

 UNIVERSIDAD DE GRANADA	INSTRUCCIÓN TÉCNICA ESPECÍFICA GUÍA DE USUARIO PARA LA ADQUISICIÓN DE ESPECTROS DE RUTINA CON TOPSPIN 3.6.5	IE16-12-TOPS	Página 1 de 19 Nº Revisión: 4 19/09/2024	 Centro de Instrumentación Científica
--	---	-------------------------	---	--

GUÍA DE USUARIO PARA LA ADQUISICIÓN DE ESPECTROS DE RUTINA CON TOPSPIN 3.6.5

COPIA NO CONTROLADA

 UNIVERSIDAD DE GRANADA	INSTRUCCIÓN TÉCNICA ESPECÍFICA	IE16-12-TOPS	Página 2 de 19 Nº Revisión: 4 19/09/2024	 Centro de Instrumentación Científica
	GUÍA DE USUARIO PARA LA ADQUISICIÓN DE ESPECTROS DE RUTINA CON TOPSPIN 3.6.5			

INDICE

1. OBJETIVO

2. ALCANCE

3. DEFINICIONES

4. DESARROLLO

4.1. Consideraciones previas

4.2. Interfaz de TopSpin 3.6.5

4.3. Esquema del procedimiento general para la adquisición de espectros

4.4. Preparación de la muestra

4.5. Manipulación de spinners y tubos de RMN

4.6. Creación de experimentos de rutina para ^1H y ^{13}C

4.7. Introducción de la muestra en el aparato

4.8. Ajuste del lock, tune y shim

4.9. Comprobación de los parámetros de adquisición

4.10. Ajuste del gain y adquisición de la FID

4.11. Procesado de la FID

4.11.1. Ajuste manual de la fase

4.11.2. Listado de picos

4.11.3. Integración de señales

4.12. Transferencia de resultados al servidor FTP

 UNIVERSIDAD DE GRANADA	INSTRUCCIÓN TÉCNICA ESPECÍFICA	IE16-12-TOPS	Página 3 de 19 Nº Revisión: 4 19/09/2024	 Centro de Instrumentación Científica
	GUÍA DE USUARIO PARA LA ADQUISICIÓN DE ESPECTROS DE RUTINA CON TOPSPIN 3.6.5			

1. OBJETIVO.

Describir el procedimiento que deben seguir los Usuarios en régimen de autoservicio para la adquisición de espectros de protón y carbono en el espectrómetro NanoBay Avance III HD 400 MHz de Bruker (AVIII400 RMN) con el software TopSpin 3.6.5. Para una ayuda más precisa en la adquisición de espectros de rutina o experiencias de RMN más avanzadas, consulta con el Técnico de la Unidad y/o guía de usuario de Bruker.

2. ALCANCE.

Este procedimiento se aplicará en la Unidad de RMN del CIC.

3. DEFINICIONES.

C.I.C: Centro de Instrumentación Científica.

4. DESARROLLO.

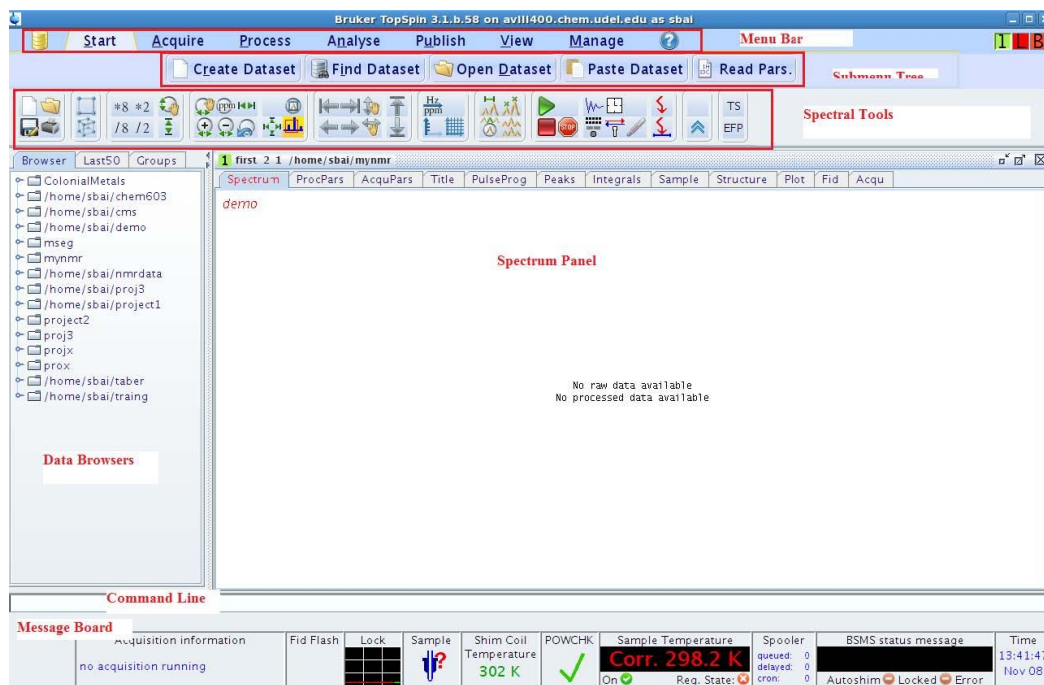
4.1. Consideraciones previas

Las entradas de comandos por teclado en este manual aparecerán en **negrita**. Se asume que el comando “Enter” debe usarse después de cada orden tecleada. Todo lo tecleado se hará en la línea de comandos mostrada debajo de la ventana del programa TopSpin 3.6.5. BI, BM y BD se usa para indicar acciones del botón izquierdo, ruleta y derecho del ratón, respectivamente. Click y doble click se refiere a pulsar el BI.

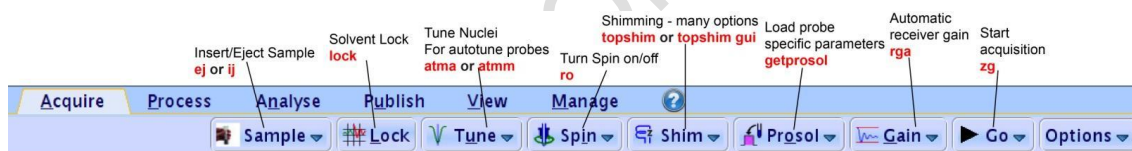
El AVIII400 RMN está equipado con la sonda BBFO de dos canales (^1H y X-núcleos) con capacidad para ajustar automáticamente la sintonía de la misma (tunning y matching o también llamado ATM). El canal de altas frecuencias se sintoniza para ver y desacoplar el ^1H . El canal (X) cubre un rango de frecuencias de ^{15}N a ^{19}F , (para hacer ^1H , ^{13}C y experiencias 2D). Su rango de temperatura es de -150 a $150\text{ }^\circ\text{C}$.

