

DOSY (revised at 2022.01.26)


1. Sample 준비

- A. 선택할 수 있다면 되도록 Viscous 한 solvent 를 선택한다.
 - i. Viscosity(mPa*s)
 - 1. **DMSO(1.99) / D2O(0.89)**. Benzne (0.60)
 - 2. Chloroform(0.54), THF(0.46) / Acetonitrile(0.35) / Acetone (0.31)
- B. NMR tube 는 일반적인 5mm NMR tube 를 사용한다.
 - i. Convection 이 우려될 때는 3mm tube 사용할 것
 - 1. 이경우 5mm → 3mm adapter 를 구입해야 함.
 - ii. Convection 이 우려될 때는 Shigemi tube 를 사용하여도 됨
- C. 기본적으로는 spin off. 권장.

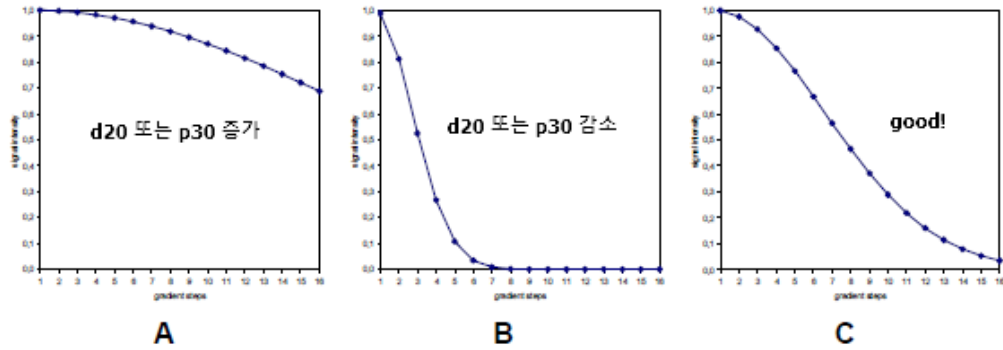
2. 실험 과정

//명령어로 입력하는 경우에는 *italic* 으로 표시하였음//

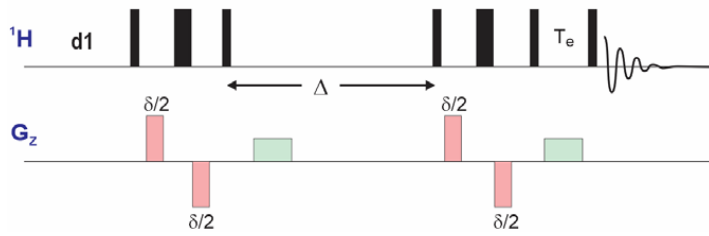
- A. 시료를 넣고 lock / tune / shim 을 한다. (*lock / atma / topshim*)
 - B. 1D proton 스펙트럼 획득
 - i. 1D proton NMR 을 찍는다.
 - ii. 관심있는 peak 들의 S/N 을 확인하다.(*sino*) [권장 : S/N >200:1]
 - C. peak 들의 T1 값을 확인한다.
 - i. Inversion recovery 실험 혹은 null method 로 측정 가능
 - ii. 측정하지 않았을 경우에는 D1 을 20~60 초로 설정 (1H DOSY 의 경우)
 - D. DOSY 1D 을 이용하여 dosy parameter 들을 설정
 - i. 1D DOSY 스펙트럼 (starting point)
 - 1. 새로운 폴더를 만든다.
 - 2. Experiment 에서 'dosy1d.led'를 선택한다.
 - 실험핵종에 따라 experiment 선택을 다르게 해야 함
 - KAIST 외에서는 *PULPROG* 를 'ledbpgp2s1d'로 설정후 사용
3. 다음 패러미터들을 수정한다.
- A. *GPZ6*[%] = 2
 - i. *GPZ6*[%]는 2~5 정도로 변경가능
 - B. *D20*[s] : 0.1 s
 - i. Stejskal-Tanner diffusion delay : Spin-echo
 - ii. 0.05~0.5(s)로 설정가능 [권장 : 0.05s(작은크기), 0.1s(고분자)]
 - C. *P30*[us] : 1800 us
 - i. Gradient duration

