

NMR 사용방법 (1)

- 1D 측정

2021.12.08

KAIST 화학과 NMR실

신재선



개요

- 실험방법 (1)
 - 1. 시료 투입, lock/tune/shim, parameter 설명
 - 2. 1D 실험 방법
 - Proton NMR
 - Carbon NMR
 - 31P NMR
 - 19F NMR
 - 11B NMR
 - 29Si NMR
 - 1D NOE
 - Water suppression
 - qNMR
- 실험방법 (2)
 - 3. 2D 실험 방법
 - COSY / TOCSY
 - NOESY / ROESY / HOESY
 - HSQC / HMBC
- 실험방법 (3)
 - 4. kinetics 실험 방법
 - 5. 기타 실험들
 - T1 Relaxation 측정
 - T2 Relaxation 측정
 - Diffusion coefficient 측정



PREPARATION :

HOW TO PREPARE SAMPLE INTO NMR TUBE

- **NMR tube**
 - O.D. : 5mm NMR tube only
 - 7 inch(Bruker) , 8 inch (Agilent)
 - Any length is okay when you do not use spin (Default at KAIST ChemNMR facility)
 - Spin을 사용하지 않을 경우에는 어느 길이든 상관없음(기본 지침)
- **Solvent**
 - Deuterated solvent (ex>CDCl₃, D₂O, DMSO-d₆)
 - [Option] + (0.03 ~ 0.1%) TMS : 0ppm reference
 - Volume : 0.6~0.7ml Recommended (Minimum : 0.5ml)
- **Sample**
 - Should totally solved. Remove pellet by filtration or centrifuge.
 - 완전히 녹아야 함. 부유물은 filter 혹은 centrifuge를 이용하여 제거 권장.
 - **Concentration** : (assume M.W. ~500)
 - More high conc. is required in case of // 아래의 경우 더 높은 농도 필요
 - 2D experiment (ex> NOESY, HSQC, HMBC)
 - 13C experiment with Fluorocarbon
 - 2D INADEQUATE //13C-13C correlation

권장농도	400Mhz (AS400/AVHD400 /AVNEO400)	500Mhz (AV500)	600Mhz (IBS600)
1H (10분이내)	5 mg/ml 10mM	2 mg/ml 4mM	1 mg/ml 2mM
13C(낮) (10분이내)	30 mg/ml 60mM	10 mg/ml 20mM	30 mg/ml 60mM
13C(밤) (overnight)	5 mg/ml 10mM	2 mg/ml 4mM	5 mg/ml 10 mM

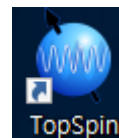


PREPARATION : LOGIN

- Click 'Not Listed?' at bottom // 화면 하단의 'Not Listed?' 클릭
 - Type 'Account' and 'Password' of user // 사용자 계정 및 비밀번호 입력



- Double-click "Topspin" icon on Desktop screen
 - 바탕화면의 "Topspin" 아이콘 더블클릭



PROGRAM : TOPSPIN

Main Menu

Sub Menu

Action

Dataset
Browser

Screen

Command line

Acquisition
Status

Lock
Display
(lockdisp)

Sample
Status
(bsmsdisp)

Temperature
Status
(edte)

Spooler

- Can use Topspin by 'type command' or 'Click icon'
 - Click Icon : Don't need to remember command. Easy to follow
 - 아이콘 클릭으로 실행 : 명령어를 외울 필요없음. 따라하기 쉬움
 - Recommend to users who : use NMR 1~2 times in week. 1H/13C experiments
 - Type command : can check history easily. One sentence macro is available
 - 어떤 명령을 확인하기 쉬움. 한줄 매크로로 스펙트럼을 편하게 얻을 수 있음
 - Recommend to users who : use NMR more than 2 times in day. 2D experiments

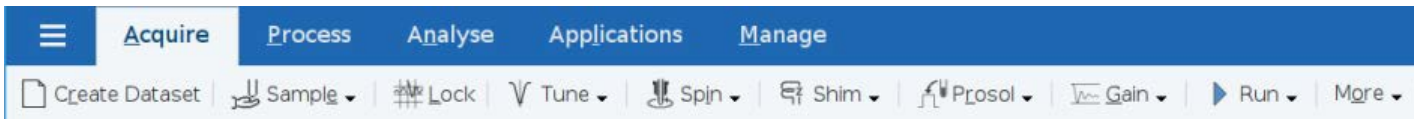


PROGRAM : TOPSPIN

Topspin 3.x : AVHD400, AS400



Topspin 4.x : AVNEO400, AV500



- **Can use Topspin by 'type command' or 'Click icon'**
 - **Click Icon : Don't need to remember command. Easy to follow**
 - 아이콘 클릭으로 실행 : 명령어를 외울 필요없음. 따라하기 쉬움
 - Recommend to users who : use NMR 1~2 times in week. 1H/13C experiments
 - **Type command : can check history easily. One sentence macro is available**
 - 어떤 명령을 확인하기 쉬움. 한줄 매크로로 스펙트럼을 편하게 얻을 수 있음
 - Recommend to users who : use NMR more than 2 times in day. 2D experiments



ACQUISITION : 실험 폴더 만들기

- Dataset 만들기 : (edc) 또는 (new)

Create Dataset

New...

Prepare for a new experiment by creating a new data set and initializing its NMR parameters according to the selected experiment type. For multi-receiver experiments several datasets are created. Please define the number of receivers in the Options.

NAME

EXPNO

PROCNO

TITLE

Use current parameters

Experiment

Options

Set solvent:

Execute "getprosol"

Keep parameters:

DIR

Show new dataset in new window

Receivers (1,2, ...16)

폴더이름

실험번호

메모장 처럼 기입

열려져 있는 실험과 같은 실험을 하고 싶으면 체크

실험 목록을 보고 싶으면 체크 후 **select** 클릭



ACQUISITION : 실험 종류 선택

The screenshot shows the Bruker acquisition software interface. At the top, the 'Source' field is set to `/opt/topspin3.1/exp/stan/nmr/par/user`. Below this, there are search filters for 'Find file names', 'Class', 'Dim', 'Type', 'SubType', and 'SubTypeB'. A table of files is displayed, including `b11.kaist`, `gradtest`, `N15.kaist`, `si29.kaist`, `carbon.kaist`, `H2.kaist`, `n15.kaist`, `dept135`, `hoesy`, `noemult`, `dept90`, `igd`, `p31.kaist`, `f19.kaist`, `kinetics`, and `proton.kaist`. A red box highlights the 'Source' field and contains the following text:

Source는 KAIST 실험 폴더로 사용할 것
 KAIST 실험 폴더(기본)
 /opt/topspin/exp/stan/nmr/user
 Bruker 기본 :
 /opt/topspin/exp/stan/nmr/par/

