

CALIBRAÇÃO EM RMNq

GUIA PARA OBTER RESULTADOS RASTREÁVEIS
AO SISTEMA INTERNACIONAL DE UNIDADES (SI)



CALIBRAÇÃO EM RMNq

Guia para obter resultados rastreáveis
ao Sistema Internacional de Unidades (SI)

Wagner Wollinger & Bruno Garrido
Divisão de Metrologia Química e Térmica - Inmetro
wwollinger@inmetro.gov.br / bcgarrido@inmetro.gov.br

A rastreabilidade metrológica é a propriedade de um resultado de medição pela qual tal resultado pode ser relacionado a uma cadeia ininterrupta e documentada de calibrações cada uma contribuindo para a incerteza de medição [1]. Na prática, cada vez que se usa um padrão para uma determinação em química analítica, a rastreabilidade metrológica do resultado daquela medição passa a depender da rastreabilidade metrológica do padrão utilizado. Assim, se um padrão comercial for utilizado, visto que sua fração mássica (de pureza ou concentração) não é rastreável ao SI, o resultado daquela medição também não será. Isso significa na prática que esse resultado só poderá ser comparado com um outro resultado obtido utilizando o mesmo padrão. Daí nasce a propriedade da comparabilidade.

Dois resultados de medição só podem ser comparados se ambos forem rastreáveis a uma referência em comum (figura 1).

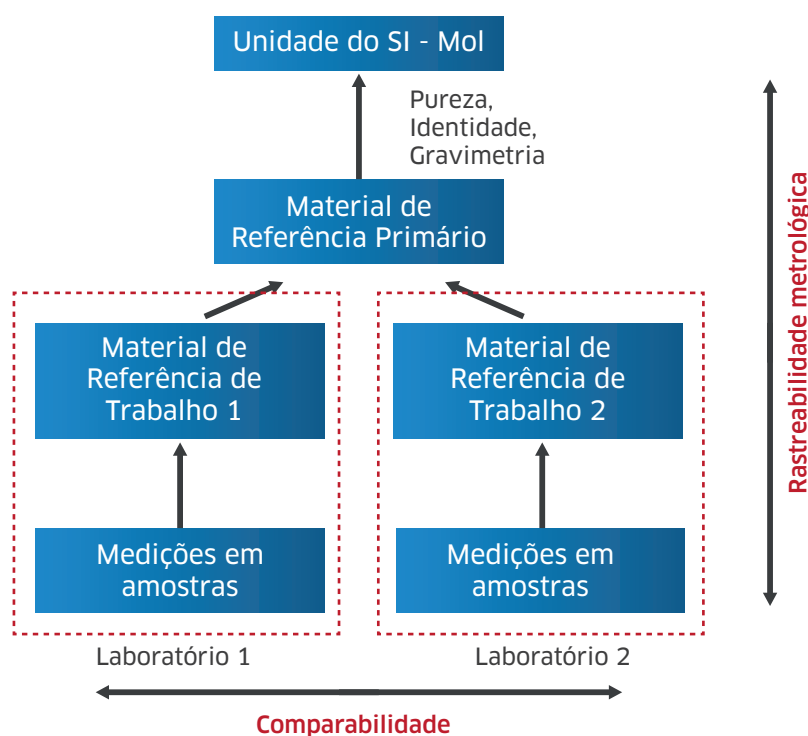


Figura 1 - Esquema simplificado de rastreabilidade metrológica em química

O trabalho do sistema internacional de metrologia é justamente o de prover essa referência comum para uso dos laboratórios em suas medições de forma a permitir que os resultados sejam comparáveis internacionalmente. Esse trabalho teve início em 1875 com a assinatura do tratado do metro e posteriormente os acordos de reconhecimento mútuo. A importância de um sistema como esse reside no fato de que por meio do reconhecimento mútuo, medições realizadas em um país com fins comerciais, por exemplo, não serão questionadas em outro país já que o acordo implica em reconhecer que as medições realizadas em outro local são equivalentes àsquelas realizadas sob seu controle. Assim, há exemplos fáceis de compreender, como o quilograma que consistia até recentemente (maio de 2019) em um padrão físico reconhecido internacionalmente e outros mais difíceis. Após a entrada em vigor do novo SI em 20 de maio de 2019, não existem mais padrões físicos e, portanto, todo o sistema depende fortemente dos Institutos Nacionais de Metrologia e da equivalência entre os mesmos, fato que é declarado por meio das assim chamadas Capacidades de Medição e Calibração (CMC) para cada área da ciência. O Inmetro possui diversas CMC na área de química, demonstrando sua capacidade de produzir materiais químicos rastreáveis ao SI e consequentemente capazes de serem usados para produzir resultados comparáveis com aqueles obtidos em qualquer ponto do Globo.

2.

ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR QUANTITATIVA (RMNq)

A importância da espectroscopia de RMN para a química analítica e metrologia química vem crescendo em razão de seu potencial quantitativo. O Bureau Internacional de Pesos e Medidas (BIPM) e autores relevantes para a área consideram a RMNq um método de medição primário, ou seja, um método que fornece resultados diretamente rastreáveis ao Sistema Internacional de Unidades (SI), sem precisar de padrões ou materiais de referência intermediários, nem de fatores de correção empíricos [1]–[4]. Tomando como exemplo a gravimetria, método primário consagrado, é possível facilmente compreender que nem todas as determinações de massa feitas em balanças são medições primárias. Na realidade, para que a propriedade do método primário seja mantida, há uma série de requisitos que devem ser seguidos como a calibração adequada, o manuseio correto dos equipamentos e o uso de padrões com rastreabilidade, dentre outros. Da mesma forma, nem todas as determinações quantitativas feitas por RMN serão consideradas primárias e esse documento tem por objetivo mostrar alguns dos requisitos que devem ser seguidos para que a medição tenha essa propriedade.

3.

PADRÕES PARA RMNq

Como a RMNq se baseia na resposta de determinados núcleos dos compostos que estão sendo analisados, um material de referência de uma substância diferente pode ser usado como padrão, desde que essa substância contenha o núcleo utilizado na análise, por exemplo, hidrogênio (^1H). Essa propriedade é muito útil quando não existe material de referência disponível para aquela substância. Por essa razão, a RMNq vem sendo utilizada com frequência em determinações de pureza de compostos orgânicos, necessárias para estabelecer a cadeia de rastreabilidade metrológica de medições subsequentes. Além disso, a técnica permite que o mesmo material de referência seja usado em diversas quantificações. É necessário porém que os padrões utilizados cumpram uma série de requisitos que serão discutidos nesse documento.

4.

TIPOS DE CALIBRAÇÃO

Embora procedimentos de calibração externa possam ser empregados em RMNq, a calibração interna é mais recomendada por apresentar incerteza de medição menor e potencial para fornecer resultados com rastreabilidade metrológica ao SI. Nesse tipo de calibração, um padrão interno (PI) é adicionado junto com a amostra ao tubo de RMN. Portanto deve ser usada como PI uma substância que não esteja presente na amostra. A determinação da amostra e do PI na mesma análise faz com que ambos estejam sujeitos às mesmas condições experimentais. Isso elimina fontes de variação como diâmetro do tubo, duração do pulso de radiofrequência, ganho do receptor e número de transientes (*scans*), por exemplo. Há também métodos de referência eletrônica, nos quais um sinal é gerado eletronicamente no espectro da amostra (ERETIC™) ou aqueles que se baseiam em propriedades físicas do método (PULCON).

5.

RMNq COMO MÉTODO DE MEDIÇÃO PRIMÁRIO DE RAZÕES

A resposta do sinal de RMN, particularmente a área do sinal integrado (I_i), é diretamente proporcional ao número de núcleos (n_i) que originaram aquele sinal:

$$I_i = K_s \times n_i$$

sendo K_s uma constante do espectrômetro. Se a aquisição do espectro for feita de maneira adequada para quantificação, como será mostrado adiante, K_s será igual para todos os sinais do espectro. Ainda que na prática não seja viável determinar seu valor, o uso da razão entre o sinal do analito (I_A) e o de um PI (I_{PI}) permite retirar K_s da equação:

$$\frac{I_A}{I_{PI}} = \frac{n_A}{n_{PI}}$$



CALIBRAÇÃO EM RMNq

GUIA PARA OBTER RESULTADOS RASTREÁVEIS AO SISTEMA INTERNACIONAL DE UNIDADES (SI)

sendo n_A e n_{PI} o número de núcleos que originaram os sinais do analito e do PI, respectivamente.

Uma vez que o uso da razão entre os sinais do analito e do PI é a melhor forma de se obter resultados quantitativos, a RMNq é chamada de “método de medição primário de razões” [2], [3]. A razão molar n_A/n_{PI} é calculada por:

$$\frac{n_A}{n_{PI}} = \frac{I_A}{I_{PI}} \times \frac{N_{PI}}{N_A}$$

sendo N_{PI} e N_A o número de núcleos equivalentes presentes em cada molécula do PI e do analito, envolvidos nos sinais integrados. Por exemplo, se a molécula do PI apresenta 4 átomos de hidrogênio, mas somente 2 originaram o sinal que foi integrado, $N_{PI} = 2$. A equação anterior pode ser adaptada para cálculos de medições por RMNq. Por exemplo, para determinar a pureza de uma substância:

$$P_A = \frac{I_A}{I_{PI}} \times \frac{N_{PI}}{N_A} \times \frac{M_A}{M_{PI}} \times \frac{m_{PI}}{m_A} \times P_{PI}$$

sendo, respectivamente, M_A e M_{PI} as massas molares do analito e P_{PI} , m_{PI} e m_A as massas pesadas do PI e analito e P_{PI} a pureza do PI [2].

6.

