HAL
open science

Présaturation de plusieurs signaux de solvant et élimination des artefacts de découplage dans la résonance magnétique nucléaire 13 C 1 H

Marine Canton, Richard Roe, Stéphane Poigny, Jean-Hugues Renault, Jean-Marc Nuzillard

To cite this version:

Marine Canton, Richard Roe, Stéphane Poigny, Jean-Hugues Renault, Jean-Marc Nuzillard. Présaturation de plusieurs signaux de solvant et élimination des artefacts de découplage dans la résonance magnétique nucléaire 13 C 1 H. 2020, pp.Magn. Reson., 1, 155-164. hal-02938745

HAL Id: hal-02938745

https://hal.science/hal-02938745v1

Submitted on 15 Sep 2020

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.

Présaturation de plusieurs signaux de solvant et élimination des artefacts de découplage dans la résonance magnétique nucléaire $^{13}C\{^{1}H\}$

Magn. Reson., 1, 155–164, 2020

Marine Canton, Richard Roe, Stéphane Poigny, Jean-Hugues Renault, Jean-Marc Nuzillard

Résumé

L'analyse par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire au carbone 13 découplé par protons d'échantillons dissous dans des solvants présentant de fortes résonances multiples peut être facilitée par la suppression de ces résonances par présaturation multisite. L'avantage tiré de cette opération est l'élimination des éventuels artefacts issus des signaux de solvant dans des conditions de découplage non optimisées. La présaturation du solvant a été mise en œuvre sur le glycérol, le 1,2-propanediol, le 1,3-propanediol, le 1,2-butanediol et le 1,3-butanediol avec une efficacité de résonance d'au moins 94% et une bande passante inférieure à 50 Hz mesurée à une diminution de l'intensité du signal de 50%. La mesure expérimentale de la largeur de bande de suppression du signal conduit à des profils de sélectivité inattendus pour les résonances à fréquence proche. La résolution informatique des équations de Bloch pendant la pré-saturation multisite donne un aperçu de l'origine des perturbations de profil observées.

1 Introduction

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est la seule méthode spectroscopique utilisée pour l'élucidation structurale de molécules organiques qui produit des informations au niveau atomique. La RMN à l'état liquide des protéines repose fortement sur l'observation des résonances des protons amides NH et est donc réalisée dans un solvant principalement composé d'eau légère. La concentration d'hydrogène dans les échantillons de protéines RMN (près de 100 mol L^{-1}) comparée à celle de la protéine elle-même (1 mmol L^{-1} ou moins, Zheng et Price , 2010) a forcé les spectroscopistes RMN à créer des techniques efficaces de suppression du signal de l'eau (Lee et al. , 2017 ; Chen et al. , 2017 ; Duarte et coll. , 2013 ; Gouilleux et coll. , 2017) . Sans eux, le signal d'eau couvrirait une large bande de signaux de haute importance structurelle et entraverait également le fonctionnement précis des dispositifs de conversion de signal analogique-numérique (Mo et Raftery , 2008) , entraînant une réduction de la sensibilité de détection. La RMN des petites molécules bénéficie également des techniques de suppression du signal de solvant lorsqu'elle est couplée à la chromatographie liquide dans l'étude des fluides d'intérêt biologique (plasma, urine, etc.) ou alimentaire (jus de fruits, boissons alcoolisées, etc.) (Friedbolin , 2011 ;Kew et coll. , 2017) .

Un taux de rejet de signal élevé, une faible perturbation de la ligne de base et une fenêtre de fréquence d'atténuation du signal étroite définissent une technique de suppression de signal de solvant de haute qualité (Zheng et Price , 2010) . Une fenêtre de suppression étroite garantit que les intensités de résonances proches de celle du solvant seront au mieux préservées. La présaturation par résonance du solvant est la plus ancienne de ces techniques et consiste en l'application pendant le délai de relaxation d'un champ radiofréquence (RF) de faible puissance en résonance avec le signal du solvant (Hoult , 1976 ; Ross et al. , 2007) .

La suppression du signal à plusieurs solvants est une nécessité en chromatographie liquide – résonance magnétique nucléaire (LC-RMN) (Parella et al. , 1998) et a été impliquée dans l'étude des interactions des solvants organiques avec les biomolécules (Dalvit , 1998) . Les méthodes de suppression sont dérivées dans ces deux cas de la séquence originale d'impulsions de sculpture d'excitation (Hwang et Shaka , 1995) . Les huit signaux produits parl'eau et l'éthanol peuvent être efficacement atténués par présaturation pour l'étude des boissons alcoolisées par RMN ^{1}H (Monakhova et al. , 2011) . Cependant, la présence de solvants n'est

pas un problème en spectroscopie RMN ^{13}C car leurs raies de résonance sont très nettes, par rapport à la largeur de la fenêtre de fréquence d'observation, et ne sont pas susceptibles de chevaucher celles d'intérêt. Le contexte de la présente étude est la caractérisation par RMN ^{13}C de composés au sein d'extraits naturels (Hubert et al. , 2014 ; Tsujimoto et al. , 2018 ;Bakiri et coll. , 2017) . Les extraits végétaux peuvent être conditionnés sous forme de produits secs ou de solutions dans divers solvants, éventuellement préparés à partir de ressources renouvelables et pour lesquels l'évaporation à sec peut être impossible ou incompatible avec l'intégrité chimique des solutés. Des alcools comme le glycérol, les propanediols, les butanediols et les pentanediols sont utilisés pour de telles applications (Chemat et al. , 2019 ; Shehata et al. , 2015) . Leurs points d'ébullition varient de 188 à 290 $\circ$ C sous pression atmosphérique. La caractérisation des solutés par la spectroscopie RMN ^{13}C peut être réalisée sur des extraits ou sur des fractions obtenues par des méthodes chromatographiques. Les fractions d'intérêt peuvent également contenir une quantité importante de ces solvants à point d'ébullition élevé.

L'acquisition des données RMN de séries d'échantillons est souvent réalisée en mode automatisation avec des paramètres d'acquisition standard. Un étalonnage précis des impulsions sur le canal RF ^{1}H est nécessaire pour enregistrer les spectres ^{13}C{^{1}H} dans des conditions de découplage appropriées. La puissance optimale des impulsions de découplage dépend de la qualité de l'accord de la sonde et de la nature des analytes. Un mauvais calibrage de la puissance du découpleur peut provoquer des artefacts de découplage autour des signaux de solvant intenses, et à un moment donné, leur intensité est comparable à celle des signaux d'intérêt (Blechta et Schraml , 2015) .

Des artefacts de découplage analytiquement trompeurs ont été observés au cours de l'analyse par RMN ^{13}C de fractions chromatographiques contenant du glycérol, même si la sonde était automatiquement réglée avant chaque enregistrement de spectre. L'élimination des artefacts de découplage par la réduction de leurs signaux de glycérol parent a été obtenue par présaturation multisite, en utilisant une modulation multiple du champ RF (Patt , 1992). L'avantage tiré de cette opération n'est pas seulement la réduction d'intensité des signaux de solvant mais également l'élimination des éventuels artefacts qui résultent des signaux de solvant dans des conditions de découplage non optimisées. À notre connaissance, l'élimination du signal de solvant n'a pas été rapportée dans le cadre de la spectroscopie RMN ^{13}C.

