



HAL
open science

Apport de la RMN du deutérium en abondance naturelle dans les cristaux liquides chiraux pour le contrôle d'authenticité : applications aux molécules d'intérêts économiques

Tristan Texier Bonniot

► To cite this version:

Tristan Texier Bonniot. Apport de la RMN du deutérium en abondance naturelle dans les cristaux liquides chiraux pour le contrôle d'authenticité : applications aux molécules d'intérêts économiques. Chimie analytique. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASS051 . tel-02922817

HAL Id: tel-02922817

<https://theses.hal.science/tel-02922817v1>

Submitted on 26 Aug 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.

Apport de la RMN du deutérium
en abondance naturelle dans
les cristaux liquides chiraux pour
le contrôle d'authenticité :
Applications aux molécules
d'intérêts économiques

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°571 Sciences chimiques : molécules, matériaux,
instrumentation et biosystèmes (2MIB)
Pôle Chimie Physique, Biophysique et Analytique
Spécialité de doctorat : Chimie
Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CNRS, Institut de chimie moléculaire
et des matériaux d'Orsay, 91405, Orsay, France
Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 21 février 2020, par

Tristan TEXIER BONNIOT

Composition du Jury

Carine VAN HEJENOORT

Directrice de Recherche, CNRS de Gif-sur-Yvette
Institut de Chimie des Substances Naturelles (UPR 2301)

Présidente

Olivier LAFON

Professeur, Université de Lille
Unité de Catalyse et de Chimie du Solide (UMR 8181)

Rapporteur & Examineur

Hassan OULYADI

Professeur, Université de Rouen
Chimie Organique et Bioorganique : Réactivité et Analyse
(UMR 6014)

Rapporteur & Examineur

Myriam MALET-MARTINO

Professeure, Université de Toulouse
Synthèse et Physico-chimie de Molécule d'Intérêt
Biologique (UMR 5068)

Examinatrice

Philippe LESOT

Directeur de Recherche, Université Paris-Saclay
Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay
(UMR 8182)

Directeur de thèse

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein de l'équipe de RMN en milieu orienté de l'Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay (UMR 8182) à l'Université Paris-Sud / Paris-Saclay. Je tiens tout d'abord à remercier le Prof. David AITKEN, directeur de l'ICMMO de m'avoir accueilli au sein de l'Institut. Je souhaite également remercier le Prof. Denis MERLET, de m'avoir accueilli au sein de l'équipe RMN en milieu orienté.

Je remercie vivement les Prof. Hassan OULYADI de l'Université de Rouen-Normandie (COBRA), et Prof. Olivier LAFON de l'Université de Lille 1 (UCCS) de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de ce manuscrit de thèse. Je tiens également à remercier le Dr. Carine VAN HEIJENOORT, Directrice de Recherche au CNRS (ICSN) de Gif-sur-Yvette, et le Prof. Myriam MALET-MARTINO (SPMIB), de l'Université de Toulouse III, d'avoir accepté de faire partie de ce Jury de Thèse en qualité d'examinatrices. Je souhaite une nouvelle fois remercier le Prof. Hassan OULYADI pour avoir accepté d'être membre de mon comité de suivi de thèse (CST) au cours de ces trois années, et pour ses conseils avisés lors des entretiens annuels.

Je souhaite grandement remercier mon Directeur de Thèse, le Dr. Philippe LESOT, Directeur de Recherche au CNRS pour m'avoir fait confiance il y a trois ans. Merci pour toutes les connaissances en RMN multidimensionnelle « isotrope et anisotrope » et en Chimie/Stéréochimie qu'il m'a transmises, pour toutes les réflexions proposées. Je tiens également à le remercier pour nos échanges variés durant ces trois années, car tout ce qui s'est passé m'a fait beaucoup grandir et m'a beaucoup appris sur moi-même. Merci également pour toutes les corrections apportées au manuscrit de Thèse.

Je voudrais remercier, le Prof. Gérald Remaud et le Dr. Richard Robins (DR CNRS) de l'Université de Nantes (CEISAM) pour leur collaboration dans le cadre du projet « vanilline » (don d'échantillons de vanilline de diverses origines, analyses et discussions des résultats biologiques), ainsi que le Dr. Freddy Thomas de la Société Eurofins (France) dans le cadre du projet « frambinone » pour le don de divers échantillons de frambinone.

Je souhaite remercier le Dr. Philippe BERDAGUE, MCF à l'Université de Paris-Sud, pour tous ses conseils, sa bonne humeur, pour m'avoir régulièrement aidé, pour nos discussions permanentes, et pour m'avoir conseillé lorsque de nouveaux problèmes se présentaient. Merci encore d'avoir parlé régulièrement de Saskatchewan et Oulu !

Je remercie grandement le Dr. Christie AROULANDA (MCF à l'Université de Paris-Sud) pour son soutien permanent, pour m'avoir régulièrement supporté lors des moments les plus difficiles, pour ses précieux conseils en chimie, en RMN et dans tout le reste. Merci beaucoup à toi et à Hervé pour tous de supers moments. Et surtout, n'oublie jamais ce que commande Dark Vador dans une boulangerie !

Remerciements

Un immense merci à Jean-Pierre BALTAZE (IE RMN) pour tout. Ta bonne humeur permanente, ton aide exceptionnelle, tout ce que tu m'as appris sur les séquences impulsionsnelles et sur la gestion d'un parc de spectromètres RMN et toutes les discussions que l'on a eues durant ces trois années. Merci pour toutes nos discussions sportives régulières ! Je me souviendrais toute ma vie de cette soirée du 15 juillet 2018 sur la place Saint-Michel où l'on fêtait une simple étoile sur un maillot de football. Merci de m'avoir fait découvrir le Stade de France en vrai, malgré une fin de soirée bretonne.

Un grand merci à Amandine DOS SANTOS (A.I.) pour ta gentillesse, tes conseils, ta patience pour les remplissages d'azote lorsque mes expériences RMN n'étaient pas finies et surtout pour toutes nos discussions quotidiennes qui m'ont beaucoup aidées. Mon téléphone sera toujours allumé, si tu en as besoin même en pleine nuit !

Je veux présenter mes infinis remerciements à Danielle FOLQUER. Un manuscrit comme celui-ci ne suffirait pas pour t'exprimer ma reconnaissance. Si j'en suis là aujourd'hui, c'est grâce à toi ! Merci pour ta grande gentillesse, ta profonde bienveillance, ton immense générosité, ton écoute, ton soutien, ton attention, tes précieux conseils et ton amitié. Un grand merci pour tout ce que tu as fait pour moi dans les bons et dans les mauvais moments. Je suis heureux d'avoir réussi mon pari en t'emmenant voir un vrai film au cinéma. Avec ça, tu as mis des paillettes dans ma vie !

Un immense merci à Hélène MAISONNEUVE. Que dire que tu ne saches déjà ? Merci pour tout, ta profonde amitié, ton exceptionnelle gentillesse, tes précieux conseils que tous devraient appliquer, ton soutien dans ces derniers mois difficiles. Merci pour les nombreux délires que l'on a pu avoir ensemble, pour ces nombreuses soirées où nous avons refait le monde, pour tous ces verres partagés. Même si la ponctualité n'est pas ta principale qualité, rien n'aurait été pareil sans ton arrivée. Même s'il faudrait que j'arrête de dire des trucs, je finirai en parlant d'un lance-flamme, de Century 21, et en disant que tu sais déjà où venir lors de tes trente semaines de congés payés. Et là, tu as du péremptoire !

Merci à Tanya INCEOGLU pour sa bonne humeur, sa gentillesse et ses conseils. Merci de m'avoir accueilli régulièrement dans le laboratoire de spectrométrie de masse durant ces longs derniers mois ! Merci également pour m'avoir permis de normaliser une constante scientifique : la constante « Tanya-Jean-Pierre ».

Merci au Dr. Abdelkrim MEDDOUR pour sa grande confiance et ses précieux conseils dans le domaine de la recherche pour mon projet doctoral et dans le domaine pédagogique et pour m'avoir fait l'honneur de me confier ses enseignements. Merci beaucoup.

Je remercie les Drs. François-Marie MOUSSALIEH et Dr. Boris GOUILLEUX, récemment arrivé dans l'équipe pour les nombreuses discussions scientifiques, logistiques et sportives au cours de ces derniers mois. Ça fait plaisir d'avoir du répondant autour du football

Remerciements

et du sport en général, et surtout de la cour des miracles marseillaise : la gare Marseille Saint Charles !

Je souhaite également remercier Delphine ARQUIER et le Dr. Nicolas GIRAUD qui m'ont beaucoup soutenu et bien conseillé durant ma première année très intense. Merci pour vos conseils et votre bonne humeur. Je n'oublierai jamais ma grande sœur de « PACS P5 » ! Et s'il y a eu des matchs de football difficiles à digérer, je me souviendrai du seul supporter de Jean-Michel Aulas que j'ai apprécié. Je remercie également Lysiane CHAMPION pour sa gentillesse et ses conseils. Merci également aux « anciens » du laboratoire, notamment les Dr. Jean-Pierre BAYLE et Patrick JUDENSTEIN pour leurs conseils.

Je ne peux finir ces lignes sans remercier ma famille et à mes amis. Merci à mes parents pour tout ce qu'ils ont fait pour moi. Maman, pour tout ce que tu as fait, je ne serais pas arrivé jusqu'ici sans toi, encore aujourd'hui pour ces corrections. Ces allers-retours quotidiens auraient eu raison de moi. Papa, sans tes conseils avisés, tes interventions acérées, et tes traits d'esprit, je ne serais pas arrivé au bout. Merci infiniment à Elodie et Valentin sans qui je ne serais pas qui je suis, ça y est ! Nous y sommes arrivés au bout de ces trois ans !

Pour finir je remercie l'ensemble des Permanents, Post-Docs, Doctorants et Stagiaires de l'ICMMO avec qui j'ai pu discuter, échanger, partager, rigoler, boire et manger. Dans le désordre, je remercie Patricia, Philippe, Zeynab, Guillaume, Océane, Morane, Alexandre, Julien, Coline, Amanda, Sophie, Laura, Jean-Etienne, Blaise, Marion, Ghada, Aurélie, Fahima, Eva, Sophie, Axel, Nicolas, Sébastien, Nelly, David, Emilie, Tass, Rosa, Maria Francesca, Giovanna, ... A cette liste non-exhaustive mais aussi à tous les autres, je dis grandement. merci

Liste des abréviations et des notations grecques utilisées

NB : Ces abréviations contiennent à la fois des acronymes en français et en anglais.

¹H : Hydrogène

²H : Deutérium (Hydrogène-2)

¹²C : Carbone-12

¹³C : Carbone-13

1D : Une dimension spectrale

2D : Deux dimensions spectrales

ACD: Agents Chiraux de Dérivation

ACQ : Temps d'acquisition (s)

ACDCL : Agents Chiraux de Déplacement Chimique à base de lanthanide

ACS : Agents Chiraux de Solvatation

ADC : Analog-to-Digital Converter

AG : Acide Gras (forme estérifiée)

AGI : Acide Gras Insaturé (forme estérifiée)

AGIC: Acide Gras Insaturé Conjugué (forme estérifiée)

AGS : Acide Gras Saturé (forme estérifiée)

AINS : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien

Bis-WET : Double-WET

CAN : Convertisseur Analogue-Digital

CAM : Crassulacean Acid Métabolism

CCl₄ : Tétrachlorométhane

CG: Chromatographie en phase gazeuse

CH₂Cl₂ : Dichlorométhane

CH₃CN : Acétonitrile

CHCl₃ : Chloroforme

CL : Cristal Liquide

CLA : Cristal Liquide Achiral

CLC : Cristal Liquide Chiral

CLHP: Chromatographie Liquide à Haute Performance

COSY: COrrélation SpectroscopY

CPD: Composite Pulse Decoupling

CS: Compressed Sensing

CSA : Anisotropie de déplacement chimique (Chemical Shift Anisotropy)

D_{ij} : Couplage dipolaire (résiduel) ij (Hz)

D₁: Délai de relaxation (s)

Abréviations

DAN : Deutérium en Abondance Naturelle
DMF : DiMéthylFormamide
DNP : Dynamic Nuclear Polarization
DP : Degré de Polymérisation
DQ : Double Quantum
EM : Eleostéarate de Méthyle
EE : Excès Enantiomérique (%)
EI : Excès Enantio-Isotopomérique (%)
EIC : Effet Isotopique Cinétique
ERETIC : Electronic Reference To access In Vivo Concentration
F₁ : Dimension spectrale indirecte
F₂ : Dimension spectrale directe (Acquisition)
FAS : Fatty Acid Synthetase
FID : Free Induction Decay
FINS : Fractionnement Isotopique Naturel Site-Spécifique
FWHM : Largeur de raies à mi-hauteur (Hz)
EIC : Effet isotopique cinétique
G₁ : Gradient de champ magnétique
GC : Chromatographie en phase Gazeuse
IRMS : Isotopic-Ratio Mass Spectroscopy
J_{ij} : Couplage scalaire ij (Hz)
K : Degré Kelvin
k(²H) : Coefficient de distribution isotopique
LM : Linoléate de Méthyle
LnM : Linolénate de Méthyle
MM : Myristate de Méthyle
MW : Molecular Weight
M₀ : Aimantation macroscopique à l'état initial (axe z)
M_{xy} : Aimantation macroscopique dans le plan x,y
NS : Nombre de Scans
NS_t : Nombre de scans total
NUS : Non-Uniform Sampling (échantionnage non uniforme)
OM : Oléate de Méthyle
O₁ : Offset frequency
PBDG : Poly- γ -Benzyl-*D*-Glutamate
PBLA : poly- β -benzyl-*L*-aspartate
PBLG : Poly- γ -Benzyl-*L*-Glutamate

Abréviations

PCBLL : poly- ϵ -carboxy-L-lysine (PCBLL)
PELG : Poly- γ -Ethyl-L-Glutamate
PLA : Polyacétyleène
PM : Punicate de Méthyle
PPLA : Poly- β -Phenethyl-L-Aspartate
PPM : Partie Par Million
PSIA : Position Specific Isotopic Analysis
Q-COSY Fz : Quadrupolar CORrelation SpectroscopY with z-Filter gradient
Q-resolved Fz : Quadrupolar resolved with z-Filter gradient (*Q*-résolue)
QUOSY : QUadrupolar Ordered SpectroscopY
QUOSY-WET : QUadrupolar Ordered SpectroscopY - Water Supression Enhanced T₁ effect
R : Enantiomère de configuration absolue *R*
RCSA : Residual Chemical Shift Anisotropy
RD : Radiation Damping
RDC : Residual Dipolar Coupling (Hz)
RF : Radio-Fréquence (Hz)
RG : Receiver Gain (gain en dB de la chaîne de réception du signal RMN)
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RMN DAN : Résonance Magnétique Nucléaire du Deutérium en Abondance Naturelle
RMN-FINS[®] : Résonance Magnétique Nucléaire par Fractionnement Isotopique Naturel Site-Spécifique
RQC : Residual Quadrupolar Coupling (Hz)
RSD : Relative Standard Deviation
S/B : Rapport Signal-sur-Bruit
S : Enantiomère de configuration absolue *R S*
SM : Stéaréate de méthyle
SM : Spectrométrie de Masse
SMri : Spectrométrie de Masse à rapport isotopique
SP : Shape Pulse
SPE : Extraction en Phase Solide
SPmE : Micro-Extraction en Phase Solide
SQ : Simple Quantum
SW : Spectral Width (ppm)
t_{Acq} : Temps d'acquisition des données en t₂ (s)
T_R : Temps de recyclage (D₁ + t_{Acq}) (s)
t_{SP} : Temps des impulsions sélective (ms)
TD_{aq} : Nombre d'incrément t₁ acquis en mode NUS

Abréviations

- TD_{rec}** : Nombre d'incrément t_1 reconstruits en mode NUS
- TD₁** : Nombre d'incrément en dimension t_1 d'une expérience 2D
- TD₂** : Nombre de points d'acquisition en dimension t_2
- TF** : Transformée de Fourier
- TG** : Triglycéride
- THF** : Tétrahydrofurane
- T_{ij}** : Couplage spin-spin total i-j (Hz)
- Tilt** : Procédure de basculement des DQ(²H)
- TMU** : Tétraméthylurée
- T_R** : Temps de recyclage (s)
- T₁** : Temps de relaxation longitudinal (s)
- T₂** : Temps de relaxation transversale (s)
- US** : Uniform sampling (échantionnage uniforme)
- V** : Gradient de champ électrique
- WET** : Water suppression Enhanced by T₁ effect
- δ** : Déplacement chimique (ppm)
- δ^{aniso}** : Déplacement chimique anisotrope (ppm)
- δ^{iso}** : Déplacement chimique isotrope (ppm)
- Δν_Q** : Eclatement quadrupolaire (Hz)
- Δχ_m** : Anisotropie de susceptibilité magnétique moléculaire
- σ^{iso}** : Ecrantage électronique isotrope
- σ^{aniso}** : Ecrantage électronique anisotrope

Remerciements.....	3
Liste des abréviations et des notations grecques utilisées.....	6
Introduction générale.....	17
Références.....	26
Chapitre I : La RMN dans les cristaux liquides.....	29
1. Présentation des cristaux liquides.....	30
1.a. Introduction	30
1.b. Les différentes phases cristal-liquides.....	30
1.b.i. Les phases thermotropes	30
1.b.ii. Les phases lyotropes.....	32
1.c. Les différentes organisations des phases cristal-liquides	32
1.c.i. Les phases nématiques (N).....	33
1.c.ii. Les phases smectiques (S)	33
1.c.iii. Les phases cholestériques (Ch).....	33
1.d. Utilisation de homopolymères polypeptides pour la formation de phases CL lyotropes ..	34
1.d.i. Le polymère PBLG	34
1.d.ii. Autres homopolymères polypeptidiques utilisables en milieu cristal-liquide chiral.	37
2. Les paramètres d'ordre	40
2.a. Expression de la fonction de probabilité d'orientation $P(\{X_N\})$	40
2.a.i. Expression générale de la fonction de probabilité.....	40
2.a.ii. Expression de la fonction de probabilité dans une phase nématique.....	42
2.a.iii. Développement de la fonction par les matrices de Wigner.....	43
2.b. La matrice d'ordre de Saupe.....	45
2.b.i. Description de la matrice de Saupe.....	45
2.b.ii. Calcul du facteur d'orientation d'une direction internucléaire	46
3. Les interactions RMN	47
3.a. Description de l'Hamiltonien de spin.....	47
3.b. Présentation de l'interaction de déplacement chimique	47
3.c. Principe des couplages spin-spin.....	49
3.c.i. L'interaction de couplage scalaire.....	49
3.c.ii. L'interaction de couplage dipolaire.....	50

3.c.iii. <i>Le couplage spin-spin total</i>	50
3.d. L'interaction de couplage quadrupolaire	51
4. Technique RMN de discrimination énantiomérique en milieu cristal-liquide chiral	53
4.a. Stéréochimie et conséquences spectrales en RMN.....	53
4.b. Analyse par RMN du proton (¹ H).....	54
4.c. Analyse par RMN du carbone-13 (¹³ C).....	54
4.c.i. <i>La RMN du carbone-13 découplé du proton (RMN ¹³C-¹H)</i>	55
4.c.ii. <i>La RMN du carbone-13 couplé du proton (RMN ¹³C)</i>	56
4.d. La RMN du deutérium (² H) découplé du proton de molécules marquées.....	57
5. Discrimination énantiomérique par RMN DAN	59
5.a. Etude par RMN 1D du deutérium en abondance naturelle.....	59
5.b. Méthodologies RMN 2D du deutérium en abondance naturelle	62
5.b.i. <i>Les expériences Q-COSY</i>	62
5.b.ii. <i>Les expériences Q-COSY Fz</i>	64
5.b.iii. <i>Les expériences Q-resolved Fz</i>	65
5.b.iv. <i>Les expériences Q-resolved MQ</i>	67
5.b.v. <i>L'expérience δ-resolved Fz</i>	67
5.b.vi. <i>Les impulsions dures composites</i>	69
Références	71
Chapitre II : Analyse isotopique quantitative par Résonance Magnétique Nucléaire ... 79	
1. Principe de la RMN quantitative	80
1.a. Introduction	80
1.b. Paramètres importants en RMN quantitative.....	81
1.b.i. <i>Principe de l'exactitude des mesures</i>	81
1.b.i.1. Evaluation de la précision des résultats	81
1.b.i.2. Evaluation de la justesse des résultats	82
1.b.ii. <i>Le rapport Signal sur Bruit (S/B)</i>	82
1.b.iii. <i>Angle d'impulsion β</i>	83
1.b.iv. <i>Temps de relaxation T₁ et de recyclage T_R</i>	83
1.c. Méthodes de référence en RMN quantitative	84
1.c.i. <i>Utilisation d'une référence interne</i>	84

Sommaire

1.c.ii.	Utilisation d'une référence externe	86
1.c.iii.	Utilisation d'une référence électronique (ERETIC).....	87
2.	Mesures isotopiques quantitatives par RMN.....	88
2.a.	Analyse isotopique	88
2.a.i.	Définitions	88
2.a.ii.	Les paramètres de mesures isotopiques	89
2.a.iii.	Méthode de mesure de la composition isotopique moléculaire par Spectrométrie de Masse	90
2.b.	Fractionnement isotopique naturel site-spécifique par RMN	91
2.b.i.	Historique	91
2.b.ii.	Séquence RMN 1D DAN appliquée aux analyses deutérium quantitatives.....	91
2.b.iii.	Conditions méthodologiques	92
2.c.	Détermination du profil isotopique par RMN DAN.....	92
2.c.i.	Particularités.....	92
2.c.ii.	Inconvénients.....	93
2.c.iii.	Un nouvel outil : les cristaux liquides chiraux.....	94
3.	La RMN DAN dans les cristaux liquides chiraux	95
3.a.	Introduction	95
3.b.	Application des CLC aux molécules cibles d'intérêt	95
3.b.i.	Etude de la famille des acides gras	95
3.b.ii.	Etude de la miliacine.....	99
	Références.....	103
 Chapitre III : Nouvelles méthodologies d'analyses RMN dans les cristaux liquides chiraux..... 107		
1.	Les techniques de suppression sélective des signaux du solvant en RMN	108
1.a.	Introduction	108
1.b.	Séquence de saturation sélective utilisée en RMN isotrope	109
1.b.i.	Les premières techniques de saturation	109
1.b.ii.	La séquence WATERGATE	109
1.b.iii.	Description de la séquence WET.....	110
1.c.	Application dans les phases orientées lyotropes.....	111

2. Suppression sélective des signaux du co-solvant en milieu cristal liquide chiral	113
2.a. Suppression d'une composante du DQ du co-solvant	114
2.b. Suppression sélective sur les deux composantes du DQ	118
2.b.i. Application de la double impulsion sélective	118
2.b.ii. Application d'une impulsion sélective ^2H avec un angle de 90° et de 270°	120
2.c. Application de la séquence WET- 90° ^2H sur les composantes d'un DQ	122
2.d. Développement de l'expérience 1D ^2H - $\{^1\text{H}\}$ Bis-WET	124
3. Incorporation de la saturation doublement sélective Bis-WET dans les séquences RMN 2D en milieu cristal liquide	126
3.a. Développement des expériences 2D QUOSY ^2H - $\{^1\text{H}\}$ Bis-WET	126
3.b. Application des expériences 2D QUOSY Bis-WET ^2H sur des échantillons en abondance naturelle	129
3.b.i. Analyse des échantillons à abondance isotopique naturelle	129
3.b.ii. Limitation pratique des expériences 2D QUOSY Bis-WET DAN	131
4. Application du Non-Uniform Sampling en milieu orientée	133
4.a. Principe du protocole NUS	133
4.b. Paramétrage du protocole « <i>Non Uniform Sampling</i> »	134
4.c. Application du protocole NUS dans les expériences 2D QUOSY DAN	138
5. Application du protocole NUS sur les expériences 2D QUOSY avec saturation sélective	138
5.a. Combinaison du protocole NUS et saturation sélective Bis-WET	139
5.b. Application du protocole NUS sur une molécule d'intérêt : cas de la frambinone	144
5.c. Augmentation du nombre de scans à temps d'expérience constant	146
Références	150
Chapitre IV : Analyse de la vanilline par RMN DAN dans une phase cristal-liquide chirale	155
1. L'arôme de vanille	156
1.a. Composition moléculaire de la vanille	156
1.b. Voie de synthèse de la vanilline	157
1.c. Stratégie analytique de vérification des échantillons de vanilline	159
1.c.i. Analyse par chromatographie	159
1.c.ii. Analyse par spectrométrie de masse	160

Sommaire

1.c.iii.	Analyse isotopique par SMri	160
1.c.iv.	Analyse isotopique par RMN-FINS® du ^2H - $\{^1\text{H}\}$	160
1.c.v.	Analyse isotopique par RMN-FINS du ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$	161
1.d.	Analyse de la vanilline en RMN ^2H - $\{^1\text{H}\}$ isotrope	161
2.	Apport de la RMN DAN anisotrope pour l'étude isotopique de la vanilline.....	164
2.a.	Attribution des signaux ^2H anisotrope de la molécule de vanilline	164
2.a.i.	Impact de l'axe des liaisons C- ^2H sur l'analyse de la Vanilline	164
2.a.ii.	Simplification des analyses avec les expériences RMN 2D QUOSY DAN	166
2.b.	Optimisation des conditions expérimentales pour l'étude de la vanilline	166
2.b.i.	Optimisation de la phase cristal-liquide lyotrope polypeptidique	167
2.b.ii.	Choix de la température optimale	171
2.c.	Acquisition des spectres RMN 2D DAN- $\{^1\text{H}\}$ anisotrope de la vanilline de différentes origines	174
3.	Discrimination d'échantillons naturels et synthétiques par RMN DAN anisotrope.	177
3.a.	Apport du TMU dans l'analyse isotopique de la vanilline	178
3.a.i.	Intérêts de l'utilisation du TMU dans une mésophase cristal liquide	178
3.a.ii.	Limites de l'utilisation du TMU pour l'étude isotopique de la vanilline	178
3.b.	Discrimination des différentes sources de vanilline à partir des rapports isotopiques des positions aromatiques de la vanilline	179
3.c.	Interprétation de ces différences isotopiques.....	183
	Références.....	186
Chapitre V : Analyse de la Frambinone par RMN 2D DAN dans une phase cristal-liquide chirale		
190		
1.	L'arôme de Framboise.....	191
1.a.	Présentation de la frambinone	191
1.b.	Voie de synthèse de la molécule de frambinone	193
1.c.	RMN 1D ^1H et DAN- $\{^1\text{H}\}$ isotrope de la frambinone	195
2.	Apport de la RMN ^2H anisotrope dans un milieu anisotrope	198
2.a.	Caractérisation de la molécule de frambinone	198
2.a.i.	Utilisation d'une phase cristal-liquide achirale (CLA).....	198
2.a.ii.	Utilisation d'une phase cristal liquide chirale (CLC).....	199

2.b. Optimisation de la phase cristal-liquide chirale PBLG	201
3. Discrimination d'échantillons naturels et synthétiques par RMN 2D DAN-¹H} anisotrope	
3.a. Analyse de la distribution isotopique des directions énantiotopes de la frambinone	204
3.a.i. <i>TMU et RMN DAN anisotrope</i>	204
3.a.ii. <i>Calcul des coefficients de distribution isotopique relatifs aux sites énantiotopes</i> ..	204
3.a.iii. <i>Calcul des excès énantio-isotopomériques associés aux groupements méthylènes</i>	207
3.b. Utilisation des expériences 2D QUOSY Bis-WET DAN- ² H} et du protocole NUS	209
3.b.i. <i>Suppression du DQ(²H) du co-solvant organique</i>	209
3.b.ii. <i>Application du protocole NUS</i>	211
Références	217
Conclusion générale	220
Liste des Figures	225
Liste des Tableaux	234
Annexe	235
Liste des Annexes	236
ANNEXE A : Localisation des axes <i>x</i> , <i>y</i> et <i>z</i> de la matrice de Saupé associés à différents groupes dissous dans CL uniaxiale chirale ou achiral	237
ANNEXE B : Plan d'expériences pour l'acquisition de spectre de RMN 2D deutérium découplé des protons en abondance naturelle (RMN 2D DAN- ¹ H}) de type « QUOSY-Bis WET » avec l'application possible du « protocole NUS»	238
ANNEXE C : Séquence 2D Q-COSY	263
ANNEXE D : Séquence 2D Q-COSY Fz.....	265
ANNEXE E : Séquence 2D Q-résolue	267
ANNEXE F : Séquence 2D Q-résolue Fz	269
ANNEXE G : Séquence 2D Q-résolue MQ	271
ANNEXE H : Séquence 2D δ -résolue.....	273
ANNEXE I : Séquence 2D δ -résolue Fz	275

Sommaire

ANNEXE J: Séquence 1D zgdc.....	277
ANNEXE K: Séquence 1D selzgd.....	278
ANNEXE L: Séquence 1D zgdc WET.....	279
ANNEXE M: Séquence 1D zgdc Bis-WET	281
ANNEXE N : Séquence 1D Q-COSY Fz Bis-WET	284
ANNEXE O : Séquence 2D Q-résolue Fz Bis-WET	287
ANNEXE P : Séquence 2D Q-résolue MQ BIS-WET	291
ANNEXE Q : Exemple de liste d'échantillonnage de points utilisée pour des expériences 2D QUOSY intégrant le protocole NUS.....	294
ANNEXE R : Table des caractéristiques RMN des trois isotopes de l'hydrogène	295
Liste des Figures annexes.....	296
Production Scientifique.....	298
Publications scientifiques.....	298
Communication orales (réalisées)	298
Communication par affiches.....	298

Introduction générale

Il est maintenant reconnu, depuis une demi-décennie, que les énantiomères (isomères optiques) d'une molécule chirale active peuvent présenter des différences de bioactivités. De multiples exemples peuvent être cités dans tous les domaines de la chimie (pharmaceutique, agrochimie, parfumerie, ...). Pour la plupart des composés chiraux, l'activité biologique recherchée est principalement associée à un seul énantiomère, tandis que le second présentera des propriétés différentes, pouvant aller d'une simple inactivité biologique à une forte toxicité. Ce phénomène s'explique par des comportements différents (interactions) des molécules chirales bioactives face à certains récepteurs spécifiques (protéines, hormones, ADN, ...) [1].

Parmi les nombreux exemples que l'on peut citer, le cas de la molécule d'aspartame est intéressant. Elle est utilisée dans l'agro-alimentaire comme un substitut du sucre (glucose et saccharose). Correspondant à un dipeptide formé par l'acide-*L*-aspartique et la *L*-phénylalanine, elle a été synthétisée en 1966 sous le nom de *L*-Aspartyl-*L*-phénylalanate de méthyle [2]. Pour cette molécule, il avère que l'énantiomère *R* présente un goût sucré, alors que l'énantiomère *S* demeure insipide. Si cette différence gustative n'est pas problématique, d'autres exemples ont conduit à des événements plus dramatiques. Le cas le plus emblématique en pharmacopée reste celui du Thalidomide [3]. Synthétisé en série racémique (*R* + *S*) en 1954, ce principe actif a été commercialisé en 1957 en tant que sédatif non barbiturique. Compte-tenu de sa faible toxicité lors des essais pharmaceutiques, il fut prescrit comme médicament aux femmes enceintes pour lutter contre les nausées. Si les propriétés pharmaceutiques recherchées provenaient de l'énantiomère *R*, les effets associés à l'énantiomère *S* se sont révélés catastrophiques pour le développement fœtal (effets tératogènes majeurs) en entraînant des malformations congénitales sévères chez les nouveau-nés, notamment au niveau des membres supérieurs.

L'analyse de ce drame a conduit, notamment les (bio)chimistes, à mieux comprendre l'importance des différences d'activités biologiques associées à un couple d'énantiomères (enjeu sociétal), mais aussi que la mise au point de méthodes analytiques aussi généralistes que performantes permettant la détermination de la pureté énantiomérique (*ee*) d'une molécule chirale était un enjeu nouveau et essentiel, tant en synthèse organique qu'en chimie analytique. Depuis, les normes européennes (directives REACH par exemple) mises en place imposent un contrôle obligatoire de toutes les impuretés d'un mélange et de leurs effets biologiques, notamment ceux des énantiomères minoritaires non désirés mais présents dans le mélange.

Historiquement, l'analyse de la pureté d'un « mélange » énantiomérique (énantiopur / énantio-enrichi / racémique) repose sur des méthodes chiroptiques (polarimétrie, dispersion rotatoire, ...) [4]. Ces techniques se basent sur l'utilisation d'un faisceau lumineux de longueur d'onde connue linéairement polarisé. Dans le cas d'une solution présentant un mélange racémique, le plan de polarisation ne sera pas dévié, alors qu'en présence d'un

énantiomère pur ou majoritaire, ce plan sera dévié à droite (dextrogyre) ou à gauche (lévogyre) [5]. Si cette méthode demeure très simple à mettre en place, elle présente des inconvénients importants. En effet, la présence même infime d'impuretés chirales présentant une activité optique non nulle va fausser la mesure des excès énantiomériques (*ee*). De plus, le choix des conditions expérimentales, comme la température ou la nature même du solvant, peuvent influencer sur la valeur de l'*ee* mesurée.

De nos jours, les méthodes analytiques de routine les plus utilisées dans les laboratoires académiques ou les laboratoires de R&D industriels sont essentiellement la chromatographie chirale en phase gazeuse (GC) et en phase liquide à haute performance (HPLC). Le principe de ces méthodes repose sur l'utilisation d'une phase stationnaire dans la colonne composée d'une espèce chirale greffée qui va interagir différemment avec des énantiomères pour les séparer et les quantifier. Si ces approches sont généralement énantiomériquement performantes (séparation des énantiomères), l'optimisation des paramètres chromatographiques reste une étape importante et propre à chaque composé. L'optimisation des séparations énantiomériques est parfois longue, voire impossible, si les colonnes disponibles sont inadaptées.

Si les techniques chromatographiques chirales sont généralement efficaces, la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) reste toujours une alternative importante en chimie analytique pour mesurer les excès énantiomériques. Dans un environnement achiral, deux énantiomères plongés dans un champ magnétique, \mathbf{B}_0 , homogène et uniforme (symétrie axiale) vont présenter des propriétés magnétiques identiques et seront donc indissociables par RMN. Pour pouvoir déterminer leurs puretés énantiomériques par RMN, il est nécessaire d'utiliser des entités chirales (énantiopures) au sein du mélange afin de former des diastéréoisomères de façon covalente ou temporaire (complexe). En effet, les diastéréoisomères ayant des environnements chimiques et magnétiques différents, leurs signaux RMN doivent être inéquivalents. En principe, les différences de déplacements chimiques observées pour les deux diastéréoisomères doivent permettre leurs discriminations spectrales et leurs quantifications. En RMN liquide (RMN isotrope), il existe plusieurs méthodes qui utilisent divers types d'agents chiraux énantiopurs. On peut, ainsi, citer les agents chiraux de dérivation (ACD), les agents chiraux de solvation (ACS) ou les agents chiraux de déplacements chimiques à base de lanthanide (ACDCL) [4, 6].

Par exemple, l'acide α -méthoxy- α -trifluorométhylphénylacétique (aussi appelé acide de Mosher) est communément utilisé comme ACD pour analyser des amines, des alcools ou des acides carboxyliques chiraux. L'acide de Mosher étant énantiomériquement pur, il va former deux diastéréoisomères covalents en réagissant avec chaque énantiomère. En RMN du proton ou du fluor, les diastéréoisomères vont être *a priori* distingués sur la base d'une différence de déplacements chimiques ^1H ou ^{19}F . En pratique, cette méthode n'est pas générale. De plus, elle demande une étape de dérivation (terminale) des énantiomères à

étudier, tout en ne garantissant pas la résolution des diastéréoisomères *in fine* sur le spectre. Par ailleurs, il est nécessaire que la molécule possède des fonctionnalités chimiques spécifiques (groupes polaires, -NH, -OH, -COOH) capables de réagir avec l'ACD.

Une alternative aux ACDs est l'utilisation d'agents (appelés aussi réactifs) chiraux de déplacements chimiques à base de lanthanide (ACDCL) comme l'Europium (Eu) ou l'Ytterbium (Yb). Ces agents permettent d'analyser : i) les composés possédant des groupements donneurs d'électrons (cétones, alcools, ...). Il existe aussi des complexes binucléaires, composés de terres rares et de métaux (Ag), pour différencier des composés chiraux faiblement donneurs comme les alcènes ou les composés aromatiques. Les énantiomères forment *in situ* (dans le tube RMN) des complexes diastéréoisomères temporaires (ou adduits). Les différences de déplacements chimiques entre les complexes diastéréoisomériques sont amplifiées par l'effet inductif des noyaux lanthanides. Malheureusement, cet avantage est contrebalancé par les effets paramagnétiques des lanthanides qui peuvent induire un élargissement des raies suffisamment grand pour gêner la discrimination spectrale des diastéréoisomères.

Une alternative aux ACDs et aux ACDCLs est l'utilisation d'agents chiraux de solvation (ACS). Comme les ACDCLs et contrairement aux ACDs, les ACS se « lient » temporairement aux énantiomères en formant des complexes diastéréoisomériques (adduits). L'utilisation de ces agents n'est souvent possible qu'en présence de solvants peu polaires (CDCl_3 , C_6D_6). Les spectres obtenus sont alors composés de deux types de signaux : i) les signaux des énantiomères libres non discriminés ; ii) les signaux correspondant aux complexes diastéréoisomères formés. Seuls, ces derniers sont susceptibles d'être discriminés sur la base d'une différence de déplacements chimique isotrope. Dans la famille des ACSs, on peut citer les macromolécules encageantes ou criptantes (comme les cyclodextrines) qui ont donné de bons résultats avec des composés apolaires chiraux (notamment les alcanes) [7].

Malgré les limitations intrinsèques à ces techniques analytiques (présence de fonctions chimiques spécifiques dans la molécule, polarité du solvant, ...), elles sont couramment testées pour évaluer les excès énantiomériques par RMN en milieu isotrope. Clairement, aucune technique n'est générale et le choix de la méthode (ACD, ACS, ACDCL) va dépendre de la nature du composé chiral à étudier et des fonctions chimiques disponibles. Ainsi, certaines familles chimiques comme les halogénures, les éthers ou les hydrocarbures chiraux ne sont pas (ou difficilement) étudiables avec des ACSs ou des ACDCLs. En effet, l'absence de fonction très polaire réduit la possibilité de former une liaison ou générer une interaction entre les énantiomères et l'agent chiral. De plus, ces méthodes permettent la discrimination des deux diastéréoisomères associés uniquement sur la base d'une différence de déplacements chimiques qui selon les molécules étudiées peut être relativement faible par rapport aux largeurs de raies (notamment avec l'utilisation des espèces paramagnétiques).

A ce jour, les différentes techniques analytiques de routine (les plus) employées pour l'analyse énantiomérique (DRX, GC/HPLC chirales, spectroscopie RMN liquide en présence d'entités chirales, ...) n'apparaissent pas comme des méthodes universelles. Elles ne permettent donc pas toujours de répondre efficacement aux problématiques des chimistes.

Au début des années 1990, une alternative à la RMN isotrope ne nécessitant pas une interaction intermoléculaire entre un groupement fonctionnel spécifique du soluté et de l'agent chiral (stimuli chiral) a été proposée [8]. Cette approche consiste à remplacer les solvants isotropes par des milieux orientés comme une phase cristal-liquide chirale (CLC). Elle associe donc le potentiel énantio-discriminant des CLCs au pouvoir analytique de la RMN en milieu orienté. En particulier, l'originalité de cet outil repose sur la détection d'observables RMN sensibles à l'ordre orientationnel des molécules au sein de l'échantillon. Rappelons ici qu'en milieu isotrope (température ambiante), les molécules présentent un mouvement aléatoire (mouvement Brownien) durant l'acquisition des spectres de RMN. Dans ces conditions, l'ordre orientationnel des molécules est nul en moyenne, et par conséquent, les observables RMN « anisotropes » dépendantes de l'ordre orientationnel ne sont pas accessibles sur les spectres isotropes.

Un intense travail de développements méthodologiques a alors été mené au laboratoire de « RMN en milieu orienté » de l'ICMMO (UMR 8182) depuis une trentaine d'années [9]. Les différents outils développés et exploités ont permis de répondre à de nombreuses problématiques autour de l'analyse diastéréomérique / énantiomérique / énantiotopique, tandis que les méthodes classiques isotropes étaient inefficaces [7].

L'utilisation de milieux orientés comme solvants de RMN tels que les cristaux liquides chiraux (CLC) lyotropes permet d'accéder à toutes les interactions RMN anisotropes d'une molécule [9, 10, 11]. En effet, dans une phase CL ou CLC, les molécules adoptent un ordre orientationnel moyen au sein de l'échantillon, et de fait, les interactions RMN résiduelles anisotropes sensibles à l'ordre orientationnel telles que : i) l'anisotropie de déplacement chimique résiduelle (RCSA); ii) le couplage dipolaire résiduel (RDC) ou iii) l'interaction quadrupolaire résiduel (RQC) spécifique aux noyaux de spin $I > \frac{1}{2}$ qui étaient moyennées à zéro dans les échantillons isotropes (à cause du mouvement Brownien) deviennent observables [9].

Les milieux orientés à base de CLC lyotropes polymériques peuvent être préparés à partir, par exemple, de poly- γ -benzyl-*L*-glutamate (PBLG) [9-12], de poly- ϵ -carboxy-*L*-lysine (PCBLL) [13] ou de polyacétyleène (PLA/PDA) [14] (cf. **Chapitre I**). Pour obtenir une phase CLC lyotrope, il est nécessaire de dissoudre un homopolymère (ou un copolymère ou un mélange d'homopolymère) de synthèse dans un co-solvant organique adéquat. Dans le cas des polypeptides (PBLG, PCBLL, PELG, ...), le solvant organique ne doit pas dénaturer l'hélice

peptidique (rupture des liaisons hydrogène de l'hélice α). Les solvants utilisables peuvent être peu polaires (CHCl_3 , CH_2Cl_2) ou polaires (DMF, THF, TMU).

Au cours des dernières décennies, différents outils/expériences RMN (1D, 2D, 3D, avec ou sans découplage des ^1H) ont été développés spécifiquement pour différents types de noyaux (magnétiquement actifs), comme le ^1H , le ^2H , le ^{13}C ou le ^{19}F , par exemple [9-11]. En RMN du deutérium, la technique a été appliquée sur une large gamme de composés organiques marqués (molécule mono-, poly- ou perdeutérée) ou en abondance naturelle [9-11].

L'intérêt de la RMN ^2H pour analyser des molécules marquées est multiple : i) l'éclatement quadrupolaire ^2H (spin $I=1$) est l'interaction la plus sensible à une différence d'ordre orientationnel entre énantiomère ; ii) la RMN $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ de molécules chirales monodeutérées conduit à des spectres relativement simples avec un doublet quadrupolaire pour chaque énantiomère. Toutefois, ce protocole nécessite des analytes chiraux enrichis en deutérium. Une alternative puissante, développée à partir de 1998 [15], consiste à enregistrer des spectres RMN du deutérium en abondance naturelle (RMN DAN) [9-12]. Cet outil est au cœur de ce travail de Thèse.

Compte tenu de la faible abondance isotopique naturelle du noyau ^2H ($1,55 \times 10^{-2} \%$), la RMN DAN en milieu isotrope ou en milieu orienté peut apparaître peu attractive pour les chimistes car elle nécessite de grandes quantités de soluté à utiliser (pas toujours disponibles) [7-12]. Aujourd'hui, ces problèmes de sensibilité liés à la RMN DAN sont contournés en enregistrant les spectres sur un spectromètre RMN à haut champ magnétique de 14,1 T (correspondant à une fréquence de résonance pour le noyau ^2H de 92,1 MHz), équipé d'une crysonde sélective deutérium (5 mm).

Cette combinaison permet d'obtenir des spectres 1D RMN DAN isotropes et anisotropes en quelques heures avec des quantités de solutés (chiraux) raisonnables (30 - 100 mg en fonction de leur masse moléculaire). Le second problème associé à la RMN DAN réside dans l'apparition d'un nombre conséquent de doublets quadrupolaires ($\text{DQ}(^2\text{H})$) sur les spectres 1D DAN découplés du proton ($\text{DAN}\{-^1\text{H}\}$), associés aux différents isotopomères inéquivalents du mélange. En effet, pour chaque site hydrogéné d'un composé, il existe un isotopomère monodeutééré associé qui apparaîtra sous la forme d'un doublet quadrupolaire. Pour des molécules de taille importante, la multitude des $\text{DQ}(^2\text{H})$ observables sur les spectres RMN 1D DAN conduit à une analyse plus difficile, en particulier l'appariement des deux composantes de chaque DQ et leur attribution respective. Pour contourner cette difficulté, des expériences RMN bidimensionnelles d'autocorrélation ^2H appelées QUOSY (QUadupole Ordered SpectroscopY) ont été mises au point pour simplifier l'analyse et l'attribution des doublets quadrupolaires [15-17].

D'un point de vue applicatif, la RMN DAN dans les CLC a notamment été utilisée pour la mesure des excès énantiomériques de diverses petites molécules chirales (synthons chiraux dont le contrôle stéréochimique est essentiel, molécules d'intérêt pharmaceutique (famille des profènes (AINS), ...) [9, 19].

Depuis 2004, un intérêt particulier a été porté à l'étude des profils isotopiques sites-spécifiques ($^2\text{H}/^1\text{H}$) de molécules achirales, chirales et prochirales à l'aide de la RMN 2D DAN anisotrope [20-22]. Ces travaux de recherche font suite aux travaux des Profs. G. Martin et M.Y. Martin à l'Université de Nantes, qui ont développé en 1981 une technique analytique puissante, nommée RMN-FINS[®], (Fractionnement Isotopique Naturel Site-spécifique par Résonance Magnétique Nucléaire) pour mesurer les rapports isotopiques deutérium-proton ($^2\text{H}/^1\text{H}$) spécifiques à chaque position (inéquivalente) d'une molécule [23] alors que les méthodes utilisant la spectrométrie de masse à rapport isotopique (SMri) ne donnent accès qu'à un rapport isotopique global. Cette technique s'est révélée être un outil incontournable pour déterminer les origines biologiques ou synthétiques des molécules utilisées dans les spiritueux, l'agro-alimentaire ou l'industrie cosmétique [24-27].

Contrairement à la méthode classique isotrope « RMN-FINS[®] », l'utilisation d'un cristal-liquide chiral permet de discriminer les énantiomères de molécules chirales et les directions énantiotopes de molécules prochirales. Cette approche permet donc d'accéder aux rapports isotopiques ($^2\text{H}/^1\text{H}$)_i associés aux énantiomères (détection de diastéréo-isotopomères et/ou d'énantio-isotopomères monodeutérés) mais aussi aux directions énantiotopes (détection d'énantio-isotopomères monodeutérés) de molécules prochirales [24-27]. Cet apport d'informations isotopiques associées à une énantiodétection spectrale a été crucial pour mieux comprendre les aspects stéréochimiques des mécanismes enzymatiques conduisant à la formation de petites biomolécules (acides gras, par exemple). Il peut également fournir de nouvelles données importantes pour déterminer l'origine géographique et/ou botanique de composés naturels ou comprendre leurs voies de productions (fermentation naturelle, synthétique, ...) [27, 28].

Les travaux de cette Thèse menés autour de cette problématique se sont focalisés autour de deux axes principaux.

Le premier axe a consisté en une optimisation des conditions expérimentales et une validation de méthode RMN DAN anisotrope pour la discrimination spectrale de positions diastéréotopes et/ou énantiotopes de molécules cibles comme la vanilline [29] et la Frambinone [30]. Ces molécules de type « arôme alimentaire » présente un fort intérêt économique et font l'objet de contrôle d'authenticité permanent dans le cadre de la lutte contre la contrefaçon. L'objectif a donc été d'évaluer l'apport de RMN 2D (QUOSY : QUadupole Order SpectroscopY) DAN anisotrope pour l'analyse isotopique intramoléculaire de ces deux composés.

L'objectif du second axe de recherche a été de mettre en place de nouvelles méthodologies RMN 2D DAN anisotrope (saturation doublement sélective ^2H) afin de proposer de nouveaux outils analytiques utilisables pour lutter contre les fraudes et/ou la contrefaçon. Ces outils ont été appliqués à des molécules cibles à fortes valeurs ajoutées comme la frambinone.

Ces travaux ont été réalisés sur un spectromètre RMN opérant à 14,1 T (92,1 MHz pour le ^2H) et équipé d'une sonde cryogénique sélective ^2H .

Ce manuscrit de Thèse se décompose en cinq chapitres qui s'articuleront de la façon suivante :

Le premier Chapitre introduira les bases théoriques de la RMN dans les cristaux liquides chiraux. Une présentation des différents types de mésophases, et plus particulièrement celle utilisée dans cette Thèse (systèmes lyotropiques polypeptides) sera proposée. Nous poursuivrons par une description théorique de la notion d'ordre orientationnel, ainsi que de l'ensemble des observables RMN visibles en milieu isotrope et anisotrope. Pour finir, nous décrirons diverses expériences 2D QUOSY adaptées à l'analyse des spectres DAN anisotrope.

Dans le second Chapitre, nous aborderons les règles régissant l'aspect quantitatif des mesures RMN et les ajustements obligatoires pour vérifier la qualité de ces études. Par la suite, nous présenterons le principe du protocole de RMN-FINS[®] appliqué en milieu isotrope depuis les années 1980. Enfin, nous présenterons l'impact de l'utilisation d'une phase cristalline chirale pour la mesure de distribution isotopique intramoléculaire.

Dans le troisième Chapitre deux développements méthodologiques réalisés aux cours de cette thèse seront présentés. Dans un premier temps, nous décrirons deux techniques de saturation sélective très utilisées en milieu isotrope (WATERGATE et WET). Nous verrons ensuite l'application de séquence Bis-WET (doublement sélective) en RMN 1D et 2D ^2H et DAN anisotrope pour éliminer le DQ du co-solvant organique dans les CL lyotropes polypeptide (PBLG). Nous décrirons ensuite les principes des expériences 1D DAN Bis-WET et 2D QUOSY DAN Bis-WET. Pour finir, l'implémentation du concept d'échantillonnage non uniforme (NUS) au cours de ces nouvelles expérimentations 2D DAN sera proposée, afin de compenser l'augmentation des temps d'expériences associée à l'utilisation de durées d'impulsions sélectives longues pendant la séquence WET.

Le quatrième Chapitre présentera le potentiel analytique de la RMN 2D DAN dans les CL polypeptidiques appliqué à l'étude de la distribution isotopique ($^2\text{H}/^1\text{H}$) d'une molécule achirale, la Vanilline. Dans un premier temps, un « historique » rapide de cette molécule très utilisée dans l'industrie alimentaire sera proposé. Nous présenterons ensuite l'apport de la RMN 2D DAN anisotrope pour différencier l'origine (naturelle ou synthétique) de divers échantillons de Vanilline.

Introduction générale

Pour finir, le cinquième et dernier Chapitre de cette Thèse présentera une seconde application de RMN 2D DAN dans les CLCs dédiée à l'analyse de la distribution isotopique ($^2\text{H}/^1\text{H}$) d'une seconde molécule d'intérêt économique, la frambinone, très utilisée dans l'industrie alimentaire. Nous verrons comment la possibilité de détecter les énanti-isotopomères de ce composé fourni une nouvelle approche pour potentiellement différencier l'origine (synthétique ou naturelle) de cette molécule.

Références

- [1] Understanding the thalidomide chirality in biological processes by the self-disproportionation of enantiomers
Tokunaga E., Yamamoto T., Ito E., Shibata N.
Scientific Reports, **2018**, 8, 17131-17137.
- [2] Polypeptides. Part III. The synthesis of the C-terminal tetrapeptide sequence of gastrin, its optical isomers, and acylated derivatives
Davey J.M., Laird A.H., Morley J.S.
Journal of the Chemical Society C: Organic, **1966**, 555-566.
- [3] Thalidomide induced teratogenesis: History and mechanisms
Vargesson N.
Birth Defects Research (Part C), **2015**, 105, 140-156.
- [4] Stereochemistry of organic compounds
Eliel E.L., Wilen S.H.
John Wiley & Sons, **1994**, 1-1267.
- [5] NMR determination of enantiomeric purity
Parker D.
Chem. Rev., **1991**, 91, 1441-1457.
- [6] Discrimination of chiral compound using NMR spectroscopy
Wenzel T.J., Wilcox J.D.
Wiley **2007**.
- [7] Natural abundance deuterium NMR spectroscopy in polypeptide liquid crystals as a new and incisive means for enantiodifferentiation of chiral hydrocarbons
Lesot P., Sarfati M., Courtieu J.
Chem. Eur.J., **2003**, 9, 1724-1745.
- [8] Enantiomeric analysis in a polypeptide lyotropic liquid crystal through proton decoupled deuterium NMR
Bayle J.-P., Courtieu, J., Gabetty E., Loewenstein A., Péchiné J.-M.
New J. Chem, **16** (1992) 837-838.
- [9] Multinuclear NMR in polypeptide liquid crystals: three fertile decades of methodological developments and analytical challenges
Lesot P., Aroulanda C., Berdagué P., Meddour A., Merlet D., Farjon J., Giraud N., Lafon O.
Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc., **2019**, sous presse,
DOI: 10.1016/j.pnmrs.2019.10.001.
- [10] Deuterium NMR of Liquid-crystalline Samples at Natural Abundance
Lesot P.
Encyclopedia of Magnetic Resonance (eMagRes), **2013**, 2, 315-334.
- [11] Theoretical and experimental aspects of enantiomeric differentiation using natural abundance multinuclear NMR spectroscopy in polypeptide liquid crystals
Sarfati M., Lesot P., Merlet D., Courtieu J.
Chem. Commun. **2000**, 2069-2081.

- [12] Enantiomeric analysis in a polypeptide lyotropic liquid crystal by deuterium NMR
Canet I., Courtieu J., Loewenstein A., Meddour A., Péchiné J-M.
J. Am. Chem. Soc., **1995**, 117, 6520-6526.
- [13] Investigation of enantioselectivity of three polypeptide liquid-crystalline solvents using NMR Spectroscopy
Aroulanda C., Sarfati M., Courtieu J., Lesot P.
Enantiomer, **2001**, 6, 281-287.
- [14] Polyacetylenes as enantiodifferentiating alignment media
Meyer N.-C., Krupp A., Schmidts V., Thiele C. Reggelin M.
Angew. Chem., **2012**, 124, 8459-8463.
- [15] Enantiomeric Visualisation using Proton-Decoupled Natural Abundance Deuterium NMR in Poly(γ -benzyl-*L*-glutamate) liquid crystalline solutions
Lesot P., Merlet D., Loewenstein A., Courtieu J.
Tetrahedron Asymm., **1998**, 9, 1871-1874.
- [16] Two-dimensional deuterium NMR spectroscopy of chiral molecules oriented in a polypeptide liquid crystal: application for the enantiomeric analysis through natural abundance deuterium NMR
Merlet D., Ancian B., Courtieu J., Lesot P.
J. Am. Chem. Soc., **1999**, 121, 5249-5258.
- [17] Description of natural abundance deuterium 2D NMR experiments in weakly ordered liquid crystalline solvents using a tailored cartesian spin-operator formalism
Merlet D., Sarfati M., Ancian B., Courtieu J., Lesot P.
Phys. Chem. Chem. Phys., **2000**, 2, 2283-2290.
- [19] Synthesis of a mycobacterium tuberculosis tetra-acylated sulfolipid analogue and characterization of the chiral acyl chains using anisotropic NAD 2D-NMR spectroscopy
Lemeta A., Bourdeux Y., Lesot P., Farjon J., Beau J-M.
J. Org. Chem., **2013**, 78, 7648 7657.
- [20] Combined analysis of four C-18 unsaturated fatty acids using natural abundance deuterium 2D NMR spectroscopy in chiral oriented solvents
Lesot P., Baillif V., Billault I.
Anal. Chem., **2008**, 80, 2963-2972.
- [21] Complete determination of natural site-specific enantio-isotopomeric excesses in linoleic acid using natural abundance deuterium 2D NMR in polypeptide mesophases
Serhan Z., Martel L., Billault I., Lesot P.
Chem. Comm., **2010**, 46, 6599-6601.
- [22] Enantiotopic discrimination in the NMR spectrum of prochiral solutes in chiral-liquid crystals
Lesot P., Aroulanda C., Zimmermann H., Luz Z.
Chem. Soc. Rev., **2015**, 44, 2330-2375.
- [23] Deuterium labelling at the natural abundance level as studied by high field quantitative ^2H NMR
Martin G., Martin M.
Tetrahedron, **1981**, 22, 3525-3528.

- [24] Détermination par résonance magnétique nucléaire du deutérium du fractionnement isotopique spécifique naturel. Application à la détection de la chaptalisation du vin
Martin G., Martin M.
J. Chem. Phys., **1983**, 80, 293–297.
- [25] Stable isotope analysis of food and beverages by nuclear magnetic resonance
Martin G., Martin M.
Annu. Rep. NMR. Spectrosc., **1995**, 31, 81-104.
- [26] A coupled NMR and MS isotopic method for the authentication of natural vinegars
Remaud G., Guillou C., Vallet C., Martin G.
J. Anal. Chem., **1992**, 342, 457-461.
- [27] Detection of sophisticated adulterations of natural vanilla flavors and extracts: application of the SNIF-NMR method to vanillin and p-hydroxybenzaldehyde
Remaud G., Martin Y.L., Martin G.G., Martin G.J.
J. Agric. Food. Chem., **1997**, 45, 859-866.
- [28] Analytical contribution of deuterium 2D-NMR in oriented media to $^2\text{H}/^1\text{H}$ isotopic characterization: the case of vanillin
Texier-Bonniot T., Berdagué P., Robins R., Remaud G., Lesot P.
Flav. Frag. J., **2018**, 33, 217-229.
- [29] A review of flavors authentication by position specific isotope analysis by nuclear magnetic resonance spectrometry: the example of vanillin
Remaud G., Akoka S.
Flav. Frag. J., **2016**, 32, 77-84.
- [30] Natural abundance ^2H nuclear magnetic Resonance study of the origin of raspberry ketone
Fronza G., Fuganti C., Guillou C., Reniero F., Joulain D.
J. Agric. Food Chem., **1998**, 46, 248-254.

Chapitre I

La RMN dans les cristaux liquides

1. Présentation des cristaux liquides

1.a. Introduction

Les cristaux liquides (cf. **Figure I.1**) sont des composés chimiques purs ou en mélange qui forment des phases caractérisées par un ordre orientationnel, avec un degré d'ordre moléculaire intermédiaire entre celui d'un liquide isotrope (état désordonné en position et en orientation) et celui d'un solide cristallin (état ordonné en position et en orientation). Les cristaux liquides sont aussi appelés « mésophases », du grec *meso* = intermédiaire, (état désordonné en position et ordonné en orientation). L'état CL présente à la fois les propriétés des liquides (comme la fluidité) et les propriétés des solides (comme l'orientation moléculaire). L'apport combiné de ces deux propriétés est intéressant du point de vue de la RMN, puisqu'il va être possible d'obtenir des spectres haute-résolution et de détecter des observables anisotropes nulles en moyenne, en milieu isotrope [1].

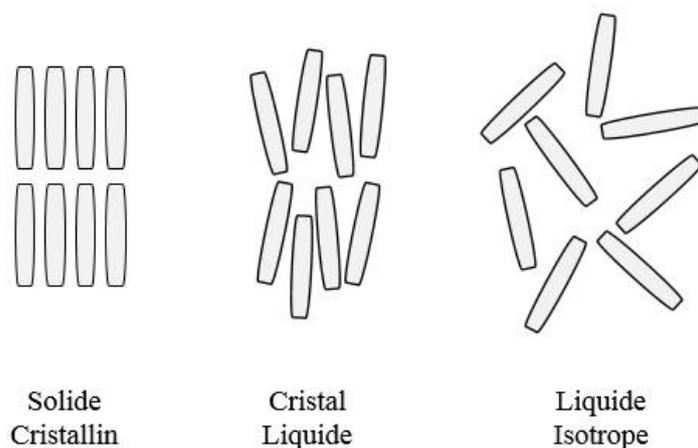


Figure I.1 : Représentation schématique de l'organisation d'une phase solide, d'une phase cristal-liquide et d'une phase liquide.

Comme présentés sur la **Figure I.2**, les cristaux liquides peuvent être classés en deux grandes catégories : les phases thermotropes et les phases lyotropes.

1.b. Les différentes phases cristal-liquides

1.b.i. *Les phases thermotropes*

Les cristaux liquides thermotropes sont composés d'un unique type de composé organique ou organométallique [2-4] qui, dans une certaine gamme de température, présentent les propriétés mésogènes. Classiquement, la géométrie des molécules constituant une mésophase va conditionner la structure mésomorphe de la phase cristal-liquide. Ces molécules sont généralement constituées d'un cœur rigide formé par un ou plusieurs cycle(s) aromatique(s) et entourées par d'autres chaînes plus flexibles [5].

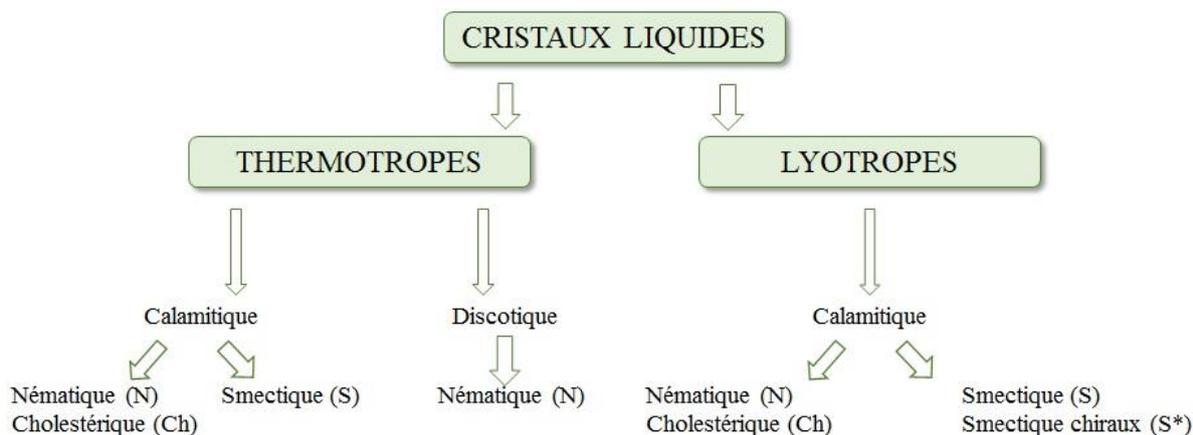


Figure I.2 : Présentation simplifiée des différents types de cristaux liquides.

Le type de mésophases est fondamentalement lié à la forme anisotrope des molécules qui les composent. Cette anisotropie de forme est à l'origine de l'organisation macroscopique moléculaire qui permet de distinguer les mésophases en deux catégories selon leurs degrés d'ordre moléculaire : la mésophase nématique (N) de degré d'organisation moléculaire 1, et les phases smectiques (S et S*) de degré 2 [6]. Les différents types de mésophases découlent de la structure chimique des mésogènes qui la composent. Il existe essentiellement deux types de phases mésogènes thermotropes : les phases calamitiques associées à des structures moléculaires essentiellement allongées (du grec *calamos* = roseau) (cf. Figure I.3a) ; ii) les phases discotiques associées à des structures discoïdales (cf. Figure I.3b).

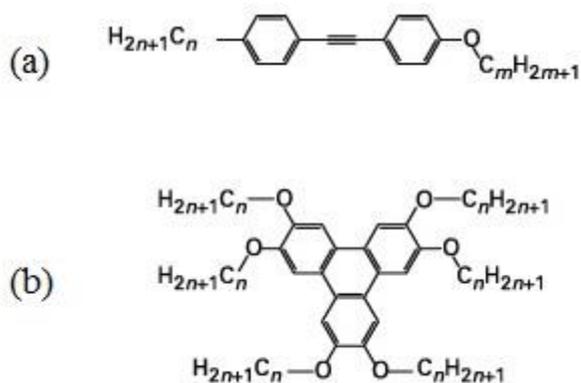


Figure I.3 : Exemple de structure chimique générique de composés mésogènes : (a) Structure de type « calamitique » et (b) Structure de type « discotique ».

Étant donné leurs fortes affinités intermoléculaires au sein de l'échantillon, les mésophases thermotropes présentent un fort degré d'ordre orientationnel (noté S) moléculaire ($0.9 < S < 1$), qui, en retour, va générer un fort alignement moléculaire des solutés (de l'ordre de 10^{-1} à 10^{-2}).

1.b.ii. Les phases lyotropes

Les cristaux liquides lyotropes sont composés d'au minimum deux composés. Intrinsèquement, les composants constituant le mélange ne possèdent pas de propriétés mésogènes. Cependant, ces systèmes, associés dans les proportions adéquates et soumis à une température optimale, conduisent à l'obtention d'une mésophase [7].

Comparées aux phases thermotropes, les phases lyotropes polymériques (de type polypeptide, par exemple) sont constituées d'un mélange d'au moins deux composés dont un co-solvant organique de polarité variée. Il est possible de modifier le degré d'ordre d'un soluté en modulant la concentration du polymère dans la phase organique. Une très grande variété de mésophases lyotropes, plus ou moins fluides et capables de dissoudre une large gamme de solutés (polaires, apolaires, chargés, ...) peut donc être préparée, tout en conservant la « gestion » du paramètre d'ordre. Par exemple, l'augmentation de la concentration du co-solvant organique va augmenter à la fois la fluidité de la phase cristal-liquide et réduire son degré d'ordre. En revanche, l'augmentation de la concentration du polymère va accroître à la fois la viscosité de la phase CL et augmenter son degré d'ordre.

La modulation de la composition du mélange polymère/solvant et le choix du co-solvant sont les principaux avantages de l'utilisation de CL polypeptide. Typiquement, le degré d'ordre des solutés dans une phase CL lyotrope polypeptide varie de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-5} , soit deux ordres de grandeur de moins par rapport à une phase thermotrope [1].

1.c. Les différentes organisations des phases cristal-liquides

Dans les liquides isotropes, les molécules peuvent adopter l'ensemble des positions et des orientations (vis-à-vis du champ magnétique) avec une isoprobabilité, tandis que dans les solides cristallins, les mouvements de translation et de rotation sont bloqués avec l'organisation du système. Selon la nature de la phase cristal-liquide, la mésophase tend à s'organiser de façon globale. Les mésophases sont généralement classées selon leur degré d'organisation au sein de l'échantillon. La **Figure I.4** présente schématiquement les différents types d'organisation cristal-liquide.

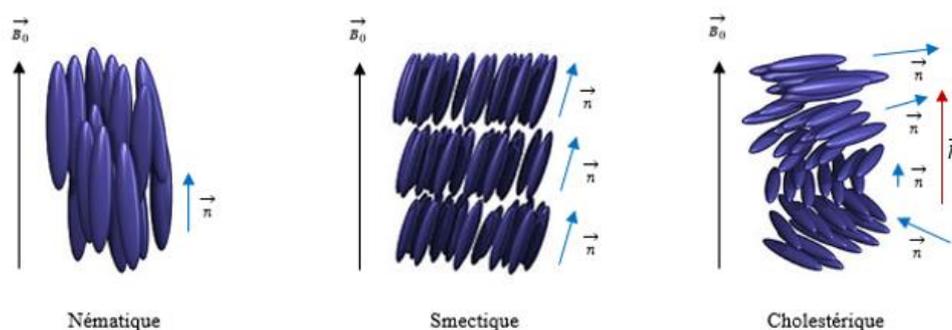


Figure I.4 : Représentation schématique de l'agencement des molécules dans trois CLs en présence d'un champ magnétique : (a) Nématique ($\Delta\chi_m > 0$), (b) Smectique, (c) Cholestérique ($\Delta\chi_m < 0$).

En 1922, le chimiste français Georges Friedel a, pour la première fois, présenté, nommé et classifié les phases cristal-liquides en deux catégories pouvant être distinguées selon leurs modes d'organisation moléculaire [8]. Les phases nématiques (N) et les phases cholestériques (Ch) qui peuvent être considérées comme un cas particulier des premières ont un degré d'organisation moléculaire de 1 (parallèle à l'axe des molécules dans le nématique et central à l'hélice dans le cholestérique). Les mésophases smectiques (S) sont composées de deux degrés d'organisation moléculaire : un degré positionnel avec l'organisation en strates et un orientationnel qui peut être soit perpendiculaire aux couches pour les phases smectiques A (S_A) soit incliné pour les phases smectiques C (S_C).

1.c.i. *Les phases nématiques (N)*

La phase cristal-liquide nématique présente un degré d'organisation orientationnel simple. Dans un CL nématique, les molécules ont tendance à s'aligner parallèlement entre elles, orientées généralement selon leur axe moléculaire le plus long (cf. **Figure I.4**). Dans cette situation, il n'y a qu'un seul degré d'ordre orientationnel. Hors d'un champ magnétique (ou électrique) polarisé, la phase n'est homogène qu'à l'échelle locale au sein de l'échantillon (appelé microdomaine). Cependant, lorsqu'elle est soumise à un champ magnétique \vec{B}_0 , l'ordre orientationnel local s'étend à l'ensemble de l'échantillon de façon uniforme et homogène (tube RMN), ce qui conduit à des spectres RMN haute-résolution (mais complexes à analyser). Dans ces conditions, la RMN ^1H ou ^{13}C dans les phases nématiques thermotropes est possible et a longtemps été utilisée pour déterminer la structure de petites molécules (via les couplage dipolaires ^1H - ^1H), par exemple [9].

1.c.ii. *Les phases smectiques (S)*

Comparée aux phases nématiques, la phase cristal-liquide smectique présente un degré d'ordre positionnel dans l'espace. Ce second degré d'ordre conduit à une structure en couches parallèles entre elles et espacées de façon régulières. Selon la structure des molécules, les phases smectiques sont classées sur la base de l'arrangement moléculaire à l'intérieur des couches. Dans la phase smectique A (S_A), les molécules suivent une orientation moyenne dans le plan des couches moléculaires. Dans cette configuration la phase smectique est dite uniaxe. Dans une phase smectique C (S_C), les molécules sont inclinées d'un angle θ par rapport à l'axe normal des couches, ce qui conduit à un milieu biaxial.

1.c.iii. *Les phases cholestériques (Ch)*

La mésophase cholestérique est composée de molécules chirales énantiopures. Elle correspond à une organisation supramoléculaire hélicoïdale qui, en raison de la chiralité de la molécule qui la compose, est modélisée par une succession de couches moléculaires de type nématique. Même si chaque couche possède les propriétés d'un cristal-liquide nématique, la direction moyenne du vecteur directeur \vec{n} associé à chaque plan change d'un angle θ le long de l'axe d'hélicité, \vec{h} (cf. **Figure I.5**).

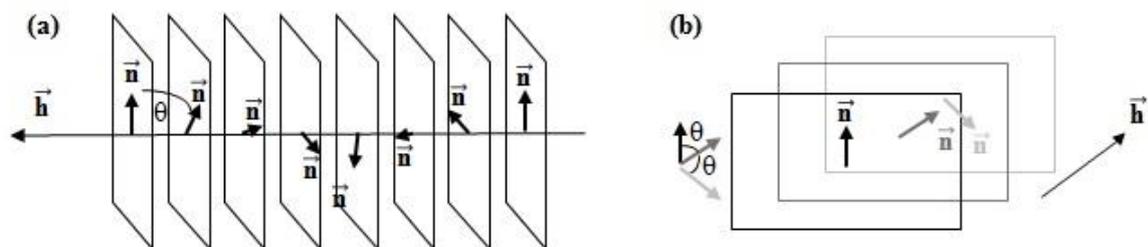


Figure I.5 : Schéma de la structure hélicoïdale des mésophases cholestériques : (a) vue selon l'axe d'hélicité \vec{h} ; (b) vue en profondeur.

Ces propriétés ayant été observées pour la première fois, avec des dérivés du cholestérol [8], ces mésophases ont été nommées « cholestériques ». L'orientation gauche ou droite possible de l'axe d'hélicité \vec{h} va dépendre de l'énantiomère présent dans la phase.

1.d. Utilisation de homopolymères polypeptides pour la formation de phases CL lyotropes

Si l'adjectif "lyotropique" a d'abord été utilisé pour qualifier les phases LC, telles que les phases micellaires, hexagonales ou lamellaires, formées par des molécules amphiphiles dans l'eau [10-11-12], le terme a également été utilisé pour qualifier les phases LC formées par des macromolécules en tige, comme des homopolymères (ou copolymères) hélicoïdaux, mélangés à un solvant judicieusement choisi et avec des conditions expérimentales (concentrations des différents composants) adéquates [13-14-15].

De nombreuses études sont menées sur les systèmes composés d'un polymère chiral organisé en hélice α (cf. **Figure I.6b**) [1], notamment les homopolymères de type polypeptidique présentant diverses chaînes latérales achirales [16]. Parmi eux, l'homopolymère polypeptide noté « PBLG » s'est révélé extrêmement efficace pour discriminer des énantiomères de molécules chirales et des directions (éléments) énantiotopes de molécules prochirales [1].

1.d.i. Le polymère PBLG

Le Poly- γ -Benzyl-*L*-Glutamate (PBLG) est un homo-polypeptide de synthèse qui possède une chaîne latérale achirale de type glutamate. Sa structure est présentée sur la **Figure I.6a**. Cet homo-polypeptide est soluble dans un grand nombre de co-solvants organiques hélicogènes (c'est-à-dire non dénaturants) comme le CHCl_3 , CH_2Cl_2 , DMF ou THF. Dans ces co-solvants organiques, la chaîne principale du polypeptide adopte une conformation 3D en hélice α , stabilisée par des liaisons hydrogènes intramoléculeaires. La structure tridimensionnelle schématique du PBLG est présentée sur la **Figure I.6b**. Ce polypeptide est le plus utilisé en laboratoire pour former une phase cristal-liquide chirale énantiodiscriminante [17-18]. Il présente différents avantages : i) il est disponible commercialement à différents degrés de polymérisation, avec une préférence pour des DP supérieurs à 500 pour obtenir aisément un système monophasique dans une large gamme de

concentration en polymères; ii) la forme énantiomère du PBLG (le « PBDG ») existe aussi commercialement, ce qui permet de pouvoir former une phase CL achirale en mélangeant de manière racémique les deux polymères de configurations absolues inversées (*L/D*) [1,19].

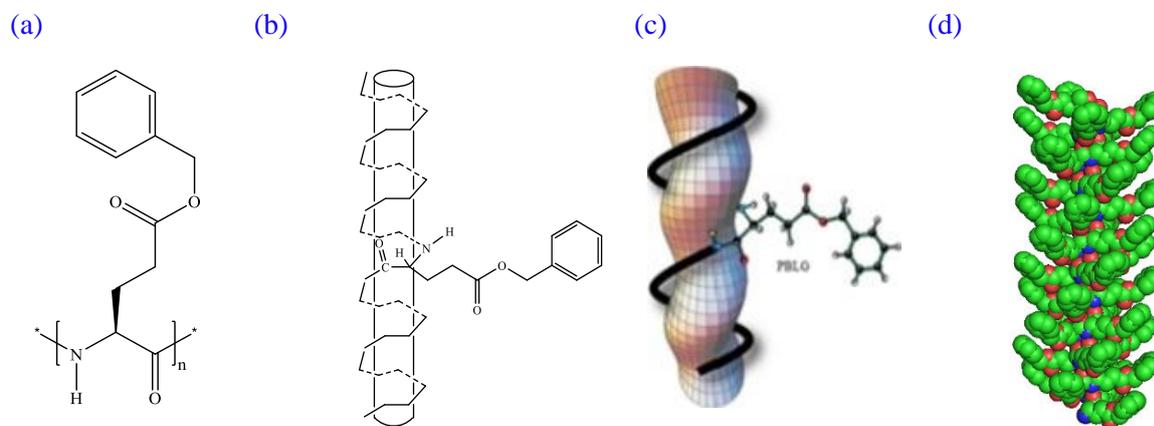


Figure I.6 : (a) Structure du monomère du PBLG. (b et c) Structure hélicoïdale du PBLG et de sa chaîne latérale. (d) Représentation 3D d'une fibre de PBLG (environ 40 unités monomères).

Hors d'un champ magnétique, les mésophases de type PBLG s'orientent pour former des microdomaines de type cholestérique (Ch). Cependant, sous l'action d'un champ magnétique extérieur suffisamment intense, \vec{B}_0 , les hélices cholestériques se détordent et toutes les fibres du polymère s'alignent parallèlement à la direction du champ \vec{B}_0 , sous l'effet des contraintes magnétiques (cf. **Figure I.7**). La phase CL chirale adopte alors une orientation nématique chirale (N*) homogène et uniforme.

Compte tenu de la nature lyotrope des phases polypeptides, les molécules dissoutes dans ces systèmes possèdent un faible degré d'orientation moléculaire. Par conséquent, les spectres RMN de solutés sont plus faciles à enregistrer et à analyser (spectre pseudo-premier ordre) que ceux obtenus avec les phases thermotropes (cf. **Chapitre I.1.b.i**). Comme pour les phases thermotropes, notons ici que le fort degré d'alignement des fibres du polymère (et donc leur faible mobilité) conduit à des signaux RMN ^1H , ^2H , ^{13}C associés aux noyaux atomiques des fibres polypeptidiques extrêmement larges (noyés généralement dans la ligne de base des spectres). Ces spectres très basse-résolution du polymère sont la conséquence de la faible mobilité des fibres (MW : 150 000 à 300 000 g/mol) comparée aux solutés, et induisant des temps de relaxations T_1 et T_2 très courts ($< 0.01\text{-}0.05$ s). Ces signaux n'interfèrent donc pas (ou très rarement) avec ceux du soluté. L'ensemble des deux effets conduit à l'obtention de spectre RMN de haute-résolution pour les analytes dissous dans ces phases [20].

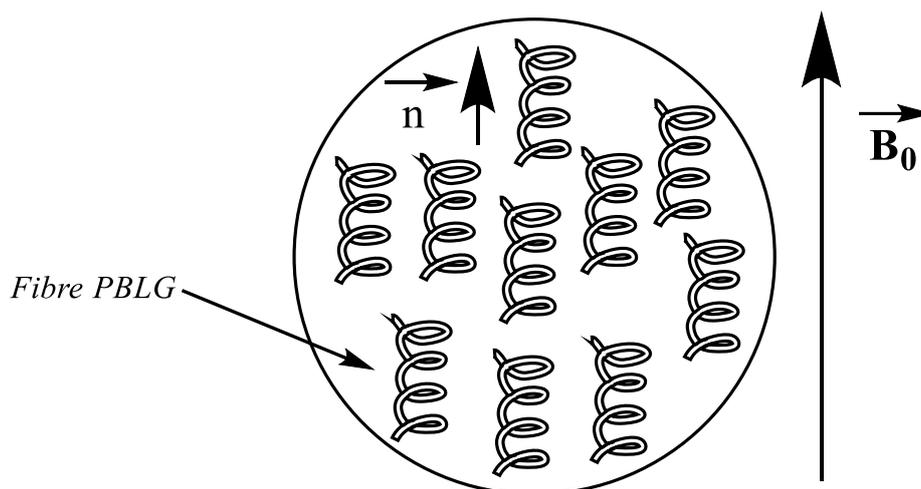


Figure I.7 : Représentation schématique de l'organisation des fibres de PBLG au sein du champ magnétique \vec{B}_0 . Le vecteur \vec{n} correspond au directeur de la phase PBLG.

Utiliser des CLC de type polypeptide comme le PBLG comme solvant de RMN présente un autre avantage. Ils peuvent en effet solubiliser une grande quantité de soluté (jusqu'à 200 mg selon le type de soluté) avant de perdre leurs propriétés orientationnelles [21]. Cela correspond à des pourcentages massiques en soluté dans l'échantillon variant entre 10 à 20 %, contre 1 à 2 % (au maximum) dans les phases thermotropes. Dans ces conditions, l'analyse des noyaux magnétiquement actifs de faible sensibilité et/ou de faible abondance isotopique naturelle (comme le ^2H) est toujours possible même pour les composés à très haut poids moléculaires.

Les cristaux liquides lyotropes de type PBLG constituent une matrice chirale énantiodiscriminante performante. Ils permettent d'orienter les énantiomères de molécules chirales ou les directions énantiotopiques de molécules prochirales différemment en moyenne, par rapport à l'axe du champ magnétique extérieur \vec{B}_0 [22] (cf. **Figure I.8**). Cette différence d'ordre orientationnel induit des différences sensibles sur les mesurables RMN dites anisotropes (sensibles à l'ordre), les RCSA, les RDC, les RQC, ce qui permet d'observer des spectres RMN différents pour chaque énantiomère (y compris dans le cas des énantiomères de chiralité isotopique (R-C*HD-R') ou pour chaque direction énantiotope [23].

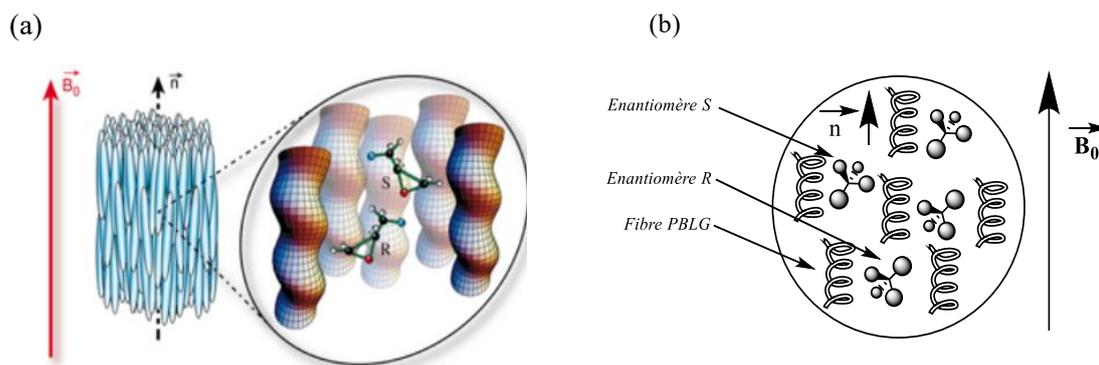


Figure I.8 : (a) Alignement de fibres de polymères parallèlement à l'axe du champ B_0 , similairement à une phase nématique de $\Delta\chi_m > 0$. (b) Représentation schématique des énantiomères R s'orientant différemment des énantiomères S en moyenne, et permettant la discrimination des deux isomères par RMN.

1.d.ii. Autres homopolymères polypeptidiques utilisables en milieu cristal-liquide chiral

D'autres polymères polypeptidiques permettent l'énantiodiscrimination de composés chiraux ou prochiraux en tant qu'alternative aux phases CLC lyotropes PBLG. Historiquement, les plus connus sont le Poly- ϵ -CarboBenzyloxy- L -Lysine, ou PCBLL, ainsi que le Poly- γ -Ethyl- L -Glutamate, noté PELG, qui présentent également des potentiels énantiodiscriminants intéressants [16-24]. Les structures de ces polymères sont présentées sur la **Figure I.9**.

Lorsqu'ils sont compatibles, des mélanges de deux polypeptides avec des chaînes latérales de nature chimique différents mais de même configuration absolue, tels que PBLG et PCBLL, peuvent être utilisés. Ils permettent la discrimination des énantiomères de molécules chirales et des directions énantiotopiques dans les molécules prochirales. Il est intéressant de noter que dans ces systèmes, l'amplitude de l'énantiodiscrimination peut être ajustée en variant la proportion relative des deux polypeptides. Par conséquent, ces mélanges énantiodiscriminants peuvent constituer une alternative attrayante aux mésophases monopolypeptidiques [25-26].

Le régime d'échange rapide du soluté vers les deux fibres polypeptides chimiquement différents dans les mélanges chiraux ("PBLG-PCBLL") est comparable à celui observé dans les systèmes orientés achiraux notés "PBG" ou "PCBL". Cependant, dans ces systèmes, l'inversion de la chiralité des polypeptides (L et D) conduit à un milieu orienté achiral sans discrimination énantiomérique ou énantiotopique. Par conséquent, le mélange racémique de deux paires d'homopolypeptides, par exemple la paire "PBLG/PBDG" ajoutée à la paire "PCBLL/PCBDL" dans le même échantillon fournit à nouveau un milieu orienté achiral éliminant toute énantiodiscrimination. Dans ce cas, les interactions anisotropes résiduelles mesurées dans le système achiral à quatre homopolypeptides sont égales à la moyenne de celles mesurées dans les systèmes chiraux à deux polypeptides [26].

Plus récemment, de nouveaux travaux ont décrit le potentiel analytique de phases CLC à base de Poly- β -Phenethyl-*L*-Aspartate (PPLA) [27] et de Poly- γ -BiPhenylMethyl-*L*-Glutamate (PBPMLG) [28]. Enfin, il a été montré par Thiele et *al.* que le-Poly- γ -(*S*)-2-MethylButyl-*L*-Glutamate (PSMBLG), qui possède une chaîne latérale chirale, présente un renforcement du potentiel énantiDiscriminant comparé à d'autres systèmes homopolypeptidiques [29].

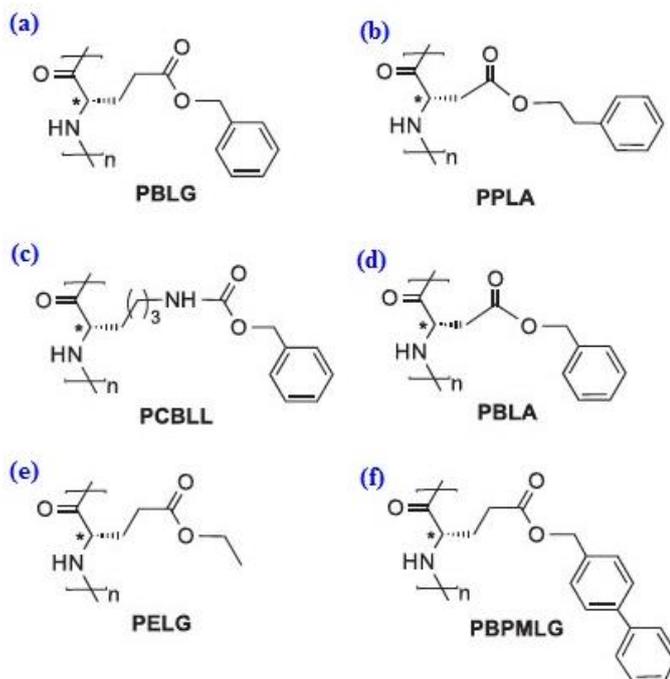


Figure I.9 : Structure des polymères polypeptidiques : (a) PBLG ; (b) PPLA ; (c) PCBLL ; (d) PBLA ; (e) PELG ; (f) PBPMLG.

Ces dernières années, de nouvelles familles de polymères chiraux hélicoïdaux « non polypeptidiques » ont été synthétisées. Ces systèmes possèdent un potentiel énantiDiscriminant intéressant pour répondre à certaines problématiques. Parmi elles, il est possible de citer : les polyguanidines (*cf.* **Figure I.10a**) [40] ou les polyacétylènes (*cf.* **Figure I.10b**) [32-33].

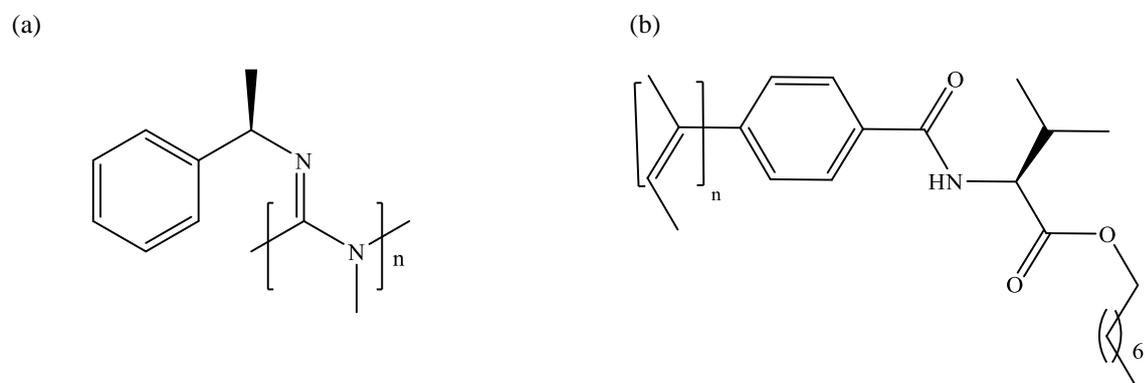


Figure I.10 : Structure chimique des polymères hélicoïdaux chiraux de type : (a) polyguanidique ; (b) polyacétylène substitué par de la *L*-valine.

Parmi ces systèmes, la famille des polyacétylènes apparaît comme une alternative intéressante à l'utilisation du PBLG. En effet, ces polymères sont faciles à synthétiser et permettent d'obtenir une phase cristal-liquide chirale avec différents co-solvants organiques comme le chloroforme, dichlorométhane, etc ... Une étude récente de 2019 a montré spécifiquement le fort potentiel du polyacétylène, dont la chaîne latérale est dérivée de la *L*-valine, en discriminant les énantiomères ou les directions énantiotopes d'un grand nombre de molécules modèles chirales et prochirales [34]. Les CLCs à base de polyacétylène apparaissent donc comme une alternative intéressante aux phases polypeptides, et notamment au PBLG [34]. Les différents types de polymères chiraux hélicoïdaux formant une phase CLC lyotrope dans un solvant organique hélicogène sont présentés dans le **Tableau I.1**.

Tableau I.1: Liste des polymères hélicoïdaux chiraux organosolubles disponibles pour former une phase CLC en présence d'un solvant organique. Pour chaque polymère, la position du centre stéréogène, et les co-solvants disponibles sont précisés.

Polymère hélicoïdal	Acronyme	Position du centre stéréogène ^a	Co-solvant organique disponible ^c	Année
<i>Poly(peptide)</i>	PB(L)G	CS	CHCl ₃ , CH ₂ Cl ₂ , CHBr ₃ , DMF, NMP, TCE, THF, TMU, benzene, dioxane, <i>m</i> -cresol, pyridine, toluene,	1992 [22]
	PCB(L)L	CS	CHCl ₃ , DMF, dioxane,	2001 [16]
	PE(L)G	CS	CHCl ₃ , CH ₂ Cl ₂	2001 [16]
	PB(L)G (cross-linked)	CS	CHCl ₃ , CH ₂ Cl ₂ , THF, benzene, dioxane	2013 [35]
	PP(L)A ^d	CS	CHCl ₃ , TCE	2017 [27]
	PB(L)A	CS	CHCl ₃ , CH ₂ Cl ₂ , TCE	2018 [36]
	PBPM(L)G ^d	CS	CHCl ₃	2018 [28]
	PSMB(L)G ^d	CS / CL	CHCl ₃	2017 [30]
<i>Poly(guanidine)</i>	(<i>R</i>)-PPEMG	CS	CHCl ₃	2010 [30]
<i>Poly(isocyanide)</i>	PPI-(<i>L</i>)-Ala	CS	CHCl ₃ , CH ₂ Cl ₂ , THF	2012 [31]
<i>Poly(arylacetylene)</i>	PPA-(<i>L</i>)-Ala	CS	CHCl ₃ , CH ₂ Cl ₂	2012 [32]
	PPA-(<i>L</i>)-Phe	CS	CHCl ₃	2012 [37]
	PPA-(<i>L</i>)-Val	CS	CHCl ₃	2012 [33]
<i>Poly(isocyanopeptide)</i>	(<i>L,L</i>)-PIAF-OBn	CS	CHCl ₃	2017 [38]

^a CS: Le centre stéréogène est localisé sur la chaîne centrale. CL: Un centre stéréogène est localisé sur la chaîne latérale. Le co-solvant organique peut être protoné ou deutéré.

2. Les paramètres d'ordre

Les cristaux liquides thermotropes ou lyotropes chiraux sont des milieux orientés. Lorsque les solutés sont dissous dans ces milieux, ils voient la liberté de leurs mouvements restreinte par le confinement qu'ils subissent entre les molécules de solvant orienté. Ainsi, le soluté n'est plus libre d'adopter l'ensemble des orientations possibles de façon équiprobable et va acquérir une orientation moyenne privilégiée. Il convient donc de définir le paramètre d'ordre moléculaire.

2.a. Expression de la fonction de probabilité d'orientation $P(\{X_N\})$

2.a.i. Expression générale de la fonction de probabilité

Soit N un ensemble de molécules dissoutes dans un milieu cristal-liquide qui va être analysé en spectroscopie RMN. A cet ensemble, déterminons un repère moléculaire orthonormé direct, noté $Oxyz$, associé à une molécule dont on souhaite déterminer l'orientation moléculaire [39] (cf. **Figure I.11**).

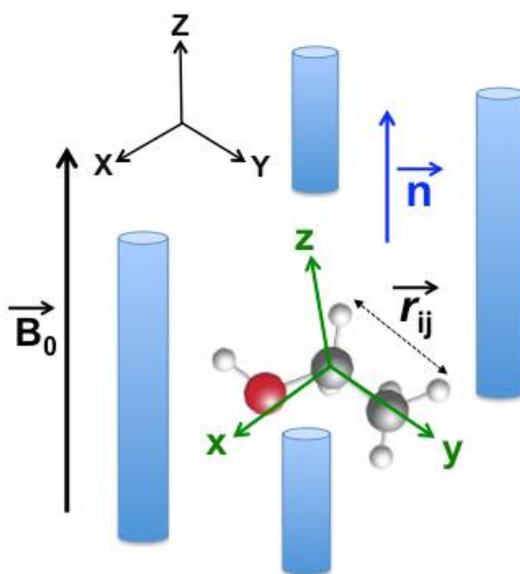


Figure I.11: Exemple d'un système d'axes de référence moléculaire (x , y et z) attaché à une molécule dissoute dans une phase nématique. L'anisotropie de susceptibilité magnétique moléculaire de la phase, $\Delta\chi_m$, est ici positive ($\Delta\chi_m > 0$). Les axes du laboratoire sont notés X , Y et Z . Dans ce cas, le directeur de la mésophase, n , aligne parallèlement avec l'axe B_0 (Z). Lorsque $\Delta\chi_m < 0$, le directeur s'aligne perpendiculairement à B_0 .

La description quantitative de l'orientation et de la position d'une molécule dans une phase cristal-liquide nécessite la connaissance de la fonction de probabilité d'orientation. Cette fonction prend en compte toutes les interactions existantes entre soluté-solvant (interactions intermoléculaires) et soluté-soluté (interactions inter- et intramoléculaires) et sera notée $P^n(\{X_N\})$. Physiquement, cette fonction représente la probabilité de trouver n molécules parmi l'ensemble de N molécules dans une position, une orientation et une

conformation données correspondant aux microdomaines ($X_1 + dX_1, X_2 + dX_2, \dots, X_N + dX_N$). Cette fonction peut s'écrire comme :

$$P^n(\{X_N\}) = \frac{N!}{(N-n)!} \times \frac{1}{Z_N} \int_{X_1} \int_{X_2} \dots \int_{X_N} \exp\left(-U(\{X_N\})/k_B T\right) \times dX_1 dX_2 \dots dX_N \quad (\mathbf{I.1})$$

où le terme $U(\{X_N\})$ représente l'énergie potentielle de la molécule, k_B est la constante de Boltzmann égale à $1,382 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$, T est à la température absolue du composé et Z_N est un facteur de normalisation appelé fonction de configuration.

La notation $\{X_N\}$, utilisée dans la fonction de probabilité, permet une réduction de l'écriture de l'équation en regroupant les paramètres de position, d'orientation et de conformation. Ainsi, la fonction peut-être notée $P^n(r, \Omega, \Phi)$ avec r désignant les variables de positions (typiquement noté x, y et z pour des coordonnées cartésiennes), Ω correspond aux variables d'orientations telle que $\Omega = (\alpha, \beta, \gamma)$ qui correspondent aux variables d'angles avec ($0 \leq \alpha \leq 2\pi$), ($0 \leq \beta \leq \pi$) et ($0 \leq \gamma \leq 2\pi$) connus comme les angles d'Euler [40] présentés en **Figure I.12** et Φ correspond à la variable de conformation telle que $\Phi = \{\varphi\}$ qui représente l'ensemble des conformations possibles de la molécule.

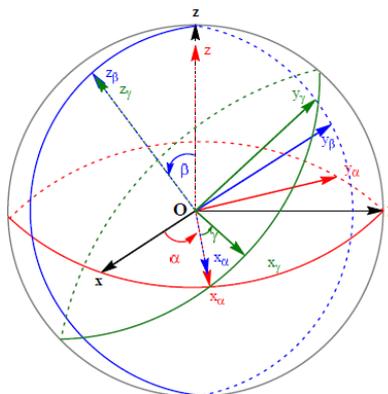


Figure I.12: Représentation des angles d'Euler (α, β, γ) dans un repère orthonormé moléculaire ($Oxyz$) avec : l'angle α ($0 \leq \alpha \leq 2\pi$) transformant le trièdre (x, y, z) en (x_α, y_α, z) ; l'angle β ($0 \leq \beta \leq \pi$) transformant le trièdre (x_α, y_α, z) en ($x_\alpha, y_\beta, z_\beta$) ; l'angle γ ($0 \leq \gamma \leq 2\pi$) transformant le trièdre ($x_\alpha, y_\beta, z_\beta$) en ($x_\alpha, y_\beta, z_\beta$).

De façon détaillée, α correspond à « l'angle de précession » et correspond à un angle de rotation autour de l'axe Oz . Ainsi, cette rotation va transformer le trièdre (x, y, z) en trièdre (x_α, y_α, z). β correspond à « l'angle de nutation » et se définit comme une rotation autour de l'axe Ox_α . Celle-ci transforme le trièdre (x_α, y_α, z) en trièdre ($x_\alpha, y_\beta, z_\beta$). Enfin, l'angle γ est défini comme « l'angle de rotation propre » et tourne autour de l'axe Oz_β . Ce dernier transforme ($x_\alpha, y_\beta, z_\beta$) en trièdre ($x_\gamma, y_\gamma, z_\beta$).

Avec cette notation $P^n(r, \Omega, \Phi)$, la fonction de probabilité peut s'écrire :

$$P^n(r, \Omega, \Phi) = \frac{N!}{(N-n)!} \times \frac{1}{Z_N} \int_1^N \left(\int_r \int_{\Omega} \int_{\Phi} \exp\left(-U(r, \Omega, \Phi)/k_B T\right) \times dr d\Omega d\Phi \right) \quad (\text{I.2})$$

Cette fonction étant difficile à étudier telle quelle, il est possible de simplifier cette équation à partir de certaines hypothèses, afin de pouvoir exploiter plus facilement la fonction de probabilité d'orientation.

Tout d'abord, il est intéressant de négliger la contribution de toutes les interactions soluté-soluté intermoléculaire et de conserver uniquement la contribution soluté-solvant dans la fonction potentielle $U(r, \Omega, \Phi)$. Ainsi, la fonction $P^n(r, \Omega, \Phi)$ se transforme en $P^1(r, \Omega, \Phi)$ d'après l'Equation I.3, et permet de déterminer, au sein d'un milieu orienté, l'orientation d'une seule molécule selon sa configuration et sa conformation.

$$P^1(r, \Omega, \Phi) = \frac{N}{Z_N} \left(\int_r \int_{\Omega} \int_{\Phi} \exp\left(-U(r, \Omega, \Phi)/k_B T\right) \times dr d\Omega d\Phi \right) \quad (\text{I.3})$$

D'un point pratique, l'organisation positionnelle, orientationnelle et conformationnelle d'une molécule dans un milieu orienté suit une distribution statistique selon la fonction de probabilité. Cependant, il est possible d'exprimer $P^1(r, \Omega, \Phi)$ à partir d'une fonction de Dirac notée δ , qui sélectionne spécifiquement une valeur donnée dans cette distribution statistique. Cette fonction est présentée en Equation I.4 :

$$P^1(r, \Omega, \Phi) = \langle \delta(r - r') \times \delta(\Omega - \Omega') \times \delta(\Phi - \Phi') \rangle \quad (\text{I.4})$$

$$\begin{aligned} r, r' \in [0, 2\pi], \quad r = r' \rightarrow \delta(r - r') = 1 \\ r \neq r' \rightarrow \delta(r - r') = 0 \end{aligned} \quad (\text{I.5})$$

L'expression de la fonction de Dirac (I.5) permet le dénombrement sur l'ensemble des molécules, des cas où $r = r'$, $\Omega = \Omega'$ et $\Phi = \Phi'$ en calculant une moyenne d'ensemble symbolisée par $\langle \delta \rangle$ avec l'intégration sur l'ensemble des valeurs possibles des variables r' , Ω' et Φ' .

2.a.ii. Expression de la fonction de probabilité dans une phase nématique

Il est possible de simplifier notre équation du fait de leur symétrie de révolution cylindrique induisant l'invariance de la phase autour de l'axe directeur par les effets de translation et de rotation. L'Equation I.6 présente la fonction de probabilité $P^1(r, \Omega, \Phi)$ en tenant compte de l'invariance des trois variables de position comprises dans $r(x, y, z)$ et une variable d'orientation de $\Omega(\alpha)$.

$$P^1(r, \Omega, \Phi) = P^1(x, y, z, \alpha, \beta, \gamma, \Phi) = P^1(0, 0, 0, 0, \beta, \gamma, \Phi) = P^1(\beta, \gamma, \Phi) \quad (\mathbf{I.6})$$

Dans ces conditions, la fonction de probabilité d'orientation de la molécule dans une phase nématique ne dépend plus que des angles d'Euler de nutation (angle β) et de rotation propre (angle γ) et de(s) conformation(s) Φ des solutés.

De plus, l'apolarité de la phase nématique [41] induit une invariance de la fonction de probabilité d'orientation β pour une transformation de 180° . Ainsi, l'équation peut s'écrire :

$$P^1(\beta, \gamma, \Phi) = P^1(\beta - \pi, \gamma, \Phi) \quad (\mathbf{I.7})$$

Dans le cas des molécules rigides, la fonction de probabilité d'orientation n'est pas affectée pas la contribution des paramètres de conformations. C'est pourquoi, la fonction $P^1(\beta, \gamma, \Phi)$ va uniquement dépendre des angles β et γ . Elle peut être exprimée comme :

$$P^1(\beta, \gamma, \Phi) = P^1(\beta, \gamma) \quad (\mathbf{I.8})$$

L'utilisation d'une phase nématique simplifie donc grandement la fonction de probabilité d'orientation qui dépend seulement de deux paramètres orientationnels (β et γ).

2.a.iii. Développement de la fonction par les matrices de Wigner

Pour la suite, il est intéressant de développer la partie angulaire de la fonction δ du Dirac ($\delta(\Omega - \Omega')$) (Equation I.4) sur la base des matrices de rotation de Wigner noté $D_{m,n}^L(\Omega)$ [42], on obtient donc :

$$\delta(\Omega - \Omega') = \sum \left(\frac{2L+1}{8\pi^2} \right) D_{m,n}^L(\Omega) D_{m,n}^{L*}(\Omega') \quad (\mathbf{I.9})$$

avec $D_{m,n}^{L*}(\Omega)$ correspondant à la fonction conjuguée de $D_{m,n}^L(\Omega)$, avec $\Omega = (\alpha, \beta, \gamma)$ et avec L, m et n correspondant aux indices reliés aux coordonnées angulaires du composé.

En appliquant le développement de l'Equation I.8 à l'Equation I.4 de la fonction de probabilité $P^1(r, \Omega, \Phi)$, on obtient l'Equation I.10 qui, développée correspond à l'Equation I.11 :

$$P^1(\beta, \gamma, \Phi) = \langle \delta(r - r') \rangle \times \left\langle \sum \left(\frac{2L+1}{8\pi^2} \right) D_{m,n}^L(\Omega) D_{m,n}^{L*}(\Omega') \right\rangle \times \langle \delta(\Phi - \Phi') \rangle \quad (\mathbf{I.10})$$

$$P^1(\beta, \gamma, \Phi) = \langle \delta(r - r') \rangle \times \sum \left(\frac{2L+1}{8\pi^2} \right) D_{m,n}^L(\Omega) \langle D_{m,n}^{L*}(\Omega') \rangle \times \langle \delta(\Phi - \Phi') \rangle \quad (\mathbf{I.11})$$

Cependant, dans le cas d'une phase nématique, nous avons vu que la fonction $P^1(r, \Omega, \Phi)$ devenait $P^1(\beta, \gamma)$ car elle n'est dépendante que des angles β et γ . Ainsi, compte tenu de l'invariance de l'angle α , l'indice m associé à cet angle n'a plus de sens et se retrouve fixé à 0. L'**Equation I.11** se simplifie alors, et devient :

$$P^1(\beta, \gamma) = \sum \left(\frac{2L+1}{8\pi^2} \right) D_{0,n}^L(\beta, \gamma) \langle D_{0,n}^{L*}(\beta', \gamma') \rangle \quad (\text{I.12})$$

Comme l'orientation dans les cristaux liquides est apolaire (**Equation I.7**), les seuls paramètres de la matrice de Wigner non nuls sont ceux pour lesquels L est pair ($L = 0, 2, 4, \dots$). L'**Equation I.12** se développe donc de la manière suivante :

$$P^1(\beta, \gamma) = \frac{1}{8\pi^2} \left(1 + 5 D_{0,0}^2(\beta, \gamma) \langle D_{0,0}^{2*}(\beta', \gamma') \rangle + 9 D_{0,0}^4(\beta, \gamma) \langle D_{0,0}^{4*}(\beta', \gamma') \rangle + \dots \right) \quad (\text{I.13})$$

Avec L (0) (2) (4)

Comme la RMN permet uniquement l'étude d'observables associés à des tenseurs de rang 2, les paramètres d'ordre retenus sont ceux pour lesquels $L = 2$. Sachant que n peut prendre $2L + 1$ valeurs ($-L, -L+1, \dots, L-1, \text{ et } L$), il y a cinq matrices (pour $n = -2, -1, 0, 1, 2$) qui vont permettre de décrire l'orientation du soluté :

$$P^1(\beta, \gamma, \Phi) = P^1(\beta - \pi, \gamma, \Phi) \quad (\text{I.14})$$

Cependant, il serait imprécis d'affirmer que l'on connaît réellement l'ordre moléculaire globale de l'échantillon car nous avons négligé les interactions soluté-soluté intermoléculaires dès le début de la démonstration et nous n'accédons pas aux tenseurs d'ordre supérieur à 2 dans la fonction de probabilité.

