

文件编号：WU-ISCMS-QM 20201674

版本号：V1.1

受控状态：

分发号：

分子科学公共实验平台

质量管理文件

500 MHz 液体核磁共振波谱仪 (超低温探头) 标准操作规程

2022 年 03 月 20 日发布

年 月 日实施

分子科学公共实验平台 发布

修订页

修订日期	版本号	修订说明	修订	审核	批准
2020.03.20	V1.0	发布试行	施孝活	卢星宇	
2022.01.23	V1.1	修改安全事项及管理规范	施孝活	陈银娟	卢星宇

分子科学公共实验平台

目 录

1. 目的	1
2. 范围	1
3. 职责	1
4. 核磁共振谱仪安全管理规范	2
5. 磁共振实验室仪器设备管理规范	3
5.1. 500 MHz 液体核磁共振谱仪（超低温探头）使用制度	3
5.2. 预约制度	4
5.3. 培训考核制度	5
5.4. 仪器故障报告	6
5.5. 实验脉冲序列分类	6
6. 实验内容	7
6.1. 系统组成	7
6.2. 系统检查	8
6.3. 样品的准备	9
6.4. Topspin 软件简介	10
6.5. 500 MHz 液体核磁共振波谱仪（超低温探头）自动进样器的使用	11
6.6. 500 MHz 液体核磁共振波谱仪（超低温探头）一维谱实验手动操作流程	16
6.6.1 一维氢谱	16
6.6.2 一维碳谱	21
6.6.3 一维氟谱	25
6.7. 500 MHz 液体核磁共振波谱仪（超低温探头）二维谱实验手动操作流程	27
6.7.1 COSY: H-H 直接相关	27
6.7.2 NOESY: H-H 空间相关	29
6.7.3 TOCSY: H-H 全相关	33
6.7.4 HSQC: C-H 直接相关	35
6.7.5 HMBC: C-H 远程相关	37
6.7.6 二维谱实验注意事项	39
6.8. 一维核磁图谱的处理	39
6.8.1 处理参数的设置	39

6.8.2	傅立叶变换 (efp)	40
6.8.3	相位校正 (apk)	40
6.8.4	基线校正 (abs)	41
6.8.5	定标	41
6.8.6	谱峰标识	42
6.8.7	积分	42
6.8.8	图谱的输出	43
7.	相关/支撑性文件	44
8.	记录	44

分子科学公共实验平台

1. 目的

建立 500 MHz 液体核磁共振波谱仪(超低温探头)标准操作规程, 使其被正确、规范地使用。

2. 范围

本规程适用于所有使用 500 MHz 液体核磁共振波谱仪(超低温探头)的用户。

3. 职责

3.1. 用户: 严格按本程序操作, 发现异常情况及时汇报实验室技术员。

3.2. 实验室技术员: 确保操作人员经过相关培训, 并按本规程进行操作。

3.3. 文章致谢格式

根据学校指导意见, 使用各校级平台仪器设备表征产生的科研成果必须致谢平台。如果您在文章成果中使用了光谱、色质谱、磁共振波谱以及其他属于分子科学平台的仪器设备, 请务必在文末致谢分子科学公共实验平台。

英文文章致谢:

① Acknowledgement: The author thanks (Dr. XXX from) Instrumentation and Service Center for Molecular Sciences at Westlake University for (the assistance/discussion/supporting in) ... measurement/data interpretation.

② Coauthorship on the resulting publications would be appreciated if our staff make technical contributions (including but not limited to critical sample preparation, novel experiment designation and comprehensive data analyzation).

Affiliation address: "Key Laboratory of Precise Synthesis of Functional Molecules of Zhejiang Province, School of Science, Instrumentation and Service Center for Molecular Sciences, Westlake University, 18 Shilongshan Road, Hangzhou 310024, Zhejiang Province, China."

中文文章致谢:

① 致谢: 感谢西湖大学分子科学公共实验室平台 XXX 博士(或者 XXX 老师)在.....表征或数据分析上提供的帮助。

② 共同作者: 如果分子科学平台老师在您课题组样品表征或文章发表上有重要技术贡献(包括但不限于关键样品制备、新型实验设计和深度数据分析), 我们感谢您将相关

老师列为共同作者，作者单位地址如下：西湖大学，分子科学公共实验平台，功能分子与精准合成浙江省重点实验室，杭州，310030，浙江。

4. 核磁共振谱仪安全管理规范

- 4.1. 相关人员进入实验室之前必须通过学校、中心和平台的安全考试或考核。严禁无关人员进入实验室。
- 4.2. 爱护核磁实验室公共基础设施，包括桌椅、上样扶梯、除湿机等。
- 4.3. 严格遵守磁共振实验室的各项安全注意警示标识规范或要求。
- 4.4. 严禁心脏起搏器或金属关节的使用者接近磁体，切勿携带铁磁性物质，如钥匙、手表、雨伞、耳机、手机、银行卡等物品靠近磁体。
- 4.5. 进入磁共振实验室后应远离磁体，除放样品之外，人员应保持至少在 5 高斯线范围以外。在等待上样时，请不要在磁共振实验室频繁的来回走动，以免对其他使用者的实验造成干扰。
- 4.6. 严禁在实验室内使用金属座椅与钢铁做成的梯子。不要在磁体附近使用螺丝刀、螺钉等铁磁性工具。严禁碰撞磁体。
- 4.7. 磁共振实验室通道及消防紧急通道必须保持畅通，所有实验人员应了解消防器具与紧急逃生通道位置。
- 4.8. 严禁戴手套接触门把手。禁止随意丢弃实验废弃物。禁止将锐器、玻璃、枪头丢弃在常规垃圾箱中。
- 4.9. 磁共振实验室应保持整洁，严禁摆放与实验无关的个人物品。严禁在实验室饮食与抽烟。严禁动物进入实验室。
- 4.10. 不建议使用杂牌或者无牌核磁管；核磁样品管必须保持清洁、均匀、不弯曲、管口无破损；不得使用粘贴类标签，应使用记号笔标记。样品管可进行烘干，但不能超过 80 °C。核磁管使用时间半年以上的，或者短时间内重复大量使用的，建议换新。
- 4.11. 定深量筒，白色塑料基座的位置放在定深量筒中线以下 20 mm 处。不可随意改变定深量筒的位置。
- 4.12. 上样前，核磁管帽要盖紧，一定要用绸布或无尘纸将核磁管外壁擦拭干净。当没有气流时，严禁将样品扔进磁体。需等自动进样器灯变绿色时，才能上样或取样。严禁直接在自动进样器对准磁体口的位置上样或取样。不得将空转子放入磁体，不得将转子自行带出磁共振实验室。

- 4.13. 非常规实验测试须技术员同意并指导方可进行。个人 U 盘、移动硬盘等易带入病毒的存储设备不得与核磁谱仪工作站电脑连接。
- 4.14. 禁止自主上机时做强酸、强碱、强腐蚀性、高盐、产气以及还在发生化学反应的样品；不可擅自做变温实验，如有需求请务必联系技术员；低温实验时，若发现磁体匀场线圈或磁体底部黑色法兰盘上明显结露时，必须即刻停止降温，尽快恢复温度。同时注意匀场线圈的温度。低温实验时必须时刻有技术员在场辅助。
- 4.15. 严禁擅自处理、拆卸、调整仪器主要部件。使用期间如仪器出现故障，使用者须及时通知技术员，以便尽快维修或报修，隐瞒不报者将被追究责任，加重处理。
- 4.16. 务必提前通过培训考核，方可取用液氮。取用液氮时，必须佩戴面罩和防冻手套。

5. 磁共振实验室仪器设备管理规范

5.1. 500 MHz 液体核磁共振谱仪（超低温探头）使用制度

该仪器遵从学校“科研设施与公共仪器中心”对大型仪器设备实行的管理办法和“集中投入、统一管理、开放公用、资源共享”的建设原则，面向校内所有教学、科研单位开放使用；根据使用机时适当收取费用；并在保障校内使用的同时，面向社会开放。

核磁共振样品检测方案分为五类：

- (1) 培训测试：用户负责装样，与技术员共同操作仪器并做数据处理；
- (2) 自主测试-初级：用户负责装样，并独立操作自动进样器控制软件 icon，*可操作实验^a*仅限于 icon 中的常规一维氢、氟、碳谱及常规二维氢氢、碳氢相关谱；
(达到 Bruker 基础用户培训标准，培训期为一天。)
- (3) 自主测试-中级：用户负责装样，并独立操作仪器，*可操作实验^a*包括手动操作 Topspin 中的常规一维氢、氟、碳谱及常规二维氢氢、碳氢相关谱；
(达到 Bruker 研讨班培训标准，培训期为一周。)
- (4) 自主测试-高级：用户负责装样，并独立操作仪器，*可操作实验^a*包括 icon 中的高级实验及手动操作 Topspin 中的复杂一维谱（带各种压水、去耦方法）、高级二维同核及异核相关谱、及纵向弛豫、横向弛豫、自扩散系数等动力学参数表征；
(达到 Bruker 高级研讨班培训标准，培训期为一个月。)
- (5) 自主测试-特级：用户负责装样，并独立操作仪器，*可操作实验^a*包括上述初、中、高级实验及手动操作 Topspin 中的选择性脉冲激发一维氢谱、其他特殊核一维谱、特殊二维谱及多种三维谱，并可对核磁共振脉冲序列做相应的改进和开发；
(等同技术员标准，培训期为六个月。)

(6) 维护/开发测试：技术员负责装样，定期检测仪器性能（灵敏度、线形等）、维护设备运行、开发新方法/技术；

(7) 送样测试：用户负责装样，技术员操作仪器并做基本数据处理；

a. 可操作实验具体见该仪器《标准操作规程》中的“实验脉冲序列分类”，并保持日后更新。

该仪器的使用实行预约制度，请使用者根据样品的测试要求在学校“大型仪器共享管理系统”（以下简称大仪共享）进行预约，并按照要求登记预约信息。

5.2. 预约制度

为充分利用仪器效能、服务全校科研工作，根据测试内容与时间的不同，磁共振实验室制定了核磁共振谱仪 7*24 小时预约制度。根据预约制度可登陆大仪共享网站最少提前 2 小时预约机时，包括周末；寒暑假及国庆假期最少提前一天预约机时。（注仪器预约系统中的设置为：添加预约最早可提前 7 天，最晚可提前 0 分钟，修改/删除预约最晚可提前 30 分钟）

请严格遵守预约时间使用仪器，以免浪费机时。如需调换时间段，在技术员同意下可与其他使用者协商。因故不能在预约时间内测试者，请提前 2 小时取消预约并通知技术员。恶意预约机时或有多次无故不遵预约规则的用户，实验室将进行批评教育、通报批评或取消上机资格等处罚。

预约时段		预约时间/每人	测试内容
周一 至 周六	09:00 至 23:59	每人可预约机时为 10-30 分钟	一维氢、氟、碳、磷谱等，以自主测试为主
	00:00 至次日 08:59	每人可预约机时为 10-540 分钟，低浓度及特殊样品请与技术员讨论	一维氢、氟、碳、磷谱，二维氢氢、碳氢谱等，以自主测试为主
周日 及节 假日	自主测试 送样测试 维护/开发测试	每人可预约机时为 10-240 分钟，低浓度及特殊样品请与技术员讨论	一维氢、氟、碳、磷谱，二维氢氢、碳氢谱等，根据用户培训情况，陆续更新中、高、特级实验

(1) 校内使用者须经过技术员的实验操作培训，考核合格后方可上机使用；核磁培训应至少提前一天向技术员提出申请并预约；

- (2) 为避免机时的浪费, 应严格遵守预约时间, 因故不能在预约时间内测试者, 请提前 30 分钟取消预约;
- (3) 估计好实验时间, 严禁占用他人机时。若占用他人机时, 他人有权停掉相关实验;
- (4) 如果在自动进样器预设实验, 必需预约好相应时段机时, 并告知仪器管理员或在“NMR 用户技术交流群”说明;
- (5) 实验过程中, 勿随意关掉软件或退出系统, 万一误关, 务必还原; Topspin 软件的快捷方式统一放在桌面的右下角;
- (6) 实验开始时务必在实验记录本上登记, 结束时如实记录仪器状态;
- (7) 严禁擅自处理、拆卸、调整仪器主要部件。使用期间如仪器出现故障, 使用者须及时通知技术员(比如: 核磁管卡在进样器上, 切勿强行取下来, 应及时联系技术员), 以便尽快维修或报修, 隐瞒不报者将被追究责任, 加重处理;
- (8) 因人为原因造成仪器故障的(如硬件损坏), 其导师课题组须承担维修费用;
- (9) 不可擅自做变温实验, 如有需求请务必联系技术员;
- (10) 禁止在仪器工作站上删改核磁共振原始数据, 禁止用 U 盘与移动硬盘直接拷贝数据。使用者应根据要求通过科研仪器网/数据服务器传送下载原始数据至本地电脑, 以保存并做数据处理; 实验数据在本实验室电脑中保留 2 年;
- (11) 使用者应保持实验区域的卫生清洁, 测试完毕请将转子放回原位并及时带走样品, 技术员不负责保管用户样品。取样品时, 请确保为自己的样品, 误拿他人样品, 请及时放回原处。取样时务必小心, 万一弄断自己或他人的核磁管, 切勿私自处理, 应及时报告技术员。

使用者若违犯以上条例, 将酌情给予警告、通报批评、罚款及取消使用资格等惩罚措施。

5.3. 培训考核制度

校内教师、研究生均可提出预约申请, 由技术员安排时间进行培训, 培训内容包括仪器使用规章制度、送样须知及安全规范、基本硬件知识、标准操作规程(自主测试-初、中、高三级 SOP) 及相应数据处理。

培训结束后, 培训者可预约技术员进行考核:

- (1) 初级考核合格后, 可在管理人员监督下上机操作, 一周后复考;
- (2) 中级考核合格后, 可在管理人员监督下上机操作, 一月后复考;
- (3) 高、特级考核合格后, 可在管理人员监督下上机操作, 每月复考。

仪器管理员认为培训者达到相应级别的独立操作水平后, 给予培训者授权在相应级别所允许的 *可操作实验*^a 范围内独立使用仪器。如果在各级别因为人为操作错误导致仪器故障者, 除按要求承担维修费用之外, 还将处以降级重考、培训费翻倍等惩罚。

对接受培训人员的核心要求:

- (1) 了解核磁共振技术的原理及其应用的多学科背景知识, 不断跟踪学习核磁共振技术的最新发展, 积极开发仪器在不同学科的应用, 使其在自身相关科研工作中尽可能发挥最大作用;
- (2) 熟悉核磁共振仪器的原理、构造及各部分的功能, 严格遵守仪器部件的开关顺序, 在突然停电时能及时处理仪器并上报, 关注仪器各部件有无异常, 包括液氮和液氮出口是否有结冰现象等;
- (3) 熟练掌握核磁共振仪器的软件系统, 严格按照标准操作规程操作, 防止因人为操作不当造成仪器故障, 特别是样品管在仪器探头内断裂造成重大仪器故障(此种情况属人为事故, 所属课题组须承担维修费用), 认真做好核磁共振仪器的使用及故障记录。

5.4. 仪器故障报告

仪器使用过程中, 谱仪、自动进样器及 Topspin 出现故障及错误提示信息时:

- (1) 应立即通知技术员;
- (2) 请在第一时间将故障及错误提示信息截屏, 并保存在桌面“Error Report”文件夹中, 截屏文件命名请按照“导师名-用户名-样品名-故障时间(具体到分钟)”; 在《仪器设备使用记录本》的备注栏做简单说明。

5.5. 实验脉冲序列分类

5.5.1 自主测试-初级:

Icon 中的一维氢谱—PROTON(zg30 或 zg)、一维氟谱—F19(zg30 或 zgig)、一维碳谱—C13CPD(zgpg30 或 zgdc) / C13APT(jmod) / C13DEPT135(deptsp135) / C13DEPT90(deptsp90)、COSYGPSW(cosygpppqf)、NOESYPHSW(noesygpphp)、MLEVPHSW(mlevphp)、ROESYPHSW(roesyphp.2)、HSQCGP(hsqcetspsi2) 与 HMBCGP(hmbcgplndqf)等, 并不定期更新。

5.5.2 自主测试-中级:

Topspin 中的一维氢谱—PROTON(zg30 或 zg)、一维氟谱—F19(zg30 或 zgig)、一维碳谱—C13CPD(zgpg30 或 zgdc) / C13APT(jmod) / C13DEPT135(deptsp135) /

C13DEPT90(deptsp90)、COSYGPSW(cosygpppqr)、NOESYPHSW(noesygpphpp)、MLEVPHSW(mlevphpp)、ROESYPHSW(roesyphpp.2)、HSQC GP(hsqcetspsi2) 与 HMBCGP(hmcbgplpndqr)等，并不定期更新。

5.5.3 自主测试-高级：

一维氮谱—N15(zg) 或 N15IG(zgig)、HSQC-TOCSY(hsqcdietgpsi.2)、DOSY(ledbpgp2s)、COSYDQFPHSW(cosydfph)、HETLOC(dipsi2etgpcsix1)、INADEQUATE(inadqr.2)、T1(t1ir)、STDDIFFESGP(stddiffesgp)、WaterLOGSY(ephogsygpno 或 ephogsygpno.2)、Cpmgpr1d、NOESYPR1D(noesypr1d)、Ledbpgp2s1d 等，并不定期更新。

5.5.4 自主测试-特级：

SELCO1H(selco 或 selcogp)、SELNO1H(selno 或 selno)、SELRO1H(selro 或 selrogp)、HSQCETF3GPSI(hsqcETF3psi)、HMBCGP_15N(hmcbgpndqr)等，并不定期更新。

