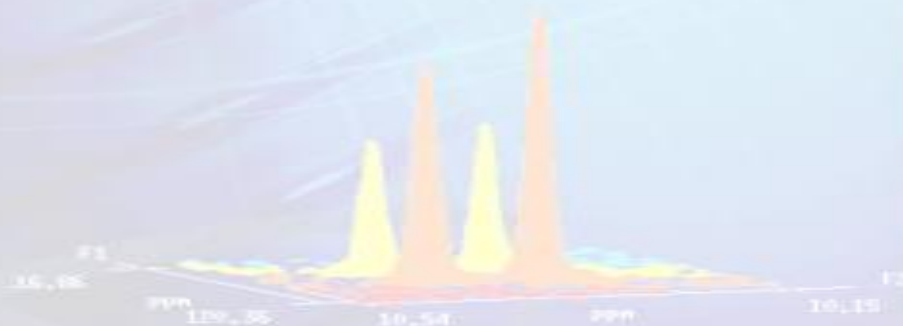


FAQ

# NMR Acquisition



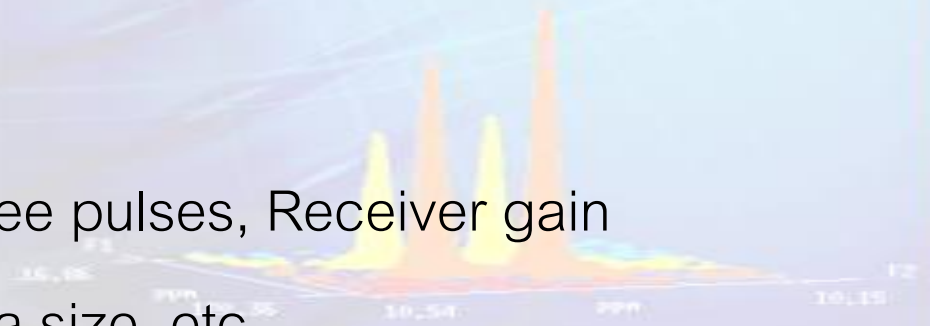
Kwanchai Khongwattananon  
Bruker BioSpin AG, Bangkok, Thailand

ENRICHING LIFE SCIENCE TOOLS  
BASED ON MAGNETIC RESONANCE



# Understand the basic concept

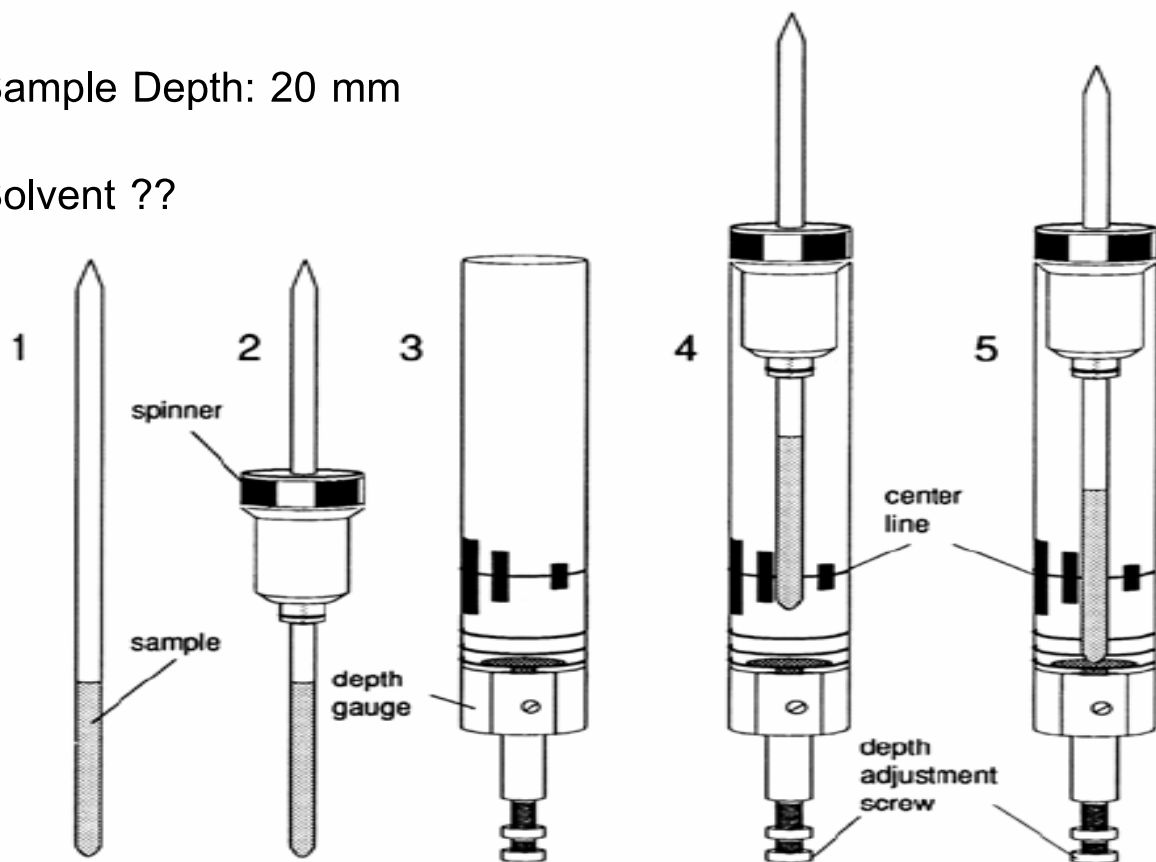
- **Sample:** ตำแหน่ง, ชนิดของหลอด, Solvent ??
- **Magnetic field ( $B_0$ ):** homogeneity, stable ??
- **RF Coil ( $B_1$ ):** ความถี่, ความต้านทาน, ชนิดของ coil ??
- **Parameters:** ถูกต้อง ??
  - Pulse program, 90 degree pulses, Receiver gain
  - Acquisition time, Spectra size, etc.
  - NMR example: “NOEdiff”



# Sample Handling

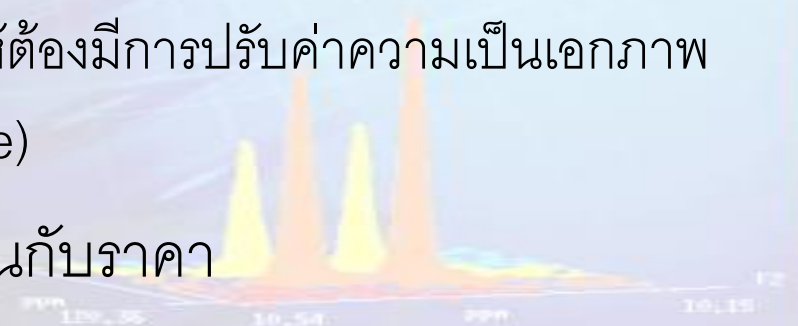
Sample Depth: 20 mm

Solvent ??



# NMR Tubes

- ชนิดของหลอดสารตัวอย่าง มีผลต่อ spectrum อย่างไร
  - ความหนาของหลอด ส่งผลต่อ sensitivity
  - ความหนาและไม่สม่ำเสมอของหลอด ส่งผลต่อการรับพลังงานของ spin
  - ชนิดของหลอดที่แตกต่างกัน ส่งผลให้ต้องมีการปรับค่าความเป็นเอกภาพที่แตกต่างกัน (resolution, lineshape)
- ความสม่ำเสมอของหลอด แปรผกผันกับราคา
- ชนิดของหลอดจึงขึ้นกับจุดประสงค์ และความต้องการของผู้ใช้



# Magnetic Field ( $B_0$ )

## ■ Superconducting Magnet

☞ ยังคงมีความต้านทานเหลืออยู่ ทำให้ความเข้มสนามแม่เหล็กลดลงตลอดเวลา แต่ในอัตราที่ต่ำมาก ในการ run NMR ค่าสนามแม่เหล็กต้องคงที่ (Stable)

=> Lock ??

☞ สนามแม่เหล็กหลักครอบคลุม จะต้องมีความเป็นเอกภาพ นั่นคือทุกๆจุด จะต้องมีความเข้มสนามแม่เหล็กเท่ากัน (Homogeneity)

=> Shim ??

