



Mémoire / Full paper

## Détermination des abondances isotopiques spécifiques par RMN-<sup>2</sup>H et la méthode ERETIC

Flore Le Grand, Serge Akoka \*

LAIEM, UMR 6006 CNRS, université de Nantes, BP 92208, 44322, Nantes cedex 3, France

Reçu le 14 mai 2003 ; accepté le 20 novembre 2003

Disponible sur internet le 1<sup>er</sup> avril 2004

### Résumé

L'abondance isotopique spécifique ( $A_i$ ) naturelle en deutérium se mesure aujourd'hui en routine par spectroscopie RMN (SNIF-NMR). Cette étude propose de remplacer la référence par un signal généré électroniquement : c'est la méthode ERETIC. La mesure des  $A_i$  a été réalisée sur cinq échantillons d'éthanol, en utilisant comme référence, soit une substance chimique (TMU), soit ERETIC. L'écart entre les deux méthodes n'est pas significatif. Le rapport signal sur bruit a été multiplié par 1,6 et les inconvénients liés à l'emploi d'une référence interne ont été éliminés. **Pour citer cet article :** F. Le Grand, S. Akoka, C. R. Chimie 7 (2004).

© 2004 Académie des sciences. Publié par Elsevier SAS. Tous droits réservés.

### Abstract

**Site-specific natural isotope abundance determination by <sup>2</sup>H-NMR and the ERETIC method.** Deuterium site-specific natural isotope abundance ( $A_i$ ) is routinely measured by NMR spectroscopy (SNIF-NMR). This study suggests substituting the reference by an electronically generated signal: the ERETIC method. Measurements of  $A_i$  on five ethanol samples have been performed using either a chemical compound (TMU), or ERETIC. No significant difference between the two methods has been found. The signal-to-noise ratio was increased by a factor of 1.6 and the internal reference drawbacks have been removed. **To cite this article:** F. Le Grand, S. Akoka, C. R. Chimie 7 (2004).

© 2004 Académie des sciences. Publié par Elsevier SAS. Tous droits réservés.

**Mots clés :** RMN-<sup>2</sup>H ; Signal de référence ; ERETIC ; Abondance isotopique

**Keywords:** <sup>2</sup>H-NMR; Reference signal; ERETIC; Isotope abundance

### 1. Introduction

La RMN quantitative du deutérium permet de déterminer aujourd'hui en routine la distribution isotopique

naturelle pour chaque site d'une molécule [1]. Cette méthode, brevetée sous le nom de SNIF-NMR<sup>TM</sup> (Site-Specific Natural Isotope Fractionation by Nuclear Magnetic Resonance, Trade Mark d'Eurofins, Nantes, France), permet de mesurer les variations significatives de cette distribution isotopique en fonction du mode de formation de la molécule [2]. Le champ d'application

\* Corresponding author.

Adresses e-mail : [flore.legrand@chimbio.univ-nantes.fr](mailto:flore.legrand@chimbio.univ-nantes.fr)  
(F. Le Grand), [serge.akoka@chimbio.univ-nantes.fr](mailto:serge.akoka@chimbio.univ-nantes.fr) (S. Akoka).

de cette méthode comprend notamment la détection de la chaptalisation des vins [3,4], l'authentification de l'origine des produits [5–11] et la détermination des mécanismes de biosynthèse [12,13]. Dans le cas du  $^2\text{H}$ , très peu abondant, l'abondance isotopique

$A = \frac{\text{lourd}}{\text{léger} + \text{lourd}}$  peut être assimilée au rapport isotopique  $R = \frac{\text{lourd}}{\text{léger}}$  ou (D/H).

La surface ( $S_i$ ) sous une raie d'un spectre RMN est directement proportionnelle au nombre ( $N$ ) de noyaux qui produisent cette raie.  $N$  est proportionnel à la concentration  $c$  de l'isotopomère comportant le noyau étudié à la position  $i$ .

$$S_i = k n_i c A_i V \quad (1)$$

où  $n_i$  est le nombre de noyaux équivalents pour le site  $i$ ,  $V$  est le volume sensible de l'antenne et  $A_i$  est l'abondance isotopique spécifique de ce site. En pratique, la constante  $k$  de l'équation (1) dépend de nombreux paramètres : c'est pourquoi les mesures quantitatives en RMN sont toujours des mesures relatives.

