



## **Einführung in die Benutzung der NMR-Prozessierungs-Software TopSpin 3.5**

(06/2016)

### **Index**

- **Prozessierung von 1D-Spektren:** S. 1 - 4.
- **Prozessierung von 2D-Spektren:** S. 5 - 7.
- **Öffnen von Spektrendaten:** S. 8 - 9.
- **Wahl der Fensterfunktion:** S. 10.
- **Manipulation von Spektren im aktiven Fenster:** S. 11.
- **Display-Optionen beim aktiven Spektrum:** S. 11 - 13.
- **Multipllett-Analyse:** S. 14 - 16.
- **Export von Peak-/Integral-/Kopplungslisten:** S. 16.
- **Stacked-Plots:** S. 17.
- **Einfacher Plot, Grafik für Publikationen:** S. 18 - 19.
- **Software-Installation:** S. 20.

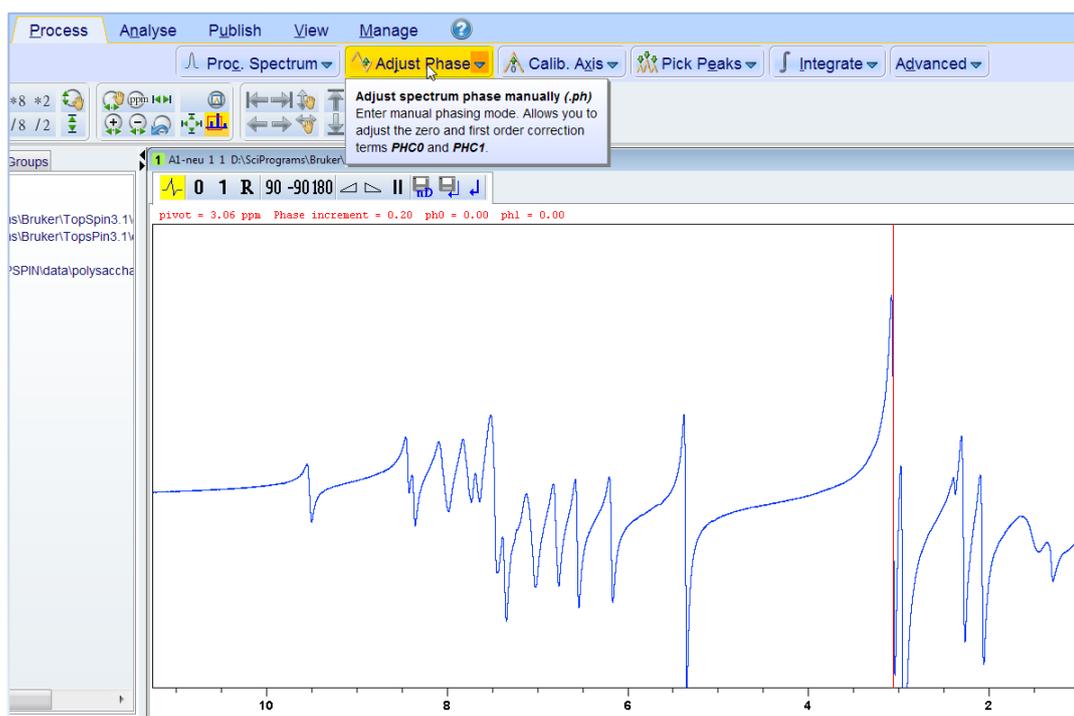
## Einführung in die Benutzung der NMR-Prozessierungs-Software TopSpin 3.5 (06/2016)

In der folgenden Kurzbeschreibung finden Sie Informationen zur Prozessierung von 1D- und 2D-Spektren. Im Anhang werden außerdem die Installation von TopSpin, verschiedene Möglichkeiten zum Öffnen und interaktiven Handling von Spektren sowie die Benutzung des Multiplett-Tools und die Auswahl von Fensterfunktionen beschrieben.

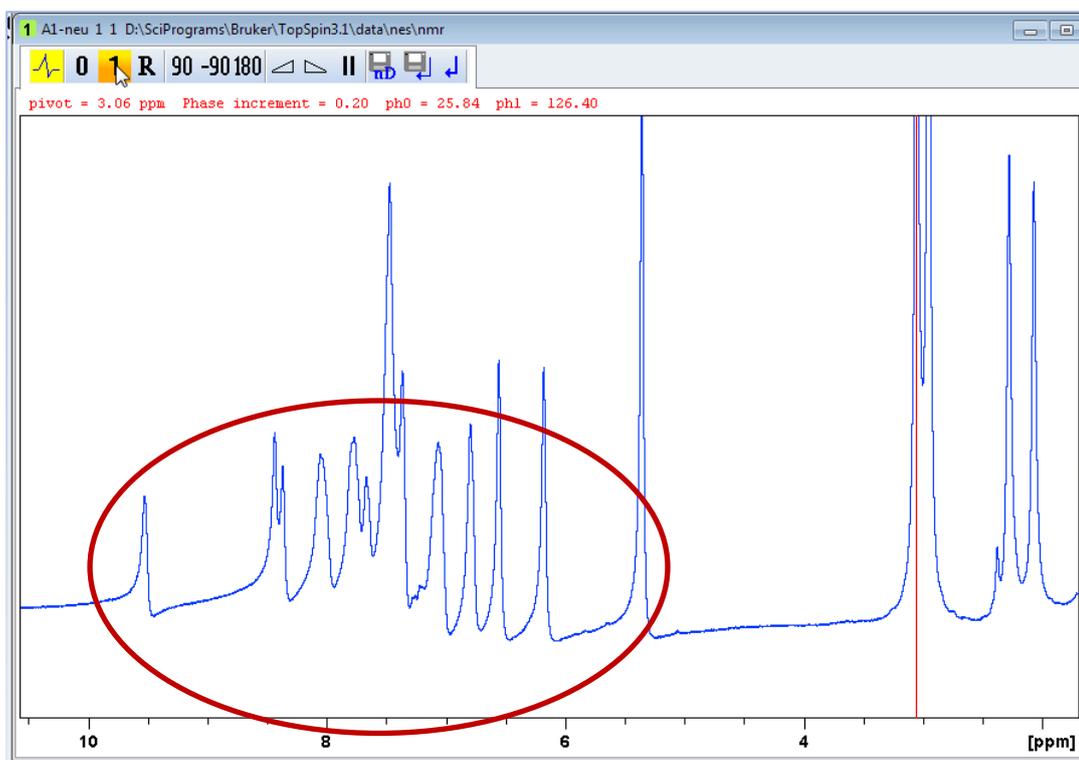
### Standard-Prozessierung von 1D-Spektrendaten

Folgende Schritte sind für die Prozessierung eines 1D-Spektrums immer erforderlich:

- **Fourier-Transformation:** Hierbei sollte darauf geachtet werden, dass die Anzahl von Datenpunkten für den FID (Parameter „td“ in Kommandozeile abfragen) so groß ist wie die Anzahl Punkte, die für die Digitalisierung des Spektrums eingesetzt wird („si“ abfragen). „si“ sollte gleich oder doppelt so groß sein wie td. Der Glättungsfaktor (Parameter „lb“) sollte zwischen 0.1 Hz ( $^1\text{H}$ ) und 3 Hz ( $^{13}\text{C}$ ) gewählt werden. Anschließend wird das Spektrum mit dem Kommando „ef“ umgerechnet.
- **Phasenkorrektur:** Das Phasierungsmenü wird durch Klick auf den Reiter „Process“ und dann Wahl des in der darunterliegenden Zeile befindlichen Registers „Adjust Phase“  (Kommando „.ph“). Im nun Phasierungsmenü wird automatisch das stärkste Signal für die Phasenkorrektur 0ter Ordnung gewählt und mit einer roten Linie markiert. Für den ersten Schritt sollte immer ein Signal hoher Intensität und am linken oder rechten Ende des Spektrums ausgewählt werden (manuelle Wahl des Signals durch Verschieben des Cursorpfeils auf das Signal und Rechtsklick, „set pivot point“).

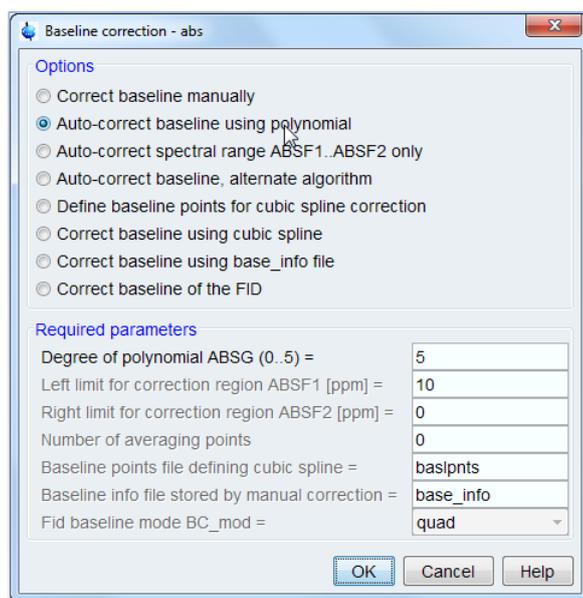


Die Phasenkorrektur 0ter Ordnung wird durch Klicken auf **0** und Gedrückt-Halten der linken Maustaste und anschließendes Ziehen/Schieben der Maus durchgeführt. Nur das ausgewählte Signal wird korrekt phasiert. Danach wird die Phasenkorrektur 1ter Ordnung durch Klick auf **1**, Gedrückt-Halten der linken Maustaste und anschließendes Ziehen/Schieben der Maus durchgeführt. Dabei konzentriert man sich auf die korrekte Phasierung der Signale des zum ausgewählten Signal entgegengesetzten Endes des Spektrums.

