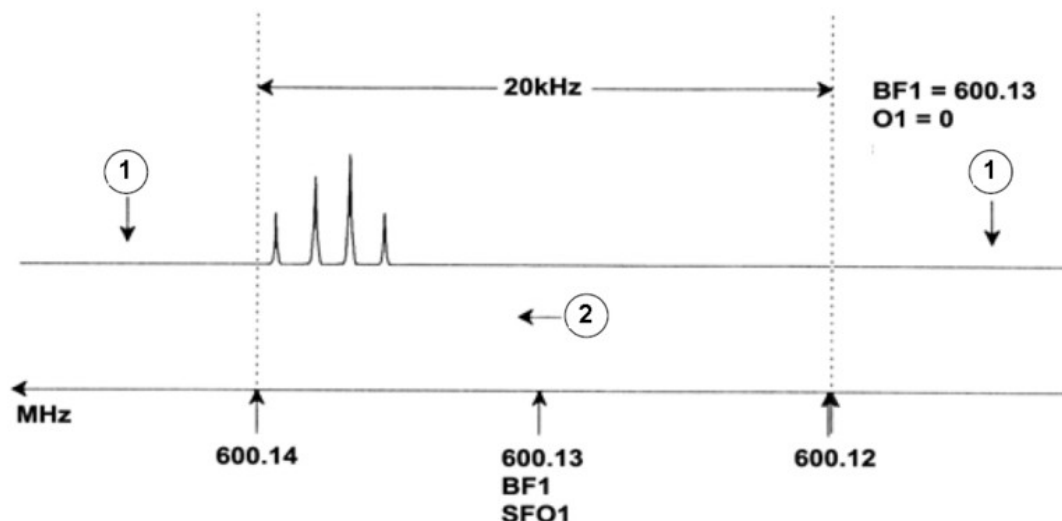
Należy pamiętać, że najistotniejszym parametrem jest SFOR, ponieważ jest to częstotliwość rzeczywiście emitowana w kierunku próbki. Należy ponadto zauważyć, że można ustawić wartości zerowe przesunięcia; wtedy $SFOX = BFX$. Bardziej szczegółowy opis podano w kolejnym punkcie.

6.2 Wyjaśnienie częstotliwości nadawanej, podstawowej i przesunięcia na wartościach liczbowych

Założmy, że do rejestracji sygnałów wodoru wykorzystuje się spektrometr 600 MHz. Spektrometr został tak skonfigurowany, aby wartość BF1 wynosiła 600,13 MHz (w przypadku spektrometru 500 MHz wartość BF1 wynosi zazwyczaj 500,13 MHz, a dla spektrometru 400 MHz BF1 wynosi 400,13 itd.).

Jeśli parametr O1 został ustawiony na zero, wówczas: $SFO1 = 600,13 + 0 = 600,13$ MHz

W ten sposób środek widma znajduje się przy 600,13 MHz. Jeśli wartość parametru SWH ustawiono na 20 kHz, widmo powinno przypominać pokazane poniżej.



Rysunek 6.1: Widmo przy $BF1 = 600,13$ MHz, $O1 = 0$ Hz

1.	Sygnaly odfiltrowane	2.	Częstotliwość
----	----------------------	----	---------------

Z naszego hipotetycznego widma jasno wynika, że wszystkie sygnały NMR znajdują się przy końcu zakresu widmowego o wysokiej częstotliwości. Ponadto możliwe jest, że niektóre sygnały pojawiły się powyżej 600,14 MHz i znalazły się poza zakresem widmowym. Z tego też względu zostały odfiltrowane i nie są obserwowane. Aby sprawdzić obecność takich sygnałów, możliwe są dwie opcje:

- Można zwiększyć zakres widmowy, aby obejmował wszystkie brakujące sygnały. Takie rozwiązanie ma jednak pewne wady, np. dotyczące rozdzielczości sygnału FID (im niższa wartość parametru FIDRES, tym lepsza rozdzielczość).
- Najlepszą opcją byłoby pozostawienie zakresu widmowego bez zmian i przypisanie wartości parametru O1, aby przesunąć środek zakresu.

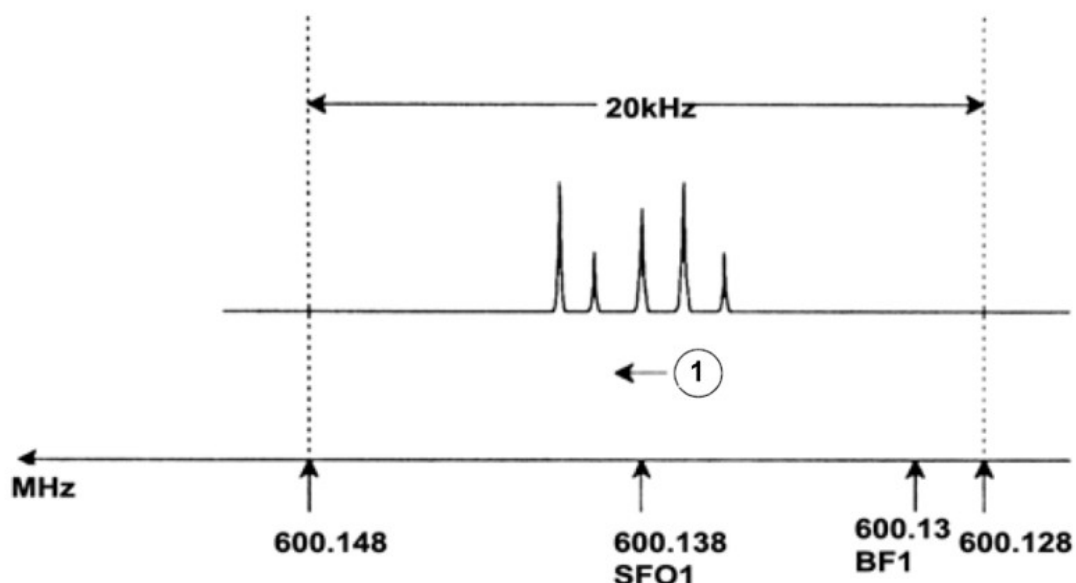
W naszym przykładzie wszystkie wykryte sygnały znajdują się w obszarze 600,138 MHz i należy wyśrodkować widmo według tej częstotliwości.

$$\Rightarrow SFO1 = 600,138 = BF1 + O1$$

$$\Rightarrow 600,138 = 600,13 + O1$$

$$\Rightarrow O1 = 0,008 \text{ MHz} = 8 \text{ kHz}$$

W związku z tym, jeśli częstotliwość przesunięcia O1 zostanie ustawiona na 8 kHz, okno zostanie przesunięte tak, aby wyglądało jak na rysunku poniżej.

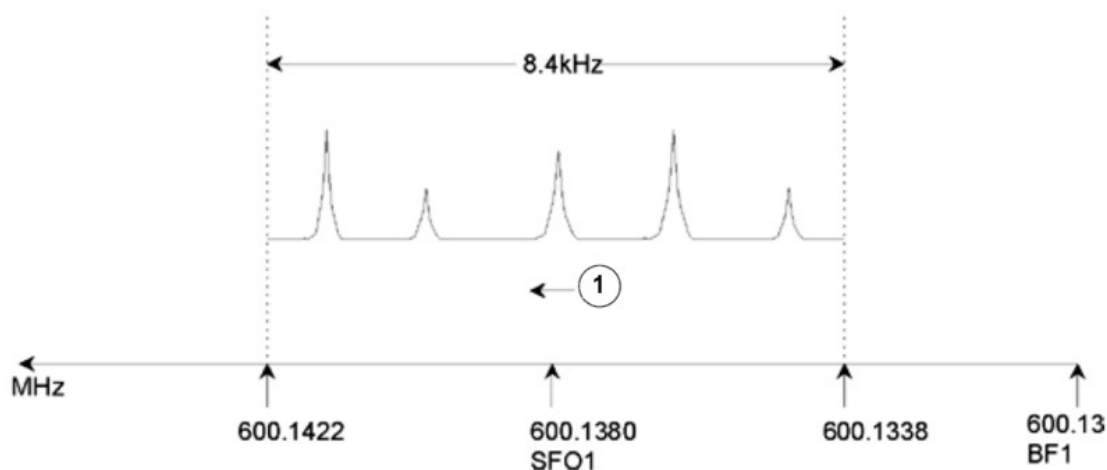


Rysunek 6.2: Widmo przy $BF1 = 600,13 \text{ MHz}$, $01 = 8 \text{ kHz}$

1.	Częstotliwość		
----	---------------	--	--

Ponadto z powyższego rysunku wynika, że sygnały NMR emitowane przez protony w naszej hipotetycznej próbce zajmują tylko część zakresu widmowego. Dlatego zakres widmowy można zmniejszyć bez utraty istotnych danych. Jedną z zalet zmniejszenia parametru SW jest zwiększenie rozdzielczości widmowej. Wadą jest proporcjonalne wydłużenia czasu potrzebnego do pozyskania danych.

W części [Wstępne informacje teoretyczne i terminologia \[9\]](#) podano, że przesunięcie chemiczne protonów rzadko przekracza 14 ppm. Odpowiada to wartości 8,4 kHz w przypadku spektrometru 600 MHz. Poniższy rysunek pokazuje widmo hipotetyczne wykreślone ponownie po zmniejszeniu przypisanej do parametru SWH wartości z 20 kHz do 8,4 kHz.

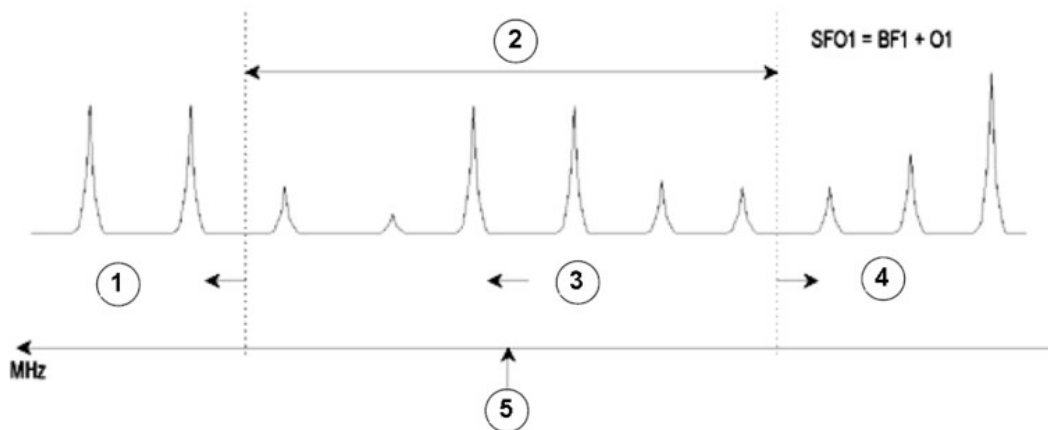


Rysunek 6.3: Widmo przy $BF1 = 600,13 \text{ MHz}$, $01 = 8 \text{ kHz}$, $SWH = 8,4 \text{ kHz}$

1.	Częstotliwość		
----	---------------	--	--

Należy zauważyć, że wartość parametru SWH użytą w konkretnym eksperymencie określa wyłącznie analizowana próbka i wymagana rozdzielczość widmowa. Wartość 14 ppm w przypadku widm protonowych gwarantuje wykrycie większości sygnałów protonowych. Jednak w celu szczegółowego zbadania konkretnego sygnału stosuje się znacznie mniejsze wartości SWH.