L'évaluation de la méthode comprenait la détermination du profil de fréquence de l'atténuation du signal autour des fréquences de présaturation. Les échantillons contenant du 1,2-propanediol montrent des spectres RMN ^{13}C avec deux raies de résonance proches, à quelques Hz l'une de l'autre, en fonction de la concentration. Le profil de saturation correspondant a montré des caractéristiques inattendues qui nous ont incités à étudier en détail la dynamique de spin sous-jacente par simulation numérique. L'effet d'interférence apparent entre les impulsions de saturation rappelle celui observé pour deux impulsions de réponse uniforme (BURP) étroitement décalées en fréquence et sélectives en bande, comme indiqué dans l'article intitulé «Rencontres rapprochées entre impulsions douces» (Kupče et Freeman , 1995). Dans cet article, Ēriks Kupče et Ray Freeman ont démontré que lorsque la différence entre les deux décalages de fréquence a le même ordre de grandeur que la bande passante de l'opération d'impulsion sélective, alors le profil de fréquence de fonctionnement résultant présente un aspect chaotique.

La première partie de la section suivante traite des aspects théoriques simples de la présaturation. Les résultats expérimentaux incluent l'étude d'un échantillon de saccharose dilué dans du glycérol et montrent que la présaturation est efficace pour découpler l'élimination des artefacts et la manipulation d'autres solvants qui présentent jusqu'à quatre résonances telles que le 1,2-propanediol, le 1,3-propanediol, 1, 2-butanediol et 1,3-butanediol.

2 Théorie

La saturation de la résonance en RMN se produit lorsqu'un champ RF est appliqué en continu à une fréquence égale à la fréquence de résonance d'un noyau. La dynamique de magnétisation d'une collection de nombreux spins isolés identiques qui constitue un échantillon macroscopique est régie par les équations de Bloch (Bloch , 1946) . Les composantes M_x , M_y et M_z de l'aimantation macroscopique M , observées dans le référentiel tournant, évoluent comme suit:

$$\begin{aligned}\frac{dM_x}{dt} &= \Omega_0 M_y - \Omega_{1y} M_z - R_2 M_x,\\ \frac{dM_y}{dt} &= \Omega_{1x} M_z - \Omega_0 M_x - R_2 M_y,\\ \frac{dM_z}{dt} &= \Omega_{1y} M_x - \Omega_{1x} M_y - R_1 \left(M_z - M_z^{eq}\right),\end{aligned} \tag{1}$$

où Ω_0 est la fréquence angulaire de précession des noyaux, Ω_1 est la norme du vecteur de nutation exprimée en fréquence angulaire, et (Ω_{1x} , Ω_{1y}) sont les composantes de ce dernier sur les axes X et Y du cadre rotatif. La relaxation de spin nucléaire est phénoménologiquement décrite par les deux constantes de vitesse R_1 et R_2 définies comme les inverses des temps de relaxation longitudinale et transversale T_1 et T_2 , respectivement. M_z^{eq} désigne la valeur de l'aimantation nucléaire à l'équilibre de l'échantillon et intervient dans la description de la relaxation longitudinale. Dans le cas $\Omega_0 = 0$ d'un champ RF appliqué d'intensité constante à la résonance, les composantes du vecteur d'aimantation tendent vers une limite stationnaire pour laquelle

$$M_z^{stat} = \frac{M_z^{eq}}{1 + \Omega_1^2 T_1 T_2}. \tag{2}$$

Si $\Omega_1^2 T_1 T_2 \gg 1$ alors l'aimantation stationnaire est bien inférieure à celle d'équilibre, correspondant à une égalisation des populations d'état de spin induite par le champ RF, comme attendu de la saturation.

La suppression du signal de solvant en spectroscopie RMN peut être obtenue par saturation sélective d'un ou plusieurs signaux de solvant pendant le délai de relaxation. Cette technique est appelée présaturation car elle précède l'excitation non sélective des résonances de l'échantillon. La présaturation sur un seul site estfacilement réalisé par irradiation RF en onde continue. La présaturation multisite repose sur des impulsions laminaires à fréquences multiples décalées, une espèce particulière d'impulsion façonnée (Patt , 1992) . Une telle impulsion mise en forme sert de module de présaturation de durée T et est appliquée de manière répétitive à l'échantillon de sorte que le temps d'irradiation RF global soit égal au retard de relaxation souhaité. Un module de présaturation est constitué de N impulsions élémentaires, nommées tranches ci-après, de durée δt telle que $T = N\,\delta t$. La création d'un module nécessite la définition de T , N, le nombre n de sites de présaturation et la liste des décalages de fréquence Ω_k^{sat} associé à chaque site. Les valeurs de Ω_{1x} et Ω_{1y} sont obtenues à partir de

$$\begin{aligned}&\left(\Omega_{1x} + i\Omega_{1y}\right)(t_j)\\ &\quad = \frac{\Omega_1}{n} \sum_{k=0}^{n-1} \exp\left(i\Omega_k^{sat} \cdot j\delta t\right) \quad \text{for } 0 \le j < N,\end{aligned} \tag{3}$$

qui stipule que les intensités de champ RF sont également réparties entre les n sites et les phases sont arbitrairement fixées à zéro à $t = 0$.

Les valeurs de Ω_k^{sat} sont calculées par rapport à une fréquence porteuse auxiliaire déterminée comme la moyenne des décalages les plus élevés et les plus bas des signaux à présaturer. L'émission de l'impulsion de présaturation doit prendre en compte la différence entre la fréquence auxiliaire et la fréquence réelle de l'émetteur, ce que l'on appelle le décalage d'impulsion façonné, comme décrit sur la figure 1 . La valeur de δt est choisie de telle sorte que l'angle de précession le plus élevé $|\Omega_k^{sat}|\delta t$ pour le plus grand $|\Omega_k^{sat}|$ pendant ce temps doit être maintenu en dessous d'une petite valeur seuil de l'ordre de $\pi/15$. La valeur de N doit être aussi élevée que possible et dépend de la taille de la mémoire disponible pour les impulsions mises en forme dans le séquenceur de programmes d'impulsions. N = 50 000 a été utilisé tout au long de la présente étude. Le produit $N\delta t$ détermine la durée d'impulsion T . En variante, T peut être choisi de telle sorte que le plus grand angle de précession pendant δt tombe sous le seuil prédéfini pour la valeur retenue de N .

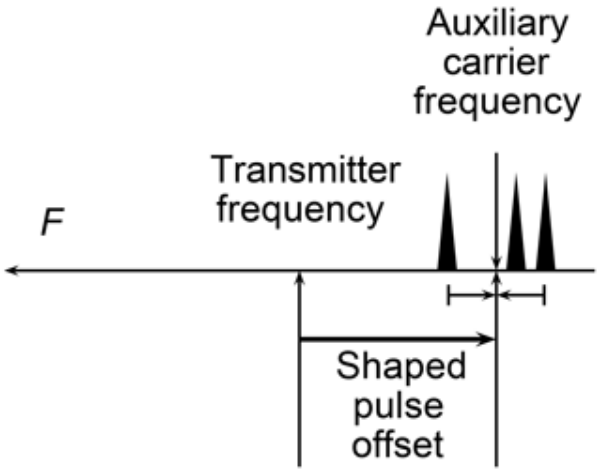

Figure 1. Définition du décalage des impulsions en forme de présaturation dans un spectre schématique. Les triangles noirs étroits représentent les pics de solvant. La fréquence porteuse auxiliaire est définie comme la moyenne des fréquences de résonance du solvant la plus élevée et la plus basse. Le décalage de l'impulsion en forme de présaturation est la différence entre la fréquence porteuse auxiliaire et la fréquence réelle de l'émetteur.