Il est aussi possible de développer les paramètres d'ordre de la fonction de probabilité $P^1(\beta, \gamma)$ selon les cosinus directeurs de la molécule (notés $\cos \theta_\alpha^n$) par rapport à l'axe du directeur du cristal-liquide noté \vec{n} précédemment où $\alpha = x_a, y_a, z_a$ correspond aux axes d'un repère attaché à la molécule. La fonction simplifiée $P^1(\beta, \gamma)$ s'écrit donc :

$$P^1(X) = \frac{1}{8\pi^2} \left(1 + 5 \sum_{\alpha, \beta} \cos \theta_\alpha^n \cos \theta_\beta^n S_{\alpha\beta} + 9 \sum_{\alpha, \beta, \gamma, \delta} \cos \theta_\alpha^n \cos \theta_\beta^n \cos \theta_\gamma^n \cos \theta_\delta^n S_{\alpha\beta\gamma\delta} + \dots \right) \quad (\text{I.15})$$

(0) (2) (4)

Les coefficients $S_{\alpha\beta}$, $S_{\alpha\beta\gamma\delta}$, sont les paramètres d'ordre orientationnel dans la phase nématique. Sachant que la RMN ne donne accès qu'aux observables correspondant aux tenseurs de rang 2, les seuls termes visibles sont :

$$S_{\alpha\beta} = \frac{\langle 3 \cos \theta_{\alpha}^n \cos \theta_{\beta}^n - \delta_{\alpha\beta} \rangle}{2} \quad (\text{I.16})$$

Dans l'Equation I.16, le terme $\delta_{\alpha\beta}$ correspond au symbole de Kröonecker. $\delta_{\alpha\beta} = 1$ quand $\alpha = \beta$, et $\delta_{\alpha\beta} = 0$ quand $\alpha \neq \beta$,

2.b. La matrice d'ordre de Saupe

2.b.i. Description de la matrice de Saupe

Dans un cristal-liquide, l'ordre orientationnel peut être défini par une matrice S de 3×3 qui correspond aux neuf éléments du terme $S_{\alpha\beta}$ issus de la distribution d'orientation. Cette matrice est appelée matrice d'ordre de Saupe [43] et s'écrit sous forme matricielle :

$$S = \{S_{\alpha,\beta}\} = \begin{pmatrix} S_{xx} & S_{xy} & S_{xz} \\ S_{yx} & S_{yy} & S_{yz} \\ S_{zx} & S_{zy} & S_{zz} \end{pmatrix} \quad (\text{I.17})$$

Cette matrice d'ordre présente trois caractéristiques fondamentales : elle est réelle, symétrique (telle que $S_{\alpha\beta} = S_{\beta\alpha}$ pour tout $(\alpha,\beta) \in (x,y,z)^2$) et de trace nulle ($S_{xx} + S_{yy} + S_{zz} = 0$). Par conséquent, on compte au maximum cinq éléments indépendants dans la matrice ($S_{xy}, S_{xz}, S_{yz}, S_{xx} - S_{yy}, S_{zz}$) exprimée dans un système (repère) d'axes initiaux (SAI) moléculaires (cf. Figure I.11). En réalité, le nombre de paramètres indépendants peut être réduit en fonction des éléments de symétries moléculaires de la molécule et le type de phase cristal-liquide utilisé (chirale ou achirale) [44].

Comme la matrice de Saupe (exprimée dans un repère initial moléculaire arbitraire est symétrique et réel), elle peut toujours être diagonalisée, conduisant à un système d'axes propres (SAP) que l'on peut noter (x', y', z') . Les valeurs propres de la matrice diagonalisée ($S_{\alpha'\beta'}$) sont obtenues à partir de l'équation de transfert I.18:

$$\{S_{\alpha'\beta'}\} = M_{Tr} \times \{S_{\alpha\beta}\} \times M_{Tr}^{-1} \quad (\text{I.18})$$

où M_{Tr} correspond à la matrice de transfert. La matrice diagonale ($S_{\alpha'\beta'}$) s'écrit alors :

$$\{S_{\alpha'\beta'}\} = \begin{pmatrix} S_{x'x'} & 0 & 0 \\ 0 & S_{y'y'} & 0 \\ 0 & 0 & S_{z'z'} \end{pmatrix} \quad (\text{I.19})$$

La nouvelle matrice diagonalisée est composée deux termes indépendants et non nuls ($S_{x'x'} - S_{y'y'}$ et $S_{z'z'}$). La valeur $S_{x'x'} - S_{y'y'}$ représente le facteur d'asymétrie de l'orientation où

les $S_{x'x'}$ et $S_{y'y'}$ correspondant aux paramètres d'ordre des axes d'orientation [45] et $S_{z'z'}$, désigne par convention, le paramètre d'ordre diagonalisé de plus grande amplitude et souvent nommé « paramètre de Saupe principal ».

Trois angles d'Euler (au maximum) peuvent être utilisés pour convertir le SAI en SAP. Dans la pratique, le nombre de paramètres d'ordres indépendants non nuls dans le SAI dépend de la symétrie du groupe moléculaire et du type de phase CL (chirale ou achirale). Le nombre de paramètres d'ordres indépendants non nuls pour une symétrie donnée dans les phases achirale et chirale, ainsi que l'emplacement des axes dans le SAP sont présentés dans l'**Annexe A** [46-47].

2.b.ii. Calcul du facteur d'orientation d'une direction internucléaire

A partir de la matrice d'ordre de Saupe ($S_{\alpha\beta}$) associée à un repère moléculaire, il est alors possible de calculer le facteur d'orientation, S_{ij} , associé à une direction internucléaire notée \vec{V}_{ij} , à partir des coordonnées de i et de j dans le repère moléculaire. Pour ce faire, il suffit de développer les termes de la matrice de Saupe, $S_{\alpha\beta}$, sur la base des cosinus directeurs. Nous pouvons alors écrire :

$$S_{ij} = \sum_{\alpha,\beta}^{x,y,z} \cos \theta_{ij}^{\alpha} \cos \theta_{ij}^{\beta} \times \{S_{\alpha\beta}\} \quad (\text{I.20})$$

où $(\alpha, \beta) \& (i, j) \in (x, y, z)^2$ correspondant au repère moléculaire, et θ_{ij}^{α} et θ_{ij}^{β} sont les angles entre le vecteur \vec{V}_{ij} et les axes x,y,z des repères moléculaires. D'après le développement de l'équation (I.16), le facteur d'orientation S_{ij} s'écrit aussi :

$$S_{ij} = \frac{\langle 3 \cos^2 \theta_{ij}^{B_0} - 1 \rangle}{2} \quad (\text{I.21})$$

où $\theta_{ij}^{B_0}$ désigne l'angle entre le vecteur \vec{V}_{ij} et l'axe B_0 qui est supposé parallèle à l'axe z du laboratoire. Sachant que l'angle $\theta_{ij}^{B_0}$ peut prendre l'ensemble des valeurs entre 0 et 2π radians, l'**Equation I.21** montre que S_{ij} est compris entre -0.5 quand le vecteur \vec{V}_{ij} est perpendiculaire à l'axe B_0 et 1 quand \vec{V}_{ij} est parallèle à l'axe B_0 . Il est important de noter que le terme $\langle 3 \cos^2 \theta_{ij}^{B_0} - 1 \rangle$ admet une unique solution tel que $3 \cos^2 \theta_{ij}^{B_0} = 1$ et que le terme s'annule. Cet angle particulier est égal à 54.74° et est appelé Angle Magique.

Si le développement des paramètres d'ordre par les matrices de Wigner est plus représentatif que ceux de Saupe qui ne sont valables que dans un milieu nématique uniaxial, (axe parallèle à l'axe B_0), c'est cette seconde représentation mathématique qui sera utilisée pour la RMN.

3. Les interactions RMN

3.a. Description de l'Hamiltonien de spin

Au sein d'un champ magnétique continu et homogène B_0 , l'ensemble des moments magnétiques des spins non nuls d'une espèce chimique diamagnétique interagit avec le champ B_0 . L'énergie du système associée aux différentes interactions RMN peut être décrite en résolvant l'équation de Schrödinger [48-50] :

$$\mathcal{H}_{\text{tot}} |\Psi\rangle = E |\Psi\rangle \quad (\text{I.22})$$

où \mathcal{H}_{tot} est Hamiltonien de spin total qui régit le système de spin étudié.

Dans le cas d'une molécule dissoute dans un milieu anisotrope (CL ou CLC), l'Hamiltonien \mathcal{H}_{tot} , décrivant les différentes contributions observées sur un spectre de RMN anisotrope correspond à la somme de cinq termes : l'effet Zeeman (Z), l'écrantage électronique (σ), le couplage scalaire (J), le couplage dipolaire (D) et le couplage quadrupolaire (Q) [51]. \mathcal{H}_{tot} , se développe selon l'Equation I.23 :

$$\mathcal{H}_{\text{tot}} = \mathcal{H}_Z + \mathcal{H}_\sigma + \mathcal{H}_J + \mathcal{H}_D + \mathcal{H}_Q \quad (\text{I.23})$$

Dans cette équation : i) \mathcal{H}_Z correspond à l'Hamiltonien Zeeman décrivant l'interaction entre un moment magnétique nucléaire (non nul) et le champ magnétique statique B_0 , ii) \mathcal{H}_σ à l'Hamiltonien de blindage électronique qui définit l'effet d'écrantage des électrons autour des noyaux, iii) \mathcal{H}_J à l'Hamiltonien de couplage scalaire représentant le couplage spin-spin à travers les liaisons de valence, iv) \mathcal{H}_D à l'Hamiltonien de couplage dipolaire représentant le couplage spin-spin à travers l'espace, et v) \mathcal{H}_Q à l'Hamiltonien de couplage quadrupolaire qui correspond à l'interaction entre le moment quadrupolaire du noyau de spin I supérieur à $\frac{1}{2}$ et les gradients de champ électrique, V , autour de celui-ci.

3.b. Présentation de l'interaction de déplacement chimique

Prenons un champ magnétique axial, statique et homogène noté B_0 au sein duquel est placé un ensemble de noyaux i de spin nucléaire noté I_i . Pour chaque noyau i , le champ B_0 crée une interaction de type Zeeman notée \mathcal{H}_Z et qui est l'interaction la plus importante en RMN. De plus, l'environnement électronique présent autour du noyau i est également affecté par le champ magnétique B_0 et forme un champ magnétique local qui s'oppose à B_0 . Cette interaction est connue comme l'écrantage électronique et décrit la réaction de l'environnement électronique face à la perturbation et elle peut être modélisée par un tenseur d'écran $\tilde{\sigma}^i = (\sigma_{\alpha\beta}^i)$ et est décrite par l'Hamiltonien \mathcal{H}_σ .

En RMN, l'Hamiltonien de déplacement chimique, noté \mathcal{H}_δ représente l'interaction magnétique du noyau i et le champ magnétique effectif perçu. Il correspond à la somme des Hamiltoniens Zeeman \mathcal{H}_Z et d'écrantage électronique \mathcal{H}_σ . Cet Hamiltonien s'écrit :

$$\mathcal{H}_\delta = \mathcal{H}_Z + \mathcal{H}_\sigma = -\gamma \hbar I_i^Z \overrightarrow{B}_{\text{eff}} \quad (\text{I.24})$$

où γ correspondant au rapport gyromagnétique du noyau i , \hbar à la constante de Planck réduite ($\hbar = h/2\pi$), I_i^Z correspond au tenseur associé à la composante suivant l'axe z du noyau I et $\overrightarrow{B}_{\text{eff}}$ correspond au champ magnétique effectif tel que:

$$\overrightarrow{B}_{\text{eff}} = (1 - \sigma_i^{\text{iso}} - \sigma_i^{\text{aniso}}) \overrightarrow{B}_0 \quad (\text{I.25})$$

Dans cette équation, σ_i^{iso} correspond à la partie isotrope de l'écrantage électronique qui est égale au tiers de la trace du tenseur $\tilde{\sigma}^i$ soit :

$$\sigma_i^{\text{iso}} = \frac{1}{3} \tilde{\sigma}^i = \frac{1}{3} (\sigma_{xx}^i + \sigma_{yy}^i + \sigma_{zz}^i) \quad (\text{I.26})$$

Ce développement montre l'invariance de cette partie isotrope, qui en pratique, ne dépend pas de l'orientation de la molécule.

En milieu orienté, le terme σ_i^{iso} est complété par le terme σ_i^{aniso} qui représente la partie anisotrope de l'interaction d'écrantage qui est directement reliée aux paramètres d'ordre de rang 2. Pour un noyau i , ce terme s'écrit :

$$\Delta\sigma^i = \frac{2}{3} \sum_{\alpha, \beta = x, y, z} \sigma_{\alpha\beta}^i S_{\alpha\beta} \quad (\text{I.27})$$

Finalement, le développement de l'Equation I.25 d'après l'Equation I.24 conduit à l'Hamiltonien \mathcal{H}_δ suivant :

$$\mathcal{H}_\delta = \mathcal{H}_Z + \mathcal{H}_\sigma = -\gamma \hbar I_i^Z (1 - \sigma_i^{\text{iso}} - \sigma_i^{\text{aniso}}) \quad (\text{I.28})$$

Par rapport à la partie isotrope, σ_i^{iso} , l'anisotropie de déplacement chimique, σ_i^{aniso} , est très souvent négligeable pour les noyaux protons (^1H) ou deutériums (^2H). En revanche, σ_i^{aniso} , est rarement négligeable pour les noyaux de carbone 13 (^{13}C).

3.c. Principe des couplages spin-spin

Le couplage spin-spin correspond à une perturbation du noyau i de spin nucléaire I_i par un noyau j de spin nucléaire I_j . Cette interaction peut se décomposer entre les interactions scalaires (à travers les liaisons de valence) et les interactions dipolaires (à travers l'espace).

3.c.i. *L'interaction de couplage scalaire*

L'interaction de couplage scalaire décrit l'interaction entre spins à travers les électrons formant des liaisons de valence au sein de la molécule [52]. Le couplage entre les deux spins i et j est décrit par le tenseur \tilde{J}_{ij} et l'Hamiltonien caractérisant cette interaction est noté \mathcal{H}_J (cf. **Equation I.29**).

$$\mathcal{H}_J = \sum_i \sum_j \vec{I}_i \tilde{J}_{ij} \vec{I}_j \quad (\text{I.29})$$

Ici, \vec{I}_i correspond au vecteur réel associé au spin nucléaire d'un noyau i , \vec{I}_i correspond au vecteur complexe conjugué du \vec{I}_i et \tilde{J}_{ij} au tenseur de couplage scalaire. Cette équation se développe selon l'équation (cf. **Equation I.30**) :

$$\mathcal{H}_J = \sum_i \sum_j \frac{J_{ij}}{2} (2 I_i^Z I_j^Z + I_i^+ I_j + I_i I_j^+) + \sum_i \sum_j \frac{\Delta J_{ij}}{4} (4 I_i^Z I_j^Z + I_i^+ I_j + I_i I_j^+) \quad (\text{I.30})$$

Dans cette équation, on peut distinguer les deux parties du couplage scalaire : i) le terme $\sum_i \sum_j \frac{J_{ij}}{2} (2 I_i^Z I_j^Z + I_i^+ I_j + I_i I_j^+)$ correspondant à la composante isotrope du couplage avec I_i^Z et I_j^Z , respectivement les opérateurs associés aux composantes selon l'axe z des spins des noyaux I et J ; ii) les termes I_i^+ et I_i^- correspondant aux opérateurs de transitions (de montée et de descente) construits par la combinaison linéaire des opérateurs I_i^X et I_i^Y qui permettent de passer d'un niveau de spin m_n à $(m_n \pm 1)$ où m_n est le nombre quantique associé à I_i^Z et J_{ij} correspond au couplage scalaire isotrope correspondant au tiers de la trace du tenseur \tilde{J}_{ij} .

Le second terme de l'équation correspond à la partie anisotrope du couplage scalaire. Le paramètre anisotrope, ΔJ_{ij} , est égal à :

$$\Delta J_{ij} = \frac{2}{3} \sum_{\alpha, \beta = x, y, z} J_{\alpha\beta}^{ij} S_{\alpha\beta} \quad (\text{I.31})$$

Pour les couples de noyaux $^1\text{H}-^1\text{H}$, $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}-^2\text{H}$, le paramètre ΔJ_{ij} est considéré comme négligeable [53]. Cette contribution reste inséparable de l'interaction dipolaire.

3.c.ii. L'interaction de couplage dipolaire

L'interaction de couplage dipolaire décrit l'interaction entre spins à travers l'espace. De ce fait, elle est donc purement anisotrope [52]. Le couplage entre les deux spins i et j est décrit par le tenseur \tilde{D}_{ij} et l'Hamiltonien caractérisant cette interaction est noté \mathcal{H}_D (cf. [Equation I.32](#)).

$$\mathcal{H}_D = \sum_i \sum_j \tilde{I}_i \tilde{D}_{ij} \tilde{I}_j \quad (\text{I.32})$$

De la même façon que pour le couplage scalaire, \vec{I}_i correspond au vecteur réel associé au spin nucléaire d'un noyau i , \tilde{I}_i correspond au vecteur complexe conjugué du \vec{I}_i et \tilde{D}_{ij} au tenseur de couplage dipolaire. Le développement de l'équation donne [52] :

$$H_D = \sum_i \sum_j 2D_{ij} (I_i^Z I_j^Z - \frac{1}{4}(I_i^+ I_j^- + I_i^- I_j^+)) \quad (\text{I.33})$$

où I_i^Z et I_j^Z respectivement les opérateurs associés aux composantes selon l'axe z des spins des noyaux I et J . I_i^+ et I_i^- correspondent aux opérateurs de transitions (de montée et de descente) construits par la combinaison linéaire des opérateurs I_i^X et I_i^Y et D_{ij} correspond au couplage dipolaire anisotrope à travers l'espace et correspondant à :

$$D_{ij} = -\frac{h\gamma_i\gamma_j}{4\pi^2} \times \frac{S_{ij}}{\langle r_{ij}^3 \rangle} \quad (\text{I.34})$$

Dans cette équation, h est la constante de Planck, γ_i et γ_j sont les rapports gyromagnétiques des noyaux i et j , r est la distance internucléaire entre les noyaux i et j et S_{ij} correspond au paramètre d'ordre orientationnel qui correspond à l'angle entre les vecteurs internucléaires selon les axes x , y et z comme nous l'avons vu dans l'[Equation I.21](#).

3.c.iii. Le couplage spin-spin total

Le couplage spin-spin total correspondant à la contribution du couplage scalaire, J , et du couplage dipolaire, D . L'Hamiltonien du couplage total, \mathcal{H}_{CT} , s'écrit comme [52] :

$$\mathcal{H}_{CT} = \mathcal{H}_J + \mathcal{H}_D = \sum_i \sum_j J_{ij} + 2D_{ij} I_i^Z I_j^Z + \sum_i \sum_j \frac{1}{2}(J_{ij} + D_{ij}) \times (I_i^+ I_j^- + I_i^- I_j^+) \quad (\text{I.35})$$

Ainsi, le couplage total, T_{ij} , entre deux spins i et j inéquivalent peut s'écrire :

$$T_{ij} = J_{ij} + 2D_{ij} \quad (\text{I.36})$$

Les couplages scalaires J_{ij} sont mesurables sur les spectres RMN isotropes, tandis que les constantes de couplages T_{ij} sont mesurables sur les spectres RMN anisotropes. A partir de ces deux mesures, l'accès au couplage dipolaire D_{ij} devient possible ($2D_{ij} = (T_{ij} - J_{ij})/2$).

3.d. L'interaction de couplage quadrupolaire

Les noyaux de spin $I > 1/2$ possèdent un moment quadrupolaire électrique intrinsèque Q dont l'origine est une distribution des charges électriques nucléaires non sphérique. Ce moment quadrupolaire électrique nucléaire peut interagir avec un gradient de champ électrique, V . L'interaction de couplage quadrupolaire décrit l'interaction entre le gradient de champ électrique local pour un noyau i et son moment quadrupolaire Q_i . L'Hamiltonien associé à cette interaction s'écrit :

$$\mathcal{H}_Q = \sum_i \vec{I}_i \cdot \vec{Q}_i \cdot \vec{I}_i \quad (\text{L.37})$$

où \vec{I}_i correspond au vecteur réel associé au spin nucléaire d'un noyau i , \vec{I}_i correspond au vecteur complexe conjugué du \vec{I}_i et \vec{Q}_{ij} au tenseur de couplage quadrupolaire. Le développement de l'[Equation I.37](#) donne [52] :

$$\mathcal{H}_Q = \frac{e^2}{4h} \sum_i \frac{q_i Q_i}{I_i(2I_i-1)} \times 3 \left(I_i^Z - I_i^2 \right) \times \left(\frac{3 \cos^2 \theta_i^Z - 1}{2} \right) \quad (\text{L.38})$$

avec q_i , le gradient de champ électrique autour du noyau i , I_i^Z correspond à l'opérateur associé au spin du noyau i . et θ_i^Z l'angle entre le gradient de champ magnétique au niveau du noyau i et l'axe du champ B_0 (correspond à l'axe z). Ainsi, comme l'interaction de couplage dipolaire, l'interaction de couplage quadrupolaire est un élément purement anisotrope.

Dans le cas du noyau deutérium (^2H) de spin $I = 1$, il est admis que le gradient de champ magnétique est de symétrie axiale le long de la liaison $\text{C}-^2\text{H}$, et l'expression de Hamiltonien \mathcal{H}_Q devient :

$$\mathcal{H}_Q = \Delta v_Q \times \frac{3 \left(I_H^Z - I_H^2 \right)}{6} \quad (\text{L.39})$$

$$\Delta v_Q = \frac{3}{2} K_{\text{CD}} S_{\text{C}-^2\text{H}} \quad \text{avec } K_{\text{CD}} = \frac{e^2 Q_D q_{\text{C-D}}}{h} \quad (\text{L.40})$$

En milieu anisotrope, un noyau ^2H donnera naissance à un doublet quadrupolaire dont les composantes sont séparées par un éclatement quadrupolaire, noté Δv_Q . Cet éclatement est défini dans l'[Equation I.40](#). Dans cette équation, deux paramètres sont distinguables : i) la

constante de couplage quadrupolaire K_{CD} ; ii) le paramètre d'ordre local, S_{C-^2H} qui correspond au paramètre d'ordre associé à la liaison $C-^2H$. S_{C-^2H} dépendant de l'angle entre la liaison et l'axe du champ magnétique B_0 .

Notons ici que la valeur du facteur K_{CD} varie en fonction de l'état d'hybridation de l'atome de carbone lié au deutérium, mais aussi de l'électronégativité des substituants proches. Généralement, cette valeur est approximativement égale à 170 ± 5 kHz, 185 ± 5 kHz and 210 ± 5 kHz, pour des atomes carbones sp^3 , sp^2 and sp , respectivement [9, 52, 54, 55]

Le signe du couplage résiduel quadrupolaire 2H associé à une direction $^{12,13}C-^2H$ ne peut pas être déterminé directement à partir de l'analyse des spectres $^2H-\{^1H\}$ anisotropes pour une molécule marquée ou en RMN 2H en abondance naturelle (DAN). Il est cependant possible de déterminer ce signe à partir de : i) l'amplitude du couplage résiduel, $\Delta\nu_Q(^2H)$, mesuré sur les spectres 2H ou DAN anisotrope (associé à la direction $^{12,13}C-^2H$), et de l'amplitude du couplage dipolaire $^1D(^{13}C-^2H)$ ou $^1D(^{13}C-^1H)$ déterminée à partir du couplage total, $^1T(^{13}C-^2H)$ ou $^1T(^{13}C-^1H)$ mesuré sur les spectres RMN anisotropes ^{13}C couplé des 2H (molécule marquée) ou couplé des 1H (molécule non-enrichie).

Dans le premier cas, le rapport $[\Delta\nu_Q(^{12,13}C-^2H)/^1D(^{13}C-^2H)]$ est égal à environ -80. Dans le second cas, et en supposant que vecteur $^{12,13}C-^2H$ est colinéaire au vecteur $^{13}C-^1H$, le rapport $[\Delta\nu_Q(^{12,13}C-^2H) / ^1D(^{13}C-^1H)]$ est égal à environ -12. Dans une première étape, et en considérant que le couplage total, $^1T(^{13}C-^2H)$ ou $^1T(^{13}C-^1H)$ mesuré en milieu anisotrope est soit positif, soit négatif (deux solutions possibles), deux valeurs de $^1D(^{13}C-^2H)$ ou $^1D(^{13}C-^1H)$ ($^1D_{ij} = [^1T_{ij} - ^1J_{ij}]/2$), sont calculables à partir du couplage scalaire $^1J(^{13}C-^2H)$ ou $^1J(^{13}C-^1H)$ mesuré en milieu isotrope et supposé toujours positif et (généralement inférieur) à $^1D(^{13}C-^2H)$ ou $^1D(^{13}C-^1H)$. Dans une seconde étape, seule la valeur de $^1D(^{13}C-^2H)$ ou $^1D(^{13}C-^1H)$ expérimentale se rapprochant du rapport $[\Delta\nu_Q(^{12,13}C-^2H)/80]$ ou $[\Delta\nu_Q(^{12,13}C-^2H)/12]$ sera retenue. Connaissant l'amplitude et le signe de $^1D(^{13}C-^2H)$ ou de $^1D(^{13}C-^1H)$, on détermine *in fine* le signe de $\Delta\nu_Q(^{12,13}C-^2H)$.

En conclusion, en milieu orienté, l'anisotropie des interactions RMN apparaît alors qu'elle est, en moyenne, nulle en milieu isotrope. Nous observons donc des mesurables RMN supplémentaires apportant davantage d'informations moléculaires mais pouvant rendre l'analyse des spectres plus complexe. Ainsi : i) l'anisotropie d'écrantage électronique résiduel, $\Delta\sigma$, va induire une modification des déplacements chimiques plus ou moins grande selon le type de noyaux observés ; ii) au couplage scalaire J_{ij} mesurable en milieu isotrope va s'ajouter le couplage dipolaire D_{ij} en milieu anisotrope (système de spins inéquivalents de type AX, AMX,); iii) un couplage dipolaire va également apparaître pour des systèmes de spin équivalents (système de spins équivalents de type A_2 , A_3); iv) enfin dans le cas d'étude de noyau de spin $I > 1/2$, les éclatements quadrupolaires, $\Delta\nu_Q$, vont être observés.

Dans une phase CLC, ces nouvelles observables seront observées pour les énantiomères d'une molécule chirale ou les directions énantiotopes dans les molécules prochirales [23].

4. Technique RMN de discrimination énantiomérique en milieu cristal-liquide chiral

Lorsque deux énantiomères d'une molécule sont dissous dans un milieu CLC comme les solutions organiques de polymère polypeptidique, ils interagissent et s'orientent différemment au sein de la phase chirale (*cf.* Chapitre I.1.d). Sur les spectres de RMN, les différences d'orientation entre énantiomères seront détectables *via* toutes les mesurables RMN anisotropes (sensibles à l'ordre orientationnel). Le même principe existe pour des directions énantiotopes dans les molécules prochirales.

4.a. Stéreochimie et conséquences spectrales en RMN

D'un point de vue stéréochimique, il existe trois types d'éléments (atomes ou groupe d'atomes) dans une molécule : i) les éléments dits « homotopes », échangeables par un axe de symétrie de type C_n ; ii) les éléments dits « diastéréotopes », non échangeables, ni par un axe, ni par un plan de symétrie ; iii) les éléments dits énantiotopes, échangeables par plan de symétrie σ ou un axe S_n . Ces éléments sont présents dans les molécules prochirales (de symétrie C_s (par exemple, l'éthanol) ou de symétrie S_4 (par exemple, le 1,3,5,7-tétraméthylcycloocta-1,3,5,7-tétraène) (*cf.* Figure I.13 et Tableau I.2).

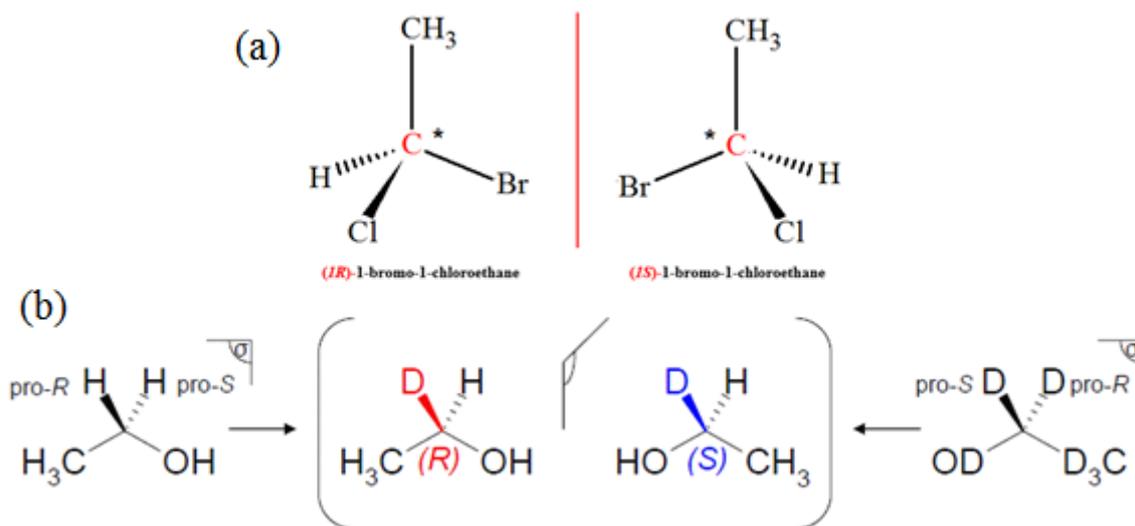


Figure I.13 : (a) Exemple d'énantiomères « classiques » comportant quatre substituants différents. (b) Structure des énantiomères de chiralité isotopique (énantio-isotopomères) de l'éthanol et leurs homologues prochiraux: l'éthanol protoné et l'éthanol perdeutééré.

Selon le type de solvant utilisé, chiral ou achiral, anisotrope ou isotrope, ces éléments sont spectralement discriminables ou pas. Le **Tableau I.2** résume les différentes situations spectrales possibles.

Tableau I.2 : Discrimination spectrale selon le type d'éléments et selon le solvant considéré

Solvant	Type d'éléments		
	Homotopes	Enantiotopes	Diastéréotopes
Liquide achiral	Non	Non	Oui (δ) ^a
Liquide chiral	Non	Oui (δ^{iso}) ^a	Oui (δ^{iso}) ^a
Cristal liquide achiral (CLA)	Non	Non	Oui (δ^{aniso} , D, $\Delta\nu_Q$) ^a
Cristal liquide chiral (CLC)	Non	Oui (δ^{aniso} , D, $\Delta\nu_Q$) ^a	Oui (δ^{aniso} , D, $\Delta\nu_Q$) ^a

^a Observables RMN utilisables pour révéler une discrimination (énantiomérique/énantiotopique).

4.b. Analyse par RMN du proton (¹H)

Sur un spectre RMN proton, la discrimination énantiomérique (*R/S*) sera essentiellement détectée via une différence entre les couplages totaux spin-spin, $T_{\text{H-H}} ((T_{\text{H-H}})^R \neq (T_{\text{H-H}})^S)$. En effet, comme la direction internucléaire H-H est orientée différemment dans l'espace pour des énantiomères, le couplage dipolaire $D_{\text{H-H}}$ associé sera différent ($(D_{\text{H-H}})^R \neq (D_{\text{H-H}})^S$). Dans une phase CLC faiblement orientante, les spectres anisotropes proton sont généralement difficiles à analyser pour deux raisons : i) la multitude de couplages dipolaires ¹H-¹H à courte et à longue distance qui conduisent à des spectres basse-résolution [1], ii) le dédoublement des spectres dû à la discrimination des énantiomères. Le cumul de ces deux effets rend l'analyse spectrale proton (assez) difficile pour la plupart des molécules (même présentant peu de sites hydrogénés). Différentes méthodologies RMN ont été développées pour extraire et simplifier leur analyse (détection sélective des signaux ¹H par des expériences 1D/2D SERF) [1, 56-59]. La RMN ¹H anisotrope reste relativement peu utilisée en milieu orienté chiral, et d'autres méthodes (basées sur la détection de noyaux peu abondants ¹³C, ²H) sont plus souvent utilisées pour visualiser des énantiomères, des énantio/diastéréo-isotopomères ou des directions énantiotopes [1].

4.c. Analyse par RMN du carbone-13 (¹³C)

Les molécules organiques sont principalement composées d'atomes d'hydrogène et de carbone. Comme l'intérêt de la RMN ¹H dans les CLC peut apparaître limité, il est intéressant d'étudier les noyaux d'atomes de carbone-13 qui sont également magnétiquement actifs (spin $I \neq 0$), à savoir les atomes de carbone-13. Malgré la faible abondance naturelle de ce noyau (\approx

1,1 %), les analyses RMN sur les spectromètres actuels sont très efficaces, aussi bien en présence d'un découplage large bande des protons (RMN $^{13}\text{C}-\{^1\text{H}\}$) qu'en son absence (RMN ^{13}C) [60, 61].

4.c.i. La RMN du carbone-13 découplé du proton (RMN $^{13}\text{C}-\{^1\text{H}\}$)

Dans la plupart des composés organiques, les noyaux ^{13}C ne sont couplés qu'avec les protons de la molécule. En milieu isotrope, le spectre RMN $^{13}\text{C}-\{^1\text{H}\}$ en abondance naturelle d'une molécule présente, pour chaque site carbone-13 inéquivalent, un signal singulet centré sur son déplacement chimique isotrope, $\delta^{\text{iso}}(^{13}\text{C})$. En milieu anisotrope achiral, le spectre sera composé du même nombre de signaux qu'en milieu isotrope mais résonant à un déplacement chimique (légèrement) différent de $\delta^{\text{iso}}(^{13}\text{C})$ que l'on note $\delta^{\text{aniso}}(^{13}\text{C})$. Ce décalage correspond à l'anisotropie de déplacement chimique résiduelle (RCSA ou σ^{aniso}) (cf. Chapitre I.3.c.) qui s'ajoute au déplacement chimique isotrope δ^{iso} selon l'Equation I.41 (exprimé en Hz).

$$\delta^{\text{aniso}} = \delta^{\text{iso}} + (\gamma B_0 / 2\pi) \times \sigma^{\text{aniso}} \quad (\text{I.41})$$

Pour une molécule chirale dissoute dans un CLC, chaque site ^{13}C inéquivalent est susceptible de donner deux résonances, un par énantiomère, visible sur son spectre RMN 1D $^{13}\text{C}-\{^1\text{H}\}$. Ces deux résonances sont centrées sur des déplacements chimiques anisotropes différents $(\delta^{\text{aniso}})^R \neq (\delta^{\text{aniso}})^S$ (cf. Figure I.14). La discrimination spectrale des énantiomères est donc basée sur la possibilité de détecter une différence de RCSA(^{13}C), interaction sensible à l'ordre moléculaire (cf. Chapitre I.3). En effet, l'orientation du nuage électronique pour un site carboné sera différente pour chaque énantiomère conduisant à $(\sigma^{\text{aniso}})^R \neq (\sigma^{\text{aniso}})^S$. Ainsi, les deux singulets seront séparés d'une valeur $\Delta\sigma^{\text{aniso}}$. L'anisotropie de déplacement chimique dépendant fortement de l'hybridation de l'atome de carbone. Elle sera plus grande pour un carbone hybridé sp que pour un carbone hybridé sp^2 ou sp^3 (cf. Equation I.42).

$$|\sigma^{\text{aniso}}(\text{sp})| > |\sigma^{\text{aniso}}(\text{sp}^2)| > |\sigma^{\text{aniso}}(\text{sp}^3)| \quad (\text{I.42})$$

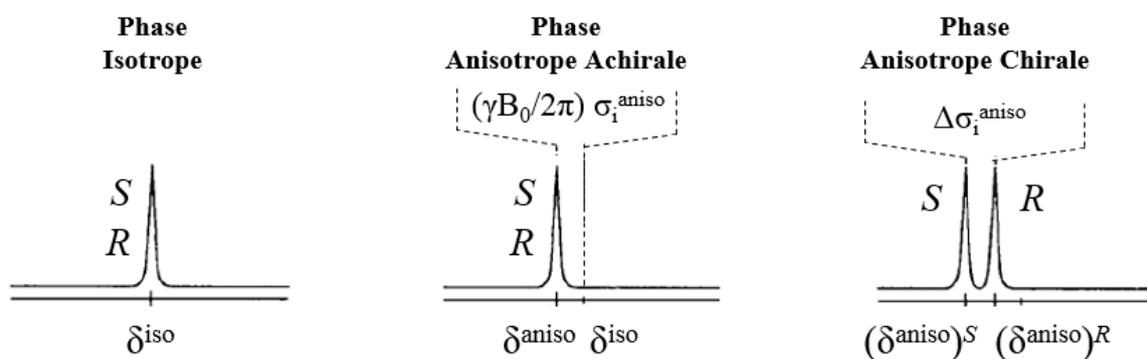


Figure I.14: Représentation schéma d'un signal $^{13}\text{C}-\{^1\text{H}\}$ dans différents milieux : (a) isotrope; (b) anisotrope achiral; (c) anisotrope chirale. L'énantiodiscrimination est possible dans un CLC car la valeur du RCSA(^{13}C) est différente pour les deux énantiomères. L'attribution des stéréodescripteurs R

et S est arbitraire. La réduction (d'un facteur 2) de l'intensité du signal $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ associée au doublement du nombre de pics dans la phase CLC pas été représentée (c). Figure extraite de la référence [1].

4.c.ii. La RMN du carbone-13 couplé du proton (RMN ^{13}C)

En RMN du carbone-13, les expériences sont réalisées avec un découplage des protons pour simplifier les spectres. Cependant, la RMN ^{13}C sans découplage ^1H peut également permettre de discriminer des énantiomères.

Dans un milieu isotrope, un groupement méthine (C-H) d'une molécule chirale donne naissance à un doublet dont les composantes sont séparées par la constante $^1J_{\text{C-H}}$ et sont centrées sur le déplacement chimique isotrope $\delta^{\text{iso}}(^{13}\text{C})$. En milieu anisotrope achiral, le signal observé est encore un doublet, mais il sera centré sur le déplacement chimique anisotrope $\delta^{\text{aniso}}(^{13}\text{C})$. L'éclatement du doublet correspond alors au couplage total spin-spin $^1T_{\text{C-H}}$. Il est égal à $^1J_{\text{C-H}} + 2^1D_{\text{C-H}}$ [60, 61]. En milieu anisotrope chiral, le signal ^{13}C du méthine donne naissance à deux doublets centrés sur leurs déplacements chimiques anisotropes ^{13}C respectifs : $(\delta^{\text{aniso}})^R$ et $(\delta^{\text{aniso}})^S$. Ils présenteront des couplages spin-spin total $(T_{\text{C-H}})^{R,S}$ différents ($(T_{\text{C-H}})^R \neq (T_{\text{C-H}})^S$). Ces différences de $T_{\text{C-H}}$ sur les spectres ^{13}C proviennent des différences de couplage dipolaire résiduel $D_{\text{C-H}}$ ($(D_{\text{C-H}})^R \neq (D_{\text{C-H}})^S$).

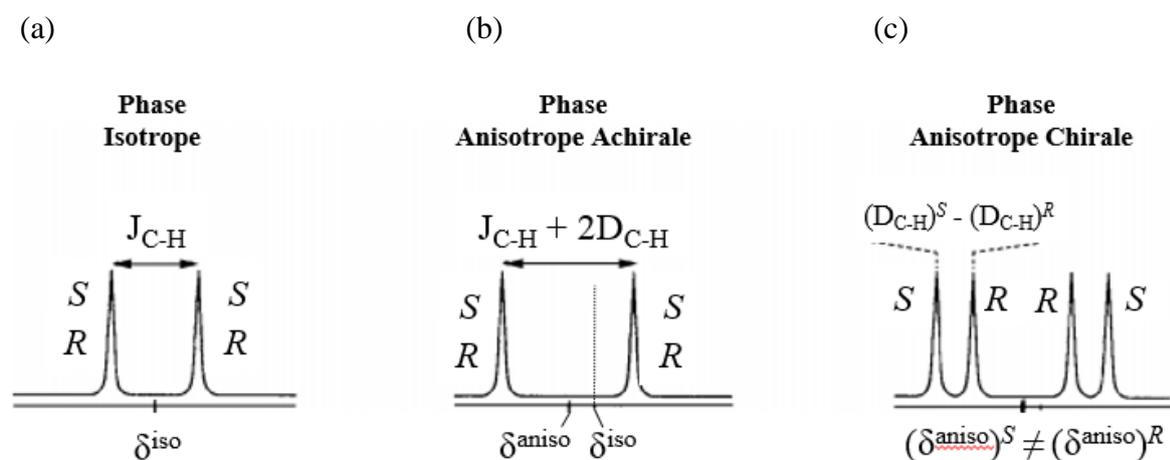


Figure I.15 : Représentation d'un spectre RMN ^{13}C couplé proton d'un groupement méthine ($^{13}\text{C}\text{-}^1\text{H}$) dans différents milieux : (a) une phase isotrope (achirale), (b) une phase anisotrope achirale, (c) une phase anisotrope chirale. L'énantiodiscrimination (R/S) est possible dans un milieu anisotrope chiral car le couplage spin-spin total $T_{\text{C-H}}$ est différent pour les deux énantiomères. L'attribution des stéréodescripteurs R et S est arbitraire. La réduction (d'un facteur 2) de l'intensité du signal $^{13}\text{C}\text{-}^1\text{H}$ associée au doublement du nombre de pics dans la phase CLC pas été représentée (c). Figure extraite de la référence [1].

Cependant, l'intérêt de la RMN 1D ^{13}C couplée des protons est parfois limité dans le cas de l'étude de molécules complexes. Différentes raisons expliquent la complexité des spectres 1D ^{13}C : i) la présence de nombreux couplages $T(^{13}\text{C}\text{-}^1\text{H})$ à longue distance ; ii) les couplages hétéronucléaires $T(^{13}\text{C}\text{-X})$ si la molécule possède des hétéroatomes X magnétiquement actifs ; iii) des figures spectrales présentant des effets au second ordre

lorsque le système de spins ^1H est fortement couplé (cas de groupements méthylènes de type AXY). Des expériences 2D hétéronucléaires peuvent être utilisées pour simplifier les spectres ^{13}C couplées ^1H [1, 62, 63].

Finalement une alternative à la RMN ^{13}C (couplée et découplée des ^1H) consiste à réaliser des expériences RMN 1D/2D du deutérium découplé du proton (molécules marquées ou en abondance naturelle). Cette approche permet de discriminer des énantiomères mais aussi des directions énantiotopes (détection d'énantioisotopomères).

4.d. La RMN du deutérium (^2H) découplé du proton de molécules marquées

La RMN en deutérium est un outil analytique à fort potentiel à la fois pour étudier des molécules marquées (mono-, poly- ou perdeutérées) mais aussi en abondance naturelle deutérium ($1,55 \cdot 10^{-2}\%$ / ^1H), que ce soit en milieu liquide ou en milieu orienté [1, 64, 65].

En milieu isotrope, le spectre ^2H découplé des protons (RMN $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$) d'une molécule chirale monodeutérée donne naissance à un seul singulet centré sur le déplacement chimique isotrope δ^{iso} du deutérium, $\delta^{\text{iso}}(^2\text{H})$ (cf. **Figure I.16**). En milieu anisotrope achiral, l'interaction quadrupolaire anisotrope sensible à l'ordre n'est plus moyennée à zéro et se manifeste par l'apparition d'un doublet quadrupolaire (DQ(^2H)) d'éclatement $\Delta\nu_Q$ et centré sur son déplacement chimique anisotrope, $\delta^{\text{aniso}}(^2\text{H})$ (cf. **Figure I.16**).

Pour comprendre le phénomène d'un point de vue fondamental, il est nécessaire de s'intéresser au diagramme de niveau d'énergie du noyau deutérium comme décrit sur la **Figure I.16a**.

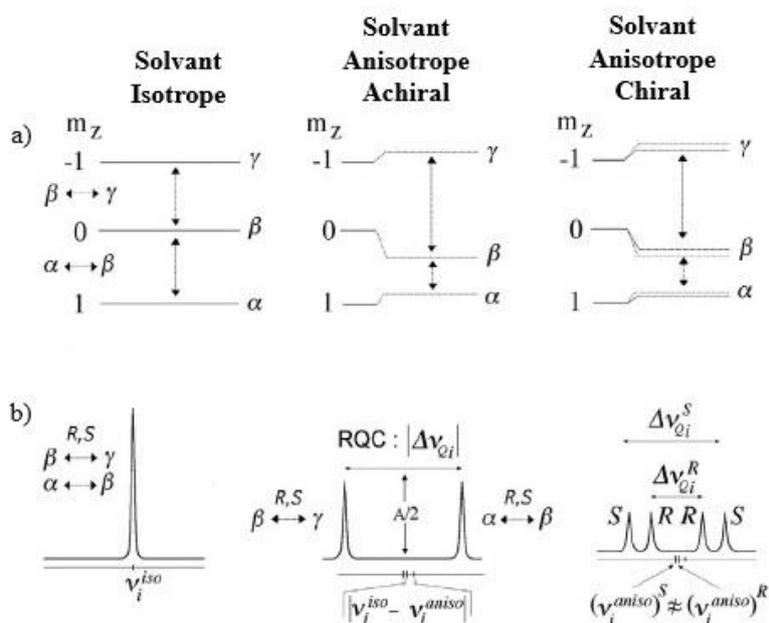


Figure I.16 : (a) Représentation des diagrammes des niveaux d'énergie du noyau deutérium selon la nature de la phase (solvant isotrope, phase anisotrope achirale et phase anisotrope chirale). (b) Spectres RMN 1D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ théoriques attendus. Les largeurs de raies sont supposées identiques. Noter

la réduction (d'un facteur 2) de l'intensité du signal $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ associée au doublement du nombre de pics dans la phase CLA (b) et la réduction (d'un facteur 4) dans la phase CLC (c), comparée au signal ^2H unique obtenu dans la phase isotrope (a). Figure extraite de la référence [1].

D'un point de vue quantique, le noyau ^2H de spin $I = 1$ présente trois niveaux d'énergies notés α , β et γ et correspondant au nombre quantique magnétique $m_z = 1, 0, -1$, respectivement. Dans ce cas, il existe trois transitions entre les niveaux d'énergies : i) deux transitions simple quantum (SQ) associées à la transition $\alpha \rightarrow \beta$, et la transition $\beta \rightarrow \gamma$; ii) une transition double quantum (DQ) entre le niveau α et le niveau γ ($\alpha \rightarrow \gamma$). En RMN 1D, seules les transitions SQ sont directement observables, deux changements d'états de spins sont possibles.

Dans un solvant isotrope, les trois niveaux d'énergies sont espacés par la même différence, notée ΔE et tel que :

$$\Delta E_{\alpha \rightarrow \beta} = \Delta E_{\beta \rightarrow \gamma} \quad (\text{I.43})$$

Comme les différences d'énergies, ΔE , entre les trois états magnétiques sont égales, les fréquences de transition (SQ) sont identiques, ce qui conduit à l'apparition d'un seul signal (une transition) sur le spectre RMN $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ d'une molécule monodeutérée chirale (*cf.* **Figure I.16a**).

En milieu anisotrope achiral, les trois états de spins (α , β et γ) sont toujours présents mais l'action de l'interaction quadrupolaire, \mathcal{H}_Q , va perturber ces niveaux d'énergies (stabilisation ou déstabilisation). Ainsi, les niveaux d'énergies des états α et γ sont augmentés, alors que le niveau d'énergie de l'état β est abaissé. Ainsi, les différences entre niveaux d'énergies ($\alpha \rightarrow \beta$ et $\beta \rightarrow \gamma$) sont modifiées telles que :

$$\Delta E_{\alpha \rightarrow \beta} < \Delta E_{\beta \rightarrow \gamma} \quad (\text{I.44})$$

Comme les différences d'énergie entre niveaux d'énergies ne sont plus identiques, deux transitions de fréquences différentes sont observables. Le signal ^2H obtenu se présentera sous la forme d'un doublet quadrupolaire centré sur la valeur δ^{aniso} . Dans ce schéma, la composante blindée est associée à la transition correspondant au ΔE le plus petit ($\alpha \rightarrow \beta$) et la composante déblindée est associée à la transition correspondant au ΔE le plus grand ($\beta \rightarrow \gamma$).

Enfin, dans une phase anisotrope chirale, le même processus se produit pour les états α , β et γ mais entraîne l'apparition de deux paires de signaux différenciées et associées aux deux énantiomères monodeutérés. Quatre transitions différentes sont attendues, soit :

$$(\Delta E_{\alpha \rightarrow \beta})^R \neq (\Delta E_{\alpha \rightarrow \beta})^S < (\Delta E_{\beta \rightarrow \gamma})^R \neq (\Delta E_{\beta \rightarrow \gamma})^S \quad (\text{I.45})$$

En d'autres termes et en pratique, en milieu anisotrope chiral, deux énantiomères (monodeutérés) orientés différemment vont donner naissance à deux doublets quadrupolaires $(\Delta\nu_Q)^R \neq (\Delta\nu_Q)^S$ centrés sur leurs déplacements chimiques anisotropes respectifs : $(\delta^{\text{aniso}})^R$ et $(\delta^{\text{aniso}})^S$. En général dans les milieux faiblement orientants, les RCSA(^2H) sont petits, expérimentalement, nous avons $(\delta^{\text{aniso}})^R \approx (\delta^{\text{aniso}})^S$. Chaque doublet quadrupolaire sera caractérisé par un éclatement quadrupolaire différent, $\Delta\nu_Q^R$ et $\Delta\nu_Q^S$, proportionnel au facteur d'ordre associé à la direction $S_{\text{C-D}}^R$ et $S_{\text{C-D}}^S$.

Grâce à cette différence d'éclatements quadrupolaires ^2H , il a été possible de déterminer expérimentalement les excès énantiomériques (*ee*) de mélanges d'énantiomères pour une large gamme de molécules chirales : i) de nature chimique différente (alcool, éther, amine, halogène, ...); ii) de structure différente (rigides, flexibles, semi-flexibles....); iii) avec une chiralité « classique » (centre stéréogène carboné ou phosphoré), avec une chiralité de type « isotopique », axiale ou atropo-isomérique [66-69]. Ces résultats s'expliquent par la très forte sensibilité de l'éclatement quadrupolaire à une différence d'ordre orientationnel de la direction C- ^2H (cf. **Chapitre I.4.d**), mais aussi la simplicité des spectres à analyser (observation d'un seul DQ(^2H)) par énantiomère pour une molécule monodeutérée.

Cependant, cette méthode possède un inconvénient majeur pour les chimistes : i) une étape de synthèse supplémentaire pour le marquage isotopique (enrichissement) d'une seule direction C- ^2H , étape, qui peut être longue et/ou difficile (cas des alcanes) ; ii) la non-garantie que la position marquée soit, *in fine*, discriminée spectralement. Pour répondre à cette problématique, la RMN du deutérium en abondance naturelle (RMN- ^2H DAN) a été développée au laboratoire depuis 1998 [1, 65, 70-72].

5. Discrimination énantiomérique par RMN DAN

5.a. Etude par RMN 1D du deutérium en abondance naturelle

Le principe des analyses RMN du deutérium en abondance naturelle (DAN) consiste à détecter les différents isotopomères monodeutérés (énantio- ou diastéréoisotopomères) de la molécule étudiée et présents dans le mélange [1, 70,71]. Comme en RMN ^{13}C ou en RMN ^2H de molécules marquées, les deutériums sont découplés des protons en RMN 1D DAN (DAN- $\{^2\text{H}\}$). Ce découplage est basé sur un train d'impulsion composite (CPD) de 180° (de faible puissance : 0,5 to 1 W), tel que la séquence WALTZ-16 or WALTZ-64 [72] afin d'éliminer les couplages scalaires et dipolaires ^2H - ^1H . Des séquences modernes de découplage adiabatique peuvent également être utilisées [73]. Il est à noter ici que le découplage des protons peut être appliqué durant l'ensemble de l'expérience 1D DAN (délai de relaxation et acquisition). En effet et contrairement aux noyaux ^{13}C , les noyaux ^2H ne sont pas affectés par les transferts de polarisation $^2\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ lors du découplage des ^1H (pas d'effet nOe) [1, 74]. En effet, en raison de son spin ($I = 1$), la relaxation des noyaux ^2H est dominée par des mécanismes quadrupolaires relativement efficaces. Par conséquent, les

effets nOe, qui sont principalement associés à des mécanismes de relaxation dipolaire, sont généralement négligeables. Par conséquent, il est inutile d'appliquer un découplage (en créneaux), c'est-à-dire uniquement pendant l'acquisition du signal ^2H , pour enregistrer des spectres RMN DAN quantitatif (mesure des rapports isotopiques, par exemple).

Pour les molécules organiques simples se réorientant relativement rapidement (phase liquide), les temps de relaxation ^2H longitudinale, $T_1(^2\text{H})$, et transversale, $T_2(^2\text{H})$, sont généralement égaux et relativement courts [1, 74]. Notons ici que des temps de relaxation $T_1(^2\text{H})$ courts sont intéressants du point de vue de la sensibilité puisqu'ils permettent une accumulation (plus) rapide du signal RMN. Néanmoins, les temps de relaxation $T_2(^2\text{H})$ sont suffisamment long (0,1 et 0,8 s), et conduisent à des largeurs de raies modérées (1 - 5 Hz).

D'un point de vue d'analyse spectrale, il est facile d'attribuer des signaux DAN- $\{^1\text{H}\}$ puisque les déplacements chimiques ^2H exprimés en ppm sont généralement identiques aux déplacements chimiques ^1H correspondants. Un autre avantage de la RMN DAN par rapport à la spectrométrie de masse à rapport isotopique (SMri) est que les atomes d'hydrogène échangeables ne perturbent pas l'analyse isotopique. En SMri, ils doivent être éliminés avant l'analyse.

De la même façon que pour les molécules marquées en deutérium, l'énantiodifférenciation par RMN DAN dans un CLC est essentiellement basée sur une différence de $\Delta\nu_Q(^2\text{H})$.

Cette technique n'a pas été exploitée immédiatement compte-tenu de la faible abondance isotopique des noyaux ^2H (0,015 % par rapport aux noyaux ^1H), soit une abondance cent fois plus faible que celle des noyaux carbone-13. Malgré cette faible abondance, les premières expériences RMN DAN anisotrope ont été historiquement réalisées sur un spectromètre RMN de 5,7 T (AM Bruker 250 / 38,3 MHz pour le ^2H) [70], puis sur un spectromètre RMN 9.4 T (DRX Bruker 400 / 61,4 MHz pour le ^2H) [74].

En 2009, le laboratoire ICMMO s'est équipé d'un spectromètre RMN Bruker à haut champ (AV-600 / 92,1 MHz pour ^2H) équipé d'une sonde cryogénique (cryosondeTM) sélective ^2H de 5 mm. L'utilisation d'une cryosonde permet de réduire significativement le bruit thermique (électronique) de l'antenne de détection et du préamplificateur (cf. **Figure I.17b**). [75]. Cette combinaison d'équipements permet un gain significatif en sensibilité (par rapport à un DRX-400 (9.4 T) équipé d'une sonde sélective standard ^2H (« SEX »)). Elle permet, ainsi, d'enregistrer des spectres RMN 1D/2D DAN de haute qualité (pour des temps d'expériences raisonnables, compris entre 10 et 15 heures), même quand la quantité d'analyte est relativement faible ou que sa masse molaire est élevée (400 g/mol) (cf. **Figure I.17a**). Expérimentalement, le gain en sensibilité (un facteur 5 – 6) permet de détecter les isotopomères ^{13}C - ^2H (1.1 % \times 0.015 %), notamment au niveau du signal du co-solvant organique (cf. **Figure I.18b**). En revanche, les isotopomères ^2H - ^2H (isotopomères dideutérés),

du soluté ou même du co-solvant (le cas échéant) ne sont pas détectés expérimentalement (avec nos équipements) compte tenu de leur trop faible abondance naturelle ($0.015 \% \times 0.015 \%$) (cf. **Figure I.18a**).

Contrairement à la RMN $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ anisotrope de molécules marquées, l'observation simultanée de tous les isotopomères monodeutérés d'une molécule complexifie fortement l'analyse des spectres 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$, notamment l'attribution des différents DQ(^2H). En effet, les nombreux entrelacements de DQ et/ou les recouvrements possibles de composantes rendent difficile l'identification des composantes de chaque DQ DAN.

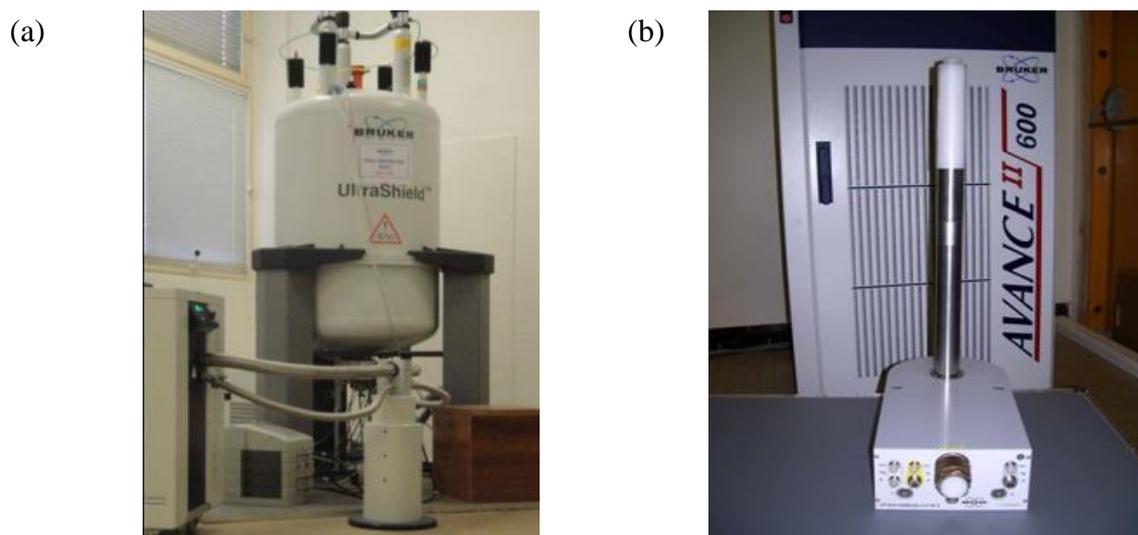
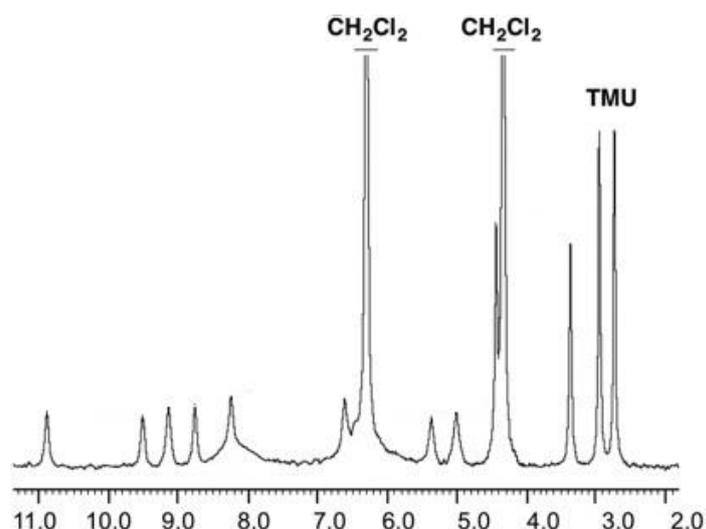


Figure I.17 : (a) Photo de l'aimant de 14,1 T couplé à sa cryoplateforme utilisé au sein du LRMN; (b) Photo de la cryosonde ^2H sélective (5 mm) devant la console Avance II, et avant son installation dans l'aimant. Notez le préamplificateur sous la sonde et les connectiques sur le panneau frontal. Réfroidie par de l'hélium gaz, la température de la sonde et du préamplificateur sont égales à 17 K et 77 K, respectivement.

Pour contourner ces problèmes, différentes séquences RMN bidimensionnelles (2D) permettent d'éclater les informations sur les deux domaines de fréquences (F_1 et F_2) en permettant de corrélérer les deux composantes de chaque DQ(^2H). Ces séquences RMN 2D ont été développées au laboratoire [71,76-78], et sont appelées « QUOSY » (QUadropole Ordered Spectroscopy). Dans la section suivante, nous décrirons trois expériences 2D QUOSY, les séquences de type « Q -COSY », « Q -résolue », et « δ -résolue » [71,76-78]. Les séquences 2D de type « Q -DQ » mettant en jeu la transition double quantum (DQ) $\alpha \rightarrow \gamma$ (cf. **Figure I.16**) des noyaux ^2H ne sera pas présentée [76]. En effet, comme l'intensité des DQs observés va dépendre du paramètre de refocalisation, τ ($\tau = 1/4\Delta\nu_Q$) dans la séquence, cette expérience est beaucoup moins intéressante en termes d'analyse quantitative [76]. Une approche 3D a été explorée pour contourner ce problème [79, 80].

(a)



(b)

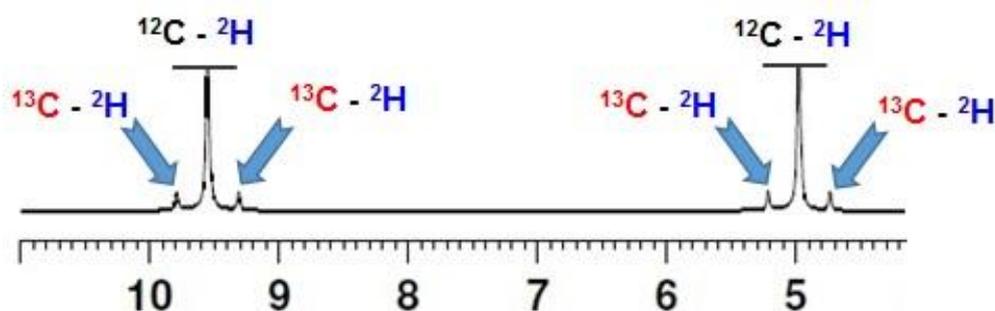


Figure I.18 : (a) Spectre 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ de la vanilline dans la phase PBLG/ CH_2Cl_2 - CCl_4 . Chaque isotopomère monodeutééré forme un DQ centré sur son δ^{aniso} . L'attribution de ce spectra sera présentée dans le Chapitre IV. (b) Exemple de signal 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ du co-solvant (chloroforme) montrant les satellites ^{13}C (associés à l'isotopomère ^{13}C - ^2H du chloroforme) au pied de l'isotopomère ^{12}C - ^2H .

5.b. Méthodologies RMN 2D du deutérium en abondance naturelle

5.b.i. *Les expériences Q-COSY*

Historiquement, la première séquence 2D d'autocorrélation ^2H développée et appliquée en RMN 2D DAN anisotrope chirale a été la séquence 2D Q-COSY [71]. Comme pour une expérience 2D COSY ^1H - ^1H , la séquence 2D Q-COSY ^2H est constituée de deux impulsions : une impulsion d'excitation de 90° et une impulsion de lecture de 180° séparées par la période d'évolution t_1 du système. La séquence est présentée sur la Figure I.19 [74, 76, 77]. Durant l'ensemble de l'expérience, un découplage ^1H de type CPD est appliqué (cf. Section 5a). Le programme « Bruker » de la séquence 2D Q-COSY est fourni en Annexe C.

Après l'enregistrement de l'expérience 2D, une double TF est appliquée dans les deux dimensions spectrales afin d'obtenir une carte 2D comme présentée sur la Figure I.20.

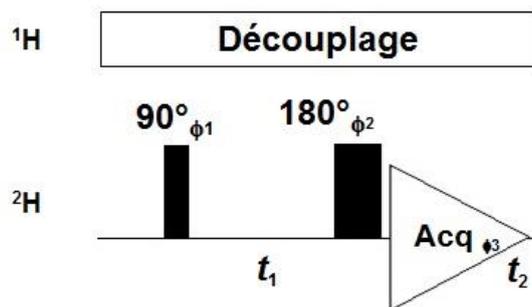


Figure I.19 : Séquence d'impulsion de l'expérience 2D Q -COSY $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$. Le cyclage de phase sur 4 étapes est : $\phi_1 = x, x, x, x$; $\phi_2 = x, y, -x, -y$; $\phi_3 = x, -x, x, -x$.

Sans tenir compte des termes de relaxation et des facteurs de phase, l'expression du signal pendant la période d'acquisition, après un seul scan, s'écrit :

$$S(t_1, t_2) = A \{ \exp [i(\pi\Delta\nu_Q) \times t_1] \times \exp [i(2\pi\nu + \pi\Delta\nu_Q) \times t_2] + \exp [-i(\pi\Delta\nu_Q) \times t_1] \times \exp [i(2\pi\nu - \pi\Delta\nu_Q) \times t_2] \} \quad (\text{I.46})$$

Le but de cette séquence est d'auto-corréler les deux composantes de chaque $\text{DQ}(^2\text{H})$ associées à chaque site deutérium inéquivalent d'une molécule (isotopomère monodeutééré). Dans cette expérience, les $\text{DQ}(^2\text{H})$ s sont centrés sur leurs déplacements chimiques respectifs, $\delta^{\text{aniso}}(^2\text{H})$ localisés sur la diagonale principale de la carte 2D. Il peut être utile d'extraire du spectre 2D, les différents sous-spectres 1D DAN- $\{^2\text{H}\}$ associés à chaque type de deutérium de la molécule. Pour pouvoir sélectionner les colonnes du spectre Q -COSY sur l'unique base du déplacement chimique ^2H , il est possible d'appliquer un traitement post-acquisition (purement mathématique) nommé *tilt*. Ce tilt consiste à faire basculer les $\text{DQ}(^2\text{H})$ s de 45° pour les aligner parallèlement à la dimension F_1 (cf. **Figure I.21**). Notons qu'avant l'opération de tilt, la carte 2D peut être symétrisée [76, 77].

Après l'opération de tilt, tous les DQ sont alignés parallèlement à l'axe F_1 . Sur la projection F_2 , ils apparaissent sous la forme d'une transition unique (comme découplé) avec une fréquence de résonance deux fois plus grande (2ν) par rapport à leur vraie valeur mesurée en F_1 . Ce facteur d'échelle est une conséquence du théorème de la projection « oblique ou penchée » (« skew projection » en anglais) pour des spectres sur lesquels les déplacements chimiques ne sont pas refocalisés dans la dimension F_1 (contrairement aux expériences 2D J-résolue) [76]. Dans notre cas, les facteurs d'échelle, ' f_x ' des éclatements quadrupolaires et des déplacements chimiques obtenus avec la projection sur l'axe F_2 sont respectivement égaux à (cf. **Equations I.47** et **I.48**) :

$$f_Q = 1 - \cot(\varphi) \quad (\text{I.47})$$

$$f_\delta = 1 + \cot(\varphi) \quad (\text{I.48})$$

où l'angle φ définit la direction de la projection oblique sur l'axe F_2 (angle de tilt).

Quand $\varphi = 45^\circ$, les facteurs appliqués sont $f_Q = 0$ et $f_\delta = 2$. Formellement, cela revient à éliminer les RQC(^2H)s sur la projection F_2 , tout en doublant les différences entre les δ^{aniso} . Dans la mesure où les valeurs des déplacements chimiques δ^{aniso} (exprimées en ppm) affichées par le logiciel sont incorrectes en dimension F_2 , il est nécessaire de rajuster (manuellement) ces valeurs.

Après ce traitement, nous obtenons sur la projection F_1 , le spectre RMN 1D du deutérium en milieu anisotrope (contenant δ^{aniso} et $\Delta\nu_Q$). En revanche, la projection F_2 obtenue est formellement identique au spectre deutérium 1D dans la mesure où $\delta^{\text{aniso}}(^2\text{H}) \approx \delta^{\text{iso}}(^2\text{H})$ [76, 77] (cf. **Figure I.20**).

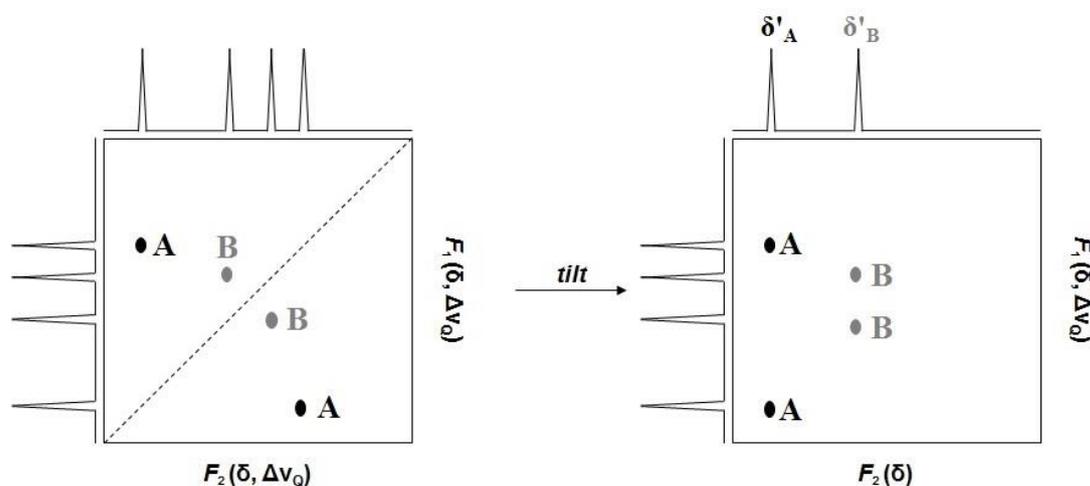


Figure I.20 : Exemple de représentation schématique d'une carte 2D Q -COSY $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ / Q -COSY F_z $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ avant et après l'application du processus de tilt. Ici deux doublets quadrupolaires, $DQ(^2\text{H}_A)$ et $DQ(^2\text{H}_B)$ sont considérés. Les informations anisotropes observables sur les deux domaines de fréquence, F_1 et F_2 , sont données. Noter le doublement artificiel des fréquences de résonance en F_2 .

Si l'expérience 2D Q -COSY présente un potentiel analytique intéressant, l'obtention d'un spectre 2D en mode magnitude réduit ces possibilités. En effet, après la double transformée de Fourier, il est impossible de phaser (en absorption pure) les signaux du spectre puisqu'ils sont composés d'une composante en absorption et en dispersion (signaux de « phase twist ») [76, 78]. Les spectres traités en mode magnitude induisent une augmentation importante des largeurs de raies et donc une diminution de la résolution spectrale. Pour répondre à ce problème, la séquence Q -COSY- F_z a été développée en 2004 [79].

5.b.ii. Les expériences Q -COSY F_z

Afin d'obtenir des signaux en absorption pure, il est possible d'ajouter un filtre gradient- z (cf. **Figure I.21a**), communément utilisé pour les spins $I = 1/2$, juste avant la période d'acquisition t_2 . Cette nouvelle séquence 2D est l'une des plus utilisées pour les études RMN DAN en milieu cristal-liquide lyotrope. Elle se nomme Q -COSY F_z [79]. La séquence est

présentée sur la **Figure I.21b**. Le programme « Bruker » de la séquence 2D Q -COSY Fz est fourni en **Annexe D**.

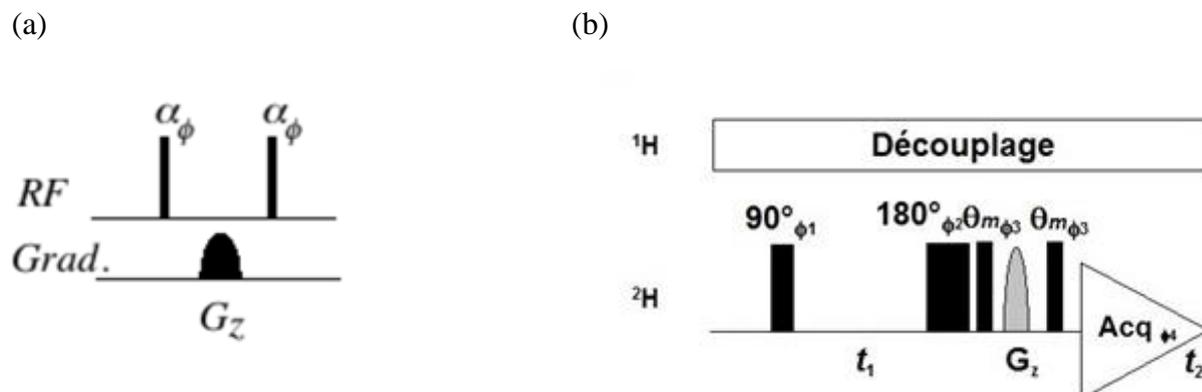


Figure I.21 : (a) Principe du filtre gradient z. (b) Séquence d'impulsion de l'expérience 2D Q -COSY Fz $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$. Le cyclage de phase est : $\phi_1 = x, x$; $\phi_2 = x, -x$; $\phi_3 = x, -x$; $\phi_4 = x, x$. Dans cette séquence, l'angle θ_m est égal à $54,7^\circ$.

Pour être efficace avec des spins $I = 1$, l'angle θ_m du filtre gradient-z pour la séquence Q -COSY doit être égal à $54,7^\circ$, afin que ce filtre puisse conserver les cohérences désirées sur l'axe z, de déphaser toutes les cohérences indésirables, puis de reconvertir les populations en cohérences observables avant la détection [79]. Au cours de la période de détection t_2 , le signal, $S(t_1, t_2)$ est proportionnel à :

$$S(t_1, t_2) \propto \sin^2(\theta_m) \cos(\pi q t_1) i \times (e^{-i(\omega - \pi q)t_2} + e^{-i(\omega + \pi q)t_2}) \quad (\text{I.49})$$

5.b.iii. Les expériences Q -resolved Fz

Une alternative à l'expérience 2D Q -COSY Fz est appelée « Q -resolved Fz » [79]. La séquence est présentée sur la **Figure I.22**. A la différence de l'expérience précédente, l'impulsion 180° est appliquée au milieu de la période d'évolution t_1 , ce qui va permettre la refocalisation des déplacements chimiques anisotrope, δ^{aniso} , dans la dimension F_1 . Une représentation schématique du spectre 2D Q -resolved Fz après deux TF est proposée sur la **Figure I.23**. Comme pour la séquence 2D Q -COSY Fz, la séquence 2D Q -résolue Fz conduit à des spectres phasables en absorption pure dans les deux dimensions spectrales.

Historiquement, cette séquence est issue de la séquence 2D Q -resolved (90 - t_1 - 180° - t_1 - Acq.) développée en 1999, mais qui conduisait (comme pour la séquence 2D Q -COSY) à des spectres 2D présentant des pics en « phase twist », et donc uniquement traitables en mode magnitude [76]. Les programmes « Bruker » de la séquence 2D Q -résolue et 2D Q -résolue Fz sont proposés en **Annexes E** et **F**, respectivement.

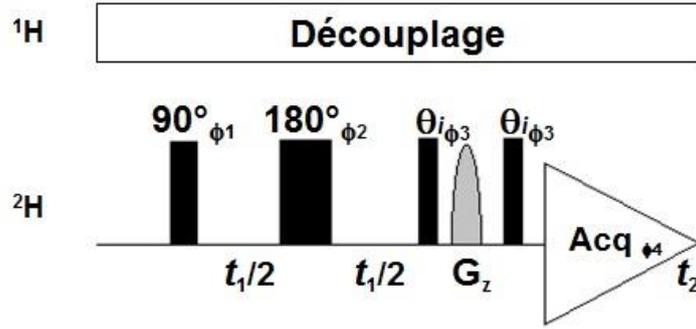


Figure I.22: Séquence d'impulsion de l'expérience 2D Q -resolved F_z ^2H - $\{^1\text{H}\}$ avec le cyclage de phase: $\phi_1 = x, x$; $\phi_2 = x, -x$; $\phi_3 = x, -x$; $\phi_4 = x, x$. Dans cette séquence, l'angle θ_i est égal à 60° pour les expériences impaires et est égal à 45° pour les expériences paires.

Sans tenir compte des termes de relaxation et des facteurs de phase, l'expression du signal de l'expérience 2D Q -résolue, après un seul scan, s'écrit [79]:

$$S(t_1, t_2) = A \{ \exp [i(\pi\Delta\nu_Q) \times t_1] \times \exp [i(2\pi\nu + \pi\Delta\nu_Q) \times t_2] + \exp [-i(\pi\Delta\nu_Q) \times t_1] \times \exp [i(2\pi\nu - \pi\Delta\nu_Q) \times t_2] \} \quad (\text{I.50})$$

Comme pour l'expérience Q -COSY F_z , l'expérience Q -résolue F_z est obtenue en ajoutant un filtre gradient- z avant l'acquisition du signal. Cependant, pour cette expérience, il est nécessaire de modifier l'angle, θ_i , du filtre gradient- z entre les expériences impaires ($\theta_i = 60^\circ$) et paires ($\theta_i = 45^\circ$), afin d'ajuster l'intensité des signaux d'auto-corrélation pour la partie cosinus et sinus du signal.

Sans tenir compte des termes de relaxation et des facteurs de phase, le signal RMN ^2H est proportionnel, respectivement, pour les expériences impaires et paires à [76]:

$$S(t_1, t_2) \propto \frac{3}{4} \cos(\pi q t_1) i \times (e^{-i(\omega - \pi q)t_2} + e^{-i(\omega + \pi q)t_2}) \text{ avec } \theta_i = 60^\circ \text{ (Exp. impaire)} \quad (\text{I.51})$$

$$S(t_1, t_2) \propto \frac{3}{4} \sin(\pi q t_1) i \times (e^{-i(\omega - \pi q)t_2} + e^{-i(\omega + \pi q)t_2}) \text{ avec } \theta_i = 45^\circ \text{ (Exp. paire)} \quad (\text{I.52})$$

Après l'application de la double TF, la projection en dimension F_2 de la carte 2D est identique au spectre 1D deutérium anisotrope. Dans la dimension F_1 , on obtient l'ensemble des éclatements quadrupolaires, $\Delta\nu_Q$, tous disposés symétriquement autour de la porteuse $O_1 = 0$ Hz (cf. **Figure I.23a**).

Comme pour les expériences 2D J -résolue (isotrope) ou 2D Q -COSY, l'absence de signaux diagonaux sur la carte 2D permet de pouvoir appliquer la procédure de tilt, conduisant, dans ce cas, à séparer formellement les interactions anisotropes (δ^{aniso} et $\Delta\nu_Q$) sur la dimension F_2 et F_1 , respectivement (cf. **Figure I.23b**). Notons que les valeurs de δ^{aniso}

mesurées sur la projection F_2 correspondent aux valeurs exactes de δ^{aniso} mesurées sur les spectres 1D anisotropes. Notons finalement, qu'après l'opération de tilt (et contrairement aux expériences 2D Q -COSY), la carte 2D peut être symétrisée [72, 75].

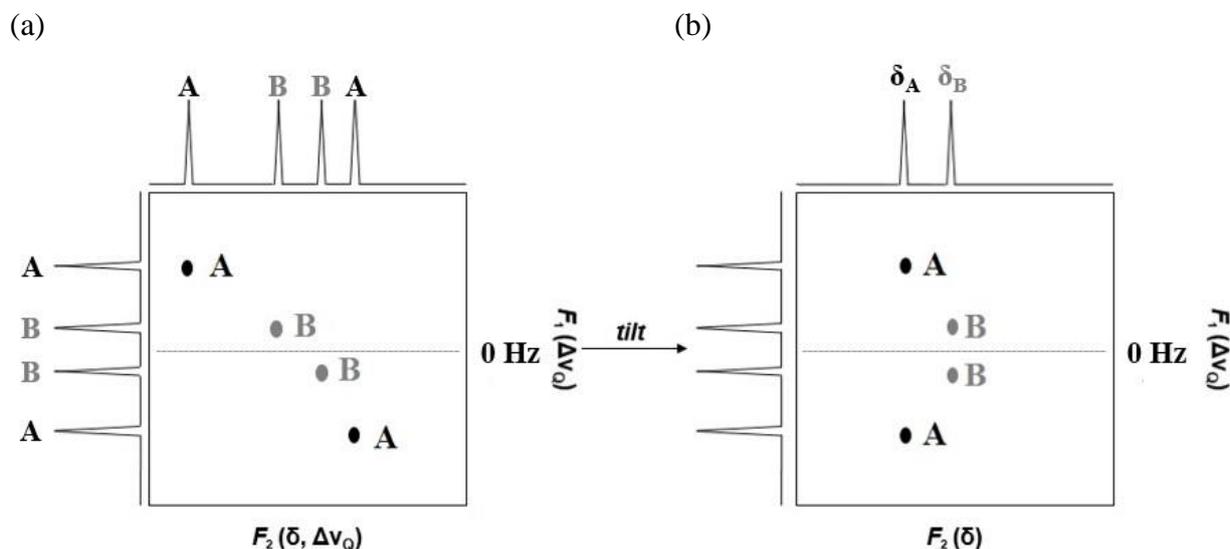


Figure I.23 : Exemple de représentation schématique de la carte 2D Q -résolue / Q -résolue F_z ^2H - $\{^1\text{H}\}$ avant (a) et après (b) l'application du processus de tilt. Les informations anisotropes observables sur chaque domaine de fréquence (F_1 et F_2) sont données.

5.b.iv. Les expériences Q -résolue MQ

Une variante de l'expérience 2D Q -résolue F_z a été développée en 2003, et est appelée expérience 2D Q -résolue MQ (cf. **Figure I.24a**) [82]. Contrairement à l'expérience Q -COSY- F_z / Q -résolue F_z , le filtre gradient- z est remplacé par un bloc de deux impulsions de 90° (espacé d'un délai Δ court (4 μs)) dont les cyclages de phase sont en adéquation avec le cyclage de phase du récepteur. Cela permet de faire intervenir alternativement la cohérence double quantum (DQ) et zéro quantum (ZQ). Les **Figures I.24b** et **24c** présentent le chemin de transfert de cohérence associé à ces deux types de cohérences (pour les expériences impaires et paires, respectivement). Le programme « Bruker » de la séquence Q -résolue MQ est proposé en **Annexe G**.

5.b.v. L'expérience δ -résolue F_z

La troisième séquence RMN de type QUOSY ^2H d'intérêt développée au laboratoire est la séquence 2D δ -résolue F_z [82, 83]. Elle est schématisée sur la **Figure I.25**. Cette séquence dérive de la séquence δ -résolue dont les signaux conduisent à des pics en phase twist [72]. Comme pour, la séquence 2D Q -COSY, une version phasée de cette expérience est obtenue en introduisant un filtre gradient- z avant l'acquisition du signal [79, 82, 83]. Conceptuellement, la séquence est assez similaire à la séquence 2D Q -résolue F_z , à la différence près que l'impulsion 180° est remplacée par une impulsion de 90° . Cette modification permet la refocalisation des éclatements quadrupolaires, $\Delta\nu_Q$, et non plus des

déplacements chimiques, δ^{aniso} , en dimension F_1 [72]. Les programmes « Bruker » de la séquence 2D δ -résolue et 2D δ -résolue Fz sont proposés en Annexes H et I, respectivement.

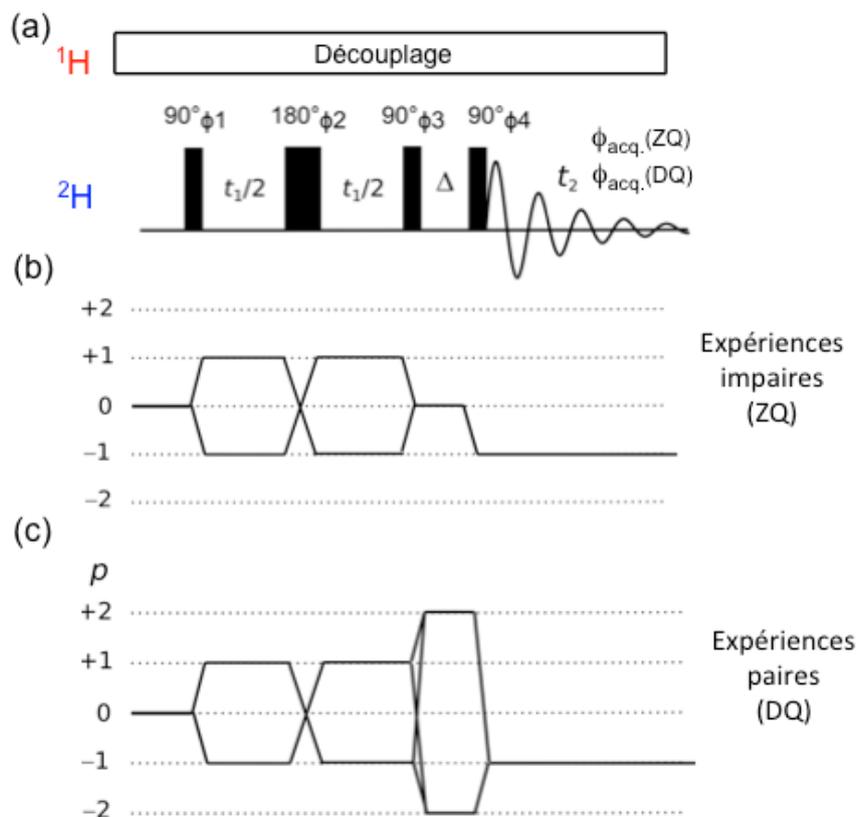


Figure I.24 : (a) Séquence d'impulsion de l'expérience 2D Q -résolue MQ $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$. (b) Représentation du chemin de cohérence associé aux expériences (b) impaires (ZQ) et (c) aux expériences paires (DQ).

Sans tenir compte des termes de relaxation et des facteurs de phase, l'expression du signal de l'expérience δ -résolue, après deux scans, s'écrit :

$$S(t_1, t_2) = A \{ \exp [i(2\pi\nu) \times t_1] \times \exp [i(2\pi\nu + \pi\Delta\nu_Q) \times t_2] + \exp [i(2\pi\nu) \times t_1] \times \exp [i(2\pi\nu - \pi\Delta\nu_Q) \times t_2] \} \quad (\text{I.53})$$

En revanche, sans tenir compte des termes de relaxation et des facteurs de phase, l'expression du signal de la séquence δ -résolue Fz pendant la période d'acquisition, (après 8 scans) est de la forme :

$$S(t_1, t_2) = A \{ \sin^2\theta \exp [i(2\pi\nu) \times t_1] \} \times \{ \exp [i(2\pi\nu + \pi\Delta\nu_Q) \times t_2] + \exp [i(2\pi\nu - \pi\Delta\nu_Q) \times t_2] \} \quad (\text{I.54})$$

Après deux TF, l'ensemble des informations anisotropes (δ^{aniso} et $\Delta\nu_Q$) sont visibles dans le domaine de fréquence F_2 , et la projection 1D est strictement identique au spectre 1D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ anisotrope. Par contre, en dimension F_1 , seuls les δ^{aniso} sont visibles compte tenu de la refocalisation de l'éclatement quadrupolaire en dimension t_1 . Cette projection est donc identique au spectre 1D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ isotope. La **Figure I.25** présente la carte RMN 2D schématique obtenue pour une expérience 2D δ -résolue / δ -résolue Fz.

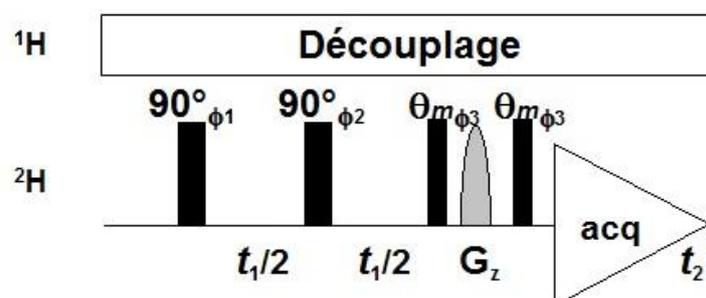


Figure I.25: Séquence d'impulsion de l'expérience 2D δ -résolue Fz $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ avec le cyclage de phase : $\phi_1 = x, x$; $\phi_2 = x, -x$; $\phi_3 = x, -x$; $\phi_4 = x, x$. Dans cette séquence, la valeur de l'angle θ_m est égale à 54.7° .

A la différence des expériences Q -résolue et Q -COSY, la procédure de tilt n'est pas applicable pour cette expérience. Notons, finalement, que les cartes δ -résolues ne peuvent pas être symétrisées.

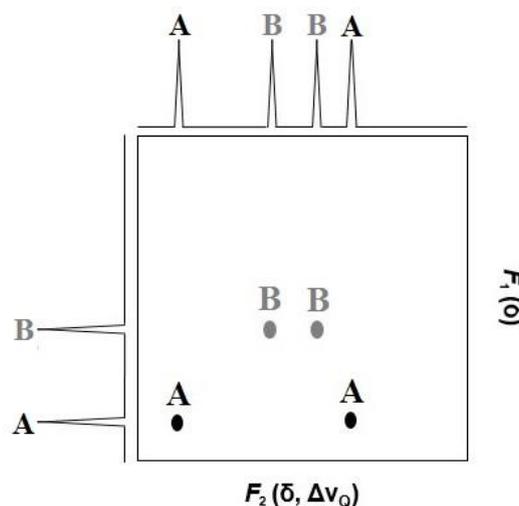


Figure I.26: Représentation schématique de la carte 2D δ -résolue ou δ -résolue Fz $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$. Les informations anisotropes observables sur chaque domaine de fréquence (F_1 et F_2) sont données.

5.b.vi. Les impulsions dures composites

Les séquences 2D présentées dans ce chapitre sont décrites avec une configuration impulsionnelle minimale. Afin d'éviter des effets d'offset, associés par exemple aux impulsions de 180° , des impulsions composites sont utilisables et ont été utilisées [78]. Par exemple, l'impulsion dure de $180^\circ(\phi)$ peut être remplacée par une impulsion composite de

trois impulsions : $90^\circ(\phi \pm \pi/2) - 180^\circ(\phi) - 90^\circ(\phi \pm \pi/2)$ ou $45^\circ(-\phi) - 180^\circ(\phi) - 135^\circ(-\phi)$. Il est à noter, cependant, que les effets d'offset sont relativement limités pour des spectres ^2H anisotropes enregistrés dans des milieux faiblement orientants ($\text{SW} < 2000 \text{ Hz}$).

Références

- [1] [Multinuclear NMR in polypeptide liquid crystals: three fertile decades of methodological developments and analytical challenges](#)
Lesot P., Aroulanda C., Berdagué P., Meddour A., Merlet D., Farjon J., Giraud N., Lafon O.
Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc., **2019**, sous presse,
DOI: 10.1016/j.pnmrs.2019.10.001.
- [2] [Metallomesogens: metal complexes in organized fluid phases](#)
Giroud-Godquin A-M., Maitlis P.M.
Angew. Chem. Int. Ed., **1991**, 30, 375-402
- [3] [Calamitic metallomesogens: metal-containing liquid crystals with rodlike shapes](#)
Hudson S.A., Maitlis P.M.
Chem. Rev., **1993**, 93, 861-885.
- [4] [A ferrocene-containing carbohydrate surfactant: thermotropic and lyotropic phase behavior](#)
Donnio B., Seddon J.M., Deschenaux R.
Organometallics, **2000**, 19, 3077-3081.
- [5] [The structural study of liquid crystals](#)
Zorkii P.M., Timofeeva T.V., Polishchuk A.P.
Russ. Chem. Rev., **1989**, 58, 1119-1144.
- [6] [Structures des phases mésomorphes formées de molécules discoïdes](#)
Levelut A.M.
J. Chem. Phys., **1983**, 80, 149-161.
- [7] [Liquid crystal phase formation by biopolymers](#)
Hamley I.W.
Soft Matter, **2010**, 6, 1863-1871.
- [8] [Les états mésomorphes de la matière](#)
Friedel G.
Anal. Phys., **1922**, 18, 273-474.
- [9] [NMR spectroscopy using liquid crystal solvents](#)
Emsley J.W., Lindon J.C.
Pergamon Press, **1975**.
- [10] [The aqueous phase behaviour of surfactants](#)
Laughlin R.G.
Academic Press, **1996**, ISBN 0-12-437760-2.
- [11] [IUPAC: compendium of chemical terminology](#)
McNaught A.D., Wilkinson A.
Blackwell Scientific Publications, **1997**, ISBN 0-9678550-9-8.
- [12] [Definitions of basic terms relating to polymer liquid crystals](#)
Barón M., Stepto R.F.T.
Pure Appl. Chem., **2002**, 74, 493-509.

- [13] Lyotropic liquid crystalline samples
Tracey A.S.
Encyclopedia of Magnetic Resonance (eMagRes), **2007**.
- [14] Polypeptide liquid crystals: magnetic susceptibility, twist elastic constant, rotational viscosity coefficient, and PBLG sidechain conformation
Guha C., Hines W.A., Samulski E.T.
J. Chem. Phys., **1974**, 61, 947-953.
- [15] Liquid crystal phase formation by polymer
Hamley I.W.
Soft Matter, **2010**, 6, 1863-1871.
- [16] Investigation of the enantioselectivity of three polypeptide liquid-crystalline solvents using NMR spectroscopy
Aroulanda C., Sarfati M., Courtieu J., Lesot P.
Enantiomer., **2001**, 6, 281-287.
- [17] Some unusual properties of poly(γ -benzyl-L-glutamate) films cast in strong magnetic fields
Samulski E.T., Tobolsky A.V.
Macromolecules, **1968**, 1, 555-557.
- [18] Poly- γ -Benzyl-L-Glutamate: order parameter, oriented gel, and novel derivatives
Poliks M.D., Park Y.W., Samulski E.T.
Mol. Cryst. Liq. Cryst., **1987**, 153, 321-345.
- [19] Deuterium NMR stereochemical analysis of threo-erythro isomers bearing remote chiral centres in racemic and non-racemic liquid crystalline solvents
Canlet C., Merlet D., Lesot P., Meddour A., Loewenstein A., Courtieu J.
Tetrahedron Asymm., **2000**, 11, 1911-1918.
- [20] Magnetic ordering of poly(γ -benzyl-L-glutamate) solutions
Panar M., Philips W.D.
J. Am. Chem. Soc., **1968**, 90, 3880-3882.
- [21] Exploring the analytical potential of NMR spectroscopy in chiral anisotropic media for the study of the natural abundance deuterium distribution in organic molecules
Lesot P., Aroulanda C., Billault I.
Anal. Chem., **2004**, 76, 2827-2835.
- [22] Enantiomeric analysis in a polypeptide lyotropic liquid crystal through proton deuterium NMR
Bayle J-P., Courtieu J., Gabetty E., Loewenstein A., Pechiné J-M.
New J. Chem., **1992**, 16, 837-838.
- [23] Enantiotopic discrimination in the NMR spectrum of prochiral solutes in chiral liquid crystals
Lesot P., Aroulanda C., Zimmermann H., Luz Z.
Chem. Soc. Rev., **2015**, 44, 230-275.

- [24] Enantiodifferentiating properties of the alignment media PELG and PBLG -- A comparison
Hansmann S., Larem T., Thiele C.
Eur. J. Org. Chem., **2016**, 7, 1324-1329.
- [25] ²H NMR studies of two-homopolypeptide lyotropic mesophases: toward the quantification of solute-fiber interactions
Lesot P., Lafon O., Aroulanda C., Dong R.
Chem. Eur. J., **2008**, 14, 4082-4092.
- [26] Investigation of solute-fiber affinity and orientational ordering of norbornadiene interacting with two-polypeptide chiral liquid crystalline solvents by NAD NMR
Serhan Z., Aroulanda C., Lesot P.
J. Phys. Chem. A, **2016**, 120, 6076-6088.
- [27] Polyaspartates as thermoresponsive enantiodifferentiating helically chiral alignment media for anisotropic NMR spectroscopy
Schwab M., Herold D., Thiele C.
Chem. Eur. J., **2017**, 23, 14576-14584.
- [28] Poly- γ -*p*-biphenylmethyl-glutamate as enantiodifferentiating alignment medium for NMR spectroscopy with temperature-tunable properties
Jziorowski S., Thiele C.
Chem. Eur. J., **2018**, 24, 15631-15637.
- [29] Synthesis of poly- γ -*S*-2-methylbutyl-*L*-glutamate and poly- γ -*S*-2-methylbutyl-*D*-glutamate and their use as enantiodiscriminating alignment media in NMR spectroscopy
Hansmann S., Schmidts V., Thiele C.
Chem. Eur. J., **2017**, 23, 9114-9121.
- [30] Polyguanidines as chiral orienting media for organic compounds
Arnold L., Marx A., Thiele C., Reggelin M.
Chem. Eur. J., **2010**, 16, 10342-10346.
- [31] Polyisocyanides as a new alignment medium to measure residual dipolar couplings for small organic molecules
Dama M., Berger S.
Org. Lett., **2012**, 14, 241-243.
- [32] Polyacetylenes as enantiodifferentiating alignment media
Meyer N., Krupp A., Schmidts V., Thiele C., Reggelin M.
Angew. Chem. Int. Ed., **2012**, 51, 8334-8338.
- [33] Polyacetylenes as a new alignment medium to measure residual dipolar couplings for chiral organic molecules
Dama M., Berger S.
Tetrahedron Lett., **2012**, 14, 6439-6442.
- [34] ²H and ¹³C NMR - based enantiodetection using polyacetylene versus polypeptide aligning media: versatile and complementary tools for chemists
Lesot P., Berdagué P., Meddour A., Kreiter A., Noll M., Reggelin M.
Chem. Plus Chem., **2019**, 84, 144-155.

- [35] Cross-linked helically chiral poly-(γ -benzyl-*L*-glutamate) as enantiodiscriminating alignment medium
Montag T., Thiele C.
Chem. Eur. J., **2013**, 19, 2271-2274.
- [36] Molecular weights: the key of lyotropic liquid crystalline of Poly- β -benzyl-*L*-Aspartate
Hirschmann M., Schwab M., Thiele C.
Macromolecules, **2019**, 52, 6025-6034.
- [37] Phenylalanine-based polyarylacetylenes as enantiomer-differentiating alignment media
Krupp A., Reggelin M.
Magn. Reson. Chem., **2012**, 50, 45-52.
- [38] Helical polyisocyanopeptides as lyotropic liquid crystals for measuring residual dipolar couplings
Li G.W., Cao J.M., Zong W., Hu L., Hu M.L., Lei X., Sun H., Tan R.X.
Chem. Eur. J., **2017**, 23, 7653-7656.
- [39] Quantitative description of orientational order: Rigid molecules
Zannoni C.
Nuclear Magnetic Resonance of Liquid Crystals,
Ed. J.W. Emsley, **1**
985, Chap. 1, 1-34.
- [40] Elementary theory of angular momentum
Rose M.E.
Wiley, **1957**.
- [41] Molecular theory of orientational order
Photinos D.J.
NMR of Ordered Liquids, Edition E. Burnell – C.A. de Lenge, **2003**, Chap. 12, 259-284
- [42] Angular momentum in quantum physics. Theory and application
Biedenharn L.C., Louck J.D.
Encycl. Math. Appl., **1981**, 8, 1-716.
- [43] Kernresonanzen in kristallinen Flüssigkeiten und in kristallinflüssigen Lösungen. Teil I
Saupe A.
Z. Naturforschung, **1964**, 19a, 161-171.
- [44] Studies of chemical shift anisotropy in liquid crystal solvents
Yannoni C. Dailey B., Ceasar G.
J. Chem. Phys., **1971**, 54, 4020-4024.
- [45] Magnetically-oriented phospholipid micelles as a tool for the study of membrane-associated molecules
Sander C., Hare B., Howard K., Prestegard J.
Progress NMR Spectroscopy, **1994**, 26, 421-444
- [46] Point group symmetry applications. Methods and tables
Butler P.H.
Plenum Press, **1981**, Chap. 3.

- [47] The relationship between molecular symmetry and second-rank orientational order parameters for molecules in chiral liquid crystalline solvents
Merlet D., Emsley J.W., Lesot P., Courtieu J.
J. Chem. Phys., **1999**, 111, 6890-6896.
- [48] La Spectroscopie de RMN : Principes de base, concepts et applications
Gunther H.
Edition Elsev. Masson, **1996**, 1-557.
- [49] Principles of NMR in one and two dimensions
Ernst R., Bodenhausen G., Wokaun A.
Edition Clarendon Press, **1987**
- [50] Nuclear spin hamiltonian
Levitt M.
Spin dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance, *Edition Wiley*, **2008**, Chap. 8, 171-194.
- [51] Theoretical and experimental aspects of enantiomeric differentiation using natural abundance multinuclear NMR spectroscopy in chiral polypeptide liquid crystals
Sarfati M., Lesot P., Merlet D., Courtieu J.
Chem. Commun., **2000**, 2069-2081.
- [52] Spin dynamics, basic of nuclear magnetic resonance
Levitt M.H.
Wiley, **2008**.
- [53] Molecular structure from dipolar coupling
Diehl P.
Nuclear Magnetic Resonance of Liquid Crystals, *édition J. W. Emsley*, **1985**, 147-180
- [54] Natural abundance ²H NMR spectroscopy
Lesot P., Lafon O.
Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry, **2017**, 3, 1-14.
- [55] A new method for the determination of the dynamic isotope effect and the deuterium quadrupole coupling constant in liquids
Hardy E.H., Zeidler M.D.
J. Magn. Res., **1998**, 34, 300-307.
- [56] SERF, a new method for H,H spin-coupling measurement in organic-chemistry
Facke T., Berger F.
J. Magn. Res. A, **1995**, 113, 114-116.
- [57] Accurate quantitative analysis of enantiomeric mixtures from spatially
Plainchont B., Pitoux D., Cyrille M., Giraud N.
Anal. Chem., **2018**, 90, 1595-1600.
- [58] Analyses of enantiomeric mixtures using chiral liquid crystals
Giraud N., Farjon J.
Current Opinion in Colloid & Interface Science, **2018**, 33, 1-8.

- [59] A quarter of a century of SERF: the progress of an NMR pulse sequence and its application
Berger S.
Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc., **2018**, 108, 74-114.
- [60] Visualization of enantiomers in a polypeptide liquid-crystal solvent through carbon-13 NMR spectroscopy
Lesot P., Merlet D., Meddour A., Courtieu J., Loewenstein A.
J. Chem. Soc., Faraday Trans., **1995**, 91, 1371-1375.
- [61] Proton-decoupled carbon-13 NMR spectroscopy in a lyotropic chiral nematic solvent as an analytical tool for the measurement of the enantiomeric excess
Meddour A., Berdagué P., Hedli A., Courtieu J., Lesot P.
J. Am. Chem. Soc., **1997**, 119, 2069-2081.
- [62] Discrimination and analysis of the NMR spectra of enantiomers dissolved in chiral liquid crystal solvents through 2D correlation spectroscopy
Lesot P., Merlet D., Courtieu J., Emsley J.W.
Liq. Crystals, **1996**, 21, 427-435.
- [63] 2D-NMR strategy dedicated to the analysis of weakly ordered, fully deuterated enantiomers in chiral liquid crystals
Lesot P., Sarfati M., Merlet D., Ancian B., Emsley J.W. Timini B.A.
J. Am. Chem. Soc., **2003**, 125, 7689-7695.
- [64] Natural abundance deuterium NMR in chiral liquid crystals: technological evolutions methodological improvements and new analytical applications
Lesot P.
Spectra Analyse., **2008**, 260, 16-22.
- [65] Deuterium NMR of liquid-crystalline samples at natural abundance
Lesot P.
Encyclopedia of Magnetic Resonance (eMagRes), **2013**, 2, 315-334.
- [66] Observation of enantiomers, chiral by virtue of isotopic substitution, through deuterium NMR in a polypeptide liquid crystal
Meddour A., Canet I., Loewenstein A., Péchiné J-M., Courtieu J.
J. Am. Chem. Soc., **1994**, 116, 9652-9656.
- [67] Enantioselective intramolecular hydroamination catalysed by lanthanide ate complexes coordinated by N-Substituted (*R*)-1,1-binaphthyl-2,2-diamido ligands
Riegert D., Collin J., Meddour A., Schultz E., Trifonov A.
J. Org. Chem., **2006**, 71, 2514-2517.
- [68] Enantiomeric analysis in a polypeptide lyotropic liquid crystal by deuterium NMR
Canet I., Courtieu J., Loewenstein A., Meddour A., Péchiné J-M.
J. Am. Chem. Soc., **1995**, 117, 6520-6526.
- [69] Extreme enantiomeric discrimination of fluoroalkanes using deuterium NMR in chiral liquid crystalline media
Tavasli M., Courtieu J., Goss R.J., Meddour A., O'Hagan D.
Chem. Commun., **2002**, 844-845.

- [70] Enantiomeric visualisation using proton-decoupled natural abundance deuterium NMR in poly(γ -benzyl-*L*-glutamate) liquid crystalline solutions
Lesot P., Merlet D., Lowestein A., Courtieu J.
Tetrahedron Asym., **1998**, 9, 1871-1888.
- [71] Analysis of the natural abundance deuterium NMR spectra of enantiomers in chiral liquid crystals through 2D Auto-correlation experiments
Lesot P., Sarfati M., Smadja W., Courtieu J.
Chem. Commun., **1998**, 2301-2302.
- [72] Evaluation of a new broadband decoupling sequence: WALTZ-16
Shaka A.J., Keeler J.
J. Magn. Reson., **1983**, 53, 33-340.
- [73] Adiabatic ^1H decoupling scheme for very accurate intensity measurements in ^{13}C NMR
Tenaillon E., Akoka S.
J. Magn. Reson., **2007**, 185, 50-58.
- [74] Natural abundance deuterium NMR spectroscopy: Developments and analytical applications in liquids, liquid crystals and solid phases
Lesot P., Courtieu J.
Progress NMR Spectro., **2009**, 55, 128-159.
- [75] Cryogenically cooled probes, a leap in NMR technology
Kovacs H., Moskau D., Spraul M.
Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 45 (2005) 131-155.
- [76] Two-dimensional deuterium NMR spectroscopy of chiral molecules oriented in a polypeptide liquid crystal: Application for the enantiomeric analysis through natural abundance deuterium NMR
Merlet D., Ancian B., Courtieu J., Lesot P.
J. Am. Chem. Soc., **1999**, 121, 5249-5258.
- [77] Description of natural abundance deuterium 2D NMR experiments in weakly ordered liquid crystalline solvents using a tailored cartesian spin-operator formalism
Merlet D., Sarfati M., Ancian B., Courtieu J., Lesot P.
Phys. Chem. Chem. Phys., **2000**, 2, 2283-2290.
- [78] Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions,
Ernst R.R., Bodenhausen G., Wokaun A.
Clarendon Press, Oxford, 1987.
- [79] Modified z-gradient filtering as a new mean to obtain phased deuterium autocorrelation 2D NMR spectra in oriented solvents
Lafon O., Lesot P., Merlet D., Courtieu J.
J. Magn. Reson., **2004**, 171, 135-142.
- [80] Deuterium three-dimensional NMR experiments for analysing weakly aligned, isotopically enriched molecules
Lafon O., Lesot P.
Chem. Phys. Lett., **205**, 404, 90-94.

- [81] Enantiomeric analysis using natural abundance deuterium 3D NMR spectroscopy in polypeptide chiral oriented media
Lesot P., Lafon O.
Chem. Phys. Lett., **2008**, 458, 219-222.
- [82] Revisiting NAD QUOSY 2D-NMR experiments in oriented media: Practical solutions for improving the sensitivity and/or saving experimental time
Lafon O., Lesot P.
Article en cours de redaction (**2020**).
- [83] Nouveaux développements en RMN 2D du deutérium anisotrope et ses applications
Khelifi S.
Rapport de Master 1, (**2015**), Université de Paris-Sud.