Poniższy rysunek ilustruje ogólne zasady wzajemnej zależności parametrów SFO1, BF1 i O1 (tutaj pokazano z nową próbką).



Rysunek 6.4: Wzajemne zależności parametrów SFO1, BF1 i O1

1.	Przypisanie parametrowi O1 wartości dodatniej przesuwa okno w stronę wyższych częstotliwości.
2.	Parametr SW określa szerokość okna.
3.	Częstotliwość.
4.	Przypisanie parametrowi O1 wartości ujemnej przesuwa okno w stronę niższych częstotliwości.
5.	SFO1 stanowi środek widma.

7 Próbka do badania metodą spektrometrii NMR

W przypadku badania **ciała stałego** za pomocą metody NMR obserwowane sygnały są zazwyczaj szerokie i nie można rozdzielić struktury subtelnej mającej największe znaczenie dla badaczy. W związku z tym próbki ciał stałych zazwyczaj rozpuszcza się w odpowiednim rozpuszczalniku przed akwizycją widma. To samo dotyczy **próbek ciekłych**. Do rozpuszczalników organicznych można dodać niewielkie ilości związku odniesienia. Jednak, aby uzyskać najlepsze wyniki, próbka powinna być tak czysta, jak to tylko możliwe. Sygnały pochodzące od **zanieczyszczeń** w najlepszym przypadku niepotrzebnie skomplikują widmo, zaś w najgorszym przesłonią istotne sygnały. Należy zwrócić szczególną uwagę na to, aby próbka nie zawierała **zanieczyszczeń magnetycznych**, ponieważ mogą one zniekształcić pole magnetyczne, a tym samym zmniejszyć rozdzielczość widma. Zanieczyszczenia stałe można najłatwiej usunąć przez filtrację. W przypadku próbek w **rozpuszczalnikach organicznych** rozpuszczoną wodę można usunąć przez dokładne osuszenie próbki przed rozpuszczeniem.

7.1 Wybór rozpuszczalnika

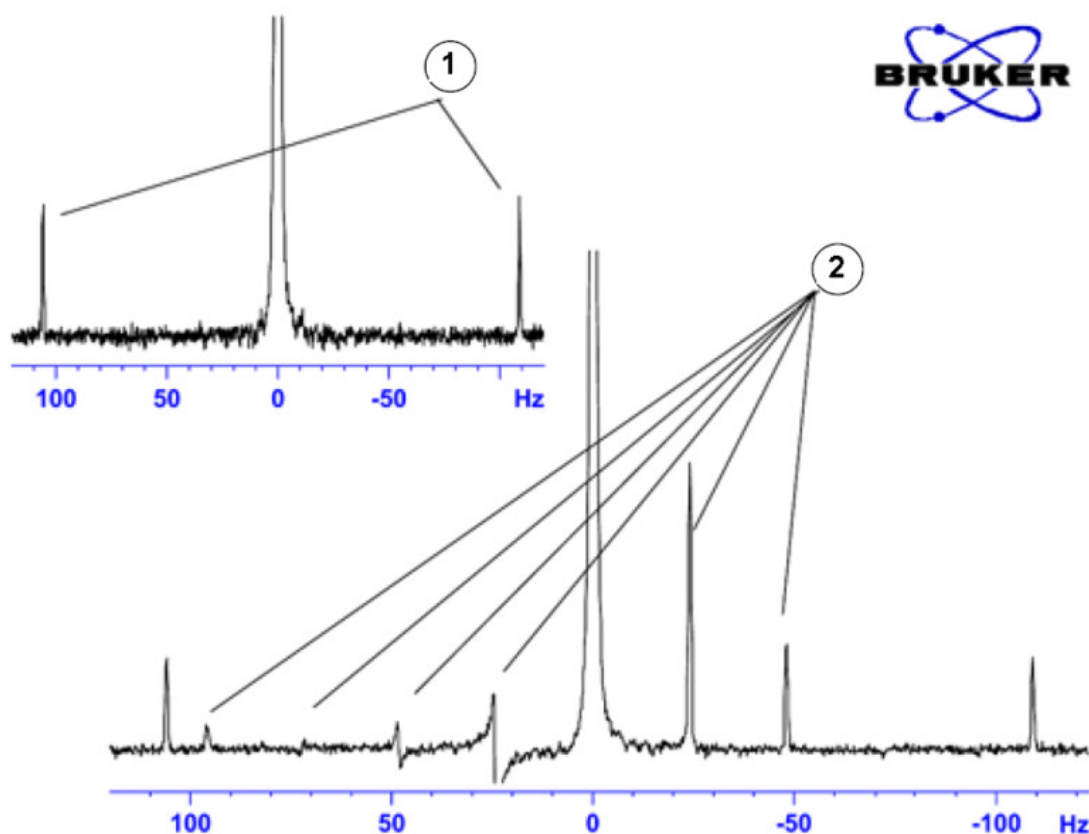
Gdy próbka zostanie dostatecznie oczyszczona i wysuszona, następnym krokiem jest wybór odpowiedniego rozpuszczalnika. Ponieważ deuter jest najczęściej wykorzystywanym jądrem do lock'owania, próbkę zazwyczaj rozpuszcza się w deuterowanym rozpuszczalniku (deuterowany rozpuszczalnik to taki, w którym znaczna część, zwykle ponad 99%, atomów wodoru została zastąpiona przez deuter). Powszechnie stosowanymi **rozpuszczalnikami deuterowanymi** są benzen-d₆, aceton-d₆ i chloroform-d, ale dostępnych jest wiele innych rozpuszczalników. Do czynników, które należy wziąć pod uwagę przy wyborze rozpuszczalnika należą:

1. **Rozpuszczalność:** Oczywiście, im lepsza rozpuszczalność próbki w rozpuszczalniku, tym lepiej. Zwiększa to do maksimum zawartość próbki w objętości zapewniającej zwiększenie czułości eksperymentu. Duża rozpuszczalność jest szczególnie ważna, jeśli dostępne są tylko małe ilości próbki.
2. **Zakłócenia widma próbki przez sygnały rozpuszczalnika:** Sam rozpuszczalnik będzie nieuchronnie wytwarzał sygnały NMR, które przesłonią pewne obszary widma. Te „piki pozostałości rozpuszczalnika” nie powinny pokrywać się z sygnałami próbki.
3. **Zależność od temperatury:** W przypadku eksperymentów przeprowadzanych powyżej lub poniżej temperatury pokojowej istotnymi czynnikami są również temperatury topnienia i wrzenia rozpuszczalnika. Ponadto rozpuszczalność próbki prawdopodobnie zmieni się w zależności od temperatury.
4. **Lepkość:** Im niższa lepkość rozpuszczalnika, tym lepsza rozdzielczość eksperymentu.
5. **Cena:** Oczywiście faktem jest, że w przypadku rutynowych badań NMR, w trakcie których rejestruje się widma wielu próbek, ważnym czynnikiem jest cena rozpuszczalnika. Z reguły cena wzrasta wraz z liczbą deuterowanych atomów.
6. **Zawartość wody:** Prawie wszystkie rozpuszczalniki NMR zawierają śladowe ilości wody. Ponadto wiele z nich posiada właściwości higroskopijne (pochłania wodę z atmosfery), a zatem im dłużej są przechowywane, tym więcej wody zawierają. Obecność piku wody (HDO) pogarsza jedynie jakość widma NMR. Zawartość wody w rozpuszczalniku można znacznie zredukować, filtrując rozpuszczalnik przez środek suszący lub przechowując go na sitach molekularnych.

Wybór rozpuszczalnika dla danej próbki polega na znalezieniu kompromisu, biorąc pod uwagę różne zalety i wady każdego rozpuszczalnika. Informacje szczegółowe na temat określonych rozpuszczalników można znaleźć w Internecie.

7.2 Próbka na próbkę

W zależności od typu sondy lub eksperymentu podczas analizy próbki może ona być obracana. **Obrót** próbki pozwala znieść niejednorodności pola w kierunku X i Y, w wyniku czego zwiększa się rozdzielczość widmowa. Wadą obracania próbki jest możliwość wystąpienia **pasm bocznych wskutek obracania**. Są to sygnały (piki) fałszywe wynikające z modulacji pola magnetycznego z częstotliwością obrotu. Piki te zawsze występują po obu stronach każdego pików rzeczywistego w odległości równej prędkości obrotowej. Natężenie pasm bocznych jest proporcjonalne do natężenia pików rzeczywistego. W związku z tym, jeśli prędkość obrotowa wynosi 20 obrotów na sekundę (= 20 Hz), należy szukać pasm bocznych powstałych w wyniku obracania 20 Hz powyżej i poniżej częstotliwości rezonansowej sygnałów rzeczywistych.



Rysunek 7.1: Widmo, na którym pokazano pasma boczne powstałe w wyniku obracania

1.	Sygnały satelitarne ^{13}C	2.	Pasma boczne powstałe w wyniku obracania
----	-------------------------------------	----	--

Występowanie pasm bocznych powstałych w wyniku obracania nie można uniknąć, ich wielkość często zależy od jakości próbki na próbki. W sytuacji idealnej próbka na próbkę powinna mieć symetrię doskonale cylindryczną. Nietypowo wysokie pasma boczne mogą wskazywać na niewystarczającą **symetrię próbki**, co może wymagać zastosowania próbek o lepszych parametrach (a przez to droższych).

Probówki na próbki muszą być czyste i wolne od brudu i zarysowań. Nie wolno szorować probówek za pomocą szczotek do probówek. Nie należy zakładać, że nowe probówki do NMR są czyste. Probówki można oczyścić przepłukując acetonem lub wodą destylowaną. Można zastosować płynny detergent, jednak w ciągu kilku minut należy probówkę wypłukać, aby nie nastąpiło zarysowanie jej powierzchni. Probówki można ponadto czyścić ultradźwiękowo w odpowiednim roztworze. Jeśli wszystkie powyższe metody zawiodą, probówki należy zanurzyć w wodzie królewskiej na maksymalnie dwa dni, a następnie dokładnie wypłukać i wysuszyć. Probówki do NMR można suszyć w piecu. Nie należy ich ogrzewać do temperatury powyżej 100°C, ponieważ może nastąpić ich odkształcenie, w wyniku czego nie będą się właściwie obracać. Suszenie najlepiej przeprowadzić przepuszczając przez probówkę filtrowany azot.

7.3 Postępowanie z próbką

Dobłą zasadą jest filtrowanie roztworów do badań NMR bezpośrednio do probówki na próbkę. Dzięki temu w roztworze nie będzie brudu i innych zanieczyszczeń.



Uwaga: Probówkę na próbkę należy zawsze trzymać za górną część!

