

NMR operátori gyakorlat II.

TTKML0530

A gyakorlaton bemutatott és használt BRUKER Avance Neo 700 MHz készülék a GINOP-2.3.3-15-2016-00004 projekt keretében, az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával került beszerzésre.



- 2D kísérletek:
 - COSY: spin-spin csatolás, két ^1H között
 - TOCSY: spinrendszer tagjai (^1H -ek)
 - ROESY: térközelségben lévő H-ek (5Å)
 - HSQC: összetartozó ^{13}C - ^1H (egy kötés)

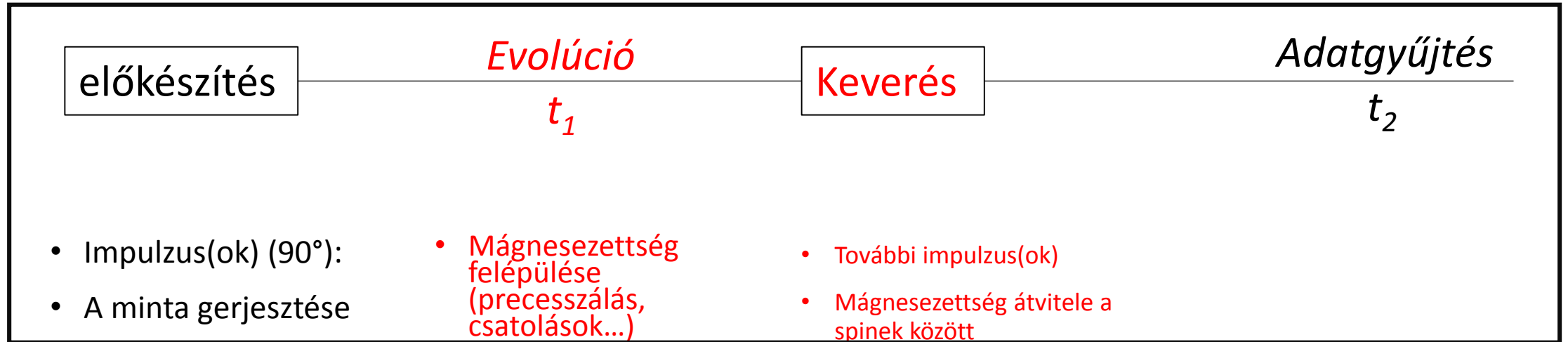
Balesetvédelmi tudnivalók:

- Pacemaker-rel, Fe/Co/Ni/egyéb mágnesezhető implantátummal belépni tilos
- Hitelkártya, belépő kártya, telefon, nem digitális órák: ne hozzuk közel a mágneshez
- Tekercs túlzott felmelegedése: N_2 , He elforr, a levegőt kiszorítja > a labort azonnal el kell hagyni

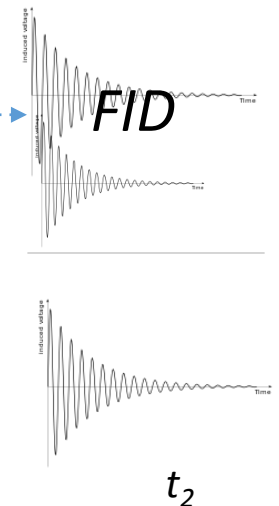
Műszer megóvása:

- Spatula, aprópénz, kulcs, gémkapocs, hullámcsat
- Külsős emberekkel kapcsolatos figyelmeztetések: karbantartók, takarítók, stb.

2D NMR módszerek

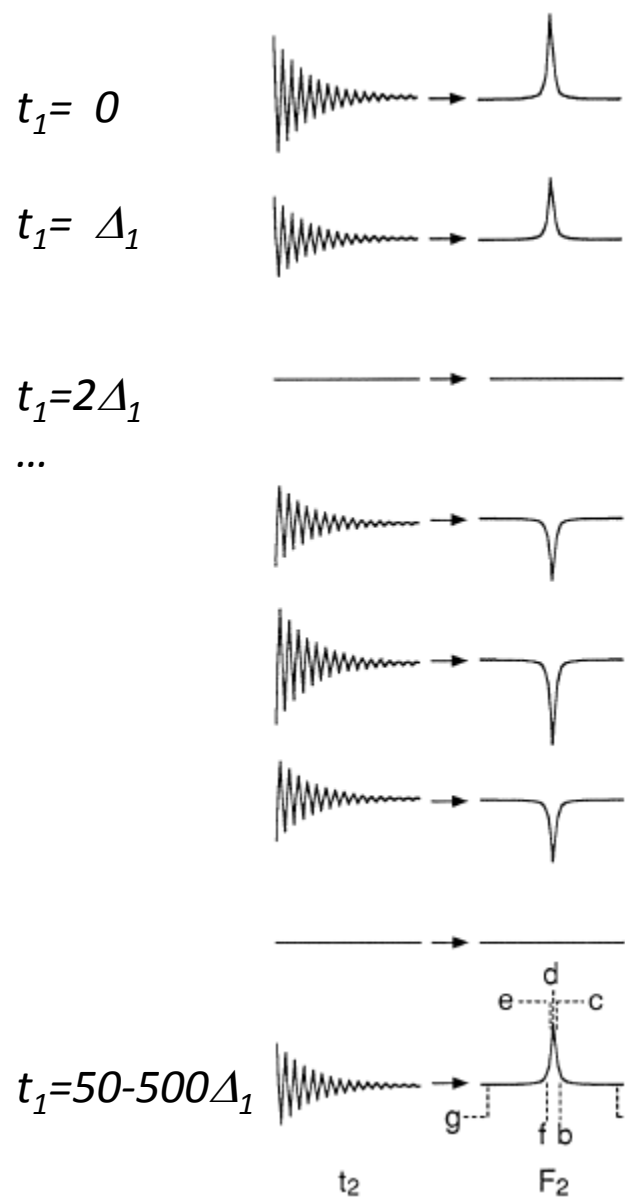


$t_1 = 0$
 $t_1 = \Delta_1$
 $t_1 = 2\Delta_1$
...
 $t_1 = 50-500\Delta_1$

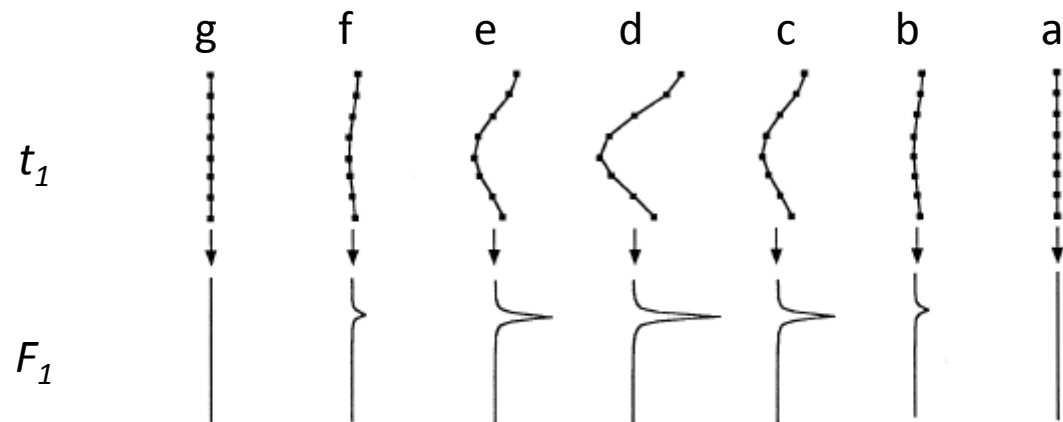


1D spektrumok sorozata

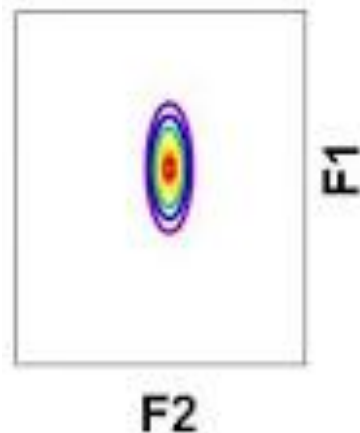
1.) 1D spektrumok Fourier-transzformálása

