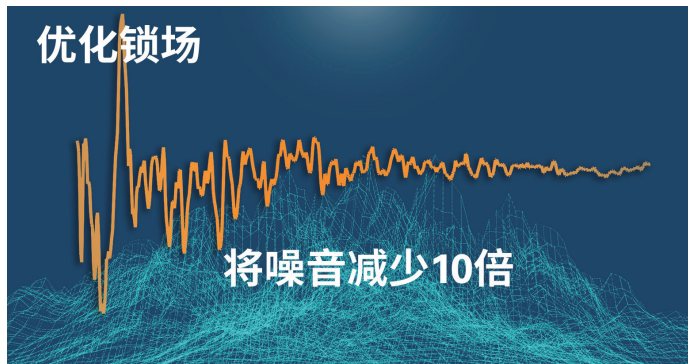


优化锁场

将噪音减少10倍



利用弱锁场耦合, 将信噪比提高10倍

在核磁共振中, 一些较小信号 (例如, 痕量杂质产生的小信号) 很容易被噪声掩埋。为此, 可利用弱锁耦合技术来降低噪声!

痕量信号能否被检测到并能被积分, 以及二维实验需要多少实验时间, 在很大程度上取决于信噪比 (S/N)。布鲁克的 AvanceCore 核磁共振波谱仪经过优化, 具有良好的信噪比。通过设置最佳锁场耦合参数, 可充分释放硬件的潜力, 通常会产生惊人的效果。

AvanceCore 400 MHz 核磁共振波谱仪配备数字气锁, 可用于检测参考信号的频率, 以确定样品所需要的磁场强度。如果参考信号的频率因磁体漂移、温度变化或外部电磁干扰等影响而发

生变化, 则通过校正 B_0 场, 使样品中的磁场保持恒定。此外, 在长时间实验中, 可以利用氘信号自动匀场, 使该磁场保持均匀。锁场和自动匀场均可促进谱仪的稳定性, 并有助于采集高质量的核磁共振谱图。

锁场和自动匀场有助于获得高质量的谱图

如上所述, 锁场和自动匀场有助于保持核磁共振波谱仪的稳定。

图1 (红色) 显示的伪2D实验反映了这一点。该实验是在10小时内, 每5分钟记录一张1D氢谱, 将所记录的一系列氢谱叠加而成。

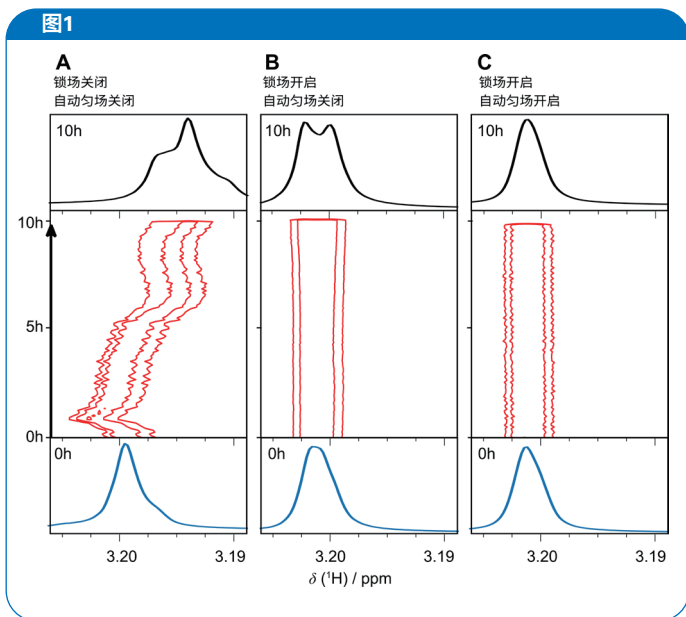


图1: 记录¹H伪二维实验, 以评估波谱仪在三种条件下10小时内的稳定性: A) 锁场关闭且自动匀场关闭: 磁场的强度和均匀性不稳定。B) 锁场开启、自动匀场关闭: 磁场强度保持恒定, 但均匀性不稳定。C) 锁场开启、自动匀场开启: 磁场强度和均匀性均稳定, 从而获得最高质量谱图。

