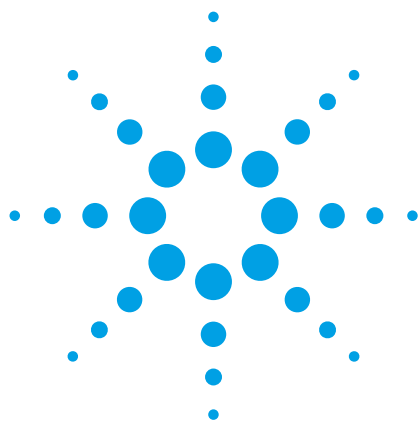




NMR quantitativa facile, precisa e accurata

Nota applicativa

Autori

Ronald Crouch
David Russell
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara CA 95051
USA

Abstract

In questa nota si dimostra che è possibile ottenere risultati di spettroscopia NMR quantitativa (qNMR) estremamente accurati e precisi, mediante calibrazione con uno standard esterno, grazie all'utilizzo dei nuovi strumenti qNMR del software VnmrJ 3.1. La calibrazione periodica garantisce un'accuratezza vicina al 99,9% e una precisione dello 0,59%; nello stesso tempo l'esecuzione della calibrazione prima di ogni studio può fornire un'accuratezza prossima al 100% e una precisione dello 0,35%.

Introduzione

L'analisi quantitativa di composti organici costituiti da piccole molecole può essere effettuata mediante diverse tecniche, la più comune delle quali prevede la separazione cromatografica con rivelazione dell'analita per via spettroscopia (ad esempio, con spettroscopia ultravioletto/visibile, evaporativa a luce diffusa e così via) o spettrometria (ad esempio, spettrometria di massa). Benché questi metodi di rivelazione presentino ciascuno vantaggi in determinati aspetti, essi vengono complicati da problemi relativi, ad esempio, ai fattori di risposta o agli effetti matrice. Non esiste infatti un rivelatore cromatografico universale.

Anche se utilizzata più frequentemente per l'analisi strutturale, la tecnica NMR ha acquistato sempre più considerazione nel campo dell'analisi quantitativa. La sua potenza risiede nel fatto che esiste una proporzionalità diretta tra l'integrale di un segnale e il numero di nuclei da esso rappresentato. Inoltre, tutti i protoni all'interno dello spettro sono ugualmente sensibili, quindi la quantificazione non richiede calibrazioni o coefficienti di estinzione specifici per ogni composto. La spettroscopia NMR è stata utilizzata per determinare le concentrazioni di prodotti sintetici e biosintetici, composti di chimica fine e farmaceutica, nonché metaboliti, cataboliti e composti endogeni nei fluidi biologici¹. La spettroscopia NMR quantitativa (qNMR) si è dimostrata particolarmente utile in metabolomica, nell'identificazione e analisi dei farmaci e nell'analisi dei prodotti naturali², confermando di possedere le doti di accuratezza e precisione richieste per diventare uno strumento quantitativo di routine in molti laboratori analitici.



Agilent Technologies

Il metodo dello standard interno può fornire una quantificazione accurata, ma è laborioso e contamina il campione. In altri approcci, nel tentativo di fornire risultati quantitativi precisi e accurati, si è sostituito al riferimento di concentrazione chimico un segnale di riferimento generato elettronicamente come nelle tecniche ERETIC (Electronic Referencing to access in vivo Concentrations), PIG (Pulse Into Gradient), ARTSI (Amplitude-corrected Referencing Through Signal Injection) e QUANTAS (Quantification by Artificial Signal); questi metodi hanno, tuttavia, finalità limitate e sono a rischio di errori³⁻⁷.