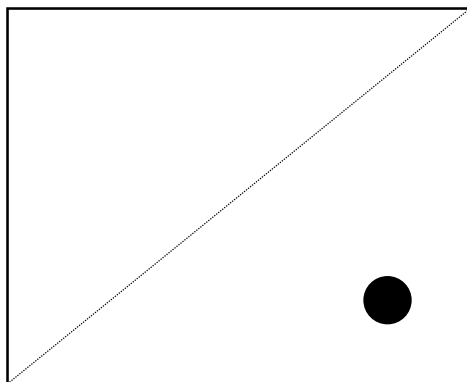


2.) Hogyan változik a spektrum a t_1 függvényében?



3.) Összefésülve F_2 -t és F_1 -et:



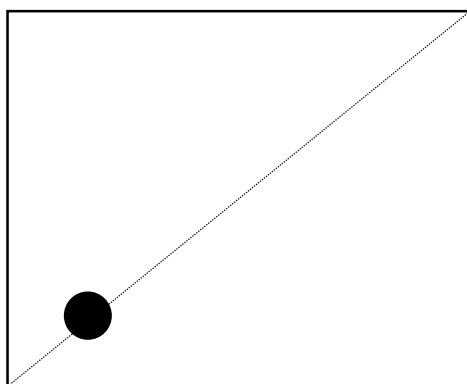


F_2 80

F_1

20

t_1 alatt a jel frekvenciája 20 Hz
 t_2 alatt ugyanez a jel „átalakult” egy 80 Hz frekvenciájú jellé



20 F_2

F_1

20

t_1 és t_2 alatt is ugyanaz a jel frekvenciája (20 Hz)
A keverési periódus nem volt rá hatással

Az NMR-minta

- Minél töményebb: 10-100 mg, 1-10 mM
- Üveg/műanyag cső (műanyag, ha alacsony hőmérsékleten mérünk, fagyás veszélye)
- Deuterált oldószer
- Ne legyen benne szilárd rész (szűrés/centrifugálás), fémkanalat ne használjunk (paramágneses szennyezők)
- Leparafilmezhető/leforrasztható

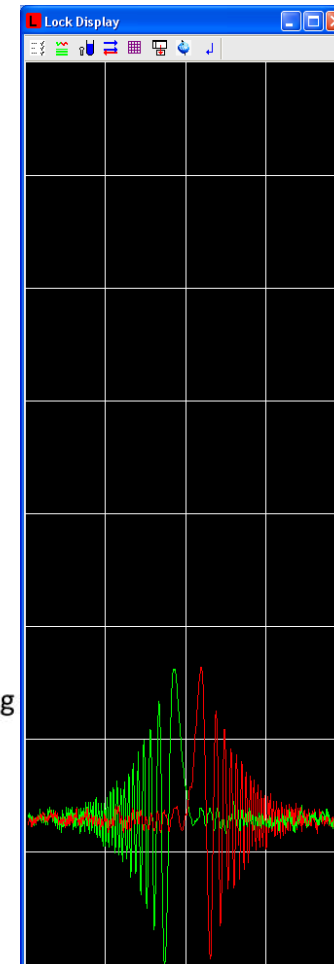
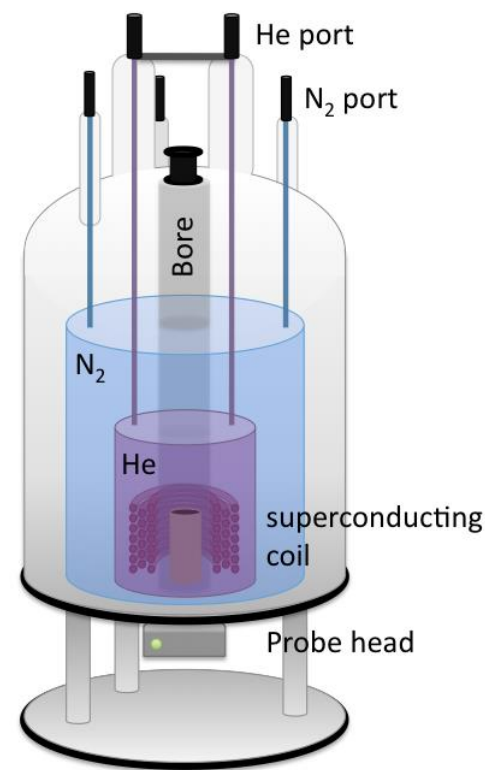
- Turbinába tesszük: szoros illeszkedés
- Minta magasságának beállítása: „2 cm”-nél a cső alja (700 Mhz-es készülék: előre rögzített állásnak megfelelően)
- Csövet letöröljük (különben a mérőfejet összezsírozzuk vagy esetleg nem jó pozícióba kerül a minta)
- A mintát felül (kupak felől) fogjuk
- Minta betétel: Lift On/Off
- Fekete kupakkal lezárjuk az NMR-t
- 2D méréseknél a mintát nem forgatjuk
- Hőmérséklet változtatása: min. 20 perc várakozás – termikus egyensúly
 - Hőmérséklet-szabályozó bekapcsolása, > edte, Target temperature: xxx K (Kelvinben)



1. Lockolás = mágneses tér (B_0) stabilizálása

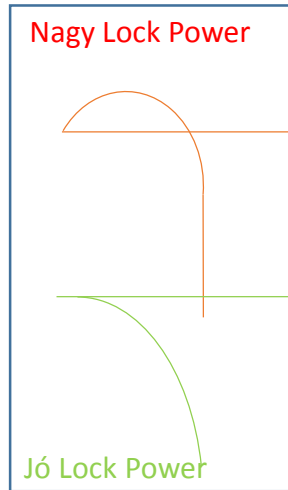
- Szupravezető mágnesből „szökdösnek” az elektronok (0K helyett 4K)
- 500 MHz térerősségnél ~ 10 Hz/óra drift (más frekvenciánál jön ugyanaz a jel)
- ^2D csatorna feladata: oldószer ^2D jelét detektáljuk, frekvenciáját rögzítjük (lock = „zár”)
- Lockolást követően a mérőfejben biz. tekercsek az elveszített mágneses térerősséget kompenzálják folyamatosan \rightarrow állandó B_0

- Automata lock: > lockdisp, > lock, Oldószer kiválasztása
- Lock ablak: ^2D -spektrum; pásztázó jel vagy abszorpciós-diszperziós jel (frekvencia)
- Frekvencia, fázis további állítása (ez már a drift következménye) :
 - Lock-ból kivesszük (Lock on/off)
 - Field: középre (nullpontra) állítjuk a tekerőgombbal, stdby, Lock on
 - Lock Phase: „pásztázó” jel maximálása, stdby



