

RMN quantitative facile à mettre en œuvre, précise et exacte

Note d'application

Auteurs

Ronald Crouch
David Russell
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara CA 95051
États-Unis

Résumé

Les nouveaux outils RMNq du logiciel VnmrJ 3.1 ont permis de démontrer qu'il était possible de réaliser une quantification juste et précise par RMN. L'étalonnage périodique permet d'obtenir une justesse de 99,9 % et une précision supérieure à 0,59 %. En effectuant un étalonnage avec chaque étude l'exactitude peut atteindre 100 % et la précision 0,35 %.

Introduction

Diverses techniques peuvent être utilisées pour fournir une analyse quantitative de composés organiques à petite molécule. La plus courante consiste à effectuer une séparation chromatographique suivie d'une détection de l'analyte par détection spectroscopique (c'est-à-dire UV-Visible, diffusion de lumière après évaporation, etc.) ou détection spectrométrique (par exemple par spectrométrie de masse). S'il est certain que chacune de ces méthodes de détection présente des avantages, elles sont toutes oblitérées par des problèmes tels que des facteurs de réponse non constants ou des effets de matrice. Il n'y a pas de détecteur de chromatographie universel.

Bien qu'utilisée la plupart du temps pour l'analyse structurale, la RMN est de plus en plus considérée comme un outil quantitatif de première importance. Utilisée quantitativement, la RMN est extrêmement puissante car l'intensité intégrée d'un signal de résonance est directement proportionnelle au nombre de noyaux représentés par ce signal. En outre, comme les protons de l'ensemble du spectre ont une sensibilité identique, il n'est pas nécessaire d'effectuer des étalonnages ni d'employer des coefficients d'extinction spécifiques des composés pour obtenir des résultats quantitatifs. La RMN a été utilisée pour déterminer la concentration de produits synthétiques et biosynthétiques, de spécialités chimiques, de composés de parapharmacie ainsi que de métabolites, catabolites et de composés endogènes dans les fluides biologiques¹. La RMN quantitative (RMNq) s'avère particulièrement utile en métabolomique, pour l'analyse de médicaments et la recherche de nouveaux médicaments ainsi que l'analyse de produits naturels².



Agilent Technologies

L'exactitude et la précision de la RMN quantitative sont suffisantes pour en faire un outil quantitatif de routine dans de nombreux laboratoires analytiques. Le référencement chimique au moyen d'étalons internes peut fournir une quantification exacte, mais cette technique est fastidieuse et contamine l'échantillon. Plusieurs approches électroniques de référencement ont également été utilisées pour fournir des résultats quantitatifs exacts et précis comme ERETIC (Electronic Referencing to access in vivo Concentrations = référencement électronique pour la mesure des concentrations in vivo), PIG (Pulse Into Gradient = impulsions dans le gradient), ARTSI (Amplitude-corrected Referencing Through Signal Injection = référencement corrigé en amplitude par injection d'un signal) et QUANTAS (Quantification by Artificial Signal = quantification par un signal artificiel). Cependant, le champ d'application de ces méthodes est limité et elles sont sujettes aux erreurs³⁻⁷.

Une quantification RMN exacte et précise de petites molécules de composés organiques peut être facilement obtenue en utilisant exclusivement l'intégration absolue d'un étalon externe de concentration et de spectres, à condition d'avoir une plateforme RMN très stable et linéaire. Cette note d'application démontre la capacité exclusive du système RMN Agilent à fournir une quantification absolue exacte facilement pour pratiquement tous les échantillons de chimie organique. Elle décrit l'utilisation du logiciel Agilent VnmrJ 3.1, de la sonde OneNMR très tolérante aux solvants, aux diélectrique et aux hauteurs d'échantillon, et des consoles DirectDrive permettant de quantifier les composés de petites molécules organiques. Avec une seule détermination d'étalonnage, il est possible de tenir une exactitude (en pourcentage de la concentration réelle) de 96,98 à 102,12 % et une précision de 0,59 à 1,07 % (écart-type en %). Il est même possible d'obtenir une exactitude et une précision supérieures (respectivement de 99,98 à 100 % et de 0,35 à 0,60 %).