# RF Coil ( $B_1$ )

- RF Coil ( $B_1$ ) หรือที่เรียกกันว่า probehead เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดการ resonance ด้วยการส่งพลังงานที่เหมาะสม (ระดับพลังงาน ความถี่ และเวลาที่ถูกต้อง) ให้กับ spin ในสารตัวอย่าง และรับสัญญาณ FID

☞ ความถี่ **Tuning ??**

☞ ความต้านทาน **Matching ??**

- RF Coil จึงจะต้องมีการออกแบบที่มีลักษณะเฉพาะ เพื่อให้เกิดความไวต่อสัญญาณสูงที่สุดต่อ nuclei (spin) ที่ต้องการ ดังนั้น probehead จึงมีความหลากหลายตามวัตถุประสงค์

# BBI vs BBO Probehead

## ■ BBI Probehead

ถูกออกแบบมาให้เหมาะกับการ  
observe  $^1\text{H}$  และ decoupling  
นิวเคลียสอื่นๆ ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$ )  
โดยเฉพาะ Inverse experiment  
เช่น HMQC, HMBC, NOESY  
Watersuppression เป็นต้น

## ■ BBO Probehead

ถูกออกแบบมาให้เหมาะกับการ  
observe  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$ , Nuclei  
อื่นๆ ในช่วงระหว่าง frequency  
 $^{15}\text{N}$ - $^{31}\text{P}$  และ decoupling  $^1\text{H}$   
ตัวอย่าง experiment เช่น  $^{13}\text{C}$ ,  
 $^{15}\text{N}$ , DEPT, COLOC เป็นต้น

# ปัญหา: Sample, Magnetic ( $B_0$ ), RF Coil ( $B_1$ )

- เมื่อเกิดปัญหาต่างๆ เช่น ไม่มีสัญญาณ lock (2H), ไม่มีสัญญาณ FID (หรือ spectrum) จะต้องตรวจสอบทั้งสามส่วนที่กล่าวมาว่า ถูกต้องหรือไม่ เช่น

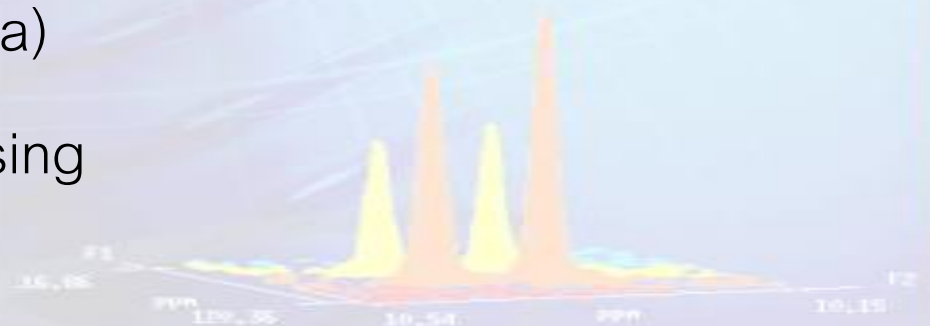
👍 Sample is good ? (position and solvent)

👍  $B_0$  is good ? (good lock and shim)

👍  $B_1$  is good ? (Right probe and good matching & tuning)

# Start your NMR experiment

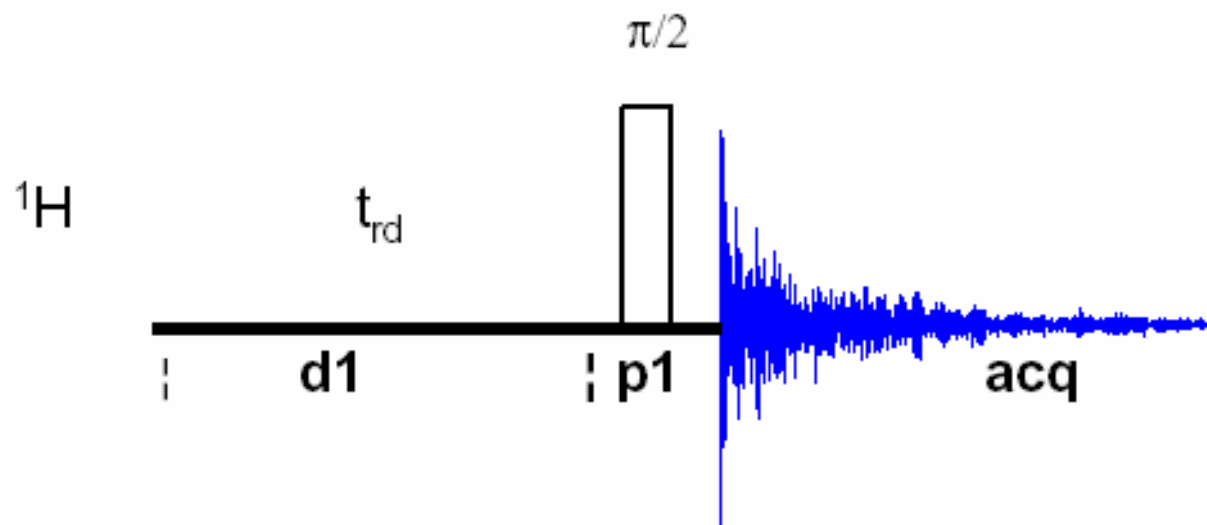
- Set up your NMR experiment e.g. proton, carbon, cosy, hmqc
- Basic experiment : zero and go (zg) for proton (30, 90 pulse)
- Acquire your FID (NMR Data)
- Fourier Transform and phasing
- Analyze your results



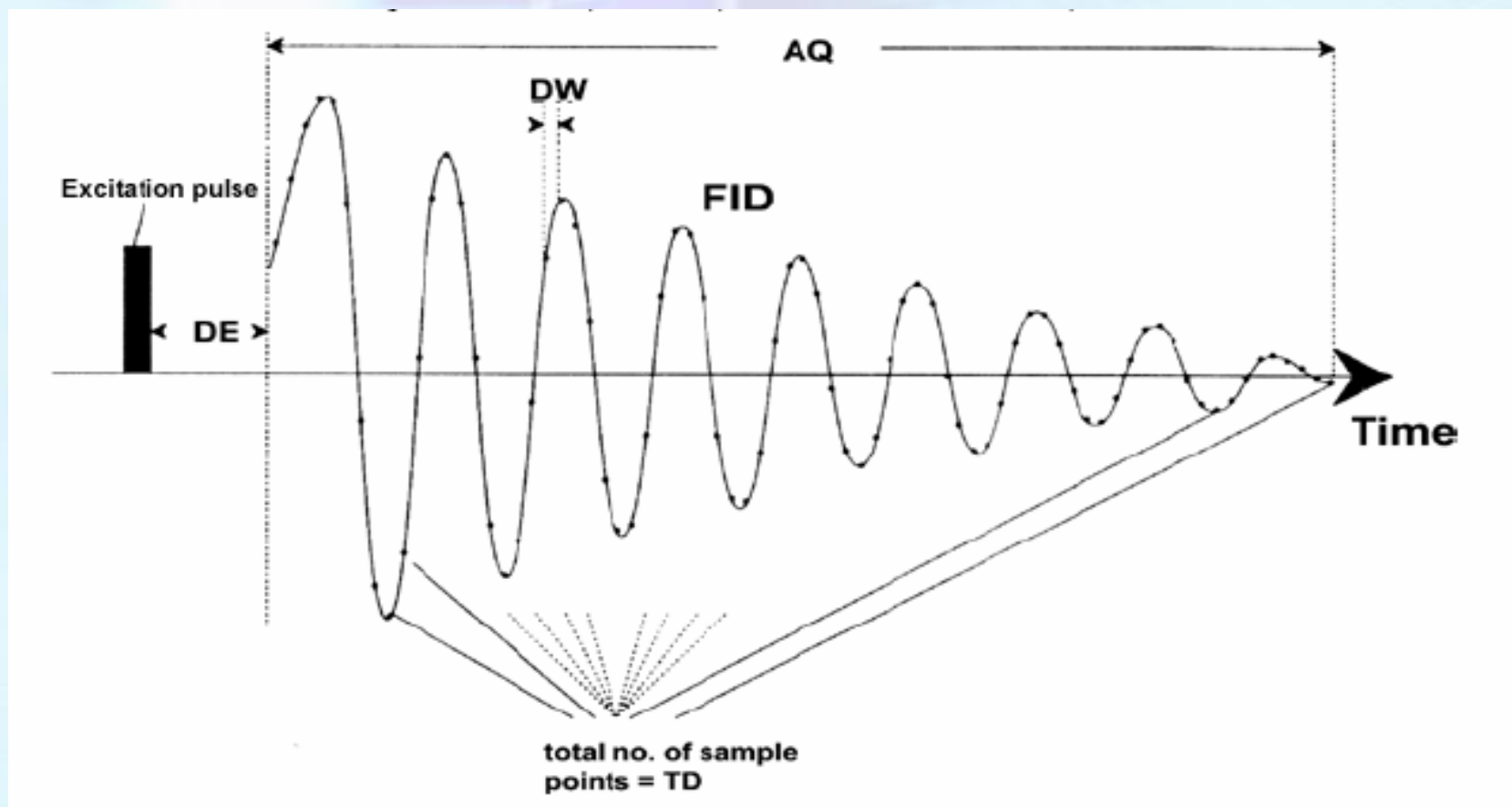
# Zero and Go (ZG) experiment

- zg : “zero and go” experiment for observe  $^1\text{H}$  or  $^{13}\text{C}$  without decoupling

