

NMR基础知识简介



NMR 与诺贝尔奖



Isador I. Rabi

Isador I. Rabi
1944, Physics



Edward M. Purcell
1952, Physics



Felix Bloch
1952, Physics

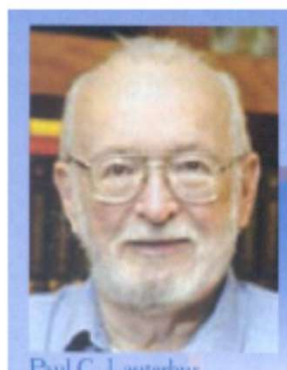


Richard Ernst

Richard R. Ernst
1992, Chemistry



Kurt Wuthrich
2002, Chemistry



Paul C. Lauterbur

Paul Lauterbur
2003, Medicine



Peter Mansfield
2003, Medicine

NMR 谱仪 - 应用领域



- 化学结构鉴定
 - 天然产物化学
 - 有机合成化学
- 动态过程的研究
 - 反应动力学
 - 研究平衡过程（化学平衡或构象平衡）
- 三维结构的研究
 - 蛋白质
 - DNA, 蛋白/DNA复合物
 - 多糖
- 代谢组学的研究（生物代谢指纹谱图与外界应激的关系）
- 药物设计（NMR研究构效关系SAR）
- 医学（磁共振成像）
- ...



NMR 类型

- 液体
- 固体
- MRI（成像）

Outlines



- **核磁共振的基本原理**
- 核磁共振谱仪的硬件介绍
- 核磁共振信号采集和处理的相关参数介绍
- 核磁共振样品的配制
- 核磁共振谱图的特性参数



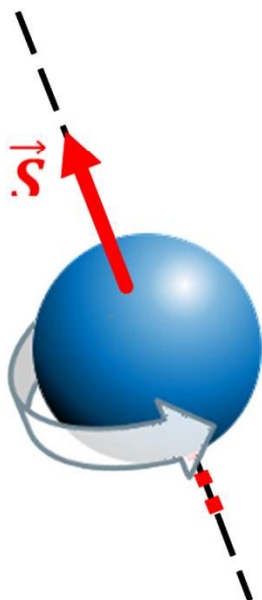
NMR的基本原理



Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy:

- **N**ucleus with spin (核自旋)
- **M**agnetic field (磁场)
- **R**esonance perturbation (共振扰动)

什么是自旋？



物质的基本属性

- 质量 m
- 电荷 e
- 自旋 $\vec{S}$

自旋的幅度（自旋角动量） $|\vec{S}| = \hbar \cdot \sqrt{I(I+1)}$

- 只有自旋量子数 (I) 不为零的核才有NMR信号
 - 质量数和原子序数都为偶数 $\Rightarrow I = 0$ (^{12}C , ^{16}O)
 - 质量数为偶数，原子序数为奇数 $\Rightarrow I = \text{整数}$ (^{14}N , ^2H , ^{10}B)
 - 质量数为奇数 $\Rightarrow I = \text{半整数}$ (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P)
- 原子核的自旋态是量子化的: $m = I, (I-1), (I-2), \dots, -I$
- m 为磁量子数; 如: ^1H , ^{13}C $m = 1/2, -1/2$

自旋角动量和磁矩



自旋角动量 $\vec{S}$ 产生一个磁矩 $\vec{\mu}$:

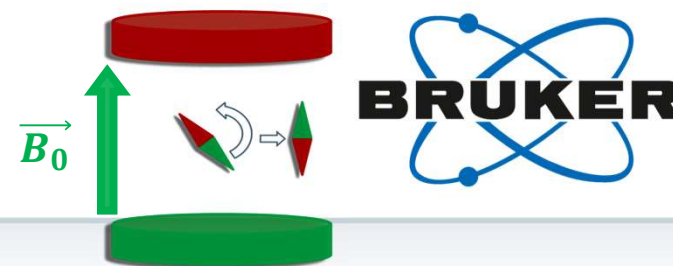
$$\vec{\mu} = \gamma \cdot \vec{S}$$

γ : 旋磁比, 不同的原子核具有不同的旋磁比.

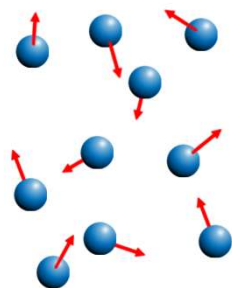
磁矩是一个矢量, 它给出了“原子核磁体”的方向和大小(强度)

Isotope	$\gamma/2\pi$
^1H	42.58
^{13}C	10.71
^{15}N	-4.32

磁场中 $I=1/2$ 的核（能量自旋状态）

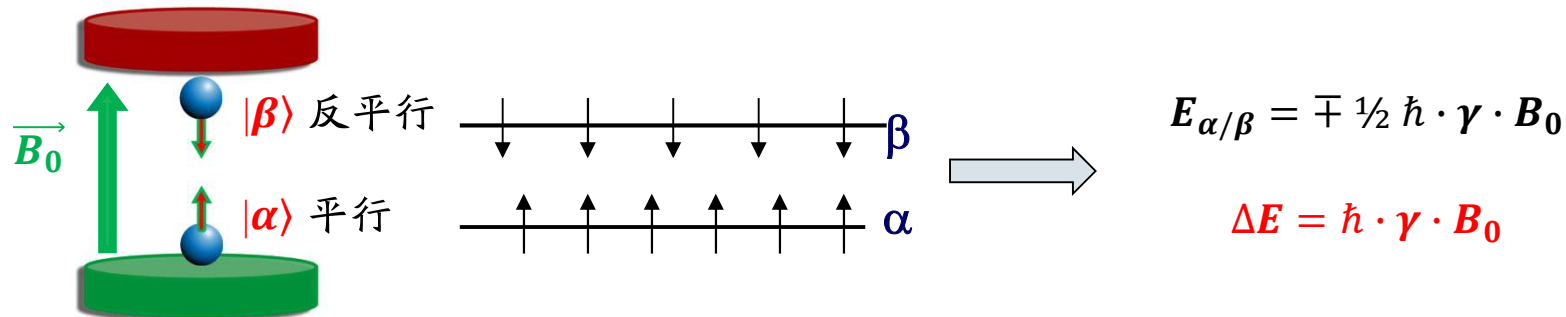


- 在基态下核自旋是无序的，彼此之间没有能量差。它们的能态是简并的：



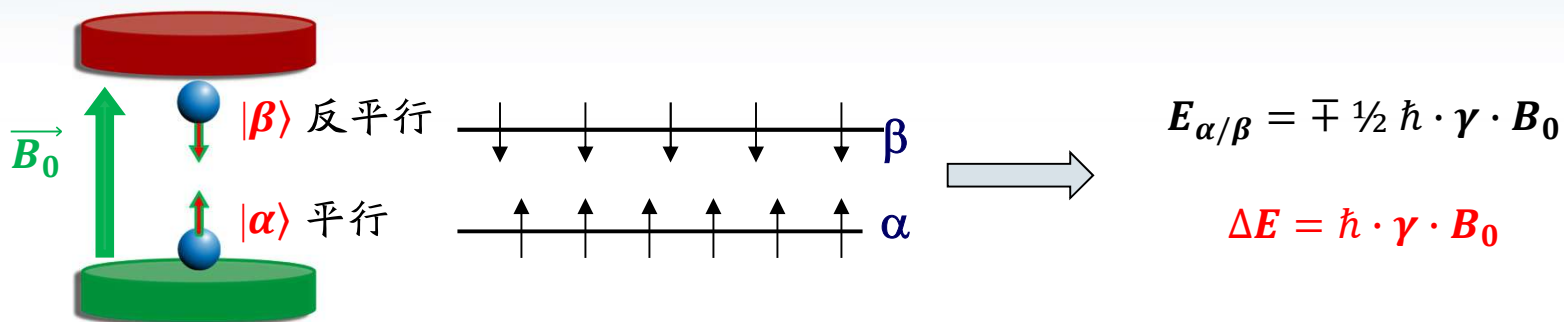
$$\hbar = \gamma h / 4\pi$$

- 由于原子核具有核磁矩，当外加一个强磁场时（ B_0 ），核磁矩的取向会与外磁场平行或反平行：



- 取向与外磁场平行核的数目总是比取向反平行的核稍多。

能量与布居数（能量吸收理论）



- 每个能级都有不同的布居数 (N)，布居数的差别与能量差有关遵守 Boltzmann 分布:

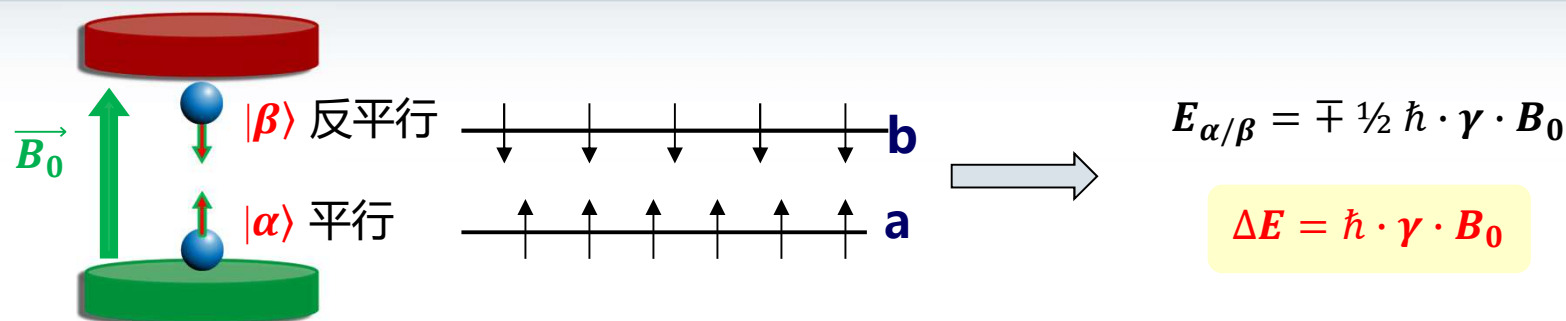
$$N_{\alpha} / N_{\beta} = e^{\Delta E / kT}$$

- 400 MHz ($B_0 = 9.5 \text{ T}$) 下的 ^1H ，能量差为 $3.8 \times 10^{-5} \text{ Kcal / mol}$

$$N_{\alpha} / N_{\beta} = 1.000064$$

- 与 UV 或 IR 相比，NMR 两个能级的布居数差别很小。

能量与灵敏度（能量吸收理论）



• 这个能量的差就是每个核可以吸收的能量（与信号的强度和灵敏度直接相关）：

- 磁体的磁场越强（大的 B_0 ），NMR谱仪的灵敏度就越高。
- 具有较大 γ 值的核，吸收或发射的能量就越大，也就越灵敏。灵敏度与 μ 、 $N_\alpha - N_\beta$ 及“线圈的磁通量”都成正比，这三者都与 γ 成正比，所以灵敏度与 γ^3 成正比。

$$\gamma^{13}\text{C} = 6,728 \text{ rad / G}$$

$$\gamma^1\text{H} = 26,753 \text{ rad / G}$$

仅仅是 γ 的原因， ^1H 的灵敏度就大约是 ^{13}C 的64倍

- 如果考虑同位素的天然丰度， ^{13}C (~1%) 的灵敏度要比 ^1H 低6400倍。

能量与频率（能量吸收理论）

- 能量与频率是相关的，我们可以作一些简单的数学变换：

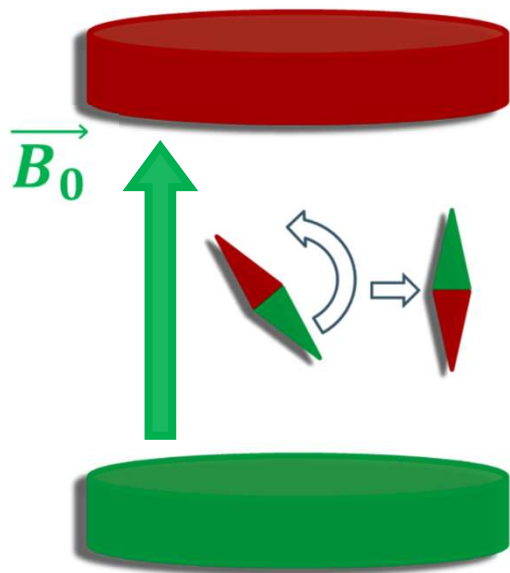
射频： $\Delta E = h \cdot \nu$

能量差： $\Delta E = h \cdot \gamma \cdot B_0 / 2\pi$ $\longrightarrow$ $\nu = h \cdot \gamma \cdot B_0 / 2\pi$

- 对于 ^1H 来说，在通常的磁体中（2.35–18.6 T），其共振的频率在100–800 MHz之间。对 ^{13}X ，是其频率的1/4.
- 在解释有些 NMR原理时，我们需要用到圆周运动。对于描述圆周运动 ν 并不是一个好的单位。我们把进动（或Lamor）频率定义为 ω ：

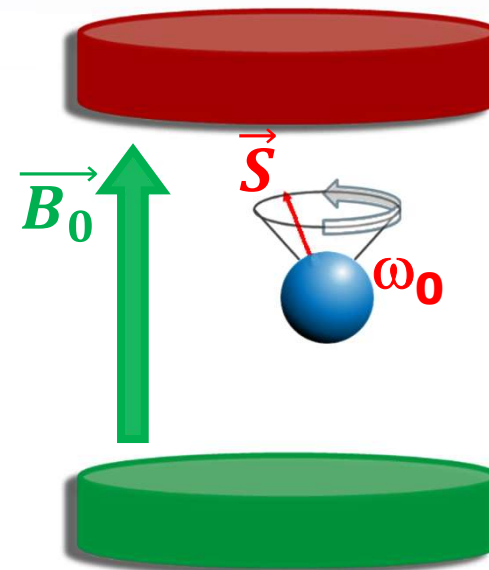
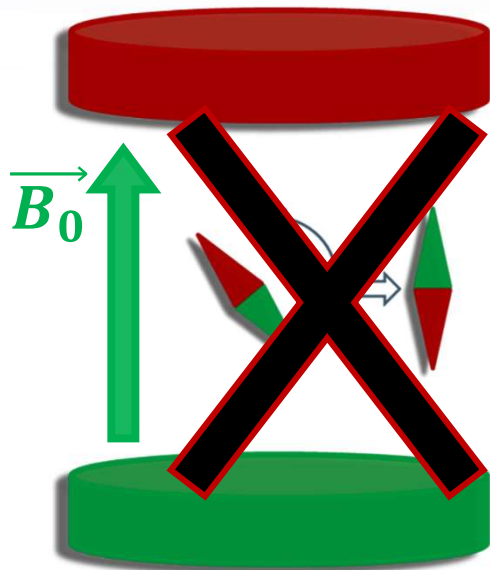
$$\omega = 2\pi\nu \Rightarrow \omega_0 = \gamma B_0 \text{ (弧度)}$$

磁场中 $I=1/2$ 的核（电磁感应理论）



... 但是原子核不是指南针

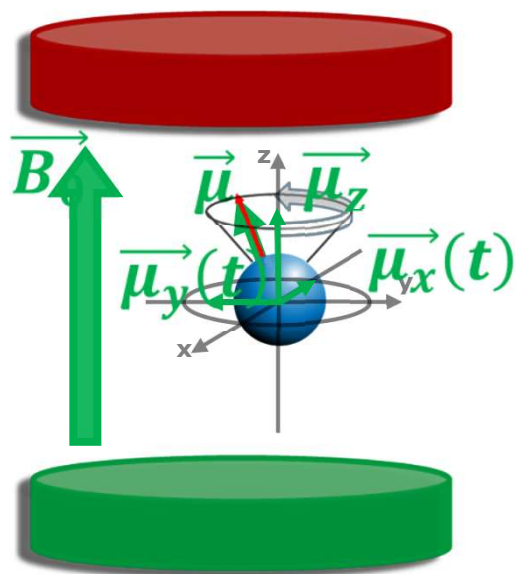
磁场中 $I=1/2$ 的核（电磁感应理论）



进动频率称为**Larmor Frequency** ω_0 :

$$\omega_0 = \gamma \cdot B_0$$

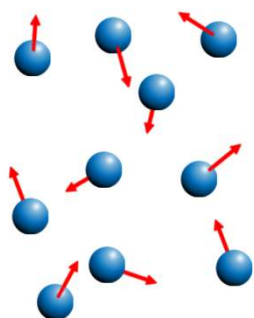
磁场中 $I=1/2$ 的核Larmor进动（电磁感应理论）



磁矩 $\vec{\mu}$ 的矢量分解

矢量分解	运动
$\vec{\mu}_x$	随 ω_0 振荡
$\vec{\mu}_y$	随 ω_0 振荡
$\vec{\mu}_z$	不变

磁场中 $I=1/2$ 的核（电磁感应理论）



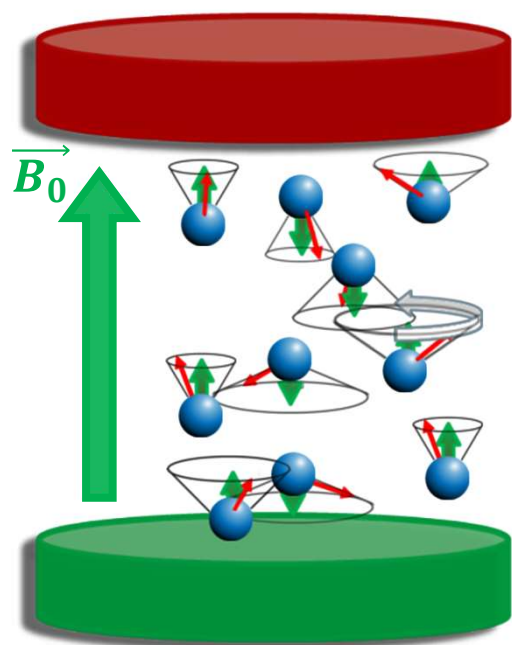
$$\sum_i \vec{\mu} = 0$$

自旋的总和

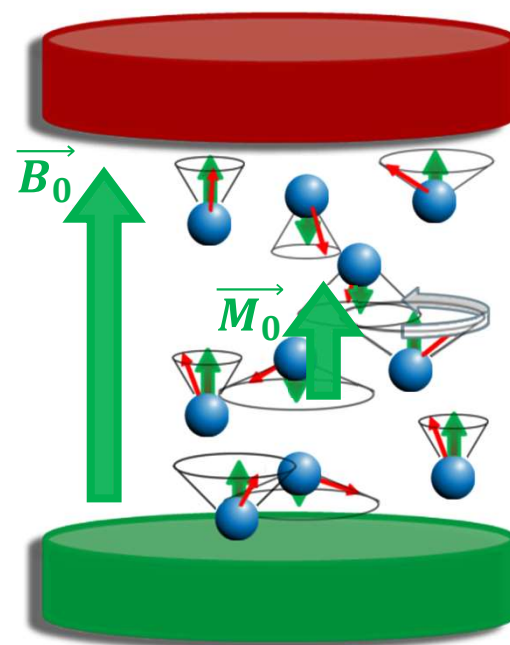
无外部 $\vec{B}_0$

- 每个自旋向量的随机方向
各向同性分布

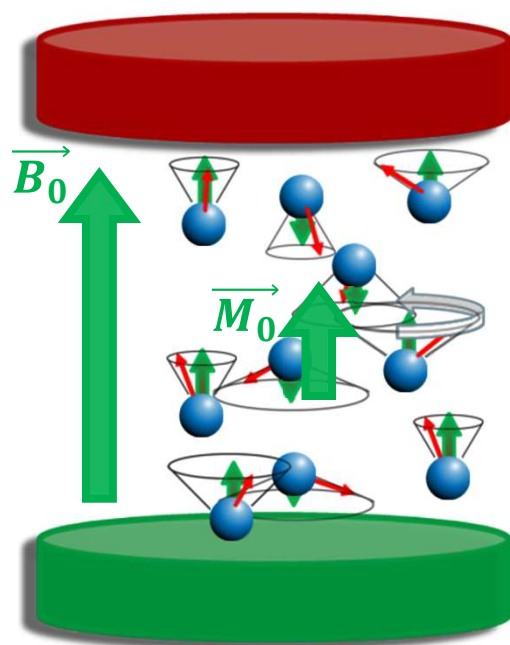
磁场中 $I=1/2$ 的核（电磁感应理论）- 弛豫



Relaxation



磁场中 $I=1/2$ 的核（电磁感应理论）- 弛豫



$$\sum_i \vec{\mu} = \vec{M}_0$$

弛豫 → 动态平衡

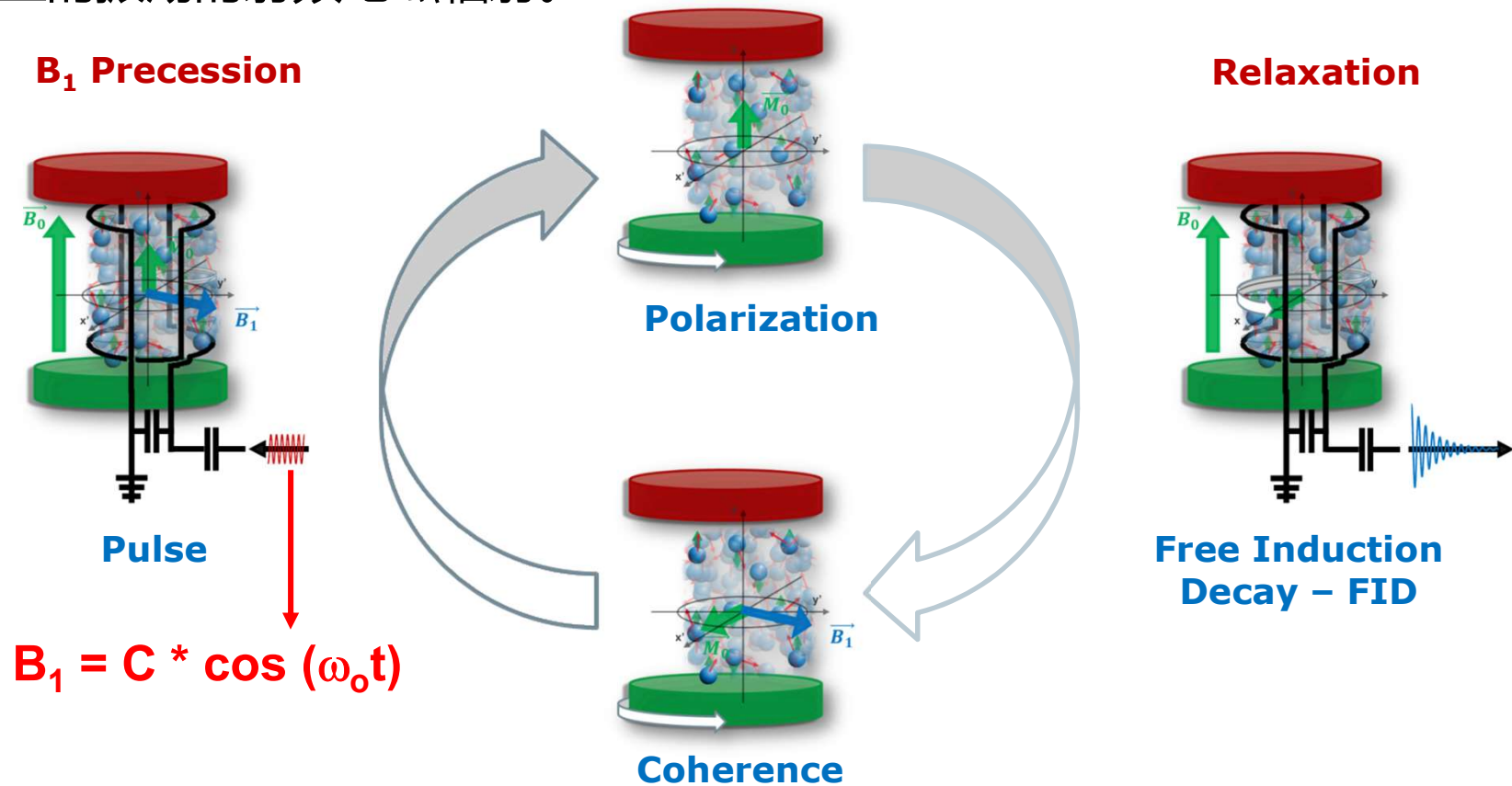
- 与外磁场平行或反平行
- 热各向同性分布

宏观效应—宏观磁化矢量 $\vec{M}_0$

- $|\alpha\rangle$ 和 $|\beta\rangle$ 态能量差
- 波兹曼分布
- $\vec{M}_0$ 的大小

射频脉冲产生NMR信号

NMR激发需要核自旋体系吸收能量。能量的来源是一个由变化的电场所产生的振荡的射频电磁辐射。



Outlines



- 核磁共振的基本原理
- **核磁共振谱仪的硬件介绍**
- 核磁共振信号采集和处理的相关参数介绍
- 核磁共振样品的配制
- 核磁共振谱图的特性参数



NMR谱仪



1. 操作工作站
2. 机柜
3. 超导磁体
4. 前置放大器
5. 探头
6. 室温匀场系统

NMR探头 – 室温探头



- 正向探头 (BBO; TXO) :
X inner / ^1H outer
- 反向探头(BBI; TXI):
 ^1H inner / X outer
- 探头直径从1mm到10mm



兼具正向和反向探头的优点 -> *SmartProbe™*

High Resolution Room Temperature Probes

NMR探头 – 低温探头



High Resolution CryoProbes

$S / N \propto 1 / d_{coil}$ → 更小的线圈直径

$$S / N \propto \frac{\omega \cdot M_0 \cdot V \left(B_1 / I_{coil} \right)}{\sqrt{4 \cdot k \cdot \Delta f \cdot R \cdot T}}$$

T : 线圈的温度

内置前放和射频电子元件处于低温以降低热噪音

- **CryoProbe™:**
氦气冷却(~20K)灵敏度提高4倍
- **CryoProbe™ Prodigy:**
液氮冷却(~80K)灵敏度提高3倍

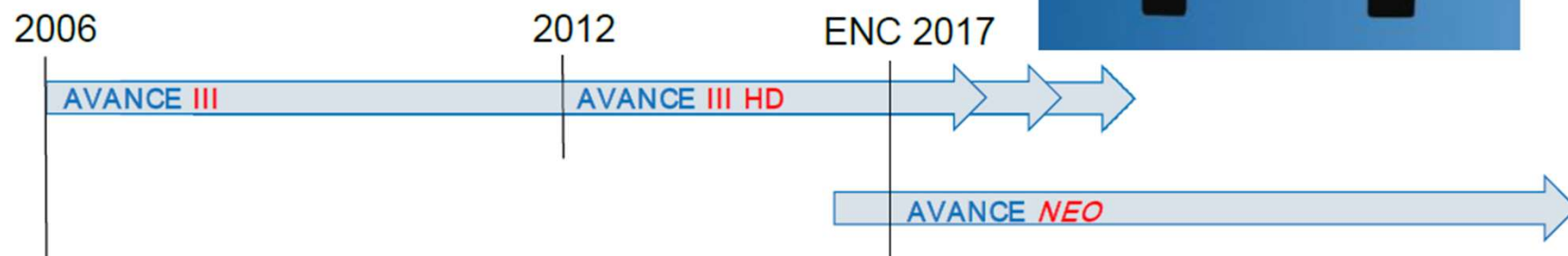
NMR探头 – 固体探头



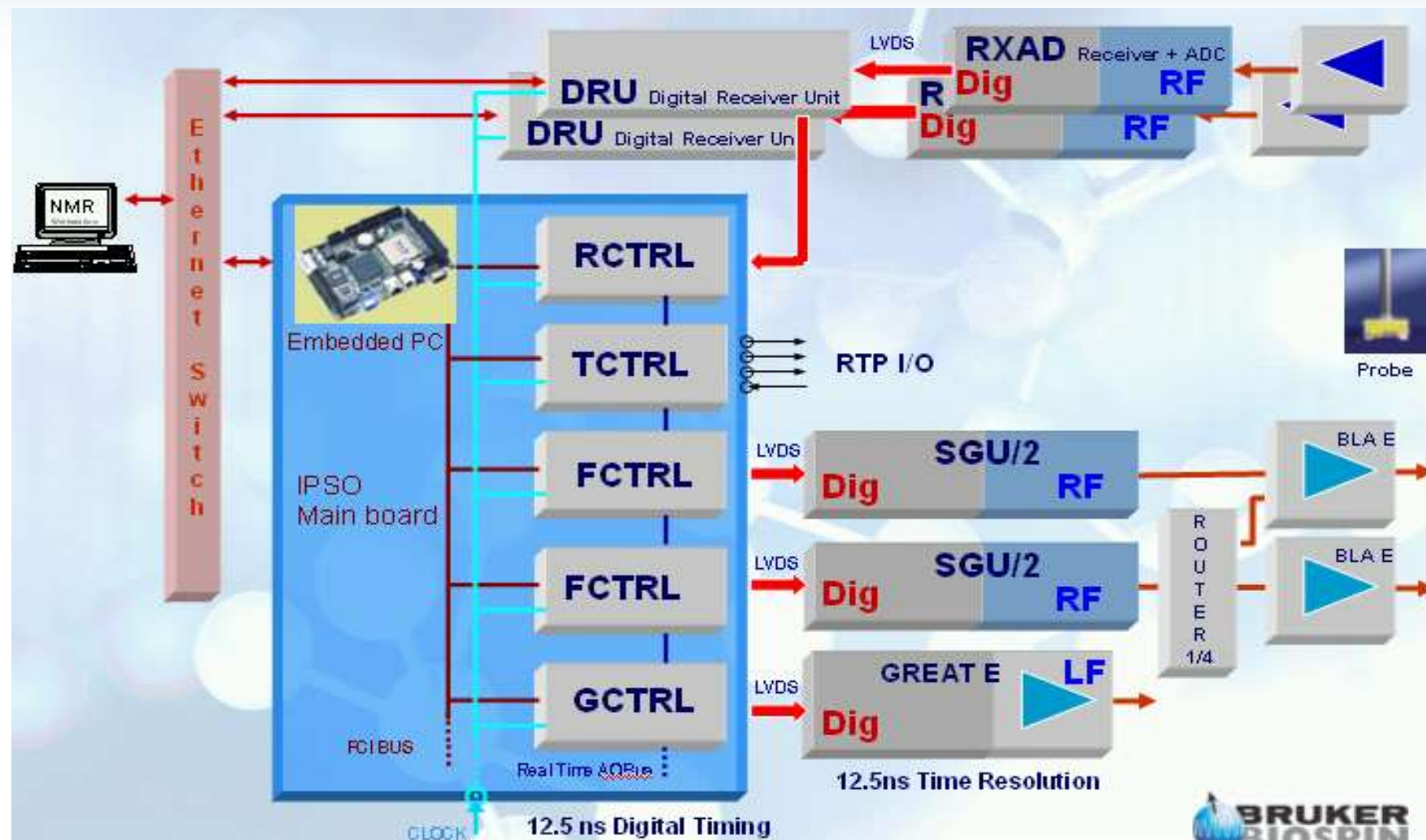
Solid State NMR Probes

- 样品倾斜成魔角 $\sim 54.7^\circ$
- 转速高达111 kHz
- 宽腔、标准腔磁体
- 不锁场

NMR机柜



NMR机柜 – AVIII HD、AVIII



NMR机柜 – AV NEO



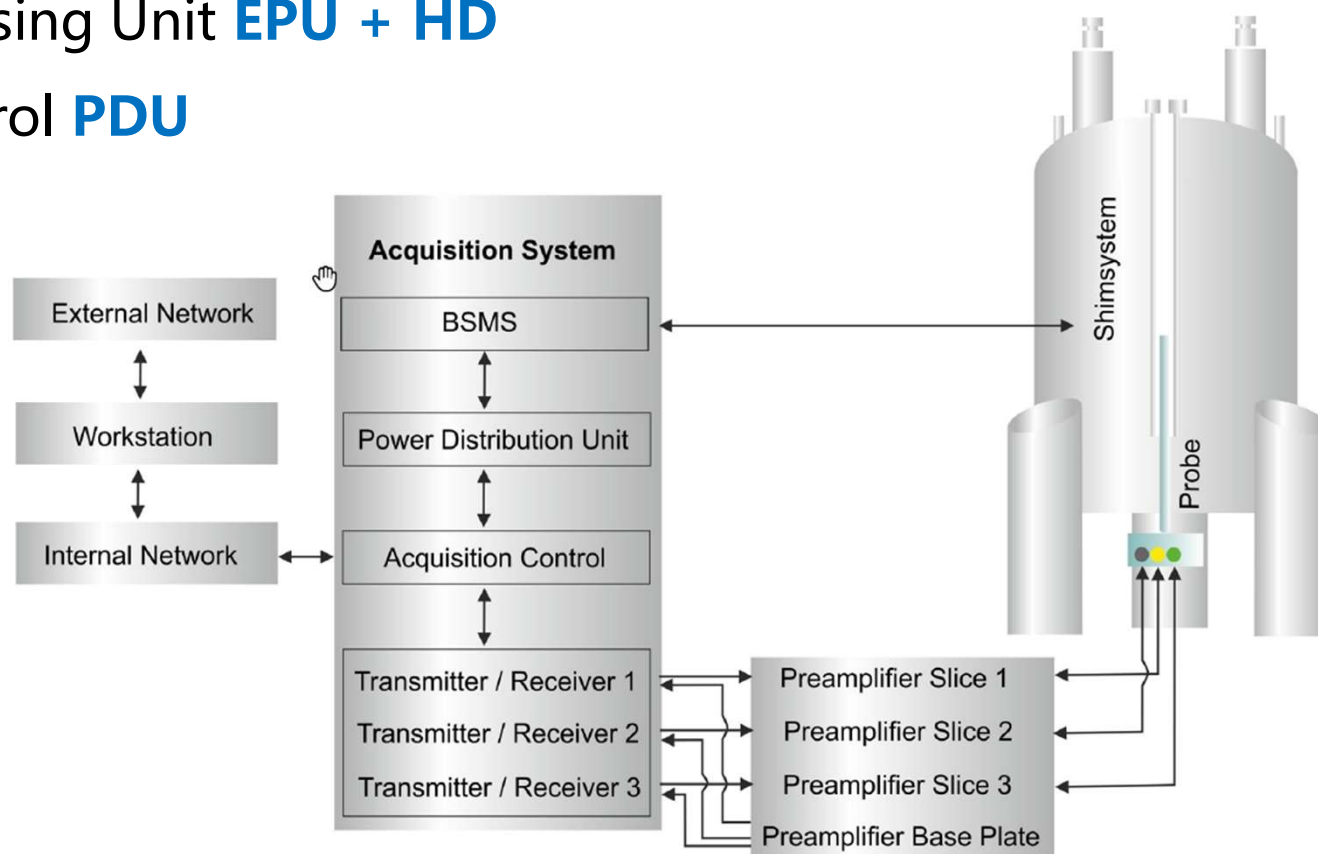
Transceiver **TRX** = TX + RX + IPSO F (multi RX)

