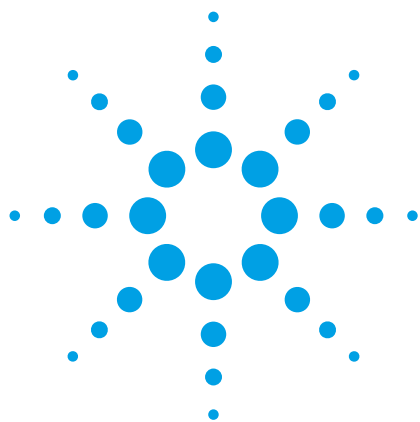




简便、精密而准确的定量 NMR

应用报告

作者

Ronald Crouch
David Russell
安捷伦科技公司
Santa Clara CA 95051
USA

摘要

通过 VnmrJ 3.1 软件中的新型 qNMR 工具及利用外标物进行校准，展示了极为准确而精密的定量 NMR。定期校准可使准确度高达 99.9%，精密度高达 0.59%；而每次实验时均进行校准可使准确度和精密度分别达到 100% 和 0.35%。

前言

针对小分子有机化合物的定量分析可通过多种技术来完成。最常用的是在色谱分离后利用光谱检测（如紫外/可见光、蒸发光散射等）或者波谱检测（如质谱）对分析物进行检测。虽然这些检测方法在某些用途上各有其优势，但它们都会受到如响应因子或基质效应等问题的困扰。通用的色谱检测器是不存在的。

尽管 NMR 通常用于结构分析，它正被越来越多的人视为一种重要的定量工具。NMR 用于定量分析时最为强大，因为共振信号的积分强度直接与该信号所代表的原子核数成正比。此外，谱图中的所有质子均具有相同的灵敏度，因此确定定量结果不再需要特定化合物的消光系数或校准。NMR 已经用于测定合成和生物合成产物、精细化学品和药物以及生物体液中的代谢产物、分解代谢产物和内源性化合物的浓度¹。研究表明，定量 NMR (qNMR) 尤其适用于代谢组学、药物开发和分析以及天然产物分析²。



Agilent Technologies

定量 NMR 具有必要的准确度和精密度，可成为许多分析实验室的常规定量工具。与内标物进行化学参比能够完成准确定量，但这种技术繁琐冗长并且污染样品。为了得到准确而精密的定量结果，人们还使用过数种电子参比法，如 ERETIC（电子参比以获得体内浓度）、PIG（梯度脉冲）、ARTSI（通过信号插入进行振幅校正参比）和 QUANTAS（由人工信号定量）。然而，这些方法由于检测范围和/或其易出现误差的固有性质，使用受到限制³⁻⁷。

由于 NMR 平台高度稳定且线性良好，仅通过浓度外标物的绝对积分和一维谱图就可以方便地对小分子有机物进行准确而精密的 qNMR 测量。本应用报告展示了安捷伦 NMR 系统独一无二的性能，即能够对几乎任意有机化学样品进行简便而准确的绝对定量。文中描述了如何使用 Agilent VnmrJ 3.1 软件、OneNMR 探头（对于溶剂、电介质或样品高度变化具有非常好的耐受性）和 DirectDrive 控制台对小分子有机物进行定量分析。仅进行一次校准可以获得的准确度（实际浓度的百分比）为 96.98 到 102.12%，精密度（标准偏差的百分比）为 0.59 到 1.07%。如果在每次实验时均采集校准数据以将实验室环境的细微变化计算在内，还可获得更高的准确度和精密度（分别为 99.48-100% 和 0.35-0.60%）。

实验部分

标样和试剂

布洛芬购自 Sigma-Aldrich，其储备液用 DMSO-d₆（含有 6 个氘原子的二甲亚砜）配制，浓度为 200.00 mg/mL 或 969.5 mM。通过稀释该储备液而制备得到一系列样品共九种，浓度低至 515 μ M。样品系列中还包括仅含 DMSO-d₆ 溶剂的空白样品。咖啡因购自 Sigma-Aldrich，用 D₂O 配制成浓度为 52.11 mM 的储备液。并用 D₂O 稀释储备液，配制为稀释液待用。

