Guía de Procesado RMN usando TopSpin

Algunas consideraciones...

- TopSpin es un programa de procesado muy flexible que a diferencia de otros ofrece acceso a un gran numero de variables que pueden ser modificadas por el usuario. Esta "falta" de automatización permite una mayor control y ajustes a la hora de procesar información de RMN.
- Esta aplicación ofrece múltiples caminos para obtener los mismos resultados.
- Ofrece una interfase del tipo línea de comando que muchas veces resulta practica y más rápida, además brinda la posibilidad de programar scripts para ejecutar varios comandos de forma automática.
- Tiene un excelente respaldo a través de detallados manuales en formato electrónico y tutoriales interactivos.

Almacenamiento y manejo de datos.

El manejo y la organización de la información de RMN es clave ya que cada experimento no se encuentra circunscripto a un simple archivo de datos. En cambio, cada experimento incluye una decena de archivos y otros subdirectorios.

Estructura de archivos en TopSpin

Cada conjunto de experimentos realizados sobre la misma muestra conforma un "set de datos" en TopSpin. Cada uno de estos incluye:

 Cada experimento numerado (directorio). Como resultado de la adquisición se obtiene una serie de datos crudos "raw data" sin procesar:



- - fid 1D raw data (archivo)
 - ser 2D or 3D raw data (archivo)
- acqu parámetros de adquisición 1D
- - acqus status de los parámetros de adquisición 1D
- acqu F2 acquisition parameters 2D
- acqu2 F1 acquisition parameters 2D
- acqus F2 acquisition status parameters 2D
- acqu2s F1 acquisition status parameters 2D
- pdata (directorio) raw data procesada de diferentes formas. <dir>/data/<user>/nmr/<name>/<expno>/pdata/<procno>/
- 1r, 1i 1D processed data
- 2rr, 2ir, 2ri, 2ii 2D processed data
- proc processing parameters 1D
- procs processing status parameters 1D
- proc F2 processing parameters 2D
- proc2 F1 processing parameters 2D
- procs F2 processing status parameters 2D
- proc2s F1 processing status parameters

- Cree en el escritorio el siguiente directorio "Curso procesado". Descargue desde la dirección web <u>http://www.umymfor.fcen.uba.ar/Espectros_300/</u> los archivos de datos y guárdelos en el directorio recién creado. Ábralos e identifique los archivos y la estructura de directorio arriba comentada.
- 2. Ejecute el programa TopSpin 4.3.0. La interfase debería verse como la figura siguiente. Observe la descripción de la tabla.



- 1. Barra de título, con la versión del programa y el nombre de la computadora donde se ejecuta.
- 2. Barra de menú, para acceder a las diferentes operaciones en TopSpin agrupadas según la función que cumplen.
- Cada grupo de operaciones tiene asociados diferentes funciones. Además, se incluyen algunas opciones extra de manejo de datos. En esta versión cada menú se muestra como FlowChart.
- 4. Esta barra de iconos de accesos directos está dividida en bloques asociados. Los bloques incluyen funciones de manejo de información, opciones de visualización, escalas, etc. También es posible agregar botones personalizados.
- 5. Explorador de archivos, permite el acceso rápido y la exploración de los diferentes sets de datos así también como la interacción entre ellos. Ofrece además opciones de visualización de los últimos 50 archivos abiertos y una opción de vista en miniatura de los archivos procesados.
- 6. Área de datos, es donde se mostrará la información procesada
- 7. Línea de comando, para introducir comandos a través del teclado.
- 8. Barra de estado. Muestra el estado del proceso ejecutado.
- 9. Ventana donde se puede visualizar información de la estructura, comandos, ayudas y un historial de procesos ejecutados.
- 3. Exploremos las opciones de configuración que nos brinda TopSpin, para esto hacemos clic en la pequeña *tuerca* ubicada en la parte superior izq. de la barra de menú.

 Bruker Topford 43.0 on CRISTIAN-NMR as Cristian (Academic Liverse)

 Image: Process Analyze Applications Manage

 Process Constructions Manage

 Image: Process Analyze Applications Manage

 Ima



Esta nueva ventana nos permite configurar multitud de opciones en TopSpin, desde las puramente estéticas, como los colores de las trazas, el tamaño de la letra etc. Hasta opciones mas avanzada como la estructura de directorios, opciones de búsqueda, impresión incluso la administración de paquetes externos como Python y otro.

