

AVANCE

- Podręcznik dla początkujących użytkowników
Podręcznik użytkownika
Version Polnisch 006

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.

Autor podręcznika

Bruker BioSpin END

© 10 marca 2014 Bruker Corporation

Nr kat.: Z31633PL

DWG: Z4D12322A

W celu uzyskania dodatkowej pomocy technicznej dotyczącej produktu prosimy o kontakt z najbliższym przedstawicielem firmy BRUKER lub bezpośrednio pod następującym adresem:

Bruker Corporation
am Silberstreifen
76287 Rheinstetten
Niemcy
Telefon: +49 721 5161 6155
FAX: +49 721 5171 01
nmr-support@bruker.de
Internet: www.bruker.com

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	12
3.2	Związki odniesienia, herce, ppm	13
3.3	Protonowa spektroskopia NMR – przesunięcie chemiczne	15
3.4	Widmo protonowe benzenu	16
3.5	Widmo protonowe octanu benzylu	17
3.6	Widmo protonowe etylobenzenu ze sprzężeniem spinowo-spinowym	19
3.7	Rozprężanie	21
3.8	Sygnał FID a widmo	22
4	Opis systemu	25
4.1	Przegląd budowy systemu AVANCE	26
4.1.1	Konsola operatora i podłączenia	26
4.2	Konsola	26
4.3	Łącze między komputerem hostem a modułem IPSO	27
4.4	Magnes, układ kompensacyjny (shimów), HPPR i sonda	27
4.5	Magnes oraz naczynie Dewara magnezu	29
4.5.1	Otwór o temperaturze pokojowej	30
4.5.2	Zbiornik z helem	31
4.5.3	Zbiornik z azotem	31
4.6	Wprowadzenie do układu blokującego	31
4.7	Sondy	32
4.8	Sonda szerokopasmowa	33
4.9	Wymiana sondy	35
5	Procedury podstawowe	37
5.1	Okno programu TOPSPIN	37
5.1.1	Tworzenie nowego zbioru danych	38
5.1.2	Przygotowywanie próbek	39
5.2	Wprowadzanie próbki z elementem obrotowym do magnezu	41
5.3	Lock próbki	41
5.4	Strojenie i dopasowanie sondy	42
5.4.1	Sondy wyposażone w ATM (procedura strojenia automatycznego)	43

5.4.2	Sondy wyposażone w ATM (procedura strojenia ręcznego)	43
5.5	Obracanie próbki	46
5.6	Kompensacja.....	46
5.6.1	Kompensacja rutynowa za pomocą procedury TopShim	46
5.7	Ustawianie parametrów zależnych od sondy i rozpuszczalnika	47
5.8	Regulacja wzmacnienia odbiornika	47
5.9	Uruchamianie rejestracji.....	47
5.10	Przetwarzanie danych	48
6	Przygotowanie do rejestracji, parametry związane z częstotliwością.....	49
6.1	Częstotliwość	49
6.2	Wyjaśnienie częstotliwości nadawanej, podstawowej i przesunięcia na wartościach liczbowych	49
7	Próbka do badania metodą spektrometrii NMR.....	53
7.1	Wybór rozpuszczalnika	53
7.2	Probówka na próbkę	54
7.3	Postępowanie z próbką	55
8	Widmo protonowe	57
8.1	Rejestracja widma protonowego	57
8.1.1	Optymalizacja szerokości przemiatania	59
8.2	Całkowanie.....	61
8.3	Wykreślanie widma protonowego.....	63
9	Widmo ¹³C z rozprężaniem protonów.....	65
9.1	Rejestracja widma ¹³ C	66
9.2	Wybieranie pików	67
9.3	Wykreślanie widma ¹³ C.....	70
10	Podstawowe informacje dotyczące rozwiązywania problemów	73
11	Kontakt	75
	Rysunki.....	77
	Tabele	79
	Słowniczek	81
	Indeks	83

1 Wstęp

Celem niniejszej instrukcji jest omówienie podstawowych elementów spektrometru Bruker, ich funkcji oraz odniesienia do nich w programie TopSpin służącym do rejestracji danych NMR. Dzięki temu użytkownik niemający odpowiedniego doświadczenia będzie mógł przeprowadzić serię podstawowych eksperymentów NMR w technice jednowymiarowej (1-D) i w wysokiej rozdzielczości (HR). Jako próbkę wybrano antranilan mentylu. Omówione zostaną metody rezonansu protonowego i węglowego z rozprzęganiem protonów. Aby ułatwić użytkownikowi pracę, wykorzystane zostaną standardowe zestawy parametrów znajdujące się w każdym pakiecie oprogramowania TopSpin. Dzięki takiemu podejściu zmniejszono do minimum czas pracy przy spektrometrze, co jest istotne szczególnie w przypadku kursów dla dużej liczby studentów. W związku z tym przeanalizowanie można wykonać bez trudności na oddzielnym komputerze korzystając z podręczników znajdujących się w dokumentacji spektrometru.

Zakłada się, że użytkownik rozpoczynający pracę z niniejszą instrukcją dysponuje:

- Podstawową wiedzą dotyczącą pakietu oprogramowania TopSpin.
- Sondą lub sondami służącymi do rejestracji rezonansu protonowego i węglowego z rozprzęganiem protonów.
- Podstawową wiedzą dotyczącą wykorzystywania zakładek i przycisków w oknie programu TopSpin.

W tekście instrukcji starano się omówić wszystkie czynności krok po kroku, jednak nowi użytkownicy na pewno będą mieli pewne wątpliwości, dlatego warto zwracać się o pomoc do użytkowników mających większe doświadczenie. Cel niniejszej instrukcji jest następujący: jeśli jest to wykonalne, umożliwić użytkownikowi samodzielną pracę i nabycie podstawowej wiedzy o użytkowaniu systemu. Mamy nadzieję, że dzięki niniejszej instrukcji czas potrzebny na przeszkolenie nowych użytkowników będzie znacznie krótszy.

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 zagrożeniach.

1.2 Wersja oprogramowania i składnia poleceń

Niniejsza instrukcja dotyczy wersji 3.2 programu TopSpin. W całej treści instrukcji podano, w jaki sposób należy wprowadzać poszczególne polecenia.

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 pobliżu 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 magnecie, 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 oparowanymi 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 elementy sprzętowe znajdujące się w spektrometrach AVANCE z konsolami SGU, a także urządzenia peryferyjne, na przykład przedwzmacniacze HPPR, systemy kompensacyjne i sonda, spełniają wymagania deklaracji zgodności CE. Obejmuje ona poziom rozproszonego promieniowania elektromagnetycznego, które może być emitowane, a także typowe zagrożenia elektryczne. Należy pamiętać, że aby do minimum zmniejszyć emisję promieniowania elektromagnetycznego, należy zamykać drzwiczki konsoli oraz pokrywę tylną.



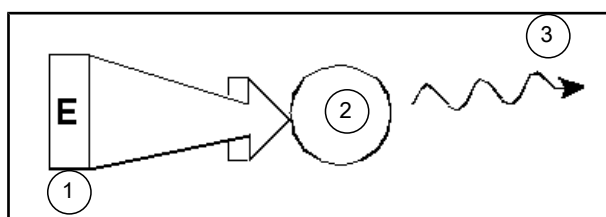
Uwaga: Dodatkowe informacje dotyczące bezpieczeństwa systemów AVANCE podano w podręczniku *AVANCE III Systems General Safety Considerations* (nr kat. Z31836) znajdującym się na płycie DVD z dokumentacją BASH.

3 Wstępne informacje teoretyczne i terminologia

NMR jest metodą wykorzystywaną do analizy struktury wielu cząsteczek związków chemicznych, w szczególności związków organicznych. Typowy związek może składać się z atomów węgla, wodoru i tlenu.

W najprostszej formie eksperyment NMR składa się z trzech etapów:

1. Umieszczenie próbki w statycznym polu magnetycznym.
2. Wzbudzenie jąder w próbce za pomocą impulsów o częstotliwości radiowej.
3. Pomiar częstotliwości sygnałów emitowanych przez próbkę.



Rysunek 3.1: Wzbudzenie i odpowiedź

1.	Impuls wzbudzający
2.	Atom
3.	Sygnał emitowany

Na podstawie częstotliwości wyemitowanej analityk może uzyskać informacje dotyczące wiązań chemicznych oraz rozmieszczenia atomów w próbce. Znajdujące się w próbce jądra aktywne w spektrometrii NMR rezonują z różną częstotliwością określaną jako „**częstotliwość rezonansowa**”. Są to częstotliwości emitowane przez jądra po ich wzbudzeniu przez wysłany impuls o częstotliwości radiowej. Wartość częstotliwości rezonansowej zależy od dwóch czynników:

1) Rodzaj jądra atomowego:

Każdy izotop charakteryzuje się określoną kombinacją protonów i neutronów znajdujących się w jego jądrze. Struktura jądra określa w znacznym stopniu wartość częstotliwości rezonansowej. Oznacza to, że każdy izotop ma pewną podstawową częstotliwość rezonansową. Jądra ^{13}C mają inną podstawową częstotliwość rezonansową od wartości dla jąder ^1H itd. Należy pamiętać o dużej zmienności podstawowej częstotliwości rezonansowej w przypadku poszczególnych izotopów wymienionych w poniższej tabeli.

Jądro	Aktywność w metodzie NMR	Podstawowa częstotliwość rezonansowa (przybliżona) [MHz]	Zawartość naturalna [%]
^1H	Tak	500	99.98
^2H	Tak	77	0.015
^3H	Tak	533	ślady

Jądro	Aktywność w metodzie NMR	Podstawowa częstotliwość rezonansowa (przybliżona) [MHz]	Zawartość naturalna [%]
^{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 dla różnych izotopów (częstotliwości dotyczą magnesu o indukcji 11,7 T)

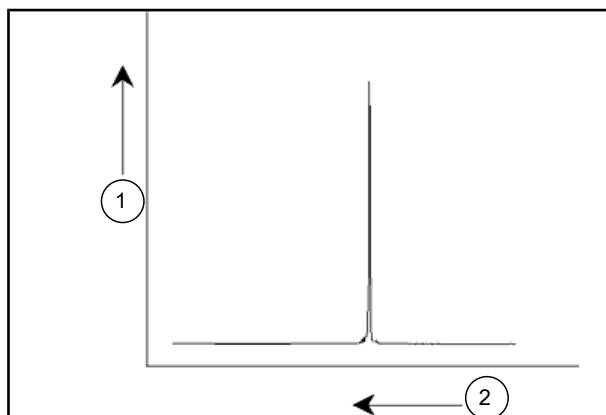
2) Lokalne otoczenie atomowe:

Na podstawową częstotliwość rezonansową nakłada się efekt wynikający z lokalnego otoczenia atomowego, w którym znajduje się izotop. Dokładna wartość częstotliwości rezonansowej jądra ^1H w konkretnym związku chemicznym zależy od atomów, z którym jest ono połączone wiązaniami i które je otaczają. Jądro jest otoczone przez elektrony, które można traktować jako poruszające się ładunki elektryczne z towarzyszącymi im polami magnetycznymi. Elektrony te oddziałują stanowiąc źródło przesłaniania magnetycznego jądra. Wielkość przesłaniania zależy od konkretnego lokalnego otoczenia atomowego. Wielkość typowych zmian pola skutkująca w zmianie częstotliwości, zależna jest od izotopu, a także od natężenia pola magnetycznego, w którym umieszczona jest próbka. W tabeli poniżej przedstawiono typową zmienność częstotliwości dwóch jąder wykorzystywanych najczęściej w NMR, czyli ^1H i ^{13}C . Jest niewątpliwe, że lokalne otoczenie atomowe będzie miało stosunkowo niewielki wpływ na podstawową częstotliwość rezonansową.

Jądro	Typowa zmienność podstawowej częstotliwości rezonansowej wskutek lokalnego otoczenia atomowego
^1H	6 kHz
^{13}C	30 kHz

Tabela 3.2: Zmiany częstotliwości (dotyczą magnesu o indukcji 11,7 T)

Sygnaly NMR wykreśla się zazwyczaj w postaci widm i analizuje w odniesieniu do dwóch właściwości: **częstotliwości** i **natężenia**. Według konwencji stosowanej w przypadku rezonansu NMR częstotliwość wykreśla się na osi poziomej, przy czym wzrasta ona w lewo.



Rysunek 3.2: Widmo NMR

1.	Natężenie
2.	Częstotliwość

Jak zaznaczono powyżej, częstotliwość niesie informacje jakościowe dotyczące lokalnego otoczenia atomowego. Natężenie **scalkowane sygnału** jest miarą **natężenia sygnału**; wyznacza się je za pomocą całkowania pola powierzchni pod pikiem sygnału. Całka ta jest wprost proporcjonalna do liczby jąder, które składają się na dany sygnał przy konkretnej częstotliwości (jeśli wszystkie jądra ulegają wzbudzeniu w takim samym stopniu), dlatego daje informacje jakościowe dotyczące struktury związku chemicznego.

Aby nastąpiło wzbudzenie danego jądra w eksperymencie NMR, częstotliwość impulsu wzbudzającego powinna ściśle odpowiadać częstotliwości rezonansowej jądra. Częstotliwość ta nosi nazwę **częstotliwości nośnej**. Oznacza to, że jeśli eksperymenty prowadzi się za pomocą magnesu o indukcji 11,7 T, jądra ^1H wymagają częstotliwości nośnej wynoszącej w przybliżeniu 500 MHz, zaś jądra ^{13}C wymagają częstotliwości nośnej bliskiej 126 MHz. Częstotliwość nośna jest określana przez parametr SFO1. Jądro ulegające wzbudzeniu przez taką częstotliwość nośną nosi nazwę **jądra rejestrowanego**.

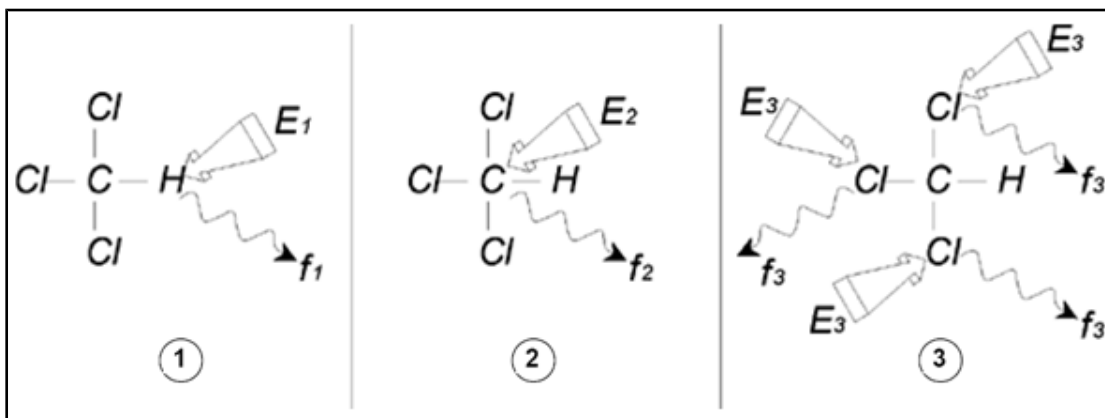
Należy pamiętać, że występują eksperymenty, w których wzbudzeniu ulega więcej niż jedno jądro, np. podczas przeniesienia polaryzacji lub rozprzęgania. W tych przypadkach istnieje więcej niż jedna częstotliwość nośna, jednak nadal tylko jedna częstotliwość rejestracji.

Nie wszystkie **izotopy** reagują na impulsy o częstotliwości radiowej, tzn. nie wszystkie są **aktywne w NMR**. W przyrodzie występują trzy izotopy wodoru: ^1H (wodór), ^2H (deuter) i ^3H (tryt, promieniotwórczy!). Naturalna zawartość tych izotopów wynosi odpowiednio 99,98%, 0,015% i 0,005%. Wszystkie trzy jądra są aktywne w NMR, jednak, jak widać na podstawie tabeli 3.1, wszystkie charakteryzują się znaczną zmiennością częstotliwości rezonansowej. Aby przeprowadzić analizę próbki w odniesieniu do wodoru, wzbudzeniu ulega izotop ^1H , ponieważ izotop ten występuje w największej ilości. Spośród izotopów węgla występujących w przyrodzie tylko jeden jest aktywny w NMR. Okazuje się, że izotop występujący w największej ilości, ^{12}C (98,89% zawartości w przyrodzie) jest nieaktywny. W związku z tym w analizie związków organicznych metodą NMR wykorzystuje się sygnały emitowane przez izotop ^{13}C , którego zawartość naturalna wynosi zaledwie 1,11%. Analiza NMR w przypadku węgla jest rzecz jasna trudniejsza niż, na przykład, ^1H (występują inne czynniki wpływające na czułość, które zostaną omówione w kolejnych punktach tego rozdziału).

Na podstawie tego krótkiego wprowadzenia do metody NMR warto zrobić ćwiczenie i zastanowić się, w jaki sposób można ją wykorzystać do analizy składowych chloroformu (CHCl_3).

3.1 Analiza NMR chloroformu

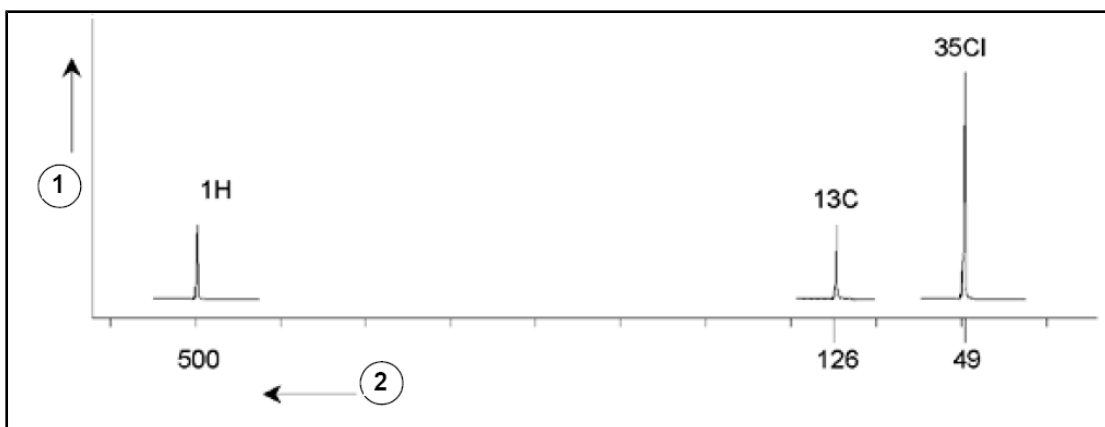
Jak pokazano na rysunku poniżej, można przeprowadzić trzy odrębne eksperymenty odpowiadające trzem możliwym jądrom rejestrowanym: ^1H , ^{13}C i ^{35}Cl .



Rysunek 3.3: Analiza NMR CHCl_3

1.	Wzbudzenie E_1
2.	Wzbudzenie E_2
3.	Wzbudzenie E_3

W stronę próbki kierowane są trzy impulsy wzbudzające (E_1 , E_2 , E_3) mające odpowiednią częstotliwość nośną. E_1 , odpowiada częstotliwości rezonansowej ^1H , E_2 częstotliwości ^{13}C , zaś E_3 częstotliwości ^{35}Cl . Zakładając, że nastąpiło wzbudzenie trzech izotopów, próbka wyemituje sygnały o trzech częstotliwościach f_1 , f_2 i f_3 , które zostają zarejestrowane na trzech odrębnych widmach. Jeśli wyemitowane sygnały zostaną pokazane na pojedynczym wykresie, użytkownik może oczekiwać widma podobnego do przedstawionego na rysunku poniżej (należy pamiętać, że podane częstotliwości sygnałów dotyczą magnesu o indukcji 11,7 T oraz że wszystkie sygnały wykreślono jako , czyli piki pojedyncze).



Rysunek 3.4: Sygnały MRJ emitowane przez CHCl_3

1.	Natężenie
2.	Częstotliwość (MHz)

To sztuczne widmo przedstawia trzy piki odpowiadające trzem izotopom. Jeśli uwzględnimy względną liczbę trzech izotopów, można spodziewać się, że natężenie pików chloru, wodoru i węgla będzie pozostawać w stosunku 3:1:1. Należy jednak także uwzględnić naturalną zawartość trzech izotopów, przez co stosunek wynosi 227:100:1. Użytkownik może sprawdzić, że wyznaczone eksperymentalnie stosunki natężenia pików nie zgadzają

się z tymi wartościami. Przyczyna tego stanu jest następująca: każdy izotop charakteryzuje się naturalną czułością w metodzie NMR. Czułość ^1H jest 63 razy większa w metodzie NMR niż w przypadku ^{13}C . Oznacza to, że nawet jeśli próbka zawiera dokładnie tę samą liczbę jąder ^1H co ^{13}C , natężenie sygnałów ^1H jest 63 razy większe niż sygnałów ^{13}C .

W przypadku wykresu przedstawionego na rysunku powyżej wszelkie informacje szczegółowe zostają utracone i dokładne określenie konkretnej częstotliwości jest niemożliwe. Mówi się wtedy, że widmo ma niską rozdzielczość (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 naturalnej zawartości często powoduje, że wykreślanie sygnałów różnych izotopów na jednym widmie jest niewykonalne. W takim wypadku rozdzielczość pionowa widma byłaby bardzo niska (rozdzielczość pionowa, czyli stosunek sygnału do szumu widma jest miarą czułości).

Okazuje się, że analiza chloroformu jest dość skomplikowana, jednak wynika to z tego, że próbujemy porównać sygnały trzech odmiennych jąder rejestrowanych na pojedynczym widmie (ponadto pomijane są wszelkie ograniczenia dotyczące elementów sprzętowych i elektroniki). W związku z tym w praktyce eksperymenty NMR przeprowadza się w taki sposób, że tylko jedno jądro jest rejestrowane. Jakkolwiek może nastąpić jednoczesne wzbudzenie więcej niż jednego izotopu dzięki zastosowaniu więcej niż jednej częstotliwości (np. eksperymenty z rozprzęganiem), rejestruje się zawsze sygnały jednego izotopu. Dzięki temu znacznie upraszcza się analizę widma.

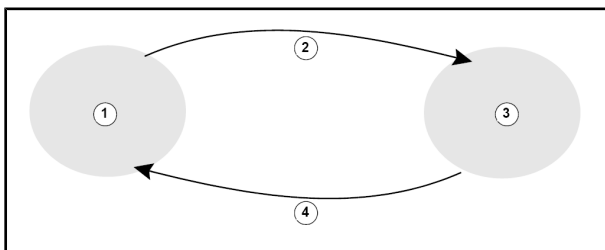
Już wcześniej wspomniano o tym, że zmiany podstawowej częstotliwości rezonansowej wskutek lokalnego otoczenia atomowego są zazwyczaj stosunkowo małe. Oznacza to, że nie występują znaczne zakresy widmowe. Ponadto naturalna zawartość oraz naturalna czułość dla danego izotopu zawsze pozostają identyczne. W związku z tym względne natężenie na przykład dwóch sygnałów emitowanych przez izotopy ^1H w danym widmie zależy jedynie od liczby atomów składających się na sygnał. W ten sposób znacznie upraszcza się analiza widm i uzyskiwanie informacji ilościowych. Zanim przejdziemy do bardziej szczegółowego omówienia metody NMR, czytelnik powinien zapoznać się z koncepcją pomiaru sygnałów w *ppm* (częściach na milion) względem sygnału odniesienia.

3.2 Związki odniesienia, herce, ppm

Wspomniano już wcześniej o tym, że sygnały NMR analizuje się w odniesieniu do dwóch właściwości: natężenia i częstotliwości. Częstotliwość bezwzględną mierzy się w hercach (Hz – cykle na sekundę) lub w megahercach (MHz). Podawanie sygnałów zarejestrowanych jest uproszczone, jeśli wszystkie pomiary częstotliwości wykonuje się 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 , zawartość TMS powoduje powstanie pojedynczego pików, który łatwo jest zidentyfikować. Pikowi temu przypisuje się wartość zero, co oznacza, że częstotliwości wszystkich pozostałych pików podaje się jako częstotliwość względną w odniesieniu do częstotliwości TMS. W ten sposób można 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.

Dzięki odniesieniu sygnałów do pików TMS znacznie zmniejsza się liczba cyfr niezbędnych do opisu częstotliwości sygnału. Jednak nawet ten zapis można jeszcze bardziej uprościć, jeśli zamiast herców stosuje się jednostki ppm. Jednostka ppm odpowiada częstotliwości wyrażonej w postaci ułamka bezwzględnej częstotliwości rezonansowej zależnej od natężenia pola magnesu. Zaletą tej jednostki jest to, że pomiary częstotliwości są niezależne od natężenia pola magnesu. W ten sposób znacznie upraszcza się porównywanie widm zarejestrowanych przy użyciu różnych spektrometrów.

Współczynniki przeliczeniowe wykorzystywane przy przeliczaniu wartości w hercach na ppm i odwrotnie podano na schemacie poniżej.



Rysunek 3.5: Przeliczanie wartości w hercach i ppm

1.	Herce
2.	Podzielić przez częstotliwość nośną (SFO1) w MHz.
3.	ppm
4.	Pomnożyć przez częstotliwość nośną (SF=1) w MHz.

Korzyści wynikające z zastosowania jednostki ppm najlepiej jest pokazać na przykładzie praktycznym.

Korzyści wynikające z zastosowania jednostki ppm najlepiej jest pokazać na przykładzie praktycznym. Załóżmy, że przy 2,5 kHz powyżej sygnału TMS korzystając z częstotliwości nośnej (SFO1) wynoszącej 500 MHz zarejestrowano sygnał ^1H . Częstotliwość każdego emitowanego sygnału NMR jest wprost proporcjonalna do natężenia pola magnesu. Ten sam sygnał pojawiłby się przy wartości 3,0 kHz powyżej sygnału TMS w przypadku spektrometru 600 MHz oraz przy 2,0 kHz powyżej sygnału TMS w przypadku spektrometru 400 MHz. Jedna operacja przeliczania pozornie nie stanowi większej niedogodności, jednak należy ją wykonać dla każdego pików w każdym systemie. Teraz zajmiemy się tym samym sygnałem wyrażonym w jednostkach ppm.

Częstotliwość w hercach dzieli się przez SFO1 = częstotliwość w ppm.