Lockolás = mágneses tér (B_0) stabilizálása – egyéb értékek

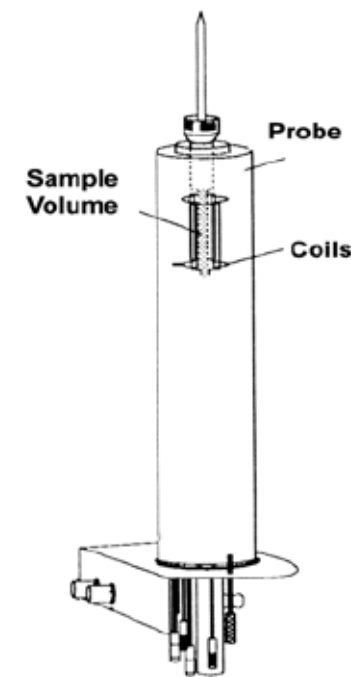
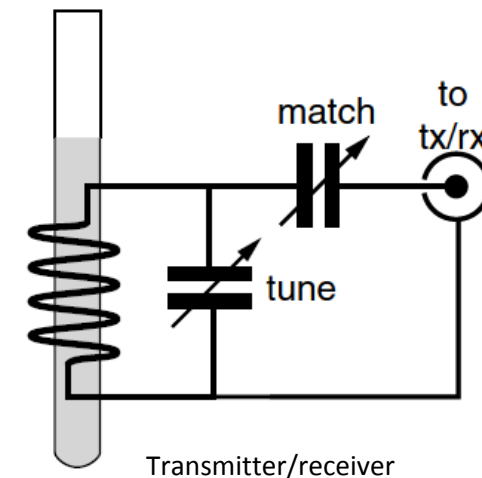
- Lock power = milyen teljesítménnyel gerjesztjük a 2D magokat
 - Ha túl sok energiát közlünk, telítjük a rendszert, a lock jel instabil lesz = jelintenzitás csökken, instabil B_0
 - A Topspin az oldószertáblázatból elvileg az optimálisat állítja be
 - Túl nagy lock power jelei: instabil lock jel, hullámos alapvonal, gradiens kísérletek: →
 - Manuális beállítás:
 - A) verzió: telítésig visszük, majd 8-10 dB-lel csökkentjük az értéket
 - Telítés: LPower növelés hatására a jel csökkenni kezd
 - B) verzió, alapja: a LPower és LGain skálája ugyanaz:
 - 1.) L.Gainnel a felső vonalra állítjuk a jelet.
 - 2.) LPower-en 1 dB-t növelünk. 3.) LockGainen 1 dB-t csökkentünk. Ha kb. ugyanoda tértünk vissza, nem vagyunk még telítésben.
 - 4.) LPower további növelése, LGain csökkentése (+1 dB/-1 dB). Ha nem ugyanoda tértünk vissza, elértünk a telítéshez; ezt az értéket kell tehát csökkenteni min. 6 dB-lel.
 - Nem megy a lockolás: érdemes egy „odaillő” shimfile-t behívni (oldószer, mérőfej, hőmérséklet) [>rsh]
- Lock Gain
 - Megjelenítéshez szükséges (beleférjünk az ablakba)
 - Hosszú mérésnél informatív, ha a lock jel látványosan esett



2. Hangolás =

mérőfej érzékenysége maximális legyen az adott magra

- Mérőfejben
 - rezgőkör = tekercs (gerjeszt+detektál) + kondenzátorok
 - Rezgőkör = áramkör, mely külső energia hatására rezgésbe hozható
 - Kondenzátor = elektromos töltések tárolása
 - Tuning: **rezgőkör frekvenciáját a Larmor-frekvenciára állítjuk** > tekercsben nagyobb áram detektál
 - Matching: teljesítmény átadás maximális legyen legyen a mérőfej, transzmitter és receiver között
 - Transzmitter = jeladó (RF forrás + „gyengítő tekercs” + erősítő)
 - Receiver = „jelfogó” (előerősítő, egyéb erősítők)
 - Kondenzátorok kapacitásait változtatjuk
- 2D-nél minden mintára
- Ionerősség-, oldószerérzékeny
- Tuning/Matching egymástól nem független
- Rosszul hangolt mérőfej: túlságosan hosszú impulzusok kellene a minta gerjesztéséhez

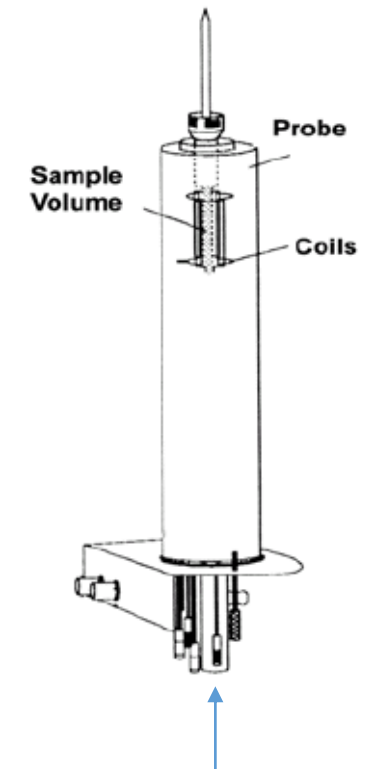
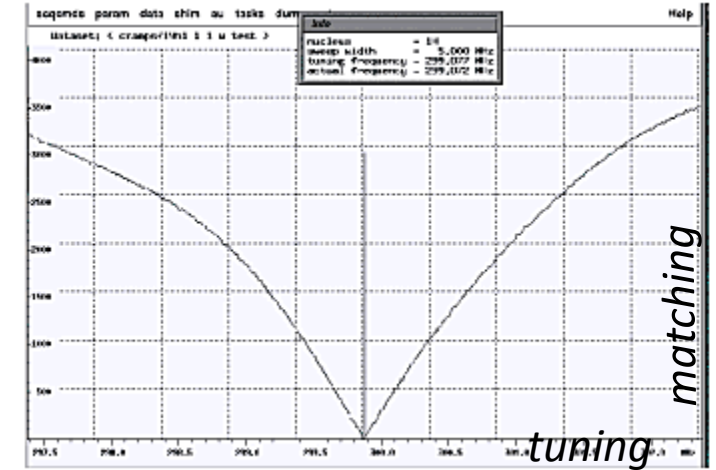


Mérőfej a mintával

Hangolás

mérőfej érzékenysége maximális legyen az adott magra

- 1.) heteromagra (^{13}C , ^{15}N ...), mert az kevésbé érzékeny
 - ^{13}C -file, pl. ^{13}C - ^1H Hsqc behívása
 - >wobb
 - Hangolási „görbe”: x – tuning, y – matching
 - „Lapkák” ellenőrzése: papíron beállított értékek vannak-e
 - Utolsó helyiértéket ÓVATOSAN! tologatjuk
 - > stop
- 2.) H-re
 - ^1H std / cosy, tocsy... behívása
 - > wobb
 - szürke tekerő csavarása, rezes színű hangolóbot
 - Tuning, matching
 - >stop



