

# Unterdrückung von Lösungsmittelsignalen

Christian Richter

Goethe-University Frankfurt  
[ric@nmr.uni-frankfurt.de](mailto:ric@nmr.uni-frankfurt.de)



PPNMR2023, Berlin 21. & 22.03.2023 – Tutorial: Unterdrückung von Lösungsmittelsignalen – Christian Richter

## Überblick

- **Einleitung**
- **1D-Wasserunterdrückungsexperimente vor dem Ausleseimpuls**
- **1D-Wasserunterdrückungsexperimente nach dem Ausleseimpuls**
- **Weitere Optimierung**
- **Implementierung der Wasserunterdrückung in 2D-Sequenzen**

Signale, die sich mit Wassersignalen (+/- 3 ppm) überlappen, können nicht erkannt werden

Konzentrationsunterschiede:

110 M H<sub>2</sub>O versus 0,5 mM Protein oder RNA → Faktor 100.000

Dynamic Range Problem

Das Wasser trägt den größten Teil der Intensität des aufgezeichneten FIDs bei. Daher muss die Verstärkung des Empfängers reduziert werden, und das interessierende Signal kann nur unzureichend digitalisiert werden.

Radiation Damping -- Strahlungsdämpfung

Die starke Magnetisierung des Wassersignals induziert Ströme in der NMR-Spule, die Magnetfelder erzeugen, was zu einer Linienverbreiterung führt.

Zheng & Price Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy 56 (2010) 267–288



## Strahlungsdämpfung

**Der durch die Strahlungsdämpfung (RD) induzierte Linienverbreiterungseffekt ist gegeben durch:**

$$T_{RD} = \frac{2}{\gamma \mu_0 \eta Q M_0}$$

$\gamma$	gyromagnetic ratio
$\mu_0$	magnetic permeability
$M_0$	equilibrium magnetization
$\eta$	filling factor of the probe
$Q$	quality factor of the probe

Die Strahlungsdämpfung nimmt zu

bei höherer Wasserkonzentration

bei höherem Magnetfeld

mit empfindlicheren Probenköpfen (CryoProbe)

mit größeren Röhrendurchmesser, z.B. 5mm versus 3mm Rohre

Zheng & Price Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy 56 (2010) 267–288



**Ideale**  
Lösungs-  
mittelsignal-  
unterdrückung:

Erfordert keine zusätzliche Zeit

Beeinflusst nur das Lösungsmittel und nicht die Resonanzen von untersuchten Molekül

Hat keinen Einfluss auf das Pulsprogramm

ist einfach einzurichten



## Gründe, warum die Wasserunterdrückung versagen kann

Schlechter shim → anderen Startshim einlesen, *rsh xxx* & *topshim*

Luftblasen besonders in Shigemi-Röhrchen

falsche Einstellung der Protonenpulslänge oder Wasserfrequenz (O1, O1P)

$^1\text{H}$  oder  $^2\text{H}$  Tuning + Matching ist falsch justiert

falsche Einstellung des Lockparameters

minderwertige NMR-Röhrchen oder zu wenig Probenvolumen

Verunreinigung





$\Delta_1$   
(relaxation delay)

Vor dem Ausleseimpuls  
(Sättigungsmethoden)  $\Delta_2=0$ :

- presaturation
- composite presat
- 1D presat NOESY
- WET



## 1D Presat Experiment: pp zgpr

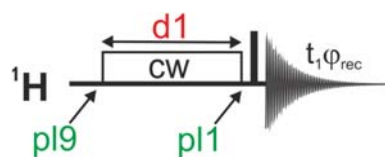
pulse program code:

```
1 ze
2 30m
d12 pl9:f1
d1 cw:f1 ph29

4u do:f1
d12 pl1:f1
p1 ph1
go=2 ph31
30m mc #0 to 2 F0(zd)
exit

ph1=0 2 2 0 1 3 3 1
ph29=0
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1
```

- Umschalten auf geringe Leistung pl9
- selektive Wassersättigung  
Mit dem Beginn von **d1** startet die kontinuierliche Einstrahlung mit geringer Leistung (CW, presat) mit phase 29 (x-direction)
- do = decoupler off, stoppt die Vorsättigung
- schaltet auf hohe Protonenleistung pl1



Parameter:

pulprog = zgpr  
d1 = 2s  
ds = 2  
ns = 4 (minimum)  
pl9 = 40-50dB (berechnet in edprosol)

- ☺ flexibel & einfach einzurichten
- ☹ Signale um das Wasser werden ebenfalls abgeschwächt
- ☹ Dämpfung/Unterdrückung von Resonanzen durch chemischen Austausch



Testprobe: 2mM Sucrose mit 0.5mM DSS, 2mM  
in 10% D<sub>2</sub>O / 90% H<sub>2</sub>O (Z10246)

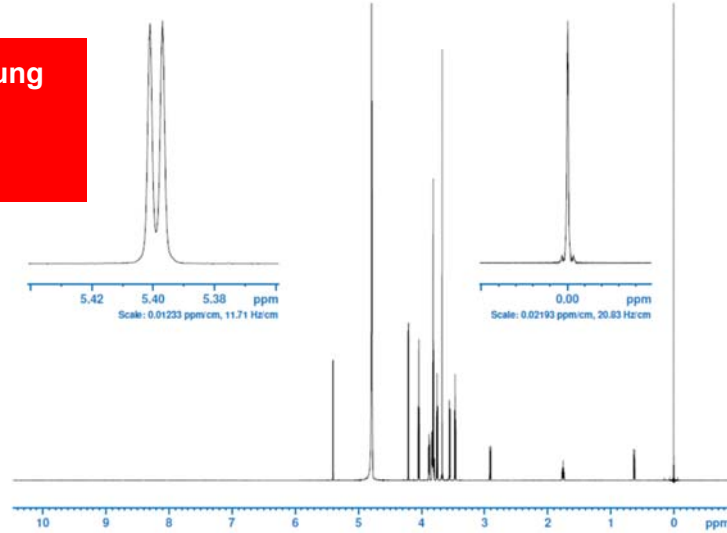
- Temperatur: 298K (kalibriert mit MeOH d4)
- Pulseprogramm: **zgpr**
- Akquisitionszeit (Aq): 1s
- TD (<sup>1</sup>H) = Abhängig vom Feld
- SW (<sup>1</sup>H) = 12ppm
- Relaxationszeit: d1 = 5s
- NS = 8, DS = 4,
- cw Anregungsfeld: max. 50Hz

- Wasserunterdrückung
- Auflösung
- s/n

### Prozessierung:

- nur FT, keine window function, kein bcomod,
- automatic Basislinienkorrektur
- Si = 16K (wenn TD kleiner als 16k sonst 32k)
- Bestimmung von S/N: au-prog, suppcal

NMR TEST ACCEPTANCE \*\*\* System: AV NEO (950.05 MHz) \*\*\* TopSpin 4.1.4  
 Probe: Z10246: 0002 CP2 1 TC (95005 H<sub>2</sub>O-D<sub>2</sub>O 2:1) \*\*\* Sample Depth: 21 mm  
 Sample: 2 mM Sucrose, 0.5 mM DSS, 2 mM NaN<sub>3</sub> in 90% H<sub>2</sub>O + 10% D<sub>2</sub>O (40 mm filling height) (Z10902)  
 Watersuppression with recommended gas flow (NPT\_1H\_watersuppression\_recflow\_spin rate 0 Hz)  
 Stim Correction Z = 18, Z2 = 0, PULPROG = zgpr, Input, L23 = 1, G1 optimized, OvFl = 1  
 Linewidth [achieved/rated]: at 50 % of DSS signal [10.4 Hz <= 80.0 Hz] <-pass>  
 Linewidth [achieved/rated]: at 10 % of DSS signal [19.8 Hz <= 160.0 Hz] <-pass>  
 Splitting anomeric proton [achieved]: [13%] <-na>  
 SINO (1.5 ppm) [achieved/rated]: Signal (6.00 to 5.20 ppm), Noise (9.50 to 8.00 ppm) [1546.5 >= 1340.0] <-pass>  
 Recommended VT flow: [535 l/h]



## Wasserunterdrückungstest

Testprobe: 2mM Sucrose mit 0.5mM DSS, 2mM NaN<sub>3</sub> in 10% D<sub>2</sub>O / 90% H<sub>2</sub>O (Z10246)

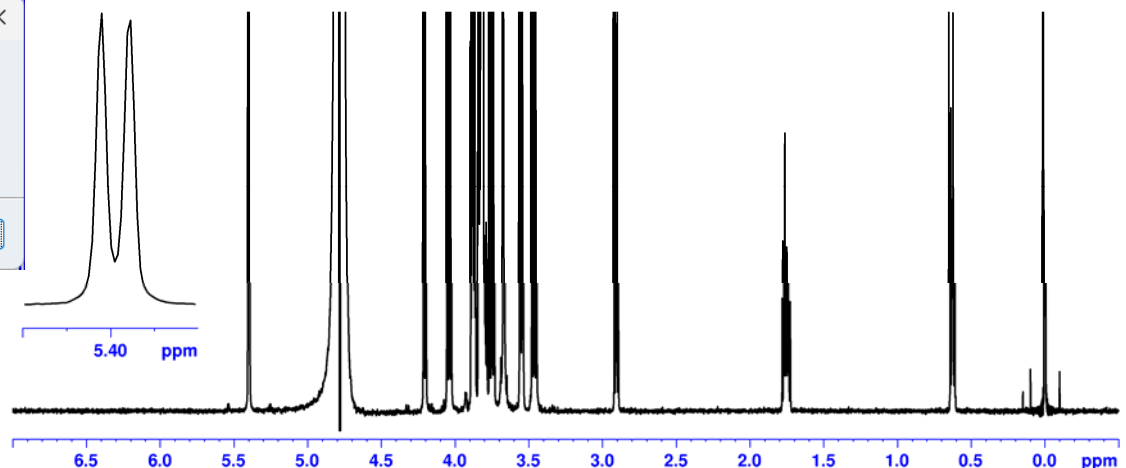
- Startshim: **rsh xxx** oder im letzten Sucrose-Datensatz: **rsh acqu**
- atma exact high und T+M von <sup>2</sup>H
- Topshim 3d ordmax=5,5 und pulsecal

suppcal

Water suppr. : 18.9 / 37.9 Hz

Resolution : 15%, Sino best : 750.8

OK



600MHz TCI Prodigy <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F [<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N]



# Wasserunterdrückungstest

Testprobe: 2mM Sucrose mit 0.5mM DSS, 2mM NaN<sub>3</sub> in 10% D<sub>2</sub>O / 90% H<sub>2</sub>O (Z10246)