Figure 1:  $1\text{D } ^1\text{H}$  NMR One-Pulse Sequence



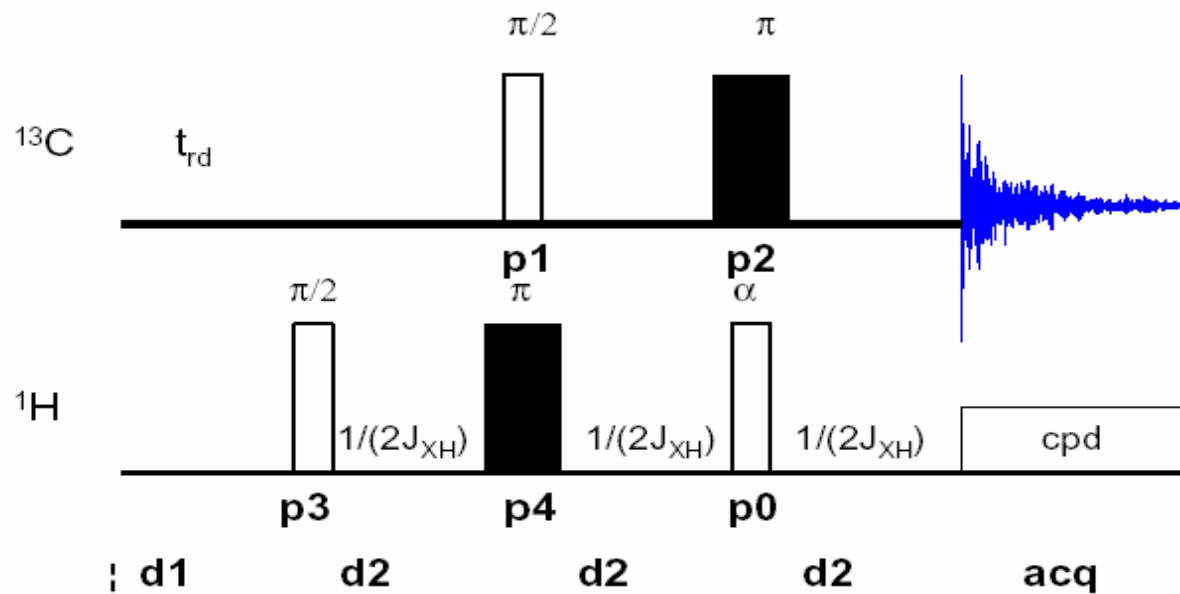
# NMR Parameters



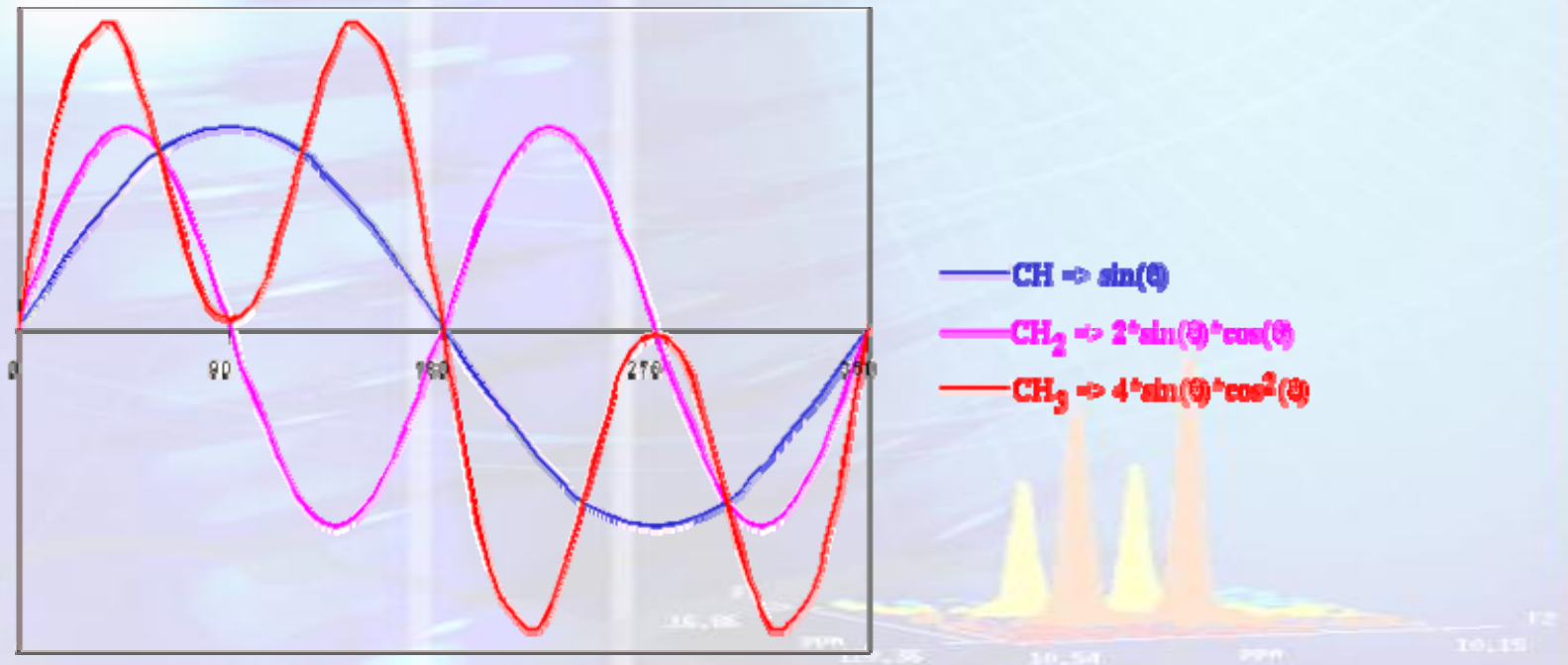
# DEPT Experiments

- DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)

Figure 17: DEPT Pulse Sequence



# DEPT parameters

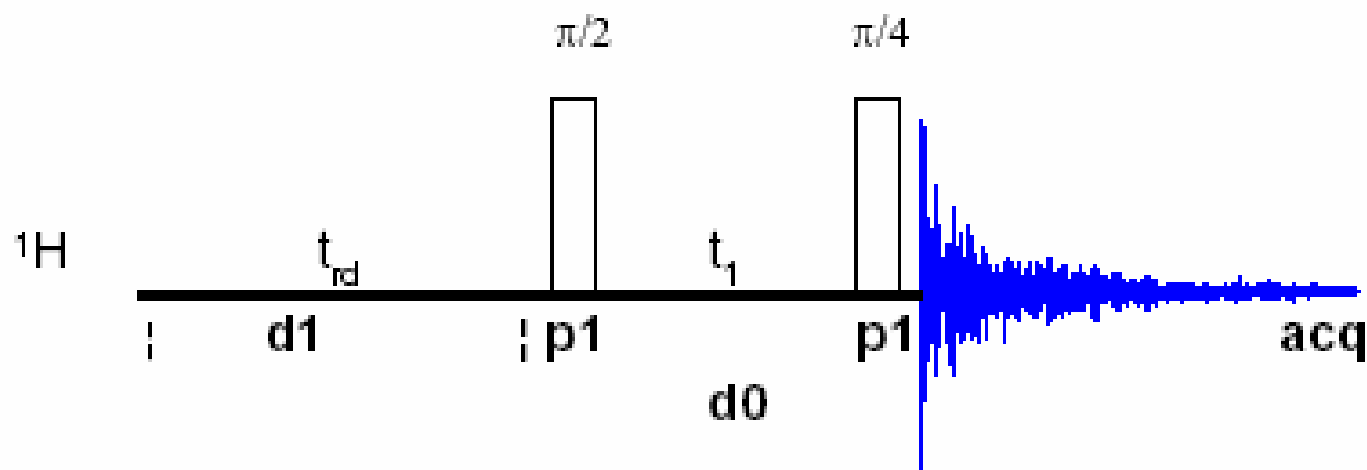


90 degree pulses สำหรับ 1H, X ทั้ง Hard pulse, CPD pulse e.g. p1,p2 สำหรับ X-nuclei ; p3,p4 สำหรับ 1H

