

AVANCE NEO Beginners Guide

●
Guía de usuario

Version 001



© Bruker Corporation

Reservados todos los derechos. Se prohíbe la reproducción, almacenamiento en sistemas de recuperación o la transmisión, en cualquier forma o por cualquier medio, de los contenidos de este documento sin el consentimiento expreso de la compañía dueña de la firma. Los nombres de productos son marcas comerciales o marcas registradas de sus respectivos propietarios.

© agosto 21, 2018 Bruker Corporation

Número de documento: 10000061278

T/N: H171804S

Contenido

1	Introducción	5
1.1	Fuentes de riesgo	5
1.2	Versión del software y sintaxis de comandos	5
2	Seguridad	7
2.1	Seguridad magnética	7
2.1.1	Seguridad criogénica	7
2.2	Seguridad eléctrica	8
2.3	Seguridad química	8
2.4	Certificación CE	8
3	Introducción a la Teoría y Terminología	9
3.1	Análisis de RMN del cloroformo	11
3.2	Compuesto de referencia, hercios, ppm	13
3.3	RMN de Protón – Desplazamientos químicos	14
3.4	Espectro de protón del benceno	15
3.5	Espectro de protón del acetato de bencilo	16
3.6	Espectro de protón del etilbenceno con acoplamiento espín /espín	18
3.7	Desacoplamiento	20
3.8	FID y espectro	22
4	Descripción del sistema	23
4.1	Visión de la arquitectura AVANCE	24
4.1.1	Consola del operador y conexiones	24
4.2	Consola	24
4.3	Enlace entre el ordenador principal y AQS	26
4.4	Imán, sistema de homogeneización, preamplificador HPPR y sonda	26
4.5	Imán y dewar del imán	27
4.5.1	Tubo interno a temperatura ambiente	28
4.5.2	Tanque de helio	28
4.5.3	Tanque de nitrógeno	29
4.6	Introducción al sistema de bloqueo de campo (lock)	29
4.7	Sondas	30
4.8	Sonda de banda ancha	32
4.9	iProbe	33
4.10	Cambiar una sonda	34
5	Procedimientos Básicos	35
5.1	La ventana de TopSpin	35
5.1.1	Crear un nuevo conjunto de datos	36
5.1.2	Preparación de la muestra	37
5.2	Insertar la muestra con la turbina en el imán	38
5.3	Hacer el lock de la muestra	39
5.4	Sintonización y ajuste de la sonda	40
5.4.1	Utilizando la rutina de sintonización y ajuste automático en sondas equipadas con ATM	40

5.4.2	Utilizando la rutina de sintonización manual en sondas equipadas con ATM	41
5.5	Girar la muestra	43
5.6	Ajuste de la homogeneidad (Shimming)	44
5.6.1	Ajuste de la homogeneidad de rutina con TopShim	44
5.7	Establecer los parámetros dependientes de la sonda/disolvente	44
5.8	Ajuste de la ganancia del receptor	45
5.9	Iniciar la adquisición	45
5.10	Procesado de datos	45
6	Preparación para la Adquisición, parámetros relacionados con la Frecuencia	47
6.1	Frecuencia	47
6.2	Explicación numérica de las frecuencias de transmisión, básicas y de offset	47
7	La muestra de RMN	51
7.1	Selección del disolvente	51
7.2	Tubo de muestra	52
7.3	Manipulación de muestra	53
8	Espectro de Protón	55
8.1	Configuración del experimento	55
8.2	Adquisición	59
8.3	Procesamiento	59
8.4	Integración	61
8.5	Trazado de los espectros de protones de 1D	63
8.6	Ajuste de la anchura espectral	64
9	Espectro de ¹³C con desacoplamiento de protón	67
9.1	Configuración del experimento	68
9.2	Adquisición	70
9.3	Procesamiento	70
9.4	Selección de picos	72
9.5	Trazado del espectro de carbono de 1D	73
10	Contacto	75
	Figuras	77
	Tablas	79
	Glosario	81
	Índice	83

1 Introducción

El objetivo de este manual es describir los componentes básicos de un espectrómetro, su funcionalidad y cómo los trata el software TopSpin para adquirir datos RMN. Debería servir para que un usuario con relativamente poca experiencia pudiera realizar una serie de experimentos básicos de RMN monodimensionales de alta resolución (1-D High Resolution, HR). Se seleccionó como ejemplo el antranilato de mentilo. Se describirán tanto la observación del protón como del carbono desacoplado de protón. Para ayudar al usuario, se utilizarán conjuntos de parámetros estándar suministrados con cada paquete de software TopSpin. De esta forma se minimiza el tiempo invertido en el propio espectrómetro, especialmente en el caso de que se estén formando a cantidades relativamente grandes de estudiantes universitarios. En ese contexto, el procesamiento puede realizarse fácilmente en otro ordenador utilizando los tutoriales suministrados con la documentación del espectrómetro.

Para poder seguir las instrucciones de este manual, se asume que el usuario cuenta con:

- Conocimientos básicos acerca del paquete de software TopSpin.
- Una(s) sonda(s) capaz/capaces de observar protones y carbono mientras se desacoplan los protones.
- Conocimientos básicos de cómo utilizar las pestañas y botones de flujo en la ventana de TopSpin.

Aunque nos hemos esforzado al máximo para proporcionar una descripción que abarque los procesos realmente paso a paso, los nuevos usuarios tendrán, lógicamente, alguna pregunta y puede que necesiten en alguna ocasión la ayuda de un usuario más experimentado. El objetivo de este manual es, en la medida de lo posible, permitir a los usuarios trabajar de forma independiente y adquirir una comprensión básica de cómo utilizar el sistema. Se espera que el uso de este manual reduzca considerablemente el tiempo necesario para formar a nuevos usuarios.

1.1 Fuentes de riesgo

La seguridad se tratará de forma más detallada en el capítulo de seguridad, pero en esta introducción merece la pena destacar los peligros potenciales que pueden surgir cuando se trabaja con un espectrómetro de RMN. A pesar de tratarse de un sistema altamente sofisticado, las situaciones en las que un usuario inexperto puede dañar el equipo son sorprendentemente pocas, así que sólo vale la pena mencionar las más importantes. Durante el manejo y uso habitual del equipo, las causas más comunes de daño son:

- Retirar la muestra del imán estando el tubo interno todavía tapado.
- Insertar una muestra en el imán sin la presencia del colchón de aire de soporte.
- Transmitir potencia de radiofrecuencia (RF) por cables desconectados o sondas mal ajustadas.

Se recomienda a los nuevos usuarios que se familiaricen con estos peligros potenciales antes de empezar, y a los encargados del sistema de asegurarse que cada nuevo usuario comprenda los puntos mencionados.

1.2 Versión del software y sintaxis de comandos

Este manual se ha redactado para la versión 4.0 de TopSpin. A lo largo de este manual se esbozarán procedimientos para introducir diversos comandos.

2 Seguridad

En términos de seguridad, lo que diferencia a los espectrómetros de RMN de la mayoría de los equipos de laboratorio es la presencia de un imán relativamente potente. Cuando se diseña un laboratorio de RMN, o se entrena al personal que trabajará en él o sus alrededores, ninguna otra característica tiene mayor relevancia. Si se cumplen los procedimientos correctos, trabajar en las cercanías de imanes superconductores es completamente seguro y no se conocen efectos secundarios dañinos para la salud humana. Las negligencias, sin embargo, pueden provocar accidentes serios.

El imán es potencialmente peligroso debido a:

- La gran fuerza de atracción que ejerce sobre los objetos ferromagnéticos.
- El gran contenido de nitrógeno y helio líquido.

2.1 Seguridad magnética

El campo magnético circunda el imán en todas las direcciones. Este campo (conocido como campo disperso) es invisible, y por lo tanto es importante colocar signos de advertencia en las ubicaciones adecuadas. Todo objeto constituido por un material ferromagnético, como hierro, acero, etc. será atraído hacia el imán. Si un objeto ferromagnético se acerca demasiado, puede ser atraído repentinamente hacia el imán con una fuerza sorprendente. Su impacto puede dañar al imán, o causar daño a cualquier persona que se encuentre en el trazado de su recorrido.

Es importante que las personas que trabajen cerca del imán tengan pleno conocimiento de las posibles situaciones que entrañan un riesgo. Es de vital importancia que nunca se permita a una persona con un marcapasos o un implante metálico acercarse al imán.

Debido a que la fuerza del campo disperso disminuye significativamente al alejarse del imán, es importante que los usuarios consulten y conozcan las medidas de seguridad de trabajo a respetar en la proximidades del imán a través de su supervisor.

2.1.1 Seguridad criogénica

El imán contiene cantidades relativamente grandes de helio y nitrógeno líquido. Estos líquidos, llamados criogénicos, tienen la función de mantener el núcleo del imán a temperaturas muy bajas.

Debido a las bajas temperaturas que implica la manipulación de estos líquidos criogénicos, siempre deben usarse **guantes, camisa de manga larga o bata de laboratorio** y gafas de seguridad. El contacto directo con estos líquidos puede provocar congelación. El responsable del sistema debe asegurarse regularmente de que los gases de evaporación puedan salir libremente del imán, o sea que sus válvulas que permiten su liberación no estén bloqueadas. No intente rellenar el imán con helio o nitrógeno si no ha recibido una formación sobre el procedimiento correcto.

El helio y el nitrógeno no son gases tóxicos. Sin embargo, los gases evaporados en caso de quench pueden llenar la sala y desplazar al oxígeno, para evitarlo la sala ha de estar equipada con la ventilación adecuada.

2.2 Seguridad eléctrica

El hardware del espectrómetro no es ni más ni menos peligroso que cualquier otro hardware eléctrico o neumático, y por tanto debe tratarse como tal. No retire ningún panel protector de las diferentes unidades. Se han instalado para su protección y seguridad, sólo el personal cualificado del servicio debe abrirlos. El panel principal, situado en la parte posterior de la consola, se puede quitar mediante dos tornillos de liberación rápida, pero también este proceso sólo debe ser realizado por personal cualificado.

2.3 Seguridad química

Los usuarios deben ser plenamente conscientes de cualquier peligro asociado a las muestras con las que están trabajando. Los compuestos orgánicos pueden ser altamente inflamables, corrosivos, cancerígenos, etc.

2.4 Certificación CE

Todas las unidades principales del hardware de las consolas AVANCE, así como las unidades periféricas como la unidad HPPR, los sistemas de homogeneización y la sonda, cumplen con la CE Declaración de conformidad. Esto incluye la magnitud de cualquier radiación electromagnética de dispersión que pudiera emitirse, así como los peligros eléctricos habituales. Tenga en cuenta que, para minimizar las fugas de radiación electromagnética, las puertas de las consolas deben estar cerradas y el panel trasero, instalado.



Nota: Encontrará información adicional sobre seguridad en relación con los sistemas AVANCE en el manual *Sistemas AVANCE: Consideraciones generales sobre seguridad* (P/N Z31836) disponible en el DVD BASH.

3 Introducción a la Teoría y Terminología

La RMN es una técnica utilizada para analizar la estructura de muchas moléculas químicas, sobre todo compuestos orgánicos. Un compuesto suele constar de átomos de carbono, de hidrógeno y de oxígeno.

En su forma más simple, un experimento de RMN consta de tres pasos:

1. Colocación de la muestra en un campo magnético estático.
2. Excitación de los núcleos en la muestra con un pulso de radiofrecuencia.
3. Mida la frecuencia de las señales emitidas por la muestra.

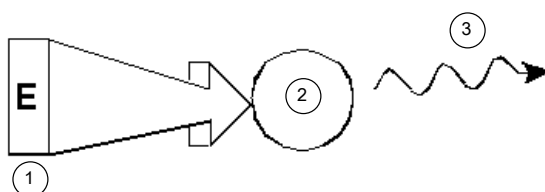


Figura 3.1: Excitación y respuesta

1.	Pulso de excitación	2.	Átomo
3.	Señal emitida		

A partir de las frecuencias emitidas, los analistas pueden deducir información sobre los enlaces y la disposición de los átomos en la muestra. Los núcleos activos por RMN en la muestra resuenan a diferentes frecuencias denominadas **frecuencias de resonancia**. Se trata de las frecuencias emitidas por los núcleos cuando se excitan mediante el pulso de radiofrecuencia entrante. El valor de una frecuencia de resonancia depende de dos factores:

1) Tipo de núcleo:

Cada isótopo cuenta con una combinación determinada de protones y neutrones en su núcleo. La estructura nuclear determina en gran medida el valor de la frecuencia de resonancia. Así, cada isótopo muestra una **frecuencia de resonancia básica**. Los núcleos ^{13}C tendrán una frecuencia de resonancia básica diferente de la de ^1H , etc. Nótese la gran variación en las frecuencias de resonancia básicas entre diferentes isótopos tal y como aparecen en la siguiente tabla:

Núcleo	Activos por RMN	Frecuencia de resonancia básica (aprox.) [MHz]	Abundancia natural [%]
^1H	sí	500	99.98
^2H	sí	77	0.015
^3H	sí	533	Trazas (aprox. 10^{-18})
^{12}C	no	---	98.89
^{13}C	sí	126	1.11
^{35}Cl	sí	49	75.77
^{37}Cl	sí	41	24.23

Tabla 3.1: Tabla de datos para diversos isótopos (frecuencias correspondientes a un imán de 11,7 T)

2) Entorno atómico local:

A la frecuencia de resonancia básica se superpone un efecto debido al entorno atómico local en el que se halla el isótopo. El valor preciso de la frecuencia de resonancia de un núcleo ^1H en un determinado compuesto dependerá de los átomos a los que esté enlazado y de los que esté rodeado. El núcleo está rodeado de electrones que pueden verse como cargas eléctricas en movimiento con campos magnéticos asociados. Estos electrones actúan como una fuente de blindaje magnético para el núcleo. La extensión del blindaje dependerá del entorno atómico local en concreto. El tamaño de las variaciones de campo locales típicas (que resultarán en una variación de frecuencia) dependerá del isótopo y de la intensidad del campo magnético en el que se coloca la muestra. La siguiente tabla muestra la variación de frecuencia típica para dos de los núcleos de RMN más utilizados, ^1H y ^{13}C . Queda claro que el entorno atómico local tiene un efecto relativamente reducido sobre la frecuencia de resonancia básica.

Núcleo	Variación típica en una frecuencia de resonancia básica debido a un entorno atómico local.
^1H	6 kHz
^{13}C	30 kHz

Tabla 3.2: Variaciones de frecuencia (correspondientes a un imán de 11,7 T)

Las señales de RMN suelen representarse como espectros y analizarse respecto a dos características, **frecuencia** e **intensidad**. Habitualmente, en la RMN, se representa la frecuencia en el eje horizontal axis aumentando hacia la izquierda.

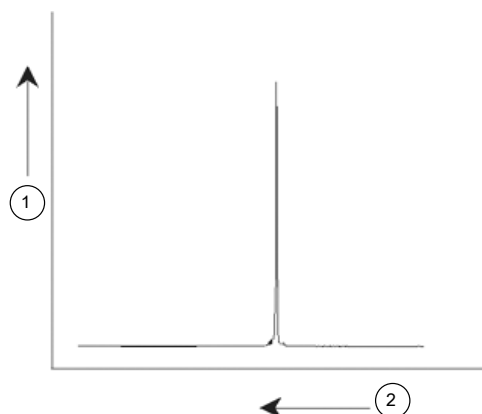


Figura 3.2: Espectro de RMN

1.	Intensidad
2.	Frecuencia

Como se ha mencionado, la frecuencia proporciona información cualitativa sobre el entorno atómico local. La **Integral intensidad** de una señal es una **medida de potencia de la señal** y se determina mediante la integración del área bajo el pico de la señal. La integral será directamente proporcional al número de núcleos que contribuyen a una señal en una frecuencia determinada (si todos los núcleos están excitados en la misma medida) y, por tanto, proporcionará información cuantitativa respecto a la estructura química.

Para excitar un núcleo determinado en un experimento de RMN, la frecuencia del pulso de la excitación deberá coincidir con bastante exactitud con la frecuencia de resonancia del núcleo. Esta frecuencia se denomina **frecuencia portadora**. Así, si los experimentos se llevan a cabo con un imán de 11,7 T, los núcleos ^1H requerirán una frecuencia portadora de aproximadamente 500 MHz; mientras que los núcleos ^{13}C requerirán una frecuencia portadora cercana a los 126 MHz. La frecuencia portadora se especifica mediante el parámetro SFO1. El núcleo excitado por esta frecuencia portadora se denomina **núcleo observado**.

Debe tenerse en cuenta que hay experimentos en los que se excita más de un núcleo; p. ej. durante la transferencia de polarización o el desacoplamiento. En estos casos, uno tiene más de una frecuencia portadora pero sigue teniendo únicamente una frecuencia observada.

No todos los **isótopos** responderán a pulsos de radiofrecuencia; es decir, no todos son **activos por RMN**. Tres isótopos del elemento hidrógeno se encuentran en la naturaleza: ^1H (hidrógeno), ^2H (deuterio) y ^3H (tritio, ¡radioactivo!). La abundancia natural de estos isótopos es 99,98 %, 0,015 % y 0,005 % respectivamente. Los tres son activos por RMN; aunque, como puede verse en la tabla 3.1, todos muestran una gran variación en frecuencia de resonancia. Para analizar una muestra respecto a hidrógeno, se excita el isótopo ^1H , dado que dicho isótopo es claramente el más abundante. De los isótopos de carbono que se encuentran en la naturaleza, únicamente uno es activo por RMN. Con diferencia, el isótopo más común, ^{12}C (98,89 % de abundancia natural) es inactivo. Por lo tanto, el análisis de RMN de los compuestos orgánicos respecto a carbono depende de las señales emitidas por el isótopo ^{13}C , que presenta una abundancia natural de tan solo 1,11 %. Obviamente, el análisis de RMN respecto a carbono es más difícil que el de, por ejemplo, ^1H (existen otros factores que afectan a la sensibilidad y que comentaremos en las siguientes secciones de este capítulo).

Utilizando la breve introducción a la RMN esbozada anteriormente, un buen ejercicio es reflexionar sobre cómo la técnica podría utilizarse para analizar la composición del cloroformo (CHCl_3).

3.1 Análisis de RMN del cloroformo

Pueden llevarse a cabo tres experimentos individuales, como se esbozan en la siguiente figura, correspondiendo a los tres núcleos observados posibles ^1H , ^{13}C y ^{35}Cl .

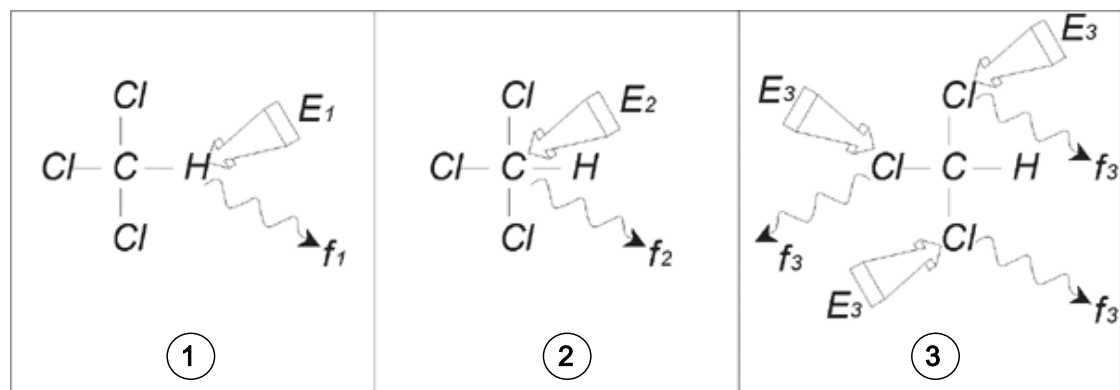


Figura 3.3: Análisis mediante RMN de CHCl_3

1	Excitación E_1
2	Excitación E_2
3	Excitación E_3

Tres pulsos de excitación (E_1 , E_2 , E_3) se dirigen a la muestra a las frecuencias portadoras apropiadas. E_1 corresponde a la frecuencia de resonancia ^1H , E_2 a la frecuencia ^{13}C y E_3 a la frecuencia ^{35}Cl . Asumiendo que los tres isótopos se hayan excitado correctamente, la muestra emitirá señales a tres frecuencias f_1 , f_2 y f_3 ; lo que se registra en tres espectros separados. Si las señales emitidas se muestran en un trazado simple, el usuario puede esperar un espectro de ese tipo en la siguiente figura (tenga en cuenta que las frecuencias de señales ilustradas corresponden a un imán de 11,7 T y que todas las señales se han trazado como singletes; es decir, picos únicos).

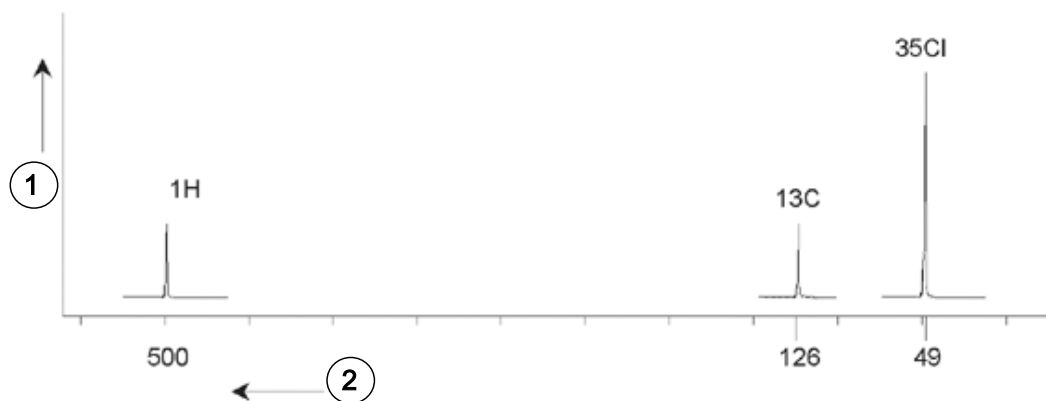


Figura 3.4: Señales de RMN emitidos por el CHCl_3

1	Intensidad
2	Frecuencia (MHz)

Este espectro artificial muestra tres picos correspondientes a tres isótopos. Teniendo en cuenta los números relativos de los tres isótopos, podría esperarse que la intensidad de los picos de cloro, hidrógeno y carbono se hallen en una proporción de 3:1:1. Sin embargo, la abundancia natural de los tres isótopos debe tenerse también en cuenta, por lo que la proporción es en realidad 227:100:1. El usuario se encontrará con que las tasas de intensidad de los picos establecidos de forma experimental no concuerdan con estos valores. El motivo es que cada isótopo tiene una sensibilidad inherente a la técnica de la RMN. El ^1H es 63 veces más sensible a RMN que ^{13}C . Así, incluso si una muestra contiene el mismo número de núcleos ^1H que ^{13}C , la intensidad de las señales ^1H será 63 veces mayor que la de las señales ^{13}C .

Con un trazado como el de la figura anterior, se pierde información detallada y resulta imposible determinar una frecuencia de forma precisa. Podría decirse que el espectro muestra una resolución deficiente (la resolución horizontal de un espectro es una medida de hasta qué punto diferencia el espectro entre dos señales cercanas en frecuencia).

Otra complicación es el enorme rango de escalado vertical. La variación en sensibilidad inherente a la RMN, junto con las variaciones en abundancia natural, a menudo hará que no sea factible llevar a cabo la representación en un único trazado de las señales correspondientes a diferentes isótopos. De hecho, la resolución vertical del espectro será muy deficiente (la resolución vertical, es decir, la relación señal/ruido de un espectro es una medida de sensibilidad).

Si nuestro análisis de cloroformo está resultando bastante complicado es porque estamos intentando comparar las señales de tres núcleos observados diferentes en un único espectro (estamos ignorando en este caso toda restricción de hardware o electrónica). Por lo tanto, en la práctica, los experimentos de RMN se llevan a cabo con un único núcleo observado. Aunque puede excitarse más de un isótopo simultáneamente, usando más de una frecuencia portadora (p. ej. experimentos de desacoplamiento), únicamente llegamos a observar las señales de un único isótopo. Esto simplifica enormemente el análisis del espectro.

Se ha mencionado anteriormente que las variaciones de la frecuencia de resonancia básica debido al entorno atómico local suelen ser relativamente pequeñas. De esa forma, no hallamos grandes rangos espectrales. Es más, la abundancia natural y la sensibilidad inherente serán siempre las mismas para un isótopo. Por tanto, la intensidad relativa de, por ejemplo, dos señales emitidas desde isótopos ^1H en un único espectro dependerá únicamente del número de átomos que contribuyen a la señal. Esto simplifica enormemente el análisis de los espectros para obtener información cuantitativa. Antes de continuar con una descripción más detallada de la RMN, el lector deberá familiarizarse con el concepto de medición de señales en *ppm* (partes por millón) respecto a una señal de referencia.

3.2 Compuesto de referencia, hercios, ppm

Ya se ha comentado que las señales de RMN se analizan respecto a dos características, intensidad y frecuencia. Las frecuencias absolutas se miden en hercios (Hz - ciclos por segundo) o megahercios (MHz). El informe sobre las señales medidas se simplifica si todas las mediciones de frecuencia se realizan respecto a la referencia. Para RMN de ^1H , la referencia recomendada es una sustancia química denominada tetrametilsilano (TMS). Cuando se adquiere un espectro ^1H o ^{13}C , la presencia de TMS origina un pico único y fácilmente identificable. Dicho pico toma el valor cero como referencia y las frecuencias de todos los demás picos se indican en términos de su frecuencia en relación con la frecuencia de TMS. De esa forma, podemos hablar de una señal que está 2,5 kHz *por encima* del pico de TMS. Esto es preferible a citar la frecuencia absoluta de la señal, lo que podría asemejarse a 500,1325 MHz.

Referenciar las señales respecto al pico de TMS reduce claramente el número de dígitos necesarios para describir la frecuencia de una señal. Sin embargo, esto se puede simplificar aún más si se usa la unidad ppm en lugar de los hercios. La unidad ppm representa frecuencias como fracción de la frecuencia de resonancia absoluta que dependerá de la intensidad del imán. La ventaja de la unidad ppm es que las mediciones de frecuencia son independientes de la potencia del imán. Esto simplifica enormemente la comparación de espectros adquiridos con diferente espectrómetros.

Los factores de conversión a utilizar al cambiar de hercios a ppm (y viceversa) se muestran en el siguiente diagrama.