Gradient + Timing **GTU** = IPSO G & T

Embedded Processing Unit **EPU + HD**

Mains power control **PDU**

Ethernet **ROUTER**



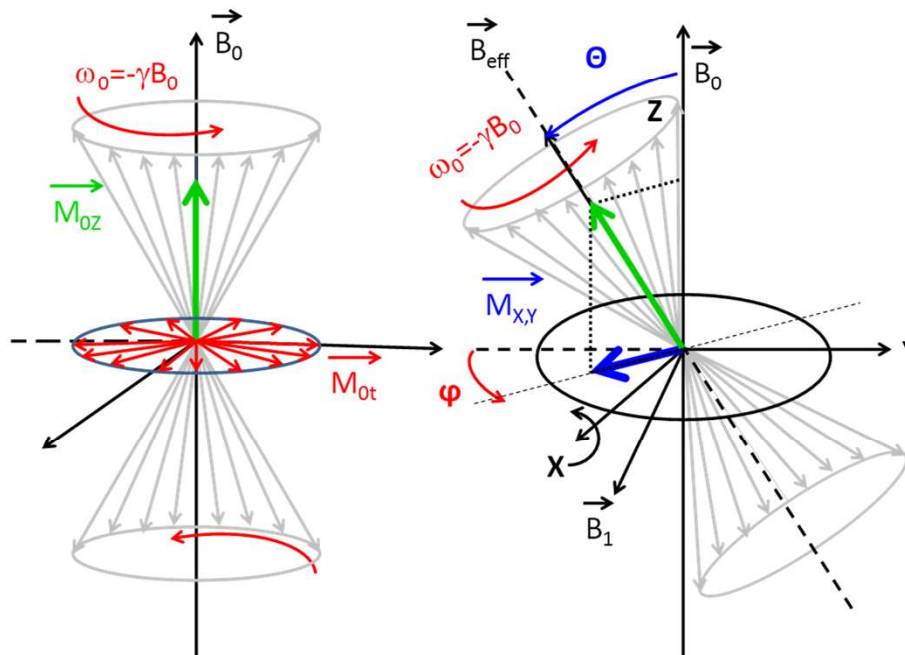
Outlines



- 核磁共振的基本原理
- 核磁共振谱仪的硬件介绍
- **核磁共振信号采集和处理的相关概念介绍**
- 核磁共振样品的配制
- 核磁共振谱图的特性参数



Pulse program : graphical representation



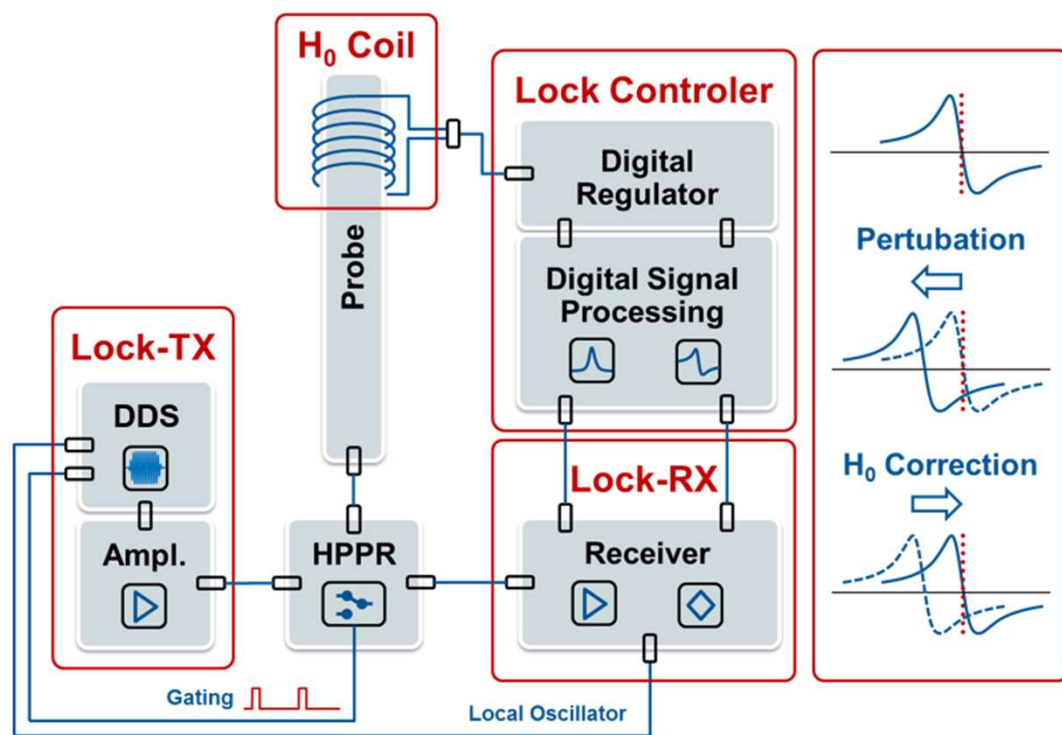
Spin assembly : Stady state

Spin assembly : Effect of an RF pulse

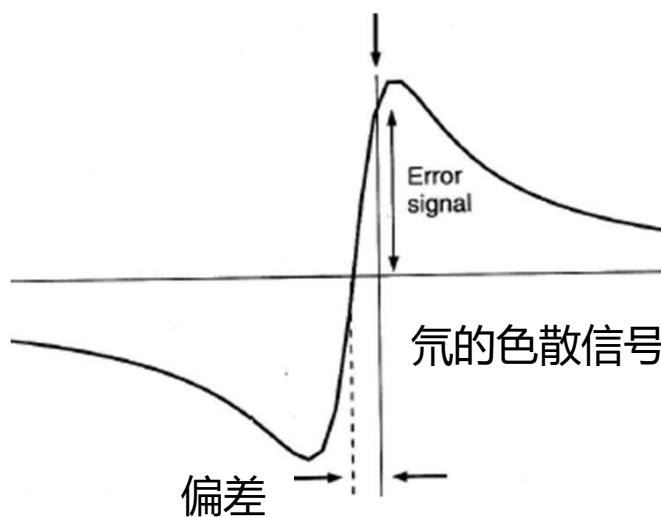
核磁实验前的准备——锁场



实验对磁场稳定性的要求可以通过锁场实现，通过不间断（每秒数千次）的测量—参照信号(氦信号)并与参考频率进行比较。如果出现偏差，则此差值被反馈到磁体并通过增加或减少辅助线圈(H_0)的电流来进行矫正。



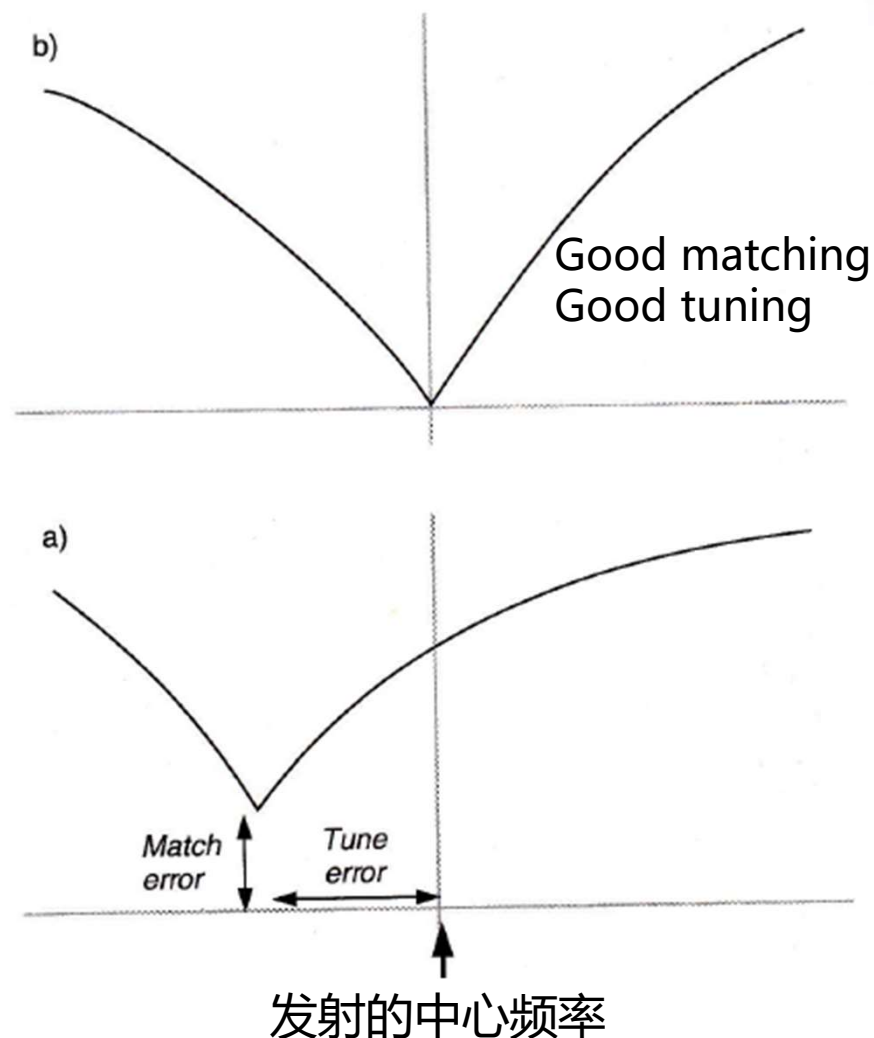
气信号的参考频率



核磁实验前的准备——调谐



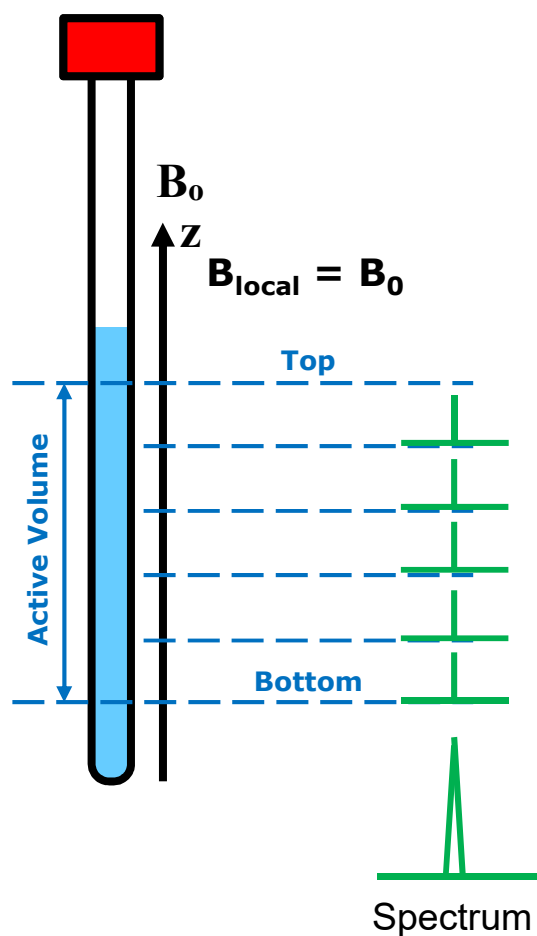
- 给探头一个弱信号，把探头和电缆的阻抗和HPPR内50欧姆的参考阻抗进行比较
- 调谐曲线是不同频率（水平轴）下反射信号的振幅（垂直轴）
- 调频（tune）：调谐曲线的最小值与发射中心频率重合
- 匹配（match）：调谐曲线的最小值落在基线上，确保反射最小
- 调频和匹配是相互关联的，必须交互进行



核磁实验前的准备——匀场

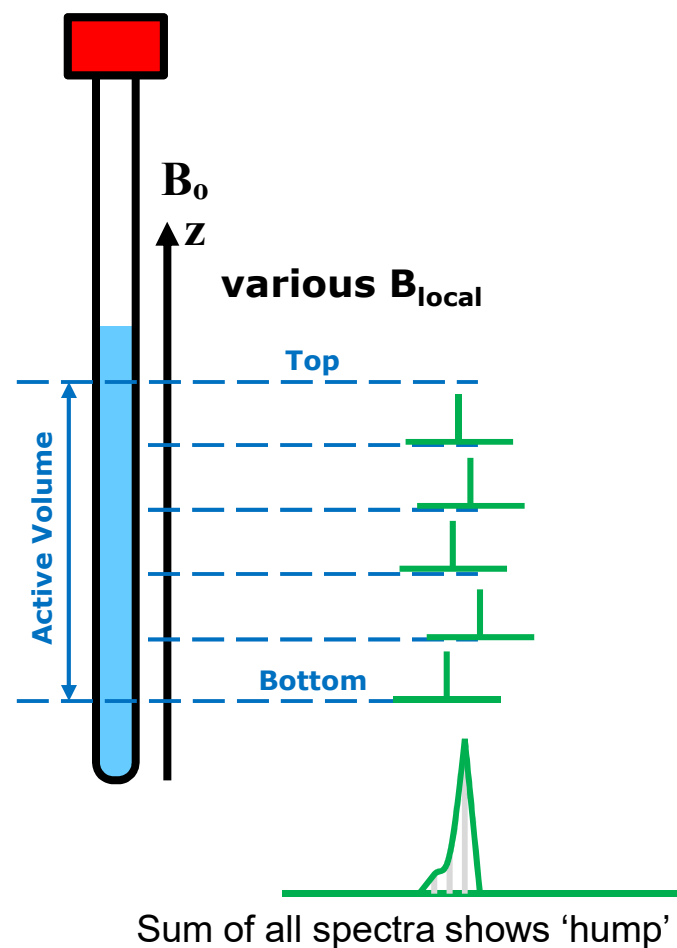


- 当匀场很好时，整个样品体积内磁场强度是一致的



$$\omega_0 = -\gamma B_0$$

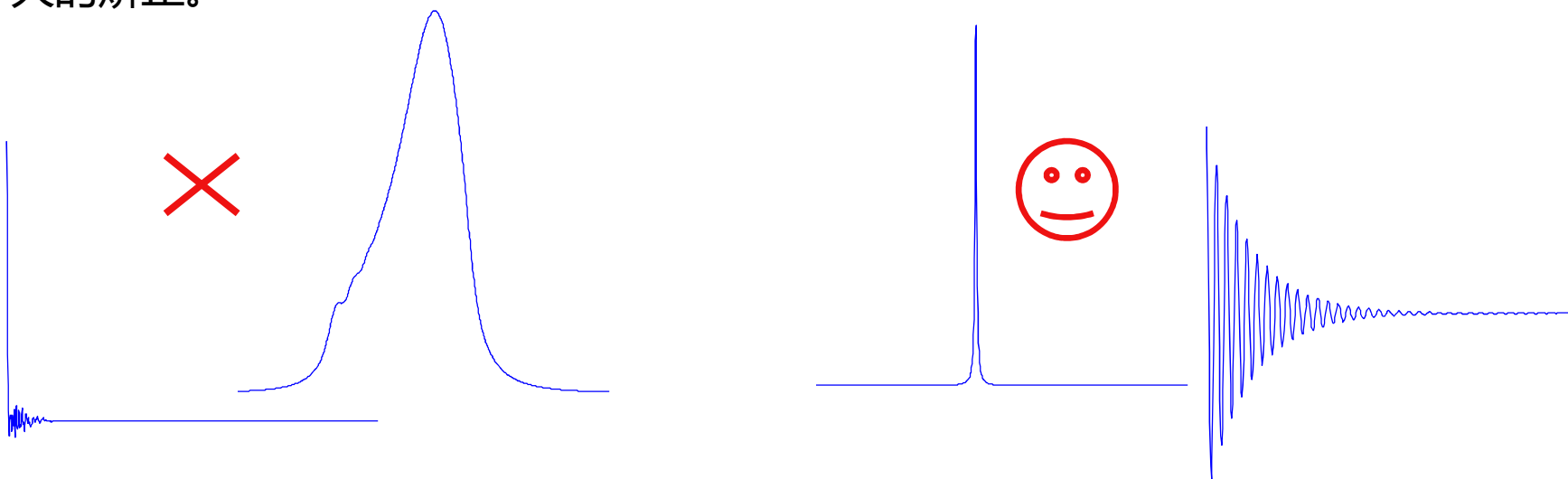
- 匀场不好，磁场不均匀时



匀场(Shimming)



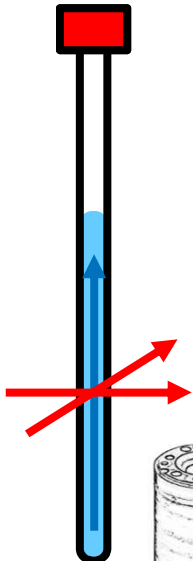
在样品中，磁场强度应该是均匀且单一，以使相同的核无论处于样品的何种位置都应给出相同的共振峰。为达此目的，一系列所谓匀场线圈按绕制所提供的函数方式给出补偿以消除磁场的均匀性，从而得到窄的线形。实际应用中可分为低温匀场(Cryo-shims)线圈和室温匀场线圈(RT-shims)。低温匀场线提供较大的矫正。



匀场(Shimming)

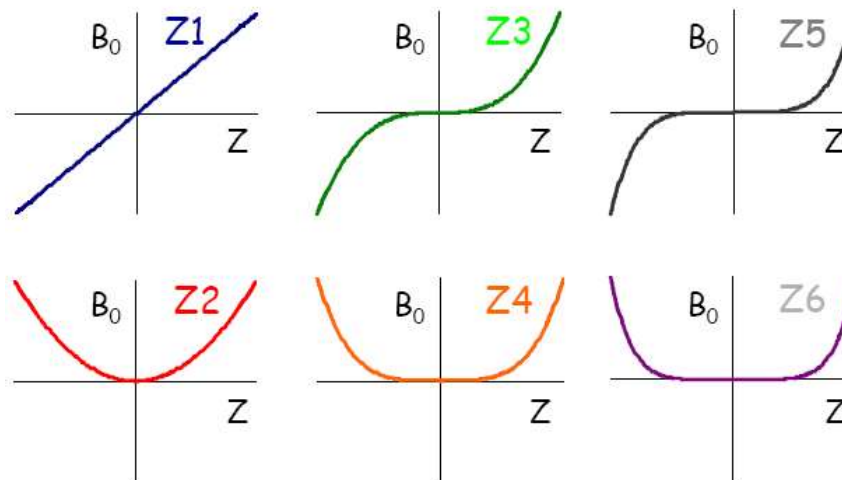


Sample



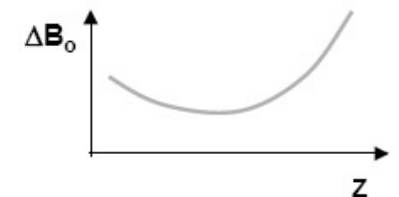
SHIM		On Axis Gradients				
Spin.	NonSpin.	Z	Z ²	Z ³	Z ⁴	Z ⁵
Off Axis Gradients		XZ	XZ ²	XZ ³	XZ ⁴	XZ ⁵
		YZ	YZ ²	YZ ³	YZ ⁴	YZ ⁵
		XYZ	XYZ ²	XYZ ³	XYZ ⁴	XYZ ⁵
		(X ² -Y ²)Z	(X ² -Y ²)Z ²	(X ² -Y ²)Z ³	(X ² -Y ²)Z ⁴	(X ² -Y ²)Z ⁵
		X ³ Z				
		Y ³ Z				

Combined Gradients

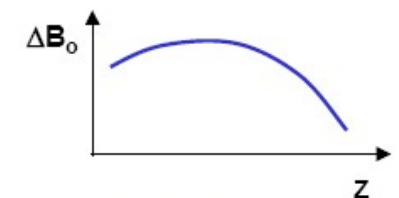


Shim Coil

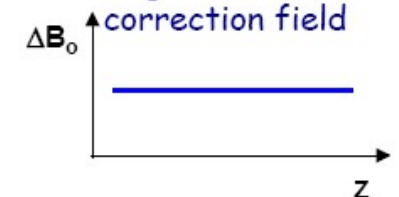
magnet's field before correction



shim coil correction field



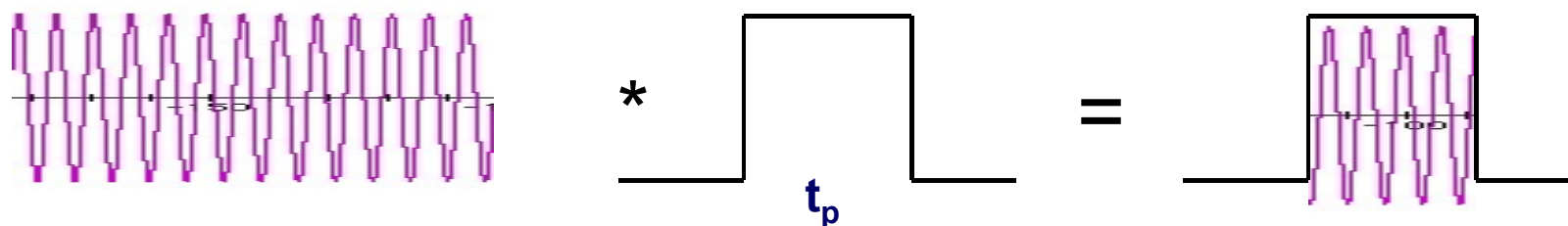
superposition of magnet's field & correction field



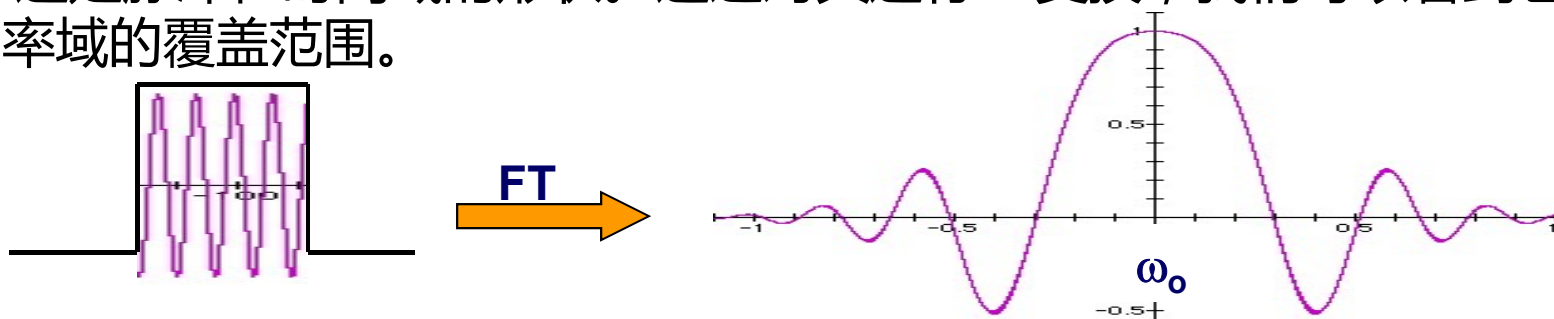
射频脉冲



- 射频脉冲是频率为 ω_0 的连续波 (cosine) 与阶梯函数的组合结果。



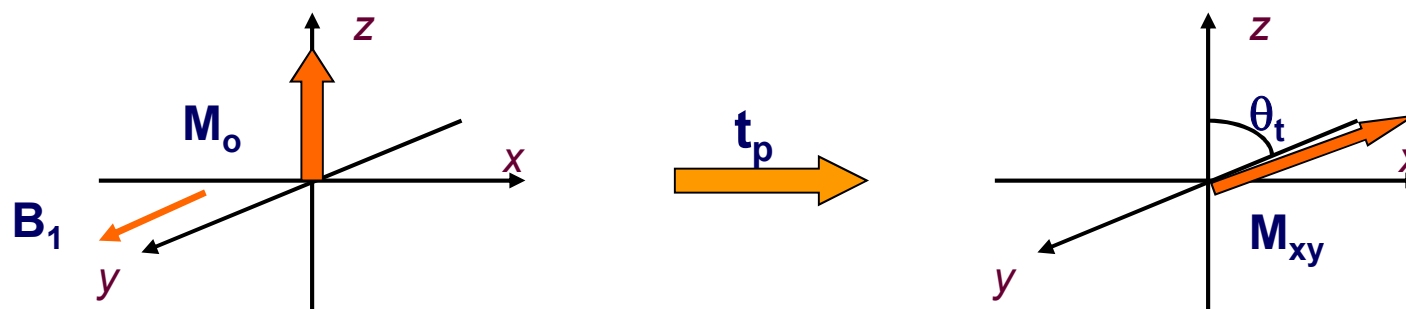
- 这是脉冲在时间域的形状。通过对其进行FT变换，我们可以看到它在频率域的覆盖范围。



- 对其进行FT的结果是一个中心位于 ω_0 ，两边覆盖一定频率宽度的信号。其覆盖的频率宽度与 t_p 成反比： $f \propto 1 / t$ 。

脉冲宽度和倾倒角

- 脉冲的宽度不只和其覆盖的频率范围有关，它还表明外加射频场 B_1 的作用时间。因此，它就是外加扭力对宏观磁化矢量 M_0 的作用时间。



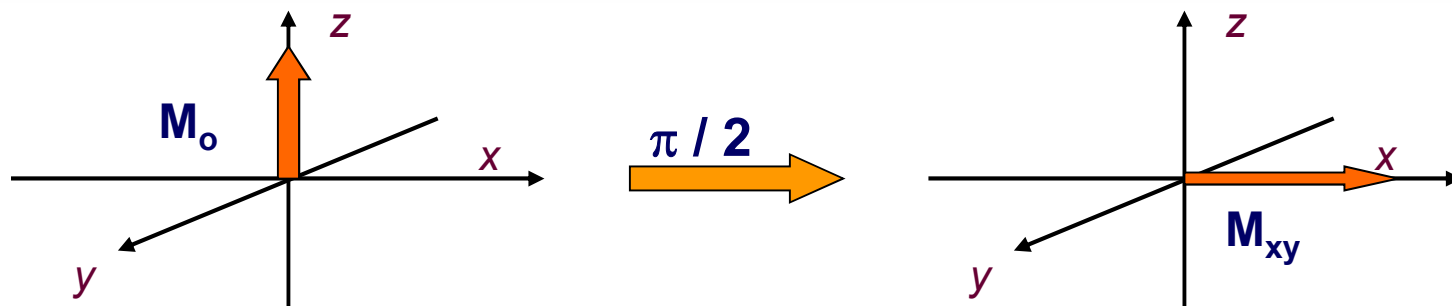
$$\theta_t = \gamma * t_p * B_1$$

- 特定倾倒角脉冲的宽度也仪器本身有关（ B_1 ），我们习惯上以脉冲使宏观磁化矢量倾倒的角度来标识脉冲。所以我们常见的脉冲有 $\pi/4$ 、 $\pi/2$ 和 π 脉冲。

