

Småt er godt – også i NMR

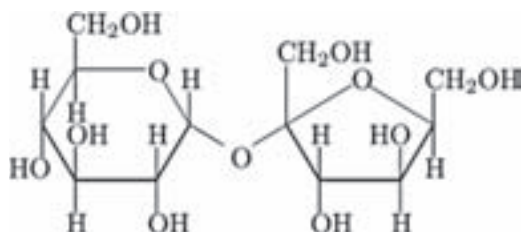
I snart mange år har trenden inden for analytisk kemi været: *how low can you go*, dvs. for hvor små stofmængder og lave koncentrationer kan vi analysere? I løbet af de sidste ti år er der i den forbindelse kommet stadig mere følsomme prober til NMR

Af Claus Cornett, lektor, ph.d., Institut for Farmaci og Analytisk Kemi, Danmarks Farmaceutiske Universitet

Som antydnet er det nu blevet muligt at købe kommercielt fremstillede prober til NMR, der giver brugbare spektre af stadig mindre prøvemængder.

Lige siden jeg startede mit arbejde med NMR, har jeg lagt øre til, at NMR ikke er en særligt følsom metode. Ofte måtte jeg ty til det sidste argument: »men til gengæld skal stoffet ikke udkrystalliseres eller ioniseres på gasfase«.

Heldigvis er der sket fremskridt siden. Der er kommet større (og dyrere) magneter, hvilket i sig selv øger følsomheden. Elektronikken er blevet bedre, og man har fundet på at køle dele af målehovedet – proben – og forforstærkeren med flydende helium, så man minimerer elektrisk støj fra elektronernes varmebevægelse. Man har fået bedre analog til digital-konvertere og kan udnytte dem bedre. I det hele taget er der udviklet en masse smarte teknikker, der sikrer, et så stort og støjfrit signal fra prøven som muligt. Probe-teknologien er også blevet bedre, især for små prober.



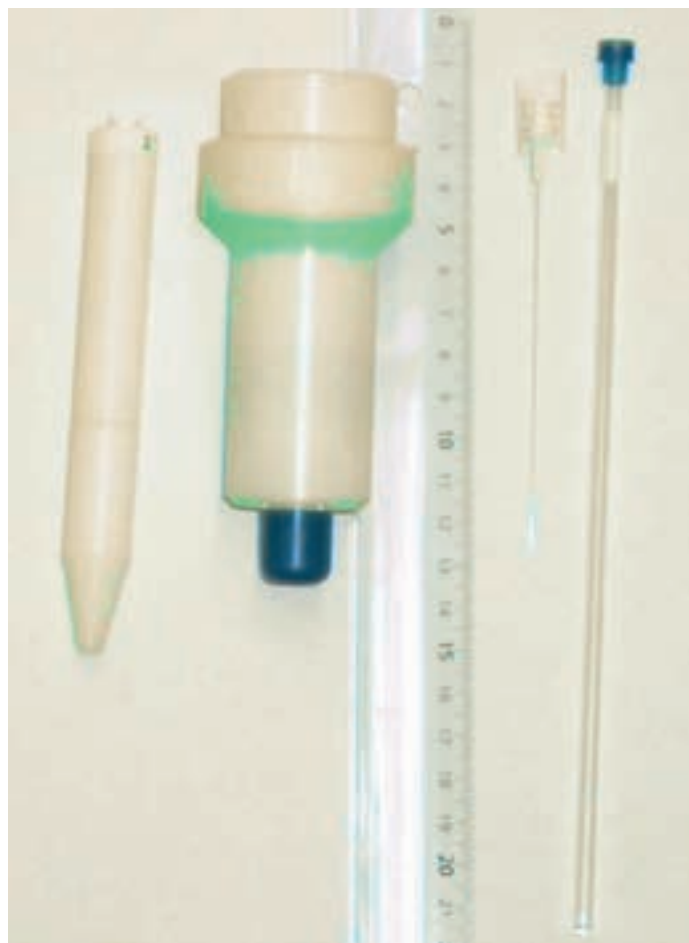
Haworth formel for sucrose. Der blev fremstillet en serie opløsninger med følgende koncentration:

1	10.1 mg/mL	- i 10 µL: 100.8 µg
2	1.01 mg/mL	- i 10 µL: 10.1 µg
3	0.101 mg/mL	- i 10 µL: 1.01 µg
4	0.010 mg/mL	- i 10 µL: 0.1 µg

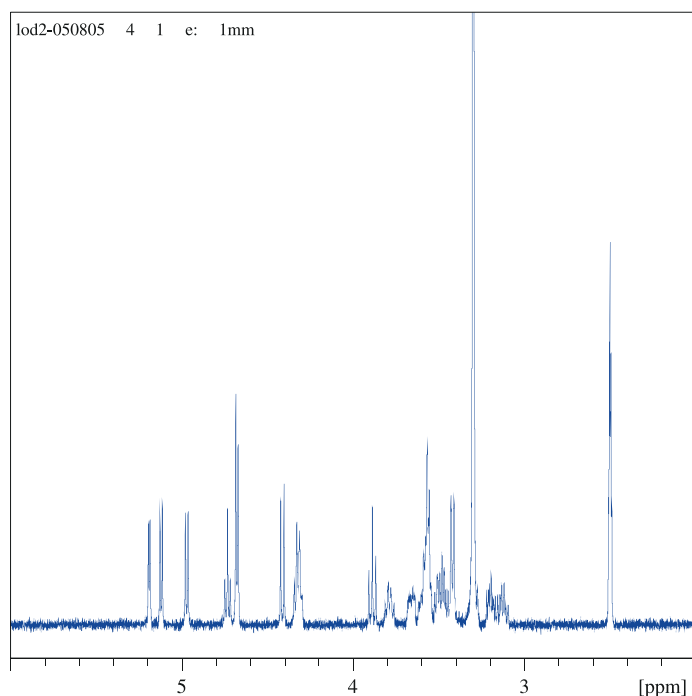
Små prober

I snart mange år har man for de fleste prøver opløst prøvematerialet i 5-700 µL, når der skulle optages et NMR-spektrum. Det svarer til et NMR-rør med en ydre diameter på 5 mm. Det har i mange år virket udmærket, og det er ikke så ufølsom en teknik, som man måske forestiller sig. Ofte er det blot et spørgsmål om at midle nogle flere spektre. Alt har dog en grænse, og på et tidspunkt er det som om, at stoffet forsvinder, og så nytter det ikke noget at forlænge optagetiden. Sker det, kan man samle det opløste stof i et mindre volumen. Hermed øger man antallet af spin pr. volumenenhed, hvilket fører til øget følsomhed [1]. Specielt for flowprober hvor optagespolen kan monteres direkte på prøveglasset, får man en forøget *filling factor*. Den kan groft

sagt forklares med, at jo tættere et spin er på optagespolen, desto større en del af dens magnetfelt detekteres – og dermed forstørres det detekterede signal. Selv blev jeg ganske positivt overrasket første gang, jeg satte en flowprobe i vores 400 MHz NMR. Denne flowprobe (som vi havde lånt af Bruker, tak igen, sidenhen har vi fået bedre og mere moderne udstyr) tillod, at man samlede stoffet i et volumen på ca. 160 µL. Det lyder måske ikke som en stor forbedring sammenlignet med en »normal« 5 mm probe, men det tillod os at opnå ¹H NMR-spektre på 30 minutter af prøver, der før typisk skulle tilbringe 12 timer i ►



Figur 1. Fra venstre mod højre ses: Centrifugeholder til 1 mm rør. Prøveholder (det blå, der stikker ud af bunden er den originale shuttle). Lineal. 1 mm NMR-rør. 5 mm NMR-rør.



Figur 2. ^1H NMR-spektrum af opløsning 2, $NS = 16$, ingen linjeforbredning (!)