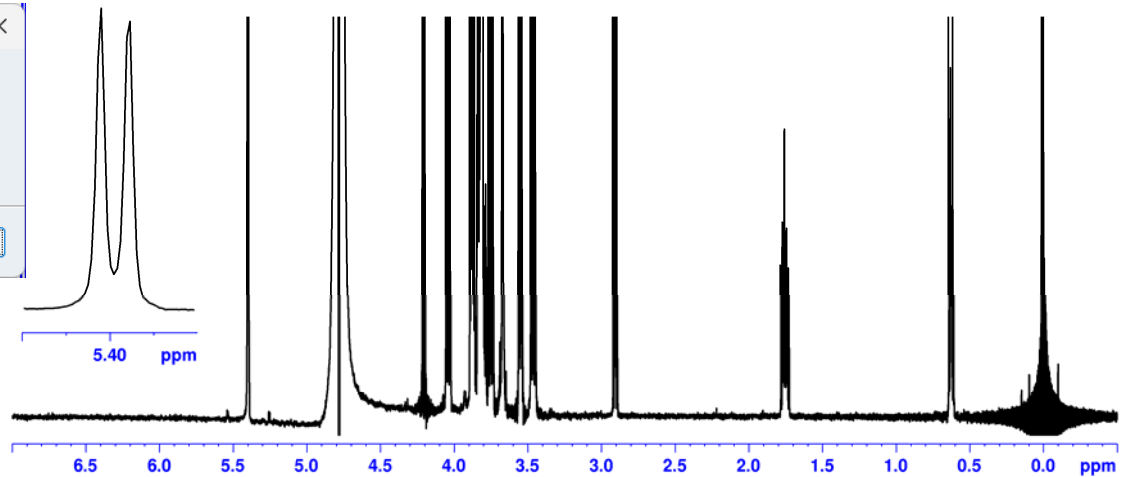
- Für Kryoprobeköpfe gilt: es gibt ein Temperaturgradient in der Probe
- Dieser kann durch kleine Shim-Änderungen kompensiert werden
- Üblicherweise wird der z-Shim um **+10 bis +18** geändert

suppcal

Water suppr. : 7.0 / 32.6 Hz

Resolution : 12%, Sino best : 823.0

OK



600MHz TCI Prodigy <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F [<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N]

# Wasserunterdrückungstest

Testprobe: 2mM Sucrose mit 0.5mM DSS, 2mM NaN<sub>3</sub> in 10% D<sub>2</sub>O / 90% H<sub>2</sub>O (Z10246)

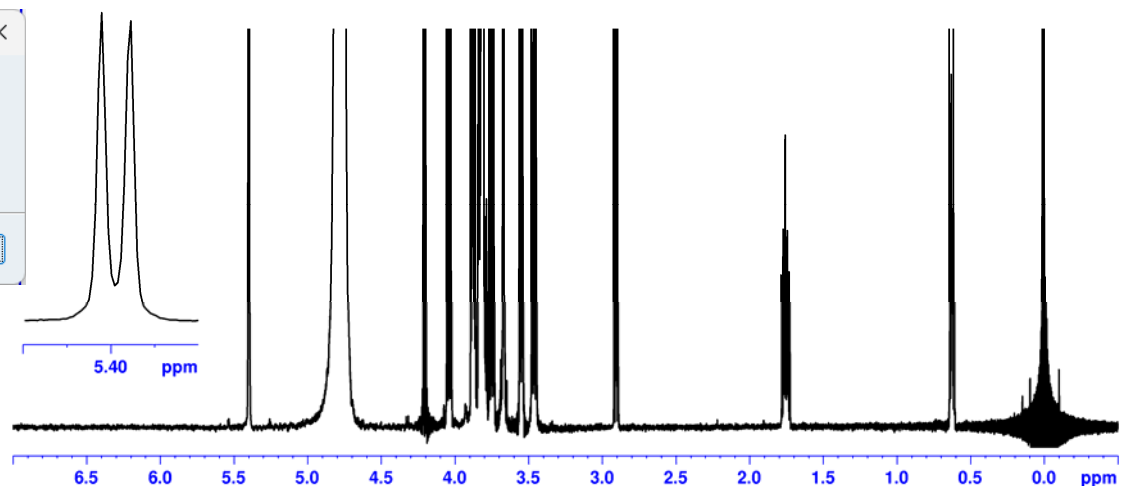
- Weitere Optimierung
  - Einstrahlfrequenz  $\alpha_1$ , z.B. mit AU-prog **bt\_calibrate\_o1**
  - 90° Pulse manuell kalibrieren

suppcal

Water suppr. : 16.3 / 36.1 Hz

Resolution : 12%, Sino best : 866.0

OK



600MHz TCI Prodigy <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F [<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N]

# Salzabhängigkeit von verschiedenen NMR-Röhrchen

Testprobe: 2mM Sucrose mit 0.5mM DSS, 2mM NaN<sub>3</sub> in 10% D<sub>2</sub>O / 90% H<sub>2</sub>O  
298K am AV950 ausgestattet mit 5mm CryoProbe TCI <sup>1</sup>H[<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N]

Tube	Salt	Water Hump [HZ]	Resolution [%]	S/N	Füllhöhe	<sup>1</sup> H-90° Puls
Shigemi	0	46 / 67	29	675 :1	280µl	9.3 µs
Shigemi	100mNaCl	62 / 120	29	424 :1	280µl	13.5 µs
Shigemi	200m NaCl	85 / 130	32	375 :1	280µl	16.3 µs
4mm tube	0	52 / 92	15	588 :1	360µl	8.6 µs
4mm tube	100mNaCl	40 / 78	19	414 :1	360µl	10.7 µs
4mm tube	200m NaCl	116 / 239	27	363 :1	360µl	12.3 µs
shape tube	0	58 / 110	17	542 :1	330µl	8,3 µs
shape tube	100mNaCl	55 / 88	19	422 :1	330µl	9.5 µs
shape tube	200m NaCl	54 / 107	15	472 :1	330µl	10,5 µs

Frank Löhr



# Füllhöhe und Wasserunterdrückung

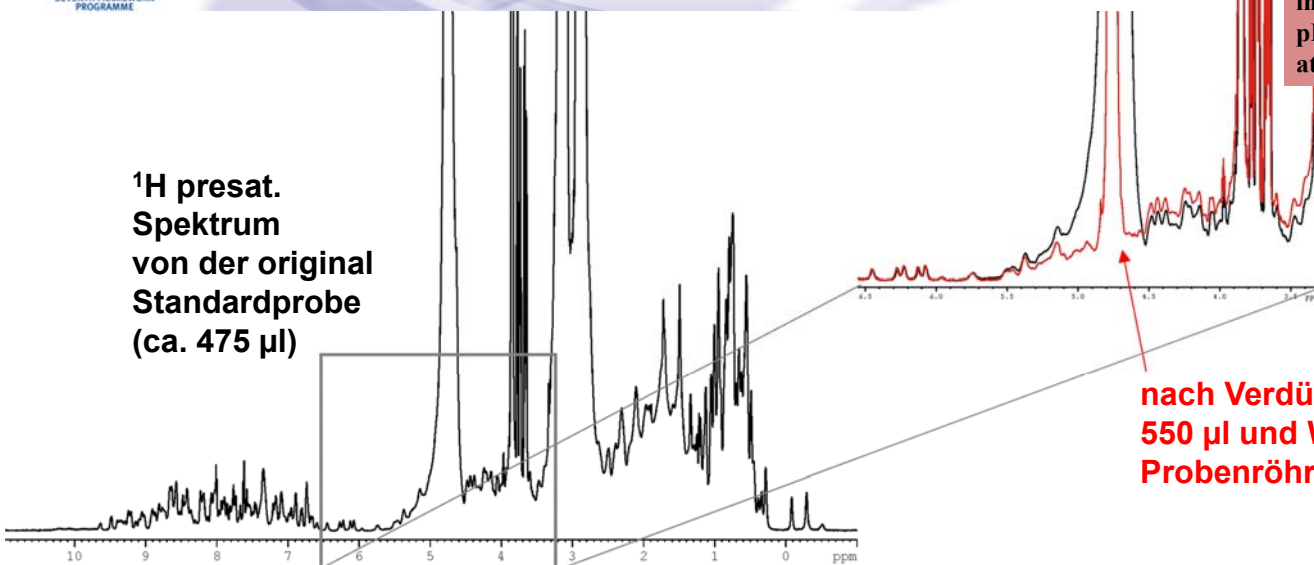


**Bio-NMR**  
www.bio-nmr.net

European Network of Research Infrastructures for providing  
Access and Technological Advancements in bio-NMR

Ubiquitin  
[<sup>u-13</sup>C/<sup>15</sup>N] 1mM  
in 50mM HEPES  
pH=7  
at 600 MHz

<sup>1</sup>H presat.  
Spektrum  
von der original  
Standardprobe  
(ca. 475 µl)



nach Verdünnung auf  
550 µl und Wechsel des  
Probenröhrchens

Frank Löhr

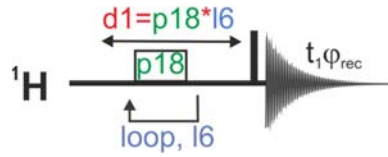


# Setup Off-Resonanz Vorsättigung: **zgps**

Puls-Programmcode:

```
1 ze
2 30m
3 p18:sp6:f1 ph29
4u
lo to 3 times l6
d12 pl1:f1
p1 ph1
go=2 ph31
30m mc #0 to 2 F0(zd)
exit
```

```
ph1=0 2 2 0 1 3 3 1
ph29=0
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1
```



→ selektive Wasserunterdrückung

→ Loop l6

Parameter:

p18= 100ms  
l6 =20 (gleich p18\*l6=d1=2s)  
spnam6=Squa100.1000  
spoffs6=o1+H<sub>2</sub>O-offset [Hz]  
sp6 = pl9 = 40-50dB

☺ Multilösungsmittel-Unterdrückung möglich

☹ Signale um das Wasser werden ebenfalls abgeschwächt

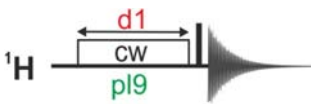
☹ Dämpfung/Unterdrückung von Resonanzen durch chemischen Austausch