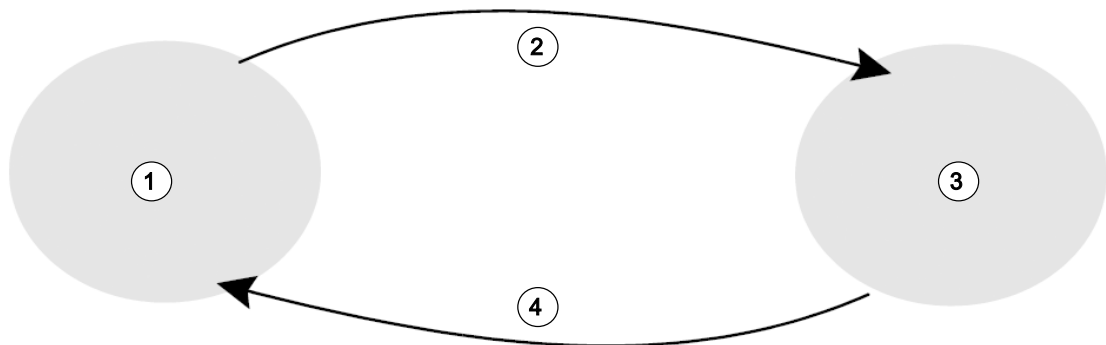


Figura 3.5: Conversión de hercios y ppm

1	Hercios	3	ppm
2	Dividir entre la frecuencia portadora (SFO1) en MHz	4	Multiplicar por la frecuencia portadora (SFO1) en MHz

Las ventajas de utilizar la unidad ppm quedarán más claras con un ejemplo práctico.

Supongamos que se observó una señal ^1H a 2,5 kHz por encima de TMS usando una frecuencia portadora (SFO1) de 500 MHz. La frecuencia de cualquier señal de RMN emitida es directamente proporcional a la potencia del imán. La misma señal aparecería a 3,0 kHz por encima de TMS en un espectrómetro de 600 MHz y a 2,0 kHz por encima de TMS en una máquina de 400 MHz. Una única conversión puede no resultar un gran problema, pero debe llevarse a cabo para cada pico de cada sistema. Tengamos ahora en cuenta la misma señal, pero citada en la unidad ppm.

Frecuencia en hercios dividida entre SFO1 = Frecuencia en ppm

Ejemplos:

$$2500 \text{ Hz} / 500 \text{ MHz} = 5 \text{ ppm}$$

$$3000 \text{ Hz} / 600 \text{ MHz} = 5 \text{ ppm}$$

$$2000 \text{ Hz} / 400 \text{ MHz} = 5 \text{ ppm}$$

La señal ^1H puede describirse ahora como ubicada a 5 ppm *por encima*; es decir, con un desplazamiento a campo más bajo respecto al pico de TMS con independencia de la frecuencia del espectrómetro.

Los usuarios experimentados trabajarán siempre con ppm y los espectros reproducidos en las publicaciones científicas mostrarán una escala horizontal graduada en ppm y no en hercios.

El lector debería ser consciente de algunas simplificaciones realizadas en el ejemplo anterior. El valor de la frecuencia portadora de ^1H con un espectrómetro de 500 MHz no será exactamente 500 MHz. La frecuencia portadora a utilizar en un cálculo en ppm debería ser el valor preciso asignado al parámetro SF01. De manera similar, para los espectrómetros de 600 MHz y 400 MHz, citados por encima de la frecuencia portadora de ^1H , el valor no será exactamente 600 MHz y 400 MHz, respectivamente.

También debe tenerse en cuenta que un valor en ppm positivo denota una frecuencia superior a TMS y se define como *desplazamiento a campo más bajo* en relación con TMS.

3.3 RMN de Protón – Desplazamientos químicos

Dado que ^1H es el isótopo más comúnmente observado en experimentos de RMN, abordaremos este tema en mayor detalle. Un núcleo de ^1H contiene un único protón y los espectros en los que ^1H es el núcleo observado suelen denominarse espectros de protón.

Se ha afirmado anteriormente que un protón en un imán de 11,7 T mostrará una frecuencia de resonancia básica de aproximadamente 500 MHz, pero que la frecuencia de resonancia precisa dependerá del entorno atómico local. Un protón en una molécula de cloroformo resuena a una frecuencia ligeramente diferente en comparación con un protón en benceno (C_6H_6). Por lo tanto, la frecuencia emitida actúa como una etiqueta que ofrece a los analistas información cualitativa sobre el entorno atómico local en el que se halla un protón. Esta es la base de la RMN.

La variación en la frecuencia de resonancia precisa se denomina *desplazamiento químico*. La frecuencia de resonancia se ve desplazada por el efecto de átomos vecinos y el alcance del blindaje magnético de electrones locales comentado anteriormente. El tamaño del desplazamiento suele medirse en ppm en relación con el pico de TMS que tiene un valor de referencia de 0 ppm.

La mayoría de protones, con independencia del compuesto orgánico al que están vinculados, muestran desplazamientos químicos en un rango de 14 ppm de TMS. La siguiente figura es una ilustración de desplazamientos químicos de protones típicos en compuestos orgánicos.

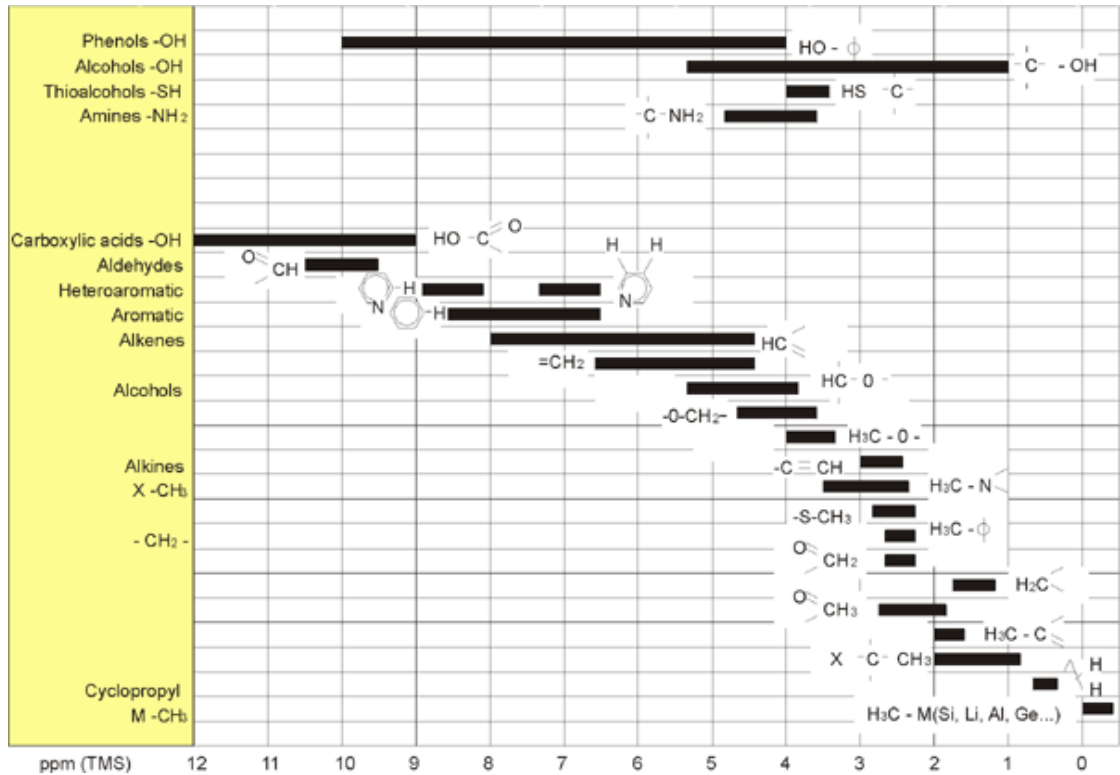


Figura 3.6: Desplazamientos químicos de 1H en compuestos orgánicos

3.4 Espectro de protón del benceno

La estructura del anillo del benceno queda ilustrada en la siguiente figura:

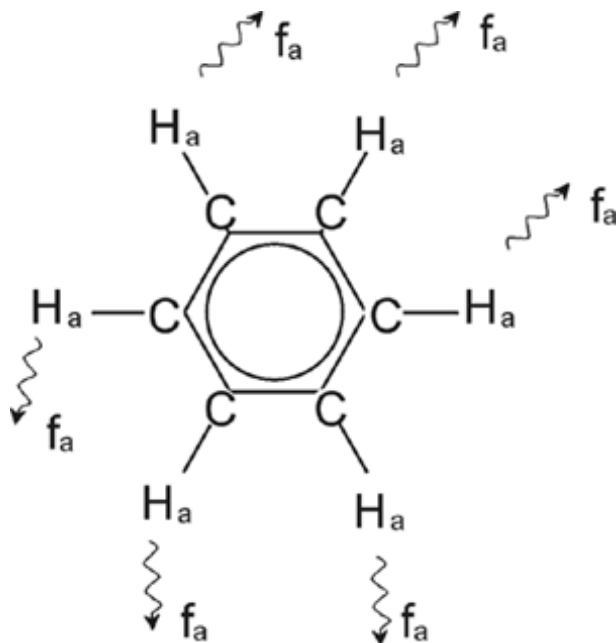


Figura 3.7: Anillo del benceno

Los seis protones (etiquetados como H_a) pueden considerarse idénticos. Cada uno de ellos está vinculado a un átomo de carbono. Cada átomo de carbono, a su vez, forma dos enlaces aromáticos con sus vecinos de carbono más cercanos. Por tanto, cada uno de los seis protones está en un entorno químico idéntico y se considera *equivalente químicamente* y, en este caso, incluso *equivalente magnéticamente*. Resonarán todos a exactamente la misma frecuencia f_1 sin mostrar un patrón de acoplamiento. Es más, el benceno puro emitirá una única señal. La siguiente figura es un espectro de benceno en acetona - d_6 y muestra que la señal está ubicada a 7,5 ppm.

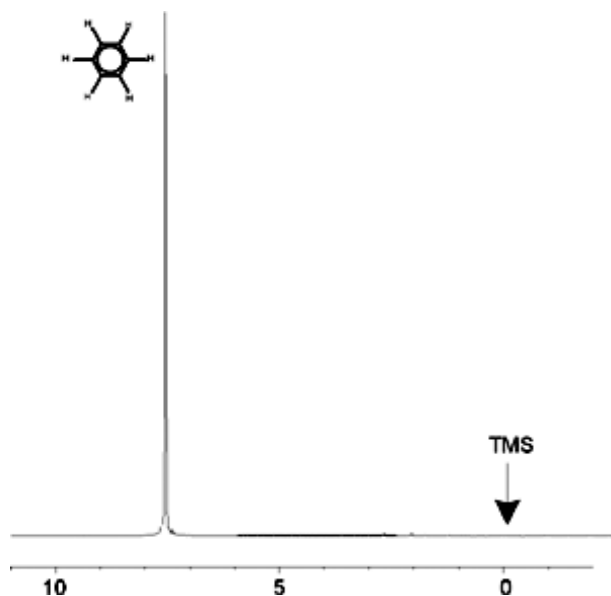


Figura 3.8: Espectro del benceno

3.5 Espectro de protón del acetato de bencilo

El bencilacetato ($C_6H_5 - CH_2 - O - CO - CH_3$) es una molécula orgánica más complicada cuya estructura queda ilustrada en la siguiente figura:

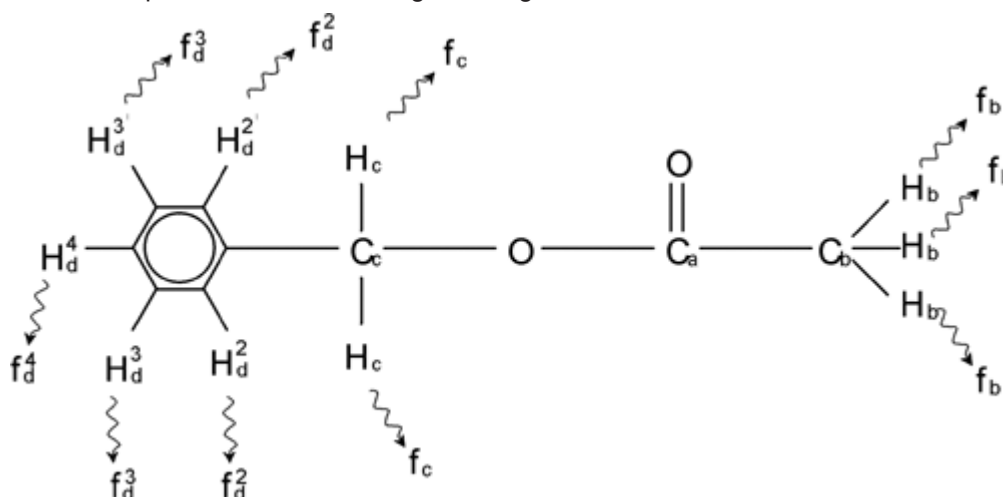


Figura 3.9: Bencilacetato

Ahora podemos distinguir entre tres grupos diferentes de protones que se han etiquetado de la forma correspondiente. Por ejemplo, los tres protones etiquetados como H_b se encuentran claramente en un entorno atómico diferente al de los dos protones etiquetados como H_c .

Los tres protones H_b están enlazados al carbono C_b que se enlaza de forma individual a otro átomo de carbono C_a . Los dos protones H_c están enlazados al carbono C_c que, por sí mismo, está enlazado de forma individual al anillo del benceno y a un átomo de oxígeno. El tercer grupo de protones consta de cinco protones H_d del propio anillo del benceno. La siguiente figura es un espectro de protón de bencilacetato en acetona - d_6 . En este espectro son de esperar tres señales correspondientes a los tres grupos de protones.

Téngase en cuenta que la posición de las señales de los protones del anillo del benceno se ha desplazado ligeramente desde 7,5 ppm (que aparecen en el espectro de la figura del benceno) a aproximadamente 7,2 ppm (que aparecen en la siguiente figura).

Los protones del anillo del benceno ya no son equivalentes magnéticamente; hasta cierto punto, ni siquiera son equivalentes químicamente, y se han etiquetado de la forma correspondiente. Queda claro en la figura 3.10 que la señal que surge de los protones H_d es un multiplete, pero esos detalles se omitirán hasta la siguiente sección. Los tres picos de protones que aparecen en esta figura muestran claramente diferentes intensidades.

El análisis cuantitativo del espectro es relativamente simple, dado que todas las señales las emite un mismo isótopo 1H ; es decir, la abundancia natural y la sensibilidad inherente a la técnica de RMN son las mismas para cada pico. Por lo tanto, el área debajo del benceno, los picos CH_2 y CH_3 , deberán estar en una proporción de 5:2:3 respectivamente, en correspondencia con el número de protones que se contribuyen.

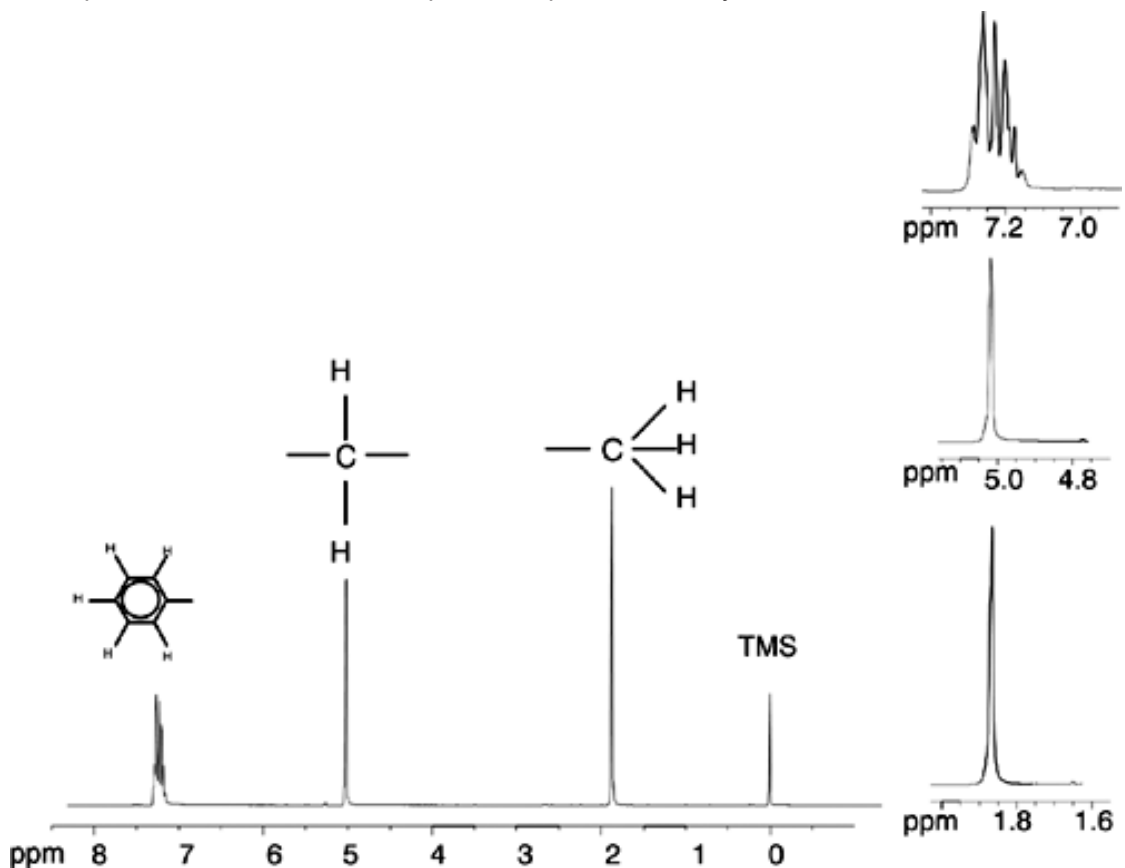


Figura 3.10: Espectro de protón del bencilacetato

3.6 Espectro de protón del etilbenceno con acoplamiento espín / espín

La descripción de los espectros de RMN de protón hasta ahora se ha visto muy simplificada por el hecho de que todas las señales, con la excepción de las del anillo del benceno en el bencilacetato, han sido singletes. La estructura del compuesto orgánico etilbenceno y el espectro de protón correspondiente se ilustran en la figura del etilbenceno y en la del espectro del etilbenceno, respectivamente. Como anteriormente, los protones se han etiquetado como tres grupos distintos correspondientes a tres entornos atómicos básicos.

La diferencia más obvia entre las señales de este espectro y las del bencilacetato es la división en **multipletes**. La señal emitida por los protones CH_3 es un **tripleto** y la señal de los protones CH_2 es un **cuarteto**. Téngase en cuenta también que las posiciones de la señal no coinciden. Los protones CH_3 del bencilacetato emiten una señal a 1,85 ppm, mientras que los protones CH_3 correspondientes del etilbenceno emiten la señal del tripleto a 1,25 ppm. No es ninguna sorpresa, porque los dos grupos de CH_3 se hallan en diferentes entornos químicos.

La causa de la división en multipletes es un efecto denominado acoplamiento espín-espín. Este manual no pretende abordar en profundidad dicho efecto, el lector deberá consultar un texto de RMN estándar si desea información más detallada. Para nuestros fines, un breve esbozo del acoplamiento espín-espín será suficiente.

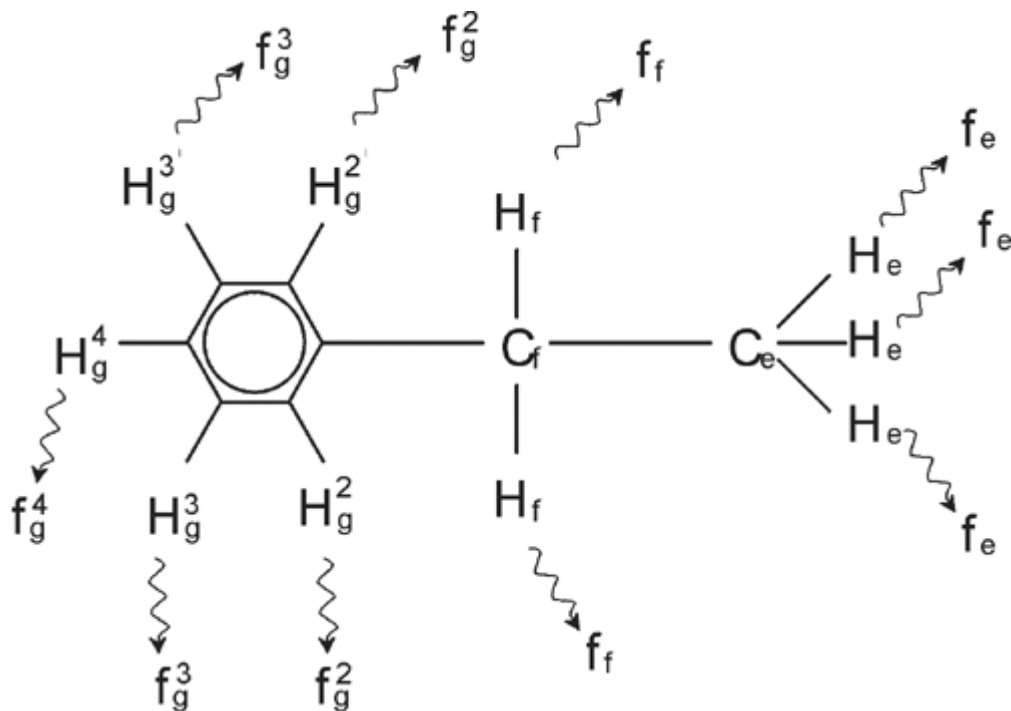


Figura 3.11: Etilbenceno

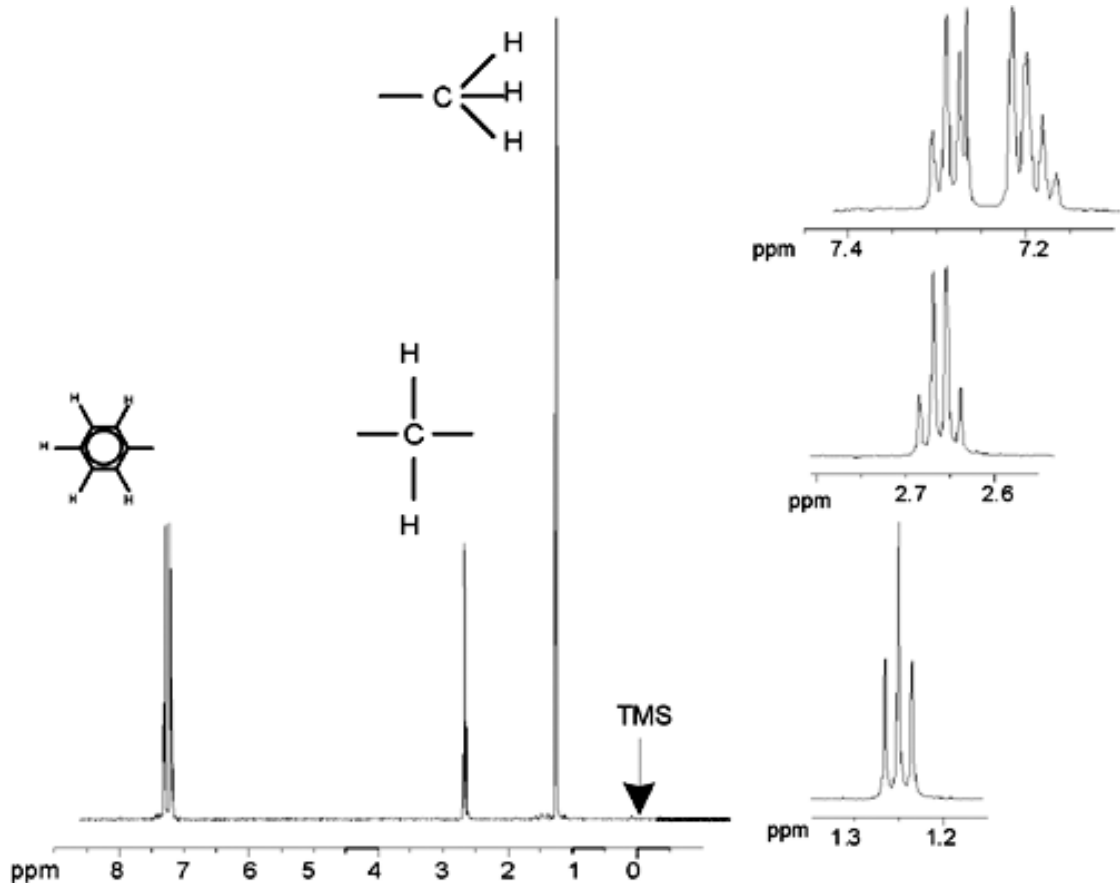


Figura 3.12: Espectro del etilbenceno

La división de las señales de RMN en la figura del etilbenceno es el resultado de una interacción magnética entre protones vecinos. Los dos protones H_f son equivalentes magnéticamente y no interactúan entre sí. Similarmente, los tres protones H_g son equivalentes magnéticamente y no afectan el uno al otro. Sin embargo, los dos protones H_f y los tres protones H_e están en diferentes entornos locales y se “acoplan” entre sí mediante sus electrones de enlace. El resultado neto de este acoplamiento es que los dos grupos de protones interactúan entre sí y causan la división de las señales de RMN.

Los dos protones H_f pueden combinarse para existir en tres posibles estados magnéticos (se trata del resultado de la orientación del espín y de ahí el término acoplamiento espín-espín). Como resultado del acoplamiento, las señales de RMN emitidas por los protones H_e resuenan a tres frecuencias posibles y se observa un triplete.

De manera similar, el efecto de los protones H_e es dividir las señales de H_f . Los tres protones H_e pueden combinarse para existir en cuatro estados magnéticos posibles. En consecuencia, los protones H_f resuenan a cuatro frecuencias posibles, por lo que la señal se divide en un cuarteto.

Las señales de los protones de benceno también se han dividido como resultado de la no-equivalencia magnética, dando como resultado un acoplamiento espín-espín. La cuestión es por qué los protones CH_2 y CH_3 del etilbenceno interactúan entre sí, mientras que los dos grupos comparables de protones en bencilacetato no lo hacen. La respuesta se halla en el número de enlaces que separan ambos grupos. En el etilbenceno, los dos grupos de protones están fijados a átomos de carbono adyacentes y puede esperarse que interactúen suficientemente entre sí. En el bencilacetato, sin embargo, los dos átomos de carbono C_c y C_b están conectados mediante dos vínculos extra entre el oxígeno y otro átomo del carbono. Como resultado, los grupos de protones están demasiado alejados entre sí para mostrar un acoplamiento espín-espín significativo.

3.7 Desacoplamiento

El efecto del acoplamiento espín-espín puede eliminarse mediante una técnica denominada “desacoplamiento”. El efecto del desacoplamiento es enmascarar la presencia de un grupo de protones en concreto; p. ej. los protones H_e en la figura del etilbenceno. Se adquiere un espectro como si los protones H_e no estuvieran. Esto se logra mediante la transmisión de una secuencia de pulso de desacoplamiento en la frecuencia de resonancia de H_e (frecuencia de resonancia f_e), lo que cambia permanentemente la orientación del espín de dichos protones. Para el espectro ilustrado en la figura del espectro del etilbenceno, la frecuencia de desacoplamiento sería de 1,25 ppm por encima del pico de TMS.

