

Opciones para adquirir espectros de ^{13}C en la Unitat de RMN

FACTORES QUE CONDICIONAN LA SENSIBILIDAD

En la sensibilidad en RMN influyen, entre otros factores, la constante giromagnética del núcleo y su abundancia natural. Así en relación al ^1H , el ^{13}C es unas 5600 veces menos sensible y el ^{15}N unas 260.000 veces menos sensible. Por ello, para la realización de los espectros de ^{13}C se precisa disponer de una mayor cantidad de muestra que para ^1H y/o realizar un número significativamente mayor de acumulaciones

En la Unidad de RMN es posible la adquisición de espectros de ^{13}C en los siguientes equipos: Bruker250/Varian300; Varian400; Varian500 y de un modo excepcional en el Bruker600.

La pregunta que surge de un modo inmediato es: *¿qué equipo es el más adecuado y que relación resultado/coste tiene cada uno de ellos?*

Para responder a esta pregunta, es necesario tener en cuenta varios factores:

- La sensibilidad depende del campo magnético. Así, a más campo magnético, mayor es la sensibilidad, por ejemplo en el paso de un equipo de 300 MHz a uno de 500 MHz se produce un incremento de $(5/3)^2$, es decir unas 2.8 veces.
- Otro factor importante a tener en cuenta es el diseño de la sonda. En las denominadas sondas de detección inversa (**ID**), la bobina más próxima a la muestra es la de ^1H , mientras que la de ^{13}C está más alejada, lo que hace que esta última sea menos efectiva. Por el contrario, en las sondas **BB**, la bobina de ^{13}C es la más próxima al tubo, con un incremento de sensibilidad con respecto a las de **ID**.
- Independientemente de cual sea el diseño de la sonda, las bobinas utilizadas en $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ son diferentes que en ^{13}C o ^{31}P , por ello es difícil establecer una comparación directa entre ^1H y ^{13}C . Por otra parte, el intento de relacionar el número de acumulaciones entre el espectro de ^1H y el de ^{13}C para un mismo equipo y sonda tampoco es inmediato, ya en ^{13}C hay que tener en cuenta factores como el Noe, las diferencias de relajación entre los carbonos, etc.

SENSIBILIDAD DE LOS EQUIPOS DISPONIBLES EN LA UNIDAD DE RMN

Para determinar la sensibilidad base en ^{13}C , se utiliza una muestra de benceno dioxano al 40%. El espectro se efectúa con una sola acumulación y en unas condiciones fijas e iguales para todos los equipos. De este modo, es factible comparar entre distintos equipos y/o sondas. En la **tabla 1**, se indican las relaciones SN (relación entre el ruido en un espectro y la intensidad de las señales de nuestro producto) obtenidas para algunos de los equipos de la Unidad, todos ellos con sonda BB (excepto el Inova500 que tiene una sonda **ID**)

	Bruker250	Varian300	Varian400	VNMRS500	Inova500	Bruker600
SN ^{13}C	(70-80):1	(70-80):1	(150-160):1	(220-230):1	(70-80):1	700:1

¿Cómo influyen estos valores en los espectros a realizar?: A mayor relación SN inicial, es necesario un menor número de acumulaciones para alcanzar el objetivo propuesto. Alternativamente será posible realizar el espectro con menor cantidad de producto. En la **figura 1** se muestran las curvas de evolución de la relación SN en función del número de acumulaciones para algunos de los equipos disponibles en la Unidad.

Debe tenerse en cuenta que la relación SN en un espectro de RMN se incrementa proporcionalmente al número de acumulaciones según $(nt)^{1/2}$. Es decir, para disminuir el ruido a la mitad es necesario hacer 4 veces más de acumulaciones. Por el contrario, el coste del espectro se incrementa de un modo lineal (función de $Ci \cdot nt$). Al determinar el coste final del espectro debe tenerse en cuenta que en la mayoría de las ocasiones hay un tiempo adicional debido a los ajustes y procesado (aprox 8-10 minutos).