Typowa procedura przygotowania próbki wygląda następująco:

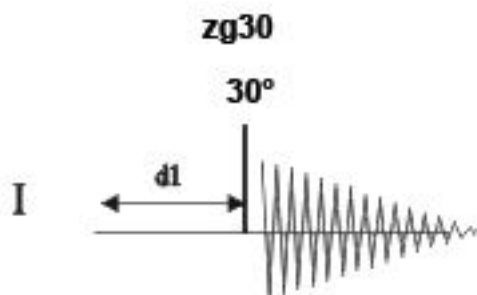
1. W przypadku próbki stałej i probówki o średnicy 5 mm należy rozpuścić do 20 mg próbki w około 0,6 cm³ wybranego rozpuszczalnika (a w przypadku probówki o średnicy 10 mm rozpuścić 80 mg w 2,5 cm³). Zazwyczaj w przypadku próbki ciekłej i obserwacji protonów należy rozpuścić 20% próbki w 80% rozpuszczalnika deuterowanego.
2. Dodać niewielką ilość (~ 0,1%) związku odniesienia — tetrametylosilanu (TMS). Upewnić się, że sygnał TMS jest mniej intensywny od najbardziej intensywnego sygnału próbki lub rozpuszczalnika (w przeciwnym razie zmniejszy się stosunek sygnału do szumu wskutek niskiego wzmocnienia odbiornika).
3. Przefiltrować roztwór do probówki na próbkę przez pipetę Pasteura z małym korkiem z chusteczki Kimwipe.
4. Przefiltrować 0,2 cm³ rozpuszczalnika przez filtr do probówki. Powstały roztwór powinien sięgać do wysokości trzech do czterech centymetrów.
5. Zamknąć probówkę korkiem, u góry zabezpieczyć folią parafilm, aby zmniejszyć parowanie i opisać probówkę w części górnej. Należy zapewnić, że korek, folia parafilm i etykieta są koncentryczne. W przeciwnym razie będą miały negatywny wpływ na wirowanie próbki.



Uwaga: Jeśli do filtracji próbki wykorzystuje się włókno szklane, mogą wystąpić pewne problemy, szczególnie w przypadku pomiaru T₁.

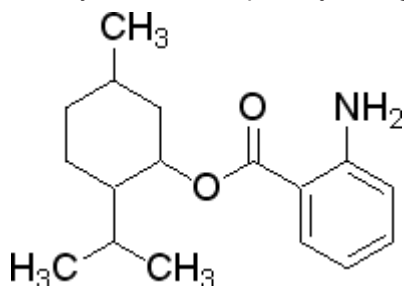
8 Widmo protonowe

W tym rozdziale opisano rejestrację i przetwarzanie jednowymiarowego widma ^1H NMR przy użyciu standardowego zestawu parametrów firmy Bruker **PROTON**. Sekwencja impulsów **zg30** (patrz rysunek poniżej) składa się z opóźnienia kolejnego cyklu, impulsu o częstotliwości radiowej (RF) i czasu rejestracji sygnału. Pokazany kąt impulsu wynosi 30° . Dwa parametry, **d1** i **p1**, odpowiadają odpowiednio długości opóźnienia kolejnego cyklu i długości impulsu RF 90° .



Przedziały czasu podane na schematach sekwencji impulsów nie są pokazane w skali. Na przykład **d1** ma zazwyczaj długość kilku sekund, zaś **p1** kilku mikrosekund.

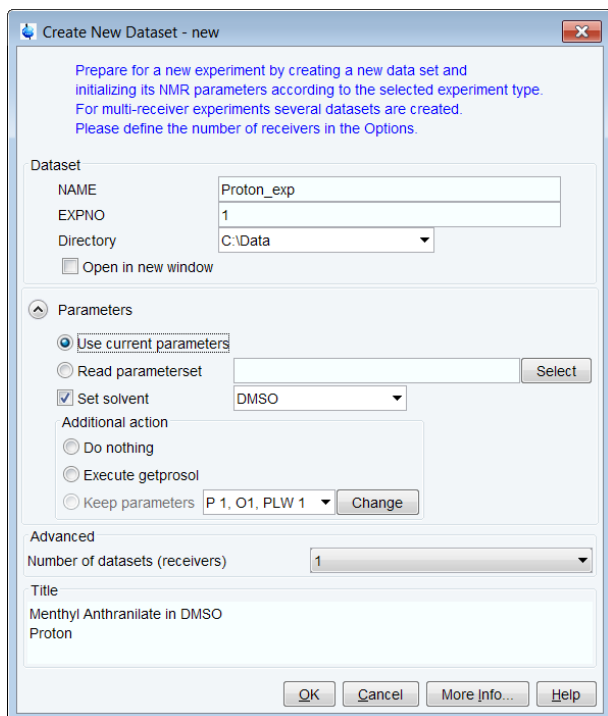
Należy zastosować próbkę **30 mg antranilanu mentylu w DMSO-d6**.



8.1 Ustawienie eksperymentu

Utworzenie nowego zbioru danych

- Na pasku menu kliknąć **Acquire|Create Dataset**, aby otworzyć okno Create New Dataset.



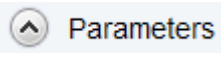
- W oknie Create New Dataset wprowadzić lub zaznaczyć:
NAME = Proton_exp
EXPNO = 1
Directory = np. C:\Data

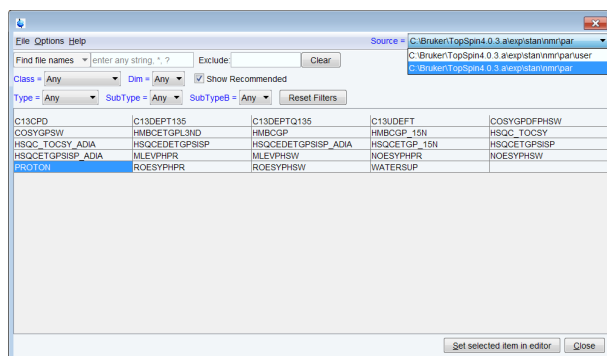
Parametry **Directory**, **NAME** i **EXPNO** określają miejsce przechowywania zbioru danych nowego eksperymentu w komputerze.

Directory/NAME/EXPNO/ W przykładzie: *C:\Data\proton_exp\1*



Parametr **Directory** można wybrać z listy rozwijanej lub w polu tekstowym można wpisać nową lokalizację. Parametr **NAME** jest podkatalogiem parametru **Directory**, zaś parametr **EXPNO** jest podkatalogiem parametru **NAME**. Parametr **EXPNO** musi być dodatnią liczbą całkowitą. Zapewnia sposób przechowywania wielu powiązanych zbiorów danych pod tym samym parametrem dotyczącym nazwy **NAME**.

- W grupie parametrów  kliknąć **Read parameterset** i **Select**, aby otworzyć okno rpar.



- Zaznaczyć opcję **Show Recommended**, aby uzyskać listę typowych eksperymentów uwzględniających małe cząsteczki.
- Upewnić się, że katalog źródłowy to
`<Topspin>\exp\stan\nmr\par`
 a nie
`<Topspin>\exp\stan\nmr\par\user`
- W tabeli wybrać eksperyment **PROTON** i kliknąć polecenie **Set selected item in editor**.
- W oknie Create New Dataset zaznaczyć opcję **Set solvent** i z listy rozwijanej wybrać **DMSO**.
- W polu TITLE wprowadzić tekst określający eksperyment, próbkę, rozpuszczalnik i inne użyteczne informacje. Informacje zawarte w tytule można wykorzystać do wyszukiwania zbioru danych.
- W oknie New Dataset kliknąć **OK**.
- Na pasku menu kliknąć zakładkę **Acquire**.

Aby zarejestrować widmo, skorzystać z przycisków czynności na pasku przycisków czynności od lewej do prawej (patrz kroki poniżej). Polecenia wyświetlane w nawiasach w różnych oknach wyskakujących można również wpisać w wierszu polecenia oprogramowania TopSpin (np. **ej**, **ij**, **edte** itd.).

- Na przycisku **Sample** kliknąć strzałkę **w dół**, aby wyświetlić więcej opcji.
- Z listy wybrać opcję **Eject sample manually (ej)**.



Poczekać na włączenie przepływu sprężonego powietrza podnoszącego próbkę i wyjąć próbkę, która może znajdować się w magnesie.

Wprowadzenie próbki

- Umieścić próbkę ze spinnerem na górze magnesu.
- Na przycisku **Sample** kliknąć strzałkę **w dół**, aby wyświetlić więcej opcji.
- Z listy wybrać opcję **Insert sample manually (ij)**.



Odczekać do momentu opuszczenia próbki w sondzie i wyłączenia przepływu sprężonego powietrza podnoszącego próbkę. Może być słyszalny dźwięk kliknięcia.

Lock'owanie rozpuszczalnika

- Na pasku przycisków czynności kliknąć opcję **Lock**.
- W oknie Solvents table wybrać rozpuszczalnik, np. **DMSO**. Kliknąć **OK**.

Solvent	Description
Acetic	acetic acid-d4
Acetone	acetone-d6
C6D6	benzene-d6
CD2Cl2	dichloromethane-d2
CD3CN	acetonitrile-d3
CD3CN_SPE	LC-SPE Solvent (Acetonitrile)
CD3OD_SPE	LC-SPE Solvent (Methanol-d4)
CDCl3	chloroform-d
CH3CN+D2O	HPLC Solvent (Acetonitril/D2O)
CH3OH+D2O	HPLC Solvent (Methanol/D2O)
D2O	deuteriumoxide
D2O_salt	deuteriumoxide with salt
Dioxane	dioxane-d8
DMF	N,N-dimethylformamide-d7
DMSO	dimethylsulfoxide-d6
EtOD	ethanol-d6
H2O+D2O	90%H2O and 10%D2O
H2O+D2O_salt	90%H2O and 10%D2O with salt
HDMSO	90%DMSO and 10%DMSO-d6
Juice	fruit juice
MeOD	methanol-d4
Plasma	blood plasma
Pyr	pyridine-d5
T_H2O+D2O+Me4NCl	(CD3)4NCl in 90%H2O and 10%D2O, for NMR thermometer
T_H2O+D2O+NaAc	sodium acetate in 90%H2O and 10%D2O, for NMR thermometer
T_H2O+D2O+Pivalate	pivalate-d9 in 90% H2O and 10% D2O, for NMR thermometer
T_MeOD	methanol-d4, for NMR thermometer
TFE	trifluoroethanol-d3
THF	tetrahydrofuran-d8
Tol	toluene-d8
Urine	urine

Lock nucleus: 2H

Strojenie i dopasowanie sondy

- Na pasku przycisków czynności kliknąć opcję **Tune**.

Zostanie wykonana procedura **atma (automatyczne strojenie i dopasowanie)**, która wymaga sondy wyposażonej w automatyczny moduł strojenia. Aby uzyskać więcej opcji, kliknąć strzałkę **w dół** na przycisku **Tune**.

Wirowanie próbki (opcjonalne)

- Na przycisku **Spin** kliknąć strzałkę **w dół**, aby wyświetlić więcej opcji.
- Z listy wybrać opcję **Turn sample rotation on (ro on)**.



Obracanie można **WYŁĄCZYĆ** w przypadku sond takich jak **BBI, TXI, TBI** i sond dla małych próbek.

Shim'owanie próbki

- Na pasku przycisków czynności kliknąć opcję **Shim**.

Spowoduje to wykonanie polecenia **topshim**. Shim'owanie rozpocznie się natychmiast i powinno zająć mniej niż minutę. Na przycisku **Shim** kliknąć strzałkę **w dół**, aby wyświetlić więcej opcji.

Wczytanie parametrów prosol

- Na pasku przycisków czynności kliknąć opcję **Prosol**.

Spowoduje to wczytanie szerokości impulsu i poziomów mocy do zestawu parametrów.

