

Arimo Mertanen

Pure shift -parametrien optimointi psyche-¹H-, psyche-TOCSY- ja BIRD-HSQC-mittauksille

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

9.10.2018

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Arimo Mertanen Pure shift -parametrien optimointi psyche- ¹ H-, psyche-TOCSY- ja BIRD-HSQC-mittauksille 58 sivua + 1 liite 9.10.2018
Tutkinto	laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	laboratorioanalytiikka
Ohjaajat	Yliopettaja Jukka Niiranen Dosentti Hannu Maaheimo
<p>Protonisignaalien multiplittirakenteet aiheuttavat signaalien päällekkäisyyttä ja vaikeasti tulkittavia NMR-protonispektrejä. Tavoitteena oli protonien välisten kytkennät poistavien pure shift -NMR-pulssisarjojen parametrien optimointi psyche-¹H-, psyche-TOCSY- ja BIRD-HSQC-mittauksille monimutkaisten näytteiden analysoimiseen. Työssä hyödynnettiin valmiita pulssisarjoja. Työ sisältää paljon yksittäisten parametrien vaikutusten tutkimista.</p> <p>Teoriaosuudessa esitetään ydinmagneettisen resonanssispektroskopian perusteet ja tutustutaan pure shift -mittauksen irtautus- ja keräysvaiheisiin. Irtautusmenetelmistä esitetään BIRD- ja psyche-elementit. Pseudo-2d ja reaaliaikainen keräystapa käydään läpi yleisesti, jotta niiden erot tulevat lukijalle selviksi.</p> <p>Käytännön osuus suoritettiin Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy:n Biologisen NMR-spektroskopian laboratoriossa Viikissä. Osuudessa käydään pulssisarjojen käyttöönotto ja optimointi läpi. Kokeita suoritettiin yksi kerrallaan siten, että joka ajon jälkeen tulkittiin saatua pure shift -spektriä ja tehtyjä parametrimuutoksia. Aiempia kokemuksia pure shift -kokeista ei juuri ollut. Työprosessissa teoreettiseen tutkimukseen sekoittui empiiristä tutkimustyötä.</p> <p>Työssä saatujen tulosten pohjalta valmistui yhteenveto menetelmien parametreista ja siitä, mikä pure shift -mittauksissa on tärkeää ja mikä toisarvoista.</p>	
Avainsanat	NMR-spektroskopia, pure shift, protonien välisten kytkentöjen irtautus, psyche- ¹ H, psyche-TOCSY, BIRD-HSQC

Author Title	Arimo Mertanen The Optimization of Homonuclear Broadband Decoupling NMR Parameters for Psyche- ¹ H, Psyche-TOCSY and BIRD-HSQC
Number of Pages Date	58 pages + 1 appendix 9 October 2018
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Jukka Niiranen, Principal lecturer Hannu Maaheimo, Docent
<p>Overlapping multiplet structures reduce the resolution of NMR spectra. The aim of this study was to develop homonuclear broadband decoupling (pure shift) pulse parameters for psyche-¹H, psyche-TOCSY and BIRD-HSQC for measuring complex mixtures. Existing pulse programs were utilized. Considerable emphasis was put on the process of analyzing the effects of individual parameters, which was done between the measurements.</p> <p>The theory section discusses the basics of nuclear magnetic resonance spectroscopy, and illustrates pure shift decoupling and data acquisition methods. BIRD and psyche homonuclear broadband decoupling methods are introduced. Furthermore pseudo-2d and real-time acquisition modes are reviewed in order to clarify their differences to the reader.</p> <p>The practical part was carried out at the VTT Technical Research Centre Ltd. The optimizing process of the acquisition parameters is reviewed thoroughly. The measurements were ran one at a time to examine how and why the different parameter changes affected the quality of the pure shift spectrum as they did. Existing examples for developing pure shift methods were limited so the development process mixed theoretical research and empirical fixing.</p> <p>Based on the work, a summary for primary and secondary method parameters was completed.</p>	
Keywords	NMR, pure shift, homonuclear broadband decoupling, psyche- ¹ H, psyche-TOCSY, BIRD-HSQC

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	NMR-spektrometri	3
3	NMR-spektroskopia	6
3.1	Ytimen energia magneettikentässä	6
3.2	Spin-spinkytkeytyminen	8
3.3	Radiopulssin vaikutus ytimeen	10
3.4	Pulssitettu kenttägradientti	11
4	NMR-pulssisarja	13
4.1	Protoni-NMR	14
4.2	Pure shift	15
4.2.1	BIRD-HSQC	16
4.2.2	Psyche- ¹ H	17
4.2.3	Psyche-TOCSY	18
4.2.4	Irtautetun signaalin keräys	19
5	Työn suoritus	21
5.1	Psyche- ¹ H	22
5.1.1	Bruker	23
5.1.2	Manchesterin yliopisto	40
5.2	Psyche-TOCSY	43
5.3	BIRD-HSQC	47
6	Tulosten käsittely ja tarkastelu	50
6.1	1d psyche- ¹ H	50
6.2	Psyche-TOCSY	54
6.3	BIRD-HSQC	54
7	Yhteenveto	55
	Lähteet	57

Liite 1. Psyche-¹H (ajo 23), J-eroteltu NMR-spektri ja irtauttamaton ¹H-spektri

Lyhenteet

BIRD	Bilinear rotational decoupling. Mittaustekniikka, jossa ^{12}C - ja ^{13}C -ytimiin kiinnittyneet protonien signaalit erotetaan toisistaan erilleen.
FID	Free induction decay. Vaimeneva oskilloiva signaali.
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence. Mittausmenetelmä, joka näyttää suoraan toisiinsa kytkeytyneiden ^1H - ja ^{13}C -ydinten välisen korrelaation.
PSYCHE	Pure shift yielded by chirp excitation. Pure shift -mittaustekniikka, jossa chirp-pulssien ja gradientin yhteisvaikutuksesta poistetaan protonien väliset kytkennät.
^1H TOCSY	Total correlated spectroscopy. Mittausmenetelmä, jolla nähdään, mitkä protonit sijaitsevat samassa spinsysteemissä.

1 Johdanto

Nuclear magnetic resonance, NMR, ydinmagneettinen resonanssi -spektroskopia, on spektroskopointimenetelmä pienten ja keskikokoisten orgaanisten ja biomolekyylien rakenteiden tutkimiseen ja varmistukseen. NMR-spektroskopiaa voidaan käyttää myös kvantitatiivisiin mittauksiin. Yleisimpiä mitattavia ytimiä ovat ^1H ja ^{13}C . Kemiallisen ongelman ratkaisussa sitä käytettiin ensimmäisen kerran 1950-luvulla [1, s. xiii]. Uusien mittausten menetelmien tutkiminen on osa kehittyvää alaa.

Mittaukset perustuvat siihen, että useimmat atomien ytimet resonoivat niille ominaisella radiotaajuudella, joka saa ne virittymään korkeampaan energiatilaan. Ulkoisella magneettikentällä aikaansaadussa energiatilan vaihdoksessa ytimeen absorboituu energiaa, jolloin virittynyt tila indusoi radiotaajuussignaalin detektorille.

NMR-spektrin luettavuuteen vaikuttavat pääasiassa kaksi tekijää: mittausherkkyyys ja erottelukyky. Viimeisen 20 vuoden aikana mittausherkkyyteen on saatu merkittäviä parannuksia voimakkaampien magneettien, kehittyneempien tietokoneiden ja etenkin cryoproben eli lähelle absoluuttista nollapistettä jäähdytetyn mittapään yleistymisen myötä. Sen sijaan erottelukykyyteen ei ole saatu parannuksia muuten kuin voimakkaammilla magneeteilla. [2.] Protonien kemialliset siirtymät NMR-mittauksissa sijoittuvat kaapelelle noin 10 - 15 ppm:n levyiselle alueelle [3]. Protonisignaalien multipliettirakenteet aiheuttavat signaalien päällekkäisyyttä ja vaikeasti tulkittavia spektrejä jo pienillä molekyyleillä.

Uusien NMR-mittausmenetelmien kehittäminen on tuonut uusia tapoja mitata monimutkaisia NMR-näytteitä. Yksi viime vuosina kiinnostuksen kohteeksi noussut lähestymistapa erottelukyvyn parantamiseen ovat pure shift -mittaukset, joissa samojen ydinten väliset kytkennät irtautetaan. Tuloksena on spektrejä, joissa näkyvät ydinten kemialliset siirtymät, mutta ei kytkentöjen aiheuttamaa multipliettirakennetta. Idea samojen ydinten välisten skalaarikytkentöjen poistamiseen ei ole uusi. Käytössä aiemmin on ollut erinäisiäkin keinoja poistattaa kytkentöjä. Koko kaistanleveydeltä irtautettuun spektriin johtavaa yleistä tapaa ei ole ollut olemassa. Irtautus on ollut epäherkkää, ja se on joko tapahtunut hyvin pienellä selektiivisellä kaistalla tai siihen on käytetty monimutkaisia mittaus-

jälkiprosessointiyhdistelmiä, kuten J-erotelluissa mittauksissa. Näissä ei oikeasti irtauteta kytkentöjä, vaan sopivalla mittaustekniikalla ja jälkiprosessoinnilla kytkennät on saatu häivytettyä lopullisesta yksiulotteisesta spektristä.

Yksi uusimmista pure shift -mittaussekvensseistä on vuonna 2013 kehitetty psyche-elementti, jossa käytetään kahta chirp-pulssia irtautukseen sekä havainnointiin. HSQC-mittauksissa edelleen kannattavin vaihtoehto on käyttää BIRD-elementtiä.

Opinnäytetyössä otettiin käyttöön ja optimoitiin pure shift -pulssisarjojen parametreja 1d-¹H-, 2d-TOCSY- ja HSQC-kokeille. Manchesterin yliopistolta ja Brukerilta oli jaossa omat pulssisarjansa pure shift -mittauksille, joita soveltamalla oli myös tarkoitus saada vastaavat mittaukset toimimaan VTT:n 600 MHz:n spektrometrillä.

2 NMR-spektrometri

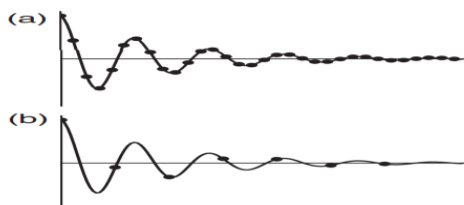
NMR-spektrometri koostuu magneetista, mittapäästä, lähettimestä ja vastaanottimesta, vahvistimesta, A/D-muuntimesta ja tietokoneesta. NMR-spektrometrit ovat melko massiivisia laitteita, mutta nykyisin on kehitelty myös alle 100 MHz:n pöytäversioita.

Magneetin tehtävänä on kehittää voimakas, stabiili, homogeeninen magneettikenttä B_0 . Magneetit ovat joko kestopagneetteja, sähkömagneetteja tai suprajohtavia magneetteja. Tyhjiöillä eristetty suprajohtava magneetti koostuu käytännössä käämistä, jonka läpi on johdettu virta ja sen jälkeen se on oikosuljettu. Käämi on valmistettu materiaalista, joka muuttuu suprajohtavaksi neljässä kelvinissä (-269 °C). Käämi pidetään neljässä kelvinissä nestemäisellä heliumilla, jota ympäröi tyhjiön eristämänä nestemäinen typpi (77 K , -196 °C). Suprajohtavuuden seurauksena virta kulkee käämissä lähes häviöttömästi. Suprajohtavat magneetit ovat hyvin stabiileja ja siten käytännöllisiä NMR:ään. [4, 5.1.] Magneettikenttä saadaan homogeeniseksi mittapään ympärille asetetuilla shimmi-keloilla. Käytännössä nämä kelat tuottavat ympärilleen pieniä, eri muotoisia magneettikenttiä, joiden voimakkuuksia säätämällä näyte saadaan kokemaan magneettikenttä homogeenisenä.

Probe eli mittapää on sylinterinmuotoinen metalliputki magneetin alaosassa, jonne NMR-näyteputki viedään. Se sisältää kelan ja kondensaattorin muodostaman virtapiirin, jonka kelalla sekä viritetään ytimet radiotaajuuspulsseilla että havaitaan NMR-signaali. Kelan induktanssia ja kondensaattorin kapasitanssia muuttamalla piiri asetetaan resonanssiin Larmor-taajuuden kanssa. Tämä lisää kelan havaitsemaa signaalia. Prosessia kutsutaan mittapään ”tuunaukseksi” eli virittämiseksi. Mittapään ”matchaamisella” eli sovittamisella tarkoitetaan radiolähettimen ja vastaanottimen tehonsiirron optimoimista sovittamalla mittapään kapasitanssi siirtolinjan impedanssiin. [4, 5.2.] Nykyaikaisilla spektrometreillä nämä tärkeät prosessit on tehty hyvin yksinkertaisiksi tietokoneelta suoritettaviksi operaatioiksi. Mittapään sisältämä elektroniikka voi olla joko huoneenlämmössä tai se voidaan pitää jäähdytettynä lähellä absoluuttista nolapistettä. Jäähdytettyä mittapäätä kutsutaan cryoprobeiksi tai kryogeenisesti jäähdytetyksi mittapääksi. Kryogeenisesti jäähdytetyn mittapään etuna on, että se muodostaa vähemmän elektronista lämpökohinaa, jolloin spektrille saadaan parempi signaali-kohinasuhde. Näyte on eristetty tyhjiöllä ympäröivästä mittapäästä, jolloin mittauslämpötila voidaan valita vapaasti tietyissä rajoissa. [18.]

Radiotaajuuslähettimellä luodaan radiopulssit, jotka synnyttävät magneettikentän B_1 . Lähettimen vaatimuksena on saada aikaiseksi vakioaajuinen radiosignaali, joka voidaan säätää tietylle taajuudelle esimerkiksi taajuusselektiivisiä kokeita tehdessä [4, 3.11]. Pulssin pituus ja sen ajoitus ovat oleellisia parametreja NMR-kokeessa. Näitä hallitaan tietokoneen kautta ohjatuilla porteilla. Portti päästää ja estää kontrolloidusti pulssin pääsyn eteenpäin vahvistimelle. Vahvistimen jälkeen pulssi siirtyy mittapähän, missä muodostuu näytteeseen vaikuttava magneettikenttä B_1 . B_1 :n suuntaa voidaan vaihtaa x- ja y-tasolla siirtämällä radiotaajuuspulssin vaihetta. Jos B_1 halutaan esimerkiksi x-akselilta y-akselille, siirretään pulssin vaihetta 90 astetta. Jos mittapähän tuodaan liikaa energiaa, sen kondensaattorin levyjen välille muodostuu liian suuria potentiaalieroja. Tämän seurauksena mittapäässä oleva ilma voi ionisoitua aiheuttaen valokaaria. Tästä syntyy vääristymiä B_1 -kentässä, ja potentiaalisesti se voi jopa rikkoa mittapään kelan ja kondensaattorin. Tästä syystä laitevalmistajat ilmoittavat turvarajat mittapään sallituille tehoille. [4, 5.3.] Kryogeenisesti jäädytetyt mittapäät ovat erityisen herkkiä lämmön suhteen.

Vastaanotinkelaan indusoitunut NMR-signaali on vain muutamia mikrovoltteja. Tätä vahvistetaan vähäkohinaisilla vahvistimilla. Signaali viedään esivahvistimelle. Sen tehtävänä on vahvistaa signaalia ennen signaalin kulkeutumista spektrometrin konsolille, jossa sitä jälleen vahvistetaan ja muunnetaan jännitearvoista binäärisiksi biteiksi analogi-/digitaalimuunnimella. Tällöin sitä voidaan käsitellä tietokoneella. A/D-muunnoksessa ei saada tarkkaa arvoa jännitteelle, vaan se on aina likiarvo riippuen A/D-muuntajan resoluutiosta. Jos käytössä on vähäbittinen A/D-muunnin, niin A/D-muunnoksesta signaalien sivuille saattaa muodostua heikot sivupiikit. [4, 5.5.] Kuvassa 1 on havainnollistettu, kuinka A/D-muunnin samplaa eli ottaa arvon signaalista tasaisin väliajoin. Nämä pisteet näkyvät FIDillä datapisteinä. Kuvassa 1a datapisteitä on riittävästi. Kuvassa 1b pisteitä on liian harvassa, jolloin datapisteistä rakentuva FID ei edusta havaittua analogista signaalia.



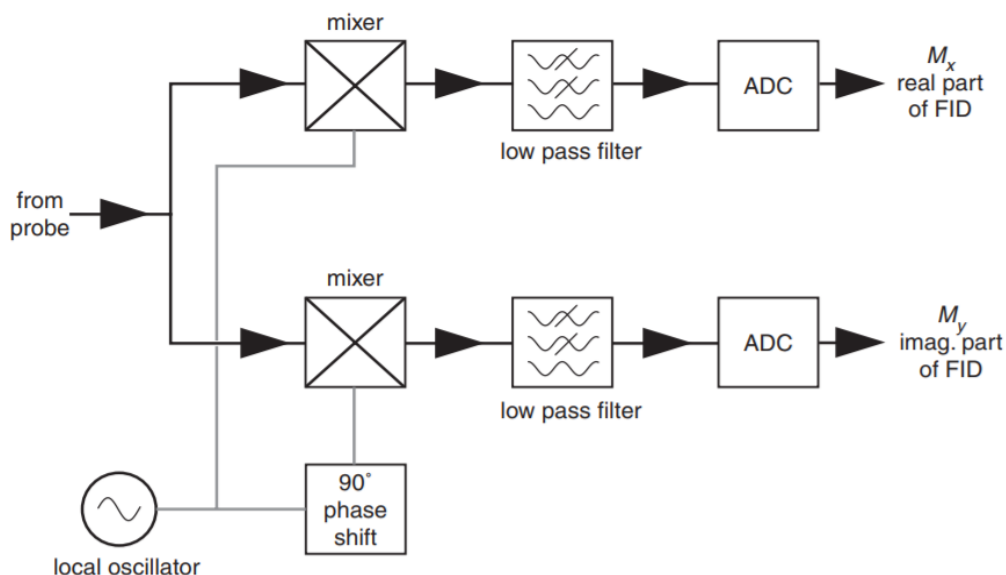
Kuva 1. Signaalin samplaustiheyden vaikutus FIDIin. Kohdassa a) datapisteitä on riittävän tiheässä, kohdassa b) niitä on liian harvoin. [4, 5.5.]

Datapisteiden väliselle aikavälille voidaan laskea arvo Nyquistin taajuuden kautta kaavalla 1. Tätä aikaväliä kutsutaan dwell-ajaksi, d_w (dwell time). [4, 5.5.]:

$$\Delta = \frac{1}{2 \times f_{\max}} = d_w, \quad (1)$$

jossa f_{\max} on Nyquistin taajuus. Nyquistin taajuus määritellään kaksi kertaa niin suureksi kuin alkuperäisessä spektrissä esiintyvä suurin taajuus [3, s. 21 - 22]. Tyypillinen d_w -arvo NMR-mittauksissa on useita kymmeniä mikrosekunteja.

Keräykseen ja havainnointiin käytetään kvadratuuridetektointia eli NMR-signaalia kerätään sekä x- että y-akseleilta pyörivässä koordinaatistossa kahteen FIDIin. Ytimen pyörimissuunnan havaitsemiseen tarvitaan vähintään kaksi mittapistettä, koska yksittäinen mittapiste ei erota koordinaatiston pyörimisnopeuteen verrattuna negatiivista ja positiivista taajuutta toisistaan. Kaksi mittapistettä yhdellä kelalla saadaan aikaiseksi kuvan 2 mukaisesti jakamalla havaittu signaali kahdelle mikserille. Mikserit vähentävät signaaleista 90° toisistaan poikkeavat vastaanottimen referenssitaajuudet. Referenssitaajuus on sama kuin lähtimen taajuus. Kahdesta mikseristä saadaan ulos pyörivän koordinaatiston sini- ja kosinikomponentit. Komponentit A/D-muunnetaan toisistaan erillään. Näistä saadaan toiseen FIDIin signaalin reaali- ja toiseen signaalin imaginaariosa. [4, 5.6.]



Kuva 2. Kvadratuuridetektoinnin kaaviokuva [4, 5.6].

Reaaliosan ja imaginääriosan nimitykset tulevat matemaattisesta Fourier-muunnosoperaatiosta, jolla FID muunnetaan aikadimensiosta taajuusdimensioon. Fourier-muunnos tuottaa reaaliosan (absorbtiiospektri) ja imaginääriosan (dispersiiospektri). [3, s. 15.] Yksiulotteiset NMR-spektrit ovat sovitusti absorbtiiospektrejä.

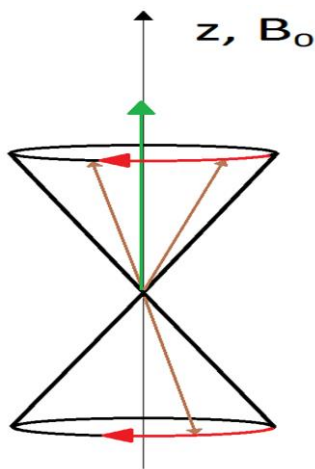
3 NMR-spektroskopia

3.1 Ytimen energia magneettikentässä

Ydinmagneettinen resonanssi -spektroskopiassa tutkitaan atomien ydinten käyttäytymistä, kun ne altistetaan ulkoisille voimakkaille magneettikentille. Kaikkia ytimiä ei voida havaita NMR:llä. Ytimen alkeishiukkasrakennetta kuvaavasta spinkvanttiluvusta tiedetään, onko ydin havaittavissa. Ydin havaitaan, jos sen spinkvanttiluku poikkeaa nolasta. Ydin saa spinkvanttilukuarvonsa riippuen sen ytimessä olevien protonien ja neutronien määrästä. Jos protoneita ja neutroneita on molempia parillinen määrä, kuten ^{12}C ($6p^+ + 6n$) tai ^{16}O ($8p^+ + 8n$), ytimen spinkvanttiluku on nolla eikä sillä ole vuorovaikutusta magneettikentän kanssa. Tällaisia alkuaineita tutkitaan NMR:ssä mittaamalla niiden muita isotooppeja, kuten hiilen ^{13}C ($6p^+ + 7n$). Ytimen spinkvanttiluku on yleensä $\frac{1}{2}$, jos protoneja tai neutroneja on pariton määrä, kuten ^1H ($1p^+$) tai äsken mainittu ^{13}C . Kun sekä protoneja että neutroneja on pariton määrä, kuten deuteriumilla, ^2H ($1p^+ + 1n$), saa spinkvanttiluku arvokseen yleensä yksi. On olemassa ytimiä, joiden spinkvanttiluku poikkeaa yllämainituista säännöistä. Spinkvanttiluku voi vaihdella kokonaisluvun välein aiemmin mainituista, kuten ^{17}O (spinkvanttiluku $5/2$) tai boori ^{11}B (spinkvanttiluku 3). Eri spinkvanttiluvut vaikuttavat muun muassa siihen, kuinka monta energiatasoa ytimillä on. Tässä työssä on keskitytty protoniytimiin (spinkvanttiluku on $\frac{1}{2}$).

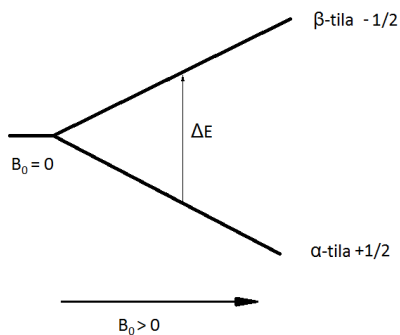
Ytimen spin voidaan ymmärtää sen hyrrämäisenä "vaappumisena" eli prekessiona akselinsa ympäri, missä sen toinen pää pysyy paikallaan. Tämä aiheuttaa magneettisen momentin. Jos ytimellä ei ole spiniä, ei ytimellä ole myöskään magneettista momenttia. Ydin, jonka spinkvanttiluku on $\frac{1}{2}$, voi olla kahdessa energiatilassa ulkoisessa magneettikentässä B_0 : joko B_0 -suuntaisesti α -tilassa eli alemmassa energiatilassa. Tällöin sen spin saa arvon $+\frac{1}{2}$. Vaihtoehtoisesti ydin voi olla magneettikentän vastaisessa korkeammassa β -energiatilassa. Tällöin sen spin saa arvon $-\frac{1}{2}$.

Kuvassa 3 on esitetty puolispinydinten dipolien prekessio ulkoisessa magneettikentässä. Ydin saa dipoliluonteensa sen magneettisesta momentista. Ruskeat nuolet kuvaavat kahta eri spintiloissa olevaa hiukkasta. Punaiset nuolet kuvaavat hiukkasen pyörimissuuntaa. Prekessio tapahtuu niin kutsutulla Larmor-taajuudella, ja voi tapahtua vasta- tai myötäpäivään. Suunta määräytyy jokaiselle ytimelle ominaisen gyromagneettisen suhteen positiivisuuden tai negatiivisuuden perusteella. Vihreä nuoli kuvaa ytimen kokonaismagnetisaatiota M , joka muodostuu samassa spintilassa olevien ydinten yhteenlaskeutuista magnetisaatioista. Lepotilassa (ulkoisessa magneettikentässä) magnetisaatio asettuu magneettikentän B_0 -suuntaisesti z-akselille.



Kuva 3. Hiukkasen pyörimisliike magneettikentässä, kun spin on $\frac{1}{2}$ [3, s. 4].

Energiatilojen ero on häviävän pieni. Termisten yhteentörmäysten vaikutusten energia on itsessään riittävä vaihtamaan ydinten spintilaa. Tästä johtuen ydinten spinpopulaatiot jakautuvat lähes tasaisesti molempiin spintiloihin. Kuvassa 4 on havainnollistettu kahden spintilan energiaeroa ulkoisessa magneettikentässä B_0 .



Kuva 4. Kahden spin-tilan välinen energiaeron kasvu magneettikentän kasvaessa [1, s. 4].

Tilojen energiaero lasketaan seuraavalla yhtälöllä (kaava 2):

$$\Delta E = \frac{h\gamma B_0}{2\pi}, \quad (2)$$

jossa h on Planckin vakio, γ on gyromagneettinen suhde ja B_0 on ulkoisen magneettikentän voimakkuus. Boltzmannin jakaumalla (kaava 3) voidaan laskea ydinten jakautuminen eri tiloihin [3, s. 4 - 6]:

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{-\Delta E/k_B T}, \quad (3)$$

jossa N_β on ydinten lukumäärä ylemmässä energiatilassa, N_α on ydinten lukumäärä alemmassa energiatilassa, e on Neperin luku, k_B on Boltzmannin vakio ($1,3805 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$) ja T on lämpötila.

