



**CCiT<sup>U</sup><sub>B</sub>**  
Centres Científics i Tecnològics  
UNIVERSITAT DE BARCELONA

### **Avances tecnológicos**

Equipos, nuevas alternativas.

### **Sensibilidad en moléculas pequeñas**

Alternativas en la Unitat de RMN

Presentación del nuevo equipo B400-cryo

### **Metodología, Previsiones para el 2014**

## Espectrómetros de sobremesa

CCiT  
Centres Científics i Tecnològics  
UNIVERSITAT DE BARCELONA  
www.ccit.ub.edu

- Bruker (Fourier 60)  
1.5 Teslas 60 MHz  
Protón, experimentos 1D y 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$



<http://www.youtube.com/watch?v=n1xmqrWXRJ4>  
<http://www.youtube.com/watch?v=PrIh-kv8lo4>

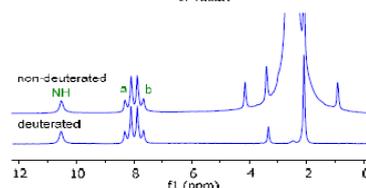
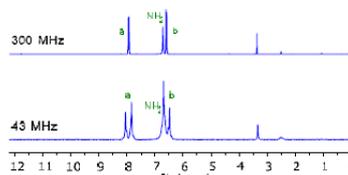
- Thermo Scientific (PicoSpin)  
45 MHz y 80 MHz (2 Teslas)  
Capilar, sólo exp 1D soft MNova



- Oxford (Pulsar)  
60 MHz  $^1\text{H}$  &  $^{19}\text{F}$   
Soft: Mnova



- Magritec (SpinSolve)  
43 MHz  
 $^1\text{H}$  &  $^{19}\text{F}$ , 1D y 2D  $^1\text{H}$  Básicos



Concentraciones 200 mM (4mM acumulando)  $^1\text{H}$  5% y  $^{13}\text{C}$  un 25%  
Lock de  $^2\text{H}$ , también pueden hacer espectros sin disolventes deuterados  
Ajuste de homogeneidad fácil, resolución de aprox 1Hz, Pulsos, FT y acumulaciones

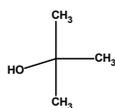
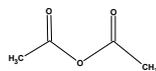
*Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy 76 (2014) 1–60*

3

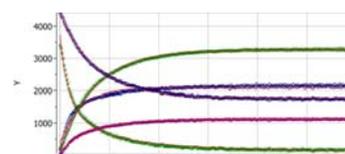
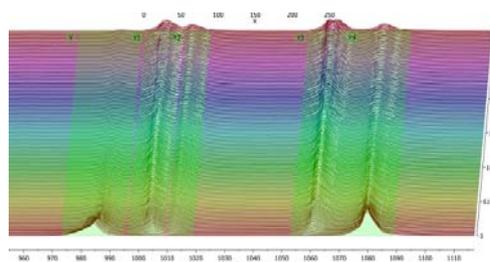
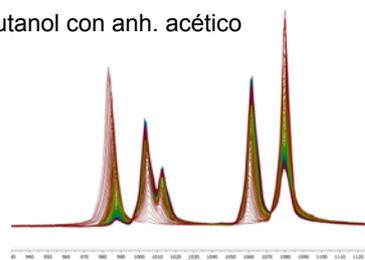
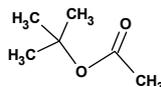
## Control de reacciones en equipos de sobremesa

CCiT  
Centres Científics i Tecnològics  
UNIVERSITAT DE BARCELONA  
www.ccit.ub.edu

### PNA John Edwards



### Esterificación de terbutanol con anh. acético



Equipo de 60MHz con capacidad de trabajo en  $^{31}\text{P}$

4



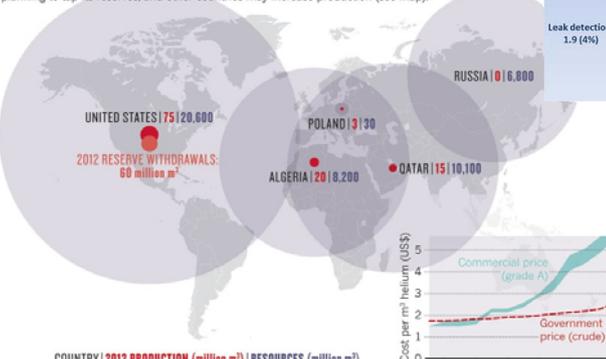
Centres Científics i Tecnològics  
UNIVERSITAT DE BARCELONA  
www.ccit.ub.edu

## Helio un bien escaso

Las bobinas de los imanes necesitan bajar temperatura para ser superconductoras

**FLOATING SKYWARD**

The price of helium from a US government stockpile has not kept pace with commercial prices (see graph). Most helium currently comes from the United States, but with price rises expected to continue, Russia is planning to tap its reserves, and other countries may increase production (see map).