700 MHz-es készülék: automatikus hangolás – ,atma exact' parancs

3. Shim – mágneses tér (B_0) homogenitása

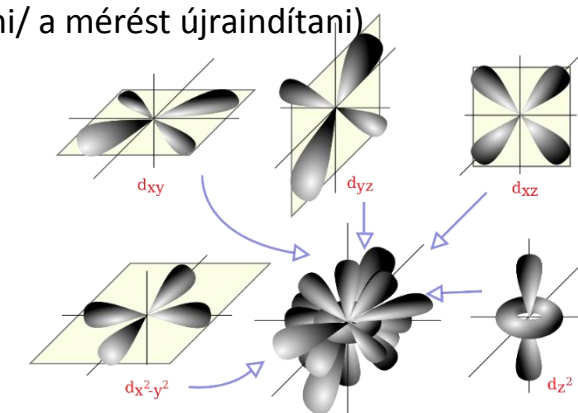
- Lock jel intenzitásának maximálása (ha nem működik: FID/jelalakra shimelünk)
- Ha van már készletünk hasonló mintáról: > rsh
- **1.) z shimek beállítása:**
 - Felső menüből: Spectrometer/shim control/automatic shimming/Start (Report: B_0 std deviation; 0,3 Hz alatt jó*. Tömény minta a topshim nem működik)
 - Vagy: on axis/ $z^1 z^2 z^3 z^2 z^1$
- **2.) xy shimek:**
 - $xz^0 yz^0$ $xz^1 yz^1$ xyz^0 (kis szerves molekulák) $xz^2 yz^2$ xyz (peptidek, szacharidok)
 - És visszafelé is...
- **3.) z shimek ellenőrzése:** on axis/ $z^1 z^2 z^3 z^2 z^1$
- **4.) Lock Phase** maximálása (z shim változása módosíthatja)
- **5.) Lock Gain**-nel a felső vonalra állítani (Ha a lock jel nagyot esik mérés közben, érdemes újrashimmelni/ a mérést újraindítani)
- Ha meg akarjuk őrizni a shimkészletet: > wsh
- Shimtekercsek által keltett kis mágneses mezők alakja \sim H atompályák alakja
- Ha nem sikerül jól shimelni: buborékok eltüntetése a mintából



Mérőfej a mintával

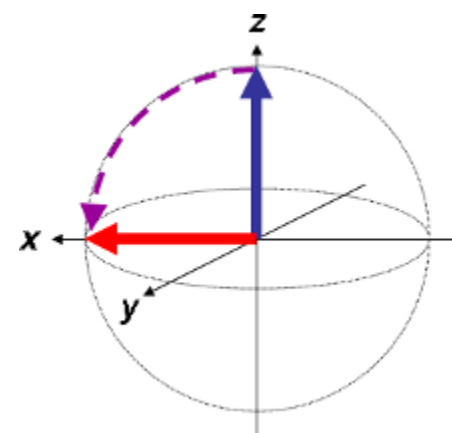
D = shimtekercsek

E = minta (turbinában)

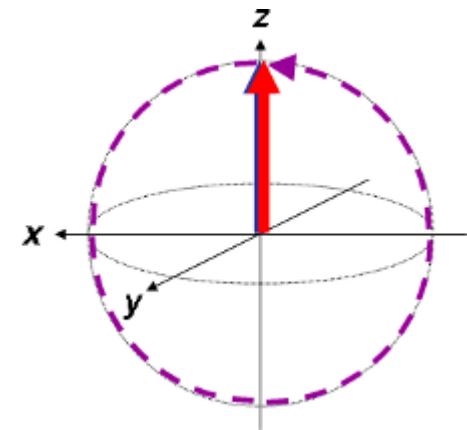


4. Impulzuskalibrálás = 90°-os impulzushossz meghatározása (^1H)

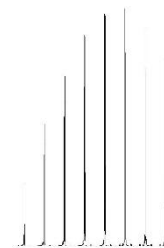
- 2D szekvenciákban: ^1H 90° impulzusok
 - Adott energia közlése
 - Energia = teljesítmény x idő
 - idő (p1) és teljesítmény (p1) meghatározása
 - A 90° kitérítést elérhetem rövid idő alatt, nagy teljesítménnyel vagy hosszú idő alatt kicsi teljesítménnyel
- Heteromagok (^{13}C , ^{15}N ...): nem kell kalibrálni, keveset változik
- ^1H impulzushossz, ideális: 10 μs (9-11 [8-15])
- Keresés módja, p1 változtatása
 - Hol maximális a jel \rightarrow 90° impulzus, de: relax. idő 5x-ét kellene megvárni az újabb kísérlethez
 - Gyorsabb: 360°-os impulzus időtartama



90 fokos impulzus



360 fokos impulzus



4. Impulzuskalibrálás = 90°-os impulzushossz meghatározása (^1H)

- ^1H file behívása, edc
 - 1.) Jó fáziskészlet létrehozásához: 60° impulzussal ^1H spektrum felvétele (NS=1)
 - 60°, 45° ...: a lényeg, hogy ne 90° legyen (így biztosan relaxál; nem telítődik)
 - p1 = (standard, 6,6 dB)
 - p1 ~ 7 us
 - (ha 90°-hoz kb. 10 us tartozik, 60°-hoz $10 \times 60 / 90 = 7$ us, 360°-hoz $10 \times 4 = 40$ us)
 - Rga
 - Receiver gain: összességében milyen mértékben erősítjük a receiver-ben a mintából származó FID-et. Minden mintára beállítandó. Biztonságból érdemes az automata által ajánlott érték felét venni. Csak 1D spektrumoknál használható! Könnyűvízes ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1) mintáknál rg = 1-et állítunk be.
 - D1= 1 v 2 (beállított)
 - Ns 1, ds 0
 - Zg, ft, fáziskorrekción: pk/apk vagy manuálisan
 - lb = 1 Hz (^1H -ra), efp, apk
 - **Ezt a fáziskészletet fogjuk felhasználni a 360°-os impulzushosszal mért spektrumhoz!**
Ne használjunk mostmár apk-t, csak ft/pk-t!



4. Impulzuskalibrálás = 90°-os impulzushossz meghatározása (^1H)

- 2.) 360° impulzussal spektrum felvétele
 - p1 = (standard)
 - p1 = 10x4 = 40 us
 - Zg, ft, pk
- Ha még nem elég hosszú az impulzus, és 360°-nál kisebb a kitérés:
(p1-et növelni kell, következő próba pl. p1 = 41-42 us)
- Ha pont 360°-os:
- Ha „túlment” a 360°-on:
(p1 csökkentése, pl. p1 = 38 us)

Ha p1 = 39,6 us a 360° impulzushossz, akkor a 90° impulzus hossza:
 $p1 = 39,6/4 = 9,90$ us

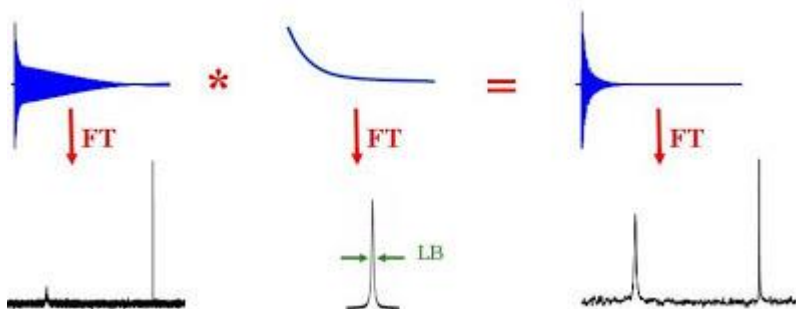


4. Impulzuskalibrálás = 90°-os impulzushossz meghatározása (^1H)

- Ha túl hosszú p_1 ($p_1 > 15 \text{ us}$), nem egységesen gerjeszthetjük a spektrális tartományt
- Rövidebb impulzushoz nagyobb teljesítmény kell
- ! A p_1 valójában a gyengítő tekercs teljesítménye
 - Transzmitter = jeladó (felépítés: RF forrás + „gyengítő tekercs” + erősítő)
 - A gyengítést kell csökkenteni, azaz pl. $p_1 = 6,6 \text{ dB}$ -ról $p_1 = 6 \text{ dB}$ mellett megnézni a p_1 értéket.