Przykłady:

$$\begin{aligned} 2500 \text{ Hz} / 500 \text{ MHz} &= 5 \text{ ppm} \\ 3000 \text{ Hz} / 600 \text{ MHz} &= 5 \text{ ppm} \\ 2000 \text{ Hz} / 400 \text{ MHz} &= 5 \text{ ppm} \end{aligned}$$

Można teraz powiedzieć, że sygnał ^1H znajduje się 5 ppm powyżej, czyli w kierunku niższego natężenia pola, od pików TMS niezależnie od częstotliwości spektrometru.

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

Użytkownik powinien mieć świadomość, że w powyższym przykładzie zastosowano pewne uproszczenia. 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 SFO1. Podobnie w przypadku spektrometrów 600 MHz i 400 MHz, o których mowa powyżej, częstotliwość nośna ^1H nie wynosi dokładnie odpowiednio 600 MHz i 400 MHz.

Należy ponadto pamiętać, że dodatnia wartość w ppm oznacza częstotliwość większą od TMS, czyli w kierunku niższego natężenia pola względem TMS.

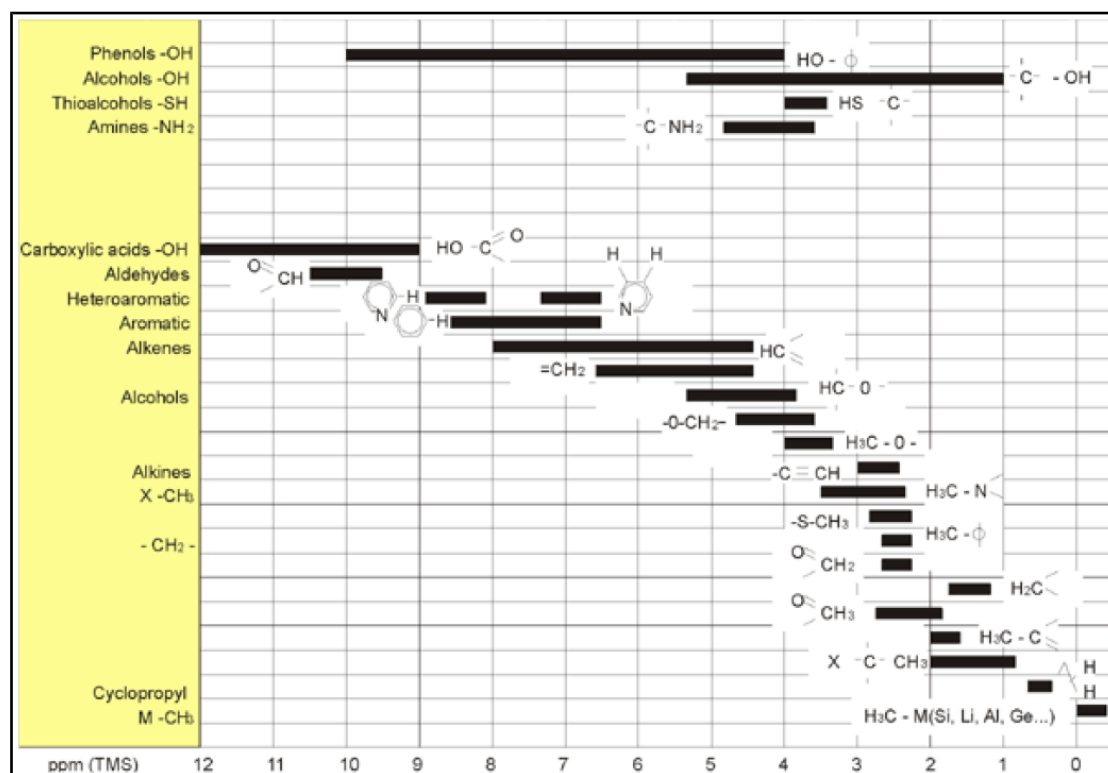
3.3 Protonowa spektroskopia NMR – przesunięcie chemiczne

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

Jak wspomniano wcześniej, proton w magnecie o indukcji 11,7 T charakteryzuje się podstawową częstotliwością rezonansową w przybliżeniu 500 MHz, jednak dokładna wartość częstotliwości rezonansowej zależy od lokalnego otoczenia atomowego. Proton w cząsteczce chloroformu rezonuje z częstotliwością trochę inną od częstotliwości protonu w benzenie (C_6H_6). W związku z tym częstotliwość emitowana jest rodzajem znacznika, który daje analitykowi informacje jakościowe dotyczące lokalnego otoczenia atomowego, w którym znajduje się proton. Zjawisko to jest podstawą spektroskopii NMR.

Zmiana dokładnej wartości częstotliwości rezonansowej nosi nazwę [przesunięcia chemicznego](#). Częstotliwość rezonansowa zostaje przesunięta wskutek oddziaływania sąsiednich atomów oraz od wielkości przesłaniania przez elektrony znajdujące się w pobliżu, co omówiono wcześniej. Wielkość przesunięcia mierzy się zazwyczaj w jednostkach ppm względem piku TMS, dla którego przyjmuje się wartość 0 ppm.

Niezależnie od tego, w jakim związku organicznym się znajdują, większość protonów charakteryzuje się przesunięciem chemicznym w zakresie 14 ppm od TMS.

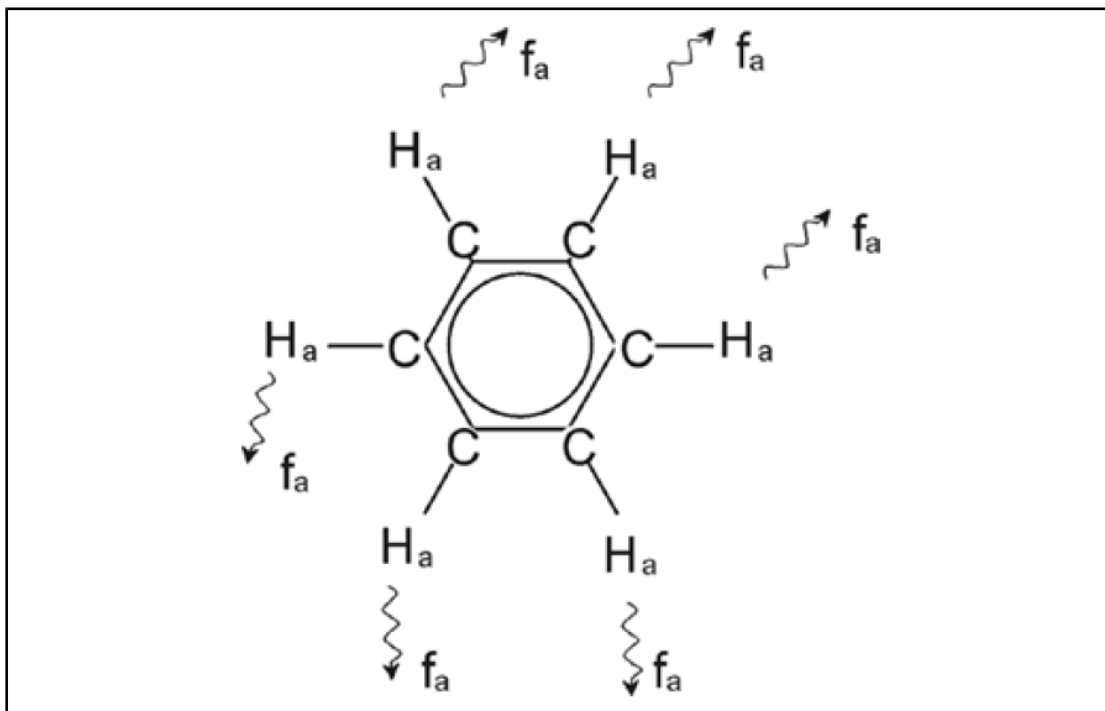


Rysunek 3.6: Przesunięcia chemiczne ^1H w związkach organicznych

Powyższy rysunek pokazuje typowe przesunięcia chemiczne protonów w związkach organicznych.

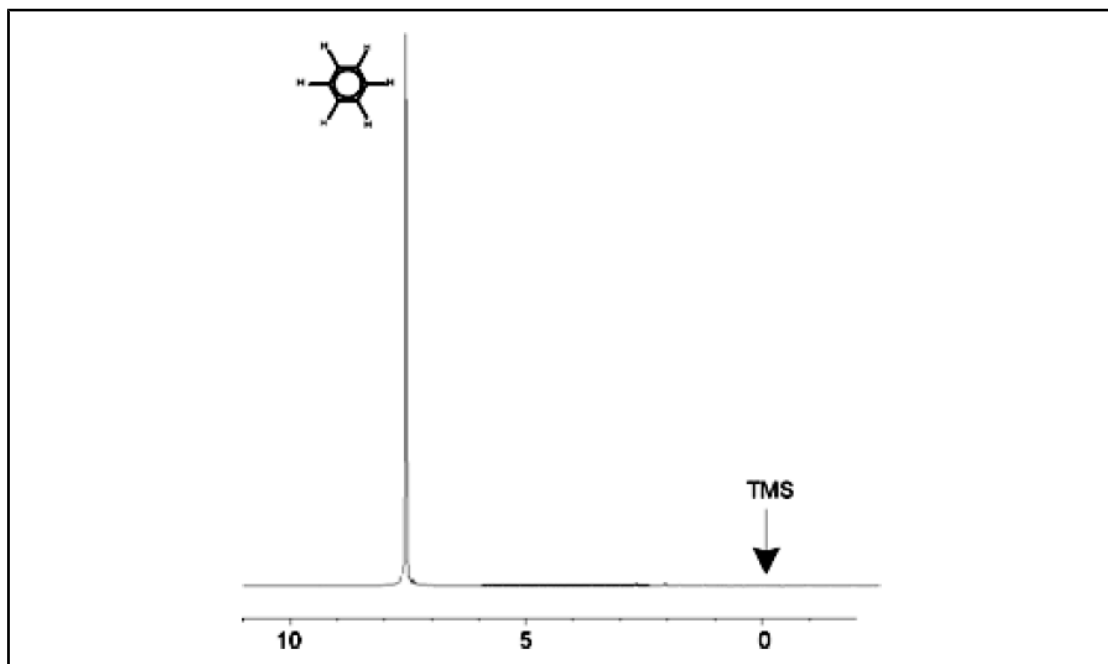
3.4 Widmo protonowe benzenu

Strukturę pierścienia benzenowego przedstawiono na poniższym rysunku:



Rysunek 3.7: Pierścień benzenowy

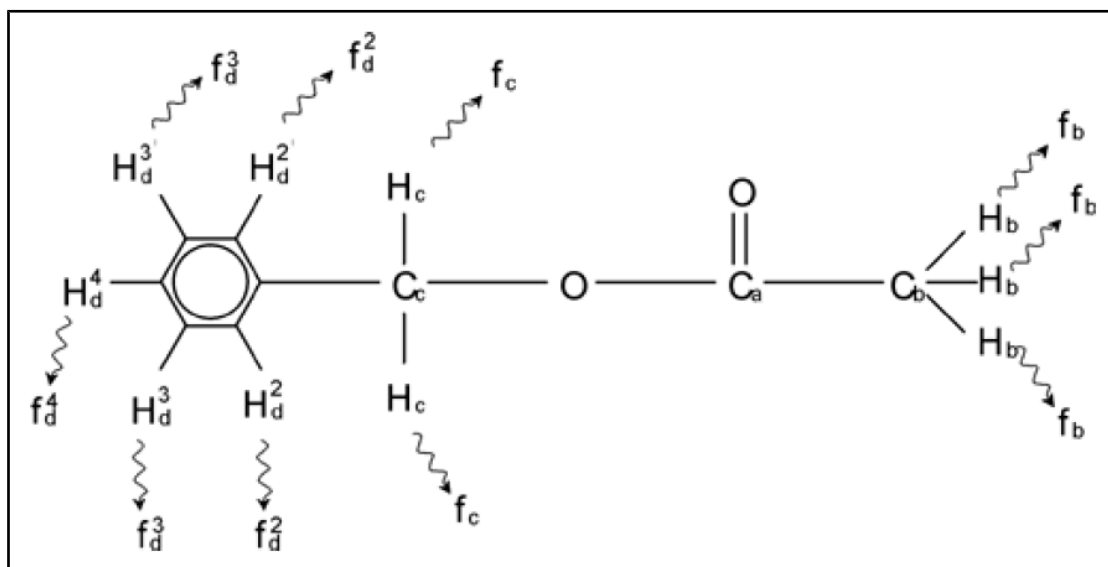
Wszystkie sześć protonów (oznaczonych jako H_a) można uznać za identyczne. Są one połączone wiązaniami pojedynczymi z poszczególnymi atomami węgla. Z kolei każdy atom węgla tworzy dwa wiązania aromatyczne z sąsiadującymi z nim atomami węgla. Ponieważ każdy z sześciu protonów znajduje się w identycznym otoczeniu chemicznym, mówi się, że jest „chemicznie równoważny”, w tym zaś przypadku nawet „magnetycznie równoważny”. Wszystkie atomy będą rezonować przy dokładnie tej samej częstotliwości f_1 , przy czym ich sprzężenie nie wystąpi. W związku z tym w przypadku czystego benzenu można oczekiwać sygnału pojedynczego. Na rysunku poniżej przedstawiono 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

Octan benzylu ($C_6H_5 - CH_2 - O - CO - CH_3$) jest bardziej złożoną cząsteczką organiczną, której budowę przedstawiono na poniższym rysunku:



Rysunek 3.9: Octan benzylu

Można w tym przypadku wyróżnić 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 .

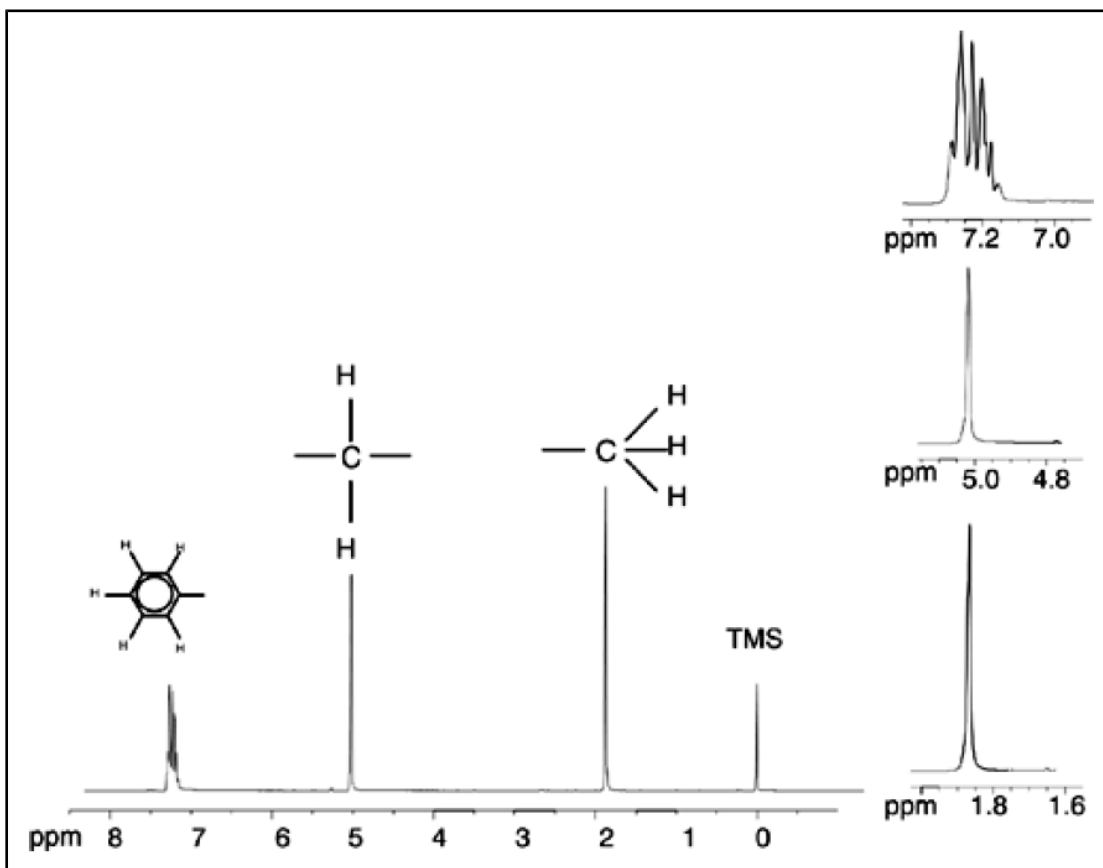
Trzy protony H_b są połączone z atomem węgla C_b , który z kolei jest połączony wiązaniem pojedynczym z innym atomem węgla C_a . Dwa protony H_c są połączone z atomem węgla C_c , który z kolei jest połączony wiązaniem pojedynczym z pierścieniem benzenowym oraz z atomem tlenu. Trzecia grupa protonów składa się z pięciu protonów H_d samego pierścienia

benzenowego. Na rysunku powyżej przedstawiono widmo protonowe octanu benzylu w acetonie - d₆. W tym widmie należy oczekiwać występowania 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 w pierścieniu benzenowym nie są już magnetycznie równoważne, a nawet do pewnego stopnia równoważne chemicznie, dlatego odpowiednio je oznaczono. Na podstawie rysunku 3.10 widać wyraźnie, że sygnał emitowany przez protony H_a jest multipletem; kwestią tą zajmiemy się dokładniej w kolejnym punkcie. Trzy piki protonów przedstawione na widmie wyraźnie różnią się natężeniem.

Analiza ilościowa widma jest stosunkowo prosta, ponieważ wszystkie sygnały są emitowane przez ten sam izotop ¹H, tzn. naturalna zawartość oraz naturalna czułość w metodzie NMR są identyczne dla każdego pikę. W związku z tym pole powierzchni pod pikami benzenu, CH₂ i CH₃ powinno pozostawać w stosunku odpowiednio 5:2:3 zgodnie z liczbą protonów dających sygnały.



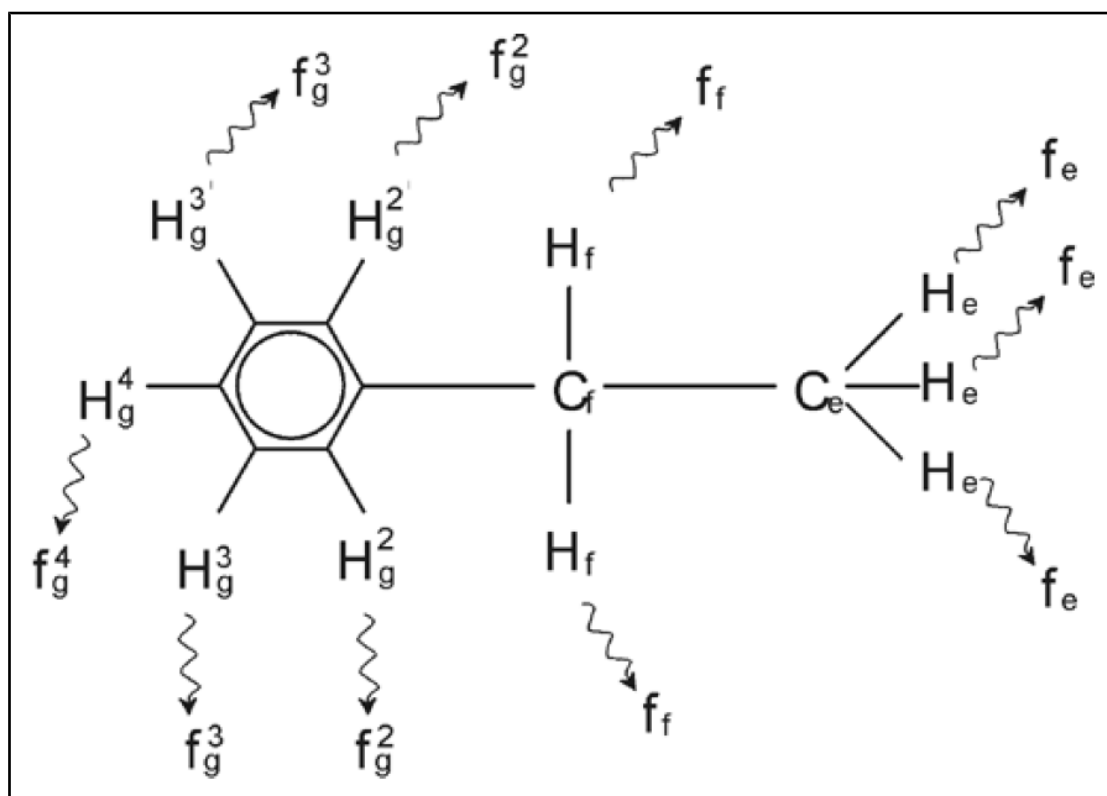
Rysunek 3.10: Widmo protonowe octanu benzylu

3.6 Widmo protonowe etylobenzenu ze sprzężeniem spinowo-spinowym

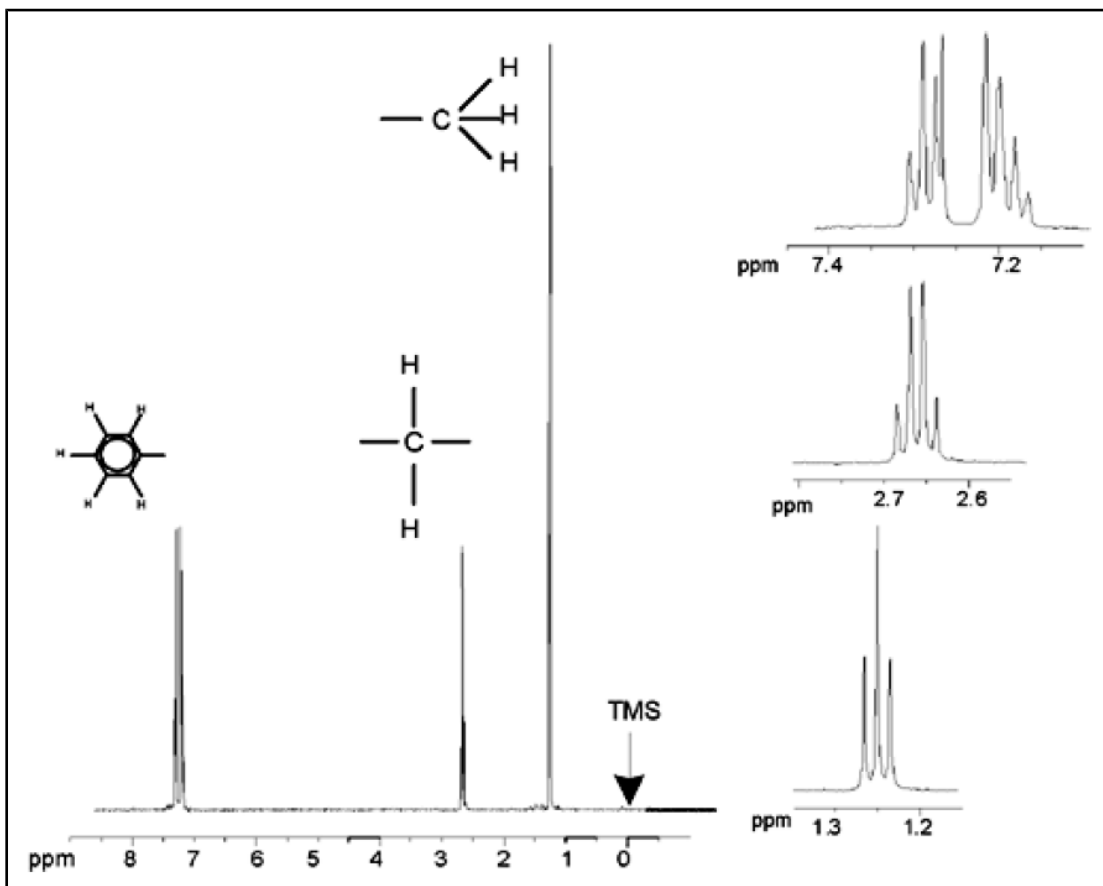
Opis widm protonowych NMR był do tej pory znacznie uproszczony dzięki temu, że wszystkie sygnały, z wyjątkiem pochodzących od pierścienia benzenowego w octanie benzylu, były singletami. Strukturę związku organicznego etylobenzenu oraz odpowiadające mu widmo protonowe podano odpowiednio na rysunkach przedstawiających etylobenzen i widmo etylobenzenu. Podobnie jak wcześniej protony oznaczono jako trzy odrębne grupy odpowiadające trzem podstawowym otoczeniom atomowym.

Najbardziej oczywistą różnicą między sygnałami występującymi w tym widmie i w widmie octanu benzylu jest rozszczepienie na **multipty**. Sygnał emitowany przez protony grupy CH₃ jest **tripletem**, zaś sygnał protonów grupy CH₂ stanowi **kwartet**. Należy ponadto zauważyć, że położenia sygnałów nie nakładają się. Protony grupy CH₃ w octanie benzylu emitują sygnał przy 1,85 ppm, zaś odpowiednie protony grupy CH₃ w etylobenzenu emitują sygnał tripletowy przy 1,25 ppm. Jest to zgodne z oczekiwaniami, ponieważ dwie grupy CH₃ znajdują się w różnych otoczeniach chemicznych.

Przyczyna rozszczepienia multiptetu wynika ze zjawiska noszącego nazwę sprzężenia spinowo-spinowego. Pełen opis tego zjawiska wykracza poza zakres niniejszej instrukcji; użytkownik może zapoznać się z nim w standardowych podręcznikach NMR. Na potrzeby niniejszej instrukcji wystarcza 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 także nie wpływają wzajemnie na siebie. Jednak dwa protony H_f i trzy protony H_e pozostają w odmiennych otoczeniach lokalnych, dlatego poprzez elektrony wiążące są ze sobą sprzężone. Wynik wypadkowy tego sprzężenia jest następujący: dwie grupy protonów oddziałują ze sobą i powodują rozszczepienie sygnałów NMR.