# NMR Experiments

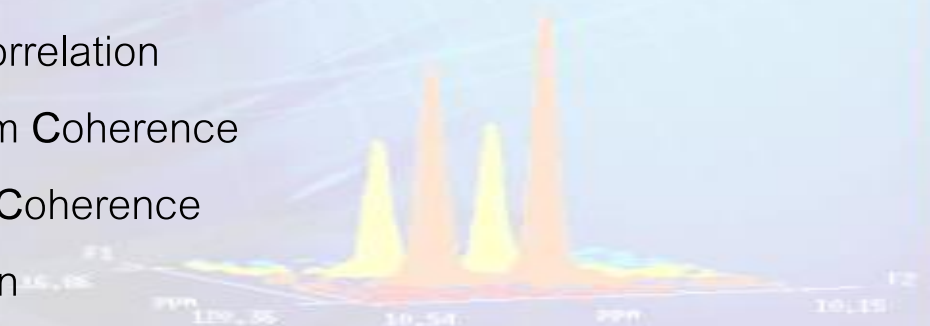
- COSY ( COrrelation SpectroscopY): 1H-1H coupling via scalar coupling

*Figure 19: COSY-45 Pulse Sequence*



# NMR Experiments and more

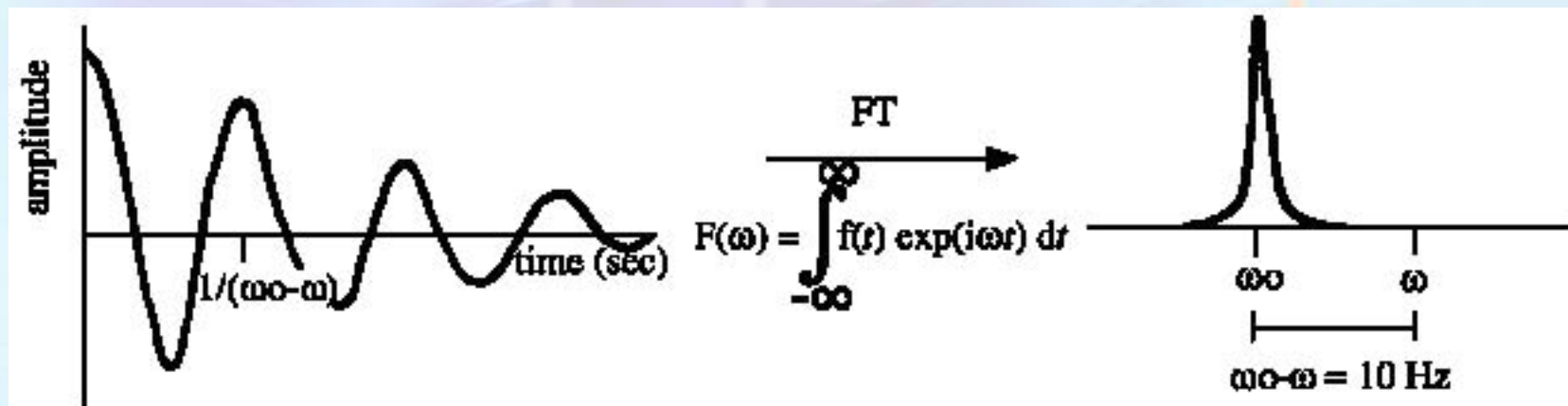
- COLOC = Correlation spectroscopy via Long range Coupling
- COSY = COReLation SpectroscopY
- DEPT = Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
- INADEQUATE = Incredible Natural Abundance Double QUAtum Transfer Experiment
- HETCOR = Heteronuclear Correlation
- HMBC = Heteronuclear Multiple Bond Correlation
- HMQC = Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
- HSQC = Heteronuclear Single Quantum Coherence
- HOHAHA = Homonuclear Hartmann Hahn
- HOESY = Heteronuclear Overhauser Effect SpectroscopY
- NOE = Nuclear Overhauser Effects
- NOESY = Nuclear Overhauser Enhancement SpectroscopY
- ROESY = Rotating frame Overhauser Enhancement SpectroscopY



# Fourier Transform

Fourier Transform :

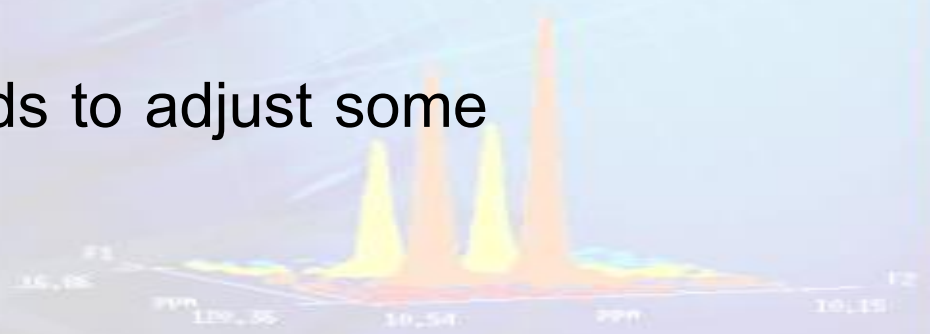
“apply to transform the signal from time domain (FID) to frequency domain (spectrum)”



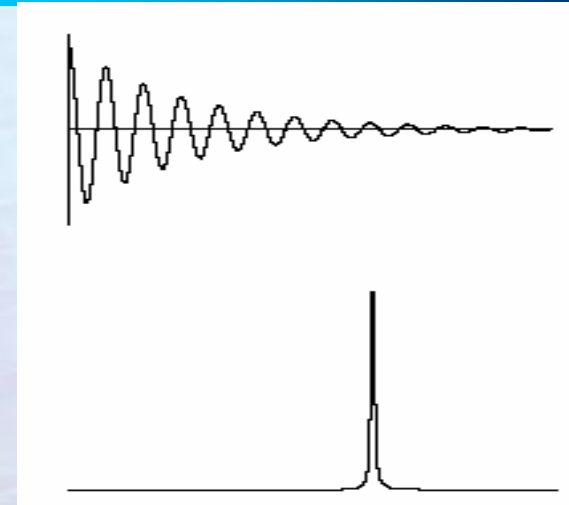
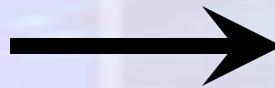
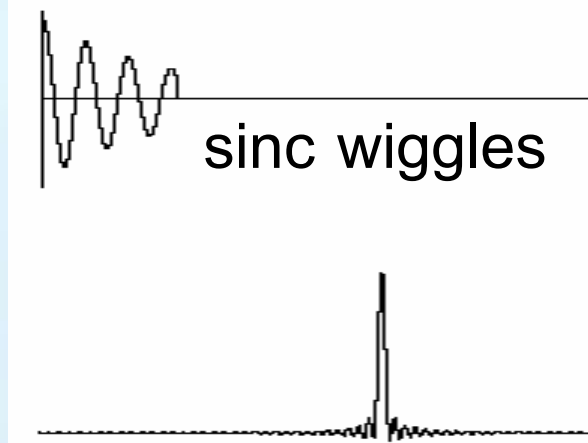
# Look at your spectra!

- Bad Spectra no.1 ?
- Bad Spectra no.2 ?