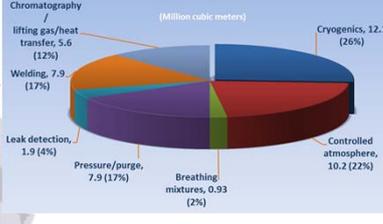
COUNTRY | 2012 PRODUCTION (million m<sup>3</sup>) | RESOURCES (million m<sup>3</sup>)

RUSSIA	0	6,000
UNITED STATES	75	20,600
QATAR	15	10,100
ALGERIA	20	8,200
POLAND	3	3,300



Cost per m<sup>3</sup> helium (US\$)

**FIGURE 3**  
ESTIMATED HELIUM CONSUMPTION, BY END USE, IN THE UNITED STATES IN 2011



(Million cubic meters)

- Cryogenics, 12.1 (26%)
- Controlled atmosphere, 10.2 (22%)
- Chromatography / lifting gas/heat transfers, 5.6 (12%)
- Welding, 7.9 (17%)
- Pressure/purge, 7.9 (17%)
- Breathing mixtures, 0.93 (2%)
- Leak detection, 1.9 (4%)



No se recupera, mayor utilización → dificultades de suministro

5



Centres Científics i Tecnològics  
UNIVERSITAT DE BARCELONA  
www.ccit.ub.edu

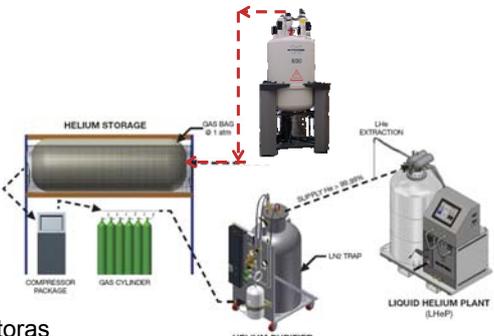
## Dificultad de suministro de He

**Crisis otoño del 2013** → Causas geopolíticas y económicas

- Instalaciones de nuevos equipos paradas
- Retrasos y cancelaciones en el suministro a equipos en funcionamiento

**Soluciones a medio y largo plazo**

- Recuperación
- Imanes más eficientes
- Imanes con recirculación
- Nuevas aleaciones superconductoras con una T<sub>c</sub> mayor



*Cryomech Helium Recovery System.*

6

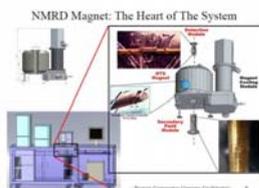
## HTS-NMR Imanes “menos fríos”

CCiT  
Centres Científics i Tecnològics  
UNIVERSITAT DE BARCELONA

www.ccit.ub.edu

### A Compact, Portable 4.7 T Driven NMR System for Reaction Monitoring.

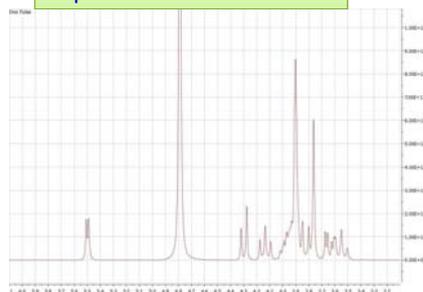
Pfizer and Protasis Corporation



Temperatura de aprox. 14 °K  
Crioplataforma de helio.  
Inicio y parada rápida y sin necesidad de ajustes.

HTS-110

<http://www.hts110.co.nz/nmr/>



Sucrose sample in D<sub>2</sub>O acquired on the new 200 MHz cryogen free NMR system.

7

## Zero Boil off Magnets

CCiT  
Centres Científics i Tecnològics  
UNIVERSITAT DE BARCELONA

www.ccit.ub.edu



<http://www.jeolusa.com/NEWSEVENTS/PressReleases/tabid/314/ID/296/JEOL-Resonance-Introduces-New-Zero-Boil-Off-Magnet-for-NMR-Systems.aspx>

<http://www.bruker.com/products/mr/nmr/magnets/magnets/ascend-aeon/overview.html>

The new JEOL Resonance Zero Boil Off magnet will substantially reduce consumption of liquid helium by reliquifying the helium gas generated by evaporation of the helium in the magnet. **In the event of a power outage the helium reservoir will maintain the magnetic field for 4 days.**

500 MHz (11.7 T) and 600 MHz (14.1 T) to offer a complete line of new NMR systems. Sales will begin in May 2013.



**Ascend Aeon 600 & 700**

The Ascend™ Aeon 600 and 700 superconducting, nitrogen-free magnet systems, feature fully integrated Helium reliquification. The unique Aeon technology enables long-term care-free operation without the need for user maintenance.

**Ascend Aeon 400 & 500**

Aeon 400 and 500 magnets, which are nitrogen-free, have very low liquid Helium evaporation rates, and require liquid Helium refills only every 18 months.