Explore las diferentes opciones que brinda esta ventana, en general las encontrara agrupada según su función. Algunos cambios requieren un reinicio del programa otros toman efecto de forma automática. Busque y deshabilite la opción de procesado automático de datos. Esto evitara que TopSpin procese de forma automática los espectros.

Antes de abrir un experimento, exploremos el programa y vemos donde buscar cada función:

Esta parte de la guía la hacemos juntos mirando el programa, para aquellos que ya tiene experiencia utilizando TopSpin les servirá de repaso, para los que son nuevos es la oportunidad de hacer todas las preguntas que surjan sobre el uso del programa

- 4. Vamos a usar el directorio curso de procesado y abrir uno de los *dataset*. Existen varias formas de hacerlo.
 - a. "Drag and Drop"
 - b. Dese el menú archivos
 - c. Desde la línea de comando: re, rew
 - d. Desde el explorador de archivos.
- 5. Exploremos algún dataset cargado en TopSpin:

Bruker TopSpin 4.3.0 on CRISTIAN-NMR as Cristian [Academic License]			- 0 X
Erocess Analyze Applications Manage	TopSpin	:: \$ (9)	BRUKER
N Prog. Spectrum - V Adjust Phase - V	Baseline • 💦 Calib. Agis • Advanced •		-200
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$\begin{array}{c c} 1 & \overline{\Lambda} & \underline{\mu} \\ \hline & \underline{\lambda} & \underline{\mu} \\ \hline & \underline{\mu} & \underline{\mu} \end{array} & APK & APS \\ \hline APK & GP \end{array}$		
SPICENUM PROCEA C CMD.ker/Sp6pind.30user + Cycloperine + Cycloperine - exam_CMCse_1 - 1 - ay - Alpha forume (- 1 - ay - Alpha forume (- 2 - ay - Alpha forume (- 3 - higadelegip.3 + 4 - hinketegistim Exact	S ACQUPARS TITLE PULSIPROG PLAKS INTEGALS SAMPLE STRUCTURE PLOT FI 1 C:\Bruker\Top\$pin4.3.0\\examdata		×

Explore la información que brindan las pestañas ubicadas en la parte superior.

6. Procesado de espectros 1D:

Vamos a comenzar trabajando con algunos de los comandos de procesado, un camino lógico de procesado luego de examinar la FID seria: aplicar una transformada de Fourier, un ajuste de fase, un ajuste de línea de base y finalmente la calibración del espectro.

- Manipular raw FID. (WM, LP, ZF, etc)
- Aplique transformada de Fourier (ft, tft)
- Corrección de Fase. (apk)
- Corrección de línea de base. (bas)
- Calibrar el espectro. (.cal)

Utilizando el dataset **exam_CMCse_1** del directorio de ejemplos de Topspin, vamos a explorar las opciones del comando **FT**. En el menú desplegable de **Proc Spectrum** vamos a la opción **Fourier transform options** o ponemos en la línea de comandos **ftf**

Founer transform – ft				×
Options				
O Standard Fourier trans	storm			
Advanced Fourier tran	nsform			
Requiree parameters				
Size of real spectrum SI [pnts] =			131072	
 of fid data points to be 	used TDeff =		0	
Index of first output point of strip transform STSR =			0	
Total # of output points of strip transform STSI =			0	
Fid linear prediction (JP) mode ME_mod =			No LP 💌	
# of LP coefficients NCDEF =			200	
# of fid data points contributing to backward LP LPBIN =			0	
# of fid data points to be predicted TDoff +			0	
Reverse spectrum REVERSE =			No	•
Weighting factor for first fid point FCOR =				
Apply 5th order phase co	orrection (A*X only)	PKNL =	Yes	•
	01	× cm	est all	Hale

Discutimos alguna de las opciones que se muestran, particularmente SI y la relación que existe con el parámetro TD.

Probamos transformando la FID con diferentes valores de SI: 128K, 32K, 16K, 8K y 1K. Analizamos como se ve el espectro transformado (nota: para poder analizar los cambios luego de transformado ejecutamos el comando APK, luego veremos en detalle su funcionamiento.)