Variación de la relación SN en ¹³C

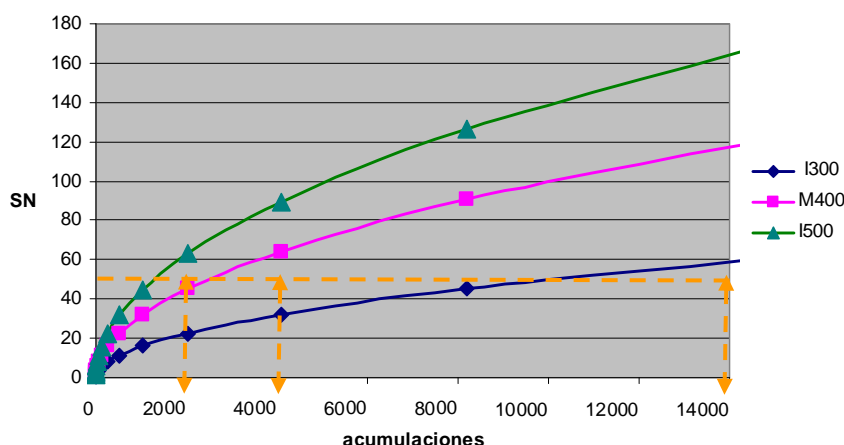


Figura 1 Incremento de la relación SN

Una vez se ha realizado un número elevado de acumulaciones, por ejemplo 10.000 - 15.000, conseguir una mejora significativa de la relación SN requiere hacer un número de acumulaciones excesivo (x4 o más). En la mayoría de los casos este esfuerzo en tiempo y coste no compensa la mejora obtenida. Una alternativa más efectiva consiste en acceder a un equipo de mayor sensibilidad, disponer de más muestra o bien utilizar algún tubo especial que permita aumentar la concentración en la zona activa de las bobinas. También es posible obtener la información de desplazamientos a través de un experimento de HSQC

SELECCIÓN DEL EQUIPO

En principio, se puede pensar que el equipo más conveniente es aquel que tiene una mayor sensibilidad. No obstante, deben tenerse en cuenta otros factores, como la disponibilidad del equipo y de muestra, además de las diferencias de coste que implica el análisis.

En general, la utilización de los equipos de 300 y 250 MHz es válida siempre que se disponga de suficiente cantidad de producto para que el espectro no requiera más de unas 2500 acumulaciones (coste no superior a 4-5€). La diferencia de sensibilidad entre el 400 y el VNMR500 es de aproximadamente un 30%, lo que implica que el 500 se puede obtener la misma relación SN con aprox 2 veces menos acumulaciones que en el 400 (ver la figura 1). No obstante, esta desventaja se compensa por una mayor disponibilidad en equipos de 400 MHz y con una ligera diferencia de coste

Campos de aplicación:

- Equipos de 300-250, 400 cuando se dispone entre 40-80 mg de muestra disuelta
- Equipos de 400 cuando se dispone entre 15-40 mg de muestra disuelta
- Equipo de 500 cuando se dispone de menos de 15 mg de muestra disuelta

Para poder ilustrar las posibilidades de los distintos equipos disponibles en la Unitat, se han utilizado dos muestras de mentol, una de ellas con 5.5 mg/ml y otra con una concentración de 1.3 mg/ml. En todos los casos las condiciones de realización de los espectros han sido iguales: pulso de 60°, tiempo de espera de 1s y tiempo de adquisición de 1s.