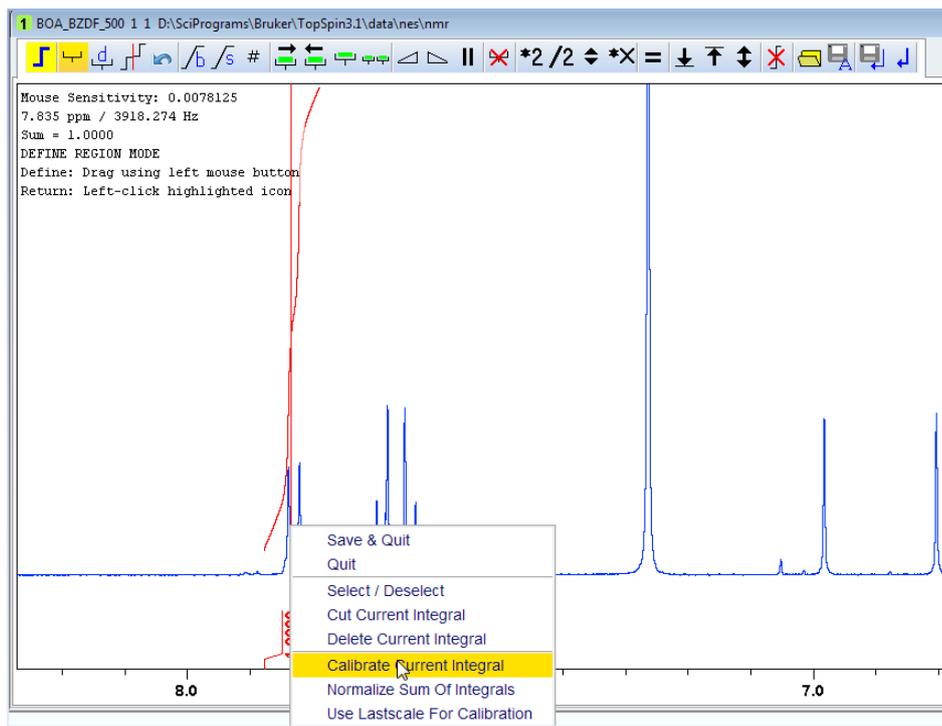


Weniger ratsam ist meist die automatische Phasierung mit dem Kommando „apk“.

- **Basislinienkorrektur:** Hierzu wird in der Kommandozeile „bas“ eingegeben, aus dem Menü wird die Option „Auto-correct baseline using polynomial“ ausgewählt

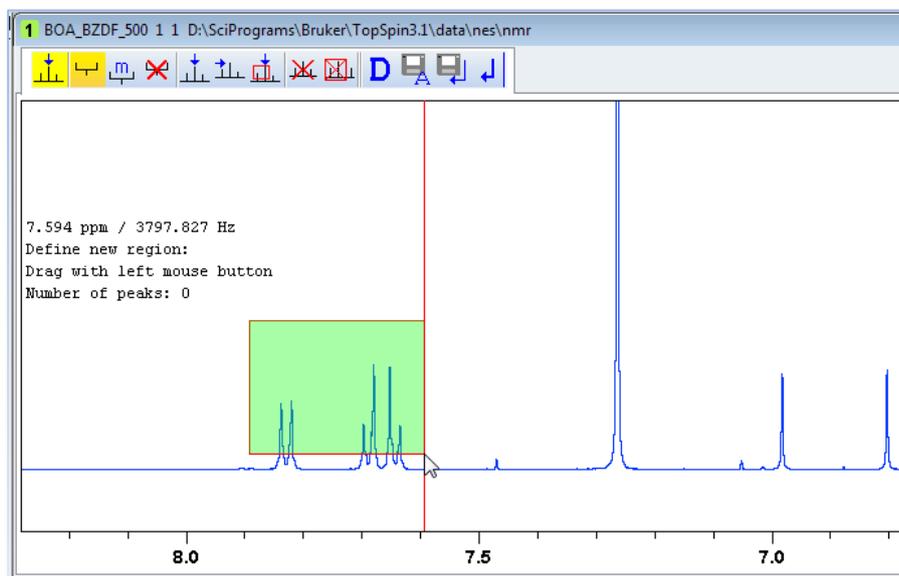


- Integration:** Dieser Schritt entfällt bei  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren! Das Integrationsmenü wird durch Klick auf den Reiter „Process“ und anschließende Wahl des in der darunterliegenden Zeile befindlichen Registers „Integrate“  (Kommando „int“) aktiviert. Die Integrale werden über den Signalen aufgezogen, indem mit links geklickt und dann bei gedrückter Maustaste der Cursor über das zu integrierende Signal gezogen wird. Der dem Integral zugewiesene Wert kann durch Verschieben des Cursors auf den Integralbereich, Rechtsklick und Auswahl von „Calibrate Current Integral“ geändert werden.



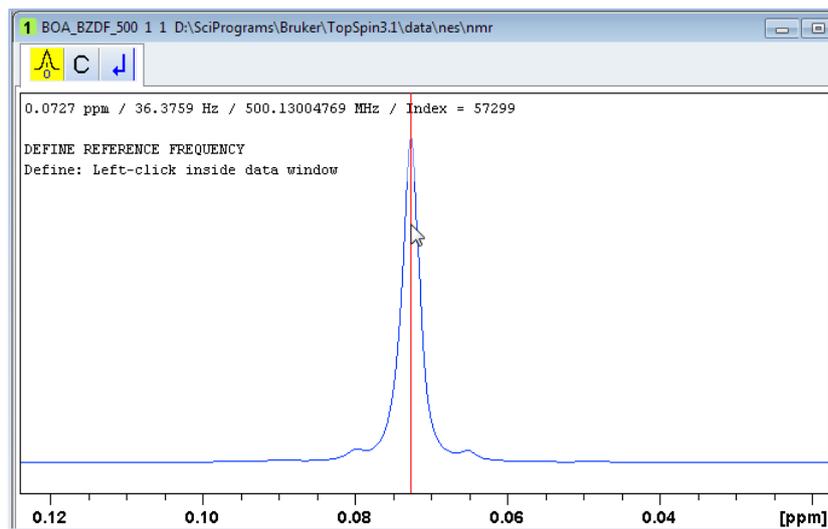
Nach Integration aller interessierenden Signale wird das Integrationsmenü durch Klick auf  verlassen. Eine automatische Integration ist mit dem Kommando „int auto“ möglich.

- Peak-Picking:** Zum Picking der Signale kann das entsprechende Menü durch Klick auf den Reiter „Process“ und anschließende Wahl des in der darunterliegenden Zeile befindlichen Registers „Pick Peaks“  (Kommando „pp“) aktiviert werden. Die interessierenden Signale werden dann ausgewählt, indem man mit gedrückter linker Maustaste eine Rechtecksfläche über ihnen aufzieht.



Das Peak-Picking-Menü wird durch Klick auf  beendet.

- **Referenzierung:** Spektren sollten stets auf das Signal einer Standard-Referenzsubstanz (meist TMS) kalibriert werden. Hierzu wird zunächst der Signalbereich des TMS-Signals herausgespreizt und dann das Kalibrierungs-Menü durch Klick auf den Reiter „Process“ und Wahl des in der darunterliegenden Zeile befindlichen Registers „Calib. Axis“  (Kommando „cal“) aktiviert. Der Cursor wird dann genau auf die Mitte des Referenzsignals gesetzt und die Frequenz durch Linksklick markiert.

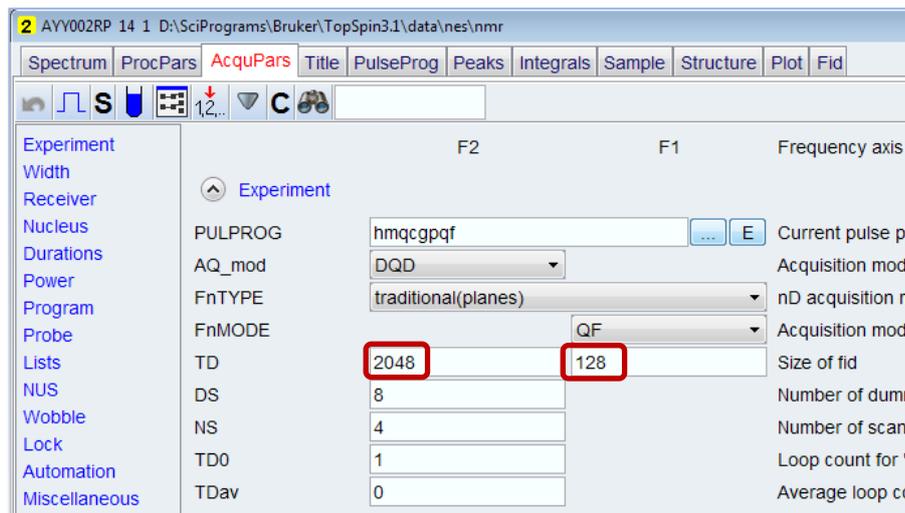


Im Pop-Up-Fenster wird nun die Verschiebung für das Standard-Signal (0 ppm bei TMS) eingegeben.

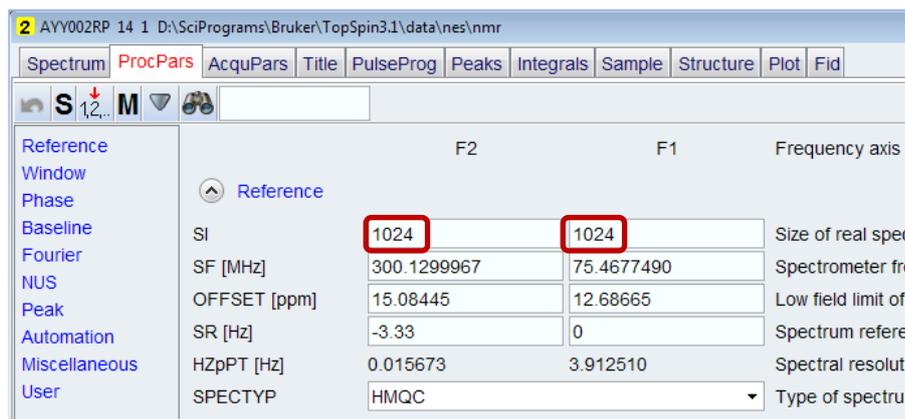
## Standard-Prozessierung von 2D-Spektrendaten

Folgende Schritte sind für die Prozessierung eines 2D-Spektrums erforderlich:

- **Fourier-Transformation:** Bei 2D-Experimenten sollte zunächst mit dem Kommando „eda“ das Acquisitionsparameter-Fenster geöffnet und überprüft werden, wie viele Datenpunkte für die Aufnahme der sog. direkte Dimension (Spaltentitel „F“) und der sog. indirekte Dimension (Spaltentitel „F1“) verwendet wurden.