4.2. Interfaz de TopSpin 3.6.5

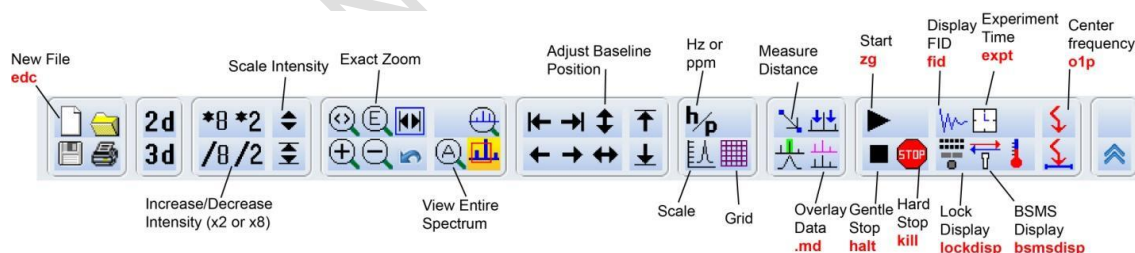
La interfaz, mostrada en la imagen inferior, contiene una barra de Menú con varias pestañas ([Start](#), [Acquire](#), [Process](#), [Analyse](#), [Publish](#), [View](#), [Manage](#)). El Submenú (barra situada debajo de la barra de Menú) muestra las funciones especiales de cada parte del menú (por ejemplo para [Start](#) hay [Create Dataset](#), [Find Dataset](#), etc.). Debajo del Submenú están dos líneas con las herramientas de manipulación del espectro y algunas funciones típicas.



Distribución de los paneles y barras en TopSpin 3.6.5



Barra de Menú

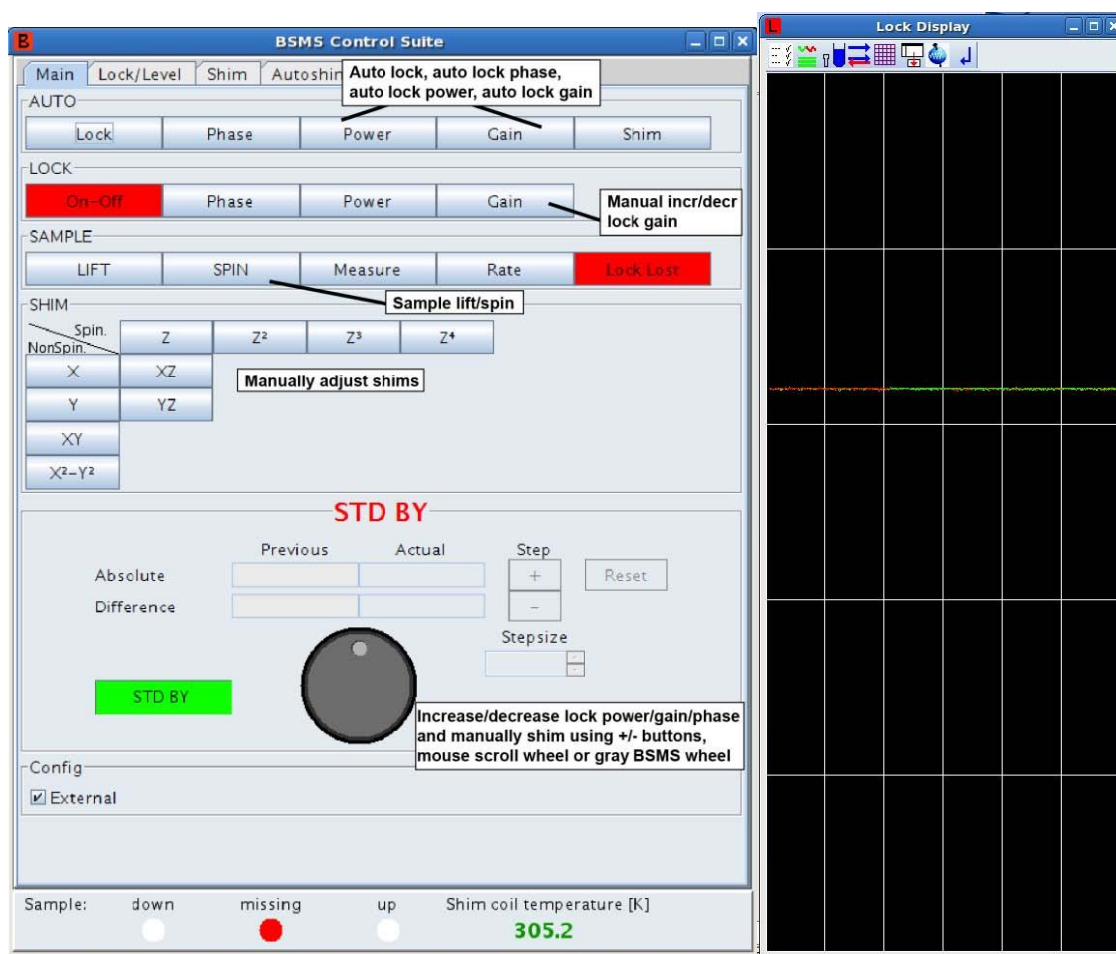


Barra de manipulación del espectro

El panel de la izquierda es para el manejo de los datos y a la derecha está el panel de los datos que contiene varias pestañas como la visualización del espectro (Spectrum), los parámetros de procesado (ProcPars), los parámetros de adquisición (AcquPars), etc. Debajo de estos paneles se localiza la línea de comandos para introducir los comandos manualmente (aunque el software permite manipular todo a través de la interface; **recomendado**).

Por último, en la parte inferior está la barra de estado para ver información en tiempo real sobre el experimento y desde la cual poder abrir las siguientes ventanas:

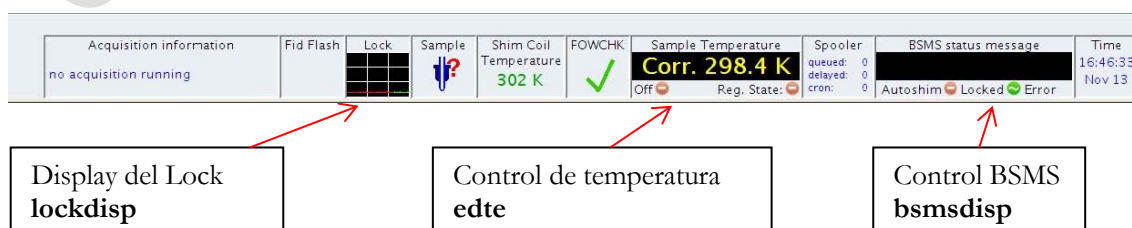
- El display Lock muestra el perfil del lock (frecuencia del deuterio ^2H).
- La BSMS permite ejecutar algunos comandos relacionados con la preadquisición de la FID como son introducir y retirar la muestra, ajustar manualmente o automáticamente el shim, lock, gain, etc.
- El control de temperatura de la muestra.



