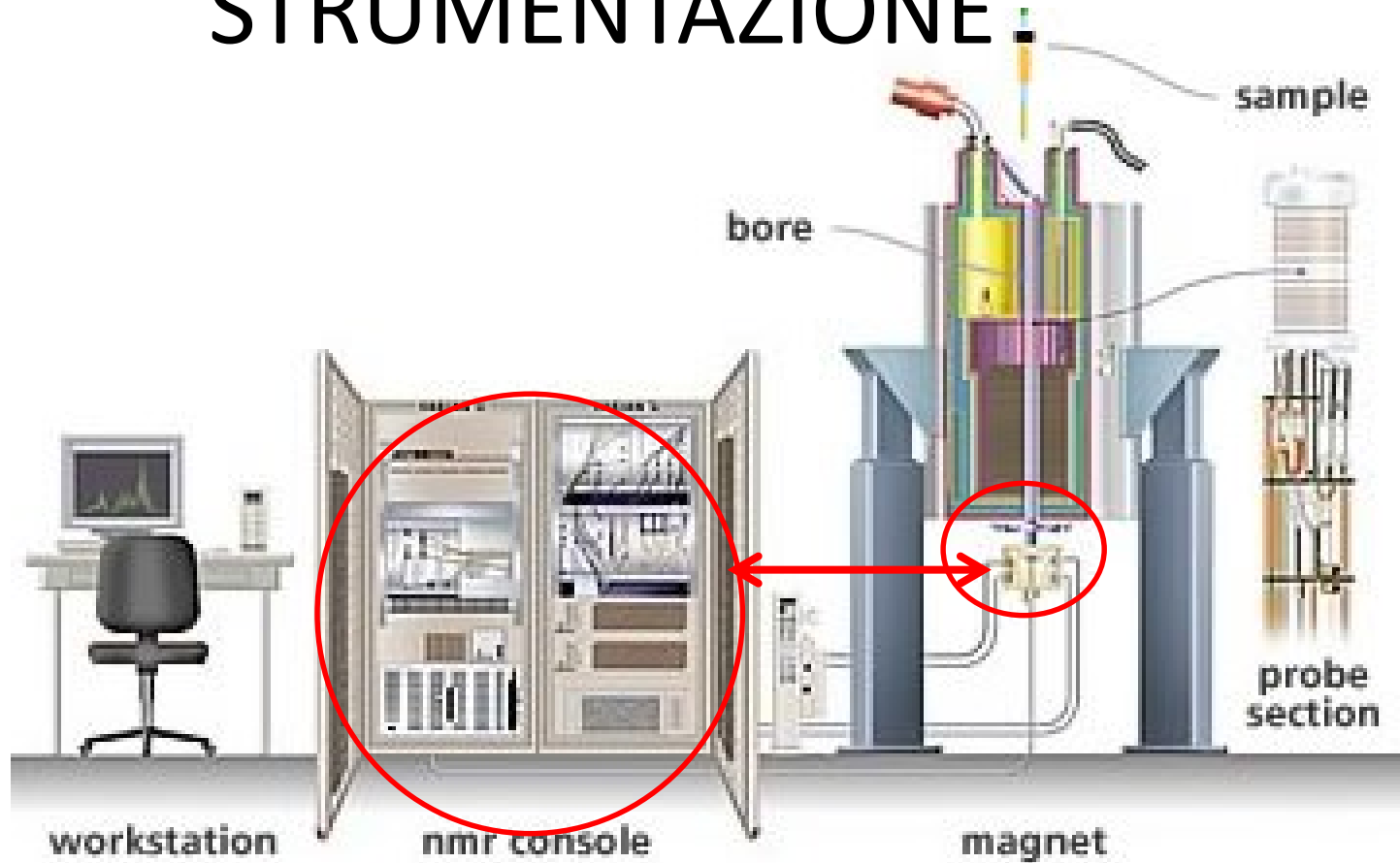
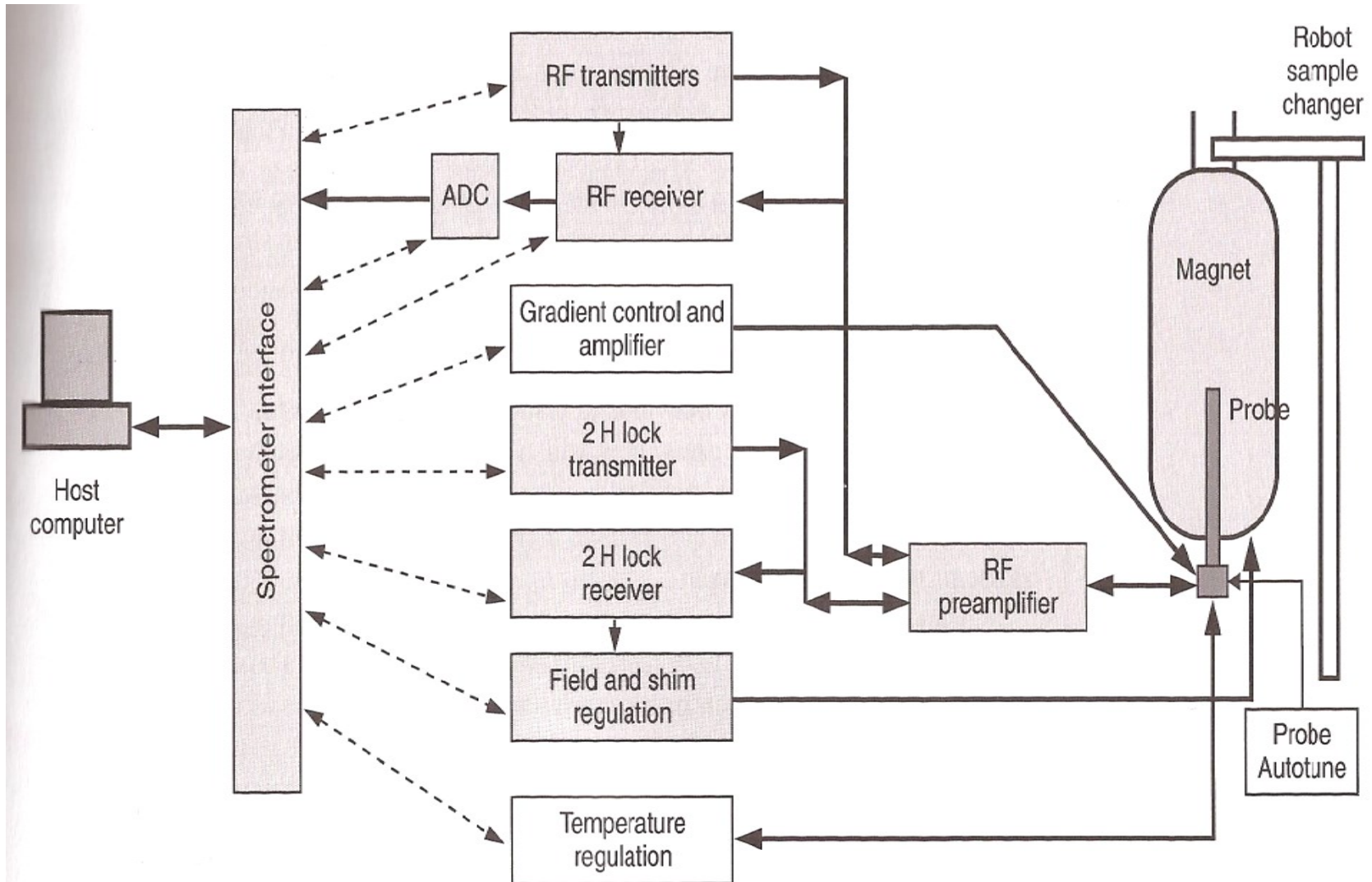


STRUMENTAZIONE

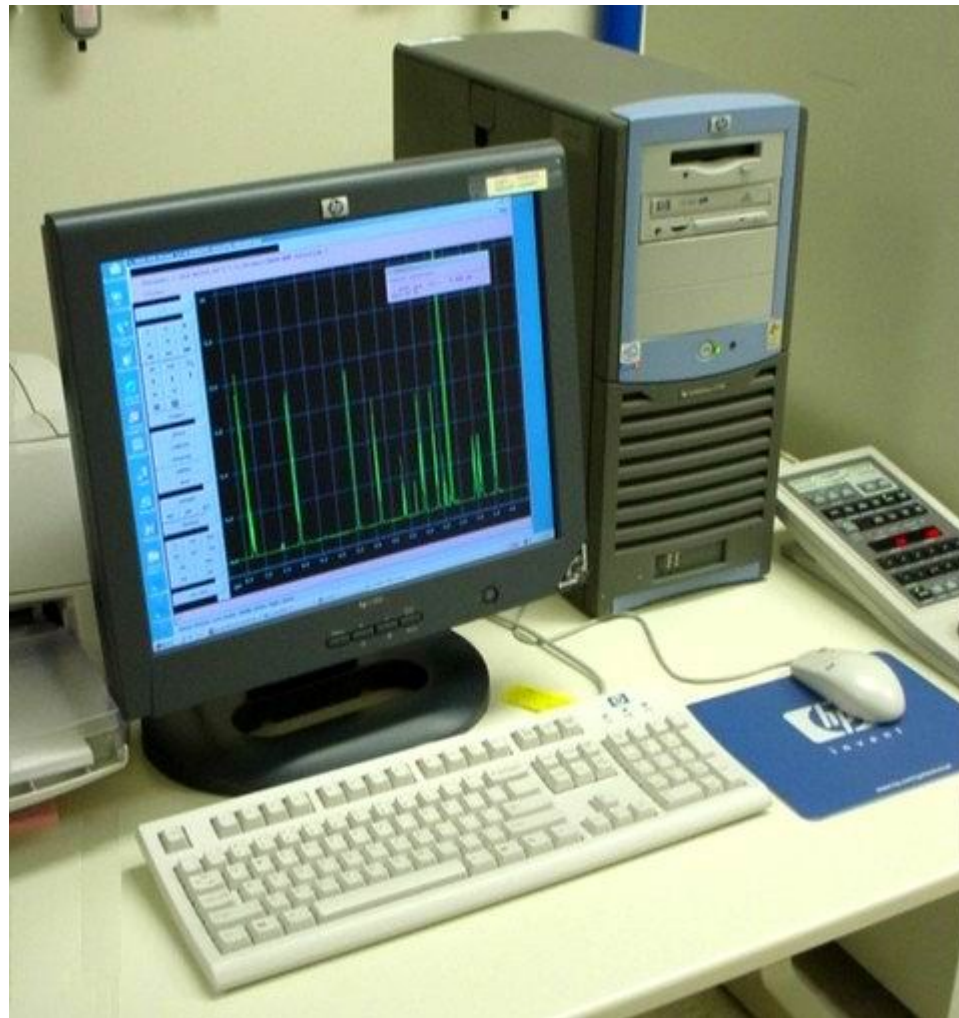
STRUMENTAZIONE



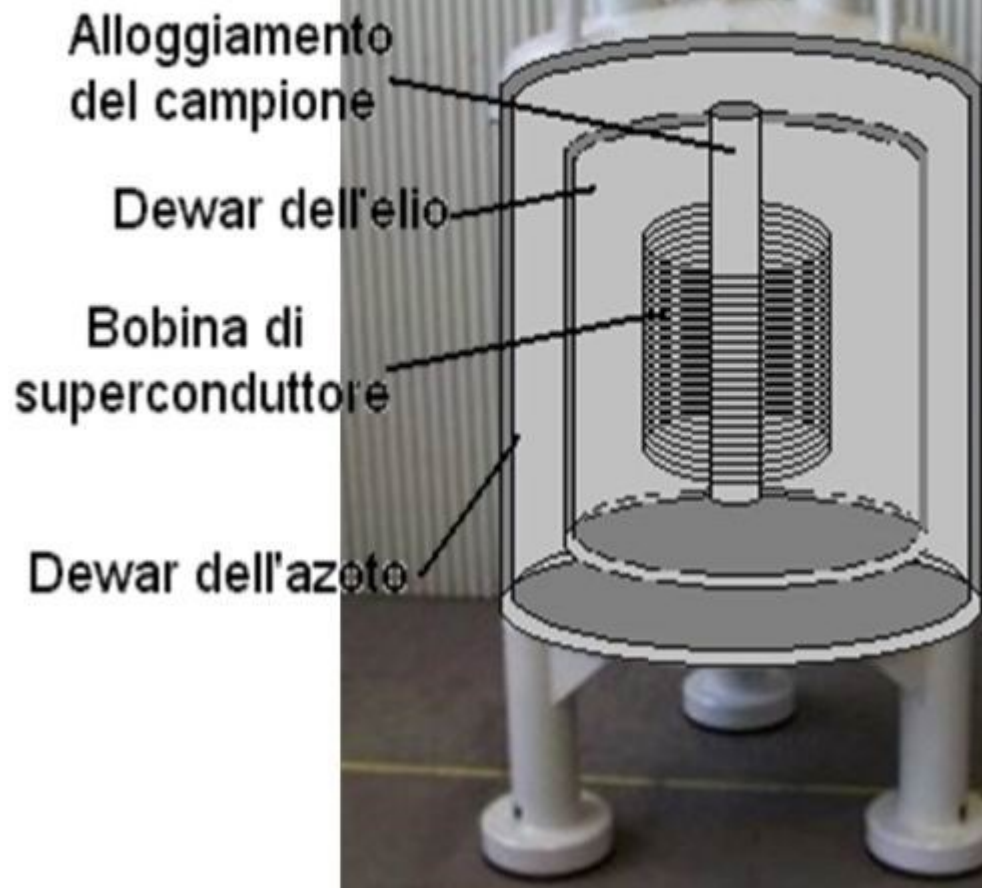
Schema dello spettrometro



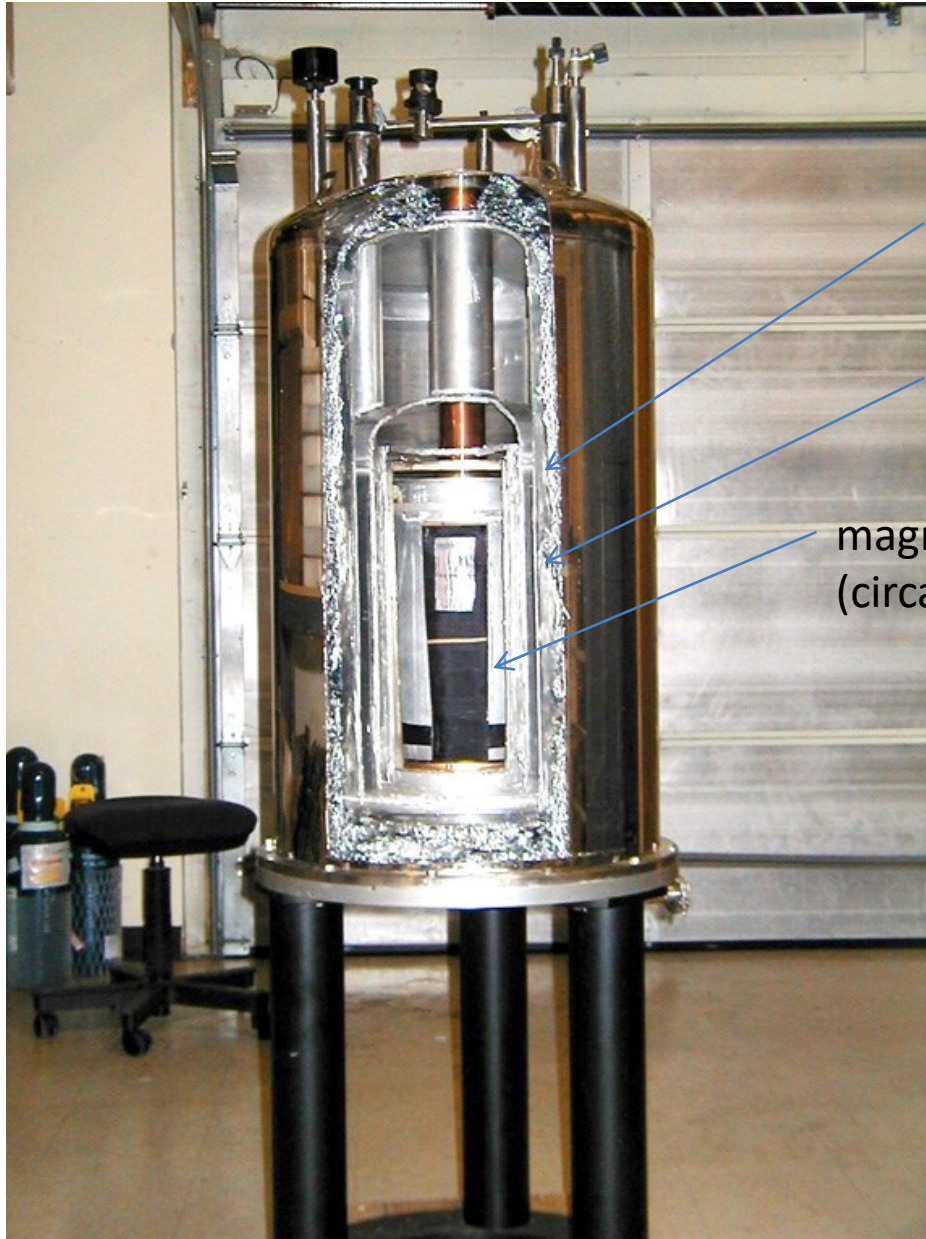
LA WORKSTATION



IL MAGNETE



IL MAGNETE



recipiente N2 liquido (77 K)

recipiente He liquido (4 K)

magnete superconduttore
(circa 19 Km di filo)