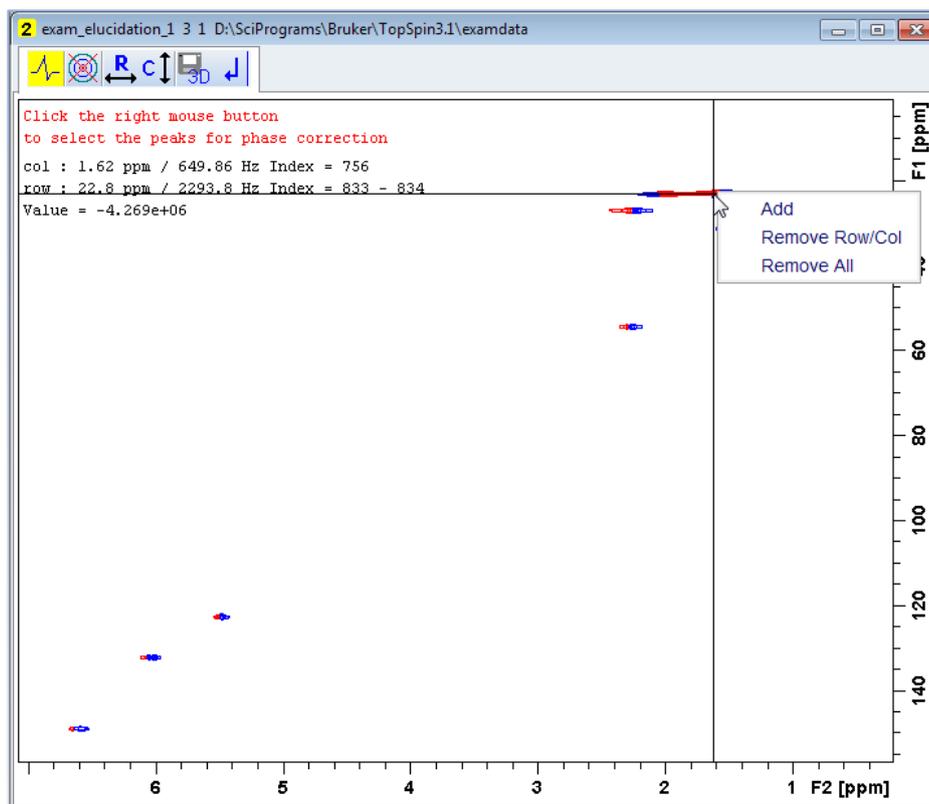
Anschließend öffnet man das Prozessierungsparameter-Fenster mit dem Kommando „edp“ und setzt hier eine gleich große Zahl von Datenpunkten für die direkte und die indirekte Dimension ein (als Faustregel gilt: bei Aufnahme von 1k Datenpunkten in F2 sollten auch 1k bis 2k Datenpunkte für die Prozessierung von F2 benutzt werden, die Zahl der Datenpunkte für die Prozessierung der indirekten Dimension ist gleich oder halb so groß zu setzen wie die für F2).



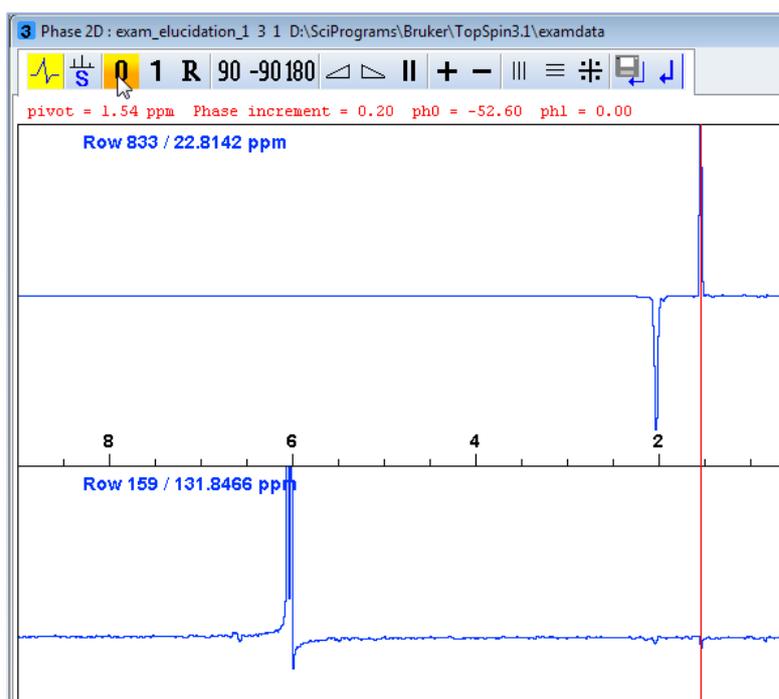
Nun wird das Spektrum mit dem Kommando „xfb“ umgerechnet.

- **Phasenkorrektur:** Bei Spektren im magnitude-mode (z.B. Standard-COSY, -HMQC oder -HMBC) entfällt dieser Schritt. Bei phasensensitiven 2D-Spektren (NOESY, HSQC, editiertes HSQC) wird nun die Phase der Signale korrigiert. Das Phasierungs-menü wird durch Klick auf den Reiter „Process“ und dann Wahl des in der darunterliegenden Zeile befindlichen Registers „Adjust Phase“ (Kommando „.ph“) geöffnet. Zunächst wird ein Signal im oberen, rechten Bereich des Spektrums durch Platzieren des Cursor-Fadenkreuzes auf dem Signal und anschließenden

Rechtsklick markiert. Anschließend verfährt man genauso mit einem weiteren Signal im unteren, linken Bereich des Spektrums.

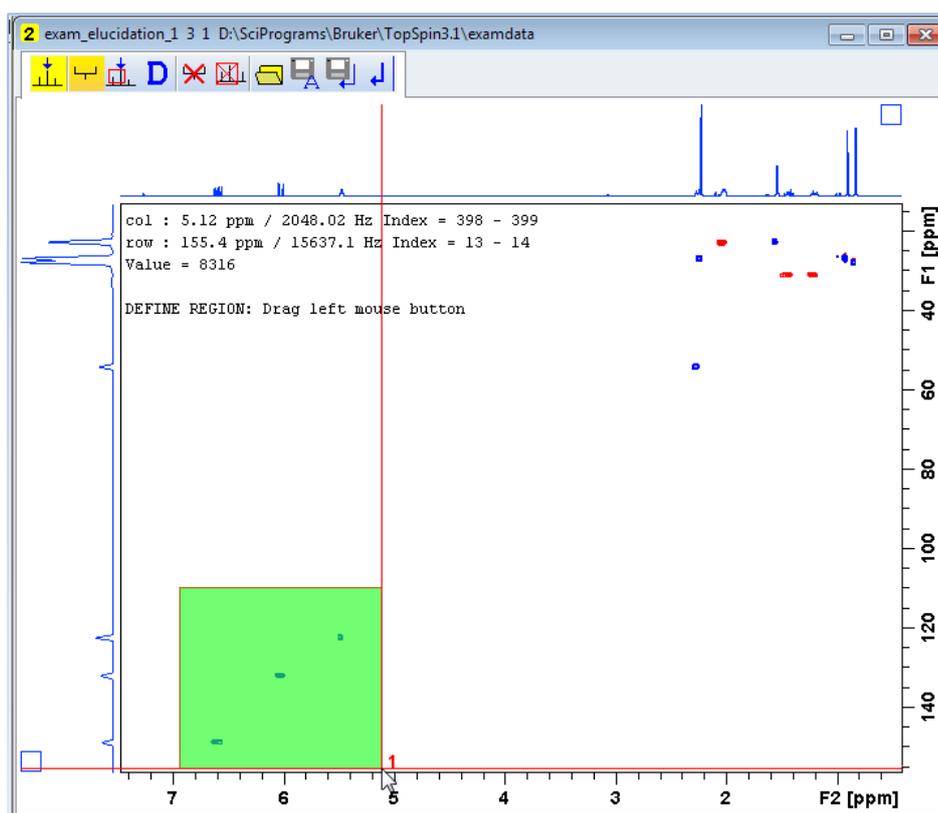


Durch Klick auf das Icon **R** des Phasierungsmenüs werden nun die ausgewählten 1D-Bereiche des Spektrums parallel angezeigt. Die Software wählt ein Signal zur Durchführung der Phasenkorrektur 0ter Ordnung vor (siehe Beschreibung im 1D-Teil), an dem wie oben beschrieben eine Phasenkorrektur durchgeführt wird.



Je nach Typ des Spektrums kann das Signal nach oben oder unten phasiert werden. Danach wird durch Klick auf **1** eine Phasenkorrektur 1ter Ordnung an dem zweiten Signal, das in der unteren Spur dargestellt ist, durchgeführt. Anschließend wird das Phasierungsmenü durch Klicken auf  und  wieder verlassen.

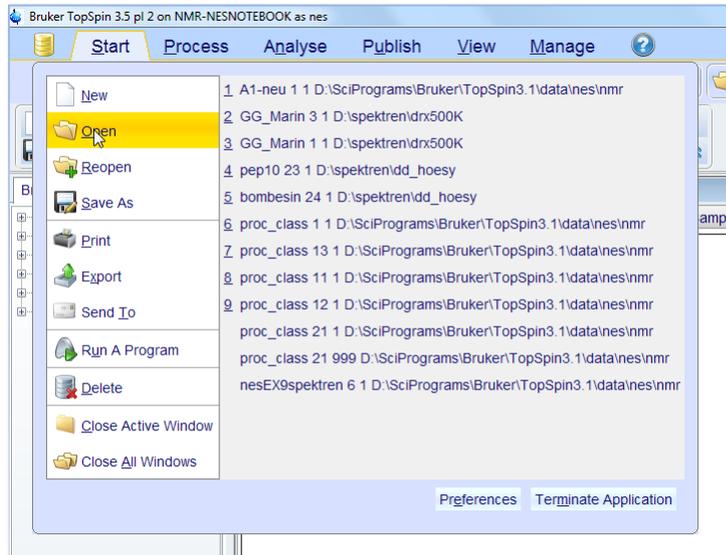
- **Basislinienkorrektur:** Hierzu wird wie bei der 1D-Prozessierung beschrieben in der Kommandozeile „bas“ eingegeben und aus dem Menü wird die Option „Auto-correct baseline using polynomial“ ausgewählt. Es sollte in beiden Frequenzdimensionen eine Korrektur durchgeführt werden, weshalb zuerst das linke Kästchen (F2) und beim zweiten Durchgang das rechte Kästchen (F1) aktiviert sein sollte. Stattdessen können auch nacheinander die Kommandos „abs2“ und „abs1“ eingegeben werden.
- **Peak-Picking:** Analog wie beim Prozessieren von 1D-Spektren kann das entsprechende Menü durch Klick auf den Reiter „Process“ und anschließende Wahl des in der darunterliegenden Zeile befindlichen Registers „Pick Peaks“  (Kommando „-pp“) aktiviert werden. Die zu pickenden Signalbereiche werden durch Aufziehen von Rechtecken markiert, anschließend werden die darin befindlichen Signale durch Klick auf  automatisch gepickt. Wenn Signale von Hand gepickt werden sollen müssen sie lediglich per Rechtsklick mit der Maus („Add Peak to List“) markiert werden.