Los pulsos de desacoplamiento suelen ser más largos y de menor potencia que los pulsos de excitación. La siguiente figura del Experimento de desacoplamiento es una representación de un experimento de desacoplamiento, mientras que el espectro del etilbenceno con homodesacoplamiento muestra el espectro desacoplado. El cuarteto CH_2 se ha convertido en un **singlete**. Los epectroscopistas hablan de un cuarteto que colapsa en un singlete. Además, el área debajo del singlete debería ser igual a la del cuarteto original (compárese las alturas relativas de los picos de los anillos de CH_2 y benceno en las dos figuras). La señal del grupo CH_3 a 1,25 ppm no se halla en el espectro desacoplado porque los pulsos de desacoplamiento eliminan de manera efectiva los efectos de la presencia de los protones CH_3 .

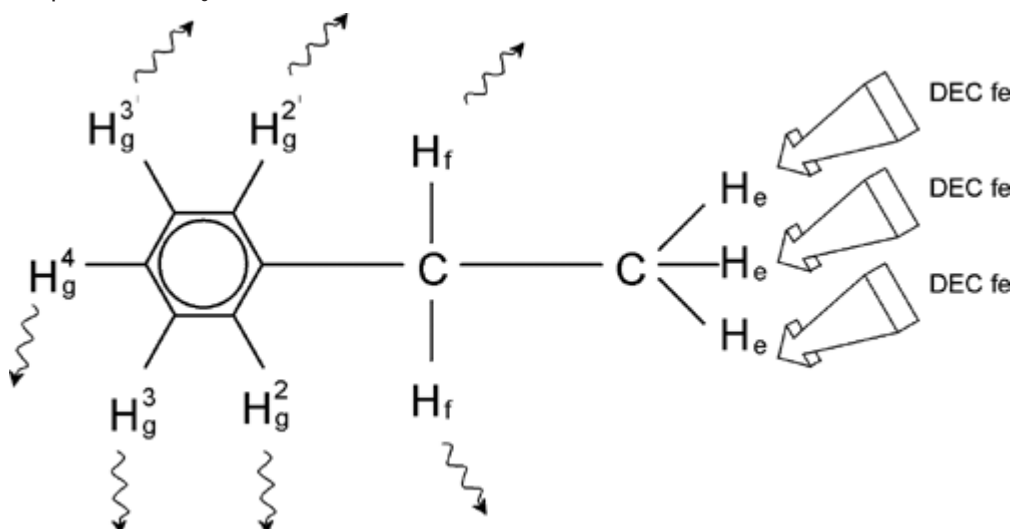


Figura 3.13: Experimento de desacoplamiento

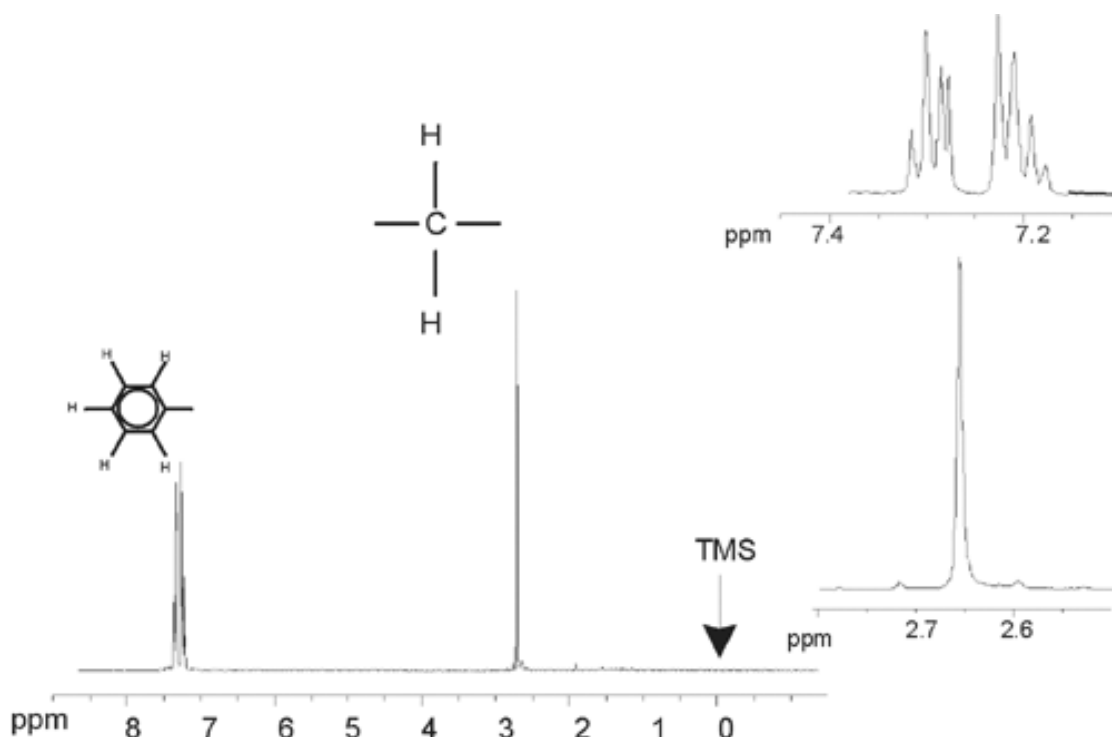


Figura 3.14: Espectro de etilbenceno con homodesacoplamiento

El experimento descrito anteriormente es un ejemplo de homodesacoplamiento en el que el mismo isótopo, concretamente ^1H , se observa y desacopla. El heterodesacoplamiento tiene lugar cuando el isótopo a observar es diferente del que está desacoplado. En el capítulo [Espectro de \$^{13}\text{C}\$ con desacoplamiento de protón \[▶ 67\]](#) de este manual, llevará a cabo un experimento de heterodesacoplado en el que observará ^{13}C y desacoplará ^1H . Los espectrómetros AVANCE pueden realizar experimentos muy complejos dependiendo del número de canales instalados. Puede utilizarse un espectrómetro de cuatro canales para observar un núcleo y desacoplar otros tres. Al contar con hasta ocho canales independientes, el rango de experimentos posible es sorprendente. El usuario debería ser consciente de que el factor limitante actualmente no radica en la generación de excitación de RF y los pulsos de desacoplamiento, sino en la transmisión de dichos pulsos a la muestra mediante sondas y, hasta cierto punto, en los preamplificadores. El enrutamiento de señales del experimento a realizar se configura mediante el menú “edasp”. Encontrará más detalles en el manual “Comandos y parámetros de adquisición” (P/N H9775SA3).

3.8 FID y espectro

Las señales emitidas por los átomos excitados en la muestra son recibidas por el espectrómetro y procesadas mediante la transformada de Fourier en el ordenador. El proceso de recibir las señales de RMN se llama adquisición. Se dice que los datos son adquiridos. Hay que distinguir los términos “FID” (dominio del tiempo) y su “espectro” asociado (dominio de frecuencia).

Cuando se realiza una adquisición, se adquieren los datos “originales” y la señal recibida se llama FID (caída libre de la inducción). Una FID típica se muestra en la figura siguiente.

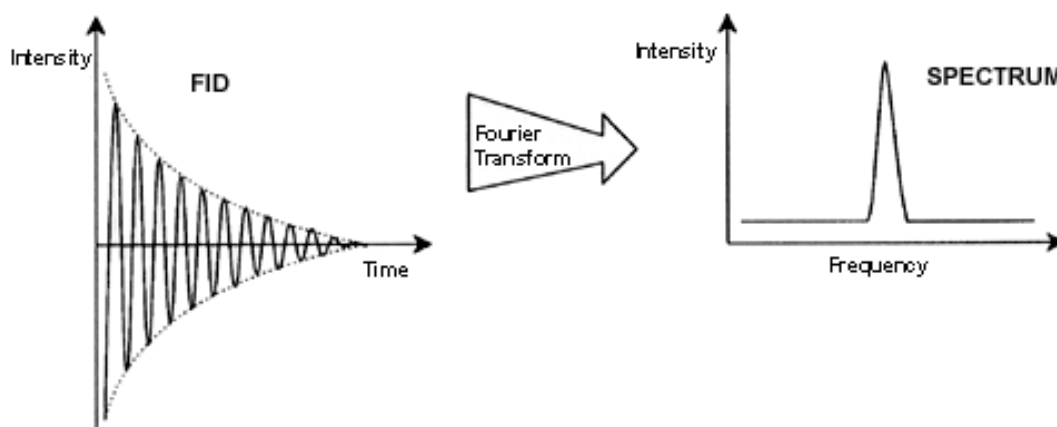


Figura 3.15: Transformada de Fourier

Para que una FID se pueda analizar de forma útil, debe transformarse primero en el dominio de la frecuencia. Esto se logra aplicando una transformada de Fourier. Una **transformada de Fourier** es una operación matemática que convierte la FID en un espectro de frecuencias. Una **FID** es una señal cuya intensidad varía con el tiempo, mientras que un espectro muestra como la intensidad varía con la frecuencia. La transformada de Fourier es el proceso más importante de las diferentes operaciones de procesamiento que se llevan a cabo normalmente con los datos originales.

4 Descripción del sistema

El espectrómetro consta de las siguientes subunidades:

- **Consola del operario**, que incluye el ordenador principal, el monitor y el teclado.
- **Consola**, que contiene el hardware electrónico.
- **Sistema de imán**, que incluye el sistema de homogeneización y la sonda.



Figura 4.1: Consola AVANCE NEO e imán Ascend

4.1 Visión de la arquitectura AVANCE

La siguiente imagen muestra una vista general de la arquitectura simplificada de un sistema AVANCE NEO. Utilice BASH (manual de servicio avanzado de Bruker, por sus siglas inglesas) si necesita más información sobre el sistema y el hardware AVANCE.

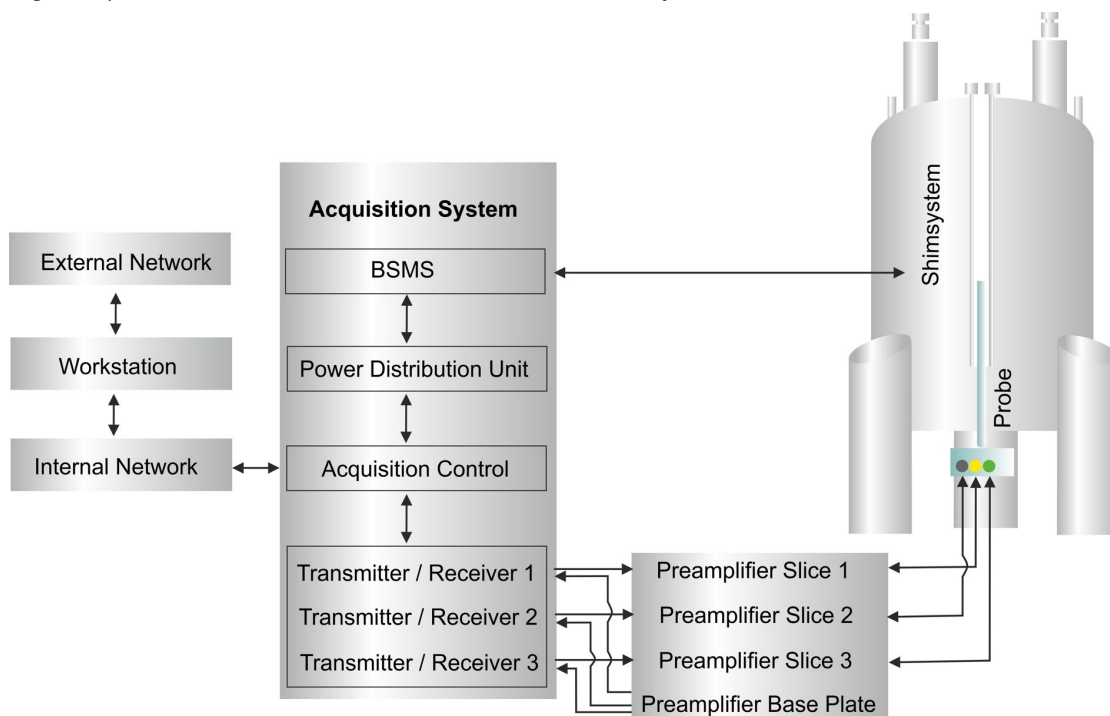


Figura 4.2: Vista general de la arquitectura de AVANCE NEO

4.1.1 Consola del operador y conexiones

Todos los aspectos del funcionamiento del espectrómetro se controlan desde la consola del operario. El diseño y la implementación de los experimentos, así como el análisis de datos, se controlan mediante comandos introducidos por el operario en la consola. Los subcomponentes de la consola del operario son los siguientes:

Ordenador principal: Se trata de un ordenador personal. El ordenador principal ejecuta el programa TopSpin y maneja todo el análisis y el almacenamiento de los datos. Todas las operaciones relevantes para la adquisición de datos se controlan mediante un segundo sistema informático denominado AQS y alojado en la propia consola.

Conexión Ethernet del ordenador principal a AQS: Se utiliza para transferir datos e instrucciones entre el ordenador principal y AQS.

4.2 Consola

Esta unidad puede ser una bahía NanoBay, OneBay, o TwoBay, dependiendo del sistema, y alojará la mayor parte del hardware electrónico asociado con un espectrómetro digital moderno. Las unidades principales son **AQS**, **BSMS** (sistema de imanes inteligente de Bruker, por sus siglas inglesas) y varios amplificadores (con o sin gradiente) (en caso de microimagen o difusión).

AQS: Las diversas unidades dentro de AQS generan los pulsos de radiofrecuencia utilizados para excitar la muestra y recibir, amplificar y digitalizar las señales de RMN emitidas por la muestra. Para cada canal de RF, existe un transceptor (**TRX 1200**) que interpreta el programa de pulsos, lo convierte en señales de RF e incluye un receptor, un digitalizador y un filtrado digital de los datos. Eso significa que una consola AVANCE es un auténtico sistema de multirrecepción que, por diseño, tiene tantos receptores como canales de excitación de pulsos. Los gradientes de campo pulsado se generan mediante una unidad adicional denominada **GTU** (unidad de gradiente y temporización). Esta unidad también genera y recibe señales de disparo en tiempo real que se utilizan para sincronizar otras unidades (p. ej., señal de disparo del rotor MAS). La tarjeta electrónica REF (Referencia) proporciona una señal de reloj o sincronismo común para todos los canales. De esa forma, todas las frecuencias de la cadena de RF se derivan de un oscilador de cuarzo de gran precisión para garantizar una sincronización general y niveles de ruido bajos. AQS también aloja a **EPU**. Se trata de un potente ordenador que administra el espectrómetro AVANCE, envía información del programa de pulsos a las unidades TRX y GTU, proporciona el control de la adquisición y se comunica con las estaciones de trabajo externas de procesamiento de datos. La última fase del filtrado digital se realiza en EPU, así como la acumulación de los datos de FID. La información se traslada entonces vía Ethernet a un ordenador principal externo para continuar con el procesamiento y el almacenamiento. Es importante hacer énfasis en que EPU tiene un control total sobre el funcionamiento del espectrómetro durante toda la duración del experimento. Eso sirve para garantizar un funcionamiento sin interrupciones y la integridad de la adquisición.

BSMS: El sistema se controla mediante software usando el comando "bsmsdisp" y se utiliza para hacer funcionar el sistema de bloqueo y homogeneización, así como para controlar la elevación y el espín de la muestra. La unidad **BSVT** también está incorporada en BSMS. Su función es variar la temperatura de la muestra de forma controlada, o mantenerla en un valor constante. Además, pueden colocarse hasta tres **GAB/3** en el soporte BSMS. Aportan los gradientes de campo pulsados para sondas de alta resolución y se controlan mediante la unidad **GTU**.

Amplificadores, también denominados **Transmisores**. Las señales con una amplitud relativamente grande normalmente requieren que se excite la muestra RMN, para lo que es necesario amplificar las señales de RF de las unidades TRX. Los amplificadores pueden ser internos (e ir incorporados en el soporte del AQS) o externos (unidades independientes). Los cables que van directamente desde las salidas del amplificador hasta **HPPR** (preamplificador de alto rendimiento por sus siglas inglesas) llevan la señal de RF a la muestra. Aunque existe una amplia gama de amplificadores disponibles (incluyendo amplificadores para sólidos), las dos categorías principales son:

Amplificadores selectivos, por ejemplo, los amplificadores selectivos ^1H , ^{19}F , ^{13}C o ^{31}P . Se han diseñado específicamente para amplificar las frecuencias más altas asociadas con ^1H , ^{19}F , ^{13}C o ^{31}P .

Amplificadores de banda ancha (también denominados amplificadores X). Se han diseñado para amplificar una amplia gama de frecuencias. Se utilizan para la excitación de los denominados núcleos X (es decir, para todo menos para ^{19}F y ^1H).

Tenga en cuenta que los nuevos amplificadores de banda ancha también abarcan ^{19}F hasta 600 MHz, lo que simplifica el uso de sondas SMART y sondas BBFO en las que la bobina X de banda ancha pueda ajustarse hasta ^{19}F .

PDU: Se utiliza una unidad de distribución de potencia en la parte posterior de la consola para encender el espectrómetro de forma controlada. Es posible encender / apagar AVANCE mediante una instrucción de software desde TopSpin. La PDU se encarga de que todas las unidades se enciendan / apaguen en el orden correcto y de que las unidades de alta potencia se enciendan con retardos de tiempo adecuados para limitar la corriente de entrada del sistema.

4.3 Enlace entre el ordenador principal y AQS

Aunque durante una sesión habitual de TopSpin este enlace estará permanentemente operativo y totalmente invisible para el usuario, el enlace se interrumpe cada vez que el ordenador principal o la consola se apagan y debe restablecerse cuando se vuelven a encender. Esto se hará automáticamente.

4.4 Imán, sistema de homogeneización, preamplificador HPPR y sonda

El **imán** genera el campo magnético necesario para inducir transiciones de RMN. Para mantener un sistema superconductor, se enfría el núcleo del imán a temperaturas muy bajas usando nitrógeno y helio líquidos (encontrará más detalles en la sección [Imán y dewar del imán \[27\]](#)).

El sistema de homogeneización a temperatura ambiente **sistema de homogeneización**, instalado en el extremo inferior del imán, es un conjunto de bobinas portadoras de corriente (denominadas "shims") usadas para compensar cualquier falta de homogeneidad existente. Las corrientes en estas "shims" a temperatura ambiente (llamadas así porque no se enfrían por inmersión en un baño de helio líquido) se controlan mediante el BSMS y pueden ajustarse desde la pantalla BSMS para optimizar la señal de RMN. Este proceso tiene un efecto fundamental en la resolución y sensibilidad de la señal. A la acción de ajustar las corrientes de las "shims" a temperatura ambiente se la denomina **homogeneización** del imán.

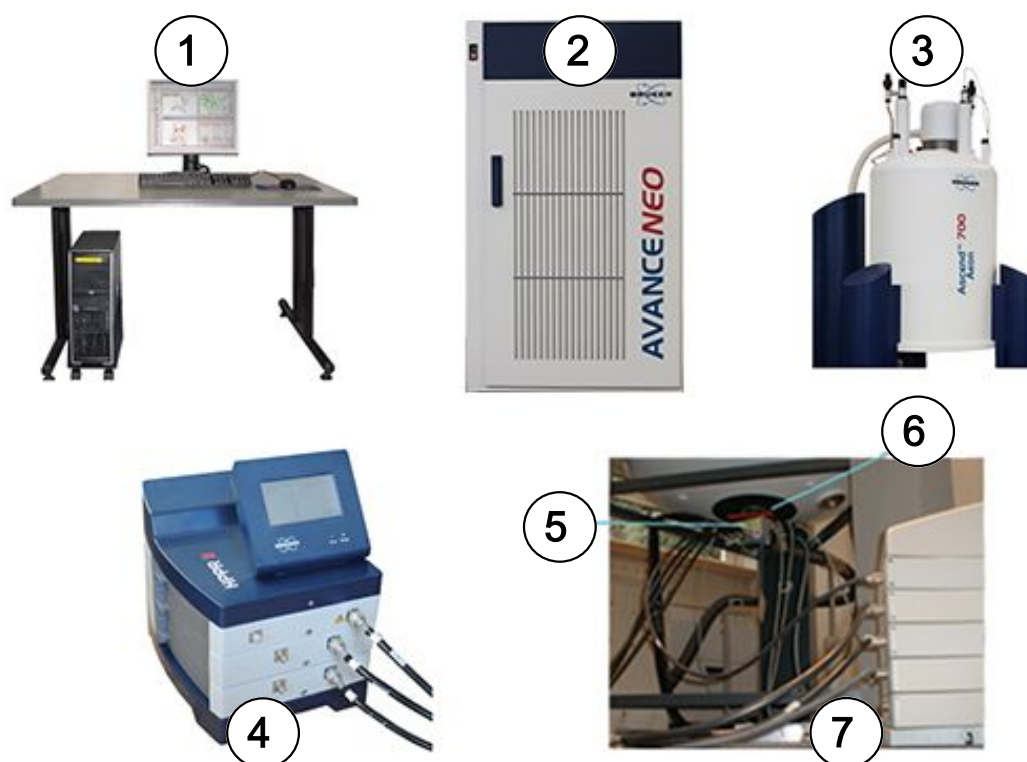


Figura 4.3: Foto de imán, sistema de homogeneización, sonda y HPPR

1	Consola del operario	5	Sonda
2	Consola	6	Sistema de homogeneización
3	Imán	7	Sonda y sistema de homogeneización
4	Módulo 2 de cubierta HPPR/2 con conexiones a la sonda		

Aunque el **HPPR/2** (preamplificador de alto rendimiento) transporta la señal transmitida *hacia* la muestra, se ocupa principalmente de magnificar las señales relativamente débiles emitidas *por* la muestra. Está situado en la base del imán para amplificar la señal de RMN tan cerca como sea posible y minimizar así las pérdidas a lo largo del cable. Una vez que la señal se ha amplificado con el HPPR/2, cualquier pérdida posterior en el cableado será menos crítica. El HPPR/2 también transmite y recibe las señales de bloqueo del deuterio (o flúor), y se usa en la rutina del barrido en frecuencia ("wobble"). Se pueden configurar hasta 8 (**HPPR/2**) módulos individuales (excluyendo el módulo de la cubierta que siempre está presente). Una configuración muy habitual que consta de tres módulos individuales es un **protón, X-BB y 2H** junto con el módulo de cubierta.

La sonda se inserta en el sistema de homogeneización en la base del imán, y consta, básicamente, de diversas bobinas utilizadas para transmitir pulsos de excitación a la muestra, así como para recibir la señal emitida. La sonda también transmite y recibe la señal de bloqueo.

4.5 Imán y dewar del imán

Existe una gran variedad de imanes con diferentes intensidades. La **intensidad del imán** se clasifica según la frecuencia de las señales de RMN emitidas por los átomos de hidrógeno. Cuanto mayor sea la intensidad del campo magnético, mayor será la frecuencia del hidrógeno. Esto significa, por ejemplo, que si situamos una muestra química en un imán de 500 MHz (11,7 T) para analizarla, los átomos de ¹H de la muestra emitirán señales a una frecuencia muy próxima a 500 MHz. Bruker dispone de imanes en el rango de 300-1000 MHz.

Los **imanes superconductores** son **electroimanes**, y como tales aprovechan la propiedad de una corriente eléctrica de producir un campo magnético. El **núcleo del imán** está formado por una extensa bobina de cable en forma de solenoide por el que pasa la corriente. En el centro de la bobina existe un campo magnético estático muy intenso. La muestra a analizar se coloca dentro de ese campo magnético.

A temperaturas muy bajas, algunos materiales presentan una propiedad notable, la superconductividad. Un cable superconductor transporta electricidad sin necesidad de energía impulsora (es decir, sin batería ni alimentación de red). Una vez se inicia una corriente en un circuito superconductor con forma de bucle, esta seguirá para siempre. Los imanes de Bruker contienen este tipo de circuitos superconductores con forma de bucle. El único mantenimiento requerido para estos imanes consiste en garantizar que la bobina se mantenga inmersa en helio líquido.

El imán consta de varias secciones. Al revestimiento exterior del imán se le ha practicado el vacío, y las superficies interiores se han plateado (se trata del mismo principio que un termo). A continuación hay un baño de nitrógeno que reduce la temperatura a 77,35 K (-195,8 °C), y, finalmente, un tanque de helio en el que está inmersa la bobina superconductora. Dicho tanque está aislado térmicamente del baño de nitrógeno gracias a una segunda capa de vacío (véase la siguiente imagen).

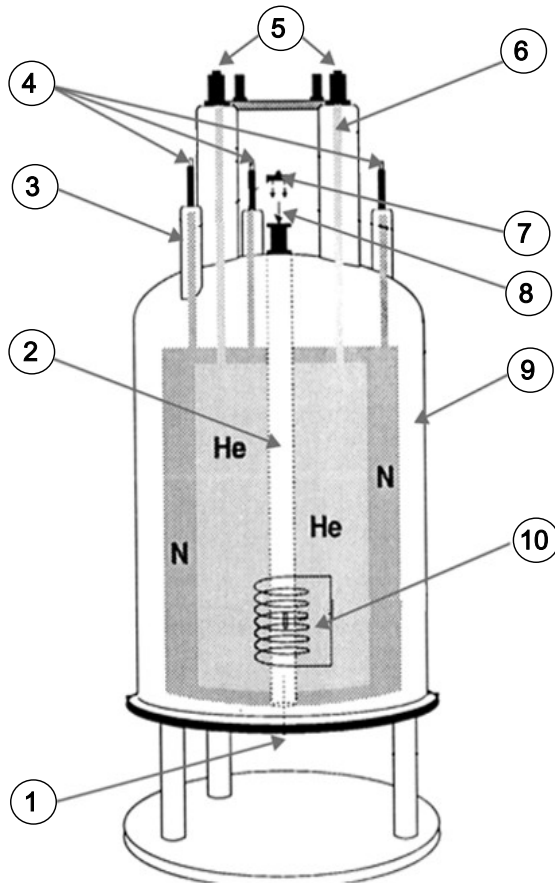


Figura 4.4: Imán superconductor

1	Insertar sonda aquí	6	Torre de helio
2	Cavidad	7	Tapón metálico
3	Torre de nitrógeno	8	Insertar muestra aquí
4	Puertos de nitrógeno	9	Cámara de vacío
5	Puertos de helio	10	Imán

4.5.1 Tubo interno a temperatura ambiente

Los tanques de helio y nitrógeno envuelven una columna central que se denomina cavidad del imán. Generalmente, un tapón metálico protege la parte superior de esta cavidad. Hay imanes con cavidad estándar (54 mm) e imanes con cavidad ancha (89 mm). Las muestras a analizar se introducen en el imán por la parte superior de dicha cavidad. Las sondas, que sostienen la muestra y transmiten las señales hacia y desde la muestra, se introducen desde la parte inferior.