8

## Imanes más eficientes



### Ascend Magnets Operational Cost Savings

Magnet	Previous generation magnet, He consumption	Ascend magnet, He consumption	Cryogen savings, % of less He consumption
400MHz	15 ml/hr	13 ml/hr	13% less He
500MHz	17 ml/hr	13 ml/hr	23% less He
600MHz	28 ml/hr	16 ml/hr	42% less He
700MHz	45 ml/hr	26 ml/hr	42% less He
750MHz	92 ml/hr	45 ml/hr	51% less He
800MHz	250 ml/hr	140 ml/hr	44% less He

9

## Retos en RMN

**Resolución**  
**Dispersión**  
**Sensibilidad**

→ “Independiente” del campo magnético

→ Dependientes del campo magnético



60 MHz  
Fac. Químicas



1000 MHz  
Bruker Magnet

1.2 GHz  
2014

18.5 x 10<sup>6</sup> €

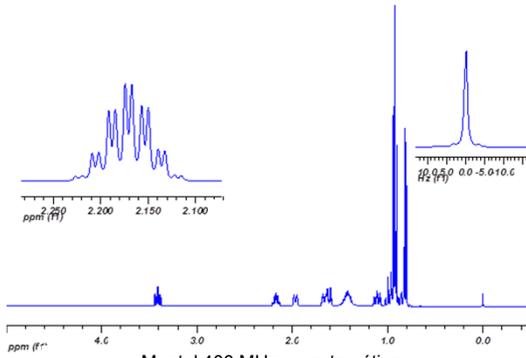
10



## Resolución, anchura de línea

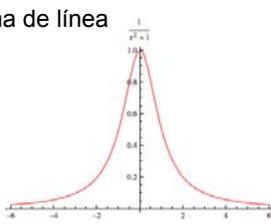
La anchura de línea depende de:

- Inhomogeneidad del campo
  - Imán
  - Muestra
- De la inversa del tiempo de relajación  $T_2$ 
  - Pesos moleculares bajos  $\rightarrow$  anchura pequeña
  - Polímeros  $\rightarrow$  señales anchas



Mentol 400 MHz en automático

### Forma de línea



forma ideal lorenziana

### Test de forma de línea

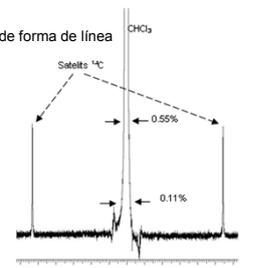


Figura 1 Mesura de la forma de línea en protó



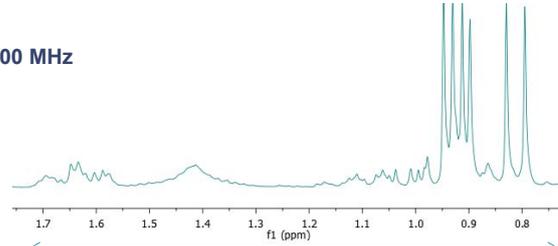
## Dispersión de las señales

Un incremento del campo puede originar:

1. Simplificación de los sistemas de acoplamiento
2. Disminuir el solapamiento

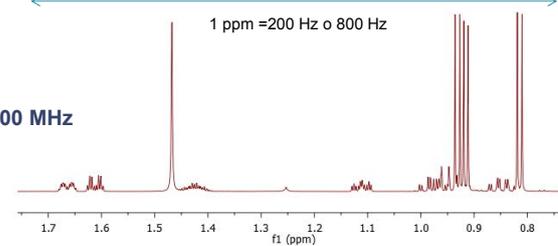
A 200 MHz | ppm son 200 Hz  
A 800 MHz | ppm son 800 Hz

### 200 MHz



**Alternativa más eficaz**  
**Utilizar experimentos de 2D**

### 800 MHz



1 ppm = 200 Hz o 800 Hz

12

**CCiT**  
Centres Científics i Tecnològics  
UNIVERSITAT DE BARCELONA  
www.ccit.ub.edu

## Sensibilidad en RMN

$\Delta E = \gamma \hbar B_0$

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} \approx 1 - \frac{\gamma \hbar B_0}{K_B T}$$

$K_B = 1.3085 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$

**<sup>1</sup>H**

$B_0 = 1.41 \text{ T (60 MHz)}$      $\frac{N_\beta}{N_\alpha} = 0.9999904$

$B_0 = 7.05 \text{ T (300 MHz)}$      $\frac{N_\beta}{N_\alpha} = 0.999995$

Baja sensibilidad

Diferencias del orden de 1-20 ppm

13

**CCiT**  
Centres Científics i Tecnològics  
UNIVERSITAT DE BARCELONA  
www.ccit.ub.edu

## Sensibilidad

La relación S/N en RMN depende de:

$$\frac{S}{N} \propto N A T_s^{-1} B_0^{3/2} \gamma^{5/2} T_2^* (NS)^{1/2}$$

$\gamma \text{ } ^1\text{H} = 26,753 \text{ rad/G}$   
 $\gamma \text{ } ^{13}\text{C} = 6,728 \text{ rad/G}$