Lorsque l'abondance isotopique moyenne sur l'ensemble des isotopomères,  $\bar{A}$ , peut être mesurée (par exemple par SMRI), on peut écrire les équations :

$$S = \sum_i S_i = k \bar{A} \sum_i n_i c V \quad (2)$$

$$A_i = \bar{A} \frac{f_i}{F_i} \quad (3)$$

avec  $f_i = \frac{S_i}{S}$  la fraction molaire de l'isotopomère

et  $F_i = \frac{n_i}{\sum_i n_i}$  la population statistique du site  $i$ .

Lorsqu'il est possible d'introduire une référence interne dans l'échantillon, il n'est plus nécessaire de connaître  $\bar{A}$ . Cette référence interne doit être soigneusement choisie et mise en œuvre. L'abondance isotopique et la pureté devant être parfaitement connues, soit une calibration préalable est nécessaire, soit le composé est un standard commercial calibré, qui induit un surcoût significatif. Le composé doit présenter une co-solubilité avec l'échantillon, un (des) déplace-

ment(s) chimique(s) différent(s) et une bonne stabilité chimique en présence de l'échantillon. Afin de limiter la quantité de référence à ajouter, le nombre de noyaux équivalents doit être élevé. Enfin, pour ne pas induire une augmentation du temps d'expérience, le  $T_1$  de la référence doit être inférieur ou égal à ceux du composé étudié. Dans le cas de l'analyse de l'éthanol, la référence officielle est la tétraméthylurée (TMU).

La technique de référence ERETIC (Electronic Reference To access In vivo Concentration) a été conçue afin d'éviter l'ajout, contraignant, voire impossible, d'une substance de référence en RMN in vivo [14,15]. Elle a ensuite été appliquée à la mesure de concentrations en RMN- $^1\text{H}$  [16–18]. Cette étude propose d'éliminer les contraintes de la référence interne en utilisant la méthode ERETIC pour la mesure des abondances isotopiques  $^2\text{H}$ .

L'abondance isotopique spécifique a ainsi été mesurée parallèlement grâce aux deux méthodes (référence interne et ERETIC), sur quatre éthanols d'origines (et donc d'abondances isotopiques spécifiques) différentes. Un cinquième éthanol a été utilisé comme référence.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Échantillons analysés

Les cinq éthanols utilisés proviennent d'origines botaniques différentes : raisin, betterave, canne, blé et maïs. Les échantillons ont été obtenus par fermentation, puis distillation, afin qu'ils contiennent plus de 95% d'éthanol, et conservés sur tamis moléculaire.

Une première série d'échantillons est préparée dans des proportions standards (3.3 ml d'éthanol pour 1.8 ml de TMU, 150  $\mu\text{l}$  de *substance-lock*  $\text{C}_6\text{F}_6$ ) : c'est la série n° 1. La TMU employée est fournie par Eurofins, Nantes. Son abondance isotopique a été calibrée selon un protocole officiel européen à 84,44 ppm [19].

Une deuxième série de tubes est préparée à partir des mêmes échantillons, simultanément. Ces tubes ne contiennent alors quasiment que de l'éthanol (5,1 ml d'éthanol, 150  $\mu\text{l}$  de  $\text{C}_6\text{F}_6$ ) : c'est la série n° 2.

L'éthanol de maïs a été utilisé comme référence.

### 2.2. Acquisitions RMN- $^2\text{H}$

Le spectre RMN- $^2\text{H}$  quantitatif des échantillons a été mesuré dans des conditions standard, selon le pro-

tole décrit dans les publications antérieures [5,20] et dans les méthodes officielles [21] :  $\alpha = 90^\circ$  soit  $P_1 = 10 \mu\text{s}$ ,  $T_R = 6,9 \text{ s}$ ,  $S_W = 1200 \text{ Hz}$ .

Seule la séquence d'impulsion a été modifiée, afin de faire intervenir le signal électronique ERETIC dans le spectre.

