

מדידת ספקטרום 2D NMR

מאת רוי הופמן ויאיר עוזרי 28.04.2008

המדריך מותאם לשימוש שיגרתי בספקטרומטר ה-400.

מדידת ספקטרום דו-מימדי אפשרית בספקטרומטר ה-200 אך לא יושם בגלל חוסר התעניינות.

שימו לב!

הקטעים המיועדים לספקטרומטר ה-500 מגהרץ של מעבדת הסטודנטים נמצאים במסגרת מקווקוות.

המדריך מיועד לספקטרומטרים של המכון לכימיה באוניברסיטה העברית. ניתן להשתמש בו לספקטרומטרים אחרים של ברוקר המופעלים על ידי תוכנת TOPSPIN אם מכינים קודם פרמטרים לאיסוף, להדפסה ושגרות מקרו. ראה פרק 2.

תוכן העניינים

3	איסוף שגרת	.1
3	א. ייצור קובץ לספקטרום דו-מימדי	
5	ב. בחירת התחום	
6	ג. ייצוב הטמפרטורה	
6	ד. כיוונון הגלאי	
6	ה. הכנת ספקטרום פרוטון	
6	ו. הכנת הגרדיאנטים	
7	ז. איסוף והמרת ספקטרום הדו-מימדי	
8	ח. שליטה בייצוג הספקטרום הדו-מימדי	
9	ט. תיקון פאזה	
9	י. תיקון קו הבסיס	
9	יא. כיול היסט כימי	
9	יב. אינטגרציה	
10	יג. סימון סיגנלים	
10	יד. השלכות	
10	טו. הדפסה	
10	שימוש המדריך במעבדות אחרות	.2
16	שימוש בגלאי לא מועדף	.3
17	מדידת רוחב והנמכת הפולסים	.4
18	כיול השהיית הרלקסציה	.5
18	אפודיזציה (פונקציות חלון) להגברת רגישות או הפרדה	.6
19	בחירת הניסוי להתאמה בין-גרעינית	.7
23	מדידת קבוע פיצול בין-גרעיני	.8

1. איסוף שגרת

א. ייצור קובץ לספקטרום דו-מימדי

אסוף ספקטרום פרוטון לפי המדריך "מדידת ספקטרום NMR פרוטון" ולניסיונות TOCSY, ROESY, HSQC ו-HMQC בספקטרומטר ה-500 מגהרץ יש להניח את הפרמטרים לייצוב הטמפרטורה לפי הקווים המקווקווים בתרשים 49 וייתכן שצריכים להעלות את הטמפרטורה עד חמש מעלות מעל הרגיל או לחבר את יחידת הקירור שם מאחר שהניסוי משתמש בהפרת צימוד.

לניסיונות התאמה בין-גרעיניות בין פרוטון ופחמן, חנקן, וכו' (HSQC ו-HMBC) יש מימד של הגרעין השני (פחמן, חנקן, וכו') ונוח להשתמש בספקטרום פחמן כהשלכה בהדפסת הספקטרום. כדי ליצור השלכה למימד הפחמן לניסוי התאמה פרוטון-פחמן (HSQC ו-HMBC) מומלץ להריץ ספקטרום של הגרעין השני כשהרגישות של ספקטרום הפחמן מאפשרת זאת. על מנת למדוד ספקטרום פחמן יש לבחור את הגלאי BBO ולאסוף את ספקטרום של הגרעין השני כמו שמפורט במדריך "מדידת ספקטרום NMR של פחמן וגרעינים אחרים (לא פרוטון)". אם ספקטרום הגרעין השני לא ניתן או קשה למדידה אפשר ליצור השלכה באיכות פחותה מספקטרום הדו-מימדי.

לניסיונות HSQC ו-HMQC, חבר את מסנן עצירת הדוטריום לציאת פס הרחב של קדמי המגבר ("מדידת ספקטרום NMR של פחמן וגרעינים אחרים (לא פרוטון)" תרשים 61).

לניסיונות הדו-מימדיים COSY, HSQC, HMQC ו-HMBC, חייבים להשתמש בגלאי BBI. לניסיונות NOESY, ROESY ו-TOCSY מומלץ להשתמש בגלאי BBI אך ניתן להשתמש בגלאי BBO-ה.

בספקטרומטר ה-500 מגהרץ מומלץ להשתמש בגלאי BBI אך ניתן להשתמש בגלאי BBO לכל הניסיונות (ראה פרק 3) ומקבלים רגישות של קצת פחות מחצי מזו של ה-BBI. כדי ליצור קובץ חדש יש להקליד edc (תרשים 1) ולהכניס את הפרמטרים: שם הקובץ בשדה NAME, 1 (או יותר אם רוצים מספר ספקטרומים בשם אחד) בשדה EXPNO, 1 בשדה PROCNO, הספריה c:\bruker\topspin1.3 או c:\bruker\topspin1 בשדה DIR, שם המשתמש בשדה USER, שם הממס לפי בחירה בשדה solvent, קובץ פרמטרים לניסוי לפי בחירה מטבלה 1 בשדה Experiment ואת הכותרת בשדה TITLE. (ניתן לשנות את הכותרת מאוחר יותר בלחיצה על לשונית Title של חלון הספקטרום.) יש לחוץ OK או Enter לייצר את הקובץ. ניתן להעתיק קובץ קיים ב-edc עם בחירת Use current parameters בשדה Experiment.

טבלה 1. ניסוי תמ"ג דו-מימדי

ניסוי	פרמטרים	תיאור הניסוי
COSY	3_COSY	התאמה בין פרוטון לפרוטון דרך קשרים כימיים
NOESY	4_NOESY	התאמה בין פרוטון לפרוטון דרך המרחב
HSQCsisp2	5_HSQCsisp2	התאמה בין פרוטון לפחמן דרך קשר יחיד עם הגברת רגישות וארבע פולסים מעוצבים (עם צורה)
¹ H- ¹⁵ N HSQCsisp2	5a_HSQCsisp21h15n	התאמה בין פרוטון לחנקן דרך קשר יחיד עם הגברת רגישות וארבע פולסים מעוצבים (עם צורה)
HMBC1p2	6_HMBClowpass2	התאמה בין פרוטון לפחמן דרך מספר רב של קשרים בעיקר 3 קשרים וכאשר מפריים התאמה חד קשרית בטווח רחב (124 עד 162 הרץ) של צימודים
HMBC	6a_HMBC1h15nnofilter	התאמה בין פרוטון לחנקן דרך מספר רב של קשרים בעיקר 3 קשרים ללא הפרה של התאמה חד קשרית

התאמה בין פרוטון לכספית דרך שני קשרים או יותר	6b_HMQC1h199hg	^1H - ^{199}Hg HMQC
התאמה בין פרוטון לרודיום דרך מספר רב של קשרים	6c_HMQC1h103rh	^1H - ^{103}Rh HMQC
התאמה בין פרוטון לפרוטון דרך קשרים כימיים	7_TOCSY	TOCSY
התאמה בין פרוטון לפרוטון דרך המרחב	8_ROESY	ROESY

קיימות שתי שיטות למדידת התאמה דרך קשרים כימיים: COSY ו-TOCSY. COSY נותן התאמות בעיקר דרך שניים או שלושה קשרים והתאמות חלשות מאוד לקשרים רחוקים יותר. ואילו TOCSY נותן התאמות לקשרים רחוקים וקרובים באזור הקרוב של המולקולה. הסיגנלים של COSY בצורת אנטיפאזה ונותנים מידע על סוג הקשר ואילו TOCSY נותן סיגנלים חזקים יותר באותו פאזה. ב-TOCSY כאשר יש מספיק רגישות אפשר לקצר את זמן האיסוף בהקלדת ns 1 אבל יופיע סגנלי סרק (artifacts) בקצים העליון והתחתון של הספקטרום.