锁场关闭且自动匀场关闭

当氘信号的锁场系统关闭时, 磁场不稳定, 磁场强度受超导磁体漂移及其他因素 (例如, 温度变化) 的影响 (图1A)。这会导致初始峰值 (图1A, 蓝色) 随时间变化在水平轴上移动 (图1A, 红色)。在10小时1D ¹H NMR实验中, 将所有信号进行叠加, 信号峰的峰宽将增宽 (图1A, 黑色)。在此情况下, 峰宽增宽并非由B₀磁场 (匀场) 不均匀引起, 而是由B₀场随时间变化而引起。

锁场开启、自动匀场关闭

当氘信号的锁场系统激活时, 锁场电路使磁场保持恒定。这导致信号峰在10小时期间保持相同的化学位移 (图1B, 蓝色和红色)。当自动匀场未激活时, 磁场均匀度随着时间慢慢减弱, 导致信号峰的峰宽越来越宽 (图1B, 红色)。由于匀场衰减, 这10小时的整个1D ¹H波谱显示为“双峰” (图1B, 黑色)。

锁场开启、自动匀场开启

当锁场和自动匀场均处于激活状态时, 磁场强度和均匀性均保持恒定, 因而在长时间的实验过程中保持稳定的信号 (图1C, 蓝色和红色)。因此, 对于所有几分钟以上的实验, 都建议使用自动匀场功能。要激活自动匀场功能, 可打开BSMS控制套件 (“bsmsdisp”) “Autoshim”选项卡 点击“Shim” (图2)。我们建

议使用以下通用设置: Z (1)、Z² (1)、X (1) 和Y (1) (括号中给出的是每个维度的建议步长)。通过点击“Interval”可设置自动匀场的时间间隔。建议将初始间隔值设置为一至两秒。点击“Shim”即可启动连续匀场过程。之后, 采集状态栏中的BSMS状态消息会指示自动匀场处于激活状态, 以及当前正在更新哪个匀场向参数。

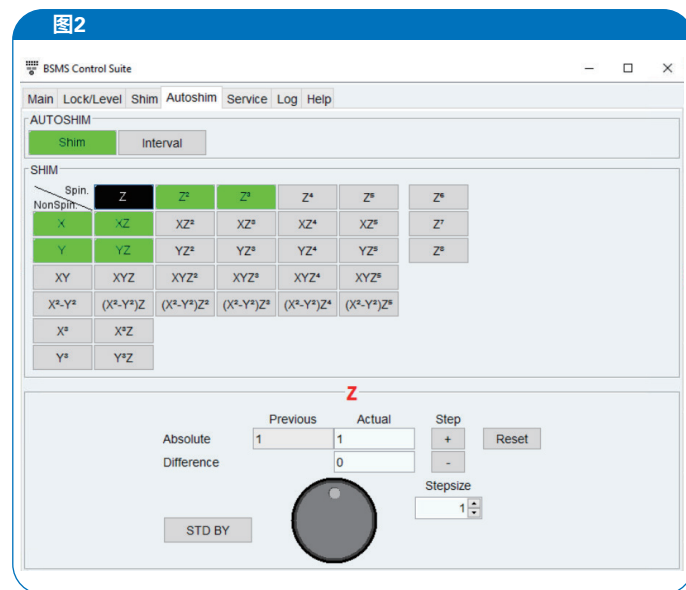


图2: 自动匀场可通过BSMS控制套件进行控制。绿色的“Shim”按钮表示自动匀场处于激活状态。

锁场系统工具旨在对超导磁体的固有漂移以及其他对磁场产生影响的效应 (例如, 实验室温度变化) 予以补偿。此外, 当磁场受到附近有轨电车线路或电梯等直接影响时, 此工具也很有用。

锁场耦合和锁场噪声

锁场系统具有两个主要功能, 需要根据应用情况相互权衡。在许多情况下, 预定义的设置可实现良好的检测结果, 无需进一步优化。锁场系统的两个需要相互权衡的主要功能如下:

- 如上所述, 检测氘的共振频率, 以调整B₀场在**较长时间**内的强度。这一点可通过弱耦合反馈环路来实现。
- 针对**快速的**、较大的磁瞬态信号, 提供补偿。这一点需要通过强耦合反馈环路来实现。

强耦合锁场系统支持快速跟踪磁场变化,从而在强干扰环境下完成核磁共振检测。然而,强锁场耦合也会引入来自气通道的噪声,这可能使较小信号的检测受到限制(详见下一节所述)。在磁场噪声较小的实验室中,则可通过使用弱锁场耦合来降低噪声。建议按照下述程序进行操作。