- 검색창에서 실험 이름 검색 가능
 - * 를 검색어 앞 뒤에 붙이면 해당 단어가 포함되는 실험 검색 가능
 - 핵종은 '숫자+Nuclei'로 표시 (예> `13C_CPD.kaist`, `1H.kaist`)
- 접두/접미어 설명
 - CPD : Composite Pulse Decoupling : 일반적인 Decoupling 방법
 - IGD : Inverse-Gated Decoupling : 정량분석 또는 `29Si` 실험시 사용
 - noCPD : no Decoupling : 정량분석 또는 J-coupling 측정시 사용
 - NUS : Non-Uniform Sampling : 2D 실험시간 단축



ACQUISITION : LOCK/TUNE/SHIM



- **Sample** : 시료 투입 // 예> (sx 8) >8번 위치 시료 투입
- **Lock** : lock 자동 조정 // 예> (lock cdcl3) >CDC13로 lock
- **Tune** : tune 자동 조정 // (atma)
 - 현재 열려져 있는 실험에서 사용하는 nuclei에 대한 tune/match 실행
 - 예> 1H.kaist의 경우에는 1H만 조정. 13C_CPD.kaist의 경우에는 1H와 13C 조정
- **Spin** : Spin on/off 선택 가능 // 가능한 사용하지 말 것
 - NMR tube가 새 tube일 경우에 1D proton 실험은 추천. 그외에는 비추천
- **Shim** : Shim 자동 조정 // (topshim)
 - 경우에 따라서는 다음 옵션 사용 가능
 - (topshim tunebxyz tuneaz) // XY plane도 같이 조정한 후, lock phase도 조절
 - (topshim convcomp) // 대류현상이 있을 때 사용 (예>온도실험)
 - (topshim zrange=-0.8,0.8) // 시료 부피가 작을 때 사용 (시간 오래걸림)
 - (topshim shigem) // Shigem tube 사용시
- 아래와 문제가 발생했을 경우
 - **Final B0 stddev**가 너무 클 때 :
 - 원인 : tube상태가 좋지 않거나, xy plane쪽 shimming이 좋지 않을 때
 - 해결 방법 :
 - (rsh)로 최신 standard shim 불러온 후 다시 시도
 - 파일명 : 연도/월/일.xxx 예>20211208.dual
 - (topshim tuneb tunea) 혹은 (topshim tunebxyz tuneaz)를 적용후 시행
 - **S/N too low**
 - 원인 : solvent peak 세기가 생각보다 작을 때
 - 해결 방법 : (topshim rga durmax=30) [또는 60, 120]
 - **Too many points lost during fit.**
 - 원인 : convection이 발생했을 때(acetone/methanol사용시)
 - 해결 방법 : (topshim convcomp)
 - **Echo time must be reduced**
 - 원인 : convection이 발생하거나, linewidth가 생각보다 클 때
 - 해결방법 : (topshim convcomp)



ACQUISITION : (OPTIONAL) AUTOGAIN/MANUAL SHIM

BSMS Control Suite

Main | Lock/Level | Shim | Autoshim | Service | Log | Help

AUTO

Lock | Phase | Power | Gain | Shim

LOCK

On-Off | Phase | Power | Gain

SAMPLE

LIFT | SPIN | Measure | Rate | **Lock Lost**

SHIM

Spin.	Z	Z ²	Z ³	Z ⁴
NonSpin.				
X	XZ			
Y	YZ			
XY				
X ² -Y ²				

STD BY

Absolute | Previous | Actual | Step | Reset

Difference

Stepsize

STD BY

Config

External

Sample: down missing up Shim coil temperature **296 K**

- 명령어 (autogain) : Lock level을 적절한 위치로 재조정
- **Manual Shim**
 - **Topshim**에서 에러가 계속 날 때 시도해볼만 함
 - Z를 클릭한 후 마우스 휠로 Z값을 변경. Z2도 같은 방법으로 변경
 - 변화폭이 너무 큰 경우 Stepsize를 조정
 - 더 이상 lock level이 올라가지 않을 때까지 Z1, Z2 조정 반복
 - 여유가 된다면 Z3/Z4도 변경 후 다시 Z1, Z2 조정 반복
 - 홀수 : peak 선폭에 주로 영향. 짝수 : peak 모양 대칭성에 주로 영향.



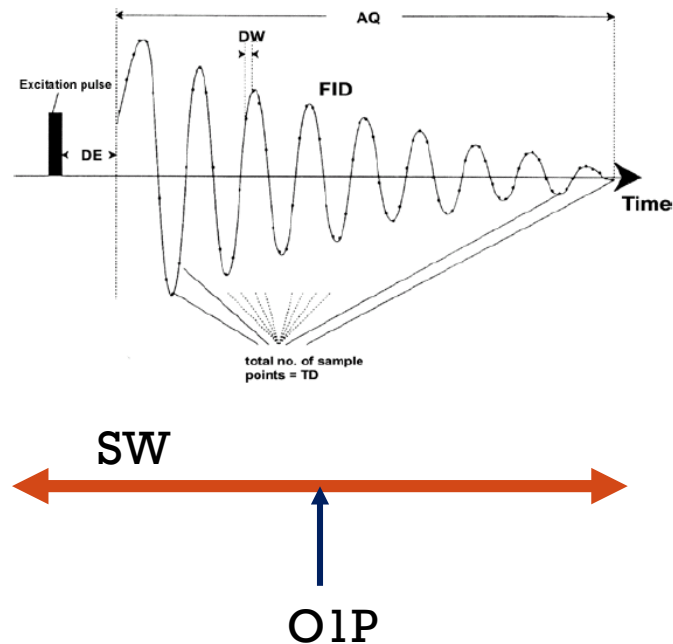
ACQUISITION : PROSOL/RGA/ZG



- **Prosol** : 관리자가 저장해둔 power parameter set 소환
 - 명령어 : (getprosol)
 - NMR에 익숙한 경우에는 P1, P2를 직접 측정도 가능
 - AU : (pulsecal), (paropt) (교육받지 않은 사용자의 임의 사용 금지)

측정에 관련 다른 Parameter들을 다음과 같음

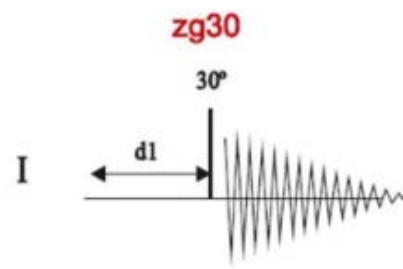
그림 출처 topospin 매뉴얼



- **NS** : Number of scan
- **DS** : Dummy scan
- **SW** : Spectral width
- **O1P**: offset of 1st nucleus in ppm
- **TD** : Time Domain Data Size
- **AQ** : Acquisition time
- **D1** : Relaxation Delay
 - 권장 1~ 5 * T1
 - Quantitative NMR에 중요
- **RG** : Receiver Gain
 - Dynamic range와 관련됨.
- **Parameter와 관련된 식**
 - $AQ = TD / (2 * SWH)$
 - **SWH** : Spectral width in Hz
 - 실험예상시간 = $(NS + DS) * (D1 + AQ)$
 - Microsecond 단위의 시간은 대략적인 예상시간 계산에서는 고려하지 않아도 됨
 - 시간 확인 명령어 : (expt)
- **Gain** : 적당한 Receiver gain값을 알아서 조정 : (rga)
- **GO** 또는 **Run** : 실험 시작
 - 명령어 : (zg) // 기존의 데이터가 있는 경우 처음부터 재시작
 - 명령어 : (go) // 기존의 데이터가 있는 경우 이어서 실험 누적