6. 实验内容

6.1. 系统组成

500 MHz 液体核磁共振波谱仪（超低温探头）由磁体、探头、机柜、前置放大器、超低温平台、液氮回收系统、电脑控制系统、自动进样器与不间断电源组成。如图 6-1 所示：

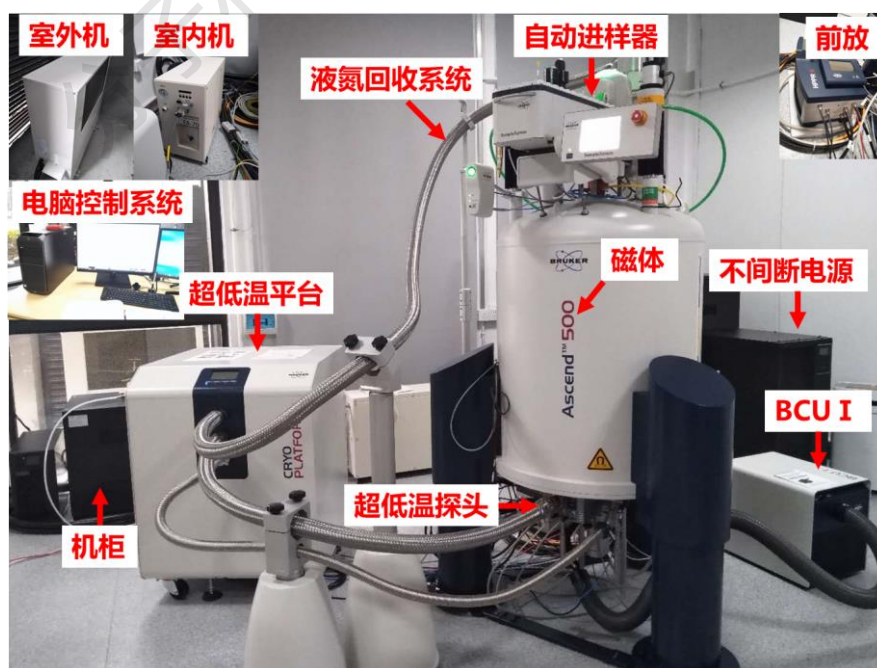


图 6-1 500 MHz 液体核磁共振波谱仪（超低温探头）系统图示

6.1.1 超低温平台系统:

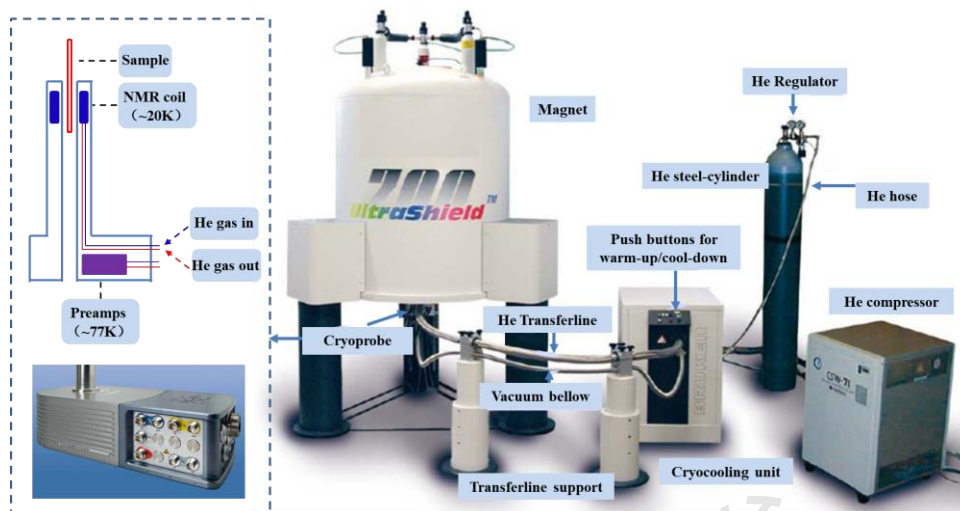


图 6-2 超低温平台系统图示

超低温平台系统由超低温平台、超低温探头、氦压缩室内机、氦压缩室外机、超高纯氦气瓶（氦气纯度高达 99.99995%）、氦气传输管等组成，通过超低温平台冷却超高纯氦气后输送到探头的低温前放和 NMR 线圈中，分别将探头的低温前放和 NMR 线圈冷却至 77 K 与 20 K 左右，降低这些部件的热噪音，从而提高探头检测的灵敏度。一般氦超低温探头的灵敏度跟相同规格的常温探头相比可提高 4-5 倍。

6.1.2 BBO 超低温探头

属于正相双共振宽带超低温探头，该探头的外线圈用于观测 ^1H 与 ^{19}F ，内线圈用于观测 ^{13}P - ^{15}N 之间频率范围的核（ ^{199}Hg - ^{153}Eu 之间的频率范围除外）。该探头可在观测 BB 的同时，对 ^1H 或 ^{19}F 去耦（反之亦然），但是不能观测 ^1H 的同时对 ^{19}F 去耦（反之亦然）。该探头适合不常用核以及低丰度、低灵敏度核的核磁检测。与老一代超低温探头相比，该探头能做更低温度的核磁实验。其样品检测的温度范围为 -40°C 到 80°C 。

6.2. 系统检查

依据图 6-1，逐项完成如下检查：

- (1) 检查磁体、探头、机柜、前置放大器、电脑控制系统与不间断电源各部件是否亮红灯或报错。如果亮红灯或报错，则表明仪器存在故障，需联系实验室技术人员查明故障原因。

- (2) 检查自动进样器, 如果亮绿灯, 则表明自动进样器处于正常的状态, 可以开始实验。如亮红灯, 则表明仪器存在故障, 需联系实验室技术人员查明故障原因。

6.3. 样品的准备

6.3.1 样品要求: 进行核磁测试的样品纯度一般应 $> 90\%$, 无铁屑、灰尘、滤纸毛等杂质。一般有机物须提供的样品浓度 $5\text{ mg} / 0.5\text{ ml}$ 左右, 聚合物量需适当增加。浓度太低: 图谱信噪比低, 累加时间增加; 浓度太高: 溶液粘度提高, 磁场均匀性变差, 弛豫增快, 导致图谱分辨率下降。

6.3.2 核磁管要求: 要求使用质量合格的核磁管, 粗细均匀、管内外壁干净、管壁较厚且无划痕破损。在自主上机之前, 务必对着灯光检查样品管底部是否有裂痕或损伤。清洗旧核磁管时避免超声、避免 80°C 以上烘烤。如果核磁管有裂纹、破损、弯曲或装到转子中太松或太紧, 请勿使用。

6.3.3 样品体积: 对 5 mm 核磁管而言, 氘代溶剂体积约 0.5 ml (不低于 0.4 ml , 溶剂在样品管内的高度不低于 3 cm)。样品体积太小: 匀场困难; 样品体积太大: 对流, 温度不均。样品应充分混匀。

6.3.4 核磁样品管的标记: 核磁样品名称建议直接用记号笔在核磁管上端标记 (切勿在核磁管中下端标记), 请勿使用标签纸进行标识。

6.3.5 样品管插入转子深度的确定: 经过定深量筒确定, 如果液面高度 $\geq 4\text{ cm}$, 直接将样品管插到定深量筒的底部。如果液面高度 $< 4\text{ cm}$, 则以定深量筒“0”的位置为中心, 上下对称。具体如下图所示:



图 6-3

6.4. Topspin 软件简介

6.4.1 进入电脑桌面，打开 Topspin 软件（在桌面的右下角）。

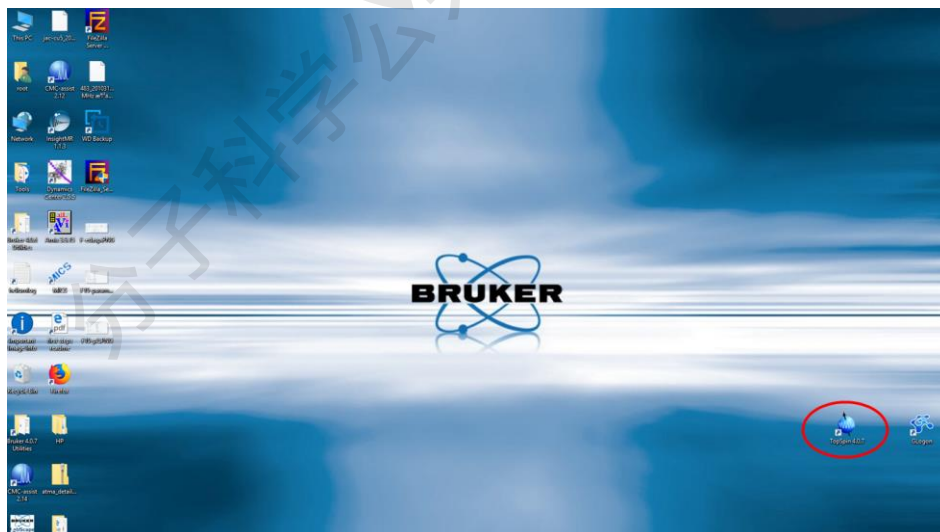


图 6-4

6.4.2 Topspin 软件窗口包含主功能表、工具栏、档案浏览器、状态栏、命令栏与波谱视窗。具体如下图所示：

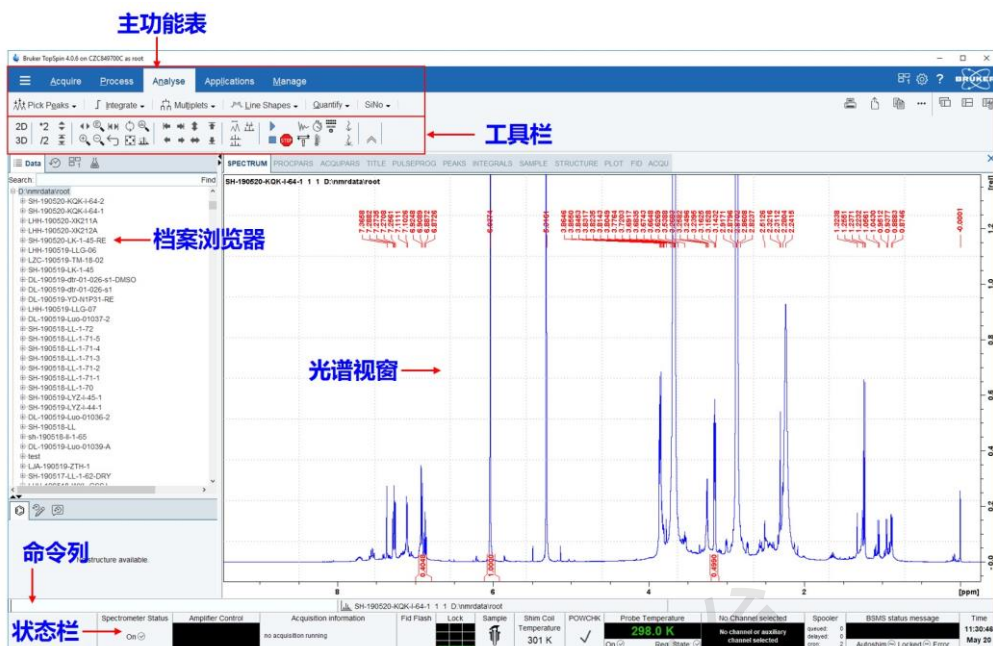


图 6-5

6.5. 500 MHz 液体核磁共振波谱仪（超低温探头）自动进样器的使用

500 MHz 液体核磁共振波谱仪（超低温探头）配备的是“SampleXpress”自动进样器，紧凑、高度集成的设计大大缩短了样品传输距离，几秒钟内即可完成样品更换，最多可容纳 60 个样品。

6.5.1 登录基理系统，进入电脑桌面：(a) 如基理界面显示“一卡通用户”，请在 Account 输入预约者的一卡通账号，Password 栏输入相应账户密码，点击 Submit。（注意：如果登录失败，禁止点击 Cancel，否则会导致 Windows 当前账户注销。登录失败可能的原因有两个（1）账号或密码输入错误，请按键盘 Delete 键删除，再重新输入；（2）未在预约时间段登录。