4.5.2 Tanque de helio

En un imán estándar, el tanque de helio está suspendido de dos chimeneas que se prolongan por encima del imán. Se puede acceder al tanque de helio por dos puertos. Uno de estos puertos permite el relleno de helio, y también contiene un extremo del **sensor de nivel de helio**. El otro puerto sólo se usa cuando se energiza o des-energiza el imán. Las chimeneas de helio pueden tener varias válvulas que controlan la salida de pequeñas cantidades de helio gas, el cual inevitablemente se evaporará.



Nota: La manipulación de las válvulas y el llenado del imán con helio líquido sólo deben ser realizados por una persona cualificada.

4.5.3 Tanque de nitrógeno

Tres pequeñas chimeneas situadas en la parte superior del imán dan acceso al tanque de nitrógeno.

4.6 Introducción al sistema de bloqueo de campo (lock)

Esta sección se ha incluido para proporcionar al usuario unos conocimientos básicos sobre los principios del sistema de bloqueo de campo. Los aspectos prácticos de como llevar a cabo el lock de una muestra, se tratarán en la sección Referenciar la muestra.

La finalidad del sistema de bloqueo de campo es garantizar que la intensidad del campo magnético que rodea la muestra no varíe durante un experimento ni que vea afectado por perturbaciones externas. El análisis de RMN implica medir la frecuencia exacta de las señales que emite la muestra. La frecuencia de estas señales es directamente proporcional a la intensidad del campo magnético, o sea que si la intensidad del campo varía, lo hará también la frecuencia emitida. Por lo tanto, el usuario debe estar seguro que la intensidad del campo magnético se mantenga siempre en exactamente el mismo valor, proceso al que se refiere como “hacer el lock” (bloquear el campo) de la muestra. El sistema de Lock o bloqueo del campo es, en esencia, un espectrómetro independiente diseñado para observar deuterio. Hay que mencionar que las señales emitidas por el deuterio normalmente están muy alejadas de las frecuencias de interés. En el caso de que las frecuencias del deuterio no sean adecuadas, se **puede utilizar fluor** (^{19}F) para el lock. Debido a que el lock con deuterio es el más común, sólo el se tratará aquí, pero el lector debe tener en cuenta que los principios de bloqueo de campo con deuterio y con flúor son idénticos.

En sistemas AVANCE, la BSMS proporciona el hardware necesario para implantar el bloqueo de campo, y un módulo independiente de deuterio en el HPPR transmite y recibe las señales de lock. Por supuesto, debe introducirse algún compuesto con deuterio en las muestras que se analizan. La forma más fácil es disolver la muestra en un disolvente deuterado. En un **disolvente deuterado** un alto porcentaje de los átomos de hidrógeno han sido sustituidos por deuterio. Los disolventes deuterados más utilizados son la acetona-d6, el benceno-d6, el cloroformo-d6 y el DMSO-d6, aunque hay muchos otros disolventes disponibles. La muestra que usaremos para ilustrar algunas técnicas de RMN básicas en este manual, es el antranilato de mentilo en DMSO-d6.

La frecuencia de las señales de deuterio emitidas es conocida exactamente para un imán de una intensidad de campo determinada. Por lo tanto, si la intensidad del campo magnético es correcta, cualquier núcleo de deuterio en la muestra emitirá a exactamente esta frecuencia. Si varía la intensidad del imán, también lo hará la frecuencia del deuterio. El sistema de lock emplea un receptor (situado en la BSMS) para controlar esta frecuencia de deuterio y ajustar la intensidad del campo magnético adecuadamente.

El receptor del sistema de lock está diseñado de forma que cuando la intensidad del campo sea correcta (o sea cuando se detecte la frecuencia de deuterio correcta), no se haga ningún ajuste del campo. Sin embargo, si la intensidad del campo varía (deriva), se modifica la corriente en una bobina especial (la bobina H0), situada dentro del sistema de homogeneización del imán, provocando el retorno de la intensidad del campo magnético al valor correcto. La frecuencia del deuterio se mide miles de veces por segundo. Por lo tanto, siempre que el sistema esté bloqueado, el usuario puede estar seguro que el campo se mantiene a una intensidad constante durante la adquisición.

4.7 Sondas

La sonda se ha diseñado para sostener la muestra, transmitir señales de radiofrecuencia que excitan la muestra y recibir la respuesta emitida. La transmisión y la recepción se realizan utilizando bobinas RF diseñadas especialmente.

La sonda se inserta en la parte inferior del imán y se aloja dentro de los "shims" de temperatura ambiente. Los cables coaxiales transportan las señales de excitación desde los amplificadores de la consola hasta la sonda y la señal de RMN regresa de la muestra al receptor. Se traza el cableado mediante un conjunto de preamplificadores (HPPR) que están situados junto a la base del imán o en sistemas NanoBay en el interior de la consola. Los **preamplificadores** son necesarios para potenciar las señales de RMN, que normalmente son muy débiles.

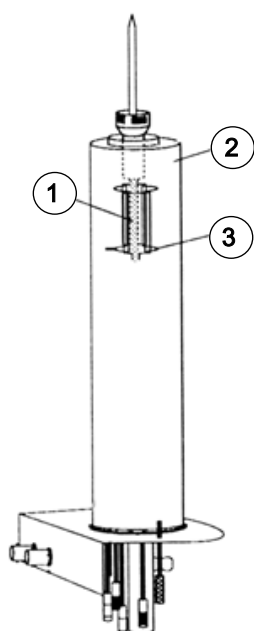


Figura 4.5: Muestra en la sonda

1	Volumen de la muestra	3	Bobinas
2	Sonda		

Hay sondas de muy diversos tamaños y tipos. El tamaño de la sonda se clasifica en función del tamaño del tubo de muestra para el que ha sido diseñado, siendo los diámetros de tubo de muestra de 5 mm y de 10 mm los más utilizados. Se emplean diferentes tipos de sonda dependiendo del tipo de experimento. Las **sondas selectivas** están especialmente diseñadas para observar núcleos específicos, por ejemplo ^{13}C ; mientras que las sondas multinucleares (X-BB o de banda ancha) se pueden utilizar para analizar un amplio rango de núcleos. Lo que distingue físicamente un tipo de sondas de otras es el número y el diseño de las bobinas internas. Además, el diámetro exterior y la longitud de la sonda se construyen según las especificaciones de los distintos imanes (cavidad ancha o cavidad estándar, diferente longitud desde la parte inferior hasta el centro del campo magnético para imanes con distintas intensidades de campo).

Las señales entran y salen de las bobinas de la sonda por medio de conectores claramente etiquetados y situados en la base de la sonda. Se utiliza el mismo cable para transportar la señal hacia y desde la sonda. Cada sonda tiene una bobina interna (la **bobina observada**). Esta bobina es la que está situada más cerca del volumen de muestra para maximizar la sensibilidad. El código de colores de la bobina interior BNC sigue una norma sencilla. Siempre tiene el mismo color que la banda rectangular situada directamente encima de los conectores BNC. La siguiente figura muestra el etiquetado de una sonda multinuclear. En este caso, la bobina de banda ancha es la bobina interna.

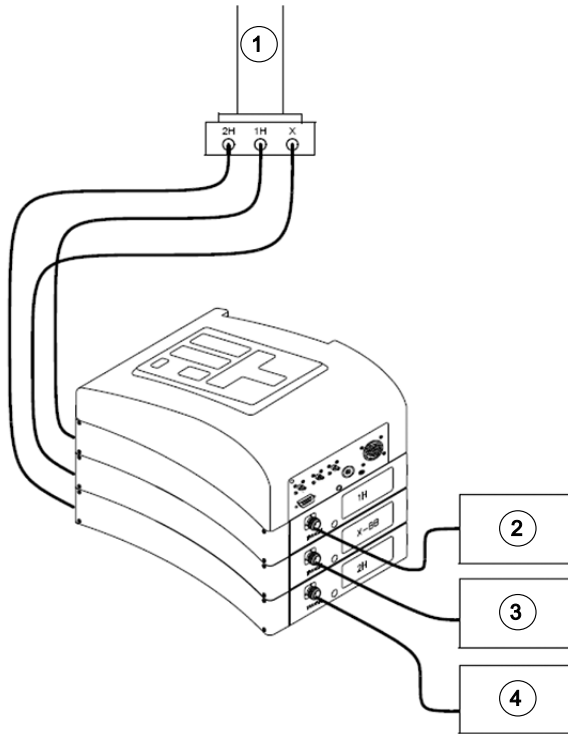


Figura 4.6: Cableado HPPR típico

1	Sonda	3	Conexión al amplificador X
2	Conexión al amplificador de protones	4	Conexión al transmisor BSMS 2H

4.8 Sonda de banda ancha

Aquí describimos como ejemplo el tipo de sonda inteligente BBO de 5 mm. Como su propio nombre indica, esta sonda se ha diseñado para usuarios que estén interesados en analizar muestras con varios núcleos. La frecuencia X suele presentar un rango desde ^{15}N a ^{31}P incluyendo ^{19}F .

La BNC izquierda está marcada como ^2H (véase siguiente figura) y se emplea para transportar la señal de bloqueo. Las otras dos conexiones son para las señales de ^1H y del núcleo X, y están debidamente etiquetadas. Los cables que salen de ^1H , X y ^2H BNC están conectados a los preamplificadores.



Figura 4.7: Ejemplo de sonda de banda ancha

Las sondas están diseñadas para habilitar el control de la temperatura de la muestra de RMN. Se emplea un **de sondas** junto con una **Línea de transferencia de N₂** para controlar la temperatura de la muestra. Se emplea un **termopar** como termómetro para monitorizar la temperatura de la muestra. Todos estos dispositivos están conectados a la base de la sonda y son fácilmente accesibles. La unidad de temperatura variable (**VTU**), situada dentro de la consola, monitoriza constantemente la lectura del termopar y ajusta la potencia del calentador para mantener la temperatura requerida.

Casi todas las sondas de alta resolución vienen equipadas con la bobina de gradientes, cuyo conector se encuentra en un lado de la base de la sonda.

Finalmente, en la caja negra situada en la parte inferior de la sonda se aloja el equipamiento de sintonización y ajuste. Se utiliza para realizar los ajustes finos y optimizar el rendimiento de la sonda. Cuando se analiza un compuesto, se excita con señales de una frecuencia definida (la frecuencia de resonancia). Núcleos diferentes se excitarán con frecuencias diferentes y la sintonización implica ajustar los circuitos dentro de la sonda, de modo que tenga la mayor sensibilidad posible para la frecuencia de interés. Además, la sonda se ajusta para minimizar el reflejo (la pérdida) de las señales de excitación y de la FID. Ambos, la sintonización y el ajuste, son interactivos y no se pueden ajustar independientemente el uno del otro.

Hay que sintonizar y ajustar la sonda cada vez que se cambia la muestra en el imán. Cada bobina de la sonda se sintoniza y ajusta por separado, utilizando la rutina "atma" o "atmm", descrita en [Sintonización y ajuste de la sonda](#) [40].

El cambio de una sonda requerirá la reconexión de la sonda a los preamplificadores.

4.9 iProbe

Otro tipo de sonda es la nueva plataforma iProbe, una SmartProbe™ de última generación para la detección de RMN. Esta novedosa arquitectura de sondas RMN permite no solo aumentar la relación señal/ruido y una sintonización de RF más rápida y precisa, sino que también proporciona un diseño más flexible que permite una personalización más sencilla de las sondas RMN para aplicaciones específicas. Las primeras sondas introducidas en esta plataforma incluyen las sondas líderes del sector, las SmartProbe iProbe, disponibles actualmente desde 400-600 MHz, que ofrecen un aumento de sensibilidad del 10 %.



Figura 4.8: La plataforma iProbe de Bruker

4.10 Cambiar una sonda

Si se debe cambiar la sonda, asegúrese de seguir el procedimiento indicado a continuación. Las sondas son frágiles y caras, y por lo tanto debe consultar al responsable del sistema antes de intentar cambiar la sonda. El imán, y en concreto las corrientes parásitas, influyen de forma importante en el movimiento mecánico de la sonda. Cuando retire la sonda del imán, cuente con que esta se acelere repentinamente al alcanzar el extremo inferior de la cavidad del imán. También debe contar con encontrar cierta resistencia al insertar la sonda en el imán.

Procedimiento para el Cambio de la sonda:

1. Asegúrese de que no haya ninguna adquisición en marcha haciendo clic en el botón STOP en la barra de herramientas superior de la ventana de TopSpin, o escribiendo stop en la línea de comando.
2. Apague cualquier tipo de **calefacción** o **refrigeración** del sistema. Utilice el comando "edte" para apagar el calentador. Espere a que la sonda vuelva a la temperatura ambiente. ¡No apague el sistema!
3. Retire la conexión de aire/N₂ sujeta a la base de la sonda.
4. Tras asegurarse de que la cavidad del imán no está tapada en la parte superior, retire la muestra que pueda haber en el imán activando el botón **LIFT** disponible en la ventana de la BSMS.
5. Desactive LIFT.
6. Desconecte todos los cables BNC de la base de la sonda.
7. Desconecte el termopar, el calentador y cualquier otra conexión de gradiente o PICS.
8. Afloje los dos tornillos que sostienen la sonda en el imán, empleando el destornillador unido a la base de la sonda.
9. Baje la sonda manteniendo su posición recta y extráigala del imán.
10. Inserte la nueva sonda y asegúrela apretando los dos tornillos.
11. Vuelva a conectar los cables coaxiales, el termopar, el calentador, las líneas de refrigeración y cualquier otra conexión según corresponda.
12. Encienda de nuevo el calentador.

Podrá ver un vídeo que muestra este procedimiento en la página web de [Bruker](#).

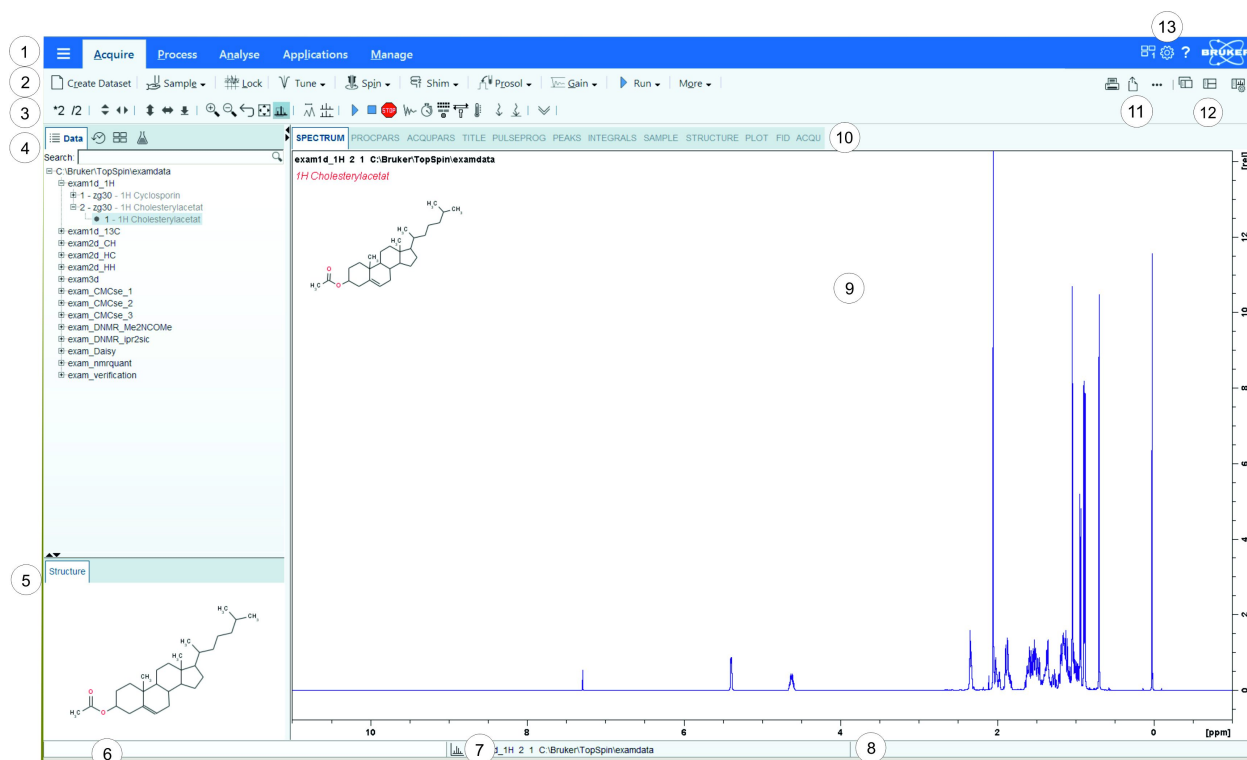
5 Procedimientos Básicos

En este capítulo se describirán las operaciones básicas que se usan cada vez que se adquiere un espectro. El software TopSpin tiene una interfaz de flujo de trabajo fácil de utilizar que guía al usuario por los pasos necesarios para obtener un espectro. Todas las operaciones se controlan mediante software y pueden seleccionarse con un clic de ratón en las pestañas de flujo de trabajo (véase 1. en la figura de la interfaz de TopSpin); se abrirá una fila de botones de flujo de trabajo (véase 2. en la figura de la interfaz de TopSpin).

El usuario puede saltarse este capítulo si ya está familiarizado con esas operaciones.

5.1 La ventana de TopSpin

La siguiente imagen muestra el diseño de la interfaz básica de TopSpin.



1	Barra de menús	8	Barra de visualización de estado
2	Barra del botón del flujo de trabajo	9	Ventana del conjunto de datos
3	Barra de herramientas	10	Pestañas de la ventana del conjunto de datos
4	Ventana de navegador y búsqueda	11	Imprimir, exportar y publicar
5	Ventana de estructura	12	Opciones de visualización
6	Línea de comandos	13	Conmutador de ventanas, preferencias de configuración y ayuda
7	Barra del conjunto de datos actual		

5.1.1 Crear un nuevo conjunto de datos

El uso regular del espectrómetro genera en poco tiempo una gran cantidad de datos. Los usuarios querrán almacenar sus datos en carpetas etiquetadas adecuadamente, para poder acceder a ellos más tarde. Este proceso es especialmente importante en un entorno multiusuario. Cuando se adquiere una serie de datos, se puede almacenar en lo que se denomina **conjunto de datos**. Cada conjunto de datos debe tener un descriptor único (identificador), para que se puedan distinguir los diferentes conjuntos de datos. Un descriptor completo de un conjunto de datos requiere el uso de tres parámetros: NAME, EXPNO y DIR.

- En la barra de menús, haga clic en **Acquire | Create Dataset** para abrir la ventana Crear nuevo conjunto de datos.

Prepare for a new experiment by creating a new data set and initializing its NMR parameters according to the selected experiment type. For multi-receiver experiments several datasets are created. Please define the number of receivers in the Options.

Dataset

NAME: Proton_exp
EXPNO: 1
Directory: C:\Data
 Open in new window

Parameters

Use current parameters
 Read parameterset [Select]
 Set solvent: DMSO
Additional action:
 Do nothing
 Execute getprosol
 Keep parameters: P 1, O1, PLW 1 [Change]

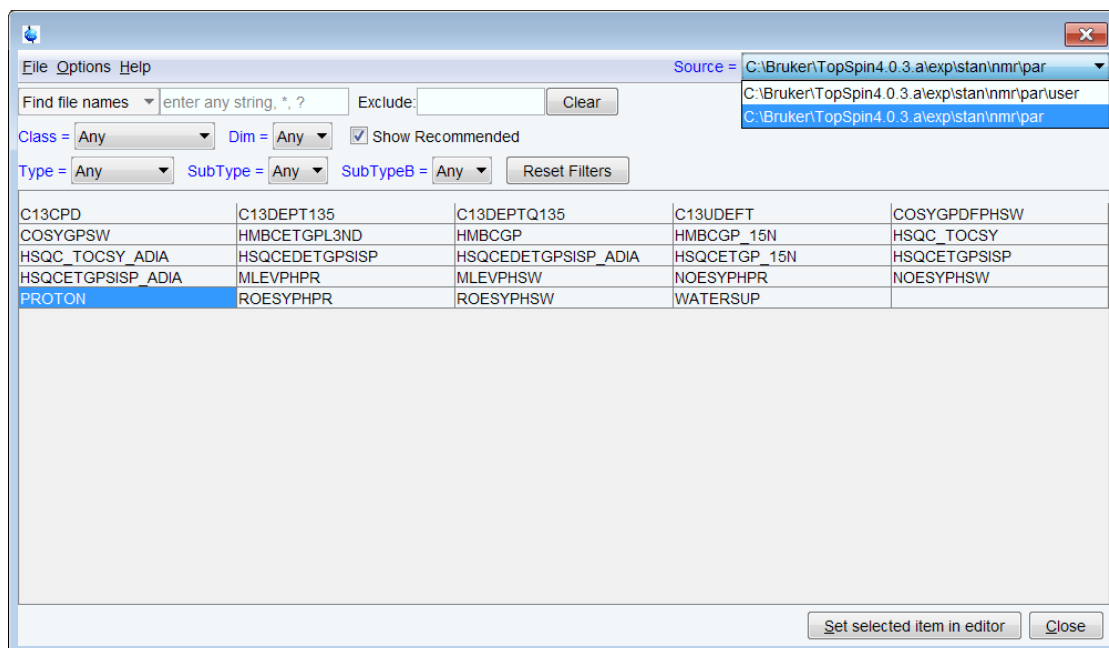
Advanced

Number of datasets (receivers): 1

Title: Menthyl Anthranilate in DMSO
Proton

OK Cancel More Info... Help

- Entonces podrá crear su propio conjunto de datos. En NAME puede introducir una cadena de hasta 13 caracteres. En EXPNO, introduzca "1" o cualquier otro número adecuado. Seleccione la ruta del directorio (por ejemplo: C:\Data).
- En el grupo de parámetros, haga clic en **Read parameterset** y **Select** para abrir la ventana rpar.



- Active **Show Recommended** para obtener la lista de los experimentos más habituales con moléculas de tamaño reducido.
- Asegúrese de que el directorio de origen sea:
`<Topspin>\exp\stan\nmr\par`
 y no:
`<Topspin>\exp\stan\nmr\par\user`
- Seleccione el experimento (p. ej., protón) y haga clic en **Set selected item in editor**.
- En la ventana Crear nuevo conjunto de datos marque **Set solvent** y en la lista desplegable seleccione el disolvente de su muestra; p. ej. DMSO.
- Haga clic en **OK**.



Nota: Su conjunto de datos recién creado es ahora el conjunto de datos actual y se almacenarán los detalles del descriptor en el disco duro, en la carpeta: DIR\NAME\EXPNO, donde cada EXPNO corresponde a un conjunto de datos completamente independiente. En este ejemplo, los datos se almacenarán en **C:\Data\Proton_exp\1**. Esta ruta también aparecerá en la barra del título de la ventana de datos de TopSpin

5.1.2 Preparación de la muestra

- Use tubos limpios y secos para la muestra.
- Use tubos de calidad media-alta para la muestra.
- Filtre siempre la solución de la muestra.
- Utilice siempre el mismo volumen o la misma altura de solución de la muestra.
- El volumen de relleno de los tubos de 5 mm es 0,6 ml o 5 cm.
- El volumen de relleno de los tubos de 10 mm es 4 ml o 5 cm.
- Use el calibrador de profundidad de la muestra para ajustar la profundidad de la muestra.

Tipo de tubo para la muestra	Sondas CryoProbe	Sondas RT	Sondas RT antiguas
Tubo de muestra estándar de 5 mm con extremo redondo.	19 mm	20 mm	18 mm
Tubo Shigemi de Bruker.	17 mm	20 mm	18 mm

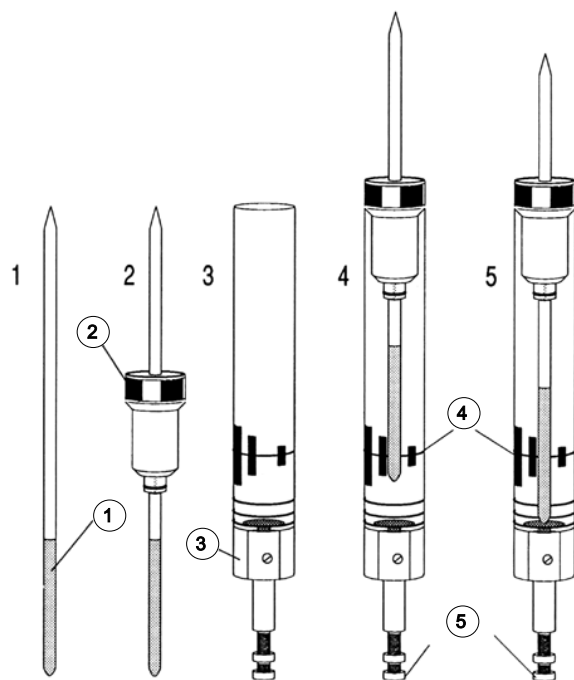


Figura 5.1: Inserción de la muestra en la centrifugadora

1	Muestra	4.	Línea central
2	Centrifugadora	5.	Tornillo de ajuste de profundidad
3	Calibrador de profundidad		

- El tubo de la muestra debe estar bien firme dentro de la centrifugadora.
- Limpie el tubo de la muestra antes de insertarla en el imán.

5.2 Insertar la muestra con la turbina en el imán

La subida y bajada de la muestra se controla por un flujo de aire a presión. Antes de situar la muestra en la parte superior de la cavidad, asegúrese de que haya flujo de aire (se oye bastante bien) y retire cualquier muestra que esté subiendo hasta la parte superior de la cavidad.

- En la barra de menús, haga clic en **Acquire**.
- En el botón **Sample**, haga clic en la flecha **desplegable** para ver más opciones.
- En la lista, seleccione **Eject sample manually (ej)**. Se activa la elevación de la muestra.



Espere hasta que se active el aire de elevación de la muestra y retire la muestra que pueda haber en el imán.

- Coloque la muestra y la centrifugadora encima de la cavidad del imán.
- En el botón **Sample**, haga clic en la flecha **desplegable** para ver más opciones.
- En la lista, seleccione **Insert sample manually (ij)**.