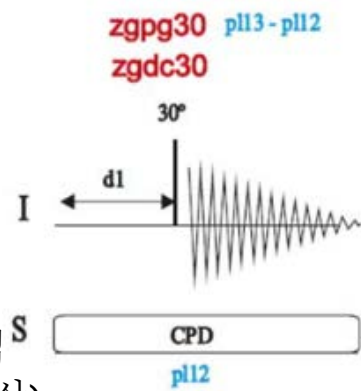
1D EXPERIMENT : PROTON



- 사용자 계정으로 로그인한후 **topspin** 프로그램 실행
 - 하단의 **Not listed?**를 클릭후 입력
- 모든 과정은 한 단계가 완료된 걸 확인하고 이어서 실행해야 함
- **Dataset**을 만든다. : (new) → 실험을 **proton.kaist** 또는 **PROTON**을 선택
- 시료를 투입한다.
 - **Autosampler**없는 NMR : (ej) → 시료 투입 → (ij)
 - **Autosampler**있는 NMR : 시료 **Tray**에 놓음 → (**sx** 홀더번호) 입력
- **Lock** 을 조정한다. : [lock] → 적절한 **solvent** 선택
- **Tune**을 조정한다.
 - 유기용매를 사용할 경우 **1H**실험은 보통 **Tune**조정과정 생략
 - 같은 **solvent**일 경우에는 생략가능 시간이 부족할 때는 생략해도 됨
 - **H2O+D2O** 용매를 사용하거나 **NOE**실험, **2D**실험을 이어서 할 경우: (atma)
 - 가능한 감도를 높여야 할 경우에는 강하게 권장
- **Shim**을 조정한다
 - 첫번째 시료인 경우에는 **rsh**로 최신 **standard shim**을 소환 권장
 - **Standard shim** 파일 이름 : 날짜.알파벳 예> 20211208.dual, 20211107.shin
 - 수동 **shim** 조정: (**bsmsdisp**) → 마우스를 이용하여 **Z1, Z2** 조정
 - 자동 **shim** 조정 : (topshim) or (topshim gui)
 - **AV500**의 경우에는 (topshim tunebxyz tuneaz) 추천
- 적절한 **parameter** 설정
 - (**getprosol**)
 - 주로 바꾸는 **parameter**들 : **NS, SW, O1P, D1**
- 스펙트럼을 획득한다. : (rga) → (zg)
 - 중간 확인 (tr) → (efp) → (apk) → (absn)
 - 중간 확인 결과 만족하면 (halt)로 종료
 - (halt [종료 scan수]) 설정 가능. 예> halt 32 //32 스캔 후 저장하고 종료
- **Lock**을 풀고 시료를 뺀다.
 - **Autosampler** 없을 때 : (lock off) → (ej) → 시료 회수 → (ij)
 - **AS400, AV500** : (lock off) → (sx ej)
- **Topspin** 프로그램을 닫고 로그아웃 한다.



1D EXPERIMENT : CARBON



- Proton 실험과 유사
- Dataset 만들 때 carbon.kaist 또는 13C_CPD.kaist 선택
 - 정량분석을 원한다면 13C_IGD.kaist (D1 값은 최소 10s 이상)
 - Decoupling 없이 찍으려면 13C_noCPD.kaist
- Proton 실험처럼 lock, tune, shim 을 한다. (tune 필수)
- Parameter 설정
 - (getprosol)
 - 파라미터 NS, O1P, SW 확인
- (ii) 입력 : 장시간 실험인 경우 (ii) 실행 후 실험 시작 강하게 권장
- 스펙트럼 획득 : (rga) → (zg)
 - 중간확인 : (tr) → (efp) → (apk) → (absn)
- 주의사항
 - 13C 실험은 1H에 비해 감도가 많이 떨어지므로, 농도에 따른 분석 시간 차이가 아주 큼.
 - 시료양이 부족하여 농도를 높이기 어려울 때는 shigemi NMR tube 권장
 - 가능한 감도가 높은 장비 사용 권장
 - Quaternary carbon을 보지 않아도 될 경우 DEPT 실험 권장
 - 정량분석을 원할 경우에는 inverse-gated decoupling (IGD) 사용
 - D1 값을 최소 10s, 상황에 따라서는 180s 이상 설정
 - 또는 relaxation agent를 추가하여 실험
 - Proton 실험 직후에 13C 실험을 할 경우에는 lock/shim은 생략가능
 - Fluorocarbon의 경우에는 19F coupling으로 인해 분석시간이 훨씬 오래걸림
 - 대안으로 13C-19F HSQC로 확인하는 것이 더 빠를 수 있음.



1D EXPERIMENT : PHOSPHORUS

- Carbon 실험과 동일
- Dataset 만들 때 31P_CPD.kaist 선택
 - Inverse-gated decoupling : 31P_IGD.kaist
 - Decoupling 없이 찍으려면 : 31P_noCPD.kaist
- Parameter 설정
 - (getprosol)
 - NS, O1P, SW 확인
- (ii) 입력
- 스펙트럼 획득 : (rga) → (zg)
 - 중간확인 : (tr) → (efp) → (apk) → (absn)
- 기타
 - 31P 실험은 13C 실험보다 감도가 좋은 편.
 - Proton 실험 직후에 13C 실험을 할 경우에는 lock/shim은 생략가능
 - 31P는 나타나는 chemical shift 의 범위가 많이 넓은
 - 사전에 시료가 나타날 것으로 예상되는 chemical shift 범위를 확인 필요
 - 자료가 없는 경우에는 적당한 SW로 나누어서 스캔하여 적정 범위 찾을 것
 - Reference 다음의 3가지 방법으로 조정
 - Absolute Referencing (IUPAC 2001) : TMS (혹은 DSS) 추가 필요
 - Pure Appl. Chem Vol 73. No 11 . Pp 1795-1818, 2001. (proposed)
 - Pure Appl. Chem Vol 80. No 1 . Pp 59-84, 2008. (updated)
 - External Referencing
 - Coaxial tube를 이용하여 외부에는 기준물질을 내부에는 시료를 넣어 실험
 - Internal Referencing (Secondary reference)
 - (chemical shift가 알려진) standard 물질을 같은 tube에 추가하여 실험
 - Residual solvent peak : solvent peak 위치로 부터 보정. Sref
 - 2D 31P-31P COSY (with 1H decoupling) 도 실험 가능 (2D 실험에서 다룰 예정)
- 비슷한 방식으로 가능한 nuclei들
 - 7Li, 15N, 17O, 23Na, 35Cl, 75As, 81Br, 77Se, 125Te
 - 등록 안된 nuclei의 실험을 원할 경우에는 NMR관리자에게 문의