Ratio  $(\gamma \text{ } ^1\text{H} / \gamma \text{ } ^{13}\text{C})^3 \approx 62,87$

Si se tiene en cuenta el termino A (Abundancia natural)

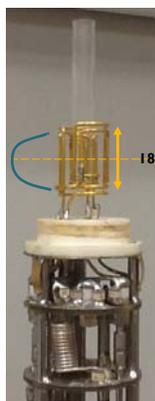
**<sup>1</sup>H es unas 5800 veces más sensible que el <sup>13</sup>C**

**<sup>1</sup>H es  $\approx 27 \cdot 10^5$  veces más sensible que el <sup>15</sup>N**

Núcleo	Spin (I)	Relación Giromagnética (10 <sup>7</sup> rad/T sec)	Frecuencia (MHz) a 9.40 Teslas	Abundancia Natural %	Receptividad
<sup>1</sup> H	1/2	26.7522128	400.22	99.985	1.0000
<sup>19</sup> F	1/2	25.18148	376.30	100.0	0.834
<sup>31</sup> P	1/2	10.8394	161.92	100.0	0.0665
<sup>13</sup> C	1/2	6.728284	100.58	1.10	0.000175
<sup>15</sup> N	1/2	-2.71261804	40.54	0.366	0.00000382

14

## Sonda



Sonda BB B250

### Emisor y detector de radiofrecuencia

- Diferentes bobinas
- Frecuencia ajustable

### Ajuste de la frecuencia (sintonía), optimización de:

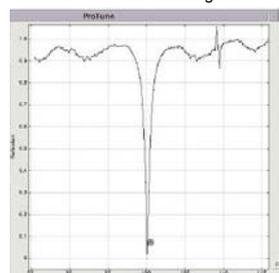
- Los pulsos de RF
- Recepción de la señal

### La sintonía depende de:

- Del disolvente
- La Fuerza iónica de la solución (Afecta al valor de pulsos y sensibilidad)



I500 Sonda BB sin grad



15

## Mejora de la sensibilidad

**Alternativas para mejorar la  $SN_i$  (inicial) :**  $\frac{S}{N} \propto NAT_s^{-1} B_0^{3/2} \gamma^{5/2} T_2^*(NS)^{1/2}$

- Incrementar la concentración en el volumen activo.
- Utilizar equipos con un campo magnético mayor
- Utilizar sondas y secuencias optimizadas

### Sondas de 10 mm ( $^{13}\text{C}$ y $^{31}\text{P}$ )



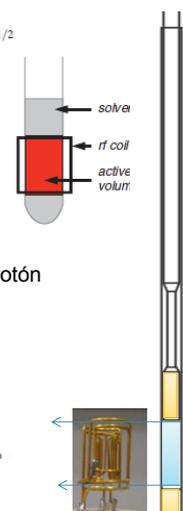
Sólo  $^{13}\text{C}$  o X Núcleos  
Con desacoplamiento de protón  
Baja sensibilidad y homogeneidad para protón

### Sondas de 5 mm

Tubos estándar  $\rightarrow$  0.5- 0.6 ml  
Tubos Shigemi  $\rightarrow$  0.2- 0.3 ml  
Volumen útil ajustado al las bobinas  
Tubos de 3 mm 150ul

### Microsondas

25-1 nl



16

## Limite de detección

La capacidad de detección depende de la muestra y sus componentes

La capacidad de detección es mayor en:

- Muestras con un único producto
- Mezclas con productos en proporciones similares

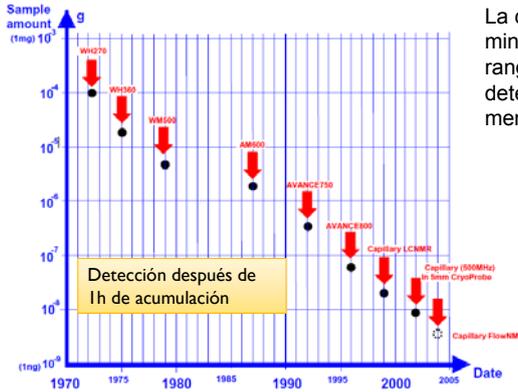


La capacidad para detectar un compuesto minoritario, está condicionada por el rango dinámico del equipo: Que determina la relación entre el mayor y el menor valor que puede observarse.