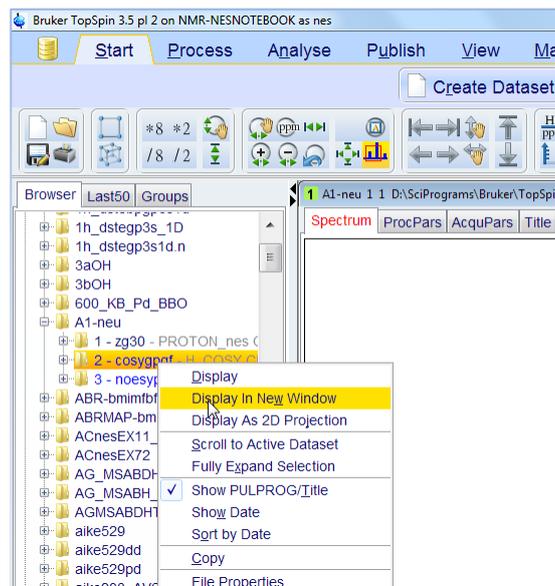
Nachdem alle Signale markiert wurden verlässt man das Menü durch Klicken auf  wieder.

## Öffnen von Spektrendaten

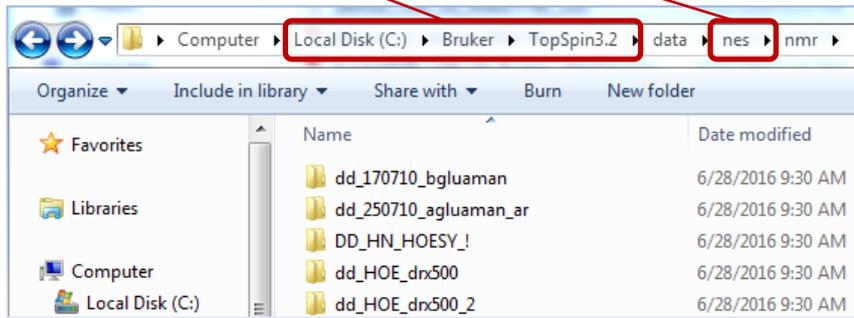
Das Öffnen von Spektren erfolgt z.B. durch Klicken auf das Icon  links oben (Kommandozeile „reb“). Nach Klick auf „ok“ muss das entsprechende Unterverzeichnis (10, 11, ... o.ä.) aus dem Spektrenordner angewählt werden, das geöffnet werden soll, und die Option „display“ gewählt werden.



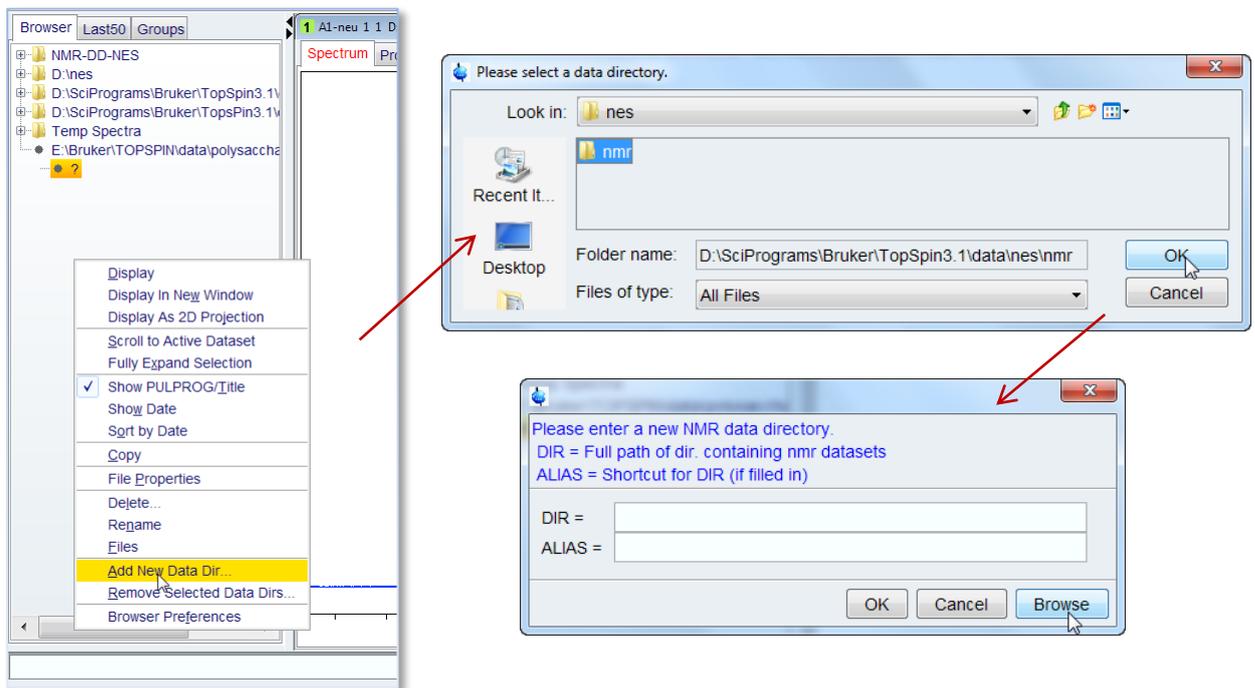
Die während einer Sitzung geöffneten Spektren sind in der links im TopSpin-Fenster befindlichen „Last50“-Leiste zu sehen. Sollen mehrere Spektren in verschiedenen Fenstern geöffnet werden, dann markiert man das in einem neuen Fenster zu öffnende Spektrum in der Liste und klickt rechts, es muss „Display in New Window“ ausgewählt werden.



Insbesondere für ältere Installationen der Software ist ein Verzeichnispfad mit der Struktur `<dir>\data\<user>\nmr\<dataset name>` notwendig (`<dir>` = Installationsverzeichnis von TopSpin, `<user>` = vom individuellen Nutzer benanntes Unterverzeichnis), bei dem alle Spektren aus den Messungen in das Verzeichnis `... \nmr\...` abgelegt werden, z.B. wie bei `C:\Bruker\topspin\data\guest\nmr\exam1d_13C`, wo der Nutzer „guest“ das Spektrum „exam1d\_13C“ abgelegt hat.



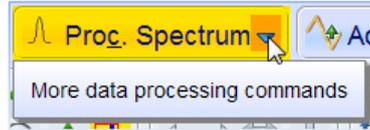
Unter TopSpin können solche Verzeichnisse durch Rechtsklick in die „Browser“-Leiste links im TopSpin-Fenster eingehängt werden: Zuerst auf „Add New Data Dir“ klicken, dann auf „Browse“ und den Pfad bis einschließlich dem Verzeichnis „... \nmr“ auswählen, dann ein „Alias“ zur Bezeichnung definieren.



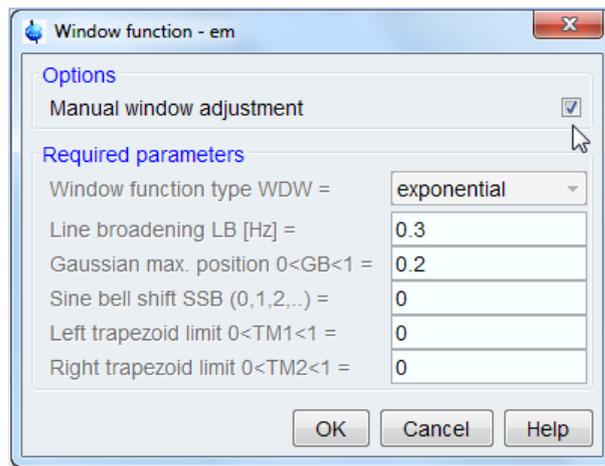
## Einige Tipps zur Prozessierung:

### Wahl der Fensterfunktion

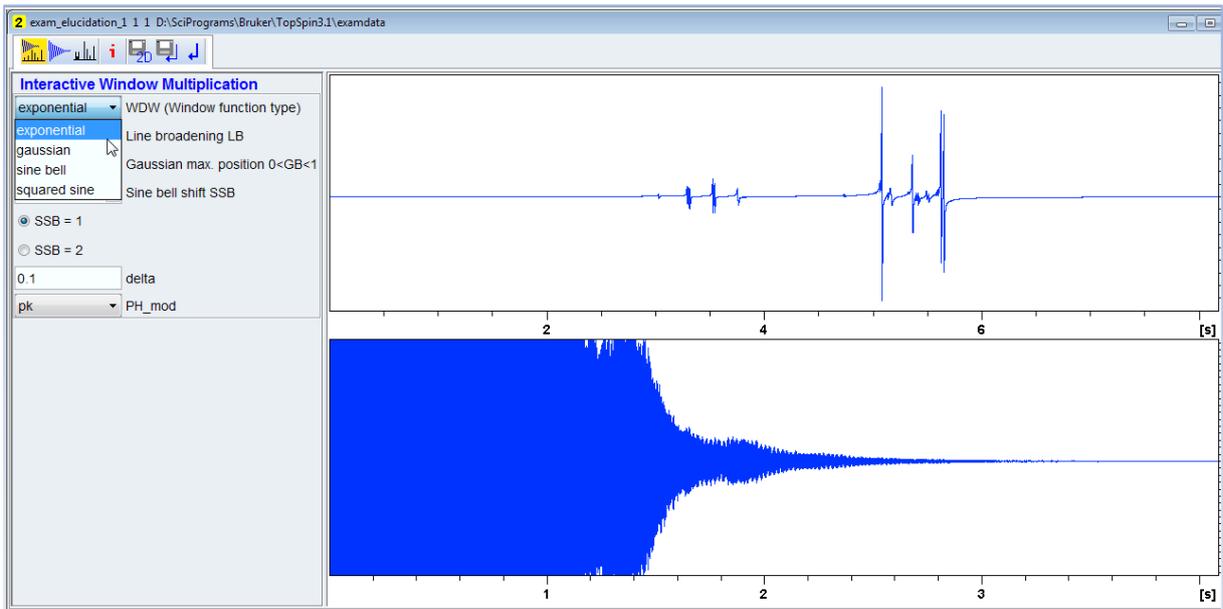
Die Wirkung der gewählten Fensterfunktion („window function“), mit der unterschiedliche Bereiche des FIDs zur Prozessierung gewichtet werden, lässt sich mit Hilfe der Option für manuelle Justierung der Fensterfunktion beobachten. Hierzu wird im Prozessierungs-Menü zuerst der Pfeil rechts neben „Proc. Spectrum“ markiert.



Danach wird die Option „Window multiplication“ ausgewählt und im Pop-Up-Fenster die Box „Manual window adjustment“ aktiviert.



Nun kann durch Änderung der Parameter/Funktionen interaktiv der Einfluss auf Spektrum und FID beobachtet werden.