锁场系统的耦合可通过三个参数进行调整(从弱至强):环路增益(loop gain)、环路时间(loop time)和环路滤波器(loop filter)。用户可通过命令(*lgain*、*ltime*和*lfilter*),或者从BSMS控制套件的Lock/Level注册表中的“bsmsdisp”来访问这些参数(详见TopSpin采样参考),并可在Edlock窗口中,查看每种溶剂对应的默认值。

lock.n	LockGain	LoopGain	LoopTime	LoopFilter
1	119.3	-17.9	0.681	20
2	115.4	-14.3	0.589	30
3	110.2	-9.4	0.464	50
4	107.2	-6.6	0.384	70
5	104.1	-3.7	0.306	100
6	99.7	0.3	0.220	160
7	96.0	3.9	0.158	250
8	92.6	7.1	0.111	400
9	89.6	9.9	0.083	600
10	86.0	13.2	0.059	1000
11	83.9	15.2	0.047	1500
12	82.2	16.8	0.041	2000

表1: 命令set_loopval可列出从弱耦合(1)到极强耦合(12)之间可选的12种预定义的环路设置。用户可通过命令lock.n(n=1..12),直接激活相应的环路参数。在磁场噪声较小的环境中,lock.3为最佳设置。

用户可分别调整这三个环路参数。然而,我们建议通过在TopSpin命令行输入命令lock.n(n=1..12),或者使用命令set_loopval来选择这12个预设参数之一。命令lock.3对应于弱锁场耦合,是一种适用于大多数情形的良好设置,也可作为初始设置,以便后续优化。

截至这份《应用说明》(2022年版)发布之时,这些默认的loop参数均来自每种溶剂的Edlock表,并且在lock.6的范围之内。在标准设置下,谱仪被设置为——以牺牲信噪比为代价来承受磁瞬态。在磁场噪声较小的环境中,可将耦合降至lock.3,以改善信噪比。大多数实验室的磁场噪声都较小,因而非常适合通过弱锁场耦合来获得高质量核磁共振谱图。

无干扰环境下的核磁共振

磁场或物体会干扰核磁共振磁体产生的 B_0 场。样品所感受到的 B_0 场发生变化导致NMR共振频率的改变,从而在谱图反映为所产生的核磁共振信号共振频率的改变。然后,谱仪会显示发生了偏移。这些干扰可能类似于图1A(红色)所示,具体取决于磁干扰和瞬态信号的强度和持续时间。通过检测以Hz为单位的偏移,可量化磁干扰的大小。扰动值通常在0至100 Hz范围内。

大多数磁瞬态信号并不严重,不会对大多数核磁共振实验室产生影响。其原因包括:

- 现代核磁共振磁体(例如,AvanceCore磁体)包含超导电路,可屏蔽与环境的磁相互作用。该系统被称为电磁干扰抑制(EDS),可减少因磁瞬态产生的影响(例如,附近有轨电车线路和电梯)。与旧磁体相比,现代磁体可将瞬态信号衰减几个数量级。以前会造成强信号偏移的强瞬态信号如今可衰减至几乎不明显的水平,因而可忽略不计。
- 主动屏蔽功能可将AvanceCore磁体的5高斯杂散场半径缩小至0.5米以下。即使在靠近磁体之处,极弱的杂散场也会使物体几乎不受影响(例如,建筑物墙体钢筋磁化),从而减少这些物体对核磁共振磁体产生的磁场的反作用。
- 大多数实验室并不靠近强瞬变源(强瞬变源会对样品中的磁场产生影响),因而可视为核磁共振的“无扰动环境”。

应用示例: 为定量核磁共振和小信号检测选择弱锁场耦合

需要使用核磁共振氢谱技术完成的实验室任务通常包括产物、副产物及杂质的识别与定量。反应混合物可能包含一些结构相似的化合物(通常称为“关联化合物”),这些化合物浓度较低,会在主化合物的大信号附近产生小信号。要测定主要化合物的含量以及对关联产物及杂质进行定量,都必须确保良好的信噪比。

