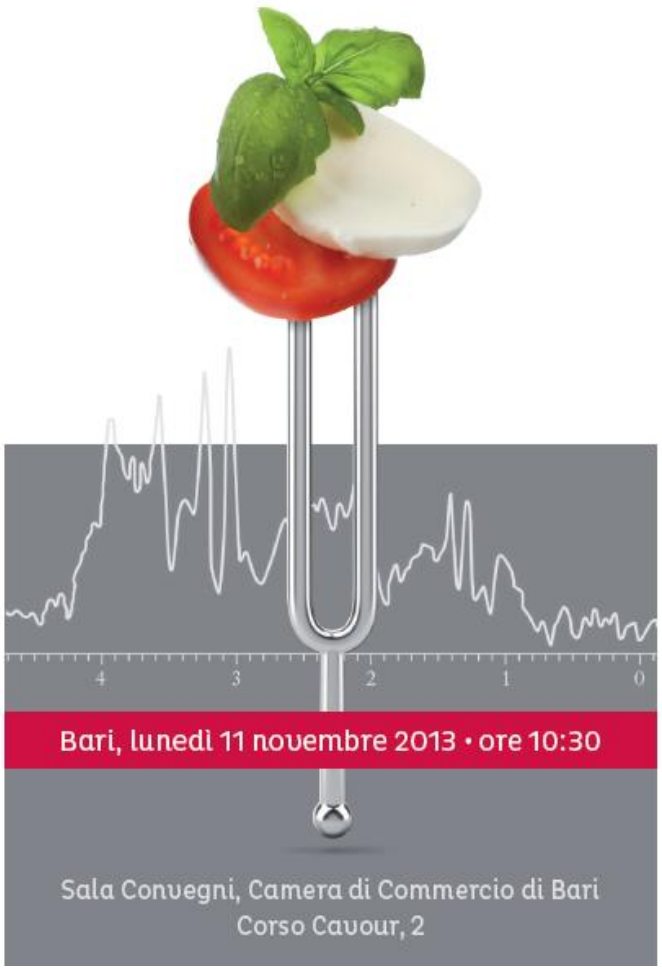
Camera di Commercio di Bari
Azienda Speciale
SAMER
Laboratorio Pubblico

RETELAB
RETE DEI LABORATORI DELLE CAMERE DI COMMERCIO

CAMERA DI COMMERCIO
INDUSTRIA, ARTIGIANATO E AGRICOLTURA DI BARI

UNIONCAMERE
CAMERE DI COMMERCIO D'ITALIA



RISONANZA MAGNETICA E CONTROLLO QUALITÀ

Impostazione degli esperimenti NMR nel primo confronto interlaboratorio Retelab

Dott. Vito Gallo

Ricercatore presso il Politecnico di Bari

Consulente Scientifico di SAMER
Laboratorio della Camera di Commercio di Bari

Perché un circuito Interlaboratorio NMR?

Perché la Risonanza Magnetica è una tecnica dalle elevate potenzialità per valutazioni qualitative e quantitative

Per divulgare le potenzialità analitiche dell'NMR

Perché è necessario validare e rendere ufficiali i metodi NMR

Perché non esistono altri circuiti NMR in Italia

Trends in Analytical Chemistry, Vol. 35, 2012 Trends

Quantitative ^{1}H NMR spectroscopy

Santosh Kumar Bharti, Raja Roy

$$I_x = K_s \cdot N_x$$

2. Basics of qNMR spectroscopy

The most important fundamental relationship of qNMR is that the signal intensity in the NMR spectrum is directly proportional to the number of nuclei responsible for that particular resonance:

$$I_x \propto N_x, \text{ so } I_x = K_s \cdot N_x \quad (1)$$

where K_s is the spectrometer constant and remains the same for all resonances in a NMR spectrum. However, factors that affect K_s are:

(a) pulse excitation (that should be uniform throughout the spectral width);
(b) repetition time (should be 5 times T_1); and,
(c) broad-band decoupling, which causes inherent distortion in intensity due to the Nuclear Overhauser Effect (NOE).