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

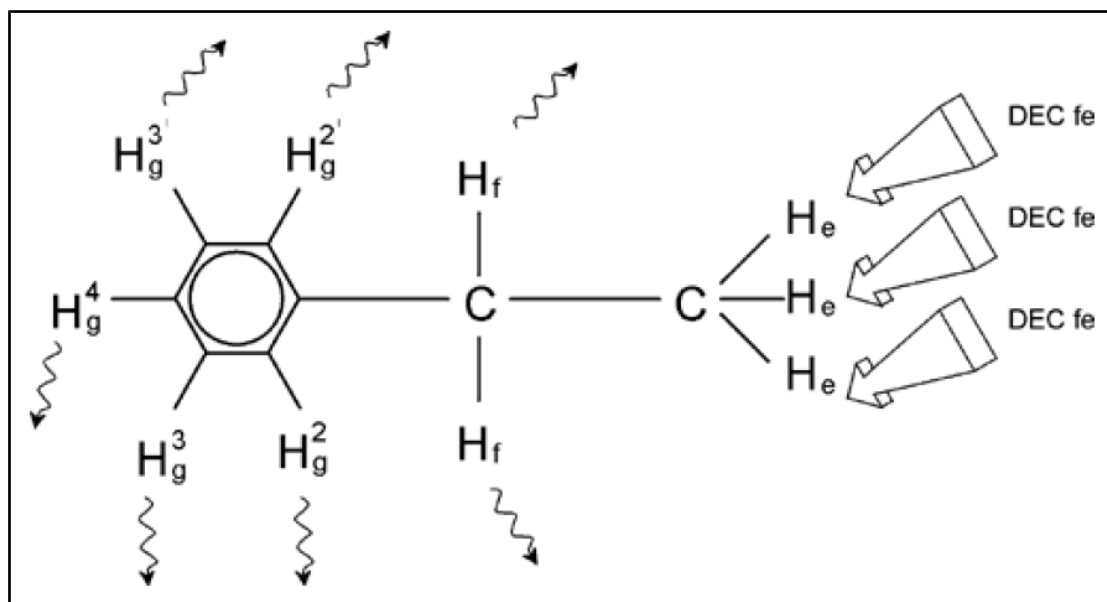
Podobnie działanie protonów H_e powoduje rozszczepienie sygnałów H_f . Trzy protony H_e mogą w sumie występować w czterech możliwych stanach magnetycznych. W związku z tym protony H_f rezonują przy czterech możliwych częstotliwościach, dlatego sygnał zostaje rozszczepiony na kwartet.

Sygnały protonów w benzenie także ulegają rozszczepieniu w wyniku braku równoważności magnetycznej i wynikającego z niego sprzężenia spinowo-spinowego. Powstaje pytanie, dlaczego protony CH_2 i CH_3 w etylobenzenu oddziałują ze sobą, zaś dwie porównywalne grupy protonów w octanie benzylu nie oddziałują. Wynika to z liczby wiązań oddzielających obie grupy. W przypadku etylobenzenu obie grupy protonów są przyłączone do sąsiednich atomów węgla i można oczekiwać ich wystarczającego oddziaływania ze sobą. Z kolei w przypadku octanu benzylu oba atomy węgla C_c i C_o są połączone poprzez dwa dodatkowe wiązania między atomem tlenu a kolejnym atomem węgla. W wyniku tego grupy protonów znajdują się w zbyt dużej odległości od siebie, aby wystąpiło większe sprzężenie spinowo-spinowe.

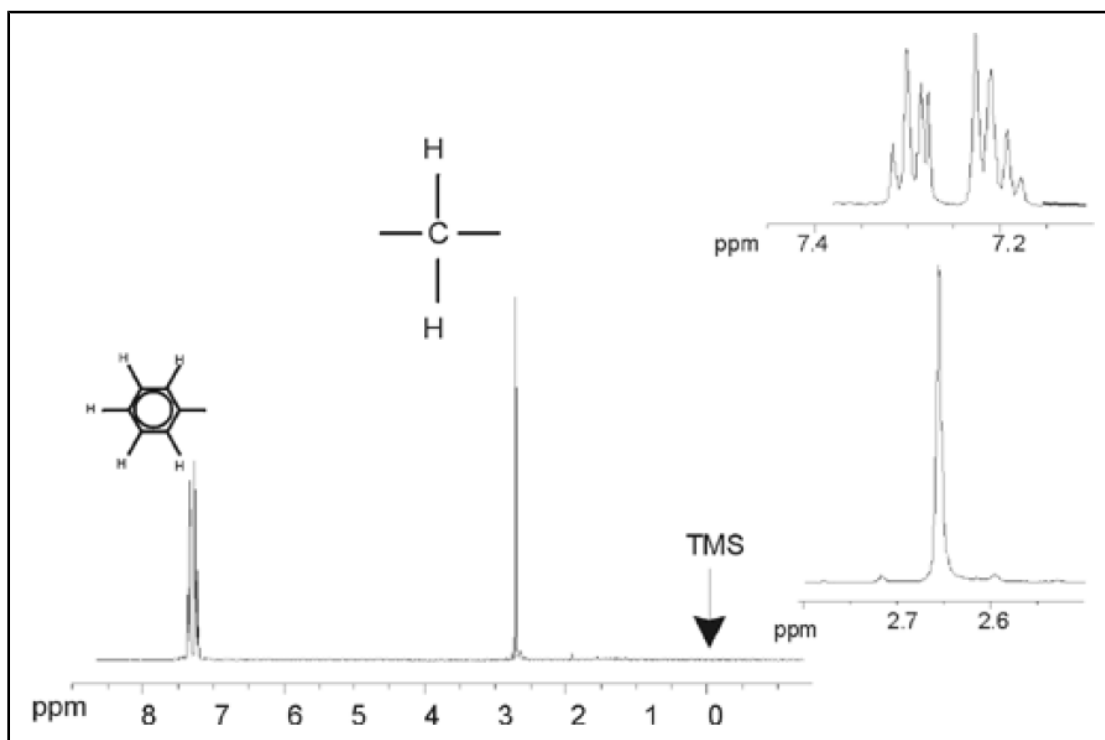
3.7 Rozprężanie

Sprężenia spinowo-spinowe można zniwelować wykorzystując metodę określaną jako rozprężanie. Rozprężanie polega na maskowaniu występowania określonej grupy protonów, np. protonów H_e na rysunku przedstawiającym etylobenzen. Rejestrowane jest widmo, które wygląda, jakby protony H_e nie występowały. Efekt ten uzyskuje się przez wysłanie sekwencji impulsów rozprężających o częstotliwości rezonansowej H_e (f_e), dzięki czemu w sposób trwały zmienia się orientację spinów tych protonów. W przypadku widma przedstawionego na rysunku z widmem etylobenzenu częstotliwość rozprężania wynosi 1,25 ppm powyżej pików TMS.

Impulsy przy rozprężaniu są zazwyczaj dłuższe i słabsze niż impulsy wzbudzające. Na rysunku 3.13 pokazano eksperyment z rozprężaniem, zaś na rysunku 3.14 (widmo etylobenzenu z rozprężaniem homojądrowym) przedstawiono widmo po rozprężaniu. Okazuje się, że kwartet CH_2 stał się **singletem**. Specjaliści od spektroskopii mówią wtedy o redukcji kwartetu do singletu. Ponadto pole powierzchni pod singletem powinno być równe polu pierwotnego kwartetu (warto porównać wysokości względne pików CH_2 i pierścienia benzenowego na obu rysunkach). Sygnał grupy CH_3 przy 1,25 ppm nie występuje w widmie rozprężonym, ponieważ impulsy rozprężające skutecznie znoszą wpływ występowania protonów CH_3 .



Rysunek 3.13: Eksperyment z rozprężaniem



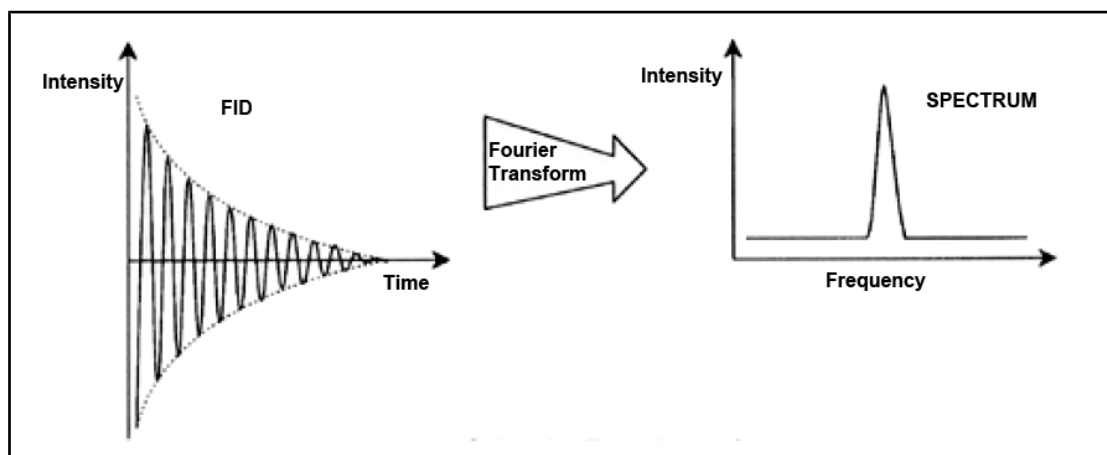
Rysunek 3.14: Widmo etylobenzenu z rozprężaniem homojądrowym

Eksperyment pokazany powyżej stanowi przykład rozprężania homojądrowego, ponieważ rejestruje się i rozpręga ten sam izotop – ¹H. Rozprężanie heterojądrowe następuje, kiedy izotop rejestrowany jest różny od izotopu ulegającego rozprężaniu. W punkcie [Widmo ¹³C z rozprężaniem protonów \[65\]](#) na stronie 61 niniejszej instrukcji zostanie przeprowadzony eksperyment z rozprężaniem heterojądrowym, w którym rejestruje się ¹³C, zaś rozprężanie obejmuje ¹H. Spektrometry AVANCE z modułem SGU umożliwiają przeprowadzanie bardzo złożonych eksperymentów w zależności od liczby zainstalowanych kanałów. Można zastosować spektrometr czterokanałowy dający możliwość rejestracji jednego jądra i rozprężania trzech innych. Dzięki temu, że maksymalna liczba niezależnych kanałów wynosi osiem, możliwy zakres eksperymentów jest niezwykle szeroki. Użytkownik powinien pamiętać, że obecnie czynnikiem stanowiącym ograniczenie nie jest generowanie impulsów wzbudzających o częstotliwości radiowej i rozprężających, ale przekazywanie tych impulsów do próbki przez sondy oraz w pewnym stopniu przez przedwzmacniacze. Drogę sygnału w ramach przeprowadzanego eksperymentu określa się w menu „edasp”. Więcej informacji szczegółowych podano w podręczniku „Acquisition Commands and Parameters” (nr kat. 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 podzespołów:

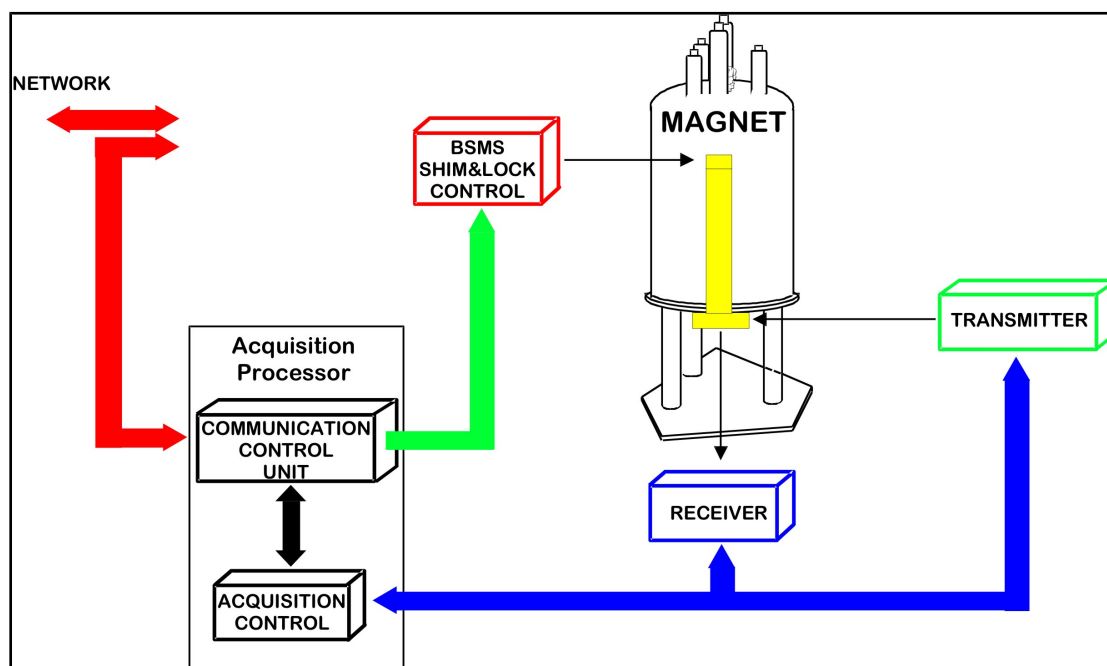
- **Konsola operatora** zawierająca komputer host, monitor i klawiaturę.
- **Konsola** zawierająca podzespoły elektroniczne.
- **Układ magnesu** zawierający układ kompensacyjny (shimów) i sondę.



Rysunek 4.1: Magnes, konsola operatora i konsola

4.1 Przegląd budowy systemu AVANCE

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



Rysunek 4.2: Przegląd architektury systemu AVANCE

4.1.1 Konsola operatora i podłączenia

Wszystkie aspekty funkcjonowania spektrometru są kontrolowane z konsoli operatora. Opracowywaniem i wykonywaniem eksperymentów, a także analizą danych steruje się za pomocą poleceń wprowadzanych przez operatora na konsoli. Poszczególne podzespoły konsoli operatora są następujące:

Komputer host: jest to komputer osobisty. Komputer host uruchamia program Topspin oraz zajmuje się całą analizą danych i ich przechowywaniem. Wszystkie operacje w ramach rejestracji danych są kontrolowane przez drugi układ obliczeniowy noszący nazwę [IPSO](#) (Intelligent Pulse Sequence Organizer), który znajduje się w samej konsoli.

Połączenie Ethernet między komputerem hostem a IPSO: Jest ono wykorzystywane do przekazywania danych i instrukcji między komputerem hostem a modułem IPSO.

4.2 Konsola

Moduł ten może występować w różnych konfiguracjach, takich jak NanoBay, OneBay lub TwoBay w zależności od systemu. Znajduje się w nim większość elementów elektronicznych wbudowanych w nowoczesny spektrometr cyfrowy. Główne moduły są następujące: [IPSO](#) (Intelligent Pulse Sequence Organizer), [BSMS](#) (Bruker Smart Magnet System), [VTU](#) (moduł sterowania temperaturą VTU), a także różne wzmacniacze.

IPSO: Poszczególne podzespoły znajdujące się w IPSO wytwarzają impulsy o częstotliwości radiowej wykorzystywane do wzbudzenia próbki, a także do rejestrowania, wzmacniania i digitalizacji sygnałów NMR emitowanych przez próbkę. Po zarejestrowaniu i digitalizacji danych odpowiednie informacje są przekazywane do komputera hosta w celu ich dalszego przetworzenia i zapisania. Głównym połączeniem z komputerem hostem jest

łącze Ethernet. Należy podkreślić, że moduł IPSO kontroluje w sposób całkowity pracę spektrometru przez cały czas trwania eksperymentu. Ma to na celu zapewnienie bezproblemowej pracy, a więc gwarantuje integralność rejestracji. We sekcji AQS zawierającej IPSO znajduje się zestaw płyt cyfrowych i analogowych, których zadaniem jest przygotowanie sygnału nadawczego, a także do rejestracji, wzmacniania i digitalizacji sygnału NMR. Opis szczegółowy tych płyt wykracza poza zakres niniejszej instrukcji.

BSMS: Ten układ jest kontrolowany przez oprogramowanie (polecenie `bsmsdisp`). Jest wykorzystywany do sterowania układem locku i kompensacyjnym (shimów), a także kontroluje podnoszenie i obracanie próbki.

Moduł VTU: W zależności od modelu moduł VTU może być podzespołem odrębnym i niezależnym lub może być wbudowany w BSMS. Jego zadaniem jest zmiana temperatury próbki w sposób kontrolowany lub utrzymywanie jej stałej wartości.

Wzmacniacze (określane także jako **nadajniki**). Do wzbudzenia próbki niezbędne są często sygnały mające stosunkowo dużą amplitudę, dlatego konieczne jest zastosowanie wzmacniaczy. Wzmacniacze mogą być wewnętrzne (wtedy znajdują się we wnętrzu modułu IPSO) lub zewnętrzne (moduły odrębne i samodzielne). Przewody wychodzące bezpośrednio ze wzmacniacza i podłączone do przedwzmacniacza o dużej wydajności [HPPR](#) przekazują sygnał o częstotliwości radiowej (RF). Jakkolwiek można zastosować wiele różnych wzmacniaczy (w tym wzmacniaczy monolitycznych), dwie główne kategorie są następujące:

Wzmacniacze selektywne (określane także jako wzmacniacze ^1H lub protonowe) projektuje się specjalnie w celu wzmacniania wyższych częstotliwości powiązanych z ^1H i ^{19}F .

Wzmacniacze szerokopasmowe (określane także jako wzmacniacze X) projektuje się w celu wzmacniania szerokiego zakresu częstotliwości (z wyłączeniem ^1H i ^{19}F).

4.3 Łącze między komputerem hostem a modułem IPSO

Jakkolwiek podczas typowej sesji w programie Topspin łącze to jest wykorzystywane w sposób ciągły i jest w praktyce niewidoczne dla użytkownika, zostaje ono przerwane zawsze, gdy komputer host lub moduł IPSO zostają wyłączone i musi zostać nawiązane ponownie po ich włączeniu. Połączenie jest nawiązywane automatycznie.

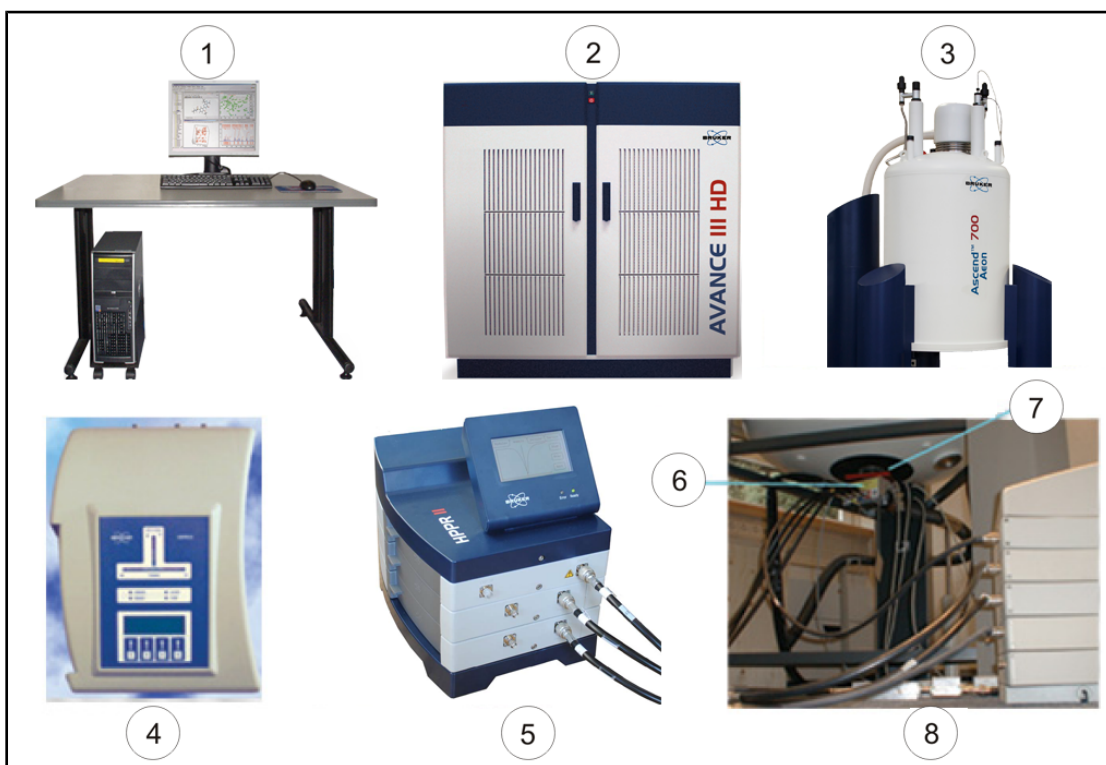
Zobacz również

- Podstawowe informacje dotyczące rozwiązywania problemów [► 73]

4.4 Magnes, układ kompensacyjny (shimów), HPPR i sonda

Magnes wytwarza pole magnetyczne niezbędne do indukowania przejść NMR. Aby utrzymać nadprzewodnictwo w układzie, rdzeń magnesu jest chłodzony do bardzo niskiej temperatury za pomocą ciekłego azotu i helu (więcej informacji szczegółowych podano w punkcie [Magnes oraz naczynie Dewara magnesu](#) [► 29]).

Układ kompensacyjny (shimów) o temperaturze pokojowej zainstalowany w dolnej części magnesu stanowi grupa cewek, przez które przepływa prąd (elementy kompensacyjne), wykorzystywany do maksymalnego zwiększenia jednorodności pola przez zrównoważenie wszelkich występujących niejednorodności. Prąd elektryczny płynący w cewkach shimowych wysokotemperaturowych (określa się je w ten sposób, ponieważ nie są chłodzone przez zanurzenie w ciekłym helu) jest sterowany przez moduł BSMS i może być korygowany z wyświetlacza BSMS w celu optymalizacji sygnału NMR. Ma on znaczny wpływ na rozdzielczość sygnałów i czułość. Działanie polegające na regulacji prądu elektrycznego w cewkach shimowych wysokotemperaturowych nosi nazwę **kompensacji** pola magnetycznego.



Rysunek 4.3: Fotografia magnesu, układu kompensacyjnego, sondy i HPPR

1.	Konsola operatora	5.	Moduł HPPR/2 Cover 2 z połączeniami sondy
2.	Konsola	6.	Sonda
3.	Magnes	7.	Układ kompensacyjny (shimów)
4.	Widok z góry modułu HPPR/2 Cover 1	8.	Sonda i układ kompensacyjny

Jakkolwiek **HPPR** (przedwzmacniacz o dużej czułości) przekazuje nadawany sygnał do próbki, jego podstawowym zadaniem jest wzmacnianie stosunkowo słabych sygnałów emitowanych przez próbkę. Znajduje się on u podstawy magnesu i wzmacnia sygnał NMR możliwie najwcześniej, dzięki czemu zmniejsza się straty na długości przewodu. Po wzmocnieniu sygnału za pomocą przedwzmacniacza HPPR wszelkie późniejsze straty na przewodach mają mniejsze znaczenie. Przedwzmacniacz HPPR nadaje ponadto i odbiera sygnały locku deuteru lub fluoru oraz jest wykorzystywany w procedurze dostrajania. Można skonfigurować maksymalnie 5 (**HPPR**) lub 8 (**HPPR/2**) odrębnych modułów (oprócz modułu górnego, który występuje zawsze). Jedną z najbardziej typowych konfiguracji składa się z trzech odrębnych modułów: **protonowego**, **X-BB** i **2H** wraz z modułem górnym.

Sondę wprowadza się do układu kompensacyjnego (shimów) znajdującego się u podstawy magnesu, który zasadniczo składa się z różnych cewek wykorzystywanych do przesyłania impulsów wzbudzących do próbki oraz do odbioru sygnału wyemitowanego. Ponadto sonda przekazuje i odbiera sygnał locku.

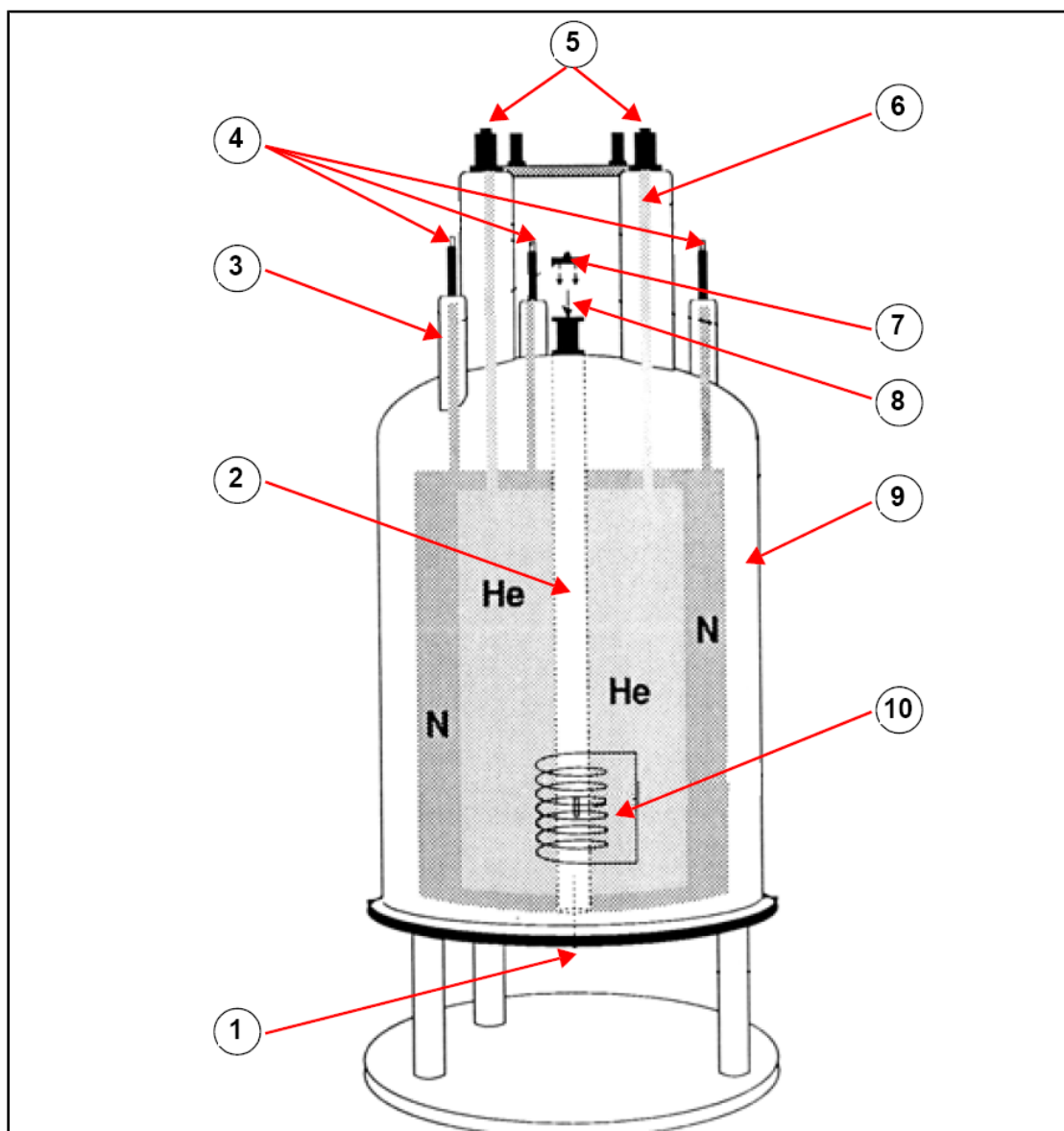
4.5 Magnes oraz naczynie Dewara magnezu

Dostępnych jest wiele typów magnesów charakteryzujących się różnym natężeniem pola magnetycznego. **Natężenie pola magnezu** określa się na podstawie częstotliwości sygnałów NMR emitowanych przez atomy wodoru. Im wyższa jest wartość natężenia pola magnezu, tym większa jest częstotliwość dla wodoru. Na przykład magnes 500 MHz (11,7 T) oznacza, że jeśli próbka chemiczna zostanie umieszczona w magnesie w celu wykonania jej analizy, atomy ^1H w próbce będą emitować sygnały o częstotliwości bardzo zbliżonej do 500 MHz. Firma Bruker oferuje magnesy w zakresie 200-1000 MHz.