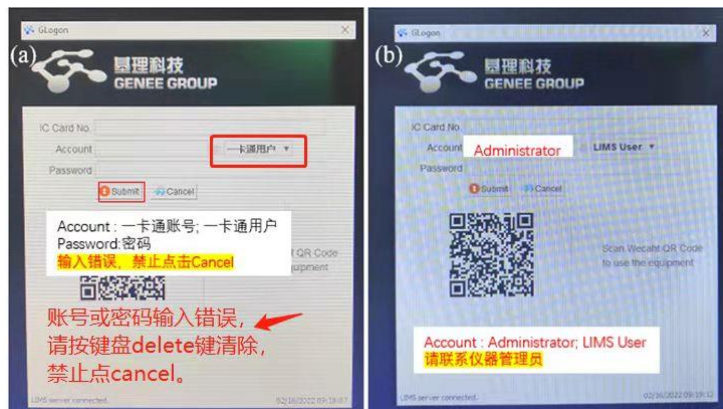


图 6-6

6.5.2 进入电脑桌面，打开桌面右下角的 Topspin 软件。

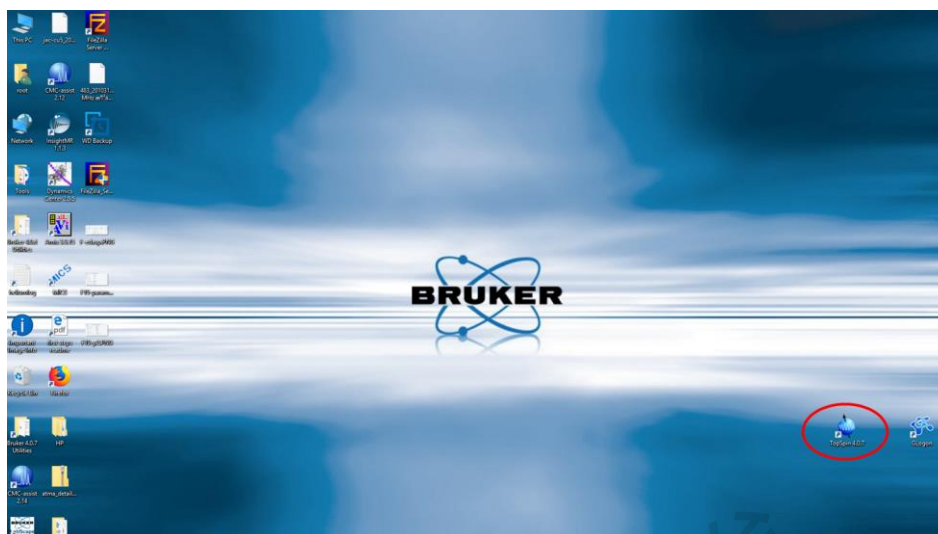


图 6-7

6.5.3 在 Topspin 软件的命令栏输入命令“icon”，弹出如下方框：

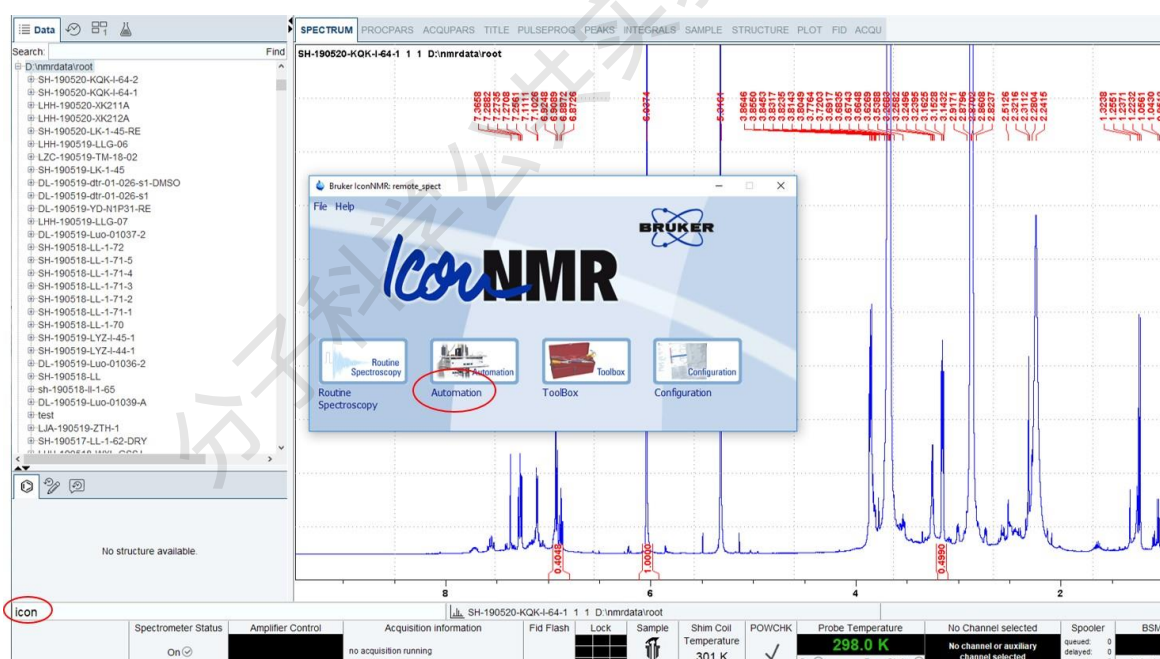


图 6-8

6.5.4 点击“Automation”，进入 icon 软件界面。

6.5.5 将核磁样品用定深量筒量定深度后，放在自动进样器的相应位置，比如 1 号位置。

6.5.6 在 icon 软件界面中，先选中样品所在位置，点击“Add”，出现如下方框。

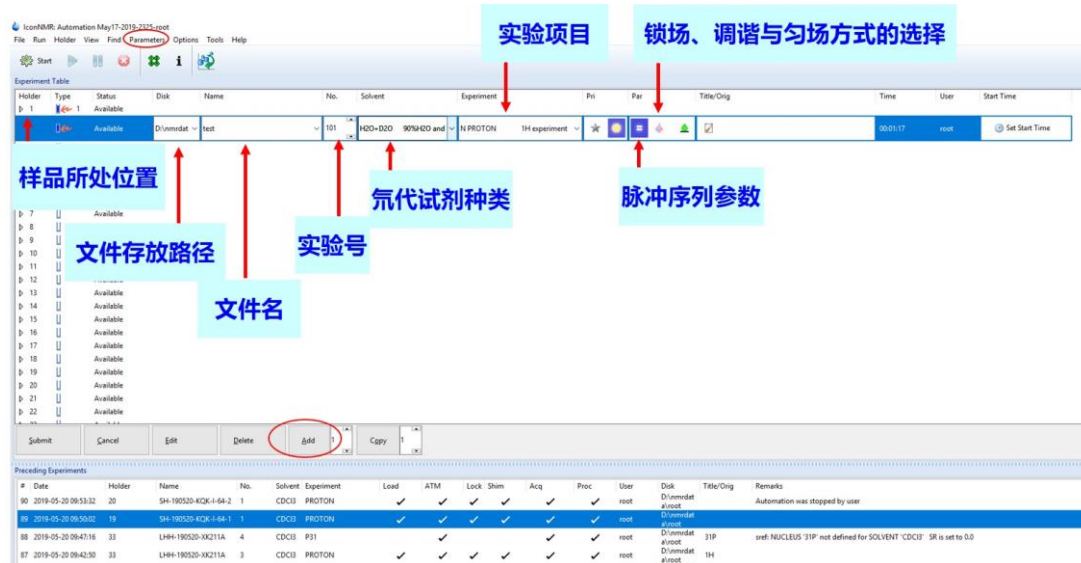


图 6-9

6.5.7 依次填写“文件存放路径”、“文件名”、“实验号”、“氘代试剂种类”、“实验项目（脉冲序列种类）”、“脉冲序列参数”（如需更改实验参数，可以在 Par 下修改，比如锁场方式、匀场方式、采样参数等等；如果需要更改其他的采样参数，点击“Parameters”进入采样参数界面，即可更改所有采样参数；修改完成后点击“Return to IconNMR”即可回到 icon 界面。）、“是否锁场”、“是否调谐”、“匀场方式”后，点击“Submit”提交样品，样品进入到“Queued（排队状态）”。样品提交后，如果此时想取消实验或更改实验参数，点击“Cancel”，然后点击“Edit”即可进行参数编辑。

6.5.8 如果同一样品还需做其他的核磁实验，点击“Add”，然后按 6.3.6 填写实验相应内容。

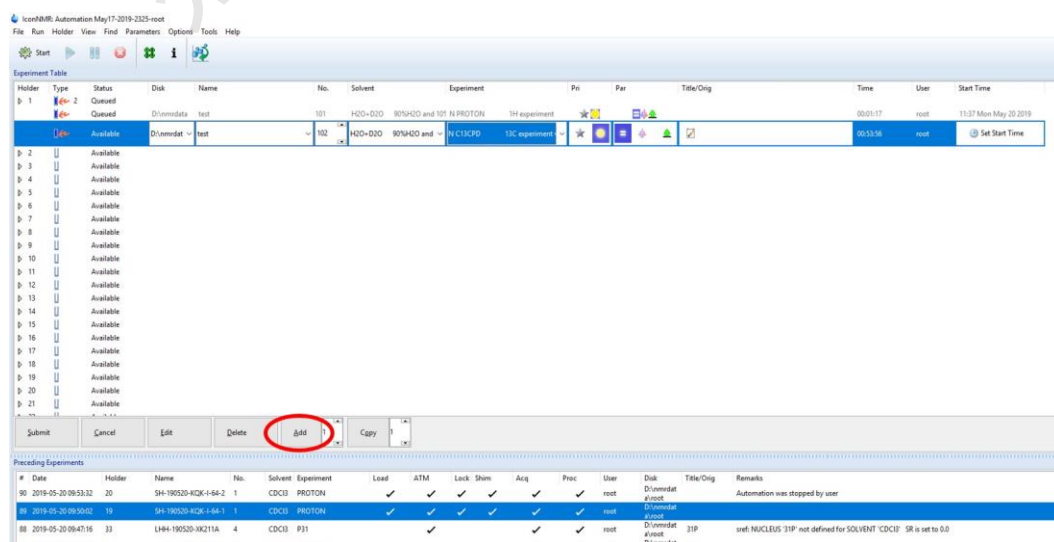


图 6-10

6.5.9 如果下一个位置的样品做的实验与该样品相同，直接点击“Copy”。在新的实验中修改样品名，然后编辑相应的采样参数即可。

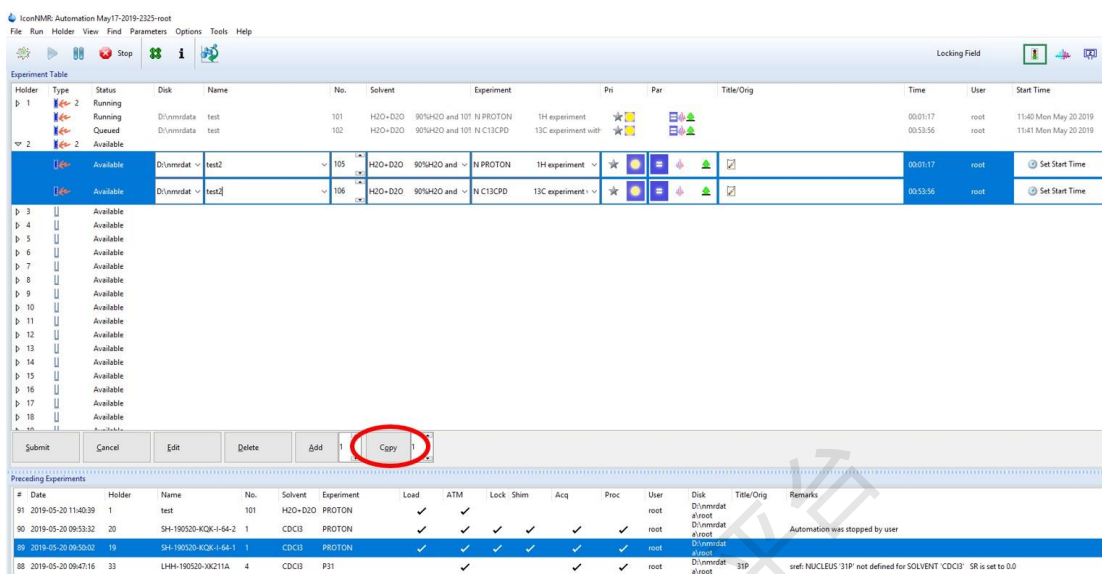


图 6-11

6.5.10 点击“Start”，在 First sample 中填写当前样品所在位置。如果该样品已经在磁体中并且锁场和匀场已完成，在 First sample in the magnet (locked, shimmed, tuned and matched?) 处打“√”，否者不选。然后点击“Start”。样品变成“Running”状态。

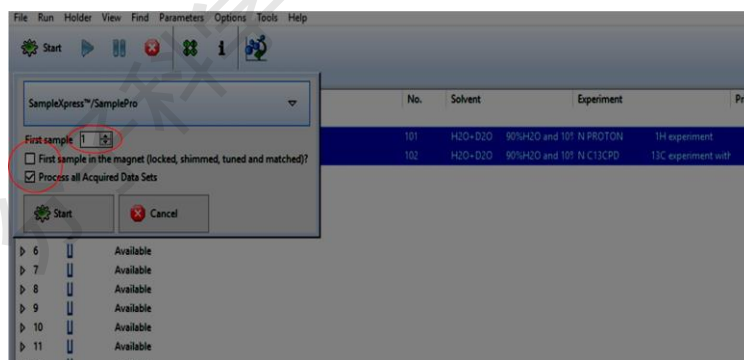


图 6-12

6.5.11 在“Preceding Experiments”框中，可以看到实验的状态，Load 进样、ATM 调谐、Lock 锁场、Shim 匀场、Acq 采样、Proc 图谱处理是否完成。需要注意的是样品在进行调谐、锁场与匀场时，不得中途强行停止实验。样品图谱采集完成后，双击“Preceding Experiments”框中完成的实验，图谱即会在 Topspin 波谱视窗中打开，可进行图谱数据的处理与分析。

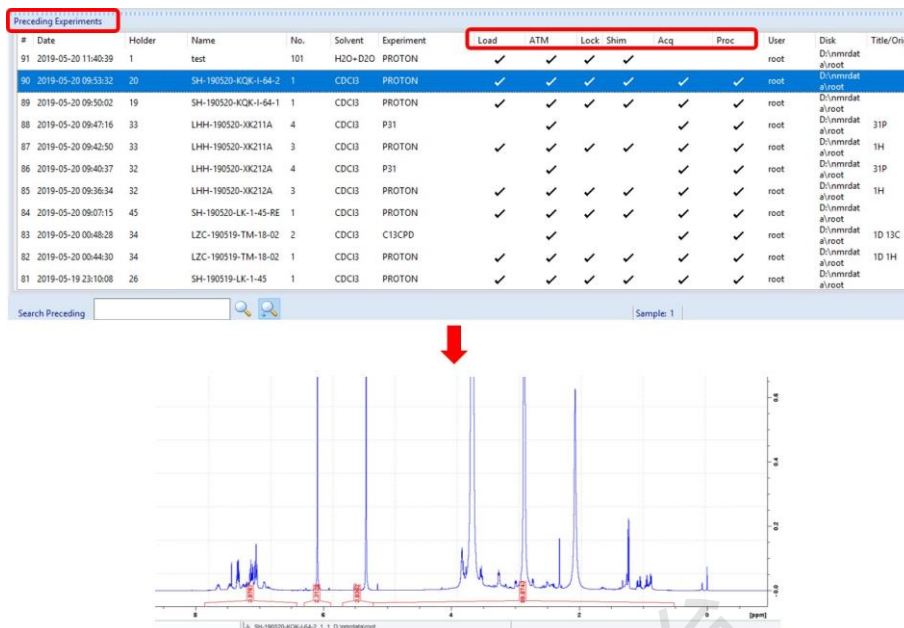


图 6-13

注：实验过程中不要点击 icon 界面右边中间位置的“Change User”（见下图），否则 icon 界面会被锁定，导致不能编辑提交实验。

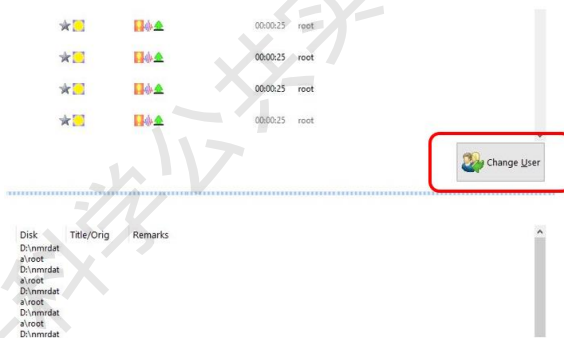


图 6-14

6.5.12 实验结束后，点击桌面右下角的登出按钮，弹出一个界面（见下图），点击“Submit”即可登出（见下图）。（注：如果找不到登出按钮，双击桌面右下角的“Glogon”图标即可，如果忘记登出，请及时告知仪器管理员）

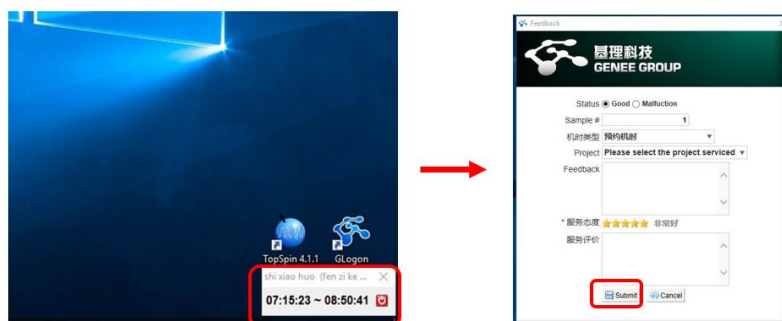


图 6-15

6.6. 500 MHz 液体核磁共振波谱仪（超低温探头）一维谱实验手动操作流程

6.6.1 一维氢谱

6.6.1.1 进入用户窗口，打开 Topspin 软件。

6.6.1.2 核磁样品管放入自动进样器前检查管内溶液的高度。

6.6.1.3 进样：自动进样器打开时，输入“sx 样品位置”，如“sx 9”，前一个样品会先从磁体弹出，然后 9 号样品进入磁体；如果自动进样器处于“stop”状态，输入“sx ej”弹出原样品，或者打开 BSMS 界面中的 **LIFT** 启动程序，换上要做的样品，输入“sx ij”，或者再次点击 BSMS 界面中的 **LIFT**，将样品放入到磁体中。确定样品已经进入磁体后（BSMS 界面的“down”显示绿色），开始具体的实验设置。

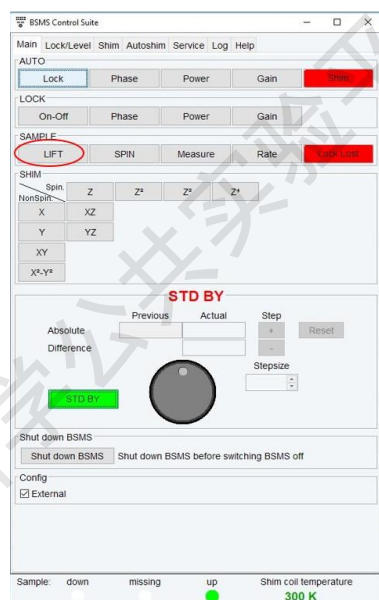


图 6-16

6.6.1.4 新建文件：点击 New Experiment；或输入命令“new”或“edc”，得如下图：

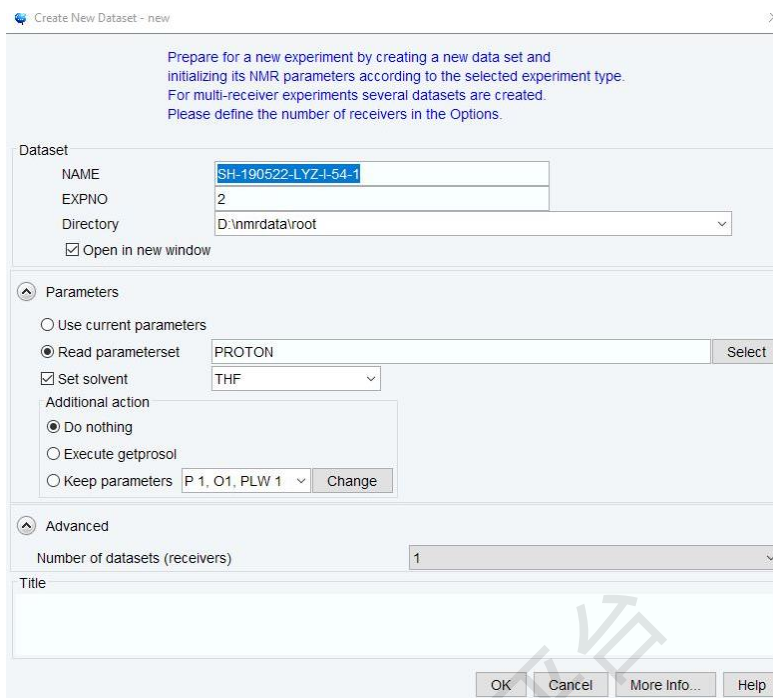


图 6-17

“NAME”：文件名；

“EXPNO”：实验号；

“Directory”：文件存放路径；

“Parameters”：选择核磁实验的类型（建议打开已知的文件夹，在此基础上新建，此时新建文件的实验设置参数与已知文件夹相同）；

“Read parameterset”：重新选一个新的实验；

“Set solvent”：选择样品所使用的氘代试剂；

“Execute getprosol”：读取 90°脉冲参数。

6.6.1.5 设置实验温度：输入命令“edte”，在“Target temperature”中设置实验所需的温度。

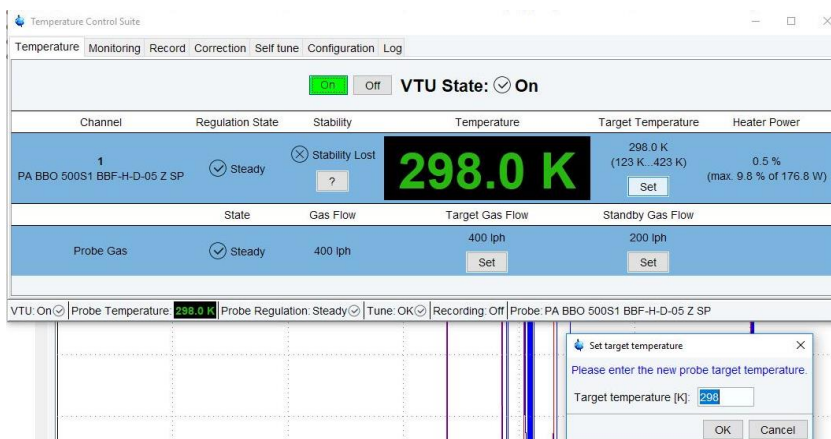


图 6-18

6.6.1.6 查看通道：输入命令“edasp”，确认选择实验所需的原子核种类及连线。

一维氢谱只需打开 F1 中的氢通道，如下图所示：

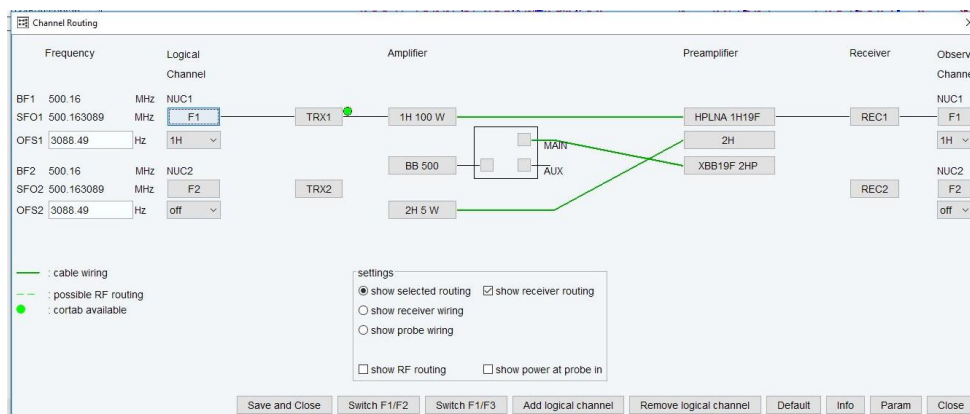


图 6-19 一维氢谱的通道设置图

6.6.1.7 锁场：输入命令“lock”，选择需要锁场的氘代试剂；或者直接输入“lock 氘代试剂简称（如 lock CDCl₃）”。同一溶剂的样品建议在同一时段采谱，有利于匀场。