Trends in Analytical Chemistry, Vol. 35, 2012 Trends

Quantitative ^{1}H NMR spectroscopy

Santosh Kumar Bharti, Raja Roy

5. Referencing techniques in qNMR

5.1. Internal standard

5.2. External standard

5.3. Standard-addition and calibration-curve methods

5.4. Electronic reference method (ERETIC)

5.5. Amplitude-corrected Referencing Through Signal Injection (ARTSI)

5.6. QUANTification by Artificial Signal (QUANTAS) or digital referencing

5.7. Pulse Into Gradient (PIG)

5.8. Pulse length based concentration determination (PULCON)

Trends in Analytical Chemistry, Vol. 35, 2012 Trends

Quantitative ^{1}H NMR spectroscopy

Santosh Kumar Bharti, Raja Roy

5. Referencing techniques in qNMR

5.1. Internal standard

5.2. External standard

5.3. Standard-addition and **calibration-curve** methods

5.4. Electronic reference method (ERETIC)

5.5. Amplitude-corrected Referencing Through Signal Injection (ARTSI)

5.6. QUANTification by Artificial Signal (QUANTAS) or digital referencing

5.7. Pulse Into Gradient (PIG)

5.8. Pulse length based concentration determination (PULCON)

Le precedenti esperienze

ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 38 (2005) 813–823

JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS

www.elsevier.com/locate/jpba

Validation of quantitative NMR

F. Malz*, H. Jancke

1999. H. Jancke, F. Malz

First national (NMR-1) and international (CCQM-4) intercomparisons have been organized by the Federal Institute of Materials Research and Testing, Berlin, Germany.

Including over 30 participants from laboratories of universities, research institutes, companies and national metrology institutes, it was found that the results did differ enormously (up to 100%) not only between the participating laboratories but also with respect to the gravimetric reference values by analysing a simple five model compound mixture. This unacceptable result is mainly caused by the individual and independent setup of the measurements and the data processing and evaluation procedures in each laboratory.

Le precedenti esperienze

ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 38 (2005) 813–823

JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS

www.elsevier.com/locate/jpba

Validation of quantitative NMR

F. Malz*, H. Jancke

2005. H. Jancke, F. Malz

Second national (NMR-2) intercomparison has been organized by the Federal Institute of Materials Research and Testing, Berlin, Germany

The objective of our efforts was to overcome this serious analytical problem by identifying the various sources of errors in detail. As a result, a protocol for experimental setup of the measurement and the subsequent data processing and handling has been developed and tested intensively using different spectrometer configurations. Additionally, a new national intercomparison (NMR-2) with a large number of participants has been performed and proved the applicability of qNMR as validated method. Also, the validation has been extended to purity determination of selected pharmaceutical substances. This paper focuses on the detailed description of all possible sources of errors, their influence on the final uncertainty budget and, most importantly, on the explanation of the new measurement protocol for qNMR and its first results.

Spettrometri utilizzati:

- 300 MHz 1
- 400 MHz 1
- 500 MHz 1
- 600 MHz 2
- 800 MHz 1

IL PRIMO CONFRONTO INTERLABORATORIO NMR

- Laboratori aderenti: 36
- Laboratori che hanno fornito risultati: 33
- Set di esperimenti considerati: 38
- Spettrometri utilizzati:
  - 300 MHz 1
  - 400 MHz 17
  - 500 MHz 4
  - 600 MHz 14
  - 700 MHz 2

