



HAL
open science

**Développements méthodologiques et validations
expérimentales dans le cadre de l'analyse isotopique par
RMN-¹³C**
Sophie Renou

► **To cite this version:**

Sophie Renou. Développements méthodologiques et validations expérimentales dans le cadre de l'analyse isotopique par RMN-¹³C. Chimie analytique. Nantes Université, 2022. Français. NNT : 2022NANU4089 . tel-04104704

HAL Id: tel-04104704

<https://theses.hal.science/tel-04104704>

Submitted on 24 May 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 596
Matière, Molécules, Matériaux
Spécialité : Chimie analytique

Par

Sophie RENOU

Développements méthodologiques et validations expérimentales dans le cadre de l'analyse isotopique par RMN-¹³C

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 16 décembre 2022

Unité de recherche : Laboratoire CEISAM UMR CNRS 6230, UFR Sciences et Techniques de l'Université de Nantes, 2 chemin de la Houssinière 44322 Nantes

Rapporteurs avant soutenance :

Pierre CARTIGNY, Directeur de recherche, Université Paris Cité
Philippe LESOT, Directeur de recherche, Université Paris-Saclay

Composition du Jury :

Président : **Mary ELLIOT**, Professeur, Nantes Université

Examineurs : **Sabine BOUGUET-BONNET**, Professeur, Université de Lorraine
Pierre CARTIGNY, Directeur de recherche, Université Paris Cité
Mary ELLIOT, Professeur, Nantes Université
Philippe LESOT, Directeur de recherche, Université Paris-Saclay

Dir. de thèse : **Serge AKOKA**, Professeur, Nantes Université

Invité
Gérald REMAUD, Professeur, Nantes Université

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'équipe MIMM (Magnetic resonance, Isotopomics, Metabolomics, Monitoring) du laboratoire CEISAM (Chimie et Interdisciplinarité : Synthèse, Analyse, Modélisation). Je souhaiterais remercier Monsieur Jean-Michel BOULER de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Je voudrais remercier chaleureusement mon directeur de thèse Serge Akoka qui m'a tant appris pendant ces trois années de thèse. Merci d'avoir partagé avec moi ta passion pour la RMN. Merci pour ta pédagogie et pour toutes les discussions enrichissantes qu'on a pu avoir. Merci pour m'avoir accompagné et travaillé avec moi sur ce projet.

Merci à Gérald Remaud qui m'a aidé pendant mon projet de thèse. Je le remercie pour toutes les discussions et pour les débats qu'on a pu avoir autour de ce projet.

Je tiens à remercier Pierre Cartigny et Philippe Lesot d'avoir examiné mon travail en tant que rapporteur. Je remercie également mes examinatrices Sabine Bonnet et Mary Elliot qui ont accepté de juger mon travail.

Je remercie également le ministère de la recherche français pour le financement de ma thèse. Merci aux membres des projets INTRATREE, TOFoo, et ainsi que la société de RS²D pour avoir contribué à l'environnement de la thèse. Le projet ACIR-NASA a aussi contribué au financement des travaux de thèse (*National Aeronautics and Space Administration through the NASA Astrobiology Institute under Cooperative Agreement No. 80NSSC18M0094 issued through the Science Mission Directorate*).

Je souhaite remercier une nouvelle fois Gérald Remaud et également Patrick Giraudeau qui ont été les responsables successifs de notre équipe. Merci à la team isotopie Mathilde, Maylis, Anne-Marie et Illa avec qui j'ai partagé de super moments ! Merci Mathilde pour ta disponibilité et ton aide dans le projet TOFoo, merci pour ta bonne humeur et ton écoute tout au long de ces années de travail. Merci à Anne-Marie pour les analyses de EA-IRMS. Merci à Virginie Silvestre pour m'avoir transmis ses connaissances sur la RMN isotopique et pour la maintenance des spectromètres. Merci également à Benoit et Aurélie pour avoir entretenu les spectromètres et pour m'avoir formée sur les pleins d'azote et d'hélium. Un grand merci aux doctorants et post-doctorants de mon équipe Maylis, Marg, Célia, Clément, Arnab, Victor, Thomas, Achille avec qui j'ai partagé des supers moments : les pauses déj, la ballade aux canards, et les emblématiques karaokés. Merci également aux anciens doctorants avec qui j'ai pu partager des pauses-café et des bons moments : Dylan, Lenny, Corentin, Jérôme, Louis. Je remercie pour leurs contributions les deux stagiaires Anne-Lise et Margot que j'ai pu encadrer,

ainsi que Dounia et Gamze. Je remercie tout le personnel du CEISAM et les autres membres de l'équipe MIMM, Jean-Nicolas, Estelle, Jonathan et Evelyne.

Je tiens également à remercier toute la société RS²D et plus particulièrement Julien Pontabry et Gaëtan Assemat avec qui j'ai collaboré pendant ces trois années de thèse. Merci Gaëtan pour tout ce que tu m'as appris professionnellement et apporté personnellement. Merci Alexis Gilbert et Maxime Julien pour avoir réalisé la synthèse des produits enrichis et les analyses par pyrolyse. Merci pour les discussions autour des mesures PSIA et pour m'avoir transmis leurs connaissances en pyrolyse et en Orbitrap.

Je remercie mes amis, la team L3yen : Laurine, Camille, Jérémy, Clément et Thomas. Merci pour votre soutien pendant toutes ces années d'études. Merci pour tous ces moments et les soirées avec le délicieux punch coco de Laurine !

Pour finir, je tiens à remercier Bastien et Florian mes amis de longue date qui m'ont toujours soutenu dans toutes mes décisions et qui m'ont apporté tout leur soutien pendant ces mois de rédaction. MERCI d'être là depuis toutes ces années. Enfin, je remercie ma famille, mes parents, mes frères et mes belles-sœurs pour leur soutien. Merci Papa et Maman de m'avoir aidée à faire des études supérieures et de m'avoir toujours encouragée et soutenu dans mes choix.

Liste des acronymes et des symboles

asHSQC	HSQC symétrique adiabatique
CAM	Métabolisme acide crassulacéen
CHIRP	<i>Frequency swept pulse</i>
CS	<i>Compressed Sensing</i>
CSIA	Analyse Isotopique de Composé Spécifique
CV	Coefficient de variation
DAGF	1,2:5,6-di-o-isopropylidene-D-glucofuranose
DAGap	1,2:3,4-di-o-isopropylidene-D-galactopyranose
DEPT	<i>Distorsionless Enhancement Polarization Transfer</i>
DS	<i>Dummy scans</i>
DWET	Double-WET
ERETIC	<i>Electronic Reference To access in vivo Concentration</i>
FID	<i>Free Induction Decay</i>
GC-irm-MS	Mesure isotopique par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie gazeuse
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
INEPT	<i>Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer</i>
irm- ¹³ C NMR	Mesure isotopique par RMN du carbone-13
irm- ² H NMR	Mesure isotopique par RMN du deutérium
irm-MS	Mesure isotopique par spectrométrie de masse
LC-irm-MS	Mesure isotopique par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide
LOD	Limite de détection
LOQ	Limite de quantification
LP	Prédiction linéaire
MAGF	1,2-O-Isopropylidene- α -D-glucofuranose
MDD	<i>Multi-dimensional decomposition</i>
MWET	Multi-WET
nOe	Effet Overhauser nucléaire
NUS	Echantillonnage non-uniforme
OIA	Adiabaticité indépendante de l'offset
PSIA	Analyse Isotopique Position-Spécifique
PULCON	<i>PULse Length based CONcentration determination</i>
PWET	Profiled-WET
Py-GC/irm-MS	Mesure isotopique par spectrométrie de masse couplée à la pyrolyse
RF	Radiofréquence
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
S/B	Rapport signal-sur-bruit
SNIF-NMR	<i>Site-Specific Natural Isotope Fractionation by Nuclear Magnetic Resonance</i>

SW	<i>Spectral Width</i> – Gamme spectrale – Largeur spectrale
TF	Transformation de Fourier
VIM	Vocabulaire International de Métrologie
VRT	<i>Variable Recycling Time</i>
WET	<i>Water suppression enhanced through T₁ effect</i>
WURST	<i>Wideband Uniform Rate and Smooth Truncation</i>
\vec{B}_0	Champ magnétique
\vec{B}_1	Champ magnétique alternatif
\vec{B}_{eff}	Champ magnétique effectif
ΔF^*	Gamme de fréquence efficace pendant le découplage
B_2	Intensité du champ RF de découplage
F_1	Dimension indirecte
F_2	Dimension directe
F_i	Valeur statistique de la fraction molaire
J_{res}	Couplage résiduel
\vec{M}	Aimantation
M_{eq}	Aimantation à l'équilibre
M_z	Aimantation longitudinale
N_1	Nombre d'incrément dans la dimension indirecte
$S_{(t)}$	Signal
T_1	Temps de relaxation longitudinale
T_2	Temps de relaxation transversale
T_2^*	Temps de relaxation transversale avec l'inhomogénéité du champ
T_{exp}	Temps expérimental
V_S	Volume sensible
f_i	Fraction molaire
g_e	Gradient d'encodage
g_i	Gradient de déphasage
g_r	Gradient de lecture
n_i	Nombre de carbone d'un site i
t_1	Délai d'incrémentable dans la dimension indirecte
x_g	Abondance isotopique totale du produit
x_i	Abondance isotopique de chaque position i de la molécule
Ω_0	Fréquence de résonance de Larmor
α_{eff}	Angle parcourus par l'aimantation
τ_c	Temps moyen pour qu'un groupement chimique parcourt un radian
ω_0	Vitesse angulaire de précession autour de \vec{B}_0
$\omega_1(t)$	Modulation de l'amplitude d'une impulsion
ω_{eff}	Vitesse angulaire de précession autour de \vec{B}_{eff}

$\Delta(\%)$	Justesse
ΔF	Gamme de balayage
μ	Moment magnétique
H	Hauteur de la bobine ^{13}C
H'	Hauteur de la bobine ^1H
Ω	Fréquence de résonance
A	Amplitude du signal de RMN
AQ	Acquisition
D	Durée d'une impulsion
DW	<i>Dwell Time</i>
J	Constante de couplage
L	Indice de l'uniformité du découplage
L'	Indice de l'efficacité du découplage
NS	Nombre de scans
R	Rapport isotopique
S	Surface sous une raie
TD	Nombre de point du FID
TR	Temps de répétition
e	Épaisseur de la tranche observée
k	Constante dépendante de l'appareillage
p	Nombre de noyaux équivalents
u	Nombre de carbones directement liés au site <i>i</i>
x	Abondance isotopique
Γ	Erreur induite par la saturation partielle
$\Delta\nu_{1/2}$	Largeur à mi-hauteur
$\Delta\omega(t)$	Modulation de la fréquence d'une impulsion
\mathcal{E}	Efficacité du découplage
α	Fractionnement isotopique
β	Angle d'une impulsion
γ	Rapport gyromagnétique
$\delta(^{13}\text{C})$	Composition isotopique du carbone-13
δf	Fréquence centrale
ε	Taux d'enrichissement
ϕ	Phase d'une impulsion

Sommaire

REMERCIEMENTS	3
LISTE DES ACRONYMES ET DES SYMBOLES	5
INTRODUCTION	13
CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	17
1. Principe de la RMN	19
1.1. Application d'un champ magnétique	19
1.2. Relaxation	20
1.3. Le signal de RMN : <i>Free Induction Decay</i> (FID)	21
1.4. Du FID au spectre RMN.....	22
2. La RMN quantitative.....	23
2.1. Introduction.....	23
2.2. Paramètres qualitatifs et métrologiques en RMN	24
2.3. Impulsions RF.....	33
2.4. Les références en RMN quantitatives.....	39
2.5. Séquences multi-impulsionnelles	41
2.6. Traitement du signal.....	46
3. La RMN quantitative pour l'analyse isotopique : la RMN isotopique ¹³ C	52
3.1. Définitions	52
3.2. Méthodes d'analyses isotopiques	54
3.3. Détermination de la composition isotopique position-spécifique par <i>irm-¹³C NMR</i>	61
3.4. Développement des séquences utilisées.....	64
4. Variabilité intra et inter-instrumentale sur les $\delta^{13}\text{C}_i$	69
4.1. Composition isotopique : partielle, apparente et partielle apparente.....	69
4.2. Facteur de correction	70
CHAPITRE II : L'OBJECTIF ULTIME D'UNE METHODOLOGIE PSIA : LA JUSTESSE	73
1. Que mesure-t-on avec les différentes méthodes : exemple du n-propanol.....	75
2. Un trio complémentaire.....	77
3. Objectifs de la thèse.....	78
3.1. Précision	78
3.2. Justesse.....	78

CHAPITRE III : DEVELOPPEMENT ET OPTIMISATION D'UNE NOUVELLE STRATEGIE PLUS RAPIDE DE MESURE PAR *IRM-¹³C NMR* – HSQC SYMETRIQUE ADIABATIQUE 81

1.	Développement de l'asHSQC	83
1.1.	Obtention de la précision cible	83
1.2.	Réduction du temps d'analyse	84
2.	Calibrage rapide des impulsions RF.....	85
2.1.	Courbe de nutation.....	85
2.2.	Séquence MISSTEC	86
2.3.	Evaluation des résultats.....	88
2.4.	Optimisation du traitement des données	89
2.5.	Impact de l'accord de sonde.....	90
2.6.	Impact du radiation damping	91
2.7.	Calibrage des impulsions de faible puissance.....	92
2.8.	Echantillons réels.....	93
2.9.	Comparaison avec d'autres méthodes rapides : la séquence PulsCal et le 360°/4	93
2.10.	Calibrage du ¹³ C	94
2.11.	Conclusion	95
3.	Analyse isotopique intramoléculaire du cholestérol : optimisation de la séquence asHSQC et évaluation de la précision	96
3.1.	Préparation et analyse du cholestérol.....	96
3.2.	Evaluation de la précision	96
3.3.	Optimisation du temps d'expérience	97
3.4.	Pure-shift	102
3.5.	Concentration en cholestérol	102
3.6.	Conclusion	104
4.	Authentification de produits bio : le lait et le blé	105
4.1.	Importance de l'authentification des produits bio.....	105
4.2.	Compositions du lait et du blé.....	106
4.3.	Préparation et analyse d'échantillon.....	106
4.4.	Optimisation de l'asHSQC pour ces matrices	109

CHAPITRE IV : DES MESURES *IRM-¹³C NMR* HOMOGENES ET JUSTES113

1.	La composition intramoléculaire ¹³ C du glucose comme outil de suivi de la réaction des arbres au changement climatique	115
1.1.	Méthodologie	117
1.2.	Nature des échantillons.....	118
1.3.	Etude sur l'échange entre l'eau et la fonction hydroxyle du DAGF : justification du choix du dérivé	119
1.4.	Préparation des échantillons et configuration du spectromètre	123
1.5.	Optimisation de la séquence 2D.....	123

1.6. Optimisation du traitement de données et répétabilité de la séquence	125
1.7. Expression des résultats sur l'échelle $\delta^{13}\text{C}_i$	127
1.8. Conclusion	129
2. Homogénéisation des résultats d' <i>irm-¹³C NMR</i>	130
2.1. Méthodologie	132
2.2. Configuration des spectromètres	133
2.3. Résultats	134
3. Vers des valeurs justes : application sur l'alanine.....	140
3.1. Analyse <i>irm-MS</i> par fragmentation chimique et pyrolyse de l'alanine	140
3.2. Analyse par <i>irm-¹³C RMN</i>	141
3.1. Correction et expression des résultats	142
3.1. Conclusion	143
CHAPITRE V : REDUCTION DE LA DEPENDANCE A LA TYPOLOGIE DE LA SONDE	145
1. Développement de la séquence CWET	147
1.1. Stratégie	147
1.2. Création des impulsions	149
2. Séquence de calibration : Echograd- ¹³ C.....	149
2.1. Optimisation de l'amplitude du gradient <i>ge</i>	150
2.2. Echantillon pour calibrer les impulsions.....	151
2.3. Paramètres expérimentaux	151
2.4. Optimisation de la puissance d'atténuation.....	151
3. Evaluation de la justesse de la séquence CWET.....	153
3.1. Choix et préparation de l'échantillon	153
3.2. Traitement des données de la séquence CWET	154
3.3. Optimisation du délai τ	155
3.4. Optimisation de la largeur de l'impulsion	155
3.5. Optimisation du sens de balayage.....	157
4. Conclusion	158
CONCLUSION GENERALE	159
RÉFÉRENCES	163
ANNEXES	183
Annexe 1 : Programme d'impulsion de la séquence asHSQC sur TopSpin	185
Annexe 2 : Valeurs de différentes listes de VRT	188
Annexe 3 : Protocole d'extraction, d'hydrolyse et de dérivation des échantillons de lait et de blé	194

Annexe 4 : Extraction des sucres de l'ananas	196
Annexe 5 : Paramètres d'acquisition de la séquence <i>Inverse Gated</i> sur les DAGF.....	197
Annexe 6 : Préparation des échantillons et spectres RMN de l'éthanol et l'acide acétique bi-marqué.....	198
Annexe 7 : Préparation des échantillons et spectres RMN du benzaldéhyde, acétate de vinyle et DAGF	201
Annexe 8 : Programme d'impulsions de la séquence Echograd- ¹³ C sur TopSpin	206
Annexe 9 : Script R utilisé avec Rnmrfit sur la vanilline	208
Annexe 10 : Programme d'impulsion de la séquence CWET sur TopSpin	210
LISTE DES FIGURES	213
LISTE DES TABLEAUX	223
LISTE DE LA PRODUCTION SCIENTIFIQUE	225

Introduction

Depuis de nombreuses années, les mesures isotopiques sont utilisées dans de multiples applications et notamment pour l'analyse de la traçabilité des produits agroalimentaires ou pharmaceutiques. ^[1-4] Le rapport isotopique d'une molécule peut donner, dans sa globalité, des informations sur la naturalité et/ou l'origine géographique du produit dont est issu cette molécule, et permet dans certains cas de discriminer plusieurs molécules. Afin de rendre plus performantes les analyses isotopiques, les mesures positions-spécifiques (PSIA : *Position-Specific Isotope Analysis*) peuvent être utilisées afin de déterminer la distribution isotopique présente au sein d'une molécule. L'ajout de ces variables donne des informations supplémentaires et permet de mieux caractériser l'origine des produits étudiés en mettant en évidence, par exemple, des fraudes non détectables auparavant.

Parmi les méthodes utilisées à ce jour pour les mesures PSIA, la RMN (*irm-NMR* : *isotope ratio measured by NMR*), développée dans les années 80, a montré des avantages considérables. Partant de l'analyse en deutérium, cette méthode a été étendue dans les années 2000 au carbone-13 et son déploiement a ensuite permis d'obtenir les compositions isotopiques avec une précision de l'ordre de 1 pour-mille. Ainsi, ces développements ont rendu possible l'authentification de nombreux composés tels que la caféine, ^[5] le cholestérol ^[6] ou la vanilline. ^[7] D'autres domaines comme la détection de contrefaçon, ^[8,9] les sciences forensiques (par exemple la détection d'une pollution), ^[10] la caractérisation d'explosifs, ^[11] l'analyse de drogues, ^[12] ou encore la détermination d'effets isotopiques ^[13] ont montré l'intérêt de l'*irm-¹³C NMR*.

Au cours de ces dernières années, de nouvelles séquences d'impulsions RMN ont été développées afin de gagner en sensibilité, mais malheureusement au détriment de la justesse. En parallèle, une variabilité sur les résultats a été observée, dépendant de la configuration du spectromètre utilisé ; que ce soit le champ magnétique, la console de pilotage ou la géométrie de la sonde. ^[14] De ce fait, les mesures obtenues par l'*irm-¹³C NMR* restent d'un usage uniquement relatif, ce qui est suffisant pour les applications déjà citées. Cependant, il est attendu qu'un outil devienne universel en permettant les inter-comparaisons entre molécules et entre laboratoires. A partir de ce constat, l'ambition de cette thèse est de contribuer significativement aux développements méthodologiques pour obtenir des mesures d'*irm-¹³C NMR* homogènes entre spectromètres et justes sur l'échelle des compositions isotopiques δ (‰) habituellement utilisées par les isotopistes, et ainsi permettre la comparaison avec les résultats obtenus par d'autres méthodes.

Pour atteindre cet objectif, le manuscrit est articulé en 5 chapitres, encadrés par une introduction et une conclusion générale.

Le premier chapitre est constitué de rappels bibliographiques qui ont pour but de faire un état des lieux de l'outil *irm-¹³C NMR*. Les avancées, ainsi que les manques, concernant les performances de la méthodologie RMN sont explicités autour des notions de sensibilité,

justesse et précision qui seront le socle des objectifs du travail de la thèse. Une attention particulière a été portée au rappel des principes physiques tels que la RMN et le fractionnement isotopique. L'objectif est que la lecture de ce manuscrit puisse être abordée par les non-spécialistes d'un domaine sans obstacle majeur de compréhension.

Le chapitre II présente succinctement les problématiques associées à une analyse PSIA autour de l'expression des résultats, c'est-à-dire les compositions isotopiques ^{13}C intramoléculaires. Dans le contexte où d'autres approches existent ou sont émergentes, il est important d'utiliser une échelle δ (‰) commune à la communauté isotopique. En particulier, l'usage de la spectrométrie de masse haute résolution par Orbitrap ^[15] est prometteuse en termes de sensibilité mais nécessite des standards. Dans ce contexte, l'*irm- ^{13}C NMR* peut devenir l'outil incontournable pour produire des molécules de référence. Pour cela il faut pallier deux défauts : (i) la sensibilité et (ii) l'obtention des valeurs δ justes sur échelle « absolue », tout en gardant une précision au pour mille. Ce sont ces deux objectifs de travaux de thèse qui sont abordés dans les prochains chapitres.

Le chapitre III, porte sur le développement d'une nouvelle séquence d'impulsions à 2 dimensions plus sensible. L'objectif avec cette séquence est double : soit travailler avec la quantité minimale de produit, de l'ordre de la dizaine de mg, soit réduire le temps d'analyse. Deux projets de recherche s'appuient sur les performances de cette séquence, le premier concerne la discrimination entre des aliments issus de l'agriculture biologique et ceux provenant de cultures conventionnelles ; et le second porte sur l'analyse du glucose issu de la cellulose contenue dans les cernes des arbres afin de comprendre l'évolution climatique. Cependant, comme expliqué précédemment, les mesures réalisées avec cette séquence sont uniquement relatives. Il est alors nécessaire de mettre en place des facteurs de correction afin de rendre les résultats lisibles et facilement exploitables. Leur élaboration doit suivre des étapes successives dont la première est décrite dans ce chapitre. Elle consiste en la conversion des données brutes sur une échelle compréhensible. Les autres étapes sont décrites dans le chapitre suivant.

Le chapitre IV décrit la stratégie de l'élaboration des facteurs de correction qui commence par l'homogénéisation des résultats obtenus par l'*irm- ^{13}C NMR* classique afin de réduire au maximum les biais induits par les spécificités de la configuration du spectromètre. Puis, il est nécessaire d'intégrer le caractère multi-impulsionnel de la méthode d'acquisition. Ce chapitre permet notamment la mise en lumière de l'importance de la correction des résultats d'*irm- ^{13}C NMR*.

Dans le chapitre V qui est le dernier de ce manuscrit, une perspective est mise en place avec l'objectif ultime du développement de l'*irm- ^{13}C NMR* : réaliser une analyse avec l'obtention directe de valeurs justes et homogènes entre elles, quel que soit le spectromètre utilisé. Pour cela une nouvelle séquence d'impulsions indépendante à la géométrie de la sonde est proposée afin de permettre d'obtenir des résultats indépendants de la configuration instrumentale.

Chapitre I : Rappels bibliographiques

1. Principe de la RMN

La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) permet d'exploiter les noyaux présentant un spin non nul notamment le ^1H , ^2H , ^{13}C , ^{19}F . Le noyau d'un atome peut être considéré en première approximation comme une sphère chargée positivement. La rotation des charges du noyau produit un petit champ magnétique appelé moment magnétique ($\vec{\mu}$). En l'absence de champ magnétique, tous les moments magnétiques sont distribués de manière aléatoire donnant une résultante nulle.

1.1. Application d'un champ magnétique

Lorsqu'un champ magnétique intense \vec{B}_0 est appliqué, tous les moments magnétiques s'orientent parallèlement à ce champ. Pour un proton dont le spin est égal à $1/2$, deux orientations sont alors possibles : l'une correspondant à $\mu_z = +\frac{\mu}{2}$ et l'autre $\mu_z = -\frac{\mu}{2}$ appelées état α et β , respectivement (Figure 1a). La somme des moments magnétiques n'est plus nulle car il y a un léger excès de la population des moments magnétiques selon $+z$. Cette résultante est appelée aimantation \vec{M} (Figure 1b). L'orientation suivant \vec{B}_0 est accompagnée d'un mouvement de précession autour de ce champ (appelée précession de Larmor). Dans le référentiel du laboratoire constitué de trois axes : x, y et z, l'axe z est par convention orienté selon le champ \vec{B}_0 .

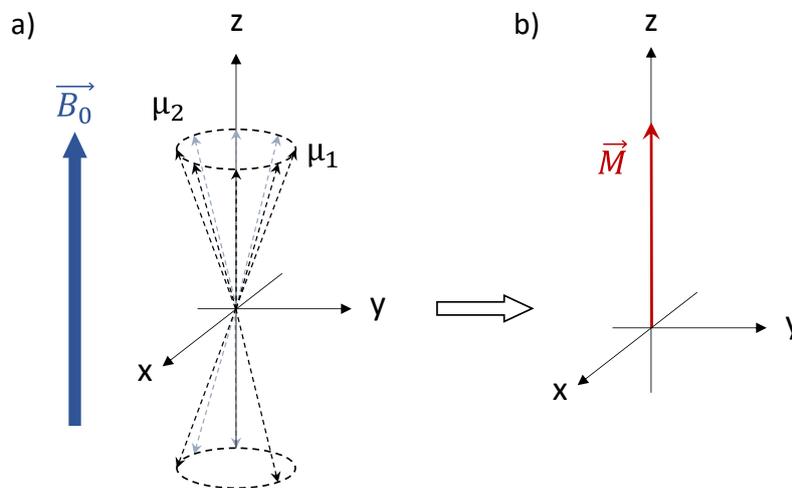


Figure 1 : Orientation des moments magnétiques en présence d'un champ magnétique externe. a) les moments magnétiques s'orientent selon le champ externe ; b) la somme des moments magnétiques représente l'aimantation \vec{M} .

La vitesse angulaire de précession (ω_0) autour du champ \vec{B}_0 est donnée par l'équation (Eq. 1.1).

$$\omega_0 = \gamma \cdot B_0 \quad (1.1)$$

avec, γ représentant le rapport gyromagnétique de l'atome et \vec{B}_0 le champ magnétique du spectromètre.

L'aimantation \vec{M} est proportionnelle au nombre de noyaux. Cependant, elle n'est pas observable lorsqu'elle est parallèle au champ \vec{B}_0 . Pour observer \vec{M} , il faut alors appliquer un 2^{ème} champ oscillant appelé \vec{B}_1 qui est perpendiculaire à \vec{B}_0 . Cette impulsion radiofréquence (RF) permet de basculer \vec{M} de 90° suivant \vec{B}_1 (Figure 2). Afin de pouvoir entraîner \vec{M} , \vec{B}_1 doit lui aussi tourner autour de \vec{B}_0 à la même vitesse angulaire de précession que les moments magnétiques.

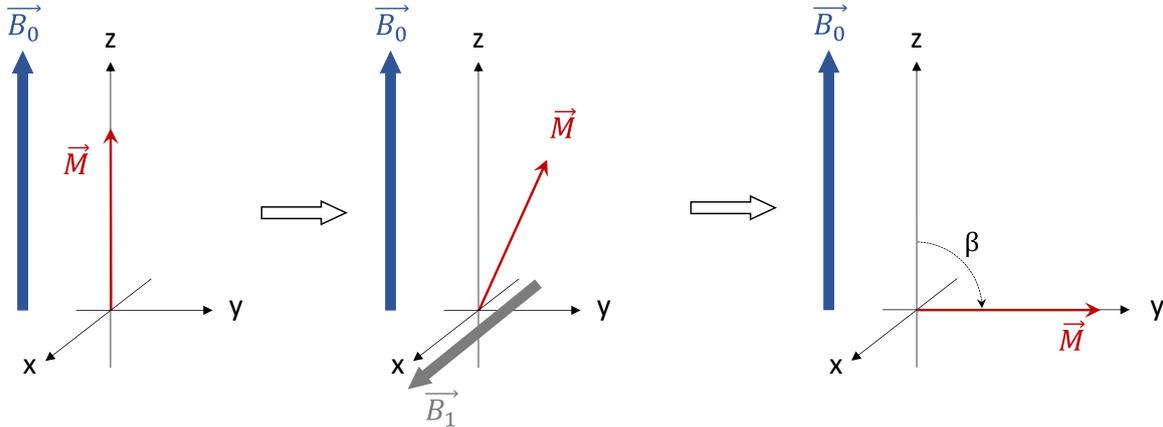


Figure 2 : Evolution de l'aimantation \vec{M} pendant une impulsion radiofréquence \vec{B}_1 .

L'axe z est appelé axe longitudinal et le plan (xy) est appelé plan transversal. L'aimantation \vec{M} a donc une composante longitudinale et une transversale.

L'impulsion RF envoyée peut être calibrée avant l'expérience afin de contrôler l'angle (β) réalisé par \vec{M} . Une fois, \vec{B}_1 coupé, \vec{M} revient progressivement selon \vec{B}_0 suivant les mécanismes de relaxation.

1.2. Relaxation

Lorsque l'aimantation \vec{M} revient selon le champ \vec{B}_0 , les composantes longitudinale et transversale ne sont pas affectées de la même manière.

La relaxation longitudinale conditionne le retour de l'aimantation longitudinale (M_z) vers sa valeur à l'équilibre. Ce processus suit une loi mono-exponentielle caractérisée par une constante appelée T_1 (temps de relaxation longitudinale).

Comme la relaxation longitudinale, la relaxation transversale évolue mono-exponentiellement, mais conduit à la disparition de la composante de l'aimantation dans le plan transversal. Cette décroissance est caractérisée par une constante appelée T_2 (temps de relaxation transversale) et elle gouverne la largeur de la raie obtenue en RMN (Eq. 1.2). Ainsi, plus le temps T_2 est petit et plus les signaux sont larges, cela est plus particulièrement vrai pour la RMN du solide.

$$\Delta\nu_{1/2} = \frac{1}{\pi T_2^*} \quad (1.2)$$

avec, $\Delta\nu_{1/2}$ correspondant à la largeur à mi-hauteur, et T_2^* correspondant au temps de relaxation transversale additionné à l'inhomogénéité du champ.

Les valeurs de T_1 et de T_2 dépendent de la mobilité des groupements chimiques moléculaires dans lequel est l'atome (Figure 3). Le temps moyen pour qu'un groupe chimique en rotation parcourt un radian est représenté par le temps de corrélation τ_c . Ainsi, pour une faible mobilité, la valeur de τ_c est élevée et la relaxation transversale est plus efficace que la relaxation longitudinale. Ces valeurs de relaxation sont retrouvées dans des solides dans lesquels la mobilité est faible. Pour les liquides, la relaxation longitudinale est moins efficace et les deux temps de relaxation sont très proches l'un de l'autre. Les valeurs de T_1 sont minimum lorsque le produit, $\tau_c\omega_0$, est proche de 1, cette valeur dépend donc de B_0 .

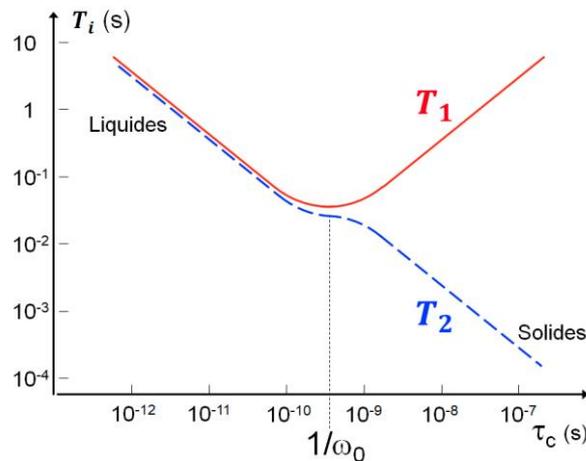


Figure 3 : Relation entre les valeurs de T_1 et T_2 et la dynamique moléculaire représentée par le temps de corrélation τ_c .^[16]

1.3. Le signal de RMN : *Free Induction Decay* (FID)

Une fois l'aimantation \vec{M} basculée dans le plan transversal, \vec{M} tourne alors autour de \vec{B}_0 à la vitesse angulaire de ω_0 . La bobine électrique de réception est placée dans le plan transversal. La tension aux bornes de cette bobine est proportionnelle à la variation du flux de \vec{M} sur l'axe de cette bobine. Le signal ($S(t)$) alors généré est une sinusoïde amortie par une décroissance exponentielle gouvernée par la valeur du temps T_2^* et il est appelé FID pour *Free Induction Decay* (Eq. 1.3).

$$S(t) = A \cdot \cos(\Omega \cdot t) \cdot e^{-\frac{t}{T_2^*}} \quad (1.3)$$

avec, A l'amplitude pour une fréquence de résonance, et T_2^* son temps de relaxation transversale additionné à l'inhomogénéité du champ.

Chaque résonance présente dans l'échantillon donne un FID, donc à la fin d'une expérience, une somme de FIDs est obtenue. Pour passer du domaine temporel au domaine fréquentiel il faut faire une opération mathématique appelée transformation de Fourier (FT).

1.4. Du FID au spectre RMN

La transformation de Fourier permet de déterminer la contribution de chaque résonance au FID total. Cette opération permet d'obtenir un spectre dans le domaine fréquentiel (Figure 4).

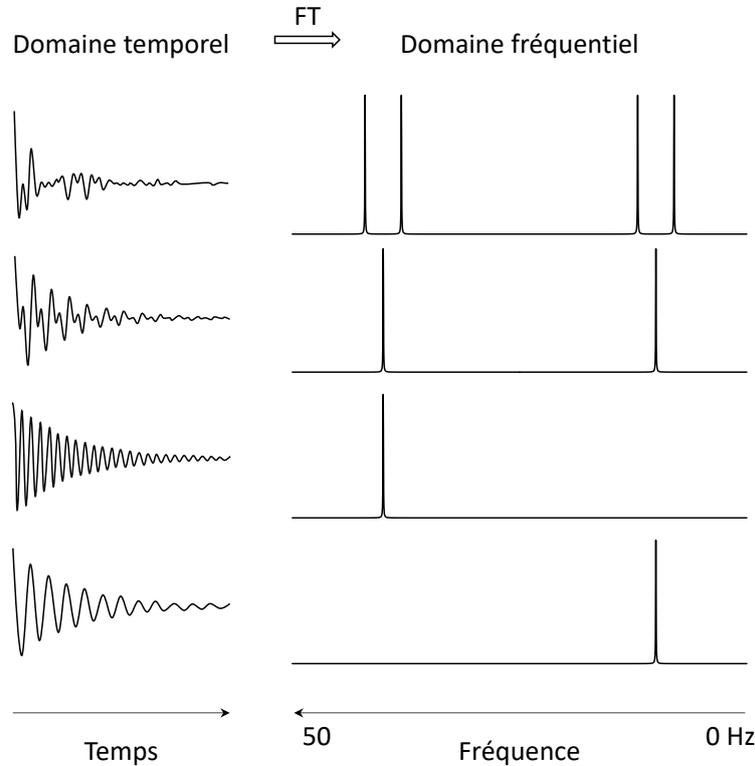


Figure 4 : Transformation de Fourier de plusieurs FID (domaine temporel) en spectre (domaine fréquentiel).^[17]

Pour déterminer correctement la fréquence d'un signal il faut que le FID soit correctement échantillonné durant le temps d'acquisition. D'après le théorème de Nyquist, pour caractériser correctement un signal régulier et oscillant, il faut au minimum deux points par période. La fréquence correctement échantillonnée la plus élevée conditionne la largeur spectrale ou gamme spectrale (*SW* pour *spectral width*). L'intervalle de temps entre chaque point des données est appelé *dwell time* (*DW*), et vérifie donc l'équation (Eq. 1.4) :

$$DW = \frac{1}{2 \cdot SW} \quad (1.4)$$

La durée du *DW* est liée à la durée de l'acquisition (*AQ*) et au nombre de points du FID (*TD*) (Eq. 1.5).

$$AQ = DW \cdot TD \quad (1.5)$$

Le spectre obtenu s'étend sur la largeur spectrale, avec au milieu la fréquence d'excitation appelée également offset ou porteuse (Figure 5). Chaque signal sur le spectre correspond à une fréquence de résonance qui est fonction de l'environnement électronique de l'atome. Chaque

groupe chimique donne lieu à un massif de raies centré sur le déplacement chimique qui est exprimé en ppm.

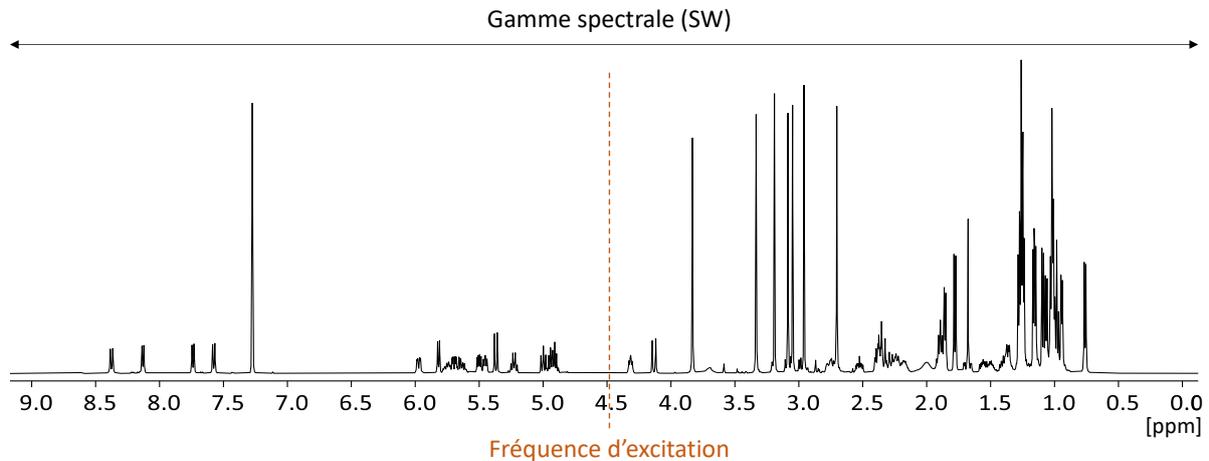


Figure 5 : Spectre ^1H de la cyclosporine. La fenêtre spectrale (SW) couvre les fréquences correctement observées. Le centre de la gamme spectrale est appelé offset et correspond à la fréquence d'excitation.

2. La RMN quantitative

2.1. Introduction

La RMN est utilisée en routine pour faire de l'élucidation structurale de molécule complexe. Mais cette technique d'analyse peut également être quantitative. En effet, la surface sous chaque raie (S) est proportionnelle au nombre de noyaux qui résonnent à cette fréquence et donc à la concentration. Celle-ci peut donc être facilement obtenue selon l'équation (Eq. 1.6), avec k une constante dépendante de l'appareil, p le nombre de noyaux équivalents résonant à la même fréquence, C la concentration et V_S le volume sensible.

$$S = k \cdot p \cdot C \cdot V_S \quad (1.6)$$

Le volume sensible (V_S) est relié à la hauteur de la bobine de la sonde. En RMN du liquide, le volume de l'échantillon est donc supérieur au volume sensible. La constante k dépend de l'appareillage, et des conditions d'expérience propres à l'analyse telles que la température, la séquence d'impulsion utilisée, et les temps de relaxation longitudinale et transversale (T_1 et T_2 , respectivement).

Cependant, le volume sensible (V_S) et la constante k sont difficiles à déterminer à un niveau de justesse et précision convenable. Il est donc nécessaire de faire des mesures relatives par rapport à une autre molécule qui servira de référence. Ainsi, pour les molécules A et B, les équations des surfaces deviennent respectivement (Eq. 1.7 et 1.8) :

$$S_A = k \cdot p_A \cdot C_A \cdot V_S \quad (1.7)$$

$$S_B = k \cdot p_B \cdot C_B \cdot V_S \quad (1.8)$$

Donc le ratio des deux surfaces donne une équation indépendante de V_S et de k (Eq. 1.9) :

$$\frac{S_A}{S_B} = \frac{p_A \cdot C_A}{p_B \cdot C_B} \quad (1.9)$$

Si la concentration de la molécule B est connue, il est alors possible de connaître la concentration de la molécule A (Eq. 1.10).

$$C_B = C_A \cdot \frac{p_A \cdot S_B}{p_B \cdot S_A} \quad (1.10)$$

Le résultat est donné avec une certaine exactitude, dépendant du spectromètre RMN et de la séquence d'impulsions utilisée. La RMN est dans ce sens qualifiée de méthode primaire relative.

2.2. Paramètres qualités et métrologiques en RMN

2.2.1. Exactitude : fidélité (précision) et justesse

Les mesures quantitatives données par différentes techniques analytiques sont caractérisées par une fidélité (ou précision, c'est le terme qui sera utilisé dans la thèse), une justesse et une exactitude. Ces trois concepts, ^[18] ont été définis en 2012 par le groupe de travail du comité commun pour les guides en métrologie (JCGM/WG 2) : VIM (Vocabulaire International de Métrologie) ^[19] et leur utilisation a été commentée par Prenesti *et al.* ^[20] Dans la suite de la thèse, ce sont les significations attribuées par VIM qui seront utilisées.

La précision est donnée par l'écart entre des résultats indépendamment obtenus dans les mêmes conditions de répétition. Elle traduit la répétabilité de la méthode et elle est représentée par l'écart-type s ou par le coefficient de variation (CV) sur plusieurs répétitions qui est exprimé en % (Eq. 1.11).

$$CV (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (1.11)$$

Où la moyenne \bar{x} et l'écart-type s sont calculés pour un nombre de séries fini.

La justesse Δ (%) représente l'écart entre la valeur moyenne obtenue à partir d'un ensemble de résultats et une valeur de référence acceptée. Elle est calculée grâce à l'équation (Eq. 1.12).

$$\Delta (\%) = \frac{V - V_{vraie}}{V_{vraie}} \cdot 100 \quad (1.12)$$

Où V représente la valeur calculée et V_{vraie} la valeur vraie. Un défaut de justesse se traduit par un biais.

Enfin, l'exactitude combine la précision et la justesse d'un résultat, caractérisée par l'écart entre une valeur mesurée et une valeur de référence (Figure 6). Elle est associée à l'erreur totale (contribution des erreurs systématique et aléatoire) et est de nature qualitative.

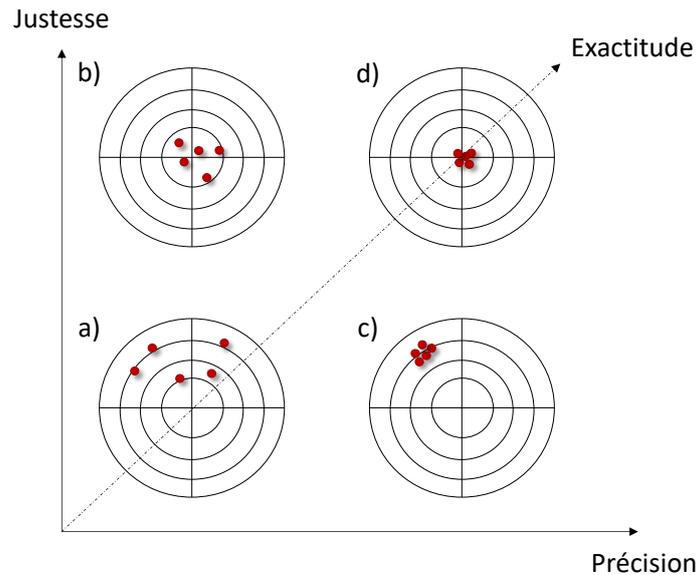


Figure 6 : Représentations graphiques de la justesse, de la précision et de l'exactitude ; a) ni précis ni juste : mauvaise exactitude ; b) juste mais pas précis ; c) précis mais pas juste ; d) précis et juste : bonne exactitude.

2.2.2. Sensibilité, limite de détection et quantification

La limite de détection (LOD, pour « *limit of detection* ») et de quantification (LOQ, pour « *limit of quantification* ») sont des paramètres importants pour la validation d'une méthode analytique. La sensibilité est souvent confondue avec la LOD, alors que la définition métrologique de la sensibilité est la suivante : quotient de la variation d'une indication d'un système de mesure par la variation correspondante de la valeur de la grandeur mesurée. ^[19] C'est donc la capacité d'un instrument à distinguer deux valeurs correspondant à des quantités différentes. En RMN, la LOD représente la quantité de produit minimal pouvant être détectée. Cette limite peut être déterminée visuellement ou mathématiquement ^[21] et elle est reliée à la mesure du rapport signal sur bruit (S/B). Une valeur de S/B de 3 est généralement considéré comme acceptable pour estimer la limite de détection. ^[21] Cependant, l'intensité du signal dépend de la forme de ce dernier (largeur, couplage) et du nombre de noyaux correspondants. Dans le langage courant RMN, la sensibilité prend la définition de la LOD et sera utilisée dans ce sens dans la suite de la thèse.

La LOQ est la concentration de l'analyte, pour laquelle le signal sélectionné présente le S/B minimal requis pour la précision de la méthode visée, ^[21] plus de détail sur l'impact du S/B sur la précision est donné dans la section 2.2.4.1 de ce chapitre.

2.2.3. Paramètres influençant la justesse

La justesse est impactée par des erreurs dites systématiques, ^[18] comme la saturation partielle, les effets d'*off-resonance*, le découplage et la géométrie de la sonde.

2.2.3.1. Saturation partielle

Pour faire des mesures quantitatives, il est important d'accumuler du signal afin d'avoir un rapport signal sur bruit (S/B) élevé. Chaque expérience est répétée NS fois avec un temps de répétition (TR) entre chaque impulsion radiofréquence RF (NS est alors désigné comme le nombre d'accumulations, le nombre de passages ou le nombre de scans). Dans le modèle vectoriel, ces impulsions permettent de basculer tout ou une partie de l'aimantation dans le plan transversal. Pour $\beta = \pi/2$, l'aimantation longitudinale (M_z) est nulle immédiatement après l'impulsion RF. Pendant le temps t , l'aimantation va revenir progressivement à sa valeur M_0 en suivant les équations de Bloch, ^[22] équation (Eq. 1.13) :

$$M_z = M_0 \cdot \left(1 - e^{-\frac{t}{T_1}}\right) \quad (1.13)$$

Si le temps de répétition TR (Figure 7) est grand devant T_1 , l'aimantation a le temps de retourner à sa valeur M_0 . L'amplitude du FID est alors maximale. Cependant, si TR est plus petit ou de l'ordre de T_1 , l'aimantation à l'équilibre prend la valeur M_{eq} suivant l'équation (Eq. 1.14).

$$M_{eq} = M_0 \cdot \left(1 - e^{-\frac{TR}{T_1}}\right) \quad (1.14)$$

Le signal alors obtenu dans ces conditions n'est plus maximum (Figure 7). Le S/B va être diminué, ce phénomène s'appelle la saturation partielle. Ainsi, M_{eq} est conditionnée par les valeurs de T_1 , qui sont dépendantes des groupements chimiques de la molécule, entraînant une mesure quantitative impossible car le spectre est alors modulé en fonction des T_1 .

Lorsque $\beta \neq \pi/2$, M_{eq} est également dépendante de la valeur de l'angle d'impulsion (β) (Eq. 1.15).

$$M_{eq} = M_0 \cdot \frac{1 - e^{-\frac{TR}{T_1}}}{1 - \cos(\beta) \cdot e^{-\frac{TR}{T_1}}} \quad (1.15)$$

La dérivée de l'équation 1.15 permet d'obtenir l'angle pour lequel l'amplitude est maximale, appelé l'angle de Ernst : $\beta_{opt} = \arccos\left(e^{-\frac{TR}{T_1}}\right)$. Cette expression est valable uniquement si la relaxation transversale (selon T_2) s'est complètement exprimée avant l'impulsion RF suivante.

Dans ces conditions, l'erreur induite par la saturation partielle (Γ) peut être exprimée en fonction de TR , T_1 et β (Eq. 1.16).

$$\Gamma = \frac{M_0 - M_{eq}}{M_0} = \frac{e^{-\frac{TR}{T_1}}(1 - \cos \beta)}{(1 - e^{-\frac{TR}{T_1}} \cdot \cos \beta)} \quad (1.16)$$

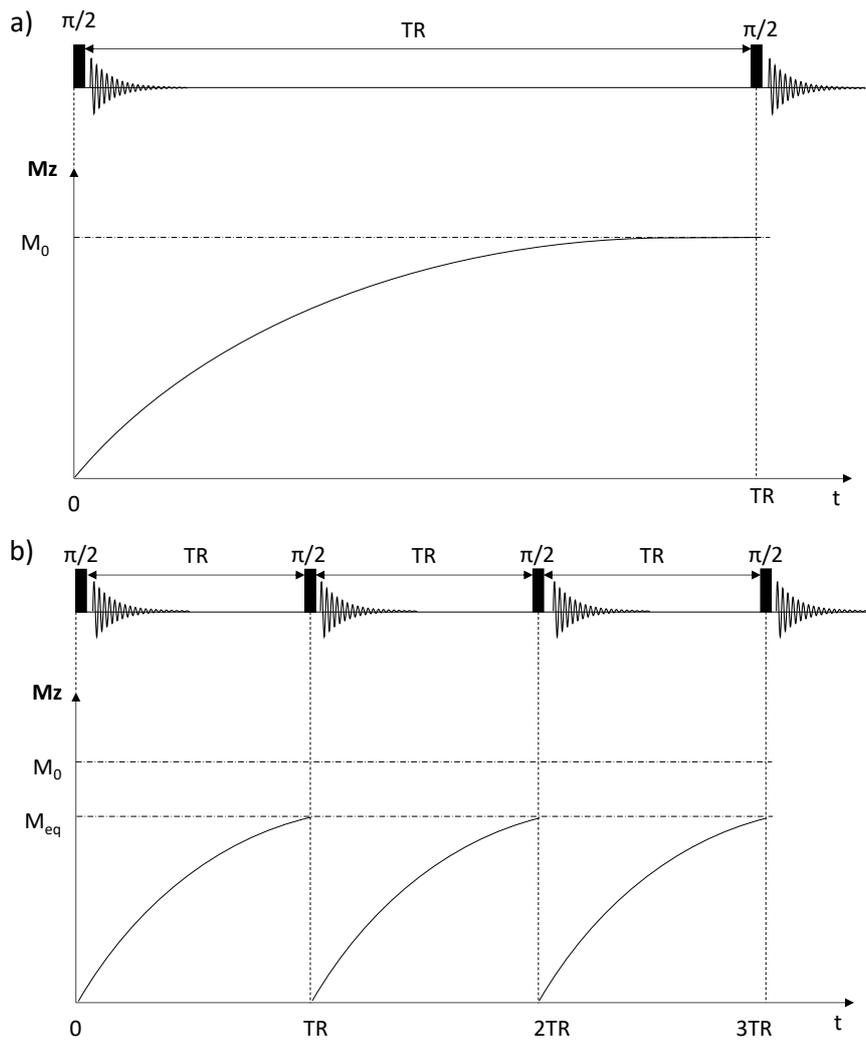


Figure 7 : Evolution de l'aimantation longitudinale M_z en fonction de la valeur de TR après une impulsion RF d'un angle $\pi/2$ a) TR est grand devant T_1 : retour de l'aimantation à la valeur de M_0 ; b) TR est du même ordre de grandeur que T_1 : l'aimantation retourne à une valeur d'équilibre $M_{eq} < M_0$.^[16]

Pour un S/B maximum, l'angle doit être autour de $\pi/2$.^[23] L'erreur Γ , calculée en fonction du rapport TR/T_1 , est donnée dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Evaluation de l'erreur maximale ε pour un angle de 90° en fonction du rapport TR sur T_1 .

TR/T_1	Erreur maximale pour $\beta = \pi/2 = 90^\circ$
3	5% (ou 50‰)
5	0,7% (ou 7‰)
7	0,1% (ou 1‰)

Par conséquent, pour réaliser des mesures quantitatives avec 1% d'erreur, il est nécessaire d'éliminer la saturation partielle. Pour cela, il faut avoir un TR égal au minimum à 7 fois le T_1^{max} de la molécule à quantifier.

2.2.3.2. Off-resonance

Comme déjà décrit, lors d'une impulsion RF, l'aimantation \vec{M} est basculée dans le plan transversal. Dans le cas d'impulsions RF de grande puissance (et donc de durée très courte), il est possible de négliger la précession autour de \vec{B}_0 pendant la bascule autour de \vec{B}_1 . Cependant, cette approximation n'est pas possible pour les expériences quantitatives demandant une grande précision. Ainsi, l'aimantation tourne autour d'un champ effectif \vec{B}_{eff} dépendant de \vec{B}_1 et de \vec{B}_0 , c'est l'effet d'*off-resonance* (Eq. 1.17).

$$\vec{B}_{eff} = \vec{B}_1 + \overline{\Delta B_0} \quad (1.17)$$

avec, $\Delta B_0 = \frac{\Omega_0}{\gamma}$ et Ω_0 correspond à la fréquence de résonance de Larmor.

L'aimantation évolue selon la vitesse angulaire (ω_{eff}), qui dépend de \vec{B}_{eff} (Eq. 1.18).

$$\omega_{eff} = \gamma \cdot B_{eff} \quad (1.18)$$

Ainsi, l'angle parcouru par l'aimantation β_{eff} (Figure 8) dépend de la fréquence dans le référentiel tournant. Les spins de fréquences différentes ne sont plus affectés de la même manière, produisant un déphasage des raies. Les impulsions produisant des angles supérieurs à 90° sont particulièrement affectées par l'effet d'*off-resonance* et, en conséquence, cela impacte notamment l'uniformité du découplage.

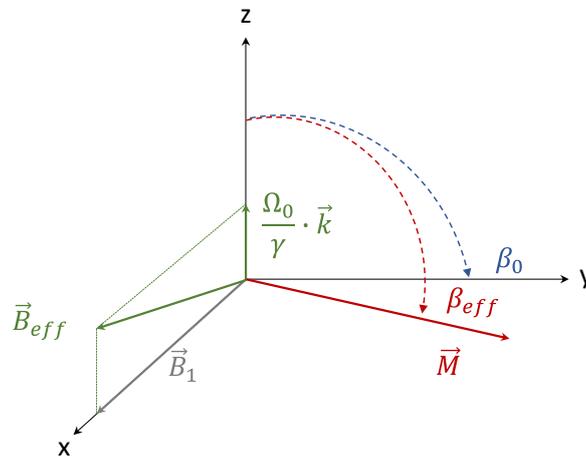


Figure 8 : Représentation de l'effet d'*off-resonance* ; pendant une impulsion RF l'aimantation \vec{M} précesse autour du champ \vec{B}_{eff} qui est différent du champ \vec{B}_1 (\vec{k} est un vecteur unitaire dirigé suivant l'axe z). ^[16]

2.2.3.3. Découplage large bande

En RMN, des noyaux peuvent interagir avec les noyaux voisins à travers les liaisons chimiques composées d'électrons. Ce phénomène produit une démultiplication des raies caractérisée par la constante de couplage (J) provoquant une forme de multiplet. En RMN- ^{13}C ces couplages

correspondent aux interactions entre les carbones et les protons portés par ce dernier. Ainsi, sur le spectre pour chaque signal carbone un multiplet peut être observé dans le cas des CH (doublet), CH₂ (triplet) ou CH₃ (quadruplet). Afin de rendre le spectre plus lisible, d'améliorer S/B et d'éviter les recouvrements, un découplage est mis en place permettant ainsi de supprimer l'influence sur le spectre des couplages entre les carbones et les protons. Le spectre résultant est alors composé uniquement de singulet dont l'intensité est plus importante (Figure 9).

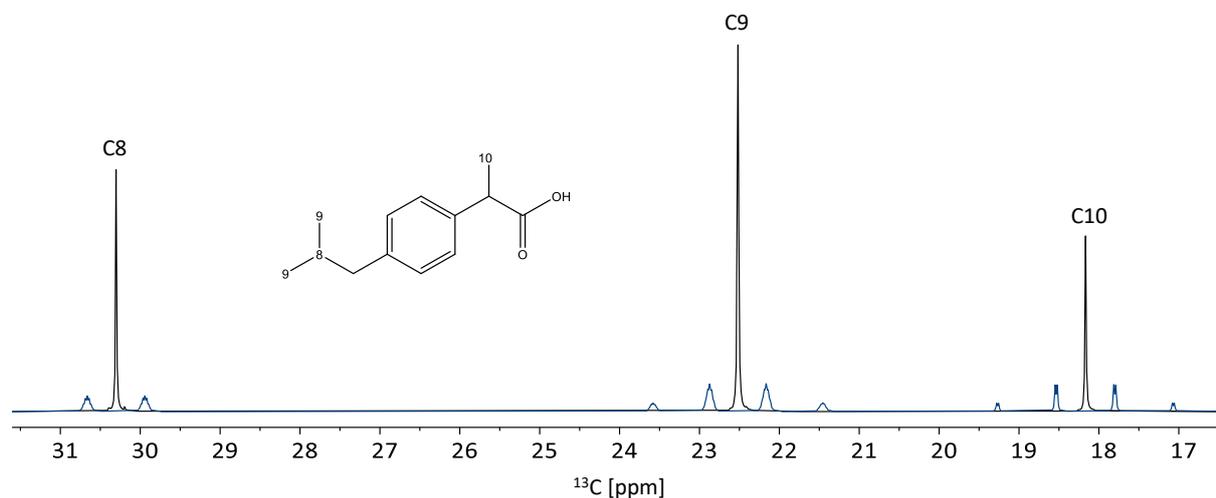


Figure 9 : Spectres RMN ¹³C découplés des protons (■) et non découplés (■) de l'ibuprofène entre 17 et 31 ppm.

Le découplage large bande (toute la gamme des fréquences protoniques) est une succession d'impulsions (180°) afin d'inverser rapidement l'état des spins d'un noyau couplé à un autre pendant l'observation du signal de ce dernier. Il permet de faire disparaître l'éclatement des massifs dû aux couplages existants entre les noyaux observés et découplés. Cependant, lors d'un découplage, l'effet Overhauser nucléaire (nOe) peut s'exprimer, se traduisant par un transfert de polarisation entre ces 2 noyaux et provoquant une modification de la surface des raies selon l'équation (Eq. 1.19).

$$\frac{S}{S_0} \leq 1 + \frac{\gamma_{irr}}{2 \cdot \gamma_{obs}} \quad (1.19)$$

avec S et S_0 représentant les surfaces mesurées en présence et en absence d'irradiation, γ_{irr} et γ_{obs} les rapports gyromagnétiques des noyaux irradiés et observés, respectivement. Dans le cas du ¹³C (noyau observé) découplé du ¹H (noyau irradié) le transfert de polarisation entraîne une augmentation du signal qui est dépendant du groupement considéré de la molécule. Les différences d'intensité entraînent une mesure qui n'est plus quantitative. La suppression du nOe est possible grâce à l'utilisation du découplage en créneau inverse.^[24] La méthode d'acquisition utilisée pour le quantitatif, appelée *Inverse Gated*, est composée d'un 90° ¹³C et d'un découplage ¹H pendant l'acquisition (Figure 10). Cette séquence peut aussi être appelée « single-pulse ».

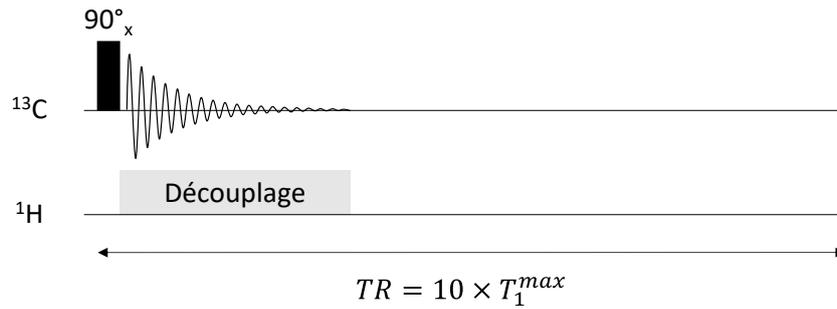


Figure 10 : Séquence Inverse Gated utilisée pour l'analyse quantitative ^{13}C . L'aimantation est basculée dans le plan transversal afin d'être détectée. Le découplage ^1H à lieu pendant l'acquisition pour éliminer les couplages $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ de façon à simplifier le spectre et d'augmenter le S/B.

Dans cette séquence, le nOe s'établit partiellement pendant le découplage sur la fin du FID. Afin qu'il soit éliminé avant la prochaine impulsion, il est important que le TR soit égal à 10 fois le T_1^{max} pour obtenir une justesse de 1%. [25]

Plusieurs motifs de découplage ont vu le jour. Pour les comparer, un facteur d'efficacité a été mis en place [26] prenant en compte la gamme en fréquence efficace à découpler (ΔF^*), l'intensité du champ RF de découplage (B_2) et le rapport gyromagnétique du noyau (γ). L'efficacité du découplage est directement proportionnelle à l'intensité du découplage, l'indice d'efficacité (\mathcal{E}) est donné selon l'équation (Eq. 1.20).

$$\mathcal{E} = \frac{2\pi\Delta F^*}{\gamma B_2} \quad (1.20)$$

Les indices d'efficacité pour les différents motifs sont donnés (Tableau 2) pour un même facteur d'élargissement LB de 1,5 Hz. La gamme efficace représente la gamme dans laquelle au-moins 80% de l'intensité du signal on-résonance est obtenu (Figure 11).

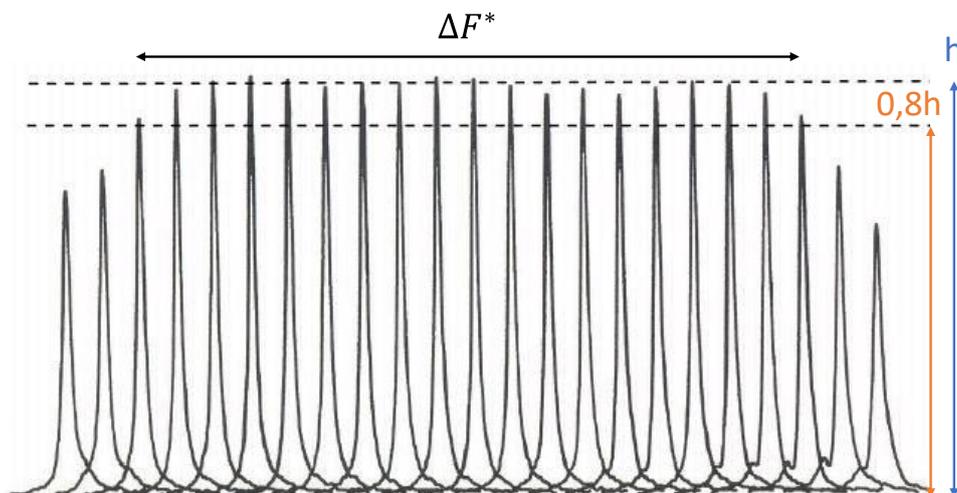


Figure 11 : Gamme d'efficacité des découplages dans laquelle le signal est supérieur ou égal à 80% du signal on-résonance. [26] La hauteur h correspond à l'intensité maximal du signal on-résonance.

Tableau 2 : Indice d'efficacité (Ξ) des différents découplages existants ainsi que leur application.

Nom du découplage	Indice d'efficacité	Application	Références
MLEV-16	1,5	Découplage ^1H	[27]
WALTZ-16	2	Découplage haute-résolution ^1H	[28,29]
GARP	4,8	Découplage noyaux X	[30]
WURST	16,7	Découplage adiabatique	[31–33]

Dans sa thèse, Eve Tenailleau ^[34] a optimisé le découplage adiabatique afin qu'il soit homogène et uniforme sur toute la gamme ^1H . Un découplage inhomogène peut avoir des conséquences sur le spectre (Figure 12) et par conséquent donner des mesures quantitatives erronées.

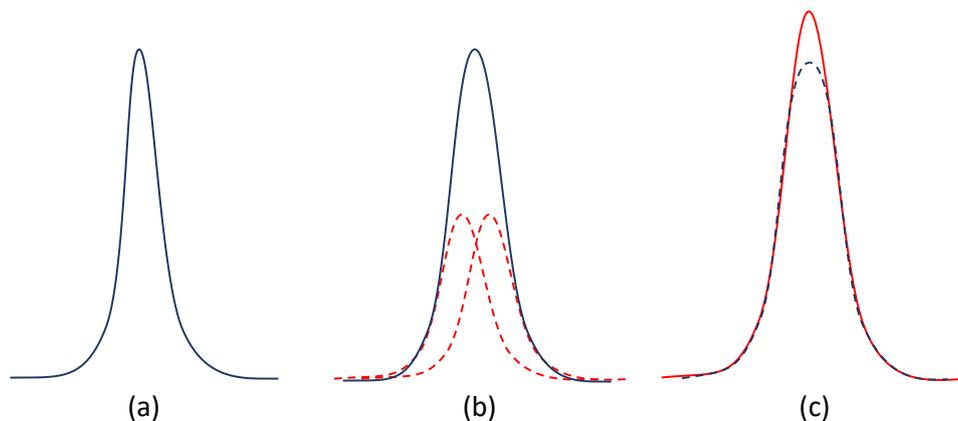


Figure 12 : Impact du découplage sur la forme des raies : a) découplage parfait ; b) découplage partiel, même avec un petit couplage résiduel, provoquant un dédoublement de la raie dont l'enveloppe ne correspond plus à une forme lorentzienne ; c) l'ajustement de cette enveloppe avec une forme lorentzienne conduit à une surface erronée. ^[16]

2.2.3.4. Typologie des sondes

Dans les sondes RMN, la bobine accordée à la fréquence de résonance ^{13}C (de hauteur H) émet les impulsions RF ^{13}C . La bobine accordée à la fréquence des protons (de hauteur H') est utilisée pour émettre les impulsions RF ^1H . En configuration directe, le signal est détecté par une bobine de hauteur H et le découplage hétéronucléaire est réalisé grâce à une bobine de hauteur H' supérieure H (Figure 13a). En configuration inverse, les rôles des deux bobines sont inversés (Figure 13b). L'efficacité d'une bobine RF décroît fortement à proximité des bords pour devenir nulle à l'extérieur. Il faut donc considérer que le découplage, dont l'efficacité est directement liée à celle des impulsions RF, n'est correctement réalisé que pour une hauteur utile H_u . Cette hauteur est inférieure à H' (lors d'une observation directe avec découplage ^1H) et inférieure à H (lors d'une observation inverse avec découplage ^{13}C). Compte tenu de la faible différence entre H et H' dans les sondes utilisées actuellement, même lorsque la bobine la plus haute est utilisée pour le découplage, une partie des noyaux observés n'est pas correctement découplée. Ceci

conduit à des distorsions dans les intensités et les formes de raie, et la justesse des mesures est alors détériorée.

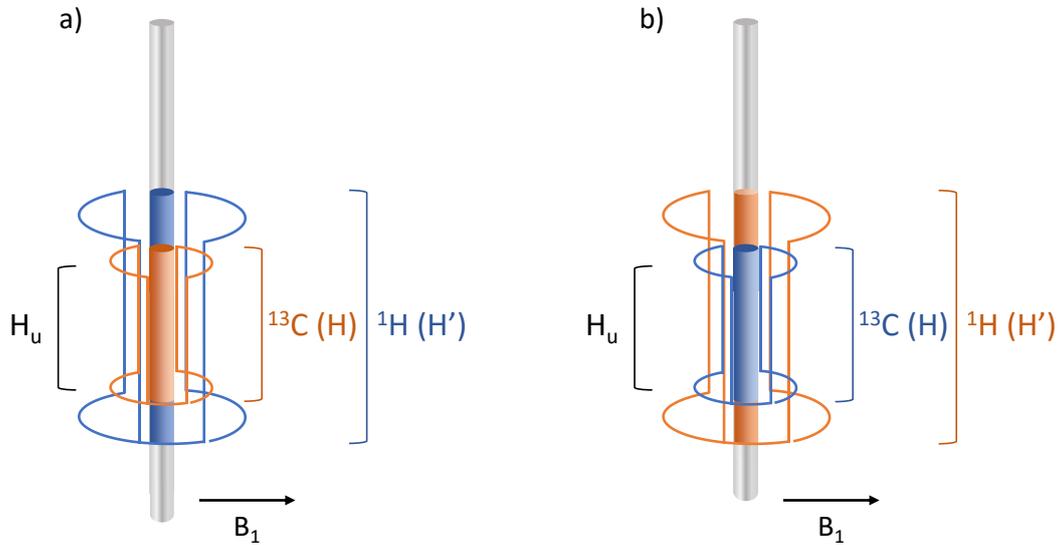


Figure 13 : Schéma simplifié de sonde dans laquelle le tube contenant l'échantillon est placé dans une configuration : a) directe et b) indirecte. H est la hauteur de la bobine ^{13}C (■), et H' la hauteur de la bobine ^1H (■), H_u représente la hauteur utile correctement observée.

2.2.4. Paramètres influençant la précision

La précision est impactée par des erreurs qui sont aléatoires. ^[18] Les effets d'*off-resonance* (notamment au cours du découplage) peuvent également avoir un effet sur la précision s'ils sont couplés à des variations de fréquences de résonances. Le rapport signal sur bruit, la stabilité du spectromètre et de l'échantillon impactent la précision.

2.2.4.1. Le rapport signal sur bruit S/B

Lors d'une expérience RMN, l'expérience est répétée NS fois. Ainsi, le signal (s) évolue suivant le nombre de répétitions (NS) et devient au final (S) : $S = NS \cdot s$. Le bruit (b) s'additionne de façon incohérente et il évolue suivant la racine carrée du nombre de répétitions, donc : $B = \sqrt{NS} \cdot b$. Le S/B est alors proportionnel à la racine carrée du nombre de répétition : $\frac{S}{B} = \frac{s}{b} \cdot \sqrt{NS}$.

D'un point de vue statistique, l'erreur maximale relative d'une surface $\left(\frac{\Delta S}{S}\right)$ est inversement proportionnel au S/B ^[35] (Eq. 1.21).

$$\frac{\Delta S}{S} \leq \frac{1}{2 \cdot (S/B)} \quad (1.21)$$

L'erreur relative peut être assimilée à la précision cible et ainsi pour un S/B de 50 une précision de 1% est obtenue contre 1‰ pour un S/B de 500.

2.2.4.2. Stabilité du spectromètre et de l'échantillon

Les instabilités du spectromètre et de l'échantillon au cours du temps peuvent impacter la répétabilité de l'analyse et donc la précision comme c'est le cas du champ magnétique et de la température de l'échantillon. ^[36,37]

La température est un paramètre important en RMN quantitative. Elle peut affecter les propriétés de relaxation des molécules, ^[36] créer des artefacts sur le spectre ^[36] et également modifier les déplacements chimiques. ^[38] C'est pourquoi, la température de l'échantillon doit impérativement être stable pendant les expériences.

L'inhomogénéité du champ magnétique peut créer des distorsions de signal et des formes de raie inappropriées. ^[36] Il est important que le champ magnétique soit optimisé et stable dans le temps afin d'avoir une bonne résolution (largeur à mi-hauteur du signal) et donc une bonne précision. Les inhomogénéités du champ magnétique peuvent également provenir de l'échantillon. Ce dernier doit être stable, ne présenter aucune évolution physique ou chimique au cours du temps : recristallisation, précipitation, hydrolyse, interaction avec le solvant de *lock*. Une quelconque inhomogénéité de l'échantillon peut provoquer des inhomogénéités de champ magnétique.

2.3. Impulsions RF

Les impulsions RF sont utilisées pour faire basculer l'aimantation d'un angle β , et elles sont caractérisées par une durée D et une amplitude B_1 . Des imperfections peuvent exister sur l'angle β réellement appliqué et peuvent affecter directement des résultats quantitatifs.

2.3.1. Imperfections des impulsions

Les origines des imperfections des impulsions sont multiples et peuvent provenir de l'inhomogénéité du champ \vec{B}_1 , d'un mauvais calibrage des impulsions, ou des problèmes d'*off-resonance* (Figure 14).

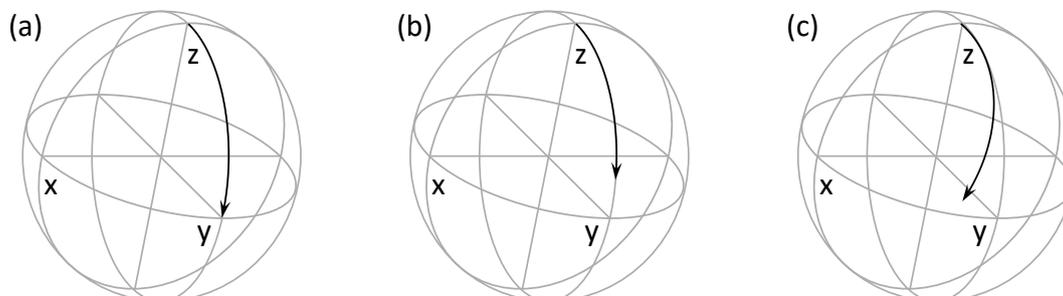


Figure 14 : Représentation de l'impact des imperfections des impulsions. (a) 90° parfait ; (b) erreur sur la valeur de β dû à l'inhomogénéité de B_1 ou à un calibrage imparfait ; (c) effet d'*off-resonance*. ^[17]

L'angle β doit être calibré avec une puissance et une durée données. Les calibrages sont eux-mêmes impactés par l'accord de sonde, la température et les concentrations de l'échantillon.

Il est nécessaire de refaire les calibrages pour chaque échantillon et avant chaque expérience afin d'avoir des expériences répétables et reproductibles. La méthode la plus simple et rapide pour faire ces calibrages est de déterminer le point d'annulation du signal pour un angle de bascule de 360° et de diviser la durée trouvée par 4 afin de connaître la durée pour un 90° . Cette méthode, bien que rapide et facile à mettre en place, est dépendante de l'opérateur (lorsque l'estimation du point d'annulation n'est pas automatisée, ce qui est le cas le plus fréquent) et donne seulement une valeur approximative du 90° ^[39] pouvant provoquer des imperfections sur l'angle β . Plus de détails sur cette méthode sont donnés dans le chapitre III. L'effet *off-resonance* peut également donner lieu à des imperfections (Cf. section 1.2.3.2 de ce chapitre). Les impulsions RF doivent être courtes afin de ne pas être sélectives, cependant la précession autour de \vec{B}_0 ne doit pas être négligée. L'effet des imperfections RF n'a pas le même effet sur le signal pour tous les angles de nutation. Les imperfections des impulsions sur un 90° réduisent toutes les surfaces des pics dans la même proportion, ^[40] les mesures quantitatives ne sont donc pas impactées par des imperfections sur les 90° . Mais cela n'est pas vrai pour les impulsions à 180° , c'est pourquoi de nouvelles impulsions ont été développées afin de compenser ces imperfections.

2.3.2. Impulsions composites

Les impulsions composites ^[41] sont constituées d'impulsions successives rectangulaires avec des délais très courts (négligeables) pour limiter la précession dans le plan transversal (xy). Chacune de ces impulsions a une phase différente et produit un angle différent.

L'impulsion $(90^\circ)_x - (180^\circ)_y - (90^\circ)_x$ (Figure 15a) permet de compenser les imperfections dues aux calibrages ou à l'inhomogénéité de champ \vec{B}_1 . L'imperfection de la première impulsion est compensée à l'aide de la dernière impulsion. Ainsi, toutes les trajectoires finissent près de l'axe -z ce qui montre l'erreur minime restante sur la position de l'aimantation. D'autres impulsions composites permettent de corriger les imperfections causées par l'effet d'*off-resonance*, c'est le cas de l'impulsion $(90^\circ)_x - (240^\circ)_y - (90^\circ)_x$ (Figure 15b).

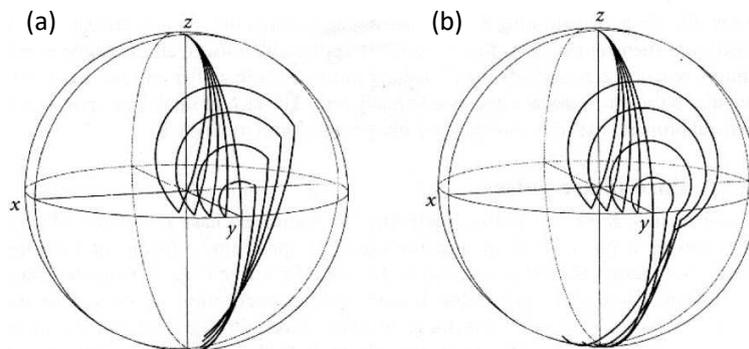


Figure 15 : Impulsions composites : a) $(90^\circ)_x - (180^\circ)_y - (90^\circ)_x$ permettant de compenser les imperfections des calibrages avec des longueurs d'impulsions allant de 80 à 90% de la valeur nominale ; b) $(90^\circ)_x - (240^\circ)_y - (90^\circ)_x$ permettant de compenser les imperfections provenant de l'*off-resonance* pour différents offsets. ^[26]

Ces impulsions sont utilisées pour remplacer les impulsions rectangles de 180° notamment dans les séquences multi-impulsionnelles. ^[42] Cependant, il n'est pas possible de compenser toutes les imperfections avec une même impulsion composite. Dans ce sens, les impulsions adiabatiques ^[33,43,44] sont plus efficaces.

2.3.3. Impulsions modulées en amplitude et en fréquence

Les impulsions modulées en amplitude et en fréquence permettent de balayer une gamme de fréquences bien définie afin de compenser les imperfections des impulsions RF. Pour une impulsion de durée D , l'amplitude est modulée entre 0 et ω^{max} et suit la fonction donnée par l'équation (Eq. 1.22).

$$\omega_1(t) = \omega_1^{max} \cdot f(t) \quad (1.22)$$

avec $t \in \left[-\frac{D}{2}, +\frac{D}{2}\right]$, $\omega_1^{max} = \gamma \cdot B_1^{max}$, et $f(t)$ est la fonction définissant l'amplitude de l'impulsion, variant de 0 à 1.

La fréquence est modulée entre $-\Delta\omega^{max}$ et $\Delta\omega^{max}$ (Eq. 1.23).

$$\Delta\omega(t) = \Delta\omega^{max} \cdot g(t) \quad (1.23)$$

avec $\Delta\omega^{max} = \pi \cdot \Delta F$, ΔF représentant la gamme de fréquence balayée, et $g(t)$ est la fonction définissant la fréquence de l'impulsion variant de -1 à 1.

Sur les spectromètres récents, la modulation en fréquence est remplacée par un encodage en phase qui permet d'être plus précis et qui est plus facile à mettre en œuvre. Cette modulation suit la fonction (Eq. 1.24) :

$$\phi(t) = \int_0^t \Delta\omega(\tau) d\tau \quad (1.24)$$

Les impulsions les plus utilisées sont des impulsions appelées CHIRP (*Frequency swept pulse*) ^[45] et WURST (*Wideband Uniform Rate and Smooth Truncation*). ^[31-33] Les impulsions CHIRP contiennent une modulation en amplitude de forme rectangulaire avec un début et une fin composés d'un quart de sinus afin d'adoucir les variations de B_1 aux extrémités (Figure 16a). Ce lissage permet également d'avoir B_{eff} qui commence et qui se termine le long de l'axe $\pm z$. ^[17] Les impulsions WURST ont été développées indépendamment des CHIRP mais sont constituées d'une modulation en amplitude très similaire. L'amplitude suit une fonction : $f(t) = 1 - \left| \sin\left(\frac{\pi t}{D}\right) \right|^m$. L'exposant m définit la pente de troncature, plus m est élevé plus la pente aux extrémités est importante (Figure 16a). Généralement, m est compris entre 20 et 40. ^[17] Ces deux familles d'impulsions ont une variation en fréquence linéaire qui suit la fonction suivante : $g(t) = 2t/D$, la modulation de phase suit donc une fonction du second degré (Figure 16b).

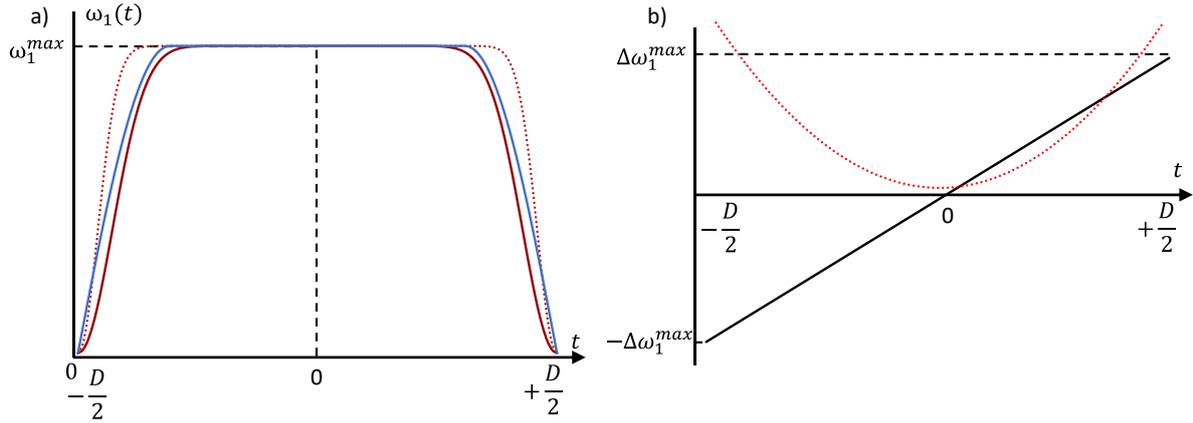


Figure 16 : a) Profils de modulation en amplitude pour une impulsion WURST-60 (rouge-pointillé), WURST 40 (rouge) et CHRIP-20% (bleu) pour une durée D . b) Modulation en fréquence (noir) et en phase (rouge) pour les impulsions CHIRP et WURST. 0 représente la position de la porteuse au centre de l'impulsion.

En première approximation, lorsque la valeur de $\omega_1(t)$ est égale à une fréquence de résonance, l'aimantation est basculée dans le plan transversal ; pour le reste des résonances, l'effet est alors nul. Ces impulsions basculent donc les aimantations dans le plan transversal de façon séquentielle. Si la gamme est assez grande et pour les résonances touchées lors du plateau en $\omega_1(t)$, ces impulsions sont alors immunisées contre les effets d'*off-resonance*. Cependant, lorsque l'aimantation est basculée dans le plan transversal, la précession est toujours en place entraînant un déphasage des raies pour chacune des résonances. Ces impulsions sont donc d'excellentes candidates pour réaliser des inversions, mais ne peuvent pas être utilisées pour des refocalisations en raison de l'introduction d'une dépendance de phase en fonction de l'offset.

2.3.4. Impulsions adiabatiques

Les impulsions adiabatiques sont des impulsions contenant une modulation en amplitude et en fréquence et elles sont gouvernées par l'effet d'*off-resonance*.

L'écart $\Delta\Omega$ entre la fréquence de l'impulsion à l'instant t et la fréquence de résonance Ω (Figure 17) est défini par l'équation (Eq. 1.25) :

$$\Delta\Omega = \Delta\omega(t) - \Omega = \Delta\omega^{max} \cdot g(t) - \Omega \quad (1.25)$$

Au début de l'impulsion adiabatique, $\omega(t) \ll \Omega$, ainsi $\Delta\omega(t)$ est proche de sa valeur minimale $-\Delta\omega^{max}$, et \vec{B}_{eff} est donc collinaire à $+z$ (Figure 17a). L'aimantation \vec{M} a donc la même direction que \vec{B}_0 . Lorsque $\Delta\omega(t)$ augmente, le $\Delta\Omega(t)$ diminue, et entraîne un basculement de \vec{B}_{eff} (Figure 17b). Ainsi, lorsque $\Delta\Omega(t)$ est égale à Ω , \vec{B}_{eff} est égale à \vec{B}_1 et l'aimantation est dans le plan transversal (Figure 17c). Pour faire une inversion de 180° , le balayage en phase continue pour amener l'aimantation suivant $-z$, l'aimantation est alors inversée (Figure 17e).

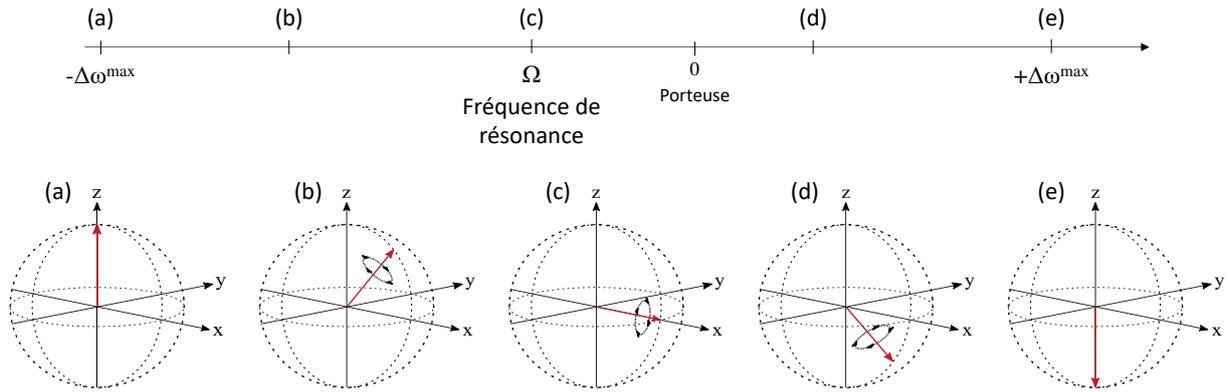


Figure 17 : Représentation de la variation de l'aimantation \vec{M} pendant une impulsion adiabatique d'inversion ; a) au début, $\omega(t) \ll \Omega$; \vec{M} est suivant z ; c) \vec{M} est dans le plan transversal lorsque $\Delta\Omega(t) = \Omega$; d) le balayage en fréquence continue ; e) \vec{M} est aligné suivant l'axe -z.

Pour être adiabatique, ces impulsions doivent remplir les conditions suivantes (Eq. 1.26 et 1.27) :

$$\left| \frac{d\theta}{dt} \right| \ll \omega_{eff} \tag{1.26}$$

$$\theta \left(\pm \frac{D}{2} \right) = \pm \frac{\pi}{2} \tag{1.27}$$

En d'autres termes, l'aimantation \vec{M} doit précesser assez vite afin qu'elle soit entraînée par \vec{B}_{eff} mais il faut également qu'au début de l'impulsion \vec{M} et \vec{B}_{eff} soient colinéaires.

Les impulsions adiabatiques permettent de délivrer un angle fixe (90° ou 180°) pour tous les niveaux de puissance à partir d'un seuil ^[46] (Figure 18). Elles sont donc immunisées contre les problèmes de calibrages et d'*off-resonance*.

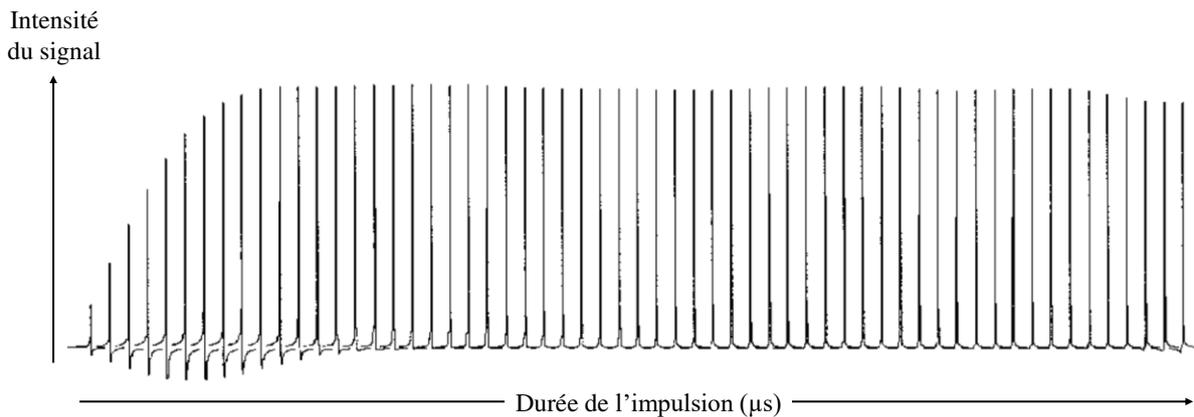


Figure 18 : Intensité d'un signal résultant d'une impulsion adiabatique lorsque la largeur de l'impulsion est augmentée. L'intensité est toujours la même à partir d'un seuil de durée. Cette figure montre l'immunité de ces impulsions contre les problèmes de calibrages. ^[46]

En RMN quantitative, les impulsions adiabatiques ont dans un premier temps été implémentées pour le découplage afin d'améliorer la précision des mesures. ^[47] L'efficacité d'un schéma de découplage adiabatique est définie par : (i) la capacité de faire une inversion de l'aimantation

sur toute la gamme de découplage, (ii) des impulsions de courte durée par rapport à la relaxation transversale (T_2^*) et à l'inverse de la constante du couplage, (iii) le cycle de phase appliqué pendant le découplage doit compenser les imperfections résiduelles des impulsions. [32,48,49] Le développement du découplage adiabatique réalisé pendant la thèse d'Eve Tenailleau a conduit à une forme d'impulsion cosinus avec un balayage en fréquence obtenu à partir de la méthode de l'adiabaticité indépendante de l'offset (OIA). [44] Les impulsions ont une durée de 200 μ s, une amplitude maximale (ω_1^{max}) de 75,2 krad/s et une gamme de balayage ΔF de 14 kHz. Cette forme d'impulsion combinée avec un cycle de phase optimisé a permis d'obtenir une précision de 1% sur les résultats quantitatifs. [47]

Les impulsions adiabatiques ont également été implémentées dans des séquences multi-impulsionnelles telles que l'INEPT en remplaçant tous les 180° rectangulaires par des impulsions adiabatiques, [50] les 90° n'impactant pas les résultats quantitatifs sont restés rectangulaires (Cf. paragraphe 2.3.1 de ce chapitre). Dans ces travaux, les auteurs ont pu démontrer l'impact des impulsions adiabatiques, ainsi que du découplage adiabatique en faisant varier la fréquence d'émission (Figure 19). L'utilisation de molécule bi-marquée (Cf. paragraphe 2.4 de ce chapitre) permet de calculer directement l'erreur commise sur les mesures quantitatives.