Con un detector de 16 bits se pueden digitalizar valores en el rango de  $\pm 32767 (2^{15} - 1)$   
Nuevos equipos con detectores de 22 bits (detección de  $\pm 2097152$ )

En un equipo de 600 MHz el limite de detección (LOD, S/N=3) en protón está en el rango de los nanomoles ( $10^{-9}$ )

IR  $\rightarrow 10^{-14}$  mol  
MS  $\rightarrow 10^{-18}$  mol



17

## Sensibilidad en los equipos de la Unitat

■ Especificaciones, Muestras test

<sup>1</sup>H: 0.1% etilbenceno, 0.01% TMS en cdcl<sub>3</sub>      <sup>19</sup>F: 0.05% trifluorotolueno en C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>

<sup>13</sup>C: 60% C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, 40% dioxano      <sup>15</sup>N: 45% dimetilformamida

<sup>31</sup>P: 0.0485 M trifenilfosfato en cdcl<sub>3</sub>



Núcleo	B800/B600US	B600	B400-Crio	VNMR500	Inova-500	Mercury-400	Inova300
<sup>1</sup> H	7000:1	650:1	1050	730:1	726:1	220:1	84:1
<sup>13</sup> C	1128:1	335:1	475	240:1	83:1	158:1	83:1
<sup>31</sup> P	----	200:1	300	135:1	24:1	183:1 *	50:1
<sup>19</sup> F	----	450:1	850	650:1	----	175:1	66:1
<sup>15</sup> N	----	45:1	40	25:1	----	----	----

Proteínas

Moléculas medianas-pequeñas

18

## Como mejorar más la sensibilidad

$$\frac{S}{N} \propto \frac{U_I}{U_N} \propto \frac{N \times \gamma_e \sqrt{\gamma_d^3 \times B_0^3} \times (B_1 / I_{\text{coil}})}{\sqrt{4k_B \times \Delta f \times (R_c(T_c + T_a) + R_s(T_s + T_a))}}$$

**Resistencia y temperatura bobinas**

$$\frac{S}{N} \propto N A T_s^{-1} B_0^{3/2} \gamma^{5/2} T_2^*(NS)^{1/2}$$



- **Diseño de la sonda**
  - Factor de calidad Q de la sonda ( $Q = \omega L/R$ )
  - "Filling factor"  $\eta$  (relación V muestra / V bobina)
  - Geometría de la bobina Relación señal-ruido (S/N) y temperatura
- **Fuentes de ruido:**
  - Bobina receptora de la sonda ( $R_c, T_c$ )
  - Preamplificador ( $T_a$ )
  - Muestra ( $R_s, T_s$ )

Disminuyendo la temperatura se reduce el ruido detectado

19

## Crisondas B600/B800

La bobina y el preamplificador se mantienen a 20 K y 80 K respectivamente

Disminución de  $T_c$  (bobina receptora) y  $R_c \Rightarrow$  reducción del ruido térmico un factor de 2

Disminución de  $T_a$  (preamplificador)  $\Rightarrow$  reducción del ruido térmico un factor de 2

La reducción total de ruido térmico en una crisonda es de un factor de 4



### TCI 600S3 H-C/N-D-05 Z:

bobina  $^1\text{H}$  fría  
bobina  $^{13}\text{C}$  fría  
bobina  $^{15}\text{N}$  temperatura ambiente  
bobina de gradientes en Z

Línea helio  
Línea vacío  
Crioplatforma



20

## B400 Avance III + Cryoprobe

CCiT  
Centres Científics i Tecnològics  
UNIVERSITAT DE BARCELONA  
www.ccit.ub.edu



**Consola Avance III HD**  
Última generación de RF  
Digital  
Elevado rango dinámico  
Dos canales  
**NMR Thermometer™**

### Equipo cedido por Bruker:

Consola Avance III (última generación de RF)  
Imán Ascend 400 (apantallado y bajo consumo de helio)  
Sonda CryoProbe™ Prodigy BBO  
Cambiador de 16 muestras

22

## B400 Avance III + Cryoprobe

CCiT  
Centres Científics i Tecnològics  
UNIVERSITAT DE BARCELONA  
www.ccit.ub.edu

### Criosonda enfriada con nitrógeno líquido

En los núcleos de BB se obtiene un factor de ganancia de 2-3

para  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$  la ganancia el incremento puede ser de dos veces o algo más

Banda ancha, cubriendo el rango de frecuencias comprendidas entre  $^{31}\text{P}$  y  $^{15}\text{N}$ .

Coste reducido. Permite un aumento significativo de la operatividad del espectrómetro al reducir el tiempo de los experimentos.



Temperatura disponible **4 a 80 °C**

La sensibilidad final será comparable a la que se obtiene con el B600 y la sonda BBO

### Previsiones

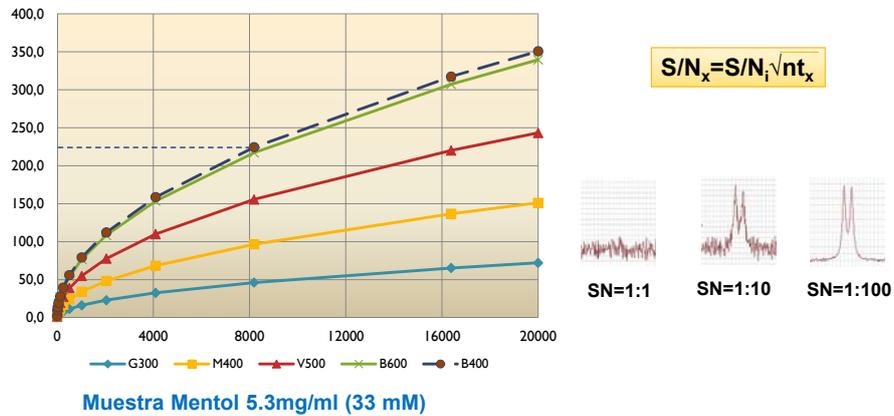
$^1\text{H} / ^{19}\text{F}$	$\geq 50 \mu\text{M}$ (0.025 mg/ml, PM 500)
$^{13}\text{C}$	$\geq 1 \text{mM}$ (0.5 mg/ml, PM 500)
$^{15}\text{N}$	$\geq ?$