8.2 Akwizycja

Ustawienie wzmocnienia odbiornika

- Na pasku przycisków czynności kliknąć opcję **Gain**.

lub

- Na przycisku Gain kliknąć strzałkę rozwijaną w dół, aby ręcznie dostosować wzmocnienie odbiornika.

Rozpoczęcie akwizycji danych

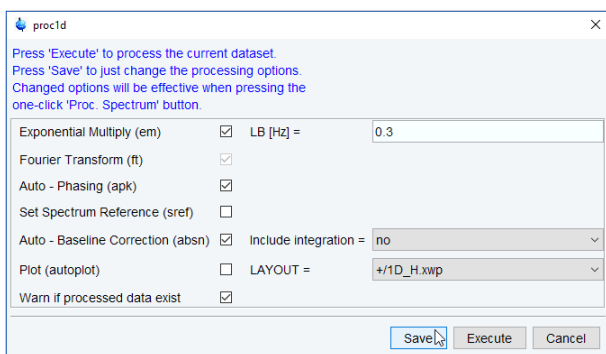
- Na pasku przycisków czynności kliknąć opcję **Run**.

lub

- Na przycisku **Run** kliknąć strzałkę **w dół**, aby wyświetlić więcej opcji.

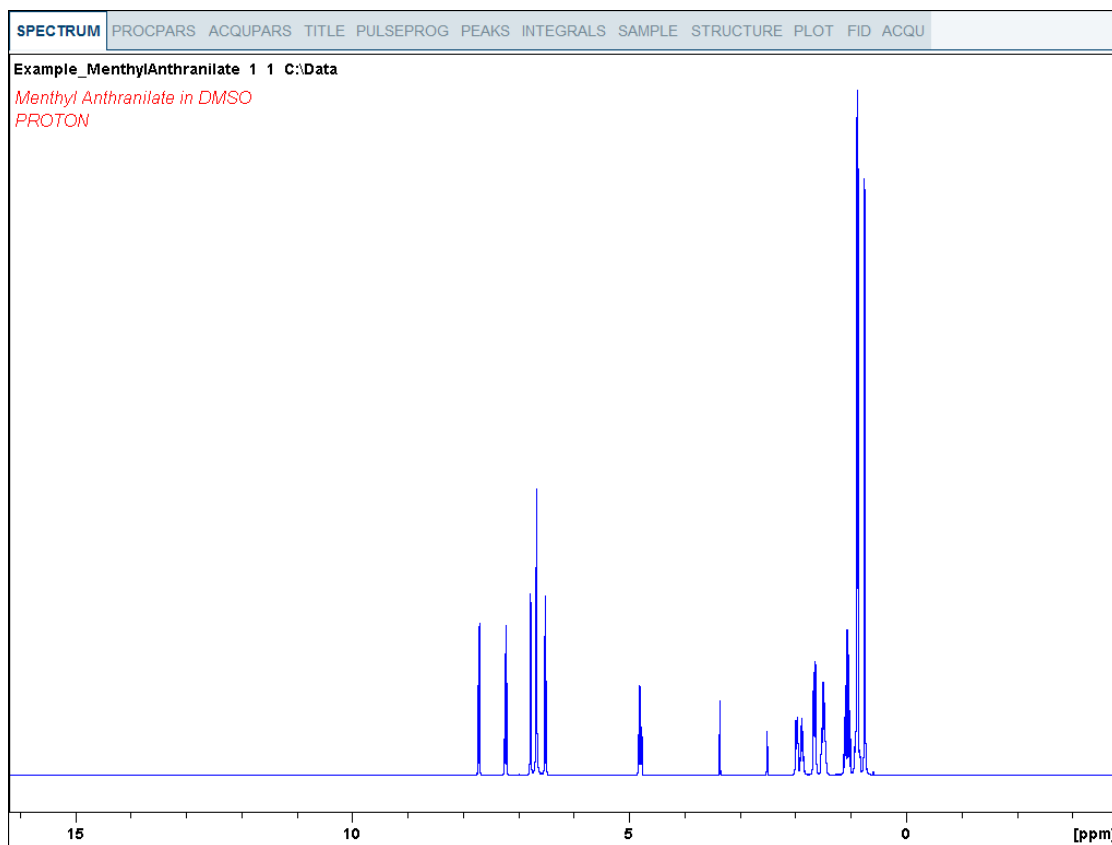
8.3 Przetwarzanie

- Po zakończeniu akwizycji kliknąć zakładkę **Process** na pasku menu.
- Na przycisku **Proc Spectrum** kliknąć strzałkę **w dół**, aby wyświetlić więcej opcji.
- Z listy wybrać opcję **Configure Standard Processing (proc1d)**.
- W oknie proc1d zaznaczyć następujące opcje:
 - Exponential Multiply (em)
 - Auto - Phasing (apk)
 - Auto - Baseline Correction (absn)



- Jeśli do próbki dodano związek odniesienia — TMS, zaznaczyć opcję **Set Spectrum Reference (sref)**.
- W oknie proc1d kliknąć polecenie **Execute**, a następnie kliknąć **Save**, aby zapisać wybrane ustawienia przetwarzania.

Teraz wszystkie przyszłe zbiory danych mogą być przetwarzane za pomocą zdefiniowanych czynności, klikając na **Proc Spectrum**.

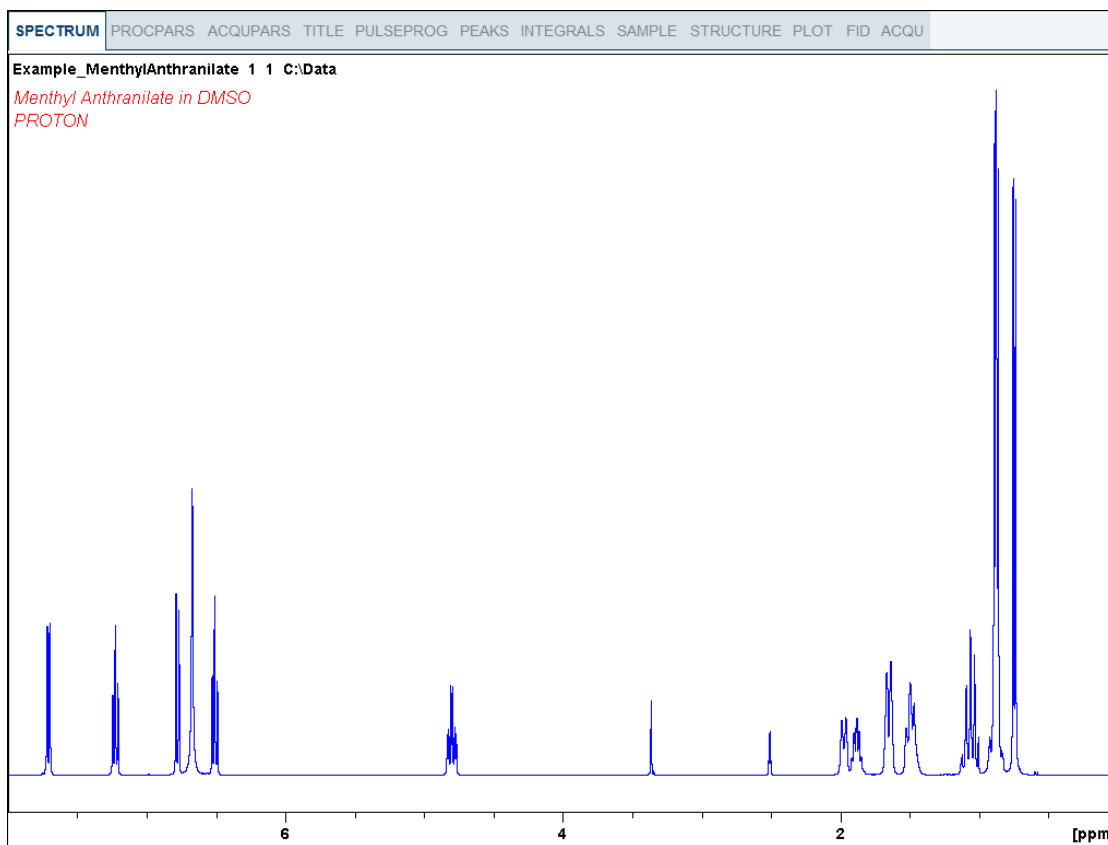


8.4 Całkowanie

Aby ilościowo przeanalizować zaobserwowany sygnał protonowy porównuje się ze sobą scałkowane intensywności pików. Często wykonuje się całkowanie widma protonowego w celu wyliczenia liczby protonów w analizowanej cząsteczce.

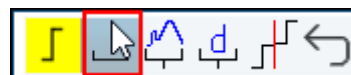
Aby uzyskać dokładniejsze wyniki integracji ilościowej, należy zapoznać się z podręcznikiem **Analiza ilościowa NMR**.

- Rozszerzyć widmo, aby obejmowało wszystkie piki.

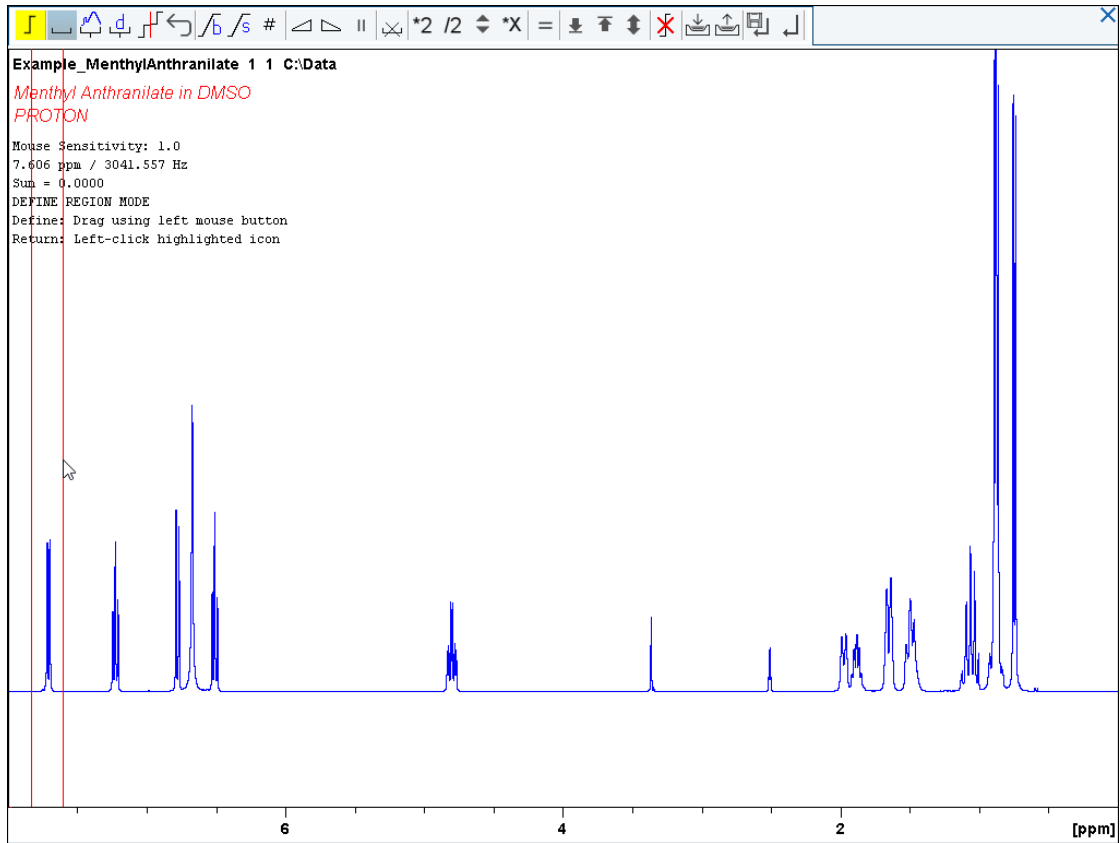


- W menu kliknąć zakładkę **Analyse|Integrate**.