Magnesy nadprzewodzące to elektromagnesy, co oznacza, że wykorzystuje się w nich zjawisko wytwarzania pola magnetycznego przez prąd elektryczny. **dzeń magnezu** składa się z dużej cewki w kształcie solenoidu, zbudowanej z drutu nadprzewodzącego, przez który przepływa prąd. W środku cewki występuje bardzo silne, statyczne pole magnetyczne. W tym polu magnetycznym umieszcza się próbkę, którą należy zbadać.

Niektóre materiały w bardzo niskiej temperaturze charakteryzują się niezwykłą właściwością - nadprzewodnictwem. Drut nadprzewodzący przesyła prąd elektryczny nie korzystając z żadnej energii napędowej (np. akumulatora lub zasilania sieciowego). Po włączeniu prądu pętla nadprzewodząca będzie działać w nieskończoność. Taką pętlę nadprzewodzącą zawierają magnesy firmy Bruker. Jediną czynnością konserwacyjną niezbędną przy magnesie jest utrzymanie cewki zanurzonej w ciekłym helu.

Magnes składa się z kilku części. Z obudowy zewnętrznej magnezu usunięto powietrze, zaś powierzchnie wewnętrzne są posrebrzane (zasada działania jest ta sama jak w termosie). Następnym elementem jest kąpiel azotowa, dzięki której temperatura zmniejsza się do 77,35 K (-195,8°C), 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.	Tutaj wprowadza się sondę	6.	Kolumna z helem
2.	Otwór	7.	Zatyczka metalowa
3.	Kolumna z azotem	8.	Tutaj wprowadza się próbki
4.	Wloty azotu	9.	Komora próżniowa
5.	Wloty helu	10.	Magnes

4.5.1 Otwór o temperaturze pokojowej

Zbiorniki helu i azotu otaczają kolumnę centralną noszącą nazwę otworu magnesu. Zazwyczaj otwór ten zamyka od góry metalowa zatyczka. Dostępne są magnesy o standardowej lub zwiększonej średnicy otworu. Analizowane próbki wprowadza się do magnesu przez górny otworu. Sondy, w których znajduje się próbka i które przekazują sygnały do próbki i od niej, wprowadza się od dołu.

4.5.2 Zbiornik z helem

Zbiornik z helem w magnesie standardowym jest zawieszony na dwóch szyjkach wystających wysoko nad magnesem. Dostęp do zbiornika jest możliwy przez dwa wloty. Jeden z nich umożliwia uzupełnianie ciekłego helu, a także wprowadzanie **czujnika poziomu helu**. Drugi wlot wykorzystuje się jedynie w przypadku ładowania lub rozładowywania magnesu. W szyjkach 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 helem.

4.5.3 Zbiornik z azotem

Trzy krótsze wloty 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-d₆, benzen-d₆ i chloroform-d i DMSO-d₆, jednak dostępnych jest wiele innych. Próbką, którą w tej instrukcji wykorzystano do zilustrowania podstawowych technik NMR, jest antranilan mentylu w DMSO-d₆.

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

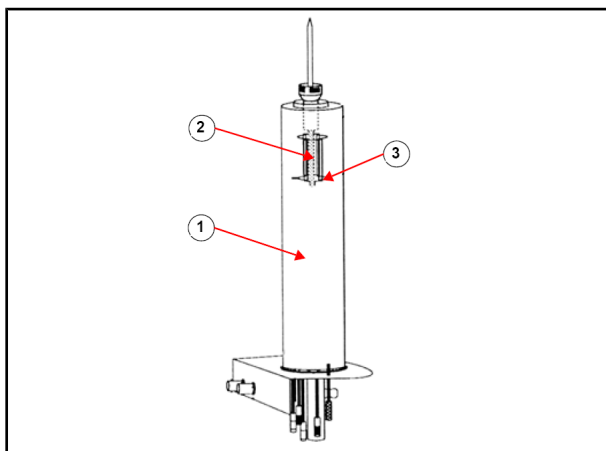
częstotliwość deuteru. Układ blokujący wykorzystuje odbiornik (znajdujący się we wnętrzu modułu BSMS) monitorujący częstotliwość deuteru, który wprowadza odpowiednie korekty natężenia pola magnetycznego.

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 H0) w układzie kompensacyjnym magnezu, 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 następuje za pomocą specjalnie zaprojektowanych cewek częstotliwości radiowej (RF).

Sondę wprowadza się w dolną część magnezu; znajduje się ona wewnątrz elementów kompensacyjnych o temperaturze pokojowej. Przewody koncentryczne przekazują sygnały wzbudzające ze wzmacniaczy w konsoli do sondy i sygnał NMR ponownie z próbki do odbiornika. Przewody przebiegają przez grupę przedwzmacniaczy (HPPR) znajdujących się w pobliżu podstawy magnezu, zaś w przypadku systemów NanoBay są wbudowane w konsolę. **Przedwzmacniacze** są niezbędne do wzmocnienia sygnałów NMR, które zazwyczaj są bardzo słabe.

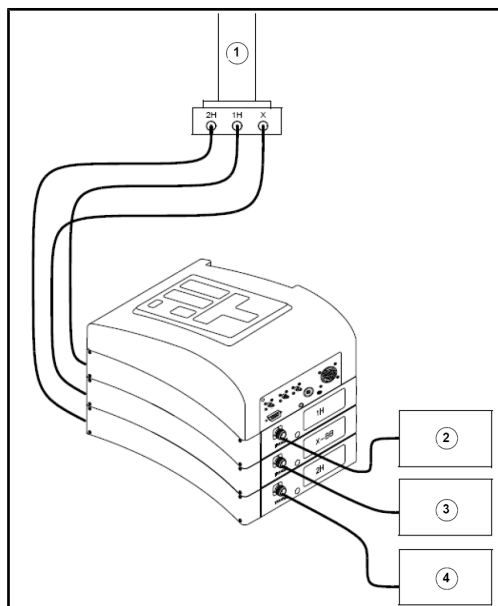


Rysunek 4.5: Próbka w sondzie

1.	Sonda	3.	Cewki
2.	Objętość próbki		

Sondy mogą mieć różną wielkość i mogą być różnych typów. Wielkość sondy podaje się w odniesieniu do wielkości probówki na próbkę, którą można do nich wprowadzić; najczęściej wykorzystuje się średnice probówek na próbki 5 mm i 10 mm. Wykorzystywane są różne rodzaje sond w zależności od rodzaju eksperymentów. **Sondy selektywne** są zaprojektowane specjalnie do obserwacji konkretnych jąder, np. ^{13}C , zaś sondy do rejestracji wielu jąder (X-BB lub szerokopasmowe) można wykorzystywać przy badaniu szerokiego zakresu jąder. Liczba i konstrukcja cewek wewnętrznych to parametry odróżniające fizycznie poszczególne rodzaje sond. Ponadto średnica zewnętrzna i długość sondy są zgodne z wymaganiami dostosowanymi do poszczególnych magnesów (średnica duża lub standardowa; różna długość od dna do środka pola magnetycznego w przypadku magnesów o różnym natężeniu pola).

Sygnaly wchodzą do cewki sondy i ją opuszczają przez złącza, które zostały jednoznacznie oznakowane; znajdują się one u podstawy sondy. Ten sam przewód wykorzystuje się do przesyłania sygnału do sondy i od sondy. Każda sonda zawiera cewkę wewnętrzną (**cewka rejestracyjna**). Cewka ta znajduje się możliwie najbliżej próbki, aby zwiększyć czułość do maksimum. Oznakowanie kolorami złącz BNC cewki wewnętrznej jest zgodne z prostym schematem. Kolor jest zawsze ten sam co kolor prostokątnego paska znajdującego się bezpośrednio nad złączami BNC. Poniższy rysunek pokazuje oznakowanie sondy do rejestracji wielu jąder. W tym wypadku cewka szerokopasmowa jest cewką wewnętrzną.



Rysunek 4.6: Typowy schemat przewodów do przedwzmacniacza HPPR

1.	Sonda	3.	Wzmacniacz X
2.	Wzmacniacz protonów	4.	Nadajnik BSMS 2H

4.8 Sonda szerokopasmowa

Jednym z rodzajów sond, który zostanie opisany w niniejszym punkcie jako przykład typowej sondy, jest sonda BBO Smart (5 mm). Zgodnie z nazwą, sondę tę zaprojektowano z myślą o użytkownikach zainteresowanych analizą próbek zawierających różne jądra. Zakres częstotliwości X obejmuje zazwyczaj od ^{15}N do ^{31}P , w tym ^{19}F .

Lewe złącze BNC zostało oznaczone ^2H (patrz rysunek poniżej); jest wykorzystywane do przesyłania sygnału blokowania. Pozostałe dwa połączenia są związane z sygnałami ^1H i jąder X; zostały one odpowiednio oznaczone. Przewody wychodzące ze złącz BNC dla ^1H , X i ^2H są podłączone do przedwzmacniaczy.



Rysunek 4.7: Przykład sondy szerokopasmowej

Sondy projektuje się w taki sposób, aby umożliwiły kontrolę temperatury próbki NMR. Do kontroli temperatury próbki służy **ogrzewacz** wykorzystywany w połączeniu z **linią transferową powietrza/N₂ Termopara** jest wykorzystywana jako termometr do monitorowania temperatury próbki. Wszystkie te elementy są zamocowane u podstawy sondy i są łatwo dostępne. Moduł sterowania temperaturą (**VTU**) znajdujący się wewnątrz konsoli stale monitoruje odczyt termopary i wprowadza korekty mocy ogrzewacza, aby utrzymać odpowiednią temperaturę.

Niemal wszystkie sondy o wysokiej częstotliwości są wyposażone w cewki gradientowe, zaś z boku podstawy sondy znajduje się złącze.

Wreszcie w czarnej skrzynce u podstawy sondy znajdują się elementy do strojenia i dopasowywania. Są one wykorzystywane do wprowadzania drobnych korekt w sondzie i optymalizacji jej pracy. Podczas analizy związku zostaje on wzbudzony za pomocą sygnałów 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 przeprowadzić dopasowanie przy każdej zmianie próbki w magnecie. Każda cewka w sondzie zostaje dostrojona i dopasowana oddzielnie za pomocą procedury `atma` lub `atmm`, co opisano w punkcie [Strojenie i dopasowanie sondy \[42\]](#).

Wymiana sondy wymaga jej ponownego podłączenia z przedwzmacniaczami.

4.9 Wymiana sondy

Jeśli występuje konieczność wymiany sondy, należy postępować według poniższych wskazówek. Sondy są elementami delikatnymi i drogimi, dlatego wymianę sondy należy uzgodnić z osobą zarządzającą systemem. Na ruch mechaniczny sondy znaczny wpływ ma magnes, a w szczególności prądy wirowe. 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.

Postępowanie przy wymianie sondy:

1. Należy sprawdzić, czy nie trwa rejestracja widma klikając przycisk STOP na górnym pasku narzędzi okna programu Topspin lub wpisując stop w wierszu poleceń.
2. Wyłączyć **ogrzewanie** lub **chłodzenie** systemu, jeśli działa. Za pomocą polecenia `edte` wyłączyć ogrzewacz i ustawić wartość zero przepływu powietrza. Pozostawić sondę do osiągnięcia temperatury pokojowej. Nie wyłączać samego systemu!
3. Zdemonstrować podłączenie powietrza/N₂ u podstawy sondy.
4. Należy upewnić się, czy otwór magnesu nie jest zamknięty, a następnie wyjąć próbkę, która ewentualnie znajduje się w magnesie, klikając przycisk **LIFT** w oknie BSMS.
5. Wyłączyć przycisk LIFT.
6. Odłączyć wszystkie przewody BNC u podstawy sondy.
7. Odłączyć termoparę i ogrzewacz oraz wszelkie połączenia gradientów lub PICS.
8. Za pomocą dołączonego śrubokrętu zwolnić dwie śruby radełkowane mocujące sondę w magnesie.
9. Wyjąć sondę z magnesu ruchem prosto w dół.
10. Wprowadzić nową sondę i umocować ją za pomocą dwóch śrub.
11. Ponownie podłączyć przewody koncentryczne, przewody ogrzewacza lub chłodzące oraz wykonać wszelkie inne potrzebne podłączenia.
12. Ponownie włączyć ogrzewacz.

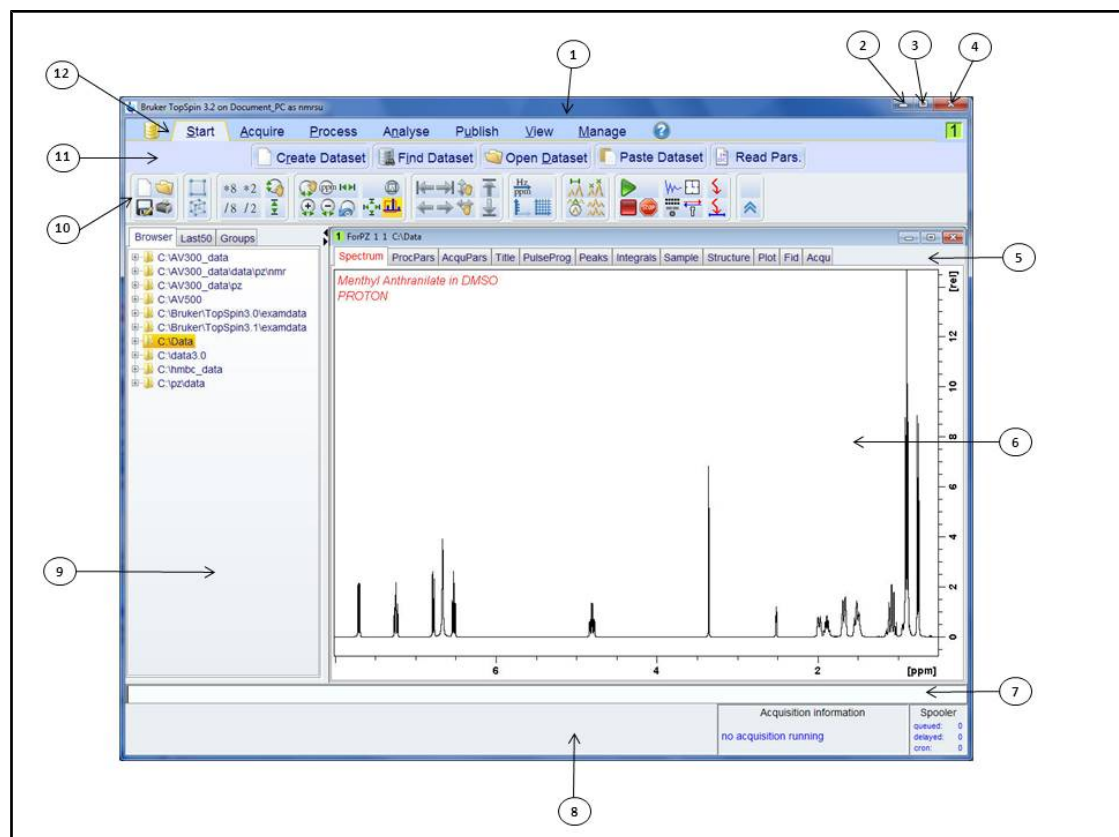
5 Procedury podstawowe

W tym rozdziale omówione zostaną podstawowe czynności, które wykonuje się zawsze przy rejestracji widm. Oprogramowanie TopSpin ma interfejs dostosowany do kolejnych czynności, co ułatwia pracę i przeprowadza użytkownika przez wszystkie niezbędne czynności służące do rejestracji widma. Wszystkie czynności są kontrolowane przez oprogramowanie i można je wybrać przez kliknięcie myszą zakładek dotyczących kolejnych czynności (punkt 12 na rysunku przedstawiającym okno programu TopSpin), dzięki czemu wyświetla się rząd przycisków odpowiadających czynnościom (punkt 11 na rysunku przedstawiającym okno programu TopSpin).

Jeśli użytkownik zapoznał się wcześniej z tymi operacjami, można pominąć ten rozdział.

5.1 Okno programu TOPSPIN

Poniższy rysunek pokazuje układ okna programu TopSpin.



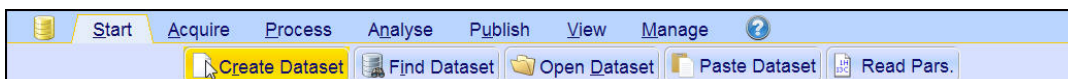
Rysunek 5.1: Okno programu TopSpin

1.	Pasek tytułu	7.	Wiersz poleceń
2.	Przycisk minimalizacji	8.	Pasek stanu
3.	Przycisk maksymalizacji	9.	Okno przeglądarki
4.	Przycisk zamykania	10.	Pasek narzędzi
5.	Zakładki ze zbiorami danych	11.	Pasek klawiszy czynności
6..	Okno wyświetlania danych	12.	Pasek menu czynności

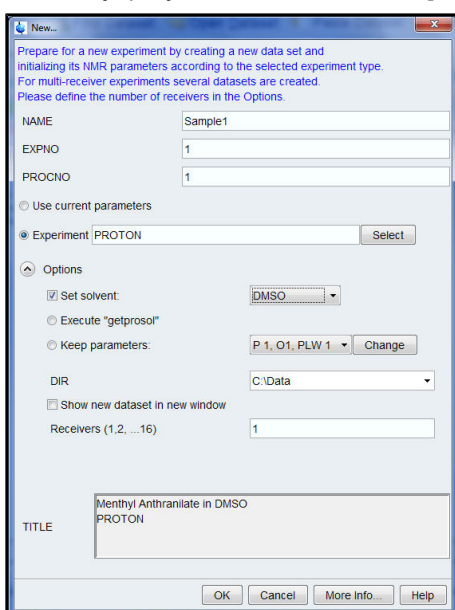
5.1.1 Tworzenie nowego zbioru danych

Regularne korzystanie ze spektrometru w krótkim czasie powoduje nagromadzenie znacznej ilości danych. Użytkownicy powinni zapisywać dane w plikach o nazwach ułatwiających identyfikację, dzięki czemu będą mieli później łatwy dostęp do odpowiednich danych. Jest to szczególnie istotne, jeśli z systemu korzysta duża liczba użytkowników. Jeśli został zarejestrowany zestaw danych, można go zapisać w tak zwanym **zbiorniku danych**. Każdy zbiór danych musi mieć unikatowy deskryptor (identyfikator), który odróżnia poszczególne zbiory danych. Pełny deskryptor zbioru danych wymaga określenia czterech parametrów: DIR, NAME, EXPNO i PROCNO.

1. Kliknąć zakładkę **Start** na pasku menu czynności.



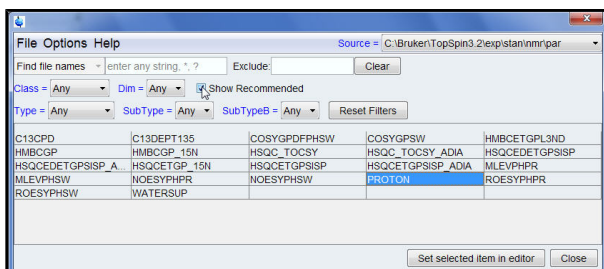
2. Kliknąć przycisk **Create Dataset** [Utwórz zbiór danych] na pasku klawiszy czynności.



3. Można teraz utworzyć własny zbiór danych. Jako nazwę (NAME) można wpisać ciąg maksymalnie 13 znaków. W przypadku parametrów EXPNO i PROCNO wpisać '1'.

4. Wybrać eksperyment, który ma zostać przeprowadzony, klikając przycisk **Select** [Wybierz] z prawej strony okna eksperymentu.

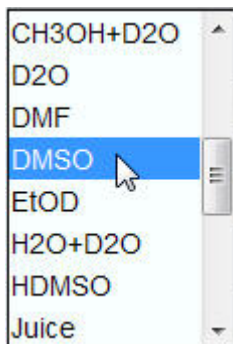
5. W oknie wyboru eksperymentu zaznaczyć opcję **Show Recommended** [Pokaż zalecane].



6. Wybrać rodzaj eksperymentu (np. Proton).

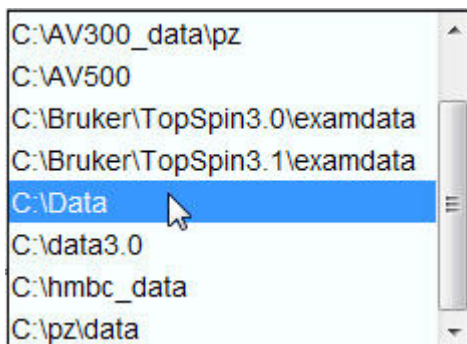
7. W oknie wyboru eksperymentu kliknąć **Set selected item in editor** [Ustaw wybrany element w edytorze].

8. Wybrać rozpuszczalnik dla danej próbki klikając **strzałkę w dół** z prawej strony okna rozpuszczalnika.



9. Wybrać rozpuszczalnik (np. DMSO) klikając go.

10. Wybrać ścieżkę dostępu do katalogu na dysku twardym komputera, w którym zapisano zbiór danych, klikając **strzałkę w dół** z prawej strony okna DIR.



11. Wybrać ścieżkę dostępu (np. C:\Data).

12. W oknie **Title** wpisać opis danej próbki.

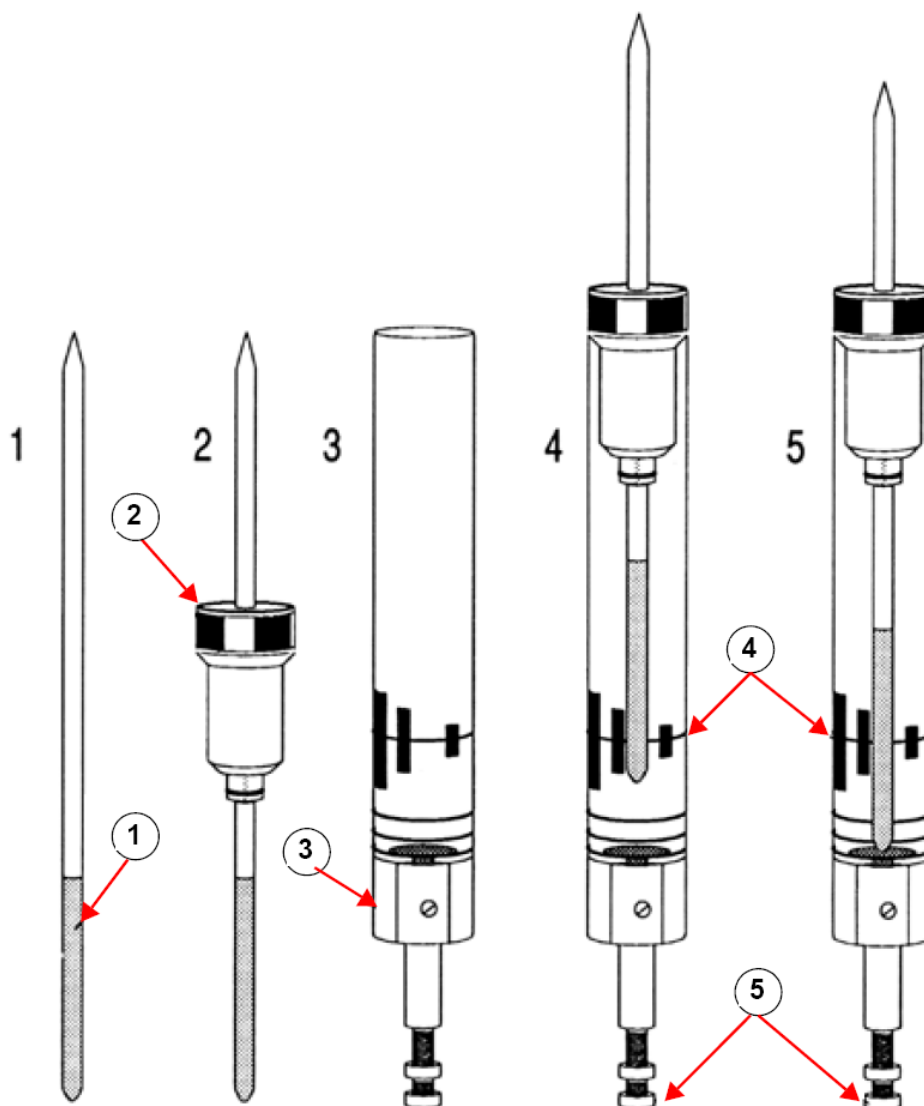
13. Kliknąć przycisk **OK** w oknie New Data set [Nowy zbiór danych].