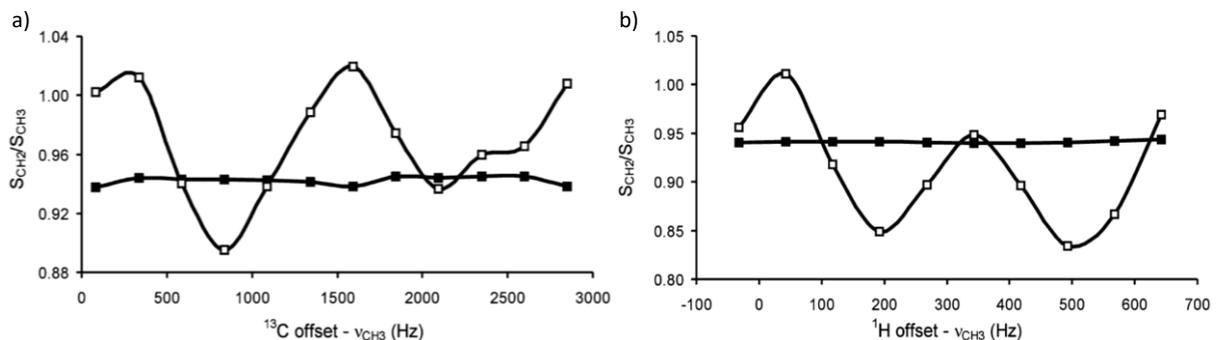


Figure 19 : Variation de la surface sous les pics des atomes du ^{13}C de l'éthanol bimarqué mesurée avec : □ l'INEPT normal et ■ INEPT avec des impulsions adiabatiques et composites, en variant l'offset : a) ^{13}C de 0 à 3000 Hz par pas de 250 Hz ; b) 1H de 0 à 675 Hz par pas de 75 Hz. [50]

2.3.5. Impulsions spatialement sélectives

Dans les impulsions modulées en fréquence et en amplitude, seule la gamme de fréquence modulée est excitée par l'impulsion. Ces impulsions en association avec un gradient g_e de champ magnétique permettent de sélectionner une partie du tube. En effet, le gradient et l'impulsion sont appliqués simultanément, créant un encodage spatial qui suit la modulation en fréquence. Ainsi, cette combinaison permet de réaliser des expériences spatialement sélectives.

2.4. Les références en RMN quantitatives

Le signal obtenu en RMN est proportionnel au nombre de noyaux observés. Cette technique permet, à l'aide d'une référence, de connaître la concentration d'un échantillon. Plusieurs références peuvent être utilisées, interne, externe, ou électronique. Ce paragraphe décrit les avantages et les inconvénients de chacune d'elles dans le contexte de justesse et de précision.

2.4.1. Référence interne chimique

Cette méthode consiste à additionner directement dans le tube RMN une molécule dite de référence afin de quantifier une autre molécule dont la concentration est inconnue. Comme déjà mentionné, le signal provenant de la molécule de référence obtenue en RMN est directement proportionnel : à son nombre de noyaux équivalents observés pour le site i ($p_{i_{ref}}$), à sa concentration (C_{ref}), au volume sensible (V_{ref}) et à la constante k_{ref} (Eq. 1.28).

$$S_{ref} = k_{ref} \cdot p_{i_{ref}} \cdot C_{ref} \cdot V_{ref} \quad (1.28)$$

La même formule peut être écrite pour la molécule à quantifier (Eq. 1.29).

$$S_{inc} = k_{inc} \cdot p_{i_{inc}} \cdot C_{inc} \cdot V_{inc} \quad (1.29)$$

Le rapport entre les deux équations donne la relation (Eq. 1.30) :

$$\frac{S_{ref}}{S_{inc}} = \frac{k_{ref} \cdot p_{i_{ref}} \cdot C_{ref} \cdot V_{ref}}{k_{inc} \cdot p_{i_{inc}} \cdot C_{inc} \cdot V_{inc}} \quad (1.30)$$

Les deux molécules étant dans la même préparation et dans le même tube, le volume sensible observé est le même soit $V_{ref} = V_{inc}$. La constante k est dépendante de l'appareillage et peut varier avec les instabilités de l'appareil. Cependant, l'analyse est réalisée sur le même tube entraînant la même constante k pour la référence et pour le composé à quantifier : $k_{ref} = k_{inc}$. L'équation est simplifiée afin d'obtenir l'équation (Eq. 1.31) :

$$C_{inc} = C_{ref} \cdot \frac{p_{i_{ref}} \cdot S_{inc}}{p_{i_{inc}} \cdot S_{ref}} \quad (1.31)$$

Cependant, plusieurs critères sont importants à prendre en compte lors du choix de la molécule de référence. En effet, la référence doit être soluble dans le même solvant que l'échantillon et ne doit pas présenter d'interaction chimique avec ce dernier. Afin de ne pas augmenter le temps d'analyse, le T_1^{max} de la référence doit être proche ou inférieur au T_1^{max} de la molécule à quantifier. Pour minimiser les erreurs de mesure, les concentrations de la référence et de la molécule doivent être proches, ainsi, le signal sera du même ordre de grandeur. Les déplacements chimiques doivent être différents de l'échantillon. Enfin, la référence ne doit être ni volatile, ni hygroscopique.

2.4.2. Référence externe

Pour s'affranchir des problèmes de volatilité, de co-solubilité et des interactions chimiques, la référence peut être utilisée en externe soit (i) à l'aide d'un capillaire directement placé dans le tube RMN, (ii) en réalisant une même acquisition sur deux tubes différents, le premier contenant le produit de référence et le deuxième, la molécule à quantifier. Cette dernière approche, permet également d'éviter le recouvrement de signaux entre la référence et le produit.

Pour calculer la concentration (dans le cas de l'utilisation d'un capillaire), il est important de prendre en compte le volume sensible analysé qui est différent entre le capillaire et le tube, soit V_{ref} différent de V_{inc} (Eq. 1.32 et 1.33).

$$V_{ref} = \frac{\pi}{4} \cdot d_{int_{capillaire}}^2 \cdot h \quad (1.32)$$

$$V_{inc} = \frac{\pi}{4} \cdot (d_{int_{tube}}^2 - d_{ext_{capillaire}}^2) \cdot h \quad (1.33)$$

avec d_{int} et d_{ext} les diamètres interne et externe, respectivement, du capillaire et du tube RMN, et h la hauteur du volume sensible, soit la hauteur de la bobine. Ainsi, la concentration est calculée avec la formule (Eq. 1.34) :

$$C_{inc} = C_{ref} \frac{n_{i_{ref}} \cdot S_{inc} \cdot V_{ref}}{n_{i_{inc}} \cdot S_{ref} \cdot V_{inc}} \quad (1.34)$$

Malgré les points positifs de la référence externe, cette méthode montre de nombreux problèmes. L'utilisation d'un capillaire entraîne une diminution du nombre de noyaux observés provoquant un abaissement du S/B. De plus, l'homogénéité de B_0 ainsi que les calibrages ne sont pas les mêmes entre le capillaire et le tube, diminuant la précision des résultats par rapport à la référence interne. ^[51] Lorsque la mesure est réalisée sur deux tubes différents, non seulement le temps d'expérience est multiplié par deux, mais la répétabilité des résultats est dégradée car on cumule les erreurs de deux mesures.

Enfin, la méthode PULCON (*PULse Length based CONcentration determination*) a été développée afin de diminuer les variations pouvant avoir lieu entre deux expériences réalisées sur deux tubes différents. ^[52,53] Cette méthode est utilisée lorsque les échantillons ont des facteurs qualité de sonde très différents, comme c'est le cas avec différentes salinités. ^[52]

2.4.3. ERETIC

La méthode ERETIC (*Electronic Reference To access in vivo Concentration*) a été développée en 1997 par Barantin *et al.* afin de déterminer la concentration d'un échantillon sans avoir besoin de rajouter une référence interne. ^[54] Un signal additionnel est émis par une antenne annexe et il est réceptionné en même temps que le signal RMN (Figure 20). Après transformation de Fourier, le signal ERETIC est additionné sur le spectre comme un

déplacement chimique supplémentaire. Le signal normalement obtenu de la référence est dans ce cas-là un signal électronique dont l'aire et le déplacement chimique sont choisis par l'utilisateur. Il doit être calibré afin de servir de référence interne.

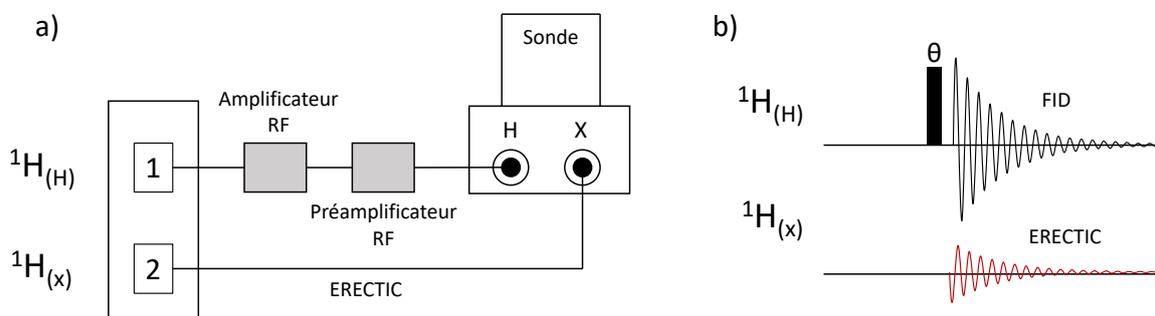


Figure 20 : a) Représentation de l'installation de la méthode ERETIC ; b) séquence ERETIC. [17]

Cette méthode a de nombreux avantages, elle permet d'éviter les interactions chimiques avec une référence interne, et simplifie la préparation de l'échantillon. De plus, elle n'impose pas de contrainte sur le temps de répétition. Une étude comparative a montré une exactitude des résultats proche voire meilleure qu'avec une référence interne. [55] Cette méthode a également été utilisée pour la quantification de métabolites, [56] et pour déterminer une vitesse cinétique de réaction, [57] ainsi que pour une analyse RMN ^2H . [58] L'application de cette technique a également été réalisée sur des spectres 2D. [59] Néanmoins, cette approche demande une configuration particulière du spectromètre. Ce dernier doit avoir un canal disponible afin de générer ce signal électronique.

Pour faire le bon choix sur la méthode de référence il est important de prendre en compte : (i) la précision visée, (ii) le domaine d'application et (iii) les contraintes expérimentales. [51] Afin d'atteindre 1‰ de précision, la référence interne est une méthode de choix pour les mesures isotopiques.

2.5. Séquences multi-impulsionnelles

La séquence *Inverse Gated* (Figure 10) est couramment utilisée pour faire de la RMN quantitative ^{13}C . Cependant, le ^{13}C a un rapport gyromagnétique 4 fois plus petit que celui du ^1H et une abondance naturelle très faible (1,1%, en moyenne) donnant lieu à de longues expériences afin d'accumuler du signal. Pour pallier ce manque de sensibilité, des séquences 1D et également 2D multi-impulsionnelles ont été proposées. En effet, grâce à un transfert de polarisation entre le ^1H et le ^{13}C , la sensibilité est alors augmentée permettant ainsi de diminuer le temps de l'analyse. La saturation partielle est alors gouvernée par les T_1 ^1H , et le $n\text{Oe}$ n'intervient plus. Cependant, l'utilisation de ces séquences entraîne une perte de l'information provenant des carbones quaternaires, car ils ne sont liés à aucun ^1H . En effet, le transfert se produit via les électrons de valence des liaisons chimiques entre le ^{13}C et le ^1H .

2.5.1. INEPT

L'INEPT (*Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer*) a été proposée par Morris et Freeman en 1979. ^[60] Grâce à un transfert de polarisation du noyau H vers l'hétéro-noyau X (Eq. 1.35), cette séquence permet une diminution significative du temps de l'expérience par augmentation de l'intensité du signal.

$$I_{INEPT} = I_0 \left(\frac{\gamma_H}{\gamma_X} \right) \quad (1.35)$$

Elle est composée d'un écho de spin ($90_x(^1H) - \tau - 180_y(^1H)180_x(^{13}C) - \tau -$) et de deux 90° simultanés qui permettent de faire le transfert de polarisation entre le 1H et le ^{13}C (Figure 21a).

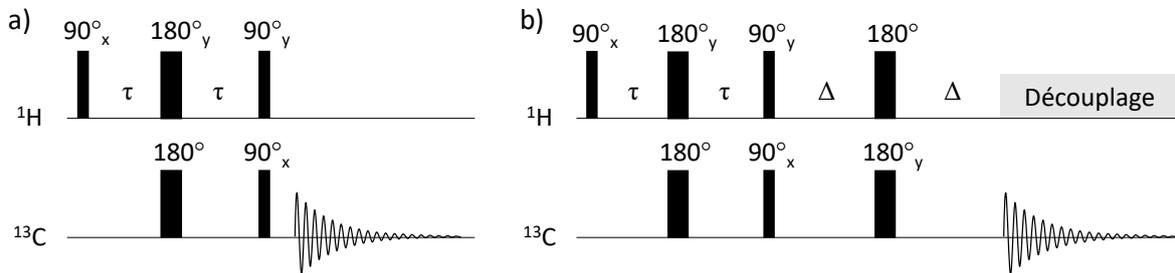


Figure 21 : Représentation schématique d'une séquence d'impulsion a) INEPT, composée d'un transfert de polarisation entre les protons et les carbones b) INEPT refocalisée et découplée. Pour un transfert optimal, le délai τ est égal à $1/4J$.

Le principe de l'INEPT peut être facilement expliqué par le modèle vectoriel pour un système IS (CH) mais il fonctionne également pour les systèmes IS_2 (CH_2) et IS_3 (CH_3). Considérons S_A et S_B les deux états possibles (α et β) du 1H couplé au ^{13}C . Le premier 90° bascule ces deux aimantations dans le plan transversal, les aimantations vont alors évoluer suivant leur déplacement chimique et le couplage $^1J_{CH}$. Après un temps τ , le 180° présent sur le canal 1H va permettre de refocaliser les déplacements chimiques ainsi que les inhomogénéités de champ. L'application d'un 180° simultanément sur le canal ^{13}C permet de garantir la continuité de l'évolution des couplages J_{CH} . Enfin, l'application des deux 90° simultanément après le deuxième temps d'écho τ permet de transférer les aimantations S_A et S_B vers I_A et I_B . Le spectre obtenu est composé de deux raies en antiphase correspondant à I_A et I_B séparées par la constante de couplage $^1J_{CH}$ (Figure 22).

L'ajout d'un découplage 1H va superposer les deux raies en anti-phase et provoquer des signaux faibles et, même parfois l'annulation. Burum et Ernest en 1980 ont ajouté un deuxième écho de spin qui permet de refocaliser les déplacements chimiques (Figure 21b), donnant lieu à l'INEPT refocalisée. ^[61] En effet, grâce à cette refocalisation, les raies ont alors la même phase et sont toujours séparées par la constante $^1J_{CH}$. Un découplage 1H peut alors être mis en place afin de superposer les raies à la fréquence du déplacement chimique (Figure 22).

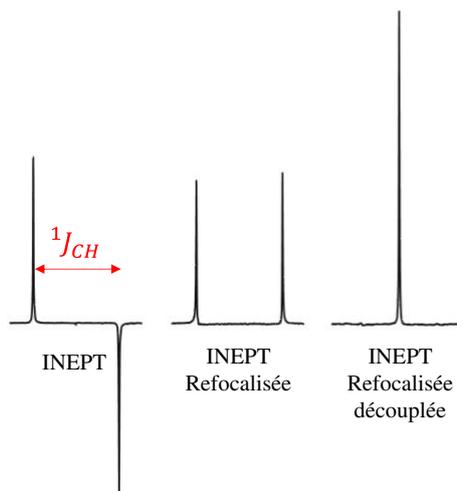


Figure 22 : Signal ^{13}C du groupement méthyle de l'acide méthanoïque obtenu à partir de l'INEPT, l'INEPT refocalisée et l'INEPT refocalisée avec découplage ^1H . ^[17]

Cette séquence permet de faire de l'édition de spectre afin d'obtenir des informations sur le nombre de protons liés à un carbone. Les intensités obtenues avec l'INEPT vérifient la relation suivante lorsque $\tau = 1/4J_{CH}$ (Eq. 1.36) :

$$I_n = k \cdot n \cdot \sin(2 \cdot \pi \cdot J_{CH} \cdot \Delta) \cdot [\cos(2 \cdot \pi \cdot J_{CH} \cdot \Delta)]^{(n-1)} \quad (1.36)$$

Ainsi, les systèmes IS, IS₂ et IS₃ n'ont pas la même évolution en fonction du délai Δ (Figure 23). En effet, pour un $\Delta = 1/8J_{CH}$, tous les carbones sont positifs, pour $\Delta = 1/4J_{CH}$ seulement les CH sont visibles sur le spectre et enfin pour $\Delta = 3/8J_{CH}$ les CH et CH₃ sont positifs et les CH₂ sont négatifs. Suivant les informations qu'on veut obtenir, il est facile de connaître l'environnement des carbones. La valeur de la constante de couplage à utiliser est obtenue en calculant la médiane de toutes les constantes de couplages $^1J_{CH}$ de la molécule. En absence de découplage, des distorsions de phase peuvent être observées en raison du compromis dans le choix du délai Δ .

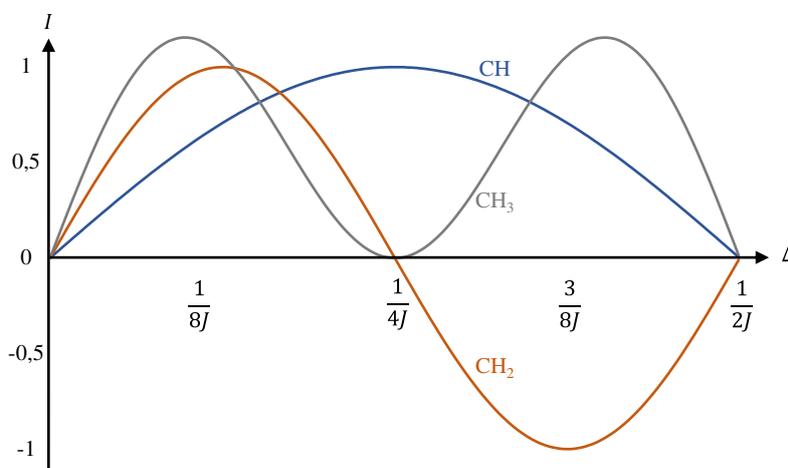


Figure 23 : Evolution des intensités observées après une séquence INEPT refocalisée pour les CH (■), CH₂ (■) ou CH₃ (■) en fonction du délai de refocalisation Δ .

2.5.2. DEPT

La séquence DEPT (*Distorsionless Enhancement Polarization Transfer*) est la plus répandue pour faire de l'édition de spectre. ^[62] Elle a été proposée en 1982 afin de résoudre les problèmes de phase rencontrés avec l'INEPT refocalisée non découplée. La séquence DEPT commence de la même manière que l'INEPT avec un 90° sur le canal ^1H basculant l'aimantation dans le plan transversal (Figure 24). Après un temps égal à $1/2J_{\text{CH}}$, un 180° est appliqué sur le canal ^{13}C conduisant à un nouvel état quantique appelé cohérence hétéronucléaire multiple quanta. Il n'est pas possible de décrire les évolutions des vecteurs d'aimantation de cet état, mais il peut être imaginé comme un regroupement des aimantations ^1H et ^{13}C . ^[17] Un $180^\circ(^1\text{H})$ est appliqué en même temps que le $90^\circ(^{13}\text{C})$ permettant d'éliminer les effets de déplacement chimique ^1H . Cependant, l'état multiple quanta n'est pas observable en RMN, il faut alors repasser par un état simple quantum à l'aide de l'impulsion d'angle β émis sur le canal ^1H . Un $180^\circ(^{13}\text{C})$ appliqué simultanément permet de refocaliser les déplacements chimiques ^{13}C .

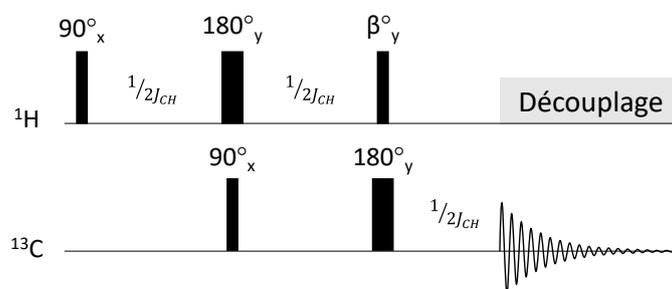


Figure 24 : Représentation schématique d'une séquence d'impulsion DEPT. L'effet de cette séquence est sensiblement le même que l'INEPT. L'angle β peut prendre différentes valeurs permettant de jouer sur l'intensité des groupements CH, CH₂ et CH₃.

Le signal observé pour les systèmes, IS, IS₂ et IS₃ dépend de la valeur de l'angle β appliqué et vérifie l'équation (Eq. 1.37) :

$$I_n = k \cdot n \cdot \sin(\beta) \cdot [\cos \beta]^{(n-1)} \quad (1.37)$$

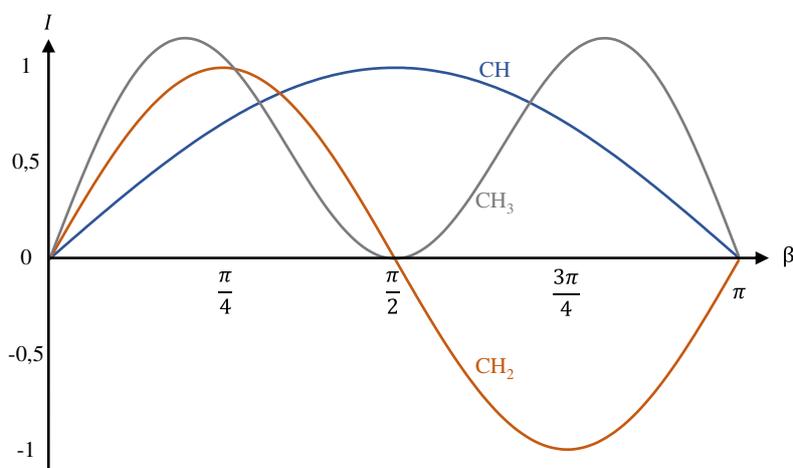


Figure 25 : Evolution des intensités observées après une séquence DEPT pour les CH (■), CH₂ (■) ou CH₃ (■) en fonction de l'angle β .

Le même raisonnement que l'INEPT peut être appliqué ici, pour $\beta = \pi/4$, tous les carbones ont un signal positif, pour $\beta = \pi/2$ seulement les signaux des CH sont visibles et pour $\beta = 3\pi/4$ les signaux des CH et CH₃ sont positifs et les CH₂ négatifs (Figure 25).

2.5.3. HSQC

La séquence HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*) est une séquence à 2 dimensions avec détection inverse (Figure 26). Elle a été proposée en 1980 pour visualiser les corrélations des protons liés au carbone $^1J_{CH}$.^[63]

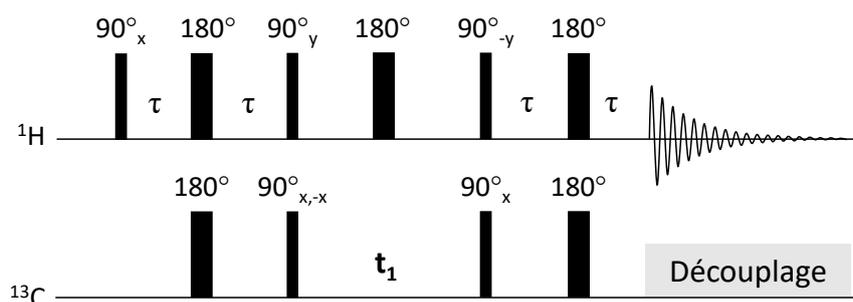


Figure 26 : Représentation schématique d'une séquence d'impulsions HSQC. Cette séquence est composée d'un segment INEPT et d'un segment rétro-INEPT permettant un double transfert de polarisation : 1H vers ^{13}C , puis ^{13}C vers 1H , canal sur lequel se fait l'acquisition du signal.

Cette séquence est composée d'un segment INEPT suivi d'un segment rétro-INEPT. Un premier transfert de polarisation est induit entre les 1H et les ^{13}C puis pendant le temps t_1 , les déplacements chimiques ^{13}C s'expriment. Un écho de spin, pendant cette période, permet de refocaliser les couplages J_{CH} . Ensuite, un bloc retro-INEPT permet de transférer de nouveau la polarisation entre les ^{13}C vers les 1H , pour acquérir le signal des 1H . Afin d'observer les carbones directement liés aux protons, le délai τ doit être ajusté à $1/4J_{CH}$. Le découplage ^{13}C permet de supprimer le couplage $^1J_{CH}$, et ainsi de sommer les deux pics satellites augmentant le S/B.

Le but de l'HSQC est d'observer les protons liés à un noyau avec un spin $1/2$ comme c'est le cas du carbone-13. Par conséquent, il est important de supprimer les protons liés au carbone-12. La méthode de suppression la plus simple consiste à utiliser un cycle de phase. D'autres méthodes plus robustes à l'aide de gradient peuvent être mises en place.^[64,65]

Les séquences à 2 dimensions demandent un temps d'analyse important. En effet, la deuxième dimension est créée en enregistrant plusieurs acquisitions avec une évolution du délai t_1 pour chacune d'entre elles. Le temps d'analyse (T_{exp}) est alors donné dans l'équation (Eq. 1.38) :

$$T_{exp} = TR \cdot NS \cdot N_1 \quad (1.38)$$

avec, TR le temps de répétition, NS le nombre de scans et N_1 le nombre de valeurs de t_1 .

Pour réduire le temps d'analyse, le repliement spectral peut être appliqué. Il peut être mis à profit pour augmenter la résolution d'un spectre 2D en diminuant la gamme spectrale. [66] Les signaux situés en dehors de la gamme spectrale sont alors repliés jusqu'à être contenus dans la gamme de déplacement chimique fixée (Figure 27).

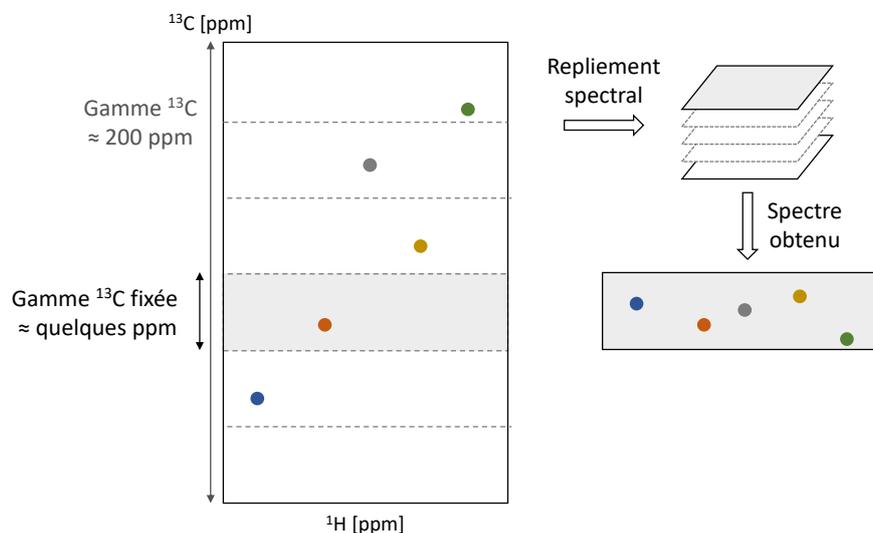


Figure 27 : Représentation schématique d'un spectre 2D hétéronucléaire ^1H - ^{13}C avec du repliement spectral.

Cette opération permet de diminuer le nombre d'incrément dans la dimension indirecte (F_1) afin de n'observer qu'une petite gamme spectrale. Les déplacements chimiques dans la dimension F_1 sont alors erronés. Plusieurs stratégies ont été développées pour reconstruire le spectre 2D à partir du repliement spectral. [67,68] La diminution de la gamme spectrale permet de diminuer le nombre de valeurs de t_1 nécessaire afin d'obtenir la même résolution que le spectre 2D initial.

2.6. Traitement du signal

Le traitement du FID est une étape importante en RMN quantitative. Plusieurs paramètres peuvent impacter le S/B, la résolution spectrale, la justesse et la précision des résultats.

2.6.1. Correction ligne de base

Une déformation de la ligne de base peut impacter la justesse des résultats due à une mauvaise intégration des signaux. [36] Ces distorsions peuvent être dues à un gain du récepteur trop élevé, ou encore une mauvaise linéarité de phase des filtres de réception. [69] La première source d'erreur peut être facilement corrigée en adaptant le gain du récepteur avant l'expérience. Les corrections de ligne de base peuvent être réalisées sur le FID. [70] Cependant, des algorithmes robustes [71-74] peuvent être appliqués automatiquement dans le domaine fréquentiel avec notamment un algorithme utilisant un polynôme de degrés d . [71,75] Les corrections sont également possibles manuellement par l'utilisateur mais cela peut provoquer une dépendance supplémentaire liée à l'opérateur.

2.6.2. Correction de la phase

Une raie RMN est composée d'une composante en absorption et d'une autre en dispersion correspondant, après transformée de Fourier (Eq. 1.39), à la partie réelle (Eq. 1.40) et imaginaire (Eq. 1.41), respectivement.

$$F_{(\Omega)} = R_{(\Omega)} + i.I_{(\Omega)} \quad (1.39)$$

$$R_{(\Omega)} = A_{(\Omega, \Omega_0, T_2^*)} \cdot \cos(\phi) - D_{(\Omega, \Omega_0, T_2^*)} \cdot \sin(\phi) \quad (1.40)$$

$$I_{(\Omega)} = A_{(\Omega, \Omega_0, T_2^*)} \cdot \sin(\phi) - D_{(\Omega, \Omega_0, T_2^*)} \cdot \cos(\phi) \quad (1.41)$$

La phase d'une raie conditionne sa forme, et donc sa surface. La correction de phase consiste à replacer la raie en absorption pure et donc à annuler la surface de la composante imaginaire dans le spectre. Cette correction doit être réalisée à l'ordre 0 et à l'ordre 1 (Figure 28). La correction de phase à l'ordre 0 correspond à un décalage entre la phase du récepteur et la phase du détecteur entraînant un même déphasage pour toutes les résonances. La correction à l'ordre 1 est dépendant de la fréquence de résonance, de tels déphasages peuvent être dus à des problèmes d'*off-resonance* ou à l'évolution des aimantations entre l'excitation et l'ouverture du récepteur. Ces corrections peuvent être réalisées par l'opérateur ou de façon automatique.

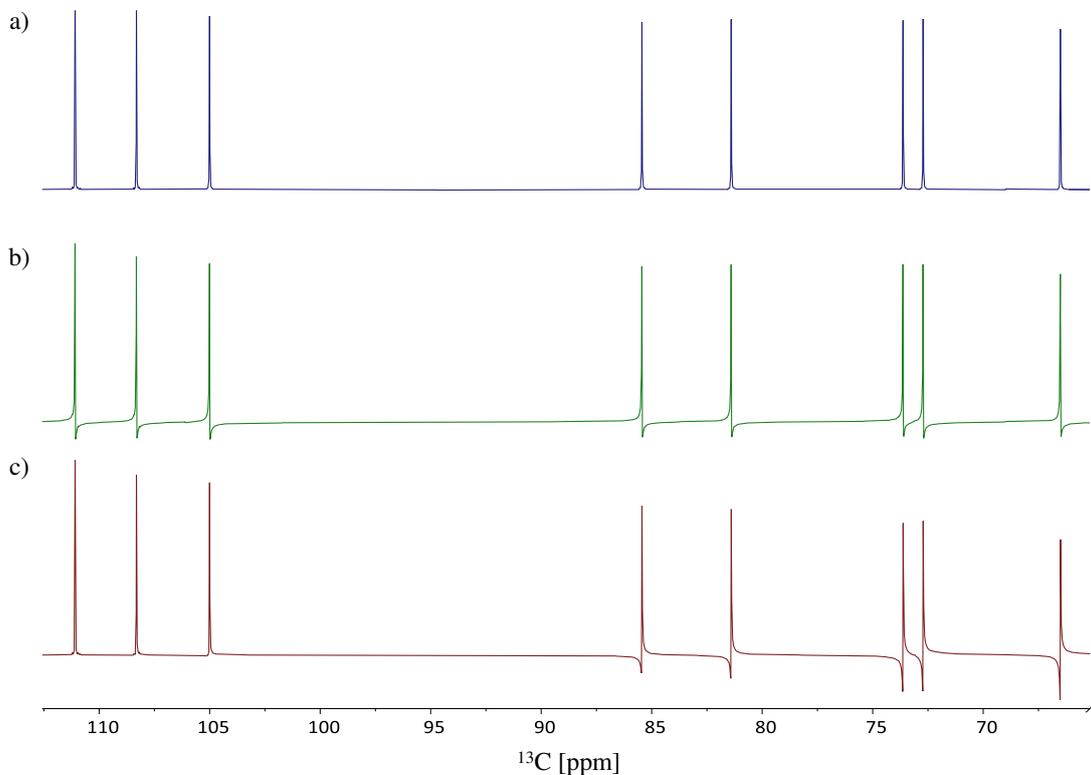


Figure 28 : Correction de phase sur un spectre RMN ^{13}C . a) Spectre RMN corrigé ; b) spectre en présence d'un déphasage d'ordre 0 ; c) spectre en présence d'un déphasage d'ordre 1.

2.6.3. Zero-filling

Le FID est acquis analogiquement et il doit être digitalisé afin de pouvoir être stocké et traité. La transformation de Fourier permet de convertir un FID (domaine temporel) en spectre (domaine fréquentiel). Cependant, l'algorithme utilisé (TF) impose un nombre de points correspondant à une puissance de 2 et identique pour le spectre et le FID. Le nombre de point du FID est défini grâce à 2 paramètres : (i) l'intervalle entre 2 points (*dwell time*), qui est inversement proportionnel à la largeur spectrale définie et (ii) la durée de l'acquisition. Cependant, augmenter la longueur de l'acquisition peut être limité avec la présence d'un découplage en créneau inverse. En effet, un découplage trop long peut provoquer une surchauffe de l'appareil et donc un endommagement de ce dernier. Le *zero-filling* ^[76] est une méthode permettant d'augmenter la résolution digitale en additionnant un nombre de points, dont la valeur est égale à 0, à la fin du FID (Figure 29). Ainsi, le nombre de points du FID n'est plus obligatoirement une puissance de 2, et cela permet de choisir plus librement le temps de l'acquisition.

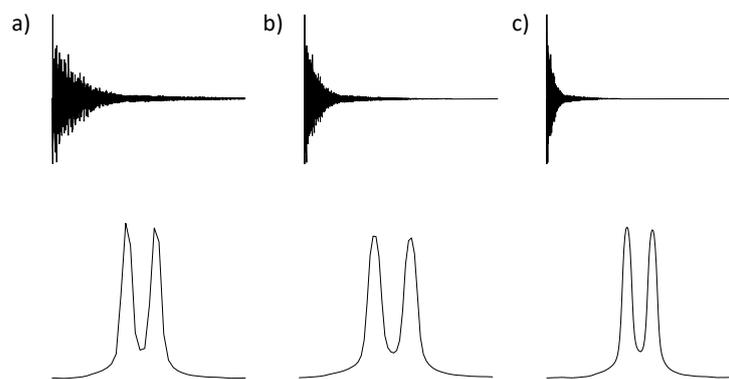


Figure 29 : Amélioration du spectre à l'aide du zero-filling. L'addition de point à la fin du FID permet d'améliorer la résolution digitale du spectre. Ici, l'exemple est donné avec un doublet provenant du spectre ^1H du di-acetone-D-glucose sur un FID de 49 019 points. Le spectre est présenté avec un nombre de points de : a) 16k ; b) 32k et c) 64k.

2.6.4. Apodisation

La longueur du FID est régie par la durée de l'acquisition. Si l'intégralité de l'aimantation n'est pas relaxée alors, le FID est tronqué provoquant des artéfacts qui impactent la forme des raies, la résolution et également le S/B. Pour éliminer la troncature, des fonctions mathématiques appelées fonctions d'apodisation, peuvent être appliquées sur le FID pour accélérer sa décroissance. Plusieurs fonctions sont possibles comme la fonction de Hanning, l'exponentielle décroissante, la fonction sinus, la transformation Lorentz-gauss (Figure 30).

Ces différentes fonctions ne présentent pas le même impact sur le spectre résultant. Les premiers points du FID donnent les informations sur la surface des signaux. Pour la RMN quantitative, il est important que la fonction soit égale à 1 au début du FID. La fonction

exponentielle décroissante (Eq. 1.42) est la plus utilisée en RMN quantitative, elle décroît de la même manière qu'un FID ce qui permet de préserver la forme lorentzienne de la raie.

$$e^{-\alpha t} \text{ avec : } \alpha = \pi.LB \quad (1.42)$$

Le paramètre LB traduit par *line broadening* est donné en Hz et correspond à l'élargissement des signaux. Cette fonction peut donc entraîner une diminution de la résolution.

Une façon d'augmenter la résolution est d'utiliser une fonction sinus (Figure 30d). L'application de cette fonction permet de diminuer les artéfacts mais une déformation du signal peut apparaître de part et d'autre des signaux d'intérêt. Ces pics peuvent être éliminés en optimisant la position du maximum de la fonction. Cependant, cette fonction diminue le S/B et impacte les premiers points du FID entraînant une distorsion des intensités. Cette fonction n'est pas utilisée en RMN quantitative.

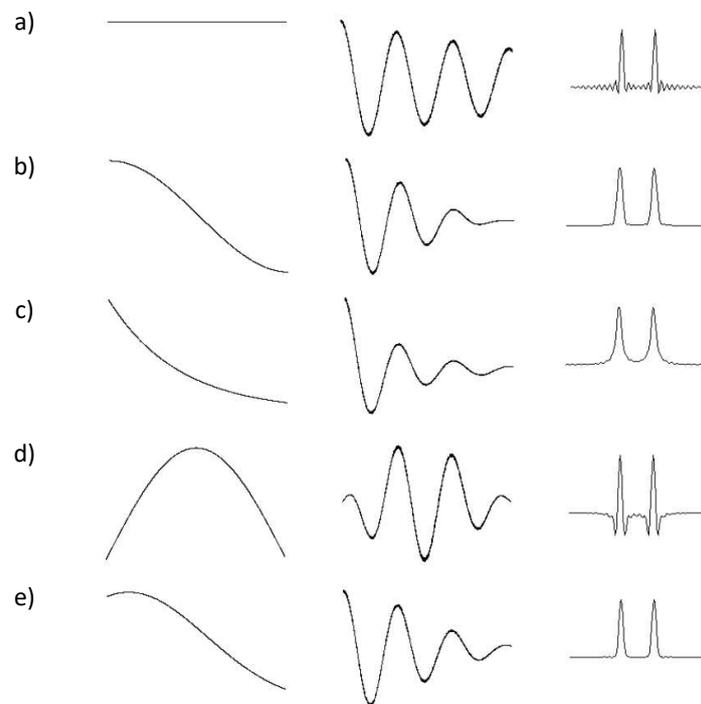


Figure 30 : Application de différentes fonctions d'apodisation sur un FID. Le spectre de droite correspond au spectre après transformation de Fourier du signal présent au centre obtenue lui-même par la multiplication du FID par la fonction d'apodisation présentée à gauche : a) aucune apodisation ; b) fonction de Hanning ; c) fonction exponentielle décroissante ; d) fonction sinus ; e) transformation Lorentz-Gauss. ^[16]

2.6.5. Echantillonnage non-uniforme

L'échantillonnage non-uniforme (NUS) a été développé pour réduire le temps d'analyse des spectres multi-dimensionnels. Cette stratégie consiste à acquérir de façon non-uniforme une partie des points dans les dimensions indirectes. Ainsi, les points non acquis sont calculés grâce à des algorithmes de reconstruction pour obtenir le spectre multi-dimensionnel (Figure 31c). Plusieurs approches ont été développées pour échantillonner les points et pour les reconstruire.

^[77] Un échantillonnage de 50 à 25% réduit le temps d'analyse de 2 à 4 fois. Le NUS permet

également d'augmenter la résolution sur deux expériences avec le même temps d'analyse, en effet, le gain de temps donne un spectre avec plus d'incrément. Le gain de résolution entraîne un compromis avec la sensibilité, les points acquis à la fin de l'expérience souffrent plus de la relaxation entraînant une perte de sensibilité. Cette limitation peut être contournée en plaçant les points acquis essentiellement au début et les points à reconstruire plutôt à la fin de l'expérience. Des artefacts peuvent être présents si le S/B ou le nombre de points échantillonnés n'est pas suffisant. ^[17]

L'utilisation des différents algorithmes est dépendant du logiciel de traitement mis en place par le constructeur. ^[17] Par exemple, les algorithmes de reconstruction couramment utilisés sont basés sur les techniques MDD (*Multi-dimensional decomposition*) ^[78], CS (*Compressed Sensing*) ^[79], ou encore la RMN de covariance ^[80]. Ils ont été développés sur différentes approches et ils impactent différemment le spectre obtenu.

2.6.6. Prédiction linéaire

La prédiction linéaire (LP) basée sur la technique des moindres carrés ^[81] peut être utilisée pour différents objectifs : de la rectification des données corrompus ou déformés à la génération complète de données dans le domaine fréquentiel. ^[82] L'utilisation courante de cette méthode est la prédiction des points à la fin d'un FID afin d'éviter une troncature (Figure 31d). En effet, au lieu d'ajouter des zéros comme le *zero-filling* (Cf. paragraphe 2.6.3 de ce chapitre), un algorithme prédit les points à l'aide des informations données par le point précédent et ainsi de suite. Ce processus donne lieu à l'extension du FID et permet d'augmenter la résolution, d'éviter l'utilisation d'une forte fonction d'apodisation et d'atténuer les erreurs de troncature.

L'application de la LP pour l'analyse 2D donne lieu à l'augmentation de la résolution et/ou la sensibilité en diminuant le temps d'analyse. ^[83] Tout comme le NUS, la LP nécessite un S/B important afin d'obtenir une bonne estimation ainsi qu'une reconstruction du spectre correct.

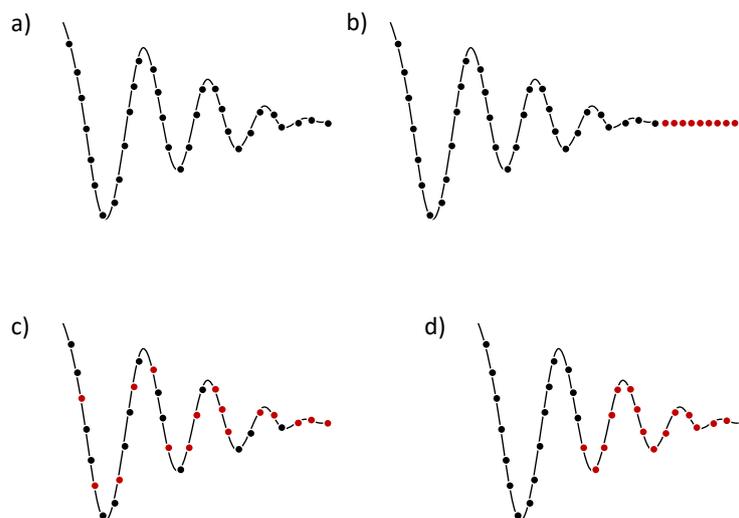


Figure 31 : Répartition des points acquis en noir et des points ajoutés en rouge pour : a) un FID standard ; b) zero-filling ; c) 50% de points calculés par NUS ; d) 50% de points prédits par LP.

2.6.7. Détermination de la surface S

La RMN quantitative est basée sur la détermination de la surface S du signal qui est proportionnelle au nombre de spins. La détermination de la surface S joue un rôle crucial dans l'exactitude des résultats.

2.6.7.1. Intégration

L'intégration est une méthode primaire qui consiste à faire la somme de l'intensité de chaque point contenu dans une zone d'intégration, préalablement délimitée par des bornes d'intégration. Cette méthode est la plus simple car elle est implémentée dans les logiciels couramment utilisés en RMN. Cependant, le résultat est impacté par les bornes d'intégration, le phasage ou encore la ligne de base, rendant cette méthode dépendante de l'opérateur. Face à des recouvrements de signaux, l'intégration ne permet pas de déterminer précisément la surface de plusieurs raies pouvant se superposer.

2.6.7.2. Ajustement à un modèle théorique

Une autre méthode plus précise consiste à faire un ajustement des données à l'aide d'un modèle théorique. Cet ajustement peut se faire dans le domaine fréquentiel (spectre) ou dans le domaine temporel (FID).

Dans le domaine fréquentiel, cette méthode consiste à utiliser plusieurs fonctions lorentziennes, gaussiennes ou un mélange des deux, pour correspondre au spectre expérimental. Pour faciliter la convergence de l'algorithme, il est nécessaire d'indiquer plusieurs paramètres d'entrée comme la hauteur, la largeur à mi-hauteur, ou bien la fréquence de résonance. Après convergence, l'algorithme intègre la fonction théorique donnant la surface S . Plusieurs logiciels peuvent être utilisés tel que PERCH (Perch NMR softwareTM, Perch solutions Ltd, Kuopio, Finland), Eurospec, ^[84] ou bien la librairie Rnmrfit utilisable sur logiciel R. ^[85] Grâce à cet ajustement, il est possible de séparer plusieurs signaux pouvant se recouvrir (Figure 32).

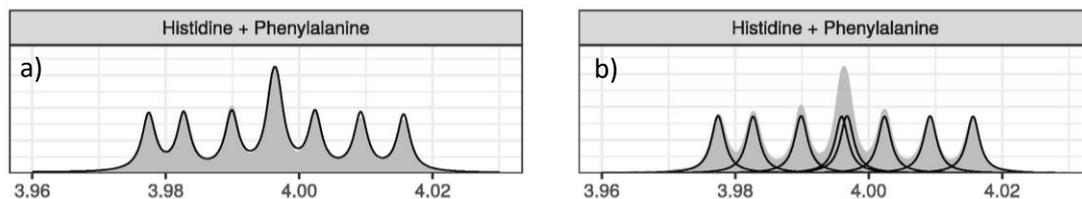


Figure 32 : Résultat de l'ajustement à l'aide de Rnmrfit, en gris est représenté le spectre expérimental et en noir le spectre théorique : a) fit total : correspondance entre le spectre théorique et expérimental ; b) représentation de la contribution de chaque raie permettant d'obtenir le fit total. ^[85]

L'ajustement dans le domaine temporel, consiste à sommer plusieurs courbes sinusoïdes exponentiellement décroissantes, permettant de correspondre au mieux au FID expérimental. Le nombre de paramètres est plus critique avec cette méthode car le FID expérimental est

composé de plusieurs FID correspondant au nombre de résonances. Cette méthode est plus robuste que l'ajustement fréquentiel cependant elle reste limitée au nombre de résonances.

3. La RMN quantitative pour l'analyse isotopique : la RMN isotopique ^{13}C

3.1. Définitions

3.1.1. Isotopologues et isotopomères

Les éléments chimiques peuvent comporter un ou plusieurs isotopes, constitués d'un même nombre d'électrons et de protons, mais d'un nombre différent de neutrons. Les molécules de différentes compositions isotopiques sont appelées isotopologues et peuvent réagir différemment dans des transformations physiques, enzymatiques, chimiques ou biologiques (Figure 33). Les isomères isotopiques, appelés isotopomères présentent un même nombre d'isotope mais sur une position différente.

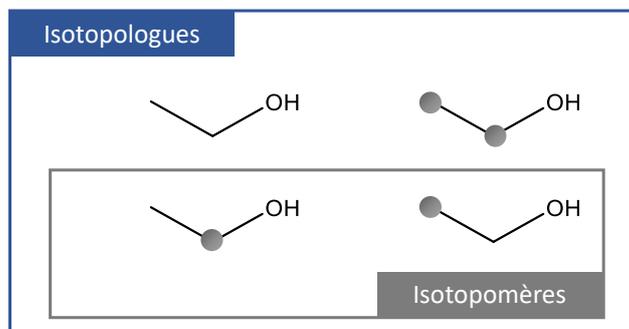


Figure 33 : Isotopomères et isotopologues de l'éthanol pour le carbone, le carbone-13 est représenté en gris.

3.1.2. Grandeurs isotopiques

Les notations présentées dans cette partie sont exprimées pour l'atome du carbone. Le rapport isotopique (R) représente le rapport entre l'isotope lourd (^{13}C) et l'isotope léger (^{12}C) (Eq. 1.43).

$$R(^{13}\text{C}) = \frac{N(^{13}\text{C})}{N(^{12}\text{C})} \quad (1.43)$$

L'abondance isotopique x est définie par la fraction molaire de l'isotope lourd (Eq. 1.44).

$$x(^{13}\text{C}) = \frac{N(^{13}\text{C})}{N(^{12}\text{C}) + N(^{13}\text{C})} \quad (1.44)$$

La variation entre les deux isotopes étant faible, la composition isotopique δ , exprimée en ‰ a été mise en place afin de donner la différence relative entre un échantillon et un standard (Eq. 1.45). Dans le cas du ^{13}C , la référence internationale est le Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB) avec un rapport isotopique : $R_{VPDB} = 0,0112372$.

$$\delta(^{13}\text{C}) = \frac{R(^{13}\text{C})_{\text{éch}} - R(^{13}\text{C})_{\text{VPDB}}}{R(^{13}\text{C})_{\text{VPDB}}} \cdot 1000 \quad (1.45)$$

Plus récemment, une nouvelle unité a été introduite pour exprimer la composition isotopique. En effet, l'équation (1.42) est sans dimension imposant le symbole d'unité « 1 » dans le Système International des unités (SI). De plus, le SI ne permet pas l'utilisation des préfixes officiels tel que le micro- ou le milli- pour les unités de dimension 1. ^[86] Il a été introduit l'unité « Urey » ^[87] en reconnaissance à Harold C. Urey, qui a implémenté pour la première fois une analyse en routine sur les isotopes stables afin d'étudier les changements de températures des océans dans l'histoire de la Terre. Ses recherches ont donné lieu à un prix Nobel pour sa découverte du deutérium. Grâce à cette nouvelle unité, il est possible d'utiliser les préfixes du SI et ainsi avoir le milliurey (mUr) qui correspond au ‰. Par facilité, le terme δ , composition isotopique, en ‰ sera utilisé dans la suite de la thèse. Il sera ainsi plus facile de relier les variabilités au ‰ des données brutes RMN à celles des compositions isotopiques calculées à partir de ces données.

3.1.3. Fractionnement et effet isotopique

Lors d'une réaction, un fractionnement isotopique (α) peut se produire entre un substrat et un produit (Eq. 1.46).

$$\alpha = \frac{R_{\text{substrat}}}{R_{\text{produit}}} \quad (1.46)$$

Si $\alpha < 1$, le produit est enrichi en isotope lourd, l'effet isotopique est dit normal. Et inversement, l'effet isotopique est dit inverse si $\alpha > 1$. Un taux d'enrichissement (ε) peut alors être défini suivant la relation suivante (Eq. 1.47) :

$$\varepsilon = (\alpha - 1) \times 1000 \quad (1.47)$$

Lors d'une réaction cinétique (irréversible), un apport énergétique est essentiel afin de rompre les liaisons chimiques. Dans une réaction avec une rupture de liaison C-C, l'énergie nécessaire sera plus grande dans le cas d'une liaison $^{13}\text{C}-^{12}\text{C}$ que $^{12}\text{C}-^{12}\text{C}$. La constante de vitesse de la rupture $^{12}\text{C}-^{12}\text{C}$ sera donc plus grande que pour la liaison $^{13}\text{C}-^{12}\text{C}$ provoquant un fractionnement isotopique cinétique. Si cette réaction est incomplète, un fractionnement isotopique peut être observé entre le substrat et le produit. Lors d'une réaction chimique réversible, présentant un équilibre thermodynamique entre le substrat et le produit, les constantes de vitesse entre deux isotopomères peuvent être différentes. Le rapport des deux constantes de vitesse donne l'effet isotopique d'équilibre qui correspond au fractionnement isotopique thermodynamique. Enfin, dans le cas d'une réaction totale avec un taux de conversion de 100% le fractionnement isotopique est inexistant. En effet, la totalité du substrat est transformée en produit.

Dans un même organisme, plusieurs fractionnements isotopiques ont lieu. L'exemple le plus commun est la fixation du CO_2 par les plantes grâce à la photosynthèse. En effet, le métabolisme des plantes peut être divisé en 3 catégories : C_3 , C_4 et CAM, leur donnant une composition isotopique différente suivant la région géographique ou l'espèce. [88] Les produits naturels sont répartis sur une gamme de composition isotopique ^{13}C de 50‰ (Figure 34). Cette échelle montre l'importance d'avoir une précision de l'ordre de 1‰ sur les résultats.

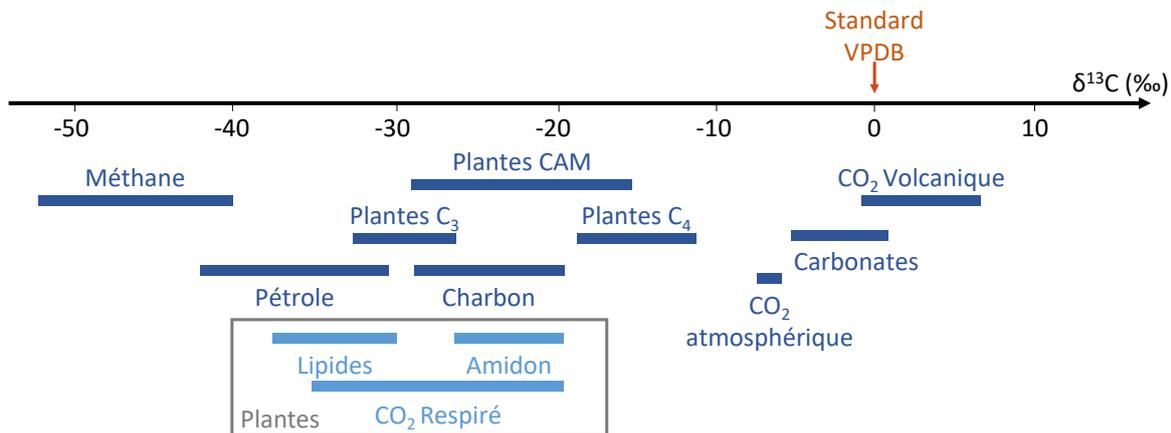


Figure 34 : Distribution de la composition isotopique globale $\delta^{13}\text{C}$ dans des produits naturels due au fractionnement isotopique.

3.2. Méthodes d'analyses isotopiques

Les méthodes d'analyses isotopiques ont évolué au cours du temps en partant de la Spectrométrie de Masse à Rapport Isotopique, que l'on peut désigner comme *Isotopic Ratio Monitoring Mass Spectrometry* ou *irm-MS* (souvent nommée IRMS, ou SMRI en français), à la RMN (*irm-NMR*). Grâce à ces techniques, il est possible de déterminer le rapport isotopique global d'un échantillon, d'une molécule, d'une molécule au sein d'un mélange ou la distribution isotopique dans une molécule.

3.2.1. Détermination de la composition isotopique globale

La composition isotopique globale, appelée également moyenne, totale ou *bulk* (cette dernière expression étant source de confusion car elle est appropriée pour désigner la matrice entière) est mesurée en routine sur la matière organique, grâce à l'*irm-MS* couplée à un analyseur élémentaire. [89] Les échantillons sont sertis dans des capsules en étain avant d'être déposés dans un four à combustion, permettant d'oxyder les molécules de type $\text{C}_x\text{H}_y\text{O}_z\text{N}_n$ en gaz simples : N_xO_y , H_2O et en CO_2 . Puis, les gaz passent dans un four de réduction permettant de réduire les gaz N_xO_y en N_2 , ce qui permet alors l'analyse ^{13}C et ^{15}N , suite à la séparation des gaz CO_2 et N_2 , l'eau étant éliminée par un piège à eau comme le perchlorate de magnésium. Après être ionisés, les ions sont analysés à l'aide d'un champ magnétique. Les ions sont séparés suivant leur masse sur charge (m/z) et comptés avec un détecteur de faraday. Pour l'analyse du ^{13}C , 4 isotopologues sont possibles : $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ $m/z=44$; $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O} + ^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ $m/z = 45$; $^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$

+ $^{13}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ + $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{17}\text{O}$ $m/z=46$. Après correction de la quantité de ^{17}O , le rapport des intensités correspondant aux masses 45 et 44 donne le rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$.

L'*irm-MS* a été utilisée dans de nombreuses études [89] comme en forensic, [90-92] contre la fraude de produit alimentaire, [93-95] l'environnement [96-98] et la détermination de l'origine géographique de différents médicaments. [3,99]

3.2.2. Analyse Isotopique d'un Composé Spécifique

L'Analyse Isotopique d'un Composé Spécifique, de l'anglais *Compound-Specific Isotope Analysis* (CSIA) permet de déterminer la composition isotopique globale d'un composé contenu dans un mélange ou de plusieurs molécules constituant la matrice. Dans ce cadre, une technique chromatographique (gazeuse ou liquide) est couplée à l'*irm-MS* afin de séparer plusieurs composés.

3.2.2.1. GC-*irm-MS*

La chromatographie gazeuse (GC) couplée à l'*irm-MS* permet de séparer et de déterminer la composition isotopique de plusieurs composés contenus dans un mélange. Les molécules doivent être volatiles afin d'être vaporisées et séparées en fonction de leur température d'ébullition et de leur interaction avec la phase stationnaire. Une dérivation chimique, peut être mise en place avant l'analyse afin de modifier chimiquement les molécules pour les rendre volatiles. Son intérêt a été démontrée pour de nombreuses applications dont les acides aminés, [100-102] cependant, il est important de vérifier qu'aucun fractionnement isotopique n'ait lieu. [103] Les $\delta^2\text{H}$, $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ de chaque molécule peuvent être déterminées ensuite par *irm-MS*, en fonction de la configuration du spectromètre.

3.2.2.2. LC-*irm-MS*

Afin d'analyser des composés non-volatils, la *LC-irm-MS* a été développée pour séparer les molécules avec la chromatographie liquide (LC). La colonne HPLC est couplée à une interface d'oxydation chimique, composée d'un agent oxydant et d'un catalyseur, qui permet de transformer les molécules en CO_2 . Le gaz formé est ensuite analysé par *irm-MS*. La séparation des composés est gouvernée par leurs interactions relatives avec les phases mobile et stationnaire. Cependant, l'utilisation de la LC engendre plusieurs contraintes : (i) la composition de la phase mobile doit être uniquement aqueuse limitant le choix de la phase mobile (pas d'apport de carbone), (ii) le débit maximal doit être inférieur à 0,7 mL/min, (iii) la mesure peut être faite uniquement en ^{13}C . [104] Le temps d'analyse peut être plus long qu'une analyse HPLC classique mais il est possible de le réduire en optimisant le diamètre de la colonne au débit utilisé. [105] Cette technique est utilisée dans de nombreux domaines tels que l'archéologie, [106,107] l'environnement [108,109] ou bien la santé humaine. [110] La *LC-irm-MS* est

une alternative à l'analyse *GC-irm-MS* pour éviter la dérivation des molécules, comme c'est le cas pour l'analyse d'acide aminé. ^[111]

3.2.3. Analyse Isotopique Position-Spécifique (PSIA)

L'Analyse Isotopique Position-Spécifique, de l'anglais *Position-Specific Isotope Analysis* (PSIA) donne la distribution isotopique au sein d'une molécule (Figure 35). Plusieurs approches peuvent être utilisées. Dans ce paragraphe, seule une partie sera développée.

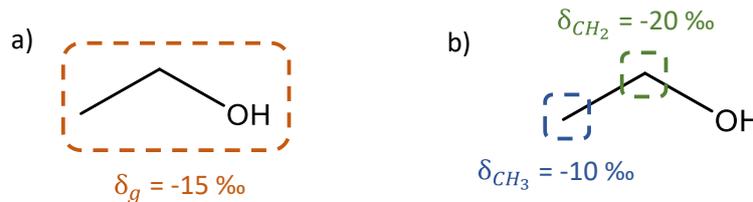


Figure 35 : Différence sur l'éthanol entre une composition isotopique : a) globale : composition isotopique moyenne entre les deux carbones ; b) position-spécifique : composition isotopique pour chaque carbone.

3.2.3.1. Fragmentation de la molécule

Voie chimique

La plus ancienne approche de la mesure PSIA est l'utilisation d'une dégradation chimique ou enzymatique afin de fragmenter la molécule. Chaque fragment est ensuite analysé par *irm-MS* pour déterminer le rapport isotopique de chaque site de la molécule.

Par pyrolyse

Moins fastidieux, la *Py-GC/irm-MS* est une technique en ligne permettant de déterminer la distribution isotopique à l'aide de la pyrolyse. ^[112,113] Un four à pyrolyse fragmente la molécule à étudier en morceaux qui sont ensuite séparés par GC puis analysés par *irm-MS*. Cette technique peut être couplée en amont à une GC afin de séparer les molécules d'un mélange. Un couplage avec un détecteur à trappe d'ions permet d'identifier les fragments. Cette méthode n'est aujourd'hui applicable que sur des petites molécules telles que l'acide acétique ^[114] et l'éthanol, ^[2] au-delà de 4 carbones une étude très minutieuse des types de fragment et de réarrangement doit être effectuée limitant l'aspect universel de l'approche.

Par Orbitrap

Plus récemment, l'analyse des molécules par *irm-MS* par Orbitrap a permis d'augmenter la sensibilité de l'analyse. ^[15] Les molécules sont ionisées par impact électronique ou électrospray. Puis, un quadripôle permet de transmettre un ion parent dont sa masse-sur-charge (m/z) a été préalablement sélectionnée, ensuite, un piège linéaire incurvé ou C-trap, permet de concentrer l'ion au centre du piège afin qu'il soit de nouveau fragmenté avec une cellule de collision. Tous les fragments sont ensuite envoyés dans l'analyseur de masse Orbitrap. Cette méthode permet d'analyser de petite quantité de produit (de l'ordre du μg), cependant, elle présente plusieurs

limites. Les résultats obtenus présentent un biais car plusieurs fragmentations peuvent avoir lieu en même temps. Afin de corriger les résultats, des produits de référence doivent être encore développés. Les mesures obtenues sont aujourd'hui seulement relatives.

3.2.3.2. RMN

Irm-²H NMR

Développée à la fin des années 70 à l'Université de Nantes, l'*irm-²H NMR* également connue sous le nom de SNIF-NMR™ (*Site-Specific Natural Isotope Fractionation by Nuclear Magnetic Resonance*) est la première technique développée pour faire de la PSIA par RMN. [115] La gamme de variation de la composition isotopique du ²H est de 500‰ permettant de travailler avec une précision de l'ordre du pourcent. Le ²H est un noyau quadripolaire avec un spin nucléaire égal à 1, ce qui conduit à l'apparition d'un moment électrique quadripolaire dû à une répartition non sphérique des charges au sein du noyau. Ce moment quadripolaire en interaction avec le champ électrique produit par le nuage électronique lui confère un mécanisme de relaxation très efficace, donnant lieu à des faibles T_1 , généralement entre 1 ms à 1 s, et l'absence de nOe. [16]

L'*irm-²H NMR* a été mise en œuvre dans de nombreux domaines. [116] La première application a été la détection de fraude sur la chaptalisation du vin en dosant et identifiant le sucre ajouté pour augmenter le degré d'alcool du vin. Elle est devenue une méthode officielle européenne. [4] Cette analyse est aujourd'hui réalisée en routine dans les laboratoires de contrôle européens, comme Eurofins Nantes. D'autres exemples d'études portent sur la contrefaçon de médicaments [1] et l'authentification de produits alimentaires tels que la vanilline, [117,118] le vin, [119] et le vinaigre. [120] Des travaux ont également été menés sur le fractionnement isotopique au sein des cernes des arbres afin de combiner les données climatiques (température et humidité) et signaux physiologiques [121,122] montrant l'adaptation des arbres aux changements climatiques antérieurs. Plusieurs études ont porté sur la mesure PSIA ²H sur la RMN anisotrope chirale permettant ainsi discriminer les sites chiraux en solution. [123,124]

Cependant, l'*irm-²H NMR* présente des contraintes : (i) sa faible sensibilité due à la faible abondance du noyau ²H (0,015% en moyenne) et un rapport gyromagnétique 6,5 fois plus petit que le ¹H qui donne lieu à des longues expériences ; (ii) sa petite gamme de déplacements chimiques (20 ppm), qui peut entraîner des recouvrements ; (iii) des faibles valeurs de T_2 qui peuvent induire des raies larges ; (iv) la possibilité d'échanges chimiques avec d'autres espèces contenues dans le tube.

Irm-¹³C NMR

L'analyse *irm-¹³C NMR* a été finalisée après l'*irm-²H NMR*. Le ¹³C est un noyau plus sensible que le ²H, avec un rapport gyromagnétique plus élevé et une abondance 70 fois plus grande. La

plage de déplacement chimique est plus élevée (200 ppm) permettant d'éviter généralement les recouvrements des signaux. De plus, ce noyau ne présente aucun échange chimique.

La séquence utilisée au début des travaux est la séquence appelée *Inverse Gated*, (comme déjà décrit, composée d'un 90° ^{13}C et d'un découplage ^1H pendant l'acquisition ; Figure 10). Cette séquence est souvent appelée « single-pulse » dans la littérature traitant de la RMN isotopique, étant la méthode de base (ou de référence) pour faire du PSIA.

L'*irm- ^{13}C NMR* est connue pour l'authentification de produits tels que la caféine, ^[5] le cholestérol ^[6] ou la vanilline. ^[125] L'information sur l'origine du produit, synthétique ou naturelle, permet de lutter contre la fraude. L'*irm- ^{13}C NMR* a également prouvé son utilité dans de nombreux domaines tels que la détection de contrefaçons, ^[8,9] les sciences forensiques comme la détection d'une pollution, ^[10] la caractérisation d'explosifs, ^[11] ou encore l'analyse de drogues. ^[12]

Cependant, l'*irm- ^{13}C NMR* présente plusieurs limites : (i) la présence de nOe et un S/B de 500 imposent de longues expériences et (ii) la plage des compositions isotopiques ^{13}C est petite (50‰) nécessitant une précision de l'ordre de 1‰.

Irm- ^1H NMR

Très récemment, une nouvelle approche a été développée pour déterminer les $\delta^{13}\text{C}$ par PSIA à l'aide de l'*irm- ^1H NMR*. En effet, sur un spectre proton, les signaux principaux représentent des protons qui sont liés à des carbones-12. Les pics satellites de part et d'autre des pics principaux représentent les protons liés à des carbones-13 (Figure 36a). Hoffman et Rasmusen ont développé un script permettant de déconvoluer le pic principal de chaque site à l'aide des pics satellites. ^[126] En effet, la multiplicité du pic principal est la même que celle des pics satellites. Le script additionne les deux pics satellites et multiplie la somme par un facteur multiplicatif afin que les pics satellites se superposent au pic principal (Figure 36b). Le facteur multiplicatif entre la somme des pics satellites et le pic principal donne le rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Afin d'obtenir les $\delta^{13}\text{C}$, il est nécessaire de réaliser une droite d'étalonnage avec des molécules ne contenant qu'un seul carbone et qui ont été analysés par *irm-MS*.

Ce script a permis de déterminer le rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de différents acides aminés provenant de différentes origines. ^[127] Cependant, cette méthode présente quelques limites, il faut : (i) un S/B suffisant pour bien déconvoluer les pics satellites, (ii) éliminer le radiation damping (*Cf.* paragraphe 3.3.2), (iii) et des signaux bien résolus (pas de recouvrement). Par conséquent les molécules avec un poids moléculaire important ne peuvent pas être analysées (ex. Cholestérol).

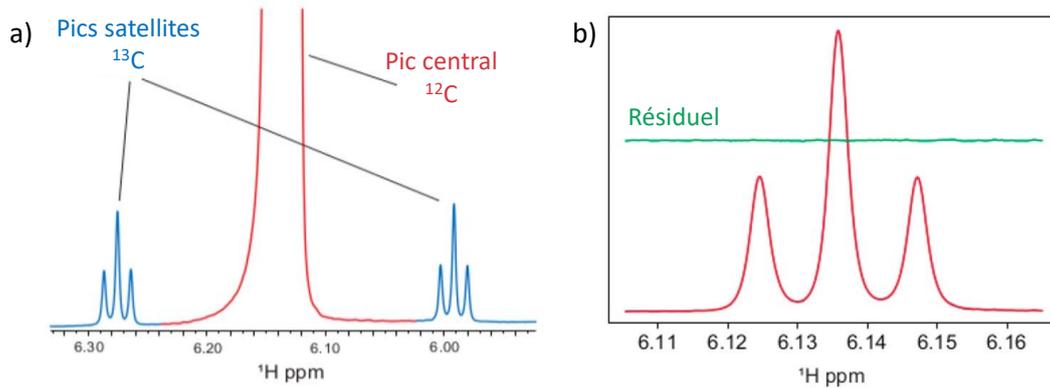


Figure 36 : a) Section du spectre RMN ^1H de la thymidine. Le pic triplet central (hors échelle) provient de ^1H avec une liaison avec un ^{12}C , et les deux pics triplets satellites proviennent de ^1H avec une liaison avec un ^{13}C ; b) Superposition entre le pic principal et la somme des pics satellites. Le meilleur ajustement a été obtenu en utilisant un rapport $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ de 91,26. Le résidu (vert) est décalé de la ligne de base pour plus de clarté. ^[126]

3.2.4. Comparaison des différentes méthodes

Les différentes techniques analytiques pour l'analyse isotopique ont été développées au cours du temps avec une évolution croissante de la finesse des résultats (Figure 37). L'analyse isotopique a débuté avec la méthode *irm-MS* donnant accès seulement à la composition isotopique globale d'un échantillon. Le couplage avec la chromatographie a permis l'analyse de mélanges avec la CSIA. Enfin, pour obtenir plus de variables entre les échantillons, la PSIA a été développée à l'aide de la RMN.

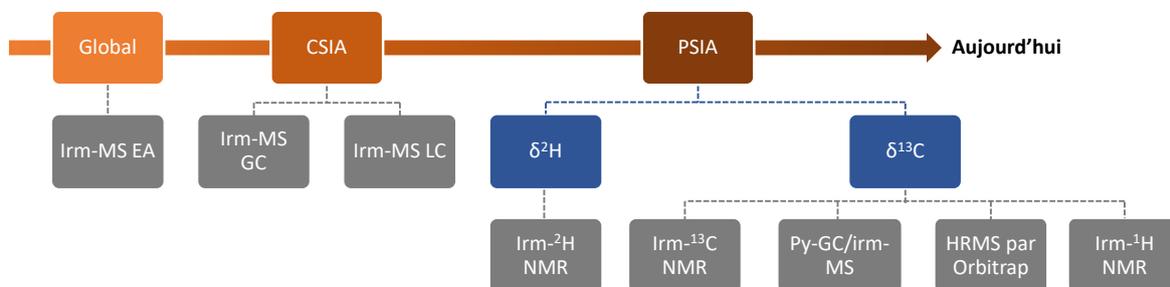


Figure 37 : Evolution dans le temps des différentes techniques d'analyse en fonction du type de résultats : composition isotopique globale, composé-spécifique ou position-spécifique.

Ces différentes méthodes sont complémentaires ; présentant des avantages et des inconvénients pour chacune d'entre elles (Tableau 3). Ces différentes analyses se distinguent principalement par leurs limites de quantification, et par conséquent la masse minimale de produit à analyser. Cette contrainte limite certaines applications notamment par *irm-NMR*.

Cependant, ces méthodes peuvent être combinées. Par exemple, l'utilisation conjointe de l'*irm- ^2H NMR* et de l'*irm- ^{13}C NMR* a montré son importance pour séparer par Analyse par Composante Principale (ACP) 8 sources différentes de vanilline (Figure 38). ^[7]

Tableau 3 : Comparaison des différentes méthodes analytiques, présentation des avantages et des limites de chacune.

Méthodes analytiques	Avantages	Limites
<i>Irm-MS</i>	<ul style="list-style-type: none"> ● Quantité de produit : 1 mg ● Excellente précision ● Plusieurs isotopes 	<ul style="list-style-type: none"> ● Seulement la valeur globale ● Nécessite des standards pour exprimer la justesse
<i>GC-irm-MS</i>	<ul style="list-style-type: none"> ● Composé spécifique 	<ul style="list-style-type: none"> ● Dérivation pour les composés non-volatiles : possible fractionnement isotopique ● Nécessite des standards pour exprimer la justesse
<i>LC-irm-MS</i>	<ul style="list-style-type: none"> ● Composé spécifique ● Composés non-volatiles, solubles dans une phase aqueuse 	<ul style="list-style-type: none"> ● Composition de la phase mobile ● Analyse $\delta^{13}\text{C}$ uniquement ● Nécessite des standards pour exprimer la justesse
<i>Irm-²H NMR</i>	<ul style="list-style-type: none"> ● Position spécifique ● Précision et justesse 	<ul style="list-style-type: none"> ● Échange chimique ● Sensibilité ● Plage de déplacement chimique ● Molécule avec un faible poids moléculaire
<i>Py-GC/irm-MS</i>	<ul style="list-style-type: none"> ● Position spécifique ● Justesse et précision ● Sensibilité 	<ul style="list-style-type: none"> ● Analyse $\delta^{13}\text{C}$ uniquement ● Petite molécule : 4 carbones maximum
<i>HRMS par Orbitrap</i>	<ul style="list-style-type: none"> ● Position spécifique ● Précision ● Sensibilité 	<ul style="list-style-type: none"> ● Nécessite des standards pour exprimer la justesse
<i>Irm-¹³C NMR</i>	<ul style="list-style-type: none"> ● Précision : 1‰ ● Pas d'échange chimique ● Gamme de déplacements chimiques 	<ul style="list-style-type: none"> ● Quantité de produit : 200 mg ● nOe ● Plage des variations isotopiques : $\delta^{13}\text{C}$

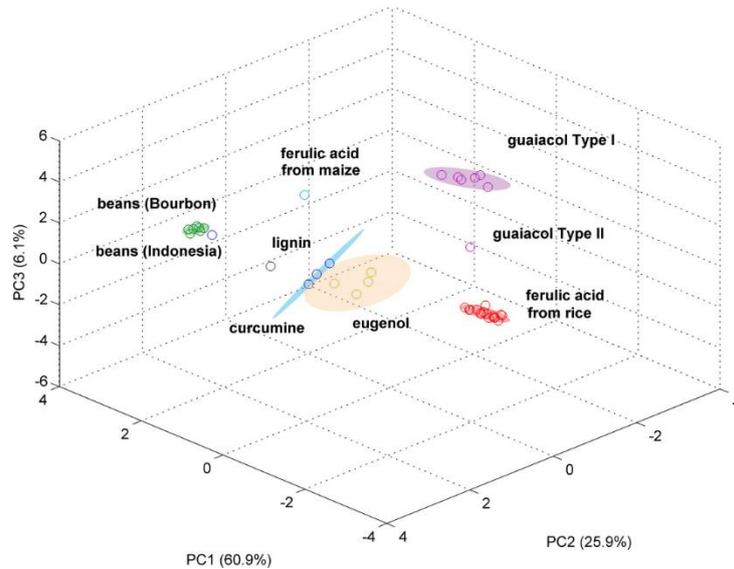


Figure 38 : Tracé tridimensionnel des scores obtenus par ACP sur les données combinées des compositions isotopiques ^2H et ^{13}C de la vanilline. La Composante Principale 1 (PC1) explique 60,9%, la Composante Principale 2 (PC2) 25,9%, et la Composante Principale 3 (PC3) 6,1% de la variabilité totale des principales sources actuelles de vanilline. ^[7]

3.3. Détermination de la composition isotopique position-spécifique par $irm\text{-}^{13}\text{C}$ NMR

Deux approches existent pour obtenir une mesure PSIA par $irm\text{-}^{13}\text{C}$ NMR. Une première approche consiste à utiliser l' $irm\text{-MS}$ donnant la composition isotopique globale. Une seconde approche est l'utilisation d'une référence interne comme c'est le cas en $irm\text{-}^2\text{H}$ NMR.

3.3.1. A partir de l' $irm\text{-MS}$

Le signal obtenu par $irm\text{-}^{13}\text{C}$ NMR doit être dans un premier temps corrigé. En effet, un spectre observé en RMN correspond à la contribution de plusieurs isotopologues. Pour chaque carbone d'une molécule, un isotopomère majoritaire est observé en RMN. Dans le cas d'une molécule à 3 carbones, les raies majoritairement observées correspondent aux 3 isotopomères (Figure 39a-b-c). Cependant, une molécule constituée de deux atomes ^{13}C qui ne présentent pas de couplage ou un couplage faible (compris dans la largeur de raie) (Figure 39f), va également contribuer à ce signal proportionnellement à son abondance. Les autres isotopologues dont le ^{13}C est couplé avec un autre ^{13}C vont apparaître sur le spectre sous forme d'un doublet séparé par la constante de couplage $^1J_{CC}$, ces signaux sont aussi connus sous le nom de pics satellites (Figure 39d-g).

L'intensité des pics satellites est trop faible pour obtenir la précision de 1%. Afin de les prendre en compte, une correction sur les surfaces (S) avec le nombre de carbones (u) directement reliés au carbone du site i est réalisée pour obtenir une surface corrigée (S_i) (Eq. 1.48). La distribution stochastique au sein d'une molécule est donc proportionnelle à l'abondance isotopique du ^{13}C qui est de 1,1%.

$$S_i = S(1 + u \times 0,011) \quad (1.48)$$

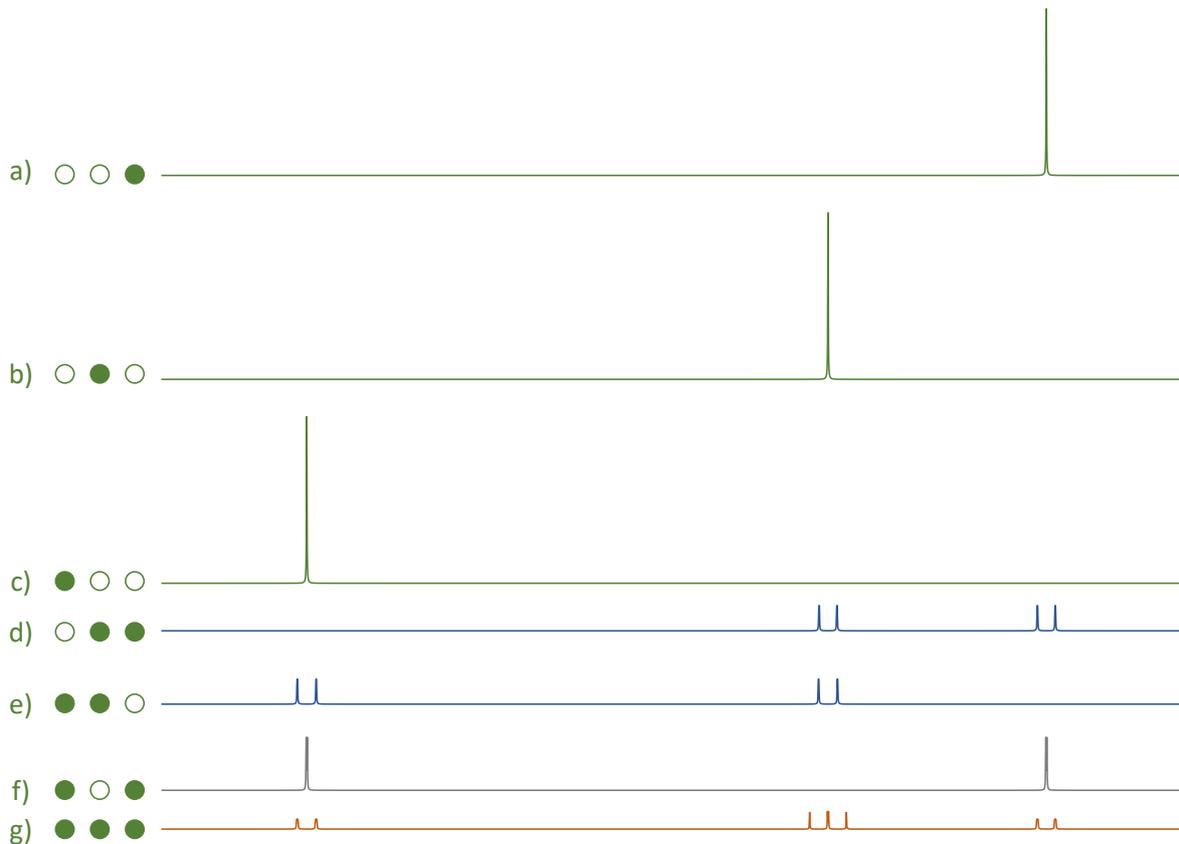


Figure 39 : Signaux RMN ^{13}C découplés des protons d'une molécule à 3 carbones. Les cercles remplis indiquent les positions occupées par un ^{13}C et les cercles ouverts les positions occupées par un ^{12}C . Le spectre observé consiste en l'addition de toutes ces contributions. Les intensités des pics des spectres d, e, f, g ont été amplifiées par rapport aux spectres a, b, c pour une meilleure lisibilité. ^[128]

L'abondance isotopique (x_i) de chaque site (ou position) i est calculée en utilisant l'équation (Eq. 1.49) suivante :

$$x_i = x_g \cdot \frac{f_i}{F_i} \quad (1.49)$$

où f_i représente la fraction molaire (Eq. 1.50), x_g l'abondance isotopique totale du produit et F_i la valeur statistique de la fraction molaire (Eq. 1.51).

$$f_i = \frac{S_i}{\sum_n S_i} \quad (1.50)$$

$$F_i = \frac{p_i}{\sum p_i} \quad (1.51)$$

avec p_i représentant le nombre de carbone équivalent du site i . Cette méthode nécessite l'analyse du produit par *irm-MS* pour connaître la valeur de x_g et l'intégration des signaux doit se faire avec le moins de recouvrement.

3.3.2. Utilisation d'une référence interne

Une référence interne peut également être utilisée pour déterminer l'abondance isotopique d'un site x_i (Eq. 1.52).

$$x_i = \frac{p^{ref}}{p_i} \cdot \frac{m^{ref} \times P_m^{ref}}{m \times P_m} \cdot \frac{M}{M^{ref}} \cdot \frac{S_i}{S^{ref}} \cdot x^{ref} \quad (1.52)$$

avec p^{ref} et p_i le nombre de carbones équivalents pour la référence et le site i , respectivement, m^{ref} / m la masse de produit et P_m^{ref} / P_m la pureté et M^{ref} / M la masse molaire pour la référence et le produit à analyser respectivement, S^{ref} et S_i les surfaces de la référence et du site i respectivement, et x^{ref} l'abondance isotopique globale de la référence.

Les références utilisées en $irm\text{-}^2H$ NMR et $irm\text{-}^{13}C$ NMR sont la tétraméthylurée (TMU) et la diméthylsulfone (DMSO₂), respectivement. La précision visée en $irm\text{-}^{13}C$ impose de connaître la pureté, la masse molaire et la masse du produit avec une précision de l'ordre du pour-mille. Afin de pallier cette contrainte, l'utilisation du spectre 1H permet de connaître le rapport des concentrations entre le produit et la référence avec 1‰ de précision. Cette stratégie a été initialement proposée afin d'analyser plus facilement l' $irm\text{-}^2H$ NMR. [129] L'abondance isotopique peut être calculée à partir de l'équation (Eq. 1.53) :

$$x_i = \frac{p^{ref}}{p_i} \cdot \frac{S_H^{ref} \times n_{H_i}}{S_{H_i} \times n_H^{ref}} \cdot \frac{S_i}{S^{ref}} \cdot x^{ref} \quad (1.53)$$

Cependant, cette méthode impose d'enregistrer le spectre 1H et ^{13}C avec le même préparation d'échantillon. En raison de la faible sensibilité du ^{13}C , il est nécessaire de mettre une quantité importante de produit, mais par conséquent, le 1H étant plus sensible, la concentration élevée peut provoquer sur le spectre 1H des distorsions par le radiation damping. [130] Ce phénomène est présent dans toutes les expériences RMN. Habituellement, lorsqu'une impulsion radiofréquence bascule l'aimantation dans le plan transversal, l'énergie absorbée par les spins est moins importante que l'énergie émise par le champ \vec{B}_1 . Lorsque la densité de spins est très forte, comme c'est le cas d'un échantillon très concentré, l'énergie produite par les spins est trop importante et induit un champ magnétique qui n'est plus négligeable devant \vec{B}_1 . Ce phénomène est observé sur le spectre avec une distorsion des signaux et de la ligne de base provoquant une quantification difficile. Plusieurs stratégies pour réduire ce phénomène seront expliquées dans la partie 3.4.4 de ce chapitre.

3.4. Développement des séquences utilisées

3.4.1. L'importance du découplage adiabatique

Le découplage adiabatique a été développé afin d'atteindre une précision de 1‰ (voir la section 2.3.4 de ce chapitre). Un découplage inhomogène provoque un couplage résiduel J_{res} impactant la justesse des résultats (Figure 40).^[47]

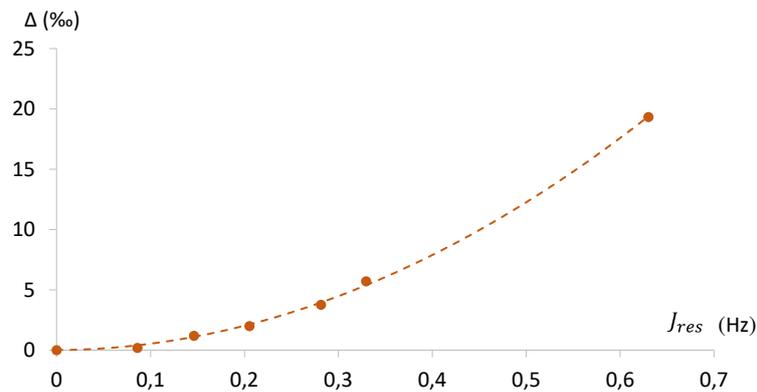


Figure 40 : Impact des couplages résiduels (J_{res}), provoqué par un découplage 1H inhomogène, sur la justesse des mesures isotopiques ^{13}C . Δ représente les intensités relatives de l'éthanol bi-marqué.^[38]

Pour mesurer l'impact du découplage sur l'exactitude des résultats, des molécules bi-marquées telles que l'éthanol et l'acide acétique sont analysées avec la séquence *Inverse Gated*.^[47,131,132] Les molécules bi-marquées à 99% sont composées de 4 isotopologues : $^{12}C_1-^{12}C_2$, $^{13}C_1-^{12}C_2$, $^{12}C_1-^{13}C_2$ qui sont présents en faibles proportions et le $^{13}C_1-^{13}C_2$ qui est majoritaire (Figure 41).

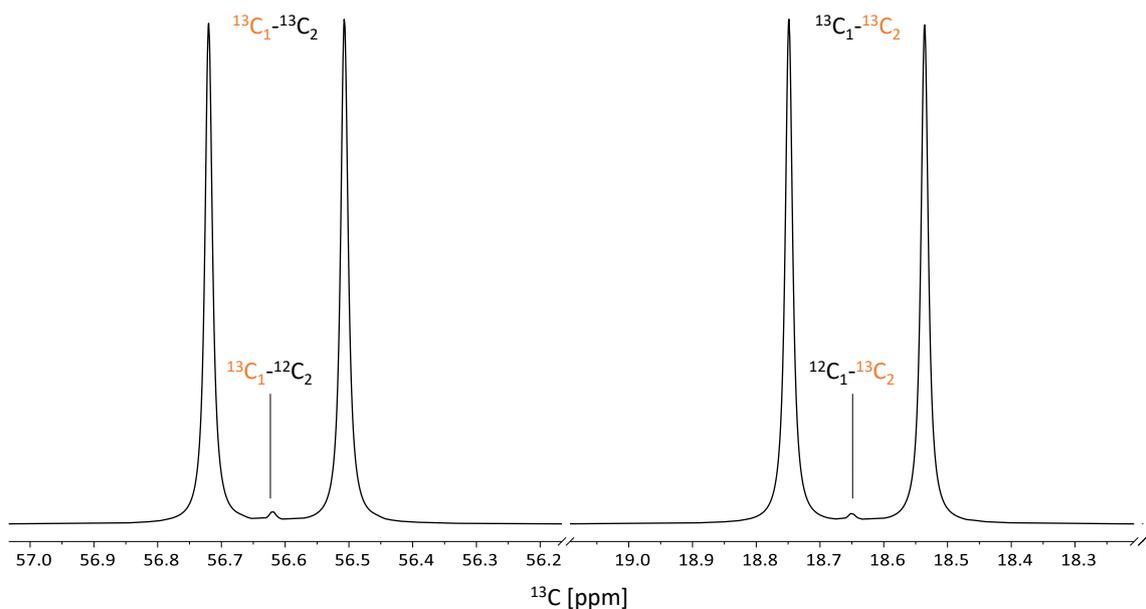


Figure 41 : Spectre ^{13}C RMN découplé des protons avec la séquence *Inverse Gated* (single-pulse) sur l'éthanol bi-marqué ^{13}C à 99%. L'isotopologue $^{12}C_1-^{12}C_2$ n'est pas visible car le spin ^{12}C est nul.