仪器

布洛芬定量实验采用配有 5 mm OneNMR 探头和 7600-AS 自动进样器的 Agilent 500 MHz DirectDrive NMR 波谱仪来完成。所有数据均在活性样品温度规定值 25 °C 下采集。探头首先根据校准标样进行调谐，并在随后的所有测定中均保持该配置。

咖啡因定量实验采用配有 5 mm OneNMR 探头和 7600-AS 自动进样器的 Agilent 400 MHz DirectDrive NMR 波谱仪来完成。探头在每次研究前根据校准标样进行调谐。

分析参数

各仪器使用的参数如表 1 所示。

表 1. 安捷伦 NMR 波谱仪工作条件

单次校准	
仪器	配有 5 mm OneNMR™ 探头的 Agilent Direct Drive 500 MHz NMR
激发脉冲	12.1 μ s @ 57 dB; 90° 翻转角
接收器增益	针对每个样品自动调整
扫描次数	1
操作频率	499.86 MHz
采集时间	3.0 秒
傅里叶数	256k
窗函数	0.3 Hz 指数谱线增宽
多次校准	
仪器	配有 5 mm OneNMR™ 探头的 Agilent Direct Drive 400 MHz NMR
激发脉冲	11.5 μ s @ 59 dB; 90 度翻转角
接收器增益	20 dB
扫描次数	1
操作频率	399.92 MHz
采集时间	4.0 秒
傅里叶数	256k
窗函数	0.3 Hz 指数谱线增宽

结果与讨论

外标物校准

安捷伦控制台在接收器通道中使用了直接信号数字化。这一设计架构能够在仅通过一次外标物校准而无需任何内参比信号的情况下，带来返回高质量绝对定量数据所需的稳定性和线性。

可以用浓度范围 10 到 100 mM 的任何已知浓度样品进行校准。样品应当包含适当

的、能与所有其他信号很好地分离的锐共振或共振组，并且校准物共振所代表的原子核总数必须是已知的。然后用 90 度脉冲收集单次扫描的一维谱图，并对含有校准物共振的区域进行积分。手动设置积分区域的值：首先确定样品浓度和原子核数的乘积，然后在 Integral Value(积分值)内输入该乘积值，再单击“Set Integral Value”（设置积分值）按钮（图 1）。然后可以使用 **qEstimate** 命令在探头文件中填充确定未知样品浓度所需的全部参数。