Le spectromètre utilisé est un Bruker DRX 500 de fréquence nominale 500,13 MHz en proton, équipé d'une sonde adaptée à la mesure isotopique en  $^2\text{H}$  (sonde 10 mm  $^2\text{H}$ - $^1\text{H}$ , lock  $^{19}\text{F}$ ). Le spectromètre comporte trois canaux radiofréquence, permettant à la fois l'observation des noyaux  $^2\text{H}$ , le découplage  $^1\text{H}$  et l'injection du signal ERETIC.

Après une multiplication exponentielle ( $LB = 2 \text{ Hz}$ ) et une transformation de Fourier sur 64 K, les surfaces des raies ont été déterminées par ajustement du spectre à un modèle lorentzien à l'aide du logiciel PERCH (PERCH NMR Software © Université de Kuopio, Finlande).

Pour chaque tube, quatre spectres ont été réalisés.

### 2.3. ERETIC

La technique ERETIC consiste à générer électroniquement un signal radiofréquence, émis par une antenne annexe et recueilli lors de l'acquisition du FID de l'échantillon. Dans notre cas, lors des acquisitions de RMN- $^2\text{H}$ , le signal ERETIC est émis par la bobine proton par l'intermédiaire d'un coupleur RF (Fig. 1) ; lors des acquisitions de RMN- $^1\text{H}$ , ce signal est émis par la bobine  $^2\text{H}$  [14,15].

Après transformation de Fourier, ce signal donne naissance à un pic supplémentaire sur le spectre (Fig. 2).

### 2.4. Mesure des temps de relaxation longitudinale $T_1$

Pour les deux séries de tubes, les temps de relaxation longitudinale  $T_1$  ont été mesurés, sur chaque site

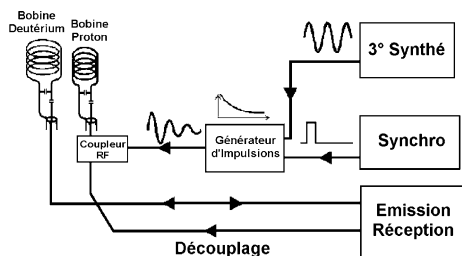


Fig. 1. Dispositif de création d'ERETIC.

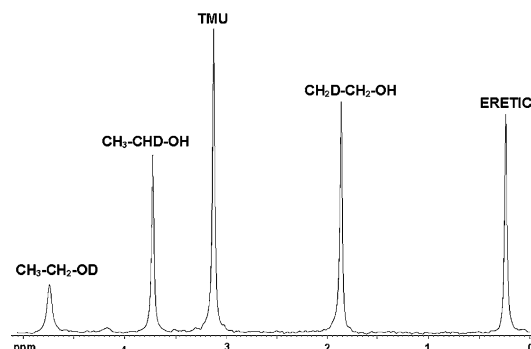


Fig. 2. Spectre  $^2\text{H}$  découplé  $^1\text{H}$  de l'éthanol, pour un tube contenant de la TMU, en présence du signal électronique ERETIC.

du spectre, par la séquence d'inversion-récupération (12 temps d'inversion compris entre 5 ms et 8 s). Le traitement des données est effectué par un programme dédié au calcul des temps de relaxation, intégré à la console du spectromètre.

### 2.5. Mesure du rapport signal/bruit

Pour chaque spectre, le rapport signal/bruit a été mesuré sur le plus petit pic quantifié du spectre:  $\text{CH}_3\text{-CHD-OH}$ , le bruit étant mesuré entre 2,4 et 2,7 ppm.

### 2.6. Calcul des $A_i$

La mesure des concentrations respectives des différents composés a été effectuée à partir des spectres  $^1\text{H}$  quantitatifs, selon un protocole publié précédemment [22] :  $\alpha = 10^\circ$ ,  $T_R = 9 \text{ s}$ ,  $S_W = 10 \text{ ppm}$ .