Not really, it just needs to adjust some parameters



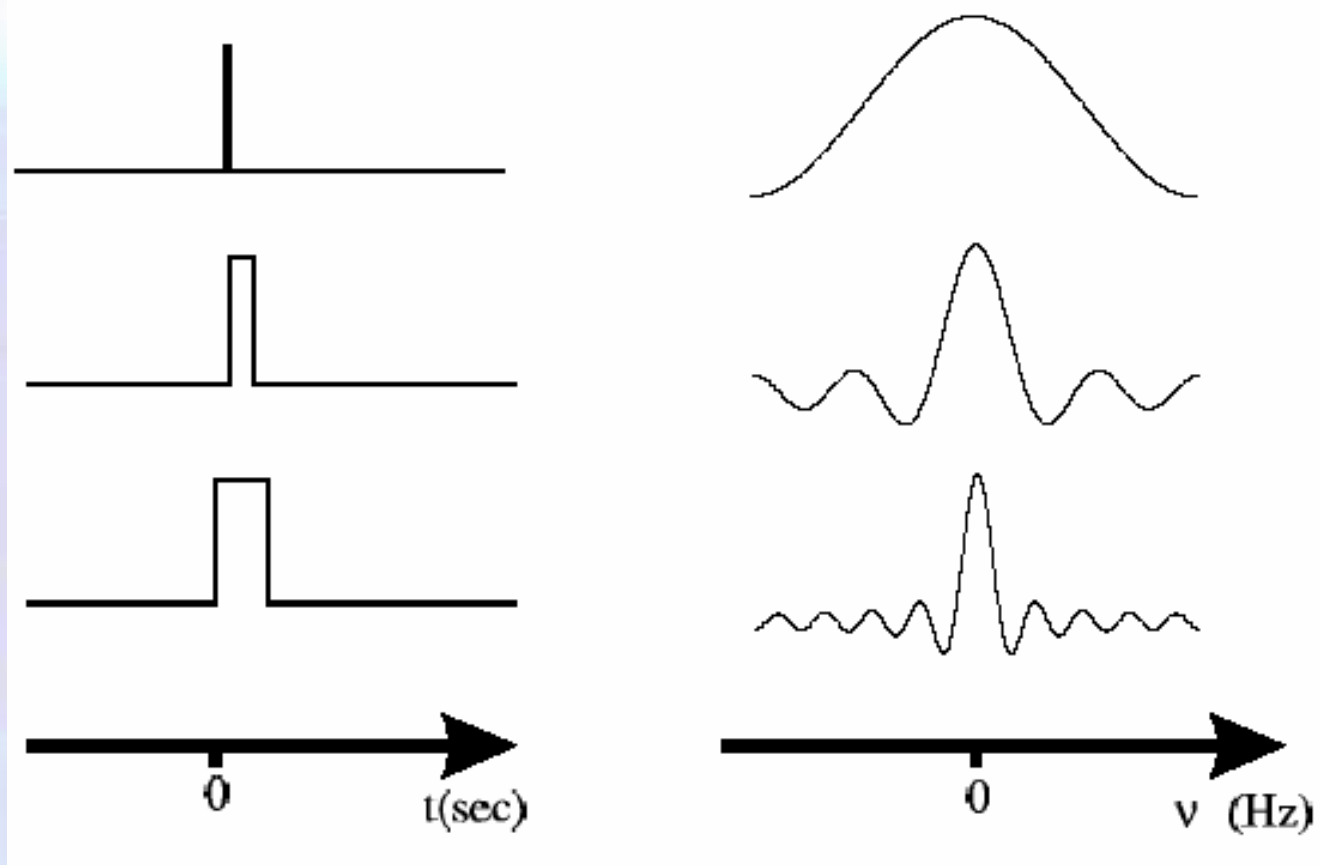
# Bad Spectrum no.1?



ภาครับสัญญาณถูกปิดลง แต่ FID ยังไม่สิ้นสุด จึงทำให้ spectrum มีรูปร่างผิดปกติ (sinc wiggles) ฉะนั้น ถ้าเห็น spectrum ดังรูป จึงไม่ใช่ความผิดปกติของเครื่องแต่อย่างใด

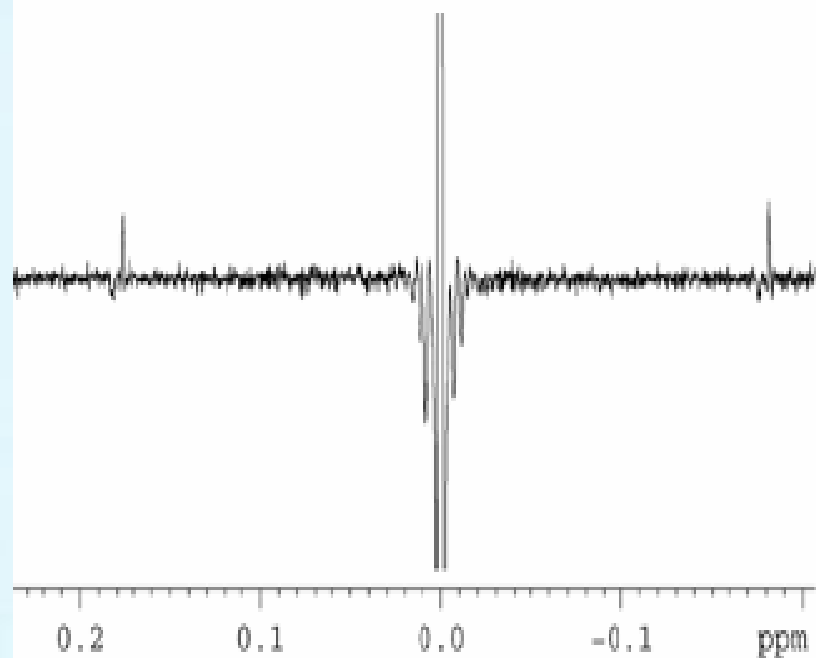
Solution => increase acquisition time

# Truncation

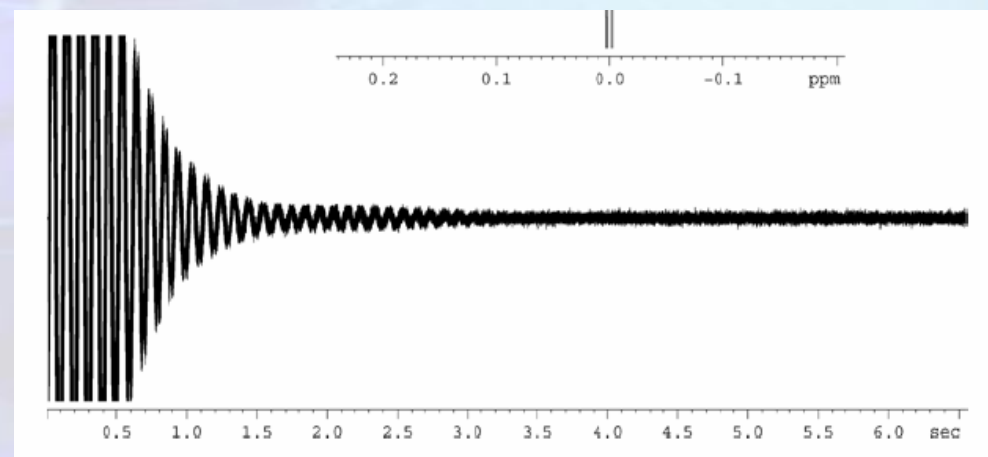


## Bad Spectrum no. 2 ?

i. *Clipped FID as a Result of RG Set too High*



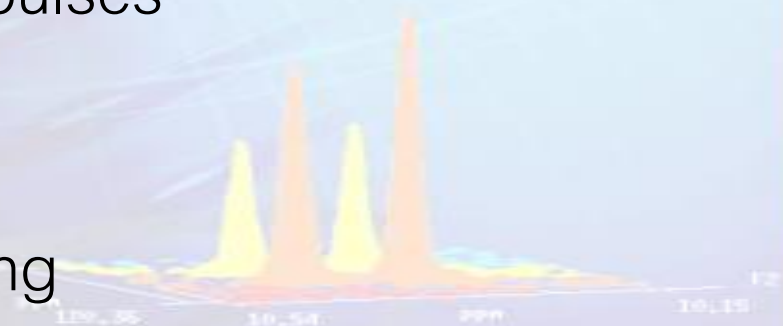
Clipped FID => reduce receiver gain,  
or use 'rga' for automatic  
adjustment



# 90 degree pulse

---

- หาค่า Power level และ Power length
- Hard pulses และ CPD pulses
- Shape pulses
- ปรับ matching และ tuning