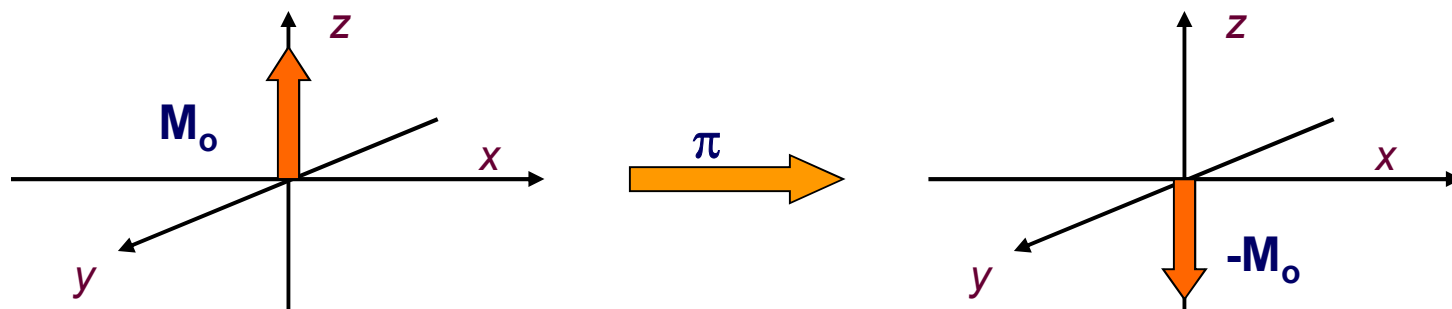
一些常用的脉冲



- 最常用的脉冲是 $\pi/2$ 脉冲，它使磁化矢量完全倾倒在 xy 平面：



- π 脉冲也很重要，它使得自旋体系的布居数反转。

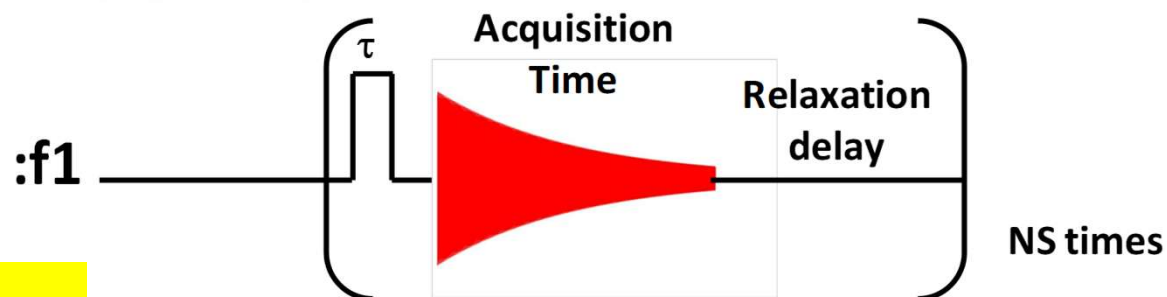


- 原则上讲我们可以得到任意角度的脉冲。

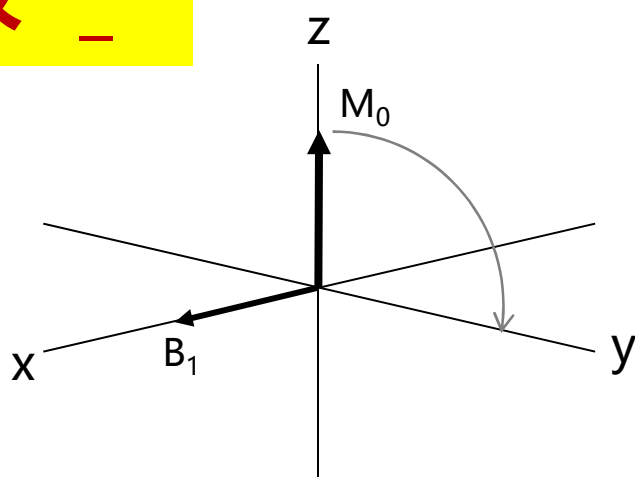
激发相位和接收相位



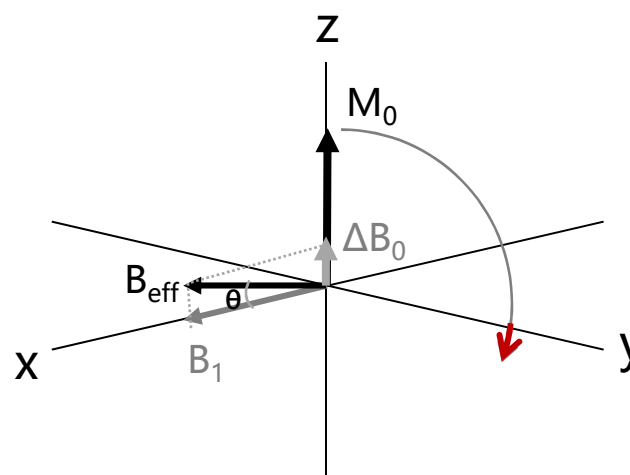
Pulse program : graphical representation



建议 ^ _ ^

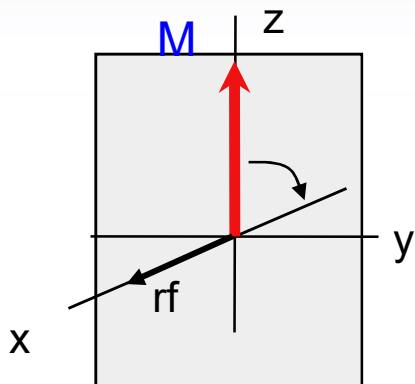


On-resonance



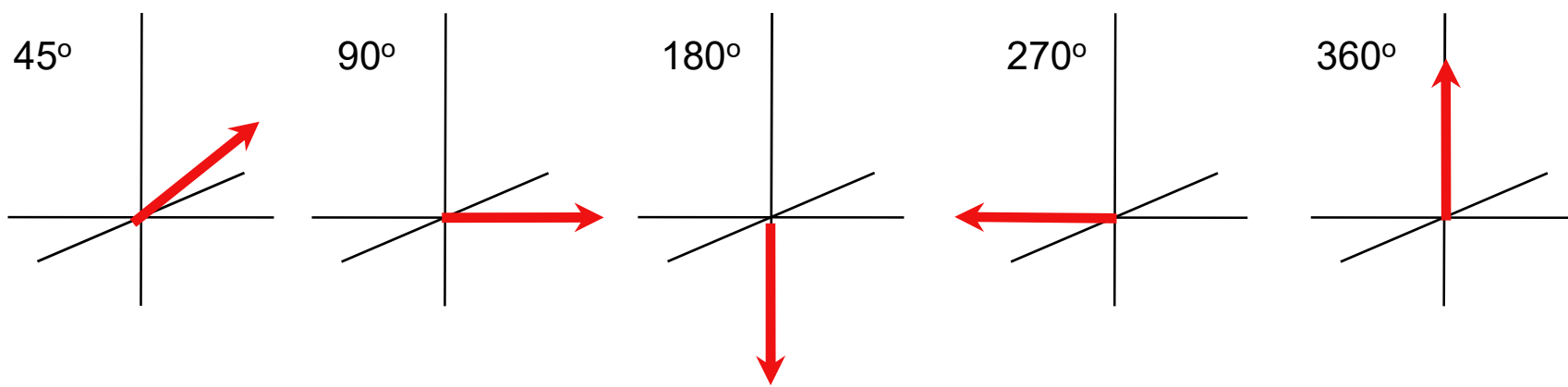
Off-resonance

RF 脉冲

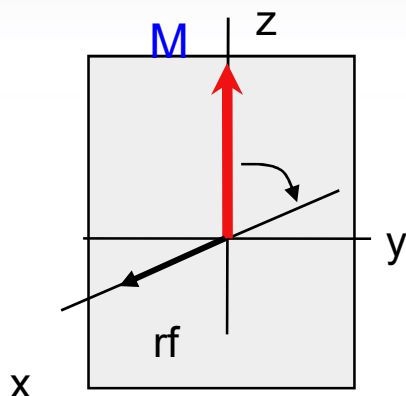


通过RF脉冲的照射，磁化矢量将以RF脉冲的照射方向为轴，在垂直于RF脉冲的照射方向的平面内转动。如使用X-脉冲则磁化矢量将围绕X-轴方向在YZ平面内转动。

- 只要RF脉冲打开，则磁化矢量的转动就不会停止。
- 磁化矢量的转动速度取决于脉冲强度。
- 脉冲长度将决定磁化矢量停止的位置。

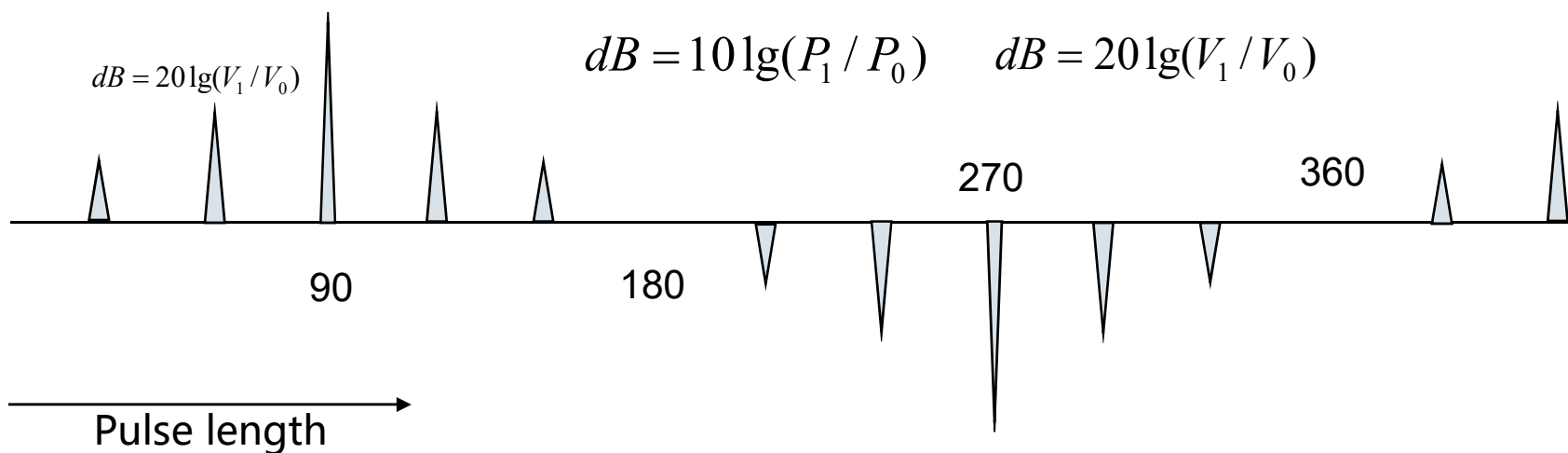


RF 脉冲的校准



90° 或 $\pi/2$ 脉冲将给出最大的信号，所以也就成为准确测定此参数的原因之一。在特定的功率强度下，通过采集一系列不同脉冲长度的谱图以确定最大值或零强度点。此点就给出90°或180°的脉冲。

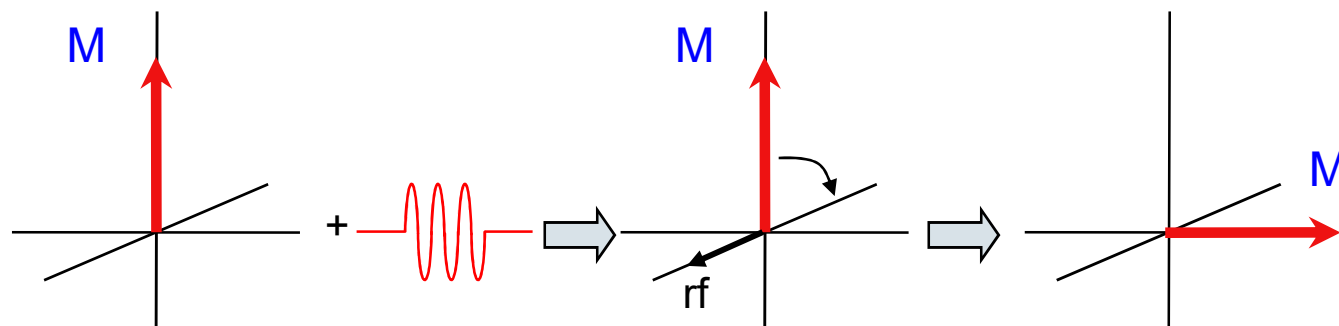
在BRUKER 仪器，RF 脉冲一般以 pn (e.g. $p1$)等参数来描述其标准单位是微秒(us)。功率强度是以 $plwn$ ， (e.g. $plw1$)等参数来描述其标准单位是dBw。



RF 脉冲



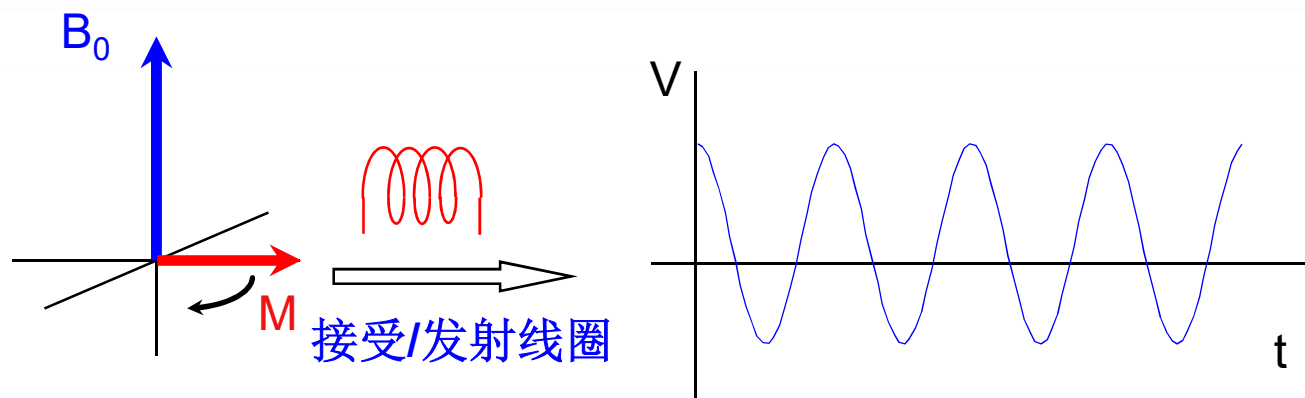
核磁信号只能在核磁化矢量位于XY平面时才能被检测到.使用与原子核 Larmor频率相同无线电射频即可将M 从Z-轴转向X-或Y-轴.



当观测信号时,RF 脉冲是处于关闭状态 (**DE**: dead time) .

NMR信号是在毫伏(microvolts), 而RF脉冲是在千伏kilovolts.

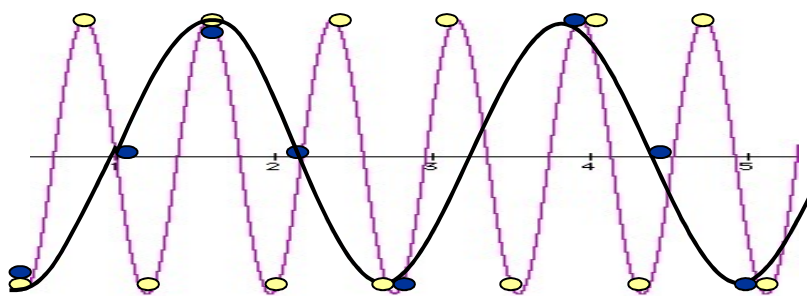
信号接收



经过脉冲照射后，磁化矢量被转到XY平面上并绕Z-轴旋转（**进动**）。由于此转动切割了接受器的线圈，并在接受器的线圈中产生振荡电流。其频率就是Larmor频率。

信号首先被送到前置放大器然后送到接收器。接收器分解此信号使之频率降低到**音频**范围。模拟数字转换器将此信号数字化。

- **Nyquist** 原理表明采样的速度至少要是最快的信号（频率最高）的两倍



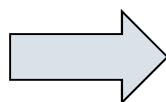
数据采集



采样快慢决定了观测的谱图的频率范围，在Bruker仪器中，采样的快慢由驻留时间参数(DW)确定。驻留时间和谱宽间的关系由下式确定：

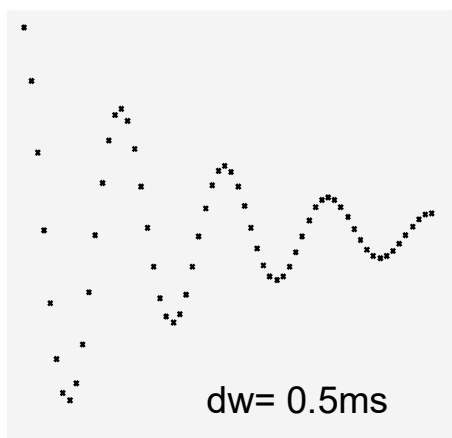
$$SR = 1/DW$$

$$SR = 2 * SW$$

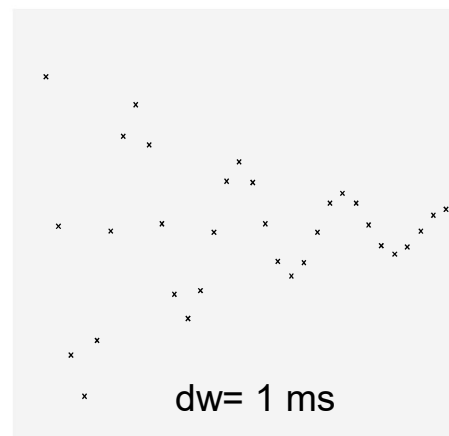


$$SW = 1/(2 * DW)$$

$$AQ = TD * DW$$

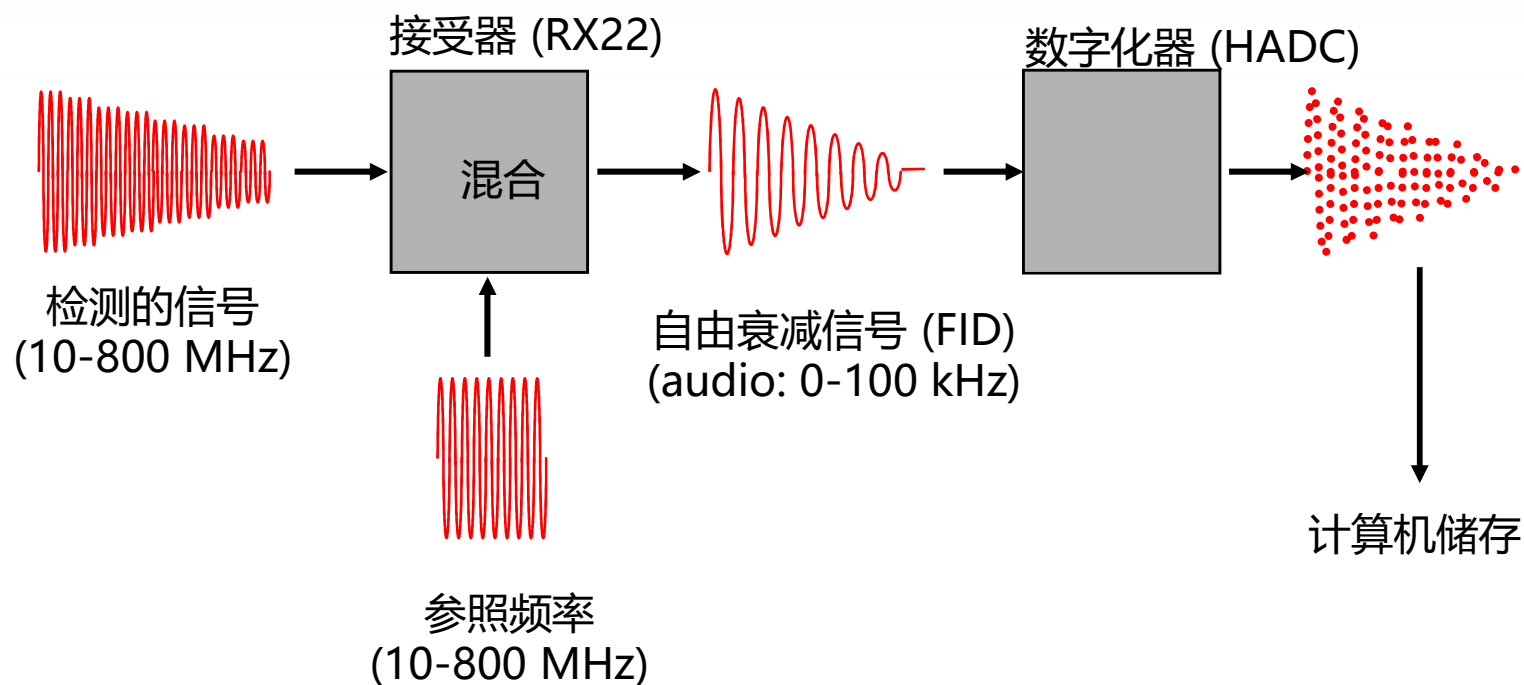


sw=1000 Hz



sw=500 Hz

接收器(Receiver)



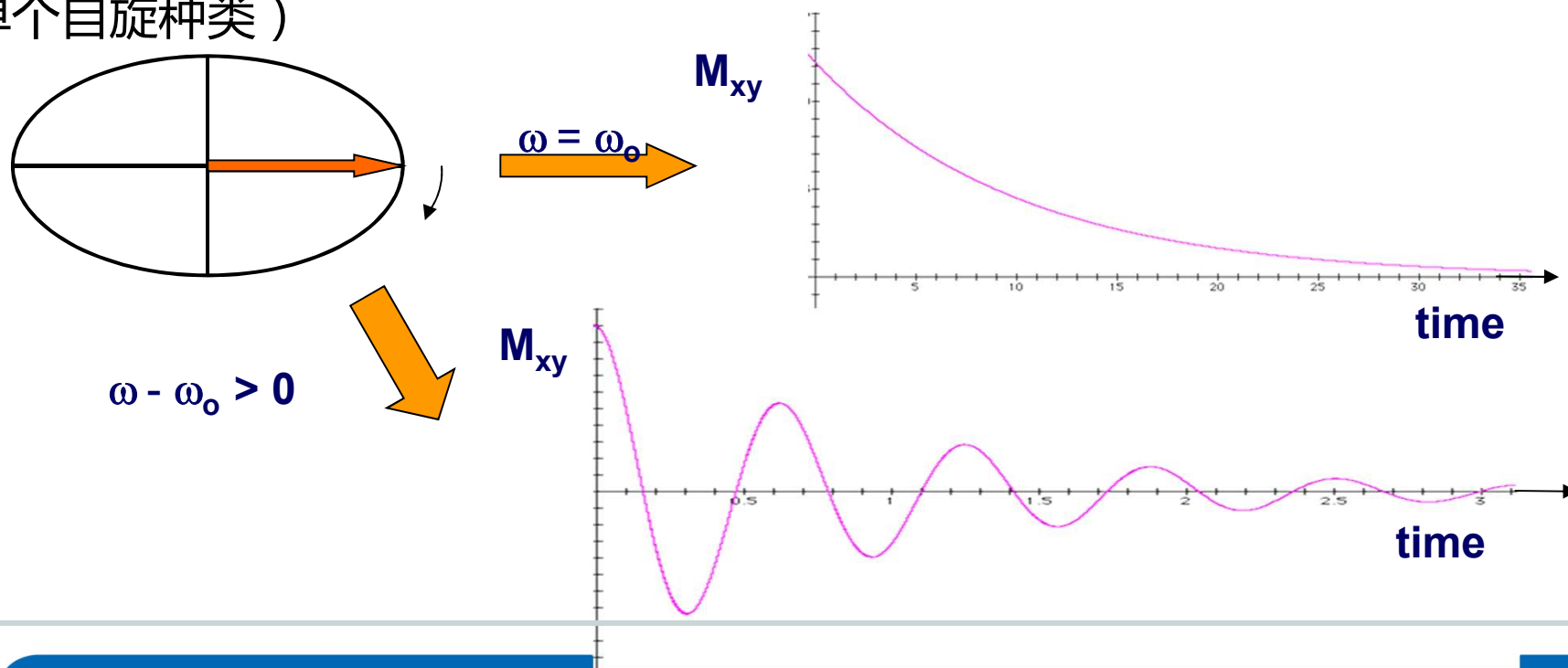
检测方法:

具有Larmor频率NMR信号与激发脉冲混合，所得的差被数字化。

自由感应衰减 (FID)

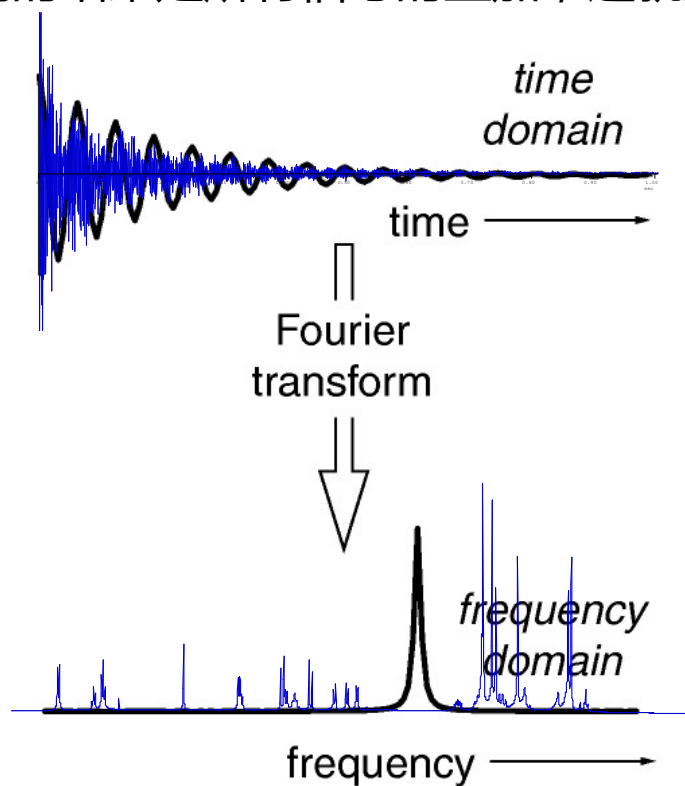


- 当宏观磁化矢量 $\mathbf{M}_0$ 受到 $\pi/2$ 脉冲的倾倒到 $\langle xy \rangle$ 平面后，检测线圈中会出现NMR信号。
- 核自旋系统会向平衡态恢复，宏观磁化矢量 $\mathbf{M}_0$ 在 $\langle xy \rangle$ 平面内的弛豫可用指数函数描述。所以检测线圈会检测到一个衰减的 $\cos(\omega - \omega_0)t$ 信号（单个自旋种类）

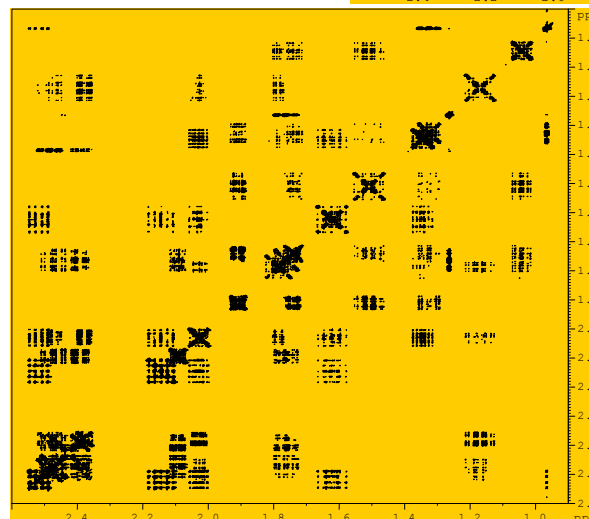
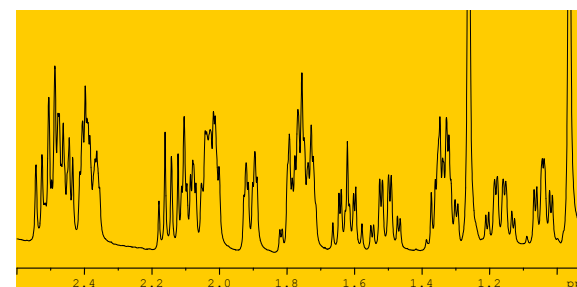


从NMR信号到NMR谱图-傅立叶变换

- 在实际的样品中可能存在数以百计的自旋系统，它们的共振频率各不相同。我们用射频脉冲同时激发所有的频率，接收线圈会同时检测到所有频率的信号。我们看到的結果是所有信号的叠加，这就是FID信号。



一维谱图



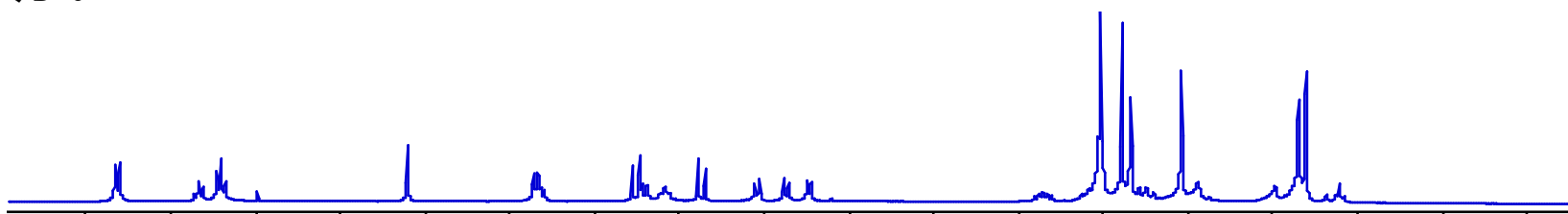
二维谱图

nD NMR (n=2,3,4)

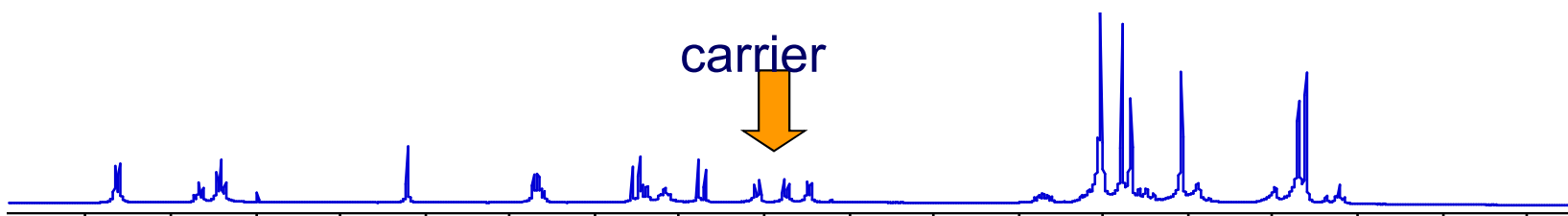
正交检测(Quadrature Detection)



- 通常 B_1 的频率会设置的比其它所有信号的频率都高（或低）。这样作的目的是为了 避免有信号的频率高于（或低于）参考频率。这样计算机就可以知道信号的正负了。



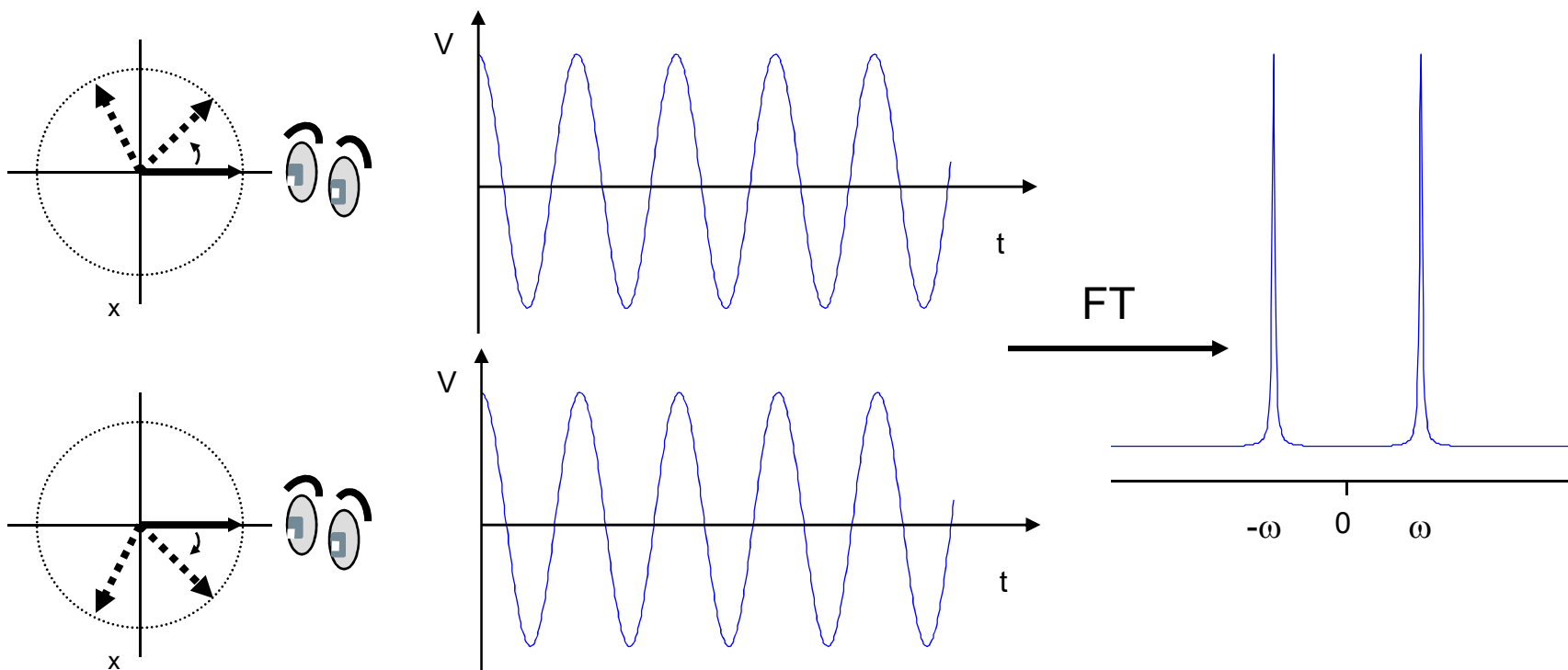
- 这样做会有两个问题：第一个是噪音问题，多余的噪音会折叠回NMR谱中，影响信噪比。第二个是激发脉冲问题，激发较宽的谱宽需要更高功率的脉冲。
- 最好的解决办法是把参考频率设置到谱频率的中间。



正交检测



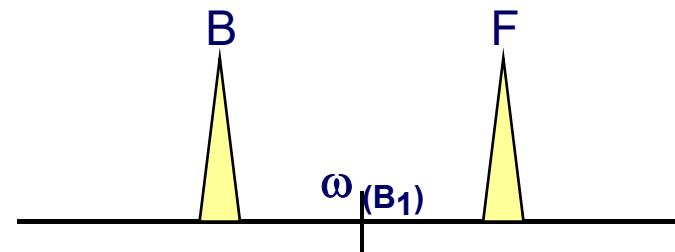
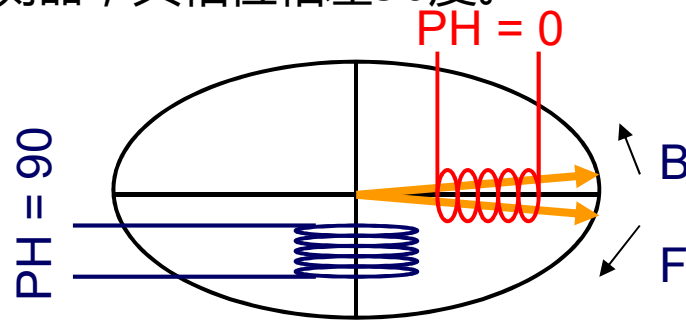
由于NMR检测器不能检测出顺时针或反时针方向的核磁信号,傅立叶转换后,将给出 $+\omega$ 和 $-\omega$ 两个峰.