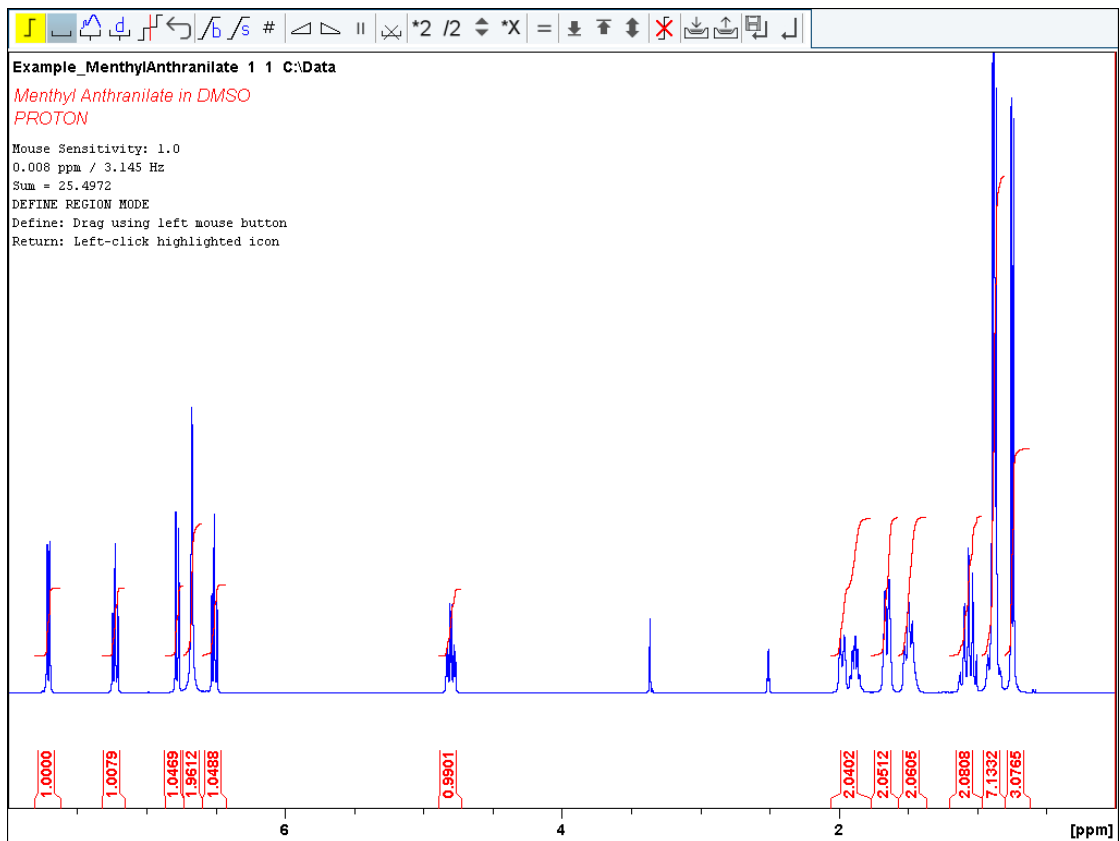
Powoduje to włączenie ręcznego trybu całkowania. Pasek zakładek **The Dataset** zostaje zastąpiony przez pasek **narzędzi całkowania**.



- Zaznaczyć przycisk **Define new region using cursor**.
- Ustawić linię kursora po lewej stronie pierwszego piku, który chcemy zintegrować. Kliknąć lewym przyciskiem myszy i przeciągnąć linię kursora w prawo od piku, a następnie zwolnić przycisk myszy.



- Powtórzyć ostatni krok dla wszystkich pozostałych pików.



- Na pasku narzędzi integracji kliknąć opcję **Return, save region**, aby zapisać obszary

całkowania. 

8.5 Wykreślanie widma protonowego 1D

- Rozszerzyć widmo, aby obejmowało wszystkie piki.
- Na pasku narzędzi kliknąć ikonę **Retain expansion and scale**.





Widmo można wydrukować w postaci takiej, jak wyświetlana w zakładce SPECTRUM,

klikając ikonę **Print active window** .

Widmo można również wydrukować w postaci wstępnie zdefiniowanej, klikając ikonę **Export**

active data or plot window as PDF .

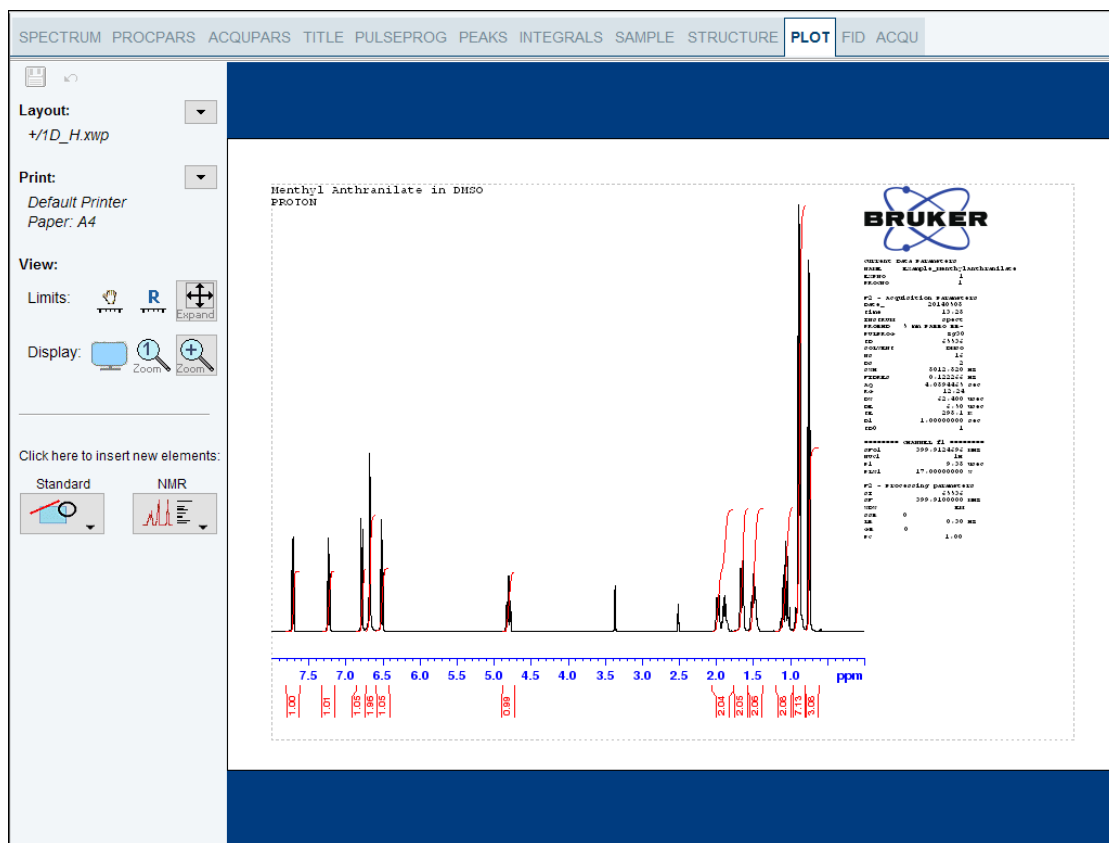
Dodatkowe opcje są dostępne po kliknięciu przycisku **Show more Publish Options** na

pasku menu  i przełączeniu do edytora wydruku. . Można również przełączyć się do interaktywnego edytora wydruku, klikając zakładkę **Plot** na pasku zakładek w oknie zbioru danych (patrz rysunek poniżej).



Szczegółowe informacje na temat pracy z edytorem wydruku i modyfikacji układów można

znaleźć w podręczniku **Publikowanie danych** w menu pomocy. . Kliknąć kolejno **Help** | **Manuals** | **Automation and Data Publishing** | **Data Publishing**.

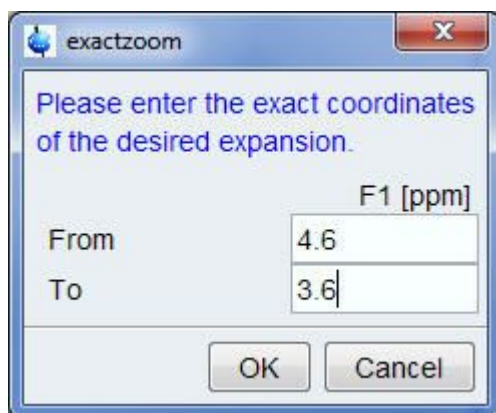


8.6 Optymalizacja szerokości przemiataania

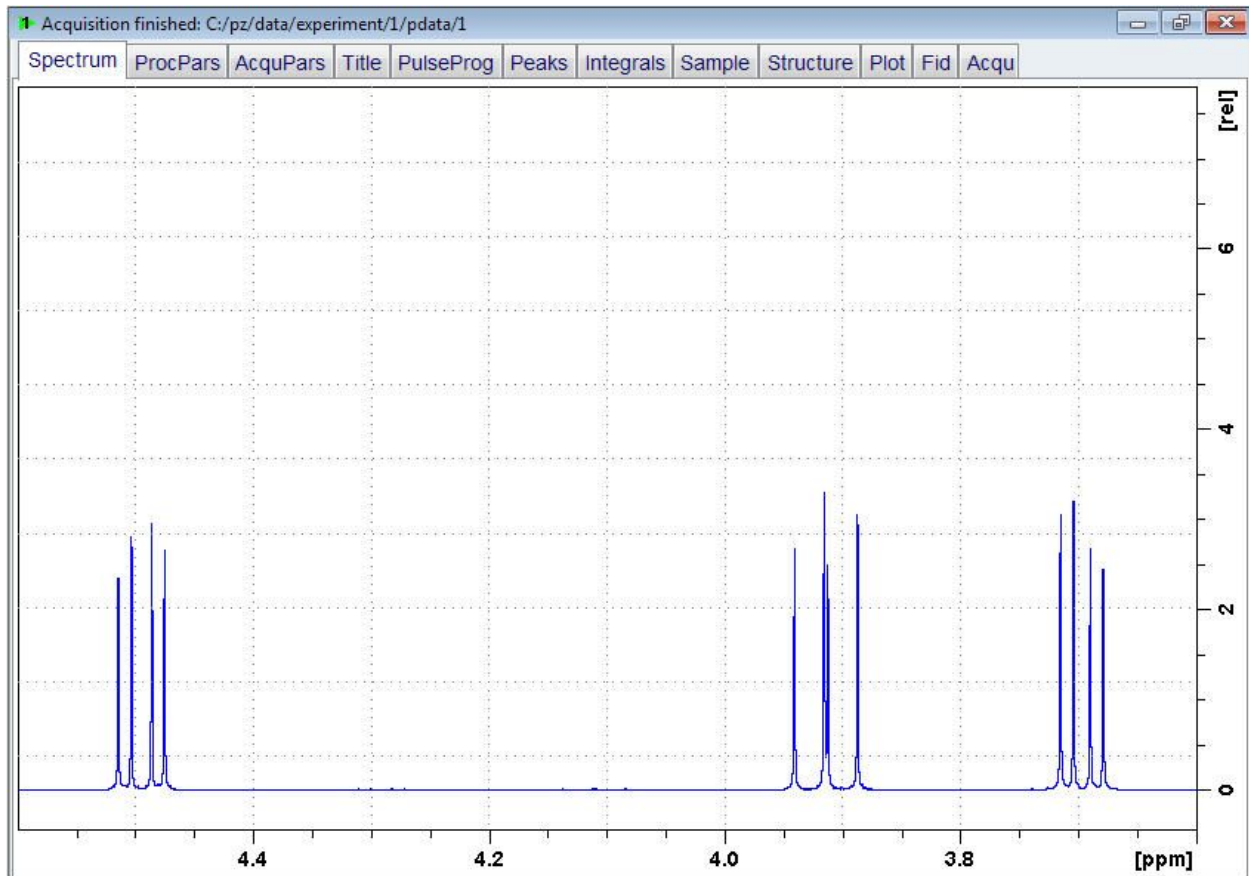
Optymalizacja szerokości przemiataania pozwala uzyskać lepszą rozdzielczość i rozdzielić piki w widmie protonowym.