Données expérimentales

Étalons et réactifs

L'ibuprofène a été fourni par Sigma-Aldrich, et une solution mère a été préparée dans du DMSO-d₆ (diméthylsulfoxyde contenant 6 atomes de deutérium) à une concentration de 200,00 mg/mL ou 969,5 mM. Une série de neuf échantillons à des concentrations descendant jusqu'à 515 µM a été préparée par dilution à partir de cette solution mère. Un échantillon "blanc" contenant uniquement du solvant DMSO-d₆ a également été inclus dans la série d'échantillons. La caféine a été fournie par Sigma-Aldrich, une solution mère 52,11 mM a été préparée dans D₂O. Toutes les dilutions ont été préparées avec du D₂O.

Instruments

Les expériences de quantification de l'ibuprofène ont été effectuées sur un spectromètre RMN Agilent 500

MHz DirectDrive équipé d'une sonde OneNMR de 5 mm et d'un passeur d'échantillon 7600-AS. Toutes les données ont été collectées avec un asservissement de la température de l'échantillon à 25 °C. La sonde a été initialement réglée sur le mélange étalon puis figée dans cette configuration pour toutes les mesures ultérieures.

Les expériences de quantification de la caféine ont été effectuées sur un spectromètre RMN Agilent 400 MHz DirectDrive équipé d'une sonde OneNMR de 5 mm et d'un passeur d'échantillon 7600-AS. La sonde a été réglée sur le produit étalon avant chaque étude.

Paramètres d'analyse

Les paramètres utilisés pour chaque instrument sont indiqués sur le tableau 1.

Tableau 1. Configuration de mesure du spectromètre RMN Agilent

Étalonnage unique	
Instrument	Agilent Direct Drive RMN 500 MHz avec sonde OneNMR™ de 5 mm
Impulsion d'excitation	12,1 µs @ 57 dB ; impulsion à 90°
Gain du récepteur	réglage automatique sur chaque échantillon
Nbre de balayages	1
Fréquence opérationnelle	499,86 MHz
Temps d'acquisition	3,0 s
Nombre de Fourier	256k
Apodisation	0,3 Hz élargissement de ligne exponentiel
Étalonnages multiples	
Instrument	Agilent Direct Drive RMN 500 MHz avec sonde OneNMR™ de 5 mm
Impulsion d'excitation	11,5 µs @ 59 db ; angle de la pointe de la sonde
Gain du récepteur	20 dB
Nbre de balayages	1
Fréquence opérationnelle	399,92 MHz
Temps d'acquisition	4,0 s
Nombre de Fourier	256k
Apodisation	0,3 Hz élargissement de ligne exponentiel

Résultats et discussion

Étalonnage externe

Les consoles Agilent utilisent une numérisation du signal directement dans le circuit de réception. Cette conception architecturale fournit la stabilité et la linéarité nécessaires pour obtenir des données de quantification absolue de haute qualité en utilisant uniquement un étalonnage externe sans recourir à un signal de référence interne.

L'étalonnage peut être effectué au moyen de n'importe quel échantillon de concentration connue dans une gamme

de 10 à 100 mM. L'échantillon doit faire preuve d'une résonance (ou d'un groupe de résonances) raisonnablement marquée et bien séparée des autres signaux et le nombre total de noyaux représentés par la résonance d'étalonnage doit être connu. Un spectre 1D issu d'un balayage unique est ensuite collecté à l'aide d'une impulsion de 90° et la région contenant la résonance d'étalonnage est intégrée. La valeur de la région intégrale est fixée manuellement en déterminant le produit de la concentration de l'échantillon et du nombre de noyaux et en saisissant ce produit dans le champ de la valeur intégrale [Integral Value]

et en cliquant sur le bouton de validation [Set Integral Value] (figure 1). La commande **qEstimate** peut ensuite être utilisée pour alimenter le fichier de sonde avec tous les paramètres nécessaires pour déterminer la concentration d'un échantillon inconnu.