È invece possibile ottenere facilmente la quantificazione accurata e precisa di composti organici per via NMR utilizzando solo l'integrazione assoluta di uno standard di concentrazione esterno e lo spettro 1D della sostanza di interesse, a patto che si lavori con uno strumento NMR altamente stabile e lineare. Questa nota applicativa dimostra l'eccezionale capacità del sistema NMR Agilent di garantire la quantificazione assoluta di quasi ogni sostanza organica in modo semplice e accurato. Viene descritta la procedura per determinare la concentrazione di composti organici caratterizzati da piccole molecole mediante l'utilizzo del software Agilent VnmrJ 3.1, della sonda OneNMR (le cui prestazioni sono per lo più indipendenti da solvente, costante dielettrica o variazioni nell'altezza del campione) e delle console DirectDrive. Con una calibrazione con standard esterno effettuata una sola volta per tutte si è ottenuta un'accuratezza (% rispetto alla concentrazione reale) variabile dal 96,98 a 102,12% e una precisione (espressa come deviazione standard %) nell'intervallo da 0,59 a 1,07%. Accuratezza e precisione ancora maggiori (rispettivamente 99,48-100% e 0,35-0,60%) possono essere ottenute calibrando il sistema nel corso di ogni studio per tenere conto delle piccole variazioni ambientali del laboratorio.

Risultati sperimentali

Standard e reagenti

L'ibuprofene è stato ottenuto da Sigma-Aldrich e una soluzione madre è stata preparata in DMSO-d₆ (dimetilsolfossido contenente 6 deuteri) a una concentrazione di 200,00 mg/mL o 969,5 mM. Dalla soluzione madre è stata preparata per diluizione una serie di nove campioni con concentrazione minima di 515 µM. All'interno del set è stato inoltre inserito un bianco contenente solo il solvente DMSO-d₆. La caffeina è stata ottenuta da Sigma-Aldrich e con essa si è preparata una soluzione madre alla concentrazione di 52,11 mM; tutte le relative diluizioni sono state ottenute con D₂O.

Strumenti

Per eseguire gli esperimenti di quantificazione dell'ibuprofene si è utilizzato uno spettrometro NMR Agilent 500 MHz

DirectDrive dotato di una sonda OneNMR da 5 mm e di un campionatore automatico 7600-AS. Tutti i dati sono stati raccolti con regolazione attiva della temperatura del campione impostata su 25 °C. La sonda è stata inizialmente sintonizzata sullo standard di calibrazione e mantenuta in tale condizione di tuning per tutte le misurazioni successive.

Gli esperimenti di quantificazione della caffeina sono stati effettuati con lo spettrometro NMR Agilent 400 MHz DirectDrive dotato di una sonda OneNMR da 5 mm e di un campionatore automatico 7600-AS. La sonda è stata sintonizzata sullo standard di calibrazione prima di ogni studio.

Parametri di analisi

I parametri utilizzati per ciascuno strumento sono indicati nella Tabella 1.

Tabella 1. Parametri sperimentali dello spettrometro NMR Agilent

Calibrazione singola	
Strumento	Agilent Direct Drive 500 MHz NMR con una sonda OneNMR™ da 5 mm
Impulso di eccitazione	12,1 µs a 57 dB; Angolo di nutazione 90°
Guadagno del ricevitore	Regolato automaticamente per ogni campione
N. di scansioni	1
Frequenza operativa	499,86 MHz
Tempo di acquisizione	3,0 secondi
Dimensioni dello spettro	256k
Apodizzazione	line broadening di 0.3 Hz
Calibrazioni multiple	
Strumento	Agilent Direct Drive 400 MHz NMR con una sonda OneNMR™ da 5 mm
Impulso di eccitazione	11,5 µs a 59 db; Angolo di nutazione 90°.
Guadagno ricevitore	20 dB
N. di scansioni	1
Frequenza operativa	399,92 MHz
Tempo di acquisizione	4,0 secondi
Dimensioni dello spettro	256k
Apodizzazione	line broadening di 0.3 Hz

Risultati e discussione

Calibrazione mediante standard interno

Le console Agilent utilizzano la digitalizzazione diretta del segnale ottenuto dal ricevitore. Questa architettura fornisce la stabilità e la linearità richieste per garantire dati di quantificazione assoluta di elevata qualità servendosi solo di una calibrazione con standard esterno e senza la necessità di un qualsiasi segnale di riferimento interno.