Uwaga: Nowo utworzony zbiór danych jest teraz aktualnym zbiorem danych, zaś szczegółowe dane deskryptora zostaną zapisane na dysku twardym w katalogu: DIR \NAME\EXPNO, przy czym każdy parametr EXPNO odpowiada całkowicie niezależnemu zbiorowi danych. W tym przykładzie dane zostaną zapisane w katalogu **C:\Data \Sample1\1**. Ścieżka dostępu pojawi się także na pasku tytułu w oknie danych programu Topspin.

5.1.2 Przygotowywanie próbek

- Stosować czyste i suche próbki do próbek.
- Stosować próbki do próbek średniej lub wysokiej jakości.
- Zawsze filtrować roztwór próbki.
- Zawsze używać tej samej objętości próbki lub wysokości roztworu.
- Objętość napełniania probówek 5 mm wynosi 0,6 ml lub 5 cm.
- Objętość napełniania probówek 10 mm wynosi 4 ml lub 5 cm.
- Użyć przyrządu do pomiaru głębokości próbki do korekty głębokości próbki (1,8 cm w przypadku sond starszych, 2,0 cm w przypadku sond nowszych).



Wprowadzanie próbki do elementu obrotowego

1.	Próbka	4.	Linia środkowa
2.	Element obrotowy	5.	Śruba do regulacji głębokości
3.	Miernik głębokości		

- Probówka na próbkę powinna być dobrze osadzona w elemencie obrotowym.
- Wytrzeć probówkę na próbkę do czysta przed wprowadzeniem do magnesu.

5.2 Wprowadzanie próbki z elementem obrotowym do magnesu

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

1. Kliknąć zakładkę **Acquire**[Rejestracja] na pasku menu czynności.



2. Kliknąć **strzałkę w dół** na przycisku **Sample** [Próbka] na pasku klawiszy czynności.



3. Kliknąć opcję **Turn on sample lift air (ej)**.

4. Umieścić próbkę z elementem obrotowym u góry otworu magnesu.

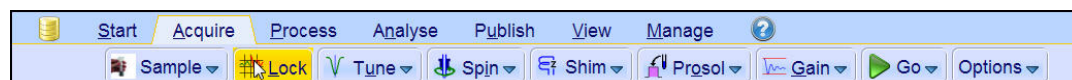
5. Kliknąć strzałkę w dół na przycisku **Sample** [Próbka] na pasku przycisków czynności.



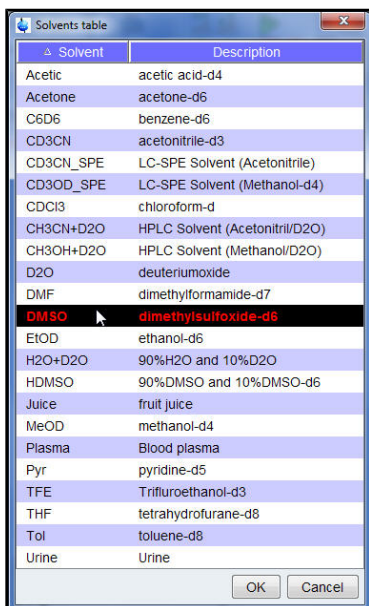
6. Kliknąć opcję **Turn off sample lift air (ij)**.

5.3 Lock próbki

Do generowania sygnału, który ma zostać wykryty i monitorowany przez układ locku, wykorzystuje się rozpuszczalniki deuterowane. Częstotliwość i natężenie tego sygnału zależy od zastosowanego rozpuszczalnika. Główną cechą procedury locku w programie TopSpin jest to, że wartości parametrów, na przykład siły locku, wzmocnienia i częstotliwości, zostają dostosowane do danego rozpuszczalnika. Jeśli te ustawione wartości domyślne są zbliżone do oczekiwanych dla danego rozpuszczalnika, program BSMS jest w stanie szybko odnaleźć i namierzyć sygnał rozpuszczalnika przez przemiatanie zakresu częstotliwości lub wartości pola magnetycznego. Parametry zależne od rozpuszczalnika są wczytywane z tabeli „edlock“.



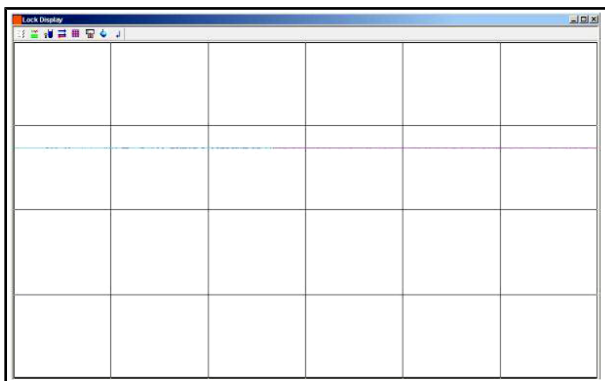
1. Kliknąć przycisk **Lock** [Lock] na pasku klawiszy czynności.



2. Wybrać rozpuszczalnik klikając go.
3. Kliknąć przycisk **OK** w oknie tabeli rozpuszczalników.



Uwaga: Jeśli lockowanie już nastąpiło, sygnał powinien mieć postać linii poziomej z pewnym powiązaniem z nim szumem lub pulsacją (patrz rysunek poniżej). Wysokość tej linii nosi nazwę poziomu locku.



Rysunek 5.2: Wyświetlanie zablokowane po locku próbki

5.4 Strojenie i dopasowanie sondy

Czułość każdej sondy zmienia się wraz z częstotliwością sygnału do niej wysłanego. 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.

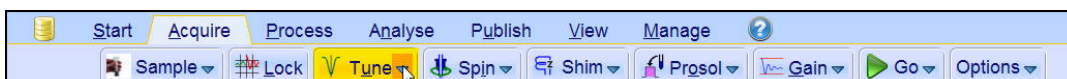
5.4.1 Sondy wyposażone w ATM (procedura strojenia automatycznego)



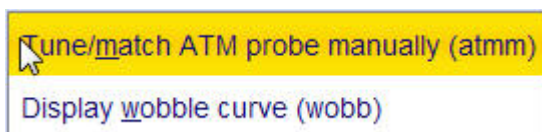
- Kliknąć przycisk **Tune** [Strojenie] na pasku klawiszy czynności.

Na wyświetlaczu pojawi się automatycznie okno rejestracji i wyświetli się krzywa strojenia. Strojenie i dopasowanie następuje automatycznie. Jeśli w zestawie parametrów wykorzystuje się więcej niż jedną częstotliwość, np. C13CPD itd., ATMA rozpocznie wpierw korektę najniższej częstotliwości, a następnie przejdzie automatycznie do częstotliwości wyższej.

5.4.2 Sondy wyposażone w ATM (procedura strojenia ręcznego)



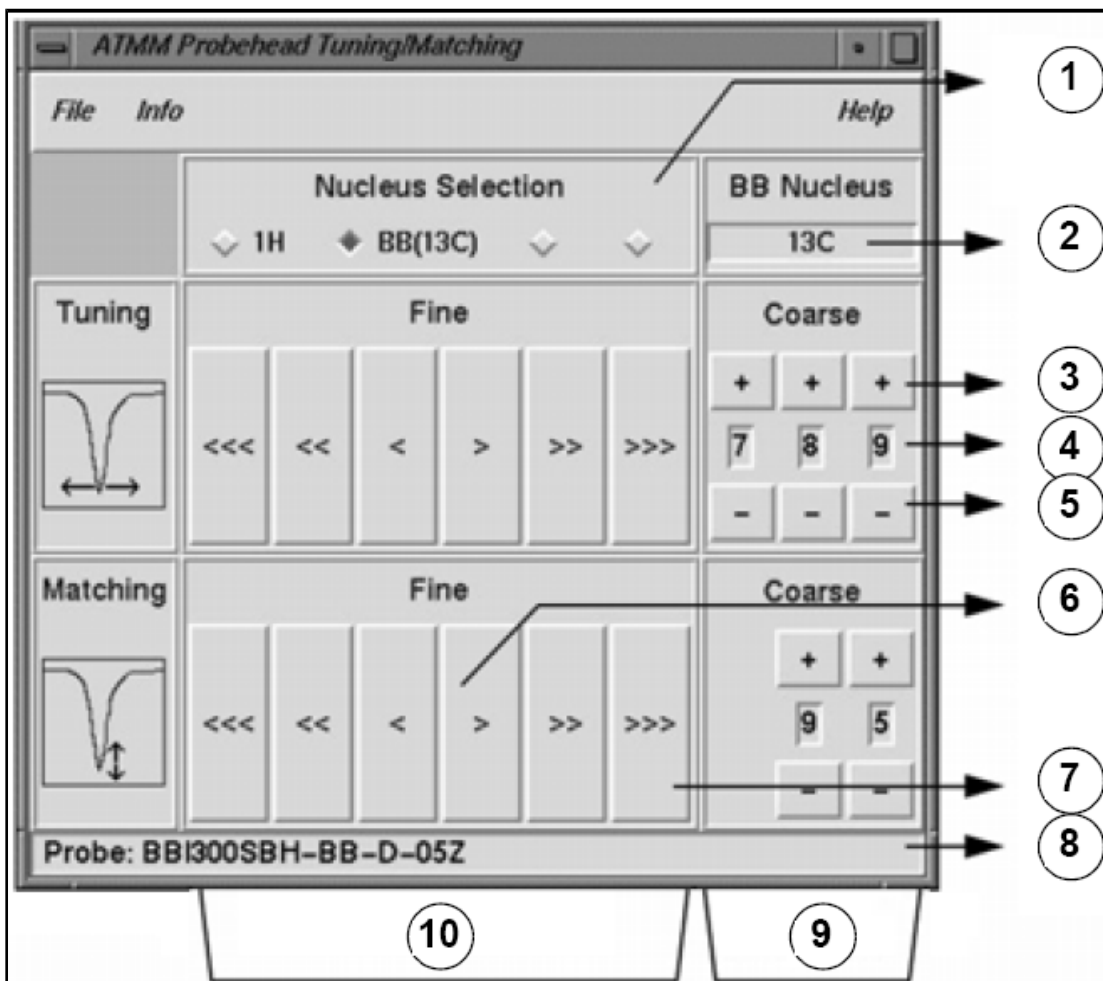
- Kliknąć **strzałkę w dół** na przycisku **Tune** [Strojenie] na pasku klawiszy czynności.



- Kliknąć **Tune/match ATM probe manually (atmm)**.



Uwaga: Wyświetli się okno ATMM Probe Tuning/Matching [Strojenie/dopasowywanie sondy ATMM] (rysunek poniżej) oraz okno, w którym znajduje się krzywa strojenia.



Rysunek 5.3: Okno strojenia/dopasowywania sondy ATMM

1.	Wybrać następnę jądro do strojenia (widoczne są jedynie kanały podłączone).
2.	Wybrane jądro w kanale szerokopasmowym.
3.	Zwiększenie wartości o jeden.
4.	Położenie jądra.
5.	Zmniejszenie wartości o jeden.
6.	Ruch powolny (czerwony, nieaktywny przycisk wskazuje brak dalszych zmian w tym kierunku).
7.	Ruch szybki.
8.	Typ sondy.
9.	Strojenie i dopasowywanie zgrubne w przypadku sond szerokopasmowych.
10.	Strojenie i dopasowywanie precyzyjne w przypadku wszystkich sond.

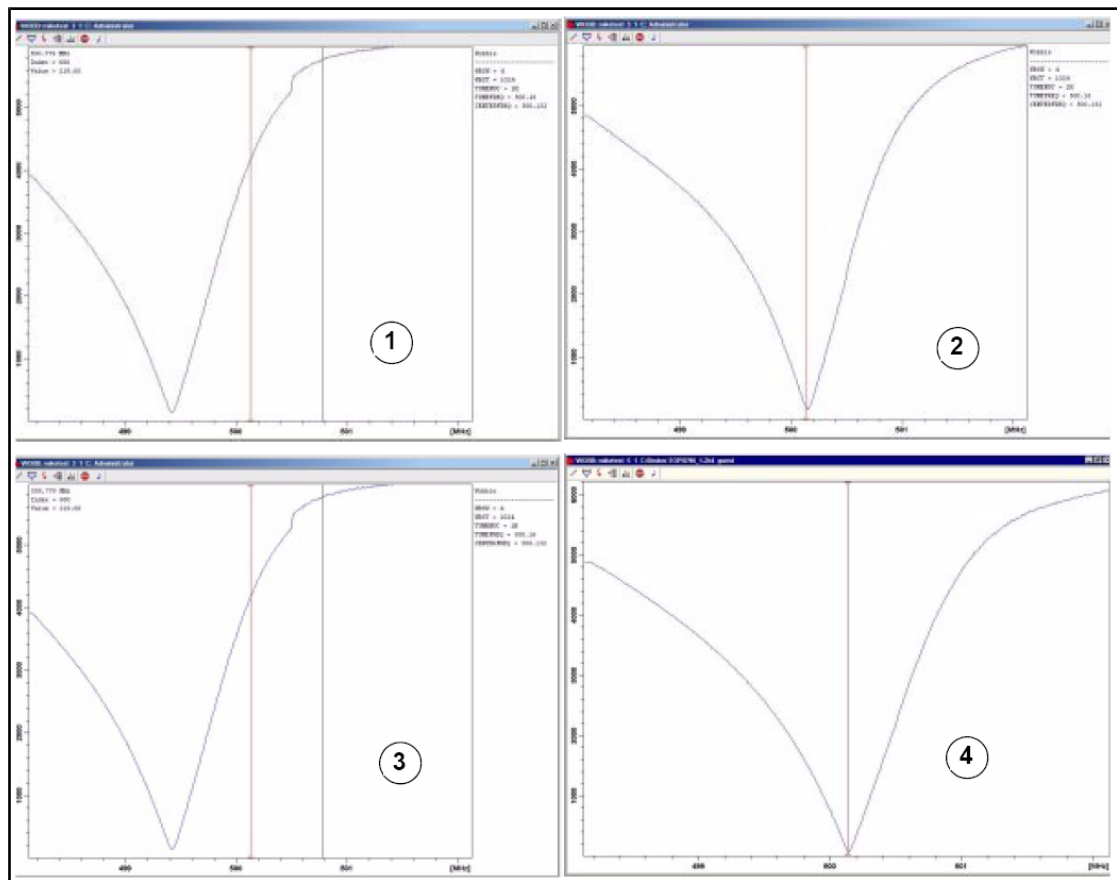
Wybrać odpowiednie jądro do danego eksperymentu, a następnie przeprowadzić korektę klikając przyciski ze strzałkami. Należy zawsze rozpoczynać od dopasowywania, a następnie wykonywać strojenie.

Procedura **kołysania** 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 krzywa odpowiedzi obwodu rezonansowego. Stanowi po prostu miarę amplitudy sygnału odbitego (oś pionowa) w zależności od częstotliwości (oś pozioma).

Dopasowywanie oznacza regulację sondy w taki sposób, aby minimum krzywej kołysania znajdowało się u podstawy wykresu (czyli aby stykało się z osią poziomą częstotliwości). Odpowiada to minimalnemu odbiciu nadawanego sygnału.

Strojenie polega na sprawdzeniu, czy następuje to przy częstotliwości nadawania znajdującej się w środku skali poziomej ekranu. Należy jednak zauważyć, że regulacja w ramach strojenia i dopasowywania jest współzależna 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 5.4: Przykłady krzywych kołysania 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 chce przeprowadzić optymalizację sondy dla kilku jąder (np. eksperymenty z rozprzęganiem), można w oknie ATMM Probe Tuning/matching wybrać kolejne jądro.

5.5 Obracanie próbki

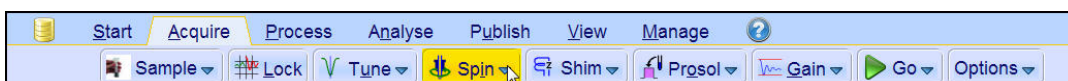
Drugą funkcją sprężonego powietrza jest umożliwienie obrotu próbki. Obracanie próbki wykonuje się w celu skompensowania pewnych niejednorodności, które mogą występować w polu magnetycznym w centrum magnesu.



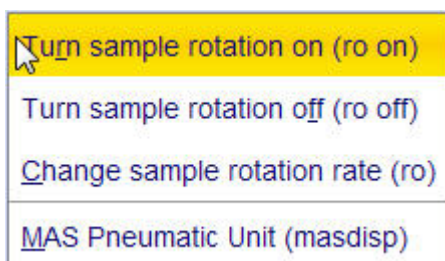
Uwaga: Należy pamiętać, że próbki badane w eksperymentach, np. 2-D, 3-D, SELECTIVE, NOEDIFF, T1, i za pomocą wszystkich sond odwróconych zazwyczaj nie są obracane.

Zalecane szybkości obrotowe są następujące:

- Hz dla sondy 5 mm 20Hz
- Hz dla sondy 10 mm 12Hz



- Kliknąć **strzałkę w dół** na przycisku **Spin** [Obracanie] na pasku klawiszy czynności.



- Kliknąć 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 kompensacja rutynowa, którą należy przeprowadzić na początku każdej sesji pracy ze spektrometrem oraz przy każdej zmianie próbki w magnesie. Kompensacja rutynowa obejmuje dokładną regulację parametrów kompensacji Z, Z², Z³, Z⁴ i Z⁵. Niektóre magnesy o większym natężeniu pola mogą wymagać kompensacji wyższego rzędu Z. Administrator systemu zaprogramował TopShim, aby uzyskać największą jednorodność dla każdej próbki. Procedura jest wykonywana automatycznie.

Główną metodą procedury TopShim jest kompensacja gradientowa. Kryterium jakości ostatecznego kształtu linii zapewnia najlepsze wyniki w każdej sytuacji.

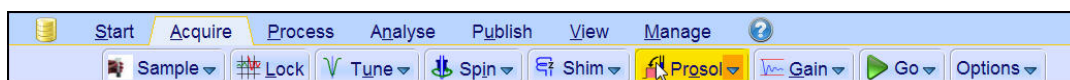
W przypadku wszystkich rozpuszczalników deuterowanych TopShim wykorzystuje metodę kompensacji gradientowej ^2H , zaś w przypadku innych rozpuszczalników (w szczególności H_2O) metodę kompensacji gradientowej ^1H .



- Kliknąć przycisk **Shim** [Kompensacja] na pasku klawiszy czynności. Kompensacja rozpocznie się natychmiast; powinna trwać mniej niż minutę.

5.7 Ustawianie parametrów zależnych od sondy i rozpuszczalnika

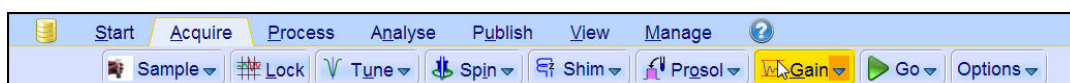
Parametry, na przykład impuls 90-stopniowy lub długość impulsu rozprzegającego z powiązаныmi poziomami mocy, można zapisać dla danego jądra w dowolnym dostępnym kanale. Wartości te wprowadza technik wykonujący instalację lub administrator systemu. Są one wczytywane automatycznie po kliknięciu przycisku **Prosol**.



- Kliknąć przycisk **Prosol** na pasku klawiszy czynności.

5.8 Regulacja wzmocnienia odbiornika

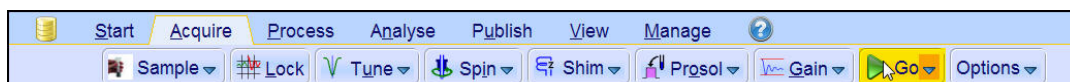
Wzmocnienie odbiornika jest parametrem bardzo istotnym, wykorzystywanym do dopasowywania amplitudy sygnału FID do zakresu dynamicznego dyskretyzatora. Wzmocnienie ustawia się automatycznie klikając przycisk **Gain**.



- Kliknąć przycisk **Gain** [Wzmocnienie] na pasku klawiszy czynności. Korekta wzmocnienia odbiornika rozpocznie się natychmiast. Powinna trwać mniej niż minutę.

5.9 Uruchamianie rejestracji

Proces odbierania sygnałów NMR nosi nazwę rejestracji. Mówi się, że dane są rejestrowane. Jeśli prowadzona jest rejestracja, zapisane zostają dane surowe, zaś odebrany sygnał określa się jako FID (sygnał zaniku swobodnej precesji). Wielkość punktu cyfrowego sygnału FID określa się jako TD (domena czasu).



- Kliknąć przycisk **Go** [Rozpocznij] na pasku klawiszy czynności. Przed uruchomieniem ustawionej liczby skanów spektrometr wykonuje pewną liczbę skanów pozornych (określoną domyślnie dla wybranego eksperymentu).

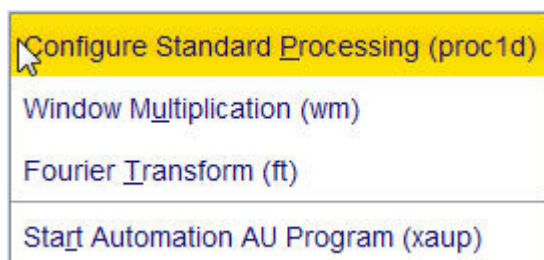
5.10 Przetwarzanie danych

Transformację Fouriera wykorzystuje się do przekształcania sygnału FID w widmo częstotliwości. Liczba punktów wykorzystanych do utworzenia widma wynikowego jest definiowana parametrem SI (wielkość). Sygnał FID zostaje przekształcony w widmo składające się z punktów danych SI w części rzeczywistej oraz punktów danych SI w części urojonej. Wartość typowa parametru SI wynosi $SI = TD/2$. Jeśli użytkownik wczytał zestaw parametrów „PROTON”, można łatwo sprawdzić, że $TD = 64K$, zaś $SI = 32K$.

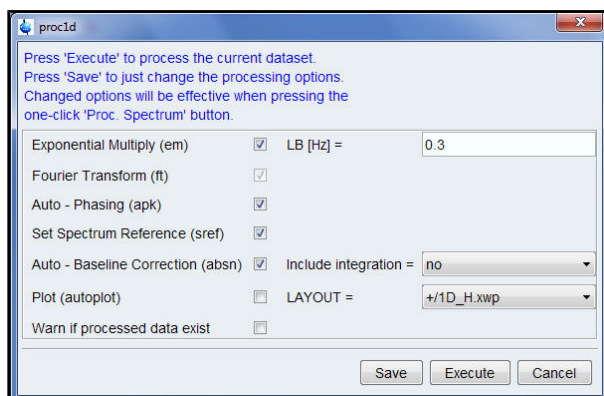
1. Kliknąć zakładkę **Process** na pasku menu czynności.



2. Kliknąć **strzałkę w dół** na przycisku **Proc. Spectrum** na pasku klawiszy czynności.



3. Kliknąć **Configure Standard Processing (proc1d)**.



4. Włączyć następujące opcje:

- **Exponential Multiply (em)**
- **Auto – Phasing (apk)**
- **Set Spectrum Reference (sref)**
- **Auto – Baseline Correction (absn)**

5. Kliknąć **Execute** w oknie proc1d.



Uwaga: Nacisnąć przycisk **Save** [Zapisz] w oknie proc1d, aby zapisać 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.

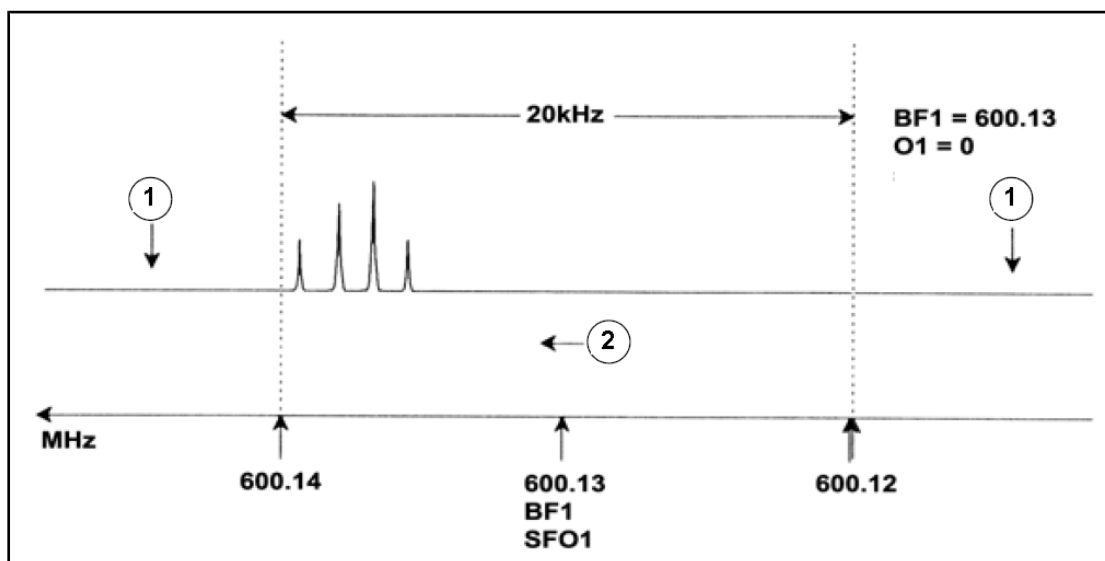
Należy pamiętać, że najistotniejszym parametrem jest SFOR, ponieważ jest to częstotliwość rzeczywiście emitowana w kierunku próbki. Należy ponadto zauważyć, że można ustawić wartości zerowe przesunięcia; wtedy $SFOX = BFX$. Bardziej szczegółowy opis podano w kolejnym punkcie.

6.2 Wyjaśnienie częstotliwości nadawanej, podstawowej i przesunięcia na wartościach liczbowych

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

Jeśli ustawiono wartość zero parametru O1, wtedy: $SFO1 = 600,13 + 0 = 600,13$ MHz

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



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

1.	Sygnały odfiltrowane	2.	Częstotliwość
----	----------------------	----	---------------

Z tego widma hipotetycznego wynika niewątpliwie, że wszystkie sygnały NMR znajdują się przy końcu zakresu widmowego o wysokiej częstotliwości. Ponadto jest możliwe, że niektóre sygnały znajdują się powyżej 600,14 MHz. Oznacza to, że sygnały te wykraczają poza zakres widmowy, zostały odfiltrowane i nie nastąpiła ich rejestracja. Aby sprawdzić, czy takie sygnały występują, dostępne są dwie możliwości:

- Szerokość widmową można zwiększyć, aby obejmowała wszystkie brakujące sygnały. Takie podejście ma jednak pewne wady, na przykład zwiększenie rozdzielczości sygnału FID (im niższa jest wartość parametru FIDRES, tym lepsza jest rozdzielczość).
- Najlepszą możliwością jest pozostawienie niezmienionego zakresu widmowego i jednocześnie przypisanie wartości parametru O1, aby nastąpiło przesunięcie środka zakresu.