1D EXPERIMENT : FLUORINE

- Carbon 실험과 유사
- Dataset 만들 때 19F_IGD.kaist 선택
 - Decoupling 없이 찍으려면 : 19F_noCPD.kaist
- Parameter 설정
 - (getprosol)
 - NS, O1P, SW, AQ, TD 확인
 - AQ 시간은 SW와 TD가 바뀌면 자동조정됨. (권장 AQ : 0.7 ~ 4s)
- (ii) 입력
- 스펙트럼 획득 : (rga) → (zg)
 - 중간확인 : (tr) → (efp) → (apbk) 또는 수동 phase 조정
- 기타
 - 19F는 -150~ -230 ppm 근처에 background signal이 나옴
 - 유리 코팅에 사용하는 teflon의 signal
 - Mnova에서는 spline 혹은 whittaker smother 방법으로 baseline correction 적용
 - 기본 설정의 SW가 너무 넓어서 AQ가 많이 짧은 편
 - AQ는 0.7~ 4.0 s 정도가 적당
 - AQ가 너무 짧으면 wiggling이 심함
 - LB를 1.0 Hz 정도 적용하면 wiggling 억제가 됨 (대신 해상도가 희생됨)
 - 정량 분석을 하고 싶을 경우에는 SW가 줄여서 분석해야 함
 - off-resonance effects
 - AVANCE NEO부터는 19F를 direct detection하므로 감도가 월등히 좋음
 - AVANCE HDIII // Topspin 3.x : zgfhigqn.2 (감도가 낮음)
 - AVANCE NEO // Topspin 4.x : zgig (감도가 높음)
 - Phase correction은 매뉴얼 권장
 - 19F peak가 하나일 경우에는 apk 가능. Peak 수가 많지 않을 경우에는 apbk 권장
 - 수동 조절 (.ph) → [0] 조절 --> [set pivot] → [1] 조절 → (.sret)
 - Mnova에서도 할 수 있지만, topspin에서 조정해 두는 걸 권장
 - 19F관련 2D : 1H-19F HOESY, (H,F)-PANSY COSY, 19F-13C HSQC

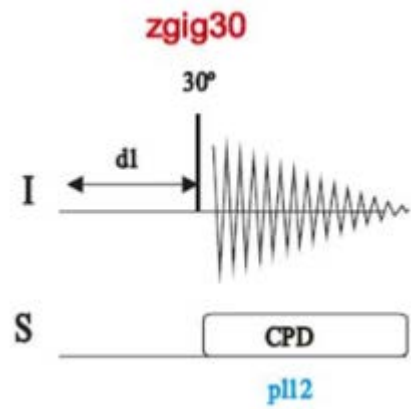


1D EXPERIMENT : BORON

- Fluorine 실험과 유사
- Dataset 만들 때 11B_CPD.kaist 선택
 - Decoupling 없이 찍으려면 : 11B_noCPD.kaist
 - Background signal suppression이면 11B_IGD_noBG.kaist
- Parameter 설정
 - (getprosol)
 - NS, O1P, SW, AQ, TD, D1 확인
 - 11B는 decay가 빠르므로 D1 값을 0.1~1 s으로 보통 설정
- (ii) 입력
- 스펙트럼 획득 : (rga) → (zg)
 - 중간확인 : (tr) → (efp) → 수동 phase조정
 - 중간확인 결과 만족하면 (halt)
- Topspin 종료후 logout
- 기타
 - 10B와 11B 모두 관찰가능하지만, 11B가 더 sensitive함
 - 11B는 30 ~ -30 ppm 근처로 broad한 background signal이 나옴
 - 유리성분인 borosilicate glass의 peak
 - Spin-echo를 적용한 'noBG' 접미어가 붙어 있는 실험을 고르면 완화 됨
 - NMR tube를 teflon tube를 써도 완화됨
 - Mnova에서는 spline 혹은 whittaker smother 방법으로 baseline correction 적용
 - 다만, boron peak이 broad할 경우에는 polynomial로 조정할 것
 - Phase correction은 매뉴얼로 해야 함 // (apk) 권장하지 않음
 - (apbk)를 사용해도 되나, broad한 peak가 나타날 경우에는 수동으로 조정할 것
 - 수동 조절 (.ph) → [0] 조절 --> [set pivot] → [1] 조절 → (.sret)
 - Mnova에서도 할 수 있지만, topspin에서 맞춰가는 걸 권장
 - 관련 2D : 11B-11B COSY, 1H-11B HSQC



1D EXPERIMENT : SILICON



- Boron 실험과 유사
- Dataset 만들 때 29Si_IGD.kaist 선택
 - Decoupling 없이 찍으려면 : 29Si_noCPD.kaist
 - INEPT로 찍으려면 : 29Si_INEPT.kaist
- Parameter 설정
 - (getprosol)
 - NS, O1P, SW, AQ, TD, D1 확인
 - 29Si는 decay가 많이 느리므로 D1 값을 5~30 s으로 보통 설정
- (ii) 입력
- 스펙트럼 획득 : (rga) → (zg)
 - 중간확인 : (tr) → (efp) 수동 phase 조정
 - 중간확인 결과 만족하면 (halt)
- Topspin 종료 후 logout
- 기타
 - 29Si는 gyromagnetic ratio가 음수이므로 CPD 대신 IGD으로 기본 설정됨
 - 29Si는 -80~120 ppm 근처로 broad한 background signal이 나옴
 - 유리에 있는 borosilicate glass
 - Probe 내부 quartz를 Sapphire 로 교체하면 완화되나, 이 경우 27Al 실험 불가
 - NMR tube를 teflon 혹은 sapphire tube를 써도 완화됨
 - INEPT 혹은 DEPT를 사용하면 Background signal 제거됨
 - Mnova에서 spline 혹은 whittaker smother 방법으로 baseline correctio 적용
 - 29Si는 감도가 많이 낮아서 가능하면 농도를 최대한 높여야 함
 - INEPT 혹은 DEPT를 이용하면 감도를 크게 향상 시킬 수 있음
 - DEPT : 1J Si-H(367hz)를 이용하므로 Si에 proton이 붙어있어야 측정가능
 - INEPT : 2J Si-H (6.6hz)를 이용하므로 Si에 CH3가 붙어있어야 측정가능
 - 다른 J coupling constant를 사용하려면 NMR관리자에게 문의
 - Phase correction은 매뉴얼로 해야 함 (apk) 금지. 대신 (apbk)는 사용가능
 - Peak가 broad 할 경우에는 manual로 phase, baseline correction 권장