IL PRIMO CONFRONTO INTERLABORATORIO NMR

I partecipanti

UNIVERSITÀ/ENTE	LABORATORIO	REFERENTI
Agilent Italia S.p.a.		Mauro Cremonini (mauro.cremonini@agilent.it)
Aptuit S.r.l.	Discovery Analytical Science	Silvia Davalli (silvia.davalli@aptuit.com)
Bruker Italia S.r.l.	Laboratorio applicativo NMR	Claudia Napoli (claudia.napoli@bruker.it)
CIRMMP	FiorGen	Claudio Luchinat (cirmmp@cerm.unifi.it) (g.scatizzi@fiorgen.net)
CNR – Istituto dei Composti di Chimica OrganoMetallica		Maurizio Peruzzini (maurizio.peruzzini@iccom.cnr.it)
CNR – Istituto di Metodologie Chimiche	Laboratorio di risonanza magnetica "Annalaura Segre"	Donatella Capitani (donatella.capitani@imc.cnr.it) Luisa Mannina (luisa.mannina@imc.cnr.it) (luisa.mannina@uniroma1.it)
CNR – Istituto per lo Studio delle Macromolecole	Laboratorio NMR	Roberto Consonni (roberto.consonni@ismac.cnr.it)
Consorzio 7C		Corrado Dallacosta (corrado.dallacosta@bruker.it)
CRA	CRA-RPS, Laboratorio di Risonanza Magnetica	Massimiliano Valentini (massimiliano.valentini@entecra.it)
ENEA	Laboratorio NMR CR ENEA Trisaia	Raffaele Lamanna (raffaele.lamanna@enea.it)
Innovative Solutions S.r.l. – Spin Off del Politecnico di Bari		Vito Gallo (areatecnica@innovative-solutions.it) (v.gallo@poliba.it)
Istituto di ricerche chimiche e biochimiche "G. Ronzoni"	NMR Center	Marco Guerrini (guerrini@ronzoni.it)
Istituto zooprofilattico sperimentale dell'Abruzzo e del Molise		Salvatore Milone (s.milone@izs.it)
Politecnico di Bari	DICATECh – Laboratorio NMR	Piero Mastrorilli (p.mastrorilli@poliba.it)
Università del Salento	DISTeBA – Laboratorio di chimica generale ed inorganica	Francesco Paolo Fanizzi (fp.fanizzi@unisalento.it)
Università degli Studi dell'Aquila	Dipartimento di Scienze Fisiche e Chimiche Laboratorio di spettroscopia NMR	Giorgio Cerichelli (giorgio.cerichelli@univaq.it)
Università degli Studi di Bari	Centro interdipartimentale beni culturali	Giuseppe Colafemmina (giuseppe.colafemmina@uniba.it)
Università degli Studi di Bari	Dipartimento di Chimica AFF	Francesco Longobardi (francesco.longobardi@uniba.it)
Università degli Studi di Bari	MetalBioLab – Chimica Bioinorganica	Fabio Arnesano (fabio.arnesano@uniba.it)
Università degli Studi di Bologna	Laboratorio Bio-NMR	Francesco Capozzi (francesco.capozzi@unibo.it)
Università degli Studi di Cagliari	Laboratorio Interdipartimentale NMR	Flaminia Cesare Marincola (flaminia@unica.it)
Università degli Studi di Messina – CNR	Centro NMR Materia Soffice	Francesco Mallamace (francesco.mallamace@unime.it)
Università degli Studi di Milano "Bicocca"	Laboratorio NMR	Cristina Airoldi (cristina.airoldi@unimib.it)
Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia		Adele Mucci (adele.mucci@unimore.it), Maria Cecilia Rossi (mariacecilia.rossi@unimore.it)
Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia	Laboratorio di chimica degli alimenti Dipartimento di Scienze della Vita	Davide Bertelli (davide.bertelli@unimore.it)
Università degli Studi di Napoli "Federico II"	CERMANU	Alessandro Piccolo (alpiccol@unina.it) Pierluigi Mazzei (pierluigi.mazzei@unina.it)
Università degli Studi di Napoli "Federico II"	Laboratorio Prof. Novellino	Antonio Randazzo (antonio.randazzo@unina.it)
Università degli Studi di Padova	Laboratorio Interdipartimentale di Risonanza Magnetica	Stefano Mammi (stefano.mammi@unipd.it)
Università degli Studi di Parma	Laboratorio CIM-tecnopolo	Gabriele Costantino (gabriele.costantino@unipr.it)
Università degli Studi di Perugia	Laboratorio di chimica metallorganica	Alceo Macchioni (alceo@unipg.it)
Università degli Studi di Roma "Sapienza"	Dipartimento di Chimica Laboratori NMR	Maurizio Delfini (maurizio.delfini@uniroma1.it)
Università degli Studi di Roma "Sapienza"	Dipartimento di Chimica Laboratorio NMR	Cesare Manetti (cesare.manetti@uniroma1.it)
Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"	Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche – Laboratorio NMR	Maurizio Paci (paci@uniroma2.it)
Università degli Studi di Siena	Dipartimento di Biotecnologie, Chimica e Farmacia	Daniela Valensin (daniela.valensin@unisi.it)
Università degli Studi di Torino	Torino NMR Laboratory	Roberto Gobetto (roberto.gobetto@unito.it)
Università degli Studi di Verona	Dipartimento di Biotecnologie – Laboratorio NMR	Michael Assfalg (michael.assfalg@univr.it)