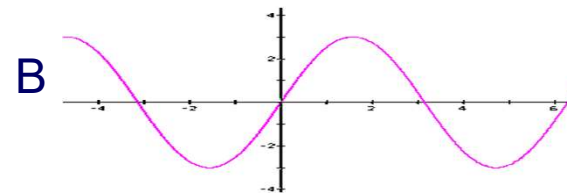
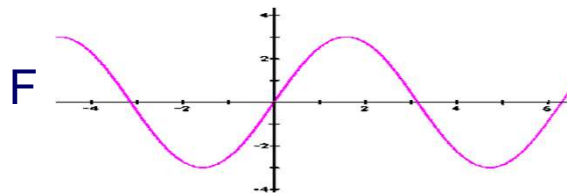
正交检测



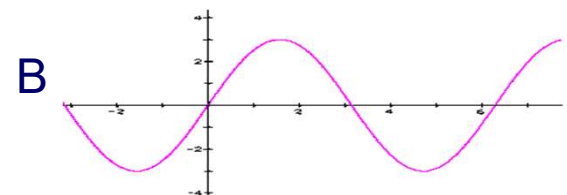
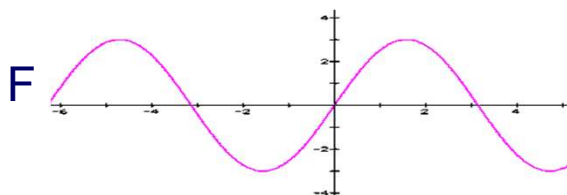
- 怎样才能区别信号的频率比参考频率快还是慢呢？解决这个问题的办法就是使用两个检测器，其相位相差90度。



PH = 0



PH = 90

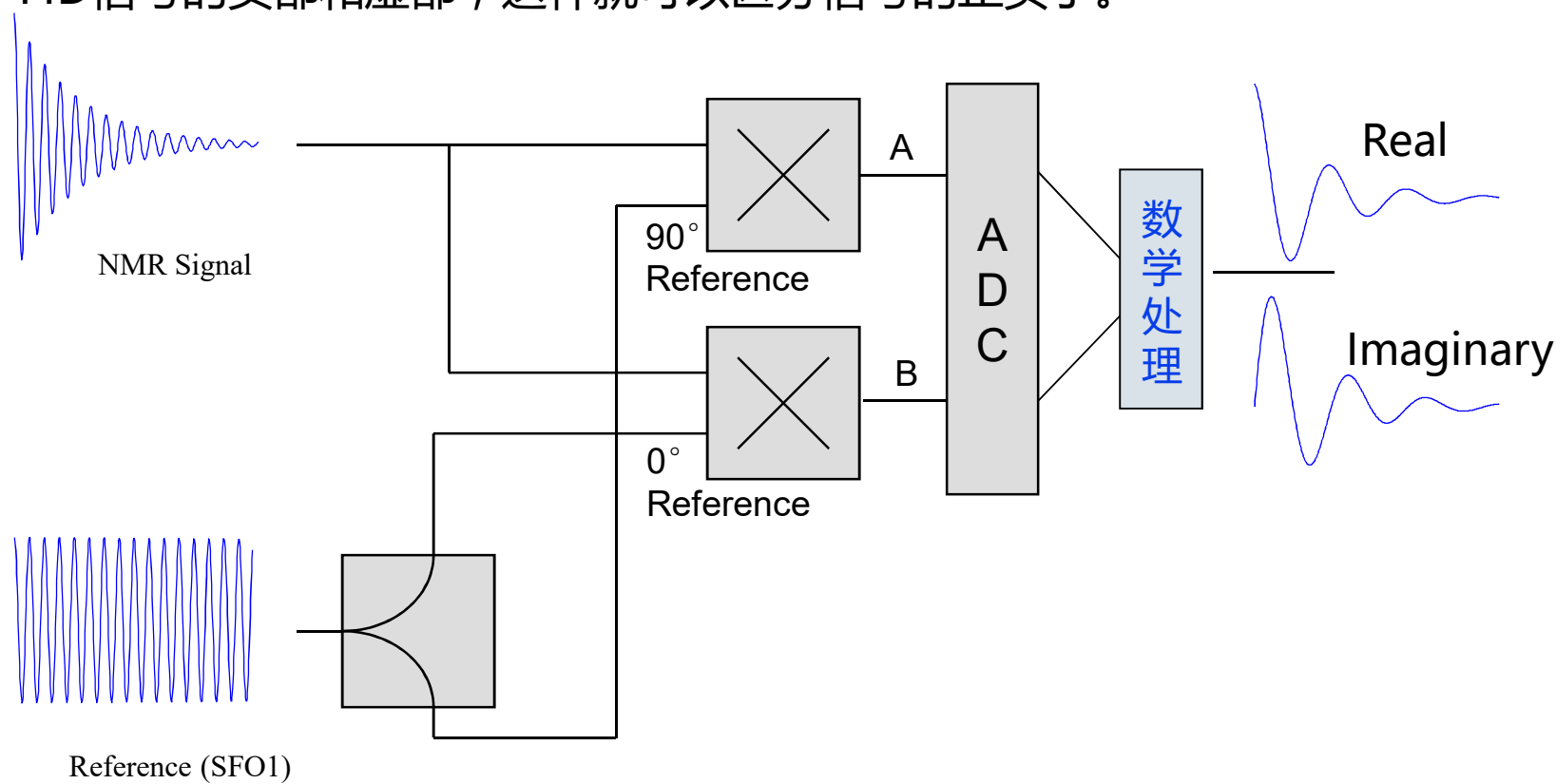


- 频率高的信号与频率低的信号正负相反，这样就可以区分开频率的正负。

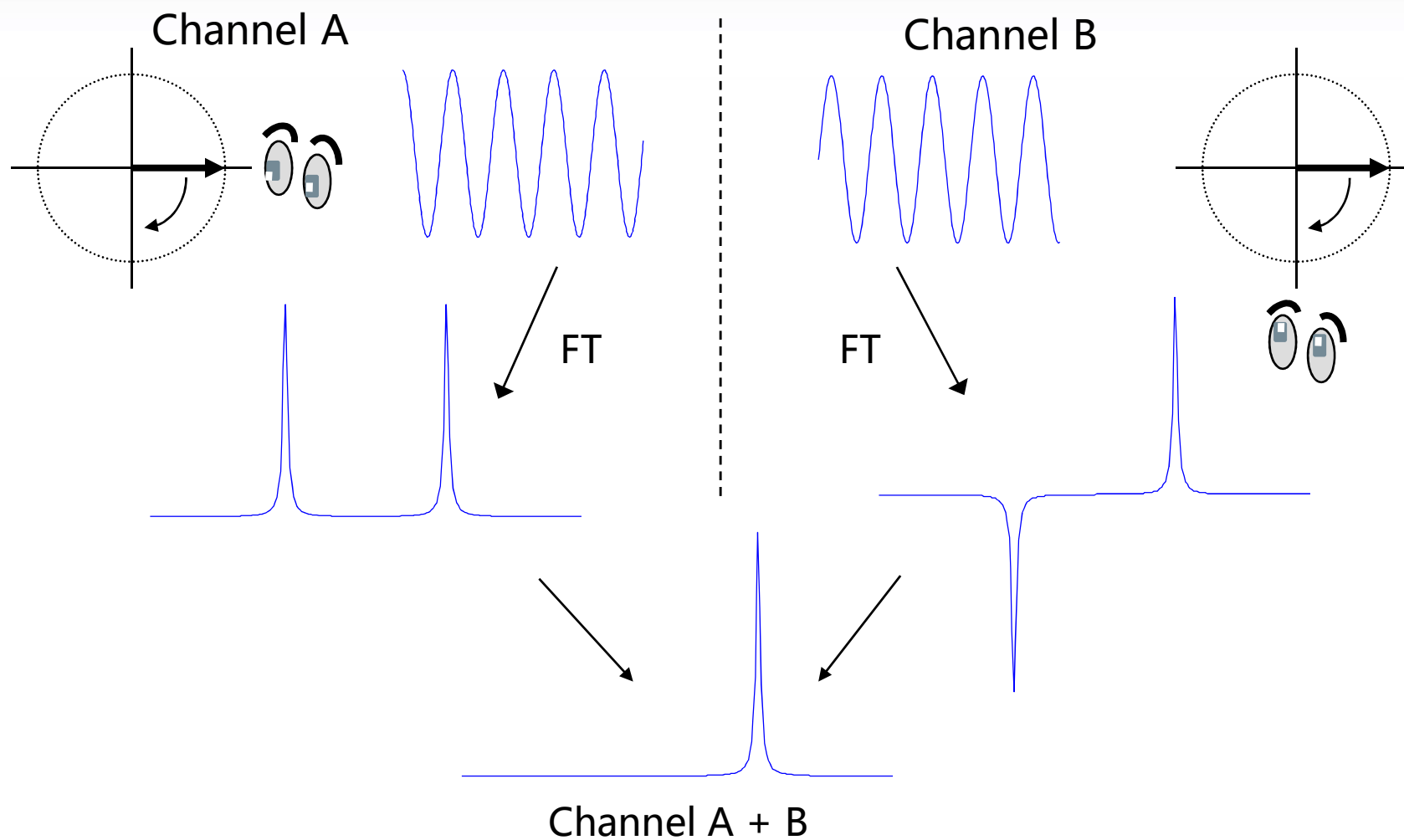
正交检测



实际应用中，并非使用两个检测器，而是使用一个检测器。将检测到的信号分成两部分，一个检测器的参考信号相对于另一个**相移90°**实现的。这两个信号构成了FID信号的实部和虚部，这样就可以区分信号的正负了。



正交检测

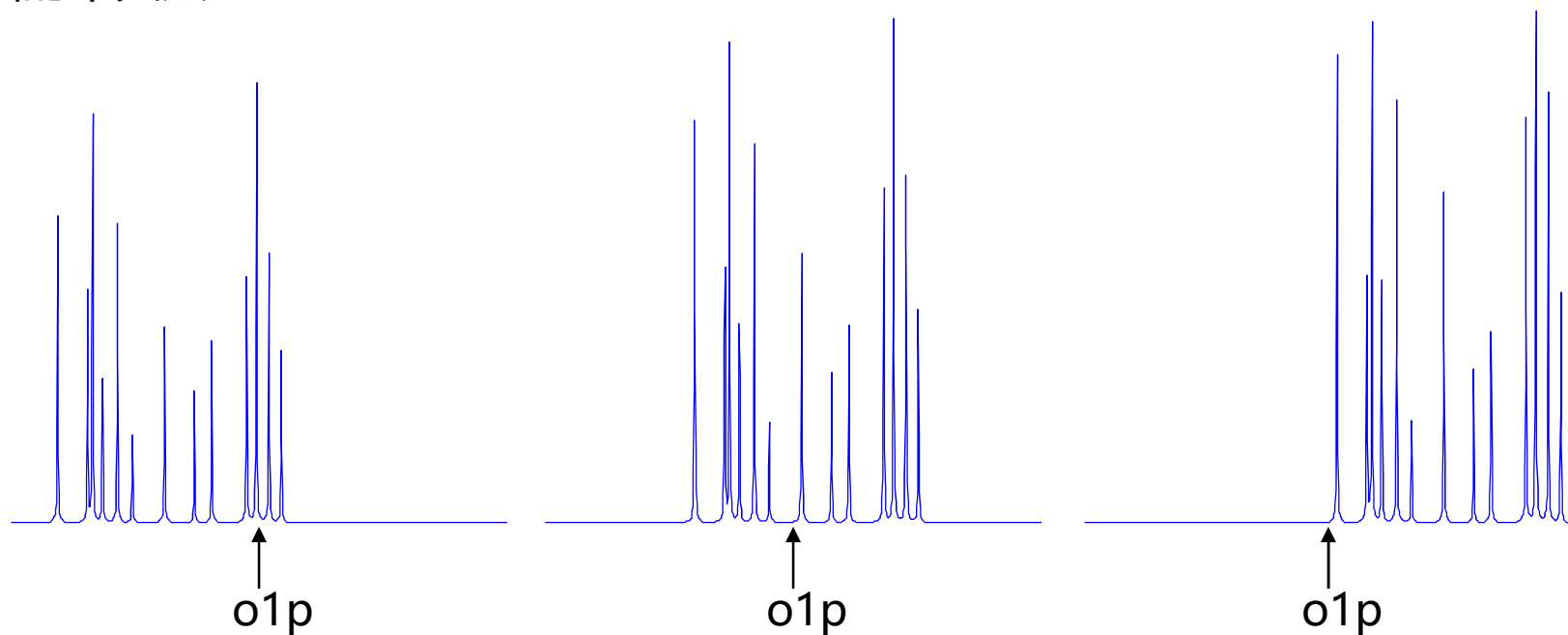


频域谱宽度(SW)和中心频率 (O1P)



在BRUKER的仪器中,频域谱图的中央点是由参数**SFO1** ($=\text{SF} + \text{O1P}$)确定。

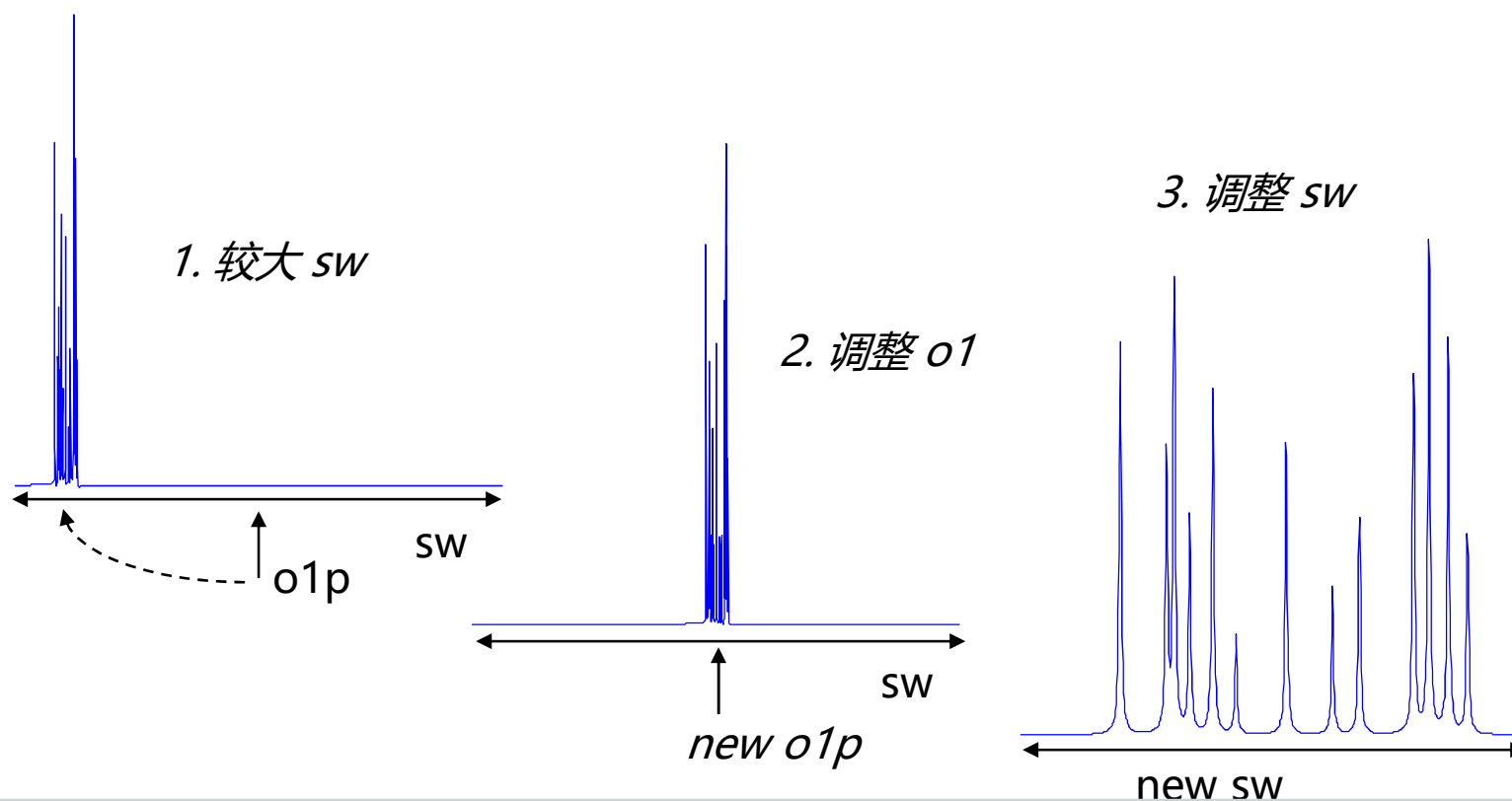
其中, SF是所观测的原子核Larmor频率; o1p 是偏置频率可以用来改变频域谱图的中央点。



频域谱宽度(SW)和中心频率 (O1P)



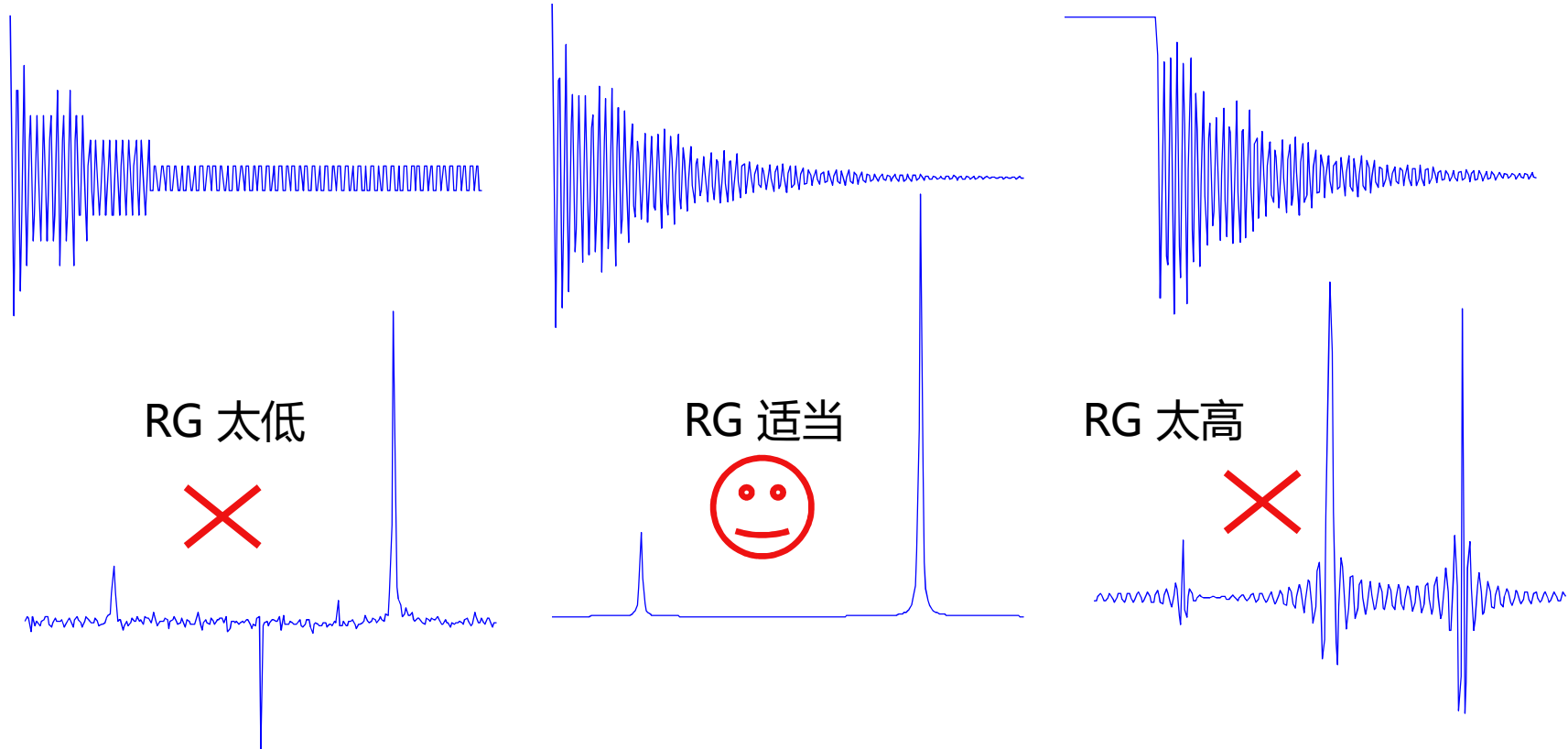
在实际测试未知样品时，可以使用较大的SW值采样。然后调整O1采样，最后再调整SW。



ADC (模数转换)



NMR 信号通常包含许多共振频率及振幅。为能更好的描述NMR信号，我们一般使用16 或18 bit ADC。增益值(RG)应被调节到一适当的值。既能充分利用又不至于使接收器过饱和。

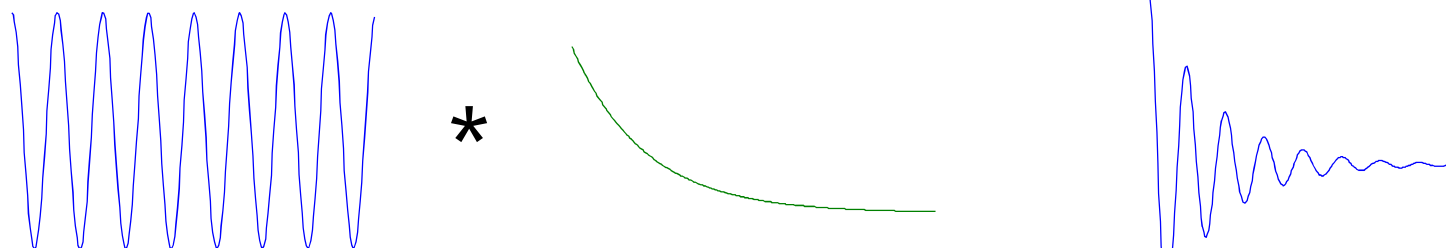


自由衰减信号(Free Induction Decay)

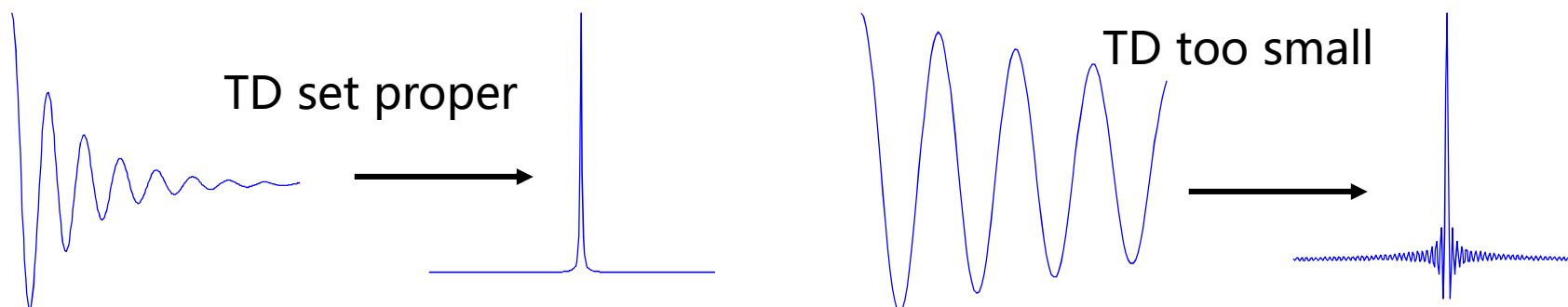


NMR 信号被称为自由衰减信号 (Free Induction Decay 或 FID)。

此信号并不能象COS函数一样保持同样的振幅持续下去，而是以指数的方式衰减为零。此一现象是由所谓的自旋-自旋弛豫造成 (T_2 relaxation)。



在BRUKER仪器中，时域信号的数据点是由参数TD 设定。为使时域信号能够被完全采集到，TD应为一适当的值，以免使信号被截断(truncation)。



信号平均(Signal Averaging)

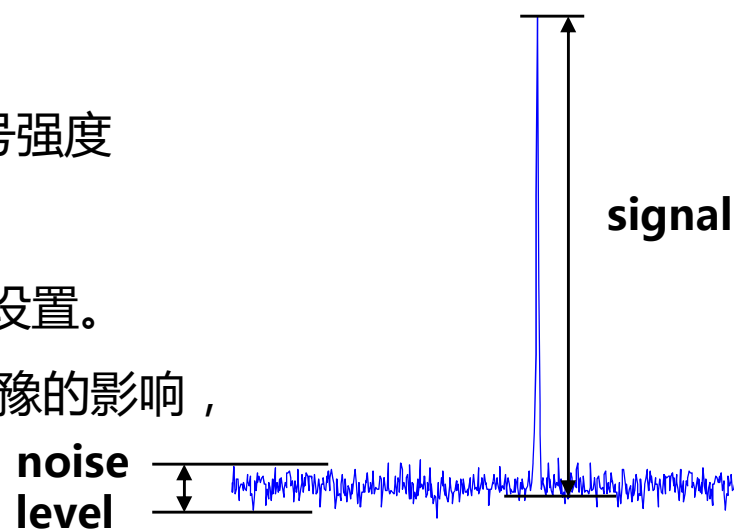


在测量NMR信号的同时，由于仪器的电子元件及样品本身产生的噪音也同样被接收线圈检测到。为了得到适当信噪比的图谱，我们一般可以增加扫描次数以达到要求的信噪比(S/N)。信号平均是指通过增加扫描次数来压制噪音而增加信号强度的方法。