#### 2.6.1. Méthode de la référence interne

Sur le spectre RMN- $^2\text{H}$  obtenu sur un échantillon contenant le composé étudié et une référence interne, les surfaces :

$$S_i^c = k n_i^c c A_i^c V$$

et

$$S^{\text{ref}} = k n^{\text{ref}} [\text{ref}] A^{\text{ref}} V$$

sont mesurées ( $S_i^c$  et  $S_{\text{ref}}$  sont les surfaces sous les raies  $^2\text{H}$  de l'échantillon au site  $i$  et de la référence, respectivement), d'où :

$$A_i^c = A^{\text{ref}} \frac{S_i^c n^{\text{ref}} [\text{ref}]}{S^{\text{ref}} n_i^c c} \quad (4)$$

Sur le spectre RMN-<sup>1</sup>H obtenu sur le même échantillon, les surfaces :

$$\Sigma^c = k_h n^c c V_{sh}$$

$$\Sigma^{\text{ref}} = k_h n^{\text{ref}} [\text{ref}] V_{sh}$$

sont mesurées (pour déterminer le rapport des concentrations, la quantification d'un seul déplacement chimique du composé étudié est nécessaire).

D'où :

$$\frac{n^{\text{ref}} [\text{ref}]}{n^c c} = \frac{\Sigma^{\text{ref}}}{\Sigma^c}$$

et donc :

$$A_i^c = A_i^{\text{ref}} \frac{S_i^c \Sigma^{\text{ref}}}{S_i^{\text{ref}} \Sigma^c} \quad (5)$$

### 2.6.2. Méthode ERETIC

Les spectres RMN-<sup>2</sup>H et RMN-<sup>1</sup>H sont obtenus à partir des échantillons à mesurer et sur un tube de référence contenant le composé étudié dont les abondances isotopiques  $A_i^{\text{ref}}$  sont connues. (Dans le cas de ce travail, le tube de référence contenait un alcool de maïs dont les abondances isotopiques étaient :  $A_1^{\text{ref}} = 106,4 \pm 0,7$  ppm et  $A_2^{\text{ref}} = 119,8 \pm 1,0$  ppm).

Le spectre <sup>2</sup>H obtenu sur le tube de référence fournit les aires :

$$S_i^{\text{ref}} = k' n_i^{\text{ref}} [\text{ref}] A_i^{\text{ref}} V \quad \text{et} \quad S_{\text{eretic}}'$$

Un spectre <sup>2</sup>H obtenu sur le tube à mesurer fournit :

$$S_i^c = k n_i^c c A_i^c V \quad \text{et} \quad S_{\text{eretic}}$$

$$\text{avec} \quad \frac{S_{\text{eretic}}'}{S_{\text{eretic}}} = \frac{k}{k'} \quad \text{et} \quad n_i^c = n_i^{\text{ref}}$$

$$\text{donc} : A_i^c = A_i^{\text{ref}} \frac{S_i^c}{S_i^{\text{ref}}} \cdot \frac{S_{\text{eretic}}'}{S_{\text{eretic}}} \frac{[\text{ref}]}{c}$$

Le spectre <sup>1</sup>H obtenu sur le tube de référence fournit :

$$\Sigma^{\text{ref}} = k_h n^{\text{ref}} [\text{ref}] V_{sh} \quad \text{et} \quad \Sigma_{\text{eretic}}'$$

Le spectre <sup>1</sup>H obtenu sur le tube à mesurer fournit :

$$\Sigma^c = k_h n^c c V_{sh} \quad \text{et} \quad \Sigma_{\text{eretic}}'$$

$$\text{avec} \quad \frac{\Sigma_{\text{eretic}}'}{\Sigma_{\text{eretic}}} = \frac{k_h}{k_h'} \quad \text{et} \quad n^c = n^{\text{ref}}, \quad \text{d'où} :$$

$$\frac{[\text{ref}]}{c} = \frac{\Sigma_{\text{eretic}}'}{\Sigma^c} \cdot \frac{\Sigma^{\text{ref}}}{\Sigma_{\text{eretic}}'} \quad (6)$$

et donc :

$$A_i^c = A_i^{\text{ref}} \frac{S_i^c}{S_{\text{eretic}}'} \frac{S_{\text{eretic}}'}{S_{\text{eretic}}'} \frac{\Sigma_{\text{eretic}}'}{\Sigma^c} \frac{\Sigma^{\text{ref}}}{\Sigma_{\text{eretic}}'} \quad (7)$$

À partir des quatre spectres <sup>1</sup>H acquis sur chaque tube, une valeur moyenne pour  $\frac{\Sigma^{\text{ref}}}{\Sigma^c}$  est obtenue. Cette valeur est utilisée pour calculer les  $A_i$  pour chaque spectre <sup>2</sup>H. À partir des quatre spectres <sup>2</sup>H acquis sur chaque tube, une valeur moyenne et un écart type sont calculés.