## 1D-Wasserunterdrückungsexperimente vor dem Auslesepuls

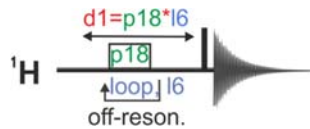
presaturation

**zgpr**



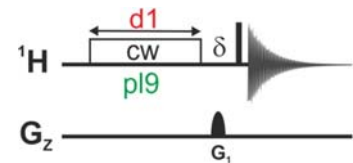
selective pulse for  
off resonance presat

**zgps**



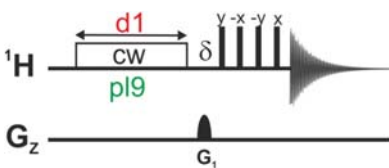
presaturation + gradient

**zggppr**



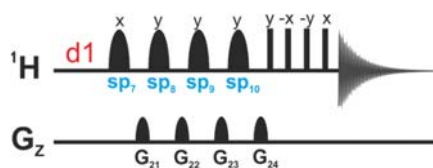
composite presaturation  
+ gradient

**zgcpppr**



WET

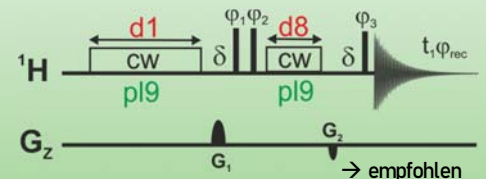
Mehrfache Lösungsmittelunterdrückung  
**wet**



1D presat NOESY

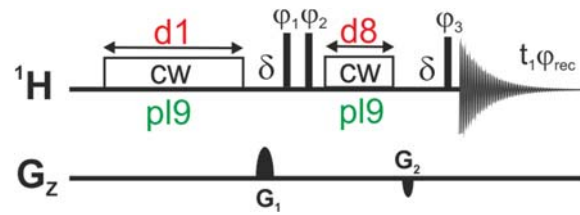
+gradient

**noesygppr1d**





# 1D NOESY: pp noesygppr1d



$T_1$ -Diskriminierung: Die  $T_1$  der zu messenden Verbindung ist um ein Vielfaches kleiner als die des Wassers.

- ☺ flexibel & einfach einzurichten
- ☺ Empfohlene Methode für Metabolomik Projekte
- ☹ Signale um das Wasser werden ebenfalls abgeschwächt
- ☹ Dämpfung/Unterdrückung von Resonanzen durch chemischen Austausch

Parameter:

pulprog = noesygppr1d

d1 = 2s

ds = 4

ns = 8 (minimum)

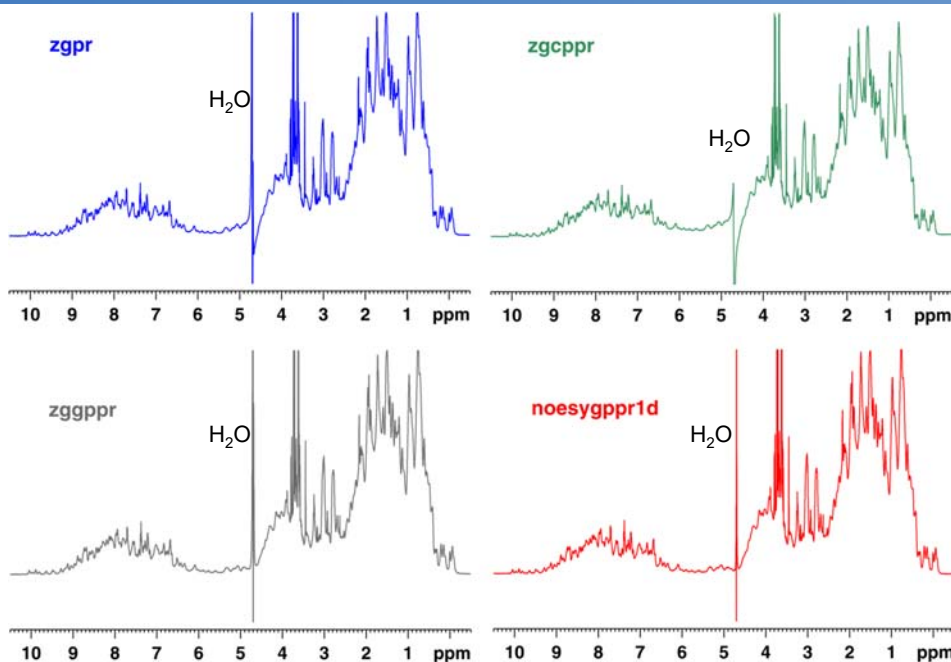
p19 = 40-50dB (berechnet in edprosol)

d8 = 10 ms (NOE Mischzeit)

more information: Ryan T Mckay Concepts in Magnetic Resonance Part A 38A(5) 197–220, 2011



# 1D water suppression experiments



Protein L11 (0.5mM)  
200mM KCl,  
20m phosphate  
pH 5.4

at 600 MHz



## Vorteile

flexibel & einfach einzurichten

## Nachteil

- ❑ Langsam mit dem Lösungsmittel austauschende Protonen können ebenfalls gesättigt werden. Abhängig von
  - pKa
  - pH
  - Temperatur
  - Pufferkonzentration
  -
- ❑ Alle Spins mit Resonanzen nahe der Lösungsmittelfrequenz werden ebenfalls gesättigt.



# Methoden zur Unterdrückung von Lösemittelsignalen



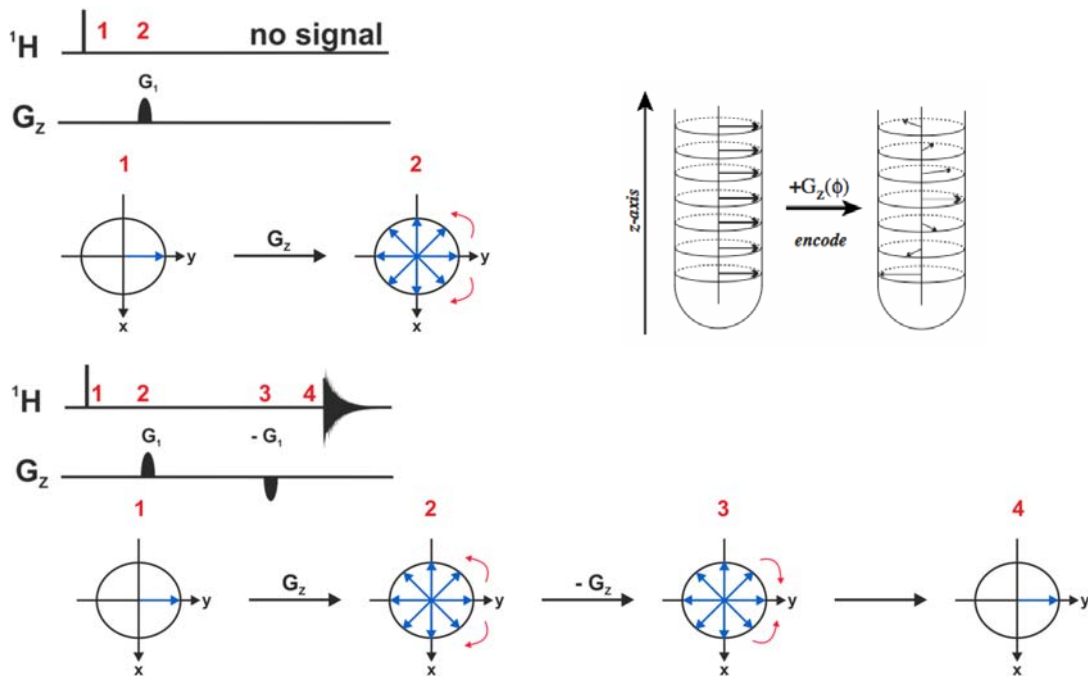
$\Delta_2$

**Nach dem Ausleseimpuls:**

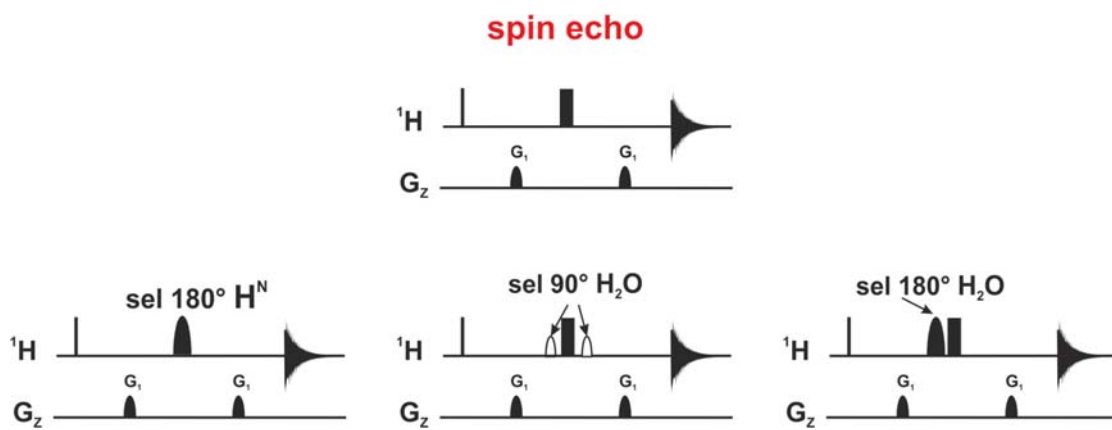
- **Excitation Sculpting**
- **Binominal WATERGATE**
- **soft WATERGATE**
- **Jump-Return Echo**



# Einfluss des gepulsten Feldgradienten (PFG)

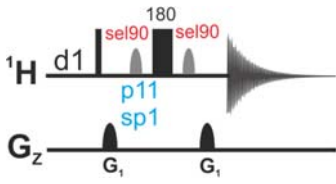


## PFG hilft bei effizienter Wasserunterdrückung

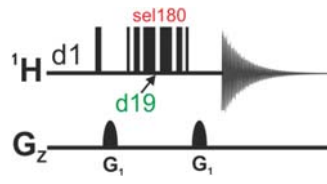


- 180° Puls für Amidproton
- Kein Puls oder insgesamt 360° Puls für  $\text{H}_2\text{O}$