^1H NMR: S/N növelése

- $lb = 1$ Hz (line broadening factor)
- Efp = Exponential window multiplication + Fourier transform + phase correction



Rossz jel/zaj arányú spektrumban/ jelszélesedés esetén **S/N növelhető** (a felbontás kárára), ha a FID-et megszorozzuk egy csökkenő exponenciális függvénnyel ($e^{-lb \cdot t}$). A „lecsengés” mértékét mi állítjuk be (1H esetén $lb = 1$ Hz).

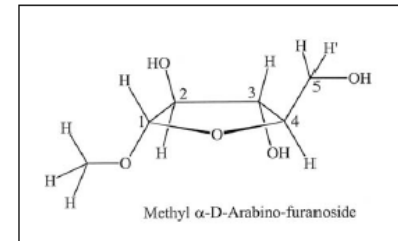
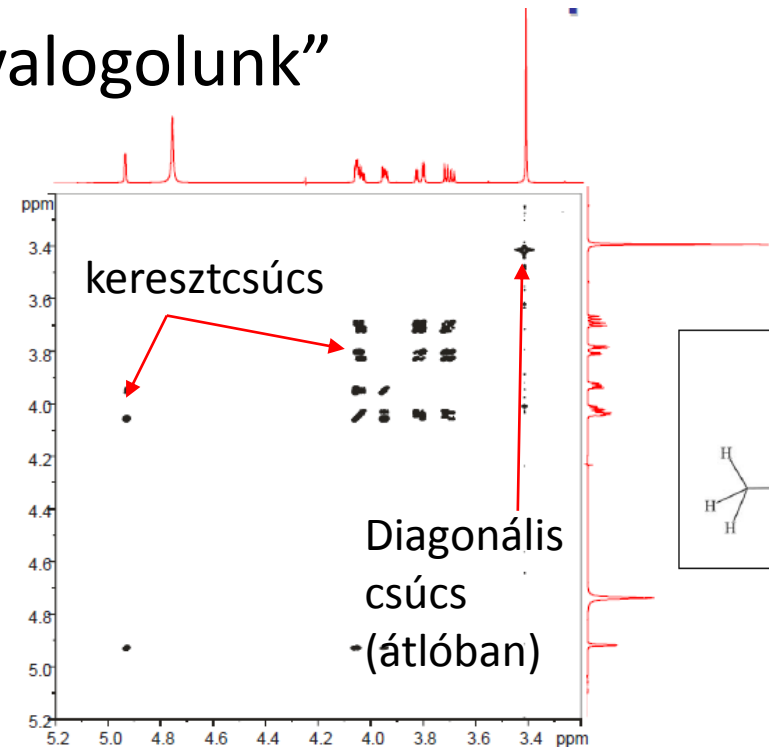
lb optimális értékének meghatározása:

- 1) lb -t 0-ra állítjuk, azaz: $> lb 0$, efp, apk
- 2) Kérdéses jel magasságának felénél mért jelszélességet lemérjük, és vesszük ennek 75%-át, pl. 1 Hz esetén ez 0,75 Hz lesz
- 3) $lb 0,75$, efp, apk

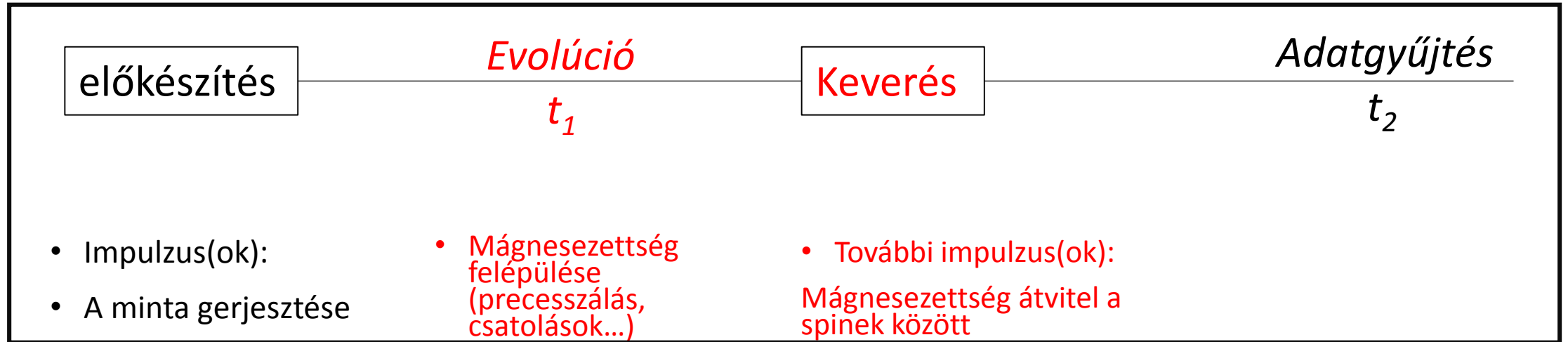
2D NMR mérések

COSY

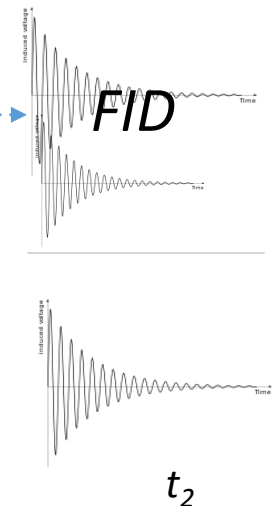
- Correlation Spectroscopy
- Spin-spin csatolásban levő protonok közötti korreláció (keresztcsúcsok)
- 1 spinrendszer összes protonján „végiggyalogolunk”
- 90 fokos impulzus a keverési szakaszban