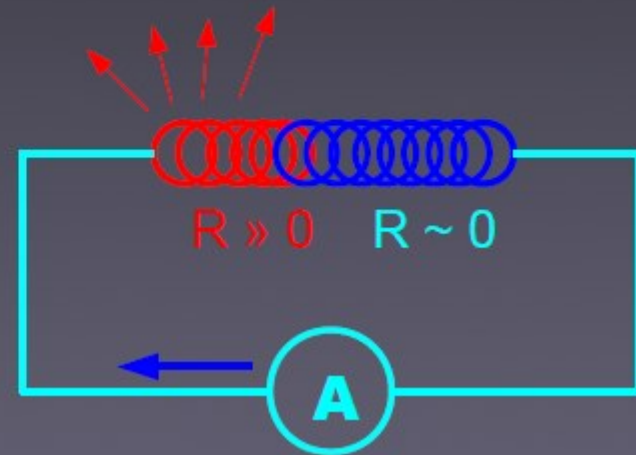
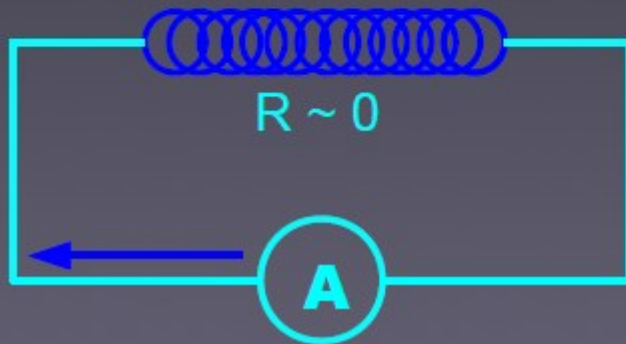
IL MAGNETE

In presenza di superconduttività:

- 1) la resistenza del filo tende a zero
- 2) circolano molte decine di A di corrente

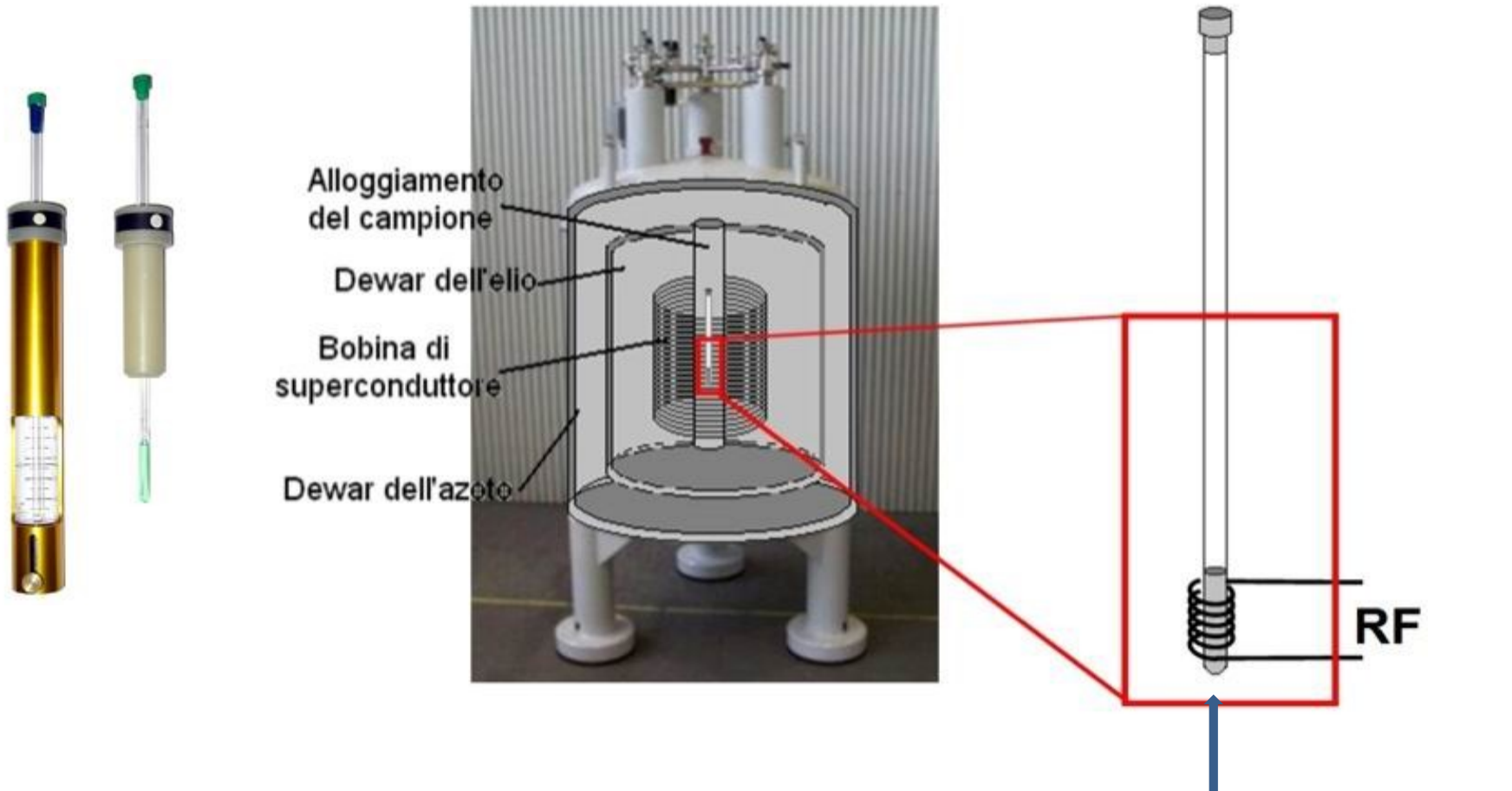
Se una parte del filo diviene normale:

- 1) quella parte del filo comincia a dissipare (RI^2)
- 2) il calore prodotto può danneggiare il filo



Quench del magnete!

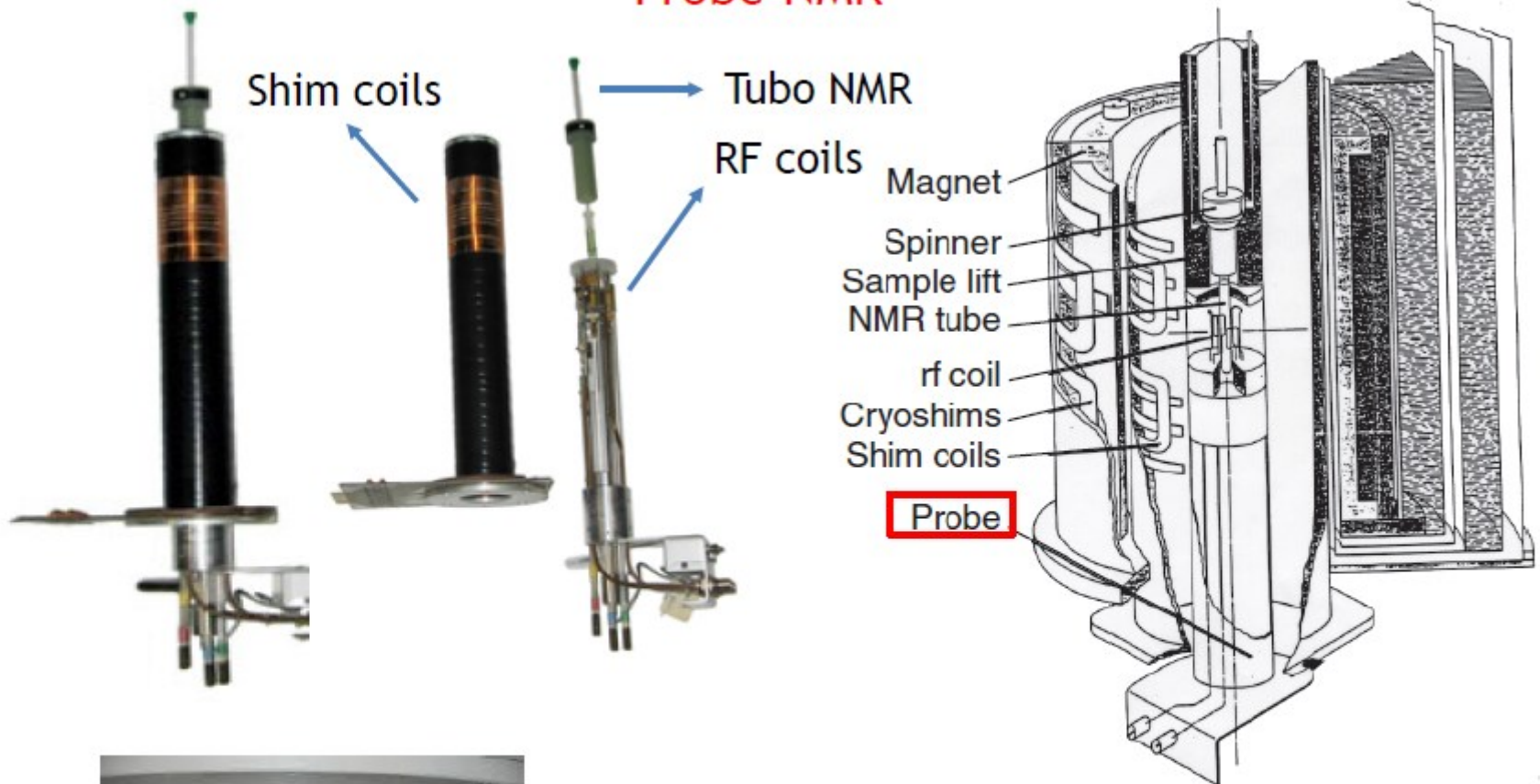
IL MAGNETE



Trasmette al campione l'impulso
Riceve dal campione il segnale emesso

IL PROBE

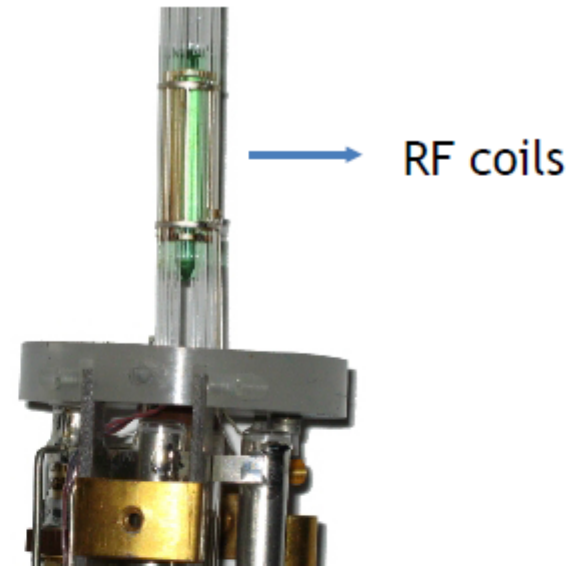
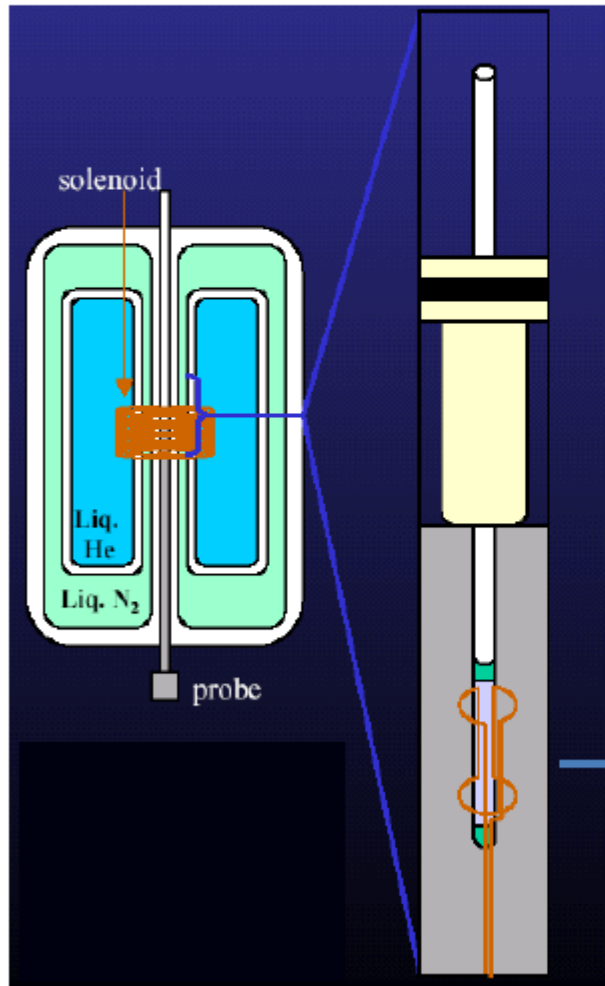
Probe NMR



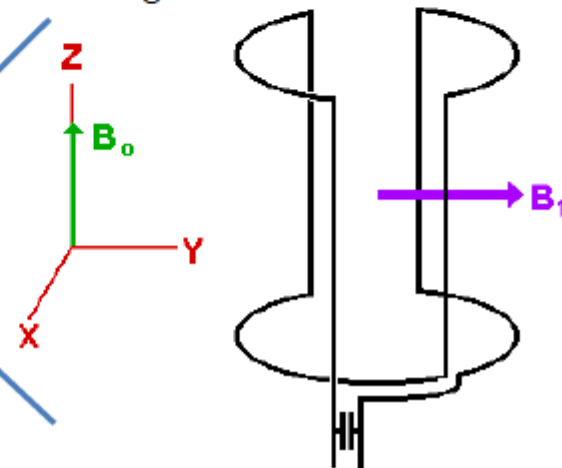
Inserimento del Probe NMR nella parte inferiore del magnete

IL PROBE

Schema del probe con il tubo NMR inserito:



La bobina a radiofrequenze (RF coils) serve per trasmettere il campo oscillante a RF e per ricevere il segnale.



PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

- 1. SCELTA DEL SOLVENTE E DEL RIFERIMENTO**
- 2. TUBI E VOLUME DI SOLVENTE**
- 3. FILTRARE E DEGASSARE**

Preparazione del campione

1. SCELTA DEL SOLVENTE

- Solubilità
- Interferenza dei segnali del solvente
- Dipendenza dalla temperatura
- Viscosità
- Costo
- Contenuto di acqua

Preparazione del campione

1. SCELTA DEL SOLVENTE

Tabella: Proprietà di solventi deuterati comuni.

