

## Espectros de Protón y Flúor, límite de detección

### Protón

En comparación con otras técnicas analíticas la sensibilidad en RMN es relativamente baja. Así, en los equipos de RMN alto campo (=+ de 600 MHz) el límite de detección para protón es del orden de nanomolar ( $10^{-9}$ ), mientras que en IR es de aproximadamente  $10^{-14}$  o de  $10^{-18}$  en EM<sup>1</sup>. La capacidad de detección en RMN está relacionada con el campo magnético, la razón giromagnética del núcleo observado, su abundancia natural y la sonda utilizada (ver nota de sensibilidad de <sup>13</sup>C con la sonda Prodigy). Se considera que una señal se detecta inequívocamente cuando su relación señal/ruido (S/N) es igual o mayor de 3 y de 10 cuando se quiere utilizar para cuantificar.

Por lo general, en los equipos de campo medio bastan 2-5 mg de compuesto para adquirir un espectro de protón en poco tiempo. No obstante, es conveniente conocer cuál es el límite de detección en los equipos de (400-500 MHz) disponibles en la Unitat. Información necesaria para determinar no sólo la mínima concentración a utilizar, sino hasta donde se pueden detectar trazas de otros compuestos. Para responder a esta cuestión, se han adquirido en condiciones estándar, espectros de mentol en cdcl<sub>3</sub> (99.8% de deuteración y 0,01%v/v de agua), con concentraciones decrecientes (obtenidas por dilución de una solución de partida). En la siguiente tabla se indican las relaciones S/N calculadas para dos señales del mentol, en cada una de las concentraciones y equipo utilizado.

1h 10 minutos por espectro		M400		B400		VNMR500		B600	
Concentraciones de la muestra		Valores de relación señal ruido en:							
		3.42 ppm	0.82 ppm	3.42 ppm	0.82 ppm	3.42 ppm	0.82 ppm	3.42 ppm	0.82 ppm
1.2 mg/ml	7.67 mM	1180	6900	5000	47140	2650	28800	2900	32000
0.24 mg/ml	1.53 mM	330	1800	860	22131	739	7482	985	9849
0.048 mg/ml	0.30 mM	67	790	418	1964	233	1700	186	2200
0.0096 mg/ml	61 uM	12	130	94	1004	42	500	47	600
0.00192 mg/ml	12 uM	---	60	32	348	3.9	141	3.4	150
0.00096 mg/ml	6 uM	---	36	10	223	1.6	77	1.7	82
0.00038 mg/ml	2.4 uM	----	-----	-----	54	-----	-----	-----	-----

A concentraciones bajas, las impurezas del disolvente deuterado pueden interferir con las señales del producto (figura1), limitando la capacidad de detección. Tal como es de esperar, por las características del equipo, el peor valor del límite de detección corresponde al Mercury 400, entre 30-40 micromolar. Los equipos de 500 y 600 tienen un LOD similar, estimado en 11-12 micromolar (figura2). La mayor capacidad de detección corresponde al Bruker400, LOD 4-5 micromolar, y debe a que dispone de una criosonda Prodigy, que incrementa la sensibilidad 2-3 veces en relación a un equipo de 400 con una sonda convencional. Superando la de los equipos de mayor campo como el 500 y 600 con sondas estándar.