La simulation d'un ensemble de profils de saturation comme celui de la figure 2 nécessite tout d'abord la création d'une table de N valeurs de Ω_{1x} et de Ω_{1y} selon l'Eq. (3). Les fréquences de décalage de résonance du noyau $\Omega_0/2\pi$ sont ensuite sélectionnées de manière répétitive pour le calcul de l'effet de présaturation à partir d'un ensemble de valeurs linéairement espacées entre un minimum et un maximum. A partir d'un vecteur d'aimantation dans sa position d'équilibre, on évalue l'action qu'il subit de la série de modules de présaturation. La fréquence de décalage et la quantité finale d'aimantation longitudinale $M_z$sont imprimés dans un fichier informatique de sorte qu'un graphique de M_z ($\Omega_0/2\pi$) puisse être dessiné pour l'ensemble choisi de valeurs de Ω_0. L'action d'un module de présaturation est déterminée par l'action de la série de ses tranches constitutives. L'action de chaque tranche d'impulsion façonnée doit être calculée par résolution du système d'équations de Bloch (équation 1) sur la durée δt , même si une méthode différente a été suivie, comme expliqué ci-après.

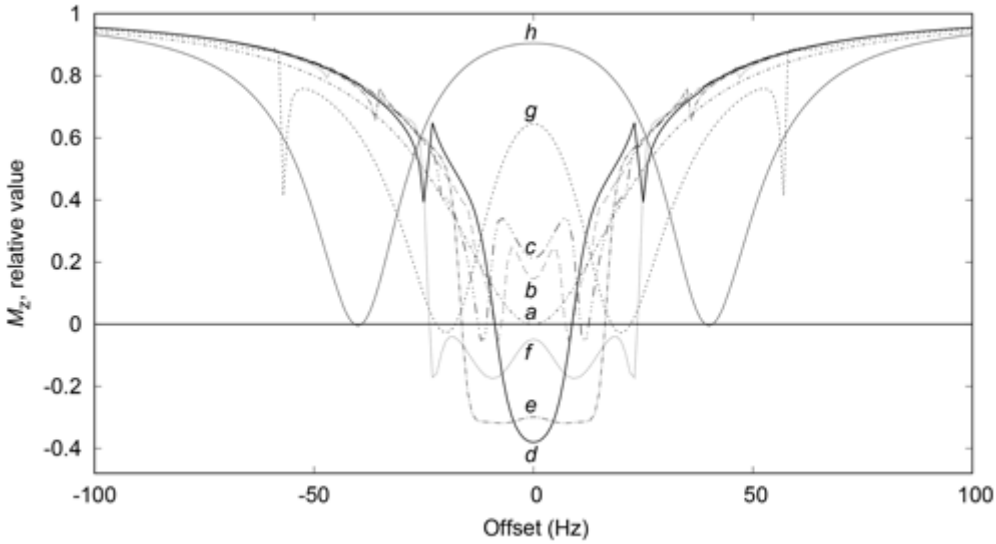

Figure 2. Profils de saturation pour la présaturation sur deux sites, à $\pm\Omega^{sat}/2\pi$ pour $\Omega^{sat}/2\pi$=0, 2, 4, 6, 8 10, 20, 40 Hz , correspondant aux traces a à h . Les temps de relaxation T_1 et T_2 sont tous deux égaux à 0,5 s . Le retard de relaxation dure 5 s pendant lesquelles 10 modules de présaturation de 0,5 s chacun sont appliqués. Chaque module est composé de 50000 tranches, pour lesquelles les valeurs Ω_{1x} et Ω_{1y} sont calculées avec $\Omega_1/2\pi$=50 Hz .

Des solutions exactes des équations de Bloch ont été rapportées, mais présentent un certain degré de complexité (Canet et al. , 1994 ; Madhu et Kumar , 1995) . Ils prennent en compte simultanément les processus de précession d'aimantation, de nutation et de relaxation. L'approche suivie ici utilise une solution

approximative facile à mettre en œuvre. Elle repose sur l'observation que l'évolution de l'aimantation induite par la relaxation seule est lente par rapport à celle induite par la précession et la nutation simultanées. L'évolution de M uniquement sous précession et nutation reprend à une rotation à fréquence angulaire Ω eff , la norme du vecteur $\Omega^{eff}(\Omega_{1X},\Omega_{1y},\Omega_0)$ lorsqu'ils sont signalés dans le cadre de référence rotatif. L'axe de rotation est défini par le vecteur unitaire $u=\Omega^{eff}/\Omega^{eff}$. Pour des calculs pratiques, il faut exprimer les éléments de la matrice de rotation $R_{u,\theta}$ dans laquelle $\theta = \Omega^{eff}\,\delta t$ et $u(u_x, u_y, u_z)$.

$$\begin{aligned}\mathbf{R}_{u,\theta} &= \cos\theta \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \\ &+ (1-\cos\theta) \begin{pmatrix} u_x^2 & u_x u_y & u_x u_z \\ u_x u_y & u_y^2 & u_y u_z \\ u_x u_z & u_y u_z & u_z^2 \end{pmatrix} \\ &+ \sin\theta \begin{pmatrix} 0 & -u_z & u_y \\ u_z & 0 & -u_x \\ -u_y & u_x & 0 \end{pmatrix} \end{aligned} \tag{4}$$

La relaxation seule est prise en compte par la transformation suivante de M .

$$\begin{aligned}&(M_x, M_y, M_z) \\ &\longrightarrow \left(M_x e^{-R_2\delta t}, M_y e^{-R_2\delta t}, M_z^{eq} + (M_z - M_z^{eq})e^{-R_1\delta t}\right)\end{aligned} \tag{5}$$

L'évolution de M pendant une tranche de temps de durée δt est simplement calculée par l'application successive de transformations de rotation et de relaxation. L'approximation qui consiste à alterner rotation et relaxation au lieu de les considérer simultanément s'améliore lorsque δt tend vers zéro. Un intervalle de temps δt donné peut être divisé en deux (ou plus) parties et le remplacement de la rotation(δt)–relaxation(δt) par deux rotations($\delta t/2$)–relaxation($\delta t/2$) consécutifs fournit un moyen d'évaluer l'erreur induite par la méthode de calcul proposée.

Une approche identique à la résolution de l'équation de Bloch a été utilisée pour l'optimisation des BURP en présence de relaxation, conduisant à la conception d'impulsions avec une silhouette largement insensible aux processus de relaxation (SLURP), pour lesquelles les détails de calcul sous-jacents n'ont pas été rapportés (Nuzillard et Freeman , 1994) . L'action de la relaxation sur les profils de domaine fréquentiel des BURP a été recalculée en utilisant des solutions exactes des équations de Bloch et les résultats étaient visuellement identiques à ceux dérivés du traitement approximatif (Canet et al. , 1994) .

3 Résultats

L'effet indésirable sur les spectres RMN ^{13}C de la présence de glycérol à des concentrations élevées a été reproduit par l'analyse d'une solution de saccharose (29 mM) dans du diméthylsulfoxyde perdeutéré (DMSO-d 6) auquel du glycérol (3,62 M) a été ajouté. Cet échantillon constitue une bonne approximation d'un cas réel, car les extraits de plantes préparés industriellement sont souvent livrés sous forme de solutions dans des solvants à haut point d'ébullition comme le glycérol, à des concentrations de métabolites proches ou inférieures à celle du saccharose dans notre préparation modèle.