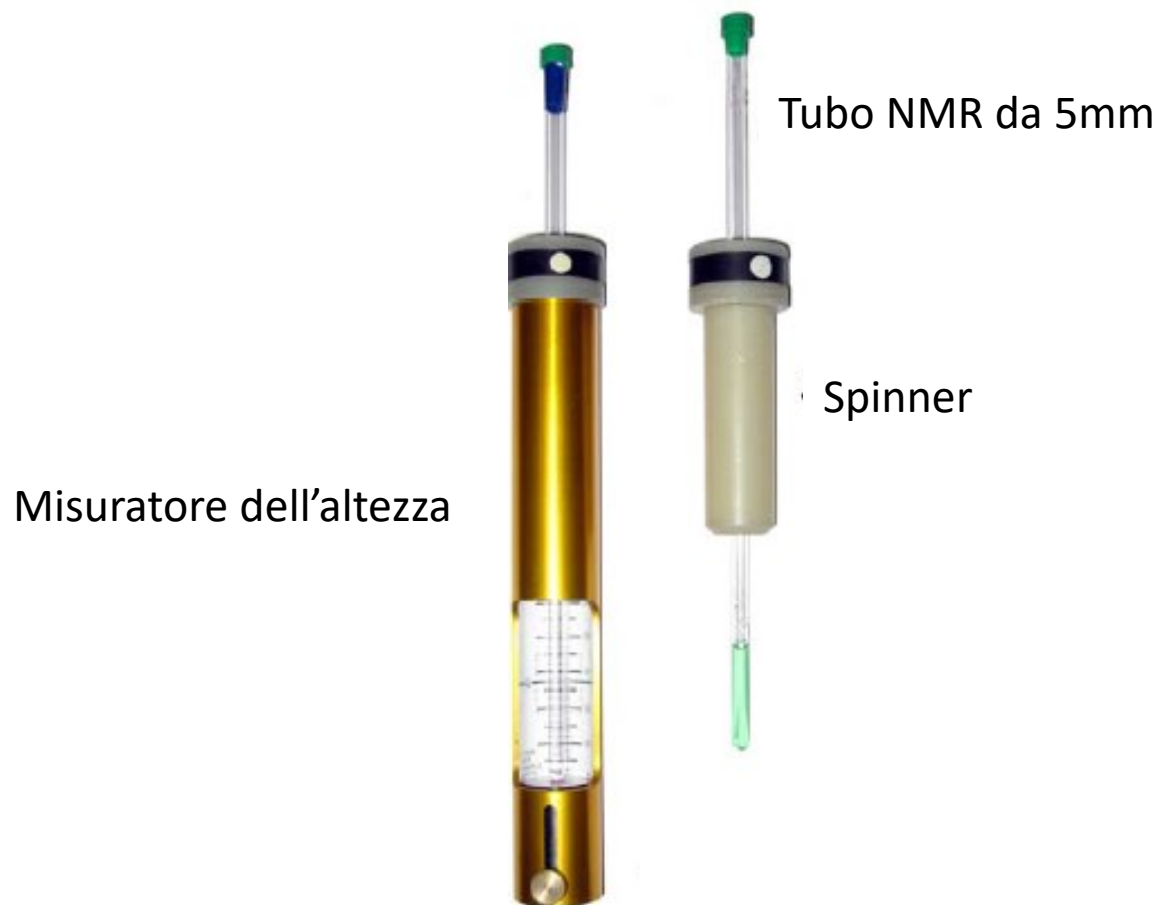
^1H e ^{13}C shifts (ppm) dei residui non protonati e segnali di HDO nei vari solventi

Solvent	$\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$	$\delta_{(\text{HDO})}/\text{ppm}$	$\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$	Melting point/ $^{\circ}\text{C}$	Boiling point/ $^{\circ}\text{C}$
Acetic acid- d_4	11.65, 2.04	11.5	179.0, 20.0	16	116
Acetone- d_6	2.05	2.0	206.7, 29.9	-94	57
Acetonitrile- d_3	1.94	2.1	118.7, 1.4	-45	82
Benzene- d_6	7.16	0.4	128.4	5	80
Chloroform- d_1	7.27	1.5	77.2	-64	62
Deuterium oxide- d_2	4.80	4.8	-	4	101
Dichloromethane- d_2	5.32	1.5	54.0	-95	40
N,N-dimethyl formamide- d_7	8.03, 2.92, 2.75	3.5	163.2, 34.9, 29.8	-61	153
Dimethylsulfoxide- d_6	2.50	3.3	39.5	18	189
Methanol- d_4	4.87, 3.31	4.9	49.2	-98	65
Pyridine- d_5	8.74, 7.58, 7.22	5.0	150.4, 135.9, 123.9	-42	114
Tetrahydrofuran- d_8	3.58, 1.73	2.4	67.6, 25.4	-109	66
Toluene- d_8	7.09, 7.00, 6.98, 2.09	0.4	137.9, 129.2, 128.3, 125.5, 20.4	-95	111
Trifluoroacetic acid- d_1	11.30	11.5	164.2, 116.6	-15	75
Trifluoroethanol- d_3	5.02, 3.88	5.0	126.3, 61.5	-44	75

Riferimento: TMS (tetrametilsilano $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$)

Preparazione del campione

2. TUBI NMR

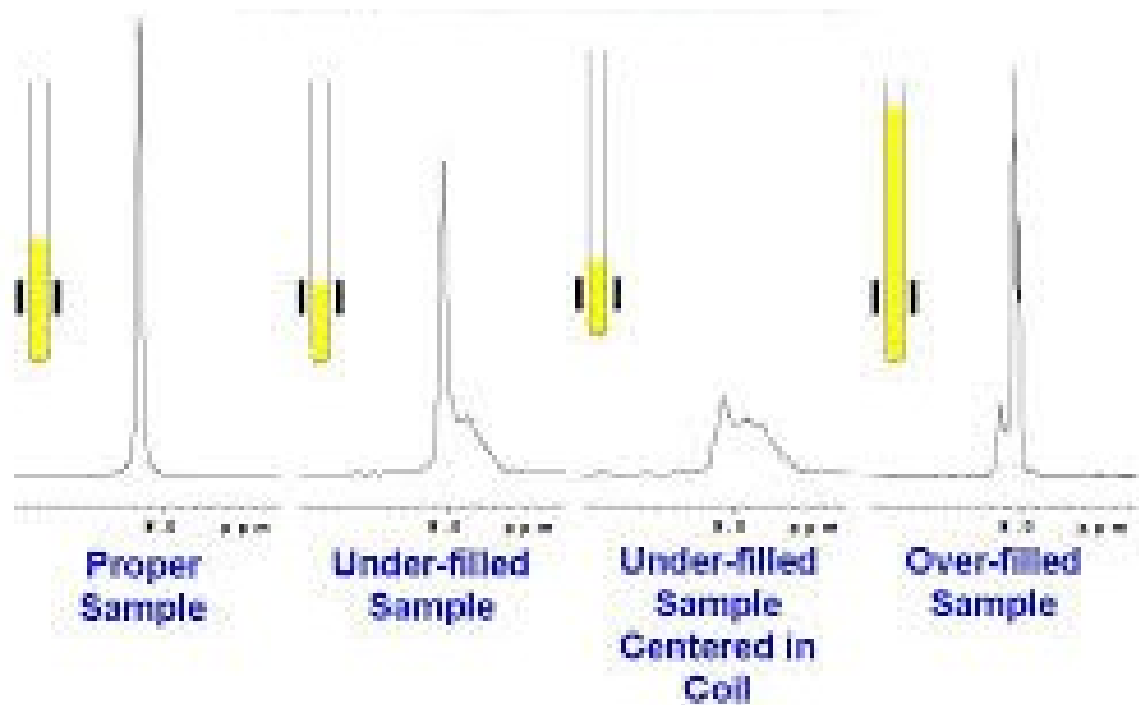
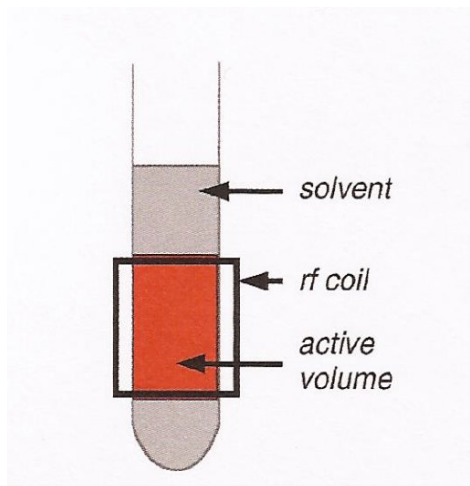


Fino a 20 mg del campione solido in circa $0,6 \text{ cm}^3$ di solvente

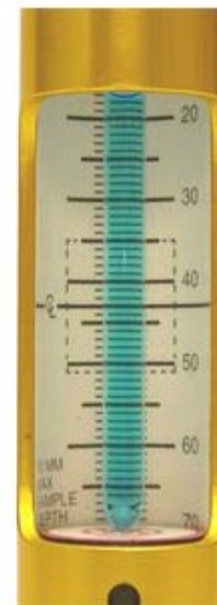
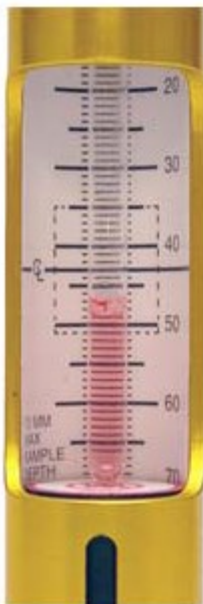
Fino al 20% di campione liquido nel solvente

2. TUBI NMR – VOLUME DI SOLVENTE

Effetto del volume sull'omogeneità



2. TUBI NMR - POSIZIONE



PREPARAZIONE DELLO SPETTROMETRO

Prima dell'acquisizione di uno spettro ci sono alcune operazioni preliminari da seguire:

- Il lock
- La sintonia del probe (Tuning e matching)
- (controllo della temperatura)
- L'omogeneità del campo magnetico

1. IL CIRCUITO DI LOCK

**Instabilità del campo magnetico
(variazioni temporali)**

Il campo magnetico non è costante

- **Temperatura ambiente**
- **Pressione atmosferica**
- **Intorno elettromagnetico**
- **Drift del campo magnetico (1-10 Hz/hr)
dovuto a imperfezioni nel solenoide**

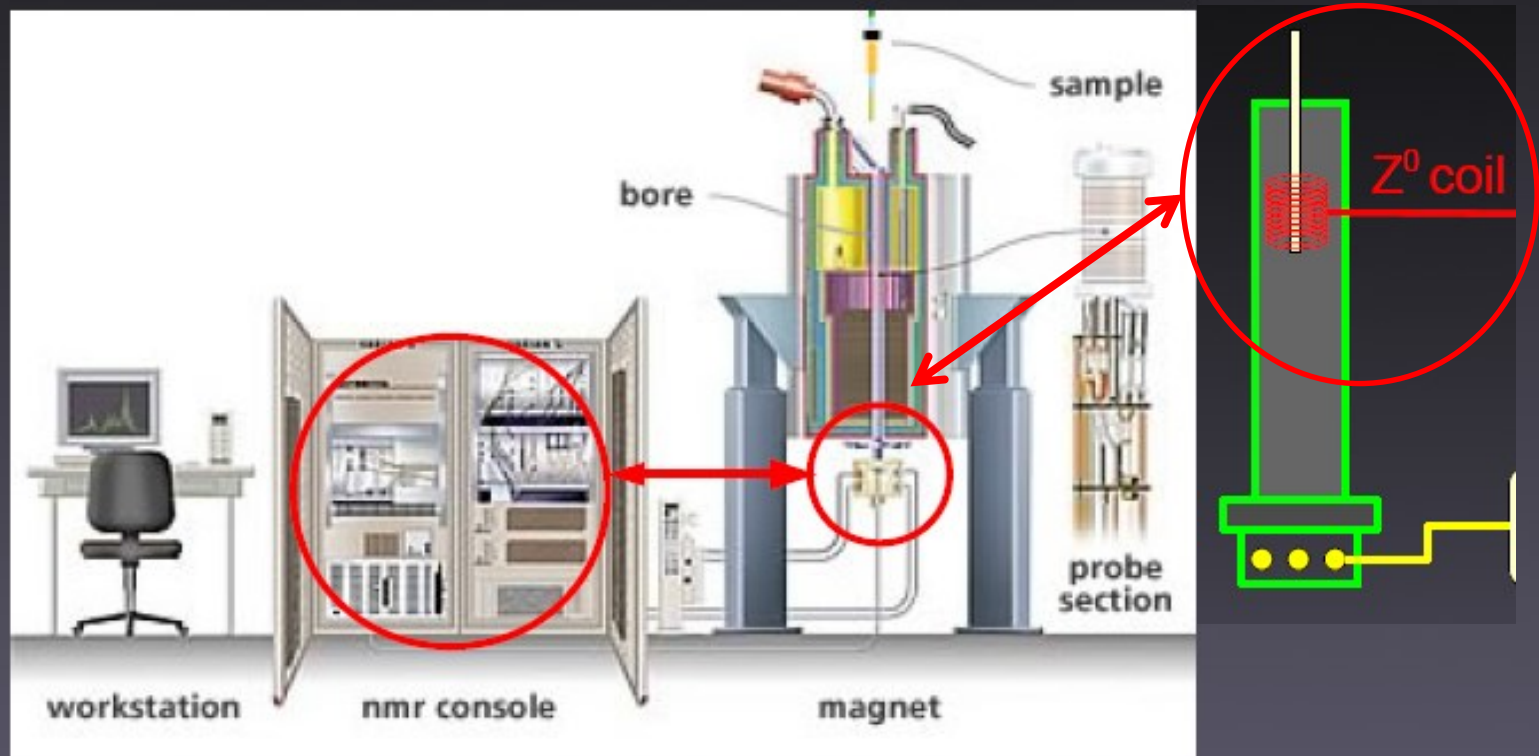
Il campo deve essere controllato



«Secondo spettrometro» dedicato al deuterio

Shim coil Z^0

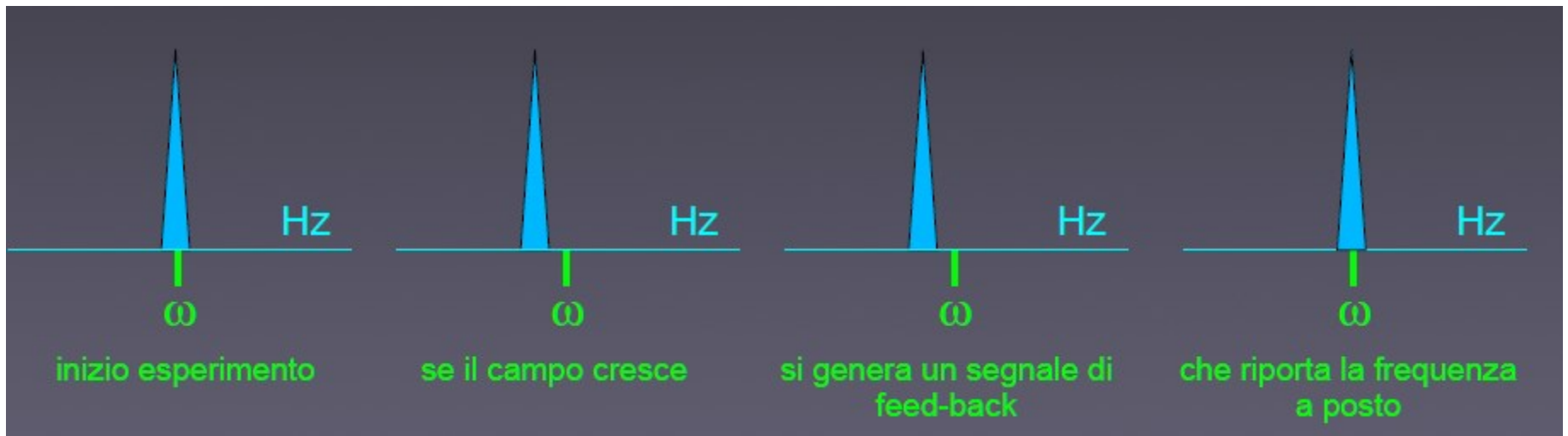
**è un avvolgimento che genera un campo estremamente uniforme sul campione
e che varia leggermente la frequenza di risonanza dei nuclei
viene usato nel circuito di LOCK**



PREPARAZIONE DELLO SPETTROMETRO

1. IL LOCK

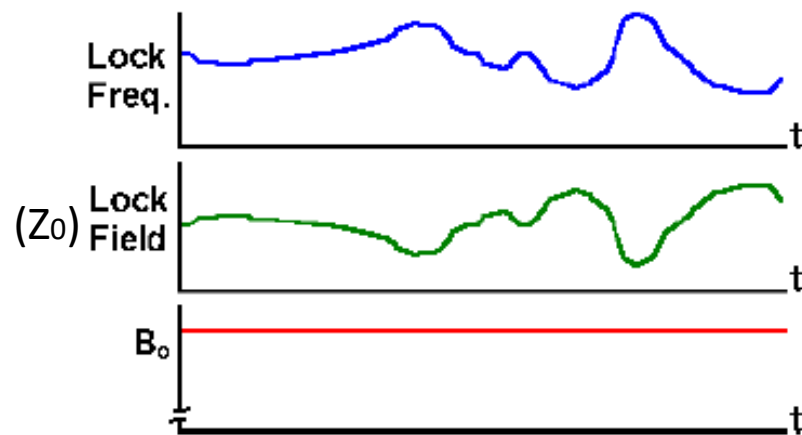
- Il circuito di lock effettua il controllo sul magnete osservando il segnale NMR del deuterio del solvente;
- Affinché il circuito di controllo funzioni correttamente è necessario porsi in risonanza con il solvente deuterato;
- Ogni solvente deuterato ha una diversa frequenza di risonanza, pertanto è necessario modificare la frequenza di eccitazione.