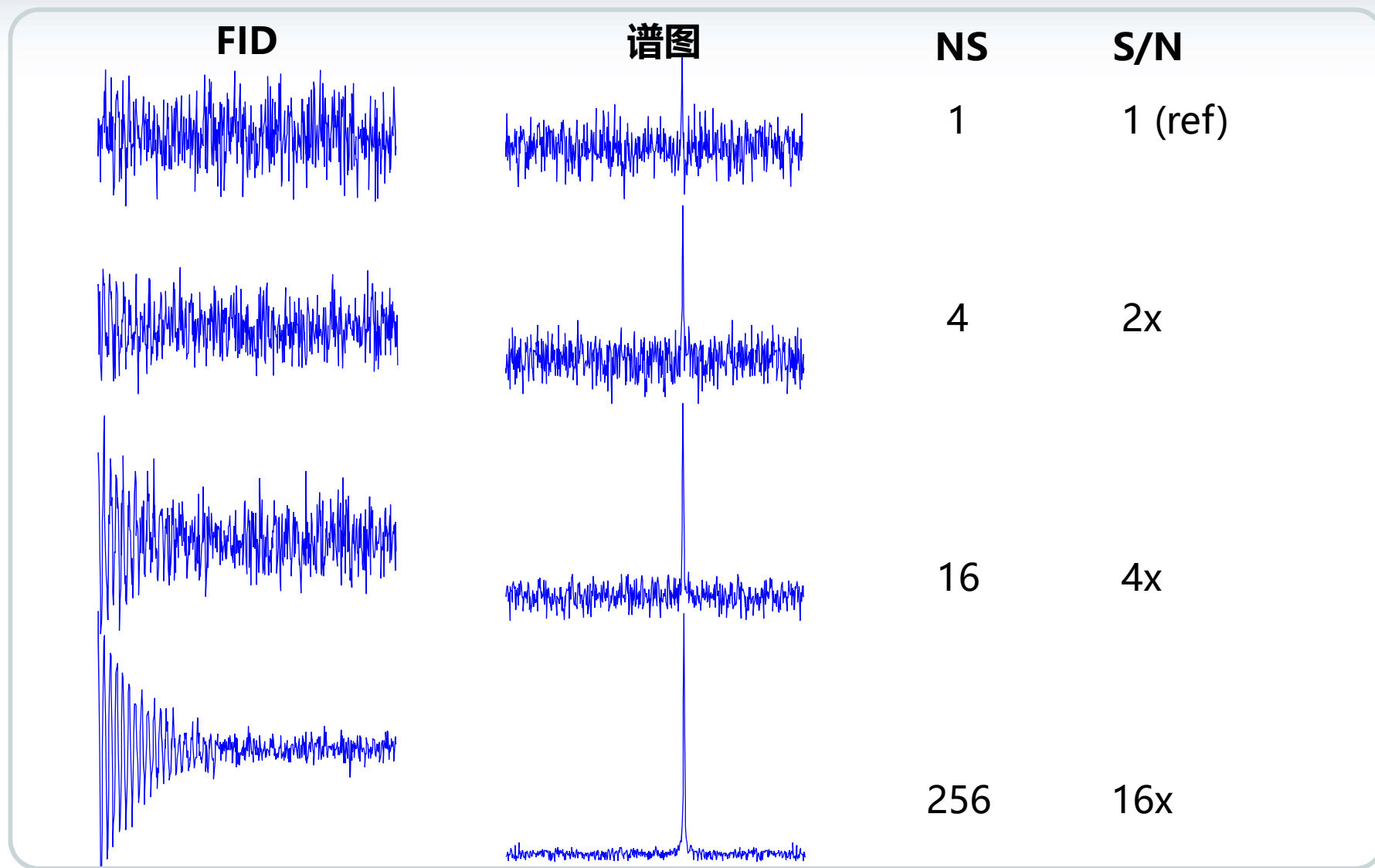
N次额外的扫描会给出 $\sqrt{n}$ 倍的增强的信号强度

在BRUKER仪器中，扫描次数是由参数ns设置。

另外，增加扫描次数时，一定要考虑T1弛豫的影响，
也就是说要考虑参数D1的设置。



信号平均(Signal Averaging)



弛豫现象(Relaxation)

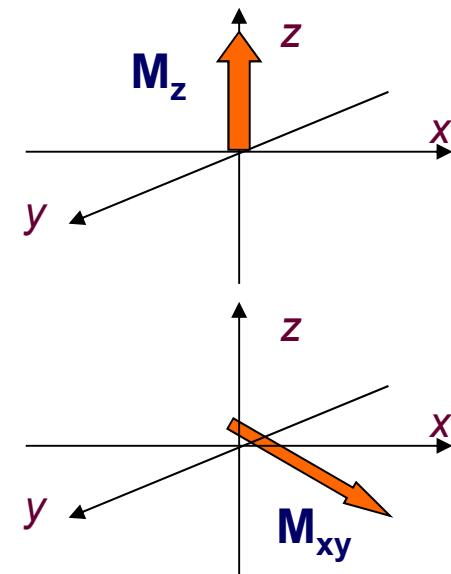
弛豫过程就是宏观磁化矢量回复到平衡态的过程。弛豫分为两种类型，它们都与时间成指数函数关系。

- **纵向弛豫**（自旋 - 晶格弛豫）（ T_1 ）

- 它主要影响磁化矢量在 z 轴方向的分量（ M_z ）
- 自旋系统与周围的环境发生能量交换，自旋系统恢复到平衡态。
- 与其它核的偶极耦合以及顺磁物质会影响到 T_1 时间的大小。

- **横向弛豫**（自旋 - 自旋弛豫）（ T_2 ）

- 它主要影响磁化矢量在 $\langle xy \rangle$ 平面的分量（ M_{xy} ）
- 自旋 - 自旋相互作用使得 M_{xy} 散相
- 还会受到磁场不均匀性的影响
- $T_2 \leq T_1$
 - 小分子： $T_2 \sim T_1$
 - 大分子： $T_2 \ll T_1$



弛豫效应



NMR信号是一个以常数为 T_2 的指数方式衰减的函数。

T_2 就是横向弛豫过程的时间常数。

此外，在XY平面的磁化矢量需要一定的时间回到Z-轴上。这一过程需要的时间就叫纵向弛豫时间，其时间常数是 T_1 。

T_1 和 T_2 与原子核的种类，样品的特性及状态，温度以及外加磁场的大小有关。

信号平均方法成功的关键就是要正确设定参数 D_1 。 D_1 必须是五倍的 T_1 以保证在下次扫描时磁化矢量完全回到Z-轴。

有时为节省时间，使用小角度的脉冲，重复扫描以达到增强信号的目的。

$T_1=30s$, 4 scans

a. $D_1=150s$; 90° pulse; 600s;

b. $D_1=15s$; 90° pulse; 60s;

c. $D_1=15s$; 30° pulse; 60s.



小角度快速激发快重复扫描

最佳偏转角



在长时间的累加实验中，通常采用“小角度激发快重复扫描”的方法，在最佳脉冲偏转角和等待时间T之间有如下关系：

$$\cos\theta_{opt} = ept(-T/T_1)$$

表 4-3 最佳脉冲偏转角 θ_{opt} 与等待时间的关系

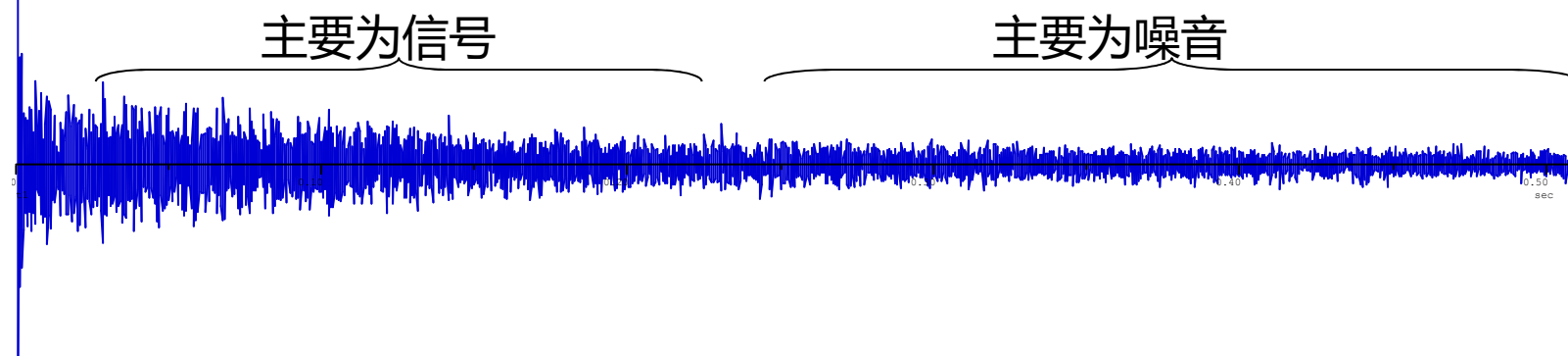
T/T_1	θ_{opt} (度)	累加次数	在 $500T_1$ 时间内所获得的相对信噪比(以 M_0 为单位)
5	90	100	10
2	82	250	15.7
1.5	77	330	17.8
1	68	500	20.8
0.5	53	1000	25.1
0.2	35	2500	28.7
0.1	25	5000	30.1
0.05	18	10000	30.8
0.02	11	25000	31.3
0.01	8	100000	31.3

Ernst角

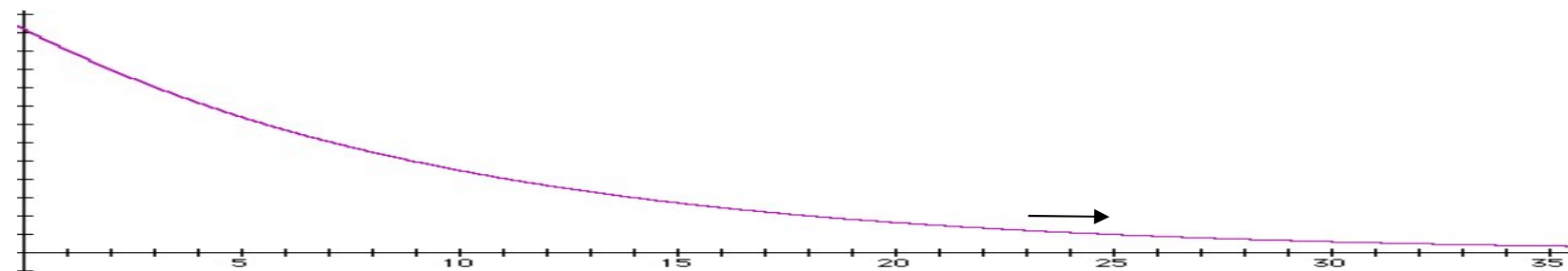
数据处理-窗口函数(Window Function)



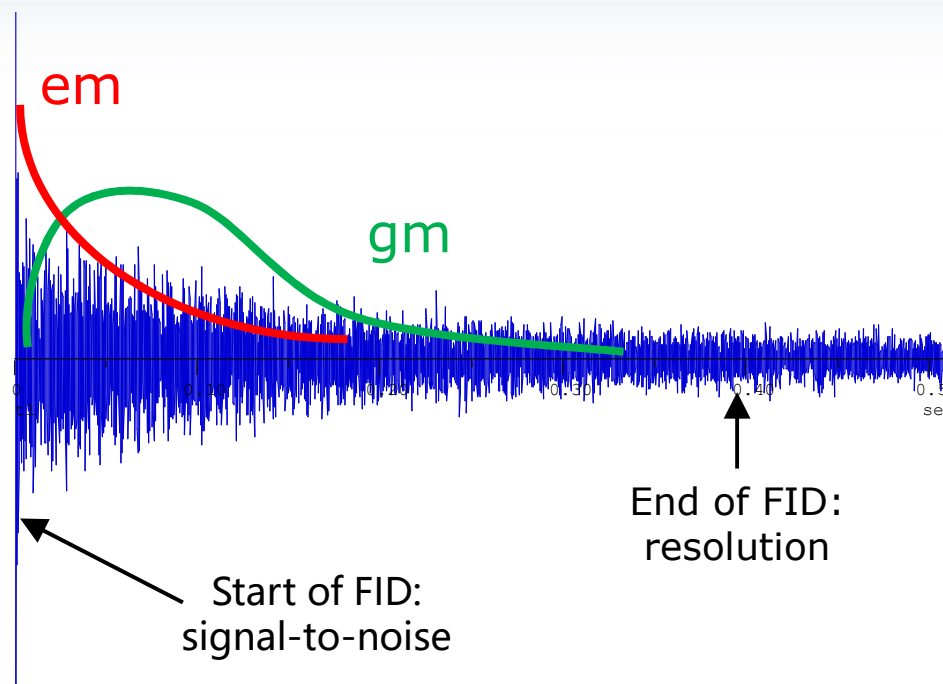
- 现在计算机中已经有了FID数据。我们可以对FID做一些处理，比如数字滤波等。真正的NMR信号主要位于FID前面的部分，随着 M_{xy} 的衰减，FID的后部主要以噪音为主。



- 直观上讲数字滤波就是给 FID 乘上一个函数，使噪音比例较大的FID末端变得较小。



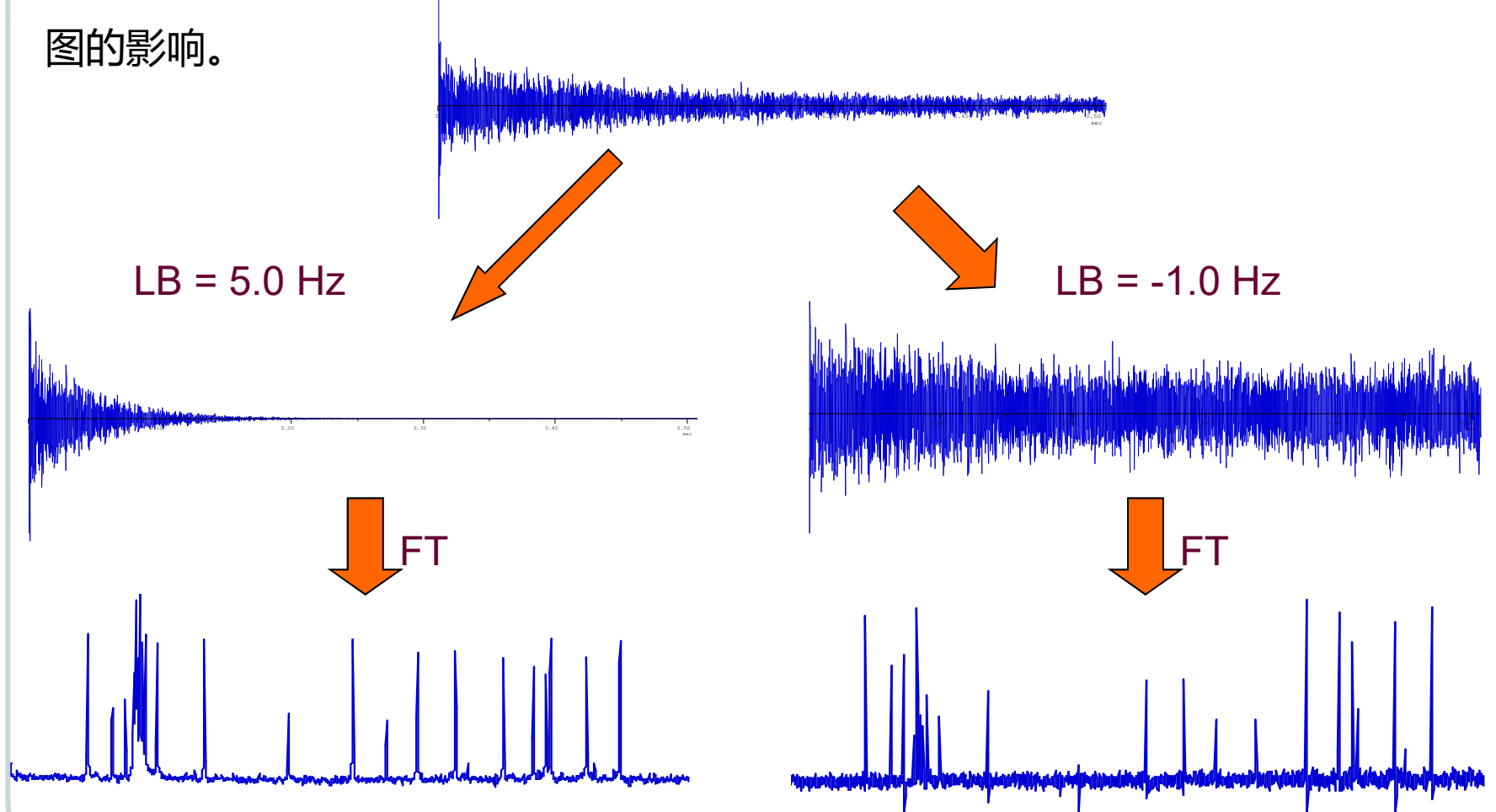
数据处理-窗口函数(Window Function)



Function	Command	Factor	Value
Exponential (指数)	em	LB	LB>0
Gaussian (高斯)	gm	LB & GB	LB<0 & 0<GB<1

灵敏度和分辨率的增强 (EM)

- 对于下面原始的FID，我们分别使用一个正的和负的LB值，以说明它们对最终谱图的影响。



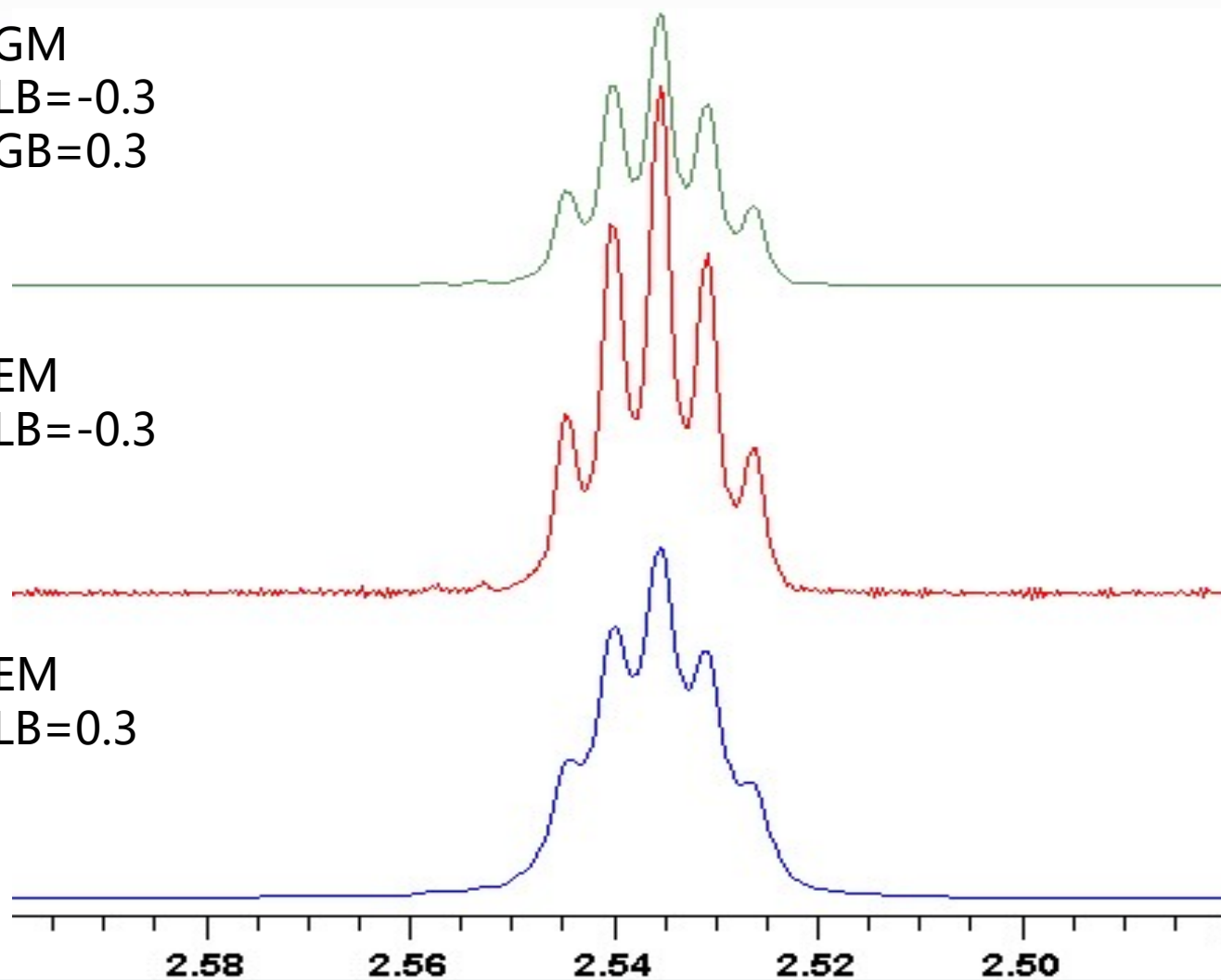
EM和GM



GM
LB=-0.3
GB=0.3

EM
LB=-0.3

EM
LB=0.3

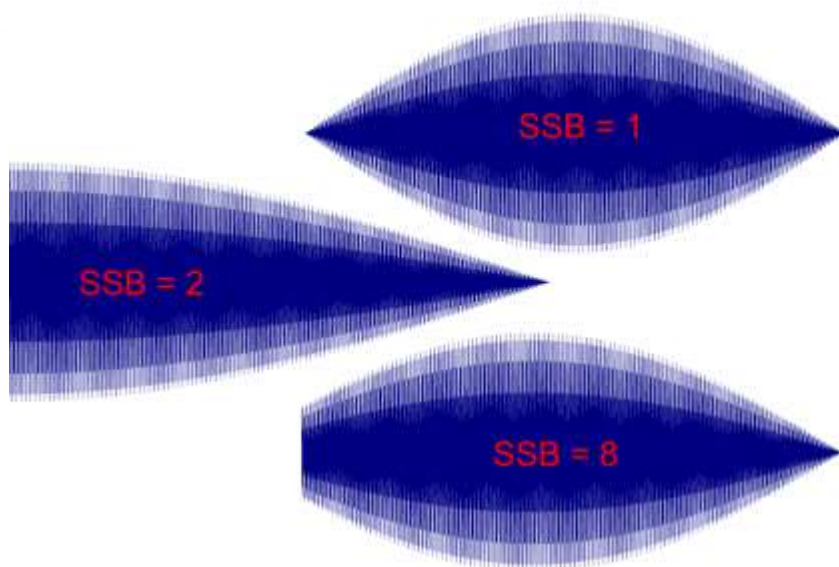


其它有用的窗口函数

Sine和qsine

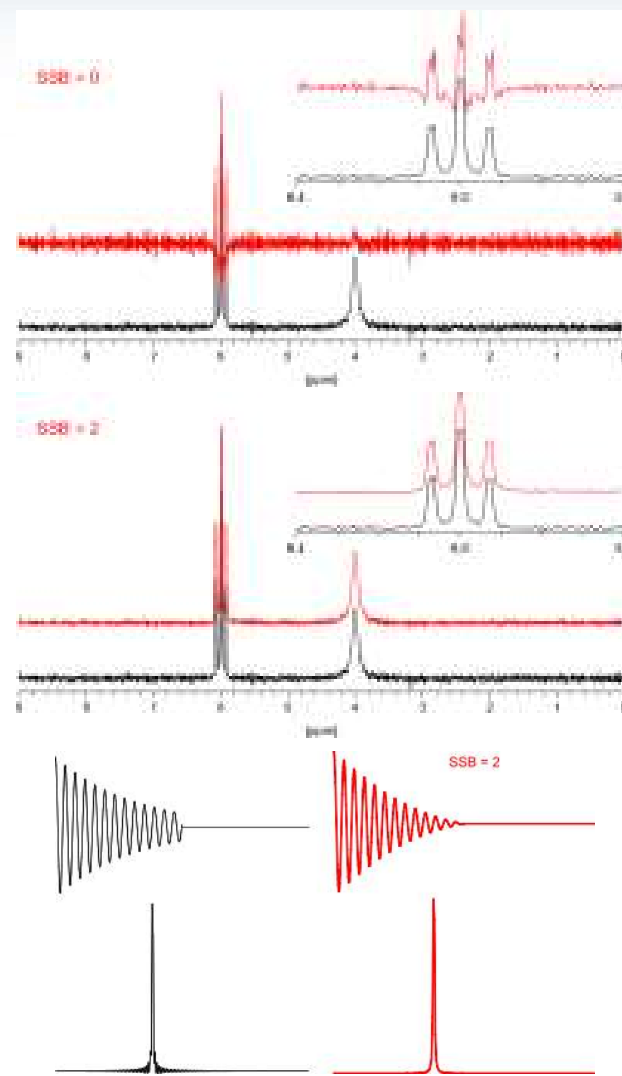


$$SINM(t) = \sin \left\{ \left(\pi - \frac{\pi}{SSB} \right) (t/AQ) + \frac{\pi}{SSB} \right\}$$



SSB	Result
0,1	Sine
2	Cosine
>2	Increasingly sine

- 主要用于二维谱



数据大小和冲零(Zero Filling)

- 数据的大小与谱宽（采样速度）、和采样时间有关。数据的点数越多，采样的时间就越长。
- 即使数据的存储空间足够大，过长的采样时间也会使实验的时间变得很长。
- 我们把每个点所对应的Hz 数定义为数字分辨率。

$$DR = SW / SI$$

SW - spectral width (Hz)

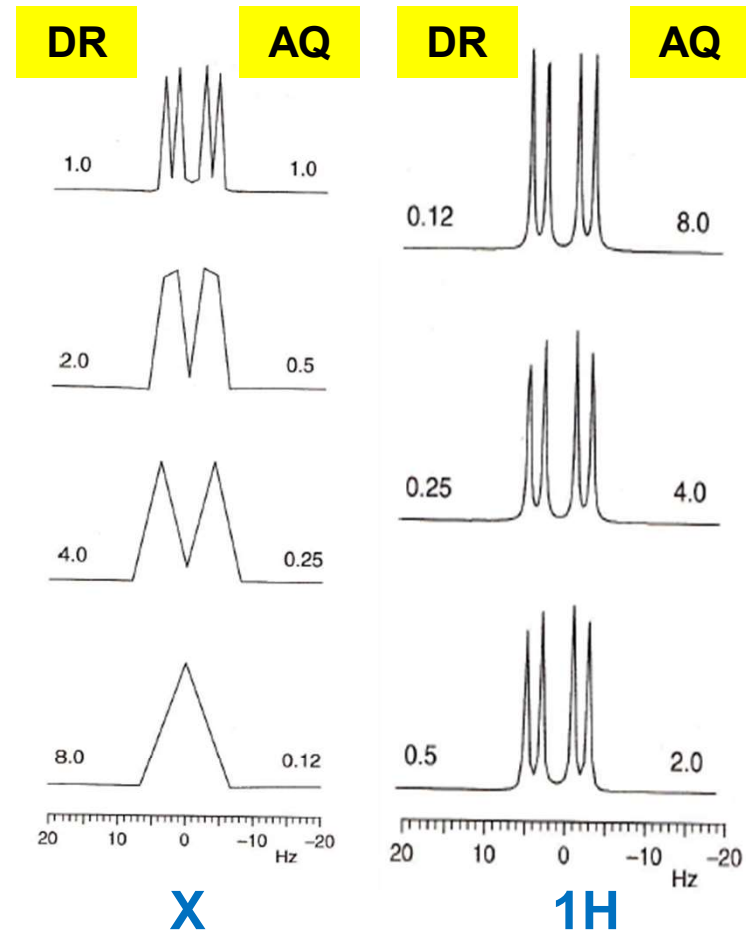
SI - data size (points)

- 对于 SW 为5 KHz，FID 点数为16K的数据，其数字分辨率为：0.305 Hz/point.
- 一个很明显的问题是：当SW很大而SI很小时，数字分辨率就很低，不能准确的反映出谱峰形状。