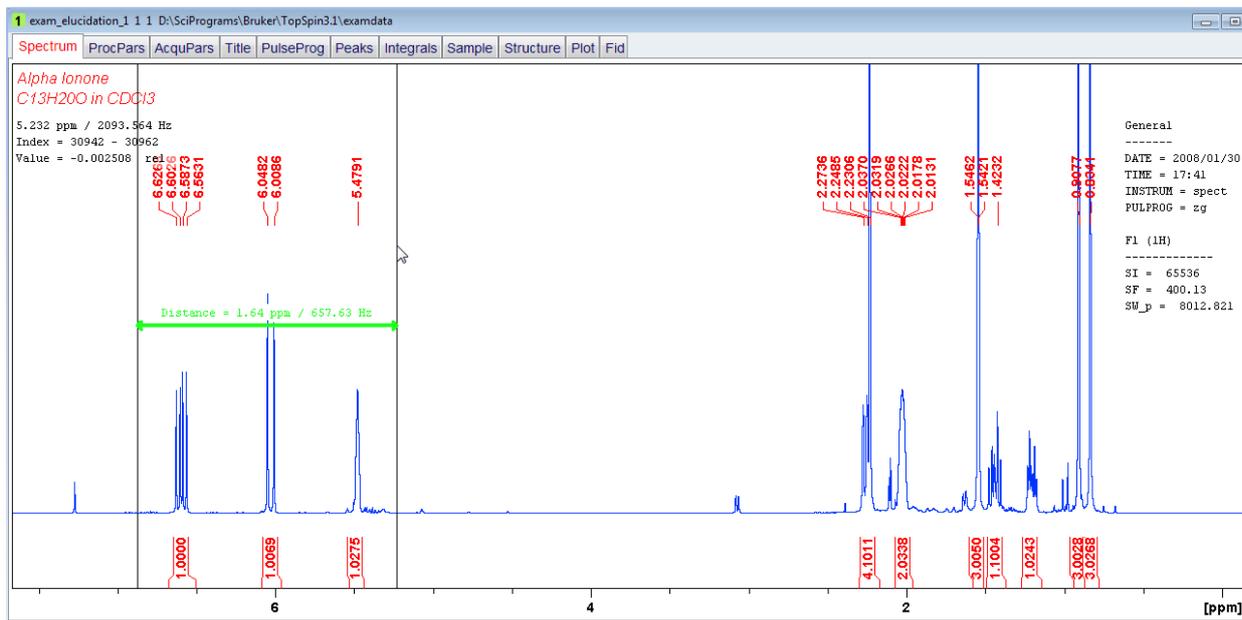


## Möglichkeiten zur Manipulation der Spektrendarstellung im aktiven Fenster

Zum Spreizen, zur Intensitätsänderung, zum Verschieben der Basislinie etc. lässt sich meist die Maus am einfachsten einsetzen. So kann man beispielsweise die Anzeige der Signalintensität erhöhen oder verringern, indem man den Cursor in den aktiven Spektrenbereich bringt und mit dem Mausekranz arbeitet. Eine andere Möglichkeit sind die Icons im linken oberen Menübereich, mit denen die Intensität durch Multiplikation/Division mit/durch einen Faktor geändert oder auch stufenlos durch Klicken und Gedrückt-Halten der linken Maustaste erhöht oder erniedrigt werden kann.



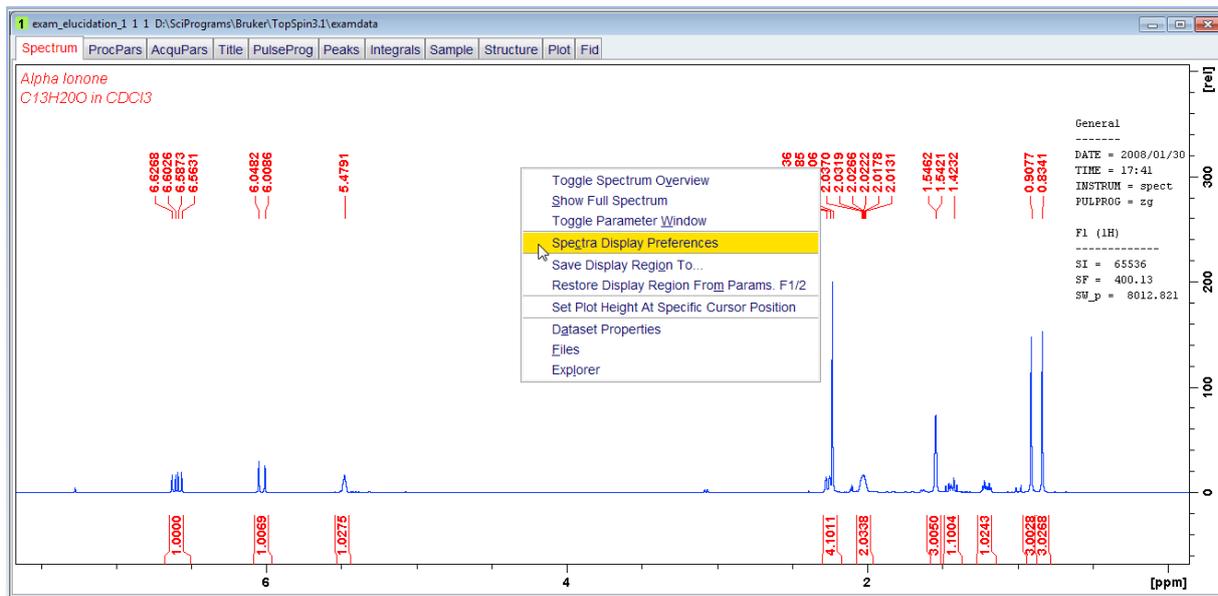
Um einen Bereich aus dem Spektrum zu vergrößern, kann dieser durch Linksklick und anschließendes Ziehen der Maus über den interessierenden Bereich ausgewählt werden.



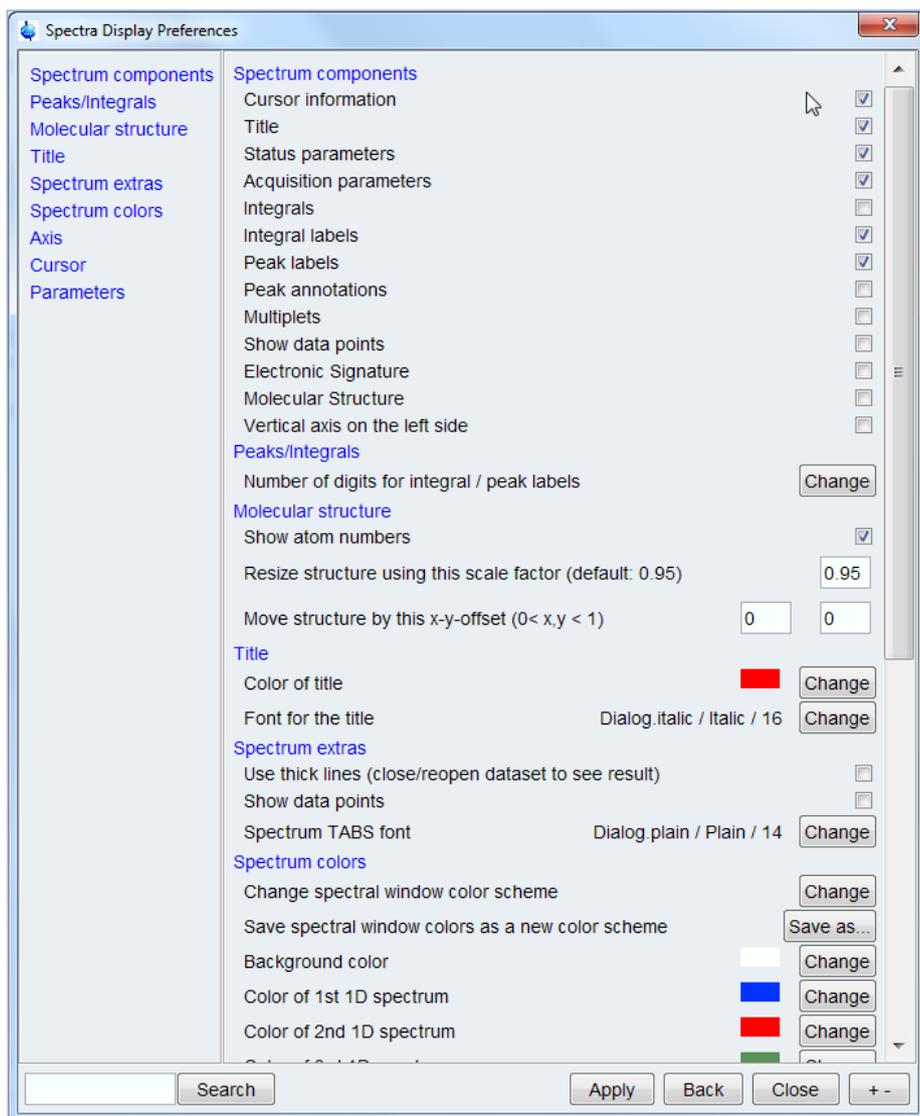
Ein exakter Bereich für die Ausschnittwahl kann durch Klicken auf definiert werden. Das Gesamtspektrum kann dann durch Klick auf wieder angezeigt werden.

## Einstellung der Display-Optionen für das aktive Spektrum

Sowohl bei der Prozessierung von 1D- als auch 2D-Experimenten können verschiedene Anzeige-Modi ausgewählt werden. Z.B. können die Integralfunktionen, -werte, Peak-Anzeigen, Titel, Cursor- und Statusparameter im aktiven Spektrenfenster selektiv für die Anzeige an- und abgewählt werden. In diesen Teil des Menüs gelangt man, indem man den Maus-Cursor in den Spektrenbereich verschiebt und dort einen Rechtsklick setzt.