La calibrazione può essere eseguita con qualunque campione a concentrazione nota nell'intervallo da 10 a 100 mM.

Il campione deve contenere almeno una riga ragionevolmente stretta o un gruppo di segnali ben separato da tutti gli altri ed è necessario conoscere il numero totale di nuclei rappresentato dai segnali usati per la calibrazione. Viene quindi registrato uno spettro 1D con singola scansione e impulso di 90° e si integra la regione contenente la risonanza o le risonanze dello standard. Il valore di questo integrale viene impostato manualmente determinando il prodotto della concentrazione del campione per il numero dei nuclei, immettendo il risultato nel campo relativo al valore dell'integrale e schiacciando il pulsante Set Integral

Value (Imposta il valore dell'integrale, Figura 1). È quindi possibile utilizzare il comando **qEstimate** per inserire nel file della sonda tutti i parametri necessari per la determinazione della concentrazione di un campione sconosciuto.

Una volta immessi i valori nel file della sonda, la calibrazione è completa ed è possibile determinare la concentrazione di un campione con un semplice clic del mouse. Una descrizione più dettagliata della procedura di calibrazione si trova nel capitolo relativo agli strumenti di quantificazione di VnmrJ 3.1 nel Manuale utente per l'automazione.

Interfaccia semplificata per l'integrazione dello standard di calibrazione

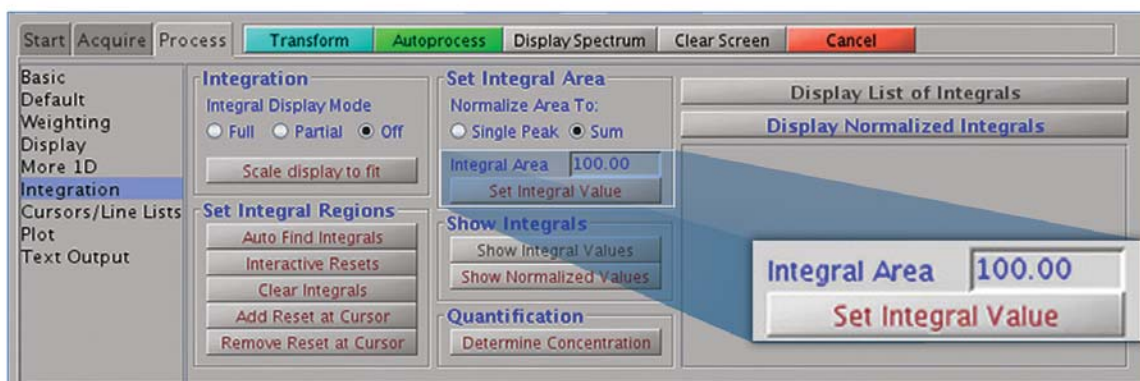


Figura 1. L'interfaccia per l'impostazione dell'area di integrazione si trova nel pannello Integration della scheda Process.

Calibrazione periodica per qNMR di routine

Per utilizzare i nuovi strumenti qNMR per la quantificazione dei campioni con accuratezza e precisione accettabili è richiesta almeno una calibrazione della sonda (o una calibrazione periodica, come si fa normalmente per la lunghezza dell'impulso a 90°). Per ridurre gli errori di integrazione al di sotto dell'1% si dovrà avere un rapporto segnale-rumore (S/N) di almeno 150/1, poiché l'errore è approssimato all'equazione $0,25 + (100/SN)^8$. È importante dunque tenere a mente che, quando accuratezza e precisione sono fondamentali, si dovrà considerare sia il rapporto S/N dello spettro utilizzato per la calibrazione che quello di ciascun analita.