Control BSMS

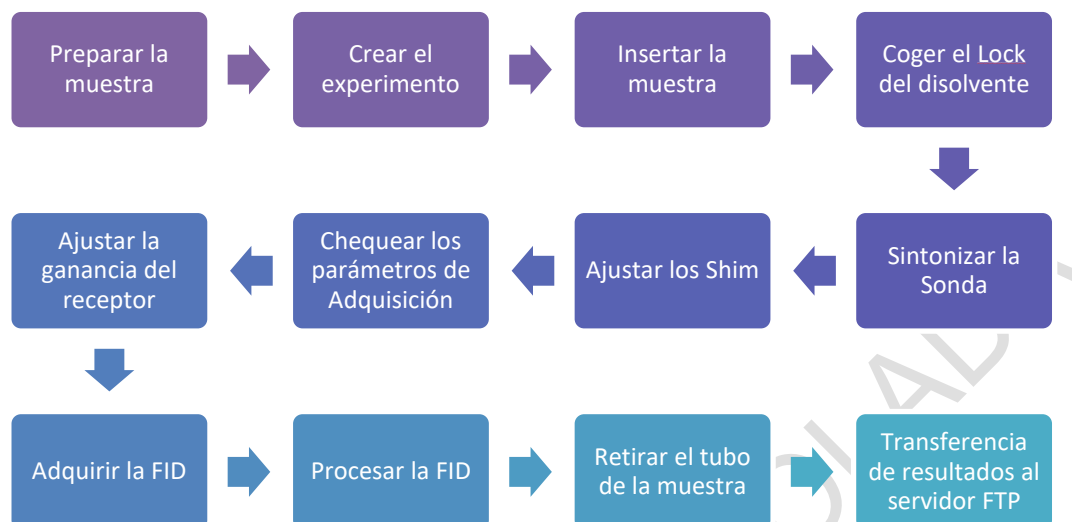
Lock Display

Todos estos displays se pueden abrir haciendo doble click sobre el mensaje correspondiente o usando comandos.



 UNIVERSIDAD DE GRANADA	INSTRUCCIÓN TÉCNICA ESPECÍFICA	IE16-12-TOPS	Página 6 de 19 Nº Revisión: 4 19/09/2024	 Centro de Instrumentación Científica
	GUÍA DE USUARIO PARA LA ADQUISICIÓN DE ESPECTROS DE RUTINA CON TOPSPIN 3.6.5			

4.3. Esquema del procedimiento general para la adquisición de espectros



4.4. Preparación de la muestra

En primer lugar, hay que disolver la muestra en un disolvente deuterado apropiado y comprobar que no hay material sin disolver. En su caso, debe centrifugar o filtrar la muestra para eliminar las partículas sólidas en suspensión.

A continuación, se transfiere sobre 0,600 mL a un tubo de RMN limpio. Se recomienda tubos de alta calidad (600 MHz), pero se puede usar tubos más económicos para trabajos de rutina (400 MHz), sin que por ello la inserción del tubo en el spinner sea dificultosa. En caso de holgura, cambiar el spinner. **La altura de la disolución en el tubo debe ser sobre 4-4,5 cm.**

Para más información sobre la preparación de la muestra consulta las instrucciones técnicas específicas <IE16-12-PREP-Preparación de muestras para RMN de líquidos> y <IE16-12-DISD-Características disolventes deuterados> disponibles en la opción *Documentos* del *Área privada* del CIC.

4.5. Manipulación de spinners y tubos de RMN

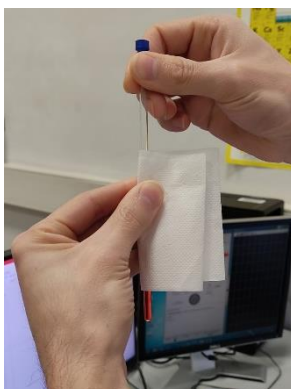
Con objeto de minimizar la suciedad en la sonda y en el cañón de shim alojados dentro del imán, en este tutorial se mostrará al usuario las pautas y pasos a seguir durante la manipulación de los spinners y tubos de RMN.

- 1) Coja un trozo de papel del dispensador situado al lado de la ventana y rocíele un poco de acetona. Cuidado con que al teclado no le caiga acetona. Es importante no escribir con rotulador permanente o tipex ni en el tubo ni en el tapón.

 UNIVERSIDAD DE GRANADA	INSTRUCCIÓN TÉCNICA ESPECÍFICA	IE16-12-TOPS	Página 7 de 19 Nº Revisión: 4 19/09/2024	 Centro de Instrumentación Científica
	GUÍA DE USUARIO PARA LA ADQUISICIÓN DE ESPECTROS DE RUTINA CON TOPSPIN 3.6.5			



- 2) Coja el tubo por la parte superior y límpielo con el papel. *No es necesario usar guantes pero si se usan, deben estar limpios y no contener polvo de talco.*



- 3) Abra la caja de spinner, coja el tubo como en la imagen y suavemente introdúcelo por un spinner.



- 4) Sin tocar el spinner, sáquelo de la caja apoyando los dedos en el corcho blanco.

 UNIVERSIDAD DE GRANADA	INSTRUCCIÓN TÉCNICA ESPECÍFICA	IE16-12-TOPS	Página 8 de 19 Nº Revisión: 4 19/09/2024	 Centro de Instrumentación Científica
	GUÍA DE USUARIO PARA LA ADQUISICIÓN DE ESPECTROS DE RUTINA CON TOPSPIN 3.6.5			



- 5) Ajuste la altura del tubo con el medidor. Para más información sobre la altura correcta de la disolución en el tubo, lea el documento **<IE16-12-PREP-Preparación de muestras para RMN de líquidos>**.



- 6) Una vez concluido el experimento, para retirar el tubo del spinner, cójalo como en la imagen y con dos dedos, presione suavemente el spinner hacia abajo. Cierre la caja.