Une fois ces valeurs intégrées dans le fichier de sonde, l'étalonnage est terminé et la concentration de l'échantillon est accessible d'un clic de souris. Une description plus détaillée du processus d'étalonnage est donnée au chapitre des outils de quantification du guide d'utilisation du logiciel VnmrJ 3.1.

Intégration facile de l'étalon

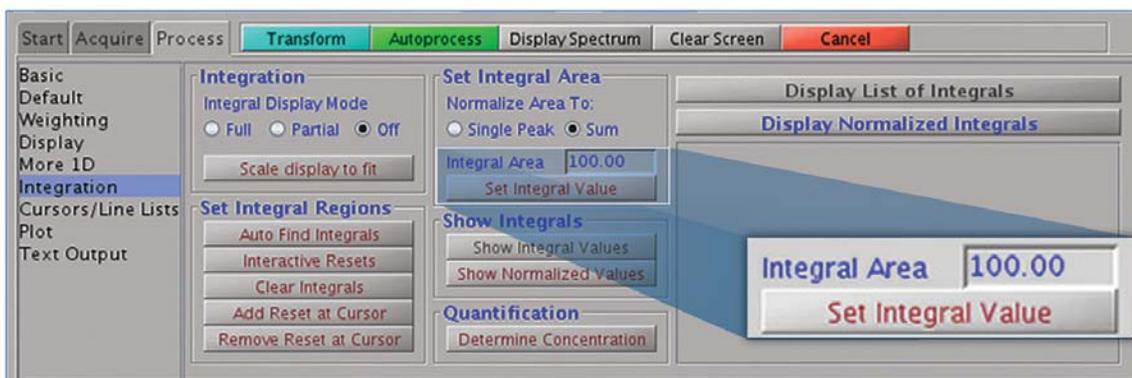


Figure 1. L'interface des paramètres d'intégration se trouve sur le panneau d'intégration de l'onglet de traitement des données.

Étalonnage périodique pour la RMN quantitative de routine

Pour utiliser les nouveaux outils RMNq et quantifier avec une justesse et une précision acceptable, il est nécessaire d'effectuer au moins un étalonnage de la sonde (ou un étalonnage périodique comme on le ferait pour les impulsions d'une largeur de 90°). Afin de réduire les erreurs d'intégration à moins de 1 %, un rapport signal sur bruit (S/B) d'au moins 150/1 est nécessaire. L'erreur est en effet approximativement donnée par l'équation $0,25 + (100 / S/B)^8$. Si l'exactitude et la précision sont importantes, il faut tenir compte du rapport S/B des spectres utilisés pour les étalonnages ainsi que pour chaque analyte.

Pour illustrer l'utilisation d'un étalonnage unique pour la RMN quantitative de routine, un étalon 15,17 mM d'ibuprofène a été préparé dans du DMSO-d6 et placé dans un tube RMN de 5 mm. En outre, une série de neuf échantillons à des concentrations comprises entre 132 mM et 500 µM a été préparée. La concentration de l'échantillon étalon et l'intensité du doublet du méthyle à 1,33 ppm ont été utilisées comme données de départ pour l'étalonnage avec la commande qEstimate (figure 2).

Une fois l'étalonnage de la sonde effectué, chaque échantillon de la série de concentration a subi une acquisition automatisée. Un spectre RMN ¹H d'un balayage unique a été acquis pour chaque échantillon après que le système ait lancé les fonctions autolock, autoshim, et autogain. Les données ont été collectées à tour de rôle pour chaque échantillon et la série entière a été répétée jusqu'à acquérir au moins 20 réplicats des jeux de données pour chaque échantillon.

Les pics appropriés des spectres de l'étalon externe sont intégrés au cours de l'étape d'étalonnage.