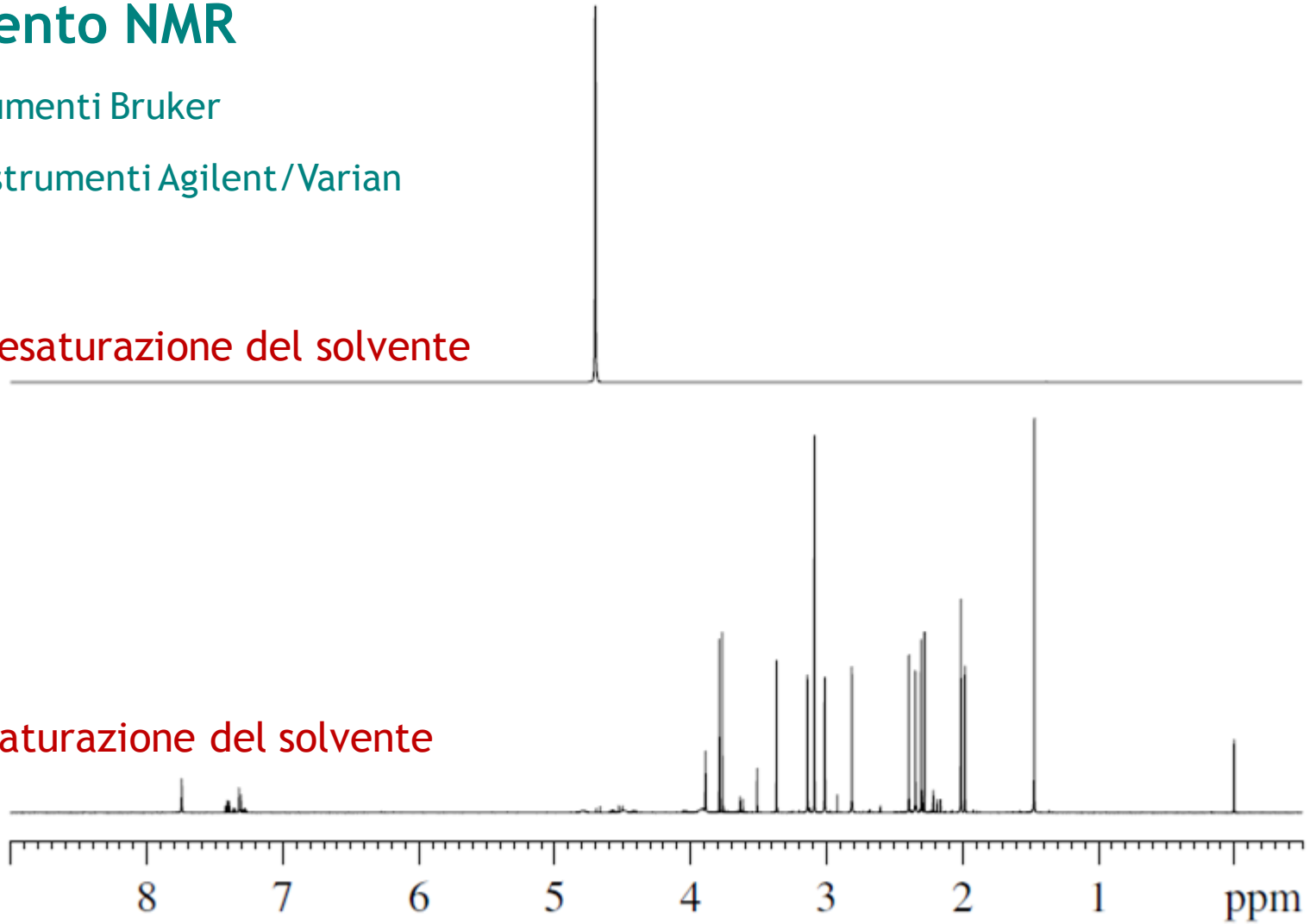
L'esperimento NMR

zgpr per gli strumenti Bruker

PRESAT per gli strumenti Agilent/Varian

Senza presaturazione del solvente

Con presaturazione del solvente

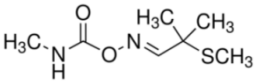


I campioni analizzati:

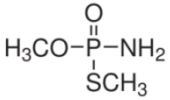
Soluzioni dei quattro principi attivi in D_2O

in presenza di TSP come riferimento interno

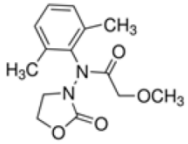
Lab. Instruments S.r.l
www.labinstruments.it