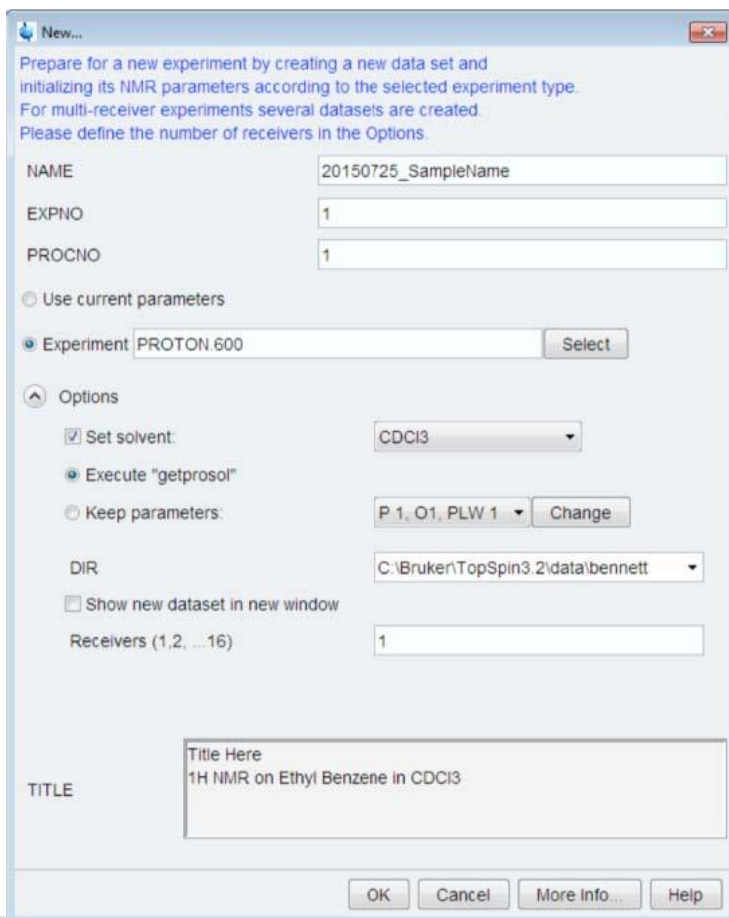


4.6. Creación de experimentos de rutina para ^1H y ^{13}C

En primer lugar, el usuario debe acceder desde el explorador de ficheros, al directorio de datos que le corresponde. El directorio de cada usuario tendrá la siguiente estructura:

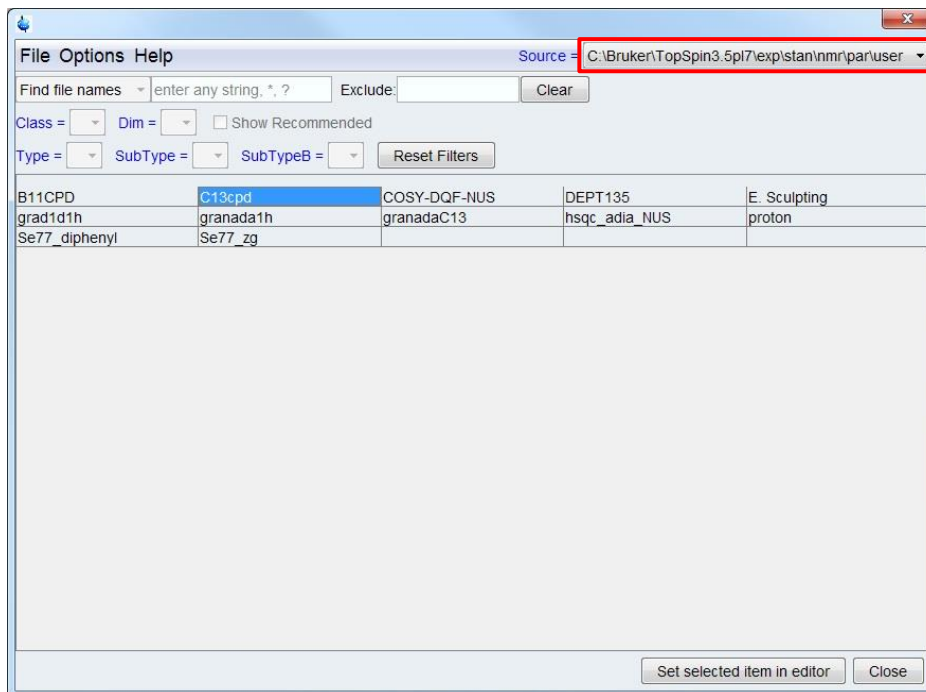
C:\AUTOSERVICIO\Usuario\Año\Mes. Los usuarios menos habituales suelen obviar la subcarpeta *Mes*.

Para crear un experimento nuevo, teclear **new** o **edc** en la línea de comandos o pulsar **Create Dataset** de la pestaña **Start**. A continuación, emergerá una ventana donde introducir los datos del experimento:



Ventana para crear experimentos

- **NAME**: espacio para introducir el nombre de la muestra.
- **EXPNO**: espacio para introducir el número del experimento. Con el mismo nombre para una muestra, se pueden hacer varios experimentos así que si el usuario va a realizar más de un experimento, debe asegurarse que no repite los mismos números para este. Normalmente, se comienza con el número 1 para el experimento de ^1H y si después el usuario quiere realizar un experimento de ^{13}C y DEPT, cambiará este valor a 2 y 3, respectivamente.
- **PROCNO**: corresponde al número de procesado. Por defecto, introducir 1.
- Desde *Experiment*, seleccionar el experimento que se desea realizar. Basta con seleccionarlo desde una ventana (ver imagen inferior) que aparece al hacer click en *Select*.



Seleccionar *proton*, *C13cpd* y *DEPT135* para los experimentos de ^1H , ^{13}C y DEPT respectivamente. Asegurarse que se muestran los experimentos que están en **C:\Bruker\TopSpin3.6.5\exp\stan\nmr\par\user**.

- Elegir el disolvente de la muestra desde el menú desplegable de *Set solvent*. Si el disolvente no está en la lista, contacta con los técnicos de la Unidad.
- Marcar la opción *Execute getprosol* para cargar los parámetros de adquisición del experimento.
- Asegurarse que está en el directorio correcto. La estructura del directorio es **C:\AUTOSERVICIO\Usuario\Año\Mes**. Si se desea añadir una subcarpeta al *Mes*, por ejemplo con la fecha, escribir a continuación de *Mes*, lo siguiente: **\Fecha(o nombre de la subcarpeta)**.
- Cuando se hayan completado y revisado todas las opciones, hacer click en **OK**.

Solamente se puede realizar un experimento a la vez indistintamente si es sobre la misma muestra o no, por tanto, si se quiere llevar a cabo dos o más experimentos sobre una misma muestra, hay que crear tantos experimentos como se desee adquirir.

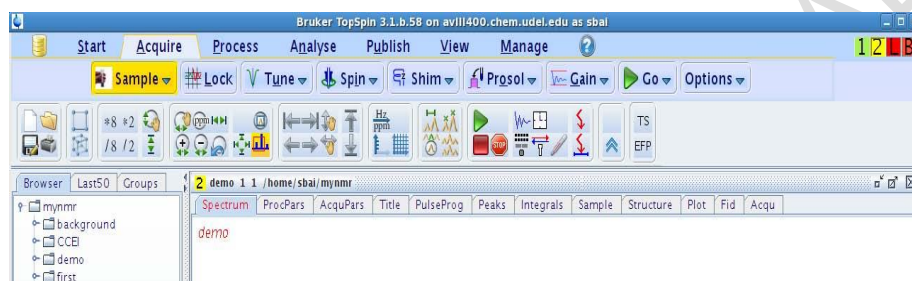
4.7. Introducción de la muestra en el aparato

Los pasos que hay que seguir son los siguientes:

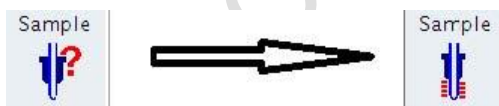
- 1) Manipular el tubo e introducirlo en el spinner como se describe en el punto 4.5 de este manual.
- 2) Asegurarse que la entrada/salida de la muestra en el imán no está tapada con un tapón negro. Si es así, retirarlo.
- 3) Presionar el botón **Lift** de la ventana de control BSMS o teclear **ej** en la línea de comandos para activar el chorro de aire que hace subir a la muestra.