PREPARAZIONE DELLO SPETTROMETRO

1. IL LOCK

Controllo tramite lock

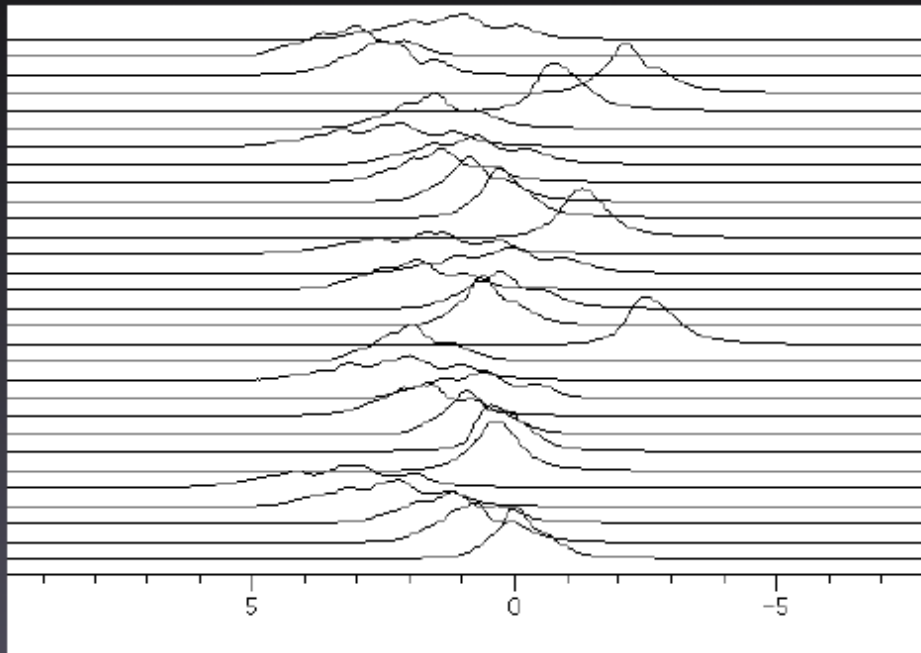


Il segnale del deuterio è centrato su una frequenza definita. Un circuito di feedback mantiene fisso il rapporto fra B e la frequenza del D del solvente.

PREPARAZIONE DELLO SPETTROMETRO

1. IL LOCK

E' proprio necessario?



Spettrometro 700 Mhz senza lock. Spettri registrati ogni minuto.

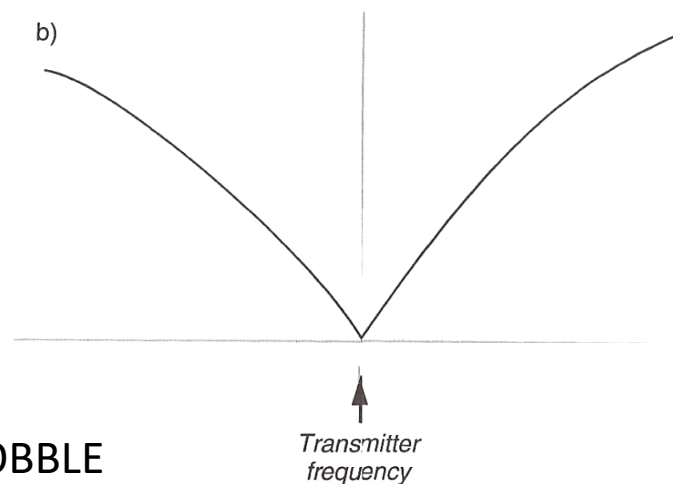
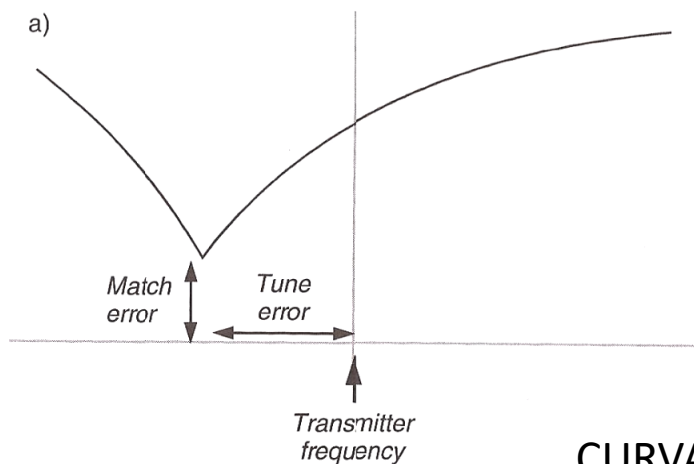
PREPARAZIONE DELLO SPETTROMETRO

2. TUNING & MATCHING

TUNING (SINTONIA): SINTONIZZARE ALLA FREQUENZA DI MASSIMA SENSIBILITA' TUTTO IL CIRCUITO DI RADIOFREQUENZE (PROBE, CAVI, AMPLIFICATORI).

MATCHING: ACCORDARE L'IMPEDENZA (RESISTENZA A UNA CORRENTE ALTERNATA) DELL'INSIEME CIRCUITO/CAMPIONE CON QUELLA DELLA LINEA DI TRASMISSIONE (TRASMITTER E RECEIVER) AD ESSA CONNESSA (50 OHM) PER AVERE MASSIMO PASSAGGIO DI ENERGIA RF DAL TRASMITTER AL CAMPIONE E DAL CAMPIONE AL RECEIVER NESSUNA POTENZA RIFLESSA (RISCALDAMENTO DEL PROBE).

Tuning e matching si fanno a ogni cambio solvente

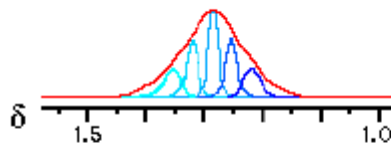
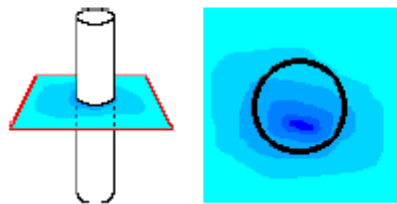


CURVA DI WOBBLE

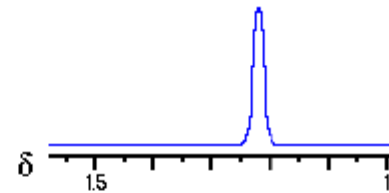
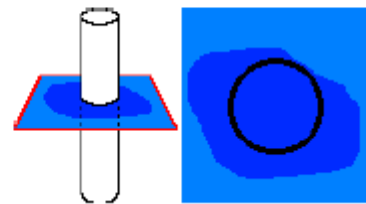
PREPARAZIONE DELLO SPETTROMETRO

3. SHIMMING

Il campo magnetico statico non è perfettamente omogeneo
all' interno della sonda



Cattiva omogeneità

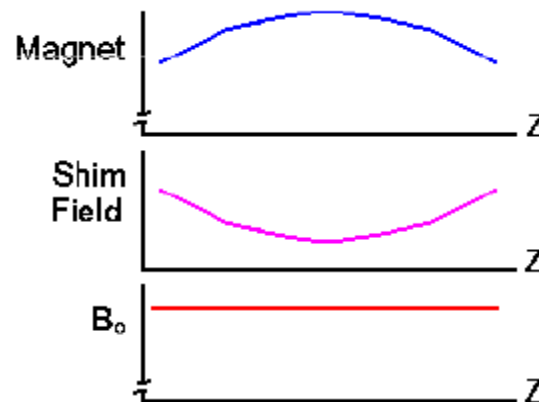


Buona omogeneità

PREPARAZIONE DELLO SPETTROMETRO

3. SHIMMING

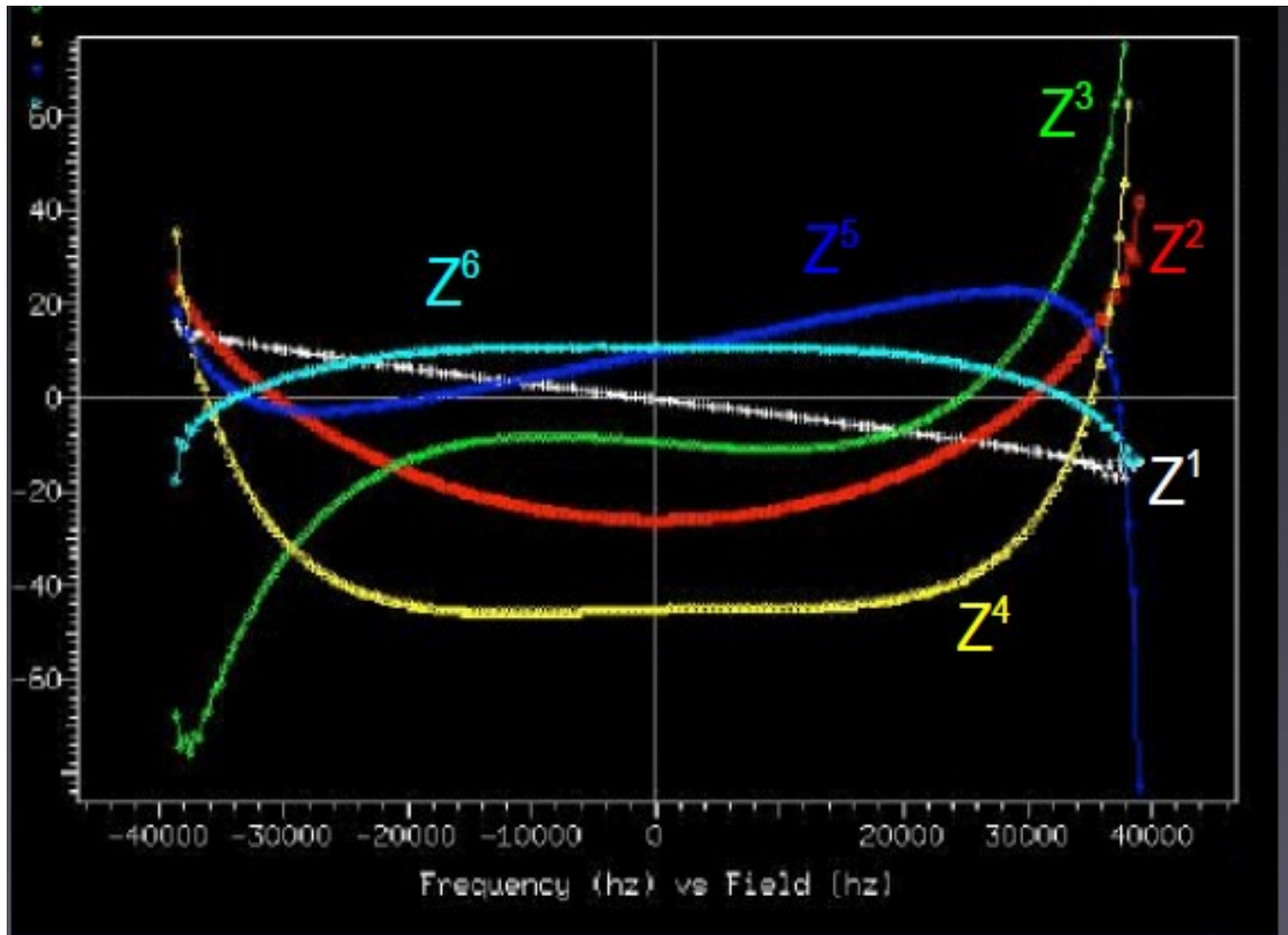
È necessario correggere le disomogeneità introducendo delle correnti aggiuntive (shim), modificabili dall'operatore e ottimizzate in funzione della sonda, del campione, del solvente, della temperatura etc.



Le correnti aggiuntive operano nello spazio tridimensionale introducendo delle correzioni

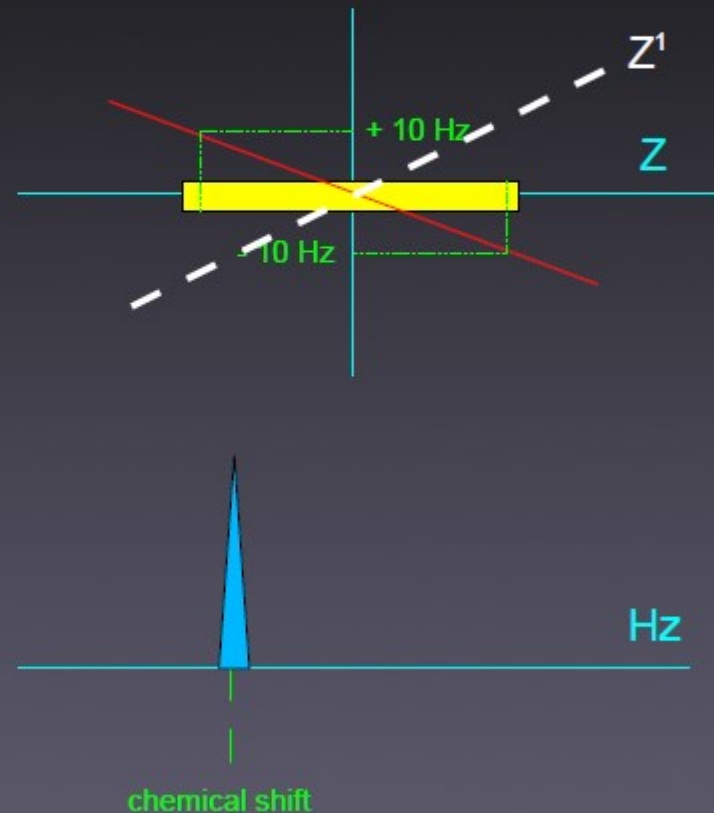
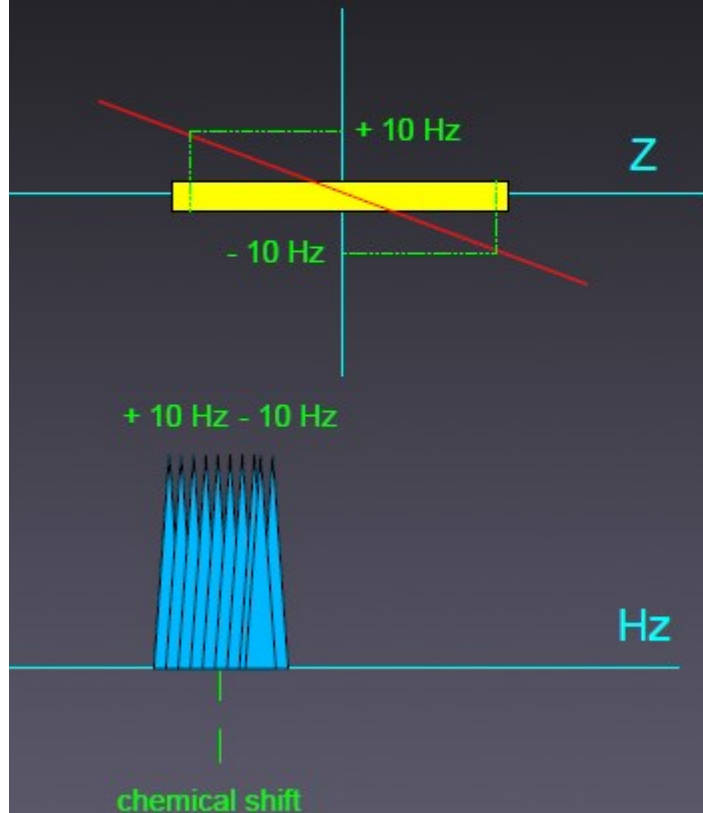
PREPARAZIONE DELLO SPETTROMETRO