2D NMR módszerek



$t_1 = 0$
 $t_1 = \Delta_1$
 $t_1 = 2\Delta_1$
...
 $t_1 = 50-500\Delta_1$



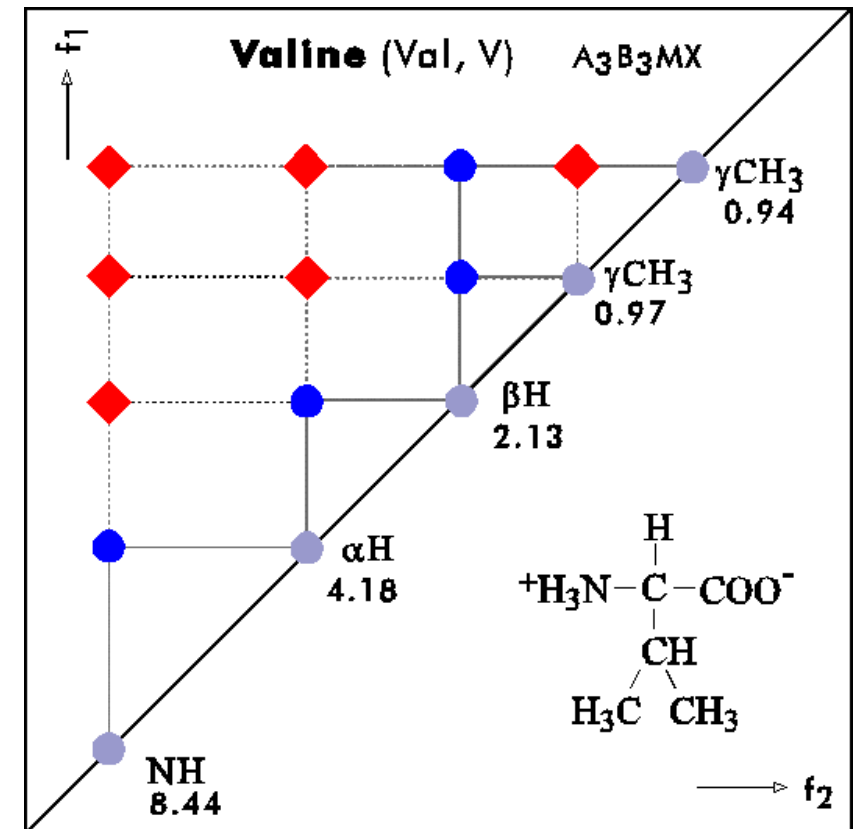
1D spektrumok sorozata

COSY - Beállítandó paraméterek

- 90 fokos ^1H impulzus hossza, teljesítmény PI1 , p1
- Spektrális ablak, spektrum közepe: Sw, o1p (mindkét dimenzióban ugyanaz legyen)
 - Sw nem egész szám, mert a program a digitalizálás szerint állítja át
- TD: adatpontok száma (2^n)
 - F2 2k (1k) > detektálási dimenzió
 - F1 > kísérletek száma
 - 512: ha vannak egymáshoz nagyon közeli/átlapoló jelek
- NS: 2-4 (töménységtől függően)
 - Pl. 500-600 g/mol, 20-30 mg feloldva > 4 scan
- DS: termikus egyensúly beálljon
- Spektrális ablak szénhidrátoknál kicsi > td (f2) 1K
- Mérési idő befolyásolása: TD/f1; NS
 - Transzformálás: Procpa/SI: min. az akvizíciós paraméterek (1kx256), de érdemes duplázni (2kx512) > xfb (execute Fourier transformation in both dimensions)
 - Itt: Magnitudo COSY-t használtunk - ez nem fázisérzékeny, nem kell fáziskorrigálni
 - A mérés során bármikor transzformálhatjuk a FID-et, és ha elég jónak ítéljük a spektrumot, a mérés leállítható.
- RG a 2D kísérletekben: 1H-1H korrelációban megadható annak a *fele*, ami kijött 1D ^1H -NMR kísérletből rga-val, HSQC-nél viszont a standard kísérletben megadott RG-értéket használjuk.

TOCSY

- Total Correlation Spectroscopy, ^1H - ^1H korreláció
- Spinrendszer összes tagja („csatolási hálózat” feltérképezése)
- Spinrendszerek elkülönítése
 - Érdeemes először TOCSY-t, majd COSY-t felvenni
- Keverési szakasz: „lág” impulzusok (90° , 180°) sorozatával egy spinlock teret/mezőt hozunk létre (homonukleáris Hartman-Hahn állapot); a mágneszettség az xy síkban marad, ez alatt adódik át a mágneszettség a spinrendszer tagjai között
- Minél hosszabb a keverési szakasz, annál „tovább” megy a mágneszettség a spinrendszeren
 - 20-200 msec, inkább 40-120 msec



- COSY-spektrum
- + ♦ TOCSY-spektrum


TOCSY - Beállítandó paraméterek

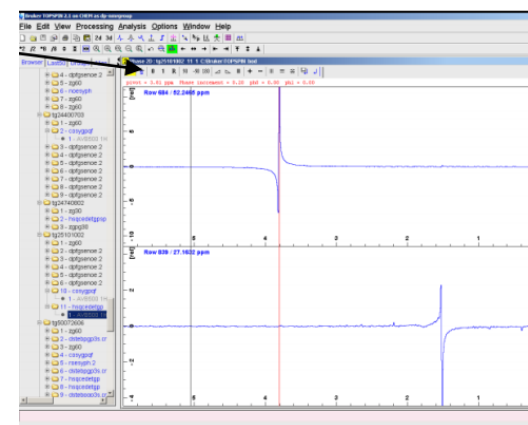
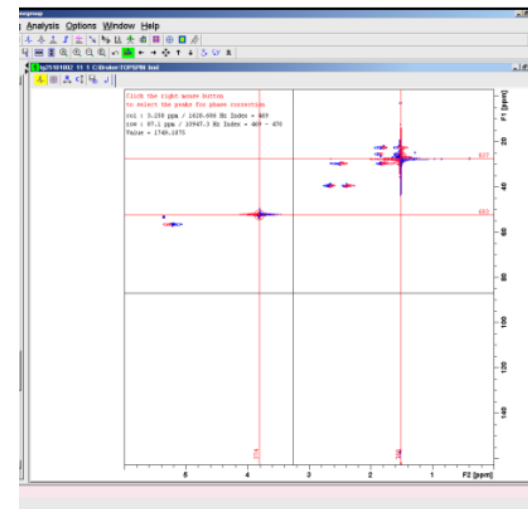
- 90 fokos ^1H impulzus hossza, teljesítmény PI1 , p1
- Spektrális ablak, spektrum közepe: Sw, o1p (mindkét dimenzióban ugyanaz legyen)
- TD: adatpontok száma (2^n)
 - F2 2k (1k) > detektálási dimenzió
 - F1 > kísérletek száma, ált. 256
 - Növelhető: ha vannak egymáshoz nagyon közeli/átlapoló jelek
- NS: ált. 8 (0,1 M; 0,01 M)
 - töménységtől függően
 - Cc. Minta: 4 scan
 - Híg: 16-32 scan
 - A TOCSY érzéketlenebb, mint a COSY
 - uaz a „mágnesezettség” terjed tovább > kisebb intenzitású jel
 - Keverési idő hossza – relaxációs elvesztés
- DS: pl. 16 termikus egyensúly beálljon
- D9 keverési idő: standard 70 msec, de változtatható:
 - 20 msec: COSY jellegű spektrum (nem terjed végig a mágnesezettség) , de csatolási állandók méréséhez jól használható, ha 1D-ből nem sikerül meghatározni J-t > 4k méretű adattábla
 - Hosszabb idő: kis csatolásokhoz
 - Loop counter-rel (l1) változtatható (képlet az impulzusprogramban)
- Mérés idő befolyásolása: TD/f1; NS

TOCSY - Beállítandó paraméterek

- **A keverési periódus alatti H-impulzusok teljesítményének beállítása (pl10) – csökkentett teljesítmény**
Kemény impulzusok sorozata terhelné az elektronikát, fűtené a mintát (minta nem stabil, elvesztés)
Irányelv 30 usec legyen a 90 fokos impulzus
 - Shape Tool display= > stdisp
 - Főmenü: Shapes/Basic shapes/rectangle [impulzus alakja]
 - Főmenü: Analysis/integrate shape
 - 30 usec – length of pulse
 - 90 – total rotation
 - ... – p1 = kalibrált, „kemény” impulzus hossza
 - Enter
- de! ne Update-eljük a paramétereket!
- Alul: Change of power level (Δ)
 - $Pl10 = pl1 + \Delta$

Transzformálás, fáziskorrekció

- > xfb
- **Fáziskorrekció** gomb 
- Kiveszünk 3-4 sort a spektrumból, hogy az egész tartományt lefedjük:
 - Jobb klikk/Add
- R (row) vagy C (column) = sor vagy oszlop kiválasztása (ami mentén „megnyúlt” a jel)
- 0 vagy 1 rendű fáziskorrekció (bal egeret folyamatosan lenyomva, a 0 vagy 1 ikonon)
- Mentés
- Ha zajos maradt a spektrum: **alapvonalkorrekció**
 - ProcPars/Baseline correction; absg = 2 (polinom kitevője)
 - > abs1, abs2