气相色谱法残留溶剂分析的样品量通常为100 mg。对于AvanceCore 400 MHz波谱仪，可以类似方法选择样品量（例如，将100 mg样品材料溶解在500 μ l氘代试剂中）。然而，样品浓度可在较大范围内调整。在我们的示例中，我们使用500 mg乙腈作为样品材料，该样品产生强烈的信号，并受到辐射阻尼影响。为限制辐射阻尼，我们将探头解谱1 MHz（详见应用说明《辐射阻尼：定义及如何应对》）。

谱仪选择D₂O进行锁场（“lock D₂O”），将会自动设置Edlock表中的默认loop数值。这些默认loop值近似于lock.6，对应于较强锁场耦合（相比于通过lock.12实现的极强耦合）。大多数核磁共振实验室采用现代核磁共振磁体，因而可选择弱锁场耦合。因此，可通过选择弱锁场耦合来避免默认的lock.6耦合所产生的不必要的噪音。

锁场引入的噪声通常集中在强信号周围，如图3所示。这些噪声会严重干扰其附近弱信号的检测。从图3中的放大图可见，噪声在接近强信号时更明显（从2 ppm至3 ppm，蓝色），而在远离该区域的噪音信号则不太明显（例如，从9 ppm至10 ppm，红色）。

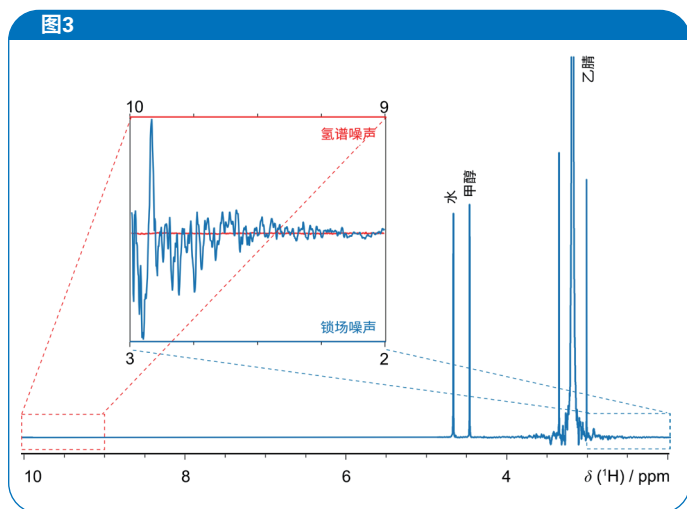


图3: 通过自动锁场（“lock D₂O”）采集的核磁共振氢谱，其锁场设置近似于Edlock窗口中定义的lock.6。样品含有500 mg乙腈 + 5 mg甲醇 + 100 μ l D₂O，按乙腈¹³C卫星信号的强度进行缩放。命令lock.6能有效地补偿磁瞬态，但同时也会在强信号周围产生锁场噪音。采集时间为11秒，探头解谱1 MHz，以减少辐射阻尼。波谱未经变迹处理。

图3所示的谱图经过手动基线校正，并对以下两个噪声区域进行了比较：

- 接近乙腈信号的区域 (2-3 ppm)，与
- 谱图的未受干扰的外部区域 (9-10 ppm)。

为对这两个区域的噪音进行比较，我们使用命令“sinocal”，将这两个噪音区域与乙腈的信号强度相关联。比较结果见表2。

噪音区域 (ppm)	信噪比 (乙腈)	信噪比 (乙腈浓度)
2 - 3 (有锁场噪音区域)	4640	5
9 - 10 (无锁场噪音区域)	119448	100

表2: 图3所示核磁共振氢谱的两个区域的信噪比数值。该氢谱使用默认自动锁场设置而获得。

相对较强的自动锁场耦合 (lock.6) 可降低乙腈信号附近的信噪比。

若要通过增加扫描次数来改善信噪比，则不太可能成功，因为实验持续时间会很快达到不切实际的水平（信噪比仅随实验时间的平方根而增大）。

在使用默认锁场参数完成采集后，通过在TopSpin命令行键入lock.n (n=1..12)来改变锁场耦合。所产生的谱图见图4所示。乙腈信号周围的信号区域因噪音大小的变化而受到影响，具体取决于锁场耦合强度。通过使用lock.1，乙腈信号附近的信噪比从5% (表2) 提高至60% (表3)。信噪比提高了12倍，相当于检测时间增加了122倍，从而能够检测到密集信号附近的低密度关联化合物及其他杂质。对于大多数磁场噪音较小的实验室，建议使用lock.3。