קיימות שתי שיטות למדידות התאמה דרך המרחב: NOESY ו-ROESY. שניהם נותנים התאמות כתוצאה מהמרחק בין הגרעינים וגם כתוצאה מחילוף. NOESY תמיד נותן התאמות יותר חזקות עבור חילוף ובדרך כלל גם עבור התאמות דרך המרחב. ההתאמות כתוצאה מחילוף תמיד באותו פאזה של האלכסון בשני השיטות. ההתאמות דרך המרחב של NOESY נוטים להיות בפאזה הפוכה מהאלכסון עבור המולקולות קטנות ועם עליית הטמפרטורה ובאותו פאזה של האלכסון עבור מולקולות גדולות ועם ירידת הטמפרטורה. בשני הקצוות ההתאמות יותר גדולות מאלה של ROESY אבל באמצע כאשר גודל ההתאמה מתקרב לאפס, ROESY נותן התאמות חזקות ותמיד הפוכות ביחס לאלכסון.

ניסוי התאמה בין גרעינית מחולקים לשניים: בקבוצה 5 הניסיונות דרך קשר אחד ובקבוצה 6 הניסיונות דרך יותר קשרים כימיים.

ברירת המחדל שמתאים ביותר למולקולות קטנות הם הפרמטרים המצויים ב-5_HSQCsisp2 מתאימים (מיועדים) להתאמה בין פרוטון לפחמן דרך קשר יחיד והפרמטרים ב-6_HMBClowpass2 מתאימים (מיועדים) להתאמה בין פרוטון לפחמן דרך מספר רב של קשרים.

להתאמה בין פרוטון לחנקן דרך קשר יחיד מתאימים הפרמטרים המצויים 5a_HSQCsisp21h15n ולהתאמה בין פרוטון לחנקן דרך מספר רב של קשרים מתאימים הפרמטרים 6a_HMBC1h15nnofilter-

במקרים רבים ניתן לשפר קצת את הרגישות ו/או ההפרדה בבחירת ניסוי שונה אבל אם הסיגנלים לא רחבים השיפור קטן (ראה פרק 7). למדידת קבוע פיצול ראה פרק 8.

תרשים 1. יצירת קובץ חדש עם edc

New...

Prepare for a new experiment by creating a new data set and initializing its NMR parameters according to the selected experiment type.

NAME	filename
EXPNO	1
PROCNO	1
DIR	c:\bruker\topspin1.3(2.0)
USER	username
Solvent	CDCI3
Experiment	1_Proton
TITLE	

Put title here

OK Cancel More Info... Help

בספקטרומטר ה-500 מגהרץ ערוץ BB הוא השני מלמעלה (תרשים 2).


תרשים 2. מסנן עצירת דוטריום מחובר לערוץ X בקדמי-המגבר של ספקטרומטר ה-500 מגהרץ



ב. בחירת התחום

לאיסוף דו-מימדי נדרש זמן על מנת לקבל הפרדה גבוה בתחום רחב לכן מומלץ מאוד למטב (optimize) את תחום האיסוף כדי לקבל תוצאות טובות בזמן איסוף סביר.

עבור אל ספקטרום הפרוטון שאספת, בחר את האזור בספקטרום (או כולו) שברצונך לבדוק הוסף קצוות משני הצדדים (מדריך "מדידת ספקטרום NMR פרוטון" תרשים 32) ורשום לעצמך את רוחב תחום הבדיקה ב-ppm. יש להשאיר עשר רוחבי קו, (כ-20 הרץ בשני הצדדים של האזור

הנדרש) כדי למנוע תופעות חתך. עבור ניסוי HMBC יש להוסיף את קבוע הצימוד החד-קשרי פרוטון-פחמן (במימד הפרוטון) – כ-150 הרץ. רשום גם את היסט הכימי ב-ppm של מרכז אזור המדידה בספקטרום הפרוטונים. על מנת למצוא את האמצע ניתן להיעזר ברשת – לחץ פעמיים על . בסרגל הכלים והעבר את הסמן אל מרכז החלון, בפינה השמאלית העליונה יופיע הערך המתאים ב ppm למקום הסמן.

עבור אל הקובץ הדו-מימדי. אם הניסוי הוא COSY, TOCSY, או NOESY או ROESY הכנס את רוחב אזור המדידה שרשמת לפרמטר SW על ידי הקלדת enter, sw ורשום את הערך של הרוחב במימד F2 ו F2. הקלד o1p ורשום את ההיסט הכימי של המרכז הספקטרום.

אם הניסוי הוא HSQC, ל-HMQC ול-HMBC עבור אל הספקטרום של הגרעין המוצמד (^{13}C או ^{15}N , וכו') אם קיים על מנת למדוד את SW במימד F1 ואת O2P באותו אופן שמתואר לגבי של הפרוטונים בפסקה לעיל. בניסיונות בין-גרעיניים דרך קשר אחד מקבוצה 5 (כאלו עם המספר 5 בהתחלה) התחום צריך לכלול רק את הסיגנלים הקשורים לפרוטון.

אם לא קיים ספקטרום ולא רוצים להריץ ספקטרום (יתכן שיהיה צורך בהחלפת גלאי), ניתן לקבוע את SW במימד F1 ואת O2P לפי הספרות או לפי הערכה. כמו כן ניתן להתחיל באיסוף ותוך כדי האיסוף לבדוק אם התחום נכון, לשנות את הפרמטרים ולהתחיל מחדש אם נדרש.

ג. ייצוב הטמפרטורה

חשוב מאוד לייצב את הטמפרטורה (ראה המדריך "מדידת ספקטרום NMR פרוטון" פרק 7) לניסוי דו-מימדי במיוחד ל-ROESY, NOESY ומדידות תופעות איזוטופיות (ראה פרק 8).

ד. כיוונון הגלאי

יש לפתוח את הקובץ הדו-מימדי. לניסוי חד-גרעיני (COSY, TOCSY, NOESY ו-NOESY) יש לכוון רק את ערוץ הפרוטון כמפורט במדריך "מדידת ספקטרום NMR פרוטון" ואילו לניסוי דו-גרעיני (HSQC, HMQC ו-HMBC) יש לכוון את הגלאי לפחמן ופרוטון כמפורט במדריך "מדידת ספקטרום NMR של פחמן וגרעינים אחרים (לא פרוטון)"

בספקטרומטר ה-500 מגהרץ עבור אל הספקטרום הדו-מימדי והקלד atma. הכיוונון אוטומטי חוץ מהניסוי של ההתאמה עם רודיום. לכיוון רודיום ראה את המדריך "מדידת ספקטרום NMR של פחמן וגרעינים אחרים (לא פרוטון)" פרק 1, ב'.

ה. כיוול הפרמטרים

ניתן לשפר את הספקטרום בכיוול של הפולסים כמפורט בפרק 4 והשהיית הרלקסציה כמפורט בפרק 5. כיוול פולס הפרת הצימוד הכרחי ל-HSQC ול-HMQC אם רוחב הספקטרום של הגרעין המוצמד עורך על 100 ppm.

כדי לחסוך בזמן האיסוף אוספים פחות נקודות בספקטרום דו-מימדי ביחס לחד-מימדי. אם ההפרדה של ברירת המחדל אינה מספיקה ניתן להגדיל אותה עם הפרמטרים TD ו-SI (ראה המדריך "מדידת ספקטרום NMR פרוטון" פרק 10).

ו. הכנת הגרדיאנטים

בספקטרומטר ה-500 מגהרץ הגרדיאנטים מוכנים ולא צריך להכין אותם.