Chapitre II

Analyse isotopique quantitative par Résonance Magnétique Nucléaire

1. Principe de la RMN quantitative

1.a. Introduction

Si la RMN isotrope est une technique analytique moderne et incontournable pour l'élucidation structurale des molécules (petits composés organiques, biomolécules, matériaux) et l'obtention d'informations moléculaires (comportement dynamique/conformationnel, profil isotopique site-spécifique, ...), elle est aussi utilisable dans le cadre d'études quantitatives. En effet, l'intégrale ou la surface d'une raie associée à un site i (notée S_i) mesurée sur un spectre RMN (et enregistrée avec des conditions dites « quantitatives » ($T_R \geq 5 \times T_1$)) est directement proportionnelle au nombre de spins qui résonnent à une fréquence donnée au sein de l'échantillon. Ainsi, il est possible de déterminer la concentration moléculaire d'une espèce chimique, à partir de l'aire du signal RMN, S_i , d'un de ses noyaux. Cette aire S_i est définie par l'**Equation II.1** :

$$S_i = k \times C \times n_i \times x_i \times V_s \quad \text{(II.1)}$$

Dans cette équation, C est la concentration de l'analyte, n_i représente le nombre de noyau équivalent (^1H , ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ...) contribuant au signal i , x_i correspond à l'abondance isotopique du site i et V_s est le volume de l'échantillon sensible (dépendant du volume de la bobine (interne/externe) de la sonde du spectromètre RMN). Le facteur k correspond à un coefficient de proportionnalité dépendant de l'appareil RMN, des conditions d'analyse (température, nature de la phase, ...), de la séquence d'impulsion mais également des caractéristiques intrinsèques de l'échantillon comme les temps de relaxation (T_1 et T_2), l'effet nOe, et tous les effets de couplages (scalaire J , dipolaire D et quadrupolaire Q) [1,2].

De façon empirique, il est impossible de déterminer les facteurs k et V_s de l'**Equation II.1**. Cependant, les analyses quantitatives sont possibles dans l'hypothèse que les paramètres k et V_s entre deux expériences successives sont identiques. En effet, lorsque deux composés A_1 et A_2 sont analysés simultanément (même échantillon) avec des conditions RMN quantitatives, les valeurs k et V_s seront identiques, et les intégrales des signaux RMN A_1 et A_2 seront égales à :

$$S(A_1) = k \times C_{A_1} \times n_{A_1} \times V_s \quad \text{(II.2)}$$

$$S(A_2) = k \times C_{A_2} \times n_{A_2} \times V_s \quad \text{(II.3)}$$

où $S(A_1)$ correspond à l'aire du pic dont la concentration du composé est connue (référence) et $S(A_2)$ à l'aire du pic dont la concentration est inconnue (analyte d'intérêt). Dans les **Equations II.2** et **II.3**, l'influence de l'abondance isotopique a été négligée mais sera réintroduite ultérieurement. A partir de la mesure des aires des pics et du calcul de leurs

rapports, il est possible de déterminer la concentration exacte associée au signal d'A₂ (de concentration inconnue) à partir de l'**Equations II.5**.

$$\frac{S_{A_1}}{S_{A_2}} = \frac{C_{A_1} \times n_{i_{A_1}}}{C_{A_2} \times n_{i_{A_2}}} \quad \text{(II.4)}$$

$$C_{A_2} = \frac{C_{A_1} \times n_{i_{A_1}} \times S_{A_2}}{n_{i_{A_2}} \times S_{A_1}} \quad \text{(II.5)}$$

Cette approche analytique demeure inefficace pour mesurer la concentration absolue d'un composé inconnue (A₂) à partir de deux spectres RMN différents. En effet, le paramètre k pouvant légèrement varier entre deux expériences, il serait nécessaire de supprimer son impact sur le calcul.

En RMN, la validité des analyses RMN quantitatives est évaluée par l'exactitude des résultats qui dépendent de plusieurs éléments. En effet, les paramètres RMN des séquences d'impulsion et de retraitement des résultats doivent être optimisés selon l'exactitude recherchée. Ces paramètres importants seront décrits dans ce chapitre.

1.b. Paramètres importants en RMN quantitative

1.b.i.Principe de l'exactitude des mesures

Comme présenté dans l'**Introduction**, une étude analytique quantitative doit présenter des résultats exacts (c'est-à-dire le plus proche possible de valeur vraie). La qualité des analyses réalisées se mesure grâce à l'exactitude. Cette dernière se définit par l'étude de deux paramètres : la précision et la justesse des résultats.

1.b.i.1. Evaluation de la précision des résultats

La précision des résultats peut se définir comme la mesure de la proximité des résultats de différents essais enregistrés dans les mêmes conditions [3]. Elle peut être évaluée par l'étude de la répétabilité de la méthode d'analyse associée à la même expérience répétée n fois (avec le même échantillon et sur le même spectromètre RMN).

A partir des résultats obtenus, il est possible de calculer la déviation standard relative (ou Relative Standard Deviation, noté RSD) qui s'exprime en pour mille (‰) selon l'**Equation II.6** :

$$\text{RSD (\%)} = \frac{\sigma}{\mu} \times 1000 \quad \text{(II.6)}$$

où σ correspondant à la déviation standard et μ à la moyenne de l'aire des pics mesurée. Le calcul du RSD permet de déterminer l'effet des erreurs aléatoire sur la mesure des aires des pics. En effet, lorsqu'une expérience RMN est répétée n fois, le spectre obtenu n'est jamais

strictement identique et la mesure des aires correspondant aux signaux va varier à cause de possibles instabilités du spectromètre RMN.

Pour évaluer la précision d'une mesure, il peut être intéressant d'évaluer la reproductibilité de l'expérience. Pour cela, il suffit de suivre le même protocole expérimental, mais en changeant le manipulateur, les conditions de l'expérience (échantillon, température, ...) ou l'appareil de mesure.

1.b.i.2. Evaluation de la justesse des résultats

La justesse est le second paramètre important à évaluer pour connaître la qualité d'une analyse quantitative. En effet, elle permet de juger de la proximité de la valeur moyenne des résultats d'une série d'expérience par rapport à la valeur d'une référence connue. Le calcul de ce paramètre s'effectue selon l'**Equation II.7**.

$$\Delta(\text{‰}) = \frac{S_i - S_{\text{réf}}}{S_i} \times 1000 \quad (\text{II.7})$$

où S_i représentant l'aire d'un signal, i , mesurée sur le spectre de RMN et $S_{\text{réf}}$ est l'aire mesurée pour le signal de référence.

Grâce à ces deux paramètres, il est possible de définir une analyse quantitative comme : i) précise et juste; ii) imprécise mais juste; iii) précise mais non juste ou iv) imprécise et injuste. L'évaluation de la qualité de l'analyse permet ainsi de prendre le recul nécessaire pour l'interprétation des résultats obtenus [4].

1.b.ii. *Le rapport Signal sur Bruit (S/B)*

Un spectre de RMN se caractérise par un ou plusieurs signaux notés, s_i , et par un bruit noté σ . Afin d'atteindre des rapports signal-sur-bruit $(S/B)_i$ suffisants pour des analyses robustes, l'expérience RMN est répétée NS fois (nombre de scans) afin d'accumuler du signal à chaque itération. Pour un site i , les acquisitions successives donnent un signal cohérent qui va se cumuler tel que : $S_i = NS \times s_i$. Ainsi, à chaque répétition de l'expérience, le signal global S_i augmente. A l'inverse, le bruit, σ , va se cumuler de façon incohérente (aléatoire) pour chaque scan, et se compense selon l'équation : $B = \sqrt{NS} \times \sigma$. Le rapport signal-sur-bruit $(S/B)_i$ est donc directement proportionnel \sqrt{NS} . Pour obtenir des analyses de précision, le rapport $(S/B)_i$ doit être suffisamment grand dans la mesure où les erreurs ΔS sur la mesure de l'aire du pic S_i dépendent du rapport $(S/B)_i$ de chaque signal selon l'**Equation II.8**

$$\frac{\Delta S_i}{S_i} = \frac{1}{2 \times (S/B)_i} \quad (\text{II.8})$$

En pratique, plus la précision attendue pour une analyse RMN quantitative est importante, plus le rapport $(S/B)_i$ devra être important (supérieur à 50 pour une précision de 1%) [5].

1.b.iii. Angle d'impulsion β

Tout d'abord, supposons que l'expérience RMN quantitative présente des rapports $(S/B)_i$ suffisants après l'acquisition d'un seul scan. Avant l'expérience, la projection de l'ensemble des spins pour chaque site de la molécule va être orientée le long du champ magnétique B_0 (axe z) conduisant à une aimantation macroscopique (M_0) selon l'axe z (cf. **Figure II.1.a**). Lors d'une expérience RMN classique, une impulsion radiofréquence (RF) va être appliquée (selon l'axe x) et va-basculer l'aimantation M_0 dans le plan transversal (plan xy), qui sera ensuite détecté (cf. **Figure II.1.b**).

En pratique, le basculement de l'aimantation dans le plan transverse (xy) s'effectue selon un angle d'impulsion β . Si l'angle β n'est pas parfaitement égal à 90° , l'aimantation ne se retrouve pas complètement sur le plan transversal (seule sa projection le sera !). Il est donc nécessaire de calibrer précisément l'angle d'impulsion β à 90° , afin de bénéficier d'un transfert d'aimantation complet conduisant à une intensité maximale des signaux détectés et donc un $(S/B)_i$ optimum.

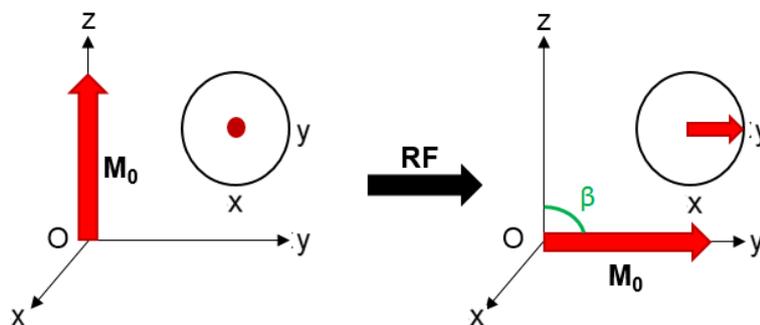


Figure II.1 : Schéma de l'aimantation macroscopique avec et après l'impulsion RF.

1.b.iv. Temps de relaxation T_1 et de recyclage T_R

Dans la réalité, il est souvent nécessaire d'accumuler un nombre suffisant de scans RMN afin d'obtenir des rapports $(S/B)_i$ exploitables. Durant l'acquisition du signal, l'aimantation de chaque spin retourne à son état d'équilibre le long de l'axe z sous l'action des phénomènes de relaxation longitudinale avec une vitesse de relaxation, R_1 , (en s^{-1}) et un temps caractéristique T_1 (en s, avec $T_1 = 1/R_1$) [6,7].

Notons que chaque noyau d'une molécule possède un temps de relaxation T_1 propre qui correspond à son retour à l'équilibre. Si l'impulsion RF de la seconde accumulation ($NS = 2$) est appliquée avant le retour à l'équilibre des aimantations macroscopiques (de chaque site), on atteindra pour un nombre de NS scans suffisamment grands, un état stationnaire du

retour de l'aimantation qui ne permet pas des mesures quantitatives absolues [6,7]. (cf. **Figure II.2**).

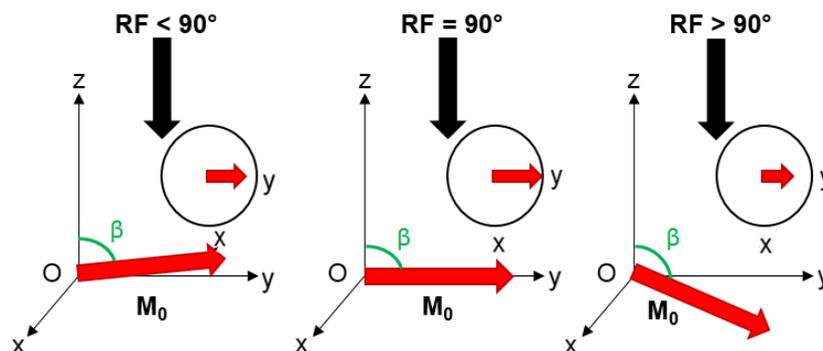


Figure II.2 : Représentation schématique de l'effet de l'angle d'impulsion β de l'impulsion RF avec β inférieur à 90° ; β égale à 90° ; et β supérieur à 90° .

Pour éviter ce problème, il est nécessaire d'attendre un délai entre deux scans d'une expérience RMN, appelé temps de recyclage (T_R), suffisamment grand, afin que l'ensemble des aimantations soient retournées à l'équilibre. En RMN quantitative, le temps de recyclage T_R doit être (au moins) égal à cinq fois le temps de relaxation longitudinale T_1 le plus long d'une molécule ($T_R \geq 5 \times T_1$). Pour un tel délai, plus de 99 % des spins de la molécule seront revenus à leur position initiale, et l'impulsion RF transfèrera l'aimantation complète sur le plan transversal lors du second scan. [6, 7].

1.c. Méthodes de référence en RMN quantitative

Enregistrer avec des conditions quantitatives, la RMN permet une mesure relative des surfaces des pics fiables par intégration ou déconvolution des signaux sur le spectre. Cependant, il n'est pas possible de faire des comparaisons quantitatives entre les différents spectres de RMN, si les conditions ne sont pas strictement identiques (cf. le paramètre k dans l'**Equation II.2** et **II.3**). A cause de ce paramètre, il n'est pas possible d'accéder à la concentration absolue de la molécule cible. Pour contourner ce problème, il est nécessaire de supprimer l'effet du paramètre k dans les équations à l'aide d'une méthode qui utilise une référence (ou un étalon) interne [8]. Ces méthodes de références peuvent être séparées en trois catégories : i) l'utilisation d'une référence interne où la référence est un composé chimique (de quantité connue) ajouté à l'échantillon contenant le produit de quantité inconnue ; ii) l'utilisation d'une référence externe où le composé de référence est analysé séparément de l'échantillon inconnu ; et iii) l'utilisation d'une référence électronique où le signal de référence est généré électroniquement. Chacune de ces méthodes sera présentée brièvement ci-dessous avec leurs avantages et leurs inconvénients.

1.c.i. *Utilisation d'un référence interne*

Le principe de cette méthode est de mélanger de façon homogène un composé chimique de référence (de masse connue et de rapport isotopique connu si nécessaire) et la

molécule cible dans le même échantillon RMN. Pour que l'analyse soit correcte, la quantité du produit de référence doit être précisément connue (mesure très précise de la masse) et le composé étudié doit être le plus pur possible. A défaut, sa pureté doit être connue et un paramètre de correction appliqué le cas échéant.

Comme la molécule cible est analysée en même temps que la molécule de référence, la constante k (cf. **Equation II.1**), qui peut affecter la valeur de l'aire du pic de référence, $S_{\text{réf}}$, devient identique à celle qui affecte l'aire du pic du composé d'intérêt noté S_x . Ainsi, $S_{\text{réf}}$ et S_x s'écrivent :

$$S_{\text{réf}} = k \times C_{\text{réf}} \times n_{i_{\text{réf}}} \times V_{\text{réf}} \quad \text{(II.9)}$$

$$S_x = k \times C_x \times n_{i_x} \times V_x \quad \text{(II.10)}$$

Dans ce cas, les paramètres k , $V_{\text{réf}}$ et V_x ne dépendent plus directement des conditions de l'expérience et du spectromètre RMN utilisé. Comme le composé de référence est analysé avec la molécule cible, les deux paramètres sont strictement identiques ($V_{\text{réf}} = V_x$). C'est pourquoi, le rapport des deux aires donne :

$$\frac{S_{\text{réf}}}{S_x} = \frac{k \times C_{\text{réf}} \times n_{i_{\text{réf}}} \times V}{k \times C_x \times n_{i_x} \times V} \quad \text{soit} \quad \frac{S_{\text{réf}}}{S_x} = \frac{C_{\text{réf}} \times n_{i_{\text{réf}}}}{C_x \times n_{i_x}} \quad \text{(II.11)}$$

Dans ces conditions, il est possible de déterminer la concentration absolue, C_x , de la molécule étudiée à partir de la concentration de la référence interne (cf. **Equation II.12**).

$$C_x = \frac{S_x \times n_{i_{\text{réf}}}}{S_{\text{réf}} \times n_{i_x}} \times C_{\text{réf}} \quad \text{(II.12)}$$

Bien évidemment, cette équation n'est valable que si le temps de recyclage de l'expérience RMN est égal au moins à cinq fois la valeur du T_1 le plus long que ce soit pour la molécule cible ou pour la référence interne.

Les avantages principaux de cette stratégie sont : i) la facilité de mise en œuvre ; ii) la rapidité d'obtention des informations recherchées. Cependant, le choix de la référence moléculaire interne n'est pas anodin et peut être source de difficultés d'interprétation ou d'erreurs de mesure. La molécule de référence doit, en effet : i) ne pas interagir avec la molécule cible ou le solvant ; ii) être complètement soluble dans le solvant ; iii) avoir un déplacement chimique suffisamment différent pour éviter des recouvrements de pics avec la molécule à analyser ; iv) avoir un temps de relaxation longitudinal T_1 (plutôt court) ; v) la quantité de molécule de référence doit conduire à un rapport (S/B)_i du même ordre de

grandeur que celui de la molécule cible. L'ensemble de ces caractéristiques est parfois difficilement conciliable [9].

Parmi les molécules de référence les plus utilisées en RMN quantitative (et en particulier isotopique), on peut citer la tétraméthylurée (TMU) dont la structure est présentée sur la **Figure II.3**. Cette molécule symétrique, est particulièrement bien adaptée pour mener des analyses isotopiques intramoléculaires ($^2\text{H}/^1\text{H}$) en RMN DAN- $\{^1\text{H}\}$ dans la mesure où elle possède douze sites hydrogénés équivalents (12 isotopomères monodeutérés) qui contribuent au signal DAN du TMU.

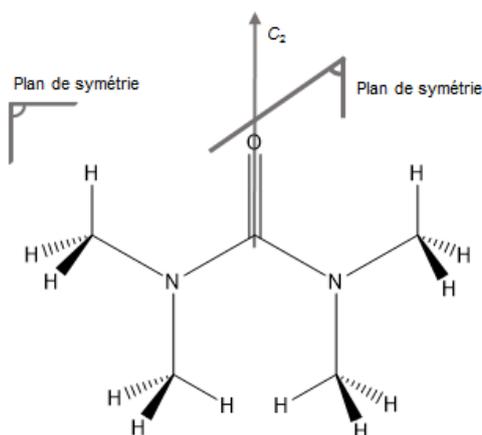


Figure II.3: Formule développée du tétraméthylurée (TMU), molécule de symétrie C₂. la masse moléculaire du TMU est égale à 116,1 g/mol.

La pyridine peut être aussi utilisée comme référence secondaire en cas d'incompatibilité du TMU avec la molécule cible (en termes de déplacement chimique).

1.c.ii. *Utilisation d'une référence externe*

L'utilisation d'une référence externe lors d'une analyse quantitative est décrite dans deux protocoles : i) la référence externe est contenue dans un capillaire inséré dans le tube RMN qui contient la molécule à étudier ; ii) l'analyse est effectuée dans deux tubes RMN (de diamètre 4 et 5 mm) insérés l'un dans l'autre, avec le premier contenant le soluté et le second, la molécule de référence. Dans les deux cas, il n'y a pas de contact direct entre la molécule de référence et l'analyte, levant ainsi les problèmes de compatibilité chimique (problèmes de solubilité, d'homogénéité ou de polarité) [10].

Une autre approche consiste à utiliser deux tubes RMN identiques avec dans le premier tube la molécule de référence et dans le second le soluté. Dans le cas de l'utilisation de deux tubes RMN distincts, il est possible d'utiliser la même molécule que l'analyte en tant que référence externe. Dans ce cas, la quantité de soluté de la référence doit être connue précisément. Cependant, l'inconvénient de cette technique réside dans le fait que les conditions d'enregistrement de l'expérience associée à l'analyte et à la molécule de référence

sont différentes [10]. Ainsi, certaines variations de paramètres peuvent être source d'erreurs importantes (paramètres k et V).

$$S_{\text{réf}} = k_{\text{réf}} \times C_{\text{réf}} \times n_{i_{\text{réf}}} \times V_{\text{réf}} \quad (\text{II.13})$$

$$S_x = k_x \times C_x \times n_{i_x} \times V_x \quad (\text{II.14})$$

Ainsi, la concentration de l'analyte peut être déterminée par l'**Equation II.15**:

$$C_x = \frac{k_{\text{réf}} \times S_x \times n_{i_{\text{réf}}} \times V_{\text{réf}}}{k_x \times S_{\text{réf}} \times n_{i_x} \times V_x} \times C_{\text{réf}} \quad (\text{II.15})$$

L'inconvénient de cette stratégie analytique, impliquant une référence externe, se situe au niveau de ces paramètres k et V et de la difficulté à les maîtriser parfaitement. Finalement la troisième stratégie analytique utilisant une référence électronique est davantage privilégiée et appliquée [11].

1.c.iii. *Utilisation d'une référence électronique (ERETIC)*

Si l'utilisation d'une référence interne est très efficace au niveau de la justesse et de la précision des analyses RMN quantitatives, l'ajout d'un composé de référence est parfois impossible notamment pour des études RMN *in vivo*. Pour contourner ce problème, une stratégie alternative a été développée et consiste à générer un signal de référence électroniquement. Cette technique est connue sous la méthode « ERETIC » (Electronic Reference To access *In vivo* Concentration) [11].

Expérimentalement, la méthode ERETIC consiste à générer électroniquement un pseudo FID (associé au signal de référence) qui est transmis durant l'acquisition du signal (*cf.* **Figure II.4a**). Après la transformée de Fourier, un signal supplémentaire va apparaître. Ce signal sera calibré à partir d'une première expérience de référence (combinant signal ERETIC et référence chimique : TMU) (*cf.* **Figure II.4b**) Ainsi, le signal électronique remplace le signal de la molécule de référence avec l'avantage que l'utilisateur peut définir le déplacement chimique du signal électronique et donc s'adapter à l'échantillon étudié. Cette technique présente plusieurs autres avantages : i) elle permet de simplifier la préparation de l'échantillon et de n'avoir aucune interaction entre la référence et le soluté ; ii) l'expérience réalisée est semblable à une acquisition avec une référence interne. Cette méthode a été appliquée pour les expériences *in vivo*, l'étude de métabolites, mais aussi pour des études cinétiques [13-15]. Plus récemment, la méthode ERETIC a pu être appliquée, combinée avec des expériences 2D, pour les études isotopiques quantitatives en deutérium [16-17].

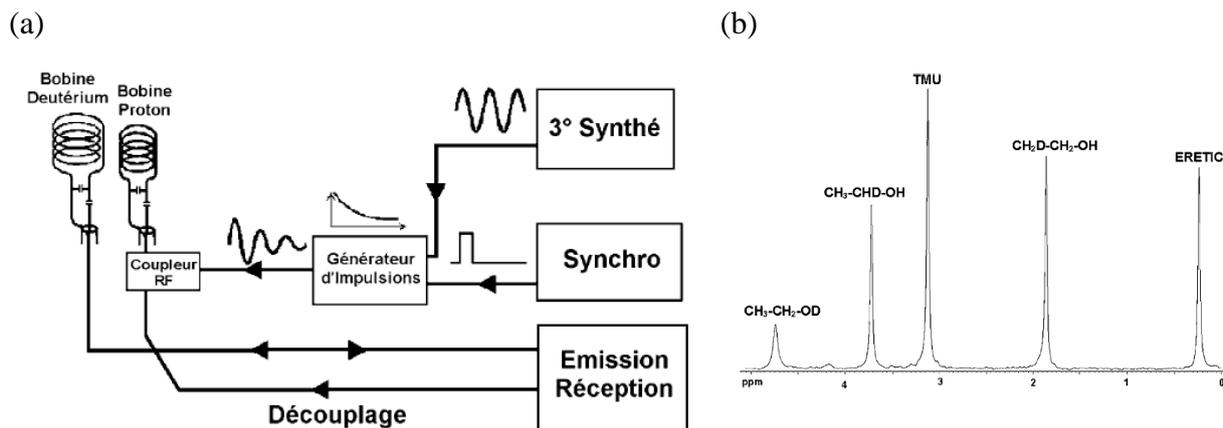


Figure II.4: (a) Dispositif de création du signal ERETIC. (b) Spectre ^2H découplé ^1H de l'éthanol, pour un tube contenant de la TMU, en présence du signal électronique ERETIC [12].

2. Mesures isotopiques quantitatives par RMN

2.a. Analyse isotopique

2.a.i. Définitions

Chaque élément chimique a au moins un ou plusieurs isotopes (stables ou instables) qui se caractérisent par le même nombre de protons et d'électrons mais un nombre de neutrons différents. On distingue, ainsi, les isotopes lourds (^2H , ^{13}C , ^{19}F , ...) et les isotopes légers (^1H , ^{12}C , ^{18}F , ...), tous n'étant pas magnétiquement actifs (spin $I = 0$) du point de vue de la RMN [18]. Chaque isotope est présent avec une abondance naturelle propre qui le caractérise. Ainsi pour le couple $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$, les abondances isotopiques sont 98,9% et 1,1%, alors que pour le couple $^1\text{H}/^2\text{H}$, les abondances isotopiques naturelles sont 99,9845 % de ^1H , 0,0155% de ^2H . [19].

La structure d'une molécule organique peut être composée d'isotopes différents. Comme on peut le voir sur la Figure II.5, la molécule d'éthanol peut être constituée que d'atomes d'hydrogène-1 (^1H) ou avoir un ou plusieurs atomes d'hydrogène-2 (^2H). Ces différentes structures sont appelées « isotopologues ». De la même façon, il existe des isotopologues carbonés associant des atomes de carbone-12 (^{12}C) et de carbone-13 (^{13}C) ou des isotopologues oxygénés associant des atomes d' ^{16}O , ^{17}O et ^{18}O .

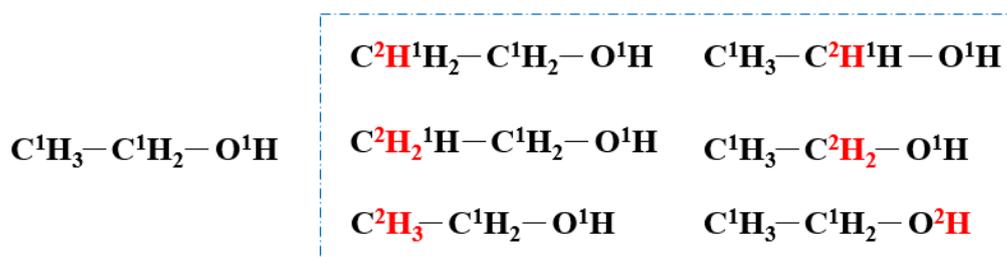


Figure II.5 : Présentation des isotopologues du noyau hydrogène de la molécule d'éthanol.

Parmi l'ensemble des isotopologues d'une molécule, on peut séparer différents groupes d'isotopomères qui sont composés du même nombre d'isotopes du même noyau, mais dont la position diffère au sein de la molécule. Ainsi, la molécule d'éthanol présente trois types d'isotopomères monodeutérés où le noyau de deutérium (^2H) est présent sur le groupement méthyle, sur le groupement méthylène ou sur la fonction alcool (cf. **Figure II.6**).



Figure II.6 : Présentation des isotopomères monodeutérés de la molécule d'éthanol.

2.a.ii. Les paramètres de mesures isotopiques

Les processus enzymatiques conduisant à des biocomposés (produits naturels), induisent une discrimination réactionnelle entre isotopes lourds et légers correspondant à des effets isotopiques cinétiques (EIC) différents. Les EICs correspondent à un changement de la vitesse (k) d'une réaction chimique lorsque l'un des atomes du réactif (substrat) est substitué par un de ses isotopes ($k_{\text{H}} \neq k_{\text{D}}$) [20]. Cet effet peut s'exprimer comme :

$$\text{EIC} = k_{\text{léger}}(^1\text{H}) / k_{\text{lourd}}(^2\text{H}) \quad (\text{II.16})$$

Cette différence entre k_{H} et k_{D} résulte du fait que les isotopologues plus lourds ont une vitesse/mobilité plus faible et une stabilité accrue (énergies de dissociation de liaison plus élevées) par rapport aux composés contenant des isotopes plus légers.

Lorsque $k_{\text{H}} > k_{\text{D}}$, on parle d'un effet de déplétion (appauvrissement isotopique) en deutérium et lorsque $k_{\text{D}} > k_{\text{H}}$, on parle d'un effet d'enrichissement isotopique en deutérium. Ces différences conduisent à des valeurs d'abondance naturelle isotopique ^2H site-spécifique parfois très différentes de la valeur moyenne standard. La valeur standard est appelée V-SMOW ("Vienna Standard Means Ocean Water"). Sa valeur est égale à 0,0155 % (ou 155 ppm). Des différences de plus de 50 ppm peuvent être mesurées.

Pour étudier la distribution isotopique d'une molécule, il est nécessaire de mesurer le rapport isotopique R (associé à un couple d'isotopes donné). Ce rapport de la quantité de matière de l'isotope le plus lourd sur l'isotope le plus léger. Pour le couple ($^2\text{H}/^1\text{H}$), nous pouvons écrire :

$$R (^2\text{H}/^1\text{H}) = \frac{n(^2\text{H})}{n(^1\text{H})} \quad (\text{II.17})$$

Le calcul de l'abondance isotopique se définit comme :

$$x(^2\text{H}/^1\text{H}) = \frac{n(^2\text{H})}{n(^2\text{H}) + n(^1\text{H})} \quad (\text{II.18})$$

A partir des expériences quantitatives, il est possible de mesurer les quantités de matière isotopique (stable) afin de connaître le rapport isotopique, R , et l'abondance isotopique, x , d'un même élément chimique dans un échantillon donné. Deux techniques sont connues et utilisables pour des études isotopiques : i) la Spectrométrie de Masse de Rapport Isotopique (SMri) ; ii) la spectrométrie de RMN de Fractionnement Isotopique Naturel Site-spécifique (la RMN-FINS[®]).

2.a.iii. Méthode de mesure de la composition isotopique moléculaire par Spectrométrie de Masse

Parmi les techniques analytiques connues, la Spectrométrie de Masse de Rapport Isotopique (SMri ou IRMS en anglais) est la plus communément utilisée pour déterminer la composition isotopique moyenne globale d'une molécule. Cet outil permet de mesurer des faibles variations d'abondance isotopique pour les couples isotopiques intéressants comme les couples $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, ... [21].

La SMri est une SM particulière utilisée pour déterminer l'abondance des isotopes d'un échantillon. Avant d'être analysés par le SMri, les analytes sont oxydés pour être convertis en gaz simple comme H_2 , O_2 , N_2 , CO_2 (cf. Figure II.7). Après leur analyse dans le spectromètre de masse, chaque gaz présentera des signaux pour chaque isotopologue à son rapport m/z correspondant. Pour le dioxygène, on aura : $^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ à $m/z = 32$, $^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ à $m/z = 33$, $^{18}\text{O}^{16}\text{O} + ^{17}\text{O}^{17}\text{O}$ à $m/z = 34$, $^{18}\text{O}^{17}\text{O}$ à $m/z = 35$ et $^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ à $m/z = 36$. De la même façon, la molécule de CO_2 donnera : $m/z = 44$ pour $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$; $m/z = 45$ pour $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O} + ^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$; et $m/z = 46$ pour $^{13}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O} + ^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O} + ^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{17}\text{O}$. A partir de la quantification de ces signaux, il est possible de calculer les rapports isotopiques R de chaque couple d'isotopes ($^2\text{H}/^1\text{H}$), ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), ($^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$), ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$). Il est donc possible de mesurer la composition isotopique globale de la molécule.

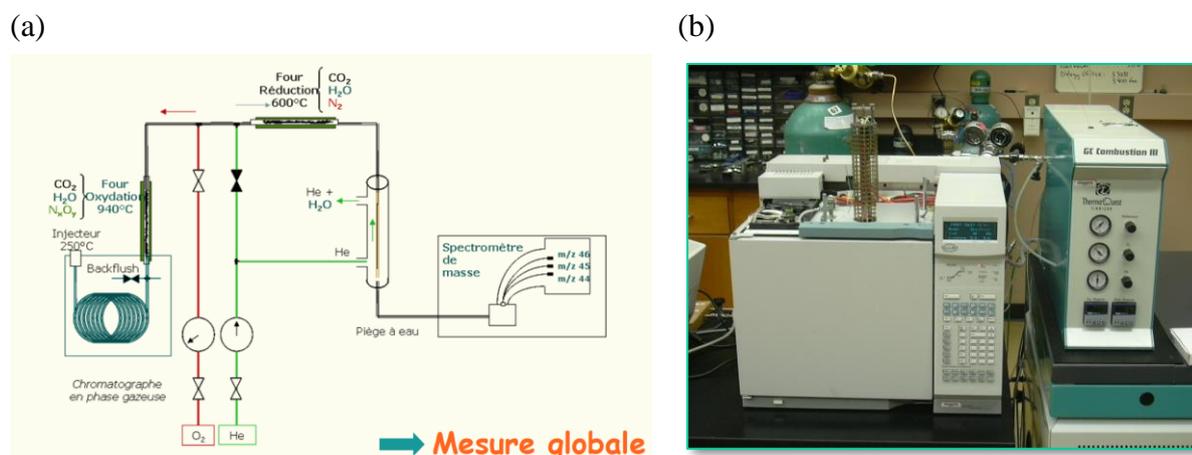


Figure II.7 : Principe de l'analyse par SMri. (b) Exemple d'un instrument SMri couplé à une GC.

Cette technique analytique présente l'avantage de nécessiter une faible quantité de produit (inférieur à 5 mg dans l'échantillon) et d'être très précise. La méthode SMri a été abondamment utilisée comme méthode analytique dans le domaine de l'agro-alimentaire pour l'adultération des jus de fruits, du sucre et de l'éthanol [22-24] ou encore dans les études environnementales [25].

Quoique puissante, cette méthode ne donne accès qu'à une valeur globale de l'abondance isotopique de l'échantillon. Elle ne permet donc pas d'étudier les disparités/variations isotopiques d'un site à l'autre des molécules étudiées, correspondant à la distribution isotopique intramoléculaire. Ces variations du profil isotopique site-spécifique peuvent avoir pour origines : i) des différences d'origine géographique ; ii) des différences d'origine botanique ; iii) des différences d'origine biochimique [26].

Face à cette problématique, des stratégies analytiques ont été développées autour de l'analyse isotopique position-spécifique (ou PSIA pour Position-Specific Isotope Analysis), notamment basées sur la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire.

2.b. Fractionnement isotopique naturel site-spécifique par RMN

2.b.i. *Historique*

Même si la quantité d'analyte peut apparaître élevée (10 à 100 mg) comparée à la SMri, les analyses isotopiques réalisées par spectroscopie RMN ^2H ou ^{13}C (en abondance naturelle et en milieu isotopique) sont très intéressantes. La méthode est, en effet, quantitative et non destructive. Par ailleurs et contrairement à l'analyse isotope en SMri, la RMN peut apporter des informations isotopiques spécifiques pour chacun des sites hydrogénés inéquivalents d'une molécule. Historiquement, cette méthode d'analyse a été explorée puis développée à l'Université de Nantes dès 1981 par l'équipe du Professeur G. Martin [27]. La méthode est connue sous le nom de Résonance Magnétique Nucléaire du Fractionnement Isotopique Naturel Site-spécifique (RMN-FINS[®]) et a fait l'objet d'un brevet.

La RMN-FINS[®] a été appliquée pour mesurer la distribution isotopique ($^2\text{H}/^1\text{H}$) site-spécifique de nombreuses molécules d'intérêts (économique) et pour une large gamme d'application, notamment dans le milieu agro-alimentaire ou l'authentification des origines des produits alimentaires. Ultérieurement, les analyses isotopiques ont été appliquées à l'étude du couple $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, amenant à un complément d'information isotopique sur les molécules étudiées [26].

2.b.ii. *Séquence RMN 1D DAN appliquée aux analyses deutérium quantitatives*

Pour mesurer le fractionnement isotopique site-spécifique en deutérium, la séquence RMN 1D utilisée (cf. **Figure II.8**) se compose d'une impulsion 90° sur le canal deutérium, qui est considéré comme le canal d'observation (à la différence d'autres expériences où le canal ^2H correspond au canal de lock). L'abondance isotopique de l'isotope ^1H étant de

99,9845%, chaque noyau ^2H observé (isotopomère monodeutééré) sera couplé avec les protons adjacents de la molécule, donnant une structure fine parfois compliquée à appréhender. Pour simplifier l'analyse des spectres DAN, un découplage ^1H est appliqué simultanément (cf. Chapitre I.5.a).

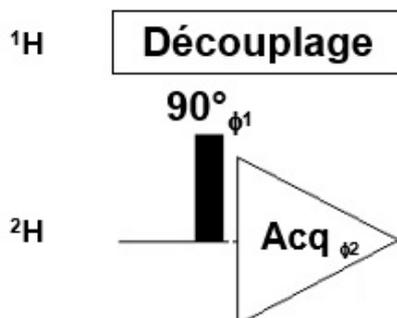


Figure II.8 : Schéma impulsionnel de la séquence 1D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ avec le cyclage de phase : $\phi_1 = 0, 1, 2, 3$, et $\phi_2 = 1, 1, 1, 1$. Cette expérience est nommée « zgdc » dans la librairie du logiciel Topspin (cf. Annexe J).

En pratique, les spectres DAN- $\{^1\text{H}\}$ isotopes expérimentaux sont composés d'une somme de singlets ^2H correspondant à chaque site hydrogéné (isotopomère monodeutééré) inéquivalent de la molécule étudiée.

2.b.iii. Conditions méthodologiques

Comme nous l'avons vu dans la Chapitre II.1.b, les analyses quantitatives en RMN DAN doivent répondre à deux conditions importantes pour donner des résultats isotopiques robustes : i) le temps d'impulsion nécessaire pour réaliser une impulsion de 90° ; ii) le choix de la durée du temps de recyclage T_R par rapport au temps de relaxation le plus long pour le soluté ou la référence interne ($T_R \geq 5 \times T_1$).

2.c. Détermination du profil isotopique par RMN DAN

2.c.i. Particularités

En RMN, la détermination du fractionnement isotopique naturel site-spécifique en RMN se calcule à partir de l'aire des signaux DAN- $\{^1\text{H}\}$ et celle d'une référence chimique interne dont la masse et la composition isotopique sont connues. En RMN DAN, la référence interne généralement utilisée est le tétraméthylurée (TMU) [28, 29]. A partir de l'Equation II.19, il est possible de calculer l'abondance isotopique site-spécifique de la position i . En considérant que le TMU, utilisé comme référence, est pur à 100%, nous pouvons écrire :

$$x_i = \left(\frac{S_i}{S_{\text{TMU}}} \right) \times \frac{n_{\text{TMU}} \times C_{\text{TMU}}}{n_i \times C_i} \quad (\text{II.19})$$

Dans l'Equation II.19, x_i correspond à l'abondance isotopique de la position i (aussi appelé isotopomère i), x_{TMU} à l'abondance isotopique du composé de référence, S_i correspond à l'aire

du pic de la position i , S_{TMU} à l'aire du pic du TMU (composé de référence), n_i correspond au nombre stœchiométrique associé au nombre d'hydrogène équivalent de la position i , n_{TMU} au nombre stœchiométrique de la molécule de référence (ici $n_{\text{TMU}} = 12$), C_i correspond à la concentration molaire du produit et C_{TMU} à la concentration molaire du TMU.

Dans le cas du fractionnement isotopique naturel deutérium, l'abondance isotopique x_i peut être définie par un rapport isotopique $(\text{D}/\text{H})_i$ selon l'Equation II.20 :

$$\left(\frac{\text{D}}{\text{H}}\right)_i = \left(\frac{S_i^{\text{Anal}}}{S_{\text{TMU}}}\right) \times \frac{n_i}{n_{\text{TMU}}} \times \frac{m_{\text{TMU}}}{m_{\text{Anal}}} \times \frac{M_{\text{Anal}}}{M_{\text{TMU}}} \times \frac{P_{\text{TMU}}}{P_{\text{Anal}}} \times \left(\frac{\text{D}}{\text{H}}\right)_{\text{TMU}} \quad (\text{II.20})$$

où $\left(\frac{\text{D}}{\text{H}}\right)_i^{\text{Anal}}$ et $\left(\frac{\text{D}}{\text{H}}\right)_{\text{TMU}}$ représentent les rapports isotopiques respectivement pour la position i de l'analyte et pour la référence interne (ici le TMU), M_{Anal} et M_{TMU} correspondent à la masse molaire de l'analyte et de la molécule de référence et P_{Anal} et P_{TMU} à leur pureté respective.

L'étude du profil isotopique associé aux différents rapports isotopiques d'un composé (*via* le protocole RMN-FINS[®]) est une source d'informations moléculaires importante permettant de discriminer des échantillons. De nombreuses applications ont été proposées dans le cadre de l'élucidation métabolique et/ou l'authentification biologique et/ou géographique de produits naturels et agro-alimentaires. Par exemple, la RMN-FINS[®] (²H) a été abondamment utilisée pour la détection et le contrôle du processus de chaptalisation des vins (apport de sucre exogène à celui issu du fruit dans le processus de vinification) [30] ou pour déterminer l'origine géographique de l'éthanol [31-32]. On peut également citer le cas de la vanilline, molécule aromatique d'intérêt en agroalimentaire et donc soumis à nombre de contrefaçons. En effet, le prix de la vanilline naturelle est beaucoup plus élevé que celui de la vanilline synthétique ou hémisynthétique. Ainsi le protocole RMN-FINS[®] a été officialisé par l'AOAC (Association of Analytical Communities) pour vérifier l'adultération d'extraits de vanille [28, 33].

2.c.ii. Inconvénients

L'analyse isotopique par RMN DAN isotrope est un outil puissant. Cependant, compte tenu de l'abondance naturelle moyenne du ²H (0.0155 %) et du faible rapport gyromagnétique, $\gamma(^2\text{H})$, (6.5 fois plus faible que celui du noyau ¹H), cette méthode se caractérise par une faible sensibilité, conduisant à des temps d'expérience RMN longs. Par ailleurs, la gamme de déplacements chimiques du noyau deutérium (de 0 à 15 ppm) combinée à son faible rapport gyromagnétique $\gamma(^2\text{H})$, induit une distribution des résonances ²H sur des largeurs spectrales (exprimée en Hz) relativement petite (comparé au ¹H), ce qui peut induire un fort taux de recouvrement des signaux. Par exemple, pour un spectromètre opérant à 14,1 T (600 MHz pour le ¹H, 92,1 MHz pour le ²H), la valeur d'une unité ppm en ²H correspond à 92,1 Hz. Dans ces conditions, les signaux résonant à des déplacements chimiques très proches

($0,05 < \Delta\delta$ (en ppm) $< 0,1$) risquent de ne pas être résolus spectralement, conduisant à des mesures de leur surfaces (intégration ou déconvolution) difficiles. Plus gênant, pour certaines molécules, il n'est pas possible de discriminer certains sites (pseudo anisochronie). On peut citer, par exemple, le cas des AG saturés à longue chaîne alkyle, comme le stéarate de méthyle (C18:0) pour lequel, le spectre 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ montre une seule résonance pour les groupes méthylènes 4 à 17 de molécule (cf. **Figure II.9**). Une telle situation conduit une perte d'information isotopique site-spécifique considérable.

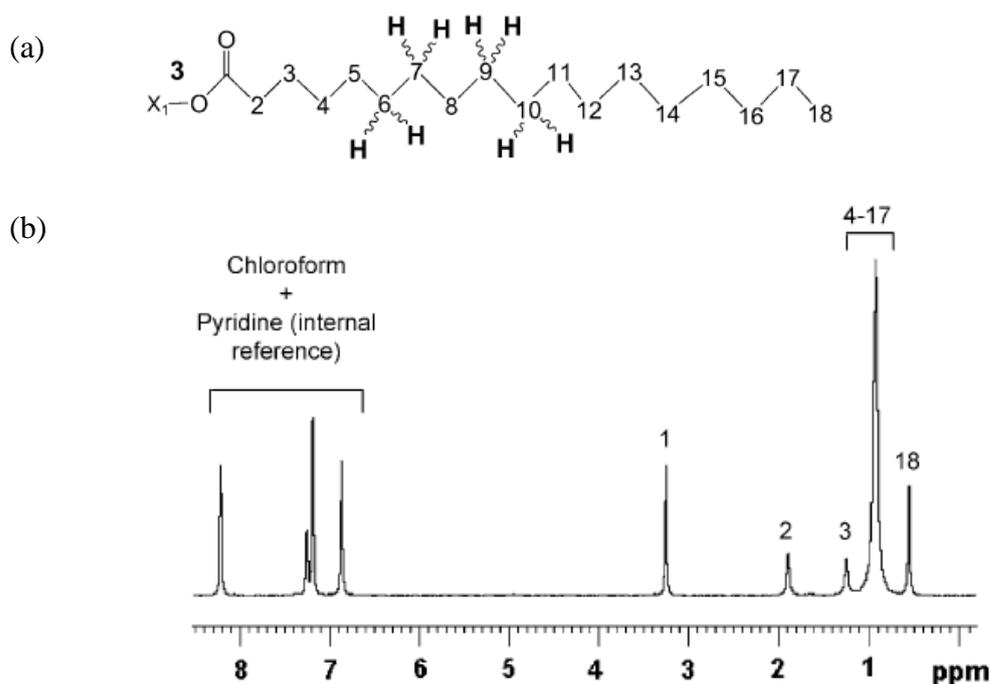


Figure II.9 : (a) Structure du stéarate de méthyle (LM) acide gras (estérifié) possédant deux doubles liaisons (C-18:2). (b) Spectre 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ isotrope du LM. Notez par exemple, la non-discrimination des signaux ^2H des quatre positions éthylénique ou en position 8/14. Figure extraite de la référence [34].

Dans le protocole RMN-FINS[®], les solvants isotropes (liquides) utilisés sont achiraux (CHCl_3 , CH_2Cl_2 , DMF, ...). Cette caractéristique de la RMN quantitative 1D DAN isotrope « classique » ne permet pas de discriminer spectralement les paires d'énantio-isotopomères monodeutérés ($\text{R-C}^*\text{HD-R}'$) associées aux différentes positions hydrogénées énantiotopes (pro-*R*/pro-*S*) dans les molécules prochirales ($\text{R-CH}_2\text{-R}'$). La mesure de leur rapports isotopiques ($^2\text{H}/^1\text{H}$) respectifs est donc impossible (même dans le cas de l'éthanol), réduisant encore la quantité d'information isotopique disponible [35].

2.c.iii. Un nouvel outil : les cristaux liquides chiraux

Pour contourner les problèmes de limites analytiques de la RMN-FINS[®] ^2H en milieu isotrope, il a été proposé en 2004 de changer de paradigme, en remplaçant les solvants isotropes par des solvants anisotropes (systèmes orientés et orientants) à base de cristaux liquides chiraux [36].

Avec des phases anisotropes chirales, les limitations du milieu isotrope sont levées, puisque : i) il est possible d'accéder à l'interaction quadrupolaire ^2H sensible à l'ordre orientationnel des molécules et d'obtenir des doublets quadrupolaires centrés sur le déplacement chimique anisotrope (très proche de la valeur δ^{iso} pour le ^2H) ; ii) l'utilisation d'un système chiral permet la discrimination des énatio-isotopomères (molécules prochirales) et des diastéréo-isotopomères (molécules chirales) sur la base d'une différence de δ^{aniso} (possiblement différents) mais surtout sur la base d'une différence d'éclatements quadrupolaires ($\Delta\nu_Q$) (cf. **Chapitre I**).

Dans la partie suivante, nous présenterons rapidement les apports analytiques de la RMN 1D/2D DAN dans les CLC polypeptidiques, utilisés dans pour les études isotopiques réalisées précédemment au laboratoire.

3. La RMN DAN dans les cristaux liquides chiraux

3.a. Introduction

Les principes de la RMN 1D/2D DAN dans les cristaux liquides chiraux (notamment dans le cas de système faiblement orientant comme les CLC polypeptidiques) ont été décrits en détails dans le **Chapitre I**. Sans y revenir, on peut rappeler rapidement les différents avantages de cette approche, comparée aux techniques RMN 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ isotropes classiques sont : i) la présence de DQ(^2H) permettant une plus grande distribution des signaux (^2H) et la possibilité de discriminer des sites ayant la même valeur de δ (en milieu isotrope) ; ii) l'utilisation d'expériences bidimensionnelles permettant la simplification des spectres 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ complexes (corrélation des composantes de chaque DQ, levée des recouvrements de raies) en décomposant un spectre 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ complexe en une série de sous-spectres 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ associés à chaque isotopomère monodeutééré du mélange (cf. **Figure II.10**) ; iii) la discrimination des directions énantiotopes (discrimination des énatio-isotopomères monodeutéérés) pour des molécules prochirales ; iv) la discrimination des énantiomères (discrimination des diastéréo/énatio-isotopomères) de molécules chirales.

3.b. Application des CLC aux molécules cibles d'intérêt

3.b.i. *Etude de la famille des acides gras*

Ce travail été initié en 2004 [36]. Les premières molécules d'intérêt étudiées par RMN 1D/2D DAN dans les CLCs (polypeptidiques) sont une série d'acides gras (AG) (sous leur forme estérifiée), mono- et polyinsaturés (conjugués ou pas), puis saturés, suivi de l'étude de triglycérides (TG) homogènes [36-41].

Associé à l'étude de ces AG, le principal challenge était de pouvoir accéder aux informations isotopiques des positions énantiotopes des groupements méthylènes de ces molécules flexibles de symétrie C_s en moyenne, alors que le protocole de RMN-FINS[®] ne permet pas d'obtenir ce type d'information. Historiquement, l'étude du 1,1'-bis-(phénylthio)-hexane

(BPTH) qui est un fragment prochiral d'un acide gras insaturé essentiel, le linoléate de méthyle (LM), a révélé un enrichissement en ^2H des énantiotopomères (*R*) comparé aux énantiotopomères (*S*) pour les groupements méthylènes pairs et impairs, démontrant pour la première fois l'intérêt analytique de la RMN 2D DAN anisotrope chirale dans des études isotopiques (cf. **Figure II.11**) [36, 39, 40].

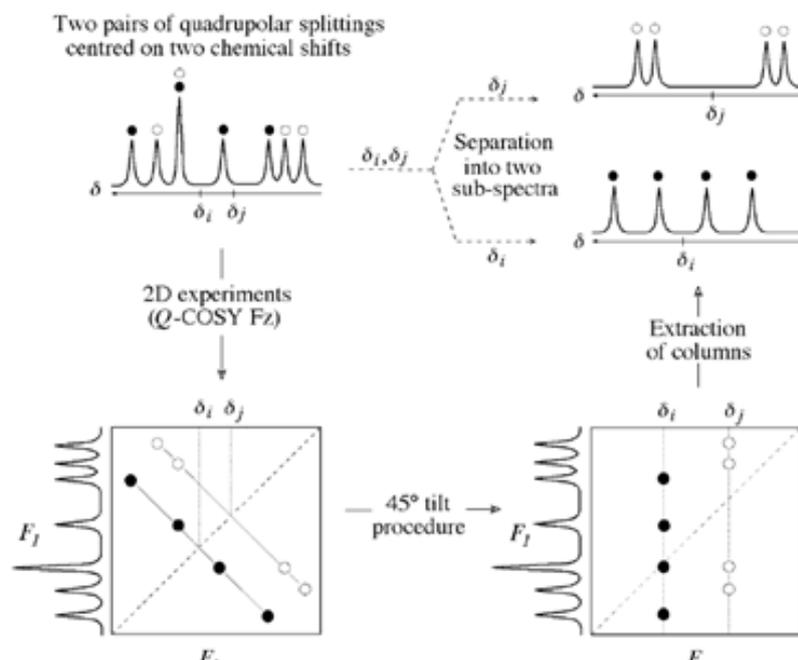


Figure II.10 : Principe schématique de la décomposition d'un spectre 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ d'isotopomères monodeutérés en une somme de sous-spectres 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ en utilisant une expérience de type 2D *Q*-COSY. Ici, deux sites ^2H inéquivalents (δ^{anisot} différents pour chaque énantiotopomère monodeutééré). Figure extraite de la référence [38].

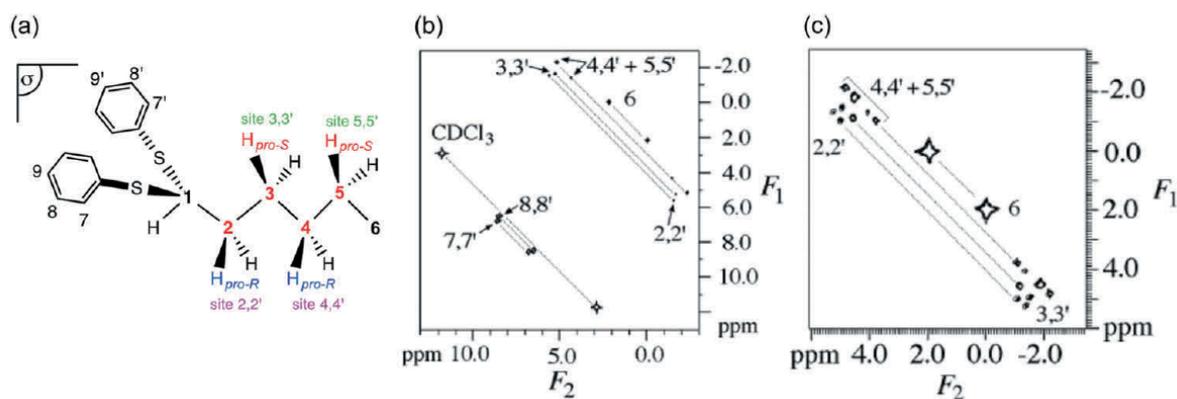


Figure II.11 : (a) Structure chimique du BPTH et numérotation atomique associée. (b) Spectre 2D *Q*-COSY DAN- $\{^1\text{H}\}$ (mode magnitude) du BPTH en phase achirale PBG/ CHCl_3 . (c) Région aliphatique du spectre 2D *Q*-COSY du BPTH en phase chirale PBLG/ CHCl_3 montrant quatre DQ(^2H)s pour les sites 4/4' et 5/5' de la molécule. Ces spectres 2D DAN ont été enregistrés à 61,4 MHz (9,4 T) en une nuit d'acquisition. Figure adaptée de la référence [36].

Par la suite, les études RMN DAN anisotropes se sont portées sur des molécules d'AG prochirales, mono- ou polyinsaturées de la famille des C-18 (AGI : oléate de méthyle (OM), linoléate de méthyle (LM), ...), des AG polyinsaturés conjugués (AGIC : punicate de méthyle, PM, éléostéarate de méthyle, EM, ...) (cf. **Figure II.12**). Parmi ces molécules cibles, la **Figure II.13** présente le spectre RMN 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ isotrope du linoléate de méthyl (LM).

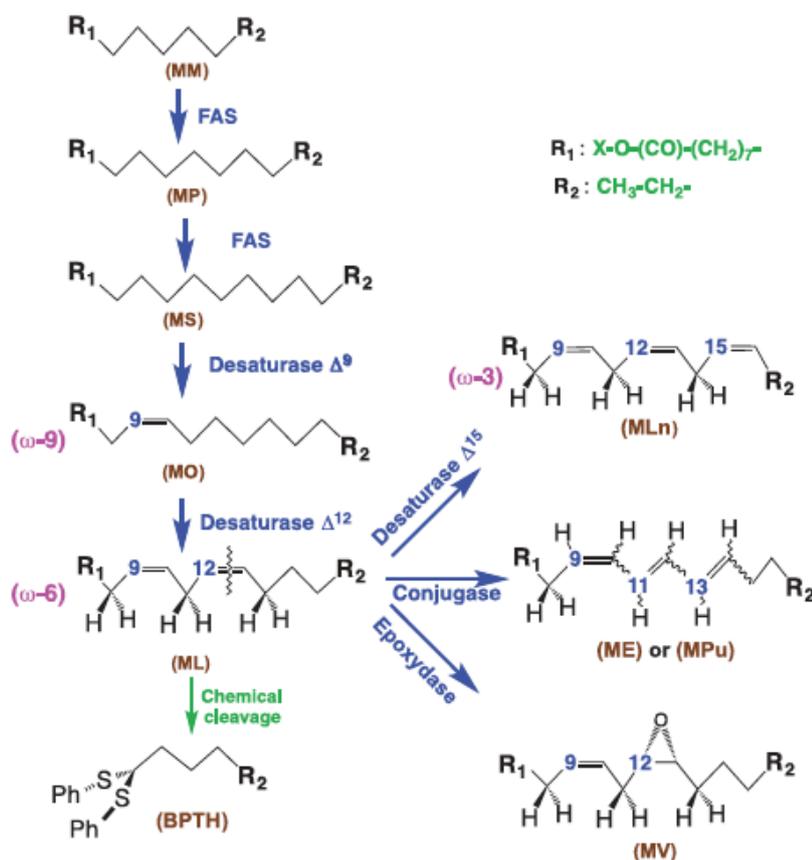


Figure II.12: Schéma des diverses transformations biochimiques successives du myristate de méthyle, MM, (AGS) conduisant successivement à divers AGI, (9Z)-OM, (9Z, 12Z)-ML, (9Z, 12Z, 15Z)-LnM, (9Z, 12R, 13S)-VM ou AGIC, (9Z, 11E, 13E)-EM et (9Z, 11E, 13Z)-PM. Dans les cellules des plantes ou de micro-organismes, X correspond à la coenzyme A (CoA) ou protéine porteuse (ACP). Pour l'analyse RMN DAN, X est un groupe méthyle

Sur le spectre 1D DAN isotrope, l'ensemble des mono-isotopomères deutérés ne sont pas discriminés (30% des sites ^2H théoriquement inéquivalents et *a priori* attendus sont discriminables), ce qui rend, en autres, l'analyse isotopique des énatio-isotopomères incomplète. L'utilisation d'une phase cristal liquide chirale optimisée à base de PBLG/pyridine a permis, en revanche, de discriminer tous les isotopomères et les énatio-isotopomères monodeutérés de la molécule sur la base d'une différence de déplacements chimique anisotrope, δ^{aniso} , et de l'éclatement quadripolaire, $\Delta\nu_Q$. L'obtention de l'expérience 2D *Q*-COSY Fz tiltée a permis d'extraire l'ensemble des sous-spectres 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ de la molécule (cf. **Figure II.14**).

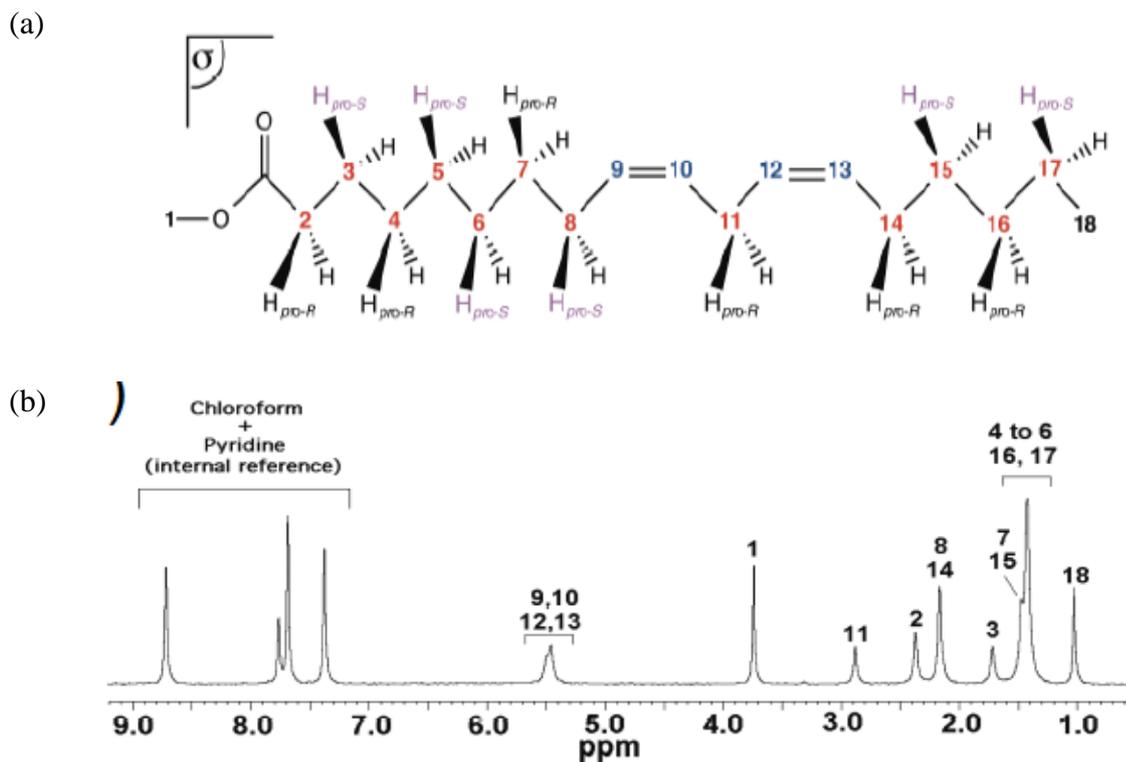


Figure II.13: (a) Structure du linoléate de méthyle (LM) acide gras (estérifié) possédant deux doubles liaisons (C-18:2). (b) Spectre 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ isotrope du LM. Notez, par exemple, la non-discrimination des signaux ^2H des quatre positions « éthyléniques » ou en position 8/14 de la chaîne. Figures extraites de la référence [27, 41].

A partir des informations isotopiques obtenues en RMN 1D DAN isotrope et RMN 2D anisotropes quantitatives, l'évaluation du fractionnement isotopique de chaque énanti-isotopomère (*R* ou *S*) a été possible. Pour mieux comprendre ces résultats, les rapports isotopiques ($^2\text{H}/^1\text{H}$) des paires d'énanti-isotopomère ($3^R / 3^S$, $15^R / 15^S$, ...) peuvent être examinés. En effet, de larges variations de rapports isotopiques entre deux positions énantiotopiques existent et peuvent s'interpréter par des différences de source d'hydrogène (lors de la synthèse enzymatique) pour ces deux positions. Ces données isotopiques fournissent des compléments d'informations isotopiques impossibles à obtenir par RMN 1D DAN isotrope [27, 41].

Dans cette optique, la discrimination des énanti-isotopomères (*R/S*) dans les cristaux liquides chiraux a conduit à la première détermination d'excès énanti-isotopomériques (noté EEI) pour étudier la tendance isotopique de chaque groupement méthylène (CH_2) de molécule prochirale. La mesure de l'excès énanti-isotopomérique s'obtient selon l'**Equation II.21** :

$$\text{EEI (\%)} = \frac{\left| (^2\text{H}/^1\text{H})_i^R - (^2\text{H}/^1\text{H})_i^S \right|}{(^2\text{H}/^1\text{H})_i^R + (^2\text{H}/^1\text{H})_i^S} \times 100 \quad (\text{II.21})$$

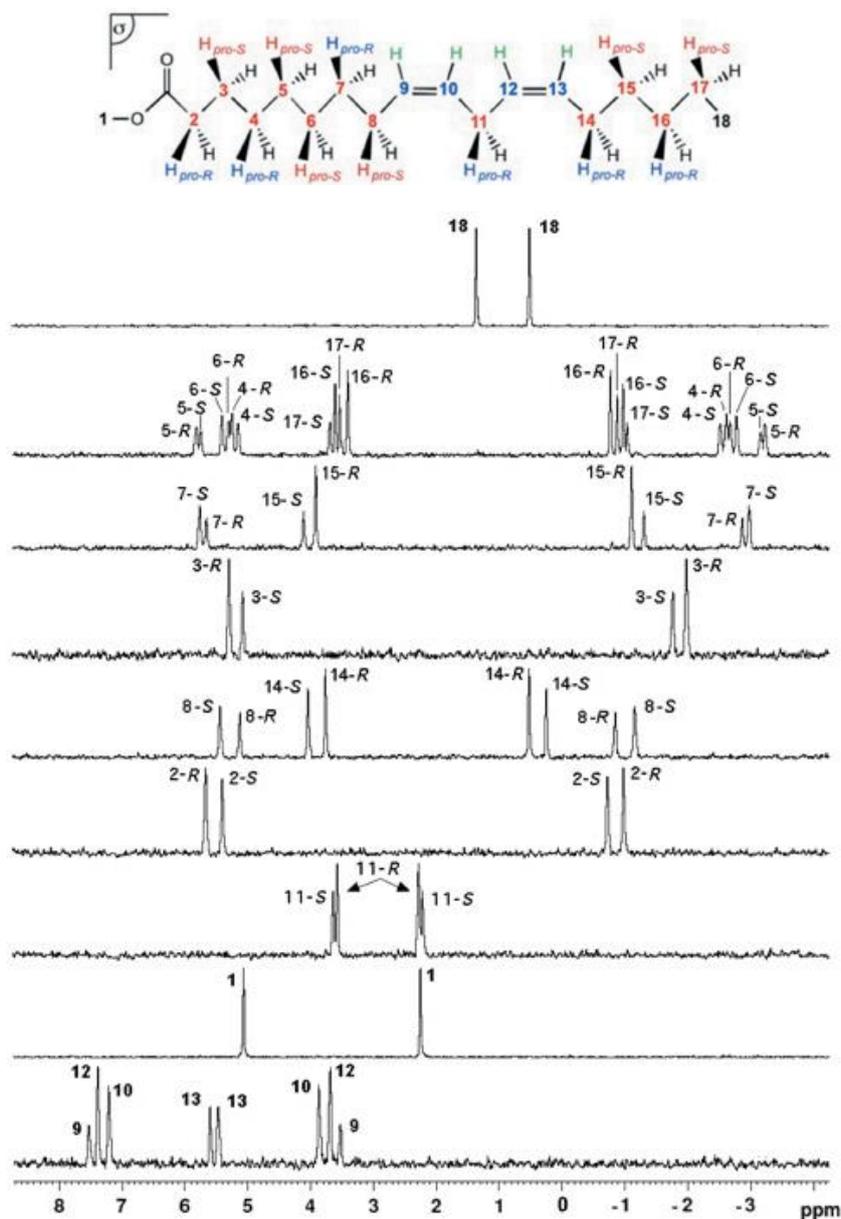


Figure II.14 : Série de sous-spectres 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ associés aux deux méthyles, aux quatre positions éthyléniques et aux vingt-deux positions méthyléniques du ML dans la phase chirale PBLG/pyridine extraits de la carte 20D Q -COSY Fz tiltée DAN anisotrope chirale enregistré à 14.1 T. Figure extraite de la référence [41].

La **Figure II.15** présente les variations de EEIs selon la position du groupement méthylène du LM. L'analyse de ces résultats a montré deux tendances : i) des excès énantiomériques plus importants (entre 15 et 40 %) pour les groupements CH_2 impairs qui ont pu être expliqués par une différence d'incorporation des hydrogènes (deutérium) à partir de l'enzyme FAS (Fatty Acid Synthetase) [43] ; ii) Hormis pour les positions 6 à 8, l'énanti-isotopomère majoritaire est le *R*.

3.b.ii. *Etude de la miliacine*

Comme nous l'avons vu, la RMN DAN en milieu anisotrope a démontré un pouvoir analytique intéressant pour apporter des réponses (d'ordre stéréochimique) aux analyses

biologiques (autour de problématique des AGI, AGIC, AGS). Dans le même temps, cette méthode peut répondre à d'autres problématiques comme l'étude isotopique site-spécifique de biomarqueurs moléculaires mis en jeu dans les analyses géologiques. En effet, la mesure isotopique RMN DAN anisotrope pourrait permettre : i) de définir les étapes principales du processus de biosynthèse ; ii) d'apporter des informations sur les conditions climatiques passées et capables d'induire des variations notables dans la composition isotopique ($^2\text{H}/^1\text{H}$) de ces molécules au niveau global et/ou site-spécifique.

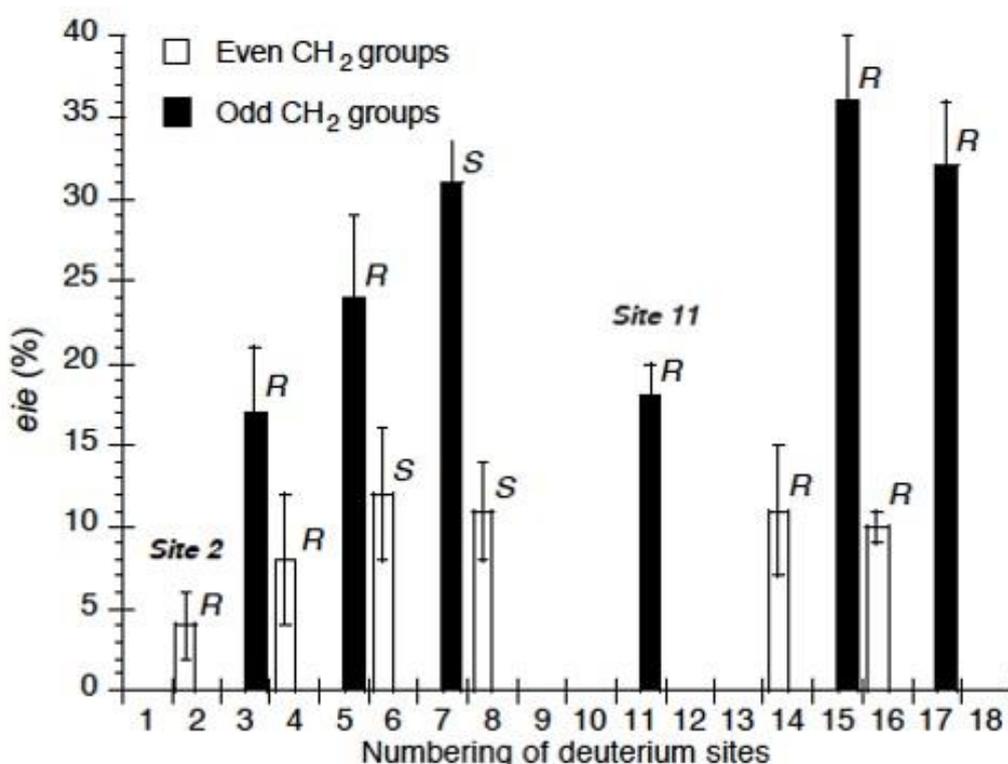


Figure II.15 : Variation des EEI (%) des différents groupements méthylènes du LM. Figure extraite de la référence [41].

Actuellement, la méthode analytique la plus utilisée par les géochimistes est la CG-SMri. Comme cet outil ne donne accès qu'à des rapports isotopiques globaux des molécules analysées, la RMN 1D/2D DAN en milieu anisotrope a été testée afin de vérifier le potentiel analytique de l'étude des rapports isotopiques site-spécifique intramoléculaires [43]. Dans ce cadre, la molécule cible qui a été étudiée est la miliacine (cf. **Figure II.16**). La miliacine est une molécule chirale énantiopure de la famille des triterpènes pentacycliques (hydrocarbures insaturés cycliques composés de 30 atomes de carbone) qui a été extraite du millet ou *Panicum Miliaceum L* [43].

Ce métabolite peut être utilisé comme un biomarqueur géologique spécifique dans le cadre de l'étude des couches sédimentaires en analysant les variations des rapports isotopiques ($^2\text{H}/^1\text{H}$) ou ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) dans différentes strates géologiques [43-44].

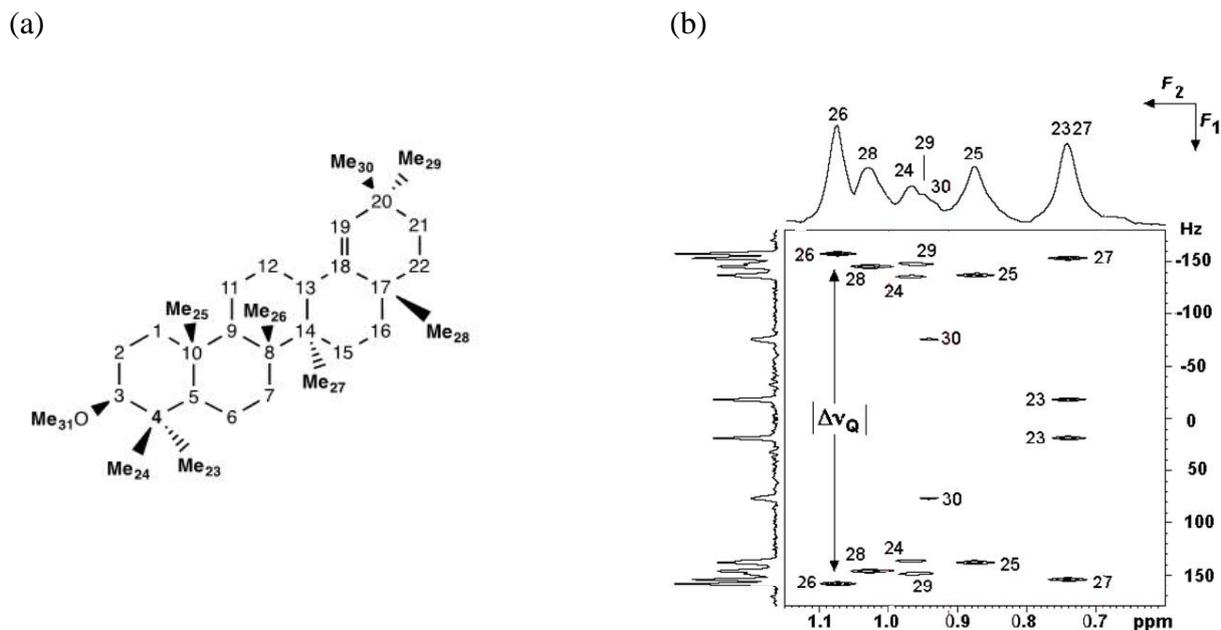


Figure II.16 : (a) Structure chimique de la miliacine, composé chiral énantio pur triterpénique. (b) Spectre 2D Q -résolue Fz tilté DAN- $\{^1\text{H}\}$ (92.1 MHz) centré sur les déplacements chimiques des groupements méthyles de la miliaciane. Toutes les positions méthyles de la molécule sont discriminées sur la base d'une différence de δ^{aniso} et $\Delta\nu_Q$. Figure extraite de la référence [44].

L'étude de la miliacine par RMN 2D DAN (expérience Q -résolue Fz tiltée) dans les cristaux liquides chiraux a permis de discriminer, pour la première fois, l'ensemble des groupements méthyles de la molécule sur la base de leurs déplacements chimiques δ^{aniso} et de leurs éclatements quadrupolaires $\Delta\nu_Q$ (cf. **Figure II.16b**). A l'aide du spectre 2D Q -résolue Fz tilté DAN, tous les signaux ^2H des groupes méthyles ont pu être attribués, y compris les sites méthyles présentant des déplacements chimiques, δ^{aniso} , très proches et donc non discriminés en milieu isotrope (par exemple, les positions 24, 29 et 30 et les positions 23 et 27) [44].

Grâce à cette discrimination, il a été possible de calculer les rapports isotopiques ($^2\text{H}/^1\text{H}$) des neuf sites méthyles visibles de la miliacine. L'étude de la variation des rapports isotopiques ($^2\text{H}/^1\text{H}$) des sites méthyles (variation en cloche) a permis de valider (cf. **Figure II.17a**) que l'étape clé de la synthèse de cette molécule était le couplage de deux entités farnesyl pyrophosphates [44] (cf. **Figure II.17b**).

En conclusion, la RMN 2D DAN- $\{^1\text{H}\}$ en milieu anisotrope chiral peut être considérée comme un outil complémentaire à la RMN-FINS® et/ou comme une alternative. Elle est capable d'apporter de nouvelles informations isotopiques permettant de mieux caractériser ou comprendre les mécanismes de biosynthèse dans de nombreux domaines de la chimie. Elle permet donc d'apporter des réponses spécifiques aux problèmes rencontrés par la communauté des chimistes.

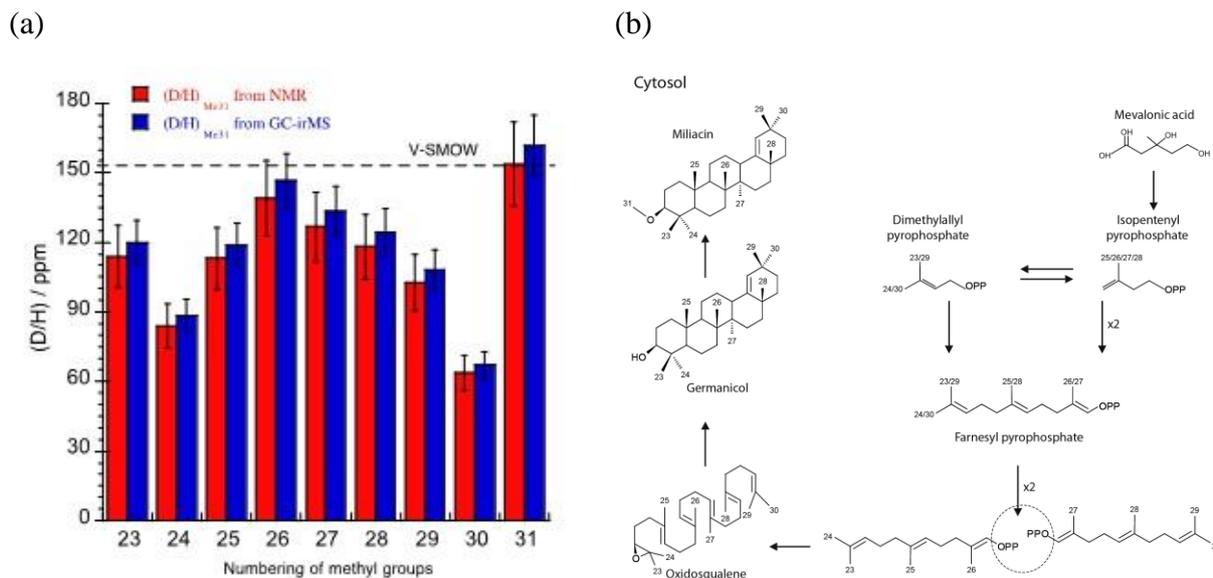


Figure II.17 : (a) Variations des rapports isotopiques ($^2\text{H}/^1\text{H}$) des groupements méthyles de la miliacine obtenues à partir de l'association des informations des mesures RMN DAN anisotrope et isotrope (colonnes rouges), et à partir des mesures anisotropes RMN DAN et GC-SMri (colonne bleue). Noter la très bonne concordance des résultats. Voie synthétique de la miliacine dans le cytosol. Modifiée à partir de la synthèse proposée par Sachse *et al.* [45]. Notez le couplage entre les deux entités farnésyl pyrophosphates qui permet d'expliquer le profil isotopique ($^2\text{H}/^1\text{H}$) observé expérimentalement. Figures extraites de la référence [44].

L'utilisation du protocole RMN-FINS[®] en milieu isotrope a été préférentiellement associée à des problématiques liées à l'agroalimentaire. Parmi elles, la vérification de l'authenticité des produits vendus dans le commerce et donc la lutte contre la contrefaçon est une des thématiques majeures. Cependant, comme nous allons le voir dans les chapitres suivants, certaines molécules d'intérêt ne peuvent être complètement identifiées isotopiquement par RMN 1D DAN en milieu isotrope.

Pour répondre à cet enjeu, l'utilisation de la RMN DAN dans une phase cristal liquide chirale lyotrope s'est révélée essentielle. Deux molécules cibles d'intérêts seront étudiées : i) la vanilline, molécule achirale très utilisée comme arôme (goût de la vanille) dans l'industrie agro-alimentaire ; ii) la frambinone, molécule prochirale, associée à l'arôme de framboise. Ces deux études seront développées respectivement dans les **Chapitres IV et V**.

Références

- [1] Quantitative 2D liquid-state NMR
Giraudeau P.
Magn. Reson. Chem., **2014**, 52, 259–272.
- [2] Challenges and perspectives in quantitative NMR magnetic resonance in chemistry
Giraudeau P.
Magn. Reson. Chem., **2019**, 55, 61–69.
- [3] Understanding the meaning of accuracy, trueness and precision
Menditto A., Patriarca M., Magnusson B.
Accred. Qual. Assur., **2007**, 12, 45-47.
- [4] Accurate quantitative ¹³C NMR Spectroscopy: repeatability over time of site-specific ¹³C isotope ratio determination
Caytan E., Botosoa E., Silvestre V., Robins R.J., Akoka S., Remaud G.
Anal. Chem., **2007**, 79, 8266-8269
- [5] Reference and normalization methods: essential tools for the intercomparison of NMR spectra
Giraudeau P., Tea I., Remaud G., Akoka S.
J. Pharma. Biomed. Anal., **2014**, 93, 3-16.
- [6] Principles of NMR in one and two dimensions
Ernst R., Bodenhausen G., Wokaun A.
Edition Clarendon Press, **1987**.
- [7] Nuclear spin hamiltonian
Levitt M.
Spin dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance, *Edition Wiley*, **2008**, Chap. 8, 171-194
- [8] Dispositif d'analyse quantitative par Résonance Magnétique Nucléaire
Barantin L., Akoka S., Le Pape A.
French Patent CNRS, **1995**.
- [9] Survey and qualification of internal standards for quantification by ¹H NMR spectroscopy
Rundlöf T., Mathiasson M., Bekiroghu S., Hakkarainen B., Bowden T., Arvidsson T.
J. Pharma. Biomed. Anal., **2010**, 52, 645-651.
- [10] Quantitative ¹H NMR with external standards: use in preparation of calibration solutions for algal toxins and other natural products
Burton I.W., Quilliam M.A., Walter J.A.
Anal. Chem., **2005**, 77, 3123-3131.
- [11] A new method for absolute quantitation of MRS metabolites
Barantin L., Le Pape A., Akoka S.
Magn. Reson. Med., **1997**, 38, 179-182.

- [12] Détermination des abondances isotopiques spécifique par RMN-²H et la méthode ERETIC
Le Grand F., Akoka S.
C. R. Chimie, **2004**, *7*, 233–239.
- [13] Concentration measurement by proton NMR using the ERETIC method
Akoka S., Barantin L., Trierweiler M.
Anal. Chem., **1999**, *71*, 2554-2557.
- [14] Kinetic constant measurement by NMR using a calibrated internal signal (ERETIC)
Billault I., Akoka S.
Instrum. Sci. Technol., **2000**, *28*, 233-240.
- [15] The application of the ERETIC method to 2D-NMR
Michel N., Akoka S.
J. Magn. Res., **2004**, *168*, 118-123.
- [16] Determination of deuterium isotope ratios by quantitative ²H NMR spectroscopy: the ERETIC method as a generic reference signal
Billault I., Robins R., Akoka S.
Anal. Chem., **2002**, *74*, 5902-5906.
- [17] Natural abundance ²H-ERETIC-NMR authentication of the origin of methyl salicylate
Le Grand F., George G., Akoka S.
J. Agric. Food Chem., **2005**, *53*, 5125-5129.
- [18] IUPAC: Compendium of chemical terminology
McNaught A.D., Wilkinson A.
Blackwell Scientific Publications, **1997**.
- [19] Handbook of high resolution multinuclear NMR
Brevard C.
Wiley Interscience, **1981**
- [20] High-precision simultaneous determination of multiple small kinetic isotope effects at natural abundance
Singleton D.A., Thomas A.A.
J. Am. Chem. Soc., **1995**, 9357-9393
- [21] Isotope ratio mass spectrometry – history and terminology in brief
Flenker U.
Drug Testing and Analysis, **2012**, *4*, 394-398.
- [22] Detection of exogenous sugars or organic acids addition in pineapple juices and concentrates by ¹³C IRMS analysis
Jamin E., Gonzalez J., Remaud G., Naulet N., Martin G.G.
J. Agric. Food Chem., **1997**, *45*, 3961-3967.
- [23] Evidence for a nonstatistical carbon isotope distribution in natural glucose
Rossmann A., Butzenlechner M., Schmidt H.L.
Plant. Physiol., **1991**, *96*, 609-615.
- [24] Comparison of isotopic fractionation in lactic acid and ethanol fermentations
Zhang B-L., Fallourd V., Role C., Martin G.J.
Bioorganic Chem., **2003**, *31*, 227-236.

- [25] Assessing transformation processes of organic contaminants by compound-specific stable isotope analysis
Hofstetter T.B., Berg M.
Trends. Anal. Chem., **2011**, 30, 618-627.
- [26] The new face of isotopic NMR at natural abundance
Jézéquel T., Joubert V., Giraudeau P., Remaud G., Akoka S.
Magn. Res. Chem., **2017**, 55, 77-90.
- [27] Deuterium labelling at the natural abundance level as studied by high field quantitative ^2H NMR
Martin G.L., Martin M.L.
Tetrahedron Lett., **1981**, 22, 3525-3528.
- [28] Detection of sophisticated adulterations of natural vanilla flavors and extracts: application of the SNIF-NMR method to vanillin and p-hydroxybenzaldehyde
Remaud G., Martin Y.L., Martin G.G., Martin G.J.
J. Agric. Food Chem., **2017**, 45, 859-866.
- [29] The application of SNIF-NMR and IRMS combined with C, H and O isotopes for detecting the geographical origin of chinese wines
Wei J., Jie X., Xiang L., De-Liang W., Yang G.
Int. J. Food. Sci. Techno., **2014**, 50, 774-781.
- [30] The site-specific natural isotope fractionation-NMR method applied to the study of wines
Martin G.J., Martin M.L.
Wine Analytics, **1988**, Edition Springer, Berlin Heidelberg, pp. 258-275.
- [31] Office international de la vigne et du vin (OIVV)
2001
- [32] Isotopic analysis of some romanian wines by ^2H NMR and IRMS
Pirna A., Bogdan M., Magdas D., Statescu D.
Food Biophys., **2013**, 8, 24-28.
- [33] Determination of site-specific (deuterium/hydrogen) ratios in vanillin by ^2H -nuclear magnetic resonance spectrometry: collaborative study
Jamin E., Martin F., Martin G.G.
J. AOAC Int., **2007**, 90, 187-195.
- [34] Analysis of NAD 2D-NMR spectra of saturated fatty acids in polypeptide aligning media by experimental and modeling approaches
Serhan Z., Billault I., Borgogno A., Ferrarini A., Lesot P.
Chem. Eur. J., **2012**, 18, 117-126.
- [35] Multinuclear NMR in polypeptide liquid crystals: three fertile decades of methodological developments and analytical challenges
Lesot P., Aroulanda C., Berdagué P., Meddour A., Merlet D., Farjon J., Giraud N., Lafon O.
Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc., **2019**, sous presse,
DOI: 10.1016/j.pnmrs.2019.10.001.

- [36] Exploring the analytical potential of NMR spectroscopy in chiral anisotropic media for the study of the natural abundance deuterium distribution in organic molecules
Lesot P., Aroulanda C., Billault I.
Anal. Chem., **2004**, 76, 2827-2835.
- [37] Recent advances in the analysis of the site-specific isotopic fractionation of metabolites such as fatty acids using anisotropic natural abundance ^2H NMR spectroscopy: Applications to conjugated linolenic methyl esters
Lesot P., Serhan Z., Billault I.
Anal. Bioanal. Chem., **2011**, 399, 1187-1200.
- [38] Analytical contribution of NAD 2D-NMR spectroscopy in polypeptide mesophases to the investigation of triglycerides
Lesot P., Serhan Z., Aroulanda C., Billault I.
Magn. Reson. Chem., **2012**, 50, S2-S11.
- [39] Assignment of absolute configuration of natural abundance signals associated with (*R*)- and (*S*)-enantiotopomers in a fatty acid aligned in a chiral liquid crystal: enantioselective synthesis and NMR analysis
Baillif V., Billault I., Robins R.J, Lesot P.
J. Am. Chem. Soc., **2006**, 128, 11180-11187.
- [40] Determination of the natural deuterium distribution of fatty acids by application of ^2H 2D-NMR in liquid crystals: fundamentals, advances, around and beyond
Lesot P.
Liquid Crystal, **2019**, <https://doi.org/10.1080/02678292.2019.1613685>.
- [41] Complete determination of natural site-specific enantio-isotopomeric excesses in linoleic acid using natural abundance deuterium 2D NMR in polypeptide mesophases
Lesot P., Martel L., Serhan Z., Billault I.
Chem. Comm., **2010**, 46, 6599-6601.
- [42] Investigation of fatty acid elongation and desaturation steps in *fusarium lateritium* by quantitative two-dimensional deuterium NMR spectroscopy in chiral oriented media
Baillif V., Robins R.J, Le Feunten S., Lesot P., Billault I.
J. Biol. Chem., **2009**, 284, 10783-10792.
- [43] Carbon isotope evidence for sedimentary miliacin as a tracer of *Panicum miliaceum* (broomcorn millet) in the sediments of lake le Bourget (french Alps)
Jacob J., Disnar J-R., Bardoux G.
Org. Geochem., **2008**, 39, 1077-1080.
- [44] Contribution of NAD 2D-NMR in liquid crystals to the determination of hydrogen isotope profile of methyl groups in miliacin
Berdagué P., Lesot P., Jacob J., Terwillinger V.J., Le Milbeau C.
Geochim. Cosmochim. Acta, **2016**, 173, 337-351.
- [45] δD values of individual n-alkanes from terrestrial plants along a climatic gradient – Implications for the sedimentary biomarker record
Sachse D., Radke J., Gleixner G.
Org. Geochem., **2006**, 37, 469-483.

Chapitre III

Nouvelles méthodologies d'analyses RMN dans les cristaux liquides chiraux

1. Les techniques de suppression sélective des signaux du solvant en RMN

Dans ce **Chapitre III**, nous allons aborder différents aspects méthodologiques de la RMN 2D DAN en milieu orienté, notamment la suppression du signal du co-solvant organique dans les phases polypeptides lyotropes.

1.a. Introduction

En RMN classique ^1H ou ^{13}C en milieu isotrope ou anisotrope, tout échantillon est préparé en solubilisant le soluté dans un solvant organique enrichi isotopiquement en deutérium. En pratique, la masse de soluté introduite est généralement beaucoup plus faible que la quantité de solvant (entre 1 et 5 mg de produit pour 400 à 600 mg de solvant). En présence de solvant deutéré, le spectre RMN ^1H ou ^{13}C est composé uniquement des signaux du soluté.

Cependant, plusieurs thématiques de recherches autour de la biologie et de la biochimie (études d'acides aminés, de protéines, d'ADN, d'ARN, ...) nécessitent une solution aqueuse et limite le choix du solvant à l'eau. De plus, il peut être nécessaire d'utiliser un mélange binaire $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$. Dans ces échantillons, le poids moléculaire élevé des solutés et la forte concentration en solvant protoné conduit à une concentration largement plus faible pour les molécules d'intérêt que pour l'eau et donc des densités de spin très différentes dans l'échantillon. Ce large excès d'eau peut poser plusieurs problèmes pour les mesures RMN [1].

Tout d'abord, le gain du récepteur (paramètre RG) du spectromètre RMN devra être sélectionné à une faible valeur afin de ne pas saturer le récepteur à cause de la très grande intensité des signaux de l'eau. Dans ces circonstances, le convertisseur de signal analogique en digital (CAN) (ou analogue-to-digital converter ou ADC) sera calibré sur la résonance de l'eau (le signal le plus intense) et les signaux associés au soluté risquent de ne pas être correctement digitalisés (déformation des raies, disymétrisation, déphasage) par un manque de résolution « électronique » de l'ADC (inférieure à la différence de tension (en V)) détectable par l'ADC et convertissable en valeur digitale (codée entre 12 et 16 bits) [2].

Deux autres problématiques peuvent être également citées : i) le signal très intense de l'eau (ou du solvant protoné) peut recouvrir certains signaux du soluté et donc conduire à une perte conséquente d'informations spectrales limitant l'interprétation du spectre RMN ; ii) la forte densité des spins de l'eau peut causer un phénomène de « radiation damping » (RD) mettant en jeu un nouveau mécanisme de relaxation. Cet effet, combiné aux mécanismes de relaxation classique en RMN (dipolaire, ...), diminue le temps de relaxation des spins de l'eau et donne un signal RMN considérablement élargi [3, 4]. Afin d'obtenir des spectres RMN ^1H exploitables des solutés dissous en phase aqueuse, des solutions ont été proposées pour éliminer/diminuer significativement l'intensité du signal ^1H de l'eau. Les premières études,

menées dès les années 1970 [5-7], ont conduit au développement de nombreuses séquences d'impulsion de saturation sélective du signal de l'eau.

1.b. Séquence de saturation sélective utilisée en RMN isotrope

1.b.i. *Les premières techniques de saturation*

Historiquement, les premières approches connues autour de la saturation sélective consistent à une pré-saturation de l'eau à partir d'une impulsion radiofréquence sélective durant le classique délai de relaxation D_1 [5, 8-10]. Cependant, les phénomènes de relaxation croisée et/ou d'échange chimique des signaux entre le soluté et l'eau altèrent le spectre du soluté (distorsion de phase). En effet, la plupart des signaux affectés disparaissaient du spectre RMN et la caractérisation du composé devient difficile [11].

Des techniques alternatives ont été développées en empêchant sélectivement l'excitation des spins de l'eau [12] ou en permettant la saturation du signal en quelques millisecondes avant la détection du signal du soluté [13-15]. A partir de ces dernières, le principe de saturation sélective devient le modèle de référence pour la suppression de signal du solvant. Malheureusement, la majorité de ces séquences d'impulsions sélectives cause une excitation sélective non-uniforme et une distorsion de la ligne de base pouvant réduire considérablement la qualité de la suppression sélective.

1.b.ii. *La séquence WATERGATE*

Le développement et la mise en place des gradients de champ magnétique sur les instruments de RMN ont permis le développement de méthodes de suppression sélective de l'eau *via* un transfert de cohérence double-quantum (DQ) [16-17] ou *via* une différence de diffusion entre l'eau et les molécules d'intérêt [18].

Dans les années 1990, une technique de saturation sélective a été développée en combinant impulsions sélectives (SP pour *Shape Pulse*) et gradients de champ magnétique. Cette association conduit à une suppression sélective de l'eau relativement efficace sans génération de transition multi-quanta. Cette séquence d'impulsion (publiée en 1992) est appelée WATERGATE pour « WATER suppression by GrAdient-Tailored Excitation » [19]. Elle est présentée sur la **Figure III.1**. Cette séquence présente l'avantage de pouvoir être introduite dans n'importe quelles séquences RMN 1D ou 2D détectant les cohérences simple-quantum (SQ) ^1H du soluté.

En pratique, la séquence se comporte comme un écho de spin encadré par deux gradients de champ magnétique noté G (*cf.* **Figure III.1**). Dans la première partie, une impulsion radiofréquence 90° excite uniformément l'ensemble des résonances quels que soient leurs déplacements chimiques. Après l'application du premier gradient de champ magnétique, l'ensemble des cohérences des systèmes de spins de l'échantillon (le soluté et le solvant) sont déphasés. L'impulsion sélective de 90° transfère l'aimantation des spins de l'eau

sur l'axe $-z$. Après l'impulsion dure de 180° qui affecte tous les spins, la seconde impulsion sélective retransfère l'aimantation des spins de l'eau sur le plan transversal. Cependant, la rotation de l'aimantation des spins de l'eau sera inversée par rapport à celle des spins du soluté. L'effet du second gradient de champ magnétique empêche le rephasage des résonances du solvant à la différence des résonances du soluté. Afin de minimiser les effets de relaxation et de couplage, cet écho doit rester le plus court possible [19].

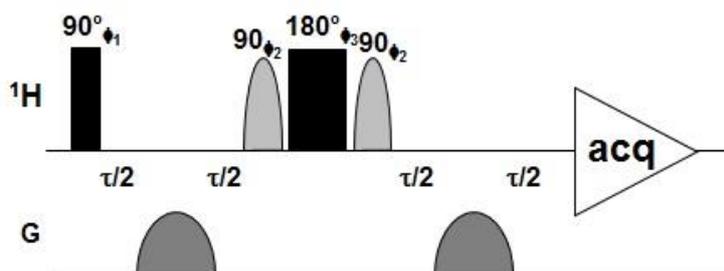


Figure III.1 : Schéma d'impulsion de la séquence de saturation sélective de type WATERGATE (WATER suppression by GRAdient Tailored Excitation). Les impulsions de radiofréquences et les gradients de champ magnétique (axe z) sont séparés sur deux lignes. ($\phi_1 = x, x, x, x$, $\phi_2 = -y, -y, -y, -y$ et $\phi_3 = y, y, y, y$).

Pour améliorer la qualité de la suppression (augmentation de la sélectivité de la suppression) l'utilisation d'un double écho a été proposé (cf. **Figure III.2**) [20]. Cependant, cette approche présente une durée globale des impulsions doublée mais aussi une baisse de l'intensité des pics les plus proches de la résonance du solvant.

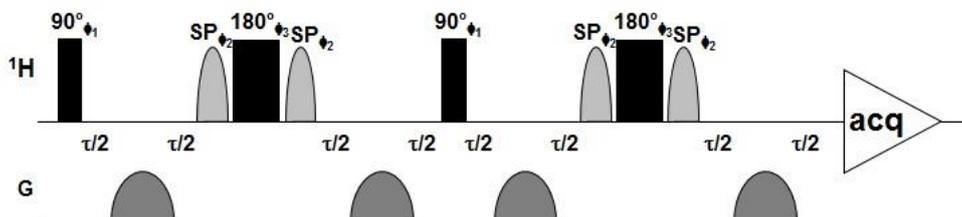


Figure III.2 : Schéma d'impulsion de la séquence de saturation sélective de type double-WATERGATE. Les impulsions radiofréquences et les gradients de champ magnétique sont séparés sur deux lignes. ($\phi_1 = x, x, x, x$, $\phi_2 = -y, -y, -y, -y$ et $\phi_3 = y, y, y, y$).

Plus récemment, de nouveaux développements ont montré que la séquence de saturation WATERGATE pouvait être utilisée sans affecter les signaux ^1H dans le voisinage du signal de l'eau [21-22].

1.b.iii. Description de la séquence WET

Dans les études RMN *in vivo*, les techniques décrites précédemment pour éliminer le signal de l'eau présentent des limites. Celles-ci sont liées : i) aux inhomogénéités du champ magnétique de la bobine B_1 lors de la suppression de l'eau ; ii) aux différences de temps de relaxation $T_1(^1\text{H})$ du soluté par rapport au $T(^1\text{H})$ de l'eau.

Une alternative à la technique de saturation « WATERGATE » ^1H a été développée en 1994 [23]. Celle-ci consiste en un train d'impulsions de radiofréquences sélectives (4 SP)

entrecoupées par une succession gradient de champ magnétique (G), quatre au total. Cette technique permet d'annuler la composante longitudinale de l'aimantation de l'eau et donc de s'affranchir de son temps de relaxation T_1 . Cette nouvelle séquence est appelée « WET » pour « *Water suppression Enhanced through T_1 effects* » [23].

Initialement, cette séquence d'impulsion sélective a été développée après une analyse des équations de Bloch [23]. En effet, ces calculs ont montré que les effets (indésirables) de la saturation sélective sur les paramètres T_1 et B_1 sont inexistantes lorsque l'on combine quatre impulsions radiofréquence sélectives (SP) centrées autour de l'angle de 90° . Chaque impulsion RF sélective est succédée par un gradient de champ magnétique G [23]. La séquence d'impulsion du bloc de saturation sélective WET est présentée sur la **Figure III.3**.

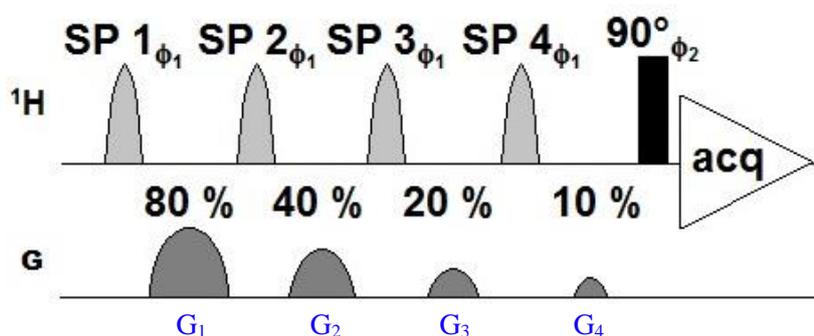


Figure III.3 : Schéma d'impulsion de l'expérience RMN 1D avec une saturation WET.

Pour améliorer l'efficacité de la saturation de cette séquence, il a été démontré ultérieurement, que les angles associés aux quatre impulsions sélectives devaient être respectivement égaux à $81,4^\circ$, $101,4^\circ$, $69,3^\circ$ et $161,0^\circ$. Chaque impulsion sélective est suivie d'un gradient d'impulsion. Pour être le plus efficace possible, il est nécessaire que ces gradients de champ magnétique soient successivement divisés de moitié, tel que : $G_2 = \frac{1}{2} G_1$; $G_3 = \frac{1}{2} G_2$ et $G_4 = \frac{1}{2} G_3$ [24].

1.c. Application dans les phases orientées lyotropes

Dans les phases lyotropes CLA ou CLC, la concentration (ou masse utilisée) en co-solvant organique est beaucoup plus importante que celle du soluté (comme en milieu isotrope), soit environ de 400 à 700 mg de solvant pour 30 à 100 mg de soluté. En conséquence, les spectres RMN 2D QUOSY ^2H - $\{^1\text{H}\}$ présentent un doublet quadrupolaire (DQ) ^2H du co-solvant organique beaucoup plus intense que les DQ(^2H) du soluté.

Pour les signaux DAN- $\{^1\text{H}\}$ de très faibles intensités, les problèmes dus au convertisseur analogique-digital (CAN ou ADC) du spectromètre peuvent diminuer la qualité des signaux DAN du soluté. A titre d'exemple, la différence d'intensité des DQ(^2H)s des directions énantiotopes de la frambinone et celui du CH_2Cl_2 du co-solvant sur le spectre 2D Q -résolue Fz de la frambinone est clairement visible (cf. **Figure III.4**). Ces différences ont

pour origine : i) la différence molaire entre co-solvant et soluté, ii) la différence entre nombre d'isotopomères monodeutérés inéquivalents contribuant au signal DAN (deux sites ^1H pour le

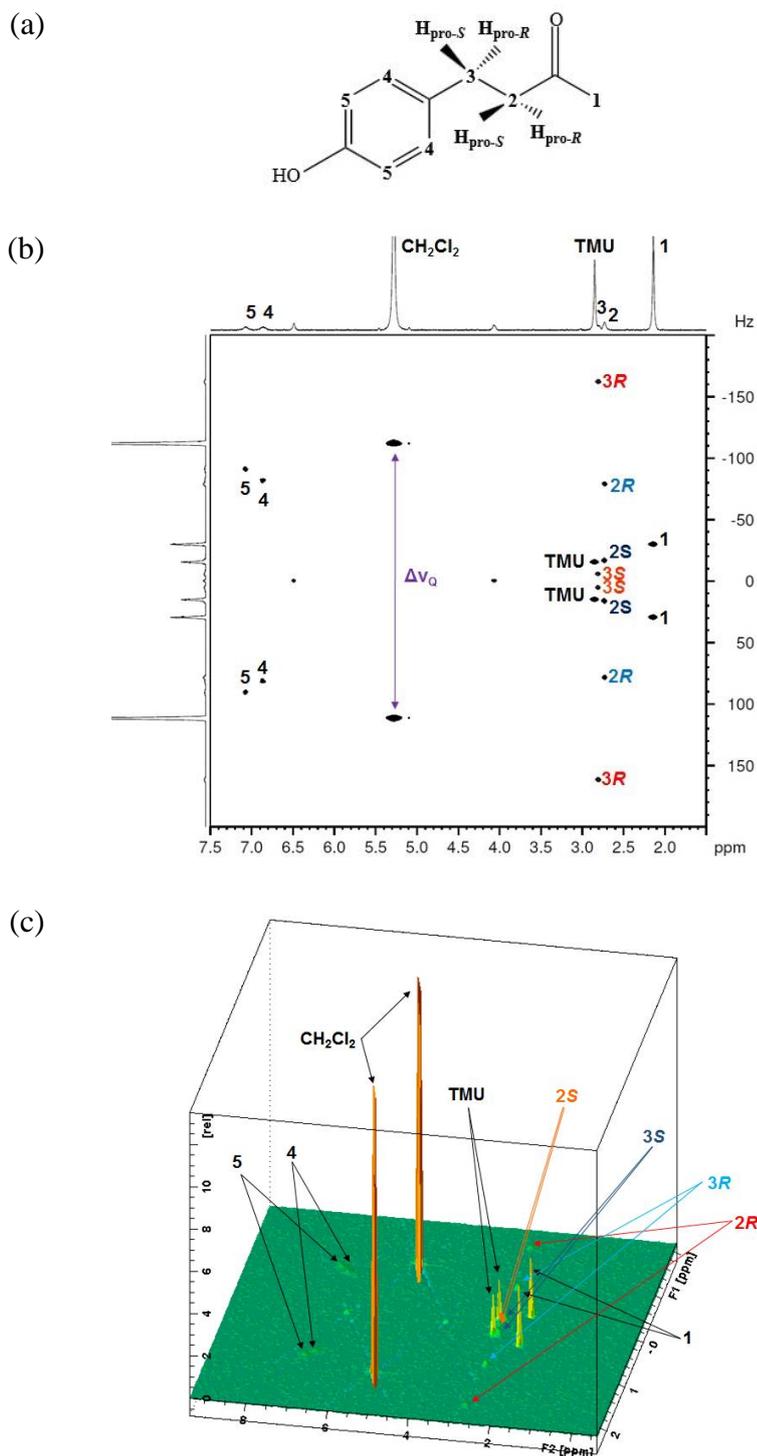


Figure III.4 : (a) Structure de la frambinone. (b) Spectre RMN 2D Q -résolue Fz tilté de la frambinone dans la phase PBLG/ CH_2Cl_2 - CCl_4 enregistré en 16 heures ($\text{NS} = 64$, $\text{TD}_1 = 400$ / $\text{TD}_2 = 3684$, $\text{AQ} = 2\text{s}$, $\text{D}_1 = 0,05$ s). Sur les spectres, les signaux correspondant aux positions énantiotopes des groupements méthylène ont une intensité très faible par rapport au DQ du co-solvant. Leurs attributions stéréochimiques R/S sont définies arbitrairement. (c) Représentation 3D du spectre 2D Q -résolue Fz.

co-solvant et un site ^1H correspondant aux directions énantiotopes (discriminées) du soluté ($2R, 2S, 3R, 3S$); iii) de possibles différences de rapport isotopique entre les sites du soluté de du co-solvant $(^2\text{H}/^1\text{H})_i \neq (^2\text{H}/^1\text{H})_j \neq (^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{co-solvant}} \neq (^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{V-SMOW}}$; et iv) des différences de temps de relaxation transversale effectif, $T_2^*(^2\text{H})$, avec ici, $T_2^*(^2\text{H})_{\text{analyte}} < T_2^*(^2\text{H})_{\text{co-solvant}}$.

Pour diminuer la concentration d'un co-solvant protoné, il est possible de le substituer par un co-solvant non protoné comme le tétrachlorométhane (CCl_4). Cependant, ce choix est limité car CCl_4 ne solubilise pas le polypeptide PBLG et ne permet donc pas d'obtenir une phase cristal-liquide lyotrope. C'est pourquoi, le meilleur compromis consiste à préparer un mélange de CH_2Cl_2 et CCl_4 dans les proportions massique 50 % / 50 % afin de réduire de moitié l'intensité des signaux du co-solvant organique, tout en conservant une phase cristal-liquide homogène. Cette approche a été utilisée pour étudier la vanilline (cf. **Chapitre IV**). Cependant, cet apport de solvants chlorés rend les phases CLC plus visqueuses, ce qui peut induire des élargissements de raies significatifs et donc mener à une diminution de la résolution des spectres DAN anisotropes.

Dans ces conditions, il est intéressant de mettre en place une saturation sélective du $\text{DQ}(^2\text{H})$ du co-solvant organique ($\text{CHCl}_3, \text{CH}_2\text{Cl}_2$ ou TMU), comparable à la suppression de l'eau dans les échantillons isotropes biologiques (en utilisant des séquences de saturation comme la séquence « WATERGATE » ou « WET »).