BOAS PRÁTICAS PARA OBTER RESULTADOS DE RMNq RASTREÁVEIS AO SI

O BIPM com a colaboração dos Institutos de Metrologia do Brasil (Inmetro), China (NIM), Turquia (UME) e Japão (NMIJ) elaborou uma série de documentos a respeito de PIs e procedimentos para RMNq que podem ser acessados no endereço <https://www.bipm.org/en/bipm/chemistry/organic-analysis/qnmr/> [5]–[11]. Suas principais recomendações serão mostradas a seguir, juntamente com a experiência do Inmetro na área. Esse texto foi pensado para RMN de ^1H , núcleo que apresenta spin $\frac{1}{2}$, abundância isotópica elevada (99,98 %) e faixa espectral pequena (20 ppm). Se outros núcleos forem analisados, outros cuidados devem ser tomados também. Por exemplo, verificar a influência do perfil de excitação do pulso é importante em caso de núcleos de faixa espectral extensa, como ^{19}F . Já o fracionamento isotópico natural exerce influência significativa em núcleos menos abundantes, como o ^{13}C [12]–[14]. Além disso, os resultados só serão absolutamente quantitativos quando uma sequência simples do tipo pulso-aquisição for utilizada já que em sequências mais complexas é muito comum que haja efeitos que potencializam ou inibem diferencialmente alguns sinais, como as perdas por relaxação em longas sequências bidimensionais que não são equivalentes para todos os sinais visto que cada um possui sua constante de tempo de relaxação.

6.1. Identificação

O primeiro passo para RMNq é confirmar a identidade da substância que será quantificada, utilizando RMN qualitativa ou outras técnicas. Em seguida, verificar sua massa molar (M) e o número de núcleos (N) envolvidos em cada sinal que será integrado. Depois adquirir um espectro da amostra pura (sem PI) em solução para verificar se os sinais que serão integrados estão livres de interferentes.

6.2. Escolha do solvente

Na padronização interna, amostra e PI devem estar solúveis no mesmo tubo, portanto o solvente deuterado deve solubilizar ambos. Recomenda-se testar a solubilidade antes da análise, pesando as quantidades que serão usadas de amostra e PI no mesmo tubo e adicionando o solvente – que não precisa ser deuterado para esse teste. Uma fração não solubilizada da amostra ou do PI causará erro no resultado final, portanto devem-se evitar concentrações próximas do limite da solubilidade. Os sinais residuais do solvente e da umidade não devem se sobrepor aos sinais que serão integrados. Tabelas com os deslocamentos dos solventes mais utilizados estão disponíveis na literatura [15]. Um espectro do solvente puro deve ser adquirido para verificar se apresenta alguma impureza que atrapalhará a análise.

6.3. Escolha do PI

O PI selecionado deve apresentar pelo menos um sinal em região do espectro livre de sinais da amostra ou interferentes.

Para manter a cadeia de rastreabilidade metrológica, deve ser utilizado como PI um material de referência certifica-



CALIBRAÇÃO EM RMNq
GUIA PARA OBTER RESULTADOS RASTREÁVEIS
AO SISTEMA INTERNACIONAL DE UNIDADES (SI)

do (MRC) produzido por um Instituto Nacional de Metrologia (INM) ou por um produtor de MRC acreditado pela norma ABNT NBR ISO 17034 [16]. Pode-se ainda utilizar um material de pureza elevada cujo valor de pureza tenha sido determinado no laboratório do usuário utilizando procedimento validado de RMNq. Nesse caso, o PI utilizado na análise deve ser um MRC produzido por INM ou por produtor acreditado pela norma ABNT NBR ISO 17034. Idealmente, o material usado como PI deve apresentar pureza mínima de 995 mg/g (ou 99,5 %) e incerteza de medição inferior a 5 mg/g (ou 0,5 %). Seu espectro de RMN deve conter poucos picos (de preferência um só) em forma de simpleto ou multipeto simples, sem interferentes nas regiões integradas. Deve ser solúvel e inerte no solvente de RMN e não deve reagir com a amostra. Para facilitar a pesagem, não deve ser higroscópico, volátil ou sujeito a efeitos eletrostáticos. Deve ainda apresentar razão adequada entre número de átomos de hidrogênio quantificáveis e massa molar, de modo a evitar a pesagem de massa excessivamente baixa do PI para obter sinais da mesma ordem de grandeza da amostra [11].

Um espectro do PI puro deve ser adquirido no solvente que será usado para verificar se apresenta alguma impureza que atrapalhará a análise.

6.4. Pesagem

Erros de pesagem da amostra ou do PI ou perda de material durante transferências subsequentes terão efeito direto, sendo essa uma das principais fontes de erro nos resultados de medição. Portanto, o procedimento de pesagem deve estar bem estabelecido e a umidade relativa do laboratório deve estar entre 30 e 70 % no momento da pesagem.

A pesagem é uma fonte importante de incerteza para RMNq. Por exemplo, caso a incerteza-padrão esperada para o resultado seja 0,1 %, a incerteza relacionada aos procedimentos de pesagem deveria ser tipicamente menor que 0,03 %. Supondo que a incerteza-padrão combinada da pesagem seja 3 µg (um nível de incerteza atingido por balanças microanalíticas modernas), a massa mínima pesada deve ser 10 mg para que a incerteza final não fique acima do valor esperado.