Allo scopo di illustrare l'utilizzo di una calibrazione singola per effettuare esperimenti qNMR di routine, è stato preparato uno standard esterno di ibuprofene alla concentrazione di 15,17 mM in DMSO-d6 in un tubo NMR da 5 mm. È stata preparata inoltre una serie di 9 campioni a concentrazioni comprese tra 132 mM e 500 µM. La concentrazione del campione standard e l'intensità del doppietto metilico a 1,33 ppm sono stati utilizzati come *input* per la calibrazione con qEstimate (Figura 2).

Una volta completata la calibrazione, sono stati acquisiti in modalità automatica gli spettri per ciascun campione della serie. Per ciascun campione è stato registrato uno spettro NMR ¹H a singola scansione dopo l'esecuzione di auto-lock, autoshim e autogain di routine. I campioni sono stati analizzati in sequenza e l'intera serie è stata ripetuta fino a ottenere almeno 20 repliche per campione.

I picchi appropriati dello standard esterno sono integrati durante la calibrazione.

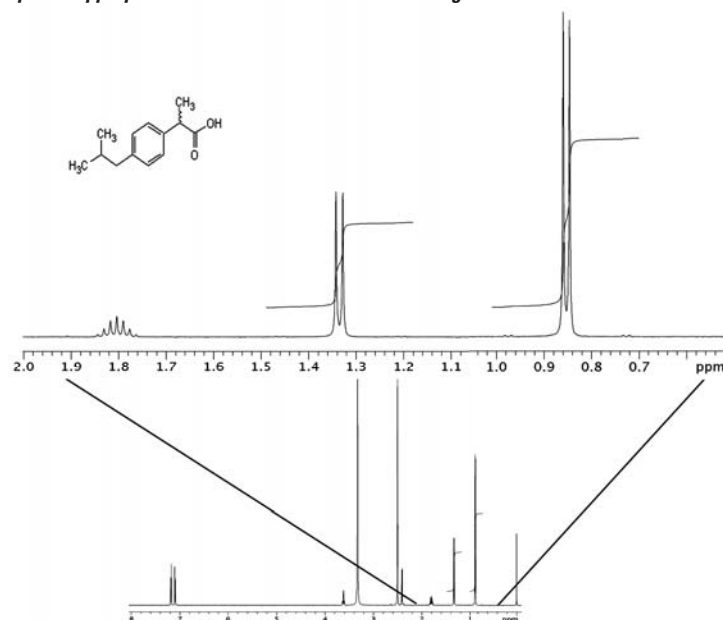


Figura 2. Spettro NMR ¹H di ibuprofene utilizzato per la calibrazione e la quantificazione della serie di concentrazioni di ibuprofene (traccia inferiore; tabella 2) con espansione della regione da 0,5 a 2 ppm. (traccia superiore). Il doppietto metilico appare a 1,33 ppm e il doppietto del metile isobutilico appare a ~0,84 ppm. La figura mostra la struttura dell'ibuprofene.