Con la muestra de 5.3 mg de mentol en el VNMRS-500 se han requerido 1.900 acumulaciones para obtener una relación SN de 80:1, con estas mismas acumulaciones en el Mercury 400 la relación SN ha sido de 46:1 y en el 300 de 22:1. En la **figura 2** se puede ver la comparación de los espectros de ^{13}C

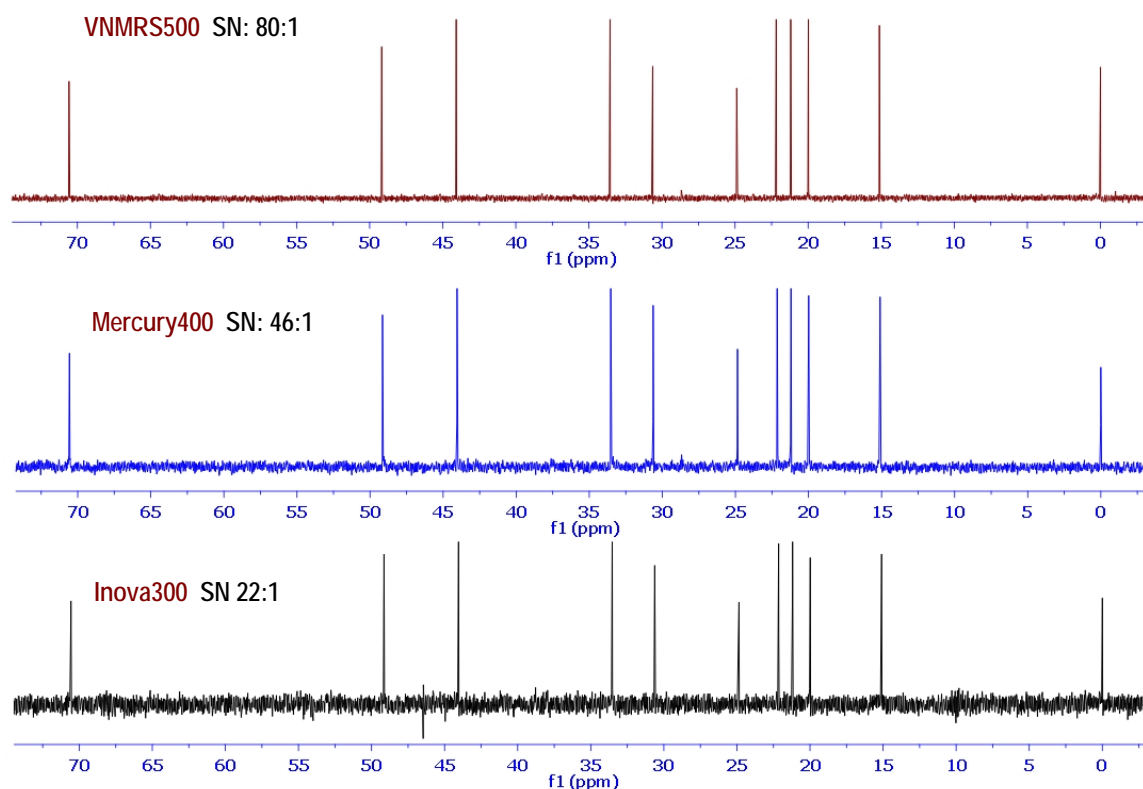


Figura 2 Mentol 5.3mg/ml nt=1900 tiempo 1h 4 minutos

Con la muestra de 1.3mg/ml en el VNMRS-500 con 10.240 acumulaciones (6h), la relación señal ruido final es de aproximadamente 70:1. Para obtener una relación SN similar en el equipo de 400 se precisarían aproximadamente unas 19.000-20.000 acumulaciones (12h), mientras que en el equipo de 300 serían necesarias unas 80.000 acumulaciones (más de 2 días de acumulación)

RELACIÓN SN VÁLIDA. ¿HASTA CUANTO ACUMULAR?

Un aspecto muy importante al definir cuantas acumulaciones se programaran, además de conocer la cantidad de producto que se tiene disuelto en el tubo, es saber cual es el objetivo de relación SN que queremos alcanzar. Una relación muy baja dificultará ver algunas señales, por el contrario una relación SN muy elevada, permitirá ver perfectamente todas las señales, pero puede requerir un tiempo de acumulación inaceptable. La cuestión es fijar un objetivo de SN que conjugue la obtención de toda la información requerida, con el menor tiempo (coste) posible. En la **figura 3** se indican los resultados para la muestra de 1.3 mg en función del número de acumulaciones realizado Por ejemplo el espectro **3a** se ha obtenido con sólo 256 acumulaciones (9 minutos) y su relación SN es de 9.8/1, que es insuficiente. El

espectro **3b** se ha obtenido después de 2560 acumulaciones (VNMR500) y tiene una relación SN de 27: que puede ser aceptable en la mayoría de las situaciones.