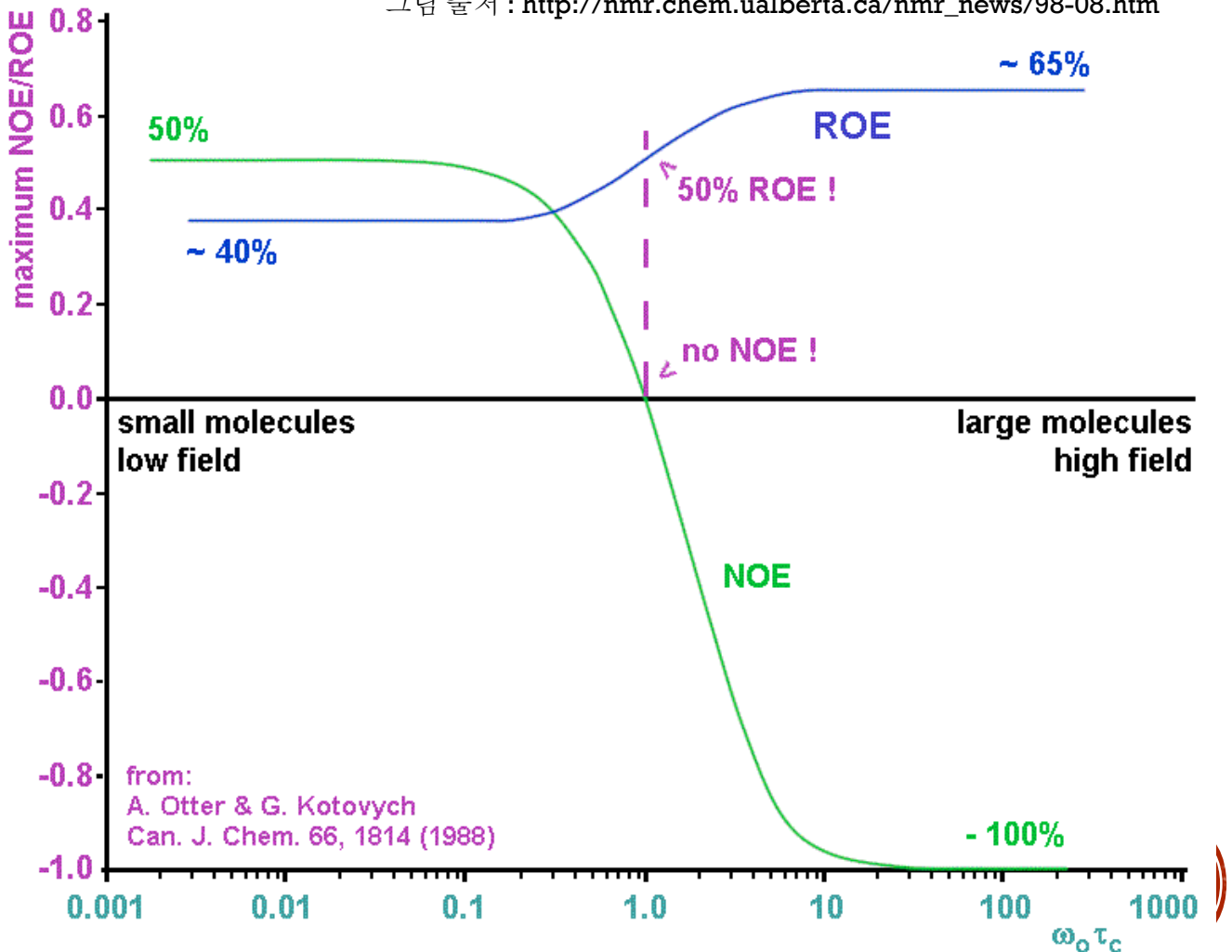
1D EXPERIMENT :

1D NOE (TRANSIENT NOE) 0

NOE : Nuclear Overhauser Effect

- 특정 nuclei를 irradiation시키면 일정 거리(보통 5 Å) 이내에 있는 nuclei들의 polarization(단순하게 표현하면 peak 크기)가 커지는 현상
- 주의사항
 - WoTc ~ 1 부근에서는 NOE 가 관측되지 않음
 - Wo : Larmour frequency , Tc : Tumbling rate
 - 보통 400Mhz에서 분자량 700 ~ 1400 인 분자는 NOESY실험으로는 NOE관찰이 어려움
 - Solvent의 viscosity가 다른 용매로 바꿔보거나, 온도를 바꿔서 시도
 - 다른 자기장에서 시도 (예> 400Mhz에서 안보이면, 300 또는 500Mhz에서 시도)
 - 위의 두 방법이 안될 때는 ROESY를 시도

그림 출처 : http://nmr.chem.ualberta.ca/nmr_news/98-08.htm



1D EXPERIMENT :

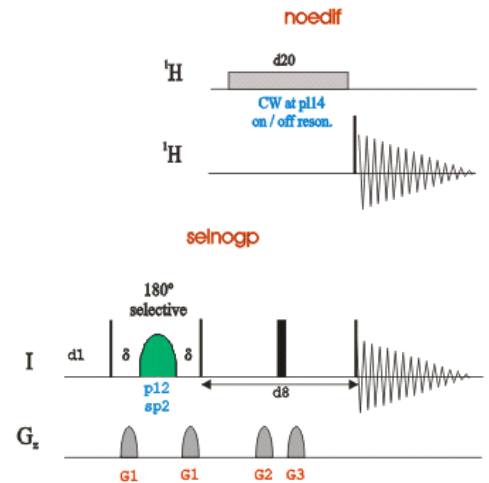
1D NOE (TRANSIENT NOE) 1

주의사항

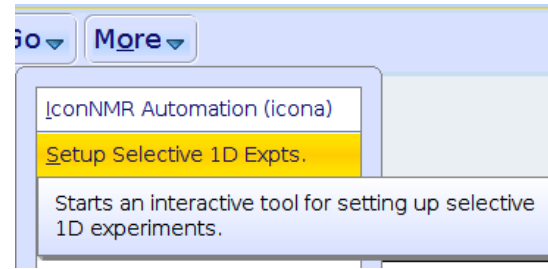
- 2D NOESY에서 **cross peak**이 잘 보이지 않을 경우
 - TD(# of point, F1 axis)를 늘린다. (권장 : 256 ~ 1024, 가능한 2^N 으로 설정 권장)
 - D8 (mixing time)을 늘려서 실험
 - NS(# of scan)을 늘려서 실험 (ROESY의 경우 8의 배수로 설정할 것)
 - 분자량이 600~1800 범위면 2D ROESY로 실험
 - OH, NH 같이 broad/weak peak을 보고 싶을 경우 1D NOE를 권장
- D8(mixing time)은 목적에 따라 적절히 설정할 것
 - 보통은 T1 [Spin-lattice relaxation time) 만큼 설정
 - 작은 분자량 (0.3 ~ 0.8s 권장)
 - 큰 분자량 (0.1 ~0.5 s 권장)
 - Inter-proton distance를 측정하려면 mixing time을 되도록 작게 설정할 것
- NOE 신호는 작은 분자량일 경우에는 + 값으로, 큰 분자량은 - 값으로 나옴
- Chemical exchange가 있을 경우, 강한 -값으로 나옴.
 - EXSY (예> rotamer 확인)