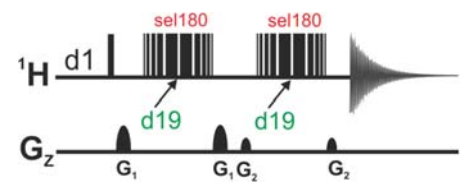
## soft-WATERGATE zggpwg



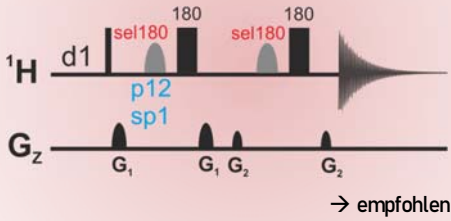
## binomial WATERGATE p3919gp



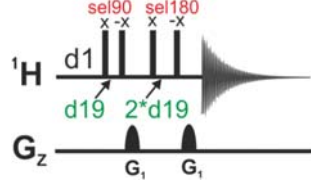
## WATERGATE\_W5 zggpw5



## excitation sculpting zgesgp



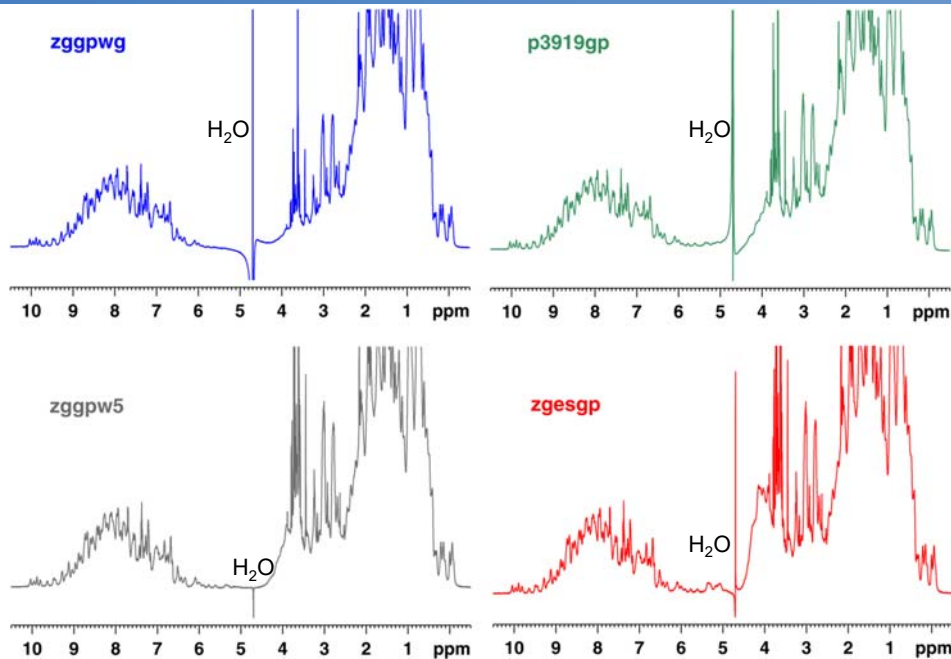
## jump-return (1 -1) echo zggpjrs



- V. Sklenar & A. Bax, J. Magn. Reson. 74, 469 (1987)
- M. Piotto, V. Saudek & V. Sklenar, J. Biomol. NMR 2, 661 - 666 (1992)
- V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik & V. Saudek, J. Magn. Reson., Series A 102, 241 -245 (1993)
- T.-L. Hwang & A.J. Shaka, J. Magn. Reson. Series A 112 275-279 (1995)
- M. Liu, X. Mao, C. He, H. Huang, J.K. Nicholson & J.C. Lindon, J. Magn. Reson. 132, 125 - 129 (1998)



# 1D-Wasserunterdrückungs Experimente



**Protein L11 (0.5mM)**  
**200mM KCl,**  
**20m phosphate**  
**pH 5.4**

**at 600 MHz**



# Excitation sculpting: zgesgp

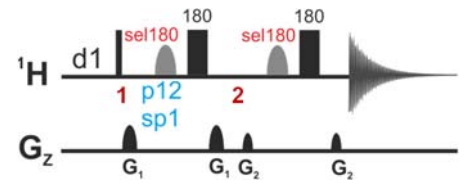
## pulse program code:

- ```

.....
1  p16:gp1      Start des 1. Gradienten Echo (p16=1ms, gpnam1=SMSQ10.100, gpz1=31%)
   d16 pl0:f1   Gradienterholungszeit, Setzt die Leistung des F1 Kanal auf 0W
   (p12:sp1 ph2:r):f1  Selektiver 180° Puls auf Wasser:
                       ▪ spnam1=Sinc.1000 oder Square oder Gauss
                       ▪ p12=2ms, sp1 Berechnet aus P1
                       ▪ Optimierung von sp1 in gs Modus möglich

4u
d12 pl1:f1     Setzt die Leistung vom F1 Kanal zurück zu plw1 (Max. zulässige Leistung)
p2 ph3        nicht selektiver 180° Puls
4u
2  p16:gp1     Refokussierungs Gradient
   d16         TAU
   TAU
   p16:gp2     Start des 2. Gradienten Echo,
               p16=1ms, gpnam2= SMSQ10.100, gpz2=11%

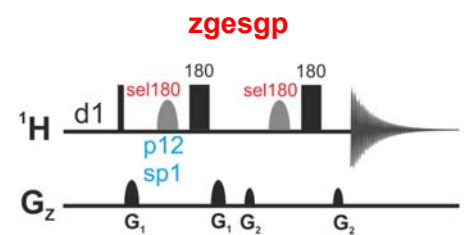
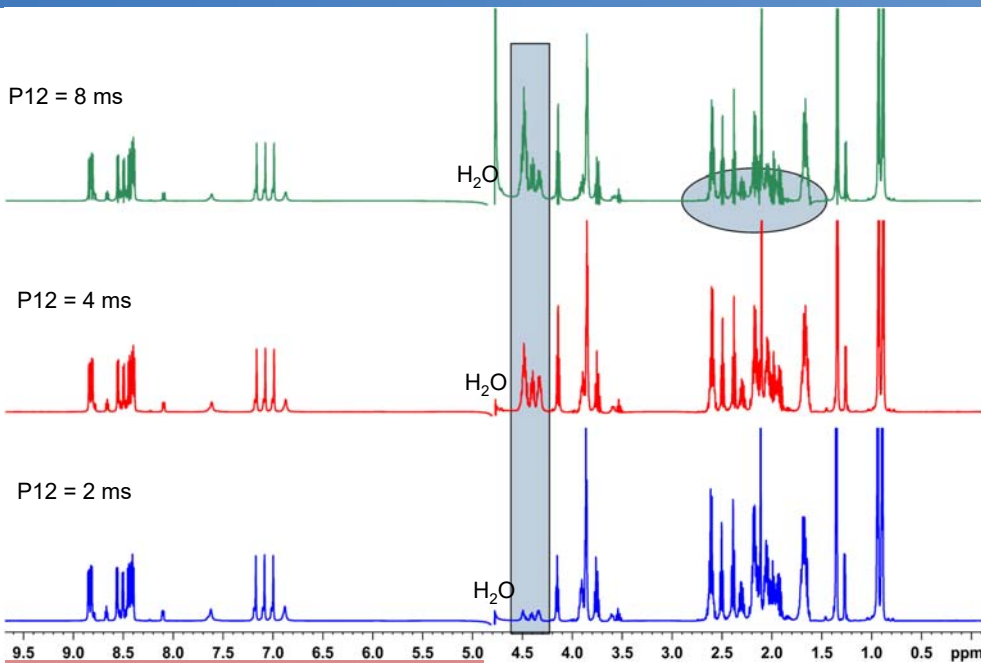
d16 pl0:f1    Selektiver 180° Pulse auf Wasser
   (p12:sp1 ph4:r):f1
4u
d12 pl1:f1    nicht selektiver 180° Pulse
   p2 ph5
4u
p16:gp2       Refokussierungs Gradient
.....
    
```



- ☺ Signale in Wassernähe können beobachtet werden
- ☺ gleichmäßige Anregung
- ☺ Mehrfache Lösemittelunterdrückung möglich
- ☺ sehr effizient ( $>10^4$ )
- ☺ Resonanzen, die austauschen, sind beobachtbar
- ☹  $n(\text{HH})$  entwickelt sich
- ☹ Zeitintervall von 4 - 12 ms nach Anregungspuls



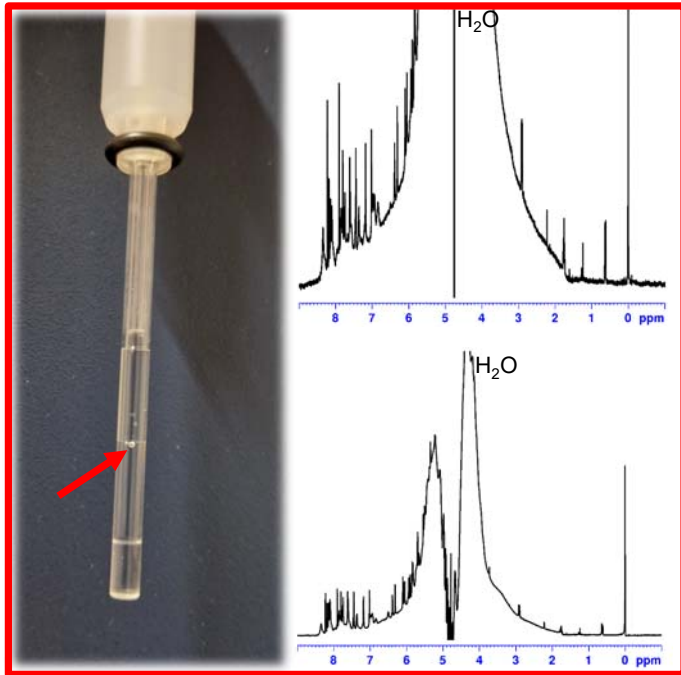
# Excitation sculpting: Parameteroptimierung



- ☺ Signale in der Nähe des Wassers werden intensiver wenn p12 verlängert wird.
- ☹ Phasenfehler aufgrund der Entwicklung von  $n\text{J}(\text{HH})$