NMR-spektrometret. Dertil fik vi væsentligt bedre spektre oveni. Jeg vil ikke komme yderligere ind på flowprober ud over at nævne, at vi nu har dem i størrelsesordenen 30-60 μL . I forbindelse med SMASH 2000-konferencen i Chicago besøgte jeg Magnetic Resonance Microsensors, MRM, der lige var begyndt at markedsføre en 3 μL flowprobe. MRM er siden opkøbt af Protasis. Desværre nåede vi ikke at få bevilget penge til sådan en. Forholdsvis kort tid efter begyndte Bruker at omtale en 1 mm probe til NMR med et solventvolumen på ca. 5 μL . Og sådan en lykkedes det at få hjemkøbt til DFU, nærmere betegnet til vores 400 MHz NMR-instrument. Vi er efterhånden blevet meget glade for den. I flere tilfælde har vi opnået udmærkede spektre af prøver, vi før enten ikke kunne se signaler fra i

praksis eller simpelthen opgav på forhånd. I flere tilfælde har prøverne været fremstillet ved fraktionsopsamling fra et analytisk HPLC-system.

400 MHz-instrumentet er et »widebore«-instrument, hvilket vil sige, at man kan købe prober, der kan tage ganske store rør – vi har bl.a. en 20 mm probe, der er specielt velegnet til tungtop-løselige stoffer. Da vi – som åbenbart de eneste på planeten – har fundet på at indkøbe denne 1 mm probe til et widebore-instrument, gav det i sig selv et mindre problem – der var åbenbart ingen, der havde tænkt over, at man ikke kan købe en prøveholder - shuttle - til et widebore-instrument, men skal sætte et guiderør i hullet i magneten for at anvende en shuttle til et standard bore-instrument.

Vi fik derfor vores dygtige værktøjsmager til at lave en prøveholder-holder (se figur 1), der i øvrigt fungerer fremragende. Og da vi nu var i gang, blev den lavet, så vi kan variere prøvens position ift. optagespolen og derved yderligere mindske det volumen, prøven er opløst i.

Proben er udstyret til at pulse på og observere ^1H direkte og ^{13}C og ^{15}N indirekte fra et volumen på ca. 5 μL . Da vi har en gruppe på instituttet, der forsker i speciering og human metabolisme af selenholdige forbindelser, er vores probe konfigureret med en ^{77}Se -kanal i stedet for ^{15}N -kanalen. Også på det punkt er vi indtil videre den eneste.

Prøveforberedelse

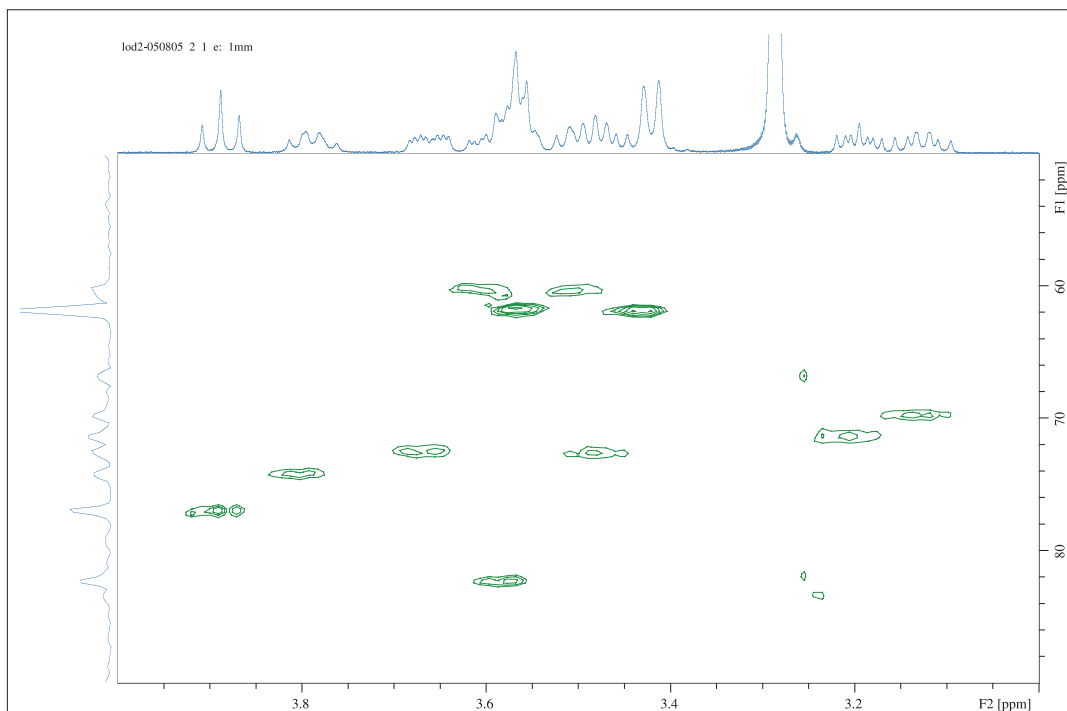
Når magnetfeltet er finindstillet, vha. de standardprøver der følger med proben, dukker næste problem op: Hvordan får man den opløste prøve ned i 1 mm røret, hvis indre diameter er ca. 0,75 mm?