1D NOE 측정 시 고려사항

- 1D NOE를 측정하는 방법은 2가지가 있음
 - Steady-State NOE (NODIFF)
 - 특정 peak만 saturation시킨 후 측정
 - 2개의 실험(실험/대조)을 빼서 확인
 - Transient NOE(SELNOGP)
 - 특정 peak만 inversion 시킨 후 측정
 - 2D NOESY실험을 변형하여 1D로 확인
 - 여기서는 Transient NOE 측정방식만 설명
- Peak 겹침이 심할 경우에는 2D로 측정할 것
- Peak가 broad할 경우 용존산소를 제거하고 시도하면 개선될 수도 있음












1D EXPERIMENT : 1D NOE (TRANSIENT NOE) 2



- Proton 실험결과가 있어야 함
 - 먼저 proton 실험을 한 후 이어서 실험
- 순서
 - 1D proton 실험 후 (efp) (→apk) → (absn)
 - [Acquire] → [More] → [Setup Selective 1D Expts]. 를 클릭



- 사용방법은 1D Selective Experiment Setup에 적혀 있으니 참조
- [Define Regions]을 클릭한다. # integration mode
- 원하는 peak 위치를 drag하여 선택한다.
 - 이때  이 노란색이어야 함. 기본상태에서 drag하면 그냥 zoom이 됨
 - 여러 위치 선택 가능 (예> 4군데 선택하면, 각 peak별로 하나씩 총 4개의 실험 생성)
 - 선택할 때는 peak 내부에서 시작/끝 하지 말 것
 - 다 선택했으면  을 눌러서 Save regions to 'reg' 선택하고 옆에 있는  을 클릭
 - Topspin 3.x    Topspin 4.x   



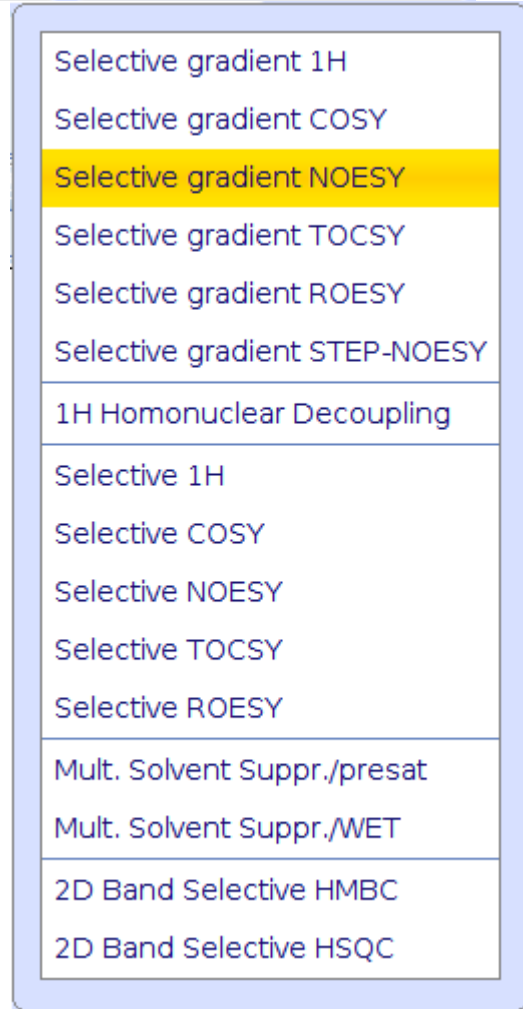
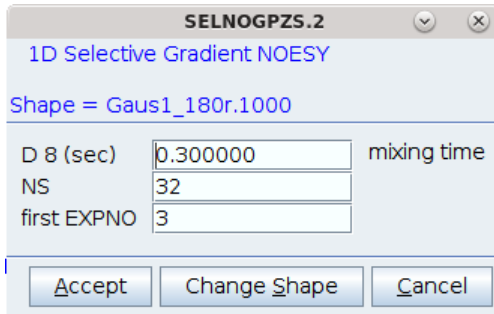
1D EXPERIMENT : 1D NOE (TRANSIENT NOE) 3

1D Selective Experiment Setup

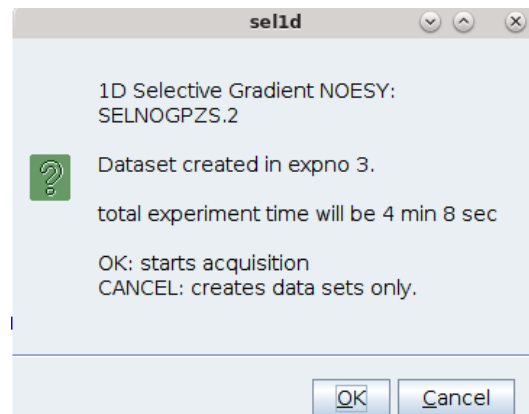
Define Regions

Create Datasets

- [Create Datasets] 을 클릭
- Selective gradient NOESY 선택
- Parameter들을 적절하게 설정한다.
 - D8 : mixing time
 - 작은 분자량이면 0.3 ~ 0.7 s 정도에서 시작
 - 큰 분자량(2000이상)이면 0.1 ~ 0.5 s 정도에서 시작
 - NS : Number of scan
 - 8의 배수로 설정 권장
 - 감도가 낮은 편이므로 128을 권장. (최소 32 권장)
 - First EXPNO : 기본값으로 나뉨
 - 원하는 실험 번호로 변경가능



- [Accept]를 클릭한다.
 - 예상시간을 확인할 것
 - 문제없으면 OK를 클릭하여 실험 시작
 - Parameter를 변경하고 싶으면 Cancel후 parameter변경후 zg로 실험 시작
- 가능하면 중간에 멈추지 말것
 - 멈추고 싶다면 8의 배수로 멈출 것
 - 예> (halt 16)



1D EXPERIMENT :

1D NOE (TRANSIENT NOE) 4

■ 분석

- Resolution이 크게 중요하지 않다면, apodization을 적당히 설정할 것
 - Topspin : LB = 1
 - Mnova : exponential = 1
- Irradiation된 peak가 negative가 되도록 phase 조정할 것
 - Manual phase correction으로 조정한다. 또는...
 - Topspin : (apk)후 (.ph)하여 180 버튼을 눌러서 저장
 - Mnova : Automatic Phase correction 후 Manual phase correction에서 180 클릭
- ZQ artifact (peak가 위아래로 나오는 artifact)는 무시할 것
 - 찍을 때 NS를 8의 배수로 하면 많은 완화됨
- Inter-proton distance를 재려면 찍을 때 다음 사항을 주의
 - 충분히 D1을 설정한다. // 권장 : > 5* T1
 - D8을 작게 설정한다. //초기 근사 이용

