

ESPECTROSCOPIA DIFUSIONAL, SEPARACION E IDENTIFICACION DE COMPONENTES EN UN SOLO ESPECTRO

Ing. Leandro Santos, Farm. Bioq. Marcelo Feltrinelli, Farm. Agustina Pereyro
Farm. Bioq. Ramon Nuñez Cantelli, Téc. Ivana Innecco.

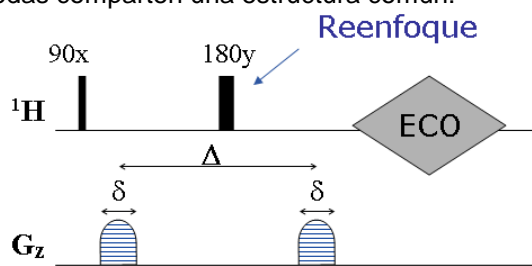
INTI Química
santos@inti.gov.ar

OBJETIVO

Desarrollar e implementar experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN) que permitan identificar los diferentes componentes de una muestra de acuerdo a sus desplazamientos químicos (δ) y a su vez, separar las especies presentes de acuerdo a sus coeficientes de difusión.

DESCRIPCIÓN

Si bien se evaluaron diferentes secuencias de pulsos para realizar experimentos de difusión, todas comparten una estructura común:



Una bobina genera un gradiente de campo externo (G_z), que codifica espacialmente las diferentes moléculas de la muestra (son "marcadas" según su posición). Luego de un tiempo de espera determinado, se aplica un segundo gradiente para decodificar la nueva posición de la molécula. Si durante el periodo de espera la molécula se movió, la integración de su señal a largo del volumen de muestra se verá atenuada, de acuerdo a la ecuación de *Stejskal-Tanner*:

$$\frac{I}{I_0} = \exp(D \cdot \gamma^2 \cdot g^2 \cdot \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right))$$

Donde:

I/I_0 : atenuación de la señal.

D : coeficiente de difusión.

γ : constante giro magnética del núcleo.

g : fuerza del gradiente.

δ : duración del gradiente.

Δ : espera entre gradientes de difusión.

Luego de obtener experimentalmente los valores de Δ y δ óptimos (indispensables para lograr la resolución necesaria) se realizaron diferentes espectros, midiendo la atenuación de las señales de la muestra para diferentes valores de la fuerza del gradiente (g). Del análisis de estos datos y empleando la ecuación de *Stejskal-Tanner* se extrajeron los

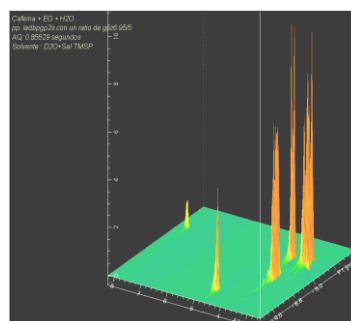
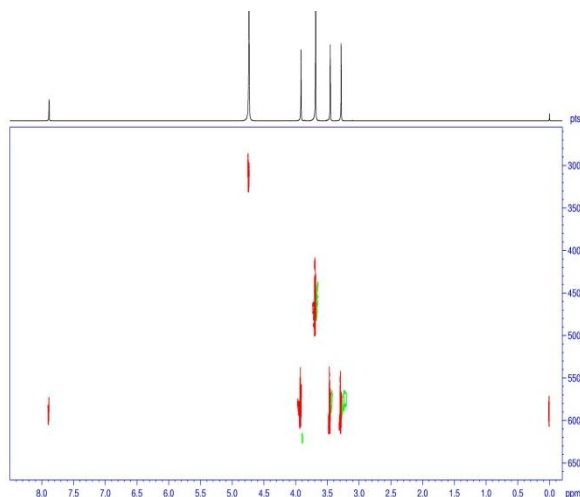
diferentes valores de coeficientes de difusión para cada uno de los componentes individuales.

Se preparó una solución 1×10^{-4} mM de cafeína, etilenglicol y agua en agua deuterada con el agregado de la sal sódica del ácido trimetil silil propiónico (TMSP) como referencia. Los espectros se obtuvieron a 25°C en un FT-RMN marca Bruker, a 400 MHz para protón con una sonda BBI con gradientes z .

RESULTADOS

Para la muestra evaluada los valores óptimos hallados de Δ y δ fueron 50 ms y 800 μs respectivamente.

Con los datos recolectados y empleando un programa específico se obtiene un espectro de dos dimensiones (2D DOSY) en el cual las señales se separan de acuerdo con su desplazamiento químico en una dimensión y según sus coeficientes de difusión en la otra:



En el espectro 2D-DOSY (arriba) se observa en detalle la separación de los componentes de la muestra (cafeína, H_2O y EG).

En la vista 3D (izq.) se detalla la intensidad de las señales cruzadas.

CONCLUSIONES

El método empleado permite identificar la cantidad de especies diferentes presentes en la muestra, asignar las señales a cada uno de los componentes y estimar los coeficientes de difusión de las mismas.

Si bien encontrar los valores de Δ y δ es una tarea laboriosa, una vez conocidos estos, el experimento es sencillo y permite obtener resultados asequibles en menos de una hora.

Eventualmente también se podrá evaluar el radio de las especies a través de sus diferentes coeficientes de difusión, empleando la ecuación de Einstein-Stokes:

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D}$$

Donde:

R_h : radio hidrodinámico de la molécula.

k: constante de Boltzmann.

T: temperatura absoluta.

D: coeficiente de difusión.

η : viscosidad de la solución.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Stejskal E.O, Tanner J.E; Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of time-dependent field gradient. Journal of Chemical Physics 1965; 42(1):288-292.
- [2] Pulsed-Field Gradient Nuclear Magnetic Resonance as a Tool for Studying Translational Diffusion: Experimental Aspects; WILLIAM S. PRICE
- [3] Molecular mass estimation by PFG NMR spectroscopy; Christopher A. Crutchfield, Douglas J. Harris.
- [4] NMR Chromatography: Molecular Diffusion in the Presence of Pulsed Field Gradients in Analytical Chemistry Applications; Kurt Cobain, Joy J. Goto, Viswanathan V. Krishnan.
- [5] Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy of Poly([ethylene-co-vinylacetate]-graft-vinyl chloride) in Solution; Sangdoo Ahn, Eun-Hee Kim and Chulhyun Lee.