Kaksi samaa ydintä, jotka ovat α - ja β -tiloissa, kumoavat toistensa magneettiset vaikutukset. NMR:ssä ei havaita yksittäisiä spinejä, vaan α - ja β -tilojen spinpopulaatioiden erotusta. Magneettikentän voimakkuus vaikuttaa tilojen energiaeroon. Energiaeron kasvaessa ydinpopulaatiot jakautuvat epätasaisemmin spintiloihin. Seurauksena on, että voimakkaampi magneettikenttä antaa voimakkaamman NMR-signaalin.

Jokaisella ytimellä on sille ominainen resonanssitaajuus. Sen taajuiselle energialle altistuminen on vaatimuksena ytimen korkeampaan energiatilaan virittymiselle. Tämä tietty taajuus vastaa ytimen tilojen energiaeroa. Vaatimusta kutsutaan resonanssiehdoksi. Resonanssitaajuus lasketaan kaavalla 4:

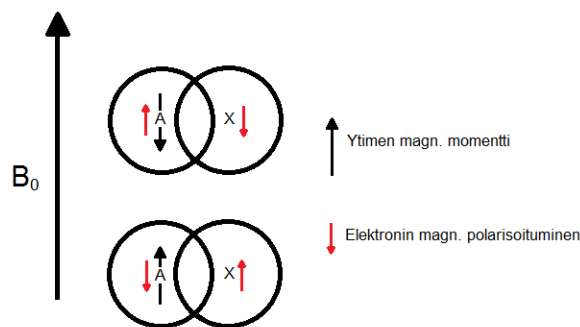
$$\nu = \frac{\gamma B_0}{2\pi}. \quad (4)$$

Esimerkiksi protonille ($\gamma_{1H} = 267,513 \cdot 10^6 \text{ rad s}^{-1} \text{ T}^{-1}$) 14,1 teslan magneettikentässä lasketaan resonanssitaajuudeksi 600 MHz.

3.2 Spin-spinkytketyminen

Spin-spinkytketyksellä (eli skalaari- tai J-kytkeytyksellä) tarkoitetaan ydinten välisten elektronien kautta tapahtuvaa keskinäistä magneettista vuorovaikutusta. Kuvassa 5 on

ytimen A epäsuora spin-spinkytkeytyminen ytimeen X. Ytimen A magneettinen momentti aiheuttaa sen sidoselektronien heikon magneettisen polarisoitumisen. Polarisaatio siirtyy jaettujen orbitaalien kautta ytimen X elektroneille voimistaen tai heikentäen epäsuorasti ytimen X kokemaan magneettikenttää. Seurauksena on, että ytimellä X on yhden sijasta kaksi resonanssitaajuutta. Ne ovat jakautumattoman signaalin resonanssitaajuuden molemmiin puolin etäisyydellä $\frac{1}{2} \times J$. Sama pätee ytimelle A, joka kokee ytimen X kaksi eri energiatilaa kahtena resonanssitaajuutena. Spin-spinkytkeytymisistä seuranneiden eri resonanssitaajuuksien välistä taajuuseroa kutsutaan kytkentävakioksi, J_{AX} , jonka suuruus on magneettikentästä riippumaton. Sen yksikkönä käytetään hertsiä.



Kuva 5. Ytimen A vaikutus ytimeen X sidoselektronien kautta [1, s. 30].

Ydinten muodostamaa joukkoa, jolla on keskinäisiä spin-spin vuorovaikutuksia, kutsutaan spinsysteemiksi. Kun spinsysteemi koostuu kahdesta ytimestä, mahdollisia energiatilayhdistelmiä on neljä: $\alpha_A\alpha_X$, $\alpha_A\beta_X$, $\beta_A\alpha_X$, $\beta_A\beta_X$, missä alaindeksillä A ja X viitataan ytimiin A ja X. Kun A ja X ovat samoja ytimiä, $\alpha_A\beta_X$ - ja $\beta_A\alpha_X$ -tilojen energiat ovat hyvin lähellä toisiaan johtuen siitä, että Larmor-taajuudet ovat satoja megahertsejä ja ydinten välinen kytkentä on kymmeniä hertsejä: Protonien väliset kytkennät ovat alle hertsistä vajaan 20:een hertsiin, ja ^{13}C - ^{13}C -kytkennät ovat kymmeniä hertsejä. [4, 2.1]. Kytkeytymiset voivat olla heikkoja tai vahvoja. Vahvalla kytkennällä tarkoitetaan tilannetta, jossa kahden ytimen keskinäisten kemiallisten siirtymien erotus on pieni suhteessa niiden väliseen kytkentävakiin. Vahva kytkeytyminen aiheuttaa muun muassa signaalipiikkien muotojen ja intensiteettien vääristymistä spektreissä [5].

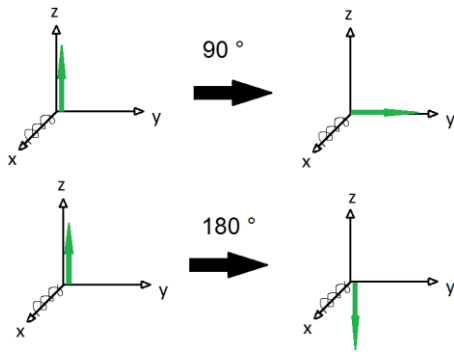
Kytkeytymistä tapahtuu sekä samojen ydinten eli homonukleaaristen, kuten ^1H ja ^1H , että eri ydinten eli heteronukleaaristen, kuten ^{13}C ja ^1H , välillä. ^{13}C -isotooppia esiintyy luonnossa 1,1 % kaikista hiiliatomeista, eli vain joka sadas hiiliydin on aktiivinen NMR:ssä. Tästä syystä hiiliytimen vaikutusta toiseen hiiliyttimeen tai vetyyn ei yleensä havaita. Sen

sijaan hiiliyttimeen vaikuttavan vety-ytimen, jonka ^1H -isotooppia on runsaasti luonnossa, 99,98 %, vaikutus havaitaan. [3, s. 3.]

3.3 Radiopulssin vaikutus ytimeen

Vaikka ytimen sanotaankin olevan magneettikentän suuntaisesti tai vastaisesti, niin prekessiosta seuraa ytimelle x- ja y-suuntaiset komponentit. Ytimiä on kuitenkin niin valtavasti, että eri ydinten x- ja y-suuntaiset komponentit kumoavat toisensa. Jäljelle jää vain magneettikentän ja z-akselin suuntainen α - ja β -tilojen populaatioeron suuruinen summautuva kokonaismagnetisaatio M , jota kuvataan klassisessa mallissa usein vektorina. NMR-mittaus perustuu kokonaismagnetisaation manipulointiin säteilyttämällä ytimiä resonanssiehdon taajuisella radiosäteilyllä ulkoiseen magneettikenttään nähden kohtisuorasti. Jokaisella ytimellä on oma ominainen resonanssitaajuutensa, joten näytteen säteilytyksessä käytetään yleensä kaikista tarvittavista taajuuksista koostuvaa pulssia. Pulssin seurauksena kokonaismagnetisaatio kääntyy z-akselilta kohti xy-tasoa, josta sen x- ja y-suuntaiset komponentit voidaan havaita.

Pulssia kutsutaan taajuusselektiiviseksi, kun se koostuu joko yhdestä tai useista yksittäisistä taajuuksista. Kaistaselektiivisessä pulssissa säteilytetään rajattua taajuusaluetta. Kuvassa 6 on esimerkit niin sanotuista 90° :n ja 180° :n pulssien vaikutuksista kokonaismagnetisaatioon. 90° :n pulssin kesto asetetaan sellaiseksi, että se kääntää kokonaismagnetisaation xy-tasolle (kuvassa y-akselille) 90° :n kulmaan z-akseliin nähden. Tällöin z-akselin suuntainen magnetisaatiokomponentti M_z on nolla. 90° :n pulssilla saadaan kaikista voimakkain signaali vastaanottimelle, ja se on hyvin yleinen pulssi NMR:ssä kokeen ensimmäisenä pulssina. Toinen paljon käytetty pulssi on 180° :n pulssi, joka kääntää magnetisaation z-akselin negatiiviselle puolelle. Jos aluksi oli enemmän ytimiä α -tilassa kuin β -tilassa, niin tilanne on kääntynyt päinvastaiseksi. Pulssin tehoon vaikuttaa sen kesto ja säteilytyksen voimakkuus. Näistä kahdesta useimmiten muutetaan pulssin kesto. 90° :n NMR-pulssi on kestoaltaan kymmeniä mikrosekunteja.

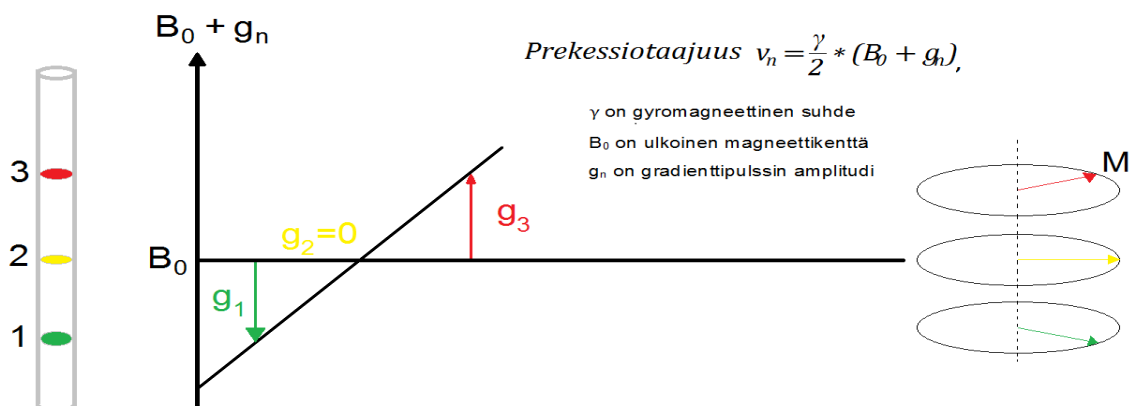


Kuva 6. 90° ja 180°:n radiopulssien vaikutukset kokonaismagnetisaatioon.

Radiotaajuuspulssien lisäksi voidaan käyttää myös niin sanottuja kenttägradienttipulsseja.

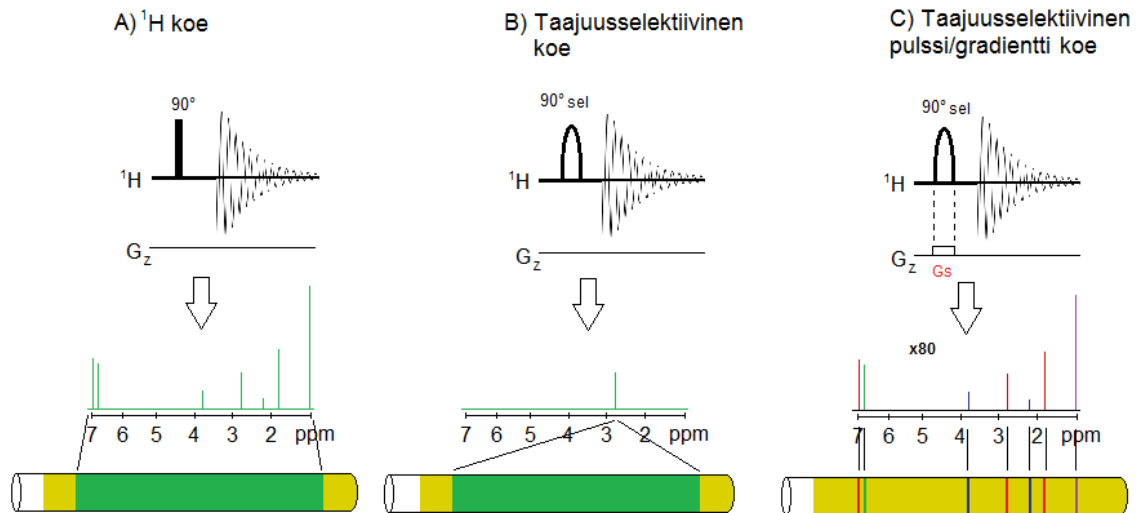
3.4 Pulssitettu kenttägradientti

Pulssitetun kenttägradientin aikana ulkoinen magneettikenttä on epähomogeeninen lyhyen aikaa. Se toteutetaan ylimääräisellä kelalla probessa, jonka läpi johdetaan virta tietyllä hetkellä. Kuvassa 7 on havainnollistettu pulssitetun kenttägradientin vaikutusta prekessioon eri paikoissa NMR-näyteputkea. Gradientti vaihtaa lineaarisesti ytimen kokeman magneettikentän B_0 suuruutta eri paikoissa näytettä (kuva 7, oikealla). Gradienttipulssin alussa transversaalista magnetisaatiota, eli x- ja y-suuntaisia tekijöitä kuvaavat vektorit ovat samassa vaiheessa. Ajan kuluessa vektorit prekessoivat erilleen muista omilla Larmor-taajuuksillaan. [4, 9.5.2.]



Kuva 7. Pulssitetun kenttägradientin vaikutus prekessiotaajuuteen eri paikoissa näyteputkea. Alaviite n viittaa tutkittavaan viipaleeseen. [6, mukailen.]

Normaalissa protonikokeessa (kuva 8A) kaikki signaalit vaikuttavat koko näyteputken pituudelta vastaanottimen havaitsemassa datassa. Taajuusselektiivisessä kokeessa (8B) vain ne signaalit, jotka kokevat selektiivisen pulssin ovat mukana havaitussa datassa. Taajuusselektiivisillä pulsseilla ja gradientteilla saadaan koko spektri näkyviin, missä näyte on "viipaloitu" siten, että jokainen signaali tulee eri viipaleesta näytettä (8C).



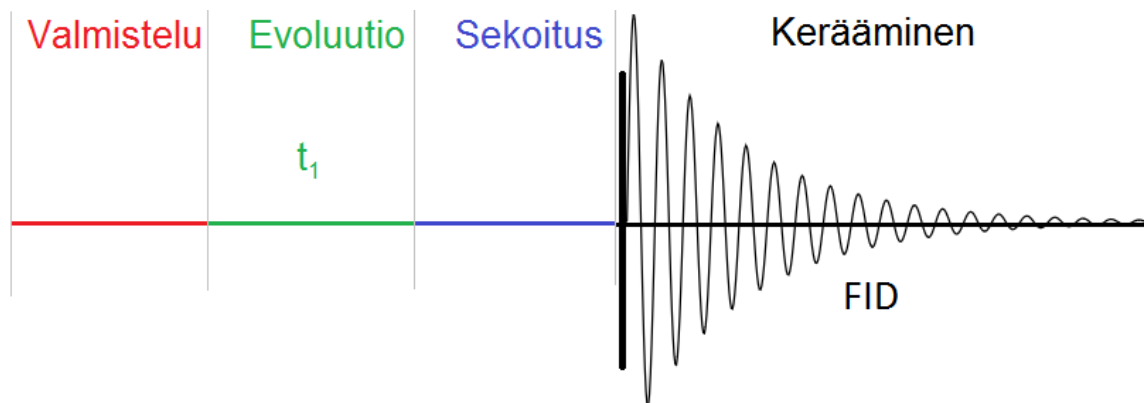
Kuva 8. Gradientin vaikutus ydinten virittymiseen. Kohdassa A on normaali protonikoe, kohdassa B viritetään kapea taajuuskaista, kohdassa C viritetään kapea taajuuskaista gradientin kanssa. 90° :n pulssin jälkeinen vaimeneva oskilloiva käyrä on vastaanottimen havaitsema signaali. [7, mukailen.]

Gradienttipulssin amplitudin yksikkönä käytetään G/cm (gaussia senttimetriä kohden) z-akselilla. Pulssiparametreissa se saatetaan ilmoittaa prosentteina, joka tarkoittaa prosenttimäärää gradienttikelan suurimmasta arvosta. Tyypillinen maksimisuuruusluokka vaihtelee noin välillä 50 - 60 G/cm [7].

Magnetisaation xy-tason suuntaiset komponentit indusoivat radiovastaanottimelle sini-muotoisen vaimenevan oskilloivan signaalin eli FIDin. FIDin vaimeneminen ajan kuluessa johtuu T_1 - (spin-ympäristö) ja T_2 (spin-spin) -relaksaatioista. Relaksaatiolla tarkoitetaan prosessia, missä spinit palaavat tasapainotilaan. Tasapainotilalla tarkoitetaan tilaa, jossa ei ole xy-tason komponentteja ja kaikki magnetisaatio on z-akselilla, sekä missä energiatasojen ydinpopulaatiot vastaavat Boltzmannin jakaumaa. [4, 8.1.] Pulssisarjojen toistojen välillä käytetään niin kutsuttua relaksaatioviivettä, jonka aikana spinien annetaan relaksoitua tasapainoasemaan.

4 NMR-pulssisarja

Yksi- ja kaksiulotteiset NMR-pulssisarjat koostuvat neljästä aikajaksosta (kuva 9): valmistelu, evoluutio, sekoitus sekä kerääminen. Valmistelun aikana spinsysteemin annetaan relaxoitua, ja tämän jälkeen sitä häiritään vähintään yhdellä pulssilla. Evoluution t_1 aikana spinsysteemi kehittyy vapaasti eri vuorovaikutusten alaisena, joita ovat esimerkiksi Larmor-prekessio ja spin-spin-kytkäytyminen. Kaksiulotteisissa mittauksissa evoluution kesto inkrementoidaan askelittain. Sekoitusjakso pitää sisällään erinäisiä pulsseja ja viiveitä. Lopuksi signaali kerätään. [6.]



Kuva 9. Pulssisarjan 4 erilaista aikajaksoa [6].

NMR-spektreissä käytetään magneetin voimakkuudesta riippuvan resonanssitaajuuden sijasta yksikötöntä kemiallista siirtymää δ . Resonanssitaajuuden muuttaminen kemiallisen siirtymän arvoksi lasketaan kaavalla 5:

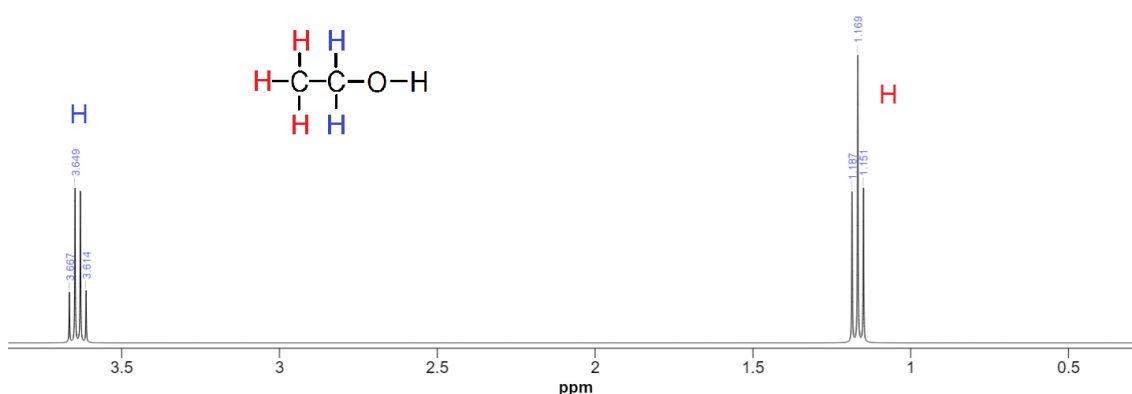
$$\delta = 10^6 \times \frac{\nu - \nu_{REF}}{\nu_{REF}}, \quad (5)$$

jossa ν on resonanssitaajuus ja ν_{REF} on standardin referenssitaajuus. Protonimittauksissa standardina käytetään yleensä tetrametyylisilanaa (TMS). Jos liuottimena on vesi, käytetään TSP- (trimetyylisilyylipropanoatti) tai DSS (eräs sulfonihappo) -standardeja. Tyypillisesti kemialliset siirtymät ovat hyvin pieniä, joten ne annetaan miljoonasosina (ppm). Kemiallisen siirtymän etuna on, että se ei ole magneetin voimakkuudesta riippuvainen. Toisin sanoen sillä saadaan eri vahvuisten magneettien NMR-spektrit keskenään vertailukelpoisiksi. [4, 2-1.]

4.1 Protoni-NMR

^1H -NMR-spektri on yleisin korkean resoluution NMR-koee. Protonien kemiallisista siirtymistä voidaan selvittää näytteessä esiintyviä eri funktionaalisia ryhmiä. Eri ryhmien protonilla on niille ominaiset resonanssitaajuusalueensa. Esimerkiksi orgaanisen yhdisteen aldehydiprotoni antaa signaalin 9 - 11 ppm välisellä kemiallisella siirtymällä [3, s. 44]. Integroimalla signaalipiikkien pinta-aloja saadaan tietoa protonien suhteellisesta määrästä näytteessä. Käyttämällä näytteessä standardia voidaan yhdisteen konsentraatio laskea tarkasti. Signaalien multipliettirakenne sisältää tietoa skalaarikytkennöistä. Näitä tietoja voidaan käyttää hyväksi molekyylien rakenteen määrittämisessä ja kvantitatiivisissa mittauksissa.

Kuvassa 10 on etanolin (liuottimena D_2O) ^1H -spektri. Metyyli- ja metyleeniprotonien kytkeytyminen toisiinsa aiheuttaa signaalien jakautumisen multipleteiksi, joissa ytimen kemiallinen siirtymä on multiplletin keskikohdassa. Muodostuneen multiplletin piikkien määrä protonille voidaan laskea yksinkertaisella laskutoimituksella $n+1$, jossa n on naapuriprotonien määrä. Kuvassa kaksi metyleeniprotonia kytkeytyy kolmeen metyyliprotoniin ja jakautuu kvartetiksi ($\delta \approx 3.6$). Metyyliprotonit jakautuvat tripletiksi ($\delta \approx 1.2$). Kvartetin signaalipiikkien pinta-alat ovat suhteessa 1:3:3:1. Tripletin signaalipiikkien pinta-alojen suhde on 1:2:1. Signaalien alojen suhteet ovat samat kuin energiatilojen suhteet. Hydroksyyliiryhmän happeen sitoutunut protoni ei näy määrässä liuoksissa, sillä hydroksyyliiryhmän olemassaoloaika on niin lyhyt, että NMR-spektrometri ei havaitse sitä.



Kuva 10. Etanolin ^1H -NMR-spektri [23].

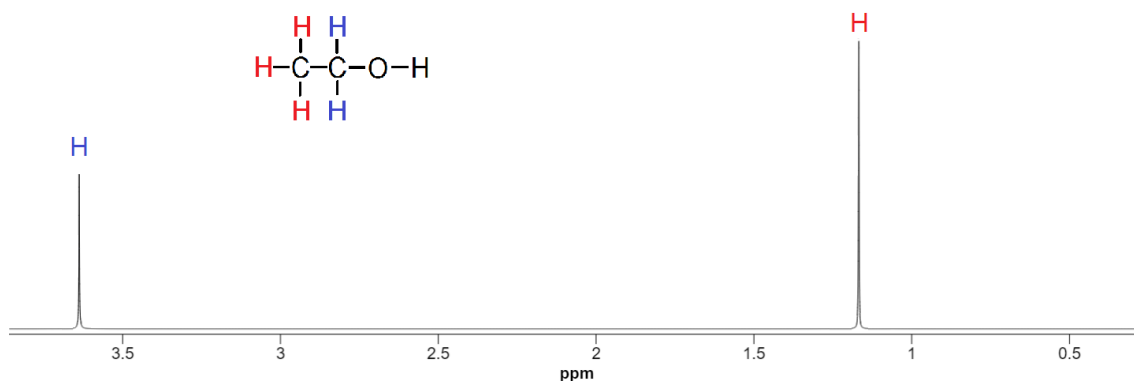
Protonien signaalit osuvat kapealle alueelle 10 - 15 ppm [2]. Tästä syystä spin-spin-kytketyksistä johtuvia signaalien päällekkäisyyksiä on merkittävästi ^1H -NMR:ssä jo useissa

pienissä molekyyliissä [8]. Sitä vastoin hiilimittauksissa (^{13}C -NMR) ^{13}C :a on luonnollisina pitoisuuksina vain pieni määrä kaikista hiili-isotoopeista. Mittauksessa saadaan paljon selkeämpi spektri, koska ^{13}C :n väliset kytkeytymiset ovat harvassa ja signaalialue on suurempi (0 - 200 ppm) [1].

Kahden eri ytimen, kuten ^{13}C ja ^1H , kytkennät voidaan poistaa eli irtauttaa säteilyttämällä toisen ytimen taajuuksia kaistaselektiivisellä jatkuvalla pulssilla keräyksen tai evoluution aikana [8]. Esimerkiksi ^{13}C -spektriä ajattaessa käytännössä aina irtautetaan koko protonikaista. Samaa tekniikkaa ei voida käyttää samojen ydinten välisten kytkentöjen poistamisessa. Toisiinsa kytkeytyneiden ydinten signaalit sijaitsevat samalla taajuusalueella ja kaistaselektiivinen säteilytys poistaa polarisaation koko kaistalta. [5.] Sitä varten on kehitelty omat niin kutsutut pure shift -mittauksensa.

4.2 Pure shift

Pure shift -mittauksissa irtautetaan samojen ydinten (esimerkiksi ^1H ja ^1H) väliset skaalarikytkennät koko kaistan leveydeltä. Tällöin saadaan spektrejä, joissa näkyvät vain kemialliset siirtymät. Kuvassa 11 on etanolin pure shift -protonispektri, jossa protonien väliset kytkennät on irtautettu. Molemmat antavat jakautumattoman signaalipiikin.