A razão ideal entre as integrais do analito e do PI é 1:1, podendo variar entre 10:1 e 1:10, desde que a relação sinal/ruído seja superior a 1000. Uma vez definida a quantidade da amostra que se pretende utilizar, a massa do PI pode ser obtida por:

$$m_{PI} = m_A \times \frac{N_A}{N_{PI}} \times \frac{M_{PI}}{M_A}$$

no caso do uso de um MRC como PI, deve-se levar em conta também a quantidade mínima que pode ser usada do MRC, conforme descrito em seu certificado. A pesagem não deve ser feita diretamente no tubo de RMN. Além da dificuldade para pesar num tubo com abertura tão pequena, a solubilização do material seria difícil. Podem ser usados frascos de vidro com auxílio de barcas de pesagem de alumínio, por exemplo.

6.5. Preparo da amostra

Uma vez que amostra e PI tenham sido pesados adequadamente, o resultado quantitativo dependerá da razão entre as duas massas. Portanto, o volume do solvente (ou a concentração das substâncias) não entrará no cálculo, de modo que uma medida simples de volume com micropipeta, por exemplo, é suficiente. O volume utilizado deve ser suficiente para solubilizar amostra e PI e para alcançar a altura mínima no tubo de RMN, recomendada pelo fabricante para a sonda utilizada. Agitação em vórtex auxilia na dissolução dos sólidos. Banho de ultrassom também pode ser usado desde que não comprometa a estabilidade da amostra.

Em caso de amostras pouco solúveis ou disponíveis em quantidades pequenas, pode ser necessária uma quantidade muito pequena do PI, tornando inviável a pesagem direta do sólido. Nessa situação, uma solução intermediária do PI pode ser preparada em solvente deuterado e uma alíquota dessa solução adicionada à amostra. Como o volume e a concentração da solução serão usados para calcular a massa de PI adicionada à amostra, os volumes devem ser medidos com exatidão nesse caso. Para reduzir a incerteza final, recomenda-se preparo gravimétrico, feito pela pesagem tanto do solvente usado para a solução intermediária, quanto da solução de PI adicionada à amostra.

6.6. Otimização do espectrômetro de RMN

Não existe uma especificação de campo magnético mínimo para ensaios quantitativos, embora campos mais altos aumentem a resolução e a sensibilidade, melhorando a exatidão e a precisão dos resultados. Para que os resultados sejam quantitativos, é necessário que a amostra esteja totalmente polarizada antes do experimento ser iniciado e

que ocorra relaxação completa de todos os núcleos antes de cada aquisição. A polarização da amostra acontece rapidamente assim que o tubo é colocado no magneto, sendo normalmente suficiente o tempo que se gasta para sintonizar a sonda e homogeneizar o campo magnético. Já o tempo de relaxação depende de diversos fatores, como ambiente químico em que o núcleo está inserido, concentração da amostra, solvente utilizado e temperatura [17]. Portanto, deve ser avaliado para cada procedimento de medição. Se esses requisitos forem atendidos, pode-se esperar que a resposta seja linear em qualquer concentração, bem como entre amostras e aquisições diferentes.

Os parâmetros de aquisição recomendados para ensaios quantitativos estão resumidos na tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros de aquisição recomendados para RMNq [18]

Parâmetro	Recomendação	Comentário
Homogeneidade do campo magnético (<i>shimming</i>)	picos simétricos com largura < 1 Hz na metade da altura do pico	Importante para que a resposta seja uniforme ao longo da faixa de deslocamentos químicos e para evitar que a área de integração se torne muito larga.
Ângulo do pulso	90°	Não afeta diretamente a quantificação, mas diminui o tempo de aquisição para que se atinja relação sinal/ruído adequada.
Centralização do pulso (<i>offset</i>)	Na frequência central (média) dos sinais integrados	Compensa erros causados quando os picos estão fora de ressonância (<i>off-resonance</i>)
Tempo de repetição (tempo de aquisição + tempo de espera ou intervalo de relaxação)	$10 - 15 \times T_1$	Considerar o T_1 mais longo do espectro; depois de um pulso de 90°, uma espera de $10 \times T_1$ é suficiente para recuperar mais de 99,995 % da magnetização
Número de transientes (<i>scans</i>)	Suficiente para atingir relação sinal/ruído > 1000	Verificar se cada sinal que será integrado atingiu esse critério
Janela espectral	> 20 ppm	Em alguns instrumentos, o uso de faixa espectral extensa (<i>oversampling</i>) pode melhorar o resultado por filtrar ruídos de frequências distantes que podem ser rebatidos para a faixa do espectro que será utilizada
Tempo de aquisição	> 2,5 s (recomenda-se 4 s)	Importante para melhorar a resolução digital; se for muito baixo, produz sinais truncados; se for alto demais, aumenta o ruído
Resolução digital	< 0,4 Hz/ponto	Para não prejudicar o formato do sinal digitizado
Rotação do tubo (<i>spinning</i>)	sem rotação	Para evitar contribuições indesejáveis de interferências da rotação no espectro (<i>spinning sidebands</i>)
Replicatas de aquisição do mesmo tubo	> 3	Devem ser medidas independentes, isto é, o tubo deve ser retirado ao final da primeira aquisição, recolocado e todo o procedimento repetido (<i>locking</i> , <i>sintonia</i> , <i>shimming</i>); a análise de uma amostra distinta, em outro solvente, entre uma aquisição e outra aumenta a independência das aquisições

Experimentos bidimensionais como HSQC podem ajudar a verificar se os sinais escolhidos para quantificação são unicamente da amostra ou do PI, sem contribuição de impurezas. Entretanto, a sensibilidade desses experimentos é baixa e a ausência de interferências detectáveis não garante que o sinal está totalmente livre de sobreposição com outros picos.