Dans les travaux d'Eve Tenailleau,^[34] le calcul de la justesse a été définie à partir des surfaces des signaux (Eq. 1.54).

$$\Delta(\text{‰}) = \left(\frac{S_{CH_2}}{S_{CH_3}} - 1 \right) \times 1000 \quad (1.54)$$

Cependant, cette formule n'utilise pas les fractions molaires comme c'est le cas en isotopie. Une formule a été introduite dans la thèse de Kévin Bayle afin de travailler sur les fractions molaires^[133] (Eq. 1.55).

$$\Delta(\text{‰}) = \left(\frac{f_{CH_x}}{F_{CH_x}} - 1 \right) \times 1000 \quad (1.55)$$

avec, comme défini précédemment, f_{CH_x} représentant la fraction molaire du CH_2 ou du CH_3 pour l'éthanol (ou $C=O$ et CH_3 pour l'acide acétique), F_{CH_x} représente la fraction molaire théorique qui est dans ce cas de 0,5. Dans le cas d'un découplage parfait Δ doit être égale à 0.

Afin de mesurer l'uniformité du découplage sur toute la gamme 1H , plusieurs expériences sont réalisées avec un décalage de fréquence 1H de -2500 à +2500 Hz par pas de 500 Hz. Pour évaluer les résultats, deux indices sont calculés : L représentant l'uniformité du découplage sur toute la gamme de fréquence, traduisant la précision (Eq. 1.56) et L' l'efficacité du découplage (Figure 42) (Eq. 1.57).^[47]

$$L = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n \Delta_i^2}}{n} \quad (1.56)$$

$$L' = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (\Delta_i - \bar{\Delta})^2}}{n} \quad (1.57)$$

avec, Δ_i représentant chaque valeur de fréquence 1H , et $\bar{\Delta}$ la moyenne de tous les Δ_i . Plus ces indices sont proches de 0 et plus le découplage est uniforme et efficace.

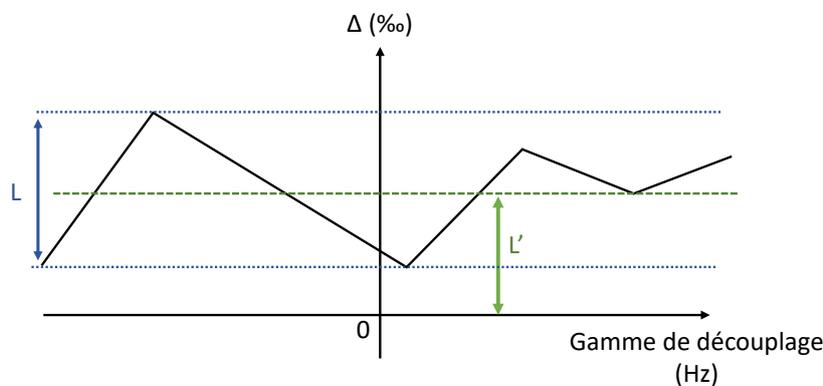


Figure 42 : Représentation des paramètres L et L' montrant l'uniformité et l'efficacité du découplage 1H , respectivement.

Le découplage adiabatique pour l'isotopie a été développé en 2005 durant la thèse d'Eve Teneailleu. ^[34] Le découplage WALTZ-16 utilisé en routine est moins uniforme sur la gamme ^1H que le découplage adiabatique avec un L de 1,9 et 10,7 pour l'acide acétique et l'éthanol contre 0,42 et 0,44, respectivement (Figure 43). ^[47] L'optimisation de ce découplage a conduit à des impulsions adiabatiques avec une évolution en amplitude selon une fonction cosinus et un balayage en fréquence calculé avec la méthode de l'adiabaticité indépendante de l'offset (Cos/OIA). Le cycle de phase utilisé est de la forme $M_4P_5-M_4P_9-M_4P_5'-M_4P_9'$ ($M_4 = 0^\circ, 0^\circ, 180^\circ, 180^\circ$; $P_5 = 0^\circ, 150^\circ, 60^\circ, 150^\circ, 0^\circ$; $P_9 = 0^\circ, 15^\circ, 180^\circ, 165^\circ, 270^\circ, 165^\circ, 180^\circ, 15^\circ, 0^\circ$; $P_5' = 0^\circ, 330^\circ, 60^\circ, 330^\circ, 0^\circ$; $P_9' = 0^\circ, 195^\circ, 180^\circ, 345^\circ, 270^\circ, 345^\circ, 180^\circ, 195^\circ, 0^\circ$).

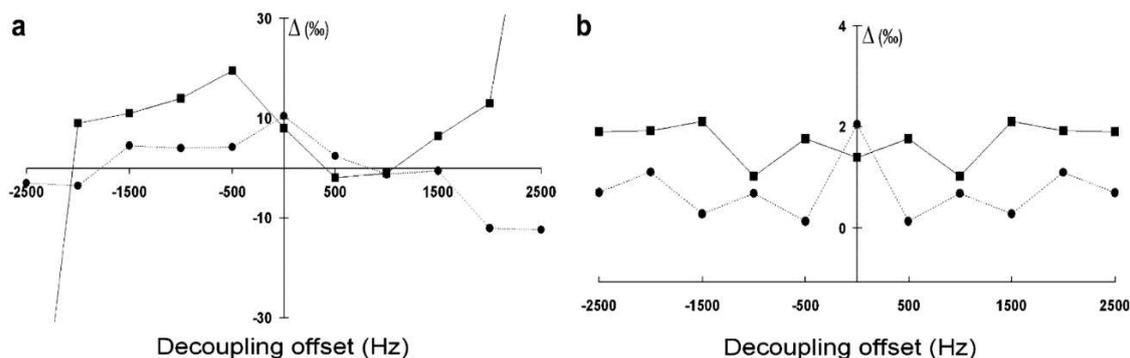


Figure 43 : Variation des intensités relatives Δ en fonction de différentes valeurs d'offset de découplage. Mesures réalisées sur deux molécules bi-marquées : éthanol (---■---) et l'acide acétique (---●---). a) Découplage réalisé avec la séquence WALTZ-16 ; b) découplage adiabatique avec l'utilisation d'une impulsion cos/OIA. ^[47]

C'est ce qui a permis de démontrer la reproductibilité de la RMN ^{13}C isotopique et ainsi son développement par la suite. ^[134]

3.4.2. INEPT vs. DEPT

Afin d'augmenter la sensibilité (réduction du temps d'analyse et/ou de la quantité de produit analysé), les séquences avec transfert de polarisation ont été envisagées comme c'est le cas de la séquence INEPT et DEPT. Ces séquences vues précédemment (2.5.1, 2.5.2, respectivement de ce chapitre) permettent de transférer la polarisation ^1H vers le ^{13}C afin d'augmenter la sensibilité du ^{13}C . L'INEPT adiabatique (Figure 44a) et la DEPT adiabatique (Figure 44b) ont été optimisées afin d'obtenir la précision de 1%. Pour corriger les imperfections des impulsions et l'effet d'*off-resonance*, les impulsions de 180° d'inversion et de refocalisation ont été remplacés par des impulsions adiabatiques et adiabatiques composites, respectivement.

Une étude sur la répétabilité de ces séquences a montré une stabilité à court terme de 1,4 et 1,7‰ et sur le long terme une stabilité de 0,7 et 6,2‰ pour l'INEPT adiabatique et la DEPT adiabatique, respectivement. ^[135] Les 180° adiabatiques ont été implémentés pour limiter leurs imperfections. L'impact des autres impulsions sur le signal dépend du cosinus de l'angle d'impulsion (β). Ainsi, une variation de β induit une variation du signal proportionnelle au sinus de β . Par conséquent, une variation sur un angle de 90° impact peu l'intensité des signaux alors que des angles différents de 90° peuvent induire une variation significative de

l'intensité des signaux. La séquence INEPT adiabatique contient uniquement des angles de 90° et 180° , alors que la DEPT adiabatique contient une dernière impulsion de 60° . L'écart de la stabilité à long terme est donc expliqué par les imperfections des impulsions RF. Par conséquent, la séquence INEPT est plus appropriée pour l'analyse isotopique du ^{13}C .

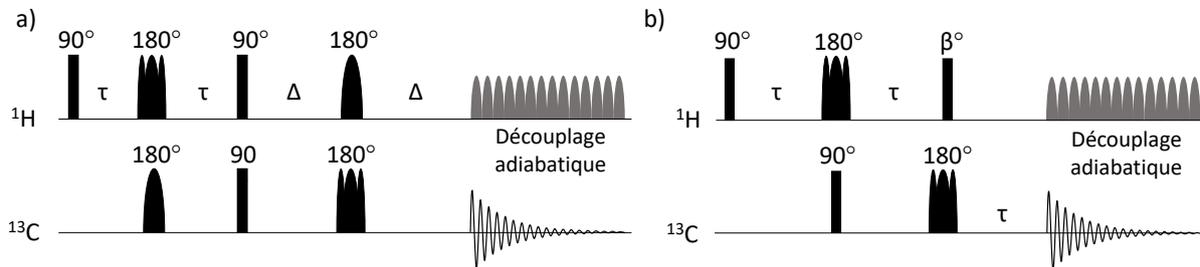


Figure 44 : Représentation schématique des séquences a) INEPT adiabatique ; b) DEPT adiabatique. Les 180° d'inversion et de refocalisation ont été remplacés par des impulsions adiabatiques et adiabatiques composites, respectivement. Ces deux séquences réalisent un transfert de polarisation entre le ^1H et le ^{13}C .

L'INEPT adiabatique a été utilisée dans plusieurs études. En 2013, Remaud *et al.* ont analysé 20 échantillons d'ibuprofène et 11 échantillons de naproxène commerciaux afin de trouver de nouveaux paramètres de discrimination. Ainsi, cette nouvelle séquence a permis d'ajouter 9 et 7 nouveaux paramètres de discrimination pour le naproxène et l'ibuprofène, respectivement, permettant ainsi d'introduire la notion d'isotopomique.^[8] Plus récemment, une étude a couplé le profilage isotopique et métabolomique des triglycérides dans les huiles d'olive de quatre origines géographiques différentes.^[136] L'utilisation de l'INEPT adiabatique a permis de diviser le temps d'expérience par 7 par rapport à l'utilisation de la séquence *Inverse Gated*. Les triglycérides présentent beaucoup de recouvrement de signaux sur un spectre RMN ^{13}C , cependant, l'utilisation d'un algorithme de déconvolution permet de déterminer chaque signal sous un recouvrement.

3.4.3. HSQC symétrique

L'HSQC a été développée en isotopie pour pallier le recouvrement spectral.^[137] Le développement d'une séquence HSQC symétrisée en impulsions RF a ensuite été réalisé (Figure 45).

La symétrie parfaite de cette séquence a induit une meilleure robustesse vis-à-vis des imperfections RF. En effet, les imperfections sur le premier segment INEPT de la séquence sont compensées par le segment rétro-INEPT. Cette symétrie permet également de supprimer correctement tout le signal provenant des protons liés à un carbone-12.

L'application du NUS, de la LP et du repliement spectral permet de réduire le temps d'analyse en diminuant le nombre d'incrément acquis.^[137] Ainsi, une précision de quelques ‰ a été obtenue avec un temps expérimental de 22 minutes pour un spectre utilisable pour la discrimination de différents échantillons d'huile de provenances distinctes.^[138]

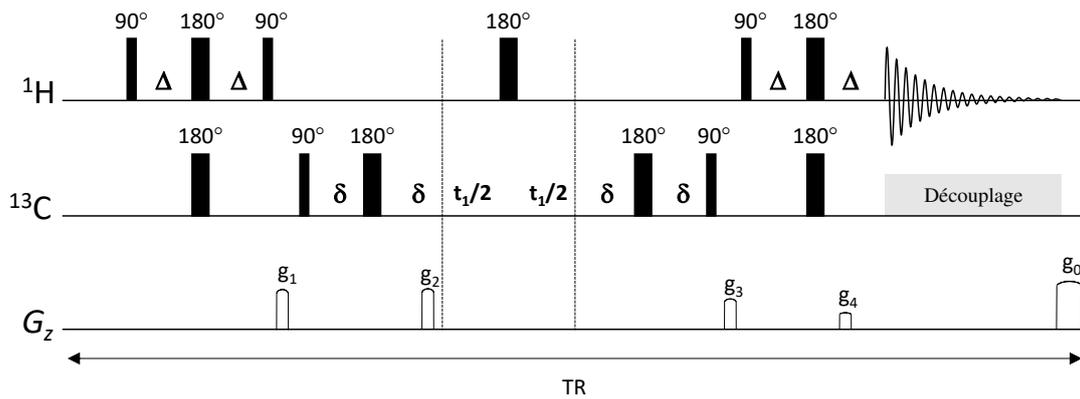


Figure 45 : Représentation schématique d'une séquence d'impulsion HSQC symétrique. Une première partie composée d'une séquence INEPT suivie d'une rétro-INEPT. La symétrie parfaite des impulsions permet une meilleure robustesse vis-à-vis des imperfections RF et une meilleure suppression des signaux des ^1H liés aux ^{12}C .

3.4.4. Séquences Double-WET, Multi-WET et Profiled-WET

Comme décrit précédemment, l'abondance isotopique peut être calculée sans l'utilisation de l'abondance isotopique globale (provenant d'une mesure par *irm-MS*) mais en utilisant une référence interne et la RMN- ^1H . Cependant, cette méthode impose de réaliser sur le même tube le spectre ^1H et ^{13}C dans des conditions quantitatives. Comme signalé précédemment, la forte concentration en analyte provoque du radiation damping sur l'analyse ^1H impactant les surfaces mesurées. Afin de supprimer ce phénomène plusieurs séquences ont été développées à partir de la séquence WET. ^[139] Cette séquence est classiquement utilisée pour la suppression du signal du solvant. La combinaison d'impulsions RF sélectives suivie d'un gradient de déphasage permet de supprimer la composante longitudinale du signal des pics excités par les impulsions sélectives. A partir de cette séquence, la séquence Double-WET (DWET) a été développée ^[140] afin de supprimer une zone spatiale du tube (Figure 46).

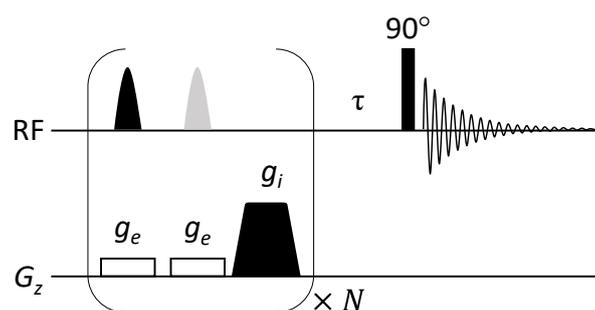


Figure 46 : Représentation schématique d'une séquence d'impulsion DWET. Deux impulsions sélectives contenant une modulation en phase avec application d'un gradient d'encodage g_e et un gradient de purge g_i .

Les deux impulsions sélectives balayant une gamme de fréquence ΔF , peuvent être combinées à un gradient d'excitation (g_e) afin de produire un encodage spatial. La première impulsion excite la partie basse du tube et la deuxième la partie haute. Ainsi, les aimantations contenues dans ces zones sont basculées dans le plan transversal, et le gradient de purge g_i permet de les supprimer et d'observer uniquement les aimantations d'une tranche d'épaisseur e (Figure 47).

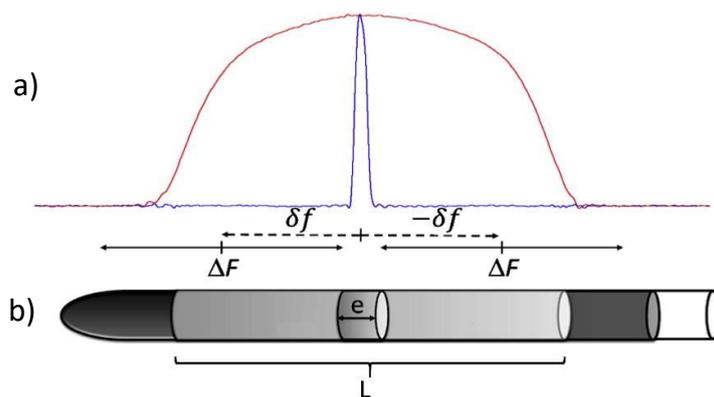


Figure 47 : a) Profil selon z en rouge sans l'utilisation de la séquence DWET et en bleu avec la séquence DWET. b) Représentation schématique de L , hauteur de l'échantillon à l'intérieur de la bobine, et e , épaisseur de la tranche détectée après saturation par les impulsions RF sélectives. ^[140]

L'utilisation de cette séquence permet de réduire le radiation damping en éliminant le signal des spins contenus dans les zones saturées. Ainsi, le spectre obtenu ne présente plus de distorsion et les signaux RMN ^1H peuvent être quantifiés précisément (Figure 48).

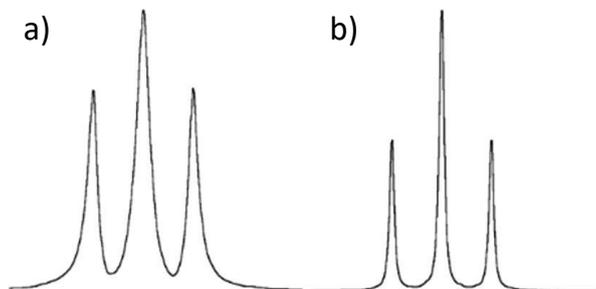


Figure 48 : Région méthyle des spectres RMN- ^1H obtenus sur une solution d'éthanol dans D_2O (50/50) à 400 MHz avec : (a) excitation simple avec un angle de bascule de 9° , avec radiation damping, (b) séquence d'impulsions DWET, sans radiation damping. ^[140]

Afin de réduire le temps de saturation, deux séquences ont ensuite été développées : la Multi-WET (MWET) et la Profiled-WET (PWET). ^[141] La séquence MWET permet d'exciter simultanément les deux régions du tube ce qui divise par deux le nombre d'impulsions nécessaires. La séquence PWET est composée d'une impulsion sélective asymétrique permettant d'augmenter la saturation sur les bords du tube afin de réduire le nombre de répétitions du motif de base.

4. Variabilité intra et inter-instrumentale sur les $\delta^{13}\text{C}_i$

4.1. Composition isotopique : partielle, apparente et partielle apparente

La justesse des résultats bruts en RMN dépend de la séquence utilisée. La composition isotopique mesurée à partir de l'*Inverse Gated* est considérée comme juste. Dans une publication de 2013, les auteurs ont rassemblé les résultats obtenus sur la vanilline à partir de 9 spectromètres avec une configuration similaire (400 MHz avec sonde direct). ^[142] Cette étude a montré une dispersion avec un écart-type inférieur à 2‰ sur les résultats entre ces spectromètres. De plus, sur l'éthanol et l'acide acétique, cette configuration donne des $\delta^{13}\text{C}_i$

proche de ceux donnés par la pyrolyse, considérés comme justes de par la méthode utilisée pour ces deux molécules. ^[143] Cependant, les résultats présentent des distorsions si le champ B_0 augmente avec l'augmentation de l'effet d'*off-resonance* et de la gamme ^1H à découpler. Si la sonde est dans une configuration inverse la bobine ^1H est plus petite que celle du ^{13}C provoquant un mauvais découplage des molécules aux extrémités de la bobine. ^[128] Ces effets sont encore plus accentués si une sonde cryogénique est utilisée. Les fractions molaires extraites sont alors considérées comme apparentes. ^[140]

Les séquences multi-impulsionnelles telles que l'INEPT ou l'HSQC réalisent un transfert de polarisation par le couplage $^1J_{^{13}\text{C}-^1\text{H}}$. Les carbones quaternaires ne sont alors pas observables entraînant des $\delta^{13}\text{C}_i$ partiels. L'intensité des signaux est également impactée par les délais de transfert et de refocalisation car les constantes de couplage sont différentes pour chaque site, produisant des distributions des intensités apparentes. Des séquences multi-dimensionnelles réalisées sur un spectromètre présentant des compositions isotopiques apparentes donnent alors lieu à des résultats partiels apparents.

La méthodologie Full-Spectrum INEPT (FS-INEPT) consiste à optimiser les délais de l'INEPT afin de tirer profit de différentes amplitudes de couplage $^nJ_{^{13}\text{C}-^1\text{H}}$ permettant d'obtenir les signaux des carbones quaternaires. Avec cette méthode, un écart-type sur la répétabilité à long terme de 2% a été obtenu permettant la classification selon leur origine de différents échantillons de caféine et paracétamol. ^[144] Cette approche est toutefois limitée car très exigeante en termes de préparation des échantillons.

4.2. Facteur de correction

4.2.1. Entre fraction molaire de référence et apparente

Lorsque deux séquences différentes sont comparées, il est nécessaire d'appliquer des coefficients de correction. Il est alors possible de corriger des fractions molaires apparentes à l'aide des fractions molaires de référence obtenues sur une même molécule. La séquence *Inverse Gated* (« single-pulse ») est alors prise comme expérience de référence.

Une correction entre des fractions molaires de référence et apparentes est possible avec la correction de données obtenues avec l'INEPT adiabatique sur des échantillons d'éthanol. Le temps d'analyse par échantillon a pu être divisé par 2 avec une même quantité de produits permettant de faire l'authentification des produits d'agave par l'analyse de l'éthanol. ^[145] La méthodologie consiste à analyser plusieurs échantillons d'origines différentes en *Inverse Gated* (méthode initialement utilisée pour distinguer les origines CAM des plantes C_4 , telle l'adultération de la tequila (CAM) par du maïs (C_4) ^[146]) et en INEPT. Les $\delta^{13}\text{C}$ du CH_2 obtenus montrent une bonne corrélation entre l'*Inverse Gated* et l'INEPT (Figure 49). Cette correction a uniquement été réalisée sur le CH_2 car les deux sites carbonés ne sont pas indépendants, la composition isotopique étant calculée à partir de la moyenne des carbones de la molécule

(composition globale obtenue par *irm-MS*). Cette corrélation fonctionne essentiellement pour un couple spectromètre/sonde, le changement de matériel peut modifier les résultats comme c'est le cas entre les fractions molaires de référence et apparente.

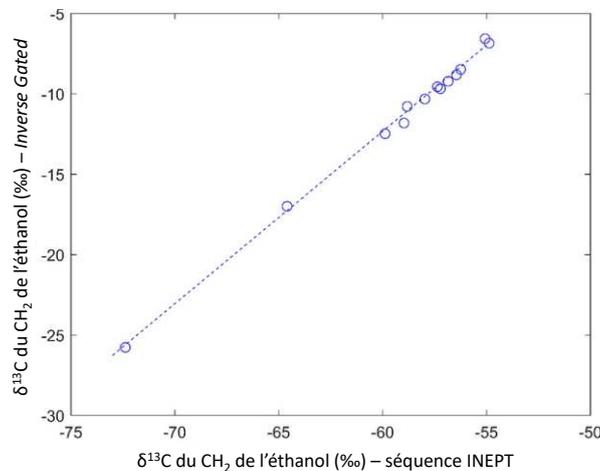


Figure 49 : Relation entre les compositions isotopiques spécifiques du CH_2 de l'éthanol en ‰ obtenues par la méthode INEPT et par Inverse Gated. L'équation de la droite de régression et le coefficient de corrélation sont les suivants : $y = 51,986 - 1,072x$ en ‰ ; $R^2 = 0,9975$. [145]

4.2.2. Entre fraction molaire de référence et partielle

Les carbones quaternaires ne sont pas observés par utilisation de séquences multi-impulsionnelles et donc invisibles sur le spectre, entraînant une perte d'information et donc un biais dans le calcul des fractions molaires. L'utilisation des séquences de transfert de polarisation permet néanmoins d'augmenter la sensibilité et/ou de diminuer le temps d'analyse. Une récente étude sur des échantillons de vanilline a permis de prédire les 8 fractions molaires données par la méthode de référence qui est l'*Inverse Gated* à l'aide des 5 présentes en INEPT (les 3 carbones quaternaires n'étant pas observés). [147] Les différentes variables ont été considérées comme indépendantes donnant lieu à 8 régressions linéaires multiples. Ainsi, la modélisation statistique des sites spécifiques a montré une différence non significative entre les deux séquences permettant l'authentification de précurseurs de (bio)synthèse de la vanilline de différents échantillons. Cette nouvelle méthodologie dans les laboratoires de contrôle permet de diviser par 4 le temps de l'analyse.

4.2.3. Un facteur de correction commun à toutes les molécules

Plusieurs pistes ont été explorées afin d'homogénéiser les données réalisées sur différents spectromètres avec la séquence de base, l'*Inverse Gated*. En effet, des biais peuvent être présents sur les résultats si deux spectromètres ont des champs magnétiques ou des sondes différents. Les travaux de Kevin Bayle ont montré que les biais étaient dépendants de la molécule (Figure 50). [133] Cette étude a porté sur la dispersion des $\delta^{13}\text{C}_i$ sur deux spectromètres avec le même champ magnétique mais avec des sondes et des consoles différentes. [14] Plus la gamme spectrale de la molécule est grande et plus la différence entre les 2 spectromètres est

importante. Cette observation est à rapprocher des effets liés à l'*off-resonance* et aux filtres numériques qui sont différents entre les deux spectromètres. La Figure 50 montre que le facteur de correction entre les deux spectromètres RMN est dépendant de la position des signaux sur la gamme de déplacement chimique.

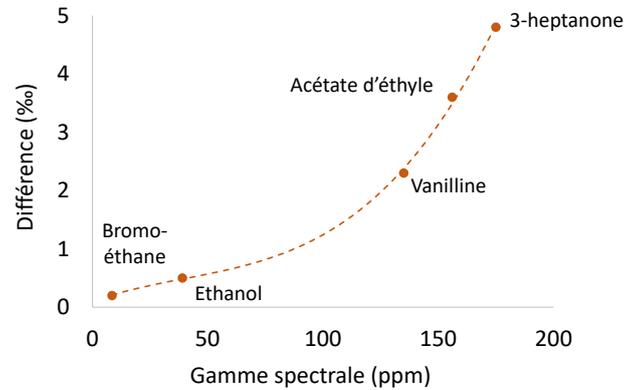


Figure 50 : Différence des $\delta^{13}\text{C}$ du signal le plus déblindé en déplacement chimique selon l'axe y en fonction de l'écart de déplacement chimique exprimé en ppm selon l'axe x, pour deux spectromètres de même champ magnétique mais équipés de sondes et de consoles différentes.

Chapitre II : L'objectif ultime d'une méthodologie PSIA : la justesse

Le but des mesures PSIA est de mesurer les rapports $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ position-spécifiques afin de déterminer la distribution isotopique au sein d'une molécule. Ces mesures peuvent être réalisées, soit en utilisant l'*irm-MS* (pyrolyse ou Orbitrap) ou par *irm- ^{13}C NMR*. Les résultats obtenus avec ces différentes techniques ne traduisent pas exactement la même réalité. Ce chapitre porte sur la justesse des résultats obtenus par ces techniques et décrit les objectifs de cette thèse.

1. Que mesure-t-on avec les différentes méthodes : exemple du n-propanol

Le n-propanol est une molécule linéaire simple composée de 3 carbones qui compte 7 isotopologues carbone (Figure 51). L'abondance isotopique statistique du carbone-12 est de 98,9% contre 1,1% pour le carbone-13. L'isotopologue présent majoritairement est donc constitué uniquement de ^{12}C . Les isotopologues monosubstitués (A, B et C) représentent donc 1,1% de la quantité de n-propanol. Les molécules doublements substituées (AB, BC, CA) représentent 1,1% de 1,1% soit 0,012% et l'isotopologue totalement substitués (ABC) représente seulement 0,0001%.

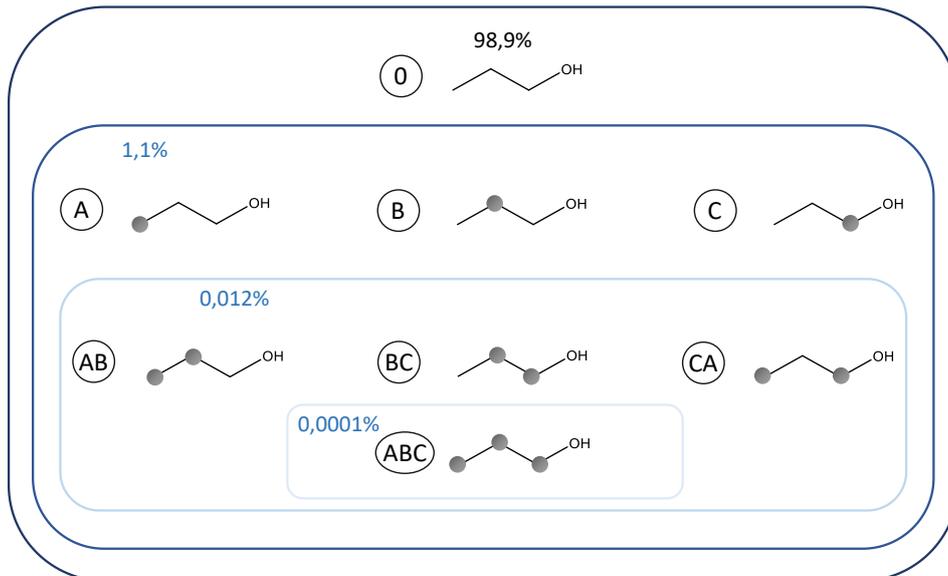


Figure 51 : Isotopologues du n-propanol, l'atome de carbone-13 est représenté en gris.

L'analyse par *irm-MS* couplée à la pyrolyse (*Py-GC/irm-MS*) fragmente les molécules et extrait le rapport isotopique pour chaque fragment. Trois signaux sont alors générés nommer P_a , P_b et P_c correspondant à chaque position du n-propanol (Eq. 2.1), (Eq. 2.2) et (Eq. 2.3), respectivement.

$$P_a = A + CA + AB \quad (2.1)$$

$$P_b = B + BA + BC \quad (2.2)$$

$$P_c = C + CA + BC \quad (2.3)$$

L'isotopologue ABC est considéré comme négligeable compte tenu de sa faible abondance.

L'analyse *irm-MS* par Orbitrap (*irm-MS HRMS*) consiste à sélectionner l'ions parents $[M+1]$ correspondant à l'isotopologue contenant un isotope lourd. Puis, cet ion est fragmenté afin de mesurer le rapport isotopique de chaque position. Les signaux alors obtenus correspondent aux isotopologues monosubstitués (Eq. 2.4), (Eq. 2.5) et (Eq. 2.6).

$$O_a = A \quad (2.4)$$

$$O_b = B \quad (2.5)$$

$$O_c = C \quad (2.6)$$

L'*irm- ^{13}C NMR* est une méthode primaire relative donnant un spectre avec la séparation des isotopologues (Figure 52). L'isotopologue 0 qui contient uniquement des carbones-12 n'est pas observable en RMN. Les signaux majoritairement présents sur le spectre proviennent des molécules monosubstituées (A, B et C). Les isotopologues contenant deux ^{13}C l'un à côté de l'autre (BC et AB) se caractérisent sous la forme de doublets appelés pics satellites et leurs intensités représentent statistiquement 1,1% de l'intensité du signal central. Enfin, les signaux de l'isotopologue CA (dont l'intensité est de 1,1% par rapport au signal central) se superposent à ceux des isotopologues C et A car le couplage ^{13}C - ^{13}C pour cette molécule est très petit et les satellites sont confondus avec la base du pic central. Ainsi, les isotopologues contribuant aux pics mesurés par *irm-NMR- ^{13}C* sont indiqués dans les équations (Eq 2.7, 2.8 et 2.9).

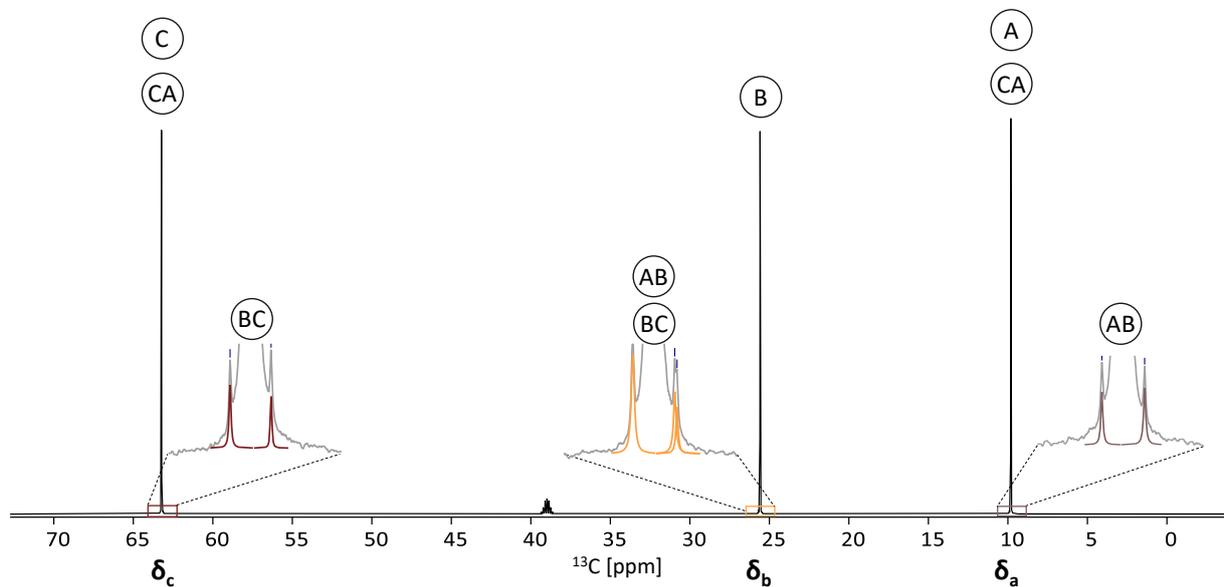


Figure 52 : Spectre RMN ^{13}C - $\{^1H\}$ du *n*-propanol avec les isotopologues enregistré à 700,28 MHz.

$$S_a = A + CA \quad (2.7)$$

$$S_b = B \quad (2.8)$$

$$S_c = C + CA \quad (2.9)$$

Les pics satellites ne sont pas intégrables à cause de leur faible intensité. Afin de les prendre en compte une correction statistique est réalisée sur les surfaces (Cf. Chapitre I – paragraphe 3.3.1) pour obtenir les surfaces corrigées pour chaque position (Eq. 2.10 à 2.12).

$$R_a = A + CA + BC \quad (2.10)$$

$$R_b = B + AB + BC \quad (2.11)$$

$$R_c = C + CA + AB \quad (2.12)$$

2. Un trio complémentaire

Ces méthodes ne répondent pas de la même manière en termes de justesse et de sensibilité (Figure 53). L'analyse *Py-GC/irm-MS* est la méthode présentant le moins de biais donnant alors les résultats les plus justes. Cependant, bien qu'elle soit très sensible, cette technique ne permet pas de mesurer des molécules contenant plus de 4 carbones ; au-delà, des réarrangements entre les fragments apparaissent. L'*irm-¹³C NMR* est une technique moins sensible et moins juste que la *Py-GC/irm-MS*, cependant, il est possible d'analyser des molécules avec un poids moléculaire plus élevé dans la limite de recouvrement des signaux. Enfin, l'*irm-MS* par Orbitrap (*irm-MS HRMS*) est une technique plus sensible que l'*irm-¹³C NMR* avec une quantité d'échantillons nécessaire comprise entre le μmol et le nmol . Cependant, cette technique développée récemment (Cf. Chapitre I – paragraphe 3.2.3.1), n'est pas juste naturellement et elle a besoin d'être calibrée avec des standards.

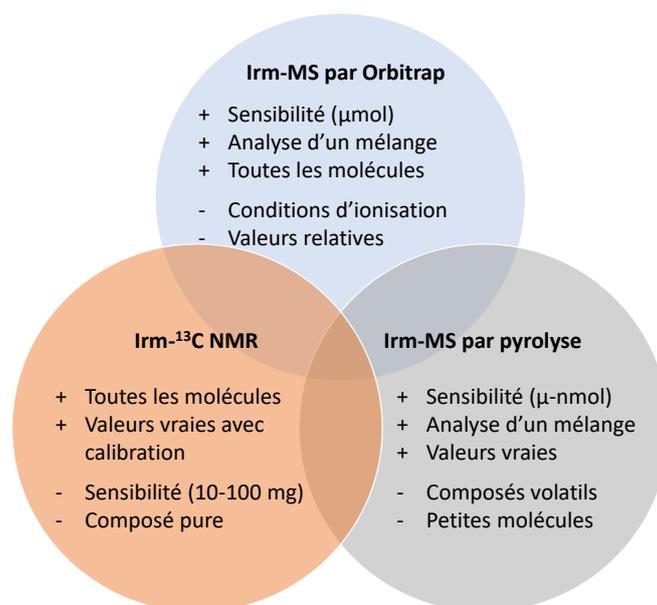


Figure 53 : Comparaison entre *irm-MS* par pyrolyse, *irm-¹³C NMR* et *irm-MS HRMS*.

Ces techniques présentent donc une complémentarité. La justesse de l'*irm-MS HRMS* peut être corrigée par des standards analysés par *irm-¹³C NMR* qui elle peut être corrigée par l'*irm-MS* par pyrolyse. Ainsi, la méthodologie *irm-¹³C NMR* apparaît comme l'outil clé dans une démarche PSIA, cependant les différents facteurs de correction ne sont pas encore

définitivement établis. Enfin, une fois ces corrections réalisées, l'outil *irm-¹³C NMR* permettra de produire des standards pour les techniques émergentes comme *irm-MS HRMS*.

3. Objectifs de la thèse

Le chapitre I de la thèse représente un état des lieux de l'outil *irm-¹³C NMR*. En voici les principaux éléments qui soulignent les points à améliorer pour conduire à un outil universel et d'un usage générique pour une approche PSIA. Aujourd'hui, l'utilisation de la séquence mono-impulsionnelle, dénommée *Inverse Gated* ou encore *single-pulse*, permet d'avoir uniquement des résultats relatifs entre les échantillons, avec l'observation de biais entre différents spectromètres. Afin d'augmenter la sensibilité de la méthode, des séquences multi-impulsionnelles et multi-dimensionnelles ont été optimisées pour les mesures isotopiques au détriment de la justesse. L'objectif de cette thèse est d'obtenir des compositions ¹³C intramoléculaires par *irm-¹³C NMR* sur une échelle en absolue, comme celle qui est utilisée en routine en *irm-MS*, pour la mesure de la teneur isotopique globale.

3.1. Précision

Le critère de précision, exprimé par un écart-type sur l'échelle des « pour mille », soit pour la réponse instrumentale, soit pour l'expression de la composition isotopique δ (ou mUr si l'unité récemment proposée est utilisée) est un élément important dans l'objectif du travail de thèse. La précision qui est obtenue par *irm-MS* est inférieure à 0,3‰ pour une analyse de routine et peut atteindre 0,1‰ pour des déterminations plus pointues. Ce n'est pas cet objectif qui est ciblé en *irm-¹³C NMR*. En effet tous les travaux antérieurs, ^[128] principalement issus du laboratoire, ont montré : (i) une grande variation $\delta^{13}\text{C}_i$ au sein d'une molécule qui peut atteindre des dizaines de ‰ et (ii) une discrimination potentielle entre échantillons de plusieurs ‰ selon leur origine. A partir de ce constat une précision de 1‰ pour nos différentes études apparaît comme suffisante. Le fait de travailler avec une approche PSIA est essentiel car, non seulement elle permet de mettre en évidence des variations importantes, mais aussi de révéler des effets isotopiques normaux et inverses au sein de la molécule invisibles à l'échelle globale (obtenue par *irm-MS*) par annulation mutuelle de ces effets opposés concomitants.

3.2. Justesse

Dans ce but plusieurs étapes de développement seront abordées. Ainsi, l'utilisation de la séquence mono-impulsionnelle permet d'obtenir des résultats sur une échelle compréhensible par la communauté isotopique mais les biais entre les spectromètres empêchent d'obtenir des résultats absolus. Les nouvelles séquences multi-dimensionnelle et multi-impulsionnelle développées produisent des résultats sur une échelle non-compréhensible par les isotopistes. Le premier objectif de cette thèse est de développer une séquence plus sensible pour l'*irm-¹³C NMR*. Ensuite, il est nécessaire de corriger les données brutes obtenues par cette séquence afin de parvenir, dans un premier temps, à des résultats exprimés sur la même échelle que la

séquence *Inverse Gated*. Ensuite, une étape d'homogénéisation des résultats recueillis par l'*irm-¹³C NMR* pour lisser les effets de configurations des spectromètres utilisés (valeur de champ magnétique, type de sonde et architecture de la chaîne RF) est primordiale avant d'envisager de les corriger avec l'*irm-MS* par pyrolyse et/ou fragmentation pour présenter les compositions isotopiques sur l'échelle absolue. La Figure 54 présente la progression du travail de thèse en pointant les objectifs à atteindre, en particulier, en termes de facteurs de corrections : elle correspond au fil rouge de l'avancée du travail.

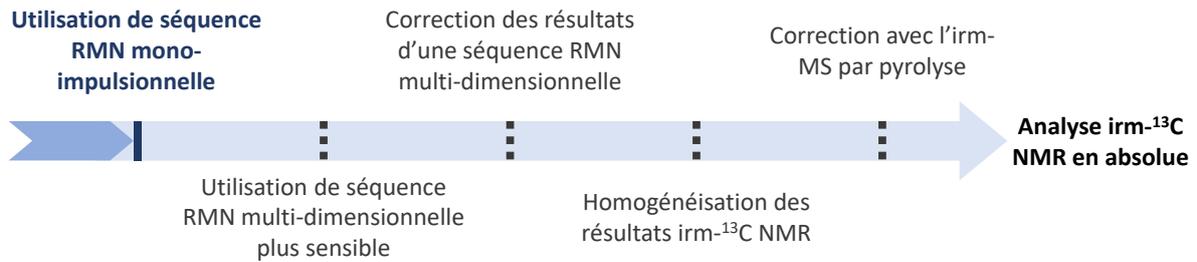


Figure 54 : Objectifs de la thèse pour l'obtention de résultats *irm-¹³C* juste en absolue.

Chapitre III : Développement et optimisation d'une nouvelle
stratégie plus rapide de mesure par *irm*- ^{13}C NMR – HSQC
symétrique adiabatique

L'HSQC est une séquence qui permet de gagner en sensibilité grâce à l'excitation et à l'observation ¹H. Ainsi, cette séquence a permis d'augmenter la sensibilité des mesures en irm-¹³C NMR (Cf. Chapitre I – paragraphe 3.4.3). Nous allons voir dans ce chapitre le développement et l'optimisation d'une nouvelle stratégie afin de gagner en sensibilité tout en ayant une bonne précision à l'aide de l'HSQC symétrique et adiabatique (asHSQC).

1. Développement de l'asHSQC

1.1. Obtention de la précision cible

Pour obtenir la précision cible qui est de l'ordre du pour-mil, les imperfections des impulsions RF doivent être limitées : les 180° de la séquence HSQC symétrique ont été remplacés par des 180° adiabatiques et adiabatiques composites (Figure 55). Le programme d'impulsion est donné en annexe 1.

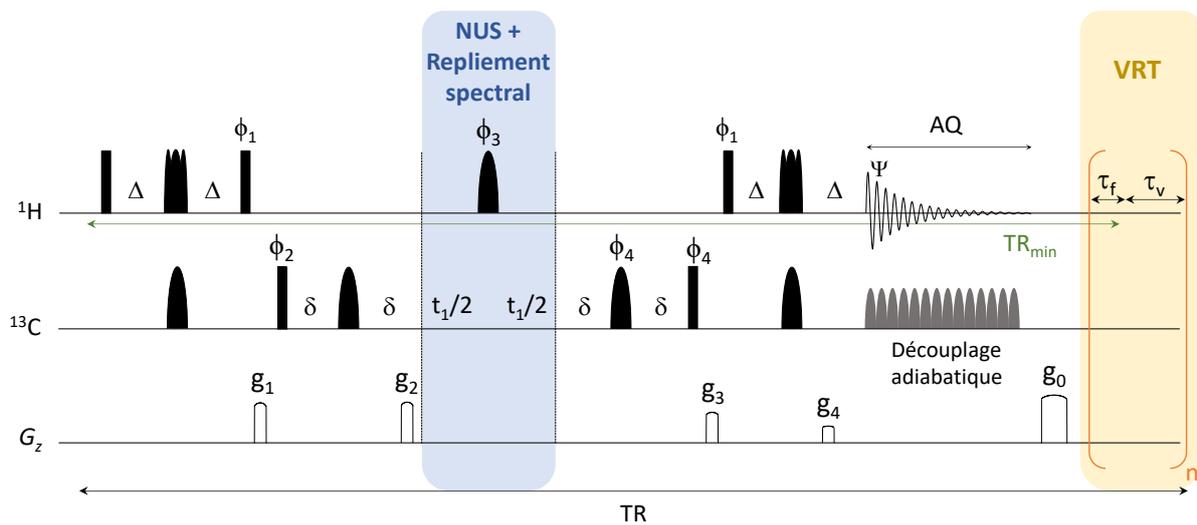


Figure 55 : Séquence HSQC symétrique adiabatique (asHSQC) avec l'utilisation du NUS (bleu) et du VRT (jaune). Des impulsions 180° adiabatique ont été utilisés pour les inversions, des impulsions adiabatiques et composites pour les refocalisations. Le cycle de phase est le suivant : $\phi_1 = y$; $\phi_2 = y, y, y, y, -y, -y, -y, -y$; $\phi_3 = x, x, -x, -x$; $\phi_4 = x, -x$; $\Psi = x, -x, x, -x, -x, x, -x, x$.

Les caractéristiques des impulsions sont données dans le Tableau 4. Ces impulsions ont été générées avec le logiciel MathcadTM.^[50] Chaque impulsion est modulée en amplitude selon une fonction cosinus avec application de l'adiabaticité constante en fonction de la fréquence d'excitation pour la modulation en fréquence (Cos/OIA). Les impulsions ¹H et ¹³C balayent une gamme de fréquence ΔF de 17 et 39 kHz, respectivement. Ainsi, il est possible de déterminer pour chacune le ω_1^{max} qui, associé à une durée, permet de déterminer la puissance nécessaire pour les appliquer correctement. Chaque puissance, peut être associée à une durée équivalente pour un 90° rectangulaire permettant ainsi de déterminer l'atténuation à adapter (Δ (dB)).

Tableau 4 : Caractéristiques des impulsions adiabatiques et adiabatiques composites pour la refocalisation et l'inversion pour le ¹H et le ¹³C.

Impulsions	Durée (ms)	Modulation de l'amplitude	ΔF (kHz)	ω_1^{max} (Hz)	PW ₉₀ eq ^a (μ s)	Atténuation ^b (dB)
Refocalisation ¹ H	3.6	Cos/OIA	17	53226	29.51	+9.4
Inversion ¹ H	2	Cos/OIA	17	37681	41.69	+12.4
Refocalisation ¹³ C	2	Cos/OIA	39	93805	16.75	+3.65
Inversion ¹³ C	3.6	Cos/OIA	39	37995	41.34	+11.5
Découplage ¹³ C	1.2		40	35541	44.20	+12.08

^a Durée d'une impulsion rectangulaire provoquant une nutation de 90° avec une puissance égale à la puissance maximale de l'impulsion adiabatique.

^b Atténuation par rapport à la puissance d'un PW₉₀ de référence (10 μ s en ¹H et 11 μ s en ¹³C) : Δ (dB).

Avant l'expérience, il est important de calibrer ces impulsions. Pour cela, il faut déterminer la puissance nécessaire pour réaliser un 90° en 10 μ s et 11 μ s pour le ¹H et le ¹³C, respectivement. Ces valeurs sont celles habituellement utilisées pour limiter l'effet d'*off-resonance* tout en appliquant une puissance acceptable. Elles permettent de fixer pour chaque échantillon la même durée pour réaliser un 90° de manière à avoir une bonne répétabilité à long terme. L'atténuation (échelle de puissance délivrée) calculée pour chaque impulsion adiabatique et composite est ensuite ajoutée à l'atténuation trouvée pour faire le 90°.

1.2. Réduction du temps d'analyse

Plusieurs stratégies peuvent être appliquées pour réduire le temps d'analyse des expériences 2D sans impacter la précision des mesures (Cf. Chapitre I). Pour réduire encore le temps d'analyse, une nouvelle stratégie a été développée et optimisée. L'utilisation du *Variable Recycling Time* (VRT) consiste à réduire le temps de répétition entre chaque incrément.^[148] Il se découpe en 2 temps : un fixe, τ_f et un variable, τ_v . Le temps variable décroît au cours de l'expérience et évolue entre chaque incrément (Figure 56). Le premier incrément est réalisé avec un temps correspondant à 7 fois de T_1^{max} (¹H) pour éviter la saturation partielle. Plus les incréments augmentent et plus τ_v diminue jusqu'à 0. Le temps de répétition correspond au dernier incrément est alors égal à τ_f . La surface d'un pic est directement proportionnelle à l'intensité au début du FID (premiers points échantillonnés), ainsi l'utilisation du VRT provoque un élargissement des raies mais n'impacte pas l'aspect quantitatif des mesures.

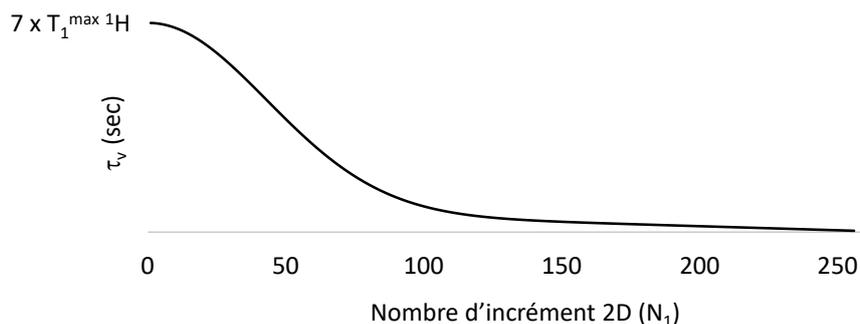


Figure 56 : Evolution du temps variable (τ_v) dans la fonction VRT en fonction de la position dans la liste des valeurs de t_1 .

2. Calibrage rapide des impulsions RF

Il est nécessaire de calibrer les impulsions RF afin de garder la sélection de cohérence, d'éviter des artefacts ou une perte de sensibilité. Les calibrages peuvent être affectés suite à un changement de l'accord de sonde provoqué par un changement de composition entre les échantillons, la température de travail ou le solvant utilisé. Les calibrages réalisés à l'installation sont seulement approximatifs et sont généralement utilisés pour faire des expériences à visée structurale. C'est pourquoi, il est nécessaire de faire les calibrages pour chaque échantillon et chaque noyau avant une expérience quantitative précise.

2.1. Courbe de nutation

La méthode la plus courante pour faire les calibrages RF est de réaliser une courbe de nutation. Cette méthode consiste à enregistrer une série de spectres 1D en incrémentant la durée ou la puissance de l'impulsion. Une courbe de nutation est alors obtenue avec une variation sinusoïdale (Figure 57). Elle permet d'extraire différents angles tels que le 90° correspondant au premier maximum, le 180° et le 360° donnés par la première et la deuxième annulation, respectivement.

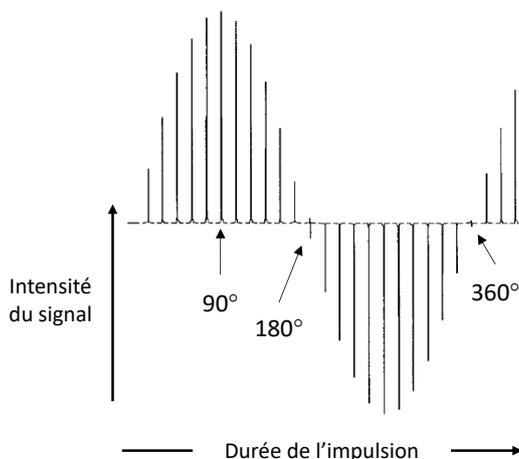


Figure 57 : Courbe de nutation correspondant à l'intensité du signal en fonction de l'augmentation de la durée de l'impulsion. L'angle de 90° est donné par le premier maximum, le 180° et le 360° par la première et deuxième annulation, respectivement. ^[46]

Cependant, cette méthode est impactée par l'effet d'*off-resonance*, le radiation damping et les inhomogénéités de B_1 et B_0 .^[46] De plus, la saturation partielle doit être éliminée impliquant de connaître les valeurs de temps T_1 , et impactant le temps d'expérience dans le cas de T_1^{max} élevé. Afin de réduire le temps d'expérience, il est possible de réaliser quelques points autour du 360° où la fonction est considérée comme linéaire et où la contrainte sur la relaxation est fortement réduite. La durée pour le 90° (PW_{90}) est ensuite trouvée en divisant la valeur du 360° par 4, toutefois cette méthode donne seulement une valeur approximative du PW_{90} .^[39] Une approche universelle et systématique pour des applications des calibrages d'impulsions en routine est présentée dans le paragraphe suivant.

2.2. Séquence MISSTEC

2.2.1. Description de la séquence

La séquence MISSTEC^[149] (*Mixed Imaging sequence using Spin and STimulated EChos*) a été appliquée afin de déterminer le PW_{90} rapidement. Cette séquence, issue de l'imagerie^[150] est composée de 3 impulsions RF : β , 2β et β , permettant de générer un écho de spin (ES) et un écho stimulé (EST) (Figure 58).

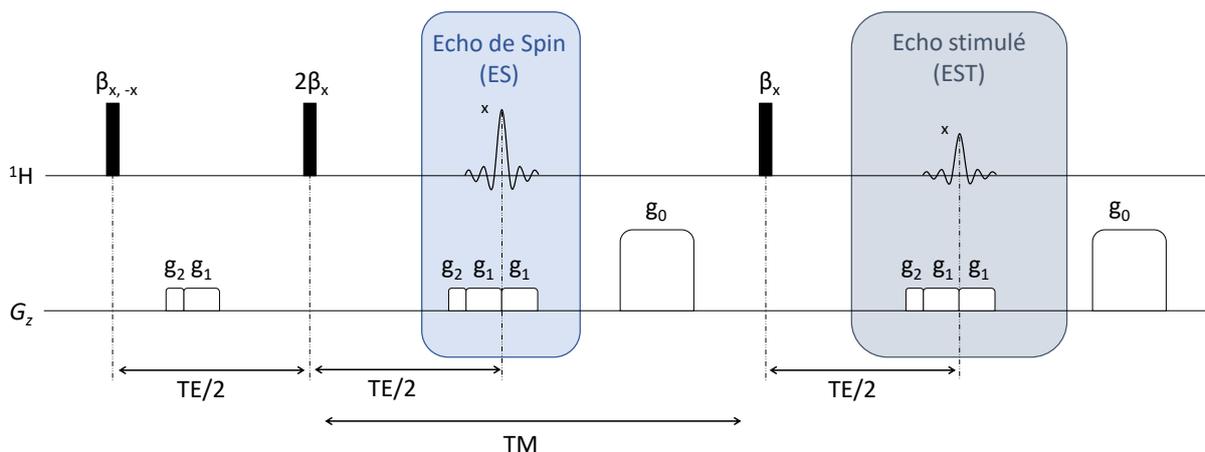


Figure 58 : Séquence MISSTEC utilisée pour obtenir un écho de spin (ES) et un écho stimulé (EST). Dans ce travail, le temps d'écho (TE) et le temps de mélange (TM) ont été ajustés à 8 ms et 10 ms, respectivement. L'amplitude du gradient g_1 a été choisie afin d'obtenir une dispersion en fréquence significativement plus importante que les déplacements chimiques. Le gradient g_2 d'une durée de 1 ms et une amplitude ($=g_1$) a été ajouté afin d'éliminer les FID parasites générés par la 2 ou 3^{ème} impulsion. Le gradient g_0 est un spoiler permettant de supprimer l'aimantation transversale résiduelle et d'éviter la formation d'un écho parasite généré par la deuxième et la troisième impulsion.

Par exemple pour β égal à 45° , la première impulsion bascule les aimantations d'un angle de 45° , elles sont alors constituées d'une composante longitudinale et transversale. Le premier gradient g_1 permet de réaliser une dispersion en fréquence plus importante que les déplacements chimiques. Ensuite, l'impulsion de 90° inverse toutes les aimantations selon le plan perpendiculaire à x . Puis, le gradient g_1 refocalise les aimantations, et au milieu de g_1 il est possible de faire l'acquisition du premier écho appelé écho de spin (SE). Une fois l'écho de spin acquis, le gradient spoiler g_0 permet de supprimer toutes les composantes contenues dans

le plan transversal, seules les composantes suivant l'axe longitudinal ne sont pas élimées. Puis, l'écho stimulé est acquis suite à une nouvelle impulsion de 45° et un nouveau gradient g_1 .

Cette méthode utilise le rapport des intensités entre l'écho de spin (I_{ES}) et l'écho stimulé (I_{EST}) (Figure 59). Les intensités en fonction de l'angle β vérifient les équations (Eq. 3.1 et 3.2).

$$I_{ES} = k_{ES} \sin^3(\beta) \quad (3.1)$$

$$I_{EST} = k_{EST} \sin^3(\beta) \cos(\beta) \quad (3.2)$$

Les constantes k_{ES} et k_{EST} sont dépendantes de la configuration de l'instrument et des temps de relaxation (T_1 et T_2). La configuration de l'instrument est la même dans les deux équations. L'impact des temps T_2 et de l'aimantation à l'équilibre est le même entre les deux échos. De plus, la valeur du temps de mélange (TM) est négligeable (10 ms) devant les T_1 rencontrés en RMN haute résolution, l'effet de la relaxation longitudinale entre les échos n'est donc pas significatif. Ainsi, $k_{ES} = k_{EST}$ et β dépend directement de I_{ES} et I_{EST} (Eq. 3.3).

$$\beta = \text{Arcos}\left(\frac{I_{EST}}{I_{ES}}\right) \quad (3.3)$$

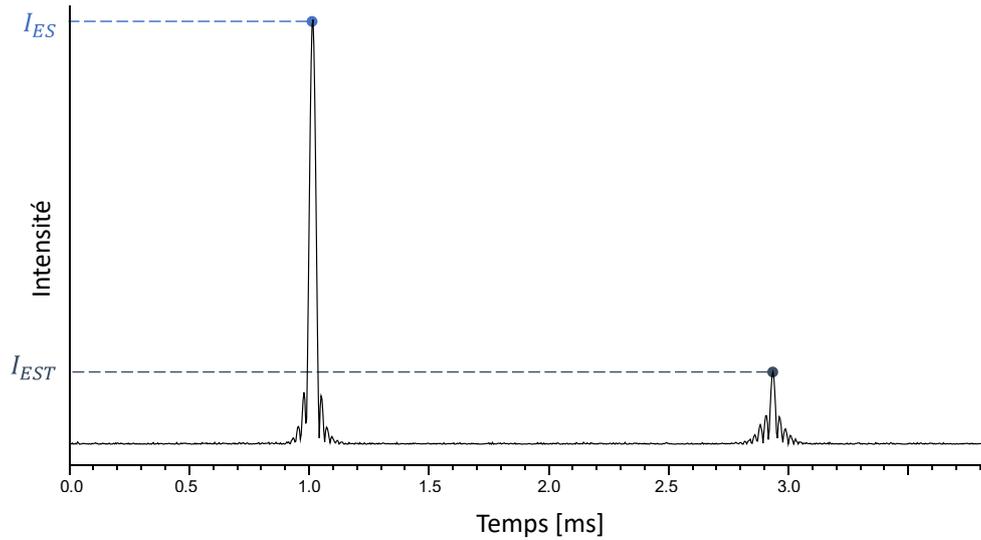


Figure 59 : Echo de spin (ES) et l'écho stimulé (EST) pour un calibrage ¹H pour un angle $\beta = 80^\circ$. Seulement les deux périodes d'acquisition sont affichées ici (le temps entre les deux échos n'est pas représenté).

Les variations des intensités des échos en fonction de β (Figure 60) sont globalement en accord avec les variations théoriques, comme cela a déjà été observé par Akoka *et al.* ^[150] Cependant, entre 60° et 90°, le modèle semble sous-estimer systématiquement I_{ES} et surestimer systématiquement I_{EST} . L'écart par rapport au modèle théorique peut provenir de l'inhomogénéité de B_1 mais aussi de l'effet d'*off-resonance* puisque l'aimantation est dispersée sur une large gamme de fréquences pendant les impulsions de gradients. L'effet d'*off-resonance* est certainement plus prononcé sur l'impulsion 2β que sur les deux impulsions β , ce qui explique le comportement différent des échos de spin et stimulé.

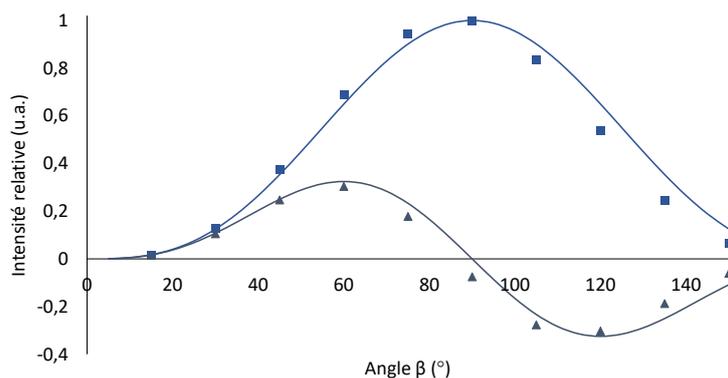


Figure 60 : Variation de l'intensité relative de l'écho de spin (■) et de l'écho stimulé (▲) en fonction de la valeur de l'angle β ; mesurée sur un échantillon d'acétate de vinyle (20 μ L dans 600 μ L d'acétone- d_6). Les lignes pleines correspondent aux fonctions théoriques données par les équations (1) et (2).

Cette séquence utilise comme point de départ les calibrages de base réalisés lors de l'installation ou des maintenances de l'appareil. Un angle cible théorique (β_0) est calculé à partir des paramètres de base de l'instrument associé à une puissance et une durée. L'angle β_0 est appliqué pendant la séquence. La séquence MISSTEC permet de fournir la valeur expérimentale de l'angle β correspondant au couple puissance et durée pour l'angle β_0 . Un écart entre l'angle théorique β_0 et β montre l'écart entre la valeur donnée par l'instrument et la valeur expérimentale dépendante de l'échantillon à analyser. Connaissant la durée de l'impulsion de l'angle β et sa valeur, il est possible de déterminer le 90° avec une règle de proportionnalité.

2.2.2. Paramètres d'acquisition et de traitement

Le nombre de scans est fixé à 2 correspondant au nombre de scans minimum pour respecter le cycle de phase. Le temps de mélange (TM) et le temps d'écho (TE) sont choisis à 10 et 8 ms, respectivement, comprenant un temps d'acquisition de 2 ms. Les gradients g_1 et g_2 ont une durée de 1 ms avec une puissance de 7,5 G/cm et le gradient g_0 dure 5 ms avec une puissance de 40 G/cm. Le temps de relaxation entre chaque scan a été fixé à 3 s.

Les données ont été acquises sur un aimant Bruker connecté à une console Pulse RS²D. Une sonde DUAL+ ¹H/¹³C ATMA grad-Z 5 mm a été accordée à 400,15 et 100,62 MHz pour les calibrages ¹H et ¹³C, respectivement. Le traitement a été réalisé sur le logiciel SPINit, implémenté sur la console.

Le traitement des données a été optimisé en collaboration avec l'entreprise RS²D afin de donner directement la valeur de l'angle β . L'algorithme détermine le maximum des deux échos et calcule le rapport correspondant ainsi que l'angle β . Ensuite, une règle de proportionnalité est utilisée pour donner la durée du 90° .

2.3. Evaluation des résultats

Les résultats sont évalués en fonction de leur précision et de leur justesse. La précision est donnée par le coefficient de variation calculé sur 5 mesures successives. La justesse est décrite

comme le biais représenté par la différence relative entre la valeur donnée par la nutation (PW_{90}^{Nut}) et la séquence MISSTEC (PW_{90}^{MIS}) (Eq. 3.4). Une justesse de quelques pourcents signifie que la méthode est juste car le biais est faible.

$$Justesse (\%) = 100 \cdot \frac{(PW_{90}^{Nut} - PW_{90}^{MIS})}{PW_{90}^{Nut}} \quad (3.4)$$

Afin d'obtenir une valeur de PW_{90}^{Nut} , une fonction d'ajustement a été ajoutée sur le logiciel de traitement ^[39] (Eq. 3.5). Elle permet d'extraire facilement les valeurs de 90°, 180° et 360° (Figure 61).

$$h(PW, I_0, PW_{90}, a_0, a_1, b_0, b_1, b_2) = I_0 \times \sin\left(\frac{\pi \times (b_0 + b_1 PW + b_2 PW^2)}{2 \times PW_{90}}\right) + \exp(-a_0 PW - a_1 PW^2) \quad (3.5)$$

où b_0 , b_1 , b_2 , a_0 et a_1 sont des coefficients réels, I_0 l'amplitude du signal, et PW la durée de l'impulsion.

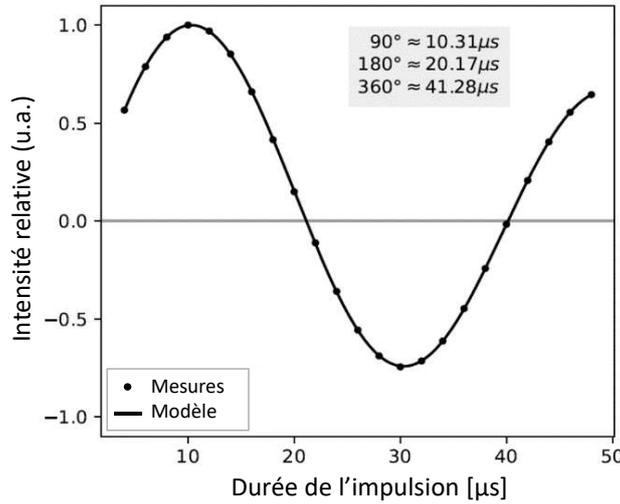


Figure 61 : Ajustement typique d'une courbe de nutation utilisant le modèle proposé par Nagashima. ^[39]

Cette fonction est actuellement la meilleure fonction (à notre connaissance) pour ajuster une courbe de nutation car elle prend en compte tous les paramètres qui l'influencent, y compris l'inhomogénéité de B_1 . ^[39]

Les courbes de nutation ont été acquises à partir de 23 valeurs d'incrément allant de 4 à 48 µs avec entre chaque incrément une durée de 5 fois le T_1^{max} afin d'éviter la saturation partielle. Les valeurs de T_1 ont été déterminées à l'aide d'une séquence d'inversion-récupération et en suivant le protocole proposé par Akoka *et al.* ^[128]

2.4. Optimisation du traitement des données

Plusieurs traitements ont été évalués afin de donner la meilleure précision et justesse sur une même série de données. Un algorithme avec un pourcentage d'une zone d'intégration a été implémenté sur le logiciel. Ce pourcentage représente la zone d'intégration qui est centrée sur

les échos. Plus ce pourcentage est élevé et plus la zone est importante. Notre choix s'est porté sur le test de 4 méthodes de traitement :

- Le maximum des intensités des signaux en magnitude
- Une zone d'intégration de 20% de la gamme spectrale en magnitude
- Une zone d'intégration de 15% de la gamme spectrale en magnitude
- Intégration des signaux sur la partie réelle

Les résultats montrent une meilleure précision pour des angles proches de 90°, quelle que soit la méthode de traitement utilisée (Figure 62a). Une précision inférieure à 0,2% est obtenue pour un angle β d'environ 80°. Cependant, une différence au niveau de la justesse est observée entre les différentes méthodes (Figure 62b). L'intégration des signaux sur la partie réelle montre une justesse supérieure à 7%. L'utilisation d'une zone d'intégration donne des résultats différents dépendant du pourcentage utilisé. Les zones d'intégration de 20 et 15% montrent une meilleure justesse autour de 60° avec -1,1% et 0,04% respectivement, cet angle correspondant au maximum de l'intensité pour l'écho stimulé (Figure 60). L'utilisation du maximum d'intensité est juste autour de 80° à 0,9%, où l'écho de spin est maximum (Figure 60). Les mesures ne peuvent pas être réalisées à 90° car l'écho stimulé est nul.

Les résultats montrent que pour être précis et juste au même angle, il faut utiliser un traitement de données utilisant le maximum des intensités. De plus, il est plus facile à mettre en place que les zones d'intégration qui sont dépendantes de la largeur de la zone d'intégration. Pour le reste des résultats montrés dans ce manuscrit, les données ont été traitées en prenant le maximum de chaque pic sur la partie en magnitude avec un angle β de 80°.

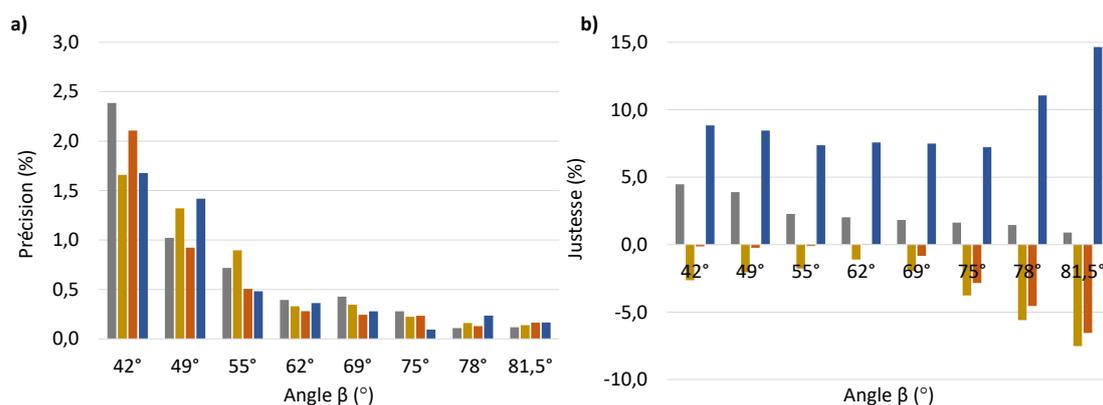


Figure 62 : Variation de la précision (a) et de la justesse (b) en fonction de la méthode du traitement : le maximum des intensités (■), une zone d'intégrale de 20% (■), une zone d'intégrale de 15% (■), ou l'intégration des signaux sur la partie réelle (■).

2.5. Impact de l'accord de sonde

Afin d'évaluer différents accords de sonde et donc différents calibrages, 4 solutions D₂O:H₂O (90:10) ont été réalisées avec des concentrations en sel (NaCl) croissantes : 0 ; 0,5 ; 2 et 4 mol/L.

Le PW_{90}^{Nut} augmente avec la concentration en sel (Tableau 5). En effet, l'addition de sel modifie la susceptibilité magnétique de l'échantillon et la conductivité des solutions entraînant un changement de l'accord de sonde, des calibrages et également des T_1 .

Tableau 5 : Les valeurs de PW_{90}^{Nut} et T_1 en fonction de la concentration en NaCl. Les PW_{90}^{Nut} ont été mesurés avec la même puissance RF. T_1 est le temps de relaxation longitudinale des protons de l'eau.

Ratio D ₂ O:H ₂ O	NaCl concentration (mol/L)	T_1 (s)	PW_{90}^{Nut} (μs)	PW_{90}^{MIS} (μs)
90:10	0	8,45	10,31	10,24
	0,5	10,71	11,82	11,72
	2	15,1	14,01	13,88
	4	15,23	15,40	15,26

Les PW_{90}^{MIS} mesurés pour chaque échantillon ont montré une bonne précision et justesse par rapport aux PW_{90}^{Nut} (Figure 63) : une précision et justesse inférieures à 0,2 et 1% respectivement.

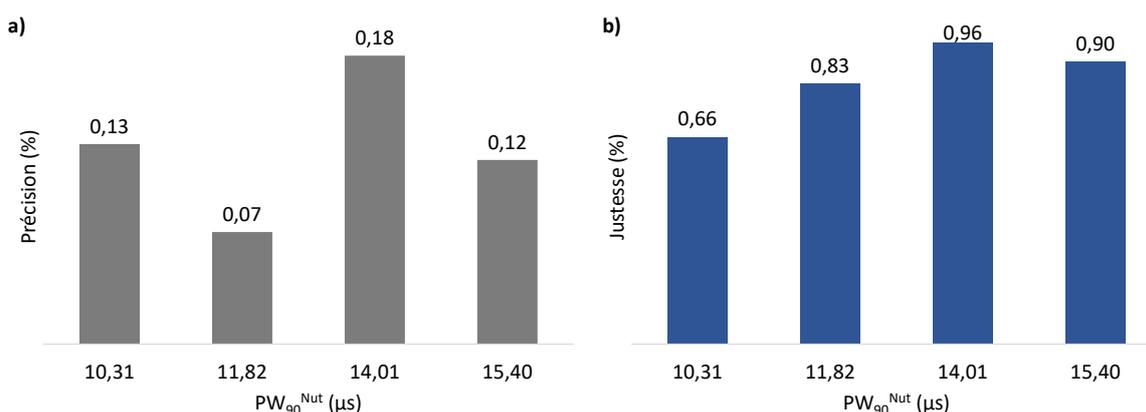


Figure 63 : Précision (a) et justesse (b) des PW_{90}^{MIS} pour différents PW_{90}^{Nut} induits par des variations de NaCl (de gauche à droite : 0 ; 0,5 ; 2 ; et 4 mol/L).

2.6. Impact du radiation damping

Le radiation damping peut perturber la quantification d'un signal (Cf. Chapitre I) et par conséquence, impacter le résultat de la nutation en induisant une distorsion de la courbe de nutation. [46] Ainsi, il n'est pas possible d'obtenir une valeur exacte du PW_{90} en présence de radiation damping. [151]

Un tube avec une concentration D₂O:H₂O (40:60) a été préparé, et le spectre ¹H montre un haut niveau de radiation damping. Une précision de 0,07% a été obtenue sur les calibrages donnés par la séquence MISSTEC. Le radiation damping rend impossible la mesure du PW_{90}^{Nut} sur cet échantillon. Cependant, l'accord de sonde n'a pas changé entre la préparation 90:10 et 40:60, nous pouvons donc supposer que les valeurs de PW_{90}^{Nut} sont très proches pour ces 2

préparations. Avec cette hypothèse, la justesse mesurée pour cet échantillon n'est pas significativement différente de 0% pour la préparation 40:60.

Dans la séquence MISSTEC, les aimantations pendant l'acquisition sont dispersées grâce à un gradient, entraînant une immunité face au radiation damping. En revanche, si le volume d'eau est encore augmenté (préparation avec un rapport 10:90 (D₂O:H₂O)), le signal est trop élevé et cela induit une saturation du récepteur. Ce même problème est observé avec la nutation. Dans cette situation, le seul calibrage possible est de déterminer la durée de l'impulsion de 360° en réalisant une nutation proche de cette valeur. Une valeur approximative pour le PW_{90} est alors obtenue. [39]

2.7. Calibrage des impulsions de faible puissance

Des impulsions RF avec une faible puissance sont couramment utilisées en RMN, notamment pour le découplage. Leur durée peut être calculée à partir du PW_{90} mesurée sur une impulsion avec une puissance élevée ; mais la justesse dépend fortement de la linéarité de l'amplificateur RF présent dans le spectromètre. La séquence MISSTEC a été testée pour calibrer expérimentalement ces impulsions. Une corrélation entre la séquence MISSTEC et la nutation a été obtenue pour des impulsions comprises entre 10 et 100 μ s (Figure 64). Un R^2 de 0,99996 démontre l'excellente précision des résultats obtenus pour les différentes durées testées, de plus, la pente est proche de 1 (0,99205) et l'ordonnée à l'origine proche de 0 (0,03913) traduisant une bonne justesse.

Les impulsions de faible puissance peuvent donc être calibrées avec la séquence MISSTEC sans la nécessité d'avoir un amplificateur linéaire, en effet, les mêmes puissances sont utilisées dans les expériences contenant ces impulsions. Des impulsions supérieures à 100 μ s n'ont pas été testées, mais la seule limite est que le temps de mélange doit être significativement inférieur aux temps de relaxation longitudinale.

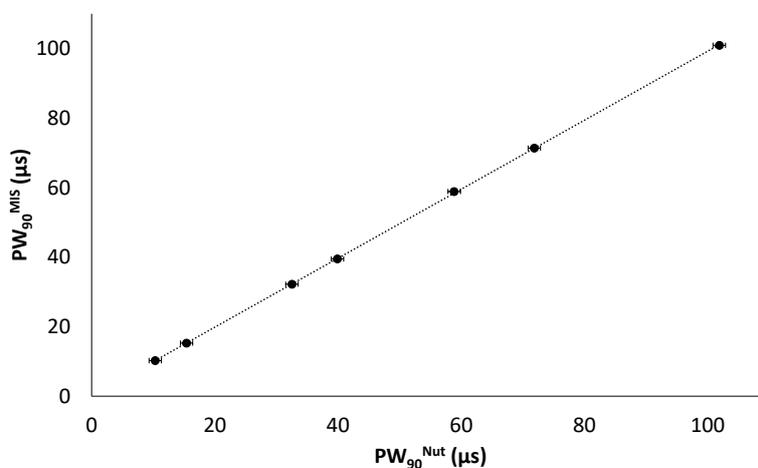


Figure 64 : Corrélation des résultats entre la nutation (PW_{90}^{Nut}) et la séquence MISSTEC (PW_{90}^{MIS}) pour des valeurs de PW_{90} de 10 à 100 μ s. Les résultats ont été obtenus sur la préparation 90:10 (D₂O:H₂O). $PW_{90}^{MIS} = 0,99205 \cdot PW_{90}^{Nut} + 0,03913$ avec $R^2 = 0,99996$.

2.8. Echantillons réels

Des échantillons d'ibuprofène et de diacétone-D-glucose (DAGF) ont été préparés afin d'évaluer les performances de la séquence MISSTEC avec des conditions plus réelles que les préparations de D₂O:H₂O qui ne contiennent qu'une seule résonance. 20 mg d'ibuprofène et 200 mg de DAGF ont été solubilisés dans 600 µL de chloroforme-*d*₁ et de DMSO-*d*₆, respectivement. Les résultats ont montré une justesse de -0,15% pour l'ibuprofène et -0,40% pour le DAGF (Tableau 6). Une précision meilleure que 0,1% a été obtenue pour les deux échantillons.

Tableau 6 : Résultats de la justesse sur l'ibuprofène et le diacétone-D-glucose entre les méthodes de nutation (PW_{90}^{Nut}) et la séquence MISSTEC (PW_{90}^{MIS})

	PW_{90}^{Nut} (µs)	PW_{90}^{MIS} (µs)	Justesse (%)
Ibuprofène	10,35	10,37	-0,15
Diacétone-D-glucose	10,00	9,96	-0,40

2.9. Comparaison avec d'autres méthodes rapides : la séquence PulsCal et le 360°/4

La séquence PulsCal a été proposée en 2005 pour déterminer rapidement le PW_{90} .^[152] Dans cette séquence, des petits angles sont appliqués plusieurs fois et l'accumulation du signal donne un pseudo FID. La TF donne la fréquence de nutation et également le PW_{90} . Une autre méthode rapide pour déterminer le PW_{90} est l'utilisation de l'annulation observée à PW_{360} , et diviser la durée par 4 afin de connaître le PW_{90} . Ces deux méthodes sont rapides car le délai de relaxation peut être court par rapport à la valeur du T_1^{max} . Cependant, la séquence PulsCal ne semble réellement efficace qu'avec une résonance dominante, par exemple un échantillon dans l'eau et un solvant fortement protoné. La méthode du $PW_{360}/4$ est très dépendante de l'opérateur puisque le point d'annulation est estimé visuellement ; de plus, la valeur obtenue est approximative.^[39]

La séquence MISSTEC a été comparée aux 2 autres méthodes décrites précédemment, avec les préparations contenant différentes concentrations de sel : 0 ; 0,5 ; 2 et 4 mol/L, afin de modifier l'accord de sonde et donc obtenir différentes valeurs de PW_{90} (Figure 65). La justesse obtenue avec la séquence MISSTEC est meilleure que 1% pour toutes les préparations. Pour la séquence PulsCal et la méthode $PW_{360}/4$, la justesse est d'environ 1,5% et 2,5%, respectivement.

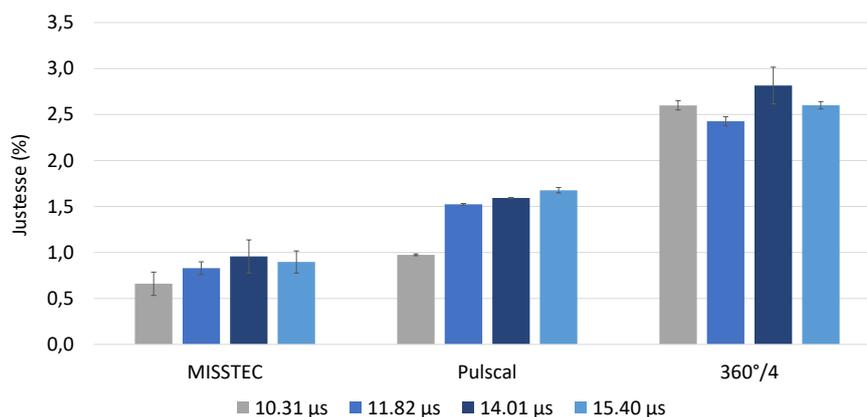


Figure 65 : Justesse du PW_{90} avec différentes méthodes : MISSTEC, PulsCal et le $360^{\circ}/4$ pour 4 différentes concentrations de NaCl (de gauche à droite : 0 ; 0,5 ; 2 et 4 mol/L). PW_{90}^{Nut} est respectivement 10,31 (■), 11,82 (■) ; 14,01 (■) ; et 15,40 μs (■). Les barres d'erreur correspondent à la précision calculée sur 5 répétitions successives.

2.10. Calibrage du ¹³C

La séquence MISSTEC a également été appliquée pour le calibrage du ¹³C. Réaliser une courbe de nutation pour le ¹³C est plus fastidieux que pour le ¹H à cause des longs T_1 , et de la faible sensibilité de ce noyau due à sa faible abondance isotopique et un faible rapport gyromagnétique. Toutes ces contraintes augmentent le temps expérimental. Un calibrage sur le solvant peut être un compromis pour les échantillons de faible concentration, néanmoins les T_1 des solvants sont souvent plus longs que ceux de l'échantillon.

Afin d'adapter cette nouvelle séquence à ce noyau, le nombre de scans et le temps de relaxation ont été augmentés dans le but d'augmenter le S/B. Une étape dans le traitement des données a également été ajoutée. Une fonction sinusoïdale à la puissance 4 a été appliquée dans le domaine fréquentiel après une TF ; puis après une TF inverse, le signal observé présente un S/B augmenté.

La séquence a été testée sur le cyclohexane avec une concentration de 7,7 mol/L (Figure 66). L'angle β optimal pour obtenir la meilleure justesse et précision a été trouvé autour de 70° avec 0,6 et 0,8%, respectivement.

Cette séquence a été également évaluée sur le méthanol (Figure 67) avec un résultat similaire pour un angle β optimal autour de 70° . Ce résultat a été obtenu en augmentant le nombre de scans, en effet, le cyclohexane est constitué de 6 carbones équivalents comparés à seulement 1 pour le méthanol.

Le calibrage du ¹³C est comparable en termes de justesse et de précision à celle du ¹H. Cependant, deux différences ont été observées : (i) un nombre de scans plus élevés associé à un traitement de données (afin de compenser une sensibilité plus faible) et (ii) une valeur optimale pour β qui est plus faible (70°).

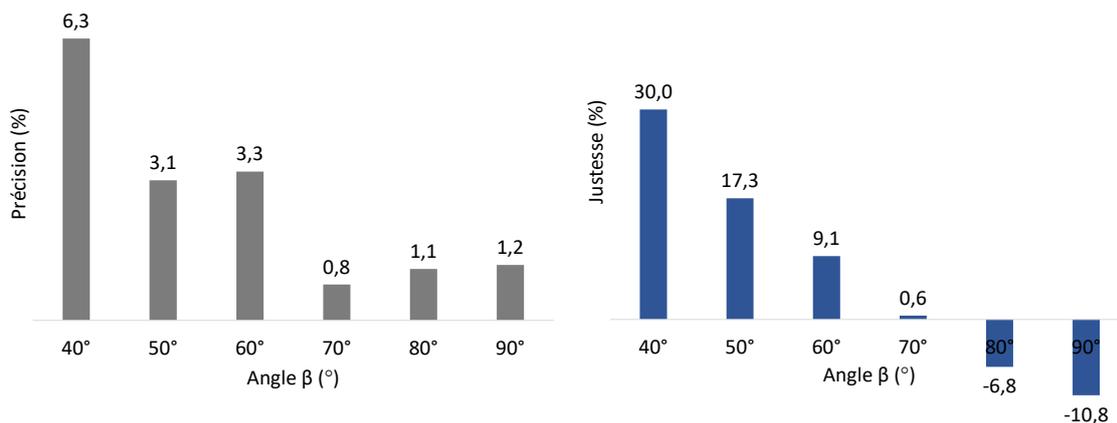


Figure 66 : Précision et justesse de la séquence MISSTEC sur le calibrage de l'impulsion ¹³C avec différents angles β . Ces résultats ont été obtenus sur 600 μ L de cyclohexane dans 120 μ L de solution de Cr(acac)₃ à 0,1 mol/L dans de l'acétone-d₆.

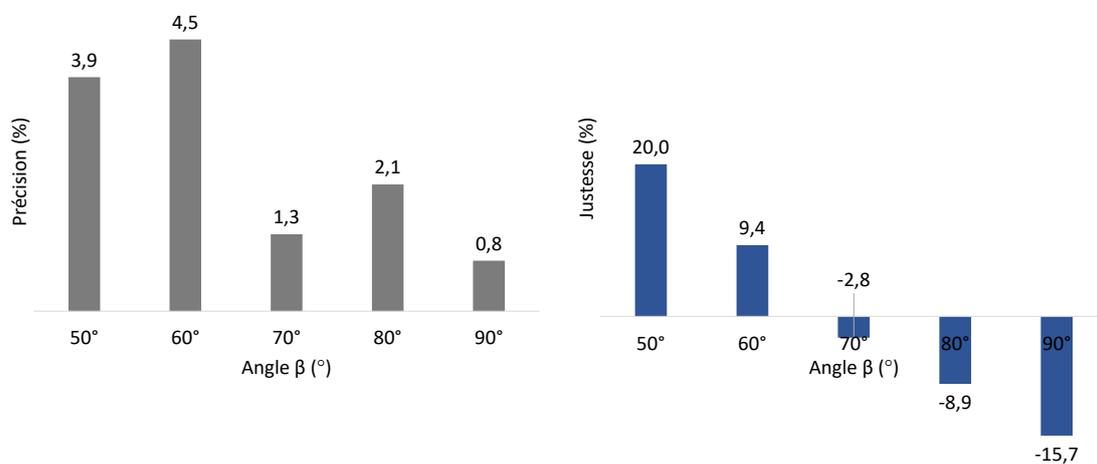


Figure 67 : Précision et justesse de la séquence MISSTEC sur le calibrage de l'impulsion ¹³C avec différents angles β . Ces résultats ont été obtenus sur 500 μ L de méthanol dans 120 μ L de solution de Cr(acac)₃ à 0,1 mol/L dans de l'acétone-d₆.

2.11. Conclusion

La séquence MISSTEC a été évaluée pour calibrer les impulsions RF rapidement. Pour le calibrage ¹H, une bonne justesse et précision a été obtenue avec un temps d'expérience égal à 8 s avec différentes conditions : différents échantillons, et concentration, pour des impulsions avec des puissances élevées et faibles, et avec du radiation damping. L'angle β optimal a été trouvé autour de 80°. La comparaison avec d'autres méthodes rapides a révélé une meilleure justesse pour la séquence MISSTEC.

L'application de la séquence MISSTEC sur le ¹³C a montré une bonne justesse et précision mais pour un temps expérimental de 2 minutes. L'angle β optimal a été déterminé autour de 70°. Afin de réduire le temps d'analyse, une séquence avec une détection inverse pourrait être imaginée.

Cette séquence peut être complètement automatisée (indépendance de l'opérateur) et être utilisée en routine avant n'importe quelle expérience de RMN. Il est par exemple possible d'insérer cette étape entre la routine de shims et les expériences.

3. Analyse isotopique intramoléculaire du cholestérol : optimisation de la séquence asHSQC et évaluation de la précision

L'optimisation de la séquence asHSQC a été réalisée sur le cholestérol pour l'authentification des fromages. Le cholestérol a un rôle important dans l'organisation et la stabilité cellulaire. C'est un important biomarqueur ^[153,154] pour les diagnostics cliniques. ^[155]

Le $\delta^{13}C$ global (mesuré par *irm-MS*) du cholestérol présent dans les os humains permet de connaître le régime alimentaire le plus récent de l'individu. ^[156-159] Cependant, l'*irm-MS* ne permet qu'une mesure isotopique globale du cholestérol. Une approche par PSIA permet d'obtenir plus de variables. L'*irm-¹³C NMR* sur le cholestérol a été précédemment réalisée avec la séquence INEPT adiabatique ^[160] pour étudier l'origine des œufs. Dans cette étude, 90 mg de cholestérol étaient nécessaires pour atteindre la précision de 1‰. Les carbones C22, C4, C26/C27 et C12 ont permis de discriminer l'origine des échantillons ; les carbones C12 et C25 la race de la poule ; et les carbones C21, C7, C9, C24, C14 et C20 le système de culture. Toutefois, cette quantité de produit reste trop importante pour effectuer des analyses sur des produits laitiers, du fait d'une plus faible concentration en cholestérol.