图4

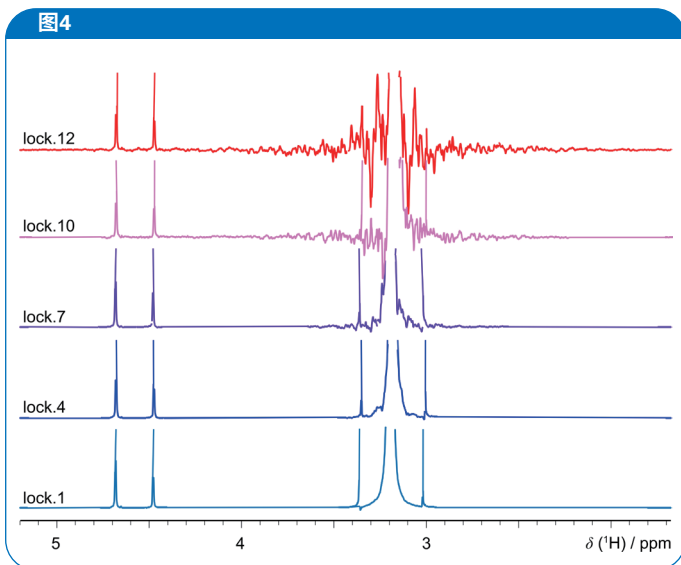


图4: 500 mg 乙腈 + 5 mg 甲醇 + 100 μ l D₂O的核磁共振氢谱, 在lock.1至lock.12之间的多个不同的锁场设置下获得, 按乙腈¹³C卫星信号的强度进行缩放。谱图区域主峰周围的信号可能会受到锁场噪声的影响, 具体取决于锁场耦合情况。受影响区域的小信号甚至可能完全被掩盖。

图5

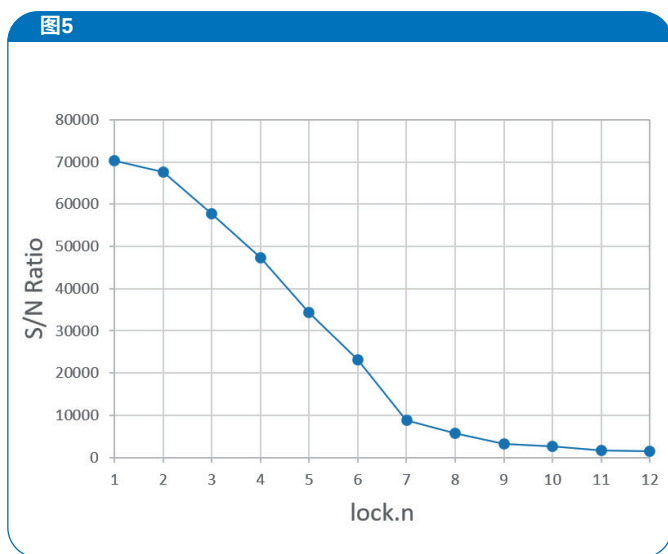


图5: 基于乙腈信号和3至2 ppm的噪音范围计算出的图4所示谱图的信息比。计算结果涵盖从n = 1到n = 12的所有lock.n设置。在强锁场耦合下观察到的信噪比下降会将小信号掩盖。

表3

噪音区域 (ppm)	信噪比 (乙腈)	信噪比 (乙腈浓度)
2 - 3 (有锁场噪音区域)	70362	60
9 - 10 (无锁场噪音区域)	116679	100

表3: 在lock.1设置下获得的核磁共振氢谱的信噪比数值。

在上述示例中, 我们对距乙腈信号1 ppm的信号范围 (从2 ppm到3 ppm) 在多个不同的锁场设置下的信噪比进行了评估。评估结果如图5所示。我们使用命令“sinocal”来计算信噪比。该命令始终返回设定范围内的最高信噪比数值。由于噪音在2 ppm至3 ppm的范围内分布不均匀, 因此, 当进一步接近乙腈信号的化学位移时, 通过设置弱锁场耦合而实现的增益更为显著 (例如, 在2.5 ppm至3 ppm之间)。