# What's 90 Degree Pulse

- $\theta = gB_1 T_p$

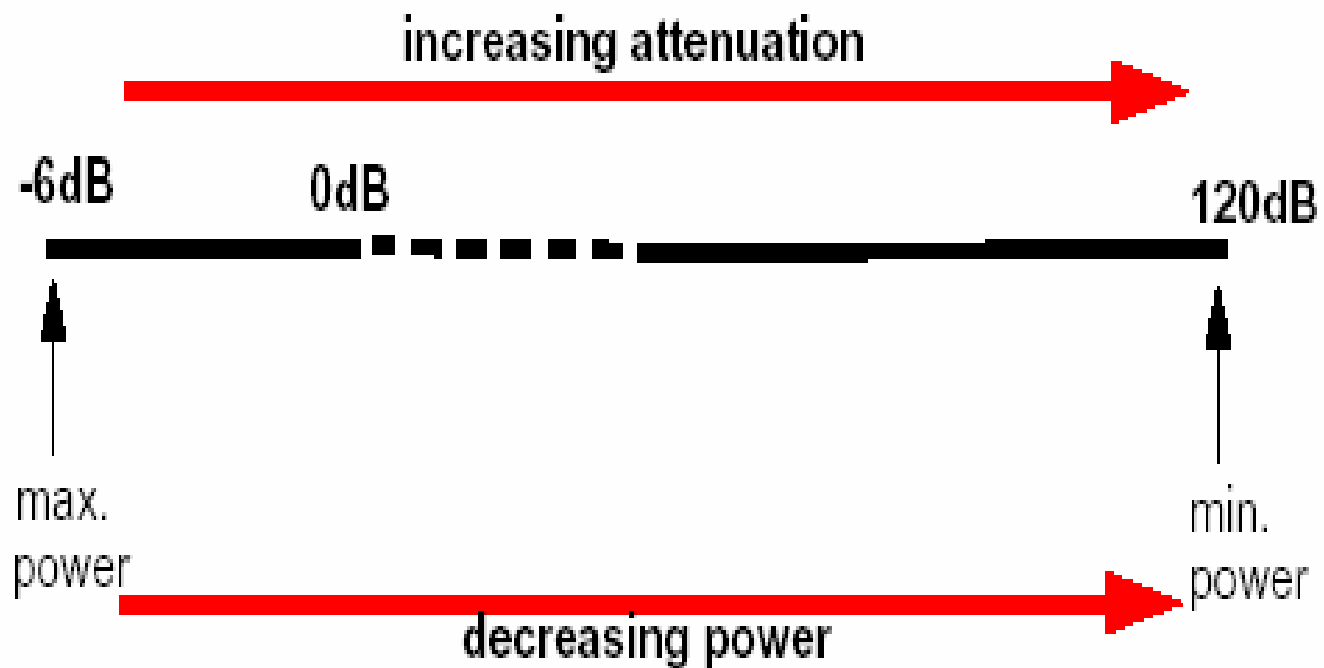
$\theta$  คือมุมที่ spin จะ flip ไป เช่น 45 องศา หรือ 90 องศา เป็นต้น

$g$  คือค่า magnetogyro ratio ของนิวเคลียสนั้นๆ

$B_1$  คือค่าความเข้มสนามแม่เหล็ก (magnetic field) จ่ายกระตุ้นให้กับ sample (resonance) ซึ่งก็คือ pl (power level) pl1, pl2, ..., pl31 หรือเรียกว่า power attenuation มีหน่วยเป็น dB

$T_p$  คือระยะเวลาของ  $B_1$  ที่จ่ายกระตุ้นให้กับ sample ซึ่งคือค่า p1, p2, p3, ..., p31

# Power Attenuation (p11, p12, .., p131)



# Calculation 90 degree pulse: Formula

$$\theta = \gamma B_1 T_p$$

$$\text{dB} = 20 \log ( V_{in} / V_{out} ) = 10 \log ( P_{in} / P_{out} )$$

$$\text{dB} = p1..p31 \text{ (dB in attenuation unit)}$$

$$T_p = p1..p31 \text{ (usec)}$$

$$PI1 - PI2 = 20 \log ( P1/P2 )$$

$$\text{EX. } 0 - PI12 = 20 \log ( 7/100 )$$

$$- PI12 = -23.098$$

$$PI12 = 23 \text{ dB at } 100 \text{ us.}$$

# 90 Degree pulse determination

## ■ การหา 90 pulse

1. ใช้การตรวจสอบที่ 180 องศา : ง่ายและรวดเร็ว
2. ใช้โปรแกรม 'paropt' ในการหาค่า : สามารถเห็นการตอบสนองที่ค่าต่างๆได้ และง่ายต่อการอธิบายผล
3. การหาค่าแบบ indirect observe เช่นในกรณีของการหาค่า 90 pulse ของ  $^{13}\text{C}$  ใน probe BBI จะใช้ pulse program "dec90"

# Sample & method: 90 pulse 1H,13C

## ■ For 1H nuclei

- ☞ Direct OBS: 0.1%EB => “180 pulse with zg” or “paropt”
- ☞ Indirect OBS: ASTM => “dec90” pulse sequence (CPD: waltz16)
- ☞ Direct OBS: any sample => “180 pulse” or “paropt”

## ■ For 13C nuclei

- ☞ Direct OBS: ASTM => “180 pulse” or “paropt”
- ☞ Indirect OBS: UREA => “dec90” pulse program
- ☞ Indirect OBS: CHCl3 => “dec90” pulse program

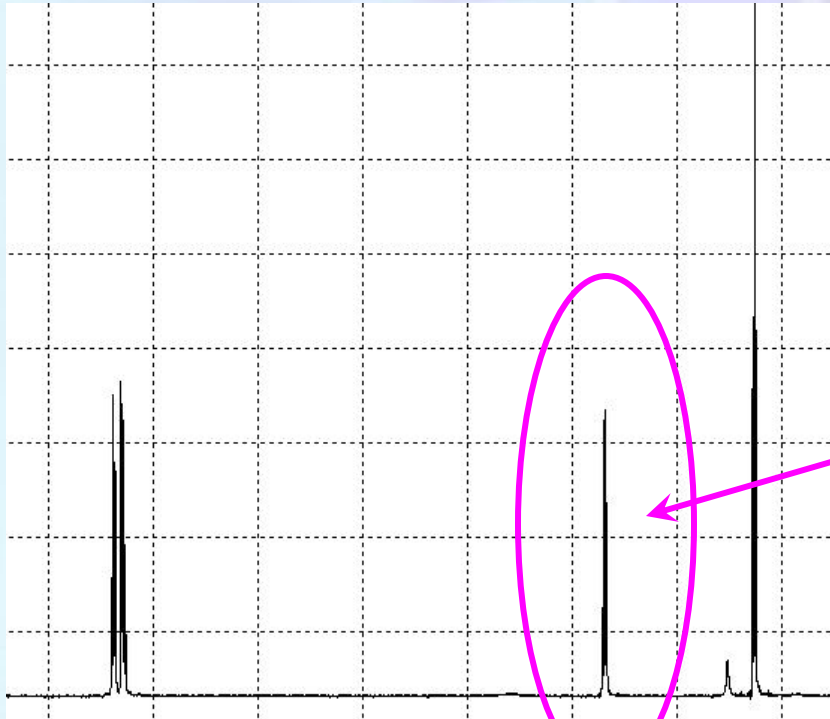


# 1H 90 pulse determination, 0.1%EB

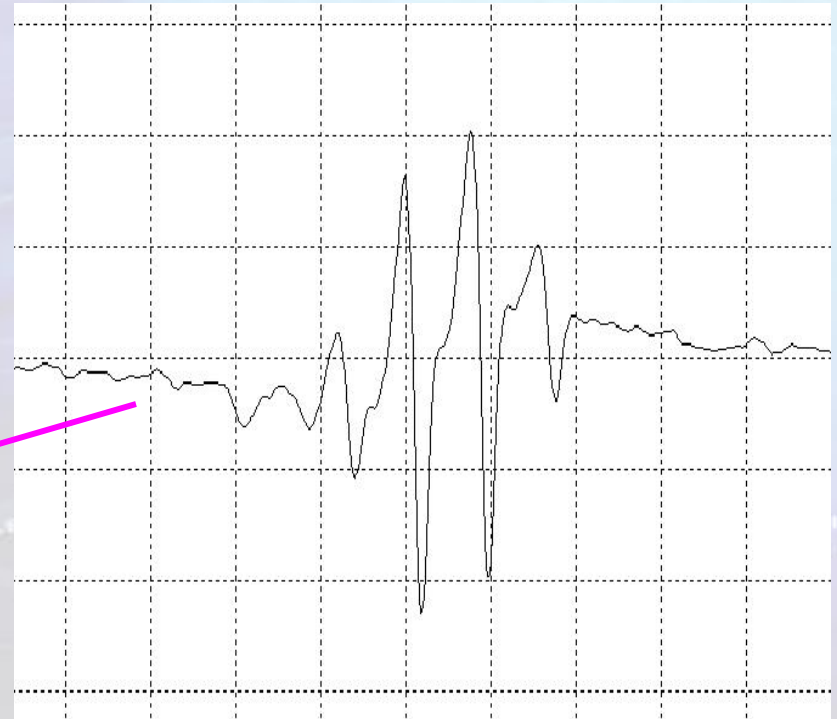
- Lock and shim the magnetic field
- Tune and match the RF coil (probe)
- ใช้ pulse program ‘zg’ ไม่ใช่ ‘zg30’
- “d1” should be long enough for equilibrium  $> T1$  (15 sec)
- Use only 1 scan, ns=1
- เราสามารถ fix ค่า ‘p1’ และหาค่า ‘p1’ หรือในลักษณะตรงกันข้าม เช่น กำหนด fix ค่า ‘p1=-3dB’ และหาค่า ‘p1’
- พิจารณาค่า 180 องศาที่ CH2 group