- ii. 500 ~ 3000us 사이에서 설정할 것 (3000us 이상은 절대 사용금지)
 - D. $D1 : 2 \sim 5s$
 - i. P30 과 D20 의 조정이 우선이므로 일단 작은 값을 사용한다.
 - E. $P30/(d1+aq) < 0.05$ 이어야 probe 가 고장나지 않음
 - i. 단위는 모두 s 로 계산할 것
 - ii. 예 > $0.0018 / (2+1) \rightarrow 0.006$ is fine
 - iii. $G_dutycycle(8*p30+3*p19)/(d1+d20+8*p30+3*p19+d21+aq) < 0.05$
 - F. NS 는 8 의 배수로 설정한다. (권장 : 8)
 - G. Receiver gain 을 계산한다. *rga*
 - H. 실험을 시작한다. *zg*
 - I. 스펙트럼을 확인한다. *efp* \rightarrow *apk* \rightarrow *absn*
- ii. 1D DOSY 스펙트럼 (end point)
1. 위의 실험(starting point)의 실험을 복사한다. *iexpno*
 2. $GPZ6[\%] = 95$ 로 변경한다.
 - A. 80~95%까지 변경 가능
 3. 실험을 시작한다. *zg* // 주의사항 : *rga* 는 하지 말 것
 4. 스펙트럼을 확인한다. *efp* \rightarrow *apk* \rightarrow *absn*
- iii. Starting point 와 end point 의 스펙트럼들을 겹쳐서 비교
1. End point 실험 폴더에서 비교 아이콘  클릭한다. *.md*
 2. Starting 번 실험을 브라우저에서 drag 하여 스펙트럼 화면으로 drop 한다.
 3. 두개의 스펙트럼의 intensity 차이가 20~50 배 정도 차이가 나면 OK
 - A. 관심있는 peak 를 비슷하게 높이를 맞췄을 때의 scale 로 가늠
 - i. 20~50 배(AVHD400,AS400), 20~100 배(AVNEO400, AV500)면 적당
 - B. Scale 이 적당하지 않으면 아래와 같이 조정하여 다시 반복실험
 - i. Scale 이 20 배미만이면 d20 이나 p30 을 늘릴 것
 - ii. Scale 이 100 배이상일 경우에는 d20 나 p30 을 줄일 것
 - iii. 미묘하게 차이가 날 경우에는 GPZ6 를 2~5, 80~95 로 조정
 - iv. P30 은 3000us 이하여야 하므로 보통 D20 으로 먼저 조정 시도할 것

2. 그림 1 : gradient 설정 방법 (상단), pulseprogram (하단)



STE + LED + BP – BiPolar gradients



현재 가능한 핵종 (2021.01.21)

- ^1H : dosy1d.led / dosy2d.led
- ^7Li : dosy1d.led.7Li / dosy2d.led.7Li
- ^{13}C (INEPT) : dosy1d.inept.13c / dosy2d.inept.13C // quaternary carbon 은 관측불가
- ^{19}F : dosy1d.led.19F / dosy2d.led.19F // SW 설정에 주의할 것