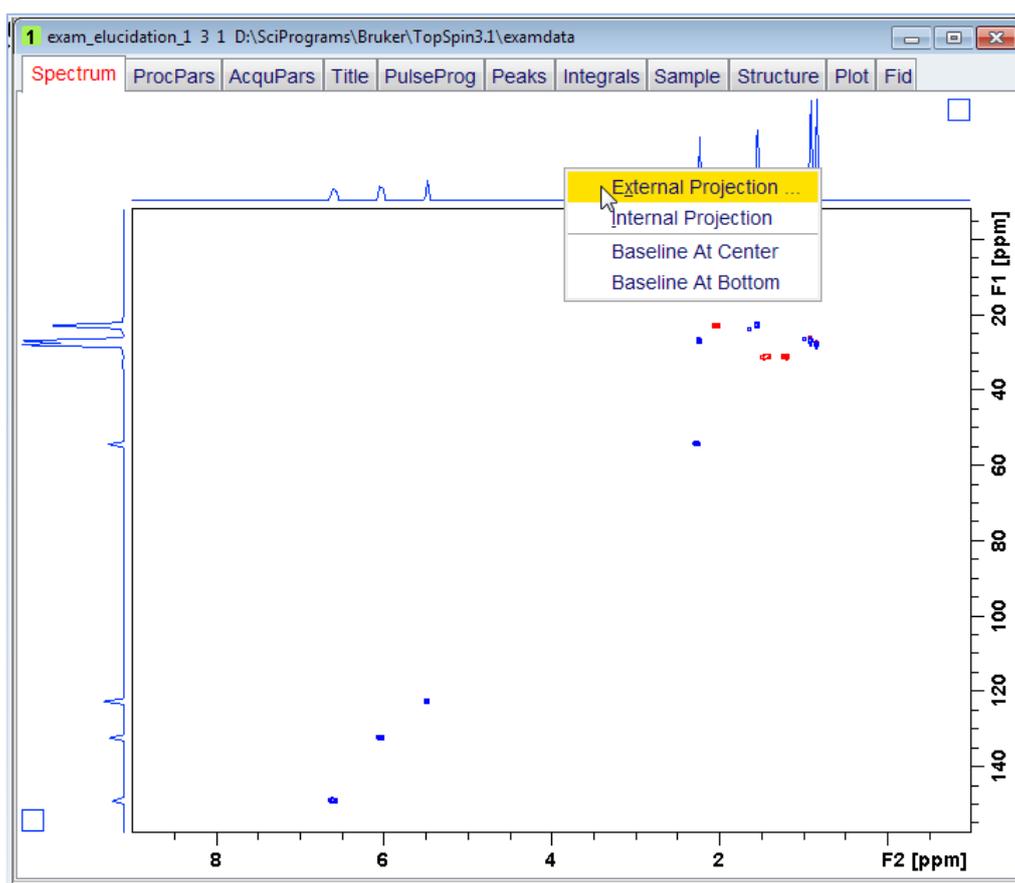


Durch Auswahl der Option „Spectra Display Preferences“ öffnet sich ein Pop-Up-Fenster, in dem eine Vielzahl von Anzeige-Einstellungen vorgenommen werden können. Die Anzeige kann mit Hilfe der Boxen in der rechten Spalte selektiv (de)aktiviert werden.



Insbesondere bei der Benutzung der direkten Plot-Funktion („Publish“-Menü) können hierdurch die notwendigen Einstellungen vorgenommen werden.

Zur Anzeige von 1D-Projektionen am aktiven 2D-Spektrum wird automatisch von TopSpin die Summen-Projektion entlang der Dimensionen dargestellt. Stattdessen können jedoch auch (zuvor prozessierte) 1D-Spektren angezeigt werden. Hierzu setzt man den Cursor auf den Bereich der gewünschten Projektion und klickt mit der rechten Maustaste („External Projection“).



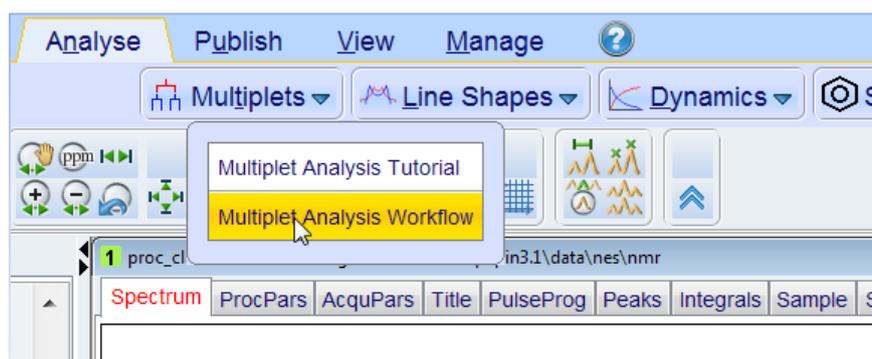
Im sich öffnenden Pop-Up-Fenster wird das entsprechende 1D-Experiment eingetragen, das an Stelle der Projektion angezeigt werden soll.

Options	
<input checked="" type="radio"/>	Display data in same window
<input type="radio"/>	Display data in new window
NAME =	exam_elucidation_1
EXPNO =	3
PROCNO =	1
DIR =	D:\SciPrograms\Bruker\TopSpin3.1

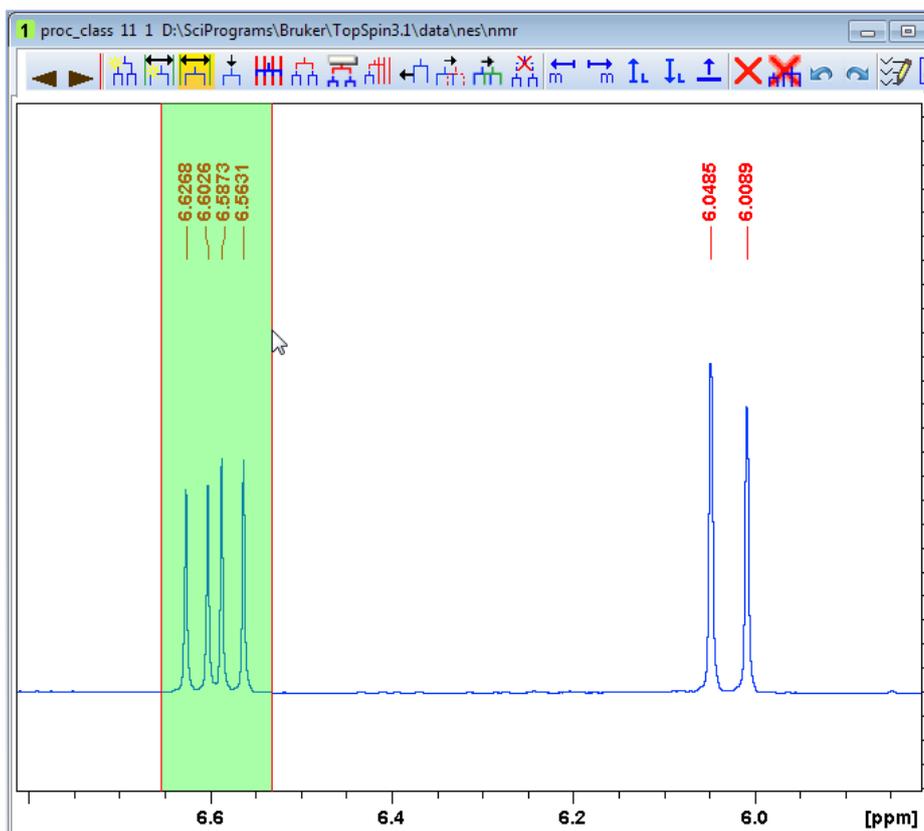
Aus der Kommandozeile können die zuvor genannten Einstellungen mit „projd“ aufgerufen und geändert werden.

### Benutzung der Multipllett-Erkennung von TopSpin

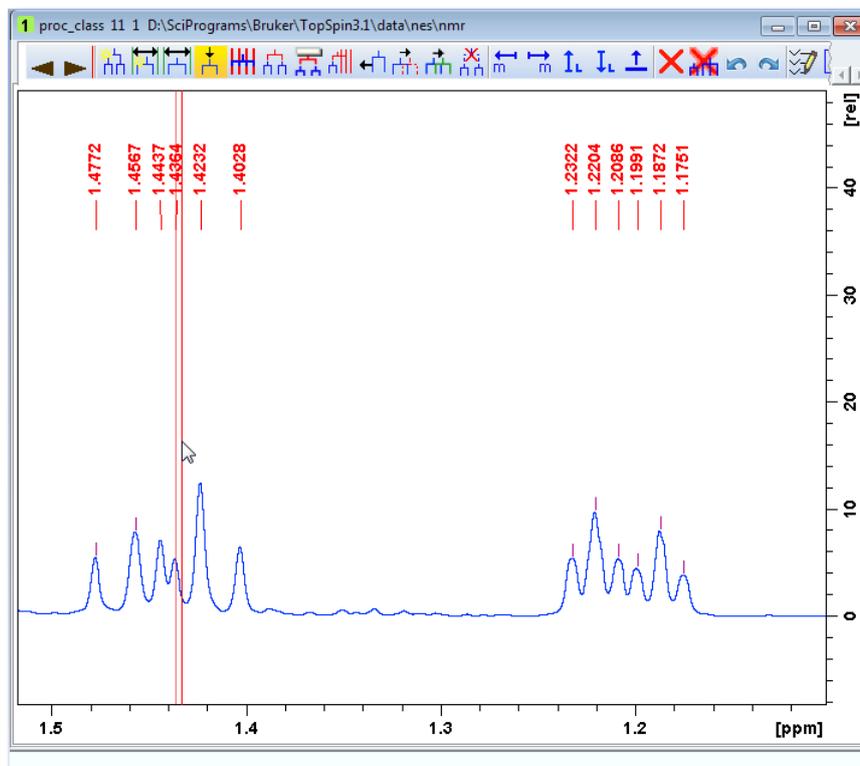
Vor der Anwendung dieser Funktion müssen das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum bereits prozessiert und die interessierenden Signale einem Peak-Picking unterzogen worden sein. Für die Multipllett-Erkennung wird das entsprechende Menü durch Klick auf den Reiter „Analyse“ und anschließende Wahl des in der darunterliegenden Zeile befindlichen Registers „Multiplets“ (Kommando „pp“) aktiviert.



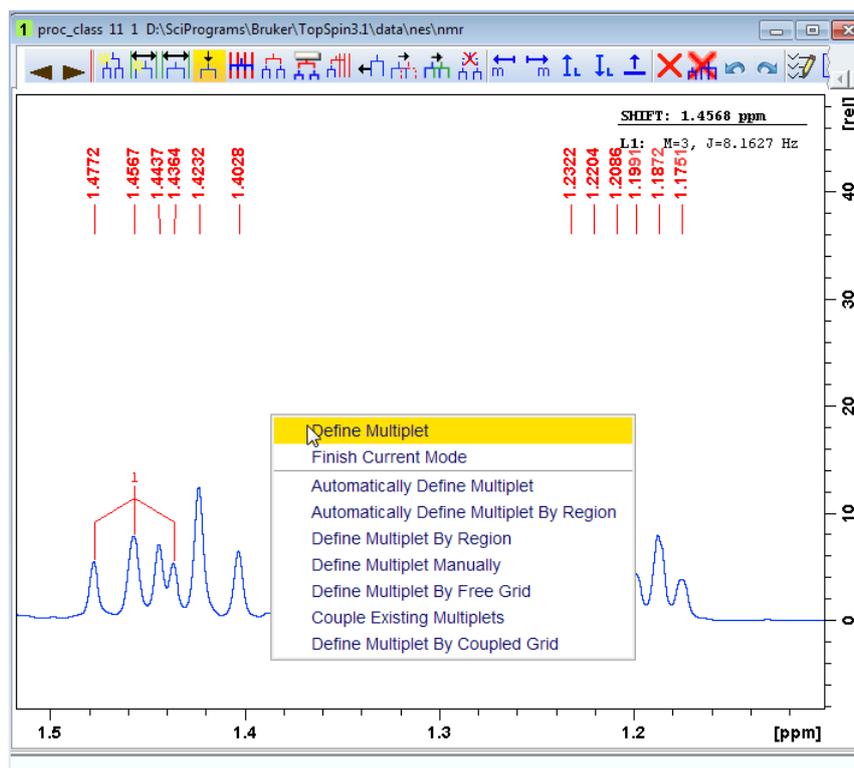
In der aktivierten Multipllett-Analyse können entweder alle Multiplletts einer automatischen Analyse unterzogen werden (durch Klick auf ) – dieses Vorgehen empfiehlt sich aber außer bei sehr einfachen Aufspaltungen erster Ordnung weniger. Im Normalfall sollte der Bereich um interessierende Multiplletts herausvergrößert werden und dann auf  (im ausgewählten Bereich wird eine automatische Multipllettanalyse durchgeführt) oder  (alle Linien werden demselben Multipllett zugeordnet) geklickt werden.



