

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 285**

51 Int. Cl.:

**G01R 33/46** (2006.01)

**G01N 24/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2013 PCT/EP2013/057104**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.10.2013 WO13150098**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2013 E 13719430 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2834659**

54 Título: **Método para identificación de sustancia a partir del espectro de RMN**

30 Prioridad:

**05.04.2012 DE 102012205686**  
**05.04.2012 US 201261620700 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.11.2017**

73 Titular/es:

**NUMARES AG (100.0%)**  
**Am BioPark 9**  
**93053 Regensburg, DE**

72 Inventor/es:

**HUBER, FRITZ;**  
**PFAHLERT, VOLKER;**  
**KIRCHHÖFER, RENATE y**  
**KRUMPEL, ANDREAS**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 644 285 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método para identificación de sustancia a partir del espectro de RMN

5 La presente invención se refiere a un método para la identificación de una sustancia en una muestra de acuerdo con la reivindicación 1 así como también a un producto de programa informático, que contiene instrucciones apropiadas para ejecutar dicho método, de acuerdo con la reivindicación 8. En el campo de la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (espectroscopia RMN), durante décadas, ha existido el problema de que no resulta posible llevar a cabo una identificación automática de las sustancias presentes en una muestra con ayuda de un espectro de RMN  
10 medido. En su lugar, incluso hoy en día los espectros de RMN todavía se tienen que evaluar con gran esfuerzo a mano con el fin de poder identificar las sustancias medidas por medio de espectroscopia de RMN. El éxito de la identificación en este caso depende significativamente de la experiencia técnica de la persona que lleva a cabo la identificación de la sustancia a mano. Además, la complejidad de la composición de la muestra que se mide por medio de espectroscopia RMN también es importante. De esta manera, los componentes individuales de una muestra sometida a formación de compuestos de forma compleja, de forma genera no inequívoca, se pueden  
15 identificar de forma rápida y simple con ayuda de un espectro de RMN conjunto.

Los protones y otros núcleos activos de RMN, tales como por ejemplo  $^{15}\text{N}$  o  $^{13}\text{C}$ , básicamente producen una señal de RMN definida en un entorno químico definido (que es un grupo molecular específico de una molécula). Por lo tanto, cada sustancia tiene una huella de RMN individual. Sin embargo, estas huellas de RMN varían en gran medida con el valor de pH, la temperatura, la intensidad de campo, la concentración salina y muchos otros parámetros. Además, las huellas de RMN individuales de las diferentes sustancias presentes en una muestra, con frecuencia, se solapan para formar patrones complejos, a partir de los cuales las huellas de RMN individuales ya no se aíslan más de forma sencilla.  
20

25 Como resultado, hasta ahora, ha sido posible tomar en consideración todos estos factores cuando se tienen en cuenta composiciones complejas de muchas sustancias o para almacenar las diversas influencias de los parámetros anteriormente mencionados sobre las sustancias individuales en una base de datos. Debido a esto, es preciso llevar a cabo amplias series de mediciones con diversos valores de pH, temperaturas, concentraciones de sal y otros parámetros para cada sustancia individual. Además, habría que tener en cuenta que el comportamiento de una sustancia puede cambiar dependiendo de la presencia de otras sustancias.  
30

El documento DE 10 2010 038 014 A1 describe un método para caracterizar una muestra que comprende las siguientes etapas: que proporciona al menos un resultado de análisis que tiene una pluralidad de valores, en el que el resultado del análisis se generó mediante análisis de una muestra por medio de al menos un método de análisis; determinando el valor de al menos una relación matemática entre al menos dos valores de pluralidad de los valores; generando una firma característica de la muestra basada en el valor de al menos una relación matemática. Por lo tanto, el método va destinado a caracterizar una muestra, es decir, una mezcla compleja de diferentes sustancias-como tal. Para ello, no resulta relevante identificar las sustancias individuales presentes en la muestra - esto se afirma explícitamente en diversos capítulos del documento DE 10 2010 038 014 A1.  
35  
40

El documento EP 2 161 587 A1 describe un método para el análisis automático de espectros de RMN que hace uso de un sistema de interpretación libre de parámetros que imita la lógica humana. El presente método extrae información a partir de un espectro de RMN de forma similar a como lo harían expertos humanos. De esta manera, se combinan diferentes sistemas de expertos que proporcionan características espectrales de RMN, así como también características de una estructura química propuesta. Tras diversos ciclos del método iterativo, se genera un listado de hipótesis con ponderación de probabilidad.  
45

Vu et al.: "An integrated workflow for robust alignment and simplified quantitative analysis of NMR spectrometry data", BMC Bioinformatics 2011, 12: 405 describe un método clásico de adaptación para espectros durante el cual se adapta un espectro de referencia sobre el espectro de la muestra por medio de modificación. Para ello, se usa un algoritmo que se basa en la asignación de picos basada en asociaciones jerárquicas. El presente método depende en gran medida de las condiciones de medición en las cuales se ha registrado el espectro RMN de la muestra y el espectro RMN de referencia.  
50  
55

El objetivo subyacente de la presente invención consiste en especifica un método con el que se pueda llevar a cabo una identificación automática de la sustancia para el espectro de RMN. El presente método debe ser apropiado para los espectros de RMN que se han registrado en la mayoría de las diversas condiciones básicas.  
60

El presente objetivo se logra por medio de un método que tiene las características de la reivindicación 1. Dicho método para la identificación de una sustancia en una muestra tiene las siguientes posteriormente explicadas.

En primer lugar, se proporciona un espectro de RMN de una muestra que contiene al menos una sustancia que tiene al menos un núcleo activo en RMN. Los núcleos activos de RMN apropiados son por ejemplo  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ .  
65

Posteriormente, tiene lugar la separación de líneas del espectro en RMN. Es decir, el espectro de RMN se separa en valores espectrales discretos. Dicho valor espectral puede, por ejemplo, ser una línea espectral que corresponde a un grupo químico individual activo en RMN. Cada valor espectral en este caso tiene un valor integral y un valor de posición. El valor integral especifica la altura de una línea individual del espectro de RMN o altura y/o área de una sección espectral individual del espectro de RMN, en la que cada sección espectral individual comprende una o más líneas del espectro de RMN. El valor integral, de este modo, comprende información sobre la intensidad de la línea considerada o la sección espectral considerada o consiste en esta información de intensidad. Cada valor de posición identifica la posición de la línea considerada o de la sección espectral considerada en el espectro de RMN. Los valores de posición en este caso son una medida del blindaje magnético de los átomos/grupos moleculares en la molécula completa de la sustancia presente en la muestra. Los valores integrales son una medida del número de átomos/grupos moleculares del espectro de RMN.

Como posición, generalmente se usa en este caso la posición central de la línea considerada o la posición media de la sección espectral considerada. En términos técnicos, dicha sección espectral también se denomina como "depósito". La separación del corte de un espectro de RMN en varias secciones espectrales discretas, que comprenden en cada caso una o múltiples líneas, además también resulta conocida por el experto en la técnica con la expresión de "al depósito".

La separación de líneas también puede tener lugar básicamente de acuerdo con métodos generalmente conocidos por el experto en la técnica. Básicamente, se puede emplear cualquier método apropiado para extraer la información acerca de los grupos moleculares individuales o átomos del espectro de RMN. La separación de líneas especificada en este caso trata de ilustrar un espectro de RMN como un solapamiento, lo más perfecto posible, de curvas de Lorenz (o de una suma de curvas de Lorenz y Gauss). El objetivo deseado en la presente memoria es, preferentemente, ubicar un valor integral definido y un valor de posición correspondiente a cada grupo activo de RMN individual tras la separación de las líneas. Es decir, preferentemente, cada línea del espectro de RMN se separa del resto del espectro de RMN.

Posteriormente, sobre la base en cada caso de al menos dos valores del espectro de RMN, se calcula una multitud de valores de relación integral. Preferentemente, se parte cada valor integral individual del espectro de RMN frente a cualquier otro valor integral del espectro de RMN. Cada valor de relación integral en este caso especifica la relación de valores integrales de los valores espectrales subyacentes. Cuando, por ejemplo, se obtienen 20 valores espectrales con 20 valores integrales por medio de la separación de líneas y posteriormente, en cada caso, se parten exactamente dos valores integrales uno frente a otro para formar un valor de relación integral, se obtienen valores de relación integral de  $20 \times 20 = 400$ . 20 de estos valores de relación integral tienen un valor de 1 (división de los mismos valores integrales unos entre otros) y preferentemente no se tienen más en cuenta como valores de relación integral debido a que no contienen información relevante.

Además, se calcula una multitud de valores de distancia procedentes en cada caso de al menos dos valores de posición del espectro de RMN. Preferentemente, también en este caso, tiene lugar la partición de cada valor de posición individual del espectro de RMN frente a cualquier otro valor de posición del espectro de RMN. Cada valor de distancia en este caso refleja la distancia espectral entre los valores espectrales subyacentes. Cuando, de acuerdo con el ejemplo anterior, se obtienen 20 valores espectrales y por consiguiente también 20 valores de posición y, se separan en cada caso exactamente dos valores de posición uno frente a otro, entonces se obtienen valores de distancia de  $20 \times 20 = 400$ . 20 de estos valores de distancia tienen un valor de 1 (división de los mismos valores de posición uno entre otro) y preferentemente no se tienen más en cuenta como valores de distancia porque no contienen información relevante.

Los valores de distancia se calculan como diferencias directas de los valores de posición, como diferencias normalizadas de los valores de posición o en forma de cociente de los valores de posición. Teniendo en cuenta los valores de posición absolutos, uno puede funcionar con las diferencias directas de las frecuencias de resonancia ( $\nu_a = T + \Delta\nu_a$ ). T en este caso se refiere a la frecuencia del portador (también denominada como frecuencia de operación o frecuencia de resonancia de protón) del espectrómetro de RMN usado.  $\Delta\nu_a$  se refiere a la parte de frecuencia natural de la señal respectiva que pertenece a la sustancia A.