6.7. Processamento dos espectros

O processamento dos espectros exerce influência expressiva nos resultados de RMNq. Durante a etapa de treinamento de analistas novos, sugere-se comparar seu processamento com o de outros mais experientes e ver se os resultados são concordantes. Caso contrário, revisar os procedimentos para identificar a causa da diferença.

Sinais de átomos de hidrogênio lábeis, intercambiáveis ou sujeitos a troca tautomérica nunca devem ser usados para quantificação. Portanto, na grande maioria dos casos, os sinais quantificados serão de átomos de hidrogênio ligados a carbono. O acoplamento do ^1H ao ^{13}C resulta na formação dos chamados satélites de ^{13}C no espectro de ^1H . Somados, os satélites representam aproximadamente 1,1 % da área total do pico (incluindo os satélites). Embora cada posição da molécula tenha um valor específico de abundância de ^{13}C , essa variação representa pouco para o resultado de ^1H . Ou seja, para fins práticos, pode-se considerar que todos os sinais de ^1H ligado a carbono, tanto da amostra quanto do PI, apresentam satélites de ^{13}C de intensidade relativa igual. Portanto, para RMNq de ^1H , os satélites de ^{13}C podem ser incluídos ou excluídos da integração, desde que o mesmo procedimento seja adotado para amostra e PI.

Uma sequência recomendada para o processamento dos espectros é apresentada a seguir, baseada nas orientações do BIPM [18]:

- ajustar a fase do espectro – o ajuste manual costuma fornecer resultados quantitativos melhores;
- calibrar o eixo de deslocamento químico do espectro, utilizando como referência o sinal do TMS ou do solvente, por exemplo, para que a mesma faixa integrada possa ser usada em todos os espectros;
- para melhorar a relação sinal/ruído, pode-se utilizar uma função de multiplicação exponencial aos dados brutos (FID); por exemplo, apodização com alargamento de pico de no máximo 0,3 Hz (recomenda-se de 0,05 a 0,10 Hz para evitar alargamento excessivo);
- integrar os sinais da amostra e do PI que serão quantificados. A região integrada para um sinal deve se estender para cada lado a partir do centro do pico por 76 vezes a largura da metade da altura do pico. Isso corresponde a mais de 99,9 % da área do sinal. No caso de multipletos, deve-se considerar a largura dos picos mais externos. Alternativamente, pode-se integrar a região compreendida em 30 Hz além dos satélites de ^{13}C mais externos. Essa faixa integrada normalmente excede o critério baseado na largura à meia altura. A mesma integração pode ser copiada para os demais espectros da análise;
- corrigir a linha de base. Caso seja usada correção automática, verificar previamente, utilizando amostras de pureza conhecida (materiais de referência, por exemplo), se o algoritmo utilizado para correção não está prejudicando a exatidão ou a precisão dos resultados. A correção manual costuma gerar resultados melhores quando exatidão elevada é importante para o resultado. Nesse caso, pode-se fazer a correção ponto-a-ponto, focando nos picos que serão quantificados. Para isso, adicionar pontos de correção próximos da região integrada, mas fora dela, para que a alteração da linha de base causada pela adição do ponto não se localize dentro de uma área integrada.

Um ou mais picos do PI e da amostra podem ser utilizados na quantificação. No caso da amostra, sempre que possível, deve-se integrar mais de um sinal e calcular o resultado separadamente para cada sinal integrado. A concordância entre os valores obtidos indica, embora não garanta, que os picos integrados estão livres de interferências e que o resultado está correto.

6.8. Estimativa da Incerteza de medição

A identificação das fontes de incerteza de medição pode ser feita a partir da verificação das grandezas de entrada na equação do mensurando, apresentada anteriormente para o caso de uma medição de pureza. Apresentam-se a seguir os principais componentes de incerteza que devem ser avaliados.

A repetibilidade da área integrada do sinal incorpora contribuições de fatores como excitação, população, eficiência de detecção e processamento dos dados, que são fontes de incerteza tipo A. Como uma análise costuma ser feita com pelo menos duas soluções preparadas independentemente, as diferenças de massa pesada influenciarão o resultado absoluto das integrais. Portanto, uma estimativa inicial da incerteza pode ser feita para cada preparo e os valores obtidos podem ser combinados posteriormente. Ou então valores de área normalizados para a menor massa pesada, por exemplo, podem ser adotados para que os resultados de diferentes preparos de amostra sejam avaliados simultaneamente.

As fontes de incerteza das demais grandezas de entrada da equação são do tipo B. A incerteza das massas molares pode ser obtida a partir de dados da IUPAC [19]. O cálculo do peso molecular com a sua respectiva incerteza de medição pode ser realizado em ferramenta online da própria IUPAC [20]. A contribuição da pesagem pode ser avaliada pela incerteza da calibração das balanças e pela contribuição do empuxo. A incerteza do valor de pureza do PI deve ser informada pelo fornecedor do MRC em seu certificado.