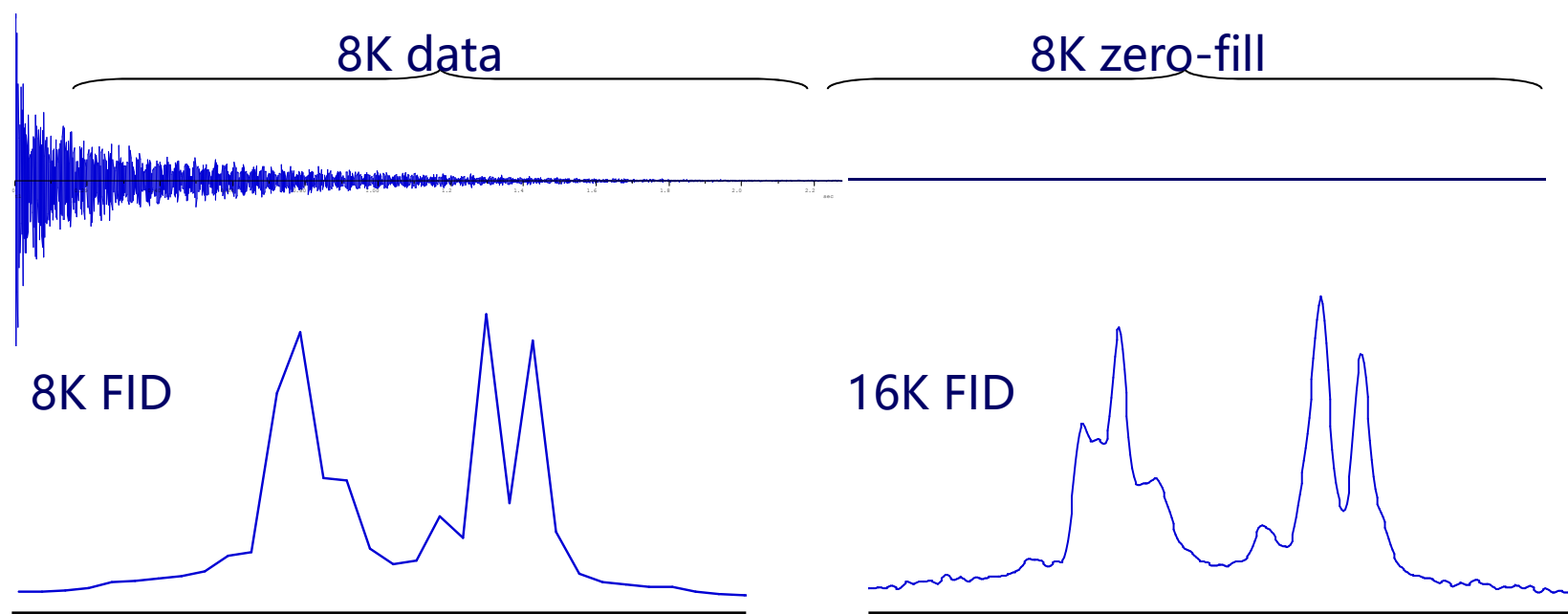
谱图的数字分辨率

$$AQ = TD \times DW = \frac{TD}{2SW}$$

$$DR = \frac{SW}{SI} = \frac{2SW}{TD} = \frac{1}{AQ}$$

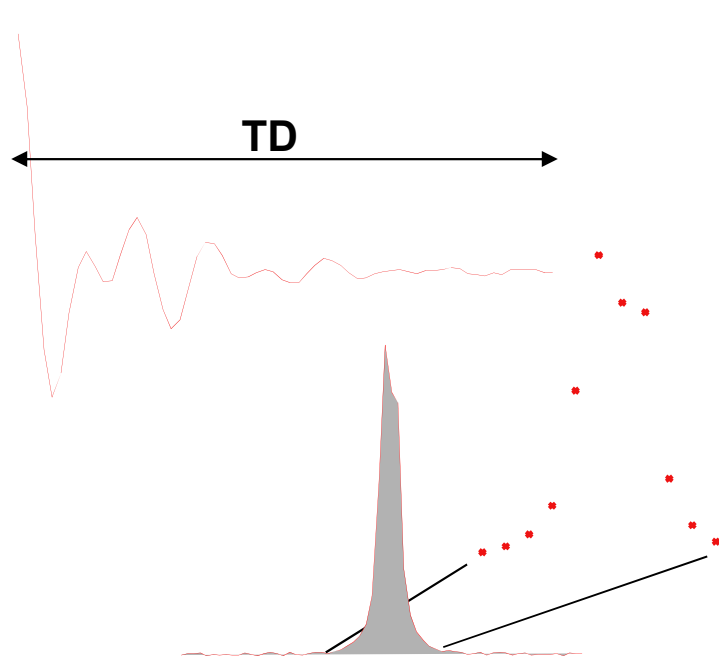


- 当采样时间不是足够长（数据点数较少）时，通过冲零可以提高数字分辨率。
- 冲零就是在FT前，在FID的末端加上大小为零的点。通常冲零的点数为1倍或2倍

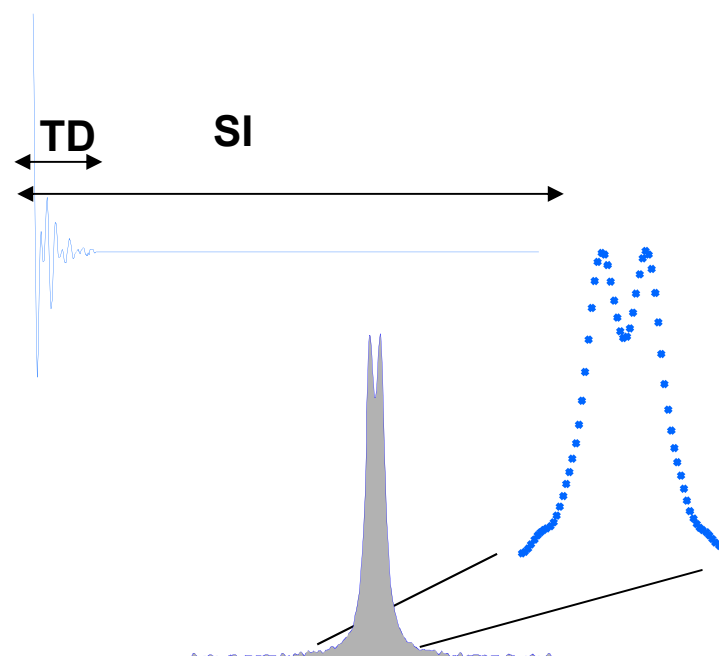


- 通过这种方法可以提高数字分辨率，通常可以提高谱图的质量。如果最初的FID点数太少，通过冲零也不能得到好的谱图。

在Topspin软件中，冲零是通过设置SI的值来实现的。当SI大于TD时，软件会自动冲零

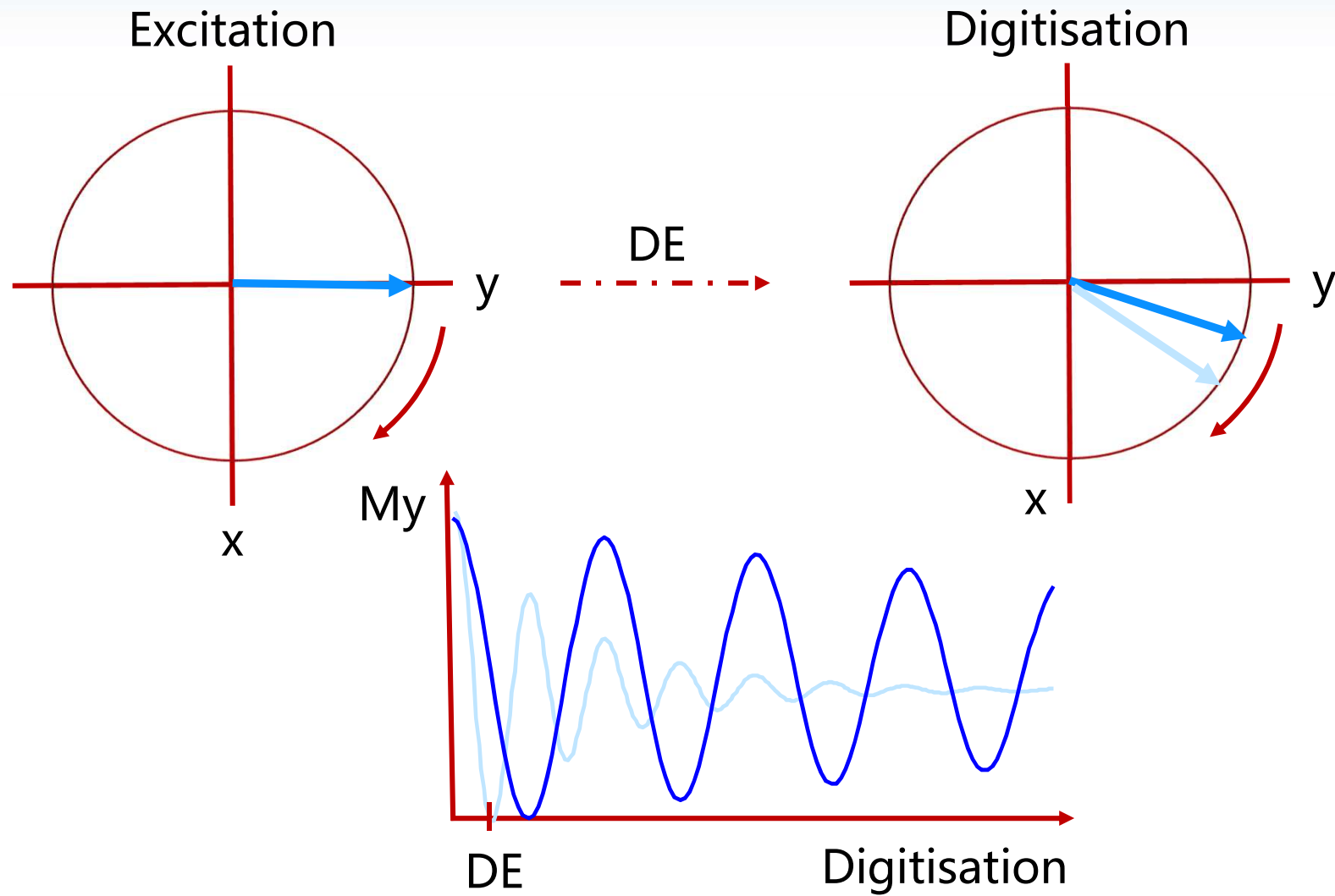


TD=SI=128



TD=128; SI=1024

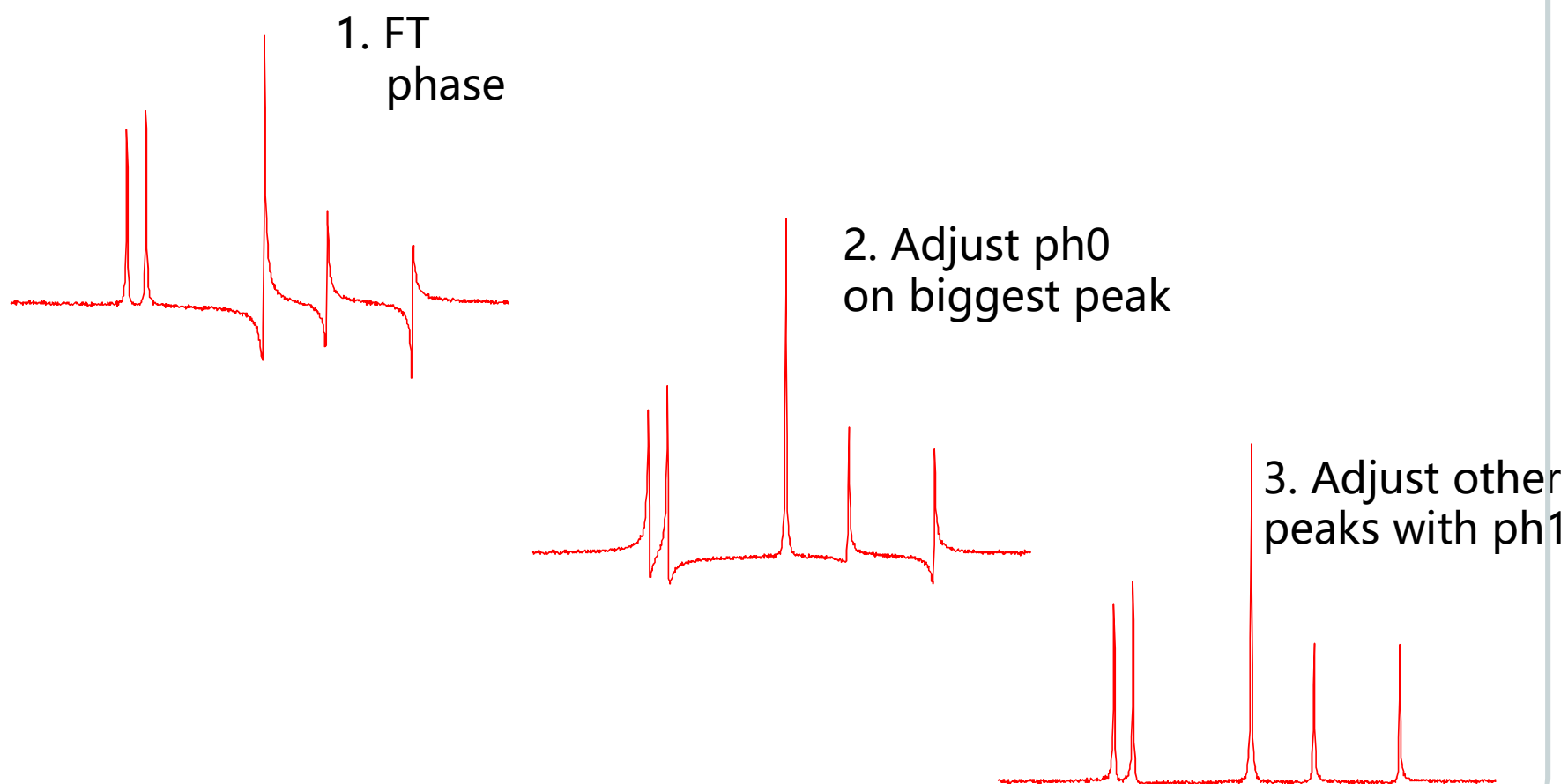
相位调整(Phasing)



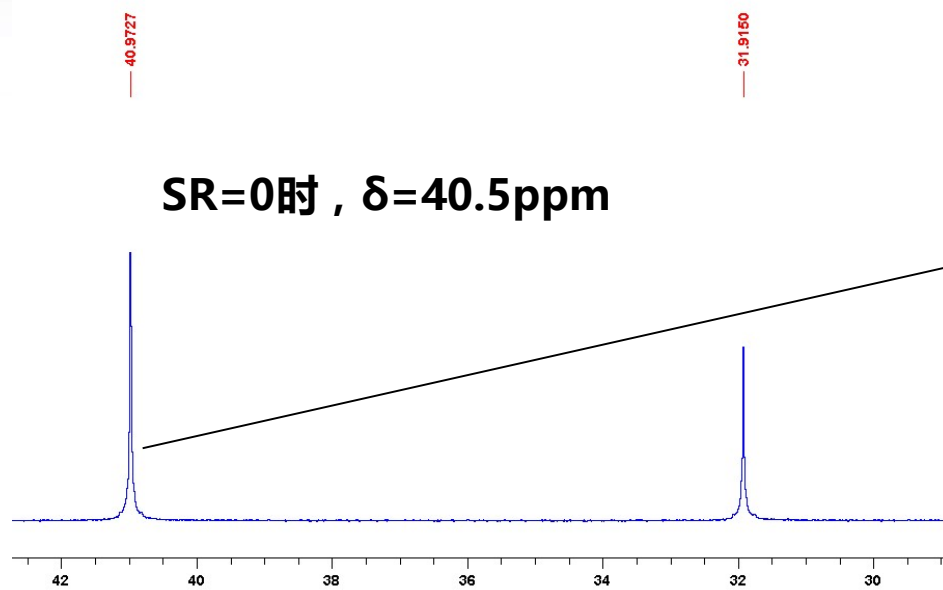
相位调整(Phasing)



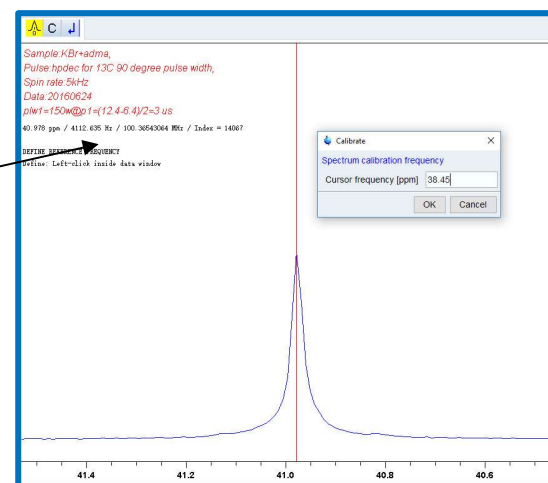
在BRUKER仪器中，相位调整首先对最大峰进行零级相位调整 PH_0 ，然后以一级相位调整 PH_1 来调节其他的峰。



SR : 化学位移参考频率值



定标 $\delta=38.45\text{ppm}$ 时, SR变为253.73



^{13}C MAS NMR spectrum@adam

- 当定标后SR值较小时（1000左右），可以直接通过校准化学位移值来定标
- 当定标后SR值很大（2000及以上），则表明场漂严重，需要通过调整Field来定标(锁场选择溶剂错误排除在外)

Outlines



- 核磁共振的基本原理
- 核磁共振谱仪的硬件介绍
- 核磁共振信号采集和处理的相关参数介绍
- **核磁共振样品的配制**
- 核磁共振谱图的特性参数



NMR 样品的要求



- 样品：非磁性及非导电性
- 样品量： $\sim 10^{15}$ 原子核 (10^{-8}mol)，
例：400MHz NMR谱仪
(^1H 谱：MW=300D，2~3mg)
- 浓度太低：
谱图信噪比低，需要很长时间累加
- 浓度太高：
由于溶液粘度的提高，磁场均匀性变差和弛豫增快导致谱图分辨率的下降



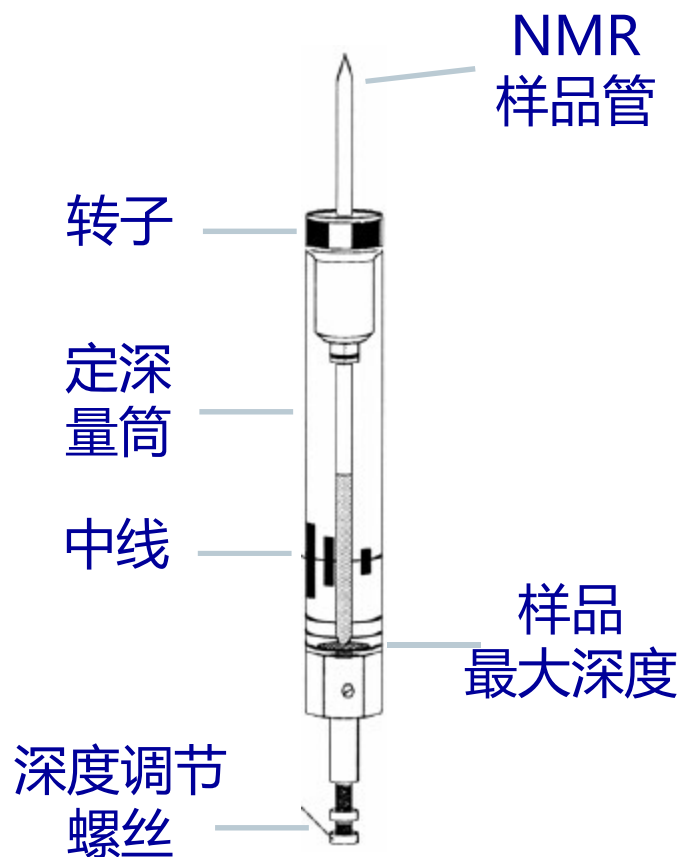
氕代试剂的选择

保证实验期间磁场的稳定，需要用氕代试剂进行锁场。可综合以下因素进行选择：

- 溶解度：越大越好
- 溶剂信号对样品谱的干扰：溶剂信号不能与样品信号重叠
- 溶剂的熔点和沸点：在实验温度范围内保持液体状态
- 粘度：越小越好
- 成本：氕代原子越多，价格越高
- 水含量：溶剂吸湿性，降低水含量的方法：
 - 用干燥剂进行过滤；
 - 用分子筛储存溶剂；
 - 尽可能选用0.5ml左右的小瓶试剂

样品的体积

500ul (~4cm)

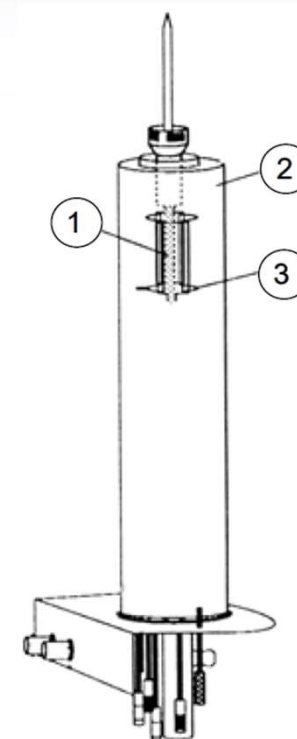


- 样品体积太少：匀场困难
- 样品体积太多：对流，温度不均
- 大量类似样品：样品体积一致可减少匀场时间及难度
- 通过离心去除沉淀或悬浮物，以免影响匀场，降低分辨率
- 溶液的上表面和下表面（即样品管底部）是等距的，但如果样品量足够多，就直接把样品管推到样品最大深度即可。

可能的损害



- 样品高度量取不正确就放入磁体
- 在盖着防尘盖时，从磁体中弹出样品管
- 在没有压缩气体支持下往磁体内放入样品管
- 发射的RF脉冲太长、太强或又长又强
- 往未连接的导线或调谐不好的探头中传输RF能量



Outlines



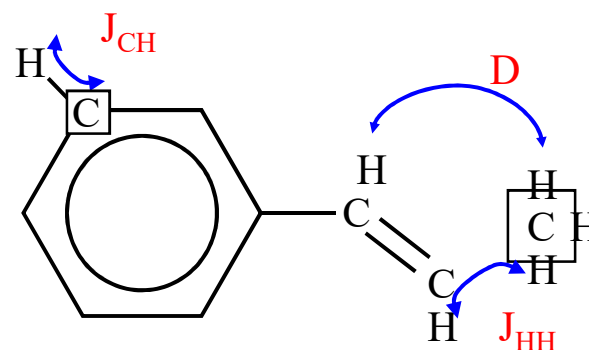
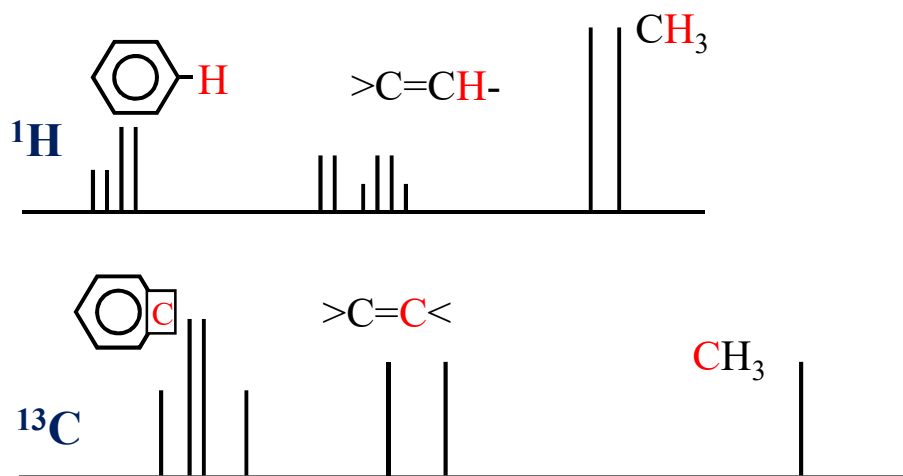
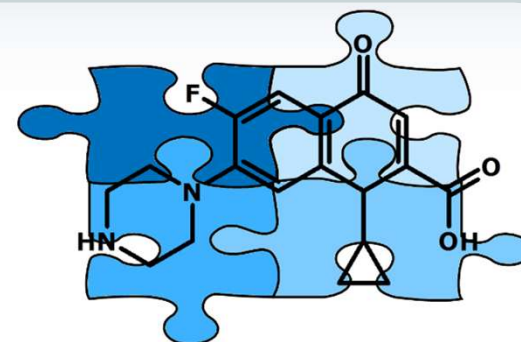
- 核磁共振的基本原理
- 核磁共振谱仪的硬件介绍
- 核磁共振信号采集和处理的相关参数介绍
- 核磁共振样品的配制
- **核磁共振谱图的特性参数**



NMR谱图包含的信息

Information:

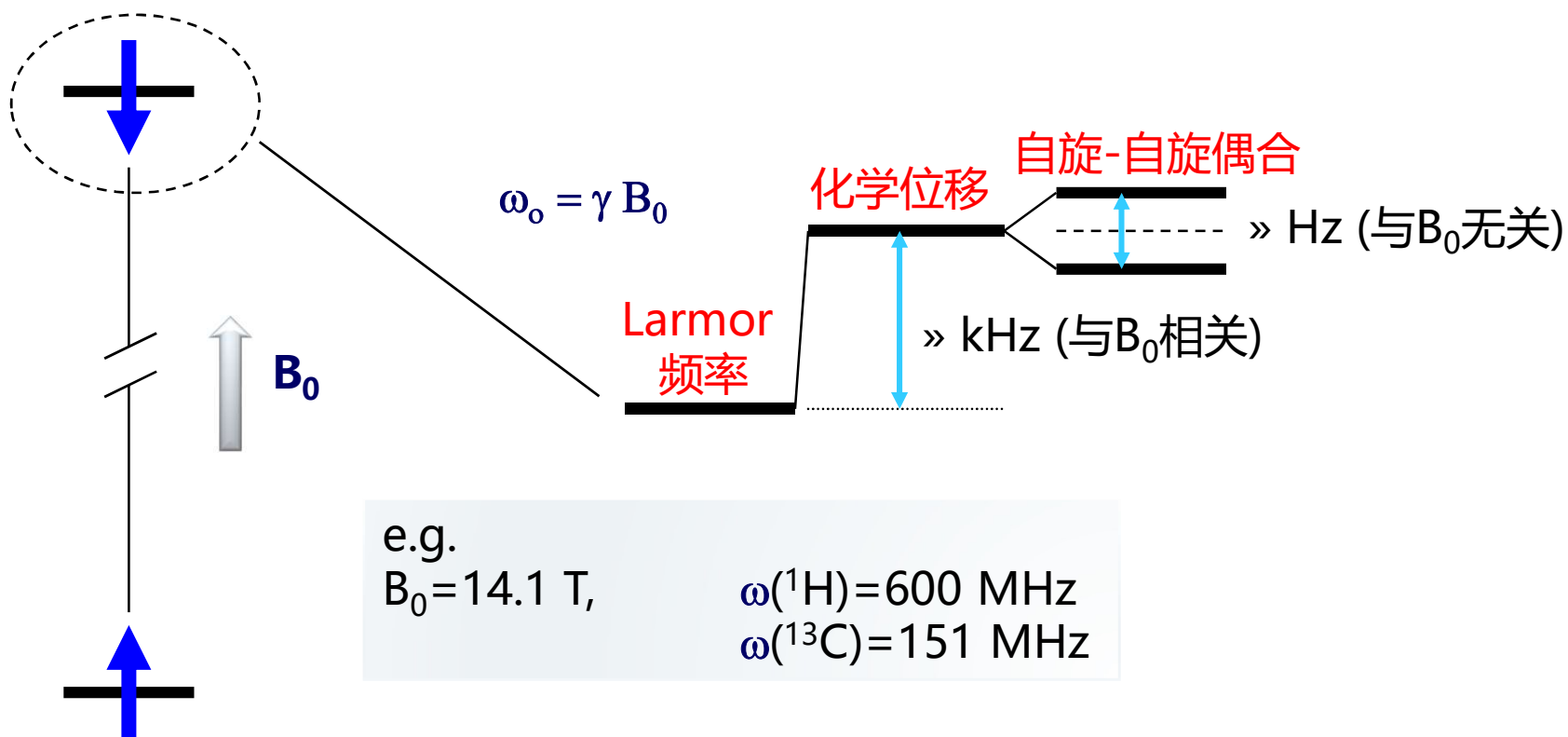
Larmor频率	原子核
化学位移	结构测定(功能团)
J-偶合	结构测定(原子的相关性)
偶极偶合	反映分子运动 (固体) 及空间距离
弛豫	动力学



化学位移与J耦合

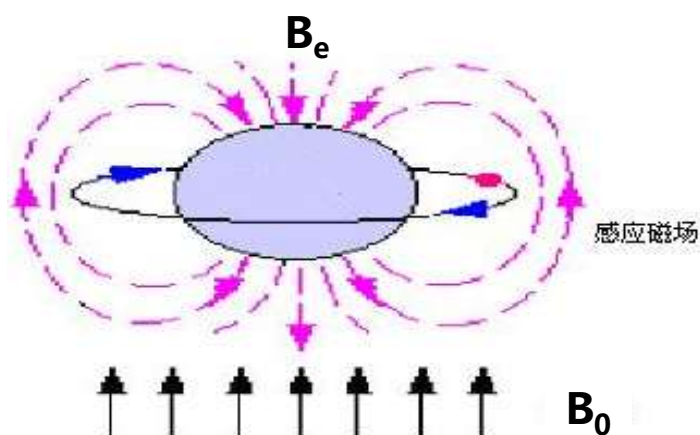


分子中的原子并不是孤立存在,它不仅在相互间发生作用(耦合)也同周围环境(化学位移)发生作用,从而导致相同的原子核却有不同核磁共振频率.



化学位移 (Chemical Shift)

化学位移产生的原因？



原子核实际感受到的磁场:

$$B_{\text{eff}} = (1 - \sigma) B_0 \quad (\sigma: \text{屏蔽常数})$$

实际的共振频率：

$$\omega = \gamma(1 - \sigma)B_0$$

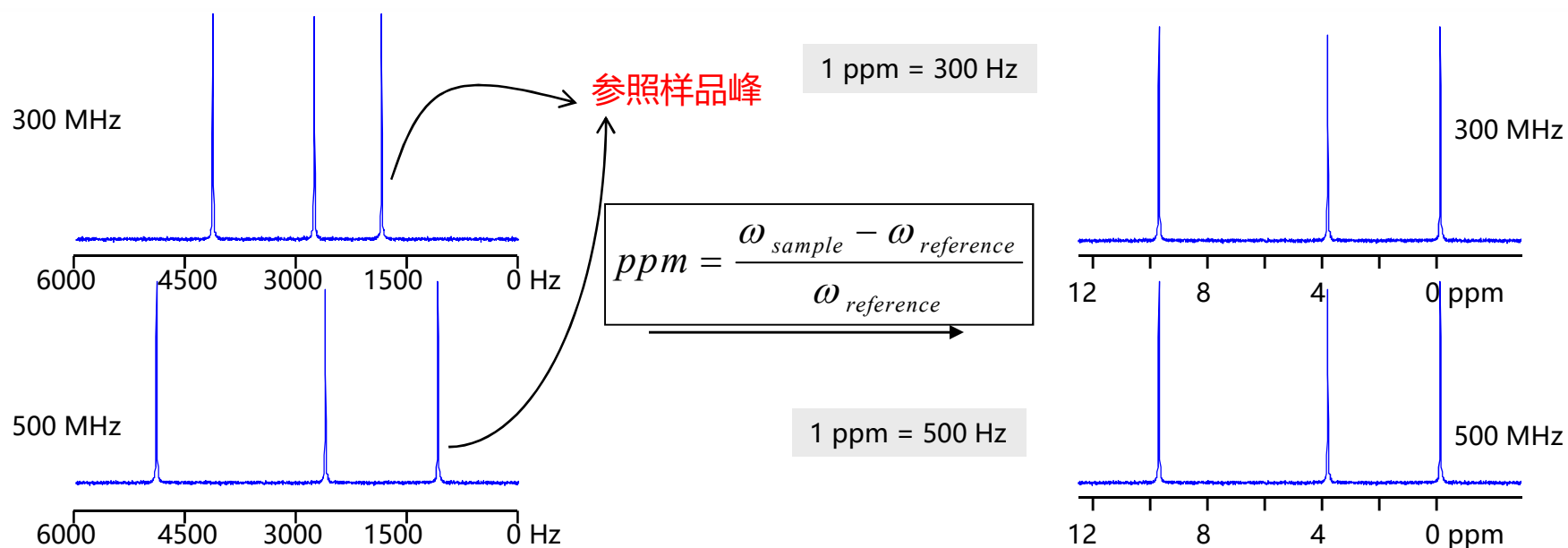
同种原子核在不同的化学环境中，有不同的屏蔽常数，产生不同的共振频率：
 ω_A 、 ω_B ，二者的绝对频率差别：

$$\omega_A - \omega_B = \gamma(\sigma_A - \sigma_B) B_0 \quad (\text{与外磁场强度} B_0 \text{有关})$$

相对频率差别： (通常 $\times 10^{-6}$, 用ppm值表示)

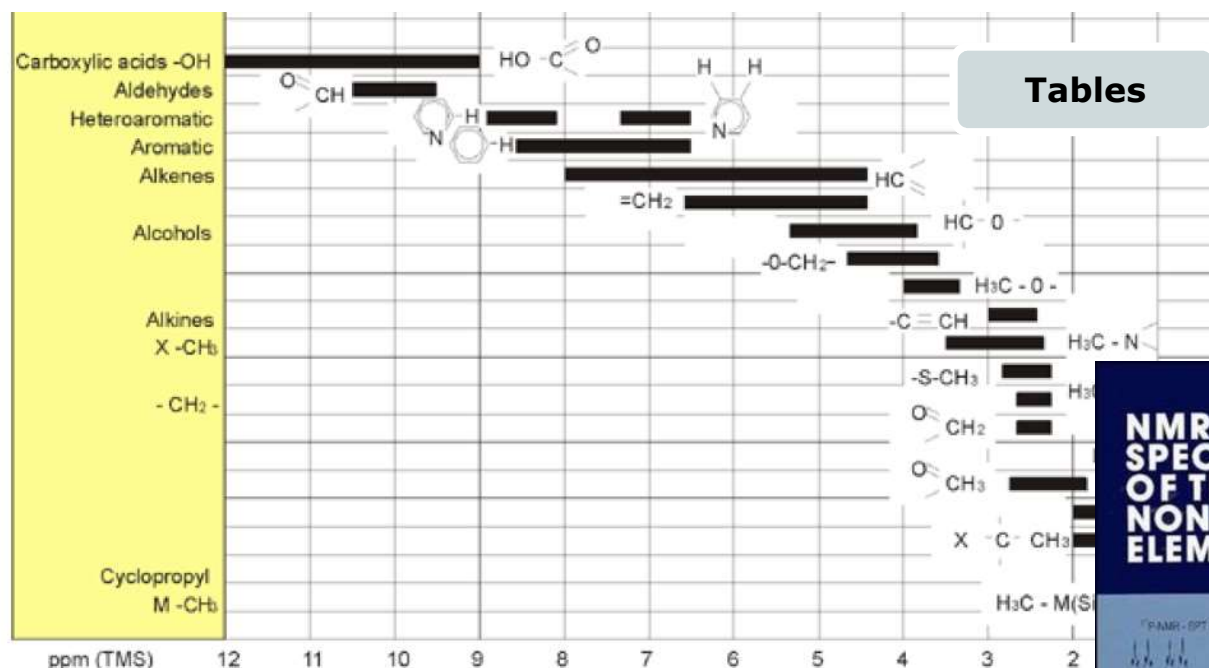
$$(\omega_A - \omega_B) / \gamma B_0 = \sigma_A - \sigma_B \quad (\text{与外磁场强度} B_0 \text{无关})$$

PPM单位



化学位移的变化只有 10^{-6} 左右，且化学位移与磁场强度成正比，为了避免麻烦，引入ppm单位并使用参考标准物（如TSP），可以得到与磁场强度无关的化学位移数值。