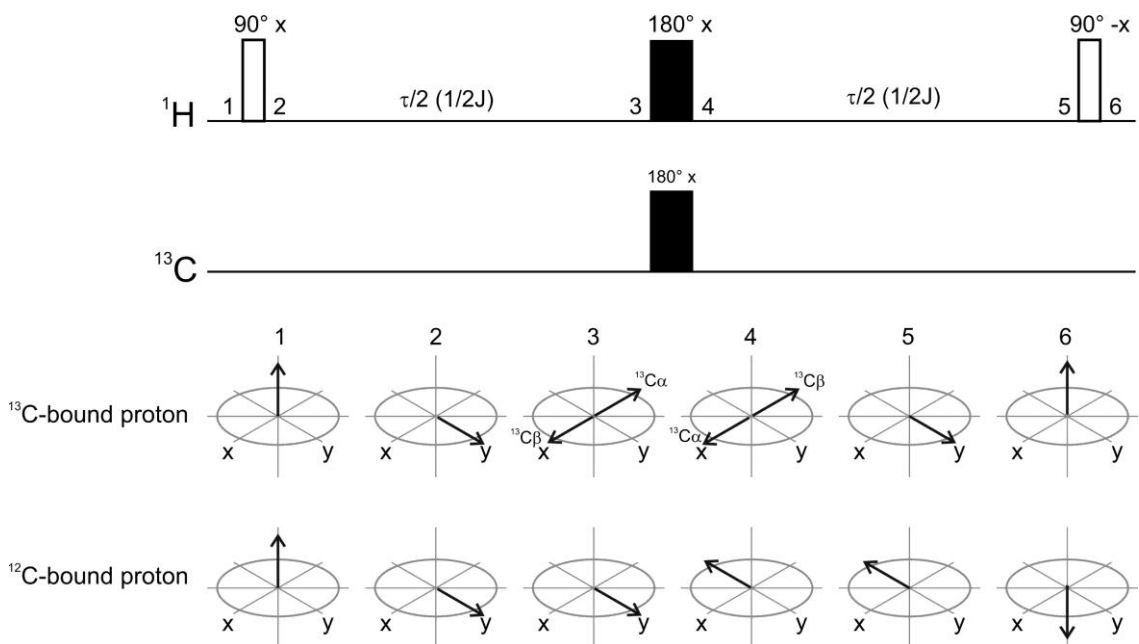
Kuva 11. Etanolin protonikytkennöistä irtautettu ^1H -NMR-spektri.

J-kytkennät ovat usein turhia moniulotteisissa NMR-spektreissä, joissa tutkitaan kemiallisten siirtymien korrelaatioita signaalien välillä. Monimutkaiset multiplettirakenteet myös sotkevat automatisoituja piikinpoimintaohjelmia. Pure shift -spektrien edut tiedostetaan, mutta ei ole keksitty yleistä irtautustekniikkaa niiden saavuttamiseksi. Kaikki pure shift -irtautustekniikat voidaan perustaa spinien jakamiseen aktiivisiin ja passiivisiin spineihin.

Aktiivisilla tarkoitetaan havaittavia ytimiä ja passiivisilla tarkoitetaan aktiivisista ytimistä irtautettavia ytimiä. Eri tekniikat käyttävät eri tapoja jakamiseen. Irtautetun spektrin herkkyys ei vastaa lähes koskaan irtauttamattoman spektrin herkkyyttä, koska tällöin havainnoidaan vain pientä joukkoa aktiivisia ytimiä. Ainoa poikkeus on pure shift -HSQC -spektri, jonka protonikytkentöjen irtautukseen on käytetty BIRD-elementtiä [9].

4.2.1 BIRD-HSQC

Yksi yleisimmistä suoran dimension pure shift -irtautustavoista on BIRD-elementti, joka voidaan yhdistää häviöitä HSQC-mittaukseen [7]. HSQC-mittauksella nähdään ^{13}C :n ja protonin väliset suorat kytkeytymiset. Hiiltä esiintyy luonnossa 98,9-prosenttisesti ^{12}C -isotooppina ja 1,1-prosenttisesti ^{13}C -muodossa [3, s. 3]. BIRD-irtautustekniikassa käytetään tätä hyväksi ja erotetaan ^{12}C :een ja ^{13}C :een liittyneet protonit toisistaan. Elementti (kuva 12) sisältää kaksi 90° :n ja yhden 180° :n pulssin protonikanavalla ja yhden 180° :n pulssin hiilikanavalla.



Kuva 12. BIRD-pulssielementti ja sen vaikutus magnetisaatioon [2].

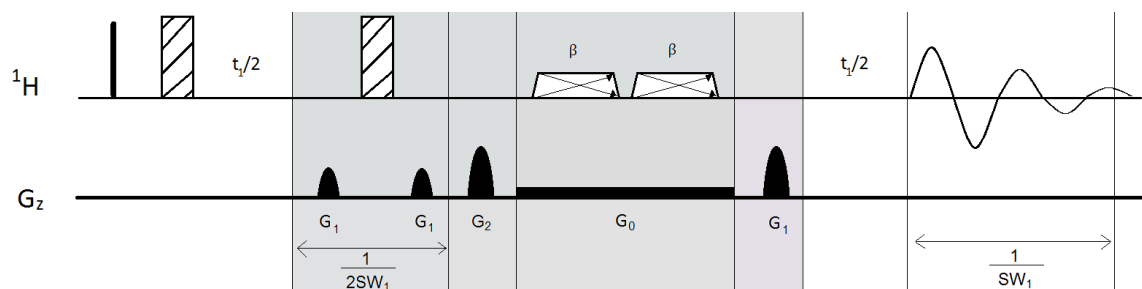
Ensimmäinen 90° :n virituspulssi kääntää kokonaismagnetisaation xy -tasolle (kohdat 1 ja 2). ^{13}C -protonien kytkennät kehittyvät johtuen niiden kokemista kytkeytymisistä ^{13}C -ytimiin. ^{12}C :een liittyneet protonit eivät koe ^{12}C -ytimiä. Ytimet refokusoidaan 180° :n pulssilla, joka sijoitetaan keskelle aikaa τ (kohdat 3 ja 4). Viimeisen 90° :n pulssin tehtävänä

on kääntää ^{13}C -protonien magnetisaatio z-akselin positiiviselle puolelle ja ^{12}C -protonien magnetisaatio negatiiviselle puolelle, jolloin on selektiivisesti käännetty ^{12}C -protonien magnetisaatio 180° samalla säilyttäen ^{13}C -protonien magnetisaatio ennallaan. [2.] Johdun ^{13}C -ydinten vähäisestä luontaisesta esiintymisestä, on äärimmäisen pieni ($\sim 0,01\%$) todennäköisyys, että kaksi ^{13}C -ydintä kytkeytyy toisiinsa.

BIRD-elementin etuihin lukeutuu sen kyky irtauttaa myös vahvoja kytkeitä. Huonona puolena on sen epäherkkyys, koska irtautuksessa hukataan ^{12}C -kytketyneet protonit. [12.] Yllä kuvattu BIRD-elementti ei poista geminaalien protonien kytkeitä, koska nämä ovat kiinni samassa ^{13}C -ytimessä. Kokeissa, joissa mitataan ^1H - ja ^{13}C -välisiä kytkeytymiä, kuten HSQC, BIRD-elementin lisääminen pulssisarjaan ei vähennä kokeen herkkyyttä. Reaaliaikainen (real-time) BIRD-HSQC on ainoa pure shift -koejärjestely, missä herkkyys sekä erottelukyky on irtauttamaton koetta suurempi [7; 10]. Sen herkkyyden parantuminen selittyy multipliettien katoamisella, jolloin pienetkin signaalit näkyvät.

4.2.2 Psyche- ^1H

Psyche-irtautuselementti (Kuva 13, harmaa alue) koostuu 180° :n pulssista, kahdesta alhaisen tehon (pienen kulman, β) chirp-pulssista sekä gradienteista. Chirp-pulssien aikana käytetään heikkoa pulssitettua kenttägradienttia. Gradientteja G_1 ja G_2 käytetään halutun koherenssireitin valintaan [8].



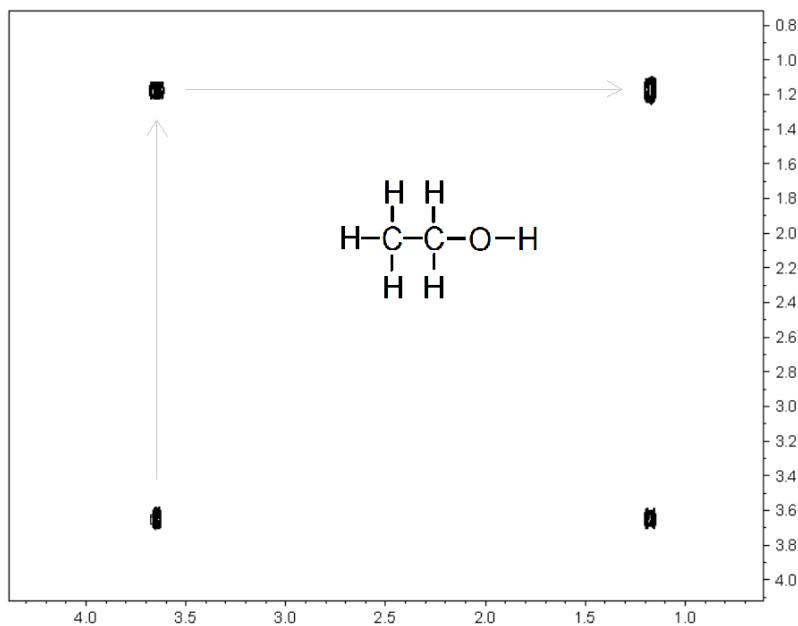
Kuva 13. Psyche-irtautuselementti (harmaalla pohjalla) koostuu 180° :n pulssista, kahdesta chirp-pulssista ja gradienteista [8].

Chirp-pulssi on pulssi, joka pyyhkäisee asetetun taajuusalueen läpi kantotaajuuden ympäriltä häiriten spinejä β -astekulman verran ajanhetkellä, joka määräytyy kunkin spinin Larmor-taajuudesta ja pulssille asetetusta pyyhkäisy nopeudesta. Psyche-pulssielementin chirp-pulssissa on kaksi samanaikaista pyyhkivää pulssia, jotka käyvät taajuusalueen läpi lähtien sen keskeltä vastakkaisesti suuntiin. Kahteen suuntaan samanaikaisesti

pyyhkäisevää chirp-pulssia kutsutaan *altire*-pulssiksi. Elementissä voidaan käyttää myös yhteen suuntaan pyyhkäiseviä chirp-pulsseja, mutta *altire*-pulsseja käytettäessä syntyy vähemmän kytkentöjen uudelleenkehittymistä [8]. Kahdella peräkkäisellä chirp-pulssiparilla (ja gradientilla) pystytään refokusoimaan aktiivisten spinien ($\sin^2\beta$) J-kytkennät sekä häivyttämään passiivisten spinien ($\cos^2\beta$) vaikutukset. β -kulmaa suurentamalla havaitaan irtautetut signaalit voimakkaampina, mutta tällöin spektriin syntyy voimakkaampia artefaktoja. Kulman valinnassa tehdään kompromissi herkkyuden ja spektrin puhtauden välillä. Normaalisti β -arvo asetetaan 10 - 30°:n välille [8].

4.2.3 Psyche-TOCSY

Psyche-irtautus voidaan liittää osaksi TOCSY-mittaukseen. TOCSY on mittausmenetelmä, jolla nähdään, mitkä protonit sijaitsevat samassa spinsysteemissä. Spektrin molemmilla taajuusakseleilla on protonin kemialliset siirtymät. Kuvassa 14 on etanolin TOCSY-spektri (liuottimena D_2O). Mittauksella nähdään, että protonit (δ 1,2 ja 3,6 ppm) sijaitsevat samassa spinsysteemissä.



Kuva 14. Etanolin TOCSY-spektri [24].

TOCSY-kokeen protonikytkentöjen irtautus voidaan suorittaa suorassa, epäsuorassa tai molemmissa dimensioissa. Usein kytkennät irtautetaan vain toisessa dimensiossa, koska molempien dimensioitten irtautus hävittää herkkyyttä ja kasvattaa suuresti kokeen

mittausaika. Epäsuoran dimension irtautuksen etuna on, että siinä säästetään interferogrammin kokoamiselta ja siitä syntyviltä artefaktoilta. [14.] Yhdessä ulottuvuudessa irtautettu spektri voidaan käsitellä kovarianssi-operaattorilla jälkiprosessoinnissa. Tuloksena on protoni-irtautettu spektri molemmissa dimensioissa. Kovarianssimuunnos on herkkä ja muunnoksessa voi syntyä spektriin epäpuhtauksia, jos protonisignaaleita on useita päällekkäin irtauttamattomassa dimensiossa [14].

4.2.4 Irtautetun signaalin keräys

Pure shift -kokeen signaalinkeräys suoritetaan yleensä koesarjalla, jossa kerätään FID:ää evoluutioajan funktiona ja kootaan lopullinen kytkennöistä irtautettu spektri liittämällä yhteen lyhyitä datapistepätkiä, blokkeja, joka FIDistä. Blokin pituudeksi suositellaan yleisesti 10 - 20 millisekuntia. Se on riittävän lyhyt aika, etteivät J_{HH} -kytkennät ole vielä ehtineet kehittyä merkittävästi [16]. Blokkeja voidaan kerätä joko toisistaan erillisinä pseudo-2d-koesarjoina tai jatkuvana reaaliajassa [8].

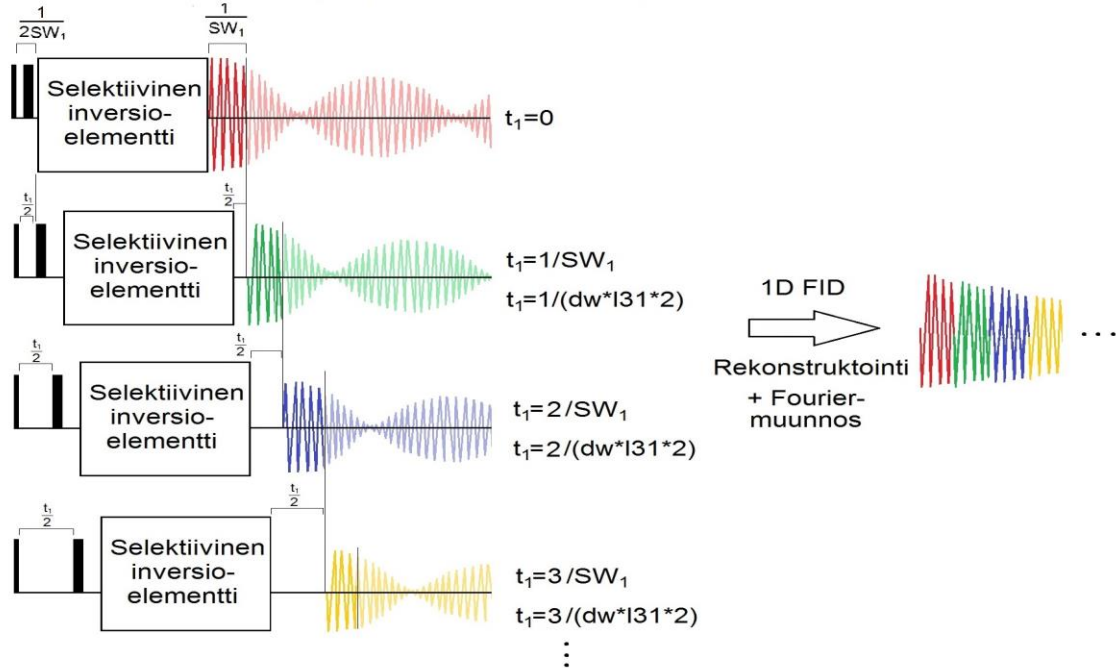
Pseudo-2d-keräyksessä yksiulotteinen koe suoritetaan kaksikulotteisen kokeen tavoin inkrementoimalla evoluutioaika ja keräämällä FID joka inkrementistä. Inkrementoinnin suuruus on $1/SW_1$, missä SW_1 on spektrin leveys epäsuorassa dimensiossa. Signaalien erottuvuus riippuu inkrementtien määrästä epäsuorassa dimensiossa. [7.] Lopullinen irtautettu spektri kootaan niin kutsuttuna interferogrammiksi ottamalla joka inkrementin FIDin alusta aikadimensiossa tietynpituisen pätkä ja liittämällä ne peräkkäin yhteen FID:ää muistuttavaksi interferogrammiksi. Sen jälkeen se Fourier-muunnetaan taajuusdimensioon. [5.]

Toinen tapa on kerätä interferogrammi reaaliajassa (real-time), jolloin keräys keskeytetään jakson 2τ keskellä refokusointipulssin ajaksi, minkä jälkeen FIDin keräystä jatketaan [7]. Refokusointi/keräysjakso toistetaan n kertaa. Reaaliaikaista keräystä voidaan käyttää osana BIRD- ja ZS-irtautuselementtejä (Zangger-Sterk, eräs viipaleselektiivinen irtautustekniikka). Psyche-menetelmä vaatii pseudo-2d-koejärjestelyn, sillä aktiivisten ja passiivisten spinien erotus on puhtaasti tilastollista. Reaaliaikainen keräysmenetelmä on pseudo-2d-keräysmenetelmää herkempi, mutta sen erottelukyky on huonompi, koska se antaa leveämpiä signaalipiikkejä [16].

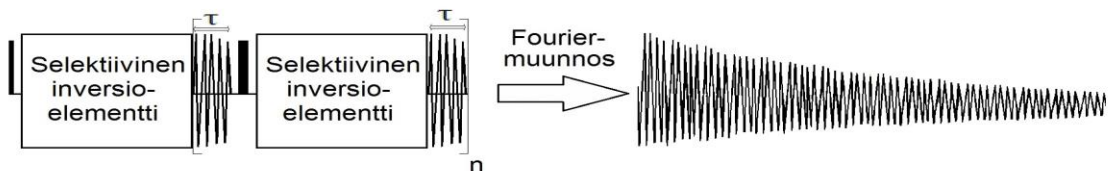
Keräystavat on esitetty kuvassa 15. Selektiivinen inversioelementti tarkoittaa käytettyä irtautusmenetelmää, kuten psyche tai BIRD. Blokin pituudesta käytetään pulssisarjoissa

lähteestä riippuen nimitystä SW_1 (Monissa julkaisuissa & Manchesterin yliopistolla) tai DELTA2-parametreja (kuvan $dw \times I31 \times 2$, Bruker). Kun kokeessa käytetään DELTA2-parametria, niin tällöin sitä ei sovi sekoittaa sarjoissa myös esiintyvään SW_1 -parametriin. Irtautus tapahtuu täydellisimmin t_1 - (pseudo-2d) ja 2τ (real-time) -jaksojen keskellä.

A) Pseudo-2d keräys (interferogrammi)



B) Reaaliaikainen keräys (real time)



Kuva 15. A) pseudo-2d-keräys, jossa lopullinen FID:iä muistuttava interferogrammi saadaan yksittäisten ajojen blokkeja yhdistelemällä. B) Reaaliaikainen keräystapa, missä keräys-elementti toistetaan n kertaa lopulliseen FID:iin. [5, mukailen.]

Vaikka J-kytkentöjä ei kehity keräysjaksojen välillä, niin yksittäisen jakson aikana sitä kuitenkin tapahtuu. Pure shift -spektreihin syntyy J-refokusoitumissignaaleja oikeiden NMR-signaalien ympärille. Signaalit ovat tyypillisesti 2 - 4 %:n luokkaa pure shift -NMR-signaaleista [15]. Mitä pidempi keräysjakso, sitä pidempään J-kytkennät ehtivät kehittyä [7]. Koska sivupiikkien paikka spektrissä riippuu keräysjakson pituudesta, voidaan käyttää tekniikkaa, joka vaihtaa jakson pituutta toistojen välillä, millä saadaan häiritseviä piikkejä katoamaan kohinaan, koska ne eivät enää vahvista toisiaan [17]. Tähän tekniikkaan liittyvää vuonna 2017 julkaistua SAPPHIRE-metodia voidaan käyttää lisänä pure shift -

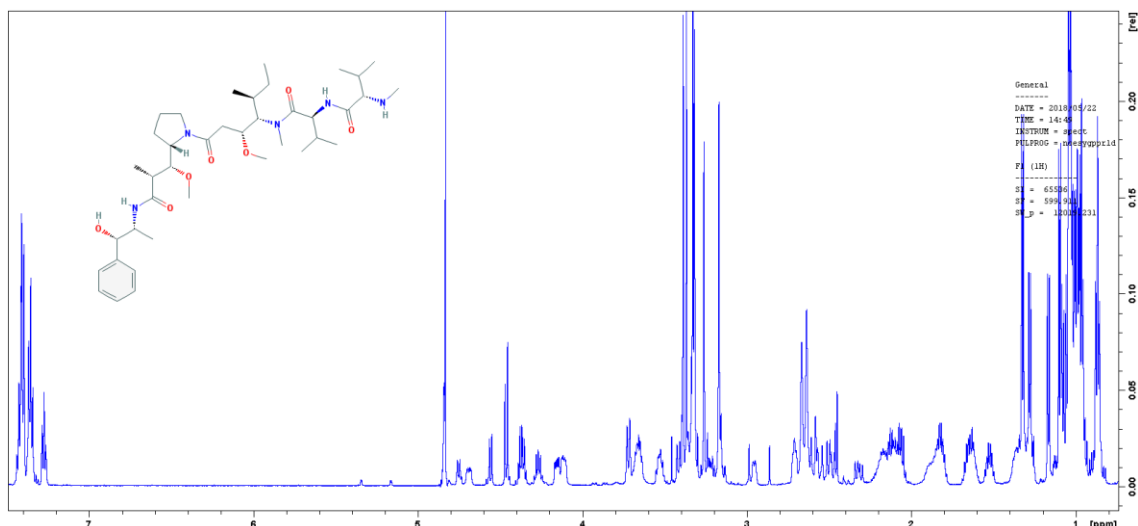
mittauksia poistamaan ylimääräisiä signaaleja [15]. Lyhyemmät keräysjaksot johtavat pienempiin sivupiikkeihin, mutta niitä esiintyy tiheämmin.

Myös itse keräystavat tuottavat ylimääräisiä signaalipiikkejä lopulliseen pure shift -spektriin. Ne muodostuvat irtautettujen NMR-signaalien ympärille taajuuksille, jotka vastaavat keräysjakson pituuden käänteislukua. Mitä enemmän pseudo-2d-kokeessa on inkrementtejä, sitä enemmän interferogrammin koonnista syntyy sivupiikkejä. [17.] Reaaliaikaisissa kokeissa syntyy lisäksi ylimääräisiä signaaleja transversaalista relaksoitumisesta keräyksen keskeytyksen aikana. Se voidaan nähdä askelittaisena FIDinä. [9.]

5 Työn suoritus

Pure shift -menetelmien kehitykseen hyödynnettiin pohjana Brukerin ja Manchesterin yliopiston (University of Manchester, UoM) pure shift -pulssisarjoja. Ne olivat yhdistelmiä kokeesta, irtautustavasta ja keräystavasta. Mukana tulivat myös prosessointimakrot interferogrammikokeisiin. Lähtökohtana oli kehittää jommankumman pulssisarjoista optimiparametrit pure shift - ^1H -mittaukselle. Lisäksi parametrit optimoitiin pure shift -TOCSY- ja -HSQC-mittauksille.

Kokeet suoritettiin VTT:n 600 MHz:n Bruker Avance III NMR -laitteistolla Viikissä VTT:n tiloissa. Mittaukset suoritettiin 22 °C:n lämpötilassa. Käytössä oli 5 mm:n kryogeenisesti jäähdytetty mittapää (QCI H-C/N/P-D). Näytteenä käytettiin veteen liuotettua (runsaasti) monometyyliauristatiini E:tä (MMAE), jonka molekyylikaava ja ^1H -spektri ovat kuvassa 16. [19]



Kuva 16. MMAE:n molekyylikaava ja ^1H -spektri H_2O :ssa.

Ohjelmistona käytettiin TopSpin 3.5 -ohjelmistoa. Spektreistä on suurennettu etenkin alueita väliltä δ 1 - 4 ppm, joka on usein monimutkaista aluetta useissa sakkaridimitauksissa. Ajojen spektrejä verrattiin kokeiden välissä toisiinsa sekä yllä olevaan irtauttamattomaan spektriin.

5.1 Psyche- ^1H

Taulukossa 1 on esitetty psyche- ^1H -menetelmässä käytetyt pulssisarjat ja jälkiprosessointiin käytetyt AU-ohjelmat eli TopSpin-ohjelmiston automaatiokriptit.

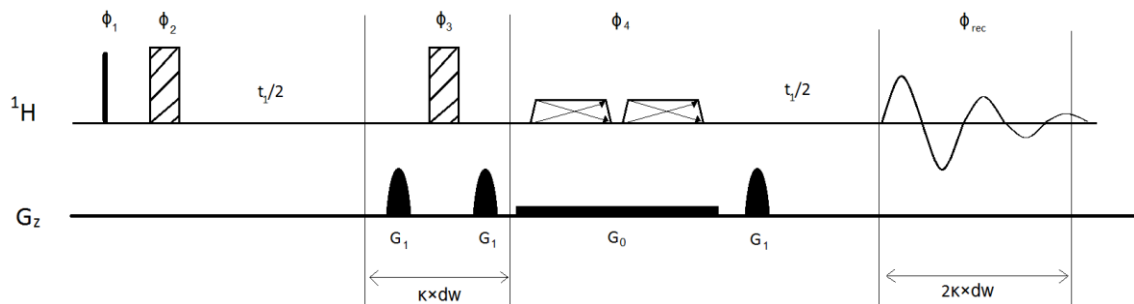
Taulukko 1. Psyche- ^1H -menetelmän kehityksessä käytetyt pulssisarjat ja jälkiprosessointiin käytetyt AU-ohjelmat.

	Pulssisarja	AU-ohjelma
Bruker	<i>reset_psyche_1d</i>	<i>proc_1d_reset</i>
Manchesterin Yliopisto	<i>UoM_1d_if_psyche_ts4x</i>	<i>UoM_proc_1d_2d_if</i>

Bruker ja Manchesterin yliopisto käyttivät omia välillä kirjallisuudestaakin poikkeavia pulssiparametrejaan (kuten Brukerin käyttämä DELTA2-parametri). Parametreja on pyritty selittämään mittausten yhteydessä.