■ Cf> NOEDIFF의 경우

- D1 : Relaxation Delay 5* T1을 권장
- D20 : saturation time 0.2 ~ 0.7 sec 권장 (작은 분자량의 경우)
- PL14 : 관리자에게 문의 (임의로 설정할 경우 장비 고장의 원인이 됨)
- FQ2LSIT : irradiation하고 싶은 peak 위치 (control 포함할 것)
- L4 : FQ2LIST의 line의 줄 수
- NS : # of scan. 8의 배수로 설정
- TD : 65536 , L4 (F2, F1)



1D EXPERIMENT : SOLVENT SUPPRESSION 1

- 실험 방법
 - 모든 실험을 먼저 **proton** 스펙트럼을 찍은 후 물 **peak** 위치를 적어둔다.
 - 물의 **peak** 위치를 찾아서 적어둔다. (.pp)로 **peak picking**하면 쉬움
 - 용액의 농도, salt 농도, pH 등에 따라 물 **peak** 위치는 미묘하게 다를 수 있음.
 - **Pre-saturation**
 - (getprosol)을 한 후, O1P를 위의 물의 **peak** 위치로 설정한다.
 - 더 정확하게 하려면 (gs)로 맞춰야 하나 여기서는 생략 (NMR 관리자에게 문의)
 - SW, NS, D1, AQ 등을 적절하게 변경
 - O1P가 물 **peak**로 고정되어 있는 걸 고려하여 SW를 설정
 - 정확한 정량 분석을 원한다면, T1 시간을 고려하여 D1, AQ 를 설정
 - PL9는 장비에 따라 다르니 관리자에게 문의 후 설정
 - (rga) → (zg)
 - **WATERGATE 3-9-19 , WATERGATE W5**
 - (getprosol)을 한 후, O1P를 위의 물의 **peak** 위치로 바꾼다.
 - **Proton** 스펙트럼에서 물에서 가장 먼 **peak**를 넘어 평평해지는 부분까지의 거리(Δ)를 Hz 단위로 잰다. (예> 400Mhz NMR에서 11ppm까지면 $(11.0-4.7)*400.13$ Hz)
 - $D19 = 1/(2 * \Delta)$ 로 설정한다.
 - D19 가 작을 수록 물의 **notch**가 좁아진다.
 - D19가 너무 작으면 **null**부근의 **peak**는 사라진다.
 - SW, NS, D1, AQ 등을 적절하게 변경 .NS는 8의 배수로 해야 함.
 - (rga) → (zg)
 - **WET**
 - (getprosol)을 한 후, O1P를 위의 물의 **peak** 위치로 바꾼다.
 - SPdB7 최적화가 필요함. (gs)를 사용해야 하므로 관리자에게 교육 받을 것)
 - **Excitation Sculpting**
 - (getprosol)을 한 후, O1P를 위의 물의 **peak** 위치로 바꾼다.
 - SW, NS, D1, AQ 등을 적절하게 변경 .NS는 8의 배수로 해야 함.
 - (rga) → (zg)