化学位移 (Chemical Shift) - 官能团



Tables

Prediction Software

<http://web.chemdoodle.com>

¹³C-NMR-Spektroskopie

Hans-Otto Kalinowski
Stefan Berger
Siegmar Braun

NMR
SPECTROSCOPY
OF THE
NON-METALLIC
ELEMENTS

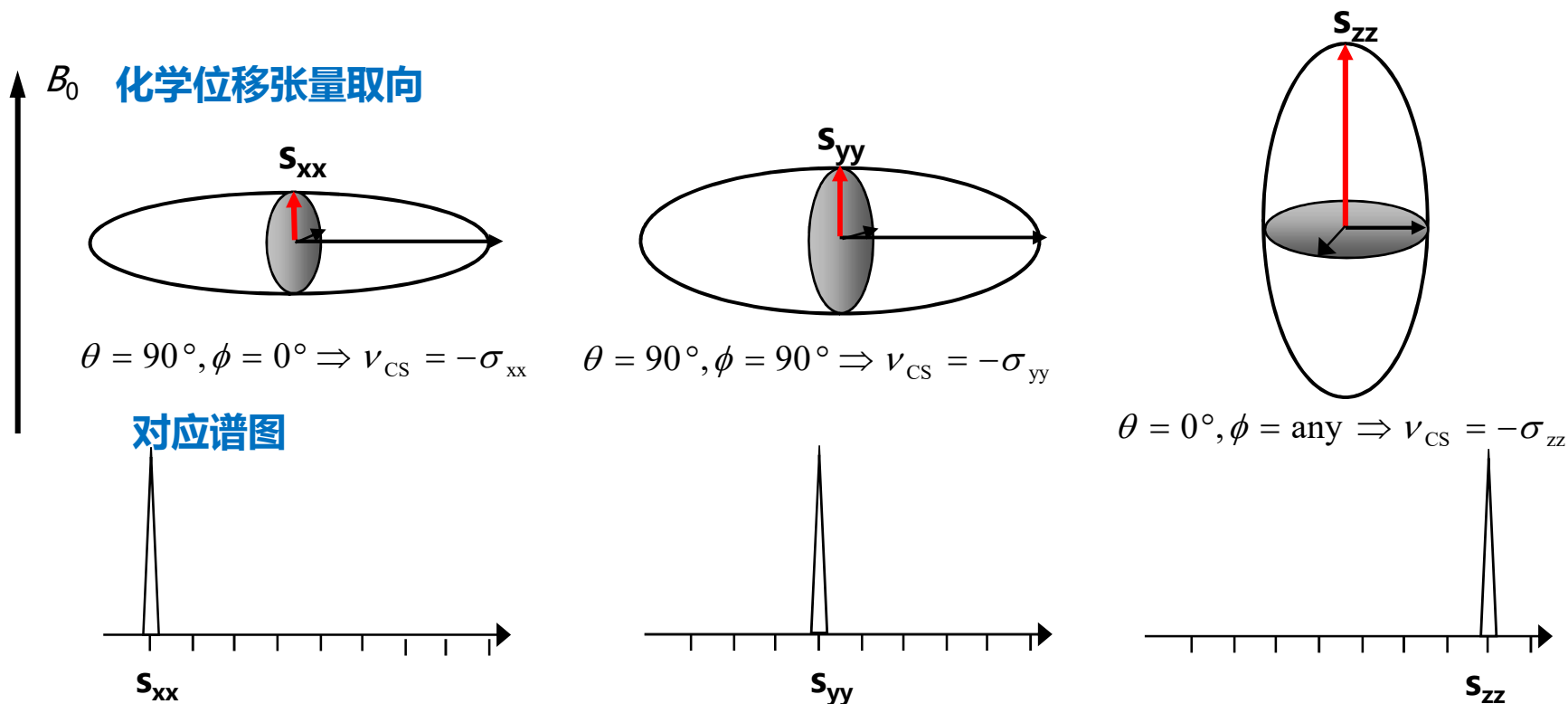
Stefan Berger
Siegmar Braun
Hans-Otto Kalinowski

Books

固体NMR-化学位移各向异性 (Chemical shift Anisotropy , CSA)



- 共振频率或化学位移值由化学位移张量相对于外磁场的取向决定

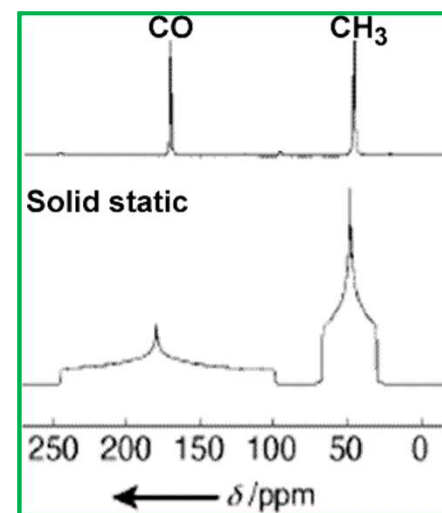
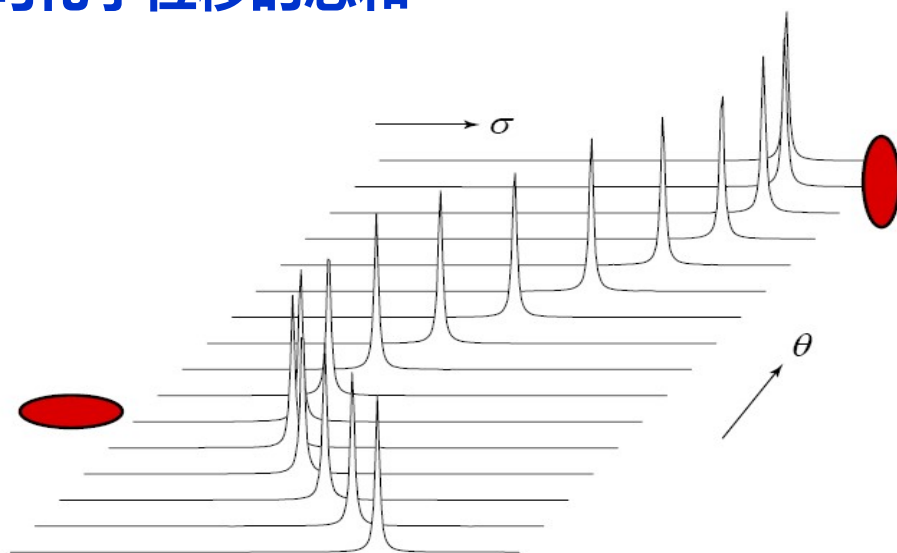
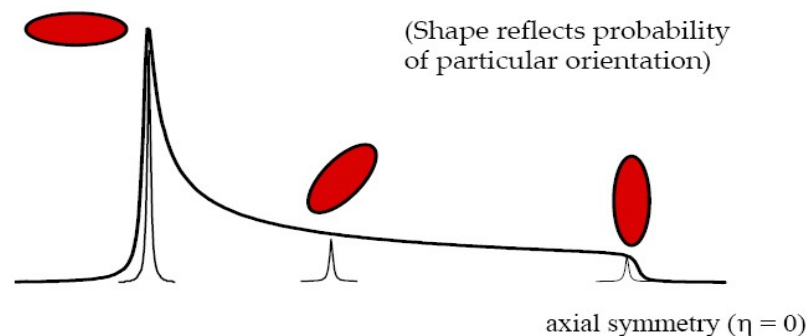


固体NMR-化学位移各向异性 (Chemical shift Anisotropy , CSA)



化学位移与单晶取向的关系示意图：

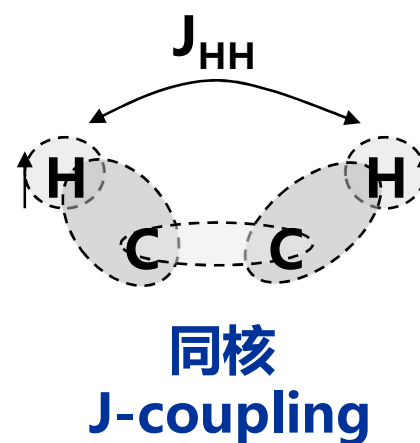
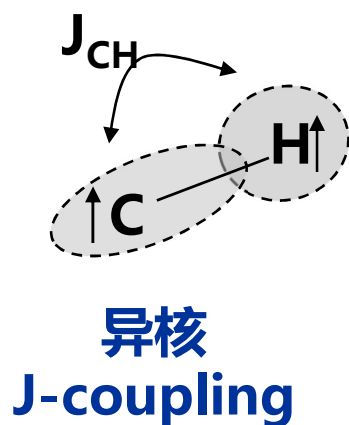
多晶样品粉末谱是各个
取向化学位移的总和



¹³C NMR spectra of Glycine

J-偶合 (自旋偶合)

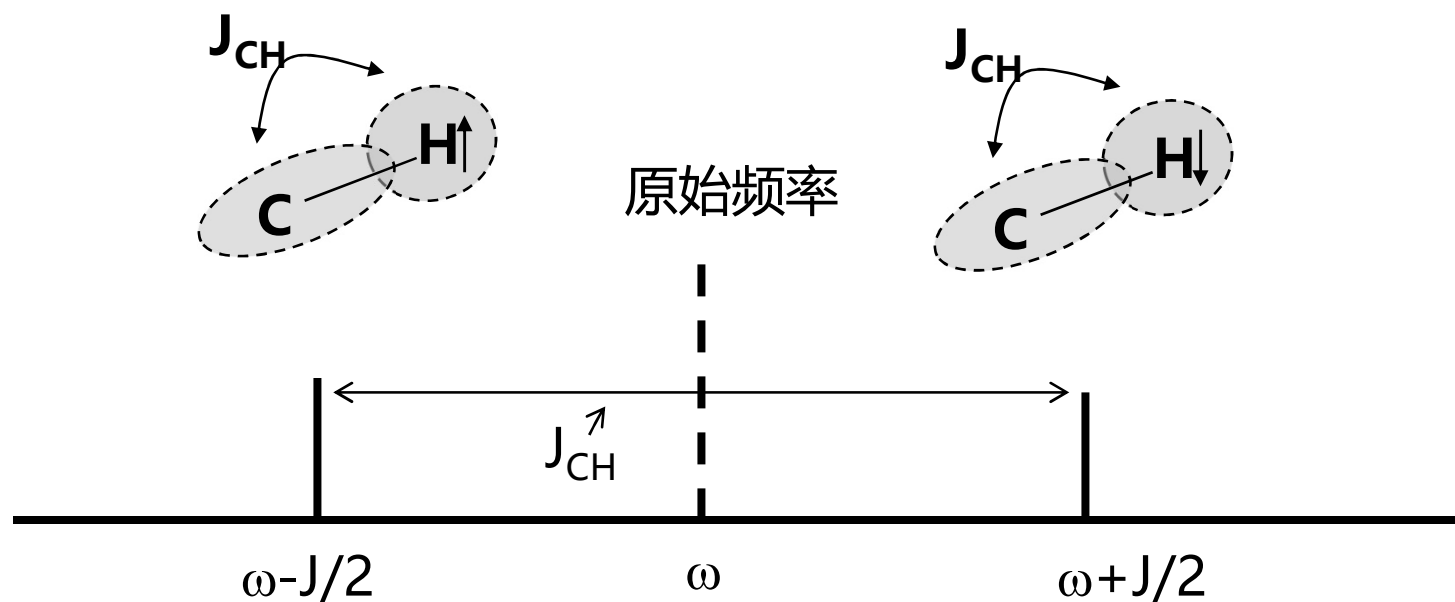
- J-偶合产生的原因？



相邻的原子核可以通过中间媒介(电子云)而发生作用.此中间媒介就是所谓的化学键.这一作用就叫自旋-自旋偶合作用(J-偶合).特点是通过化学键的间接作用.

J-偶合（自旋偶合）

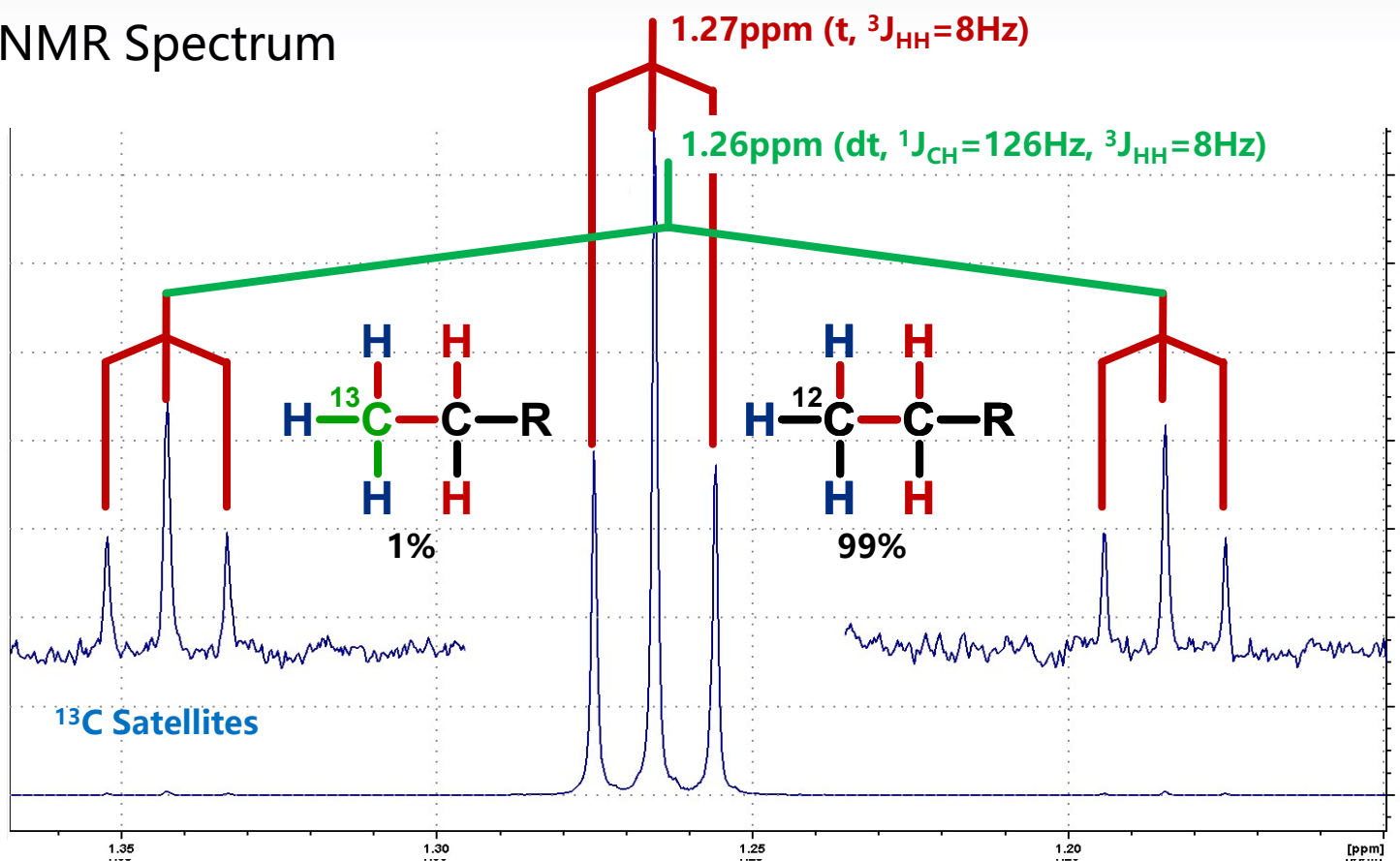
- 自旋-自旋偶合引起共振线的分裂而形成多重峰。多重峰实际代表了相互作用的原子核彼此间能够出现的空间取向组合。



J-偶合（自旋偶合）

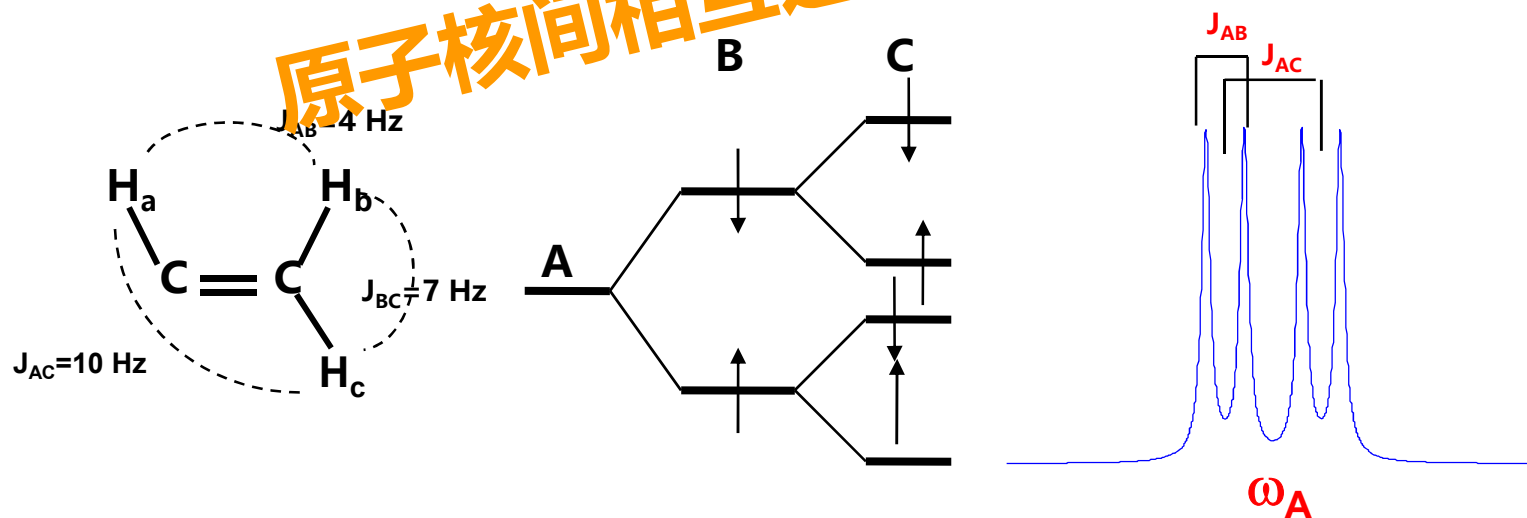
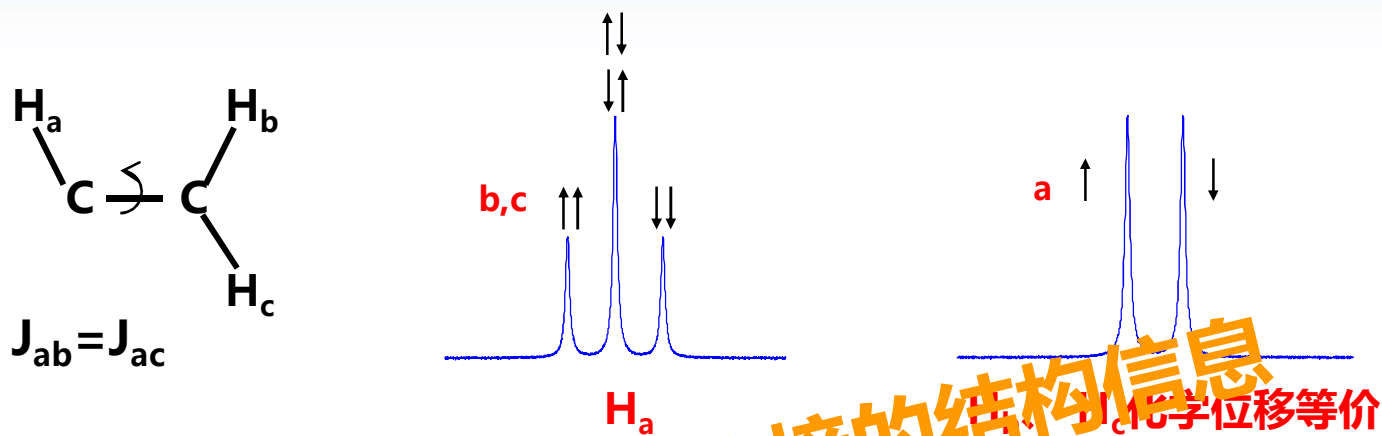


^1H -NMR Spectrum



由于一些核的自然丰度并非如此100%。因此谱图中可能出现耦合分裂的峰和无耦合的峰。

J-偶合 (自旋偶合)



原子核间相互连接的结构信息

J-偶合 (自旋偶合)



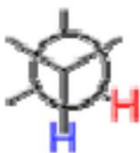
$^3J_{HH}$ 与两面角 Φ 的关系 (Karplus公式)

$$\begin{aligned} ^3J &= J_0 \cos^2 \Phi + C & \Phi = 0^\circ - 90^\circ & \text{ or } & ^3J = A + B \cos \Phi + C \cos^2 \Phi \\ ^3J &= J_{180} \cos^2 \Phi + C & \Phi = 90^\circ - 180^\circ & & (A=7 \quad B=-1 \quad C=5) \end{aligned}$$

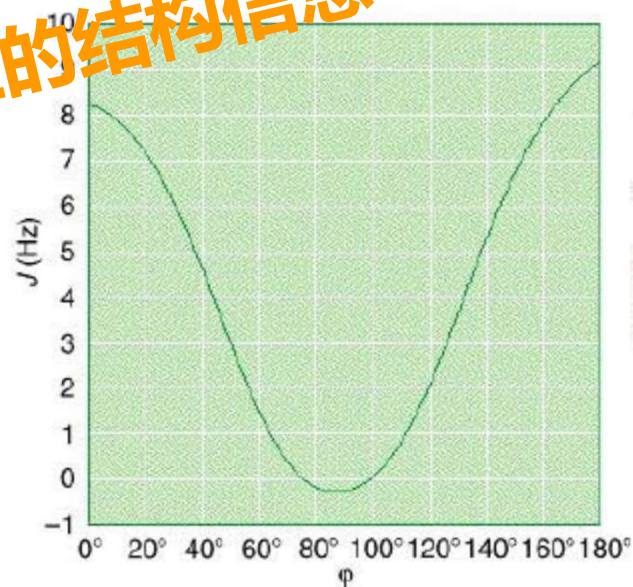
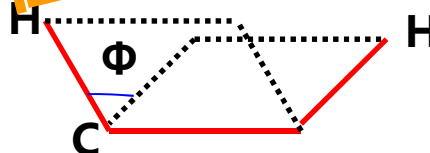
Newman Projections



180°



60°



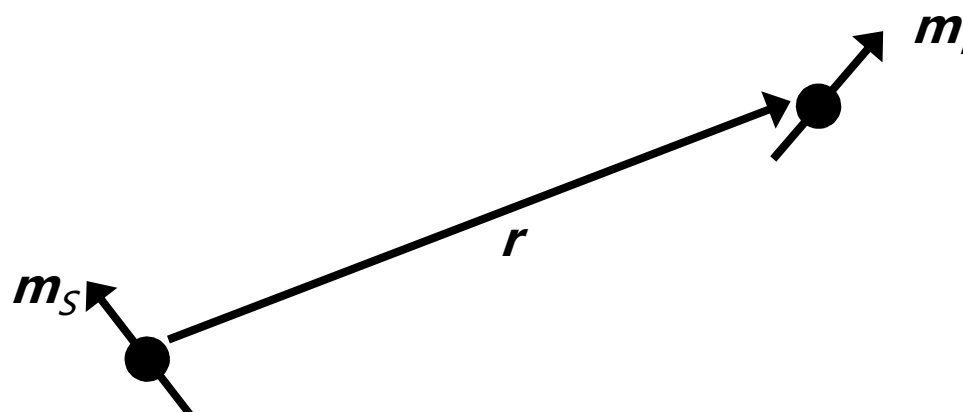
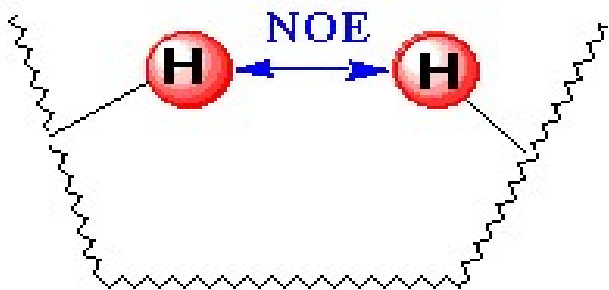
原子间在空间取向上的结构信息

偶极耦合相互作用（核Overhauser效应）



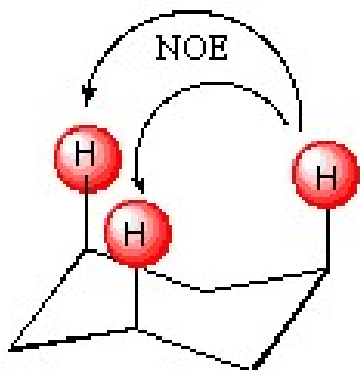
偶极耦合基本原理: 一个核所感受到的磁场强度是外磁场 B_0 与样品中其它磁量子 m 所产生的磁场强度之和。

什么是NOE效应？

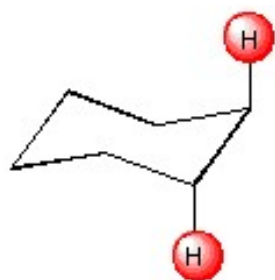


空间位置靠近($r < 0.5 \text{ nm}$)的两个原子核，当其中一个核的自旋被干扰达到饱和时，另一个核的谱峰强度也发生变化，这就是NOE效应。

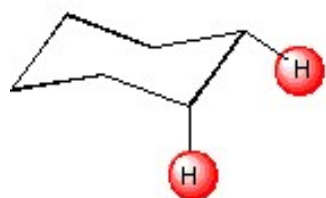
偶极偶极相互作用(获得分子空间距离关系)



$$V \propto C * r^{-6}$$



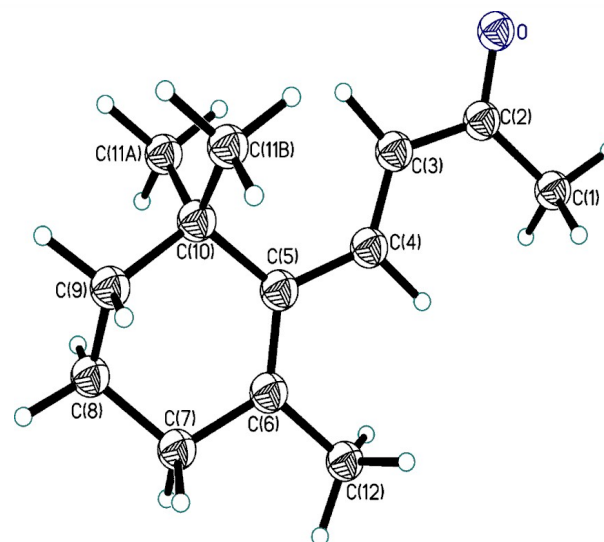
NOE null



NOE small-medium



NOE medium-large



● C(11)上的H --- C(9)上的H $\approx 2.5 \text{ \AA}$

● C(11)上的H --- C(8)上的H $\approx 3.8 \text{ \AA}$

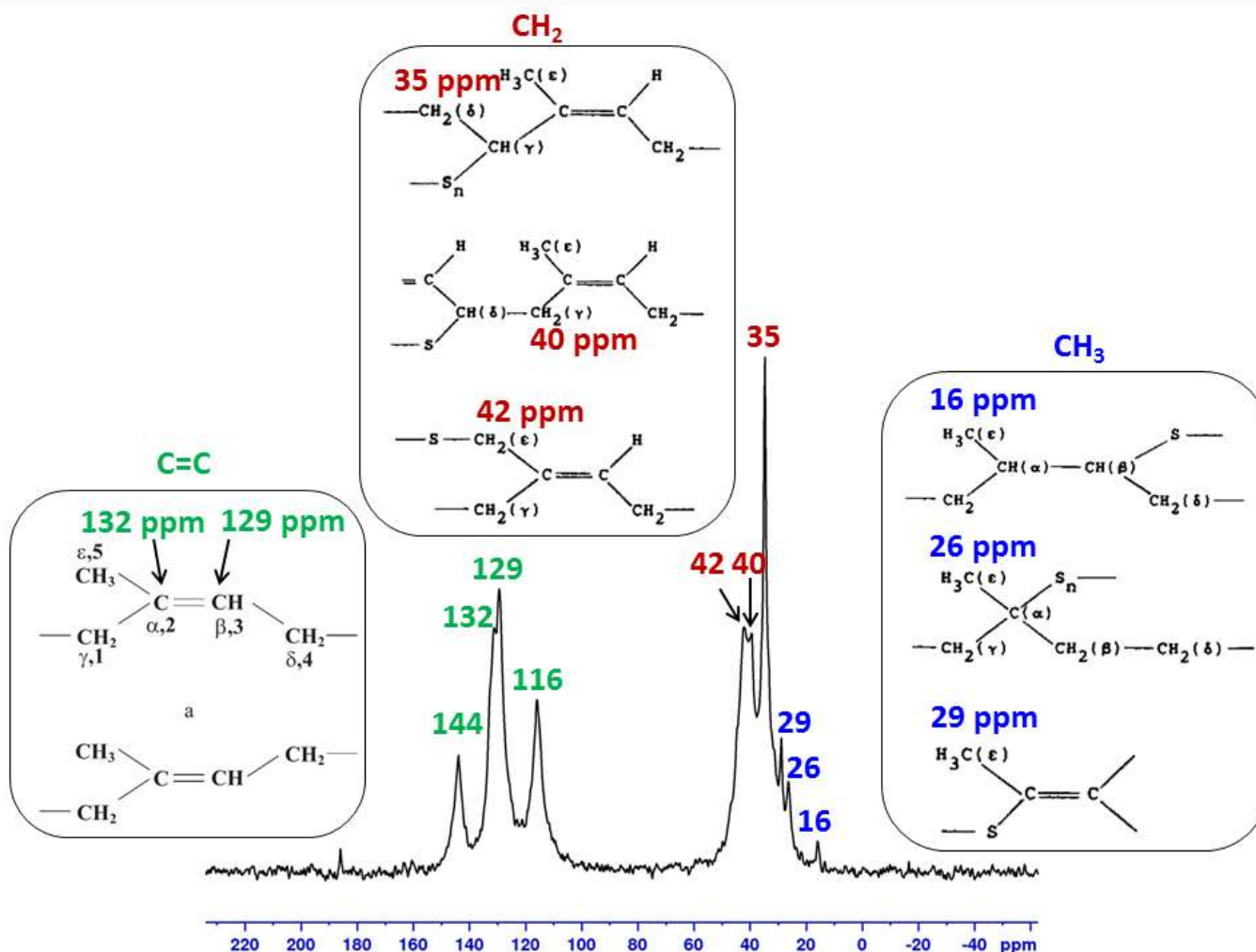
● C(11)上的H --- C(7)上的H $\approx 4.7 \text{ \AA}$

偶极偶极相互作用(反映分子运动-固体)



Rubber
橡胶

¹³C谱



NMR实验 (结构解析)



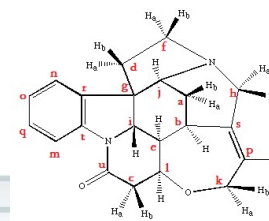
• 1D

- ^1H
- ^{13}C
- DEPT(90,135)
- 1D-selective experiment:
 - TOCSY;NOESY;ROESY
- 1D-CSSF experiment:
 - TOCSY;NOESY
- Homedecoupling;
- inadequate related experiments
- Pureshift experiment
- ^1H with solvent suppression