7. USO DE UMA REFERÊNCIA ELETRÔNICA PARA CALIBRAÇÃO

O ganho de precisão em RMNq é bastante considerável quando se compara a padronização interna com a padronização externa [21]. No entanto, em muitos casos é difícil encontrar um padrão interno adequado para a realização das análises que cumpra todos os requisitos mostrados aqui. Uma alternativa quando não existe padrão interno adequado é o uso de padronização por referência eletrônica.

A padronização eletrônica elimina a necessidade de se pesar um padrão interno juntamente com as amostras. Esta prática reduz possíveis erros analíticos e torna o processo mais prático, uma vez que uma mesma referência pode ser usada para a quantificação de várias amostras diferentes [22]. O uso de referências eletrônicas fornece resultados com aproximadamente o mesmo nível de precisão daqueles obtidos com padronização interna [21] e, se a referência for adequadamente calibrada, com rastreabilidade metrológica [23].

O uso de referências eletrônicas foi introduzido com o método chamado ERETIC™ (Electronic Reference to Assess In vivo Concentrations) [24], que consiste em criar um pico sintético através da introdução de um pulso de radiofrequência (RF) durante a detecção. Esse sinal sintético pode ser calibrado e usado para medir as concentrações absolutas posteriormente [25]. Uma vez que o ERETIC™ requer o uso de equipamento acessório para a geração do pulso de RF, outro grupo interessado em referências eletrônicas desenvolveu uma metodologia que não depende de instrumento externo, o PULCON (Pulse Length Based Concentration Determination) [26]. O método PULCON (chamado comercialmente de ERETIC2) é baseado num princípio da espectroscopia de RMN chamado princípio da reciprocidade que, de maneira sucinta, diz que a intensidade de um sinal de RMN é inversamente proporcional à largura do pulso de 90° da amostra. Dessa forma, o método promete uma forma robusta e de fácil utilização para medição de concentrações em soluções. Tanto o ERETIC™ quanto o PULCON requerem a calibração da referência eletrônica por uma referência, que pode então ser utilizada para a quantificação de diversas amostras com a mesma sonda de RMN e, para obter medidas com rastreabilidade metrológica, essa calibração da referência deve ser feita seguindo exatamente os mesmos passos descritos na seção 6 desse documento, porém usando apenas o material de referência certificado que naquele caso seria o PI.

Utilizando o PULCON, a concentração de uma amostra pode ser calculada através da Equação [26]:

$$C_{amostra} = f_T * C_{ref} * \frac{S_{amostra} * T_{amostra} * \theta_{amostra} * n_{ref}}{S_{ref} * T_{ref} * \theta_{ref} * n_{amostra}}$$

onde $C_{amostra}$ e C_{ref} são as concentrações molares da amostra e da referência, f_T é um fator de correção para o uso de diferentes ganhos do receptor nas aquisições da amostra e da referência e para relaxação incompleta, T são as temperaturas de aquisição, θ são os comprimentos de pulso e n o número de transientes usados nas aquisições.

A partir de um tratamento cuidadoso dos parâmetros de aquisição e do uso de relações básicas da química, essa equação pode ser usada para o cálculo direto de frações em massa conforme demonstrado em trabalho do nosso grupo [22]:

$$w_{amostra} = \frac{V_{amostra} * w_{estoque} * m_{estoque} * S_{amostra} * \theta_{amostra} * RG_{ref}}{m_{amostra} * V_{ref} * S_{ref} * \theta_{ref} * RG_{amostra}}$$

onde $w_{estoque}$ é a fração em massa da solução usada para o preparo da referência, $m_{estoque}$ é a massa de solução estoque pesada para o preparo da referência, V_{ref} e $V_{amostra}$ são os volumes de solvente, $m_{amostra}$ é a massa pesada de amostra e RG são os ganhos do receptor usados nas aquisições. É conveniente usar o mesmo ganho para as aquisições de forma a eliminar esse fator da equação.

É extremamente importante ressaltar que o princípio das medições feitas utilizando o método PULCON leva em conta a duração (largura) do pulso utilizado na aquisição, ou seja, esse parâmetro deve obrigatoriamente ser determinado em cada amostra a ser medida levando em conta a largura obtida para o sinal de interesse. Caso isso não seja feito, o método será na realidade uma padronização externa simples e não mais uma medida com PULCON. Maiores informações práticas sobre esse método e suas fontes de incerteza podem ser vistas na referência [22].

Para a calibração da referência eletrônica, uma amostra de um MRC que cumpra os mesmos requisitos da seção 6.3 deve ser preparada. Nesse caso, é importante que o preparo seja feito de forma a resultar em uma concentração muito bem caracterizada, ou seja, a pesagem do pó deve ser feita de acordo com 6.4 e a adição do solvente deve ser feita com uma micropipeta calibrada. Na ausência de material volumétrico calibrado ou para uma exatidão ainda melhor, o preparo pode ser feito de forma totalmente gravimétrica (pesando-se o pó e o solvente adicionado). Os mesmos cuidados de preparo devem ser aplicados nas amostras. Todos os outros cuidados mencionados na seção 6 devem ser considerados na aquisição e tratamento dos dados.