אין צורך בגרדיאנטים עבור NOESY אבל לניסיונות אחרים יש להכין את הקדם-הדגשה preemphasis

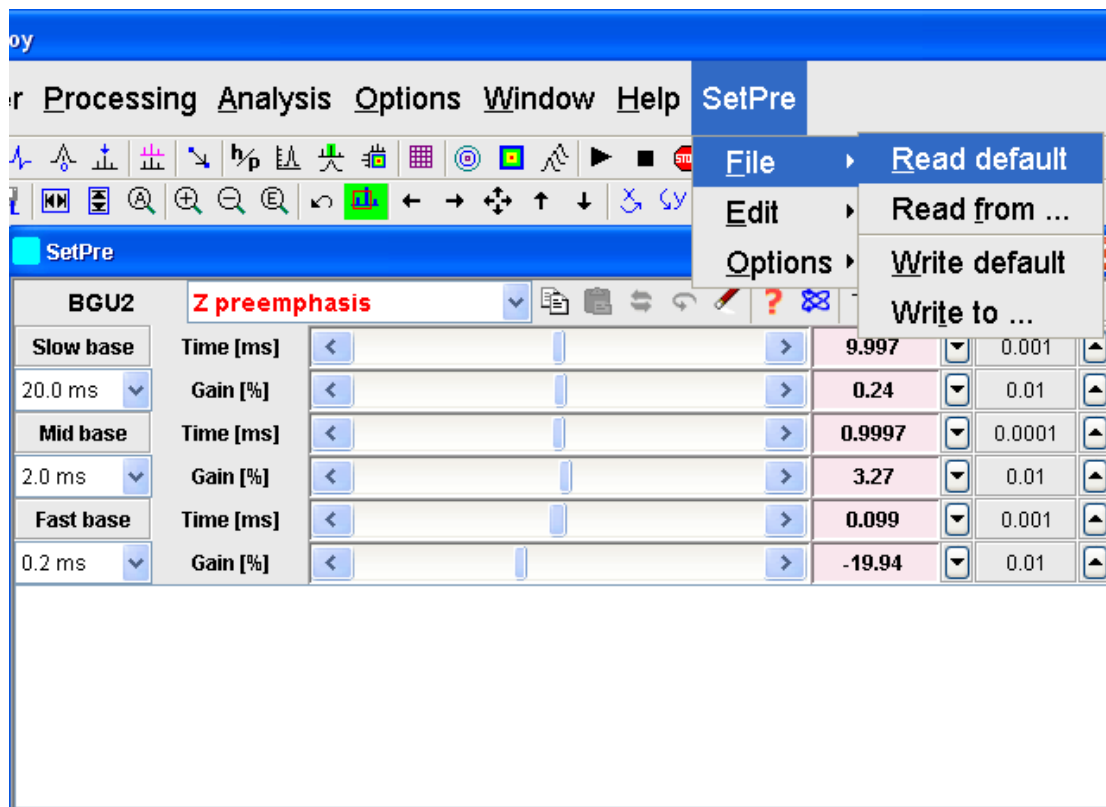
הקליד setpre יופיע חלון חדש ובתפריט שהחלון הראשי יופיע אפשרות נוסף SetPre:

SetPre > File > Read default

Store

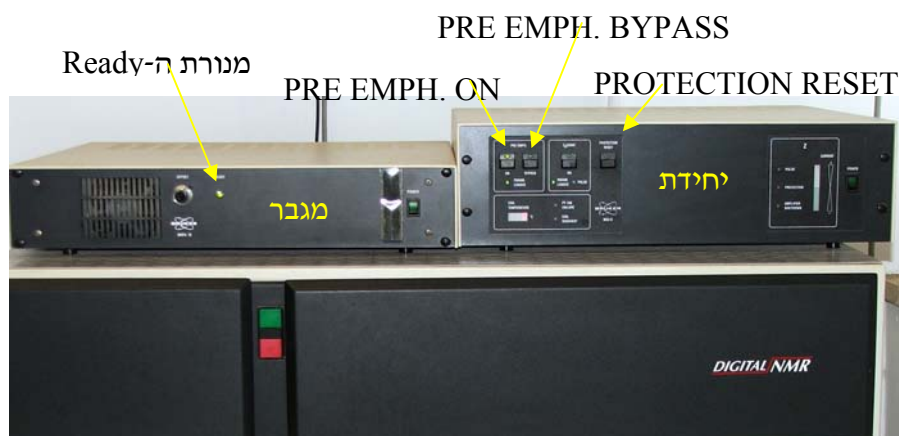
סגור את חלון ה-SetPre

תרשים 3. חלון קדם ההדגשה



בלוח הבקרה של הגרדיאנטים (מפלים תרשים 4) מוודאים שכפתור PRE EMPH. ON דלוק ו- PRE EMPH. BYPASS כבוי. במגבר הגרדיאנטים מוודאים שמנורת ה-Ready דלוק ואם לא לוחצים על PROTECTION RESET שנמצא בלוח הבקרה של הגרדיאנטים.

תרשים 4. יחידת הגרדיאנטים



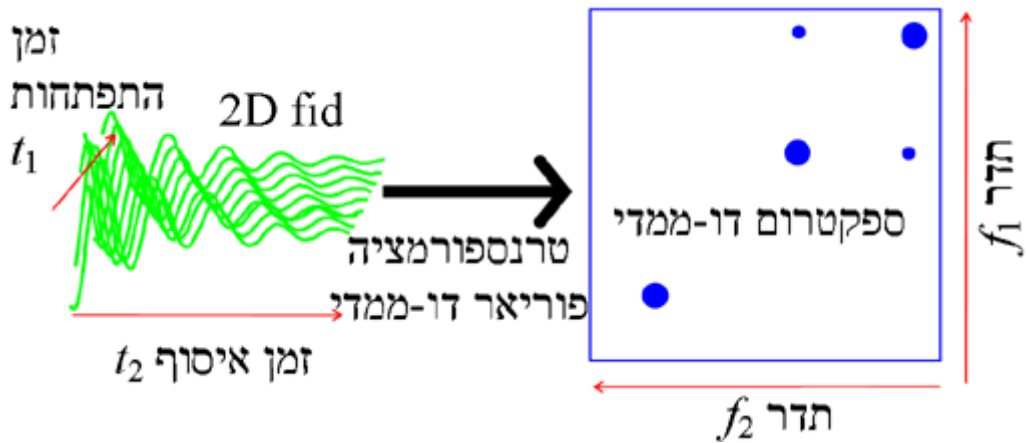
ז. איסוף והמרת ספקטרום הדו-מימדי

יש לבטל את הסיבוב (אם הדוגמה מסתובב לחץ על SPIN ON/OFF בלוח בקרה).

יש להקליד zg. האיסוף מכיל שורות רבות ואחרי איסוף כמו שורות ראשונות ניתן ומומלץ להתחיל בפענוח כדי לבדוק שהאיסוף מתקדם כנדרש.