# $^1\text{H}$ , 0.1% EB $\Rightarrow$ 180 degree spectra

< 90 degree pulse

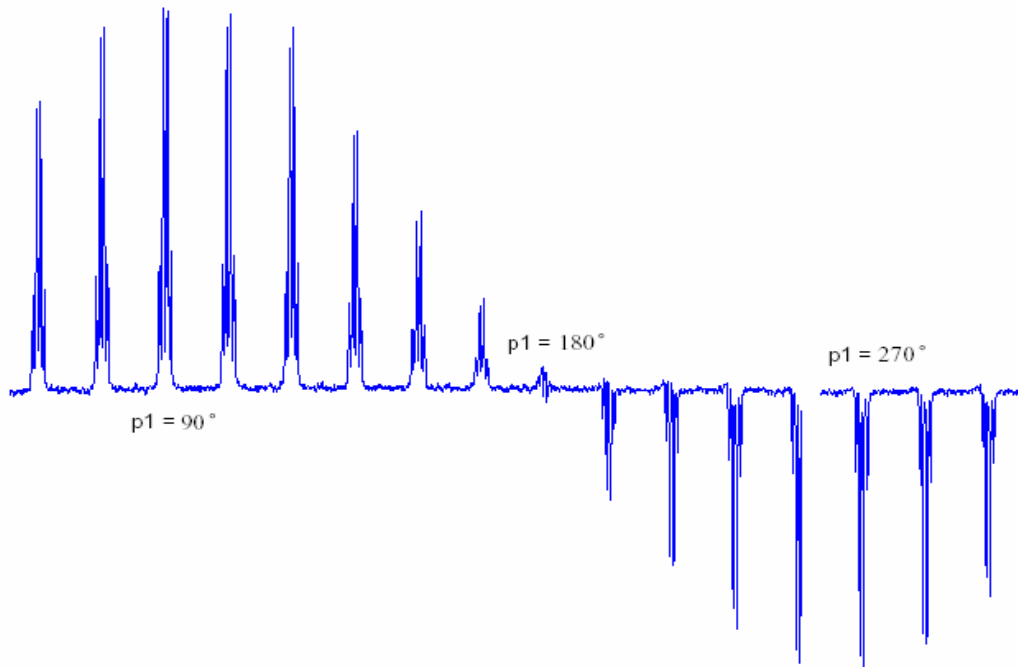


180 degree pulse



# 1H, 0.1%EB => 'paropt' spectra

Figure 3: Paropt Results for 1H 90° Pulse Calibration

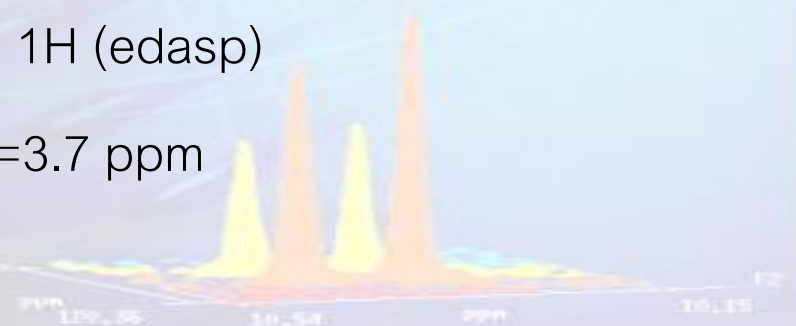


1. Run normal 1H spectra, phase ต้องถูกต้อง
2. define region เฉพาะรอบ CH2 group
3. “paropt” กำหนดตัวแปรที่ต้องการ vary, กำหนดค่าเริ่มต้น และจำนวน exp
4. Take about 6 mins for 16 experiments

# 1H 90 degree pulse determination, ASTM

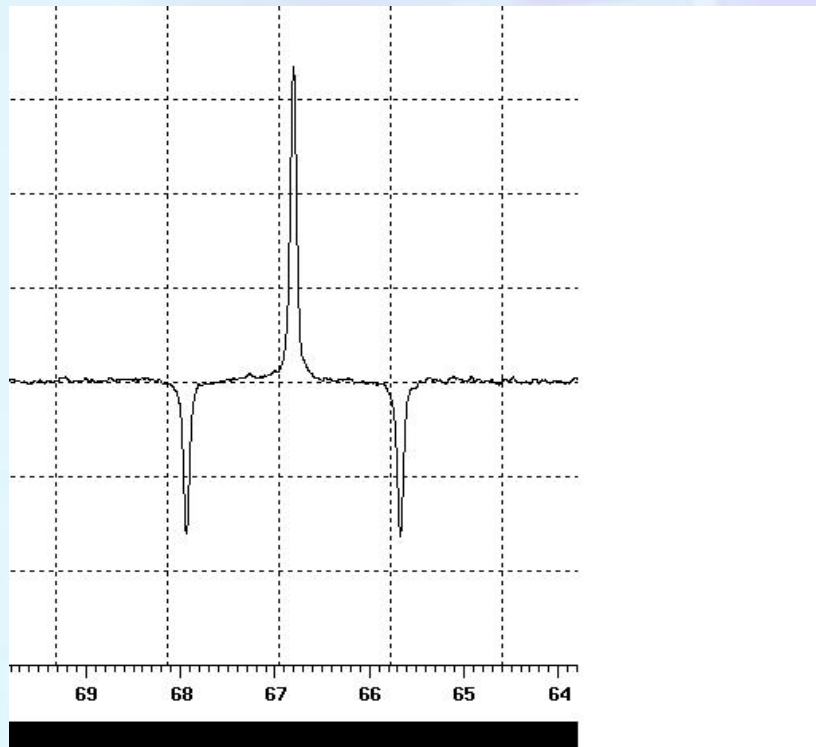
■ 1H Indirect observe,  $\text{CH}_2$  peak at 67 ppm with following parameter;

- pulprog = decp90, d1 > 10 s.
- 1<sup>st</sup> channel to  $^{13}\text{C}$ , 2<sup>nd</sup> channel to 1H (edasp)
- o1p = 67 ppm, swh = 3 kHz, o2p=3.7 ppm
- p1,p11 is 90 degree pulse of  $^{13}\text{C}$
- p3 = variable, pl2 = 20 dB for 1H (example)
- cnst2 = 142 Hz, d2 = 3.52 msec