6.6.1.8 调谐：输入命令“atma”（自动调谐），或者“atmm”（手动调谐）。手动调谐（atmm）的操作步骤以下图为例说明：采一维氟谱（对氢去耦）时，需要对氟和氢的通道都进行调谐，输入命令“atmm”，弹出如下图框：

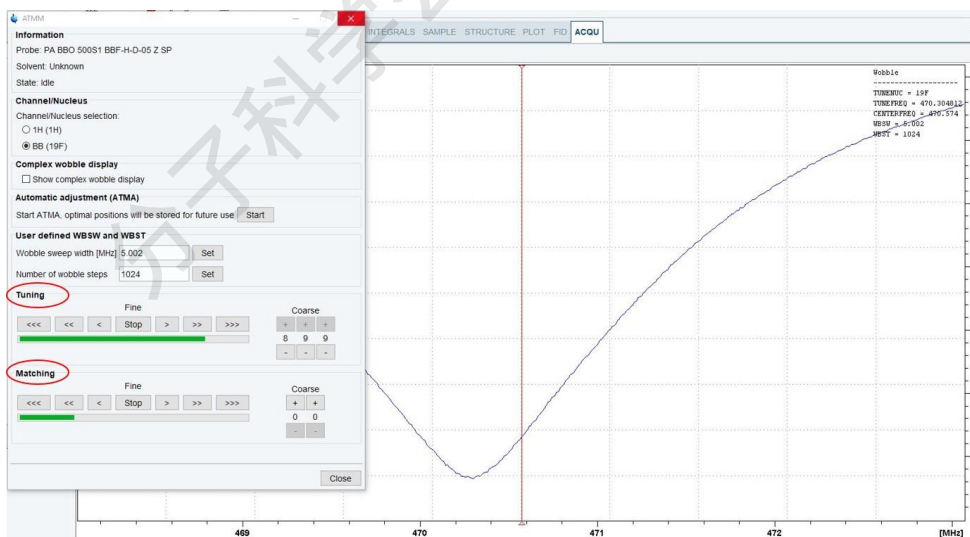


图 6-20

首先对氟通道进行调谐，先调“Matching”使峰尖到最底部，然后再调“Tuning”使峰尖与红线重叠，然后切换到氢通道，按同样的步骤对氢进行调谐，调完之后直接关闭调谐界面，即完成调谐操作。一维氢谱只需对氢通道进行调谐即可。需要注意的是，如果样品的盐浓度高，应手动调谐。

6.6.1.9 样品旋转：依需求决定样品是否需要旋转及转速设置。一般液体转速为 20 Hz，但是大部分样品不建议旋转。

6.6.1.10 恒温：样品进入磁体后，需要一定的恒温时间，3 分钟左右。

6.6.1.11 匀场：直接输入命令“topshim”或者输入“topshim gui”，输入“topshim gui”后，得到如下图框：

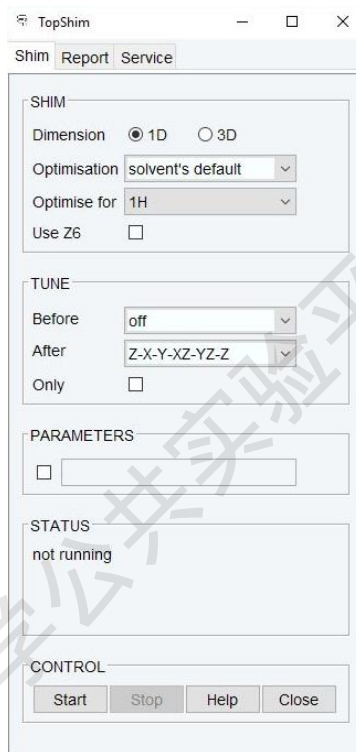


图 6-21

对于常规的实验，“Dimension”选择“1D”即可（如果要进行磁场维护，可选择“3D”）
“Optimise for”一般选择“1H”，“Use Z6”一般不选，TUNE 模式下的“After”可以选择“Z-X-Y-XZ-YZ-Z”选项。然后点击“Start”，即开始匀场。

6.6.1.12 查看采样参数：点击“Acquisition pars”；或者直接输入命令“eda”，

6.6.1.13 进入以下界面：

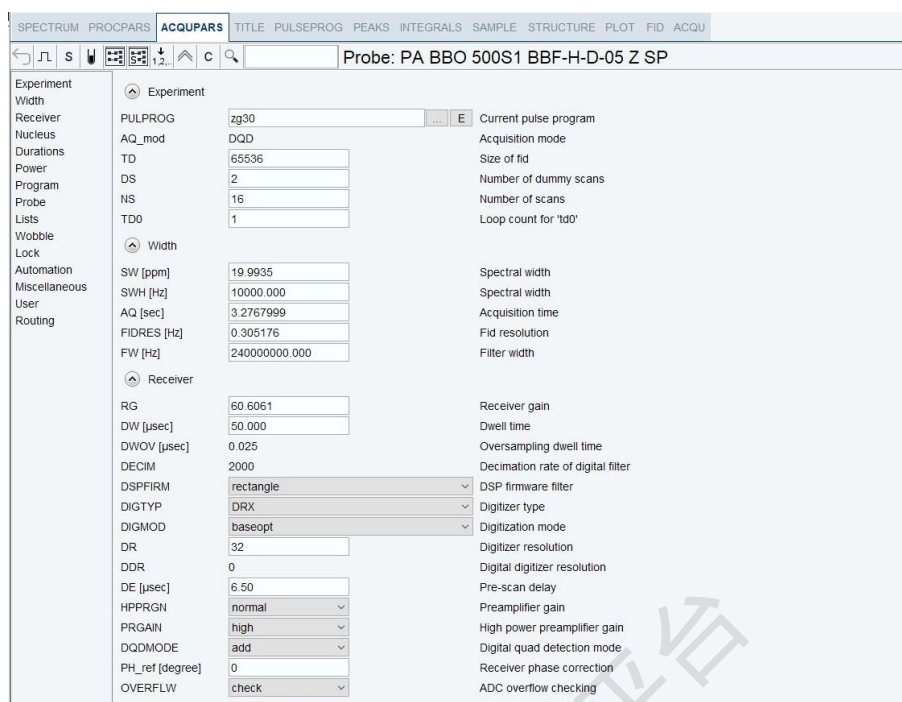


图 6-22

需要编辑与脉冲序列相关的采样参数时，输入命令“ased”，进入以下界面：

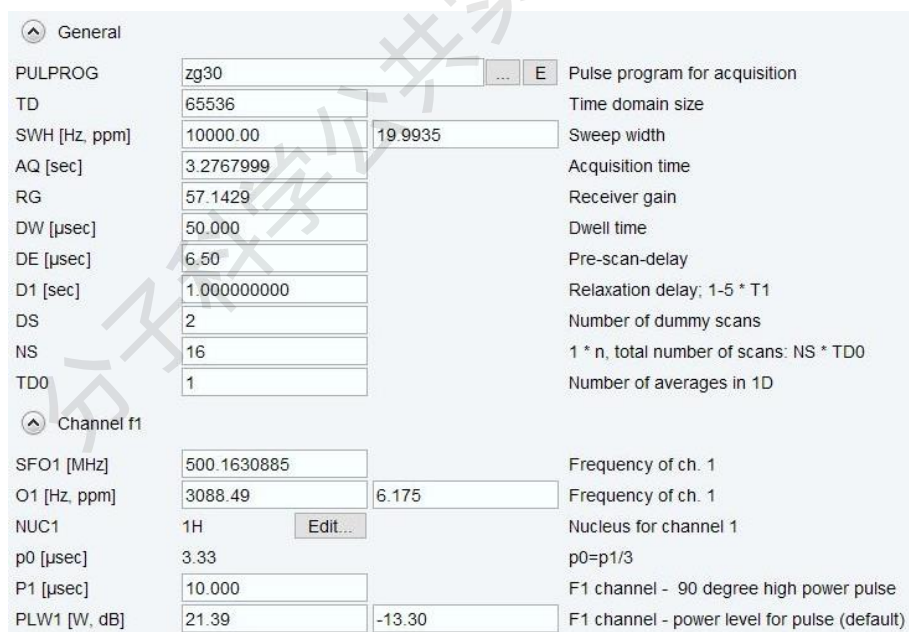


图 6-23

通常需要确认的有图谱的中心点（O1P 与 O2P）、图谱宽度（SW）、扫描次数（NS）、弛豫延迟（D1），依具体的样品特性而有所调整。其余参数不需要轻易改动。

PULPROG: 常规选择 zg30（30 度小角度激发）；需要压制溶剂峰时选择（预饱和和压水）；¹³C 选择 zgpg30（pg: 去耦）；定量碳谱选择 zgig 或者 zgig30。

AQ-mod: DQD。

TD: 采样点数。

NS: 扫描次数（与样品浓度相关，同时满足 PULSEPROG 中相位循环的具体要求）。

DS: 空扫次数（查看 PULSEPROG 里看有没有具体要求）。

TD0: 真正采样次数=NS*TD0，如 TD0 设为 4，NS 设为 256，则总的采样次数为 1024。

O1P 与 O1: 中心频率，可通俗理解成谱的中间位置，O1P 以 ppm 为单位，O1 以 HZ 为单位。需要压制溶剂峰时，在此输入溶剂峰的位置。

RG: 一般通过命令“rga”自动算出。rg 太大，信号溢出，图谱变形；rg 太小，影响图谱信噪比。

D1: 弛豫延迟，做定量实验时 D1 需大于 5 倍 T_1 弛豫时间。

P1: 90° 脉冲的激发脉宽。

PL1: 90° 脉冲的激发功率。

6.6.1.14 读取相关的脉冲参数: 直接输入命令“getprosol”。或者输入 pulsecal 自动计算 90° 脉冲宽度（10 us 左右），但同时要考虑到探头本身对功率的要求。核磁实验时，确保 PowerCheck 功能始终开启，以防止脉冲功率超出极限损毁探头。

6.6.1.15 计算增益: 直接输入“rga”。

6.6.1.16 开始实验: 直接输入命令“zg”。如果样品采集完，发现核磁图谱信噪比太低，可在原有数据的基础上，增加采样次数，并输入命令“go”进行累加采集。

6.6.1.17 傅立叶变换: 实验结束后，输入命令“fp”或“efp”，即可得到核磁图谱。

采集数据过程中的各种操作命令:

- (1) “tr”保存已采集的数据而实验继续进行。（“tr 16”表示保存累加 16 次的数据，实验继续进行。）
- (2) “halt”保存已采集的数据并且中止实验。（“halt 16”表示保存累加 16 次的数据，同时终止实验。）
- (3) “stop”直接从采集数据的状态中退出而不保存已采集的数据。

6.6.2 一维碳谱

一维碳谱除了采样参数与通道设置与一维氢谱不同，其他步骤与氢谱相似。

6.6.2.1 碳谱（对氢去耦）参数设置：在 PULPROG 选择 zgpg30（pg：去耦）；定量碳谱选择 zgig 或者 zgig30，其他的参数如下图所示：

SPECTRUM	PROCPARS	ACQUPARS	TITLE	PULSEPROG	PEAKS	INTEGRALS	SAMPLE	STRUCTURE	PLOT	FID	ACQ
<div style="text-align: right;">Probe: PA BBO 500S1 BBF-H-D-05 Z SP</div>											
Experiment	<div style="margin-left: 20px;"> <p>Experiment</p> <p>PULPROG <input type="text" value="zgpg30"/> E Current pulse program</p> <p>AQ_mod DQD Acquisition mode</p> <p>TD <input type="text" value="65536"/> Size of fid</p> <p>DS <input type="text" value="4"/> Number of dummy scans</p> <p>NS <input type="text" value="512"/> Number of scans</p> <p>TD0 <input type="text" value="1"/> Loop count for 'td0'</p> </div>										
Width	<div style="margin-left: 20px;"> <p>Width</p> <p>SW [ppm] <input type="text" value="283.9472"/> Spectral width</p> <p>SWH [Hz] <input type="text" value="35714.285"/> Spectral width</p> <p>AQ [sec] <input type="text" value="0.9175040"/> Acquisition time</p> <p>FIDRES [Hz] <input type="text" value="1.089913"/> Fid resolution</p> <p>FW [Hz] <input type="text" value="240000000.000"/> Filter width</p> </div>										
Receiver	<div style="margin-left: 20px;"> <p>Receiver</p> <p>RG <input type="text" value="101"/> Receiver gain</p> <p>DW [µsec] <input type="text" value="14.000"/> Dwell time</p> <p>DWOV [µsec] <input type="text" value="0.025"/> Oversampling dwell time</p> <p>DECIM <input type="text" value="560"/> Decimation rate of digital filter</p> <p>DSPFIRM <input type="text" value="sharp(standard)"/> DSP firmware filter</p> <p>DIGTYP <input type="text" value="DRX"/> Digitizer type</p> <p>DIGMOD <input type="text" value="digital"/> Digitization mode</p> <p>DR <input type="text" value="32"/> Digitizer resolution</p> <p>DDR <input type="text" value="0"/> Digital digitizer resolution</p> <p>DE [µsec] <input type="text" value="6.50"/> Pre-scan delay</p> <p>HPPRGN <input type="text" value="normal"/> Preamplifier gain</p> <p>PRGAIN <input type="text" value="high"/> High power preamplifier gain</p> <p>DQDMODE <input type="text" value="add"/> Digital quad detection mode</p> <p>PH_ref [degree] <input type="text" value="0"/> Receiver phase correction</p> <p>OVERFLW <input type="text" value="check"/> ADC overflow checking</p> </div>										
Nucleus	<div style="margin-left: 20px;"> <p>Nucleus 1</p> <p>NUC1 <input type="text" value="13C"/> Edit... Observe nucleus</p> <p>O1 [Hz] <input type="text" value="12576.53"/> Transmitter frequency offset</p> <p>O1P [ppm] <input type="text" value="100.000"/> Transmitter frequency offset</p> <p>SFO1 [MHz] <input type="text" value="125.7779086"/> Transmitter frequency</p> <p>BF1 [MHz] <input type="text" value="125.7653320"/> Basic transmitter frequency</p> <p>Nucleus 2</p> <p>NUC2 <input type="text" value="1H"/> Edit... 2nd nucleus</p> <p>O2 [Hz] <input type="text" value="2000.64"/> Frequency offset of 2nd nucleus</p> <p>O2P [ppm] <input type="text" value="4.000"/> Frequency offset of 2nd nucleus</p> <p>SFO2 [MHz] <input type="text" value="500.1620006"/> Frequency of 2nd nucleus</p> <p>BF2 [MHz] <input type="text" value="500.1600000"/> Basic frequency of 2nd nucleus</p> </div>										