5.1.1 Bruker

Brukerin *reset_psyche_1d*-pulssisarja on kuvassa 17. Kapea musta viiva on 90° :n radio-
taajuuspulssi. Viistokuvioiset leveät palikat ovat 180° :n refokusointipulsseja. Puolisuun-
nikkaat ovat chirp-pulsseja. Heikkoa pulssitettua kenttägradienttia G_0 käytetään chirp-
pulssien aikana. Joka t_1 inkrementillä käytetään $2\kappa \times dw$ pituista blokkia lopullisen FIDin
rakennukseen, missä κ on suoran dimension kompleksipisteiden määrä (131 pulssiohjel-
massa). [7.] dw on mittapisteiden välinen aika mikrosekunteina. 180° :n refokusointipul-
sseina käytettiin *Bip720,50,20.1*-pulsseja ja *psyche*-elementtiin *Crp_psyche.20*-pulsseja.
DIGMOD-arvona oli kaikissa kokeissa "baseopt", paitsi kokeessa 23, jossa testattiin ko-
parametrin vaikutusta, kun se asetettiin "digital"-arvoiseksi.



Kuva 17. Brukerin *reset_psyche_1d*-pulssisarja [7].

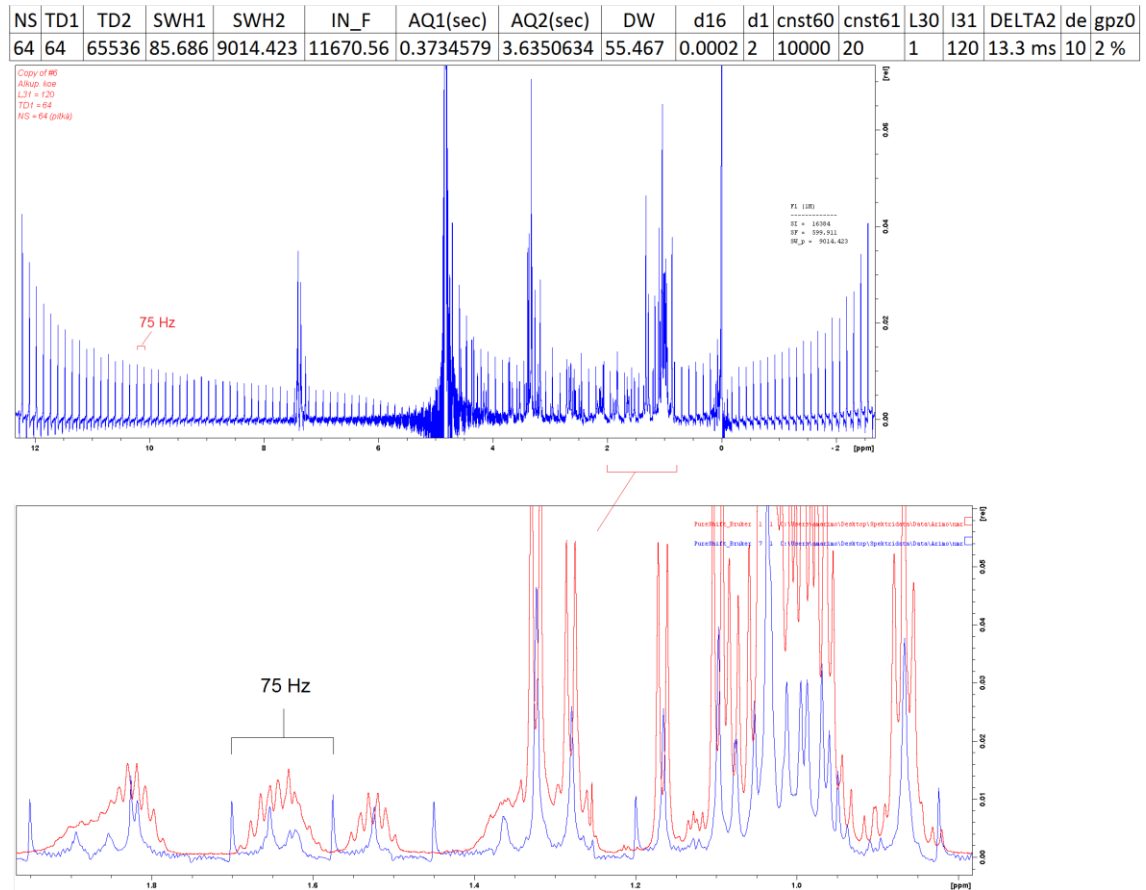
Taulukossa 2 on taulukoituna reset_psyche_1d-pulssisarjan parametreja ja niiden selitykset sekä ehdotetut tyypilliset viitearvot lähteestä 7.

Taulukko 2. reset_psyche_1d-pulssisarjan parametreja ja niiden selitykset sekä Brukerin ehdottamat tyypilliset viitearvot.

Parametri	Kuvaus	Arvo
pulprog	Pulssiohjelma	reset_psyche_1d
ns	Toistojen lkm	1 * n
l30	Kompleksisten pisteiden määrä, joka poistetaan joka FIDin alusta	2
l31	Suoran dimension kompleksipisteiden määrä, mitä käytetään FIDin rekonstruktioinnissa, κ	1-64
dw	Dwell time; aika mittapisteiden välillä	100 μ s
DELTA2	Yksittäisen FIDin kesto sekunteina ($=2 * dw * l31$)	200 μ s -12,8 ms
cnst60	Yksittäisen chirp-elementin pyyhkimän kaistan leveys	10 kHz
cnst61	Chirp-pulssin β -kulma	20°
gpz0	Gradientin vahvuus chirp-pulssien aikana	2 % *
td1	Inkrementtien määrä epäsuorassa dimensiossa	2 ⁿ
td2	Inkrementtien määrä suorassa dimensiossa	-
SWH1	Spektrin leveys epäsuorassa dimensiossa (Hz)	-
SWH2	Spektrin leveys suorassa dimensiossa (Hz)	-
AQ1 (sec)	Keräysaika epäsuorassa dimensiossa	-
AQ2 (sec)	Keräysaika suorassa dimensiossa	-
d16	Spoilpulssin jälkeinen "toipumisaika"	-
d1	Relaksaatioviive	-
de	Pre-scan delay	-

*Gradientin G_0 voimakkuus suositeltiin optimoimaan erillisellä koesarjalla, mitä ei kuitenkaan tehty. Näennäisesti gradientin optimoinnilla näytti saavan noin 10 % voimakkaampia signaaleja. [7.] Gradientin voimakkuus pidettiin kahdessa prosentissa. Optimoidun gradientin voimakkuus vaihteli julkaisun esimerkissä välillä 1,5 - 2,5 %. Relaksaatioviive pidettiin kahdessa sekunnissa kaikissa kokeissa.

Vuotta aiemmin pulssisarjaa oli kokeiltu muutaman kerran. Koe ajettiin vuoden takaisilla parametreilla. Sen spektri ja parametrit ovat alla (kuva 18). Suurennoksessa on päällekkäin irtauttamaton spektri (punainen) ja irtautettu spektri (sininen) alueella δ 0,8 - 2,0 ppm.

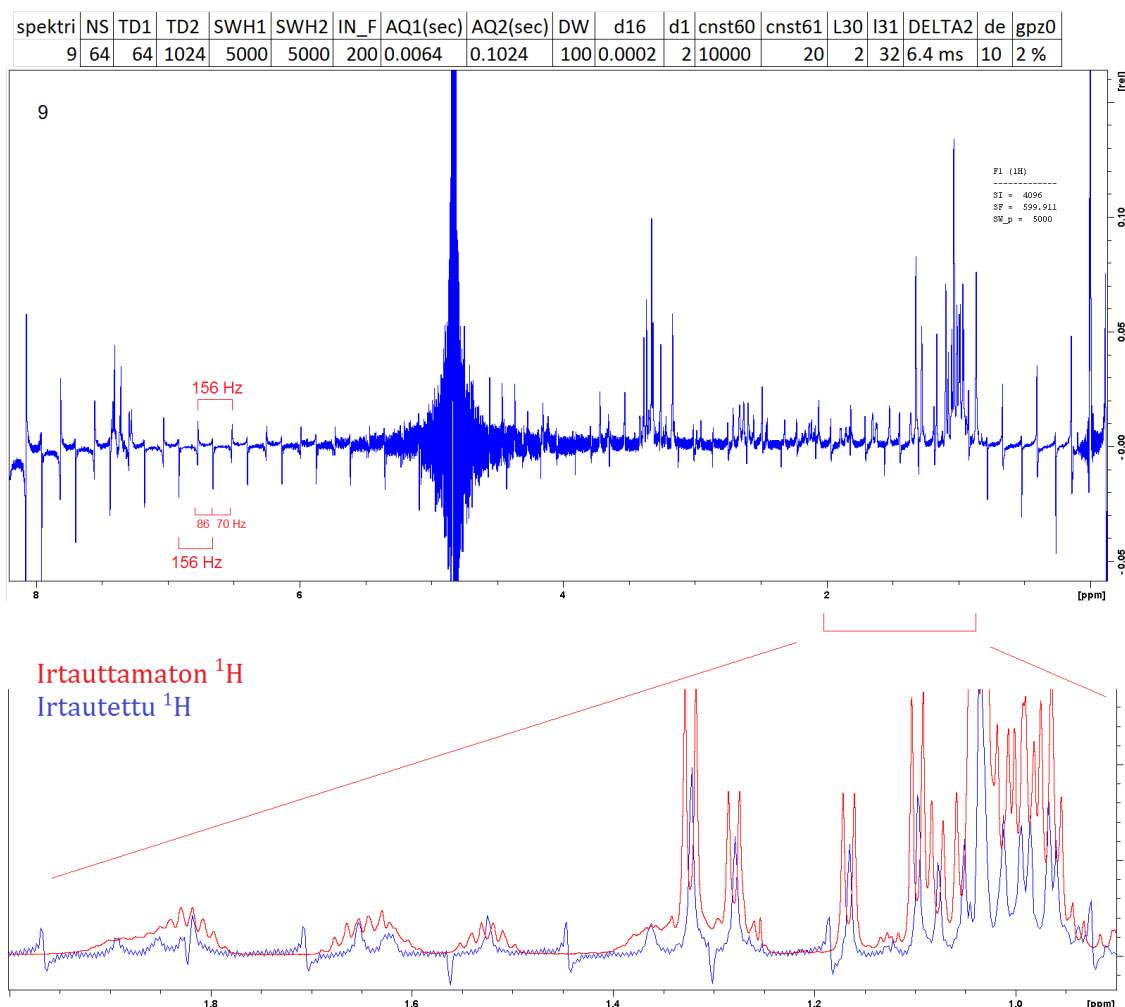


Kuva 18. Psyche- ^1H -spektri vanhoilla parametreilla. Alemmassa suurennoksessa punainen signaali on irtauttamattomasta ^1H -spektristä ja sininen irtautetusta.

Kuten kuvasta 18 nähdään, spektrissä on voimakkaita jaksoittain toistuvia ylimääräisiä artefaktoja, joita muodostuu koko spektrialueelle x-akselin positiiviselle puolelle ja vähän negatiiviselle puolelle. Tiedettiin kirjallisuudesta, että pure shift -kokeissa syntyy pure shift -signaalien ympärille sivupiikkejä, joiden taajuusväli on blokin keston käänteisluku (yksi jaettuna DELTA2). TopSpinilla mitattiin piikkien taajuusväliksi 75 Hz, joka on sama kuin blokin keston käänteisluku. Ne eivät näytä kerääntyvän pelkästään oikeiden signaalien ympärille, vaan joka puolelle spektriä ja etenkin spektrialueen reunoille, mihin ei kirjallisuudesta löytynyt esimerkkejä. Arveltiin niiden kuitenkin olevan irtautuksesta johtuvia sivupiikkejä.

Kuten suurennoksesta nähdään, protonikytkennät ovat irtautuneet. Jatkossa keskityttiin pure shift -spektrin laadukkuuden optimointiin minimoimalla ylimääräisiä signaalipiikkejä samalla selvittäen parametrien vaikutuksia.

Lähteen 7 ehdottamilla tyypillisillä parametriarvoilla ajettu spektri 9 on kuvassa 19.

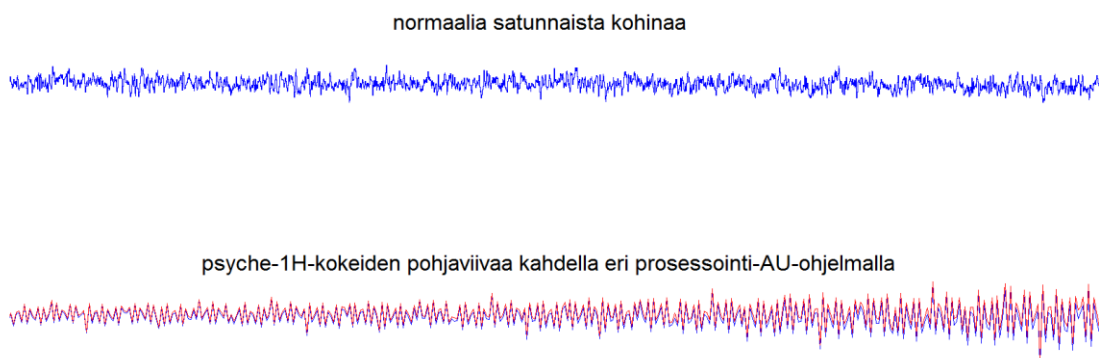


Kuva 19. Spektri 9. Brukerin ehdottamilla arvoilla ajettu Psyche- ^1H -spektri.

Blokin keston käänteisluku kokeessa oli 156 Hz, jonka taajuisia sivupiikkejä esiintyy jälleen x-akselin molemmin puolin. Niiden profiili on erilainen ja ne esiintyvät kaksi kertaa tiheämmin kahdessa vaiheessa aiempaan spektriin verrattuna. Piikkien lähdettä selvitetiin muun muassa pohjaviivan tutkimisen kautta.

Alla kuvan 20 suurennoksessa nähdään äskeisen pure shift -spektrin ja irtauttamattoman protonispektrin pohjaviivaa kemiallisen siirtymän väliltä δ 8 - 9 ppm, jossa ei esiinny NMR-signaaleja. Psyche-spektrin pohjaviiva ei näytä olevan puhdasta satunnaista kohinaa. Se tekee säännöllistä "siksakkia" intensiteetin vuoroin kasvaessa ja pienentyessä. Oletettavasti psyche-spektriin pohjaviiva pitää sisällään signaalia, joka tulee irtautus-, keräys- tai prosessointivaiheessa. Seikkaa tutkittiin kokeilemalla toisen AU-prosessointiohjelman vaikutusta kohinaan. Käytetyt AU-makrot olivat proc_1d_reset-AU-ohjelma

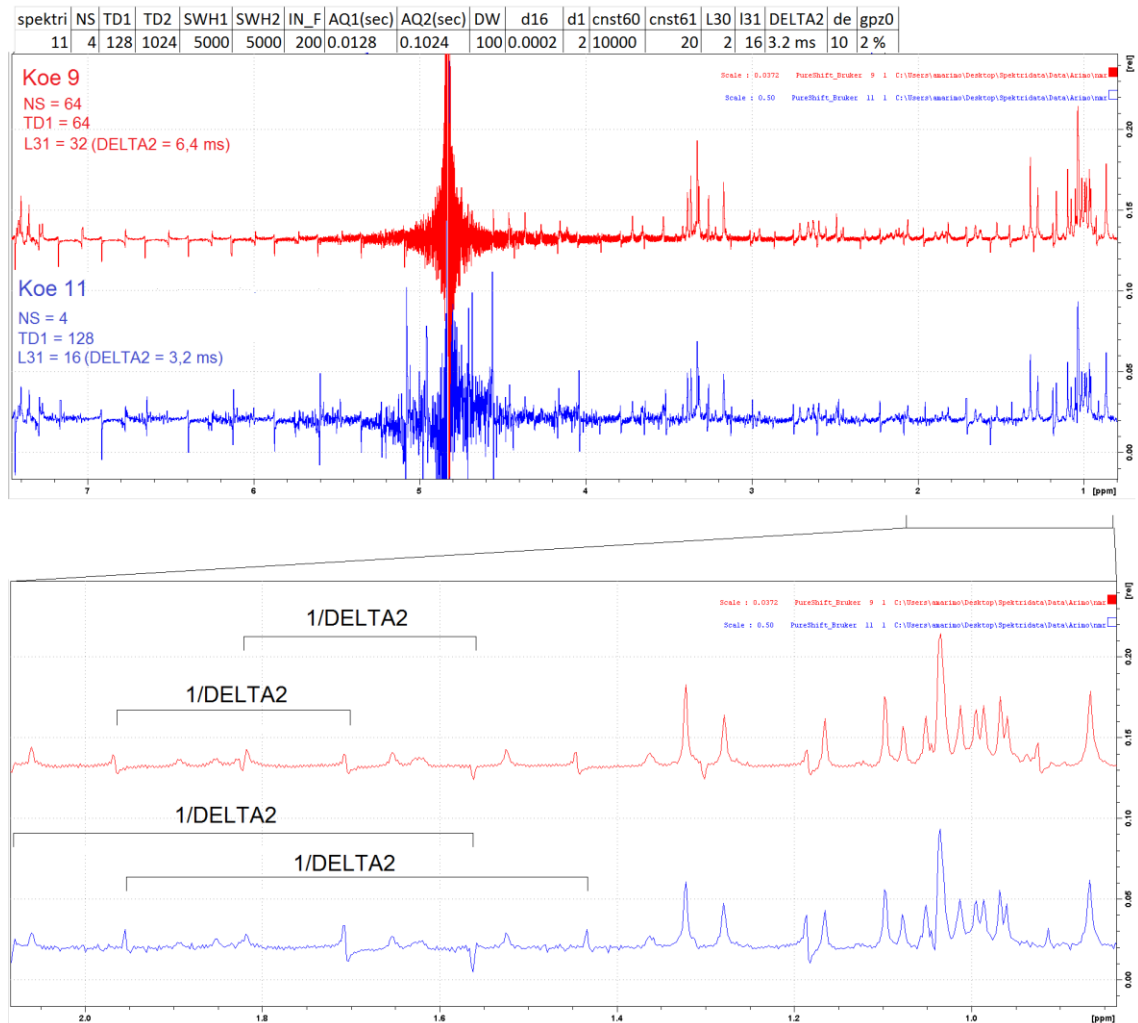
(punainen) ja proc_reset-AU-ohjelma (sininen; vanha versio, jota käytettiin vain tähän testiin).



Kuva 20. Ylemmässä kuvassa normaalia satunnaista kohinaa ^1H -spektristä. Alemmassa on psyche- ^1H -kokeissa havaittu kohina, joka ei näytä olevan satunnaista.

Kuten kuvasta 20 näkyy, pure shift -pohjaviiva on identtistä molemmilla prosessointiohjelmilla. Joka tapauksessa kohinan minimointi asetettiin vaatimukseksi kokeiden onnistumiselle jatkossa.

Lähteen 7 parametreja pohjana käyttäen kokeiltiin muutamaa muunneltua parametrisettiä äskeisestä ajosta (kuvat 21-24; kuvien yläosassa on uuden kokeillun kokeen tarkat parametrit, koe 9 tarkoittaa äsken ajettua koetta, spektreissä on lueteltuna tutkittavien parametrien erot). Ensimmäiseen vaihdettiin toistojen (NS), inkrementtien määrää (TD1) ja lyhennettiin blokin kestoa (DELTA2). Toistojen määrän vähentäminen vähensi herkyyttä, joten spektrejä on skaalattu saman suuruiseksi käyttäen TSP-standardin piikkejä apuna. Vastaavasti on toimittu jatkossa spektrejä vertailtaessa. Kuvissa näkyväksi spektrinleveydeksi on rajattu näytteen protonisignaali-alue ($\approx \delta 1 - 8 \text{ ppm}$), ellei toisin mainita.



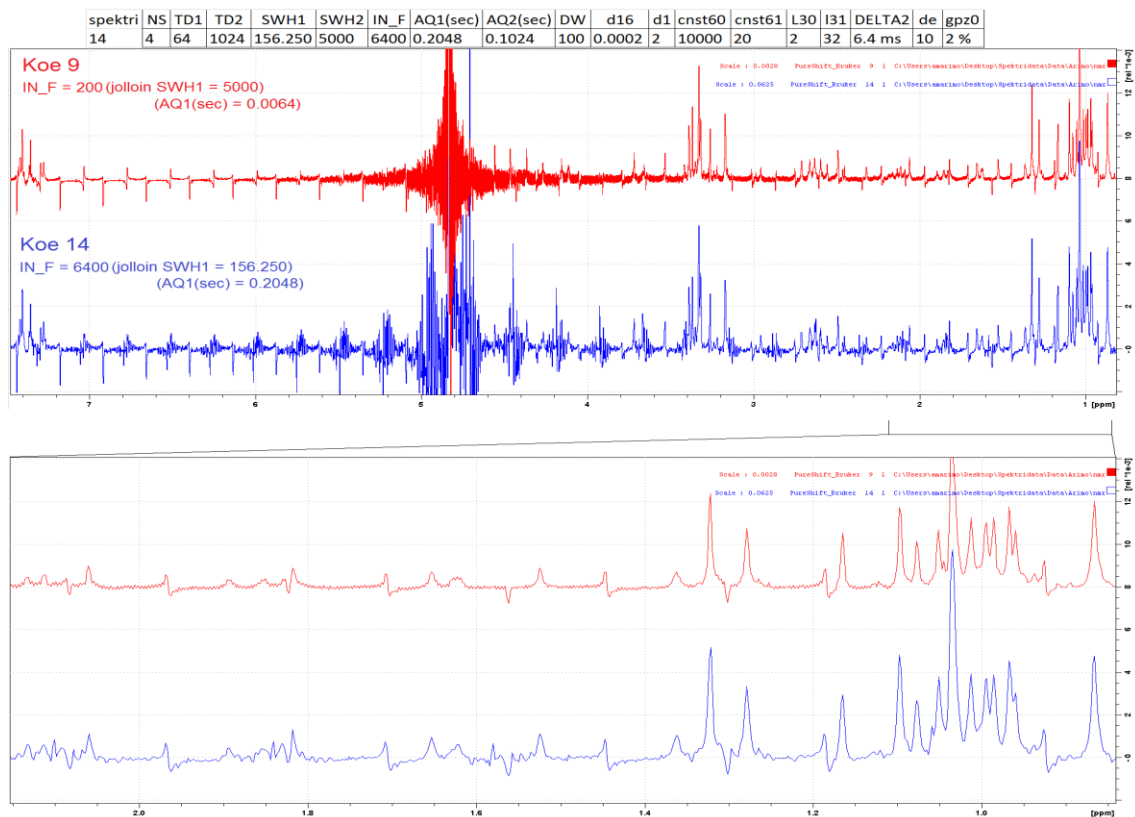
Kuva 21. Kokeiden 9 ja 11 spektrien vertailu keskenään. Kokeilussa oli toistojen, inkrementtien määrän ja blokin koon vaikutus (muuttamalla L31-parametria) pure shift ^{-1}H -spektriin.

Kuten kuvasta 21 nähdään, erotuskyvyssä ei ole suuria eroja, vaikka pienemmän toistojen määrän vuoksi kokeen 11 spektriä piti skaalata noin 15 kertaa suuremmaksi. Ajettua spektriä voidaan pitää huonompana johtuen sen kasvaneista sivupiikkien intensiteeteistä. Niiden esiintymisväli on suurempi, mutta jostain syystä tämän taajuusvälin piikkejä esiintyy useassa vaiheessa lomittain. Tässä vaiheessa arveltiin, että koska sivupiikkien pitäisi syntyä oikeiden pure shift -NMR-signaalien ympärille ja koska niiden esiintymisväli oli nyt suurempi, niin ne mahdollisesti kertautuvat suuremmalle taajuusalueelle spektrissä. Julkaisuissa ei selitetä yksiselitteisesti, miten nopeasti signaalien ympärille kertautuvat sivupiikit vaimenevat. Pure shiftin hyödyt tulevat juuri monimutkaisten näytteiden tulkinnassa, joten blokin keston vaikutusta pyrittiin selvittämään jatkokokeiden ohessa.