注意, 当使用自动锁场时 (例如, 使用“锁场D₂O”), loop值将重置为Edlock表中的默认值。通过从BSMS控制套件 (Lock/Level注册表) 中读取loop设置, 并将其输入Edlock窗口 (从命令行输入“Edlock”可访问该窗口), 可使loop设置保持不变。或者, 可在Edlock窗口中创建新溶剂 (例如, “DMSO_qNMR_final_product”, 其中包含各自的loop值)。

若要向lock表中添加永久性更改, 则需要为AvanceCore谱仪订阅方法开发软件。

二维核磁共振中的加性和乘性噪音

加性噪音 (例如, 来自射频线圈或前置放大器等电子部件的噪音) 是核磁共振波谱中的主要噪音源。

外部磁瞬态等环境变化可能使核磁共振信号发生改变, 并导致乘性噪音随信号增强而增多。这一点适用于锁场噪音。周围环境的变化主要会影响核磁共振谱图的可再现性。二维谱的间接维数可基于一系列重复的一维谱计算得出。要获取这些重复的一维谱, 需要延长检测时间。在这段较长的检测时间内, 信号的大小和化学位移很可能随环境变化而改变。正因如此, 间接维数特别容易受到乘性噪音的影响。

这种噪音被称为t1噪音(勿与T1弛豫混淆)。经过间接维的傅立叶变换后, t1噪音在强信号的垂直列中显现出来。这种乘性噪音不同于均匀分布在一维谱和二维谱中的“正态”加性高斯噪音。图6显示了二维TOCSY谱的两个示例——一个采用强锁场耦合, 另一个采用弱锁场耦合。

t1噪音可通过弱锁场耦合(例如, lock.3)来降低。虽然在对强信号的纯化合物的二维谱图进行评估时, 噪音通常不会造成问题, 但对于含有杂质或其他低浓度物质的混合物, 情况恰恰相反。在后一种情况下, 降低噪音是区分“真实”信号与噪音的前提——尤其是在图6左半部分所示的存在较大峰值的情况下。

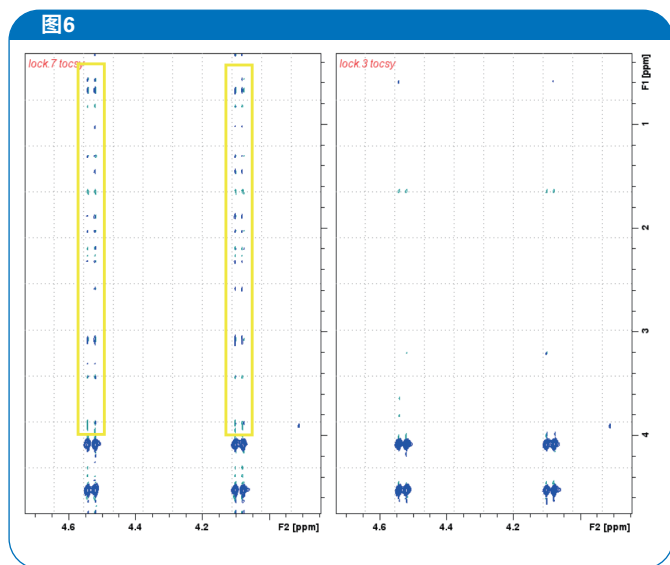


图6: 使用lock.7(左)和lock.3(右)记录的TOCSY氢谱。注意, 在lock.7的间接维度可观察到明显的t1噪音(以黄色突出显示)。T1噪音通过弱锁场耦合(lock.3)而减少。

此外, 当存在较大伪影峰值(对角信号)时, NOESY等实验会产生较小的关联峰值。因此, 即使对于高纯度浓缩样品, 也建议使用弱场锁耦合。



布鲁克磁共振微信公众号

● 布鲁克(北京)科技有限公司

网址: www.bruker.com
E-mail: sales.bbco.cn@bruker.com
布鲁克应用技术咨询:
400-898-5858
布鲁克售后技术支持:
400-898-1088

布鲁克(北京)科技有限公司
北京市海淀区西小口路66号
中关村东升科技园B-6号楼C座8层
邮编: 100192
电话: (010) 58333000
传真: (010) 58333299

上海办公室
上海市闵行区合川路
2570号1号楼9楼
邮编: 200233
电话: (021) 51720800
传真: (021) 51720810

广州办公室
广州市海珠区新港东路
618号南丰汇6楼A12单元
电话: (020) 22365885/
(020) 22365886