一旦这些值输入到探头文件中，校准就完成了，可通过鼠标单击来获取样品浓度。校准过程的更详细说明可在“VnmrJ 3.1 自动化用户指南”的“定量工具”一章中找到。

便捷地对校准标样进行积分

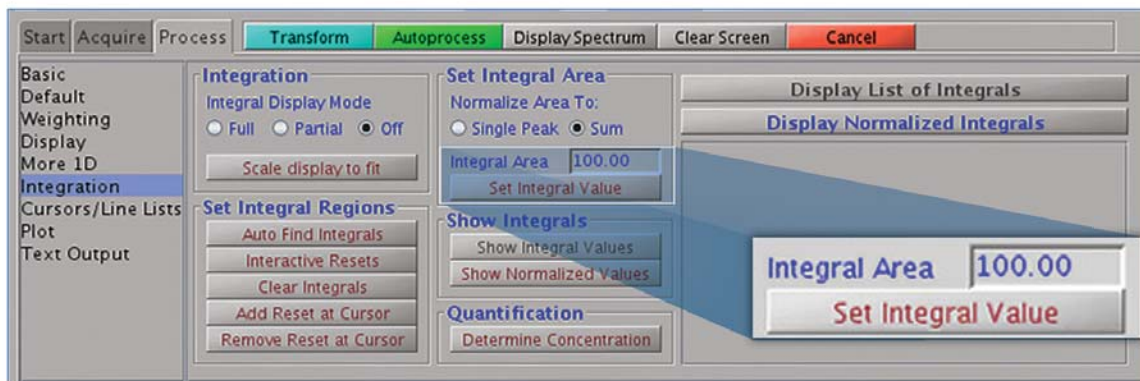


图 1. 设置积分面积的界面工具可在“Process”（数据处理）选项卡下的“Integration”（积分）面板中找到

常规 qNMR 的定期校准

要使用新型 qNMR 工具定量分析样品并得到可接受的准确度和精密度，最少需要一次探头校准（或者针对 90 度脉冲宽度的定期校准）。积分误差大致可由公式 $0.25 + (100/\text{SN})^8$ 计算得到，因此为了将积分误差降至 1% 以下，信噪比 (S/N) 必须达到 150/1。在准确度和精密度很重要时，必须考虑用于校准的及每个分析物的光谱信噪比。

为了说明常规 qNMR 所用的单次校准，用 DMSO-d₆ 制备浓度为 15.17 mM 的布洛芬校准标样，并将其置于 5 mm 的 NMR 管中。此外，还配制了浓度在 132 mM 与 500 μM 之间的一系列共九种样品。标样浓度以及 1.33 ppm 处的甲基双重峰的强度被用作 qEstimate 校准的输入值（图 2）。

一旦探头校准完成，浓度系列中每个样品都将自动提交进行采集。在系统执行了常规的自动锁场、自动匀场和自动增益功能后，采集每个样品的单次扫描 ¹H NMR 谱图。依次采集每个样品的数据，然后重复整个采集过程直至对每个样品至少采集了 20 组重复数据。

在校准步骤中，对合适的外标物谱峰进行积分

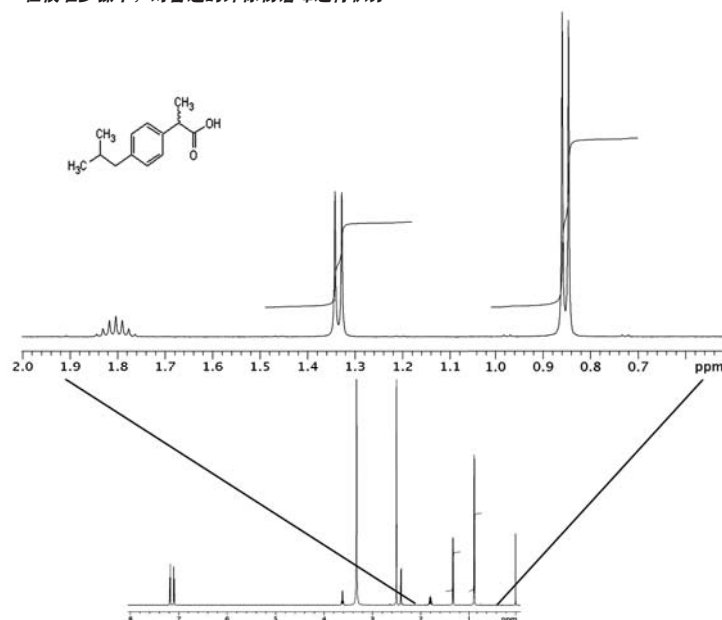


图 2. 布洛芬的 ¹H NMR 谱图（下方轨迹），用于校准和定量表 2 中所给的布洛芬浓度系列，区域宽度为 0.5 到 2 ppm（上方轨迹）。甲基双重峰出现在 1.33 ppm，甲基异丁基双重峰出现在 ~0.84 ppm。图中还给出了布洛芬的结构