23

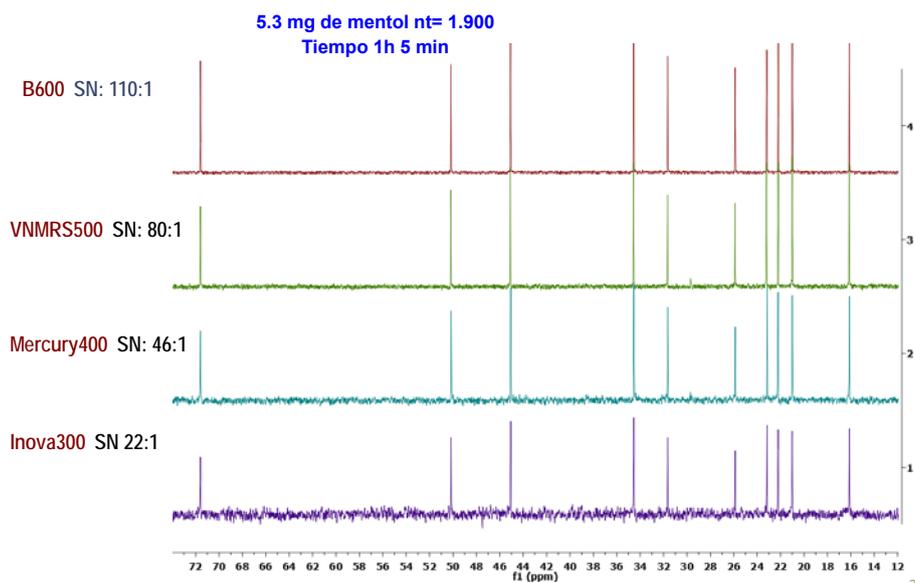
## Mejora de la relación SN

Variación de la relación SN en  $^{13}\text{C}$  en función de las acumulaciones

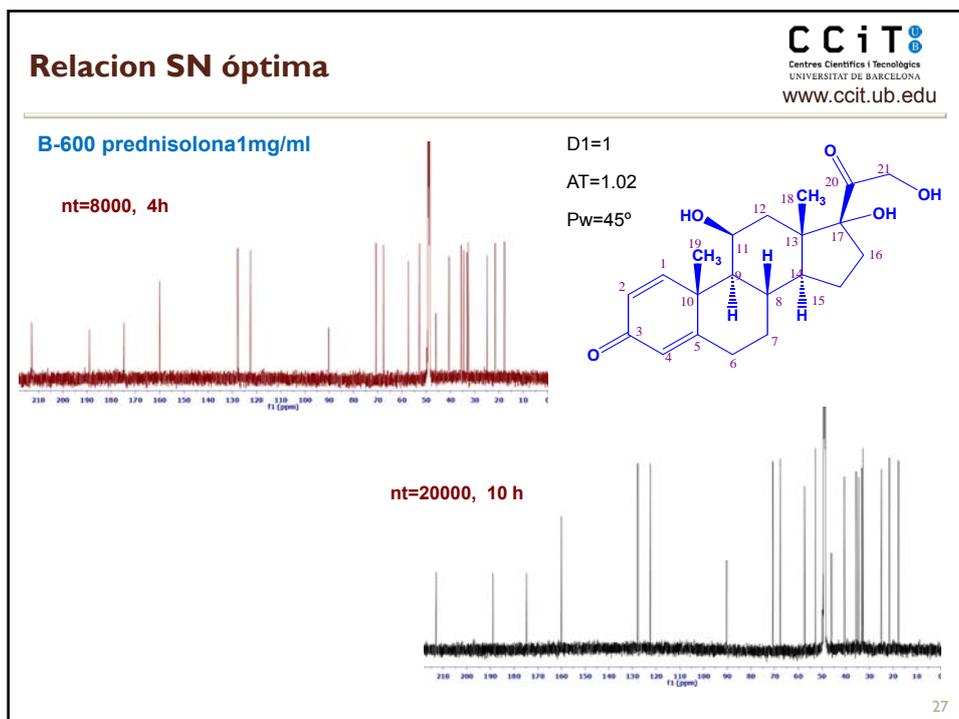
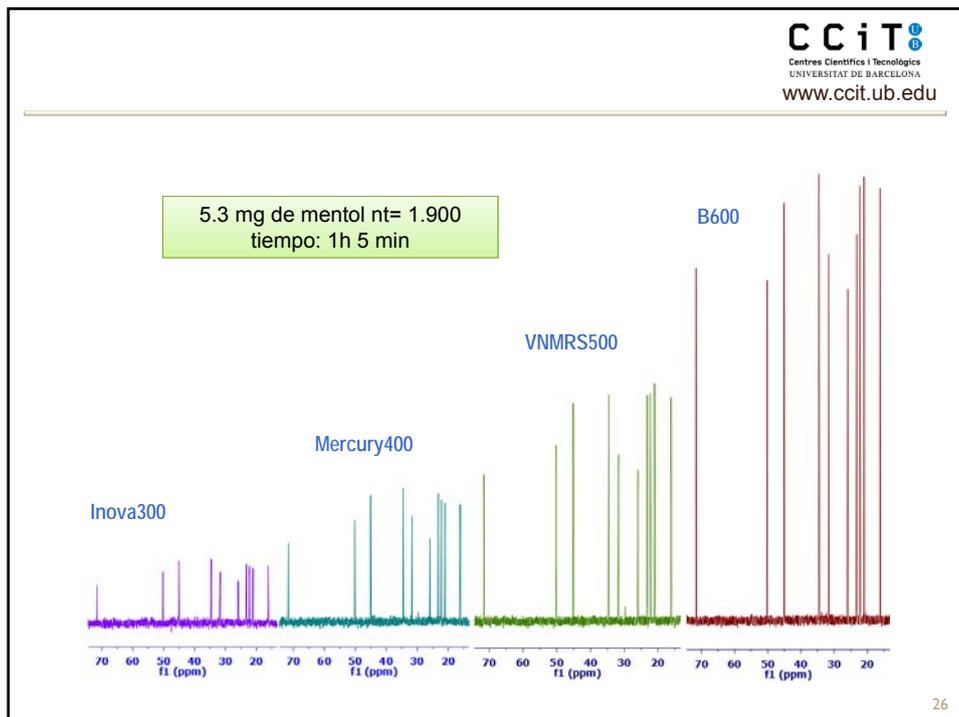