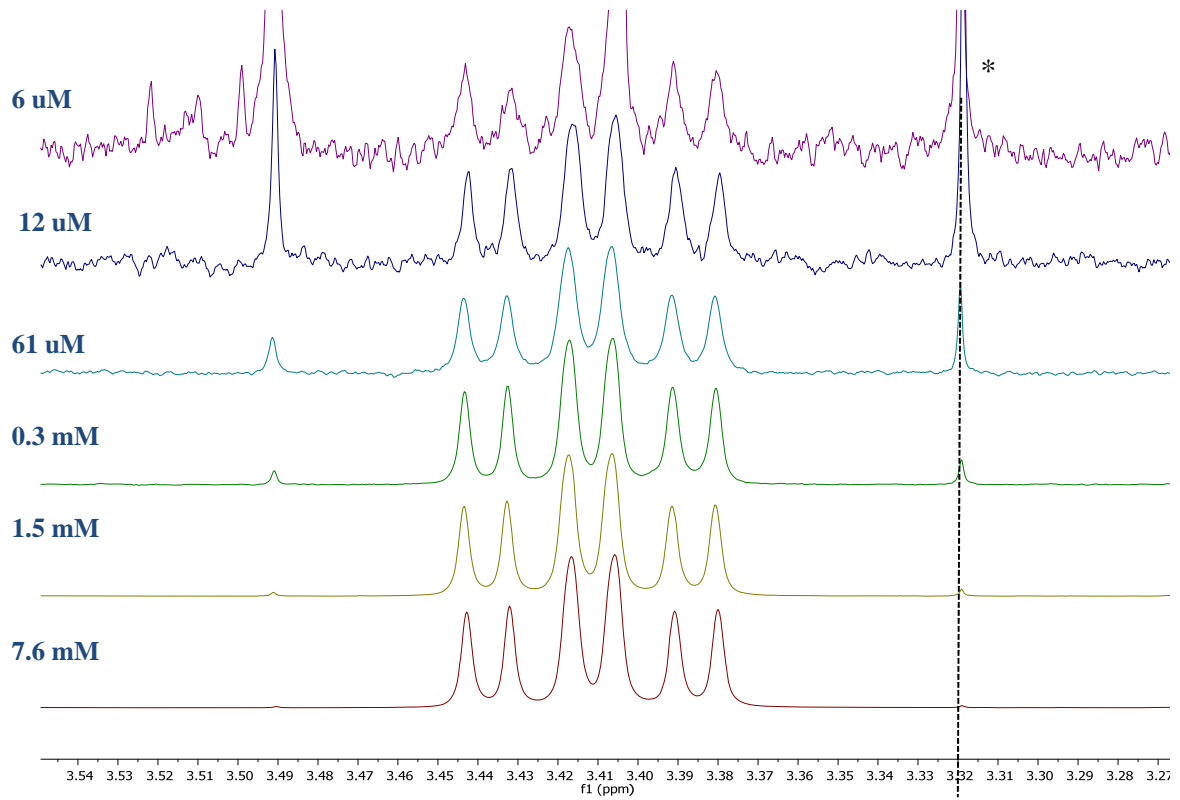


Figura-1 Espectros adquiridos en el B400.Criosonda, mentol a diferentes concentraciones