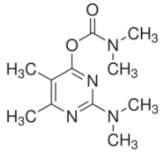
Aldicarb



Methamidophos



Oxadixyl

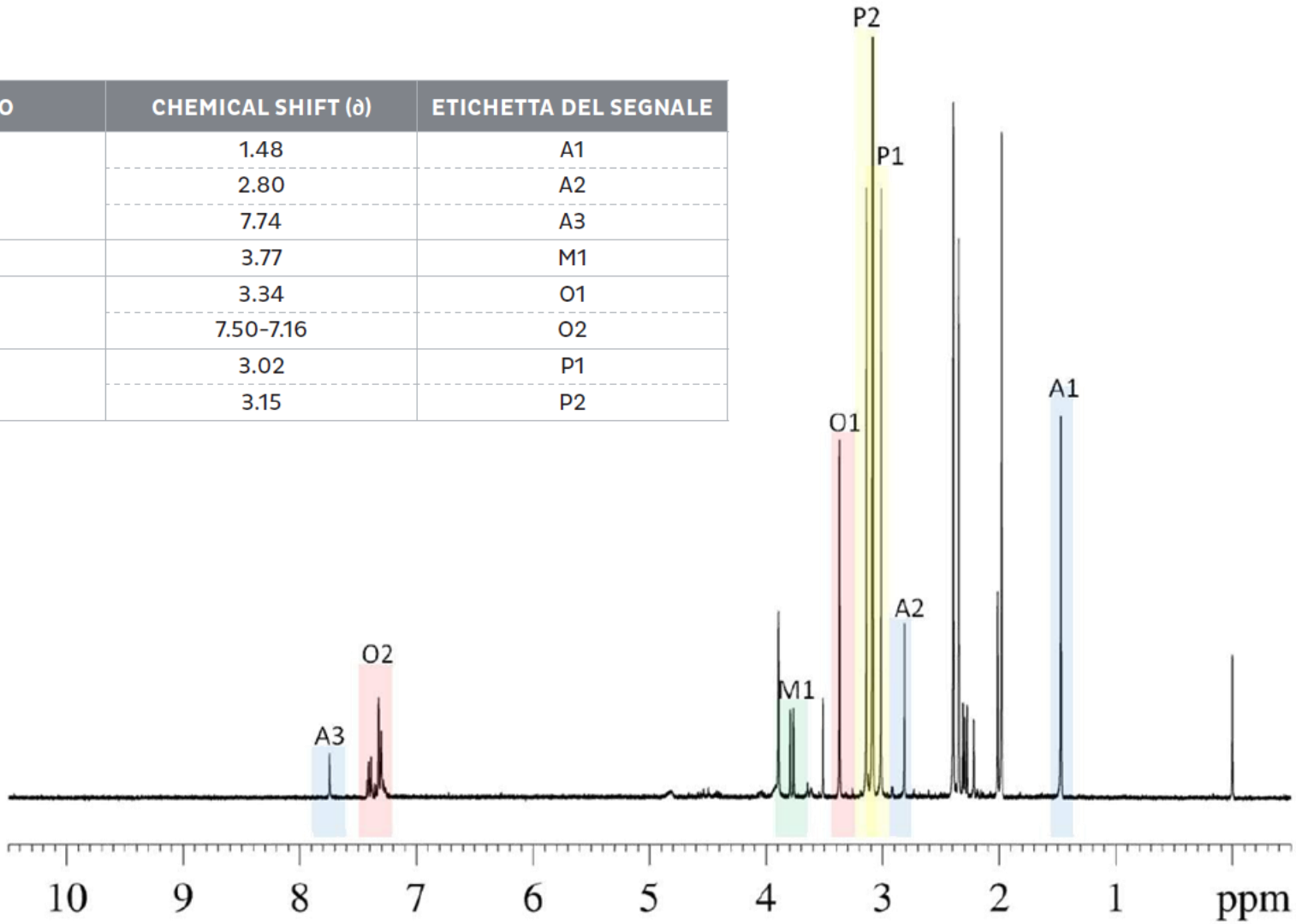


Pirimicarb

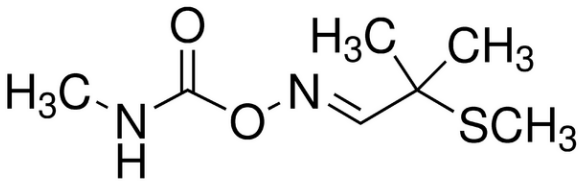
TUBO	PRINCIPIO ATTIVO	CONCENTRAZIONE DICHIARATA	INCERTEZZA DICHIARATA		
A	ALDICARB	498,32	±	6,28	mg/l
	OXADIXYL	500,44	±	6,31	mg/l
	METHAMIDOPHOS	501,23	±	6,32	mg/l
	PIRIMICARB	498,72	±	6,28	mg/l
B	ALDICARB	249,67	±	3,2	mg/l
	OXADIXYL	250,73	±	3,21	mg/l
	METHAMIDOPHOS	251,13	±	3,25	mg/l
	PIRIMICARB	249.87	±	3,2	mg/l
C	ALDICARB	125,91	±	1,64	mg/l
	OXADIXYL	126,45	±	1,64	mg/l
	METHAMIDOPHOS	126,65	±	1,65	mg/l
	PIRIMICARB	126,01	±	1,64	mg/l
D	ALDICARB	62,47	±	0,82	mg/l
	OXADIXYL	62,74	±	0,83	mg/l
	METHAMIDOPHOS	62,84	±	0,84	mg/l
	PIRIMICARB	62,52	±	0,83	mg/l
E	ALDICARB	31,23	±	0,42	mg/l