2. Suppression sélective des signaux du co-solvant en milieu cristal liquide chiral

La technique la plus simple pour supprimer sélectivement un signal RMN (comme la résonance d'un solvant) consiste à appliquer une impulsion 90° centrée sur le signal à éliminer, suivi d'une impulsion de 90° non sélective (impulsion dure) (cf. **Figure III.5**). Dans ce schéma, les spins associés au signal indésirable (sélectionné) vont basculer d'un angle global de 180° , contrairement aux autres spins de l'échantillon qui basculeront dans le plan transversal (plan xy) après l'impulsion dure de 90° . Ils seront donc observables lors de l'acquisition du signal, contrairement aux spins du solvant.

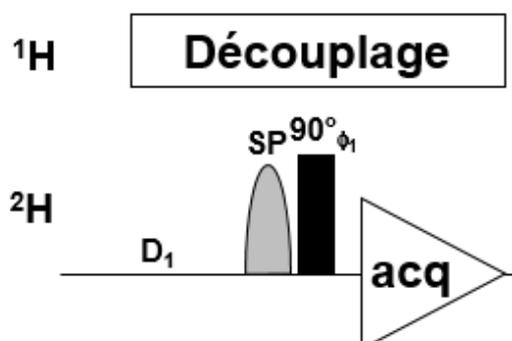


Figure III.5 : Séquence d'impulsion d'une expérience 1D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ avec une saturation sélective du co-solvant.

Dans les CLA et CLC lyotropes, les signaux indésirables correspondent principalement au DQ(^2H) du co-solvant organique. Pour étudier les effets d'une saturation sélective sur ce DQ(^2H), il convient de procéder en deux étapes : i) la saturation d'une des deux composantes du DQ ; ii) la saturation des deux composantes du DQ. Dans le premier cas, on peut imaginer qu'une seule composante soit supprimée (ou diminuée en intensité), alors que la seconde ne sera pas affectée (ou affectée partiellement).

En RMN, il existe plusieurs formes d'impulsion sélective (gaussienne, semi-gaussienne, sinus cardinal, ...) [25]. Chacune présente des caractéristiques de sélections particulières. L'analyse des propriétés des différentes formes d'impulsions sélectives nous a conduits à choisir des impulsions de type « sinus cardinal » qui présente une sélectivité accrue par rapport à d'autres formes. En mathématique, la fonction « sinus cardinal », notée sinc, est définie à partir de la fonction trigonométrique « sinus ». L'équation de cette fonction est de la forme :

$$\text{Sinc}(x) = \frac{\text{Sin}(x)}{x} \quad (\text{III.1})$$

La forme de cette impulsion mathématique est tracée sur la **Figure III.6**. Dans la suite de ce manuscrit, toutes les impulsions sélectives appliquées seront construites sur la base d'un profil d'excitation de type « sinus cardinal ».

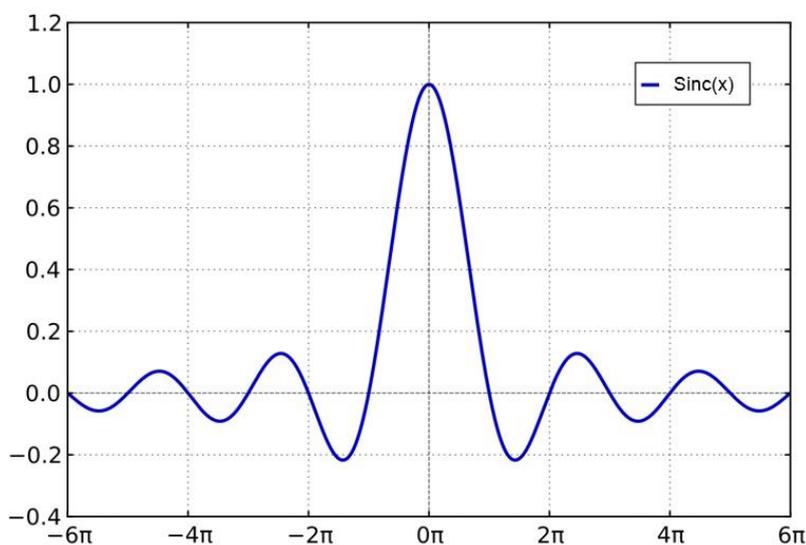


Figure III.6 : Représentation d'une fonction de type « sinus cardinal ».

2.a. Suppression d'une composante du DQ du co-solvant

Pour comprendre l'effet de la saturation sélective sur l'une des deux composantes (blindée ou déblindée) d'un DQ(^2H) comme celui du co-solvant, il est nécessaire de comparer les spectres RMN 1D ^2H avec et sans impulsion sélective appliquée, et de les analyser en termes de rapport signal-sur-bruit (S/B). Pour cette étude, un échantillon RMN d'acétone- d_6

(45,6 mg) dissous la phase PBLG/ CDCl_3 (99,0 mg / 609,9 mg) a été préparé. L'impulsion sélective utilisée (sinus cardinal) est caractérisée par une durée de 100 ms et une puissance de $1,99 \times 10^{-5}$ W (47 dB).

Comme on le voit sur les spectres 1D RMN ^2H de cet échantillon (cf. **Figure III.7a/b** et **Figure III.8a/b**), l'application de l'excitation sélective sur l'une des deux composantes induit une réduction sensible du rapport signal sur bruit S/B (moyenne sur des deux composantes) du DQ(^2H) du chloroforme- d_1 ($(\text{S/B})_{\text{CDCl}_3} = 24150$ contre 47700 pour le spectre de référence sans saturation appliquée) sans affecter le DQ(^2H) celui de l'acétone- d_6 ($(\text{S/B})_{\text{acétone}} \approx 3800$).

Initialement, les premières réflexions menées autour de la saturation d'une composante du DQ du co-solvant organique laissaient penser que la composante affectée par l'impulsion sélective devait être intégralement supprimée, tandis que l'intensité de la seconde composante ne serait pas affectée. Expérimentalement, l'analyse des résultats montre que : i) la composante affectée par l'impulsion sélective, reste visible ; ii) le rapport (S/B) (moyen) mesuré sur les deux composantes du DQ(^2H) du co-solvant est réduit de moitié (environ).

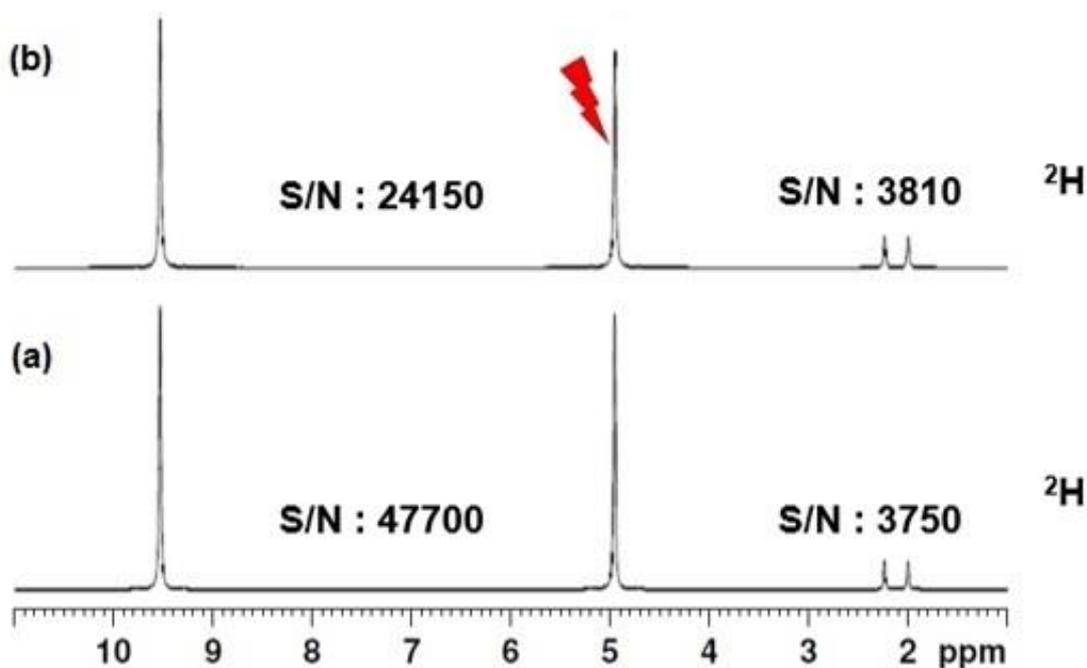


Figure III.7 : Spectres RMN 1D ^2H - $\{^1\text{H}\}$ de l'acétone- d_6 dans une phase PBLG/ CDCl_3 à 300 K (NS = 16, AQ = 2 s et $T_R = 2,5$ s): (a) Sans saturation sélective, (b) Avec une impulsion sélective (unique) centrée sur la résonance blindée de CDCl_3 ($\Delta\nu_Q = 422$ Hz) à 4,97 ppm (indiquée par la flèche rouge).. L'impulsion sélective (sinus cardinal) a une durée de 100 ms pour une puissance de $1,99 \times 10^{-5}$ W (47 dB). Les deux expériences 1D ont été obtenues avec la même valeur de RG et un filtrage exponentiel de 0,6 Hz a été appliqué.

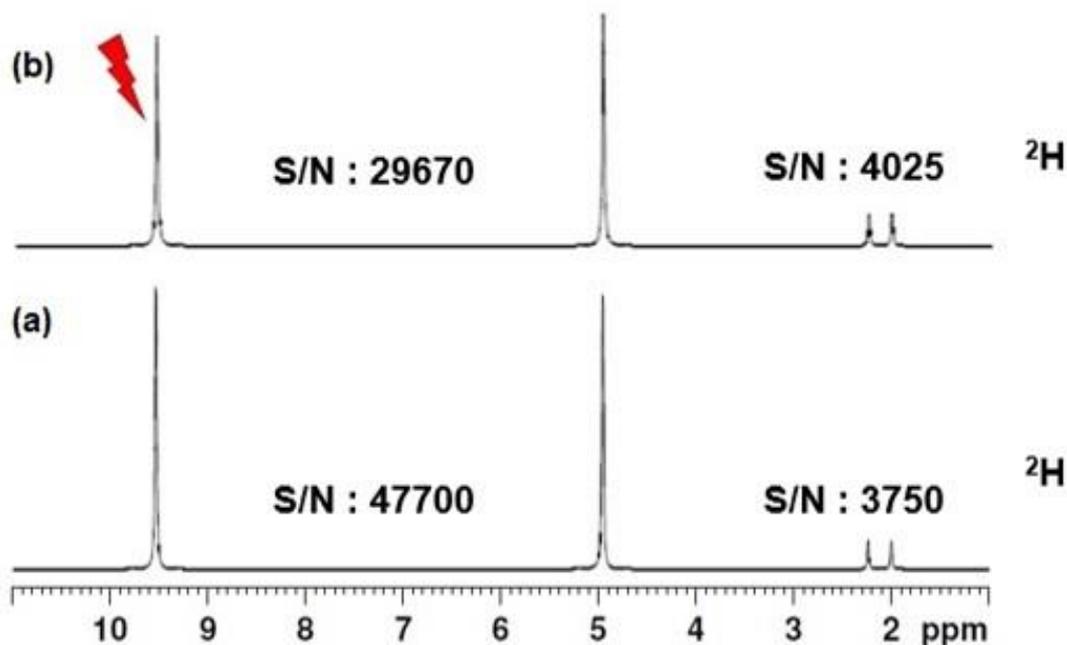


Figure III.8 : Spectre RMN 1D ^2H - $\{^1\text{H}\}$ de l'acétone- d_6 dans la phase PBLG/ CDCl_3 à 300 K: (a) Sans saturation sélective, (b) Avec une impulsion sélective (unique) centrée sur la résonance déblindée de CDCl_3 ($\Delta\nu_Q = 422$ Hz) à 9,55 ppm (indiquée par la flèche rouge). Les conditions expérimentales RMN sont identiques à celles mentionnées dans la légende de la **Figure III.7**.

Pour tenter d'expliquer simplement ce phénomène de manière qualitative, nous pouvons revenir sur le diagramme d'énergie associé à un noyau deutérium isolé (spin $I = 1$) qui se décompose en trois niveaux d'énergies ($m_z = -1, 0, 1$) (cf. **Figure III.9.Ia**). En milieu isotrope, les transitions SQ entre les niveaux d'énergie α et β ($\alpha \rightarrow \beta$) et β et γ ($\beta \rightarrow \gamma$) ne sont pas différenciables (même ΔE) et un unique signal RMN de fréquence unique, ν_i ($\nu_i = \Delta E/h$) apparaît. En milieu anisotrope (cf. **Figure III.9.Ib.**), les effets de stabilisation et la déstabilisation des niveaux d'énergie dus à \mathcal{H}_Q entraînent l'apparition des doublets quadrupolaires ^2H (cf. **Figure I.16**).

En accord avec la loi de distribution de Boltzmann (cf. **Equation III.2**), les populations de spins sur les trois niveaux d'énergies sont distribuées, telles que :

$$\frac{N_i}{N_{\text{tot}}} = \frac{g_i \times e^{-\frac{E_i}{k_B T}}}{\sum_i g_i \times e^{-\frac{E_i}{k_B T}}} \quad \text{(III.2)}$$

Dans cette équation, N_i correspond au nombre de spins occupant un état magnétique i , N_{tot} correspond à l'ensemble des spins du système, E_i correspond au niveau d'énergie de l'état i , g_i correspond au phénomène de dégénérescence dans le cas où le niveau d'énergie E_i présente plusieurs états, k_B est la constante de distribution de Boltzmann et T est la température du système du système.

Dans la mesure où les trois niveaux d'énergies, E_α , E_β et E_γ , associés aux trois états de spin (α , β et γ) croissent de l'état α à l'état γ , c'est-à-dire :

$$E_\alpha < E_\beta < E_\gamma, \quad \text{(III.3)}$$

on obtient la distribution des spins sur les trois niveaux d'énergies suivante :

$$P_\alpha > P_\beta > P_\gamma \quad \text{(III.4)}$$

où P_α , P_β et P_γ correspondent à la population de spins associés aux niveaux d'énergie α , β et γ , respectivement. Cette situation est vraie en milieu isotrope et anisotrope (cf. **Figure III.9.Ia et III.9.Ib**).

Pour comprendre le phénomène observé en RMN ^2H , nous devons nous rappeler qu'une transition RMN (entre deux niveaux d'énergie) n'est observable que si, et seulement si, il existe une différence de population de spin entre ces niveaux d'énergie. Si à l'état d'équilibre (initial), les populations de spin sont déjà égales, il n'y a pas de transition possible et donc pas signal RMN détectable à la fréquence de cette transition.

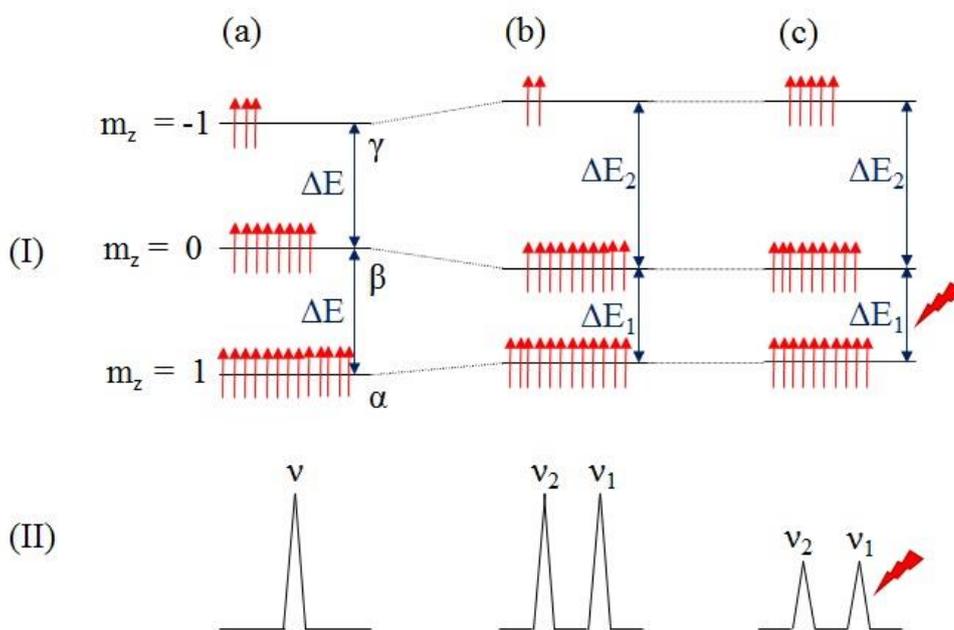


Figure III.9 : (I) Représentations schématiques des distributions de spins sur les trois niveaux d'énergie d'un noyau ^2H isolé ($I=1$) (à un état initial donné) : (a) distribution de spins associée à l'état initial pour un échantillon isotrope, (b) distribution de spins associée à l'état initial d'un échantillon anisotrope, (c) distribution de spins attendue juste après la saturation sélective sur une transition (ν_1). Comme nous le voyons, les populations de spin sur les trois niveaux sont différentes. (II) Signal RMN 1D ^2H attendu après une excitation du système à l'aide d'une impulsion dure 90° . Comme représenté ici, un QD(^2H) reste observable.

Pour un noyau isolé de spin $I = 1/2$ ($m_z = -1/2$ (α) et $m_z = 1/2$ (β) en milieu isotrope ou orienté, l'effet d'une excitation sélective (saturation) à la fréquence de la transition de spin ($\alpha \rightarrow \beta$), conduit à redistribuer les spins sur les deux niveaux d'énergie en les égalisant ($P_\alpha = P_\beta$). Pour un noyau isolé de spin $I = 1$ ($m_z = -1$ (α), $m_z = 0$ (β) et $m_z = 1/2$ (γ)) en milieu anisotrope, la situation est plus complexe. En effet, l'effet de l'excitation d'une seule transition sur les deux possibles (par exemple, la transition $\alpha \rightarrow \beta$, et correspondant à la composante du DQ associée ν_1), conduit à une redistribution des spins sur les trois niveaux d'énergie α , β et γ ($\alpha \rightarrow \beta$ et $\beta \rightarrow \gamma$), sans pour autant égaliser les populations de spin des niveaux d'énergie α et β ($P_\alpha \neq P_\beta$) (cf. **Figure III.9.Ic**). Le même effet existe quand l'autre transition ($\beta \rightarrow \gamma$) est excitée sélectivement, avec $P_\beta \neq P_\gamma$.

Comme l'impulsion sélective sur l'une des deux transitions (une des composantes du DQ) conduit toujours une répartition différenciée des populations ($P_\alpha \neq P_\beta \neq P_\gamma$), il ne peut avoir ni l'élimination des deux composantes du DQ, ni même simplement l'élimination de la composante excitée sélectivement. L'effet d'une impulsion monosélective conduit uniquement à une diminution de l'intensité du DQ comparée au spectre 1D ^2H sans saturation sélective enregistrée dans les mêmes conditions (cf. **Figure III.9.IIb** et **III.9.IIc**), comme nous l'avons observé expérimentalement. Dans ces conditions, et compte tenu de cette analyse phénoménologique, il semble essentiel de réaliser une excitation sélective simultanément sur les composantes du DQ (les deux transitions ν_1 et ν_2) du co-solvant pour potentiellement supprimer complètement les signaux. Cette excitation sélective simultanée sera nommée « doublement sélective » dans la suite de ce travail.

2.b. Suppression sélective sur les deux composantes du DQ

2.b.i. *Application de la double impulsion sélective*

Grâce aux outils disponibles sur le logiciel associé aux spectromètres RMN Bruker (logiciel Topspin), il est possible de construire des impulsions doublement sélectives (shape pulse) qui permettent d'être simultanément sélectives sur les deux résonances d'un DQ(^2H). Pour ce faire, il est nécessaire de construire une première impulsion sélective ^2H centrée sur une résonance donnée (par exemple la composante blindée à 5 ppm de la **Figure III.7.b**). Dans un second temps, une seconde impulsion sélective ^2H centrée sur la résonance déblindée est construite (à 9.5 ppm sur la **Figure III.8.b**). Lorsque ces deux impulsions sélectives ont été construites, elles sont ensuite additionnées afin de créer une impulsion doublement sélective ^2H qui permettra le basculement de l'aimantation des deux résonances simultanément. Le protocole de construction (informatique) d'impulsions doublement sélectives est présenté en **Annexe B** du manuscrit.

L'effet d'une excitation doublement sélective est clairement visible sur la **Figure III.10b**. Le résultat conduit à une réduction significative de l'intensité des composantes, et par conséquent, une réduction du rapport signal-sur-bruit du co-solvant organique d'environ

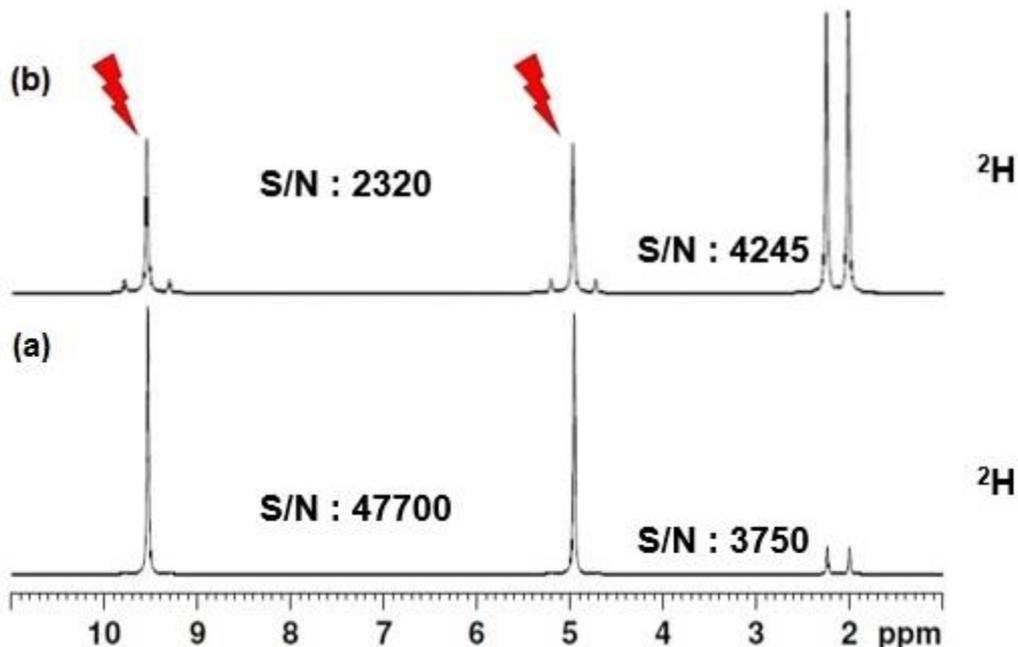


Figure III.10 : Spectre RMN 1D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ d'un échantillon d'acétone- d_6 dans PBLG/ CDCl_3 à 300 K (NS = 16, AQ = 2 s et $T_R = 2,5$ s) : (a) sans saturation sélective, (b) avec une impulsion doublement sélective unique (angle de 90°) centrée sur les deux résonances du DQ du CDCl_3 , soit 4,97 et 9,55 ppm ($\Delta\nu_Q$: 422 Hz), et indiquée par les deux flèches rouges (cf. la séquence de la **Figure III.5**). La durée d'impulsion sélective (sinus cardinal) est égale à 100 ms pour une puissance de $1,99 \times 10^{-5}$ W (47 dB). Les deux expériences 1D ont été obtenues avec la même valeur de RG et un filtrage exponentiel de 0,6 Hz a été appliqué.

95% ($(S/B)_{\text{co-solvant}} = 2320$ après l'impulsion doublement sélective contre 47700 initialement). L'analyse des résultats montre que: i) comme pour une impulsion sélective unique, l'application d'une impulsion doublement sélective n'affecte pas les signaux du soluté (dans l'hypothèse qu'aucune composante du soluté ne se superpose à celles du co-solvant) ; ii) la saturation réalisée (en accord avec les conditions expérimentales utilisées) est très sélective puisqu'elle n'affecte pas les signaux satellites ^{13}C (isotopomère $^{13}\text{C}\text{-}^2\text{H}$) des signaux du co-solvant (qui correspondent à 0,55 % de l'intensité des signaux associés à l'isotopomère $^{12}\text{C}\text{-}^2\text{H}$).

Si la double saturation simultanée permet une diminution significative du signal du co-solvant et présente un bon potentiel, nous avons cherché, de nouveau, à améliorer la qualité de la suppression du DQ du co-solvant. Une solution explorée dans ce travail a consisté à appliquer des impulsions doublement sélectives présentant un angle de basculement différent, soit 90° et 270° .

2.b.ii. Application d'une impulsion sélective ^2H avec un angle de 90° et de 270°

D'un point de vue expérimental, l'application d'une impulsion doublement sélective (angle de 90°) bascule l'aimantation des spins du co-solvant organique sur le plan transversal. Après l'impulsion RF non-sélective (dure) de 90° , l'ensemble des spins non sélectionnés par l'impulsion sélective bascule de 90° , alors que les spins sélectionnés par l'impulsion sélective basculent de 180° (au final). En théorie, seuls les spins ayant basculé d'un angle de 90° (impulsion non-sélective) sont détectés sur le plan transversal et donnent un signal RMN observable.

En réalité, tous les spins excités sélectivement n'ont pas forcément basculé à 180° (effet d'offset), ce qui conduit à l'apparition d'un signal résiduel pour ces spins. Pour diminuer l'intensité du signal résiduel du co-solvant organique obtenu, il est apparu astucieux de répéter l'expérience une seconde fois en remplaçant l'impulsion doublement sélective de 90° par une impulsion doublement sélective caractérisée par un angle de basculement de 270° (cf. **Figure III.11**) et de combiner la somme des deux expériences. En pratique, pendant le premier scan (scan impair), le basculement de l'impulsion sélective est égal à 90° , tandis que l'angle de l'impulsion sélective du second scan (scan pair) est de 270° . Par conséquent, le signal résiduel dont l'origine est un basculement imparfait à 180° est apparaît comme mieux compensé par celui du basculement total de 360° (correspondant à $270^\circ + 90^\circ$).

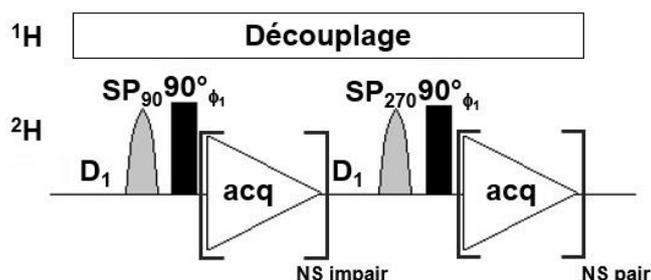


Figure III.11 : Schéma d'impulsion d'une séquence $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ 1D avec une double impulsion sélective centrée sur les deux composantes du co-solvant alternativement à 90° et à 270° à chaque scan (NS(impair) = 90° / NS(pair) = 270°).

Les résultats expérimentaux ^2H obtenus (avec l'acétone- d_6 dissoute dans une phase PBLG/ CHCl_3) avec la combinaison des deux expériences 1D ^2H (sur deux scans) sont présentés sur la **Figure III.12**.

Ils ont été acquis dans les mêmes conditions que précédemment décrites (NS = 8, $D_1 = 8$, $t_{\text{acq}} = 2$ s, soit un $T_R = 10$ s) sur un échantillon RMN d'acétone- d_6 (45,2 mg) dissous la phase PBLG/ $\text{CDCl}_3\text{-CHCl}_3$ (99,5 mg / 305,3 mg – 303,6 mg). Les impulsions doublement sélectives ont un temps d'impulsion de 100 ms. Pour obtenir un angle de basculement de 90° , la puissance utilisée est $1,99 \times 10^{-5}$ W (47 dB), tandis qu'elle est de $1,99 \times 10^{-4}$ W (37 dB) pour l'angle de 270° . L'application de cette séquence a permis une réduction supplémentaire

d'environ 10 % par rapport à l'intensité du signal résiduel après l'application d'une impulsion doublement sélective unique d'un angle de basculement égal à 90° , ($NS_{\text{impair}} = 90^\circ / NS_{\text{pair}} = 90^\circ$). Enfin, l'utilisation de cette séquence est intéressante car la suppression d'environ 90 % du signal du co-solvant permet d'augmenter le gain du récepteur du spectromètre, ce qui conduit à une meilleure digitalisation des signaux les moins intenses du spectre (la molécule d'intérêt) par l'ADC.

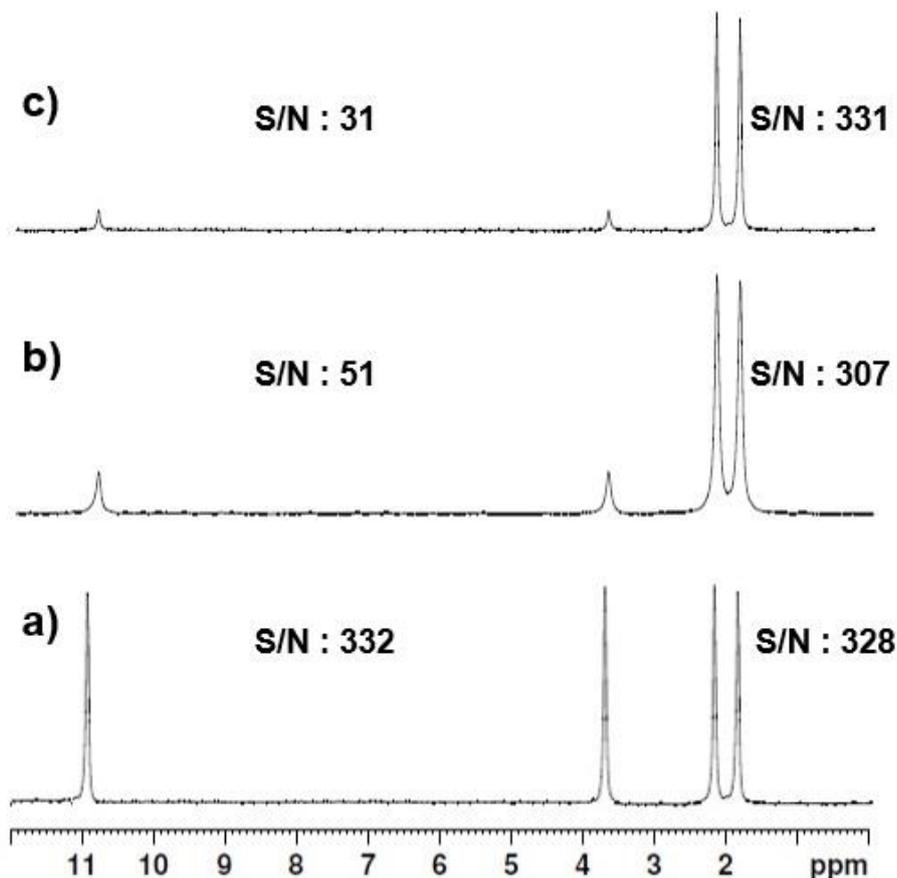


Figure III.12 : Spectres RMN 1D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ de l'acétone- d_6 dans la phase PBLG/ $\text{CDCl}_3\text{-CHCl}_3$ à 295 K. ($NS = 8$, $D_1 = 8$ s, $t_{\text{acq}} = 2$ s, $T_R = 10$ s): (a) sans saturation sélective, (b) avec une impulsion doublement sélective unique d'angle 90° à chaque scan, (c) avec une impulsion doublement sélective d'angle 90° pour le premier scan ($NS_{\text{impair}} = 90^\circ$) et une impulsion sélective d'angle 270° pour le second scan ($NS_{\text{pair}} = 270^\circ$) (cf. séquence de la **Figure III.11**). L'impulsion doublement sélective est centrée sur les deux résonances du CDCl_3 à 3,8 et 10,9 ppm ($\Delta\nu_Q = 654$ Hz). L'impulsion (sinus cardinal) a une durée de 100 ms et une puissance de $1,99 \times 10^{-5}$ W (47 dB) pour un angle de basculement de 90° . Pour obtenir l'impulsion doublement sélective d'angle de 270° , la puissance utilisée est égale à $1,99 \times 10^{-4}$ W correspondant à une atténuation de 37 dB au lieu de 47 dB. Les deux expériences 1D ont été obtenues avec la même valeur de RG et un filtrage exponentiel de 0,8 Hz a été appliqué.

Après avoir étudié le potentiel de la saturation doublement sélective ^2H , nous avons cherché à appliquer ce concept en impliquant la séquence de saturation sélective « WET » dans le cadre de la RMN ^2H / DAN anisotrope.

2.c. Application de la séquence WET-90 ^2H sur les composantes d'un DQ

A l'instar de l'expérience 1D avec une excitation doublement sélective, la séquence de saturation WET ^2H a été construite pour faire basculer sélectivement et simultanément les deux composantes du DQ du co-solvant organique. Comme précédemment, les signaux du co-solvant devraient être supprimés sans affecter les signaux ^2H du soluté. La séquence de l'expérience 1D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ combinée avec un bloc WET ^2H est présentée sur la **Figure III.13**.

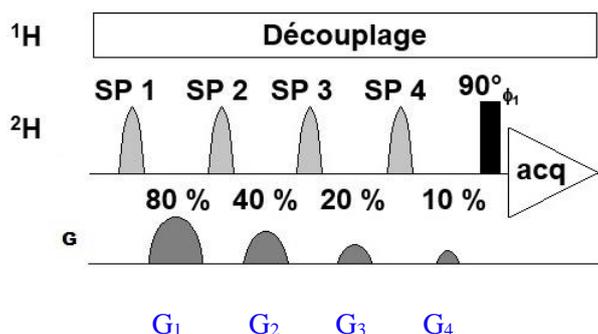


Figure III.13 : Schéma d'impulsion de la séquence $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ 1D avec une saturation doublement sélective de type WET du signal ^2H à éliminer (co-solvant). Ici, l'angle des quatre impulsions sélectives n'est pas défini.

Dans une première étape, l'expérience 1D ^2H avec saturation doublement sélective WET ^2H a été appliquée sur un échantillon RMN orienté enrichi en deutérium (acétone- d_6 dans PBLG/ CDCl_3) (cf. **Annexe K**). La **Figure III.14** présente une comparaison entre les spectres 1D ^2H obtenu via la séquence de saturation composé d'une impulsion doublement sélective unique ($\text{NS}_1 = 90^\circ / \text{NS}_2 = 270^\circ$) (**Figure III.14b**) et celle avec la saturation sélective WET à 90° . Ces spectres RMN sont acquis avec un temps d'acquisition $t_{\text{acq}} = 2$ s et un délai de relaxation $D_1 = 8$ s pour obtenir un temps de recyclage $T_R = 10$ s, et 16 scans. Comme précédemment, la durée de l'impulsion doublement sélective est fixée à 100 ms. L'angle de basculement va dépendre de la puissance de l'impulsion. Dans notre cas (et sur notre spectromètre), nous utiliserons une puissance de $1,99 \times 10^{-5}$ W pour un angle de 90° (soit une atténuation de 47 dB) et une puissance de $1,99 \times 10^{-4}$ W pour un angle de 270° (soit une atténuation de 37 dB). Les angles des impulsions sélectives du bloc WET-90, ont été optimisés autour de 90° ($81,4^\circ$, $101,4^\circ$, $69,3^\circ$ et $161,0^\circ$) [24]. La puissance des quatre impulsions doublement sélectives du bloc WET (SP₁, SP₂, SP₃, SP₄) associée à une durée de 100 ms est égale à $1,63 \times 10^{-5}$ W (47,87 dB), à $2,53 \times 10^{-5}$ W (45,96 dB), à $1,18 \times 10^{-5}$ W (49,27 dB) et à $6,38 \times 10^{-5}$ W (41,95 dB), respectivement.

A partir de l'étude des résultats RMN obtenus avec l'échantillon d'acétone- d_6 , plusieurs remarques peuvent être faites. Tout d'abord, les résultats montrent que : i) l'utilisation de la saturation doublement sélective de type WET 90° présente une meilleure réduction du signal du co-solvant organique que l'expérience 1D comportant une impulsion doublement sélective unique avec un angle d'excitation alterné ($\text{NS}_1 = 90^\circ / \text{NS}_2 = 270^\circ$). En

effet, l'intégration relative du signal résiduel du chloroforme- d_1 par rapport au signal de l'acétone- d_6 indique que le bloc WET permet de supprimer plus de 90 % du signal initial du co-solvant organique ($(S/B)_{\text{solvant}}$ de 5611 pour la référence contre 540 avec la saturation WET) alors que la première technique n'avait réduit l'intensité des signaux que d'environ 80 % (5611 contre 1099) (cf. **Figure III.14.c**). L'utilisation du bloc WET-90 doublement sélective conduit à une sélectivité très propre et n'affecte ni les signaux de l'acétone- d_6 ni ceux des satellites ^{13}C .

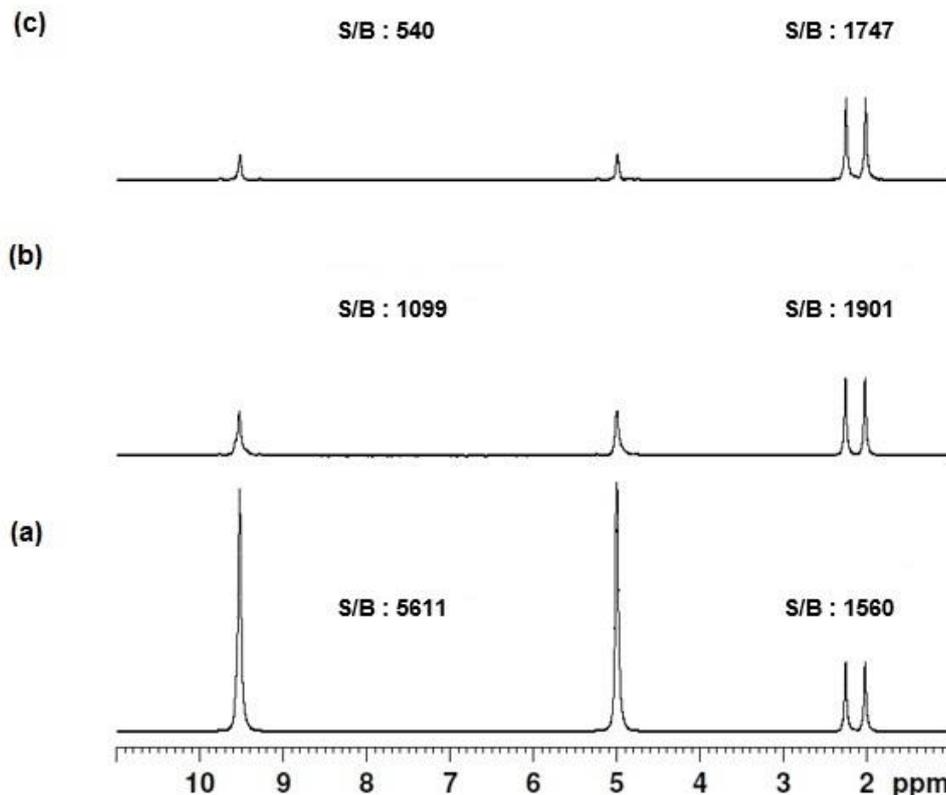


Figure III.14 : Spectres RMN 1D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ de l'acétone- d_6 dans PBLG/ CDCl_3 à $T = 300\text{ K}$ ($\text{NS} = 16$, $\text{AQ} = 2\text{ s}$, $\text{T}_R = 10\text{ s}$): (a) sans saturation sélective (référence) ; (b) avec une impulsion doublement sélective unique ($\text{NS}_{\text{impair}} = 90^\circ / \text{NS}_{\text{pair}} = 270^\circ$) (cf. **Figure III.11**); (c) avec une saturation doublement sélective de type WET-90 (WET 90 : $\text{NS}_{\text{impair/pair}} = 90^\circ$) (cf. **Figure III.13**). Comme précédemment, l'impulsion doublement sélective (sinus cardinal et de durée égale à 100 ms) est centrée sur les deux résonances du CDCl_3 à 4,97 et 9,55 ppm ($\Delta\nu_Q = 422\text{ Hz}$) (cf. **Figure III.12**). Pour le bloc de saturation WET, la durée des quatre impulsions doublement sélectives d'angle de 90° est égale à 100 ms, avec une puissance égale à $1,63 \times 10^{-5}\text{ W}$ (SP_1), à $2,53 \times 10^{-5}\text{ W}$ (SP_2), à $1,18 \times 10^{-5}\text{ W}$ (SP_3) et à $6,38 \times 10^{-5}\text{ W}$ (SP_4) respectivement. Les deux expériences 1D ont été obtenues avec la même valeur de RG et un filtrage exponentiel de 0,8 Hz a été appliqué.

Comme le principe de compensation des signaux résiduels par une variation de l'angle de l'impulsion doublement sélective sur deux scans (90° pour les scans impairs et 270° pour les scans pairs) s'est avéré efficace, il était intéressant de tester ce concept avec le bloc de saturation WET.

2.d. Développement de l'expérience 1D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ Bis-WET

Pour vérifier le potentiel du bloc WET ^2H intégrant une impulsion doublement sélective en milieu orienté, nous avons utilisé deux angles de basculement : 90° et 270° (cf. la séquence de la **Figure III.3**) La séquence a été appliquée à notre échantillon d'acétone- d_6 orientée dans PBLG en présence de CDCl_3 .

Pour l'expérience ^2H WET utilisant un angle centré autour 90° (notée WET-90), les puissances des quatre impulsions doublement sélectives du bloc WET-90 (SP_1 , SP_2 , SP_3 , SP_4) correspondant à un angle de basculement de $81,4^\circ$, $101,4^\circ$, $69,3^\circ$ et $161,0^\circ$ sont égales à $1,63 \times 10^{-5}$ W (47,87 dB), à $2,53 \times 10^{-5}$ W (45,96 dB), à $1,18 \times 10^{-5}$ W (49,27 dB) et à $6,38 \times 10^{-5}$ W (41,95 dB), respectivement. Pour l'expérience ^2H WET-270 utilisant un angle centré autour 270° (noté WET-270), les puissances des quatre impulsions doublement sélectives (SP_1 , SP_2 , SP_3 , SP_4) correspondant à un angle de basculement de $261,4^\circ$, $281,4^\circ$, $249,3^\circ$ et $341,0^\circ$ sont égales à $1,63 \times 10^{-4}$ W (37,87 dB), à $2,53 \times 10^{-4}$ W (35,96 dB), à $1,18 \times 10^{-4}$ W (39,27 dB) et à $6,38 \times 10^{-4}$ W (31,95 dB). Dans les deux cas, la durée d'impulsion doublement sélective a été fixée à 100 ms.

Les spectres RMN 1D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ WET-90 et 1D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ WET-270 sont présentés sur les **Figures III.15b** et **III.15c** (Ech. Acétone- d_6 /PBLG/ CDCl_3) L'analyse de ces spectres ^2H montrent : i) une forte réduction des signaux du co-solvant organique par rapport au spectre de référence (cf. **Figure III.15a**) ; ii) que le choix des paramètres de l'impulsion sélective conduit à une sélectivité suffisamment grande pour ne pas affecter les satellites $^{13}\text{C}\text{-}^2\text{H}$ du co-solvant (dont le couplage total est égal à $^1T_{\text{CD}} = 46$ Hz) ; iii) que l'intensité des signaux ^2H résiduels sont sensiblement identiques ; iv) et qu'enfin le signal résiduel ^2H obtenu avec le bloc WET-90 et le bloc WET-270 sont de phases opposées: de phase positive pour un angle de 90° , de phase négative pour un angle de 270° (comparés à la phase des pics satellites ^{13}C).

A partir des remarques iii) et iv) précédentes, il apparaît que l'addition des deux spectres 1D ^2H WET-90 et 1D ^2H WET-270 devrait conduire à une compensation optimale des signaux ^2H saturés sélectivement, et à une augmentation d'un facteur deux (addition de deux scans) de l'intensité des signaux non affectés par la saturation sélective (le $\text{DQ}(^2\text{H})$ de l'acétone- d_6 et les signaux des satellites $^{13}\text{C}\text{-}^2\text{H}$ du co-solvant). Pour acquérir un spectre RMN qui correspond à cette addition, une nouvelle séquence d'impulsion a donc été proposée. Cette approche, basée sur l'alternance de l'angle de basculement (90° et 270°) du bloc « WET » (WET-90 + WET-270) est appelée « séquence Bis-WET ». Le schéma de l'expérience 1D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ Bis-WET est présenté sur la **Figure III.16**. Le programme de cette nouvelle séquence d'impulsion (programmation Topspin) nommé « zgdc-Bis-WET » est fourni dans l'**Annexe M**.

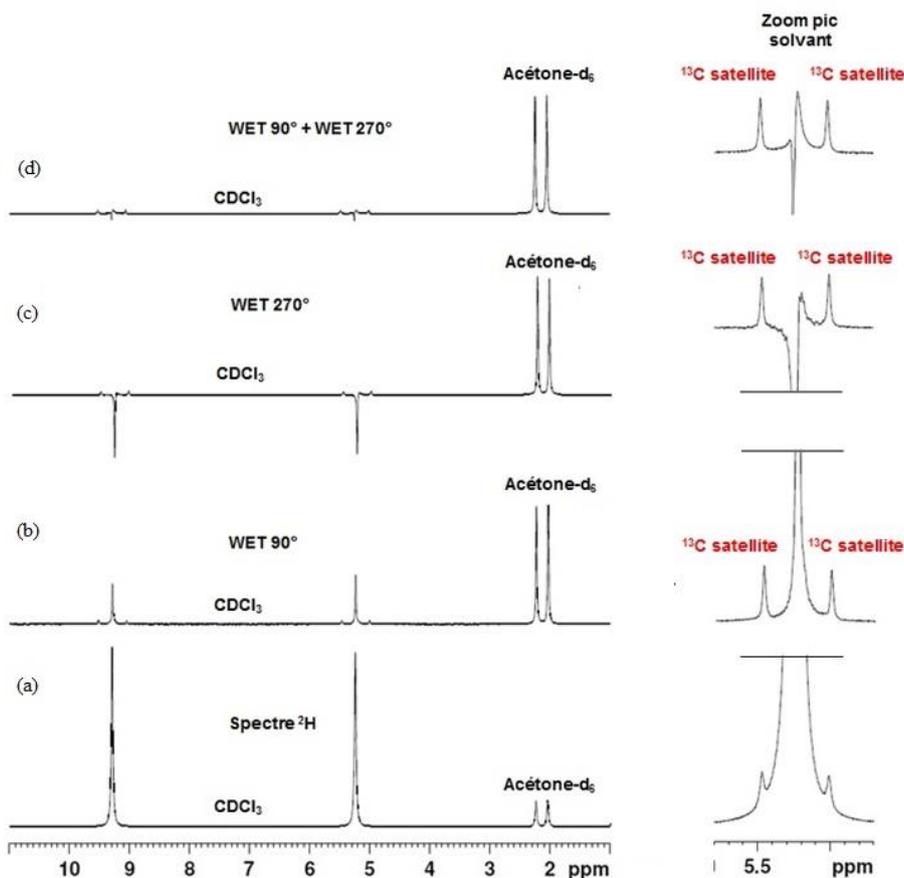


Figure III.15 : Spectres RMN 1D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ de l'acétone- d_6 dans PBLG/ CDCl_3 enregistrés à 310 K (NS = 16, AQ = 2 s, T_R = 10 s) : (a) sans saturation sélective, (b) avec une saturation doublement sélective de type WET avec un angle de 90° (WET-90 : $\text{NS}_{\text{impair/pair}} = 90^\circ$) (cf. **Figure III.13**).; (c) avec une saturation doublement sélective de type WET avec un angle de 270° (WET-270 : $\text{NS}_{\text{impair/pair}} = 270^\circ$) (cf. **Figure III.13**).; (d) avec une saturation doublement sélective de type Bis-WET avec un angle d'excitation sélective alterné de 90° et 270° (Bis-WET : $\text{NS}_{\text{impair}} = 90^\circ / \text{NS}_{\text{pair}} = 270^\circ$) (cf. **Figure III.16**). La double impulsion sélective est centrée sur les deux résonances du CDCl_3 à 5,2 et 9,2 ppm ($\Delta\nu_Q = 368$ Hz). Le couplage total $^1\text{T}_{\text{C-D}}$ est égal à 46 Hz. Les paramètres de blocs WET dans l'expérience 1D Bis-WET sont donnés dans le texte. Les deux expériences 1D ont été obtenues avec la même valeur de RG et un filtrage exponentiel de 0,8 Hz a été appliqué.

Le spectre 1D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ Bis-WET associé à notre échantillon enrichi en deutérium est présenté sur la **Figure III.15.d**. La valeur des puissances pour un angle de 90° et 270° a été fixée à 100 ms. Comme les deux spectres 1D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ WET-90 et WET-270, le spectre 1D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ Bis-WET a été obtenu avec un nombre de scans égal à 16, ce qui correspond à $16/2 = 8$ alternances du bloc WET. Comme espéré, une très bonne compensation des signaux résiduels du chloroforme deutéré est obtenue, conduisant à leur quasi-suppression. Comme on le voit sur le zoom de la **Figure III.15d** (correspondant à la composante blindée du co-solvant), l'intensité du signal résiduel (légèrement déphasé en mode dispersion) est de l'ordre de grandeur de celle des signaux satellites $^{13}\text{C}\text{-}^2\text{H}$ qui ne sont pas affectés par la saturation doublement sélective. Compte tenu de l'abondance isotopique naturelle du carbone-13, la hauteur des signaux du co-solvant (0,5 % du signal $^{12}\text{C}\text{-}^2\text{H}$) indique que la réduction est

supérieure à 99 % du signal. Du fait de sa conception et son principe, cette expérience doit impérativement être réalisée avec un nombre pair de scans.

Afin d'optimiser l'élimination du DQ(^2H) du co-solvant, la phase des impulsions doublement sélective a été cyclée sur quatre étapes (0° , 90° , 180° , 270°). Un cyclage plus complexe basé sur un déphasage de 90° de ce « vecteur phase » (super-cycle) a été testé, mais n'a pas montré d'amélioration supplémentaire.

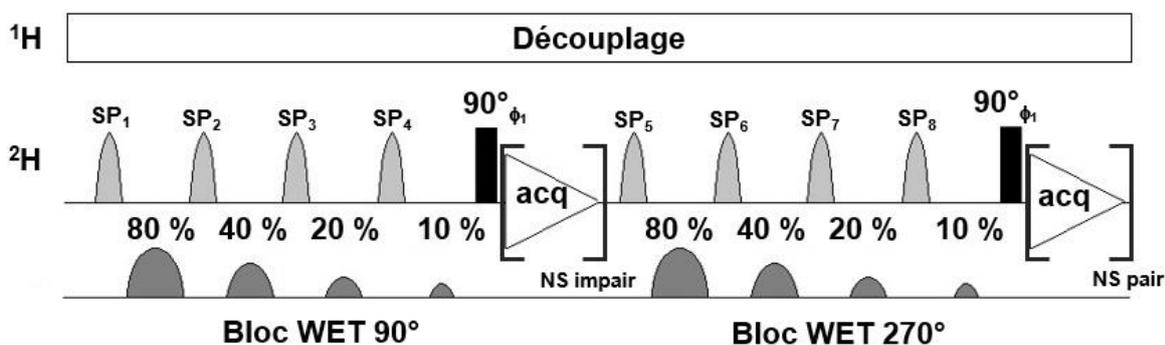


Figure III.16 : Schéma impulsif de l'expérience RMN 1D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ Bis-WET. Cette séquence se décompose en deux parties. Pour les scans pairs, l'angle de basculement du bloc de saturation WET ^2H est centré autour de 90° (SP₁, SP₂, SP₃, SP₄), pour les scans impairs, l'angle de basculement est centré autour de 270° (SP₅, SP₆, SP₇, SP₈).

En conclusion, les résultats de l'expérience RMN 1D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ Bis-WET ont montré les avantages de la saturation doublement sélective « Bis-WET ^2H » grâce à l'utilisation d'angles de basculement différents (90° et 270°) compensant une partie des imperfections RF sélectives. Pour répondre à la problématique des analyses en RMN 2D DAN dans les phases orientées polypeptides, le concept « Bis-WET » a été étendu aux expériences RMN 2D QUOSY DAN.

3. Incorporation de la saturation doublement sélective Bis-WET dans les séquences RMN 2D en milieu cristal liquide

3.a. Développement des expériences 2D QUOSY $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ Bis-WET

Compte tenu de la complexité des spectres RMN 1D DAN $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ en milieu orienté (multitude d'éclatements quadrupolaires $\Delta\nu_Q(^2\text{H})$ observés), il est nécessaire de réaliser des expériences RMN 2D de type QUOSY phasées comme la Q -COSY Fz, la Q -résolue Fz ou la Q -résolue MQ. Pour bénéficier du potentiel du concept Bis-WET, nous avons implémenté le bloc Bis-WET dans les expériences QUOSY ^2H phasables et symétrisables les plus utilisées. Les expériences 2D obtenues sont notées Q -COSY Fz Bis-WET, Q -résolue Fz Bis-WET et Q -résolue MQ Bis-WET. Les séquences d'impulsions associées sont présentées schématiquement sur la **Figure III.17**. Les programmes d'impulsions (programmation Topspin) de ces trois nouvelles expériences 2D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ sont fournis dans les **Annexes N, O,**

P. Evidemment, le bloc Bis-WET peut être également implanté sur les séquences 2D QUOSY ^2H non-phasables.

L'effet de la saturation sélective Bis-WET a été testé sur notre échantillon modèle d'acétone- d_6 dans la phase PBLG/ CDCl_3 . Un exemple de spectre 2D Q -COSY Fz Bis-WET est présenté sur la **Figure III.18**. Ce spectre 2D a été acquis en deux heures de temps d'expérience avec 16 scans et 256 incréments t_1 . Sur cette figure, on peut voir que les signaux résiduels du $\text{DQ}(^2\text{H})$ du co-solvant organique deutérés sont fortement réduits (98 %). Comme en RMN 1D, la très grande sélectivité des impulsions doublement sélectives associées à la séquence Bis-WET ^2H , permet de ne pas toucher aux signaux satellites ^{13}C (isotopomère ^{13}C - ^2H). Comme pour les études précédentes, la durée nominale de l'impulsion sélective utilisée avait été fixée à 100 ms pour le bloc WET-90 et WET-270. Cette valeur permet une très grande sélectivité ($\text{SW}_{\text{Exc-Sél}} = 1/2t_{\text{SP}}$, soit idéalement $5 \text{ Hz} < ^1\text{T}_{\text{C-D}} = 46 \text{ Hz}$), mais conduit à une durée effective globale du bloc WET de 400 ms ($4 \times 100 \text{ ms}$).

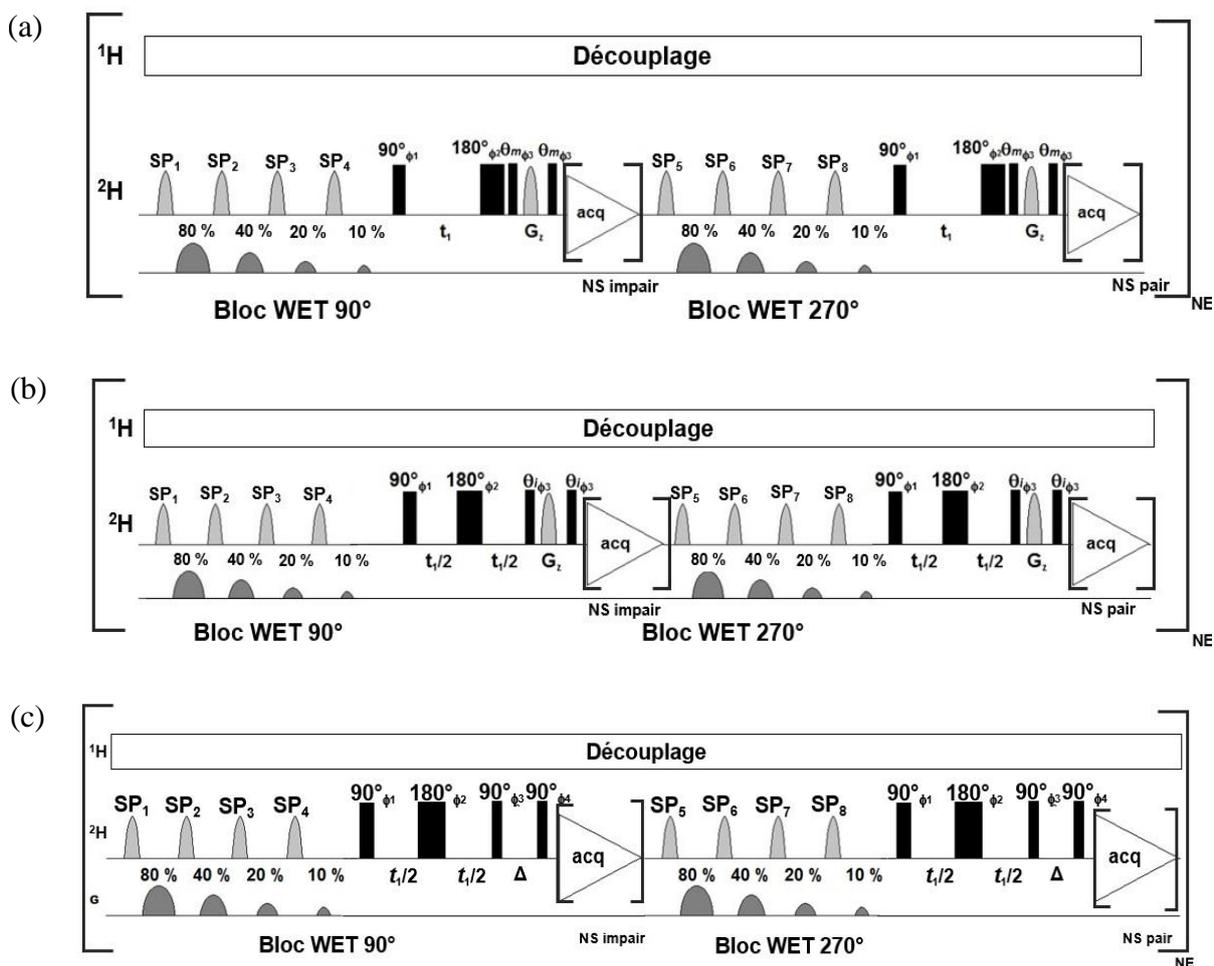


Figure III.17 : Schéma impulsionnel des expériences 2D ^2H - $\{^1\text{H}\}$ / DAN- $\{^1\text{H}\}$ incluant le bloc WET : (a) Q -COSY Fz Bis-WET, (b) Q -résolue Fz Bis-WET, (c) Q -COSY MQ Bis-WET. Ces séquences d'impulsions 2D sont basées sur le même concept, et se décomposent en deux parties : un bloc de saturation WET-90 pour les scans impairs et un bloc WET-270 pour les scans pairs.

Comparée aux expériences 2D QUOSY classiques, la durée totale des expériences 2D Q -COSY Fz Bis-WET, Q -résolue Fz Bis-WET, et Q -résolue MQ Bis-WET (comme pour l'expérience 1D zg Bis-WET) est fortement augmentée. En effet, le bloc de saturation sélective WET est composé d'une série de quatre impulsions sélectives successives, SP, entrecoupée de quatre gradients de champ magnétique G.

En négligeant : i) la somme des durées des impulsions ^2H dures ($\Sigma P(^2\text{H}) < 120 \mu\text{s}$, avec un $P^{90^\circ}(^2\text{H}) \approx 21 \mu\text{s}$ sur notre spectromètre à 14,1 T) ; ii) la somme des durées des gradients du bloc WET (8 ms) ; iii) la durée du gradient dans le filtre Fz ($G_{Fz} = 2 \text{ ms}$) pour les séquences 2D QUOSY-Fz ; iv) le temps de recyclage global, T_R , (sur 1 scan) pour ces expériences peut être calculé comme :

$$T_R = D_1 + (4 \times t_{SP}) + t_{acq} = 0,5 + (4 \times 0,1) + 0,74 = 1,64 \text{ s} \quad \text{(III.5)}$$

Dans cette équation, le temps d'évolution t_1 (d'une expérience 2D enregistré avec TD_1 points) n'a pas été pris en compte. Théoriquement, à chaque incrément t_1 , T_R augmente de façon

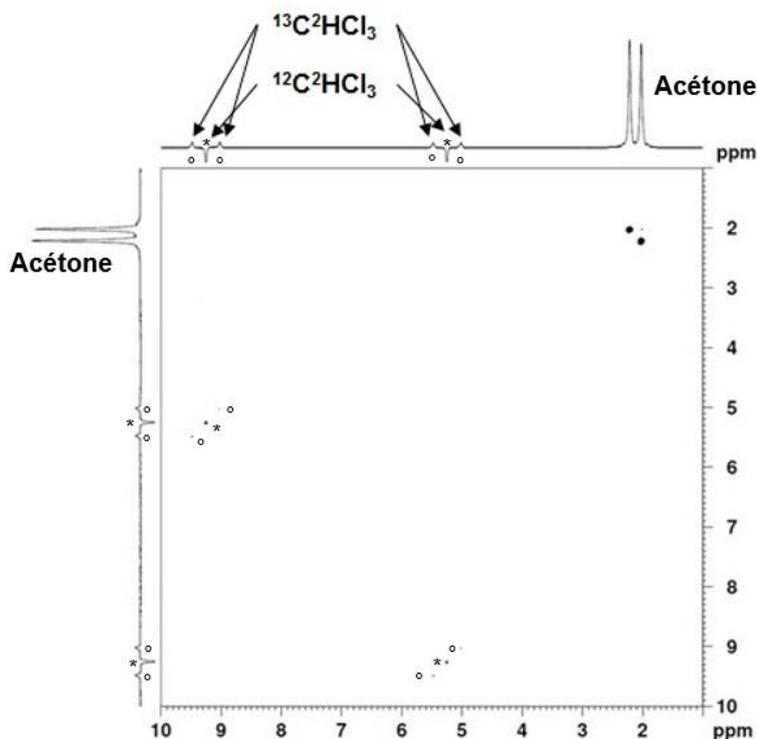


Figure III.18 : Spectre 2D Q -COSY MQ de l'acétone- d_6 dans la phase PBLG/ CDCl_3 enregistré en 2 heures à 310 K (NS = 16, $TD_1 = 256$, AQ = 0,74 s, $D_1 = 0,5$ s). La saturation doublement sélective Bis-WET est appliquée sur les signaux du CDCl_3 avec deux cycles alternés ($90^\circ/270^\circ$) de 8 scans. Sur le spectre 2D, les signaux résiduels du co-solvant organique sont indiqués par une étoile (*) et les signaux associés aux satellites $^{13}\text{C}-^2\text{H}$ par un rond ouvert (o). Pour le bloc WET-90, les puissances des impulsions sont égales à $1,63 \times 10^{-5} \text{ W} / 47,87 \text{ dB}$ (SP_1), $2,53 \times 10^{-5} \text{ W} / 45,96 \text{ dB}$ (SP_2), $1,18 \times 10^{-5} \text{ W} / 49,27 \text{ dB}$ (SP_3) et $6,38 \times 10^{-5} / 41,95 \text{ dB}$ (SP_4). Pour le bloc WET-270, les puissances utilisées sont $1,63 \times 10^{-4} \text{ W} / 37,87 \text{ dB}$ (SP_5), $2,53 \times 10^{-4} \text{ W} / 35,96 \text{ dB}$ (SP_6), $1,18 \times 10^{-4} \text{ W} / 39,27 \text{ dB}$ (SP_7) et $3,8 \times 10^{-5} / 31,95 \text{ dB}$ (SP_8). La durée de toutes les impulsions doublement sélectives est de 100 ms (t_{SP}).

continue (associée à un nombre d'incrément, défini par le paramètre TD_1) d'une valeur Δt_1 égale à $\Delta t_1 = IN_1^{1, \dots, TD_1} \times (1/SW_1)$, soit un délai compris entre 3 μ s ($D_0 = 3 \mu$ s) et environ 1 s (dépendant de la valeur de SW_1 et de TD_1). Pour l'expérience 2D classique (sans bloc WET), le temps de recyclage (en négligeant l'augmentation du temps associé à l'incrément t_1) était de 1,24 seconde (0,74 s d'acquisition et 0,5 s de D_1). Evidemment, le temps total pour un scan complet peut être réduit en modifiant la valeur des paramètres D_1 , t_{acq} mais aussi t_{SP} . Une plus faible sélectivité du bloc WET ($SW_{Exc-Sél} > {}^1T_{C-D}$) peut, en effet, être suffisante si aucun signal de l'analyte est présent dans l'environnement spectral des deux composantes du DQ(2H) à éliminer. Une diminution de 100 ms à 50 ms permet, par exemple, une réduction du temps total pour un scan de 10%.

Afin de pouvoir tester les séquences 2D QUOSY Bis-WET 2H sur un plus large panel d'échantillons, le potentiel analytique de ces nouvelles séquences 2D a été testé sur des analyses de molécules d'intérêts et en abondance isotopique naturelle 2H .

3.b. Application des expériences 2D QUOSY Bis-WET 2H sur des échantillons en abondance naturelle

3.b.i. Analyse des échantillons à abondance isotopique naturelle

Pour étudier le potentiel des expériences 2D QUOSY Bis-WET 2H , nous avons étudié un échantillon de frambinone « non-enrichie » dissous dans une mésophase PBLG / CH_2Cl_2 - CCl_4 (proportions 75 % / 25 %), en présence de TMU. Cet échantillon est composé de 100 mg de frambinone ($N_{anal} = 6,09 \times 10^{-4}$ mol), de 100 mg de PBLG avec un degré de polymérisation (DP) = 742, de 375 mg de dichlorométhane ($N_{anal} = 6,09 \times 10^{-4}$ mol), de 125 mg de tétrachlorométhane et 10 mg de tétraméthylurée ($N_{TMU} = 8,60 \times 10^{-5}$ mol) (cf **Figure III.4**). Afin d'étudier l'impact de la saturation doublement sélective, nous avons enregistré une expérience 2D Q -résolue MQ Bis-WET DAN, et comparer les résultats avec le spectre 2D Q -résolue MQ DAN (cf. **Figure III.4**). Le spectre 2D phasé, tilté puis symétrisé est présenté sur la **Figure III.19**.

Sur le spectre 2D de référence (cf. **Figure III.4**), l'intensité du DQ(2H) du co-solvant est environ dix fois supérieure à celle des signaux du TMU et du groupement méthyle de la frambinone (site noté 1). Sur cette carte 2D, nous observons une très bonne élimination du signal DAN du dichlorométhane puisque les signaux résiduels (avant ou après l'opération de tilt) apparaissent avec une intensité comparable (forme dispersive) associée aux positions énantiotopes des groupements méthylènes (en position 2 et 3) et des sites aromatiques (4-5). Comme pour l'étude réalisée avec l'échantillon enrichi en deutérium, aucun des signaux DAN

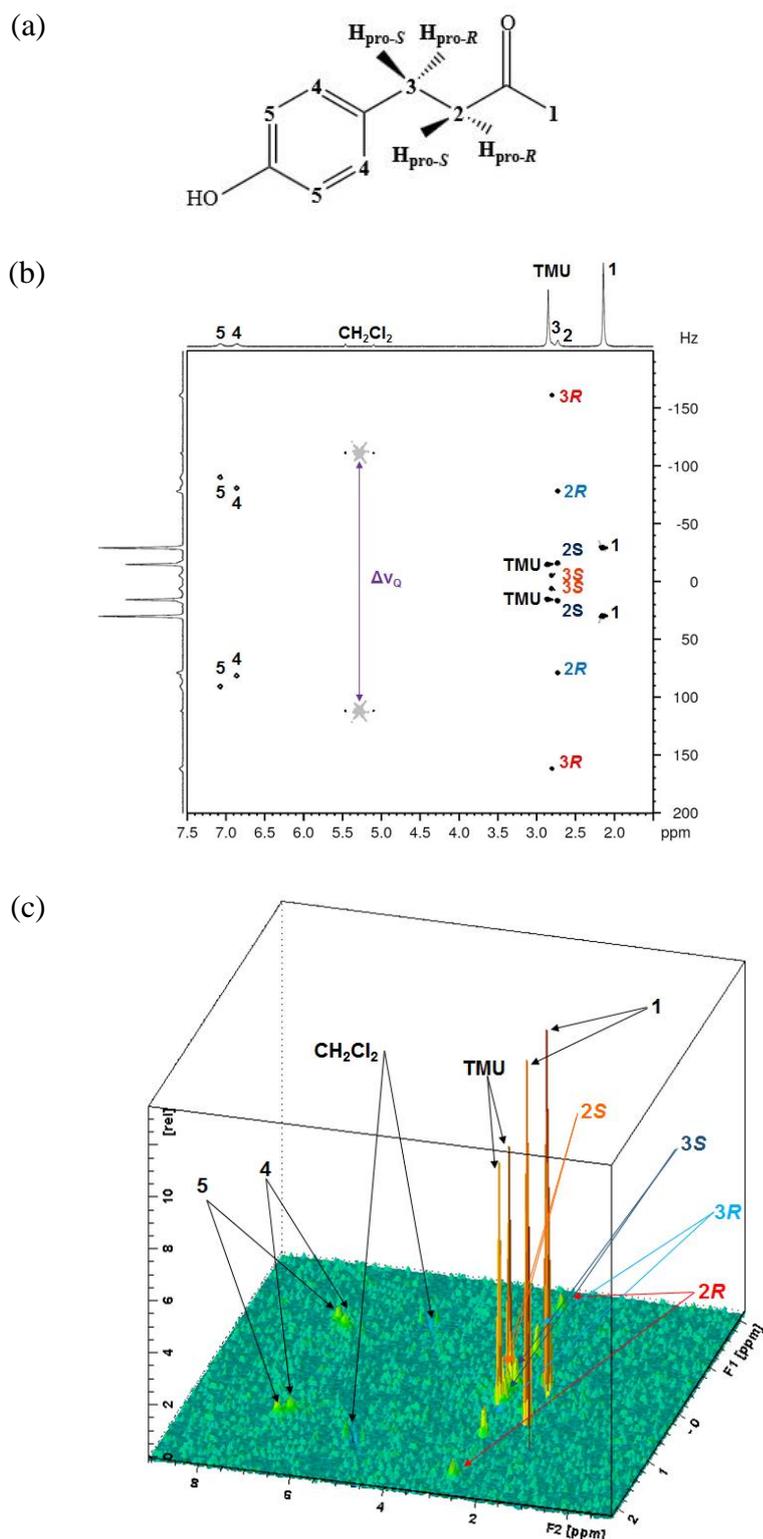


Figure III.19 : (a) Structure de la frambinone : (b) spectre 2D Q -résolue MQ Bis-WET tilté et symétrisé de la frambinone dans PBLG/ CH_2Cl_2 - CCl_4 en présence de TMU, et enregistrée en 24 heures ($\text{NS} = 64$, $\text{TD}_1 = 400$, $t_{\text{acq}} = 2$ s, $\text{D}_1 = 0,05$ s). La bpc de saturation sélective Bis-WET ^2H est appliquée sur les signaux de CH_2Cl_2 . Les attributions stéréochimiques R/S sur spectres sont définies arbitrairement. (c) Représentation 3D du spectre 2D Q -résolue MQ phasé.

de la frambinone n'est affecté par l'excitation doublement sélective. L'analyse de la carte 2D de la **Figure III.19** montre l'intérêt des expériences 2D QUOSY Bis-WET DAN pour l'étude de solutés en RMN DAN.

Comme pour l'échantillon enrichi, le problème du temps d'expérience global est encore présent ($T_{\text{exp}} = 24$ heures) en RMN DAN. Ce problème est d'autant plus important que les spectres 2D ^2H sont enregistrés en abondance naturelle, ce qui nécessite un nombre de scans et d'incrément t_1 en dimension indirecte suffisamment grands pour obtenir des rapports $(S/B)_i$ exploitables et une résolution spectrale suffisante en t_1 . Notons ici, que pour un nombre d'incrément t_1 identique, les expériences 2D Q -résolues sont plus intéressantes que les expériences 2D Q -COSY dans la mesure où la disparition des déplacements chimiques ^2H ($\delta^{\text{aniso}}(^2\text{H})$) dans la dimension F_1 permet de réduire (entre 20 et 30 %) la largeur spectrale (en Hz) dans cette dimension [26].

3.b.ii. *Limitation pratique des expériences 2D QUOSY Bis-WET DAN*

Comme nous l'avons vu dans le **Chapitre III.3.a.**, la succession des quatre impulsions sélectives du bloc d'excitation doublement sélectif Bis-WET induit un temps de recyclage T_R beaucoup plus long que celui associé à l'expérience 2D QUOSY sans le bloc WET (expérience de référence). Pour l'échantillon de frambinone, la proximité des composantes blindées des DQ des positions aromatiques nous a amené à construire une impulsion sélective (bloc WET-90 et WET-270) encore plus longue correspondant à une durée, t_{SP} , nominale de 300 ms (soit $SW_{\text{Exc-Sél}} = 1/2t_{\text{SP}}$ soit idéalement $2 \text{ Hz} < {}^1T_{\text{C-D}} = 46 \text{ Hz}$). Pour les deux blocs de saturation WET, on obtient un délai global de $4 \times 0,3 \text{ s} = 1,2 \text{ s}$. C'est à dire, une augmentation de 1,2 s comparée à la valeur calculée pour l'expérience 2D sans le bloc Bis-WET, tous les autres paramètres étant identiques par ailleurs. Rappelons de nouveau ici que pour les blocs WET-90 et WET-270, seule la puissance d'excitation est modifiée.

Comme dans l'**Equation III.5**, en négligeant la somme des durées $P(^2\text{H})$, des gradients de champs, G_{WET} et de G_{Fz} , combiné à un délai $D_1 = 0,05 \text{ s}$ et un temps d'acquisition, $t_{\text{acq}} = 2 \text{ s}$, la durée T_R pour un scan est égale à :

$$T_R = D_1 + (4 \times t_{\text{SP}}) + t_{\text{acq}} = 0,05 + (4 \times 0,3) + 2 = 3,25 \text{ s} \quad \text{(III.6)}$$

En considérant cette augmentation de 1,2 seconde pour un scan, il faut prendre en compte que ce temps va être multiplié par le nombre de scans par incréments t_1 , mais aussi par le nombre d'incrément t_1 acquit durant l'expérience 2D. Dans l'expérience 2D Q -résolue F_z de référence, le spectre de la frambinone a été obtenu avec 64 scans et 400 incréments t_1 ($TD_2 = 3586$). En se plaçant dans les mêmes conditions expérimentales RMN, on obtiendra un temps total d'expérience, T_{tot} , pour l'expérience 2D QUOSY Bis-WET égal à :

$$\begin{aligned} T_{\text{tot}} &= TD_1 \times (NS \times T_R) = TD_1 \times (D_1 + (4 \times t_{\text{SP}}) + t_{\text{acq}}) \\ &= 400 \times (64 \times 3,25) = 83200 \text{ s} \end{aligned} \quad \text{(III.7)}$$

d'où une augmentation du temps total d'expérience, ΔT_{tot} , égale à :

$$\Delta T_{\text{tot}} = TD_1 \times (NS \times \Delta T_R) = 400 \times (64 \times 1,2) = 30720 \text{ s} \quad \text{(III.8)}$$

Comme précédemment, le temps d'évolution, t_1 , n'est pas pris en compte dans ces deux équations.

Cette augmentation temporelle de 30720 s correspond à une augmentation de 8 heures et 30 minutes. Sachant que l'expérience 2D de référence (sans saturation) a duré 16 heures, le temps total d'expérience de l'expérience 2D Q -résolue Fz Bis-WET de la frambinone dans les mêmes conditions est égal à 24 heures 30 minutes.

Dans l'absolu, une expérience RMN multidimensionnelle ne possède pas de durée de temps maximale (si ce n'est par son coût financier), cependant, deux conditions sont nécessaires pour obtenir un spectre RMN 2D de qualité et exploitable : i) maintenir l'homogénéité et la stabilité (pas de dérive) magnétique de l'aimant ; ii) vérifier que l'échantillon reste « stable » (formation d'un gradient d'ordre) durant le temps de l'expérience *via* un système de verrouillage de champ (lock). En RMN 2D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ ou DAN- $\{^1\text{H}\}$ anisotrope, aucun système de lock (^2H) n'est utilisé. Il faudrait pour cela : i) soit choisir un co-solvant deutéré (ce qui n'est pas compatible avec des expériences DAN) ; ii) soit utiliser un lock sur un noyau exotique comme le ^{19}F (utilisation d'un solvant fluoré tel que le FCCl_3) à l'aide d'un capillaire contenant ce solvant et inséré dans le tube de 5 mm, ou encore un tube de 4 mm (contenant la mésophase) inséré dans un tube de 5 mm contenant le solvant fluoré. En pratique, la dérive du champ de l'aimant de notre spectromètre RMN opérant 14,1 T est suffisamment faible (1 à 2 Hz (en RMN ^2H) pour une quinzaine d'heures), ce qui ne nécessite pas d'utiliser un système de verrouillage de champ. L'effet de « *drift* » de l'aimant s'additionne aux largeurs de raies ^2H anisotropes légèrement plus grandes qu'en milieu isotrope puisque généralement $T_2^*(^2\text{H})^{\text{aniso}} < T_2^*(^2\text{H})^{\text{iso}}$.

En revanche, il apparaît que la stabilité de la mésophase chirale (système lyotrope à trois composants) au court du temps soit le facteur limitant principal. En effet, certains échantillons orientés perdent leur homogénéité et leur uniformité orientationnelle au cours du temps (élargissement des raies, désymétrisation ou variation des $\text{DQ}(^2\text{H})$, ...) au-delà d'une vingtaine d'heures.

Pour permettre l'analyse de tous types d'échantillons avec des séquences QUOSY Bis-WET et des temps d'acquisitions raisonnables (inférieur 20 h maximum), il est nécessaire de réduire le temps d'expérience global des expériences 2D. Pour cela, un échantillonnage non-

uniforme des données RMN dans la dimension temporelle indirecte, t_1 , de l'expérience 2D est possible. Ce protocole est appelé *Non-Uniform Sampling* (NUS) [27].

4. Application du Non-Uniform Sampling en milieu orientée

4.a. Principe du protocole NUS

En RMN isotrope, il existe une grande variété d'expériences multidimensionnelles (nD avec $n = 2, 3, 4, \dots$) homo- et hétéronucléaires qui permettent d'observer les corrélations interatomiques d'une molécule à travers les liaisons chimiques (informations scalaires) ou à travers l'espace (informations dipolaires) [28, 29]. Ces séquences permettent l'attribution structurale complète de (petites) molécules naturelles ou de macromolécules complexes (analyse protéomique). Cependant, les expériences nD présentent un inconvénient majeur : un temps d'expérience global qui est beaucoup plus long qu'une expérience RMN 1D. Par ailleurs, la détection d'expériences multidimensionnelles de noyaux de faible sensibilité et/ou peu abondants nécessite un nombre de scans, NS, important pour augmenter le rapport signal-sur-bruit, $(S/B)_i$, de tous les signaux.

Pour répondre aux problèmes de sensibilité et réduire notablement les durées d'expérience en RMN nD, différentes stratégies (instrumentales ou méthodologiques) sont possibles et ont été explorées. Nous pouvons, par exemple, citer : i) l'avènement des spectromètres RMN à haut et très haut champ magnétique ; ii) l'utilisation de sondes de détection cryogéniques [30] ; iii) l'augmentation de la différence de population *via* le développement de la polarisation dynamique nucléaire (*Dynamic Nuclear Polarization* (DNP)) [31] ou l'utilisation de basses ou ultra-basses températures pour l'échantillon [32] ; iv) la réduction du temps de recyclage (T_R) *via* une excitation sélective ^1H ou ^{13}C combiné à un angle d'excitation optimisé (angle de Ernst) comme pour les expériences RMN 2D de type « SOFAST » ou « BEST » [33].

Lorsque des expériences RMN nD demeurent toujours trop longues (pour des suivis réactionnels, par exemple), il est possible d'accélérer considérablement le temps d'expérience (et réduire le temps d'expérience à des durées de l'ordre de la seconde) en utilisant un encodage spatial de l'échantillon [34-36]. Ainsi, lorsque la sensibilité / l'abondance du noyau le permet, une alternative moderne consiste à appliquer le concept de RMN 2D ultra-rapide ou Ultra-Fast (UF), qui est capable de produire des expériences de corrélations 2D homo- ou hétéronucléaires (^1H - ^1H ou ^1H - ^{13}C) en un seul "balayage". Le concept repose sur l'application d'un gradient de champ magnétique appliqué le long de l'axe z, (parallèle à B_0) pour encoder l'information RMN [37-38]. Il est à noter que l'application de cette approche à la RMN 2D ^2H (molécule enrichie) en milieu anisotrope a été explorée avec succès en 2015 [39].

Une dernière solution envisagée, et qui ne demande pas d'instrumentation spécifique (contrairement à la DNP !), consiste en la réduction du nombre d'incrément (donc le nombre de points, TD_1) sur la période d'évolution indirecte d'une expérience 2D ou sur les n-1

périodes d'évolution indirecte d'une expérience nD ($n > 1$) à l'aide d'un échantillonnage non uniforme des données associées à ces dimensions. Cette méthode d'acquisition RMN nD a été développée en 1984. Elle est appelée « *Non-Uniform Sampling* » (NUS) [40-42]. Cette approche peut s'appliquer sur l'ensemble des séquences d'impulsions multidimensionnelles existantes en préservant l'ensemble des informations présentes sur les spectres 2D enregistrées classiquement [40, 43, 44]. Ce type d'échantillonnage, combiné à de méthodes de reconstruction adaptées, offre une alternative aux schémas classiques basés sur un échantillonnage uniforme (US) des données en t_1 suivi d'une double TF classique [45, 46]. Compte tenu de l'intérêt pratique de réduire le temps expérimental, T_{exp} , des expériences 2D QUOSY 2H , il est possible de combiner l'acquisition de données de type NUS en t_1 avec deux types de reconstruction mathématique : i) la méthode dite de « Covariance » (Cov) [47] ; ii) la méthode dite de « Compress sensing » (CS) [48].

En pratique, le choix de la méthode de reconstruction des données dépend du type d'expérience 2D QUOSY 2H utilisée, c'est-à-dire si la carte 2D est symétrique ou non. Ainsi, la méthode "Cov" a été utilisée efficacement pour la reconstruction des expériences NUS Q -COSY (F_z) [47], où les informations spectrales (δ^{aniso} et $\Delta\nu_Q$) sont identiques dans les dimensions spectrales F_1 et F_2 . La reconstruction de type "CS" a été plus utilisée pour traiter des spectres 2D 2H asymétriques, comme par exemple, les expériences 2D Q -résolue 2H ou 2D δ -résolue 2H pour lesquelles les informations spectrales sont différentes sur les dimensions spectrales F_1 et F_2 en raison de la refocalisation des déplacements chimiques ou de l'interaction quadrupolaire pendant t_1 [49]. En fait, le traitement de type "CS" est beaucoup plus général, et convient aussi bien pour les spectres 2D QUOSY symétriques que pour les spectres 2D asymétriques.

4.b. Paramétrage du protocole « *Non Uniform Sampling* »

Dans une expérience RMN 2D traditionnelle, l'échantillonnage du signal sur le domaine de temps indirect (t_1) est uniforme et réalisé en accord avec le théorème de Nyquist, basé sur le principe d'échantillonnage de Shannon. Ce théorème précise qu'une fonction périodique (cosinus ou sinus) de période, ω , ou de fréquence ($\nu = \omega/2\pi$) est correctement échantillonnée si au moins deux points de cette fonction sont échantillonnés correctement pendant la période ω . En fait, chaque acquisition successive réalisée en dimension indirecte d'une expérience 2D est caractérisée par une durée variable, t_1 , régie par une suite arithmétique uniforme, telle que :

$$t_1(n) = t_1(0) + (n - 1) \times \Delta t_1 \quad \text{(III.9)}$$

où n est la $n^{\text{ième}}$ expérience 1D transitoire de l'expérience 2D. Ainsi, l'incrément t_1 de la troisième expérience transitoire de cette expérience 2D sera égal à la somme de t_1 de la

première expérience et de deux fois l'incrément Δt_1 . Pour la vingtième acquisition, $t_1(20) = t_1(0) + 19 \times \Delta t_1$.

En pratique, l'incrément, noté Δt_1 , est directement lié à la largeur de la fenêtre spectrale sélectionnée en dimension F_1 (SW_1), soit $\Delta t_1 = 1/SW_1$. Si la fenêtre spectrale étudiée est petite, la valeur d'incrément t_1 entre deux acquisitions successives (cadence d'échantillonnage en t_1) sera grande. A l'inverse, plus la fenêtre spectrale est grande, plus la valeur d'incrément, Δt_1 , entre deux acquisitions successives t_1 sera petite.

En fonction de la qualité et de la résolution des informations recherchées, il convient de choisir le meilleur compromis entre temps d'expérience total et résolution en dimension t_1 . Ce choix est donc directement relié au nombre de données acquies en dimension indirecte t_1 (TD_1).

Avec un échantillonnage uniforme, la double transformée de Fourier en dimension directe (F_2) et indirecte (F_1) conduit à un spectre 2D contenant tous les signaux d'une molécule, correctement définis fréquentiellement. La représentation schématique de ce type d'échantillonnage est présentée sur la **Figure III.20**. Comme on peut le voir, chaque incrément t_1 conduit à un « spectre RMN 1D » après une première TF des données en t_2 (TF_2). Cette évolution périodique temporelle se transforme en un signal fréquentiel après une seconde $FT(t_1)$ (TF_1) conduisant à un spectre fréquentiel bidimensionnel.

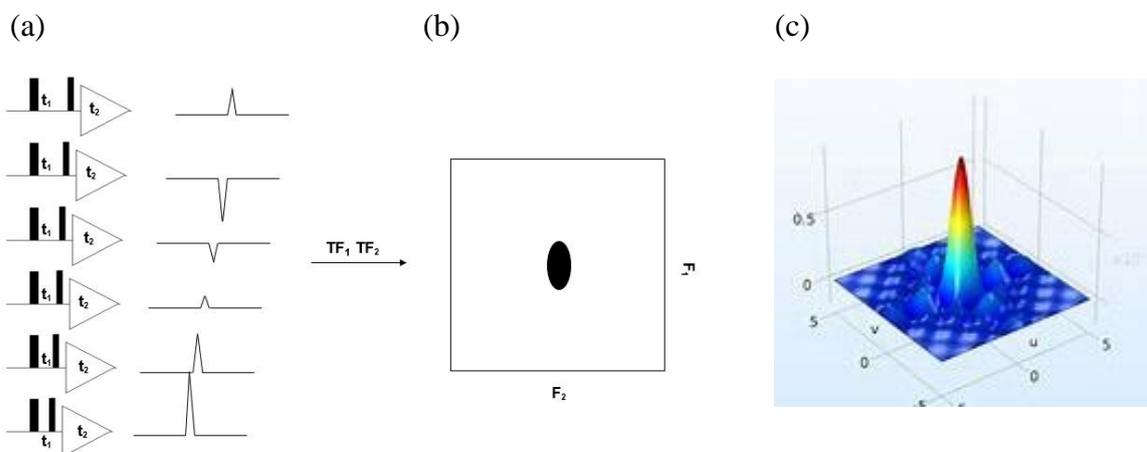


Figure III.20 : (a) Représentation schématique d'un échantillonnage uniforme d'un signal RMN (US) dans la dimension indirecte dans un expérience RMN 2D. (b) Carte 2D après une transformée de Fourier du signal dans les deux dimensions spectrales. (c) Représentation 3D d'un signal RMN $S(v_1, v_2)$. L'intensité du signal est représentée dans la 3^{ème} dimension.

Lors de l'acquisition d'une expérience RMN 2D avec l'application du protocole NUS, l'échantillonnage du signal dans le domaine de temps indirect (t_1) n'est plus uniforme. Il ne répond donc plus au théorème de Nyquist. Si les paramètres expérimentaux sont identiques à une expérience RMN 2D standard « US » (même fenêtre spectrale SW_1 et un nombre de

points (TD_1) choisi), l'incrément Δt_1 n'est plus uniforme et est différent de celui d'un échantonnage de type US. Cependant, les acquisitions successives d'un échantonnage NUS en fonction du temps suivent un ordre croissant.

Dans une expérience 2D « NUS », l'acquisition du $n^{\text{ième}}$ point du « spectre 1D » en dimension t_1 ne correspond pas forcément au $n^{\text{ième}}$ point du « spectre 1D » d'une expérience 2D « US » pour laquelle $t_1(n) = t_1(0) + n \times \Delta t_1$. En fait, le $n^{\text{ième}}$ point du « spectre 1D » obtenu dans le cadre du protocole NUS correspond à la $x^{\text{ième}}$ expérience 1D transitoire telle que $t_1(n) = t_1(0) + (x-1) \times \Delta t_1$ dans la limite du nombre de points défini par le paramètre TD_1 . Ainsi, si l'on acquiert l'ensemble des points en t_1 (TD_1 point choisi), le spectre RMN 2D observé sera identique à celui d'une expérience RMN 2D classique (US). L'intérêt de l'application du protocole NUS réside donc dans la non-uniformité de l'échantillonnage des données en t_1 . En effet, il est possible d'acquérir seulement un « certain » pourcentage des points en t_1 (expériences 1D transitoires), par exemple 25%, 50%, 75%, Dans ce cas, et malgré la non-uniformité de l'échantillonnage des données dans le domaine de temps t_1 , cet échantillonnage reste représentatif des données spectrales à acquérir, comme dans le cas des expériences 2D US [19,31]. Le principe schématique du protocole NUS est présenté sur la **Figure III.22**.

Pour parvenir à des résultats optimaux, l'échantillonnage du protocole NUS ne consiste pas simplement à un échantillonnage aléatoire des données. En effet, l'application d'une valeur d'incrément t_1 différente pour chaque TD_1 acquis est régit par une liste numérique définie. Cette liste est générée par un algorithme qui prend en compte trois paramètres. Le premier paramètre est celui qui régit toutes les acquisitions 2D en RMN : le nombre de point en dimension indirect (TD_1). En effet, pour toutes les expériences 2D la résolution spectrale dépend de la valeur de TD_1 sélectionnée. Le second paramètre qui génère le nombre d'incrément t_1 non linéaire est le pourcentage d'acquisition de l'expérience NUS. Compris entre 0 et 100 %, ce paramètre indique le nombre d'expériences 1D transitoires acquit en dimension t_1 . La liste des points sélectionnés est d'autant plus longue que le pourcentage NUS est grand. Par exemple, le nombre de points TD_1 acquis (TD_{acq}) pour un nombre de points TD_1 introduit égal à 200 et un pourcentage NUS de 50 est égal à (cf. **Figure III.21**) :

$$TD_{\text{acq}} = TD_1 \times \text{NUS} = 200 \times 50 \% = 100 \quad \text{(III.10)}$$

Le dernier paramètre essentiel pour la définition des points par l'algorithme est associé à la valeur du temps de relaxation transversale, T_2^* , des signaux enregistrés. Dans une expérience RMN 2D, l'évolution du signal dans la dimension indirecte t_1 doit être échantillonnée d'autant plus rapidement (intensité du signal maximale) que le temps de relaxation transversale T_2 des spins est court. Dans ce cas, le signal devra être échantillonné avec des incréments t_1 les plus faibles possibles (ce qui correspond aux premiers incréments t_1 dans les expériences RMN 2D classiques). Ainsi, l'acquisition des expériences avec des incréments plus longs devient

inutile. En ce sens, la valeur du paramètre T_2^* introduit dans l'algorithme permet de concentrer sa liste des points en dimension t_1 dans la gamme la plus pertinente pour reconstruire le « pseudo FID » dans la dimension indirecte (cf. **Figure III.22**).

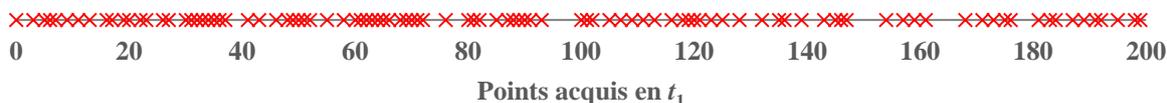


Figure III.21 : Exemple de représentation linéaire des points TD_1 acquis (TD_{acq}) pour une expérience 2D utilisant $TD_1 = 200$ points, $NUS = 50\%$ et $T_2 = 1$ s. Cette distribution des points a été modélisée à l'aide de l'algorithme de type CS (proposé dans TOPSPIN). En choisissant une valeur de T_2 petite (1 s) la plupart des points acquis en dimension indirecte sont concentrés dans la première moitié du FID indirect en dimension t_1 .

Durant l'acquisition en mode NUS d'une expérience 2D, le paramètre essentiel reste le pourcentage d'acquisition d'expérience NUS. Par l'intermédiaire de la liste des points acquis en dimensions indirecte qu'il génère, c'est lui qui régit la diminution de la durée de l'expérience RMN 2D. En effet, plus le pourcentage est faible, plus le nombre de points enregistré durant l'acquisition sera limité. Avec un nombre d'acquisition limité, le temps d'expérience global sera réduit considérablement.

Dans l'exemple présenté ci-dessus, le pourcentage sélectionné est de 50 %. En conséquence, seulement la moitié des expériences sont enregistrées et le temps d'expérience global est diminué d'environ 50 %. En pratique, ce temps n'est pas réduit strictement de 50 %. Il va dépendre de la valeur de T_2^* introduite, en concentrant les points sur une plage d'incrément t_1 optimale. Plus le T_2^* est faible, plus le temps d'expérience total sera encore plus réduit [40].

L'enregistrement expérimental des expériences 1D transitoires sélectionnées par l'algorithme ne permet pas encore d'éditer la carte 2D RMN. En effet, la non-périodicité des incréments t_1 interdit appliquer une double FT dans les deux dimensions. Pour répondre à ce problème, il est nécessaire d'effectuer un retraitement mathématique des données appelé *Compressed Sensing* (CS) [49-52]. L'objectif est de reconstruire l'ensemble des « expériences 1D transitoires » non acquises *via* le protocole NUS afin de pouvoir obtenir un spectre 2D NUS présentant les mêmes caractéristiques spectrales (fidélité spectrale) comparées au spectre 2D US (de référence). Le principe de cette reconstruction consiste à analyser le signal de chaque expérience 1D acquise afin de calculer la distribution optimale des différents points TD_1 non acquis expérimentalement. A partir de chaque point recalculé (associé à une valeur t_1), un signal digital est généré. Ces signaux correspondent aux différentes expériences 1D transitoires reconstruites, ce qui va permettre de générer une carte RMN 2D reconstruite dans les deux dimensions spectrales F_1 et F_2 [41].

(a)

(b)

(c)

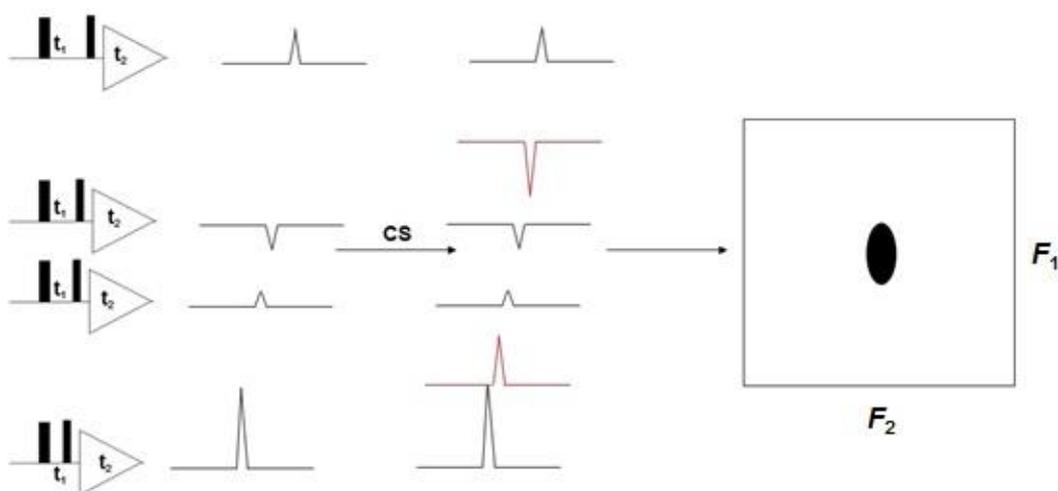


Figure III.22 : (a) Représentation schématique d'un échantillonnage NUS d'un signal dans la dimension indirecte d'une expérience RMN 2D. (b) Après avoir reconstruit les signaux manquants à partir d'un algorithme de type Cov ou Cs. (c) Carte 2D reconstruite dans les deux dimensions spectrales.

4.c. Application du protocole NUS dans les expériences 2D QUOSY DAN

Comme nous l'avons vu précédemment, les analyses par RMN 2D DAN dans les CLC permet d'accéder aux RDC(²H). Comme la durée de certaines expériences 2D QUOSY DAN peut conduire à une dégradation significative de l'homogénéité du CLC, la combinaison de ces expériences 2D DAN avec le protocole NUS a été exploré en 2011 (approche Cov / expérience 2D symétrique) [47] et en 2014 (protocole CS / expérience 2D dissymétrique) [48]. Une revue sur l'intérêt de ces deux approches a été publiée en 2015 [53].

Ces deux études ont montré que la combinaison NUS-Cov permettait : i) d'améliorer la résolution de certains pics sur la carte 2D, ii) une réduction possible du temps d'expérience (t_{exp}) par rapport aux expériences classiques (US-FT) sans perdre trop en résolution [47]. Pour la combinaison NUS-CS, il a été montré : i) un léger gain en sensibilité par rapport aux expériences classiques ; ii) le maintien d'une bonne résolution par rapport aux expériences classiques ; iii) la plus grande fidélité spectrale (résolution spectrale optimale) est obtenue lorsque t_s varie $0.5T_2^*$ entre $0.6 T_2^*$ quand le temps d'évolution t_1 suit une distribution décroissante exponentielle avec une constante de temps d'échantillonnage, t_s [48].

Dans la section suivante, nous présenterons l'intérêt du protocole NUS combiné aux expériences RMN 2D QUOSY Bis-WET (*Q*-COSY Fz Bis-WET DAN, *Q*-résolue Fz Bis-WET ou *Q*-résolue MQ Bis-WET) appliquées à RMN DAN dans les cristaux liquides lyotropes.

5. Application du protocole NUS sur les expériences 2D QUOSY avec saturation sélective

5.a. Combinaison du protocole NUS et saturation sélective Bis-WET

Afin de vérifier l'intérêt analytique que pourrait apporter la combinaison du bloc de saturation Bis-WET et du protocole NUS en RMN 2D QUOSY DAN anisotrope, nous avons appliqué l'approche NUS sur les expériences 2D Q -résolue MQ Bis-WET sur un échantillon modèle de butan-2-one dissous dans le PBLG. Cet échantillon est composé de 70 mg de butan-2-one, de 100 mg de PBLG (DP = 743) et de 550 mg de CHCl_3 .

Afin d'étudier l'influence du pourcentage d'acquisition des données en t_1 lors du protocole NUS sur la sensibilité des expériences DAN anisotropes (variation des rapports $(S/B)_i$), nous avons testé différents pourcentages (% NUS = 75 %, 50 % et 25 %). Pour cette étude, une série de trois expériences 2D QUOSY Bis-WET NUS DAN a été enregistrée (avec les mêmes conditions expérimentales (RG, NS, D_1 , t_{Aq} , ...)) et traitées avec les mêmes paramètres de filtrage (exponentiel) dans les deux dimensions), afin d'analyser une valeur moyenne des résultats RMN associée à un ensemble statistique.

Le spectre 2D Q -Résolue MQ Bis-WET DAN (spectre de référence) du butan-2-one a été enregistré en 14 heures avec (RG = 1150, NS = 64, $TD_1 = 512$, $TD_2 = 3500$, $D_1 = 0,1$, $t_{acq} = 1$ s). Pour étudier cet échantillon, les impulsions doublement sélectives dure 100 ms. Pour les SP du bloc WET-90, les puissances sont égales à $5,16 \times 10^{-5}$ W (42,87 dB), $8,01 \times 10^{-5}$ W (40,96 dB) $3,74 \times 10^{-5}$ W (44,27 dB), $2,01 \times 10^{-4}$ W (36,95 dB). Pour le bloc WET-270, les puissances associées aux SP sont de : $5,16 \times 10^{-4}$ W (32,87 dB), $8,01 \times 10^{-4}$ W (30,96 dB) $3,74 \times 10^{-4}$ W (34,27 dB), $2,01 \times 10^{-3}$ W (26,95 dB). Ce spectre 2D est présenté sur la **Figure III.23c**.

Pour les différents pourcentages % NUS choisis (75 %, 50 % et 25 %), les temps d'expérience ont été réduits respectivement à 10 heures 30 minutes, 7 heures et 3 heures et 30 minutes. A partir de l'analyse de ces spectres (série de trois expériences, soient 9 au total), nous avons évalué les rapports $(S/B)_i$ (moyenne sur les deux composantes) pour chaque site de la molécule, puis nous avons calculé le rapports des rapports $(S/B)_i$ (notés $R_i^{S/B}$) pour les différents pourcentages NUS et sur chaque site i , tels que :

$$R_i^{S/B} = \frac{(S/B)_i^{\%NUS}}{(S/B)_i^{ref}} \quad \text{(III.11)}$$

Les résultats obtenus pour les différents pourcentages d'acquisition NUS (75 %, 50 %, 25 %) par rapport à l'expérience 2D Q -résolue MQ Bis-WET sont listés dans le **Tableau III.1**.

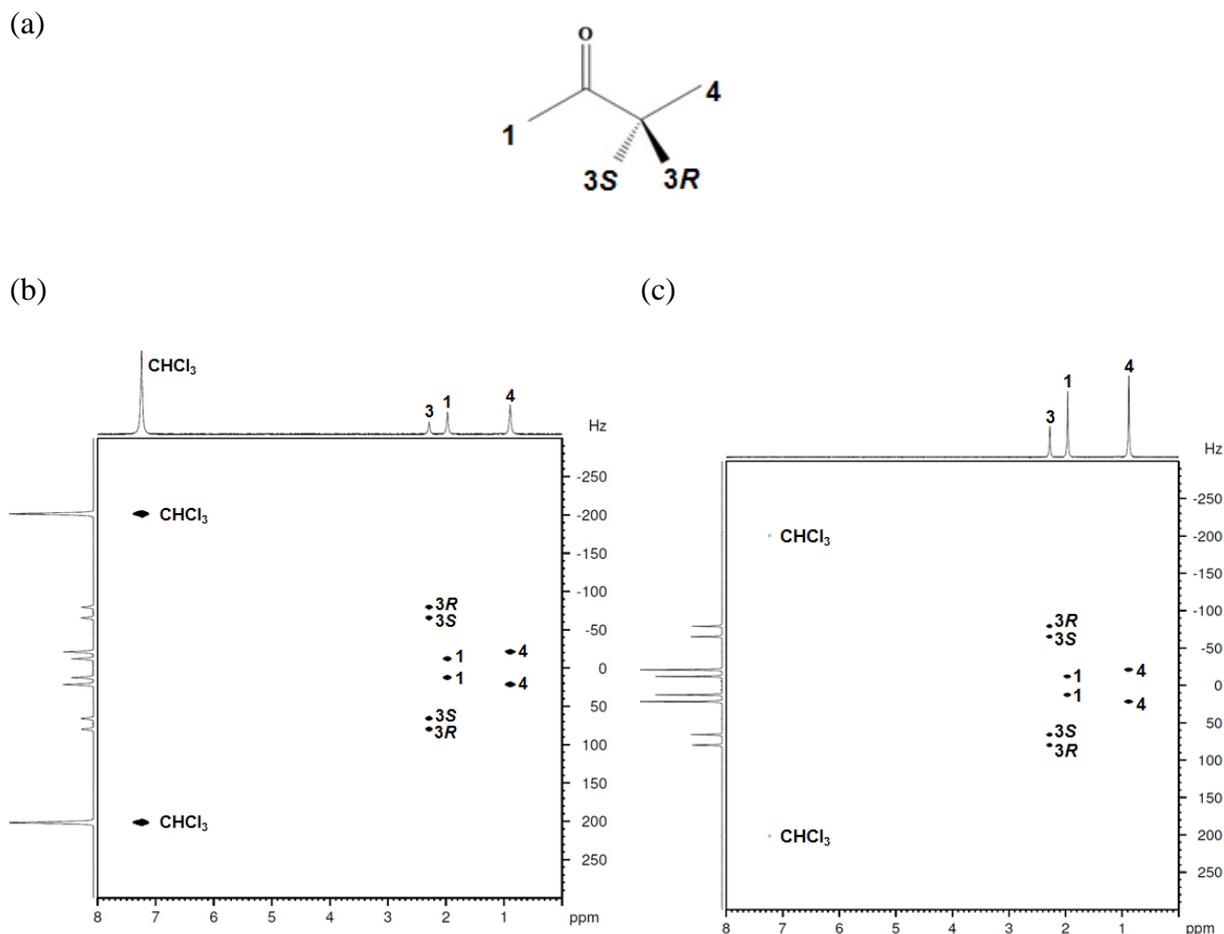


Figure III.23 : (a) Structure du butan-2-one. (b et c) Spectre 2D Q -résolue MQ et Q -résolue MQ Bis-WET du butan-2-one dans PBLG/ CHCl_3 à 300 K. Ces expériences ont été enregistrées en 14 heures ($\text{RG} = 1150$, $\text{NS} = 64$, $\text{TD}_1 = 512$, $\text{TD}_2 = 3500$, $\text{D}_1 = 0,1$, $t_{\text{acq}} = 1$ s). L'attribution R et S des énantiomères (associé au groupement méthylène) donnée sur le spectre 2D est arbitraire, mais telle que ($\Delta\nu_Q(^2\text{H}^R) > \Delta\nu_Q(^2\text{H}^S)$). Les caractéristiques des impulsions WET-90/270 ont été données dans le texte.

A la lecture des résultats, nous pouvons observer que plus le pourcentage d'acquisition d'expérience NUS est faible, plus les rapports $(S/B)_i$ des signaux sont faibles. Mathématiquement, cette observation s'explique par la réduction du nombre total de scans NS_i acquis au cours de l'expérience 2D DAN Q -résolue-Fz Bis-WET avec le protocole NUS.

En écartant les effets liés au relaxation T_1 et T_2^* , globalement, les rapports $(S/B)_i$ d'une molécule mesurés sur un spectre 2D dépendent du nombre de scans enregistrés, ce qui correspond au produit du nombre d'incréments t_1 et du nombre de scans NS_{tot} . Dans cette étude, 64 scans sont additionnés pour chaque incrément t_1 (avec $\text{TD}_1 = 512$), la valeur de NS_{tot} est égale à :

$$\text{NS}_{\text{tot}} = \text{NS} \times \text{TD}_1 = 64 \times 512 = 32768 \quad \text{(III.12)}$$

Tableau III.1 : Rapports $(R_i^{S/B})^{\text{exp}}$ des signaux du butan-2-one calculés à partir des spectres 2D Q-résolue MQ Bis-WET sans application du protocole de réduction NUS.