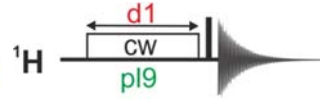
6mer-Peptid gemessen bei 600 MHz



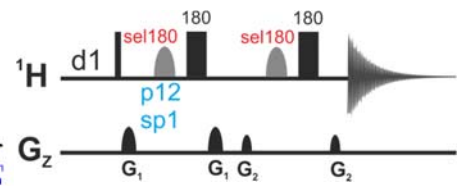


22mer RNA (0.5mM)  
50mM KCl,  
10m phosphate  
pH 6.5  
at 600 MHz

presaturation  
zgpr

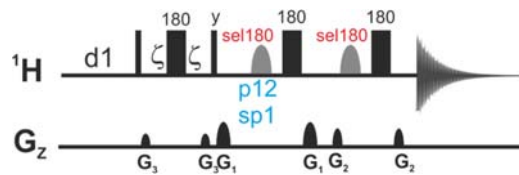


excitation sculpting  
zgesgp

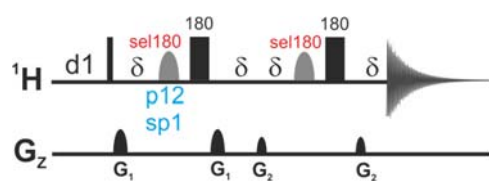


## Excitation sculpting: Pulsprogrammoptimierung 1

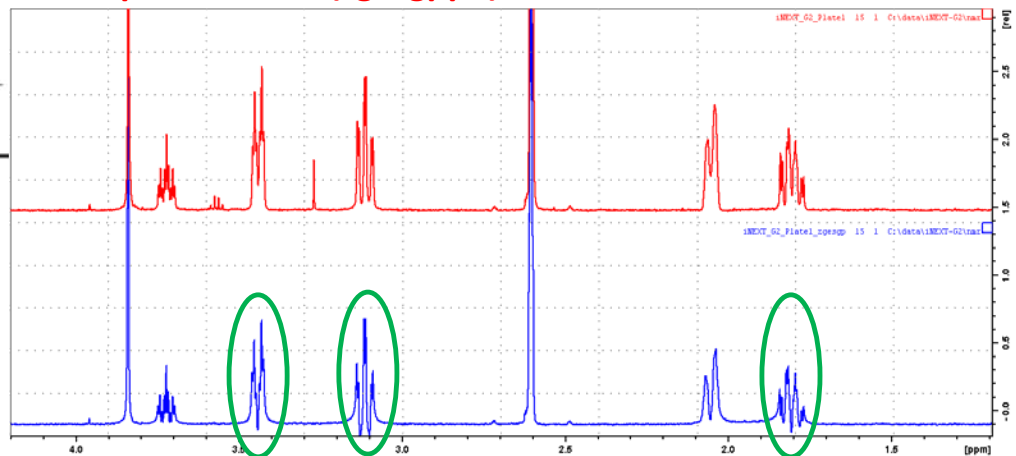
zgesgppp



zgesgp



ES mit perfect Echo (zgesgppp), NS=80



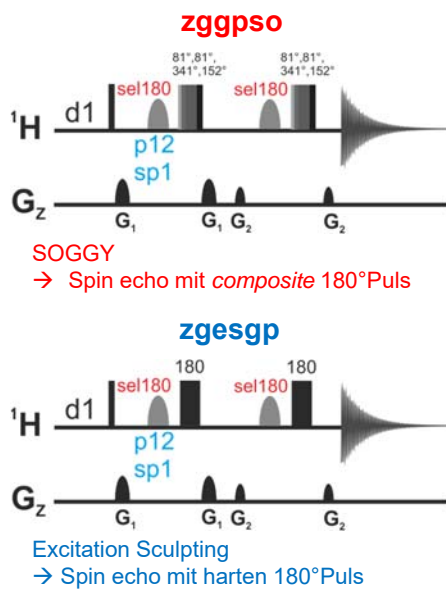
ES (Excitation Sculpting, zgesgp), NS=64

ES: T.-L. Hwang & A.J. Shaka, J. Magn. Reson. ; Series A 112 275-279 (1995)  
PE: R.W. Adams, C.M. Holroyd, J.A. Aguilar, M. Nilsson & G.A. Morris, Chem. Commun. 49, 358-360 (2013)

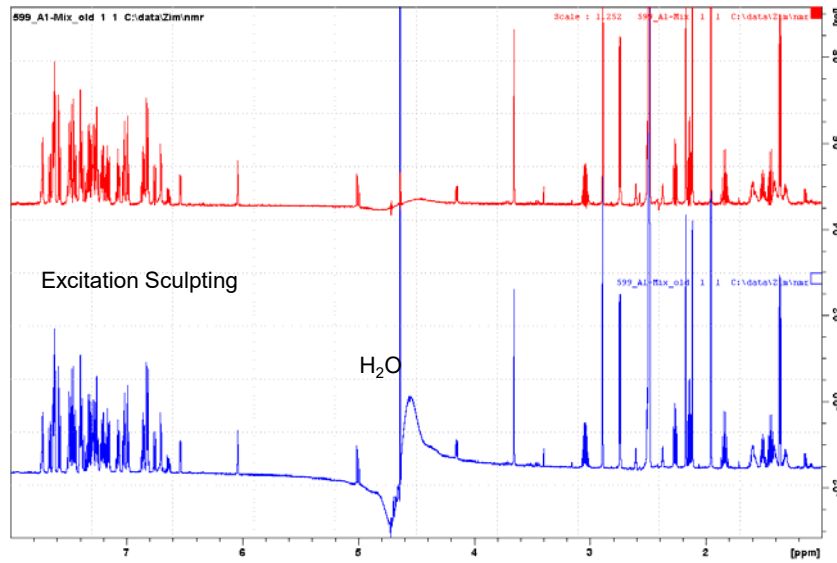




# Excitation sculpting: Pulsprogrammoptimierung 2



SOGGY Solvent-optimized double gradient spectroscopy for water suppression



**Liganden-  
basierte  
NMR-  
Screening-  
Kampagne  
von SARS-  
CoV-2-RNA-  
Elementen**

**Mischung aus  
12 Liganden  
in  
5% DMSO  
/95% H2O  
bei 600 MHz**

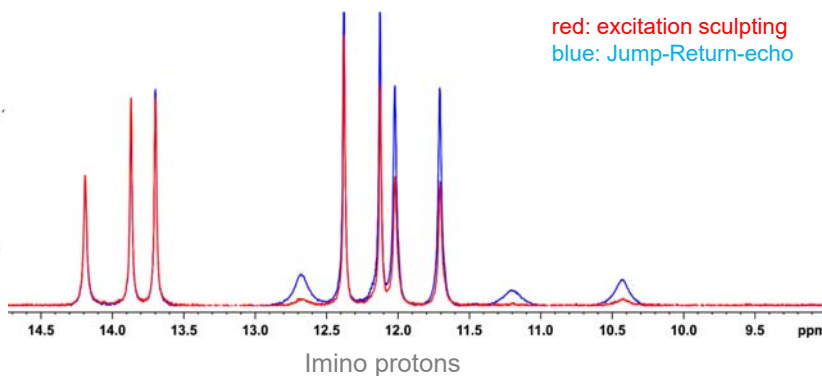
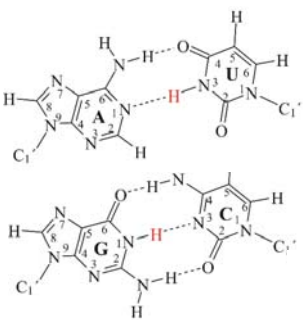
SOGGY: Bao D. Nguyen, Xi Meng, Kevin J. Donovan, A.J. Shaka J. Magn Reson 184 (2007) 263274

Screening SARS-CoV-2: Sreeramulua & Richter et al, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. (2021): 10.1002/anie.202103693

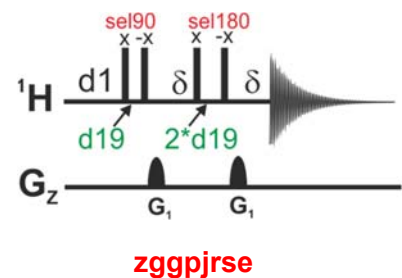


## Empfohlene Methode für RNA und DNA: Jump-Return-Echo

Watson-Crick base pairs:



red: excitation sculpting  
blue: Jump-Return-echo



☺ Austauschbare Protonen sind beobachtbar

☺ Wasser vollständig unterdrückt

☺ schnell

☺  $^nJ(HH)$  ist refokussiert

☹ Ungleichmäßige Anregung:  $\sin^3$

Parameter:

pulprog = zggpjrs0

d1 = 2s

ds = 4

ns = 8 (minimum)

d19 =  $(1/(2*d))$ , d = Entfernung von Wasser zu HN (in Hz) muss optimiert werden (@600 MHz 40µs)

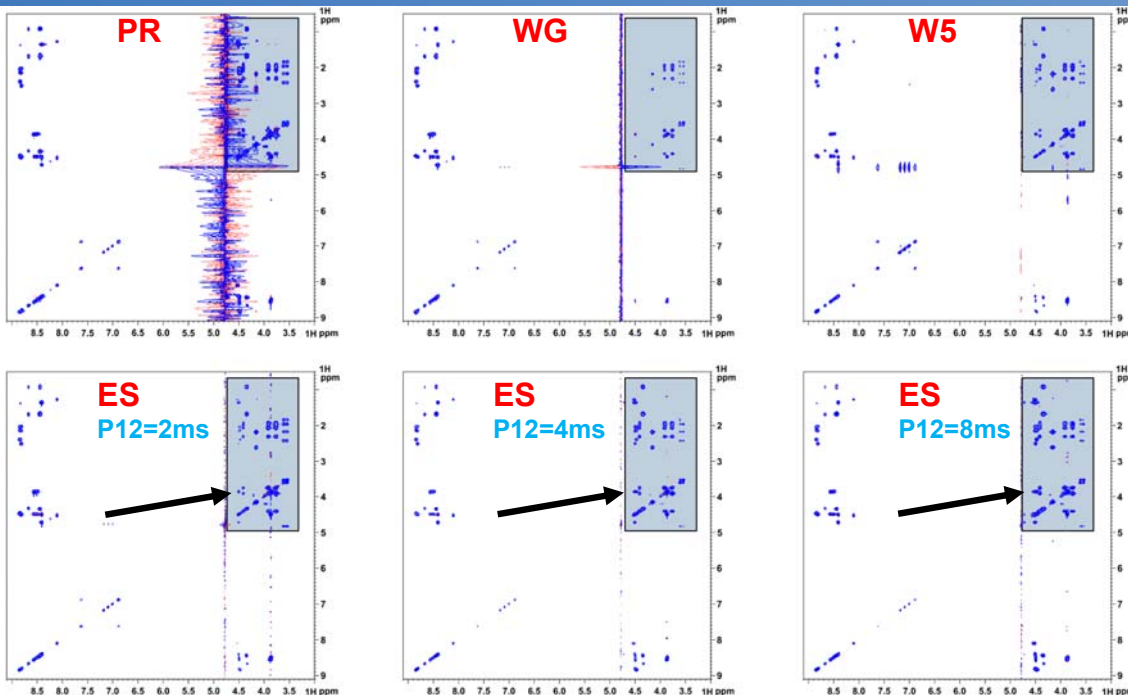
gpanm1: SMSQ10.100; gpz1=20; p16=1ms; d16=100us



|                        |    |
|------------------------|----|
| Presat                 | pr |
| WET                    | wt |
| binominal WATERGATE    | 19 |
| soft WATERGATE         | wg |
| binominal WATERGATE W5 | w5 |
| excitation sculpting   | es |
| jump return echo       | jr |