Software di facile utilizzo per le determinazioni di concentrazione

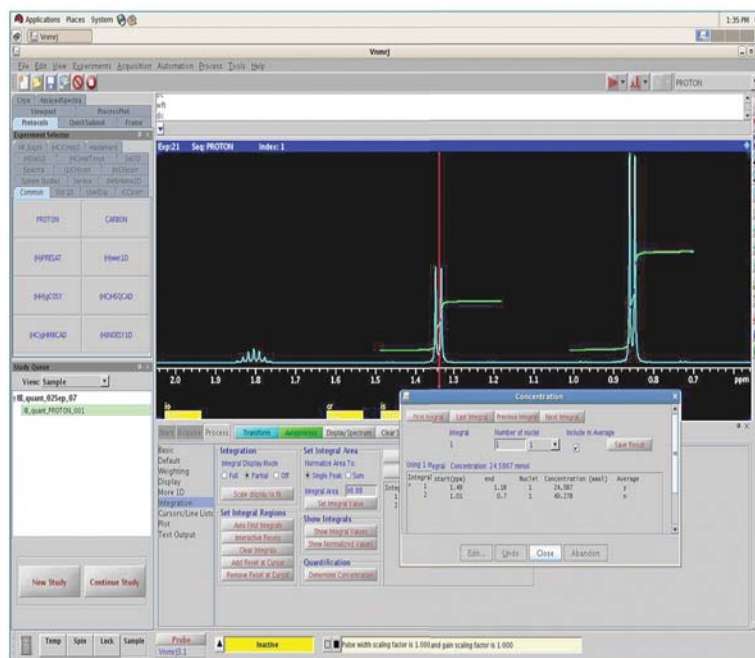


Figura 3. Il pulsante **Determine Concentration** è utilizzato per inizializzare la finestra popup Concentration (Concentrazione). Questo strumento consente l'assegnazione interattiva della molteplicità a ciascun integrale dello spettro e la scelta di quali regioni includere nel calcolo della concentrazione finale.

La figura 3 mostra la finestra che viene visualizzata quando si accede all'interfaccia per la determinazione della concentrazione tramite il pulsante **Determine Concentration** (Determinazione della concentrazione) nel pannello Integration (Integrazione) della scheda Process. Ogni integrale viene visualizzato nello spettro ed è possibile aggiungerlo all'elenco per il calcolo della concentrazione dopo aver assegnato in maniera interattiva la molteplicità appropriata. Se si lavora su un campione singolo, lo schema di lavoro in modalità manuale appena descritto è consigliabile in quanto più rapido, semplice e veloce.

Per l'elaborazione dei dati sperimentali ottenuti nel corso del presente studio, più di 180 spettri, è stata utilizzata una macro di elaborazione automatizzata per selezionare le regioni del doppietto metilico a ~1,3 ppm e del doppietto dell'isobutile a ~0,8 ppm, scalare l'integrazione delle regioni sulla base della molteplicità (3 e 6 protoni, rispettivamente), calcolare la concentrazione del campione in base a questi due segnali e, infine, inserire i risultati in un file di testo separato da virgole (CSV). È possibile trovare un esempio di tale macro all'interno della libreria utente dello spettrometro (ad esempio, /vnmr/userlib/mac/lib/qEst2csv). Per le finalità di questo lavoro, ogni picco è stato trattato come una misura indipendente di concentrazione.

I risultati riportati nella tabella 2, mostrano che la deviazione standard percentuale è sempre inferiore a 1 % nell'intero intervallo di concentrazioni considerato. I risultati mostrano inoltre grande linearità ($R^2=0,9995$) all'interno dell'intervallo di concentrazione di almeno 3 ordini di grandezza (Figura 4).

Tabella 2. Accuratezza e precisione della quantificazione di una serie di concentrazioni dell'ibuprofene tramite calibrazione a punto singolo.

Concentrazione reale (mM)	Concentrazione media misurata (mM)	Deviazione standard (mM)	Accuratezza* (% rispetto alla concentrazione reale)	Precisione (%DS)
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%
Totale			98,46%	0,74%

* Notare la perdita prevista di accuratezza nei campioni a concentrazioni molto elevate o molto ridotte. Sono possibili errori di integrazione a basse concentrazioni a causa del minor rapporto S/N ottenuto da un'acquisizione a scansione singola; il cosiddetto "radiation dumping" può influire sui campioni a concentrazioni molto elevate.