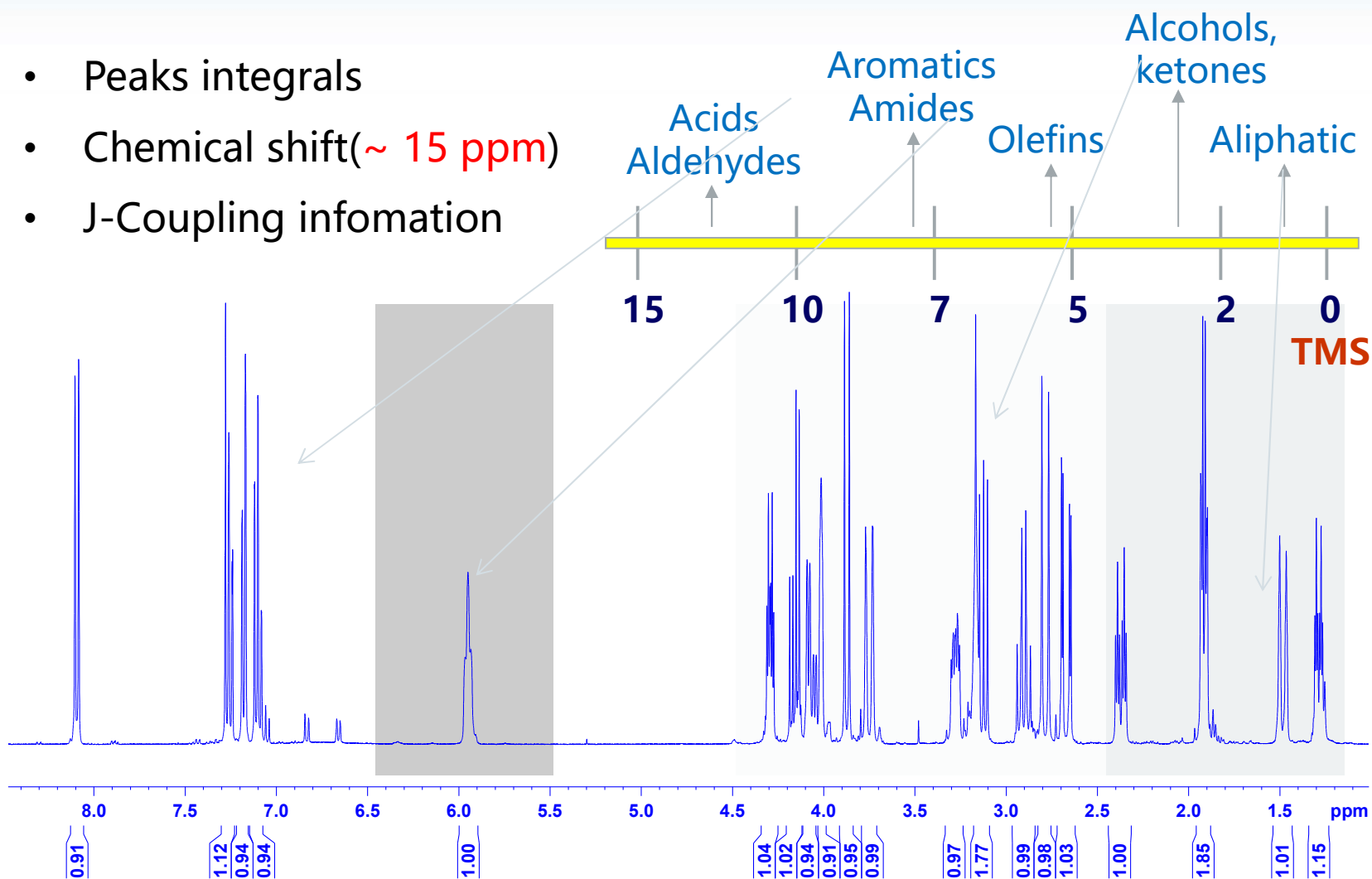
• 2D

- H/H COSY
- H/C HSQC
- H/C HMBC
- H/H NOESY/ROESY
- H/H TOCSY
- edit-HSQC
- HMBC related experiments
- HSQC-TOCSY
- HSQC-NOESY;
- J-coupling constant related experiments
- H/X HSQC/HMBC
- H/X NOESY
- Inadequate related experiments
- J-Resolved experiment
- 2D experiments with solvent suppression

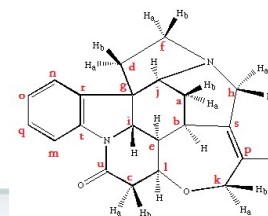
1H



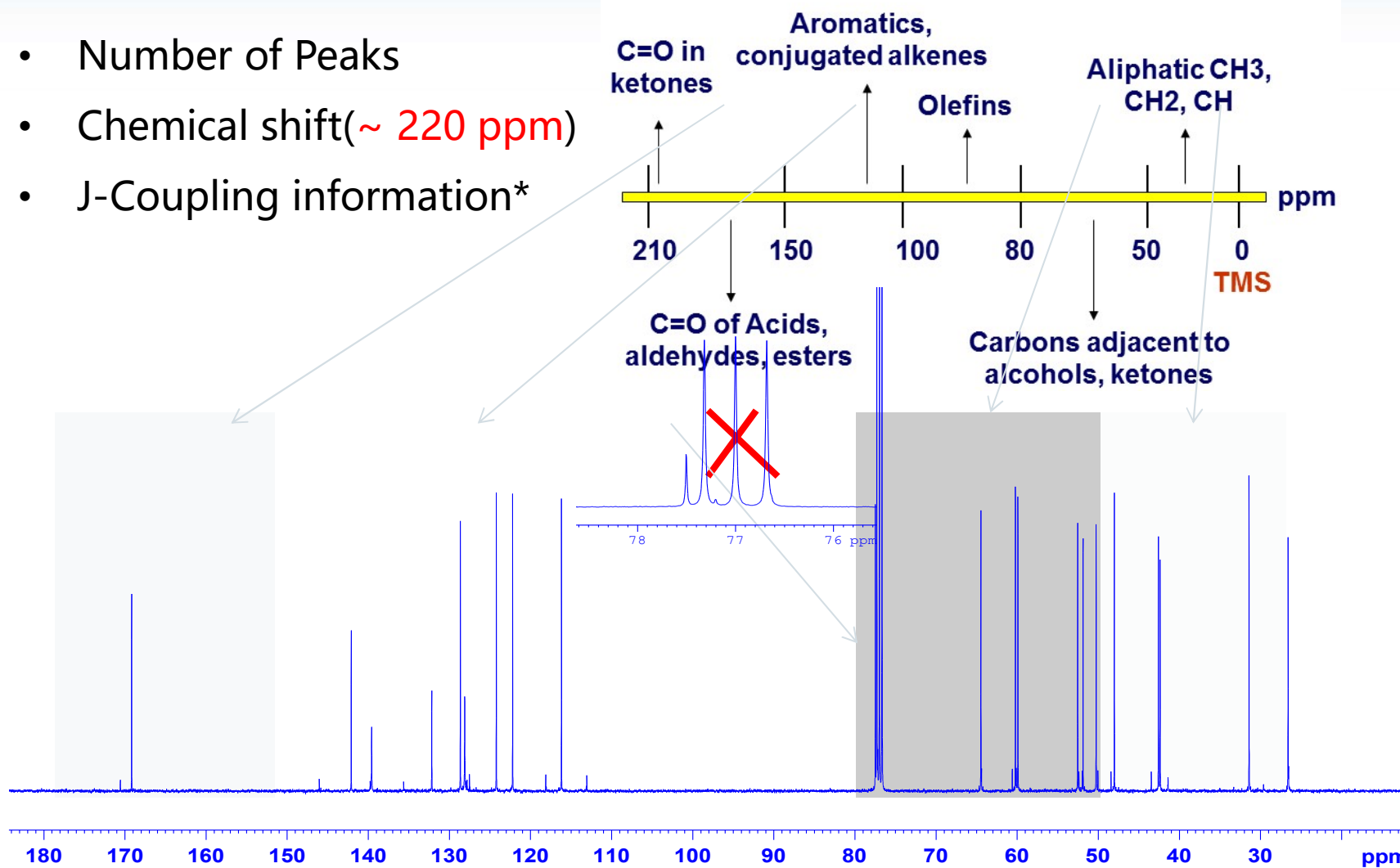
- Peaks integrals
- Chemical shift (~ 15 ppm)
- J-Coupling information



13C



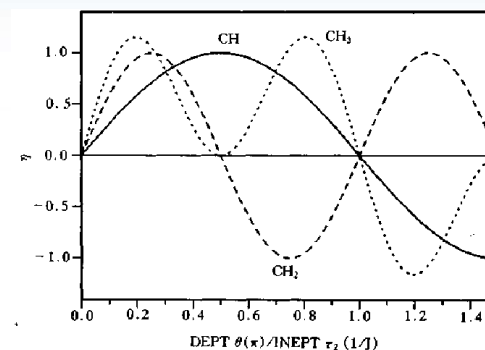
- Number of Peaks
- Chemical shift (~ 220 ppm)
- J-Coupling information*



DEPT135, DEPT90-判断碳的级数



- DEPT90 : CH
- DEPT135: CH($\uparrow$), CH₃($\uparrow$), CH₂($\downarrow$), C(no)



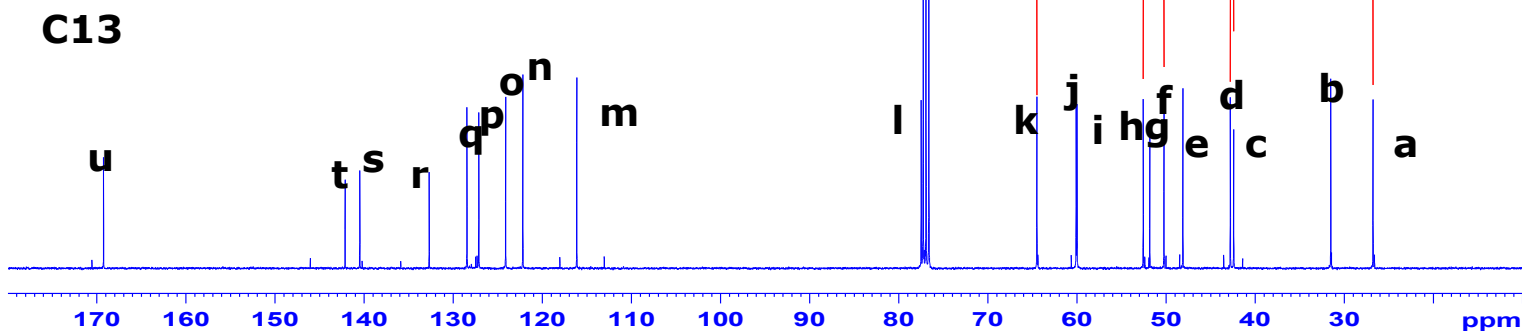
DEPT90



DEPT135

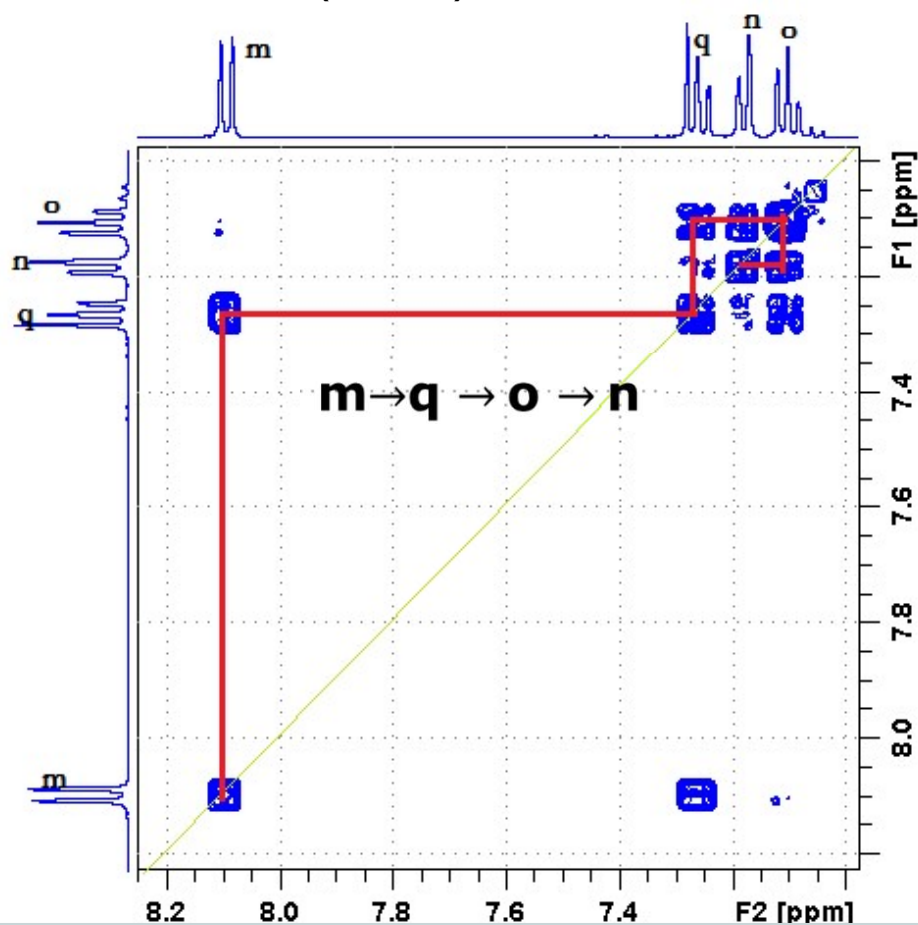
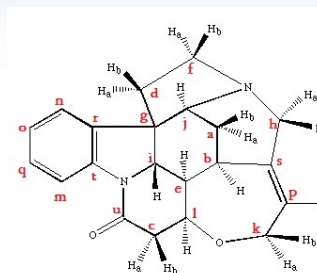


C13

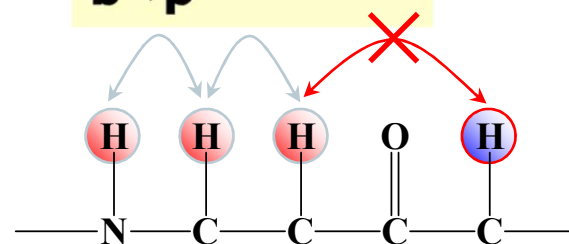


COSY

- 相关峰表示两个峰之间有J耦合存在
- ^1H - ^1H 耦合 ($n \leq 3$)，但共轭 π 键会出现远程耦合 ($n=4-5$)

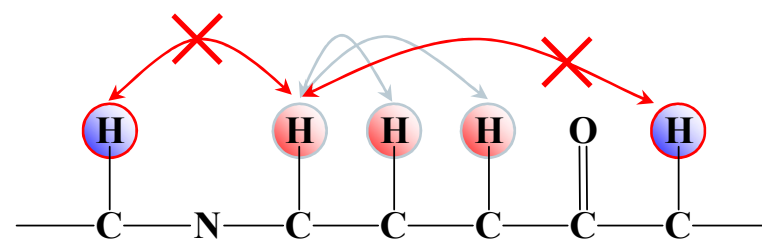
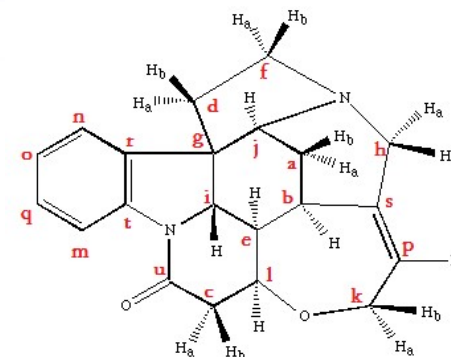
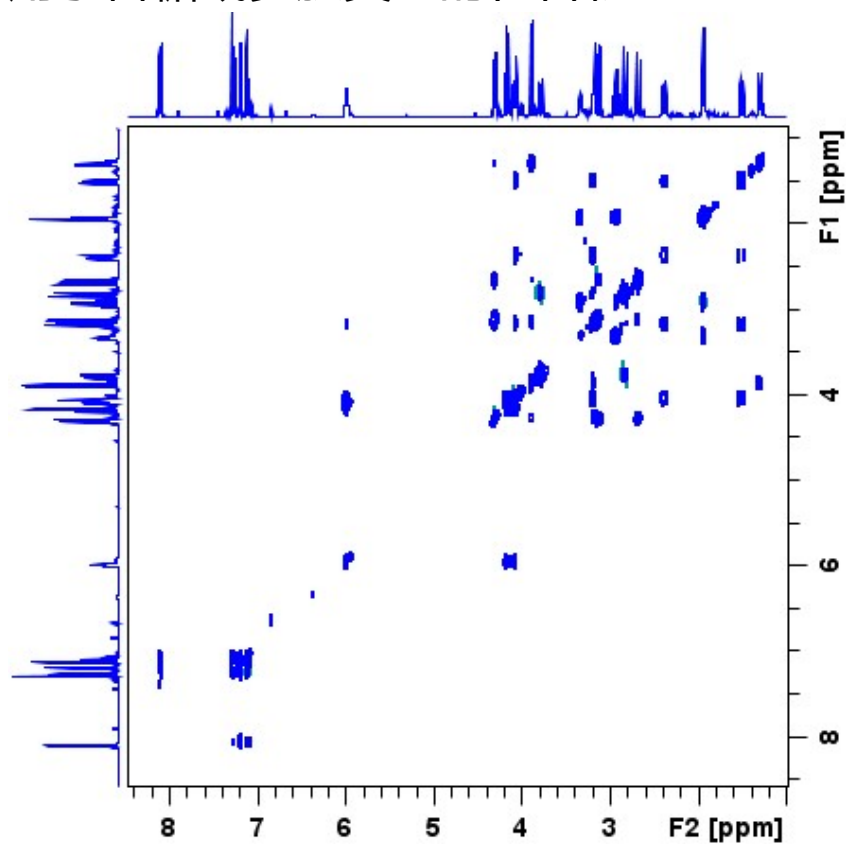


m → q → o → n
i → e → l → c
j → a → b → e
p → k
j → a
f → d
b → p



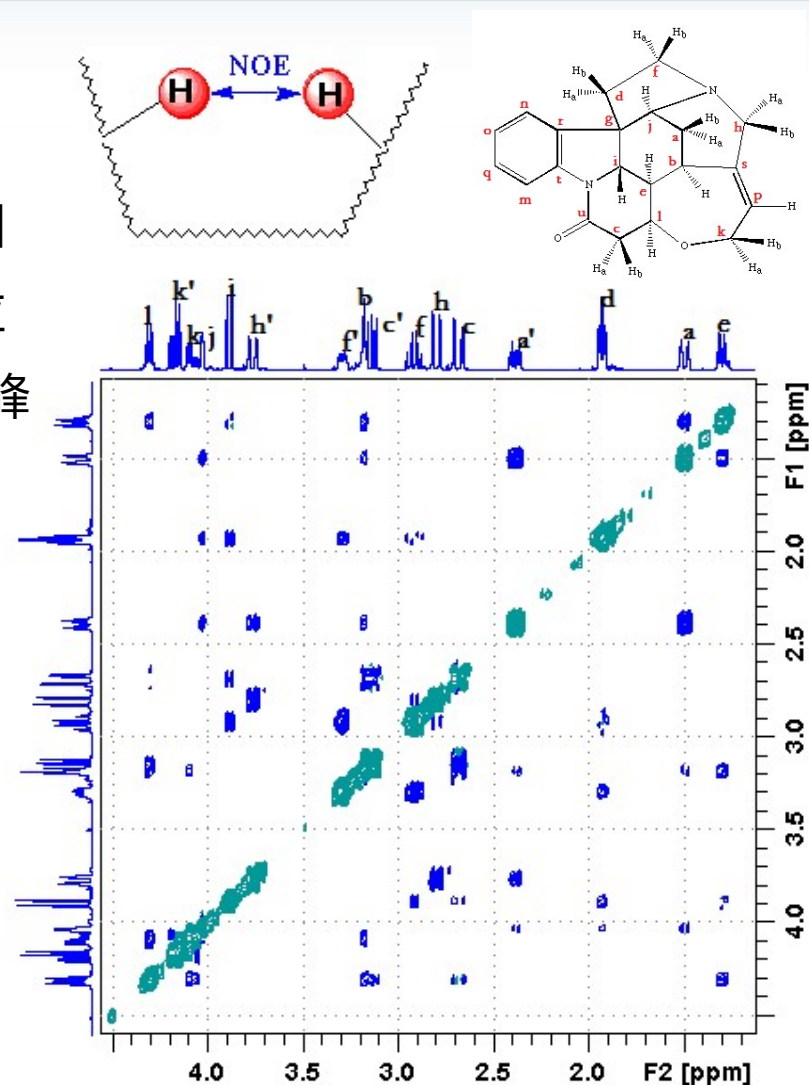
1H-1H TOCSY

- 相关峰表示直接耦合或间接耦合
- 判定自旋体系
- 常用于含糖或多肽类型的化合物



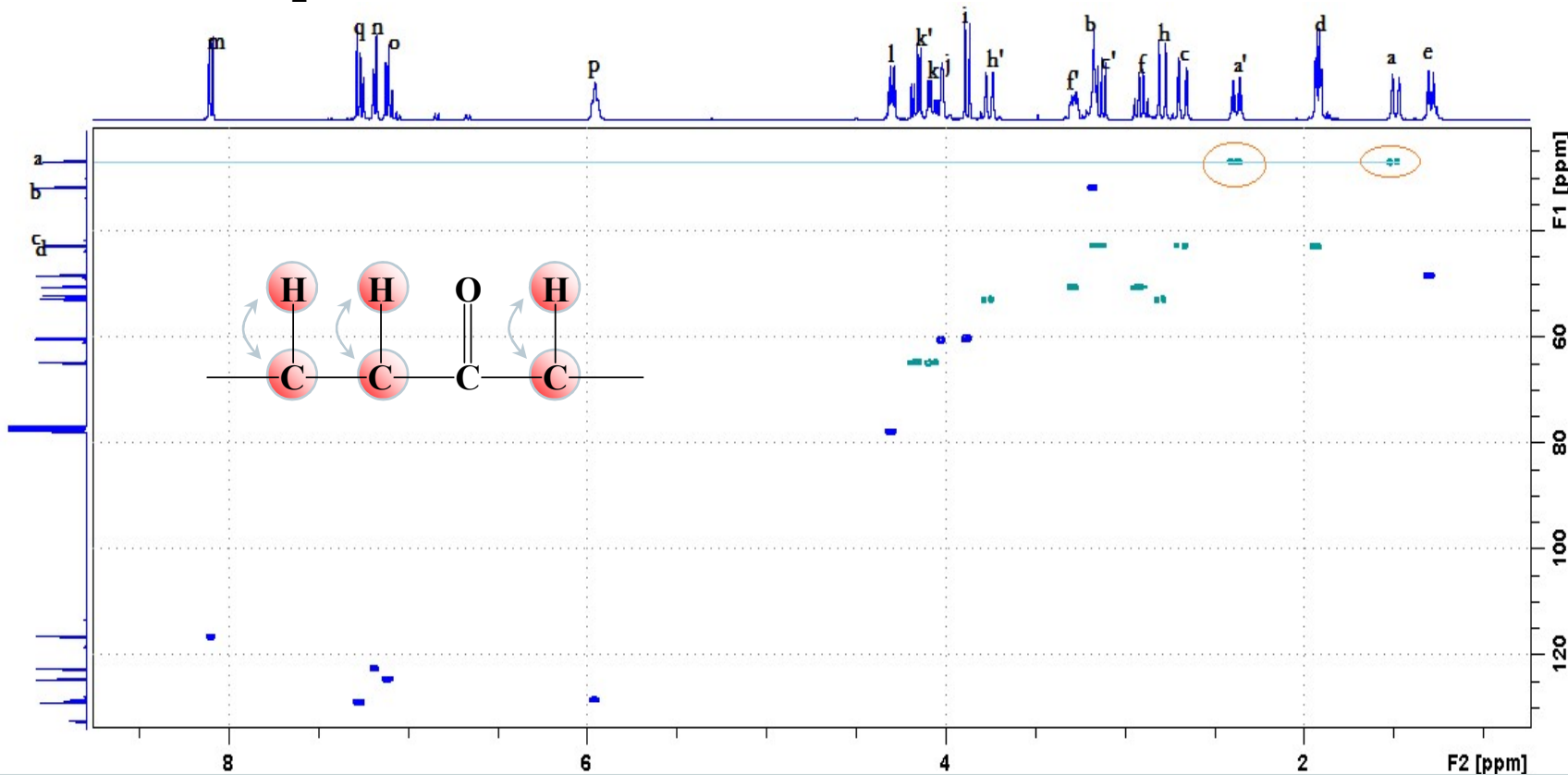
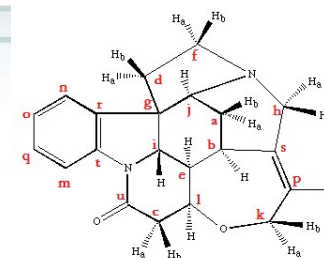
1H-1H NOESY/ROESY

- 相关峰表示产生该两个氢原子间空间距离小于0.5nm
- 小分子的NOE相关峰与对角线峰的相位相反，大分子的NOE相关峰与对角线峰相位相同，分子量在1000 - 2000左右时不出峰（与分子的运动快慢有关，也与仪器磁场强度有关，ROESY实验没有该问题。）
- 有化学交换的峰之间也会产生相关峰，其相位与对角线峰相同
- 可以用于判断化合物立体结构中的相对构象



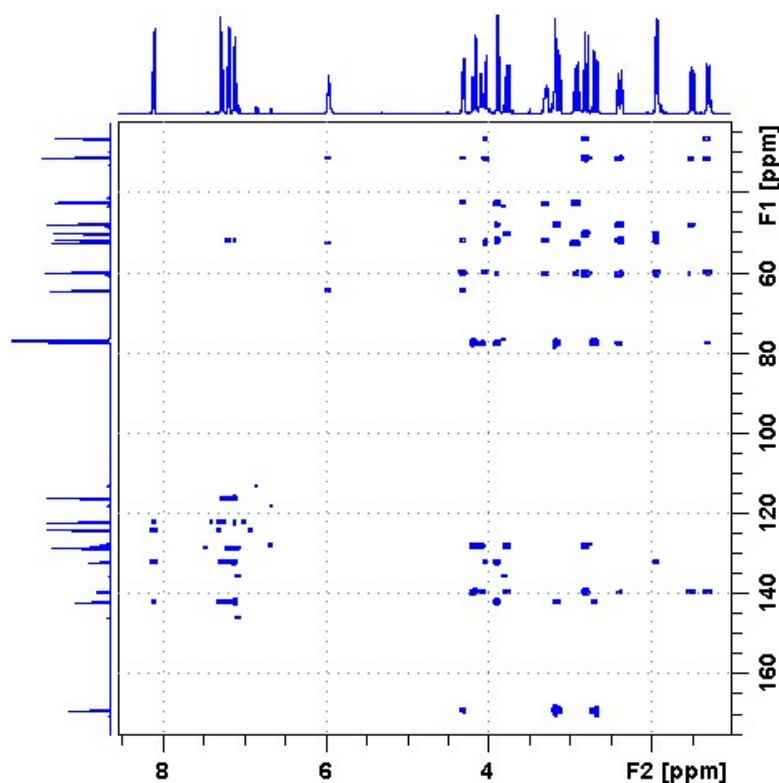
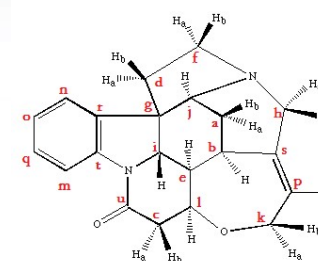
^1H - ^{13}C HSQC/HMQC

- 相关峰表示对应的 ^1H 和 ^{13}C 是直接相关
- 前手性 ^{13}C 对应 ^1H 的点可能会有多个 (如2个点是 CH_2 ; 4个点是 CH_2 且有杂核F19或P31耦合裂分)

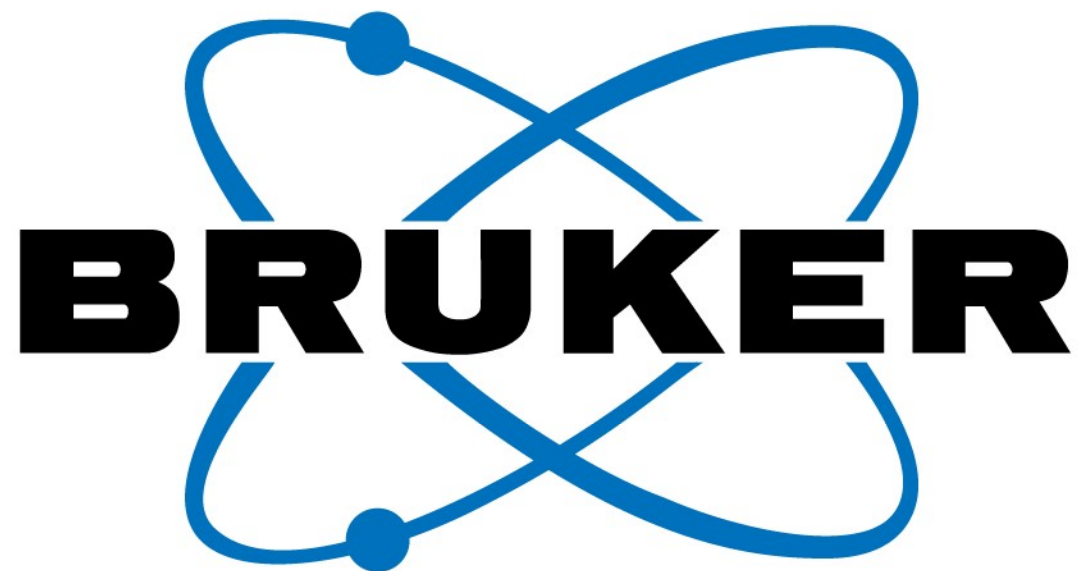


^1H - ^{13}C HMBC

- 相关峰表示对应的 ^1H 和 ^{13}C 原子是以两键、三键或四键相连的；建立远程连接，识别其它结构片段、归属季碳，最终将结构片段连接起来



$m \rightarrow n, o, q, r, t, g$
 $q \rightarrow m, n, r, t, o$
 $n \rightarrow m, q, r, t, d, g$
 $o \rightarrow m, n, q, r, t, g$
 $d \rightarrow r, j, f, g$
 $j \rightarrow r, i, g, h, a, b, f$
 $a \rightarrow s, e, g, b, j, l$
 $f \rightarrow r, j, d, g, h$
 $i \rightarrow j, l, d, e, g, n, r, t$
 $c \rightarrow t, u, l, e$
 $e \rightarrow a, b, c, g, i, l, s$
 $l \rightarrow u, i, k, c, g, b, e$
 $k \rightarrow p, s, l, e, h$
 $h \rightarrow p, r, s, j, f, a, b$
 $p \rightarrow b, h, k$



www.bruker-biospin.com