Seuraavaan aioon (14, muunnos kokeesta 9) kokeiltiin IN_F-parametrin (eli SWH1-arvon käänteisluvun) vaikutusta muuttamalla se arvosta 200 arvoksi 6400 (6,4 millisekuntia), joka on TD1-parametrin monikerta. Viipaleselektiivisissä irtautustavoissa (kuten ZS-irtautus) on tärkeää pitää tietyt parametriarvot toisilleen jaollisina. Psyche-julkaisuissa IN_F-parametrille, eikä SWH2/SWH1-suhteelle ollut annettu ohjeistusta. Muutettaessa IN_F-parametria samalla muuttuivat SWH1- ja AQ1-parametrien arvot. Parametrien keskinäinen suhde on seuraava (kaava 6):

$$\frac{TD1 \times IN_F}{SWH1} = AQ1 \quad (6)$$

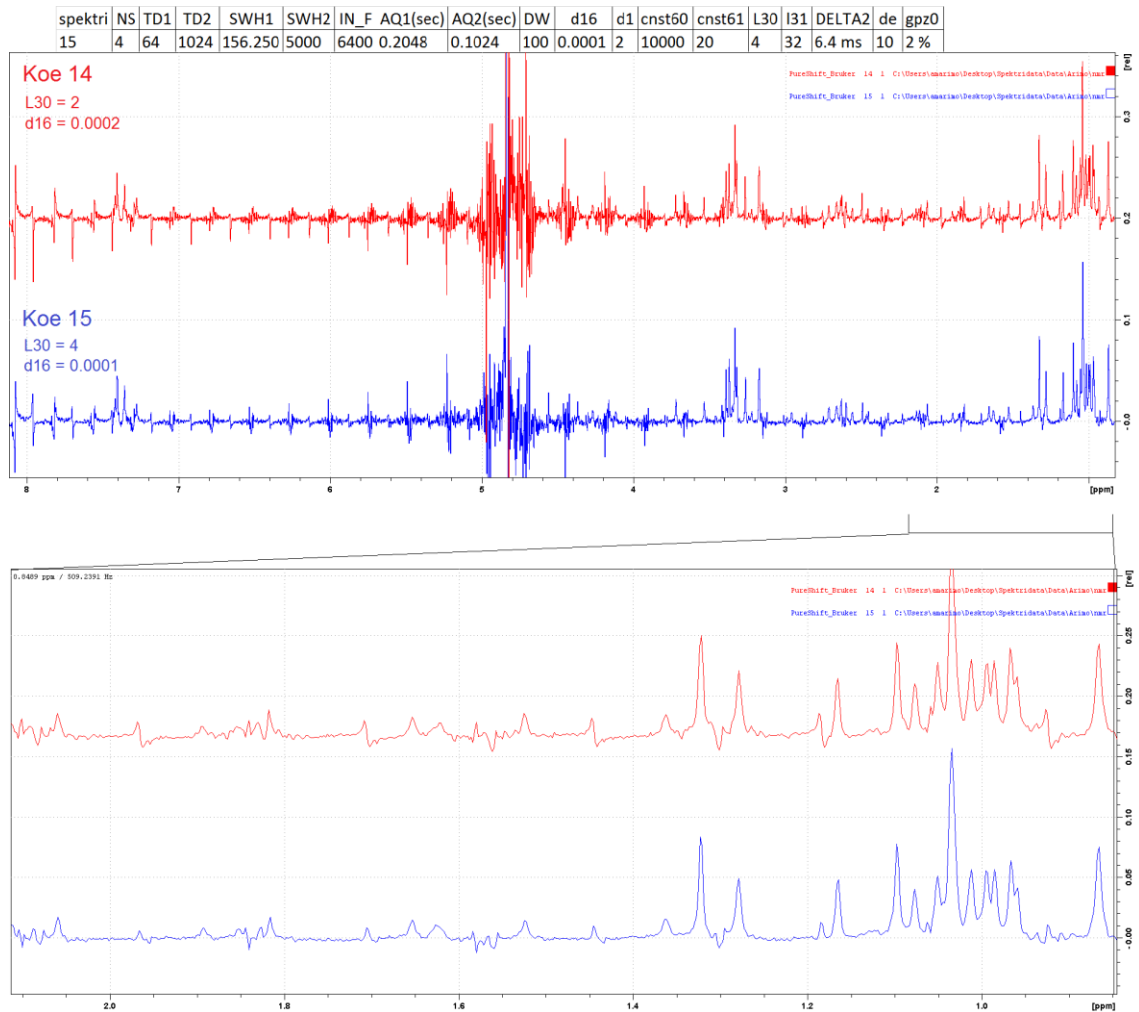
Monilla parametreilla, kuten AQ1- ja SWH1-parametreilla on kytköksiä toisiinsa, jolloin TopSpin-ohjelma automaattisesti laskee arvon siihen kytkettyneille parametreille. Esimerkiksi jos IN_F-parametrin arvo on 200, on SWH1-parametrin arvo sen käänteisluku 5000 ja vastaavasti, jos toisen arvoksi asettaa 5000, saa toinen arvon 200. Lukupareilla saadaan eri arvot pulssisarjan parametrille AQ1. Alla (kuva 22) tulosta on verrattu aiempaan kokeeseen 9.



Kuva 22. Kokeet 9 ja 14. Kokeiden erona muutetut IN_F-parametrien arvot, joiden muuttaminen vaikuttaa sen käänteislukuun SWH1- ja AQ1-arvoihin.

Kuten kuvasta 22 nähdään, IN_F-parametrin iso muutos TD1-parametriarvon moniker-raksi ei juuri vaikuttanut sivupiikkien intensiteettiin. Sen sijaan sivupiikkien ympärille muodostui kohinamaisuutta (vertaa δ 5 - 7 ppm:n alueita toisiinsa). Kokeiltu (melkein) SWH1- ja IN_F-parametriarvojen päittäin vaihtaminen ei muuttanut spektriä mullista-vasti, vaikka ne vaikuttivatkin epäsuoran dimension keräysaikaan pidentäen sitä yli 30-kertaisesti.

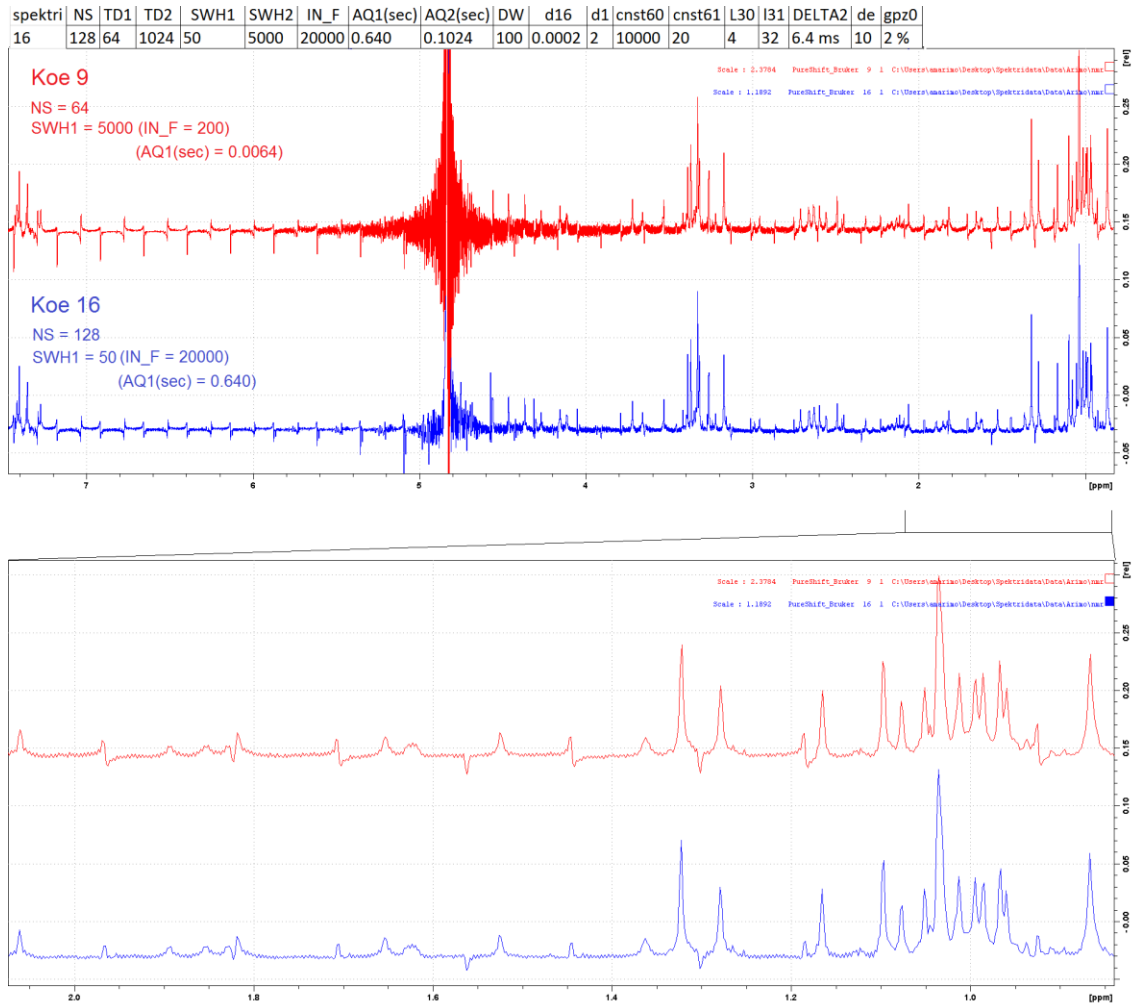
Kokeessa 15 (kuva 23) kokeiltiin d16- ja L30-parametriarvojen muutosten vaikutusta. Digitaalisessa signaalin prosessoinnissa vääristyy muutama ensimmäinen datapiste, joista halutaan eroon. L30-parametri on tämä alusta poisheitettävien pisteiden määrä. [21.] Liian pieni L30-arvo päästää vääristyneitä pisteitä mukaan. Liian suuri arvo huonontaa herkkyttä tarpeetta. d16 on eräs (spoilpulssiin liittyvä) viive. d16- ja L30-arvoja lukuun ottamatta koe vastasi äskeistä koetta 14.



Kuva 23. Kokeiden 14 ja 15 erona d16- ja L30-parametrien arvot. d16 on spoilpulssin viive. L30 on alussa poisheitettävien pisteiden lukumäärä, joiden oletetaan olevan vääristyneitä.

Kuten kuvasta 23 nähdään, poisheitettävien pisteiden määrän kasvattaminen kahdesta neljään paransi vähän spektriä. Jatkossa pidettiin L30-arvona neljä. d16-viiveen pienentäminen ei juuri nopeuttanut koetta ajallisesti suurillakaan toistomäärillä. Pienentämistä ei kokeen perusteella voi perustella. Todettiin parametri toisarvoiseksi pure shiftin kannalta. Jatkossa pysyttiin d16-arvossa 0,0002, jolla gradienttilaiteisto saa levähtää hetken pidempään.

Seuraavaksi (kuva 24, koe 16) kartoitettiin pienen SWH1-arvon vaikutusta (jolloin sen käänteisluku IN_F on iso). SWH1-parametrin arvo asetettiin 50:een, joka on SWH2-arvon kerrannainen. Koe ajettiin yön yli isolla määrällä toistoja, jolloin saatiin parempi NMR-spektrin signaali-kohinasuhde. Koetta on jälleen verrattu kokeeseen 9.



Kuva 24. Kokeet 16 ja 9. SWH1-parametrin muutoksen kokeilua. Molemmat kokeet on suoritettu suurella määrällä toistoja, jolla on pyritty minimoimaan lyhyestä ajasta mahdollisesti johdettavat epäherkkyydet.

Kuten kuvasta 24 nähdään, pieni SWH1-arvo (ja joka on jaollinen SWH2-arvolle) pienentää sivupiikkien suhteellista suuruutta spektrissä ja tuottaa siten suurta arvoa paremman spektrin. Aiempaa kohinamaista signaalia ei nyt esiinny piikkien ympärillä, kuten aiemmassa kokeessa 14 ($IN_F = 6400$; $SWH1 = 156,250$). Toisin sanoen spektrin herkkyys on parempi. SWH1 lienee tärkeämpi pitää jaollisena muille parametreille kuin IN_F . Lisäksi tässä vaiheessa voidaan päätellä, että SWH1-arvon on oltava mieluummin pieni kuin suuri. AQ1-arvo todetaan toisarvoiseksi luvuksi pulssisarjalle pure shiftin kannalta. Sille ei kirjallisuudessa annettu ohjearvoja.

Seuraavaksi palattiin ajamaan osittain omilla empiirisillä arvoilla, joilla selvitettiin lisää eri parametrien vaikutuksia pure shift -spektriin. Kokeiden pohjana (kuten koetta 9 aiemmin)

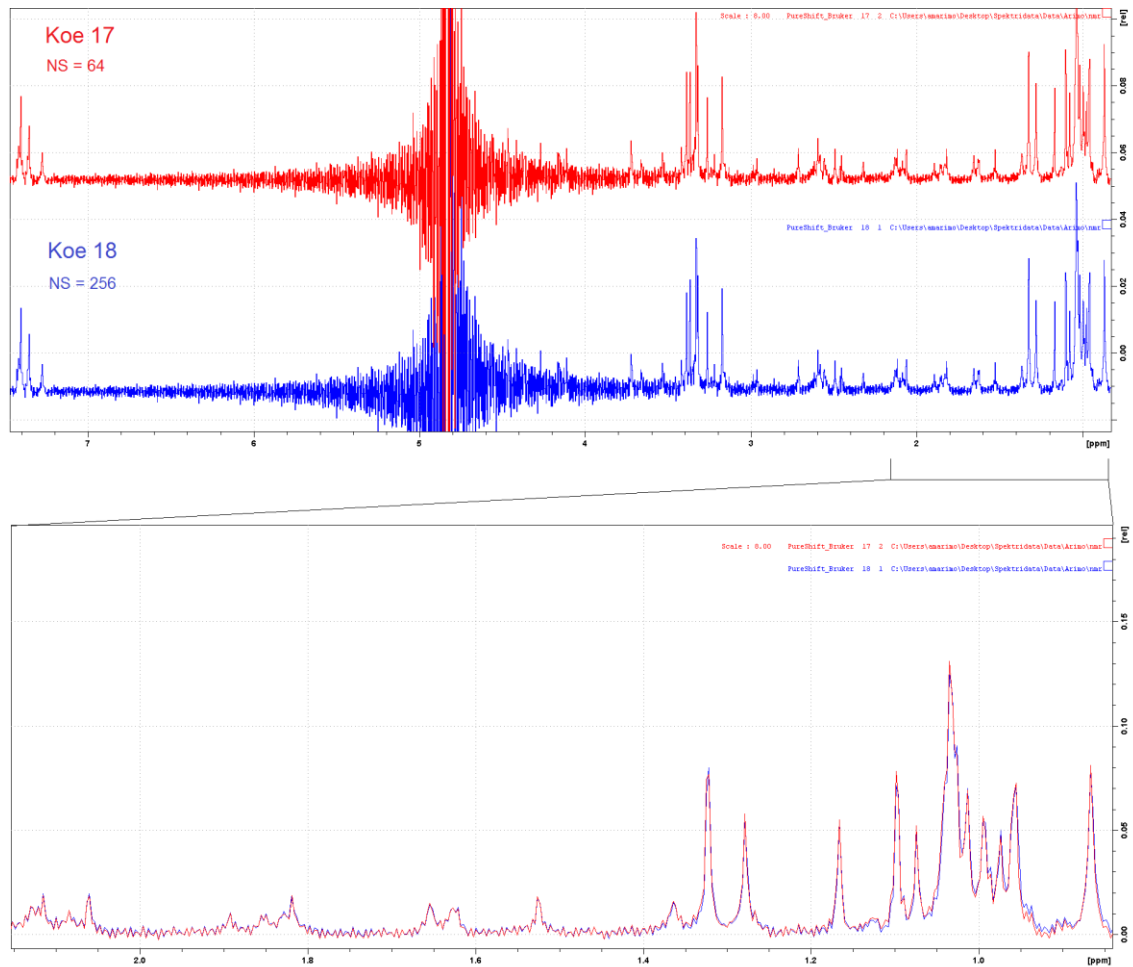
on pidetty koetta 17. Kokeiden 17 ja 18 parametrit ovat taulukossa 3. Spektrit ovat alla kuvassa 25.

Taulukko 3. Kokeiden 17 ja 18 parametrit. Kokeet ovat toistojen määrää lukuun ottamatta identtiset.

Koe	NS	TD1	TD2	SWH1	SWH2	IN_F	AQ1	AQ2	DW	d16	d1	cnst60	cnst61	L30	I31	DELTA2	de	gpz0
17	64	16	4096	50	15000	20000	0.160	0.1365	33.33	0.0002	2	10000	20	4	300	20 ms	10	2 %
18	256	16	4096	50	15000	20000	0.160	0.1365	33.33	0.0002	2	10000	20	4	300	20 ms	10	2 %

Alla on kokeen 17 parametriarvojen muutokset tarkemmin:

- Inkrementtien (TD1) määrä vähennettiin kuuteentoista. Inkrementtien vähentämisen pitäisi johtaa interferogrammin kokoamisessa syntyviin sivupiikkien vähentymisiin. Erotuskyky on ollut kaikissa kokeissa hyvä, joten tätä kannatti kokeilla. Spektreissä näkyvät sivupiikit johtuisivat siis nyt suhteellisesti aiempia kokeita enemmän J-kytkentöjen uudelleenkehittymisistä kuin FIDin kokoamisesta.
- Spektrin leveyttä (SWH2) kasvatettiin 5000:sta 15 000 hertsiin, millä tutkittiin sen vaikutusta spektri-ikkunan laitojen sivupiikkeihin.
- Kompleksipisteiden määrä rekonstruktiovaiheessa (I31) muutettiin 300:aan ja dwell-aika (dw) muutettiin 33,33 mikrosekuntiin. Tämä kasvatti blokin pituuden 20 millisekuntiin. Se on pisin aika, mitä julkaisuissa suositellaan käytettäväksi ennen kuin J-kytkentöjä kehittyy häiriöksi. Tosin huomattava, että Bruker suosittelee tätäkin lyhyempää aikaa ko. pulssisarjalle (taulukko 2). Lyhyitä blokin aikoja oli jo kokeiltu.
- Lisäksi TD2 pidennettiin 4000:een. Muutoksella ei teorian mukaan ole merkitystä, sillä interferogrammin blokkeihin ($2\kappa \times dw$) tarvitaan muutenkin vain pieni alkuosa mitatusta datasta ($TD2 \times dw$).

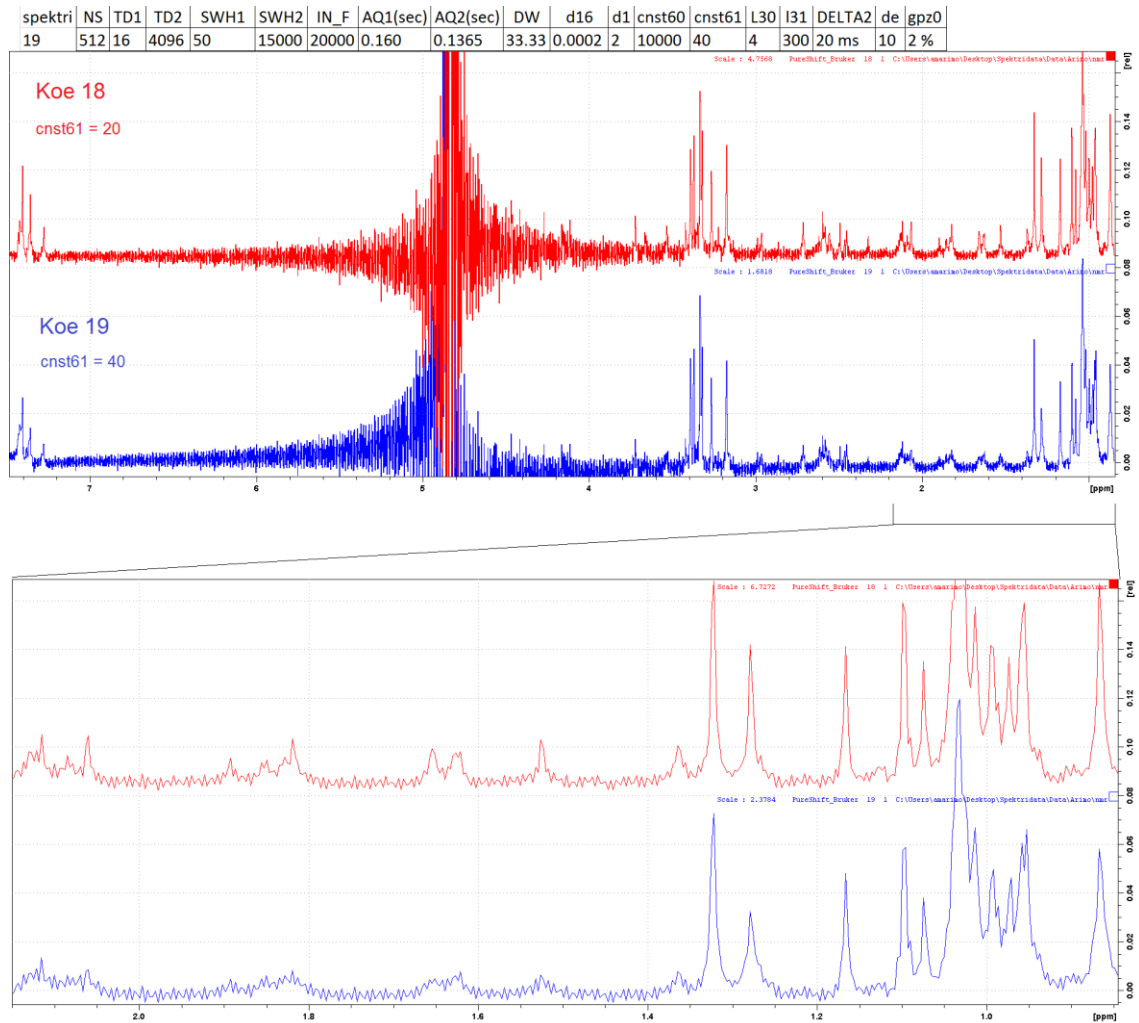


Kuva 25. Toistojen määrän vaikutus kokeisiin pure shift -kokeisiin. Kokeen 17 spektri on skaalattu vastaamaan koetta 18. Kokeiden parametrit ovat taulukossa 3. Suurennoksesta nähdään, että toistojen määrällä (64 tai 256) ei ole merkitystä pulssisarjalla.

Kuten kuvan 25 spektreistä nähdään, suuremmalla toistojen määrällä sivupiikit eivät poikenneet suhteellisilta intensiteeteiltään vähemmällä toistoilla ajetun kokeen sivupiikkien suhteellisista intensiteeteistä. SWH2-arvon kasvattaminen poisti spektrin laitojen sivupiikit protonisignaalien merkittävältä alueelta. Aiemmissä kokeissa ollut 5000 Hz:n spektriikkuna oli ollut liian kapea. Kapean spektri-ikkunan ajo toistettiin vielä myöhemmässä kokeessa 22. Verrattaessa aiemmin työssä ajettuihin pure shift -kokeisiin nyt ollut pitkä blokin aika ja vähäiset inkrementit tuottivat spektrin, jossa ei näy sivupiikkejä. Jatkossa selvisi, että spektrin kohinainen pohjaviiva peittää pienemmät signaalit (ja mahdollisesti sivupiikit) alleen.

Chirp-pulssin β -kulman (cnst61) vaikutusta on kokeiltu kokeessa 19 (Kuva 23), jossa β -kulma on vaihdettu 20° :sta 40° :een. Voimakkaamman chirp-pulssin pitäisi voimistaa sig-

naaleja, mutta tuoda mukanaan spektriin epäpuhtauksia ja huonontaa erotuskykyä. Kirjallisuuden mukaan [7] sen tyypillinen arvo käytetylle pulssisarjalle on 20° . Vaikutusta on verrattu äskeiseen kokeeseen 18, joka on parametreiltaan identtinen muutettua β -kulmaa lukuun ottamatta.

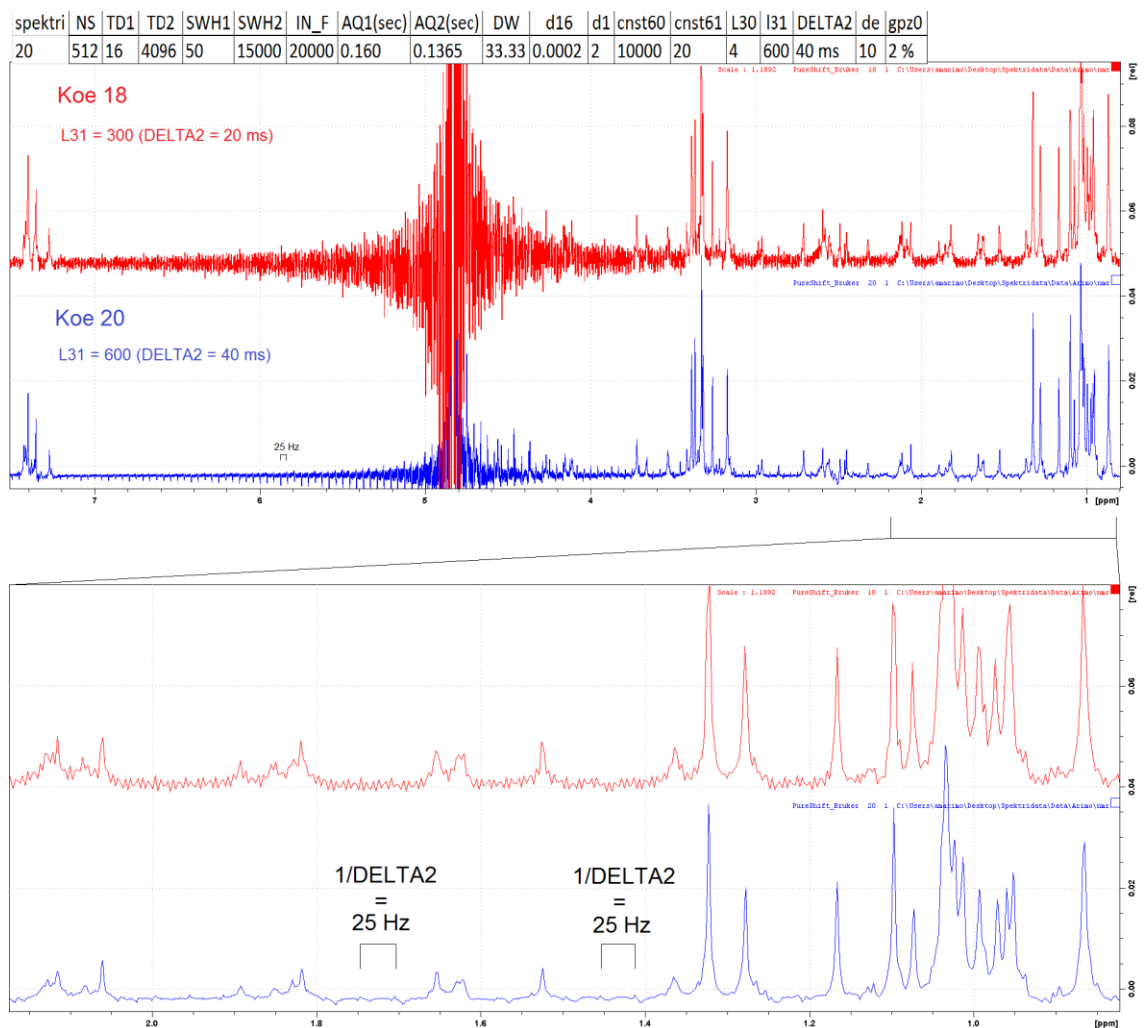


Kuva 26. β -kulman (cnst61) vaikutus pure shift -kokeessa. Kokeiden parametrit ovat identtiset β -kulmaa lukuun ottamatta. Koetta 18 (β -kulma = 20°) piti skaalata suuremmaksi, jotta TSP-piikit vastasivat toisiaan. Erotuskyky on siinä silti parempi kuin kokeessa 19 (β -kulma = 40°), mikä nähdään hyvin suurennoksessa multipleteista alueelta δ 1,8 - 2,2 ppm.