通过软件可便捷地测定浓度值

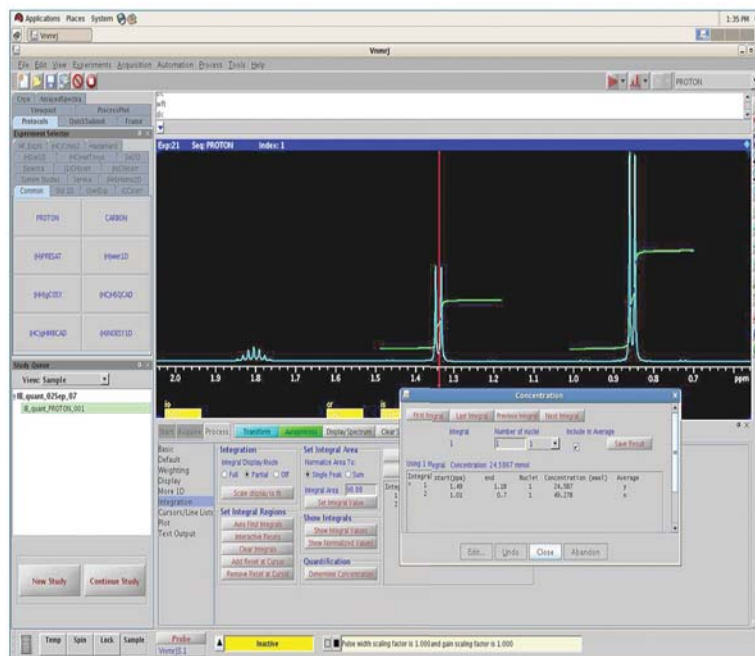


图 3. “Determine Concentration”（确定浓度）按钮用于初始化“Concentration”（浓度）弹出口。该工具允许交互式地在谱图中分配每个积分区域的重数（即原子核数），并可选择将哪些区域包含在最终的浓度计算中

图 3 是通过“Process”（处理）选项卡下“Integration”（积分）面板中的“Determine Concentration”（确定浓度）按钮访问“Determine Concentration”（确定浓度）工具时所显示的窗口。其中显示了谱图中的各个积分面积，并且可以在交互式地分配了适当的重数后将其添加到用以计算浓度的列表中。对于单个样品的考察，手动实行该工作流程是非常快速、简单且便捷的。

由于当前研究包含超过 180 张的谱图，因此使用了自动处理宏来选择对应甲基的双重峰（约 1.3 ppm 处）和异丁基的双重峰（约 0.8 ppm 处）的区域，根据重数（即原子核数）缩放这些区域的积分（分别为 3 和 6 个质子），然后依据这两个信号计算样品的浓度，最后将结果写入以逗号分隔的电子表格（csv）文件中。此宏的示例可在光谱仪上的用户库中找到（/vnmr/userlib/mac/lib/qEst2csv）。为了达到本工作数据分析的目的，将每个峰作为独立的浓度测定进行处理。

结果如表 2 所示，整个浓度系列的标准偏差低于 1%。结果表明，在接近三个数量级的浓度范围内，线性非常出色， $R^2 = 0.9995$ （图 4）。

表 2. 对一系列浓度的布洛芬进行定量分析的准确度和精密度，使用单点校准

实际浓度 (mM)	平均测定浓度 (mM)	标准偏差 (mM)	准确度* (实际浓度的百分比)	精密度 (%SD)
0.515	0.531	0.006	96.98%	1.07%
1.03	1.049	0.008	98.13%	0.79%
2.06	2.098	0.012	98.14%	0.59%
4.12	4.171	0.024	98.77%	0.57%
8.24	8.269	0.048	99.65%	0.58%
16.49	16.571	0.103	99.51%	0.62%
32.98	33.014	0.293	99.90%	0.89%
65.97	67.813	0.492	97.21%	0.73%
131.94	129.141	1.091	102.12%	0.84%
总体			98.46%	0.74%