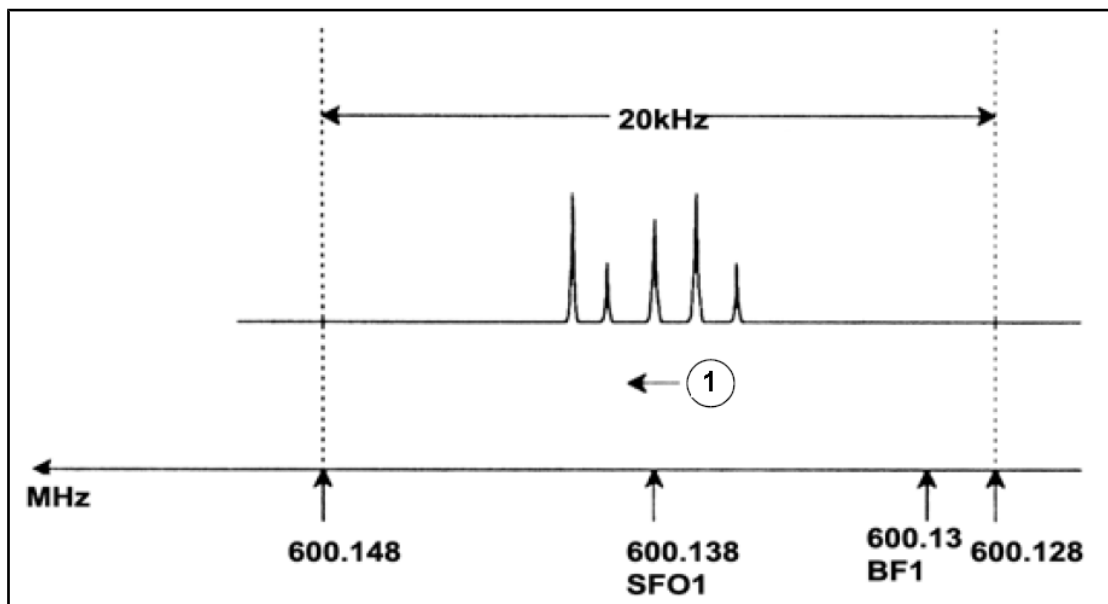
W tym konkretnym przykładzie wszystkie wykryte sygnały znajdują się w obszarze 600,138 MHz, dlatego należy wyśrodkować widmo według tej wartości.

$$\Rightarrow \text{SFO1} = 600.138 = \text{BF1} + \text{O1}$$

$$\Rightarrow 600.138 = 600.13 + \text{O1}$$

$$\Rightarrow \text{O1} = 0.008 \text{ MHz} = 8 \text{ kHz}$$

W związku z tym, jeśli ustawi się częstotliwość przesunięcia 8 kHz, okno zostanie przesunięte i będzie miało postać jak na rysunku poniżej.

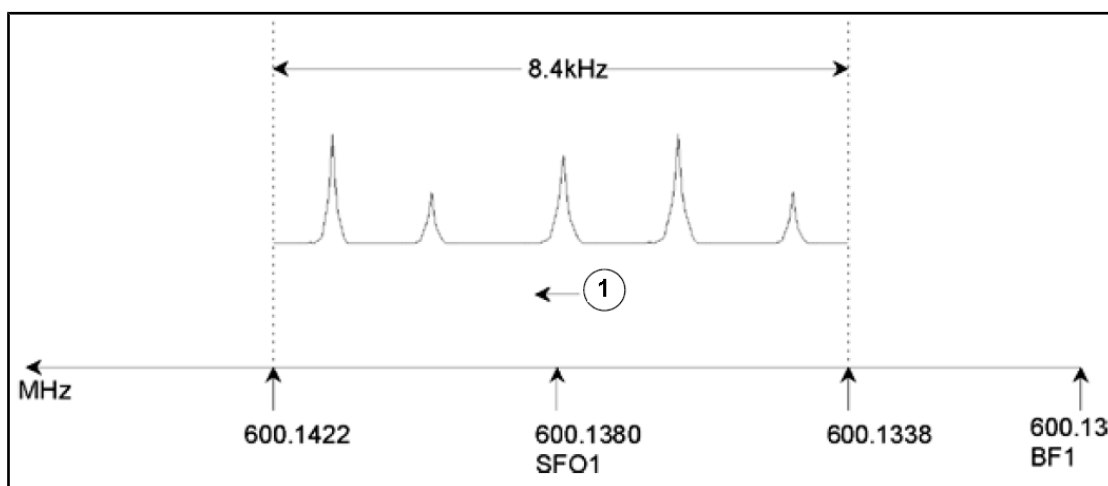


Rysunek 6.2: Widmo przy BF1 = 600,13 MHz, O1 = 8 kHz

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

Z powyższego rysunku wynika, że sygnały NMR emitowane przez protony znajdujące się w hipotetycznej próbce zajmują jedynie część zakresu widmowego. W związku z tym szerokość widmową można zmniejszyć bez utraty istotnych danych. Jedną z zalet zmniejszenia parametru SW jest zwiększenie rozdzielczości widmowej. Z kolei wadą jest proporcjonalne zwiększenie czasu niezbędnego do rejestracji danych.

W rozdziale [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. Na rysunku poniżej przedstawiono hipotetyczne widmo wykreślone ponownie, w przypadku gdy wartość parametru SWH zmieszono z 20 kHz do 8,4 kHz.

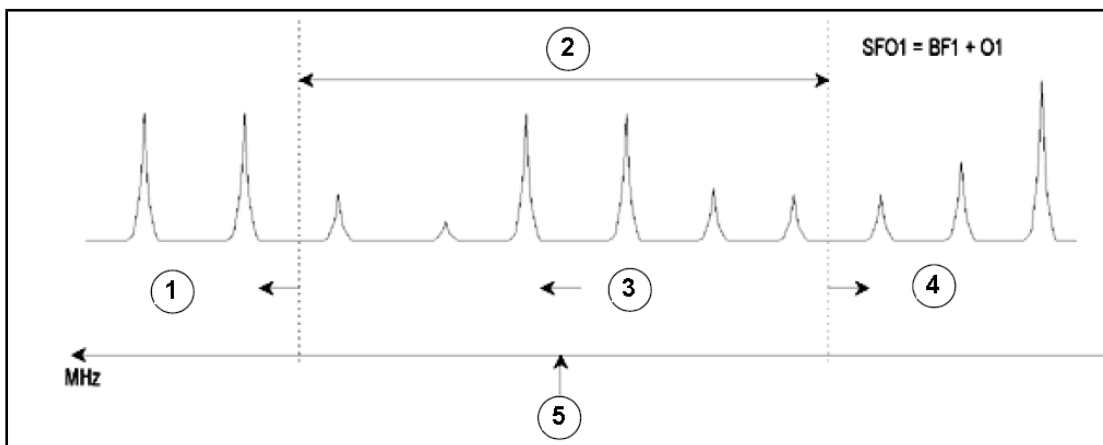


Rysunek 6.3: Widmo przy BF1 = 600,13 MHz, O1 = 8 kHz, SWH = 8,4 kHz

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

Należy zauważyć, że wartość parametru SWH wykorzystywaną w konkretnym eksperymencie wyznacza jedynie badana próbka oraz konieczna rozdzielczość widmowa. Jeśli zastosuje się wartość 14 ppm w przypadku widm protonowych, większość sygnałów protonów zostanie wykryta. Do szczegółowych badań konkretnego sygnału, jednak, wykorzystuje się znacznie mniejsze wartości SWH.

Na rysunku poniżej pokazano ogólne zasady wzajemnego oddziaływania parametrów SFO1, BF1 i O1 (w tym przypadku pokazano inną próbkę).



Rysunek 6.4: Zależności między SFO1, BF1 i O1

1.	Ustawienie dodatniej wartości parametru O1 powoduje przesunięcie okna w stronę wyższych częstotliwości.
2.	SW określa szerokość okna.
3.	Częstotliwość.
4.	Ustawienie ujemnej wartości parametru O1 powoduje przesunięcie okna w stronę niższych częstotliwości.
5.	SFO1 stanowi środek widma.

7 Próbka do badania metodą spektrometrii NMR

Jeśli za pomocą metody NMR bada się **ciało stałe**, otrzymywane sygnały są zazwyczaj szerokie, wskutek czego nie można rozdzielić struktury subtelnej mającej największe znaczenie dla badaczy. W związku z tym przed rejestracją sygnału zazwyczaj rozpuszcza się próbki ciał stałych w odpowiednim rozpuszczalniku. To samo dotyczy **próbek ciekłych**. Do rozpuszczalników organicznych można dodać niewielką ilość związku odniesienia. Aby jednak uzyskać najlepsze wyniki, próbka powinna być możliwie najczystsza. Sygnały pochodzące od **zanieczyszczeń** w najlepszym przypadku doprowadzą do tego, że widmo będzie niepotrzebnie złożone, zaś w najgorszym przesłonią istotne sygnały. Należy zwrócić szczególną uwagę na to, aby próbka nie zawierała **zanieczyszczeń magnetycznych**, ponieważ mogą one zniekształcać pole magnetyczne, a więc i zmniejszać rozdzielczość widma. Zanieczyszczenia stałe najłatwiej jest usunąć przez filtrację. W przypadku próbek w **rozpuszczalnikach organicznych** rozpuszczoną wodę można usunąć przez dokładne osuszenie próbki przed rozpuszczeniem.

7.1 Wybór rozpuszczalnika

Kolejnym etapem po wystarczającym oczyszczeniu i wysuszeniu próbki jest wybór odpowiedniego rozpuszczalnika. Ponieważ jądrem najczęściej wykorzystywanym do blokowania jest deuter, próbki zazwyczaj rozpuszcza się w rozpuszczalniku deuterowanym (jest to rozpuszczalnik, w którym znaczna część atomów wodoru, zazwyczaj ponad 99%, została zastąpiona deuterem). Najczęściej wykorzystywane **rozpuszczalniki deuterowane** to aceton-d₆, benzen-d₆ i chloroform-d, jednak dostępnych jest wiele innych. Czynniki, które należy uwzględnić przy wyborze rozpuszczalnika, są następujące:

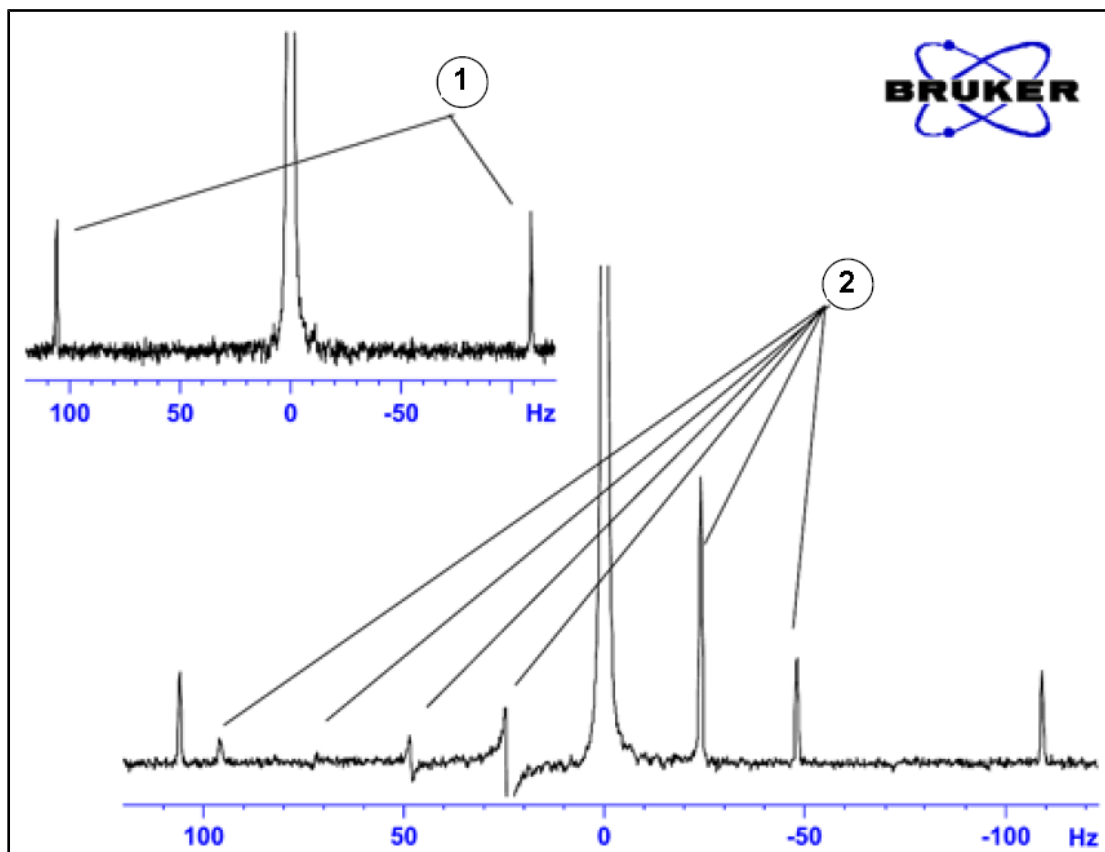
1. **Rozpuszczalność:** Nie ma wątpliwości, że im próbka jest łatwiej rozpuszczalna w rozpuszczalniku, tym lepiej. Zwiększa to do maksimum zawartość próbki w objętości zapewniającej zwiększenie czułości eksperymentu. Duża rozpuszczalność jest szczególnie istotna, jeśli dostępna jest niewielka jedynie ilość próbki.
2. **Zakłócenia widma próbki wprowadzane przez sygnały rozpuszczalnika:** Sam rozpuszczalnik w nieunikniony sposób będzie wytwarzał sygnały NMR przesłaniające pewne obszary widma. Takie piki pozostałości rozpuszczalnika nie powinny nakładać się na sygnały próbki.
3. **Zależność od temperatury:** W przypadku eksperymentów prowadzonych powyżej lub poniżej temperatury pokojowej istotnymi czynnikami są także temperatura topnienia i wrzenia rozpuszczalnika. Ponadto rozpuszczalność próbki będzie prawdopodobnie różna w zależności od temperatury.
4. **Lepkość:** Im niższa jest lepkość rozpuszczalnika, tym większa rozdzielczość eksperymentu.
5. **Koszt:** Jest niewątpliwe, że w przypadku rutynowych pomiarów NMR, w których rejestruje się wiele próbek, istotnym czynnikiem jest koszt rozpuszczalnika. Regułą ogólną jest wzrost ceny wraz z liczbą atomów deuterowanych.
6. **Zawartość wody:** Prawie wszystkie rozpuszczalniki wykorzystywane w pomiarach NMR zawierają śladowe ilości wody. Ponadto wiele jest higroskopijnych (pochłaniają wodę z atmosfery), dlatego dłuższy czas przechowywania powoduje zwiększenie zawartości

wody. Występowanie piku wody (HDO) pogarsza jedynie jakość widm NMR. Zawartość wody w rozpuszczalniku można znacznie zmniejszyć za pomocą środka suszącego i sączenia lub przechowywać rozpuszczalnik nad sitami molekularnymi.

Wybór rozpuszczalnika w przypadku konkretnej próbki powinien być najlepszym kompromisem między różnymi ich zaletami i wadami. Dokładny opis poszczególnych rozpuszczalników można znaleźć w Internecie.

7.2 Probówka 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 **pasmboczných wskutek obracania**. Są to sygnały (piki) fałszywe wynikające z modulacji pola magnetycznego z częstotliwością obrotu. Piki te zawsze występują po obu stronach każdego piku rzeczywistego w odległości równej prędkości obrotowej. Natężenie pasmboczných jest proporcjonalne do natężenia piku rzeczywistego. W związku z tym, jeśli prędkość obrotowa wynosi 20 obrotów na sekundę (= 20 Hz), należy szukać pasmboczných 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
----	-------------------------------------	----	--

Występowania 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).

Próbki na próbki muszą być czyste i wolne od brudu i zarysowań. Nie wolno szorować próbek za pomocą szczotek do próbek. Nie należy zakładać, że nowe próbki do NMR są czyste. Probówki można oczyścić przepłukując acetonem lub wodą destylowaną. Można zastosować płynny detergent, jednak w ciągu kilku minut należy próbkę wypłukać, aby nie nastąpiło zarysowanie jej powierzchni. Probówki można ponadto czyścić ultradźwiękowo w odpowiednim roztworze. Jeśli wszystkie powyższe metody zawiodą, próbki 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 próbkę filtrowany azot.

7.3 Postępowanie z próbką

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



Uwaga: Należy pamiętać o konieczności trzymania próbki na próbkę zawsze za górną część.

Typowe postępowanie przy przygotowywaniu próbki (przykład):

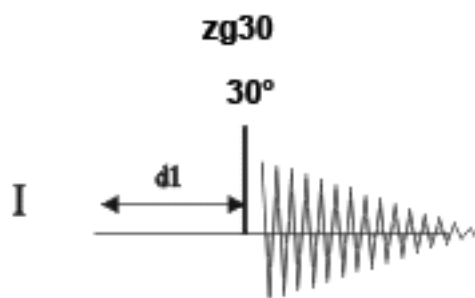
1. W przypadku próbki stałej i próbki 5 mm należy rozpuścić maksymalnie 20 mg próbki w około 0,6 cm³ wybranego rozpuszczalnika (w przypadku próbek 10 mm rozpuścić 80 mg w 2,5 cm³). Typowo w przypadku próbki ciekłej i rejestracji sygnałów protonów rozpuścić 20% próbki w 80% rozpuszczalnika deuterowanego.
2. Dodać niewielką ilość (~0,1%) związku odniesienia - tetrametylosilanu (TMS). Sprawdzić, czy sygnał TMS jest mniejszy od sygnału próbki lub rozpuszczalnika o największym natężeniu (w przeciwnym razie zmniejszyć się stosunek sygnału do szumu wskutek niskiego wzmocnienia odbiornika).
3. Przefiltrować roztwór do próbki na próbkę przez pipetę Pasteura z małym korkiem z chusteczki Kimwipe.
4. Przefiltrować 0,2 cm³ rozpuszczalnika przez filtr do próbki. Otrzymany roztwór powinien sięgać do wysokości 3 do 4 centymetrów.
5. Zamknąć próbkę korkiem, u góry zabezpieczyć folią parafilm i opisać próbkę w części górnej. Należy pamiętać, że zatyczka, folia parafilm oraz etykieta powinny być koncentryczne, w przeciwnym wypadku będą zakłócały obrót próbki.



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

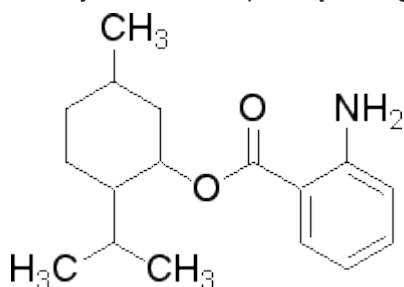
8 Widmo protonowe

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.

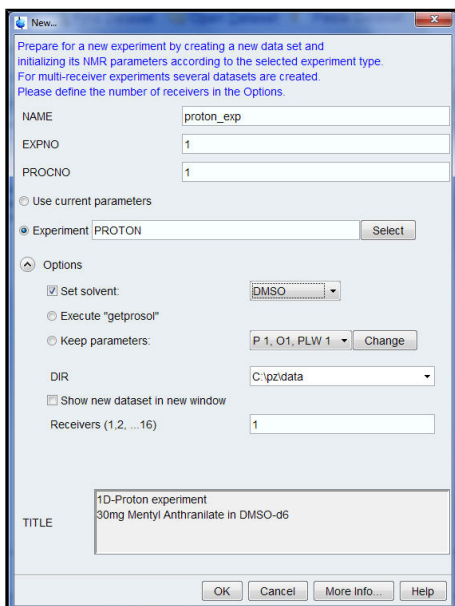
Należy zastosować próbkę **30 mg antranilanu mentylu w DMSO- d_6** .



8.1 Rejestracja widma protonowego

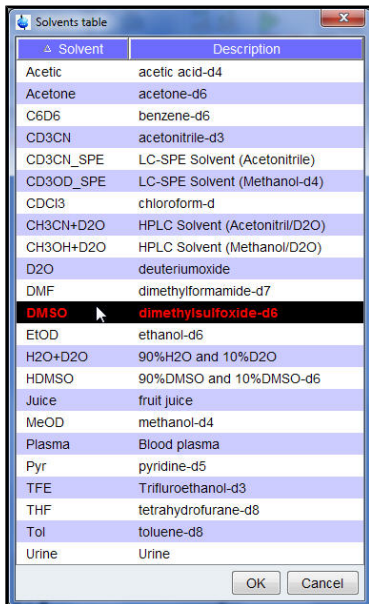
Podstawowe czynności opisano w rozdziale **Podstawowe procedury**. Są one następujące:

1. Utworzenie nowego zbioru danych.



Uwaga: Katalog (DIR) zależy od lokalizacji zapisanych danych, dlatego użytkownik może wiedzieć inne nazwy niż podane na rysunku powyżej. Należy kliknąć strzałkę w dół i odszukać odpowiedni katalog.

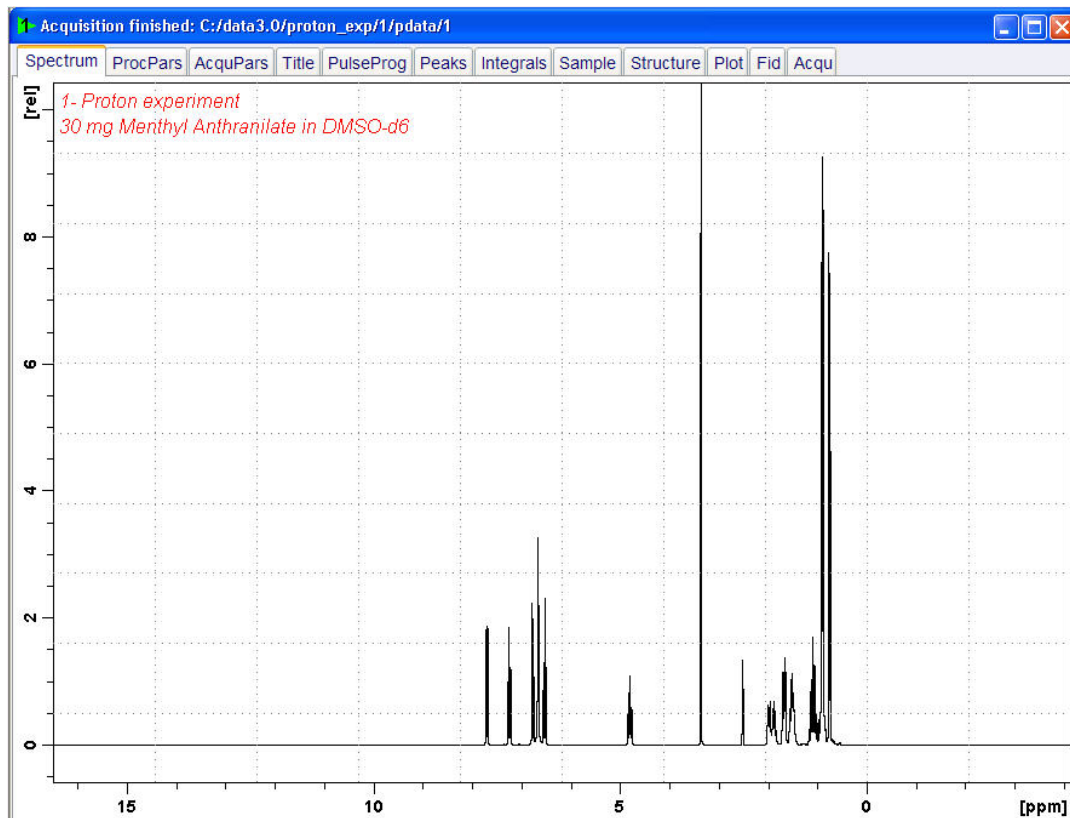
2. Przygotowanie próbeki.
3. Wprowadzenie próbki z elementem obrotowym do magnesu.
4. Blokowanie próbki.



Uwaga: Na liście rozpuszczalników wybrać **DMSO**.

5. Strojenie i dopasowanie sondy.
6. Obracanie próbki.
7. Kompensacja (shim).

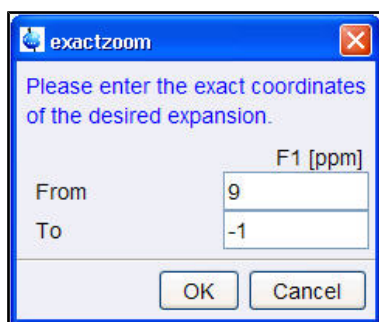
- Ustawienie parametrów zależnych od sondy i rozpuszczalnika.
- Regulacja wzmocnienia odbiornika.
- Uruchomienie rejestracji.
- Przetwarzanie danych.



8.1.1 Optymalizacja szerokości przemieszczenia

Optymalizacja szerokości przemieszczenia pozwala uzyskać lepszą rozdzielczość i rozdzielanie pików w widmie protonowym.

- Kliknąć ikonę **ppm (Exact zoom)** na pasku narzędzi.