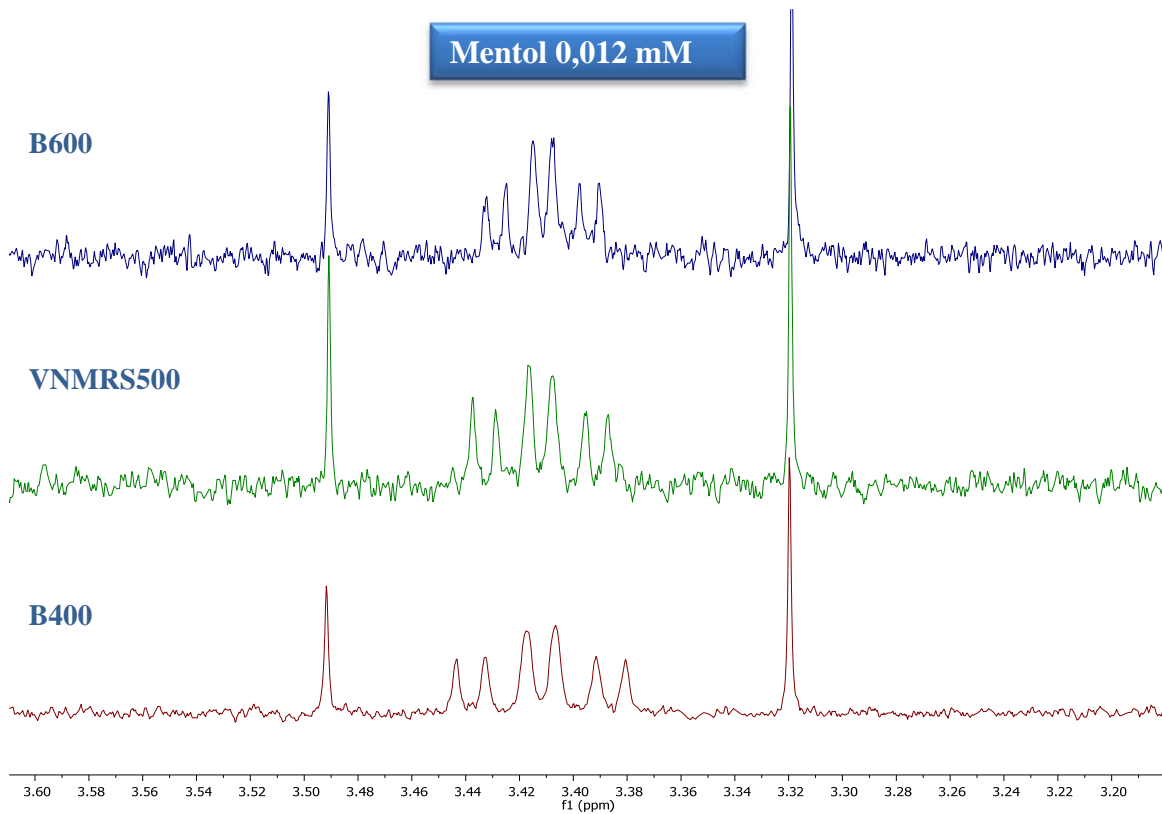


Figura-2 Comparación VNMRS500, B600 y B400-Crio para una muestra de mentol en  $cdcl_3$  12uM

Otra cuestión a tener en cuenta al determinar impurezas es la máxima diferencia de intensidades que se puede observar (rango dinámico). Es decir, el cociente entre la intensidad de la señal mayor y la más pequeña. En el B400-crio para la concentración de 6 micromolar la relación intensidades entre la señal del cloroformo residual y la del multiplete a 3.42 ppm es de 14.000:1.

Hay que tener en cuenta que el límite de detección puede mejorarse si se reducen interferencias externas, utilizando disolventes con una purificación adicional.

#### Condiciones experimentales <sup>1</sup>H

Equipos utilizados Mercury 400, Bruker400-criosonda, VNMR500 y Bruker600.

Pulso de observación de 45°, tiempo de adquisición de 3s y tiempo de relajación de 1s, 1024 acumulaciones (aproximadamente 1h y 10 minutos). Espectros procesados con el programa Mnova, aplicando una función de procesamiento exponencial (coeficiente 0.3). La relación S/N se ha calculado con un script del MNova.

#### Límite de detección en <sup>19</sup>F

La sensibilidad intrínseca del <sup>19</sup>F es 0.83 veces la del protón (sin tener en cuenta la influencia de la sonda). De modo análogo a lo indicado en el caso del protón se ha querido comprobar la capacidad de detección en <sup>19</sup>F en los equipos VNMR500, VNMR400 y en el Bruker-400 con criosonda.

En la siguiente tabla se indican las relaciones obtenidas para las dos señales de Flúor que se observan en el espectro del 2,4,6-trifluorobenzaldehído (figura3).