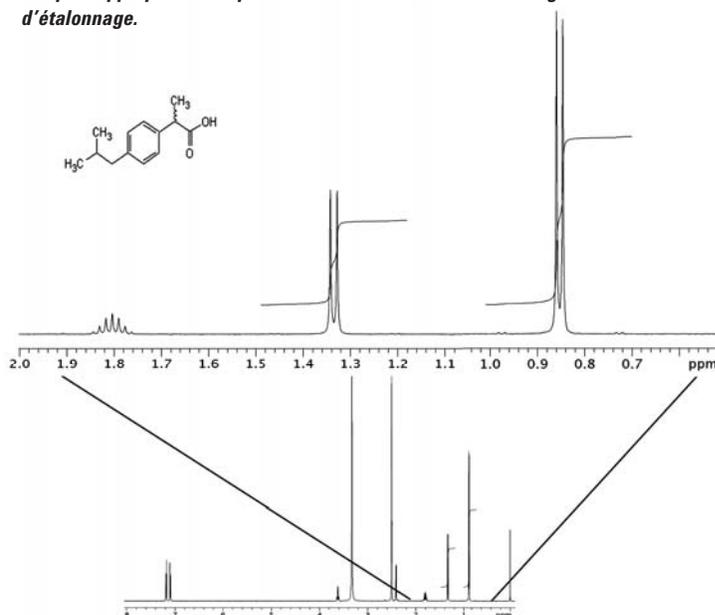


Figure 2. Spectre RMN ¹H de l'ibuprofène (graphe du bas), utilisé pour l'étalonnage et la quantification de la concentration de l'ibuprofène de la série du tableau 2 avec zoom sur la région de 0,5 à 2 ppm (graphe du bas). Le doublet méthyle ressort à 1,33 ppm et celui de l'isobutyle à ~0,84 ppm. La structure de l'ibuprofène est également montrée.

Accès facile par logiciel à la détermination des concentrations

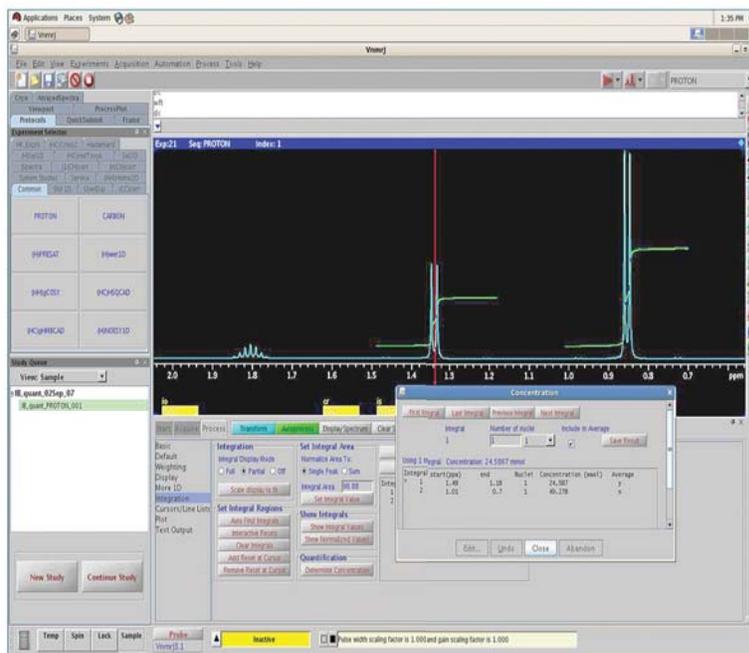


Figure 3. Le bouton **Determine Concentration** est utilisé pour ouvrir la fenêtre auxiliaire des concentrations. Cela permet une affectation interactive de la multiplicité de chaque région d'intégration d'un spectre et de choisir les régions à inclure dans le calcul final de concentration.

La figure 3 montre la fenêtre qui apparaît quand on utilise l'outil de détermination de la concentration via le bouton **Determine Concentration** du panneau d'intégration placé sous l'onglet de traitement. Chaque aire intégrée sur le spectre est affichée et peut être ajoutée à la liste pour le calcul de concentration après avoir affecté interactivement le facteur de multiplicité approprié. Pour l'analyse d'un seul échantillon, une version manuelle de ce flux de tâches est rapide, simple et facile à réaliser.