5.3 Hacer el lock de la muestra

Se utilizan disolventes deuterados para generar la señal que se detecta y monitoriza mediante el sistema de bloqueo. La frecuencia e intensidad de esta señal dependerán del disolvente empleado. La característica principal de la rutina de bloqueo de TopSpin es que asigna parámetros como la potencia, la ganancia y la frecuencia de bloqueo a un valor adecuado del disolvente. Con estos valores por defecto, próximos a los que se esperarían para ese disolvente, la BSMS puede localizar rápidamente y hacer el bloqueo en la señal del disolvente, haciendo un barrido en un rango de frecuencias o valores de campo magnético. Estos parámetros, característicos de cada disolvente, se leen en la tabla “edlock”.

- En la barra del botón del flujo de trabajo, haga clic en **Lock**.
- En la lista de la tabla de Disolventes, seleccione **DMSO** y haga clic en **OK**.

Solvent	Description
Acetic	acetic acid-d4
Acetone	acetone-d6
C6D6	benzene-d6
CD2Cl2	dichloromethane-d2
CD3CN	acetonitrile-d3
CD3CN_SPE	LC-SPE Solvent (Acetonitrile)
CD3OD_SPE	LC-SPE Solvent (Methanol-d4)
CDCl3	chloroform-d
CH3CN+D2O	HPLC Solvent (Acetonitril/D2O)
CH3OH+D2O	HPLC Solvent (Methanol/D2O)
D2O	deuteriumoxide
D2O_salt	deuteriumoxide with salt
Dioxane	dioxane-d8
DMF	N,N-dimethylformamide-d7
DMSO	dimethylsulfoxide-d6
EtOD	ethanol-d6
H2O+D2O	90%H2O and 10%D2O
H2O+D2O_salt	90%H2O and 10%D2O with salt
HDMSO	90%DMSO and 10%DMSO-d6
Juice	fruit juice
MeOD	methanol-d4
Plasma	blood plasma
Pyr	pyridine-d5
T_H2O+D2O+Me4NCl	(CD3)4NCl in 90%H2O and 10%D2O, for NMR thermometer
T_H2O+D2O+NaAc	sodium acetate in 90%H2O and 10%D2O, for NMR thermometer
T_H2O+D2O+Pivalate	pivalate-d9 in 90% H2O and 10% D2O, for NMR thermometer
T_MeOD	methanol-d4, for NMR thermometer
TFE	trifluoroethanol-d3
THF	tetrahydrofuran-d8
Tol	toluene-d8
Urine	urine

Lock nucleus: 2H [v] [OK] [Cancel]

Figura 5.2: Tabla de disolventes



Nota: Si se ha llevado a cabo el bloqueo, la señal debe tener la forma de una línea horizontal con cierto ruido o cierta onda asociados (véase figura abajo). La altura de esta línea se denomina nivel de bloqueo.

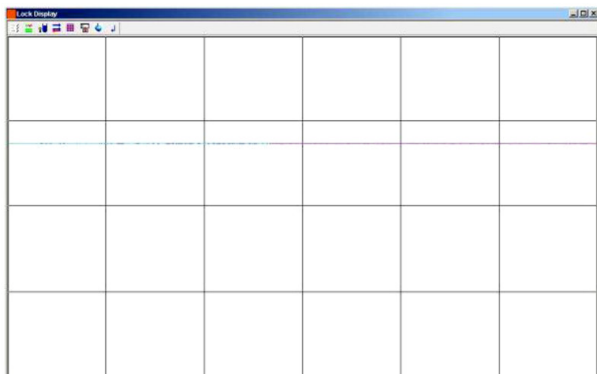


Figura 5.3: Visualización del bloqueo tras bloquear la muestra

5.4 Sintonización y ajuste de la sonda

La sensibilidad de cualquier sonda variará en función de la frecuencia de la señal que se le transmite y existe una frecuencia a la que la sonda es más sensible. Además esta frecuencia puede ajustarse en un cierto rango, condensadores internos de sintonía. La sintonización (tuning) implica el ajuste de los circuitos de la sonda de forma que la frecuencia a la que ésta es más sensible, sea la frecuencia de transmisión apropiada (SFO1, SFO2 etc.). Cada bobina en la sonda se sintonizará (y ajustará) por separado.

Si se ha cambiado la sonda o la frecuencia de transmisión se ha modificado significativamente, puede ser necesario volver a sintonizar la sonda. Para trabajos de rutina en disolventes orgánicos con sondas selectivas, es poco probable que el valor de las frecuencias transmitidas varíe mucho. Por lo tanto, una vez que la sonda se haya sintonizado inicialmente, no vale la pena volver a sintonizarla por ligeras variaciones en la frecuencia. Normalmente, se requiere un cambio de la frecuencia de transmisión de al menos 100 kHz para justificar una resintonización. Sin embargo, en las sondas de banda ancha, la frecuencia transmitida varía ampliamente de un núcleo a otro, y por tanto se deben volver a sintonizar cada vez que se cambia el núcleo seleccionado.

Siempre que se sintonice una sonda, también se debe ajustar. El ajuste (matching) implica asegurar que la máxima cantidad de potencia de la señal de radiofrecuencia llegue hasta la base de la sonda y de este modo se transmita hasta la bobina situada en su parte superior. Esto asegura que sólo una mínima cantidad de la potencia que llegue a la base de la sonda, se refleje de nuevo hacia los amplificadores (y por consiguiente se pierda).



Nota: Bruker ofrece dos maneras distintas de sintonización y ajuste. A parte del ajuste manual de los condensadores de sintonización y ajuste, las sondas también pueden estar equipadas con un módulo de sintonización automática (ATM). Siga los pasos que se describen a continuación para cada una de las opciones.

5.4.1 Utilizando la rutina de sintonización y ajuste automático en sondas equipadas con ATM

- En la barra del botón del flujo de trabajo, haga clic en **Tune**.

La pantalla pasará automáticamente a la ventana de adquisición y mostrará la curva del barrido en frecuencia ("wobble"). La sintonización y el ajuste se llevarán a cabo automáticamente. En el caso de que se usen múltiples frecuencias en un parámetro como, por ejemplo, en un C13CPD, etc., ATMA empezará ajustando la frecuencia más baja y seguirá automáticamente en orden de frecuencia creciente.

5.4.2 Utilizando la rutina de sintonización manual en sondas equipadas con ATM

- En el botón **Tune**, haga clic en la flecha **desplegable** para ver más opciones.
- En la lista, seleccione **Tune/match ATM probe manually**.



Nota: Se abrirá la ventana de Sintonización / ajuste de la sonda con ATMM (véase figura de abajo) y una ventana que mostrará la curva del barrido en frecuencia ("wobble").

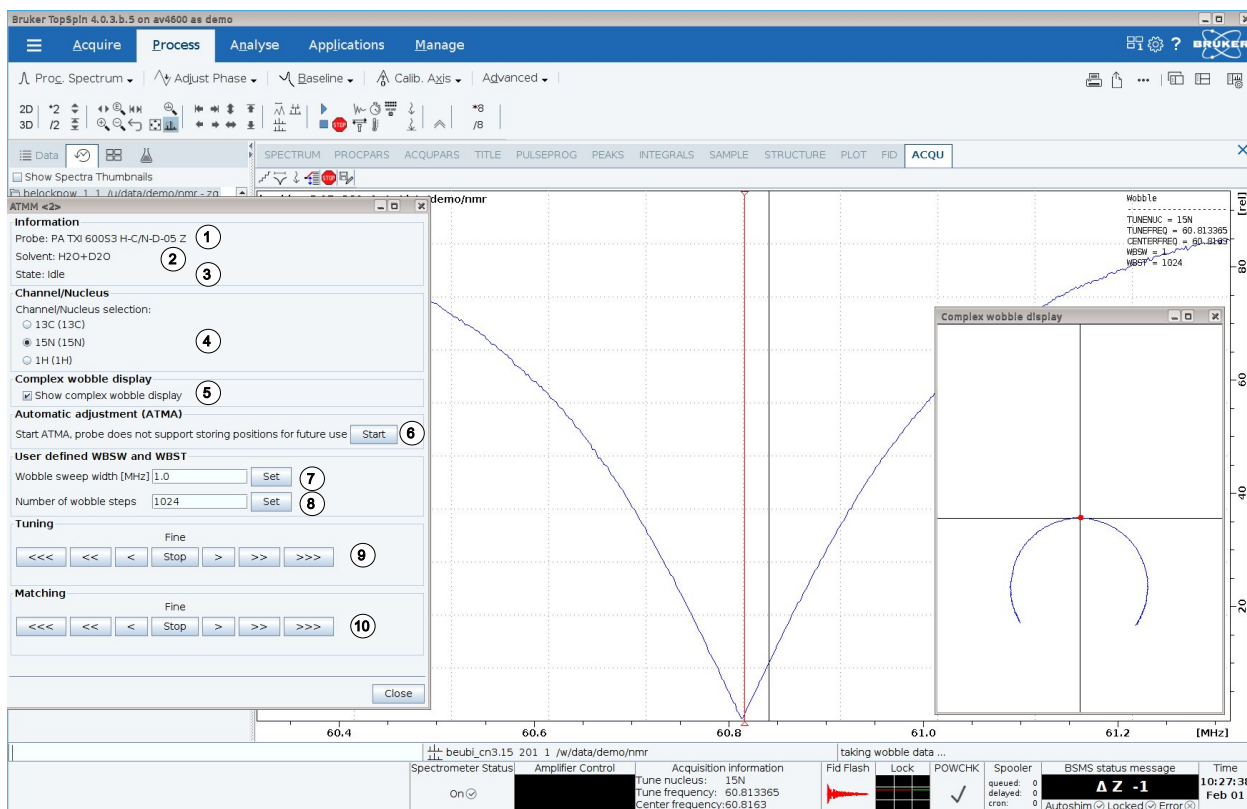


Figura 5.4: Ventana de sintonización / ajuste de la sonda con ATMM

1.	Tipo de sonda.
2.	Disolvente utilizado.
3.	Estado actual.
4.	Selección de canal / núcleo
5.	Marcar para visualizar el barrido en frecuencia en modo complejo.
6.	Hacer clic para iniciar ATMA, mientras que las posiciones óptimas se almacenan para un futuro uso.
7.	Ancho de barrido en frecuencia definido por el usuario.
8.	Número de pasos de barrido en frecuencia definido por el usuario.
9.	Botones para mover y mostrar la curva de barrido en frecuencia centrada.
10.	Botones para ajustar el descenso de la curva de barrido en frecuencia hasta la posición más baja.

- En la ventana de control de ATMM, haga clic en los botones de **Tuning** para mover y visualizar la curva de barrido en frecuencia centrada.
- En la ventana de control de ATMM, haga clic en los botones **Matching** para ajustar el descenso de la curva de barrido en frecuencia hasta la posición más baja.

Resulta muy práctico examinar la visualización del barrido en frecuencia en modo complejo. Si el círculo con el punto rojo es demasiado grande o demasiado pequeño, ajuste primero el ajuste. Una vez que el círculo pasa por el centro del sistema de coordenadas, coloque el punto rojo en el centro ajustando la sintonización. La curva le indica, básicamente, el orden en el que ajustar la sintonización y el ajuste.

Nota: Los ajustes de sintonización y ajuste se guardarán haciendo clic en el botón **Start**.



Dado que los ajustes de sintonización y ajuste interactúan entre sí, será necesario repetir todos los pasos para una sintonización y un ajuste perfectos. Si se utilizan múltiples frecuencias en un conjunto de parámetros como C13CPD, use los botones de radio **Nucleus Selection** en la ventana de control de ATMM para pasar a otro núcleo y repetir la sintonización y el ajuste.

La rutina **wobble** funciona mediante la transmisión de una señal débil a la sonda y la comparación de la sonda y la impedancia de cable con una referencia de 50 ohmios dentro de HPPR. La frecuencia de transmisión se centra en SFO1, SFO2, etc., pero se realiza un "barrido" en un rango determinado por el valor del parámetro WBSW (ver más adelante). La curva resultante es la típica curva de respuesta de un circuito de resonancia y representa, simplemente, una medida de la amplitud de la señal reflejada (eje vertical) frente a la frecuencia (eje horizontal).

Matching implica ajustar la sonda de forma que el mínimo de la curva de barrido en frecuencia se sitúe en la parte inferior de la pantalla (es decir, tocando el eje horizontal de frecuencia). Esta posición representa la reflexión mínima de la señal transmitida.

Tuning implica asegurar que esto ocurra a la frecuencia de transmisión, que se sitúa en el centro de la escala horizontal de la pantalla. Sin embargo, se verá que la sintonización y el ajuste interactúan entre sí y deben ajustarse conjuntamente. Cuando el mínimo de la curva del barrido en frecuencia esté centrado y situado en la base de la pantalla, la sonda estará sintonizada y ajustada de forma óptima.

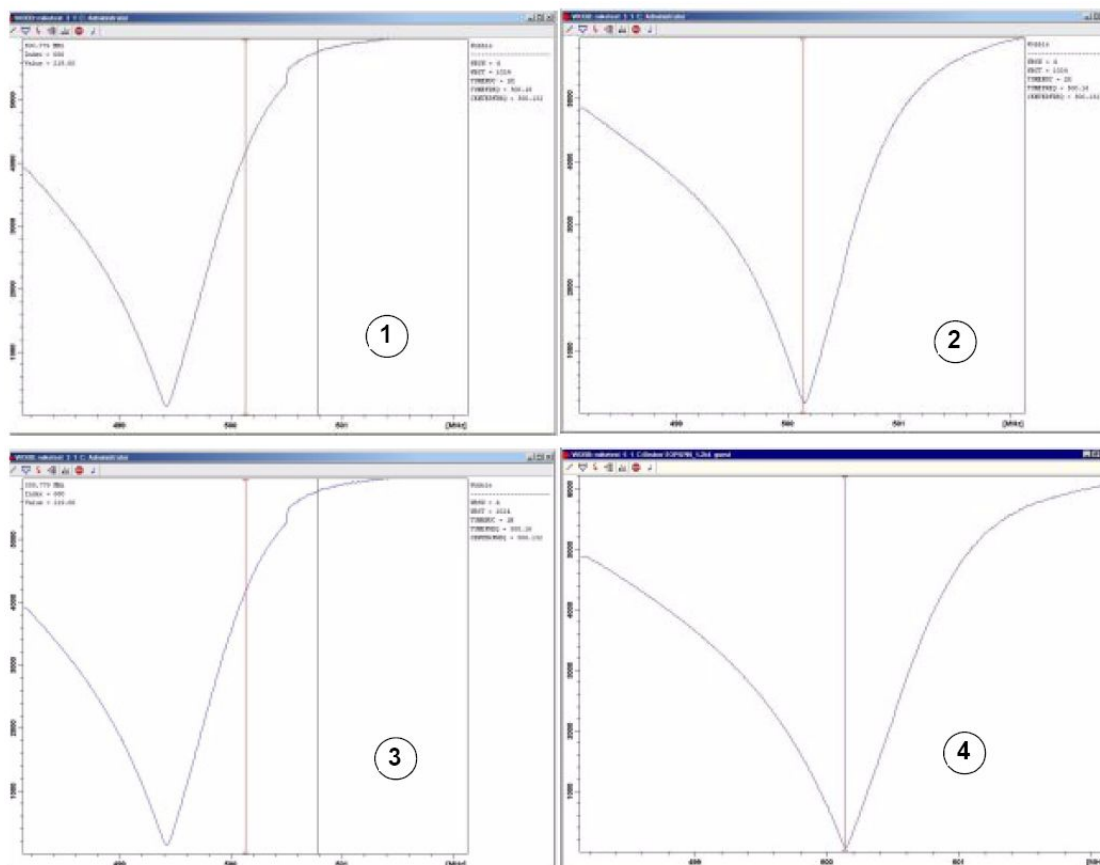


Figura 5.5: Ejemplos de curvas de barrido en frecuencia con diferente sintonización y ajuste

1.	Sintonización y ajuste deficientes.	3.	Buen ajuste, sintonización deficiente.
2.	Ajuste deficiente, buena sintonización.	4.	Buen ajuste, buena sintonización.

Si desea optimizar varios núcleos de sonda (por ejemplo, en experimentos de desacoplamiento), puede seleccionar el siguiente núcleo en la ventana de sintonización y ajuste de sonda con ATMM.

5.5 Girar la muestra

Una segunda función del aire a presión es permitir la rotación de la muestra. El espín de la muestra sirve para "igualar" los puntos no homogéneos que puedan existir en el campo magnético en el centro del imán.



Nota: Las muestras que se analizan empleando experimentos de tipo 2-D, 3-D, SELECTIVE, NOEDIFF, T1 y todas las sondas inversas no se suelen rotar.

Tasas de espín sugeridas:

- 20 Hz para una sonda de 5 mm
- 12 Hz para una sonda de 10 mm

- En el botón **Spin**, haga clic en la flecha **desplegable** para ver más opciones.
- En la lista, seleccione **Turn sample rotation on (ro on)**.

5.6 Ajuste de la homogeneidad (Shimming)

En el proceso de homogeneización (**Shimming**) se realizan pequeños cambios en el campo magnético para optimizar la homogeneidad (uniformidad). El resultado de mejorar la homogeneidad es una mejor resolución espectral. Es necesario volver a ajustar la homogeneidad cada vez que se cambia la muestra. El responsable del sistema ha guardado valores de homogeneidad (llamados archivos de shims) adecuados para cada sonda, que reducirán de forma importante el tiempo requerido para ajustar la homogeneidad cada vez que se cambie la sonda.

5.6.1 Ajuste de la homogeneidad de rutina con TopShim

Se trata de una homogeneización rutinaria y debería realizarse al iniciar una nueva sesión de RMN y siempre que se cambie la muestra que está en el imán. La homogeneización rutinaria implica el ajuste fino de las "shims" Z, Z², Z³, Z⁴ y Z⁵. Algunos imanes con campos más altos pueden requerir "shims" Z de orden más alto. TopShim es completamente automático y el administrador del sistema lo ha programado de forma que se obtenga la mejor homogeneidad para cada muestra.

TopShim se basa en la homogeneización por gradientes. La aplicación de un criterio de calidad a la forma de línea final garantiza los mejores resultados para todas las situaciones.

TopShim utiliza el método de homogeneización por gradiente ²H para todos los disolventes deuterados, y para otros disolventes, especialmente para H₂O, el método de homogeneización por gradiente ¹H.

- En la barra del botón del flujo de trabajo, haga clic en **Shim**.

La homogeneización comenzará inmediatamente y no debería durar más de un minuto.

5.7 Establecer los parámetros dependientes de la sonda/ disolvente

Se pueden almacenar parámetros como la longitud del pulso de 90° o del desacoplador con los niveles de potencia asociados y para cualquier núcleo específico en cualquier canal disponible. El ingeniero de instalación o el administrador del sistema han introducido estos valores, y se cargarán automáticamente usando el botón **Prosol**.

- En la barra del botón del flujo de trabajo, haga clic en **Prosol**.

5.8 Ajuste de la ganancia del receptor

La ganancia del receptor es un parámetro muy importante que se utiliza para ajustar la amplitud de la FID al rango dinámico del digitalizador. La ganancia se ajusta de forma automática apretando el botón Gain.

- En la barra del botón del flujo de trabajo, haga clic en **Gain**.

El ajuste de la ganancia del receptor se iniciará en un momento y debería llevar menos de un minuto.

5.9 Iniciar la adquisición

El proceso de recepción de señales de RMN se denomina adquisición. Se habla de adquirir datos. Cuando se lleva a cabo una adquisición, se adquieren datos "sin procesar" y la señal recibida se denomina FID (decaimiento de inducción libre, por sus siglas en inglés). La cantidad de puntos digitales de la FID se denomina TD (dominio del tiempo, por sus siglas en inglés).

- En la barra del botón del flujo de trabajo, haga clic en **Run**.

Por defecto, una vez seleccionado el experimento, el espectrómetro realizará un número de barridos "ficticios" antes de iniciar el número de barridos reales.

5.10 Procesado de datos

Se recurre a una transformada de Fourier para convertir la FID en un espectro de frecuencias. El número de puntos que se utilizan para generar el espectro resultante vienen determinados por el parámetro llamado SI (size = tamaño). La FID se transforma en un espectro que consta de SI puntos de datos en la parte real y SI puntos de datos en la parte imaginaria. El valor habitual para SI es $SI = TD/2$. Si ha cargado el conjunto de parámetros "PROTON", puede verificar fácilmente que $TD = 64\text{ K}$ y $SI = 32\text{ K}$.

- En la barra de menús, haga clic en **Process**.
- En el botón **Proc Spectrum**, haga clic en la flecha **desplegable** para ver más opciones.
- En la lista, seleccione **Configure Standard Processing (proc1d)**.

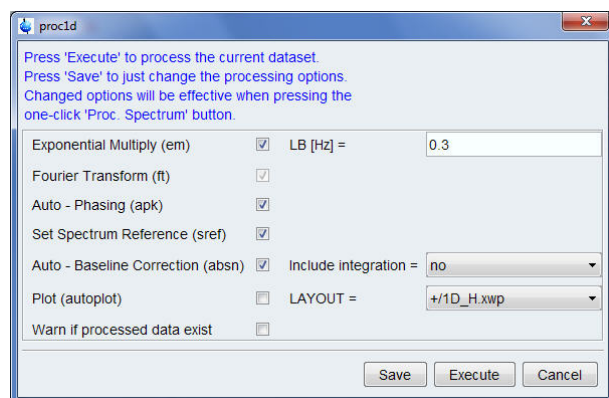


Figura 5.6: La ventana de proc1d

- En la ventana de proc1d, seleccione las opciones:
 - Exponential Multiply (em)**
 - Auto – Phasing (apk)**
 - Set Spectrum Reference (sref)**
 - Auto – Baseline Correction (absn)**
- En la ventana de proc1d, haga clic en **Execute**.
- En la ventana de proc1d, haga clic en **Save** para guardar los ajustes de procesamiento seleccionados.

6 Preparación para la Adquisición, parámetros relacionados con la Frecuencia

En este capítulo se explicarán dos de los parámetros más importantes para observar un espectro de RMN. Antes de asignar valores a los distintos parámetros, es importante que el usuario entienda el concepto de conjunto de datos (data set), como grupo de parámetros enlazados intrínsecamente entre sí.

6.1 Frecuencia

Las frecuencias de las señales transmitidas en los canales uno, dos y tres vienen dadas por los valores SFO1, SFO2 y SFO3, etc., respectivamente. Sin embargo, puede que estas frecuencias no se puedan establecer directamente (observará que no se marcarán al seleccionarlas con el ratón).

Las frecuencias de transmisión se controlan mediante los valores de offset (desplazamiento en frecuencia) de las frecuencias básicas BF1, BF2 y BF3 etc.

Para el canal observado:

- $SFO1 = BF + \text{offset}$

La frecuencia de transmisión es establecida automáticamente por el usuario.

De forma similar, para los dos siguientes canales, de desacoplamiento, vale:

- $SFO2 = BF2 + \text{offset (O2)}$
- $SFO3 = BF3 + \text{offset (O3)}$

Al seleccionar un núcleo específico, la frecuencia básica adecuada se establecerá automáticamente. Después de leer un grupo de parámetros estándar, se establecerá la frecuencia básica correcta y sólo hará falta ajustar los valores de offset.

Recuerde que SFOX es el parámetro más relevante al ser la frecuencia que realmente se transmite a la muestra. Observe también que los offsets pueden ajustarse a cero en cuyo caso $SFOX = BFX$. En la siguiente sección se hará una descripción más detallada.

6.2 Explicación numérica de las frecuencias de transmisión, básicas y de offset

Imagine un espectrómetro de 600 MHz que se utiliza para observar hidrógeno. El espectrómetro se ha configurado para tener una BF1 de 600,13 MHz (un espectrómetro de 500 MHz normalmente tiene una BF1 de 500,13 MHz, uno de 400 MHz una BF1 de 400,13 MHz, etc).

Si a O1 se le da el valor de cero, entonces: $SFO1 = 600,13 + 0 = 600,13$ MHz

Por lo tanto, el centro del espectro se situaría en 600,13 MHz. Si SWH estuviera ajustado a 20 kHz, el espectro podría tener el aspecto de la siguiente imagen.

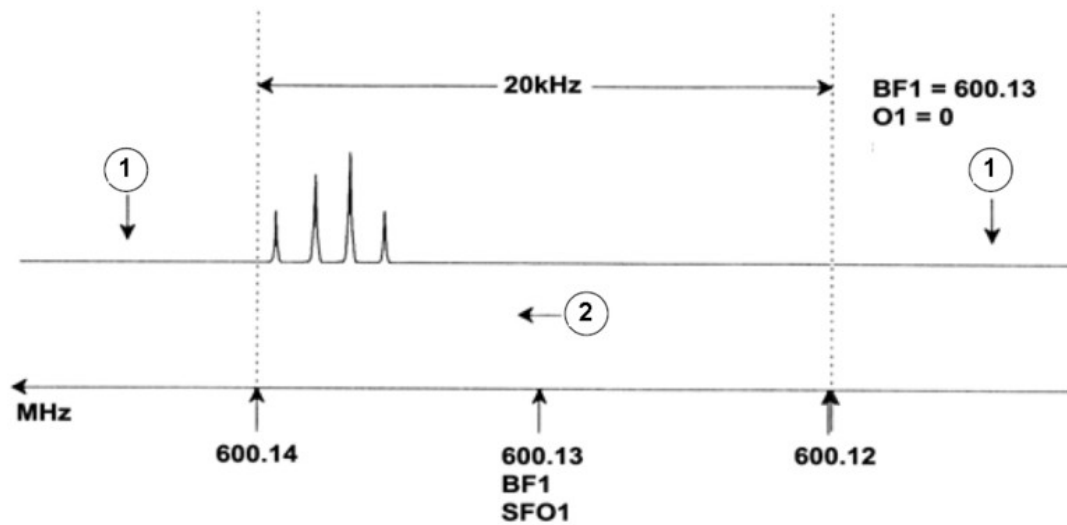


Figura 6.1: Espectro con $BF1 = 600,13$ MHz, $O1 = 0$ Hz

1.	Señales no incluidas	2.	Frecuencia
----	----------------------	----	------------

Nuestro espectro hipotético deja claro que todas las señales de RMN aparecerán en el lado de las altas frecuencias de la anchura espectral. Además, es posible que algunas señales aparezcan por encima de 600,14 MHz, y como estas señales quedan fuera de la ventana espectral, serán excluidas y no se observarán. Para comprobar la presencia de este tipo de señales hay dos opciones posibles:

- Se podría aumentar la anchura espectral para incluir las señales que faltan. Esto, sin embargo, tendría la desventaja, por ejemplo, de aumentar la resolución de la FID (cuanto menor sea el valor de FIDRES, mejor será la resolución).
- Una mejor solución sería no modificar la anchura espectral, pero atribuir un valor a O1 para desplazar el centro de la ventana.