3. SHIMMING



Shimming

Se ad esempio il campo generato dal magnete dà un gradiente lineare

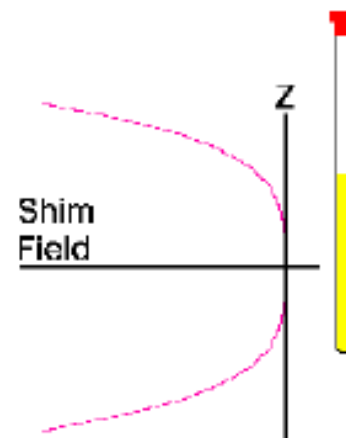
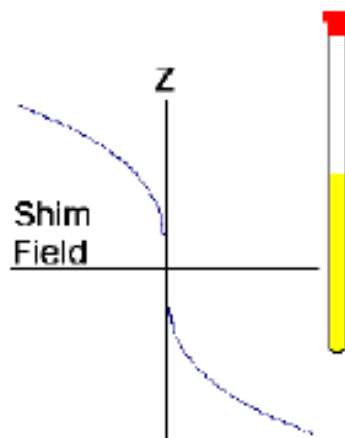
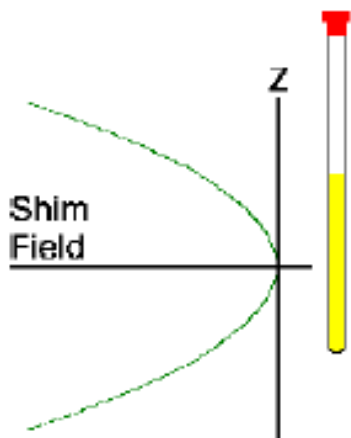
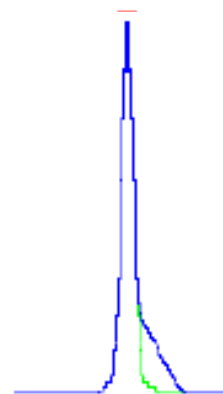
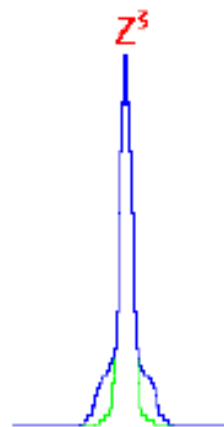
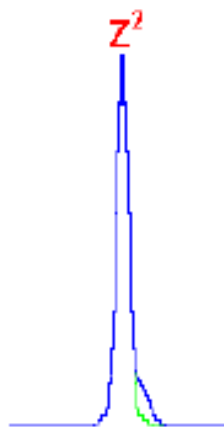


l'applicazione di un gradiente contrario risolve il problema

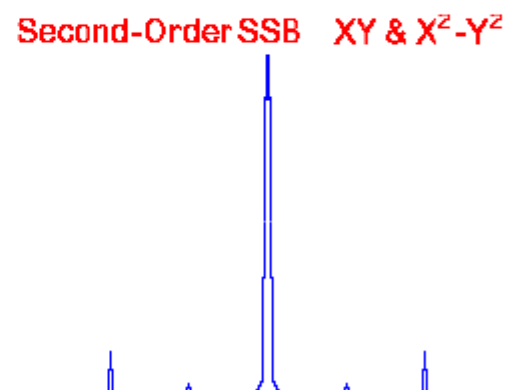
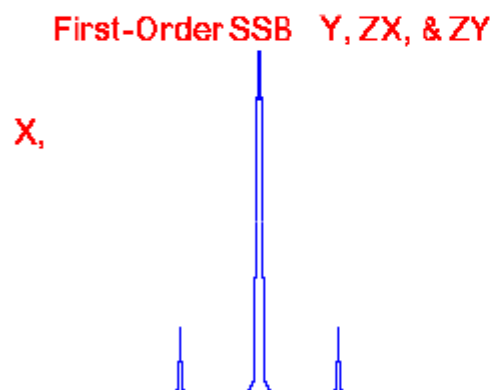
Si cercano quei coefficienti a_i che massimizzano l'omogeneità:

$$\text{campo cercato} = \sum a_i \times Z^i$$

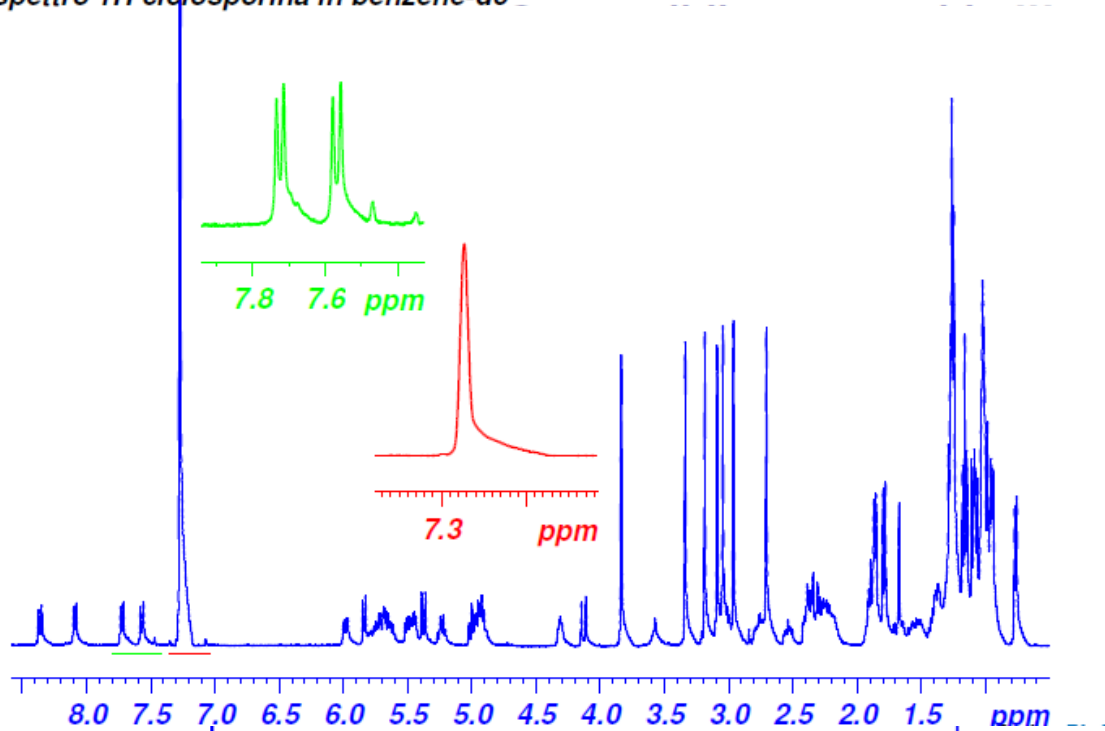
EFFETTI DELLA SHIMMATURA



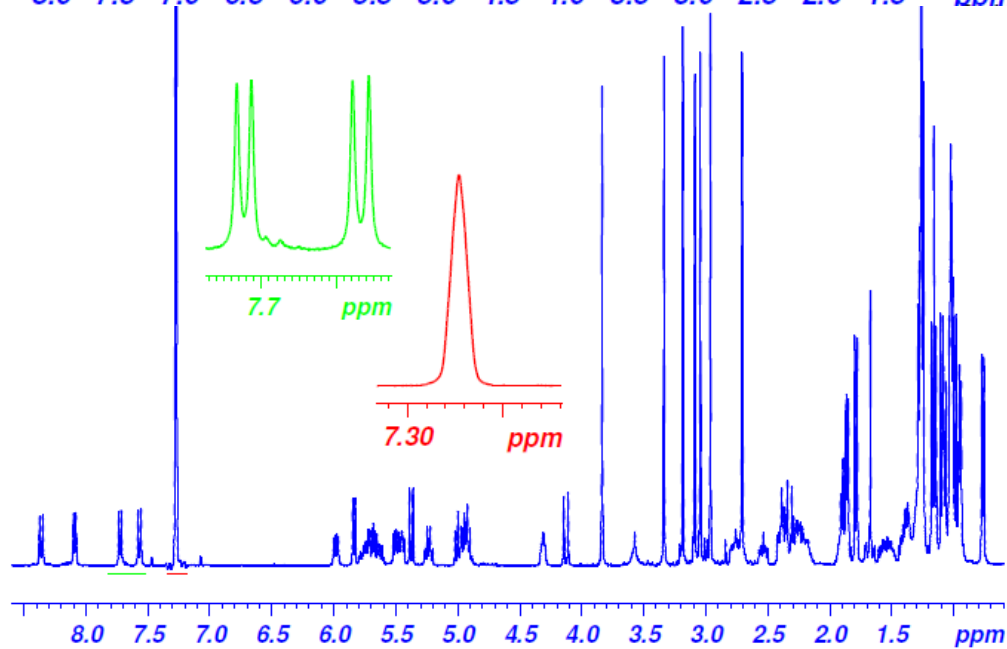
...e radiali



spettro ^1H ciclosporina in benzene- d_6

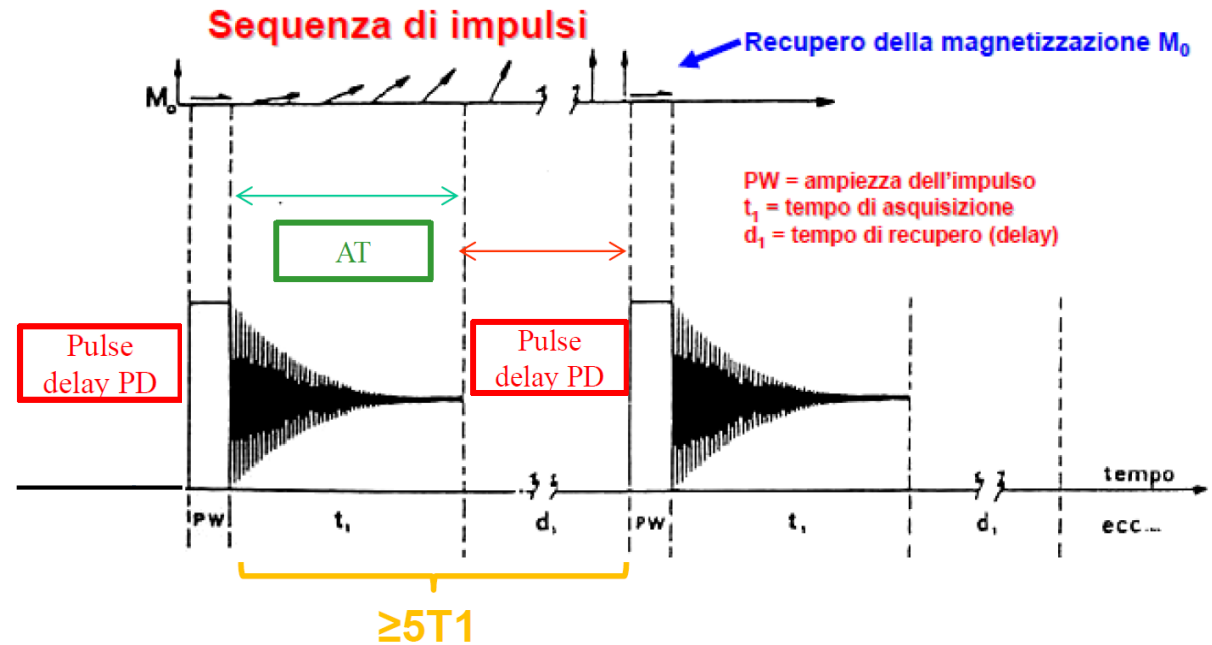


Shim z non corrette



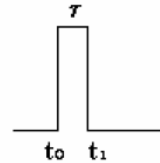
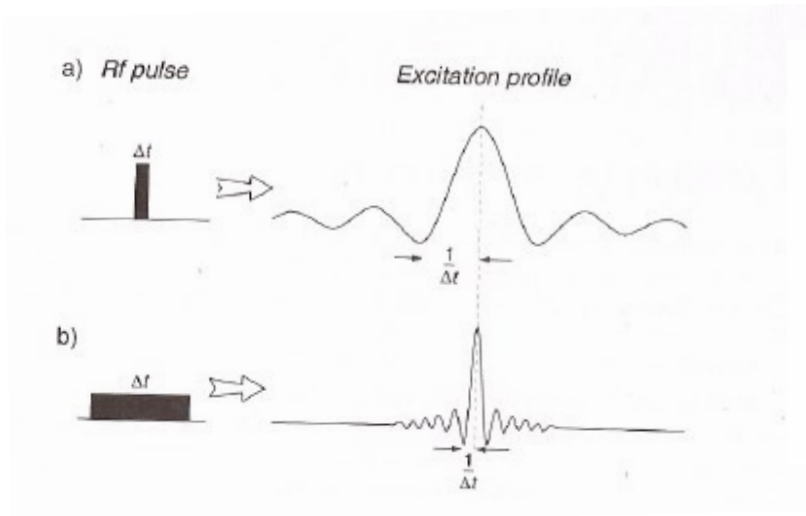
Shim z corrette

ACQUISIZIONE E PROCESSAMENTO DEI DATI

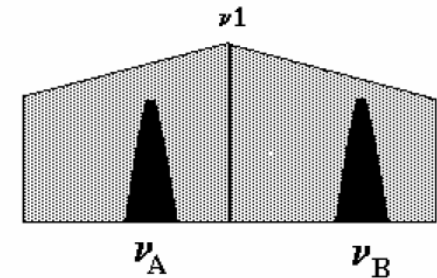


1. PD (equilibrio)
2. Impulso dal transmitter
3. Ricezione del FID dal receiver
4. Amplificazione del segnale (MHz)
5. Sottrazione della portante (da MHz a KHz)
6. Campionamento del FID (in AT) e conversione del segnale in numeri binari (ADC)
6. Somma di FID digitali
7. Ripetizione (Scansioni) (con PD)
8. FT

□ IMPULSO A 90°x



Rappresentazione schematica di un impulso



Tutti i segnali vengono eccitati dal set di radiofrequenze prodotto da un impulso

- **^1H NMR**

es con $\tau_p = 5 \mu\text{s}$ l'ampiezza spettrale sarà 10^5 Hz

$$\theta = \gamma \mathbf{B}_1 \tau_p$$

θ = **Tip angle, pulse angle, angolo di nutazione**

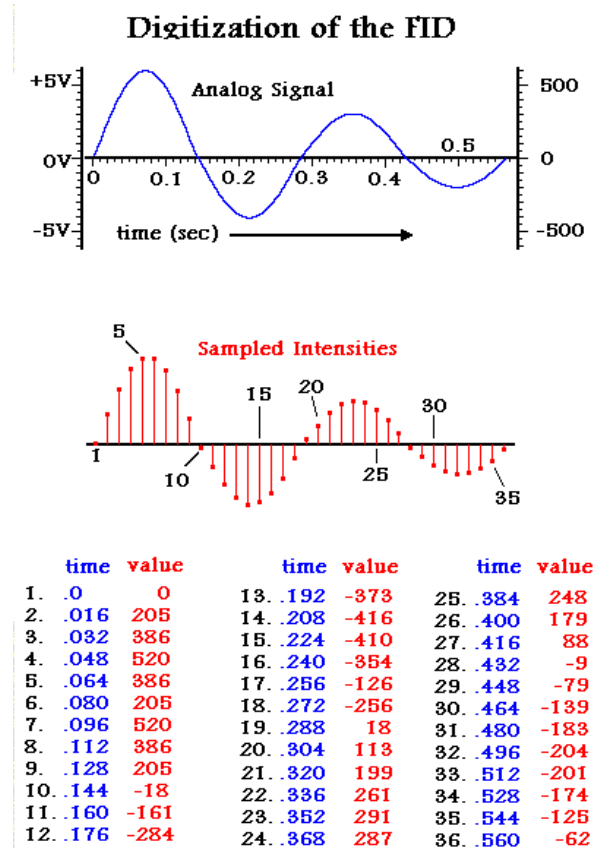
τ_p = **pulse time**

PROCESSAMENTO DEI DATI

❑ CAMPIONAMENTO DEL FID

CAMPIONAMENTO: PRIMA DELLA FT

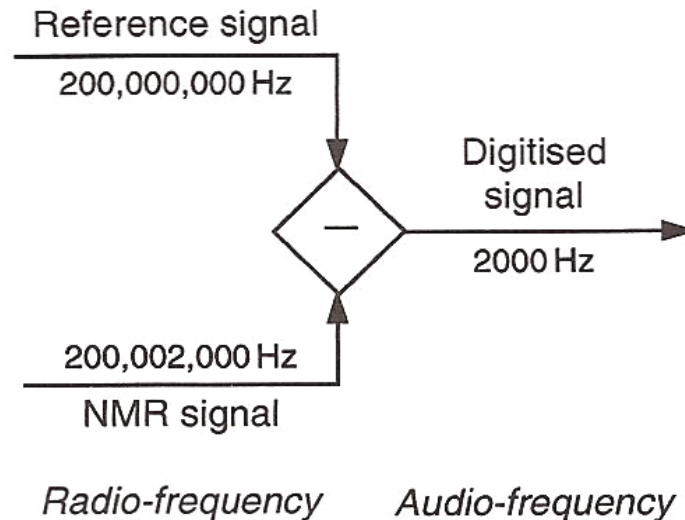
VIENE MISURATA L'AMPIEZZA DELL'INTERFEROGRAMMA (IN VOLT)
A INTERVALLI REGOLARI PER LA SUCCESSIVA CONVERSIONE
DI QUESTI VALORI IN NUMERI BINARI, TRATTABILI DAL COMPUTER