De manera alternativa, resulta recomendable el uso de diferencias normalizadas de frecuencias de resonancia para calcular los valores de distancia, en el que los valores de posición no se expresan más en Hz sino en ppm. Finalmente, también es posible la determinación inequívoca de la distancia de los dos picos o líneas entre sí, por medio de la formación de un cociente. Una ubicación inequívoca de la distancia por medio de relación resulta posible en este caso, ya que la frecuencia del portador es mucho mayor que las partes de frecuencia natural de las señales individuales ( $T \gg \Delta\nu$ ).

El valor de distancia es una medida de la distancia que existen entre las líneas individuales del espectro de RMN unas con respecto a otras. Cuando la distancia es pequeña, las líneas se encuentran cerca unas de otras. Cuando la distancia es grande, las líneas se separan. El valor de distancia puede proporcionarse en diversas unidades tales como, por ejemplo, Hz o ppm.

En el método reivindicado, ahora tiene lugar una comparación de los valores de relación integral calculados del espectro de RMN con los valores de relación integral correspondiente de un espectro de RMN de referencia. El espectro de RMN de referencia en este caso es un espectro de RMN de al menos una sustancia de referencia. Para el cálculo de los valores de relación integrales del espectro de RMN de referencia, se procede preferentemente de forma análoga al cálculo de los valores de relación integrales del espectro de RMN examinado. Es decir, en primer lugar, se lleva a cabo, en particular, una separación de líneas para obtener valores integrales de múltiples, preferentemente de la totalidad, de los valores espectrales.

Tras comparar los valores de relación integral, tiene lugar una selección de un primer subgrupo apropiado a partir de los valores de relación integral del espectro de RMN. El primer subgrupo en este caso comprende aquellos valores de relación integral que corresponden a un valor de relación integral del espectro de RMN de referencia dentro de los primeros límites de tolerancia que se pueden proporcionar en cada caso. Tanto si existen una correspondencia como si no, básicamente depende del caso individual respectivo, en el que se han tenido en cuenta factores tales como, por ejemplo, el número de líneas del espectro de RMN considerado, su distancia de separación de unas con respecto a otras, y el valor absoluto de los valores de relación integral considerados. Es decir, la calidad de los datos que se comparan unos con otros es una de los factores decisivos en cuanto a si existe correspondencia o no. Con datos de elevada calidad a comparar (poas interferencias, errores de medición pequeños, una buena relación de señal con respecto a ruido, se pueden separar bien las líneas unas de otras, relaciones integrales significativas, etc.) los límites de tolerancia se ajustan para que sean menores que los datos de menor calidad. Preferentemente, los límites de tolerancia o los errores aún permisibles se escogen de tal forma que no se excluyan candidatos correctos por error. Es decir, se deben evitar los resultados de falso negativo.

Por ejemplo, cuando todas las relaciones integrales con la excepción de un valor de relación integral de un espectro de RMN de referencia se encuentran dentro del intervalo de aproximadamente 1 y el único valor de relación integral restante se encuentra dentro del intervalo de 10, puede existir una correspondencia cuando en el espectro de RMN de la muestra, asimismo, todos los valores de relación integral menos un valor de relación integral se encuentran dentro del intervalo de 1 (y no tienen desviaciones relevantes a partir de los valores de relación integral del espectro de RMN de referencia) y el valor integral restante es de 20. Por otra parte, dicha desviación de un 100 % no se puede clasificar más como correspondencia en otros grupos de casos con menos valores de relación integral significativos.

En otras palabras, la decisión de si existe o no correspondencia, tiene lugar con ayuda de los criterios individuales. Preferentemente, estos criterios vienen determinados de acuerdo con si una sustancia conocida de un espectro de RMN se identifica actualmente como esta sustancia, cuando tiene lugar una comparación del espectro de RMN de una muestra que contiene esta sustancia con un espectro de RMN de referencia de esta sustancia.

Preferentemente, se continua con la suposición de que existe una correspondencia cuando el valor de relación integral del espectro de RMN se desvía de un valor de relación integral del espectro de RMN de referencia en un 100 % o menos, en particular un 50 % o menos, en particular un 40 % o menos, en particular un 30 % o menos, en particular un 20 % o menos, en particular un 15 % o menos, en particular un 10 % o menos, en particular un 5 % o menos, en particular un 4 % o menos, en particular un 3 % o menos, en particular un 2 % o menos, en particular un 1 % o menos y muy particularmente un 0,5 % o menos. Se puede tomar una desviación particular respectiva de un valor de relación integral correspondiente del espectro de referencia de RMN en el presente caso como base para el valor de relación integral del espectro de RMN objeto de comparación. Idealmente, existe una correspondencia en el caso cuando el valor de relación integral del espectro de RMN es idéntico al valor de relación integral del espectro de RMN de referencia. En el alcance de las respectivas precisiones de medición, sin embargo, normalmente al menos se tienen que tomar en cuenta las tolerancias previamente mencionadas.

En el alcance del método reivindicado, también tiene lugar una comparación de los valores de distancia del espectro de RMN con los valores de distancia correspondientes del espectro de RMN de referencia. Los valores de distancia del espectro de RMN de referencia se calcula preferentemente de la misma manera que los valores de distancia del espectro de RMN de la muestra examinada.

La comparación de los valores de distancia sirve para escoger un segundo sub-grupo apropiado a partir de los valores de distancia del espectro de RMN. El segundo sub-grupo en este caso comprende aquellos valores de distancia que corresponden a un valor de distancia del espectro de RMN de referencia dentro de los segundos límites de tolerancia que se pueden proporcionar en cada caso. Preferentemente, se procede con la suposición de que existe una correspondencia en este caso bajo los mismos pre-requisitos que se explicó con referencia a la comparación de los valores de relación integral. Expresado en errores relativos, a continuación se transcurre preferentemente sobre la base de la suposición de que existe una correspondencia cuando la desviación entre el valor de distancia del espectro de RMN y un valor de distancia del espectro de RMN de referencia es de 100 % o menos, en particular un 50 % o menos, en particular un 40 % o menos, en particular un 30 % o menos, en particular un 20 % o menos, en particular un 15 % o menos, en particular un 10 % o menos, en particular un 5 % o menos, en particular un 4 % o menos, en particular un 3 % o menos, en particular un 2 % o menos, en particular un 1 % o menos y muy particularmente un 0,5 % o menos. En este caso también, se puede tomar una desviación particular respectiva a partir de un valor de distancia correspondiente del espectro de RMN de referencia como base para cada

valor de distancia del espectro de RMN objeto de comparación. Preferentemente, existe una correspondencia entre los valores de distancia en el caso de que un valor de distancia del espectro de RMN sea idéntico al valor de distancia del espectro de RMN de referencia. Pero en este caso también, en el alcance de la precisión de medición normalmente al menos se tienen que tener en cuenta las tolerancias anteriormente mencionadas.

5 Cuando se forman el primer sub-grupo y el segundo sub-grupo, se comparan uno con el otro. Posteriormente, todos los valores de relación integral y los valores de distancia se escogen entre ambos sub-grupos que están basados en los mismos valores espectrales. Esta selección representa un tercer sub-grupo apropiado.

10 Como un ejemplo, para una explicación más detallada se asume el siguiente caso: El primer sub-grupo contiene un primer valor de relación integral formado a partir de los valores integrales de un primer y segundo valor espectral. El primer sub-grupo, además, contiene un segundo valor de relación integral a partir de los valores integrales de un tercer y un cuarto valor espectral. El segundo sub-grupo contiene un primer valor de distancia formado a partir del primer valor espectral y el segundo valor espectral. El segundo sub-grupo, además, contiene un segundo valor de distancia formado a partir de un quinto valor espectral y un sexto valor espectral. Entonces, el primer valor de relación integral y el primer valor de distancia se formarían a partir de los mismos valores espectrales, mientras que el segundo valor de distancia se formaría a partir de los valores espectrales a partir de los cuales no se formaría valor de relación integral alguno en el primer sub-grupo. En el presente ejemplo, el tercer sub-grupo consiste, de este modo, en el primer valor de relación integral o el primer valor de distancia. El segundo valor de relación integral y el segundo valor de distancia, sin embargo, no estarían presentes en el tercer sub-grupo. El tercer sub-grupo, de este modo, representa una intersección entre el primer sub-grupo y el segundo sub-grupo.

Finalmente, se determina un criterio de calidad de los valores contenidos en el tercer sub-grupo, resultando dicho criterio de una comparación de estos valores con los valores de relación integral y/o con los valores de distancia del espectro de RMN de referencia. Con ayuda del presente criterio de calidad, se puede tomar una decisión a continuación sobre si se identifica la sustancia contenida en la muestra como sustancia de referencia o no.

25 El criterio de calidad puede comprender, por ejemplo, o ser una medida de la desviación de los valores de relación integral del espectro de RMN a partir de los valores de relación integral del espectro de RMN de referencia y/o para la desviación de los valores de distancia del espectro de RMN a partir de los valores de distancia del espectro de RMN de referencia.

Las etapas anteriormente explicadas de comparación de los valores de relación integral, escogiendo un primer sub-grupo, comparando los valores de distancia, escogiendo un segundo sub-grupo, comparando el primer sub-grupo con el segundo sub-grupo y decidiendo si la sustancia presente en la muestra se identifica como sustancia de referencia, se repiten con frecuencia hasta que se hayan identificado de forma inequívoca todas las sustancias presentes en la muestra, con ayuda de las sustancias de referencia o alguna más que ya no estén presentes en el espectro de RMN de referencia. En este caso, en cada etapa de la repetición, se usa otro espectro de RMN de referencia de otra sustancia de referencia para los fines comparativos respectivos. De esta manera, es posible ubicar las diversas sustancias presentes en la muestra para diferentes sustancias de referencia por medio de un método iterativo correspondiente. El único pre-requisito para esto es que ya existen espectros de RMN de referencia para las sustancias de referencia individuales. Los espectros de RMN de referencia se pueden generar por medio de medición, por medio de simulación o por medio de otros métodos. Estos espectros de RMN de referencia se almacenan preferentemente en una base de datos.