En nuestro ejemplo, las señales detectadas aparecen todas en la franja de 600,138 MHz y, por lo tanto, nos gustaría centrar el espectro en esa frecuencia.

$$\Rightarrow SFO1 = 600,138 = BF1 + O1$$

$$\Rightarrow 600,138 = 600,13 + O1$$

$$\Rightarrow O1 = 0,008 \text{ MHz} = 8 \text{ kHz}$$

Por lo tanto, si O1, la frecuencia de compensación, está establecida en 8 kHz, se desplaza la ventana para que tenga ese aspecto en la siguiente figura.

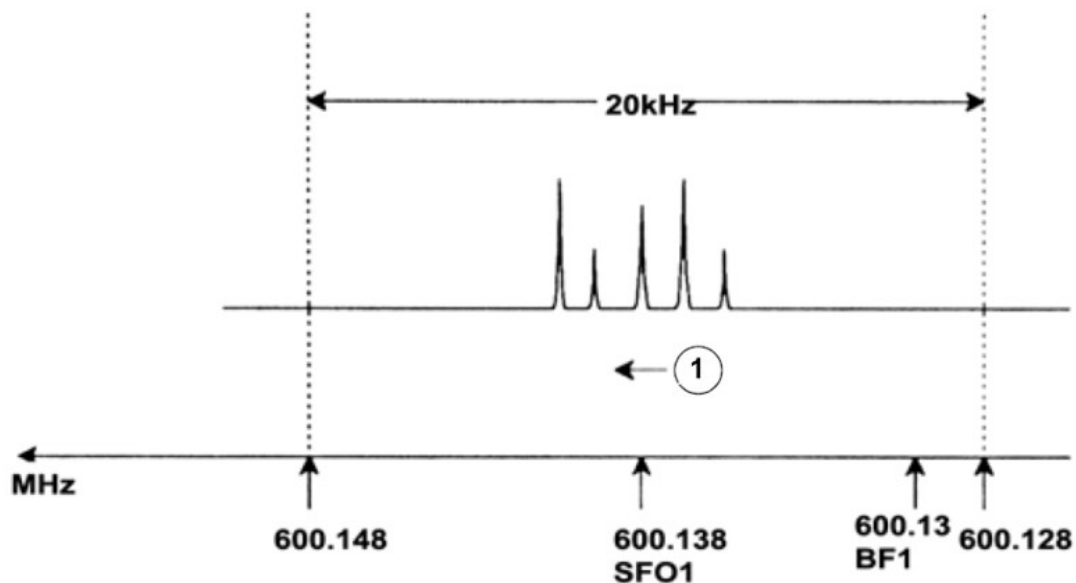


Figura 6.2: Espectro con $BF1 = 600,13 \text{ MHz}$, $01 = 8 \text{ kHz}$

1.	Frecuencia		
----	------------	--	--

La figura anterior, finalmente, deja claro que las señales de RMN emitidas por los protones en nuestra muestra hipotética ocupan únicamente una parte de la anchura espectral. Por consiguiente, la anchura espectral se podría reducir sin pérdida de datos relevantes. Una ventaja de disminuir la anchura espectral es una mejora en la resolución. La desventaja es que el tiempo de adquisición de los datos aumentará proporcionalmente.

Tal como se menciona en la [Introducción a la Teoría y Terminología \[9\]](#), los desplazamientos químicos de protones raramente superan las 14 ppm. Esto corresponde a 8,4 kHz en un espectrómetro de 600 MHz. En la figura siguiente se muestra el espectro hipotético modificando el valor de SWH de 20 kHz a 8,4 kHz.

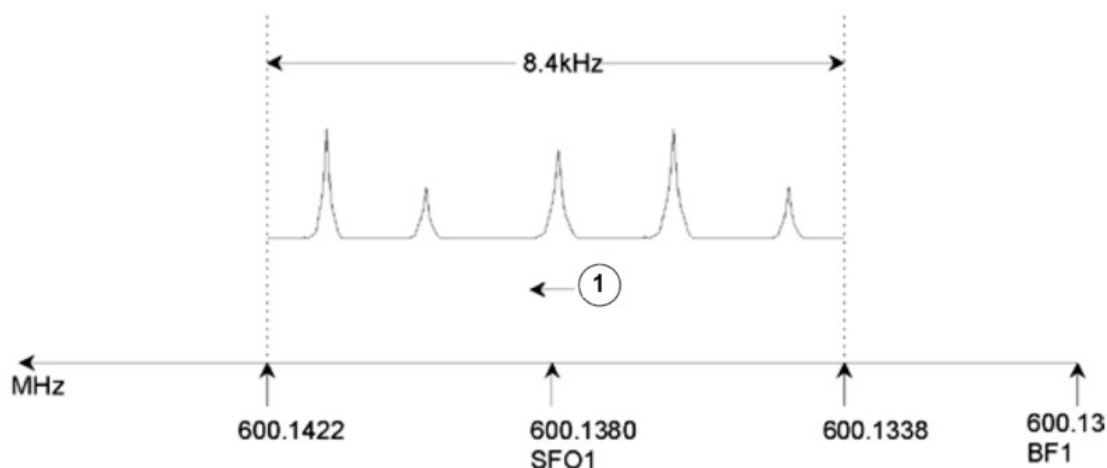


Figura 6.3: Espectro con $BF1 = 600,13 \text{ MHz}$, $01 = 8 \text{ kHz}$, $SWH = 8,4 \text{ kHz}$

1.	Frecuencia		
----	------------	--	--

Debería tenerse en cuenta que el valor de SWH utilizado en un experimento determinado únicamente se determina por la muestra a analizar y la resolución espectral requerida. Para los espectros de hidrógeno, un valor de 14 ppm asegurará que se detecten la mayoría de señales de protones. Sin embargo, para un estudio detallado de una señal concreta, se usarán valores de SWH mucho menores.

La siguiente figura ilustra los principios generales de cómo interactúan SFO1, BF1 y O1 (aquí se muestran con una muestra nueva).

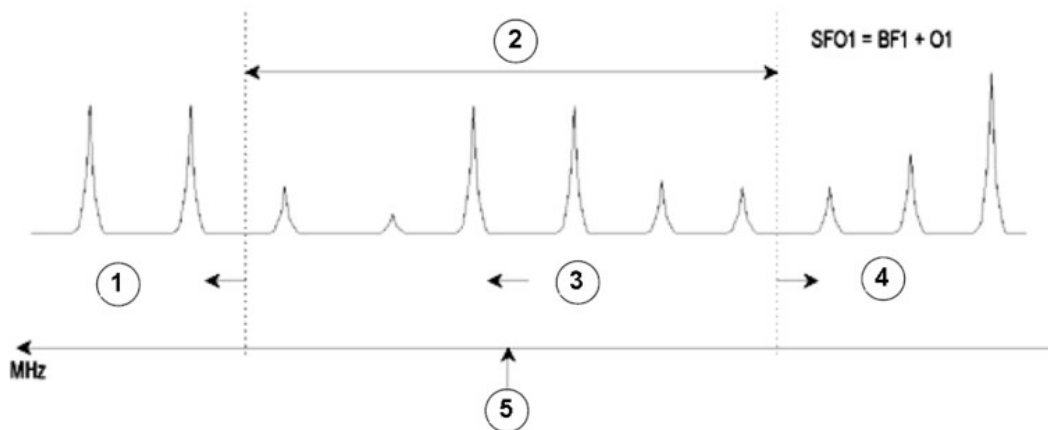


Figura 6.4: Interacción de SFO1, BF1 y O1

1.	Si a O1 se le da un valor positivo, la ventana se desplaza a frecuencias más altas.
2.	El parámetro SW determina la anchura de la ventana.
3.	Frecuencia.
4.	Si a O1 se le da un valor negativo, la ventana se desplaza a frecuencias más bajas.
5.	SFO1 es el centro del espectro.

7 La muestra de RMN

Cuando se investiga un **sólido** utilizando la técnica de RMN, las señales tienden a ser anchas y su estructura fina, que es la que tiene mayor interés para los científicos, no se puede resolver. Por este motivo, las muestras sólidas normalmente se disuelven en un disolvente adecuado antes de la adquisición. Lo mismo ocurre con las **muestras líquidas**. Se pueden añadir pequeñas cantidades de un compuesto de referencia al disolvente orgánico. Pero para obtener los mejores resultados, la muestra debe ser lo más pura posible. Las señales de **impurezas** complicarán el espectro, como mínimo, y pueden ocultar las señales importantes. Se debe poner especial cuidado en garantizar que la muestra esté libre de **impurezas magnéticas**, dado que estas pueden distorsionar el campo magnético y, por lo tanto, degradar la resolución del espectro. Las impurezas sólidas se pueden eliminar fácilmente mediante filtración. En el caso de muestras en **disolventes orgánicos**, el agua disuelta se puede eliminar en la mayor medida posible secando las muestras rigurosamente antes de su disolución.

7.1 Selección del disolvente

El paso siguiente después de purificar y secar la muestra suficientemente es escoger un disolvente adecuado. Dado que el deuterio es, con mucho, el núcleo más común para el bloqueo, la muestra se suele disolver en un disolvente deuterado (donde la mayor parte de los átomos de hidrógeno, normalmente más del 99 %, se han substituido por deuterio). Los **disolventes deuterados** más usados son el benceno-d6, la acetona-d6 y el cloroformo-d; aunque hay muchos otros disolventes disponibles. Se deberían considerar los siguientes factores cuando se escoge un disolvente:

1. **Solubilidad:** Obviamente, cuanto más soluble sea la muestra en el disolvente, mejor. Esto maximiza la cantidad de muestra en un volumen razonable, incrementando la sensibilidad del experimento. Una alta solubilidad es especialmente importante si únicamente se dispone de pequeñas cantidades de muestra.
2. **Interferencias de las señales del disolvente con el espectro de la muestra:** Inevitablemente, el disolvente generará señales de RMN que tapan algunas regiones del espectro. Estas "señales residuales del disolvente" no se deberían solapar con las señales de la muestra.
3. **Dependencia de la temperatura:** Para experimentos que se realicen a temperatura mayor o menor de la ambiente, los puntos de fusión y ebullición del disolvente también serán factores importantes. Además, la solubilidad de la muestra también puede variar en función de la temperatura.
4. **Viscosidad:** Cuanto menor sea la viscosidad del disolvente, mejor será resolución del experimento.
5. **Coste:** Evidentemente, para la RMN de rutina, en la que es necesario analizar muchas muestras, también es importante considerar el coste del disolvente. Como regla empírica, el precio incrementará con el número de átomos deuterados.
6. **Contenido de agua:** Casi todos los disolventes para RMN contienen trazas de agua. También muchos son higroscópicos (absorben trazas de agua de la atmósfera) y, por lo tanto, cuanto más tiempo estén almacenados, más agua contendrán. La presencia de un pico de agua (HDO) solo degradará la calidad de los espectros de RMN. El nivel de agua en el disolvente se puede reducir considerablemente mediante filtración a través de un agente desecante o guardando el disolvente en presencia de tamices moleculares.

La elección del disolvente para una muestra se basará en un equilibrio entre las distintas ventajas y desventajas de cada uno de ellos. Consulte la página web si necesita información detallada y precisa sobre disolventes específicos.

7.2 Tubo de muestra

Dependiendo del tipo de sonda o experimento, la muestra se puede girar mientras se analiza. **El giro** de la muestra tiene como efecto anular la no homogeneidad del campo en las direcciones X e Y, y como consecuencia mejorar la resolución espectral. Una desventaja del giro es que puede provocar **bandas laterales de rotación**. Se trata de señales (picos) falsas que resultan de la modulación del campo magnético a la frecuencia de giro. Aparecen siempre a ambos lados de los picos auténticos que son más intensos, con una separación igual a la de la velocidad de giro. La intensidad de estas bandas laterales será proporcional a la intensidad del pico auténtico. Así, si la velocidad de giro es de 20 revoluciones/segundo (=20 Hz), las bandas laterales de rotación se encontrarían a frecuencias de 20 Hz por encima y por debajo de la frecuencia de resonancia de la señal original.

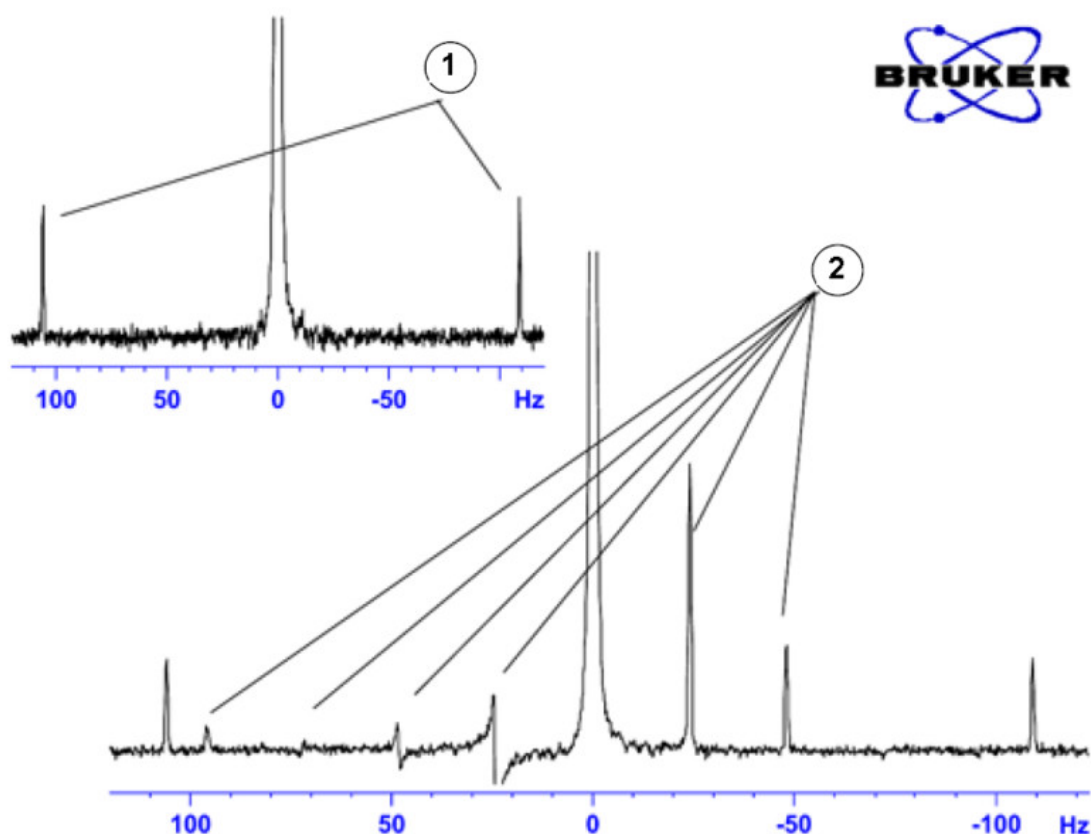


Figura 7.1: Espectro mostrando bandas laterales de rotación

1.	Satélites ¹³ C	2.	Bandas de rotación
----	---------------------------	----	--------------------

Aunque la presencia de bandas laterales de rotación pueda ser inevitable, su tamaño a menudo depende de la calidad del tubo de muestra. Idealmente, el tubo de muestra debería tener una simetría cilíndrica perfecta. Bandas laterales inusualmente grandes pueden apuntar a una **simetría inadecuada del tubo**, y por lo tanto indicar que hacen falta tubos de mejores especificaciones (y evidentemente mayor coste).

Los **tubos de muestra** deben mantenerse siempre limpios y libres de polvo y ralladuras. No limpie los tubos con escobillas para tubos de ensayo. Sea consciente de que un tubo nuevo no necesariamente está limpio. Los tubos se pueden lavar con acetona o agua destilada. Puede usar detergente líquido siempre que lo enjuague en pocos minutos para evitar la corrosión del tubo. Los tubos también pueden limpiarse mediante ultrasonidos en una solución adecuada. Si todas las medidas anteriores fallan, puede dejar los tubos en remojo en AGUA REJIA durante un tiempo de hasta dos días y luego enjuagarlos abundantemente.

antes de secarlos. Los tubos de RMN se pueden secar en una estufa, pero sin calentar por encima de 100°C, ya que se pueden deformar y en consecuencia no girar adecuadamente. La mejor manera de secar los tubos es pasando nitrógeno filtrado por el tubo.

7.3 Manipulación de muestra

Es recomendable filtrar las soluciones de RMN directamente en el tubo de muestra, para que no haya polvo u otras contaminaciones.



Nota: ¡Recuerde que los tubos de muestra siempre deben sujetarse por la parte superior!

Un procedimiento habitual de preparación de muestra puede ser el siguiente:

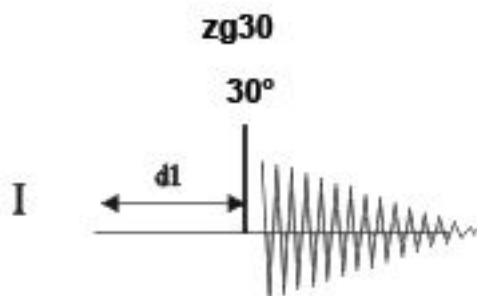
1. Para una muestra sólida, utilizando un tubo de 5 mm, disuelva hasta 20 mg de muestra en un volumen de alrededor de 0,6 cm³ del disolvente elegido (para tubos de 10 mm, disuelva hasta 80 mg en 2,5 cm³). Por regla general, para muestras líquidas y cuando se observe protón, disuelva un 20 % de muestra en un 80 % de disolvente deuterado.
2. Añada una pequeña cantidad (~0,1 %) del compuesto de referencia tetrametilsilano (TMS). Asegúrese de que la señal del TMS sea menor que las señales más intensas de la muestra o del disolvente (de lo contrario la relación señal/ruido será muy pobre debido a la baja ganancia del receptor).
3. Filtre la solución al tubo de muestra a través de una pipeta de Pasteur con un trocito de paño para laboratorio Kimwipe.
4. Filtre 0,2 cm³ de disolvente al tubo a través del filtro. La solución resultante debería tener una profundidad de tres o cuatro centímetros.
5. Cierre el tubo con un tapón, selle la parte superior con parafilm para reducir la evaporación y etiquete el tubo cerca de su parte superior. Asegúrese de que el tapón, el parafilm y la etiqueta sean concéntricos o, de lo contrario, afectarán de forma negativa al espín de la muestra.



Nota: El uso de fibra de vidrio para el filtrado de la muestra puede causar algunos problemas, especialmente si quiere hacer medidas de T₁.

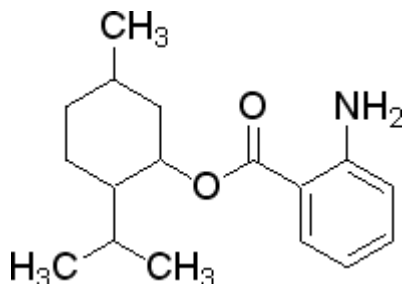
8 Espectro de Protón

Este capítulo describe la adquisición y el procesado de un espectro mono-dimensional de ^1H RMN empleando el grupo de parámetros estándar **PROTON** de Bruker. La secuencia de pulsos **zg30** (ver figura más abajo) consiste en un retardo de reinicio (recycling delay), un pulso de radiofrecuencia (RF), y el tiempo de adquisición durante el que se registra la señal. El ángulo del pulso es de 30° . Los dos parámetros, **d1** y **p1**, corresponden a la longitud del tiempo de retardo en el inicio y a la longitud del pulso de Radiofrecuencia de 90° , respectivamente.



Los intervalos de tiempo ilustrados en el diagrama de la secuencia de pulsos no se han dibujado a escala. Por ejemplo, **d1** habitualmente es de unos pocos segundos, mientras que **p1** normalmente tiene una longitud de unos pocos microsegundos.

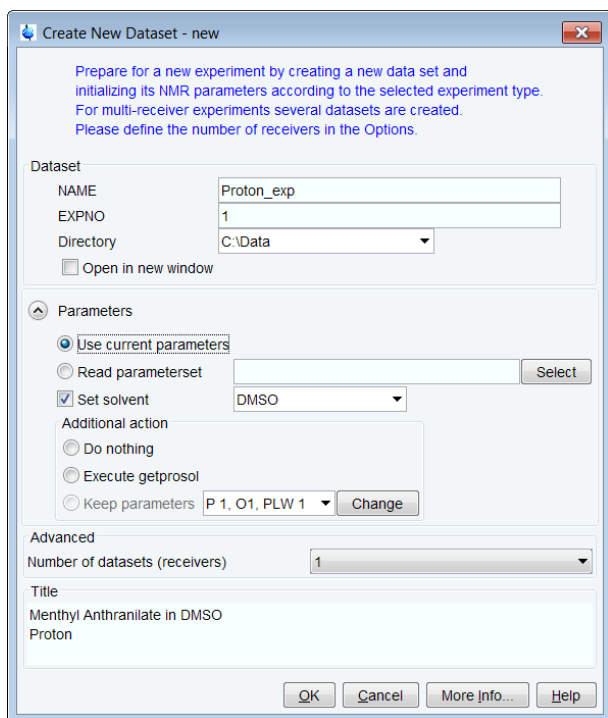
La muestra empleada consiste en **30 mg de antranilato de metilo en DMSO-d6**.



8.1 Configuración del experimento

Creación de un nuevo conjunto de datos

- En la barra de menús, haga clic en **Acquire | Create Dataset** para abrir la ventana Crear nuevo conjunto de datos.

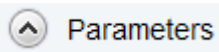


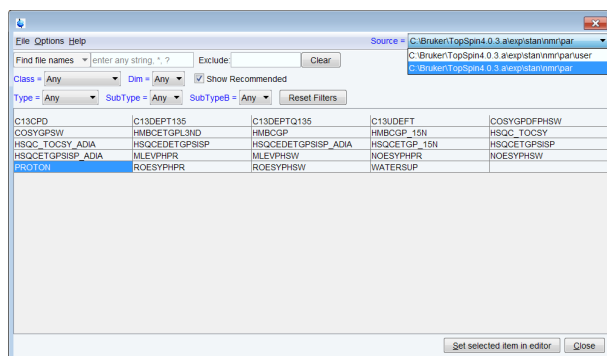
- En la ventana Crear un nuevo conjunto de datos introduzca o seleccione:
NAME = **Proton_exp**
EXPNO = 1
Directory = p. ej. *C:\Data*

Directory, **NAME** y **EXPNO** definen dónde se guardará el nuevo conjunto de datos para el experimento en el ordenador:

Directory/NAME/EXPNO/ En el ejemplo: *C:\Data\proton_exp\1*

Puede seleccionarse **Directory** en la lista desplegable o puede introducirse una nueva ubicación en el campo de texto. **NAME** es un subdirectorio de **Directory**, y **EXPNO**, de **NAME**. **EXPNO** debe ser un entero positivo. Proporciona una manera de guardar múltiples conjuntos de datos relacionados con el mismo nombre **NAME**.

- En el grupo de Parámetros,  haga clic en **Read parameterset** y **Select** para abrir la ventana rpar.



- Active **Show Recommended** para obtener la lista de los experimentos más habituales con moléculas de tamaño reducido.
- Asegúrese de que el directorio de origen sea:
`<TopSpin>\exp\stan\nmr\par`
 y no:
`<TopSpin>\exp\stan\nmr\par\user`
- En la tabla, seleccione el experimento **PROTON** y haga clic en **Set selected item in editor**.
- En la ventana Crear nuevo conjunto de datos marque **Set solvent** y en la lista desplegable seleccione **DMSO**.
- En el campo TITLE introduzca un texto que indique el experimento, la muestra, el disolvente y cualquier otra información que pueda ser útil. La información sobre el título puede utilizarse para buscar un conjunto de datos.
- En la ventana New Dataset, haga clic en **OK**.
- En la barra de menús, haga clic en **Acquire**.

Para adquirir un espectro, use los botones de flujo de trabajo en la barra de botones de flujo de trabajo de izquierda a derecha (véanse pasos a continuación). Alternativamente, pueden introducirse los comandos que se muestran entre paréntesis de las diversas ventanas emergentes cuando lo indica TopSpin (p. ej. **ej**, **ij**, **edte**, etc.).

- En el botón **Sample**, haga clic en la flecha **desplegable** para ver más opciones.
- En la lista, seleccione **Eject sample manually (ej)**.



Espere hasta que se active el aire de elevación de la muestra y retire la muestra que pueda haber en el imán.

Cargue la muestra

- Coloque la muestra con la centrifugadora encima de la parte superior del imán.
- En el botón **Sample**, haga clic en la flecha **desplegable** para ver más opciones.
- En la lista, seleccione **Insert sample manually (ij)**.



Espere hasta que la muestra se haga descender hasta entrar en la sonda y se haya desactivado el aire de elevación. Se oirá un clic.

Bloqueo del disolvente

- En la barra del botón del flujo de trabajo, haga clic en **Lock**.
- En la ventana de la tabla de Disolventes, seleccione el disolvente, p. ej. **DMSO**. Haga clic en **OK**.

Solvent	Description
Acetic	acetic acid-d4
Acetone	acetone-d6
C6D6	benzene-d6
CD2Cl2	dichloromethane-d2
CD3CN	acetonitrile-d3
CD3CN_SPE	LC-SPE Solvent (Acetonitrile)
CD3OD_SPE	LC-SPE Solvent (Methanol-d4)
CDCl3	chloroform-d
CH3CN+D2O	HPLC Solvent (Acetonitril/D2O)
CH3OH+D2O	HPLC Solvent (Methanol/D2O)
D2O	deuteriumoxide
D2O_salt	deuteriumoxide with salt
Dioxane	dioxane-d8
DMF	N,N-dimethylformamide-d7
DMSO	dimethylsulfoxide-d6
EtOD	ethanol-d6
H2O+D2O	90%H2O and 10%D2O
H2O+D2O_salt	90%H2O and 10%D2O with salt
HDMSO	90%DMSO and 10%DMSO-d6
Juice	fruit juice
MeOD	methanol-d4
Plasma	blood plasma
Pyr	pyridine-d5
T_H2O+D2O+Me4NCl	(CD3)4NCl in 90%H2O and 10%D2O, for NMR thermometer
T_H2O+D2O+NaAc	sodium acetate in 90%H2O and 10%D2O, for NMR thermometer
T_H2O+D2O+Pivalate	pivalate-d9 in 90% H2O and 10% D2O, for NMR thermometer
T_MeOD	methanol-d4, for NMR thermometer
TFE	trifluoroethanol-d3
THF	tetrahydrofuran-d8
Tol	toluene-d8
Urine	urine

Lock nucleus: 2H

Sintonización y ajuste de la sonda

- En la barra del botón del flujo de trabajo, haga clic en **Tune**.

Se realiza así una **atma (sintonización y ajuste automáticos)**. Se requiere una sonda equipada con un módulo automático de sintonización. Haga clic en la flecha **desplegable** del botón **Tune si desea más opciones**.