Kuten kuvasta 26 nähdään, β -kulman suurentaminen voimisti pure shift -signaaleja (pienemmän β -kulman spektriä on kuvassa jouduttu skaalaamaan noin kolme kertaa suuremmaksi toiseen nähden, jotta signaalien intensiteetit olisivat yhtä suuria). Se kuitenkin myös levensi signaaleja, jolloin erotuskyky huononi. Leveät multipletit kemiallisen siirty-

män alueella δ 1,8 - 2,2 ppm ovat lähes tunnistamattomissa. Kokeen perusteella β -kulman suuruus on tärkeä psyche-parametri, joka spektrin optimoimiseksi kannattaa pitää pienenä NMR-näytteillä, joissa on eripitoisuuksisia yhdisteitä tai useita kytkeytymiä naapuriytimiin (suuria multipletteja). 40-asteinen β -kulma näyttää olevan liikaa. Kohinaan sen suurentamisella ei ollut vaikutusta.

Pitkää blokin kestoa (DELTA2-arvoa) kokeiltiin (kuva 27, koe 20) muuttamalla kompleksisten mittapisteiden (L31) määrä 600:aan. Kokeen blokin kesto on 40 ms eli kaksi kertaa julkaisussa olevien suositusarvojen yli. Koe on identtinen verrattavaan kokeeseen 18 lukuun ottamatta blokin kestoa (ja kompleksisten mittapisteiden määrää).



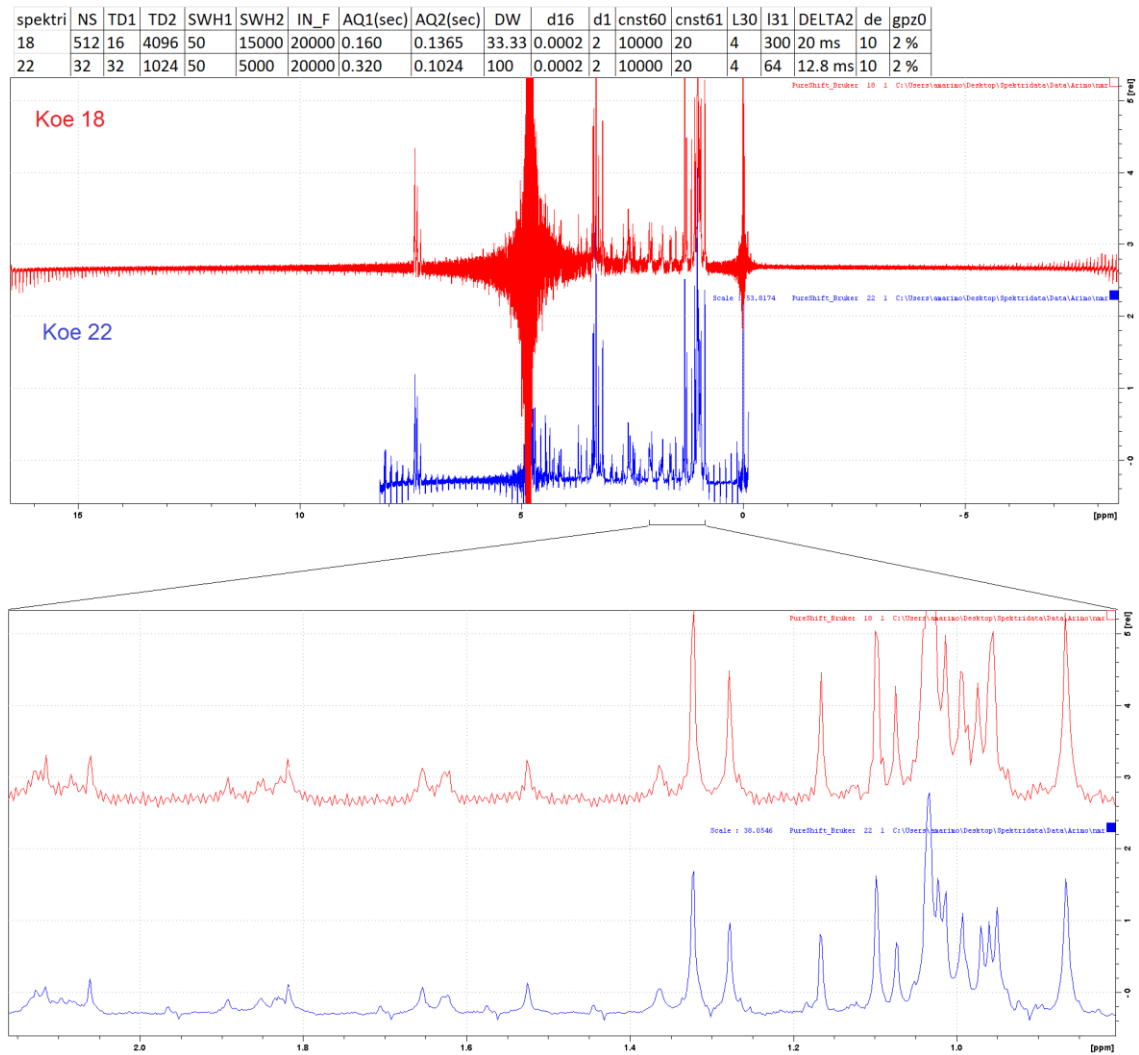
Kuva 27. Blokkikokojen 20 ms (koe 18) ja 40 ms (koe 20) ero. Blokin koko vaihdettiin muuttamalla L31-parametria. Kokeen 20 taustakohina on selvästi vähäisempää. Alta paljastuvat 25 Hz:n välein toistuvat sivupiikit.

Kuten kuvasta 27 nähdään, taustakohina on suurella L31-arvolla vähäisempää ja signaalit ovat kapeampia. Kohinasta paljastuvat 25 hertsin (joka saadaan laskemalla yksi jaettuna DELTA2) välein toistuvat sivupiikit. Blokin kesto (DELTA2) ja L31-parametrit ovat selvästi tärkeitä parametreja pure shift -kokeissa, vaikka blokin keston suositusarvon ylittyminen ei tuloksen perusteella vaikuta kriittiseltä. Jostain syystä kokeiden 17 ja 18 (keskenään eri toistomäärät, muutoin identtiset) pure shift -signaalit kemiallisella siirtymällä 0,8 ppm eivät erotu samoin kuin muissa kokeissa. (Lähempi tarkastelu osoitti, että kaikki muut signaalit ovat erottuneet muiden kokeiden tavoin.)

Seuraavassa kokeessa tutkittiin jälleen useampaa parametria.

- Kapeaa spektri-ikkunaa (SWH2 = 5000) kokeiltiin vielä kerran.
- TD2-arvo pienennettiin 1024:een, sillä 4096 on turhan paljon aiemmin mainituista syistä.
- Samalla kompleksisten mittapisteiden (L31) määrä pudotettiin 64:ksi ja dw-arvo nostettiin 100 mikrosekuntiin, jolloin blokin pituudeksi tuli 12,8 millisekuntia.
- Inkrementtien (TD1) määrä nostettiin 16:sta 32:een, millä haluttiin selvittää, tuleeko spektriin lisää erottelukykyä.

Koe 22 ja sen parametrit ovat kuvassa 28. Parametrien vaikutuksia, aiempien kokeiden tavoin, on verrattu kokeeseen 18. Kuvassa on molempien spektrien parametrit sekä tällä kertaa koko taajuusalueet. Tällä nähdään paremmin, kuinka spektri-ikkunan koko (SWH2) vaikuttaa protonialueelle kantautuviin sivupiikkeihin. Kokeen 22 signaaleja on skaalattu suuremmiksi johtuen kokeen pienemmästä toistojen määrästä.

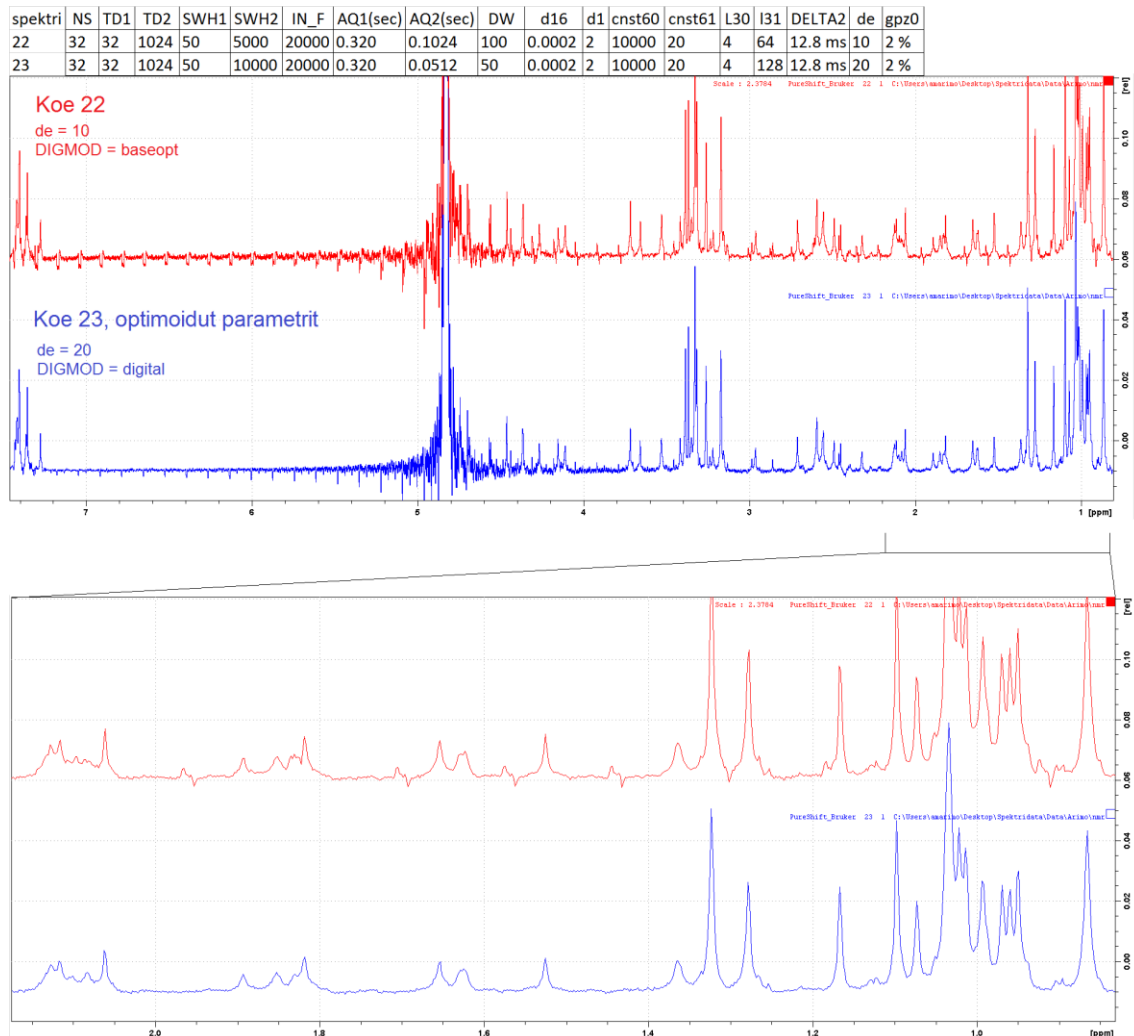


Kuva 28. Kokeiden 18 ja 22 spektrit. Kokeiden parametrit näkyvät kuvan yläosassa. Kuvasta nähdään, kuinka kokeen 22 kapea spektri-ikkuna (SWH2-parametri) on liian kapea, jolloin spektrin laidoilla olevat sivupiikit tulevat protonisignaali-alueelle.

Kuten kuvasta 28 nähdään, kokeessa 22 on liian kapea spektri-ikkuna. Protonialueen laidoille syntyvät sivupiikit on helppo sekoittaa oikeisiin pure shift -signaaleihin. Suurenoksesta nähdään jälleen, että kokeen 22 taustakohina on vähäisempää kuin kokeessa 18. Lisäksi erilliset pure shift -signaali-alueet erottuvat paremmin, mikä näkyy tarkasteltaessa vaikkapa alueen 1,0 ppm piikkejä. TD2-parametri ei osoittaudu mitenkään kriittiseksi pure shift -mittauksille, kunhan se on riittävä iso verrattuna blokin kokoon. dw-arvo ei itsessään osoittaudu kriittiseksi pure shift -mittauksille; sen sijaan sen vaikutus esimerkiksi blokin kokoon tekee siitä tärkeän parametrin. Sen arvon voi pitää samoissa lukemissa kuin normaaleissakin protonimittauksissa. Spektri on sen verran aiempia parempi, että inkrementtien määrä 32 todettiin aiempia arvoja paremmaksi.

Seuraavaan kokeeseen pulssisarjaa varten käytiin aiemmat mittaukset läpi ja parametrit optimoitiin niissä todettujen havaintojen perusteella. Spektri-ikkuna (SWH2) kasvatettiin 10 kilohertsiin (16,6691 ppm) aiempien tulosten perusteella, joissa 5 kilohertsiä oli liian vähän ja 15 kilohertsiä oli ehkä vähän liikaa. Spektrien laidoilla olevat voimakkaat sivupiikit kantautuivat noin 2 kilohertsiä spektrin laidoilta (noin 3 ppm) ”sisäänpäin”, jolloin 10 kilohertsin ikkuna pitäisi riittää.

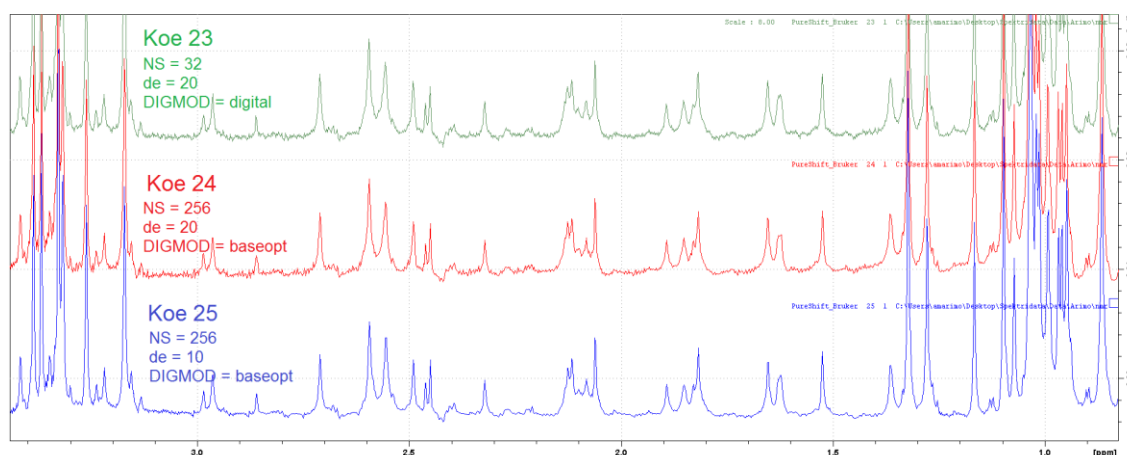
Samalla kokeiltiin de- ja DIGMOD-parametrien muutosten vaikutusta ja sitä, voidaanko niitä muuttamalla kenties optimoida koetta. Koetta on verrattu kokeeseen 22 (kuva 29, alla), jonka parametreilla oli saatu paras tulos tähän mennessä (laitojen sivupiikkejä lukuun ottamatta).



Kuva 29. Optimoitu koe 23 sekä koe 22. Kokeessa 23 tutkittiin lisäksi de- ja DIGMOD-parametrien vaikutusta.

Kuten kuvasta 29 nähdään, on optimoiduilla parametriarvoilla ajettu koe paras tähän mennessä. Sillä saadaan yksiselitteisiä arvoja multipleteille, eivätkä siinä esiintyvät sivupiikit ole mainittavia. Kokeeseen oli kuitenkin tehty monta muutosta.

Toistettavuutta ja saavutettuja päätelmiä tukevat seuraavat kaksi mittausta. Kokeet (äskeinen) 23, 24 ja 25 sekä niitä erottavat parametrit ovat kuvassa 30 (δ 0,8 - 3,4 ppm). Ajon 23 signaaleja on jouduttu skaalaamaan suuremmiksi, johtuen muita kokeita pienemmästä toistojen määrästä.



Kuva 30. Kokeiden 23, 24 ja 25 spektrit välillä δ 0,8 - 3,4 ppm. Kokeiden spektrit eivät juuri eroa toisistaan, mistä voidaan päätellä, etteivät parametriarvojen muutokset (tutkittujen arvojen välillä) vaikuttaneet nähtävästi mihinkään.

Kuten kuvasta 30 nähdään, spektrien välillä ei näy juuri mitään eroa, joten todetaan de- ja DIGMOD-parametrit toisarvoisiksi ja parametrit muutoin toimiviksi.

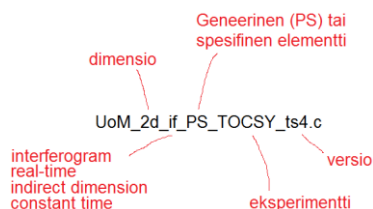
Koe oli toistettavissa (niin kuin NMR:ssä aina stabiileilla näytteillä). Parametrit oli optimoitu pulssisarjalle onnistuneesti ja parametrien profiloinnin avulla oli saatu koenäytteelle pure shift -spektri, jonka hyvyttä tutkitaan tulosten käsittelyssä tarkemmin.

5.1.2 Manchesterin yliopisto

Manchesterin yliopiston psyche- ^1H -pulssisarjaa ei ehditty optimoida kunnolla. Se ei ollut tässä vaiheessa enää tärkeää, sillä hyvin tuloksiin oli jo päästy reset_psyche_1d-pulssisarjalla. Työn tavoitteiden mukaisesti jatkossa aika käytettiin TOCSY- ja HSQC-mittauksiin. Alla kuitenkin tehdyt kokeet ja se, mitä niistä voidaan päätellä jatkoa ajatellen.

Pulssisarjan parametrit oli hieman eri lailla ohjelmoitu kuin Brukerin, joten valitettavasti kokeiden parametreja ei voinut suoraa siirtää toistensa välillä.

Manchesterin pulssisarjojen nimet noudattivat kuvan 31 nimeämissääntöä [20].



Kuva 31. Manchesterin yliopiston pulssisarjojen nimeäminen [20].

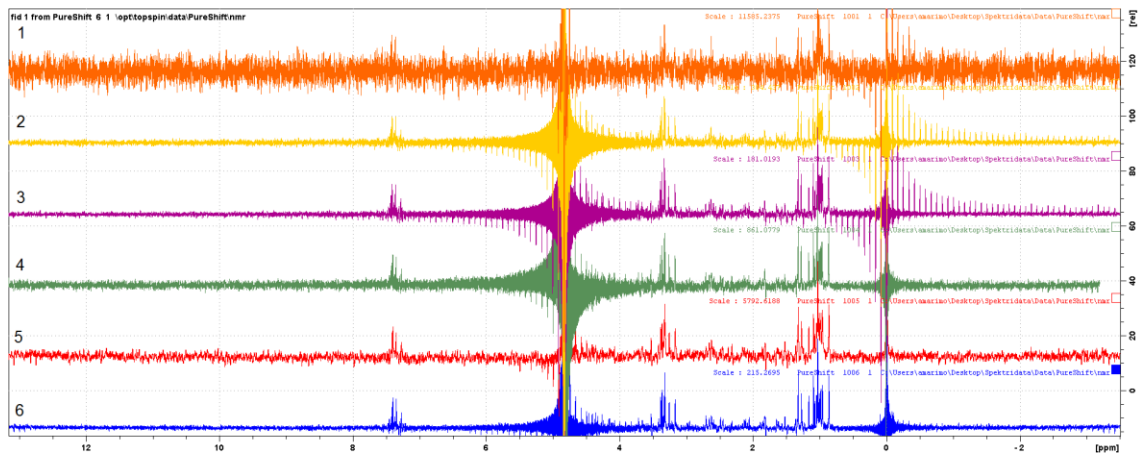
Taulukossa 4 on ajettujen kokeiden parametrit. Kokeissa on vaihdettu toistojen määrää, SWH2-parametrin arvoa sekä protonilähettimen paikkaa (O1). SWH1-arvo muuttui SWH2-arvoa muuttaessa. Pulssisarjan parametreilla oli siis hieman eri tehtävät, kuin edellisessä pulssisarjassa.

- SWH1 ja SWH2, sweep width.
- CNST4, number of drop points, vastaa Brukerin parametria L30.
- INF1, increment for F1.
- CNST21, chirp-pulssin pyyhkäisemä alue.
- CNST20, chirp-pulssin β -kulma.
- O1, protonilähettimen paikka, ppm.

Taulukko 4. UoM_1d_if_psyche_ts4x-pulssisarjalla ajettujen kokeiden parametrit.

Koe	NS	TD2	SWH1	SWH2	AQ2	CNST4	INF1	CNST21	CNST20	O1
1	2	32768	20,0349	12019.23	1,363	4	20000	10000	15	5,0
2	64	32768	20,0349	12019.23	1,363	4	20000	10000	15	5,0
3	128	32768	20,0349	12019.23	1,363	4	20000	10000	15	5,0
4	32	32768	16,6691	10000	1,638	4	20000	10000	15	5,0
5	8	32768	16,6691	10000	1,638	4	20000	10000	15	4,7
6	128	32768	16,6691	10000	1,638	4	20000	10000	15	4,7

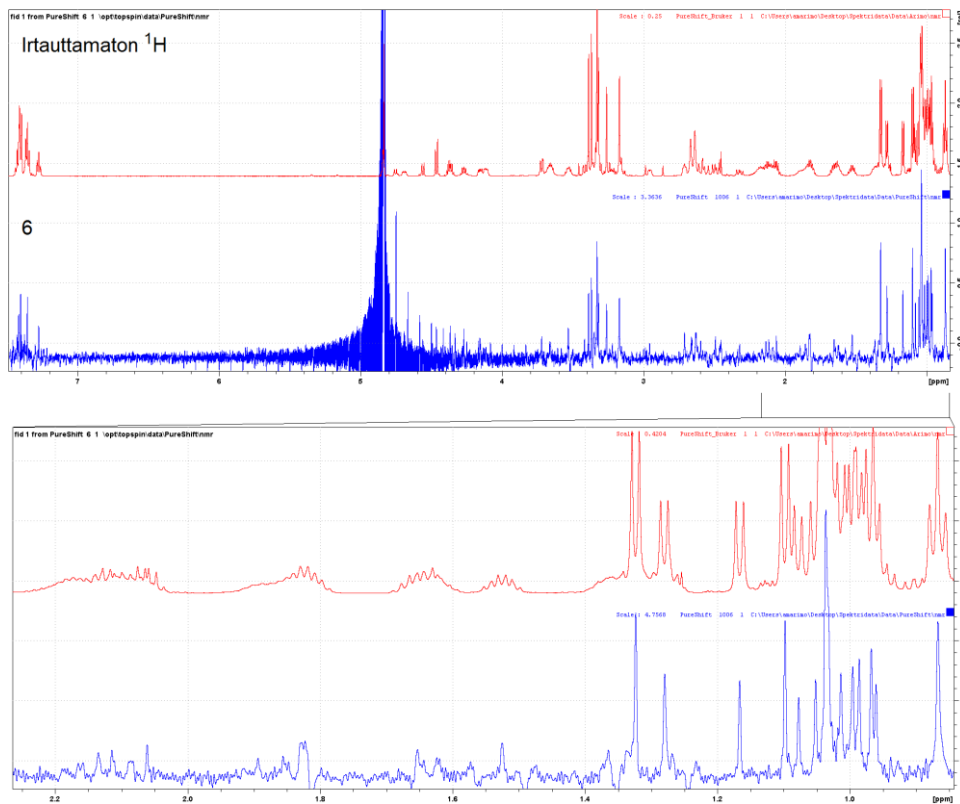
Kuvassa 31 on kokeiden NMR-spektrit. Kokeita, joissa oli vähemmän toistoja (heikommat signaalit), on skaalattu suuremmiksi vastaamaan muita.



Kuva 32. UoM_1d_if_psyche_ts4x-pulssisarjalla ajettujen kokeiden NMR-spektrit.

Kuten kuvasta 32 nähdään, pulssisarjalla ei synny samoissa määrin signaaleja spektri-ikkunan laidoille, toisin kuin aiemmalla pulssisarjalla. Kuvasta nähdään, että toistojen määrällä on selvä yhteys spektrin puhtauteen.

Kuvassa 33 on irtauttamaton ^1H -NMR-spektri ja pure shift -spektri (koe 6).

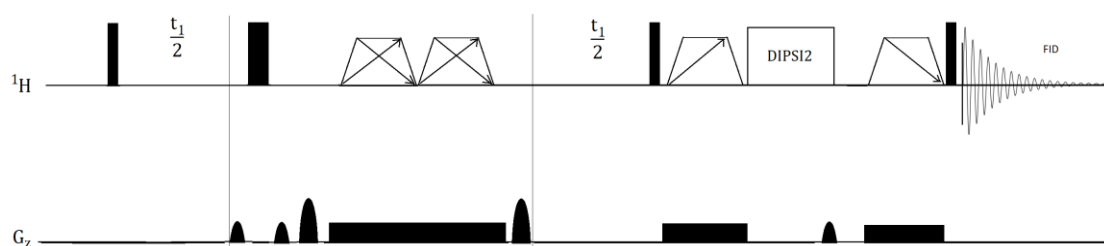


Kuva 33. Irtauttamaton ^1H ja pure shift -koe 6.

Kuten kuvasta 33 nähdään, irtautus toimii. Herkkyys ei ole kovin hyvä, varsinkaan leveillä multiplaneilla. Tämän enempää ei pulssisarjaa optimoitu.

5.2 Psyche-TOCSY

Pulssisarjana käytettiin Brukerin dipsi2gpphzs_psyche (16/01/18, DIPSI2, vaiheherkkä, nollakvanttisuppressointi, psyche-irtautus epäsuorassa dimensiossa). Kokeen pulssisarja on kuvassa 34. Protonikanavalla kapeat mustat viivat ovat 90° :n pulsseja ja paksu viiva on 180° :n radiopulssi. Puolisuunnikkaat, joissa on 2 nuolta, ovat Chirp-pulsseja. Mixing-elementin (DIPSI2) molemmilla puolilla olevat puolisuunnikkaat ovat 180° :n chirp-pulsseja nollakvanttisuppressointia varten. [14.] Pulssisarjan puoliparaabelin muotoisilla gradienteilla siistitään magnetisaatiota. GPNAM0-gradienttipulssina oli oletusarvoisesti SMSQ10.100 kaikissa muissa kokeissa paitsi neljännessä, jossa GPNAM0-pulssina keikeltiin RECT.1-gradienttipulssin vaikutusta. Siitä mainitaan kokeen yhteydessä erikseen. Kokeille suoritettiin kovarianssimuunnokset suorassa dimensiossa (irtauttamaton dimensio).