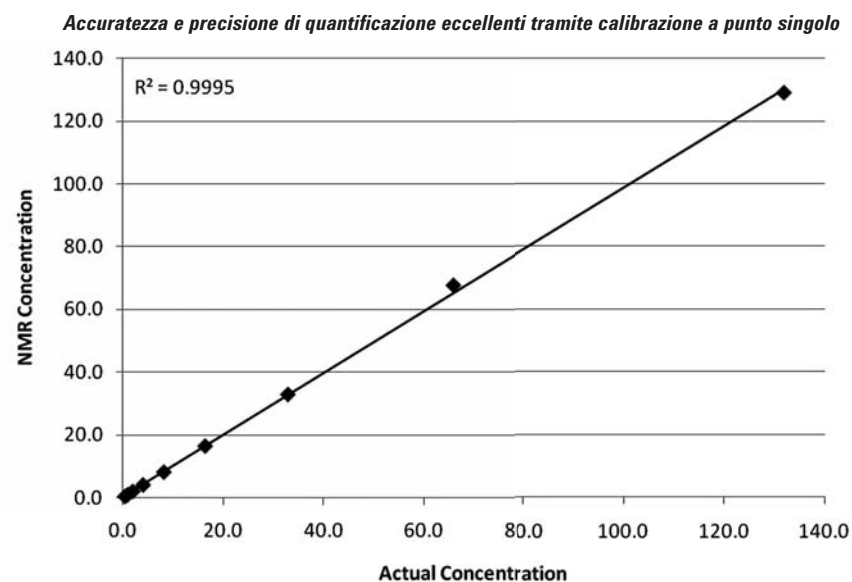


Figura 4. Determinazione rapida, veloce e accurata delle concentrazioni di ibuprofene in un intervallo superiore e 3 ordini di grandezza; il valore di R^2 per la correlazione tra concentrazione reale e misurata è di 0,9995.

Calibrazione subito prima della quantificazione per una maggior accuratezza e precisione

Precisione e accuratezza maggiori si ottengono calibrando il sistema ogni volta prima di ciascuno studio in modo da compensare piccole variazioni di stabilità dovute ai cambiamenti ambientali del laboratorio. Determinazioni ancora migliori possono essere ottenute usando la stessa amplificazione sia per lo standard che per i campioni di interesse. Per dimostrare queste possibilità sono stati preparati tre standard di caffeina alle concentrazioni di 50,44 mM, 51,91 mM e 52,11 mM, con una differenza massima tra loro di solo il 3,3%. Ciascuno studio ha previsto una calibrazione automatica dello standard esterno (54,11 mM caffeina in D₂O), seguita dalla quantificazione dei tre campioni. È stata eseguita una serie di sette studi qNMR e questa è stata ripetuta ogni tre ore fino a raggiungere un totale di 630 studi (210 per ciascuna concentrazione). Come mostrato nella tabella 3, l'accuratezza totale della quantificazione è risultata essere del 99,94% e la precisione totale dello 0,51%, consentendo di distinguere differenze di concentrazione molto piccole tra i campioni analizzati.

Per stabilire l'effetto dell'altezza del campione nel tubo NMR sui risultati di quantificazione è stato eseguito un secondo esperimento, rimuovendo un po' di campione da ciascuno dei tubi NMR usati nell'esperimento precedente fino a ottenere altezze di 48, 35 e 30 mm (tabella 4). Sono stati eseguiti 35 studi su ciascun campione con lo spettrometro programmato per ripetere la serie (sette studi qNMR, ognuno dei quali caratterizzato da una calibrazione automatica con lo standard esterno seguito dalla quantificazione dei tre campioni) ogni tre ore in un periodo di tempo di 16 ore. I risultati ottenuti con la sonda OneNMR hanno confermato che l'altezza del campione può variare tra 35 e 54 mm senza alterare l'accuratezza

Tabella 3. Accuratezza e precisione della quantificazione di tre concentrazioni di caffeina tramite più calibrazioni eseguite subito prima dell'analisi

Concentrazione reale (mM)	Altezza del campione (mm)	Concentrazione misurata (mM)	Deviazione standard (mM)	Accuratezza (% rispetto alla concentrazione reale)	Precisione (% SD)
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%
Totale				99,74%	0,51%

Tabella 4. Effetto dell'altezza del campione su accuratezza e precisione

Concentrazione reale (mM)	Altezza del campione (mm)	Concentrazione media misurata (mM)	Deviazione standard (mM)	Accuratezza (% rispetto alla concentrazione reale)	Precisione (% SD)
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	—	—	—	—
Totale				99,98%	0,42%

o la precisione del risultato (tabella 4). L'altezza del campione 3 (30 mm) è troppo ridotta perché lo shim automatico funzioni in modo adeguato e perciò i risultati per questo campione sono stati omessi.