图 6-24 一维碳谱（zgpg30）的采用参数

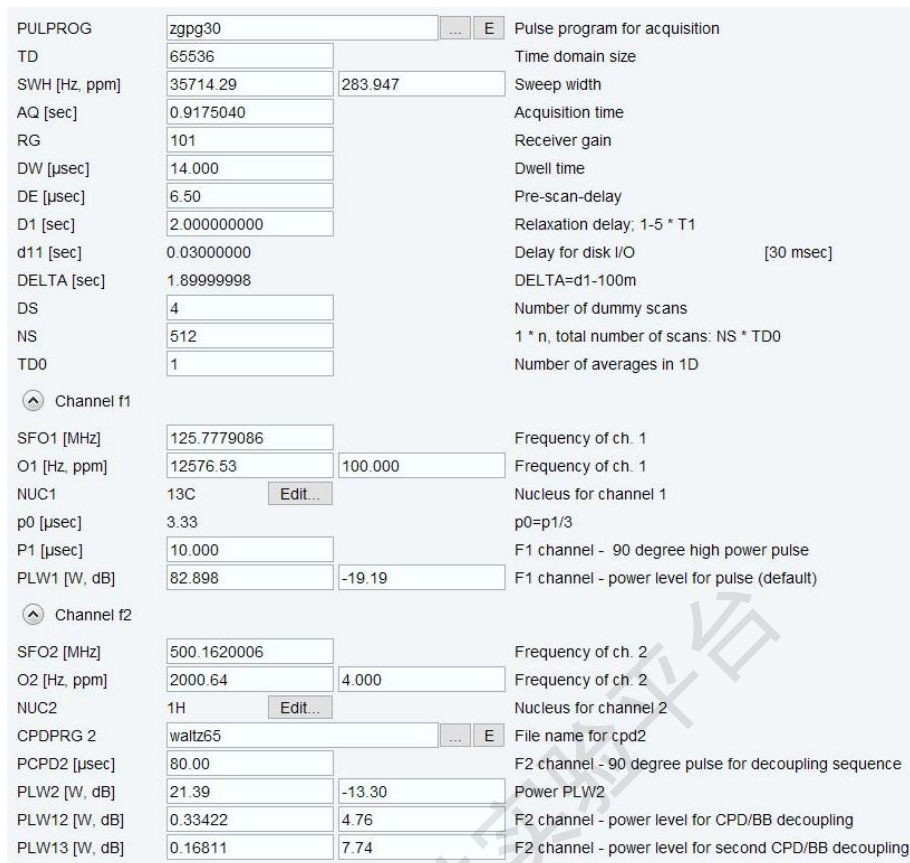


图 6-25 一维碳谱（zgpg30）与脉冲序列相关的采用参数

一般碳谱的扫描范围从-10 - 240 ppm，NS（累加次数）根据样品的浓度而定。去耦方法 CPDPRG2，通常情况下用 waltz，如果碳谱去耦不完全，可考虑选择带 bi 的参数。

6.6.2.2 碳谱（对氢去耦）通道的设置：碳谱一般同时要把氢通道和碳通道打开。具体见下图：

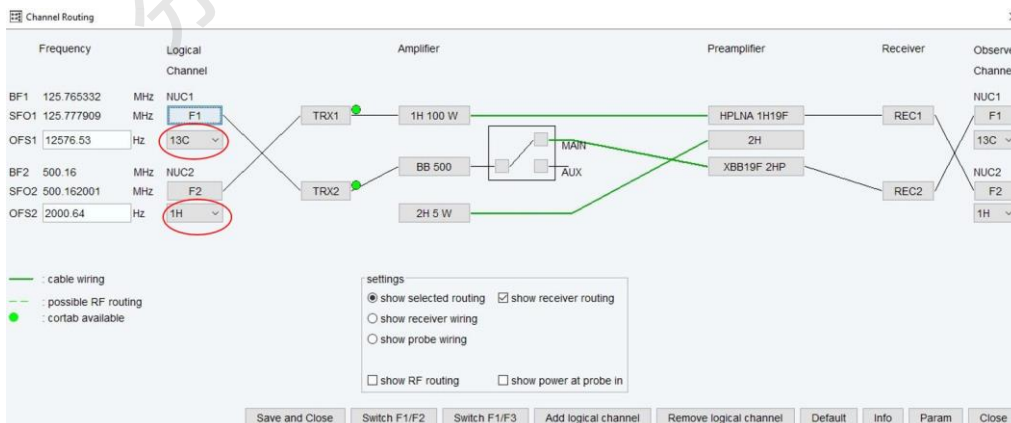


图 6-26

6.6.2.3 DEPT 谱：协助确定伯、仲、叔、季碳。可将 13C、DEPT135 和 DEPT90 谱比较，以确定碳的种类。DEPT135：CH3、CH 为正，CH2 为负；DEPT90：只有 CH。

在 PULPROG 中选择 DEPT135 或者 DEPT90。DEPT 的通道设置与碳谱相同。

6.6.2.4 采样参数方面，DEPT135 参数设置如下：

Experiment	Experiment		
Width	PULPROG	depts135	Current pulse program
Receiver	AQ_mod	DQD	Acquisition mode
Nucleus	TD	65536	Size of fid
Durations	DS	8	Number of dummy scans
Power	NS	256	Number of scans
Program	TD0	1	Loop count for 'td0'
Probe			
Lists			
Wobble	Width		
Lock	SW [ppm]	159.0136	Spectral width
Automation	SWH [Hz]	20000.000	Spectral width
Miscellaneous	AQ [sec]	1.6384000	Acquisition time
User	FIDRES [Hz]	0.610352	Fid resolution
Routing	FW [Hz]	240000000.000	Filter width
	Receiver		
	RG	101	Receiver gain
	DW [µsec]	25.000	Dwell time
	DWOV [µsec]	0.025	Oversampling dwell time
	DECIM	1000	Decimation rate of digital filter
	DSPFIRM	sharp(standard)	DSP firmware filter
	DIGTYP	DRX	Digitizer type
	DIGMOD	digital	Digitization mode
	DR	32	Digitizer resolution
	DDR	0	Digital digitizer resolution
	DE [µsec]	6.50	Pre-scan delay
	HPPRGN	normal	Preamplifier gain
	PRGAIN	high	High power preamplifier gain
	DQDMODE	add	Digital quad detection mode
	PH_ref [degree]	0	Receiver phase correction
	OVERFLW	check	ADC overflow checking
	Nucleus 1		
	NUC1	13C	Observe nucleus
	O1 [Hz]	10061.23	Transmitter frequency offset
	O1P [ppm]	80.000	Transmitter frequency offset
	SFO1 [MHz]	125.7753933	Transmitter frequency
	BF1 [MHz]	125.7653320	Basic transmitter frequency
	Nucleus 2		
	NUC2	1H	2nd nucleus
	O2 [Hz]	2000.64	Frequency offset of 2nd nucleus
	O2P [ppm]	4.000	Frequency offset of 2nd nucleus
	SFO2 [MHz]	500.1620006	Frequency of 2nd nucleus
	BF2 [MHz]	500.1600000	Basic frequency of 2nd nucleus

图 6-27

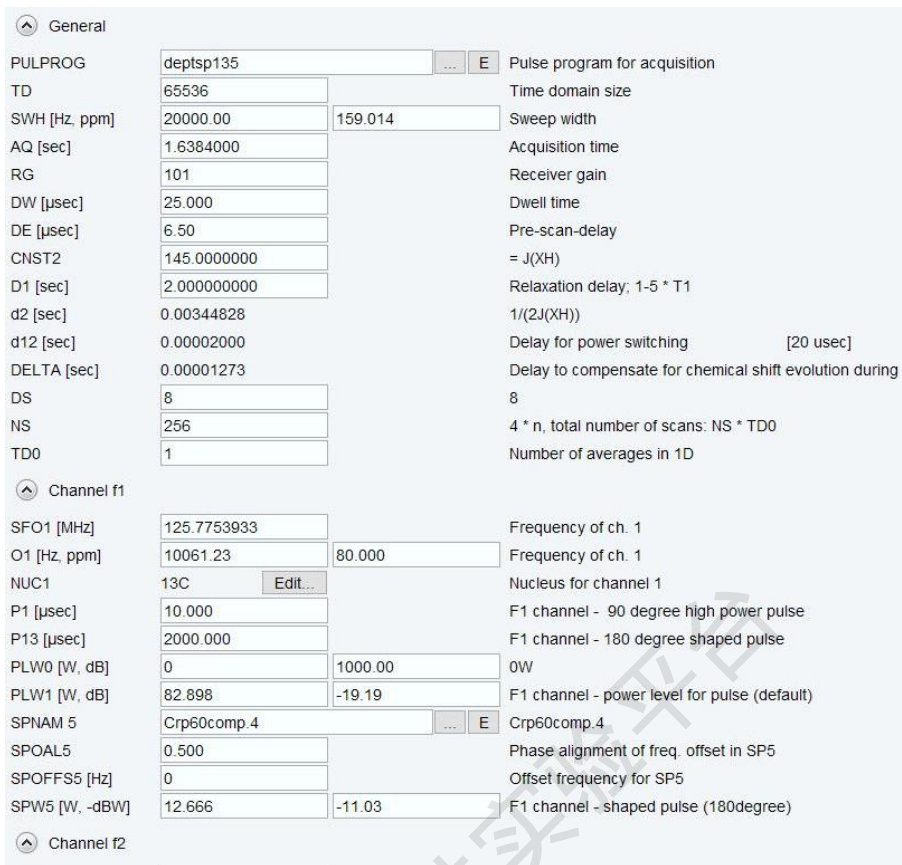


图 6-28

DEPT 图谱的 NS（累加次数）通常是碳谱 NS 的一半

6.6.2.5 DEPT90 参数设置与 DEPT135 相似。

6.6.3 一维氟谱

6.6.3.1 氟谱不能对氢去耦，PULPROG 选择“F19”，通道设置如下图所示：

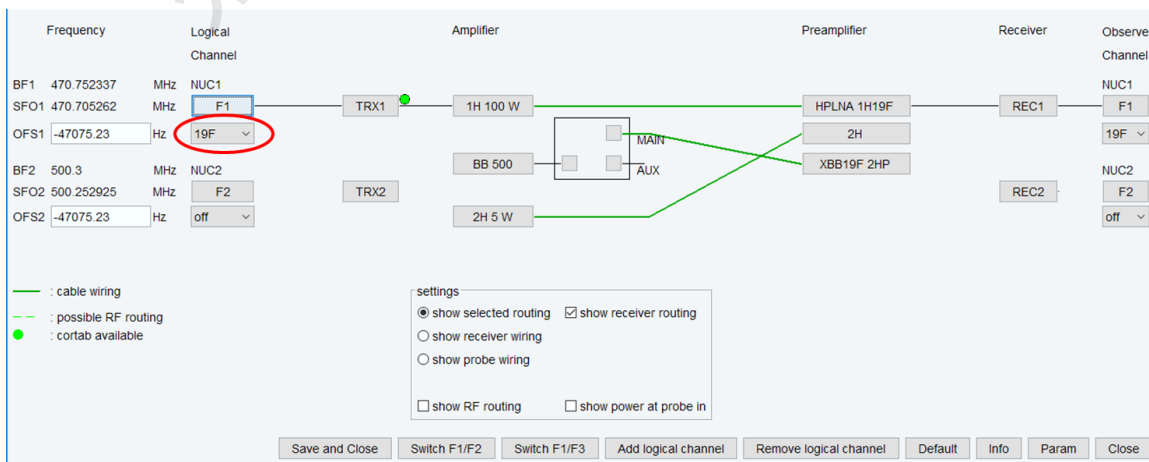


图 6-29

只需要打开氟通道即可。由于探头含有氟材料，所以氟谱背景峰较强，可通过基线分段

校平的方式去除氟谱背景峰的影响。氟谱一般利用 CFC13 进行定标，其化学位移为 0 ppm。（注：本台仪器配备的 BBO 超低温探头由于 H 和 ^{19}F 在一个通道上，所以做不了 ^{19}F （对氢去耦）的实验。）

6.6.3.2 氟谱的采样参数设置如下图所示：

Experiment		
PULPROG	zgig	Current pulse program
AQ_mod	DQD	Acquisition mode
TD	131072	Size of fid
DS	4	Number of dummy scans
NS	16	Number of scans
TD0	1	Loop count for 'td0'
Width		
SW [ppm]	241.4848	Spectral width
SWH [Hz]	113636.367	Spectral width
AQ [sec]	0.5767168	Acquisition time
FIDRES [Hz]	1.733953	Fid resolution
FW [Hz]	240000000.000	Filter width
Receiver		
RG	101	Receiver gain
DW [μsec]	4.400	Dwell time
DWOV [μsec]	0.025	Oversampling dwell time
DECIM	176	Decimation rate of digital filter
DSPFIRM	sharp(standard)	DSP firmware filter
DIGTYP	DRX	Digitizer type
DIGMOD	digital	Digitization mode
DR	32	Digitizer resolution
DDR	0	Digital digitizer resolution
DE [μsec]	6.50	Pre-scan delay
HPPRGN	normal	Preamplifier gain
PRGAIN	high	High power preamplifier gain
DQDMODE	add	Digital quad detection mode
PH_ref [degree]	0	Receiver phase correction
OVERFLW	check	ADC overflow checking
Nucleus 1		
NUC1	^{19}F	Observe nucleus
O1 [Hz]	-47062.06	Transmitter frequency offset
O1P [ppm]	-100.000	Transmitter frequency offset
SFO1 [MHz]	470.5735434	Transmitter frequency
BF1 [MHz]	470.6206054	Basic transmitter frequency
Nucleus 2		
NUC2	^1H	2nd nucleus
O2 [Hz]	2000.64	Frequency offset of 2nd nucleus
O2P [ppm]	4.000	Frequency offset of 2nd nucleus
SFO2 [MHz]	500.1620006	Frequency of 2nd nucleus
BF2 [MHz]	500.1600000	Basic frequency of 2nd nucleus

图 6-30

与脉冲序列相关的参数如下图所示：

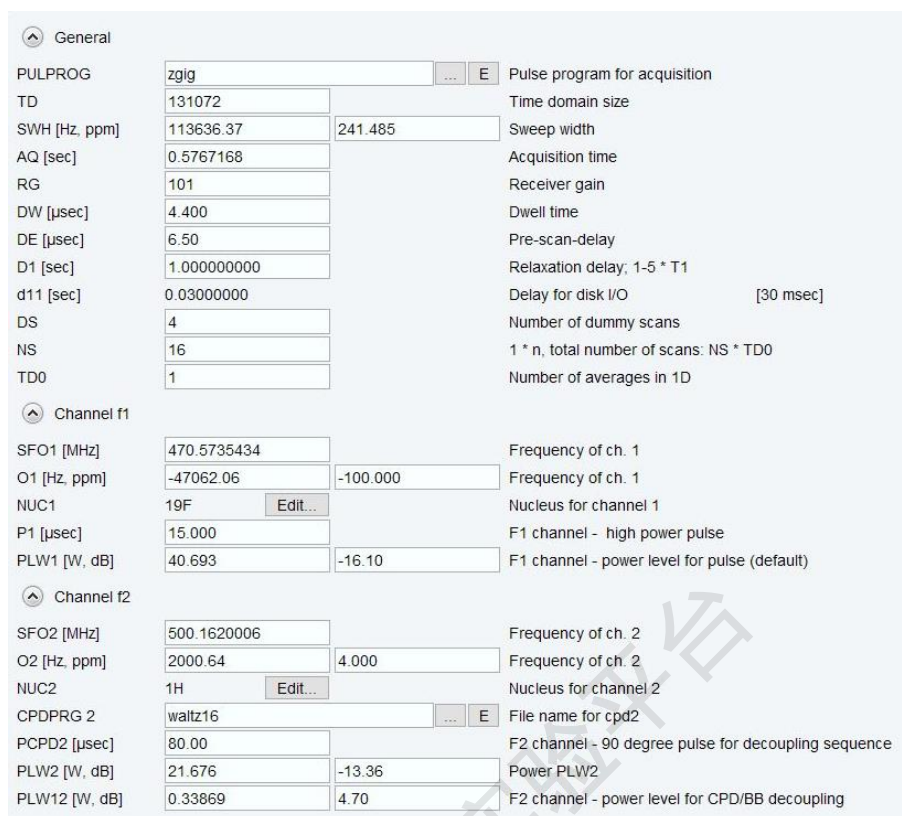


图 6-31

其他的步骤与碳谱相同。

6.7. 500 MHz 液体核磁共振波谱仪（超低温探头）二维谱实验手动操作流程

6.7.1 COSY: H-H 直接相关

6.7.1.1 在新建文件时，experiment 选择 COSYGPSW，通道设置如下所示：

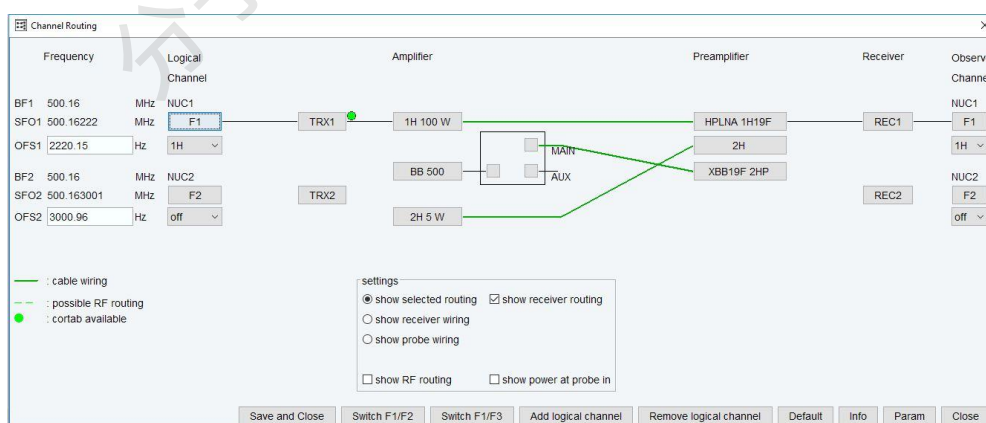


图 6-32

只需打开氢通道即可。

6.7.1.2 COSY 的采样参数设置如下图所示：

	F2	F1	Frequency axis
Experiment			
PULPROG	cosygpppqf		Current pulse program
AQ_mod	DQD		Acquisition mode
FnTYPE	traditional(planes)		nD acquisition mode for 3D etc.
FnMODE	QF		Acquisition mode for 2D, 3D etc.
TD	2048	200	Size of fid
DS	16		Number of dummy scans
NS	2		Number of scans
TD0	1		Loop count for 'td0'
TDav	0		Average loop counter for nD experiments
Width			
SW [ppm]	9.9968	10.0000	Spectral width
SWH [Hz]	5000.000	5001.630	Spectral width
IN_F [μsec]		199.93	Increment for delay
AQ [sec]	0.2048000	0.0399870	Acquisition time
FIDRES [Hz]	4.882813	25.008150	Fid resolution
FW [Hz]	240000000.000		Filter width
Receiver			
RG	101		Receiver gain
DW [μsec]	100.000		Dwell time
DWOV [μsec]	0.025		Oversampling dwell time
DECIM	4000		Decimation rate of digital filter
DSPFIRM	sharp(standard)		DSP firmware filter
DIGTYP	DRX		Digitizer type
DIGMOD	digital		Digitization mode
DR	32		Digitizer resolution
DDR	0		Digital digitizer resolution
DE [μsec]	6.50		Pre-scan delay
NBL	1		Number of blocks (of acquisition memory)
HPPRGN	normal		Preamplifier gain
PRGAIN	high		High power preamplifier gain
DQDMODE	add		Digital quad detection mode
PH_ref [degree]	0		Receiver phase correction
OVERFLW	check		ADC overflow checking
Nucleus 1			
NUC1	1H	1H	Observe nucleus
O1 [Hz]	2500.80	2500.80	Transmitter frequency offset
O1P [ppm]	5.000	5.000	Transmitter frequency offset
SFO1 [MHz]	500.1625008	500.1625008	Transmitter frequency
BF1 [MHz]	500.1600000	500.1600000	Basic transmitter frequency