7. Otra forma de modificar nuestros espectros procesados es aplicar a nuestra FID una función de pesado. La idea central es multiplicar la señal en el dominio del tiempo (FID) con una función de filtro apropiada. Con esta función de pesado podemos lograr mejora de la relación señal/ruido, mejora de la resolución, eliminar artefactos experimentales (por ejemplo, apodización). Existen multitud de funciones de pesado y se pueden acceder a ellas mediante el comando WM

Options Manual window adjustment	
Required parameters	
Window function type WDW =	exponential 🔻
Line broadening LB [Hz] =	0.3
Gaussian max. position 0 <gb<1 =<="" td=""><td>0.2</td></gb<1>	0.2
Sine bell shift SSB (0,1,2,) =	0
Left trapezoid limit 0 <tm1<1 =<="" td=""><td>0</td></tm1<1>	0
	0

Claramente es importante conocer la forma de des estas funciones, las variables que podemos manejar y el efecto que ellas tiene. Veremos dos de las funciones mas utilizadas con experimentos 1D

• Función exponencial



Un objetivo de multiplicar una FID con una función exponencial es aumentar la relación señal/ruido, a expensas de la resolución. Un compromiso razonable es donde LB (line broadening) se establece en el ancho de línea natural de los picos (matched filter). Otro objetivo es la apodización, es decir, suavizar el decaimiento final del FID en caso de que todavía quede señal al final del tiempo de adquisición (FID truncada).

- a) En el explorador de archivos abra el experimento synth/101 y synth/110, anote los valores de procesado de cada uno y analice las diferencias de resolución y relación S/N. Superponga ambos experimentos para lograr una visualización mas clara.
- b) En el explorador de archivos abra el experimento apod/1. La FID tiene TD = 1024 puntos. Establezca SI = 512 y LB = 0 y realice *em* para ver la FID sin relleno de cero y sin apodización; realice *ft* y *pk* para transformar y corregir la fase del espectro utilizando las constantes de fase guardadas. Debería observar una señal fuerte a -2.8 ppm y un artefacto (imagen cuadratura) a 3.6 ppm.
- c) Ahora hacemos lo mismo otra vez, pero esta vez usando relleno cero: SI = 1024; después de em observe la FID, después de em, ft y pk, el espectro muestra ondulaciones extensas debido a la FID truncada (el tiempo de la adquisición no fue suficiente).
- d) Para solucionar esto vamos a usar un LB = 100; después de *em* la señal básicamente se va al final del FID, y después de *ft* y *pk* el espectro resultante está relativamente libre de ondas. Pruebe otros valores de LB, observe los resultados.
- e) En el explorador de archivos abra el experimento em_sn/1, procese la FID y observe el espectro. Modifique los valores de LB y observe los cambios en el espectro
- f) Abra el espectro de 13C de Lanosterol, observe el pico a 134 ppm. Modifique le valor de LB =0.5 y vuelva a procesar. ¿observa algún cambio?
 - Función Gaussiana

Aplicar esta función genera un aumento en la resolución a expensas de la relación señal/ruido. Además, es posible convertir una forma de línea de Lorentzian a Gaussiana (2D NMR). ¿Cómo hacemos para seleccionar los parámetros adecuados para gm? Se pueden aplicar dos reglas generales: (i) para LB, tome el valor negativo de los anchos de línea naturales de los picos; obviamente, si los anchos de línea difieren ampliamente, no encontrará una solución que los ajuste a todos; (ii) para GB tome la fracción del FID donde la señal cae en el ruido. En general, habrá que probar con ambos parámetros. La regla empírica para GB tiene ciertas deficiencias, ya dependerá del número de scans, sin embargo, en la práctica es un buen punto de partida



- a) En el explorador de archivos abra los experimentos snyth/101/110/111. Superponga los espectros y compare los resultados obtenidos con las diferentes funciones.
- b) Abra el dataset exam_CMCse_3, correspondiente a Estricnina, procese el espectro de 1H. Modifique los valores de LB y GB para revela picos adicionales en los multipletes más complejos. Si aumento demasiado LB los picos serán aún más estrechos, pero mostrarán contribuciones negativas. Esto definitivamente dificulta la integración. Si aumenta GB, la relación señal/ruido disminuirá y en el peor de los casos, solo se observará ruido.
 - Función sin y qsin