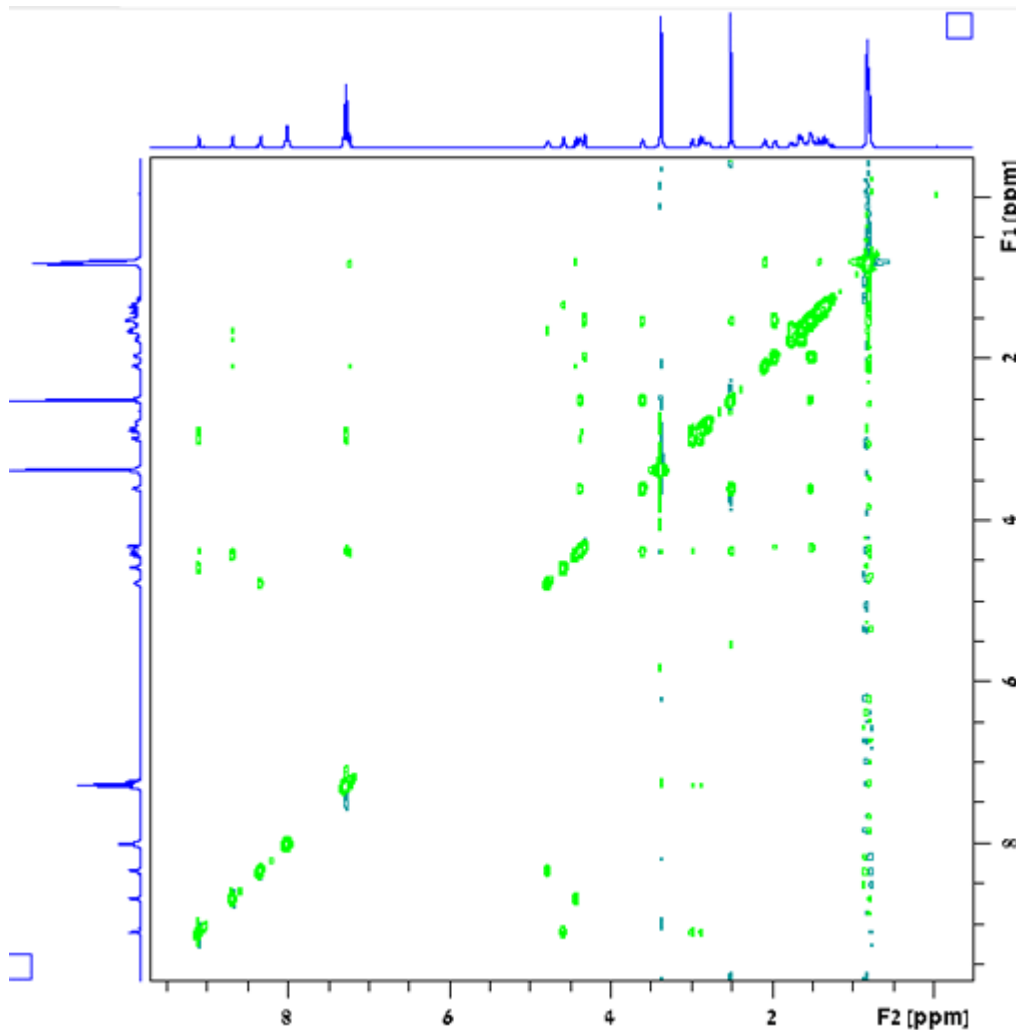
בסוף האיסוף מתבצעת המרת פוריה דו-מימדי (תרשים 5) שהופך את סיגנל הנאסף לספקטרום.

תרשים 5. המרת פוריה דו-מימדית








לבצע התמרת פוריה דו-מימדית מקלידים xfb כדי לקבל ספקטרום דו-מימדי (תרשים 6). בדרך כלל פונקציית החלון ברירת המחדל מתאים לניסוי. פרק 6 מסביר איך להתאים אותו יותר.

תרשים 6. ספקטרום דו-מימדי (NOESY של גרמיצידין)




ח. שליטה בייצוג הספקטרום הדו-מימדי

משתמשים בסרגל כלים הזה כדי לשלוט על ייצוג הספקטרום.

Integrate: a לבחור  מוחק את אינטגרלים המסומנים.  נותן אפשרות להזיז ולשנות אזור אינטגרל קיים.  מעתיק אינטגרל קיים. בסיום האינטגרציה לחץ על  כדי לשמור (או על  כדי לבטל). בחלון הראשי לחץ על לשונית Integrals לראות את רשימת האינטגרלים.

יג. סימון סיגנלים

סימון סיגנלים ידני נעשה בלחיצה על . על הספקטרום יש ללחוץ ימני על כל סיגנל שרוצים לצייין.

יד. השלכות

עבור ספקטרום HSQC, HMQC או HMBC אם אין ספקטרום פחמנים (או הגרעין השני האחר) יש להקליד proj ובשדה – Projection (sum) of יש לבחור columns. לחץ על OK לשמור.

הקלד projd או השתמש בתפריט [projd] → Processing → Display Projections...
 EXPNO ב-F2 לקובץ החד-מימדי (בדרך כלל EXPNO אחד פחות דו-מימדי). ל-F1 של COSY ו-NOESY יש להשתמש באותו קובץ שהתמשת בו ל-F2. ל-HSQC, HMQC ו-HMBC יש להשתמש בספקטרום הפחמנים. אם אין ספקטרום פחמנים יש להשתמש בהשלכה שנוצר בפקודה proj שנמצא ב-PROCNO.999.

טו. הדפסה

הדפסה כמפורט במדריך "מדידת ספקטרום NMR פרוטון" אלה ל-COSY, TOCSY, NOESY ו-ROESY משתמשים ב-LAYOUT של +/2D_hom.xwp ול-HSQC, HMQC ו-HMBC משתמשים ב-LAYOUT של +/2D_inv.xwp.

2. שימוש המדריך במעבדות אחרות

בספקטרומטר ה-400 יש יחידת גרדיאנטים מסוג BGU II עם מגבר מסוג BGPA10 שסובל ממערבולות זרם (eddy currents) וחסימה פגומה של הנעילה. לכן היה צורך לשנות את תוכנות הפולסים עבור COSY ו-HSQC.

כדי להכין פרמטרים ל-COSY יש לקרוא את הפרמטרים COSYGPMFSW (הקלד all COSYGPMFSW). שנה את הפרמטרים האלה

PL1	למינימום המותר: -6, -3, 0 או 3
P1	אורך פולס 90° במיקרו-שניות
NS	1
DS	8
PULPROG	cosydfetgp.2roy
FnMOD (F1)	Echo-Antiecho
GPZ 1	30
GPZ 2	10
GPZ 3	50
CPZ 4	-60

הכניס את תוכנית הפולסים cosydfetgp.2roy. ניתן לבחור את הטקסט ולהעתיק ל-Notepad ושמור את התוכנות בספרייה c:\bruker\topspine1.3(2.0)\exp\stan\lists\pp ב-TOPSPIN2 יש לבצע edpul->file->import.

בספקטרומטרים מסוג Avance יש להחליף את setnmr2 ב-setnmr3 כל פעם שהוא מופיע בתוכנית הפולסים.

```
;cosydfetgp.2
;avance-version (00/04/28)
;2D homonuclear shift correlation
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
;with double quantum filter using gradient selection
```

```

;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"p2=p1*2-0.8"
"d0=3u"
"d11=30m"
"d13=4u"

"DELTA=p16+d16+d0"
"DELTA1=p16+d16+8u"

1 ze
2 d11 setnmr2^0
  d11
3 d1
  50u UNBLKGRAD
  p16:gp1*-1*EA
  d16
  p16:gp4
  d16
  p1 ph1
  DELTA
  p2 ph2
  d0
  p16:gp1*EA
  d16
  p1 ph2
  DELTA1
  p2 ph2
  8u
  p16:gp2
  d16
  p1 ph2
  DELTA1
  p2 ph2
  4u
  p16:gp3
  d16
  4u BLKGRAMP

```

```

go=2 ph31
d11 setnmr2^0
d11 mc #0 to 2 F1EA(igrad EA, id0 & ip1*2 & ip31*2)
exit

```

```

ph1=0 2
ph2=0
ph31=0 2

```

```

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d13: short delay [4 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;in0: 1/(1 * SW) = 2 * DW
;nd0: 1
;NS: 8 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: echo-antiecho

```

```

;use gradient ratio: gp 1 : gp 2 : gp 3 : gp4
; 30 : 10 : 50 : -60

```

```

;for z-only gradients:
;gpz1: 30%
;gpz2: 10%
;gpz3: 50%

```

```

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
;gpnam3: SINE.100

```

```

;$Id: cosydfetgp.2,v 1.7.10.1 2005/11/10 13:18:56 ber Exp $

```

העתק את הקובץ 2D_hom.xwp ל-2D_homold.xwp ובטל את ה-readonly של 2D_hom.xwp. הכנס ל-ploteditor ושנה את התצוגה להתאים לצרכים שלך, כפי שמפורט בספר Topspin plotting של ברוקר, ושמור. הפעל שוב את ה-readonly על 2D_hom.xwp.