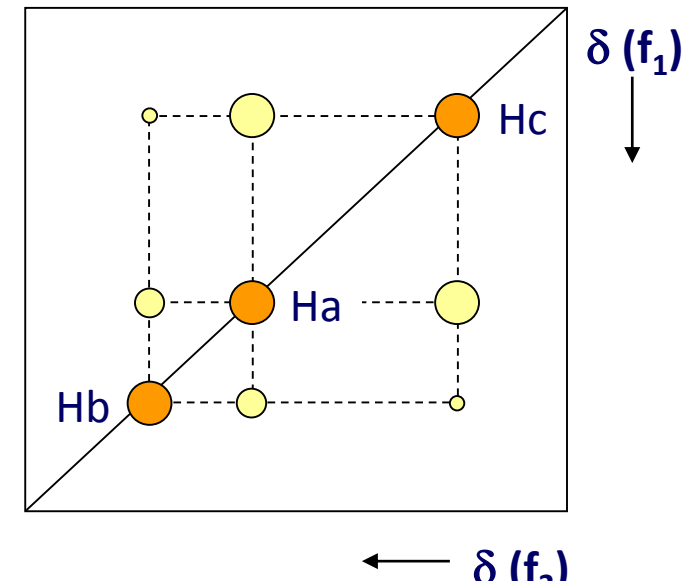
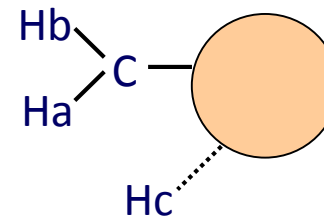
NOESY, ROESY

- Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy és Rotating Frame N.O.E.S. (forgó koordinátarendszerű NOESY)
- Keresztcsúcs térben közeli (max. 5 Å), dipoláris csatolásban levő protonok között
- Mag-Overhauser hatás: mágnesezettség átvitel két spin között keresztrelaxációval
- Dipol. keresztrelaxáció: a gerjesztett rendszer relaxációja dipol. kh. révén (téren át ható, távolságfüggő). A relaxáció során a spinek közötti polarizációttranszfert/energiatranszfert a molekuláris mozgások teszik lehetővé
- Dipoláris csatolás: téren át ható, a skalárisnál 1000x nagyobb; az egyik mag „érzi” a másik mágneses terét és viszont.
- Skaláris csatolás: e-felhő közvetíti

- Keresztcsúcs intenzitása:

$$NOE \propto \frac{1}{r^6}$$

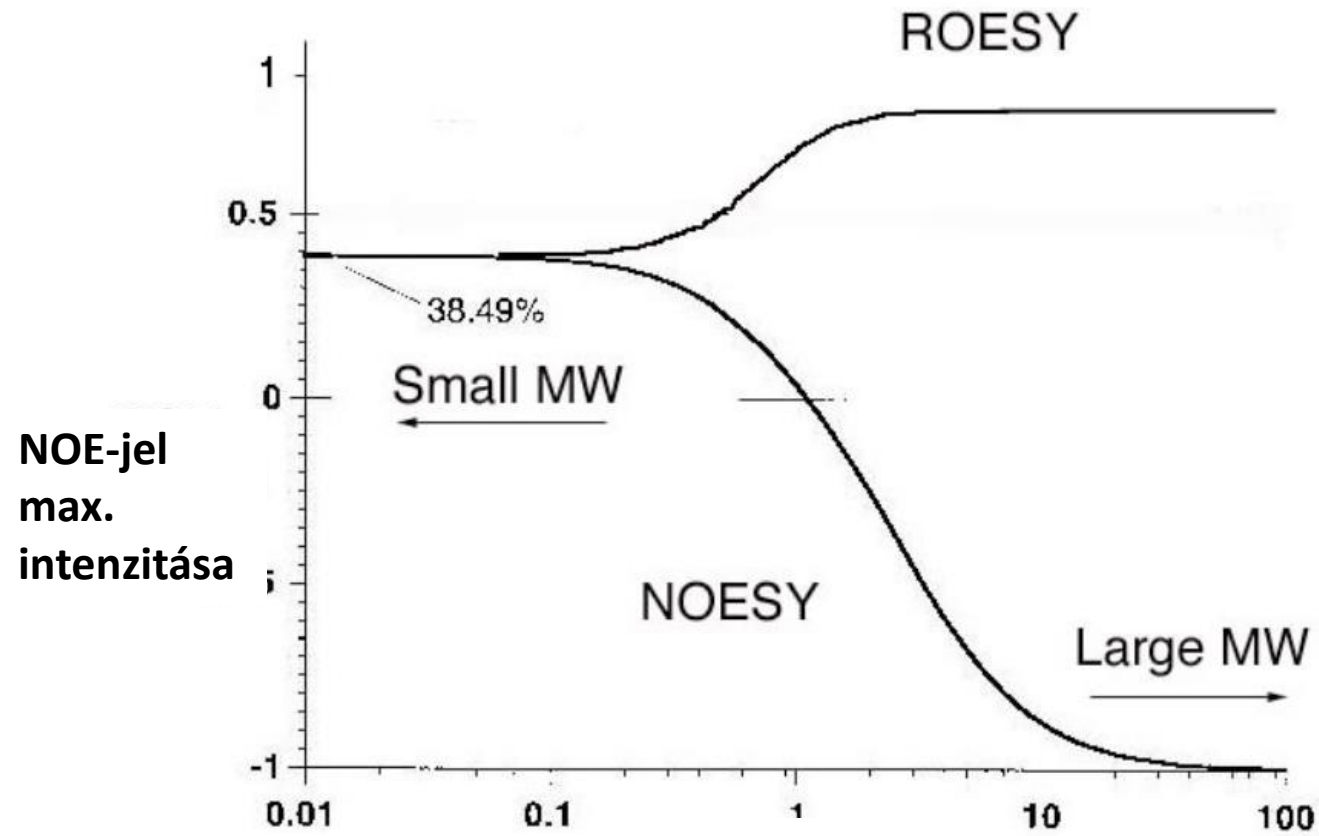
csak távolságkorlátok!



NOESY, ROESY

- Keverési szakasz alatt: dipoláris keresztrelaxáció révén mágnesezettség átvitel a térben közeli hidrogének között
 - NOESY: 2 db 90° impulzus
 - ROESY: folyamatos besugárzással, nem-szelektív 90° impulzus > spinlock mező létrehozása: a magok nem az eredeti ω_0 , hanem olyan, ω_0 -nál kisebb ω frekvenciával precesszálnak, ahol teljesülni fog az alábbi feltétel: $\omega \tau_c \ll 1$
- Távolságkorlátok – térfogati integrálokból
 - Referenciacsúcsra kalibrálni
 - szerkezetszámítás
- Keverési idő: 20-200 ms (eddig leghosszabb)

NOESY, ROESY



NOE-jel
max.
intenzitása

Larmor-frekvencia
(precessziós frekvencia,
 B_0 -tól függ)

$$\omega\tau_c$$

Rotációs korrelációs idő:
amíg a molekula 1 rad-t fordul a tengelye körül... ($\tau_c \sim 0,5$
Mt). A nagymolekulák „lomhák”. (Hőmérséklettől is függ.)