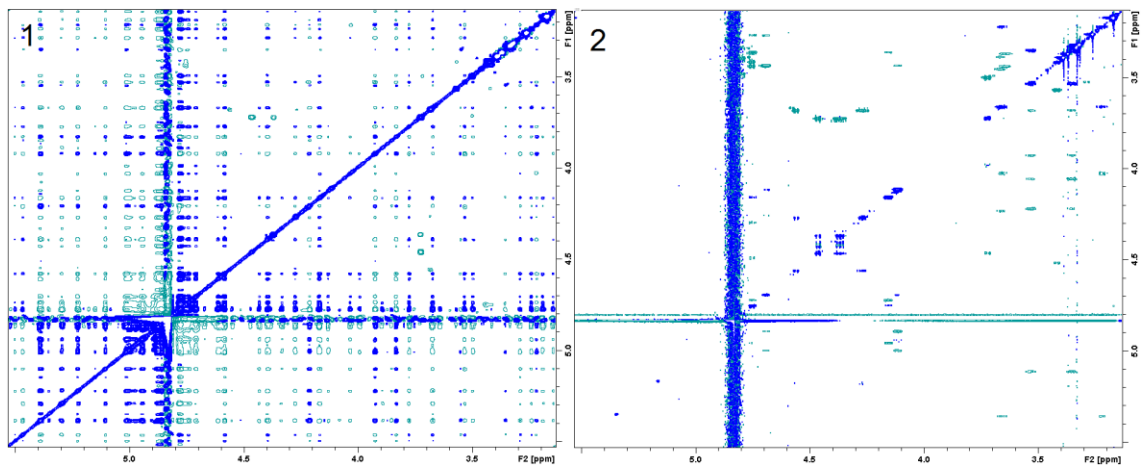
Kuva 34. Psyche-TOCSY-kokeen pulssisarja [14].

Taulukossa 5 on kokeiden 1 ja 2 parametrit. Niiden erona on inkrementtien määrät (256 ja 1024) epäsuorassa dimensiossa. Pulssisarja on ohjelmoitu siten, ettei siinä ollut juuri muutettavia parametreja. Pure shift -parametreja pulssisarjassa ovat parametrit cnst60 ja cnst61. cnst60 on chirp-pulssin pyyhkimän kaistan leveys. cnst61 on β -kulma.

Taulukko 5. Psyche-TOCSY-kokeiden 1 ja 2 parametrit.

Koe #	NS	TD1	TD2	SWH1	SWH2	IN_F	AQ1	AQ2	dw	cnst60	cnst61
1	16	256	2048	1440	1440	694,54	0,3556	0,711	347,2	10000	20
2	16	1024	2048	1440	1440	694,54	0,3556	0,711	347,2	10000	20

Kuvassa 35 on kaksi ensimmäistä psyche-TOCSY-ajoa kovarianssimuunnoksen jälkeen.

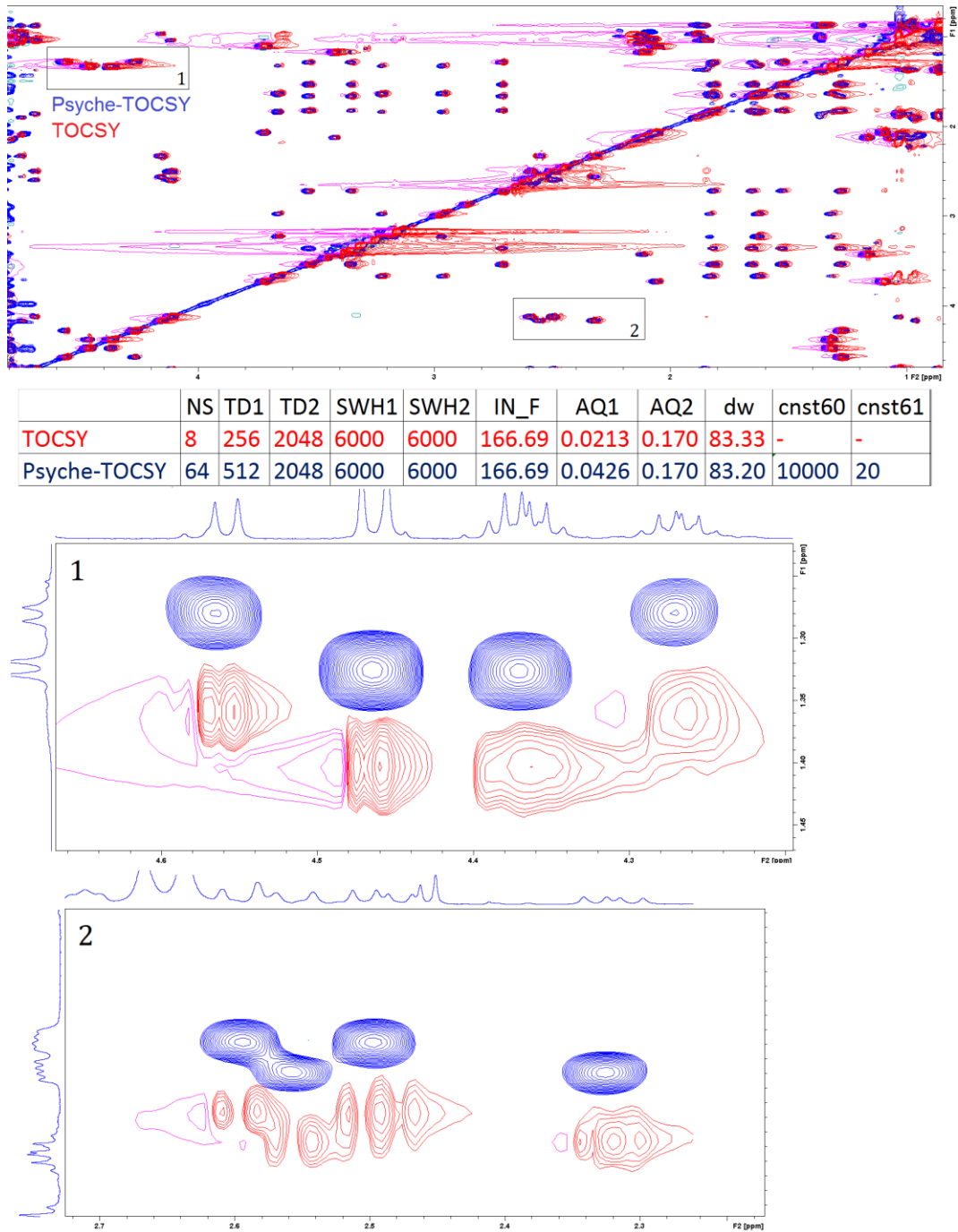


Kuva 35. Kaksi ensimmäistä psyche-TOCSY-ajoa. Vasemmanpuoleinen oli täynnä artefaktoja, jotka saatiin pois kasvattamalla inkrementtien määrää epäsuorassa dimensiossa (TD1) seuraavaan ajoon (oikeanpuolimmainen kuva). Spektreissä esiintyy vaihevirhettä.

Kuten kuvasta 35 nähdään, ensimmäiseen (vasemmanpuoleinen) ilmestyi voimakkaita säännöllisiä pistemäisiä artefaktoja koko spektrialueelle. Ne voivat johtua mahdollisesti kovarianssimuunnoksesta, joka ei ymmärrä päällekkäisiä signaaleja. Inkrementtien määrä (TD1) kasvatettiin moninkertaiseksi seuraavaan kokeeseen (oikeanpuoleinen spektri kuvassa 34 yllä). Tällöin ylimääräiset signaalit poistuivat ja jäljelle jäivät oikeat pure shift -signaalit.

Spektreissä vihreä ja sininen väri kertovat signaalien vastakkaisista vaiheista. Oikein asetetussa vaiheherkässä TOCSY-kokeessa diagonaalien ja cross-peak-signaalien vaiheiden kuuluisi olla samanmerkkiset [22, s. 204 - 205]. Normaalisti vaihevirhe tulee signaalinkäsittelyvaiheessa, ja se voitaisiin helposti korjata.

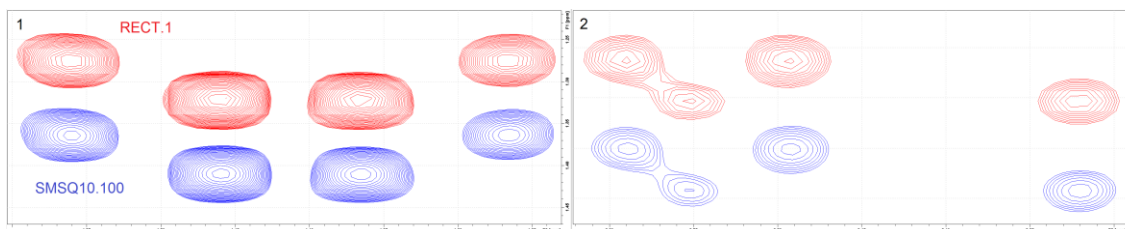
Kolmanteen ajoon spektri-ikkunoita (SWH1 ja SWH2) levennettiin. Kuvassa 36 on kolmas ajo. Irtauttamaton (punaista) TOCSY-spektriä on siirretty suurennoksissa alas-päin.



Kuva 36. Kolmas psyche-TOCSY-kokeen spektri, jota on verrattu irtauttamattomaan TOCSY-spektriin. Suurennoissa irtauttamaton (punaista) spektriä on siirretty alaspäin, jotta huiput erottuvat toisistaan paremmin.

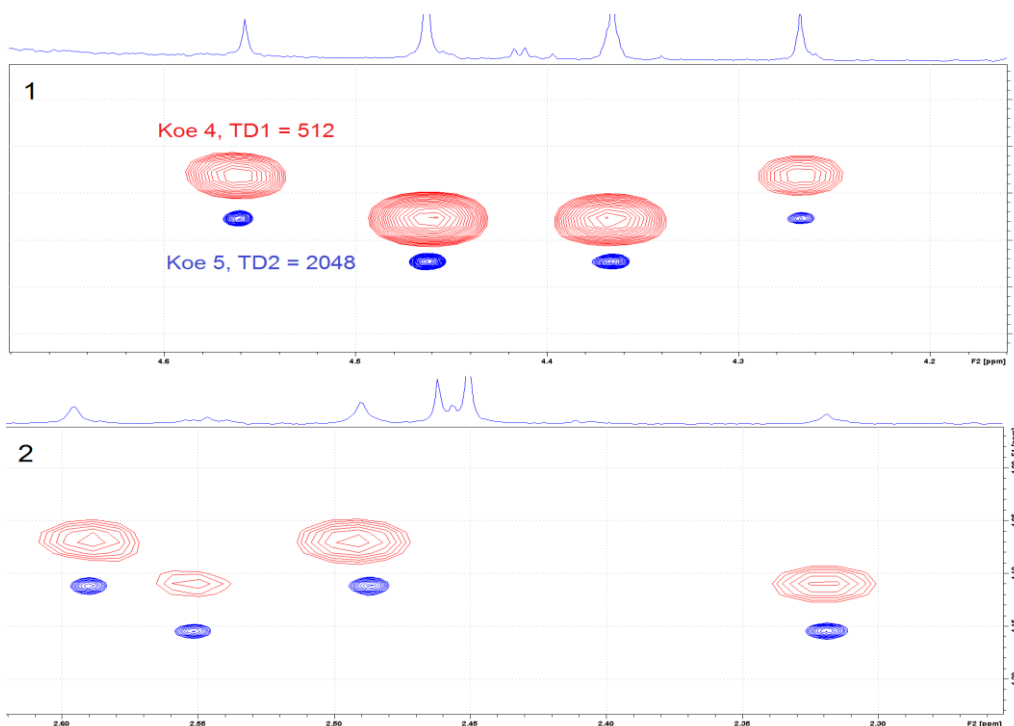
Kuten kuvasta 36 nähdään, (kuvan 35) vaihevirhe katosi spektri-ikkunan kokoa muuttamalla. Irtautettu spektri näkyy sinisenä ja irtauttamaton TOCSY-spektri punaisena.

Menetelmällä haluttiin vielä pistemäisempiä signaaleja. GPNAM0-gradienttipulssiksi vaihdettiin *RECT.1*-gradienttipulssi, joka oli aiemmissa *SMSQ10.100* neljänteen kokeeseen. Alla on eri pulssien vaikutus signaaleihin (kuva 37). Suurennoston alueet ovat samat kuin äsken.



Kuva 37. Koe 4, jossa kokeiltiin eri GPNAM0-gradienttipulssia. Vaihto ei vaikuttanut pure shift-spektriin. Kuvan suurennosten alueet ovat samat kuin kuvassa 34. Koe 3 on sinisellä ja koe 4 punaisella.

Kolmannen ja neljännen kokeen välillä ei ole eroa. Kokeessa 5 (kuva 38, samat suurennukset kuin yllä) palattiin käyttämään *SMSQ10.100*-gradienttipulssia. Kokeeseen 5 inkrementtien määrä (TD1) nelinkertaistettiin edellisestä kokeesta erotuskyvyn parantamiseksi.



Kuva 38. Neljännen ja viidennen TOCSY-spektrien eroja kahdella kemiallisen siirtymän alueella. Viidenteen kokeeseen TD1-parametriarvo nelinkertaistettiin.

Verrattaessa kokeita 4 ja 5 toisiinsa nähdään, kuinka pisteiden määrän kasvattaminen epäsuorassa dimensiossa kavensi signaaleja epäsuorassa dimensiossa. Käytännössä pistemäärän kasvattamista ei voida jatkaa loputtomiin, koska koe tulee liian pitkäksi.

Huomattiin, että SI1- ja SI2-parametrien (prosessoidun spektrin resoluutiot epäsuorassa ja suorassa dimensiossa) ennen kovarianssimuunnosta kannatti pitää vähintään 4096-arvoisina. Jos resoluutio oli tätä huonompi ennen kovarianssimuunnosta, se saattoi sulauttaa irtauttamattoman dimension signaaleja yhteen, mikä johti huonoon kovarianssimuunnettuun spektriin. Todettiin koe ja kovarianssimuunnos kaikin puolin toimiviksi.

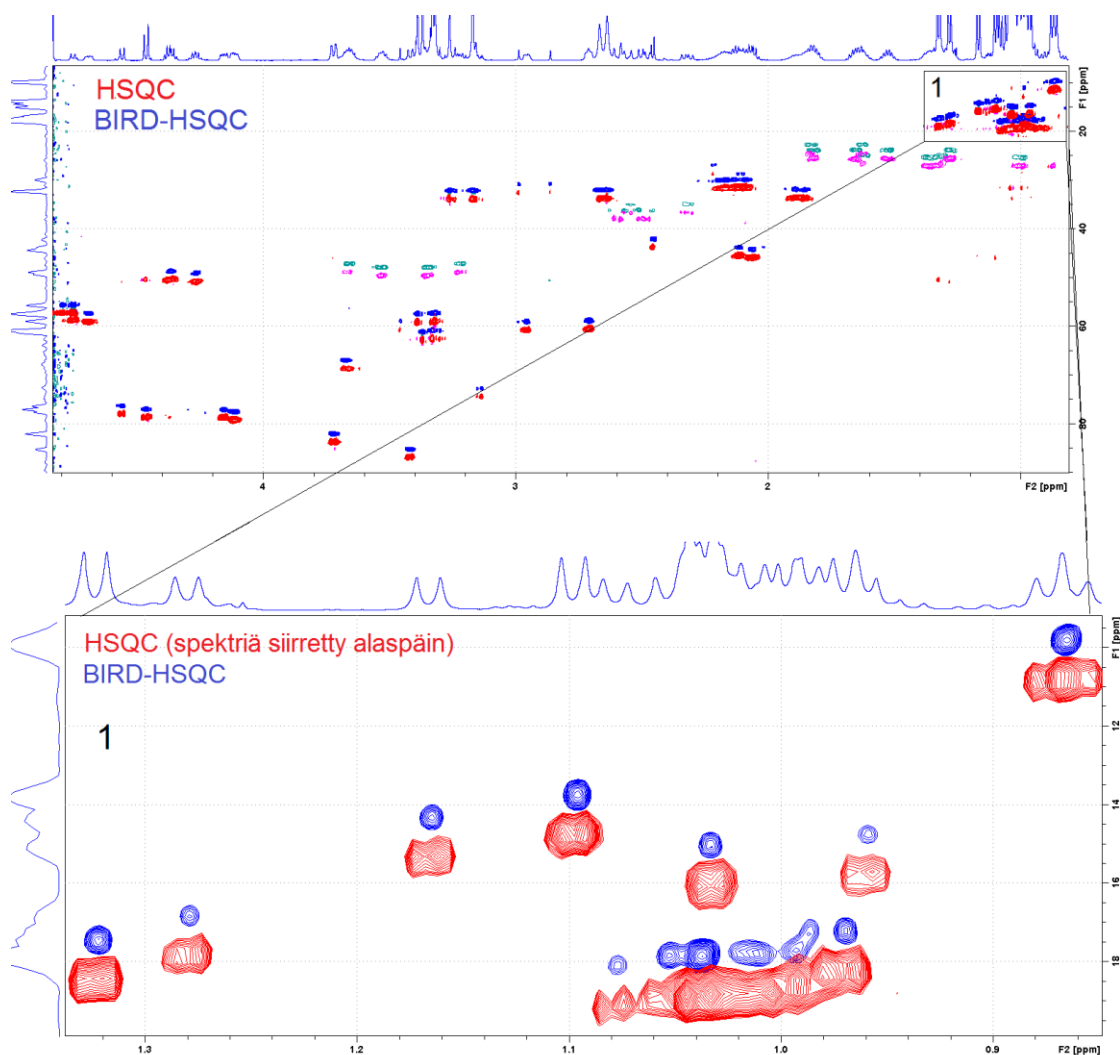
5.3 BIRD-HSQC

Pulssisarjana käytettiin *hsqcedetgpsisp2.3_bbhd*-pulssisarjaa (edHSQC, metyleeniprotonit eroteltu; BIRD-irtautus, keräys reaaliajassa). Taulukossa 2 on kokeissa käytetyt parametrit HSQC:lle ja BIRD-HSQC:lle. Näytteestä ajettiin ensin HSQC-spektri, jonka perusteella BIRD-HSQC:ssa protonikanavan ja hiilikanavan lähettimen paikat [O(13C) ja O(1H)] muutettiin signaalialueen keskelle ja spektrinleveyksiä (SWH1 ja SWH2) pienennettiin. BIRD-irtautuselementti ei huononna HSQC-kokeen herkkyyttä, joten toistojen määrä voitiin pitää neljässä.

Taulukko 6. HSQC ja BIRD-HSQC ajoparametrit.

	NS	TD1	TD2	SWH1	SWH2	IN_F	AQ1	AQ2	DW	O(13C), ppm	O(1H), ppm	SI1	SI2
HSQC	4	256	2048	30171	7194	33,14	0,004	0,142	4	95	4,7	512	2048
BIRD-HSQC	4	256	2048	22628	4500	44,19	0,005	0,227	111,1	70	4,7	1024	8192

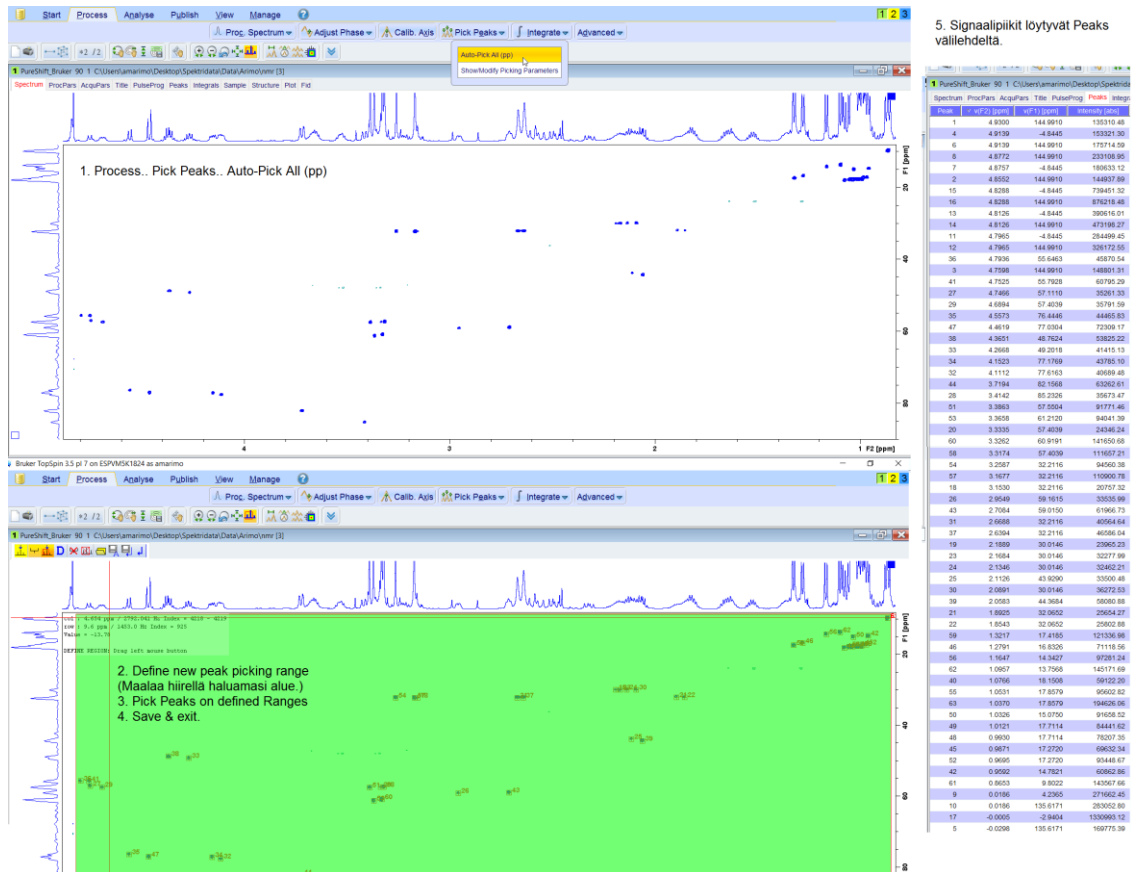
Kuvassa 39 on BIRD-HSQC- ja HSQC-ajojen spektrit. Irtauttamaton HSQC-spektriä on siirretty kuvassa alaspäin, jotta irtautuksen vaikutus nähdään. Irtautetuista signaaleista nähdään yksiselitteiset kemialliset siirtymät. Vihreät ja violetit signaalit ovat metyleeniryhmän protonisignaaleja. F₂-dimensiossa projektiona on irtauttamaton protonispektri.



Kuva 39. HSQC- ja BIRD-HSQC-ajojen spektrit ja suurennos alueelta δ_{1H} 0,84 - 1,34 ppm; δ_{13C} 9,5 - 20 ppm. HSQC-spektriä on siirretty alaspäin, jotta irtautuksen vaikutus nähdään. Vihreät ja violetit signaalit ovat metyleeniryhmän protonisignaaleja. F₂-dimension projektiona on irtauttamaton protonispektri.

Kuten kuvasta 39 nähdään, irtaus toimii, kuten pitääkin. Todettiin sekvenssi muutenkin toimivaksi. Sillä saadaan metyyli- ja metiiniyryhmien protonikytkennät irtautettua. Geminaaleja protoneja se ei irtauta.

Irtautettua spektriä kokeiltiin TopSpinin automaattisen piikinpiminta -toiminnon (Peak Picking) kanssa (kuva 40).



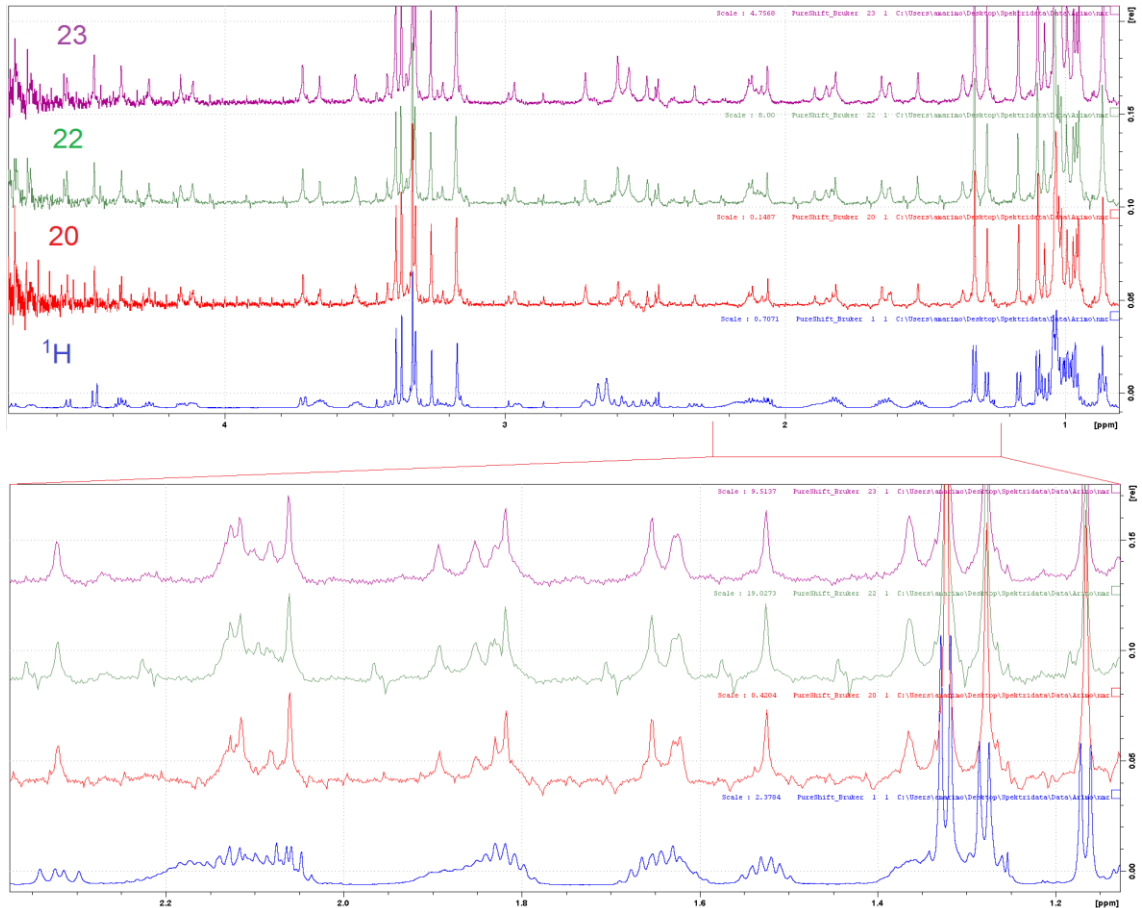
Kuva 40. Peak Picking -ominaisuuden käyttö BIRD-HSQC-spektrin kanssa TopSpin-ohjelmistolla.