Étant donné que l'évaluation en cours comportait plus de 180 spectres, une macro d'automatisation du traitement a été mise en œuvre pour choisir les régions correspondant au doublet du méthyle à ~1,3 ppm et au doublet de l'isobutyle à ~0,8 ppm, adapter l'échelle pour l'intégration des régions sur la base de la multiplicité (respectivement 3 et 6 protons), calculer la concentration de l'échantillon sur la base de ces deux signaux et finalement écrire les résultats dans un fichier de tableur en format CSV. Un exemple de cette macro figure dans la bibliothèque utilisateur du spectromètre (adresse : /vnmr/userlib/maclib/qEst2csv) Pour les besoins de l'analyse des données de cette tâche, chaque pic a été traité comme une mesure de concentration indépendante.

Les résultats sont affichés sur le tableau 2 avec un écart-type inférieur à 1 % sur la série complète de concentrations. Les résultats démontrent la grande linéarité ($R^2=0,9995$) sur une gamme de concentration de presque trois ordres de grandeur (figure 4).

Tableau 2. Exactitude et précision de la quantification d'une série d'échantillons d'ibuprofène de concentrations différentes avec un seul point d'étalonnage

Concentration réelle (mM)	Concentration moyenne mesurée (mM)	Écart-type (mM)	Exactitude* (% de la précision réelle)	Précision (%SD)
0,515	0,531	0,006	96,98 %	1,07 %
1,03	1,049	0,008	98,13 %	0,79 %
2,06	2,098	0,012	98,14 %	0,59 %
4,12	4,171	0,024	98,77 %	0,57 %
8,24	8,269	0,048	99,65 %	0,58 %
16,49	16,571	0,103	99,51 %	0,62 %
32,98	33,014	0,293	99,90 %	0,89 %
65,97	67,813	0,492	97,21 %	0,73 %
131,94	129,141	1,091	102,12 %	0,84 %
Moyenne			98,46 %	0,74 %

* Remarquer la perte d'exactitude avec les échantillons de concentration très forte ou très faible. On s'attend à une erreur d'intégration à faible concentration en raison du faible rapport S/B que présente un balayage unique d'acquisition et, à concentration élevée, à un amortissement potentiel du rayonnement.

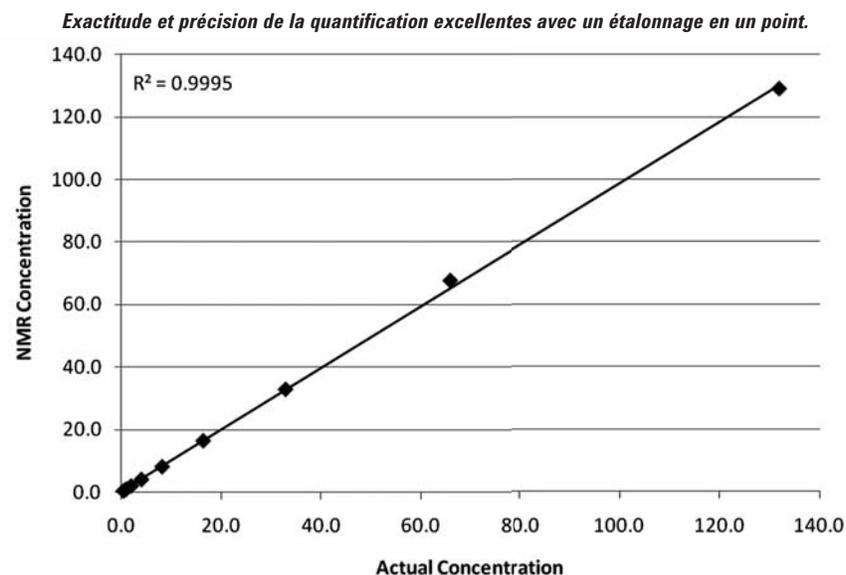


Figure 4. Détermination exacte, rapide et aisée de la concentration en ibuprofène avec une vaste plage de dynamique de plus de trois ordres de grandeur avec une valeur R carré de 0,995 pour la corrélation entre la concentration mesurée et la concentration réelle.