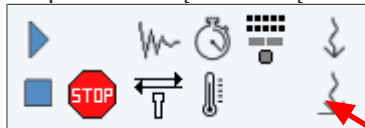
- Na pasku narzędzi kliknąć **Exact Zoom**.
- Wprowadzić następujące wartości F1 [ppm]:
Od = 4.6
Do = 3.6



- W oknie exactzoom kliknąć **OK**.



- Na pasku narzędzi kliknąć ikonę **Set sw to current region** i **SFO1 to center of region**.



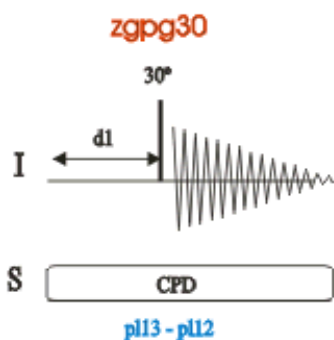
- W oknie New setting of SW kliknąć polecenie **Close**.
- Na pasku przycisków czynności kliknąć opcję **Run**.
- Na pasku menu kliknąć zakładkę **Process**.
- Na pasku przycisków czynności kliknąć opcję **Proc Spectrum**.



Uwaga: W ten sposób zastosowane zostają zapisane parametry przetwarzania w oknie proc1d.

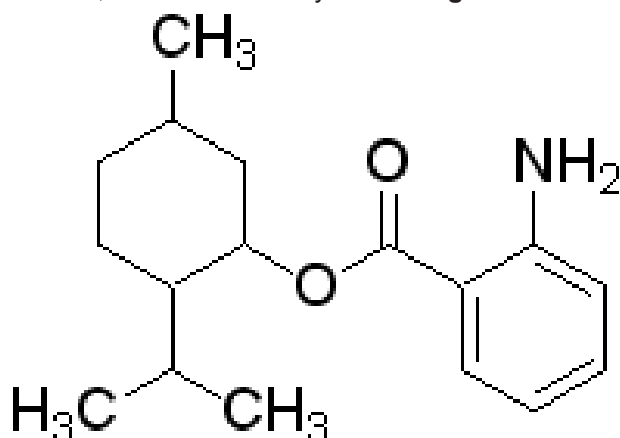
9 Widmo ^{13}C z odsprężaniem protonów

W tym rozdziale opisano akwizycję i przetwarzanie jednowymiarowego widma ^{13}C NMR. Standardowy zestaw parametrów **C13CPD** firmy Bruker obejmuje sekwencję impulsów **zgpg30** przedstawioną na rysunku poniżej. Kanał ^{13}C składa się z opóźnienia kolejnego cyklu, impulsu o częstotliwości radiowej (RF) i czasu akwizycji, podczas którego sygnał jest rejestrowany. Pokazany kąt impulsu wynosi 30° . Dwa parametry, **d1** i **p1**, odpowiadają odpowiednio długości opóźnienia kolejnego cyklu i długości impulsu RF 90° . Kanał ^1H składa się z dwóch impulsów odsprężających, których moc może być bramkowana. Pierwszy impuls, czyli impuls narastania NOE podczas opóźnienia kolejnego cyklu, może mieć niższą moc niż drugi impuls podczas akwizycji będący rzeczywistym impulsem odsprężającym. Może to być użyteczne, aby nie dopuścić do ogrzewania częstotliwością radiową próbek o dużej zawartości soli lub próbek, w przypadku których większa moc odsprężania może być niekorzystna.




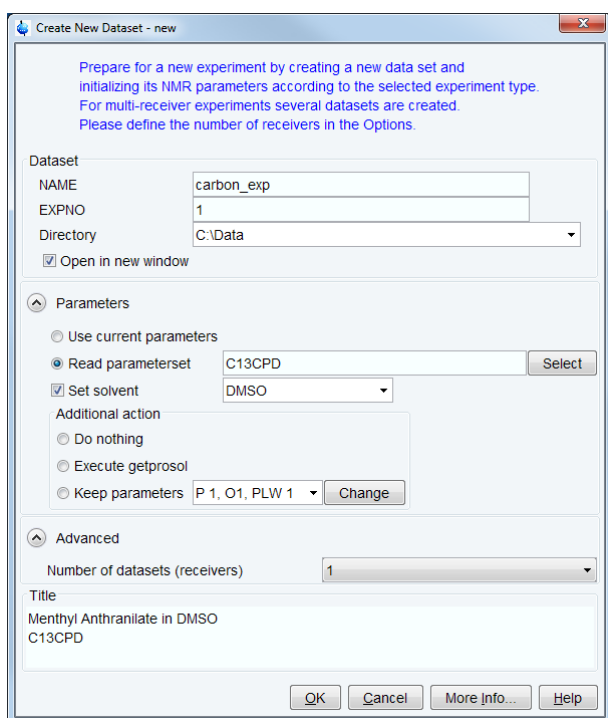
Przedziały czasu podane na schematach sekwencji impulsów nie są pokazane w skali. Na przykład **d1** ma zazwyczaj długość kilku sekund, zaś **p1** kilku mikrosekund.

Próbka, która zostanie użyta to **30 mg antranilanu mentylu rozpuszczone w DMSO-d6**.



9.1 Ustawienie eksperymentu

- Na pasku menu kliknąć **Acquire|Create Dataset**, aby otworzyć okno Create New Dataset.
- W oknie New Dataset wprowadzić lub zaznaczyć:
NAME = **carbon_exp**
EXPNO = **1**
Directory = np. **C:\Data**
- W grupie parametrów  **Parameters** kliknąć **Read parameterset** i zaznaczyć eksperyment **C13CPD**
- W oknie Create New Dataset zaznaczyć opcję **Set solvent** i z listy rozwijanej wybrać **DMSO**.



- W polu TITLE wprowadzić tekst określający eksperyment, próbkę, rozpuszczalnik i inne użyteczne informacje. Informacje zawarte w tytule można wykorzystać do wyszukiwania zbioru danych.
- W oknie New Dataset kliknąć **OK**.
- W oknie Dataset wybrać zakładkę **AcquPars**.
- Wprowadzić następującą zmianę:
NS = **128**
- Na pasku menu kliknąć zakładkę **Acquire**.



Aby zarejestrować widmo, skorzystać z przycisków czynności od lewej do prawej.

- Na przycisku **Sample** kliknąć strzałkę **w dół**, aby wyświetlić więcej opcji.
- Z listy wybrać opcję **Eject sample manually (ej)**. Przepływ sprężonego powietrza podnoszącego próbkę jest włączony.



Poczekać na włączenie przepływu sprężonego powietrza podnoszącego próbkę i wyjąć próbkę, która mogła znajdować się w magnesie.

- Umieścić próbkę ze spinnerem na górze magnesu.
- Na przycisku **Sample** kliknąć strzałkę **w dół**, aby wyświetlić więcej opcji.
- Z listy wybrać opcję **Insert sample manually (ij)**.



Odczekać do momentu opuszczenia próbki w sondzie i wyłączenia przepływu sprężonego powietrza podnoszącego próbkę. Może być słyszalny dźwięk kliknięcia.

- Na pasku przycisków czynności kliknąć opcję **Lock**.
- Na liście w tabeli Solvents table zaznaczyć **DMSO** i kliknąć **OK**.

Δ Solvent	Description
Acetic	acetic acid-d4
Acetone	acetone-d6
C6D6	benzene-d6
CD2Cl2	dichloromethane-d2
CD3CN	acetonitrile-d3
CD3CN_SPE	LC-SPE Solvent (Acetonitrile)
CD3OD_SPE	LC-SPE Solvent (Methanol-d4)
CDCl3	chloroform-d
CH3CN+D2O	HPLC Solvent (Acetonitril/D2O)
CH3OH+D2O	HPLC Solvent (Methanol/D2O)
D2O	deuteriumoxide
D2O_salt	deuteriumoxide with salt
Dioxane	dioxane-d8
DMF	N,N-dimethylformamide-d7
DMSO	dimethylsulfoxide-d6
EtOD	ethanol-d6
H2O+D2O	90%H2O and 10%D2O
H2O+D2O_salt	90%H2O and 10%D2O with salt
HDMSO	90%DMSO and 10%DMSO-d6
Juice	fruit juice
MeOD	methanol-d4
Plasma	blood plasma
Pyr	pyridine-d5
T_H2O+D2O+Me4NCl	(CD3)4NCl in 90%H2O and 10%D2O, for NMR thermometer
T_H2O+D2O+NaAc	sodium acetate in 90%H2O and 10%D2O, for NMR thermometer
T_H2O+D2O+Pivalate	pivalate-d9 in 90% H2O and 10% D2O, for NMR thermometer
T_MeOD	methanol-d4, for NMR thermometer
TFE	trifluoroethanol-d3
THF	tetrahydrofuran-d8
Tol	toluene-d8
Urine	urine

Lock nucleus: 2H

- Na pasku przycisków czynności kliknąć opcję **Tune**.



Zostanie wykonana procedura **atma** (automatyczne strojenie i dopasowanie), która wymaga sondy wyposażonej w automatyczny moduł strojenia i dopasowania. Strojenie zawsze rozpoczyna się od najniższej częstotliwości, w tym przypadku węgla, a następnie przełącza się, aby dostroić wyższe częstotliwości, w tym przypadku proton. Na przycisku **Tune** kliknąć strzałkę **w dół**, aby wyświetlić więcej opcji.

- Na przycisku **Spin** kliknąć strzałkę **w dół**, aby wyświetlić więcej opcji.
- Z listy wybrać opcję **Turn sample rotation on (ro on)**.



Obracanie można wyłączyć w przypadku sond takich **BBI, TXI, TBI** i sond dla małych próbek.