La figure 3a présente le spectre RMN ^{13}C du saccharose dans du glycérol et sa comparaison avec le spectre RMN ^{13}C du seul saccharose dans DMSO-d_6. Le spectre sur la Fig. 3c montre le signal résiduel du DMSO-d_6 et les 12 pics à partir du saccharose, avec ceux de δ 73,13 et δ 73,15 pas bien résolus. Le glycérol a clairement introduit des signaux inattendus dans les spectres, certains avec des phases anormales, mais d'autres qui peuvent être considérés comme authentiques, créant ainsi une confusion dans l'analyse d'échantillons inconnus. Le glycérol introduit également des pics qui proviennent de composés côté

production présents à des concentrations très faibles mais détectables. Une origine possible des signaux d'artefact a d'abord été recherchée dans une possible saturation du récepteur du spectromètre ou un problème lié à l'intermodulation; la modification du gain du récepteur n'a pas influencé leur position et leur phase, de sorte que cette hypothèse n'a pas été examinée plus avant (Marshall et Verdun , 1990) . Le gain du récepteur a été réglé à sa valeur maximale dans toutes les expériences suivantes.

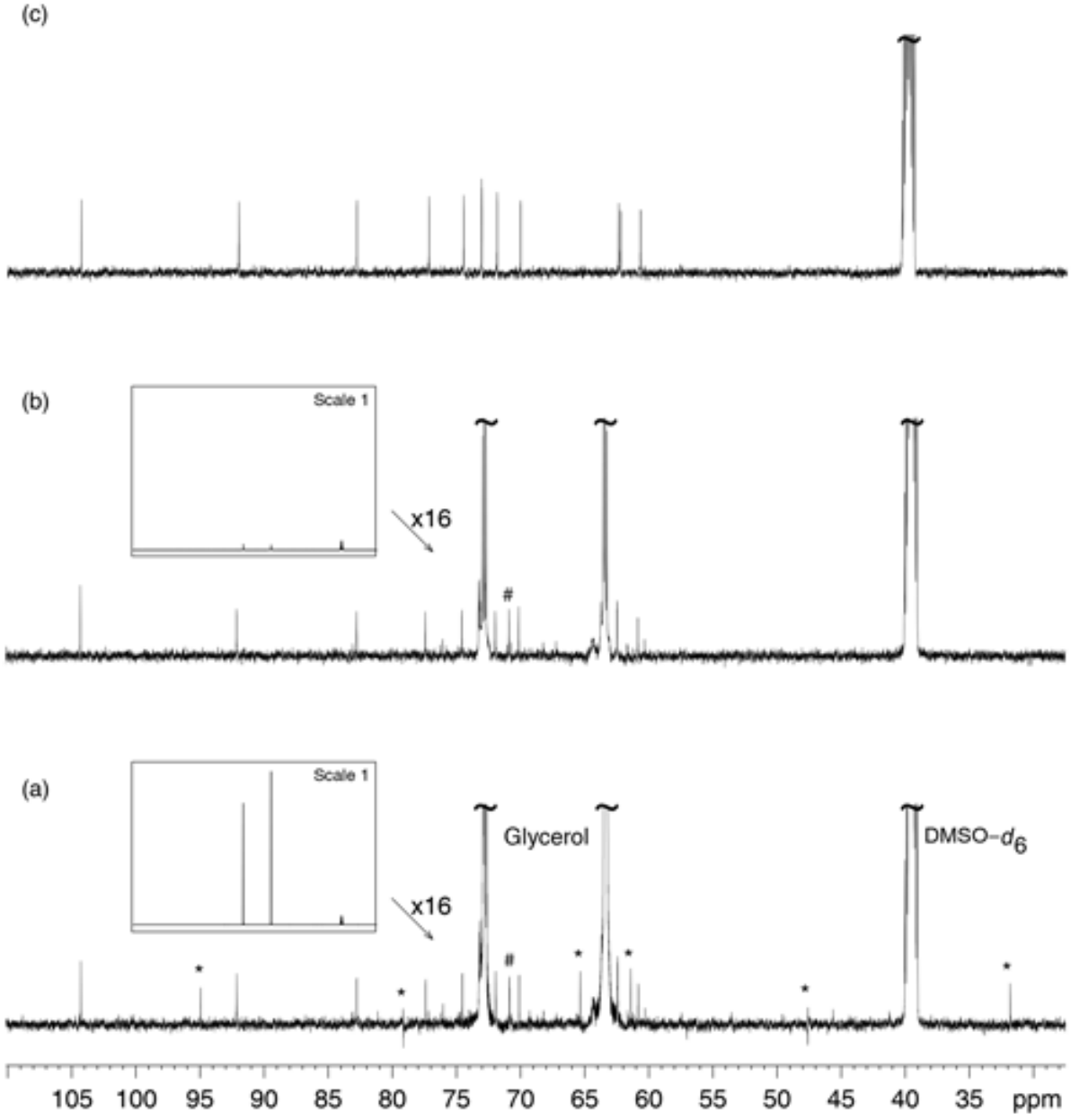

Figure 3 (a) Spectre RMN ^{13}C du D (+) - saccharose (24 mM) et du glycérol (3,6 M) dans du DMSO-d_6 . Le signe «*» indique les artefacts de découplage. Le signe «#» indique un signal provenant d'un composé mineur contenu dans le glycérol biosourcé. (b) Analyse du même échantillon qu'en (a) mais avec plusieurs présaturation des signaux glycérol. Les inserts encadrés montrent des aperçus des spectres dessinés à pleine échelle verticale. Dans le spectre (a), les pics de résonance du DMSO-d_6 (les plus à droite) sont beaucoup plus petits que ceux du glycérol tandis que dans (b)ces derniers sont à peine visibles, démontrant ainsi l'efficacité de l'élimination des pics de résonance du glycérol. (c) Spectre RMN ^{13}C du D (+) - saccharose (24 mM) dans du DMSO-d_6 . Toutes les acquisitions ont nécessité l'enregistrement de 128 scans précédés de 8 scans factices.

Le découplage hétéronucléaire à large bande constitue une autre source d'artefacts dans les spectres RMN ^{13}C { ^{1}H }. Un ajustement approprié de la puissance dans le canal ^{1}H est nécessaire pour l'enregistrement d'un spectre ^{13}C optimal, sans artefact avec découplage d'impulsions composite WALTZ-16 (Shaka et al. , 1983) . De légers changements dans la puissance RF de découplage ont entraîné des changements de