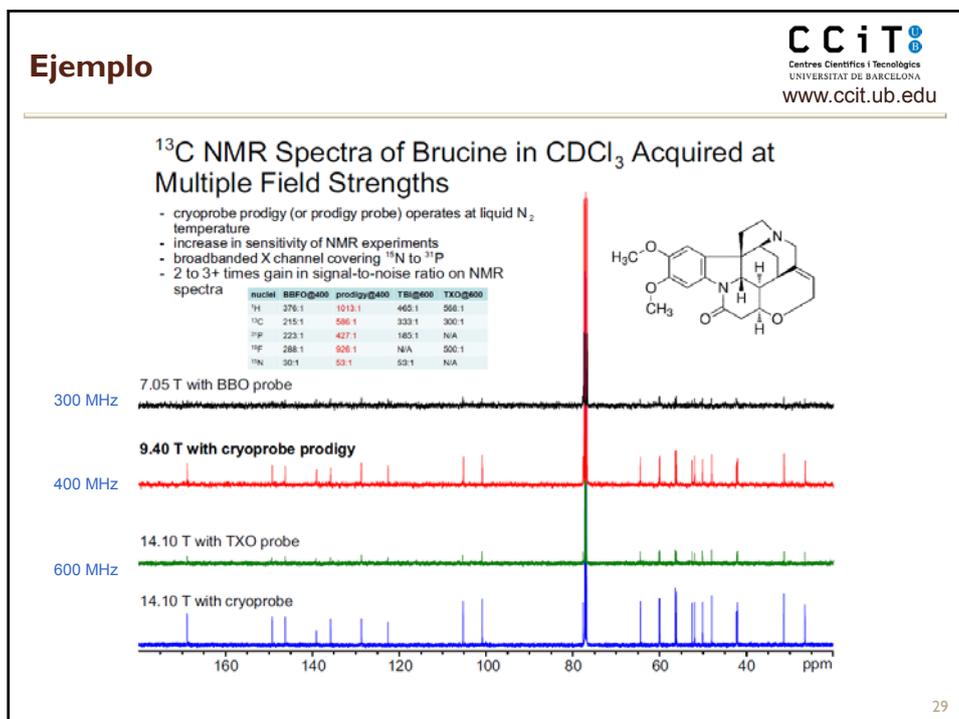
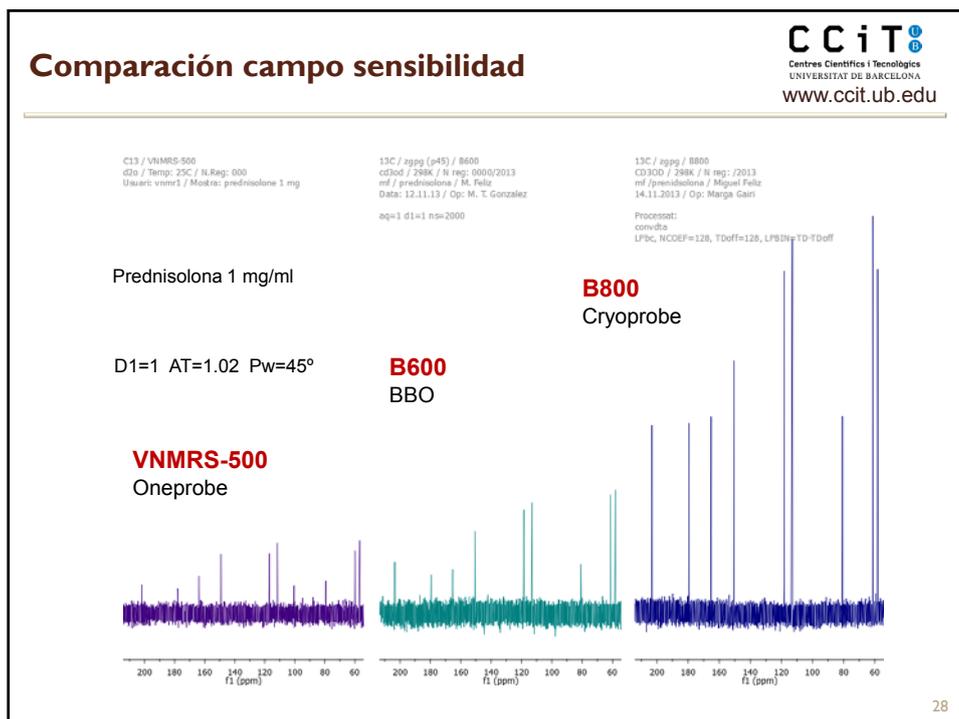
24