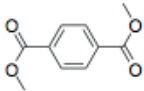
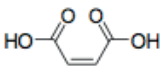
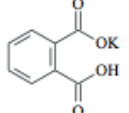
8.

MRCs PRODUZIDOS PELO INMETRO PARA USO EM RMNq

O Inmetro certificou um conjunto de MRCs de pureza elevada para serem utilizados como PI e calibrantes para referências eletrônicas em ensaios de RMNq. Os lotes de cada substância candidata à certificação foram sendo submetidos a diversos estudos para comprovar que são homogêneos e estáveis. Além disso, seus valores de pureza foram sendo caracterizados por abordagens independentes como RMNq, balanço de massas (método baseado na quantificação de todas as impurezas presentes no material), depressão do ponto de fusão (determinada por calorimetria exploratória diferencial - DSC) e titulação coulométrica, dependendo do caso. Todos esses estudos são necessários para garantir o rigor dos valores certificados, já que esses materiais estão no topo da hierarquia metrológica e serão utilizados para dar rastreabilidade a resultados de ensaios subsequentes.

Os estudos da certificação dos 4 primeiros MRCs desse tipo produzidos pelo Inmetro estão em fase de conclusão e esses materiais serão disponibilizados até o final de 2019. Na tabela 2, informações sobre esses MRCs. Os valores de solubilidade apresentados foram testados no laboratório. É possível que o limite da solubilidade seja maior.

Tabela 2 – Propriedades dos MRCs produzidos pelo Inmetro para uso em RMNq

Parâmetro		Tereftalato de dimetila	Dimetilsulfona	Ácido maleico	Bifato de potássio
Estrutura					
Deslocamento químico (δ) (ppm)	RMN de ¹ H	3,94 (6H, s) 8,09 (4H, s) (em CDCl ₃)	2,98 (6H, s) (em CDCl ₃)	6,35 (2H, s) (em D ₂ O)	7,4 a 7,6 (2H, m) 7,6 a 7,8 (2H, m) (em D ₂ O)
	RMN de ¹³ C	52,5 129,4 133,5 165,5 (em DMSO-D ₆)	42,1 (em DMSO-D ₆)	130,8 169,7 (em D ₂ O)	128,8 130,9 134,0 174,4 (em D ₂ O)
Solubilidade mínima testada (mg/mL)	D ₂ O	~ 0	19	21	51
	CDCl ₃	45	40	~ 0	~ 0
	acetona-D ₆	17	37	55	não avaliada
	DMSO-D ₆	15	52	55*	não avaliada
	metanol-D ₄	7**	17	10**	não avaliada
	acetonitrila-D ₃	10	5	25	não avaliada
T1 (s) (determinado a aproximadamente 15 mg/mL em presença de outras substâncias)	CDCl ₃	2,0 (3,94 ppm); 3,9 (8,09 ppm)	4,0	não avaliado	não avaliado
	acetona-D ₆	3,2 (3,94 ppm); 5,9 (8,09 ppm)	não avaliado	não avaliado	não avaliado
	metanol-D ₄	não avaliado	5,0	não avaliado	não avaliado
	D ₂ O:DMSO-D ₆ (500:150 V/V)	não avaliado	4,6	4,5	2,1
	D ₂ O	não avaliado	não avaliado	5,4	não avaliado

*Possível formação de sinais alargados para as hidroxilas do PI, ocupando regiões extensas do espectro.