45 En una realización adicional el criterio de calidad puede comprender o ser el número de valores presentes en el tercer sub-grupo en comparación con el número de valores de relación integral o los valores de distancia del espectro de RMN de referencia. Cuando, para calcular los valores de relación integral y los valores de distancia, en cada caso se usa el mismo número de valores espectrales, el número de valores de relación integral y el número de valores de distancia son idénticos. Cuando el cálculo de los valores de relación integral, por ejemplo, se basa, en cada caso, exactamente en dos valores espectrales o en los valores integrales ubicados para estos valores espectrales, se obtienen los valores integrales  $n^2$  cuando hay  $n$  valores espectrales. De estos  $n^2$  valores de relación integral,  $n$  valores de relación integral tienen exactamente un valor de 1 (división de dos valores integrales idénticos uno entre otro). Preferentemente, estos valores de relación, como también los valores de distancia correspondientes, no se tienen en cuenta cuando se determina el número de valores de relación integral o valores de distancia. Esta regla aplica tanto al espectro de RMN considerado de la muestra analizada como al espectro de RMN de referencia.

60 Cuando el número de valores presentes en el tercer sub-grupo es idéntico al número de valores de relación integral o valores de distancia del espectro de RMN de referencia o cuando los supera en al menos un valor umbral inferior que puede ser pre-determinado, la sustancia presente en la muestra puede, en una realización, identificarse como la sustancia de referencia. Cuando, sin embargo, los valores presentes en el tercer sub-grupo son significativamente menores que los valores de relación integral o los valores de distancia comprendidos en el espectro de RMN de referencia, puede suceder que la sustancia presente en la muestra, en una realización, no se identifique como la sustancia de referencia. Dependiendo del número de valores presentes en el tercer sub-grupo, sin embargo, por ejemplo se puede hacer la afirmación de que la sustancia presente en la muestra no es al menos la sustancia de referencia. Con el fin de poder identificar de forma inequívoca la sustancia presente en la muestra en tal caso, se

deberían llevar a cabo algunas de las etapas anteriormente mencionadas del método, de nuevo preferentemente con un espectro de RMN de referencia.

5 Con el fin de no distorsionar el valor informativo del número de los valores de relación integral o los valores de distancia del espectro de RMN, se deberían calcular los valores de relación integral y los valores de distancia del espectro de RMN de referencia en cada caso, a partir del mismo número de valores espectrales (por ejemplo, en cada caso exactamente dos valores espectrales) como los valores de relación integral y los valores de distancias del espectro de RMN de la muestra examinada.

10 El criterio de calidad puede preferentemente tener en cuenta diversos parámetros. De este modo, se concibe que, cuando existe pequeña correspondencia entre el número de valores del tercer sub-grupo y el número de valores de relación integral o de los valores de distancia del espectro de RMN de referencia, tiene lugar una identificación de sustancia no obstante cuando, al mismo tiempo, únicamente se ha adivinado una pequeña desviación entre los valores de relación integral comparada y/o los valores de distancia. Por la misma prueba, se pueden compensar desviaciones más grandes de los valores comparados de relación integral y/o los valores de distancia cuando existe una correspondencia más elevada entre el número de valores del tercer sub-grupo y el número de valores de relación integral o los valores de distancia del espectro de RMN de referencia. La calidad de los valores del tercer sub-grupo puede tener en cuenta, de este modo, los aspectos cualitativos y cuantitativos de los valores.

15 El presente método se basa en la medición de las propiedades de una molécula que son independientes unas de otras con el mismo método de medición. En el presente documento, por una parte, es el número de grupos moleculares y sus relaciones de protón en toda la molécula para el cual se puede ubicar una señal de RMN. Esta propiedad se expresa por medio del valor integral. Por otra parte, en este caso es el blindaje magnético de los grupos moleculares individuales en toda la molécula. Esta propiedad se expresa por medio del valor de posición de cada valor espectral.

20 Lo que es especial con respecto al presente método es que se puede llevar a cabo de forma independiente de las respectivas condiciones de medición. Es decir, por el contrario los parámetros más críticos tales como por ejemplo el valor de pH, la temperatura, la concentración de sal o la intensidad de campo magnético, bajo los cuales se lleva a cabo la medición de RMN, prácticamente ya no tienen importancia para la evaluación y se pueden procesar de forma automática. También es posible que el espectro de RMN de referencia se haya registrado con otros parámetros del espectro de RMN de la muestra que contiene la sustancia a identificar. Esto garantiza una aplicabilidad global del presente método independiente de los instrumentos individuales. Aplicando el presente método reivindicado, de este modo, puede tener lugar una identificación inequívoca de una sustancia en una muestra por medio de espectroscopia de RMN, por medio de una base de datos, configurada una vez, con los espectros de RMN de referencia de las sustancias de referencia.

25 De manera alternativa, también se puede identificar una sustancia por medio de su estructura molecular basándose en las evidencias teóricas en tanto que se hayan identificado los grupos moleculares individuales de esta sustancia por medio del presente método.

30 No se requiere la intervención del usuario en el método en el presente caso. En su lugar, el método se puede llevar a cabo de forma completamente automática, de manera que es posible la identificación automática o automatizada de sustancia, incluso en mezclas complejas de sustancias.

35 Aunque el espectro de RMN de referencia puede ser un espectro de diferentes sustancias, en una realización preferida del método del espectro de RMN de referencia es un espectro de exactamente una sustancia de referencia individual.

40 En una variante de la sustancia presente en la muestra, se identifica posteriormente como la sustancia de referencia, cuando al menos un 60 % de los valores de relación integral o de los valores de distancia del espectro de RMN de referencia están presentes en el tercer sub-grupo. En realizaciones preferidas adicionales se escoge un valor de un 70 %, en particular un 75 %, en particular un 80 %, en particular un 85 %, en particular un 90 %, en particular un 95 % y muy particularmente un 99 %, como valor umbral inferior para la identificación inequívoca de la sustancia como sustancia de referencia. En una realización preferida adicional del método, se identifica de forma inequívoca que la sustancia no es la sustancia de referencia cuando menos de un 40 %, en particular menos de un 30 %, en particular menos de un 20 %, en particular menos de un 10 % y muy particularmente menos de un 5 % de los valores de relación integral o de los valores de distancia del espectro de RMN de referencia están presentes en el tercer sub-grupo. Tal y como se ha explicado anteriormente, los límites anteriormente mencionados se pueden superar por arriba o por abajo en tanto que, cuando se acuda a criterio de calidad, se tiene en cuenta información adicional sobre los valores del tercer sub-grupo.

45 Las etapas individuales anteriormente mencionadas del método, en este caso, no necesariamente tienen que llevarse a cabo en la secuencia previamente explicada. En su lugar, por ejemplo, la comparación de las relaciones integrales y la selección del primer subgrupo podrían tener lugar de forma directa tras la determinación de la multitud de valores de relación integral. Igualmente, por ejemplo, la comparación de los valores de distancia y la selección de

un segundo sub-grupo podría tener lugar directamente tras la determinación de la multitud de valores de distancia. Para una persona experta en la técnica, no hace falta mencionar que la etapa de comparación del primer sub-grupo con el segundo sub-grupo se puede llevar a cabo únicamente cuando se hayan formado el primer sub-grupo y el segundo sub-grupo.

5 Los valores de distancia se pueden determinar básicamente por medio de cualquier método apropiado que permita caracterizar las propiedades de resonancia de los valores espectrales considerados.

10 En una variante las relaciones integrales se forman, en cada caso, a partir de exactamente dos valores integrales del espectro de RMN. Alternativamente, o de forma complementaria a esto, preferentemente los valores de distancia también se calculan en cada caso a partir de exactamente dos valores de posición del espectro de RMN. Cuando existen  $n$  diferentes líneas de una sustancia A, existen  $(n^2-n)/2$  relaciones integrales relevantes, en cada caso, entre dos líneas y exactamente tantos valores de distancia relevantes, en cada caso, entre las dos líneas. Basándose en  $n^2$  relaciones integrales o valores de distancia, preferentemente se restan  $n$  valores integrales que tienen un valor de  
15 1, de acuerdo con las consideraciones explicadas con anterioridad. La división siguiente del grupo restante de valores se divide entre 2, ya que la mitad de los respectivos valores corresponde al valor recíproco de la otra mitad de valores. En consecuencia, el número de valores de relación integral relevante o valores de distancia es únicamente menos de la mitad de la totalidad de los valores de relación integral o valores de distancia. También puede hacerse referencia a los valores de distancia como distancias de pico o distancias de línea.

20 El uso de exactamente dos valores integrales o de exactamente dos valores de posición para determinar los correspondientes valores de relación integral o valores de distancia tiene la ventaja de que, en cada caso, la información presente en los valores de relación integral y los valores de distancia no es demasiado compleja, sino que puede atribuirse a los valores espectrales subyacentes de manera comparativamente simple. Esto facilita la ejecución del método.