PROCESSAMENTO DEI DATI

❑ CAMPIONAMENTO DEL FID

PRIMA DEL CAMPIONAMENTO: SOTTRAZIONE DELLA FREQUENZA PORTANTE

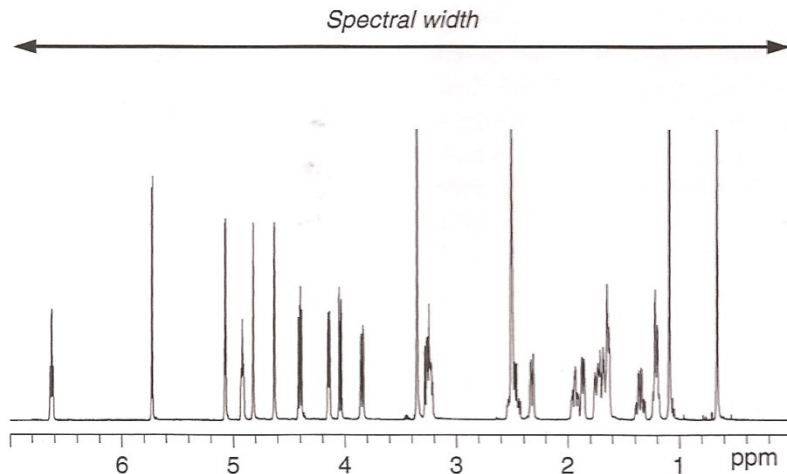


Prima della conversione da segnale analogico a digitale, viene sottratta la frequenza portante (carrier, di riferimento) in maniera tale che poi è sufficiente digitalizzare e memorizzare solo differenze di frequenza, riducendo drasticamente il numero di punti da trattare

PROCESSAMENTO DEI DATI

❑ CAMPIONAMENTO DEL FID

- a. A CHE VELOCITA' (CON QUALE FREQUENZA) CAMPIONARE?**
- b. PER QUANTO TEMPO CAMPIONARE?**



SW (SPECTRAL WIDTH)

Es: 400 MHz

Range : 0 -10 ppm

$$SW = 400 \times 10 = 4000 \text{ Hz}$$

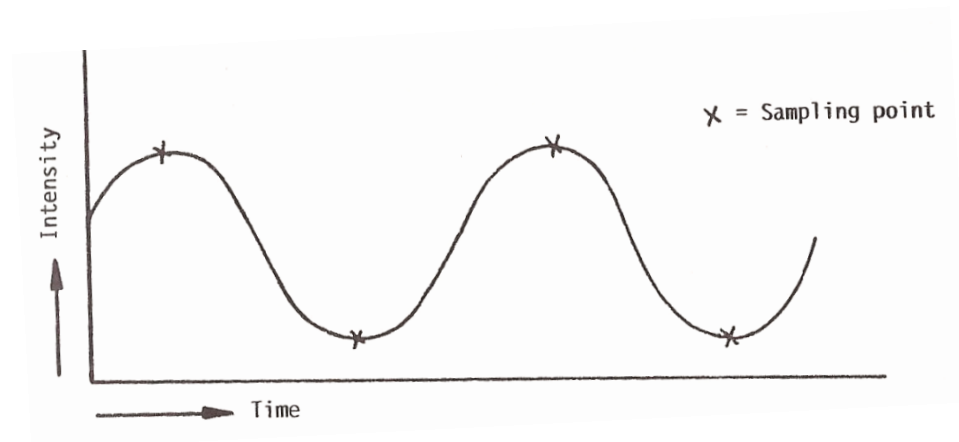
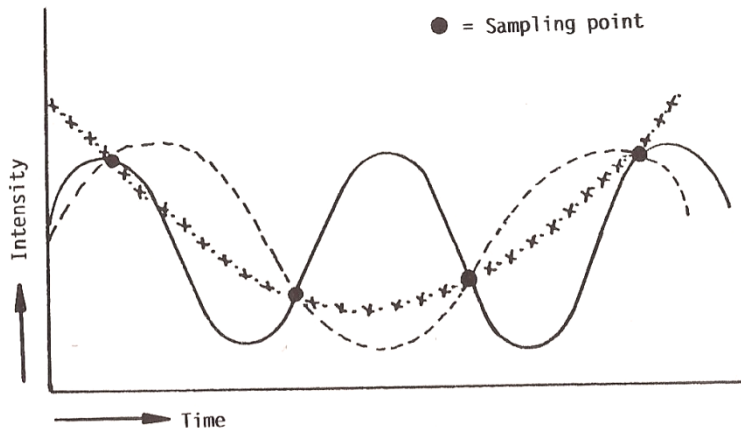
PROCESSAMENTO DEI DATI

❑ CAMPIONAMENTO DEL FID: DUE PROBLEMI:

a. A CHE VELOCITA' (CON QUALE FREQUENZA) CAMPIONARE?

TEOREMA DI NYQUIST:

PER RAPPRESENTARE CORRETTAMENTE IN FORMA DIGITALE UN'ONDA CONTINUA BISOGNA CAMPIONARLA IN ALMENO DUE PUNTI (DATA POINTS, **NP**) PER CICLO



PROCESSAMENTO DEI DATI

❑ CAMPIONAMENTO DEL FID: DUE PROBLEMI:

a. A CHE VELOCITA' (CON QUALE FREQUENZA) CAMPIONARE?

TEOREMA DI NYQUIST:

PER COPRIRE UNA CERTA **SW** il NUMERO **MINIMO** DI PUNTI NP DA MEMORIZZARE NEL COMPUTER IN UN SECONDO

$$E' \quad NP = 2SW$$

(VELOCITA' DI CAMPIONAMENTO)

PER COPRIRE UNA CERTA SW L'INTERVALLO **MASSIMO** DI CAMPIONAMENTO E':

$$DW = \frac{1}{2SW} \quad \text{sec}$$

DW = DWELL TIME

PROCESSAMENTO DEI DATI

❑ CAMPIONAMENTO DEL FID: DUE PROBLEMI:

a. A CHE VELOCITA' (CON QUALE FREQUENZA) CAMPIONARE?

NEL NOSTRO CASO: (400 MHZ, 10 PPM)

$$SW = 4000 \text{ Hz}$$

$$NP = 2 \times 4000 = 8000 \text{ DATA POINTS (MINIMO)}$$

$$DW = 1/8000 \text{ sec} = 0.125 \text{ ms (tempo massimo fra due rilevamenti)}$$

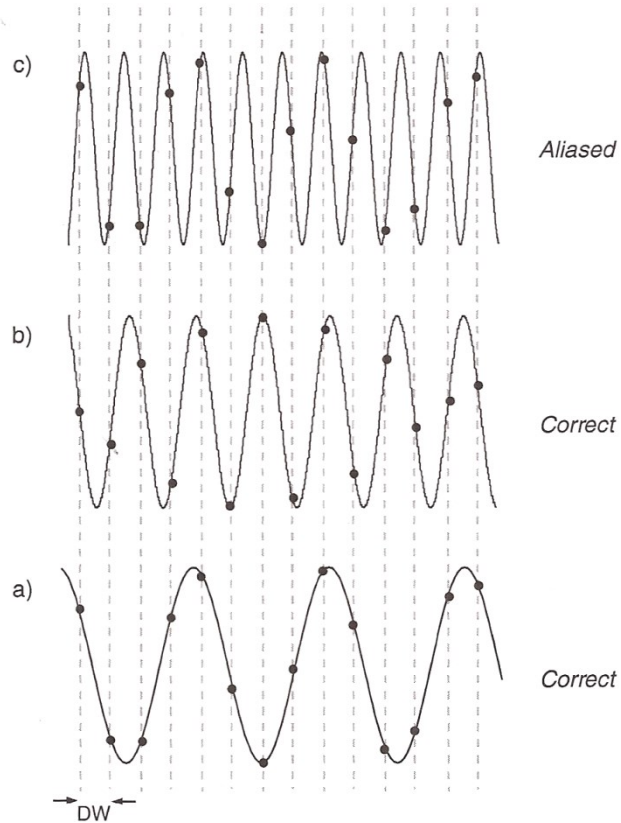


DEVO CAMPIONARE UN PUNTO OGNI 0.125 ms (al massimo)
DEVO CAMPIONARE 8000 PUNTI IN 1 SEC (al minimo)

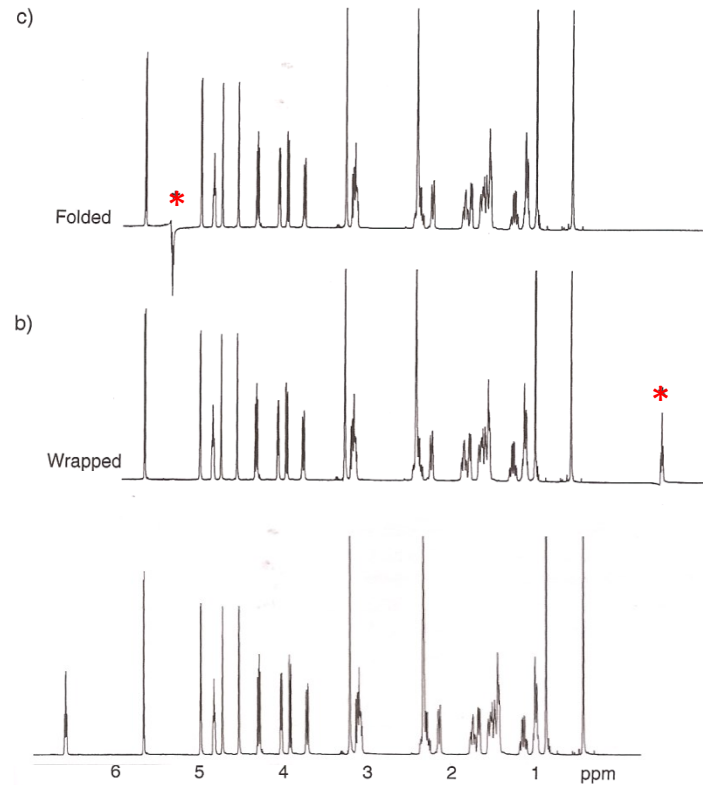
.....ALTRIMENTI

PROCESSAMENTO DEI DATI

❑ CAMPIONAMENTO DEL FID



* Picchi fantasma



PROCESSAMENTO DEI DATI

❑ CAMPIONAMENTO DEL FID

2b. PER QUANTO TEMPO CAMPIONARE?

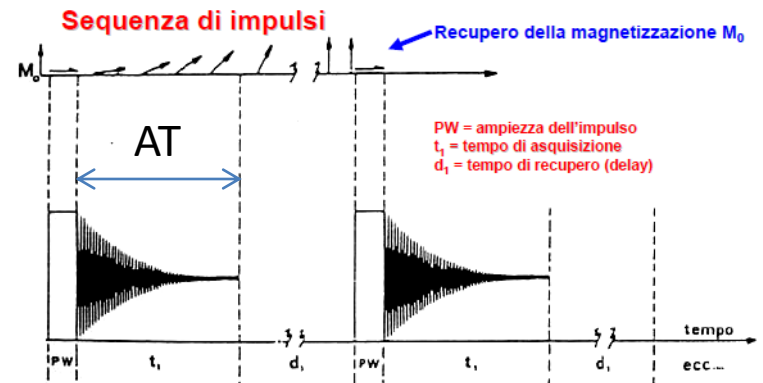
AT ACQUISITION TIME

Tempo di campionamento del FID

$$AT = NP \times DW$$

$$Ma \text{ } DW = 1/2SW$$

$$AT = NP/2SW$$



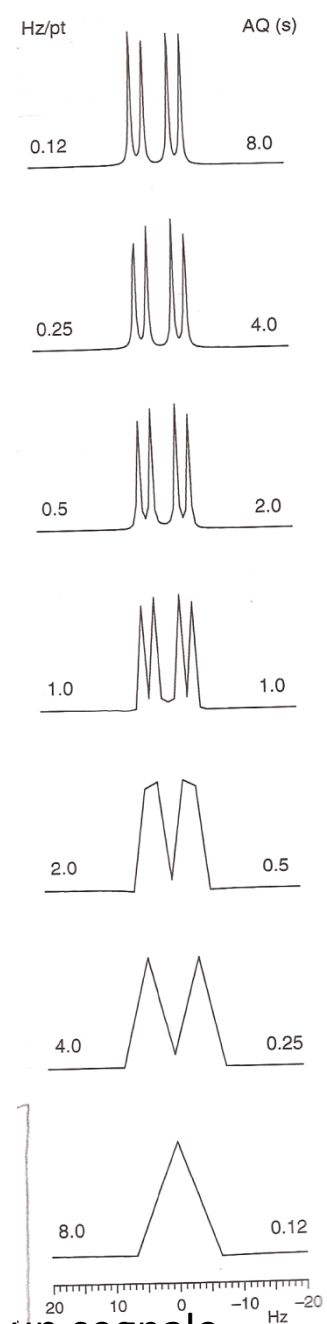
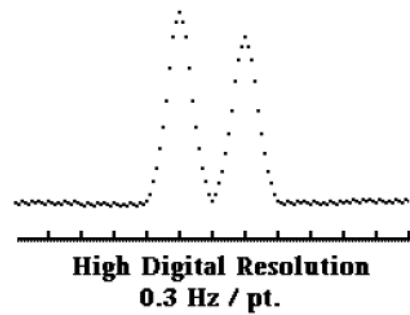
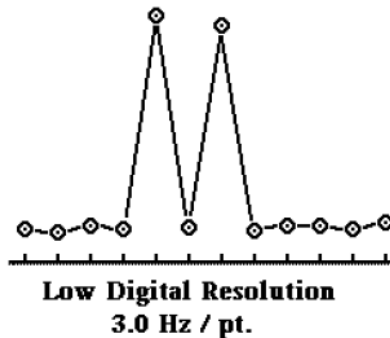
Nostro esempio: $AT = 8000/2 \times 4000 = 1\text{sec}$

PROCESSAMENTO DEI DATI

□ RISOLUZIONE DIGITALE

$$DR = \frac{2SW}{NP} = \frac{1}{AT}$$

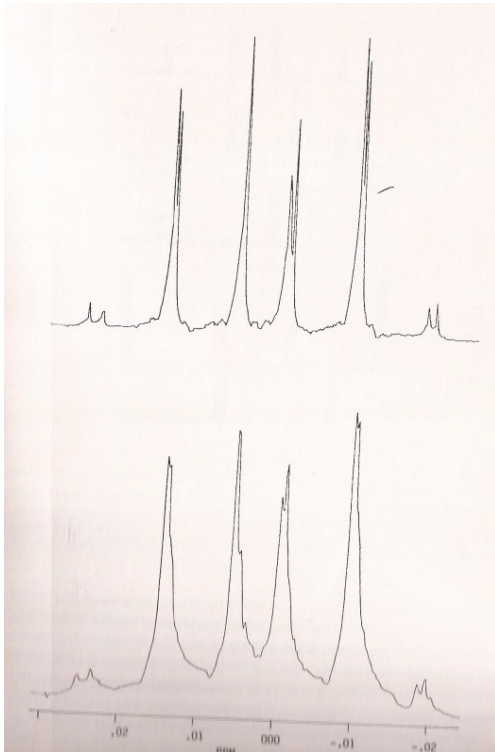
In HERZ/data point



La DR (in Hz) dovrebbe essere minore della larghezza a metà altezza di un segnale.
Questo assicura che il picco sia descritto da almeno 3 punti.