**Deve ser evitado por risco de reação de esterificação ou transesterificação entre PI e solvente.

Referências

- [1] Inmetro & IPQ, Vocabulário Internacional de Metrologia: conceitos fundamentais e gerais de termos associados (VIM 2012), vol. 1. Duque de Caxias, RJ, Brasil: Inmetro, 2012.
- [2] F. Malz & H. Jancke, "Validation of quantitative NMR," J. Pharm. Biomed. Anal., vol. 38, no. 5, pp. 813–23, Aug. 2005.
- [3] H. Jancke, "CCQM/98-2: NMR spectroscopy as a primary analytical method," in Working documents of the 4th Meeting (February 1998), Sèvres, 1998, pp. 1–12.
- [4] H. Jancke, "NMR als primäre analytische Meßmethode," Nachrichten aus Chemie, Tech. und Lab., vol. 46, no. 7–8, pp. 720–722, Jul. 1998.
- [5] S. Westwood, N. Stoppacher, G. Martos, B. C. Garrido, T. Huang, T. Saito, I. Un, T. Yamazaki, & W. Zhang, "qNMR Internal Standard Reference Data (ISRD): 4,4-Dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid-d6 [ISRD-07]," Sèvres, 2019.
- [6] S. Westwood, N. Stoppacher, G. Martos, B. C. Garrido, T. Huang, T. Saito, I. Un, T. Yamazaki, & W. Zhang, "qNMR Internal Standard Reference Data (ISRD): 1,4-Bis(trimethylsilyl)benzene [ISRD-06]," Sèvres, 2019.
- [7] S. Westwood, N. Stoppacher, B. C. Garrido, T. Huang, T. Saito, I. Un, T. Yamazaki, & W. Zhang, "qNMR Internal Standard Reference Data (ISRD): Dimethyl sulfone (DMSO 2) [ISRD-02]," Sèvres, 2018.
- [8] S. Westwood, N. Stoppacher, B. C. Garrido, T. Huang, T. Saito, I. Un, T. Yamazaki, & W. Zhang, "qNMR Internal Standard Reference Data (ISRD): Potassium Hydrogen Phthalate (KHP) [ISRD-03]," Sèvres, 2018.
- [9] S. Westwood, N. Stoppacher, G. Martos, B. C. Garrido, T. Huang, T. Saito, I. Un, T. Yamazaki, & W. Zhang, "qNMR Internal Standard Reference Data (ISRD): Dimethyl Terephthalate [ISRD-04]," Sèvres, 2019.
- [10] S. Westwood, N. Stoppacher, G. Martos, B. C. Garrido, T. Huang, T. Saito, I. Un, T. Yamazaki, & W. Zhang, "qNMR Internal Standard Reference Data (ISRD): 3,5-Bis(trifluoromethyl)benzoic Acid [ISRD-05]," Sèvres, 2019.
- [11] S. Westwood, N. Stoppacher, B. C. Garrido, T. Huang, T. Saito, I. Un, T. Yamazaki, & W. Zhang, "qNMR Internal Standard Reference Data (ISRD): Maleic Acid (MA) [ISRD-01]," Sèvres, 2018.
- [12] J. E. Power, M. Foroozandeh, R. W. Adams, M. Nilsson, S. R. Coombes, A. R. Phillips, & G. A. Morris, "Increasing the quantitative bandwidth of NMR measurements," Chem. Commun., vol. 52, no. 52, pp. 2916–2919, 2016.
- [13] E. Tenaillon, P. Lancelin, R. J. Robins & S. Akoka, "NMR Approach to the Quantification of Nonstatistical ^{13}C Distribution in Natural Products: Vanillin," 2004.
- [14] W. Wollinger, J. L. N. Fernandes, L. H. K. Queiroz Júnior, B. C. Garrido, & F. R. de Aquino Neto, "Improving quantitative ^{13}C NMR performance by an adiabatic scheme," Microchem. J., vol. 140, 2018.
- [15] N. R. Babji, E. O. McCusker, G. T. Whiteker, B. Canturk, N. Choy, L. C. Creemer, C. V. De Amicis, N. M. Hewlett, P. L. Johnson, J. A. Knobelsdorf, F. Li, B. A. Lorschach, B. M. Nugent, S. J. Ryan, M. R. Smith, & Q. Yang, "NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Industrially Preferred Solvents Used in Process and Green Chemistry," Org. Process Res. Dev., vol. 20, no. 3, pp. 661–667, Mar. 2016.
- [16] ISO, ISO 17034:2016 - General requirements for the competence of reference material producers. International Organization for Standardization, 2016.
- [17] F. Bloch, W. W. Hansen, & M. Packard, "Nuclear Induction," Phys. Rev., vol. 69, no. 3–4, pp. 127–127, Feb. 1946.
- [18] BIPM, "BIPM - qNMR." [Online]. Available: <https://www.bipm.org/en/bipm/chemistry/organic-analysis/qnmr/>. [Accessed: 10-Jul-2019].
- [19] J. Meija, T. B. Coplen, M. Berglund, W. A. Brand, P. De Bièvre, M. Gröning, N. E. Holden, J. Irrgeher, R. D. Loss, T. Walczyk, & T. Prohaska, "Atomic weights of the elements 2013 (IUPAC Technical Report)," Pure Appl. Chem., vol. 88, no. 3, pp. 265–291, Jan. 2016.
- [20] J. Meija, "IUPAC Molecular Weight Calculator ciaaw.org [BETA release v.0.7, May 2019]." [Online]. Available: <https://ciaaw.shinyapps.io/calculator/>.
- [21] C. H. Cullen, G. J. Ray, & C. M. Szabo, "A comparison of quantitative nuclear magnetic resonance methods: Internal, external, and electronic referencing," Magn. Reson. Chem., vol. 51, pp. 705–713, 2013.
- [22] B. C. Garrido & L. J. de Carvalho, "Nuclear magnetic resonance using electronic referencing: method validation and evaluation of the measurement uncertainties for the quantification of benzoic acid in orange juice," Magn. Reson. Chem., vol. 53, no. 2, pp. 135–141, Feb. 2015.
- [23] G. S. Remaud, V. Silvestre, & S. Akoka, "Traceability in quantitative NMR using an electronic signal as working standard," Accred. Qual. Assur., vol. 10, pp. 415–420, 2005.
- [24] L. Barantin, A. Le Pape, & S. Akoka, "A new method for absolute quantitation MRS metabolites," Magn. Reson. Med., vol. 38, pp. 179–182, 1997.
- [25] S. Akoka, L. Barantin, & M. Trierweiler, "Concentration measurement by proton NMR using the ERETIC method," Anal. Chem., vol. 71, pp. 2554–2557, 1999.
- [26] G. Wider & L. Dreier, "Measuring protein concentrations by NMR spectroscopy," J. Am. Chem. Soc., vol. 128, pp. 2571–2576, 2006.