La función sin y qsin multiplican la FID con una función sinusoidal con un período de dos veces el tiempo de adquisición. El valor de SSB determina la fase de la función sinusoidal y da como resultado las siguientes funciones de filtro: SSB=1 o 0 (función seno) SSB=2 (función coseno) SSB>2 mezcla de ambas. La mejora de la resolución es modesta y puede dar como resultado señales negativas que dificultan la integración. Se utiliza principalmente para espectros 2D, especialmente si el tiempo de adquisición es corto y las FID's están truncadas. Además, en el caso de qsin mejora las distorsiones de las formas de línea tipo Lorenzianas "winggles"



- a) Analice los experimentos fid/104, fid/105 y fid/106 y observe la forma de la FID luego de aplicada esta función. Pruebe cambiar los valores de SSB, en el caso de sin y qsin.
- b) Analice el experimento synth/112, aplique sinm con SSB = 0 o SSB = 1 (sine). Observe la mejora de la resolución y la apodización a expensas de la relación señal/ruido. Compare con los resultados obtenidos con otras funciones. (gm)

- c) Abra el experimento synth/113, aplique sinm con SSB = 2 (coseno). Observe la apodización y el ligero aumento de la relación señal / ruido sin pérdida significativa de resolución.
- 8. TopSpin ofrece otras funciones de multiplicación como trap, traf, trafs, sinc, y qsinc. Sin embargo, estas no son de aplicación común, aunque pueden ser útiles en casos específicos. En el archivo fid se encuentran ejemplos de cada una de ellas. Elija la opción interactiva del menú WM, analice los parámetros variables vistos en los puntos anteriores.
- 9. Abrimos uno de los dataset de ejemplo y practicamos ajustar la fase, repasamos el concepto de ajuste de orden 0 y orden 1 vemos los diferentes comandos y opciones. Sobre el mismo dataset exploramos el ajuste de línea de base y la calibración de los espectros.
- 10. Abra un archivo complete los pasos del punto 9 y además realice:
 - Peak Picking
 - Integración
 - Análisis de multipletes.
- 11. Procesado de Espectros 2D.
 - a) Abra el espectro U07-070804/2. Utilice el comando *xfb*, el cual lleva a cabo un transformada de Fourier en ambas dimensiones, aplica una ventana de multiplicación y una corrección de fase. Observe el resultado obtenido.
 - b) Haga un llenado de ceros. ¿Sobre qué dimensión lo haría?, aplique *xfb* y observe. (aumente *SI*)
 - c) Aplique una predicción linear sobre f1 (¿por qué?): Note que no solo FT aplica la LP cuando se configura ME_mod, también el comando WM aplica las LP. Esto permite ver fácilmente el efecto de la predicción lineal en el FID, por ejemplo, ejecutando em con LB = 0. ME_mod tiene las siguientes opciones.

LPfr	forward LP on real data
LPfc	forward LP on complex data
LPbr	backward LP on real data
LPbc	backward LP on complex data
LPmifr	mirror image forward LP on real data
LPmifc	mirror image forward LP on complex data

LPfc o LPfr = Predicción lineal *"hacia adelante"* compleja o real (el "complejo o real" no importa ya que el software determina automáticamente el tipo de datos: LPfb funcionará igual)

NCOEF = número de coeficientes. En términos generales, este es el número de "Frecuencias de prueba" para la extrapolación; debería ser mayor que el número de puntos esperado. LP solo se aplica si NCOEF>0. En general el valor por defecto es 32, aunque se puede aproximar tomando 2 o 3 veces el numero de picos esperados. Aumentar este número excesivamente aumentará el tiempo de cálculo y, por lo general, no mejorará el espectro.

LPBIN = el número total de puntos usados para extrapolar, por lo que si TD> LPBIN no se realiza extrapolación. Cuantos más datos se extrapolen, menos fiable será la predicción lineal, en general, una extrapolación del doble de TD es confiable. Este es el caso especial de LPBIN = 0. Sin embargo, si la relación señal/ruido es buena, pueden obtener buenos resultados usando un poco más de predicción lineal (por ejemplo, LPBIN = 4 * TD). Después de cualquier predicción lineal, el FID se completa con ceros hasta SI y está listo para la FT.