## 3. Résultats et discussion

Les valeurs de  $T_1$  obtenues pour les deux séries de tubes sont données dans le [Tableau 1](#). Dans la première série de tubes (protocole classique), le  $T_1$  de la TMU est du même ordre de grandeur que ceux des sites de l'éthanol et le  $T_1$  le plus grand est égal à 1,3 s (CHD). L'absence de TMU dans la deuxième préparation ne modifie que peu les  $T_1$  des sites de l'éthanol et le  $T_1$  le plus grand est égal à 1,2 s (CH<sub>2</sub>D).

Le  $T_1$  le plus long ( $T_{1\text{max}}$ ) détermine le temps de répétition  $T_R$  nécessaire entre chaque scan pour obtenir un spectre quantitatif (en effet, pour une précision  $\geq 0,7\%$ , il faut  $T_R \geq 5 \times T_{1\text{max}}$ ). Le  $T_{1\text{max}}$  étant très similaire entre les deux séries de tubes, le  $T_R$  est identique pour les deux séries d'acquisitions. En revanche, avec la méthode ERETIC, le  $T_1$  de la référence n'est plus à prendre en compte dans le calcul du  $T_R$  pour une acquisition quantitative. Pour d'autres types d'échantillons, par exemple les lipides, le  $T_1$  de la TMU est largement supérieur à celui des sites mesurés. La présence de TMU allonge alors considérablement le  $T_R$ . Pour ce type de composés, la méthode ERETIC (dans les conditions du deuxième protocole, en absence de TMU) diminuerait notablement le  $T_R$  et donc la durée totale d'expérience.

Tableau 1

Temps de relaxation longitudinale ( $T_1$  en s) pour les différents sites des spectres <sup>2</sup>H de l'éthanol et du TMU pour les deux séries de tubes

Site du spectre <sup>2</sup> H	CH <sub>3</sub> -CHD-OH	CH <sub>2</sub> D-CH <sub>2</sub> -OH	TMU
Série n° 1 (avec TMU)	1,3	1,1	1,2
Série n° 2 (sans TMU)	1,1	1,2	—

Tableau 2

Valeurs des  $A_i$  (en ppm) des différents éthanols, avec les deux types de référence et, dans le cas de la référence ERETIC, pour les deux séries de tubes (valeurs moyennes et écarts types obtenus à partir de quatre mesures)

		Valeur par TMU (série n° 1)	écart type	Valeur par ERETIC (série n° 1)	écart type	Valeur par ERETIC (série n° 2)	écart type
Vin	A <sub>1</sub>	100,7	0,4	101,0	0,6	100,8	0,4
	A <sub>2</sub>	125,7	0,7	125,7	1,2	123,7	1,2
Betterave	A <sub>1</sub>	90,4	0,6	89,6	0,7	89,8	0,4
	A <sub>2</sub>	119,0	0,6	117,7	1,0	116,8	1,0
Canne	A <sub>1</sub>	109,4	0,3	108,8	0,5	110,5	0,3
	A <sub>2</sub>	123,4	0,6	122,4	1,2	123,3	0,4
Blé	A <sub>1</sub>	109,7	0,5	108,8	1,1	109,9	0,3
	A <sub>2</sub>	127,8	1,5	126,4	1,9	127,6	0,3