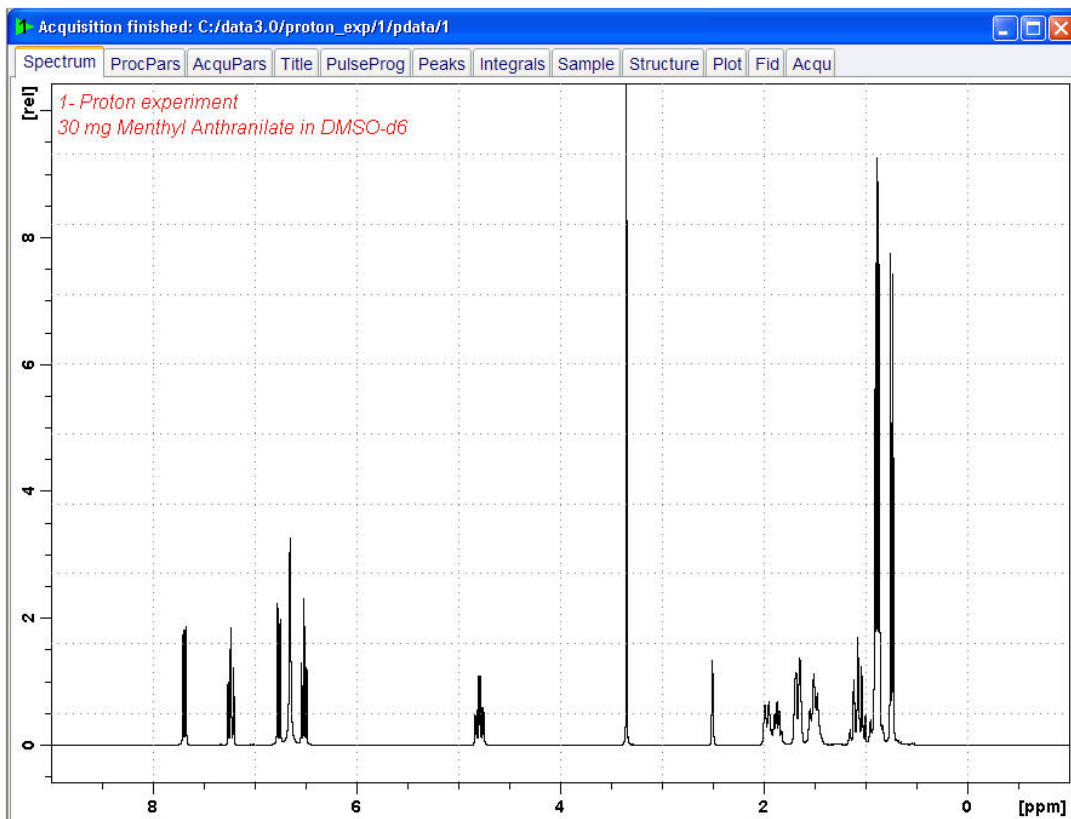


- Wpisać następujące wartości F1 [ppm]:

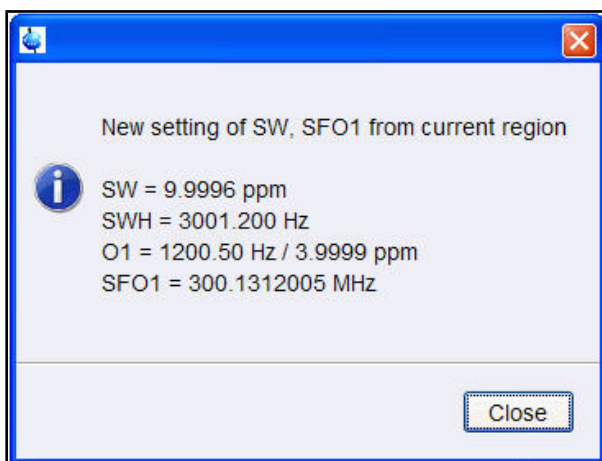
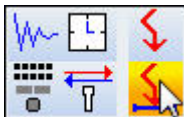
Od = 9

Do = -1

Kliknąć przycisk **OK** w oknie "Exactzoom".



Kliknąć ikonę **Set SW to current region, and SFO1 to center of region** na pasku narzędzi.



5. Kliknąć przycisk **Close** [Zamknij] w oknie "New setting of SW".

6. Kliknąć ikonę **Start acquisition** [Rozpocznij rejestrację] na pasku narzędzi.



Kliknąć zakładkę **Process** na pasku menu czynności.



Kliknąć przycisk **Proc. Spectrum** na pasku klawiszy czynności.

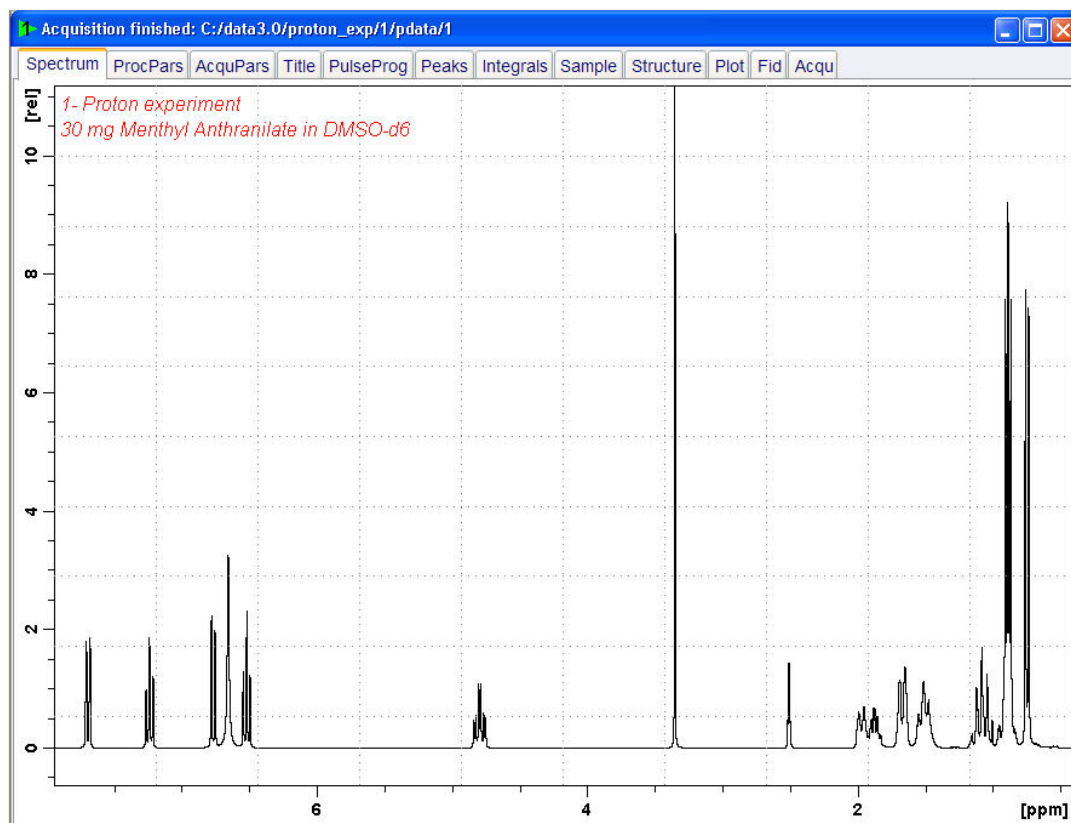


Uwaga: W ten sposób zastosowane zostają zapisane parametry przetwarzania w oknie proc1d.

8.2 Całkowanie

W celu analizy ilościowej zarejestrowanego sygnału protonu porównuje się ze sobą scałkowane natężenia pików. Często wykonuje się całkowanie widma protonowego, aby uwzględnić liczbę protonów w analizowanej cząsteczce.

1. Rozszerzyć widmo, aby obejmowało wszystkie piki.



2. Kliknąć przycisk **Integrate** [Całkowanie] na pasku klawiszy czynności.

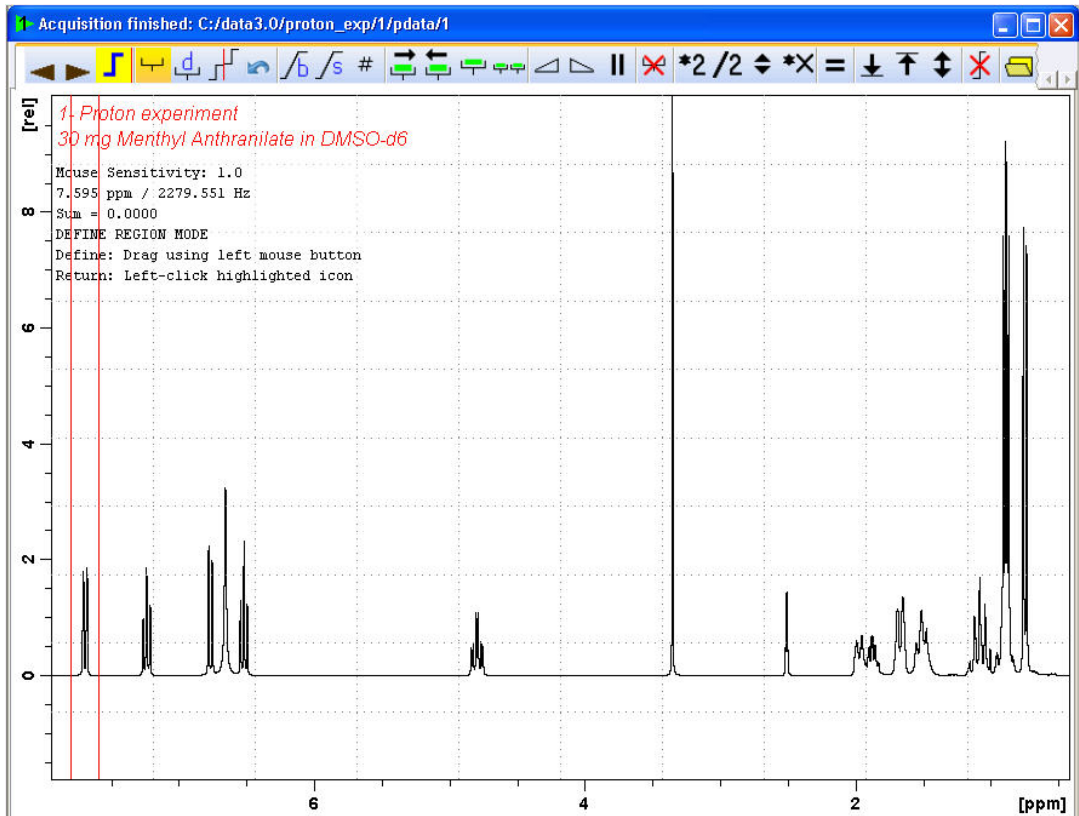


Uwaga: W ten sposób uruchamia się tryb całkowania ręcznego. Inne opcje są dostępne po kliknięciu strzałki w dół na przycisku Integrate.

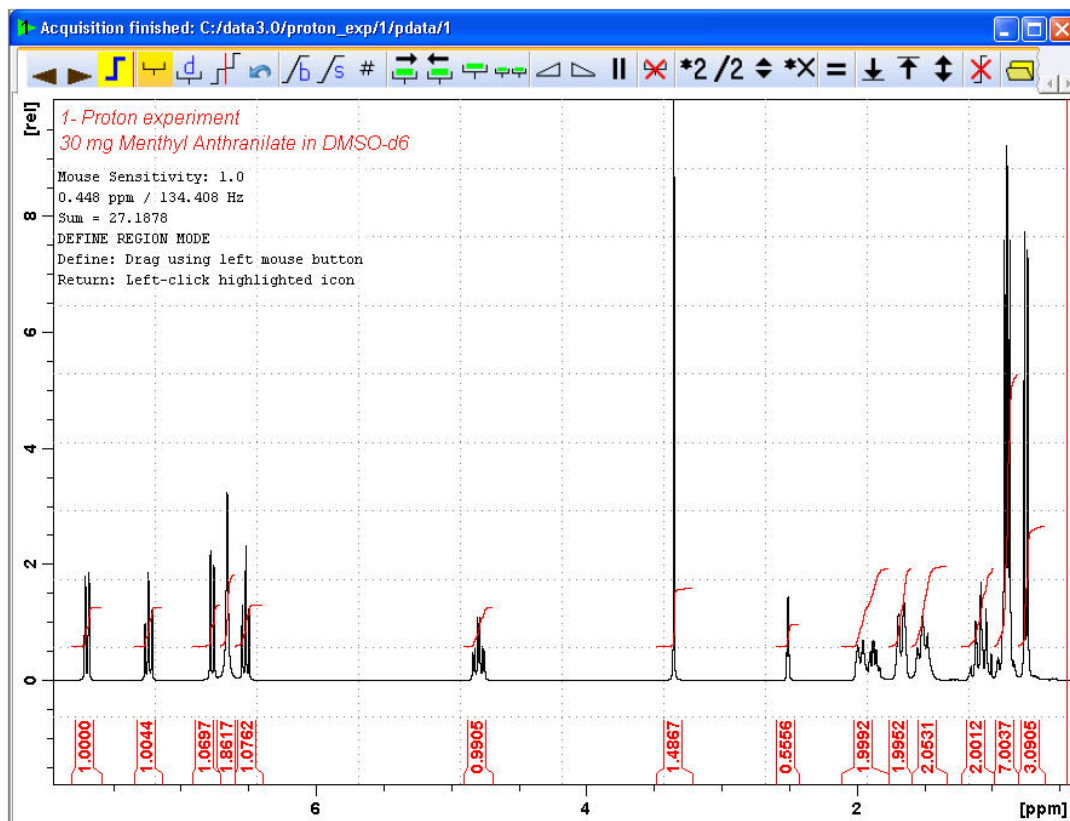
Zamiast zakładek **Data Set** pojawia się pasek **narzędzi całkowania**:



3. Ustawić linię kursora po lewej stronie obszaru, który chcemy powiększyć i trzymając lewy przycisk myszy przesunąć linię kursora w prawo do końca interesującego nas fragmentu widma, a następnie zwolnić przycisk.



4. Powtórzyć krok 3 w przypadku pozostałych pików.



5. Kliknąć ikonę **Return, save region** na pasku narzędzi całkowania.

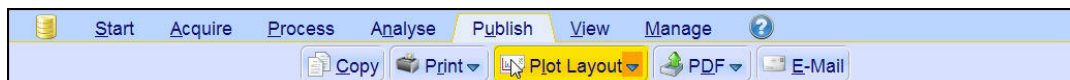


8.3 Wykreślanie widma protonowego

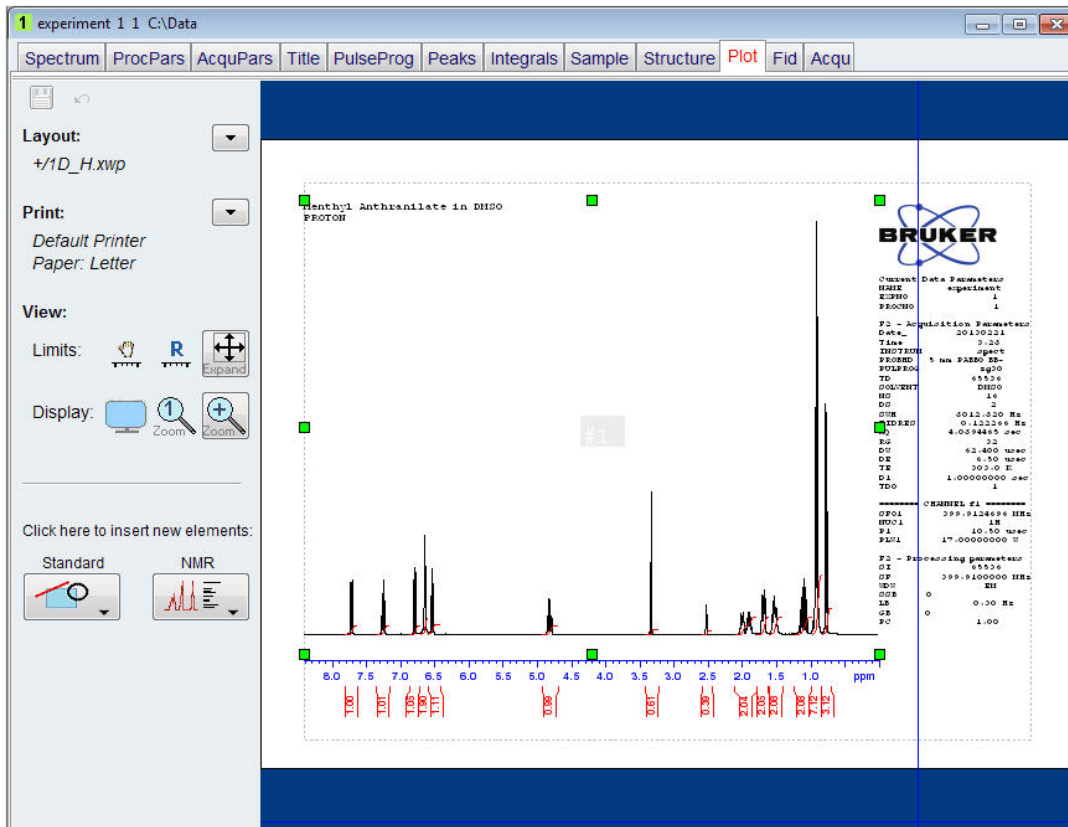
1. Rozszerzyć widmo, aby obejmowało wszystkie piki.
2. Kliknąć ikonę **Retain expansion and scale** na pasku narzędzi.



3. Kliknąć zakładkę **Publish** na pasku zakładki czynności.

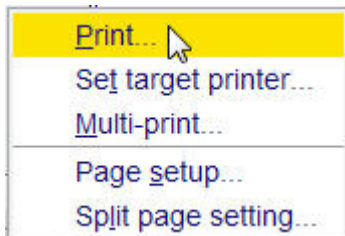


4. Kliknąć przycisk **Plot Layout** [Wykreśl widmo] na pasku przycisków czynności.



Uwaga: W razie potrzeby za pomocą narzędzi z lewej strony ekranu można wprowadzić zmiany.

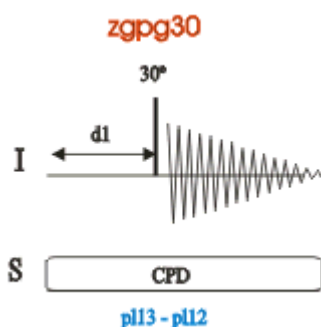
5. Kliknąć **strzałkę w dół** w polu **Print** [Drukuj] okna wykreślenia widma.



6. Kliknąć **Print**.

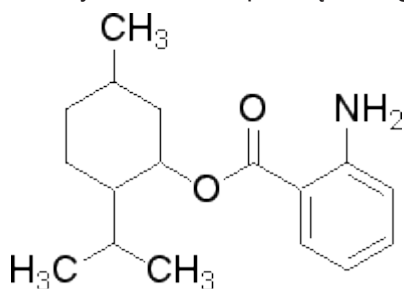
9 Widmo ^{13}C z rozprężaniem protonów

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

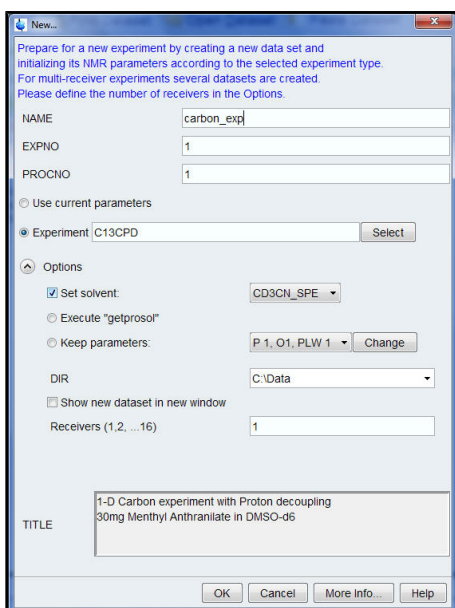
Należy zastosować próbkę **30 mg antranilanu mentylu** w DMSO-d_6 .



9.1 Rejestracja widma ¹³C

Podstawowe czynności opisano w rozdziale Podstawowe procedury.

1. Tworzenie nowego zbioru danych.

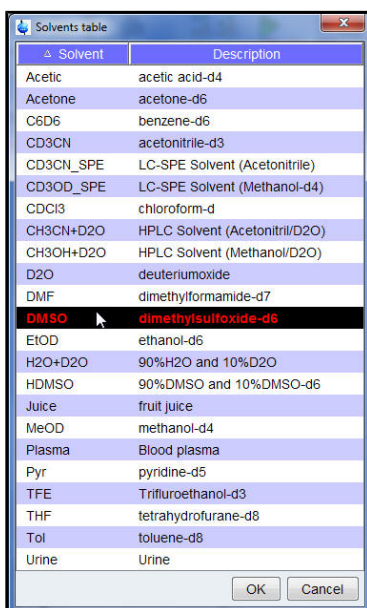


Uwaga: Katalog (DIR) zależy od lokalizacji zapisanych danych, dlatego użytkownik może wiedzieć inne nazwy niż podane na rysunku powyżej. Należy kliknąć strzałkę w dół i odszukać odpowiedni katalog.

2. Przygotowanie próbeki.

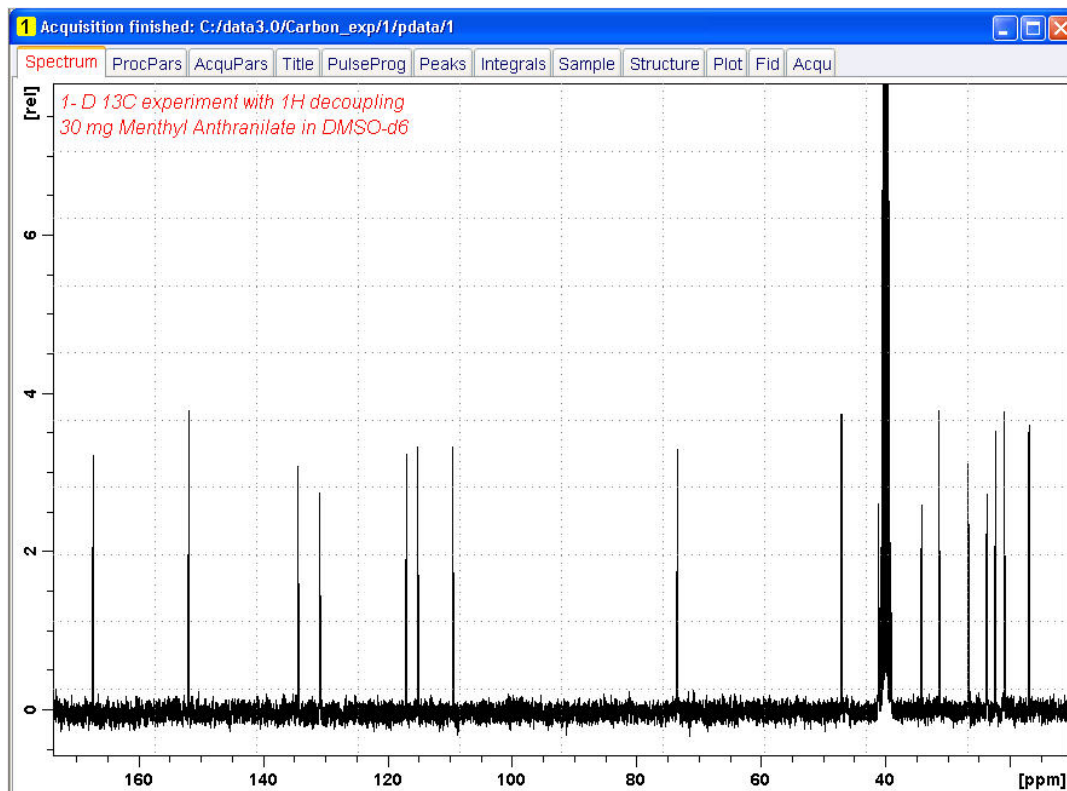
3. Wprowadzenie próbki z elementem obrotowym do magnesu.

4. Lockowanie próbki.



Uwaga: Na liście rozpuszczalników wybrać DMSO.

5. Strojenie i dopasowanie sondy.
6. Obracanie próbki.
7. Kompensacja.
8. Ustawienie parametrów zależnych od sondy i rozpuszczalnika.
9. Regulacja wzmacnienia odbiornika.
10. Uruchomienie rejestracji.
11. Przetwarzanie danych.



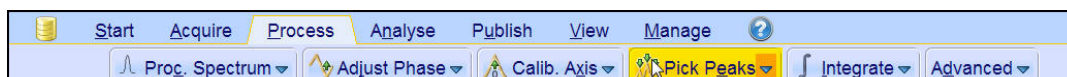
Zobacz również

Procedury podstawowe [► 37]

9.2 Wybieranie pików

W celu analizy zarejestrowanego widma węglowego porównuje się ze sobą wartości przesunięcia chemicznego pików. Wybieranie pików przeprowadza się często w widmie węglowym z rozprężaniem protonów, aby uwzględnić poszczególne atomy węgla w analizowanej cząsteczce.

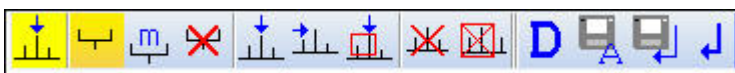
1. Rozszerzyć widmo, aby obejmowało wszystkie piki.
2. Kliknąć przycisk **Pick Peaks** [Wybierz piki] na pasku klawiszy czynności.



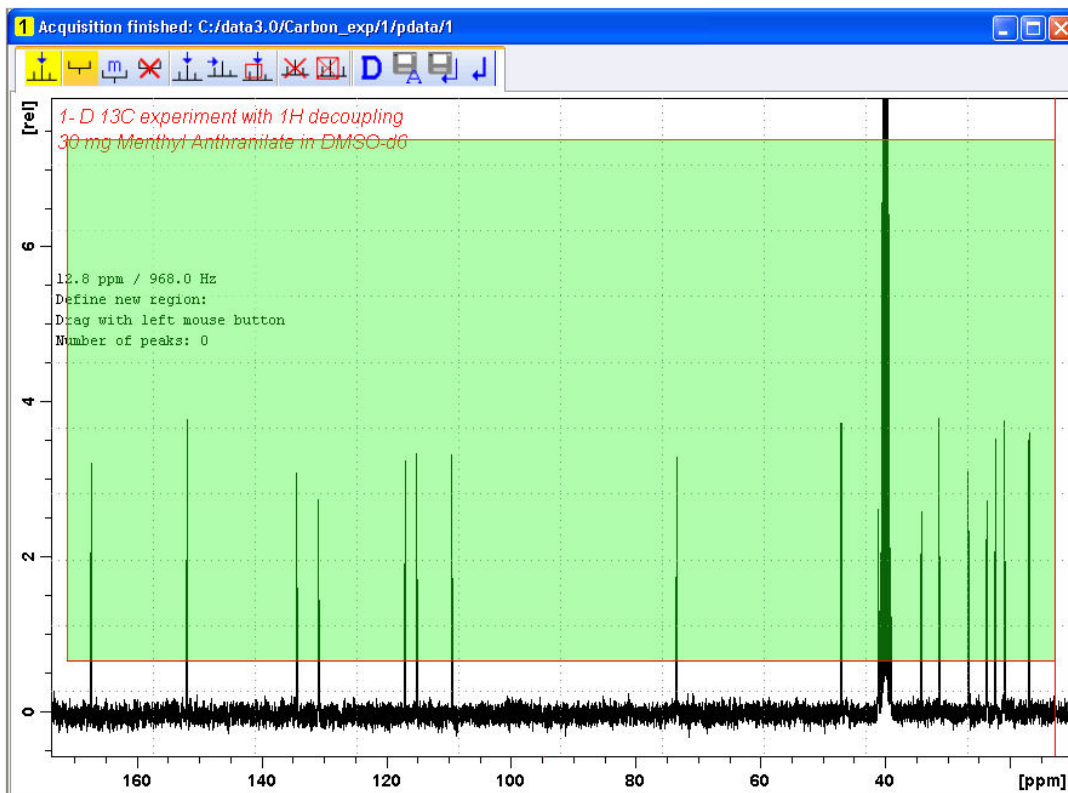
Uwaga: W ten sposób uruchamia się tryb ręcznego wyboru pików. Inne opcje są dostępne po kliknięciu strzałki w dół na przycisku **Pick Peaks**.