שמור את הפרמטרים ב-3_COSY בהקלדה 3_COSY all.wpar.

כדי להכין פרמטרים ל-NOESY יש לקרוא את הפרמטרים NOESYPHSW (הקלד
all NOESYPHSW).rpar שנה את הפרמטרים האלה

PL1 למינימום המותר: -6, -3, 0 או 3
P1 אורך פולס 90° במיקרו-שניות
NS 2
DS 4

שמור את הפרמטרים ב-4_NOESY בהקלדה all 4_NOESY.wpar

כדי להכין פרמטרים ל-HSQC יש לקרוא את הפרמטרים HSQCETGP (הקלד
all HSQCETGP).rpar שנה את הפרמטרים האלה

PL1 למינימום המותר: -6, -3, 0 או 3
P1 אורך פולס הפרוטון 90° במיקרו-שניות
P28 1000
PL2 למינימום המותר: -6, -3 או 0
PL12 להפרת צימוד
P3 אורך פולס הפחמן 90° במיקרו-שניות
NS 2
DS 16
PULPROG hsqcetgproy
GPZ 1 80
GPZ 2 20.1

הכניס את תוכנית הפולסים cosydfetgp.2roy. ניתן לבחור את הטקסט ולהעתיק ל-Notepad
ושמור את התוכנות בספרייה c:\bruker\topspine1.3(2.0)\exp\stan\lists\pp

```
;hsqcetgp
;avance-version (05/10/28)
;HSQC
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
;with decoupling during acquisition
;using trim pulses in inept transfer
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
```

```
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
```

```
"p2=p1*2-0.8"
```

```

"p4=p3*2-0.8"
"d0=3u"
"d4=1s/(cnst2*4)"
"d11=30m"
"d13=4u"

# ifdef LABEL_CN
"p22=p21*2-0.8"
# else
# endif /*LABEL_CN*/

"DELTA1=d4-p16-d13-4u"

# ifdef LABEL_CN
"DELTA=p16+d16+larger(p2,p22)+d0*2"
# else
"DELTA=p16+d16+p2+d0*2"
# endif /*LABEL_CN*/

1 ze
  d11 p112:f2
2 d1 setnmr2^0 do:f2
  d11 UNBLKGRAD
  p16:gp1*-1*EA
  d16
  p16:gp2*-1
  d16
3 (p1 ph1)
  d4 p12:f2
  (center (p2 ph1) (p4 ph6):f2 )
  d4
  p28 ph1
  d13
  (p1 ph2) (p3 ph3):f2
  d0

# ifdef LABEL_CN
  (center (p2 ph5) (p22 ph1):f3 )
# else
  (p2 ph5)
# endif /*LABEL_CN*/

  d0
  p16:gp1*EA
  d16
  (p4 ph4):f2
  DELTA
  (ralign (p1 ph1) (p3 ph4):f2 )
  d4

```

```

(center (p2 ph1) (p4 ph1):f2 )
d13
p16:gp2
DELTA1 pl12:f2
4u BLKGRAMP
go=2 ph31 cpd2:f2
d1 setnmr2^0 do:f2
d11 mc #0 to 2
  F1EA(igrad EA, id0 & ip3*2 & ip6*2 & ip31*2)
exit

```

```

ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4=0 0 0 0 2 2 2 2
ph5=0 0 2 2
ph6=0
ph31=0 2 0 2 2 0 2 0

```

```

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;p28: f1 channel - trim pulse
;d0 : incremented delay (2D)           [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d11: delay for disk I/O               [30 msec]
;d13: short delay                       [4 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;cnst2: = J(XH)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 1 * n
;DS: >= 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: echo-antiecho
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

;use gradient ratio:   gp 1 : gp 2
;                       80 : -20.12   for C-13

```

```

;                               80 : 8.1    for N-15

;for z-only gradients:
;gpz1: 80%
;gpz2: 20.1% for C-13, 8.1% for N-15

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100

                               ;preprocessor-flags-start
;LABEL_CN: for C-13 and N-15 labeled samples start experiment with
;       option -DLABEL_CN (eda: ZGOPTNS)
                               ;preprocessor-flags-end

;$Id: hsqcetgp,v 1.2.8.1 2005/11/10 13:18:58 ber Exp $

```

העתק את הקובץ 2D_inv.xwp ל-2D_invold.xwp ובטל את ה-readonly של 2D_inv.xwp
הכנס ל-ploteditor ושנה את התצוגה להתאים לצרכים שלך, כפי שמפורט בספר Topspin
plotting של ברוקר, ושמור. הפעל שוב את ה-readonly על 2D_inv.xwp

שמור את הפרמטרים ב-5_HSQC בהקלדה `.wpar 5_HSQC all`

כדי להכין פרמטרים ל-HMBC יש לקרוא את הפרמטרים HMBCGP (הקלד
`.rpar HMBCGP all`). שנה את הפרמטרים האלה

PL1	למינימום המותר: -6, -3, 0 או 3
P1	אורך פולס לפרוטון 90° במיקרו-שניות
PL2	למינימום המותר: -6, -3 או 0
P3	אורך פולס לפחמן 90° במיקרו-שניות
NS	2
DS	8
GPZ 1	50
GPZ 2	30
GPZ 3	40.1

שמור את הפרמטרים ב-6_HMBC בהקלדה `.wpar 6_HMBC all`

3. שימוש בגלאי לא מועדף

מאחר שאין לגלאי ה-BBO של ספקטרומטר ה-400 מגהרץ סליל גרדיאנט ביצוע דו-מימדי למעט
TOCSY, NOESY ו-ROESY בגלאי זה דורש יותר זמן וכיולים נוספים ומניב תוצאות פחות
טובות לכן מחוסר דרישה, לא הוכנו פרמטרים לניסיונות אלה. ניתן להריץ NOESY בגלאי ה-
BBO בשינוי של הפרמטר p1 ל-9 אך הגלאי פחות רגיש ביחס ל-BBI. ב-TOCSY יש לשנות את
הנמכת נעילת הספין, pl10 ל-5.8 וב-ROESY את pl11 ל-15.7.

בספקטרומטר ה-500 מגהרץ ניתן להריץ את כל ניסוי הדו-מימדיים בגלאי ה-BBO אך הרגישות פחות מצי זה של ה-BBI. כדי להשתמש ב-BBO יש לשנות את P1 ואת PL1 לערך של פרוטון לפי טבלה 2. עבור HSQC, HMQC ו-HMBC יש לשנות את P3 ואת PL2 לפי הגרעין המוצמד (^{13}C , ^{15}N או ^{199}Hg) בטבלה ועבור HSQC לשנות את PCPD2 ואת PL12 לפי הערך של הפרת הצימוד בטבלה 2. ב-HSQC עם פולסים בעלי צורה יש להכניס את הערך של ה-PL ב-SP3 ו-SP7. ב-TOCSY יש לשנות את pl10 וב-ROESY את pl11 לערך של נעילת הספין בטבלה 2.