图 6-33

采样模式选 QF，得到的图谱是绝对值谱，在进行图谱处理时，不需要调相位。TD2（F2 维）一般设为 1 k - 2 k，TD1（F1 维）一般设为 128 - 256（设高一点可以提高 F1 维分辨率，但会增加采样时间）。与脉冲序列相关的参数如下图所示：

General			
PULPROG	cosygpppqf	Pulse program for acquisition	
TD	2048	Time domain size	
SWH [Hz, ppm]	5000.00	9.99675	Sweep width
AQ [sec]	0.2048000	Acquisition time	
RG	101	Receiver gain	
DW [µsec]	100.000	Dwell time	
DE [µsec]	6.50	Pre-scan-delay	
d0 [sec]	0.00000300	Incremented delay (2D) [3 usec]	
D1 [sec]	2.000000000	Relaxation delay; 1-5 * T1	
d11 [sec]	0.03000000	Delay for disk I/O [30 msec]	
d12 [sec]	0.00002000	Delay for power switching [20 usec]	
d13 [sec]	0.00000400	Short delay [4 usec]	
D16 [sec]	0.000200000	Delay for homospoil/gradient recovery	
DS	16	16	
in0 [sec]	0.00020000	1/(1 * SW) = 2 * DW	
INF1 [µsec]	200.00	1/SW = 2 * DW	
NS	2	1 * n	
TDav	0	Number of averages in nD	
Channel f1			
SFO1 [MHz]	500.1625008	Frequency of ch. 1	
O1 [Hz, ppm]	2500.80	5.000	Frequency of ch. 1
NUC1	1H	Nucleus for channel 1	
P0 [µsec]	10.000	F1 channel - 20 to 90 degree high power pulse	
P1 [µsec]	10.000	F1 channel - 90 degree high power pulse	
P17 [µsec]	2500.000	F1 channel - trim pulse [2.5 msec]	
PLW1 [W, dB]	21.39	-13.30	F1 channel - power level for pulse (default)
PLW10 [W, dB]	2.3766	-3.76	F1 channel - power level for TOCSY-spinlock

图 6-34

如果想要降低对角峰的强度，提高交叉峰的相对强度，可以将 P0 设成 $1/2 P1$ ，即 COSY45。

其他的步骤与一维氢谱类似。

6.7.2 NOESY: H-H 空间相关

6.7.2.1 在新建文件时，experiment 选择 NOESYPHSW 或 ROESYPHSW、NOESYPHPR 或 ROESYPHPR。其通道设置与 COSY 相同。

6.7.2.2 NOESY 的采样参数如下图所示：

	F2	F1	Frequency axis
Experiment			
PULPROG	noesygpphpp	E	Current pulse program
AQ_mod	DQD		Acquisition mode
FnTYPE	traditional(planes)		nD acquisition mode for 3D etc.
FnMODE		States-TPPI	Acquisition mode for 2D, 3D etc.
TD	2048	200	Size of fid
DS	16		Number of dummy scans
NS	16		Number of scans
TD0	1		Loop count for 'td0'
TDav	0		Average loop counter for nD experiments
Width			
SW [ppm]	9.9968	9.9968	Spectral width
SWH [Hz]	5000.000	5000.000	Spectral width
IN_F [µsec]		200.00	Increment for delay
AQ [sec]	0.2048000	0.0200000	Acquisition time
FIDRES [Hz]	4.882813	50.000000	Fid resolution
FW [Hz]	240000000.000		Filter width
Receiver			
RG	101		Receiver gain
DW [µsec]	100.000		Dwell time
DWOV [µsec]	0.025		Oversampling dwell time
DECIM	4000		Decimation rate of digital filter
DSPFIRM	rectangle		DSP firmware filter
DIGTYP	DRX		Digitizer type
DIGMOD	baseopt		Digitization mode
DR	32		Digitizer resolution
DDR	0		Digital digitizer resolution
DE [µsec]	6.50		Pre-scan delay
NBL	1		Number of blocks (of acquisition memory)
HPPRGN	normal		Preamplifier gain
PRGAIN	high		High power preamplifier gain
DQDMODE	add		Digital quad detection mode
PH_ref [degree]	0		Receiver phase correction
OVERFLW	check		ADC overflow checking
Nucleus 1			
NUC1	1H	Edit... 1H	Observe nucleus
O1 [Hz]	2500.80	2500.80	Transmitter frequency offset
O1P [ppm]	5.000	5.000	Transmitter frequency offset
SFO1 [MHz]	500.1625008	500.1625008	Transmitter frequency
BF1 [MHz]	500.1600000	500.1600000	Basic transmitter frequency
Nucleus 2			

图 6-35

采样模式的选择根据脉冲序列的要求，TD2 一般设为 1 k - 2 k，TD1 一般设为 160 - 256。

与脉冲相关的采样参数如下图所示：

PULPROG	noesygpphpp		E	Pulse program for acquisition
TD	2048			Time domain size
SWH [Hz, ppm]	5000.00	9.99675		Sweep width
AQ [sec]	0.2048000			Acquisition time
RG	101			Receiver gain
DW [µsec]	100.000			Dwell time
DE [µsec]	6.50			Pre-scan-delay
d0 [sec]	0.00008727			Incremented delay (2D)
D1 [sec]	1.500000000			Relaxation delay; 1-5 * T1
D8 [sec]	0.500000000			Mixing time
d11 [sec]	0.03000000			d11=30m
d12 [sec]	0.00002000			Delay for power switching [20 usec]
D16 [sec]	0.000200000			Delay for homospoil/gradient recovery
DS	16			16
in0 [sec]	0.00020000			1/(1 * SW) = 2 * DW
INF1 [µsec]	200.00			1/SW = 2 * DW
NS	16			2 * n
TAU [sec]	0.24879999			TAU=d8*0.5-p16-d16
TDav	0			Number of averages in nD
Channel f1				
SFO1 [MHz]	500.1625008			Frequency of ch. 1
O1 [Hz, ppm]	2500.80	5.000		Frequency of ch. 1
NUC1	1H	Edit...		Nucleus for channel 1
P1 [µsec]	10.000			F1 channel - 90 degree high power pulse
p2 [µsec]	20.00			F1 channel - 180 degree high power pulse
P17 [µsec]	2500.000			F1 channel - trim pulse [2.5 msec]
PLW1 [W, dB]	21.39	-13.30		F1 channel - power level for pulse (default)
PLW10 [W, dB]	2.3766	-3.76		F1 channel - power level for TOCSY-spinlock

图 6-36

NOESY 实验要注意 D8（混合时间）参数的设置：如果是生物大分子，D8 一般设为 100 ~ 300 µs 之间，对角峰和交叉峰同向；如果是小分子，D8 一般设为 400 ~ 800 µs 之间，对角峰和交叉峰反向。

(2) ROESY: 当化合物的分子量在 1000 左右时，NOESY 的交叉峰信号很弱甚至没有，而 ROESY 则不存在该问题，ROESY 常用于小分子空间相对构型的确定，其交叉峰与对角峰反向。ROESY 的采样参数基本同 NOESY 相似，具体如下图所示：

采样模式的选择根据脉冲序列的要求，TD2 一般设为 1 k - 2 k，TD1 一般设为 160 - 256。

Experiment				
PULPROG	roesyhpp.2	...	E	Current pulse program
AQ_mod	DQD			Acquisition mode
FnTYPE	traditional(planes)			nD acquisition mode for 3D etc.
FnMODE		States-TPPI		Acquisition mode for 2D, 3D etc.
TD	2048	256		Size of fid
DS	16			Number of dummy scans
NS	8			Number of scans
TD0	1			Loop count for 'td0'
TDav	0			Average loop counter for nD experiments
Width				
SW [ppm]	9.9968	9.9968		Spectral width
SWH [Hz]	5000.000	5000.000		Spectral width
IN_F [μsec]		200.0000		Increment for delay
AQ [sec]	0.2048000	0.0256000		Acquisition time
FIDRES [Hz]	4.882813	39.062500		Fid resolution
FW [Hz]	240000000.000			Filter width
Receiver				
RG	64			Receiver gain
DW [μsec]	100.000			Dwell time
DWOV [μsec]	0.025			Oversampling dwell time
DECIM	4000			Decimation rate of digital filter
DSPFIRM	sharp(standard)			DSP firmware filter
DIGTYP	DRX			Digitizer type
DIGMOD	digital			Digitization mode
DR	32			Digitizer resolution
DDR	0			Digital digitizer resolution
DE [μsec]	6.50			Pre-scan delay
NBL	1			Number of blocks (of acquisition memory)
HPPRGN	normal			Preamplifier gain
PRGAIN				High power preamplifier gain
DQDMODE				Digital quad detection mode
PH_ref [degree]	0			Receiver phase correction
OVERFLW	check			ADC overflow checking
Nucleus 1				
NUC1	1H	Edit...	1H	Observe nucleus
O1 [Hz]	2350.75		2350.75	Transmitter frequency offset
O1P [ppm]	4.700		4.700	Transmitter frequency offset
SFO1 [MHz]	500.1623508		500.1623508	Transmitter frequency
BF1 [MHz]	500.1600000		500.1600000	Basic transmitter frequency
Nucleus 2				
Nucleus 3				

图 6-37

与脉冲相关的采样参数如下图所示：

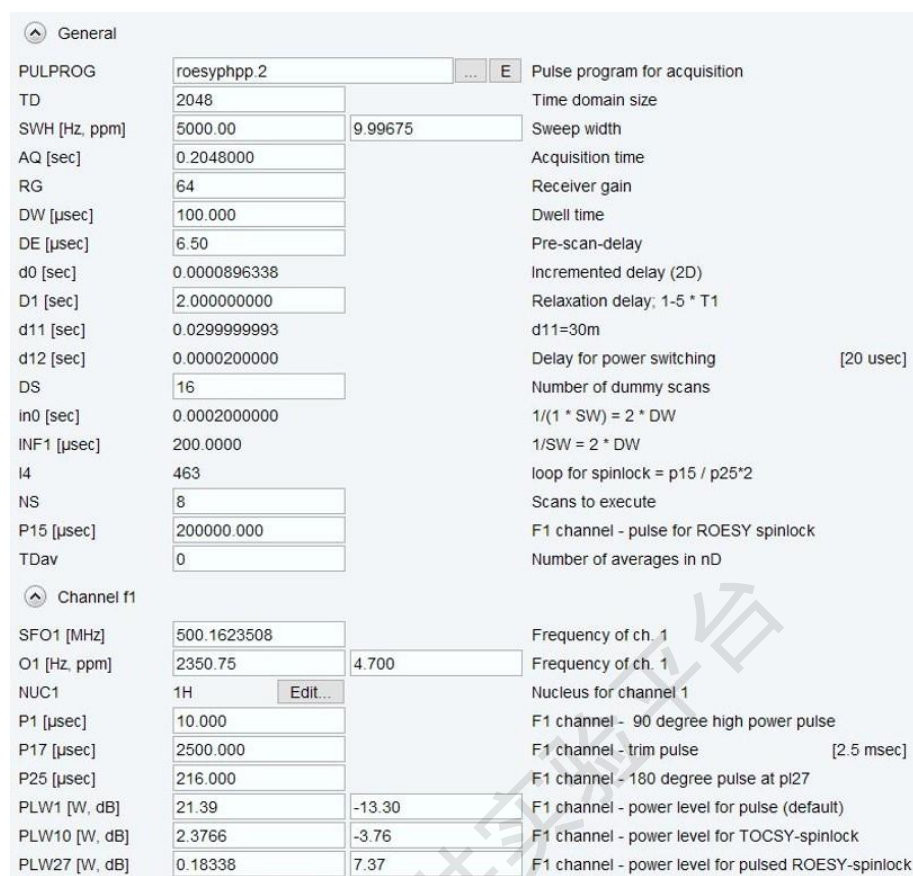


图 6-38

ROESY 的主要参数有 P15（混合时间），对小分子而言一般设在 400 ~ 800 μs 之间。

6.7.3 TOCSY: H-H 全相关

6.7.3.1 一般对于 500 MHz 及以下的核磁共振波谱仪，使用的脉冲序列为 mlevphpp 或 mlevphpr（压水时用），磁场高于 500 MHz 的核磁共振波谱仪使用的脉冲序列为 dipsi2ph 或 dipsi2phpr（压水时用）。通道的设置与 COSY 相同。

6.7.3.2 TOCSY 的采样参数如下图所示：

Experiment				
PULPROG	mlevphpp	E	Current pulse program	
AQ_mod	DQD		Acquisition mode	
FnTYPE	traditional(planes)		nD acquisition mode for 3D etc.	
FnMODE	States-TPPI		Acquisition mode for 2D, 3D etc.	
TD	2048	160	Size of fid	
DS	16		Number of dummy scans	
NS	16		Number of scans	
TD0	1		Loop count for 'td0'	
TDav	0		Average loop counter for nD experiments	
Width				
SW [ppm]	9.9968	9.9968	Spectral width	
SWH [Hz]	5000.000	5000.000	Spectral width	
IN_F [μsec]		200.00	Increment for delay	
AQ [sec]	0.2048000	0.0160000	Acquisition time	
FIDRES [Hz]	4.882813	62.500000	Fid resolution	
FW [Hz]	240000000.000		Filter width	
Receiver				
RG	101		Receiver gain	
DW [μsec]	100.000		Dwell time	
DWOV [μsec]	0.025		Oversampling dwell time	
DECIM	4000		Decimation rate of digital filter	
DSPFIRM	sharp(standard)		DSP firmware filter	
DIGTYP	DRX		Digitizer type	
DIGMOD	digital		Digitization mode	
DR	32		Digitizer resolution	
DDR	0		Digital digitizer resolution	
DE [μsec]	6.50		Pre-scan delay	
NBL	1		Number of blocks (of acquisition memory)	
HPPRGN	normal		Preamplifier gain	
PRGAIN	high		High power preamplifier gain	
DQDMODE	add		Digital quad detection mode	
PH_ref [degree]	0		Receiver phase correction	
OVERFLW	check		ADC overflow checking	
Nucleus 1				
NUC1	1H	Edit...	1H	Observe nucleus
O1 [Hz]	2500.80		2500.80	Transmitter frequency offset
O1P [ppm]	5.000		5.000	Transmitter frequency offset
SFO1 [MHz]	500.1625008		500.1625008	Transmitter frequency
BF1 [MHz]	500.1600000		500.1600000	Basic transmitter frequency

图 6-39

采样模式的选择根据脉冲序列的要求，TD2 一般设为 1 k - 2 k，TD1 一般设为 160 - 256。与脉冲相关的采样参数如下图所示：

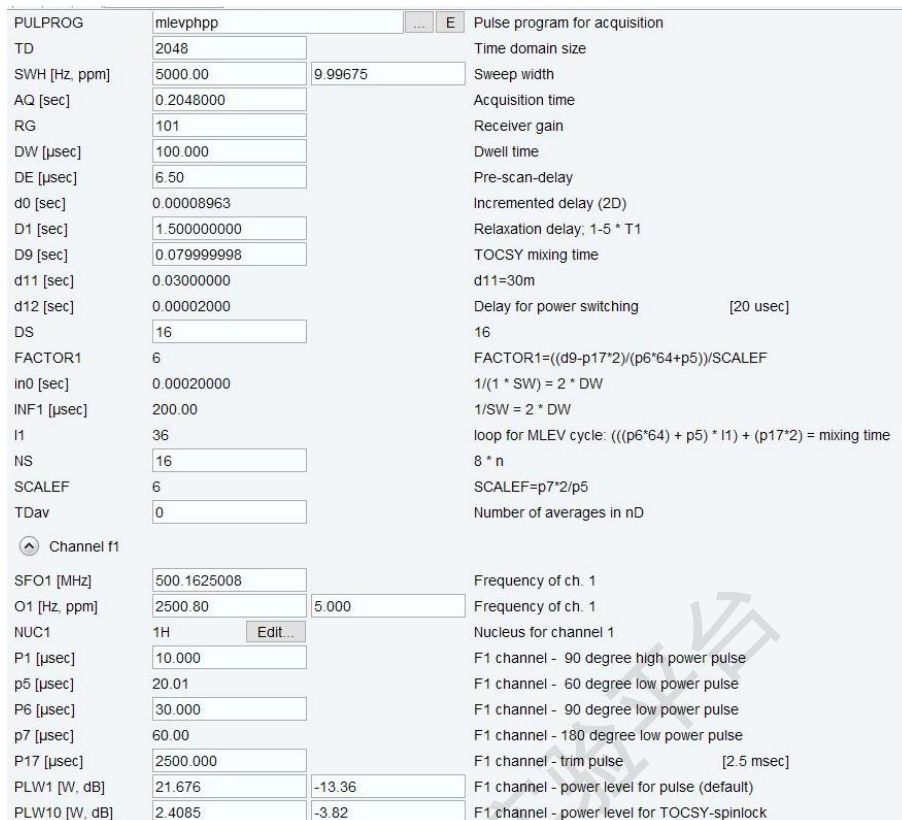


图 6-40

自旋锁定功率的选择, 主要参数为 P6 与 PL10。P6 一般设为 40 μs; PL10 可通过命令“pulse 40 μs”获得。D9（混合时间）一般设为 80 ~ 100 ms。