Widmo ^{13}C z rozprężaniem protonów

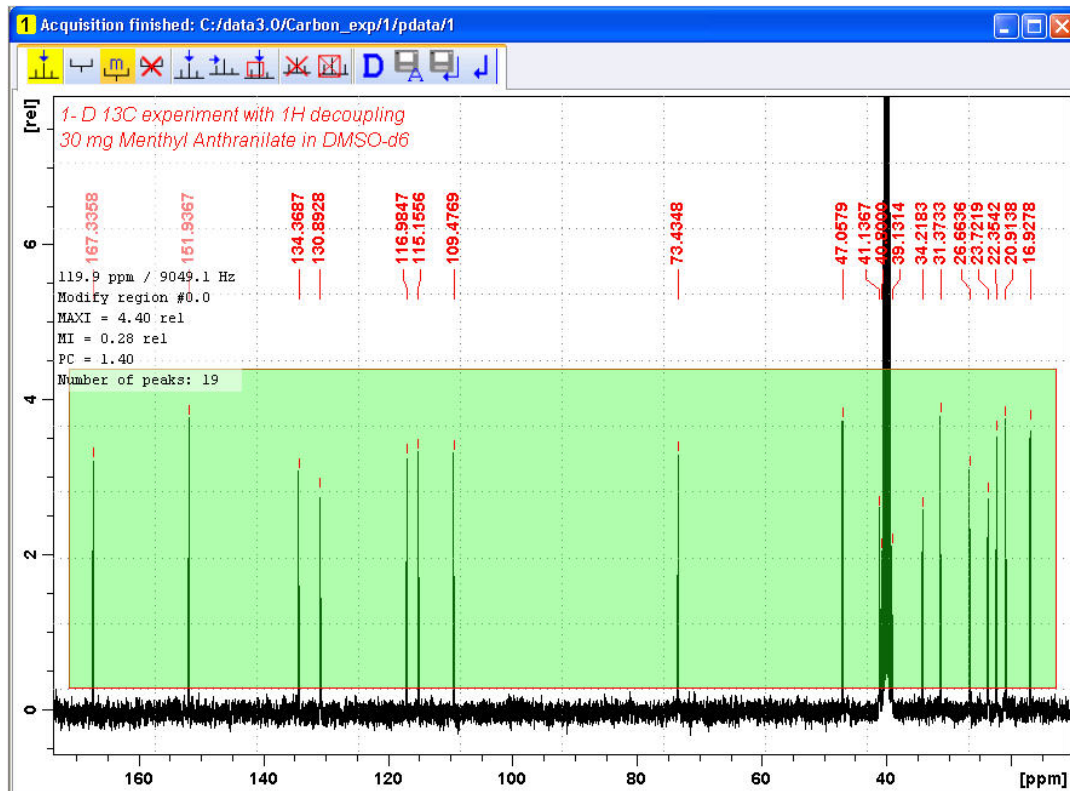
Zamiast zakładki **Data Set** pojawia się pasek narzędzia wyboru pików:



3. Rozpocząć od górnego lewego rogu okna widma i nacisnąć lewy przycisk myszy. Przesunąć linię kursora od lewej do prawej strony widma i wykreślić prostokąt obejmujący wszystkie piki.



4. Kliknąć ikonę **Modify existing peak picking range** na pasku narzędzia wyboru pików.

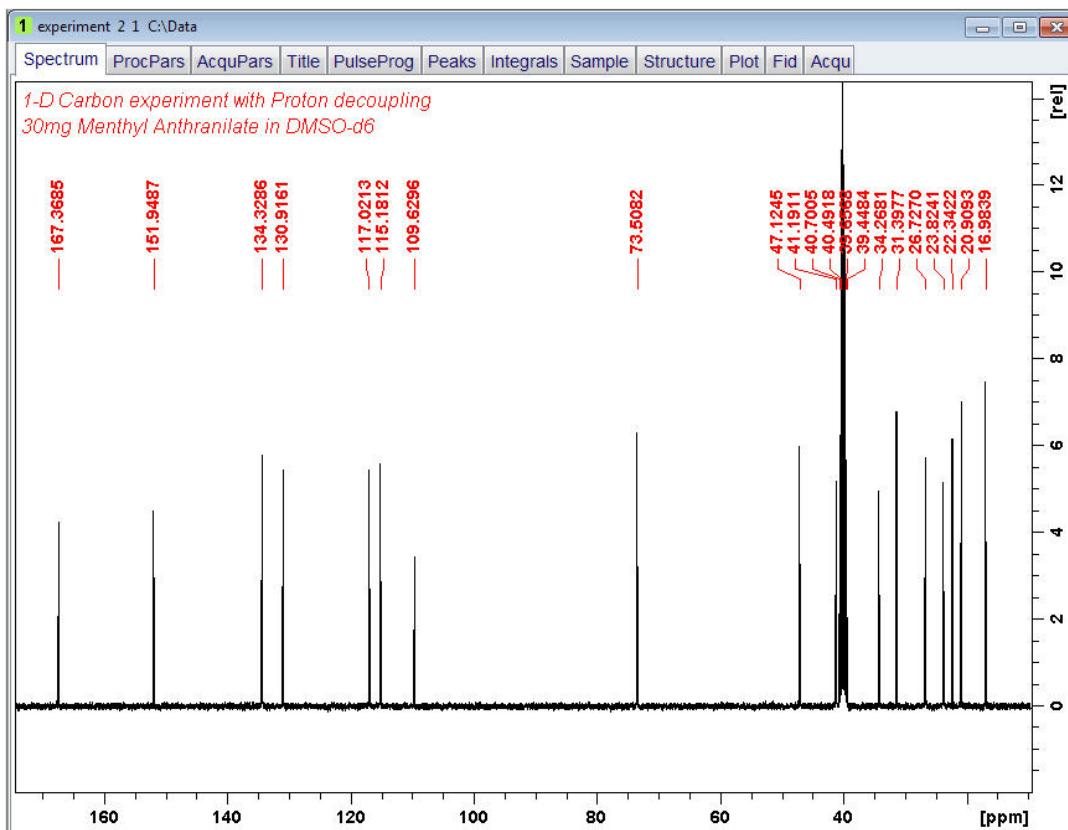


5. Kliknąć dolną krawędź zaznaczonego prostokąta lewym przyciskiem myszy i przeciągnąć ją powyżej poziomu szumu, aby ustawić minimalny poziom wyboru pików.

6. Kliknąć górną krawędź zaznaczonego prostokąta lewym przyciskiem myszy i przeciągnąć ją poniżej pików niepożądanych, np. pików rozpuszczalnika, aby ustawić maksymalny poziom wyboru pików.

7. Kliknąć ikonę **Return, save region** na pasku narzędzi wyboru pików.





9.3 Wykreślanie widma ^{13}C

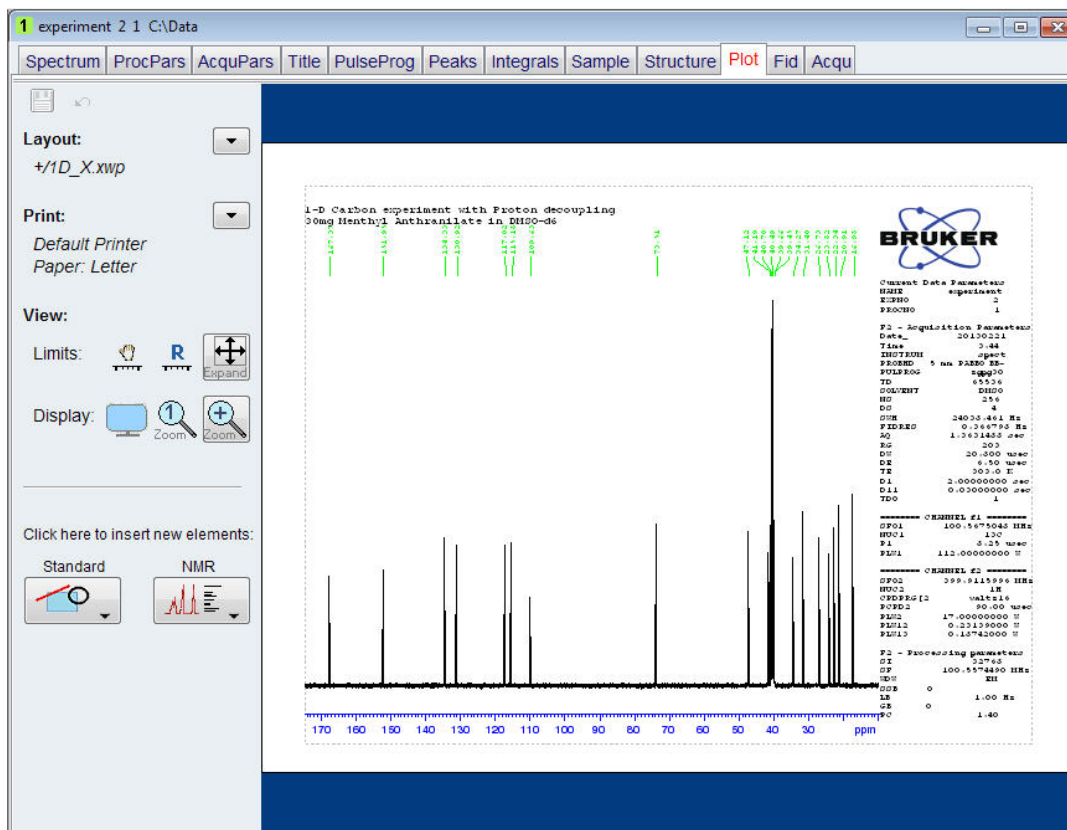
1. Rozszerzyć widmo, aby obejmowało wszystkie piki.
2. Kliknąć ikonę **Retain expansion and scale** na pasku narzędzi.



3. Kliknąć zakładkę **Publish** na pasku zakładki czynności.

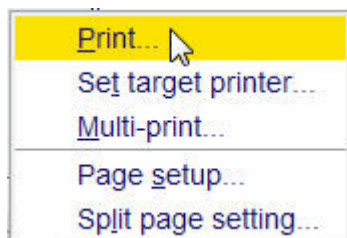


4. Kliknąć przycisk **Plot Layout** [Wykreśl widmo] na pasku klawiszy czynności.



Uwaga: W razie potrzeby za pomocą narzędzi z lewej strony ekranu można wprowadzić zmiany.

5. Kliknąć **strzałkę w dół** w polu **Print** [Drukuj] okna wykreślania widma.



6. Kliknąć Print.

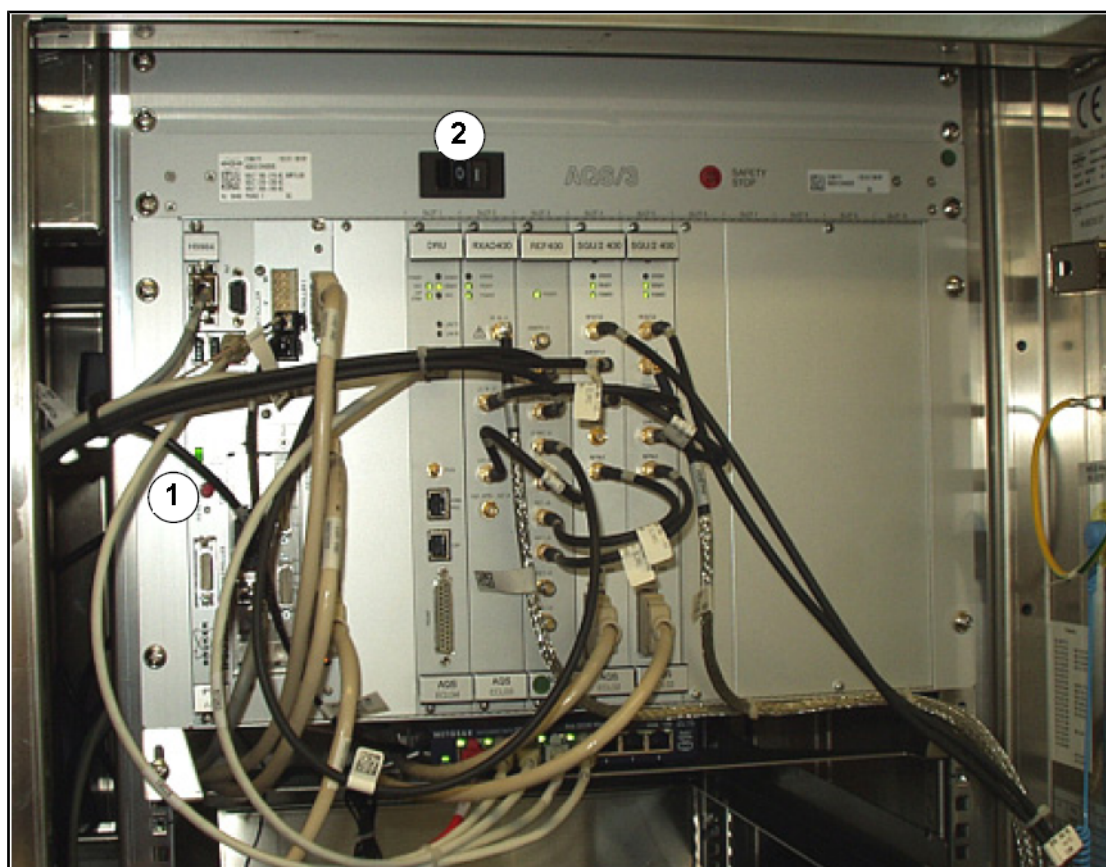
10 Podstawowe informacje dotyczące rozwiązywania problemów

Nie jest możliwe, aby w instrukcjach dla początkujących użytkowników omawiać zaawansowane metody rozwiązywania problemów. Wszyscy użytkownicy powinni jednak co najmniej umieć włączać i wyłączać zasilanie systemu.

W przypadku systemu komputerowego także należy umieć to zrobić, ponieważ komputer PC steruje serwerem DHCP odpowiedzialnym za adresy sieciowe i większość płyt oraz bezdyskowym systemem operacyjnym do modułu IPSO.

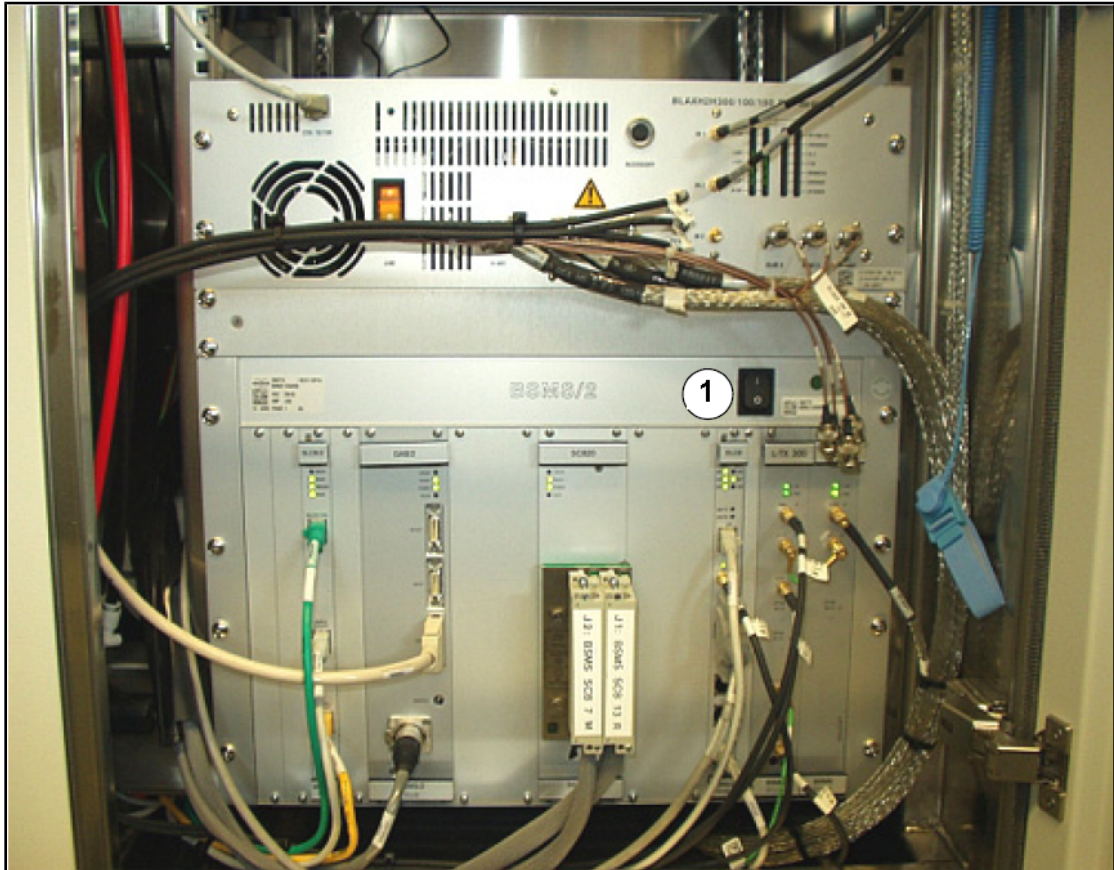


Uwaga: Osoba zarządzająca systemem powinna pokazać wszystkim użytkownikom procedurę włączania i wyłączania zasilania systemu.



Rysunek 10.1: Położenie wyłączników sieciowych w modułach AQS i IPSO

1.	Wyłącznik sieciowy modułu IPSO	2.	Wyłącznik sieciowy modułu AQS
----	--------------------------------	----	-------------------------------



Rysunek 10.2: Położenie wyłącznika głównego BSMS

1.	Wyłącznik sieciowy BSMS		
----	-------------------------	--	--

11 Kontakt

Producent:

Bruker BioSpin NMR
am Silberstreifen
D-76287 Rheinstetten
Niemcy
Telefon: +49 721-5161-0
<http://www.bruker-biospin.com>

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-biospin.com/hotlines_nmr.html

Rysunki

Rysunek 3.1	Wzbudzenie i odpowiedź	9
Rysunek 3.2	Widmo NMR	11
Rysunek 3.3	Analiza NMR CHCl ₃	12
Rysunek 3.4	Sygnaly MRJ emitowane przez CHCl ₃	12
Rysunek 3.5	Przeliczanie wartości w hercach i ppm	14
Rysunek 3.6	Przesunięcia chemiczne ¹ H w związkach organicznych	15
Rysunek 3.7	Pierścień benzenowy	16
Rysunek 3.8	Widmo benzenu	17
Rysunek 3.9	Octan benzylu	17
Rysunek 3.10	Widmo protonowe octanu benzylu	18
Rysunek 3.11	Etylobenzen	19
Rysunek 3.12	Widmo etylobenzenu.....	20
Rysunek 3.13	Eksperyment z rozprężaniem.....	21
Rysunek 3.14	Widmo etylobenzenu z rozprężaniem homojądrowym.....	22
Rysunek 3.15	Transformacja Fouriera	23
Rysunek 4.1	Magnes, konsola operatora i konsola	25
Rysunek 4.2	Przegląd architektury systemu AVANCE	26
Rysunek 4.3	Fotografia magnesu, układu kompensacyjnego, sondy i HPPR	28
Rysunek 4.4	Magnes nadprzewodzący	30
Rysunek 4.5	Próbka w sondzie.....	32
Rysunek 4.6	Typowy schemat przewodów do przedwzmacniacza HPPR	33
Rysunek 4.7	Przykład sondy szerokopasmowej	34
Rysunek 5.1	Okno programu TopSpin.....	37
Rysunek 5.2	Wyświetlanie zablokowane po locku próbki	42
Rysunek 5.3	Okno strojenia/dopasowywania sondy ATMM	44
Rysunek 5.4	Przykłady krzywych kołysania przy różnych parametrach strojenia i dopasowywania .	45
Rysunek 6.1	Widmo przy BF1 = 600,13 MHz, O1 = 0 Hz.....	50
Rysunek 6.2	Widmo przy BF1 = 600,13 MHz, O1 = 8 kHz.....	51
Rysunek 6.3	Widmo przy BF1 = 600,13 MHz, O1 = 8 kHz, SWH = 8,4 kHz	51
Rysunek 6.4	Zależności między SFO1, BF1 i O1	52
Rysunek 7.1	Widmo, na którym pokazano pasma boczne powstałe w wyniku obracania.....	54
Rysunek 10.1	Położenie wyłączników sieciowych w modułach AQS i IPSO	73
Rysunek 10.2	Położenie wyłącznika głównego BSMS	74

Tabele

Tabela 3.1	Tabela z danymi dla różnych izotopów (częstotliwości dotyczą magnezu o indukcji 11,7 T).....	9
Tabela 3.2	Zmiany częstotliwości (dotyczą magnezu o indukcji 11,7 T).....	10

Słowniczek

BSMS

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

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.

HPPR

High Performance Preamplifier - przedwzmacniacze dużej wydajności

IPSO

Intelligent Pulse Sequence Organizer

ppm

parts per million

przesunięcie chemiczne

Zmiana precyzyjnej częstotliwości rezonansowej.

VTU

Variable Temperature Unit

Indeks

A

Aktywne dla MRJ.....	11
Azot	
Ciekły azot.....	7

B

Bezpieczeństwo.....	7
Chemiczne	8
Pola magnetyczne	7
Bezpieczeństwo chemiczne	8
Bezpieczeństwo elektryczne	8
BF	49
Blokada fluoru.....	31
Blokowanie próbki	31
BSMS	26, 27

C

CE	
Deklaracja zgodności	8
Cewka	32
Cewka rejestracyjna	
Sondy	33
Cewki częstotliwości radiowej	32
Ciało stałe.....	53
Częstotliwości bezwzględne.....	13
Częstotliwości rezonansowe	9
Częstotliwość.....	10
Częstotliwość nośna	11
Częstotliwość rezonansowa	34
Czujnika poziomego helu	31
Czułość.....	13

D

Deklaracja zgodności	8
DIR	38
Dopasowywanie	45

E

edlock	41
Ekranowanie magnetyczne	10
Elektromagnesy.....	29
EXPNO	38

F

FID	
Definicja.....	23

H

Hel	
Ciekły hel	7
HPPR.....	27, 28, 31
HPPR/2.....	28
Hz	
Konwersja.....	14

I

Impulsy odsprężania.....	21
Intelligent Pulse Sequence Organizer	26
Intensywność.....	10
sygnału	11
IPSO	26, 73
Izotopy	11
Izotyp	
Podstawowa częstotliwość rezonansowa	9

J

Jądro obserwacji.....	11
Jednorodność pola	46

K

Kompensacja.....	46
Kompensacji	27
Komputer host	26
Konsola.....	25
Konsola operatora	25, 26
Kwartet	19

L

Linia transferu N2	34
--------------------------	----

M

Magnes.....	27
Bezpieczeństwo	7
Opis systemu.....	29
Magnesy nadprzewodzące.....	29
Metalowe implanty	7
moduł sterowania temperaturą VTU.....	26, 34
Multiplety	19

N

Nadajniki.....	27
NAME	38

O

Obrót.....	54
Odsprężanie heterojądrowe	22

P

Parametr SFO1	11
Pasm bocznych	
Intensywność wstęp bocznych	54
Pasm bocznych wskutek obracania	54
Pola rozproszonego.....	7
Połączenie Ethernet	26
ppm.....	13
Probówki.....	55
PROCNO.....	38
Próbek ciekłych	53
Przedwmacniacze	32
przekazują sygnał o częstotliwości radiowej	27
Przesunięcie chemiczne.....	15
Punktów danych SI.....	48

R

Rdzeń magnesu	29
Rozdzielczość pozioma widma.....	13
Rozdzielczość widmowa.....	46
Rozpuszczalnik deuterowany	31
Rozpuszczalnika	
Czynniki podczas wyboru	53
Rozpuszczalnikach organicznych.....	53
Rozpuszczalniki	
Lepkość	53
Rozpuszczalność	53
Zależność temperaturowa	53
Zawartość wody	53
Rozpuszczalniki deuterowane	53
Rozruszniki serca	7
Równoważny chemicznie	16

S

Selektywne	
Sondy	32
Serwer DHCP	73
SFO1	49
Siła sygnału	
intensywności	11
Singlet.....	21
Singlety	12
Sonda	32
Zmiana sondy	35
Sondy	
Cewka rejestracyjna	33
ogrzewacz	34
Selektywne	32
Sonya	
Szerokie pasmo.....	33
sprężenie spinowo-spinowe	
wpływ.....	21
Strojenie	45
Symetrię probówki	55
System blokowania	
Cel	31
Odbiornik	32
Szerokie pasmo	
Cewka	33

T

TD.....	48
TopShim	46
Transformację Fouriera	48
Tryplet.....	19

U

Układ magnesu.....	25
Układ kompensacyjny (shimów).....	27

V

VTU	26, 34
-----------	--------

W

Widma protonowe.....	15
Wzmacniacze	27
Selektywne	27
szerokopasmowe	27

Z

Zanieczyszczeń	53
Zanieczyszczeń magnetycznych	53
Zawartość w naturalnym pierwiastku.....	12
Zbiorze danych	38
Zgaszenie magnezu	7





Bruker Corporation

info@bruker.com
www.bruker.com

Order No: Z31633PL