- Na pasku przycisków czynności kliknąć opcję **Shim**.

Spowoduje to wykonanie polecenia **topshim**. Na przycisku **Shim** kliknąć strzałkę **w dół**, aby wyświetlić więcej opcji.

- Na pasku przycisków czynności kliknąć opcję **Prosol**.

Spowoduje to wczytanie szerokości impulsu i poziomów mocy do zestawu parametrów.

9.2 Akwizycja

- Na pasku przycisków czynności kliknąć opcję **Gain**.

lub

- Na przycisku **Gain** kliknąć strzałkę rozwijaną **w dół**, aby ręcznie dostosować wzmocnienie odbiornika.
- Na pasku przycisków czynności kliknąć opcję **Run**.

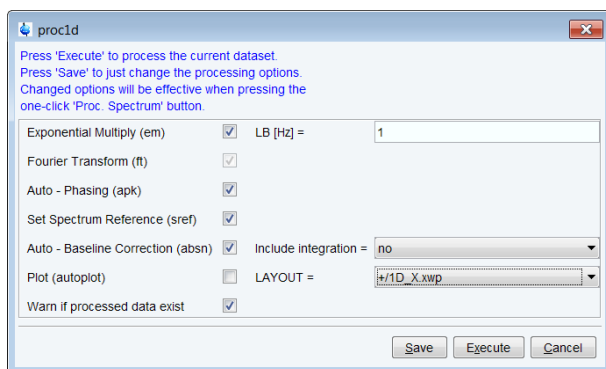
lub

- Na przycisku **Run** kliknąć strzałkę **w dół**, aby wyświetlić więcej opcji.

9.3 Przetwarzanie

Po zakończeniu akwizycji:

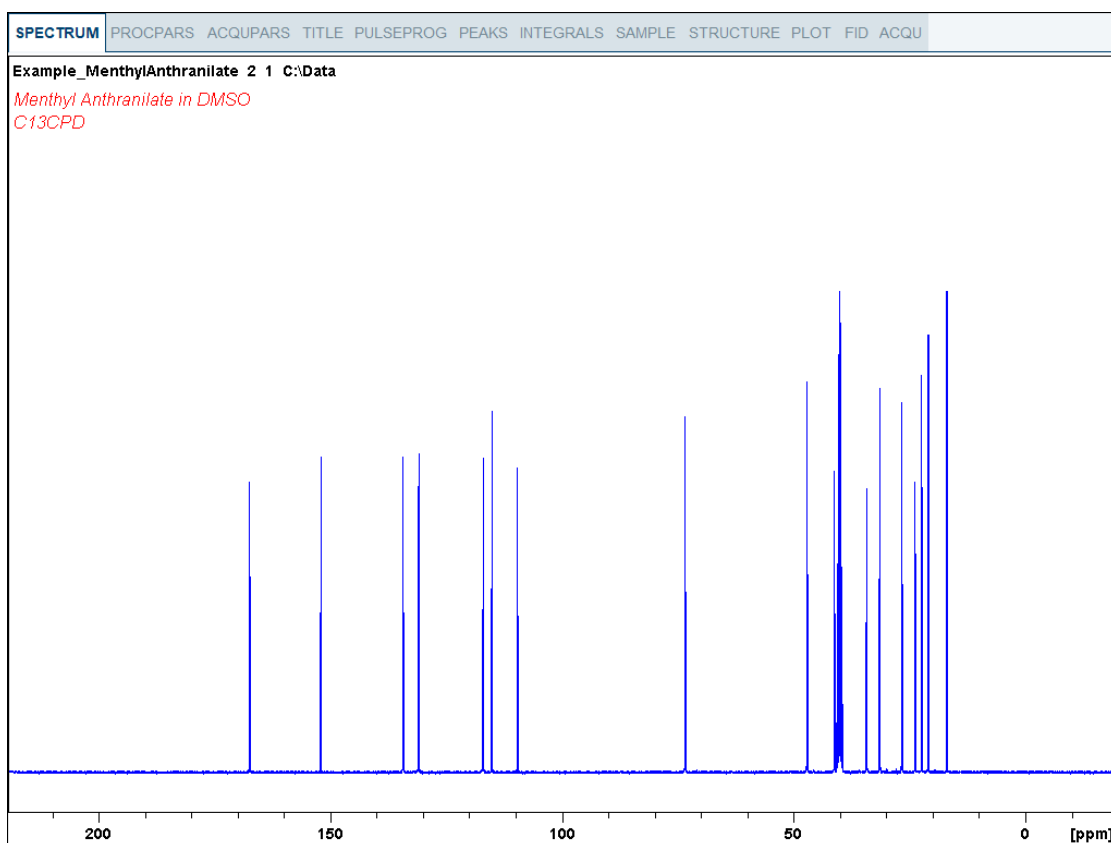
- Na pasku menu kliknąć zakładkę **Process**.
- Na przycisku **Proc Spectrum** kliknąć strzałkę **w dół**, aby wyświetlić więcej opcji.
- Z listy wybrać opcję **Configure Standard Processing (proc1d)**.
- W oknie proc1d wybrać opcje:
 - Exponential Multiply (em)
 - Auto - Phasing (apk)
 - Set Spectrum Reference (sref)
 - Auto - Baseline Correction (absn)



- W oknie proc1d kliknąć polecenie **Execute**.
- W oknie proc1d kliknąć przycisk **Save**, aby zapisać wybrane ustawienia przetwarzania.

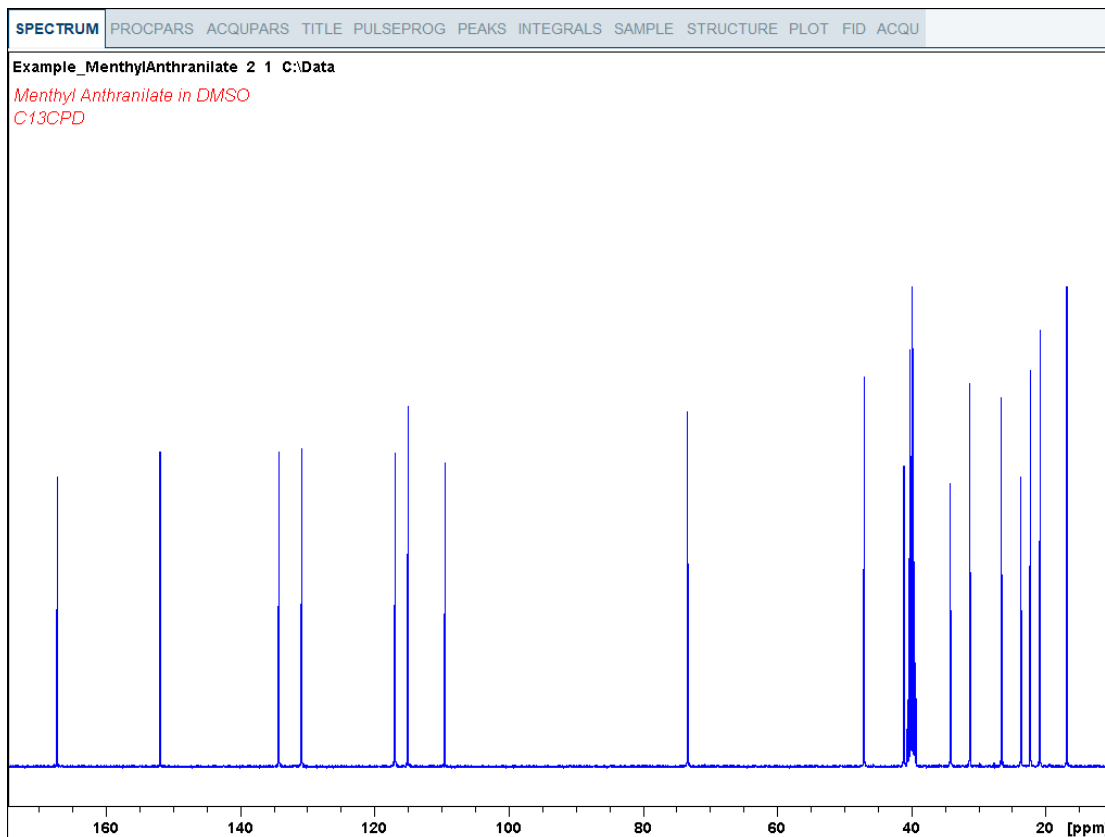


Teraz wszystkie przyszłe zbiory danych mogą być przetwarzane za pomocą zdefiniowanych czynności, klikając na **Proc Spectrum**.



9.4 Wybieranie pików

- Rozszerzyć widmo, aby obejmowało wszystkie piki.



- Na pasku menu kliknąć zakładkę **Analyse**.
 - Na pasku przycisków czynności kliknąć opcję **Pick Peaks**.
- lub
- Na przycisku **Pick Peaks** kliknąć strzałkę **w dół**, aby wyświetlić więcej opcji.

Powoduje to włączenie ręcznego wyboru pików.

Zakładki **Dataset** zostają zastąpione paskiem narzędzi **Peak Picking**.

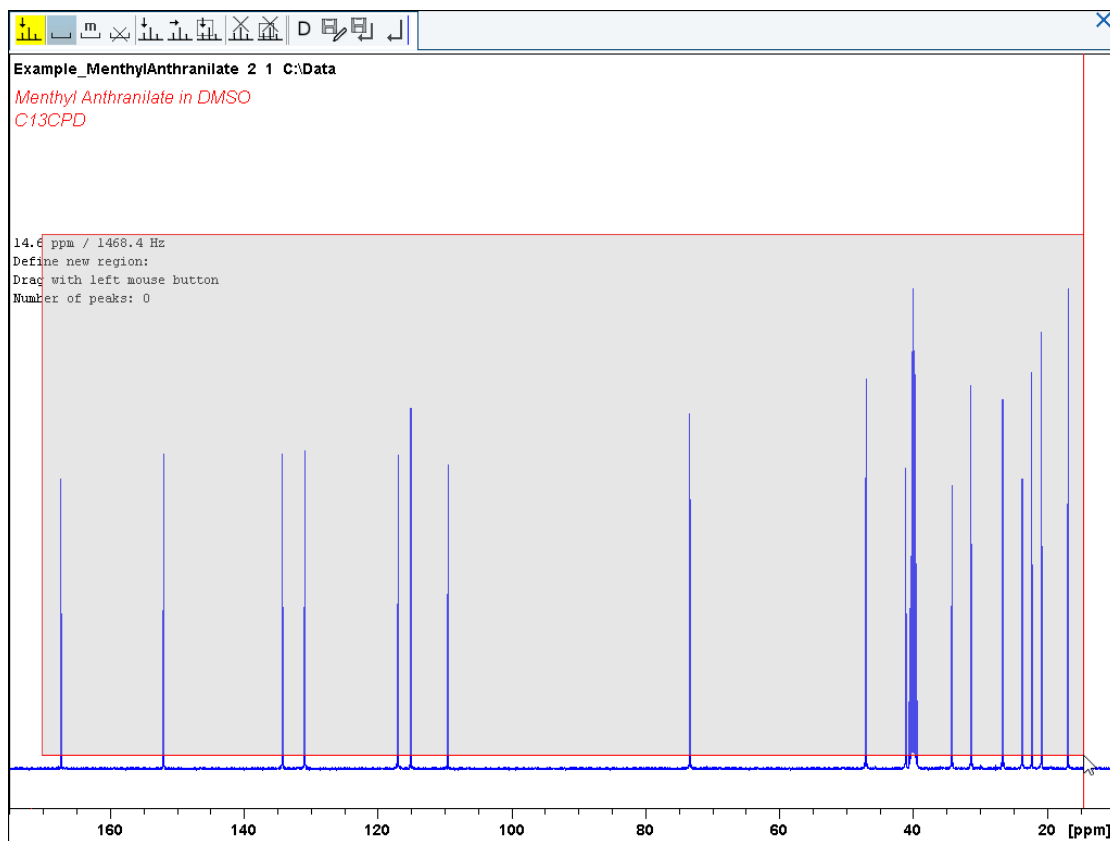


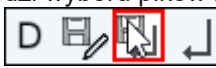
Domyślnie włączony jest przycisk **Define new peak picking range**.