טבלה 2. רוחב והנמכה של פולסים לתמ"ג דו-מימדי

500 מגהרץ				400 מגהרץ				גרעין
BBO		BBI		BBO		BBI		
PL	P _{90°}	PL	P _{90°}	PL	P _{90°}	PL	P _{90°}	
3	11.0	3	8.5	-6	9.0	-6	5.6	^1H
13.1		15.3		5.8		9.9		נעילת ספין TOCSY
23.0		25.2		15.7		19.8		נעילת ספין ROESY
2	10.0	-3	12.4			-6	15.7	^{13}C
17.7	62.0	11	62.0			15.4	100.0	הפרת צימוד מ- ^{13}C
7.81		3.29				-1.76		פולס עם צורה ^{13}C
0	13.5	-4	20.0			-6	22.5	^{15}N
15	121.5	15	180			15.4	159	הפרת צימוד מ- ^{15}N
5.55		-0.86				-4.89		פולס עם צורה ^{15}N
3	10.1	-3	11.9			-6	11.0	^{199}Hg
19.1	62.0	11.7	62.0			8.8	100.0	הפרת צימוד מ- ^{199}Hg
0	20.5							^{103}Rh

4. מדידת רוחב והנמכת הפולסים

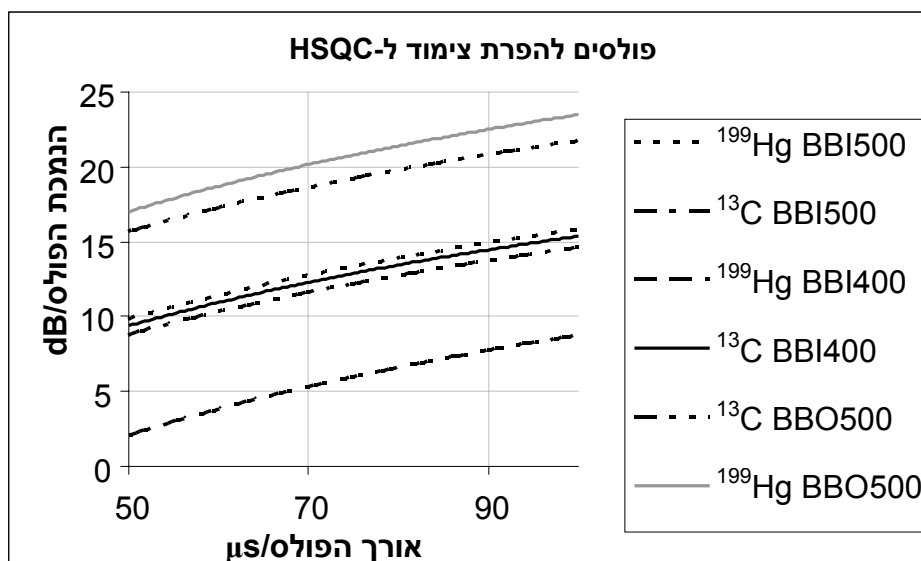
לכל ניסוי דו-מימדי ניתן למדוד את רוחב הפולס של פרוטון לפי המדריך "מדידת ספקטרום NMR פרוטון" פרק 6 ולהכניס את הערך לפרמטר P1. ל-HSQC ו-HMBC ניתן למדוד את רוחב הפולס של הגרעין המוצמד לפי המדריך "מדידת ספקטרום NMR של פחמן וגרעינים אחרים (לא פרוטון)" פרק 6 ולהכניס את הערך לפרמטר P3.

ל-HSQC יש לכייל גם את הפרת הצימוד. הכיול דומה לזה שמובא במדריך "מדידת ספקטרום NMR של פחמן וגרעינים אחרים (לא פרוטון)" פרק 6 אלה שהגרעין המוצמד כאן הוא ^{13}C , ^{15}N או ^{199}Hg ובדרך כלל משתמשים בתוכנת פולסים של garp4 להפרת צימוד מאחר שתחום הספקטרום רחב יחסית לפרוטון. רוחב פולס ההפרה במיקרושניות יכול להיות עד ל-1333 לחלק לרוחב הספקטרום במימד גרעין המוצמד בקילוהרץ. עדיף להשתמש ברוחב פולס רחב והנמכה גבוה שניתן כך שהפרת הצימוד מכסה את כל התחום במינימום כוח ומפחית את חימום הדוגמה ומשפר את יציבות הטמפרטורה. ניתן לקבוע את הנמכת ורוחב הפולס לפי תרשים 7 או למדוד את



רוחב הפולס. כדי למדוד אותו, פתח קובץ חדש לפרוטון והרץ ספקטרום ראשוני. לחץ על ובחר סיגנל לצורך כיול הפולס. שנה את pulprog ל-zgpg, PL12 ו-PL13 למתאים לגלאי לפי המדריך "מדידת ספקטרום NMR של פחמן וגרעינים אחרים (לא פרוטון)" טבלה 6 ואת P1 לארבע כפול PCPD2. שנה את PL1 קרוב לערך הצפוי והרץ ספקטרום ראשוני. אם הסיגנל חיובי הגדל את PL1 ואם הוא שלילי הקטן את PL1 עד שמקבים עוצמה קרוב לאפס.

תרשים 7. הנמכה ורוחב פולסים עבור הפרת צימוד של פחמן וכספית בספקטרומטרים ה-400 וה-500 מגהרץ



ב-TOCSY ניתן לשנות את אורך נעילת הספין מברירת המחדל שלה של 80 מילישניות. זמן קצר יותר ייתן פחות פריסה של התאומות דרך קשרים רבים והספקטרום ידמה יותר ל-COSY. אל תארך את נעילת הספין יותר מ-100 מילישניות. עוצמת נעילת הספין מכוון לפולס של 90° של 35 מיקרושניות. עוצמה חזקה יותר פורס על תחום רחב יותר מספקטרום רגיל ועוצמה חלש יותר מחליש התאמות של TOCSY ומגביר התאמות לא רצויות בניסוי זה של ROESY.

ב-ROESY ניתן לשנות את אורך נעילת הספין (פרמטר p15) מברירת המחדל שלה של 225 מילישניות. הזמן צריך להיות עד זמן הרלקסציה של נעילת הספין ($T_{1\rho}$) שהוא דומה לזמן רלקסציה אורכית (T_1) אבל לא יותר מ-300 מילישניות. עוצמת נעילת הספין מכוון לפולס של 90° של 110 מיקרושניות. עוצמה חזקה יותר פורס על תחום רחב יותר מספקטרום רגיל אבל מגביר התאמות לא רצויות בניסוי זה של TOCSY ועוצמה חלש יותר מחליש את ההתאמות. ראה גם פרק 5.

5. כיוול השהיית הרלקסציה

בפרוטון מדד את זמן הרלקסציה (הרפייה) (לפי המדריך "מדידת ספקטרום NMR פרוטון" פרק 13) המרבית של הסיגנלים שמעניינים אותך. לניסוי NOESY מדד גם את זמן הרלקסציה המועטה ביותר של בסיגנלים שמעניינים אותך.

רשום את הפרמטר AQ. ל-COSY, TOCSY, NOESY, ROESY ו-HMBC, שנה את הפרמטר D1 לזמן הרלקסציה המרבית פחות AQ. ל-HSQC ו-HMBC שנה את הפרמטר D1 לזמן הרלקסציה המרבית. אם כתוצאה מכך זמן הניסוי (ניתן לבדוק אותו בפקודת expt) ערוך מדי ניתן לקצר את D1 אבל מאבדים רגישות ומקלקלים קצת את התוצאות. למדידת NOESY ו-ROESY כמותית (לצורך EXE) שנה את הפרמטר D1 לזמן הרלקסציה המרבית פי חמש פחות AQ.

ל-NOESY שנה את D8 לחצי הזמן של זמן הרלקסציה המועטה ביותר. למדידת NOESY כמותית (לצורך EXE) שנה את הפרמטר D8 לעשירית או פחות של זמן הרלקסציה המועטה ביותר. ל-ROESY השתמש בפרמטר P15 במקום D8 אבל אל תגדיל את P15 ליותר מ-0.3s.

6. אפודיציה (פונקציות חלון) להגברת רגישות או הפרדה

בספקטרום הדו-מימדי פונקציית החלון נבחר לפי הפרמטר WDW. המדריך "מדידת ספקטרום NMR פרוטון" פרק 11 מוסבר הפונקציות EM ו-GM וניתן להשתמש בהם באותו צורה

שמשמשים במ בחד-מימדי עבור ספקטרום דו-מימדי. ניתן להשתמש בפונקציית חלון ופרמטרים שונים בכל מימד בנפרד, לדומה EM ב-F1 ו-GM ב-F2.