	OXADIXYL	31,36	±	0,42	mg/l
	METHAMIDOPHOS	31,41	±	0,43	mg/l
	PIRIMICARB	31,25	±	0,42	mg/l

IL PRIMO CONFRONTO INTERLABORATORIO NMR

PRINCIPIO ATTIVO	CHEMICAL SHIFT (∂)	ETICHETTA DEL SEGNALE
Aldicarb	1.48	A1
	2.80	A2
	7.74	A3
Methamidophos	3.77	M1
Oxadixyl	3.34	O1
	7.50-7.16	O2
Pirimicarb	3.02	P1
	3.15	P2



Prima di definire i parametri di acquisizione …



Esempio: Misure del T_1 per soluzioni di Aldicarb in D_20

Conc. [mg/L] in D_2O	Campo	T_1 [s] Segnale 1 7.60 ppm	T_1 [s] Segnale 2 2.67 ppm	T_1 [s] Segnale 3 1.87 ppm	T_1 [s] Segnale 4 1.33 ppm
Soluzione satura	400 MHz	5.01	1.82	2.51	0.82
	700 MHz	5.57	2.17	2.81	0.96
600.31	400 MHz	4.97	1.79	2.46	0.82
	700 MHz	4.36	2.13	2.81	0.95
37.48	400 MHz	nd	2.53	2.64	0.77
	700 MHz	nd	2.02	3.13	0.98