- 4) Coger el tubo introducido en el spinner siempre por la parte superior del tubo y dirigirse al imán.
- 5) Retirar la muestra que había con anterioridad en el imán, en el caso de que hubiera, y cuidadosamente, situar la muestra nueva en la parte superior del imán de tal forma que flote sobre el chorro de aire.
- 6) Volver al ordenador y presionar nuevamente el botón **Lift** o teclear **ij** para insertar la muestra. Esperar hasta que el icono del spinner (ver imagen inferior) indique que la muestra está ubicada correctamente.

Alternativamente, para no usar la barra de comandos, se puede subir y bajar la muestra haciendo click en la pestaña **Acquire** de la barra de Menú y seleccionar **Eject sample manually** o **Insert sample manually** que aparecerán al pulsar el botón **Sample**.



En la barra de estado se puede observar si en el imán hay o no una muestra introducida.



Cambio en la barra de estado de retirar e introducir un tubo de RMN

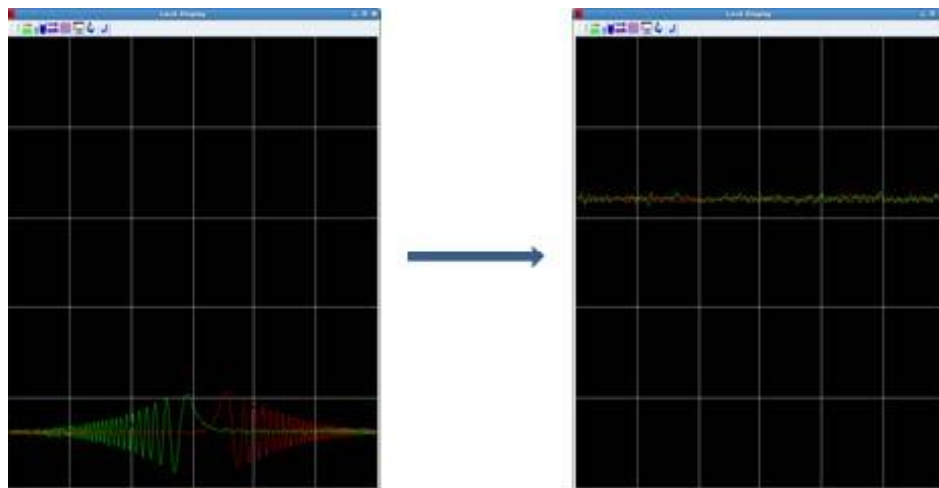
4.8. Ajuste del lock, tune y shim

Para ajustar el lock teclear **lock** en la línea de comandos o pulsar el botón de **Lock** . A continuación, en la nueva ventana que se abre, seleccionar el disolvente.

Solvents table	
Δ Solvent	Description
Acetic	acetic acid-d4
Acetone	acetone-d6
C6D6	benzene-d6
CD2Cl2	Methylene Chloride 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
DMF	dimethylformamide-d7
DMSO	dimethylsulfoxide-d6
EtOH	ethanol-d6

Lista emergente de disolventes denterados

 UNIVERSIDAD DE GRANADA	INSTRUCCIÓN TÉCNICA ESPECÍFICA	IE16-12-TOPS	Página 12 de 19 Nº Revisión: 4 19/09/2024	 Centro de Instrumentación Científica
	GUÍA DE USUARIO PARA LA ADQUISICIÓN DE ESPECTROS DE RUTINA CON TOPSPIN 3.6.5			



Display del lock antes y después de “coger” el lock

Para ajustar automáticamente el tuning y matching de un canal, pulsar el botón **Tune**  o teclear **atma** en la línea de comandos.



Tuning y matching para las frecuencias ^{13}C y ^1H

Si el experimento activo, es decir, el que se muestra en el panel de los datos, es un protón, la sintonía de la sonda (forma coloquial para nombrar tuning y matching) se realiza solo sobre la frecuencia del protón. En cambio, si se tiene activo un experimento de carbono (por ejemplo, ^{13}C o DEPT), se sintonizarán consecutivamente las frecuencias del carbono y protón (ver imagen superior).

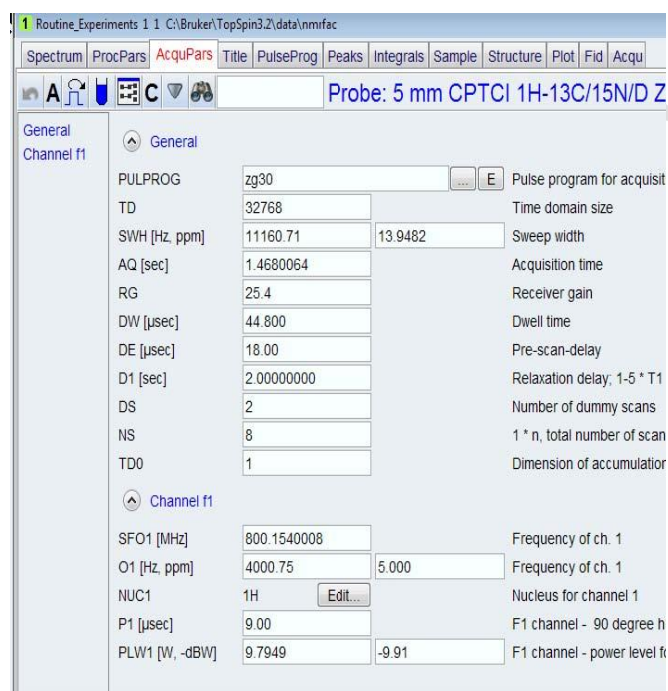
Mencionar que para realizar la adquisición de un espectro de protón un mal ajuste de la sintonía de la sonda no es relevante, pero para experimentos de carbono, esta etapa es crítica.

Por último, es muy importante ajustar los shims. Esto se realiza automáticamente haciendo click en los botones **Topshim** y **Topshim agua** para disolventes orgánicos deuterados o agua pesada, respectivamente.



4.9. Comprobación de los parámetros de adquisición

Al teclear **ased** en la línea de comandos se despliega, de forma condensada en la pestaña AcqPars del panel de los datos, los parámetros más importantes de adquisición. Para acceder a todos los parámetros, teclear **eda** en la línea de comandos. Si lo desea, modifique los parámetros de adquisición.