Man centrifugerer. Normalt betragter man det ikke som et problem at få f.eks. en sjat methanol hældt i et NMR-rør, men selv methanol og acetonitril skal centrifugeres ned i 1 mm rørene. Og da vores sikkerhedsgruppe ikke er vilde med de håndsvingsdrevne centrifuger (der stadig fremstilles, men vist ikke må sælges her i landet) har vi fået vores værksted til at fremstille nogle specielle holdere til 1 mm rørene, så man kan bruge en almindelig bordcentrifuge til 14 mL centrifuge»glas« (se billede).

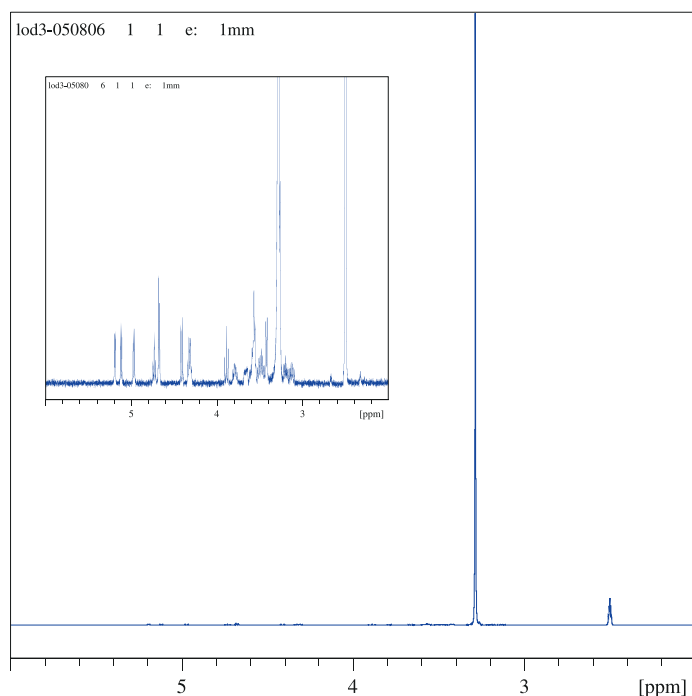
Ovenstående lyder måske frygteligt besværligt, men når man først har fået en ide om, hvor store signaler man kan få ud af hvor lidt, indfinder motivationen sig ganske prompte.

Eksempler

Når man lige har fået sit nye grej, vil man gerne vide, »hvor man er«, dvs. hvor meget stof man kan forvente at få brugbare spektre ud af. I det daglige arbejde vil vi meget gerne kunne opnå ^1H NMR-spektre »med det hele« dvs. både 1D og 2D (primært COSY, NOESY og TOCSY) og helst også ^{13}C NMR-spektre, både 1D og 2D (heteronuklear korrelation af ^1H - og ^{13}C -signalerne vha. både et-bindings koblinger – HMQC, HSQC- og flerbindings koblinger – HMBC. Mere end en binding er langt i dette tilfælde, hvorfor de sidste spektre kaldes