La séquence asHSQC permet de pallier le manque de sensibilité de l'analyse et permet de diminuer la LOQ. Ainsi, l'évaluation de la précision a été réalisée sur 20 mg de cholestérol commercial.

3.1. Préparation et analyse du cholestérol

Les analyses ont été menées sur un spectromètre Burker Avance III 700 MHz équipé d'une sonde cryogénique inverse. Cette configuration permet d'augmenter la sensibilité par rapport à une configuration classique pouvant être utilisée en isotopie. Une solution de cholestérol à 86,2 mmol/L dans du chloroforme- d_1 (20 mg dans 600 μ L) est préparée, puis filtrée dans un tube de 5 mm de haute qualité. Les expériences ont été réalisées à 288 K.

3.2. Evaluation de la précision

3.2.1. Calcul de la précision

La fraction molaire de chaque signal est calculée pour chaque position i à partir du volume des signaux (Eq. 3.6).

$$f_i = \frac{V_i}{\sum_1^n V_i} \quad (3.6)$$

où n représente le nombre de signaux, soit le nombre d'isotopomères observables de la molécule de cholestérol.

La précision est évaluée par le coefficient de variation sur chaque f_i à partir de la moyenne et de l'écart-type de 3 répétitions, elle est exprimée en %. Les coefficients de variation minimal (CV^{min}), moyen (CV^{moy}) et maximal (CV^{max}) sont déterminés correspondant à la valeur minimal, maximal et la moyenne des CV . L'optimisation des paramètres a été réalisée sur la base de ces trois CV .

3.2.2. Traitement du signal et intégration

Les spectres RMN ont été traités à l'aide du logiciel TopSpin 4.0.5. Avant la transformation de Fourier, des fonctions cosinoïdale et trapézoïdale (TM1 = 0 et TM2 = 0,5) ont été appliquées dans les dimensions ¹H et ¹³C, respectivement. Du *zero-filling* a été appliqué afin d'obtenir un nombre de points finaux à 8192 points en ¹H et 2048 points en ¹³C.

L'intégration des signaux est réalisée sur le logiciel Topspin 4.0.5. Les zones d'intégration impactent les résultats, elles ont donc été déterminées pour que les bornes dans les deux dimensions correspondent à 5% du signal central. Une fois déterminé, le fichier d'intégrales est enregistré et utilisé pour chaque spectre. Ce fichier est dépendant de la molécule à étudier. Dans chaque zone d'intégration, le logiciel somme tous les points permettant d'obtenir une valeur d'intégrale correspondant au volume du signal.

Un décalage entre les spectres et le fichier d'intégrale peut être observé. En effet, un décalage sur le déplacement chimique sur la gamme ¹³C entière, entraîne en combinaison avec le repliement spectral un décalage sur le spectre final. Afin de remédier à ce problème, un ajustement des spectres a été réalisé. Trois spectres ont été enregistrés par session et chaque spectre a été traité trois fois (principalement pour compenser les imperfections de l'alignement spectral), ce qui a conduit à neuf valeurs pour chaque mesure.

3.3. Optimisation du temps d'expérience

3.3.1. Optimisation de la gamme spectrale

Cette séquence est réalisée avec un repliement spectral afin de réduire le nombre d'incrémentes dans la dimension indirecte (Cf. Chapitre I). Une première étape d'optimisation consiste à déterminer les fréquences d'excitation ¹H et ¹³C adéquats pour éviter des recouvrements et la troncature des signaux. En effet, le repliement impact la position des signaux dans la dimension indirecte et il est possible d'obtenir des signaux trop proches ou en partie sur les bords de la fenêtre spectrale. Pour cette molécule, les fréquences d'excitation ont été optimisées à 4 ppm et 38,5 ppm avec une gamme spectrale de 7,99 et 12 ppm pour le ¹H et le ¹³C, respectivement

(Figure 68). La fréquence d'excitation est redécalée avant le découplage afin que la fréquence de découplage soit positionnée au centre de la gamme spectrale ¹³C. Dans le cas du cholestérol, la constante est égale à 7618 Hz, ce décalage permet d'obtenir une fréquence de découplage à 80 ppm.

L'attribution des signaux de la molécule est faite en combinant une HSQC sur toute la gamme ¹³C (sans repliement) et une attribution déjà réalisées sur le spectre ¹³C du cholestérol. [160] Les carbones quaternaires ne sont pas visibles sur le spectre.

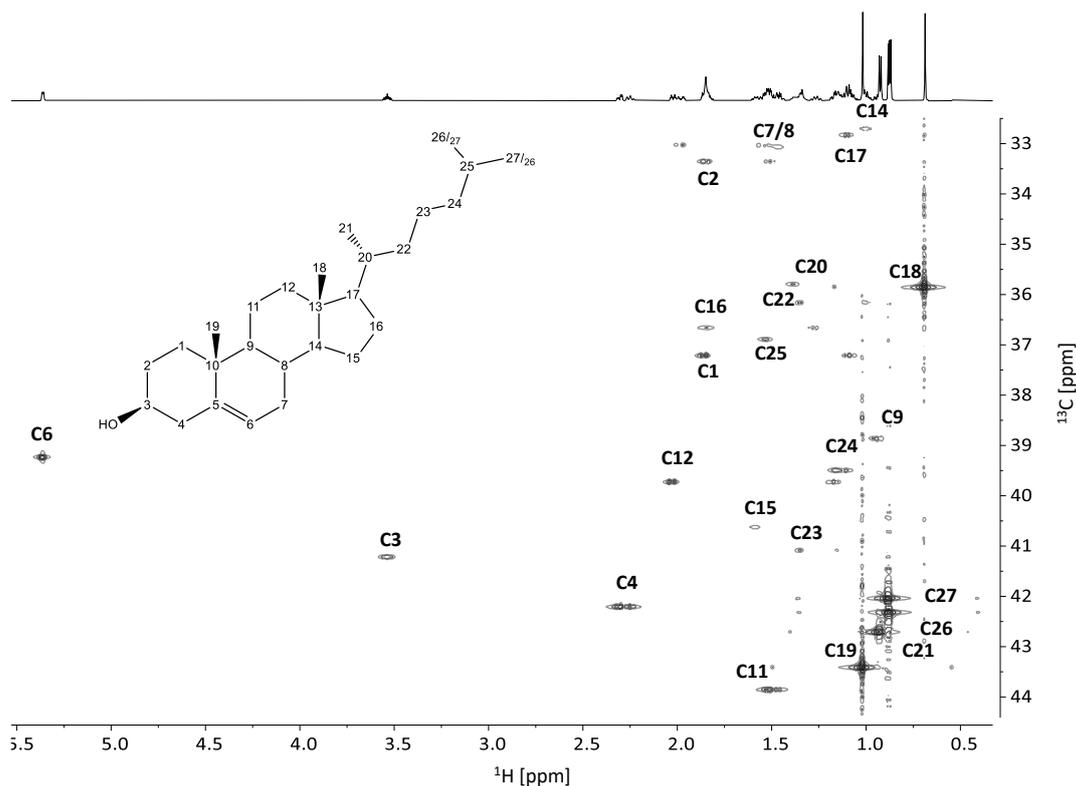


Figure 68 : Spectre asHSQC (¹H-¹³C) obtenu à partir de 10 mg de cholestérol et enregistré à 700,28 MHz avec une sonde cryogénique en 31 min, en utilisant le repliement spectral : seulement 12 ppm dans la dimension ¹³C avec 50% de NUS. La température de l'échantillon a été fixée à 288 K.

3.3.2. Variable Recycling Time (VRT)

Le VRT est utilisé pour réduire le temps d'analyse en réduisant le temps de répétition à chaque incrément au cours de l'expérience (Cf. Section 1.2 de ce chapitre). Il est caractérisé par un temps fixe (τ_f) et un temps variable (τ_v). Le cholestérol a un T_1^{max} (¹H) égal à 1,4 s. Le premier incrément est réalisé avec la somme de τ_v et τ_f égale à 7 fois le T_1^{max} soit 10 s dans le cas du cholestérol. L'utilisation du VRT entraîne donc une variation du TR (temps de répétition). L'utilisation du VRT a montré un gain de précision sur les fractions molaires tout en divisant le temps d'expérience par deux (Figure 69).

Le temps expérimental dépend des valeurs du TR qui sont conditionnées par le TR_{min} et les paramètres de la fonction VRT. La valeur du TR_{min} est essentiellement régit par le temps

d'acquisition et le τ_f (Figure 55). La Figure 70 montre que plus le τ_f et l'acquisition sont courts et meilleur est le CV^{moy} . Une valeur de 0,2 s pour τ_f est la valeur minimale autorisée par ce spectromètre, et un temps d'AQ inférieur à 0,1 s induit des artefacts de troncature.

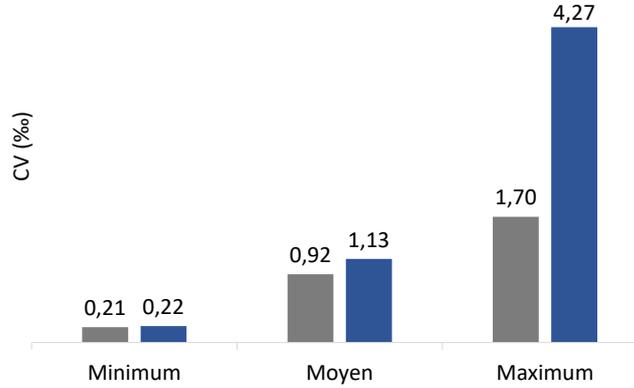


Figure 69 : Valeurs minimale, moyenne et maximale de CV (%) des f_i , avec VRT en 42 min (■), ou sans VRT en 1 h 32 (■).

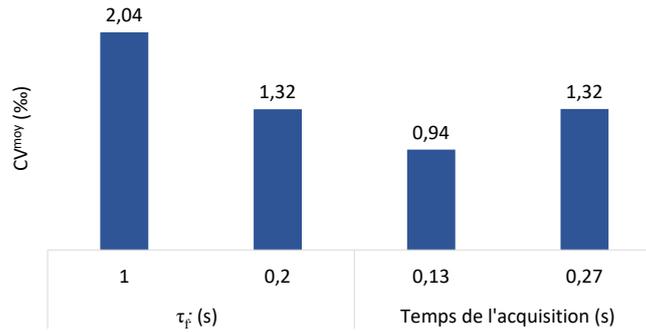


Figure 70 : Valeur de moyenne des CV (%) pour différents τ_f et durée d'acquisition.

La fonction pour définir la variation du temps τ_v est donnée avec l'équation (Eq. 3.7).

$$\tau_v = \left(u \cdot e^{(-\pi \cdot i^2 \cdot g) + (1-u) \cdot \left(\frac{1-i}{N_1-1} \right)} \right) (7 \times T_1^{max} 1H - \tau_f) + \tau_f \quad (3.7)$$

avec, i la position de l'incrément au cours de l'expérience, N_1 le nombre d'incrément, τ_f le temps fixe, et $T_1^{max} 1H$ la valeur du T_1^{max} proton. Les valeurs u et g sont des paramètres choisis par l'utilisateur afin d'obtenir différentes variations du temps τ_v . Trois listes avec des variations différentes ont été évaluées (Figure 71a). Les paramètres de chacune des fonctions sont donnés dans le Tableau 7. Les valeurs des listes sont données en annexe 2. Le CV^{min} et CV^{moy} ne présentent pas de différence significative entre les différentes listes (Figure 71b). Cependant, un CV^{max} de 3,35 ; 2,11 et 2,75% ont été obtenus pour les listes 1 ; 2 et 3, respectivement. La

liste 2 permet de diminuer le temps d'expérience d'un facteur de 2,2. Cette liste a donc été privilégiée pour la suite de l'optimisation.

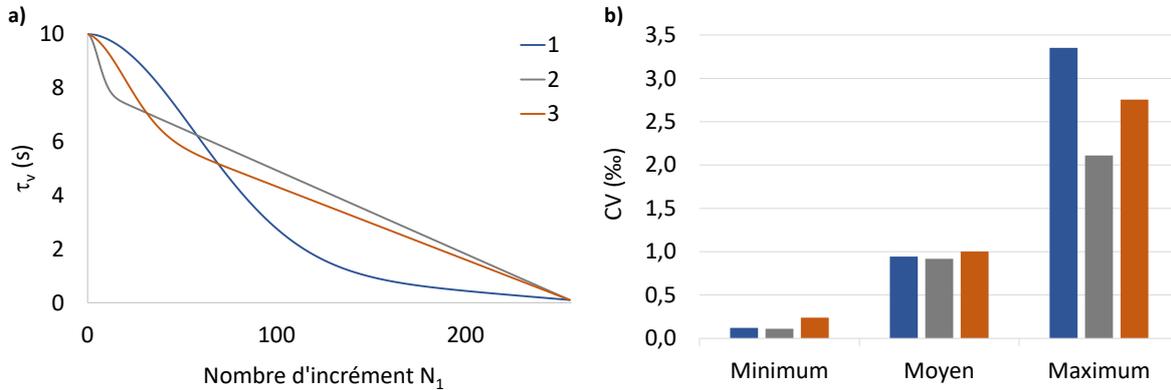


Figure 71 : a) Variation des différentes listes τ_v : 1 (■), 2 (■), et 3 (■) ; b) Valeurs minimal, moyenne et maximal de CV (%) des 3 listes de τ_v .

Tableau 7 : Paramètres des différentes listes de τ_v .

N° liste	N_1	τ_v^{min} (s)	u	g
1	256	0,1	0,85	0,00005
2	256	0,1	0,2	0,005
3	256	0,1	0,3	0,00004

3.3.3. Echantillonnage non-uniforme (NUS) et prédiction linéaire (LP)

L'échantillonnage non-uniforme et la prédiction linéaire (Cf. Chapitre I) peuvent être introduits et optimisés afin de diminuer le temps expérimental. Dans les deux cas, le nombre de points acquis est le même mais les points calculés se trouvent à des endroits différents du FID. Par conséquent, les effets de ces deux méthodes sur le CV des f_i sont différents (Figure 72).

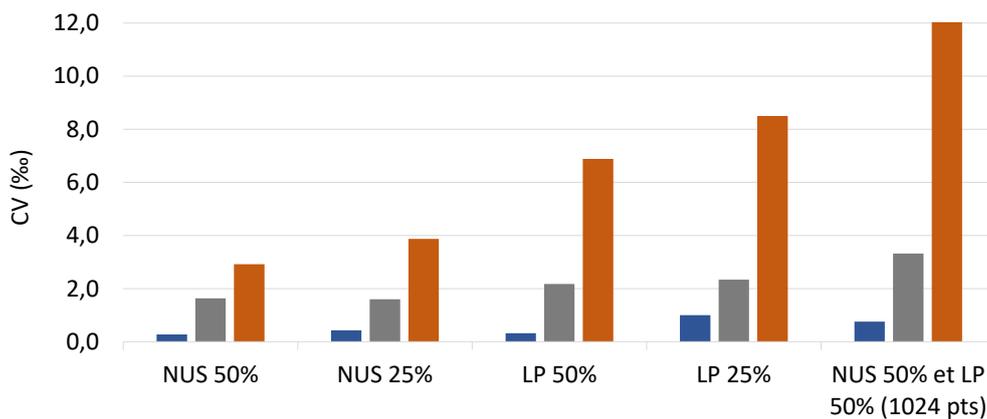


Figure 72 : Valeurs minimale (■), moyenne (■) et maximale (■) de CV (%) des f_i avec différents traitements de NUS et LP.

Les expériences ont été acquises avec un nombre total d'incrément égal à 512, donc avec 256 points acquis pour un NUS ou un LP de 50% et 128 pour un NUS ou un LP de 25%. Aucune différence significative est observée dans les valeurs CV^{min} et CV^{moy} entre le NUS (50 ou

25%) et le LP (50 ou 25%). Cependant, le CV^{max} est le critère discriminant : le CV^{max} était 1,3 fois plus élevé pour la LP que pour le NUS. Il est possible de réduire le temps expérimental en augmentant le pourcentage de points calculés afin de diminuer le nombre de points acquis, mais les résultats montrent un CV^{max} 2 fois plus élevé pour 25% que pour 50% (NUS ou LP, Figure 72). Ce résultat peut s'expliquer par un nombre trop faible de points expérimentaux, 128 points par rapport à 256 points. Par conséquent, un NUS de 50% a été choisi, ce qui correspond à une réduction supplémentaire du temps d'expérience d'un facteur 2. Une autre expérience avec 256 points acquis a été réalisée en utilisant une combinaison de NUS et LP afin d'atteindre 1024 points finaux. Les résultats présentent des valeurs CV^{moy} et CV^{max} plus élevées, probablement parce que le nombre de points théoriques est supérieur au nombre de points expérimentaux par rapport à un NUS de 50%.

Sur le logiciel de traitement des données du spectromètre, deux algorithmes peuvent être utilisés : *Iteratively Reweighted Least Squares* (IRLS) et *Iterative Shrinkage/Thresholding* (IST). Ces algorithmes sont basés sur la méthode *compressed sensing* (CS). L'algorithme IST est implémenté dans le logiciel TopSpin sans frais supplémentaires et est utilisé par défaut lors du traitement 2D. L'algorithme IRLS est un algorithme plus récent qui peut être activé avec un écho virtuel, connu pour améliorer la précision de la reconstruction dans le traitement 2D. [161] Cependant, cet algorithme n'est pas gratuit, de plus le traitement est significativement plus long. Par ailleurs, à notre connaissance il n'a jamais été utilisé pour des mesures de très haute précision.

La Figure 73a montre les valeurs de CV obtenues sur les mêmes spectres avec les deux algorithmes. Une meilleure précision a été observée avec l'algorithme IST avec des signaux plus répétables. Le CV^{max} obtenu avec l'algorithme IRLS est d'environ 8‰, contre 5‰ pour l'algorithme IST. De plus, les traitements avec l'algorithme IRLS prennent 3 fois plus de temps que l'algorithme IST pour un spectre contenant le même nombre de points. L'application de l'écho virtuel entraîne des artefacts sur le spectre (Figure 73b). En conséquence, l'algorithme IST est le meilleur choix pour le traitement de NUS pour cette application.

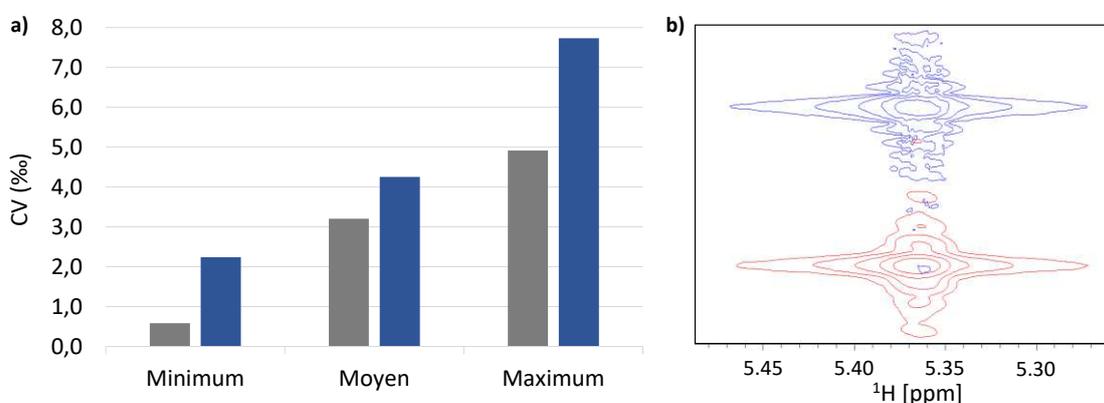


Figure 73 : a) Valeurs minimale, moyenne et maximale de CV (%) des f_i , avec l'algorithme IST (■) et IRLS (■) ; b) Comparaison du signal du C6 traité par IST (■) et IRLS avec un écho virtuel (■).

3.3.4. Nombre de scans

Ce paramètre permet d'augmenter le S/B et ainsi peut faire varier la répétabilité de la séquence. La séquence a été testée avec un nombre de scans (NS) de 2, 4 et 8. Les résultats n'ont montré aucune variation de la précision avec le nombre de scans sur le CV^{min} et le CV^{moy} , mais un CV^{max} plus élevé pour 8 scans a été obtenu (Figure 74).

Dans ces conditions expérimentales, le NS ne semble pas être un facteur limitant et son augmentation n'induit pas une réduction de la précision. L'augmentation du CV^{max} avec un NS de 8 peut être provoquée par une instabilité du spectromètre au cours du temps. Les expériences longues y sont plus sensibles, ce qui entraîne une augmentation des CV, alors que les expériences courtes sont moins sensibles à ces instabilités. Dans ce cas, les expériences courtes montrent une meilleure précision, tant que le S/B et la résolution sont suffisants pour quantifier les signaux avec la précision visée.^[56,137,138] Un NS de 2 est suffisant pour obtenir la précision visée donnant un temps d'analyse pour un spectre de 31 minutes.

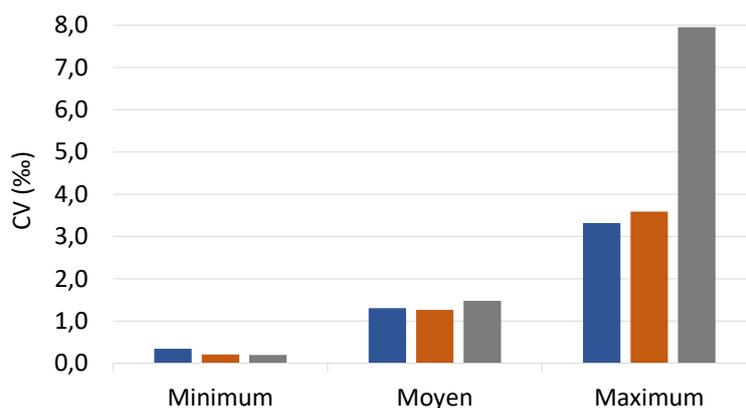


Figure 74 : Valeurs minimale, moyenne et maximale de CV (%) des f_i , avec un nombre de scan égal à 2 (■), 4 (■) et 8 (■).

3.4. Pure-shift

Le pure-shift est utilisé dans des séquences 1D et 2D pour supprimer des couplages ¹H-¹H afin d'augmenter la résolution.^[162] Ainsi, ce segment a été testé dans la séquence asHSQC. Les résultats ont montré des valeurs de CV plus élevées que sans le segment de pure-shift (Figure 75), probablement, car le nombre d'impulsions a été augmenté et une dissymétrie a été ajoutée.

3.5. Concentration en cholestérol

Les optimisations décrites dans les sections précédentes ont été réalisées avec 20 mg de cholestérol. L'effet de la concentration a été étudié afin de déterminer la quantité minimale de cholestérol pouvant être analysée tout en maintenant une précision de quelques pour mille. Il est possible d'analyser 10 mg de cholestérol en utilisant un tube RMN standard de 5 mm avec des résultats très satisfaisants (Figure 76a).

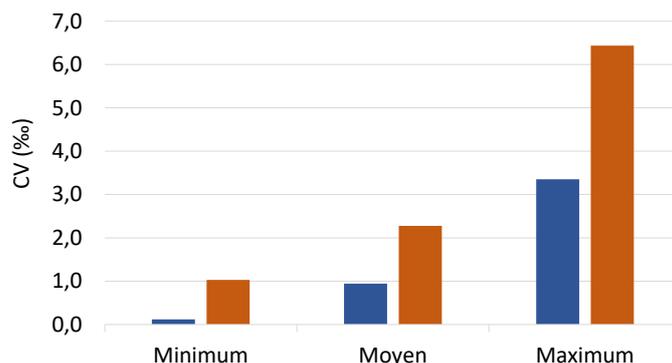


Figure 75 : Valeurs minimale, moyenne et maximale de CV (%) des f_i , avec sans (■) et avec (■) le segment pure-shift.

L'utilisation d'un tube Shigemi permet de diminuer le volume de la solution, ainsi la quantité du composé à analyser peut-être réduite. ^[17] Les résultats montrent qu'avec ce tube, 5 mg de cholestérol (la moitié de la quantité utilisée avec un tube RMN standard) sont analysables tout en gardant les autres paramètres inchangés (Figure 76b).

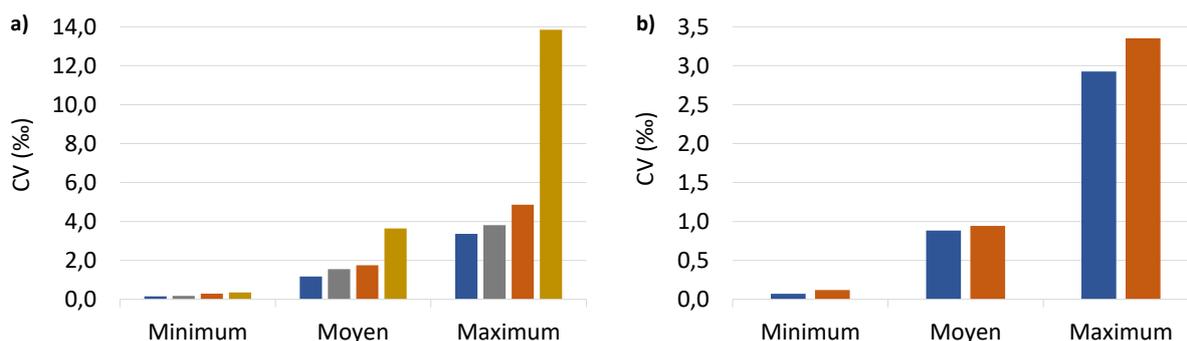


Figure 76 : Valeurs minimale, moyenne et maximale de CV (%) des f_i , avec a) des masses décroissantes de cholestérol : 20 (■), 15 (■), 10 (■) et 5 mg (■) ; b) un tube Shigemi (■) et standard (■).

3.5.1. Application sur des échantillons réels

Afin de tester l'applicabilité de la méthode développée sur le cholestérol extrait de matrices biologiques, quatre échantillons de fromage ont été utilisés dans cette étude. Le cholestérol a été extrait en suivant le protocole donné par Haddad *et al.* ^[163] Une fois extrait, il a été analysé en utilisant la même séquence asHSQC avec le meilleur ensemble de paramètres déterminés avec le cholestérol commercial. Les valeurs des CV sont déterminées pour tous les carbones mesurés sur les 4 échantillons de fromage (22 valeurs sont obtenues au lieu de 27 car les signaux C14 et C17 se chevauchent, et les carbones quaternaires C5, C10, et C13 ne sont pas observables). Les valeurs de CV pour chaque échantillon (Figure 77) ont montré une excellente précision sur l'ensemble des positions de carbone. Les valeurs CV^{min} , CV^{moy} et CV^{max} regroupées sont respectivement de 0,79 ; 1,36‰ et 2,33‰.

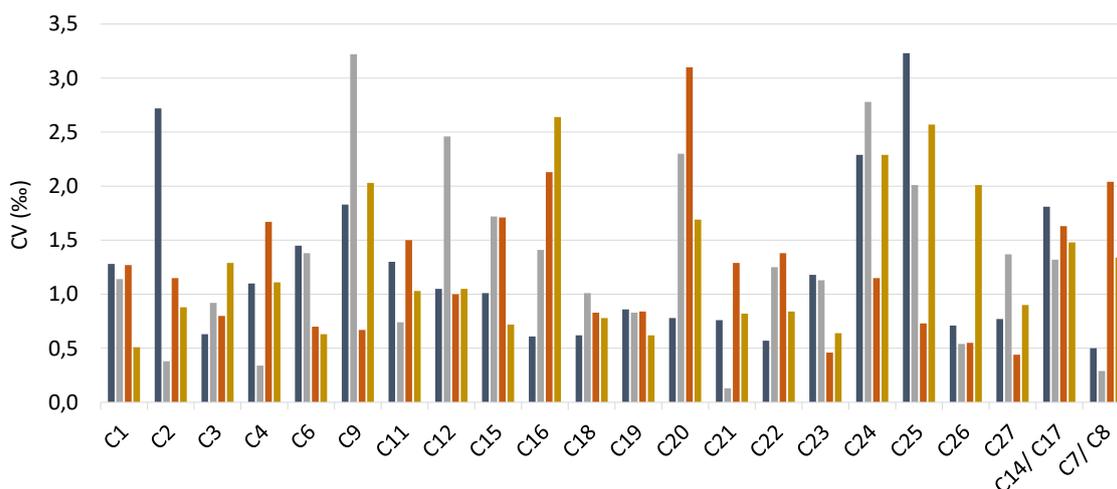


Figure 77 : Valeur de CV (%) pour tous les carbones du cholestérol sur 4 échantillons différents.

Un travail préliminaire sur 51 échantillons de fromage a été réalisé dans le cadre de la thèse de Lenny Haddad. ^[164] Différents échantillons de fromage ont été collectés en fonction de l'espèce productrice et l'origine géographique. Les carbones C19, C1 et C9 permettent de discriminer l'origine géographique ; les carbones C27, C16, C20, C1, C9, C6 séparent les fromages provenant de lait de vache et de chèvre/brebis ; les carbones C18, C21, C23, C6 et C11 séparent les fromages de brebis et de chèvre. Ainsi, l'asHSQC a permis d'authentifier les fromages en fonction de l'espèce productive, de la zone géographique et du type de fromage.

3.6. Conclusion

La séquence asHSQC a été développée pour réduire le temps d'analyse ou la quantité de produit analysable. Afin de réduire le temps d'analyse, le VRT, le repliement spectral et le NUS ont été utilisés et optimisés. L'application de cette séquence a permis de diminuer la quantité de produit analysable à 10 mg pour un tube normal et à 5 mg avec l'utilisation d'un tube Shigemi pour une molécule relativement grosse comme le cholestérol. Les CV obtenus pour la plupart des carbones étaient inférieurs à 3% (10 carbones avec un CV inférieur à 1%, 7 carbones entre 1 et 3% et 6 entre 3 et 5%). Ces résultats ont été obtenus avec un temps expérimental de seulement 31 min par spectre, alors qu'un spectre INEPT adiabatique aurait pris 16 heures pour la même quantité de cholestérol, donc 31 fois plus de temps. La méthode optimisée a ensuite été testée sur du cholestérol extrait d'échantillons de fromage. Une excellente précision, du même ordre de grandeur qu'avec le cholestérol commercial, a été observée sur toutes les positions de carbone de la molécule. Ces valeurs sont suffisantes pour observer des discriminations entre origines des échantillons de fromages.

Ce développement permet d'avancer les objectifs de cette thèse avec l'utilisation d'une séquence multi-dimensionnelle (Figure 78).

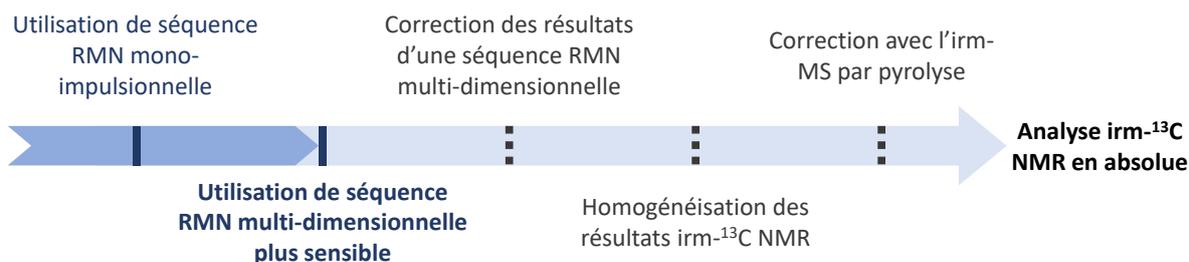


Figure 78 : Avancée dans les objectifs de la thèse avec l'utilisation de séquences RMN multi-dimensionnelles.

Enfin, la nouvelle méthodologie décrite ici peut trouver une large utilisation dans l'isotopomique des biomolécules telles que les stérols, le glucose, les acides aminés et leurs dérivés, avec des applications dans les enquêtes nutritionnelles et l'authentification des aliments.

4. Authentification de produits bio : le lait et le blé

4.1. Importance de l'authentification des produits bio

L'augmentation du commerce mondial et la forte demande de produit de qualité exigent des informations précises sur l'origine géographique et la composition des aliments. Ainsi, l'authentification des produits alimentaires a augmenté au cours de ces dernières années afin de sanctionner l'ajout de produits de qualité inférieure dans des produits haut de gamme et les erreurs d'étiquetage. Aujourd'hui, les techniques analytiques sont capables de détecter et quantifier des résidus de produits phytosanitaires, la détection des résidus de produits vétérinaires dans les produits carnés et la présence d'OGM. D'autres spécifications clé de l'agriculture biologique (exemple : rotation des cultures, recyclage des matières organiques, bien-être animal) ne peuvent être testées analytiquement à ce jour. ^[165]

Les différences dans la disponibilité de l'eau, le stress induit par la sécheresse, les conditions du sol et des engrais peuvent affecter le $\delta^{13}\text{C}$, le $\delta^2\text{H}$ et le $\delta^{18}\text{O}$ ^[166,167] du blé. Plusieurs études ont permis de discriminer des échantillons issus de l'agriculture conventionnelle et biologique en utilisant le rapport isotopique global sur de la farine de blé. ^[168,169]

Une récente étude a montré un enrichissement en ¹³C pour du lait conventionnel par rapport à du lait biologique. ^[170] En effet, le $\delta^{13}\text{C}$ du lait dépend des teneurs en isotopes stables du carbone des sources végétales utilisées pour l'alimentation des animaux. ^[171] Les vaches alimentées à partir de l'agriculture biologique reçoivent principalement des plantes de type C₃ telles que le trèfle, le seigle, le blé, mais dans les fermes conventionnelles, elles reçoivent généralement des plantes C₄ comme le maïs. ^[172] Par conséquent, la valeur $\delta^{13}\text{C}$ du lait biologique peut être inférieure à celle du lait conventionnel.

Cette partie du travail fait partie du projet TOFoo qui est financé par la Bpifrance, coordonné par Eurofins, Nantes, et porté par une dizaine de partenaires. Le but de ce projet est de développer des techniques analytiques innovantes afin de discriminer des produits issus de

l'agriculture conventionnelle et biologique sur certaines matrices d'intérêt commercial, dont le blé et le lait. Par rapport à l'analyse CSIA déjà rapportée, l'analyse par PSIA du lait et du blé permet d'augmenter le nombre potentiel de paramètres discriminatoires entre les échantillons. En cas de succès, ces analyses seront ensuite proposées pour les laboratoires de contrôle. Le nombre d'échantillons à analyser est très important, plusieurs centaines dans la phase pilote, et permet donc de sélectionner les méthodes d'analyse performante. Ainsi, le temps d'analyse doit être le plus court possible. La séquence asHSQC est donc une séquence de choix pour une analyse rapide par $irm-^{13}C$ NMR.

4.2. Compositions du lait et du blé

Le lait est composé d'eau, de matières grasses, de protéines, de lactose et de composants secondaires comme les sels minéraux et les vitamines. Le lactose est un disaccharide composé d'une molécule β -D-galactose et d'une molécule de α/β -D-glucose, qui sont reliées par une liaison osidique. Le glucose provient exclusivement de l'alimentation de l'animal, donnant alors des informations sur l'alimentation et la nature de la plante (plantes C_3 ou C_4). Le galactose est synthétisé à partir du glucose avec l'enzyme UDP-4-épimérase, conduisant à une molécule d'UDP-galactose. Le glucose et l'UDP-galactose sont transférés jusqu'à l'appareil de Golgi afin que le lactose soit synthétisé par la lactase. ^[173] Le profil isotopique du galactose pourrait être un marqueur du comportement de la vache et donc du bien-être animal associé à un élevage biologique.

Le blé est l'une des cultures céréalières les plus répandues et est consommé comme aliment de base dans le monde entier. ^[174] Le grain de blé est composé majoritairement d'amidon situé dans l'albumen, de protéines et de polysaccharides. L'amidon est composé de deux polymères de structures différentes ; l'amylose et l'amylopectine. L'amylose est une macromolécule de structure linéaire constituée d'unités α -D-glucose, liées par des liaisons α -(1-4). L'amylopectine est une macromolécule de structure ramifiée et est formée par la polymérisation d'unités α -D-glucose, liées principalement par des liaisons α -(1-4) et quelques liaisons α -(1-6) à l'origine des ramifications. Par l'analyse ^{13}C intramoléculaire du glucose issu de l'amidon, il est espéré que l'influence du mode culture soit différenciée.

4.3. Préparation et analyse d'échantillon

4.3.1. Echantillons

Pour cette étude, la collecte d'échantillons se divise en deux phases : pilote et consolidation. Elles sont toutes deux composées de 200 échantillons de lait cru de vache et 200 échantillons de blé collectés à la source, directement du producteur afin d'être sûr de la provenance des produits. Les molécules cibles sont le lactose et l'amidon provenant du lait et du blé, respectivement.

Les échantillons de lait sont d'abord écrémés afin d'éliminer la majorité des graisses présentes dans le lait. Ensuite, une extraction par précipitation des caséines, protéines majoritaires du lait, est réalisée à l'aide d'acide acétique. Le lactose est alors obtenu dans le filtrat.

Les grains de blé sont broyés afin d'extraire l'amidon de l'albumen. La poudre obtenue est tamisée et ajoutée à une solution de NaCl à 5 g/L ^[175] puis agitée afin de faire précipiter les protéines (albumine et globuline en majorités). Une étape de centrifugation permet de séparer les protéines du filtrat qui contient l'amidon.

Le lactose et l'amidon ne sont pas analysables directement en RMN à cause de la mutarotation du glucose et de la taille de la molécule, respectivement. En solution, le glucose est soumis à une mutarotation entre la forme α et β entraînant une épimérisation du carbone hémiacétal. Un dédoublement des pics est alors visible sur le spectre RMN (Figure 79). De plus, le carbone 3 et le carbone 5 de la forme β se recouvrent rendant impossible l'analyse du glucose en PSIA.

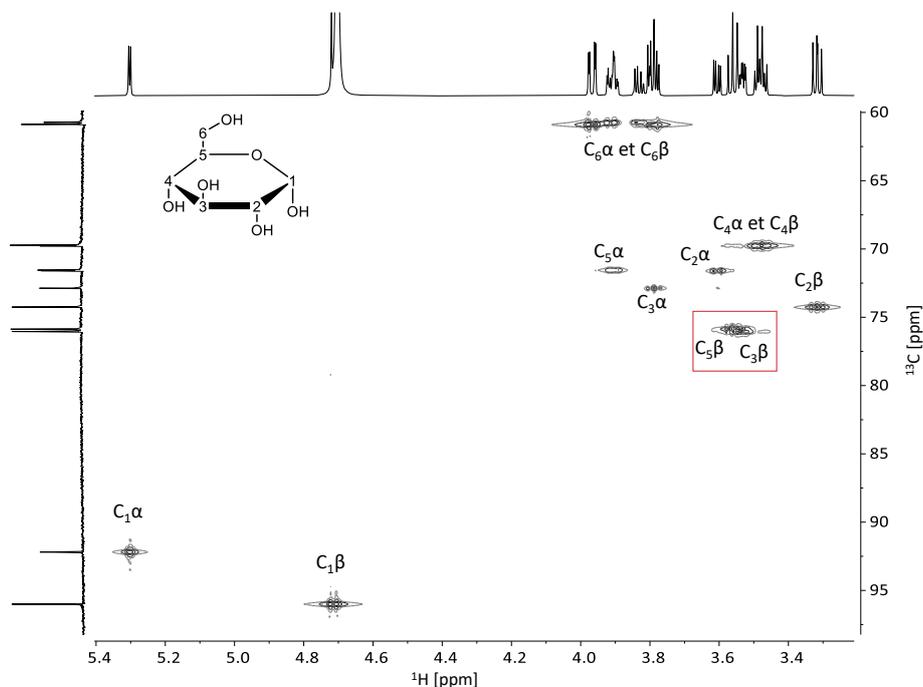


Figure 79 : Spectre 2D asHSQC du glucose enregistré à 700,28 MHz avec une sonde cryogénique, sans repliement spectral. Le nombre de scan et la température de travail ont été fixés à 2 et 308 K, respectivement.

Pour bloquer la mutarotation, une dérivation du glucose a donc été mise en place. Cette étape supplémentaire permet de convertir le glucose en 1,2:5,6-di-o-isopropylidene-D-glucofuranose (ou diacétone-D-glucose : DAGF) et le galactose en 1,2:3,4-di-o-isopropylidene-D-galactopyranose (ou DAGaP) (Figure 80). Le lactose et l'amidon sont donc hydrolysés à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique à 2 mol/L. Puis la solution est neutralisée à l'aide de soude et évaporée afin d'obtenir un mélange de glucose et de galactose pour le lait et le glucose seul pour le blé.

La dérivation du glucose a été proposée par Gilbert *et al.*, [176] et le protocole a été optimisé pour les échantillons TOFoo. La réaction est catalysée par l'acide sulfurique qui permet l'obtention de bons rendements même en présence d'eau résiduelle provenant de l'extraction des sucres. La structure du DAGF et du DAGaP étant très proche, leur séparation est fastidieuse et longue sur colonne chromatographique de silice. Comme les signaux de ces molécules ne se superposent pas, une analyse par HSQC est possible sur les deux molécules à la fois. Tous les protocoles d'extraction, d'hydrolyse et de dérivation sont donnés en annexe 3.

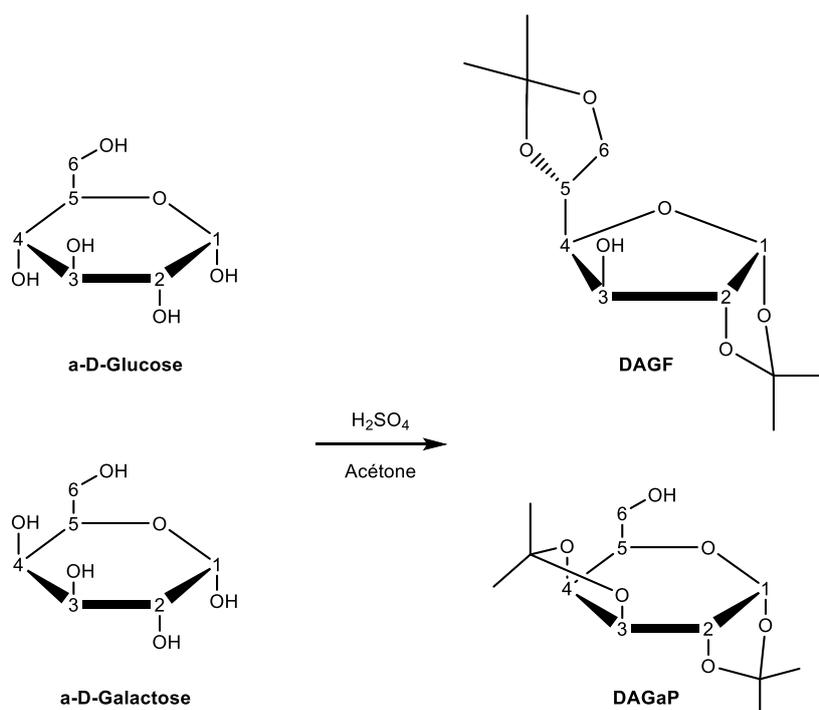


Figure 80 : Dérivation du glucose et du galactose en DAGF et DAGaP.

4.3.2. Préparation RMN des échantillons

L'analyse est réalisée sur 100 mg du mélange DAGF et DAGaP (50 mg pour chaque molécule) et 50 mg de DAGF qui sont dilués dans 600 μ L de DMSO- d_6 pour les échantillons de lait et de blé, respectivement. Les solutions sont ensuite filtrées dans un tube RMN de 5 mm. Pour les échantillons de lait analysés sur le spectromètre 500 MHz, 40 μ L de C_6F_6 ont été ajoutés comme solvant de *lock*.

4.3.3. Spectromètres RMN

Les échantillons de lait ont été analysés sur un spectromètre Bruker Avance III 500 MHz équipé d'une sonde QOneTec spécifique ¹³C et ¹⁷O avec un *lock* ¹⁹F et sur un spectromètre Bruker Avance III 700 MHz équipé d'une sonde cryogénique inverse. Les échantillons de blé ont été analysés uniquement sur ce dernier. Toutes les expériences ont été réalisées à 303 K.

4.4. Optimisation de l'asHSQC pour ces matrices

Mon rôle dans le projet TOFoo a été de proposer en amont un outil analytique prêt à l'emploi comprenant le choix des paramètres d'acquisition, de la préparation du tube RMN des échantillons, du mode d'intégration, et des signaux retenus. Les produits peuvent présenter des impuretés seulement si leurs déplacements chimiques ne se superposent pas avec les molécules d'intérêt. Ces choix finaux ont été entérinés sur la base de la précision.

4.4.1. Evaluation de la précision

Dans ce projet, la précision est évaluée pour chaque carbone avec un CV cible inférieur à 1%. Elle est donc évaluée à l'aide du CV^{min} et CV^{moy} et du nombre de carbone présentant une précision inférieure à 1%. Les échantillons de lait sont composés de deux molécules, les fractions molaires sont donc calculées en prenant la somme de chaque molécule séparément (Eq 3.8 et Eq 3.9).

$$f_i^{DAGF} = \frac{V_i^{DAGF}}{\sum_1^n V^{DAGF}} \quad (3.8)$$

$$f_i^{DAGaP} = \frac{V_i^{DAGaP}}{\sum_1^n V^{DAGaP}} \quad (3.9)$$

La justesse n'est pas un critère car les échantillons sont traités relativement. Ils sont analysés tous avec le même procédé afin de trouver une discrimination entre les deux groupes.

4.4.2. Lait

La séquence a été optimisée sur le spectromètre 500 MHz sur 50 mg de DAGF et 50 mg de DAGaP commerciaux. La présence de deux molécules entraîne un décalage non uniforme des signaux entraînant un ajustement impossible des spectres. Les spectres ne sont alors pas ajustés afin d'avoir la meilleure répétabilité et d'éviter une dépendance de l'opérateur.

L'optimisation est réalisée de la même manière que pour le développement sur le cholestérol. Les fréquences d'excitation ont été placés à 4 et 74 ppm avec une gamme spectrale de 8 et 2 ppm pour le ¹H et le ¹³C, respectivement (Figure 81).

Le nombre de points expérimentaux dans la dimension indirecte a été choisi à 128 avec un NUS de 50% soit 256 points totaux après reconstruction. Le nombre de scans a été ajusté à 6 afin d'obtenir un CV^{min} , CV^{moy} de 0,16 et 1,07%, respectivement avec 5 carbones inférieurs à 1% (sur 11 sites). Le temps d'expérience pour un spectre est égal à 1 h.

Une vingtaine d'échantillon a été analysée sur le 500 MHz, cependant, un problème avec le passeur d'échantillon a obligé le transfert de ce projet sur le 700 MHz. De plus, il a été remarqué sur certains échantillons de lait un décalage des signaux entraînant une inexploitation des données pour le C1 du DAGF. Le fichier d'intégrale utilisé sur le 500 MHz dépend de la fenêtre

spectrale et du nombre de points dans la dimension indirecte. Afin de ne pas analyser de nouveaux les échantillons (précédemment analysé sur le 500 MHz), seul le nombre de scans a été ajusté, ainsi que la liste VRT qui dépend des T_1 . Le T_1^{max} (¹H) sur le 700 MHz est de 2,5 s, le VTR doit donc commencer à 17,5 s. Un nombre de scans égal à 6, 4 et 2 a été testé (Figure 82).

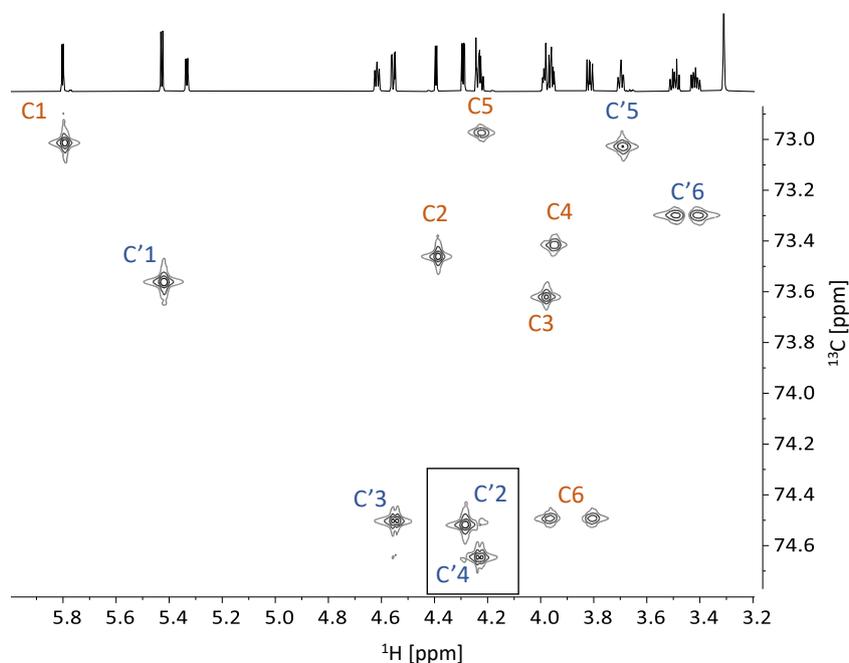


Figure 81 : Spectre asHSQC de 50 mg de DAGF (■) et 50 mg de DAGaP (■) enregistré à 700,28 MHz avec une sonde cryogénique en 22 min, en utilisant l'approche du repliement spectral. La température de l'échantillon a été réglée à 303 K.

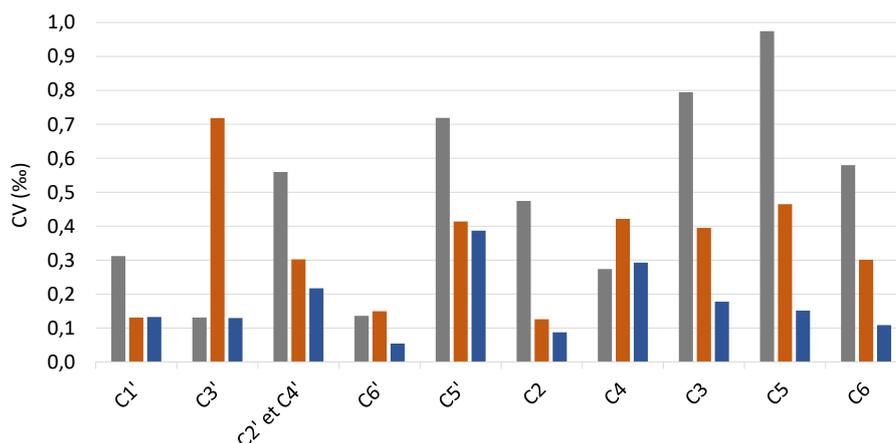


Figure 82 : Valeur de CV pour chaque carbone en fonction avec un nombre de scans de 2 (■), 4 (■) et 6 (■) sur le 700 MHz.

Les CV déterminés avec le spectromètre 700 MHz de tous les carbones sont inférieurs à 1% quel que soit le nombre de scans utilisé. Compte tenu de la précision obtenue, seulement un spectre a été réalisé sur les échantillons, ainsi le temps d'analyse par échantillon est égal à 22 minutes, soit le temps pour un spectre.

4.4.3. Blé

La séquence a été optimisée sur le 700 MHz sur un échantillon de 50 mg de DAGF commercial. Les fréquences d'excitation ont été placées à 4 et 76,8 ppm avec une gamme spectrale de 8 et 1 ppm pour le ¹H et le ¹³C, respectivement (Figure 83). Le T_1^{max} (¹H) de cet échantillon est de 2,5 s, donc la liste de VRT utilisée commence à 17,5 s avec des valeurs de 0,7 et 0,005 pour u et g , respectivement. L'utilisation de cette liste permet de diviser par 3 le temps expérimental par rapport à une acquisition sans VRT.

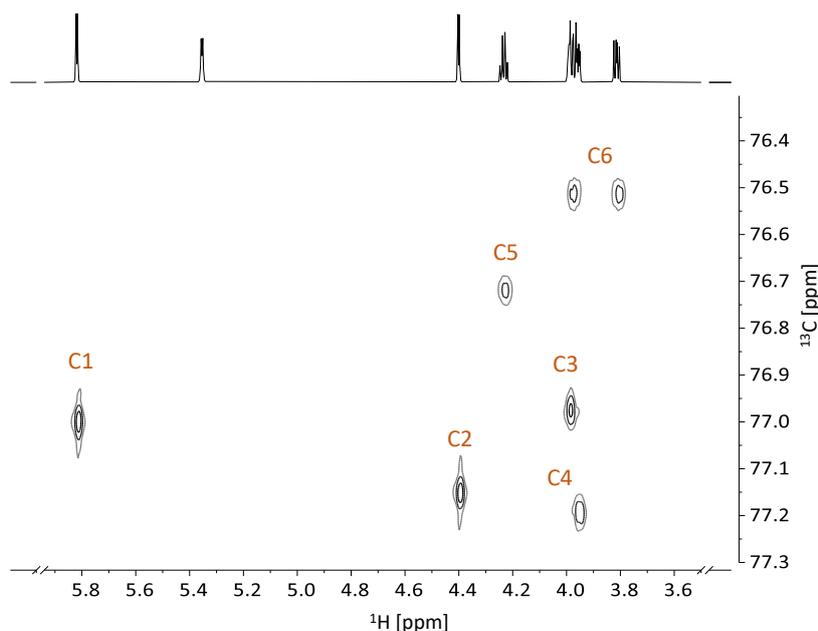


Figure 83 : Spectre asHSQC de 50 mg de DAGF enregistré à 700,28 MHz avec une sonde cryogénique en 6 min, en utilisant l'approche du repliement spectral. La température de l'échantillon a été réglée à 303 K.

Un nombre d'incrément (N_1) de 32 avec un nombre de scans (NS) de 2 et de 4, ainsi que N_1 égale à 64 avec un NS de 2 ont été testés avec un temps d'expérience de 6 min, 12 min et 16 min respectivement (Figure 84). Les résultats montrent une précision meilleure que 1% pour tous les carbones avec un CV^{min} , CV^{moy} de 0,2 et 0,6%, respectivement pour un N_1 de 32 et un NS de 2. Ces paramètres ont été gardés car ils présentent le plus petit temps d'expérience avec l'obtention de la précision visée.

Une étude de reproductibilité sur trois jours consécutifs a montré un CV^{min} , CV^{moy} de 0,5 et 0,6%, respectivement. Le paramétrage du spectromètre automatiquement par un passeur d'échantillon ne modifie pas les mesures de reproductibilité avec des CV^{min} , CV^{moy} finaux de 0,4%, validant ainsi son utilisation pour la campagne d'échantillons.

Aujourd'hui, les 200 échantillons de blé et de lait de la phase pilote ont été analysés et les données ont été envoyées au partenaire en charge de l'étude statistique. La phase de consolidation avec 400 échantillons supplémentaires dont 200 de lait et 200 de blé est en cours d'analyse. Si les résultats sont concluants à la fin de ces phases, 4000 échantillons seront

analysés sur 5 ans afin de recouvrir les différentes saisons et années afin de proposer un outil pour discriminer des échantillons biologiques et conventionnels.

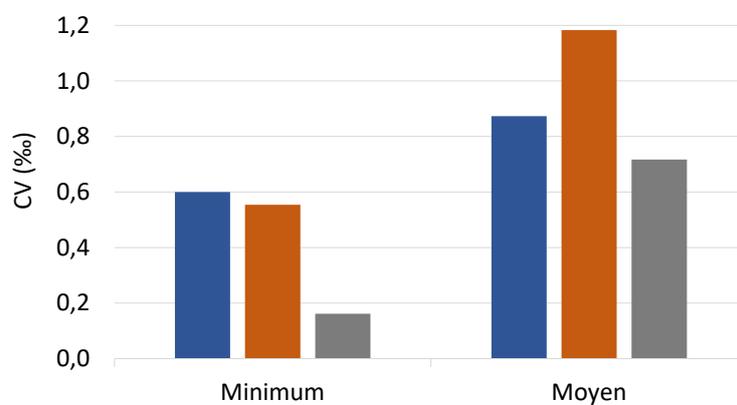


Figure 84 : Valeurs minimale, moyenne et maximale de CV (%) des f_i , avec un nombre d'incrément et de scans égal à 32 et 2 (■), 32 et 4 (■) et 64 et 2 (■), respectivement.

Chapitre IV : Des mesures *irm*-¹³C NMR homogènes et justes

La séquence asHSQC donne des résultats apparents du fait de la perte d'information provenant des carbones quaternaires et des délais de transfert d'aimantation et de refocalisation qui ne peuvent pas être optimaux pour tous les sites. Les applications vues dans le chapitre III utilisent uniquement des données relatives. Cependant, pour certaines applications les valeurs obtenues par l'asHSQC doivent être corrigées afin de fournir des valeurs de $\delta^{13}\text{C}_i$ compréhensibles pour toute la communauté isotopique. La littérature a également montré des résultats relativement inhomogènes entre les spectromètres avec l'utilisation d'une même séquence (Cf. Chapitre I). Ce chapitre aborde la notion de justesse en $irm\text{-}^{13}\text{C}$ NMR avec la proposition et la mise en place de différents facteurs de correction, d'une part sur la séquence asHSQC avec une utilisation plus contraignante que celles du chapitre précédent, et d'autre part entre deux spectromètres quelle que soit la molécule analysée. L'exemple retenu pour la démarche de correction d'une séquence multi-impulsionnelle est celui de l'analyse de 10 mg de glucose après dérivation en DAGF par asHSQC qui pourrait satisfaire les exigences de l'analyse intramoléculaire ^{13}C de la cellulose des cernes des arbres : très peu de produit, optimisation de la sensibilité, présentation des $\delta^{13}\text{C}_i$ sur l'échelle internationale déjà utilisée pour les mesures en $irm\text{-}MS$.

L'objectif de ce travail est, dans un premier temps, d'harmoniser les résultats RMN entre eux, puis dans un deuxième temps d'aborder l'expression de ces résultats homogénéisés sur une échelle $\delta^{13}\text{C}$ qualifiée de « vraie ». Dans ce sens, des molécules pouvant servir de standards de correction seront proposées.

1. La composition intramoléculaire ^{13}C du glucose comme outil de suivi de la réaction des arbres au changement climatique

La distribution isotopique dans les plantes est différente en fonction de leur métabolisme ^[88] (Figure 85). Les plantes C_3 fixent et synthétisent le glucose dans la partie mésophylle. Les plantes C_4 fixent le CO_2 dans la partie mésophylle mais synthétisent le glucose dans la gaine périvasculaire. Et les plantes CAM fixent le CO_2 la nuit et synthétisent le glucose le jour dans la partie mésophylle. Ces différents métabolismes entraînent des variations sur le profil isotopique du carbone-13 qui ont été observées en $irm\text{-}^{13}\text{C}$ NMR avec la séquence *Inverse Gated* (Figure 86). ^[176] Cependant, cette séquence demande un temps d'expérience relativement long et une masse importante de produit (environ 200 mg), ^[176,177] ce qui ne permet pas d'étudier le flux et les organes de stockage sur les différentes parties d'une plante.

Tout comme les plantes, les arbres synthétisent du glucose et le polymérisent en cellulose, représentant alors 50% de la composition du bois. Chaque année, un arbre forme un cerne dont sa composition isotopique globale peut servir d'indicateur de paramètres afin de reconstituer la variabilité climatique passée et pour proposer des futurs modèles. ^[178–180] L'analyse PSIA du glucose donne lieu à une exploitation plus complète et plus précise des signaux des cernes afin d'obtenir une reconstruction à plus haute résolution des réactions des arbres au changement climatique. Cependant, la masse de glucose pouvant être obtenus à partir de la cellulose est

d'environ 20 mg. En 2018, Wieloch *et al.* ont analysé la composition isotopique ¹³C en PSIA par irm-¹³C à l'aide de la séquence *Inverse Gated* en regroupant les échantillons pour obtenir une masse de produit de 80 mg de MAGF, dérivé qui a été retenu pour leur étude. [177] Le but de cette partie est d'optimiser et de corriger l'asHSQC afin d'analyser seulement 10 mg de dérivé du glucose correspondant à la masse cible après dérivation et extraction du glucose. Le dérivé retenu est le DAGF, son utilisation sera justifiée au cours du travail d'optimisation de la méthodologie asHSQC.

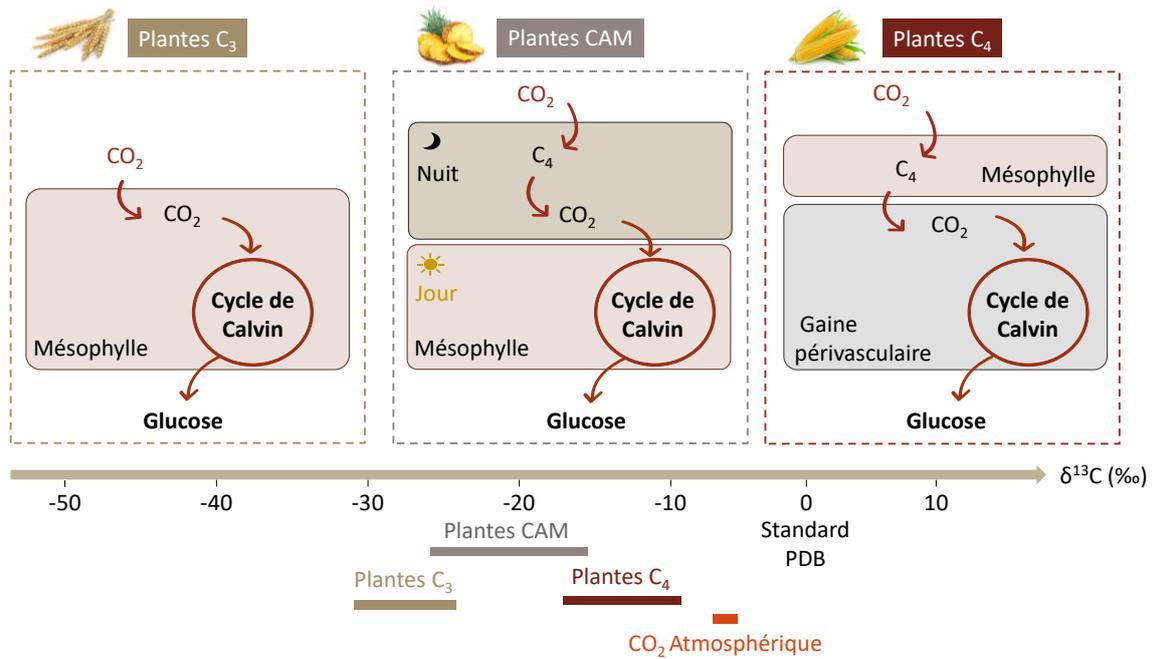


Figure 85 : Illustration schématique des voies métaboliques et composition isotopique globale des plantes C₃, C₄ et CAM au cours de la photosynthèse.

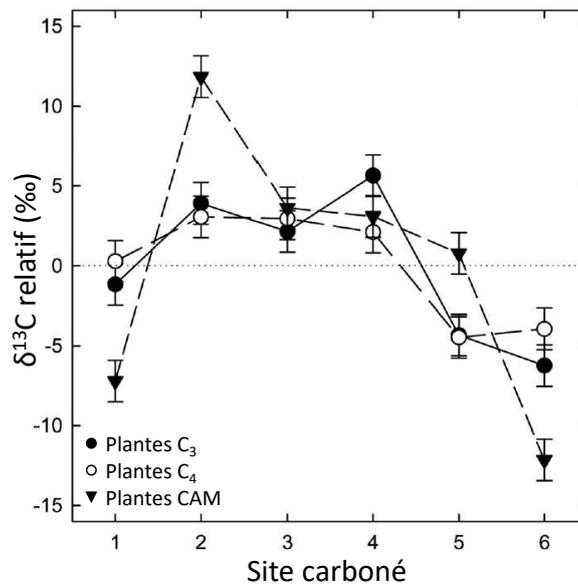


Figure 86 : Composition $\delta^{13}\text{C}$ intramoléculaire du saccharose dans les plantes C₃ (●), C₄ (○) et CAM (▼). Les valeurs $\delta^{13}\text{C}$ sont données comme relatives, c'est-à-dire calculées comme les décalages isotopiques par rapport à la valeur moyenne moléculaire. [181]

Grâce à cette méthodologie PSIA sur le glucose, différentes observations majeures ont été collectées : (i) différence de signature ¹³C du métabolisme (entre C₃, C₄ et CAM), ^[181] (ii) effet isotopique associé à l'isomérisation du glucose en fructose ^[182,183] et (iii) impact environnemental sur la composition intramoléculaire du glucose. ^[184] Ces travaux indiquent que le glucose est un biomarqueur potentiel des changements climatiques associés à la croissance de la plante.

1.1. Méthodologie

La surface des signaux en RMN est proportionnelle au nombre de noyaux équivalents sur un site i (n_i), à l'abondance isotopique (x_i) et à un facteur k_i (Eq 4.1) (Cf. Chapitre I).

$$S_i \propto k_i \cdot n_i \cdot x_i \quad (4.1)$$

Dans la séquence *Inverse Gated* le facteur k est le même pour tous les carbones permettant ainsi de s'affranchir de cette constante. Cependant, avec une séquence multi-impulsionnelle telle que l'asHSQC, le facteur k_i est dépendant de chaque site i . En effet, il est dépendant des constantes J et des valeurs de T_2^* de chaque carbone. Les résultats issus de ces séquences sont donc seulement apparents.

Il est nécessaire de rapporter les résultats sur une échelle compréhensible selon les données déjà publiées par l'approche de la séquence d'impulsion 1D classique : l'*Inverse Gated* (appelée également single-pulse, Cf. Figure 10, Chapitre I). Le but ici est de déterminer un facteur de correction pour chaque carbone entre la séquence 1D et la séquence 2D. Le DAGF commercial est analysé en *Inverse Gated* avec une quantité de produit de 200 mg, puis en asHSQC sur 10 mg. Un facteur de correction est alors déterminé pour chaque carbone. Afin de vérifier la robustesse des facteurs de corrections, plusieurs échantillons de glucose provenant de différentes sources de plantes ont été dérivés en DAGF pour être analysés. Ces facteurs de correction sont ensuite appliqués aux autres DAGF analysés en asHSQC (Figure 87). Pour vérifier la justesse de ces facteurs de correction, les échantillons sont également analysés en 1D. Une fois les facteurs de correction validés, il sera possible d'analyser les échantillons provenant des cernes des arbres qui sont analysables uniquement en 2D en raison de leur quantité limitée (seulement 10 mg). Ce dernier aspect ne sera pas abordé dans ce travail, l'objectif étant les ajustements de l'analyse RMN.

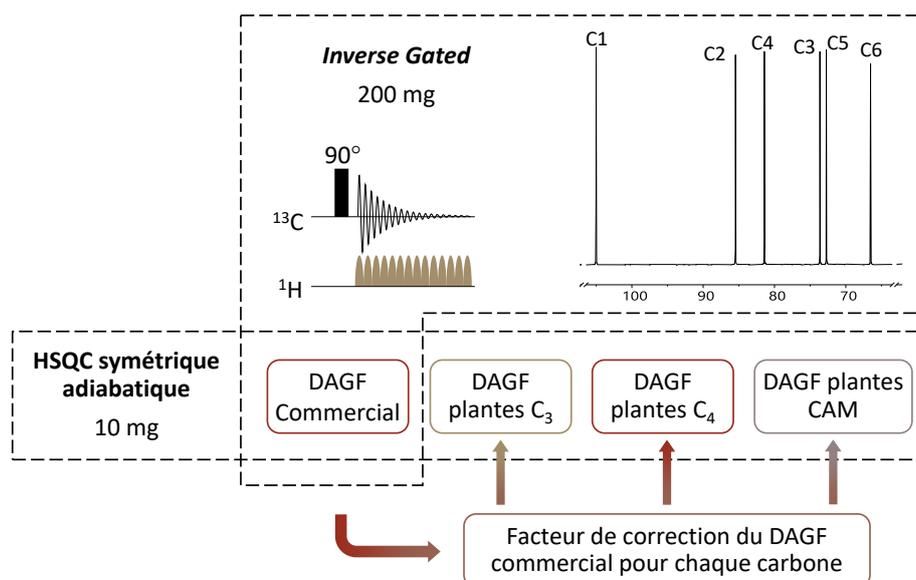


Figure 87 : Méthodologie pour corriger l'asHSQC sur des échantillons d'un dérivé du glucose provenant de différents métabolismes de plantes.

1.2. Nature des échantillons

Différents glucoses issus de différents métabolismes végétaux ont été utilisés (Tableau 8). Le DAGF commercial et les glucoses des plantes C₄ ont été achetés chez Sigma-Aldrich. Les glucoses des plantes C₃ sont issus de l'amidon après hydrolyse. Le glucose de la plante CAM a été isolé du jus d'ananas (pays d'origine : Equateur), le protocole d'extraction est donné en annexe 4.

La composition isotopique globale ($\delta^{13}\text{C}_g$) a été déterminée par *irm-MS* sur le glucose. Pour le DAGF commercial, une hydrolyse a été réalisée afin d'obtenir le $\delta^{13}\text{C}_g$ du glucose. La synthèse du DAGF suit le protocole décrit dans le Chapitre III.

Tableau 8 : Origine et $\delta^{13}\text{C}_g$ des échantillons de DAGF.

Echantillon	Métabolisme	$\delta^{13}\text{C}_g$ (‰)	Origine
DAGF commercial	C ₄	-9,9	DAGF synthétique
Maïs 1	C ₄	-9,9	Glucose commercial
Maïs 2	C ₄	-10,1	Glucose commercial
Pomme de Terre	C ₃	-25,0	Fécule
Fève	C ₃	-24,9	Amidon
Ananas	CAM	-13,9	Glucose et saccharose extraits

1.3. Etude sur l'échange entre l'eau et la fonction hydroxyle du DAGF : justification du choix du dérivé

Les essais préliminaires ont montré une grande variabilité sur des échantillons issus du même métabolisme notamment sur le carbone 3 lié à la fonction hydroxyle du DAGF (Figure 88).

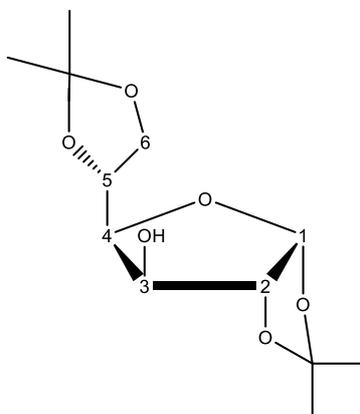


Figure 88 : Structure chimique du DAGF.

Un échange chimique entre l'eau contenue dans le tube et la fonction hydroxyle (OH) a été mis en évidence.

Dans le cas du DAGF, si l'échange est lent le proton du OH est couplé au proton sur le C3 donnant alors un doublet. Lorsque l'échange est rapide, le couplage disparaît car le OH est en échange avec l'eau provoquant l'observation d'un singulet dont la largeur dépend de la vitesse d'échange (Figure 89).

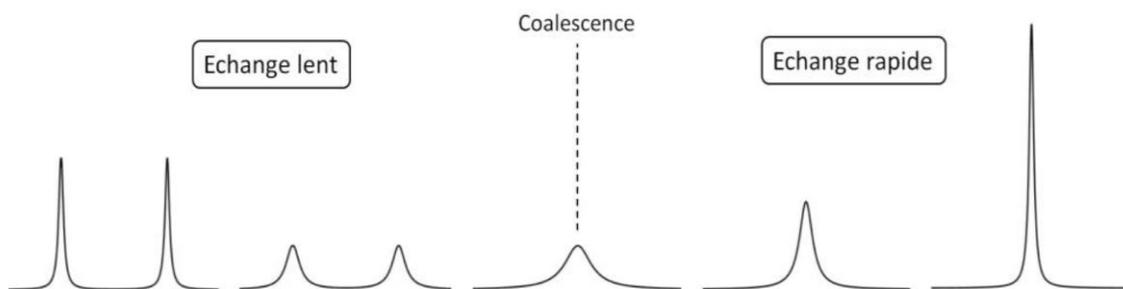


Figure 89 : Variation de la forme de raie du signal ¹H en fonction de la vitesse d'échange entre la fonction hydroxyle de l'éthanol et l'eau. ^[16]

Dans cette étude, un échange à différentes vitesses a été observé entre le OH du DAGF et l'eau résiduelle des différents échantillons (Figure 90). L'échange est le plus rapide dans l'échantillon de pomme de terre alors qu'il est le plus lent pour un échantillon de blé.

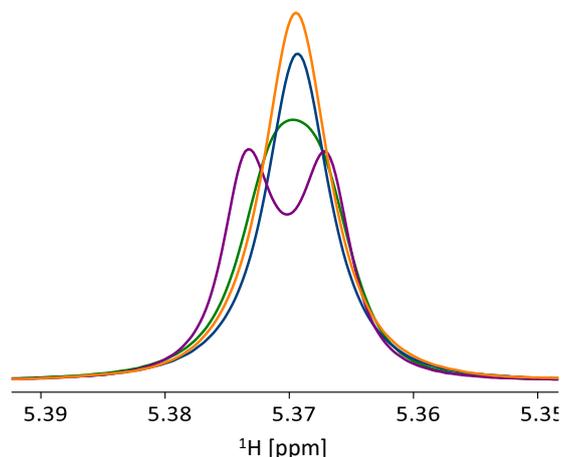


Figure 90 : Spectre ¹H zoomé sur la fonction hydroxyle pour différents échantillons synthétisés au laboratoire dont la pomme de terre (■), maïs 1 (■) maïs 2 (■) et Fève (■). Un singulet traduit un échange rapide et un doublet un échange lent. Ces résultats ont été obtenus sur 10 mg de DAGF dans 600 µL de DMSO-d₆.

Un échange entre le OH et l'eau peut provoquer un changement dans le transfert de polarisation du proton lié au C3 qui porte la fonction OH. ^[185] Afin de contourner ce problème, il est important de standardiser l'échange entre les échantillons soit en accélérant ou en supprimant ou soit en stabilisant l'échange.

1.3.1. Accélération de l'échange

Pour accélérer l'échange, 100 µL d'eau ultrapure ont été ajoutés afin d'obtenir un échange rapide en homogénéisant la quantité d'eau dans tous les échantillons. Cependant, un artefact a été observé sur les spectres asHSQC (Figure 91). Bien que l'eau ne contienne pas de carbone, sa forte concentration en proton provoque une longue trainée superposée au C4 du DAGF. Une séquence avec une suppression du signal de l'eau peut être imaginée mais cela rendrait la séquence non-quantitative (compte tenu de la précision visée) due à la suppression des signaux proches du signal de l'eau.

1.3.1. Suppression de l'échange

La suppression de l'échange a été testée en séchant les échantillons avec un agent de séchage : le sulfate de magnésium (MgSO₄). Il permet grâce à sa forte affinité avec l'eau, d'éliminer les molécules d'eau présentes dans un solvant organique. Le DAGF est solubilisé dans le DMSO-d₆ puis, du MgSO₄ est ajouté jusqu'à ce que ce dernier ne forme plus d'agrégat. Ensuite, le MgSO₄ est éliminé en filtrant la solution sur coton dans un tube RMN de 5 mm. Le spectre ¹H du DAGF commercial a montré une augmentation de la concentration en impuretés après le séchage avec le MgSO₄ (Figure 92).

L'impureté majoritaire a été identifiée, et correspond au 1,2-O-Isopropylidene- α -D-glucofuranose (MAGF). Le MgSO₄ en solution a montré un pH d'environ 5 entraînant une hydrolyse acide du DAGF en MAGF (Figure 93).

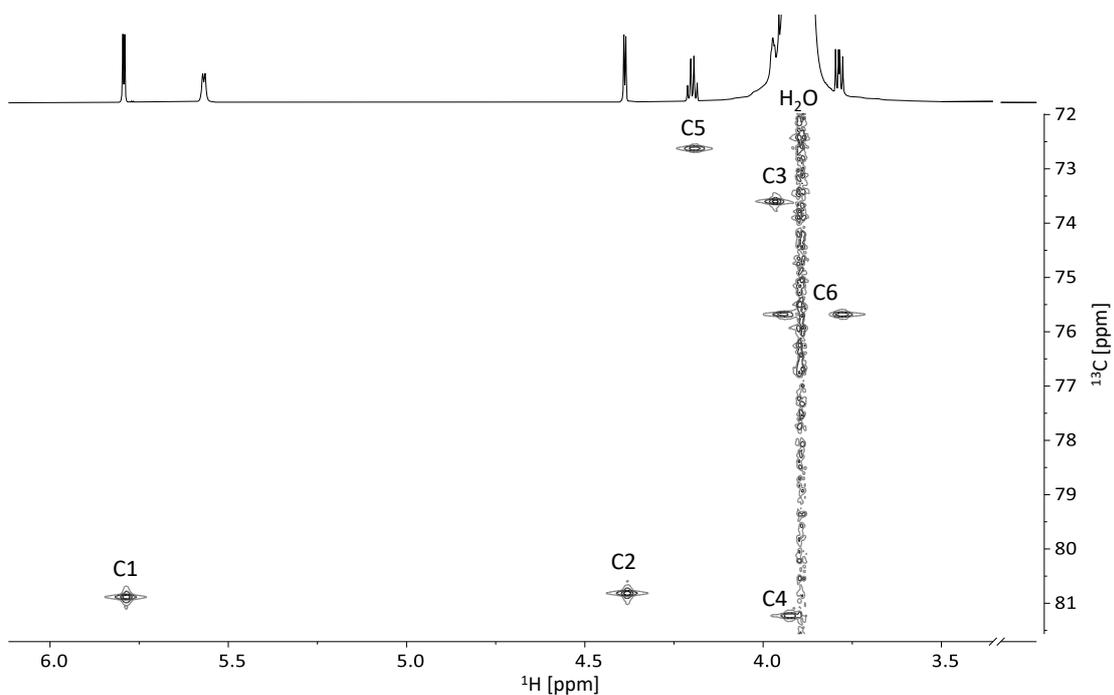


Figure 91 : Spectre asHSQC enregistré à 700,28 MHz et à 303 K de 10 mg DAGFCom solubilisé dans 500 μL de DMSO- d_6 avec 100 μL d'eau ultrapure.

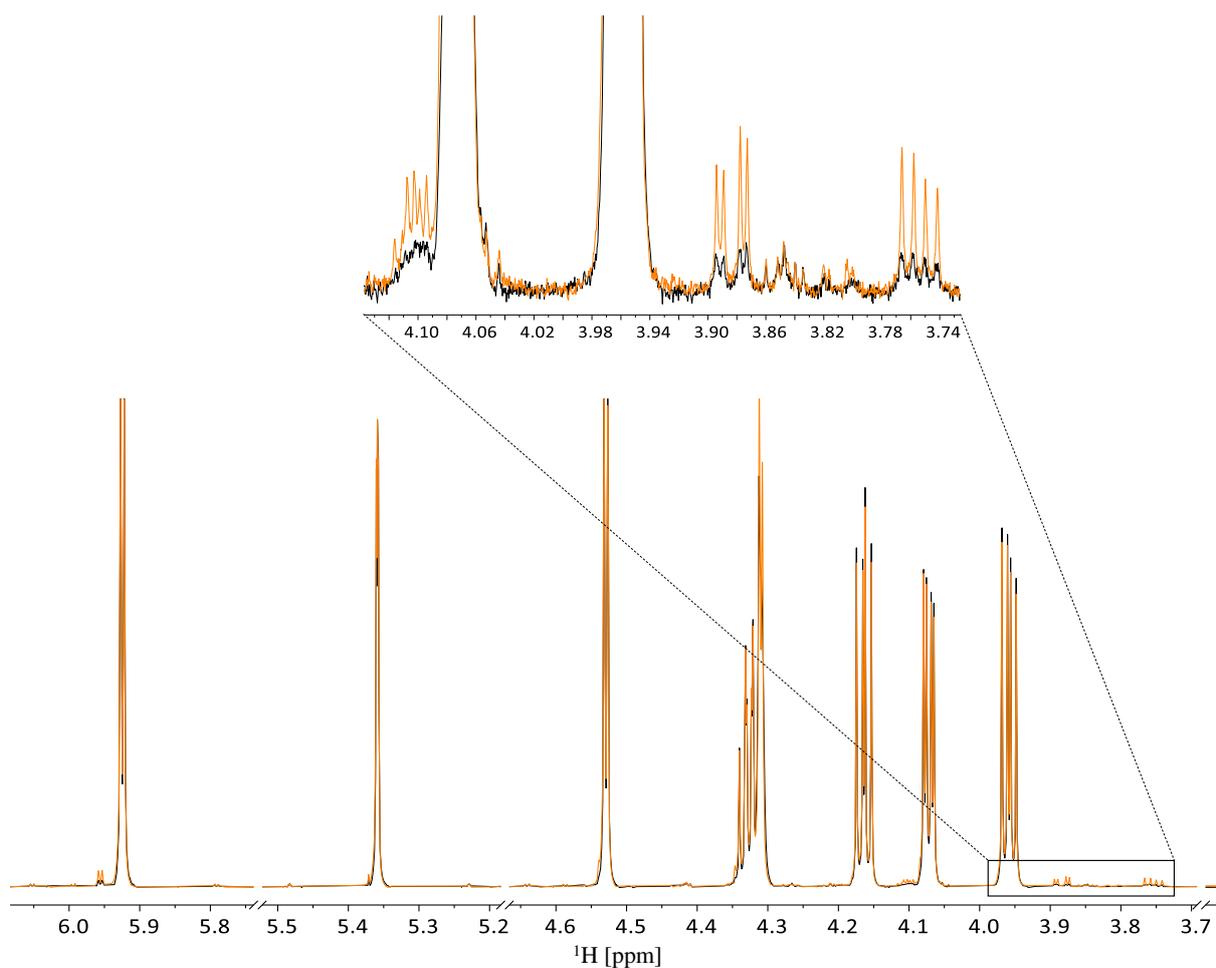


Figure 92 : Spectre ^1H du DAGF commercial avant (■) et après (■) séchage avec du MgSO_4 enregistré à 700,28 MHz avec une sonde cryogénique.

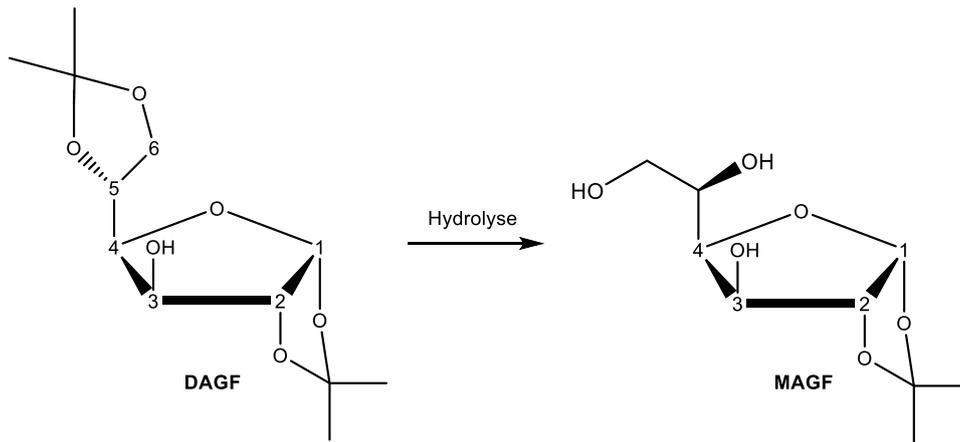


Figure 93 : Hydrolyse du DAGF en MAGF.

1.3.2. Réduction et stabilisation de l'échange

Une étude a montré qu'il est possible de réduire l'échange entre l'eau et une fonction OH en présence d'alumine (Al_2O_3).^[186] Cet ajout crée des liaisons hydrogènes entre l'eau et l'alumine permettant ainsi de réduire et de stabiliser l'échange entre la fonction OH du site 3 et l'eau. Afin de ne pas ajouter d'eau avec le solvant deutéré, le dichlorométhane deutéré (CD_2Cl_2) a été utilisé. Le CD_2Cl_2 peut présenter un caractère acide qui est stabilisée également par l'alumine empêchant l'hydrolyse du DAGF en MAGF. Plusieurs masses d' Al_2O_3 neutre ont été testées pour déterminer la quantité optimale à additionner (Figure 94).

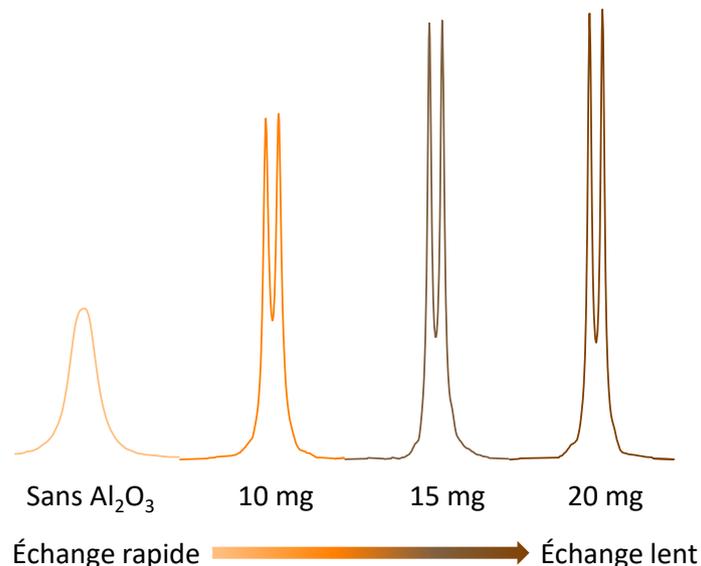


Figure 94 : Variation de la forme du multiplet, et donc de la vitesse d'échange entre la fonction hydroxyle et l'eau, avec la quantité d' Al_2O_3 ajoutée.

À partir de 15 mg d' Al_2O_3 l'échange entre l'eau et la fonction OH est réduit, permettant alors de standardiser l'échange entre l'eau et la fonction hydroxyle. Il est important que la suspension

de l'alumine soit stable avant de réaliser des expériences car sa présence peut perturber l'homogénéité du champ magnétique. Ceci est facilement atteint du fait que, de nos jours, la rotation du tube RMN dans la sonde n'est plus une exigence instrumentale.

Dans les études précédentes, les molécules du MAGF^[177] et TAMAG^[176] (3,5,6-triacetyl-1,2-O-isopropylidene- α -D-glucofuranose) ont été utilisées comme dérivés du glucose. Le TAMAG a été synthétisé dans les travaux de Gilbert *et. al.* et a été obtenu après 3 étapes.^[176] Cependant, ce nombre d'étapes est trop important car cela peut entraîner une perte de produit qui ne peut pas être envisagée sur ce projet. Quant au MAGF, il comporte 3 fonctions OH libres qui compliquent le mode opératoire avec l'utilisation de la séquence asHSQC. Donc contrairement aux dérivés du glucose utilisés dans la littérature et adaptés à une analyse 1D, le DAGF semble la structure chimique la plus robuste pour l'analyse asHSQC, après stabilisation de la préparation.

1.4. Préparation des échantillons et configuration du spectromètre

La préparation RMN d'un échantillon consiste à mettre en solution 10 mg de DAGF avec 25 mg d'Al₂O₃ dans 600 μ L de CD₂Cl₂. La solution est ensuite transvasée dans un tube RMN de 5 mm. Une quantité importante d'alumine est ajoutée car il y a une perte d'environ 7 mg lors du transfert de la solution. La filtration n'est pas envisageable à cause de l'alumine qui doit être présente dans le tube. Pour la séquence 1D, 200 mg de DAGF ont été solubilisés dans 550 μ L de DMSO-*d*₆.

Les expériences 2D et 1D ont été réalisées sur un spectromètre 700 MHz équipé d'une sonde cryogénique pour gagner en sensibilité. Les calibrages du 90° ¹H et ¹³C sont réalisés en déterminant l'annulation à 360° et en divisant la durée trouvée par 4. Les expériences ont été réalisées à 293 K pour éviter l'évaporation du solvant. Pour la séquence *Inverse Gated*, la puissance du découplage est égale à la puissance d'un 90° de 14 μ s. Les spectres 1D ont été acquis à une température de 303 K, et tous les paramètres d'acquisition sont donnés dans l'annexe 5.

1.5. Optimisation de la séquence 2D

L'optimisation de la séquence a été réalisée sur un échantillon de DAGF commercial. Les fréquences d'excitation ont été optimisées à 4 et 75,8 ppm avec une gamme spectrale de 8 et 2 ppm pour le ¹H et le ¹³C, respectivement (Figure 95). Le changement de solvant entraîne une augmentation des T_1 avec un T_1^{max} de 4,6 s soit l'utilisation du liste VRT dont le premier point est de 35 s.

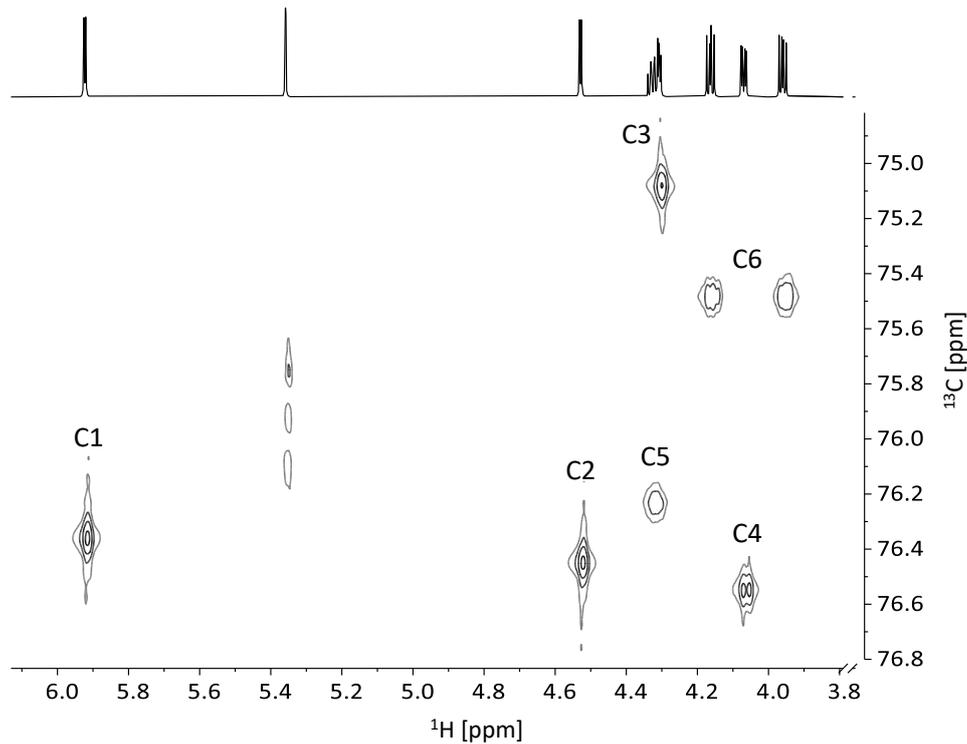


Figure 95 : Spectre asHSQC de 10 mg de DAGF commercial dans 600 μ L de CD_2Cl_2 enregistré à 700,28 MHz avec une sonde cryogénique en 1 h 47 min, en utilisant l'approche du repliement spectral. La température de l'échantillon a été réglée à 293 K.