Site de la molécule ^a	$\delta_i(^2\text{H})$ (ppm)	NUS 100 % (Référence)	NUS 75 %	NUS 50 %	NUS 25 %
CH₃ (4)	0,91	1,000	0,985	0,760	0,671
CH₃ (1)	1,99	1,000	0,935	0,791	0,663
CH₂ (3R)	2,31	1,000	0,996	0,823	0,652
CH₂ (3S)	2,31	1,000	0,996	0,809	0,664
Val. moyenne	-	1,000	0,978	0,795	0,662

^a La structure du butan-2-one est présentée sur la **Figure III.23a**.

Si le spectre de référence (sans NUS) est composé de $NS_{\text{tot}} = 32768$ scans, les expériences QUOSY NUS présenteront un nombre total de scans plus petit. Cette diminution est proportionnelle au pourcentage d'acquisition NUS, selon l'**Equation III.13**:

$$NS_{\text{tot}} = NS \times TD_1^{\text{aq}} = NS \times (TD_1 \times \% \text{ NUS}) \quad \text{(III.13)}$$

Ainsi, le nombre de scans total NS_{tot} pour chaque expérience affectée par le protocole NUS est donc égale à :

$$\text{NUS} = 75 \% \quad NS_{\text{tot}} = NS \times (TD_1 \times \text{NUS}) = 64 \times (512 \times 0,75) = 24576 \quad \text{(III.14)}$$

$$\text{NUS} = 50 \% \quad NS_{\text{tot}} = NS \times (TD_1 \times \text{NUS}) = 64 \times (512 \times 0,50) = 16384 \quad \text{(III.15)}$$

$$\text{NUS} = 25 \% \quad NS_{\text{tot}} = NS \times (TD_1 \times \text{NUS}) = 64 \times (512 \times 0,25) = 8192 \quad \text{(III.16)}$$

Pour analyser les résultats, il est possible de comparer les valeurs de $(R_{\text{moy}}^{S/B})^{\text{exp}}$ avec les valeurs $(R^{S/B})^{\text{théo}}$ en considérant que les rapports $(S/B) \propto \sqrt{NS_{\text{tot}}}$. La valeur $(R^{S/B})^{\text{théo}}$ peut être alors calculée comme :

$$(R^{S/B})^{\text{théo}} = \frac{\sqrt{NS_{\text{tot}}^{\% \text{NUS}}}}{\sqrt{NS_{\text{tot}}^{\text{réf}}}} \quad \text{(III.17)}$$

La comparaison des résultats montre une réduction des rapports $(R_{\text{moy}}^{S/B})^{\text{exp}}$ moins importante que celle attendue théoriquement en accord avec l'**Equation III.17**. Les données sont

proposées dans le **Tableau III.2**. Cette plus faible réduction des rapports $(R_{\text{moy}}^{S/B})^{\text{exp}}$ comparée aux rapports $(R^{S/B})^{\text{théo}}$ peut être associée à la reconstruction idéale du signal par la méthode de *Compressed Sensing* qui « comble » les incréments t_1 non enregistrés expérimentalement.

Tableau III.2 : Comparaison entre les rapports théoriques $(R_i^{S/B})^{\text{théo}}$ et expérimentaux $(R_i^{S/B})^{\text{exp}}$ du butan-2-one (PBLG/CDCl₃)

NUS %	T _{exp} ^a (sec)	NS _{tot}	$(R^{S/B})^{\text{théo}}$	Variation (%)	$(R_{\text{moy}}^{S/B})^{\text{exp}}$	Variation (%)
100 % (réf)	50400	32768	1,000	0	1,000	0
75 %	37800	24576	0,871	-12,9	0,978	-2,2
50 %	25200	16384	0,711	-28,9	0,795	-20,5
25 %	12600	8192	0,500	-50,0	0,662	-33,8

^a Durée de l'expérience 2D exacte (en seconde) à partir de la différence (Heure de fin de l'expérience – Heure de début de l'expérience). Cette valeur diffère de la valeur calculée par le logiciel Topspin (commande « EXPT ») qui sous estime la durée totale.

Pour évaluer l'apport du protocole NUS en termes de sensibilité, nous avons exprimé le gain, G, en termes de rapport $(R_i^{S/B})^{\text{exp}}$ par unité d'expériences 1D transitoires enregistrées en dimension t_1 (soit TD₁^{aq}) par rapport à celui calculé pour l'expérience de référence, à partir de l'**Equation** :

$$G = \frac{(S/B)_i^{\text{NUS}} / (TD_1^{\text{aq}})_{\text{NUS}}}{(S/B)_i^{\text{réf}} / (TD_1^{\text{aq}})_{\text{réf}}} = \frac{(S/B)_i^{\text{NUS}}}{(S/B)_i^{\text{réf}}} \times \frac{(TD_1^{\text{aq}})_{\text{réf}}}{(TD_1^{\text{aq}})_{\text{NUS}}} \quad \text{(III.18)}$$

La **Figure III.24** présente graphiquement les gains obtenus pour les trois pourcentages d'acquisition NUS (75 %, 50 %, 25 %). Nous pouvons voir qu'un gain plus important avec le protocole NUS en termes de rapports $(S/B)_i$ par unité d'expériences 1D transitoires enregistrées en dimension t_1 , est obtenu.

Pour des conditions d'acquisition des données RMN (RG, NS, D₁, TD₁, TD₂, t_{acq}), de traitement des données (même filtrage, même *zero-filling*) et à largeur de raie identique, le protocole NUS conduit à une légère perte de rapport $(S/B)_i$ largement compensée par la diminution significative du temps d'expérience total. Par ailleurs, plus le pourcentage d'acquisition NUS est faible, plus le gain, G, exprimé en termes de rapport $(S/B)_i$ par unité d'expériences 1D transitoires enregistrées en t_1 est grand.

L'analyse des résultats sur le butan-2-one en milieu orienté confirme le potentiel analytique du protocole NUS autour des expériences QUOSY 2D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ DAN Bis-WET anisotropes. A priori, ces résultats pourraient indiquer qu'un pourcentage d'acquisition de 25 % soit plus intéressant dans la mesure où le gain en S/B par unité d'expériences 1D transitoires t_1 est égal à $\sim 2,6$ pour chaque site du butan-2-one contre respectivement 1,6 et 1,3 pour des NUS à 50 % et 75 %, compte tenu du temps d'expérience global raccourci. Cependant, l'acquisition des expériences QUOSY 2D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ DAN Bis-WET avec un pourcentage NUS de 25 % conduit à une multitude d'artefacts de reconstruction mais aussi des distorsions et des élargissements des signaux du soluté (fidélité spectral faible) incompatibles avec des mesures de rapports isotopiques ($^2\text{H}/^1\text{H}$)_i expérimentales robustes et fiables (cf. **Figure IV.25**).

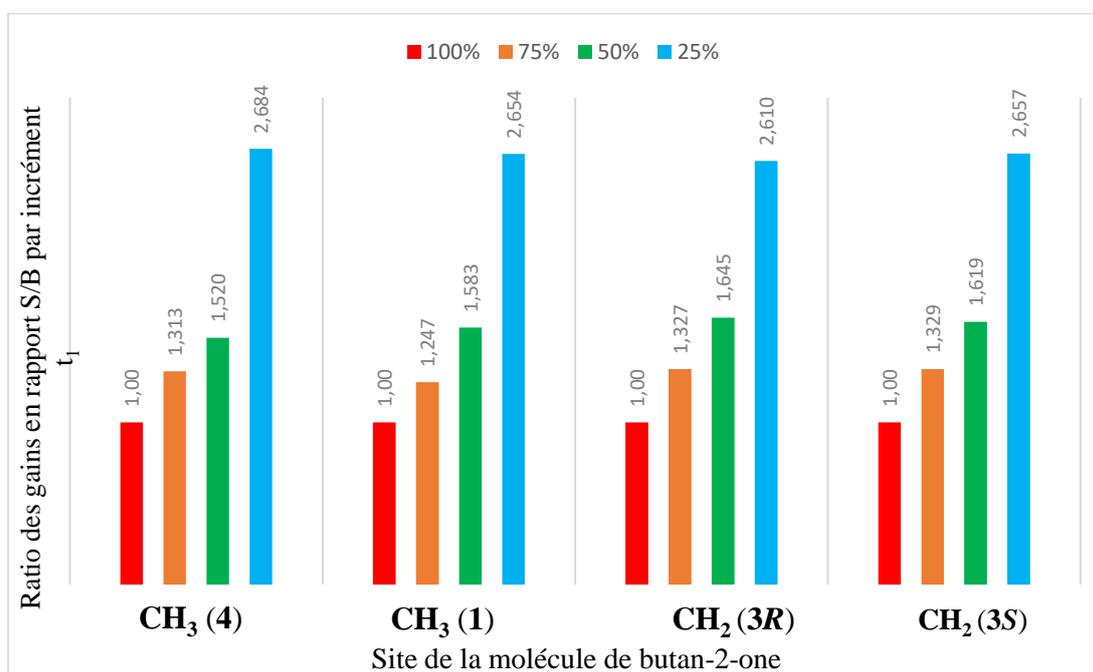


Figure III.24 : Gains en terme de rapport signal sur bruit (S/B)_i par unité d'expériences 1D transitoires en t_1 en fonction de la valeur du % NUS.

Les artefacts et la distorsion des résonances observés trouvent probablement leurs origines dans la complexification de la reconstruction des acquisitions par l'algorithme de *Compressed Sensing* quand la valeur %NUS est faible. Par exemple, pour un pourcentage d'acquisition de 25 %, seulement un quart des points sont réellement acquis (TD_1^{aq}), tandis que les trois quarts manquants sont reconstruits à partir de l'algorithme. Par ailleurs, la dispersion des points enregistrés sera d'autant plus importante que le temps de relaxation transversale T_2^* choisi est court, et concentre l'acquisition des points pour les premières expériences 1D transitoires.

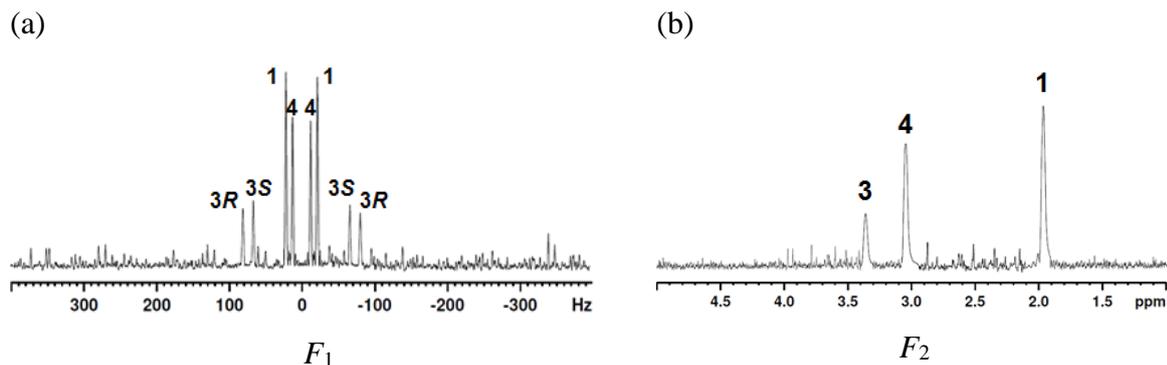


Figure III.25 : Projections F_1 (a) et F_2 (b) du spectre 2D Q-résolue MQ DAN- $\{^1\text{H}\}$ tilté du butan-2-one dans PBLG/ CHCl_3 obtenu avec le protocole NUS (25%). Le spectre a été enregistré en 3 heures et 30 minutes. La carte 2D obtenue avec NUS (25%) n'a pas été symétrisée. Noter la profusion des artefacts de reconstruction.

Un exemple de distribution des points enregistrés est présenté sur les **Figures III.26a** et **III.26b** pour une valeur de NUS = 50 % et NUS = 25 % avec une valeur de T_2^* fixée à 1s. Comme nous pouvons le voir sur la **Figure III.26a**, il existe de larges plages où aucun point t_1 n'est acquis durant l'expérience. Dans ces zones, la reconstruction du signal *via* l'algorithme de *Compressed Sensing* est plus difficile et le spectre est moins fidèle. Dans ce cas, la reconstruction devient trop approximative. A l'opposé, l'utilisation d'une valeur NUS de 50 % (*cf.* **Figure III.26b**), conduit à une distribution d'expériences 1D transitoires en t_1 plus harmonieuse et donc des spectres 2D « CS » reconstruits plus fidèles.

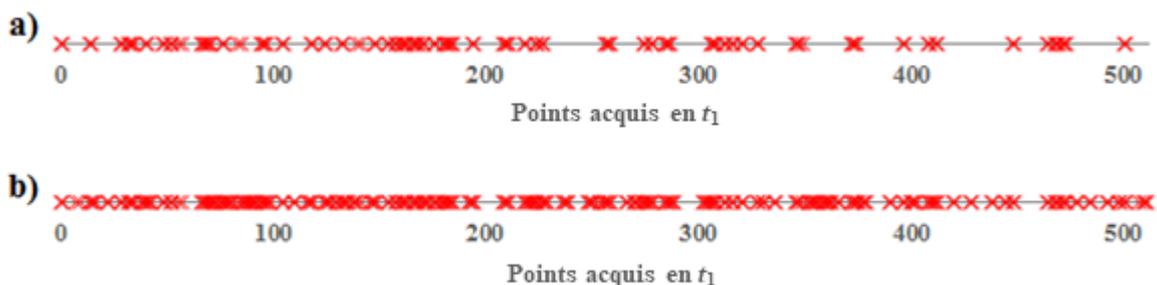


Figure III.26 : Distribution des points TD_1 acquis lors de l'expérience 2D Q-résolue Fz Bis-WET du butan-2-one avec %NUS égal à : (a) 25 % ; (b) 50 %. Pour les deux expériences, le nombre de TD_1 sélectionné est égal à 512 et le temps de relaxation transversale effectif T_2^* est égal à 1 s.

En conclusion, l'étude des différents pourcentages d'acquisition NUS semble indiquer qu'une valeur %NUS autour de 50% présente le meilleur compromis entre le temps d'expérience global et la qualité des spectres RMN 2D QUOSY.

5.b. Application du protocole NUS sur une molécule d'intérêt : cas de la frambinone

Les travaux préliminaires menés autour de la saturation sélective (Bis-WET) et de la réduction du temps d'expérience globale (NUS) dans les séquences RMN DAN 2D QUOSY

sans saturation sélective (16 heures) soit un gain de quatre heures. De manière pragmatique, nous pouvons utiliser ce gain en augmentant le nombre de scans par incrément t_1 .

5.c. Augmentation du nombre de scans à temps d'expérience constant

Afin d'utiliser le gain de temps issu de la réduction associé au protocole NUS, nous avons augmenté le nombre de scans par expériences 1D transitoires en maintenant un temps d'expérience total constant. Dans ce but, nous avons réanalysé l'échantillon modèle de butan-2-one avec les mêmes pourcentages d'acquisition d'expérience NUS (75 %, 50 % et 25 %) mais en changeant le nombre de scans. Pour conserver le temps d'expérience total de la Q -résolue Fz Bis-WET ($t_{\text{exp}} = 14$ heures), le nombre de scans NS est augmenté de 64 à 82 (18 scans) dans le cas du protocole NUS à 75 %, de 64 à 128 (64 scans) pour un pourcentage d'acquisition NUS de 50 % et de 64 à 256 (192 scans) dans le cas du NUS 25 %.

Comme précédemment, nous avons calculé les moyennes des $R_i^{S/B}$ (cf. [Equation III.11](#)) de chaque site de la molécule par rapport aux spectres de références (sans réduction du temps d'expérience *via* le protocole NUS). Les données sont consignées dans le [Tableau III.3](#). Contrairement aux expériences précédentes, les rapports $R_i^{S/B}$ obtenus restent proches de la valeur de l'expérience de référence quel que soit le pourcentage d'acquisition NUS appliqué. Nous pouvons même noter qu'avec un protocole NUS de 50 %, les rapports S/B obtenus pour le soluté sont très légèrement supérieurs à ceux du spectre de référence.

Tableau III.3 : Rapports ($R_i^{S/B}$)^{exp} des signaux du butan-2-one calculés à partir des spectre 2D Q -résolue MQ Bis-WET sans application du protocole de réduction NUS (75 %, 50 %, 25 %) et à temps d'expérience constant ($t_{\text{exp}} = 14$ heures).

Site de la molécule ^a	$\delta_i(^2\text{H})$ (ppm)	NUS 100 % (Référence)	NUS 75 %	NUS 50 %	NUS 25 %
CH ₃ (4)	0,91	1,000	0,927	1,038	0,933
CH ₃ (1)	1,99	1,000	0,923	1,042	0,938
CH ₂ (3R)	2,31	1,000	0,928	1,052	0,923
CH ₂ (3S)	2,31	1,000	0,922	1,039	0,916
Val. moyenne	-	1,000	0,925	1,0434	0,927

^a La structure du butan-2-one est présentée sur la [Figure III.23a](#).

Pour pouvoir comparer ces résultats avec les expériences précédentes à NS constant, nous avons également calculé le gain, G, en termes de rapport ($R_i^{S/B}$)^{exp} par unité d'expériences 1D transitoires enregistrées en dimension t_1 (soit TD_1^{aq}) par rapport à celui

calculé pour l'expérience de référence, à partir de l'Equation III.18. Les résultats obtenus sous forme de graphique sont présentés sur la Figure III.28. Ces graphes peuvent être comparés à ceux de la Figure III.24. A temps d'expérience 2D constant, il apparaît ainsi : i) une augmentation du gain du signal (pour chaque site) et pour les différents %NUS (comme précédemment) ; ii) une augmentation de chaque valeur de gain (pour chaque %NUS) compris entre 38 % à NUS 25% (2,6 à 3,6) et 33 % à NUS 50% (1,5 à 2). De manière suprenante aucun gain n'a été constaté pour l'expérience NUS 75%,

En conclusion, il apparaît que le gain en temps d'expérience total associé aux expérience 2D NUS peut être utilisé pour augmenter le nombre de scans pour chaque expérience transitoire 1D, et donc *in fine* augmenter le rapports (S/B)_i des signaux du soluté.

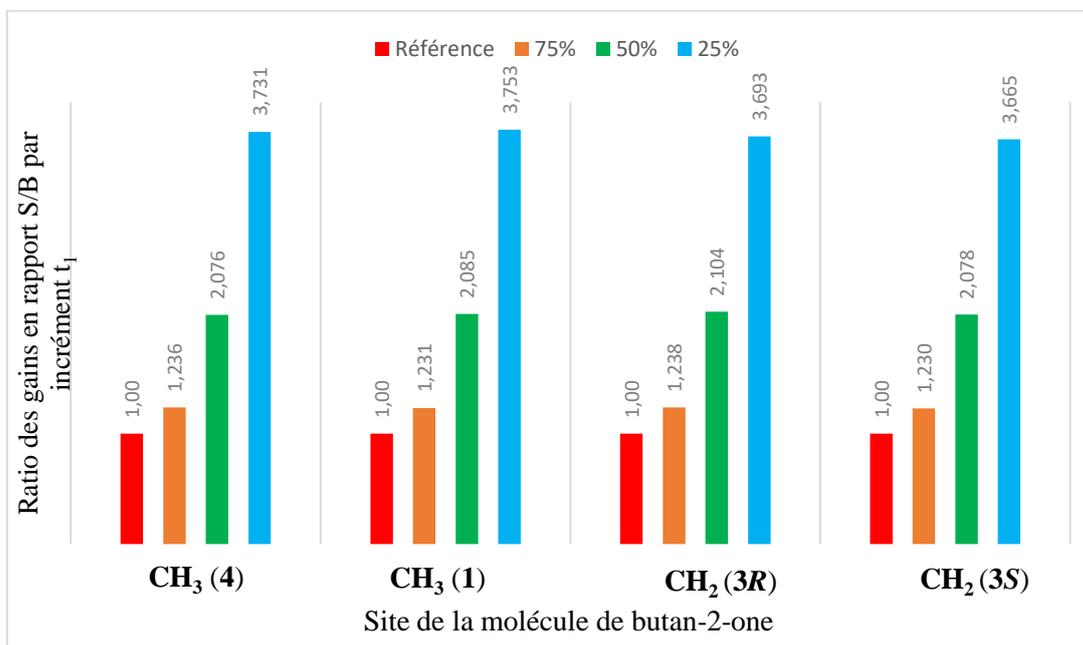
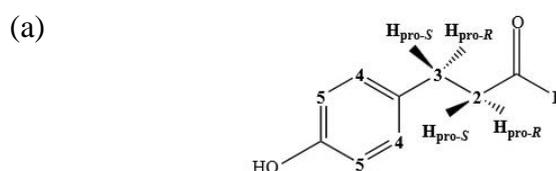


Figure III.28 : Gains en terme de rapport signal sur bruit (S/B)_i par unité d'expériences 1D transitoires en t_1 en fonction de la valeur du % NUS pour les 4 sites de la molécules.

Sur l'échantillon de frambinone, nous avons réalisé un spectre Q -résolue Fz Bis-WET avec un pourcentage d'acquisition NUS de 50 % en augmentant le nombre de scans de 64 à 80 scans par incrément t_1 . Dans ces conditions, le temps d'expérience global est de 16 heures, soit la durée de l'expérience de référence sans saturation sélective Bis-WET et sans l'application du protocole NUS. Le spectre correspondant à cette expérience est présenté sur la Figure III.29.



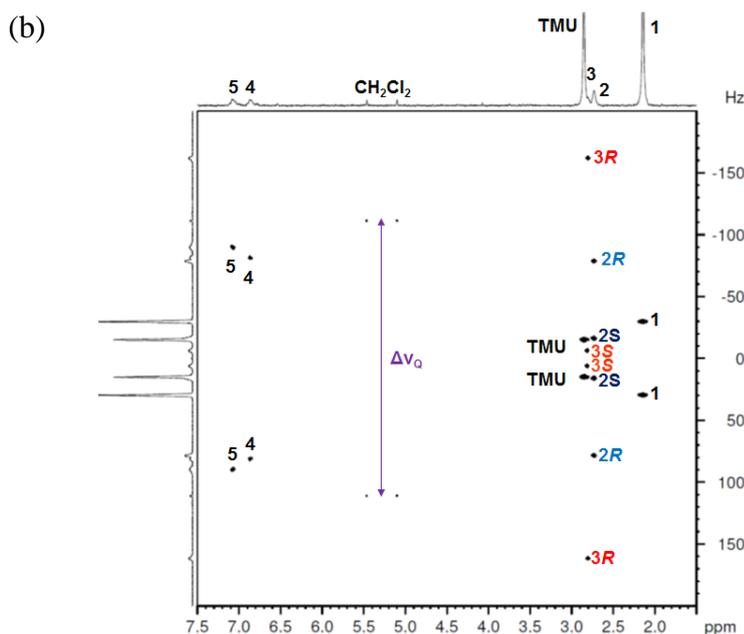


Figure III. 29 : (a) Structure de la frambinone. (b) Spectre Q -résolue Fz Bis-WET tilté et symétrisé de la molécule de frambinone dans une phase PBLG/CH₂Cl₂-CCl₄ en présence de TMU enregistré avec un protocole NUS de 50 %. L'expérience a été acquise en 16 heures avec NS = 80, TD₁ = 400 (soit TD_{aq} = 200 et TD_{rec} = 200), D₁ = 0,05 et t_{acq} = 2 s. Le bloc de saturation doublement sélective Bis-WET est appliqué sur les signaux du CH₂Cl₂.

Pour de nouveau pouvoir comparer ces résultats de ces deux nouvelles expériences, nous avons calculé les moyennes des $R_i^{S/B}$ (cf. **Equation III.11**) de chaque site de la molécule à NS constant cf. **Figure III.27**) et à temps constant (cf. **Figure III.29**) par rapport aux spectres de références (sans saturation sélective). Les données sont consignées dans le **Tableau III.4**. Comme nous pouvons le voir, la réduction de l'intensité des signaux engendrée par l'utilisation du protocole NUS à NS constant disparaît pour l'expérience utilisant du protocole NUS à temps constant.

Les résultats présentés au cours de ce **Chapitre III** ont montré l'intérêt de la saturation doublement sélective simultanée des deux composantes du DQ du co-solvant organique dans le cadre des expériences RMN 2D QUOSY DAN-¹H} pour l'analyse des molécules d'intérêt. En combinant les effets de l'expérience Bis-WET avec le protocole NUS, le calcul des rapports isotopiques (²H/¹H) des groupements dont les signaux sont les plus faibles devrait être simplifié.

Tableau III.4 : Rapports $(R_i^{S/B})^{\text{exp}}$ des signaux de la frambinone calculés à partir des spectre 2D *Q*-résolue MQ sans saturation, avec saturation et application du protocole NUS à nombre de cans ou temps constant

Site de la molécule	δ (^2H) (ppm)	$\Delta\nu_Q(^2\text{H})$ (Hz)	Sans saturation	Avec Bis-WET	
			Référence NS = 64 $t_{\text{exp}} = 16$ h	NUS 50 % NS = 64 $t_{\text{exp}} = 12$ h	NUS 50 % NS = 80 $t_{\text{exp}} = 16$ h
CH₃ (1)	2,17	61,2	1,00	0,821	1,023
CH₂ (2R)	2,73	155,8	1,00	0,832	1,009
CH₂ (2S)	2,73	35,1	1,00	0,809	0,983
CH₂ (3R)	2,83	323,2	1,00	0,819	1,016
CH₂ (3S)	2,83	10,1	1,00	0,783	0,991
CH (4)	6,88	164,3	1,00	0,729	0,943
CH (5)	7,07	180,2	1,00	0,742	0,973

^a La structure du frambinone est présentée sur la **Figure III.28a**.

Références

- [1] Radiation damping in modern NMR experiments: Progress and challenges
Mathur-De Vré R.
Prog. Biophys. Molec. Biol., **1980**, 35, 103-134.
- [2] Understanding NMR Spectroscopy
Keeler J.
How the spectrometer work, **2002**, Chap. 5, 65-78.
- [3] Radiation damping in modern NMR experiments: Progress and challenges
Krishnan V.V., Murali N.
Progress in NMR Spectroscopy, **2013**, 68, 41-57.
- [4] Radiation damping in high resolution NMR: A simulation study
Vlassenbroek A., Jeener J., Broekaert P.
J. Chem. Phys., **1995**, 103, 5886-5897.
- [5] Pulsed Fourier-transform NMR spectrometer for use with H₂O solutions
Redfield A.G., Gupta R.K.
J. Chem. Phys., **1971**, 54, 1418-1419.
- [6] NMR basic principles and progress
Redfield A.G.
Edition Springer, **1976**, 13, 137-152.
- [7] Special problems of NMR in H₂O solution
Redfield A.G.
NMR in the Life Sciences, **1986**, 107, 1-10.
- [8] Homonuclear decoupling and peak elimination in Fourier transform nuclear magnetic resonance
Jesson J.P., Meakin P., Kneissel G.
J. Am. Chem. Soc., **1973**, 95, 618-620.
- [9] The signal-to-noise ratio of the nuclear magnetic resonance experiment
Hoult D.I., Richards R.E.
J. Magn. Res., **1976**, 24, 71-85.
- [10] Radiation damping effects on NMR signal intensities
Mao X., Wu D., Ye C.
Chem. Phys. Lett., **1993**, 204, 123-127.
- [11] Cross relaxation and spin diffusion effects on the proton NMR of biopolymers in H₂O
Stoesz J.D., Redfield A.G., Malinowski D.
FEBS Letters, **1978**, 91, 320-324.
- [12] Solvent signal suppression in NMR
Guéron G., Plateau P., Decorps M.
Progress in NMR Spectroscopy, **1991**, 25, 135-209;

- [13] Measurement of proton-phosphorus-31 NMR coupling constants in double-stranded DNA fragments
Sklenár V., Bax A.
J. Am. Chem. Soc., **1987**, 109, 7525-7526.
- [14] Extended heteronuclear editing of 2D ¹H NMR spectra of isotope-labeled proteins, using the X(ω_1, ω_2) double half filter
Otting G., Wüthrich K.
J. Magn. Res., **1989**, 85, 586-594.
- [15] Protein hydration in aqueous solution
Otting G., Liepinsh E., Wüthrich K.
Science, **1991**, 254, 974-980.
- [16] Quantitative J correlation: a new approach for measuring homonuclear three-bond J(HNH α) coupling constants in ¹⁵N-enriched proteins
Vuister G.W., Bax A.
J. Am. Chem. Soc., **1993**, 115, 7772-7777.
- [17] Absorption-mode two-dimensional NMR spectra recorded using pulsed field gradients
Davis A.L., Laue E.D., Keeler J., Moskau D., Lohman, J.
J. Magn. Reson., **1991**, 94, 637-644.
- [18] Complete water suppression for solutions of large molecules based on diffusional differences between solute and solvent (DRYCLEAN)
Zilj P., Moonen C.
J. Magn. Reson., **1990**, 87, 18-25.
- [19] Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions.
Piotto M., Saudek V., Sklenár V.
J. Biomol. NMR, **1992**, 2, 661-665.
- [20] Water suppression that works. Excitation sculpting using arbitrary wave-forms and pulsed-field gradients
Hwang T.L., Shaka A.J.
J. Magn. Reson., **1995**, 112, 275-279.
- [21] Improved WATERGATE pulse sequences for solvent suppression in NMR spectroscopy
Liu M., Mao X., Ye C., Hunag H., Nicholson J., Lindon J.
J. Magn. Reson., **1998**, 132, 125-129.
- [22] Perfecting" WATERGATE: clean proton NMR spectra from aqueous solution
Adams R.W., Holroyd C.M., Aguilar J.A., Nilsson Morris G.A.
Chem. Commun., **2013**, 49, 358-360.
- [23] WET, a T₁- and B₁-insensitive water-suppression method for in vivo localized ¹H NMR spectroscopy
Ogg R.J., Kingsley P.B., Taylor J.S.
J. Magn. Reson. B, **1994**, 104, 1-10.
- [24] WET solvent suppression and its applications to LC NMR and high-resolution NMR spectroscopy
Smallcombe S.H., Patt S.L., Keifer P.A.

- J. Magn. Reson. A*, **1995**, 117, 295-303.
- [25] [Band-selective radiofrequency pulse](#)
Geen G, Freeman R.
J. Magn. Reson., 1991, 93, 93-141.
- [26] [Two-dimensional deuterium NMR spectroscopy of chiral molecules oriented in a polypeptide liquid crystal: Application for the enantiomeric analysis through natural abundance deuterium NMR](#)
Merlet D., Ancian B., Courtieu J., Lesot P.
J. Am. Chem. Soc., **1999**, 121, 5249-5258.
- [27] [Nonuniform sampling for NMR spectroscopy](#)
Robson S., Arthanari H., Hyberts S.G., Wagner G.
Methods Enzymol., **2019**, 614, 263-291.
- [28] [Principles of NMR in one and two dimensions](#)
Ernst R., Bodenhausen G., Wokaun A.
Edition Clarendon Press, **1987**.
- [29] [Nuclear spin hamiltonian](#)
Levitt M.
Spin dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance, *Edition Wiley*, **2008**, Chap. 8, 171-194.
- [30] [Cryogenically cooled probes, a leap in NMR technology](#)
Kovacs H., Moskau D., Spraul M.
Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc., **2005**, 45, 131-155.
- [31] [Dynamic nuclear polarization opens new perspectives for NMR spectroscopy in analytical chemistry](#)
Plainchont B., Berruyer P., Dumez J-N., Jannin S., Giraudeau P.
Anal. Chem., **2018**, 90, 3639-3650.
- [32] [NMR at low and ultra-low temperatures](#)
Tycko R.
Acc. of Chem. Res., **2013**, 46, 1923-1932
- [33] [How to face the low intrinsic sensitivity of 2X heteronuclear NMR with fast repetition techniques: go faster to go higher](#)
Farjon J.
Magn. Reson. Chem., **2017**, 55, 883-892.
- [34] [Non-Cartesian sampling schemes and the acquisition of 2D NMR correlation spectra from single-scan experiments](#)
Frydman L., Peng J.
Chem. Phys. Lett., **1994**, 222, 371-377.
- [35] [The acquisition of multidimensional NMR spectra within a single scan](#)
Frydman L., Scherf T., Lupescu A.
PNAS, **2002**, 99, 15858-15862.

- [36] Two-dimensional hadamard NMR spectroscopy
Kupce E., Freeman R.
J. Magn. Res., **2003**, 162, 300-310.
- [37] Ultrafast 2D NMR: an emerging tool in analytical spectroscopy
Giraudeau P., Frydman L.
Ann. Rev. Anal. Chem., **2014**, 7, 1029-1061.
- [38] Fast access to residual dipolar couplings by single-scan 2D NMR in oriented media
Giraudeau P., Montag T., Charrier B., Thiele C.M.
Magn. Reson. Chem., **2012**, 50, S53-S57.
- [39] Detection of quadrupolar nuclei by ultrafast 2D-NMR: exploring the case of deuterated analytes aligned in chiral oriented solvents
Lesot P., Berdagué P., Giraudeau P.
Chem. Commun., **2016**, 52, 2122-2125.
- [40] Exponential sampling, an alternative method for sampling in two-dimensional NMR experiments
Barna J.C., Laue E.D., Mayger M.R., Skilling J., Worrall S.J.
J. Magn. Reson., **1987**, 73, 69-77.
- [41] Fast acquisition of NMR spectra using Fourier transform of non-equispaced data
Marion D.
J. Biomol. NMR., **2005**, 32, 149-151.
- [42] Maximum entropy signal processing in practical NMR
Sibisi S., Skilling J.G., Brereton R., Laue E.D., Staunton J.
Nature, **1984**, 311, 446-447.
- [43] Improved resolution in triple-resonance spectra by nonlinear sampling in the constant-time domain
Schmieder P., Stern A.S., Wagner G., Hoch J.C.
J. Biomol. NMR, **1994**, 4, 483-490.
- [44] Perspectives in magnetic resonance: NMR in the post-FFT era
Hyberts S.G., Arthanari H., Robson S.A., Wagner G.
J. Magn. Reson., **2014**, 241, 60-73.
- [45] Fast forward maximum entropy reconstruction of sparsely sampled data
Balsgart N.M., Vosegaard T.
J. Magn. Reson., **2012**, 223, 164-169.
- [46] Non-uniform sampling and non-Fourier signal processing methods in multidimensional NMR
Mobli M., Hoch J.C.
Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc., **2014**, 83, 21-41.
- [47] Fast and high-resolution stereochemical analysis by non-uniform sampling and covariance processing of anisotropic natural abundance 2D ²H NMR datasets
Lafon O., Hu B., Amoureux J-P., Lesot P.
Chem. Eur. J., **2011**, 17, 6716-6724.

- [48] Criteria for sensitivity enhancement by compressed sensing: practical application to anisotropic NAD 2D NMR spectroscopy
Kazimierczuk K., Lafon O., Lesot P.
Analyst, **2014**, 139, 2702-2713.
- [49] Non-uniform sampling for all: more NMR spectral quality, less measurement time
Delaglio F., Walker G., Farley K., Sharma R., Hoch J.C., Arbogast L.W., Brinson R.G., Marino J.P.
Am. Pharm. Rev., **2017**, 20, 1-12.
- [50] Stable signal recovery from incomplete and inaccurate measurements
Candes E., Romberg J., Tao T.
IEEE Trans. Inf. Theory., **2006**, 52, 489-509.
- [51] Analysis of non-uniformly sampled spectra with multi-dimensional decomposition
Orehov. V.Y., Jaravine V.A.
Progress in NMR Spectroscopy, **2011**, 59, 271-292.
- [52] Random sampling in multidimensional NMR spectroscopy
Kazimierczuk K., Stanek J., Zawadzka-Kazimierczuk A., Kozminski W.
Progress in NMR Spectroscopy, **2011**, 57, 420-434.
- [53] Fast acquisition of multidimensional NMR spectra of solids and mesophases using alternative sampling methods
Lesot P., Kazimierczuk K., Trébosc J., Amoureux J-P., Lafon O.
Magn. Reson. Chem., **2015**, 53, 927-939.

Chapitre IV

**Analyse de la vanilline par RMN DAN
dans une phase cristal-liquide chirale**

Après divers développements méthodologiques présentés dans le **Chapitre III**, nous étudierons au cours de ce **Chapitre IV**, la vanilline, molécule aromatique d'intérêt économique, très utilisée dans l'industrie alimentaire. Nous examinerons les avantages de la RMN 2D DAN- $\{^1\text{H}\}$ anisotrope pour accéder au profil isotopique aromatique de cette molécule.

1. L'arôme de vanille

1.a. Composition moléculaire de la vanille

La gousse de vanille est le fruit d'une liane grimpante de la classe des *Liliopsida*, de la famille des *Orchidaceae* (orchidées) et du genre *Vanilla* comme défini par le biologiste Philip Miller en 1754 [1]. La principale espèce biologique utilisée pour produire la vanille est la *Vanilla planifolia* originaire d'Amérique centrale. La gousse de vanille contient plus de 200 molécules (cf. **Figure IV.1**). Parmi elles, on peut citer par exemple, l'alcool para-anisique, l'acide para-anisique, le para-hydroxybenzaldéhyde ou l'acide para-hydroxybenzoïque qui sont à l'origine de toute la subtilité aromatique associée au goût de la vanille dite « naturelle » (cf. **Figure IV.2**).

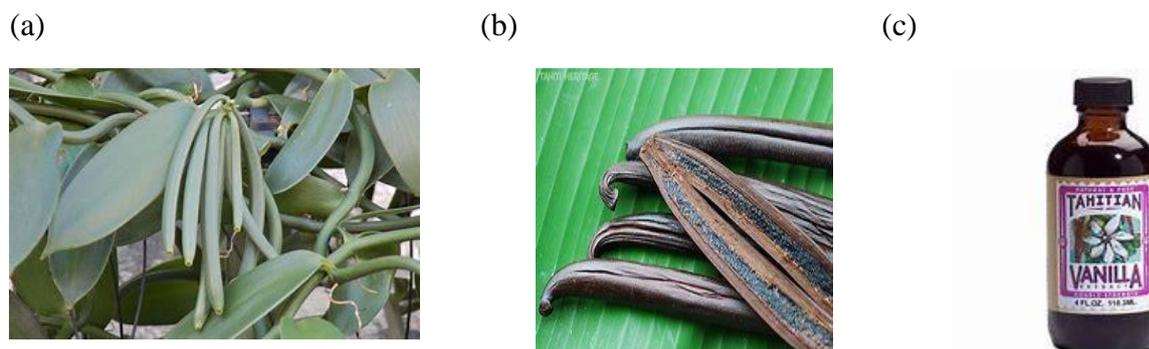


Figure-IV.1 : (a) Gousse de vanille de type *Vanilla planifolia*. (b) Gousses de *Vanilla Tahitian*. (c) Extrait de vanille tahitienne.

Ces composés sont présents en grande quantité dans certaines espèces de vanille comme la *Vanilla Tahitian* (cf. **Figure IV.1b**) [2]. Cependant, la molécule de vanilline (4-hydroxy-3-méthoxybenzaldéhyde) est la source principale de l'arôme de la vanille (cf. **Figure IV.3**). Elle dérive du benzaldéhyde substitué par un groupe méthoxy en position *meta* et un groupement hydroxyle en position *para*. Elle possède trois sites hydrogénés aromatiques et sa masse moléculaire est de 152,1 g/mol.

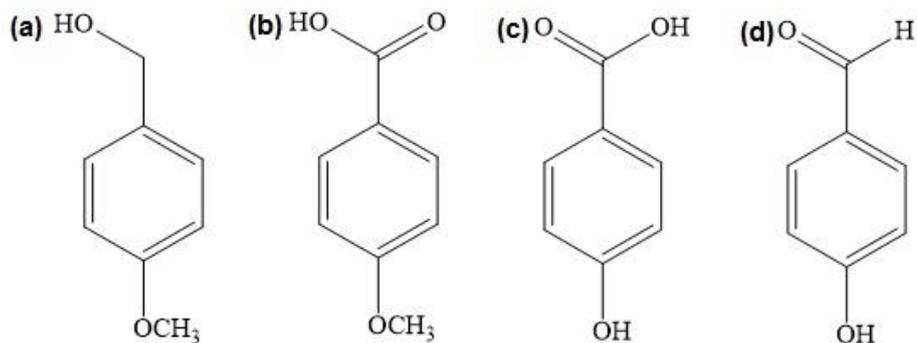


Figure IV.2 : Structure des molécules aromatiques présentes dans la gousse de vanille : (a) l'alcool *para*-anisique, (b) l'acide *para*-anisique, (c) l'acide *para*-hydroxybenzoïque, (d) le *para*-hydroxybenzaldéhyde.

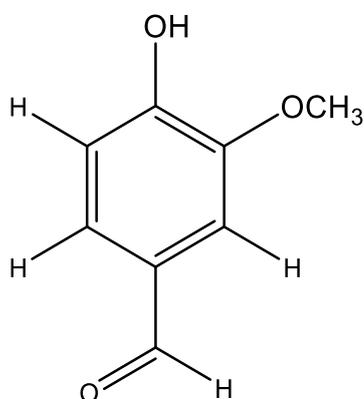


Figure IV.3 : Structure du 4-hydroxy-3-méthoxybenzaldéhyde, principale source moléculaire de l'arôme de la vanille.

La vanilline fût identifiée en 1816 par Bucholtz. En 1858, Théodore Nicolas Gobley parvient à l'extraire et à l'isoler pour la première fois par macération dans l'alcool à 85°, puis extraction à l'éther et évaporation [3]. En 1874, Wilhelm Haarmann et Ferdinand Tiemann identifient la structure chimique de la vanilline et découvrent une première voie de synthèse organique à partir de l'isoeugénol, molécule présente dans l'écorce de pin [4]. Très vite, de nouvelles voies de synthèse sont mises au point, à partir, par exemple, du gäïacol en 1876 par Karl Reimer [5] (cf. **Figure IV.4**). De nos jours, il existe un grand nombre de chemins réactionnels pour produire de la vanilline (cf. **Figure IV.5**). Du fait de son fort pouvoir aromatisant, la vanilline est très utilisée dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des cosmétiques.

1.b. Voie de synthèse de la vanilline

Pour obtenir un extrait de vanilline d'origine naturelle, l'unique méthode consiste à réaliser une extraction liquide-liquide à partir des gousses de vanille mûres (cf. **Figure-IV.1a** et **1b**). La majorité de la production mondiale de gousses de vanille se situe à Madagascar. La durée plutôt longue du protocole d'extraction, le coût de la main-d'œuvre et les faibles

volumes de production (liés à certains problèmes climatiques de cette région) induisent un coût très élevé du prix de la vanilline au kg.

Devant la demande mondiale grandissante de vanilline, diverses voies de synthèse (à coûts modérés) ont été mises au point. Désormais, deux stratégies sont couramment appliquées : i) la bioconversion de précurseurs d'origine naturelle comme l'eugénol, l'acide férulique naturel, la curcumine ou la lignine (issus de cellules de plantes ou de bactéries) en vanilline hémisynthétique ; ii) la synthèse de la vanilline à partir de précurseur non-naturel comme l'acide férulique de synthèse ou le gaïacol. Actuellement, la majorité de la vanilline hémisynthétique est obtenue à partir de l'acide férulique provenant du riz, tandis que la vanilline de synthèse provient du gaïacol.

A l'achat, le prix d'un kilogramme de gousses de vanille est d'environ 500 €. Sachant qu'il est nécessaire d'utiliser 50 kg de gousse pour produire 1 kg de vanilline naturelle, le prix au kilogramme revient à 25 k€. Pour la vanilline hémisynthétique, le prix est d'environ 1k€/kg. Celui-ci tombe à 15 €/kg pour la vanilline synthétique. Si le prix de la vanille naturelle semble prohibitif, sa qualité (gustative et odorifère) est largement supérieure aux vanillines synthétiques et hémisynthétiques (présence des autres molécules).

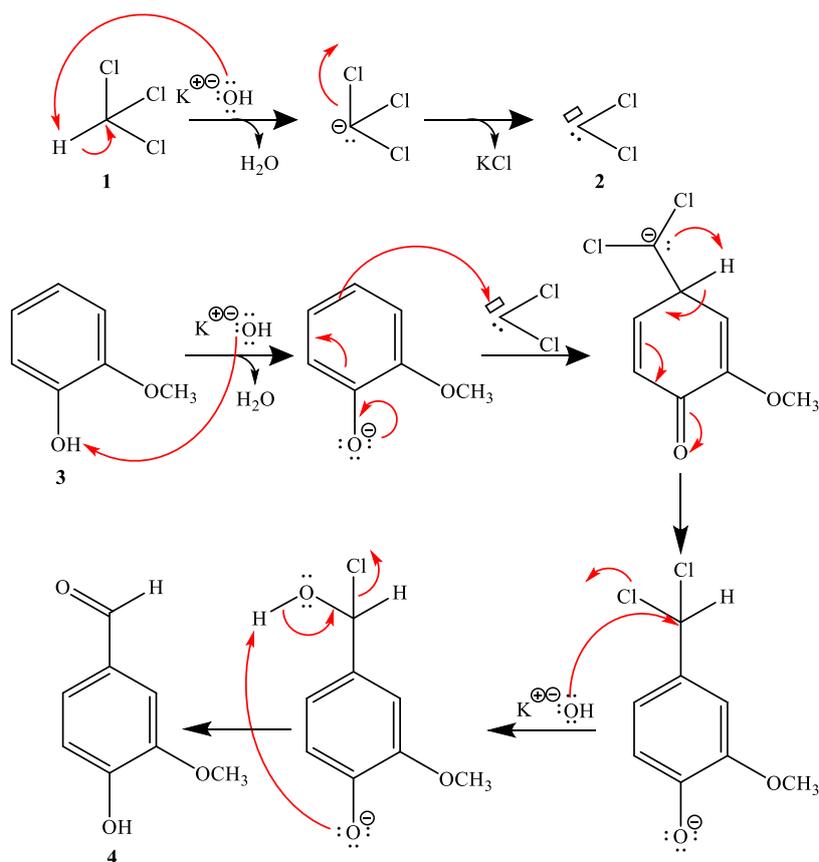


Figure IV.4 : Voie de synthèse de la vanilline à partir du gaïacol. Dans cette synthèse, (1) réagit avec la potasse pour former le dichlorocarbène (2). Celui-ci va ensuite réagir avec le gaïacol (3) pour former la vanilline (4) [5].

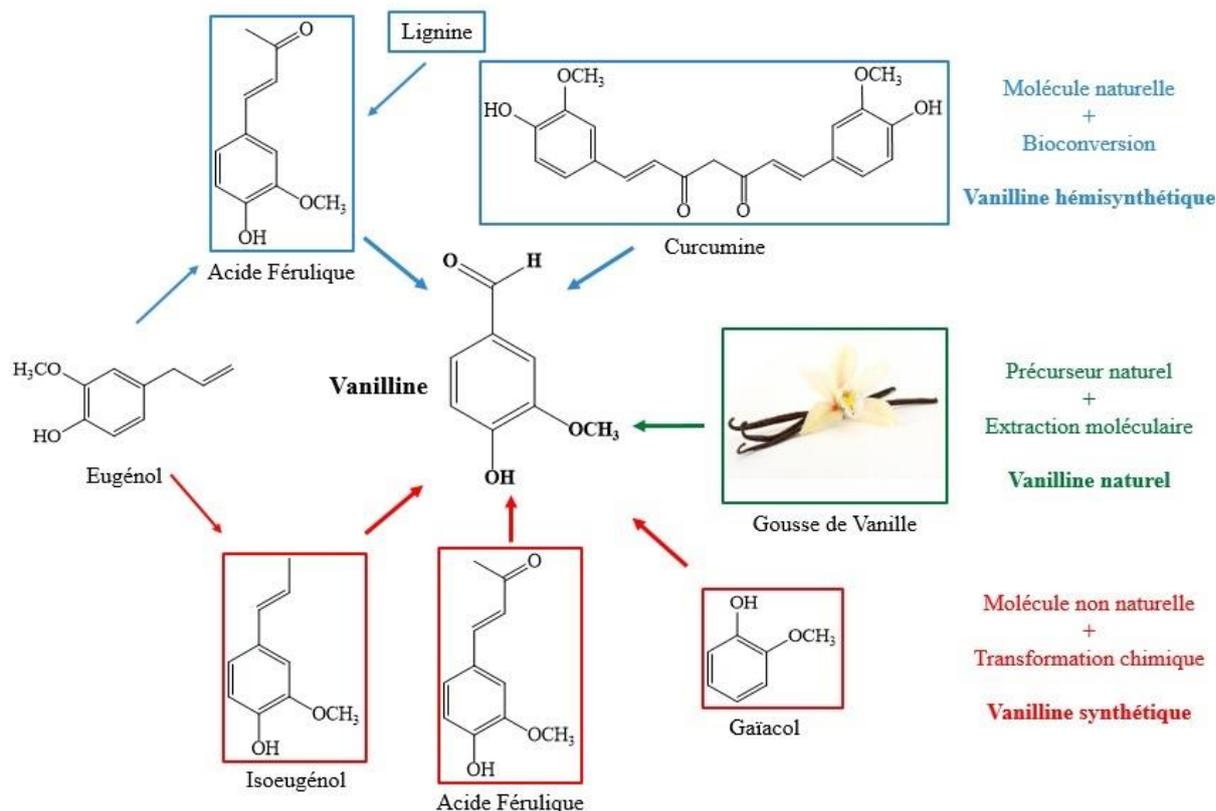


Figure IV.5 : Exemples de différents précurseurs synthétiques de la vanilline. La voie naturelle correspond à l'extraction liquide-liquide de la vanilline contenue dans la gousse de vanille (cadre vert). La vanilline hémisynthétique s'obtient par la bioconversion de l'acide férulique (cadre bleu). « Commercialement » considérée comme naturelle, elle est de faible qualité gustative mais coûte moins chère (absence des autres molécules aromatiques). La vanilline dite de synthèse est obtenue à partir de l'iso-eugénol, le gaïacol ou l'acide férulique (cadre rouge).

Compte tenu des différences de prix entre composés naturels, hémisynthétiques et synthétiques, les contrefaçons de produits naturels, dans le domaine de l'agro-alimentaire s'avèrent souvent lucratives. Dans le cas de la vanilline, elle consiste à faire passer de la vanilline synthétique pour de la vanilline naturelle, sous les appellations « extraits naturels de vanilline ou de vanille » ou « vanilline naturelle ». Economiquement parlant, déterminer l'origine des échantillons de vanilline est donc un enjeu majeur. Pour lutter contre ce type de contrefaçon, différentes stratégies analytiques ont été développées.

1.c. Stratégie analytique de vérification des échantillons de vanilline

1.c.i. *Analyse par chromatographie*

Historiquement, les premières méthodes d'analyse de la vanilline ont été les techniques chromatographiques. Dès 1973, Glenn Martin a pu séparer la vanilline et l'éthylvanilline présentes dans des solutions alcooliques par chromatographie gaz-liquide (CGL), gaz-solide (CGS), liquide-liquide (CLL) et liquide-solide (CLS) [6]. Si l'utilisation de la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) se montre très utile pour observer

l'ajout de composés (exogènes et/ou adultérants) à la vanilline naturelle [7], cette méthode ne permet pas de différencier la vanilline naturelle de la vanilline synthétique.

1.c.ii. Analyse par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (SM) couplée à différentes techniques séparatives (CLHP, CGL, SPE ou SPmE) est une technique de choix pour analyser la vanilline [8, 9]. Cependant, les méthodes spectrométriques « classiques » ne permettent pas la discrimination de molécules identiques, même si elles proviennent de sources différentes. En effet, la SM sépare les molécules selon leurs masses et donc deux produits de structure et de masse identique ne pourront pas être discriminés. Une alternative existe cependant depuis les années 1930 [10], pour séparer les molécules selon leurs abondances isotopiques exactes : la Spectrométrie de Masse à Rapport Isotopique (SMri) [10].

1.c.iii. Analyse isotopique par SMri

L'abondance naturelle en isotopes lourds (^2H et ^{13}C par exemple) de composés naturels dépend de l'origine des échantillons. Pour des molécules naturelles issues de plantes (comme la vanille), la distribution isotopique dépend principalement de la voie de photosynthèse (fixation en C_3 , fixation en C_4 ou métabolisme acide crassulacéen (CAM)). Selon le mode de synthèse (enzymatique ou pas), l'abondance isotopique naturelle en ^2H et en ^{13}C globale et/ou le profil isotopique intramoléculaire seront différents. A partir de ces différences, il est possible de caractériser, par exemple, des échantillons issus de gousses de vanille (voie CAM) et des échantillons issus de la lignine (processus C_3) [11]. L'analyse par SMri permet de déterminer avec précision la composition isotopique exacte de chaque composé. Avec cette méthode, certaines contrefaçons de la vanilline ont pu être mises en évidence [12]. Plus récemment, la SMri $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ a permis de caractériser des échantillons de vanilline hémisynthétique [13-15].

Si la discrimination des molécules identiques présentant des profils isotopiques globaux différents est possible avec le protocole SMri, il est impossible d'accéder aux rapports isotopiques site-spécifiques. Ainsi, un enrichissement anormal d'un site couplé à l'appauvrissement d'un second ne serait pas détectable en SMri si la masse isotopique totale reste identique. Pour cela, il est nécessaire d'utiliser une autre stratégie analytique : la spectroscopie RMN-FINS®.

1.c.iv. Analyse isotopique par RMN-FINS® du ^2H - $\{^1\text{H}\}$

L'analyse isotopique site-spécifique de la vanilline par la RMN-FINS® (^2H) est une stratégie analytique très utilisée depuis les années 1990. En effet, cette molécule fût l'une des premières molécules cibles pour l'étude des rapports isotopiques ($^2\text{H}/^1\text{H}$)_i intramoléculaires [16]. Cette méthode permet de discriminer efficacement les extraits de vanilline adultérés en observant le fractionnement isotopique de chaque position hydrogénée de la molécule, ce qui n'est pas possible par une analyse par SMri. Différentes études ont montré que la mesure des

rappports ($^2\text{H}/^1\text{H}$)_i obtenue par RMN 1D $^2\text{H}-\{^1\text{H}\}$ quantitative permettait de vérifier l'origine de la vanilline (géographique et/ou botanique) [16-18]. Il est aussi possible de déterminer si un échantillon est d'origine naturelle, hémisynthétique ou synthétique. Cette stratégie analytique est suffisamment robuste pour qu'en 2007, l'AOAC (Association Of Analytical Communities) développe un protocole « officiel » pour l'authentification de la vanilline [19].

1.c.v. Analyse isotopique par RMN-FINS du $^{13}\text{C}-\{^1\text{H}\}$

L'analyse isotopique par RMN quantitative a connu un nouvel essor depuis les années 2000 avec l'étude du noyau ^{13}C qui permet d'accéder au profil isotopique ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) de la molécule [20-23]. La spectroscopie RMN apparaît comme un outil essentiel pour connaître précisément les caractéristiques isotopiques intramoléculaires de la vanilline [24]. Cependant, les principes de la RMN isotrope $^2\text{H}-\{^1\text{H}\}$ conduisent à certaines limites/inconvénients pour la vanilline qui doivent être contournés.

1.d. Analyse de la vanilline en RMN $^2\text{H}-\{^1\text{H}\}$ isotrope

En RMN 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ isotrope, il est important de tenir compte de la solubilité des analytes dans les solvants organiques. En effet, pour observer les signaux ^2H en abondance naturelle associés aux positions hydrogénées d'une molécule, l'utilisation de solvant deutéré est proscrite. Ainsi, une forte concentration en co-solvant organique protoné, parfois nécessaire pour des raisons de solubilité, peut conduire à un signal RMN DAN du solvant trop intense (*cf.* Chapitre III).

De par le spin des noyaux deutérium ($I = 1$), les temps de relaxation longitudinale et transversale, $T_1(^2\text{H})$ et $T_2(^2\text{H})$ sont relativement courts en milieu isotrope, mais suffisants, pour conduire à des spectres RMN haute-résolution. Les faibles $T_1(^2\text{H})$ présentent un avantage car ils permettent de raccourcir le temps de recyclage afin d'accumuler plus rapidement les expériences RMN sous contrainte quantitative. En revanche, les $T_2(^2\text{H})$ courts vont induire un élargissement des signaux DAN qui peuvent nuire à la résolution spectrale. De plus, il convient de rappeler que le rapport gyromagnétique du deutérium, $\gamma(^2\text{H})$ est plus faible que celui du proton ($\gamma(^2\text{H}) = \gamma(^1\text{H}) / 6,515$). Même si la gamme de déplacements chimiques ^2H (en ppm) est identique à celle du ^1H , celle observée en ^2H (exprimée en Hz) est 6,515 plus faible que la plage de fréquence des résonances ^1H . Ainsi, pour les mêmes sites hydrogénés d'une molécule, les signaux DAN- $\{^1\text{H}\}$ associés seront plus proches sur le spectre $^2\text{H}-\{^1\text{H}\}$ que sur le spectre ^1H . Ceci peut induire un taux de recouvrement de signaux (partiel ou total) plus grand, altérant la lisibilité du spectre DAN- $\{^1\text{H}\}$, et réduisant *de facto* le nombre d'informations isotopiques potentiellement utiles.

Compte tenu des éléments de symétrie moléculaire (un plan en moyenne) de la vanilline six signaux DAN différents (associé à six isotopomères monodeutérés inéquivalents) devraient être observés sur son spectre RMN 1D $^2\text{H}-\{^1\text{H}\}$ isotrope : i) un signal DAN (le plus blindé et le plus intense) associé au groupement méthoxy ($-\text{OCH}_3$) ; ii) un signal DAN (large)

pour la fonction alcool (-OH) et un signal DAN pour la fonction aldéhyde (-CHO) ; iii) enfin, trois signaux DAN pour les trois positions aromatiques notées $\delta(^2H_a, ^2H_b, ^2H_c)$ différents (cf. **Figure IV.6a**). La réalité expérimentale est plus complexe (cf. **Figure IV.7**), puisque seulement deux résonances aromatiques sur les trois attendues sont observées. Les effets électro-attracteurs/donneurs (-I/+I) et mésomères attracteurs/donneurs (-M/+M) des trois substituants de la vanilline sont à l'origine de la pseudo-anisochronie des sites 2H_a et 2H_b .

Dans le cas de la vanilline (cf. **Figure IV.6a**), le site H_a subit l'effet inductif donneur (+I) et mésomère donneur (+M) de la part du groupe méthoxy- et l'effet mésomère attracteur (-M) de la fonction aldéhyde en position *ortho*. Il perçoit également une contribution du groupement alcool (effet -I et +M) en position *mé*ta. La position aromatique H_b subit l'effet -M du groupement aldéhyde en ortho, l'effet -I et +M de l'alcool en méta et l'effet -I et +M de la fonction méthoxy en position *para* (position 1-4 de l'aromatique). Enfin, le site H_c subit l'effet -I et +M de l'alcool en position *ortho*, l'effet -M du groupement aldéhyde et l'effet -I et +M de la fonction méthoxy en position *mé*ta. Pour mémoire, sur la **Figure IV.6b**, sont présentées, les formes limites de résonance du phénol (OH joue le rôle d'un groupement mésomère donneur, +M) et du benzaldéhyde (COH joue le rôle d'un groupement mésomère attracteur, -M).

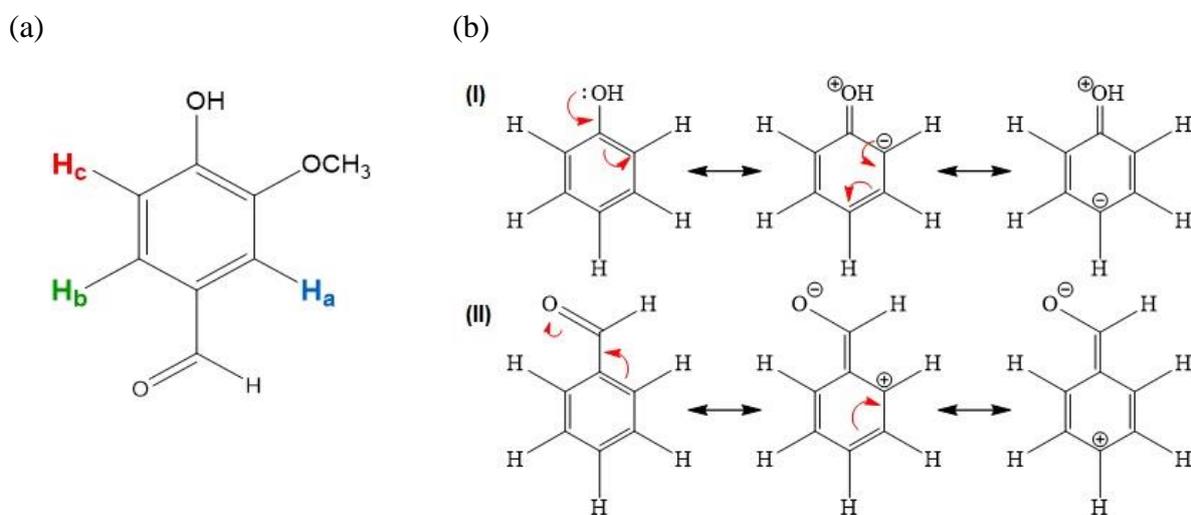


Figure IV.6 : (a) Structure de la vanilline montrant les trois positions aromatiques notées H_a , H_b et H_c . (b) Formes limites de résonance associées au phénol (I) et au benzaldéhyde (II). OH est un groupe mésomère donneur +M, alors que COH est un groupe mésomère attracteur, -M.

Compte-tenu de effets électroniques des trois substituants sur le cycle aromatique, on pouvait imaginer que: i) le signal RMN de la position 2H_c présente le déplacement chimique le plus blindé ; ii) les signaux 2H_a et 2H_b apparaissent plus déblindés que 2H_c ; iii) que 2H_a soit le site le plus déblindé des trois poitions. Le calcul prédictif des déplacements chimiques

$\delta(H_a)$, $\delta(H_b)$, $\delta(H_c)$ en ppm, à partir des effets des trois substituants (-OCH₃, -COH, -OH) en position *ortho*, *mé*ta et *para*, nous donne :

$$\begin{aligned}\delta(H_a) &= 7.26 + \Delta(-OCH_3)^{ortho} + \Delta(-(C=O)H)^{ortho} + \Delta(-OH)^{méta} = 7,22 \text{ ppm} \\ \delta(H_b) &= 7.26 + \Delta(-(C=O)H)^{ortho} + \Delta(-OH)^{méta} + \Delta(OCH_3)^{para} = 7,26 \text{ ppm} \\ \delta(H_c) &= 7.26 + \Delta(-OH)^{ortho} + \Delta(-(C=O)H)^{méta} + \Delta(-OCH_3)^{méta} = 6,83 \text{ ppm}\end{aligned}\tag{IV.1}$$

avec pour le groupe méthoxy : $\Delta(-OCH_3)^{ortho} = -0,48$ ppm; $\Delta(-OCH_3)^{méta} = -0,09$ ppm; $\Delta(-OCH_3)^{para} = -0,44$ ppm ; pour le groupe hydroxyle : $\Delta(-OH)^{ortho} = -0,56$ ppm ; $\Delta(-OH)^{méta} = -0,12$ ppm; pour le groupe aldéhyde : $\Delta(-(C=O)H)^{ortho} = +0,56$ ppm ; $\Delta(-(C=O)H)^{méta} = +0,22$ ppm.

Finalement, les résultats expérimentaux DAN-¹H} obtenus dans CH₂Cl₂ révèlent que les deux positions ²H_a et ²H_b de la vanilline présentent une isochronie spectrale fortuite, puisque $\delta^{iso}(^2H_a) = \delta^{iso}(^2H_b) = 7,42$ ppm tandis que $\delta^{iso}(^2H_c) = 7,06$ ppm (cf. **Figure IV.7**) [16].

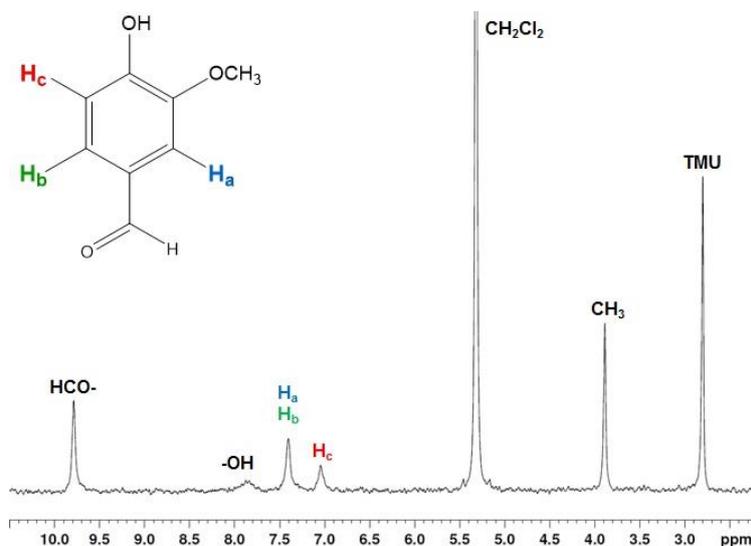


Figure IV.7 : Spectre 1D DAN-¹H} isotrope de la vanilline enregistré à 14,1 T (92,1 MHz) dans CH₂Cl₂ à 296 K en présence de TMU. Les déplacements chimiques des positions H_a et H_b sont identiques (positions fortuitement isochrones). Le rapport isotopique naturel site-spécifique de ces deux positions aromatiques, (²H/¹H)_a et (²H/¹H)_b, n'est donc pas disponible dans un solvant liquide.

Cette isochronie des positions aromatiques, H_a et H_b, ne permet donc pas de mesurer leurs rapports isotopiques (²H/¹H)_a et (²H/¹H)_b respectifs (seule une valeur globale est obtenue), ce qui conduit à un profil isotopique aromatique incomplet de la molécule, et donc un manque d'information pour la détermination de l'origine de la vanilline (naturelle ou (hémi)synthétique). En effet, à la différence des voies synthétiques, les processus naturels

vont suivre des voies métaboliques biologiquement connues dont les effets en termes de fractionnement isotopique sont prévisibles. Afin de vérifier l'origine « naturelle » de la vanilline, il peut être avantageux de déterminer les rapports isotopiques ($^2\text{H}/^1\text{H}$)_i de toutes les positions hydrogénées (isotopomère ^2H) du noyau aromatique. Si la discrimination des positions $^2\text{H}_a$ et $^2\text{H}_b$ est impossible en milieu isotrope (même en opérant à très haut champ magnétique), l'utilisation d'une phase cristal-liquide comme solvant RMN apparaît donc comme une alternative intéressante pour obtenir ces informations spécifiques.

2. Apport de la RMN DAN anisotrope pour l'étude isotopique de la vanilline

Comme nous l'avons présenté dans le [Chapitre I](#), la RMN du ^2H utilisant une phase cristal-liquide lyotrope de type polypeptide (PBLG) permet d'accéder aux $\delta^{\text{aniso}}(^2\text{H})$ anisotrope et aux éclatements quadrupolaires $\Delta\nu_Q(^2\text{H})$ de chaque position inéquivalente d'une molécule.

2.a. Attribution des signaux ^2H anisotrope de la molécule de vanilline

2.a.i. *Impact de l'axe des liaisons C- ^2H sur l'analyse de la Vanilline*

Les spectres RMN DAN $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ dans les cristaux liquides chiraux sont dominés par deux observables anisotropes, $\delta^{\text{aniso}}(^2\text{H})$ et $\Delta\nu_Q(^2\text{H})$. Cette seconde observable apporte de nombreuses informations structurales moléculaires [25, 26]. Par exemple, malgré l'isochronie fortuite des positions $^2\text{H}_a$ et $^2\text{H}_b$ ($\delta(^2\text{H}_a)^{\text{aniso}} = \delta(^2\text{H}_b)^{\text{aniso}} = 7,42$ ppm) l'éclatement du signal en deux doublets quadrupolaires (un pour chaque position) en milieu anisotrope va permettre la discrimination et l'attribution des sites $^2\text{H}_a$ et $^2\text{H}_b$.

La [Figure IV.8](#) présente le spectre $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ d'un échantillon de 80 mg de vanilline dans une phase anisotrope contenant 90 mg de PBLG, 275 mg de CH_2Cl_2 et 300 mg de CCl_4 et 25 mg de TMU. Sur la base des déplacements chimiques isotropes, $\delta^{\text{iso}}(^2\text{H})$, la caractérisation des sites deutérium de la molécule est possible exceptée pour les positions isochrones $^2\text{H}_a$ et $^2\text{H}_b$. En effet, il est nécessaire d'associer le $\text{DQ}(^2\text{H})$ à chaque site $^2\text{H}_a$ et $^2\text{H}_b$ correspondant. Pour y parvenir, il faut s'intéresser à la valeur de l'éclatement quadrupolaire $\Delta\nu_Q$, défini en Hz, par l'[Equation I.40](#) et pouvant être simplifié comme :

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2} C_Q S_{\text{C-}^2\text{H}} \quad (\text{IV.2})$$

où C_Q correspond au couplage quadrupolaire ^2H (compris entre 140 et 200 kHz) qui correspond à $\frac{e^2 Q_D q_{\text{C-D}}}{h}$ et $S_{\text{C-}^2\text{H}}$ correspond au paramètre d'ordre orientationnel de liaison C- ^2H . Ce paramètre d'ordre, $S_{\text{C-}^2\text{H}}$, peut être calculé selon l'[Equation IV.3](#) :

(a)

(b)

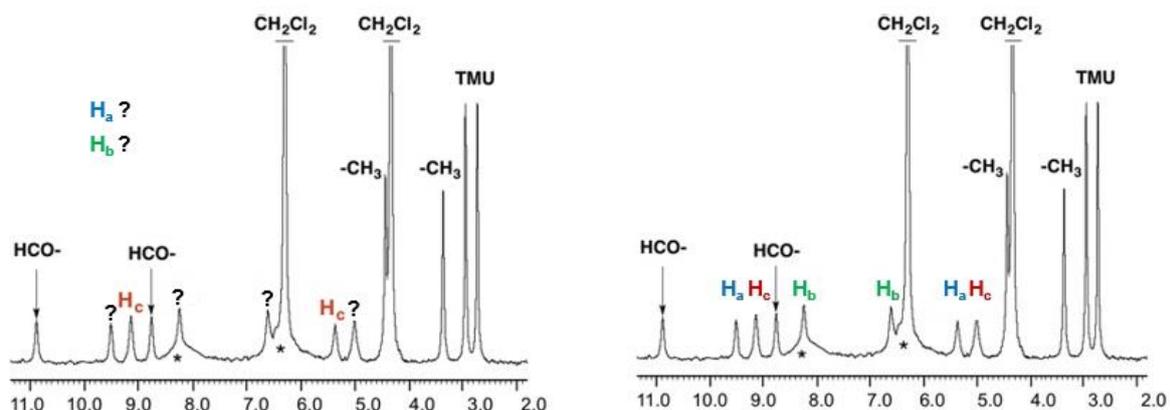


Figure IV.8 : Spectre 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ anisotrope de la vanilline (80 mg) à 14,1 T dans un mélange PBLG/ CH_2Cl_2 - CCl_4 (90 mg / 275 mg - 300 mg) en présence de TMU (25 mg) à 296 K. L'ensemble des sites deutérium de la molécule est discriminé mais l'attribution des sites H_a et H_b est incertaine. Les astérisques représentent le DQ (composante large) de la fonction alcool. (a) sans les attributions des RQC(H_a) et RQC(H_b). (b) avec les attributions des RQC(H_a) et RQC(H_b).

$$S_{\text{C-}^2\text{H}} = \frac{(3 \cos^2(\theta_{\text{C-}^2\text{H}}) - 1)}{2} \quad \text{(IV.3)}$$

Dans cette équation, $\theta_{\text{C-}^2\text{H}}$, correspond à l'angle entre le vecteur de la liaison $\text{C-}^2\text{H}$ et l'axe du champ magnétique B_0 . Ainsi, ce paramètre d'ordre est uniquement dépendant de l'angle $\theta_{\text{C-}^2\text{H}}$ pour une molécule donnée.

Dans le cas de la vanilline, les vecteurs associés aux liaisons $\text{C-}^2\text{H}$ de la molécule de vanilline (molécule rigide) peuvent nous apporter des informations sur les valeurs des $\Delta\nu_{\text{Q}}(^2\text{H})$. En effet, comme le montre la **Figure IV.9**, les sites H_a et H_c de la vanilline sont en position *para* l'un de l'autre. Comme la vanilline est une molécule plane, les deux vecteurs associés à aux positions ($\text{C-}^2\text{H}_a$ et $\text{C-}^2\text{H}_c$) sont colinéaires mais de sens opposé. A l'inverse, la direction $\text{C-}^2\text{H}_b$ est orientée à 60° de la direction internucléaire H_a - H_c .

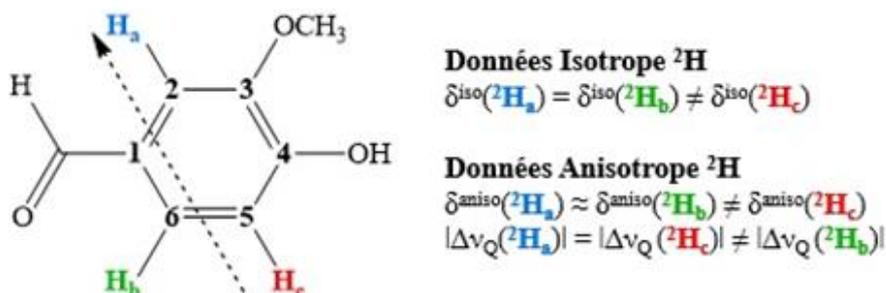


Figure IV.9 : Représentation des vecteurs $\text{C-}^2\text{H}_a$ et $\text{C-}^2\text{H}_c$ dans la vanilline. Ces vecteurs sont considérés comme colinéaires. Compte tenu de leur colinéarité, il est attendu que les éclatements quadrupolaires des sites $^2\text{H}_a$ et $^2\text{H}_c$ soient identiques entre eux ($\Delta\nu_{\text{Q}}(^2\text{H}_a) = \Delta\nu_{\text{Q}}(^2\text{H}_c)$), mais différents de l'éclatement quadrupolaire $^2\text{H}_b$ ($\Delta\nu_{\text{Q}}(^2\text{H}_b) \neq \Delta\nu_{\text{Q}}(^2\text{H}_a, ^2\text{H}_c)$).

En considérant les **Equations IV.2** et **IV.3** et la colinéarité des vecteurs $\text{C-}^2\text{H}_a$ et $\text{C-}^2\text{H}_c$, il apparaît que les RQCs associés aux sites $^2\text{H}_a$ et $^2\text{H}_c$ sont strictement identiques alors

que celui de H_b sera différent. Avec ces informations, l'attribution des deux doublets quadrupolaires 2H_a et 2H_b (centrée sur le même déplacement chimique $\delta^{\text{aniso}}({}^2H)$) devient triviale (cf. **Figure IV.9**). L'attribution complète des DQ(2H) aromatiques de la vanilline est proposée sur la **Figure IV.8b**.

2.a.ii. *Simplification des analyses avec les expériences RMN 2D QUOSY DAN*

L'utilisation de phase cristal-liquide lyotrope et l'apparition des observables RMN DAN anisotropes ($\delta^{\text{aniso}}({}^2H)$ et $\Delta\nu_Q({}^2H)$) induisent une complexification des spectres 1D DAN compte tenu : i) du doublement du nombre de pics (comparé au spectre RMN 1D DAN- $\{{}^1H\}$ isotrope) ; ii) du recouvrement partiel et/ou total de certains signaux. L'autocorrélation des deux composantes de chaque DQ(2H) à l'aide d'expériences 2D QUOSY et l'éclatement des informations spectrales DAN sur les deux dimensions spectrales permettent de simplifier l'analyse des spectres 1D DAN- $\{{}^1H\}$ [27-29].

Pour faciliter l'analyse des spectres DAN- $\{{}^1H\}$ de la vanilline, nous avons utilisé l'expérience 2D Q -résolue MQ DAN- $\{{}^1H\}$ (cf. **Chapitre I**). Après l'opération de tilt de la carte 2D, nous pouvons extraire les spectres 1D DAN- $\{{}^1H\}$ associés spécifiquement à chaque isotopomère monodeutééré de la molécule. La **Figure IV.10** présente le principe de la décomposition d'un spectre 2D de type Q -résolue- $\{{}^1H\}$ en une série de sous-spectres 1D DAN- $\{{}^1H\}$.

2.b. Optimisation des conditions expérimentales pour l'étude de la vanilline

La RMN en milieu cristal-liquide polypeptidique (achiral ou chiral) présente l'avantage d'être une technique analytique très flexible. En effet, la formation d'une matrice orientée à base de PBLG (PBDG, ou PBG) est possible avec une grande gamme de co-solvants hélicogènes de différentes polarités (chloroforme ($CHCl_3$), dichlorométhane (CH_2Cl_2), N,N -diméthylformamide (DMF), tétrachloroéthane ($Cl_2CHCHCl_2$), tétraméthylfurane (THF), ...) et sur une large gamme de températures (cf. **Chapitre I**). Selon les propriétés chimiques du soluté, il est nécessaire d'ajuster les conditions expérimentales pour réaliser des mesures isotopiques rapides et précises. C'est pourquoi le co-solvant organique doit être correctement sélectionné et la température expérimentale correctement ajustée pour répondre aux problématiques liées à l'analyse par RMN DAN anisotrope de la vanilline.

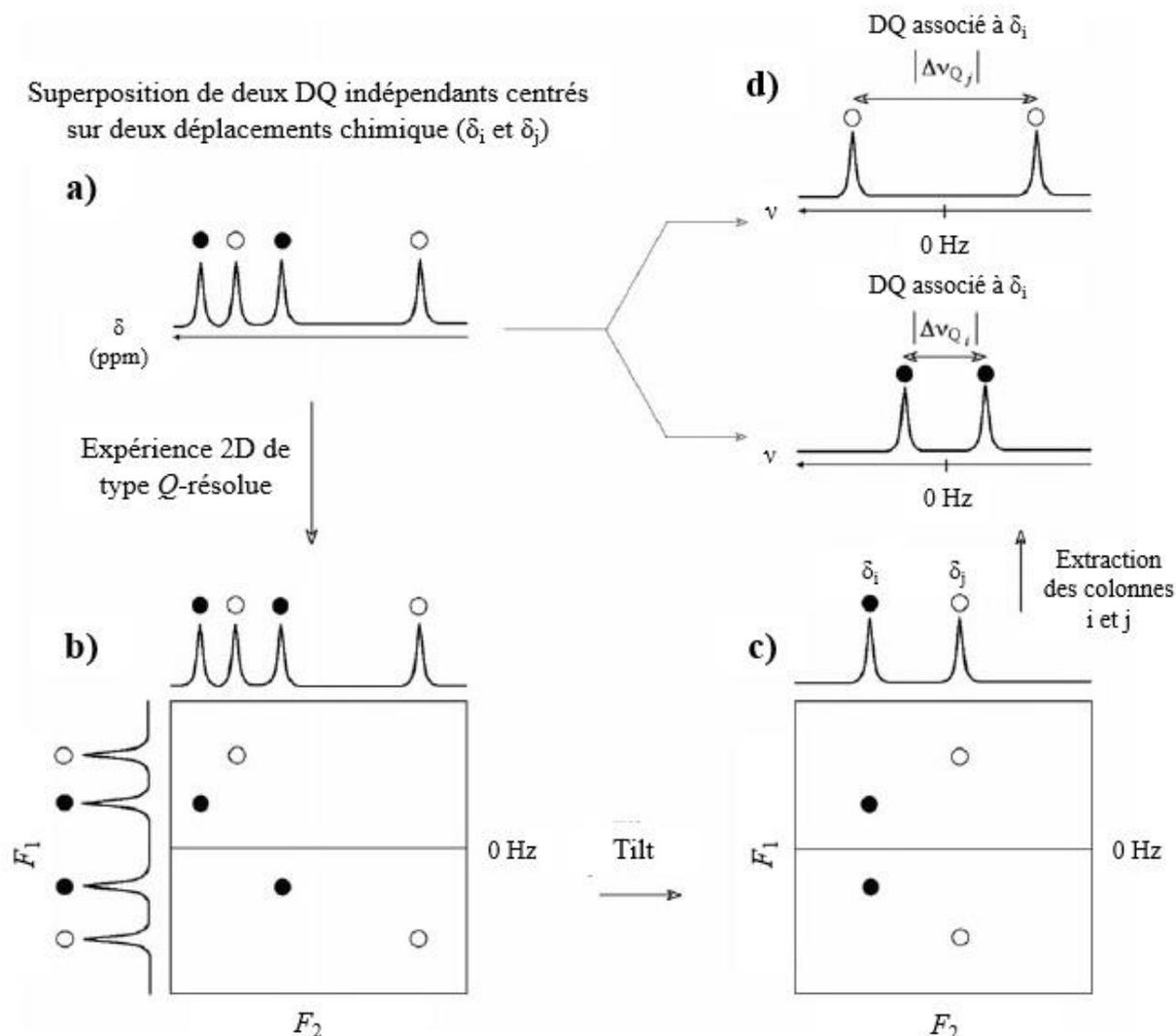


Figure IV.10 : Représentation schématique de la décomposition d'un spectre 1D DAN en une série de sous-spectres 1D DAN extrait d'une expérience 2D DAN de type Q -résolue (F_z ou MQ) tiltée. La procédure de tilt consiste à basculer les pics hors-diagonaux parallèlement à l'axe F_1 . Figure extraite de la référence [30].

2.b.i. Optimisation de la phase cristal-liquide lyotrope polypeptidique

Pour analyser une molécule dissoute dans une mésophase lyotrope (CLA ou CLC), le choix du co-solvant organique est une étape importante. D'un point de vue chimique, le co-solvant doit répondre à plusieurs critères [31] : i) être capable de dissoudre le polypeptide sans détruire la structure en hélice du polymère (solvant hélicogène) ; ii) solubiliser au maximum l'analyte ; iii) avoir un ou des signaux dont le (les) déplacement(s) chimique(s) $\delta^{\text{aniso}}(^2\text{H})$ n'interfère(nt) pas avec ceux du soluté (sachant que les signaux du polypeptide DAN ne sont pas visibles sur les spectres ($T_2^* < 0,05$ s) ; iv) obtenir une demi-différence de couplage quadrupolaire résiduel (RQC), notée $|\Delta\nu_Q/2|$, entre les composantes des DQ(^2H) des sites ^2H résonant au même déplacement chimique, $\delta^{\text{aniso}}(^2\text{H})$, suffisamment grande pour effectuer une mesure fiable de la surface des signaux (intégration ou déconvolution).

Le cinquième critère (v) à prendre en compte (lié à une problématique plus instrumentale) est d'éviter une trop grande différence de concentration en isotopomères monodeutérés entre le soluté à analyser et celle du co-solvant du CL. En effet un différentiel trop grand pourrait générer une digitalisation « imparfaite » des signaux DAN d'intensité les plus faibles, lors de la conversion du signal analogue en signal digital par le convertisseur « analogue-digital » (CAN ou ADC) (cf. **Chapitre III**) du spectromètre RMN [31]. Même si actuellement les CANs peuvent encoder le signal analogue sur 12 ou 16 bits, cela ne garantit pas toujours une bonne digitalisation des signaux les plus faibles. L'élimination du signal DAN du co-solvant par une saturation doublement sélective permet de réduire cet effet (cf. **Chapitre III**), mais cette approche n'a pas été utilisée pour l'étude de la vanilline.

A l'évidence, chaque co-solvant organique présente des avantages et des inconvénients propres (par rapport aux critères précédents) vis-à-vis de la molécule à étudier. Historiquement, les premières études d'adultération de la vanilline ont été réalisées dans l'acétonitrile (CH_3CN) car il solubilise très bien la vanilline [16]. Cependant, ce co-solvant ne satisfait pas la première condition définie précédemment puisqu'il ne dissout pas les fibres du polymère PBLG. Il ne peut donc être utilisé. Généralement, le co-solvant organique le plus utilisé pour des expériences DAN dans les polymères polypeptidiques de type PBLG est le chloroforme car son pouvoir de solubilisation est très fort (critères *i* et *ii*). De plus, la présence d'un seul site ^2H couplé à un haut poids moléculaire va induire un nombre de moles d'isotopomère monodeutééré dans l'échantillon assez faible (répondant ainsi au critère v). Si ces caractéristiques sont générales pour tous échantillons PBLG/ CHCl_3 , elles ne répondent forcément pas aux problématiques spécifiques de la molécule de vanilline.

Pour l'analyse de la vanilline, différents co-solvants organiques (tous de types halogénés) ont été explorés afin de répondre à l'ensemble des critères à respecter. Les différents co-solvants organiques testés sont présentés dans le **Tableau IV.1**. Dans cette phase préliminaire, les échantillons RMN anisotropes testés ont été préparés en mélangeant 80 mg d'analyte, 90 mg de PBLG (DP = 768) et 600 mg de co-solvant organique. L'analyse des spectres DAN des différents échantillons orientés a été réalisée à partir d'expériences 2D *Q*-résolue Fz DAN enregistrés à 296 K. Les paramètres d'enregistrement utilisés sont $\text{TD}_1 = 1300$, $\text{TD}_2 = 350$, $D_1 = 0,1$ s, $\text{NS} = 200$, $T_{\text{aq}} = 0,6$ s, $T_{\text{R}} = 0,7$ s).

L'étude de la carte 2D DAN tiltée et l'extraction des sous-spectres 1D DAN (selon le protocole présenté sur la **Figure IV.10**) obtenue pour l'échantillon PBLG/ CHCl_3 permettent d'évaluer les inconvénients du chloroforme pour l'étude de la vanilline. En effet, le déplacement chimique anisotrope de celui-ci est très proche des résonances des sites ^2H aromatiques de la vanilline ($\delta^{\text{iso}}(\text{CHCl}_3) = 7,27$ ppm), ce qui n'est pas optimum. Par ailleurs, il apparaît que pour la phase PBLG/ CHCl_3 , la demi-différence de RQC(^2H) entre les positions aromatiques $^2\text{H}_a$ et $^2\text{H}_b$ est assez faible ($|\Delta\Delta\nu_{\text{Q}}/2| = 26$ Hz). Le critère iv) n'est donc, pas non plus, satisfait de façon optimale.

Tableau IV.1 : Données des différents co-solvants organiques (simple ou en mélange) utilisés et les informations spectrales associées aux sites aromatiques $^2\text{H}_a$, $^2\text{H}_b$ et $^2\text{H}_c$ de la vanilline enregistrées à 296 K dans une phase orientée polypeptidique (PBLG).

Co-solvant	μ (D)	M (g.mol ⁻¹)	N (mol $\times 10^{-3}$)	R (no unit)	δ (^2H) (ppm)	$ \Delta\nu_Q(\text{co-s}) $ (Hz)	$ \Delta\nu_Q(^2\text{H}_a) $ (Hz)	$ \Delta\nu_Q(^2\text{H}_b) $ (Hz)	$ \Delta\nu_Q(^2\text{H}_c) $ (Hz)	$ \Delta\Delta\nu_Q/2 $ (Hz)
CCl_4	0	153,8	0,00	0,00	N.A.	N.A.	-	-	-	-
CHCl_3	1,04	119,4	5,02	9,56	7,27	309	206	258	206	26
CH_2Cl_2	1,14	84,9	14,1	26,9	5,30	161	260	180	260	40
$\text{Cl}_2\text{CHCHCl}_2$	1,32	167,2	7,17	13,6	5,96	303	273	471	273	99
$\text{CHCl}_3/\text{CCl}_4$	1,04/0	119,4	2,51	4,78	7,27	409	565	439	565	63
$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CCl}_4$	1,14/0	84,9	7,06	13,4	5,30	197	471	268	471	102
$\text{Cl}_2\text{CHCHCl}_2/\text{CCl}_4$	1,32/0	167,2	7,17	6,81	5,96	301	447	343	447	52

Les notations sont : μ correspond au moment dipolaire du co-solvant (Debye); M est la masse molaire du co-solvant protoné ; N est le nombre de moles d'isotopomères monodeutérés pour une masse de 600 mg de co-solvant ; R est le ratio calculé à partir de l'Equation IV.4 avec $m_{\text{vanilline}} = 80$ mg, $M_{\text{vanilline}} = 152,1$ g.mol⁻¹ et $m_{\text{co-solvant}} = 600$ mg. Les mélanges binaires de co-solvants organiques sont réalisés avec une proportion 50/50. Le mélange $\text{Cl}_2\text{CHCHCl}_2/\text{CCl}_4$ présente une dissolution incomplète de la vanilline à 296 K et l'expérience RMN a été effectuée à 320 K.

Pour contourner ces inconvénients, le chloroforme a été remplacé par d'autres co-solvants organiques chlorés comme le tétrachlorométhane (CCl_4), le dichlorométhane (CH_2Cl_2) ou le tétrachloroéthane ($\text{Cl}_2\text{CHCHCl}_2$) ou un mélange 50/50 de ces solvants. A l'exception de CCl_4 , ces solvants ont des caractéristiques de dissolution assez proches de celle du chloroforme.

A priori, compte tenu de l'absence d'isotopomère monodeutééré (aucun site hydrogéné) l'utilisation du CCl_4 comme co-solvant pour la RMN DAN apparaît comme idéal puisqu'il ne conduit à aucun signal DAN sur le spectre. Les critères *iii* et *iv* sont donc, dans ce cas, satisfaits. Malheureusement, ni la vanilline, ni le polymère PBLG ne sont solubles dans CCl_4 seul (critère *i*).

Les solvants organiques chlorés CH_2Cl_2 et $\text{Cl}_2\text{CHCHCl}_2$ sont des alternatives intéressantes à CHCl_3 car la position de leurs signaux respectifs ($\delta \approx 5,3$ ppm et $\approx 6,0$ ppm) est éloignée de la région aromatique où résonnent les sites $^2\text{H}_a$, $^2\text{H}_b$ et $^2\text{H}_c$ de la vanilline (critère *iii*). Plus avantageux encore, nous obtenons des séparations spectrales (demi-différence) beaucoup plus grande que pour la phase PBLG/ CHCl_3 ($|\Delta\Delta\nu_Q/2| = 40$ Hz pour PBLG/ CH_2Cl_2 et $|\Delta\Delta\nu_Q/2| = 99$ Hz pour le PBLG/ $\text{Cl}_2\text{CHCHCl}_2$). Cependant pour ces deux mésophases, cet avantage est en partie contrebalancé par la présence de deux sites ^2H équivalents (et une masse moléculaire plus faible pour CH_2Cl_2 comparé à CHCl_3) induisant une forte intensité de leurs signaux DAN comparé aux signaux aromatiques DAN de l'analyte.

Pour quantifier/évaluer l'effet des différents paramètres, on peut calculer le rapport de l'intensité des deux types de résonances (signal DAN aromatique *versus* signal DAN du co-solvant) à partir de l'Equation IV.4 en considérant que les rapports isotopiques ($^2\text{H}/^1\text{H}$) et les valeurs des largeurs de raies à mi-hauteur (FWHM) sont identiques :

$$R = \frac{P_i^{\text{co-solv}} \times M^{\text{anal}} \times m^{\text{co-solv}}}{P_i^{\text{anal}} \times M^{\text{co-solv}} \times m^{\text{anal}}} \quad (\text{IV.4})$$

Dans cette équation, $P_i^{\text{co-solv}}$ et P_i^{anal} sont les nombres stœchiométriques des sites i de l'analyte et du co-solvant, et m et M sont respectivement les masses et les masses molaires des molécules. Les valeurs de R pour les différents co-solvants sont listées dans **Tableau IV.1**.

L'analyse de l'**Equation IV.4** montre que plus la valeur de R est importante, moins le co-solvant associé apparaît adéquat pour satisfaire le critère ν). Selon le co-solvant choisi, le rapport R varie de 0 (CCl_4) à 27 (CH_2Cl_2) (cf. **Tableau IV.1**). Dans ces conditions, le dichlorométhane n'apparaît pas comme le solvant le plus optimal. Pour réduire l'intensité des signaux du co-solvant hydrogéné dans la phase PBLG (et donc le rapport R), il est possible de remplacer partiellement le co-solvant hydrogéné par un solvant non-hydrogéné comme le CCl_4 . Cette approche a déjà été utilisée dans cadre de la RMN-FINS[®] pour l'analyse isotopique ($^2\text{H}/^1\text{H}$) d'acide gras à longues chaînes [32].

Dans une seconde étape, nous avons donc testé le cas de mélanges de co-solvants organiques chlorés hydrogénés (CHCl_3 , CH_2Cl_2 , $\text{Cl}_2\text{CHCHCl}_2$) et non-hydrogénés (CCl_4) dans les mêmes proportions (50 % / 50 %) (cf. **Tableau IV.1**). Le disulfure de carbone (CS_2) autre solvant liquide non hydrogéné n'a pas été envisagé compte tenu de sa très grande volatilité et inflammabilité, ainsi que sa toxicité !

A partir des résultats RMN 2D DAN anisotrope avec ces trois mélanges de co-solvants (cf. **Tableau IV.1**), nous avons pu conclure que :

i) le mélange $\text{CHCl}_3/\text{CCl}_4$ satisfait le mieux les critères iv et ν . Pour le premier, la séparation entre les deux DQ des sites $^2\text{H}_a$ et $^2\text{H}_b$ est plus importante qu'avec le chloroforme seul ($|\Delta\Delta\nu_Q/2| = 63$ Hz pour $\text{CHCl}_3/\text{CCl}_4$ contre $|\Delta\Delta\nu_Q/2| = 26$ Hz pour le CHCl_3). Pour le second, la valeur de R tombe à 2,5 (cf. **Tableau IV.1**). Cependant la proximité des DQ(^2H) des signaux aromatiques DAN de la vanilline et du co-solvant reste problématique.

ii) l'utilisation du mélange $\text{Cl}_2\text{CHCHCl}_2/\text{CCl}_4$ est la moins adaptée à l'étude de la vanilline dans la mesure où la molécule de vanilline recristallise au sein du tube RMN à 296 K et rend l'analyse quantitative impossible. Pour réussir à obtenir une phase cristal-liquide homogène sans particules solides, il faut enregistrer les spectres RMN DAN à 320 K, ce qui conduit à une forte réduction de la demi-différence entre les éclatements quadrupolaires ($|\Delta\Delta\nu_Q/2| = 52$ Hz). Rappelons également que l'utilisation de températures élevées induit une plus grande mobilité du soluté dans la phase et donc une augmentation des valeurs de $T_1(^2\text{H})$. Du point de vue de la RMN quantitative, il est donc nécessaire d'allonger la valeur du temps de recyclage T_R .

iii) l'utilisation du mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CCl}_4$ apparaît comme le meilleur compromis entre tous les critères d'optimisation du co-solvant. Il offre, en effet, une augmentation de la demi-

différence entre les éclatements quadrupolaires $\Delta\nu_Q$ des positions $^2\text{H}_a$ et $^2\text{H}_b$ ($|\Delta\Delta\nu_Q/2| = 102$ Hz pour $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CCl}_4$ contre $|\Delta\Delta\nu_Q/2| = 40$ Hz pour CH_2Cl_2) mais aussi une discrimination claire entre les signaux du soluté et du co-solvant organique ainsi qu'une réduction de l'intensité des signaux du co-solvant d'un facteur deux (cf. **Tableau IV.1**).

Pour une meilleure visualisation des résultats, le graphique de la **Figure IV.11** montre les variations des éclatements quadrupolaires, $\Delta\nu_Q(^2\text{H})$, des trois positions aromatiques de la vanilline ainsi que la demi-différence entre les positions $^2\text{H}_a$ et $^2\text{H}_b$. Il est important de noter que malgré les changements de co-solvant organique et donc de phase cristal liquide lyotrope, les éclatements quadrupolaires des positions $^2\text{H}_a$ et $^2\text{H}_c$ sont toujours identiques.

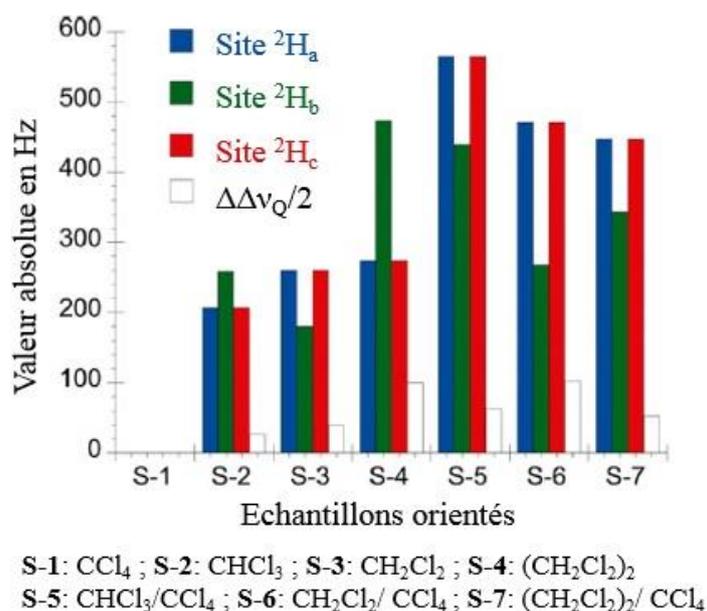


Figure IV.11 : Variation des $|\Delta\nu_Q|$ associées aux trois positions aromatiques ($^2\text{H}_a$, $^2\text{H}_b$ et $^2\text{H}_c$) de la vanilline et les demi-différences ($|\Delta\Delta\nu_Q/2|$) entre les positions $^2\text{H}_a$ et $^2\text{H}_b$ selon le co-solvant ou le mélange de co-solvant choisi ($T = 296$ K).

En conclusion, l'étude des différents co-solvants organiques à 296 K montre que les mélanges $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CCl}_4$ et $\text{Cl}_2\text{CHCHCl}_2/\text{CCl}_4$ répondent aux différents critères de choix du co-solvant. Pour davantage optimiser la phase cristal-liquide lyotrope, il est nécessaire de sélectionner une température d'analyse optimale.

2.b.ii. Choix de la température optimale

A la différence des phases cristal-liquides thermotropes, les CL polypeptidiques peuvent être utilisés sur une très large gamme de température (de 200 K à 350 K) en fonction des caractéristiques physico-chimiques (température de solidification, température d'ébullition) du co-solvant organique [33]. Le choix de la température de l'échantillon est donc un paramètre analytique important à optimiser, notamment pour solubiliser correctement un analyte solide.

En milieu orienté, la température (basse ou haute) de l'échantillon dans l'aimant joue un rôle important sur la dynamique (agitation) moléculaire et donc l'ordre orientationnel du soluté [33]. D'un point de vue pratique, la RMN ^2H à haute température est caractérisée par : i) une diminution des éclatements quadrupolaires $\Delta\nu_Q(^2\text{H})$ quand T augmente; ii) une augmentation des temps de relaxation longitudinaux $T_1(^2\text{H})$ du soluté quand T augmente; iii) une diminution des largeurs de raies à mi-hauteur (FWHM) conduisant à une augmentation de la hauteur du signal et donc du rapport (S/B)_i pour chaque site i ((S/B)_i croit quand T augmente). Ces variations sont toutes liées à l'augmentation de l'agitation thermique des molécules (solvant et soluté) quand la température de l'échantillon augmente.

Dans une seconde étape, une étude RMN 2D DAN en température pour l'échantillon PBLG/CH₂Cl₂-CCl₄ a été réalisée afin d'évaluer le meilleur compromis entre les différents effets cités ci-dessus et choisir une température de travail optimale pour cette mésophase. Les analyses ont été menées sur une large gamme de températures (275 – 330 K) afin de suivre la variation des éclatements quadrupolaires $\Delta\nu_Q(^2\text{H}_a, ^2\text{H}_b \text{ et } ^2\text{H}_c)$ et de la demi-différence $|\Delta\Delta\nu_Q/2|$, sur les largeurs de raies et finalement les rapports (S/B)_i. La variation de ces paramètres RMN est présentée sur les graphes des **Figures IV.12** et **IV.13**.

Comme le montre la **Figure IV.12**, tous les éclatements quadrupolaires ^2H diminuent avec l'augmentation de T comme attendu. Ainsi, les $\Delta\nu_Q$ diminuent pour les trois positions, de 640 Hz (278 K) à 340 Hz (323 K) pour les positions $^2\text{H}_a$ et $^2\text{H}_c$ et de 410 Hz à 130 Hz pour la position $^2\text{H}_b$. En revanche, la variation de la demi-différence entre les deux sites $^2\text{H}_a$ et $^2\text{H}_b$ reste quasiment constante sur toute la gamme de température (de 105 Hz (278 K) à 95 Hz (323 K)). Ainsi, malgré la réduction des éclatements quadrupolaires, la discrimination des DQ(^2H) des sites isochrones est toujours possible, quelle que soit la température. Le choix de la température d'analyse optimale de la vanilline ne dépendra pas de la valeur de la demi-différence entre les deux sites $^2\text{H}_a$ et $^2\text{H}_b$.

Tout étant identique par ailleurs, l'analyse des résultats en termes de largeur de raie à mi-hauteur (FWHM) et donc de rapport signal-sur-bruit (S/B) montre que l'impact de la température (*cf.* **Figure IV.13**) est limitant. Les informations spectrales associées, par exemple, au méthyle du groupement méthoxy de la vanilline indiquent une diminution de largeur de raie à mi-hauteur et donc une augmentation du rapport (S/B)_{Me} quand la température de l'expérience augmente. Ainsi, à 278 K, le rapport (S/B)_{Me} est égal à 225 pour

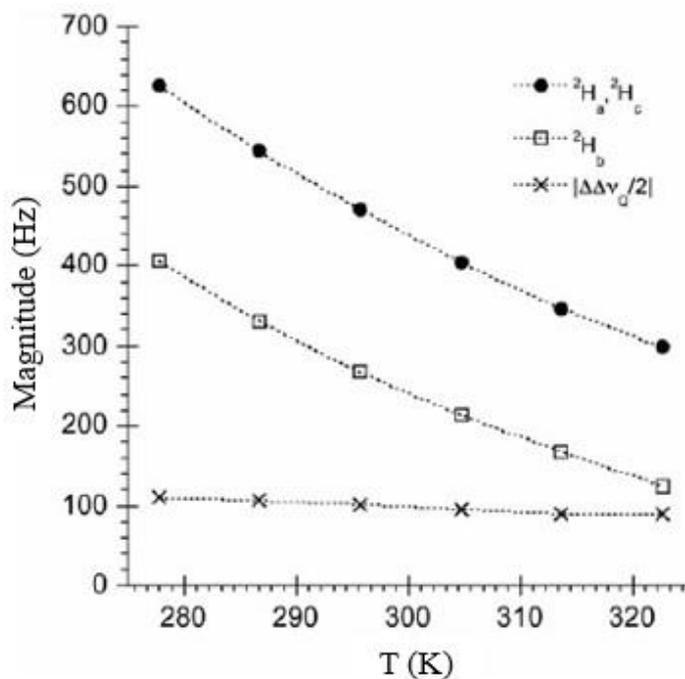


Figure IV.12 : Variation des $\Delta\nu_Q({}^2\text{H})$ s des sites aromatiques ${}^2\text{H}_a$, ${}^2\text{H}_b$ et ${}^2\text{H}_c$ et de la demi-différence d'éclatement quadrupolaire entre les positions ${}^2\text{H}_a$ et ${}^2\text{H}_b$ en fonction de la température (phase PBLG/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-CCl}_4$).

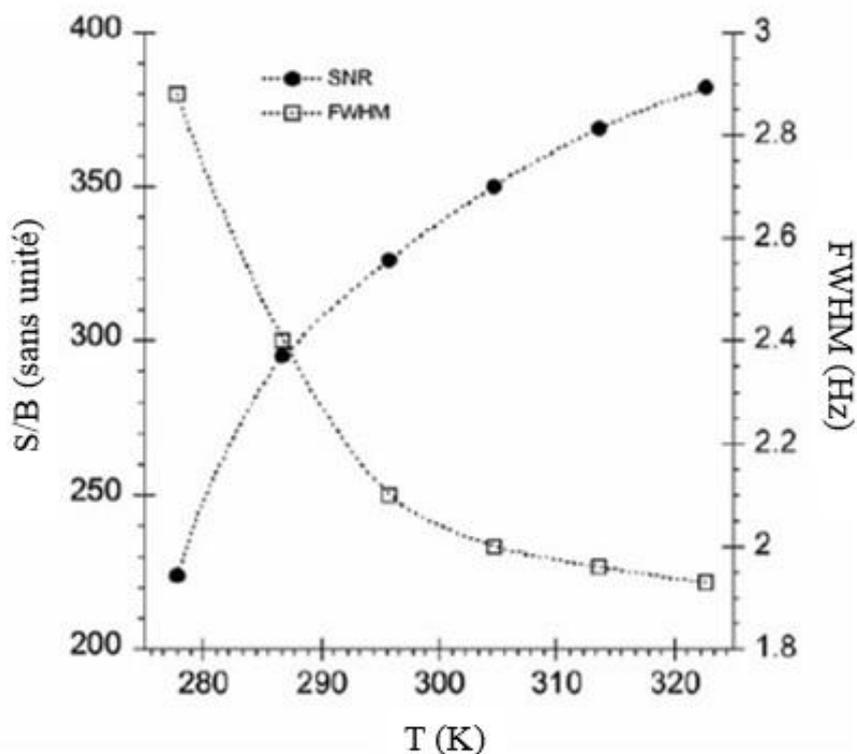


Figure IV.13 : Variation du rapport signal sur bruit $(\text{S/B})_{\text{Me}}$ et de la valeur de la largeur de raie à mi-hauteur (FWHM) selon la température (en K) pour le groupement méthoxy de vanilline (extrait à partir des cartes RMN 2D tiltées).

une largeur de raie de 2,9 Hz, tandis qu'à 323 K, le rapport $(S/B)_{Me}$ augmente à 380 pour une largeur de raie réduite à 1,95 Hz. Comme on peut le voir sur le graphique, la variation du rapport $(S/B)_{Me}$ suit une variation de type logarithmique croissante, alors que la largeur de raie à mi-hauteur suit la tendance inverse (une exponentielle décroissante). Ce résultat est conforme à l'idée qu'à nombre d'isotopomères monodeutérés constant, la hauteur d'une résonance 2H sera d'autant plus intense que la valeur FWHM sera petite, augmentant ainsi son $(S/B)_i$.

D'après les résultats précédents, il semblerait avantageux de réaliser les expériences 2D DAN à la température de 323 K. Cependant, il faut prendre en compte l'impact de la température sur les temps de relaxation $T_1(^2H)$. En effet, le temps de recyclage d'une expérience RMN quantitative étant relié au $T_1(^2H)^{max}$ du soluté d'après l'**Equation IV.5**, le temps d'expérience total augmentera d'autant plus que le $T_1(^2H)^{max}$ sera grand.

$$T_R = 5 \times T_1(^2H)^{max} \quad \text{(IV.5)}$$

En pratique, les valeurs de $T_1(^2H)$ anisotrope sont plus petites que celles de $T_1(^2H)$ isotrope à cause de la viscosité naturelle des cristaux liquides et de la plus faible dynamique moléculaire du soluté dans la phase polypeptide. Afin d'obtenir le meilleur compromis, la température sélectionnée pour l'étude de la vanilline est de 311 K. A cette température, la valeur des temps de relaxation $T_1(^2H)$ pour les positions aromatiques est comprise entre 100 et 130 ms, avec une largeur de raies à mi-hauteur respectable pour ces sites (de 4 à 6 Hz) et aussi une demi-différence d'éclatement quadropolaire $|\Delta\Delta\nu_Q/2|$ d'environ 100 Hz, permettant d'éviter les phénomènes de recouvrement des signaux.