בנוסף פונקציות אלה נהוג להשתמש בשני פונקציות נוספות המתאימות במיוחד ל-FID קטוע: SINE ו-QSINE. לפונקציית SINE ו-QSINE שייך פרמטר SSB. אם SSB שווה 1 מקבלים הגברת הפרדה ופוחתים את הרגישות. עם SSB שווה 2 מגבירים את הרגישות ופוחתים את ההפרדה. מעל 2, מקבלים תוצאה בינונית. השפעת QSINE גדול יותר מזה של SINE. לניסוי כמותי כמו EXSY אין להשתמש בפונקציה חלון אלה אם כן קיים קיטוע. עם יש קיטוע השתמש בחלון SINE עם SSB של 2 במימד(ים) שיש קיטוע.

7. בחירת הניסוי להתאמה בין-גרעינית

כדי לבחור את ניסוי ההתאמה המתאים ביותר יש לענות על שאלות אלה ולפעול לפי תרשים 8.

דרך כמה קשרים ההתאמה?

ההתאמה לאיזה גרעין?

האם ההפרדה ב- f_1 קטן מ-8 הרץ?

מה רוחב הקו של פרוטון?

מה תחום בגרעין המותאם?

מה תחום קבוע הצימוד דרך קשר אחד?

קבוצת הפרמטרים שמתחילים במספר 5 הם לקשר יחיד בין פרוטון והגרעין הצמוד המתאום (פחמן או חנקן). שיטת ההחלטה לאיזה ניסוי להשתמש דומה מאוד לפחמן ולחנקן. מה ששייך להתאמה עם חנקן יהיה בסוגריים בהמשך (מאחר שברוב המקרים לא משתמשים בחנקן).

אם ההפרדה טובה משמונה הרץ בציר של הגרעין הצמוד המותאם ורוחב הקו בפרוטון קטן מ-40 הרץ (30 הרץ עבור חנקן) משתמשים בניסוי HSQC. אם רוחב הקו של פרוטון גדול מ-20 (12) הרץ בחר את הפרמטרים 5d_HSQC (5j_HSQC1h15n). אחרת אם התחום של פחמן פחות מ-60 ppm (חנקן פחות מ-90 ppm) השתמש ב-5c_HQSCsi (5i_HSQCsi1h15n). אחרת אם רוחב הקו של פרוטון פחות מ-10 (6) הרץ משתמש ב-5_HSQCsisp2 (5a_HSQCsisp21h15n) אחרת השתמש ב-5b_HSQCsisp1 (5h_HSQCsisp1h15n).

אם ההפרדה רחב משמונה הרץ בציר של הגרעין הצמוד ורוחב הקו בפרוטון קטן מ-40 הרץ (30) הרץ עבור חנקן) משתמשים בניסוי HMQC. אם רוחב הקו של פרוטון גדול מ-10 (6) הרץ בחר את הפרמטרים 5e_HMQCsisp (5k_HMQCsisp1h15n). אחרת השתמש ב-5f_HMSC (5l_HMQC1h15n).

אם ההפרדה של פרוטון רחבה מ-40 (30) הרץ השתמש ב-5g_HMBCshortrange (5m_HMBC1h15nshortrange).

קבוצת הפרמטרים שמתחילים במספר 6 הם לקשרים רבים (2, 3, יותר) בין פרוטון והגרעין הצמוד המתאום (פחמן או חנקן).

לחנקן השתמש בפרמטרים 6a_HMBC1h15nfilter.

לפחמן בחירת הניסוי תלוי בצורך להפר את ההתאמות דרך קשר אחד. אם מפריס אותם הספקטרום מופשט אבל יש ירידה ברגישות. אם לא צריכים הפרה השתמש בפרמטרים 6f_HMBCnofilter אם ההפרדה בפחמן רחב משמנה הרץ ו-6j_HSQClnofilter אם ההפרדה טובה יותר. אם רוצים להפר צימוד אליפטי וארומטי ביחד השתמש בפרמטרים

6_HMBClowpass2 אם ההפרדה בפחמן רחב משמנה הרץ ו-6g_HSQCrlowpass2 אם ההפרדה טובה יותר. אם רוצים להפר רק את הקשרים האליפטיים השתמש בפרמטרים 6d_HMBClpaliphatic אם ההפרדה בפחמן רחב משמנה הרץ ו-6h_HSQCrlpaliphatic אם ההפרדה טובה יותר. אם רוצים להפר רק את הקשרים הארומטיים השתמש בפרמטרים 6e_HMBClparomatic אם ההפרדה בפחמן רחב משמנה הרץ ו-6i_HSQCrlparomatic אם ההפרדה טובה יותר.

הפרמטר cnst13 מכיל את קבוע הצימוד הרב קשרי עבורו הניסוי ממוטב (optimized). ברירת המחול הוא 10 הרץ. ניתן לשנות אותו לפי הצורך אבל בחירתו היא עניין של ניסוי וטעייה, אפילו אם קבועה הצימוד ידוע, מאחר שהוא מושפע מצימוד פרוטון-פרוטון וכאשר מורידים אותו מאבדים רגישות.

כאשר ידועים קבועי צימוד חד קשריים שונים של פרוטונים אליפטיים וארומטיים באותו הספקטרום ובחרת ניסוי של lowpass2. ניסוי זה מתאים ביותר לקבוע צימוד חד-קשרי בין 124 ו-162 הרץ. אם ידוע לך שתחום צר יותר או התחום אחר הכנס את הקבוע הקטן ביותר ב-cnst6 והגדול ביותר ב-cnst7. כאשר קבועי הצימוד קרובים אחד לשני או שלא רוצים לאבד יותר מדי רגישות בוחרים בניסוי מסוג lp. ניסוי מיעוד לארומטי מותאם ל-158 הרץ ואליפטי ל-127 הרץ. אם ידוע לך שקבוע הצימוד אחר ניתן להכניס אותו ל-cnst2.

כדי למדוד את קבוע הפיצול תווד-הארוך (ראה פרק 8) יש להריץ גם ניסוי חד-מימדי לפי תבלה 4 שם אם אותו פרמטרים של השורה הראשונה ה-HMBC.

טבלה 3. ניסוי תמ"ג להתאמה בין-גרעינית

ניסוי	פרמטרים	תיאור הניסוי
HSQCsisp2	5_HSQCsisp2	התאמה בין פרוטון לפחמן דרך קשר יחיד עם הגברת רגישות וארבע פולסים מעוצבים (עם צורה)
¹ H- ¹⁵ N HSQCsisp2	5a_HSQCsisp21h15n	התאמה בין פרוטון לחנקן דרך קשר יחיד עם הגברת רגישות וארבע פולסים