A. 2D DOSY 스펙트럼 얻기 (pseudo2D method)

- i. 새로운 실험을 만든다.
- ii. Experiment 에서 dosy2d.led 를 선택
 1. 위는 1H 실험으로, 다른 핵종은 그에 맞는 실험을 고르면 됨
 2. KAIST 외에서는 기본 라이브러리의 DOSY 를 선택
- iii. TD [F1]을 16 으로 설정
 1. Fitting 할 때 충분한 point 를 확보하기 위해서는 16 이상 권장
 2. 분자량이 다양한 물질이 섞여 있는 경우에는 더 큰 TD(F1)을 설정
 3. 다만, TD[F1]이 클수록 시간은 정비례로 증가함
- iv. NS와 DS를 설정 (보통 NS 8; DS 4). NS 는 8 의 배수
- v. D1 : 20 ~ 60 s
 1. T1 값을 측정했을 경우에는 max T1 의 3~5 배로 설정
 2. 모를 경우에는 30s 이상으로 권장 (1H DOSY)
- vi. dosy 를 입력(각 단계에 사용할 gradient 알아서 계산해 줌)
- vii. starting point 로 설정할 gradient 비율 (예> 2)을 입력
- viii. end point 로 설정할 gradient 비율 (예> 95)을 입력
- ix. TD [F1]에 설정한 값 (예>16)을 입력
- x. L 을 입력 (linear ramp)
- xi. 바로 실험을 시작하고 싶은 경우에는 OK 를 클릭
- xii. 실험에 소용되는 예상시간은 *expt* 명령어로 확인가능




ICON-NMR 에서 사용하는 방법

- A. 사용 계정에 supervisor 권한이 있어야함
- B. 실험을 dosy2d.led(혹은 DOSY)로 선택함
- C. 상단 메뉴의 parametes 탭에서 edit all acquisition paramter 를 클릭
- D. 위의 iii ~ x 까지를 실행한다.
- E. xi 스텝에서 Cancel 을 클릭한다.
- F. return to iconNMR 을 클릭하여 icon-NMR 화면으로 돌아온 후 submit 한다.

3. DOSY 스펙트럼 분석 (Topspin 3.x)




- Topspin 3.x 에서 2D view 로 보기

1. ProPars 탭을 클릭 *edp*
2. $SI[F2]$ 을 $TD[F2]$ 값의 2 배로 설정 $SI[F2] = TD[F2]*2$
3. $SI[F1]$ 은 32~ 128 정도로 설정
4. $PhMOD[F2,F1]$ 을 (pk,no) 로 설정
5. 스펙트럼의 phase 를 조정

1. *rser 1* → *absn* → phase 조정(.*ph*) →  →  → 

6. *xf2* 를 입력 // F2 축으로 FT 를 적용
7. *abs2*를 입력 // F2 축의 baseline 을 자동조정
8. *setdiffparm* 을 입력 // transfer key parameter
9. *eddosy*를 입력 // dosy plot 에 관련된 parameter 들을 조정할 수 있음
10. *dosy2d setup* // 2d 스펙트럼을 보여줄 준비작업
11. *dosy2d* // 2d 스펙트럼으로 보여줌

- Diffusion coefficient 계산

1. *xf2*로 변환후 *abs2*
2. *setdiffparm*
3. 상단 탭의 Analysis → Dynamics → T1/T2 (하단 그림 2 참조)
 1. 첫번째 아이콘을 클릭 (FID)
 - A. Spectrum 을 클릭
 - B. 1 번 슬라이스를 선택
 - C. Phase(.*ph*)를 맞추고 
 2. 두번째 아이콘을 클릭 (Peak/Ranges) → Manual integration
 - A. 분석하고자 하는 peak 영역들을 선택
 - B.  export 버튼을 누르고, export Region to Relaxation Module 을 선택
 3. 세번째 아이콘 선택(Relaxation)
 - A. Peak 가 분리가 잘되고 peak 면적이 클 경우에는 area 를 선택
 - B. Peak 가 overlap 되어있을 경우에는 Intensity 를 선택 (권장)
 4. 네번째 아이콘 클릭 (Fitting)
 - A. Close 를 클릭
 - B. FnType = 'Vargrad'를 확인하고, List the name = Difflist 인지 확인
 5. 다섯번째 아이콘 클릭 (Calculate)
 - A.  버튼으로 계산 시작