25 En una variante adicional, la sustancia presente en la muestra no se identifica solo cualitativamente como sustancia específica, sino que también se cuantifica. Es decir, en la presente variante, se detecta la concentración de la sustancia presente en la muestra. Con el fin de permitir dicha cuantificación, se debe haber identificado la primera sustancia de forma cualitativa. Cuando esto tiene lugar, también se conoce que se puede usar el espectro de RMN de referencia para cuantificar la sustancia presente en la muestra. Ahora, por ejemplo, se puede comparar un valor integral del espectro de RMN con un valor integral correspondiente del mismo valor espectral del espectro de RMN de referencia. En tanto que se conoce la concentración de la sustancia subyacente del espectro de RMN de referencia, se puede determinar de esta forma la concentración de la sustancia en la muestra. Para el caso en el que  
30 se conoce la concentración de protones para un valor integral, entonces se pueden convertir otros valores integrales en las concentraciones de protones a partir de ésta. Cuando un grupo molecular se ubica en un valor integral o en el correspondiente valor espectral, se puede calcular su concentración a partir de éste.

35 Con el fin de mejorar la precisión de medición, puede resultar recomendable en este caso comparar no solo un valor integral individual del espectro de RMN con un valor integral individual correspondiente del espectro de RMN de referencia, sino también comparar todos los valores integrales del espectro de RMN característico de la sustancia respectiva considerada con los valores integrales correspondientes del espectro de RMN de referencia. Idealmente, se debería detectar la misma concentración de la sustancia respectiva considerada a partir de todos los valores espectrales o los valores integrales correspondientes de los valores espectrales del espectro de RMN. Actualmente,  
40 sin embargo, debido a la precisión de medición, se pueden detectar pequeñas desviaciones entre las concentraciones determinadas, basándose en valores integrales diferentes, de manera que dichas desviaciones se pueden ilustrar según una distribución de frecuencia con distribución normal.

45 Con el fin de poder llevar a cabo los métodos de evaluación convencionales de acuerdo con la técnica anterior de la manera más simple posible, normalmente se trabaja con espectros de RMN desacoplados. El presente método también se puede llevar a cabo sobre la base de los espectros de RMN desacoplados. Esto, sin embargo, no es necesario. En su lugar, también se puede usar un espectro de RMN no desacoplado con el fin de poder llevar a cabo una identificación de sustancia de acuerdo con el presente método. En una variante preferida, el método se lleva a cabo en primer lugar mediante el uso de un espectro de RMN desacoplado. Si, de esta forma, aún no fuera posible  
50 la identificación inequívoca de las sustancias presentes en la muestra, el método se lleva a cabo posteriormente de nuevo mediante el uso de un espectro de RMN no desacoplado de la misma muestra. Aunque los espectros de RMN no desacoplados son más complejos y, además, son más difíciles de evaluar de acuerdo con los métodos tradicionales, ha de tenerse en cuenta que contienen más información que los espectros de RMN desacoplados. Esta información adicional puede, de manera preferida, utilizarse en el presente método para llevar a cabo de forma segura y exitosa una identificación de sustancia, incluso en los casos más difíciles. Preferentemente, cuando se analiza un espectro de RMN desacoplado también se emplea un espectro de RMN de referencia desacoplado. Preferentemente, cuando se analiza un espectro de RMN no desacoplado también se emplea un espectro de RMN de referencia no desacoplado.

60 El objetivo subyacente de la presente invención también se logra por medio de un producto de programa informático que comprende instrucciones para llevar a cabo las etapas de un método de acuerdo con las explicaciones previas,

cuando se ejecuta el producto de programa informático. Dicho producto de programa informático (o software) representa la solución técnica al problema, hasta ahora no resuelto, de la identificación automática de las diferentes sustancias presentes en una muestra como sustancias específicas sobre la base de un espectro de RMN. Como, para ejecutar este software, no se requiere disponer de bases de datos amplias disponibles con espectros de RMN que se hayan registrado en diversas condiciones, se reduce de forma considerable el esfuerzo computacional cuando se usa el software correspondiente. De manera muy ventajosa se pueden ahorrar recursos, tiempo y dinero usando una identificación de sustancia correspondiente. Adicionalmente, de esta manera, es posible la identificación automática de una sustancia para los espectros de RMN, medidos en diversas condiciones y sobre diversos instrumentos.

La presente invención ahora se explica de forma adicional con ayuda de los dibujos y los ejemplos. En las figuras:

la Figura 1 muestra un espectro de RMN de una sustancia A;

la Figura muestra una ilustración gráfica de dos líneas de un espectro de RMN para ilustrar el cálculo de los valores de distancia;

la Figura muestra una comparación de un espectro de RMN de una muestra con el espectro de RMN de la sustancia A de la Figura 1;

la Figura 4A muestra un espectro de RMN de una muestra compuesta B1 sin adenosina;

la Figura 4B muestra un espectro de RMN de una muestra compuesta B1 con adenosina y

la Figura 5 muestra una ilustración gráfica de la distribución de frecuencias de la concentración de adenosina, detectada sobre la base del espectro de RMN de la Figura 4B.

La explicación posterior de las figuras debe comprenderse como realización a modo de ejemplo del método presentemente especificado, en el que las etapas individuales del método se abordan con más detalles que otras.

La Figura 1 muestra un espectro de RMN de una sustancia A que sirve como sustancia de referencia. El espectro muestra la intensidad, representada frente al desplazamiento químico (medido en ppm), de las señales individuales. El espectro de la Figura 1 tiene cinco líneas o picos P1, P2, P3, P4 y P5. Cada pico individual de estos picos es característico de un grupo molecular en toda la molécula de la sustancia A. Dado que los picos individuales del espectro de RMN de la Figura 1 están bien separados unos de otros, no se requiere llevar a cabo una especial separación de líneas. En su lugar, se pueden deducir directamente los valores espectrales de los picos individuales a partir del espectro de RMN. Cada valor espectral consiste en un valor integral, que especifica el área bajo los picos individuales, y un valor de posición, que especifica el desplazamiento químico del pico respectivo considerado. La tabla 1 siguiente lista los valores integrales individuales y los valores de posición de los cinco valores espectrales presentes en el espectro de RMN de la sustancia A.

Tabla 1: Valores integrales y valores de posición de los picos individuales presentes en el espectro de RMN de la sustancia A

Pico	Posición	Integral	Anchura
P1	0,151	0,826	0,0010
P2	0,200	1,019	0,0011
P3	0,251	1,249	0,0009
P4	0,362	1,178	0,0009
P5	0,481	0,789	0,0012

Como ya se ha explicado, cuando existen  $n$  picos diferentes de una sustancia A existen  $(n^2 - n)/2$  relaciones integrales relevantes y distancias de pico o valores de distancia. Los valores de distancia se pueden calcular bien (i) como diferencias directas de frecuencias de resonancia o (ii) como diferencias normalizadas de frecuencias de resonancia o (iii) como relaciones - mediante el uso de frecuencias de resonancia escritas en relación con la frecuencia del portador -, dependiendo de qué escala se use.

La Figura 2 ilustra los diversos métodos de cálculo para determinar los valores de distancia entre los valores de posición de los picos individuales de un espectro de RMN. Aunque el eje 1 especifica un escalado en Hertz (Hz), el eje 2 muestra un escalado en ppm. Sobre la base del escalado en Hertz, se pueden formar diferencias directas de las frecuencias de resonancia individuales o cocientes de las frecuencias de resonancia. Sobre la base de la escala de ppm, se pueden detectar las diferencias normalizadas de las frecuencias de resonancia.

Las tres posibilidades de cálculo de los valores de distancia se ilustran posteriormente de nuevo por medio de las siguientes fórmulas:

(i) diferencias directas (eje 1):  $(T + \Delta v_b) - (T + \Delta v_a) = \Delta v_b - \Delta v_a = v_b - v_a$  [Hz]

(ii) diferencias normalizadas (eje 2):  $\left(\frac{v_b - v_{TSF}}{T}\right) - \left(\frac{v_a - v_{TSF}}{T}\right) = \frac{v_b - v_a}{T}$  [ppm]

(iii) distancia como cociente (eje 1):  $\frac{v_b}{v_a} = \frac{T + \Delta v_b}{T + \Delta v_a}$  ( $T \gg \Delta v_{a,b}$ )

5 Ahora, sobre la base de la tabla 1 se forman primero todas las relaciones integrales posibles, en cada caso, a partir de dos valores integrales. Es decir, cada valor integral está dividido entre cualquier otro valor integral. La base de cálculo correspondiente, así como los resultados concretos para los valores integrales de la tabla 1, se ilustran en la tabla 2 siguiente.

10 Tabla 2: Base de cálculo de los valores de relación integral a partir de los valores integrales y los resultados correspondientes para los valores integrales de la tabla 1.

Integral	I1	I2	I3	I4	I5			
<b>I1</b>	11/11	11/12	11/13	11/14	11/15			
<b>I2</b>	12/11	12/12	12/13	12/14	12/15			
<b>I3</b>	13/11	13/12	13/13	13/14	13/15			
<b>I4</b>	14/11	14/12	14/13	14/14	14/15			
<b>I5</b>	15/11	15/12	15/13	15/14	15/15			
			<b>Integral</b>	<b>0,83</b>	<b>1,02</b>	<b>1,25</b>	<b>1,18</b>	<b>0,79</b>
			<b>0,83</b>	1,00	0,81	0,66	0,70	1,05
			<b>1,02</b>	1,23	1,00	0,82	0,87	1,29
=			<b>1,25</b>	1,51	1,23	1,00	1,06	1,58
			<b>1,18</b>	1,43	1,16	0,94	1,00	1,49

15 Ahora, basándose en los valores de posición de la tabla 1, se calculan las correspondientes distancias, en cada caso, de dos picos, como distancias de pico o valores de distancia. Esto se ilustran posteriormente como ejemplo de acuerdo con la segunda variante (valores de distancia como diferencias normalizadas de frecuencias de resonancia) explicadas con anterioridad.