	M400		B400		VNMR500	
1024 acumulaciones 1h y 30 minutos	Valores de relación señal ruido en:					
	-97 ppm	-111.8 ppm	-97 ppm	-111.8 ppm	-97 ppm	-111.8 ppm
2.5 mM mM	530	570	3390	4875	1220	1705
100uM	18	36	127	163	48	109
50 uM	--	8	36	101	9	33
25 uM	--	--	24	57	---	10
12.5 uM	---		15	33	-----	----
6.2 uM	---		3	19		

Al igual que sucedía en el caso de protón, el equipo con mayor capacidad de detección es el Bruker-400 con criosonda, seguido del VNMR500.

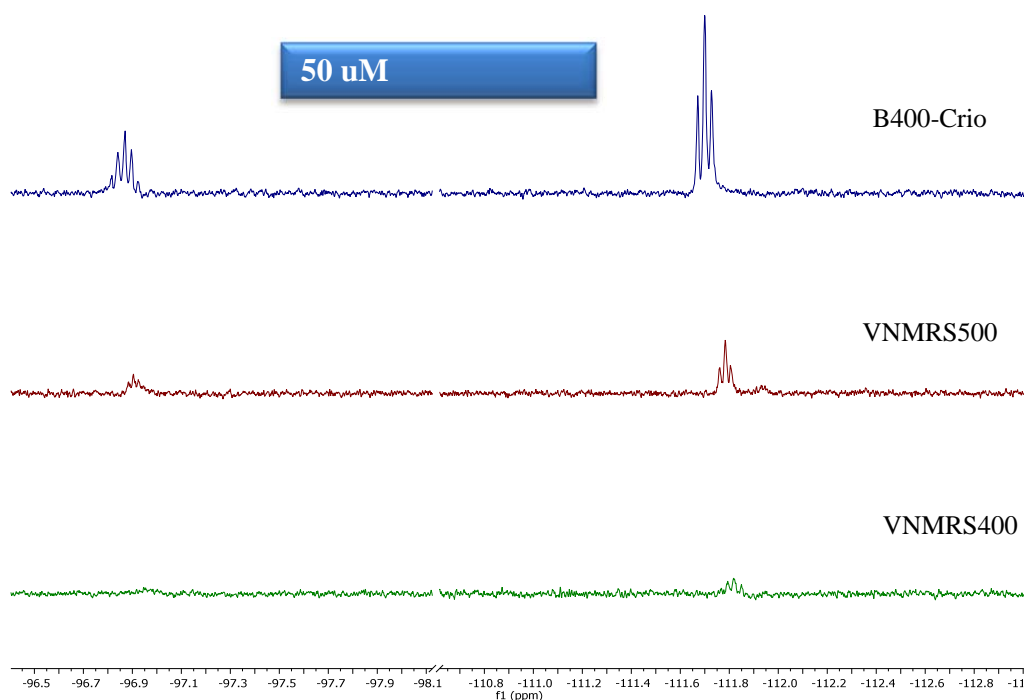


Figura-3 Espectros de  $^{19}\text{F}$  en B400-Crio VNMRS500 y VNMRS400, para una muestra 50  $\mu\text{M}$

#### Condiciones experimentales $^{19}\text{F}$

Equipos utilizados Mercury 400, Bruker400-crisonda, VNMRS500.

Pulso de observación de  $45^\circ$ , tiempo de adquisición de 3s y tiempo de relajación de 2s, 1024 acumulaciones (aproximadamente 1h y 30 minutos). Todos los espectros se han adquirido de modo manual. Espectros procesados con el programa Mnova, aplicando una función de procesamiento exponencial (coeficiente 2). La corrección de la línea de base se ha realizado de modo manual con el algoritmo Wittaker, adicionando los puntos necesarios. La relación S/N se ha calculado con un script del MNova.

#### Para saber más.

1. **NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis**; U. Holzgrabe, I. Wawer, B. Diehl (Editors); Elsevier 2008 (cap-2 pag 59)
2. **Eurolab technical report No. 01/2014**; "Guide to NMR Method Development and Validation – Part 1: Identification and Quantification"