IL PRIMO CONFRONTO INTERLABORATORIO NMR

Parametri di acquisizione (rigorosamente costanti per tutti gli strumenti)

-Numero di punti del FID: 32 kB
-Larghezza della finestra spettrale: 12 ppm
-Offset: coincidente con il segnale residuo dell'acqua (4.70 ppm)
-Recycling delay: 30 s (La presaturazione avviene durante tutto il recycling delay)
-Dummy scans: 2

Parametri di acquisizione (variabili per garantire almeno un rapporto $S_{TSP}/N > 60$)

-Numero di scansioni: ≥ 8
-Guadagno del ricevitore

Procedura di acquisizione (manuale o automatica)

-Inserimento campione e stabilizzazione temperatura a 298.1 ± 0.1 K
-tempo di attesa prima dell'esecuzione dei comandi successivi: 300 s
-Lock (D2O)
-Tuning e Matching;
-Shimming (larghezza a mezza altezza del segnale del TSP ≤ 1.30 Hz con LB=0)
-Calibrazione impulsi
-Ottimizzazione del guadagno del ricevitore
-Registrazione spettro

Gli spettri sono stati registrati in condizioni di
- **ripetibilità stretta**
  [3 ripetizioni con stesso operatore, stesso spettrometro, stesso campione ad intervalli di tempo ravvicinato]
- **ripetibilità intermedia**
  [altre 2 ripetizioni con stesso operatore, stesso spettrometro, stesso campione ad intervalli di tempo maggiori di 24 ore]

In totale, sono stati registrati **35 spettri** cosi suddivisi:
1° sessione: 3 spettri x 7 tubi
2° sessione (almeno 24 ore dopo la prima): 1 spettro x 7 tubi
3° sessione (almeno 24 ore dopo la seconda): 1 spettro x 7 tubi

Processing degli spettri ed elaborazione statistica dei dati

Lavoro svolto da
dott.ssa **Mariangela Vezzoso**

Innovative Solutions S.r.l. – Società Spin Off del Politecnico di Bari
qualita@innovative-solutions.it

Rette di calibrazione (5 replicati per ciascuna concentrazione)

- Retta 123: 3 misure consecutive (senza rimuovere il tubo dallo spettrometro)
- Retta 145: 3 misure intervallate da almeno 24 h
- Retta 12345: con tutte le misure disponibili

Principio attivo	Chemical shift (δ)	Etichetta del segnale (Fig. 1)	Retta utilizzata 123	145	12345
			Conc. (mg/L)	Conc. (mg/L)	Conc. (mg/L)
Aldicarb	1.48	A1	94.74	94.75	94.78
	2.80	A2	95.83	95.75	95.63
	7.74	A3	94.12	93.89	94.06
Methamidophos	3.77	M1	70.74	70.55	70.49
Oxadixyl	3.34	O1	282.53	282.22	282.45
	7.50-7.16	O2	284.00	284.00	284.69
Pirimicarb	3.02	P1	415.66	414.36	414.56
	3.15	P2	418.34	419.15	418.94

Ringraziamenti

Sandro Ambrosi – Presidente *CCIAA di Bari*

Giuseppe Margiotta – Presidente *SAMER*

Piero Pontrelli – *SAMER*

Pasquale Scapicchio – *LACHIMER*

Il gruppo di Chimica del *Politecnico di Bari*

Nicola Bottazzini – *UNICHIM*

Il comitato tecnico-scientifico

Tutti i Laboratori partecipanti

Nicola Intini - *ARPA Puglia*

Mariangela Vezzoso - *Innovative Solutions S.r.l.*

Riferimenti

dott. Vito Gallo

Ricercatore presso il Politecnico di Bari
tel 080 5963607
fax 080 5963611
v.gallo@poliba.it

Consulente scientifico di SAMER – Laboratorio CCIAA Bari
tel 080 5586910
fax 080 5586951
gallo@samer.it

Grazie per l'attenzione!