Le nombre d'incrément a été optimisé de 64 à 256 points avec un NUS de 50%. Un dédoublement des signaux dans la dimension ¹³C a été observé avec 128 et 256 points (Figure 96), le dédoublement disparaît avec une fenêtre spectrale de 4 ppm. Une limite de 64 points dans la dimension indirecte a donc été mise en évidence pour une fenêtre spectrale de 2 ppm.

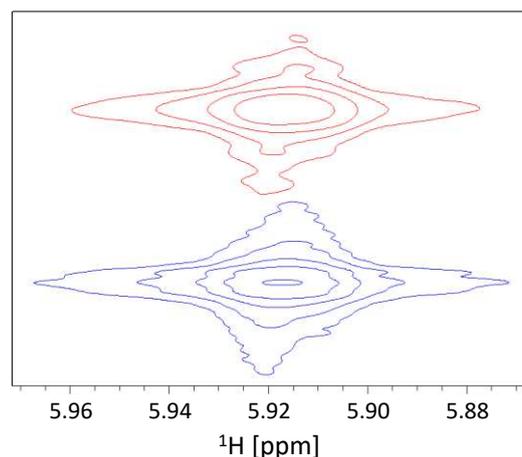


Figure 96 : Comparaison du signal du C1 du DAGF avec une acquisition contenant 128 points (■) et 64 points (■) dans la dimension indirecte avec une fenêtre spectrale totale de 2 ppm.

Le S/B impacte la précision, ainsi un nombre de scans égal à 4, 6, 8 et 10 a été testé (Figure 97). Les NS de 4 et 6 entraînent un CV^{max} de 2,4 et 2,8%, traduisant un S/B trop faible pour atteindre la précision visée. Pour les NS de 8 et 10 les résultats sont similaires avec un

CV^{min} , CV^{moy} et CV^{max} de 0,3 ; 0,7 ; et 1,2%, respectivement. Le temps d'expérience pour un spectre permet de choisir un NS de 8 donnant un temps d'expérience pour un spectre de 1 h 47 min contre 2 h 13 min pour un NS de 10.

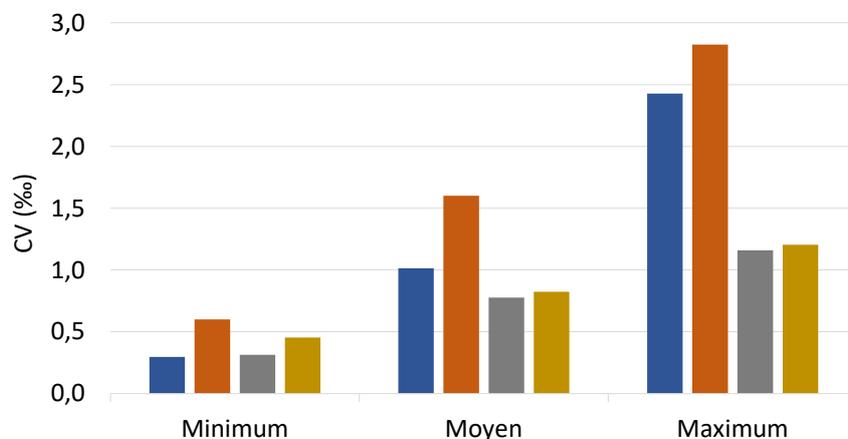


Figure 97 : Valeurs de CV^{min} , CV^{moy} , CV^{max} (%) avec NS de 4 (■), 6 (■), 8 (■), 10 (■). Les temps d'acquisition pour un spectre sont de 53 min, 1 h 20 min, 1 h 47 min et 2 h 13 min, respectivement.

1.6. Optimisation du traitement de données et répétabilité de la séquence

1.6.1. Optimisation du traitement de données

L'intégration des signaux peut influencer la précision. Dans le chapitre III, les spectres étaient ajustés mais les signaux pouvaient se décaler de manières différentes rendant ce protocole dépendant de la position des pics. Pour ce projet, d'autres protocoles ont été évalués et comparés au traitement sans ajustement c'est-à-dire sans rien toucher sur le spectre.

Il est possible de centrer chaque intégrale sur le maximum du signal, ce protocole sera appelé « ajustement des intégrales ». L'ajustement est réalisé sur le 1^{er} spectre de chaque série puis ce même fichier est appliqué aux deux autres spectres. Un autre protocole a été testé sur les projections dans la dimension ¹H, le rang dans la matrice de chaque milieu de tâche est déterminé, puis de part et d'autre 100 lignes sont additionnées. Ensuite, sur chaque spectre 1D obtenu, le signal est intégré ; ce protocole sera appelé « par projection ».

Pour étudier la répétabilité du traitement de données, 3 séries de 3 spectres ont été acquises sur le même échantillon. Les résultats (Figure 98) montrent des CV plus élevés en ajustant toutes les intégrales ce qui indique qu'il y a une dépendance à l'opérateur avec ce protocole. En réalisant la projection, le CV^{min} est le moins élevé mais le CV^{max} présente une valeur supérieure au CV^{max} obtenu sans bouger les intégrales ou les spectres. Le traitement de données retenu pour le reste des expériences ne comporte donc aucun ajustement que ce soit sur les intégrales ou les spectres.

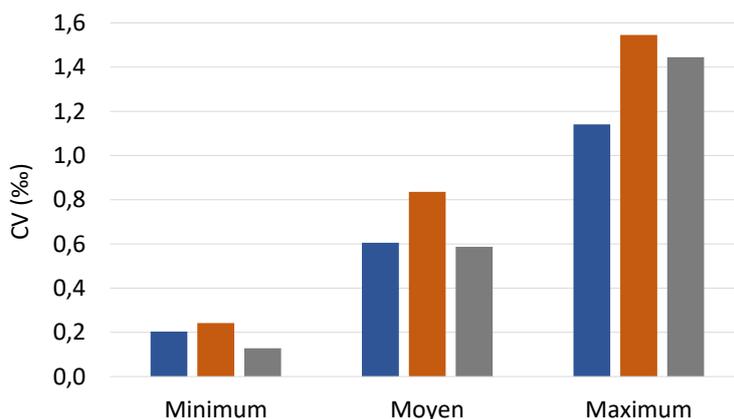


Figure 98 : Valeurs de CV^{min} , CV^{moy} , CV^{max} (%) avec un traitement de données sans ajustement (■), en ajustant les intégrales (■), ou les projections (■).

1.6.2. Répétabilité de la séquence

Dans le but de confirmer la répétabilité de la séquence, de la préparation d'échantillon et du paramétrage automatique lorsqu'un passeur d'échantillon est utilisé, une étude répétabilité sur 3 tubes a été réalisée. Trois tubes de DAGF commercial ont été préparés dans les mêmes conditions expérimentales puis mesurés à la suite. Les résultats montrent une très bonne répétabilité avec un CV pour chaque carbone inférieur à 1% (Tableau 9). Les mêmes tubes ont été analysés le lendemain pour mesurer la stabilité des échantillons sur deux jours consécutifs. La répétabilité sur les 2 jours montre un CV inférieur à 1% pour tous les carbones.

Afin d'évaluer la stabilité des échantillons après la préparation RMN, un tube préparé un mois et demi plus tôt a été analysé en même temps que les trois tubes précédemment préparés. Les résultats montrent des CV plus élevés et notamment pour le C3 du DAGF. Les spectres ¹H de cet échantillon mesurés après la préparation et un mois et demi après montrent une augmentation du signal de l'eau traduisant un caractère hygroscopique de l'échantillon. Le C3 est impacté par ce phénomène car il est lié à la fonction OH et au problème d'échange entre l'eau et la fonction hydroxyle (énoncé précédemment). Les échantillons ne sont donc pas stables en préparation, ils doivent être analysés directement après la préparation ou dans les jours qui suivent.

Tableau 9 : CV calculés sur trois tubes différents de DAGF commercial sur 1 journée, 2 jours et avec une préparation réalisée un mois et demi avant. En vert sont représentés les CV inférieurs à 1% et en rouge supérieurs à 1%.

	Répétabilité sur 3 tubes	Répétabilité sur les 2 jours	Répétabilité avec le tube préparé un mois et demi avant
C1	0,9	0,1	0,7
C2	0,5	1,0	0,5
C3	0,5	0,6	2,1
C4	0,1	0,1	0,7
C5	0,6	0,7	0,7
C6	0,2	0,7	1,2

1.7. Expression des résultats sur l'échelle $\delta^{13}C_i$

L'asHSQC donne uniquement des résultats apparents (Cf. Section 1.1 de ce chapitre), avec des $\delta^{13}C_i$ allant de 300 à -400‰ après un calcul direct à partir des volumes des pics, ce qui est impossible compte tenu de la variation de la composition isotopique dans les produits naturels. Afin d'exprimer les $\delta^{13}C_i$ du glucose (via le DAGF) sur une échelle $\delta^{13}C_i$ compréhensible par la communauté d'isotopie un protocole de corrections des données a été élaboré. Pour vérifier la correction de l'asHSQC sur les échantillons, tous les DAGF ont été également analysés en RMN 1D sur 200 mg (séquence single-pulse). Ainsi, le profil des résultats de l'asHSQC corrigés peut être comparé à celui attendu en 1D qui est considéré, à ce stade, comme juste pour cet élément de l'étude.

Le facteur de correction ($\lambda_{i_{DAGFCom}}^{HSQC}$) doit être différent pour chaque carbone car les biais de l'asHSQC sont dépendants de chaque site. Il est calculé sur les fractions molaires du DAGF commercial entre les résultats acquis par l'*Inverse Gated* et l'asHSQC (Eq. 4.2).

$$\lambda_{i_{DAGFCom}}^{HSQC} = \frac{f_{i_{DAGFCom}}^{1D}}{f_{i_{DAGFCom}}^{2D}} \quad (4.2)$$

Puis il est appliqué pour chaque fraction molaire ($f_{i_{DAGF}}^{2D}$) obtenue avec l'asHSQC (Eq. 4.3) afin d'obtenir la fraction molaire 1D ($f_{i_{DAGF}}^{1D}$).

$$f_{i_{DAGF}}^{1D} = f_{i_{DAGF}}^{2D} \cdot \lambda_{i_{DAGFCom}}^{HSQC} \quad (4.3)$$

Ensuite, la composition isotopique de chaque site ($\delta^{13}C_i$) est calculée à l'aide de la composition isotopique globale ($\delta^{13}C_g$) de chaque échantillon selon l'équation (Eq. 1.46).

La Figure 99 montre la comparaison entre les résultats corrigés de l'asHSQC et le profil 1D de chaque échantillon. Les résultats corrigés sur les profils des plantes C₃ et C₄ sont en accord avec les résultats de référence donnés par l'*Inverse Gated*. Le profil corrigé pour l'ananas présente des biais notamment sur le C₄ et le C₆ qui pour l'instant ne sont pas expliqués et qui demanderaient une investigation plus poussée avec par exemple une analyse de la pureté (dont l'influence du dérivé du fructose et ses impuretés). Les facteurs de correction ont été obtenus avec une variabilité de 1,1‰ calculée par l'intermédiaire des variances entre la séquence 1D et 2D sur le DAGF commercial.

Pour s'affranchir des différences de compositions isotopiques globales entre les échantillons, les résultats sont présentés en écart relatif par rapport au $\delta^{13}C_g$ des glucoses correspondants (Eq. 4.4).

$$\Delta\delta^{13}C_i = \delta^{13}C_i - \delta^{13}C_g \quad (4.4)$$

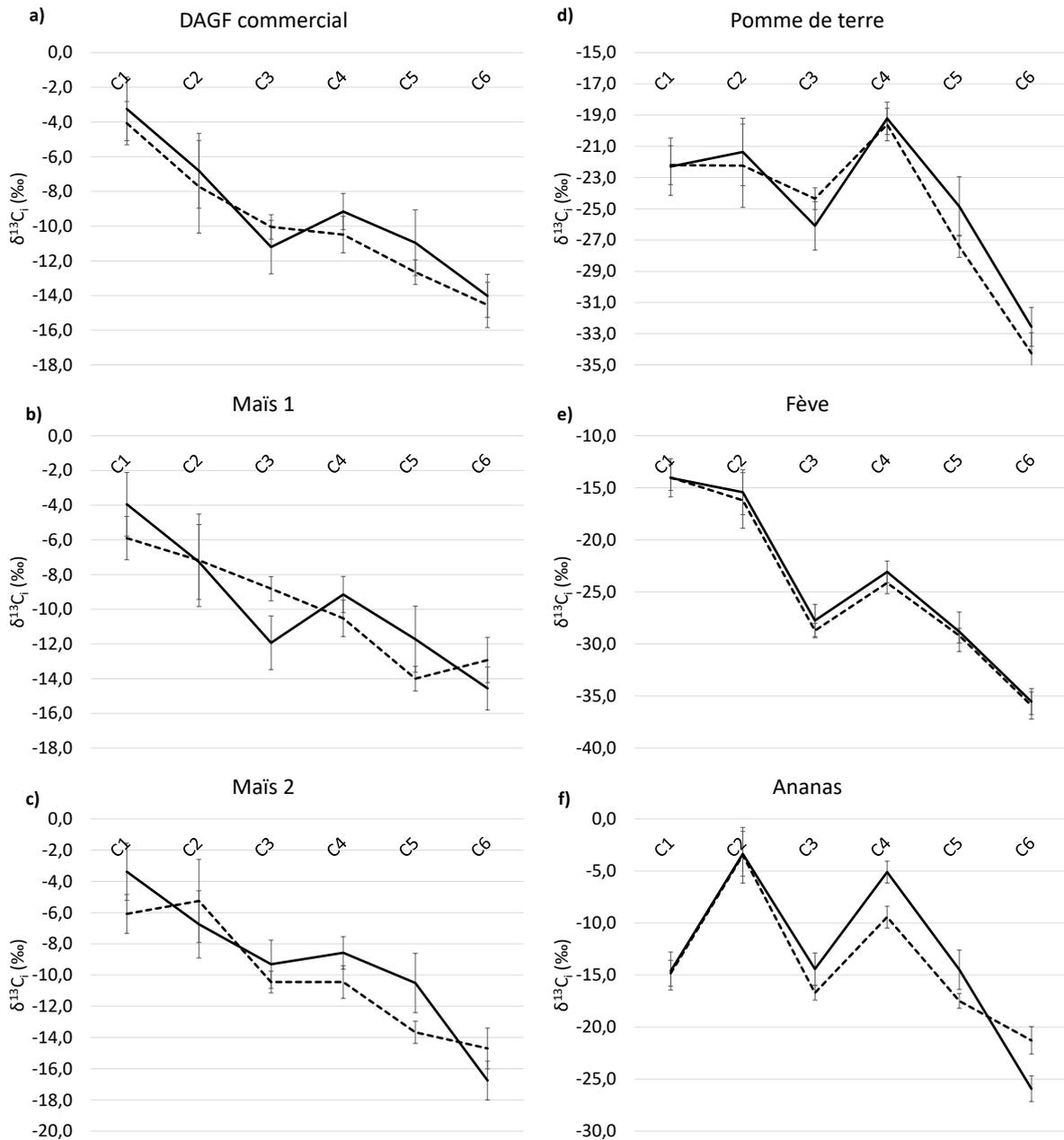


Figure 99 : $\delta^{13}C$ données par la séquence 1D (---) et la séquence 2D corrigée (—) par le facteur $\lambda_{i_{DAGFCom}}$ pour les DAGF utilisés dans cette étude. Les barres d'erreur correspondent à deux fois l'écart-type ($n = 3$ pour chaque échantillon).

Les profils de chaque origine peuvent être comparés aux données de la littérature réalisées par Gilbert *et al.* en 2011. [182] Les plantes C₄ (Figure 100a) ont des profils très similaires entre elles et par rapport à la littérature, ce qui est en accord avec leur origine qui est toujours du maïs. Les plantes C₃ (Figure 100b) présentent quant à elle des profils assez différents entre le glucose de pomme de terre et de fève obtenu avec les séquences 1D et 2D et celui de la littérature obtenu sur du glucose de blé. Ces graphiques permettent de mettre en évidence des profils différents entre les espèces d'origine. Pour avoir une vision globale pour chaque métabolisme de plantes il faudrait analyser un grand nombre d'échantillons avec plusieurs espèces de plantes

différentes. Ainsi, le glucose d'ananas (Figure 100c) présente un profil différent de celui de la littérature.

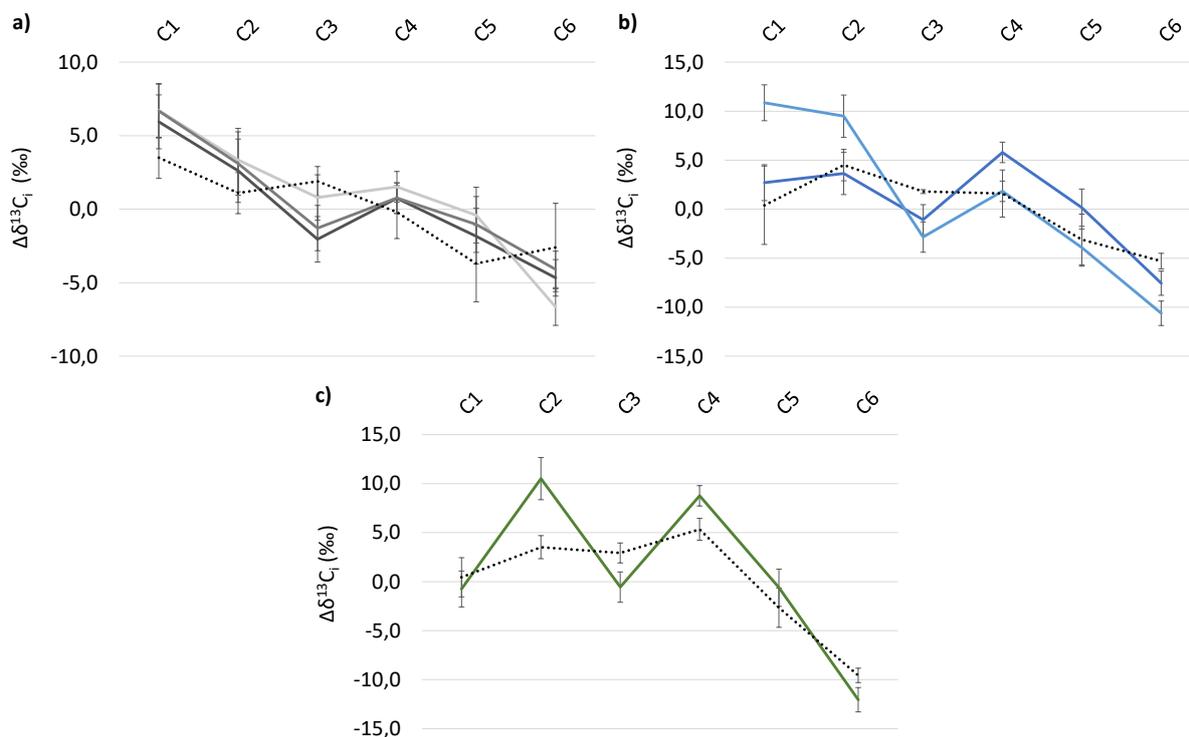


Figure 100 : Profil isotopique ¹³C du DAGF à partir de glucose provenant a) de plantes C₄ : DAGF commercial (—), Maïs 1 (—), Maïs 2 (—) ; b) plantes C₃ : Pomme de terre (—) et Fève (—) ; c) de plantes CAM : Ananas (—). Les valeurs sont décrites comme le décalage isotopique $\Delta\delta^{13}C_i$ (‰) ($\Delta\delta^{13}C_i = \delta^{13}C_i - \delta^{13}C_g$). Les barres d'erreur correspondent à deux fois l'écart-type de la séquence 2D (n = 3 pour chaque échantillon). Les résultats obtenus par Gilbert et al. (2011) pour les plantes C₃, C₄ et CAM sont également indiqués sur la figure (...).^[182]

Les différences avec la littérature peuvent être expliquées par une différence : (i) d'espèce de plantes, (ii) d'origine géographique et de production, (iii) faible nombre d'échantillons étudiés dans la littérature ou (iv) de spectromètres d'acquisition. En effet, les données acquises dans la littérature ont été acquises sur un spectromètre 400 MHz Avance I équipé d'une sonde DUAL+ ¹³C/¹H. Le champ et la sonde peuvent en effet affecter le profil isotopique des produits (Cf. Chapitre I).

1.8. Conclusion

Dans ce projet, l'asHSQC a été optimisée et utilisée sur 10 mg de produit obtenant un temps d'expérience pour un spectre de 1 h 47 min contre 2 jours et 15 heures avec l'*Inverse Gated* sur cette quantité de produit. Cette séquence a montré une très bonne répétabilité et reproductibilité interne avec une précision toujours inférieure à 1‰ sur tous les carbones. La correction a été atteinte avec l'application d'un facteur de correction appliqué entre les résultats 1D et 2D sur chaque site de la molécule, permettant ainsi d'avancer dans les objectifs de cette thèse (Figure 101). Les résultats de l'asHSQC corrigés ont montré des profils similaires à ceux donnés par la séquence *Inverse Gated* de référence et montre la même tendance des quelques données existant dans la littérature. La précision et la correction des résultats atteintes avec cette

séquence permettront d'analyser prochainement le glucose issu de la cellulose extraite des cerne des arbres et faire ainsi des comparaisons entre échantillons provenant d'une quantité relativement petite de bois.

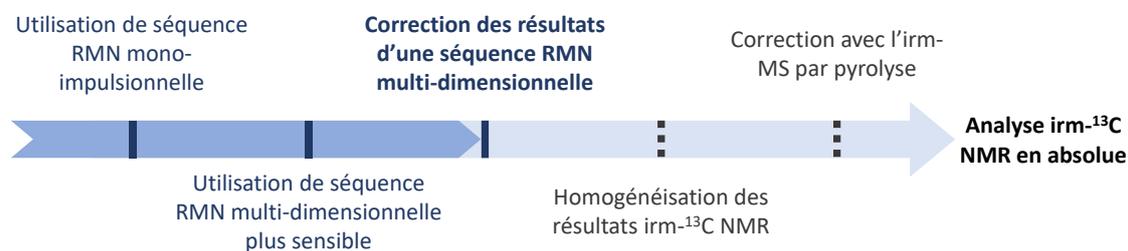


Figure 101 : Avancée dans les objectifs de la thèse avec la correction des résultats d'une séquence RMN multi-dimensionnelle.

2. Homogénéisation des résultats d'irm-¹³C NMR

Comme évoqué précédemment, pour augmenter la sensibilité en irm-¹³C NMR il est possible d'utiliser un champ magnétique plus élevé, de changer la configuration de la sonde ou la méthode d'acquisition. Ces changements peuvent entraîner des biais dans les mesures isotopiques provenant de l'effet d'*off-resonance*, des filtres de réception et des effets de sonde. Des corrections pour lisser les effets instrumentaux doivent être mises en place. Les modalités des facteurs de correction entre spectromètres RMN et leur justification sont l'objet de ce paragraphe.

Sur un spectre RMN ¹³C découplé des protons, plus le signal est loin de la fréquence d'excitation (centre du spectre) et plus il est impacté par l'effet d'*off-resonance* et les filtres de réception (Figure 102). Une augmentation de la gamme spectrale ou du champ magnétique entraîne un élargissement de la gamme de fréquences observée et engendre une accentuation des biais provenant des effets d'*off-resonance* et des filtres de réception.

Les effets provenant de la géométrie de la sonde sont visibles sur des molécules bi-marquées qui sont utilisés pour mesurer la justesse et la précision du découplage dans la séquence *Inverse Gated* (Cf. Chapitre I). Les molécules étant bi-marquées il est possible de par leur constitution de calculer une erreur sur la justesse de la séquence. Les expériences réalisées sur un 700 MHz avec une sonde inverse et sur un 400 MHz sur une sonde directe donnent une erreur sur l'éthanol bi-marqué de 7‰ et 0,01‰, et sur l'acide acétique bi-marqué 30‰ et -2‰, respectivement (Figure 103).

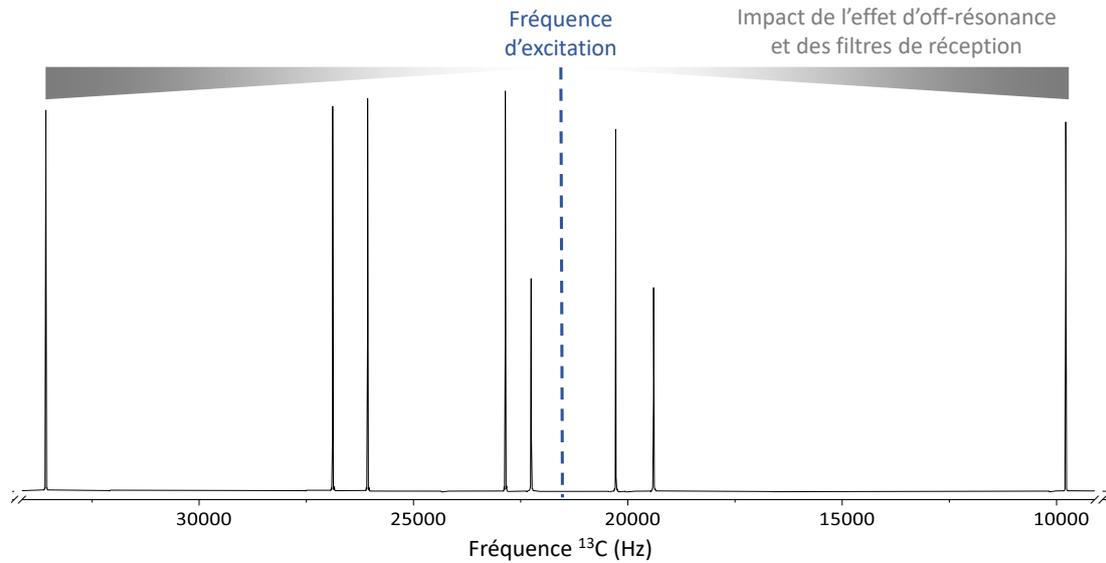


Figure 102 : Représentation graphique des effets d'off-résonance et des filtres de réception sur la justesse en fonction de la fréquence d'excitation.

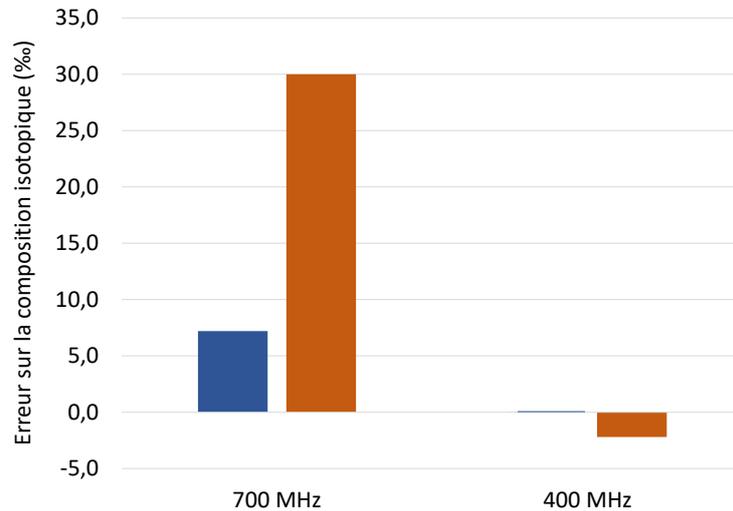


Figure 103 : Erreur sur les compositions isotopiques sur l'éthanol bi-marqué (■) et l'acide acétique (■) analysés sur un 700 MHz équipé d'une sonde inverse et un 400 MHz équipé d'une sonde directe.

Ces résultats montrent l'impact de la gamme spectrale (en effet, l'éthanol a une gamme de 39 ppm contre 157 ppm pour l'acide acétique ; Figure 104), et de la valeur du champ magnétique couplée à une différence de configuration de la sonde.

Par conséquent, les mesures réalisées en $irm-^{13}C$ NMR sont uniquement relatives ou partielles et dépendent de la configuration du spectromètre. Cette partie présente l'étude réalisée sur la correction des résultats d' $irm-^{13}C$ NMR afin de les rendre justes quelle que soit la configuration du spectromètre. La préparation des échantillons bi-marqués et l'attribution des signaux sont données dans l'annexe 6.

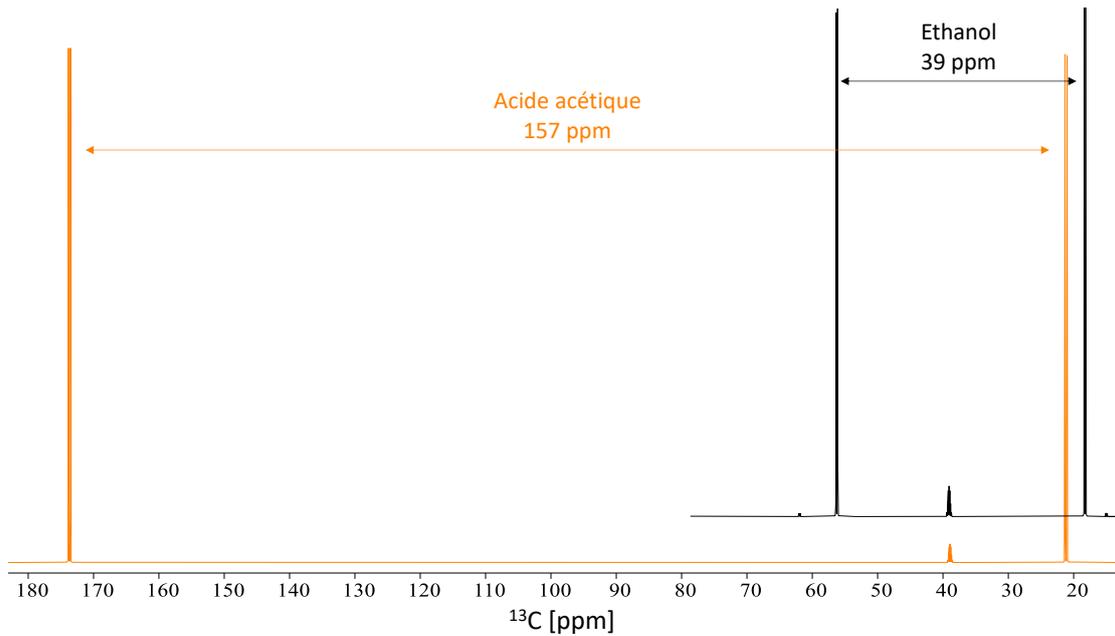


Figure 104 : Différence de la largeur de gamme entre l'acide acétique (■) et l'éthanol bi-marqué (■).

2.1. Méthodologie

Pour harmoniser les résultats obtenus avec deux configurations différentes du spectromètre, il est important de prendre en compte la gamme spectrale des molécules. Pour modéliser cet effet et permettre de couvrir une grande gamme spectrale, plusieurs molécules ont été analysées telles que le benzaldéhyde, le DAGF, et l'acétate de vinyle. L'un des signaux de chaque molécule sert de signal de référence et il est placé le plus près possible de la fréquence d'excitation sans être confondu avec celle-ci (à 60 Hz de la porteuse). Ainsi, ce signal n'est pas impacté par l'effet d'*off-resonance* et les filtres de réception (Figure 105). Pour compléter le modèle, le benzaldéhyde a été analysé avec deux signaux différents pris pour référence.

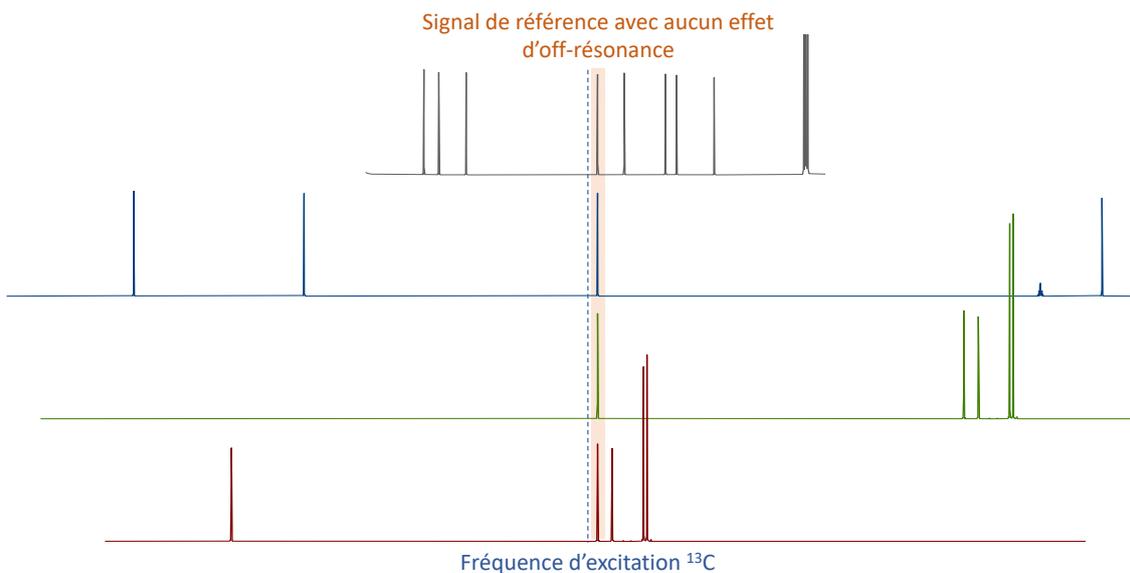


Figure 105 : Spectre RMN $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ enregistré à 700,28 MHz du DAGF (■), de l'acétate de vinyle (■) et du benzaldéhyde (■/■) avec un signal de référence placé 60 Hz de la fréquence d'excitation.

Le même signal est utilisé entre les deux spectromètres dont un est considéré comme la référence. Le spectromètre de référence doit être le spectromètre avec la configuration donnant des fractions molaires de référence (Cf. Chapitre I). Une fois les acquisitions réalisées, les fractions molaires de chaque site sont calculées pour le spectromètre de référence noté réf (Eq. 4.5) et A (Eq. 4.6).

$$f_i^{réf} = \frac{S_i^{réf}}{\sum_j S_j^{réf}} \quad (4.5)$$

$$f_i^A = \frac{S_i^A}{\sum_j S_j^A} \quad (4.6)$$

Ensuite chaque fraction molaire est divisée par la fraction molaire du signal de référence donnant alors un facteur τ_i (Eq. 4.7 et 4.8).

$$\tau_i^{réf} = \frac{f_i^{réf}}{f_{ref}} \quad (4.7)$$

$$\tau_i^A = \frac{f_i^A}{f_{ref}} \quad (4.8)$$

avec, $f_i^{réf}$ et f_i^A la fraction molaire du site i du spectromètre de référence et A, respectivement et f_{ref} la fraction molaire du signal de référence. Enfin, un facteur de correction λ_i est extrait en divisant les facteurs τ_i des spectromètres pour chaque site (Eq. 4.9).

$$\lambda_i = \frac{\tau_i^A}{\tau_i^{réf}} \quad (4.9)$$

Ce facteur de correction est basé sur l'hypothèse que la fraction molaire du signal de référence soit la même quelle que soit la configuration du spectromètre, étant supposé être exemptée de biais.

2.2. Configuration des spectromètres

Plusieurs configurations de spectromètres ont été utilisées avec des champs magnétiques différents, des consoles et des sondes provenant de divers constructeurs (Tableau 10). Les consoles proviennent de deux constructeurs : RS²D et Bruker et les sondes de QUAD system, QOneTec et Bruker. Ces constructeurs utilisent des technologies différentes qui peuvent impacter les résultats isotopiques. Il est important de noter que les sondes QUAD system et QOneTec ne sont pas standard et ont été fabriquées sur mesure pour observer spécifiquement un autre noyau à côté du ¹³C. Elles ont des tailles de bobines plus grandes que les autres sondes utilisées couramment en RMN. Les canons de shims proviennent du même fabricant (Bruker) mais sont de différentes générations.

Tableau 10 : Configuration des spectromètres utilisés.

Champ magnétique	400 MHz	500 MHz	700 MHz
Canon de shims	Boss-1	Boss-2	Boss-2
Console	Pulse RS ² D	Avance III Bruker	Avance HD Bruker
	Normal	Normal	Cryogénique inverse
	QUAD system	QOneTec	Bruker
Sonde	X[¹³ C- ² H]/ ¹ H	X[¹³ C- ¹⁷ O]/ ¹ H	QCI ¹ H/ ¹⁹ F- ¹³ C/ ¹⁵ N
	lock ¹⁹ F grad-Z	lock ¹⁹ F grad-Z	lock ² H grad-Z
	5 mm	5 mm	5 mm

Les molécules d'intérêt sont analysées sur ces configurations afin de corriger le 700 MHz qui présente la plus grande sensibilité mais aussi les plus grands biais. Les préparations d'échantillons et les paramètres d'acquisition pour chaque spectromètre sont donnés en annexe 7.

2.3. Résultats

2.3.1. Courbes de correction

Les échantillons sont analysés sur chaque spectromètre en utilisant la même méthodologie. Pour chaque écart entre le signal d'intérêt et le signal de référence, un facteur λ_i est déterminé (Eq. 4.9). La Figure 106 présente les résultats obtenus entre le 700 et le 500 MHz avec ce dernier pris comme référence. Une courbe polynomiale de degrés 3 peut être utilisée pour ajuster les résultats afin d'extraire une équation. Un R^2 de 0,96 est atteint montrant relativement une bonne fiabilité de la courbe.

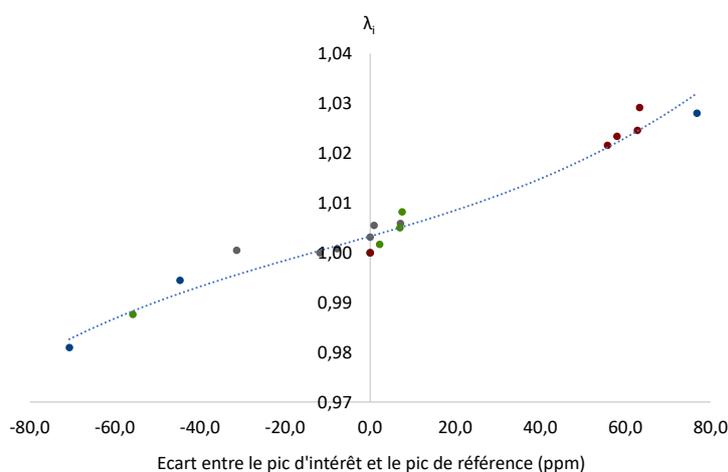


Figure 106 : Courbe de correction entre le 700 et le 500 MHz avec le DAGF (■), l'acétate de vinyle (■) et le benzaldéhyde (■/■). L'équation de la courbe est $y = 2E-08x^3 + 5E-07x^2 + 0,0002x + 1,0033$ avec un R^2 de 0,96.

La même courbe peut être tracée avec les résultats entre le 700 et le 400 MHz (Figure 107), avec un R^2 de 0,83. Ce coefficient de détermination est inférieur à celui trouvé entre le 700 et

le 500 MHz montrant un ajustement moins bon des points. Cela peut s'expliquer par une plus faible sensibilité du spectromètre 400 MHz par rapport au 500 MHz. Ainsi, des instabilités sur les mesures qui durent plus longtemps peuvent apparaître et entraîner des résultats moins concordants.

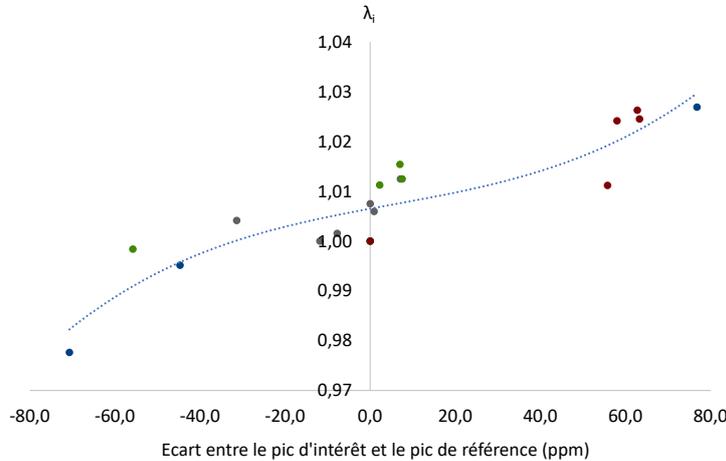


Figure 107 : Courbe de correction entre le 700 et le 400 MHz avec le DAGF (■), l'acétate de vinyle (■) et le benzaldéhyde (■/■). L'équation de la courbe est $y = 3E-08x^3 - 5E-07x^2 + 0,0002x + 1,0065$ avec un R^2 de 0,83.

Les résultats issus de l'analyse irm-¹³C peuvent donc être harmonisés mais il reste, cependant, à corriger la justesse absolue afin d'obtenir des valeurs vraies comparables aux valeurs résultant d'une approche par fragmentation comme par *Py-GC/irm-MS*.

2.4. L'acétate de vinyle : vers un nouveau standard pour l'irm-¹³C NMR

Afin de corriger la justesse des résultats donnés par l'irm-¹³C, un nouveau standard a été imaginé. L'acétate de vinyle est une molécule qui présente deux avantages : (i) elle permet de couvrir quasiment toute la gamme ¹³C entre 20 et 170 ppm (Figure 108) et (ii) elle est facilement analysable par *Py-GC/irm-MS*. Des valeurs justes $\delta^{13}C_i$ peuvent donc être obtenues permettant alors de vérifier la justesse de l'irm-¹³C NMR.

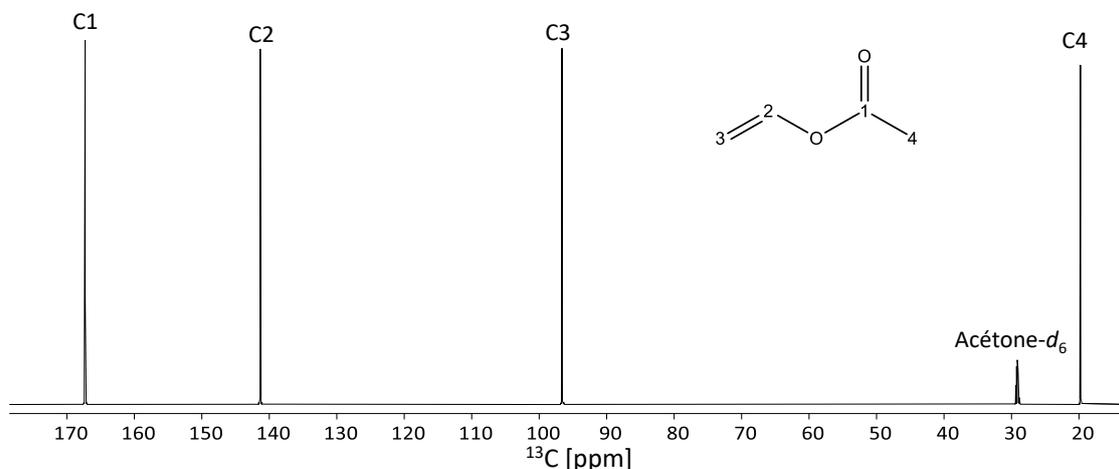


Figure 108 : Spectre RMN ¹³C-¹H} de l'acétate de vinyle enregistré à 700,28 MHz avec une sonde cryogénique avec le C3 comme signal de référence. La température de l'échantillon a été réglée à 298 K.

2.4.1. Comparaison entre la Py-GC/irm-MS et l'irm-¹³C NMR

L'analyse Py-GC/irm-MS a été réalisée à Tokyo Tec. Ces résultats permettent de comparer la composition intramoléculaire isotopique de l'acétate de vinyle donnée par la Py-GC/irm-MS et par l'irm-¹³C NMR (Figure 109). Les résultats montrent que les données acquises sur le 400 et le 500 MHz sont similaires à celle de la Py-GC/irm-MS. Les compositions isotopiques provenant du 700 MHz présentent, comme attendu, des biais notamment sur les carbones aux extrémités (C1 et C4) de l'ordre de 25%. Ces observations sont en accord avec la littérature présentant des biais importants lorsque le champ magnétique est élevé ou lorsqu'une sonde inverse est utilisée (Cf. Chapitre I).

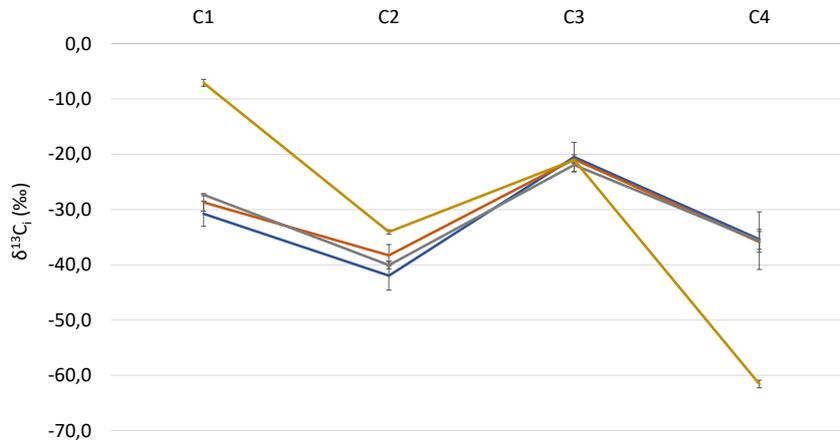


Figure 109 : Compositions isotopiques spécifiques de l'acétate de vinyle par Py-GC/irm-MS (—) et irm-¹³C NMR sur le 400 (—), 500 (—) et 700 MHz (—). Les bars d'erreur correspondent à deux fois l'écart-type.

L'utilisation du 700 MHz permet d'augmenter la sensibilité des expériences, mais les résultats précédents montrent un défaut de justesse entraînant la nécessité de les corriger.

2.4.2. Correction de l'acétate de vinyle

Afin d'obtenir des résultats justes provenant du 700 MHz, il faut utiliser la démarche développée au paragraphe 2.1 de ce chapitre avec l'utilisation de la courbe de correction entre ce spectromètre et un autre dit de référence tel que le 400 ou le 500 MHz. Une fois analysée, l'écart en ppm entre le signal de référence et les signaux d'intérêt est calculé, permettant d'extraire les λ_i avec la courbe de correction. Le facteur τ_i^{ref} pour chaque site i (Eq. 4.10) peut alors être déterminé à partir des fractions molaires sur le 700 MHz (Eq. 4.11).

$$\tau_i^{ref} = \lambda_i \cdot \tau_i^{700} \quad (4.10)$$

$$\tau_i^{700} = \frac{f_i^{700}}{f_{ref}} \quad (4.11)$$

Avec f_i^{700} et f_{ref} les fractions molaires du signal d'intérêt et de référence, respectivement, sur le 700 MHz. Enfin, chaque fraction molaire est corrigée en multipliant le facteur τ_i^{ref} par la fraction molaire du pic de référence (Eq. 4.12).

$$f_i^{ref} = \tau_i^{ref} \cdot f_{ref} \quad (4.12)$$

Les résultats du 700 MHz sur l'acétate de vinyle ont été corrigés avec la courbe de correction avec le 500 MHz comme spectromètre de référence (Figure 110). Ils sont exprimés en utilisant l'écart aux valeurs données par la *Py-GC/irm-MS*. Plus la courbe est proche de 0 et plus les résultats sont proches des valeurs de la pyrolyse, considérés comme justes. Le graphique montre que les biais sont corrigés en passant de 25‰ de différence à environ 2‰, ce qui est très acceptable considérant les erreurs de mesures pour chaque technique.

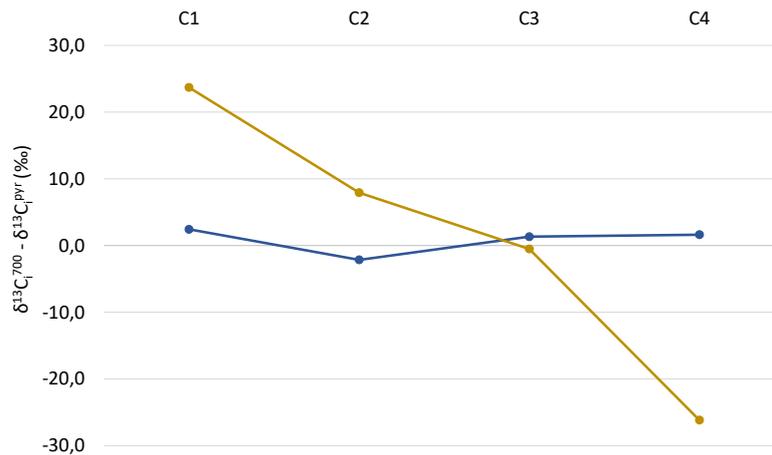


Figure 110 : Résultats du 700 MHz de l'acétate de vinyle non corrigés (—) et corrigés (—). Les valeurs sont décrites comme le décalage à la *Py-GC/irm-MS* : $\delta^{13}C_i^{700} - \delta^{13}C_i^{pyr}$.

2.4.3. Influence de la fréquence d'excitation

Les courbes de correction sont dépendantes des écarts entre la position du signal de référence et celles des signaux d'intérêt partant alors du principe que les signaux proches de la fréquence d'excitation sont justes et ou en tout cas peu impactés par les biais. Afin de compléter les courbes de correction, l'acétate de vinyle a été analysé avec la fréquence d'excitation placée à côté de chaque carbone sur chaque configuration de spectromètre.

Les résultats montrent un comportement différent entre le 400 MHz (Figure 111a) et les deux autres configurations : 500 (Figure 111b) et 700 MHz (Figure 111c). Les profils obtenus sur le 400 MHz sont symétriques : si la fréquence est placée à côté du signal du C4, le C1 est faux de l'ordre de 40‰ et inversement. Lorsque la fréquence d'excitation est placée proche du C2 ou du C3 les deux profils sont proches de la *Py-GC/irm-MS* montrant qu'une fréquence d'excitation au centre du spectre est privilégiée pour obtenir des résultats justes.

Ce comportement n'est pas observé sur les deux autres configurations. Les configurations du 500 et du 700 MHz présentent des résultats similaires mais les effets sont plus accentués sur le 700 MHz probablement en raison du champ magnétique élevé et de la géométrie de la sonde. Les résultats montrent que les carbones ne sont pas toujours justes à côté de la fréquence d'excitation. Quelle que soit la fréquence d'excitation le C3 est toujours juste montrant un autre effet pas encore observé sur les résultats isotopiques.

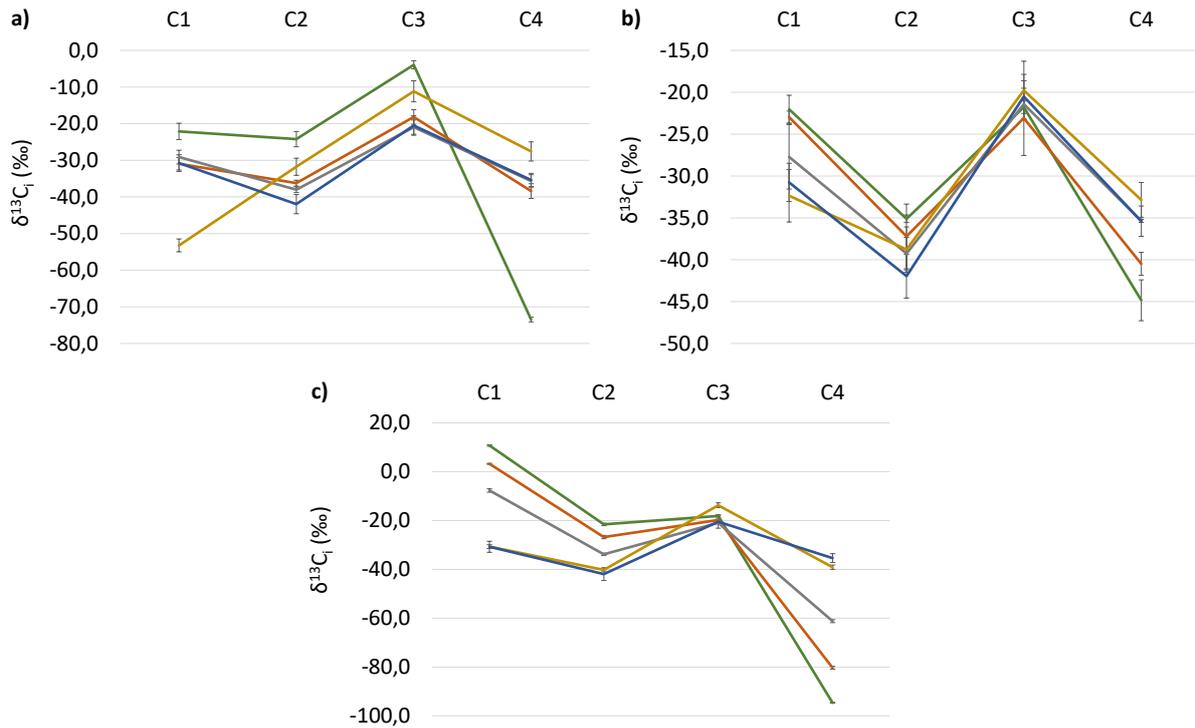


Figure 111 : Composition isotopique de l'acétate de vinyle par Py-GC/irm-MS (—) et irm-¹³C NMR sur le : a) 400 MHz, b) 500 MHz, et c) 700 MHz avec les signaux de référence : C1 (—), C2 (—), C3 (—) et C4 (—). Les bars d'erreur correspondent à deux fois l'écart-type.

Sur le 700 MHz, l'effet est plus marqué, lorsque la fréquence d'excitation est placée à côté C1, le C1 et le C4 sont faux mais lorsque qu'elle est placée à côté du C4, tout le profil est juste et proche des résultats donnés par la Py-GC/irm-MS. Pour la première fois, un profil juste et sans correction a été observé sur le 700 MHz. Cet effet impacte les données de façon asymétrique et il est visible sur les courbes de correction.

En ajoutant les données de l'acétate de vinyle, il est possible de corriger tous les signaux présents à moins de 150 ppm de part et d'autre d'un signal de référence. Entre le 700 et le 500 MHz (Figure 112) une fonction polynomiale de degré 3 permet d'ajuster les données conduisant à une équation avec un R^2 de 0,95. Ces résultats montrent que les signaux blindés (à droite du signal de référence) sont plus impactés par ce biais que les signaux déblindés (à gauche du signal de référence). Les données entre le 700 MHz et le 400 MHz (Figure 113) montrent des points beaucoup plus espacés de la courbe de tendance avec un R^2 de 0,81. Cela est cohérent avec le fait que ces deux spectromètres ont des comportements très différents vis-à-vis de la fréquence de référence.

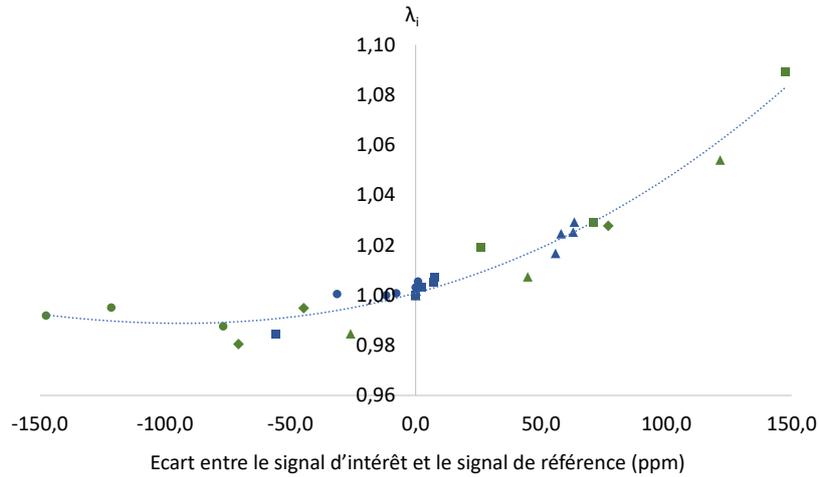


Figure 112 : Courbe de correction entre le 700 et le 500 MHz avec l'acétate de vinyle avec comme signal de référence le : C1 (■), C2 (▲), C3 (◆) et C4 (●), le DAGF (●), et le benzaldéhyde (■ - ▲). L'équation de la courbe de tendance est égale à : $y = 2.10^{-9}.x^3 + 2.10^{-6}.x^2 + 0,0003x + 1,0009$ avec un R^2 de 0,95.

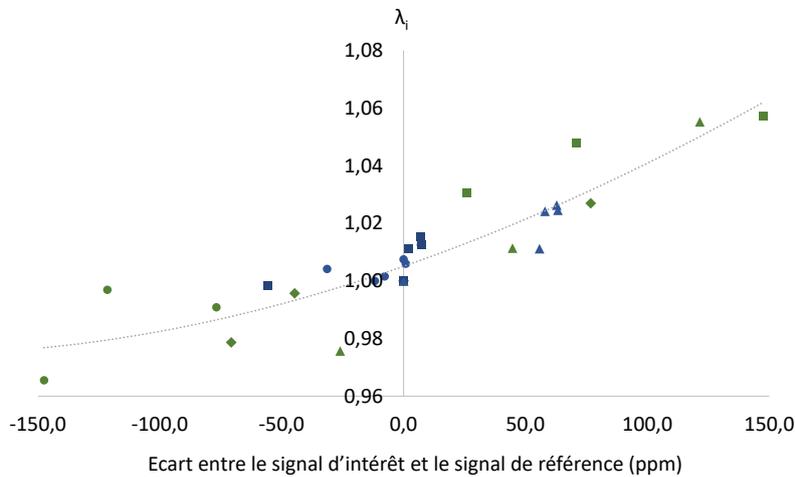


Figure 113 : Courbe de correction entre le 700 et le 400 MHz avec l'acétate de vinyle avec comme signal de référence le : C1 (■), C2 (▲), C3 (◆) et C4 (●), le DAGF (●), et le benzaldéhyde (■ - ▲). L'équation de la courbe de tendance est égale à : $y = -3.10^{-10}.x^3 + 7.10^{-7}.x^2 + 0,0003x + 1,0051$ avec un R^2 de 0,81.

Ces courbes de correction montrent que l'homogénéisation des résultats d'irm-¹³C NMR entre deux spectromètres est possible (Figure 114) pour conduire à des valeurs qualifiées de justes.

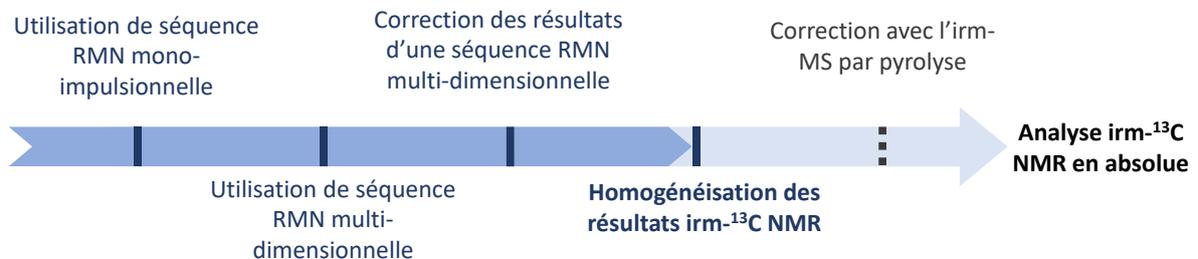


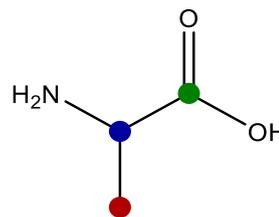
Figure 114 : Avancée dans les objectifs de thèse avec l'homogénéisation des résultats irm-¹³C NMR.

3. Vers des valeurs justes : application sur l'alanine

Afin de vérifier l'application des courbes de correction, des échantillons d'alanine ont été analysés par irm-¹³C NMR sur le 700 MHz. En raison de sa faible solubilité, l'analyse est réalisable sur 30 mg de produit au maximum et seule la configuration du 700 MHz permet son analyse dans des délais raisonnables. [187] Sa petite taille lui confère l'avantage d'être analysable facilement par irm-MS par fragmentation chimique et pyrolyse. Pour mieux comprendre la justesse en irm-¹³C NMR plusieurs isotopomères d'alanine ont été constitués par ajout d'alanine mono enrichie en ¹³C sur chacun des carbones, disponible commercialement (Tableau 11). Chaque échantillon ainsi fabriqué a ensuite été analysé par irm-MS par fragmentation chimique et pyrolyse et irm-¹³C NMR.

Tableau 11 : Composition isotopique globale ($\delta^{13}C_g$) des échantillons d'alanine enrichis sur des positions spécifiques. En vert, les molécules enrichis sur le carbone de la fonction COOH ; en bleu, sur le CH et en rouge, le CH₃. L'échantillon de référence correspond à la molécule d'alanine non enrichi.

Echantillons	$\delta^{13}C_g$ (‰)	Ecart-type (‰)
Référence	-12,3	0,1
¹³ COOH-1	-0,8	0,1
¹³ COOH-2	-4,7	0,1
¹³ COOH-3	-7,3	0,1
¹³ COOH-4	-8,8	0,1
¹³ CH-NH ₂ -1	-3,1	0,3
¹³ CH-NH ₂ -2	-7,1	0,1
¹³ CH-NH ₂ -3	-8,8	0,1
¹³ CH-NH ₂ -4	-10,0	0,1
¹³ CH-1	+1,7	0,3
¹³ CH-2	-7,9	0,1
¹³ CH-3	-9,5	0,2



3.1. Analyse irm-MS par fragmentation chimique et pyrolyse de l'alanine

3.1.1. Conditions d'analyse

Comme pour l'acétate de vinyle, les échantillons ont été analysés par Tokyo Tec. Une première étape de décarboxylation consiste à mettre en réaction l'alanine avec de la ninhydrine entraînant le dégagement de CO₂ et la formation d'acétaldéhyde (Figure 115).

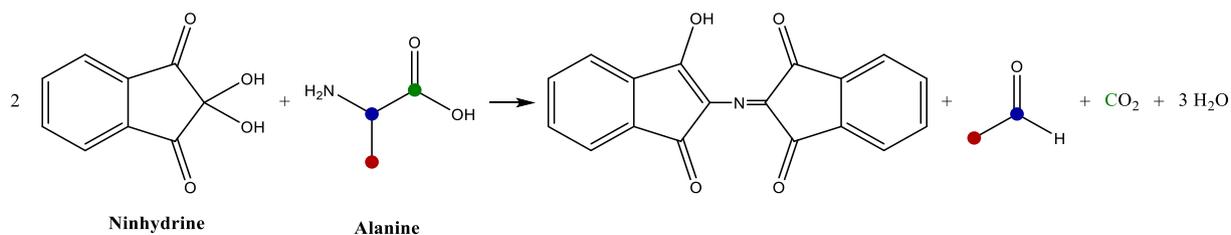


Figure 115 : Réaction de l'alanine en présence de ninhydrine.

Le CO₂ est analysé directement par *GC-irm-MS* pour mesurer la composition isotopique correspondant à la fonction COOH de l'alanine. En parallèle, l'acétaldéhyde est isolé à l'aide d'une microextraction en phase solide (SPME) et injecté en *Py-GC/irm-MS* afin de mesurer la composition isotopique des deux autres carbones restants. La température de pyrolyse a été fixée à 1000 °C, à cette température les fragments sont facilement identifiables et ne présentent pas de formation d'un mélange de carbones dû à la haute température. L'ensemble de la méthodologie sera dénommée *Py-GC/irm-MS* dans la suite du chapitre.

3.1.2. Résultats par fragmentation – *Py-GC/irm-MS*

Les résultats confirment l'enrichissement par site des carbones de la molécule (Tableau 12).

3.2. Analyse par irm-¹³C RMN

3.2.1. Préparation d'échantillon et spectromètre

L'analyse RMN est réalisée sur 30 mg d'alanine solubilisés dans 600 µL d'une solution de D₂O et d'acide acétique-*d*₄ (200 µL et 400 µL, respectivement).^[187] Le spectromètre utilisé pour ces analyses est un 700 MHz équipé d'une sonde cryogénique. La courbe de correction est réalisée par rapport au signal provenant de la fonction CH, placé au centre du spectre à 60 Hz de la fréquence d'excitation (Figure 116). Le nombre de scans a été fixé à 152 pour obtenir un S/B de 700 sur le signal le moins intense. La température du spectromètre a été réglée à 303 K. Le T_1^{max} mesuré est de 3,5 s entraînant une durée d'analyse de 1 h 30 min par spectre. Trois spectres sont acquis par échantillon pour obtenir une précision de l'ordre du pour mille.

3.2.1. Résultats par irm-¹³C RMN

Les résultats de l'analyse des échantillons par irm-¹³C RMN donnent des résultats avec des biais provenant de l'utilisation du spectromètre 700 MHz (Tableau 12). Les résultats bruts sans correction montrent des écarts de 14‰, 4‰ et 10‰ pour les sites C_{CH_3} , C_{CH-NH_2} , et C_{COOH} , respectivement. Malgré que le signal provenant du groupement C_{CH-NH_2} soit placé au centre du spectre, une erreur de 4‰ est observée par rapport aux résultats donnés par *Py-GC/irm-MS*. Cette observation est la même que celle réalisée sur l'acétate de vinyle et confirme un biais supplémentaire.

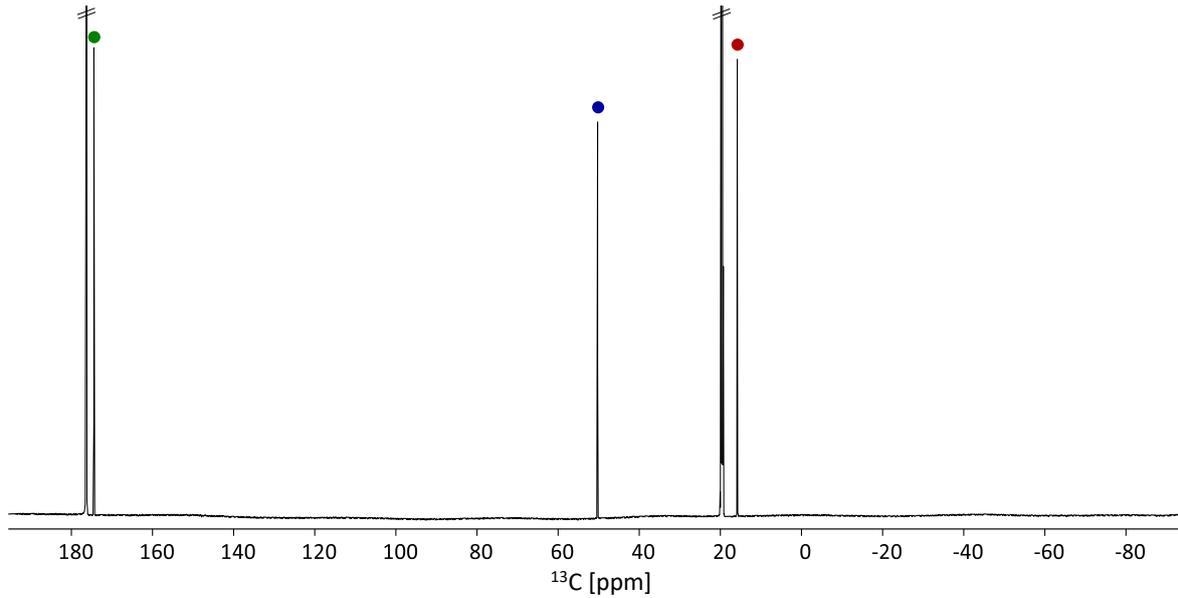


Figure 116 : Spectre RMN ¹³C-¹H} de l'alanine avec les fonctions COOH (●), CH (●) et CH₃ (●). Le spectre a été enregistré à 700,28 MHz à 303 K.

3.1. Correction et expression des résultats

3.1.1. Utilisation d'un facteur de correction

Un facteur de correction peut être établi à partir de la moyenne des différences de tous les échantillons entre les deux analyses (Eq. 4.13).

$$\Delta\delta^{13}C_i = \frac{\sum_{n=1}^{n=n_t} \delta^{13}C_i(\text{irm-}^{13}\text{C NMR})_n - \delta^{13}C_i(\text{Py-GC/irm-MS})_n}{n_t} \quad (4.13)$$

avec, $\delta^{13}C_i(\text{irm-}^{13}\text{C NMR})_n$ et $\delta^{13}C_i(\text{Py-GC/irm-MS})_n$ les compositions isotopiques de chaque site par *irm-¹³C NMR* et *Py-GC/irm-MS*, respectivement, et n_t le nombre total d'échantillons.

Chaque facteur de correction est ensuite utilisé pour corriger le $\delta^{13}C_i$ de l'*irm-¹³C NMR* (Eq. 4.14).

$$\delta^{13}C_i(\text{irm-}^{13}\text{C NMR}_{\text{corrigé}}) = \delta^{13}C_i(\text{irm-}^{13}\text{C NMR}) - \Delta\delta^{13}C_i \quad (4.14)$$

L'écart entre les résultats corrigés et la pyrolyse permet d'observer l'efficacité du facteur de correction (Tableau 13). Les résultats montrent une bonne correction des données issues de l'*irm-¹³C NMR* avec des écarts en moyenne de 1‰ entre les deux techniques.

3.1.1. Utilisation de la courbe de correction

La courbe de correction déterminée dans la partie précédente (Figure 112) peut être également utilisée pour corriger les résultats bruts de l'*irm-¹³C NMR*. Les écarts avec la fragmentation chimique et par pyrolyse (Tableau 13) donnent des résultats moins concluant qu'avec un facteur

de correction avec une moyenne de 2,6‰ avec des écarts importants notamment pour l'échantillon ¹³CH-NH₂-1.

3.1. Conclusion

L'analyse des résultats montre une réduction des biais entre l'irm-¹³C NMR et la Py-GC/irm-MS. Avec cette méthodologie, des résultats irm-¹³C NMR ont été obtenus en absolu. Des écarts ponctuels peuvent être observés en utilisant la courbe de correction mais ils sont expliqués avec les écart-types de chacune des méthodes. La méthodologie mise en place ici est opérationnelle mais elle n'est pas encore optimale ; probablement en raison d'un manque de densité de points pour définir la courbe sur l'ensemble de la gamme. Cette méthodologie devra être validée, entérinée et renforcée avec des données supplémentaires dans le cadre de tests inter laboratoires, sur différentes molécules et différentes techniques.

Une meilleure compréhension provenant de l'asymétrie des biais pourrait permettre de mieux les modéliser. Afin d'approfondir les origines de ces biais, plusieurs développements sont abordés dans le chapitre suivant.

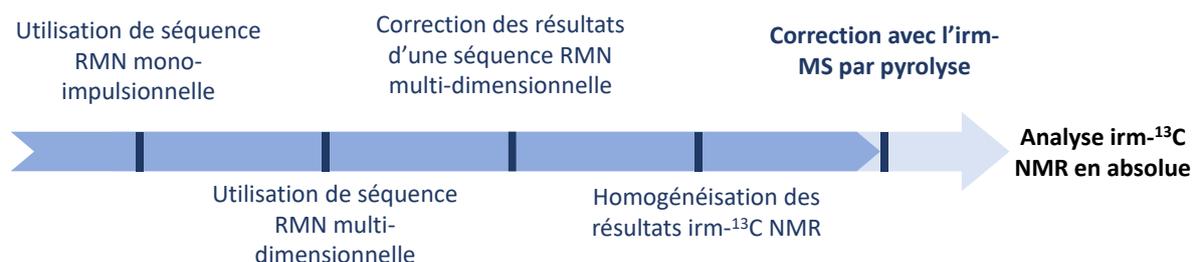


Figure 117 : Avancée dans les objectifs de thèse avec la correction absolue de l'irm-¹³C NMR.

Tableau 12 : Distribution isotopique des carbones ($\delta^{13}C_i$) des échantillons d'alanine enrichis mesurée par irm-¹³C NMR à 700 MHz.

Echantillons	$\delta^{13}C_i$ (‰) par pyrolyse			$\delta^{13}C_i$ (‰) par irm- ¹³ C NMR		
	$\delta^{13}C_{CH_3}$	$\delta^{13}C_{CH-NH_2}$	$\delta^{13}C_{COOH}$	$\delta^{13}C_{CH_3}$	$\delta^{13}C_{CH-NH_2}$	$\delta^{13}C_{COOH}$
Référence	-7,3	-10,7	-11,9	-21,7	-14,7	-0,5
¹³ COOH-1	-6,8	-13,2	+22,0	-20,9	-16,0	34,5
¹³ COOH-2	-7,2	-13,0	+10,4	-21,2	-14,4	21,5
¹³ COOH-3	-3,0	-11,2	+3,3	-21,0	-14,7	13,8
¹³ COOH-4	-5,6	-11,2	-1,7	-20,3	-14,6	8,5
¹³ CH-NH ₂ -1	-8,2	+19,2	-11,9	-21,2	12,8	-0,9
¹³ CH-NH ₂ -2	-7,9	+4,5	-11,8	-22,2	0,8	0,2
¹³ CH-NH ₂ -3	-8,0	-0,6	-11,6	-21,1	-5,0	-0,3
¹³ CH-NH ₂ -4	-8,3	-4,2	-11,8	-20,3	-6,1	-3,6
¹³ CH ₃ -1	+37,8	-10,1	-12,1	21,6	-15,2	-1,3
¹³ CH ₃ -2	+6,2	-10,6	-12,2	-6,9	-13,0	-3,8
¹³ CH ₃ -3	+0,6	-11,0	-12,2	-12,7	-15,0	-0,8

Tableau 13 : Ecart entre la distribution isotopique ($\delta^{13}C_i$) donnée par la pyrolyse (Py-GC/irm-MS) et la RMN (irm-¹³C NMR) en utilisant un facteur de correction ou la courbe de correction.

Echantillons	Facteur de correction			Courbe de correction		
	$\delta^{13}C_{CH_3}$	$\delta^{13}C_{CH-NH_2}$	$\delta^{13}C_{COOH}$	$\delta^{13}C_{CH_3}$	$\delta^{13}C_{CH-NH_2}$	$\delta^{13}C_{COOH}$
Référence	0,3	0,5	-0,7	0,9	3,1	-2,0
¹³ COOH-1	-0,1	-0,8	-1,8	0,6	1,9	-2,8
¹³ COOH-2	-0,2	-2,2	-0,3	0,4	0,5	-1,4
¹³ COOH-3	3,8	-0,1	0,2	4,4	2,6	-0,9
¹³ COOH-4	0,6	-0,2	0,5	1,2	2,5	-0,7
¹³ CH-NH ₂ -1	-1,2	2,8	-0,3	-0,5	5,4	-1,6
¹³ CH-NH ₂ -2	0,2	0,1	-1,2	0,8	2,8	-2,5
¹³ CH-NH ₂ -3	-1,1	0,8	-0,5	-0,5	3,4	-1,8
¹³ CH-NH ₂ -4	-2,2	-1,7	2,5	-1,5	1,0	1,2
¹³ CH ₃ -1	2,0	1,6	-0,1	2,1	4,2	-1,4
¹³ CH ₃ -2	-1,1	-1,2	2,4	-0,7	1,5	1,0
¹³ CH ₃ -3	-0,9	0,4	-0,7	-0,3	3,1	-2,0

Chapitre V : Réduction de la dépendance à la typologie de la sonde

Dans le chapitre précédent, nous avons constaté que des biais peuvent être présents dans le cas d'une sonde inverse avec l'utilisation de la séquence *Inverse Gated*. Ces effets peuvent même être accentués, par rapport à une sonde directe car, la hauteur de la bobine ^1H (H') qui sert notamment au découplage est plus petite que la hauteur de la bobine d'observation ^{13}C (H) entraînant des distorsions sur la forme des signaux. La question est alors : comment réduire les biais engendrés par la géométrie de la sonde, plus particulièrement pour une sonde inverse, mais aussi de manière générale pour n'importe quelle sonde ?

La réponse peut être perçue en posant l'hypothèse que si les volumes de l'échantillon soumis aux fréquences d'observation et de découplage sont suffisamment réduits alors les effets de bord au sein de l'échantillon seront significativement diminués. Dans ce but, une séquence a été développée afin de réduire la zone d'observation de la bobine ^{13}C pour que le volume observé soit une tranche d'une hauteur inférieure à H et H' . L'ultime question devient alors : peut-on obtenir directement des résultats « vrais » en RMN grâce à cette stratégie ?

Ce chapitre aborde le développement et les premières optimisations de cette séquence ainsi que l'évaluation de la justesse des résultats obtenus. Nous nous sommes placés dans le cas le plus défavorable en utilisant le spectromètre 700 MHz, équipé d'une sonde cryogénique de géométrie inverse.

1. Développement de la séquence CWET

1.1. Stratégie

La séquence CWET (^{13}C -WET) s'inspire de la séquence MWET développée pour supprimer le radiation damping (Cf. Chapitre I). La sélection du volume sensible à exciter était à la fréquence ^1H . Le passage du ^1H au ^{13}C entraîne une gamme de fréquence à disperser plus importante en passant de 7 à 35 kHz nécessitant des gradients plus importants. Par ailleurs, la séquence MWET visait à supprimer la plus grande part du signal pour éliminer le radiation damping. Ici l'objectif est de ne supprimer que le signal des bords de la zone de détection ; ce qui demande de retravailler la séquence et justifie une optimisation des impulsions de saturations. Cette séquence (Figure 118) est composée d'une succession d'impulsions sélectives combinées à un gradient d'encodage spatial (g_e) qui permet de ne basculer dans le plan transversal qu'une partie de l'aimantation ^{13}C . Puis le gradient de déphasage g_i permet de supprimer toutes les aimantations précédemment excitées. Ce motif de saturation spatialement sélective est suivi d'une séquence *Inverse Gated* avec un 90° et un découplage adiabatique pendant l'acquisition.

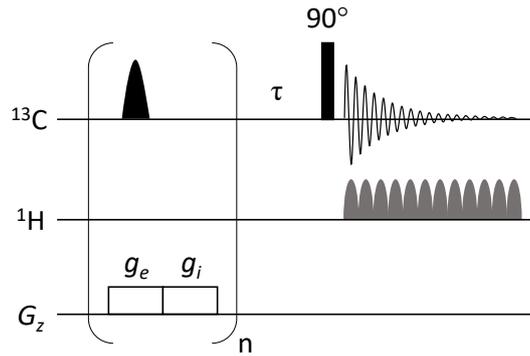


Figure 118 : Séquence CWET composée d'impulsions sélectives successives permettant de ne sélectionner qu'une partie de l'aimantation ^{13}C . L'application d'un gradient g_e en même temps que les impulsions sélectives sélectionnent spatialement une partie du tube. Le gradient de purge g_i permet de supprimer les aimantations sélectionnées précédemment. Le motif Inverse Gated qui termine la séquence permet alors d'observer le signal provenant d'une tranche de l'échantillon.

Les impulsions sélectives utilisées permettent de sélectionner directement deux zones du tubes (Figure 119). Le gradient g_i supprime les aimantations contenues dans les parties supérieure et inférieure du tube permettant alors de n'observer que les aimantations comprises dans une tranche du tube de hauteur e .

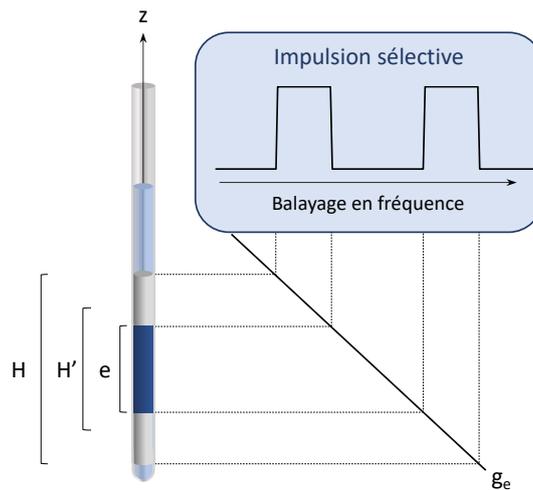


Figure 119 : Application d'une impulsion sélective avec un gradient g_e afin de sélectionner une tranche du tube de hauteur e . H représente la hauteur de la bobine ^{13}C et H' la hauteur de la bobine ^1H .

La hauteur de la tranche (e) peut être déterminée avec l'équation suivante (Eq. 5.1) : ^[188]

$$e = \frac{2 \cdot \delta f - \Delta F}{\frac{\gamma}{2\pi} \cdot g_e} \quad (5.1)$$

avec : δf , décalage en fréquence des zones de saturation ; ΔF , la gamme de fréquence balayée ; γ , le rapport gyromagnétique du noyau excité ; et g_e l'intensité du gradient g_e .

1.2. Création des impulsions

Les impulsions sélectives ont été créées grâce au logiciel Mathcad™. Elles résultent de la superposition de deux impulsions symétriques dont la gamme de fréquence balayée (ΔF), la durée et la forme (modulation en fréquence et en amplitude) sont les mêmes mais avec une valeur opposée pour la fréquence centrale ($\pm \delta f$). La durée de ces impulsions est de 5 ms avec une modulation en amplitude sous la forme d'une fonction cosinus et un balayage en fréquence calculé à partir d'un l'algorithme assurant une adiabaticité on-résonance indépendante de l'offset. [44] Ces deux impulsions sont ensuite combinées en une seule pour former le profil d'excitation attendu (Figure 120).

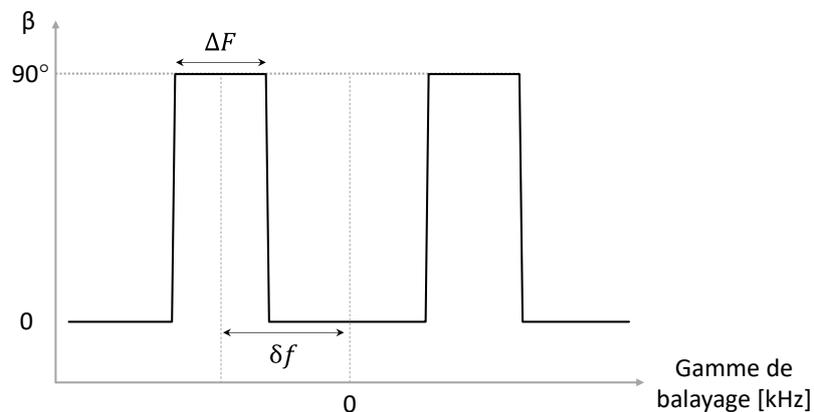


Figure 120 : Profil d'excitation visé avec les impulsions sélectives. Les impulsions ont une gamme de balayage de saturation (ΔF) décalée à la fréquence centrale $\pm \delta f$. Après calibrage, elles permettent de basculer les aimantations de 90° dans les zones ciblées afin de les éliminer par l'application d'un gradient tout en préservant la zone centrale.

2. Séquence de calibrage : Echograd-¹³C

La séquence Echograd-¹³C (Figure 121) a été utilisée afin de calibrer la séquence CWET. Le segment *Inverse Gated* est remplacé par un écho de spin réalisé avec un gradient de lecture (g_r) qui permet d'obtenir un écho, et après transformation de Fourier un profil spatial de l'échantillon dans la direction z , comme c'est le cas dans le premier écho de la séquence MISSTEC (Cf. Chapitre III).

Une fois l'écho obtenu, une fonction gaussienne est appliquée ($LB = -200$ et $GB = 0,5$) avant transformation de Fourier. Enfin, un phasage permet d'obtenir le profil de l'échantillon dans la direction z . La Figure 122 montre le profil du tube obtenu à partir de la séquence Echograd-¹³C sans impulsion de saturation. Ce profil est non rectangulaire (essentiellement en raison de la présence des inhomogénéités de B_1), et le signal est dispersé sur une gamme de fréquence ($\nu_{1/2}$) de 5182 Hz. Le programme d'impulsions est donné en annexe 8.

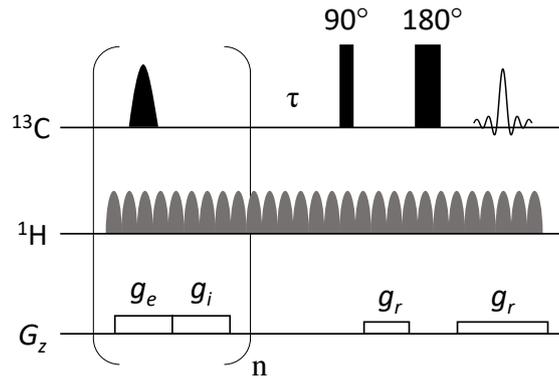


Figure 121 : Séquence Echograd- ^{13}C qui permet de calibrer la séquence CWET. La première partie est composée du motif de saturation de la séquence CWET, et la deuxième partie d'un écho de spin donnant après transformation de Fourier le profil spatial de l'échantillon dans la direction z .

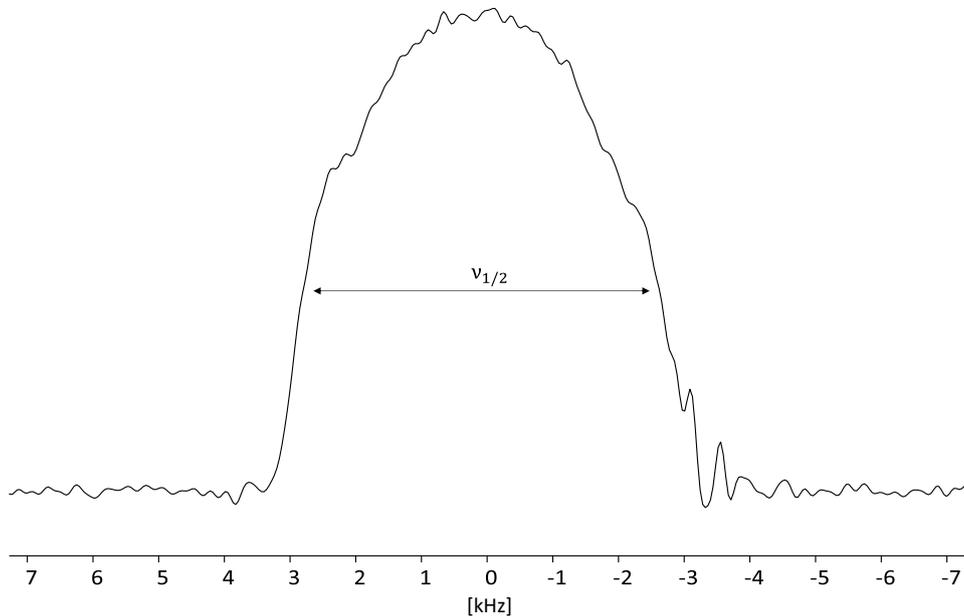


Figure 122 : Profil spatial (z -profile) d'un échantillon de benzène sans application d'une impulsion de saturation. Le gradient de lecture (g_r) a été fixé à 5% de l'amplitude maximale, permettant de disperser le signal sur une gamme de fréquence ($\nu_{1/2}$) égale à 5182 Hz.

2.1. Optimisation de l'amplitude du gradient g_e

Le gradient g_e doit disperser une gamme de fréquence significativement plus importante que la gamme de déplacement chimique du noyau utilisé. La gamme de déplacement chimique ^{13}C est d'environ de 200 ppm soit 35 kHz sur un 700 MHz. Pour calibrer le gradient g_e , la séquence Echograd- ^{13}C est utilisée sans impulsion sélective soit uniquement avec l'écho de spin. Le gradient g_r permet alors de calibrer g_e . Le pourcentage du gradient g_r est proportionnel à la gamme de fréquence balayée. Ainsi, avec un gradient de 10% de l'intensité maximale, une gamme de 9160 Hz est dispersée soit 73 kHz avec un gradient de 80%. La gamme maximale pouvant être dispersée en ^{13}C sur ce spectromètre est donc de 73 kHz, ce qui correspond à seulement 2 fois la gamme spectrale ^{13}C . Un gradient supérieur 80% peut entraîner des

dommages sur l'appareil. Le gradient g_e a donc été utilisé pour la suite des résultats avec un pourcentage égal à 80%.

2.2. Echantillon pour calibrer les impulsions

L'optimisation des calibrages a été réalisée sur le tube test Bruker utilisé pour le contrôle de la résolution et de la forme des raies en ^{13}C . Il est composé de 80% de benzène dans l'acétone- d_6 . L'utilisation d'un tube scellé permet d'avoir un composé stable et déjà en solution. De plus, le benzène a la particularité d'avoir un seul déplacement chimique ^{13}C avec 6 carbones équivalents, et donc de forte intensité. Le nOe et la saturation partielle n'impactent pas le profil obtenu, permettant alors de ne pas prendre en compte le temps de relaxation et d'augmenter la sensibilité grâce au nOe.

2.3. Paramètres expérimentaux

Le nombre de scans est fixé à 32 avec 2 scans supplémentaires non enregistrés appelés *Dummy Scans* (DS) réalisés avant l'expérience. Une acquisition de 10 ms et un gradient g_r à 5% sont utilisés pour enregistrer l'écho. Le gradient g_e est fixé à 80%.