## 2D TOCSY mit verschiedenen Wasserunterdrückungsmethoden

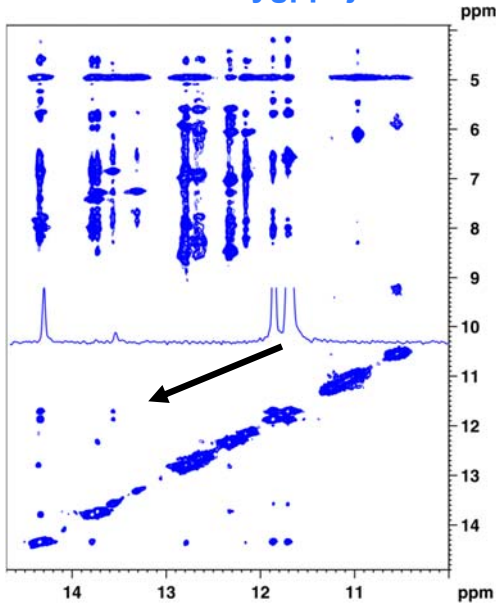


6mer peptide  
measured at  
600 MHz

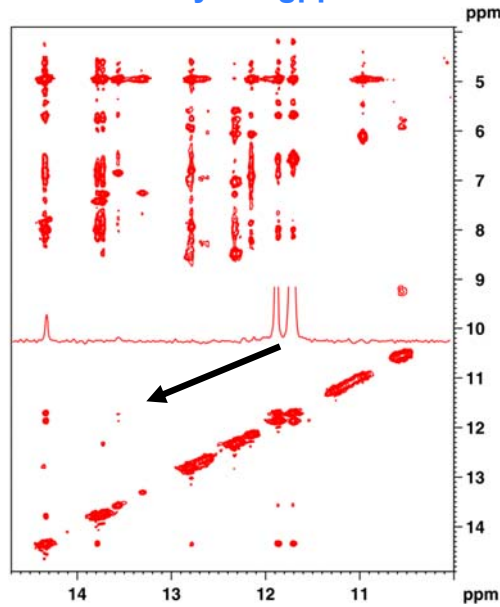




## JR-Echo -- noesygpphjrrs



## ES -- noesyefbgpph



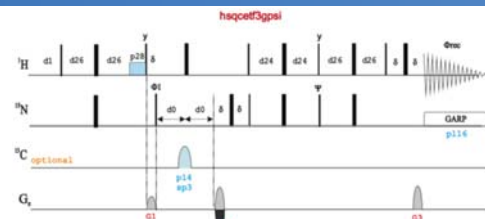
<sup>15</sup>N markierte 47mer  
RNA, 600 MHz, 283K,  
Gesamtzeit 5h

Ziegeler et al. 2012. ChemBioChem. 13:2100-2112

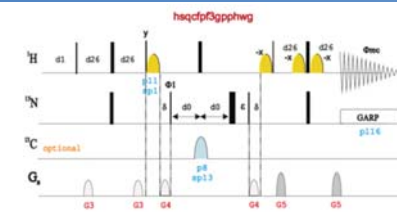


# <sup>15</sup>N-HSQC -- verschiedene Methoden

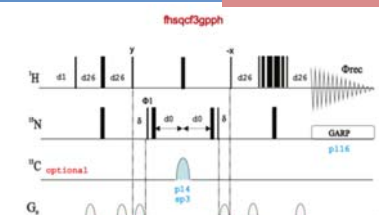
<sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C markiertes  
Ubiquitin, 600 MHz,  
298K



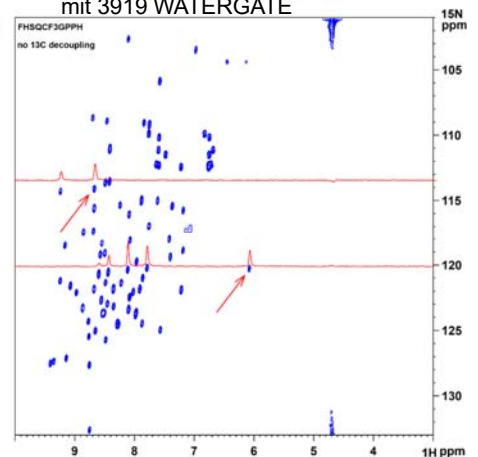
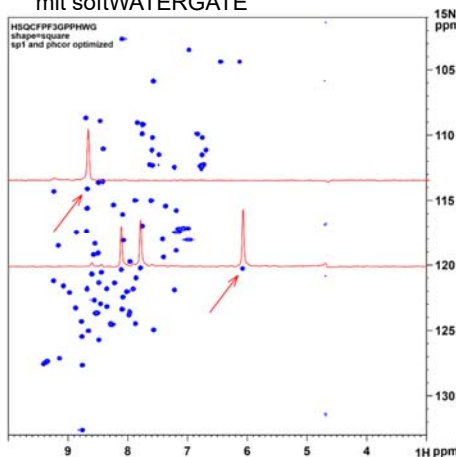
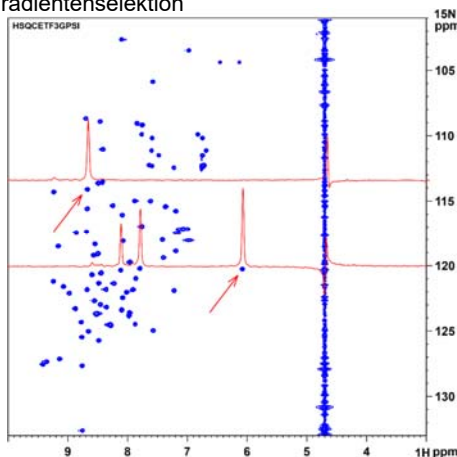
mit Gradientenselektion



mit softWATERGATE

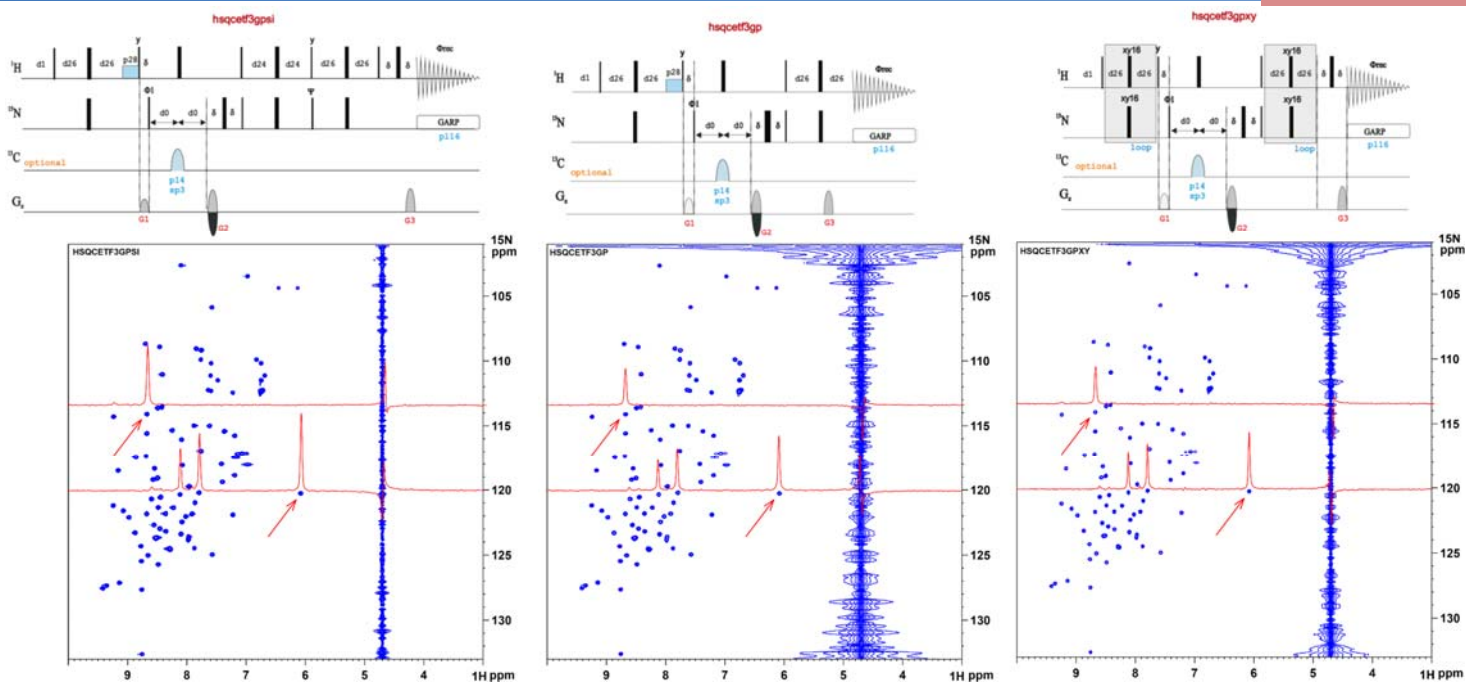


mit 3919 WATERGATE



# <sup>15</sup>N-HSQC mit Gradientenselektion

<sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C markiertes Ubiquitin, 600 MHz, 298K