6.7.4 HSQC: C-H 直接相关

6.7.4.1 在新建文件时, experiment 选择 HSQCETGPSISP2, 通道设置如下图所示:

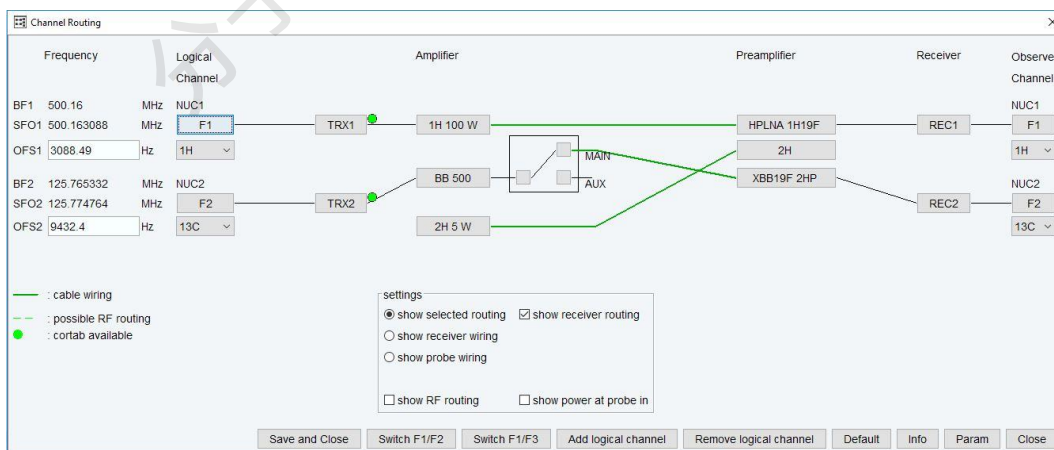


图 6-41

6.7.4.2 HSQC 的采样参数如下图所示:

	F2	F1	Frequency axis
Experiment			
PULPROG	hsqcetgpsi2	E	Current pulse program
AQ_mod	DQD		Acquisition mode
FnTYPE	traditional(planes)		nD acquisition mode for 3D etc.
FnMODE		Echo-Antiecho	Acquisition mode for 2D, 3D etc.
TD	1024	200	Size of fid
DS	16		Number of dummy scans
NS	4		Number of scans
TD0	1		Loop count for 'td0'
TDav	0		Average loop counter for nD experiments
Width			
SW [ppm]	9.9968	199.9980	Spectral width
SWH [Hz]	5000.000	25155.330	Spectral width
IN_F [μsec]		39.75	Increment for delay
AQ [sec]	0.1024000	0.0039753	Acquisition time
FIDRES [Hz]	9.765625	251.553299	Fid resolution
FW [Hz]	240000000.000		Filter width
Receiver			
RG	101		Receiver gain
DW [μsec]	100.000		Dwell time
DWOV [μsec]	0.025		Oversampling dwell time
DECIM	4000		Decimation rate of digital filter
DSPFIRM	rectangle		DSP firmware filter
DIGTYP	DRX		Digitizer type
DIGMOD	baseopt		Digitization mode
DR	32		Digitizer resolution
DDR	0		Digital digitizer resolution
DE [μsec]	6.50		Pre-scan delay
NBL	1		Number of blocks (of acquisition memory)
HPPRGN	normal		Preamplifier gain
PRGAIN	high		High power preamplifier gain
DQDMODE	add		Digital quad detection mode
PH_ref [degree]	0		Receiver phase correction
OVERFLW	check		ADC overflow checking
Nucleus 1			
NUC1	1H	13C	Observe nucleus
O1 [Hz]	2500.80	12576.53	Transmitter frequency offset
O1P [ppm]	5.000	100.000	Transmitter frequency offset
SFO1 [MHz]	500.1625008	125.7779086	Transmitter frequency
BF1 [MHz]	500.1600000	125.7653320	Basic transmitter frequency
Nucleus 2			
NUC2	13C		2nd nucleus
O2 [Hz]	12576.53		Frequency offset of 2nd nucleus
O2P [ppm]	100.000		Frequency offset of 2nd nucleus
SFO2 [MHz]	125.7779086		Frequency of 2nd nucleus
BF2 [MHz]	125.7653320		Basic frequency of 2nd nucleus

图 6-42

采样模式的选择根据脉冲序列的要求，TD2 一般设为 1 k - 2 k，TD1 一般设为 160 - 256。与脉冲相关的采样参数如下图所示：

General		
PULPROG	hsqcetgpsi2	Pulse program for acquisition
TD	1024	Time domain size
SWH [Hz, ppm]	5000.00	Sweep width
AQ [sec]	0.1024000	Acquisition time
RG	101	Receiver gain
DW [µsec]	100.000	Dwell time
DE [µsec]	6.50	Pre-scan-delay
CNST2	145.0000000	= J(XH)
d0 [sec]	0.00000300	Incremented delay (2D) [3 usec]
D1 [sec]	1.500000000	Relaxation delay, 1-5 * T1
d4 [sec]	0.00172414	1/(4)XH
d11 [sec]	0.03000000	Delay for disk I/O [30 msec]
D16 [sec]	0.000200000	Delay for homospoil/gradient recovery
D24 [sec]	0.000862070	1/(8)XH for all multiplicities
DELTA [sec]	0.00127600	DELTA=p16+d16+50u+p2+d0*2
DELTA1 [sec]	0.00120670	DELTA1=p16+d16-p1*0.78+de+8u
DELTA2 [sec]	0.00006207	DELTA2=d24-p19-d16
DELTA3 [sec]	0.00052414	DELTA3=d4-p16-d16
DS	16	>= 16
in0 [sec]	0.00001990	1/(2 * SW(X)) = DW(X)
INF1 [µsec]	39.80	1/SW(X) = 2 * DW(X)
NS	4	1 * n
TDav	0	Number of averages in nD
ZGOPSNS		Options for zg
Channel f1		
SFO1 [MHz]	500.1625008	Frequency of ch. 1
O1 [Hz, ppm]	2500.80	5.000
NUC1	1H	Nucleus for channel 1
P1 [µsec]	10.000	F1 channel - 90 degree high power pulse
p2 [µsec]	20.00	F1 channel - 180 degree high power pulse
P28 [µsec]	1000.000	F1 channel - trim pulse
PLW1 [W, dB]	21.39	-13.30
		F1 channel - power level for pulse (default)
Channel f2		
SFO2 [MHz]	125.7779086	Frequency of ch. 2
O2 [Hz, ppm]	12576.53	100.000
NUC2	13C	Nucleus for channel 2
CPDPRG 2	garp	File name for cpd2
P3 [µsec]	10.000	F2 channel - 90 degree high power pulse
p4 [µsec]	20.00	F2 channel - 180 degree high power pulse
PCPD2 [µsec]	70.00	F2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence
PLW2 [W, dB]	82.898	-19.19
		F2 channel - power level for pulse (default)
PLW12 [W, dB]	1.6918	-2.28
		F2 channel - power level for CPD/BB decoupling
Gradient channel		
GPNAM 1	SMSQ10.100	SMSQ10.100
GPZ1 [%]	80.00	80%
GPNAM 2	SMSQ10.100	SMSQ10.100
GPZ2 [%]	20.10	20.1% for C-13, 8.1% for N-15
GPNAM 3	SMSQ10.100	SMSQ10.100
GPZ3 [%]	11.00	11%
GPNAM 4	SMSQ10.100	SMSQ10.100
GPZ4 [%]	-5.00	-5%
P16 [µsec]	1000.000	Homospoil/gradient pulse [1 msec]
P19 [µsec]	600.000	Gradient pulse 2 [500 usec]

图 6-43

与脉冲序列相关的参数重点要考虑去耦参数的设置以及 C-H 耦合常数的设置, C-H 耦合常数一般设为 145 Hz。

6.7.5 HMBC: C-H 远程相关

6.7.5.1 在新建文件时, experiment 选择 HMBCGPNDQF。其通道设置与 HSQC 相同

6.7.5.2 HMBC 的采样参数如下图所示:

	F2	F1	Frequency axis
Experiment			
PULPROG	hmbcgp1pndqf		Current pulse program
AQ_mod	DQD		Acquisition mode
FnTYPE	traditional(planes)		nD acquisition mode for 3D etc.
FnMODE	QF		Acquisition mode for 2D, 3D etc.
TD	2048	256	Size of fid
DS	16		Number of dummy scans
NS	16		Number of scans
TD0	1		Loop count for 'td0'
TDav	0		Average loop counter for nD experiments
Width			
SW [ppm]	9.9968	229.9966	Spectral width
SWH [Hz]	5000.000	28928.920	Spectral width
IN_F [µsec]		34.57	Increment for delay
AQ [sec]	0.2048000	0.0088493	Acquisition time
FIDRES [Hz]	4.882813	113.003593	Fid resolution
FW [Hz]	240000000.000		Filter width
Receiver			
RG	101		Receiver gain
DW [µsec]	100.000		Dwell time
DWOV [µsec]	0.025		Oversampling dwell time
DECIM	4000		Decimation rate of digital filter
DSPFIRM	sharp(standard)		DSP firmware filter
DIGTYP	DRX		Digitizer type
DIGMOD	digital		Digitization mode
DR	32		Digitizer resolution
DDR	0		Digital digitizer resolution
DE [µsec]	6.50		Pre-scan delay
NBL	1		Number of blocks (of acquisition memory)
HPPRGN	normal		Preamplifier gain
PRGAIN	high		High power preamplifier gain
DQDMODE	add		Digital quad detection mode
PH_ref [degree]	0		Receiver phase correction
OVERFLW	check		ADC overflow checking
Nucleus 1			
NUC1	1H	13C	Observe nucleus
O1 [Hz]	2065.27	14463.01	Transmitter frequency offset
O1P [ppm]	4.129	115.000	Transmitter frequency offset
SFO1 [MHz]	500.1620653	125.7797950	Transmitter frequency
BF1 [MHz]	500.1600000	125.7653320	Basic transmitter frequency
Nucleus 2			
NUC2	13C		2nd nucleus
O2 [Hz]	14463.01		Frequency offset of 2nd nucleus
O2P [ppm]	115.000		Frequency offset of 2nd nucleus
SFO2 [MHz]	125.7797950		Frequency of 2nd nucleus
BF2 [MHz]	125.7653320		Basic frequency of 2nd nucleus

图 6-44

采样模式的选择根据脉冲序列的要求，TD2 一般设为 1 k - 2 k，TD1 一般设为 160 - 256。

SW1 一般设为 230 ppm，O2P 一般设为 115 ppm。

与脉冲相关的采样参数如下图所示：

General			
PULPROG	hmbcgp1pndqf	Pulse program for acquisition	
TD	2048	Time domain size	
SWH [Hz, ppm]	5000.00	9.99676	Sweep width
AQ [sec]	0.2048000		Acquisition time
RG	101		Receiver gain
DW [µsec]	100.000		Dwell time
DE [µsec]	6.50		Pre-scan-delay
CNST2	145.0000000		= J(XH)
CNST13	8.0000000		= J(XH) long range
d0 [sec]	0.0000300		Incremented delay (2D) [3 usec]
D1 [sec]	1.500000000		Relaxation delay, 1-5 * T1
d2 [sec]	0.00344828		1/(2J)XH
d6 [sec]	0.06250000		Delay for evolution of long range couplings
D16 [sec]	0.000200000		Delay for homospoil/gradient recovery
DS	16		16
in0 [sec]	0.00001730		1/(2 * SW(X)) = DW(X)
INF1 [µsec]	34.60		1/SW(X) = 2 * DW(X)
NS	16		2 * n
TDav	0		Number of averages in nD
Channel f1			
SFO1 [MHz]	500.1620653		Frequency of ch. 1
O1 [Hz, ppm]	2065.27	4.129	Frequency of ch. 1
NUC1	1H	Edit...	Nucleus for channel 1
P1 [µsec]	10.000		F1 channel - 90 degree high power pulse
p2 [µsec]	20.00		F1 channel - 180 degree high power pulse
PLW1 [W, dB]	21.39	-13.30	F1 channel - power level for pulse (default)
Channel f2			
SFO2 [MHz]	125.7797950		Frequency of ch. 2
O2 [Hz, ppm]	14463.01	115.000	Frequency of ch. 2
NUC2	13C	Edit...	Nucleus for channel 2
P3 [µsec]	10.000		F2 channel - 90 degree high power pulse
PLW2 [W, dB]	82.898	-19.19	F2 channel - power level for pulse (default)
Gradient channel			
GPNAM 1	SMSQ10.100	E	SMSQ10.100
GPZ1 [%]	50.00		50% for C-13, 70% for N-15
GPNAM 2	SMSQ10.100	E	SMSQ10.100
GPZ2 [%]	30.00		30%
GPNAM 3	SMSQ10.100	E	SMSQ10.100
GPZ3 [%]	40.10		40.1% for C-13, 50.1% for N-15
P16 [µsec]	1000.000		Homospoil/gradient pulse

图 6-45

主要需要优化的参数是 CNST13（远程耦合常数），CNST13 一般设为 6 ~ 10 Hz。

6.7.6 二维谱实验的注意事项：

- (1) experiment 中程序的选择。
- (2) 一定要查看 PULSEPROG 里面的具体要求
- (3) 实验完成后图谱处理命令“xfb”，进行变换，与一维不同。
- (4) 做二维谱之前先做相应的一维 1H、13C 谱，以方便投影。

6.8. 一维核磁图谱的处理

6.8.1 处理参数的设置：

- (1) $SI \geq 2 * TD$;

- (2) 窗函数：一维谱一般选择 EM；LB 的值一般看具体情况，LB 值较大时可提高图谱的信噪比，但是分辨率会降低；如果图谱因为匀场不理想导致谱峰峰型不佳，则可通过窗函数改善峰型。
- (3) PH_mod 一般选择 pk 模式，这样就可以对图谱进行调相。

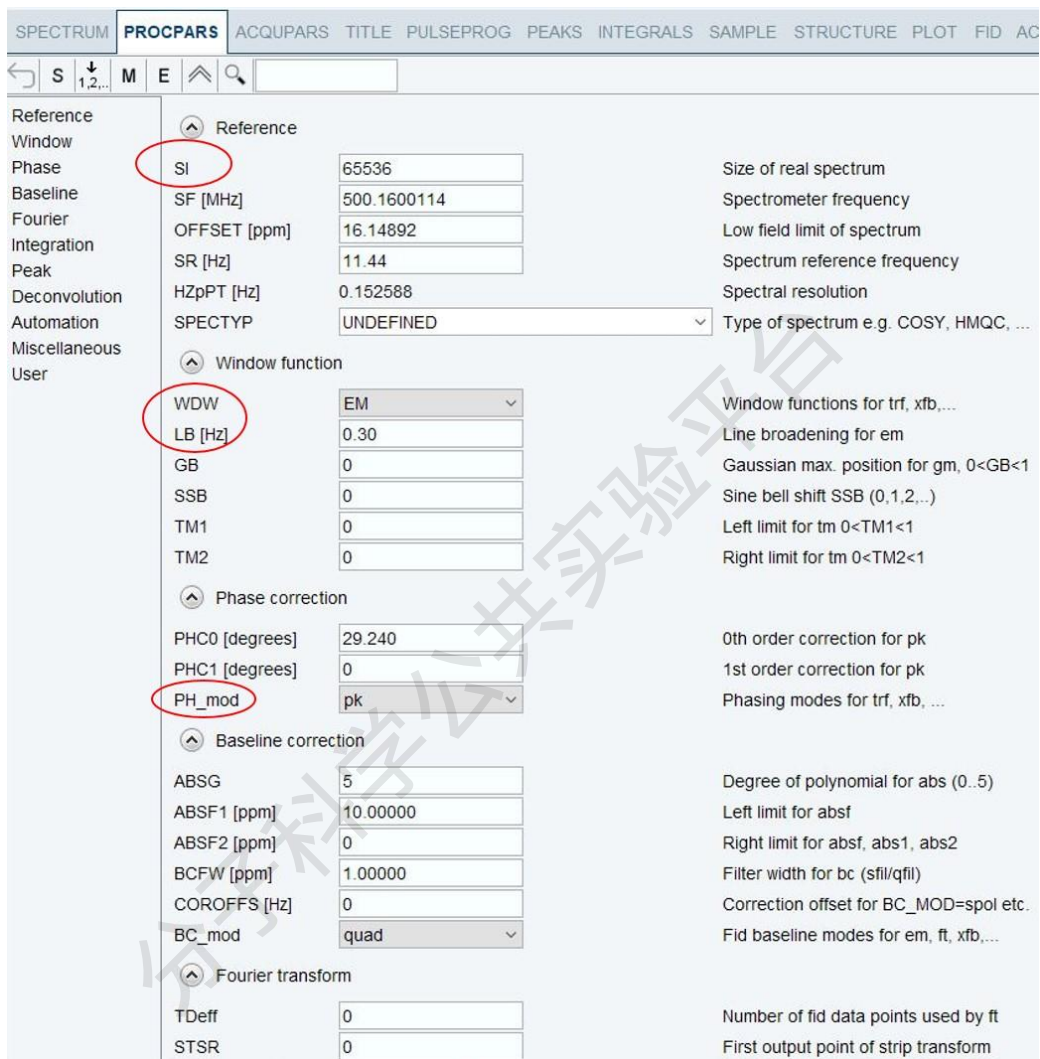


图 6-46

一维核磁谱的处理一般包含以下流程：傅立叶变换（efp）、相位校正（apk）、基线校正（abs）、定标、谱峰标识、积分、图谱输出等步骤。

6.8.2 傅立叶变换（efp）

样品采集完毕，输入“fp”（只进行傅立叶变换）或“efp”（e 表示加了“em”的窗函数）

6.8.3 相位校正（apk）

输入“apk”进行自动相位校正；也可进入调相模式，手动进行相位校正：①点击“Process”；②选择“Adjust Phase”进入手动调相模式；③选中“0”，拖动鼠标，通过调节