Il secondo esperimento è stato ripetuto con i campioni 1 e 2 disaccoppiando il ¹³C durante l'acquisizione in modo da far coalescere i satelliti ¹³C⁹. In totale sono stati eseguiti 98 studi su ciascun campione con lo spettrometro programmato per ripetere ogni serie (sette studi qNMR, ognuno dei quali caratterizzato da una calibrazione automatica con lo standard esterno seguito dalla quantificazione

dei due campioni) ogni due ore in un periodo di tempo di 28 ore. La traccia inferiore nella figura 5 mostra lo spettro di riferimento accoppiato e visualizza l'evidente risoluzione dei satelliti del ¹³C dai segnali del ¹²C. Nella traccia superiore della figura 5 è possibile notare che i picchi dei satelliti del ¹³C sono totalmente scomparsi sotto la banda della risonanza principale. L'accuratezza e la precisione della quantificazione rimangono molto buone nonostante la possibilità di errori o di un incremento del rumore provocati dal disaccoppiamento a banda larga del ¹³C (tabella 5).

Tabella 5. Effetto del disaccoppiamento del ¹³C su accuratezza e precisione

Concentrazione reale (mM)	Altezza del campione (mm)	Concentrazione media misurata (mM)	Deviazione standard (mM)	Accuratezza (% rispetto alla concentrazione reale)	Precisione (% SD)
52,11	54	52,09	0,20	99,96%	0,37%
50,44	35	50,44	0,17	100,00%	0,49%
Totale				99,98%	0,43%

Massima accuratezza e precisione nella quantificazione, anche in presenza del disaccoppiamento del ^{13}C

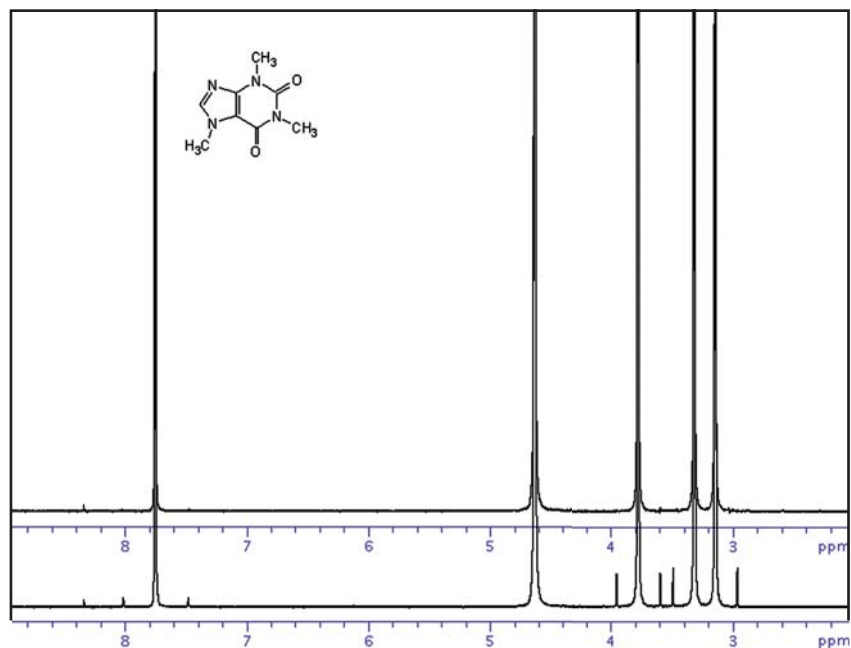


Figure 5. Spettro del campione di caffeina (vedi struttura) ottenuto con (in alto) o senza (in basso) disaccoppiamento "bi-level" a banda larga del ^{13}C di potenza sufficiente a disaccoppiare un intervallo di frequenza del ^{13}C pari a 240 ppm ^{13}C . In entrambi gli esperimenti è stato utilizzato un tempo di acquisizione NMR di 3,6 secondi. Il disaccoppiamento è stato eseguito tramite il protocollo BilevelDEC presente nella scheda Std1D di Experiment Selector.