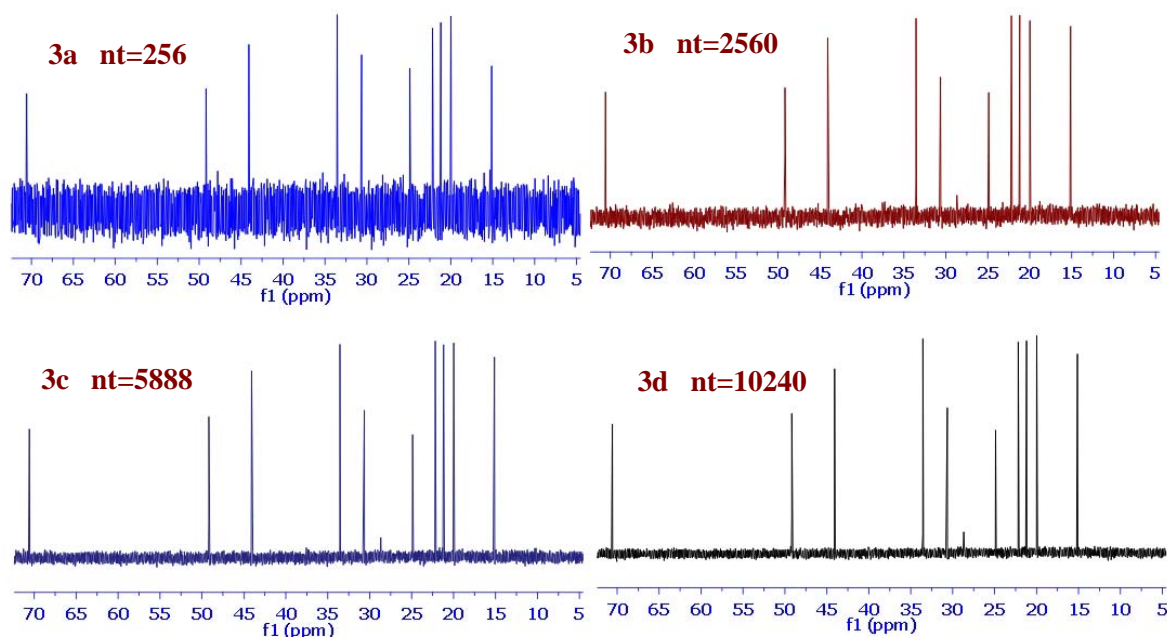


Figura 3 Mentol 1.3mg/ml

Con la misma muestra se continúa acumulando y la relación SN mejora lentamente, pero el coste del espectro se incrementa con mayor rapidez. En la **tabla 2** se indica la relación entre el número de acumulaciones, tiempo y coste para cada uno de los espectros.

espectro	acumulaciones	Relación SN	Tiempo	Coste (€)
3a	256	10:1	9 minutos	1
3b	2560	27:1	1h 26 min	10
3c	5888	46:1	3h 20 min	23
3d	10240	60:1	5h 46 min	40

Tabla2

Se puede ver que a partir del espectro **3b**, todos los resultados son válidos. Con una relación SN de 25:1 es suficiente para poder diferenciar con claridad las señales del ruido del espectro, aunque el registro del espectro puede ser poco atractivo. No obstante, en la mayoría de los casos una relación SN comprendida entre 50 y 70 es más que suficiente desde el punto de vista estético y puede suponer un importante ahorro de tiempo y de coste en la realización de los espectros de ¹³C.