position et de phase d'artefacts. Les signaux les plus forts étant de loin ceux du glycérol, leur réduction de l' intensité introduit l'intensité de l' artefact de découplage au- dessous du niveau de bruit comme le montre la Fig. 3b. De toute évidence, un meilleur étalonnage des impulsions RF dans le canal du découpleur réduirait également, voire éliminerait, les artefacts de découplage. Aucune tentative n'a été entreprise pour étudier d'autres programmes de découplage. L'enregistrement d'une série d'échantillons en mode automatisé avec un passeur d'échantillons ne favorise pas l'étalonnage d'une impulsion RF de découpleur sur une base échantillon à échantillon, de sorte que l'étude d'une forte réduction du signal a été entreprise. La réduction du signal du glycérol en RMN ^{13}C a été obtenue par présaturation. Comme observé sur la Fig. 3 b, ce qui réduit l'intensité des signaux de solvants en double pré - saturation enlevé des artefacts de découplage, et les signaux observés seulement ont été soulevées à partir des composés présents dans l'échantillon. Cette procédure était réalisée sur plus de 30 échantillons d'extraits naturels dilués dans du glycérol. La caractérisation de la présaturation du signal du glycérol a ensuite été entreprise au moyen d'un échantillon constitué uniquement de glycérol dans le DMSO-d_6 . L'étude s'est appuyée sur la séquence d'impulsions de la figure 4 , qui est une adaptation simple de zgpg de la bibliothèque TopSpin, dans laquelle la présaturation est mise en œuvre comme l'émission répétée d'une impulsion en forme de RF. Le programme de phase minimale en deux étapes garantit que les pics sont tous phasés de la même manière et que leur hauteur est proportionnelle à la quantité d'aimantation longitudinale présente à la fin de la période de présaturation. Le glycérol, $C_3H_8O_3$, ne produit que deux signaux RMN ^{13}C par symétrie, situés en δ_A 63,7 et δ_B 73,1 . Pré - saturation par onde continue à un seul site, A ou B, dans les deux cas pour résultat une réduction de l' intensité du signal de 99% , tandis que pré - saturation simultanée sur les sites A et B a provoqué une atténuation meilleure que 97%, comme le montre la Fig. 5 .

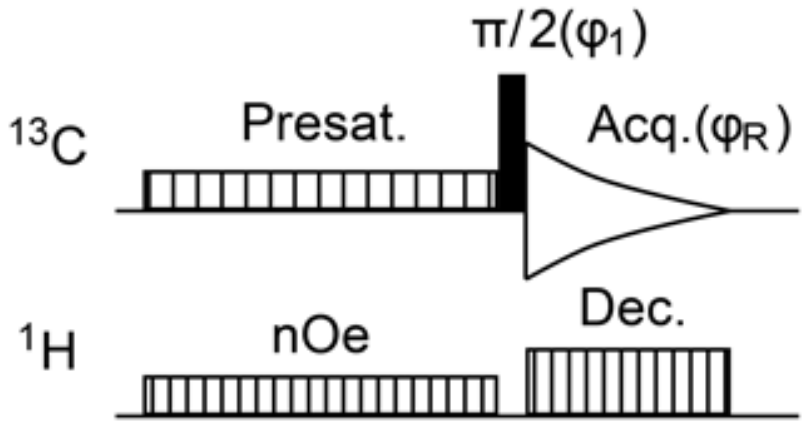

Figure 4. Séquence d'impulsions pour l'enregistrement de spectres ^{13}C { ^{1}H } avec amélioration de la sensibilité par transfert de magnétisation par effet Overhauser nucléaire à partir de noyaux ^{1}H et avec présaturation des résonances de solvant. Le programme de phase minimale est $\phi_1=\phi_R=(0,\pi)$.

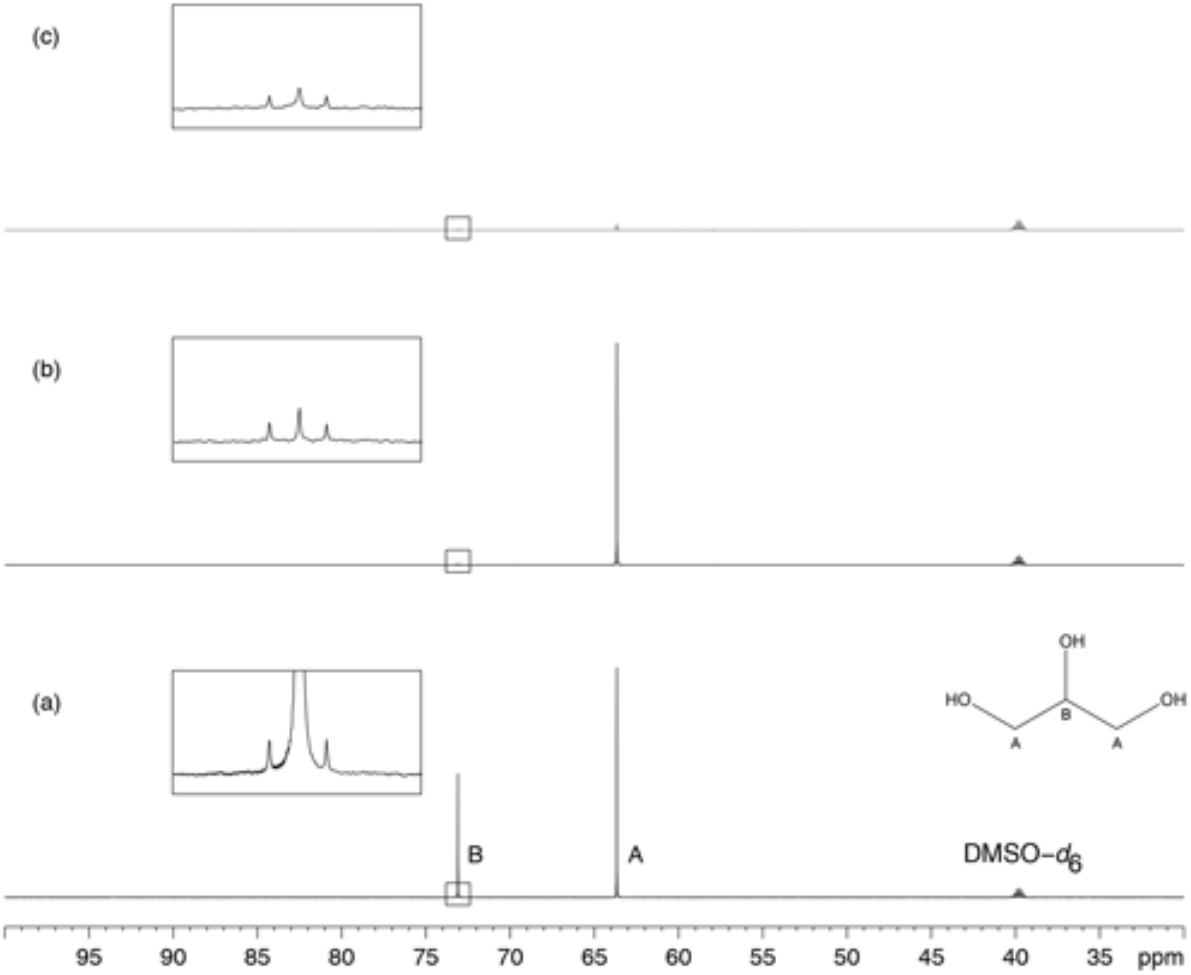

Figure 5. Présaturation du glycérol dans le DMSO-d_6 . (a) Spectre RMN ^{13}C du glycérol. Les signaux des sites A et B sont situés en δ_A 63,7 et δ_B 73,1 . (b) Effet de la présaturation unique au site B. (c) Effet de la présaturation simultanée aux sites A et B. Les modules de présaturation durent T = 1 s et sont appliqués avec une intensité maximale $\Omega_1/2\pi$ de 11,7 Hz . Toutes les acquisitions ont nécessité l'enregistrement de 8 scans précédés de 4 scans factices.