20 Tabla 3: Base de cálculo de los valores de distancia como diferencia normalizada de las frecuencias de resonancia y resultados para los valores de posición de la tabla 1.

ppm	δ1	δ2	δ3	δ4	δ5		
<b>δ1</b>	δ1-δ1	δ1-δ2	δ1-δ3	δ1-δ4	δ1-δ5		
<b>δ2</b>	δ2-δ1	δ2-δ2	δ2-δ3	δ2-δ4	δ2-δ5		
<b>δ3</b>	δ3-δ1	δ3-δ2	δ3-δ3	δ3-δ4	δ3-δ5		
<b>δ4</b>	δ4-δ1	δ4-δ2	δ4-δ3	δ4-δ4	δ4-δ5		
<b>δ5</b>	δ5-δ1	δ5-δ2	δ5-δ3	δ5-δ4	δ5-δ5		
		<b>ppm</b>	<b>0,15</b>	<b>0,20</b>	<b>0,25</b>	<b>0,36</b>	<b>0,48</b>
		<b>0,15</b>	0,00	-0,05	-0,10	-0,21	-0,33
		<b>0,20</b>	0,05	0,00	-0,05	-0,16	-0,28
=		<b>0,25</b>	0,10	0,05	0,00	-0,11	-0,23
		<b>0,36</b>	0,21	0,16	0,11	0,00	-0,12

25 De manera alternativa, en lugar de las diferencias normalizadas de frecuencias de resonancia, también se pueden emplear los cocientes de las frecuencias de resonancia individuales para calcular la distancia, en cada caso, de los dos picos. La base de cálculo para esto así como también los resultados correspondientes para los valores de posición de la tabla 1 se ilustran en la tabla siguiente 4.



La Figura 3 muestra el espectro de RMN de la sustancia A, ya ilustrada en la Figura 1, un espectro de RMN de referencia (curva superior, línea de puntos) así como también un espectro de RMN de una muestra, referida como espectro de ensayo, conteniendo dicha muestra una sustancia a identificar (curva inferior, línea sólida). De acuerdo con los métodos de evaluación manuales conocidos a partir de la técnica anterior, se buscarían los picos presentes en el espectro de referencia de RMN de una sustancia A en el espectro de RMN de la muestra con la sustancia a identificar por medio de comparación visual. En el presente caso, esto sería todavía posible debido a la complejidad comparativamente baja del espectro de RMN de la muestra.

Sin embargo, el presente método, ilustrado a modo de ejemplo, toma un enfoque diferente. La ubicación de los picos presentes en el espectro de RMN de la muestra con respecto a los picos correspondientes del espectro de RMN de referencia de la sustancia A, no tiene lugar por medio de ajuste de un patrón. En su lugar, se comparan los valores de relación integral y los valores de distancia de las matrices ilustradas en las tablas 2 a 4, unos con otros. Con este fin, ahora se calculan los valores de relación integral para todas las posibles relaciones integrales, en cada caso, a partir de dos valores integrales del espectro de RMN de la muestra. Adicionalmente, se calculan todos los valores de distancia, en cada caso, de los dos picos, sobre la base de los valores de posición correspondientes para el espectro de RMN de la muestra. Esto tiene lugar de la manera ya ilustrada anteriormente para el espectro de RMN de referencia de la sustancia A.

Posteriormente, se comparan los valores de relación integral del espectro de RMN de la muestra con los valores de relación integral del espectro de RMN de referencia. De la misma manera, se comparan los valores de distancia del espectro de RMN de la muestra con los valores de distancia del espectro de RMN de referencia.

La tabla 5 posterior muestra los valores de relación integral del espectro de RMN de la muestra calculados de manera tal que, se marcan aquellos valores de relación integral que corresponden a los valores de relación integral, del espectro de RMN de referencia.

Tabla 5: Valores de relación integral de los picos del espectro de RMN de la muestra con correspondencias marcadas con respecto a los valores de relación integral del espectro de RMN de referencia.

Pico		P1'	P2'	P3'	P4'	P5'	P6'	P7'	P8'	P9'	P10'	P11'	P12'	P13'	P14'	P15'
	Int.	<b>0,696</b>	<b>0,826</b>	<b>1,019</b>	<b>0,683</b>	<b>1,626</b>	<b>1,249</b>	<b>1,178</b>	<b>0,791</b>	<b>0,789</b>	<b>1,496</b>	<b>1,367</b>	<b>1,408</b>	<b>1,474</b>	<b>1,494</b>	<b>1,450</b>
P1'	<b>0,696</b>	1	0,843	0,683	1,019	0,428	0,557	0,591	0,880	0,883	0,466	0,509	0,494	0,472	0,466	0,480
P2'	<b>0,826</b>	1,186	1	0,810	1,209	0,508	0,661	0,701	1,044	1,047	0,552	0,604	0,586	0,560	0,553	0,570
P3'	<b>1,019</b>	1,464	1,234	1	1,492	0,627	0,816	0,865	1,289	1,292	0,682	0,746	0,724	0,692	0,683	0,703
P4'	<b>0,683</b>	0,981	0,827	0,670	1	0,420	0,547	0,580	0,864	0,866	0,457	0,500	0,485	0,464	0,457	0,471
P5'	<b>1,626</b>	2,335	1,969	1,595	2,380	1	1,302	1,380	2,055	2,061	1,087	1,189	1,154	1,103	1,089	1,121
P6'	<b>1,249</b>	1,794	1,512	1,225	1,828	0,768	1	1,060	1,579	1,583	0,835	0,914	0,887	0,848	0,836	0,862
P7'	<b>1,178</b>	1,692	1,426	1,155	1,724	0,725	0,943	1	1,489	1,493	0,788	0,862	0,836	0,799	0,789	0,813
P8'	<b>0,791</b>	1,136	0,958	0,776	1,158	0,487	0,633	0,672	1	1,003	0,529	0,579	0,562	0,537	0,530	0,546
P9'	<b>0,789</b>	1,133	0,995	0,774	1,155	0,485	0,632	0,670	0,997	1	0,527	0,577	0,560	0,535	0,528	0,544
P10'	<b>1,496</b>	2,148	1,811	1,467	2,189	0,920	1,197	1,270	1,891	1,896	1	1,094	1,062	1,015	0,001	1,032
P11'	<b>1,367</b>	1,963	1,655	1,341	2,001	0,841	1,094	1,160	1,728	1,733	0,914	1	0,971	0,927	0,915	0,943
P12'	<b>1,408</b>	2,023	1,705	1,382	2,061	0,866	1,128	1,196	1,780	1,785	0,942	1,030	1	0,956	0,943	0,972
P13'	<b>1,474</b>	2,117	1,784	1,446	2,157	0,907	1,180	1,251	1,863	1,868	0,985	1,078	1,046	1	0,987	1,017
P14'	<b>1,494</b>	2,145	1,808	1,465	2,186	0,919	1,196	1,268	1,888	1,893	0,999	1,093	1,060	1,013	1	1,030
P15'	<b>1,450</b>	2,082	1,755	1,422	2,122	0,892	1,161	1,231	1,833	1,838	0,969	1,061	1,029	0,984	0,971	1

A continuación, se asumió una correspondencia del valor de relación integral del espectro de RMN de la muestra con respecto a un valor de relación integral correspondiente del espectro de RMN de referencia, cuando los respectivos valores de relación integral difirieron uno de otro en menos de  $\pm 0,002$ . Los valores, marcados en la tabla 5 con una franja diagonal, representan un primer subgrupo de los valores de relación integral. Los valores no significativos que proceden de una división entre sí mismos se marcan con una franja horizontal en la presente tabla - como también en todas las tablas siguientes.

En la tabla 6 siguiente se ilustran todos los posibles valores de distancia, en cada caso, entre dos picos sobre la base de los correspondientes valores de estos picos del espectro de RMN de la muestra. Tal y como se ha explicado anteriormente, puede tener lugar calculando los valores de distancia sobre la base de las diferencias o cocientes. Se nuevo se marcan los valores de distancia del espectro de RMN de la muestra que corresponden a los valores de distancia del espectro de referencia de RMN de la sustancia A. Se procedió bajo la suposición de que existe una correspondencia en este caso cuando los valores de distancia del espectro de RMN de la muestra difirieron de los valores de distancia del espectro de RMN de referencia en menos de  $\pm 0,005$ .

Tabla 6: Valores de distancia, en cada caso, entre el espectro de RMN de la muestra con marcadas correspondencias con los valores de distancia del espectro de RMN de referencia.

Pico		P1'	P2'	P3'	P4'	P5'	P6'	P7'	P8'	P9'	P10'	P11'	P12'	P13'	P14'	P15'
	ppm	<b>0,063</b>	<b>0,151</b>	<b>0,200</b>	<b>0,210</b>	<b>0,224</b>	<b>0,251</b>	<b>0,362</b>	<b>0,389</b>	<b>0,481</b>	<b>0,518</b>	<b>0,712</b>	<b>0,884</b>	<b>0,957</b>	<b>1,011</b>	<b>1,082</b>
P1'	<b>0,063</b>	0	-0,088	-0,137	-0,147	-0,161	-0,188	-0,299	-0,326	-0,418	-0,455	-0,649	-0,821	-0,894	-0,948	-1,019
P2'	<b>0,151</b>	0,088	0	-0,050	-0,059	-0,073	-0,100	-0,211	-0,238	-0,330	-0,367	-0,561	-0,734	-0,806	-0,860	-0,931