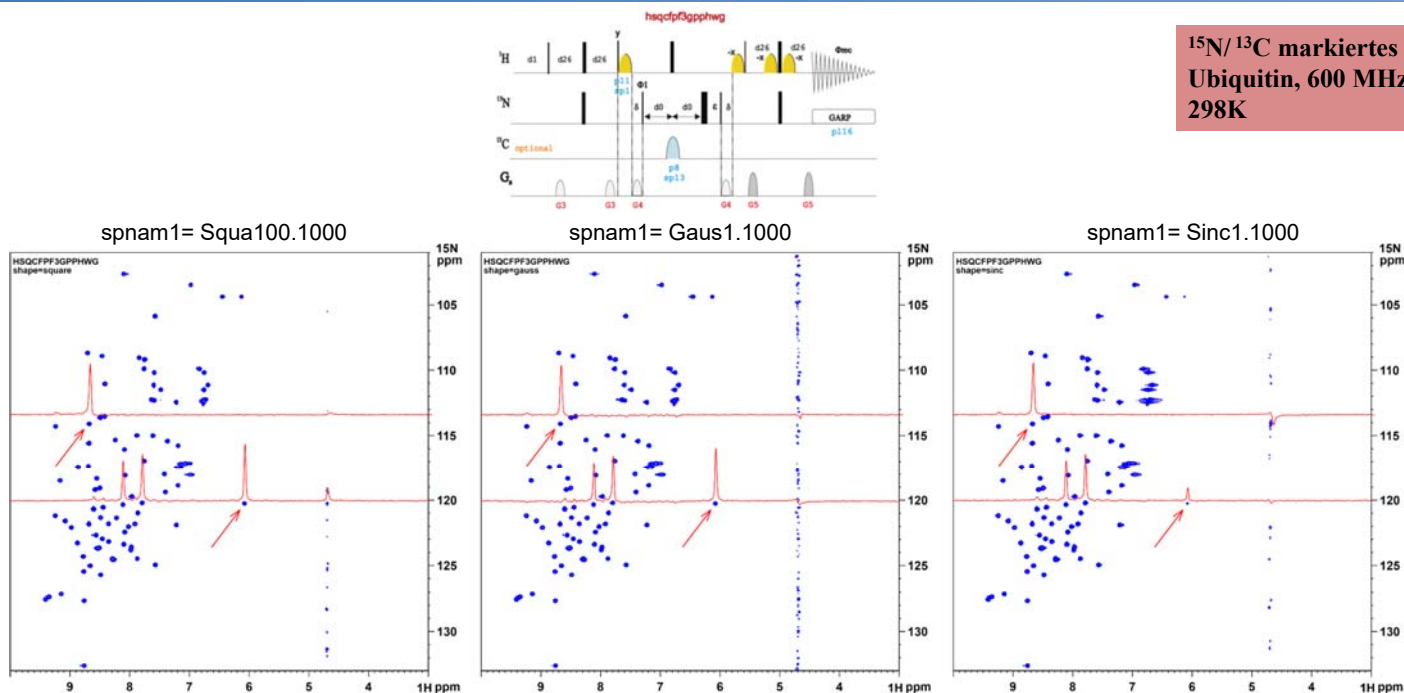
PP, Kopie aus dem Bruker-Handbuch: PULSE-PROGRAMMKATALOG: II. BIOMOLEKULARE NMR-EXPERIMENTE

PPNMR2023, Berlin 21. & 22.03.2023 – Tutorial: Unterdrückung von Lösemittelsignalen – Christian Richter

# Optimierung WATERGATE <sup>15</sup>N-HSQC, selektiver Puls

GOETHE UNIVERSITÄT FRANKFURT AM MAIN

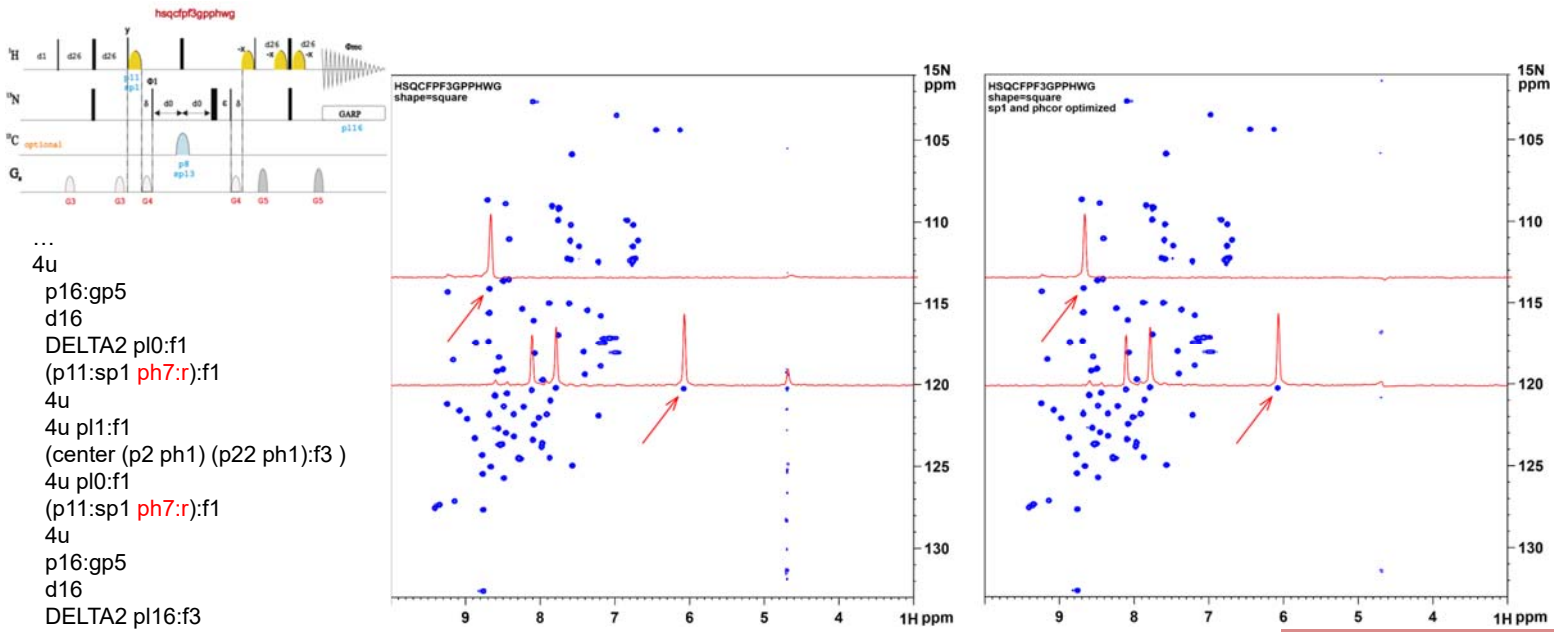
<sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C markiertes Ubiquitin, 600 MHz, 298K



PP, Kopie aus dem Bruker-Handbuch: PULSE-PROGRAMMKATALOG: II. BIOMOLEKULARE NMR-EXPERIMENTE

PPNMR2023, Berlin 21. & 22.03.2023 – Tutorial: Unterdrückung von Lösemittelsignalen – Christian Richter

# Optimierung WATERGATE $^{15}\text{N}$ -HSQC, Leistung + phcor



→ Somit kann der Parameter phcor7 im gs-Mode optimiert werden

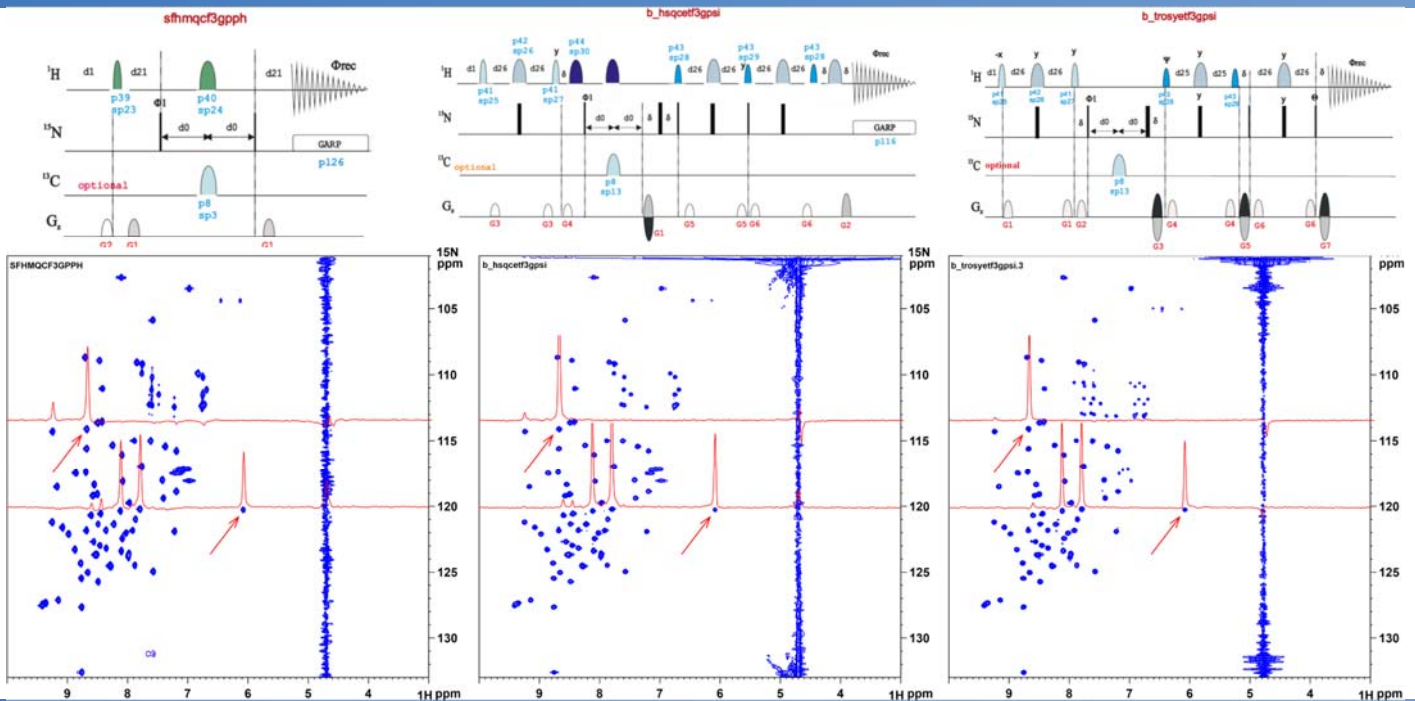
$^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$  markiertes  
Ubiquitin, 600 MHz

PP, Kopie aus dem Bruker-Handbuch: PULSE-PROGRAMMKATALOG: II. BIOMOLEKULARE NMR-EXPERIMENTE

PPNMR2023, Berlin 21. & 22.03.2023 – Tutorial: Unterdrückung von Lösemittelsignalen – Christian Richter