מעוצבים (עם צורה)		
התאמה בין פרוטון לפחמן דרך קשר יחיד עם הגברת רגישות ושני פולסים מעוצבים (עם צורה)	5b_HSQCsisp	HSQCsisp
התאמה בין פרוטון לפחמן דרך קשר יחיד עם הגברת רגישות	5c_HSQCsi	HSQCsi
התאמה בין פרוטון לפחמן דרך קשר יחיד עם הגברת רגישות	5d_HSQC	HSQC
התאמה בין פרוטון לפחמן דרך קשר יחיד ללא הפרת צימוד הומוגרעיני ב- f_1 עם הגברת רגישות ופולסים מעוצבים (עם צורה)	5e_HMQCsisp	HMQCsisp
התאמה בין פרוטון לפחמן דרך קשר יחיד ללא הפרת צימוד הומוגרעיני ב- f_1	5f_HMQC	HMQC
התאמה בין פרוטון לפחמן דרך קשר יחיד עבור סיגנלים רחבים מאוד (מעל 40 הרץ)	5g_HMBCshortrange	HMBC
התאמה בין פרוטון לחנקן דרך קשר יחיד עם הגברת רגישות ושני פולסים מעוצבים (עם צורה)	5h_HSQCsisp1h15n	$^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQCsisp
התאמה בין פרוטון לחנקן דרך קשר יחיד עם הגברת רגישות	5i_HSQCsi1h15n	$^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQCsi
התאמה בין פרוטון לחנקן דרך קשר יחיד עם הגברת רגישות	5j_HSQC1h15n	$^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC
התאמה בין פרוטון לחנקן דרך קשר יחיד ללא הפרת צימוד הומוגרעיני ב- f_1 עם הגברת רגישות ופולסים מעוצבים (עם צורה)	5k_HMQCsisp1h15n	$^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HMQCsisp
התאמה בין פרוטון לחנקן דרך קשר יחיד ללא הפרת צימוד הומוגרעיני ב- f_1	5l_HMQC1h15n	$^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HMQC
התאמה בין פרוטון לחנקן דרך קשר יחיד עבור סיגנלים רחבים מאוד (מעל 30 הרץ)	5m_HMBC1h15nshortrange	$^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HMBC
התאמה בין פרוטון לפחמן דרך מספר רב של קשרים בעיקר 3 קשרים וכאשר מפריס התאמה חד קשרית בטווח רחב (124 עד 162 הרץ) של צימודים	6_HMBClowpass2	HMBClp2
התאמה בין פרוטון לחנקן דרך מספר רב של קשרים בעיקר 3 קשרים ללא הפרה של התאמה חד קשרית	6a_HMBC1h15nnofilter	HMBC
התאמה בין פרוטון לפחמן דרך מספר רב של קשרים בעיקר 3 קשרים כאשר מפריס התאמה חד קשרי בטווח צר של צימודים מתאום לסיגנלים אליפטיים	6d_HMBClpaliphatic	HMBClp
התאמה בין פרוטון לפחמן דרך מספר רב של קשרים בעיקר 3 קשרים כאשר מפריס התאמה חד קשרי בטווח צר של צימודים מתאום לסיגנלים ארומטיים	6e_HMBClparomatic	HMBClp
התאמה בין פרוטון לפחמן דרך מספר רב של קשרים בעיקר 3 קשרים ללא הפרה של	6f_HMBCnofilter	HMBC

התאמה חד קשרי		
התאמה בין פרוטון לפחמן דרך מספר רב של קשרים בעיקר 3 קשרים וכאשר מפרים התאמה חד קשרית בטווח רחב (124 עד 162 הרץ) של צימודים	6g_HSQCrlowpass2	HSQCrlp2
התאמה בין פרוטון לפחמן דרך מספר רב של קשרים בעיקר 3 קשרים כאשר מפרים התאמה חד קשרי בטווח צר של צימודים מתאום לסיגנלים אליפטיים	6h_HSQCrlpaliphatic	HSQCrlp
התאמה בין פרוטון לפחמן דרך מספר רב של קשרים בעיקר 3 קשרים כאשר מפרים התאמה חד קשרי בטווח צר של צימודים מתאום לסיגנלים ארומטיים	6i_HSQCrlparomatic	HSQCrlp
התאמה בין פרוטון לפחמן דרך מספר רב של קשרים בעיקר 3 קשרים ללא הפרה של התאמה חד קשרי	6j_HSQClnofilter	HSQCrlr

8. מדידת קבוע פיזור בין-גרעיני





למדוד את קבוע הפיזור דרך קשר אחד ($^1J_{NH}$ ו- $^1J_{CH}$) בטל את הפרת הצימוד ב- f_2 (כאשר יש הפרת צימוד) בהקלדת pl12 120. עבד את הספקטרום כרגיל. ניתן למדוד את הצימוד ישר מספקטרום הדו-ממדי אך הקבוע יותר מדויק אם נמדד השלכה של אזור של הספקטרום. לכל סיגנל בספקטרום הדו-ממדי הכן סכום של השורות בו הוא נמצא. רשום את השורות בהן נמצא הסיגנל פתח את חלון ההשלכות בהקלדת proj. בחר את אפשרות calculate sum הזן את המספרים של השורה התחתונה של הסיגנל ב-First row/col והשורה העליונה של הסיגנל ב-Last row/col ולחץ על OK. הקלד rep 999 כדי לפתוח את ההשלכה. מדד את קבוע הצימוד מהספקטרום. חזור על הפעולה לכל הסיגנלים.

כדי למדוד את קבוע הצימוד הבין-גרעיני לתווך ארוך, הרץ הספקטרום הדו-ממדי (HMBC או HSQCrlr) ואת ספקטרום הכיול החד-ממדי לפי הטבלה עם אותו פרמטרים. אם ברצונך גם למדוד את התופעה האיזוטופית על הפרוטון כתוצאה מהחלפת ^{12}C ב- ^{13}C יש לייצב את הטמפרטורה היטב, להגדיל את מספר איסופי דמה (ds) ל-64 או 128 בכל האיסופים ולהריץ את ספקטרום החד-ממדי לפני ואחרי ספקטרום הדו-ממדי כדי לקבל ממוצא.

טבלה 4. ניסוי תמ"ג למדידת קבוע צימוד בין-גרעיני לתווך ארוך

ניסוי	פרמטרים	פרמטרים להתאמה חד-ממדי
HMBClp2	6_HMBClowpass2	6k_HMBClp2dummy
HMBClp	6d_HMBClpaliphatic	6l_HMBClpdummy
HMBClp	6e_HMBClparomatic	6l_HMBClpdummy
HMBC	6f_HMBCnofilter	6m_HMBCdummy
HSQCrlp2	6g_HSQCrlowpass2	6n_HSQClp2dummy
HSQCrlp	6h_HSQCrlpaliphatic	6o_HSQClpdummy
HSQCrlp	6i_HSQCrlparomatic	6o_HSQClpdummy
HSQCrlr	6j_HSQClnofilter	6p_HSQCldummy

עבד את ה-HMBC ללא תיקון פאזה ב- f_2 ואת ספקטרום החד-ממדי ללא תיקון פאזה. בעיבוד ה-HMBC אין להפעיל פונקציה חלון ב- f_2 ואין להפעיל פונקציה חלון בספקטרום החד-ממדי. פתח PROCNO שני לספקטרום החד מימד והכנס phc1 0, phc0 180 ואחר כך fp.

לכל סיגנל ב-HMBC, הכן סכום של השורות בו הוא נמצא כמפורט לעיל בפסקה הראשונה של פרק זה. הקלד rep 999 כדי לפתוח את ההשלכה. ה"השלכה" והיכנס לחלון ייצוג רב-ספקטרום (תרשים 8) בלחיצה על  או הקלדת .md. בחר את שני העיבודים של הספקטרום החד-מימדי מרשימת הקבצים. פתח את הסכום בלחיצה על . הזז אחד העיבודים של הספקטרום החד-מימדי ימינה במחירתו בחלון בצד שמאל למתה וגרירה הצידה על . הזז את השני שמאלה. בחר את שני החד-ממדיים יחד עם shift ו-לחיצה בחלון בצד שמאל למתה. הגבר או הנמך אותם יחד בגרירה או לחיצה על . חזור חלילה על שלושה הפעולות עד שהסכום מגיע למינימום. קרה את ההזזות מהמסך. לדוגמה בתרשים 9 קבוע הצימוד הוא $5.2+1.2=6.4$ הרץ וניתן להבחין בתופעה איזוטופית כתוצאה מהחלפת ^{12}C ב- ^{13}C של $(0.010-0.002)/2=0.004\text{ppm}$. חזור על הפעולה לכול הסיגנלים בספקטרום הדו-מימדי שרוצים למדוד.

תרשים 9. חלון ייצוג רב-ספקטרום