Tous échantillons confondus, la moyenne du rapport signal/bruit est de 180 pour la première préparation (avec TMU) et de 290 pour la deuxième préparation (éthanol quasiment pur). Le rapport signal/bruit a été multiplié, entre la première et la seconde série de tubes, par un facteur d'environ 1,6. La sensibilité est souvent un paramètre limitant en RMN-<sup>2</sup>H. Or, grâce à la méthode ERETIC, l'absence de référence interne dans le tube induit une augmentation de la concentration. En conséquence, à nombre de scans (donc à temps d'acquisition) constant, le rapport signal/bruit est amélioré et l'écart type de la mesure est réduit. À rapport signal/bruit constant, une réduction du temps d'expérience est donc possible. Pour les échantillons étudiés, le temps d'expérience aurait été divisé par environ deux. Ce gain pourrait être largement supérieur, pour des échantillons dont la co-solubilité échantillon-référence nécessite une dilution dans un solvant.

Les abondances isotopiques spécifiques mesurées par les deux méthodes (ERETIC et référence interne) sur les deux séries de tubes (avec et sans TMU) sont données dans le Tableau 2 et représentées graphiquement sur les Figs. 3 et 4. En routine, la précision de mesure des  $A_i$ , nécessaire à l'authentification des éthanols, est de 1%. Pour les deux séries de tubes, les valeurs de  $A_i$  sont toutes non significativement différentes à l'écart type de la mesure près ( $\leq 1\%$ ). Avec les deux protocoles, la référence ERETIC permet donc de caractériser les échantillons avec la précision standard requise.

Pour les deux séries d'expériences, l'écart type de la mesure est globalement similaire pour ce qui concerne la référence interne et ERETIC, et inférieur à 1%. L'utilisation de la référence ERETIC ne semble donc pas diminuer la précision de la mesure. L'examen du

Tableau 2 tend à montrer que la précision est un peu meilleure sur la seconde série de tubes. Toutefois, dans cette expérience, les écarts types étant calculés sur un petit nombre de points (quatre spectres), il est donc difficile d'interpréter finement l'évolution de ce paramètre.

Dans les deux méthodes de référence, les concentrations de produits contenus dans les tubes doivent être

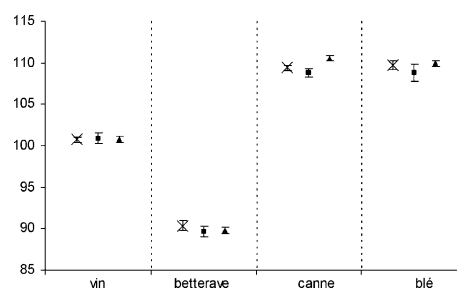


Fig. 3. Valeurs de  $A_1$  (en ppm) des éthanols avec les deux types de références et, dans le cas de la référence ERETIC, pour les deux séries de tubes : (x) référence TMU (série n° 1) ; (■) référence ERETIC (série n° 1) ; (▲) référence ERETIC (série n° 2). Les barres d'erreur sont placées à  $\pm$  l'écart type.

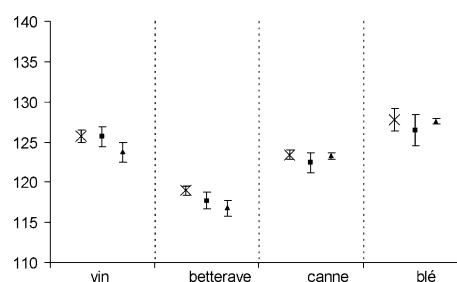


Fig. 4. Valeurs de  $A_2$  (en ppm) des éthanols avec les deux types de références et, dans le cas de la référence ERETIC, pour les deux séries de tubes : (x) référence TMU (série n° 1) ; (■) référence ERETIC (série n° 1) ; (▲) référence ERETIC (série n° 2). Les barres d'erreur sont placées à  $\pm$  l'écart type.

parfaitement connues. Les concentrations peuvent s'exprimer :

$$c = \frac{m_c n_i^c p_c}{M_c V_t} \text{ et } [\text{ref}] = \frac{m_{\text{ref}} n_{\text{ref}} p_{\text{ref}}}{M_{\text{ref}} V_t}$$

où  $n$  est le nombre de noyaux équivalents,  $M$  et  $m$  sont la masse molaire et la masse dans le tube,  $p$  est la pureté massique et  $V_t$  est le volume total de l'échantillon.