## Disponibilidad en la Unitat de RMN



25

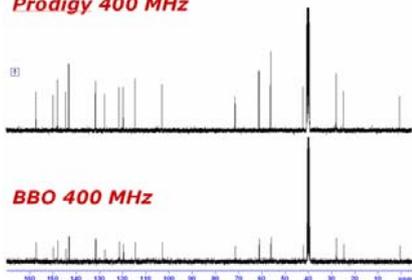




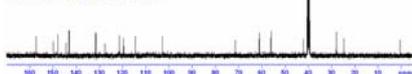
## Ejemplos de la Cryoprobe

CCiT  
Centres Científics i Tecnològics  
UNIVERSITAT DE BARCELONA  
www.ccit.ub.edu

Prodigy 400 MHz



BBO 400 MHz

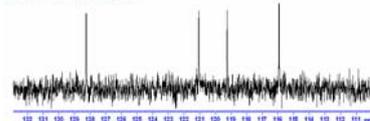


50mM Quinine DMSO-d6, 32 scans SNR Gain: ~2.5

Prodigy 400 MHz



BBO 700 MHz

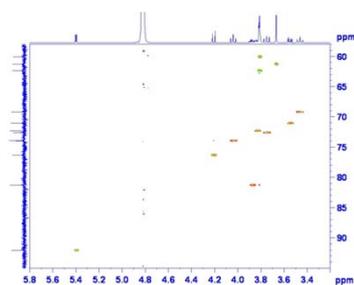


50mM Cyclosporin-A, 15N-INEPT, exper. time: 17 min

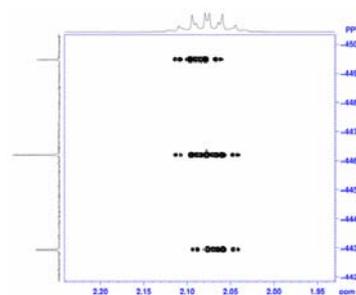
30

## Exp 2D

CCiT  
Centres Científics i Tecnològics  
UNIVERSITAT DE BARCELONA  
www.ccit.ub.edu



400µg (2mM) Sucrose in H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O 9:1,  
1H-13C HSQC, Ns = 2, expt. time: 11  
min.



HSQC 195Pt-1H cis-Dichlorobis  
(triethylphosphine) Platinum (II),  
expt. time: 10 min., 3mg in  
CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

31

## Aplicaciones a implementar en el B400-Cryo

- **QNMR**
  - Cuantificación en  $^1\text{H}$  nuevos métodos y procesado MNova
  - Cuantificación mediante INEPT
  - Cuantificación con experimentos HSQC
- **Experimentos con núcleos poco sensibles**
  - Observación directa de  $^{15}\text{N}$
  - HSQC/HMQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$
  - HMBC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$
- **Experimentos poco sensibles**
  - Correlaciones  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  (Adecuate inadecuate)
  - Experimentos combinados (HMQC-TOXY)
- **Determinación contaminantes.**
  - Heparinas
- **Ultrafast experiments ????**

32

# Gracias por la atención

35