Parámetros de adquisición típicos de un experimento de ^1H

- Programa de pulsos (PULPROG) que por defecto para la adquisición de un espectro de ^1H es zg30 en el que se realiza un pulso duro de 30° . Para los experimentos de carbono ^{13}C y DEPT (ambos desacoplados durante la adquisición), se utilizan de forma predeterminada, los programas de pulsos zgpg30 y depts135, respectivamente.
- Número de puntos de la FID o de adquisición (TD) que suele ser 32k o 64k.
- Ventana espectral en Hz (SWH) y en ppm (SW). Para experimentos ^{13}C en los que la muestra contenga un aldehído, se aconseja que este valor sea 240 ppm. En caso contrario, con 180 ppm es suficiente.
- Tiempo de relajación (D1) que usualmente es de 1 seg para zg30, zgpg30 y depts135.

 UNIVERSIDAD DE GRANADA	INSTRUCCIÓN TÉCNICA ESPECÍFICA GUÍA DE USUARIO PARA LA ADQUISICIÓN DE ESPECTROS DE RUTINA CON TOPSPIN 3.6.5	IE16-12-TOPS	Página 14 de 19 N° Revisión: 4 19/09/2024	 Centro de Instrumentación Científica
--	--	--------------	---	---

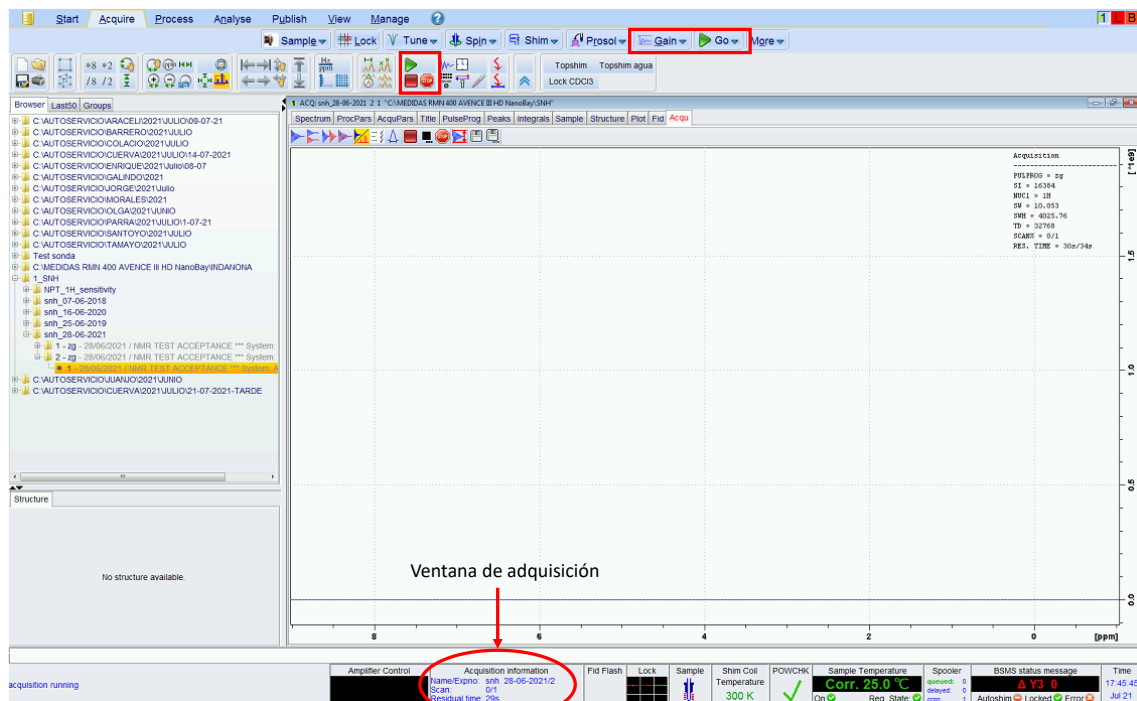
- Dummy scans (DS) son scans tomadas en la adquisición pero que no se registran, es decir, se toman antes de que se encienda el receptor. Con dos dummy scans es suficiente en experimentos ^1H y ^{13}C , pero para DEPT debe ser 8.
- Número de scans o barridos (NS). Este valor es crítico para los experimentos de carbono y depende de la concentración de la muestra. Con 20 mg, 600 y 320 scans suele ser suficiente para los experimentos ^{13}C y DEPT, respectivamente. Es importante recordar que para los experimentos ^1H y ^{13}C , NS debe ser múltiplo de 1, es decir, puede tomar cualquier valor, pero para DEPT, NS debe ser múltiplo de 4.
- Frecuencia portadora en Hz (O1) y en ppm (O1P) que corresponde al centro del espectro. Se recomienda que O1P sea 110 ppm para experimentos de carbono.
- Duración (P1) y potencia (PLW1) del pulso de 90° (P1) en μsec y W, respectivamente. El comando **getprosol** establece automáticamente estos valores.

En los experimentos de carbono, en los que el número de scans suele ser alto, es importante saber el tiempo de duración del experimento. Para conocerlo, pulsa el botón **Experiment time** (ver imagen de la barra de manipulación del espectro del punto 4.2) o teclee el comando **expt**.

4.10. Ajuste del gain y adquisición de la FID

Antes de iniciar la adquisición de la FID es necesario establecer automáticamente la ganancia del receptor. Para ello, teclear **rga** en la línea de comandos o pulsar el botón **Gain**. Esta operación hay que realizarla para cada experimento que se genera.

Después de chequear los datos de adquisición y ajustar el gain, se puede iniciar la adquisición tecleando **zg** o haciendo click en el botón **Go** (triángulo verde). El progreso de la adquisición se puede ver en la barra de estado.



Adquisición de datos en proceso

Los datos de la adquisición se van almacenando temporalmente en la consola y se transfieren automáticamente al ordenador cuando termina el experimento. Si los datos no están en el ordenador, no se pueden procesar. Con el comando **tr** se puede transferir los datos desde la consola hasta el directorio del ordenador donde se ha almacenado el experimento mientras éste está en proceso.

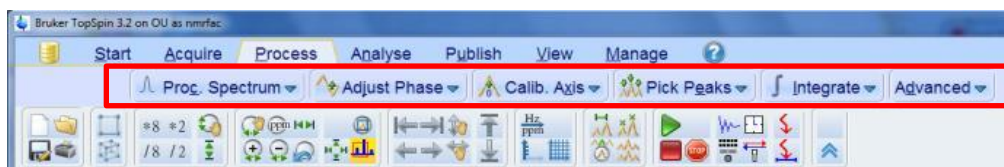
El comando **tr** es útil para procesar (ver punto 4.11 de este manual) FID de experimentos de carbono mientras aún se están adquiriendo scans. De esta forma, si el espectro es de nuestro agrado se puede detener con el comando **Halt** (botón rojo con la forma de un cuadrado). Ojo, si pulsa sobre el botón **Stop**, los datos de la adquisición no se guardarán.