Des profils de saturation expérimentaux ont été mesurés afin d'évaluer la largeur de la bande de fréquence concernée par l'atténuation du signal. Dans ce but, le décalage de fréquence de l'impulsion de présaturation a été varié par pas de 1 Hz autour de la valeur qui correspond à l'application de champ RF en résonance. La largeur de bande de présaturation est définie par l'intervalle de décalages de fréquence dans lequel l'intensité du signal est réduite d'au moins 50%. Le profil du signal de la position A en glycérol présentait une forme de cloche dont la pleine largeur à mi-hauteur était de 15 Hz pour $\Omega_1/2\pi$=11,7 Hz , ce qui représente une largeur de bande de 0,1 ppm à 151 MHz (fig. 6). Une largeur similaire, 0,09 ppm,a été mesuré pour la présaturation au site B. Les profils sont ceux attendus pour une présaturation multisite de deux résonances très largement séparées, comme celles du glycérol, avec une différence de position du pic de 9,43 ppm (soit 1424 Hz). De telles zones étroites d'atténuation du signal sont compatibles avec l'identification pratique des composés dissous.

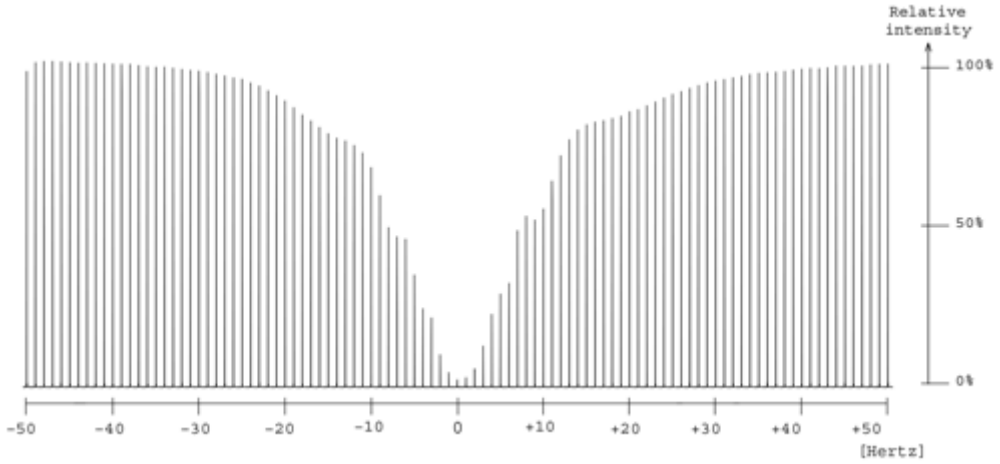

Figure 6. Mesure de la largeur de l'intervalle de fréquence pour lequel la présaturation entraîne une diminution d'au moins 50% de l'intensité du signal A (δ 63,7) en modifiant la fréquence auxiliaire par pas de 1 Hz de -50 Hz à +50 Hz .

La puissance des impulsions RF de présaturation influence l'aimantation longitudinale résiduelle en résonance et donc l'intensité du signal résiduel. Cette puissance doit être suffisamment faible pour maintenir la bande de présaturation suffisamment étroite et suffisamment élevée pour obtenir une suppression de signal utile. Cinq expériences (non représentées) ont été réalisées en réduisant la puissance de l'intensité des impulsions RF de 58,7 à 5,9 Hz . L'intensité des deux signaux résiduels était similaire: l'atténuation du signal était toujours d'au moins 95%. Sur la base de ce résultat, une intensité de 11,7 Hz a été retenue pour les impulsions de présaturation dans tous les enregistrements spectraux ultérieurs.

Tableau 1. Caractéristiques de présaturation obtenues sur les solvants lourds sélectionnés. Le signe «*» indique une perturbation du profil de présaturation due à des résonances à fréquence proche.

Matrix	Chemical shift (ppm)	Attenuation (%)	Bandwidth (Hz)
Glycerol	63.66	97	15
	73.09	97	14
1,2-Propanediol	20.36	95	20
	67.83	95	42*
	67.89	95	46*
1,3-Propanediol	36.24	94	36
	58.72	99	23
1,2-Butanediol	10.47	98	5
	26.68	99	5
	66.13	99	11
	73.13	99	6
1,3-Butanediol	24.32	98	10
	42.40	98	10
	58.86	98	11
	64.20	96	12

La présaturation à sites multiples a été étendue à d'autres solvants lourds utilisés comme agents d'extraction de produits naturels: 1,2-propanediol, 1,3-propanediol, 1,2-butanediol et 1,3-butanediol. Pour tout sauf le 1,2-propanediol, la présaturation a réduit l'intensité du signal du solvant d'au moins 94%. Une présaturation a également été effectuée sur des échantillons contenant du saccharose et chacun des solvants lourds mentionnés ci-dessus. Les spectres enregistrés avec et sans présaturation ainsi que les données RMN brutes correspondantes sont disponibles pour téléchargement. Comme prévu, la présaturation a entraîné une forte diminution des signaux ciblés et l'élimination des artefacts de découplage. Le tableau 1 résume les résultats

obtenus pour chaque solvant lourd, concernant l'atténuation du signal et la largeur de bande d'atténuation du signal.

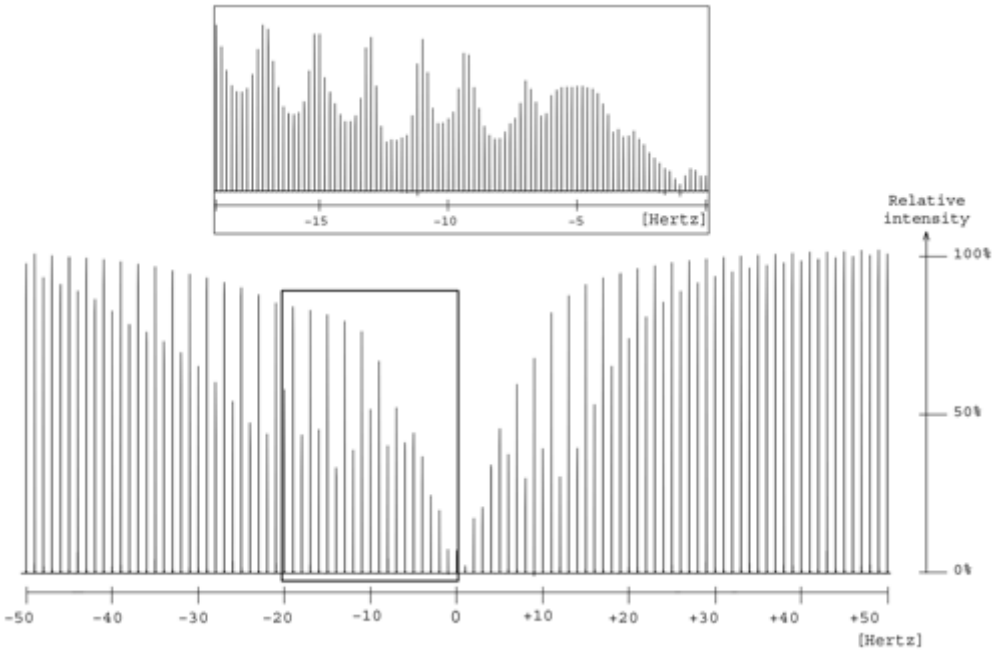

Figure 7. Profil de présaturation dans la région de deux carbones oxygénés pour le 1,2-propanediol. Un focus est effectué entre 0 et -20 Hz pour rendre la partie ondulée du profil plus visible.