* 注意在极低和极高浓度下样品准确度的预期损失。由于采集所用的单次扫描引起的低信噪比，预计在低浓度下会出现积分误差；另外，辐射阻尼可能会影响浓度非常高的样品。

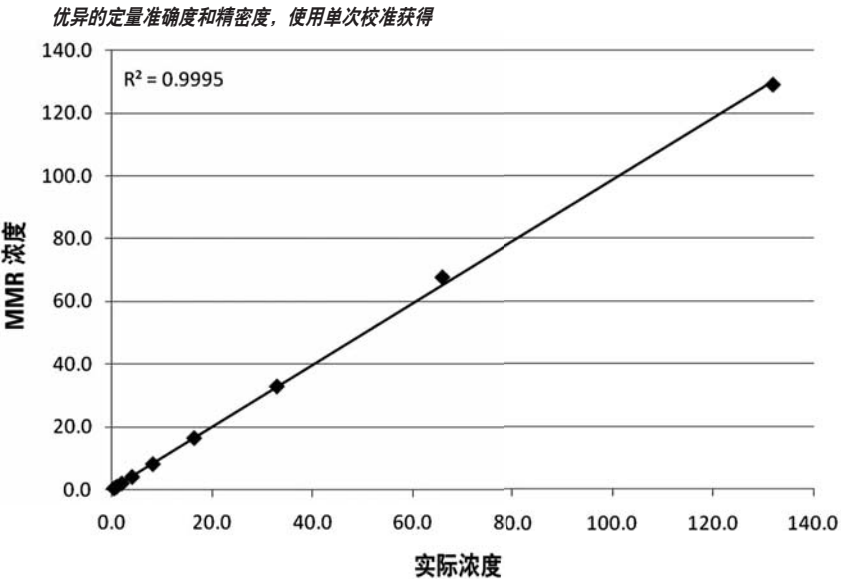


图 4. 快速、简便、准确地确定布洛芬浓度，动态范围超过 3 个数量级，实际浓度与测定浓度之间的相关性的 R^2 值为 0.9995

运行时校准以得到更高的准确度和精密度

在每次样品研究之前进行校准可获得更高的定量准确度和精密度。这有助于补偿由于实验室环境的改变而引起的稳定性的细微变化。如果对校准标样和目标样品使用相同的增益值，还能获得进一步的改善。为展示进一步提高的准确度和精密度，使用了咖啡因作为分析物，并制备得到一系列共三个浓度标样。所制备的样品浓度为 50.44 mM、51.91 mM 和 52.11 mM，整个系列的浓度差异仅为 3.3%。在这三个样品的研究中，都先进行了外标物的自动校准（以 D₂O 配制的 54.11 mM 咖啡因），然后再对样品进行定量。执行七次 qNMR 研究作为一个系列，并使用 NMR 控制台每三个小时重新提交一次该系列，直至研究总数达到 630 次（每个浓度 210 次）。如表 3 所示，定量的总体准确度为 99.94%，总体精密度为 0.51%，确保能够识别三个样品浓度之间非常细微的差异。

进行第二个实验以评估 NMR 管中样品的高度对定量结果的影响。在实验过程中，从先前实验所用的每个管中移除样品，以使每个管中的样品高度分别降至 48、35 和 30 mm（表 4）。然后对每个样品总共进行 35 次研究，设置仪器使其在 16 小时内每三小时重复系列一次（七次 qNMR 研究，研究前先进行外标物自动校准，然后再对三个样品定量）。使用 OneNMR 探头，结果证实样品高度从 35 到 54 mm 的变化不会降低结果的准确度或精密度（表 4）。样品 3 中的样品高度（30 mm）太低而无法正常进行匀场，因此未得到任何有用的结果。

表 3. 三种咖啡因浓度的定量研究的准确度和精密度，使用多次运行时校准

实际浓度 (mM)	样品高度 (mm)	平均测定浓度 (mM)	标准偏差 (mM)	准确度 (实际浓度的百分比)	精密度
52.11	54	52.16	0.27	99.85%	0.52%
50.44	45	50.70	0.21	99.48%	0.42%
51.91	37	51.99	0.31	99.90%	0.60%
总体				99.74%	0.51%