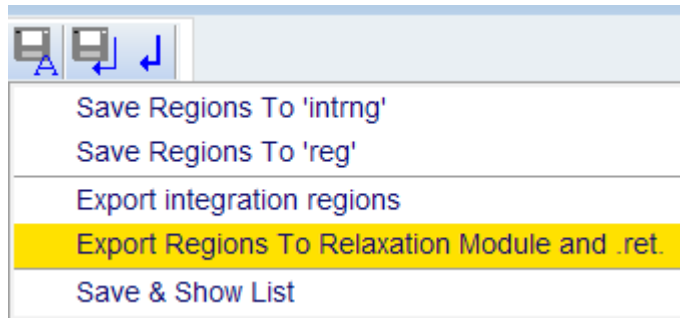
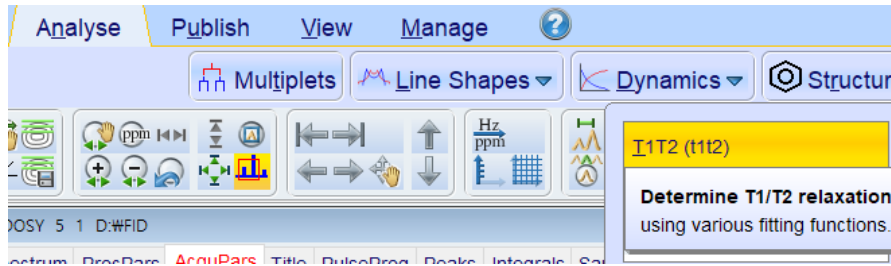
- B.  버튼으로 어떤 peak 를 보여줄 것인가 변경할 수 있음
 - C.  버튼은 안좋은 데이터포인트를 삭제할 수 있음
 - D.  버튼으로 'Calculate fitting parameters for all data'
6. 여섯번째 아이콘 클릭 (Report)



그림 2.



4. DOSY 스펙트럼 분석 (Topspin 4.x)




- Topspin 4.x 에서 2D view 로 보기

1. ProPars 탭을 클릭 *edp*
2. $SI[F2]$ 을 $TD[F2]$ 값의 2 배로 설정 $SI[F2] = TD[F2]*2$
3. $SI[F1]$ 은 32~ 128 정도로 설정
4. $PhMOD[F2,F1]$ 을 (pk,no) 로 설정
5. 스펙트럼의 phase 를 조정

1. *rser 1* → *absn* → phase 조정(*.ph*) →  →  → 2D |

6. *xf2* 를 입력 // F2 축으로 FT 를 적용
7. *abs2*를 입력 // F2 축의 baseline 을 자동조정
8. *setdiffparm* 을 입력 // transfer key parameter
9. *eddosy*를 입력 // dosy plot 에 관련된 parameter 들을 조정할 수 있음
10. *dosy2d setup* // 2d 스펙트럼을 보여줄 준비작업
11. *dosy2d* // 2d 스펙트럼으로 보여줌

- Diffusion coefficient 계산

1. *xf2*로 변환후 *abs2*
2. *setdiffparm*
3. 상단 탭의 Applications → Dynamics → T1/T2 (하단 그림 3 참조)
 1. 첫번째 아이콘을 클릭 (FID)
 - A. Spectrum 을 클릭
 - B. 1 번 슬라이스를 선택
 - C. Phase(*.ph*)를 맞추고 
 2. 두번째 아이콘을 클릭 (Peak/Ranges)
 - A. 분석하고자 하는 스펙트럼 영역을 선택
 - B.  버튼을 누르고, export Region to Relaxation Module 을 선택
 3. 세번째 아이콘 선택(Relaxation)
 - A. Peak 가 분리가 잘되고 peak 면적이 클 경우에는 area 를 선택
 - B. Peak 가 overlap 되어있을 경우에는 Intensity 를 선택 (권장)
 4. 네번째 아이콘 클릭 (Fitting)
 - A. Close 를 클릭
 - B. FnType = 'Vargrad'를 확인하고, List the name = Difflist 를 확인
 5. 다섯번째 아이콘 클릭 (Calculate)
 - A.  버튼으로 계산 시작




- B.  버튼으로 어떤 peak 를 보여줄 것인가 변경할 수 있음
 - C.  버튼은 안좋은 데이터포인트를 삭제할 수 있음
 - D.  버튼으로 'Calculate fitting parameters for all data'
6. 여섯번째 아이콘 클릭 (Report)

그림 3.