Étalonnage pendant l'analyse pour augmenter l'exactitude et la précision

Une quantification plus exacte et plus précise peut être obtenue en effectuant un étalonnage avant l'étude de chaque échantillon. Cela aide à compenser des variations mineures de stabilité dues aux modifications de l'environnement du laboratoire. Il est possible d'améliorer encore le résultat si la même valeur de gain est utilisée pour l'étalon et pour les échantillons à analyser. Une série de trois étalons de concentrations différentes a été préparée avec de la caféine comme analyte pour illustrer ce nouveau gain de justesse et de précision. Les échantillons ont été préparés à 50,44 mM, 51,91 mM et 52,11 mM ce qui donnait une différence de concentration de seulement 3,3 % à l'intérieur des séries. Chaque étude des trois échantillons a consisté en un autoétalonnage de l'étalon externe (caféine 50,11 mM dans du D2O) suivi d'une quantification des trois échantillons. Sept études en RMNq ont été effectuées comme une série et la console RMN a reçu pour instruction de réaliser cette série toutes les trois heures jusqu'à obtenir 630 études (210 pour chaque concentration). Comme l'indique le tableau 3, l'exactitude globale de la quantification était de 99,94 % et la précision globale était de 0,51 %, ce qui a permis de détecter de très petites différences de concentration pour les trois échantillons.

Une seconde expérience a été réalisée pour vérifier l'influence de la hauteur d'échantillon dans le tube RMN sur les résultats de quantification. Cette expérience a été conduite en retirant une partie de l'échantillon de chaque tube utilisé dans l'expérience précédente de façon à réduire respectivement la hauteur à 48, 35 puis 30 mm (tableau 4). On a ensuite effectué un total de 35 études sur chaque échantillon avec le spectromètre programmé pour répéter les séries (sept études en RMNq, chaque étude consistant en un autoétalonnage avec l'étalon externe suivi d'une

Tableau 3. Justesse et précision de quantification pour trois concentrations de caféine avec étalonnages multiples en cours d'analyse

Concentration réelle(mM)	Hauteur d'échantillon (mm)	Moyenne Concentration mesurée(mM)	Écart-type (mM)	Exactitude (% de la valeur réelle)	Précision
52,11	54	52,16	0,27	99,85 %	0,52 %
50,44	45	50,70	0,21	99,48 %	0,42 %
51,91	37	51,99	0,31	99,90 %	0,60 %
Moyenne				99,74 %	0,51 %

Table 4. Effet de la hauteur d'échantillon sur la justesse et la précision du résultat

Concentration réelle(mM)	Hauteur d'échantillon (mm)	Concentration moyenne mesurée (mM)	Écart-type (mM)	Exactitude (% de la valeur réelle)	Précision
52,11	48	52,13	0,19	99,96 %	0,35 %
50,44	35	50,44	0,17	100,00 %	0,49 %
51,91	30	—	—	—	—
Moyenne				99,98 %	0,42 %

quantification des trois échantillons) toutes les trois heures sur une période de seize heures. En utilisant la sonde OneNMR, les résultats ont confirmé que la hauteur d'échantillon peut varier de 35 à 54 mm sans dégradation des résultats ni en justesse ni en précision (tableau 4). La hauteur de l'échantillon pour les échantillons 3 (30 mm) était trop faible pour effectuer un shim de routine et n'a par conséquent pas pu produire de résultats exploitables.

Cette seconde expérience a été répétée avec les échantillons 1 et 2 moyennant un découplage large bande sur deux niveaux du ¹³C pendant l'acquisition afin de réduire les satellites⁹ du ¹³C. Au total, 98 études ont été exécutées pour chaque échantillon. Le spectromètre

a été programmé pour répéter chaque série (sept études RMNq, chaque étude consistant en un autoétalonnage avec l'étalon externe suivi d'une quantification des deux échantillons) toutes les deux heures sur une période de 28 heures. Le graphe du bas de la figure 5 montre le spectre de référence couplé et on y voit clairement la résolution entre les satellites du ¹³C et les signaux du ¹²C. Sur le graphe du haut de la figure 5, on voit que les pics satellites du ¹³C ont complètement disparu dans la bande de résonance principale. L'exactitude et la précision de la quantification sont toujours très bonnes même compte tenu du bruit et de l'erreur potentiels introduits par la grande largeur de bande de découplage du ¹³C (tableau 5).