M_w – ROESY vagy NOESY?

- Kismolekula (M_w<600) **ROESY** (NOESY-val közel lehetünk a 0 átmenethez [oldószer, hőmérséklet... függő])
 - Közepes méret (600-1400 g/mol) **ROESY** (NOESY: 0 átmenet)
 - 1400 felett NOESY (érzékenység nagyobb, nagy negatív jelet detektálunk)
-
- ROESY-jelek fázisa: keresztcsúcs +, diagonálisban –
 - (- keresztcsúcs: TOCSY/cseré/spindiffúzió)
 - Fáziskorrekciónak szüksége van

ROESY - Beállítandó paraméterek

- 90°impulzus adatai PI1, p1
- Sw, o1p: o1p **ne legyen teljesen szimmetrikus a csatoló partnerekre** (TOCSY-járulék minimalizálása): **COSY-ban ellenőrizni!**
 - Szénhidrátoknál: az ablak szélére állhatunk
- **PI11** beállítása (spinlock mező, 90° impulzus, folyamatos besugárzás)
 - 75 usec legyen a 90 fokos impulzus
 - Shape Tool display= > stdisp
 - Főmenü: Shapes/Basic shapes/rectangle [impulzus alakja]
 - Főmenü: Analysis/integrate shape
 - 75 usec – length of pulse
 - 90 – total rotation
 - ... – p1 = kalibrált, „kemény” impulzus hossza
 - Enter

 - de! ne Update-eljük a paramétereket!

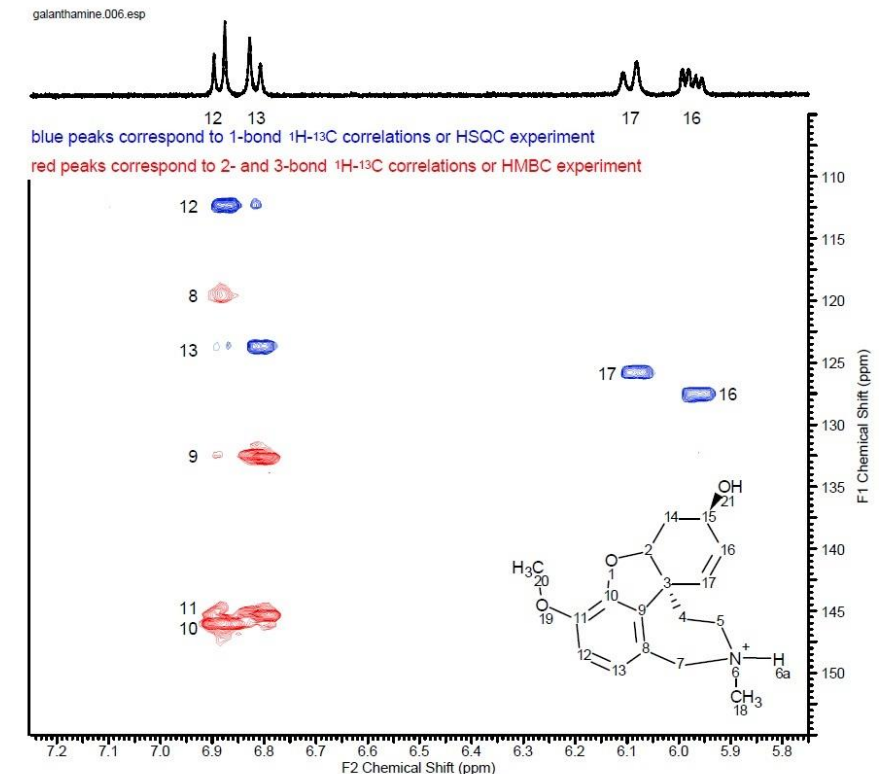
 - Alul: Change of power level (Δ)
 - PI10 = p1 + Δ
- Ns: min 16-32. Alap: 30-40 mg kb. 600-800 g/mol-os anyagot 32 scan mellett mérünk.
- Td: 2kx256 adattábla (min.)
- Általában éjszakai mérések!

HSQC

- Heteronuclear Single Quantum Correlation
- Egykötéses ^1H - ^{13}C atomok közötti keresztcsúcsok

- Felépítő blokkok:

- 1) ^1H magok gerjesztése
- 2) INEPT-blokk:
 - Inensitive Nuclei Enhancement by Polarization Transfer
 - mágnesesség átvitele a ^{13}C magokra
 - evolúció
- 3) Reverse-INEPT
 - Mágnesesség visszavitele a ^1H atommagokra
- 4) Detektálás



HSQC – Beállítandó paraméterek

- $S/N \sim \gamma_1 \cdot \gamma_2^{3/2}$

- S/N : jel/zaj
- γ_1 : gerjesztett mag giromágneses állandója
- γ_2 : detektált magé
- H-H párosítás a legérzékenyebb, mivel a γ_H 4x-ese a γ_C -nek

- Pl1, p1
- Sw, o1p, o2p > ehhez egy hsqc-t el lehet indítani/C-mérést, hogy lássuk a jeleket (C: sw 140 ppm; kvaterner C amúgy sem látszódik)
- Fontos! A detektálás ideje **aq** kb. 0,2 s legyen (min. 0,1, max 0,25 s), ugyanis ezalatt (1H -detektálás az 1H -csatornán) impulzusok sorozatával a C-csatornán C-lecsatolás történik, amely némi fűtési járulékot jelent (^{13}C -lecsatolás nélkül a ^{13}C - 1H csatolás miatt az 1H -dimenzióban 2 jelet kapnánk 1 helyett)
 - Td (f2) 2k, 1k ... > ennek beállítgatásával tudjuk aq-t befolyásolni
 - $aq \sim 1/sw$, $aq \sim td$
- Ns: cc. minta esetén ns 4, ds 8 (**ds = 2 * ns**)
- Td (f1): 256, 400, 512... (páros szám legyen!)
- A 90 °-os C-impulzus hosszát, teljesítményét nem változtatjuk
- Fáziskorrekciónak szüksége van

2D mérések

1.) Lock/Hangolás/Shim/

Új ^1H -file: impulzuskalibráció

a) $p1 = 7 \text{ us}$, $ns = 1$, $ds = 0$, rga

(rg COSY, TOCSY, ROESY-hoz felhasználható)

b) $p1 = 40 \text{ us}$

2.) ^1H spektrum

3.) 2D standard file-okból:

	COSY	TOCSY	ROESY	HSQC
	Spin-spin csat. H	Spinrendszer tagjai	Térközelség (max.5A)	Egykötéses C-H
alap	$(p1, p1) + (sw, o1p)$			
speciális		30 us szelektív imp. teljesítménye $p10$ (dB)	75 us szelektív imp. teljesítménye $p11$ (dB) $o1p$ (ne szimmetrikusan)	Aq max 0,25 ($f2, td$) $Ds = 2x ns$
Mérési idő, felbontás (600 g/mol, 20 mg, 70mM)	$2k$ ($1k$) $x256$; $ns = 4$ (30')	$2k$ ($1k$) $x256$; $ns = 8$ (1 h)	$2k$ ($1k$) $x256$, $Ns = 32$ (4-5h)	$1k x 256$, $ns = 8$ (1h)

4.) Az adatok elérése (winscp/putty): nmr.chem.klte.hu

a mérés ellenőrzése:

1) openvpn-nel csatlakozni az egyetemi hálózathoz; 2) Windows: Távoli asztal kapcsolat (shim: bsmsdisp)