Conclusione

La spettroscopia NMR mostra tutte le proprietà che si desidera siano presenti in una tecnica quantitativa: specificità, selettività, sensibilità, linearità, elevato intervallo dinamico, fattori di risposta unitari e, più importante, rilevazione universale per tutte le molecole organiche che contengono protoni. Lo svantaggio principale dell'utilizzo del sistema NMR nelle analisi quantitative è sempre stata l'assenza di linearità dell'hardware NMR disponibile in commercio. La correzione di questi errori per ogni campione è possibile, ma richiede l'aggiunta di standard chimici interni o l'inserimento di un segnale di riferimento esterno nei dati sperimentali. L'utilizzo di standard interni è laborioso e aggiunge un'altra forma di errore alle misure, mentre i metodi per generare un segnale di riferimento esterno hanno tutti finalità molto limitate e/o sono intrinsecamente più a rischio di errori.

I sistemi NMR Agilent sono unici in quanto il circuito del ricevitore è totalmente digitale, fornendo così una linearità di risposta senza precedenti in un ampio intervallo di concentrazioni del campione. La sonda OneNMR sopporta inoltre molto bene le variazioni relative di altezza dei campioni, solventi e costanti dielettriche. Combinando questo robusto hardware con un software sofisticato, Agilent ha sviluppato uno strumento eccezionale per l'analisi quantitativa. È possibile eseguire in maniera facile e veloce la quantificazione NMR accurata e precisa dei campioni tramite integrazione assoluta, utilizzando il software VnmrJ 3.1 e una calibrazione una tantum con uno standard esterno a concentrazione nota. È possibile ottenere un'accuratezza nella quantificazione di composti organici caratterizzati da piccole molecole compresa tra 96,98 e 102,12% e una precisione di 0,59 su 1,07%. Accuratezza e precisione ancora maggiori (99,48-100% e 0,35-0,60% rispettivamente) possono essere ottenute utilizzando una calibrazione

eseguita subito prima della quantificazione nel corso di ogni studio in modo da compensare piccole variazioni di stabilità dovute ai cambiamenti ambientali del laboratorio. Usando questo metodo, perfino il disaccoppiamento del ^{13}C a banda larga non influisce in maniera significativa sull'errore nelle misure. Questi livelli di accuratezza e precisione possono essere ottenuti velocemente e con facilità tramite le funzioni del software per acquisire e conservare i parametri di calibrazione, impostare e pianificare gli studi di quantificazione e creare report personalizzati.

Infine, anche se questa nota applicativa descrive solo la quantificazione attraverso la spettroscopia NMR al protone, i nuovi strumenti qNMR sono indipendenti dalla frequenza. Gli utenti possono eseguire lo stesso tipo di calibrazione per qualunque nucleo appropriato (ad esempio, ^{31}P , ^{19}F , ^{13}C e così via) implementando quindi per questi nuclei lo stesso flusso di lavoro già descritto.

Riferimenti

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).

Per ulteriori informazioni

Per saperne di più:

www.agilent.com

Acquista online:

www.agilent.com/chem/store

Trova il centro clienti Agilent più vicino a te:

www.agilent.com/chem/contactus

Italia

numero verde 800 012 575

customercare_italy@agilent.com

Europa

info_agilent@agilent.com

www.agilent.com

Le specifiche di prodotto e le descrizioni contenute nel presente documento possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc., 2011
Pubblicato negli Stati Uniti, 08 aprile 2011
Numero di pubblicazione 5990-76011TE



Agilent Technologies