Tableau 5. Effet du découplage de ¹³C sur la justesse et la précision

Concentration réelle (mM)	Hauteur d'échantillon (mm)	Concentration moyenne mesurée (mM)	Écart-type (mM)	Exactitude (% de la valeur réelle)	Précision
52,11	54	52,09	0,20	99,96 %	0,37 %
50,44	35	50,44	0,17	100,00 %	0,49 %
Moyenne				99,98 %	0,43 %

Grandes justesse et exactitude de quantification, même avec le découplage du ^{13}C

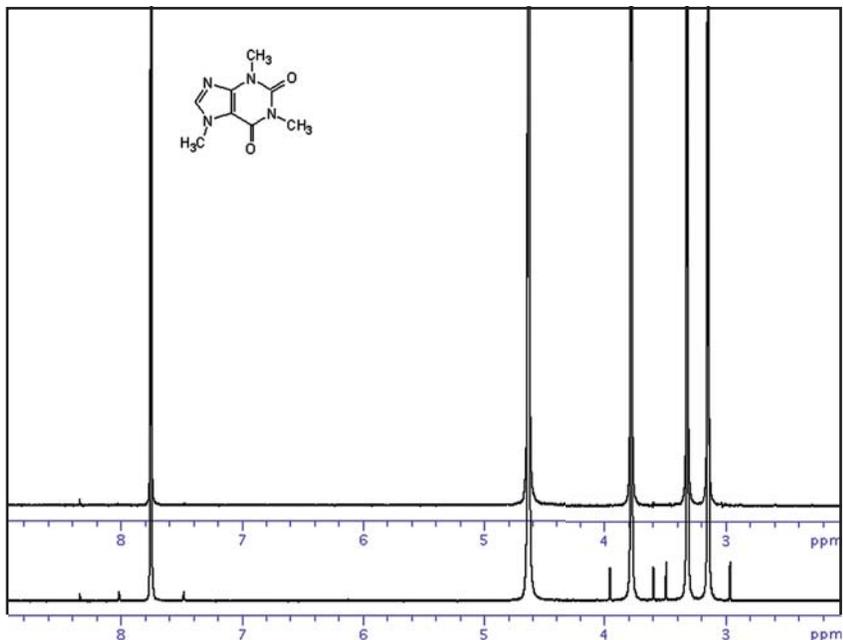


Figure 5. Échantillon de caféine (structure indiquée) acquis avec (graphe du haut) et sans (graphe du bas) découplage large bande à deux niveaux du ^{13}C avec un champ suffisant pour découpler 240 ppm de ^{13}C . Un temps d'acquisition RMN des protons de 3,6 s a été employé pour les deux expériences. Le découplage a été exécuté selon le protocole BilevelDEC d'expérimentation de l'onglet Std1D du sélecteur d'expériences.

Conclusion

En soi, l'expérience de RMN présente toutes les qualités que l'on peut exiger d'une technique quantitative : spécificité, sélectivité, sensibilité, linéarité, large plage dynamique, facteurs de réponse unitaires, et ce qui est le plus important, détection universelle pour toutes les molécules organiques protonées. La principale difficulté d'exploitation des analyses quantitatives en RMN a toujours été la non linéarité inhérente au matériel RMN commercialisé. La correction de ces erreurs pour chacun des échantillons est possible, mais elle nécessite l'ajout d'étalons internes chimiques ou l'intégration d'un signal de référence externe dans les données expérimentales. Les étalons internes sont pénibles à utiliser et apportent leur lot d'erreurs de mesure tandis que les méthodes de génération d'un signal de référence externe sont toutes très limitées dans leur champ d'application ou elles-mêmes très sujettes aux erreurs.