2.4. Optimisation de la puissance d'atténuation

Les impulsions sélectives sont calibrées à l'aide de la séquence Echograd- ^{13}C . Une atténuation est ajoutée sur chacune des impulsions afin d'obtenir un profil optimal. Comme l'ont montré Jézéquel *et al.* ^[141] la deuxième impulsion doit être plus intense que la première, il est préférable d'être moins efficace sur la première impulsion afin de ne pas créer de distorsions.

L'impulsion utilisée dans cet exemple est l'impulsion coca-5-30-40m (ΔF , et δf de 30 et 40 kHz, respectivement). La première impulsion est calibrée en faisant évoluer l'atténuation appliquée sur cette dernière (Figure 123). La Figure 123, montre que plus l'atténuation diminue traduisant une augmentation de la puissance et plus l'impulsion est efficace. Cependant, pour une atténuation de -1 dB soit une puissance de 1,26 W le profil est distordu au pied du profil. Pour cette impulsion une atténuation de 0 dB est donc retenue.

Cette impulsion devient la première impulsion de la séquence. Ensuite, chaque impulsion est calibrée une par une en gardant toujours les impulsions calibrées précédemment. Le temps du gradient g_i après chaque impulsion doit être différent afin d'éviter les échos parasites pendant le train d'impulsions de saturation. ^[140] Le nombre d'impulsions est déterminé lorsque le profil obtenu est optimal : (i) aucun signal résiduel sur les bords de la tranche n'est observé et (ii) le profil avec la meilleure forme rectangulaire. La Figure 124, montre un exemple de calibrage avec un ΔF , et δf de 30 et 40 kHz, respectivement. Avec seulement une impulsion, une partie de l'aimantation est présente sur les bords, la deuxième permet alors de supprimer le reste de l'aimantation. Une troisième impulsion permet d'obtenir un profil plus propre avec moins d'oscillation autour de -40 ppm.

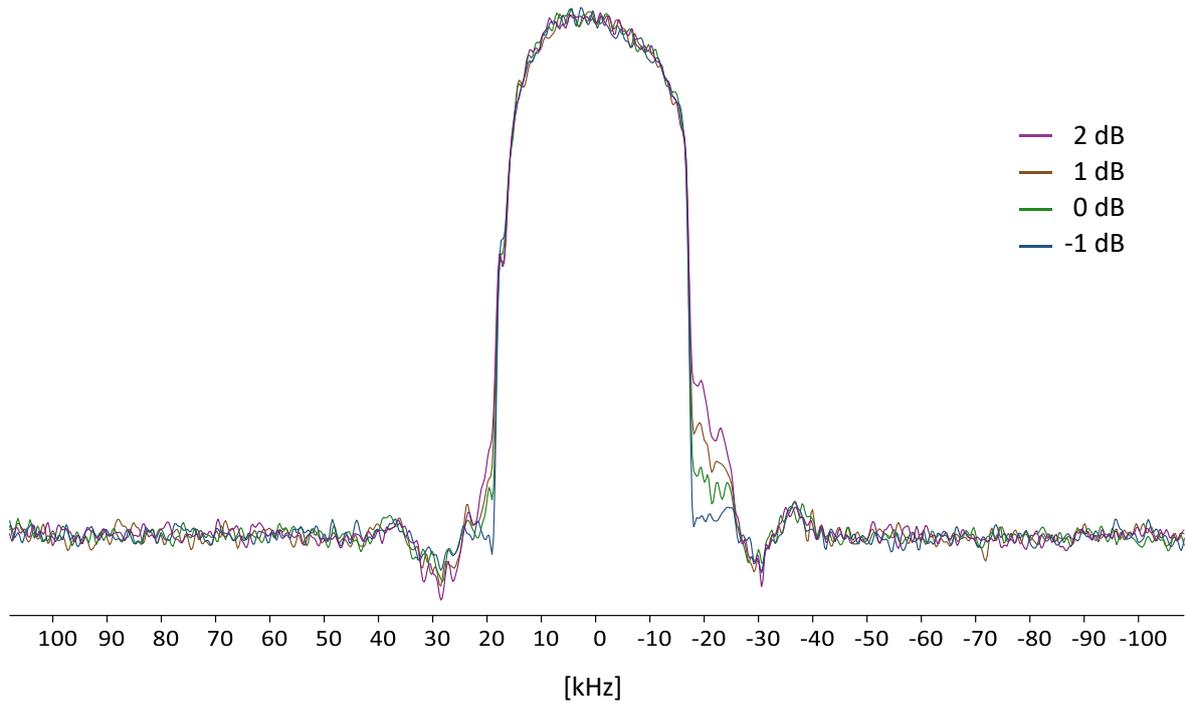


Figure 123 : Profil spatial (z-profile) du benzène avec la séquence EchoRad- ^{13}C pour l'impulsion coca-5-30-40m. Différentes atténuations ont été testées afin de calibrer cette impulsions : 2 dB (—), 1dB (—), 0 dB (—) et -1 dB (—).

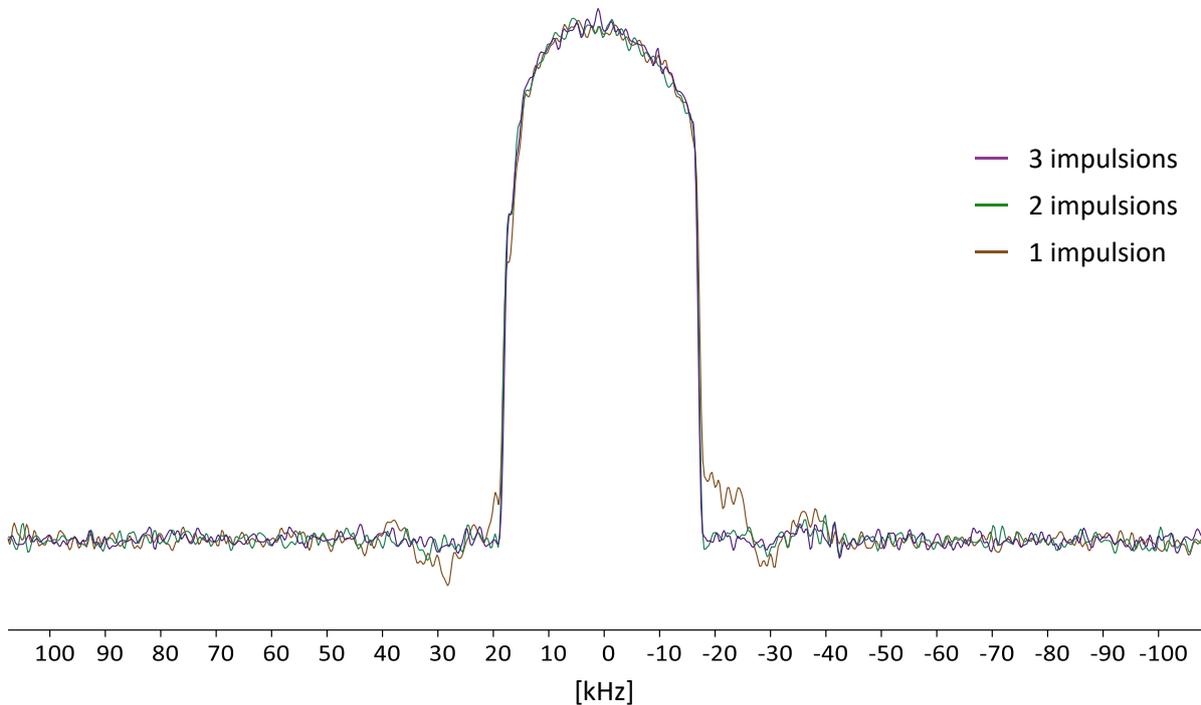


Figure 124 : Profil spatial (z-profile) du benzène avec la séquence EchoRad- ^{13}C pour l'impulsion coca-5-30-40m en saturant le signal avec 1 (—), 2 (—) et 3 impulsions (—).

Afin que ces ajustements soient répétables quels que soit la molécule analysée et le spectromètre, les impulsions sont toutes calibrées par rapport à l'atténuation de puissance d'une impulsion rectangulaire de 90° de 11 μ s de durée. Si l'atténuation des impulsions varie à cause d'un changement d'échantillon ou une instabilité du spectromètre, l'atténuation du 90° rectangle varie également. Une fois le profil optimal trouvé, la différence $\Delta(\text{dB})$ entre l'atténuation de la puissance des impulsions sélectives et du 90° rectangulaire est maintenue constante. La valeur de $\Delta(\text{dB})$ qui correspond à l'atténuation à appliquer pour chaque impulsion est déterminée à l'aide de l'équation suivante (Eq. 5.2) :

$$\Delta(\text{dB})_i = \xi_i - \psi \quad (5.2)$$

avec $\Delta(\text{dB})_i$ la constante à appliquer pour une impulsion i , ξ_i l'atténuation trouvée pour l'impulsion i et ψ l'atténuation de la puissance pour le 90° de 11 μ s.

Les informations sur les paramètres d'utilisation des impulsions utilisées dans cette étude sont regroupées dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Atténuations optimisées pour les deux impulsions utilisées dans cette étude.

Impulsions	Coca-5-30-40m	Coca-5-50-40m
ΔF (kHz)	30	50
δf (kHz)	40	40
ψ (dB)	-22,85	-22,85
ξ_1	0	-2,5
ξ_2	-1	-4
ξ_3	-2	-5,5
ξ_4		-6,0
$\Delta(\text{dB})_1$	22,85	20,35
$\Delta(\text{dB})_2$	21,85	18,85
$\Delta(\text{dB})_3$	20,85	17,35
$\Delta(\text{dB})_4$		16,85

3. Evaluation de la justesse de la séquence CWET

3.1. Choix et préparation de l'échantillon

Afin d'évaluer la séquence CWET, 250 mg de vanilline ont été solubilisés dans 400 μ L d'acétone- d_6 et 100 μ L d'une solution de $\text{Cr}(\text{acac})_3$ à 0,1 M. La molécule de vanilline présente de nombreux déplacements chimiques qui recouvrent toute la gamme ^{13}C , ce qui en fait un modèle de choix (Figure 125).

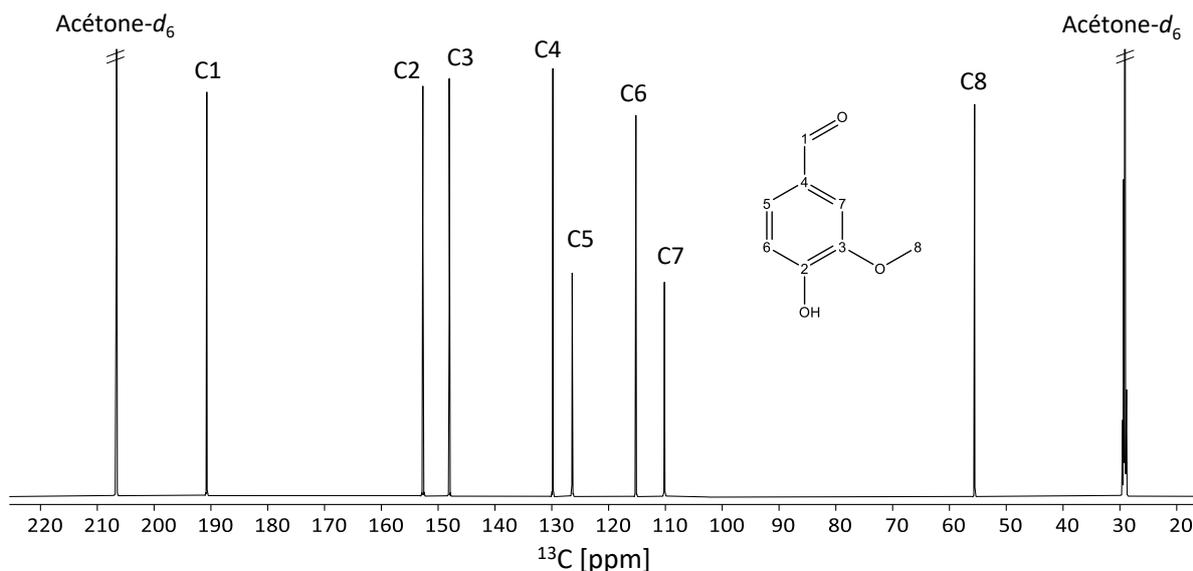


Figure 125 : Spectre RMN $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ de 250 mg de vanilline dans 400 μL d'acétone- d_6 et 100 μL d'une solution de $\text{Cr}(\text{acac})_3$ à 0,1 M.

Comme mentionné précédemment, la distribution isotopique donnée par le 700 MHz présente de nombreux biais dus au champ magnétique et à la géométrie de la sonde. La justesse est évaluée en comparant le profil donné par le 700 à celui donné par le 500 MHz qui présente moins de biais dans les résultats (Figure 126).

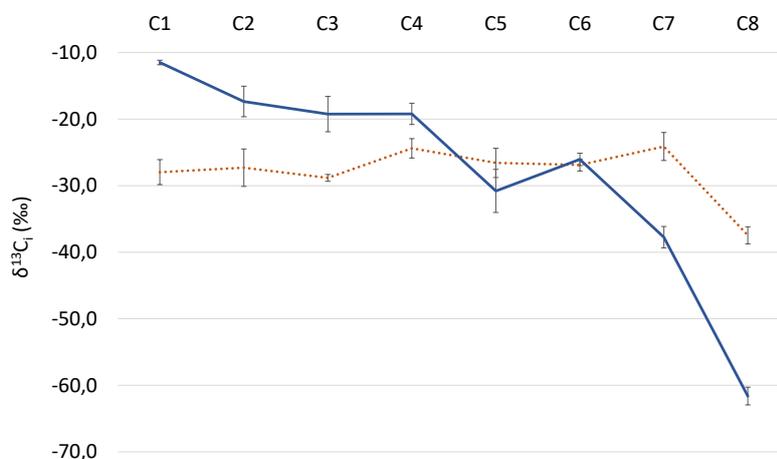


Figure 126 : Distribution isotopique ^{13}C de la vanille avec la séquence Inverse Gated sur le 700 MHz (—) et le 500 MHz (···).

3.2. Traitement des données de la séquence CWET

Les spectres de la vanilline sont obtenus en traitant au préalable les FIDs par une apodisation correspondant à une multiplication avec une exponentielle décroissante et un facteur d'élargissement (LB) de 2. La déconvolution a été réalisée sur le logiciel R à l'aide de la librairie Rnmrfit.^[85] Le script R est donné en annexe 9.

3.3. Optimisation du délai τ

Différentes acquisitions ont été réalisées en variant le délai τ entre le bloc de saturation et l'*Inverse Gated* afin d'évaluer l'impact de ce délai sur la forme des raies obtenues. Une variation entre 1 et 4 ms n'a montrée aucune variation de la forme de raie permettant ainsi de fixer τ à 1 ms afin de ne pas augmenter le temps de l'expérience.

3.4. Optimisation de la largeur de l'impulsion

Afin d'observer l'impact de la largeur de l'impulsion sur la distribution isotopique de la vanilline, la séquence CWET a été testée avec l'impulsion coca-5-30-40m (Figure 127a) et coca-5-50-40m (Figure 127b), le programme d'impulsion est donné en annexe 10. Les paramètres de ces impulsions sont donnés dans le Tableau 14.

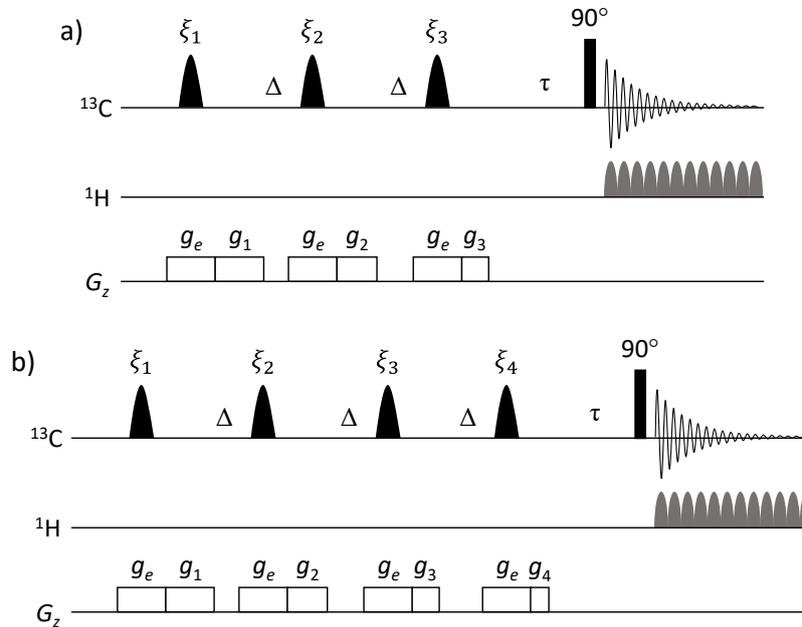


Figure 127 : Séquence CWET-zgig avec a) l'impulsion coca-5-30-40m et b) l'impulsion coca-5-50-40m. Le gradient g_e utilisé est de 80% et les gradients g_1 , g_2 , g_3 et g_4 ont été fixé à 80% pendant 1 ms, 500 μs , 250 μs et 100 μs , respectivement.

L'impulsion coca-5-50-40m permet d'obtenir une zone saturée plus large que l'impulsion coca-5-30-40m, entraînant une zone observée plus petite (Figure 128a). Cette observation est cohérente avec le calcul de l'épaisseur de la tranche non saturée (Eq. 5.1) avec une épaisseur de 1,17 cm pour l'impulsion coca-5-30-40m et 0,70 cm pour l'impulsion coca-5-50-40m. La gamme de balayage impacte également le S/B. En effet, plus l'épaisseur de la tranche est petite, plus le nombre de spins observés est réduit, diminuant le S/B (Figure 128b). Ainsi, sans saturation un S/B de 32 952 est obtenu contre 19 859 avec l'impulsion coca-5-30-40m et 13 475 avec l'impulsion coca-5-50-40m. La distribution isotopique avec les impulsions de saturation conduit à une variation du profil. Les résultats obtenus sont asymétriques, les carbones aux extrémités sont impactés par la largeur de la gamme de balayage (Figure 129).

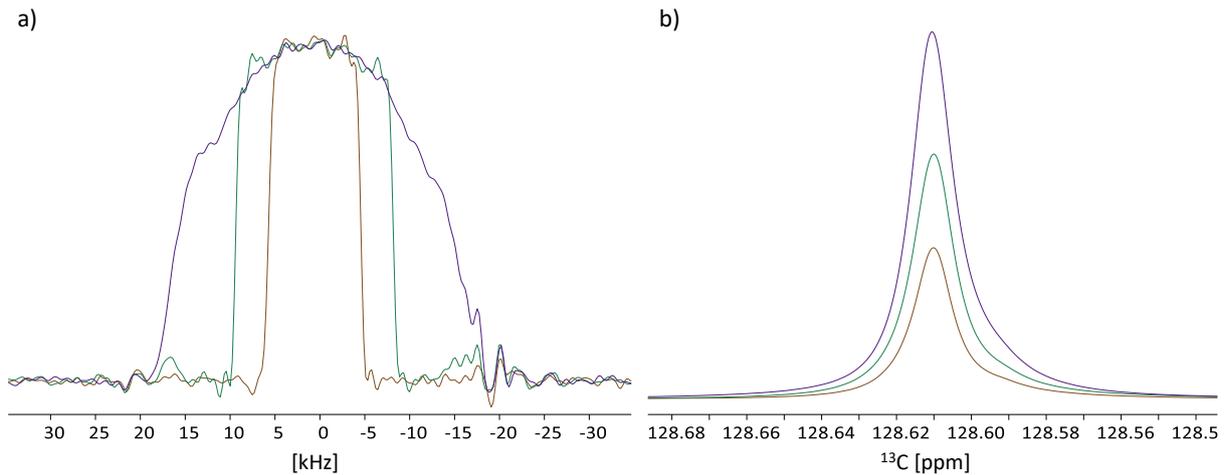


Figure 128 : a) Profil spatial 1D et b) Spectre ^{13}C avec la séquence CWET sur le benzène obtenus sans saturation (—), avec la saturation coca-5-30-40m (—) et avec la saturation coca-5-50-40m (—).

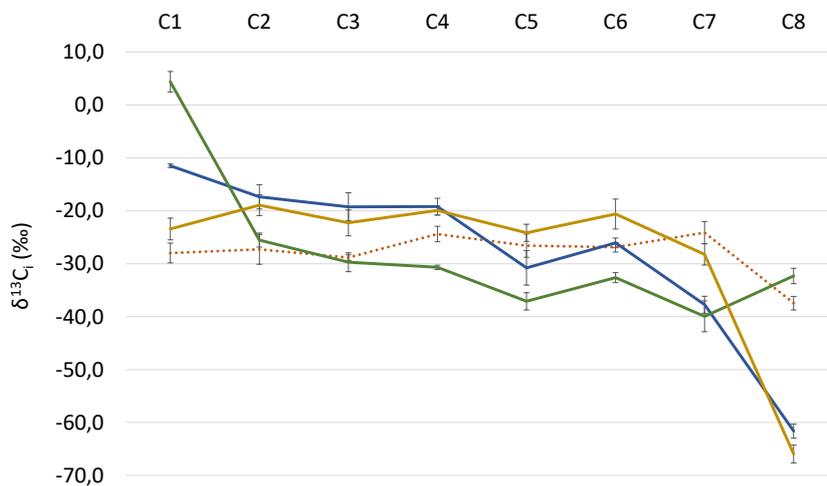


Figure 129 : Distribution isotopique ^{13}C de la vanille avec la séquence CWET et l'impulsion coca-5-30-40m (—) ou coca-5-50-40m (—) et avec la séquence Inverse Gated sur le 700 (—) et le 500 MHz (—). Les barres d'erreur correspondent à deux fois l'écart-type.

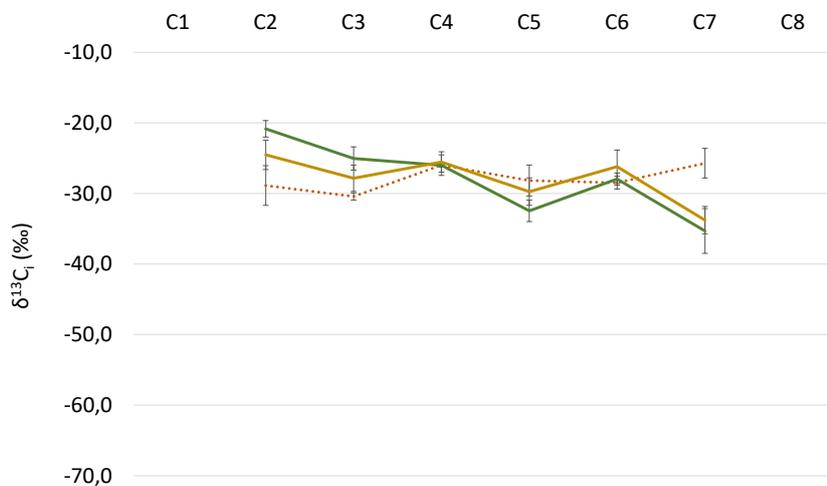


Figure 130 : Distribution isotopique ^{13}C de la vanille sans le C1 et le C8 avec la séquence CWET et l'impulsion coca-5-30-40m (—) ou coca-5-50-40m (—) et avec la séquence Inverse Gated sur le 500 MHz (—). Les barres d'erreur correspondent à deux fois l'écart-type.

Les compositions isotopiques dépendent de la somme de tous les carbones. Afin de démontrer que tous les carbones ne sont pas affectés, les calculs de fractions molaires ont été refaits en excluant les carbones C1 et C8. Les résultats ainsi obtenus montrent un profil proche du 500 MHz lorsque les carbones aux extrémités sont enlevés des résultats (Figure 130) démontrant l'impact majeur des carbones C1 et C8 sur les profils.

3.5. Optimisation du sens de balayage

Afin d'évaluer l'impact du sens de balayage sur la distribution isotopique, deux impulsions ont été créées : coca-5-50-d40 (Figure 131a) et coca-5-50-d40-r (Figure 131b). La création de ces impulsions a été réalisée comme décrit dans le paragraphe 1.2 de ce chapitre. Cependant, avant l'addition des deux segments, le sens de balayage de la deuxième impulsion a été inversé donnant alors lieu aux deux impulsions représentées sur la Figure 131.

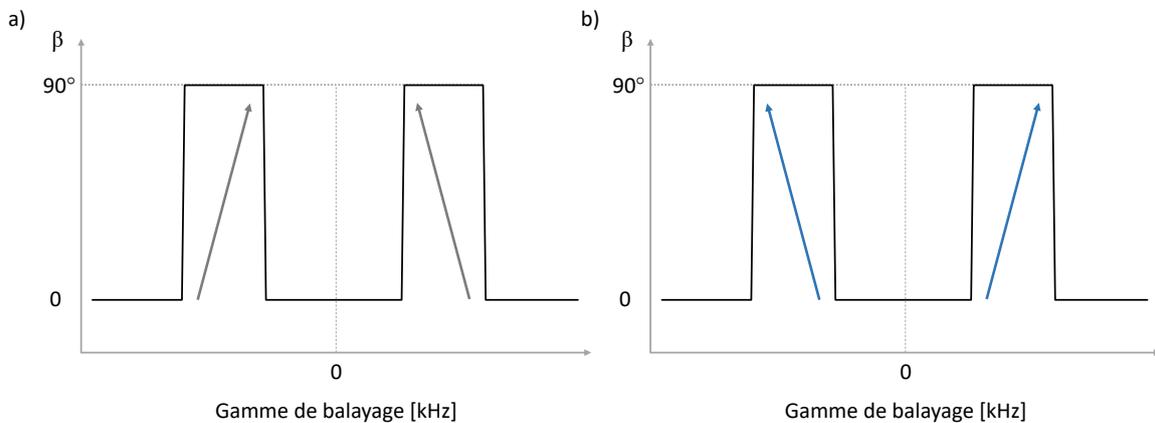


Figure 131 : Profil d'excitation de l'impulsion a) coca-5-50-d40 et b) coca-5-50-d40-r.

Les profils isotopiques obtenus avec ses impulsions ne montrent aucune différence par rapport à un balayage réalisé dans le même sens (Figure 132). Le carbone 8 présente toujours un biais montrant qu'il n'y a aucun impact du sens de balayage.

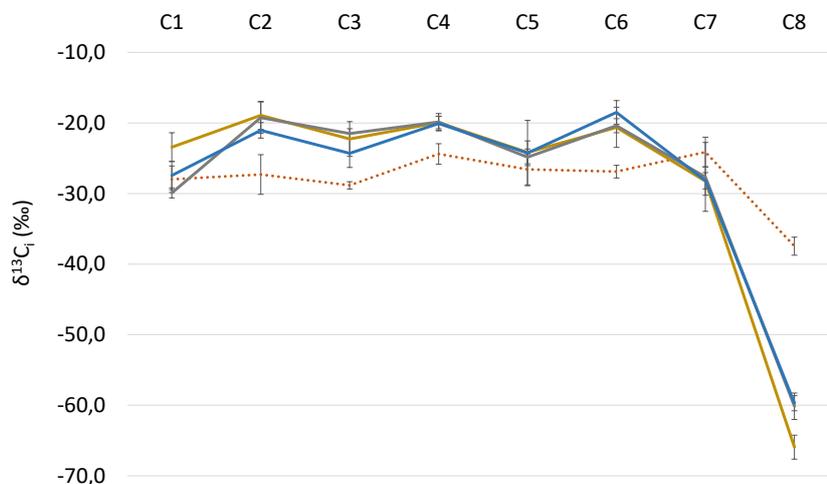


Figure 132 : Distribution isotopique ^{13}C de la vanille avec la séquence CWET et l'impulsion coca-5-50-40m (—), ou coca-5-50-d40 (—), ou coca-5-50-d40-r (—) et avec la séquence Inverse Gated sur le 500 MHz (---). Les barres d'erreur correspondent à deux fois l'écart-type.

4. Conclusion

La séquence CWET a été développée dans le but d'obtenir une séquence indépendante de la géométrie de la sonde. La précision obtenue avec cette séquence est meilleure que 1‰ quelle que soit l'impulsion utilisée. La justesse des résultats montre que la distribution isotopique avec cette séquence est modifiée et proche du profil de référence donné sur le 500 MHz qui est considéré comme le spectromètre de référence (*Cf.* Chapitre IV) pour les carbones au centre. Cependant, le profil est impacté par la largeur de la gamme de fréquences balayée par l'impulsion avec des biais présents sur les carbones aux extrémités. Le sens de balayage n'impacte pas le profil et ne permet pas de corriger les biais observés sur les carbones C1 et C8. La séquence echograd-¹³C sur la vanilline a montré que le gradient utilisé pour disperser la gamme de déplacement chimique est trop faible pour disperser correctement toute la gamme provoquant ainsi une mauvaise dispersion des aimantations. La conséquence de ce phénomène est une inhomogénéité de la zone saturée. Cette observation explique les résultats obtenus sur la vanilline. Une nouvelle étude sur le benzaldéhyde va être réalisée, cette molécule présente une gamme de fréquence 2 fois plus petite que la vanilline.

Conclusion générale

La justesse en *irm-¹³C NMR* n'a pas été une priorité au début du développement de cette méthode mais c'est un critère qui devient de plus en plus pertinent afin de pouvoir l'utiliser en tant que telle et comme outil pour calibrer les standards indispensables à d'autres techniques, notamment avec l'émergence de l'Orbitrap, pour réaliser des mesures isotopiques.

Dans ce manuscrit, la séquence d'impulsion à 2 dimensions asHSQC (HSQC symétrique et adiabatique) a été développée et optimisée afin de réduire le temps d'analyse ou la quantité de produit analysable. De nouveaux outils tels que le VRT, le repliement spectral et le NUS ont été optimisés. L'utilisation de cette nouvelle séquence a permis de diminuer considérablement le temps expérimental pour un échantillon en comparaison d'une séquence multi-impulsionnelle à une dimension comme l'INEPT. L'asHSQC a été mise en œuvre dans deux projets de recherche avec des objectifs distincts : (i) obtenir le temps minimal d'analyse avec une quantité de produit avoisinant les 50 mg et (ii) obtenir une précision de 1‰ sur seulement 10 mg de produit. Ces objectifs ont été atteints et offrent maintenant un large choix d'applications.

L'utilisation de séquences multi-impulsionnelles telles que l'asHSQC nécessite une correction si les résultats doivent être traités de façon non-relative. L'application d'un facteur de correction a montré qu'il était possible de corriger la séquence asHSQC en prenant la séquence *Inverse Gated* (mono-impulsionnelle) comme référence car c'est la séquence qui donne des résultats se rapprochant le plus des vraies valeurs en *irm-¹³C NMR*. Les résultats de l'asHSQC corrigés ont montré des profils du glucose similaires à ceux données par la séquence *Inverse Gated* de référence et la même tendance que les quelques données existant dans la littérature.

Afin d'atteindre des résultats justes en absolu, ou sur une échelle consensuelle des δ (‰), une étape d'homogénéisation des données entre spectromètres est nécessaire au préalable. Dans cette thèse, un travail sur une nouvelle méthodologie a été réalisé permettant d'obtenir une courbe de correction entre deux spectromètres. Cette étude a montré un biais supplémentaire, non appréhendé jusqu'à présent, avec un comportement asymétrique en fréquence ; les signaux à fréquence élevée présentant moins de biais que les signaux à fréquence faible. Ce phénomène n'a pas encore été expliqué. Cependant, la courbe de correction obtenue a permis de corriger des résultats sur la molécule d'alanine sur une série d'échantillons couvrant une gamme de teneur en ¹³C sur les trois sites de la molécule. Finalement, afin d'évaluer la justesse des résultats corrigés, les échantillons ont été analysés également par *irm-MS* couplée à une dégradation chimique puis par pyrolyse. Cette technique permet d'avoir des résultats justes en absolu sur des petites molécules. La comparaison a montré une diminution des biais par rapport aux données brutes. Afin de mieux corriger les résultats, la courbe de correction doit être affinée en déterminant le biais induisant l'asymétrie observée. Une meilleure compréhension de ce biais permettra de mieux le modéliser et ainsi conduire à l'expression des résultats de l'*irm-¹³C NMR* sur une échelle absolue.

Enfin, afin d'éliminer l'influence de la géométrie de la sonde, la séquence CWET a été développée. Cette séquence permet, grâce à des impulsions de saturation et à un encodage spatial, de réduire la zone d'observation en supprimant le signal provenant des bords du tube. Ainsi, la zone observée est uniquement le centre du tube dans lequel les noyaux sont bien découplés et les effets de bords provenant de la sonde n'ont plus d'impact sur la mesure. La précision obtenue avec cette séquence est meilleure que 1‰ quelle que soit l'impulsion de saturation utilisée. La justesse a été évaluée sur la molécule de vanilline (qui permet de couvrir toute la gamme ^{13}C) et avec un spectromètre de référence donnant des résultats les plus justes en *irm- ^{13}C NMR*. Les résultats montrent que la distribution isotopique avec cette séquence est corrigée et proche du profil de référence pour les carbones au centre du spectre. Cependant, le profil est impacté par la largeur de la gamme de fréquences balayée par l'impulsion avec des biais présents sur les carbones aux extrémités (carbone 1 et 8). L'asymétrie observée pourrait être la même que celle observée sur la courbe de correction demandant des études complémentaires.

Dans ce travail de thèse, plusieurs facteurs de correction ont été appliqués, d'une part pour corriger les résultats issus d'une séquence multi-impulsionnelle et d'autre part pour harmoniser des réponses instrumentales différentes. Aujourd'hui, à l'issue de ce travail les résultats d'*irm- ^{13}C NMR* ont été homogénéisés. L'acétate de vinyle a montré son grand intérêt pour devenir un standard de travail. En effet, cette molécule se prête aussi bien à l'analyse *irm- ^{13}C NMR* qu'à l'analyse *irm-MS* par pyrolyse. Grâce à cette molécule, les résultats vont pouvoir être corrigés en absolu et ainsi permettre d'analyser les standards pour l'Orbitrap. De nouveaux développements vont voir le jour pour l'analyse *irm- ^{13}C NMR*. La suite du développement de la séquence CWET permettra d'obtenir des résultats justes et homogènes directement sans application de facteurs de corrections. Le développement de l'asHSQC va permettre de faire une avancée considérable sur l'*irm- ^{15}N NMR*. En effet, cette séquence peut être utilisée et optimisée pour ce noyau qui n'est pas sensible (abondance isotopique de 0,4% et rapport gyromagnétique environ dix fois plus faible que celui du proton) qui est aujourd'hui difficile à analyser par PSIA. Dans le futur, ces développements pourraient permettre d'avancer dans la recherche de nouveaux biomarqueurs en santé comme, par exemple, pour la recherche contre le cancer du sein. ^[189]

Références

1. Acetti, D., Brenna, E., Fronza, G., & Fuganti, C. (2008). Monitoring the synthetic procedures of commercial drugs by ^2H NMR spectroscopy: The case of ibuprofen and naproxen. *Talanta*, 76(3), 651-655. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.04.009>
2. Gilbert, A., Yamada, K., & Yoshida, N. (2013). Accurate Method for the Determination of Intramolecular ^{13}C Isotope Composition of Ethanol from Aqueous Solutions. *Analytical Chemistry*, 85(14), 6566-6570. <https://doi.org/10.1021/ac401021p>
3. Jasper, J. P., Westenberger, B. J., Spencer, J. A., Buhse, L. F., & Nasr, M. (2004). Stable isotopic characterization of active pharmaceutical ingredients. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35(1), 21-30. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00581-8](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00581-8)
4. Martin, G. J., Guillou, C., Martin, M. L., Cabanis, M. T., Tep, Y., & Aerny, J. (1988). Natural factors of isotope fractionation and the characterization of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(2), 316-322. <https://doi.org/10.1021/jf00080a019>
5. Diomande, D. G., Martineau, E., Gilbert, A., Nun, P., Murata, A., Yamada, K., Watanabe, N., Tea, I., Robins, R. J., Yoshida, N., & Remaud, G. S. (2015). Position-Specific Isotope Analysis of Xanthines: A ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Method to Determine the ^{13}C Intramolecular Composition at Natural Abundance. *Analytical Chemistry*, 87(13), 6600-6606. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00559>
6. Hajjar, G., Rizk, T., Bejjani, J., & Akoka, S. (2020). Metabisotopomics of triacylglycerols from animal origin: A simultaneous metabolomic and isotopic profiling using ^{13}C INEPT. *Food Chemistry*, 315, 126325. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126325>
7. Guyader, S., Thomas, F., Jamin, E., Grand, M., Akoka, S., Silvestre, V., & Remaud, G. S. (2019). Combination of ^{13}C and ^2H SNIF-NMR isotopic fingerprints of vanillin to control its precursors. *Flavour and Fragrance Journal*, 34(2), 133-144. <https://doi.org/10.1002/ffj.3486>
8. Remaud, G. S., Bussy, U., Lees, M., Thomas, F., Desmurs, J.-R., Jamin, E., Silvestre, V., & Akoka, S. (2013). NMR spectrometry isotopic fingerprinting: A tool for the manufacturer for tracking Active Pharmaceutical Ingredients from starting materials to final medicines. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48(3), 464-473. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.12.009>
9. Silvestre, V., Mboula, V. M., Jouitteau, C., Akoka, S., Robins, R. J., & Remaud, G. S. (2009). Isotopic ^{13}C NMR spectrometry to assess counterfeiting of active pharmaceutical ingredients: Site-specific ^{13}C content of aspirin and paracetamol. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 50(3), 336-341. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.04.030>

10. Julien, M., Nun, P., Höhener, P., Parinet, J., Robins, R. J., & Remaud, G. S. (2016). Enhanced forensic discrimination of pollutants by position-specific isotope analysis using isotope ratio monitoring by ^{13}C nuclear magnetic resonance spectrometry. *Talanta*, *147*, 383-389. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.10.010>
11. Joubert, V., Silvestre, V., Ladroue, V., Besacier, F., Blondel, P., Akoka, S., Baguet, E., & Remaud, G. S. (2020). Forensic application of position-specific isotopic analysis of trinitrotoluene (TNT) by NMR to determine ^{13}C and ^{15}N intramolecular isotopic profiles. *Talanta*, *213*, 120819. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120819>
12. Joubert, V., Trébuchet, M., Mikic, M., Silvestre, V., Schiphorst, A.-M., Loquet, D., Stemmelen, A., Ladroue, V., Besacier, F., Akoka, S., & Remaud, G. S. (2020). Isotopomics by isotope ratio monitoring by ^{13}C nuclear magnetic resonance spectrometry on cutting agents in heroin: A new approach for illicit drugs trafficking route elucidation. *Drug Testing and Analysis*, *12*(4), 449-457. <https://doi.org/10.1002/dta.2745>
13. Julien, M., Liégeois, M., Höhener, P., Paneth, P., & Remaud, G. S. (2021). Intramolecular non-covalent isotope effects at natural abundance associated with the migration of paracetamol in solid matrices during liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, *1639*, 461932. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.461932>
14. Bayle, K., Gilbert, A., Julien, M., Yamada, K., Silvestre, V., Robins, R. J., Akoka, S., Yoshida, N., & Remaud, G. S. (2014). Conditions to obtain precise and true measurements of the intramolecular ^{13}C distribution in organic molecules by isotopic ^{13}C nuclear magnetic resonance spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, *846*, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.07.018>
15. Eiler, J., Cesar, J., Chimiak, L., Dallas, B., Grice, K., Griep-Raming, J., Juchelka, D., Kitchen, N., Lloyd, M., Makarov, A., Robins, R., & Schwieters, J. (2017). Analysis of molecular isotopic structures at high precision and accuracy by Orbitrap mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, *422*, 126-142. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2017.10.002>
16. Akoka, S. (2022). *Introduction à la Résonance Magnétique Nucléaire* (Ellipses).
17. Claridge, T. D. W. (2016). *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry* (3e édition). Elsevier Science.
18. Menditto, A., Patriarca, M., & Magnusson, B. (2007). Understanding the meaning of accuracy, trueness and precision. *Accreditation and Quality Assurance*, *12*(1), 45-47. <https://doi.org/10.1007/s00769-006-0191-z>

19. De Bièvre, P. (2012). The 2012 International Vocabulary of Metrology: ‘‘VIM’’. *Chemistry International -- Newsmagazine for IUPAC*, 34(3), 26-27. <https://doi.org/10.1515/ci.2012.34.3.26>
20. Prenesti, E., & Gosmaro, F. (2015). Trueness, precision and accuracy: A critical overview of the concepts as well as proposals for revision. *Accreditation and Quality Assurance*, 20(1), 33-40. <https://doi.org/10.1007/s00769-014-1093-0>
21. Tietje, C., & Brouder, A. (Éds.). (2010). International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. In *Handbook of Transnational Economic Governance Regimes* (p. 1041-1053). Brill | Nijhoff. <https://doi.org/10.1163/ej.9789004163300.i-1081.897>
22. Ernst, R. R., Bodenhausen, G., & Wokaun, A. (1990). *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*. Oxford University Press.
23. Gillet, S., & Delpuech, J.-J. (1980). Optimum conditions for nondestructive quantitative analysis by carbon-13 NMR. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 38(3), 433-445. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(80\)90325-X](https://doi.org/10.1016/0022-2364(80)90325-X)
24. Freeman, R., Hill, H. D. W., & Kaptein, R. (1972). Proton-decoupled NMR. Spectra of carbon-13 With the nuclear overhauser effect suppressed. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 7(3), 327-329. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(72\)90194-1](https://doi.org/10.1016/0022-2364(72)90194-1)
25. Cookson, D. J., & Smith, B. E. (1984). Optimal conditions for obtaining quantitative ¹³C NMR, data. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 57(3), 355-368. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(84\)90253-1](https://doi.org/10.1016/0022-2364(84)90253-1)
26. Freeman, R. (1998). *Spin Choreography: Basic Steps in High Resolution NMR* (Revised ed. edition). Oxford University Press.
27. Levitt, M. H., Freeman, R., & Frenkiel, T. (1982). Broadband heteronuclear decoupling. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 47(2), 328-330. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(82\)90124-X](https://doi.org/10.1016/0022-2364(82)90124-X)
28. Shaka, A. J., Keeler, J., & Freeman, R. (1983). Evaluation of a new broadband decoupling sequence: WALTZ-16. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 53(2), 313-340. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(83\)90035-5](https://doi.org/10.1016/0022-2364(83)90035-5)
29. Shaka, A. J., Keeler, J., Frenkiel, T., & Freeman, R. (1983). An improved sequence for broadband decoupling: WALTZ-16. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 52(2), 335-338. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(83\)90207-X](https://doi.org/10.1016/0022-2364(83)90207-X)

30. Shaka, A. J., Barker, P. B., & Freeman, R. (1985). Computer-optimized decoupling scheme for wideband applications and low-level operation. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, *64*(3), 547-552. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(85\)90122-2](https://doi.org/10.1016/0022-2364(85)90122-2)
31. Kupce, E., & Freeman, R. (1995). Adiabatic Pulses for Wideband Inversion and Broadband Decoupling. *Journal of Magnetic Resonance, Series A*, *115*(2), 273-276. <https://doi.org/10.1006/jmra.1995.1179>
32. Kupce, E., & Freeman, R. (1995). Stretched Adiabatic Pulses for Broadband Spin Inversion. *Journal of Magnetic Resonance, Series A*, *117*(2), 246-256. <https://doi.org/10.1006/jmra.1995.0750>
33. Kupce, E., & Freeman, R. (1996). Optimized Adiabatic Pulses for Wideband Spin Inversion. *Journal of Magnetic Resonance, Series A*, *118*(2), 299-303. <https://doi.org/10.1006/jmra.1996.0042>
34. Tenailleau, E. (2005). *Développement de la RMN quantitative du carbone 13 en abondance naturelle*. Nantes.
35. Saito, T., Nakaie, S., Kinoshita, M., Ihara, T., Kinugasa, S., Nomura, A., & Maeda, T. (2004). Practical guide for accurate quantitative solution state NMR analysis. *Metrologia*, *41*(3), 213-218. <https://doi.org/10.1088/0026-1394/41/3/015>
36. Bharti, S. K., & Roy, R. (2012). Quantitative ^1H NMR spectroscopy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *35*, 5-26. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.02.007>
37. Holzgrabe, U. (2010). Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, *57*(2), 229-240. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2010.05.001>
38. Jézéquel, T., Joubert, V., Giraudeau, P., Remaud, G. S., & Akoka, S. (2017). The new face of isotopic NMR at natural abundance: The new face of isotopic NMR at natural abundance. *Magnetic Resonance in Chemistry*, *55*(2), 77-90. <https://doi.org/10.1002/mrc.4548>
39. Nagashima, K. (2012). B_1 mapping of liquid NMR transversal RF coils: Analysis of heterogeneity and nonlinearity. *Concepts in Magnetic Resonance Part B: Magnetic Resonance Engineering*, *41B*(1), 1-12. <https://doi.org/10.1002/cmr.b.20211>
40. Karabulut, N., Baguet, E., Trierweiler, M., & Akoka, S. (2002). Improvement in Quantitative Accuracy of ^{13}C DEPT Integrals by Parameter-Optimization. *Analytical Letters*, *35*(15), 2549-2563. <https://doi.org/10.1081/AL-120016544>
41. Levitt, M. H., & Freeman, R. (1979). NMR population inversion using a composite pulse. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, *33*(2), 473-476. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(79\)90265-8](https://doi.org/10.1016/0022-2364(79)90265-8)

42. Schenker, K. V., & Von Philipsborn, W. (1986). Off-resonance effects and their compensation in the multiple-pulse sequences INEPT, DEPT, and INADEQUATE. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 66(2), 219-229. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(86\)90025-9](https://doi.org/10.1016/0022-2364(86)90025-9)
43. Garwood, M., & DelaBarre, L. (2001). The Return of the Frequency Sweep: Designing Adiabatic Pulses for Contemporary NMR. *Journal of Magnetic Resonance*, 153(2), 155-177. <https://doi.org/10.1006/jmre.2001.2340>
44. Tannüs, A., & Garwood, M. (1996). Improved performance of frequency-swept pulses using offset-independent adiabaticity. *Journal of Magnetic Resonance - Series A*, 120(1), 133-137. <https://doi.org/10.1006/jmra.1996.0110>
45. Bohlen, J. M., & Bodenhausen, G. (1993). Experimental Aspects of Chirp NMR Spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance, Series A*, 102(3), 293-301. <https://doi.org/10.1006/jmra.1993.1107>
46. Keifer, P. A. (1999). 90° pulse width calibrations: How to read a pulse width array. *Concepts in Magnetic Resonance*, 11(3), 165-180. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0534\(1999\)11:3<165::AID-CMR4>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0534(1999)11:3<165::AID-CMR4>3.0.CO;2-D)
47. Tenailleau, E., & Akoka, S. (2007). Adiabatic ¹H decoupling scheme for very accurate intensity measurements in ¹³C NMR. *Journal of Magnetic Resonance*, 185, 50-58. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2006.11.007>
48. Bendall, M. R., & Skinner, T. E. (1998). Calibration of STUD+ Parameters to Achieve Optimally Efficient Broadband Adiabatic Decoupling in a Single Transient. *Journal of Magnetic Resonance*, 134(2), 331-349. <https://doi.org/10.1006/jmre.1998.1522>
49. Freeman, R., & Kupče, E. (1997). Decoupling: Theory and practice I. Current methods and recent concepts. *NMR in Biomedicine*, 10(8), 372-380. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1492\(199712\)10:8<372::AID-NBM478>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1492(199712)10:8<372::AID-NBM478>3.0.CO;2-Z)
50. Thibaudeau, C., Remaud, G., Silvestre, V., & Akoka, S. (2010). Performance Evaluation of Quantitative Adiabatic ¹³C NMR Pulse Sequences for Site-Specific Isotopic Measurements. *Analytical Chemistry*, 82(13), 5582-5590. <https://doi.org/10.1021/ac100478h>
51. Giraudeau, P., Tea, I., Remaud, G. S., & Akoka, S. (2014). Reference and normalization methods: Essential tools for the intercomparison of NMR spectra. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 93, 3-16. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.07.020>
52. Burton, I. W., Quilliam, M. A., & Walter, J. A. (2005). Quantitative ¹H NMR with external standards: Use in preparation of calibration solutions for algal toxins and other natural products. *Analytical Chemistry*, 77(10), 3123-3131. <https://doi.org/10.1021/ac048385h>

53. Wider, G., & Dreier, L. (2006). Measuring Protein Concentrations by NMR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 128(8), 2571-2576. <https://doi.org/10.1021/ja055336t>
54. Barantin, L., Pape, A. L., & Akoka, S. (1997). A new method for absolute quantitation MRS metabolites. *Magnetic Resonance in Medicine*, 38(2), 179-182. <https://doi.org/10.1002/mrm.1910380203>
55. Akoka, S., Barantin, L., & Trierweiler, M. (1999). Concentration Measurement by Proton NMR Using the ERETIC Method. *Analytical Chemistry*, 71(13), 2554-2557. <https://doi.org/10.1021/ac981422i>
56. Silvestre, V., Goupry, S., Trierweiler, M., Robins, R., & Akoka, S. (2001). Determination of Substrate and Product Concentrations in Lactic Acid Bacterial Fermentations by Proton NMR Using the ERETIC Method. *Analytical Chemistry*, 73(8), 1862-1868. <https://doi.org/10.1021/ac0013204>
57. Isabelle, B., & Akoka, S. (2000). Kinetic Constant Measurement by NMR Using a Calibrated Internal Signal (eretic). *Instrumentation Science & Technology*, 28, 233-240. <https://doi.org/10.1081/CI-100100974>
58. Remaud, G. S., Silvestre, V., & Akoka, S. (2005). Traceability in quantitative NMR using an electronic signal as working standard. *Accreditation and Quality Assurance*, 10(8), 415-420. <https://doi.org/10.1007/s00769-005-0044-1>
59. Michel, N., & Akoka, S. (2004). The application of the ERETIC method to 2D-NMR. *Journal of Magnetic Resonance (San Diego, Calif.: 1997)*, 168(1), 118-123. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2004.02.006>
60. Morris, G. A., & Freeman, R. (1979). Enhancement of nuclear magnetic resonance signals by polarization transfer. *Journal of the American Chemical Society*, 3(101), 760-762. <https://doi.org/10.1021/ja00497a058>
61. Burum, D. P., & Ernst, R. R. (1980). Net polarization transfer via a J-ordered state for signal enhancement of low-sensitivity nuclei. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 39(1), 163-168. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(80\)90168-7](https://doi.org/10.1016/0022-2364(80)90168-7)
62. Doddrell, D. M., Pegg, D. T., & Bendall, M. R. (1982). Distortionless enhancement of NMR signals by polarization transfer. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 48(2), 323-327. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(82\)90286-4](https://doi.org/10.1016/0022-2364(82)90286-4)
63. Bodenhausen, G., & Ruben, D. J. (1980). *Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy*. 69(1), 185-189. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(80\)80041-8](https://doi.org/10.1016/0009-2614(80)80041-8)

64. Vuister, G. W., Ruff-Cabello, J., & van Zijl, P. C. M. (1992). Gradient-enhanced multiple-quantum filter (ge-MQF). A simple way to obtain single-scan phase-sensitive HMQC spectra. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, *100*(1), 215-220. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(92\)90381-G](https://doi.org/10.1016/0022-2364(92)90381-G)
65. Willker, W., Leibfritz, D., Kerssebaum, R., & Bermel, W. (1993). Gradient selection in inverse heteronuclear correlation spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, *31*(3), 287-292. <https://doi.org/10.1002/mrc.1260310315>
66. Jeannerat, D. (2003). High resolution in heteronuclear ^1H - ^{13}C NMR experiments by optimizing spectral aliasing with one-dimensional carbon data. *Magnetic Resonance in Chemistry*, *41*(1), 3-17. <https://doi.org/10.1002/mrc.1118>
67. Foroozandeh, M., & Jeannerat, D. (2015). Reconstruction of full high-resolution HSQC using signal split in aliased spectra: Reconstruction of full high-resolution spectra from aliased spectra. *Magnetic Resonance in Chemistry*, *53*(11), 894-900. <https://doi.org/10.1002/mrc.4283>
68. Vitorge, B., Bieri, S., Humam, M., Christen, P., Hostettmann, K., Muñoz, O., Loss, S., & Jeannerat, D. (2009). High-precision heteronuclear 2D NMR experiments using 10-ppm spectral window to resolve carbon overlap. *Chemical Communications*, *0*(8), 950-952. <https://doi.org/10.1039/B820478K>
69. Tang, C. G. (1994). An Analysis of Baseline Distortion and Offset in NMR Spectra. *Journal of Magnetic Resonance, Series A*, *109*(2), 232-240. <https://doi.org/10.1006/jmra.1994.1160>
70. Marion, D., Ikura, M., & Bax, A. (1989). Improved solvent suppression in one- and two-dimensional NMR spectra by convolution of time-domain data. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, *84*(2), 425-430. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(89\)90391-0](https://doi.org/10.1016/0022-2364(89)90391-0)
71. Brown, D. E. (1995). Fully Automated Baseline Correction of 1D and 2D NMR Spectra Using Bernstein Polynomials. *Journal of Magnetic Resonance, Series A*, *114*(2), 268-270. <https://doi.org/10.1006/jmra.1995.1138>
72. Dietrich, W., Rüdell, C. H., & Neumann, M. (1991). Fast and precise automatic baseline correction of one- and two-dimensional nmr spectra. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, *91*(1), 1-11. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(91\)90402-F](https://doi.org/10.1016/0022-2364(91)90402-F)
73. Golotvin, S., & Williams, A. (2000). Improved Baseline Recognition and Modeling of FT NMR Spectra. *Journal of Magnetic Resonance*, *146*(1), 122-125. <https://doi.org/10.1006/jmre.2000.2121>
74. Schulze, G., Jirasek, A., Yu, M. M. L., Lim, A., Turner, R. F. B., & Blades, M. W. (2005). Investigation of Selected Baseline Removal Techniques as Candidates for Automated

- Implementation. *Applied Spectroscopy*, 59(5), 545-574. <https://doi.org/10.1366/0003702053945985>
75. Carlos Cobas, J., Bernstein, M. A., Martín-Pastor, M., & Tahoces, P. G. (2006). A new general-purpose fully automatic baseline-correction procedure for 1D and 2D NMR data. *Journal of Magnetic Resonance*, 183(1), 145-151. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2006.07.013>
76. Comisarow, M. B., & Melka, J. D. (1979). Error estimates for finite zero-filling in Fourier transform spectrometry. *Analytical Chemistry*, 51(13), 2198-2203. <https://doi.org/10.1021/ac50049a032>
77. Mobli, M., & Hoch, J. C. (2014). Nonuniform sampling and non-Fourier signal processing methods in multidimensional NMR. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 83, 21-41. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2014.09.002>
78. Orekhov, V. Yu., Ibraghimov, I. V., & Billeter, M. (2001). MUNIN: A new approach to multi-dimensional NMR spectra interpretation. *Journal of Biomolecular NMR*, 20(1), 49-60. <https://doi.org/10.1023/A:1011234126930>
79. Pedersen, C. P., Prestel, A., & Teilum, K. (2021). Software for reconstruction of nonuniformly sampled NMR data. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 59(3), 315-323. <https://doi.org/10.1002/mrc.5060>
80. Brüschweiler, R., & Zhang, F. (2004). Covariance nuclear magnetic resonance spectroscopy. *The Journal of Chemical Physics*, 120(11), 5253-5260. <https://doi.org/10.1063/1.1647054>
81. Barkhuijsen, H., de Beer, R., Bovée, W. M. M. J., & van Ormondt, D. (1985). Retrieval of frequencies, amplitudes, damping factors, and phases from time-domain signals using a linear least-squares procedure. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 61(3), 465-481. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(85\)90187-8](https://doi.org/10.1016/0022-2364(85)90187-8)
82. Led, J. J., & Gesmar, Henrik. (1991). Application of the linear prediction method to NMR spectroscopy. *Chemical Reviews*, 91(7), 1413-1426. <https://doi.org/10.1021/cr00007a007>
83. Reynolds, W. F., Yu, M., Enriquez, R. G., & Leon, I. (1997). Investigation of the Advantages and Limitations of Forward Linear Prediction for Processing 2D Data Sets. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 35(8), 505-519. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-458X\(199708\)35:8<505::AID-OMR130>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-458X(199708)35:8<505::AID-OMR130>3.0.CO;2-K)
84. Martin, Y. L. (1994). A Global Approach to Accurate and Automatic Quantitative Analysis of NMR Spectra by Complex Least-Squares Curve Fitting. *Journal of Magnetic Resonance*, 111, 1-10. <https://doi.org/10.1006/jmra.1994.1218>

85. Sokolenko, S., Jézéquel, T., Hajjar, G., Farjon, J., Akoka, S., & Giraudeau, P. (2019). Robust 1D NMR lineshape fitting using real and imaginary data in the frequency domain. *Journal of Magnetic Resonance*, 298, 91-100. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2018.11.004>
86. Dybkaer, R. (2003). Units for quantities of dimension one. *Metrologia*, 41(1), 69-73. <https://doi.org/10.1088/0026-1394/41/1/010>
87. Brand, W. A., & Coplen, T. B. (2012). Stable isotope deltas: Tiny, yet robust signatures in nature. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 48(3), 393-409. <https://doi.org/10.1080/10256016.2012.666977>
88. Blair, N., Leu, A., Muñoz, E., Olsen, J., Kwong, E., & Des Marais, D. (1985). Carbon isotopic fractionation in heterotrophic microbial metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(4), 996-1001. <https://doi.org/10.1128/AEM.50.4.996-1001.1985>
89. Muccio, Z., & Jackson, G. P. (2009). Isotope ratio mass spectrometry. *The Analyst*, 134(2), 213-222. <https://doi.org/10.1039/B808232D>
90. Casale, J., Casale, E., Collins, M., Morello, D., Cathapermal, S., & Panicker, S. (2006). Stable isotope analyses of heroin seized from the merchant vessel Pong Su. *Journal of Forensic Sciences*, 51(3), 603-606. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00123.x>
91. Fraser, I., Meier-Augenstein, W., & Kalin, R. M. (2006). The role of stable isotopes in human identification: A longitudinal study into the variability of isotopic signals in human hair and nails. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(7), 1109-1116. <https://doi.org/10.1002/rcm.2424>
92. Meier-Augenstein, W., & Fraser, I. (2008). Forensic isotope analysis leads to identification of a mutilated murder victim. *Science & Justice*, 48(3), 153-159. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2007.10.010>
93. Bahar, B., Schmidt, O., Moloney, A. P., Scrimgeour, C. M., Begley, I. S., & Monahan, F. J. (2008). Seasonal variation in the C, N and S stable isotope composition of retail organic and conventional Irish beef. *Food Chemistry*, 106(3), 1299-1305. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.053>
94. Heaton, K., Kelly, S. D., Hoogewerff, J., & Woolfe, M. (2008). Verifying the geographical origin of beef: The application of multi-element isotope and trace element analysis. *Food Chemistry*, 107(1), 506-515. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.010>
95. Jamin, E., Gonzalez, J., Remaud, G., Nault, N., & Martin, G. G. (1997). Detection of Exogenous Sugars or Organic Acids Addition in Pineapple Juices and Concentrates by ¹³C IRMS Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(10), 3961. <https://doi.org/10.1021/jf9701087>

96. Elsner, M., Jochmann, M. A., Hofstetter, T. B., Hunkeler, D., Bernstein, A., Schmidt, T. C., & Schimmelmann, A. (2012). Current challenges in compound-specific stable isotope analysis of environmental organic contaminants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *403*(9), 2471-2491. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5683-y>
97. Hofstetter, T. B., & Berg, M. (2011). Assessing transformation processes of organic contaminants by compound-specific stable isotope analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 618-627. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.10.012>
98. Thullner, M., Centler, F., Richnow, H.-H., & Fischer, A. (2012). Quantification of organic pollutant degradation in contaminated aquifers using compound specific stable isotope analysis – Review of recent developments. *Organic Geochemistry*, *42*(12), 1440-1460. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2011.10.011>
99. Wokovich, A. M., Spencer, J. A., Westenberger, B. J., Buhse, L. F., & Jasper, J. P. (2005). Stable isotopic composition of the active pharmaceutical ingredient (API) naproxen. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *38*(4), 781-784. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.02.033>
100. Corr, L. T., Berstan, R., & Evershed, R. P. (2007). Optimisation of derivatisation procedures for the determination of $\delta^{13}\text{C}$ values of amino acids by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *21*(23), 3759-3771. <https://doi.org/10.1002/rcm.3252>
101. Tea, I., Guennec, A. L., Frasset-Darrieux, M., Julien, M., Romek, K., Antheaume, I., Hankard, R., & Robins, R. J. (2013). Simultaneous determination of natural-abundance $\delta^{15}\text{N}$ values and quantities of individual amino acids in proteins from milk of lactating women and from infant hair using gas chromatography/isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *27*(12), 1345-1353. <https://doi.org/10.1002/rcm.6582>
102. Zhang, Z., Tian, J., Xiao, H., Zheng, N., Gao, X., Zhu, R., & Xiao, H. (2016). A reliable compound-specific nitrogen isotope analysis of amino acids by GC-C-IRMS following derivatisation into N-pivaloyl-iso-propyl (NPIP) esters for high-resolution food webs estimation. *Journal of Chromatography B*, *1033-1034*, 382-389. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.09.004>
103. Rieley, G. (1994). *Derivatization of Organic Compounds Prior to Gas Chromatographic-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometric Analysis: Identification of Isotope Fractionation Processes*. *119*, 915-919. <https://doi.org/10.1039/AN9941900915>
104. Perini, M., & Bontempo, L. (2022). Liquid Chromatography coupled to Isotope Ratio Mass Spectrometry (LC-IRMS): A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *147*, 116515. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116515>

105. Godin, J.-P., & McCullagh, J. S. O. (2011). Review: Current applications and challenges for liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry (LC/IRMS): LC/IRMS applications and challenges. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(20), 3019-3028. <https://doi.org/10.1002/rcm.5167>
106. Matos, M. P. V., & Jackson, G. P. (2020). Compound-Specific Isotope Analysis of Human Hair: Predicting Behaviors and Biometrics beyond Dietary Factors. *Analytical Chemistry*, 92(4), 3014-3022. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b04085>
107. Raghavan, M., McCullagh, J. S. O., Lynnerup, N., & Hedges, R. E. M. (2010). Amino acid $\delta^{13}\text{C}$ analysis of hair proteins and bone collagen using liquid chromatography/isotope ratio mass spectrometry: Paleodietary implications from intra-individual comparisons. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(5), 541-548. <https://doi.org/10.1002/rcm.4398>
108. Limon, A. W., Moingt, M., & Widory, D. (2021). The carbon stable isotope compositions of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA): Improved analytical sensitivity and first application to environmental water matrices. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 35(5), e9017. <https://doi.org/10.1002/rcm.9017>
109. Mogusu, E. O., Wolbert, J. B., Kujawinski, D. M., Jochmann, M. A., & Elsner, M. (2015). Dual element ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) isotope analysis of glyphosate and AMPA by derivatization-gas chromatography isotope ratio mass spectrometry (GC/IRMS) combined with LC/IRMS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(18), 5249-5260. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8721-3>
110. Schierbeek, H., Moerdijk-Poortvliet, T. C. W., van den Akker, C. H. P., te Braake, F. W. J., Boschker, H. T. S., & van Goudoever, J. B. (2009). Analysis of [$\text{U-}^{13}\text{C}_6$]glucose in human plasma using liquid chromatography/isotope ratio mass spectrometry compared with two other mass spectrometry techniques. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23(23), 3824-3830. <https://doi.org/10.1002/rcm.4293>
111. Godin, J.-P., Hau, J., Fay, L.-B., & Hopfgartner, G. (2005). Isotope ratio monitoring of small molecules and macromolecules by liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(18), 2689-2698. <https://doi.org/10.1002/rcm.2117>
112. Corso, T. N., & Brenna, J. T. (1997). High-precision position-specific isotope analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(4), 1049-1053. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.4.1049>
113. Dias, R. F., Freeman, K. H., & Franks, S. G. (2002). Gas chromatography–pyrolysis–isotope ratio mass spectrometry: A new method for investigating intramolecular isotopic

variation in low molecular weight organic acids. *Organic Geochemistry*, 33(2), 161-168. [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(01\)00141-3](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(01)00141-3)

114. Yamada, K., Kikuchi, M., Gilbert, A., Yoshida, N., Wasano, N., Hattori, R., & Hirano, S. (2014). Evaluation of commercially available reagents as a reference material for intramolecular carbon isotopic measurements of acetic acid. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 28(16), 1821-1828. <https://doi.org/10.1002/rcm.6964>

115. Martin, G. J., & Martin, M. L. (1981). Deuterium labelling at the natural abundance level as studied by high field quantitative ^2H NMR. *Tetrahedron Letters*, 22(36), 3525-3528. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)81948-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)81948-1)

116. Remaud, G. S., Giraudeau, P., Lesot, P., & Akoka, S. (2016). Isotope Ratio Monitoring by NMR. Part 1: Recent Advances. *Modern Magnetic Resonance*, 1-26. https://doi.org/10.1007/978-3-319-28388-3_8

117. Jamin, E., Martin, F., Martin, G. G., & Collaborators: (2007). Determination of Site-Specific (Deuterium/Hydrogen) Ratios in Vanillin by ^2H -NuclearMagnetic Resonance Spectrometry: Collaborative Study. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 90(1), 187-195. <https://doi.org/10.1093/jaoac/90.1.187>

118. Texier-Bonniot, T., Berdagué, P., Robins, R. J., Remaud, G., & Lesot, P. (2018). Analytical contribution of deuterium 2D-NMR in oriented media to $^2\text{H}/^1\text{H}$ isotopic characterization: The case of vanillin. *Flavour and Fragrance Journal*, 33(3), 217-229. <https://doi.org/10.1002/ffj.3441>

119. Jamin, E., & Martin, G. J. (2006). SNIF-NMR—Part 4: Applications in an Economic Context: The Example of Wines, Spirits, and Juices. In G. A. Webb (Éd.), *Modern Magnetic Resonance* (p. 1681-1687). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/1-4020-3910-7_188

120. Thomas, F., & Jamin, E. (2009). ^2H NMR and ^{13}C -IRMS analyses of acetic acid from vinegar, ^{18}O -IRMS analysis of water in vinegar: International collaborative study report. *Analytica Chimica Acta*, 649(1), 98-105. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.07.014>

121. Augusti, A., Betson, T., & Schleucher, J. (2008). Deriving correlated climate and physiological signals from deuterium isotopomers in tree rings. *Chemical Geology*, 252, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2008.01.011>

122. Betson, T. R., Augusti, A., & Schleucher, J. (2006). Quantification of Deuterium Isotopomers of Tree-Ring Cellulose Using Nuclear Magnetic Resonance. *Analytical Chemistry*, 78(24), 8406-8411. <https://doi.org/10.1021/ac061050a>

123. Lesot, P., Aroulanda, C., Zimmermann, H., & Luz, Z. (2015). Enantiotopic discrimination in the NMR spectrum of prochiral solutes in chiral liquid crystals. *Chemical Society Reviews*, 44(8), 2330-2375. <https://doi.org/10.1039/C4CS00260A>
124. Lesot, P., Serhan, Z., & Billault, I. (2011). Recent advances in the analysis of the site-specific isotopic fractionation of metabolites such as fatty acids using anisotropic natural-abundance ^2H NMR spectroscopy: Application to conjugated linolenic methyl esters. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(3), 1187-1200. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4394-0>
125. Remaud, G. S., & Akoka, S. (2016). A review of flavors authentication by position-specific isotope analysis by nuclear magnetic resonance spectrometry: The example of vanillin: Isotopic Analysis by NMR for Flavour Authentication: The Example of Vanillin. *Flavour and Fragrance Journal*, 32, 77-84. <https://doi.org/10.1002/ffj.3366>
126. Hoffman, D. W., & Rasmussen, C. (2019). Position-Specific Carbon Stable Isotope Ratios by Proton NMR Spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 91(24), 15661-15669. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03776>
127. Rasmussen, C., & Hoffman, D. W. (2020). Intramolecular distribution of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopes in amino acids of diverse origins. *Amino Acids*, 52(6-7), 955-964. <https://doi.org/10.1007/s00726-020-02863-y>
128. Akoka, S., & Remaud, G. S. (2020). NMR-based isotopic and isotopomic analysis. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 120-121, 1-24. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2020.07.001>
129. Faulh, C., & Wittkowski, R. (1996). On-line ^1H -NMR to facilitate tube preparation in SNIF-NMR analysis. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung*, 203(6), 541-545. <https://doi.org/10.1007/BF01193160>
130. Krishnan, V. V., & Murali, N. (2013). Radiation damping in modern NMR experiments: Progress and challenges. *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy*, 68, 41-57. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2012.06.001>
131. Caytan, E., Remaud, G. S., Tenailleau, E., & Akoka, S. (2007). Precise and accurate quantitative ^{13}C NMR with reduced experimental time. *Talanta*, 71(3), 1016-1021. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.05.075>
132. Tenailleau, E., Remaud, G., & Akoka, S. (2005). Quantification of the ^1H -Decoupling Effects on the Accuracy of ^{13}C -NMR Measurements. *Instrumentation Science & Technology*, 33(4), 391-399. <https://doi.org/10.1081/CI-200063700>
133. Bayle, K. (2014). *Développements méthodologiques RMN ^{13}C isotopique pour l'étude de voies métaboliques*. Nantes.

134. Caytan, E., Botosoa, E. P., Silvestre, V., Robins, R. J., Akoka, S., & Remaud, G. S. (2007). Accurate Quantitative ^{13}C NMR Spectroscopy: Repeatability over Time of Site-Specific ^{13}C Isotope Ratio Determination. *Analytical Chemistry*, 79, 8266-8269. <https://doi.org/10.1021/ac070826k>
135. Bussy, U., Thibaudeau, C., Thomas, F., Desmurs, J.-R., Jamin, E., Remaud, G. S., Silvestre, V., & Akoka, S. (2011). Isotopic finger-printing of active pharmaceutical ingredients by ^{13}C NMR and polarization transfer techniques as a tool to fight against counterfeiting. *Talanta*, 85(4), 1909-1914. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.07.022>
136. Merchak, N., Rizk, T., Silvestre, V., Remaud, G. S., Bejjani, J., & Akoka, S. (2018). Olive oil characterization and classification by ^{13}C NMR with a polarization transfer technique: A comparison with gas chromatography and ^1H NMR. *Food Chemistry*, 245, 717-723. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.005>
137. Martineau, E., Akoka, S., Boisseau, R., Delanoue, B., & Giraudeau, P. (2013). Fast Quantitative ^1H - ^{13}C Two-Dimensional NMR with Very High Precision. *Analytical Chemistry*, 85(9), 4777-4783. <https://doi.org/10.1021/ac4005309>
138. Merchak, N., Silvestre, V., Rouger, L., Giraudeau, P., Rizk, T., Bejjani, J., & Akoka, S. (2016). Precise and rapid isotopomic analysis by ^1H - ^{13}C 2D NMR: Application to triacylglycerol matrices. *Talanta*, 156-157, 239-244. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.05.031>
139. Ogg, R. J., Kingsley, R. B., & Taylor, J. S. (1994). WET, a T_1 - and B_1 -Insensitive Water-Suppression Method for in Vivo Localized ^1H NMR Spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance, Series B*, 104(1), 1-10. <https://doi.org/10.1006/jmrb.1994.1048>
140. Bayle, K., Julien, M., Remaud, G. S., & Akoka, S. (2015). Suppression of radiation damping for high precision quantitative NMR. *Journal of Magnetic Resonance*, 259, 121-125. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2015.08.007>
141. Jézéquel, T., Silvestre, V., Dinis, K., Giraudeau, P., & Akoka, S. (2018). Optimized slice-selective ^1H NMR experiments combined with highly accurate quantitative ^{13}C NMR using an internal reference method. *Journal of Magnetic Resonance*, 289, 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2018.02.002>
142. Chaintreau, A., Fieber, W., Sommer, H., Gilbert, A., Yamada, K., Yoshida, N., Pagelot, A., Moskau, D., Moreno, A., Schleucher, J., Reniero, F., Holland, M., Guillou, C., Silvestre, V., Akoka, S., & Remaud, G. S. (2013). Site-specific ^{13}C content by quantitative isotopic ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance spectrometry: A pilot inter-laboratory study. *Analytica Chimica Acta*, 788, 108-113. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.06.004>

143. Gilbert, A., Hattori, R., Silvestre, V., Wasano, N., Akoka, S., Hirano, S., Yamada, K., Yoshida, N., & Remaud, G. S. (2012). Comparison of IRMS and NMR spectrometry for the determination of intramolecular ^{13}C isotope composition: Application to ethanol. *Talanta*, *99*, 1035-1039. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.05.023>
144. Joubert, V., Silvestre, V., Grand, M., Loquet, D., Ladroue, V., Besacier, F., Akoka, S., & Remaud, G. S. (2018). Full Spectrum Isotopic ^{13}C NMR Using Polarization Transfer for Position-Specific Isotope Analysis. *Analytical Chemistry*, *90*(14), 8692-8699. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02139>
145. Portaluri, V., Thomas, F., Jamin, E., Akoka, S., & Remaud, G. S. (2021). Authentication of Agave Products through Isotopic Intramolecular ^{13}C Content of Ethanol: Optimization and Validation of ^{13}C Quantitative NMR Methodology. *ACS Food Science & Technology*, *1*(7), 1316-1322. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.1c00177>
146. Thomas, F., Randet, C., Gilbert, A., Silvestre, V., Jamin, E., Akoka, S., Remaud, G., Segebarth, N., & Guillou, C. (2010). Improved Characterization of the Botanical Origin of Sugar by Carbon-13 SNIF-NMR Applied to Ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(22), 11580-11585. <https://doi.org/10.1021/jf102983v>
147. Portaluri, V., Thomas, F., Jamin, E., Lorandel, B., Silvestre, V., Akoka, S., & Remaud, G. S. (2021). Vanillin isotopic intramolecular ^{13}C profile through polarization transfer NMR pulse sequence and statistical modelling. *Food Control*, *130*, 108345. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108345>
148. Macura, S. (2009). Accelerated Multidimensional NMR Data Acquisition by Varying the Pulse Sequence Repetition Time. *Journal of the American Chemical Society*, *131*(28), 9606-9607. <https://doi.org/10.1021/ja9011063>
149. Franconi, F., Seguin, F., Sonier, C. B., Le Pape, A., & Akoka, S. (1995). T_1 mapping from spin echo and stimulated echoes. *Medical Physics*, *22*(11), 1763-1769. <https://doi.org/10.1118/1.597632>
150. Akoka, S., Franconi, F., Seguin, F., & Le Pape, A. (1993). Radiofrequency map of an NMR coil by imaging. *Magnetic Resonance Imaging*, *11*(3), 437-441. [https://doi.org/10.1016/0730-725X\(93\)90078-R](https://doi.org/10.1016/0730-725X(93)90078-R)
151. Mao, X.-A., & Ye, C.-H. (1997). Understanding radiation damping in a simple way. *Concepts in Magnetic Resonance*, *9*(3), 173-187. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0534\(1997\)9:3<173::AID-CMR4>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0534(1997)9:3<173::AID-CMR4>3.0.CO;2-W)
152. Wu, P. S. C., & Otting, G. (2005). Rapid pulse length determination in high-resolution NMR. *Journal of Magnetic Resonance*, *176*(1), 115-119. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2005.05.018>

153. Atkinson, A., Colburn, W., DeGruttola, V., Demets, D., & Downing, G. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 69(3), 89-95. <https://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>
154. Martins-de-Souza, D. (2010). Is the word 'biomarker' being properly used by proteomics research in neuroscience? *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 260(7), 561-562. <https://doi.org/10.1007/s00406-010-0105-2>
155. Koal, T., Schmiederer, D., Pham-Tuan, H., Röhring, C., & Rauh, M. (2012). Standardized LC-MS/MS based steroid hormone profile-analysis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 129(3-5), 129-138. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.12.001>
156. Coplen, T. B. (2011). Guidelines and recommended terms for expression of stable-isotope-ratio and gas-ratio measurement results: Guidelines and recommended terms for expressing stable isotope results. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(17), 2538-2560. <https://doi.org/10.1002/rcm.5129>
157. Erich, S., Schill, S., Annweiler, E., Waiblinger, H.-U., Kuballa, T., Lachenmeier, D. W., & Monakhova, Y. B. (2015). Combined chemometric analysis of ¹H NMR, ¹³C NMR and stable isotope data to differentiate organic and conventional milk. *Food Chemistry*, 188, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.118>
158. Mendelsohn, D., Immelman, A. R., Vogel, J. C., & Chevallier, G. V. L. (1986). Carbon-13 in natural cholesterol. *Biomedical & Environmental Mass Spectrometry*, 13(1), 21-24. <https://doi.org/10.1002/bms.1200130105>
159. Stott, A. W., & Evershed, R. P. (1996). $\delta^{13}\text{C}$ Analysis of Cholesterol Preserved in Archaeological Bones and Teeth. *Analytical Chemistry*, 68(24), 4402-4408. <https://doi.org/10.1021/ac960199r>
160. Hajjar, G., Rizk, T., Akoka, S., & Bejjani, J. (2019). Cholesterol, a powerful ¹³C isotopic biomarker. *Analytica Chimica Acta*, 1089, 115-122. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.09.001>
161. Mayzel, M., Kazimierczuk, K., & Orekhov, V. Y. (2014). The causality principle in the reconstruction of sparse NMR spectra. *Chemical Communications*, 50(64), 8947-8950. <https://doi.org/10.1039/C4CC03047H>
162. Farjon, J., Milande, C., Martineau, E., Akoka, S., & Giraudeau, P. (2018). The FAQUIRE Approach: FAst, QUantitative, hIghly Resolved and sEnsitivity Enhanced ¹H, ¹³C Data. *Analytical Chemistry*, 90(3), 1845-1851. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03874>
163. Haddad, L., Renou, S., Remaud, G. S., Rizk, T., Bejjani, J., & Akoka, S. (2021). A precise and rapid isotopomic analysis of small quantities of cholesterol at natural abundance by

optimized ^1H - ^{13}C 2D NMR. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413(6), 1521-1532. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-03135-0>

164. Haddad, L. (2021). *Caractérisation et authentification des produits laitiers par des profilages métabolomiques et isotopomiques à haute résolution*. Nantes.

165. *Garantir l'authenticité des produits biologiques grâce à des outils innovants de contrôle analytique*. (s. d.). TOFOO. Consulté 30 août 2022, à l'adresse <https://www.tofoo-project.com/>

166. Laursen, K. H., Schjoerring, J. K., Kelly, S. D., & Husted, S. (2014). Authentication of organically grown plants – advantages and limitations of atomic spectroscopy for multi-element and stable isotope analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 59, 73-82. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.04.008>

167. Li, Q., Chen, L., Ding, Q., & Lin, G. (2013). The stable isotope signatures of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) in main cultivation regions of China: Implications for tracing geographic origin. *European Food Research and Technology*, 237(2), 109-116. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-1967-0>

168. Laursen, K. H., Mihailova, A., Kelly, S. D., Epov, V. N., Bérail, S., Schjoerring, J. K., Donard, O. F. X., Larsen, E. H., Pedentchouk, N., Marca-Bell, A. D., Halekoh, U., Olesen, J. E., & Husted, S. (2013). Is it really organic? – Multi-isotopic analysis as a tool to discriminate between organic and conventional plants. *Food Chemistry*, 141(3), 2812-2820. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.068>

169. Paolini, M., Ziller, L., Laursen, K. H., Husted, S., & Camin, F. (2015). Compound-Specific $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ Analyses of Amino Acids for Potential Discrimination between Organically and Conventionally Grown Wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(25), 5841-5850. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00662>

170. Xu, S., Zhao, C., Deng, X., Zhang, R., Qu, L., Wang, M., Ren, S., Wu, H., Yue, Z., & Niu, B. (2021). Multivariate analysis for organic milk authentication. *Journal of Chromatography B*, 1186, 123029. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.123029>

171. Camin, F., Perini, M., Colombari, G., Bontempo, L., & Versini, G. (2008). Influence of dietary composition on the carbon, nitrogen, oxygen and hydrogen stable isotope ratios of milk. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22(11), 1690-1696. <https://doi.org/10.1002/rcm.3506>

172. Chung, I.-M., Park, I., Yoon, J.-Y., Yang, Y.-S., & Kim, S.-H. (2014). Determination of organic milk authenticity using carbon and nitrogen natural isotopes. *Food Chemistry*, 160, 214-218. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.061>

173. Mardones, L., & Villagrán, M. (2020). Lactose Synthesis. In *Lactose and Lactose Derivatives*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.91399>
174. Liu, H.-Y., Wadood, S. A., Xia, Y., Liu, Y., Guo, H., Guo, B.-L., & Gan, R.-Y. (2021). Wheat authentication : An overview on different techniques and chemometric methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-24. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1942783>
175. Aguirre, A., Borneo, R., & León, A. E. (2011). Properties of triticale flour protein based films. *LWT - Food Science and Technology*, 44(9), 1853-1858. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.011>
176. Gilbert, A., Silvestre, V., Robins, R. J., & Remaud, G. S. (2009). Accurate Quantitative Isotopic ^{13}C NMR Spectroscopy for the Determination of the Intramolecular Distribution of ^{13}C in Glucose at Natural Abundance. *Analytical Chemistry*, 81(21), 8978-8985. <https://doi.org/10.1021/ac901441g>
177. Wieloch, T., Ehlers, I., Yu, J., Frank, D., Grabner, M., Gessler, A., & Schleucher, J. (2018). Intramolecular ^{13}C analysis of tree rings provides multiple plant ecophysiology signals covering decades. *Scientific Reports*, 8(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23422-2>
178. Braconnot, P., Harrison, S. P., Kageyama, M., Bartlein, P. J., Masson-Delmotte, V., Abe-Ouchi, A., Otto-Bliesner, B., & Zhao, Y. (2012). Evaluation of climate models using palaeoclimatic data. *Nature Climate Change*, 2(6), Art. 6. <https://doi.org/10.1038/nclimate1456>
179. Naulier, M., Savard, M. M., Bégin, C., Gennaretti, F., Arseneault, D., Marion, J., Nicault, A., & Bégin, Y. (2015). A millennial summer temperature reconstruction for northeastern Canada using oxygen isotopes in subfossil trees. *Climate of the Past*, 11(9), 1153-1164. <https://doi.org/10.5194/cp-11-1153-2015>
180. Treydte, K., Frank, D., Esper, J., Andreu, L., Bednarz, Z., Berninger, F., Boettger, T., D'Alessandro, C. M., Etien, N., Filot, M., Grabner, M., Guillemain, M. T., Gutierrez, E., Haupt, M., Helle, G., Hilasvuori, E., Jungner, H., Kalela-Brundin, M., Krapiec, M., ... Schleser, G. H. (2007). Signal strength and climate calibration of a European tree-ring isotope network. *Geophysical Research Letters*, 34(24). <https://doi.org/10.1029/2007GL031106>
181. Gilbert, A., Silvestre, V., Robins, R. J., Remaud, G. S., & Tcherkez, G. (2012). Biochemical and physiological determinants of intramolecular isotope patterns in sucrose from C3, C4 and CAM plants accessed by isotopic ^{13}C NMR spectrometry: A viewpoint. *Natural Product Reports*, 29(4), 476. <https://doi.org/10.1039/c2np00089j>
182. Gilbert, A., Silvestre, V., Robins, R. J., Tcherkez, G., & Remaud, G. S. (2011). A ^{13}C NMR spectrometric method for the determination of intramolecular $\delta^{13}\text{C}$ values in fructose

from plant sucrose samples. *New Phytologist*, 191(2), 579-588. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03690.x>

183. Gilbert, A., Robins, R. J., Remaud, G. S., & Tcherkez, G. G. B. (2012). Intramolecular ^{13}C pattern in hexoses from autotrophic and heterotrophic C3 plant tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(44), 18204-18209. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211149109>

184. Gilbert, A., Silvestre, V., Segebarth, N., Tcherkez, G., Guillou, C., Robins, R. J., Akoka, S., & Remaud, G. S. (2011). The intramolecular ^{13}C -distribution in ethanol reveals the influence of the CO_2 -fixation pathway and environmental conditions on the site-specific ^{13}C variation in glucose: Environmental impact on the intramolecular ^{13}C distribution in glucose. *Plant, Cell & Environment*, 34(7), 1104-1112. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02308.x>

185. Maiti, N. C., Zhu, Y., Carmichael, I., Serianni, A. S., & Anderson, V. E. (2006). $^1\text{J}_{\text{CH}}$ correlates with alcohol hydrogen bond strength. *The Journal of Organic Chemistry*, 71(7), 2878-2880. <https://doi.org/10.1021/jo052389k>

186. Anderson, C. E., Britt, D. K., Sangji, S., O'Leary, D. J., Anderson, C. D., & Rychnovsky, S. D. (2005). Direct Assignment of the Relative Configuration in Acyclic 1,3-Diols by ^1H NMR Spectroscopy. *Organic Letters*, 7(25), 5721-5723. <https://doi.org/10.1021/ol052539d>

187. Fox, A. C., Martineau, E., Remaud, G. S., & Freeman, K. H. (2021). Position-specific isotope fractionation in amino acids sorbed to ice: Implications for the preservation of isotopologue biosignatures. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 309, 45-56. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2021.06.023>

188. Jézéquel, T. (2018). *Methodological developments for highly accurate quantitative ^{13}C NMR applied to isotopic analysis at natural abundance*. Nantes.