Al terminar la adquisición, si no se ha procesado la FID previamente, al hacer click en la pestaña Spectrum del panel de datos, aparecerá el mensaje “1D raw data available and no processed data available”

4.11. Procesado de la FID

Es posible procesar la FID en pocos segundos. Para ello, pulsar el botón **Proc. Spectrum** situado en la ficha **Process**. Alternativamente, se pueden utilizar, secuencialmente, los siguientes comandos:

- **efp** para aplicar la transformada de Fourier con exponencial. Puede cambiar los parámetros de la exponencial tecleando **lb**. Los valores típicos para espectros ^1H van de 0 a 0.3 Hz y para espectros ^{13}C y DEPT van de 0.5 a 1 Hz.
- **apk** para ajustar la fase automáticamente.
- **absn** para corregir la línea base sin integrar los picos.



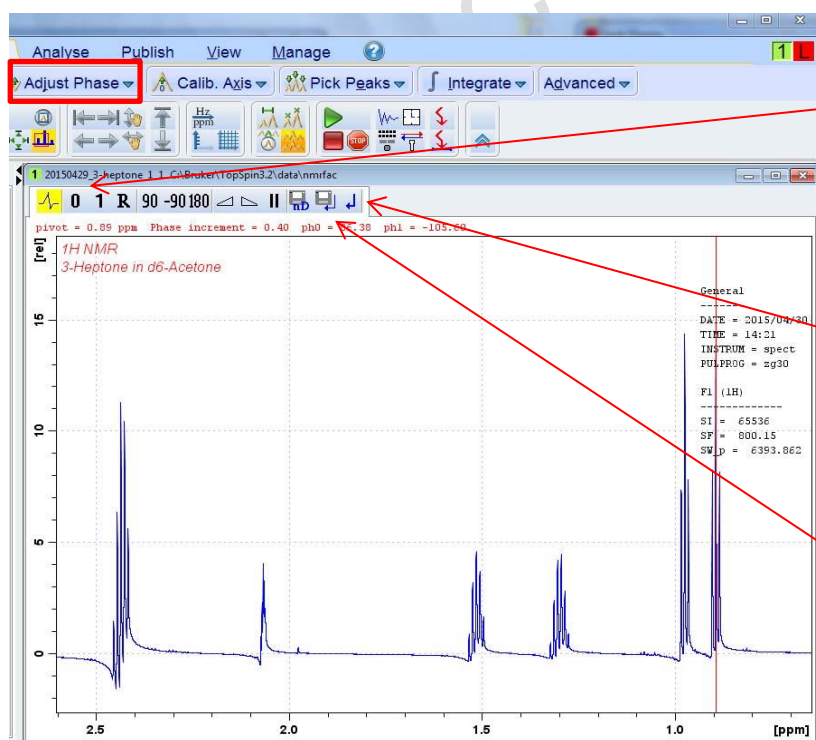
Botones de la pestaña Process

Además, se ha creado un comando llamado **pro** que ejecuta automáticamente los comandos **efp**, **apk** y **absn**.

4.11.1. Ajuste manual de la fase

Muchas veces el ajuste automático no da un resultado satisfactorio. Para ajustar la fase manualmente teclee **.ph** o haz click en el botón **Adjust Phase**. En la nueva ventana que se abre, realizar los siguientes pasos.

1. Coloca el pivote en un extremo del espectro. Pulsar BD (botón derecho) sobre el pico y selecciona *Set Pivot Point*.
2. Usa el orden 0 para ajustar la fase cerca del pivote y el orden 1, la fase lejos del mismo. La fase se cambia posicionando el ratón sobre 0 o 1 y a continuación, subiendo o bajando la ruleta del ratón.
3. Cuando la fase este ajustada, pulsar el botón de guardar y enter.



Botones para orden 0 y 1

Botón para salir sin guardar el ajuste de fase

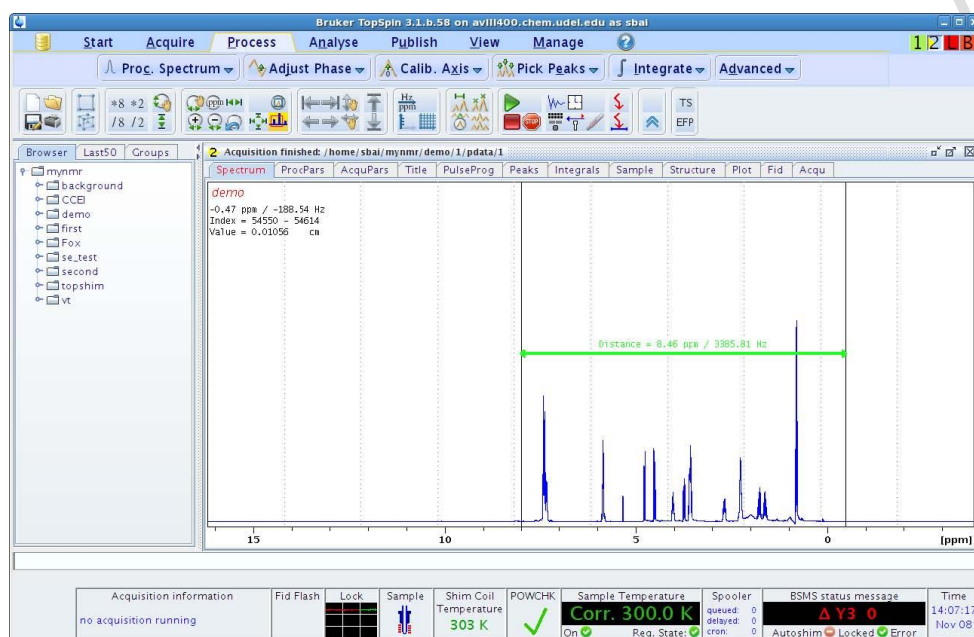
Botón para guardar y salir del ajuste de fase