La référence interne ne fait intervenir qu'un seul tube dans la mesure ( $V_t = V_t'$ ) et l'évaluation des concentrations relatives peut donc se réduire à des mesures de masses et de puretés :

$$\frac{[\text{ref}]}{c} = \frac{m_{\text{ref}} n_{\text{ref}} p_{\text{ref}} M_c}{m_c n_i^c p_c M_{\text{ref}}} \quad (8)$$

En revanche, la méthode ERETIC utilise une référence placée dans un tube différent de celui de l'échantillon mesuré. Si la méthode gravimétrique ci-dessus est employée, les comparaisons inter-tubes font intervenir dans le calcul les volumes totaux des différents tubes :

$$\frac{[\text{ref}]}{c} = \frac{m_{\text{ref}} n_{\text{ref}} p_{\text{ref}} M_c V_t}{m_c n_i^c p_c M_{\text{ref}} V_t'} \quad (9)$$

Les volumes totaux étant techniquement très difficiles à maîtriser avec la précision exigée, le choix a donc été fait de mettre en œuvre les spectres  $^1\text{H}$  pour la mesure des concentrations relatives (équation (6)). La durée de ces spectres  $^1\text{H}$  est très courte (1 min) et n'allonge que très peu la durée totale de l'expérience : les tubes 10 mm, avec leur forte concentration, fournissent une quantité de signal largement suffisante dès 16 scans (signal/bruit  $\approx 3000$ ).

Pour obtenir la meilleure précision, une calibration d'ERETIC est souhaitable sur un tube référence, à chaque session d'expérience. Cependant, dans le cas d'une mesure sur une série d'échantillons, ceci n'allonge que peu le temps d'expérience.

Le choix d'une référence interne pour la RMN quantitative  $^2\text{H}$  est toujours difficile. Non seulement le composé choisi doit satisfaire de nombreux critères (solubilité, volatilité, hygroscopicité, stabilité dans le temps, inertie chimique, non-recouvrement de raies avec l'échantillon et temps de relaxation de l'ordre de ceux de l'échantillon), mais idéalement, il doit être identique pour tous les composés qui doivent être com-

parés (dans une étude de filiation isotopique par exemple). De plus, son abondance isotopique doit être parfaitement connue. Peu de molécules satisfont à tous ces critères. À notre connaissance, les seuls composés pour lesquels l'abondance isotopique deutérium a été certifiée par une procédure de validation internationale sont : l'eau (échelle V.SMOW) [2] et la TMU [23]. L'eau est peu soluble dans les solvants organiques et la TMU a un  $T_1$  qui est très souvent nettement plus long que ceux de l'échantillon, dès que celui-ci comporte des molécules de poids moléculaire supérieur à 100 g mol $^{-1}$ . Tout ces éléments ne sont plus à prendre en compte dans le cas de la méthode ERETIC. De plus, la référence électronique ne pollue pas l'échantillon et permet donc une récupération plus facile de l'échantillon pour d'autres analyses.

Dans les applications de la méthode ERETIC à la détermination de concentrations [15–18], une « concentration équivalente » est affectée au signal de référence par calibration sur un tube qui contient un composé de concentration connue. Ici, le signal ERETIC est utilisé comme un standard de travail. Il n'est pas nécessaire de lui affecter une concentration et/ou une abondance isotopique équivalente. Les propriétés de ce signal sont uniquement utilisées pour corriger les variations de sensibilité qui ne manquent pas d'intervenir entre la mesure de la référence et celle de l'échantillon. La référence a, dans le cas de notre étude, les mêmes caractéristiques physico-chimiques que l'échantillon (nature, concentration). Les temps de relaxation de la référence et de l'échantillon peuvent donc être considérés comme identiques. Il n'est donc plus indispensable de se placer dans des conditions quantitatives strictes. Ce point n'a pas été abordé dans ce travail et devra être vérifié expérimentalement, mais il pourrait conduire à une réduction supplémentaire du temps d'expérience après optimisation du temps de répétition et de l'angle de nutation.