2.c. Acquisition des spectres RMN 2D DAN- $\{^1H\}$ anisotrope de la vanilline de différentes origines

Après avoir optimisé l'ensemble des paramètres pour obtenir une phase cristal-liquide lyotrope optimale, nous avons décidé de travailler avec un échantillon contenant 80 mg de vanilline, de 90 mg de PBLG (DP = 763), de 300 mg de CCl_4 et 275 mg de CH_2Cl_2 . La proportion des deux co-solvants n'est plus exactement 50/50 (cf. **Tableau IV.1**) comme dans les tests préliminaires, dans la mesure où 25 mg de CH_2Cl_2 ont été remplacés par 25 mg de TMU. Cette faible portion de TMU (3,6 % massique) n'affecte pas significativement les caractéristiques des spectres DAN précédents. Notons par ailleurs que le $DQ(^2H)$ du TMU et son faible éclatement quadropolaire ($\Delta\nu_Q = 21$ Hz) n'interfèrent pas avec les signaux de la vanilline. Il est intéressant de noter ici que le TMU a une double fonction. Il peut être utilisé comme référence isotopique interne (si son rapport isotopique est connu) comme dans le protocole RMN-FINS[®], mais également comme co-solvant du PBLG. En effet, il a été montré en 2011 que le TMU (à l'image du DMF) peut être utilisé comme co-solvant (relativement

polaire) pour dissoudre des polymères polypeptides comme le PBLG et former des phases CLC homogènes, uniformes et énanti discriminantes [34].

Les expériences 2D Q -résolue Fz DAN- $\{^1\text{H}\}$ utilisées pour analyser les échantillons de vanilline de diverse origine ont été réalisées sur notre spectromètre Bruker Avance II opérant à 14,1 T (92,1 MHz pour ^2H) et muni d'une cryosonde sélective ^2H de 5 mm. Un exemple de spectre 2D caractéristique est proposé sur la **Figure IV.14**. Pour éviter des élargissements de raies ^2H , l'ensemble des couplages scalaire J et dipolaire D sont supprimés en utilisant une séquence de découplage classique de type WALTZ-16 ($< 0,1$ W) (cf. **Chapitre I.5.a**).

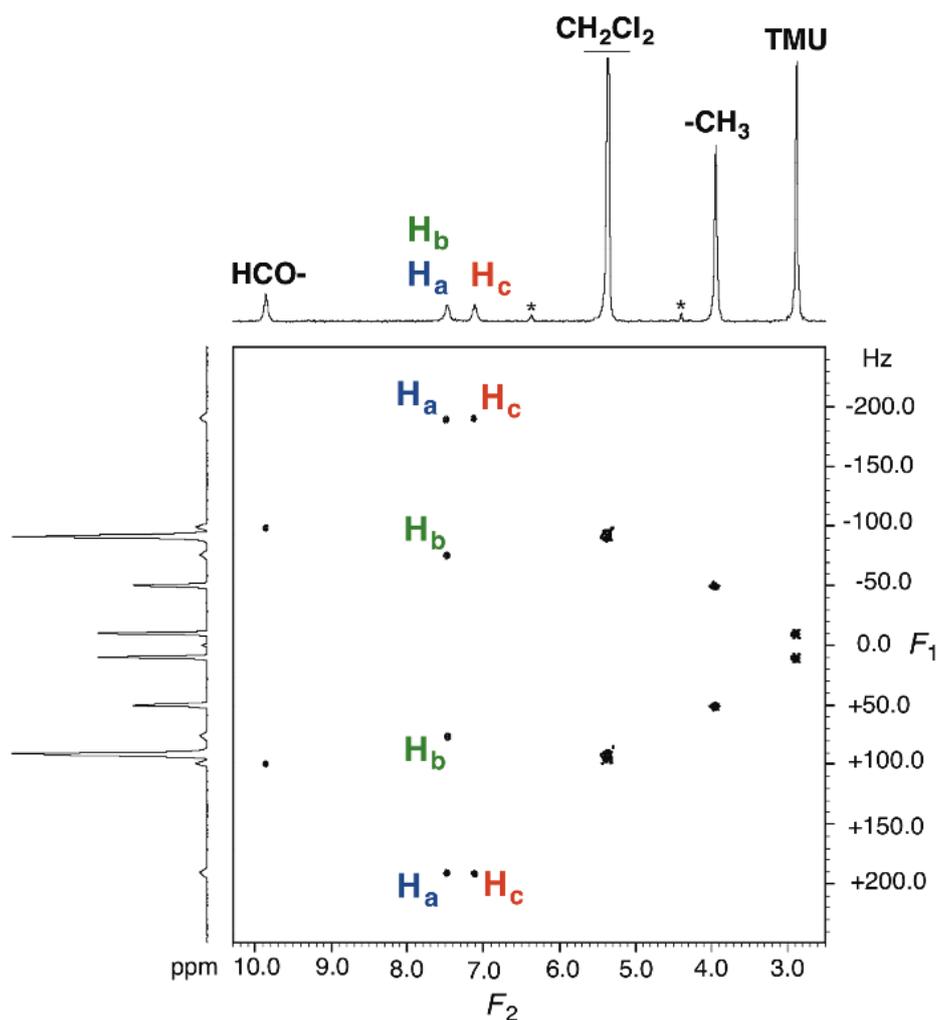


Figure IV.14 : Spectre RMN 2D Q -résolue Fz DAN- $\{^1\text{H}\}$ tilté et symétrisé enregistré à 311 K d'un échantillon de vanilline (80 mg) dissous dans la phase PBLG/ CH_2Cl_2 - CCl_4 (PBLG (90 mg), CH_2Cl_2 (275 mg), CCl_4 (300 mg), TMU (25 mg). Ce spectre a été enregistré en 16 heures avec $\text{NS} = 200$, $\text{TD}_1 = 350$, $\text{TD}_2 = 1300$ et $\text{T}_R = 1$ s. Les signaux marqués par un astérisque en dimension F_2 correspondent aux signaux axiaux résiduels ($\nu = 0$ Hz) du $\text{DQ}(^2\text{H})$ co-solvant CH_2Cl_2 (pic le plus intense).

Comparée aux expériences 2D de type Q -COSY et δ -résolue Fz, l'expérience 2D Q -résolue Fz a été choisie car elle présente l'avantage de minimiser les effets des inhomogénéités du champ magnétique (bloc d'écho en t_1). De plus, des travaux antérieurs

avaient déjà montré que cette séquence était la plus sensible des expériences de type QUOSY [27-29].

Pour pouvoir réaliser des études comparatives entre les vanillines de différentes origines, nous avons appliqué les mêmes conditions expérimentales pour les différents spectres enregistrés. Ainsi, la carte 2D a été acquise en 16 heures avec 1300 points en dimensions t_2 et de 350 incréments t_1 enregistrés chacun avec un total de 200 scans par incrément. Afin d'améliorer la résolution digitale du signal et éviter les phénomènes de troncature, une procédure de *zero filling* est appliquée pour obtenir 4000 points en t_2 et en t_1 . Après l'acquisition des spectres 2D, un filtrage exponentiel a été appliqué ($LB_1 = 2$ Hz et $LB_2 = 2$ Hz) dans les deux dimensions. Ce paramétrage correspond à un bon compromis entre élargissement des signaux et rapports (S/B)_i.

Pour améliorer sa lecture, la carte 2D est tiltée. Ceci permet d'éclater les deux informations RMN anisotrope ($\delta^{\text{aniso}}(^2\text{H})$ et $\Delta\nu_Q(^2\text{H})$) en dimension F_2 et F_1 , respectivement. Pour supprimer l'apparition possible d'artefacts (instabilité instrumentale ou trainée spectrale en F_1), la carte tiltée est symétrisée. Avant l'opération de tilt et la symétrisation du spectre, une correction automatique de la ligne de base dans les deux dimensions spectrale (ABS1/ABS2) est appliquée. Notons qu'un soin attentif a été porté au phasage du spectre 2D dans les deux dimensions.

A partir de la carte 2D, l'extraction des sous spectres 1D, selon le principe présenté en **Figure IV.10**, permet d'intégrer la surface du signal des projections pour obtenir des mesures quantitatives. Ces valeurs d'intégrales (obtenues par déconvolution des raies) vont permettre de calculer les rapports isotopiques ($^2\text{H}/^1\text{H}$) des positions aromatiques de la vanilline. Pour ce faire, il faut sélectionner une plage spectrale suffisamment large de points en dimensions F_2 dans laquelle les signaux du (ou des) DQ(s) sont présents. A partir de la carte 2D DAN tiltée, six sous-spectres 1D DAN associés à six plages spectrales différentes (en dimension F_2) et correspondant pour certains à différents isotopomères de la vanilline peuvent être extraits sans recouvrement avec d'autres signaux (cf. **Figure IV.15**). Ainsi, le premier sous-spectre 1D DAN extrait autour de 2.9 ppm correspond au signal du TMU, le second (autour de 4 ppm) correspond au signal du groupe méthoxy, le troisième (autour de 5,3 ppm) à celui du co-solvant, le quatrième (autour de 7,2 ppm) et le cinquième (autour de 7,5 ppm) correspondent aux déplacements chimiques des noyaux aromatiques $^2\text{H}_c$, et $^2\text{H}_a$ et $^2\text{H}_b$ ppm (respectivement). Enfin le sixième (autour de 9,2 ppm) correspond au signal du groupe aldéhyde. Evidemment, les différents sous-spectres 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ sont tous symétriques autour de la porteuse en F_1 ($\nu_1 = 0$ Hz).

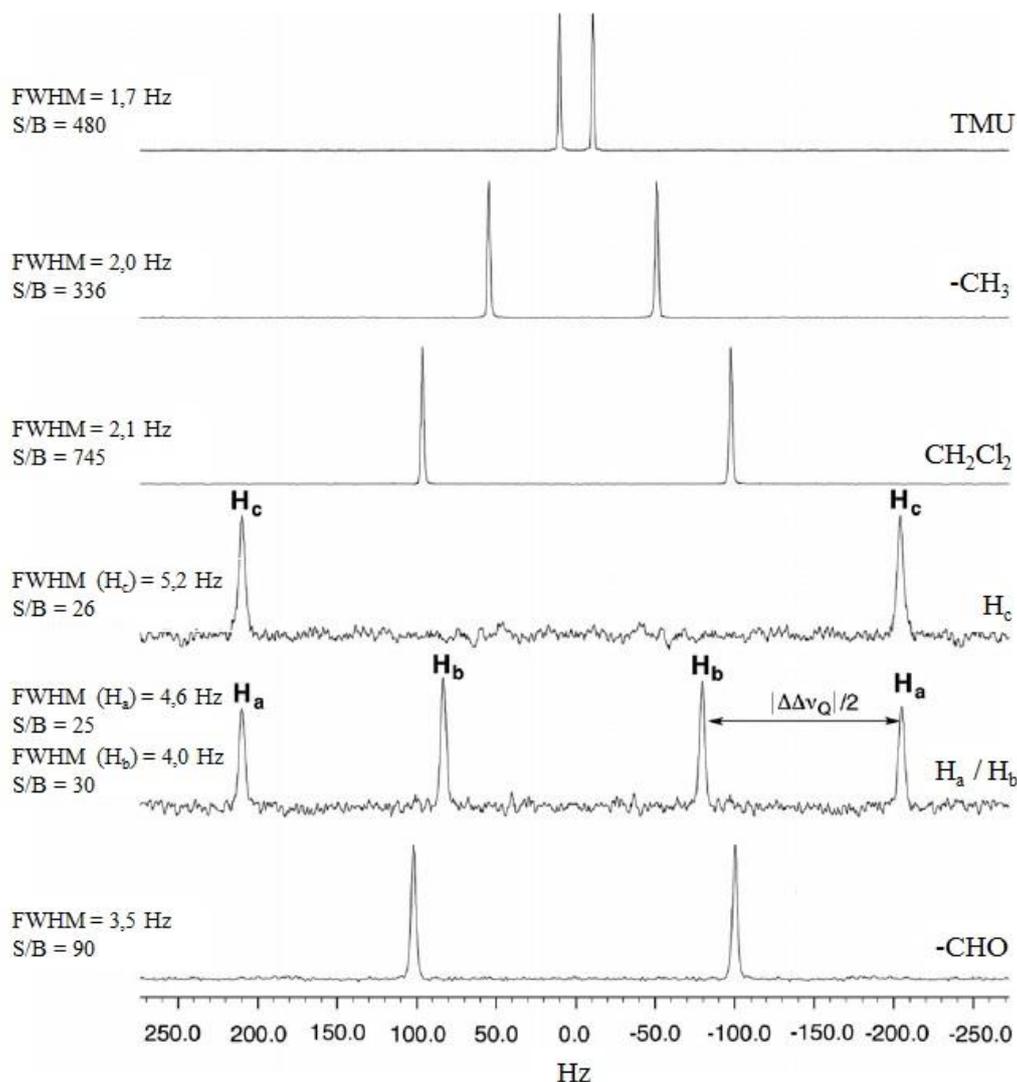


Figure IV.15 : Série de sous-spectres 1D DAN-¹H (projections F_1) associés à tous les isotopomères ²H inéquivalent de la vanilline et extraits du spectre 2D Q -résolue F_z DAN-¹H tilté et symétrisé (cf. Figure IV.14).

Après avoir trouvé les conditions expérimentales optimales pour étudier efficacement les positions aromatiques de la molécule de vanilline, l'objectif est maintenant d'analyser des échantillons de vanilline de différentes origines (naturelles, synthétiques ou hémisynthétiques) à partir du fractionnement isotopique naturel des positions aromatiques, et de trouver un critère « isotopique » pour différencier ces échantillons.

3. Discrimination d'échantillons naturels et synthétiques par RMN DAN anisotrope

Si l'étude de la vanilline en milieu orienté a permis de discriminer, pour la première fois, les trois positions aromatiques ²H de la vanilline, nous allons voir si la mesure des rapports isotopiques des positions ²H_a, ²H_b et ²H_c peut être utilisée pour le contrôle

d'authenticité de la vanilline. Pour cela, nous avons étudié six échantillons de vanilline d'origines différentes : i) trois échantillons d'origine naturelle ou hémisynthétique (Gousse de vanille naturelle (S8) ; Lignine (S9), et acide férulique naturel (S10)) notés « N » ; ii) deux échantillons d'origine synthétique (dont le précurseur est l'acide férulique (S11), Gaiacol (S12)) noté « S » ; iii) un échantillon d'origine inconnue (S13), noté « I » que l'on cherche à attribuer.

3.a. Apport du TMU dans l'analyse isotopique de la vanilline

3.a.i. *Intérêts de l'utilisation du TMU dans une mésophase cristal liquide*

L'utilisation du TMU dans cette étude a pour objectif d'évaluer le potentiel d'un standard isotopique interne directement dans une mésophase lyotrope. Comparé à d'autres molécules standards (comme la pyridine), le TMU présente des caractéristiques intéressantes pouvant répondre aux problématiques des solvants orientants polypeptidiques : i) le TMU est compatible avec tous les co-solvants organiques du PBLG ; ii) la symétrie de la molécule (*cf.* **Figure II.3**) donne, en milieu anisotrope, un unique doublet quadrupolaire intégrant pour 12 isotopomères (associés à 12 positions hydrogénées équivalentes) de la molécule. Si cette caractéristique peut être vue comme une limite en tant que co-solvant (trop forte intensité des signaux du co-solvant), elle rend son utilisation très intéressante en tant que référence interne car une très faible quantité sera nécessaire (1-3 % massique). Enfin, la dynamique rapide de cette petite molécule combinée à la libre rotation des groupements méthyles conduit à un DQ(^2H) de faible amplitude (10 - 30 Hz) [34]. Comme on peut le voir sur **Figure IV.14**, le DQ du TMU centré sur $\delta^{\text{aniso}}(^2\text{H}) = 2,9$ ppm présente un éclatement, $\Delta\nu_{\text{Q}}(\text{TMU})$ de 21 Hz. Pour l'analyse de la vanilline, ces valeurs sont intéressantes car elles n'interfèrent pas avec les DQ(^2H) du soluté.

3.a.ii. *Limites de l'utilisation du TMU pour l'étude isotopique de la vanilline*

Malgré l'intérêt de disposer d'une référence interne directement au sein de l'échantillon orienté (ce qui est possible), les signaux TMU n'ont pas été considérés dans ce travail pour une détermination absolue des rapports isotopiques ($^2\text{H}/^1\text{H}$) des sites aromatiques pour deux raisons : i) le rapport isotopique exact du TMU était inconnu ; ii) l'objectif de ce travail étant de caractériser l'origine des échantillons de vanilline sur la base des rapports isotopiques site-spécifiques des positions aromatiques, nous avons priorisé l'obtention de rapports $(\text{S}/\text{B})_i$ sur ces sites.

Comme on peut le voir sur la **Figure IV.15**, les rapports $(\text{S}/\text{B})_i$ de ces positions sont les plus faibles (compris entre 25 et 30 pour les trois positions $^2\text{H}_a$, $^2\text{H}_b$ et $^2\text{H}_c$ contre 90 pour le groupement aldéhyde et 335 pour le méthyle). C'est pourquoi, la priorité a été d'augmenter le rapport $(\text{S}/\text{B})_i$ en augmentant le nombre de scans NS par incrément t_1 tout en conservant un temps d'expérience 2D total raisonnable (de 15 à 18 heures) (*cf.* **Chapitre III**).

A 311 K, les temps de relaxation longitudinaux $T_1(^2\text{H})$ des positions aromatiques sont de l'ordre d'une centaine de millisecondes. Pour respecter les conditions de quantitativité pour les positions aromatiques ($T_R \geq 5 \times T_1(^2\text{H}_a, ^2\text{H}_b \text{ et } ^2\text{H}_c)$), le temps de recyclage est au minimum de 0,6 seconde. Cette condition n'est pas vérifiée avec le TMU, puisqu'à cette température, le $T_1(^2\text{H})$ du TMU (orienté) est environ égal à 1 s. Pour que l'analyse soit quantitative, il serait nécessaire que le T_R soit égal à 5 secondes, ce qui induirait un temps d'expérience 2D beaucoup trop long pour conserver une homogénéité de l'échantillon acceptable durant l'acquisition. Pour contourner ces difficultés, nous avons cherché un critère de discrimination sur la base du calcul des coefficients de distribution deutérium relatifs des différents sites aromatiques de la molécule sans passer par la mesure de leurs rapports isotopiques ($^2\text{H}/^1\text{H}$); absolus.

3.b. Discrimination des différentes sources de vanilline à partir des rapports isotopiques des positions aromatiques de la vanilline

Même en l'absence d'une référence interne permettant le calcul des rapports isotopiques ($^2\text{H}/^1\text{H}$); absolus, une analyse quantitative discriminante de l'origine de la vanilline a pu être proposée. Pour chaque position aromatique ($^2\text{H}_a, ^2\text{H}_b \text{ et } ^2\text{H}_c$), l'aire de la surface des DQ(^2H) a été déterminée, et notée respectivement $S_a, S_b \text{ et } S_c$. A partir de la valeur de ces surfaces, nous pouvons calculer les coefficients de distribution isotopique en deutérium (%), noté k_i , associés aux trois paires de deux sites aromatiques : $^2\text{H}_a/^2\text{H}_b, ^2\text{H}_a/^2\text{H}_c \text{ et } ^2\text{H}_b/^2\text{H}_c$ en accord avec l'**Equation IV.6**:

$$\begin{array}{l}
 \text{Paire } ^2\text{H}_a/^2\text{H}_b: \quad k(^2\text{H}_a^{a/b})(\%) = 100 \times \frac{S_a}{S_a + S_b} \quad k(^2\text{H}_b^{a/b})(\%) = 100 \times \frac{S_b}{S_a + S_b} \\
 \text{Paire } ^2\text{H}_a/^2\text{H}_c: \quad k(^2\text{H}_a^{a/c})(\%) = 100 \times \frac{S_a}{S_b + S_c} \quad k(^2\text{H}_c^{a/c})(\%) = 100 \times \frac{S_a}{S_b + S_c} \\
 \text{Paire } ^2\text{H}_b/^2\text{H}_c: \quad k(^2\text{H}_b^{b/c})(\%) = 100 \times \frac{S_b}{S_b + S_c} \quad k(^2\text{H}_c^{b/c})(\%) = 100 \times \frac{S_c}{S_b + S_c}
 \end{array} \quad \text{(IV.6)}$$

Nous pouvons également nous intéresser au coefficient de distribution isotopique k' de chaque position. Il correspond à la fraction de la surface du site $^2\text{H}_a, ^2\text{H}_a \text{ et } ^2\text{H}_b$ sur l'ensemble des surfaces des trois positions (cf. **Equation IV.7**).

$$k'_{^2\text{H}_i (i=a,b,c)}(\%) = 100 \times \frac{S_{^2\text{H}_i}}{\sum_{i=a,b,c} S_{^2\text{H}_i}} \quad \text{(IV.7)}$$

Ainsi, pour chaque échantillon de vanilline, les trois coefficients de distribution en deutérium spécifique pour une paire $^2\text{H}_i, ^2\text{H}_j$ donnée ou de distribution globale, k et k' , ont été calculés (cf. **Figures IV.16 et IV.17**). Les résultats obtenus sont listés dans le **Tableau IV.2**.

Tableau IV.2 : Coefficient de distribution relatif du deutérium, k et k' (%), correspondant respectivement aux paires de sites aromatiques ${}^2\text{H}_a/{}^2\text{H}_b$, ${}^2\text{H}_a/{}^2\text{H}_c$ et ${}^2\text{H}_b/{}^2\text{H}_c$ et aux coefficients de distribution par rapport aux trois sites ${}^2\text{H}_a$, ${}^2\text{H}_b$ et ${}^2\text{H}_c$

Vanilline		Valeur relative, normalisée à 100 % ^(a)					
N°	Source	$k({}^2\text{H}_a)/k({}^2\text{H}_b)$ (%)	$k({}^2\text{H}_a)/k({}^2\text{H}_c)$ (%)	$k({}^2\text{H}_b)/k({}^2\text{H}_c)$ (%)	$k'({}^2\text{H}_a)$	$k'({}^2\text{H}_b)$	$k'({}^2\text{H}_c)$
S-8	Lignine (N)	46,9/53,1 (0,6)	44,3/55,7 (0,9)	47,4/52,6 (0,3)	29,5 (0,6)	33,4 (0,3)	37,1 (0,5)
S-9 ₂	Acide férulique (N)	48,0/52,0 (3,0)	44,1/55,9 (1,5)	46,1/53,9 (1,6)	29,9 (1,4)	32,3 (2,0)	36,8 (0,3)
S-10 ₂	Gousse (N)	45,5/54,5 (1,7)	44,0/56,0 (1,6)	48,4/51,6 (0,9)	28,7 (1,3)	34,4 (1,0)	36,9 (1,0)
S-11	Guaiacole (S)	45,4/54,6 (1,9)	49,2/50,8 (1,2)	53,7/46,3 (1,2)	30,9 (1,2)	37,1 (1,4)	32,0 (00,6)
S-12	Acide férulique (S)	43,9/56,1 (1,6)	45,4/54,6 (1,0)	51,5/48,5 (2,1)	28,3 (1,7)	36,9 (1,9)	34,8 (0,6)
S-13	Inconnu (I)	45,3/54,7 (0,6)	43,9/56,1 (0,5)	48,5/51,5 (0,7)	28,7 (0,3)	34,6 (0,6)	36,7 (0,5)

^(a) ces données sont calculées à partir d'une série de trois expériences DAN 2D de type Q-résolue Fz sur un groupe de six échantillons de vanilline de sources différentes. Pour chaque échantillon, la nature de la source est précisée (N pour naturel, S pour synthétique et I pour inconnu). La valeur entre parenthèses correspond à la déviation standard instrumentale (cinq expériences).

L'analyse des résultats montre que :

i) le coefficient de distribution relatif, $k({}^2\text{H}_a^{a/b})$ et $k({}^2\text{H}_b^{a/b})$, associé à la paire ${}^2\text{H}_a/{}^2\text{H}_b$ indique qu'entre les deux positions aromatiques H_a et H_b , il existe un appauvrissement systématique en deutérium sur le site H_a par rapport au site H_b . En effet, pour les six échantillons étudiés (N, S et I), le coefficient de distribution $k({}^2\text{H}_a^{a/b})$ varie entre 43,9 et 48,0 %, alors que celui de $k({}^2\text{H}_b^{a/b})$ est compris entre 52 % et 56,1 %.

ii) l'analyse des coefficients de distribution relatif, $k({}^2\text{H}_a^{a/c})$ et $k({}^2\text{H}_c^{a/c})$ de la paire ${}^2\text{H}_a/{}^2\text{H}_c$ indique un appauvrissement isotopique en deutérium systématique pour la position H_a par rapport à la position H_c . Cette tendance est observable pour tous les échantillons dont l'origine est connue (N, S) et pour l'échantillon d'origine inconnue (I). Entre ces deux sites aromatiques, le coefficient de distribution $k({}^2\text{H}_a^{a/c})$ varie entre 43,9 % et 49,2 % alors que $k({}^2\text{H}_c^{a/c})$ varie entre 50,8 et 56,1 %.

iii) l'analyse des coefficients de distribution relatif, $k({}^2\text{H}_b^{b/c})$ et $k({}^2\text{H}_c^{b/c})$ de la paire ${}^2\text{H}_b/{}^2\text{H}_c$ indique un appauvrissement isotopique en deutérium pour la position H_b par rapport à la position H_c pour les échantillons dont l'origine est naturelle (N) ($k({}^2\text{H}_b^{b/c})$ compris entre

46,1 et 47,4 % et $k(^2\text{H}_c^{b/c})$ compris entre 51,6 et 53,9 %) mais pas pour les échantillons d'origine synthétique (S) ($k(^2\text{H}_b^{b/c})$ compris entre 51,5 et 53,7 % et $k(^2\text{H}_c^{b/c})$ compris entre 46,3 et 48,5 %). Pour l'échantillon d'origine inconnue, la tendance suit les échantillons de type « S » (avec $k(^2\text{H}_b^{b/c})$ égal à 48,5 % et $k(^2\text{H}_c^{b/c})$ égal à 51,5 %). Ainsi, ce dernier coefficient semble donc être discriminant !

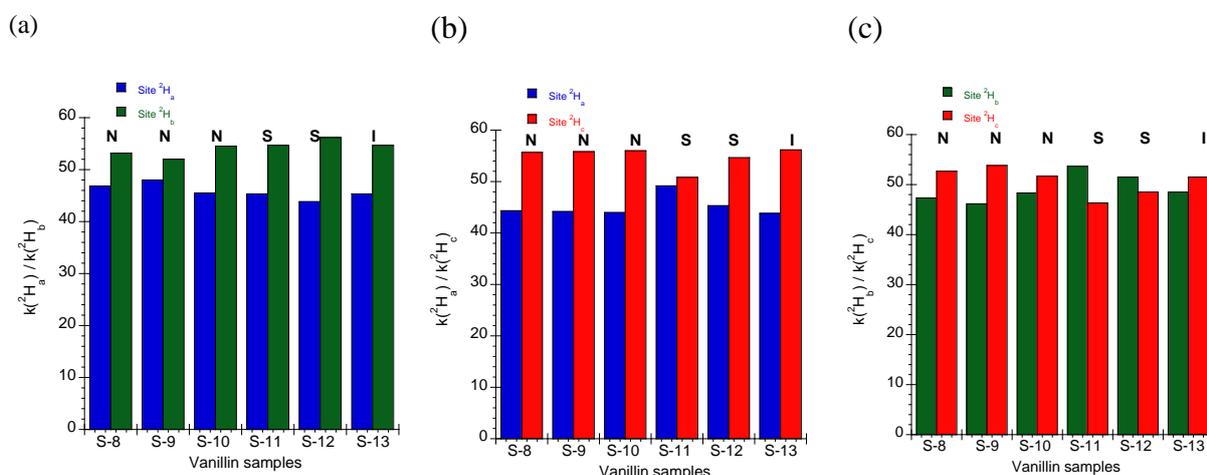
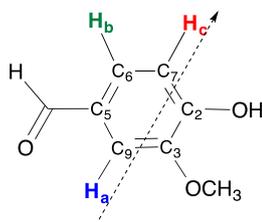


Figure IV.16 : Variations des coefficients de distribution relative de la teneur en deutérium, k , pour la paire de sites aromatiques et pour les échantillons S-8 to S-13 : (a) $^2\text{H}_a$ et $^2\text{H}_b$ (avec $k(^2\text{H}_b) + k(^2\text{H}_c) = 100\%$), (b) : $^2\text{H}_a$ et $^2\text{H}_c$ (avec $k(^2\text{H}_a) + k(^2\text{H}_c) = 100\%$), (c) : $^2\text{H}_b$ et $^2\text{H}_c$ (avec $k(^2\text{H}_b) + k(^2\text{H}_c) = 100\%$).

Ce premier critère est faiblement discriminant. Afin de trouver un second critère discriminant (plus discriminant), nous pouvons analyser les coefficients de distribution k' en deutérium sur les trois sites aromatiques. La **Figure IV.17** présente les variations de ces coefficients de distribution selon l'origine de l'échantillon sous forme de graphique. Ainsi, pour chaque échantillon (S-8 à S-13), le coefficient de distribution global $k'(^2\text{H}_a)$ est toujours strictement inférieur aux coefficients $k'(^2\text{H}_b)$ et $k'(^2\text{H}_c)$. Ceci démontre que le rapport isotopique $(^2\text{H}/^1\text{H})_a$ est toujours inférieur comparé au rapport isotopique $(^2\text{H}/^1\text{H})_b$ et $(^2\text{H}/^1\text{H})_c$. Une explication possible de cet appauvrissement en deutérium sera présentée dans la section suivante.

La comparaison entre les sites aromatiques H_b et H_c présente, quant à elle, deux tendances distinctes. Pour les trois échantillons de source naturelle (lignine, acide férulique naturel et gousse de vanille), le coefficient de distribution $k'(^2\text{H}_b)$ est plus faible que le coefficient $k'(^2\text{H}_c)$. Nous avons donc :

$$k'(^2\text{H}/^1\text{H})_a < k'(^2\text{H}/^1\text{H})_b < k'(^2\text{H}/^1\text{H})_c \quad (\text{IV.8})$$

Dans le même temps, les deux échantillons d'origine synthétique (guaïacol et acide férulique synthétique) présentent une tendance différente. En effet, le coefficient de distribution $k'(^2\text{H}_b)$ est plus important que le coefficient $k'(^2\text{H}_c)$ (cf. **Figure IV.17**). Dans ces deux échantillons, c'est la position H_b de l'aromatique qui présente le rapport isotopique $(^2\text{H}/^1\text{H})_b$ le plus important des trois positions aromatiques, soit :

$$k'(^2\text{H}/^1\text{H})_a < k'(^2\text{H}/^1\text{H})_c < k'(^2\text{H}/^1\text{H})_b \quad (\text{IV.9})$$

A partir de ces tendances, il semble possible de discriminer l'origine (naturelle ou synthétique) d'échantillons de vanilline à partir des coefficients de distribution $k'(^2\text{H}_a)$, $k'(^2\text{H}_b)$ et $k'(^2\text{H}_c)$ des positions hydrogénées du noyau aromatique. Concrètement, l'étude montre que la variation des distributions de type $k'(^2\text{H}_a) < k'(^2\text{H}_b) < k'(^2\text{H}_c)$ serait plutôt représentatif des échantillons naturels ou hémisynthétiques, tandis qu'une variation de type $k'(^2\text{H}_a) < k'(^2\text{H}_b) < k'(^2\text{H}_c)$ serait représentatif des échantillons d'origine synthétique.

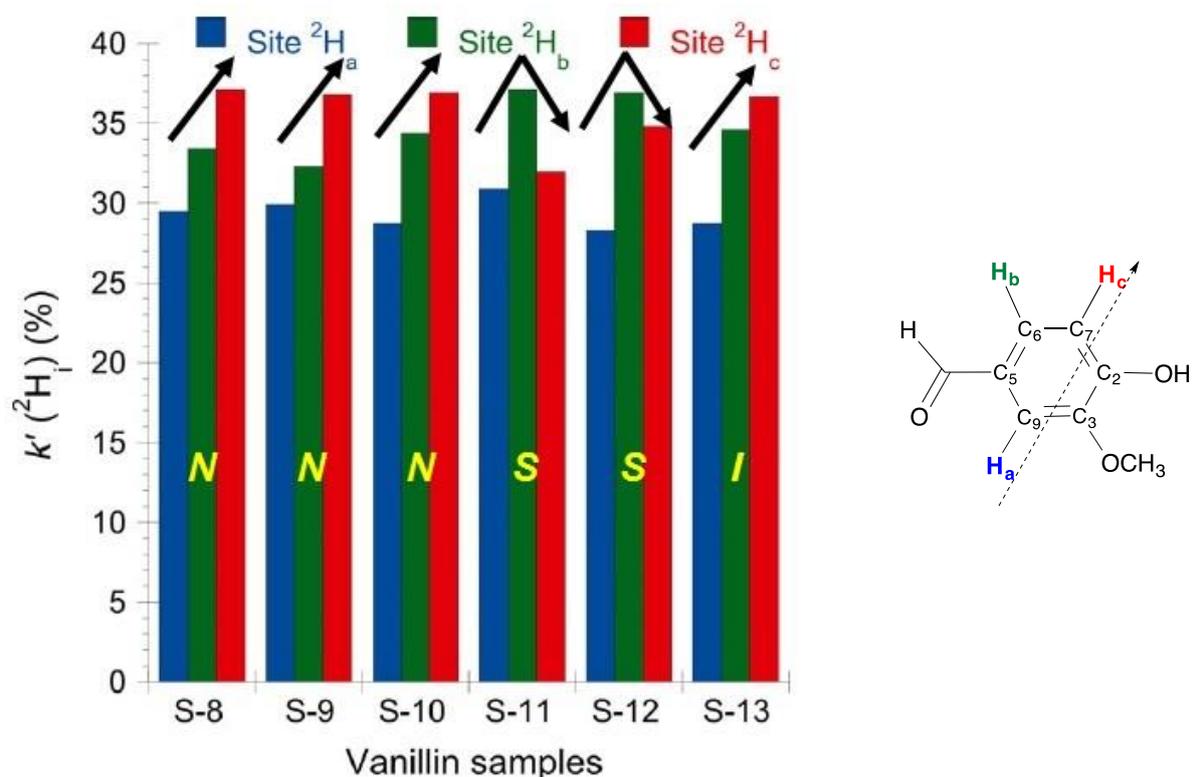


Figure IV.17 : Variation des coefficients de distribution relatif du deutérium k' sur les trois positions de l'aromatique (H_a , H_b et H_c / code couleur) pour chaque échantillon provenant de sources différentes (S-8 : lignine naturelle ; S-9 : acide férulique naturel ; S-10 : gousse de vanille naturelle ; S-11 : guaïacol synthétique ; S-12 : acide férulique synthétique ; S-13 : échantillon inconnu).

Afin de confirmer ces observations, nous avons étudié un échantillon de source inconnue (S13). Cette analyse présente deux caractéristiques : i) l'appauvrissement en deutérium de la position H_a par rapport aux deux autres sites du noyau aromatique (H_b et H_c) ; ii) un coefficient de distribution relatif $k'(^2\text{H}_b)$ inférieur à celui du site $^2\text{H}_c$, $k'(^2\text{H}_c)$, qui donnent un rapport isotopique $(^2\text{H}/^1\text{H})_b$ plus faible que $(^2\text{H}/^1\text{H})_c$. La combinaison de ces deux résultats suggère fortement que l'échantillon inconnu aurait une origine naturelle [40].

3.c. Interprétation de ces différences isotopiques

L'étude des rapports isotopiques ($^2\text{H}/^1\text{H}$) site-spécifique par RMN-FINS[®], complété ou pas par des études en RMN 2D DAN anisotrope, permet de déterminer les origines géographiques et biologiques de molécules d'intérêts, et de mieux comprendre les processus de biosynthèse. Avec ces résultats obtenus par RMN 2D DAN anisotrope sur les sites aromatiques de la vanille, il est possible de rediscuter le chemin de biosynthèse de la vanilline naturelle à partir des tendances observées.

Bien que la synthèse de la *Vanilla planifolia* soit étudiée depuis longtemps [35-37], son processus de biosynthèse est encore méconnu. Si les études antérieures ont montré que la biosynthèse de la vanilline naturelle dérive probablement du métabolisme des phenylpropanoïdes qui transforme la *L*-phénylalanine en acide cinnamique et en 4-acide coumarique à partir d'enzyme (cf. **Figure IV.18**). Le débat se situe surtout sur les étapes d'hydroxylation en position 3, de méthylation et de raccourcissement de chaîne.

Combinée à l'étude de la vanilline par RMN FINS[®] en milieu isotrope, notre étude par RMN DAN en milieu orienté permet d'obtenir des informations inédites [18]. En milieu isotrope, les signaux C₂-H ($^2\text{H}_a$) et C₆-H ($^2\text{H}_b$) ne sont pas discriminés, mais leurs valeurs de rapports isotopiques moyens sont systématiquement plus faibles que celle de C₅-H ($^2\text{H}_c$) (entre 39 et 37 ppm pour des échantillons de vanilline naturelle ou issue de la lignine). En milieu anisotrope, la discrimination des positions C₂-H ($^2\text{H}_a$) et C₆-H ($^2\text{H}_b$) permet de savoir que la position C₆-H ($^2\text{H}_b$) est plus enrichie en ^2H . Il est à noter que les coefficients de distribution associés à la vanilline issue de l'acide férulique naturel sont très similaires à ceux issue de la lignine. Ainsi, ces informations confirment les réflexions autour de la biosynthèse de la vanilline naturelle car ces fractionnements isotopiques sont introduits durant la biosynthèse de la *L*-phénylalanine, le précurseur commun de la vanilline, de la lignine et de l'acide férulique.

Les distributions isotopiques sur les sites aromatiques observées dans cette étude semblent être le résultat de la combinaison entre deux voies de biosynthèses associé à la *L*-phénylalanine. Tout d'abord, nous nous intéressons à la voie de biosynthèse *via* la *D*-érythrose-4-phosphate et la phosphoénolpyruvate (PEP) (voie (A) de la **Figure IV.18**). Lors de la fusion entre le PEP et la *D*-érythrose-4-phosphate pour former l'acide 3-deoxy-*D*-arabino-7-phosphate-heptulosonique, une nouvelle liaison chimique s'est formée entre les carbones C₆

et C₅ de la « future » vanilline. Durant cette réaction, le méthylène du PEP passe d'un état d'hybridation sp² à sp³. Cette transition est associée à un effet isotopique de cinétique secondaire inverse qui tend à enrichir le produit en ²H. Ceci explique l'augmentation d'environ 20 ppm par rapport aux évaluations théoriques (voie supérieure de la **Figure IV.18**).

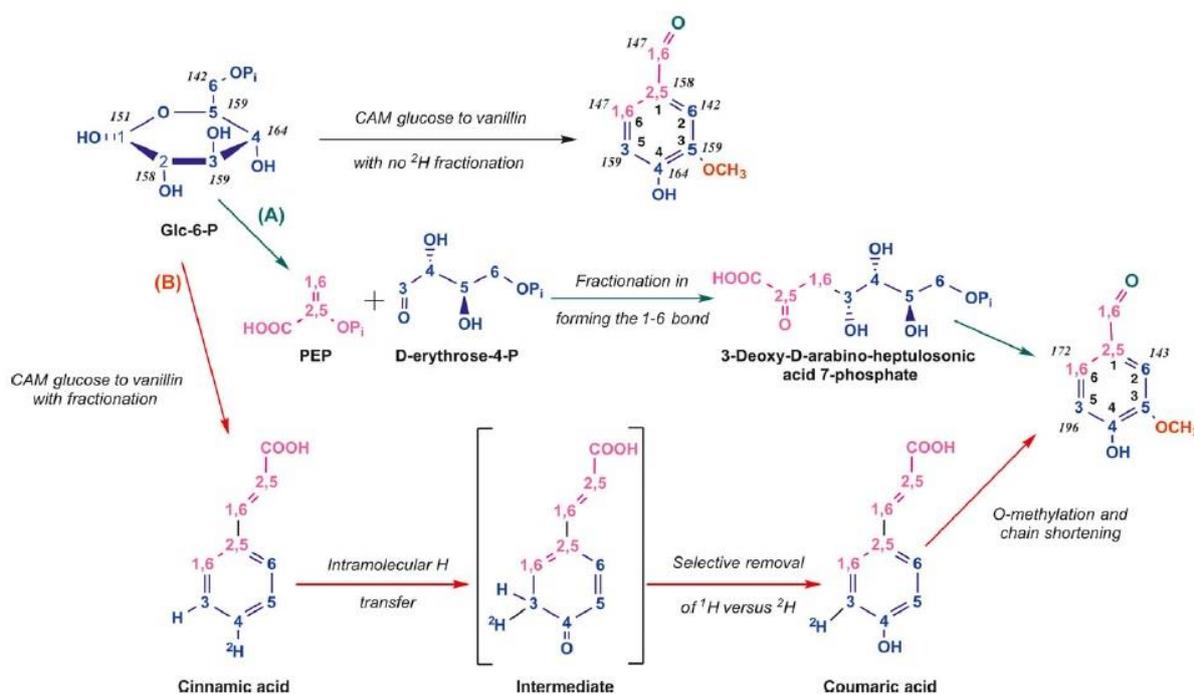


Figure IV.18 : Représentation schématique partielle des voies de biosynthèses de la vanilline montrant les probables étapes-clés introduisant des fractionnements isotopiques différents. La voie supérieure (en noir) indique les valeurs (²H/¹H) (en ppm) prédites en se basant sur le métabolisme d'acide crassulacéen (CAM pour « crassulacean acid métabolism ») du glucose en l'absence de fractionnement. La numérotation des carbones dans la structure correspond à leurs positions initiales dans la molécule de glucose (Glc-6-P). La numérotation interne au cycle aromatique correspond à la numérotation IUPAC utilisée dans les discussions. Les valeurs numériques extérieures au noyau aromatique correspondent au rapport isotopique (²H/¹H) (en ppm). Les flèches représentent plusieurs étapes successives. La série (A) illustre les causes possibles de l'enrichissement en ²H de la position C₆ de la vanilline (correspondant à la position ²H_b) et la série (B) illustre les causes possibles de l'enrichissement en ²H de la position C₅ de la vanilline (correspondant à la position ²H_c).

La différence de fractionnement isotopique (²H/¹H) entre les positions C₂ (H_a) et C₆ (H_b) peut s'expliquer par le métabolisme de l'acide crassulacéen (CAM) qui passe par une élimination stéréospécifique durant la synthèse du chorismate. Ainsi, cette étape peut appauvrir la position H_a en deutérium par rapport à H_b.

En théorie, le rapport isotopique (²H/¹H) attendu du C₅-H (²H_c) est de 159 ppm. Cependant, un enrichissement de ce rapport sur les échantillons naturels (196 ppm) est observé. Des travaux ont évoqué l'intervention probable d'un transfert d'hydrogène intramolécule associé à l'introduction du groupement hydroxyle en position 4 lors de la transformation de l'acide cinnamique en acide coumarique (voie (B) de la **Figure IV.18**) [38]. Dans ce mécanisme réactionnel, le H présent sur la position d'hydroxylation effectuée un

transfert vicinal sur la position adjacente (en position C₅), qui conduit à la perte de l'aromaticité. Pour rétablir le cycle aromatique, un hydrogène de la position C₅ est transposé sur l'oxygène de la position C₄ [39]. Ainsi, la position C₅, adjacente au site de l'hydroxylation, s'enrichira en ²H car la transition sp³ à sp² aromatique optera pour la perte de l'isotope le plus léger (donc le ¹H) compte tenu de la différence des énergies de liaisons C-H et C-D ($E_{C-H} < E_{C-D}$).

Ainsi, l'ensemble de ces explications peuvent justifier les rapports isotopiques (²H/¹H) des trois positions de l'aromatique pour les échantillons d'origine naturelle ou provenant d'un précurseur naturel [40].

Avec cette étude, nous avons pu valoriser, une nouvelle fois, le potentiel analytique de la RMN 2D DAN dans les solvants orientants pour la caractérisation isotopique ²H plus complète de la vanilline. Pour la première fois, toutes les positions C-²H de l'aromatique ont pu être discriminés spectralement sur la base de leurs déplacements chimique δ^{aniso} et des éclatements quadrupolaires $\Delta\nu_Q(^2\text{H})$, et l'analyse des coefficients de distributions qui reflète les rapports isotopiques (²H/¹H)_{a,b,c} a permis de discriminer les échantillons naturels des échantillons synthétiques.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe « Elucidation des Biosynthèses de Spectrométries Isotopiques » (Dr. Richard Robins) rattaché au laboratoire « Chimie Et Interdisciplinarité : Synthèse, Analyse et Modélisation » (CEISAM), UMR 6230) de l'Université de Nantes. Il a été publié dans le journal « Flavour and Fragrance Journal en 2018, sous le nom « Analytical contribution of deuterium 2D-NMR in oriented media to ²H/¹H isotopic characterization the case of vanillin » (disponible dans la section Production Scientifique) [40].

Références

- [1] [Vanilla plum ex. mill](#)
World Checklist of Selected Plants Families, **1754**.
- [2] [Tahitian vanilla \(*Vanilla tahitensis*\): A vanilla species with unique features](#)
Brunschwig C., Collard F-X., Lepers-Andrzejewski S., Raharivelomanana P.
Active Ingredients from Aromatic and Medicinal Plants, **2017**, Chap. 3, 29-45.
- [3] [Recherche sur le principe odorant de la vanille](#)
Gobley T.
Journal de Pharmacie et de chimie, **1858**, 34, 401-405.
- [4] [Über das Coniferin und seine Umwandlung in das aromatische Prinzip der Vanille](#)
Tiemann F., Haarmann W.
Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, **1874**, 7, 608-623
- [5] [Über eine neue Bildungsweise aromatischer Aldehyde](#)
Reimer K.
Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, **1876**, 1, 423-424.
- [6] [Comparison of gas-liquid, gas-solid, liquid-liquid, and liquid-solid chromatographic techniques in analysis of vanillin and ethyl vanillin in alcoholic solutions](#)
Martin G.E., Guinand G.G., Figert D.M.
J. Agric. Food Chem., **1973**, 21, 544-547.
- [7] [Determination of the authenticity of vanilla extracts by stable isotope ratio analysis and component analysis by HPLC](#)
Lamprecht G., Pichlmayer F., Schmid E.R.
J. Agric. Food Chem., **1994**, 42, 1722-1727.
- [8] [GC-MS and GC-olfactometry analysis of aroma compounds in a representative organic aroma extract from cured vanilla \(*Vanilla planifolia* G. Jackson\) beans](#)
Perez Silva A., Odoux E., Brat P., Ribeyre F., Rodriguez-Jimenes G., Robles-Olvera V., Garcia-Alvarado M.A., Günata Z.
Food Chemistry, **2006**, 99, 728-735.
- [9] [Comparison of headspace-SPME-GC-MS and LC-MS for the detection and quantification of coumarin, vanillin, and ethyl vanillin in vanilla extract products](#)
De Jager L.S., Perfetti G.A., Diachenko G.W.
Food Chemistry, **2008**, 107, 1701-1709.
- [10] [Isotope ratio mass spectrometry – history and terminology in brief](#)
Flenker U.
Drug Testing and Analysis, **2012**, 4, 125-148.
- [11] [Quantitative ²H NMR at natural abundance can distinguish the pathway used for glucose fermentation by lactic acid bacteria](#)
Roger O., Lavigne R., Mahmoud M., Buisson C., Onno B., Zhang B-L., Robins R.J.
J. Biol. Chem., **2004**, 279, 24923-24928.

- [12] Detection of fraudulent vanillin labeled with carbon-13 in the carbonyl carbon
Krueger D.A., Krueger H.W.
J. Agri. Food. Chem., **1985**, 33, 323-325.
- [13] Improved rapid authentication of vanillin using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^2\text{H}$ values
Greule M., Tumino L.D., Kronewald T.
Eur. Food Res. Technol., **2010**, 231, 933-941
- [14] Comparative metabolomics in vanilla pod and vanilla bean revealing the biosynthesis of vanillin during the curing process of vanilla
Gu F., Chen Y., Hong Y., Fang Y., Tan L.
AMB Express, **2017**, 7, 116-125
- [15] Vanilla authenticity control by DNA barcoding and isotope data aggregation
Geißler K., Greule M., Schäfer U.
Flav. Frag. J., **2017**, 32, 228-237.
- [16] Detection of sophisticated adulterations of natural vanilla flavors and extracts: Application of the SNIF-NMR method to vanillin and *p*-hydroxybenzaldehyde
Remaud G.S., Martin Y.-L., Martin G.G., Martin G.J.
J. Agric. Food. Chem., **1997**, 45, 859-866.
- [17] Differentiation between natural and synthetic vanillin samples using ^2H NMR
Toulemonde B., Horman I., Egli H., Derbesy M.
Helv. Chim. Acta., **1983**, 66, 2342-2345.
- [18] Determination of the origin of vanillin by multivariate analysis of the site-specific natural isotope fractionation factors of hydrogen
Maubert G., Guérin C., Mabon F., Martin G.J.
Analysis, **1988**, 16, 434-439.
- [19] Determination of site-specific (deuterium / hydrogen) ratios in vanillin by ^2H -nuclear magnetic resonance spectrometry: collaborative study.
Jamin E., Martin F., Martin G.J.
J. AOAC. Int., **2007**, 90, 187-195.
- [20] Authentication of the origin of vanillin using quantitative natural abundance ^{13}C NMR
Tenaillon E., Lancelin P., Robins R.J., Akoka S.
J. Agric. Food. Chem., **2004**, 52, 7782-7787.
- [21] NMR spectrometry isotopic fingerprinting: A tool for the manufacturer for tracking active pharmaceutical Ingredients from starting materials to final medicines
Remaud G.S., Bussy U., Lees M.
Eur. J. Pharm. Sci., **2013**, 48, 464-467.
- [22] A review of flavors authentication by position specific isotope analysis by nuclear magnetic resonance spectrometry: the example of vanillin
Remaud G.S., Akoka S.
Flav. Frag. J., **2016**, 32, 77-84.
- [23] C-13 isotopomics of triacylglycerols using NMR with polarization transfer techniques
Merchak N., Bejjani J., Rizk T., Silvestre V., Remaud G.S., Akoka S.
Anal. Meth., **2015**, 7, 4889-4891.

- [24] The new face of isotopic NMR at natural abundance
Jézéquel T., Joubert V., Giraudeau P., Remaud G.S., Akoka S.
Magn. Reson. Chem., **2017**, 55, 77-90.
- [25] Structural ambiguities in bridged ring systems resolved using natural abundance deuterium NMR in chiral liquid crystals
Aroulanda C., Lesot P., Merlet D., Courtieu J.
J. Phys. Chem. A., **2003**, 107, 10911-10918.
- [26] Integrated computational protocol for analyzing quadrupolar splittings from natural abundance deuterium NMR spectra in (chiral) oriented media
Navarro-Vasquez A., Berdagué P., Lesot P.
ChemPhysChem., **2017**, 18, 1252-1266.
- [27] Modified z-gradient filtering as a new mean to obtain phased deuterium autocorrelation 2D NMR spectra in oriented solvents
Lafon O., Lesot P., Merlet D., Courtieu J.
J. Magn. Res., **2004**, 171, 135-142.
- [28] Experimental detection of achiral and chiral naturally abundant ^{13}C - ^2H isotopomers by 2D-NMR in liquids and chiral oriented solvents
Lafon O., Lesot P.
Anal. Chem., **2012**, 84, 4569-4573.
- [29] Natural Abundance ^2H NMR Spectroscopy
Lafon O., Lesot P.
Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry, **2017**, Edition Academic Press, 1-14
- [30] Modified z-gradient filtering as a new mean to obtain phased deuterium autocorrelation 2D NMR spectra in oriented solvents
Lafon O., Lesot P., Merlet D., Courtieu J.
J. Magn. Reson., **2004**, 171, 135-142.
- [31] Dynamic range and acquisition system
Halamek J., Viscor I., Kasal M.
Measurement Science Review, **2001**, 1, 71-74.
- [32] Natural deuterium distribution in long-chain fatty acids is nonstatistical: A site-specific study by quantitative ^2H NMR spectroscopy
Billault I., Guet S., Mabon F., Robin R.R.
ChemBioChem, **2001**, 6, 425-431.
- [33] Enantiomeric recognition of chiral invertomers through NMR in chiral oriented solvents: A study of the cis-decalin
Sarfati M., Aroulanda C., Courtieu J., Lesot P.
Tetrahedron: Asymmetry, **2001**, 12, 737-744.
- [34] Recent advances in the analysis of the site-specific isotopic fractionation of metabolites such as fatty acids using anisotropic natural abundance ^2H NMR spectroscopy: application on conjugated linolenic methyl esters
Lesot P., Serhan Z., Billault I.
Anal. Bioanal. Chem., **2011**, 399, 1187-1200.

- [35] Vanillin Biosynthesis – Not as simple as it seems?
Dixon R.A.
Edition Handbook of Vanilla Science and Technology, **2011**, 292-298.
- [36] Vanillin formation from ferulic acid in *Vanilla planifolia* is catalysed by a single enzyme
Gallage N.J., Hansen E.H., Kannangara R.
Nat. Commun., **2014**, 5, 4037-4045.
- [37] A re-evaluation of the final step of vanillin biosynthesis in the orchid *Vanilla planifolia*
Yang H., Barros-Rios J., Kourteva G.
Phytochemistry, **2017**, 139, 33-46.
- [38] The prediction of isotopic patterns in phenylpropanoids from their precursors and the mechanism of the NIH-shift: Basis of the isotopic characteristics of natural aromatic compounds
Schmidt H-L., Werner R.A, Eisenreich W.
Phytochemistry, **2006**, 67, 1094-1103.
- [39] Arene oxides and NIH shift - Metabolism, toxicity and carcinogenicity of aromatic-compounds
Daly J.W., Jerina D., Witkop B.
Experimentia, **1972**, 28, 1129-1149.
- [40] Analytical contribution of deuterium 2D-NMR in oriented media to ²H/¹H isotopic characterization: the case of vanillin
Texier-Bonniot T., Berdagué P., Robins R., Remaud G., Lesot P.
Flav. Frag. J., **2018**, 33, 217-229.

Chapitre V

**Analyse de la Frambinone par RMN 2D
DAN dans une phase cristal-liquide chirale**

Dans ce dernier **Chapitre**, nous examinerons, de nouveau, l'apport de la RMN 2D DAN- $\{^1\text{H}\}$ anisotrope pour étudier une seconde molécule d'intérêt économique : la frambinone. Contrairement à la vanilline, cette molécule semi-rigide organique est prochirale. Elle possède donc des sites hydrogénés énantiotopes et donc des énantio-isotopomères monodeutérées qui ne sont pas discriminables par RMN 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ en milieu isotrope.

1. L'arôme de Framboise

1.a. Présentation de la frambinone

La framboise est un fruit rouge provenant d'arbrisseaux de la classe des *Magnoliopsida*, de la famille des *Rosaceae* et du genre des *Rubae*. Selon la classification biologique de Philip Miller en 1754, le framboisier est aussi appelé ronce du mont Ida (*Rubus idaeus*) [1]

Principalement cultivé en Europe et en Asie tempérée (notamment au Japon), il est classé en deux principales variétés selon son mode de floraison : i) les framboisiers non remontants, dits unifères, ne produisent qu'une seule récolte. La première année, les tiges donnent des feuilles mais aucune ramification et aucun bourgeon pouvant conduire à la fructification. Au début de l'été suivant, les rameaux auxiliaires ayant poussé l'année précédente sont porteurs de framboises ; ii) les framboisiers dit bifères ou remontants fructifient pendant deux périodes. La première année, les tiges non ramifiées présentent des grappes pouvant fructifier en automne. Après cette floraison, les pousses poursuivent leur développement et donnent une seconde fructification au début de l'été.

Compte tenu de l'intérêt économique associé à la frambinone utilisée dans l'industrie alimentaire, de nombreuses études biologiques ont été menées pour augmenter/optimiser la production de la framboise [2]. La framboise présente un taux d'anthocyanes important. Ces molécules bioactives possèdent des effets préventifs intéressants contre certaines maladies dégénératives chez l'humain (Alzheimer notamment) [3-4]. De plus, ce fruit présente un arôme et une odeur caractéristiques, très intéressants dans le milieu agro-alimentaire et/ou dans le domaine de la cosmétique.

Ces caractéristiques particulières de la framboise ont pour origine la présence de plus de 300 composés volatils confirmés [5-9]. Si la plupart des molécules ne jouent pas un rôle prépondérant dans cet arôme, les études menées dans les années 60 ont permis d'isoler les molécules principales de ce fruit [8]. Parmi elles, on observe la présence d'acide formique et de formiate d'éthyle qui sont partiellement responsables de l'odeur spécifique de la framboise (cf. **Figure V.1**).

En fait, les analyses ont montré que la molécule clé responsable de l'arôme de la framboise est la 4-(4-hydroxyphényl)-butan-2-one nommé simplement frambinone ou « raspberry ketone » [10]. La frambinone est une molécule prochirale (semi-rigide) de

symétrie C_s en moyenne. Sa structure est présentée sur la **Figure V.2**. Compte tenu de l'essor de la consommation « bio » dans nos sociétés actuelles, l'utilisation croissante de l'arôme de framboise (naturelle) en chimie alimentaire et en chimie olfactive fait que l'extraction et la purification optimale de la frambinone sont des problématiques majeures pour les industries agro-alimentaires et cosmétiques.

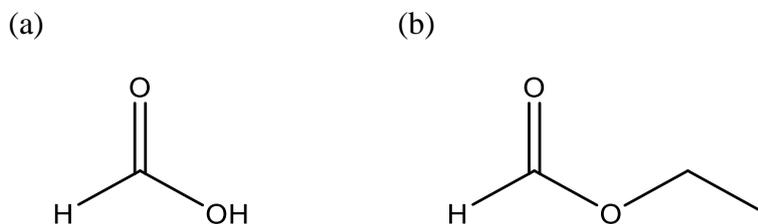


Figure V.1 : Structures de (a) l'acide formique (ou acide méthanoïque) et (b) du formiate d'éthyle (ou méthanoate d'éthyle) présent dans les framboises. Ces composés sont connus comme étant partiellement responsables de l'odeur de la framboise.

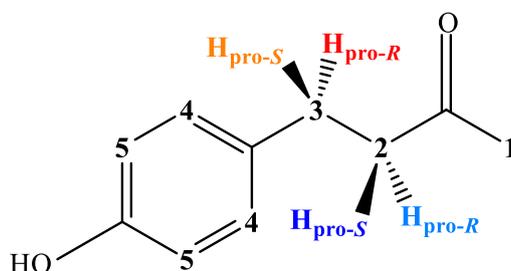


Figure V.2 : Structure du 4-(4-hydroxyphényl)-butan-2-one (frambinone). Les hydrogènes énantiotopes et leur stéréochimie (pro-R/pro-S) associés aux groupements méthylène (2 et 3) sont données.

Des études *in vivo* ont permis de rationaliser la biosynthèse de cette molécule durant la croissance de la framboise [11]. Biologiquement, la frambinone est synthétisée à partir de la *L*-tyrosine (acide aminé aromatique) et obtenue en suivant un schéma réactionnel en quatre étapes : i) un mécanisme enzymatique qui désamine la tyrosine (A) pour former de l'acide coumarique (B) ; ii) greffe d'une molécule de coenzyme A (CoA) sur l'acide coumarique pour former le coumaroyl-CoA (C) ; iii) transformation de la coumaroyl-CoA en 4-hydroxybenzalacétone (D) *via* une enzyme (la benzalacétone synthase) ; iv) la réduction de la 4-hydroxybenzalacétone par la benzalacétone réductase pour former la frambinone (E). Le schéma réactionnel biologique est présenté sur la **Figure V.3**.

Dans le fruit des framboisiers, la frambinone était synthétisée avec un rendement global faible conduisant à de faibles concentrations de cette molécule dans le fruit (quantité massique inférieure à 0,5 % de la masse du fruit). L'extraction de cette molécule biosynthétisée est donc un problème majeur. Actuellement, le protocole d'extraction utilisé permet de récupérer une quantité de 1 à 4 mg de frambinone naturelle par kilogramme de framboise, confirmant que la concentration maximale attendue (*via* les analyses *in vivo*) était de 5 mg de frambinone par kg de framboise [10-11]. Dans ces conditions, le prix de la

frambinone « naturelle » est très élevée et peut monter jusqu'à plus de 10 k€/kg. Face à ce prix prohibitif, et compte tenu du potentiel aromatique de la frambinone, divers protocoles ont été développés pour obtenir ce composé de manière synthétique.

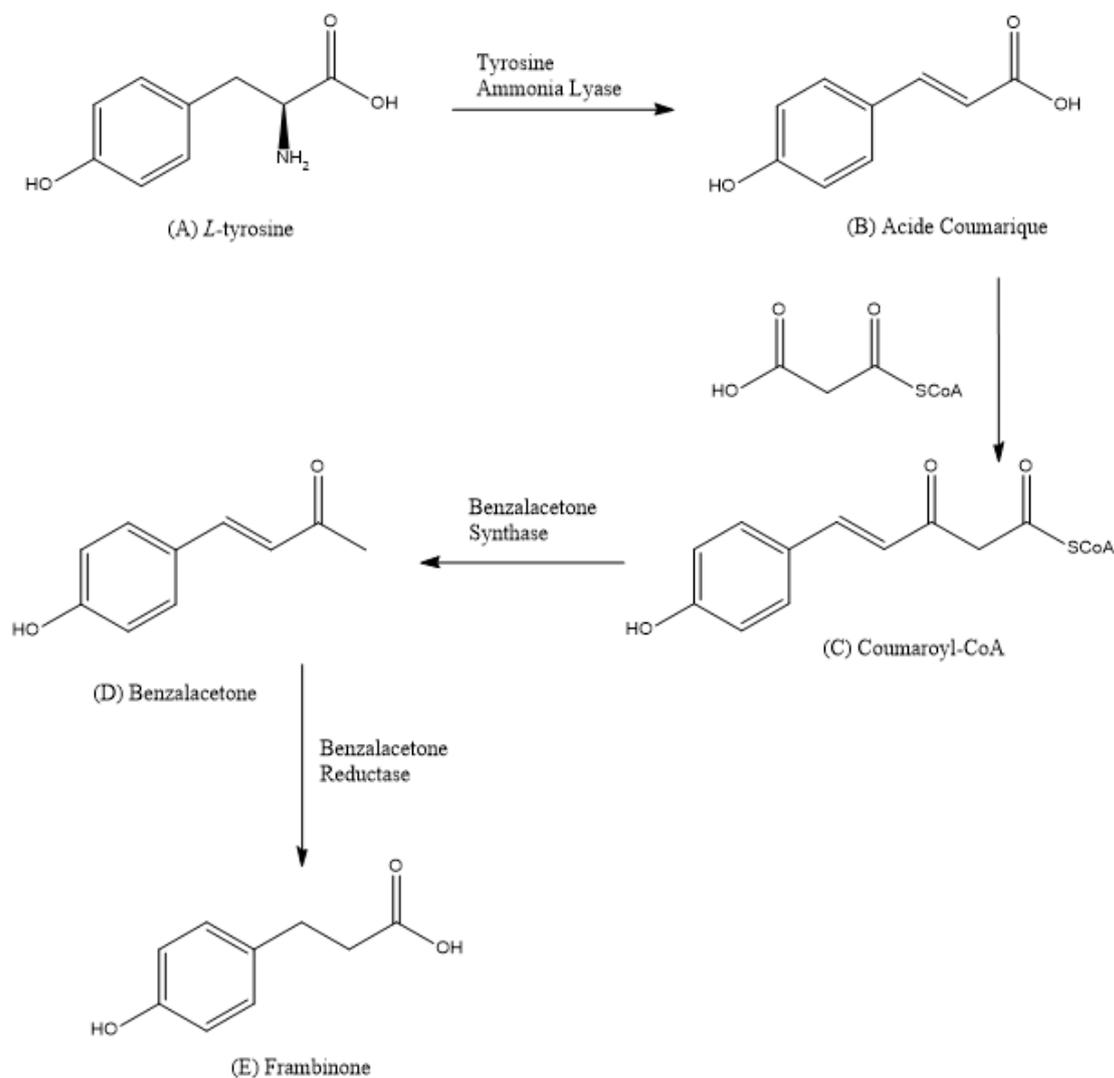


Figure V.3 : Voie de synthèse biologique (naturelle) de la frambinone. La *L*-tyrosine (A) est transformée en acide coumarique (B) par l'action de la Tyrosine Amonnia-Lyase. L'addition de la Coenzyme A conduit à la coumaroyl-CoA (C) qui forme la benzalacétone (D) sous l'action de la benzalacétone synthase. Enfin, la benzalacétone réductase réduit la benzalacétone (D) en frambinone (E).

1.b. Voie de synthèse de la molécule de frambinone

Comme l'extraction et la purification de la frambinone naturelle à partir des fruits du framboisier est coûteuse et peu rentable, diverses voies de synthèse efficaces ont été proposées pour obtenir artificiellement la frambinone. Parmi elles, certaines ont notamment été mises en place à l'échelle industrielle [12-13]. L'une des voies de synthèse les plus intéressantes a été décrites en 1996 par Leverett Smith [13]. Elle correspond à une

condensation aldolique croisée, suivi d'une hydrogénation catalytique à partir du 4-hydroxybenzaldéhyde. Le schéma de synthèse est présenté sur la **Figure V.4**.

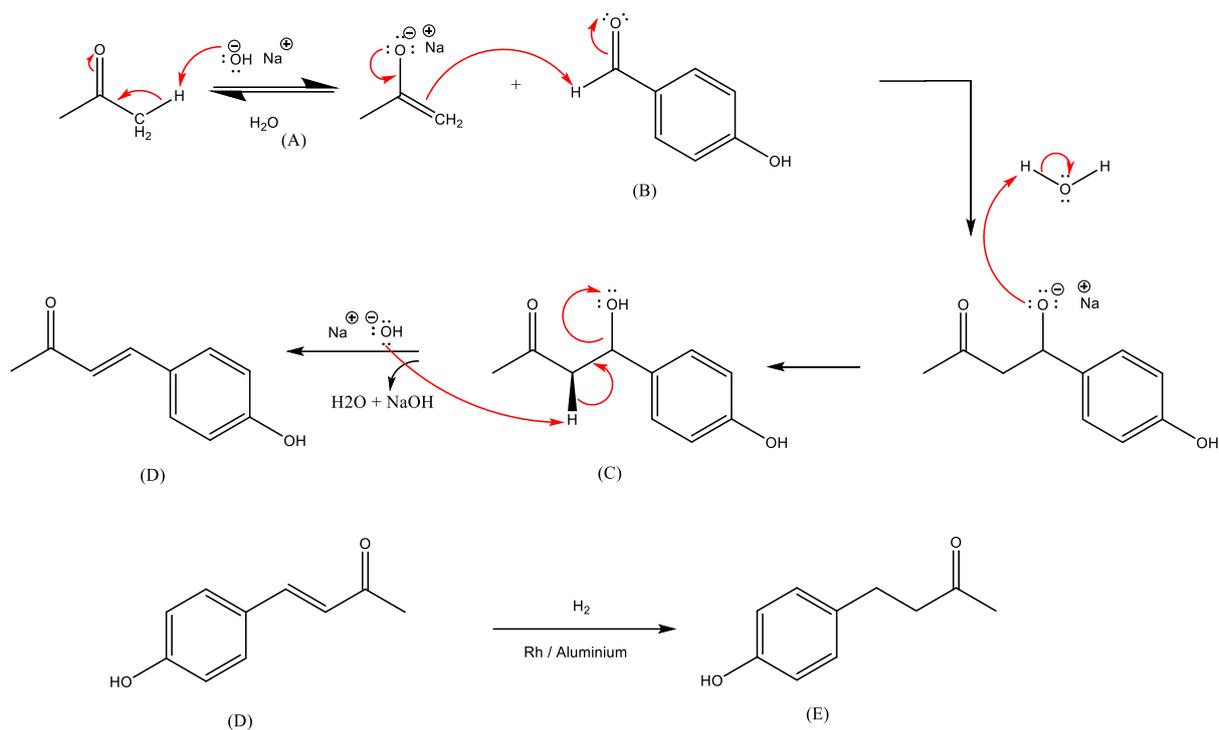


Figure V.4 : Processus de synthèse de la frambinone par condensation aldolique croisée à partir du 4-hydroxybenzaldéhyde en milieu basique [13].

De façon détaillée, la première étape correspond à la formation d'un ion énolate à partir de l'acétone en milieu basique. En présence d'hydroxyde de sodium (NaOH), l'acétone déprotonée apparaît en équilibre entre la forme cétone et la forme énol ionique (A) (équilibre céto-énolique). En présence du 4-hydroxybenzaldéhyde (B), le doublet non liant de l'ion énolate va reformer la double liaison C=O et les électrons de la double liaison C=C vont créer une liaison C-C avec l'aldéhyde. Pour respecter la règle de l'octet, la double liaison C=O du 4-hydroxybenzaldéhyde devient une simple liaison C-O et l'oxygène porte un doublet non liant supplémentaire (O⁻) qui forme une liaison O-H dans un milieu protique (C). En présence d'une base (NaOH), le doublet électronique va arracher un proton en position β de la fonction alcool. Les électrons vont former une double liaison entre le carbone β et le carbone α du OH qui sera éliminée sous forme hydroxyde HO⁻ (D). Après cette aldolisation croisée, la cétone α,β -insaturée subit une hydrogénation en présence d'un catalyseur à base de rhodium et d'aluminium pour former la 4-(4-hydroxyphényl)-butan-2-one où frambinone (E). Depuis, de nouvelles voies de synthèses sont régulièrement proposées [14] pour répondre aux besoins du monde industriel.

La voie de synthèse proposée par Leverett Smith [13] permet d'obtenir de très grandes quantités de frambinone, conduisant à un prix au kilogramme 100 fois plus faible que celui de la frambinone naturelle (≈ 100 €/kg). Dans une problématique économique, la frambinone

artificielle s'est imposée dans le milieu agro-alimentaire. Cependant, il arrive régulièrement que des produits soient vendus avec une appellation commerciale frambinone « naturelle », alors qu'en réalité, il s'agit de frambinone synthétique. Comme dans le cas de la vanilline, ce procédé illicite, considéré comme de la contrefaçon, est courant pour générer une forte plus-value. Pour lutter contre ces procédés illicites, le protocole RMN-FINS[®] est un outil de choix pour déterminer le profil isotopique intramoléculaire de cette molécule et d'en déduire son origine (naturelle ou synthétique).

1.c. RMN 1D ¹H et DAN-¹H} isotrope de la frambinone

Le spectre ¹H à 14,1 T de la frambinone dissous CH₂Cl₂ est présenté sur la **Figure V.5**. Le spectre RMN ¹H peut se décomposer comme une combinaison de trois sous-systèmes de spins ¹H : i) un sous-système de spin de type A₃ associé au groupe méthyle ($\delta^{\text{iso}} = 2,15$ ppm) et conduisant à un singulet; ii) un sous-système de spin de type AA'BB' ($\delta^{\text{iso}} = [2,76 - 2,82$ ppm]) correspondant aux deux méthylènes de la frambinone (position 2 et 3) et conduisant à une structure du second ordre (cf. zoom I de la **Figure V.5**) ; iii) un système de spins AA'XX' ($\delta^{\text{iso}} = 6,8$ et $7,1$ ppm) associé au cycle aromatique para-disubstitué et conduisant également à une structure du second ordre (cf. zoom II de la **Figure V.5**).

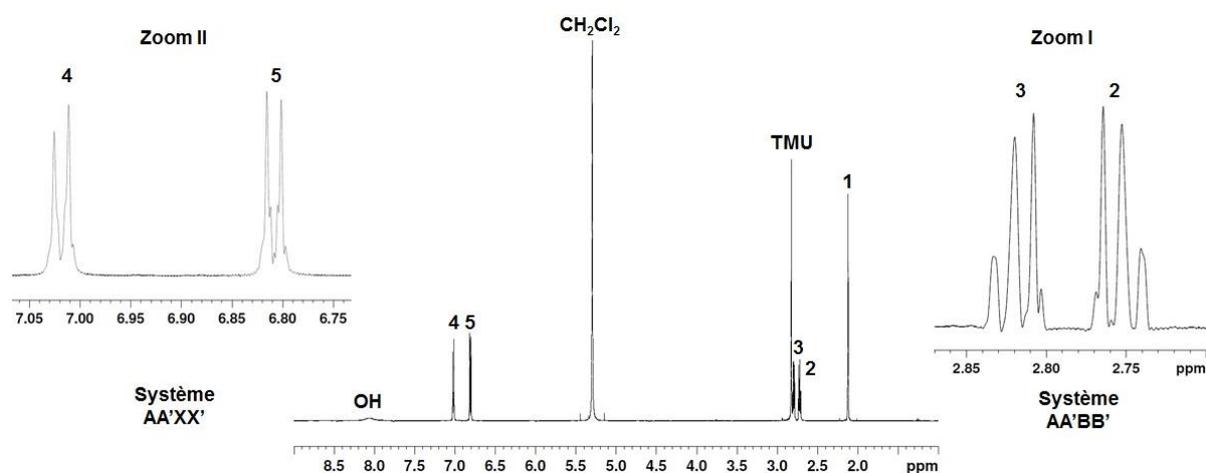


Figure V.5 : Spectre RMN ¹H isotrope (600,1 MHz) de la frambinone dissous dans CH₂Cl₂. Les deux zooms présentent la structure du second ordre associée aux protons des méthylènes (zoom I) et du cycle aromatique (zoom II). Ce spectre a été acquis avec NS = 8, RG = 2,25, TD = 10000, AQ = 0,7 et T_R = 1s. L'échantillon utilisé est composé de 106 mg de frambinone et 970 de CH₂Cl₂.

Le spectre RMN 1D DAN-¹H} de la frambinone (origine synthétique – Sigma-Aldrich) dissous le dichlorométhane, en présence de TMU est présenté sur la **Figure V.6**. Les données spectrales de ce spectre 1D DAN sont listées dans le **Tableau V.1**. Comme nous pouvons le constater, des variations notables de largeur de raies sont observées pour les sites ²H du soluté. En effet, le signal du groupement méthyle (1) à 2,15 ppm présente une largeur de raie à mi-hauteur de $\approx 0,5$ Hz, tandis que celles des groupements méthylènes (2 et 3) sont supérieures à 3 Hz (3,0 pour (2) et 3,4 (3)). Pour les sites aromatiques (4 et 5), la largeur de raie est pratiquement doublée ($\approx 4,7$ Hz) et atteint $\approx 10,7$ Hz pour la fonction alcool (groupe

labile). Ces différences de FWHM traduisent de fortes variations de relaxation transversale $T_2(^2\text{H})$ pour ces sites probablement liés à des dynamiques conformationnelles différentes pour chaque site (grandes pour le groupe méthyle (rotation libre), plus petite pour les sites aromatiques).

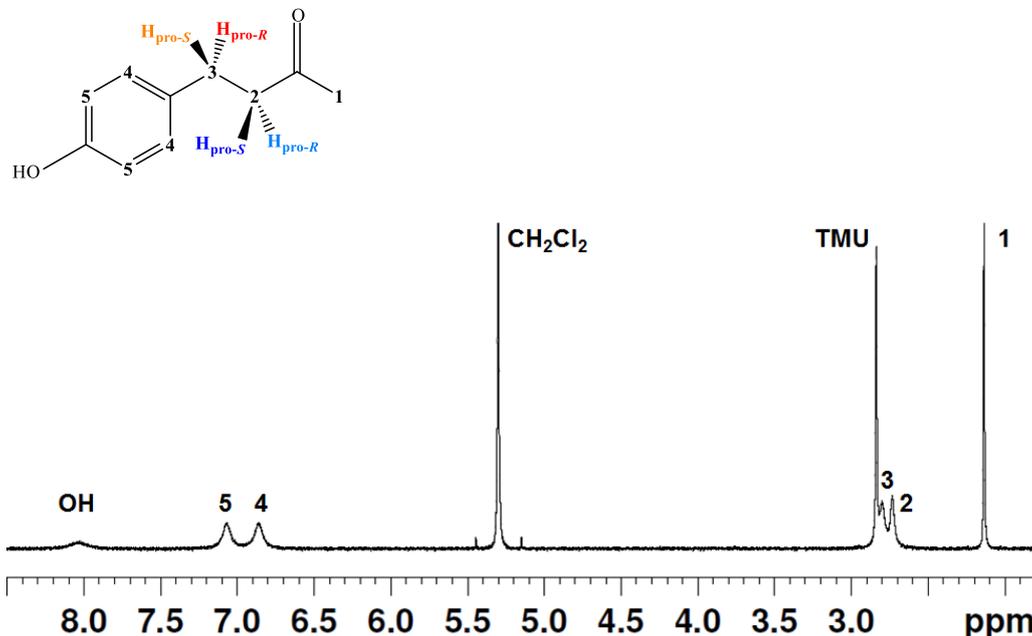


Figure V.6 : Spectre RMN $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ isotrope de la frambinone dans le dichlorométhane (CH_2Cl_2) en présence de TMU. Ce spectre a été acquis avec NS = 512, RG = 1150, TD = 7148, AQ = 2 s et T_R = 2,5 s. Un filtrage exponentiel a été appliqué (LB= 0,5 Hz).

Tableau V.1 : Données spectrales du spectre RMN 1D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ isotrope de la frambinone dissous CH_2Cl_2 .

Paramètres ^a	Sites de la molécule							
	CH ₃ (1)	CH ₂ (2)	CH ₂ (3)	CH (4)	CH (5)	-OH	TMU	CH ₂ Cl ₂
$\delta_i(^2\text{H})^a$ (ppm)	2,15	2,62	2,70	6,85	7,08	8,05	2,83	5,30
FWHM ^b (Hz)	0,5	3,0	3,4	4,7	4,8	10,7	0,7	0,7

^a Le signal du CH_2Cl_2 a été calibré à 5,30 ppm. ^b Les largeurs de raies sont mesurées avec le filtrage exponentiel.

En 1998, le protocole RMN FINS[®] a été utilisé pour déterminer le fractionnement isotopique de la frambinone associé aux différents sites accessibles en RMN DAN isotrope. L'analyse des profils isotopiques a montré qu'il était possible de discriminer les échantillons de la frambinone d'origines diverses [15, 16], fournissant ainsi aux laboratoires d'analyse et /ou de répression des fraudes un outil analytique intéressant.

Dans l'échantillon isotrope que nous avons préparé, le TMU peut jouer le rôle de référence isotopique interne. Cependant, la très forte proximité des résonances DAN du TMU

à 2,9 ppm et du groupement méthylène **3** ($\Delta\delta = 0,13$ ppm ; $\Delta\nu = 12$ Hz) peut être vue comme un inconvénient significatif pour mesurer les intégrales de ces signaux proprement même par déconvolution du signal. L'utilisation d'une autre référence isotopique étalonée peut être judicieuse dans ce cas. Dans l'article de 1998, les auteurs avaient identifié le problème et avaient remplacé le TMU par du terbutylsulfide [15, 16].

D'un point de vue structural, la frambinone est une molécule prochirale de symétrie moléculaire C_s en moyenne (semi-flexible). Elle possède donc des sites énantiotopes hydrogénés au niveau des deux groupements méthylène, notés **2** et **3**. Du point de vue de la RMN DAN- $\{^1H\}$, ces sites sont associés à deux paires d'énantio-isotopomères (R-C*HD-R') monodeutérés associées aux deux méthylènes comme le montre la Figure V.7.

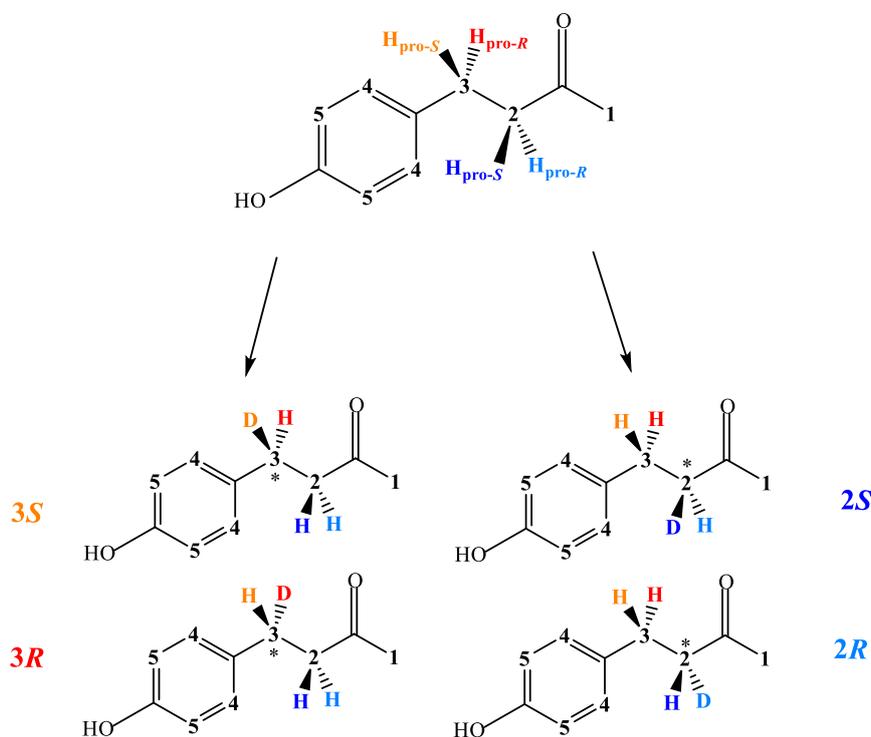


Figure V.7 : Représentation des deux couples d'énantio-isotopomères monodeutérés associés aux groupements méthylènes **2** et **3**.

Dans un solvant isotrope (achiral), il n'est pas possible de discriminer spectralement les directions énantiotopes C-H d'un groupement méthylène puisqu'elles sont équivalentes (cf. **Tableau I.2**). Par conséquent, les paires d'énantio-isotopomères monodeutérés associées à ces directions ne sont donc pas non plus discriminables par RMN 1D DAN, et une résonance unique 2H est obtenue pour chaque groupe méthylène (cf. **Figure V.6**). De fait, les analyses isotopiques ($^2H/^1H$) menées à ce jour ne permettent donc pas une caractérisation isotopique complète de la frambinone [15].

Afin de répondre à ce challenge, nous avons exploité les propriétés énantiodiscriminantes des phases CLC polypeptides combinées au potentiel analytique de RMN 2D QUOSY DAN- $\{^1H\}$ [17-19]. Le concept de discrimination spectrale d'énantio-

isotopomères monodeutérés de molécules prochirales a été exploré efficacement, dès 2004, pour analyser des acides gras à longue chaîne méthyles (cf. **Chapitre II.3**) [20-22].

2. Apport de la RMN ^2H anisotrope dans un milieu anisotrope

2.a. Caractérisation de la molécule de frambinone

2.a.i. *Utilisation d'une phase cristal-liquide achirale (CLA)*

Dans une première étape, le solvant isotrope CH_2Cl_2 a été remplacé par une phase cristal-liquide achirale « PBG » préparée à partir d'un mélange racémique de PBLG et de PBDG, son énantiomère (cf. **Chapitre I**). Dans ces conditions particulières, la compensation des deux polymères énantiomères PBLG et PBLG conduit à un milieu orienté achiral où des énantio-isotopomères monodeutérés ne peuvent être différenciés (cf. **Chapitre I.1.c.ii**) [16].

L'échantillon utilisé est composé de 100 mg de frambinone dissous dans un mélange racémique de PBLG/PBDG (50 mg (DP = 743) / 50 mg (DP = 763)) et 600 mg de CH_2Cl_2 . La **Figure V.8** présente le spectre 2D Q -résolue MQ DAN- $\{^1\text{H}\}$ (92,1 MHz) de cet échantillon enregistré en 16 heures, ainsi que les sous-spectres 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ correspondant aux cinq isotopomères discriminés. Sur cette carte 2D, nous pouvons observer que les $\text{DQ}(^2\text{H})$ des groupements méthylènes **2** et **3** sont maintenant parfaitement séparés sur la base de leurs déplacements chimiques $\delta^{\text{aniso}}(^2\text{H})$ et de leurs éclatements quadrupolaires, $\Delta\nu_Q(^2\text{H})$. Les différentes données spectrales DAN de cet échantillon sont listées dans le **Tableau V.2**.

Tableau V.2 : Données spectrales du spectre RMN ^2H - $\{^1\text{H}\}$ anisotrope de la frambinone PBG/ CH_2Cl_2 .

Paramètres	Site de la molécule					
	CH ₃ (1)	CH ₂ (2)	CH ₂ (3)	CH (4)	CH (5)	-OH
$\delta_i(^2\text{H})^a$ (ppm)	2,15	2,62	2,70	6,85	7,08	8,05
FWHM (Hz)	2,4	3,7	4,0	5,1	4,5	-
$ \Delta\nu_Q(^2\text{H}) ^b$ (Hz)	124,7	217,7	407,8	222,2	252,3	-
(S/B) _i	181	71	31	13	19	-

^a Le signal du CH_2Cl_2 a été calibré à 5,30 ppm. ^b Les largeurs de raies sont mesurées avec le filtrage exponentiel.

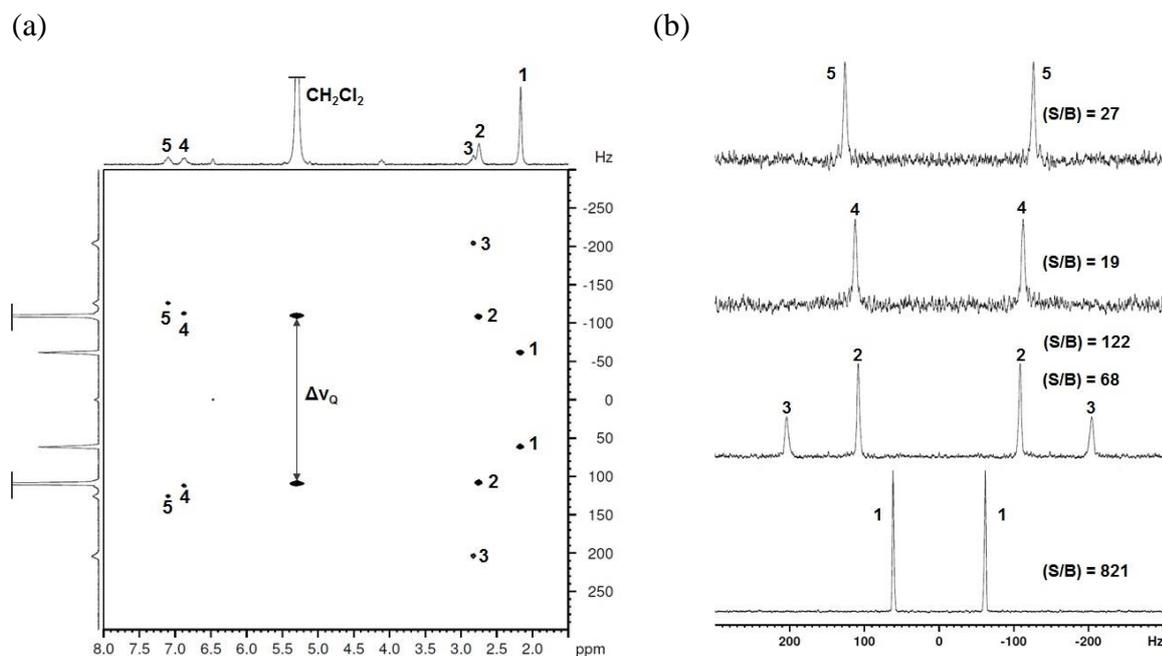


Figure V.8 : (a) Spectre RMN 2D Q -résolue MQ DAN- $\{^1\text{H}\}$ tilté et symétrisé de la frambinone dans la phase achirale PBG/ CH_2Cl_2 . Le spectre 2D a été enregistré en 16 heures avec NS = 64, $\text{TD}_1 = 400$, $\text{TD}_2 = 2048$, AQ = 0,92 s, $\text{D}_1 = 0,08$ s, $\text{T}_R = 1$ s et RG = 1150. Un filtrage exponentiel (LB= 0.8 Hz) a été appliqué. (b) Série des sous-spectres 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ extraits de la carte 2D. Pour chaque sous-spectre 1D DAN, l'intensité des signaux est maintenue constante. Noter la variation des rapports (S/B)_{*i*}.

L'analyse de ce spectre 2D DAN- $\{^1\text{H}\}$ montre maintenant que les intensités du DQ associées au groupement CH_2 (2) sont effectivement supérieures à celles du groupe CH_2 (3), indiquant que les rapports isotopiques ($^2\text{H}/^1\text{H}$) sont différents pour ces deux sites. Si l'utilisation de la phase ALC permet de décongestionner les signaux DAN comparés au spectre 1D DAN isotrope, elle ne permet pas encore la discrimination des énanti-isotopomères *R* et *S* associés aux deux méthylènes, puisque $\Delta v_Q(^2\text{H}^R)^2 \text{ ou } ^3 = \Delta v_Q(^2\text{H}^S)^2 \text{ ou } ^3$.

2.a.ii. Utilisation d'une phase cristal liquide chirale (CLC)

Dans une phase cristal-liquide chirale (CLC) polypeptide, les énanti-isotopomères monodeutérés de configuration absolue *R* et *S*, associés à chaque groupement CH_2 devraient être spectralement discriminés. Pour vérifier cette hypothèse, un nouvel échantillon contenant 100 mg de frambinone, 100 mg de PBLG (DP = 743), 365 mg de CH_2Cl_2 , 125 mg de CCl_4 , et 10 mg de TMU a été préparé et analysé. Comme pour la vanilline, l'ajout de 125 m de CCl_4 permet de réduire l'intensité du signal du CH_2Cl_2 (de 25 %) (cf. **Chapitre V.5.b**, ci-dessous)

Les spectres RMN 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ et 2D Q -résolue MQ DAN- $\{^1\text{H}\}$ (tiltés et symétrisés) de ce nouvel échantillon sont présentés sur les **Figures V.9** et **V.10**. Le spectre 2D a été enregistré en 16 heures à $T = 296$ K avec NS = 64, $\text{TD}_2 = 3584$, $\text{TD}_1 = 400$ et $\text{T}_R = 2$ s. Sur cette carte, on observe une discrimination complète des signaux sur la base du déplacement chimique anisotrope $\delta^{\text{aniso}}(^2\text{H})$ et des éclatements quadrupolaires $\Delta v_Q(^2\text{H})$.

L'analyse du spectre 1D permet d'attribuer rapidement les deux composantes du $DQ(^2H)$ du co-solvant organique (CH_2Cl_2), du TMU, et des positions 2H aromatiques sur la base de leurs déplacements chimiques anisotropes, $\delta^{aniso}(^2H)$. L'attribution des autres signaux DAN est plus difficile et requiert une expérience 2D. L'analyse du spectre 2D montre clairement quatre doublets quadrupolaires pour les groupements méthylènes (cf. **Figure V.10**). Ces $DQ(^2H)$ sont centrés sur deux déplacements chimiques distincts, $\delta(CH_2(2))^{R/S} = 2,82$ ppm et $\delta(CH_2(3))^{R/S} = 2,86$ ppm. Nous avons donc :

$$\Delta\nu_Q(^2H)^{2R} \neq \Delta\nu_Q(^2H)^{2S} \text{ et } \Delta\nu_Q(^2H)^{3R} \neq \Delta\nu_Q(^2H)^{3S} \quad (V.1)$$

Les différentes données spectrales DAN de la frambinone dans cet échantillon orienté chiral sont listées dans le **Tableau V.3**.

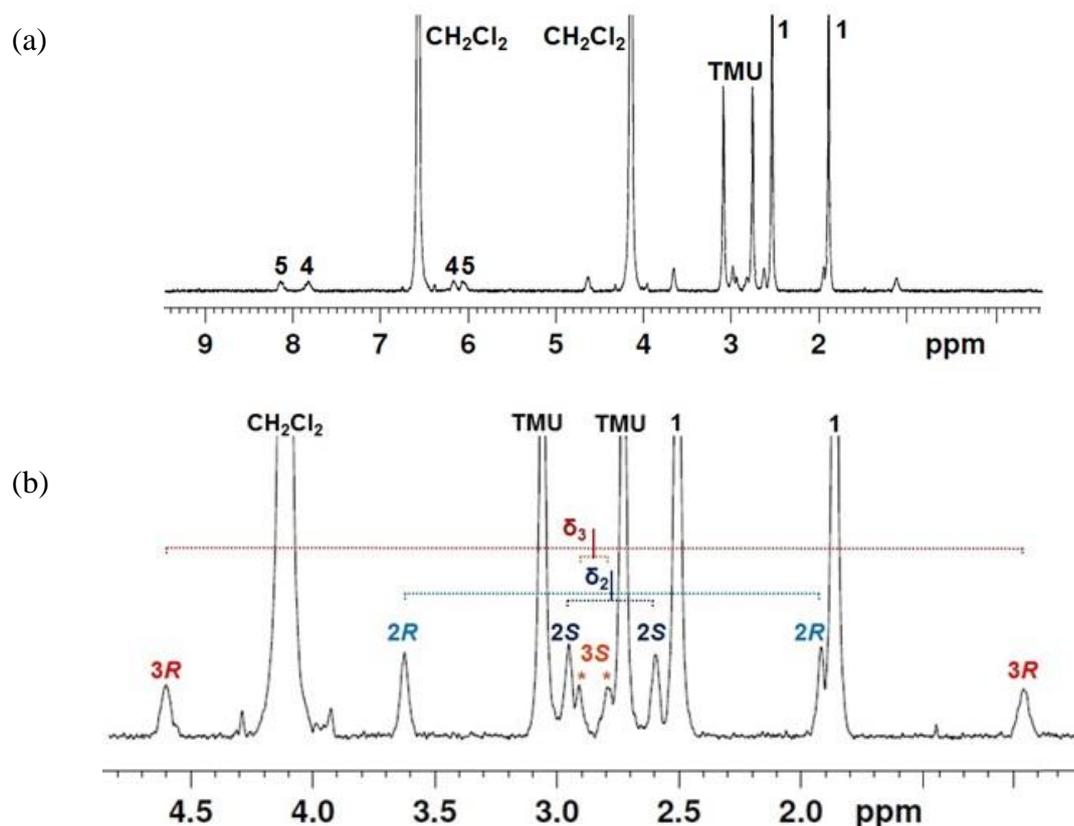


Figure V.9 : (a) Spectre RMN 1D DAN- $\{^1H\}$ anisotrope chiral (296 K) d'un échantillon de 100 mg de frambinone dans PBLG/ CH_2Cl_2 - CCl_4 (100 mg / 365 mg / 125 mg) en présence de TMU (10 mg). Les $DQ(^2H)$ du groupement méthyle, des positions aromatiques (4/5), de CH_2Cl_2 et du TMU sont facilement attribuables. (b) Zoom sur signaux des méthylènes. L'attribution des raies a été réalisée à partir de l'expérience 2D. Les attributions des descripteurs stéréochimiques sont définies arbitrairement en considérant que : $\Delta\nu_Q(^2H)^{2R,3R} > \Delta\nu_Q(^2H)^{2S,3S}$. Ce spectre a été acquis avec $NS = 64$, $TD_2 = 3584$, $TD_1 = 400$ et $T_R = 2$ s.

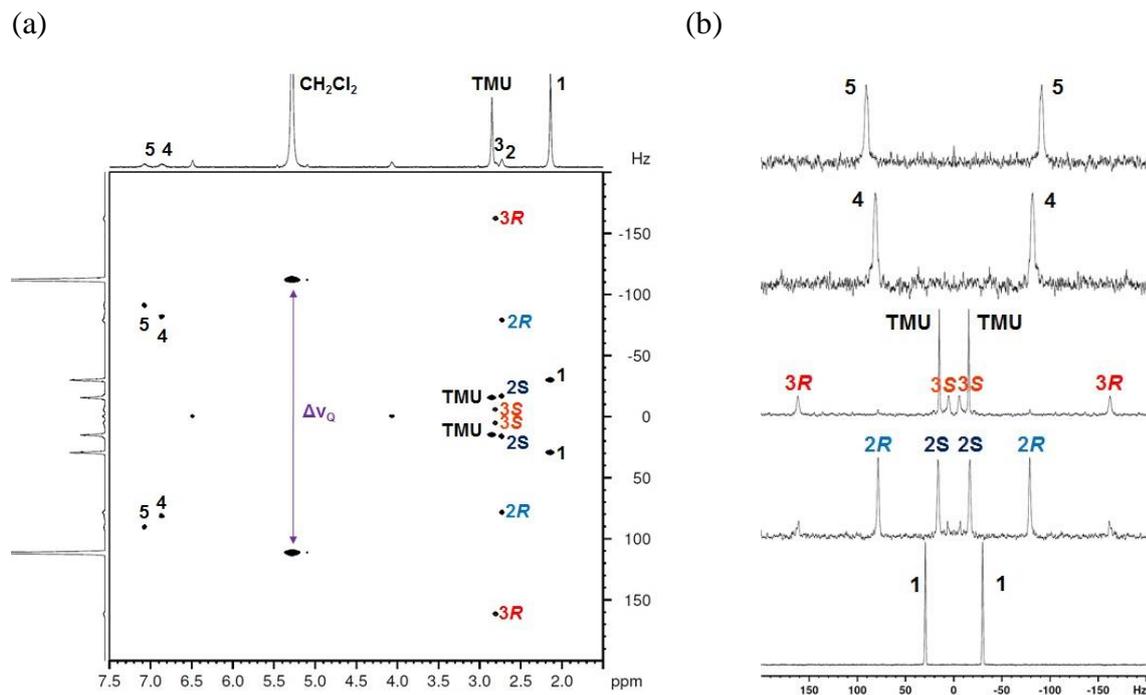


Figure V.10 : (a) Spectre RMN 2D Q -résolue MQ DAN- $\{^1\text{H}\}$ tilté et symétrisé de la frambinone dans PBLG/ CH_2Cl_2 - CCl_4 (100 mg / 365 mg / 125 mg) en présence de TMU (10 mg). Ce spectre a été enregistré en 16 heures avec $\text{NS} = 64$, $\text{TD}_1 = 400$, $\text{TD}_2 = 2048$, $\text{AQ} = 0,92$ s, $\text{D}_1 = 0,08$ s, $\text{T}_R = 1$ s et $\text{RG} = 1150$. (b) Série de sous-spectres 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ extraits de la carte 2D. Pour chaque sous-spectre 1D DAN, l'intensité des signaux est maintenue constante. Noter la variation des rapports $(\text{S/B})_i$. Comme pour le spectre 1D, les attributions des descripteurs stéréochimiques sont définies arbitrairement en considérant que $\Delta\nu_Q(^2\text{H})^{2R,3R} > \Delta\nu_Q(^2\text{H})^{2S,3S}$.

Tableau V.3 : Données spectrales DAN extraites du spectre RMN 1D ^2H - $\{^1\text{H}\}$ anisotrope de la frambinone PBLG/ CH_2Cl_2 .

Site de la molécule ^a	CH_3 (1)	CH_2 (2)	CH_2 (3)	CH (4)	CH (5)	-OH	TMU
$\delta_i(^2\text{H})^a$ (ppm)	2,15	2,62	2,70	6,85	7,08	-	2,83
FWHM (Hz)	1,6	2,7 (R) 2,9 (S)	3,7 (R) 3,3 (S)	3,7	4,8	-	1,5
$ \Delta\nu_Q(^2\text{H}) $ (Hz)	62	138 (R) 20 (R)	319 (R) 40 (S)	79	93	-	28
$(\text{S/B})_i^b$	291	42(R) 40 (S)	27 (R) 36 (S)	25	32	-	219

^a Le signal du CH_2Cl_2 a été calibré à 5,30 ppm. ^b Les largeurs de raies sont mesurées avec le filtrage exponentiel.

2.b. Optimisation de la phase cristal-liquide chirale PBLG

Les résultats obtenus avec la phase PBLG/ CH_2Cl_2 - CCl_4 sont exploitables. Cependant comme la RMN en milieu CLC polypeptidique est un outil très « flexible » en termes de

choix de matrice polypeptidique, nous avons testé trois co-solvants organiques seuls et deux mélanges de co-solvants et vérifié leur réponse vis-à-vis des cinq critères de sélection, comme dans le cas de la vanilline (cf. Chapitre IV.2.a). Les résultats expérimentaux sont listés dans le Tableau V.4.

Tableau V.4 : Données différents co-solvants organiques (simple ou mélange) et informations spectrales (296 K) des énatio-isotopomères (*R/S*) associées aux sites énantiotopes des méthylènes de la frambinone dans différentes phases PBLG.

Co-solvant	M (g.mol ⁻¹)	R (%/%)	δ (² H) (ppm)	Δv _Q (co-s) (Hz)	Δv _Q (² H) ^{2R} (Hz)	Δv _Q (² H _b) ^{2S} (Hz)	Δv _Q (² H _c) ^{3R} (Hz)	Δv _Q (² H _c) ^{3S} (Hz)	Δv _Q (² H) ² (Hz)	Δv _Q (² H) ³ (Hz)
CCl ₄	153,8	-	N.A.	N.A.	-	-	-	-	-	-
CHCl ₃	119,4	-	7,27	402	363	13	704	60	175	322
CH ₂ Cl ₂	84,9	-	5,30	199,5	339,9	86,4	605,1	206,1	126,8	199
DMF	73,1	-	3,00	116,3	458,8	339,9	741,4	608,4	59,4	66,5
			8,00	36,6						
CH ₂ Cl ₂ /CCl ₄	84,9	75/25	5,30	235,2	160,6	76,4	334,0	12,8	42,1	160,6
CH ₂ Cl ₂ /CCl ₄	84,9	50/50	5,30	217,7	349,1	99,1	594,1	284,7	125	155

^(a)M : masse molaire du co-solvant ; N : nombre de moles d'isotopomères monodéutérés pour une masse de 600 mg de co-solvant ; le ratio R correspond aux proportions des mélanges binaires de co-solvant organique. Notons que le mélange CH₂Cl₂/CCl₄ en proportion 50/50 ne dissout pas complètement le polymère et le soluté. L'attribution des stéréodescripteurs *R* et *S* a été réalisée avec la règle Δv_Q(²H)^R > Δv_Q(²H)^S. La valeur entre parenthèses correspond à la déviation standard (5 expériences).

L'analyse des résultats pour la frambinone montre que :

i) Le CHCl₃ n'est pas optimal. En effet, le déplacement chimique anisotrope du chloroforme (δ^{aniso}CHCl₃) = 7,27 ppm) est très proche de celui des résonances des sites ²H aromatiques. Cependant, les demi-différences entre les RQC des directions énantiotopes des CH₂ sont relativement importantes (|(ΔΔv_Q/2)²| = 175 Hz et |(ΔΔv_Q/2)³| = 322 Hz). Ces grandes demi-différences s'expliquent par des éclatements quadrupolaires très larges (Δv_Q(²H) compris entre 13 Hz et 704 Hz), ce qui impose un nombre d'incrémentes *t*₁ important pour l'expérience 2D de type *Q*-résolue. L'obtention de RQC(²H) plus petit permettrait de réduire la largeur de la fenêtre spectrale en dimension *F*₁ de l'expérience 2D, et donc réduire le temps d'expérience total en échantillonnant moins de point *t*₁. Une approche de type NUS pourrait aussi être alors envisagée. Notons également que généralement, les largeurs de raies (associées à *T*₂^{*}) sont d'autant plus grandes que les éclatements quadrupolaires sont larges. Cet effet peut être vu comme l'expression du « désordre dans l'ordre » ou « anisotropie de l'ordre » du soluté dans la phase (effet ∝ S×ΔS), et apparenté à une inhomogénéité. Cette contribution s'additionne à la largeur de raie (FWHM) d'un site donné, sachant que FWHM ∝ $\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \Delta_{\text{inhomo}}$.

ii) Si CCl_4 est le co-solvant idéal (en l'absence d'isotopomères monodéutéré ^2H), la frambinone et le polymère PBLG ne sont pas solubles dans le CCl_4 seul (critère *i*).

iii) Le DMF est relativement peu intéressant car il présente, comme pour le chloroforme, des éclatements quadrupolaires très larges (entre 339,9 et 741,4 Hz). De plus, les demi-différences des RQC(^2H) pour les groupements méthylènes sont plus faibles que dans CHCl_3 . Enfin, l'inconvénient principal de ce co-solvant organique reste la complexification du spectre RMN car la molécule présentera trois DQ(^2H).

iv) Le CH_2Cl_2 est une alternative intéressante car son déplacement chimique est éloigné de la région des signaux ^2H méthyléniques (5,30 ppm) où résonnent les sites ^2H énantiotopes (critère *iii*). Les résultats obtenus avec ce co-solvant montrent des séparations spectrales légèrement plus faibles que celles obtenues avec CHCl_3 ($|\Delta\Delta\nu_Q/2| = 175$ Hz et 322 Hz pour CHCl_3 contre $|\Delta\Delta\nu_Q/2| = 126,8$ Hz et 99 Hz pour le CH_2Cl_2) mais avec un éclatement quadrupolaire maximale de 603 Hz. Cependant, cet avantage est contrebalancé par la présence de deux sites ^2H équivalents qui génère un signal de forte intensité comparé aux signaux des énantiotopomère de la frambinone. Pour réduire l'intensité du DQ du co-solvant, nous avons testé le mélange binaire dichlorométhane et tétrachlorométhane dans différentes proportions massiques (50/50 et 75/25).

v) Le mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CCl}_4$ (50/50) présente une meilleure séparation entre les deux DQ des sites énantiotopes. Cependant, la molécule de frambinone recristallise au sein du tube RMN et rend l'analyse quantitative impossible. De fait, la phase cristal liquide n'est pas homogène.

vi) A l'inverse, l'utilisation d'un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CCl}_4$ (75 % / 25 %) apparaît comme le meilleur compromis entre tous les critères d'optimisation car il offre une demi-différence entre les éclatements quadrupolaires $\Delta\nu_Q$ des positions énantiotopes exploitables ($|\Delta\Delta\nu_Q/2|_2 = 42$ Hz et $|\Delta\Delta\nu_Q/2|_3 = 160,6$ Hz). De plus, l'éclatement quadrupolaire le plus grand est de 334 Hz et permet d'utiliser une plus faible fenêtre spectrale en dimension F_1 . Nous avons donc choisi d'utiliser ce mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CCl}_4$ (75 % / 25 %) pour analyser la molécule de frambinone en milieu cristal-liquide chiral (cf. **Figure V.10**).

3. Discrimination d'échantillons naturels et synthétiques par RMN 2D DAN- $\{^1\text{H}\}$ anisotrope

La RMN 2D DAN- $\{^1\text{H}\}$ de la frambinone dans PBLG a permis de discriminer, pour la première fois, les énantiotopomères ^2H associés aux paires de directions énantiotopes des groupements méthylènes. Afin de démontrer l'intérêt analytique de cette discrimination spectrale pouvant conduire à la détermination de la distribution isotopique sur les positions (^2H)_{2R}, (^2H)_{2S}, (^2H)_{3R} et (^2H)_{3S} et apporter de nouvelles informations isotopiques utilisables pour un contrôle d'authenticité de la frambinone, nous avons préparé et étudié quatre

échantillons de frambinone d'origine différente : i) un échantillon d'origine naturelle (EUROFINS) ; ii) un échantillon d'origine synthétique (EUROFINS) ; iii) un échantillon d'origine synthétique (ACROS) ; iv) un échantillon d'origine inconnu à attribuer. Chaque échantillon a été préparé dans les conditions décrites plus haut, à savoir : 100 mg de frambinone, 100 mg de PBLG (DP = 743), 375 mg de CH₂Cl₂, 125 mg de CCl₄ et 10 mg de TMU.