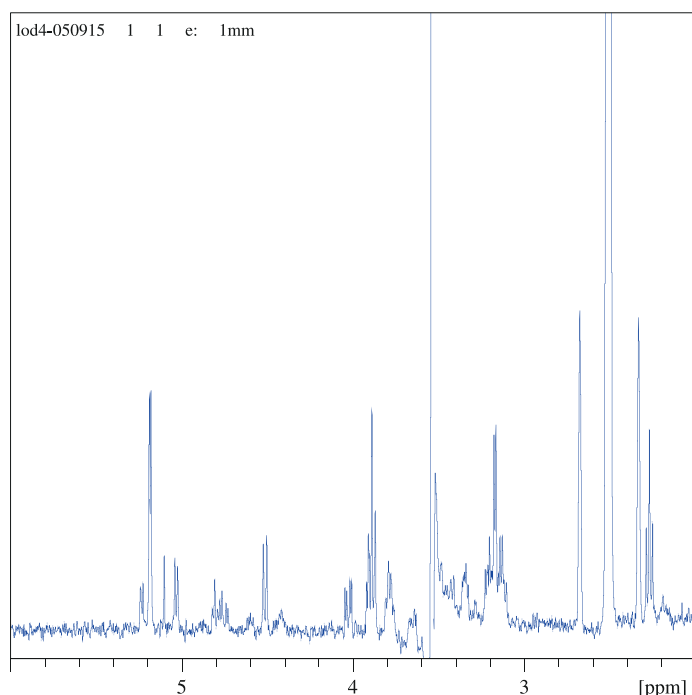
Figur 3. ^1H - ^{13}C HMQC af opløsning 2. 256 inkremitter, 64 scan hver. Ekspansion.



Figur 4. ^1H -NMR-spektrum af opløsning 3 med indsat ekspansion. $NS = 1024$.

long range korrelerede). I praksis forventer vi ikke at kunne opnå $1\text{D } ^{13}\text{C}$ -spektre ved direkte observation af prøverne. Selv for de mest koncentrerede prøver har jeg dårligt nok kunne se signaler fra andet end solventet inden for en praktisk gennemførlig tidsramme, her 48 timer.

Jeg lavede derfor i starten en serie spektre optaget på en fortyndingsrække af sucrose opløst i d_6 -DMSO, da sucrose har en passende molmasse og er let tilgængelig. Designmålet for 1 mm proberne er, at $1\text{ }\mu\text{g}$ af en forbindelse på sucroses størrelse skal give et brugbart ^1H NMR-spektrum på 1 minut.



Figur 5. ^1H NMR-spektrum af opløsning 4. I dette spektrum har det været nødvendigt at undertrykke signalet fra restvand i DMSO'en, men med lidt god vilje kan man genkende spektret.

Konklusion

I praksis regner vi med at kunne følgende (molmasse op til ca. 500 g/mol):

$1\text{D } ^1\text{H}$ -NMR spektrum af 150 pmol opløst i 5 μL solvent: 15 timer.

$1\text{D } ^1\text{H}$ -NMR spektrum af 1,5 nmol opløst i 5 μL solvent: under en time, ned til 15 minutter.

$1\text{D } ^1\text{H}$ -NMR spektrum af 15 nmol opløst i 5 μL solvent: under et minut.

Direkte ^{13}C spektre skal man ikke satse på at få, indirekte via HMQC og HMBC ser ud til at være tilgængelige fra ca. $1\text{ }\mu\text{g}$ opløst i 5 μL solvent. Homonuklear 2D (dvs. på ^1H) fungerer i praksis ned til ca. $0.1\text{ }\mu\text{g}$.

Indirekte ^{77}Se er indtil videre kun testet, mens prøben var hos Bruker. Det fungerede fint dernede, så i løbet af sommeren planlægger vi at teste, om vores forventninger holder stik.

Derudover opfatter vi mikroproben som et supplement til HPLC NMR. Hvilken type analyse vi vælger afhænger af problemet.

E-mail-adresse

Claus Cornett: cc@dfuni.dk

Referencer

1. D. I. Hoult. »The NMR Receiver: A Description of and Analysis of Design. Progress in NMR spectroscopy, 12, 1978, 41-77.

Particle size
Protein analysis
Zeta potential
Particle shape
Molecular weight
Rheology

MALVERN
INSTRUMENTS

www.malvern.se