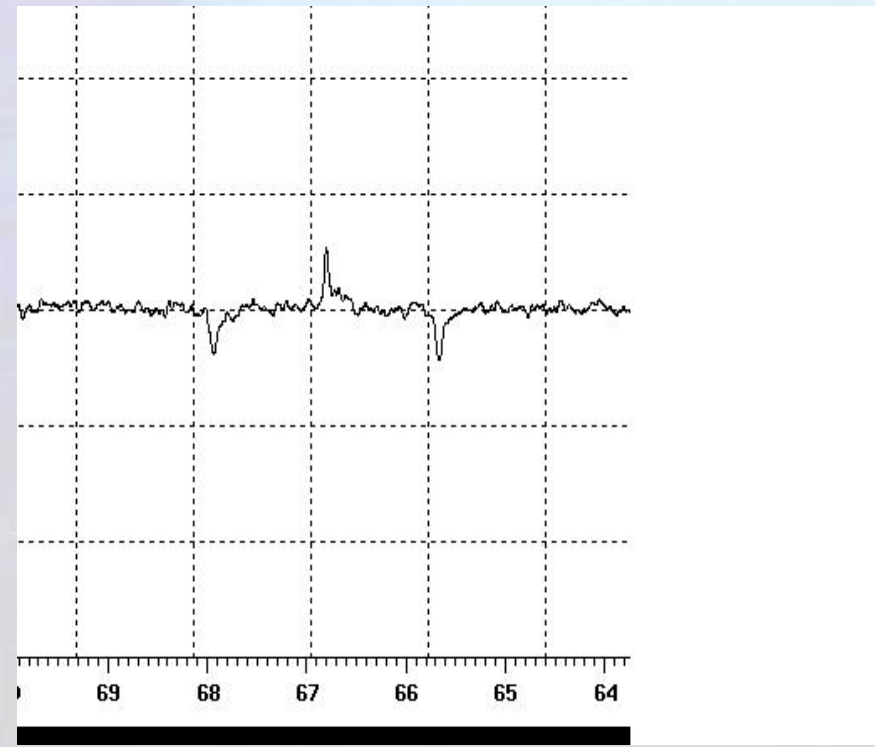


# 1H 90 degree pulse determination, ASTM

< 90 degree pulse

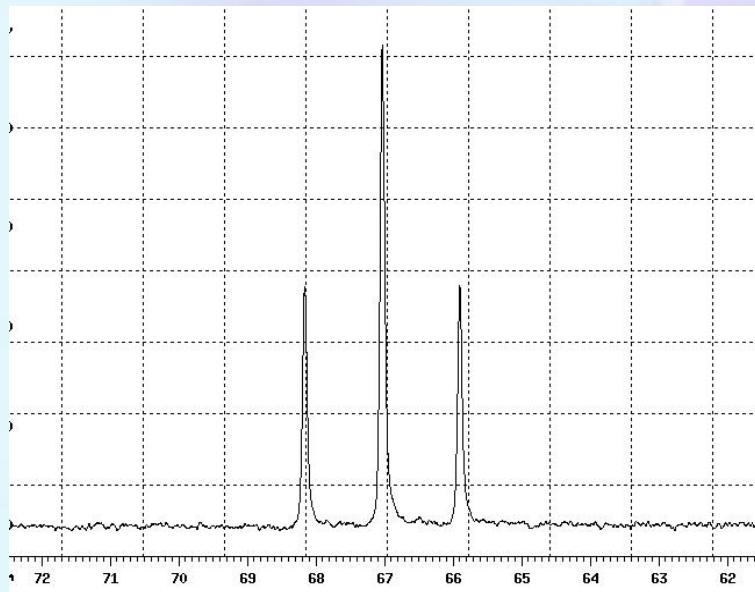


90 degree pulse



# $^{13}\text{C}$ 90 degree pulse calibration, ASTM

- Can be done same as  $^1\text{H}$  with ASTM in  $\text{C}_6\text{D}_6$
- Look at the left triplet group (67ppm), vary the p1 or pl1, d1 > 10 s.



90 degree pulse

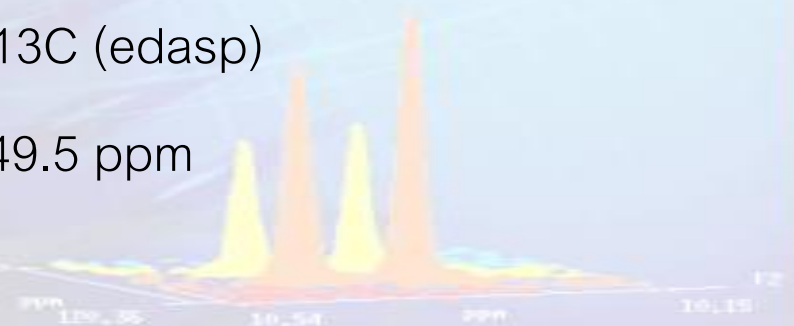


180 degree pulse

# 13C 90 degree pulse calibration, UREA

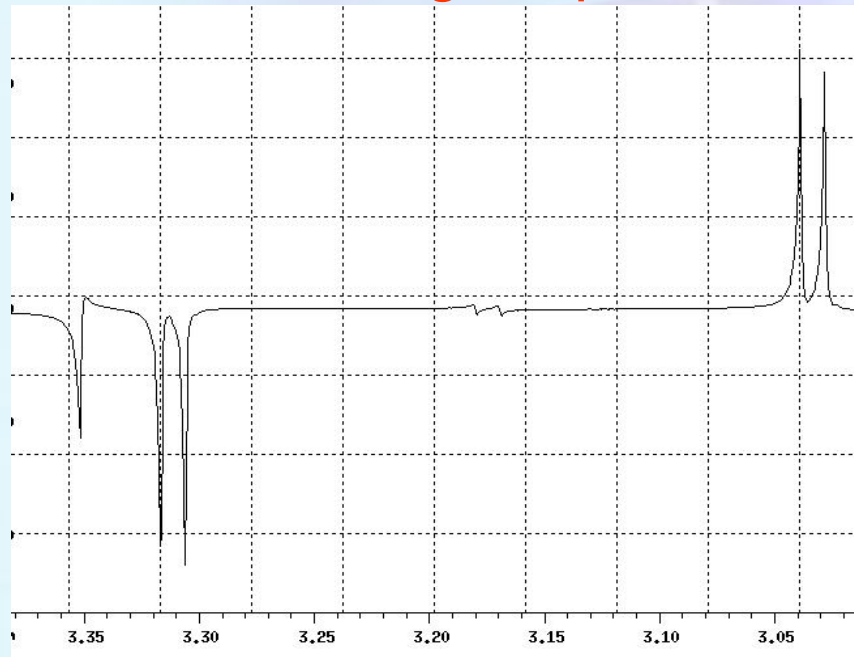
■ Use **UREA** sample, indirect observe,  $\alpha$  peak ที่ 3.2 ppm with following parameter;

- pulprog = decp90, d1 = 5 s.
- 1<sup>st</sup> channel to 1H, 2<sup>nd</sup> channel to 13C (edasp)
- o1p = 4 ppm, sw = 8 ppm, o2p=49.5 ppm
- p1,p11 is 90 degree pulse of 1H
- p3 = variable, pl2 = -3 dB for 13C (example)
- cnst2 = 139 Hz, d2 = 3.59 msec

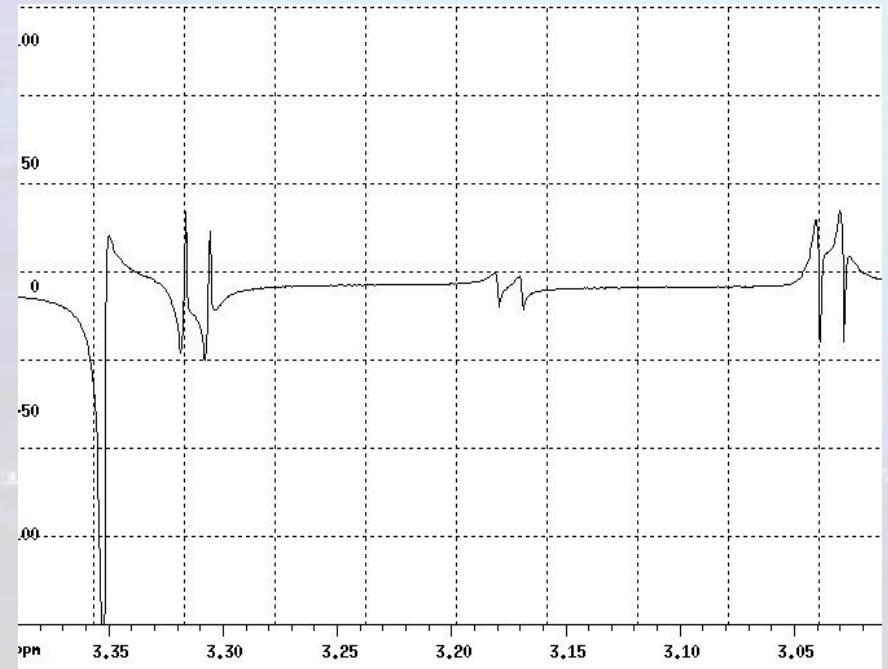


# $^{13}\text{C}$ 90 degree pulse calibration, Urea

< 90 degree pulse



90 degree pulse



# NOEdiff set up concept

1. Determine the frequency lists include one at -2 ppm as reference spectra: utilities -> frqlist.  
frqlist can be any name, example : noediff (this is a base name), while determine frqlist => noediff.1, noediff.2, ...
2. Check the irradiate power , pl14 ( default is 70 dB), using the noemul pulse program, parameter set can be read from standard parameter (use rpar + getprosol)
3. Start the au program “noemult” to start the NOE experiment
4. After acquisition finished, subtract each one with reference spectrum to observe the noe effect