<b>P3'</b>	<b>0,200</b>	0,137	0,050	0	-0,009	-0,024	-0,051	-0,162	-0,189	-0,261	-0,318	-0,512	-0,684	-0,757	-0,811	-0,882
<b>P4'</b>	<b>0,210</b>	0,147	0,059	0,009	0	-0,014	-0,041	-0,152	-0,179	-0,271	-0,308	-0,502	-0,675	-0,747	-0,801	-0,872
<b>P5'</b>	<b>0,224</b>	0,161	0,073	0,024	0,014	0	-0,027	-0,138	-0,165	-0,257	-0,294	-0,488	-0,661	-0,733	-0,787	-0,858
<b>P6'</b>	<b>0,251</b>	0,188	0,100	0,051	0,041	0,027	0	-0,111	-0,138	-0,230	-0,267	-0,461	-0,634	-0,706	-0,760	-0,831
<b>P7'</b>	<b>0,362</b>	0,299	0,211	0,162	0,152	0,138	0,111	0	-0,027	-0,119	-0,156	-0,350	-0,523	-0,595	-0,649	-0,720
<b>P8'</b>	<b>0,389</b>	0,326	0,238	0,189	0,179	0,165	0,138	0,027	0	-0,092	-0,129	-0,323	-0,496	-0,568	-0,622	-0,693
<b>P9'</b>	<b>0,481</b>	0,418	0,330	0,281	0,271	0,257	0,230	0,119	0,092	0	-0,037	-0,231	-0,404	-0,476	-0,530	-0,601
<b>P10'</b>	<b>0,518</b>	0,455	0,367	0,318	0,308	0,294	0,267	0,156	0,129	0,037	0	-0,194	-0,367	-0,439	-0,493	-0,564
<b>P11'</b>	<b>0,712</b>	0,649	0,561	0,512	0,502	0,488	0,461	0,350	0,323	0,231	0,194	0	-0,173	-0,245	-0,299	-0,370
<b>P12'</b>	<b>0,884</b>	0,821	0,734	0,684	0,675	0,661	0,634	0,523	0,496	0,404	0,367	0,173	0	-0,073	-0,127	-0,198
<b>P13'</b>	<b>0,957</b>	0,894	0,806	0,757	0,747	0,733	0,706	0,595	0,568	0,476	0,439	0,245	0,073	0	-0,054	-0,125
<b>P14'</b>	<b>1,011</b>	0,948	0,860	0,811	0,801	0,787	0,760	0,649	0,622	0,530	0,493	0,299	0,127	0,054	0	-0,071
<b>P15'</b>	<b>1,082</b>	1,019	0,931	0,882	0,872	0,858	0,831	0,720	0,693	0,601	0,564	0,370	0,198	0,125	0,071	0

Los valores de distancia marcados con sombreado diagonal en la tabla 6 representan un segundo sub-grupo de valores.

- 5 Ahora, tras comparación de los valores de la tabla 5 con los valores de la tabla 6 y filtrando todos estos valores que se formaron a partir de los mismos valores espectrales y se marcan tanto en la tabla 5 como también en la tabla 6, se obtiene el resultado ilustrado en la tabla 7.

Tabla 7: Visualización de los valores del primer sub-grupo y el segundo sub-grupo formados a partir de los mismos valores espectrales.

10

Pico	P1'	P2'	P3'	P4'	P5'	P6'	P7'	P8'	P9'	P10'	P11'	P12'	P13'	P14'	P15'
P1'															
P2'															
P3'															
P4'															
P5'															
P6'															
P7'															
P8'															
P9'															
P10'															
P11'															
P12'															
P13'															
P14'															
P15'															

Los valores marcados con un sombreado diagonal en la tabla 7 representan la intersección entre el primer sub-grupo y el segundo sub-grupo y se puede hacer referencia a ellos como tercer sub-grupo. Cuando todas las columnas y filas que no están marcadas se borran de la tabla 7, se puede correlacionar directamente los picos individuales del espectro de RMN de la muestra con los picos individuales del espectro de RMN de referencia. Esta correlación o ubicación se ilustra en la tabla 8 posterior.

15

Tabla 8: Ubicación de los picos de la sustancia A y en el espectro de RMN de la muestra con respecto a los picos de sustancia A en el espectro de RMN de referencia.

Picos de la sustancia A en el espectro de referencia	Picos de la sustancia A en el espectro de ensayo
P1	P2'
P2	P3'
P3	P6'
P4	P7'
P5	P9'

20

En la presente realización a modo de ejemplo de un método para la identificación de sustancia, también se podría encontrar de nuevo, en el espectro de RMN de la muestra, el 100 % de los picos o valores espectrales de una sustancia A en el espectro de RMN de referencia. En consecuencia, puede tener lugar una identificación inequívoca de un componente de la muestra como sustancia A. En tanto que la composición adicional de la muestra se clarifique, ahora tiene lugar una ejecución adicional a través del método previamente especificado, en el que se podría usar otro espectro de RMN de referencia para comparación.

25

Aparte de la determinación cualitativa de la sustancia contenida en la muestra como sustancia A, además, es posible una afirmación cuantitativa sobre la concentración de la sustancia A presente en la muestra, sobre la base del espectro de RMN medido.

30

Aunque previamente se ubicó un pico procedente del espectro de RMN de la muestra  $P_j'$  para cada pico de la sustancia de referencia  $P_i$  ( $i = 1, 2, \dots, 5$ ), ahora, a partir de cada uno de estos picos ubicados, se puede calcular la concentración  $\Gamma_{P_j'}^A$  (en mg/ml) de sustancia A en el espectro de RMN de la muestra por medio de la siguiente ecuación, en la que  $\Gamma_{Ref}^A$  (en mg/ml) es la concentración de la sustancia A en el espectro de referencia (Ref):

$$\Gamma_{P_j'}^A [\text{mg/ml}] = \frac{I(P_i)}{I(P_j')} \cdot \Gamma_{Ref}^A [\text{mg/ml}]$$

La Figura 4A muestra un espectro de RMN de una muestra compuesta B1 formado por siete sustancias individuales. La muestra compuesta B1 en este caso no contiene adenosina. La Figura 4B muestra un espectro de RMN de la misma muestra B1 compuesta, sobre la cual, sin embargo, se ha añadido adenosina de 0,5 mg/ml de sustancia. Los picos que se van a atribuir a adenosina se ilustran en negro, mientras que los picos que se han de atribuir a las siete sustancias restantes se ilustran con una línea discontinua. En ambos espectros de RMN de la Figura 4, de nuevo se representa la intensidad frente al desplazamiento químico (medido en ppm).

En la muestra compuesta B1 los picos provocados por adenosina se identificaron por medio de un espectro de RMN de referencia de adenosina, llevando a cabo el método previamente especificado de identificación de sustancia. La concentración de adenosina en la muestra compuesta B1 se determinó posteriormente a partir de cada pico ubicado en la adenosina de sustancia. Para ello, se usó la fórmula previamente explicada, en la que se conoce la concentración de adenosina de la solución de adenosina usada para crear el espectro de RMN de referencia.

La Figura 5 muestra la distribución de frecuencia de la concentración de adenosina en la muestra compuesta B1 detectada de esta manera. Se aprecia que el valor medido de 0,5075 mg/ml que fue el más detectado, se desvió del valor fijado de 0,5 mg/l únicamente en un 1,5 %. Esto muestra que la identificación cuantitativa de sustancia con el método presentemente especificado es posible con una precisión muy elevada.

Con el fin de posibilitar la detección de la precisión no solo para adenosina, se determinaron todas las siete sustancias individuales de la muestra compuesta B1 con el método previamente especificado, en primer lugar cualitativa y después cuantitativamente. Los resultados de cuantificación correspondientes se ilustran en la tabla siguiente 9. El "valor fijado" de especificación en este caso hace referencia a la concentración de la respectiva sustancia actualmente presente en la muestra compuesta B1. Dicha concentración se detectó de forma exacta en la composición de la muestra compuesta B1 para, de este modo, posibilitar las afirmaciones respecto a la precisión del presente método de cuantificación.

Tabla 9: Resultados de cuantificación de todas las sustancias individuales presentes en la muestra compuesta B1 (sin adenosina)

Sustancia	Valor fijado [mg/ml]	Valor medido [mg/ml]	Desviación [%]
Adenosina	0	0,000	0,00
Leucina	0,186	0,195	4,84
Benzoato	0,084	0,084	0,00
Lactato	0,375	0,403	7,47
Uridina	0,153	0,15	1,96
Creatinina	0,542	0,575	6,09
Fenilalanina	0,896	0,91	1,56
Glucosa	0,893	0,852	4,59

Tabla 10: Los resultados de cuantificación de todas las sustancias individuales presentes en la muestra compuesta B1 (con adenosina).

Sustancia	Valor fijado [mg/ml]	Valor medido [mg/ml]	Desviación [%]
Adenosina	0,5	0,508	1,50
Leucina	0,186	0,195	4,84
Benzoato	0,084	0,084	0,00
Lactato	0,375	0,403	7,47
Uridina	0,153	0,15	1,96
Creatinina	0,542	0,575	6,09
Fenilalanina	0,896	0,91	1,56
Glucosa	0,893	0,52	4,59

Para posibilitar las amplias afirmaciones sobre la precisión del método de cuantificación presentemente especificado, se proporcionaron numerosas sustancias individuales en forma de soluciones con una concentración de 0,1 mg/ml cada una y se midieron por medio de espectroscopia de RMN. Posteriormente, tuvo lugar una comparación del espectro de RMN detectado de esta forma con el correspondiente espectro de RMN de referencia de las mismas sustancias de otra concentración. El valor medido detectado de esta forma se comparó posteriormente con el valor fijado para calcular el error de medición. Se aprecia en este caso que el error de medición se basa regularmente en

el intervalo de porcentaje de dígito individual inferior y siempre se encuentra considerablemente por debajo de un 10 %. Esto prueba la elevada precisión del método de cuantificación presentemente especificado.

Tabla 11: Resultados de cuantificación de las sustancias individuales.