Ventana de trabajo para ajustar la fase manualmente

4.11.2. Listado de picos

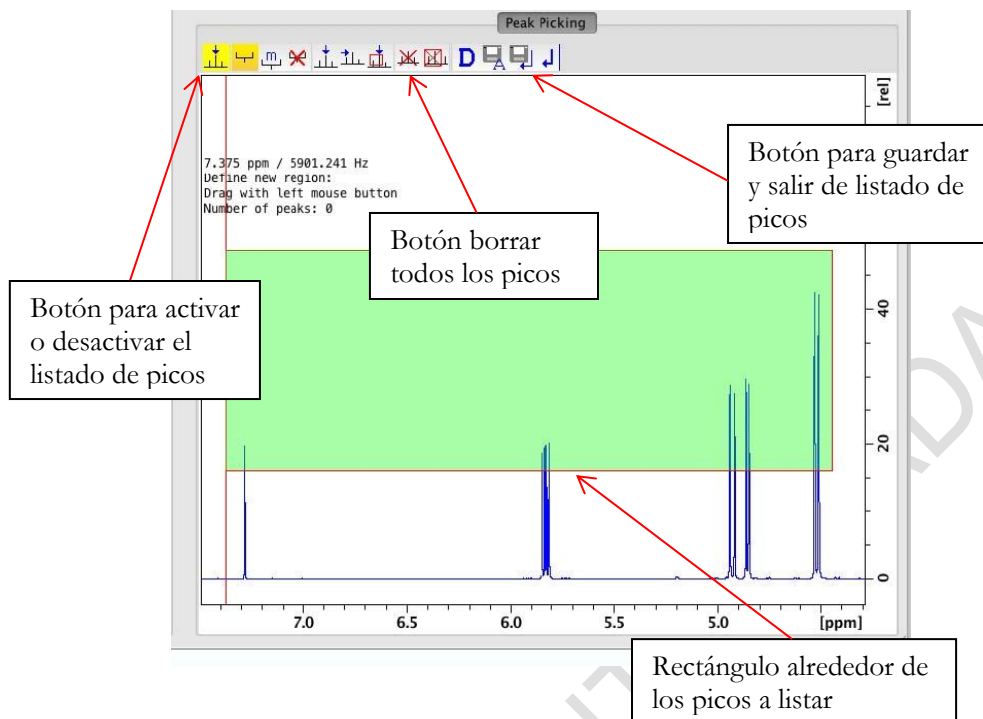
Para obtener un listado de picos de forma automática utiliza el comando **pps**. Este comando detecta y realiza un listado de picos de la región del espectro que se muestra en pantalla. Por ejemplo, si se quiere listar los picos entre 8 y 5 ppm, amplía el espectro de esta región.

La forma más sencilla de ampliar el espectro es haciendo click con el botón izquierdo y arrastrar el cursor sobre la región espectral que se desea ampliar. De esta forma, el espectro es expandido entre la zona de los dos cursores verticales.



Click y arrastrar la región espectral deseada para ampliarla

Para listar los picos de forma manual, seleccionar el botón **Pick Peaks** de la pestaña **Process**. En la nueva ventana que se abre, haz click en el botón que activa el listado de picos. A continuación, dibuja un rectángulo verde sobre los picos que desea listar. Asegúrese que selecciona la parte alta de los picos a listar.



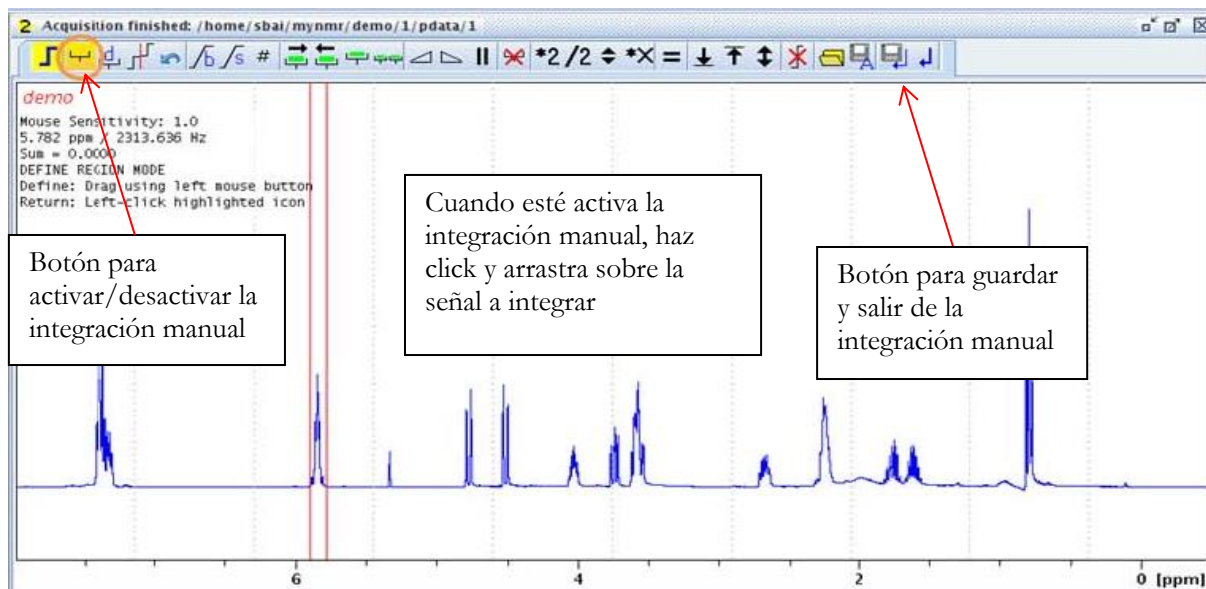
Ventana y opciones del listado de picos manual

El resultado del listado de picos se puede ver en la pestaña Peks del panel de datos o también en el archivo llamado *peaklist.xml* que se encuentra en la carpeta de procesado del experimento. Para abrir dicha carpeta rápidamente, usa el comando **expl**.

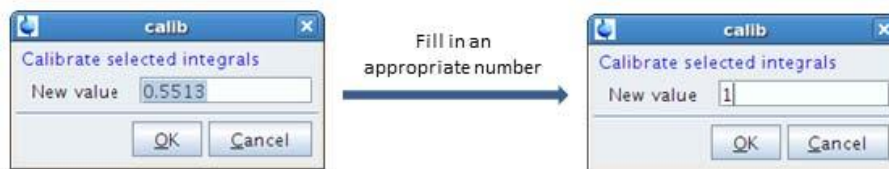
4.11.3. Integración de señales

Es posible, integrar todas las señales del espectro de forma automática con el comando **abs** que además de integrar los picos, corrige la línea base. Recuerda que con **absn** se corrige la línea base pero no se integran los picos del espectro.

Para integrar las señales manualmente, haz click sobre el botón el **Integrate** de la pestaña **Process**. En la nueva venta que se abre, activa el modo de integración manual y arrastra sobre la señal que desea integrar.



Para indicar el número de protones de dicha señal (calibración de la integral), pulsa con el botón derecho sobre la integral y selecciona *Calibrate Current Integral* del menú desplegable. Emergerá una ventana donde indicar el valor deseado.



Calibración de integrales

Al igual que en el listado de picos, el resultado de la integración se puede ver en la pestaña Integrals del panel de datos o también en el archivo *integrals.txt* situado en la carpeta de procesado del experimento (usar el comando **expl** para abrir dicha carpeta).

4.12. Transferencia de resultados al servidor FTP

La transferencia de los datos adquiridos al servidor se realiza automáticamente gracias a pequeños script ejecutados con *WinSCP* y programados con el *Programador de tareas* de Windows.

Todo el contenido del directorio **C:\AUTOSERVICIO** (directorio local) se sincroniza periódicamente en intervalos de 15 minutos con el directorio en red (servidor FTP) alojado en un disco duro de un ordenador de sobremesa en la Unidad de RMN. Una vez transferidos los datos del directorio local al servidor, aunque se eliminen del primero, no desaparecen del servidor.

Una vez al mes, el contenido del directorio **C:\AUTOSERVICIO** se corta y pega a otro directorio del ordenador local cuyo acceso está restringido.