PROCESSAMENTO DEI DATI

❑ RISOLUZIONE DIGITALE



0.012 Hz/punto

0.4 Hz/punto

Esempio

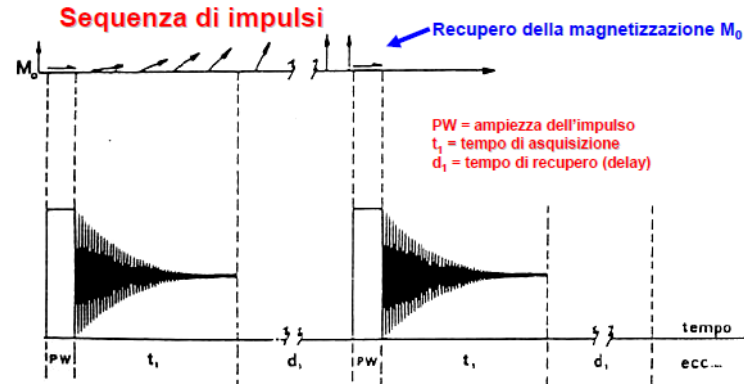
Voglio distinguere 2 picchi
distanti 0.2 Hz

Cioè $DR = 0.2 \text{ Hz}$

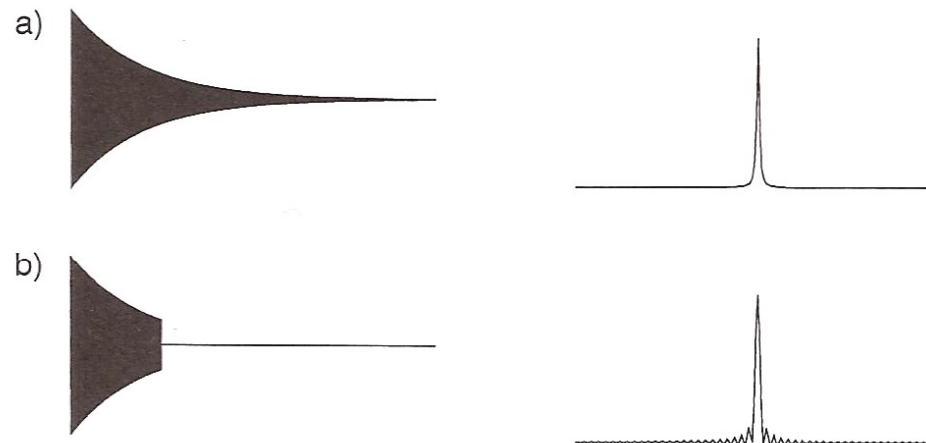
Allora $AT = 1/0.2 = 5 \text{ sec}$

PROCESSAMENTO DEI DATI

❑ TRONCAMENTI



FID troncato se AT è minore del tempo di decadimento



PROCESSAMENTO DEI DATI

□ COME AUMENTARE LA RISOLUZIONE DIGITALE

a. ZERO FILLING

AGGIUNGO DEGLI ZERI ALLA FINE DEL FID
PER ALLUNGARE ARTIFICIALMENTE L'AT
SENZA AGGIUNGERE ALTRE INFORMAZIONI

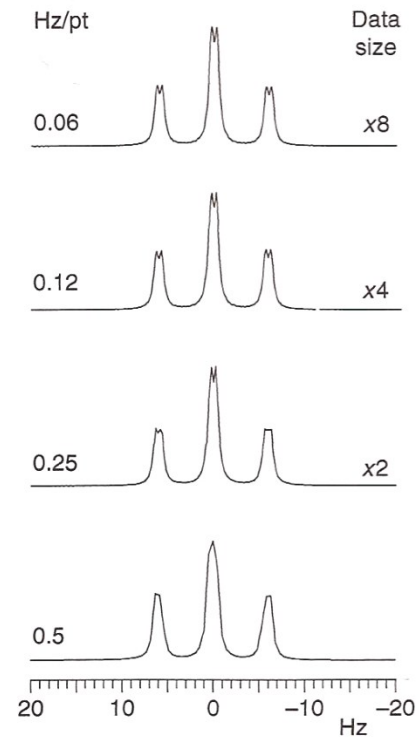


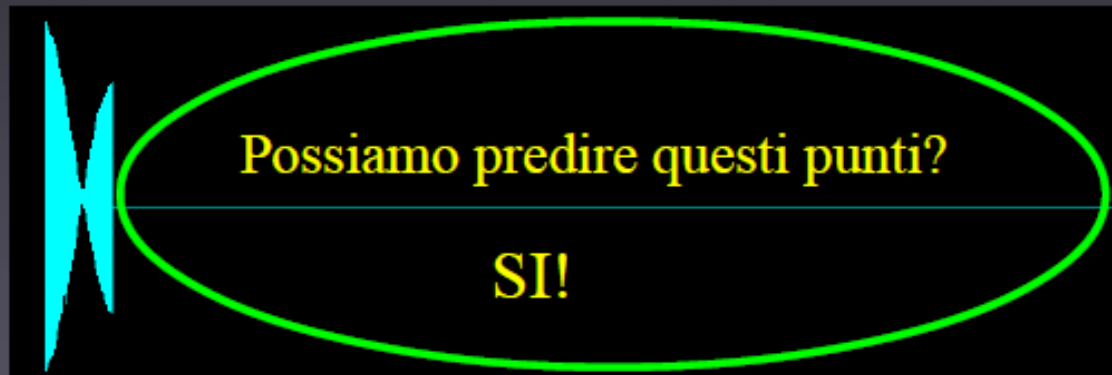
Figure 3.15. Zero-filling can be used to enhance fine structure and improve lineshape definition.

PROCESSAMENTO DEI DATI

□ COME AUMENTARE LA RISOLUZIONE DIGITALE

b. LINEAR PREDICTION

Seconda strategia: **linear prediction**. Si “creano” i punti mancanti!



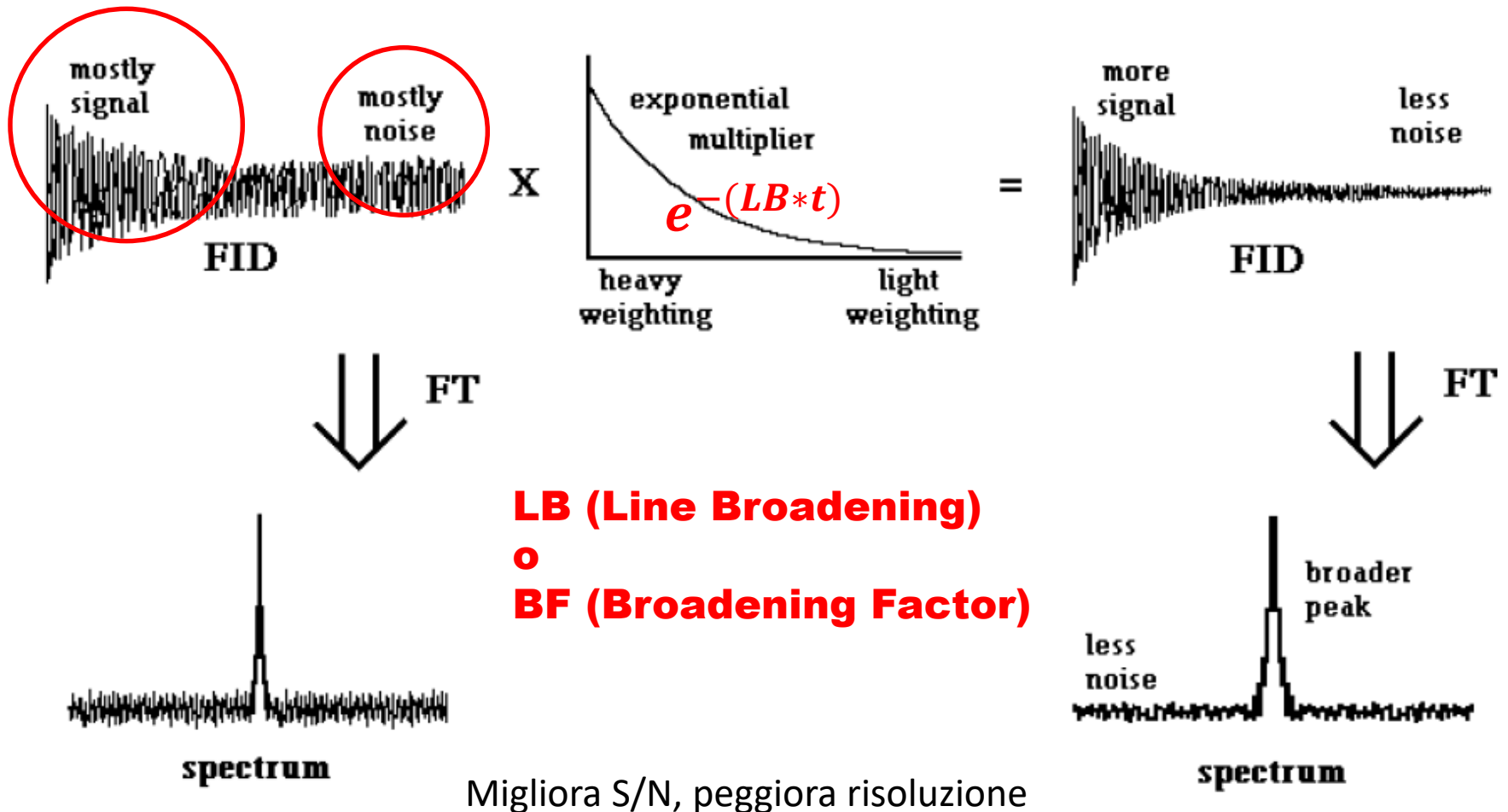
$$p_n = a_1 \times p_{n-1} + a_2 \times p_{n-2} + a_3 \times p_{n-3} + \dots + a_m \times p_{n-m}$$

Si ipotizza che ogni punto dipenda dagli m precedenti
 m è il numero dei coefficienti da usarsi nel calcolo

PROCESSAMENTO DEI DATI:

Come migliorare il S/N o la risoluzione

□ FUNZIONI FINESTRA: Esponenziale

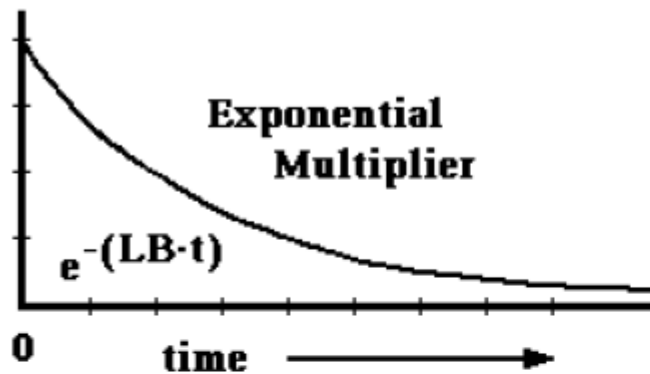


PROCESSAMENTO DEI DATI

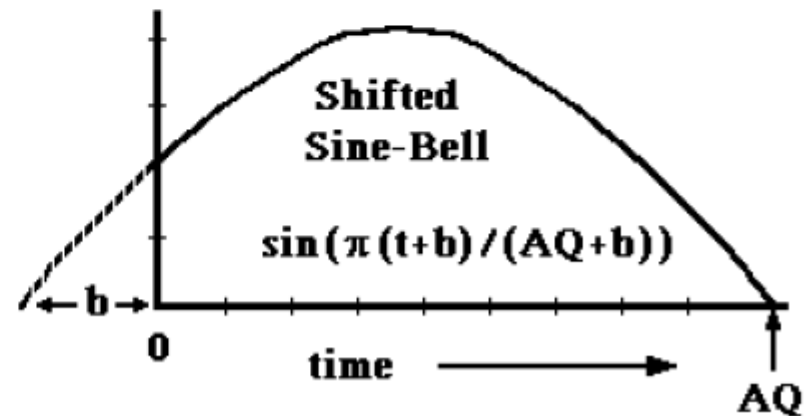
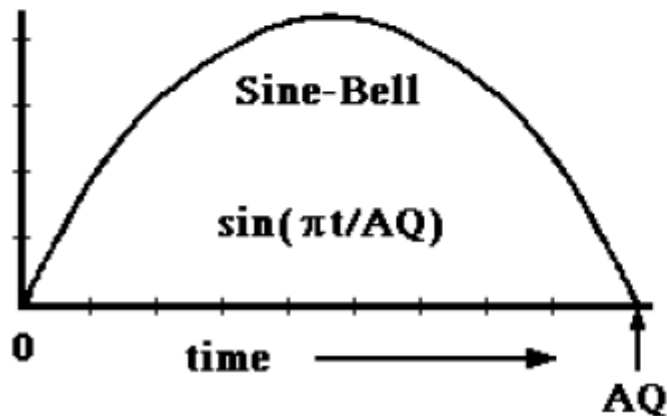
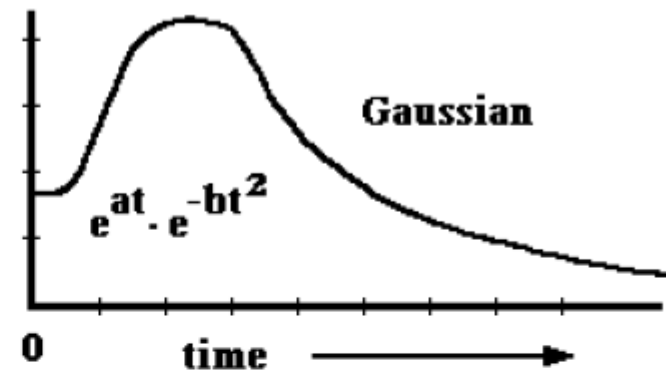
MANIPOLAZIONE DELLO SPETTRO