#### 4. Conclusion

Cette étude démontre que la référence électronique ERETIC permet d'obtenir en SNIF–NMR des résultats comparables à ceux obtenus avec la méthode de référence interne. En effet, l'écart entre les deux résultats est inférieur à la précision (1%) nécessaire à l'authentification des échantillons.



Bien que nécessitant une calibration préalable et l'intervention d'un spectre  $^1\text{H}$ , le protocole mis en place avec l'utilisation d'ERETIC est avantageux sur plusieurs points : pas de problème de choix de la référence (co-solubilité, pas de superposition de pics), pas de contamination ou d'interaction avec l'échantillon, élimination des coûts induits par l'utilisation d'une référence chimique calibrée, simplification de la préparation des tubes (pas de pesées), augmentation du rapport signal/bruit à nombre de scans constant et réduction éventuelle du temps de répétition.

Cette méthode est actuellement appliquée au laboratoire à l'étude isotopique d'échantillons dont le spectre est plus complexe que celui de l'éthanol.

## Références

- [1] G.J. Martin, M.L. Martin, *Tetrahedron Lett.* 22 (36) (1981) 3525.
- [2] G.J. Martin, M.L. Martin, in: H. Günther (Ed.), *NMR Basic Principles and Progress*, 23, Springer-Verlag, Heidelberg Germany, 1990, p. 1.
- [3] G.J. Martin, M.L. Martin, *J. Chim. Phys.* 80 (3) (1983) 293.
- [4] G.J. Martin, C. Guillou, N. Naulet, S. Brun, Y. Tep, J.-C. Cabanis, M.-T. Cabanis, P. Sudraud, *Sciences des Aliments* 6 (3) (1986) 385.
- [5] G.J. Martin, M.L. Martin, F. Mabon, M.-J. Michon, *Anal. Chem.* 54 (13) (1982) 2380.
- [6] C. Bauer-Christoph, H. Wachter, N. Christoph, A. Rossmann, L. Adam, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 204 (6) (1997) 445.
- [7] M. Day, B.L. Zhang, G.J. Martin, C. Asselin, R. Morlat, *J. Int. Sci. Vigne Vin* 29 (2) (1995) 75.
- [8] Yunianta, B.L. Zhang, G.J. Martin, C. Asselin, M. Schaeffer, *J. Int. Sci. Vigne Vin* 29 (2) (1995) 89.
- [9] G.J. Martin, M. Masure, C. Jouitteau, Y.-L. Martin, L. Aguilé, P. Allain, *Am. J. Enol. Vitic.* 50.4 (1999) 409.
- [10] C. Maubert, C. Guérin, F. Mabon, G.J. Martin, *Analisis* 16 (8) (1988) 434.
- [11] G. Remaud, Y.-L. Martin, G.G. Martin, G.J. Marti, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 859.
- [12] G.J. Martin, B.-L. Zhang, M.L. Martin, P. Dupuy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111 (3) (1983) 890.
- [13] G.J. Martin, M.L. Martin, B.-L. Zhang, *Plant, Cell Environ.* 15 (1992) 1037.
- [14] CNRS, brevet français n° 95 07651 1995, 06/1995.
- [15] L. Barantin, S. Akoka, A. Le Pape, *Innov. Technol. Biol. Med.* 17 (5) (1996) 373.
- [16] S. Akoka, L. Barantin, M. Trierweiler, *Anal. Chem.* 71 (13) (1999) 2554.
- [17] I. Billault, S. Akoka, *Instrum. Sci. Technol.* 28 (3) (2000) 233.
- [18] V. Sylvestre, S. Goupy, M. Trierweiler, R. Robins, S. Akoka, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1862.
- [19] C. Guillou, G.J. Martin, Bureau communautaire de références information, EUR 14396 EN, 1993.
- [20] G.J. Martin, B.-L. Zhang, N. Naulet, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (17) (1986) 5116.
- [21] G.J. Martin, M. Trierweiler, R. Ristow, A. Hermann, J.-J. Belliardo, Bureau communautaire de références information, EUR 15347 EN, 1994.
- [22] C. Fahl, R. Wittkowski, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 203 (6) (1996) 541.
- [23] C. Guillou, M. Trierweiler, G.J. Martin, *Magn. Reson. Chem.* 26 (1988) 491.