3.a. Analyse de la distribution isotopique des directions énantiotopes de la frambinone

3.a.i. TMU et RMN DAN anisotrope

Comme pour de l'étude de vanilline, le TMU utilisé n'est pas calibré, et ne peut être utilisé comme étalon interne. Cependant, nous avons fait le choix de l'incorporer dans la phase CLC afin d'évaluer son utilisation potentielle future pour une analyse des rapports (²H/¹H)_i absolues des quatre sites énantiotopes.

En revanche, nous avons fait le choix d'optimiser le nombre de scans pour chaque increment t_1 pour obtenir des rapports (S/B)_i exploitables tout en gardant un temps total d'expérience raisonnable (20 h) (AQ = 2 secondes et D₁ = 0.05 seconde). Une évaluation du temps de relaxation longitudinale, T₁(²H), à T = 296 K. a en effet montré que les temps de relaxation longitudinaux T₁(²H) des énantio-isotopomères de la frambinone sont inférieurs à 300 ms. Un temps de recyclage supérieur à deux secondes (AQ = 2 s et D₁ = 0.05 s) est donc suffisant pour mesurer quantitativement la surface des DQ(²H) des énantio-isotopomères. L'utilisation du TMU comme étalon interne pour des mesures absolues (²H/¹H)_i aurait porté la valeur T_R à plus de 5 secondes, soit plus de 36 heures d'expérience.

Quelque mois avant le début de la rédaction de ce manuscrit, nous avons reçu de la part de la société EUROFINS, du TMU calibré ((²H/¹H)_{TMU} = 84,44 ppm). Par manque de temps, les échantillons frambinone de diverses origines n'ont pas été re-préparés avec ce TMU.

3.a.ii. Calcul des coefficients de distribution isotopique relatifs aux sites énantiotopes

Une analyse de la distribution relative des quatre sites énantio-isotopomères ²H basée sur la mesure de leurs surfaces des pics sur les projections F_1 extraites de la carte 2D (donc mêmes conditions expérimentales) a été réalisée sur les quatre échantillons de frambinone (avec une série de trois expériences 2D). Pour chaque site deutérium (²H_{2R}, ²H_{2S}, ²H_{3R} et ²H_{3S}), la surface totale (absolue) associée aux deux composantes de chaque DQ(²H) a été obtenue par déconvolution des signaux et notée respectivement S_{2R}, S_{2S}, S_{3R} et S_{3S}. Pour une plus grande lisibilité des données dans le **Tableau V.5**, nous avons fait le choix de transformer la valeur des surfaces absolues en une valeur relative de rapports isotopiques (²H/¹H)_{2R, 2S, 3R, 3S} en normant la valeur de (²H/¹H)_{2R} à 100,0 ppm.

Tableau V.5 : Valeurs relatives des rapports ($^2\text{H}/^1\text{H}$)_{2R}, $_{2S}$, $_{3R}$, $_{3S}$ et valeurs moyennes associées quand la valeur ($^2\text{H}/^1\text{H}$)_{2R} est normée à 100 ppm^a

Echantillons	($^2\text{H}/^1\text{H}$) _{2R} (ppm)	($^2\text{H}/^1\text{H}$) _{2S} (ppm)	($^2\text{H}/^1\text{H}$) _{2^{my}} (ppm)	($^2\text{H}/^1\text{H}$) _{3R} (ppm)	($^2\text{H}/^1\text{H}$) _{3S} (ppm)	($^2\text{H}/^1\text{H}$) _{3^{my}} (ppm)
Naturel (EUROFINS)	100,0	104,49	102,25	54,12	53,65	53,89
Synthétique (EUROFINS)	100,0	110,92	105,46	75,40	80,20	77,80
Synthétique (ACROS)	100,0	96,72	98,36	74,51	71,40	72,96
Inconnu	100,0	104,23	102,12	72,08	72,74	72,41

^a Pour une meilleure lecture des valeurs, nous avons transformé la valeur des surfaces absolues en une valeur de rapports isotopiques ($^2\text{H}/^1\text{H}$)_i calculée en normant la valeur ($^2\text{H}/^1\text{H}$)_{2R} à 100,0 ppm. Les stéréodescripteurs *R* et *S* sont définis arbitrairement en considérant que : $\Delta\nu_Q(R) > \Delta\nu_Q(S)$. Pour les quatre échantillons, les valeurs obtenues sont calculées pour une série de trois expériences 2D DAN.

A partir de ces valeurs de surface, nous pouvons calculer les coefficients de distribution isotopique relatifs en deutérium (%), noté k' , pour chaque énanti-isotopomère monodeutééré du mélange et correspondant aux quatres sites énantiotopes $k'(^2\text{H})_{2R}$, $k'(^2\text{H})_{2S}$, $k'(^2\text{H})_{3R}$ et $k'(^2\text{H})_{3S}$, selon l'Equation V.2 :

$$k'(^2\text{H})_{i(i=2R,2S,3R,3S)}(\%) = 100 \times \frac{S_i}{(S_{2R} + S_{2S} + S_{3R} + S_{3S})} \quad (\text{V.2})$$

Les valeurs de $k'(^2\text{H})_{2R, 2S, 3R, 3S}$ ainsi calculées sont compilées dans le **Tableau V.6**.

Dans un second temps, nous avons calculé également le coefficient de distribution en deutérium non plus sur un site énantiotope donné mais sur un groupement méthylène donné (2 ou 3). Ce nouveau coefficient distribution, noté k'' , s'écrit selon l'Equation V.3.

$$k''(^2\text{H})_{i(i=2,3)}(\%) = 100 \times \frac{(S_{iR} + S_{iS})}{(S_{2R} + S_{2S} + S_{3R} + S_{3S})} \quad (\text{V.3})$$

En pratique, ce nouveau coefficient calculé correspond aux coefficients de distributions qui seraient obtenus dans la phase cristal-liquide achirale, lorsque les énanti-isotopomères monodeutéérés (ou les directions énantiotopes) ne sont pas spectralement discriminés. Les valeurs de $k''(^2\text{H})_2$ et $k''(^2\text{H})_3$ sont aussi compilées dans le **Tableau V.6**. Une représentation graphique des valeurs de $k'(^2\text{H})$ et de $k''(^2\text{H})$ est montrée sur la **Figure V.11a et 11b**.

Tableau V.6 : Valeurs coefficients de distribution relative du deutérium, k' (%) et k'' (%) calculé à partir de l'Equation V.2 et V.3

Echantillons	$k'(^2\text{H})_{2R}$ (%)	$k'(^2\text{H})_{2S}$ (%)	$k''(^2\text{H})_2$ (%)	$k'(^2\text{H})_{3R}$ (%)	$k'(^2\text{H})_{3S}$ (%)	$k''(^2\text{H})_3$ (%)
Naturel (EUROFINS)	32,02 (0,71)	33,46 (1,56)	65,48	17,33 (0,76)	17,18 (0,94)	34,51
Synthétique (EUROFINS)	27,28 (1,32)	30,26 (2,1)	57,54	20,57 (0,69)	21,88 (0,26)	42,45
Synthétique (ACROS)	28,99 (0,46)	28,04 (0,54)	57,34	21,60 (0,26)	20,70 (0,75)	42,66
Inconnu	28,65 (1,45)	29,86 (1,9)	58,51	20,65 (1,29)	20,84 (2,16)	41,49

^a Les stéréodescripteurs *R* et *S* sont définis arbitrairement en considérant que : $\Delta\nu_Q(R) > \Delta\nu_Q(S)$. Pour les quatre échantillons, les valeurs de k' (%) sont calculées pour une série de trois expériences 2D DAN. Les valeurs entre parenthèses correspondent à la déviation standard associée pour les trois expériences 2D acquises.

L'étude comparative des résultats (cf. **Tableau V.6**) montre des similitudes et différences notables entre les divers échantillons de frambinone testés. Tout d'abord, nous pouvons observer que les coefficients de distribution en deutérium $k'(^2\text{H})_i$ pour les sites énantiotopes *2R* et *2S* sont respectivement égaux : i) à 32,02 % et 33,46 % pour l'échantillon naturel de framboise, soit $k''(^2\text{H}_2) = 65,48$; ii) à 27,28 % et 30,26 % pour l'échantillon synthétique (EUROFINS) soit $k''(^2\text{H}_2) = 57,54$; iii) à 28,99 % et 28,04 % pour le second échantillon synthétique (ACROS), soit $k''(^2\text{H}_2) = 57,34$. Dans le même temps, on observe des coefficients de distribution $k'(^2\text{H}_{3R})$ et $k'(^2\text{H}_{3S})$ bien plus faibles et égaux : i) à 17,33 % et 17,18 % pour l'échantillon naturel, soit $k''(^2\text{H}_3) = 34,51$; ii) à 20,57 % et 21,88 % pour l'échantillon de Eurofins soit $k''(^2\text{H}_3) = 42,45$, et iii) à 21,60 % et 20,70 %, ; iii) pour l'échantillon d'ACROS, soit $k''(^2\text{H}_3) = 42,66$. Les tendances associées à k' et k'' sont donc identiques.

D'un point de vue chimique, cette forte disparité isotopique entre les deux groupements méthylènes (valeur moyenne des coefficients de distribution, cf. **Tableau V.6**) peut s'expliquer par des contraintes liées à un encombrement stérique (spatial) plus important des hydrogénés (^1H) du groupement méthylène (**3**) (proximité du noyau aromatique) comparé à celui du groupement méthylène (**2**) situés en α de la fonction carbonyle. Dans ce cas l'EIC sera plus grand pour le méthylène (**2**) que pour le méthylène (**3**), Dans cette hypothèse, on s'attend à effet d'enrichissement en deutérium pour le méthylène (**2**) et un effet de déplétion pour le méthylène (**3**).

Même si nous disposons que d'un seul échantillon de frambinone naturelle, nous constatons que les valeurs de k' et de k'' pour les sites méthylène (**2**) et (**3**) diffèrent entre la frambinone extraite du fruit et la frambinone synthétique (cf. **Tableau V.6**). Finalement, les

coefficients de distribution k' et k'' observés pour l'échantillon d'origine inconnue présente des coefficients de distribution similaires à ceux obtenu pour les deux échantillons de frambinone synthétique. Il semblerait que celui-ci soit donc d'origine synthétique.

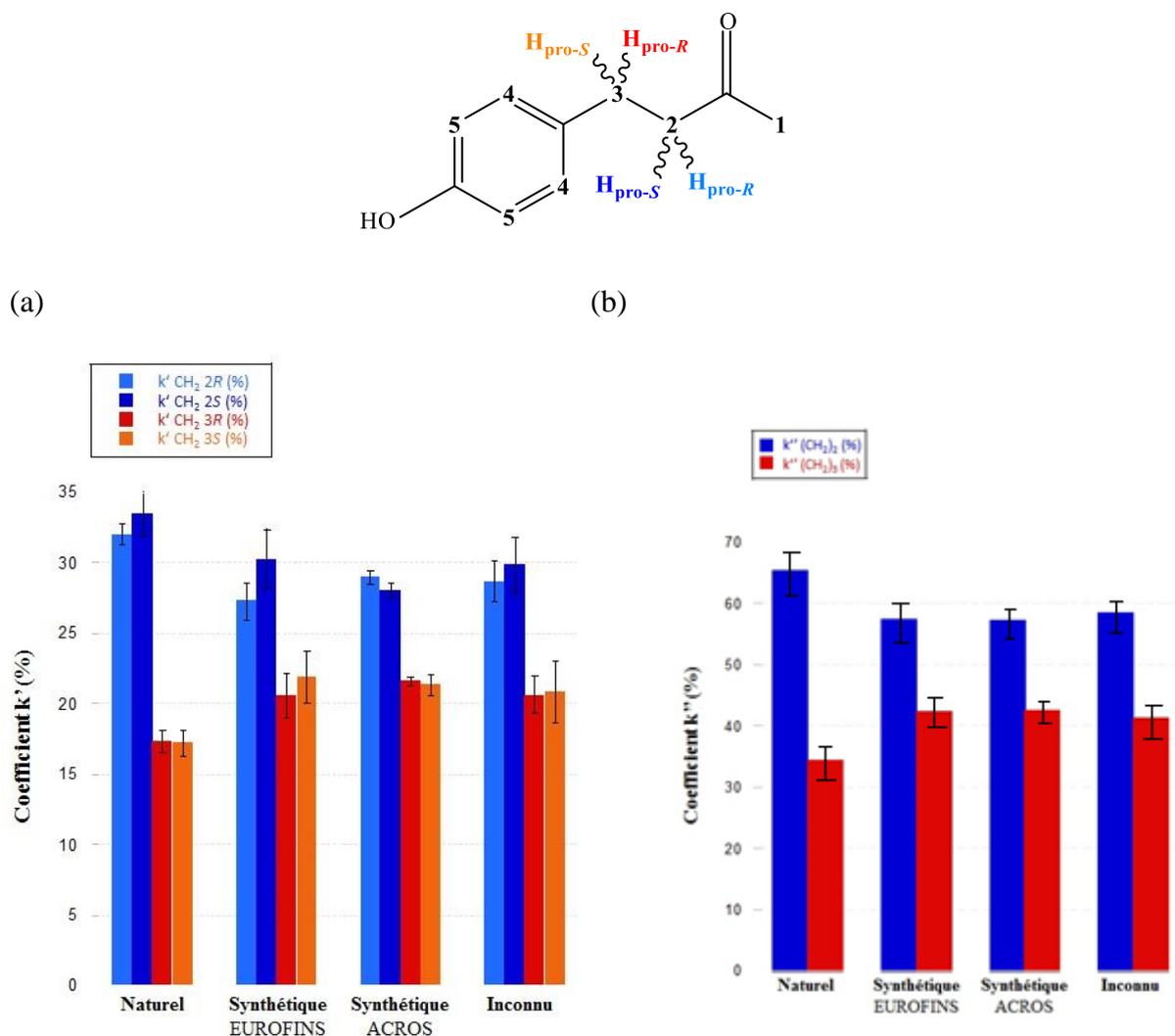


Figure V.11 : Variation des coefficients de distribution relatifs du deutérium, k' et k'' , pour les différents échantillons de frambinone testés (expériences 2D Q -résolue MQ DAN- $\{^1\text{H}\}$). Sur cette figure, la stéréochimie pro- R /pro- S montrée sur la molécule n'est plus définie comme sur la **Figure V.1** puisque les descripteurs R/S des $\text{DQ}(^2\text{H})$ sur les spectres 2D sont définis arbitrairement.

3.a.iii. Calcul des excès énanti-isotopomériques associés aux groupements méthylènes

Pour aller plus loin, nous avons calculé les valeurs des excès énanti-isotopomériques (EEI) associé aux deux paires de sites énantiotopes pro- R /pro- S de chaque groupement méthylène selon l'**Equation V.4** :

$$EEI_{i(i=2,3)}(\%) = 100 \times \frac{(S_{iR} - S_{iS})}{(S_{iR} + S_{iS})} \quad (\text{V.4})$$

La **Figure V.12** présente graphiquement les valeurs des $EEI(\%)$ pour les deux groupements méthylènes (2) et (3). Pour les deux échantillons synthétiques, une valeur moyenne a été calculée. L'analyse des résultats montre que les EEI des échantillons synthétiques sont plus faibles que celui de l'échantillon naturel. Ce nouveau résultat semble donc indiquer la possibilité de pouvoir discriminer la frambinone synthétique et naturelle sur la base des EEI . Ce résultat peut être corrélé aux conclusions issues des valeurs de k' et k'' . L'échantillon d'origine inconnue présente un EEI similaire à celui obtenu pour les échantillons de synthèse. Cela confirme les résultats obtenus avec les valeurs de k' et k'' .

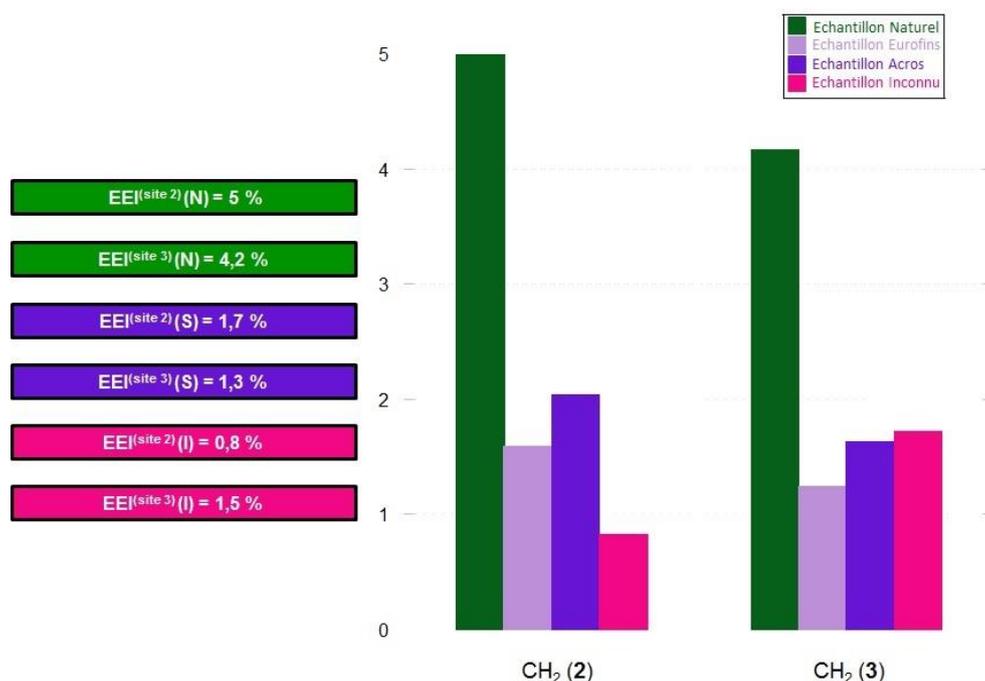


Figure V.12 : Variations des EEI (%) associés aux quatre échantillons provenant de sources différentes

En conclusion, l'utilisation de la RMN 2D DAN dans les CLC PBLG nous a permis de discriminer des échantillons de frambinone de différentes origines à partir des coefficients de distribution en deutérium k' et k'' et des EEI associé aux sites énantiotopes de chaque méthylène. Pour la suite, il serait intéressant de proposer des analyses isotopiques absolues afin d'obtenir davantage d'informations sur les voies de (bio)synthèse.

Dans la suite de ces travaux, nous avons vérifié le potentiel des séquences RMN 2D QUOSY DAN- $\{^1H\}$ Bis-WET avec et sans protocole NUS sur ces mêmes échantillons pour jauger l'exactitude (cf. **Chapitre II.1.b.i**) des résultats observés avec ces nouvelles séquences.

3.b. Utilisation des expériences 2D QUOSY Bis-WET DAN- $\{^2\text{H}\}$ et du protocole NUS

3.b.i. Suppression du $DQ(^2\text{H})$ du co-solvant organique

Afin de tester l'apport de l'expérience 2D QUOSY Bis-WET DAN- $\{^1\text{H}\}$ pour la caractérisation et la discrimination d'échantillons d'origines diverses de la frambinone, nous avons réalisé des séries d'expériences 2D Q -résolue MQ Bis-WET DAN- $\{^1\text{H}\}$ sur les échantillons précédents avec une saturation doublement sélective des composantes du doublet quadrupolaire du CH_2Cl_2 . Les cartes 2D ont été acquises avec $\text{NS} = 64$, $\text{TD}_1 = 400$, $\text{TD}_2 = 3072$, $\text{AQ} = 2$ secondes et $\text{D}_1 = 0.05$ seconde. La double impulsion sélective est de type sinus cardinal (300 ms) soit une durée de 1,2 secondes pour l'ensemble du bloc WET (4×300 ms). La carte 2D tiltée et symétrisée associée à l'échantillon de frambinone d'origine naturelle est présentée en **Figure V.13**. Ce spectre 2D Q -résolue MQ Bis-WET DAN a été obtenu en 24 heures 30 minutes, soit 8 h 30 de plus que l'expérience 2D Q -résolue MQ.

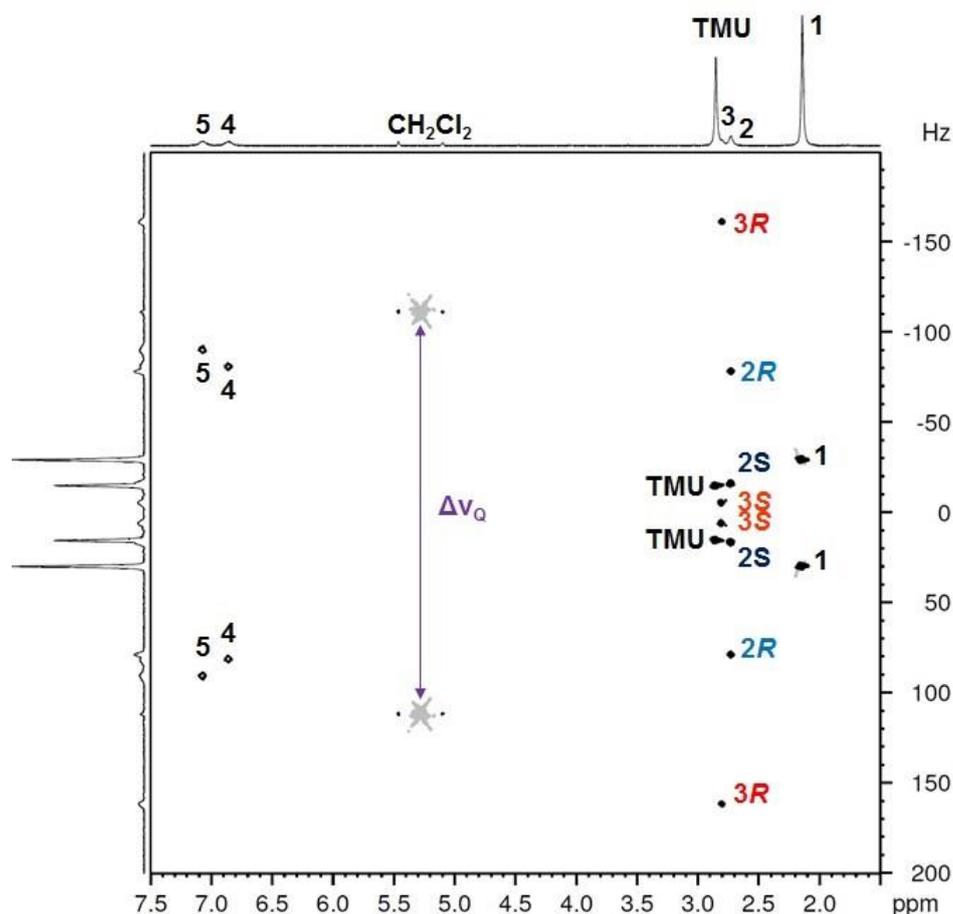


Figure V.13 : Spectre 2D Q -résolue MQ Bis-WET DAN- $\{^1\text{H}\}$ tilté et symétrisé de la frambinone dans une phase PBLG/ CH_2Cl_2 - CCl_4 en présence de TMU à 296 K. Ce spectre a été enregistré en 24 heures 30 minutes avec $\text{NS} = 64$, $\text{TD}_1 = 400$, $\text{AQ} = 2$ s, $\text{D}_1 = 0,05$ s. La double saturation sélective Bis-WET est appliquée sur les signaux du CH_2Cl_2 . Les attributions des descripteurs stéréochimiques sont définies arbitrairement en considérant que : $\Delta\nu_Q(^2\text{H})^{2R,3R} > \Delta\nu_Q(^2\text{H})^{2S,3S}$.

Hormis l'application de l'impulsion doublement sélective affectant uniquement le DQ du co-solvant organique, aucun paramètre n'a été modifié entre la série d'expériences précédente et celle-ci. Ainsi, à 296 K, les temps de relaxation longitudinal T_1 des ^2H associés aux groupements méthylènes sont identiques (≈ 300 ms) et la règle de quantitativité ($5 \times T_1^{\text{max}}$) est respectée. Comme précédemment (cf. **Chapitre V.3.a**), nous avons mesuré les aires des surfaces des doublets quadrupolaires associés à chaque site deutérium ($^2\text{H}_{2R}$, $^2\text{H}_{2S}$, $^2\text{H}_{3R}$ et $^2\text{H}_{3S}$) notées respectivement S_{2R} , S_{2S} , S_{3R} et S_{3S} (cf. **Tableau V.7**). Avec ces surfaces, nous avons calculé de nouveau les rapports isotopiques normalisés et les coefficients de distribution isotopique relatifs en deutérium, k' et k'' . Les résultats sont listés dans le **Tableau V.8** et sont représentés sous forme de graphique en **Figure V.14a** et **Figure V.14b**.

Tableau V.7 : Valeurs relative des rapports ($^2\text{H}/^1\text{H}$) $_{2R, 2S, 3R, 3S}$ et valeurs moyennes associées quand la valeur ($^2\text{H}/^1\text{H}$) $_{2R}$ est normée à 100 ppm^a (Expérience Q-résolue MQ Bis-WET DAN- $\{^1\text{H}\}$)

Echantillons	($^2\text{H}/^1\text{H}$) $_{2R}$ (ppm)	H/ ^1H) $_{2S}$ (ppm)	($^2\text{H}/^1\text{H}$) $_2^{\text{moy}}$ (ppm)	($^2\text{H}/^1\text{H}$) $_{3R}$ (ppm)	($^2\text{H}/^1\text{H}$) $_{3S}$ (ppm)	($^2\text{H}/^1\text{H}$) $_3^{\text{moy}}$ (ppm)
Naturel (Eurofins)	100,0	107,13	103,56	55,22	50,82	53,02
Synthétique (Eurofins)	100,0	100,90	100,45	73,72	74,77	74,24
Synthétique (ACROS)	100,0	110,53	105,27	82,37	76,47	79,42
Inconnu	100,0	103,39	101,7	79,69	78,14	78,92

^a Pour les quatre échantillons, les valeurs obtenues sont calculées pour une série de trois expériences 2D DAN.

Tableau V.8 : Valeurs des coefficients de distribution relative du deutérium, k' (%) et k'' (%) calculés à partir de l'Equation V.2 et V.3 (Expérience Q-résolue MQ Bis-WET DAN- $\{^1\text{H}\}$)

Echantillons	k' (^2H) $_{2R}$ (%)	k' (^2H) $_{2S}$ (%)	k'' (^2H) $_2$ (%)	k' (^2H) $_{3R}$ (%)	k' (^2H) $_{3S}$ (%)	k'' (^2H) $_3$ (%)
Naturel (EUROFINS)	32,25 (1,12)	34,55 (1,40)	66,80	17,11 (0,76)	16,19 (0,83)	33,20
Synthétique (EUROFINS)	28,62 (0,27)	28,88 (0,36)	57,52	21,10 (0,70)	21,40 (0,26)	42,50
Synthétique (ACROS)	27,07 (2,35)	29,92 (2,05)	57,03	22,30 (2,03)	20,70 (0,38)	50,0
Inconnu	27,68 (0,36)	28,62 (0,42)	56,29	22,06 (1,08)	21,63 (0,72)	43,69

^a Pour les quatre échantillons, les valeurs obtenues sont calculées pour une série de trois expériences 2D DAN. Les valeurs entre parenthèses correspondent à la déviation standard associée pour les trois expériences 2D acquises.

L'analyse des échantillons de frambinone avec l'utilisation du bloc de saturation sélective Bis-WET incorporé dans la séquence 2D *Q*-résolue MQ DAN révèle des résultats cohérents avec l'analyse des spectres 2D *Q*-résolue MQ DAN sans saturation. En effet, pour les quatre échantillons, les coefficients de distribution isotopique relatifs k' et k'' mettent en évidence la déplétion en deutérium pour le groupement méthylène (3) comparé au groupement méthylène (2), comme précédemment.

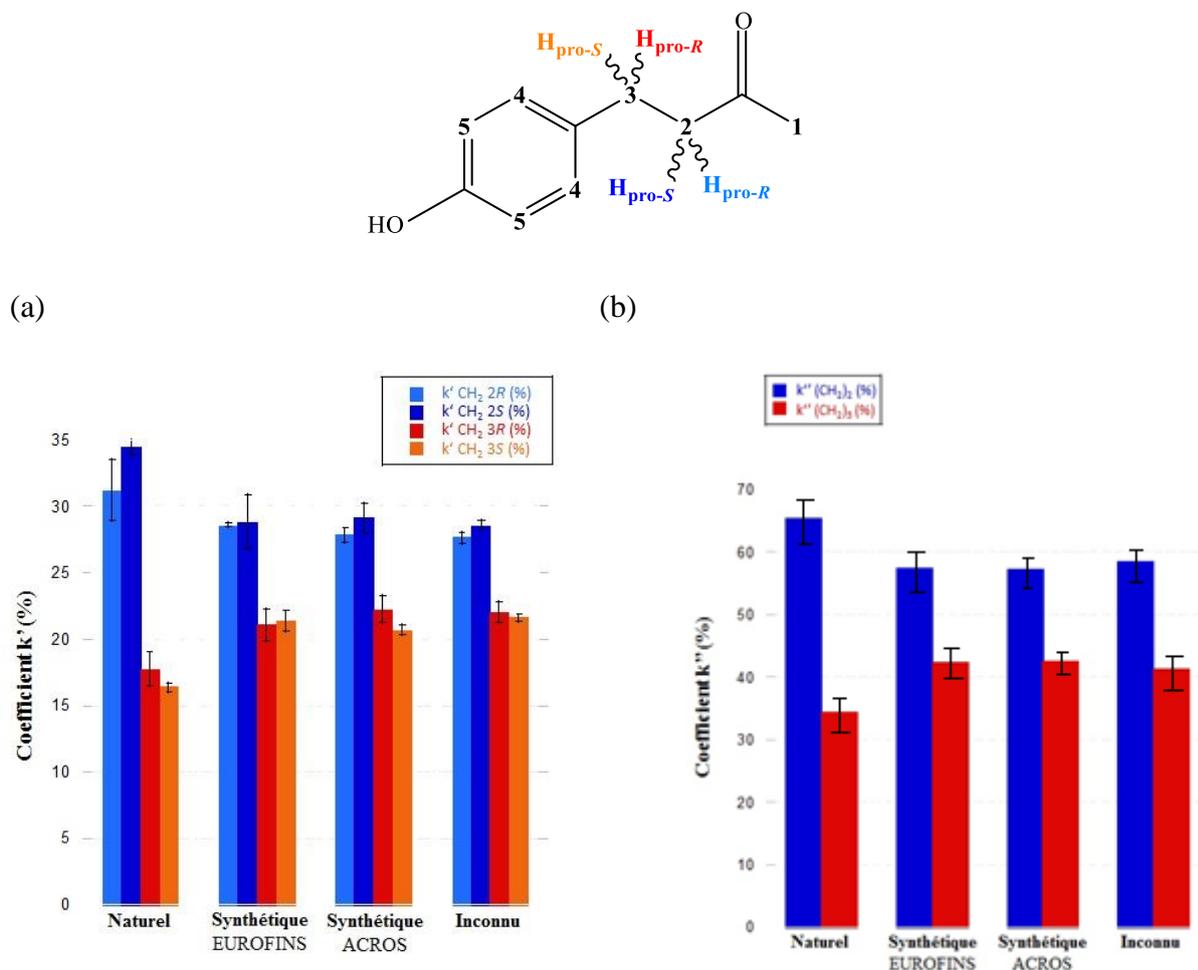


Figure V.14 : Variation des coefficients de distribution relatifs du deutérium, k' et k'' , pour les différents échantillons de frambinone testés (expériences 2D *Q*-résolue MQ Bis-WET DAN- $\{^1\text{H}\}$).

Cependant, l'utilisation de la séquence 2D *Q*-résolue Fz Bis-WET DAN- $\{^1\text{H}\}$ induit une augmentation du temps d'expérience notable. Pour répondre à cette problématique d'allongement du temps d'expérience associé au bloc de saturation WET (cf. **Chapitre III**), nous avons enregistré une nouvelle série d'expériences 2D *Q*-résolue Fz Bis-WET DAN- $\{^1\text{H}\}$ sur les différents échantillons de frambinone combiné au protocole NUS comme décrit dans la **Section 5** du **Chapitre III**.

3.b.ii. Application du protocole NUS

L'étude du potentiel analytique du protocole de *Non-Uniform Sampling* dans le cadre d'analyses isotopiques quantitatives de la frambinone a été réalisée sur une série

d'expériences 2D Q -résolue Fz Bis-WET DAN- $\{^1\text{H}\}$ avec l'application d'un NUS à 50 %. Dans ces conditions, seul le nombre d'incrément t_1 acquis est modifié (200 contre 400 précédemment), tandis que les incréments manquants sont reconstruits par l'algorithme CS. Un exemple de spectre 2D Q -résolue Fz Bis-WET DAN- $\{^1\text{H}\}$ tilté et symétrisé est présenté en **Figure V.15**. Il a été enregistré avec NS = 64 scans, TD₂ = 3072, AQ = 2 secondes, D₁ 0,05 seconde pour un temps d'expérience total de 12 heures.

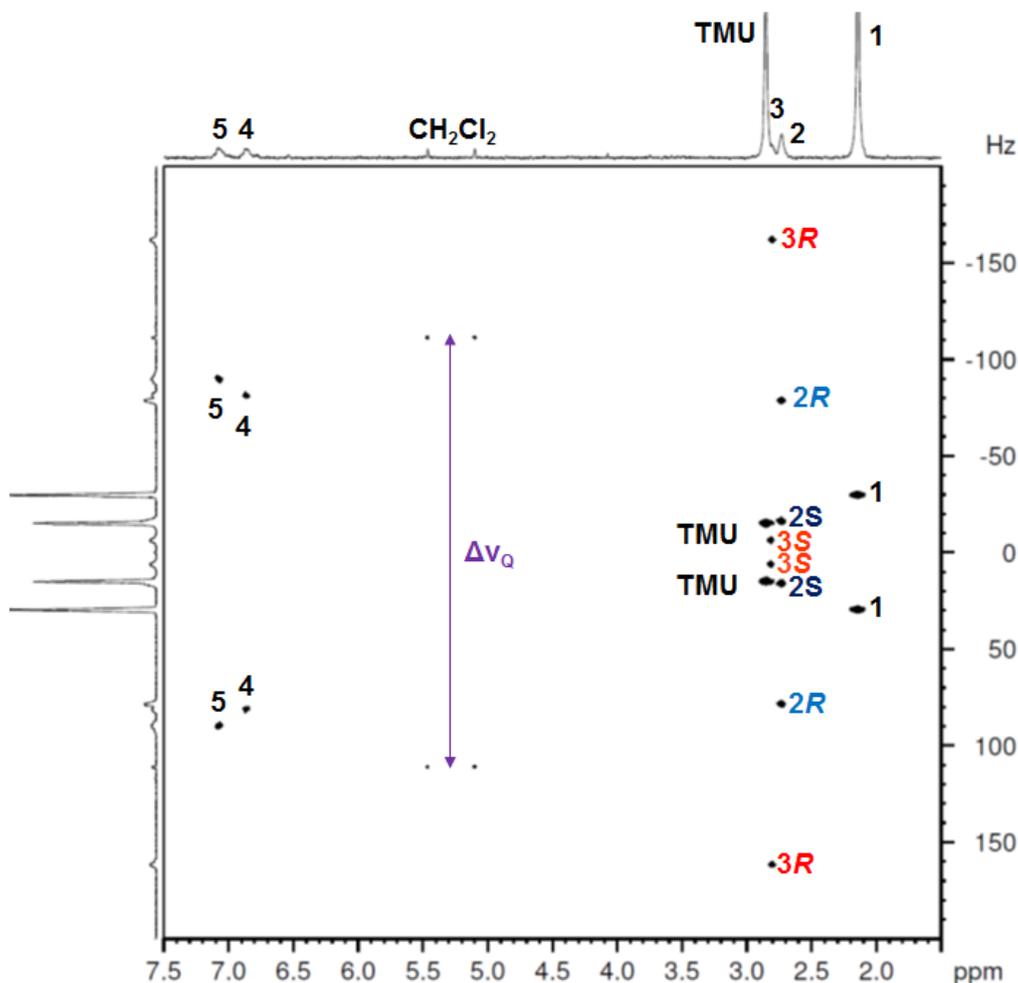


Figure V.15 : Spectre Q -résolue Fz Bis-WET tilté et symétrisé de la molécule de frambinone dans une phase PBLG/ CH_2Cl_2 - CCl_4 en présence de TMU enregistrée avec un protocole NUS de 50 %. L'expérience a été acquise en 12 heures avec NS = 64, TD₁ = 400 (soit TD_{aq} = 200 et TD_{rec} = 200), AQ = 2 s, D₁ = 0,05 s. La saturation sélective Bis-WET est appliquée sur les signaux du CH_2Cl_2 . les attributions des descripteurs stéréochimiques sont définies arbitrairement en considérant que $\Delta\nu_Q(^2\text{H})^{2R,3R} > \Delta\nu_Q(^2\text{H})^{2S,3S}$.

Comme précédemment, à partir des nouvelles cartes 2D DAN, nous avons mesuré les surfaces des doublets quadrupolaires associés à chaque site deutérium ($^2\text{H}_{2R}$, $^2\text{H}_{2S}$, $^2\text{H}_{3R}$ et $^2\text{H}_{3S}$) des groupements méthylène, puis calculé les rapports ($^2\text{H}/^1\text{H}$) normalisés ainsi que les coefficients de distribution isotopique relatifs en deutérium en pourcentage associés à chaque direction énantiotopique : $k'(^2\text{H})_{2R}$, $k'(^2\text{H})_{2S}$, $k'(^2\text{H})_{3R}$ et $k'(^2\text{H})_{3S}$, ainsi que les coefficients de distribution isotopique relatifs à chaque groupement méthylène $k''(^2\text{H})_2$ et $k''(^2\text{H})_3$. Ces

résultats sont listés dans les **Tableau V.9** et **V.10** et représentés graphiquement sur la **Figure V.16**.

Tableau V.9 : Valeurs relative des rapports ($^2\text{H}/^1\text{H}$)_{2R, 2R, 3R, 3S} et valeurs moyennes associées quand la valeur ($^2\text{H}/^1\text{H}$)_{2R} est normée à 100 ppm^a (Expérience Q-résolue MQ Bis-WET DAN- $\{^1\text{H}\}$ NUS)

Echantillons	($^2\text{H}/^1\text{H}$) _{2R} (ppm)	H/ ^1H) _{2S} (ppm)	($^2\text{H}/^1\text{H}$) _{2^{my}} (ppm)	($^2\text{H}/^1\text{H}$) _{3R} (ppm)	($^2\text{H}/^1\text{H}$) _{3S} (ppm)	($^2\text{H}/^1\text{H}$) _{3^{my}} (ppm)
Naturel (EUROFINS)	100,0	106,10	103,05	52,86	52,15	52,50
Synthétique (EUROFINS)	100,0	104,11	102,06	76,35	77,25	76,80
Synthétique (ACROS)	100,0	96,92	98,41	70,49	67,95	69,22
Inconnu	100,0	104,02	102,01	84,11	77,89	81,00

^a Pour une meilleure lecture des valeurs, nous avons transformé la valeur des surfaces absolues en une valeur de rapports isotopiques ($^2\text{H}/^1\text{H}$)_i calculée en normant la valeur ($^2\text{H}/^1\text{H}$)_{2R} à 100,0 ppm. Les stéréodescripteurs *R* et *S* sont définis arbitrairement en considérant que : $\Delta\nu_Q(R) > \Delta\nu_Q(S)$. Pour les quatre échantillons, les valeurs obtenues sont calculées pour une série de trois expériences 2D DAN.

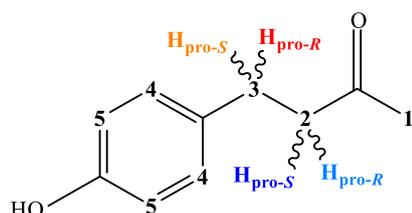
Tableau V.10 : Valeurs des coefficients de distribution relative du deutérium, k' (%) et k'' (%) calculé à partir de l'Equation V.2 et V.3 3 (Expérience Q-résolue MQ Bis-WET DAN- $\{^1\text{H}\}$ NUS)

Echantillons	k' (^2H) _{2R} (%)	k' (^2H) _{2S} (%)	k'' (^2H) ₂ (%)	k' (^2H) _{3R} (%)	k' (^2H) _{3S} (%)	k'' (^2H) ₃ (%)
Naturel (EUROFINS)	32,14 (2,0)	34,10 (0,65)	66,25	16,99 (1,3)	16,76 (0,35)	33,65
Synthétique (EUROFINS)	27,95 (1,25)	29,10 (2,05)	57,12	21,34 (1,13)	21,59 (0,79)	42,87
Synthétique (ACROS)	29,52 (0,95)	28,61 (0,52)	58,09	20,81 (0,80)	20,06 (1,44)	40,87
Inconnu	27,32 (1,44)	28,42 (1,33)	55,73	22,98 (1,78)	21,28 (1,23)	44,27

^a Les stéréodescripteurs *R* et *S* sont définis arbitrairement en considérant que : $\Delta\nu_Q(R) > \Delta\nu_Q(S)$. Pour les quatre échantillons, les valeurs de k' (%) sont calculées pour une série de trois expériences 2D DAN. Les valeurs entre parenthèses correspondent à la déviation standard associée pour les trois expériences 2D acquises.

Le calcul des coefficients de distribution associés à chaque groupement méthylène k'' (^2H)₂ et k'' (^2H)₃ confirme également les résultats précédents et la possibilité de discrimination d'origine de la frambinone à partir des données associées aux deux groupements méthylènes. En effet, on observe que l'échantillon d'origine naturelle à un coefficient de distribution k'' (^2H)₂ égal à 66,25 % contre 33,65 % pour k'' (^2H)₃, tandis que les calculs pour les échantillons d'origine synthétique donnent respectivement 57,12 % et 58,09 % pour k'' (^2H)₂ le premier et 42,87 % et 40,87 % pour k'' (^2H)₃ pour le second. L'enrichissement en deutérium du groupement méthylène en position 2 de la frambinone est

toujours vérifié. Pour l'étude de l'échantillon d'origine inconnue, les coefficients de distributions sont relativement proches des valeurs obtenues pour les échantillons synthétiques, avec $k''(^2\text{H})_2$ égal à 55,73 % et $k''(^2\text{H}_3)$ égal à 44,27 %. Contrairement aux deux séries d'expériences 2D précédentes (expériences *Q*-résolue Fz DAN- $\{^1\text{H}\}$ et *Q*-résolue Fz Bis-WET DAN- $\{^1\text{H}\}$), nous remarquons que les plages d'incertitudes sont plus grandes. En effet, comme nous l'avons vu dans le **Chapitre III**, la reconstruction des incréments t_1 est de moins bonne qualité si les écarts entre deux expériences 1D transitoires acquises sont trop importants. Afin de limiter ces effets, il pourrait être intéressant d'appliquer le protocole NUS avec un plus grand nombre d'expériences 1D transitoires réellement acquises (NUS% = 60 ou 75 %) afin de limiter le nombre de points t_1 à reconstruire *via* l'algorithme CS.



(a)

(b)

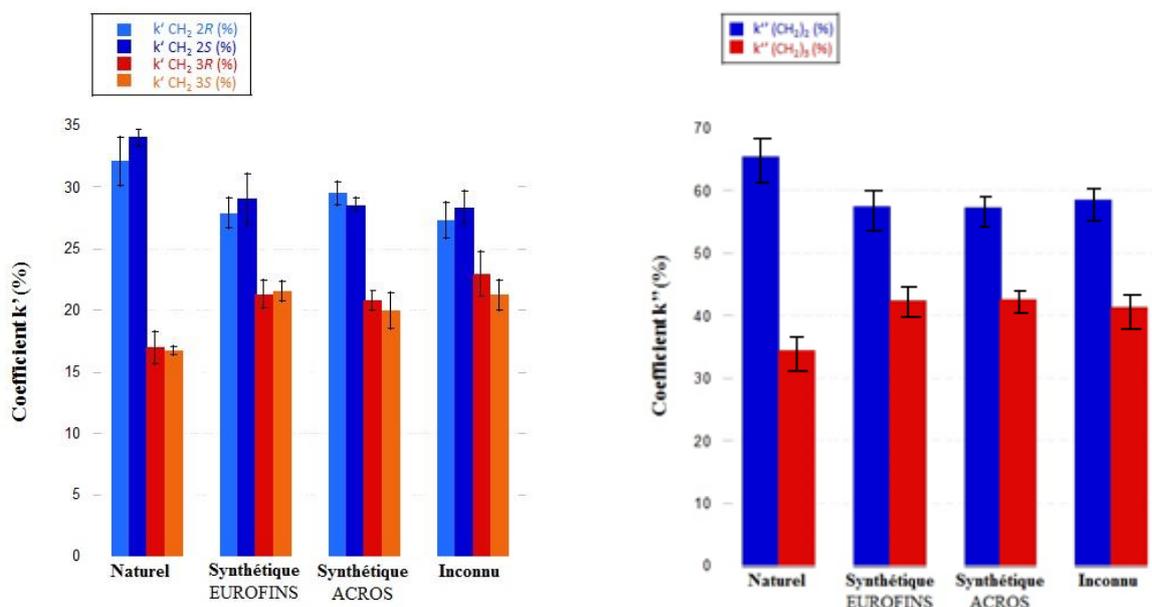


Figure V.16 : Variations des coefficients de distribution relatifs du deutérium, k' et k'' , pour les différents échantillons de frambinone testés (expériences *Q*-résolue Fz Bis-WET DAN- $\{^1\text{H}\}$ NUS (50%). Sur cette figure, la stéréochimie *pro-R/pro-S* montrée sur la molécule n'est plus définie comme sur la **Figure V.1**.

Pour une comparaison finale, l'ensemble des valeurs de $k''(\text{CH}_2)_2$ et de $k''(\text{CH}_2)_3$ pour les trois types d'expériences 2D DAN et les quatre échantillons sont présentées sur la **Figure V.17**. Comme le montre les graphes, les résultats obtenus pour les trois types d'expériences 2D DAN sont plutôt cohérents.

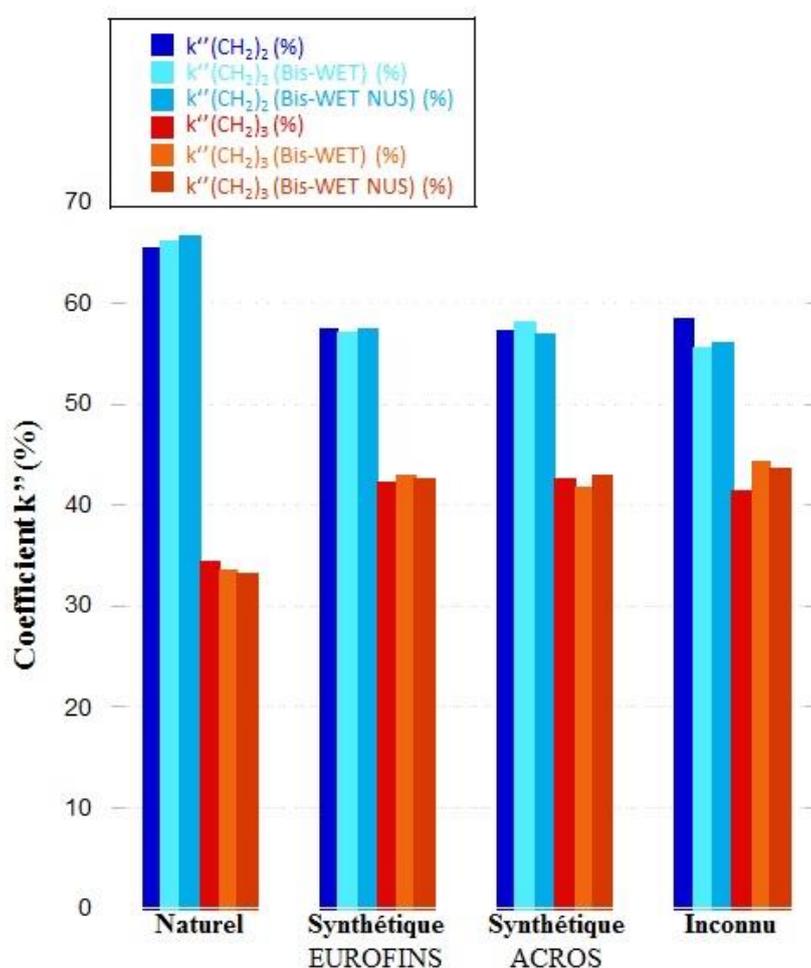


Figure V.17 : Variations des coefficients de distribution relatif en deutérium, k'' , pour chaque échantillon et pour les trois types d'expériences 2D (Q -résolue MQ DAN- $\{^1\text{H}\}$, Q -résolue MQ Bis-WET DAN- $\{^1\text{H}\}$ et Q -résolue Fz Bis-WET DAN- $\{^1\text{H}\}$ NUS (50%).

En conclusion grâce à cette nouvelle étude sur la frambinone, nous avons pu illustrer le potentiel analytique de la RMN 2D DAN dans les solvants orientants chiraux pour la caractérisation isotopique des énanti-isotopomères ^2H de la frambinone, molécule très utilisée dans le domaine alimentaire et dans la parfumerie. Pour la première fois, les énanti-isotopomères ^2H associés aux sites énantiotopes des groupements méthylènes ont pu être spectralement discriminés sur la base des déplacements chimiques $\delta^{\text{aniso}}(^2\text{H})$ et des éclatements quadrupolaires $\Delta\nu_Q(^2\text{H})$. Via l'analyse du profil isotopique ($^2\text{H}/^1\text{H}$) de ces sites et des leurs excès énanti-isotopomériques (*EEI*), nous avons pu montrer le potentiel analytique de cette méthode originale pour discriminer les échantillons de RMN 2D DAN d'origines biologiques ou synthétiques.

Afin de répondre à la problématique future liée à la détermination des rapports isotopiques $(\text{D}/\text{H})_i$ absolus en présence d'une référence interne par RMN dans les cristaux liquides chiraux, de nouveaux outils ont été développés (séquence de saturation sélective, application du protocole NUS). Ils ont montré leurs potentiels au cours de cette étude sur la

frambinone et peuvent fournir de nouveaux outils pour l'étude des molécules d'intérêts économiques analysées dans les phases anisotropes lyotropes.

Références

- [1] [Gardeners dictionary](#)
Miller P.
1754.
- [2] [Fruit breeding](#)
Kempler C., Hall H., Finn C.E.
Handbook of Plant Breeding, Edition Springer, 2012, 263-304.
- [3] [Berry phenolics and their antioxidant activity](#)
Kähkönen M.P., Hopia A.I., Heinonen M.
J. Agric. Food. Chem., 2001, 49, 4076-4082.
- [4] [Antioxidants in raspberry: on-line analysis links antioxidant activity to a diversity of individual metabolites](#)
Rao A.V., Snyder D.M.
J. Am. Food. Chem., 2010, 58, 3871-3883.
- [5] [Analyse de l'arôme des framboises. I. Les constituants carbonylés volatils](#)
Winter M., Sundt E.
HCA, 1962, 45, 2195-2211.
- [6] [Analyse de l'arôme volatil des framboises II. Les alcools](#)
Sundt E., Winter M.
HCA, 1962, 45, 2212-2218.
- [7] [Analyse de l'arôme des framboises III. Les acides et esters inférieurs](#)
Palluy E., Sundt E., Winter M.
HCA, 1963, 45, 2297-2299.
- [8] [Identification of the flavoured volatile components of the raspberry cultivar](#)
Guichard G.
Sci. Aliment, 1982, 2, 173-185
- [9] [Volatile compounds of raspberry fruit: From analytical methods to biological role and sensory impact](#)
Aprea E., Biosioli F., Gasperi F.
Molecules, 2015, 20, 2445-2474
- [10] [Untersuchungen über aromastoffe. 1. Mitteilung. über das himbeeraroma](#)
Schinz H., Seidel C.F.
Helv. Chim. Acta, 1957, 40, 1839-1859.
- [11] [Heterologous production of raspberry ketone in the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* via pathway engineering and synthetic enzyme fusion](#)
Beekwilder J., Van der Meer I.M., Sibbesen O., Broekgaarden M., Qvist I., Mikkelsen J.D., Hall R.
Biotechnology Journal, 2007, 22, 1270-1279.

- [12] Cation-exchanged montmorillonite-catalyzed facile Friedel-Crafts alkylation of hydroxy and methoxy aromatics with 4-hydroxybutan-2-one to produce raspberry ketone and some pharmaceutically active compounds
Tateiwa J., Horiuchi H., Hashimoto K., Yamauchi T., Uemura S.
J. Org. Chem., **1994**, 59, 5901-5904.
- [13] Rheosmin (“raspberry ketone”) and zingerone, and their preparation by crossed aldol-catalytic hydrogenation sequences
Smith L.R.,
The Chemical Educator, **1996**, 1, 1-18.
- [14] Synthesis of raspberry and ginger ketones by nickel boride-catalyzed hydrogenation of 4-arylbut-3-en-2-one
Bandarenko M., Kovalenko V.
Z. Naturforsch., **2014**, 69b, 885-888.
- [15] Natural abundance ²H nuclear magnetic resonance study of the origin of raspberry ketone
Fronza G., Fuganti C., Guillou C., Reniero F., Joulain D.
J. Agric. Food Chem., **1998**, 46, 248-254.
- [16] Deuterium NMR stereochemical analysis of threo-erythro isomers bearing remote chiral centres in racemic and non-racemic liquid crystalline solvents
Canlet C., Merlet D., Lesot P., Meddour A., Loewenstein A., Courtieu J.
Tetrahedron Asymm., **2000**, 11, 1911-1918.
- [17] Enantiomeric visualisation using proton-decoupled natural abundance deuterium NMR in poly(γ -benzyl-L-glutamate) liquid crystalline solutions
Lesot P., Merlet D., Loewenstein A., Courtieu J.
Tetrahedron Asymmetry, **1998**, 9, 1871-1881.
- [18] Theoretical and experimental aspects of enantiomeric differentiation using natural abundance multinuclear NMR spectroscopy in polypeptide liquid crystals
Sarfati M., Lesot P., Merlet D., Courtieu J.
Chem. Commun., **2000**, 2069-2081.
- [19] Exploring the analytical potential of NMR spectroscopy in chiral anisotropic media for the study of the natural abundance deuterium distribution in organic molecules
Lesot P., Aroulanda C., Billault I.
Anal. Chem., **2004**, 76, 2827-2835.
- [20] Enantiotopic discrimination in the NMR spectrum of prochiral solutes in chiral liquid crystals
Lesot P., Aroulanda C., Zimmermann H., Luz Z.
Chem. Soc. Rev., **2015**, 44, 2330-2375.
- [21] Recent advances in the analysis of the site-specific isotopic fractionation of metabolites such as fatty acids using anisotropic natural abundance ²H NMR spectroscopy: Applications to conjugated linolenic methyl esters
Lesot P., Serhan Z., Billault I.
Anal. Bioanal. Chem., **2011**, 399, 1187-1200.

- [22] Analytical contribution of NAD 2D-NMR spectroscopy in polypeptide mesophases to the investigation of triglycerides
Lesot P., Serhan Z., Aroulanda C., Billault I.
Magn. Reson. Chem., **2012**, 50, S2-S11.
- [23] Determination of the natural deuterium distribution of fatty acids by application of ^2H 2D-NMR in liquid crystals: fundamentals, advances, around and beyond
Lesot P.
Liquid Crystal, **2019**, <https://doi.org/10.1080/02678292.2019.1613685>.

Conclusion générale

Conclusion générale

L'objectif de ces travaux de Thèse était d'exploiter et illustrer le potentiel analytique de la résonance magnétique nucléaire quantitative DAN en phase cristal-liquide chirale lyotrope afin d'étudier et de discriminer l'origine de molécules d'intérêt économique (agroalimentaire) Pour répondre à cette problématique, nous avons combiné deux idées : i) l'étude du fractionnement isotopique naturel site-spécifique par RMN ; ii) l'apport analytique de RMN 2D DAN en milieu orienté.

Dans un premier temps, nous avons rappelé les propriétés générales des phases lyotropes, en nous intéressant plus précisément au polypeptide poly- γ -benzyl-L-glutamate (PBLG). Après avoir discuté de la notion de paramètre d'ordre orientationnel qui définit l'orientation des solutés dans une phase anisotrope, l'ensemble des interactions anisotropes ont été présentées : parmi elles, l'interaction quadrupolaire (spécifique aux noyaux de spin $I > 1/2$) modifie considérablement l'aspect général des spectres RMN $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ par la présence de doublets quadrupolaires et d'éclatement $\Delta\nu_Q$ sur les spectres $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ et DAN- $\{^1\text{H}\}$. L'analyse des spectres 1D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ anisotropes complexes est grandement simplifiée par l'utilisation d'expériences 2D de type QUOSY (QUadrupolar Ordered Spectroscopy), qui vont nous permettre d'éclater les informations anisotropes, δ^{aniso} et $\Delta\nu_Q(^2\text{H})$, sur les deux dimensions spectrales, et d'autocorréler les deux composantes de chaque doublet.

Dans la nature, les atomes les plus abondants (hydrogène, carbone, oxygène, azote,...) coexistent avec leurs isotopes stables dans différentes proportions (99,985 % pour ^1H et 0.015 % pour ^2H , 98,9 % pour ^{12}C et 1,1 % pour ^{13}C , ...). Il est donc possible de mesurer les rapports isotopiques ($^2\text{H}/^1\text{H}$), ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$), ... dans toutes les molécules organiques. Dans une molécule naturelle, ces rapports isotopiques sont site-spécifiques et leurs valeurs individuelles résultent des conditions de (bio)synthèse (conditions climatiques, processus de photosynthèse des plantes, environnement, origine botanique, ...). Depuis 1980, le protocole de RMN-FINS[®], historiquement développé autour du noyau ^2H puis récemment étendu au noyau ^{13}C (PSIA) est devenu un outil incontournable pour quantifier les rapports isotopiques $(^2\text{H}/^1\text{H})_i$ sur chaque site d'une molécule (quand ils sont tous spectralement résolus) et donc de déterminer son profil/fractionnement isotopique naturel site-spécifique. Grâce à cette technique, il est possible de discerner des échantillons d'une même molécule (éthanol, glucose, vanilline, frambinone, ...) provenant de sources ou d'origines (géographiques, botaniques) différentes. Il devient donc possible de mettre en évidence des profils ou des empreintes isotopiques anormaux révélant ainsi des procédés frauduleux (chaptalisation des vins, ajout de molécules exogènes, ventes de composés synthétiques sous l'appellation « produits naturels », ...). Si la RMN-FINS[®] développée en milieu isotrope est une technique qui a fait ses preuves, et permet de répondre à de nombreuses problématiques analytiques isotopiques, elle présente trois inconvénients liés à son principe : i) discrimination des sites uniquement sur la base du δ^{iso} ; ii) faible dispersion des signaux ^2H sur les spectres 1D

Conclusion générale

enregistrés en milieu isotrope (γ_D), iii) absence de détection d'énantio-isotopomères ^2H pour des molécules prochirales et d'énantio/diastéréo-isotopomères ^2H pour des molécules chirales.

De par son principe, la RMN 2D DAN dans une phase orientée chirale lyotrope permet de contourner ces inconvénients point par point : i) accès à une nouvelle observable (RQC) ; ii) éclatement des informations spectrales sur deux domaines de fréquence (F_1 et F_2); iii) énantioliscriminations spectrales possibles. Par ailleurs, la nature lyotrope de la phase permet de dissoudre une grande quantité d'analyte (contrairement aux CL thermotropes). En termes de sensibilité et de rapports (S/B)_i, cet avantage compense la distribution du signal ^2H sur deux composantes (DQ(^2H)) pour chaque isotopomère inéquivalent, au lieu d'une résonance unique ^2H comme en milieu isotrope. Celui-ci compense également les effets énantioliscriminants qui permettent de séparer des énantio-isotopomères du mélange, mais doublent le nombre de signaux ^2H (dédoublé chiral) comparé à un spectre ^2H enregistré en milieu achiral. Rappelons ici que le passage d'une phase isotrope achirale à un CLC conduit à une réduction de l'intensité des signaux ^2H d'au moins un facteur 4 pour une paire d'énantio-isotopomères donnée.

Comme toute technique, cette approche possède également des limites liées à la nature lyotrope des phases orientées utilisées comme solvant de RMN. Tout d'abord, la présence d'un co-solvant organique protoné (obligatoire pour obtenir des spectres RMN DAN exploitables) dans la phase induit la présence d'un doublet quadropolaire de forte intensité. Cette situation affecte relativement peu les signaux ^2H les plus intenses du soluté (groupement méthyle, groupement symétrique, ...). En revanche, la qualité de la digitalisation du signal analogique (CAN) des signaux ^2H les moins intenses du soluté (directions prochirales d'un méthylène, ...) peut être altérée (forme des raies). Pour éviter ces effets gênants en termes de quantification, nous avons développé de nouvelles expériences, les expériences RMN 1D Bis-WET DAN et les expériences RMN 2D de type QUOSY Bis-WET DAN afin de supprimer sélectivement le DQ(^2H) du co-solvant organique (CHCl_3 , CH_2Cl_2) sans affecter les signaux DAN du soluté. Dans ces deux types d'expériences, le signal DAN du co-solvant est considérablement réduit (intensité inférieure à celle des signaux du soluté les moins intenses), supprimant de fait une possible mauvaise digitalisation des signaux les plus faibles.

En milieu anisotrope, l'homogénéité de la phase cristal-liquide chirale au cours de l'acquisition conduit à un spectre RMN de haute résolution. Au-delà de 24 heures d'acquisition, l'homogénéité de l'échantillon peut s'altérer (apparition d'un gradient d'ordre) et donc réduire la qualité des spectres RMN 2D DAN enregistrés avec des temps d'expérience trop longs. Cette limite de stabilité des échantillons orientés polypeptidiques devient alors rapidement incompatible avec l'utilisation d'impulsions sélectives de longue durée (entre 100 et 300 ms) qui peuvent alors conduire à un temps total d'acquisition pour une expérience 2D pouvant dépasser les 30 heures (en fonction du nombre d'incrément t_1 et de scans).

Conclusion générale

Ce nouvel obstacle a été surmonté en appliquant le protocole *Non Uniform Sampling* (NUS) qui permet de réduire le temps d'acquisition des expériences multidimensionnelles (2D, 3D) en enregistrant seulement une partie des incréments t_1 , tandis que les incréments manquants sont obtenus à partir d'un algorithme de reconstruction. Ainsi, il a été possible d'enregistrer des spectres 2D QUOSY DAN Bis-WET de qualité mêmes combinés au protocole NUS. Ces expériences ont été réalisées avec des temps d'acquisition totale inférieurs à ceux des expériences 2D QUOSY sans saturation (et sans NUS) équivalentes.

Les possibilités analytiques des expériences de RMN 2D QUOSY DAN en milieu cristal-liquide chiral avec ou sans ces développements ont pu être appliquées avec succès et de manière concrète pour analyser des molécules d'intérêts (ici économique).

Dans ces travaux de Thèse, nous avons étudié deux molécules naturelles connues et malheureusement souvent contrefaites : la vanilline et la frambinone. Si le profil isotopique de ces composés a déjà été étudié par RMN 1D DAN isotrope, il existait encore des interrogations sur certains sites hydrogénés.

Pour la vanilline, l'isochronie fortuite entre deux positions ^2H aromatiques empêchait la caractérisation isotopique complète du cycle aromatique. Notre approche méthodologique a permis d'y répondre en discriminant les trois positions ^2H du noyau aromatique de la vanilline sur la base d'une différence de déplacements chimiques anisotropes et les éclatements quadrupolaires ($\Delta\delta^{\text{aniso}}$ et $\Delta\Delta\nu_Q(^2\text{H})$). Dans le cas de la frambinone, notre approche a permis de discriminer spectralement les énanti-isotopomères ^2H associés aux sites hydrogénés énantiotopes des groupements méthylènes et donc d'accéder pour la première fois à leur analyse isotopique.

Associée à des conditions expérimentales quantitatives, la RMN 2D DAN dans les CLCs conduit à l'obtention de nouvelles informations isotopiques ^2H (distribution isotopique relatives ^2H des sites du cycle aromatique de la vanilline ou des sites énantiotopiques de la frambinone) pouvant potentiellement être utilisables pour une discrimination et/ou une identification d'échantillons de vanilline et de frambinone de différentes origines (naturelles, hémisynthétiques ou synthétiques).

D'un point de vue méthodologique, les travaux menés ont permis de mettre au point de nouvelles séquences RMN DAN- $\{^1\text{H}\}$: les expériences 2D QUOSY Bis-WET DAN, combinées avec ou sans le protocole NUS. Nous avons ainsi pu montrer l'intérêt de cette approche pour l'analyse isotopique de la frambinone en termes de temps d'expérience.

Parmi les perspectives possibles, plusieurs pistes peuvent et devront être explorées pour rendre la méthodologie RMN 2D DAN anisotrope plus compétitive et donc attrayante. Parmi elles, la possibilité d'accéder à la détermination des rapports isotopiques $(^2\text{H}/^1\text{H})_i$ absolus site-spécifiques en présence d'une référence interne calibrée (TMU ou autre) dissoute dans la phase orientée achirale ou chirale. Dans cette optique, il sera nécessaire de limiter ou

Conclusion générale

de contourner différentes problématiques RMN: i) obtenir des rapports (S/B)_i suffisants ; ii) remplir les conditions d'obtention de spectres 2D DAN quantitatifs ($T_R = 5 \times T_1$) ; iii) conserver des temps d'expériences 2D raisonnables et inférieurs à la durée de stabilité de la phase lyotrope (polypeptidique) ; iv) éliminer le signal DAN du co-solvant quand l'intensité de ce signal est trop importante comparée à celui du soluté.

A priori, l'utilisation et l'optimisation des expériences 2D QUOSY Bis-WET DAN-¹H} combinée à un échantillonnage NUS raisonnable en t_1 (%NUS = 75 %) devrait offrir un axe de recherche intéressant et prometteur pour ces nouveaux développements.

Liste des Figures

Figure I.1 : Représentation schématique de l'organisation d'une phase solide, d'une phase cristal-liquide et d'une phase liquide.	30
Figure I.2 : Présentation simplifiée des différents types de cristaux liquides.	31
Figure I.3 : Exemple de structure chimique générique de composés mésogènes : (a) Structure de type « calamitique » et (b) Structure de type « discotique ».	31
Figure I.4 : Représentation schématique de l'agencement des molécules dans trois CLs en présence d'un champ magnétique: (a) Nématique ($\Delta\chi_m > 0$), (b) Smectique, (c) Cholestérique ($\Delta\chi_m < 0$).	32
Figure I.5 : Schéma de la structure hélicoïdale des mésophases cholestériques : (a) vue selon l'axe d'hélicité h ; (b) vue en profondeur.	34
Figure I.6 : (a) Structure du monomère du PBLG. (b et c) Structure hélicoïdale du PBLG et de sa chaîne latérale. (d) Représentation 3D d'une fibre de PBLG (environ 40 unités monomères).	35
Figure I.7 : Représentation schématique de l'organisation des fibres de PBLG au sein du champ magnétique B_0 . Le vecteur n correspond au directeur de la phase PBLG.	36
Figure I.8 : (a) Alignement de fibres de polymères parallèlement à l'axe du champ B_0 , similairement à une phase nématique de $\Delta\chi_m > 0$. (b) Représentation schématique des énantiomères <i>R</i> s'orientant différemment des énantiomères <i>S</i> en moyenne, et permettant la discrimination des deux isomères par RMN.	37
Figure I.9 : Structure des polymères polypeptidiques : (a) PBLG ; (b) PLLA ; (c) PCBLL ; (d) PBLA ; (e) PELG ; (f) PBPMLG.	38
Figure I.10 : Structure chimique des polymères hélicoïdaux chiraux de type : (a) polyguanidique ; (b) polyacétyle substitué par de la <i>L</i> -valine.	38
Figure I.11 : Exemple d'un système d'axes de référence moléculaire (<i>x</i> , <i>y</i> et <i>z</i>) attaché à une molécule dissoute dans une phase nématique. L'anisotropie de susceptibilité magnétique moléculaire de la phase, $\Delta\chi_m$, est ici positive ($\Delta\chi_m > 0$). Les axes du laboratoire sont notés X , Y et Z . Dans ce cas, le directeur de la mésophase, n , aligne parallèlement avec l'axe B_0 (Z). Lorsque $\Delta\chi_m < 0$, le directeur s'aligne perpendiculairement à B_0	40
Figure I.12 : Représentation des angles d'Euler (α , β , γ) dans un repère orthonormé moléculaire (<i>Oxyz</i>) avec : l'angle α ($0 \leq \alpha \leq 2\pi$) transformant le trièdre (<i>x</i> , <i>y</i> , <i>z</i>) en (x_α , y_α , z) ; l'angle β ($0 \leq \beta \leq \pi$) transformant le trièdre (x_α , y_α , z) en (x_α , y_β , z_β) ; l'angle γ ($0 \leq \gamma \leq 2\pi$) transformant le trièdre (x_α , y_β , z_β) en (x_α , y_β , z_β).	41
Figure I.13 : (a) Exemple d'énantiomères « classiques » comportant quatre substituants différents. (b) Structure des énantiomères de chiralité isotopique (énantio-isotopomères) de l'éthanol et leurs homologues prochiraux: l'éthanol protoné et l'éthanol perdeutééré.	53
Figure I.14 : Représentation schéma d'un signal $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ dans différents milieux : (a) isotrope; (b) anisotrope achiral; (c) anisotrope chiral. L'énantiodiscrimination est possible dans un CLC car la valeur du RCSA(^{13}C) est différente pour les deux énantiomères. L'attribution des stéréodescripteurs <i>R</i> et <i>S</i> est arbitraire. La réduction (d'un facteur 2) de l'intensité du signal $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ associée au doublement du nombre de pics dans la phase CLC pas été représentée (c). Figure extraite de la référence [1].	55
Figure I.15 : Représentation d'un spectre RMN ^{13}C couplé proton d'un groupement méthine ($^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$) dans différents milieux : (a) une phase isotrope (achirale), (b) une phase anisotrope achirale, (c) une phase anisotrope chirale. L'énantiodiscrimination (<i>R/S</i>) est possible dans un milieu anisotrope chiral car le couplage spin-spin total $T_{\text{C-H}}$ est différent pour les deux énantiomères. L'attribution des stéréodescripteurs <i>R</i> et <i>S</i> est arbitraire. La réduction (d'un facteur 2) de l'intensité du signal $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ associée au doublement du nombre de pics dans la phase CLC pas été représentée (c). Figure extraite de la référence [1].	56

Liste des Figures

- Figure I.16 :** (a) Représentation des diagrammes des niveaux d'énergies du noyau deutérium selon la nature de la phase (solvant isotrope, phase anisotrope achirale et phase anisotrope chirale). (b) Spectres RMN 1D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ théoriques attendus. Les largeurs de raies sont supposées identiques. Noter la réduction (d'un facteur 2) de l'intensité du signal $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ associée au doublement du nombre de pics dans la phase CLA (b) et la réduction (d'un facteur 4) dans la phase CLC (c), comparée au signal ^2H unique obtenu dans la phase isotrope (a). Figure extraite de la référence [1]..... 57
- Figure I.17 :** (a) Photo de l'aimant de 14,1 T couplé à sa cryoplateforme utilisé au sein du LRMN; (b) Photo de la sonde cryosonde ^2H sélective (5 mm) devant la console Avance II, et avant son installation dans l'aimant. Notez le préamplificateur sous la sonde et les connectiques sur le panneau frontal. Réfroidie par de l'hélium gaz, la température de la sonde et du préamplificateur sont égales à 17 K et 77 K, respectivement. 61
- Figure I.18 :** (a) Spectre 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ de la vanilline dans la phase PBLG/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-CCl}_4$. Chaque isotopomère monodeutééré forme un DQ centré sur son δ^{aniso} . L'attribution de ce spectra sera présentée dans le Chapitre IV. (b) Exemple de signal 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ du co-solvant (chloroforme) montrant les satellites ^{13}C (associés à l'isotopomère $^{13}\text{C}\text{-}^2\text{H}$ du chloroforme) au pied de l'isotopomère $^{12}\text{C}\text{-}^2\text{H}$ 62
- Figure I.19 :** Séquence d'impulsion de l'expérience 2D $Q\text{-COSY } ^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$. Le cyclage de phase sur 4 étapes est : $\phi_1 = x, x, x, x$; $\phi_2 = x, y, -x, -y$; $\phi_3 = x, -x, x, -x$ 63
- Figure I.20 :** Exemple de représentation schématique d'une carte 2D $Q\text{-COSY } ^2\text{H}\{-^1\text{H}\} / Q\text{-COSY } F_z ^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ avant et après l'application du processus de tilt. Ici deux doublets quadrupolaires, $\text{DQ}(^2\text{H}_A)$ et $\text{DQ}(^2\text{H}_B)$ sont considérés. Les informations anisotropes observables sur les deux domaines de fréquence, F_1 et F_2 , sont données. Noter le doublement artificiel des fréquences de résonance en F_2 64
- Figure I.21 :** (a) Principe du filtre gradient z. (b) Séquence d'impulsion de l'expérience 2D $Q\text{-COSY } F_z ^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$. Le cyclage de phase est : $\phi_1 = x, x$; $\phi_2 = x, -x$; $\phi_3 = x, -x$; $\phi_4 = x, x$. Dans cette séquence, l'angle θ_m est égal à $54,7^\circ$ 65
- Figure I.22 :** Séquence d'impulsion de l'expérience 2D $Q\text{-resolved } F_z ^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ avec le cyclage de phase: $\phi_1 = x, x$; $\phi_2 = x, -x$; $\phi_3 = x, -x$; $\phi_4 = x, x$. Dans cette séquence, l'angle θ_i est égal à 60° pour les expériences impaires et est égal à 45° pour les expériences paires. 66
- Figure I.23 :** Exemple de représentation schématique de la carte 2D $Q\text{-resolved} / Q\text{-resolved } F_z ^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ avant (a) et après (b) l'application du processus de tilt. Les informations anisotropes observables sur chaque domaine de fréquence (F_1 et F_2) sont données..... 67
- Figure I.24 :** (a) Séquence d'impulsion de l'expérience 2D $Q\text{-résolue } \text{MQ } ^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$. (b) Représentation du chemin de cohérence associé aux expériences (b) impaires (ZQ) et (c) aux expériences paires (DQ). 68
- Figure I.25 :** Séquence d'impulsion de l'expérience 2D $\delta\text{-résolue } F_z ^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ avec le cyclage de phase : $\phi_1 = x, x$; $\phi_2 = x, -x$; $\phi_3 = x, -x$; $\phi_4 = x, x$. Dans cette séquence, la valeur de l'angle θ_m est égale à $54,7^\circ$ 69
- Figure I.26 :** Représentation schématique de la carte 2D $\delta\text{-résolue}$ ou $\delta\text{-résolue } F_z ^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$. Les informations anisotropes observables sur chaque domaine de fréquence (F_1 et F_2) sont données. 69
- Figure II.1 :** Schéma de l'aimantation macroscopique avec et après l'impulsion RF..... 83
- Figure II.2 :** Représentation schématique de l'effet de l'angle d'impulsion β de l'impulsion RF avec β inférieur à 90° ; β égale à 90° ; et β supérieur à 90° 84
- Figure II.3 :** Formule développée du tétraméthylurée (TMU), molécule de symétrie C_2 . la masse moléculaire du TMU est égale à 116,1 g/mol..... 86
- Figure II.4 :** (a) Dispositif de création du signal ERETIC. (b) Spectre ^2H découplé ^1H de l'éthanol, pour un tube contenant de la TMU, en présence du signal électronique ERETIC [12]..... 88
- Figure II.5 :** Présentation des isotopologues du noyau hydrogène de la molécule d'éthanol. 88
- Figure II.6 :** Présentation des isotopomères monodeutéérés de la molécule d'éthanol. 89

Liste des Figures

- Figure II.7 :** Principe de l'analyse par SMri. (b) Exemple d'un instrument SMri couplé à une GC. 90
- Figure II.8 :** Schéma impulsionnel de la séquence 1D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ avec le cyclage de phase : $\phi_1 = 0, 1, 2, 3$, et $\phi_2 = 1, 1, 1, 1$. Cette expérience est nommée « zgdc » dans la librairie du logiciel Topsin (cf. **Annexe J**)..... 92
- Figure II.9 :** (a) Structure du stéarate de méthyle (LM) acide gras (estérifié) possédant deux doubles liaisons (C-18:2). (b) Spectre 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ isotrope du LM. Notez par exemple, la non-discrimination des signaux ^2H des quatre positions éthylénique ou en position 8/14. Figure extraite de la référence [34]. 94
- Figure II.10 :** Principe schématique de la décomposition d'un spectre 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ d'isotopomères monodeutérés en une somme de sous-spectres 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ en utilisant une expérience de type 2D Q -COSY. Ici, deux sites ^2H inéquivalents (δ^{aniso} différents pour chaque énanti-isotopomère monodeutééré). Figure extraite de la référence [38]. 96
- Figure II.11 :** (a) Structure chimique du BPTH et numérotation atomique associée. (b) Spectre 2D Q -COSY DAN- $\{^1\text{H}\}$ (mode magnitude) du BPTH en phase achirale PBG/ CHCl_3 . (c) Région aliphatique du spectre 2D Q -COSY du BPTH en phase chirale PBLG/ CHCl_3 montrant quatre DQ(^2H)s pour les sites 4/4' et 5/5' de la molécule. Ces spectres 2D DAN ont été enregistrés à 61,4 MHz (9,4 T) en une nuit d'acquisition. Figure adaptée de la référence [36]. 96
- Figure II.12 :** Schéma des diverses transformations biochimiques successives du myristate de méthyle, MM, (AGS) conduisant successivement à divers AGI, (9Z)-OM, (9Z, 12Z)-ML, (9Z, 12Z, 15Z)-LnM, (9Z, 12R, 13S)-VM ou AGIC, (9Z, 11E, 13E)-EM et (9Z, 11E, 13Z)-PM. Dans les cellules des plantes ou de micro-organismes, X correspond à la coenzyme A (CoA) ou protéine porteuse (ACP). Pour l'analyse RMN DAN, X est un groupe méthyle..... 97
- Figure II.13 :** (a) Structure du linoléate de méthyle (LM) acide gras (estérifié) possédant deux doubles liaisons (C-18:2). (b) Spectre 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ isotrope du LM. Notez, par exemple, la non-discrimination des signaux ^2H des quatre positions « éthyléniques » ou en position 8/14 de la chaîne. Figures extraites de la référence [27, 41]. 98
- Figure II.14 :** Séries de sous-spectres 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ associés aux deux méthyles, aux quatre positions éthyléniques et aux vingt-deux positions méthyléniques du ML dans la phase chirale PBLG/pyridine extraits de la carte 2D Q -COSY Fz tiltée DAN anisotrope chirale enregistré à 14.1 T. Figure extraite de la référence [41]. 99
- Figure II.15 :** Variation des EEI (%) des différents groupements méthylènes du LM. Figure extraite de la référence [41]. 100
- Figure II.16 :** (a) Structure chimique de la miliacine, composé chiral énantiopur triterpénique. (b) Spectre 2D Q -résolue Fz tilté DAN- $\{^1\text{H}\}$ (92.1 MHz) centré sur les déplacements chimiques des groupements méthyles de la miliacine. Toutes les positions méthyles de la molécule sont discriminées sur la base d'une différence de δ^{aniso} et $\Delta\nu_Q$. Figure extraite de la référence [44]. 101
- Figure II.17 :** (a) Variations des rapports isotopiques ($^2\text{H}/^1\text{H}$) des groupements méthyles de la miliacine obtenues à partir de l'association des informations des mesures RMN DAN anisotrope et isotrope (colonnes rouges), et à partir des mesures anisotropes RMN DAN et GC-SMri (colonne bleue). Noter la très bonne concordance des résultats. Voie synthétique de la miliacine dans le cytosol. Modifiée à partir de la synthèse proposée par Sachse et al. [45]. Notez le couplage entre les deux entités farnésyl pyrophosphates qui permet d'expliquer le profil isotopique ($^2\text{H}/^1\text{H}$) observé expérimentalement. Figures extraites de la référence [44]. 102
- Figure III.1 :** Schéma d'impulsion de la séquence de saturation sélective de type WATERGATE (WATER suppression by GRAdient Tailored Excitation). Les impulsions de radiofréquences et les gradients de champ magnétique (axe z) sont séparés sur deux lignes. ($\phi_1 = x, x, x, x$, $\phi_2 = -y, -y, -y, -y$ et $\phi_3 = y, y, y, y$)..... 110
- Figure III.2 :** Schéma d'impulsion de la séquence de saturation sélective de type double-WATERGATE. Les impulsions radiofréquences et les gradients de champ magnétique sont séparés sur deux lignes. ($\phi_1 = x, x, x, x$, $\phi_2 = -y, -y, -y, -y$ et $\phi_3 = y, y, y, y$). 110
- Figure III.3 :** Schéma d'impulsion de l'expérience RMN 1D avec une saturation WET. 111

Figure III.4 : (a) Structure de la frambinone. (b) Spectre RMN 2D Q -résolue Fz tilté de la frambinone dans la phase PBLG/CH₂Cl₂-CCl₄ enregistré en 16 heures (NS = 64, TD₁ = 400 / TD₂ = 3684, AQ = 2s, D₁ = 0,05 s). Sur les spectres, les signaux correspondant aux positions énantiotopes des groupements méthylène ont une intensité très faible par rapport au DQ du co-solvant. Leurs attributions stéréochimiques *R/S* sont définies arbitrairement. (c) Représentation 3D du spectre 2D Q -résolue Fz. 112

Figure III.5 : Séquence d'impulsion d'une expérience 1D ²H-¹H} avec une saturation sélective du co-solvant. 113

Figure III.6 : Représentation d'une fonction de type « sinus cardinal »..... 114

Figure III.7 : Spectres RMN 1D ²H-¹H} de l'acétone-d₆ dans une phase PBLG/CDCl₃ à 300 K (NS = 16, AQ = 2 s et T_R = 2,5 s): (a) Sans saturation sélective, (b) Avec une impulsion sélective (unique) centrée sur la résonance blindée de CDCl₃ ($\Delta\nu_Q = 422$ Hz) à 4,97 ppm (indiquée par la flèche rouge).. L'impulsion sélective (sinus cardinal) a une durée de 100 ms pour une puissance de $1,99 \times 10^{-5}$ W (47 dB). Les deux expériences 1D ont été obtenues avec la même valeur de RG et un filtrage exponentiel de 0,6 Hz a été appliqué..... 115

Figure III.8 : Spectre RMN 1D ²H-¹H} de l'acétone-d₆ dans la phase PBLG/CDCl₃ à 300 K: (a) Sans saturation sélective, (b) Avec une impulsion sélective (unique) centrée sur la résonance déblindée de CDCl₃ ($\Delta\nu_Q = 422$ Hz) à 9,55 ppm (indiquée par la flèche rouge). Les conditions expérimentales RMN sont identiques à celles mentionnées dans la légende de la **Figure III.7**..... 116

Figure III.9 : (I) Représentations schématiques des distributions de spins sur les trois niveaux d'énergie d'un noyau ²H isolé ($I = 1$) (à un état initial donné) : (a) distribution de spins associée à l'état initial pour un échantillon isotrope, (b) distribution de spins associée à l'état initial d'un échantillon anisotrope, (c) distribution de spins attendue juste après la saturation sélective sur une transition (ν_1). Comme nous le voyons, les populations de spin sur les trois niveaux sont différentes. (II) Signal RMN 1D ²H attendu après une excitation du système à l'aide d'une impulsion dure 90°. Comme représenté ici, un QD(²H) reste observable. 117

Figure III.10 : Spectre RMN 1D ²H-¹H} d'un échantillon d'acétone-d₆ dans PBLG/CDCl₃ à 300 K (NS = 16, AQ = 2 s et T_R = 2,5 s) : (a) sans saturation sélective, (b) avec une impulsion doublement sélective unique (angle de 90°) centrée sur les deux résonances du DQ du CDCl₃, soit 4,97 et 9,55 ppm ($\Delta\nu_Q : 422$ Hz), et indiquée par les deux flèches rouges (cf. la séquence de la **Figure III.5**). La durée d'impulsion sélective (sinus cardinal) est égale à 100 ms pour une puissance de $1,99 \times 10^{-5}$ W (47 dB). Les deux expériences 1D ont été obtenues avec la même valeur de RG et un filtrage exponentiel de 0,6 Hz a été appliqué. 119

Figure III.11 : Schéma d'impulsion d'une séquence ²H-¹H} 1D avec une double impulsion sélective centrée sur les deux composantes du co-solvant alternativement à 90° et à 270° à chaque scan (NS(impair) = 90° / NS(pair) = 270°). 120

Figure III.12 : Spectres RMN 1D ²H-¹H} de l'acétone-d₆ dans la phase PBLG/ CDCl₃-CHCl₃ à 295 K. (NS = 8, D₁ = 8 s, tacq = 2 s, T_R = 10 s): (a) sans saturation sélective, (b) avec une impulsion doublement sélective unique d'angle 90° à chaque scan, (c) avec une impulsion doublement sélective d'angle 90° pour le premier scan (NS_{impair} = 90°) et une impulsion sélective d'angle 270° pour le second scan (NS_{pair} = 270°) (cf. séquence de la **Figure III.11**). L'impulsion doublement sélective est centrée sur les deux résonances du CDCl₃ à 3,8 et 10,9 ppm ($\Delta\nu_Q = 654$ Hz). L'impulsion (sinus cardinal) a une durée de 100 ms et une puissance de $1,99 \times 10^{-5}$ W (47 dB) pour un angle de basculement de 90°. Pour obtenir l'impulsion doublement sélective d'angle de 270°, la puissance utilisée est égale à $1,99 \times 10^{-4}$ W correspondant à une atténuation de 37 dB au lieu de 47 dB. Les deux expériences 1D ont été obtenues avec la même valeur de RG et un filtrage exponentiel de 0,8 Hz a été appliqué. 121

Figure III.13 : Schéma d'impulsion de la séquence ²H-¹H} 1D avec une saturation doublement sélective de type WET du signal ²H à éliminer (co-solvant). Ici, l'angle des quatre impulsions sélectives n'est pas défini. . 122

Figure III.14 : Spectres RMN 1D ²H-¹H} de l'acétone-d₆ dans PBLG/CDCl₃ à T = 300 K (NS = 16, AQ = 2 s, T_R = 10 s): (a) sans saturation sélective (référence) ; (b) avec une impulsion doublement sélective unique (NS_{impair} = 90° / NS_{pair} = 270°) (cf. **Figure III.11**); (c) avec une saturation doublement sélective de type WET-90 (WET 90 : NS_{impair/pair} = 90°) (cf. **Figure III.13**). Comme précédemment, l'impulsion doublement sélective (sinus cardinal et de durée égale à 100 ms) est centrée sur les deux résonances du CDCl₃ à 4,97 et 9,55 ppm ($\Delta\nu_Q = 422$ Hz) (cf. **Figure III.12**). Pour le bloc de saturation WET, la durée des quatre impulsions doublement

Liste des Figures

sélectives d'angle de 90° est égale à 100 ms, avec une puissance égale à $1,63 \times 10^{-5}$ W (SP₁), à $2,53 \times 10^{-5}$ W (SP₂), à $1,18 \times 10^{-5}$ W (SP₃) et à $6,38 \times 10^{-5}$ W (SP₄) respectivement. Les deux expériences 1D ont été obtenues avec la même valeur de RG et un filtrage exponentiel de 0,8 Hz a été appliqué. 123

Figure III.15 : Spectres RMN 1D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ de l'acétone- d_6 dans PBLG/ CDCl_3 enregistrés à 310 K (NS = 16, AQ = 2 s, $T_R = 10$ s) : (a) sans saturation sélective, (b) avec une saturation doublement sélective de type WET avec un angle de 90° (WET-90 : NS_{impair/pair} = 90°) (cf. **Figure III.13**); (c) avec une saturation doublement sélective de type WET avec un angle de 270° (WET-270 : NS_{impair/pair} = 270°) (cf. **Figure III.13**), (d) avec une saturation doublement sélective de type Bis-WET avec un angle d'excitation sélective alterné de 90° et 270° (Bis-WET : NS_{impair} = 90° / NS_{pair} = 270°) (cf. **Figure III.16**). La double impulsion sélective est centrée sur les deux résonances du CDCl_3 à 5,2 et 9,2 ppm ($\Delta\nu_Q = 368$ Hz). Le couplage total $^1\text{T}_{\text{C-D}}$ est égal à 46 Hz. Les paramètres de blocs WET dans l'expérience 1D Bis-WET sont donnés dans le texte. Les deux expériences 1D ont été obtenues avec la même valeur de RG et un filtrage exponentiel de 0,8 Hz a été appliqué. 125

Figure III.16 : Schéma impulsif de l'expérience RMN 1D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ Bis-WET. Cette séquence se décompose en deux parties. Pour les scans pairs, l'angle de basculement du bloc de saturation WET ^2H est centré autour de 90° (SP₁, SP₂, SP₃, SP₄), pour les scans impairs, l'angle de basculement est centré autour de 270° (SP₅, SP₆, SP₇, SP₈). 126

Figure III.17 : Schéma impulsif des expériences 2D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ / DAN- $\{-^1\text{H}\}$ incluant le bloc WET : (a) Q -COSY Fz Bis-WET, (b) Q -résolue Fz Bis-WET, (c) Q -COSY MQ Bis-WET. Ces séquences d'impulsions 2D sont basées sur le même concept, et se décomposent en deux parties : un bloc de saturation WET-90 pour les scans impairs et un bloc WET-270 pour les scans pairs. 127

Figure III.18 : Spectre 2D Q -COSY MQ de l'acétone- d_6 dans la phase PBLG/ CDCl_3 enregistré en 2 heures à 310 K (NS = 16, $\text{TD}_1 = 256$, AQ = 0,74 s, $\text{D}_1 = 0,5$ s). La saturation doublement sélective Bis-WET est appliquée sur les signaux du CDCl_3 avec deux cycles alternés ($90^\circ/270^\circ$) de 8 scans. Sur le spectre 2D, les signaux résiduels du co-solvant organique sont indiqués par une étoile (*) et les signaux associés aux satellites $^{13}\text{C}\text{-}^2\text{H}$ par un rond ouvert (o). Pour le bloc WET-90, les puissances des impulsions sont égales à $1,63 \times 10^{-5}$ W / 47,87 dB (SP₁), $2,53 \times 10^{-5}$ W / 45,96 dB (SP₂), $1,18 \times 10^{-5}$ W / 49,27 dB (SP₃) et $6,38 \times 10^{-5}$ W / 41,95 dB (SP₄). Pour le bloc WET-270, les puissances utilisées sont $1,63 \times 10^{-4}$ W / 37,87 dB (SP₅), $2,53 \times 10^{-4}$ W / 35,96 dB (SP₆), $1,18 \times 10^{-4}$ W / 39,27 dB (SP₇) et $3,38 \times 10^{-5}$ W / 31,95 dB (SP₈). La durée de toutes les impulsions doublement sélectives est de 100 ms (t_{SP}). 128

Figure III.19 : (a) Structure de la frambinone : (b) spectre 2D Q -résolue MQ Bis-WET tilté et symétrisé de la frambinone dans PBLG/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-CCl}_4$ en présence de TMU, et enregistrée en 24 heures (NS = 64, $\text{TD}_1 = 400$, $t_{\text{acq}} = 2$ s, $\text{D}_1 = 0,05$ s). La bpc de saturation sélective Bis-WET ^2H est appliquée sur les signaux de CH_2Cl_2 . Les attributions stéréochimiques *R/S* sur spectres sont définies arbitrairement. (c) Représentation 3D du spectre 2D Q -résolue MQ phasé. 130

Figure III.20 : (a) Représentation schématique d'un échantillonnage uniforme d'un signal RMN (US) dans la dimension indirecte dans une expérience RMN 2D. (b) Carte 2D après une transformée de Fourier du signal dans les deux dimensions spectrales. (c) Représentation 3D d'un signal RMN $S(\nu_1, \nu_2)$. L'intensité du signal est représentée dans la 3^{ème} dimension. 135

Figure III.21 : Exemple de représentation linéaire des points TD_1 acquis (TD_{acq}) pour une expérience 2D utilisant $\text{TD}_1 = 200$ points, NUS = 50 % et $T_2 = 1$ s. Cette distribution des points a été modélisée à l'aide de l'algorithme de type CS (proposé dans TOPSPIN). En choisissant une valeur de T_2 petite (1 s) la plupart des points acquis en dimension indirecte sont concentrés dans la première moitié du FID indirect en dimension t_1 137

Figure III.22 : (a) Représentation schématique d'un échantillonnage NUS d'un signal dans la dimension indirecte d'une expérience RMN 2D. (b) Après avoir reconstruit les signaux manquants à partir d'un algorithme de type Cov ou Cs. (c) Carte 2D reconstruite dans les deux dimensions spectrales. 138

Figure III.23 : (a) Structure du butan-2-one. (b et c) Spectre 2D Q -résolue MQ et Q -résolue MQ Bis-WET du butan-2-one dans PBLG/ CHCl_3 à 300 K. Ces expériences ont été enregistrées en 14 heures (RG = 1150, NS = 64, $\text{TD}_1 = 512$, $\text{TD}_2 = 3500$, $\text{D}_1 = 0,1$, $t_{\text{acq}} = 1$ s). L'attribution *R* et *S* des énantiomères (associé au groupement méthylène) donnée sur le spectre 2D est arbitraire, mais telle que ($\Delta\nu_Q(^2\text{H}^R) > \Delta\nu_Q(^2\text{H}^S)$). Les caractéristiques des impulsions WET-90/270 ont été données dans le texte. 140

Liste des Figures

- Figure III.24 :** Gains en terme de rapport signal sur bruit $(S/B)_i$ par unité d'expériences 1D transitoires en t_1 en fonction de la valeur du % NUS..... 143
- Figure III.25 :** Projections F_1 (a) et F_2 (b) du spectre 2D Q-résolue MQ DAN- $\{^1\text{H}\}$ tilté du butan-2-one dans PBLG/ CHCl_3 obtenu avec le protocole NUS (25%). Le spectre a été enregistré en 3 heures et 30 minutes. La carte 2D obtenue avec NUS (25%) n'a pas été symétrisée. Noter la profusion des artefacts de reconstruction. 144
- Figure III.26 :** Distribution des points TD_1 acquis lors de l'expérience 2D Q-résolue Fz Bis-WET du butan-2-one avec %NUS égal à : (a) 25 % ; (b) 50 %. Pour les deux expériences, le nombre de TD_1 sélectionné est égal à 512 et le temps de relaxation transversale effectif $T2^*$ est égal à 1 s..... 144
- Figure III.27 :** (a) Structure de la frambinone. (b) Spectre 2D Q-résolue Fz Bis-WET tilté et symétrisé de la molécule de frambinone dans une phase PBLG/ CH_2Cl_2 - CCl_4 (300 K) enregistré avec un protocole NUS de 50 %. L'expérience a été acquise en 12 heures avec $\text{NS} = 64$, $\text{TD}_1 = 400$ (soit $\text{TD}_{\text{aq}} = 200$ et $\text{TD}_{\text{rec}} = 200$), $\text{tacq} = 2$ s, $D_1 = 0,05$ s. La saturation sélective Bis-WET est appliquée sur les deux composantes du DQ de CH_2Cl_2 145
- Figure III.28 :** Gains en terme de rapport signal sur bruit $(S/B)_i$ par unité d'expériences 1D transitoires en t_1 en fonction de la valeur du % NUS pour les 4 sites de la molécules. 147
- Figure III.29 :** (a) Structure de la frambinone. (b) Spectre Q-résolue Fz Bis-WET tilté et symétrisé de la molécule de frambinone dans une phase PBLG/ CH_2Cl_2 - CCl_4 en présence de TMU enregistré avec un protocole NUS de 50 %. L'expérience a été acquise en 16 heures avec $\text{NS} = 80$, $\text{TD}_1 = 400$ (soit $\text{TD}_{\text{aq}} = 200$ et $\text{TD}_{\text{rec}} = 200$), $D_1 = 0,05$ et $\text{tacq} = 2$ s. Le bloc de saturation doublement sélective Bis-WET est appliqué sur les signaux du CH_2Cl_2 148
- Figure-IV.1 :** (a) Gousse de vanille de type *Vanilla planifolia*. (b) Gousses de *Vanilla Tahitian*. (c) Extrait de vanille tahitienne..... 156
- Figure IV.2 :** Structure des molécules aromatiques présentes dans la gousse de vanille : (a) l'alcool *para*-anisique, (b) l'acide *para*-anisique, (c) l'acide *para*-hydroxybenzoïque, (d) le *para*-hydroxybenzaldéhyde. 157
- Figure IV.3 :** Structure du 4-hydroxy-3-méthoxybenzaldéhyde, principale source moléculaire de l'arôme de la vanille..... 157
- Figure IV.4 :** Voie de synthèse de la vanilline à partir du gaïacol. Dans cette synthèse, (1) réagit avec la potasse pour former le dichlorocarbène (2). Celui-ci va ensuite réagir avec le gaïacol (3) pour former la vanilline (4) [5]. 158
- Figure IV.5 :** Exemples de différents précurseurs synthétiques de la vanilline. La voie naturelle correspond à l'extraction liquide-liquide de la vanilline contenue dans la gousse de vanille (cadre vert). La vanilline hémisynthétique s'obtient par la bioconversion de l'acide férulique (cadre bleu). « Commercialement » considérée comme naturelle, elle est de faible qualité gustative mais coûte moins chère (absence des autres molécules aromatiques). La vanilline dite de synthèse est obtenue à partir de l'iso-eugénol, le gaïacol ou l'acide férulique (cadre rouge)..... 159
- Figure IV.6 :** (a) Structure de la vanilline montrant les trois positions aromatiques notées H_a , H_b et H_c . (b) Formes limites de résonance associées au phénol (I) et au benzaldéhyde (II). OH est un groupe mésomère donneur +M, alors que COH est un groupe mésomère attracteur, -M..... 162
- Figure IV.7 :** Spectre 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ isotrope de la vanilline enregistré à 14,1 T (92,1 MHz) dans CH_2Cl_2 à 296 K en présence de TMU. Les déplacements chimiques des positions H_a et H_b sont identiques (positions fortuitement isochrones). Le rapport isotopique naturel site-spécifique de ces deux positions aromatiques, $(^2\text{H}/^1\text{H})_a$ et $(^2\text{H}/^1\text{H})_b$, n'est donc pas disponible dans un solvant liquide. 163
- Figure IV.8 :** Spectre 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ anisotrope de la vanilline (80 mg) à 14,1 T dans un mélange PBLG/ CH_2Cl_2 - CCl_4 (90 mg / 275 mg - 300 mg) en présence de TMU (25 mg) à 296 K. L'ensemble des sites deutérium de la molécule est discriminé mais l'attribution des sites H_a et H_b est incertaine. Les astérisques représentent le DQ (composante large) de la fonction alcool. (a) sans les attributions des RQC(H_a) et RQC(H_b). (b) avec les attributions des RQC(H_a) et RQC(H_b). 165

Liste des Figures

- Figure IV.9 :** Représentation des vecteurs $C-^2H_a$ et $C-^2H_c$ dans la vanilline. Ces vecteurs sont considérés comme colinéaires. Compte tenu de leur colinéarité, il est attendu que les éclatements quadrupolaires des sites 2H_a et 2H_c soient identiques entre eux ($\Delta\nu_Q(^2H_a) = \Delta\nu_Q(^2H_c)$), mais différents de l'éclatement quadrupolaire 2H_b ($\Delta\nu_Q(^2H_b) \neq \Delta\nu_Q(^2H_a, ^2H_b)$)..... 165
- Figure IV.10 :** Représentation schématique de la décomposition d'un spectre 1D DAN en une série de sous-spectres 1D DAN extrait d'une expérience 2D DAN de type Q -résolue (F_z ou MQ) tiltée. La procédure de tilt consiste à basculer les pics hors-diagonaux parallèlement à l'axe F_1 . Figure extraite de la référence [30]. 167
- Figure IV.11 :** Variation des $|\Delta\nu_Q|$ associée aux trois positions aromatiques (2H_a , 2H_b et 2H_c) de la vanilline et les demi-différences ($|\Delta\nu_Q/2|$) entre les positions 2H_a et 2H_b selon le co-solvant ou le mélange de co-solvant choisi ($T = 296$ K). 171
- Figure IV.12 :** Variation des $\Delta\nu_Q(^2H)$ s des sites aromatiques 2H_a , 2H_b et 2H_c et de la demi-différence d'éclatement quadrupolaire entre les positions 2H_a et 2H_b en fonction de la température (phase PBLG/ CH_2Cl_2 - CCl_4). 173
- Figure IV.13 :** Variation du rapport signal sur bruit $(S/B)_{Me}$ de l'effet de la température (en K) sur la variation de la valeur de la largeur de raie à mi-hauteur (FWHM) et du associé pour le groupement méthoxy de vanilline (extrait à partir des cartes RMN 2D tiltées). 173
- Figure IV.14 :** Spectre RMN 2D Q -résolue F_z DAN- $\{^1H\}$ tilté et symétrisé enregistré à 311 K d'un échantillon de vanilline (80 mg) dissous dans la phase PBLG/ CH_2Cl_2 - CCl_4 (PBLG (90 mg), CH_2Cl_2 (275 mg), CCl_4 (300 mg), TMU (25 mg)-. Ce spectre a été enregistré en 16 heures avec $NS = 200$, $TD_1 = 350$, $TD_2 = 1300$ et $T_R = 1$ s. Les signaux marqués par un astérisque en dimension F_2 correspondent aux signaux axiaux résiduels ($\nu = 0$ Hz) du $DQ(^2H)$ co-solvant CH_2Cl_2 (pic le plus intense). 175
- Figure IV.15 :** Série de sous-spectres 1D DAN- $\{^1H\}$ (projections F_1) associés à tous les isotopomères 2H inéquivalent de la vanilline et extraits du spectre 2D Q -résolue F_z DAN- $\{^1H\}$ tilté et symétrisé (cf. **Figure IV.14**). 177
- Figure IV.16 :** Variations des coefficients de distribution relative de la teneur en deutérium, k , pour la paire de sites aromatiques et pour les échantillons S-8 to S-13 : (a) 2H_a et 2H_b (avec $k(^2H_b) + k(^2H_c) = 100\%$), (b) : 2H_a et 2H_c (avec $k(^2H_a) + k(^2H_c) = 100\%$), (c) : 2H_b et 2H_c (avec $k(^2H_b) + k(^2H_c) = 100\%$). 181
- Figure IV.17 :** Variation des coefficients de distribution relatif du deutérium k' sur les trois positions de l'aromatique (H_a , H_b et H_c / code couleur) pour chaque échantillon provenant de sources différentes (S-8 : lignine naturelle ; S-9 : acide férulique naturel ; S-10 : gousse de vanille naturelle ; S-11 : guaïacol synthétique ; S-12 : acide férulique synthétique ; S-13 : échantillon inconnu). 182
- Figure IV.18 :** Représentation schématique partielle des voies de biosynthèses de la vanilline montrant les probables étapes-clés introduisant des fractionnements isotopiques différents. La voie supérieure (en noir) indique les valeurs ($^2H/^1H$) (en ppm) prédites en se basant sur le métabolisme d'acide crassulacéen (CAM pour « crassulacean acid métabolism ») du glucose en l'absence de fractionnement. La numérotation des carbones dans la structure correspond à leurs positions initiales dans la molécule de glucose (Glc-6-P). La numérotation interne au cycle aromatique correspond à la numérotation IUPAC utilisée dans les discussions. Les valeurs numériques extérieures au noyau aromatique correspondent au rapport isotopique ($^2H/^1H$) (en ppm). Les flèches représentent plusieurs étapes successives. La série (A) illustre les causes possibles de l'enrichissement en 2H de la position C_6 de la vanilline (correspondant à la position 2H_b) et la série (B)) illustre les causes possibles de l'enrichissement en 2H de la position C_5 de la vanilline (correspondant à la position 2H_c). 184
- Figure V.1 :** Structures de (a) l'acide formique (ou acide méthanoïque) et (b) du formiate d'éthyle (ou méthanoate d'éthyle) présent dans les framboises. Ces composés sont connus comme étant partiellement responsable de l'odeur de la framboise. 192
- Figure V.2 :** Structure du 4-(4-hydroxyphényl)-butan-2-one (frambinone). Les hydrogènes énantiotopes et leur stéréochimie (pro- R /pro- S) associés aux groupements méthylène (2 et 3) sont données. 192
- Figure V.3 :** Voie de synthèse biologique (naturelle) de la frambinone. La L -tyrosine (A) est transformée en acide coumarique (B) par l'action de la Tyrosine Amonnia-Lyase. L'addition de la Coenzyme A conduit à la

Liste des Figures

coumaroyl-CoA (C) qui forme la benzalacétone (D) sous l'action de la benzalacétone synthase. Enfin, la benzalacétone réductase réduit la benzalacétone (D) en frambinone (E)..... 193

Figure V.4 : Processus de synthèse de la frambinone par condensation aldolique croisée à partir du 4-hydroxybenzaldéhyde en milieu basique [13]..... 194

Figure V.5 : Spectre RMN ^1H isotrope (600,1 MHz) de la frambinone dissous dans CH_2Cl_2 . Les deux zooms présentent la structure du second ordre associée aux protons des méthylènes (zoom I) et du cycle aromatique (zoom II). Ce spectre a été acquis avec NS = 8, RG = 2,25, TD = 10000, AQ = 0,7 et $T_R = 1$ s. L'échantillon utilisé est composé de 106 mg de frambinone et 970 de CH_2Cl_2 195

Figure V.6 : Spectre RMN ^2H - $\{^1\text{H}\}$ isotrope de la frambinone dans le dichlorométhane (CH_2Cl_2) en présence de TMU. Ce spectre a été acquis avec NS = 512, RG = 1150, TD = 7148, AQ = 2 s et $T_R = 2,5$ s. Un filtrage exponentiel a été appliqué (LB= 0,5 Hz). 196

Figure V.7 : Représentation des deux couples d'énantio-isotopomères monodeutérés associés aux groupements méthylènes 2 et 3..... 197

Figure V.8 : (a) Spectre RMN 2D Q -résolue MQ DAN- $\{^1\text{H}\}$ tilté et symétrisé de la frambinone dans la phase achirale PBLG/ CH_2Cl_2 . Le spectre 2D a été enregistré en 16 heures avec NS = 64, $\text{TD}_1 = 400$, $\text{TD}_2 = 2048$, AQ = 0,92 s, $D_1 = 0,08$ s, $T_R = 1$ s et RG = 1150. Un filtrage exponentiel (LB= 0.8 Hz) a été appliqué. (b) Série des sous-spectres 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ extraits de la carte 2D. Pour chaque sous-spectre 1D DA, l'intensité des signaux est maintenue constante. Noter la variation des rapports $(S/B)_i$ 199

Figure V.9 : (a) Spectre RMN 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ anisotrope chiral (296 K) d'un échantillon de 100 mg de frambinone dans PBLG/ CH_2Cl_2 - CCl_4 (100 mg / 365 mg / 125 mg) en présence de TMU (10 mg). Les $\text{DQ}(^2\text{H})$ du groupement méthyle, des positions aromatiques (4/5), de CH_2Cl_2 et du TMU sont facilement attribuables. (b) Zoom sur signaux des méthylènes. L'attribution des raies a été réalisée à partir de l'expérience 2D. Les attributions des descripteurs stéréochimiques sont définies arbitrairement en considérant que : $\Delta\nu_Q(^2\text{H})^{2R,3R} > \Delta\nu_Q(^2\text{H})^{2S,3S}$. Ce spectre a été acquis avec NS = 64, $\text{TD}_2 = 3584$, $\text{TD}_1 = 400$ et $T_R = 2$ s..... 200

Figure V.10 : (a) Spectre RMN 2D Q -résolue MQ DAN- $\{^1\text{H}\}$ tilté et symétrisé de la frambinone dans PBLG/ CH_2Cl_2 - CCl_4 (100 mg / 365 mg / 125 mg) en présence de TMU (10 mg). Ce spectre a été enregistré en 16 heures avec NS = 64, $\text{TD}_1 = 400$, $\text{TD}_2 = 2048$, AQ = 0,92 s, $D_1 = 0,08$ s, $T_R = 1$ s et RG = 1150. (b) Série de sous-spectres 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ extraits de la carte 2D. Pour chaque sous-spectre 1D DAN, l'intensité des signaux est maintenue constante. Noter la variation des rapports $(S/B)_i$. Comme pour le spectre 1D, les attributions des descripteurs stéréochimiques sont définies arbitrairement en considérant que $\Delta\nu_Q(^2\text{H})^{2R,3R} > \Delta\nu_Q(^2\text{H})^{2S,3S}$ 201

Figure V.11 : Variation des coefficients de distribution relatifs du deutérium, k' et k'' , pour les différents échantillons de frambinone testés (expériences 2D Q -résolue MQ DAN- $\{^1\text{H}\}$). Sur cette figure, la stéréochimie pro- R /pro- S montrée sur la molécule n'est plus définie comme sur la **Figure V.1** puisque les descripteurs R/S des $\text{DQ}(^2\text{H})$ sur les spectres 2D sont définis arbitrairement. 207

Figure V.12 : Variation des EEI (%) associés aux quatre échantillons provenant de sources différentes 208

Figure V.13 : Spectre 2D Q -résolue MQ Bis-WET DAN- $\{^1\text{H}\}$ tilté et symétrisé de la frambinone dans une phase PBLG/ CH_2Cl_2 - CCl_4 en présence de TMU à 296 K. Ce spectre a été enregistré en 24 heures 30 minutes avec NS = 64, $\text{TD}_1 = 400$, AQ = 2 s, $D_1 = 0,05$ s. La double saturation sélective Bis-WET est appliquée sur les signaux du CH_2Cl_2 . Les attributions des descripteurs stéréochimiques sont définies arbitrairement en considérant que : $\Delta\nu_Q(^2\text{H})^{2R,3R} > \Delta\nu_Q(^2\text{H})^{2S,3S}$ 209

Figure V.14 : Variation des coefficients de distribution relatifs du deutérium, k' et k'' , pour les différents échantillons de frambinone testés (expériences 2D Q -résolue MQ Bis-WET DAN- $\{^1\text{H}\}$). 211

Figure V.15 : Spectre Q -résolue Fz Bis-WET tilté et symétrisé de la molécule de frambinone dans une phase PBLG/ CH_2Cl_2 - CCl_4 en présence de TMU enregistrée avec un protocole NUS de 50 %. L'expérience a été acquise en 12 heures avec NS = 64, $\text{TD}_1 = 400$ (soit $\text{TD}_{\text{aq}} = 200$ et $\text{TD}_{\text{rec}} = 200$), AQ = 2 s, $D_1 = 0,05$ s. La saturation sélective Bis-WET est appliquée sur les signaux du CH_2Cl_2 . les attributions des descripteurs stéréochimiques sont définies arbitrairement en considérant que $\Delta\nu_Q(^2\text{H})^{2R,3R} > \Delta\nu_Q(^2\text{H})^{2S,3S}$ 212

Liste des Figures

Figure V.16 : Variation des coefficients de distribution relatifs du deutérium, k' et k'' , pour les différents échantillons de frambinone testés (expériences *Q*-résolue Fz Bis-WET DAN- $\{^1\text{H}\}$ NUS (50%). Sur cette figure, la stéréochimie pro-*R*/pro-*S* montrée sur la molécule n'est plus définie comme sur la **Figure V.1**..... 214

Figure V.17 : Variation des coefficients de distribution relatif en deutérium, k'' , pour chaque échantillon et pour les trois types d'expériences 2D (*Q*-résolue MQ DAN- $\{^1\text{H}\}$, *Q*-résolue MQ Bis-WET DAN- $\{^1\text{H}\}$ et *Q*-résolue Fz Bis-WET DAN- $\{^1\text{H}\}$ NUS (50%)). 215

Liste des Tableaux

Tableau I.1: Liste des polymères hélicoïdaux chiraux organosolubles disponibles pour former une phase CLC en présence d'un solvant organique. Pour chaque polymère, la position du centre stéréogène, et les co-solvants disponibles sont précisés.	39
Tableau I.2 : Discrimination spectrale selon le type d'éléments et selon le solvant considéré	54
Tableau III.1 : Rapports des signaux du butan-2-one calculés à partir des spectres 2D <i>Q</i> -résolue MQ Bis-WET sans application du protocole de réduction NUS.	141
Tableau III.2 : Comparaison entre les rapports théoriques et expérimentaux du butan-2-one (PBLG/CDCl ₃).	142
Tableau III.3 : Rapports des signaux du butan-2-one calculés à partir des spectre 2D <i>Q</i> -résolue MQ Bis-WET sans application du protocole de réduction NUS (75 %, 50 %, 25 %) et à temps d'expérience constant ($t_{exp} = 14$ heures).....	146
Tableau III.4 : Rapports des signaux de la frambinone calculés à partir des spectre 2D <i>Q</i> -résolue MQ sans saturation, avec saturation et application du protocole NUS à nombre de cans ou temps constant	149
Tableau IV.1 : Données des différents co-solvants organiques (simple ou en mélange) utilisés et les informations spectrales associées aux sites aromatiques ² H _a , ² H _b et ² H _c de la vanilline enregistrées à 296 K dans une phase orientée polypeptidique (PBLG).	169
Tableau IV.2 : Coefficient de distribution relatif du deutérium, <i>k</i> et <i>k'</i> (%), correspondant respectivement aux paires de site aromatiques ² H _a / ² H _b , ² H _a / ² H _c et ² H _b / ² H _c et aux coefficients de distribution par rapport aux trois sites ² H _a , ² H _b et ² H _c	180
Tableau V.1 : Données spectrales du spectre RMN 1D ² H- ¹ H isotrope de la frambinone dissous CH ₂ Cl ₂ . ..	196
Tableau V.2 : Données spectrales du spectre RMN ² H- ¹ H anisotrope de la frambinone PBG/CH ₂ Cl ₂	198
Tableau V.3 : Données spectrales DAN extraites du spectre RMN 1D ² H- ¹ H anisotrope de la frambinone PBLG/CH ₂ Cl ₂	201
Tableau V.4 : Données différents co-solvants organiques (simple ou mélange) et informations spectrales (296 K) des énatio-isotopomères (<i>R/S</i>) associées aux sites énantiotopes des méthylènes de la frambinone dans différentes phases PBLG.....	202
Tableau V.5 : Valeurs relative des rapports (² H/ ¹ H) _{2R, 2R, 3R, 3S} et valeurs moyennes associées quand la valeur (² H/ ¹ H) _{2R} est normée à 100 ppm ^a	205
Tableau V.6 : Valeurs coefficients de distribution relative du deutérium, <i>k'</i> (%) et <i>k''</i> (%) calculé à partir de l'Equation V.2 et V.3.....	206
Tableau V.7 : Valeurs relative des rapports (² H/ ¹ H) _{2R, 2R, 3R, 3S} et valeurs moyennes associées quand la valeur (² H/ ¹ H) _{2R} est normée à 100 ppm ^a (Expérience <i>Q</i> -résolue MQ Bis-WET DAN- ¹ H)	210
Tableau V.9 : Valeurs relative des rapports (² H/ ¹ H) _{2R, 2R, 3R, 3S} et valeurs moyennes associées quand la valeur (² H/ ¹ H) _{2R} est normée à 100 ppm ^a (Expérience <i>Q</i> -résolue MQ Bis-WET DAN- ¹ H) NUS).....	213
Tableau V.10 : Valeurs coefficients de distribution relative du deutérium, <i>k'</i> (%) et <i>k''</i> (%) calculé à partir de l'Equation V.2 et V.3 3 (Expérience <i>Q</i> -résolue MQ Bis-WET DAN- ¹ H) NUS)	213

Annexe

Liste des Annexes

ANNEXE A : Localisation des axes x , y et z de la matrice de Saube associés à différents groupes dissous dans CL uniaxiale chirale ou achiral	237
ANNEXE B : Plan d'expériences pour l'acquisition de spectre de RMN 2D deutérium découplé des protons en abondance naturelle (RMN 2D DAN- $\{^1\text{H}\}$) de type « QUOSY-Bis WET » avec l'application possible du « protocole NUS»	238
ANNEXE C : Séquence 2D Q-COSY	263
ANNEXE D : Séquence 2D Q-COSY Fz	265
ANNEXE E : Séquence 2D Q-résolue	267
ANNEXE F : Séquence 2D Q-résolue Fz	269
ANNEXE G : Séquence 2D Q-résolue MQ	271
ANNEXE H : Séquence 2D δ -résolue.....	273
ANNEXE I : Séquence 2D δ -résolue Fz	275
ANNEXE J : Séquence 1D zgdc.....	277
ANNEXE K : Séquence 1D selzgd	278
ANNEXE L : Séquence 1D zgdc WET.....	279
ANNEXE M : Séquence 1D zgdc Bis-WET	281
ANNEXE N : Séquence 1D Q-COSY Fz Bis-WET	284
ANNEXE O : Séquence 2D Q-résolue Fz Bis-WET	287
ANNEXE P : Séquence 2D Q-résolue MQ BIS-WET	291
ANNEXE Q : Exemple de liste d'échantillonnage de points utilisée pour des expériences 2D QUOSY intégrant le protocole NUS.....	294
ANNEXE R : Table des caractéristiques RMN des trois isotopes de l'hydrogène	295

ANNEXE A :

Localisation des axes x, y et z de la matrice de Saupe associés à différents groupes dissous dans CL uniaxiale chirale ou achiral

Table A.1. Emplacement des axes x, y et z de la matrice de Saupe associés à différents groupes dissous dans une mésophase uniaxiale chirale ou achirale

Molecular point group symmetry	Chiral Mesophase			Achiral Mesophase		
	Effective molecular point group	Indep. order parameters (Saupe elements)	Location of a,b,c axes	Effective molecular point group	Indep. order parameters (Saupe elements)	Location of a,b,c axes
C_1, C_i	C_1, C_i	$S_{xx}, S_{yy} - S_{zz}$ S_{xz}, S_{xy}, S_{yz}	arbitrary	C_1	$S_{xx}, S_{yy} - S_{zz}$ S_{xz}, S_{xy}, S_{yz}	arbitrary
C_s^a	C_s	$S_{xy}, S_{yy} - S_{zz}$ S_{yz}	x \perp to the plane or // to the 2-fold axis	C_1	$S_{xx}, S_{yy} - S_{zz}$ S_{xz}, S_{xy}, S_{yz}	arbitrary
C_2, C_{2h}	C_2, C_{2h}	$S_{xy}, S_{yy} - S_{zz}$ S_{yz}	x // to the 2-fold axis, y \perp to the mirror plane	C_2	$S_{xy}, S_{yy} - S_{zz}$ S_{yz}	x // to the 2-fold axis
C_{2v}^a	C_{2v}	$S_{xx}, S_{yy} - S_{zz}$	x // to the 2-fold axis, y \perp to the mirror plane	C_2	$S_{xy}, S_{yy} - S_{zz}$ S_{yz}	x // to the 2-fold axis
S_4^a	S_4	S_{xx}	x // p-fold axis or intersection of mirror planes	C_2	$S_{xy}, S_{yy} - S_{zz}$	x // to the 2-fold axis
D_2, D_{2h}	D_2, D_{2h}	S_{xx} $S_{yy} - S_{zz}$	x,y,z // to the 2-fold axes	D_2	$S_{xx}, S_{yy} - S_{zz}$	x,y,z // to 2-fold axes
D_{2d}^a	D_{2d}	S_{xx}	x // p-fold axis or intersection of mirror planes	D_2	$S_{xx}, S_{yy} - S_{zz}$	x,y,z // to 2-fold axes
$C_n, C_{nv}, C_{nh}, D_n, D_{nh}, D_{nd}$ (with n = 3, 4, 6) S_6 $C_\infty, C_{\infty v}$ $C_{\infty h}, D_{\infty h}$	$C_n, C_{nv}, C_{nh}, D_n, D_{nh}, D_{nd}$ (with n = 3, 4, 6) S_6 $C_\infty, C_{\infty v}$ $C_{\infty h}, D_{\infty h}$	S_{xx}	x // p-fold axis or intersection of mirror planes	C_n or D_n with n > 3	S_{xx}	// n-fold axis

ANNEXE B :

Plan d'expériences pour l'acquisition de spectre de RMN 2D deutérium découplé des protons en abondance naturelle (RMN 2D DAN- $\{^1\text{H}\}$) de type « QUOSY-Bis WET » avec l'application possible du « protocole NUS »

Remarque préliminaire:

Les figures présentées dans ce protocole sont associées à la version 3.2.7 du logiciel « Topspin » proposé sur les spectromètres RMN de la marque « Bruker » (valable pour les versions de Topspin 3.X).