Les systèmes de RMN Agilent sont uniques dans la mesure où le circuit signal du récepteur est totalement numérique et permet d'obtenir une réponse d'une linéarité encore jamais atteinte pour une vaste plage de concentration. La sonde OneNMR est également très tolérante aux modifications de solvant, de diélectrique et de niveau d'échantillon. En associant un tel niveau de robustesse de matériel à un logiciel sophistiqué, Agilent a développé un outil exceptionnel d'analyse quantitative. La quantification juste et précise d'échantillons de RMN peut s'effectuer facilement et rapidement au moyen d'une intégration absolue avec le logiciel VnmrJ 3.1 et d'une détermination unique des paramètres d'étalonnage au moyen d'un étalon externe de concentration connue. Une exactitude de 96,98 à 102,12 % et une précision de 0,59 à 1,07 % peuvent être atteintes avec des composés organiques à petite molécule. Une exactitude et une précision encore meilleures peuvent être obtenues (respectivement 99,48 à 100 % et 0,35 à 0,60 %) en utilisant un étalonnage

en cours d'analyse avec chaque étude d'échantillon pour tenir compte de modifications mineures des conditions de l'environnement du laboratoire. Dans les faits, même le découplage du ^{13}C n'a que peu d'influence sur l'erreur de ces mesures. Ces niveaux de justesse et de précision peuvent être atteints et documentés rapidement et facilement grâce aux fonctions logicielles d'acquisition et d'enregistrement des paramètres d'étalonnage, de configuration et d'ordonnancement des études de quantification ainsi que de création de rapports personnalisés.

Finalement, bien que cette note d'application ne traite que de la quantification à partir de données RMN de protons, les nouveaux outils de RMN quantitative sont indépendants de la fréquence. Les utilisateurs peuvent effectuer le même type d'étalonnage sur un noyau approprié quelconque (c'est-à-dire : ^{31}P , ^{19}F , ^{13}C , etc.) et mettre en œuvre le même flux de tâches pour les données collectées sur ces noyaux.

Références

1. R. Espina, *et al.* "Nuclear magnetic resonance spectroscopy as a quantitative tool to determine the concentrations of biologically produced metabolites: implications in metabolites in safety testing", *Chem Res Toxicol.* **22**, 299-310 (2009).
2. G. F. Pauli, B. U. Jaki, D. C. Lankin. "Quantitative ¹H NMR: development and potential of a method for natural products analysis.", *J Nat Prod.* **68**, 133-49 (2005).
3. K.I. Marro, *et al.*, "Synthetic signal injection using inductive coupling." *J Magn Reson* **194**, 67-75 (2008).
4. F. Ziarelli, *et al.*, "General implementation of the ERETIC method for pulsed field gradient probe heads." *J Magn Reson* **194**, 307-12 (2008).
5. Mehr, K., *et al.*, "Electronic referencing techniques for quantitative NMR: pitfalls and how to avoid them using amplitude-corrected referencing through signal injection.", *Anal Chem* **80**, 8320-8323 (2008).
6. Upton, R. in ENC. 2008. Asilomar, California USA.
7. I.W. Burton, *et al.* "Quantitative ¹H NMR with external standards: use in preparation of calibration solutions for algal toxins and other natural products." *Anal Chem* **77**, 3123-31 (2005).
8. F. Malz and H. Jancke. "Validation of Quantitative nuclear magnetic resonance." *J. Pharm. Biomed. Anal.* **38**, 813-823 (2005).
9. E. Kupce, R. Freeman, G. Wider, K. Wüthrich, "Suppression of Cycling Sidebands using Bi-level Adiabatic Decoupling." *J. Magn. Reson. A* **122**, 81-84 (1996).

Pour plus d'informations

Pour en savoir plus :

www.agilent.com

Vente en ligne :

www.agilent.com/chem/store

Localisez un centre de service client Agilent dans votre pays :

www.agilent.com/chem/contactus

États-Unis et Canada

1-800-227-9770

agilent_inquiries@agilent.com

Europe

0-810-446-446 (n° AZUR ;
valable uniquement en France)
info_agilent@agilent.com

Asie Pacifique

adinquiry_aplsc@agilent.com

www.agilent.com

Les caractéristiques techniques des produits et leur description figurant dans cette publication peuvent être modifiées sans notification préalable.

© Agilent Technologies, Inc., 2011
Publié aux États-Unis le 8 avril 2011
5990-7601FR



Agilent Technologies