LPBIN = size (0 implica 2* TD)

d) Aplique una WM. En general para espectros 2D se aplican funciones del tipo seno. Todas las funciones basadas en "sine" terminan explícitamente en cero, evitando el truncamiento de la FID. Modificando el parámetro SSB=2 (coseno) hacia una función sinusoidal SSB = 0 o 1 (seno) proporciona una mejora en la resolución (enfatizando el medio del fid) con el costo de una peor sensibilidad (se suprime el comienzo del fid).



- SSB = 2 maximiza la sensibilidad (cosine function)
- SSB = 3, 4, 5, 6 ... aumenta la resolución
- SSB = 1 maximiza la resolución (mayor peso del centro de la FID)

La selección del valor óptimo de SSB se logra en general por prueba y erro, sin embargo, es impórtate considerar algunas cuestiones. Por ejemplo si el tipo de espectro que estamos procesando es sensible a la fase (señales absorción, tipo Lorentzinas) o fue medido en modo magnitud (líneas más anchas mezcla de absorción/dispersión). Como regla general, use SSB = 2 con experimentos sensibles a la fase (HSQC, DQF-COSY, NOESY, etc) cuyos primeros puntos tengan intensidad distinta de cero y que den picos intrínsecamente agudos (Lorentzian), se puede usar valores más grandes de SSB si se necesita mayor resolución. Use SSB = 0 o 1 con experimentos no sensibles a la fase (HMQC, COSY), cuyos primeros puntos son 0 y que dan picos más anchos, si necesita más sensibilidad se puede comenzar un valor de SSB alto e ir disminuyendo de a poco. Otras MW, como la multiplicación gaussiana tradicional o la multiplicación exponencial, se pueden usar en 2D, pero no son de aplicación general y requieren un ajuste más fino para obtener buenos resultados (puede resultar útil usar *em* sobre f2 si se desea extraer espectros 1d de buena calidad a partir de datos 2d).

Pruebe aplicar los conceptos anteriores a espectros COSY y HSQC-ed.

12. Cargue un espectro 2D sensible a la fase y practique ponerlo en fase de modo manual.

Active el modo ajuste de fase manual (.ph o Adjust Phased). A continuación, haga clic con el botón derecho en algunos picos (trate de abarcar todo el espectro) y seleccione "Agregar" para elegirlos.



Haga click sobre los iconos de fila o columna ($\stackrel{\mathbb{R}}{\longleftrightarrow} \stackrel{\mathbb{C}}{\downarrow}$) para mostrar las proyecciones. Ponga en fase primero las filas usando 0 y 1. Repita el procedimiento para las columnas.



Tenga en cuenta cómo debería verse el espectro después de la corrección de fase: los espectros NOESY deberían tener la diagonal negativa y los picos cruzados positivos. Los espectros de HSQC-ed debería tener picos positivos/negativos. Puede ser necesario repetir el ajuste fase después del primer intento para obtener los mejores resultados. Recuerde que, como para los espectros 1D, puede ser útil tratar de obtener una línea de base plana, así también como ajustar la forma de los picos.

- a) Practique ajustar de forma manual la fase de diferentes espectros "phase sensitive".
- b) Utilice el comando *sref* para calibrar el espectro de 2D. Explore las opciones de ajuste de proyecciones. Use espectros reales en 1D como proyecciones
- c) Utilice las opciones de simetrizacion para espectros homonucleares (sym/syma)
- d) Pruebe los comandos *abs1* y abs2 para la corrección de linea de base en ambas dimensiones el comando *bas* ofrece mas opciones. En general el procedimiento es similar al usado en 1D
- e) En los espectros 2D también se pueden llevar acabo "pick peaking" e integración, aunque son de limitada utilidad en particular esta última. En el caso de ser necesario la mejor opción es hacerlo de forma manual, utilizando los mismos comandos que para 1D.

- 13. Topspin ofrece otra serie de posibilidades que valen la pena ser exploradas.
 - a. Extraer columnas/filas
 - b. Reducir ruido en t1
 - c. Corrección de línea de base para muestras en agua.
 - d. Ajuste de contornos de nivel.

14. Utilice el Plot editor y cree un documento para imprimir. Practique el uso de templates.