Espín de la muestra (opcional)

- En el botón **Spin**, haga clic en la flecha **desplegable** para ver más opciones.
- En la lista, seleccione **Turn sample rotation on (ro on)**.



Puede ponerse la rotación en **OFF** en el caso de sondas como **BBI, TXI, TBI** o de sondas para muestras de tamaño reducido.

Homogeneización de la muestra

- En la barra del botón del flujo de trabajo, haga clic en **Shim**.

Se ejecuta así el comando **topshim**. La homogeneización comienza de inmediato y no debería durar más de un minuto. En el botón **Shim**, haga clic en la flecha **desplegable** para ver más opciones.

Cargue los parámetros Prosol

- En la barra del botón del flujo de trabajo, haga clic en **Prosol**.

Se cargarán así los anchos de pulsos y los niveles de potencia en el conjunto de parámetros.

8.2 Adquisición

Fije la ganancia del receptor

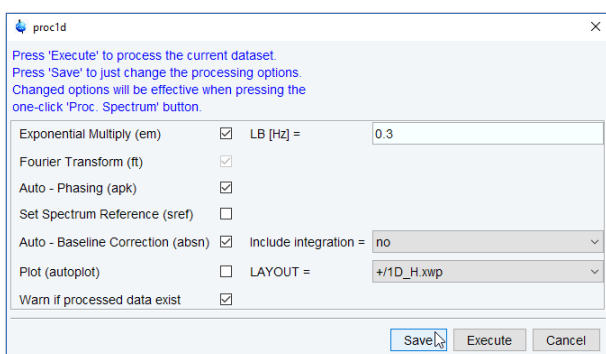
- En la barra del botón del flujo de trabajo, haga clic en **Gain**.
- o
- En el botón **Gain**, haga clic en la flecha desplegable para ajustar manualmente la ganancia del receptor.

Inicio de la adquisición de datos

- En la barra del botón del flujo de trabajo, haga clic en **Run**.
- o
- En el botón **Run**, haga clic en la flecha **desplegable** para ver más opciones.

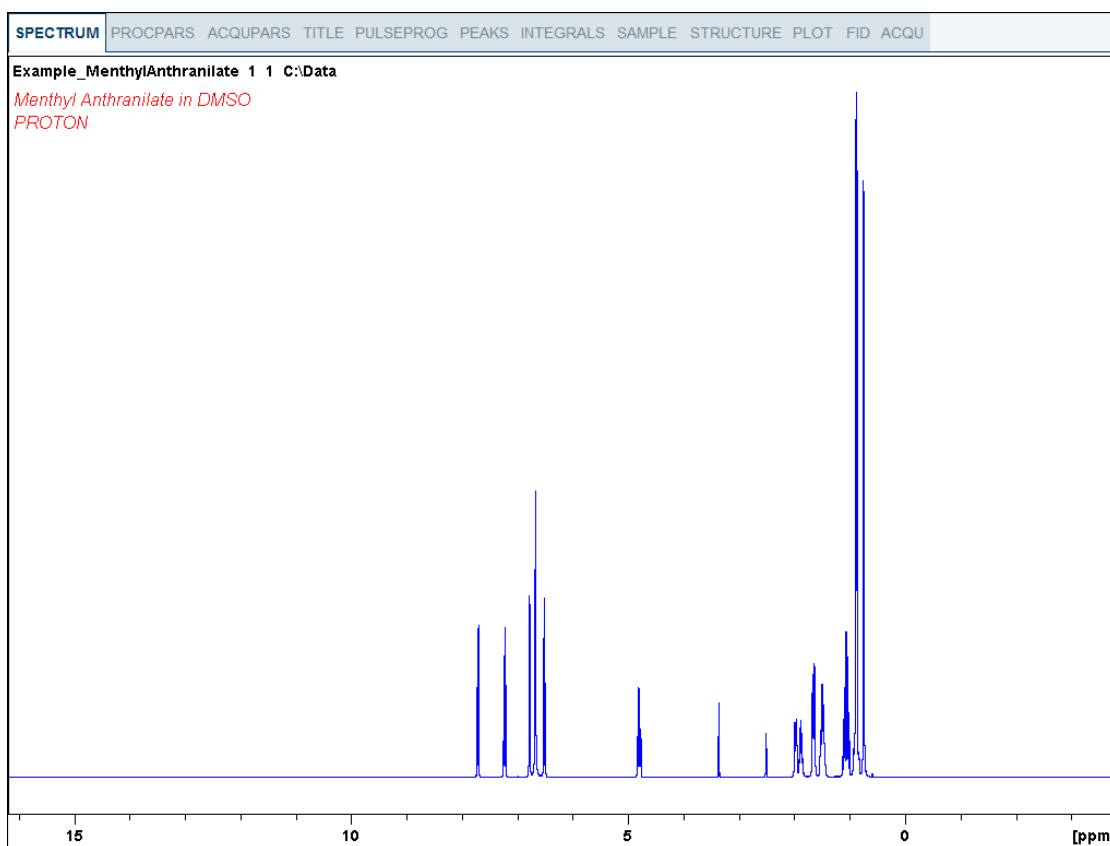
8.3 Procesamiento

- Cuando haya finalizado la adquisición, haga clic en **Process** en la barra de menús.
- En el botón **Proc Spectrum**, haga clic en la flecha **desplegable** para ver más opciones.
- En la lista, seleccione **Configure Standard Processing (proc1d)**.
- En la ventana de proc1d, active las siguientes opciones:
 - Exponential Multiply (em)
 - Auto - Phasing (apk)
 - Auto - Baseline Correction (absn)



- Si se añade TMS a la muestra para referenciado, active **Set Spectrum Reference (sref)**.
- En la ventana de proc1d, haga clic en **Execute** y, a continuación, en **Save** para guardar los ajustes de procesamiento seleccionados.

Ahora pueden procesarse todos los conjuntos de datos futuros con las acciones definidas haciendo clic en **Proc Spectrum**.

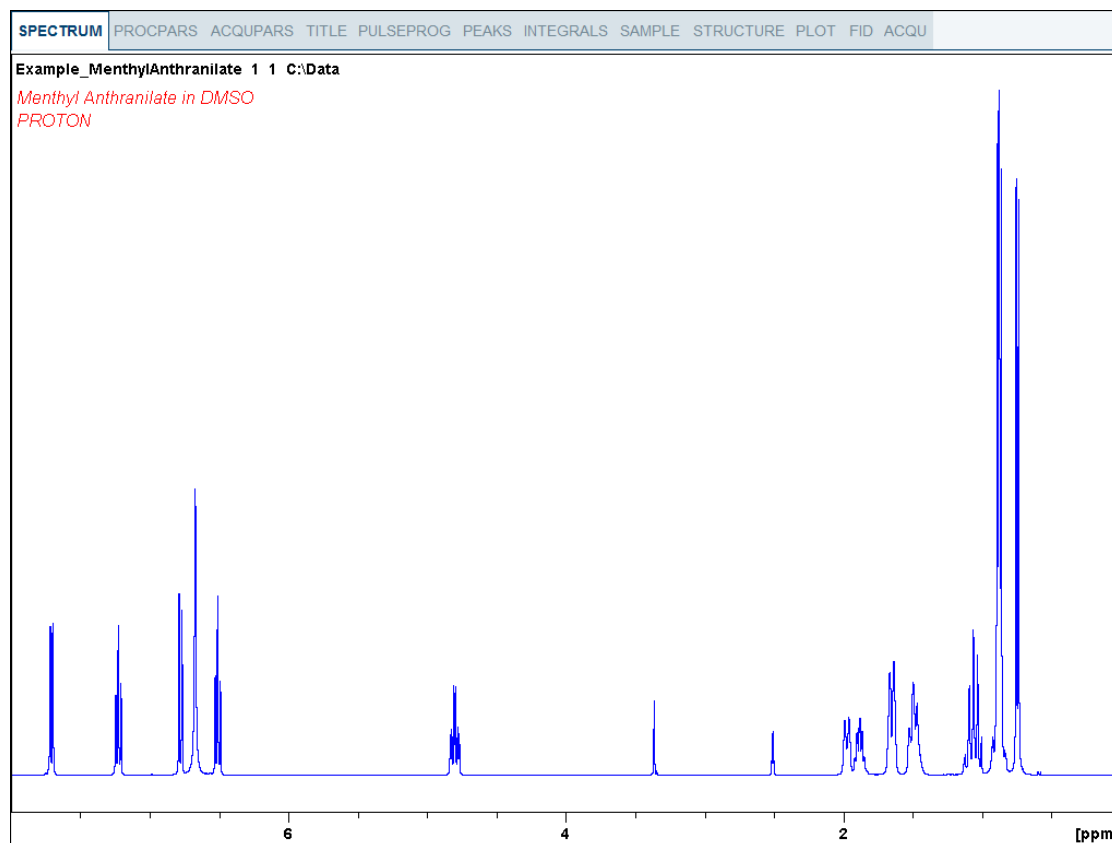


8.4 Integración

Para analizar cuantitativamente una señal de protón observada, la integral de la intensidad de los picos se compara entre sí. Suele ser habitual integrar un espectro de protón para dar cuenta del número de protones en la molécula analizada.

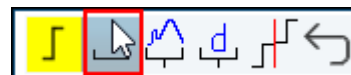
Para obtener resultados de integración cuantitativa más precisos, consulte el manual **Quantitative NMR**.

- Expanda el espectro para incluir todos los picos.



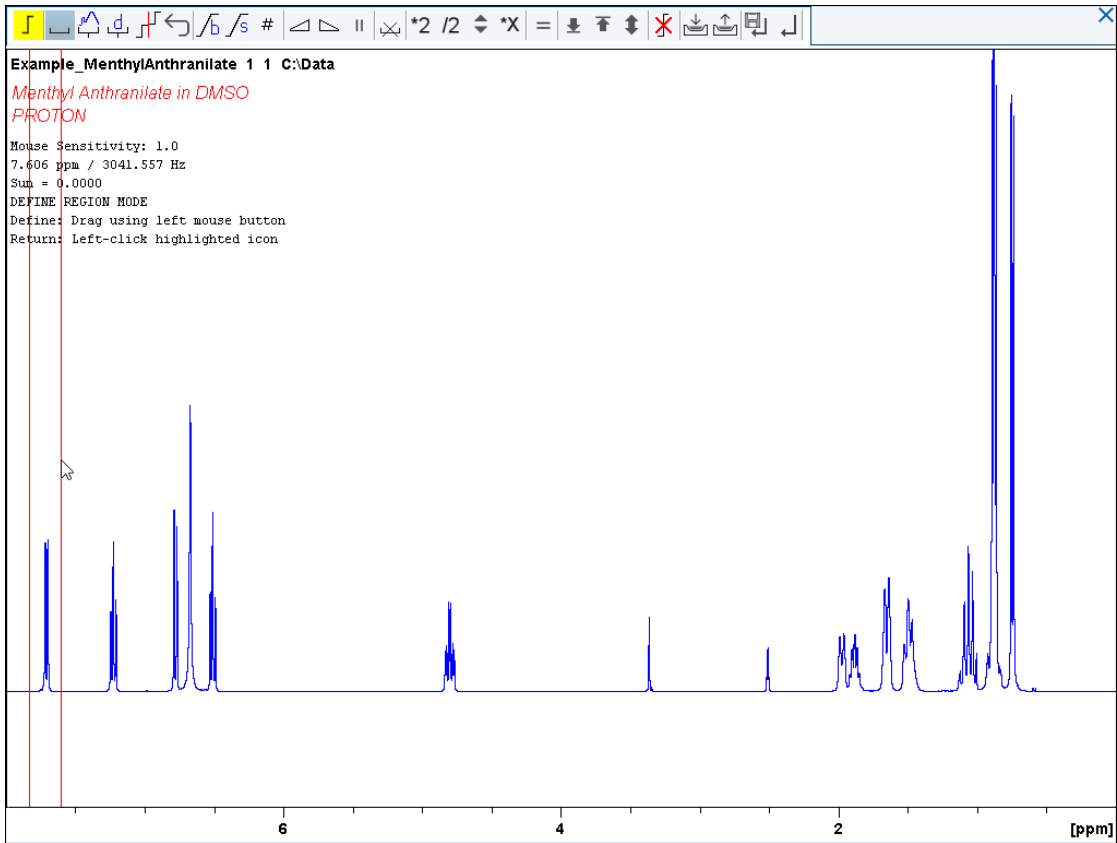
- En el menú, haga clic en **Analizar | Integrar**.

Se accede así al modo manual de Integración. La barra de pestañas de **Dataset** se sustituye por la barra de **Integration Tool**.

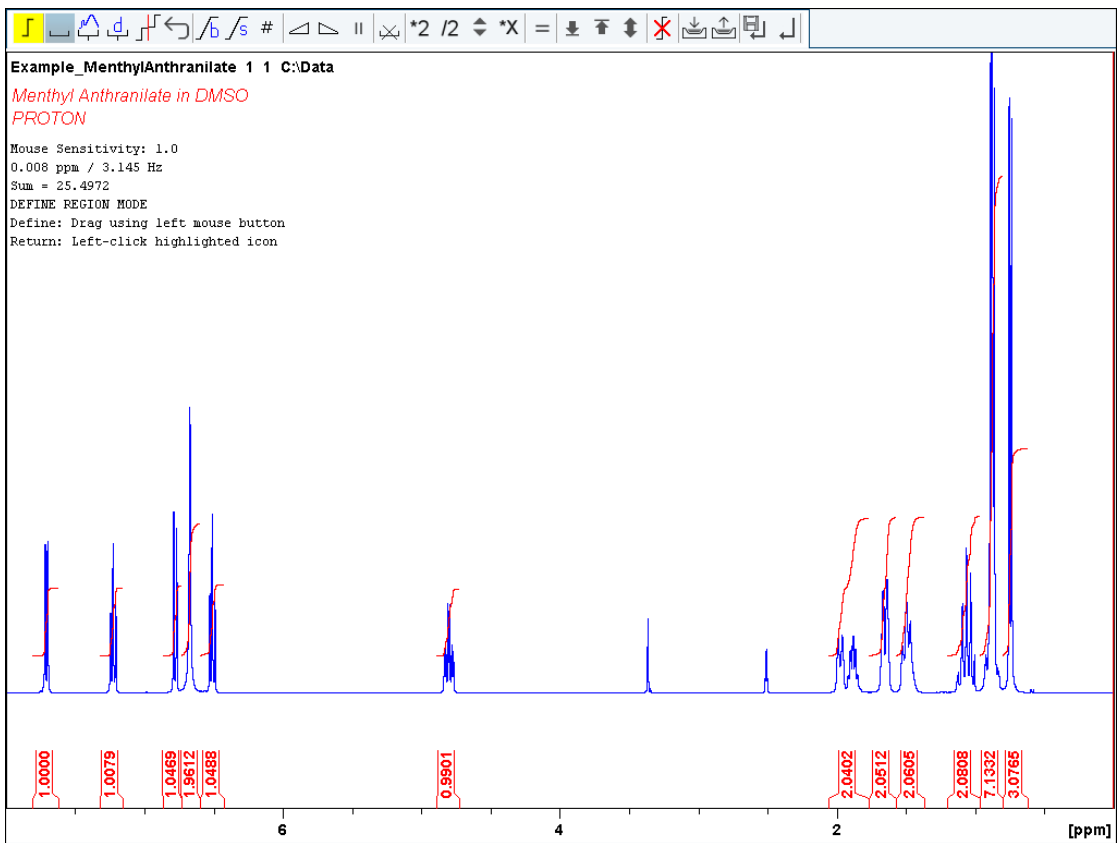



- Seleccione el botón **Define new region using cursor**.
- Ponga la línea del cursor a la izquierda del primer pico a integrar. Haga clic con el botón izquierdo del ratón y arrastre la línea del cursor hacia la derecha del pico. Luego suelte el botón del ratón.

Espectro de Protón



- Repita el último paso para todos los picos de interés.





- En la barra de Integration Tool, haga clic en **Return, save region** para guardar las regiones de integración. 



8.5 Trazado de los espectros de protones de 1D

- Expanda el espectro para incluir todos los picos.
- En la barra de herramientas, haga clic en **Retain expansion and scale**.



Puede imprimirse el espectro tal y como se muestra en la pestaña SPECTRUM haciendo clic en **Print active window** .

También puede imprimirse el espectro con un diseño predefinido haciendo clic en **Export active data or plot window as PDF** .

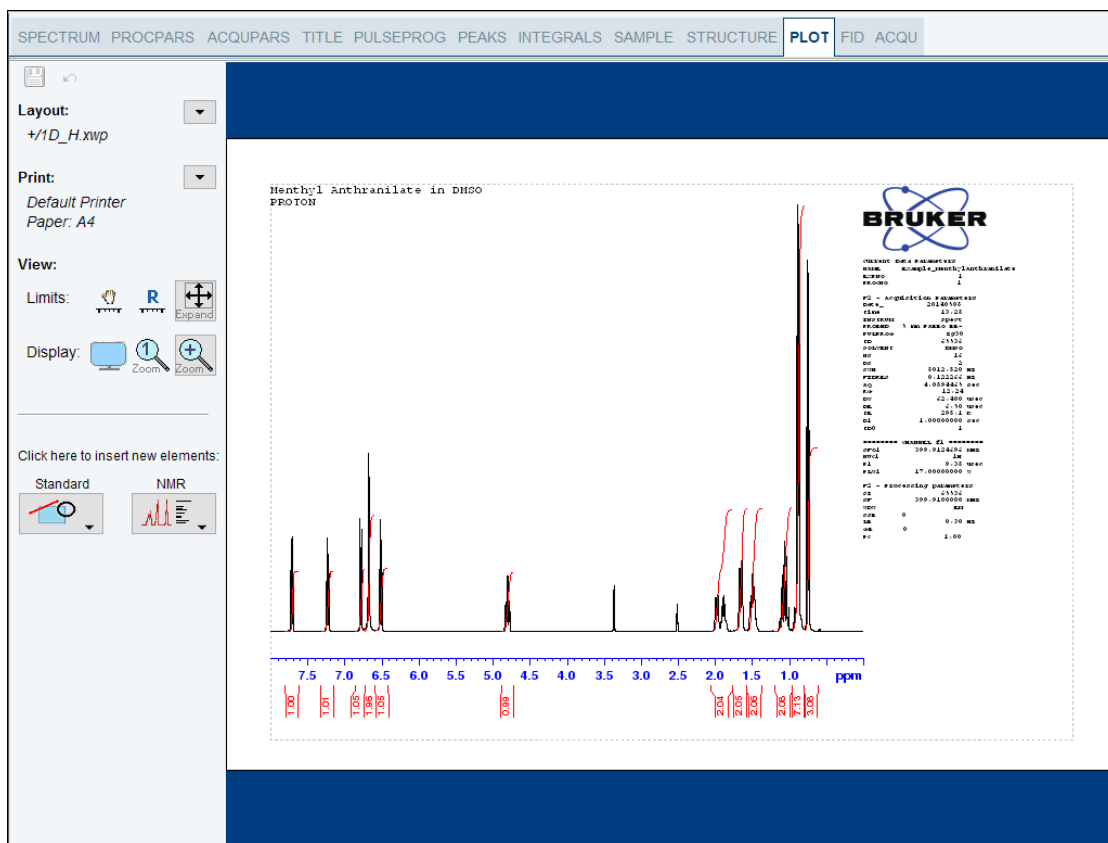
Hay más opciones disponibles con el botón **Show more Publish Options** de la barra de herramientas  y Switch to plot editor. 

También puede conmutar al trazado interactivo haciendo clic en la pestaña **Plot** en barra de pestañas de la ventana Dataset (véase la siguiente figura).



Encontrará información más detallada sobre cómo trabajar con el editor de trazado y

modificar los diseños en el manual **Data Publishing** que encontrará en el menú Help.  Haga clic en **Help | Manuals | Automation and Data Publishing | Data Publishing**.

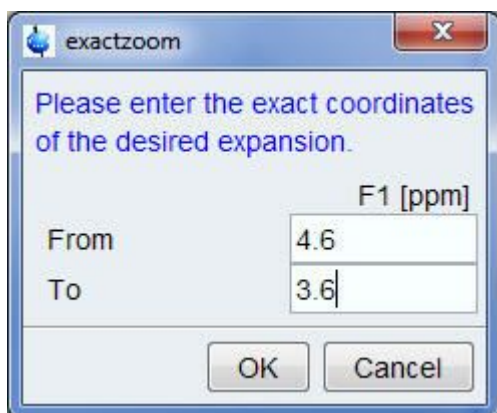


8.6 Ajuste de la anchura espectral

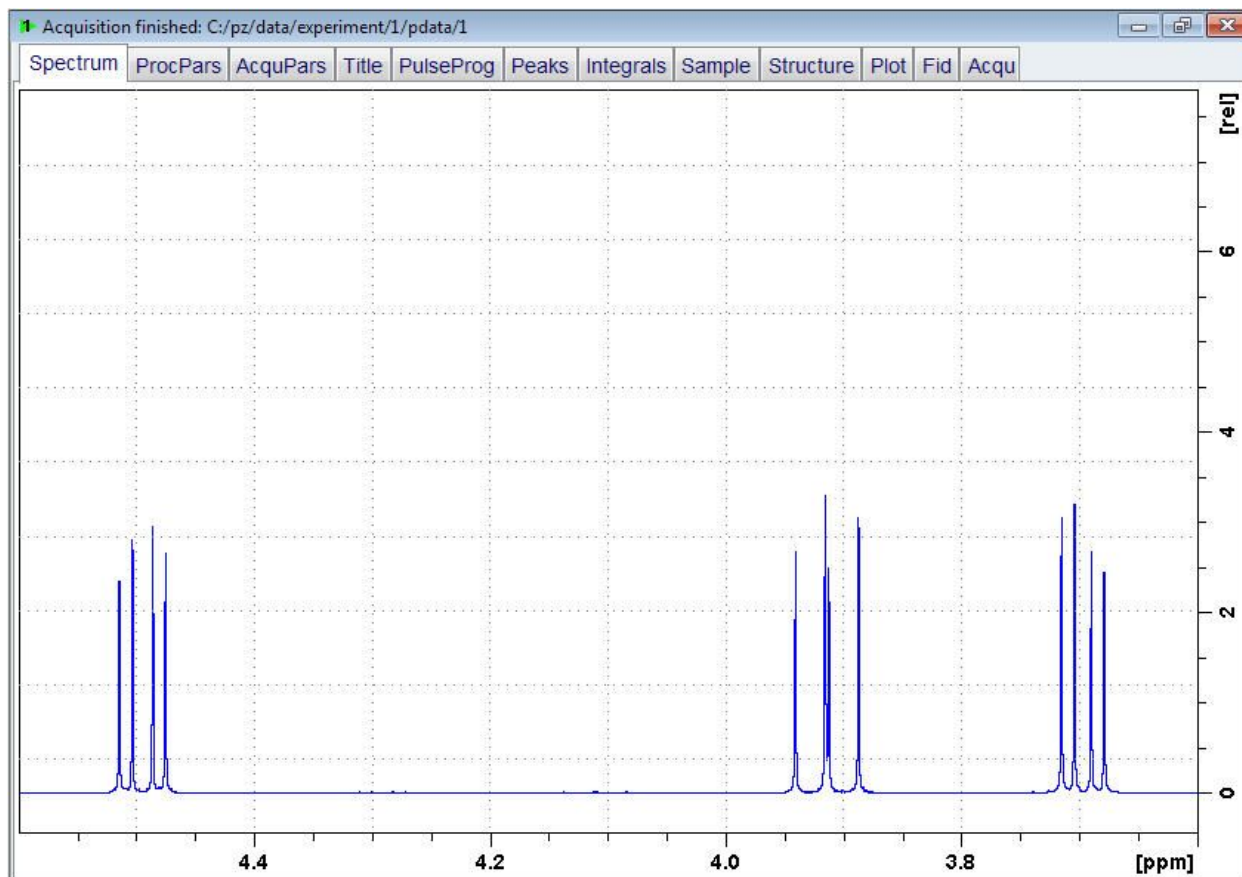
La optimización del ancho de barrido logrará una mejor resolución y separación de los picos en el espectro de protón.



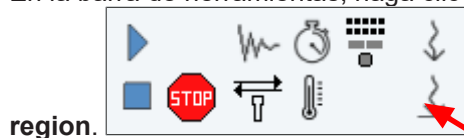
- En la barra de herramientas, haga clic en **Exact Zoom**.
- Introduzca los siguientes valores de F1 [ppm]:
Desde = 4,6
Hasta = 3,6



- En la ventana Exact Zoom, haga clic en **OK**.



- En la barra de herramientas, haga clic en **Set sw to current region** y **SFO1 to center of**



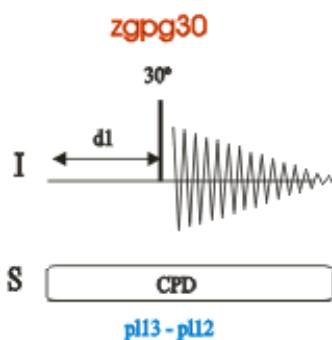
- En la ventana New setting of SW, haga clic en **Close**.
- En la barra del botón del flujo de trabajo, haga clic en **Run**.
- En la barra de menús, haga clic en **Process**.
- En la barra de botones del flujo de trabajo, haga clic en **Proc Spectrum**.



Nota: De esta forma se ejecutan los parámetros de procesamiento guardados en la ventana de proc1d.

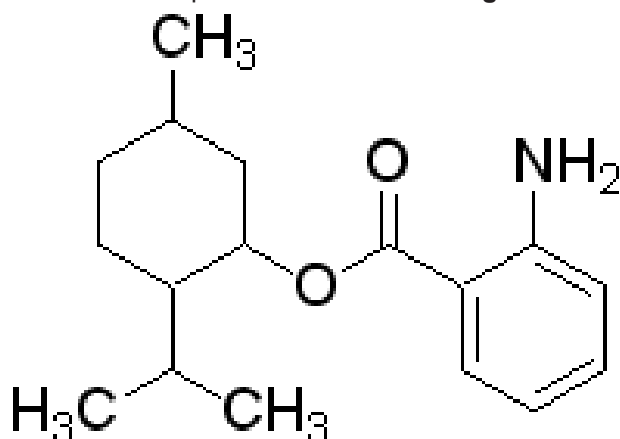
9 Espectro de ^{13}C con desacoplamiento de protón

Este capítulo describe la adquisición y el procesamiento de un espectro monodimensional de RMN de ^{13}C . El conjunto de parámetros estándar de Bruker **C13CPD** incluye la secuencia de pulsos **zpgg30** que se muestra en la siguiente figura. El canal de ^{13}C consiste en un retardo de reciclado, un pulso de RF y un tiempo de adquisición durante el que se registra la señal. El ángulo del pulso es de 30° . Los dos parámetros, **d1** y **p1**, corresponden a la longitud del retardo del reciclado y a la longitud del pulso de radiofrecuencia de 90° , respectivamente. El canal de ^1H consiste en dos pulsos de desacoplamiento con potencia regulable. El primer pulso, un pulso de acumulación de NOE durante el retardo de reciclado, puede ser de potencia menor que el segundo pulso efectuado durante la adquisición, que es el pulso de desacoplamiento real. Esta disminución de potencia puede ser útil para evitar el calentamiento debido a la RF en muestra salinas o para sondas donde una alta potencia de desacoplamiento puede ser problemática.