□ FUNZIONI FINESTRA

Migliora il S/N, peggiora la risoluzione

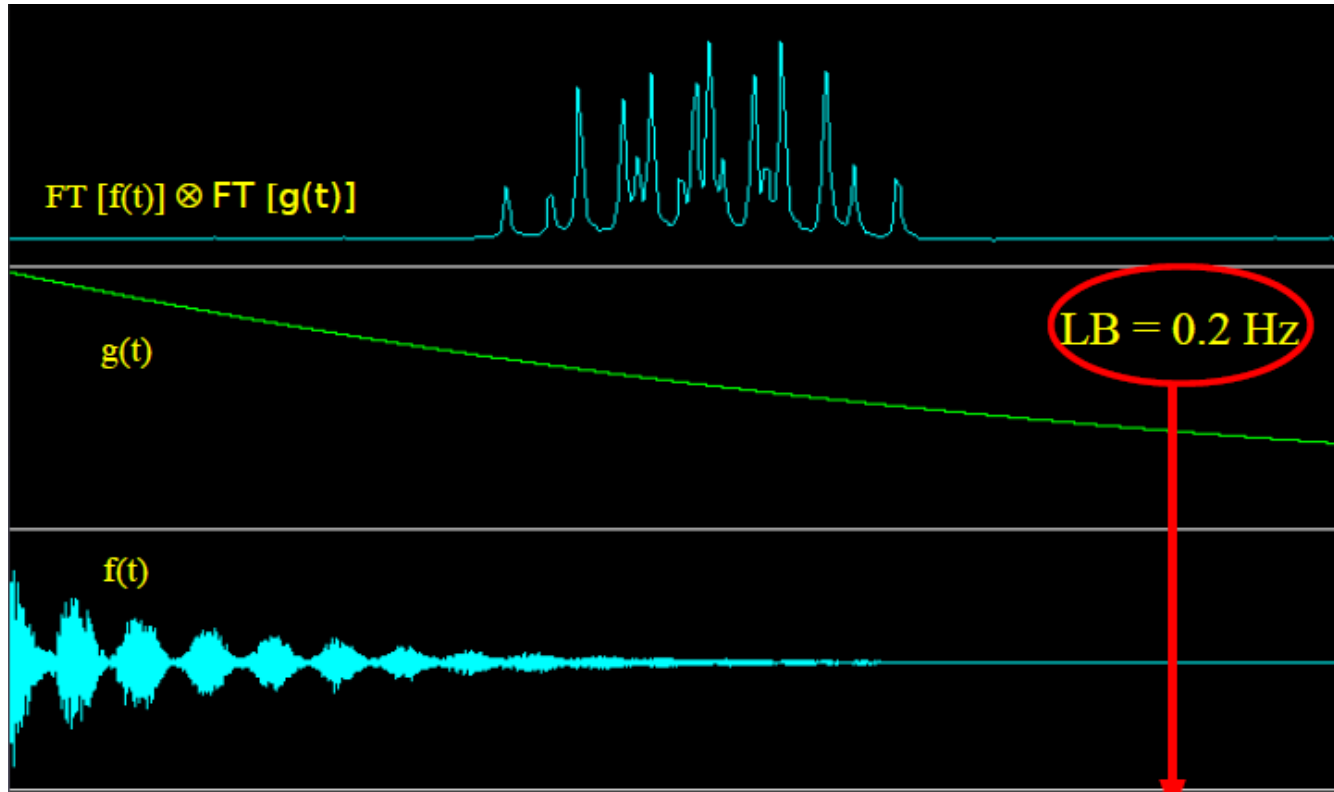


Peggiora il S/N, migliora la risoluzione



PROCESSAMENTO DEI DATI

❑ FUNZIONI FINESTRA: esponenziale



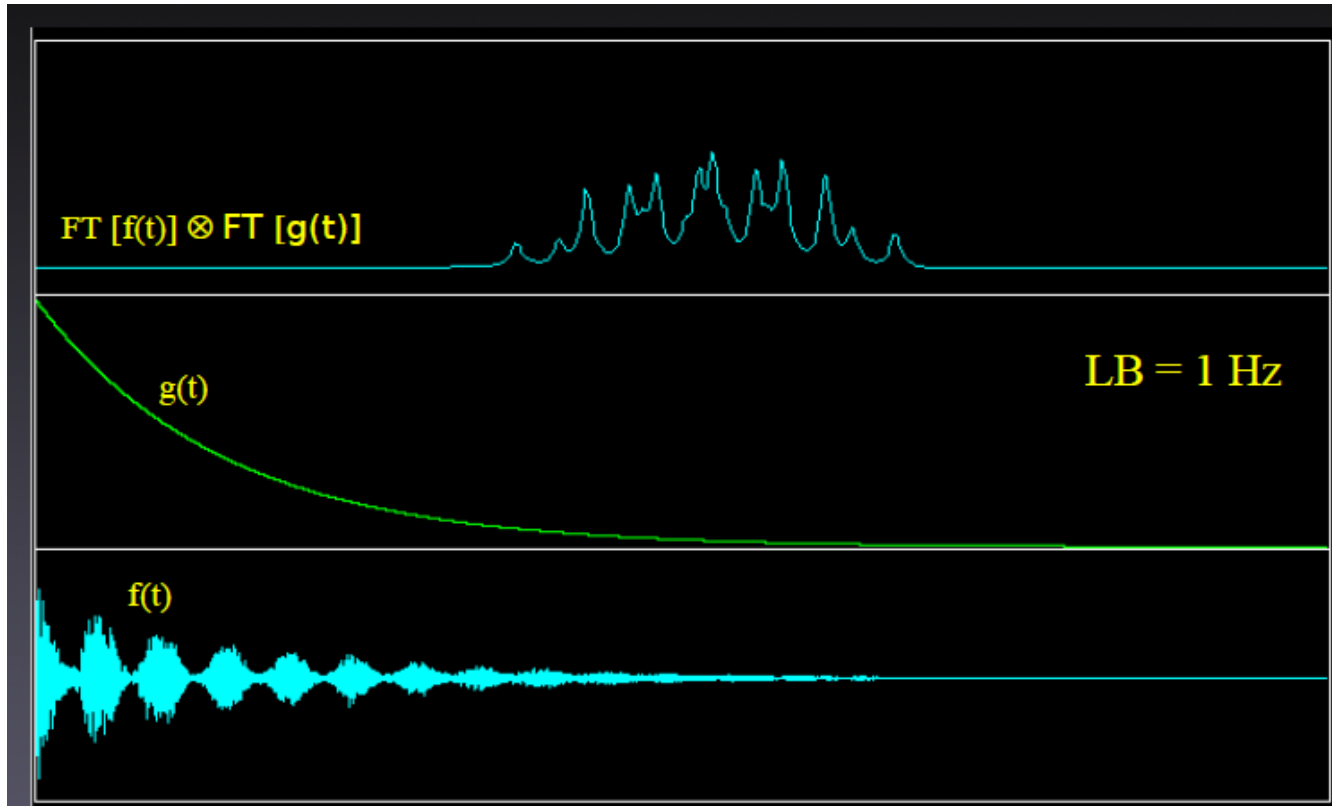
$$e^{-(LB*t)}$$

Il FID è moltiplicato punto per punto per una funzione che corrisponde ad una lorenziana larga 0.2 Hz a metà altezza.

LB bassi: aumenta il rumore di fondo, buona la risoluzione (Va bene per ^1H)

PROCESSAMENTO DEI DATI

❑ FUNZIONI FINESTRA: esponenziale



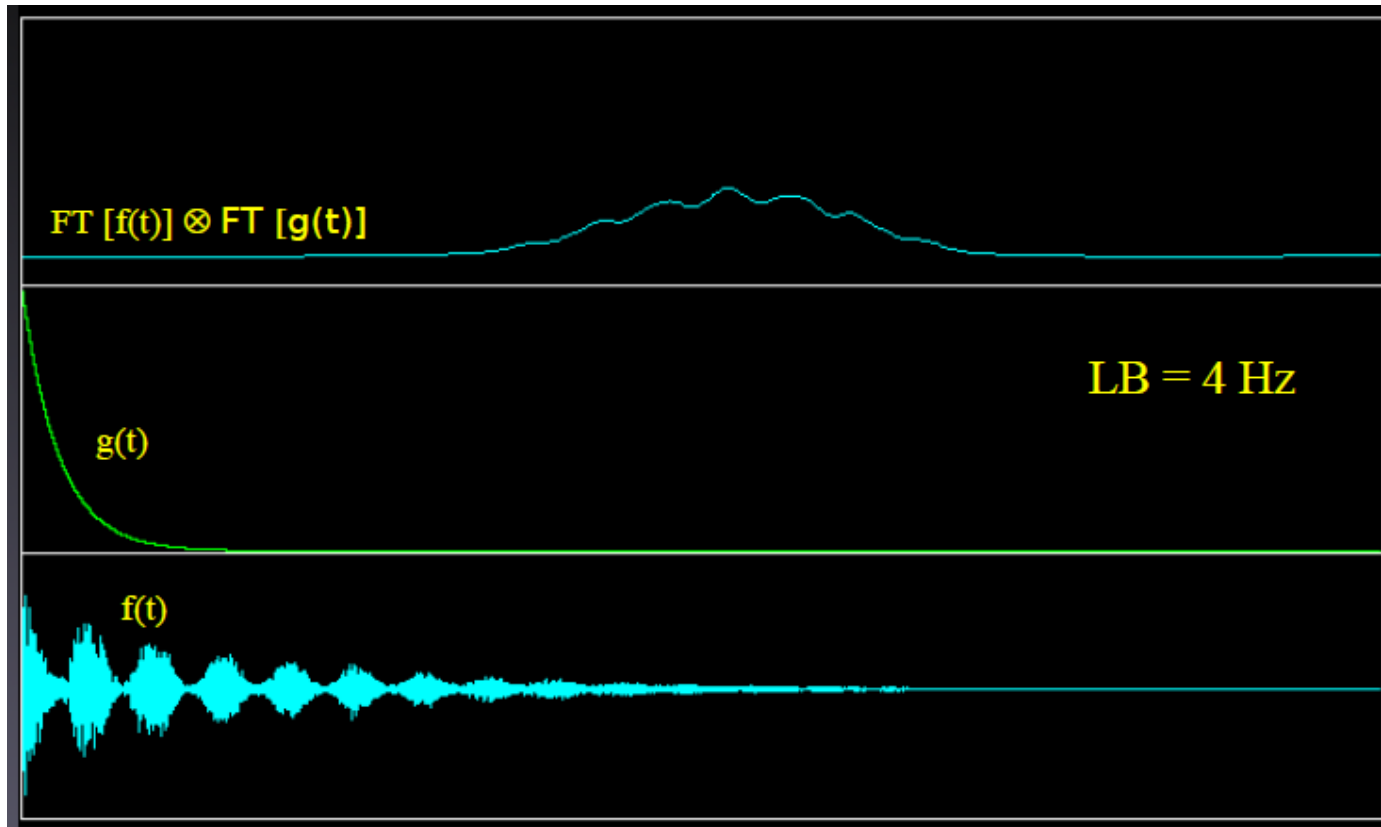
$$e^{-(LB*t)}$$

Il FID è moltiplicato punto per punto per una funzione che corrisponde ad una lorenziana larga 1 Hz a metà altezza.

LB alti: aumenta S/N, peggiora la risoluzione (va bene per ^{13}C)

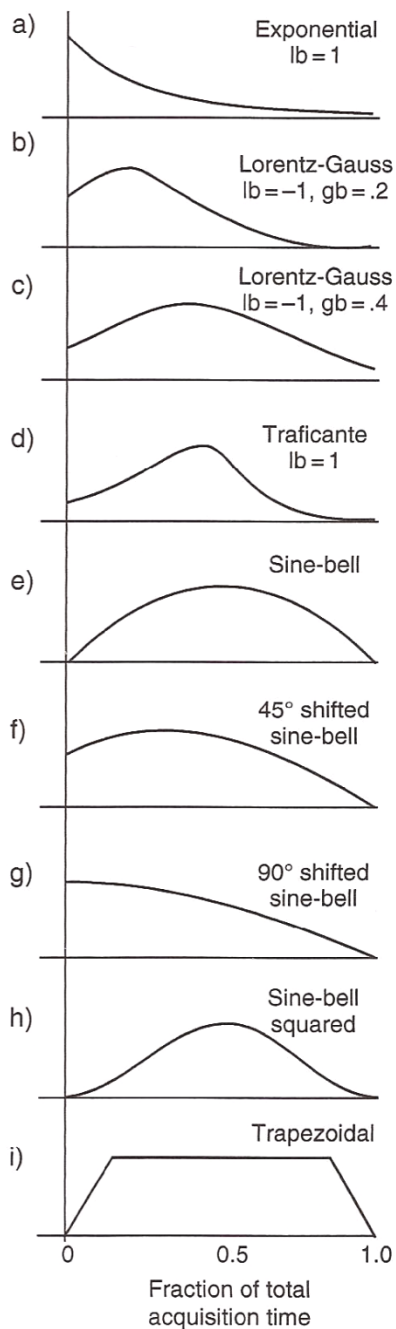
PROCESSAMENTO DEI DATI

❑ FUNZIONI FINESTRA: esponenziale



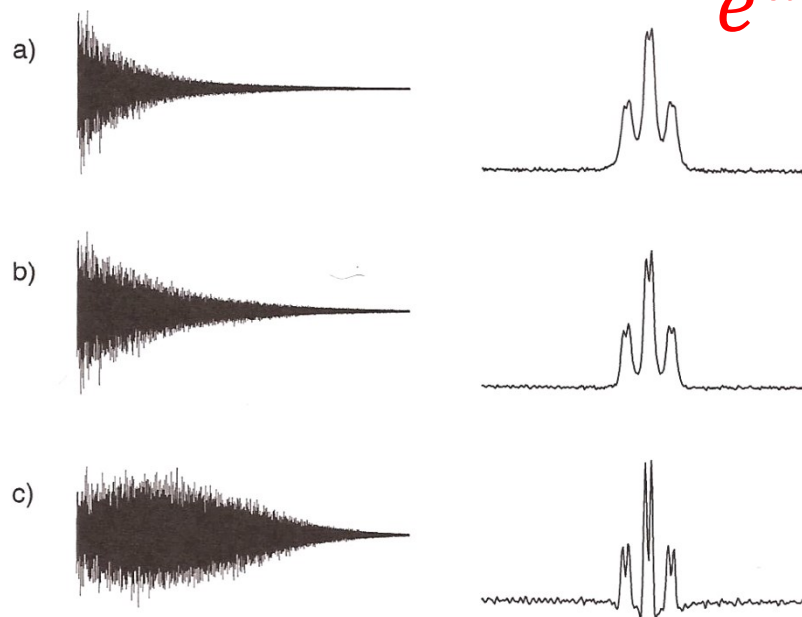
$$e^{-(LB*t)}$$

^{13}C BF = 2; ^1H BF = 0.2



❑ FUNZIONI FINESTRA: gaussiana

$$e^{at} e^{-bt^2}$$



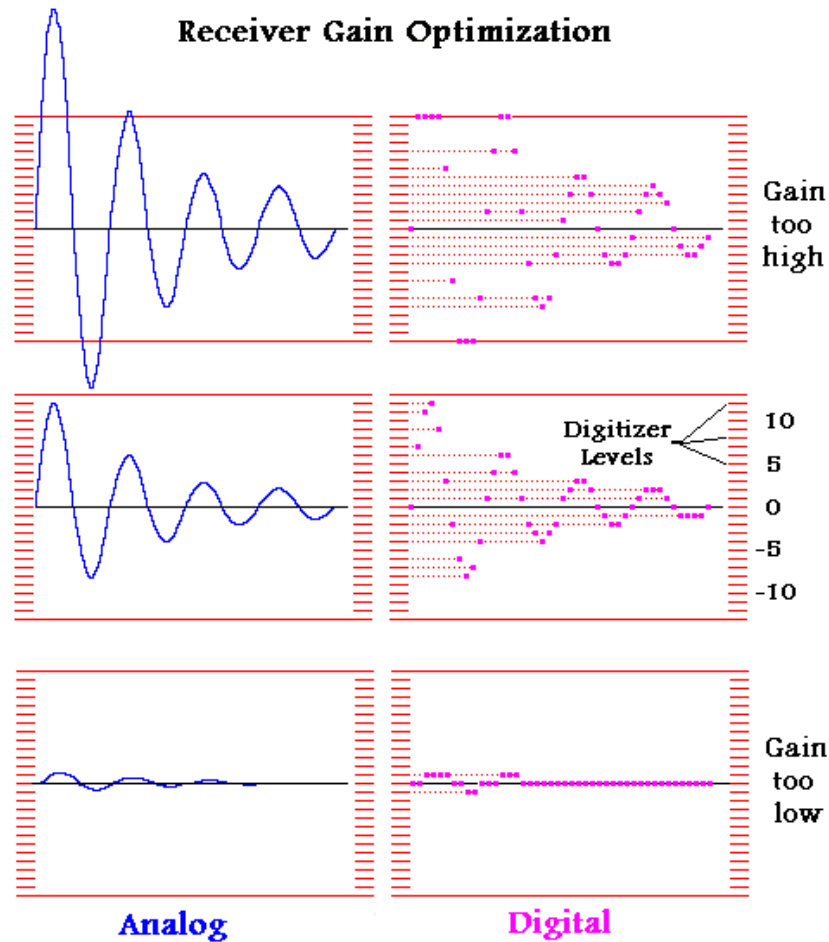
Funzione Lorenz-Gauss

b. LB = -1 Hz, gb = 0.2

c. LB = -3Hz, gb = 0.2

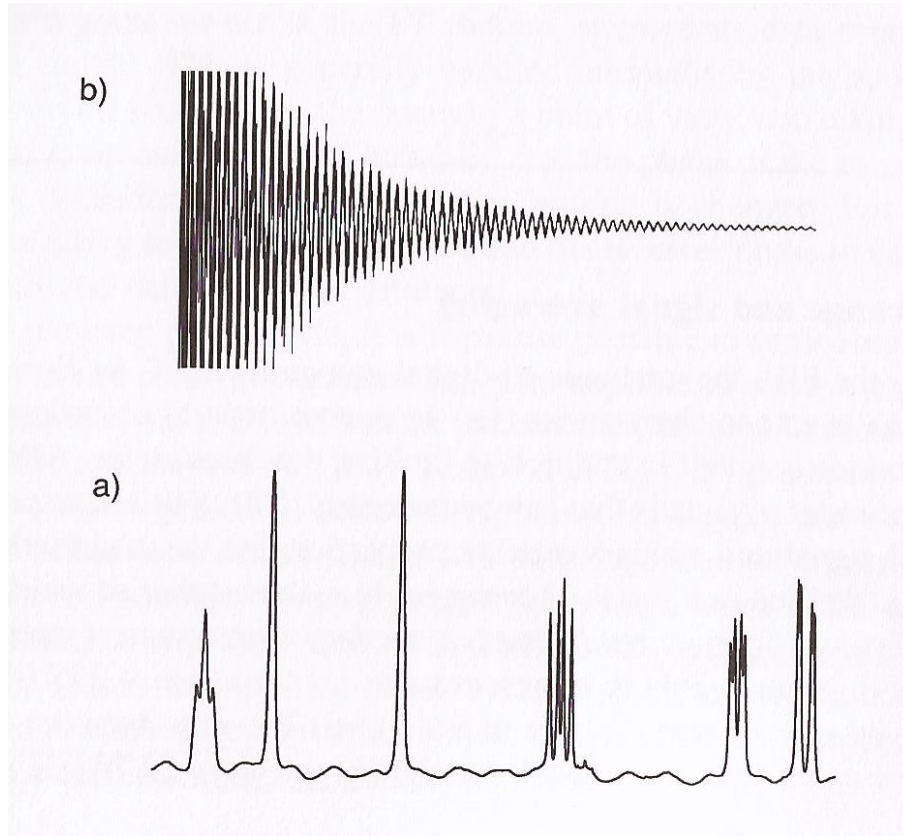
PROCESSAMENTO DEI DATI

□ GAIN DEL RECEIVER



PROCESSAMENTO DEI DATI

□ GAIN DEL RECEIVER



Troppo alto
Eccede il limite dell'ADC