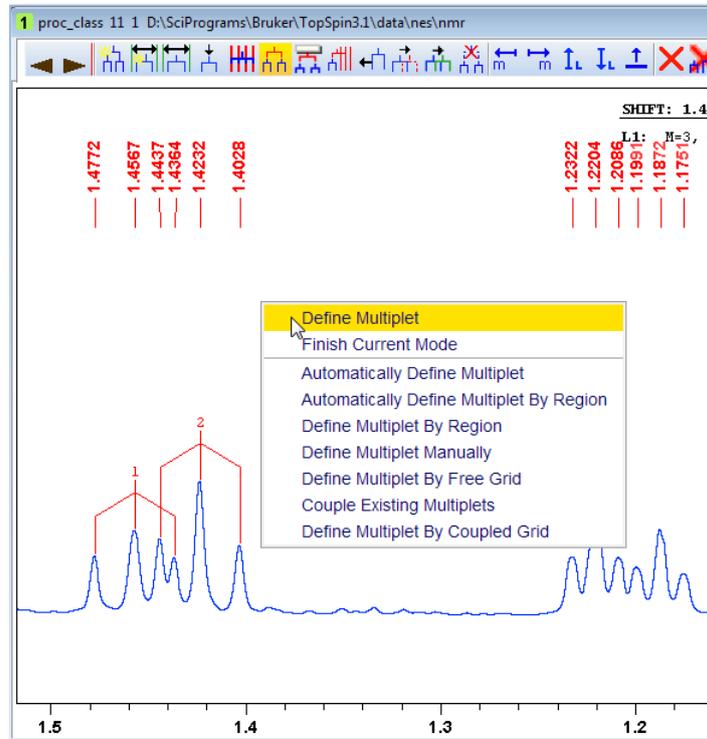
Bei komplexeren Multipletts können zusammengehörige Linien mit dem Icon  auch manuell ausgewählt werden. Durch Verschieben des Cursors rasten die angezeigten, blassroten Linien auf allen Signalen ein – erst nach Linksklick wird das Signal aber als zum Multiplett zugehörig definiert, so dass auch Linien ausgelassen werden können.



Um die so markierten Linien zu einem Multiplett zu koppeln wird nach Rechtsklick die Option „Define Multiplet“ ausgewählt.



Mehrere auf diese Weise vordefinierte Multipletts können anschließend verknüpft werden, indem das Icon aktiviert und die zu koppelnden Multipletts jeweils durch Linksklick mit der Maus markiert werden (der Spinschlüssel so aktivierter Multipletts färbt sich rot). Nach Rechtsklick und Auswahl von „Define Multiplet“ wird so ein gekoppeltes Multiplett erzeugt.



Die Werte der Kopplungskonstanten können aus der Kopplungstabelle entnommen werden, die mit dem Icon sichtbar gemacht werden kann.

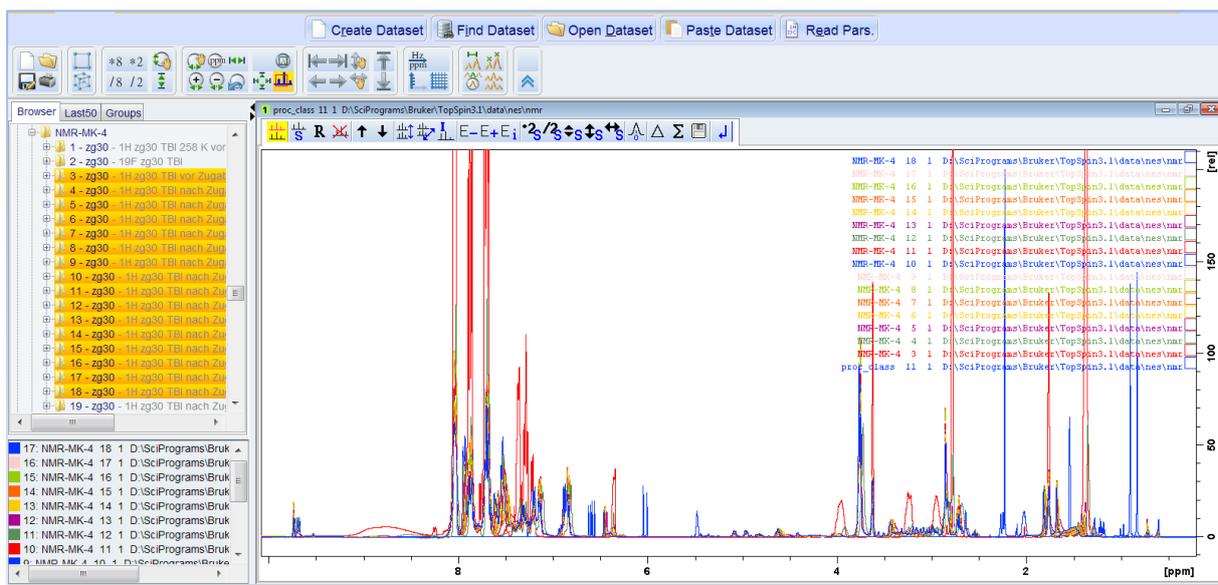
### Export von Listen (Peaks, Integrale, Kopplungen)

Peak- und Integrallisten können durch Anklicken der entsprechenden Reiter im aktiven Spektrenfenster („Peaks“, bzw. „Integrals“) inspiziert und nach Rechtsklick („Export...“) in verschiedenen Formaten exportiert werden. Im Fall von Kopplungstabellen muss das Multiplett-Erkennungsmenü aktiviert sein, dann können durch Klick auf verschiedene Export-Formate gewählt werden („JMR“ ist ein Zeitschriftenformat, „Exp.“ das übliche Zeitschriftenformat – diese Zuordnung wird als html-Datei im Prozessierungsverzeichnis abgelegt).

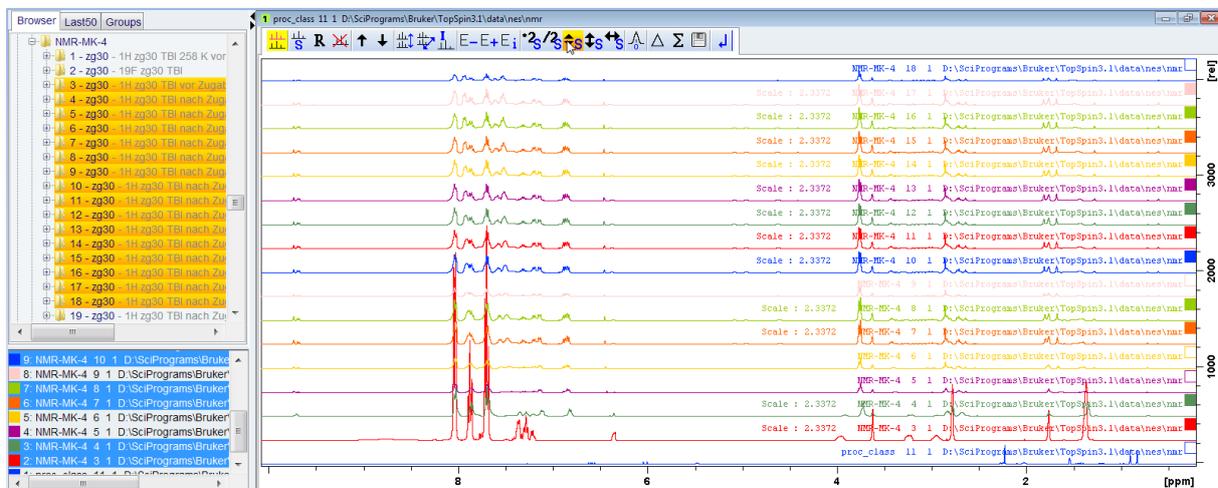
ID	Shift [ppm]	J [Hz]	M	Connection	Int.Label
1	1.4400	13.4244	2	J(1, 0)	1
		8.1727	3	J(1, 0)	
2	1.2041	13.6044	2	J(2, 0)	1
		4.7816	3	J(2, 0)	

## Erstellen eines Stacked Plots

Zum Erstellen eines Plots mit mehreren hintereinander angeordneten Spektren (für die Darstellung von  $^1\text{H}$ - und 1D-NOE-Spektren,  $^{13}\text{C}$ - und DEPT-Spektren oder Kinetikmessungen) werden die prozessierten 1D-Experimente, die übereinander angezeigt werden sollen, im Browser markiert. Außerdem wird der Modus zur gemeinsamen Darstellung mehrer Spektren („multiple display“) durch Klick auf das Icon aktiviert (Kommando „.md“).