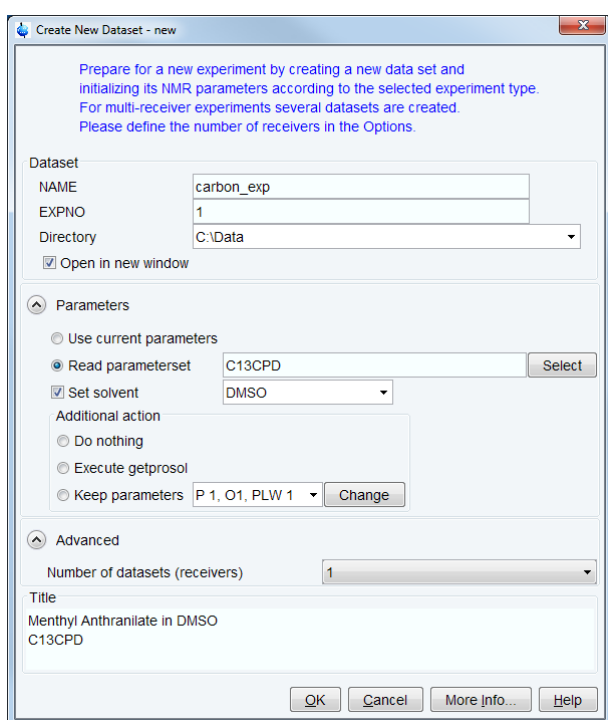
Los intervalos de tiempo ilustrados en los diagramas de la secuencia de pulsos no se han dibujado a escala. Por ejemplo, **d1** habitualmente es de unos pocos segundos, mientras que **p1** normalmente tiene una longitud de unos pocos microsegundos.

La muestra empleada consiste en **30 mg de antranilato de metilo en DMSO-d6**.



9.1 Configuración del experimento

- En la barra de menús, haga clic en **Acquire | Create Dataset** para abrir la ventana Crear nuevo conjunto de datos.
- En la ventana New Dataset, introduzca o seleccione:
NAME = **carbon_exp**
EXPNO = **1**
Directory = p. ej. **C:\Data**
- En el grupo de Parámetros,  **Parameters** haga clic en **Read parameterset** y seleccione el experimento **C13CPD**
- En la ventana Crear nuevo conjunto de datos marque **Set solvent** y en la lista desplegable seleccione **DMSO**.



- En el campo TITLE introduzca un texto que indique el experimento, la muestra, el disolvente y cualquier otra información que pueda ser útil. La información sobre el título puede utilizarse para buscar un conjunto de datos.
- En la ventana New Dataset, haga clic en **OK**.
- En la ventana Conjunto de datos, seleccione la pestaña **AcquPars**.
- Realice el siguiente cambio:
NS = **128**
- En la barra de menús, haga clic en **Acquire**.



Para adquirir un espectro, use los botones de flujo de trabajo de izquierda a derecha.

- En el botón **Sample**, haga clic en la flecha **desplegable** para ver más opciones.
- En la lista, seleccione **Eject sample manually (ej)**. Se activa la elevación de la muestra.



Espere hasta que se active el aire de elevación de la muestra y retire cualquier muestra que pueda haber en el imán.

- Coloque la muestra y la centrifugadora encima de la cavidad del imán.
- En el botón **Sample**, haga clic en la flecha **desplegable** para ver más opciones.
- En la lista, seleccione **Insert sample manually (ij)**.



Espere hasta que la muestra se haga descender hasta entrar en la sonda y se haya desactivado el aire de elevación. Se oirá un clic.

- En la barra del botón del flujo de trabajo, haga clic en **Lock**.
- En la lista de la tabla de Disolventes, seleccione **DMSO** y haga clic en **OK**.

Δ Solvent	Description
Acetic	acetic acid-d4
Acetone	acetone-d6
C6D6	benzene-d6
CD2Cl2	dichloromethane-d2
CD3CN	acetonitrile-d3
CD3CN_SPE	LC-SPE Solvent (Acetonitrile)
CD3OD_SPE	LC-SPE Solvent (Methanol-d4)
CDCl3	chloroform-d
CH3CN+D2O	HPLC Solvent (Acetonitril/D2O)
CH3OH+D2O	HPLC Solvent (Methanol/D2O)
D2O	deuteriumoxide
D2O_salt	deuteriumoxide with salt
Dioxane	dioxane-d8
DMF	N,N-dimethylformamide-d7
DMSO	dimethylsulfoxide-d6
EtOD	ethanol-d6
H2O+D2O	90%H2O and 10%D2O
H2O+D2O_salt	90%H2O and 10%D2O with salt
HDMSO	90%DMSO and 10%DMSO-d6
Juice	fruit juice
MeOD	methanol-d4
Plasma	blood plasma
Pyr	pyridine-d5
T_H2O+D2O+Me4NCl	(CD3)4NCl in 90%H2O and 10%D2O, for NMR thermometer
T_H2O+D2O+NaAc	sodium acetate in 90%H2O and 10%D2O, for NMR thermometer
T_H2O+D2O+Pivalate	pivalate-d9 in 90% H2O and 10% D2O, for NMR thermometer
T_MeOD	methanol-d4, for NMR thermometer
TFE	trifluoroethanol-d3
THF	tetrahydrofuran-d8
Tol	toluene-d8
Urine	urine

Lock nucleus: 2H

- En la barra del botón del flujo de trabajo, haga clic en **Tune**.



Se realiza así una **atma** (sintonización y ajuste automáticos). Se requiere una sonda equipada con un módulo automático de sintonización y ajuste. La sintonización comienza siempre con la frecuencia más baja; en este caso, el carbono, y luego pasa a las frecuencias superiores, en este caso, el protón. En el botón **Tune**, haga clic en la flecha **desplegable** para ver más opciones.

- En el botón **Spin**, haga clic en la flecha **desplegable** para ver más opciones.
- En la lista, seleccione **Turn sample rotation on (ro on)**.



Puede ponerse la rotación en off en el caso de sondas como **BBI, TXI, TBI** o de sondas para muestras de tamaño reducido.

- En la barra del botón del flujo de trabajo, haga clic en **Shim**.

Se ejecuta así el comando **topshim**. En el botón **Shim**, haga clic en la flecha **desplegable** para ver más opciones.

- En la barra del botón del flujo de trabajo, haga clic en **Prosol**.

Se cargarán así los anchos de pulsos y los niveles de potencia en el conjunto de parámetros.

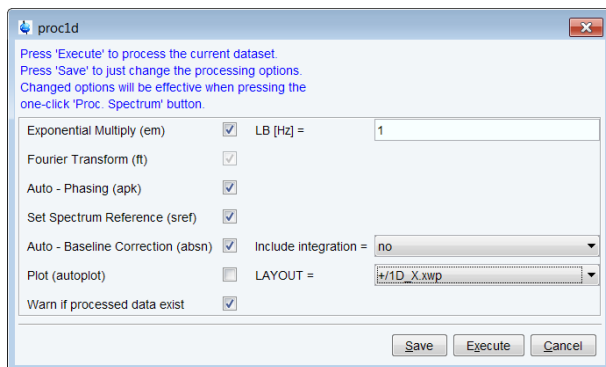
9.2 Adquisición

- En la barra del botón del flujo de trabajo, haga clic en **Gain**.
- o
- En el botón **Gain**, haga clic en la flecha **desplegable** para ajustar manualmente la ganancia del receptor.
- En la barra del botón del flujo de trabajo, haga clic en **Run**.
- o
- En el botón **Run**, haga clic en la flecha **desplegable** para ver más opciones.

9.3 Procesamiento

Cuando haya finalizado la adquisición:

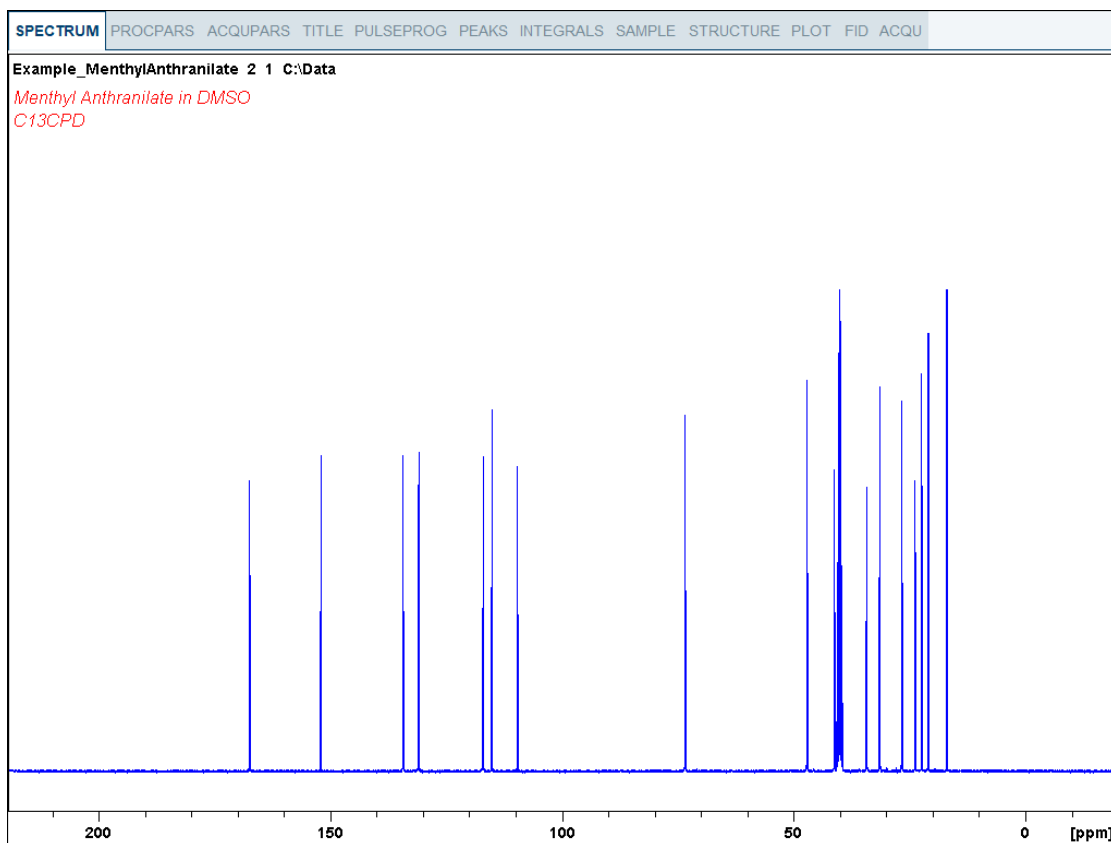
- En la barra de menús, haga clic en **Process**.
- En el botón **Proc Spectrum**, haga clic en la flecha **desplegable** para ver más opciones.
- En la lista, seleccione **Configure Standard Processing (proc1d)**.
- En la ventana de proc1d, seleccione las opciones:
 - Exponential Multiply (em)
 - Auto - Phasing (apk)
 - Set Spectrum Reference (sref)
 - Auto - Baseline Correction (absn)



- En la ventana de proc1d, haga clic en **Execute**.
- En la ventana de proc1d, haga clic en **Save** para guardar los ajustes de procesamiento seleccionados.

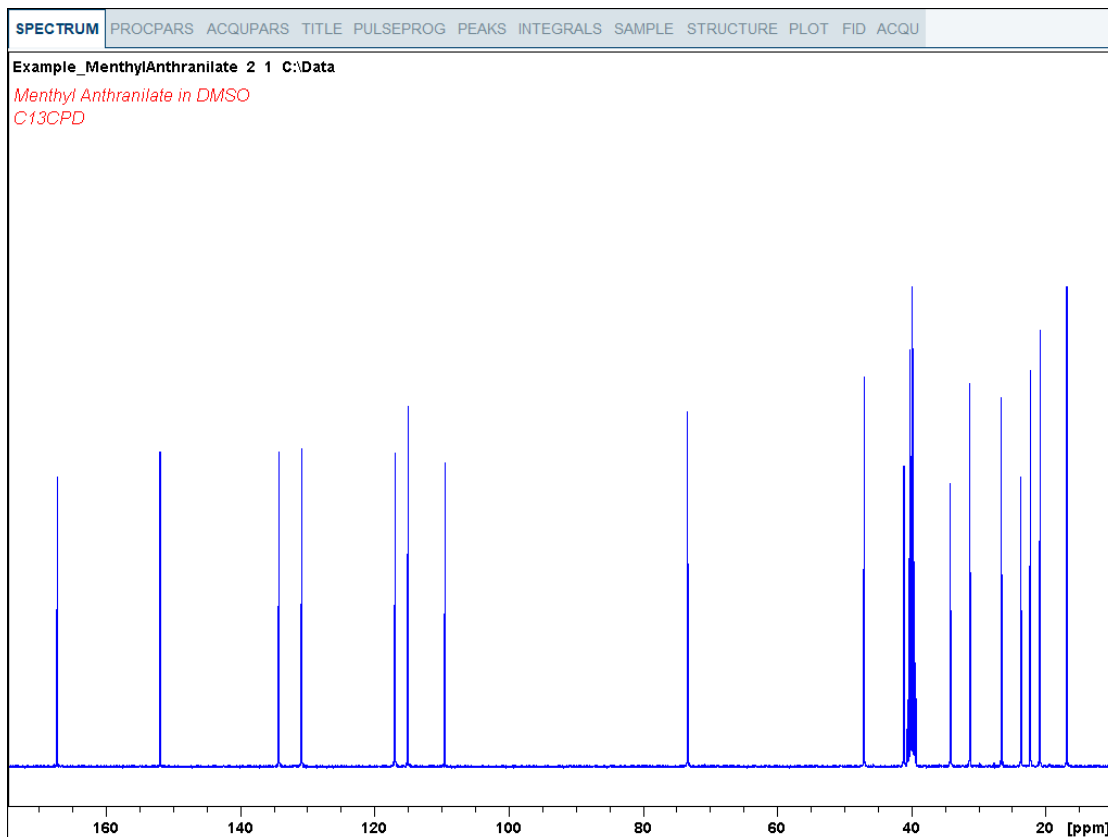


Ahora pueden procesarse todos los conjuntos de datos futuros con las acciones definidas haciendo clic en **Proc Spectrum**.



9.4 Selección de picos

- Expanda el espectro para incluir todos los picos.



- En la barra de menús, haga clic en **Analizar**.
 - En la barra de botones del flujo de trabajo, haga clic en **Pick Peaks**.
- o
- En el botón **Pick Peaks**, haga clic en la flecha **desplegable** para ver más opciones.

Se accede así al modo manual de selección de picos.

Las pestañas **Dataset** se sustituyen por la barra de herramientas **Peak Picking**.

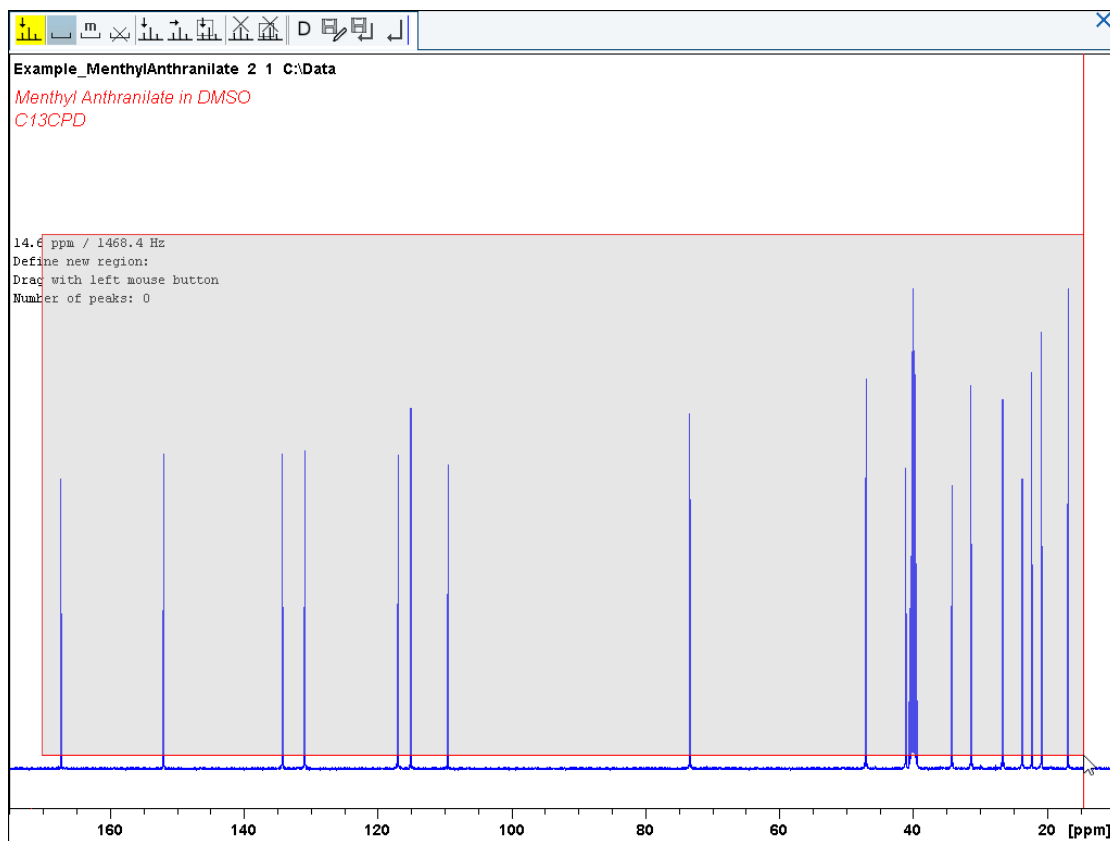


El botón **Define new peak picking range** está activado por defecto.

- Haga clic con el botón izquierdo del ratón y arrastre la línea del cursor de izquierda a derecha del espectro, dibujando una caja rectangular.



El botón **Modify existing peak picking range** permite elevar el valor inferior o disminuir el valor superior (o ambos) en la caja de selección de picos para excluir ruido o un disolvente.



- En la barra de herramientas de Peak Picking, haga clic en **Return, save region** para guardar los valores de los picos. 
- Para visualizar las etiquetas de selección de picos, haga clic con el botón derecho del ratón en la ventana del espectro y seleccione **Spectra Display Preferences**. En Spectrum components active **Peak labels** y **Peak annotations**. Haga clic en **Apply** y **Close**.

9.5 Trazado del espectro de carbono de 1D

- Expanda el espectro para incluir todos los picos.
- En la barra de herramientas, haga clic en **Retain expansion and scale**.



- En la barra de menús, haga clic en **Show more Publishing Options**.



- Seleccione **Switch to plot editor** (plot).

10 Contacto

Fabricante:

Bruker BioSpin NMR
Silberstreifen
D-76287 Rheinstetten
Germany
Phone: +49 721-5161-6155
<http://www.bruker.com>
WEEE DE43181702

NMR líneas de atención inmediata

Contacte con nuestros centros de servicio NMR.

Bruker BioSpin NMR proporciona líneas de atención inmediata y centros de servicio para que nuestros especialistas puedan responder lo más rápido posible a todos sus solicitudes de servicio, aplicaciones, preguntas, software o requerimientos técnicos.

Por favor, seleccione el centro de servicio o la línea directa que desee de nuestra lista disponible en:

<http://www.bruker.com/service/information-communication/helpdesk.html>

Figuras

Figura 3.1:	Excitación y respuesta.....	9
Figura 3.2:	Espectro de RMN	10
Figura 3.3:	Análisis mediante RMN de CHCl ₃	11
Figura 3.4:	Señales de RMN emitidos por el CHCl ₃	12
Figura 3.5:	Conversión de hercios y ppm	13
Figura 3.6:	Desplazamientos químicos de ¹ H en compuestos orgánicos	15
Figura 3.7:	Anillo del benceno	15
Figura 3.8:	Espectro del benceno	16
Figura 3.9:	Bencilacetato	16
Figura 3.10:	Espectro de protón del bencilacetato	17
Figura 3.11:	Etilbenceno	18
Figura 3.12:	Espectro del etilbenceno	19
Figura 3.13:	Experimento de desacoplamiento	20
Figura 3.14:	Espectro de etilbenceno con homodesacoplamiento	21
Figura 3.15:	Transformada de Fourier	22
Figura 4.1:	Consola AVANCE NEO e imán Ascend	23
Figura 4.2:	Vista general de la arquitectura de AVANCE NEO	24
Figura 4.3:	Foto de imán, sistema de homogeneización, sonda y HPPR.....	26
Figura 4.4:	Imán superconductor	28
Figura 4.5:	Muestra en la sonda	30
Figura 4.6:	Cableado HPPR típico.....	31
Figura 4.7:	Ejemplo de sonda de banda ancha	32
Figura 4.8:	La plataforma iProbe de Bruker	33
Figura 5.1:	Inserción de la muestra en la centrifugadora.....	38
Figura 5.2:	Tabla de disolventes.....	39
Figura 5.3:	Visualización del bloqueo tras bloquear la muestra	40
Figura 5.4:	Ventana de sintonización / ajuste de la sonda con ATMM	41
Figura 5.5:	Ejemplos de curvas de barrido en frecuencia con diferente sintonización y ajuste.....	43
Figura 5.6:	La ventana de proc1d	45
Figura 6.1:	Espectro con BF1 = 600,13 MHz, O1= 0 Hz	48
Figura 6.2:	Espectro con BF1 =600,13 MHz, O1= 8 kHz	49
Figura 6.3:	Espectro con BF1 = 600,13 MHz, O1 = 8 kHz, SWH = 8,4 kHz.....	49
Figura 6.4:	Interacción de SFO1, BF1 y O1.....	50
Figura 7.1:	Espectro mostrando bandas laterales de rotación	52

Tablas

Tabla 3.1: Tabla de datos para diversos isótopos (frecuencias correspondientes a un imán de 11,7 T).....	9
Tabla 3.2: Variaciones de frecuencia (correspondientes a un imán de 11,7 T)	10

Glosario

AQS

Sistema de adquisición

BSMS

El sistema de imán inteligente Bruker (Bruker Smart Magnet control System = BSMS) proporciona un control computarizado de las diferentes funciones asociadas al imán, el campo del imán y la muestra.

BSVT

Sistema de temperatura variable inteligente de Bruker

Desplazamiento Químico

Diferencia en frecuencia o en ppm con respecto a la señal de referencia.

EPU

Unidad de procesamiento embebida

GAB/3

Circuito del amplificador con gradiente 3

GTU

Unidad de gradiente y temporización

HPPR

Preamplificador de altas prestaciones (High Performance Preamplifier)

ppm

Partes por millón

Índice

A

Abundancia natural	12
acoplamiento espín-espín	
los efectos de	20
Activos por RMN	11
Amplificadores	25
AQS	24
AVANCE NEO	24

B

Bandas laterales de rotación	52
BASH	24
BF	47
Blindaje magnético	10
Bobina	
banda ancha	31
Bobina observada	
I	31
Bobinas RF	30
BSMS	24, 26

C

Calentador	
Calentador	32
Campo disperso	7
CE	
Declaración de conformidad	8
Con un marcapasos	7
Conexión Ethernet	24
Conjunto de datos	36
Conocido como	7
Consola	23
Consola del operario	23, 24
Cuarteto	18

D

de banda ancha	
Amplificadores	25
Declaración de conformidad	8
Desplazamiento químico	14
Disolvente	
Factores para la selección	51
Disolvente deuterado	29
Disolventes	
Contenido de agua	51
Dependencia de la temperatura	51
Solubilidad	51
Viscosidad	51
Disolventes deuterados	51

Disolventes orgánicos	51
-----------------------------	----

E

edlock	39
electroimanes	27
Equivalente magnéticamente	16
Equivalente químicamente	16
Espectros de protón	14
EXPNO	36

F

FID\$FID	
Definición	22
Finalidad del sistema	
Finalidad	29
Frecuencia	10
Frecuencia de resonancia	32
Frecuencia portadora	10
Frecuencias absolutas	13
Frecuencias de resonancia	9

G

Giro de muestra	52
-----------------------	----

H

Hercios	
Conversión	13
Heterodesacoplamiento	21
Homogeneidad del campo	44
Homogeneización	26
HPPR	25, 27
HPPR/2	27

I

Imán	26
Descripción del sistema	27
Imán seguridad	7
Imanes superconductores	27
Implante metálico	7
Impurezas	51
Impurezas magnéticas	51
Integral de la Intensidad	10
Intensidad	10
de una señal	10
Isótopo	
Frecuencia de resonancia básica	9
Isótopos	11

L

línea de transferencia de aire / N2	32
---	----

M

Matching	42
Muestras líquidas	51
Multipletes	18

N

NAME	36
Núcleo del imán.....	27
Núcleo observado	10

O

Ordenador principal.....	24
--------------------------	----

P

Parafilm	53
Parámetro:SFO1	10
PDU	25
Potencia de la señal	
medida de.....	10
ppm	12
preamplificador de alto rendimiento por sus	
siglas inglesas	25
Preamplificadores.....	30
Puertos de helio	28
Pulsos de desacoplamiento	20

Q

Quench.....	7
-------------	---

R

Referenciar la muestra	29
Resolución espectral	44
Resolución horizontal de un espectro	12

S

Seguridad	7
Seguridad eléctrica.....	8
Seguridad química	8
selectivas	
Sondas	30
selectivos	
Amplificadores.....	25
Sensibilidad	12
Sensor de nivel de helio	28
SFO1	47
Shimming	44
SI puntos de datos	45
Simetría del tubo	52
Singlete	20
Singletes.....	11
Sistema de homogeneización	26

Sistema de imán.....	23
sistema de imanes inteligente de Bruker, por sus	
siglas inglesas	24
Sistema de lock	29
Sólido	51
Sonda	30
Cambio de la sonda	34
Sonda QNP	32
Sondas	
Bobina de banda ancha	31
Bobina observada	31

T

TD.....	45
Temperatura de la muestra	32
Termopar	32
TopShim	44
Transformada de Fourier.....	22, 45
Transmisores.....	25
Triplete	18
Tubos de muestra	52
Tuning	42

U

Unidad de distribución de potencia	25
Unidad de temperatura variable	32

V

VTU	32
-----------	----





Bruker Corporation

info@bruker.com
www.bruker.com

Order No: H171804S