189. Tea, I., Martineau, E., Antheaume, I., Lalande, J., Mauve, C., Gilard, F., Barillé-Nion, S., Blackburn, A. C., & Tcherkez, G. (2016). ^{13}C and ^{15}N natural isotope abundance reflects breast cancer cell metabolism. *Scientific Reports*, 6(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/srep34251>

Annexes

Annexe 1 : Programme d'impulsion de la séquence asHSQC sur TopSpin

```

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"d11=30m"
"p13=3600u"
"p14=3600u"
"p15=2000u"
"d0=3u"
"in0=inf1/2"
"DELTA1=4u+p16+d16+d0+cnst3/2-p3*2/PI"
"DELTA2=d5-p18-d16-de-4u+2*p1/PI"
"DELTA3=4u+p16+d16"

1 ze
  d11 pl1:f1 pl12:f2
2 d1 do:f2
  vd
  10u fq=0:f2
3 (p1 ph1)
  4u
  d5 pl0:f1 pl0:f2
  (center (p14:sp4 ph6):f2 (p13:sp3 ph2) )
  4u
  d5 pl1:f1 pl2:f2 UNBLKGRAD
  (p1 ph3)
  p17:gp17
  (p3 ph7):f2
  DELTA1 pl0:f2
  (p14:sp4 ph8):f2
  4u
  p16:gp1
  d16 pl0:f1

```

```

d0
(p15:sp5 ph4)
d0
DELTA3 p11:f1
(p14:sp4 ph13):f2
DELTA1 p12:f2
(p3 ph11):f2
p17:gp18
(p1 ph3)
4u
d5 p10:f1 p10:f2
(center (p14:sp4 ph12):f2 (p13:sp3 ph5) )
4u
p18:gp3
d16 fq=cnst1:f2
DELTA2 p11:f1 p112:f2
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2
10u do:f2
50u UNBLKGRAD
p25:gp25
d16 ivd BLKGRAD
d1 mc #0 to 2 F1PH(calph(ph7, +90) & calph(ph8, +90), caldel(d0, +in0))
exit

```

```

ph1=0
ph2=0
ph3=1
ph4=0 0 2 2
ph5=0
ph6=0
ph7=1 1 1 1 3 3 3 3
ph8=0
ph11=0 2
ph12=0
ph13=0 2
ph14=0
ph31=0 2 0 2 2 0 2 0

```

```

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; [200 ms]
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d13: short delay [4 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;cnst1: shift in Hz between excitation frequency and frequency decoupling
;cnst2: = J(XH)
;inf1:  $1/SW(X) = 2 * DW(X)$ 
;in0:  $1/(2 * SW(X)) = DW(X)$ 
;nd0: 2
;NS: 1 * n
;DS: 8
;td1: number of experiments
;FnMODE: States-TPPI
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence
;for z-only gradients:
;gpz1: 80%
;gpz3: 20.1% for C-13, 8.1% for N-15
;gpz17: 80%
;gpz18: 40%
;gpz25: 50%
;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.100
;gpnam3: SMSQ10.100
;gpnam17: SMSQ10.100
;gpnam18: SMSQ10.100
;gpnam25: SMSQ10.100

```

Annexe 2 : Valeurs de différentes listes de VRT

Numéro d'incrément	Liste 1	Liste 2	Liste 3
0	10,00	10,00	10,00
1	9,99	9,94	9,97
2	9,98	9,82	9,93
3	9,97	9,65	9,89
4	9,96	9,44	9,83
5	9,94	9,20	9,77
6	9,92	8,96	9,71
7	9,89	8,72	9,63
8	9,87	8,50	9,55
9	9,84	8,30	9,47
10	9,81	8,12	9,38
11	9,78	7,97	9,28
12	9,74	7,85	9,18
13	9,70	7,76	9,08
14	9,66	7,68	8,97
15	9,62	7,61	8,86
16	9,58	7,56	8,75
17	9,53	7,51	8,63
18	9,48	7,47	8,52
19	9,43	7,44	8,40
20	9,37	7,40	8,28
21	9,31	7,37	8,17
22	9,26	7,34	8,05
23	9,20	7,31	7,93
24	9,13	7,27	7,82
25	9,07	7,24	7,70
26	9,00	7,21	7,59
27	8,93	7,18	7,48
28	8,86	7,15	7,38
29	8,79	7,12	7,27
30	8,72	7,09	7,17
31	8,64	7,06	7,08
32	8,56	7,03	6,98
33	8,48	7,00	6,89
34	8,40	6,96	6,80
35	8,32	6,93	6,72
36	8,24	6,90	6,63
37	8,16	6,87	6,56
38	8,07	6,84	6,48
39	7,98	6,81	6,41
40	7,90	6,78	6,34
41	7,81	6,75	6,27

42	7,72	6,72	6,21
43	7,63	6,68	6,15
44	7,54	6,65	6,09
45	7,45	6,62	6,04
46	7,35	6,59	5,99
47	7,26	6,56	5,94
48	7,17	6,53	5,89
49	7,07	6,50	5,84
50	6,98	6,47	5,80
51	6,88	6,44	5,76
52	6,79	6,40	5,72
53	6,69	6,37	5,68
54	6,59	6,34	5,64
55	6,50	6,31	5,60
56	6,40	6,28	5,57
57	6,30	6,25	5,53
58	6,21	6,22	5,50
59	6,11	6,19	5,46
60	6,02	6,16	5,43
61	5,92	6,13	5,40
62	5,82	6,09	5,37
63	5,73	6,06	5,34
64	5,63	6,03	5,31
65	5,54	6,00	5,28
66	5,45	5,97	5,25
67	5,35	5,94	5,22
68	5,26	5,91	5,19
69	5,17	5,88	5,16
70	5,07	5,85	5,13
71	4,98	5,81	5,11
72	4,89	5,78	5,08
73	4,80	5,75	5,05
74	4,71	5,72	5,02
75	4,63	5,69	4,99
76	4,54	5,66	4,97
77	4,45	5,63	4,94
78	4,37	5,60	4,91
79	4,28	5,57	4,88
80	4,20	5,54	4,86
81	4,12	5,50	4,83
82	4,03	5,47	4,80
83	3,95	5,44	4,77
84	3,87	5,41	4,75
85	3,80	5,38	4,72
86	3,72	5,35	4,69
87	3,64	5,32	4,67

88	3,57	5,29	4,64
89	3,49	5,26	4,61
90	3,42	5,22	4,58
91	3,35	5,19	4,56
92	3,28	5,16	4,53
93	3,21	5,13	4,50
94	3,14	5,10	4,48
95	3,07	5,07	4,45
96	3,00	5,04	4,42
97	2,94	5,01	4,39
98	2,88	4,98	4,37
99	2,81	4,95	4,34
100	2,75	4,91	4,31
101	2,69	4,88	4,29
102	2,63	4,85	4,26
103	2,57	4,82	4,23
104	2,52	4,79	4,20
105	2,46	4,76	4,18
106	2,41	4,73	4,15
107	2,36	4,70	4,12
108	2,30	4,67	4,09
109	2,25	4,63	4,07
110	2,20	4,60	4,04
111	2,15	4,57	4,01
112	2,11	4,54	3,99
113	2,06	4,51	3,96
114	2,01	4,48	3,93
115	1,97	4,45	3,90
116	1,93	4,42	3,88
117	1,88	4,39	3,85
118	1,84	4,36	3,82
119	1,80	4,32	3,80
120	1,76	4,29	3,77
121	1,72	4,26	3,74
122	1,69	4,23	3,71
123	1,65	4,20	3,69
124	1,61	4,17	3,66
125	1,58	4,14	3,63
126	1,55	4,11	3,61
127	1,51	4,08	3,58
128	1,48	4,04	3,55
129	1,45	4,01	3,52
130	1,42	3,98	3,50
131	1,39	3,95	3,47
132	1,36	3,92	3,44
133	1,33	3,89	3,42

134	1,31	3,86	3,39
135	1,28	3,83	3,36
136	1,25	3,80	3,33
137	1,23	3,76	3,31
138	1,20	3,73	3,28
139	1,18	3,70	3,25
140	1,16	3,67	3,23
141	1,13	3,64	3,20
142	1,11	3,61	3,17
143	1,09	3,58	3,14
144	1,07	3,55	3,12
145	1,05	3,52	3,09
146	1,03	3,49	3,06
147	1,01	3,45	3,04
148	0,99	3,42	3,01
149	0,97	3,39	2,98
150	0,96	3,36	2,95
151	0,94	3,33	2,93
152	0,92	3,30	2,90
153	0,91	3,27	2,87
154	0,89	3,24	2,84
155	0,88	3,21	2,82
156	0,86	3,17	2,79
157	0,85	3,14	2,76
158	0,83	3,11	2,74
159	0,82	3,08	2,71
160	0,80	3,05	2,68
161	0,79	3,02	2,65
162	0,78	2,99	2,63
163	0,77	2,96	2,60
164	0,75	2,93	2,57
165	0,74	2,90	2,55
166	0,73	2,86	2,52
167	0,72	2,83	2,49
168	0,71	2,80	2,46
169	0,70	2,77	2,44
170	0,68	2,74	2,41
171	0,67	2,71	2,38
172	0,66	2,68	2,36
173	0,65	2,65	2,33
174	0,64	2,62	2,30
175	0,63	2,58	2,27
176	0,62	2,55	2,25
177	0,62	2,52	2,22
178	0,61	2,49	2,19
179	0,60	2,46	2,17

180	0,59	2,43	2,14
181	0,58	2,40	2,11
182	0,57	2,37	2,08
183	0,56	2,34	2,06
184	0,55	2,31	2,03
185	0,55	2,27	2,00
186	0,54	2,24	1,98
187	0,53	2,21	1,95
188	0,52	2,18	1,92
189	0,52	2,15	1,89
190	0,51	2,12	1,87
191	0,50	2,09	1,84
192	0,49	2,06	1,81
193	0,49	2,03	1,78
194	0,48	1,99	1,76
195	0,47	1,96	1,73
196	0,46	1,93	1,70
197	0,46	1,90	1,68
198	0,45	1,87	1,65
199	0,44	1,84	1,62
200	0,44	1,81	1,59
201	0,43	1,78	1,57
202	0,42	1,75	1,54
203	0,42	1,72	1,51
204	0,41	1,68	1,49
205	0,40	1,65	1,46
206	0,40	1,62	1,43
207	0,39	1,59	1,40
208	0,38	1,56	1,38
209	0,38	1,53	1,35
210	0,37	1,50	1,32
211	0,36	1,47	1,30
212	0,36	1,44	1,27
213	0,35	1,40	1,24
214	0,35	1,37	1,21
215	0,34	1,34	1,19
216	0,33	1,31	1,16
217	0,33	1,28	1,13
218	0,32	1,25	1,11
219	0,31	1,22	1,08
220	0,31	1,19	1,05
221	0,30	1,16	1,02
222	0,30	1,12	1,00
223	0,29	1,09	0,97
224	0,28	1,06	0,94
225	0,28	1,03	0,92

226	0,27	1,00	0,89
227	0,27	0,97	0,86
228	0,26	0,94	0,83
229	0,25	0,91	0,81
230	0,25	0,88	0,78
231	0,24	0,85	0,75
232	0,24	0,81	0,73
233	0,23	0,78	0,70
234	0,22	0,75	0,67
235	0,22	0,72	0,64
236	0,21	0,69	0,62
237	0,21	0,66	0,59
238	0,20	0,63	0,56
239	0,19	0,60	0,53
240	0,19	0,57	0,51
241	0,18	0,53	0,48
242	0,18	0,50	0,45
243	0,17	0,47	0,43
244	0,16	0,44	0,40
245	0,16	0,41	0,37
246	0,15	0,38	0,34
247	0,15	0,35	0,32
248	0,14	0,32	0,29
249	0,14	0,29	0,26
250	0,13	0,26	0,24
251	0,12	0,22	0,21
252	0,12	0,19	0,18
253	0,11	0,16	0,15
254	0,11	0,13	0,13
255	0,10	0,10	0,10

Annexe 3 : Protocole d'extraction, d'hydrolyse et de dérivation des échantillons de lait et de blé

Extraction :

Extraction du lactose :

Une première étape d'écémage est nécessaire avant d'extraire le lactose du lait afin d'éliminer une majorité des graisses. Le lait est porté à ébullition dans un bécher pendant 5-10 minutes à 110-120 °C puis on laisse reposer pendant 3 heures au réfrigérateur, ce qui permet la formation d'une crème qui est facilement retirée.

Une fois cette étape réalisée, il faut séparer les protéines (caséine) et le lactose. Pour cela, le lait est chauffé au bain-marie à précisément 50 °C, un dépassement de la température peut provoquer une hydrolyse du lactose en contact avec de l'acide lactique (souvent présent dans un lait cru suite aux différentes manipulations et rupture de la chaîne du froid) et d'eau. Ensuite, de l'acide acétique à 10%, est ajouté goutte à goutte permettant de précipiter la caséine à un pH de 4,6 correspondant à son point isoélectrique. Une filtration sur un fritté de porosité 4 (pores de 10-16 µm) recouvert par de la célite (environ 1 g) permet d'éliminer le précipité. Le filtrat obtenu, est alors neutralisé avec du carbonate de calcium CaCO₃ en excès.

Enfin, le filtrat est porté à ébullition avec une agitation afin de précipiter le reste des protéines (famille des séroprotéines) et de neutraliser les traces d'acide. Le mélange est filtré à chaud sur papier filtre jusqu'à ce qu'il soit limpide.

Extraction de l'amidon :

Afin d'extraire l'amidon de l'albumen, le blé est broyé au mixeur. La poudre est ensuite tamisée et 10 g sont prélevés pour la suite du protocole. Ces 10 g sont transposés dans un ballon de 100 mL avec 50 mL de NaCl à 5 g/L. Le mélange est mis sous agitation magnétique pendant 1 h 15. Il est ensuite transvasé dans un falcon de 50 mL et passé à la centrifugeuse pendant 40 minutes à 5000 tour/min. L'amidon est contenu dans le surnageant, les protéines sont sous forme d'un précipité.

Hydrolyse :

Le même protocole est utilisé pour l'amidon et le lactose. La phase aqueuse ou le surnageant (environ 50 mL) est recueilli dans un ballon de 100 mL et 10 mL d'une solution d'acide chlorhydrique (HCl) à 2M sont ajoutés. Le mélange est chauffé à reflux et mis sous agitation pendant 2 heures. Ensuite, 10 mL de soude (NaOH) à 1M sont ajoutés afin de neutraliser la réaction jusqu'à obtention d'un pH d'environ 6-7, avec un contrôle par papier pH. Le mélange est transvasé dans un ballon de 500 mL puis évaporé à l'évaporateur rotatif jusqu'à environ 2 mL. Le sirop résultant (contenant essentiellement du glucose) est difficile à manipuler. L'ajout de célite permet de bien recueillir l'ensemble du sirop et d'éviter des pertes sur les parois du

ballon et de la spatule. C'est une alternative à un passage au lyophilisateur qui serait assez chronophage. La poudre résultante est par la suite recueillie dans un petit cristalliseur puis mise à l'étuve à 80 °C pendant 1 h 30. Enfin, elle est mise sous vide au dessiccateur pendant la nuit.

Dérivation :

Lors de l'étape de dérivation, 50 mL d'acétone anhydre sont ajoutés dans un ballon avec la poudre obtenue à la fin de l'hydrolyse contenant le produit avec de la célite. Le mélange est chauffé jusqu'à 50 °C et mis sous agitation magnétique, puis, 150 µL d'une solution d'H₂SO₄ sont ajoutés. Le mélange est chauffé jusqu'à 85 °C et mis sous agitation magnétique pour assurer un reflux constant pendant 4 heures. Cette réaction conduit à la formation du DAGF pour le glucose seul (blé) et au mélange DAGF et DAGaP pour le mélange glucose-galactose (lait). Une fois la réaction terminée, il faut filtrer la célite par filtration Büchner sur fritté de porosité 4. Le filtrat est récupéré dans un ballon de 100 mL et neutralisé avec 15 mL d'une solution d'hydrogencarbonate de sodium (NaHCO₃) saturée. La solution est concentrée à l'évaporateur rotatif jusqu'à ce que le mélange ne dégage plus de CO₂. Ce dernier est libéré par la réaction de la solution de NaHCO₃ saturée avec le H₂SO₄. Ensuite, une extraction liquide-liquide 3 fois 20 mL avec du dichlorométhane permet d'extraire les dérivés. Les phases organiques sont alors récupérées et regroupées afin d'être évaporées à sec à l'évaporateur rotatif. Pour finir, le produit est mis à l'étuve pour une nuit avant purification.

Purification :

Initialement, une recristallisation devait suffire pour purifier les échantillons de DAGF, mais cela s'est avéré insuffisant et conduisait à des pertes de produit. L'alternative est donc d'utiliser une colonne chromatographique. Regardant le choix de la colonne, les premiers essais montraient comme possibilité de faire une chromatographie sur silice. Cependant, avec le temps une formation de 1,2-O-Isopropylidène- α -D-glucofuranose (ou MAGF) de plus en plus importante a été remarquée avec les changements de lot de silice. La silice peut avoir un caractère acide entraînant l'hydrolyse du DAGF. Une silice neutre mais compactée a été testée avec une élution assurée par une pompe. Lors de l'optimisation de la méthode de purification, il a donc été conclu que l'utilisation des colonnes de silice compactées à 24 g de la marque BUCHI purifiait mieux les échantillons que par filtration sur charbon actif et recristallisation. La composition de l'éluant utilisée a été retravaillée et est finalement constituée des solvants MTBE et cyclohexane avec un ratio de 3:2. Le suivi est fait par chromatographie sur couches minces (CCM) avec le même éluant et la révélation est faite par une solution d'acide sulfurique (H₂SO₄) et d'éthanol (EtOH) 1:9 et par révélation thermique. Une fois les fractions d'intérêt rassemblées, 50 µL de triéthylamine est ajouté afin de finir de neutraliser le mélange. Au cours de l'évaporation, l'équivalent de 30 mL de toluène est additionné en deux fois afin d'évaporer la triéthylamine et les solvants de purification. L'échantillon est enfin séché sous N₂ et conservé au réfrigérateur jusqu'à la préparation du tube RMN.

Annexe 4 : Extraction des sucres de l'ananas

Extraction du jus

L'ananas est coupé en morceau afin de le mixer ensuite avec un blender. Une purée est obtenue contenant la pulpe et le jus. Pour extraire le jus, le mélange est centrifugé dans des Flacons de 50 mL à 4500 tour/min pendant 3 min. Le jus est alors situé au milieu entre des couches de pulpe. A l'aide d'une pipette pasteur le jus est extrait et congelé.

Extraction des sucres

Dans un ballon, 40 mL de jus sont mélangés avec 5 g de carbonate de calcium afin de basifier le jus pour obtenir un pH environnant 7. Pour précipiter les acides citriques et maliques, le mélange est mis à chauffer à 50 °C pendant 30 minutes. Une filtration sur fritté permet de séparer le précipité qui est ensuite rincé à l'éthanol. Le surnageant est évaporé à l'évaporateur rotatif afin de supprimer le maximum d'eau puis il est congelé pour être enfin lyophilisé. Le glucose, fructose et saccharose sont obtenus dans les proportions moyennes de 1/3 pour chaque sucre.

Une fois les sucres isolés, la dérivation est directement réalisée sur ce mélange. Le saccharose est hydrolysé en glucose et fructose pendant cette étape. La dérivation donne lieu à deux dérivés provenant du glucose et du fructose qui sont ensuite séparés par chromatographie préparative sur gel de silice.

Annexe 5 : Paramètres d'acquisition de la séquence *Inverse Gated* sur les DAGF

Spectromètre	700 MHz
Température	303 K
TD	22202
NS	40
DS	0
SW	70,0 ppm
O1P	85,8 ppm
O2P	5,0 ppm
AQ	0,9 s
D1	10 s
SI	256k
LB	1,6 Hz

Annexe 6 : Préparation des échantillons et spectres RMN de l'éthanol et l'acide acétique bi-marqué

Ethanol bi-marqué :

Préparation d'échantillon

Une préparation unique a été développée pour être analysée sur toutes les configurations de spectromètres. Un volume de 84 μL d'éthanol bi-marqué est prélevé afin d'être dilué dans 550 μL de DMSO- d_6 . Afin que cette préparation soit analysable sur des sondes avec un *lock* ^{19}F , 40 μL de C_6F_6 sont ajoutés. Enfin 2 gouttes d'une solution de H_2SO_4 à 1 M sont additionnées afin de produire un échange rapide de la fonction hydroxyle de l'éthanol et éliminer les couplages.

Paramètres d'acquisition et attribution du spectre :

Tableau 15 : Paramètres d'acquisition de la séquence Inverse Gated de l'éthanol bi-marqué sur les spectromètres 400 MHz et 700 MHz.

Spectromètre	400 MHz	700 MHz
Température	303 K	303 K
TD	16022	28194
NS	4	4
DS	4	4
SW	80,0 ppm	80,0 ppm
O1P	35,0 ppm	39,0 ppm
O2P	2,2 ppm	2,2 ppm
AQ	1 s	1 s
D1	120 s	120 s
SI	64k	64k
LB	2 Hz	2 Hz

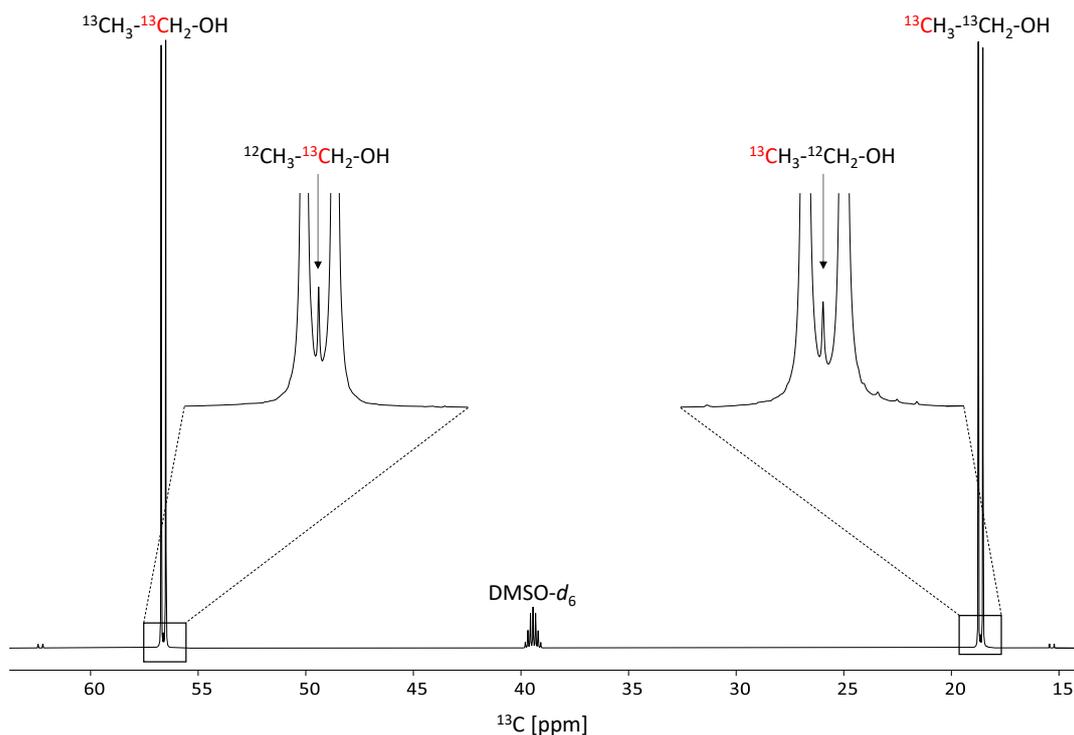


Figure 133 : Spectre RMN $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ de l'éthanol bi-marqué. Le spectre a été enregistré à 700,28 MHz et à 303 K.

Acide acétique bi-marqué :

Préparation d'échantillon

Dans un pilulier, 90 μL d'acide acétique bi-marqué sont ajoutés et dilués avec 260 μL d'eau ultra pure et 240 μL de DMSO- d_6 . Afin que cette préparation soit analysable sur des sondes avec un *lock* ^{19}F , 60 μL de TFA sont ajoutés.

Paramètres d'acquisition et attribution du spectre :

Tableau 16 : Paramètres d'acquisition de la séquence Inverse Gated de l'acide acétique bi-marqué sur les spectromètres 400 MHz et 700 MHz.

Spectromètre	400 MHz	700 MHz
Température	303 K	303 K
TD	44184	85222
NS	4	8
DS	4	4
SW	219,9 ppm	242,0 ppm
O1P	99,6 ppm	100,0 ppm
O2P	1,9 ppm	1,9 ppm
AQ	1 s	1 s
D1	160 s	170 s

SI	128k	256k
LB	2 Hz	2 Hz

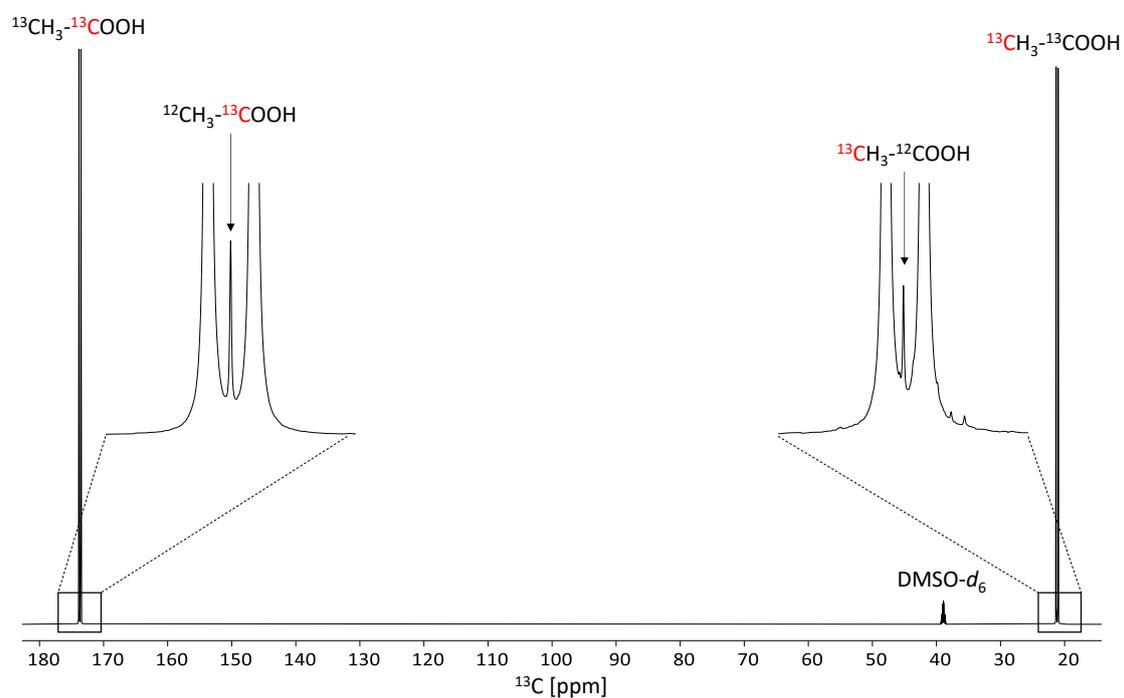


Figure 134 : Spectre RMN $^{13}\text{C}\text{-}\{^1\text{H}\}$ de l'acide acétique bi-marqué. Le spectre a été enregistré à 700,28 MHz et à 303 K.

Annexe 7 : Préparation des échantillons et spectres RMN du benzaldéhyde, acétate de vinyle et DAGF

Benzaldéhyde

Préparation d'échantillon :

Le benzaldéhyde a été analysé suivant les préparations données dans le Tableau 17.

Tableau 17 : Préparation du benzaldéhyde pour les spectromètres 400 MHz, 500 MHz et 700 MHz.

Spectromètre	400 MHz	500 MHz	700 MHz
Volume du composé	500 µL	500 µL	500 µL
Solvant de lock	Trifluoroacétate d'éthyle (¹⁹ F)	Trifluoroacétate d'éthyle (¹⁹ F)	DMSO- <i>d</i> ₆
Volume solvant de lock	40 µL	40 µL	100 µL
Solution du relaxant Cr(acac) ₃	100 µL d'une solution de 0,1 M de Cr(acac) ₃ dans DMSO- <i>d</i> ₆	100 µL d'une solution de 0,1 M de Cr(acac) ₃ dans DMSO- <i>d</i> ₆	0,1 M dans le solvant de lock
$T_1^{max\ 13C}$	1,73 s	2,3 s	1,3 s

Paramètres d'acquisition et attribution du spectre :

Les paramètres d'acquisition de l'*Inverse Gated* sont donnés dans le Tableau 18. Le nombre de scans a été ajusté pour obtenir un S/B de 700.

Tableau 18 : Paramètres d'acquisition de la séquence Inverse Gated du benzaldéhyde sur les spectromètres 400 MHz, 500 MHz et 700 MHz.

Spectromètre	400 MHz	500 MHz	700 MHz
Température	303 K	303 K	303 K
TD	40212	37592	59520
NS	40	24	8
DS	0	0	0
SW	200,0 ppm	149,4 ppm	169,0 ppm
O1P	140,7 ppm	138,5 ppm	137,1 ppm 192,9 ppm
O2P	8,8 ppm	10,1 ppm	8,8 ppm
AQ	1 s	1 s	1 s

D1	22 s	30 s	15 s
SI	128k	128k	256k
LB	1,6 Hz	1,6 Hz	1,6 Hz

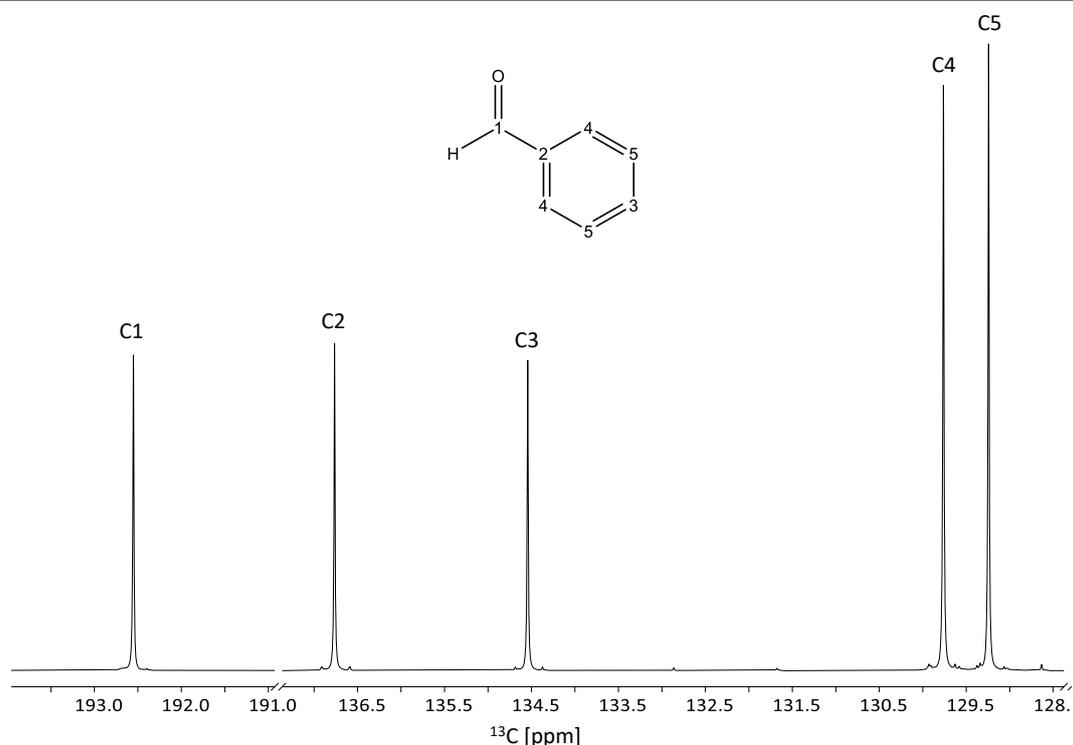


Figure 135 : Attribution ^{13}C du benzaldéhyde. Le spectre RMN ^{13}C découplé protons a été réalisé sur le 700 MHz à 303 K. Une impureté est présente en faible concentration, elle correspond à l'acide benzoïque.

Acétate de vinyle

Préparation d'échantillon :

L'acétate de vinyle a été analysé suivant les préparations données dans le Tableau 19.

Tableau 19 : Préparation de l'acétate de vinyle pour les spectromètres 400 MHz, 500 MHz et 700 MHz.

Spectromètre	400 MHz	500 MHz	700 MHz
Volume du composé	500 μL	500 μL	500 μL
Solvant de lock	C_6F_6	C_6F_6	Acétone- d_6
Volume solvant de lock	40 μL	40 μL	120 μL
Solution du relaxant $\text{Cr}(\text{acac})_3$	100 μL d'une solution de 0,1 M de $\text{Cr}(\text{acac})_3$ dans acétone- d_6	100 μL d'une solution de 0,1 M de $\text{Cr}(\text{acac})_3$ dans acétone- d_6	0,1 M dans le solvant de lock
$T_1^{\text{max } ^{13}\text{C}}$	3,4 s	3,9 s	3,1 s

Paramètres d'acquisition et attribution du spectre :

Les paramètres d'acquisition de l'*Inverse Gated* sont donnés dans le Tableau 20. Le nombre de scans a été ajusté pour obtenir un S/B de 700.

Tableau 20 : Paramètres d'acquisition de la séquence *Inverse Gated* de l'acétate de vinyle sur les spectromètres 400 MHz, 500 MHz et 700 MHz.

Spectromètre	400 MHz	500 MHz	700 MHz
Température	298 K	298 K	298 K
TD	64618	81516	113630
NS	48	16	8
DS	4	4	4
SW	321,9 ppm	324,1 ppm	322,6 ppm
O1P	168,0 ppm	168,9 ppm	167,6 ppm
	142,0 ppm	142,9 ppm	141,7 ppm
	97,2 ppm	98,0 ppm	93,5 ppm
	20,4 ppm	21,3 ppm	20,1 ppm
O2P	3,8 ppm	6,0 ppm	4,7 ppm
AQ	1 s	1 s	1 s
D1	36 s	45 s	35 s
SI	256k	256k	256k
LB	1,5 Hz	1,5 Hz	1,5 Hz

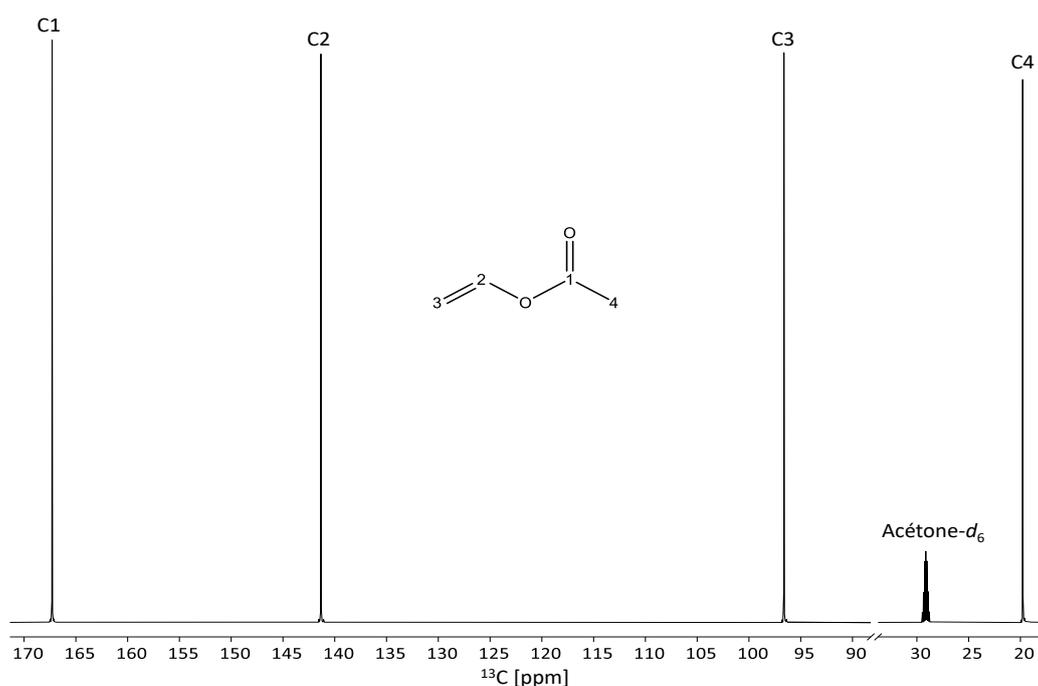


Figure 136 : Attribution ^{13}C de l'acétate de vinyle. Le spectre RMN ^{13}C découplé protons a été réalisé sur le 700 MHz à 298 K.

DAGF

Préparation d'échantillon :

Le DAGF a été analysé suivant les préparations données dans le Tableau 21.

Tableau 21 : Préparation du DAGF pour les spectromètres 400 MHz, 500 MHz et 700 MHz.

Spectromètre	400 MHz	500 MHz	700 MHz
Masse du composé	230 mg	230 mg	200 mg
Solvant de lock	C ₆ F ₆	C ₆ F ₆	DMSO- <i>d</i> ₆
Volume solvant de lock	40 µL	40 µL	550 µL
Solvant de solubilisation	500 µL DMSO- <i>d</i> ₆	500 µL DMSO- <i>d</i> ₆	Solvant de lock
$T_1^{max\ 13C}$	0,8 s	0,7 s	0,7 s

Paramètres d'acquisition et attribution du spectre :

Les paramètres d'acquisition de l'*Inverse Gated* sont donnés dans le Tableau 22. Le nombre de scans a été ajusté pour obtenir un S/B de 700.

Tableau 22 : Paramètres d'acquisition de la séquence Inverse Gated du DAGF sur les spectromètres 400 MHz, 500 MHz et 700 MHz.

Spectromètre	400 MHz	500 MHz	700 MHz
Température	303 K	303 K	303 K
TD	11146	14082	22202
NS	1424	968	40
DS	0	0	0
SW	69,6 ppm	70,0 ppm	70,0 ppm
O1P	85,3 ppm	85,9 ppm	85,8 ppm
O2P	4,0 ppm	4,8 ppm	5,0 ppm
AQ	0,8 s	0,8 s	0,9 s
D1	9 s	9 s	10 s
SI	128k	128k	256k
LB	1,6 Hz	1,6 Hz	1,6 Hz

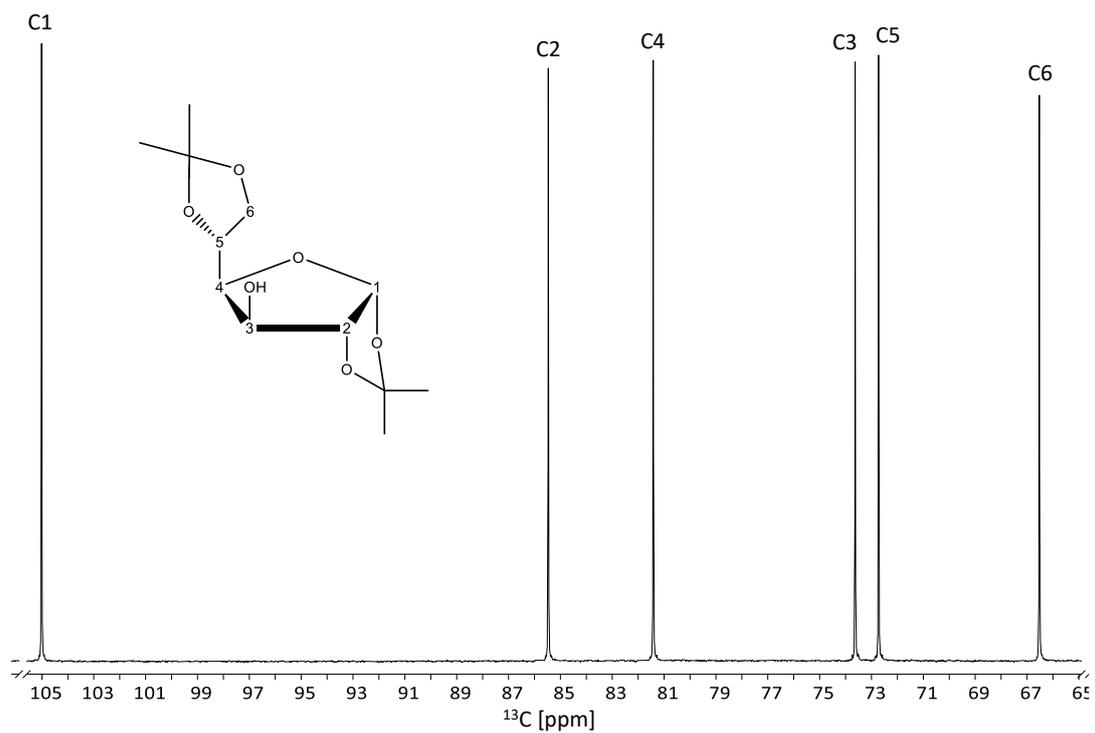


Figure 137 : Attribution ^{13}C du DAGF. Le spectre RMN ^{13}C découplé protons a été réalisé sur le 700 MHz à 303 K.

Annexe 8 : Programme d'impulsions de la séquence Echograd-¹³C sur TopSpin

```
#include <Avance.incl>
```

```
#include <Grad.incl>
```

```
1 ze
```

```
200u UNBLKGRAD
```

```
2 30m groff do:f2
```

```
1m BLKGRAD
```

```
d1
```

```
200u UNBLKGRAD
```

```
20u p10:f1
```

```
10u p12:f2
```

```
2u cpd2:f2
```

```
300u gron0
```

```
p11:sp1:f1 ph10
```

```
d20
```

```
4m groff
```

```
300u gron0
```

```
p11:sp2:f1 ph10
```

```
d21
```

```
4m groff
```

```
300u gron0
```

```
p11:sp3:f1 ph10
```

```
d22
```

```
4m groff
```

```
300u gron0
```

```
p11:sp4:f1 ph10
```

```
d23
```

```
4m groff
```

```
1m p11:f1
```

```
p1 ph1
```

```
d2 gron1
```

```
200u groff
```

```
d3
```

```
(p2 ph2):f1
```

```
d4
```

```
d5 gron2
go=2 ph31
1m groff
100u BLKGRAD
30m do:f2 mc #0 to 2 F0(zd)
d10
exit
```

```
ph1=0
ph2=0
ph10=0
ph31=0
```

```
;p11: f1 channel - power level for pulse (default)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;sp1: shaped pulse power level for selective excitation
;spnam1: shaped pulse for selective excitation
;d1 : relaxation delay
;d2 : duration of refocusing gradient
;d2+d3+200u=TE
;d4 : delay adjusted for observation of echo
;d5 : acquisition gradient delay before opening receiver
;d20: spoiler gradient
;d21: spoiler gradient
;d22: spoiler gradient
;d23: spoiler gradient
;de=10u
;NS: 1
```

Annexe 9 : Script R utilisé avec Rnmrfit sur la vanilline

```

library(rnmrfit)
library(dplyr)
library(purrr)
library(tidyr)

setwd("~/_UNC/Résultats RMN/Résultat R")
f_area <- function(filename, lower, upper, peaks) {
  nmrdata <- nmrdata_1d(filename)
  nmrdata <- filter_1d(nmrdata, lower, upper)

# First fit using the standard 'lorenz' type
  scaffold <- nmrscaffold_1d(peaks, nmrdata, peak.type = 'lorenz', include.phase = TRUE,
                             baseline.degree = 3, n.knots = 3, include.difference = TRUE)
  fit <- nmrfit_1d(scaffold)

# Output peak definitions, then attach area
  areas <- peaks(fit)
  areas$area <- calc_area(fit)$area
  areas
}

paths<-file.path('C:/', 100:108)
paths <- data_frame(filename = paths)
print(paths)

regions <- data_frame(lower = c(54.6, 109.2, 114.2, 125.4, 128.8, 147, 151.7, 189.7),
                      upper = c(56.6, 111.2, 116.2, 127.4, 130.8, 149, 153.7, 191.7),
                      peaks = list(list('C8'='55.6 s'),
                                   list('C7'='110.2 s'),
                                   list('C6'='115.2 s'),
                                   list('C5'='126.4 s'),
                                   list('C4'='129.8 s'),
                                   list('C3'='148 s'),
                                   list('C2'='152.7 s'),
                                   list('C1'='190.7 s')))

```

```
areas <- crossing(paths, regions)
print(areas)
```

```
areas <- areas %>%
  mutate(area = pmap(list(filename, lower, upper, peaks), f_area)) %>%
  select(-peaks) %>%
  unnest(area)
write.csv(areas, file = 'vanilin.csv')
```

Annexe 10 : Programme d'impulsion de la séquence CWET sur TopSpin

```
#include <Avance.incl>
```

```
#include <Grad.incl>
```

```
1 ze
```

```
  200u
```

```
2 30m do:f2
```

```
    20u BLKGRAD
```

```
  d1
```

```
  50u p10:f1 UNBLKGRAD
```

```
  10u p12:f2
```

```
(center(p11:sp1 ph10):f1 (p17:gp17))
```

```
  4m
```

```
(center(p11:sp2 ph10):f1 (p18:gp17))
```

```
  4m
```

```
(center(p11:sp3 ph10):f1 (p19:gp17))
```

```
  4m
```

```
(center(p11:sp4 ph10):f1 (p20:gp17))
```

```
  d2 p11:f1
```

```
  p1 ph1
```

```
  go=2 ph31 cpd2:f2
```

```
    20u BLKGRAD
```

```
  30m do:f2 mc #0 to 2 F0(zd)
```

```
  d10
```

```
exit
```

```
ph1=0 2 2 0 1 3 3 1
```

```
ph10=0
```

```
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1
```

```
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
```

```
;p12: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
```

```
;p1 : f1 channel - high power pulse
```

```
;d1 : relaxation delay; 10* T1
```

```
;d2: duration between saturation and inverse gated segment
```

```
;d10: relaxation delay between each spectra
;ns: 8 * n, total number of scans: NS * TD0
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence
;spnam1: Coca-5-50-m40
;spnam2: Coca-5-50-m40
;spnam3: Coca-5-50-m40
;spnam4: Coca-5-50-m40
;P11: 5000 [µsec]
;for z-only gradients:
;gpz17: 80%
;gradient duration :
;P17: 6300 [µsec]
;P18: 6000 [µsec]
;P19: 5500 [µsec]
;P20: 5250 [µsec]
;use gradient files:
;gpnam17: SMSQ10.100
```


Liste des figures

Figure 1 : Orientation des moments magnétiques en présence d'un champ magnétique externe. a) les moments magnétiques s'orientent selon le champ externe ; b) la somme des moments magnétiques représente l'aimantation \vec{M}	19
Figure 2 : Evolution de l'aimantation \vec{M} pendant une impulsion radiofréquence B_1	20
Figure 3 : Relation entre les valeurs de T_1 et T_2 et la dynamique moléculaire représentée par le temps de corrélation τ_c . ^[16]	21
Figure 4 : Transformation de Fourier de plusieurs FID (domaine temporel) en spectre (domaine fréquentiel). ^[17]	22
Figure 5 : Spectre ^1H de la cyclosporine. La fenêtre spectrale (SW) couvre les fréquences correctement observées. Le centre de la gamme spectrale est appelé offset et correspond à la fréquence d'excitation.....	23
Figure 6 : Représentations graphiques de la justesse, de la précision et de l'exactitude ; a) ni précis ni juste : mauvaise exactitude ; b) juste mais pas précis ; c) précis mais pas juste ; d) précis et juste : bonne exactitude. ...	25
Figure 7 : Evolution de l'aimantation longitudinale M_z en fonction de la valeur de TR après une impulsion RF d'un angle $\pi/2$ a) TR est grand devant T_1 : retour de l'aimantation à la valeur de M_0 ; b) TR est du même ordre de grandeur que T_1 : l'aimantation retourne à une valeur d'équilibre $M_{eq} < M_0$. ^[16]	27
Figure 8 : Représentation de l'effet d'off-résonance ; pendant une impulsion RF l'aimantation \vec{M} précesse autour du champ \vec{B}_{eff} qui est différent du champ \vec{B}_1 . ^[16]	28
Figure 9 : Spectres RMN ^{13}C découplé des protons (■) et non découplé (■) de l'ibuprofène entre 17 et 31 ppm.	29
Figure 10 : Séquence Inverse Gated utilisée pour l'analyse quantitative ^{13}C . L'aimantation est basculée dans le plan transversal afin d'être détectée. Le découplage ^1H a lieu pendant l'acquisition pour éliminer les couplages $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ de façon à simplifier le spectre et d'augmenter le S/B.	30
Figure 11 : Gamme d'efficacité des découplages dans laquelle le signal est supérieur ou égal à 80% du signal on-résonance. ^[26] La hauteur h correspond à l'intensité maximal du signal on-résonance.....	30
Figure 12 : Impact du découplage sur la forme des raies : a) découplage parfait ; b) découplage partiel, même avec un petit couplage résiduel, provoquant un dédoublement de la raie dont l'enveloppe ne correspond plus à une forme lorentzienne ; c) l'ajustement de cette enveloppe avec une forme lorentzienne conduit à une surface erronée. ^[16]	31
Figure 13 : Schéma simplifié de sonde dans laquelle le tube contenant l'échantillon est placé dans une configuration : a) directe et b) indirecte. La hauteur H est la hauteur de la bobine ^{13}C (■), et la hauteur H' la hauteur de la bobine ^1H (■), H_u représente la hauteur utile correctement observée.	32
Figure 14 : Représentation de l'impact des imperfections des impulsions. (a) 90° parfait ; (b) erreur sur la valeur de β dû à l'inhomogénéité de B_1 ou à un calibrage imparfait ; (c) effet d'off-résonance. ^[17]	33
Figure 15 : Impulsions composites : a) $(90^\circ)_x - (180^\circ)_y - (90^\circ)_x$ permettant de compenser les imperfections des calibrages avec des longueurs d'impulsions allant de 80 à 90% de la valeur nominale ; b) $(90^\circ)_x - (240^\circ)_y - (90^\circ)_x$ permettant de compenser les imperfections provenant de l'off-résonance pour différents offsets. ^[26]	34

- Figure 16** : a) Profils de modulation en amplitude pour une impulsion WURST-60 (rouge-pointillé), WURST 40 (rouge) et CHRIP-20% (bleu) pour une durée D. b) Modulation en fréquence (noir) et en phase (rouge) pour les impulsions CHIRP et WURST. 0 représente la position de la porteuse au centre de l'impulsion. 36
- Figure 17** : Représentation de la variation de l'aimantation \vec{M} pendant une impulsion adiabatique d'inversion ; a) au début, $\omega(t) \ll \Omega$; \vec{M} est suivant z ; c) \vec{M} est dans le plan transversal lorsque $\Delta\Omega t = \Omega$; d) le balayage en fréquence continue ; e) \vec{M} est aligné suivant l'axe -z. 37
- Figure 18** : Intensité d'un signal résultant d'une impulsion adiabatique lorsque la largeur de l'impulsion est augmentée. L'intensité est toujours la même à partir d'un seuil de durée. Cette figure montre l'immunité de ces impulsions contre les problèmes de calibrages. ^[46] 37
- Figure 19** : Variation de la surface sous les pics des atomes du ^{13}C de l'éthanol bimarqué mesurée avec : \square l'INEPT normal et \blacksquare INEPT avec des impulsions adiabatiques et composites, en variant l'offset : a) ^{13}C de 0 à 3000 Hz par pas de 250 Hz ; b) ^1H de 0 à 675 Hz par pas de 75 Hz. ^[50] 38
- Figure 20** : a) Représentation de l'installation de la méthode ERETIC ; b) séquence ERETIC. ^[17] 41
- Figure 21** : Représentation schématique d'une séquence d'impulsion a) INEPT, composée d'un transfert de polarisation entre les protons et les carbones b) INEPT refocalisée et découplée. Pour un transfert optimal, le délai τ est égal à $1/4J$ 42
- Figure 22** : Signal ^{13}C du groupement méthyle de l'acide méthanoïque obtenu à partir de l'INEPT, l'INEPT refocalisée et l'INEPT refocalisée avec découplage ^1H . ^[17] 43
- Figure 23** : Evolution des intensités observées après une séquence INEPT refocalisée pour les CH (\blacksquare), CH_2 (\blacksquare) ou CH_3 (\blacksquare) en fonction du délai de refocalisation Δ 43
- Figure 24** : Représentation schématique d'une séquence d'impulsion DEPT. L'effet de cette séquence est sensiblement le même que l'INEPT. L'angle β peut prendre différentes valeurs permettant de jouer sur l'intensité des groupements CH, CH_2 et CH_3 44
- Figure 25** : Evolution des intensités observées après une séquence DEPT pour les CH (\blacksquare), CH_2 (\blacksquare) ou CH_3 (\blacksquare) en fonction de l'angle β 44
- Figure 26** : Représentation schématique d'une séquence d'impulsions HSQC. Cette séquence est composée d'un segment INEPT et d'un segment rétro-INEPT permettant un double transfert de polarisation : ^1H vers ^{13}C , puis ^{13}C vers ^1H , canal sur lequel se fait l'acquisition du signal. 45
- Figure 27** : Représentation schématique d'un spectre 2D hétéronucléaire ^1H - ^{13}C avec du repliement spectral... 46
- Figure 28** : Correction de phase sur un spectre RMN ^{13}C . a) Spectre RMN corrigé ; b) spectre en présence d'un déphasage d'ordre 0 ; c) spectre en présence d'un déphasage d'ordre 1. 47
- Figure 29** : Amélioration du spectre à l'aide du zero-filling. L'addition de point à la fin du FID permet d'améliorer la résolution digitale du spectre. Ici, l'exemple est donné avec un doublet provenant du spectre ^1H du di-acétone-D-glucose sur un FID de 49 019 points. Le spectre est présenté avec un nombre de points de : a) 16k ; b) 32k et c) 64k. 48
- Figure 30** : Application de différentes fonctions d'apodisation sur un FID. Le spectre de droite correspond au spectre après transformation de Fourier du signal présent au centre obtenue lui-même par la multiplication du FID par la fonction d'apodisation présentée à gauche : a) aucune apodisation ; b) fonction de Hanning ; c) fonction exponentielle décroissante ; d) fonction sinus ; e) transformation Lorentz-Gauss. ^[16] 49

- Figure 31** : Répartition des points acquis en noir et des points ajoutés en rouge pour : a) un FID standard ; b) zero-filling ; c) 50% de points calculés par NUS ; d) 50% de points prédits par LP..... 50
- Figure 32** : Résultat de l'ajustement à l'aide de Rnmrfit, en gris est représenté le spectre expérimental et en noir le spectre théorique : a) fit total : correspondance entre le spectre théorique et expérimental ; b) représentation de la contribution de chaque raie permettant d'obtenir le fit total. ^[85] 51
- Figure 33** : Isotopomères et isotopologues de l'éthanol pour le carbone, le carbone-13 est représenté en gris..... 52
- Figure 34** : Distribution de la composition isotopique globale $\delta^{13}\text{C}$ dans des produits naturels due au fractionnement isotopique..... 54
- Figure 35** : Différence sur l'éthanol entre une composition isotopique : a) globale : composition isotopique moyenne entre les deux carbones ; b) position-spécifique : composition isotopique pour chaque carbone..... 56
- Figure 36** : a) Section du spectre RMN ^1H de la thymidine. Le pic triplet central (hors échelle) provient de ^1H avec une liaison avec un ^{12}C , et les deux pics triplets satellites proviennent de ^1H avec une liaison avec un ^{13}C ; b) Superposition entre le pic principal et la somme des pics satellites. Le meilleur ajustement a été obtenu en utilisant un rapport $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ de 91,26. Le résidu (vert) est décalé de la ligne de base pour plus de clarté. ^[124] 59
- Figure 37** : Evolution dans le temps des différentes techniques d'analyse en fonction du type de résultats : composition isotopique globale, composé-spécifique ou position-spécifique..... 59
- Figure 38** : Tracé tridimensionnel des scores obtenus par ACP sur les données combinées des compositions isotopiques ^2H et ^{13}C de la vanilline. La Composante Principale 1 (PC1) explique 60,9%, la Composante Principale 2 (PC2) 25,9%, et la Composante Principale 3 (PC3) 6,1% de la variabilité totale des principales sources actuelles de vanilline. ^[7] 61
- Figure 39** : Signaux RMN ^{13}C découplés des protons d'une molécule à 3 carbones. Les cercles remplis indiquent les positions occupées par un ^{13}C et les cercles ouverts les positions occupées par un ^{12}C . Le spectre observé consiste en l'addition de toutes ces contributions. Les intensités des pics des spectres d, e, f, g ont été amplifiées par rapport aux spectres a, b, c pour une meilleure lisibilité. ^[126] 62
- Figure 40** : Impact des couplages résiduels (J_{res}), provoqué par un découplage ^1H inhomogène, sur la justesse des mesures isotopiques ^{13}C . Δ représente les intensités relatives de l'éthanol bi-marqué. ^[38] 64
- Figure 41** : Spectre ^{13}C RMN découplé des protons avec la séquence Inverse Gated (single-pulse) sur l'éthanol bi-marqué ^{13}C à 99%. L'isotopologue $^{12}\text{C}_1\text{-}^{12}\text{C}_2$ n'est pas visible car le spin ^{12}C est nul. 64
- Figure 42** : Représentation des paramètres L et L' montrant l'uniformité et l'efficacité du découplage ^1H , respectivement. 65
- Figure 43** : Variation des intensités relatives Δ en fonction de différentes valeurs d'offset de découplage. Mesures réalisées sur deux molécules bi-marquées : éthanol (--■--) et l'acide acétique (--●--). a) Découplage réalisé avec la séquence WALTZ-16 ; b) découplage adiabatique avec l'utilisation d'une impulsion cos/OIA. ^[47] 66
- Figure 44** : Représentation schématique des séquences a) INEPT adiabatique ; b) DEPT adiabatique. Les 180° d'inversion et de refocalisation ont été remplacés par des impulsions adiabatiques et adiabatiques composites, respectivement. Ces deux séquences réalisent un transfert de polarisation entre le ^1H et le ^{13}C 67
- Figure 45** : Représentation schématique d'une séquence d'impulsion HSQC symétrique. Une première partie composée d'une séquence INEPT suivie d'une rétro-INEPT. La symétrie parfaite des impulsions permet une meilleure robustesse vis-à-vis des imperfections RF et une meilleure suppression des signaux des ^1H liés aux ^{12}C 68

- Figure 46** : Représentation schématique d'une séquence d'impulsion DWET. Deux impulsions sélectives contenant une modulation en phase avec application d'un gradient d'encodage g_e et un gradient de purge g_i 68
- Figure 47** : a) Profil selon z en rouge sans l'utilisation de la séquence DWET et en bleu avec la séquence DWET. b) Représentation schématique de L, hauteur de l'échantillon à l'intérieur de la bobine, et e, épaisseur de la tranche détectée après saturation par les impulsions RF sélectives. ^[138] 69
- Figure 48** : Région méthyle des spectres RMN-¹H obtenus sur une solution d'éthanol dans D₂O (50/50) à 400 MHz avec : (a) excitation simple avec un angle de bascule de 9°, avec radiation damping, (b) séquence d'impulsions DWET, sans radiation damping. ^[138] 69
- Figure 49** : Relation entre les compositions isotopiques spécifiques du CH₂ de l'éthanol en ‰ obtenues par la méthode INEPT et par Inverse Gated. L'équation de la droite de régression et le coefficient de corrélation sont les suivants : $y = 51,986 - 1,072x$ en ‰ ; $R^2 = 0,9975$. ^[143] 71
- Figure 50** : Différence des $\delta^{13}\text{C}$ du signal le plus déblindé en déplacement chimique selon l'axe y en fonction de l'écart de déplacement chimique exprimé en ppm selon l'axe x, pour deux spectromètres de même champ magnétique mais équipés de sondes et de consoles différentes. 72
- Figure 51** : Isotopologues du n-propanol, l'atome de carbone-13 est représenté en gris. 75
- Figure 52** : Spectre RMN ¹³C-¹H du n-propanol avec les isotopologues enregistré à 700,28 MHz. 76
- Figure 53** : Comparaison entre irm-MS par pyrolyse, irm-¹³C NMR et irm-MS HRMS. 77
- Figure 54** : Objectifs de la thèse pour l'obtention de résultats irm-¹³C juste en absolu. 79
- Figure 55** : Séquence HSQC symétrique adiabatique (asHSQC) avec l'utilisation du NUS (bleu) et du VRT (jaune). Des impulsions 180° adiabatique ont été utilisés pour les inversions, des impulsions adiabatiques et composites pour les refocalisations. Le cycle de phase est le suivant : $\phi_1 = y$; $\phi_2 = y, y, y, y, -y, -y, -y, -y$; $\phi_3 = x, x, -x, -x$; $\phi_4 = x, -x$; $\Psi = x, -x, x, -x, -x, x, -x, x$ 83
- Figure 56** : Evolution du temps variable (τ_v) dans la fonction VRT en fonction de la position dans la liste des valeurs de t_1 85
- Figure 57** : Courbe de nutation correspondant à l'intensité du signal en fonction de l'augmentation de la durée de l'impulsion. L'angle de 90° est donné par le premier maximum, le 180° et le 360° par la première et deuxième annulation, respectivement. ^[46] 85
- Figure 58** : Séquence MISSTEC utilisée pour obtenir un écho de spin (ES) et un écho stimulé (EST). Dans ce travail, le temps d'écho (TE) et le temps de mélange (TM) ont été ajustés à 8 ms et 10 ms, respectivement. L'amplitude du gradient g_1 a été choisie afin d'obtenir une dispersion en fréquence significativement plus importante que les déplacements chimiques. Le gradient g_2 d'une durée de 1 ms et une amplitude ($=g_1$) a été ajouté afin d'éliminer les FID parasites générés par la 2 ou 3^{ème} impulsion. Le gradient g_0 est un spoiler permettant de supprimer l'aimantation transversale résiduelle et d'éviter la formation d'un écho parasite généré par la deuxième et la troisième impulsion. 86
- Figure 59** : Echo de spin (ES) et l'écho stimulé (EST) pour un calibrage ¹H pour un angle $\beta = 80^\circ$. Seulement les deux périodes d'acquisition sont affichées ici (le temps entre les deux échos n'est pas représenté). 87
- Figure 60** : Variation de l'intensité relative de l'écho de spin (■) et de l'écho stimulé (▲) en fonction de la valeur de l'angle β ; mesurée sur un échantillon d'acétate de vinyle (20 μL dans 600 μL d'acétone- d_6). Les lignes pleines correspondent aux fonctions théoriques données par les équations (1) et (2). 88
- Figure 61** : Ajustement typique d'une courbe de nutation utilisant le modèle proposé par Nagashima. ^[39] 89

Figure 62 : Variation de la précision (a) et de la justesse (b) en fonction de la méthode du traitement : le maximum des intensités (■), une zone d'intégrale de 20% (■), une zone d'intégrale de 15% (■), ou l'intégration des signaux sur la partie réelle (■).....	90
Figure 63 : Précision (a) et justesse (b) des PW_{90}^{MIS} pour différents PW_{90}^{Nut} induits par des variations de NaCl (de gauche à droite : 0 ; 0,5 ; 2 ; et 4 mol/L).	91
Figure 64 : Corrélation des résultats entre la nutation (PW_{90}^{Nut}) et la séquence MISSTEC (PW_{90}^{MIS}) pour des valeurs de PW_{90} de 10 à 100 μ s. Les résultats ont été obtenus sur la préparation 90:10 (D ₂ O:H ₂ O). $PW_{90}^{MIS} = 0,99205 \cdot PW_{90}^{Nut} + 0,03913$ avec $R^2 = 0,99996$	92
Figure 65 : Justesse du PW_{90} avec différentes méthodes : MISSTEC, PulsCal et le 360°/4 pour 4 différentes concentrations de NaCl (de gauche à droite : 0 ; 0,5 ; 2 et 4 mol/L). PW_{90}^{Nut} est respectivement 10,31 (■), 11,82 (■) ; 14,01 (■) ; et 15,40 μ s (■). Les barres d'erreur correspondent à la précision calculée sur 5 répétitions successives.	94
Figure 66 : Précision et justesse de la séquence MISSTEC sur le calibrage de l'impulsion ¹³ C avec différents angles β . Ces résultats ont été obtenus sur 600 μ L de cyclohexane dans 120 μ L de solution de Cr(acac) ₃ à 0,1 mol/L dans de l'acétone-d ₆	95
Figure 67 : Précision et justesse de la séquence MISSTEC sur le calibrage de l'impulsion ¹³ C avec différents angles β . Ces résultats ont été obtenus sur 500 μ L de méthanol dans 120 μ L de solution de Cr(acac) ₃ à 0,1 mol/L dans de l'acétone-d ₆	95
Figure 68 : Spectre asHSQC (¹ H- ¹³ C) obtenu à partir de 10 mg de cholestérol et enregistré à 700,28 MHz avec une sonde cryogénique en 31 min, en utilisant le repliement spectral : seulement 12 ppm dans la dimension ¹³ C avec 50% de NUS. La température de l'échantillon a été fixée à 288 K.	98
Figure 69 : Valeurs minimale, moyenne et maximale de CV (%) des f_i , avec VRT en 42 min (■), ou sans VRT en 1 h 32 (■).	99
Figure 70 : Valeur de moyenne des CV (%) pour différents τ_f et durée d'acquisition.	99
Figure 71 : a) Variation des différentes listes τ_v : 1 (■), 2 (■), et 3 (■) ; b) Valeurs minimal, moyenne et maximal de CV (%) des 3 listes de τ_v	100
Figure 72 : Valeurs minimale (■), moyenne (■) et maximale (■) de CV (%) des f_i avec différents traitements de NUS et LP.	100
Figure 73 : a) Valeurs minimale, moyenne et maximale de CV (%) des f_i , avec l'algorithme IST (■) et IRLS (■) ; b) Comparaison du signal du C6 traité par IST (■) et IRLS avec un écho virtuel (■).	101
Figure 74 : Valeurs minimale, moyenne et maximale de CV (%) des f_i , avec un nombre de scan égal à 2 (■), 4 (■) et 8 (■).....	102
Figure 75 : Valeurs minimale, moyenne et maximale de CV (%) des f_i , avec sans (■) et avec (■) le segment pure-shift.	103
Figure 76 : Valeurs minimale, moyenne et maximale de CV (%) des f_i , avec a) des masses décroissantes de cholestérol : 20 (■), 15 (■), 10 (■) et 5 mg (■) ; b) un tube Shigemi (■) et standard (■).	103
Figure 77 : Valeur de CV (%) pour tous les carbones du cholestérol sur 4 échantillons différents.....	104
Figure 78 : Avancée dans les objectifs de la thèse avec l'utilisation de séquences RMN multi-dimensionnelles.	105

Figure 79 : Spectre 2D asHSQC du glucose enregistré à 700,28 MHz avec une sonde cryogénique, sans repliement spectral. Le nombre de scan et la température de travail ont été fixé à 2 et 308 K, respectivement.	107
Figure 80 : Dérivation du glucose et du galactose en DAGF et DAGaP.....	108
Figure 81 : Spectre asHSQC de 50 mg de DAGF (■) et 50 mg de DAGaP (■) enregistré à 700,28 MHz avec une sonde cryogénique en 22 min, en utilisant l'approche du repliement spectral. La température de l'échantillon a été réglée à 303 K.	110
Figure 82 : Valeur de CV pour chaque carbone en fonction avec un nombre de scans de 2 (■), 4 (■) et 6 (■) sur le 700 MHz.	110
Figure 83 : Spectre asHSQC de 50 mg de DAGF enregistré à 700,28 MHz avec une sonde cryogénique en 6 min, en utilisant l'approche du repliement spectral. La température de l'échantillon a été réglée à 303 K.	111
Figure 84 : Valeurs minimale, moyenne et maximale de CV (%) des f_i , avec un nombre d'incrément et de scans égal à 32 et 2 (■), 32 et 4 (■) et 64 et 2 (■), respectivement.....	112
Figure 85 : Illustration schématique des voies métaboliques et composition isotopiques globale des plantes C_3 , C_4 et CAM au cours de la photosynthèse.	116
Figure 86 : Composition $\delta^{13}C$ intramoléculaire du saccharose dans les plantes C_3 (●), C_4 (○) et CAM (▼). Les valeurs $\delta^{13}C$ sont données comme relatives, c'est-à-dire calculées comme les décalages isotopiques par rapport à la valeur moyenne moléculaire. ^[179]	116
Figure 87 : Méthodologie pour corriger l'asHSQC sur des échantillons d'un dérivé du glucose provenant de différents métabolismes de plantes.	118
Figure 88 : Structure chimique du DAGF.	119
Figure 89 : Variation de la forme de raie du signal 1H en fonction de la vitesse d'échange entre la fonction hydroxyle de l'éthanol et l'eau. ^[16]	119
Figure 90 : Spectre 1H zoomé sur la fonction hydroxyle pour différents échantillons synthétisés au laboratoire dont la pomme de terre (■), maïs 1 (■) maïs 2 (■) et Fèvre (■). Un singulet traduit un échange rapide et un doublet un échange lent. Ces résultats ont été obtenus sur 10 mg de DAGF dans 600 μ L de DMSO- d_6	120
Figure 91 : Spectre asHSQC à 303 K de 10 mg DAGFCom solubilisé dans 500 μ L de DMSO- d_6 avec 100 μ L d'eau ultrapure.	121
Figure 92 : Spectre 1H du DAGF commercial avant (■) et après (■) séchage avec du $MgSO_4$ enregistré à 700,28 MHz avec une sonde cryogénique.....	121
Figure 93 : Hydrolyse du DAGF en MAGF.....	122
Figure 94 : Variation de la forme du multiplet, et donc de la vitesse d'échange entre la fonction hydroxyle et l'eau, avec la quantité d' Al_2O_3 ajoutée.....	122
Figure 95 : Spectre asHSQC de 10 mg de DAGF commercial dans 600 μ L de CD_2Cl_2 enregistré à 700,28 MHz avec une sonde cryogénique en 1 h 47 min, en utilisant l'approche du repliement spectral. La température de l'échantillon a été réglée à 293 K.	124
Figure 96 : Comparaison du signal du C1 du DAGF avec une acquisition contenant 128 points (■) et 64 points (■) dans la dimension indirect avec une fenêtre spectrale totale de 2 ppm.	124
Figure 97 : Valeurs de CV^{min} , CV^{moy} , CV^{max} (%) avec NS de 4 (■),6 (■),8 (■),10 (■). Les temps d'acquisition pour un spectre sont de 53 min, 1 h 20 min, 1 h 47 min et 2 h 13 min, respectivement.	125

Figure 98 : Valeurs de CV^{min} , CV^{moy} , CV^{max} (%) avec un traitement de données sans ajustement (■), en ajustant les intégrales (■), ou les projections (■).....	126
Figure 99 : $\delta_i^{13}C$ données par la séquence 1D (- -) et la séquence 2D corrigée (—) par le facteur $\lambda_{iDAGFCom}$ pour les DAGF utilisés dans cette étude. Les barres d'erreur correspondent à deux fois l'écart-type (n = 3 pour chaque échantillon).	128
Figure 100 : Profil isotopique ^{13}C du DAGF à partir de glucose provenant a) de plantes C_4 : DAGF commercial (—), Maïs 1 (—), Maïs 2 (—) ; b) plantes C_3 : Pomme de terre (—) et Fève (—) ; c) de plantes CAM : Ananas (—). Les valeurs sont décrites comme le décalage isotopique $\Delta\delta^{13}C_i$ (%) ($\Delta\delta^{13}C_i = \delta^{13}C_i - \delta^{13}C_g$). Les barres d'erreur correspondent à deux fois l'écart-type de la séquence 2D (n = 3 pour chaque échantillon). Les résultats obtenus par Gilbert et al. (2011) pour les plantes C_3 , C_4 et CAM sont également indiqués sur la figure (...). ^[180]	129
Figure 101 : Avancée dans les objectifs de la thèse avec la correction des résultats d'une séquence RMN multi-dimensionnelle.	130
Figure 102 : Représentation graphique des effets d'off-resonance et des filtres de réception sur la justesse en fonction de la fréquence d'excitation.	131
Figure 103 : Erreur sur les compositions isotopiques sur l'éthanol bi-marqué (■) et l'acide acétique (■) analysés sur un 700 MHz équipé d'une sonde inverse et un 400 MHz équipé d'une sonde directe.....	131
Figure 104 : Différence de la largeur de gamme entre l'acide acétique (■) et l'éthanol bi-marqué (■).....	132
Figure 105 : Spectre RMN ^{13}C - $\{^1H\}$ enregistré à 700,28 MHz du DAGF (■), de l'acétate de vinyle (■) et du benzaldéhyde (■/■) avec un signal de référence placé 60 Hz de la fréquence d'excitation.	132
Figure 106 : Courbe de correction entre le 700 et le 500 MHz avec le DAGF (■), l'acétate de vinyle (■) et le benzaldéhyde (■/■). L'équation de la courbe est $y = 2E-08x^3 + 5E-07x^2 + 0,0002x + 1,0033$ avec un R^2 de 0,96.	134
Figure 107 : Courbe de correction entre le 700 et le 400 MHz avec le DAGF (■), l'acétate de vinyle (■) et le benzaldéhyde (■/■). L'équation de la courbe est $y = 3E-08x^3 - 5E-07x^2 + 0,0002x + 1,0065$ avec un R^2 de 0,83.	135
Figure 108 : Spectre RMN ^{13}C - $\{^1H\}$ de l'acétate de vinyle enregistré à 700,28 MHz avec une sonde cryogénique avec le C3 comme signal de référence. La température de l'échantillon a été réglée à 298 K.	135
Figure 109 : Compositions isotopiques spécifiques de l'acétate de vinyle par Py-GC/irm-MS (—) et irm- ^{13}C NMR sur le 400 (—), 500 (—) et 700 MHz (—). Les bars d'erreur correspondent à deux fois l'écart-type.....	136
Figure 110 : Résultats du 700 MHz de l'acétate de vinyle non corrigés (—) et corrigés (—). Les valeurs sont décrites comme le décalage à la Py-GC/irm-MS : $\delta^{13}C_i^{700} - \delta^{13}C_i^{pyr}$	137
Figure 111 : Composition isotopique de l'acétate de vinyle par Py-GC/irm-MS (—) et irm- ^{13}C NMR sur le : a) 400 MHz, b) 500 MHz, et c) 700 MHz avec les signaux de référence : C1 (—), C2 (—), C3 (—) et C4 (—). Les bars d'erreur correspondent à deux fois l'écart-type.....	138
Figure 112 : Courbe de correction entre le 700 et le 500 MHz avec l'acétate de vinyle avec comme signal de référence le : C1 (■), C2 (▲), C3 (◆) et C4 (●), le DAGF (●), et le benzaldéhyde (■ - ▲). L'équation de la courbe de tendance est égale à : $y = 2.10 - 9. x3 + 2.10 - 6. x2 + 0,0003x + 1,0009$ avec un R^2 de 0,95.....	139

- Figure 113** : Courbe de correction entre le 700 et le 400 MHz avec l'acétate de vinyle avec comme signal de référence le : C1 (■), C2 (▲), C3 (◆) et C4 (●), le DAGF (●), et le benzaldéhyde (■ - ▲). L'équation de la courbe de tendance est égale à : $y = -3.10 - 10. x^3 + 7.10 - 7. x^2 + 0,0003x + 1,0051$ avec un R^2 de 0,81..... 139
- Figure 114** : Avancée dans les objectifs de thèse avec l'homogénéisation des résultats irm- ^{13}C NMR. 139
- Figure 115** : Réaction de l'alanine en présence de ninhydrine. 141
- Figure 116** : Spectre RMN ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ de l'alanine avec les fonctions COOH (●), CH (●) et CH_3 (●). Le spectre a été enregistré à 700,28 MHz à 303 K. 142
- Figure 117** : Avancée dans les objectifs de thèse avec la correction absolue de l'irm- ^{13}C NMR. 143
- Figure 118** : Séquence CWET composée d'impulsions sélectives successives permettant de ne sélectionner qu'une partie de l'aimantation ^{13}C . L'application d'un gradient g_e en même temps que les impulsions sélectives sélectionnent spatialement une partie du tube. Le gradient de purge g_i permet de supprimer les aimantations sélectionnées précédemment. Le motif Inverse Gated qui termine la séquence permet alors d'observer le signal provenant d'une tranche de l'échantillon. 148
- Figure 119** : Application d'une impulsion sélective avec un gradient g_e afin de sélectionner une tranche du tube de hauteur e . H représente la hauteur de la bobine ^{13}C et H' la hauteur de la bobine ^1H 148
- Figure 120** : Profil d'excitation visé avec les impulsions sélectives. Les impulsions ont une gamme de balayage de saturation (ΔF) décalée à la fréquence centrale $\pm \delta f$. Après calibrage, elles permettent de basculer les aimantations de 90° dans les zones ciblées afin de les éliminer par l'application d'un gradient tout en préservant la zone centrale. 149
- Figure 121** : Séquence Echograd- ^{13}C qui permet de calibrer la séquence CWET. La première partie est composée du motif de saturation de la séquence CWET, et la deuxième partie d'un écho de spin donnant après transformation de Fourier le profil spatial de l'échantillon dans la direction z 150
- Figure 122** : Profil spatial (z -profile) d'un échantillon de benzène sans application d'une impulsion de saturation. Le gradient de lecture (g_r) a été fixé à 5% de l'amplitude maximale, permettant de disperser le signal sur une gamme de fréquence ($\nu_{1/2}$) égale à 5182 Hz. 150
- Figure 123** : Profil spatial (z -profile) du benzène avec la séquence Echograd- ^{13}C pour l'impulsion coca-5-30-40m. Différentes atténuations ont été testées afin de calibrer cette impulsions : 2 dB (—), 1dB (—), 0 dB (—) et -1 dB (—). 152
- Figure 124** : Profil spatial (z -profile) du benzène avec la séquence Echograd- ^{13}C pour l'impulsion coca-5-30-40m en saturant le signal avec 1 (—), 2 (—) et 3 impulsions (—). 152
- Figure 125** : Spectre RMN ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ de 250 mg de vanilline dans 400 μL d'acétone- d_6 et 100 μL d'une solution de $\text{Cr}(\text{acac})_3$ à 0,1 M. 154
- Figure 126** : Distribution isotopique ^{13}C de la vanille avec la séquence Inverse Gated sur le 700 MHz (—) et le 500 MHz (---). 154
- Figure 127** : Séquence CWET-zgig avec a) l'impulsion coca-5-30-40m et b) l'impulsion coca-5-50-40m. Le gradient g_e utilisé est de 80% et les gradients g_1 , g_2 , g_3 et g_4 ont été fixé à 80% pendant 1 ms, 500 μs , 250 μs et 100 μs , respectivement. 155
- Figure 128** : a) Profil spatial 1D et b) Spectre ^{13}C avec la séquence CWET sur le benzène obtenus sans saturation (—), avec la saturation coca-5-30-40m (—) et avec la saturation coca-5-50-40m (—). 156

Figure 129 : Distribution isotopique ^{13}C de la vanille avec la séquence CWET et l'impulsion coca-5-30-40m (—) ou coca-5-50-40m (—) et avec la séquence Inverse Gated sur le 700 (—) et le 500 MHz (⋯). Les barres d'erreur correspondent à deux fois l'écart-type.	156
Figure 130 : Distribution isotopique ^{13}C de la vanille sans le C1 et le C8 avec la séquence CWET et l'impulsion coca-5-30-40m (—) ou coca-5-50-40m (—) et avec la séquence Inverse Gated sur le 500 MHz (⋯). Les barres d'erreur correspondent à deux fois l'écart-type.	156
Figure 131 : Profil d'excitation de l'impulsion a) coca-5-50-d40 et b) coca-5-50-d40-r.	157
Figure 132 : Distribution isotopique ^{13}C de la vanille avec la séquence CWET et l'impulsion coca-5-50-40m (—), ou coca-5-50-d40 (—), ou coca-5-50-d40-r (—) et avec la séquence Inverse Gated sur le 500 MHz (⋯). Les barres d'erreur correspondent à deux fois l'écart-type.	157
Figure 133 : Spectre RMN ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ de l'éthanol bi-marqué. Le spectre a été enregistré à 700,28 MHz et à 303 K.	199
Figure 134 : Spectre RMN ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ de l'acide acétique bi-marqué. Le spectre a été enregistré à 700,28 MHz et à 303 K.	200
Figure 135 : Attribution ^{13}C du benzaldéhyde. Le spectre RMN ^{13}C découplé protons a été réalisé sur le 700 MHz à 303 K. Une impureté est présente en faible concentration, elle correspond à l'acide benzoïque.	202
Figure 136 : Attribution ^{13}C de l'acétate de vinyle. Le spectre RMN ^{13}C découplé protons a été réalisé sur le 700 MHz à 298 K.	203
Figure 137 : Attribution ^{13}C du DAGF. Le spectre RMN ^{13}C découplé protons a été réalisé sur le 700 MHz à 303 K.	205

Liste des tableaux

Tableau 1 : Evaluation de l'erreur maximale ϵ pour un angle de 90° en fonction du rapport TR sur T_1	27
Tableau 2 : Indice d'efficacité (\mathcal{E}) des différents découplages existants ainsi que leur application.	31
Tableau 3 : Comparaison des différentes méthodes analytiques, présentation des avantages et des limites de chacune.	60
Tableau 4 : Caractéristiques des impulsions adiabatiques et adiabatiques composites pour la refocalisation et l'inversion pour le ^1H et le ^{13}C	84
Tableau 5 : Les valeurs de PW_{90}^{Nut} et T_1 en fonction de la concentration en NaCl. Les PW_{90}^{Nut} ont été mesurés avec la même puissance RF. T_1 est le temps de relaxation longitudinale des protons de l'eau.	91
Tableau 6 : Résultats de la justesse sur l'ibuprofène et le diacétone-D-glucose entre les méthodes de nutation (PW_{90}^{Nut}) et la séquence MISSTEC (PW_{90}^{MIS}).	93
Tableau 7 : Paramètres des différentes listes de τ_v	100
Tableau 8 : Origine et $\delta^{13}\text{C}_g$ des échantillons de DAGF.	118
Tableau 9 : CV calculés sur trois tubes différents de DAGF commercial sur 1 journée, 2 jours et avec une préparation réalisée un mois et demi avant.	126
Tableau 10 : Configuration des spectromètres utilisés.	134
Tableau 11 : Composition isotopique globale ($\delta^{13}\text{C}_g$) des échantillons d'alanine enrichis sur des positions spécifiques.	140
Tableau 12 : Distribution isotopique des carbones ($\delta^{13}\text{C}_i$) des échantillons d'alanine enrichis mesurée par irm- ^{13}C NMR à 700 MHz.	144
Tableau 13 : Ecart entre la distribution isotopique ($\delta^{13}\text{C}_i$) donnée par la pyrolyse (Py-GC/irm-MS) et la RMN (irm- ^{13}C NMR) en utilisant un facteur de correction ou la courbe de correction.	144
Tableau 14 : Atténuations optimisées pour les deux impulsions utilisées dans cette étude.	153
Tableau 15 : Paramètres d'acquisition de la séquence Inverse Gated de l'éthanol bi-marqué sur les spectromètres 400 MHz et 700 MHz.	198
Tableau 16 : Paramètres d'acquisition de la séquence Inverse Gated de l'acide acétique bi-marqué sur les spectromètres 400 MHz et 700 MHz.	199
Tableau 17 : Préparation du benzaldéhyde pour les spectromètres 400 MHz, 500 MHz et 700 MHz.	201
Tableau 18 : Paramètres d'acquisition de la séquence Inverse Gated du benzaldéhyde sur les spectromètres 400 MHz, 500 MHz et 700 MHz.	201
Tableau 19 : Préparation de l'acétate de vinyle pour les spectromètres 400 MHz, 500 MHz et 700 MHz.	202
Tableau 20 : Paramètres d'acquisition de la séquence Inverse Gated de l'acétate de vinyle sur les spectromètres 400 MHz, 500 MHz et 700 MHz.	203
Tableau 21 : Préparation du DAGF pour les spectromètres 400 MHz, 500 MHz et 700 MHz.	204
Tableau 22 : Paramètres d'acquisition de la séquence Inverse Gated du DAGF sur les spectromètres 400 MHz, 500 MHz et 700 MHz.	204

Liste de la production scientifique

Articles dans des revues disposant d'un comité de lecture

- Haddad, L., **Renou, S.**, Remaud, G. S., Rizk, T., Bejjani, J., & Akoka, S. (2021). A precise and rapid isotopomic analysis of small quantities of cholesterol at natural abundance by optimized 1H-13C 2D NMR. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413(6), 1521-1532. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-03135-0>
- **Renou, S.**, Pontabry, J., Assemat, G., & Akoka, S. (2022). Radio-frequency pulse calibration using the MISSTEC sequence. *Journal of Magnetic Resonance*, 341, 107260. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2022.107260>

Communications orale lors de conférences

- Journées de la Société Chimique de France secteur Bretagne Pays de la Loire (SCF-BPL) 2021, Rennes : A new approach for radio-frequency pulses calibrations using the MISSTEC sequence, **Renou, S.**
- 10th International Symposium on Isotopomers (ISI) et 12th Isotopes Conference (ISI+ISOTOPES) 2022, Zurich : Towards unbiased ¹³C isotopic composition in PSIA, **Renou, S.**, Akoka, S., Remaud, G. S.

Posters lors de conférences :

- EUROMAR 2021 en visioconférence : The MISSTEC sequence, a new approach for RF pulses calibration in high resolution NMR, **Renou, S.**, Akoka, S.
- Journée de l'Ecole Doctorale à Nantes 2021 : MISSTEC sequence: a new tool for routine pulses calibration, **Renou, S.**, Akoka, S.
- 10th International Symposium on Isotopomers (ISI) et 12th Isotopes Conference (ISI+ISOTOPES) 2022, Zurich : How to determine the intramolecular ¹³C composition on low amount of glucose using irm ¹³C-NMR, **Renou, S.**, Daux, V., Tcherkez, G., Akoka, S., Remaud, G. S.



A precise and rapid isotopomic analysis of small quantities of cholesterol at natural abundance by optimized ^1H - ^{13}C 2D NMR

Lenny Haddad^{1,2} · Sophie Renou¹ · Gérald S. Remaud¹ · Toufic Rizk² · Joseph Bejjani² · Serge Akoka¹

Received: 2 November 2020 / Revised: 15 December 2020 / Accepted: 16 December 2020 / Published online: 27 January 2021
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

Cholesterol, the principal zoosterol, is a key metabolite linked to several health complications. Studies have shown its potential as a metabolic biomarker for predicting various diseases and determining food origin. However, the existing INEPT (insensitive nuclei enhanced by polarization transfer) ^{13}C position-specific isotope analysis method of cholesterol by NMR was not suitable for very precise analysis of small quantities due to its long acquisition time and therefore is restricted to products rich in cholesterol. In this work, a symmetric and adiabatic heteronuclear single quantum coherence (HSQC) 2D NMR sequence was developed for the high-precision (few permil) analysis of small quantities of cholesterol. Adiabatic pulses were incremented for improving precision and sensitivity. Moreover, several strategies such as the use of non-uniform sampling, linear prediction, and variable recycling time were optimized to reduce the acquisition time. The number of increments and spectral range were also adjusted. The method was developed on a system with a cryogenically cooled probe and was not tested on a room-temperature system. Our new approach allowed analyzing as low as 5 mg of cholesterol in 31 min with a long-term repeatability lower than 2‰ on the 24 non-quaternary carbon atoms of the molecule comparing to 16.2 h for the same quantity using the existing INEPT method. This result makes conceivable the isotope analysis of matrices low in cholesterol.

Keywords Cholesterol · Quantitative NMR · 2D HSQC · ^{13}C isotope analysis · Isotopomics

Introduction

Cholesterol is an essential membrane constituent of mammalian cells and has an important role in cellular organization and stability. Cholesterol also plays an important role as a precursor of steroid hormones, vitamin D, oxysterols, and bile acids [1]. It is implied in many health problems [2–4] and has proven to be an important metabolic biomarker [5, 6] since the profile of steroid hormones was important in clinical diagnostics [7].

It was shown that the global content in ^{13}C (isotope composition: $\delta^{13}\text{C}_\text{p}$) of cholesterol present in human bones mirrors the most recent diet of the individual [8–11]. This parameter is

currently obtained by isotope ratio measured by mass spectrometry (irm-MS, also known as IRMS [isotope ratio by mass spectrometry]) [12]. However, irm-MS only has access to the average isotopic composition, which is the mean value of the ^{13}C content within the considered molecule. As a result, information of the coexistence of both normal and inverse ^{13}C isotope effects during the biosynthesis of cholesterol is indubitably lost. In this respect, it is also known that the processes affecting the carbon isotopic composition of isoprenoid lipids would be better elucidated by an intramolecular ^{13}C composition study [13]. Position-specific isotope analysis (PSIA) can be achieved by several approaches such as (bio)chemical degradations or pyrolysis but with limited applications (only small molecules and/or partial intramolecular information and/or tedious protocols) [14–16]. Recently, analyses of molecular isotopic structure have been proposed by tandem mass spectrometry, using an Orbitrap mass analyzer [17–20]. However, in the level of the current development, these methodologies seem promising, but only for small molecules. But, irm-NMR (isotope ratio measured by nuclear magnetic resonance) is not limited by the molecular weight [21]. Isotopic analysis by ^2H -NMR was used to identify exogenous sources of sugars in wine by analyzing

✉ Serge Akoka
Serge.akoka@univ-nantes.fr

¹ CNRS, CEISAM UMR 6230, Faculté des Sciences, Université de Nantes, BP 92208, 2 rue de la Houssinière, 44000 Nantes, France

² Research Unit: Technologies et Valorisation Agroalimentaire (TVA), Laboratory of Metrology and Isotopic Fractionation, Faculty of Science, Saint Joseph University of Beirut, Mar Mikhael, P.O. Box 17-5208, Beirut 1104 2020, Lebanon

the D/H ratio of many compounds [22, 23] (the SNIF-NMR™ method). Profiling of intramolecular ^{13}C contents by means of irm- ^{13}C NMR was not straightforward because of the high level of precision required. Indeed, the variations of the quantity of ^{13}C isotopomers are very low in nature: to observe ^{13}C isotopic fractionation, a precision of the order of 1‰ (0.1%) has to be reached by the analytical method used. Only in the last 12 years has a full protocol been proposed to achieve such a performance [24]. Irm- ^{13}C NMR was then used in various domains [25–27]. Recently, irm-NMR took advantage of the multi-pulse sequences available for the ^{13}C nucleus to improve sensitivity and/or resolution but still keep the high precision as the analytical target, as demonstrated by the analyses of ^{13}C position-specific isotope composition (PSIA) of triglycerides [28, 29]. In a previous study, 90 mg of cholesterol was necessary to reach the high precision requested for isotopic measurements using an optimized INEPT (insensitive nuclei enhanced by polarization transfer) sequence [29]. That was already challenging in terms of molecule size and NMR tube concentration since a high signal-to-noise ratio (SNR) was required in order to obtain a precision of 1‰ in a relatively short analysis time [30, 31].

So far, compound-specific isotope analysis (CSIA) by gas chromatography coupled to irm-MS [32, 33] is the only method enabled to work with few milligrammes of products. None of the previously proposed irm-NMR approaches can cope with limitations regarding the cholesterol quantity and the NMR acquisition time. Indeed, the main issue remains sensitivity. In a recently published methodology, ^1H NMR was used for determining position-specific $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios within organic [34]. The main advantage of this approach is the sensitivity intrinsic to proton-detected NMR experiments, but no overlapping of ^1H signals is required. That is not the case for cholesterol as illustrated in Fig. 1 even at high field as with the 700-MHz spectrometer used here.

Therefore, to the best of our knowledge, today there is no method to perform a quantitative analysis of a few milligrammes of cholesterol with the precision required by isotopic measurements (permil), and so, a new methodology has to be proposed. In this respect, the heteronuclear single quantum coherence (HSQC) spectroscopy experiment has proven to be an effective method to quantify metabolites in complex mixtures [35, 36]. Our group recently developed a HSQC pulse sequence with perfect radiofrequency (RF) symmetry and successfully applied this new sequence to triglyceride matrices [37].

The aim of this study was to develop an HSQC method for small quantities of cholesterol able to quantitate ^{13}C isotopic contents of protonated carbon centres in this molecule with a precision of a few permil (‰). Thus, cholesterol isotopomics could be applied to matrices such as dairy products. The questions are then as follows: (i) what changes must be made to the core of the HSQC multi-pulse sequence? (ii) What parameters

must be adjusted to reach the targeted precision? And (iii) what is the minimum amount of cholesterol needed to reach the target precision (‰) with an analysis time lower than 1 h? The key to answering these questions was based on the inclusion of special adiabatic RF pulses which when implemented properly result in the prerequisite gain in precision and sensitivity. Moreover, several factors such as the use of variable recycling times (VRT) [38], non-uniform sampling (NUS) [39], and linear prediction (LP) [40] were evaluated and optimized in order to reduce the NMR experiment duration. Additionally, the number of t_1 increments and spectral range were also adjusted [41]. Also included is a comment on the nature of the data obtained and their relation to the isotopomics concept at natural abundance.

Experimental section

Chemicals

Extra pure ethanol and petroleum ether (boiling range 308–333 K, ACS basic) were purchased from Scharlab; diethylether (GPR Rectapur) and methanol (AnalaR Normapur) were purchased from VWR chemicals; potassium hydroxide (ACS reagent, $\geq 85\%$) was purchased from Sigma-Aldrich; and deuterated chloroform was purchased from Eurisotop. Whatman Purasil silica gel (60A, 230e400 Mesh ASTM) was used for column chromatography. Commercial cholesterol (Δ^5 -Cholesten-3-ol) was purchased from Sigma Grade (99+ %).

Cheese samples

Four cheese samples of French origin were purchased from grocery stores. Samples consist of Emmental (sample 1), Pyrenean cheese (sample 2), and Comté (samples 3 and 4).