Sustancia	Valor fijado [mg/ml]	Valor medido [mg/ml]	Incertidumbre [mg/ml]	Desviación [%]
Ácido acético	0,1	0,1089	0,001	8,90
Ácido fórmico	0,1	0,0977	0,001	2,30
Ácido propiónico	0,1	0,096	0,002	4,00
Ácido butírico	0,1	0,099	0,0005	1,00
Ácido isobutírico	0,1	0,109	0,0005	9,00
Ácido valérico	0,1	0,105	0,0015	5,00
Ácido isovalérico	0,1	0,091	0,0005	9,00
Ácido fenilacético	0,1	0,1043	0,0015	4,30
Ácido benzoico	0,1	0,103	0,0005	3,00
Etanol	0,1	0,096	0,001	4,00
Metanol	0,1	0,1033	0,001	3,30
Butanol	0,1	0,1	0,0025	0,00
Propanol	0,1	0,105	0,0025	5,00
2-Butanol	0,1	0,0985	0,0005	1,50
Glicerina	0,1	0,1035	0,0015	3,50
Acetona	0,1	0,0911	0,0009	8,90
Formaldehído	0,1	0,0991	0,001	0,90
Acetaldehído	0,1	0,108	0,001	8,00
Isopropanol	0,1	0,102	0,003	2,00
Ácido succínico	0,1	0,1	0,001	0,00
Ácido cítrico	0,09	0,0975	0,001	8,33
Glutamina	0,1	0,101	0,001	1,00
Alanina	0,1	0,105	0,0015	5,00
Valina	0,1	0,109	0,001	9,00
Glucosa	0,1	0,1033	0,0035	3,30
Acetilcisteína	0,1	0,099	0,006	1,00
Ácido 2-furoico	0,1	0,098	0,007	2,00
Ácido siríngico	0,1	0,1005	0,0005	0,50
4-hidroxibenzaldehído	0,1	0,0985	0,0005	1,50
Ácido 4-hidroxibenzoico	0,1	0,102	0,006	2,00
Ácido vanílico	0,1	0,098	0,001	2,00
Indol	0,1	0,1025	0,0025	2,50
2,6-dimetoxifenol	0,1	0,099	0,0005	1,00
Monometilamina	0,1	0,1006	0,001	0,60
Dimetilamina	0,1	0,103	0,001	3,00
Trimetilamina	0,1	0,0957	0,001	4,30
Ácido pirúvico	0,1	0,095	0,0005	5,00

5 A través de la combinación del método de cuantificación con el método de identificación previamente explicado, por tanto, es posible únicamente identificar de forma inequívoca sustancias individuales como sustancias específicas, pero también es posible hacer afirmaciones precisas sobre la concentración de estas sustancias en una muestra compuesta.

10 Las realizaciones a modo de ejemplo del método reivindicado, que se ilustran presentemente a modo de ejemplos, pueden variar, en el alcance de las explicaciones anteriores, de cualquier forma y no se comprenden como una restricción de la materia-objeto reivindicada.

## REIVINDICACIONES

1. Método para la identificación de una sustancia en una muestra, que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) proporcionar un espectro de RMN de la muestra que contiene al menos una sustancia que tiene al menos un núcleo activo de RMN,  
 b) convertir el espectro de RMN en valores espectrales discretos, en donde cada valor espectral tiene un valor integral, especificando la altura de la línea individual del espectro de RMN o la altura y/o el área de una sección espectral individual del espectro de RMN, de modo que cada sección espectral individual comprende una o  
 10 múltiples líneas del espectro de RMN, y un valor de posición, especificando la posición de la línea considerada o la posición media de la sección espectral considerada en el espectro de RMN,  
 c) determinar un multitud de valores de relación integral, en cada caso a partir de al menos dos valores integrales del espectro de RMN, en donde cada valor de relación integral especifica la relación de los valores integrales de los valores espectrales subyacentes,  
 15 d) determinar un multitud de valores de distancia, en cada caso a partir de al menos dos valores de posición de los valores espectrales subyacentes del espectro de RMN, en donde cada valor de distancia se calcula como una diferencia directa de los valores de posición, como una diferencia normalizada de los valores de posición o como un cociente de los valores de posición,  
 e) comparar los valores de relación integral del espectro de RMN con los valores de relación integral correspondientes de un espectro de RMN de referencia de al menos una sustancia de referencia,  
 20 f) seleccionar un primer sub-grupo apropiado de valores de relación integral del espectro de RMN, en donde el primer sub-grupo comprende aquellos valores de relación integral que corresponden a un valor de relación integral del espectro de RMN de referencia dentro de los primeros límites de tolerancia que se pueden proporcionar en cada caso,  
 25 g) comparar los valores de distancia del espectro de RMN con los correspondientes valores de distancia del espectro de RMN de referencia,  
 h) seleccionar un segundo sub-grupo apropiado a partir de los valores de distancia del espectro de RMN, en donde el segundo sub-grupo comprende aquellos valores de distancia que corresponden a un valor de distancia del espectro de RMN de referencia dentro de los segundos límites de tolerancia que se pueden proporcionar en  
 30 cada caso,  
 i) comparar el primer sub-grupo con el segundo sub-grupo y seleccionar aquellos valores de relación integral y valores de distancia procedentes de ambos sub-grupos como tercer sub-grupo apropiado que se formaron a partir de los mismos valores espectrales,  
 35 j) decidir si la sustancia presente en la muestra se identifica como el sustrato de referencia, con ayuda del criterio de calidad de los valores del tercer sub-grupo, estando determinado dicho criterio por medio de la comparación de estos valores con los valores de relación integral y/o los valores de distancia del espectro de RMN de referencia

40 en el que las etapas e) a j) se repiten con los espectros de RMN de referencia de otras sustancias de referencia tantas veces hasta que la sustancia presente en la muestra se identifica como sustancia de referencia o hasta que no haya más espectros de RMN de referencia.

2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el espectro de RMN de referencia es un espectro de RMN de exactamente una sustancia de referencia.

45 3. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por que** el criterio de calidad comprende una medida de la desviación de los valores de relación integral del espectro de RMN procedente de los valores de relación integral del espectro de RMN de referencia y/o la desviación de los valores de distancia del espectro de RMN a partir de los valores de distancia del espectro de RMN de referencia.

50 4. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el criterio de calidad comprende una medida del número de valores del tercer sub-grupo en comparación con el número de valores de relación integral o valores de distancia del espectro de RMN de referencia.

55 5. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** los valores de relación integral, en cada caso, se calculan a partir exactamente de dos valores integrales del espectro de RMN y/o los valores de distancia, en cada caso, se calculan a partir exactamente de dos valores de posición del espectro de RMN.

60 6. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la sustancia presente en la muestra se identifica de forma cuantitativa.

65 7. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el método se lleva a cabo usando un espectro de RMN desacoplado y, cuando la sustancia no se identifica de forma inequívoca, se lleva a cabo de nuevo usando un espectro de RMN no desacoplado de la misma muestra.

8. Producto de programa informático que comprende instrucciones para llevar a cabo las etapas de un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, cuando el producto de programa informático se ejecuta en un ordenador.