表 4. 样品高度对准确度和精密度的影响

实际浓度 (mM)	样品高度 (mm)	平均测定浓度 (mM)	标准偏差 (mM)	准确度 (实际浓度的百分比)	精密度
52.11	48	52.13	0.19	99.96%	0.35%
50.44	35	50.44	0.17	100.00%	0.49%
51.91	30	—	—	—	—
总体				99.98%	0.42%

第二次实验对样品 1 和 2 进行重复，在采集过程中使用双级宽带 ¹³C 去耦以消除 ¹³C 卫星峰⁹。对每个样品总共进行 98 次研究，设置仪器以在 28 小时中每两小时对每个系列重复一次（七次 qNMR 研究，研究前先进行外标物自动校准，然后再对

两个样品定量）。图 5 的下方轨迹为非去耦对比谱图，其中 ¹³C 卫星峰与 ¹²C 信号明显分离。从图 5 的上方轨迹中可以看到 ¹³C 卫星峰已经完全消失在主共振带中。即使宽带 ¹³C 去耦可能引起噪音/误差，定量的准确度和精密度仍然非常好（表 5）。

表 4. 样品高度对准确度和精密度的影响

实际浓度 (mM)	样品高度 (mm)	平均测定浓度 (mM)	标准偏差 (mM)	准确度 (实际浓度的百分比)	精密度
52.11	54	52.09	0.20	99.96%	0.37%
50.44	35	50.44	0.17	100.00%	0.49%
总体				99.98%	0.43%

在 ^{13}C 去耦的情况下仍保持着定量的高准确度和精密度

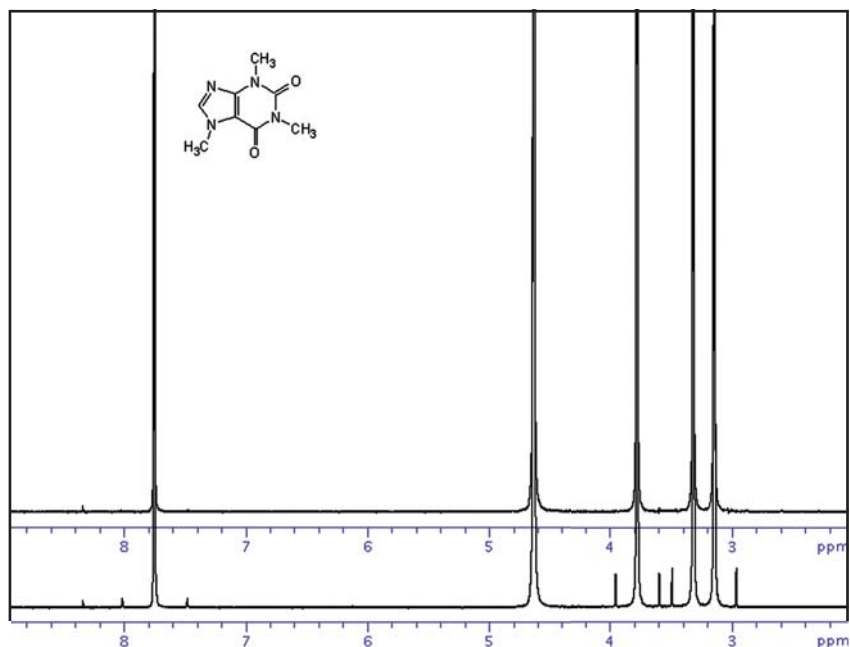


图 5. 咖啡因样品谱图: 上图采用双级宽带去耦对频宽为240ppm的 ^{13}C 去耦; 下图为不去耦质子谱。两个实验采集时间均为3.6秒。使用位于“Experiment Selector”(实验选择器)的“Std1D”(标准一维)选项卡中的“BilevelDEC”脉冲序列进行去耦