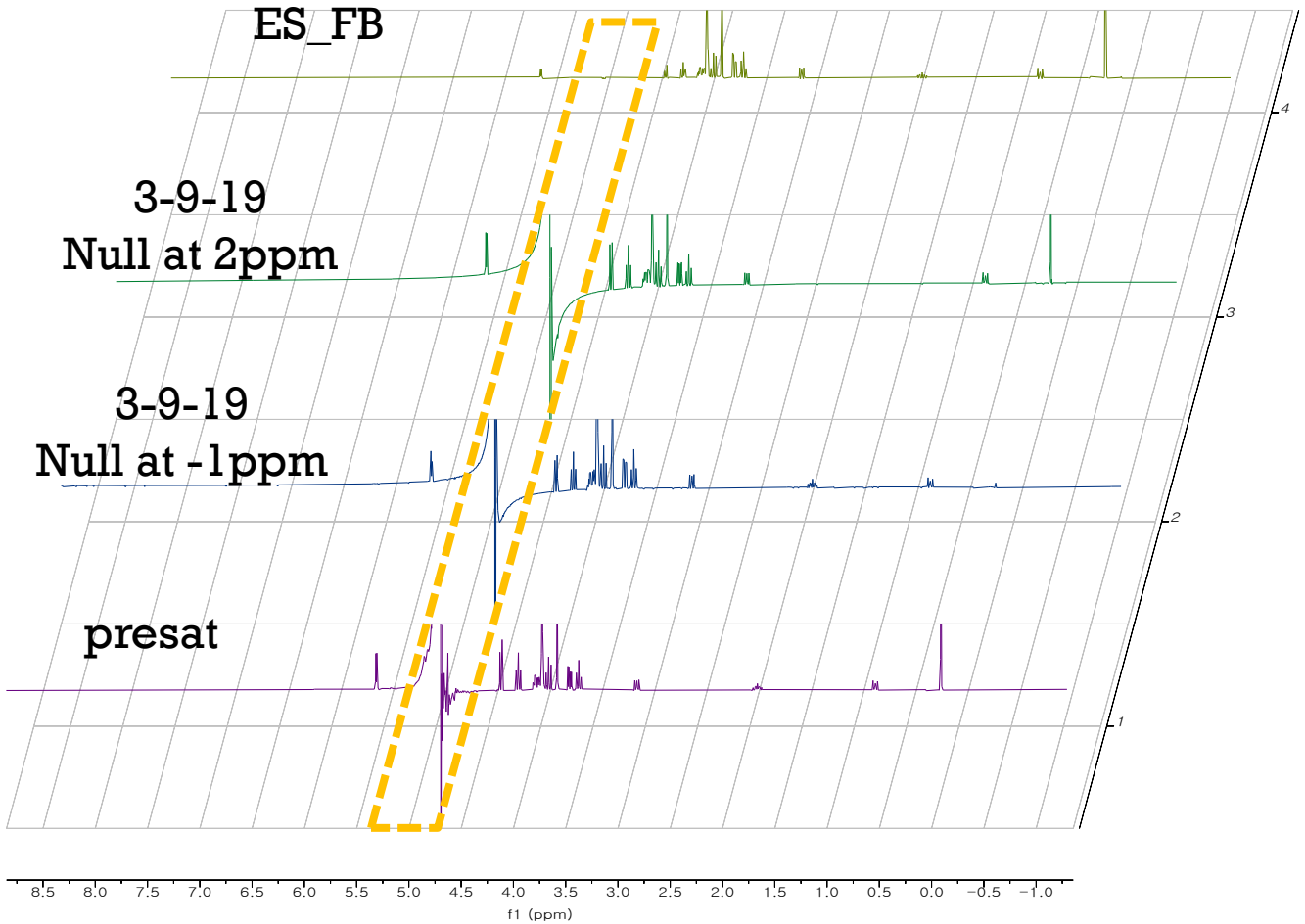
1D EXPERIMENT : SOLVENT SUPPRESSION 2

■ Processing

- 물 peak를 중심으로 양쪽의 phase가 잘 안 맞을 수 있음
 - 정성적으로 볼 때는 큰 문제가 아니나, 정량적으로 분석할 때는 적분이 어려움
 - 물이 잘 억제되는 경우 (예> Excitation-Sculpting에는 apk가 잘 되는 편)
 - 정확한 적분이 필요할 경우에는...
 - 물 peak를 중심으로 왼쪽과 오른쪽을 별도로 Phase correction과 Baseline correction을 실행한다.
 - Internal standard를 양쪽에 하나씩 따로 설정하는 것을 권장
 - 예> [CO2 reduction] Dimethyl sulfone(DMSO), Phenol
 - Baseline correction은 다음중 가장 적절한 것으로 보정한다.
 - Mnova
 - 원하는 영역을 확대한 후에 “Run on a Region”을 체크
 - 아래의 3가지 방법 중 가장 잘 맞는 방법으로 보정
 - Polynomial의 order와 filter를 조정하여 보정
 - Phase만 잘 맞았다면 어렵지 않음
 - Whittaker Smother 의 filter를 조정하여 보정
 - 잘 맞춰주는 편이나, broad peak를 없앨 수 있으니 주의
 - Spline으로 보정
 - 별도의 옵션없음.
 - 또는 Multipoint baseline correction으로 수동으로 보정
 - Topspin
 - (.basl)로 가장 잘 맞는 형태를 수동으로 보정



1D EXPERIMENT : SOLVENT SUPPRESSION 3



■ 용도별 권장 사항

- ICON-NMR로 분석하고 싶고, **phase correction**에 덜 신경쓰고 싶을 때
 - → Excitation-Sculpting with Flip-back
 - 물에서 먼 peak는 peak 모양이 예쁘지 않음.
- 수동으로 분석하고 **Peak** 모양이 예뻐야 하고, **NH/OH**를 관측해야 할 때
 - → 3-9-19 WATERGATE
 - D19 값을 계산해서 설정해야 함.
- 감도가 중요하며, **NH/OH**가 중요하지 않을 때
 - → pre-saturation
 - O1P와 P1, PL9를 잘 **calibration**해야 함.
 - PL9는 기본값을 사용하고 P1은(pulsecal)으로 조정.
 - O1P는 proton 스펙트럼의 **water peak** 위치로 설정

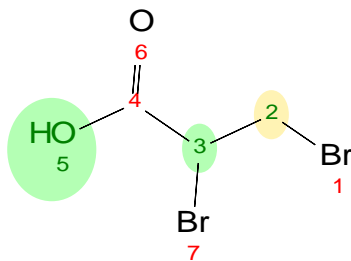


1D EXPERIMENT : QUANTITATIVE NMR 1

- 매 스캔마다 완전히 Relaxation이 된 후에, 다음 스캔을 진행되게 설정
- 관련된 parameter
 - 스캔당 소요시간 (D1+ AQ)
 - D1 : Relaxation Delay. $1 \sim 7 * T1$
 - AQ : Acquisition time $AQ = TD / (2 * SWH)$
 - Flip angle (θ) // 감도는 $\sin(\theta)$ 만큼 나옴.
 - θ 가 90도 일때가 가장 효율적이나, T1이 너무 긴 경우에는 30 또는 45를 활용
 - 실질적인 조정은 P1 시간으로 결정
 - Water suppression할 때는 90 고정이어서 D1을 충분히 늘려줘야 함
 - With ^{13}C decoupling (IGD)
 - Heating이 일어날 수 있으니 DS값을 충분하게 설정해야 함

Magnetization 회복도(%)

	90도 pulse	30도 pulse
1 * T1	>63.2	>81.6
5 * T1	>99.3	>99.7
7 * T1	>99.9	>99.9



- Sample : 2,3-DBPA in $CDCl_3$ with 2% TMS
- 90 pulse, 400Mhz NMR, 298 K

Intensity	5-OH	3-H	2a-H	2b-H	TMS	표준편차
T1(s)	5.37	8.22	1.49	1.36	11.18	
D1:2s	0.70	0.67	0.79	0.79	1.00	0.0536
D1:24s	0.70	0.67	0.71	0.71	1.00	0.0164
D1:60s	0.64	0.64	0.64	0.63	1.00	0.0043



1D EXPERIMENT : QUANTITATIVE NMR 2

■ ^1H

■ 권장 장비

- 감도가 좋은 장비를 사용하면 **scan**수가 적어 시간이 단축
 - $S/N \sim \text{root}[\text{SCAN}]$
- 상당히 큰 **peak**와 작은 **peak**가 공존하여 작은 **peak**의 **S/N**이 좋지 않을 때는 가능한 높은 **Dynamic range**를 가진 장비를 권장

■ Parameter 설정

- **D1** : **T1**값의 3~7배로 설정.
 - **T1**값은 **inversion-recovery** 실험 [**pseudo2D**] 또는 **null method**로 측정
 - 모를 때는 10s[**zg30**] ~ 60s[**zg**]로 시작.
- **P1** : 원하는 각도에 맞게 설정
 - 30° : **zg30**을 사용. 보통 그냥 **getprosol**에서 불러온 값을 써도 큰 문제없음
 - 90° : **zg**을 사용. **paropt**로 계산된 값을 적용
 - 180° 또는 360° **pulse**을 **paropt**로 찾은 후 90° 에 맞는 값을 계산
 - **paropt** 활용하여 측정. (관리자에게 문의)
 - 90% H_2O +10% D_2O solvent를 사용할 때는 **pulsecal** 명령어를 사용해도 됨.
- **AQ** : 직접 설정하거나 **TD/SWH**로 자동계산
 - 보통 0.7~4s정도 설정.
 - 1s보다 짧을 경우에는 **peak** 밑에 **wiggle**이 심함.
 - 너무 길 경우에는 **noise**가 심함.
 - **TD** : 보통 8k ~ 64k를 많이 사용. 아니면 **AQ**에 맞춰서 자동조절사용
 - **SWH(Hz)** : **SW(ppm)* SFO1**
 - 너무 **tight**하게 설정하면 **automatic phase correction + automatic baseline correction**이 잘 작동하지 않음.

■ Parameter 설정 후에는 1D proton처럼 측정

■ Signal to noise 분석

- 에러를 줄이기 위해서는 **S/N > 200:1**이상이 되도록 측정
- 측정방법
 - 명령어 : (**.sino**) → **signal** 범위와 **noise** 범위 설정 가능.
 - 명령어 : (**sino**) → 위의 설정된 범위에서 **S/N** 계산