36

# SOFAST $^{15}\text{N}$ -HMQC / BEST $^{15}\text{N}$ -HSQC / BEST $^{15}\text{N}$ -TROSY



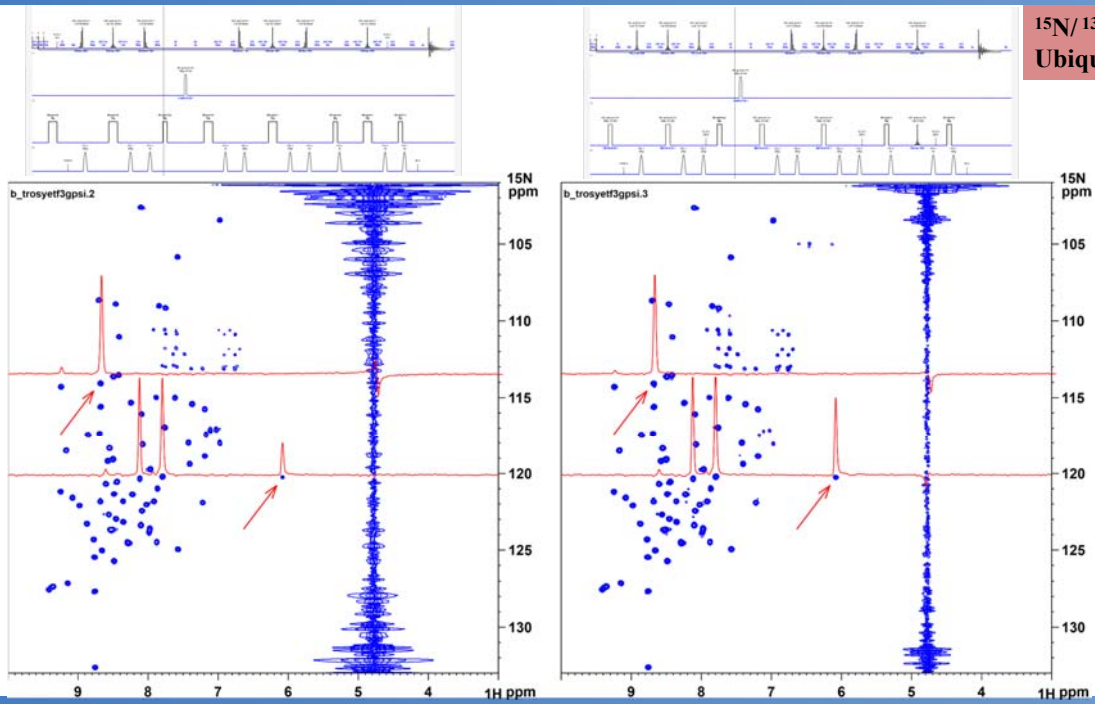
PP, Kopie aus dem Bruker-Handbuch: PULSE-PROGRAMMKATALOG: II. BIOMOLEKULARE NMR-EXPERIMENTE

PPNMR2023, Berlin 21. & 22.03.2023 – Tutorial: Unterdrückung von Lösemittelsignalen – Christian Richter

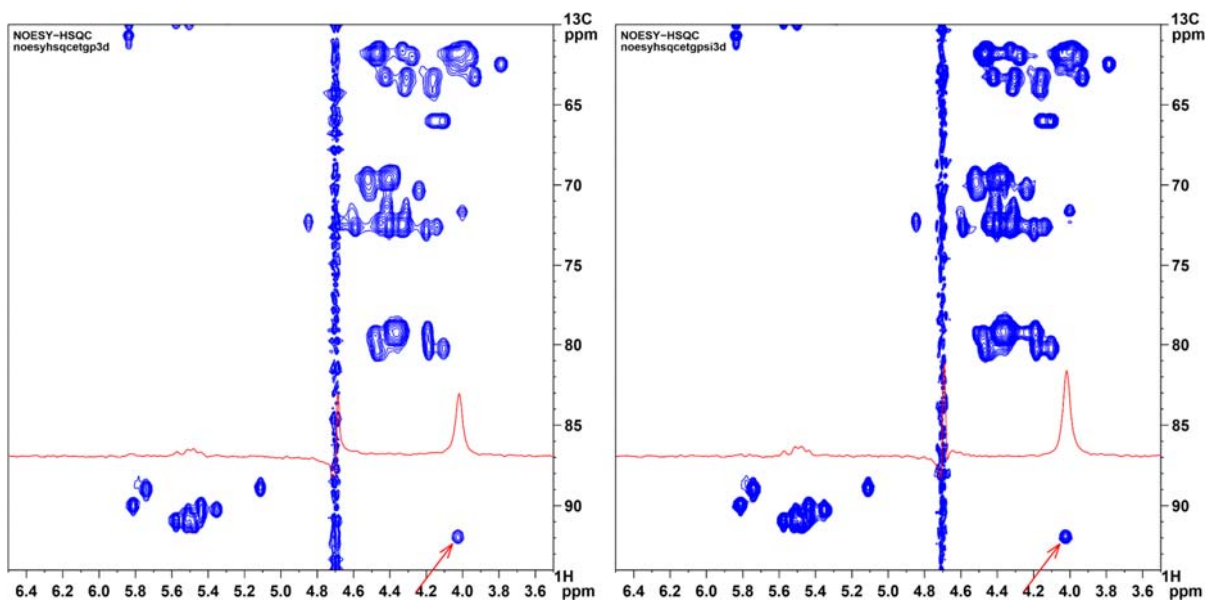
37

# BEST $^{15}\text{N}$ -TROSY

$^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$  markiertes  
Ubiquitin, 600 MHz

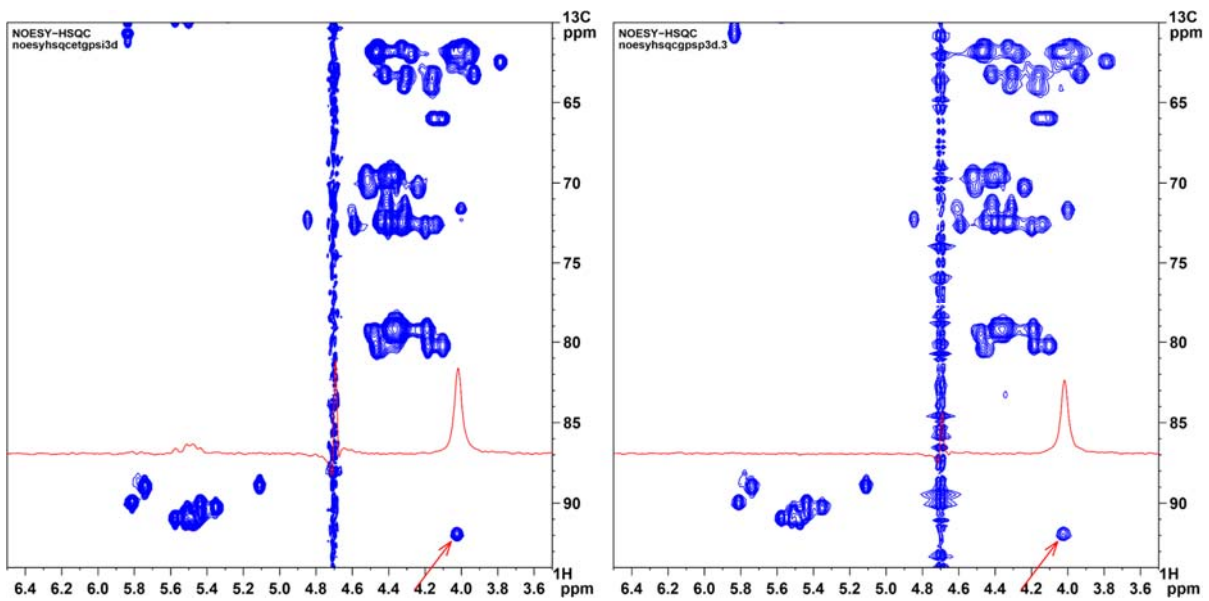
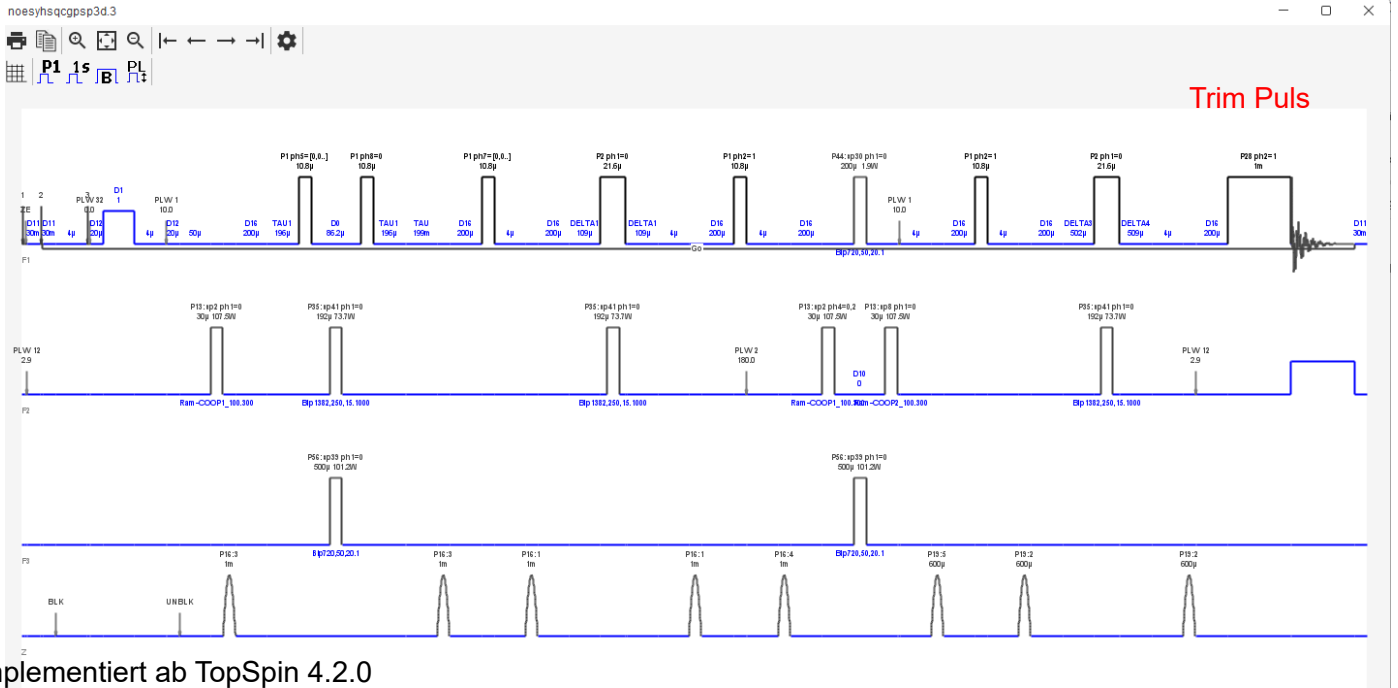


# Wasserunterdrückung im 3D



$^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$  markierte 22mer RNA bei 600MHz





$^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$  markierte 22mer RNA bei 600MHz