- Kliknąć lewym przyciskiem myszy i przeciągnąć linię kursora od lewej do prawej strony widma, rysując prostokąt.

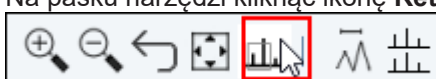



Przycisk **Modify existing peak picking range** pozwala podnieść dolną i/lub obniżyć górną krawędź prostokąta wyboru pików w celu usunięcia szumu lub pików rozpuszczalnika.



- Na pasku narzędzi wyboru pików kliknąć ikonę **Return, save region**, aby zapisać wartości pików. 
- Aby wyświetlić etykiety wyboru pików, kliknąć prawym przyciskiem myszy w oknie widma i zaznaczyć opcję **Spectra Display Preferences**. Spośród składowych widma włączyć opcje **Peak labels** i **Peak annotations**. Kliknąć polecenia **Apply** i **Close**.

9.5 Wykreślanie widma węglowego 1D

- Rozszerzyć widmo, aby obejmowało wszystkie piki.
- Na pasku narzędzi kliknąć ikonę **Retain expansion and scale**. 
- Na pasku menu kliknąć ikonę **Show more Publishing Options**. 

- Wybrać ikonę **Switch to plot editor** (drukuj). 

10 Kontakt

Producent:

Bruker BioSpin NMR
Silberstreifen
D-76287 Rheinstetten
Niemcy
Telefon: +49 721-5161-6155
<http://www.bruker.com>
WEEE DE43181702

Infolinie NMR

Prosimy o kontakt z naszymi centrami obsługi zajmującymi się spektrometrią NMR.

Firma Bruker BioSpin NMR oferuje dedykowane infolinie i centra obsługi, dzięki czemu nasi specjaliści są w stanie szybko zareagować na wszelkie pytania klientów dotyczące obsługi, aplikacji, oprogramowania lub kwestii technicznych.

Prosimy o wybór centrum obsługi NMR lub infolinii z listy dostępnej na stronie:

<http://www.bruker.com/service/information-communication/helpdesk.html>

Rysunki

Rysunek 3.1:	Wzbudzenie i reakcja na wzbudzenie.....	9
Rysunek 3.2:	Widmo NMR	10
Rysunek 3.3:	Analiza NMR CHCl ₃	11
Rysunek 3.4:	Sygnaly MRJ emitowane przez CHCl ₃	12
Rysunek 3.5:	Przeliczanie herców i ppm	13
Rysunek 3.6:	Przesunięcia chemiczne 1H w związkach organicznych	15
Rysunek 3.7:	Pierścień benzenowy	15
Rysunek 3.8:	Widmo benzenu.....	16
Rysunek 3.9:	Octanu benzylu.....	16
Rysunek 3.10:	Widmo protonowe octanu benzylu.....	17
Rysunek 3.11:	Etylobenzen	18
Rysunek 3.12:	Widmo etylobenzenu	19
Rysunek 3.13:	Eksperyment z odsprzęgnięciem	20
Rysunek 3.14:	Widmo etylobenzenu z odsprzęgnięciem homojądrowym	21
Rysunek 3.15:	Transformacja Fouriera	22
Rysunek 4.1:	Konsola AVANCE NEO i magnes Ascend.....	23
Rysunek 4.2:	Przegląd budowy systemu AVANCE NEO	24
Rysunek 4.3:	Zdjęcia magnesu, systemu shim'ów, sondy i HPPR.....	26
Rysunek 4.4:	Magnes nadprzewodzący	28
Rysunek 4.5:	Próbka umieszczona w sondzie	30
Rysunek 4.6:	Typowe okablowanie HPPR	31
Rysunek 4.7:	Przykład sondy szerokopasmowej.....	32
Rysunek 4.8:	Platforma iProbe firmy Bruker.....	33
Rysunek 5.1:	Umieszczanie próbki w spinerze	38
Rysunek 5.2:	Tabela rozpuszczalników.....	40
Rysunek 5.3:	Wyświetlanie lock'u po zalock'owaniu próbki	40
Rysunek 5.4:	Okno ATMM Probe Tuning/Matching	42
Rysunek 5.5:	Przykłady krzywych strojenia przy różnych parametrach strojenia i dopasowywania ..	43
Rysunek 5.6:	Okno proc1d	46
Rysunek 6.1:	Widmo przy BF1 = 600,13 MHz, O1 = 0 Hz	48
Rysunek 6.2:	Widmo przy BF1 = 600,13 MHz, O1 = 8 kHz	49
Rysunek 6.3:	Widmo przy BF1 = 600,13 MHz, O1 = 8 kHz, SWH = 8,4 kHz.....	49
Rysunek 6.4:	Wzajemne zależności parametrów SFO1, BF1 i O1	50
Rysunek 7.1:	Widmo, na którym pokazano pasma boczne powstałe w wyniku obracania	52

Tabele

Tabela 3.1: Tabela z danymi dotyczącymi różnych izotopów (częstotliwości podano dla magnezu 11,7 T).....	9
Tabela 3.2: Zmiany częstotliwości (podano dla magnezu 11,7 T).....	10

Słowniczek

AQS

System akwizycji (ang. Aquisition System, AQS)

BSMS

Bruker Smart Magnet control System (BSMS) zapewnia sterowanie komputerowe różnych funkcji związanych z magnesem, polem magnetycznym i próbką.

BSVT

Inteligentny system zmiennej temperatury firmy Bruker (ang. Bruker Smart Variable Temperature System, BSVT)

deuterowany rozpuszczalnik

Deuterowany rozpuszczalnik jest to rozpuszczalnik, w którym duża część procentowa atomów wodoru została zastąpiona deuterem. Powszechnie stosowane deuterowane rozpuszczalniki to aceton-d₆, benzen-d₆, chloroform-d oraz DMSO-d₆, choć dostępnych jest wiele innych rozpuszczalników.

EPU

Wbudowaną jednostka przetwarzania (ang. Embedded Processing Unit, EPU)

GAB/3

Płyta wzmacniacza gradientu (ang. Gradient Amplifier Board, GAB) 3

GTU

Jednostka gradientu i czasu (ang. Gradient and Timing Unit, GTU_

HPPR

High Performance Preamplifier - przedwzmacniacze dużej wydajności

ppm

części na milion

przesunięcie chemiczne

Zmiana precyzyjnej częstotliwości rezonansowej.

Indeks

A

Abundancja naturalna	12
Aktywne w NMR	11
AQS	24
AVANCE NEO	24
Azot	
Ciekły azot.....	7

B

BASH.....	24
Bezpieczeństwo	7
Chemiczne	8
Pola magnetyczne	7
Bezpieczeństwo chemiczne	8
Bezpieczeństwo elektryczne	8
BF	47
Blokada fluoru	29
Blokowanie próbki	29
Bruker Smart Magnet System	24
BSMS	24, 26

C

Cewka	29
Cewka rejestracyjna	
I.....	31
Cewki częstotliwości radiowej (RF)	30
Chemicznie równoważny	16
Ciała stałe	51
Częstotliwości rezonansowe	9
Częstotliwość	10
Częstotliwość bezwzględna	13
Częstotliwość nośna	11
Częstotliwość rezonansowa	32
Czujnika poziomu helu	28
Czułość	12

D

Deklaracja zgodności	8
Dopasowanie	43

E

edlock	39
Ekranowanie magnetyczne	10
Elektromagnesy	27
EXPNO	36

F

FID	
Definicja	22
Folia Parafilm	53

H

Hel	
Ciekły hel	7
Herc	
Przeliczenie	13
HPPR	25, 26, 29
HPPR/2	27

I

Impulsy odsprężające	20
Intensywność	10
sygnału	10
Izotop	
Podstawową częstotliwość rezonansową	9
Izotopy	11

J

Jądro obserwowane	11
Jednorodność pola	44
Jednostka dystrybucji mocy	25
Jednostka sterowania temperaturą	32

K

Kompensacja	44
Komputer główny	24
Konsola	23
Konsola operatora	23, 24
Kwartet	18

L

Linia transferowa N2	32
----------------------------	----

M

Magnes	26
Bezpieczeństwo	7
Opis systemu	27
Magnesy nadprzewodzące	27
Magnetycznie równoważny	16
Metalowe implanty	7
Multiplety	18

N

Nadajniki	25
NAME	36

O

Obrót	52
Odsprężanie heterojądrowe	21

P

Parametr:SFO1	11
Pasm bocznych	
Intensywność wstęp bocznych	52
Pasm bocznych wskutek obracania	52
PDU	25
Pola rozproszonego	7
Połączenie Ethernet	24
ppm	13
Probówki.....	53
Próbki ciekłe	51
Przedwmacniacze	30
Przedwmacniacz o dużej wydajności	25
Przesunięcie chemiczne.....	14
Punkty danych SI	45

R

Rdzeń magnesu	27
Rozdzielczość pozioma widma	12
Rozdzielczość widmowa	44
Rozpuszczalnik	
Czynniki wyboru	51
Rozpuszczalnik deuterowany	29
Rozpuszczalniki	
Lepkość	51
Rozpuszczalność	51
Zawartość wody	51
Rozpuszczalniki deuterowane	51
Rozpuszczalniki organiczne	51
Rozruszniki serca	7

S

Selektywne	
Sondy	30
SFO1	47
Shim'owanie	26
Siła sygnału	
miara	10
Singlet	20
Singlety.....	12
Sonda	30
Cewka rejestracyjna	31
Wymiana sondy.....	34
Sonda QNP	32
Sondy	
Cewka szerokopasmowa	31
Grzałka	32
Selektywne	30
sprężenia spinowo-spinowego	
efekty	20
Strojenie	43
Symetrię probówki	52

System blokowania	
Cel	29
Odbiornik	29
System shim'ów.....	26
Szerokopasmowa	
cewka	31

T

TD.....	45
Temperatura próbki	32
Termopara	32
TopShim	44
Transformacja Fouriera	45
Tryplet	18

U

Układ magnesu	23
---------------------	----

V

VTU	32
-----------	----

W

WE	
Deklaracja zgodności	8
Widma protonowe	14
Wzmacniacze	25
Selektywne	25
Szerokopasmowe.....	25

Z

Zależność od temperatury	
Zależność od temperatury.....	51
Zanieczyszczenia	51
Zanieczyszczenia magnetyczne.....	51
Zbiór danych.....	36
Zgaszenie magnesu	7
Zintegrowana intensywność	10





Bruker Corporation

info@bruker.com
www.bruker.com

Order No: H171804PL