Cheese cholesterol extraction

In this work, a specific procedure was developed for the quantitative extraction of cholesterol in cheese samples. Unless otherwise specified, working temperature was 295 ± 1 K. Cheese samples (30 g) were taken from the middle of the cheese blocks. Samples were cut in small pieces and dissolved in absolute ethanol (60 mL on average, depending on samples) at a temperature between 313 and 323 K. The mixture was then filtered after 15 min of protein precipitation, and the residue washed with petroleum ether (70 mL), ethanol:diethylether (1:1 v/v, 30 mL), and diethylether (60 mL). Complete extraction of lipids was assessed by thin-layer chromatography (TLC). Solvents were evaporated under vacuum at 318 K. The precipitate appearing during the concentration of the solution was separated by decantation of the liquid phase containing total

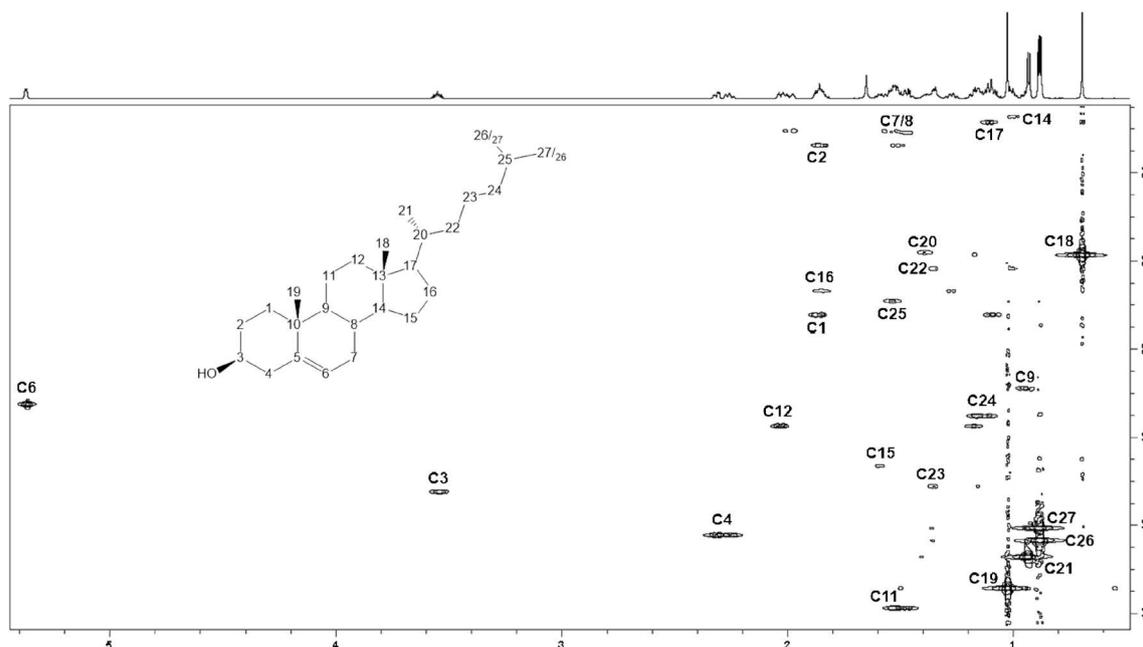


Fig. 1 HSQC spectrum from 10 mg of cholesterol recorded at 700.28 MHz with a cryoprobe in 31 min, using the spectral aliasing approach: small spectral width (12 ppm) in the F_1 dimension (^{13}C) with

50% NUS and $\text{TD} = 512$. Sample temperature was set at 288 K. Note on the top the ^1H NMR spectrum of cholesterol with severe overlapping

lipids. The precipitate was washed with absolute ethanol (3×10 mL) and then with diethylether (10 mL). Washing fractions and the liquid phase containing extracted lipids were combined and evaporation of solvents continued. Total lipids (8.5 g) thus obtained were subjected to a solid-phase extraction (SPE) over 7.8 g of silica gel to separate triacylglycerols and cholesterol. Lipids were dissolved in 40 mL of diethylether:petroleum ether (1:9 v/v) and pulled through the column. Additional 85 mL was necessary to elute triacylglycerols (TAG). Diethylether (35 mL) was used to elute cholesterol. Solvent in the fraction containing cholesterol was evaporated under vacuum at 318 K. The residue was dissolved in 1.2 mL of diethylether, distilled water (0.16 g) and a solution of potassium hydroxide in methanol (2 N, 1.2 mL) were added, and the mixture was stirred during 30 min at 318 K in order to hydrolyze the remaining acylglycerols. The liquid phase of the reaction mixture was then filtered through 1 g of silica gel, and 40 mL of diethylether was used to completely elute cholesterol and free fatty acids. After solvent evaporation (under vacuum at 308 K), the residue was dissolved in diethylether:petroleum ether (1:9 v/v, 0.5 mL) and added onto a column chromatography (2 g silica gel). Fatty acids were eluted using 35 mL of diethylether:petroleum ether (1:9 v/v). Cholesterol was then eluted with 38 mL of diethylether:petroleum ether (1:3 v/v) and solvents evaporated as in the previous step. Typically, a mixture containing approximately 25 mg of cholesterol and 6 mg of fatty acids was obtained, which implies a cholesterol purity greater than 80%, as assessed by ^1H NMR. It can be noted that other methods and

notably that proposed by Srivastava et al. [42] could be used to extract cholesterol.

NMR sample preparation

Requested quantity of commercial cholesterol (20, 10, or 5 mg) was dissolved in 600 μL of chloroform- d_1 in order to obtain a concentration of 33.3 mg mL^{-1} (86.2 mmol L^{-1}), 16.65 mg mL^{-1} (43.1 mmol L^{-1}), and 8.83 mg mL^{-1} ($21.55 \text{ mmol L}^{-1}$), respectively. Cheese cholesterol samples (approx. 25 mg) were dissolved in the same volume of chloroform- d_1 . Solutions thus obtained were carefully filtered into 5-mm high-quality NMR tubes.

NMR acquisition parameters

NMR experiments were performed on a Bruker Avance III HD 700 spectrometer equipped with an inverse $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^2\text{H}$ cryogenically cooled probe carefully tuned to the recording frequency of 176.09 MHz for the ^{13}C and to 700.28 MHz for the ^1H . The sample temperature was set at 288 K.

^1H and ^{13}C RF powers were carefully adjusted in order to obtain 90° pulse widths equal to 10 μs and 11 μs , respectively, with an acquisition time of 0.1 s, recovery time of 10 s (the longest ^1H T_1 , $T_1^{\text{max}} = 1.4$ s, was measured for the proton borne by the carbon C3; see Fig. 1

for carbon numbering), 8 dummy scans, and 2 scans. ^{13}C and ^1H offsets were set at 37 ppm and 4 ppm, respectively. Evolution period (Δ) was adjusted to 2.3 ms. Adiabatic full-passage pulses were designed with a cosine amplitude modulation of the radiofrequency (RF) field ($\omega_1^{\text{max}} = 157.1$ kHz and 93.89 kHz for ^{13}C and ^1H , respectively) and frequency sweep derived from the amplitude shape using an offset-independent adiabaticity algorithm with an optimized frequency sweep ΔF ($\Delta F = 39$ kHz and 17 kHz for ^{13}C and ^1H , respectively) as described in [43]. For inversion pulses, adiabatic full-passage pulses were used. For refocusing pulses, adiabatic composite pulses were applied [44]. ^1H decoupling was performed using an optimized phase cycle and adiabatic full-passage RF pulses with a cosine square amplitude modulation ($\omega_2^{\text{max}} = 110.6$ kHz) and offset-independent adiabaticity with an optimized frequency sweep ($\Delta F = 14$ kHz) as described in [43].

Purge gradients were set to $g_0 = 25$ G cm^{-1} , $g_1 = 40$ G cm^{-1} , and $g_3 = 20$ G cm^{-1} , while coherence order selection was obtained by $g_2 = 40$ G cm^{-1} and $g_4 = 10.05$ G cm^{-1} . Duration of all gradient pulses was 1 ms (excepted for g_0 whose duration was 10 ms) followed by a recovery delay of 300 μs .

Spectra were acquired with 512 t_1 increments and with 50% of compression rate from an NUS scheme.

NMR processing and integration parameters

NMR spectra were processed using the TopSpin 4.0.5 software. Before Fourier transform, cosinusoidal and trapezoidal functions ($\text{TM}_1 = 0$ and $\text{TM}_2 = 0.5$) were applied in dimension F_2 and F_1 , respectively. The data matrices were zero-filled to 8192 points in F_2 and 2048 points in F_1 . An automatic polynomial baseline correction ($n = 2$) was achieved in each direction for all the spectra.

Integration of 2D peak volumes was performed using the Topspin 4.0.5 software. As integration limits affect the results obtained, they were carefully chosen to be the same for all the peaks. They were defined to correspond—in both sides and in F_1 and F_2 dimensions—to 5% of the maximum signal intensity (see Supplementary Information (ESM) Fig. S1). In order to have the same integration volumes, all the spectra were calibrated in frequency. Calibration was adjusted on carbon 6 (5.36 ppm in F_2 and 39.23 ppm in F_1), which does not overlap with other carbons. Three spectra were recorded per session and each spectrum was processed three times (mainly to compensate for spectral alignment imperfections), leading to nine values for each measurement. Reconstruction of the 2D spectrum was performed using CS algorithms within TopSpin.

Molar fractions

Molar fraction was the parameter used to define the relative intramolecular ^{13}C distribution within cholesterol. Molar fraction (f_i) on each position i was calculated from peak volumes (V_i) using:

$$f_i = \frac{V_i}{\sum_1^n V_i} \quad (1)$$

where n is the number of peaks observed, i.e. the number of ^{13}C isotopomers corresponding to protonated carbons.

Results and discussion

Figure of merit: what is measured?

The aim of this study was to develop a new protocol for determining the ^{13}C intramolecular profile in cholesterol. In such studies, variables extracted from spectra are the molar fractions calculated from Eq. 1. Since f_i depends on the efficiency of the polarization transfer delays that are not the same for each signal, it is therefore an apparent ^{13}C abundance that is measured [27]. While a very good precision (a few permil) is mandatory, trueness is not an issue. To retrieve the true isotopic compositions, suitable correction factors should be determined by comparing values from classical $\text{irm-}^{13}\text{C}$ NMR and from HSQC analyses of a reference sample of the given molecule. This correction was not done in this work.

Measurement precision for each position i of the cholesterol molecule was evaluated using as a parameter the relative standard deviation (*RSD*), expressed in %. *RSD* was calculated over the nine values obtained from each measurement for each of the 23 carbon positions measured by HSQC (24 protonated carbons but two of them, C7 and C8, had the same chemical shift). During the optimization of acquisition and processing conditions, the following repeatability parameters were used: the minimum *RSD* (RSD^{min}), the maximum *RSD* (RSD^{max}), and the mean *RSD* (RSD^{mean}). Minimum, maximum, and mean values of *RSD* were calculated over the 23 observed carbon positions. Aiming to evaluate measurement precision in an actual situation, cholesterol was extracted from cheese samples and analyzed using the same method.

Sequence optimization

HSQC is a proton-detected two-dimensional (2D) NMR experiment widely used by chemists and biochemists to elucidate molecular structures [45]. Its basic form is not performant enough to reach the permil precision required. Modifications and adjustments were necessary. The HSQC sequence with perfect symmetry in the RF pulse scheme was previously

developed by our team to improve the repeatability in olive oil authentication [28] (see the previous HSQC sequence in ESM Fig. S2). However, in that work, RF pulses were not adiabatic. Adiabatic pulses have proven to increase the accuracy of the ^{13}C NMR measurements [43], but since imperfection in 90° pulses has no influence on relative measurements [46], only the 180° hard pulses were replaced by adiabatic pulses [44]. Simple adiabatic pulses are ideal for producing inversion pulses, yet given the frequency sweep during the pulse, they induce additional phase dispersion and the transverse magnetization position after the pulse is then not symmetrical with respect to its position before the pulse. With composite adiabatic pulses, however, phase variations induced by the different components compensate each other. For this reason, these pulses are suitable for refocusing. The HSQC pulse sequence optimized in this study is presented in Fig. 2.

Other optimizations were achieved by Farjon et al. with the use of NUS, VRT, and pure shift [35]. However, their goal was to reduce the acquisition time without loss of trueness, seeking determination of absolute concentrations in mixtures of metabolites. Furthermore, the HSQC sequence and RF pulse shapes were different. While our results can be compared to those of this study, the selection criterion was different, so do the optimal conditions and the conclusion.

Parameter optimization

Spectral width and offset in dimension 1

The spectral aliasing approach (Fig. 1) reduces the number of needed acquisition points by reducing the spectral width, which induces a reduction of acquisition time [47]. Furthermore, spectral aliasing does not affect the quantitativity [48].

To observe the complete spectrum of cholesterol without signal overlap, the offsets were set to 4 ppm and 38.5 ppm

with a spectral window of 12 ppm and 7.99 ppm for dimensions 1 (^1H) and 2 (^{13}C), respectively.

By reducing the spectral width in the ^{13}C dimension from 120 to 12 ppm, the number of t_1 increments in the ^{13}C dimension, and consequently the experimental time, was divided by 10.

Variable recycling times

The second approach that we used to reduce the experimental time was the VRT method. The principle of this method is to incrementally reduce the recovery time during the sampling of the indirect dimension [38]. The recovery time is therefore composed of two durations: τ_f which is a constant value and τ_v which is a variable (see Fig. 2 and ESM Table S1). At the first scan, the sum of τ_f and τ_v was equal to 10 s, equivalent to 7 times T_1^{max} ^1H . This duration affects the amplitude of the FID, therefore the values of peak integrals. The constant value of TR used in a regular acquisition is then replaced by a list of values (for the τ_v part of TR) that decrease when t_1 increases, which allows the reduction of the experimental time (i.e. from 1 h 32 to 42 min).

Furthermore, the use of VRT improved repeatability of f_i measurements as demonstrated by the lower values of RSD^{min} , RSD^{max} , and RSD^{mean} (see Fig. 3a and ESM Table S2).

This is consistent with results obtained from changing scan number (see “Scan number”) and with previous studies where a correlation between RSD and experimental time was observed [28, 49–52]. Short experiments are less sensitive to spectrometer instabilities and show a better repeatability.

As shown in Fig. 2, the repetition time (TR) is constituted by the pulse sequence duration, which is on the order of a few milliseconds, by the acquisition time (AQ), and by τ_f and τ_v , which durations are of the order of tens or hundreds of

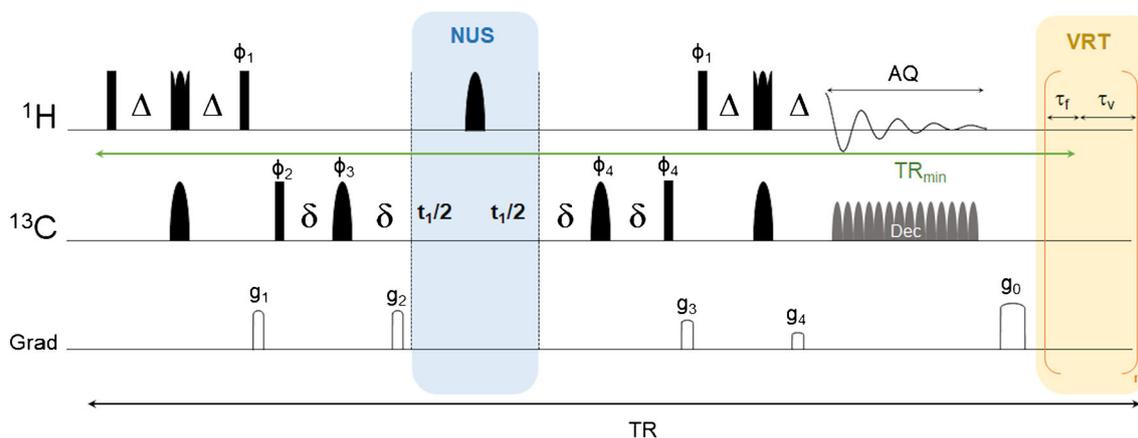


Fig. 2 Symmetrized adiabatic HSQC pulse sequence with the use of NUS (blue area, middle) and VRT (yellow area, right). ^1H and ^{13}C 180° adiabatic inversion pulses, adiabatic composite refocusing, hard pulses for 90° ^1H and ^{13}C , and adiabatic decoupling pulses were used.

Phase cycling was as follows: $\phi_1 = y$; $\phi_2 = y, -y$; $\phi_3 = x$; $\phi_4 = x, -x$. Δ was set to 2.3 ms and δ was set to 1 ms. τ_f and τ_v were the constant and the variable parts of the recovery time, respectively

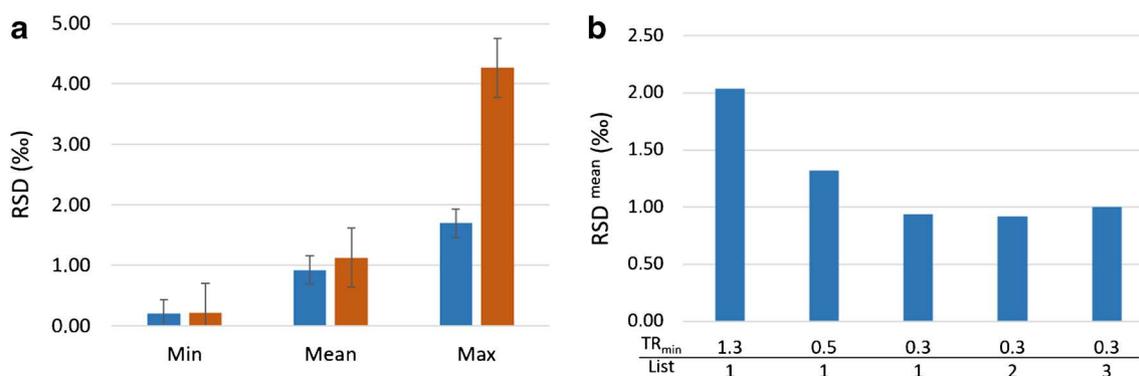


Fig. 3 **a** Minimum, maximum, and mean values of f_i RSD (%) with VRT in 42 min (blue, left) and without VRT in 1 h 32 min (orange, right). **b** Influence of the minimum repetition time and of the shape of the τ_v list on RSD^{mean} (%)

milliseconds. The minimum value of the repetition time (TR^{min}) is therefore essentially composed by AQ plus τ_f . Moreover, the final experimental time depends on TR^{min} and on the shape of the function used to define τ_v . We have therefore evaluated the influence of this shape and of the value of TR^{min} on the RSD values.

Three shapes of τ_v (see ESM Fig. S4) and different values of TR^{min} , i.e. 1.3, 0.5, and 0.3 s were tested (see ESM Table S3). RSD^{mean} evolved in the same way as TR^{min} (see Fig. 3b). A value less than 1% was obtained for RSD^{mean} with 0.2 s for τ_f and 0.1 s for AQ. However, no significant difference was observed between the three shapes of τ_v . For further optimization, the list 2 with $TR^{\text{min}} = 0.3$ s was used because it had the smallest average RSD values. This list induced a reduction of the experimental time by 2.2. The value of 0.2 s for τ_f is the minimum value allowed by our spectrometer, and AQ values lower than 0.1 s induce truncation artefacts.

NUS and/or LP

In order to further speed up the acquisition, non-uniform sampling (NUS) and linear prediction (LP) were tested. NUS methods substitute non-uniformly experimental points of the FID by calculated points, whereas LP adds calculated points at the end of the experimental ones. In both cases, the number of acquired points is the same but calculated points are in different places in the FID and the reconstruction algorithm is not the same. Consequently, effects of these two methods on f_i RSD are different (see Fig. 4 and ESM Table S4).

Experiments were acquired with a total number of FID points equal to 512, therefore with 256 points acquired for NUS or LP 50% and 128 for NUS or LP 25%. No significant differences were observed in RSD^{min} and RSD^{mean} values between NUS (50 or 25%) and LP (50 or 25%). However, RSD^{max} was the discriminant criterion: RSD^{max} was 1.3 times higher for LP than for NUS due to the imperfect repartition of the theoretical points.

It was possible to reduce experimental time by increasing the percentage of calculated points in order to decrease the number of acquired points, but our results showed that RSD^{max} was 2 times higher for 25% than for 50% (NUS or LP, see Fig. 4). This result could be explained by a too low number of experimental points, 128 points compared to 256 points.

Hence, NUS 50% was chosen, which corresponds to an additional reduction of the experiment time by a factor of 2.

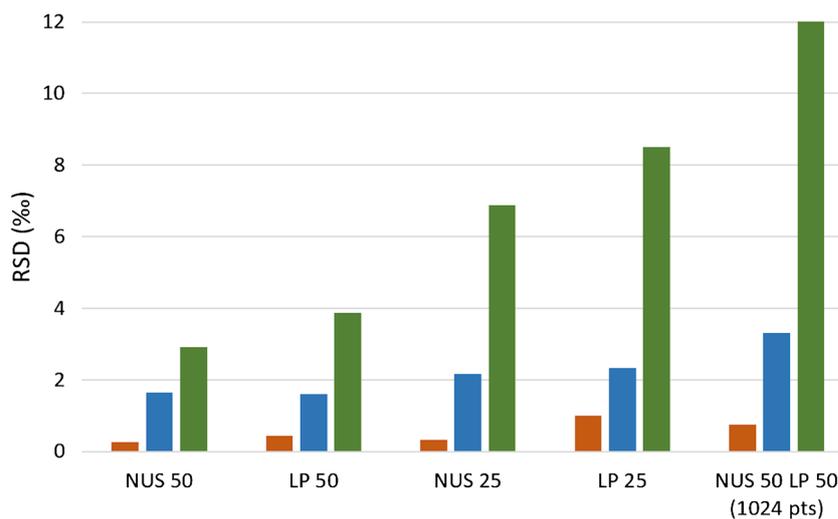
Another experiment with 256 points acquired was performed using a combination of NUS and LP in order to reach 1024 final FID points. The results presented higher RSD^{min} , RSD^{mean} , and RSD^{max} values, probably because the number of theoretical points was lower than the number of experimental points compared to NUS 50%.

NUS algorithms

For data reconstruction, two NUS algorithms were used: iteratively reweighted least squares (IRLS) and iterative shrinkage/thresholding (IST). The latter is implemented in the TopSpin software without an additional charge and is used by default during 2D processing. The IRLS algorithm is a more recent algorithm that activates a “virtual echo” parameter that is known to slightly improve the 2D treatment in spectral applications. However, this algorithm is not free of charge, the processing is significantly longer, and before the work presented here, it was never used for very high-precision measurements. We have therefore evaluated the impact of the two algorithms on precision in order to optimize the data processing.

Figure 5a (ESM Table S5) shows the RSD values obtained on the same spectra with the 2 algorithms. A better precision was observed with the IST algorithm. In fact, this algorithm allowed having more repeatable signals with less interference on all the carbon positions of the cholesterol molecule as illustrated for C6 represented in Fig. 5b. RSD^{max} obtained using the IRLS algorithm was around 8%, whereas with the IST

Fig. 4 RSD^{\min} (orange, left), RSD^{mean} (blue, middle), and RSD^{\max} (green, right) in % for different NUS and LP conditions (512 points treated)



algorithm, it was less than 5%. Moreover, treatments with IRLS took 3 times longer than with the IST algorithm for the same number of points. The IST algorithm seems therefore a better choice for our application and was retained for this study.

This is not surprising, giving the results of the well-known NUScon competition organized by the NMRBox team at the University of Connecticut (<https://nmrbox.org/>). Neither IST nor IRLS won the competition, suggesting that Bruker CS reconstruction methods are not optimal when the data gets sparse. More efficient algorithms will be tested in the future; however, in this work, we were focused on performances that can be obtained using commercial hardware and software.

Spectral calibration

In this study, the results were processed by two operators. In the initial processing strategy, five spectra were recorded per session in order to assess the repeatability of the measurements. However, due to variation in the spectral calibration

between operators, significantly different integrals and RSD values were obtained. This variation probably comes from the lower digital resolution in the ^{13}C dimension. In order to take into account the influence of eventual calibration shift, three spectra were recorded for each acquisition and each spectrum was processed three times (including calibration). With this protocol, no significant difference was observed between the two operators.

Scan number

The sequence has been tested with a NS of 2, 4, and 8. The results showed no variation in precision with the number of scans on the RSD^{\min} and RSD^{mean} , but a higher RSD^{\max} for 8 scans was obtained (see Fig. 6a and ESM Table S6). Therefore, the number of scans adopted was set to 2. In these experimental conditions, NS seems not to be the limiting factor and increasing it cannot induce a further reduction in RSD values. Once again, we observed here the impact of experimental time on RSD; long experiments are more sensitive to

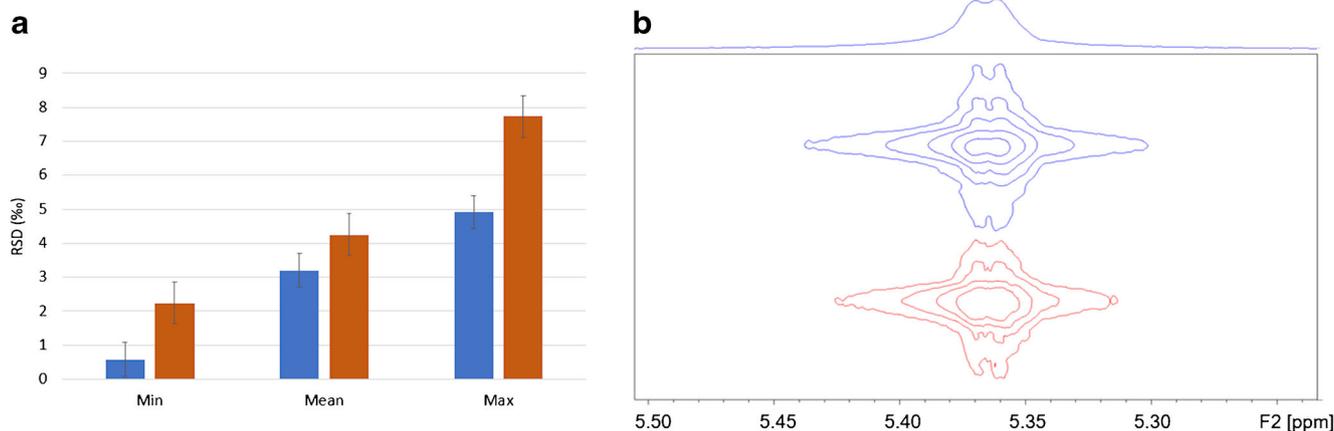


Fig. 5 **a** RSD^{\min} , RSD^{mean} , and RSD^{\max} (%) with the IST (blue, left) and IRLS (orange, right) algorithm. **b** C6 signal treated with IST (red, lower) and IRLS (blue, upper)

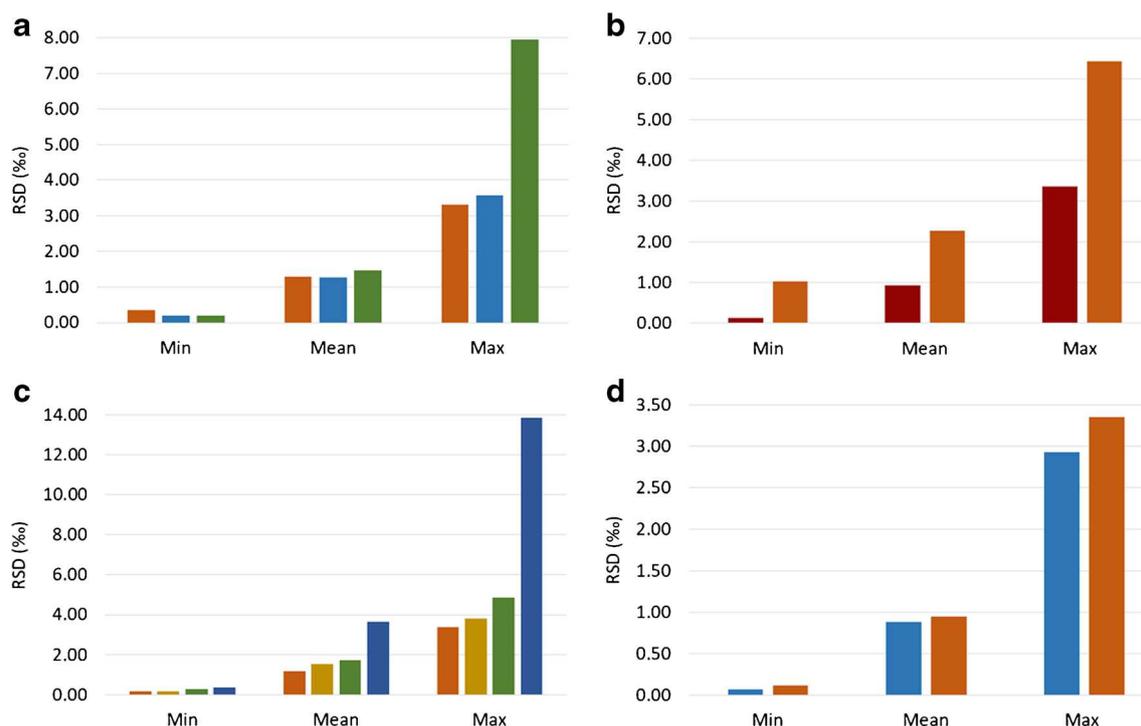


Fig. 6 RSD^{\min} , RSD^{mean} , and RSD^{max} (%) **a** with NS = 2 (orange, left), NS = 4 (blue, middle), and NS = 8 (green, right); **b** without pure-shift fragment (red, left) and with pure-shift fragment (orange, right); **c** with 20 mg (orange, left), 15 mg (yellow, middle left), 10 mg (green, middle

right), and 5 mg (blue, right); and **d** with 40 mg of cholesterol in a Shigemi tube (blue, left) and 80 mg of cholesterol in a standard tube (orange, right)

spectrometer instabilities in the course of time, leading to an increase of RSD, while short experiments are less sensitive to such instabilities and show a better precision, as long as the SNR and the resolution are sufficient to quantify relevant peaks with the target precision [28, 49–52]. This observation seems strange taking into account the good stability of modern-day spectrometers, but readers have to keep in mind that the precision targeted in this work is currently the limit of such spectrometers.

Pure shift

In the Farjon et al. study, the pulse sequence included a pure-shift segment that increased resolution by suppressing the splitting due to ^1H - ^1H coupling [35]. The pure shift segment was therefore tested on our sequence. However, the results showed higher RSD values than without the pure-shift segment (see Fig. 6b and ESM Table S7), probably because in this case the sampling period is separated in several chunks with imperfect phase coherence between them (see ESM Fig. S3).

Cholesterol concentration

Optimizations described in the previous sections were done with 20 mg of cholesterol in the tube. Effect of concentration was then investigated in order to determine the minimum quantity of cholesterol that can be analyzed while maintaining

a precision of few permil. It was possible to analyze 10 mg of cholesterol using a standard 5-mm NMR tube with very satisfactory results (see Fig. 6c and ESM Table S8).

It must be noted that an additional reduction in the amount of the analyzed compound can be obtained by using a volume-reduced tube such as the Shigemi tube. Our results showed that with such a tube, 5 mg of cholesterol (half the quantity used with a standard NMR tube) was sufficient while keeping all other parameters unchanged (see Fig. 6d and ESM Table S9).

Application to cholesterol extracted from cheese samples

Aiming to test the applicability of the developed method to cholesterol extracted from biological matrices, four cheese samples were considered in this study. Cholesterol extracted from these samples was analyzed using the same HSQC sequence with the best set of parameters determined with commercial cholesterol. RSD values were determined for all carbon positions measured over the 4 cheese samples (22 values were obtained instead of 23 since C14 and C17 signals were overlapped). RSD values for each sample as well as pooled RSD values from all samples (see Table 1) showed excellent precision over the whole set of carbon positions. Pooled RSD^{\min} , pooled RSD^{max} , and pooled RSD^{mean} were 0.79, 2.33, and 1.36%, respectively.

Table 1 *RSD* of molar fractions (f_i) of cholesterol from cheese samples

Variable ^a	<i>RSD</i> of f_i (%) ^b				Pooled <i>RSD</i> (%) ^c
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	
C18	0.62	1.01	0.83	0.78	0.82
C21	0.76	0.13	1.29	0.82	0.86
C19	0.86	0.83	0.84	0.62	0.79
C11	1.30	0.74	1.50	1.03	1.18
C26	0.71	0.54	0.55	2.01	1.13
C27	0.77	1.37	0.44	0.90	0.93
C23	1.18	1.13	0.46	0.64	0.91
C15	1.01	1.72	1.71	0.72	1.36
C25	3.23	2.01	0.73	2.57	2.33
C16	0.61	1.41	2.13	2.64	1.86
C2	2.72	0.38	1.15	0.88	1.55
C7/C8	0.50	0.29	2.04	1.34	1.25
C20	0.78	2.30	3.10	1.69	2.15
C22	0.57	1.25	1.38	0.84	1.06
C1	1.28	1.14	1.27	0.51	1.09
C24	2.29	2.78	1.15	2.29	2.21
C12	1.05	2.46	1.00	1.05	1.52
C4	1.10	0.34	1.67	1.11	1.16
C9	1.83	3.22	0.67	2.03	2.14
C14/C17	1.81	1.32	1.63	1.48	1.57
C3	0.63	0.92	0.80	1.29	0.94
C6	1.45	1.38	0.70	0.63	1.10

^a See Fig. 1 for variable labelling

^b *RSD* of f_i for each sample were calculated using values obtained from 3 spectra with 3 treatments per spectrum

^c Pooled *RSD* values were calculated over the *RSD* sets of the 4 samples

Conclusion

A symmetric adiabatic 2D HSQC pulse sequence has been developed for the first time for ^{13}C isotopomics in low quantities of cholesterol with high precision. While 5 mg represents a usual amount in the NMR analysis, it is a real challenge when very high precision (permil) and small experimental time are targeted, especially for the quantitation of heteronuclei as ^{13}C isotopomers. Folding of the peaks was used to shorten the acquisition time, and each spectrum was treated three times in order to eliminate errors related to calibration. Furthermore, NUS and VRT were also optimized to shorten the acquisition time. Influences of the scan number and of a pure shift strategy were also tested. The method was developed on a system with a cryogenically cooled probe and was not tested on a room-temperature system.

Moreover, with this methodology and using a Shigemi tube, only 5 mg of cholesterol is needed to reach an *RSD* of a few permil. For most of the detected peaks, *RSD* is below 3 permil (10 carbons have an *RSD* below 1 permil, 7 carbons

between 1 and 3 permil, and 6 carbons present an *RSD* between 3 and 5 permil). These results were obtained with an experimental time of only 31 min per spectrum while an INEPT spectrum would have taken 16.2 h for the same amount of cholesterol, therefore more than 31 times longer.

The optimized method was then tested on cholesterol extracted from cheese samples. Excellent precision, of the same magnitude as with commercial cholesterol, was observed on all carbon positions of the molecule.

Finally, the new developed methodology described herein can find widespread use in isotopomics of biomolecules—such as sterols, glucose, amino acids, and their derivatives—with applications in medical investigations and food authentication.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00216-020-03135-0>.

Acknowledgements The CORSAIRE platform from Biogenouest is acknowledged. The authors are grateful to Dr. Jonathan Farjon for his help in implementing NUS in the adiabatic HSQC sequence.

Code availability Not applicable

Authors' contributions Lenny Haddad: investigation, data curation, formal analysis, writing—original draft; Sophie Renou: investigation, data curation, formal analysis, writing—original draft; Gérald S. Remaud: conceptualization, resources, supervision, writing—review and editing, funding acquisition; Toufic Rizk: project administration, funding acquisition; Joseph Bejjani: conceptualization, supervision, resources, writing—review and editing, funding acquisition; Serge Akoka: conceptualization, methodology, supervision, writing—review and editing

Funding L.H. received financial support from the Research Council of Saint-Joseph University of Beirut and CEISAM. S.R. received financial support from the French Research Ministry. The authors received funding from the Région Pays de la Loire (Grant RFI-Food 4.2-Project AIMM).

Data availability Not applicable

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no competing interests.

References

- Röhr C, Stangl H. Cholesterol metabolism - physiological regulation and pathophysiological deregulation by the endoplasmic reticulum. *Wien Med Wochenschr.* 2018;168:280–5.
- Kanungo S, Soares N, He M, Steiner RD. Sterol metabolism disorders and neurodevelopment—an update. *Dev Disabil Res Rev.* 2013;17:197–210.
- Gidding SS, Allen NB. Cholesterol and atherosclerotic cardiovascular disease: a lifelong problem. *JAHA.* 2019;8:1–3.
- Hellman L, Rosenfeld RS, Eidinoff ML, Fukushima DK, Gallagher TF, Wang CI, et al. Isotopic studies of plasma cholesterol of endogenous and exogenous origins. *J Clin Invest.* 1955;34:48–60.
- Atkinson A, Colbum W, DeGruttola V, Demets D, Downing G. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69:89–95.
- Martins-de-Souza D. Is the word 'biomarker' being properly used by proteomics research in neuroscience? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2010;260:561–2.
- Koal T, Schmiederer D, Pham-Tuan H, Röhring C, Rauh M. Standardized LC-MS/MS based steroid hormone profile-analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2012;129:129–38.
- Erich S, Schill S, Annweiler E, Waiblinger H-U, Kuballa T, Lachenmeier DW, et al. Combined chemometric analysis of (1)H NMR, (13)C NMR and stable isotope data to differentiate organic and conventional milk. *Food Chem.* 2015;188:1–7.
- Coplen TB. Guidelines and recommended terms for expression of stable-isotope-ratio and gas-ratio measurement results: guidelines and recommended terms for expressing stable isotope results. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2011;25:2538–60.
- Stott AW, Evershed RP. $\delta^{13}\text{C}$ analysis of cholesterol preserved in archaeological bones and teeth. *Anal Chem.* 1996;68:4402–8.
- Mendelsohn D, Imelman AR, Vogel JC, Chevallerie GVL. Carbon-13 in natural cholesterol. *Biomed Environ Mass Spectrom.* 1986;13:21–4.
- Muccio Z, Jackson GP. Isotope ratio mass spectrometry. *Analyst.* 2009;134:213–22.
- Hayes JM. Fractionation of carbon and hydrogen isotopes in biosynthetic processes. *Rev Mineral Geochem.* 2001;43:225–77.
- Gauchotte-Lindsay C, Turnbull SM. On-line high-precision carbon position-specific stable isotope analysis: a review. *TrAC Trends Anal Chem.* 2016;76:115–25.
- Wuerfel O, Greule M, Keppler F, Jochmann MA, Schmidt TC. Position-specific isotope analysis of the methyl group carbon in methylcobalamin for the investigation of biomethylation processes. *Anal Bioanal Chem.* 2013;405:2833–41.
- Rossmann A, Butzenlechner M, Schmidt H-L. Evidence for a non-statistical carbon isotope distribution in natural glucose. *Plant Physiol.* 1991;96:609–14.
- Eiler J, Cesar J, Chimiak L, Dallas B, Grice K, Griep-Raming J, et al. Analysis of molecular isotopic structures at high precision and accuracy by Orbitrap mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom.* 2017;422:126–42.
- Neubauer C, Sweredoski MJ, Moradian A, Newman DK, Robins RJ, Eiler JM. Scanning the isotopic structure of molecules by tandem mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom.* 2018;434:276–86.
- Eiler JM. The isotopic anatomies of molecules and minerals. *Annu Rev Earth Planet Sci.* 2013;41:411–41.
- Neubauer C, Crémère A, Wang XT, Thiagarajan N, Sessions AL, Adkins JF, et al. Stable isotope analysis of intact oxyanions using electrospray quadrupole-Orbitrap mass spectrometry. *Anal Chem.* 2020;92:3077–85.
- Remaud GS, Giraudeau P, Lesot P, Akoka S. Isotope ratio monitoring by NMR. Part 1: Recent advances. In: Webb GA, editor. *Modern magnetic resonance.* Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 1–26.
- Martin GJ, Zhang BL, Martin ML, Dupuy P. Application of quantitative deuterium NMR to the study of isotope fractionation in the conversion of saccharides to ethanol. *Biochem Biophys Res Commun.* 1983;111:890–6.
- Martin GJ, Guillou C, Martin ML, Cabanis MT, Tep Y, Aerny J. Natural factors of isotope fractionation and the characterization of wines. *J Agric Food Chem.* 1988;36:316–22.
- Caytan E, Botosoa EP, Silvestre V, Robins RJ, Akoka S, Remaud GS. Accurate quantitative ^{13}C NMR spectroscopy: repeatability over time of site-specific ^{13}C isotope ratio determination. *Anal Chem.* 2007;79:8266–9.
- Guyader S, Thomas F, Jamin E, Grand M, Akoka S, Silvestre V, et al. Combination of ^{13}C and ^2H SNIF-NMR isotopic fingerprints of vanillin to control its precursors. *Flavour Fragr J.* 2019;34:133–44.
- Liu C, McGovern GP, Liu P, Zhao H, Horita J. Position-specific carbon and hydrogen isotopic compositions of propane from natural gases with quantitative NMR. *Chem Geol.* 2018;491:14–26.
- Akoka S, Remaud GS. NMR-based isotopic and isotopomic analysis. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc.* 2020;120–121:1–24.
- Merchak N, Silvestre V, Rouger L, Giraudeau P, Rizk T, Bejjani J, et al. Precise and rapid isotopomic analysis by ^1H - ^{13}C 2D NMR: application to triacylglycerol matrices. *Talanta.* 2016;156–157:239–44.
- Hajjar G, Rizk T, Akoka S, Bejjani J. Cholesterol, a powerful ^{13}C isotopic biomarker. *Anal Chim Acta.* 2019;1089:115–22.
- Caytan E, Remaud GS, Tenaillau E, Akoka S. Precise and accurate quantitative ^{13}C NMR with reduced experimental time. *Talanta.* 2007;71:1016–21.
- Jézéquel T, Joubert V, Giraudeau P, Remaud GS, Akoka S. The new face of isotopic NMR at natural abundance: the new face of isotopic NMR at natural abundance. *Magn Reson Chem.* 2017;55:77–90.
- Jim S, Ambrose SH, Evershed RP. Stable carbon isotopic evidence for differences in the dietary origin of bone cholesterol, collagen and apatite: implications for their use in palaeodietary reconstruction. *Geochim Cosmochim Acta.* 2004;68:61–72.
- Laffey AO, Krigbaum J, Zimmerman AR. A protocol for pressurized liquid extraction and processing methods to isolate modern and

- ancient bone cholesterol for compound-specific stable isotope analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2017;31:235–44.
34. Hoffman DW, Rasmussen C. Position-specific carbon stable isotope ratios by proton NMR spectroscopy. *Anal Chem.* 2019;91:15661–9.
35. Farjon J, Milande C, Martineau E, Akoka S, Giraudeau P. The FAQUIRE Approach: FAsT, QUantitative, hIghly Resolved and sEnsitivity Enhanced ^1H , ^{13}C Data. *Anal Chem.* 2018;90:1845–51.
36. Marchand J, Martineau E, Guitton Y, Dervilly-Pinel G, Giraudeau P. Multidimensional NMR approaches towards highly resolved, sensitive and high-throughput quantitative metabolomics. *Curr Opin Biotechnol.* 2017;43:49–55.
37. Merchak N, El Bacha E, Bou Khouzam R, Rizk T, Akoka S, Bejjani J. Geoclimatic, morphological, and temporal effects on Lebanese olive oils composition and classification: a $(1)\text{H}$ NMR metabolomic study. *Food Chem.* 2017;217:379–88.
38. Macura S. Accelerated multidimensional NMR data acquisition by varying the pulse sequence repetition time. *J Am Chem Soc.* 2009;131:9606–7.
39. Korzhneva DM, Ibraghimov IV, Billeter M, Orekhov VY. MUNIN: application of three-way decomposition to the analysis of heteronuclear NMR relaxation data. *J Biomol NMR.* 2001;21:263–8.
40. Barkhuijsen H, de Beer R, Bovée WMMJ, van Ormondt D. Retrieval of frequencies, amplitudes, damping factors, and phases from time-domain signals using a linear least-squares procedure. *J Magn Reson (1969).* 1985;61:465–81.
41. Barna JCJ, Laue ED, Mayger MR, Skilling J, Worrall SJP. Exponential sampling, an alternative method for sampling in two-dimensional NMR experiments. *J Magn Reson.* 1987;73:69–77.
42. Srivastava NK, Pradhan S, Gowda GAN, Kumar R. In vitro, high-resolution ^1H and ^31P NMR based analysis of the lipid components in the tissue, serum, and CSF of the patients with primary brain tumors: one possible diagnostic view. *NMR Biomed.* 2010;23:113–22.
43. Tenaillau E, Akoka S. Adiabatic ^1H decoupling scheme for very accurate intensity measurements in ^{13}C NMR. *J Magn Reson.* 2007;185:50–8.
44. Thibaudeau C, Remaud G, Silvestre V, Akoka S. Performance evaluation of quantitative adiabatic ^{13}C NMR pulse sequences for site-specific isotopic measurements. *Anal Chem.* 2010;82:5582–90.
45. Castañar L, Parella T. Chapter Four - Recent advances in small molecule NMR: improved HSQC and HMQMBC experiments. In: Webb GA, editor. *Annual reports on NMR spectroscopy*: Academic Press; 2015. p. 163–232.
46. Karabulut N, Baguet E, Trierweiler M, Akoka S. Improvement in quantitative accuracy of ^{13}C DEPT integrals by parameter-optimization. *Anal Lett.* 2002;35:2549–63.
47. Foroozandeh M, Jeannerat D. Reconstruction of full high-resolution HSQC using signal split in aliased spectra: reconstruction of full high-resolution spectra from aliased spectra. *Magn Reson Chem.* 2015;53:894–900.
48. Rouger L. Development and evaluation of fast methods in multidimensional NMR for the characterization of elastomeric mixtures. Thesis, Nantes. 2007. <http://www.theses.fr/2017NANT4073>. Accessed 7 April 2020.
49. Silvestre V, Goupy S, Trierweiler M, Robins R, Akoka S. Determination of substrate and product concentrations in lactic acid bacterial fermentations by proton NMR using the ERETIC method. *Anal Chem.* 2001;73:1862–8.
50. Giraudeau P, Guignard N, Hillion E, Baguet E, Akoka S. Optimization of homonuclear 2D NMR for fast quantitative analysis: application to tropine–nortropine mixtures. *J Pharmaceut Biomed Anal.* 2007;43:1243–8.
51. Martineau E, Giraudeau P, Tea I, Akoka S. Fast and precise quantitative analysis of metabolic mixtures by 2D ^1H INADEQUATE NMR. *J Pharmaceut Biomed Anal.* 2011;54:252–7.
52. Martineau E, Akoka S, Boisseau R, Delanoue B, Giraudeau P. Fast quantitative ^1H – ^{13}C two-dimensional NMR with very high precision. *Anal Chem.* 2013;85:4777–83.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Lenny Haddad is a PhD student under joint supervision between Saint-Joseph University of Beirut and the University of Nantes. She is currently working on the characterization and authentication of dairy products with high-resolution metabolomic and isotopic profiling using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy.



Sophie Renou is a PhD student at Nantes University. An analytical chemist by education, she is now working on the development of new NMR pulse sequences for ^{13}C isotopic analysis.



Gérald S. Remaud was recruited in 2003 as Professor at the University of Nantes, after spending 11 years at EUROFINs Laboratory (Nantes, France) as Technical Director. His research areas cover quantitative NMR methodologies, especially isotopic ^{13}C NMR and its application to the investigation of isotopic affiliation.



Joseph Bejjani is Associate Professor at Saint Joseph University of Beirut – Faculty of Sciences. He has a background in organic and organometallic chemistry with application in asymmetric synthesis. His current research focuses on the development of isotopomic, lipidomic, and metabolomic methods using NMR spectroscopy for the identification of biomarkers mainly for food authentication and medical applications.



Toufic Rizk is Full Professor at Saint Joseph University of Beirut. He is an international expert in food safety and was notably Head of the Center of Research and Analysis of the Faculty of Sciences and Dean of the same Faculty at Saint Joseph University. His current research deals with food safety and food authenticity.



Serge Akoka is Full Professor of Analytical Chemistry at the University of Nantes and works in the research unit CEISAM (*Chimie Et Interdisciplinarité, Synthèse, Analyse, Modélisation*). His current research interests are as follows: (i) isotopic analysis by NMR at natural abundance; (ii) methodological developments in quantitative NMR, adiabatic RF pulses for high-precision ^{13}C -NMR, quantitative 2D NMR.



Radio-frequency pulse calibration using the MISSTEC sequence

Sophie Renou^{a,*}, Julien Pontabry^b, Gaëtan Assemat^b, Serge Akoka^a

^aNantes Université, CNRS, CEISAM, UMR6230, F-44000 Nantes, France

^bRS²D, 67450 Mundolsheim, France



ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 February 2022

Revised 16 June 2022

Accepted 20 June 2022

Available online 23 June 2022

Keywords:

RF calibration

MISSTEC

Spin Echo

Stimulated echo

Automated calibration

ABSTRACT

NMR sequences are composed of multiple radio-frequency pulses. Probe adjustment, sample concentration and solvent influence the loading factor, therefore these parameters also impact the validity of flip angles. The commonly used method to calibrate RF pulses is to measure a nutation curve by varying the pulse duration. However, this method is impacted by off-resonance effects, radiation damping and B_1 and B_0 inhomogeneities. Furthermore, it is important to avoid partial saturation. In this work, the MISSTEC sequence is proposed for pulse calibration. This sequence takes only 8 s or 2 min for ^1H or ^{13}C calibration, respectively. High accuracy (with an error below 1%) was obtained for both nuclei. Therefore, the calibrations can be done rapidly and accurately. Furthermore, the MISSTEC measurement could be performed on each sample - in an automated way- before acquisitions, after which the calibration found could be automatically used.

© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

NMR sequences are generally composed of numerous radio-frequency (RF) pulses. To avoid artifacts, loss of sensitivity, and to keep the coherence selection, it is important to calibrate these pulses. Calibrations change together with electrical conductivity of the sample driven by its concentration, current temperature and the used solvent. All these parameters impact the probe adjustment (tuning and matching) and therefore the RF calibration. To calibrate pulses, the most common method is to obtain a nutation curve, by recording a series of one-dimensional experiments with incremented pulse width at a constant power. However, this method is impacted by off-resonance effects, radiation damping and B_1 and B_0 inhomogeneities. Furthermore, it is important to avoid partial saturation, which implies to know T_1 values [1] and can induce a long experiment. To reduce the experiment time and to avoid relaxation losses, it is possible to acquire only a few points near the 360° in a range where the nutation curve is assumed to be linear (small angles approximation). Then, the 90° duration (PW_{90}) is obtained by dividing the 360° duration by 4, which is an approximation, as previously demonstrated [2].

In order to determine the PW_{90} , the MISSTEC (Mixed Imaging sequence using Spin and Stimulated EChos) sequence [3] is an

attractive alternative. It was first proposed to map B_1 inhomogeneity in MRI [4] and more recently it was used on high field NMR for the same purpose [5].

In this study the MISSTEC sequence was used for ^1H and ^{13}C calibration. Different samples were used with different loading factor and different number of resonances. In addition, the method was evaluated for two nuclei (^1H and ^{13}C) and different power (hard and soft pulses). The results show that the MISSTEC sequence can be considered as an efficient tool for RF pulse calibration on high field NMR spectrometers.

2. Method

The MISSTEC sequence is composed of three RF pulses (with flip angles in proportions α , 2α and α) and generates two echoes: a spin echo (SE) and a stimulated echo (STE) (Fig. 1).

The method proposed here uses the peak intensity ratio between the spin echo (I_{SE}) and the stimulated echo (I_{STE}) (Fig. S1). These intensities (function of the α angle) are given by the following equations [6]:

$$I_{SE} = k_{SE} \sin^3(\alpha) \quad (1)$$

$$I_{STE} = k_{STE} \sin^3(\alpha) \cos(\alpha) \quad (2)$$

The k_{SE} and k_{STE} constants dependent on hardware configuration but also on relaxation times (T_1 and T_2). The spectrometer hardware contribution is the same in these two constants. Nonetheless, the impact of T_2 and equilibrium magnetization is the same for

* Corresponding author at: Chimie et Interdisciplinarité: Synthèse, Analyse, Modélisation (CEISAM), UMR 6230, Faculté des Sciences, BP 92208, 2 rue de la Houssinière, F-44322 Nantes Cedex 03, France.

E-mail address: sophie.renou@univ-nantes.fr (S. Renou).

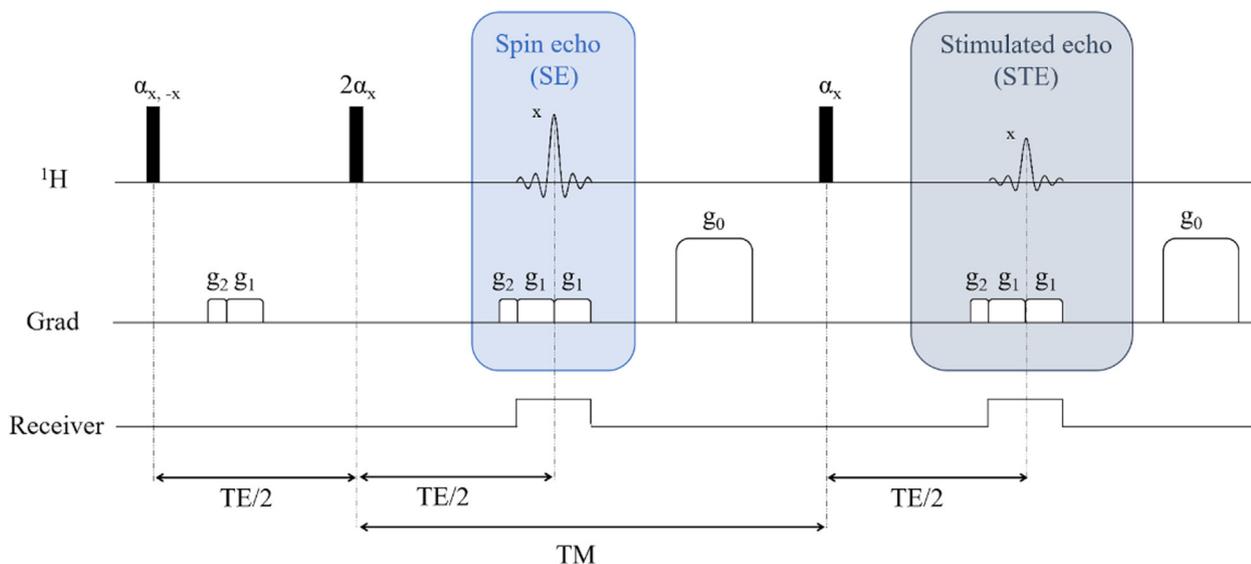


Fig. 1. The MISSTEC pulse sequence used to obtain a spin echo (SE) and a stimulated echo (STE). TE and TM were set to 8 ms and 10 ms, respectively. g_1 magnitude was chosen in order to generate a frequency dispersion significantly higher than that induced by chemical shifts, its duration (2 ms) matches the sampling time. g_2 duration (1 ms) and magnitude ($=g_1$) were adjusted to eliminate spurious FIDs generated by the second or the third RF pulse. g_0 (5 ms in duration) spoils residual transverse magnetization coming from the observed echoes and avoids formation of a spurious echo generated by the second and the third pulse. The receiver line indicates when receiver is turned on. The graphical description of the sequence -used in the programming interface- is given in Fig. S2.

both echoes. In addition, since the Mixing Time (TM) value is short regarding T_1 values encountered in high resolution NMR, the effect of longitudinal relaxation between echoes is not significant. Therefore, $k_{SE} = k_{STE}$ and:

$$\alpha = \text{Arcos}\left(\frac{I_{STE}}{I_{SE}}\right) \quad (3)$$

The angle α was determined using magnitude data, in order to avoid phasing, which is not easy to perform automatically on such echo data.

The criteria used to determine the optimal experimental conditions were precision and trueness. Precision was given by the standard deviation obtained from five consecutive measurements. Trueness (difference between the average measured value and an accepted reference value) was given by the relative difference between PW_{90} values obtained from MISSTEC (PW_{90}^{MIS}) and a reference nutation curve (PW_{90}^{Nut}):

$$\text{Trueness}(\%) = 100 \cdot \frac{(PW_{90}^{MIS} - PW_{90}^{Nut})}{PW_{90}^{Nut}} \quad (4)$$

PW_{90}^{Nut} was obtained by fitting the complete nutation curve (Fig. S3) using the following function [2]:

$$\begin{aligned} h(PW, I_0, PW_{90}, a_0, a_1, b_0, b_1, b_2) \\ = I_0 \times \sin\left(\frac{\pi \times (b_0 + b_1 PW + b_2 PW^2)}{2 \times PW_{90}}\right) \\ + \exp(-a_0 PW - a_1 PW^2) \end{aligned} \quad (5)$$

where b_0, b_1, b_2, a_0 and a_1 are real coefficients, I_0 is the signal amplitude and PW is the pulse width. Eq. (5) -proposed by Nagashima [2]- is presently the best function to fit a nutation curve as it considers all parameters influencing it, including B_1 inhomogeneity.

The only objective of any routine calibration procedure is to refine this value PW_{90} since it does not differ by more than 50% from the value obtained during a maintenance procedure. The operating procedure we used was therefore quite simple. A target value (α_0) was chosen considering results of the previous calibra-

tion. Then, after performing an acquisition with the MISSTEC sequence, the current α angle was obtained using Eq. (3). Finally, the PW_{90} was calculated using a proportionality rule.

3. Results and discussion

3.1. Determination of the optimum α angle

Theoretically PW_{90} can be determined using any value for α . However, the trueness and precision can be impacted by the targeted α value. The variations of the echo intensities were plotted against α (Fig. 2) and are in good agreement with theoretical variations, as it was observed by Akoka *et al.* [4]. Agreement is significantly better for α lower than 90° . However, between 60° and 90° the model seems to systematically underestimate I_{SE} and to systematically overestimate I_{STE} . It can be assumed that deviations from the theoretical model come from B_1 inhomogeneity but also from off-resonance effect since magnetization is dispersed on a large range of frequencies during pulse gradients. Off-resonance effect is certainly more pronounced on 2α pulse than on the two α pulses, which explains the different behavior of spin and stimulated echoes.

Trueness and precision were determined for different values of α (Fig. 3). The best precision and trueness were obtained for α close to 80° (the measurement was not done for $\alpha = 90^\circ$ since the stimulated echo gives no signal for this value). The good results obtained for α ranging from 60° to 80° seem to contrast with observations in Fig. 2. However, we can assume that the error sources are cancelling each other between the nutation method and MISSTEC, so that trueness is not compromised.

For $\alpha = 80^\circ$, 0.3% and 0.2% were obtained for precision and trueness, respectively. Hence all the ^1H results presented in this paper have been performed with α equal to 80° .

3.2. Impact of coil loading

Four $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ (90:10) samples with different salt concentrations were prepared, allowing the evaluation of the MISSTEC pulse sequence for different coil loading. As a remark, we can highlight

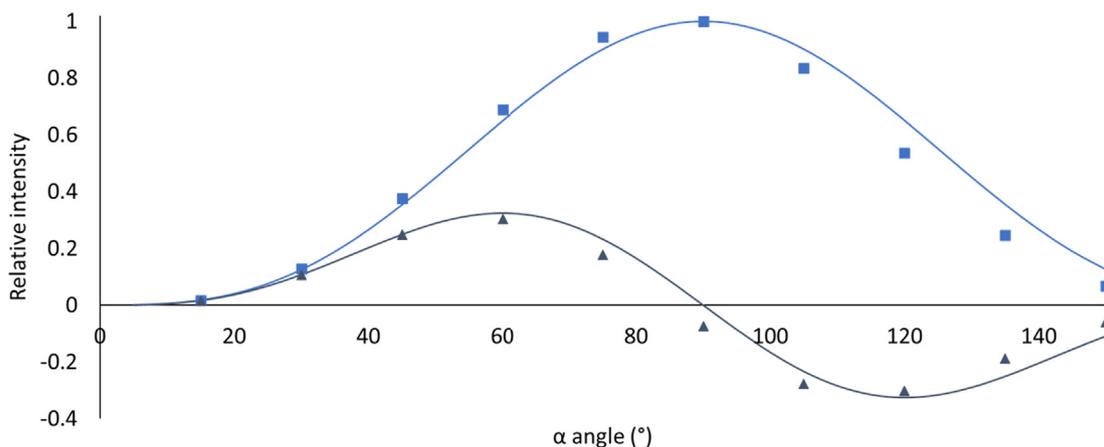


Fig. 2. Relative intensity evolution of the spin echo (square) and the stimulated echo (triangle) against the value of the α angle; measured on a vinyl acetate sample (20 μ L in 600 μ L acetone d_6). ^1H frequency was tuned at 400.15 MHz and sample temperature was set at 303 K. Solid lines correspond to the theoretical functions given by equations (1) and (2).

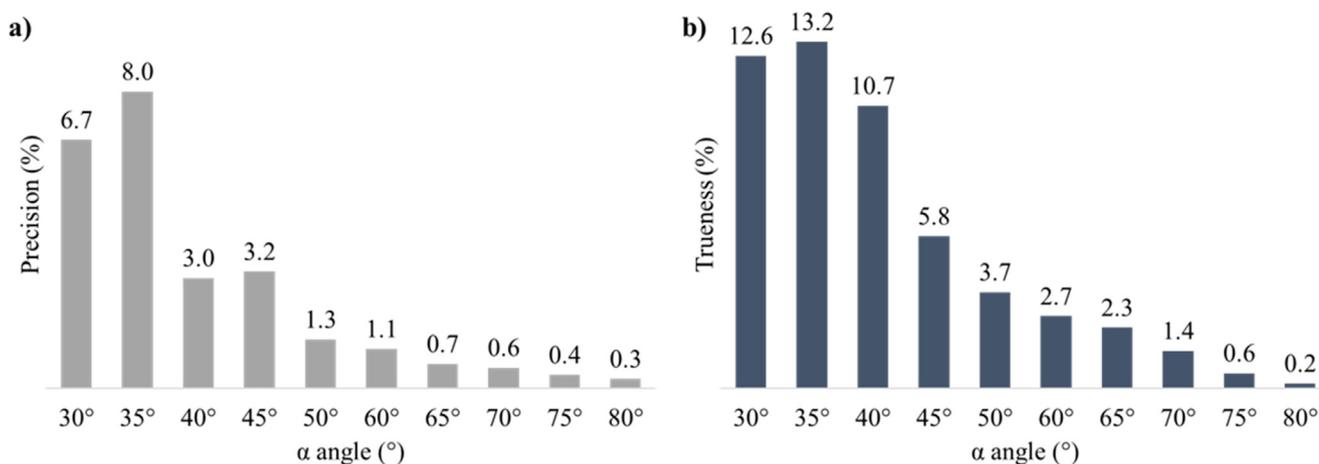


Fig. 3. Evolution of precision (a) and trueness (b) with the value of α , measured on a vinyl acetate sample (20 μ L in 600 μ L acetone d_6). ^1H frequency was tuned at 400.15 MHz and sample temperature was set at 303 K. Data are given in Table S1.

how the difference in coil loading change the true 90° calibration, and so how incorrect can be a default calibration. Different values of the PW_{90}^{Nut} were as well measured for the four concentrations in NaCl, at a given RF power (see Table 1).

The PW_{90}^{MIS} values measured on these samples have a good precision and trueness in comparison to the nutation results (Fig. 4): precision and trueness were always below 0.2% and 1% respectively.

3.3. Impact of radiation damping

Radiation damping can disrupt the signal quantification [7] and consequently, it can impact the nutation results too, inducing a distorted pulse width response [1]. Therefore, it is not possible to

obtain an accurate PW_{90} from nutation curve in presence of radiation damping [8].

The results obtained with the MISSTEC sequence on the sample $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ (40:60) present a precision of 0.07% while a high level of radiation damping can be observed on the proton spectrum. Although it was not possible to measure the true value of PW_{90}^{Nut} on this sample, the probe adjustment did not change between the sample preparation with the ratio 90:10 and 40:60, therefore the PW_{90}^{Nut} values are very close for these two preparations. Under this hypothesis, trueness measured for this sample was not significantly different from 0% for the 40:60 preparation. With the MISSTEC sequence, the magnetization during the acquisition is dispersed thanks to a gradient. That can explain that results were not impacted by radiation damping. However, for 10:90 ($\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$) the signal was too high and induces saturation of our

Table 1
 PW_{90}^{Nut} and T_1 values as a function of NaCl concentration. The PW_{90}^{Nut} were measured with the same RF power. T_1 is the longitudinal relaxation time of water protons.

Ratio $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$	NaCl concentration (mol/L)	T_1 (sec)	PW_{90}^{Nut} (μ s)	PW_{90}^{MIS} (μ s)
90:10	0	8.45	10.31	10.24
	0.5	10.71	11.82	11.72
	2	15.1	14.01	13.88
	4	15.23	15.40	15.26

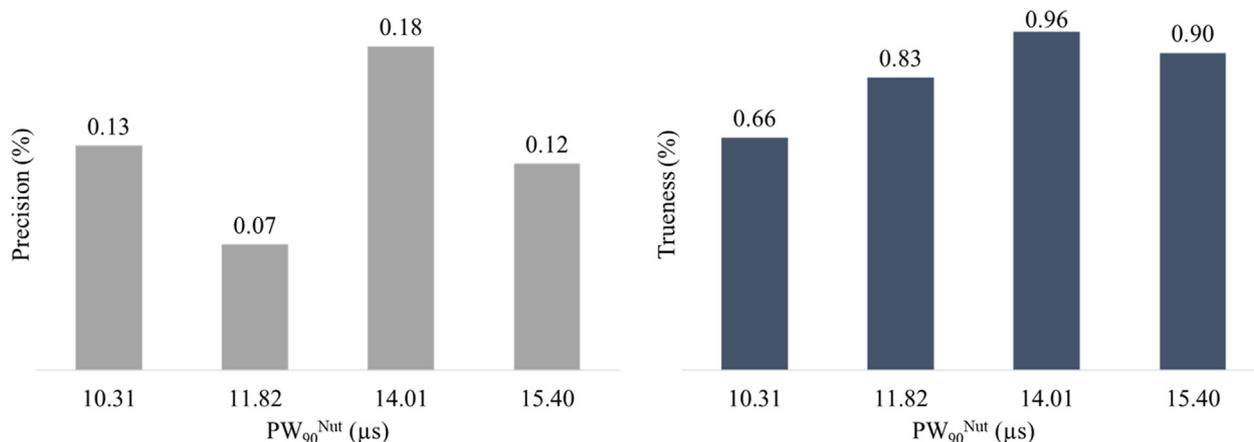


Fig. 4. Precision (a) and trueness (b) of PW_{90}^{MIS} for different PW_{90}^{Nut} induced by varying NaCl concentration (from left to right: no salt, 0.5 M, 2 M and 4 M).

spectrometer's receiver. Note that the same problem was observed with nutation data or with the PulsCal method. In such situations, the only possible calibration is to find the 360° pulse duration using only nutation angle close to this value.

3.4. Soft pulse calibration

RF pulses with reduced power (soft pulses) are commonly used in modern NMR, especially for decoupling. Their duration can be calculated from the PW_{90} value measured at high RF power; however, the trueness is then highly dependent on the RF amplifier's linearity. We have tested the MISSTEC sequence's efficiency to calibrate experimentally these pulses. Correlation between MISSTEC and nutation results is plotted on Fig. 5 for PW_{90} ranging from 10 to 100 μs . The R^2 value (0.99996) demonstrates the excellent precision obtained for the tested duration range, while the slope -very close to 1 (0.99205)- and the intercept -very close to 0 (0.03913)- indicate a very good trueness whatever the power used. Therefore, soft pulses can be calibrated with the MISSTEC sequence without need of any requirements on the amplifier's linearity since measurement were done at the same low power than that used in further experiments.

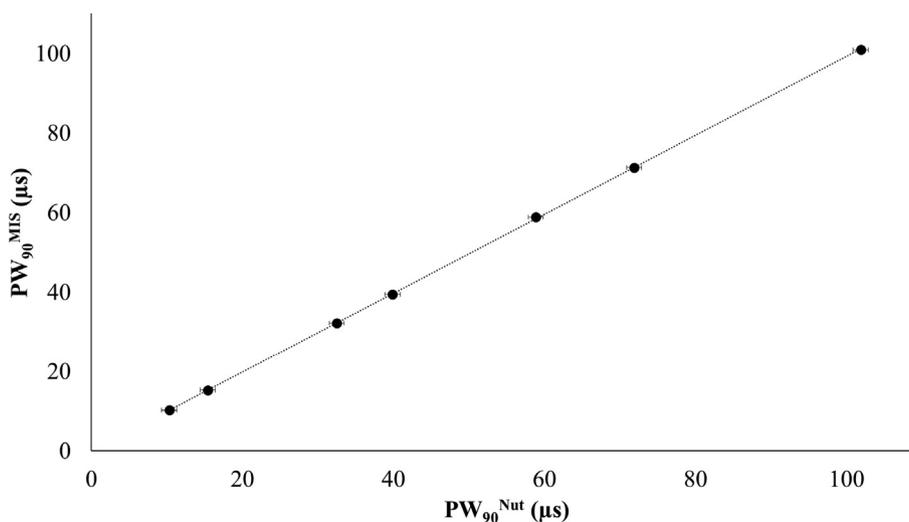


Fig. 5. Correlation between nutation (PW_{90}^{Nut}) and MISSTEC (PW_{90}^{MIS}) results for PW_{90} values ranging from 10 to 100 μs . These results were obtained with the ratio 90:10 ($D_2O:H_2O$), $PW_{90}^{MIS} = 0.99205 \cdot PW_{90}^{Nut} + 0.03913$ with $R^2 = 0.99996$. The 1H frequency was tuned at 400.15 MHz and the sample temperature was set at 303 K. Data are given in Table S2.

We have not performed measurement for pulses longer than 100 μs . However, the only limit seems to be that the mixing time has to be short as compared to longitudinal relaxation times.

3.5. Realistic samples

Ibuprofen in chloroform d_1 and diacetone-D-glucose in dimethyl-sulfoxide- d_6 samples were used to evaluate the MISSTEC performance in more realistic conditions than those of the $D_2O:H_2O$ samples (which contains only one resonance). The results show a trueness of -0.15% and -0.40% for the ibuprofen and diacetone-D-glucose, respectively (Table 2). These results were obtained with a precision better than 0.1% for both samples.

3.6. Comparison with other fast methods: PulsCal sequence and $360^\circ/4$

The sequence used by the PulsCal method was proposed in 2005 to determine quickly the PW_{90} [9]. In this sequence, calibration is performed using a simple homo-gated decoupling/nutation experiment. The Fourier transformation provides the nutation frequency and so the PW_{90} . Another method to determine quickly the PW_{90} value is to search the cancellation point of the nutation curve observed at PW_{360} and divide this result by 4. These two methods

Table 2

Trueness results on ibuprofen and diacetone-D-glucose with the nutation (PW_{90}^{Nut}) and MISSTEC (PW_{90}^{MIS}) methods. PW_{90} is given in microseconds.

	$PW_{90}^{Nut}(\mu s)$	$PW_{90}^{MIS}(\mu s)$	Trueness (%)
Ibuprofen	10.35	10.37	-0.15
Diacetone-D-glucose	10.00	9.96	-0.40

are fast, notably because the relaxation delay does not have to be long in respect to T_1 . However, in our experience the PulsCal sequence is more efficient with a single dominant resonance, e.g. a sample in water and highly protonated solvent, and the $PW_{360}/4$ approach is very operator dependant since the cancellation point is visually estimated; furthermore, the value obtained is not exactly equal to PW_{90} [2].

The MISSTEC sequence was compared to the two methods described above, with different salt concentration at 0, 0.5, 2 and 4 mol.L⁻¹, to produce different loading factors and so different PW_{90} values for the same RF power (Fig. 6). The trueness obtained with the MISSTEC sequence was better than 1% for all samples. For the PulsCal and the $PW_{360}/4$ methods, they were about 1.5% and 2.5%, respectively.

3.7. Application to ¹³C calibration

In addition to the ¹H, the ¹³C NMR is an important part of the routine NMR analysis. It can be considered as an example and results obtained here could probably be generalized to the other nuclei detectable in NMR with a limitation to their gyromagnetic ratio and natural abundance. Obtaining a nutation curve for ¹³C is more tedious than for ¹H because of the longer T_1 values, the lower sensitivity and the isotopic abundance. All these constraints induce significantly longer experimental time. Calibrating on solvent can compensate for low sample concentration but the T_1 value is often long.

The MISSTEC sequence was adapted to the ¹³C nuclei. The number of scans and the recovery delay had to be increased in order to increase the SNR and a new step in data processing was added (see experimental section). The method was tested on the cyclohexane (Fig. 7) at 7.7 mol.L⁻¹. The optimal α angle for trueness and precision was found around 70° by varying the α angle. A precision and trueness of 0.8% and 0.6% were obtained, respectively.

The method was also evaluated on methanol (Fig. 8) with a similar result for the optimal α angle, at around 70°. To obtain these results it was necessary to increase the number of scans, since cyclohexane has 6 equivalents carbons compare to only 1 for the methanol. Additional results with more resonances are in supplementary information (Fig. S4).

Therefore, ¹³C calibration is comparable in trueness and precision with ¹H one. However, two differences were observed: 1) a higher number of scans associated with a data processing (in order to compensate for lower sensitivity) and 2) an optimal value for α which is lower (70°).

4. Conclusion

The MISSTEC sequence has been evaluated for RF calibration on high resolution spectrometers. For ¹H calibration, excellent accuracy was obtained with a short experimental time (8 s), within various experimental conditions: different samples and concentrations on hard and soft pulses, with radiation damping (under saturation conditions). The best performances were obtained for α close to 80°. The proposed method outperformed the PulsCal and the $PW_{360}/4$ approaches, in terms of trueness. Hardware constraints are very low: any probe equipped with z-gradient can be used to perform the MISSTEC sequence, as soon as the gradient strength provides a sufficient spectral dispersion.

In routine, PW_{90} is most often known with an error lower than 50%. Therefore, it is easy to calibrate finely with the MISSTEC method with α close to the optimal starting value. However, when installing a new equipment (spectrometer or probe), uncertainty on PW_{90} is higher. In that case, it could be necessary to perform two consecutive measurements, one to obtain an approximate value and a second one close to 80° to obtain an accurate value.

¹³C calibration were obtained with good precision and trueness -better than 0.8% and 0.6%- but in 2 min. The best performances were obtained for α close to 70°. At this time, we don't have a definitive explanation of this difference in the optimal α value respectively to ¹H. However, it must be noted that ¹H and ¹³C measurements were performed with the same gradient amplitude. The frequency dispersion induced by gradients in respect to that induced by chemical shifts was therefore lower for ¹³C than for ¹H. In order to verify if that can explain the different behavior of the two nuclei it would be necessary to perform MISSTEC acquisitions with higher gradient amplitude during the sampling time.

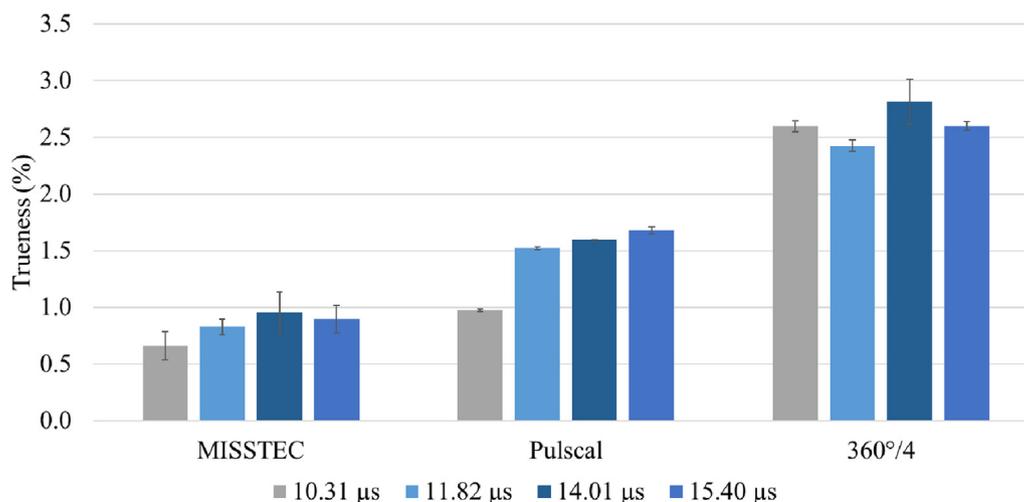


Fig. 6. PW_{90} trueness of different methods: MISSTEC, PulsCal and $360^\circ/4$ for four samples with different NaCl concentrations (from left to right: no salt, 0.5 M, 2 M and 4 M). PW_{90}^{Nut} was respectively 10.31 (\blacksquare), 11.82 (\blacksquare), 14.01 (\blacksquare) and 15.40 μs (\blacksquare). The error bars correspond to the precision calculated from 5 consecutive measurements. Data are given in Table S3.

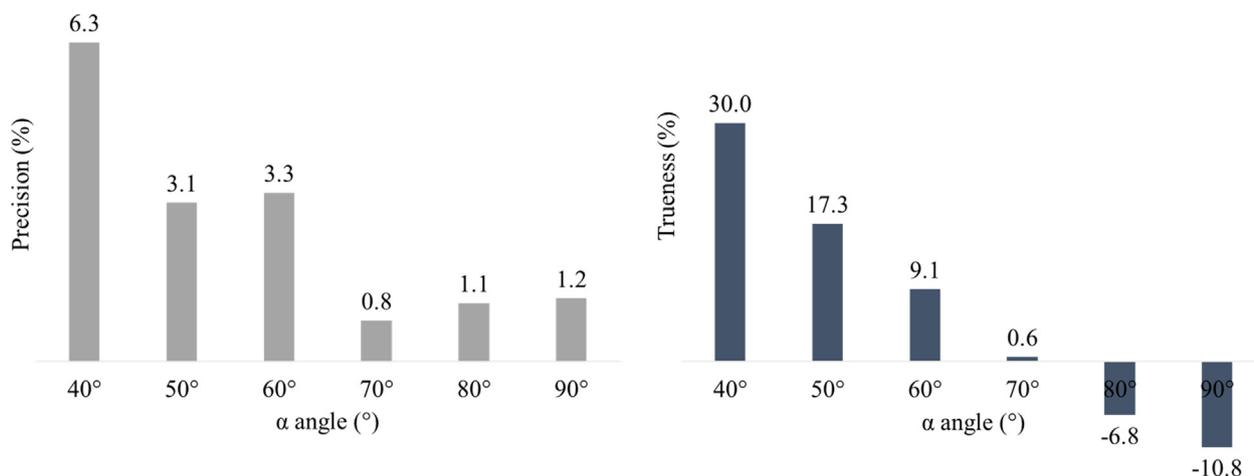


Fig. 7. ^{13}C calibration precision and trueness results with different α angle. These results were obtained on 600 μL cyclohexane in 120 μL $\text{Cr}(\text{acac})_3$ solution at 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ in acetone d_6 . The ^{13}C frequency was tuned at 100.62 MHz. The sample temperature was set at 303 K. Data are given in Table S4.

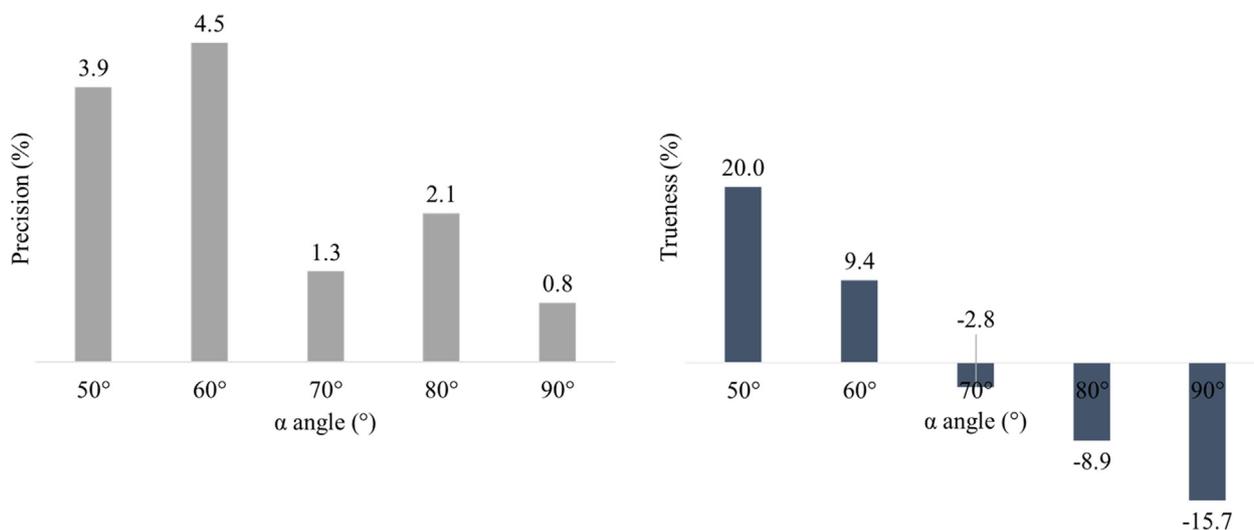


Fig. 8. ^{13}C calibration precision and trueness with different α angle. These results were obtained on 500 μL methanol in 120 μL $\text{Cr}(\text{acac})_3$ solution at 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ in acetone d_6 . The ^{13}C frequency was tuned at 100.62 MHz. The sample temperature was set at 303 K. Data are given in Table S5.

But the receiving bandwidth will be increased and so, the SNR will be lower.

In such case, in order to increase the SNR and to reduce the experiment time, a new development with inverse detection will be investigated. Thereafter, the application to lower sensitive nuclei -such as ^{15}N - will be considered.

Essentially, each measurement performed in this work with the MISSTEC sequence needed only two clicks (one to start the acquisition and the other one to process the data). Therefore, this method can be easily and fully automated and could be used routinely before any NMR acquisition. Typically, this sequence would be applied after the shim routine and before acquisition, then the calibration found could be automatically used.

5. Experimental

5.1. Chemical

Sodium chloride (NaCl) and methanol (technical quality) were purchased from VWR, ibuprofen (purity > 98%), vinyl acetate (purity > 99%) and diacetone-D-glucose (purity > 98%) were purchased from Sigma-Aldrich, cyclohexane (purity > 99.7%) was purchased

from Honeywell. Deuterated solvent, deuterium oxide, dimethylsulfoxide- d_6 , chloroform d_1 and acetone d_6 were purchased from Eurisotop.

5.2. Sample preparation

$\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ samples were prepared with three ratios, inducing different signal levels. Furthermore, in order to produce different coil loading, NaCl was added to the (90:10) mixture at four concentrations: 0, 0.5, 2 and 4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Ibuprofen (20 mg in 600 μL chloroform d_1), methanol sample (500 μL in 120 μL $\text{Cr}(\text{acac})_3$ solution at 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ in acetone d_6), cyclohexane sample (600 μL in 120 μL $\text{Cr}(\text{acac})_3$ solution at 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ in acetone d_6), and diacetone-D-glucose sample (200 mg in 600 μL dimethylsulfoxide- d_6) were prepared.

5.3. NMR acquisition parameters

NMR experiments were performed on a Bruker magnet connected to a Pulse Console from RS²D and using a DUAL+ $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ATMA grad-Z 5 mm probe carefully tuned to the recording frequency of 400.15 MHz and 100.62 MHz for ^1H and ^{13}C ,

respectively. Acquisition and data processing were made on the SPINIt software. Sample temperature was set at 303 K. The gradient g_0 , g_1 and g_2 was set to 40, 7.5 and 7.5 G/cm, respectively. The same gradient amplitudes were used in all measurements.

5.4. NMR processing

NMR spectra were processed using the SPINIt software. The α angle is directly given by a data processing which automatically find the maximum of the echoes and calculate the corresponding α angle. Lower sensitivity of ^{13}C requires the application of a previous step in the data processing pipeline: a sine function to the power of 4 was applied after the Fourier transformation, so in the frequency domain. Then, after an inverse Fourier transformation, the SNR of the echoes was increased. It is equivalent as taking the convolution product between echoes and a sine function to the power of 4.

5.5. Nutation curve

The nutation curves were obtained from 23 PW values ranging from 4 to 48 μs with $5 \times T_1^{\text{max}}$ between each in order to avoid partial saturation. The T_1 values were measured using the inversion recovery sequence and using the protocol proposed by Akoka et al. [10].

CRediT authorship contribution statement

Sophie Renou: Investigation, Data curation, Formal analysis, Writing – original draft. **Julien Pontabry:** Software, Writing – review & editing. **Gaëtan Assemat:** Writing – review & editing. **Serge Akoka:** Conceptualization, Methodology, Supervision, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: Sophie Renou reports financial support was provided by University of Nantes. Serge Akoka reports a relationship with RS2D that includes: non-financial support.

Acknowledgement

S. Renou acknowledges the financial support of the French Research Ministry. Authors from CEISAM acknowledge the French National Infrastructure for Metabolomics and Fluxomics MetaboHUB-ANR-11-INBS-0010 (www.metabohub.fr) and the Corsaire metabolomics core facility (Biogenouest). This work includes NMR experiments carried out on the CEISAM NMR platform.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2022.107260>.

References

- [1] P.A. Keifer, 90° pulse width calibrations: How to read a pulse width array, *Concepts Magn. Reson.* 11 (1999) 165–180, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0534\(1999\)11:3<165::AID-CMR4>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0534(1999)11:3<165::AID-CMR4>3.0.CO;2-D).
- [2] K. Nagashima, B1 mapping of liquid NMR transversal RF coils: Analysis of heterogeneity and nonlinearity, *Concepts Magn. Reson.* 41B (2012) 1–12, <https://doi.org/10.1002/cmr.b.20211>.
- [3] F. Franconi, F. Seguin, C.B. Sonier, A. Le Pape, S. Akoka, T1 mapping from spin echo and stimulated echoes, *Med. Phys.* 22 (1995) 1763–1769, <https://doi.org/10.1118/1.597632>.
- [4] S. Akoka, F. Franconi, F. Seguin, A. Le Pape, Radiofrequency map of an NMR coil by imaging, *Magn. Reson. Imaging* 11 (1993) 437–441, [https://doi.org/10.1016/0730-725X\(93\)90078-R](https://doi.org/10.1016/0730-725X(93)90078-R).
- [5] A. Jerschow, G. Bodenhausen, Mapping the B1 Field Distribution with Nonideal Gradients in a High-Resolution NMR Spectrometer, *J. Magn. Reson.* 137 (1999) 108–115, <https://doi.org/10.1006/jmre.1998.1645>.
- [6] R. Graumann, A. Oppelt, E. Stetter, Multiple-spin-echo imaging with a 2D Fourier method, *Magn. Reson. Med.* 3 (1986) 707–721, <https://doi.org/10.1002/mrm.1910030507>.
- [7] V.V. Krishnan, N. Murali, Radiation damping in modern NMR experiments: Progress and challenges, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 68 (2013) 41–57, <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2012.06.001>.
- [8] X.-A. Mao, C.-H. Ye, Understanding radiation damping in a simple way, *Concepts Magn. Reson.* 9 (1997) 173–187, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0534\(1997\)9:3<173::AID-CMR4>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0534(1997)9:3<173::AID-CMR4>3.0.CO;2-W).
- [9] P.S.C. Wu, G. Otting, Rapid pulse length determination in high-resolution NMR, *J. Magn. Reson.* 176 (2005) 115–119, <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2005.05.018>.
- [10] S. Akoka, G.S. Remaud, NMR-based isotopic and isotopomic analysis, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 120–121 (2020) 1–24, <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2020.07.001>.

Titre : Développements méthodologiques et validations expérimentales dans le cadre de l'analyse isotopique par RMN-¹³C

Mots clés : RMN-¹³C isotopique, justesse, facteur de correction, développement de séquence, précision

Résumé : La RMN isotopique du ¹³C est utilisée depuis de nombreuses années afin de déterminer la distribution isotopique au sein d'une molécule. Ces informations permettent notamment de connaître l'origine géographique ou la naturalité d'un composé. Les résultats donnés par la RMN sont uniquement relatifs et demandent à être corrigés. De plus, le développement de nouvelles séquences RMN a permis de gagner en sensibilité mais au détriment de la justesse. Afin d'obtenir la justesse appropriée, des facteurs de correction doivent donc être mis en place.

Ces travaux de thèse portent sur le développement d'une séquence multi-dimensionnelle RMN ¹³C isotopique plus sensible permettant ainsi de réduire le temps

d'analyse et/ou la quantité de produit analysable. Cette nouvelle séquence a permis de mener à bien deux projets de recherche innovant portant sur : (i) la discrimination de produits alimentaires entre une culture biologique et conventionnelle et (ii) la compréhension de l'évolution climatique à travers les cernes des arbres. Les résultats de cette séquence étant uniquement relatifs, une méthodologie basée sur des facteurs de correction a été mise en place afin de donner des résultats justes et accessibles à toute la communauté isotopique. En parallèle, un développement méthodologique a porté sur la correction de la RMN ¹³C isotopique pour obtenir des résultats indépendants de la sonde utilisée.

Title: Methodological developments and experimental validations for isotopic ¹³C NMR

Keywords: ¹³C-NMR isotopic analysis, trueness, correction factor, sequence development, precision

Abstract: ¹³C-NMR has been used for many years to determine the isotopic distribution within a molecule. This information allows to know the geographical origin or the naturalness of a compound. The results given by NMR are only relative and need to be corrected. Moreover, the development of new NMR sequences has allowed to gain in sensitivity but at the expense of trueness. In order to obtain the appropriate trueness, correction factors must be implemented.

This thesis work focuses on the development of a more sensitive multi-dimensional ¹³C isotopic NMR sequence that allows to reduce the

analysis time and/or the amount of analyzable product. This new sequence has allowed to carry out two innovative research projects concerning: (i) the discrimination of food products between organic and conventional crops and (ii) the understanding of climate evolution through tree rings. The results of this sequence being only relative, a methodology based on correction factors has been set up in order to give accurate results accessible to the whole isotopic community. In parallel, a methodological development was made on the correction of ¹³C isotopic NMR to obtain results independent of the probe used.