L'élimination des résonances ^{13}C du 1,2-propanediol a conduit à un profil de présaturation inattendu dans la région de deux carbones oxygénés, en raison de leurs valeurs de déplacement chimique très proches, 67,8 et 67,9 ppm, comme le montre la figure 7 . Le profil montrait des caractéristiques irrégulières déroutantes qui ont motivé la réalisation d'un travail de simulation numérique. Dans ce cas $\delta\Omega^{sat}/2\pi$=10 Hz. Le profil simulé sur la Fig. 2 f, correspondant à un décalage de 10 Hz, présente des similitudes avec celui expérimentale comme indiqué dans la Fig. 7 cadre de zoom. En effet, un effet ondulé est également observé à ± 20 Hz de décalage autour de la résonance. Ce phénomène génère une bande passante pour les deux signaux proches du 1,2-propanediol (δ 63,8) supérieure à celle du signal isolé (δ 20,4), respectivement 46 et 20 Hz . Cependant, puisque 46 Hz correspond à 0,3 ppm sur notre spectromètre, ce résultat est toujours acceptable.

La suppression du signal de solvant a été automatisée pour les cinq solvants étudiés au moyen de scripts informatiques écrits en langage C. La création de l'impulsion mise en forme du module de présaturation a été réalisée en enregistrant d'abord un spectre ^{13}C { ^{1}H } avec la séquence d'impulsions zgpg (en notant les fréquences de résonance du solvant par sélection de pic de spectre), en calculant la fréquences $\Omega^{sat}_{k}/2\pi$ et le décalage d'impulsion formé, et générer le fichier de définition de forme d'onde RF correspondant.

4 Expériences

Des solutions de glycérol, 1,2-propanediol, 1,3-propanediol, 1,2-butanediol et 1,3-butanediol ont été préparées en ajoutant 200 mg de chacun à 0,6 mL de DMSO- d_6 . Cela correspond à des échantillons à forte concentration: 3,62 M pour le glycérol, 4,38 M pour les propanediols et 3,70 M pour les butanediols. Le 1,2-propanediol et le D (+) - saccharose ont été achetés auprès de VWR. Le 1,3-propanediol et le 1,3-butanediol ont été achetés auprès d'Alfa Aesar. Le 1,2-butanediol a été acheté auprès de Sigma Aldrich. L'échantillon contenant du D (+) - saccharose (29 mM) et du glycérol dans 0,6 mL de DMSO-d_6 a été laissé une nuit à température ambiante pour obtenir une solution homogène.

Toutes les expériences ont été effectuées à 298 K sur un spectromètre Bruker Avance AVIII-600 (Karlsruhe, Allemagne) équipé d'une cryosonde optimisée pour ^{1}H détection et refroidi avec ^{1}H , ^{13}C et 2 H bobines et préamplificateurs. Les spectres RMN ^{13}C ont été acquis à 150,91 MHz , avec une largeur spectrale de 36 kHz et un enregistrement de points de données complexes de 32 K, résultant en un temps d'acquisition FID

de 0,91 s . La longueur d'impulsion d'excitation était de 13,7 µs et le délai de relaxation était de 3 s. Les spectres ont été référencés pour un signal central de DMSO-d_6 à δ 39,52.

Le code source informatique utilisé dans la présente étude a été écrit en langage C; il s'appuyait sur la bibliothèque libxml2 pour la lecture du fichier de données d'entrée (cela peut être une surcharge pour une telle tâche, certes) et sur la bibliothèque libsimu1 pour le calcul des matrices de rotation au moyen de l'Eq. (4), comme programmé pour la conception d'impulsions SLURP. Le fichier d'archive libsimu1 contient également une preuve d'Eq. (4). Le code informatique des simulations de saturation est disponible sur GitHub; son installation a été testée avec Cygwin sous Windows 10 mais devrait être réalisée facilement sur toute autre plate-forme fournissant un compilateur en langage C et des outils de type UNIX.

5 Conclusions

Le présent travail propose une méthode de saturation d'intenses résonances de solvants en spectroscopie RMN ^{13}C , telles que celles intervenant lors de l'analyse d'extraits de plantes complexes préparés dans des solvants à haut point d'ébullition. La réduction du signal de ces solvants a été obtenue avec succès en utilisant la technique de présaturation multisite.

La simulation numérique nous a donc permis de comprendre l'origine d'un profil de présaturation inattendu lié à la saturation des résonances de fréquences proches, même si elle ne prend en compte ni les défauts instrumentaux tels que les inhomogénéités des champs B_0 et B_1 , ni la relaxation incomplète entre les enregistrements de signaux transitoires. L'évolution de l'aimantation de l'échantillon a été déterminée par l'utilisation d'une simple approximation pour la résolution des équations de Bloch qui pourraient trouver des applications dans d'autres contextes. Cette approche offre des perspectives dans la suppression du signal d'autres matrices d'échantillons naturels et dans l'analyse quantitative RMN ^{13}C d'extraits dilués dans des solvants à point d'ébullition élevé.

Disponibilité du code et des données.

Le code source de PresatSimul est disponible sur https://github.com/nuzillard/PresatSimul (dernier accès: 30 juin 2020) (Nuzillard , 2020 b) . Le code source de libsimu1 est disponible sur https://github.com/nuzillard/Libsimu1 (dernier accès: 30 juin 2020) (Nuzillard , 2020 a) . Les fichiers de données, la séquence d'impulsions et le script à partir desquels les Fig. 3 et 5 ont été obtenus et une figure supplémentaire et la légende peuvent être téléchargées sur https://doi.org/10.5281/zenodo.3635970 (Canton et al. , 2020).

Contributions d'auteur.

MC a préparé les échantillons RMN; spectres enregistrés, traités et analysés; et a écrit des parties du papier. JMN a supervisé le projet, a écrit le code informatique pour les simulations numériques et pour l'acquisition automatisée des données, et a également rédigé des parties de l'article. SP, RR et JHR ont examiné le texte et les figures du document. JHR et JMN ont supervisé les travaux de thèse de doctorat de MC, qui sont liés aux développements méthodologiques dans le fractionnement d'extraits de plantes et le profilage chimique par RMN. Tous les auteurs ont lu et approuvé l'article final.

Intérêts concurrents.

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts.

Remerciements.

Agathe Martinez et Anthony Robert de l'ICMR sont reconnaissants pour leur soutien technique. Le glycérol a été gracieusement offert par Pierre Fabre Dermo-Cosmétique.

Aide financière.

Un soutien financier a été apporté par le CNRS, le Conseil Régional Champagne Ardenne, le Conseil Général de la Marne, le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR) et le programme européen FEDER au projet PlAneT CPER. Les Laboratoires Pierre Fabre Dermocosmétique et l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie ont également apporté un soutien financier à travers la bourse CIFRE no. 2017/1032.

Examen

Cet article a été édité par Marcel Utz et révisé par deux arbitres anonymes.