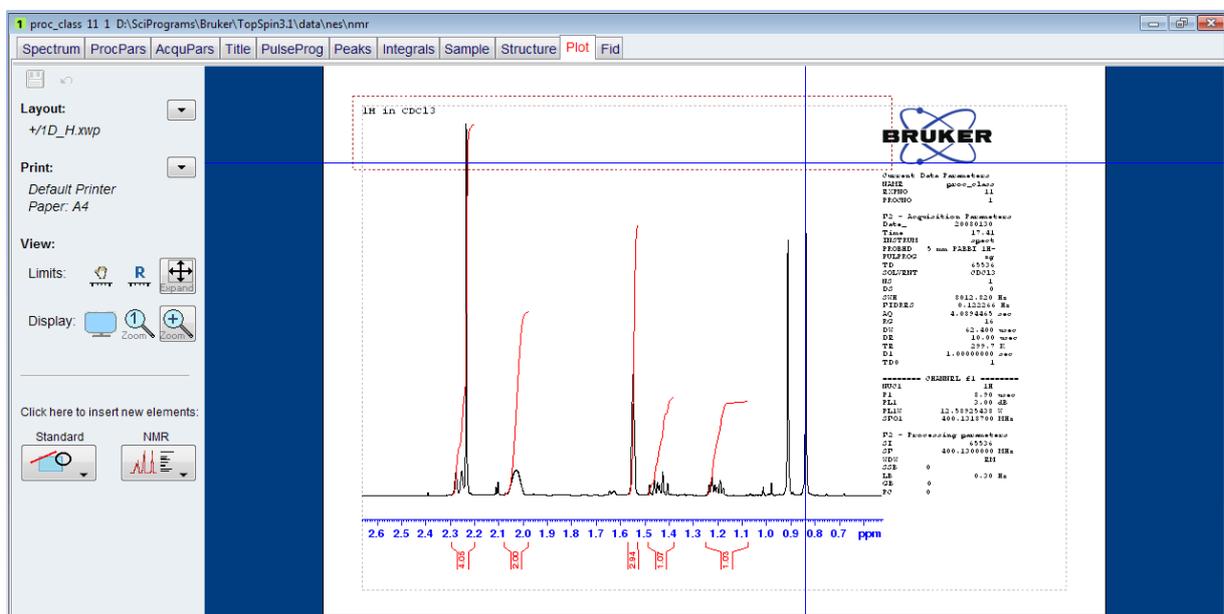
Die markierten Spektren können dann einfach per drag-and-drop in den aktiven Spektrenbereich gezogen werden. Durch Klick auf die Icons oder können die Spektren hintereinander, bzw. versetzt hintereinander dargestellt werden. Die einzelnen Spektren können durch Markierung im linken unteren Kasten oder durch Klick auf die quadratischen Boxen neben den Spektrenangaben rechts im aktiven Fenster selektiert und dann über die Icons direkt über dem Spektrenbereich manipuliert werden.



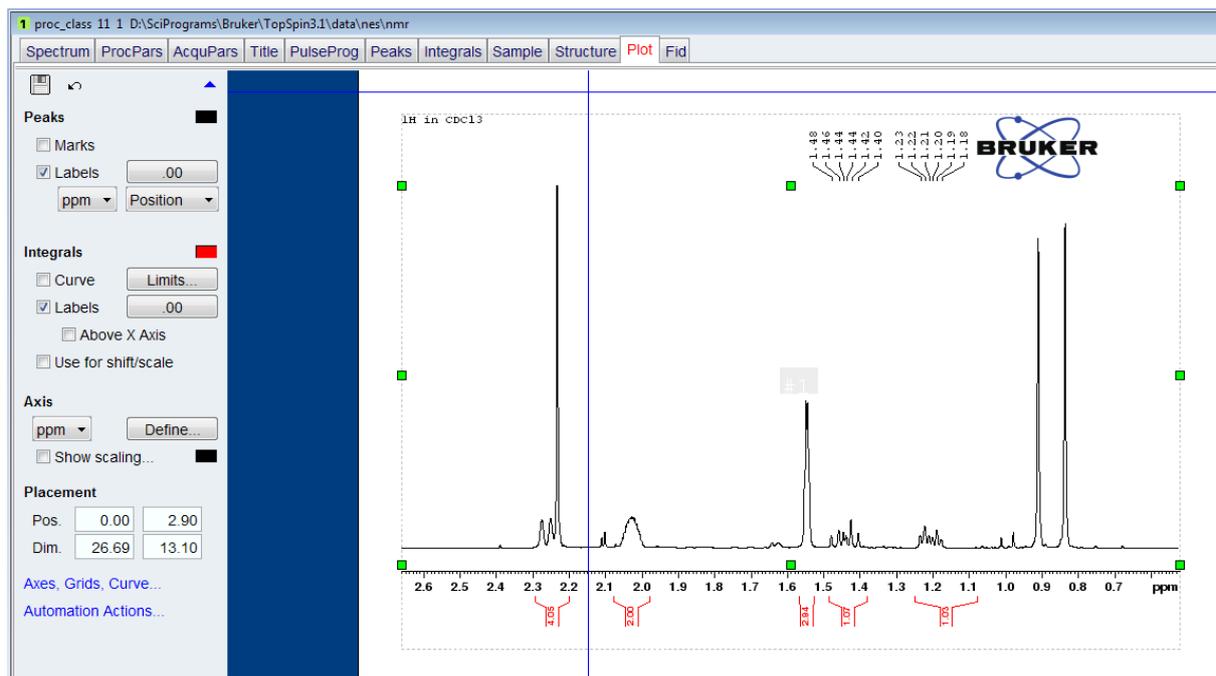
## Erstellen eines einfachen Plots und Erzeugung einer Grafik für Publikationen

Einfache Plots können direkt im „Publish“-Menü durch die Optionen „Copy“ (hiermit wird der aktive Spektrumbereich für das Einfügen in Reports in den Zwischenspeicher kopiert) bzw. „PDF“ (hier werden pdf-Dateien oder auch solche im .png-Format erstellt) erzeugt werden. Dazu wird zuvor über die per Rechtsklick ins Spektrum angewählte Option „Spectra Display Preferences“ die Darstellung des Spektrums für den Plot eingestellt. Das Spektrum kann im aktiven Fenster durch Klicken und Gedrückt-Halten des Icons nach oben oder unten verschoben werden.

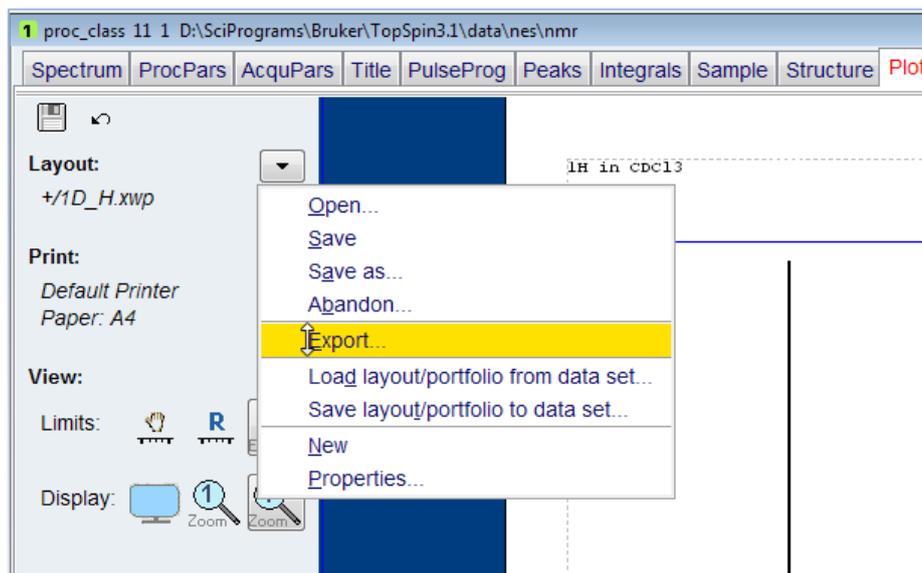
Höherwertige Grafiken von Spektren zur Veröffentlichung in wissenschaftlichen Arbeiten können mit dem in TopSpin integrierten Plot-Editor erzeugt werden. Der Plot-Editor wird durch Klick auf den Reiter „Publish“ und anschließende Wahl des in der darunterliegenden Zeile befindlichen Registers „Plot Layout“ (Kommando „plot“) oder durch Klick auf den Reiter „plot“ über dem aktiven Spektrum geöffnet.



Die einzelnen Bereiche des abgebildeten Spektrums (Spektrum, Titel, Parameter, Logo) werden zunächst auf den im aktiven Spektrenfenster ausgewählten Spektralausschnitt abgestimmt, bzw. können durch Klick auf das Icon (,View', Unteroption ,Limits:') darauf zurückgesetzt werden. Die einzelnen Fensterbereiche können markiert und mit gedrückter Maustaste vergrößert oder verkleinert werden. Solange ein Fenster aktiv ist können dessen Einstellungen (Farbe, Schriftart, ...) eingestellt werden.



Wenn das gewünschte Layout abgeschlossen ist wird in den blauen Bereich geklickt und dann das Pfeil-Icon neben dem „Layout“-Menüpunkt markiert. Die Option „Export“ erlaubt es, die so erzeugte Plot-Datei in verschiedenen Formaten (.pdf, .png, .tif, .jpg, .bmp) an beliebiger Stelle abzuspeichern.



Dazu gibt man im sich öffnenden Fenster den gewünschten Namen der zu erzeugenden Plot-Datei und das gewünschte Extension ein (für eine pdf-Datei z.B. „example.pdf“) und wählt die Auflösung (z.B. 600 dpi für sehr hochauflöste Grafiken).

### Installation der Software

Die Software kann nach Registrierung als Nutzer (<https://www.bruker.com/about-us/register.html>) und anschließende Anmeldung unter <https://www.bruker.com/login.html> über den Link <https://www.bruker.com/nc/service/support-upgrades/software-downloads/nmr/free-topspin-processing.html> heruntergeladen und installiert werden.

Dazu sollte zunächst das heruntergeladene Verzeichnis entpackt werden. Der Nutzer benötigt außerdem Administratoren-Zugriff auf seinem Profil und muss die Ausführung der Installation unter Windows genehmigen.

Sobald das ‚**Setup Tool**‘ von TopSpin in einem Fenster geöffnet wird, können durch Klick auf das „Next“-Icon mehrere Fenster einfach akzeptiert werden (‚Selection of components‘, ‚Release Letter‘, ‚Installation Directory‘, ‚Create?‘), als Typ der Installation wird ‚Data processing only‘ angewählt (mit „Next“ bestätigen). Bei der Frage nach einem ‚NMR Super User‘ wird der eigene Account vorgeschlagen, dies sollte mit „Next“ bestätigt werden. Das ‚NMR Administration Password‘ sollte sorgfältig ausgewählt werden (am besten notieren, da das Zurücksetzen dieser Funktion nicht einfach ist), Bestätigung mit „Next“. Anschließend können wieder mehrere Fenster durch Klick auf „Next“ ohne Änderung akzeptiert werden (‚Installation dir. for data‘, ‚Create?‘, ‚Install. dir. for FLEXlm‘, ‚Firewall system...‘ sowie die nächsten Nachfragen). Zum Abschluss der Installation klicken Sie auf das Icon „Finish“.

Wird TopSpin 3.5 zum ersten Mal gestartet öffnet sich ein ‚**Configuration Check**‘-Fenster: Hier sollten Sie ‚Exp. Install‘ auswählen und das zuvor (siehe vorhergehender Absatz) definierte ‚NMR Administration Password‘ eingeben. Alle folgenden Schritte können einfach durch Klick auf „Next“ akzeptiert werden, ein sich öffnendes Fenster „Warning“ kann durch Klick auf „Close“ ignoriert werden. Zum Schluss wird die so durchgeführte Konfiguration der Software durch Klick auf „Finish“ abgeschlossen. Die Möglichkeit, ein optionales automatisches Backup einzurichten liegt in Ihrem Ermessen, ist aber nicht erforderlich.