结论

NMR 实验自身展示出人们希望定量技术具备的所有特性: 特异性、选择性、灵敏度、线性、高动态范围、单位响应因子以及最重要的——对所有含质子的有机分子的通用检测能力。使用 NMR 进行定量分析的主要缺点始终在于市售 NMR 硬件所固有的线性不佳的问题。按样品到样品的方式校正这些误差是可能的, 但它需要加入化学内标物或者将外部参比信号并入实验数据。内标物使用过程繁琐并且会给测定带来另一层误差, 而生成外部参比信号的方法由于检测范围和/或其容易产生误差的固有性质, 使用范围非常受限。

安捷伦 NMR 系统与众不同的地方在于其接收器的信号通道是完全数字化的, 能够在宽样品浓度范围内得到前所未有的优秀响应线性。OneNMR 探头对于溶剂、电介质和样品高度也具有非常高的耐受性。将这一强大的硬件与先进的软件结合, 安捷伦开发出了一种出众的定量分析工具。利用 VnmrJ 3.1 软件, 并用已知浓度的外标物一次性确定校准参数, 可以通过绝对积分简便快速地完成准确而精密的 NMR 定量分析。对于小分子有机物的定量分析, 准确度可达 96.98 到 102.12%, 精密度可达 0.59 到 1.07%。如果在每个样品研究开始前进行运行时校准, 以将实验室环境稳定性的微小变化计算在内, 还可获得

更高的准确度和精密度 (分别可达 99.48-100% 和 0.35-0.60%)。实际上, 即使宽带 ^{13}C 解耦也不会产生显著的误差。使用软件功能可以采集并存储校准参数、建立并安排定量研究、创建自定义报告, 从而快速简便地实现这一水平的准确度和精密度。

最后, 尽管本应用报告仅讨论了使用质子 NMR 数据进行定量, 但该新型 qNMR 工具与频率是无关的。用户可使用任意合适的原子核 (^{31}P 、 ^{19}F 、 ^{13}C 等) 进行相同的校准, 然后通过同样的工作流程来对这些原子核采集数据。

参考文献

1. R. Espina, et al. "Nuclear magnetic resonance spectroscopy as a quantitative tool to determine the concentrations of biologically produced metabolites: implications in metabolites in safety testing", *Chem Res Toxicol.* **22**, 299-310 (2009).
2. G. F. Pauli, B. U. Jaki, D. C. Lankin. "Quantitative ^1H NMR: development and potential of a method for natural products analysis.", *J Nat Prod.* **68**, 133-49 (2005).
3. K.I. Marro, et al., "Synthetic signal injection using inductive coupling." *J Magn Reson* **194**, 67-75 (2008).
4. F. Ziarelli, et al., "General implementation of the ERETIC method for pulsed field gradient probe heads." *J Magn Reson* **194**, 307-12 (2008).
5. Mehr, K., et al., "Electronic referencing techniques for quantitative NMR: pitfalls and how to avoid them using amplitude-corrected referencing through signal injection.", *Anal Chem* **80**, 8320-8323 (2008).
6. Upton, R. in ENC. 2008. Asilomar, California USA.
7. I.W. Burton, et al. "Quantitative ^1H NMR with external standards: use in preparation of calibration solutions for algal toxins and other natural products." *Anal Chem* **77**, 3123-31 (2005).
8. F. Malz and H. Jancke. "Validation of Quantitative nuclear magnetic resonance." *J. Pharm. Biomed. Anal.* **38**, 813-823 (2005).
9. E. Kupce, R. Freeman, G. Wider, K. Wüthrich, "Suppression of Cycling Sidebands using Bi-level Adiabatic Decoupling." *J. Magn. Reson. A* **122**, 81-84 (1996).

更多信息

请访问:

www.agilent.com/en

安捷伦客户服务中心:

免费专线: 800-820-3278

400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

customer-cn@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/quote:cn

安捷伦科技大学:

<http://www.agilent.com/chem/university>

浏览和订阅Access Agilent 电子期刊:

www.agilent.com/chem/accessagilent:cn

www.agilent.com/en

本材料中涉及的产品规格和说明, 如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2011
2011 年 4 月 8 日中国出版
出版号 5990-7601CNCN



Agilent Technologies