Références

- Bakiri, A., Hubert, J., Reynaud, R., Lanthony, S., Harakat, D., Renault, J.-H., and Nuzillard, J.-M.: Computer-Aided 13C NMR Chemical Profiling of Crude Natural Extracts without Fractionation, J. Nat. Prod., 80, 1387–1396, https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01063, 2017.
- Blechta, V. and Schraml, J.: NMR artifacts caused by decoupling of multiple-spin coherences: improved SLAP experiment, Magn. Reson. Chem., 53, 460–466, https://doi.org/10.1002/mrc.4221, 2015.
- Bloch, F.: Nuclear Induction, Phys. Rev., 70, 460–474, https://doi.org/10.1103/PhysRev.70.460, 1946.
- Canet, D., Roumestand, C., and Boubel, J.-C.: A general computer program for calculating selectivity profiles in NMR spectroscopy, Proceedings – Indian Academy of Sciences Chemical Sciences, 106, 1449–1462, 1994.,
- Canton, M., Roe, R., Poigny, S., Renault, J.-H., and Nuzillard, J.-M.: Multiple solvent signal presaturation and decoupling artifact removal in 13C{1H} NMR (Version 0.0.1), Zenodo, https://doi.org/10.5281/zenodo.3635970, 2020.
- Chemat, F., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Strube, J., Uhlenbrock, L., Gunjevic, V., and Cravotto, G.: Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges, TrAC-Trend. Anal. Chem., 118, 248–263, https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.037, 2019.
- Chen, J., Zheng, G., and Price, W. S.: A new phase modulated binomial-like selective-inversion sequence for solvent signal suppression in NMR, Magn. Reson. Chem., 55, 115–119, https://doi.org/10.1002/mrc.4505, 2017.
- Dalvit, C.: Efficient multiple-solvent suppression for the study of the interactions of organic solvents with biomolecules, J. Biomol. NMR, 11, 437–444, https://doi.org/10.1023/A:1008272928075, 1998.
- Duarte, C. J., Colnago, L. A., de Vasconcellos Azeredo, R. B., and Venâncio, T.: Solvent Suppression in High-Resolution 1H NMR Spectroscopy Using Conventional and Phase Alternated Continuous Wave Free Precession, Appl. Magn. Reson., 44, 1265–1280, https://doi.org/10.1007/s00723-013-0482-6, 2013.
- Friedbolin, H.: Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy, Wiley-VCH, 5th edn., 2011.
- Gouilleux, B., Charrier, B., Akoka, S., and Giraudeau, P.: Gradient-based solvent suppression methods on a benchtop spectrometer, Magn. Reson. Chem., 55, 91–98, https://doi.org/10.1002/mrc.4493, 2017.
- Hoult, D.: Solvent peak saturation with single phase and quadrature fourier transformation, J. Magn. Reson., 21, 337–347, https://doi.org/10.1016/0022-2364(76)90081-0, 1976.
- Hubert, J., Nuzillard, J.-M., Purson, S., Hamzaoui, M., Borie, N., Reynaud, R., and Renault, J.-H.: Identification of Natural Metabolites in Mixture: A Pattern Recognition Strategy Based on 13C NMR, Anal. Chem., 86, 2955–2962, https://doi.org/10.1021/ac403223f, 2014.
- Hwang, T. and Shaka, A.: Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients, J. Magn. Reson., Series A, 112, 275–279, https://doi.org/10.1006/jmra.1995.1047, 1995.
- Kew, W., Bell, N. G., Goodall, I., and Uhrín, D.: Advanced solvent signal suppression for the acquisition of 1D and 2D NMR spectra of Scotch Whisky, Magn. Reson. Chem., 55, 785–796, https://doi.org/10.1002/mrc.4621, 2017.
- Kupče, Ē. and Freeman, R.: Close Encounters between Soft Pulses, J. Magn. Reso., Series A, 112, 261–264, https://doi.org/10.1006/jmra.1995.1043, 1995.
- Lee, D., Chaudhari, S. R., and Paëpe, G. D.: Solvent signal suppression for high-resolution MAS-DNP, J. Magn. Reson., 278, 60–66, https://doi.org/10.1016/j.jmr.2017.03.012, 2017.
- Madhu, P. and Kumar, A.: Direct Cartesian-Space Solutions of Generalized Bloch Equations in the Rotating Frame, J. Magn. Reson., Series A, 114, 201–211, https://doi.org/10.1006/jmra.1995.1127,

1995.
- Marshall, A. G. and Verdun, F. R.: Chapter 4 – Fourier Transform Spectrometry: Common Features, in: Fourier Transforms in NMR, Optical, and Mass Spectrometry, edited by: Marshall, A. G. and Verdun, F. R., Elsevier, Amsterdam, 95–140, https://doi.org/10.1016/B978-0-444-87360-6.50009-1, 1990.
- Mo, H. and Raftery, D.: Pre-SAT180, a simple and effective method for residual water suppression, J. Magn. Reson., 190, 1–6, https://doi.org/10.1016/j.jmr.2007.09.016, 2008.
- Monakhova, Y. B., Schäfer, H., Humpfer, E., Spraul, M., Kuballa, T., and Lachenmeier, D. W.: Application of automated eightfold suppression of water and ethanol signals in 1H NMR to provide sensitivity for analyzing alcoholic beverages, Magn. Reson. Chem., 49, 734–739, https://doi.org/10.1002/mrc.2823, 2011.
- Nuzillard, J.-M.: Libsimu1, GitHub, available at: https://github.com/nuzillard/Libsimu1, last access: 30 June 2020.
- Nuzillard, J.-M.: PresatSimul, GitHub, available at: https://github.com/nuzillard/PresatSimul, last access: 30 June 2020.
- Nuzillard, J.-M. and Freeman, R.: Band-Selective Pulses Designed to Accommodate Relaxation, J. Magn. Reson., Series A, 107, 113–118, https://doi.org/10.1006/jmra.1994.1056, 1994.
- Parella, T., Adell, P., Sánchez-Ferrando, F., and Virgili, A.: Effective multiple-solvent suppression scheme using the excitation sculpting principle, Magn. Reson. Chem., 36, 245–249, https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-458X(199804)36:4<245::AID-OMR264>3.0.CO;2-J, 1998.
- Patt, S. L.: Single- and multiple-frequency-shifted laminar pulses, J. Magn. Reson., 96, 94–102, https://doi.org/10.1016/0022-2364(92)90289-J, 1992.,
- Ross, A., Schlotterbeck, G., Dieterle, F., and Senn, H.: Chapter 3 – NMR Spectroscopy Techniques for Application to Metabonomics, in: The Handbook of Metabonomics and Metabolomics, edited by: Lindon, J. C., Nicholson, J. K., and Holmes, E., Elsevier Science B.V., Amsterdam, 55–112, https://doi.org/10.1016/B978-044452841-4/50004-7, 2007.
- Shaka, A., Keeler, J., and Freeman, R.: Evaluation of a new broadband decoupling sequence: WALTZ-16, J. Magn. Reson., 53, 313–340, https://doi.org/10.1016/0022-2364(83)90035-5, 1983.
- Shehata, E., Grigorakis, S., Loupassaki, S., and Makris, D. P.: Extraction optimisation using water/glycerol for the efficient recovery of polyphenolic antioxidants from two Artemisia species, Sep. Purif. Technol., 149, 462–469, https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.06.017, 2015.
- Tsujimoto, T., Yoshitomi, T., Maruyama, T., Yamamoto, Y., Hakamatsuka, T., and Uchiyama, N.: 13C-NMR-based metabolic fingerprinting of Citrus-type crude drugs, J. Pharmaceut. Biomed., 161, 305–312, https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.08.044, 2018.
- Zheng, G. and Price, W. S.: Solvent signal suppression in NMR, Prog. Nucl. Mag. Res. Sp., 56, 267–288, https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2010.01.001, 2010.,