Sekin toimii toivotusti. Normaalista HSQC:stä niitä ei voi poimia, koska jokaisella signaalilla on useita huippuja, mutta pure shiftissä näin ei ole ja kullekin signaalille saadaan automaattisesti yksiselitteiset arvot.

6 Tulosten käsittely ja tarkastelu

6.1 1d psyche-¹H

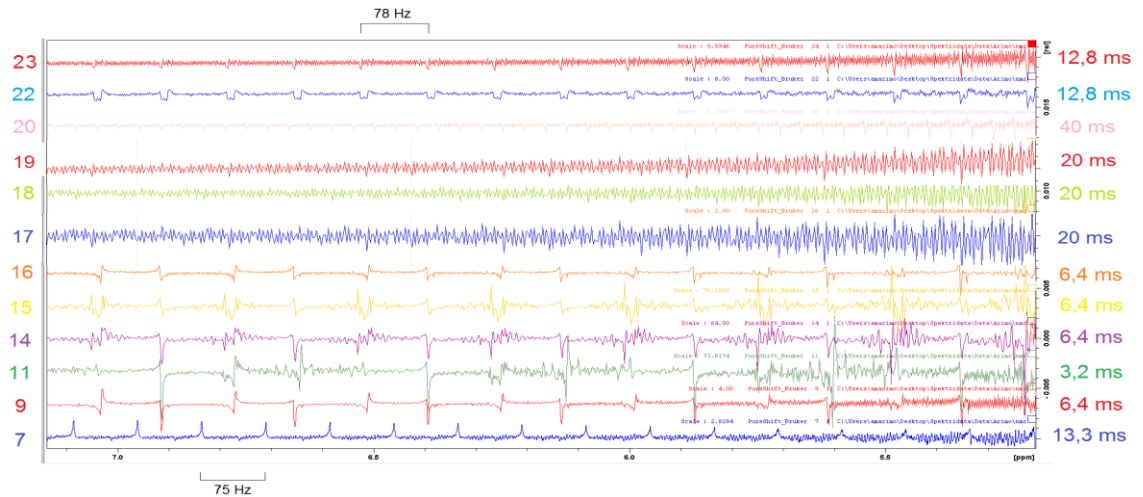
Tuloksissa on käsitelty Brukerin pulssisarjalla saatuja tuloksia. Kuvassa 41 on kolme psyche-¹H-spektriä ja irtauttamaton ¹H-spektri sekä suurennos alueesta δ 0,75 - 1,9 ppm.



Kuva 41. Psyche-¹H-spektrit 23, 22, 20 sekä ¹H-spektri (Suurennos δ 0,75 - 1,9 ppm).

Kuten kuvasta 41 nähdään, kaikkien valittujen psyche-¹H-spektrien erotuskyky on selvästi ¹H-spektriä parempi. Keskinäisten pure shift -spektrien eroiksi muodostui sivupiikkien eri suuruudet ja pohjaviivan kohina. Parhaiden pure shift -spektrien 23, 24 ja 25 välillä ei ollut juuri eroa, mikä johtuu niiden hyvin samanlaisista parametriarvoista.

Alla (Kuva 42) on vertailtu sivupiikkejä ja taustakohinaa kemiallisella siirtymällä δ 5,3 - 7,1 ppm. Alue on valittu siten, ettei sillä ole NMR-signaaleja. Eri pituisten ajojen intensiteetit on pyritty asettamaan samaksi vertaamalla TSP-signaalien intensiteettejä. Sivupiikkejä näkyi teorian mukaisesti taajuuksilla, jotka vastasivat kunkin ajon blokin keston käänteislukua.



Kuva 42. Spektrien sivupiikkejä sekä kohinaa. Signaaleja syntyi taajuudella, joka vastasi kokeen blokin keston käänteislukua (yksi jaettuna DELTA2). Kohina oli suurta kokeissa 17 - 19. Spektrien oikealla puolella on merkitty blokin kesto.

Ylimääräisiä sivupiikkejä piti syntyä vain signaalien ympärille, mutta niitä tuli koko spektrialueelle, etenkin spektri-ikkunan laidoille. Syy tälle ei selvinnyt, mutta se voitiin helposti kiertää kasvattamalla spektri-ikkunan kokoa (SWH2). Tiettyjen kokeiden (9 ja 14 - 16) ominaisena piirteenä oli (teorian mukaan) kaksi kertaa liian tiheästi esiintyvät sivupiikit. Taulukosta 7 nähdään, että näiden kokeiden inkrementtien määrät (TD1-arvot) ovat suuret. Kokeessa 11 inkrementoidaan myös paljon, mutta se tekee poikkeuksen edellisiin, että sivupiikit esiintyvät lasketulla taajuudella (blokin keston käänteisluku). Voitaan johtaa, että optimitulokseen pääsee vähemmillä inkrementteillä. Spektrin erotuskyky oli hyvä vielä 32 inkrementillä.

Ajoissa 17, 18 ja 19 kohina oli niin suurta, että mahdolliset sivupiikitkin peittyivät. Näiden kokeiden parametreista löydettäisiin muuten hyvin kaikista muista kokeista eroavia parametreja (jolloin kohinan syytä voitaisiin pohtia parametrien kautta), ellei olisi koetta 20, joka on L31-parametria (ja blokin kokoa) lukuun ottamatta identtinen kokeeseen 19, eikä siinä oleva kohina ole mitenkään suurta. Työn kannalta tällä ei ollut väliä, sillä parametreja saatiin kokeiltua sen verran, että kohinasta päästiin eroon.

Huomionarvoista on ehkä, että alle 10 ms (eli alle suositun 10 - 20 millisekunnin) blokit muodostivat sivupiikkejä vastakkaisissa vaiheissa. J-kytketyminen on tämän kokoisilla blokeilla pientä, mutta lyhyt blokki ilmeisesti sotkee pulssisarjaa jotenkin muutoin, jolloin jotain muuta viivettä pitäisi tällaisissa ajoissa kasvattaa. Vaikuttaisi, että suositusarvon alittaminen ei ole suositeltavaa, varsinkaan kun sille ei vaikuta olevan mitään edellytyksiä. Hyviä tuloksia saavutettiin 12,8 millisekunnin pituisilla blokeilla.

Taulukossa 7 on taulukoitu Brukerin psyche-¹H-kokeiden parametrit ja alla johtopäätökset, mitkä parametrit osoittautuivat tärkeiksi ja mitkä toisarvoisiksi pure shift -mittauksissa Brukerin reset_psyche_1d-pulssisarjan perusteella. Koe 25 todettiin parhaaksi. Tosiasiaassa se vastasi aikalailla ajoja 23 ja 24 ja sen toistojen määrä voitaisiin pudottaa 32:een ilman erotuskyvyn heikkenemistä ajon nopeuttamiseksi. Liitteessä 1 on verrattu kokeen 23 psyche-spektriä J-eroteltuun spektriin. J-eroteltu spektri on pure shift -¹H-spektriin verrattavissa oleva spektri, jossa lopputuloksena on yksiulotteinen spektri, jossa protonien väliset kytketykset on poistettu. Pulssisarjaa ei saatu optimoitua sen tasoiseksi.

Taulukko 7. Brukerin psyche-¹H kokeiden parametrit. Kokeen 25 parametrit todettiin parhaiksi.

Koe #	7	9	11	14	15	16	17	18	19	20	22	23	24	25 PARAS
NS	64	64	4	4	4	128	64	512	512	512	32	32	256	256
TD1	64	64	128	64	64	64	16	16	16	16	32	32	32	32
TD2	65536	1024	1024	1024	1024	1024	4096	4096	4096	4096	1024	1024	1024	1024
SWH1(Hz)	86	5000	5000	156.250	156.250	50	50	50	50	50	50	50	50	50
SWH2(Hz)	9014	5000	5000	5000	5000	5000	15000	15000	15000	15000	5000	10000	10000	10000
IN_F(μs)	11670	200	200	6400	6400	20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000
AQ1(sec)	0.3734	0.0064	0.0128	0.2048	0.2048	0.640	0.160	0.160	0.160	0.160	0.320	0.320	0.320	0.320
AQ2(sec)	3.6350	0.1024	0.1024	0.1024	0.1024	0.1024	0.1365	0.1365	0.1365	0.1365	0.1024	0.0512	0.0512	0.0512
DW (μs)	55.467	100	100	100	100	100	33.33	33.33	33.33	33.33	100	50	50	50
d16 (μs)	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0001	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002
d1(sec)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
cnst60(Hz)	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000
cnst61	20°	20°	20°	20°	20°	20°	20°	20°	40°	20°	20°	20°	20°	20°
I30	1	2	2	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
I31	120	32	16	32	32	32	300	300	300	600	64	128	128	128
DELTA2	13.3 ms	6.4 ms	3.2 ms	6.4 ms	6.4 ms	6.4 ms	20 ms	20 ms	20 ms	40 ms	12.8 ms	12.8 ms	12.8 ms	12.8 ms
de(μs)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	20	20	10
gpz0	2 %	2 %	2 %	2 %	2 %	2 %	2 %	2 %	2 %	2 %	2 %	2 %	2 %	2 %
DIGMOD	baseopt	baseopt	baseopt	baseopt	baseopt	baseopt	baseopt	baseopt	baseopt	baseopt	baseopt	baseopt	digital	baseopt

- NS: Toistojen määrällä ei ollut vaikutusta sivupiikkeihin. 32 ja 512 toiston välillä ei ollut havaittavaa eroa.
- TD1: Inkrementtien määrä vaikutti pure shift -spektrin erottelukykyyn. Erottelukyky ei tuntunut kärsivän suuresti pienemmilläkään määrillä. Vaikuttaa useisiin muihin parametriarvoihin, kuten keräysaikaan. 32 todettiin hyväksi arvoksi.
- TD2: Ei osoittautunut tärkeäksi parametriksi. Oleellista on, että blokin pituus on kerättyä blokkia pienempi. Aivan ylisuuri arvo (koe 7) saattaa sotkea koetta.
- SWH1: Osoittautui tärkeäksi parametriksi. Kaikissa onnistuneissa kokeissa käytettiin arvoa 50. Vaikuttaa useisiin muihin parametriarvoihin, kuten IN_F-arvoon. SWH2- ja SWH1-parametrien suhde suositeltiin joissain pure shift -julkaisuissa (viittasivat usein ZS-kokeisiin, missä tämä on tärkeämpää) pitämään kokonaislukuna. Se tuntui toimivan psycheissäkin.
- SWH2: Osoittautui tärkeäksi parametriksi. Suuremmalla spektrinleveydellä päästiin spektrin reunoilla olevista signaaleista eroon merkitsevällä alueella. Suositeltu arvo 10 kHz protonimittauksissa.
- IN_F: SWH1:n käänteisluku. Onnistuneissa kokeissa arvona oli 20000 (suuri arvo, jolloin SWH1 sai pienen arvon).
- AQ1: Arvo riippuu muista parametreista, kuten TD1 ja SWH1. Ei koskettu.
- AQ2: Arvo riippuu muista parametreista. AQ2 on dw:n ja TD2 tulo. Ei koskettu.
- dw: Tärkeä parametri, joka vaikuttaa blokin pituuteen. Suositettiin L31-parametrin muuttamista blokin kokoon vaikuttaessa.
- d16: Ei osoittautunut tärkeäksi parametriksi. Vaikutus ajon keston lyhentämiseen hyvin pieni. 0,0002 mikrosekuntia todettiin hyväksi arvoksi.
- cnst60: Pidettiin julkaisuiden suosittelemassa arvossa 10 kHz. Eri arvojen vaikutusta ei tutkittu.
- cnst61: Osoittautui tärkeäksi parametriksi. Suurempi β -kulma huononsi erottelukykyä. Sen kasvattaminen 40°:een ei kannattanut. Paras arvo saatiin 20°:n kulmalla, joka on suositusten (10 - 30°:n välissä).
- L30: Ei osoittautunut tärkeäksi parametriksi pure shiftin kannalta. Liian pienellä arvolla oli kuitenkin heikentävä vaikutus spektrin laatuun. Muutettiin arvoon L30 = 4, mikä osoittautui paremmaksi määräksi kuin 2.
- L31: Tärkeä parametri, jota vaihtamalla voidaan vaikuttaa blokin pituuteen yhdessä dw-parametrin kanssa. Parhaat spektrit saavutettiin parametriarvolla 128 (ja dw = 50), mikä on yli Brukerin tyyppillisen suosituksen (1 - 64). Suurellakin arvolla (600) saatiin kohtuullinen pure shift -spektri. Pulssisarjan koodia tarkasteltaessa löytyy rivi " $SWi=1000000/(131*2*dw)$ ", ja sen ohjeistus, että SWi-arvon ("*sweep width in the pseudo dimension*") tulisi olla 2 - 3-kertainen näytteen leveimpään multiplettiin nähden.
- DELTA2: Brukerin käyttämä parametri blokin pituudesta, joka saa arvonsa dw- ja L31-parametreista. Parhaat tulokset saatiin, kun DELTA2 oli 10 - 20 ms. Tätä pienemmillä arvoilla spektrit olivat huonoja. Suositusarvon ylittyminen ei osoittautunut yhtä kriittiseksi.
- de: Ei osoittautunut tärkeäksi parametriksi.

- gpz0: Ei muutettu suositellusta. Julkaisun mukaan optimoitavissa [7].
- DIGMOD: Ei osoittautunut tärkeäksi parametrikseksi. Baseopt tai digital.

Yksiulotteisen psyche-¹H-menetelmän pystytys tuotti pulssisarjoista eniten päänvaivaa, vaikka julkaisujen mukaan psyche-irtautuksen käyttö on yksinkertaista. Pulssisarja kuitenkin tarjosi paljon optimointimahdollisuuksia. Oletettavasti psyche-¹H-pulssisarjoista kehitetään tulevaisuudessa pelkistetympiä versioita, jolloin vaaditaan vähemmän esitietoa muun muassa sivupiikkien poistamisista.

6.2 Psyche-TOCSY

Psyche-TOCSY-pulssisarja ei tarjonnut samalla tavalla optimointimahdollisuuksia kuin psyche-¹H. Pulssisarjassa SWH1- ja SWH2-arvot tuli olla riittävän suuret, jotta spektriin ei syntynyt vaihevirhettä. Verrattaessa BIRD-HSQC-, psyche-¹H- ja psyche-TOCSY-spektrien protonien kemiallisia siirtymiä todettiin, että ne vastaavat toisiaan. Pure shift -parametreja (chirp-pulssin pyyhkäisyalue ja β -kulma) ei muutettu. Ennen kovarianssimuunnosta spektrin molemmat prosessointiresoluutioarvot (SI) kannatti vaihtaa vähintään 4096:ksi.

Pure shift -TOCSY-kokeella saavutettiin huomattavaa parannusta erottelukyvyyssä verrattuna irtauttamattomaan TOCSY-spektriin. Sen koeajat ovat kuitenkin normaalia TOCSY-koetta pidemmät, joten sen käyttö rajoittuu yksittäistapauksiin. Pulssisarjan keräysparametrien yksinkertaisuus (tai vähyys) mahdollistaa sen rutiininomaisen käytön pitkänkin tauon jälkeen. Kovarianssimuunnos toimii hyvin toisen dimension irtaututtamisessa.

6.3 BIRD-HSQC

BIRD-HSQC-menetelmä saatiin toimimaan heti. BIRD-elementin lisääminen kokeeseen ei monimutkaista kokeen ajamista. Pulssisarjan koodia tarkasteltaessa löytyy useita pure shift -parametreja, joihin ei ole tarkoitus päästä vaikuttamaan. BIRD-HSQC-pulssisarjan käyttö on yksinkertaista, eivätkä sen koeajat eroa normaalista HSQC:sta. Sen kanssa voidaan hyvin helposti käyttää TopSpinin automaattista piikinpoimintaa, joilla saadaan hyvin yksiselitteisiä arvoja ¹H- ja ¹³C-ydinten kemiallisille siirtymille.

7 Yhteenveto

Tavoitteena oli pure shift -parametrien optimointi psyche-¹H-, psyche-TOCSY- ja BIRD-HSQC-mittauksille, sekä oppia, mikä pure shift -kokeissa on tärkeää tai toisarvoista. Pure shift -kokeista ei ollut muutamaa kokeilua lukuun ottamatta aiempaa kokemusta. Yksiulotteisia irtautettuja spektrejä on ollut mahdollista saada J-resolvoiduilla mittauksilla ja yksiulotteisen pure shift -protonikokeen tavoitteena oli ylittää sillä saavutettu erotelutarkkuus. Kaksiulotteisille pure shift -kokeille ei ole olemassa verrattavissa olevaa koejärjestelyä. Irtautusmenetelmät ja pulssisarjat valittiin ohjaajani Hannu Maaheimon kanssa niiden mielenkiintoisuuden perusteella. Psyche-¹H-mittauksessa optimoitiin Brukerin (reset_psyche_1d) ja Manchesterin yliopiston (UoM_1d_if_psyche_ts4x) pulssisarjoja. Psyche-TOCSY-mittauksessa optimoitiin Brukerin dipsi2gpshzs_psyche-pulssisarjaa ja BIRD-HSQC:ssa hsqcedetgpsisp2.3_bbhd-pulssisarjaa.

Kokeita ajettiin yksi kerrallaan siten, että ajojen välissä tutkittiin saatua spektriä. Kaikki pulssisarjat oli ohjelmoitu niin hyvin, ettei irtautus itsessään osoittautunut missään vaiheessa ongelmaksi. Sen sijaan ongelmiksi koituivat (etenkin psyche-¹H:n kohdalla) ylimääräiset sivupiikkisignaalit. Niistä pyrittiin pääsemään eroon vaihtamalla yhtä tai useampaa parametria. Lisäksi kohinaa pyrittiin vähentämään eri parametriasetuksilla. Parametrien kanssa täytyi usein tehdä kompromisseja herkkyden ja erotuskyvyn välillä. Tällöin hyödytti työlle viitekehukseksi asetettu tavoite saada hyvän erotuskyvyn spektrejä herkkyydenkin kustannuksella.

Psyche-¹H-pulssisarjalle ei löydetty pulssiparametreja, joilla oltaisiin päästy J-erotellun kokeen tasolle (Liite 1), joten sitä ei kannata ottaa suoraan käyttöön. Kattavien kokeiden perusteella syntyi pulssisarjan parametrien esittely, jota voidaan soveltaa jatkossa pulssisarjan parametrien optimoinnissa, ja kenties muillekin pure shift -pulssisarjoille.

Psyche-TOCSY- ja BIRD-HSQC-kokeet saatiin otettua käyttöön ja optimoitua onnistuneesti. Kun BIRD-HSQC-koe oli saatu toimimaan, sitä kokeiltiin erään trisakkaridin analysoimiseen ja piikkien poiminnalla saatiin hyvin helposti laadittua taulukko ¹H- ja ¹³C-ydinten kemiallisista siirtymistä. Molempia pulssisarjoja tullaan käyttämään apuna jatkossa monimutkaisten näytteiden analysoinnissa.

Jatkossa mittauksissa voitaisiin kokeilla esimerkiksi niin sanottua non-uniform sampling -tekniikkaa, joka vähentää koeaikoja. UoM-pulssisarjaa voitaisiin optimoida tämän työn

perusteella. Muista pure shift -tekniikoista viipaleselektiivinen Zangger-Sterk-irtautustekniikka on mielenkiintoinen, koska sen yhdistelmät voidaan toteuttaa nopeina reaaliaikaisina koejärjestelyinä toisin kuin psyche-kokeet. ZS-irtautuksessa on kuitenkin omat haasteensa ja huonot puolensa, eikä se ole täydellisesti optimoidun psyche-kokeen veroinen selektiivisyydessä eikä lopulta herkkyydessäkään. Se olisi kuitenkin paljon tutkittumpi irtausmenetelmä (tutkitaan edelleen) kuin suhteellisen uusi psyche. Yksiulotteiset reaaliaikaiset pure shift -BIRD-kokeet tarjoaisivat yksinkertaisen pure shift -koejärjestelyn. BIRD-HSQC:sta on myös kehitetty hieman monimutkaisempia pulssisarjoja, jotka poistavat myös geminaalit kytkennät.

Lähteet

- 1 Günther, Harald. 1995. NMR Spectroscopy: Basic principles, concepts, and applications in chemistry. 2nd ed. Est Sussex: John Wiley & Sons Ltd.
- 2 Zangger, Klaus. 2015. Pure shift NMR. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 86-87, s. 1 - 20.
- 3 Friebolin, Horst. 2005. Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy. 4th ed. Weinheim: WILEY-VCH.
- 4 Keeler, James. 2002. Understanding NMR Spectroscopy. Verkkoaineisto. <http://www-keeler.ch.cam.ac.uk/lectures/>. Luettu 28.8.2018.
- 5 Castañar, Laura. 2017. Pure shift ^1H NMR: what is next?. Magn. Reson. Chem., 55, s. 47 - 53.
- 6 Koivisto, Jari. KE4.5110 *Käytännön NMR-spektroskopia*. Verkkoaineisto. <https://mycourses.aalto.fi/pluginfile.php/202224/mod_resource/content/1/KE-4.5510_2016.pdf/>. Luettu 22.8.2018.
- 7 Görling, Benjamin; Moreno, Aitor & Bermel, Wolfgang. 2017. Homonuclear Broadband Decoupling via PSYCHE Element. Verkkoaineisto. <https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/MagneticResonance/NMR/brochures/Homonuclear-Broadband-Decoupling.pdf/>. Luettu 29.8.2018.
- 8 Foroozandeh, Mohammadali; Morris, Gareth & Nilsson, Mathias. 2018. PSYCHE Pure Shift NMR Spectroscopy. Chem. Eur. J. 10.1002/chem.201800524.
- 9 Castañar, Laura; Parella Teodor. 2015. Broadband ^1H homodecoupled NMR experiments: recent developments methods and applications. Magn. Reson. Chem. 53, s. 399 - 426.
- 10 Zangger, Klaus & Meyer, N. Helge. 2014. Boosting the Resolution of ^1H NMR Spectra by Homonuclear Broadband Decoupling. ChemPhysChem. 15, s. 49 - 55.
- 11 Kaltschnee, L.; Kolmer, A.; Timári, I.; Schmidts, V.; Adams, R. W.; Nilsson, M.; Kövér, K. E.; Morris, G. A. & Tiele, C. M.. 2014. "Perfecting" pure shift HSQC: full homodecoupling for accurate and precise determination of heteronuclear coupling. Chem. Commun. 50, s. 15702 - 15705.
- 12 Aguilar, Juan A.; Nilsson, Mathias & Morris, Gareth A.. 2011. Simple Proton Spectra from Complex Spin Systems: Pure Shift NMR Spectroscopy Using BIRD. Ange. Chem - Int. Ed. 50, s. 9716 - 9717.

- 13 Kiraly, Peter; Nilsson, Mathias & Morris, Gareth A.. 2018. Semi-real-time acquisition for fast pure shift NMR at maximum resolution. *Magn. Reson. Chem.* 293, s. 19 - 27.
- 14 Foroozandeh, Mohammadali; Adams, Ralph W.; Nilsson, Mathias & Morris, Gareth A.. 2014. Ultrahigh-Resolution Total Correlation NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 136 (34), s. 11867 - 11869.
- 15 Moutzouri, Pinelopi; Chen, Yingxian; Foroozander, Mohammadali; Kiraly, Peter; Phillips, Andrew R.; Coombes, Steven R.; Nilsson, Mathias & Morris, Gareth A.. 2017. Ultraclean pure shift NMR. *Chem. Commun.* 53, s. 10188 - 10191.
- 16 Fredi, André; Nolis, Pau; Cobas, Carlos; Martin, Gary E. & Parella, Teodor. 2016. Exploring the use of Generalized Indirect Covariance to reconstruct pure shift NMR spectra: Current Pros and Cons. *Magn. Reson. Chem.* 266, s. 16 - 22.
- 17 Mauhart, Johannes; Glanzer, Simon; Sakhaii, Peyman; Bermel, Wolfgang & Zangger, Klaus. 2015. Faster and cleaner real-time pure shift NMR experiments. *Magn. Reson. Chem.* 259, s. 207 - 215.
- 18 Kovacs, Helena; Moskau, Detlef & Spraul, Manfred. 2005. Cryogenically cooled probes—a leap in NMR technology. *Magn. Reson. Chem.* 46, s. 131 - 155.
- 19 MMAE molekyylikuva <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imagefly.cgi?cid=11542188&width=500&height=500/>>. Luettu 20.8.2018.
- 20 Nilsson, Mathias, *Practical Implementations*. 2017. Verkkoaineisto. <https://www.nmr.chemistry.manchester.ac.uk/sites/default/files/PureShiftWorkshop/Presentations/6_Implementation.pdf/>. Luettu 31.8.2018.
- 21 Aguilar, Juan A.; Faulkner, Stephen; Nilsson, Mathias & Morris, Gareth A.. 2010. Pure Shift ^1H NMR: A Resolution of the Resolution Problem?. 49, s. 3901 - 3903.
- 22 Bruch, Martha D. 1996. *NMR Spectroscopy Techniques*. 2nd ed. Marcel Dekker Inc.
- 23 Etanolin ^1H NMR-spektri. <http://www.hmdb.ca/spectra/nmr_one_d/4985/>. Luettu 21.8.2018.
- 24 Etanolin TOCSY-spektri. <http://www.bmrb.wisc.edu/ftp/pub/bmrb/metabolomics/entry_directories/bmse000297/nmr/set01/spectra/HH_TOCSY.png/>. Luettu 5.9.2018.

Psyche-¹H (ajo 23), J-eroteltu spektri ja irtauttamaton ¹H-spektri