内部文件，请勿随意转发、打印、复印

零级相位，将最右边的谱峰相位调整好；④然后选中“1”，拖动鼠标，通过调节一级相位，将最左边的谱峰相位调整好；⑤保存调好相位的图谱，并退出调相模式。



图 6-47

6.8.4 基线校正 (abs)

输入“abs”进行自动基线校正；也可进入手动基线校正模式，进行手动基线校正：①点击“Process”；②选择“Baseline”进入手动调相模式；③通过调整 A、B、C、D、E 的值，拟合出一条与基线重合的曲线；④保存经过基线校正的图谱，并退出基线校正模式。

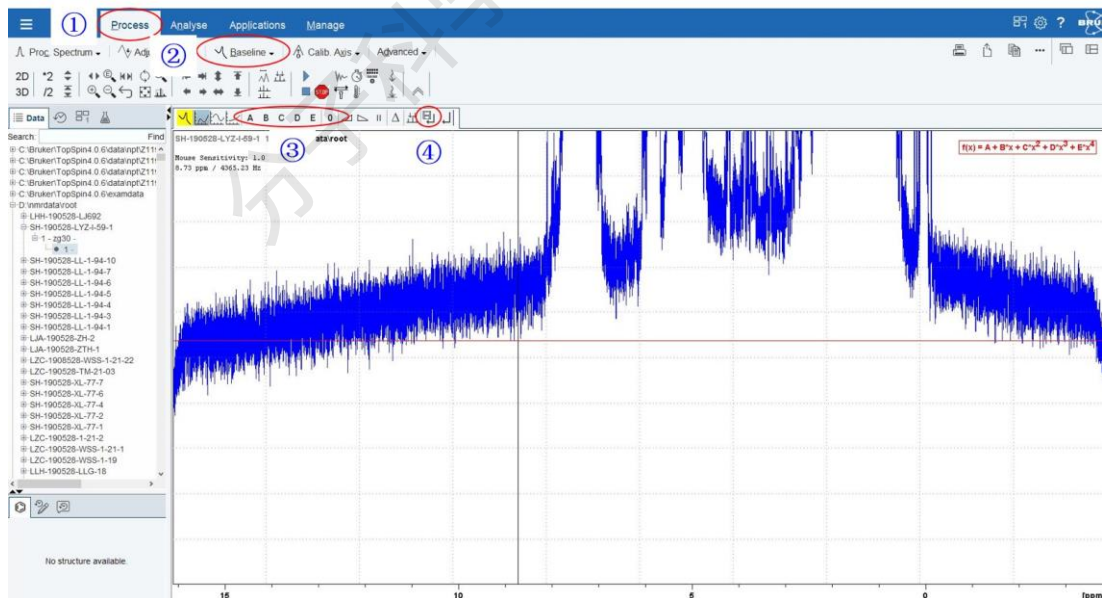


图 6-48

6.8.5 定标

先将需要定标的谱峰放大，①点击“Process”；②选择“Calib Axis”进入定标模式；③

点击图标“C”，弹出一个窗口，输入定标值，点击“OK”；④保存经过定标的图谱，并退出定标模式。

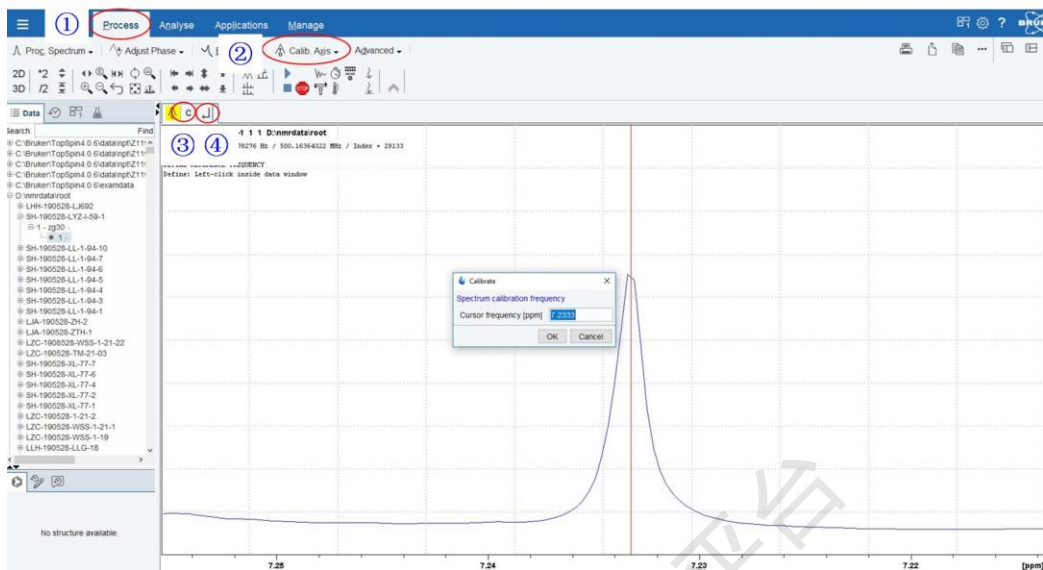


图 6-49

6.8.6 谱峰标识

①点击“Analyse”；②选择“Pick Peaks”进入标峰模式；③通过鼠标画方框，将谱峰峰尖框住，即完成标峰；④保存经过定标的图谱，并退出定标模式。

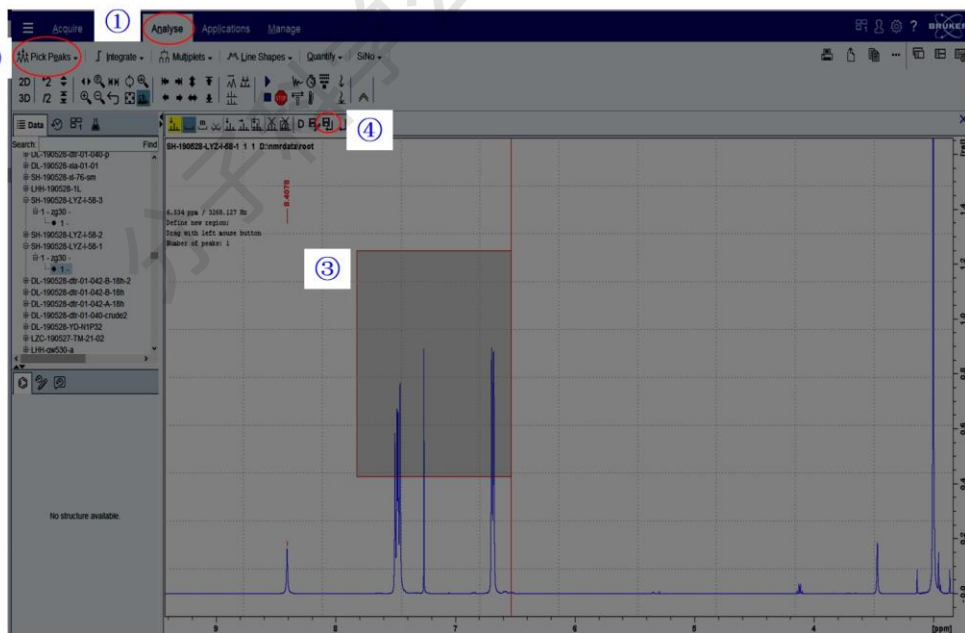


图 6-50

6.8.7 积分

①点击“Analyse”；②选择“Integrate”进入积分模式；③通过鼠标选定需要积分的区域

间，即完成积分；④保存经过积分的图谱，并退出积分模式。

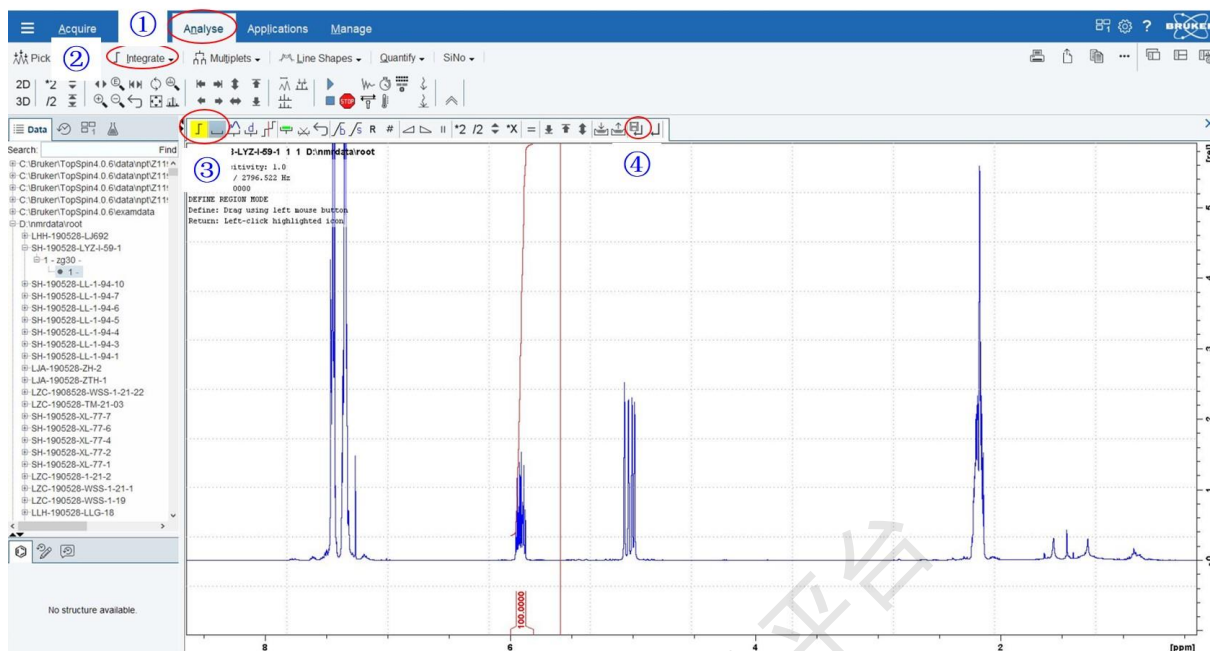


图 6-51

6.8.8 图谱的输出

(1) 输入命令“plot”，出现如下界面：

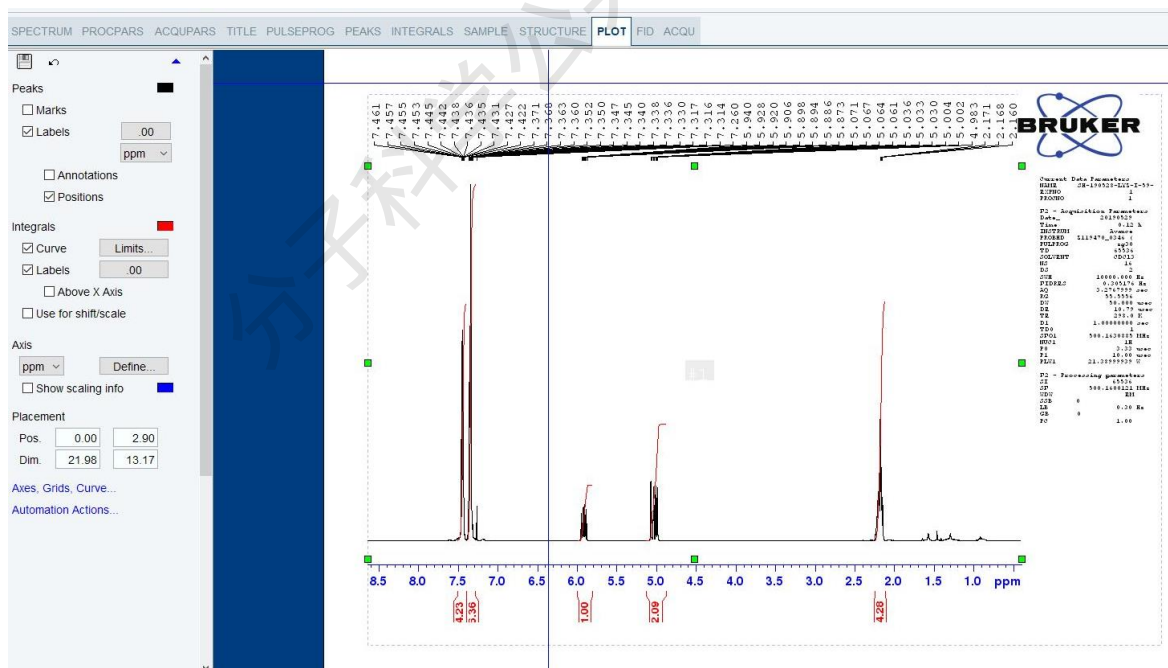


图 6-52

可以对坐标范围、字体大小等进行简单的编辑。

(2) 输入命令“plot0”，出现如下界面：

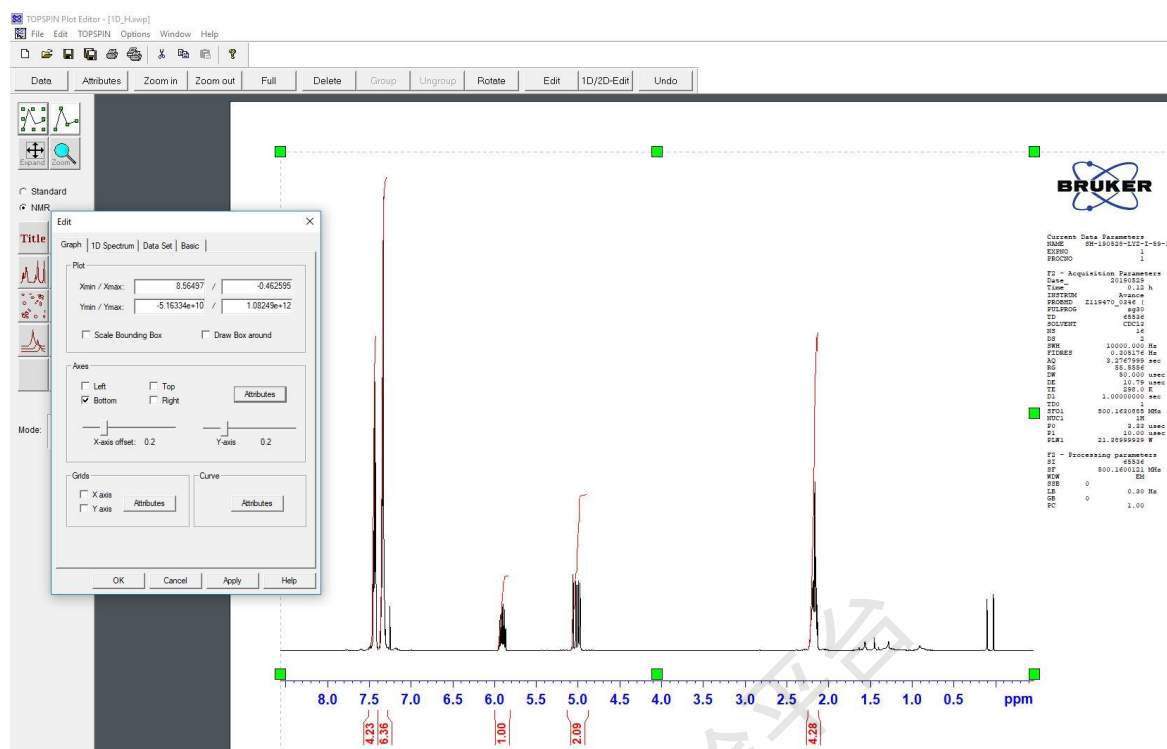


图 6-53

可以对坐标范围、字体大小、线条粗细、图谱放大的倍数等进行编辑。

7. 相关/支撑性文件

Q/WU FLHR001 文件编写规范

8. 记录

FLHS020 核磁共振谱仪使用记录表

核磁共振谱仪使用记录									
20__年									
日期 月.日	使用人 1~2 名	课题组 导师	实验命名 (Name) 导师名首字母-日期-样品-方法	检测方式		样品状态		实验内容 (Title) 检测核、方法	备注
				送样	自主	氘代溶剂	位置#		
04.11	张三、李四	王五	WW-190410-His-1H	√		CDCl ₃	01	¹ H 1D	样例
			WW-190410-His-HSQC		√	10% D ₂ O	60	¹ H- ¹³ C HSQC	依内容可多行

请注意：使用前先检查谱仪状况，一切正常方可操作；一旦开始实验，默认为使用前谱仪状况良好；使用过程中出现故障须立即联系技术员；测试后请及时取回样品。