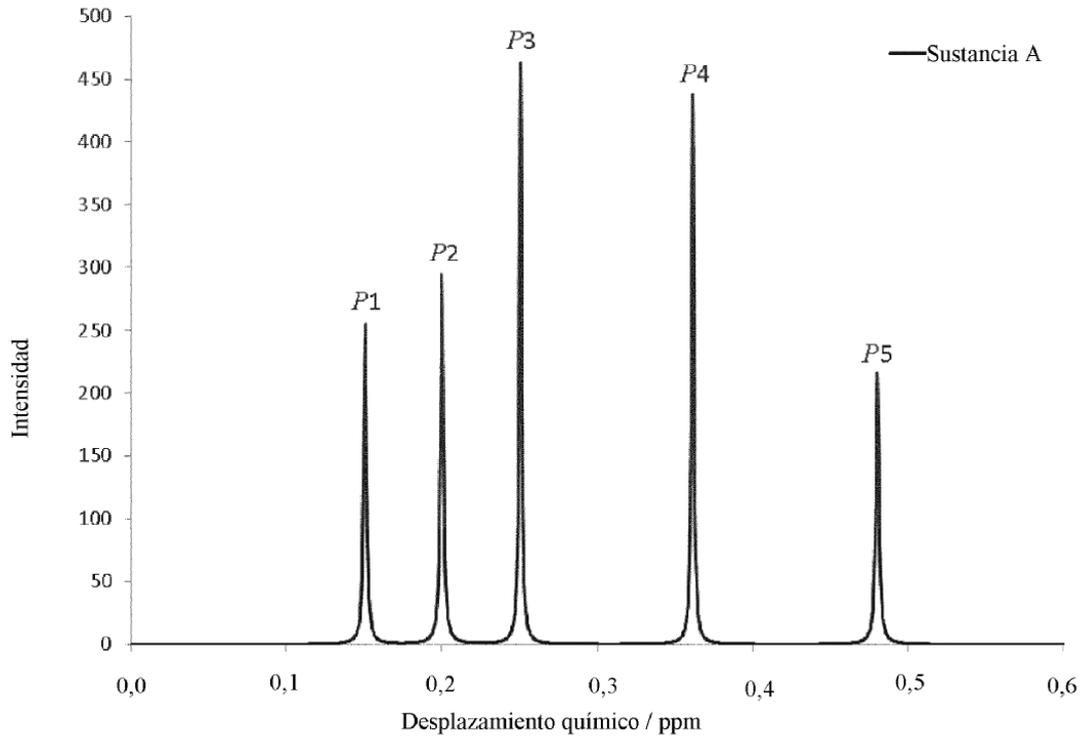


FIG 1

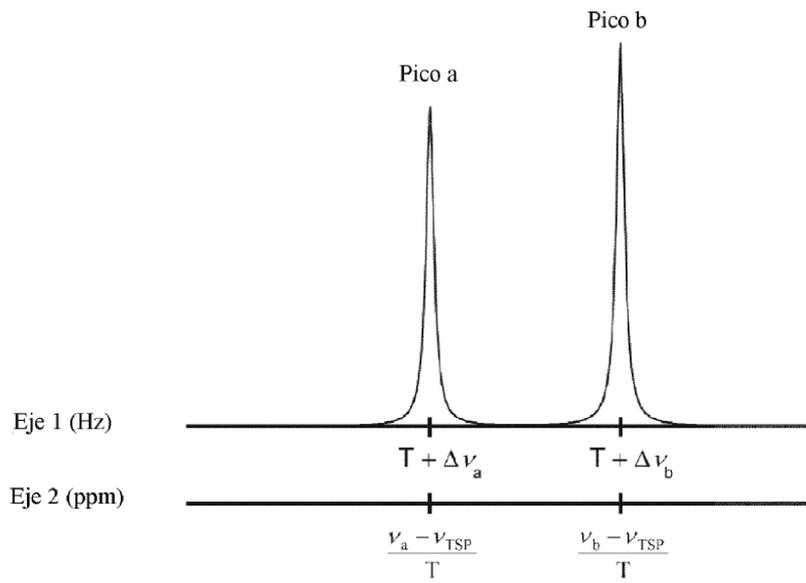


FIG 2

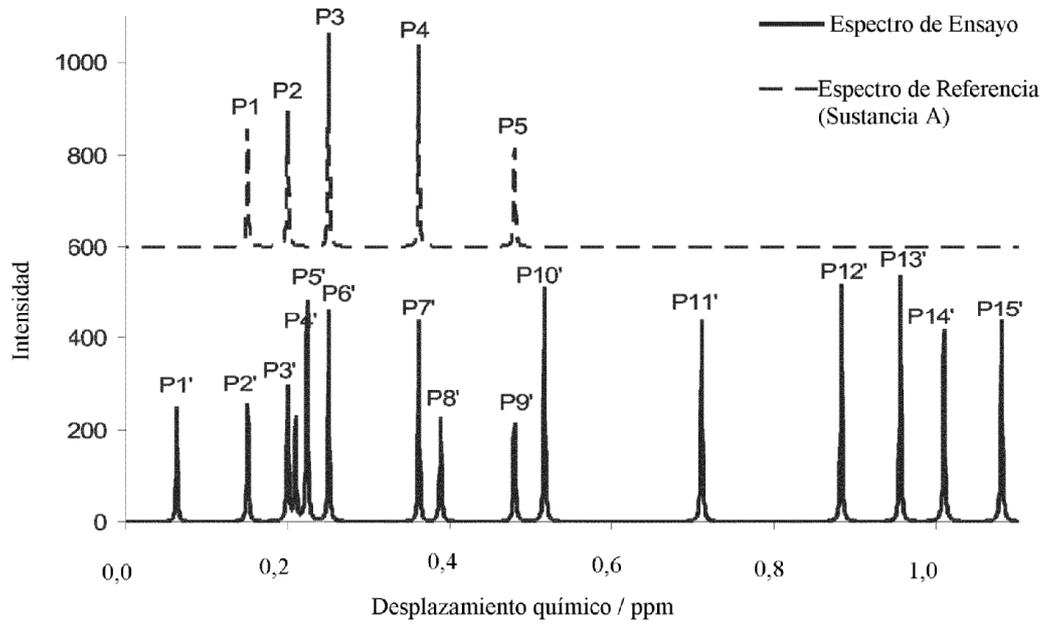


FIG 3

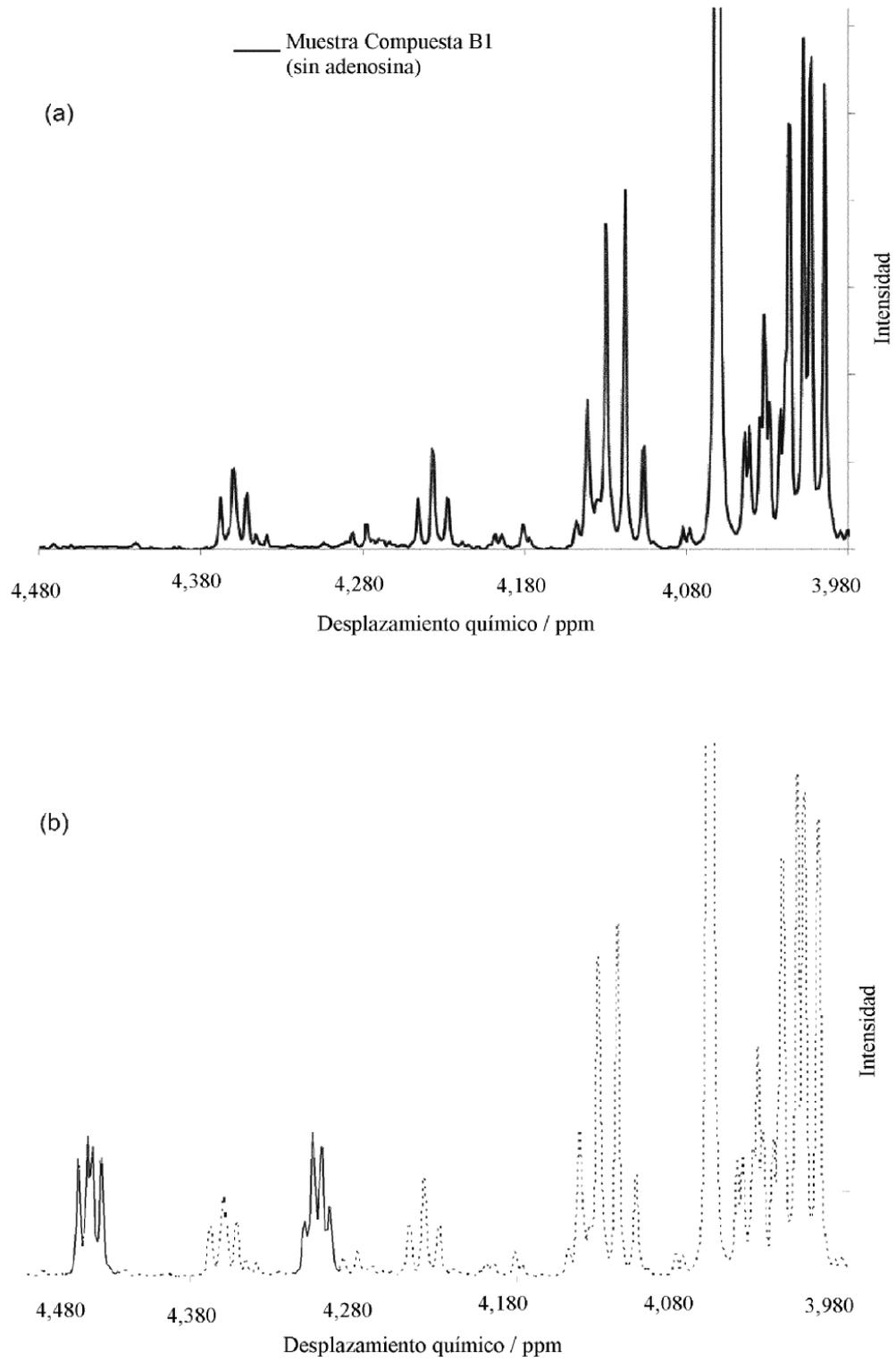


FIG 4

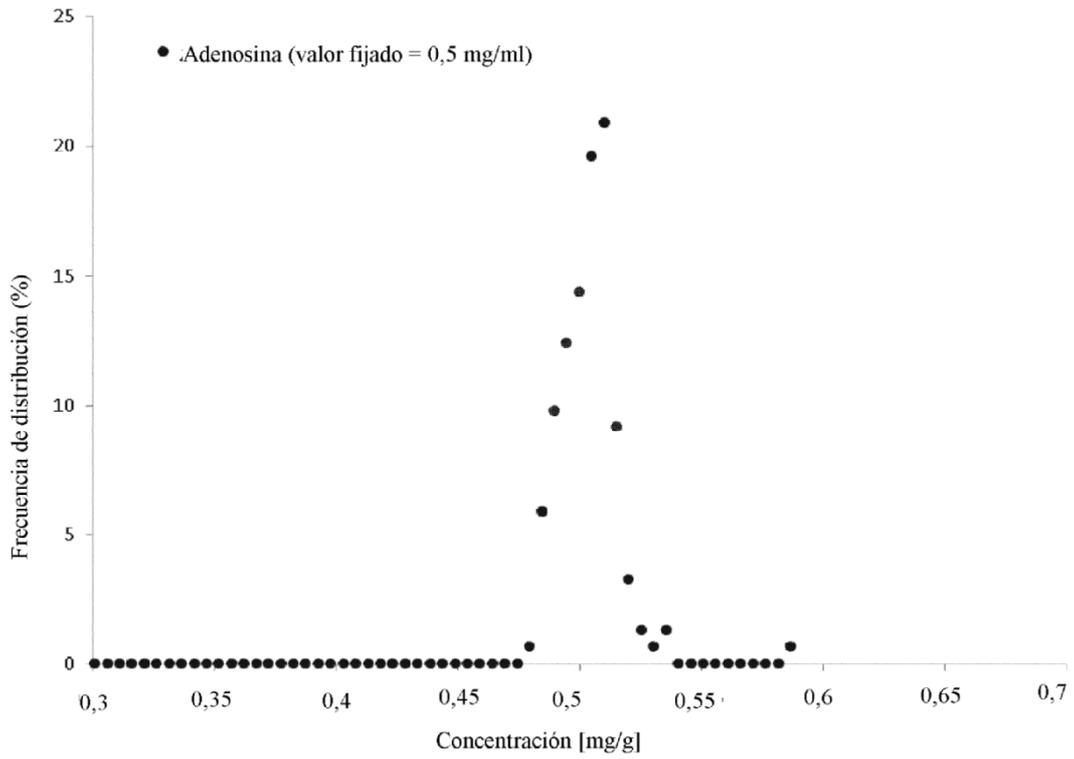


FIG 5