Un spectromètre RMN Bruker de type Avance II (2009) opérant à 14 T (600,1 MHz pour le ^1H et 92,4 MHz pour le ^2H), muni d'une BSMS (Bruker Smart Magnet System) externe, et équipé d'une sonde cryogénique ^2H sélective (5 mm) a été utilisé.

Les spectres RMN 1D et 2D DAN ont été obtenus avec un échantillon de frambinone ($\text{HO}-\phi-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CH}_3$) préparé avec 100 mg d'analyte dissous dans une phase cristalline achirale « PBG » (PBLG (50 mg) + PBDG (50 mg)) / CH_2Cl_2 (375 mg) / CCl_4 (125 mg) à 295 K.

Étape 1: Préparation d'un l'échantillon cristal-liquide lyotrope (dans le cas d'un soluté solide) / tube de 5 mm de diamètre

NB: L'emploi de tubes de RMN de haute qualité (type 507 pp, ...) est fortement conseillé pour un champ à 14 T.

1.1. Introduction du soluté par pesée (10-100 mg) dans le tube RMN

1.2. Introduction du polymère par pesée (80-120 mg) dans le tube RMN

- Phase orientée chirale : PBLG ou PBDG (ou un autre type de polymère chiraux)
- Phase orientée chirale en mélangeant deux polymères de même stéréochimie: PBLG + PCBL
- Phase orientée achirale en mélangeant deux polymères de stéréochimie inversée (échantillon racémique) : PBLG (50%) + PBDG (50%)

NB: Pour l'analyse d'un soluté liquide, il est préférable d'inverser les étapes 1.2 et 1.1

1.3. Introduction de la référence interne par pesée (5-10 mg) dans le tube RMN (si nécessaire)

1.4. Introduction du co-solvant organique (CHCl_3 , CH_2Cl_2 , DMF, THF, ...) par pesée (400-600 mg) dans le tube RMN)

NB: Ces valeurs massiques sont optimisées pour obtenir une hauteur d'échantillon supérieure à 4,2 cm dans un tube de 5 mm de diamètre (hauteur optimisée pour une cryosonde sélective ^2H de type Bruker).

1.5. Pour éviter l'évaporation du co-solvant organique au cours du temps, le tube de RMN peut être scellé.

NB: Afin d'affiner les signaux RMN, un dégazage de l'échantillon (pompage à froid) peut être envisagé pour éliminer l'oxygène (O_2 : espèce paramagnétique) contenu dans le tube.

1.6. Dissolution et homogénéisation de la phase cristal-liquide par centrifugation basse vitesse (< 10 secondes), tête en haut puis tête en bas du tube (en cas de nécessité, le tube peut être chauffé entre deux centrifugations)

Etape 2: Optimisation de l'homogénéité magnétique de l'échantillon CL **en mode « unlock » et « sweep off »**

2.1. Mise en température de l'échantillon dans l'aimant du spectromètre RMN (à partir de la commande « edte »)

2.2. Insertion de l'échantillon scellé dans l'aimant du spectromètre RMN

2.3. Vérification de la désactivation du système de lock « Mode lock off » et désactivation du balayage du champ magnétique B_0 « Mode sweep off »

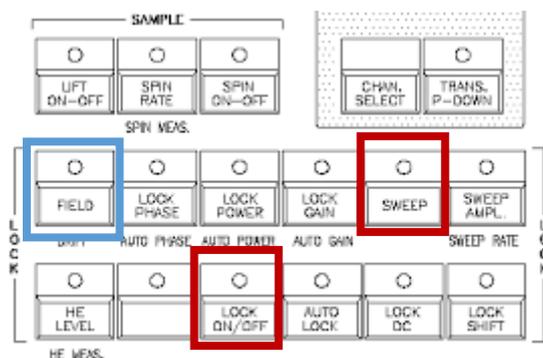


Figure A.1 : Représentation de la BSMS Bruker avec les éléments de verrouillage du système (touche « LOCK ON/OFF») et du balayage du champ (touche « SWEEP ») à désactiver.

2.4. Mise en rotation de l'échantillon (entre 7 et 10 Hz) pendant 15 minutes pour atteindre l'équilibre thermique de la mésophase dans le champ à la température choisie (« spin on »)

2.5. Vérification de la cohérence entre le câblage « physique » ^1H (au niveau du préamplificateur et de la sonde) et le câblage « électronique » (à partir des commandes « edasp » et/ou « edasp_setpreamp »)

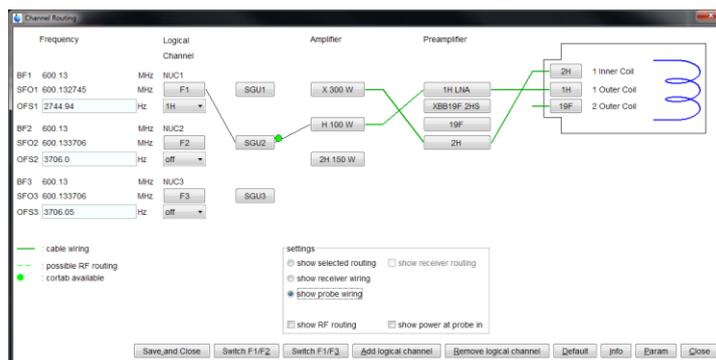


Figure A.2: Câblage électronique du spectromètre RMN pour l'acquisition d'expériences ^1H . Ici, le signal ^1H (canal F1) est synthétisé par la « SGU2 », puis est amplifié par l'amplificateur « 100 W » et passe par le préamplificateur noté « ^1H LNA ».

2.6. Accord de la fréquence et de l'impédance (« Matching/Tuning ») du canal ^1H de la cryosonde sélective (commande « wob »)

➔ Les bons accords permettront le découplage optimal des signaux ^1H (CPD).

2.7. Vérification de la valeur du « Field » (cf. Figure A.1)

➔ En cas de nécessité, ajuster la valeur de « Field » (via le BSMS).

2.8. Enregistrement d'un spectre ^1H sur 1 scan avec un temps d'expérience (recyclage) inférieur à 1 s ($T_{\text{rec}} = 1$ s) puis phasage du spectre.

2.9. Réglage des bobines de « shims » pour homogénéiser le champ magnétique

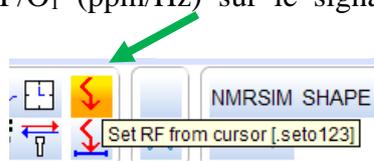
2.9.1. Rappel d'une fichier « shim » (Commande : RSH ***.shim)

2.9.2. Réglage manuel des bobines transversales (sans rotation de l'échantillon) et non transversales (en rotation) pour homogénéiser le champ (Mode « GS »)

2.9.3. Sauvegarde des « shims » avec la commande « wsh » (« write shims »)

2.10. Réglage automatique des « shims » avec l'utilisation du protocole « Topshim gui »

2.10.1. Détermination de l' O_1P/O_1 (ppm/Hz) sur le signal le plus intense (co-solvant organique)



2.10.2. Lancement de l'outil (commande « Topshim gui »)

2.10.3. Paramétrage de l'outil « Topshim gui » (cf. Figure A.3.a)

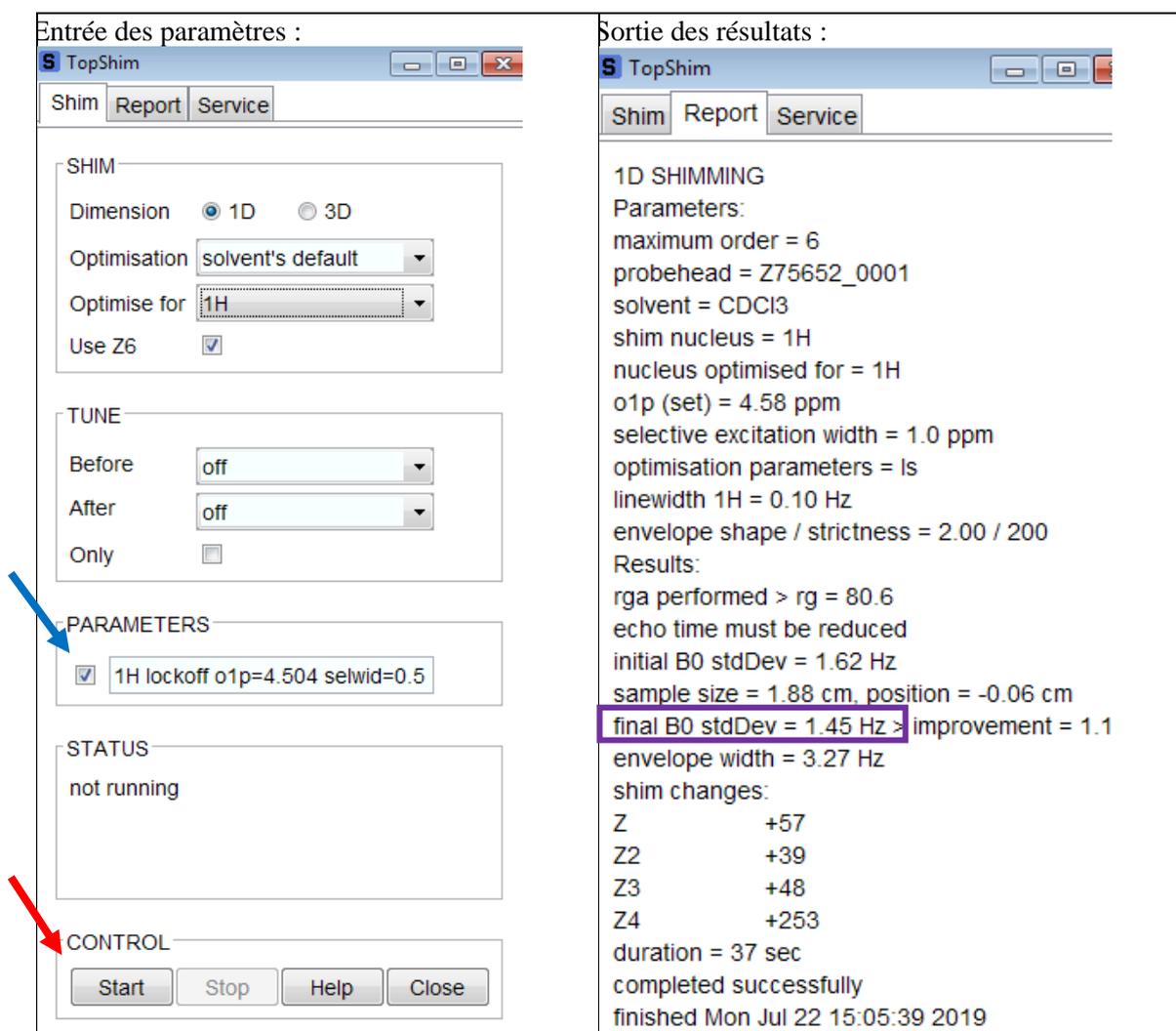


Figure A.3: Fenêtre de commande de l'outil « Topshim gui »: (a) à l'entrée des paramètres de l'opération; (b) Fenêtre de sortie des résultats obtenus selon les paramètres sélectionnés.

- ➔ Choix du noyau : (« Optimize for ») : ^1H (absence de verrouillage de champ sur le ^2H)
- ➔ Entrée des paramètres : $1\text{H lockoff o1p}=4,504 selwid=0,5 ordmax=6 rga$

2.10.4. Lancement de l'application : **Commande « Start »** (cf. **Figure A.3**).

NB: Le paramètre « selwid » peut être compris entre 0,5 et 1 et le paramètre « ordmax » entre 1 et 6.

NB: - Pour les échantillons les plus homogènes, une valeur de déviation standard de B_0 (« final B_0 stdDev ») peut atteindre 0,5 Hz (cf. **Figure A.3.b**).

- En cas de message d'erreur : « cannot perform getprosol » ➔ revérifier la cohérence du câblage physique et électronique entre la SGU et le préamplificateur, puis entre le préamplificateur et la sonde.

- En cas de message d'erreur : « Signal to noise too low » ➔ vérifier le positionnement de l' O_1P/O_1 .

Étape 3: Protocole pour enregistrer des expériences 1D/2D DAN (sans saturation sélective et sans NUS)

3.1. Vérification de la cohérence entre le câblage physique ^2H (au niveau du préamplificateur et de la sonde) et le câblage électronique (à partir des commandes « edasp » et « edasp setpreamp »)

3.2. Accord de la fréquence (Tuning) et de l'impédance (Matching) du canal ^2H de la crysonde sélective (« wobb »)

3.3. Gestion des paramètres d'expériences ^2H avec découplage

3.3.1. Préparation d'une expérience de type « zgdc »

- ➔ Sélection du type de découplage 1H de type CPD (« Waltz-16 ») avec une puissance comprise entre 0,5 et 2 W ($P_{90^\circ}(^1\text{H})/\text{CPD} = 100 \mu\text{s} / -3 \text{ dB} / 2 \text{ W}$)
- ➔ Introduction de l'O2P/O2 (égale à l'O1P du spectre ^1H)

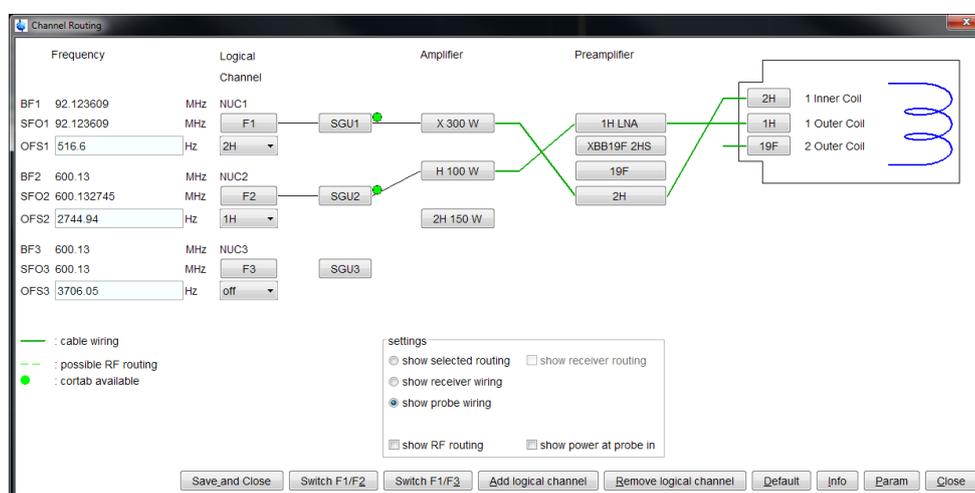


Figure A.4: Câblage électronique du spectromètre pour l'acquisition d'expérience ^2H découplé du ^1H . Le signal généré pour le noyau ^2H passe par l'amplificateur 300 W et le préamplificateur ^2H

3.4. Acquisition du spectre 1D ou 2D DAN découplé des protons

- Séquence RMN 1D (« zgdc »)
- Séquence d'inversion recouvrement (mesure de $T_1(^2\text{H})$)
- Détermination du délai d'impulsion ^2H à un angle de 90° avec ($P_{90^\circ}(^2\text{H}) = 20 \mu\text{s} / -15 \text{ dB} / 32 \text{ W}$)
- Séquence 2D QUOSY ('Q-COSY Fz', 'Q-résolue Fz', ...)



Figure A.5: Diagramme schématique de la séquence « zgdc »

NB: Si les composantes du doublet quadrupolaire ^2H du co-solvant sont larges et/ou dissymétriques, il est nécessaire de réitérer le protocole à partir de l'étape 1.6.

Etape 4: Protocole à appliquer pour enregistrer des expériences 1D/2D DAN avec saturation sélective du co-solvant organique

4.1. Détermination des paramètres spectraux du co-solvant

4.1.1. Détermination de la valeur d' O_1P/O_1 (ppm/Hz) (^2H) sur une des deux composantes du doublet quadrupolaire du co-solvant, afin de déterminer la fenêtre spectrale (SW) la plus petite possible (en fonction de la distribution des doublets quadrupolaires sur le spectre 1D) (cf. **Figure A.6**).

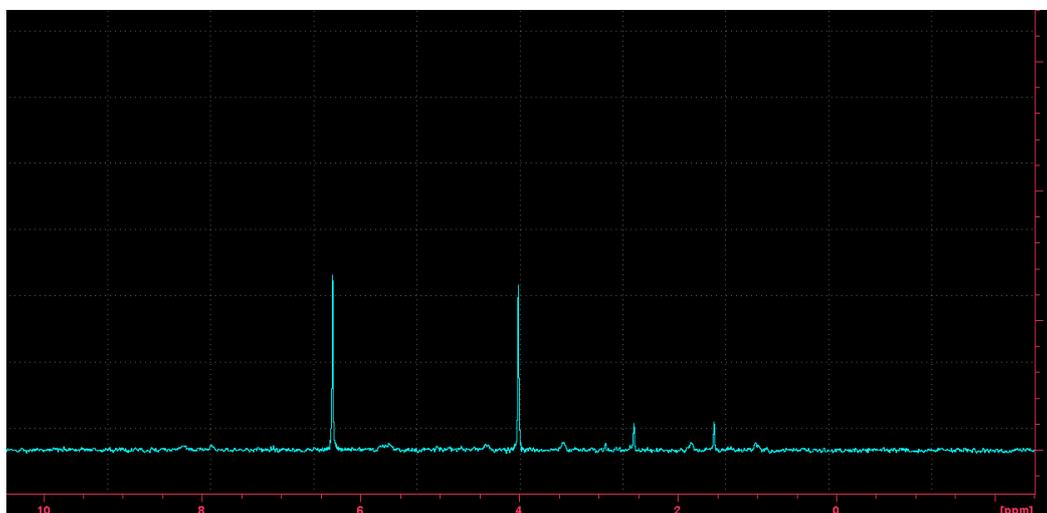


Figure A.6: Exemple de spectre ^2H - $\{^1\text{H}\}$ anisotrope avec la composante blindée du co-solvant centrée sur la valeur de O_1P . Le solvant utilisé ici est le dichlorométhane ($\delta(\text{CH}_2\text{Cl}_2) = 5.3$ ppm). La valeur de O_1P déterminée est égale à 3,351 ppm.

4.1.2. Mesure de l'éclatement quadrupolaire ^2H du co-solvant (cf. **Figure A.7**)

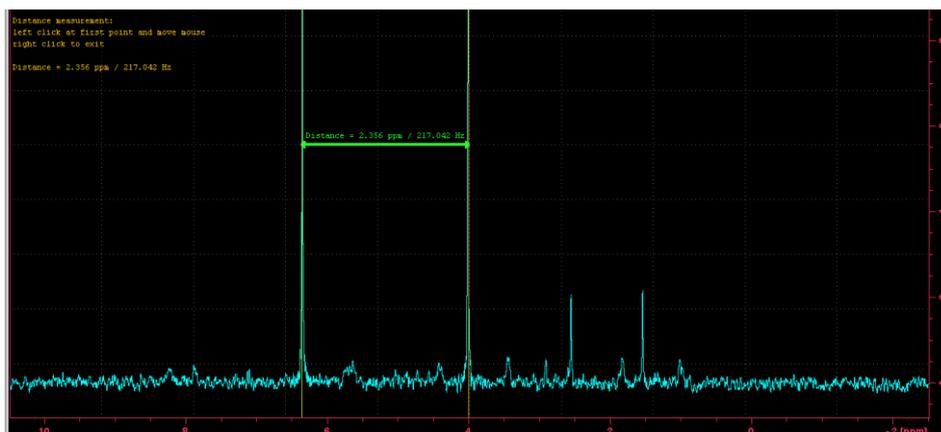


Figure A.7: Mesure de l'éclatement quadrupolaire sur le spectre 1D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ anisotrope avec la composante blindée du co-solvant centrée sur la valeur d' O_1P . Ici, la valeur mesurée est égale à 217,0 Hz. ($\text{P1} = 21 \mu\text{s}$, $\text{PLW1} = 32 \text{ W}$, $\text{PLdB1} = -15 \text{ dB}$, $\text{NS} = 32$). (Centre de la fenêtre spectrale)

4.2. Création de la première impulsion sélective sur une des deux composantes du DQ

4.2.1 Ouverture de l'outil « Shapetool » (cf. Figure A.8)

→ Commande « stdisp »



Figure A.8: Fenêtre initiale de l'outil « Shapetool » correspondant au spectre $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ étudié.

4.2.2. Création de la première impulsion sélective centrée sur O_1P

→ Sélection du type d'impulsion à partir des menus déroulants ("Shape" → "Classical shape" → "sinC") (cf. Figure A.9).

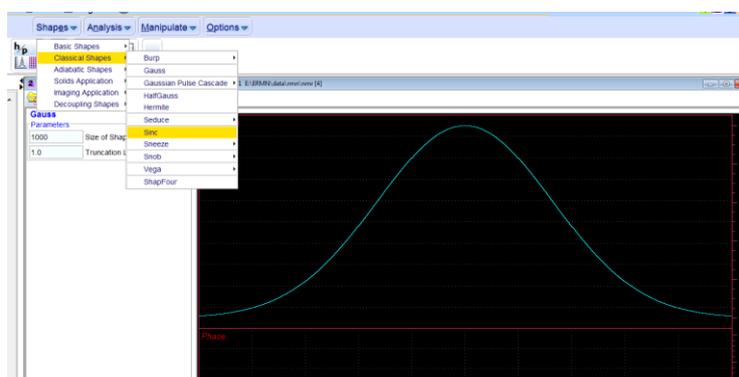


Figure A.9: Sélection du type d'impulsion dans l'outil « Shapetool ».

NB: Une impulsion de type « Sinus Cardinal » est choisie ici. L'intérêt d'un sinus cardinal par rapport à une impulsion de type gaussien est sa plus grande sélectivité spectrale pour le même temps d'impulsion (cf. **Figure A10**).

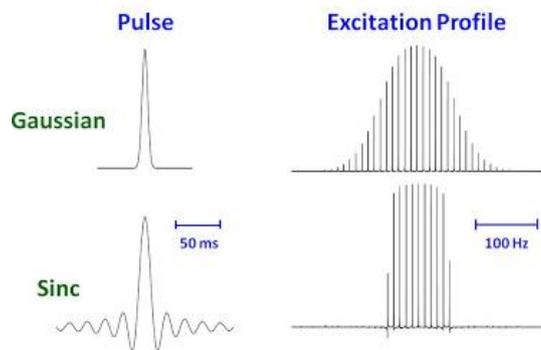


Figure A.10: Profile d'excitation d'impulsion sélective de type « Sinus Cardinal » (a) comparé à une d'impulsion sélective de type « Gaussien » (b).

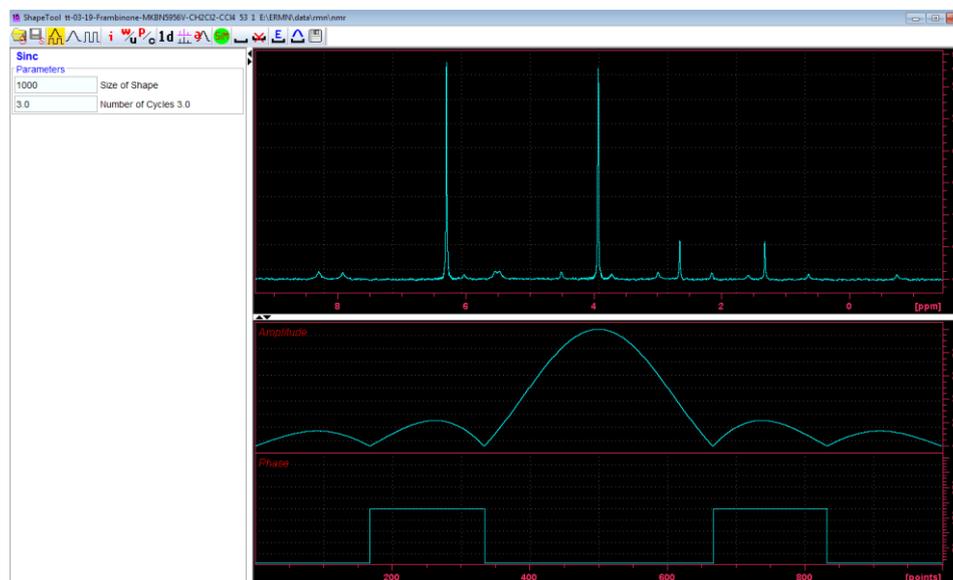


Figure A.11: Représentation de l'impulsion de type « Sinus Cardinal » dans l'outil « Shapetool ». L'affichage de cette fenêtre est automatique.

➔ Sélection de la durée d'impulsion sélective à partir des menus déroulants: ("Manipulate" → "Phase modulation acc. to Offset Freq.") (cf. **Figures A.12**)

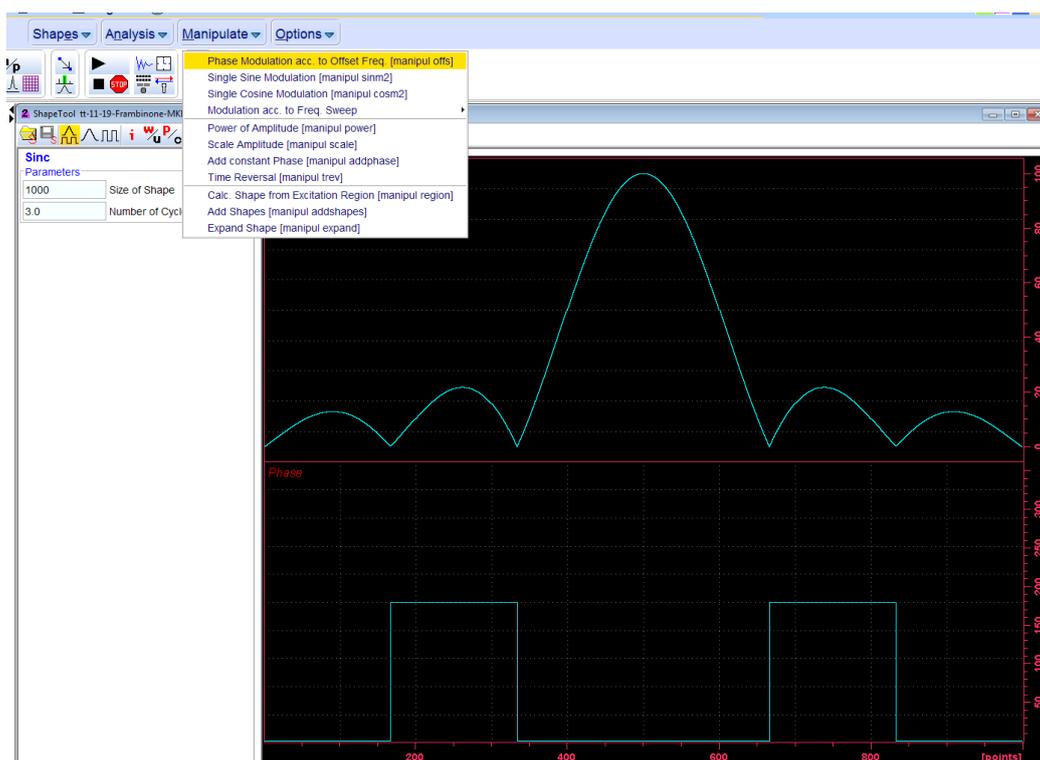


Figure A.12: Ouverture de la fenêtre de sélection de la durée de l'impulsion sélective.

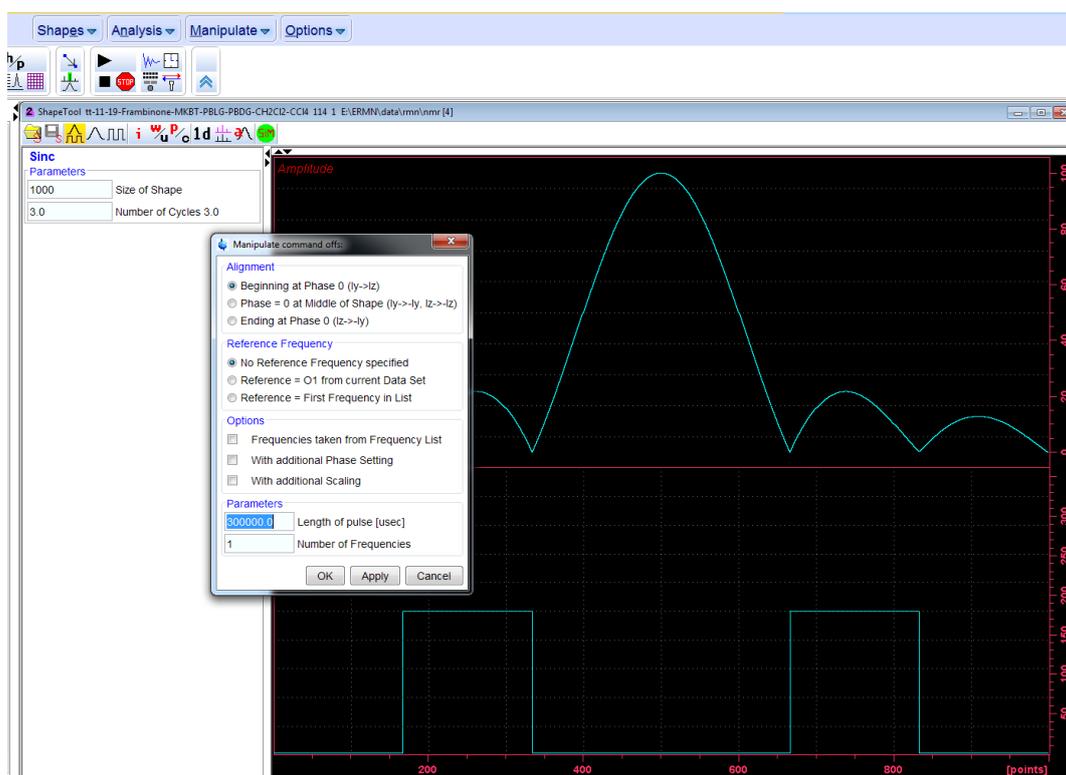


Figure A.13: Affichage de la fenêtre de sélection de la durée de l'impulsion sélective. La valeur choisie ici est de 300 ms (300 000 μ s). Cette valeur n'est pas figée et peut être réduite (gain de temps mais perte de sélectivité) en fonction de la proximité des signaux ^2H de l'analyte autour des deux composantes du doublet quadropolaire du co-solvant à éliminer.

➔ Introduction de la valeur de l'offset de l'impulsion sélective (Menu obtenu après « OK » / OK pour valider la valeur)

NB: La valeur du premier offset est égale à 0 (0 Hz) pour la première composante (la composante blindée ici, cf. **Figure A.11**). Par défaut, la fréquence de l'impulsion sélective est alignée sur la porteuse.

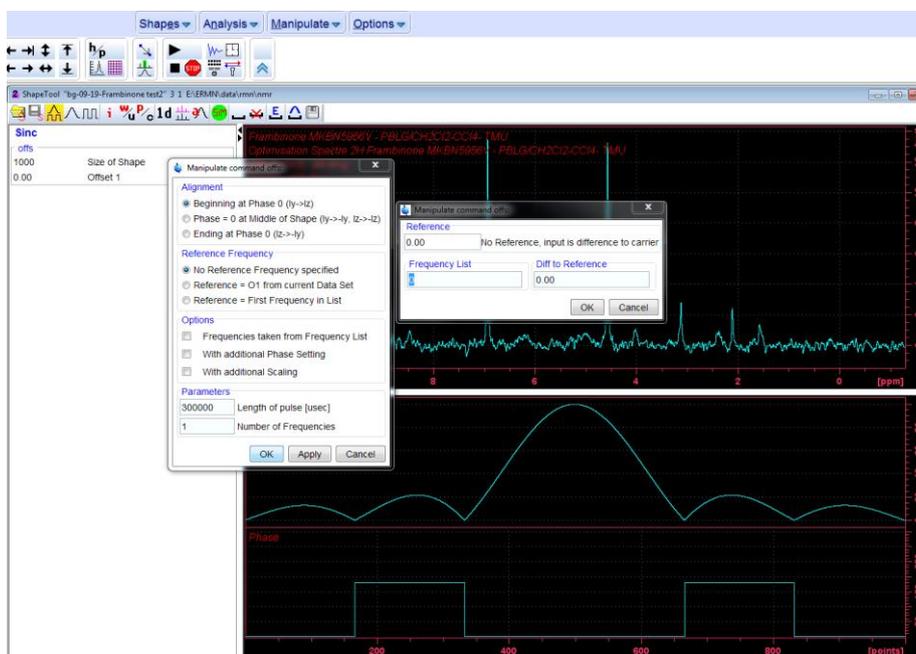


Figure A.14: Apparition de la fenêtre de l'offset de l'impulsion sélective dans l'outil « Shapetool ».

➔ Enregistrement de l'impulsion sélective ("Disquette" → "shape" en [tt-11-19-1](#))

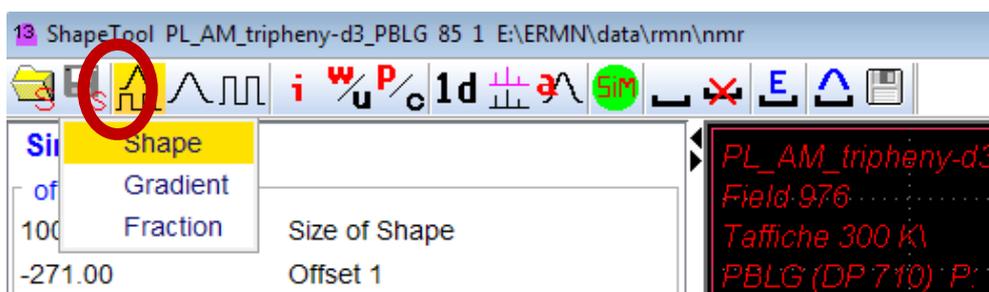


Figure A.15: Enregistrement de l'impulsion sélective sur l'onglet « Shape » pour l'option sauvegarde.

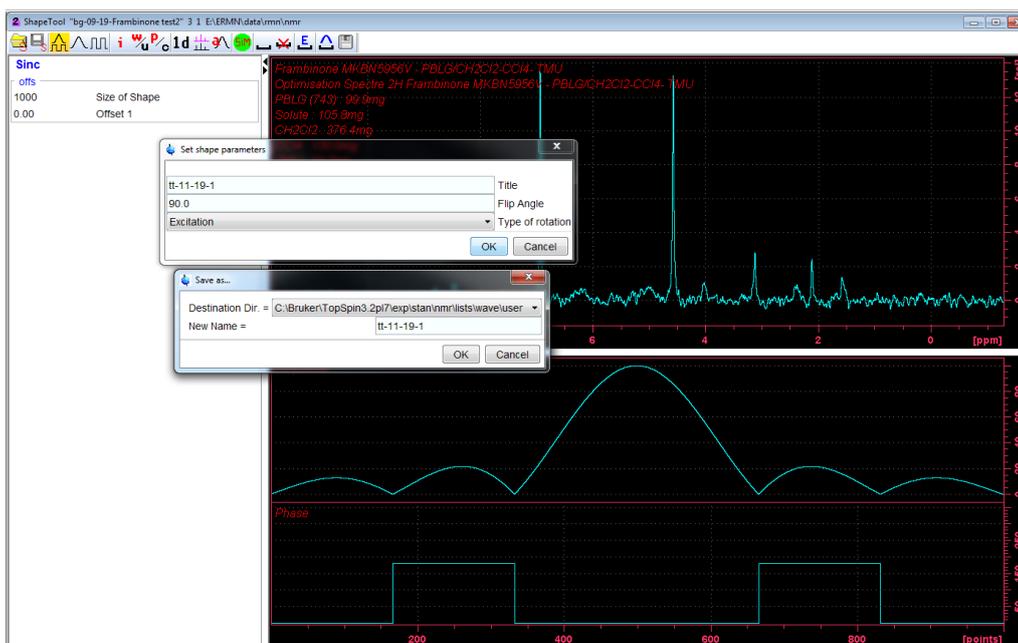


Figure A.16: Boîte de dialogue pour le choix du nom de l’impulsion sélective (ici « tt-11-19-1 ») et de son emplacement sur le disque dur. Validation via « OK »

4.2.3. Enregistrement d’une expérience 1D sélective ^2H « selzg / selzgd » centrée sur la valeur de l’ O_1P déterminé précédemment

- ➔ Ouverture d’un nouveau (via la commande « edc »)
- ➔ Remplacement de l’expérience « zgdc » par « selzg » ou « selzgd » (eda, puis recherche dans ... lists/pp/user ou ... lists/pp)
- ➔ Accès aux paramètres d’acquisition ("ased") (cf. **Figure A.17**)
- ➔ Introduire la valeur de O_1P (déterminée précédemment) dans O_1 [Hz/ppm]
- ➔ Introduire le nom de la première impulsion sélective (« tt-11-19-1 »)
- ➔ Vérification des paramètres (P11 et SPW1, SPdB1, ...). Si des paramètres ne sont pas affectés, alors une introduction manuelle est nécessaire (cf. **Figure A.17**). Pour commencer, il est préférable d’utiliser une impulsion sélective de faible puissance (par exemple : SPdB1 = 60 dB).
- ➔ Lancement de l’expérience sur 1 scan après vérification des puissances.

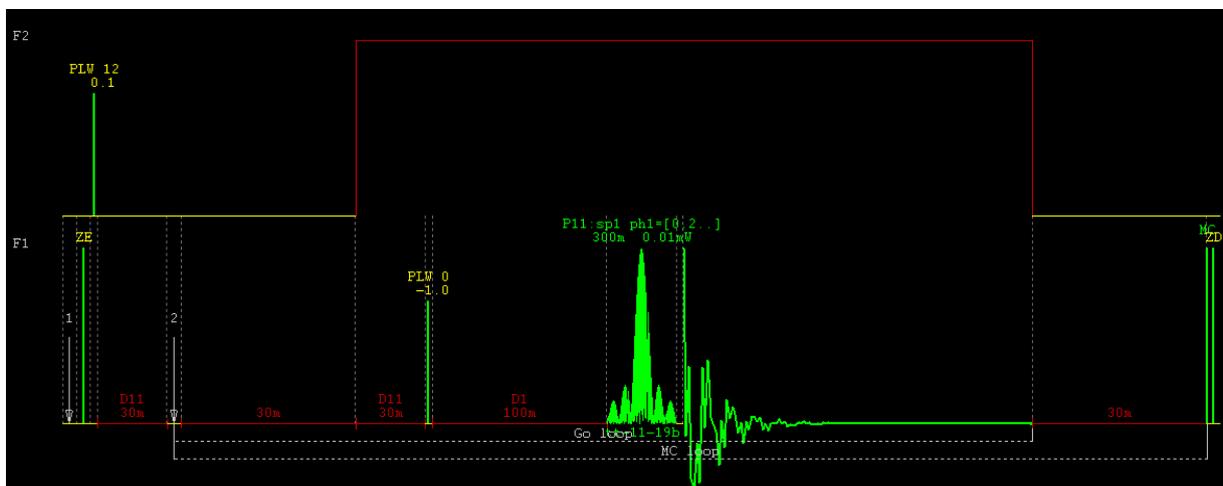


Figure A.17: Diagramme schématique de la séquence « selzgd »

NB: Le programme d'impulsion de l'expérience « **selzgd** » est présenté en Annexe D.

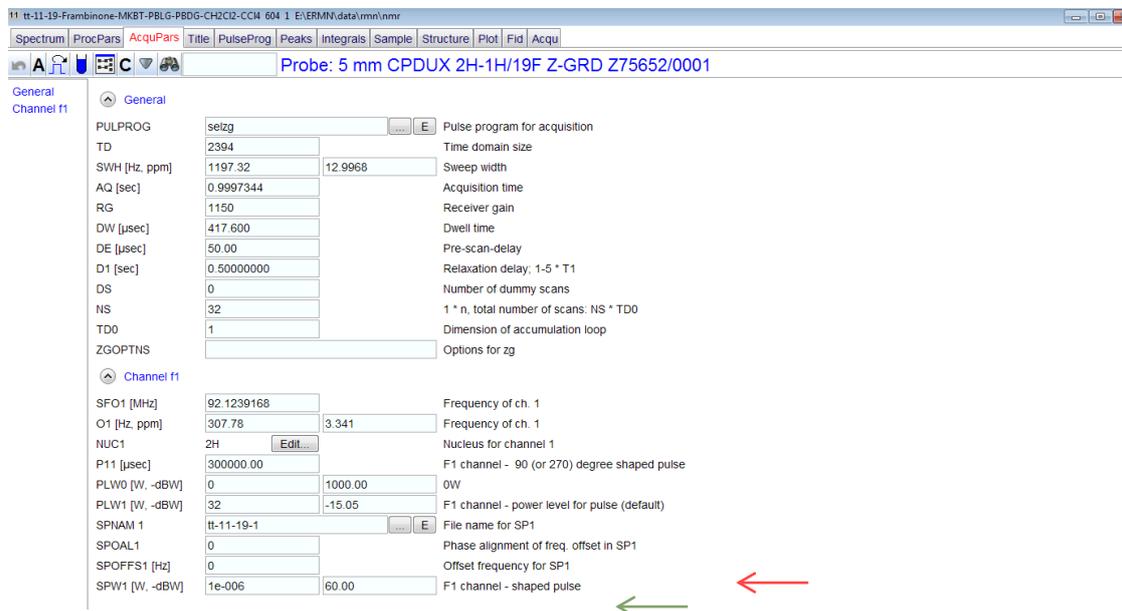


Figure A.18: Sélection des paramètres d'acquisition de la séquence « **selzg** ». La valeur de O_1P utilisée est égale à 3,351 ppm (cf. **Figure A.6**). Le nom de l'impulsion sélective (ici « **tt-11-19-1** ») est surligné en bleu. Noter à ce stade qu'une impulsion sélective de faible puissance SPdB1 = 60 dB est utilisée (valeur non optimisée).



Figure A.19: Spectre 1D DAN sélectif (expérience « **selzg** ») montrant uniquement la composante (blindée) du DQ du co-solvant de l'échantillon centrée sur O_1P ($P_{11} = 300$ ms, SPdB1 = 60 dB, SPNAM1 = tt-11-19-1, NS = 32). Le dédoublement observé est associé au couplage dipolaire résiduel $^2H-^1H$ ($D_{HD} = 5$ Hz). La valeur SPdB1 utilisée (60 dB) ici n'est pas forcément optimale (cf. Para. 4.6).

NB: Lorsque le co-solvant organique présente deux positions hydrogénées (comme pour le dichlorométhane), il est préférable d'utiliser une séquence impulsion sélective 1D (« **selzg** ») complétée d'un découplage proton (« **selzgd** »), afin éliminer le couplage total, T_{HD} .

NB: Si des signaux du soluté apparaissent (composé enrichi en 2H ou en abondance naturelle), retour à l'étape 4.2.2., en choisissant une durée d'impulsion plus longue (donc plus sélective) si nécessaire.

4.3. Création de la seconde impulsion sélective non centrée sur O_1

4.3.1. Reprendre les étapes de 4.2.1 à 4.2.2 à partir d'un nouveau répertoire provenant d'un répertoire contenant l'expérience zgdc (commande « edc »)

- ➔ Type de l'impulsion : Sinus Cardinal (« stdisp »)
- ➔ Choix de la durée : (comprise entre 50 et 400 ms) identique à la première impulsion
- ➔ Application de l'offset par rapport à O_1P/O_1 (correspondante à la valeur de l'éclatement quadrupolaire, ici 217 Hz)

NB: Si la seconde composante est déblindée par rapport la composante de référence « centrée sur O_1P », la valeur (« Frequency List ») sera positive. Elle sera négative, si la composante est blindée par rapport à celle de référence.

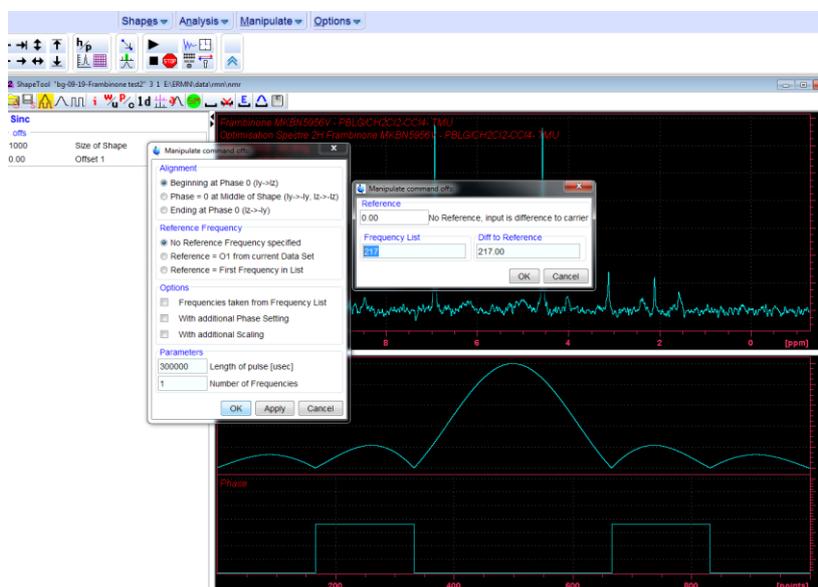


Figure A.20: Introduction de l'offset de la seconde impulsion sélective dans l'outil « Shapetool » puis « OK » pour valider. La valeur de offset introduite est de 217 Hz (cf. Figure A.7).

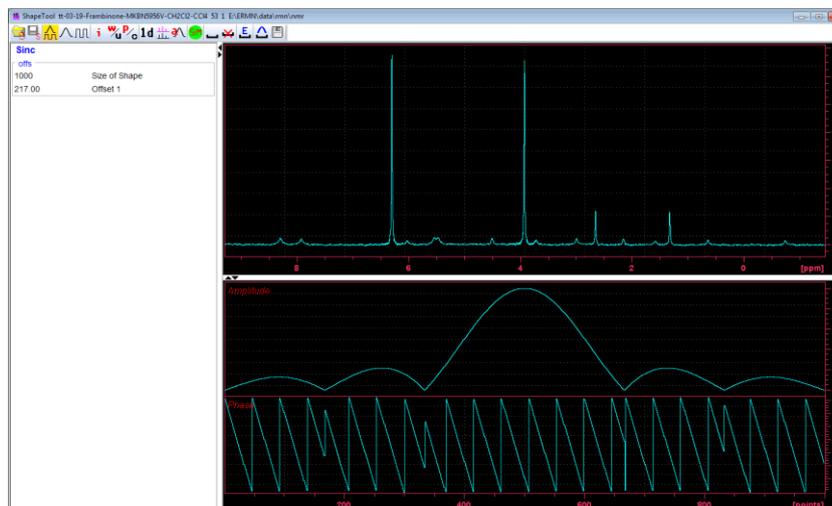


Figure A.21: Construction de la seconde impulsion sélective dans l'outil « Shapetool ». Noter la modification de la phase de l'impulsion comparée celle observé sur la Figure A.13.

→ Enregistrement de l'impulsion sélective avec le nom « tt-11-19-2 » 

4.3.2. Enregistrement d'une nouvelle expérience 1D ^2H « selzg » pour observer la seconde composante (la déblindée dans cet exemple), le spectre étant toujours centré sur l'O₁P/O₁ déterminé précédemment

- Permet de vérifier la valeur d'offset introduite (217 Hz)
- Introduire le nom de la seconde impulsion sélective (« tt-11-19-2 »)
- Lancement « zg »

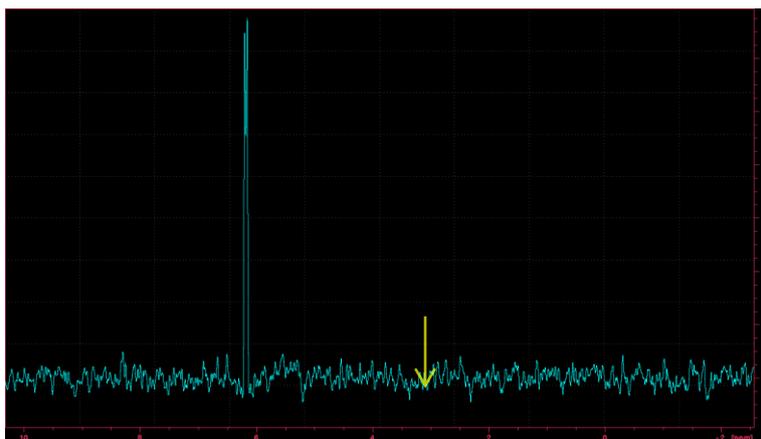


Figure A.22: Spectre 1D DAN sélectif (expérience 1D « selzg ») centrée sur O₁P (3,351 ppm) et montrant uniquement la composante (déblindée) du DQ du co-solvant de l'échantillon ($P_{11} = 300$ ms, $SPdB_1 = 60$ dB, $SPNAM1 = tt-11-19-2$, $NS = 32$).

4.4. Construction de la double impulsion sélective avec l'outil « Add Shape »

→ Retour sur le répertoire contenant le spectre 1D DAN- $\{^1\text{H}\}$ (hard pulse)

4.4.1. Ouverture du module « Add Shape » dans l'outil « Shapetool » (« stdisp »)

→ Addition des deux impulsions sélectives précédemment définies à partir des menus déroulants: ("Manipulate" -> "Add shape pulse") (cf. Figure A.23)



Figure A.23: Ouverture de la boîte de dialogue « Add Pulse » dans l'outil « Shapetool ».

- ➔ Sélection de « tt-11-19-1 » dans la boîte de dialogue
- ➔ Sélection de « tt-11-19-2 » dans la boîte de dialogue
- ➔ « OK » pour valider

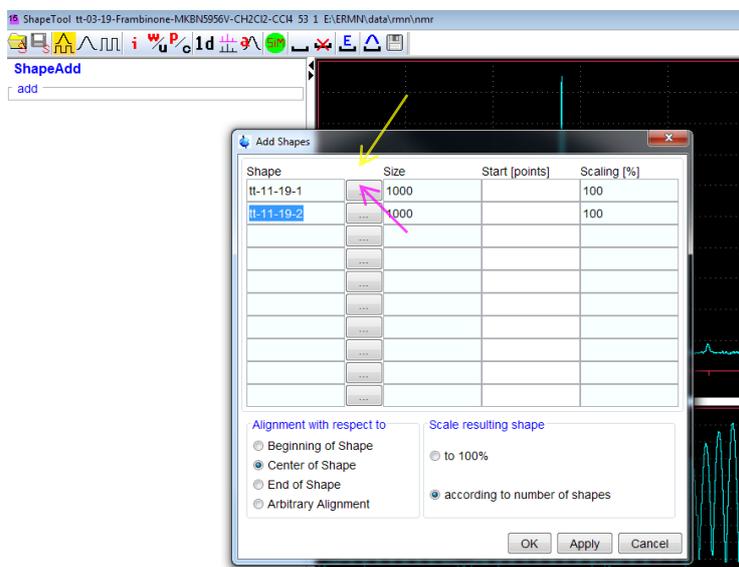


Figure A.24: Construction de la double impulsion sélective dans l’outil « Shapetool ».

4.4.2. Affichage de la double impulsion sélective utilisant les dans les conditions des deux impulsions sélectives définies précédemment, soient « tt-11-19-1 » et « tt-11-19-2 » (cf. Figure A.25)

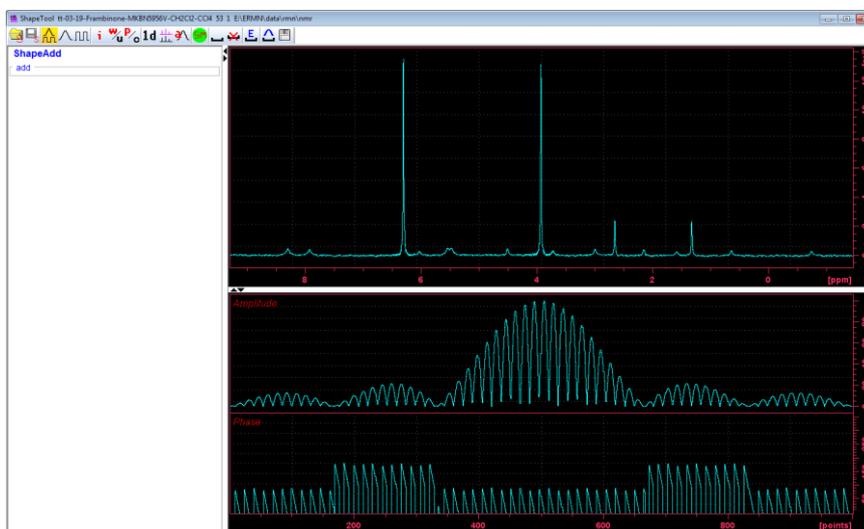


Figure A.25: Représentation de la double impulsion sélective à partir de l’outil « Shapetool ». Noter la modification de la forme et de la phase de l’impulsion comparée celle observée sur la Figure A.12 ou A.18.

4.4.3. Enregistrement de la double impulsion sélective avec le nom « tt-11-19 »

4.5. Test de la saturation (imparfaite) des deux composantes du doublet quadrupolaire avec la séquence 1D sélective « selzg » centrée sur l’O₁P déterminée sous l’action de la double impulsion sélective à faible puissance (60 dB)

- Création d'un nouveau répertoire à partir du répertoire contenant une expérience 1D sélective ^2H (commande « edc »)
- Introduire dans « SPNAM1 » (Menu « ASED») le nom de la double impulsion sélective.
- Enregistrement du spectre (NS =32)
- Phasage positive des composantes du DQ (cf. **Figure A.26**)

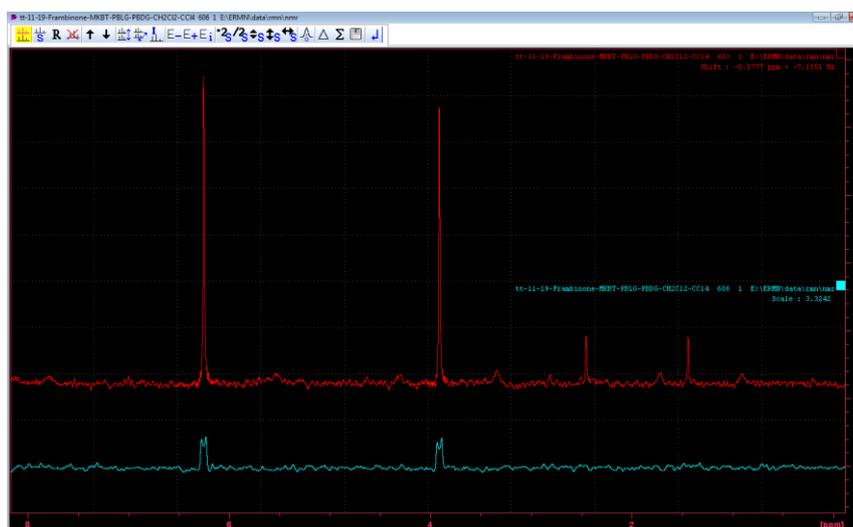


Figure A.26: Spectre 1D DAN sélectif (expérience 1D « selzg ») centrée sur O₁P (3.351 ppm) utilisant la double impulsion sélective à faible puissance (60 dB) (P11 = 300 ms, SPdB1 = 60 dB, SPNAM1 = tt-11-19, NS =32) comparé au spectre 1D DAN-{¹H} (« zgdc ») de la **Figure A.5**.

4.6. Optimisation des puissances d'atténuation nécessaire pour obtenir des impulsions sélectives de 90° et de 270°

4.6.1. Création d'un nouveau répertoire à partir du répertoire contenant l'expérience 1D ^2H double sélective (« commande « edc »)

4.6.2. Ouverture de l'outil « popt » (« parameters optimization »)

- Choix du paramètre à faire évoluer : **SPdB1**
- Choix des bornes (« STARVAL » / « ENDVAL ») : par exemple : **60 dB à 20 dB**
- Valeur de l'incrémentation (« INC ») : **-1dB**
- Lancement du programme (« start optimize »)

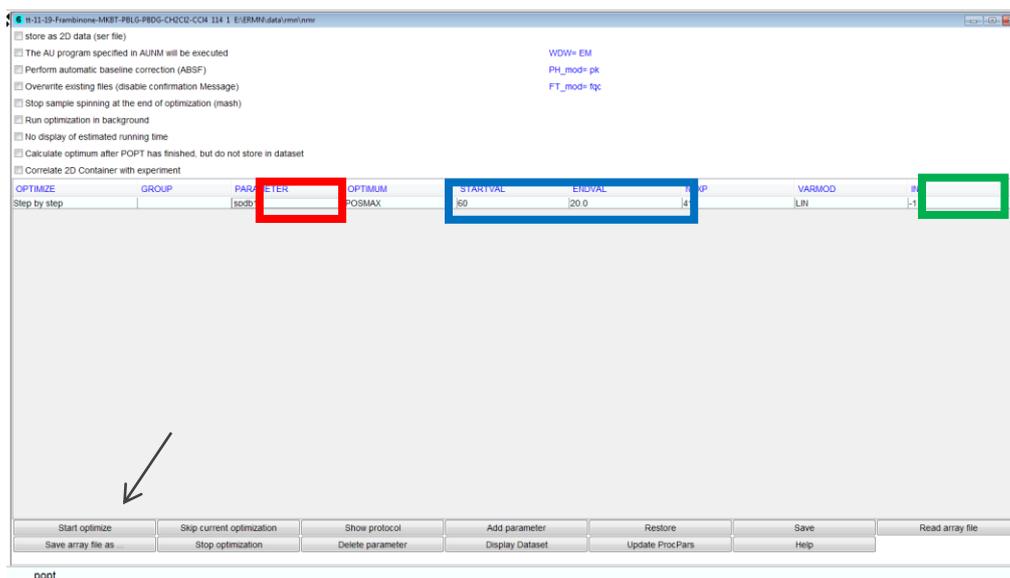


Figure A.27: Fenêtre de paramétrage de l'outil « popt » (« parameters optimization »).

- ➔ Mesure de l'angle 90° : **Amplitude maximale de phase positive**
- ➔ Mesure de l'angle 270° : **Amplitude maximale de phase négative**

Dans l'exemple de la **Figure A.28**, l'intensité maximale de phase positive du signal ^2H correspond à l'impulsion sélective de 90° (obtenue pour une valeur de $\text{SPdB}_1(90^\circ) = 49 \text{ dB}$). L'intensité maximale de phase négative du signal ^2H correspond à l'impulsion sélective de 270° (obtenue pour une valeur de $\text{SPdB}_2(270^\circ) = 37 \text{ dB}$).

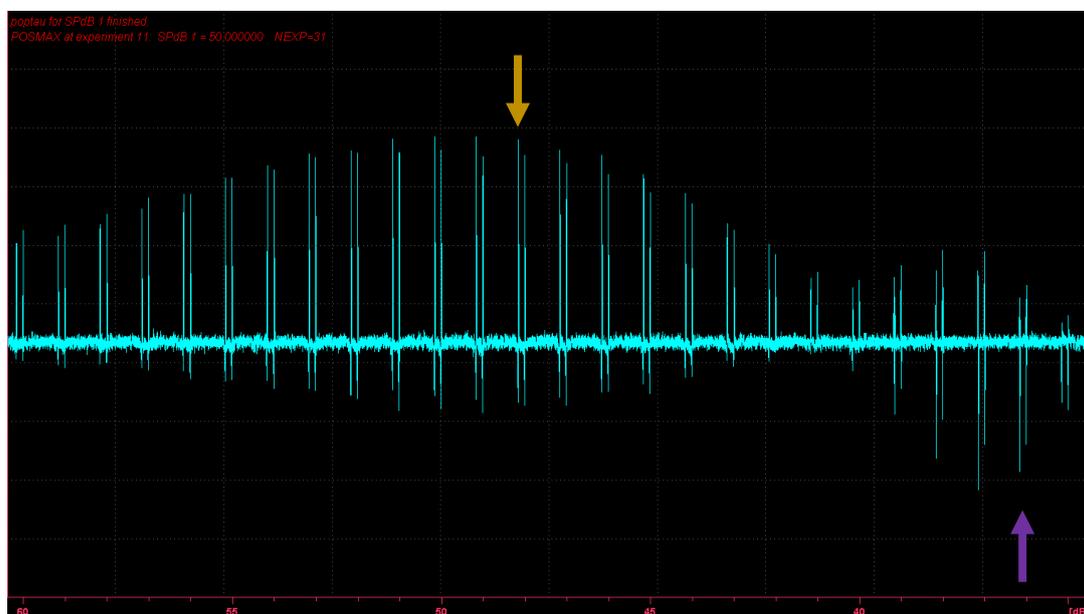


Figure A.28: Visualisation de la succession d'expériences 1D (« selzg / selzgd ») obtenu *via* l'outil « popt » pour déterminer la puissance des impulsions sélective de 90° et 270°

4.7. Préparation d'une expérience 1D excitation–acquisition ^2H - $\{^1\text{H}\}$ avec saturation sélective de type BIS-WET du signal du solvant organique

La séquence BIS-WET comprend deux séries de quatre impulsions sélectives variant autour d'une valeur centrale : i) quatre impulsions centrées autour de 90° (SP7, SP8, SP9, SP10) pour les scans impairs; ii) quatre impulsions à 270° (SP11, SP12, SP13, SP14) pour les scans pairs. Une variation des angles d'impulsions est appliquée en modifiant légèrement la puissance des impulsions (en dB), soit : SP7, = 49 dB + **0.87 dB** ; SP8 = 49 dB - **1.04 dB**; SP9 = 49 dB + **2.27 dB**; SP10 = 49 dB - **5.05 dB** et SP11, = 37 dB + **0.87 dB**; SP12 = 37 dB - **1.04 dB**; SP13 = **37 dB** + **2.27 dB**; SP14 = **37 dB** - **5.05 dB** (cf. Figure A.31b,c).

NB: Les variations appliquées ci-dessus sont standards, elles peuvent être modifiées légèrement de façon séquentielle (SP7, puis SP8, puis SP9, ..., SP14) pour optimiser l'effet de l'impulsions.

4.7.1 Création d'un nouveau répertoire à partir du répertoire contenant l'expérience 1D 2H double sélective (commande « edc »)

4.7.2 Chargement du programme « zg-doublewet-dc » (eda -> PULPROG)

NB: Le programme d'impulsion de la séquence « **zg-doublewet-dc** » est présenté en Annexe E.

4.7.3. Paramétrage de la séquence 1D (ici PULPROG: « **zg-doublewet-dc** ») / outil « eda »

➔ Vérification des valeurs d'O₁P, P1, PLW₁, PLW₂, PCPD2, SW, RG,

➔ Introduction de P10, P11, P30 et INP10 (cf. Figures A.31a,b,c)

NB: Les variables P30 et INP10 sont utilisées pour gérer la boucle dans le programme (Q-resolved MQ_MC2017-Bis-WET). Elles permettant d'appliquer alternativement une série de 4 impulsions sélectives centrées autour 90° (scan impair), puis une série de quatre impulsions sélectives de 270° (scan pair). La valeurs de P30 doit être égale à la valeur de P10,11 = 300 ms (valeurs choisies par l'utilisateur) et INP10 doit être une valeur non nulle (exemple INP10 = 1000 μ s).

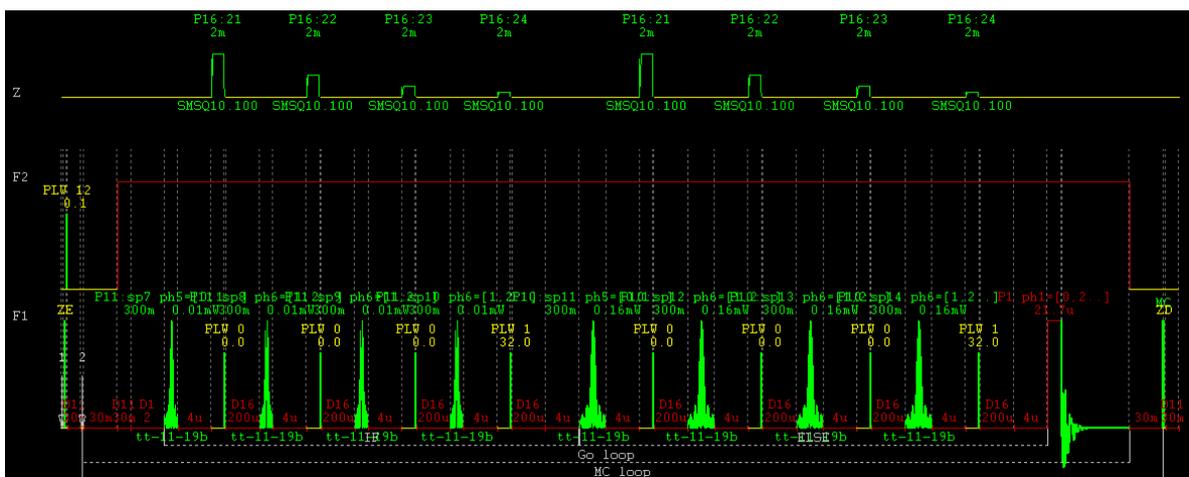


Figure A.29: Diagramme schématique de la séquence « **zg-doublewet-dc** »

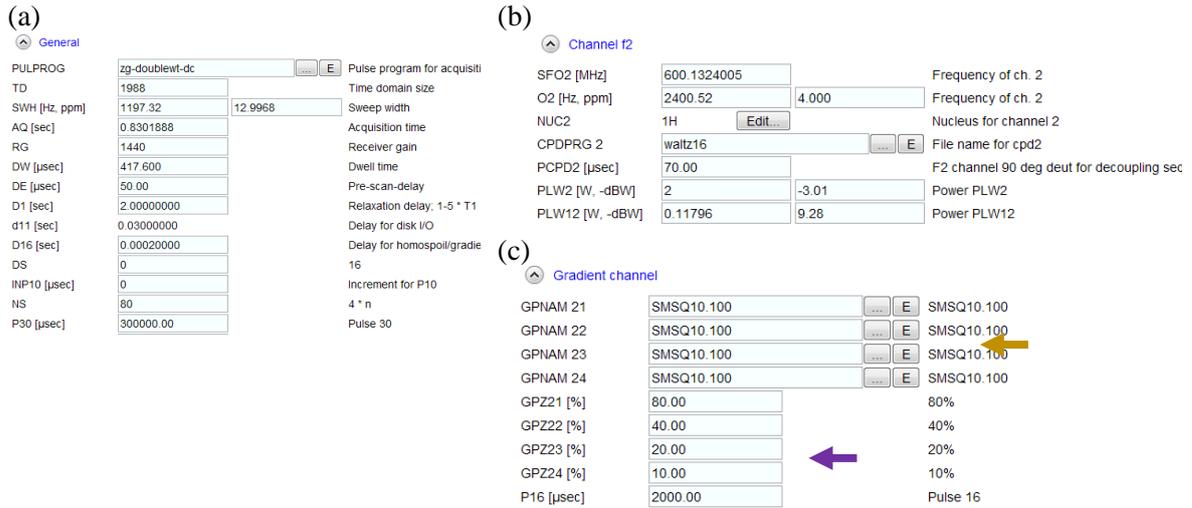
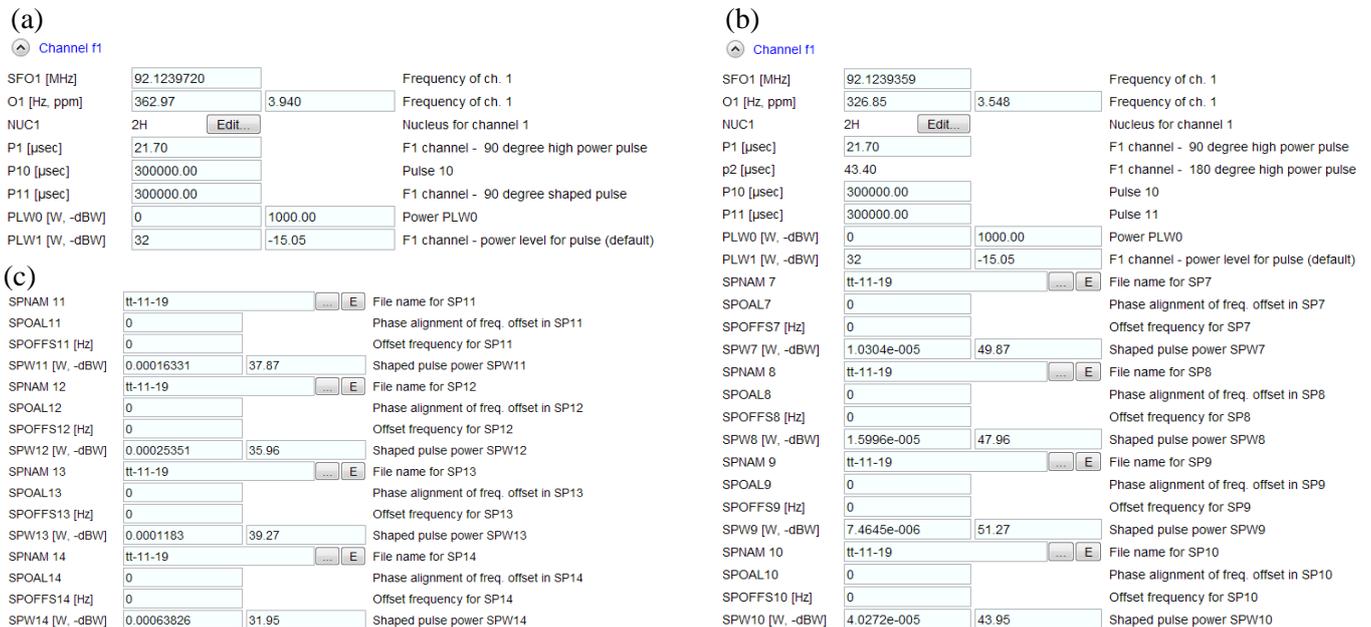


Figure A.30: Exemples de valeurs pour la séquence 1D choisie (« zg-doublewet-dc »), incluant la valeur de la variable P30 et INP10. (a) Visuel sur les paramètres généraux (« General »); (b) Visuel sur les paramètres de découplage (« Channel f2 »); (c) Visuel sur les paramètres de gradient (« Gradient channel ») associés à la séquence WET (GPNAM21,22,23,24 (ici SMSQ10.100) et GPZ21,22,23,24 [%] = 80, 40, 20, 10).

4.7.4. Paramétrage de la double impulsion sélective dans la séquence BIS-WET, nommée précédemment « tt-11-19 »

- ➔ SPNAM7,8,9,10 : « tt-11-19 » et SPNAM11,12,13,14 : « tt-11-19 »
- ➔ Valeurs de P10 et de P11 (P10 = P11 = 300 ms)
- ➔ Valeur de P30 (P30 = P10,11 = 300 ms)
- ➔ Valeurs de SPOAL7,8,9,10 = SPOAL11,12,13,14 = 0
- ➔ Valeurs de SPDB7,8,9,10 (Angle de 90°) = 49 dB (SPdB1) avec les modifications d'angles (cf. Figure A.31b)
- ➔ Valeurs de SPDB11,12,13,14 (Angle de 270°) = 37 dB (SPdB2) avec les modifications d'angles (cf. Figure A.31c)
- ➔ Valeurs de GPNAM21,22,23,24 : « SMSQ10.100 » (SMooth Square, 10 pts, 100 pts)
- ➔ Valeurs de GPZ21,22,23,24 [%] = 80, 40, 20, 10



NB: Le programme d'impulsion de l'expérience « **Q-resolved MQ_MC2017-Bis-WET** » est présenté en Annexe G.

- Introduction des valeurs d'O₁P, P1, P2, PLW₁, PLW₂, SW₁, SW₂, PCPD2, PLW12, RG, IN..
- Introduction de P10, P11, P30 et INP10 (cf. **Figures A.34a,b,c**)
- Valeur de P16 = 2 ms (« Filtre gradient-z »)

NB: Comme pour l'expérience 1D ²H-¹H} avec saturation doublement sélective, les variables P30 et INP10 sont utilisées pour gérer la boucle dans le programme (**zg-doublewet-dc**).

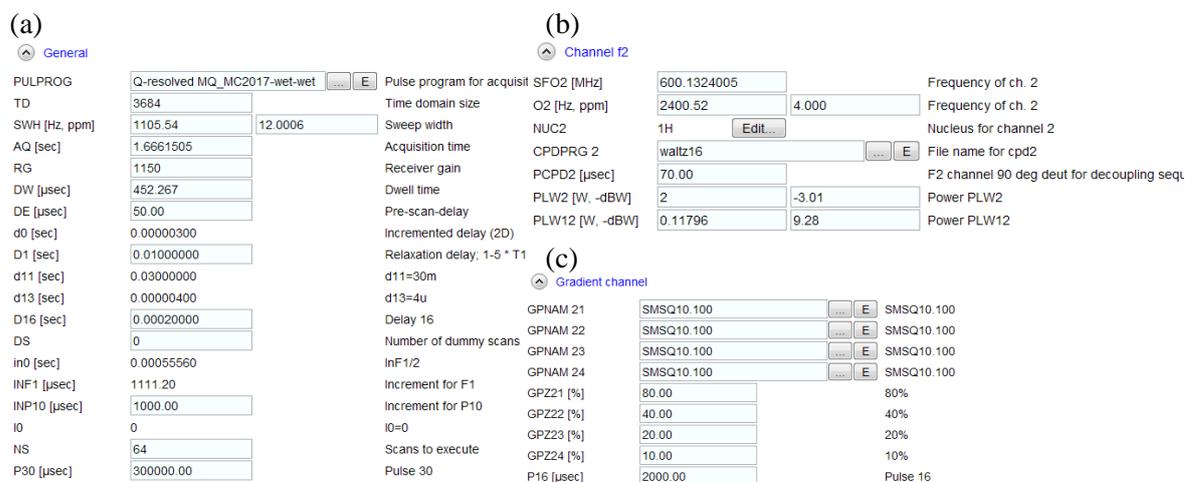


Figure A.34: Exemples de valeurs pour la séquence QUOSY choisie (**Q-résolue MQ Bis-WET**), incluant la valeur de la variable P30 et INP10. (a) Visuel sur les paramètres généraux (« General »); (b) Visuel sur les paramètres de découplage (« Channel f2 »); (c) Visuel sur les paramètres de gradient (« Gradient channel ») associés à la séquence WET (GPNAM21,22,23,24 (ici SMSQ10.100) et GPZ21,22,23,24 [%] = 80, 40, 20, 10) et du filtre gradient-z (P₁₆).

4.8.4. Paramétrage de la double impulsion sélective dans la séquence BIS-WET, nommée précédemment « **tt-11-19** »

- SPNAM7,8,9,10 : « **tt-11-19** » et SPNAM11,12,13,14 : « **tt-11-19** »
- Valeurs de P10 et de P11 (P10 = P11 = 300 ms)
- Valeur de P30 (P30 = P10,11 = 300 ms)
- Valeurs de SPOAL7,8,9,10 = SPOAL11,12,13,14 = 0
- Valeurs de SPDB7,8,9,10 (Angle de 90°) = 49 dB (SPdB1) avec les modifications d'angles (cf. **Figure A.35b**)
- Valeurs de SPDB11,12,13,14 (Angle de 270°) = 37 dB (SPdB2) avec les modifications d'angles (cf. **Figure A.35c**)
- Valeurs de GPNAM21,22,23,24 : « SMSQ10.100 » (SMooth Square, 10 pts, 100 pts)
- Valeurs de GPZ21,22,23,24 [%] = 80, 40, 20, 10

NB: A priori, comme le répertoire de l'expérience 2D DAN-¹H est issu du répertoire contenant l'expérience 1D DAN « zg-doublewet-dc », l'ensemble des paramètres associés à la séquence de saturation BIS-WET est déjà chargé.

(a)

Channel f1

SFO1 [MHz]	92.1239359	Frequency of ch. 1	
O1 [Hz, ppm]	326.85	3.548	Frequency of ch. 1
NUC1	2H	Nucleus for channel 1	
P1 [μsec]	21.70	F1 channel - 90 degree high power pulse	
p2 [μsec]	43.40	F1 channel - 180 degree high power pulse	
P10 [μsec]	300000.00	Pulse 10	
P11 [μsec]	300000.00	Pulse 11	
PLW0 [W, -dBW]	0	1000.00	Power PLW0
PLW1 [W, -dBW]	32	-15.05	F1 channel - power level for pulse (default)

(b)

Channel f1

SFO1 [MHz]	92.1239359	Frequency of ch. 1	
O1 [Hz, ppm]	326.85	3.548	Frequency of ch. 1
NUC1	2H	Nucleus for channel 1	
P1 [μsec]	21.70	F1 channel - 90 degree high power pulse	
p2 [μsec]	43.40	F1 channel - 180 degree high power pulse	
P10 [μsec]	300000.00	Pulse 10	
P11 [μsec]	300000.00	Pulse 11	
PLW0 [W, -dBW]	0	1000.00	Power PLW0
PLW1 [W, -dBW]	32	-15.05	F1 channel - power level for pulse (default)

(c)

SPNAM 11	tt-11-19	File name for SP11	
SPOAL11	0	Phase alignment of freq. offset in SP11	
SPOFFS11 [Hz]	0	Offset frequency for SP11	
SPW11 [W, -dBW]	0.00016331	37.87	Shaped pulse power SPW11
SPNAM 12	tt-11-19	File name for SP12	
SPOAL12	0	Phase alignment of freq. offset in SP12	
SPOFFS12 [Hz]	0	Offset frequency for SP12	
SPW12 [W, -dBW]	0.00025351	35.96	Shaped pulse power SPW12
SPNAM 13	tt-11-19	File name for SP13	
SPOAL13	0	Phase alignment of freq. offset in SP13	
SPOFFS13 [Hz]	0	Offset frequency for SP13	
SPW13 [W, -dBW]	0.0001183	39.27	Shaped pulse power SPW13
SPNAM 14	tt-11-19	File name for SP14	
SPOAL14	0	Phase alignment of freq. offset in SP14	
SPOFFS14 [Hz]	0	Offset frequency for SP14	
SPW14 [W, -dBW]	0.00063826	31.95	Shaped pulse power SPW14

Figure A.35: Exemples de valeurs utilisées pour les impulsions ²H (visuel « Channel f1 ») pour : (a) le paramétrage des impulsions dures, (b et c) et le paramétrage des impulsions sélectives de séquence BIS-WET.

4.8.5. Lancement de la séquence 2D via la commande « zg »

4.8.6. Traitement des expériences 2D

4.8.6.1. Contrôle de la dérive temporelle du champ B₀ et/ou de l'évolution de l'échantillon dans la dimension t₁

- ➔ Commande « xf2 »
- ➔ Si nécessaire, re-paramétriser le nombre de points expérimentaux effectifs à utiliser pour la TF en dimension F₁ (« tdeff » avec tdeff₁ < TD₁)

4.8.6.2. Choix des paramètres de traitement de l'expérience 2D (via la commande « edp »)

- ➔ Choix du nombre de points de données traités (SI₁, SI₂)
- ➔ Choix de type de filtrage en dimension t₂ et t₁
- ➔ Choix de type de TF (States ou TPPI)
- ➔ Choix du type de phasage : mode « no », « pk », « mc » ou « ps »

4.8.6.3. Double transformation de Fourier du spectre temporel

- ➔ Commande « xfb »

4.8.6.4. Manipulation du spectre 2D

- ➔ Correction de la ligne de base (« abs2 » puis « abs1 »)

- Phasage de la carte 2D
- Procédure de symétrisation (« syma »), puis de basculement à 45° (« tilt ») (cas des expériences de type 'Q-COSY')
- Procédure de basculement à 45° (« tilt »), puis de symétrisation (« symj ») (cas des expériences de type 'Q-résolue')
- Calibration des déplacements chimiques en dimension F₁ /F₂ (ppm / Hz) du spectre 2D

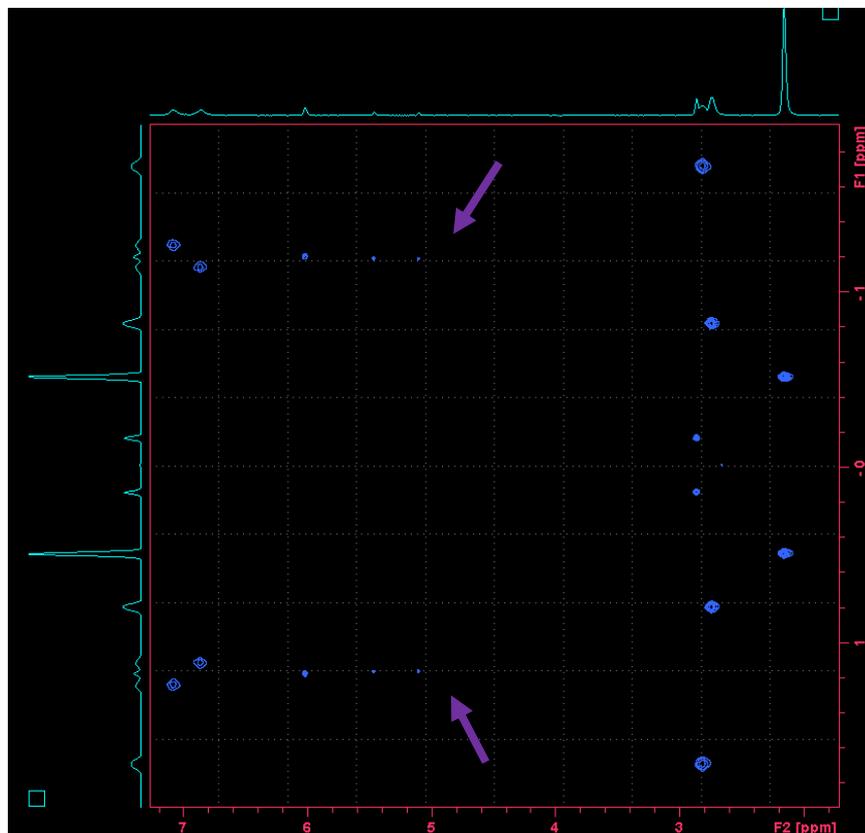


Figure A.36: Spectre 2D *Q*-résolué MQ_MC2017-Bis-WET DAN-¹H} montrant la saturation du signal DAN du co-solvant. Après la double TF, le spectre 2D est symétrisé et tilté. Notez la disparition du signal du co-solvant. Les satellites ¹³C au pied du co-solvant sont visibles (¹T_{CH} = 33 Hz). Le spectre est enregistré avec TD₂ = 3700, TD₁ = 400, NS = 256, T_{exp} = 21 h.

Étape 5: Protocole à appliquer pour enregistrer des expériences 2D DAN combinant une saturation sélective du co-solvant organique et un échantillonnage non-uniforme (NUS)

5.1. Application du protocole « saturation sélective » présenté dans l'étape 4 si nécessaire.

5.2. Paramétrage de la fonction d'échantillonnage non linéaire (« NUS »)

5.2.1. Ouverture du visuel via l'outil « EDA »

- Choix du type d'acquisition : « FnTYPE » = « non-uniform_sampling » (cf. **Figure A.37a**)
- Choix du pourcentage NUS : « NusAMOUNT » = 50%
- Choix de la valeur du couplage scalaire J : « NusJSP » = 0 Hz

- ➔ Choix du temps de relaxation T_2 : « NusT₂ » = 1 s
- ➔ Choix de la liste de points acquis durant l'expérience : « NusLIST » = automatic

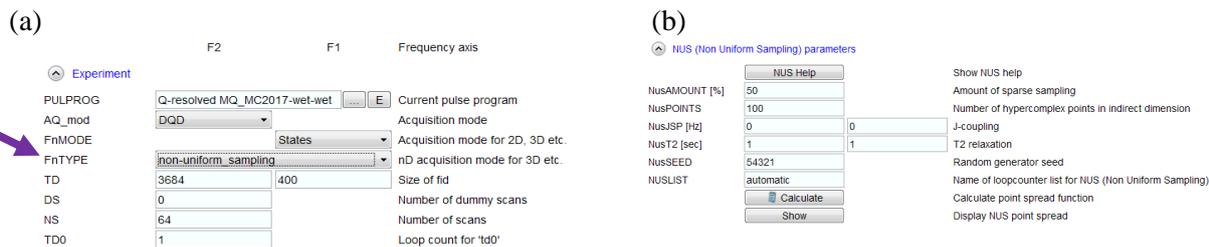


Figure A.37: Exemples de valeurs utilisées pour le paramétrage du protocole NUS. (a) Visuel « Experiment ». (b) Visuel « NUS (Non Uniform sampling) parameters ».

5.3 Lancement de l'expérience 2D via la commande « zg »

5.4. Traitement des expériences 2D avec échantillonnage non linéaire (« NUS »)

5.4.1 Choix des paramètres de traitement de l'expérience 2D (via la commande « edp »)

- ➔ Voir l'étape **4.8.6.2**.

5.4.2 Choix des paramètres de traitement pour le protocole « NUS » (via la commande « edp »)

- ➔ Type de traitement des données « NUS » : Mdd_Mod cs ou mdd

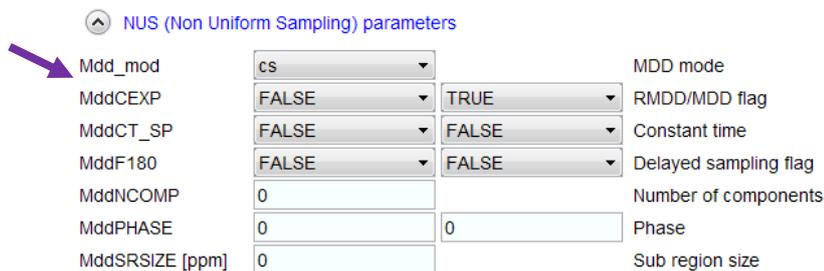


Figure A.38: Exemples de valeurs utilisées pour le paramétrage du protocole « NUS ». Visuel « NUS » dans la fenêtre « EDP ».

5.5. Transformée en fréquence des données « NUS »

5.5.1 Application de la transformée de Fourier (« xfb »)

- ➔ On obtient alors un spectre 2D phasable en F_1 (colonnes) mais pas en F_2 (lignes) ➔ menu « Adjust Phase »).

NB: La double TF (via la commande « xfb ») ne génère pas de points imaginaires en F_2 , une transformée de Hilbert en F_2 doit donc être appliquée permettant d'étendre le signal réel dans le domaine complexe (cf. **Figure A.39**).



Figure A.39: Message d’erreur affiché lorsque le phasage des lignes est demandé.

5.5.2 Application de la transformée de Hilbert

➔ Utiliser la commande « xht2 »

5.5.3. Manipulation du spectre 2D de fréquence

➔ Voir l’étape 4.8.6

ANNEXE C :

Séquence 2D Q-COSY

```

; Pulse scheme for 2H Q-COSY 2D NMR experiments

;avance-version (2005)
;2D homonuclear autocorrelation for spin I=1
;P. Lesot, J. Courtieu, D. Merlet, JACS 1999

;pulse scheme
#include <Avance.incl>

"d0=3u"
"d11=30m"
"d12=0.000020s"
"p2=p1*2"

1 ze
2 d1
   d11 p112:f2
   d11 cpd2:f2
3 p1 ph1
   d0
   p1 ph12
   p2 ph2
   p1 ph12
   go=2 ph31
   d11 wr #0 if #0 id0 zd
   lo to 2 times td1
   d11 do:f2
   exit

ph1=0 0 0 0 1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3
ph2=0 1 2 3 1 2 3 0 2 3 0 1 3 0 1 2
ph12=3 0 1 2 0 1 2 3 1 2 3 0 2 3 0 1
ph31=0 2 0 2 1 3 1 3 2 0 2 0 3 1 3 1

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;in0: 1/(2 * SW) = 1 * DW
;nd0: 1
;NS: 4 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: undefined (old mode)
;mc2 =QF

```

Annexes

```
; cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2  
; pcpd2 : f2 channel 90 deg 1H for 1H decoupling sequence
```

ANNEXE D :

Séquence 2D Q-COSY Fz

```

; Pulse scheme for 2H Q-COSY Fz 2D NMR experiments

; 90x-t1-180x-delay-(magic angle)x-grad-(magic angle)x-Acq.
#include <Avance.incl>

;"d0=3u"
"d0=in0/2-p1*2/3.1416-p0*2/3.1416"

"d11=30m"
"d12=0.000020s"
"d16=0.00020s"
"p2=p1*2"
"p3=p1*0.6082"
"p16=2ms" ; Gradient power max =2ms / 50%
"in0=infl"

; pulse scheme

1 ze
2 d1
  d11 p112:f2
  d11 cpd2:f2
3 p1 ph1
  d0
  p1 ph12
  p2 ph2
  p1 ph12
  d12
  p3 ph3
  d12
  p16:gp1
  d16
  p3 ph3
  go=2 ph31
  d1 mc #0 to 2 F1PH(calph(ph1,+90) & calph(ph11,+90), caldel(d0,
+in0)); mode States / tppi
  d11 do:f2
exit

ph1=0 0 0 0 1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3
ph11=1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3 0 0 0 0

ph2=0 2 1 3 1 3 2 0 2 0 3 1 3 1 0 2
ph12=3 1 0 2 0 2 1 3 1 3 2 0 2 0 3 1

ph3=0 0 0 0 1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3

```

Annexes

ph31=0 0 2 2 1 1 3 3 2 2 0 0 3 3 1 1

```
; p11: f1 channel - power level for pulse (default)
; p1: f1 channel - 90 degree high power pulse
; p2: f1 channel - 180 degree high power pulse
; p3: f1 channel - 54.7 degree high power pulse
; d0: incremented delay (2D) [3 µsec]
; d1: relaxation delay; 1-5 * T1

; IN_F1: 1/SW = 2 * DW
; IN0: 1/(1 * SW) = 2 * DW

; nd0: 1
; NS: 4 * n
; DS: 16
; tdl: number of experiments
; FnMODE: TPPI or QSEQ
; cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
; pcpd2 : f2 channel 90 deg 1H for decoupling 1H sequence
```

ANNEXE E :

Séquence 2D Q-résolue

```

; Pulse scheme for 2H Q-resolved 2D NMR experiments

; 2D homonuclear autocorrelation for spin I = 1
; with deuterium chemical shift refocussing
; P. Lesot, J. Courtieu, D. Merlet, JACS 1999

;pulse scheme
;90x-t1-180x-t1-Acq
#include <Avance.incl>

"d0=3u"
"d11=30m"
"p2=p1*2"
1 ze
2 d1
  d11 p112:f2
  d11 cpd2:f2
3 p1 ph1
  p1 ph11 ; 90 composite pulse
  d0
  p1 ph12
  p2 ph2 ; 180 composite pulse
  p1 ph12
  d0
  go=2 ph31
  d1 mc #0 to 2 F1QF(id0)
  d11 do:f2
exit

ph1= 0 0 0 0 1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3
ph11=1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3 0 0 0 0

ph2= 0 2 1 3 1 3 2 0 2 0 3 1 3 1 0 2
ph12= 3 1 0 2 0 2 1 3 1 3 2 0 2 0 3 1

ph31=0 0 2 2 1 1 3 3 2 2 0 0 3 3 1 1

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;in0: 1/(2 * SW) = 1 * DW
;nd0: 2
;NS: 4 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments

```

Annexes

```
;FnMODE: QF  
; cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2  
; pcpd2 : f2 channel 90 deg 1H for decoupling sequence
```

ANNEXE F :

Séquence 2D Q-résolue Fz

```

; Pulse scheme for 2H Q-resolved Fz 2D NMR experiments

; odd exp (1x, 3-x, 5x, 7-x,....) : 90x-t1-180x-t1-60-gradZ-60-Acq
; even exp (2y, 4-y, 6x, 8-y,....) : 90x-t1-180x-t1-45-gradZ-45-Acq

#include <Avance.incl>

"l3=td1/2"
"d0=3u"
"d11=30m"
"d12=0.000020s"
"d16=0.00020s"
"p2=p1*2"
"p3=p1*2/3"
"p4=p1*1/2"
"p16=2ms ; Gradient power max =2ms / 50%"
"in0=inf1/4"

1 ze
2 d1
   d11 p112:f2
   d11 cpd2:f2
3 p1 ph1
   p1 ph11
   d0
   p1 ph12
   p2 ph2
   p1 ph12
   d0
   p3 ph3 ;60 deg
   d12
   p16:gp1
   d16
   p3 ph3
   go=2 ph31
   d11 wr #0 if #0 id0
   d12 ip1
   d12 ip11 zd
; second part of the sequence
4 d1
   p1 ph1
   p1 ph11
   d0
   p1 ph12
   p2 ph2
   p1 ph12

```

```
d0
p4 ph3 ;45 deg
d12
p16:gp1
d16
p3 ph3
go=4 ph31
d11 wr #0 if #0 id0
d12 ip1
d12 ip11 zd
lo to 2 times l3
d11 do:f2
exit

ph1=0 0 0 0 1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3
ph11=1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3 0 0 0 0

ph2=0 2 1 3 1 3 2 0 2 0 3 1 3 1 0 2
ph12=3 1 0 2 0 2 1 3 1 3 2 0 2 0 3 1

ph3=0 0 0 0 1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3
ph31=0 0 2 2 1 1 3 3 2 2 0 0 3 3 1 1

; p11: f1 channel - power level for pulse (default)
; p1: f1 channel - 90 degree high power pulse
; p2: f1 channel - 180 degree high power pulse
; d0: incremented delay (2D) [3 µsec]
; d1: relaxation delay; 1-5 * T1
; in0: 1/(4 * SW) = DW / 2
; nd0: 4 (2 t1 period + tppi)
; NS: 4 * n
; DS: 16
; td1: number of experiments
; l3=td1/2
; FnMODE: undefined => set mc2 : tppi or FnMODE: TPPI
; cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
; pcpd2 : f2 channel 90 deg 1H for 1H decoupling sequence
```

ANNEXE G :

Séquence 2D Q-résolue MQ

```
; Pulse scheme for 2H Q-resolved MQ 2D NMR experiments

; odd exp : 90x-t1-180x-t1-Acq
; even exp : 90x-t1-180x-t1-90-d13-90-Acq

#include <Avance.incl>

"l0=0"
"d0=3u"
"d13=4u"
"d11=30m"
"p2=p1*2"
"in0=inf1/2"

1 ze
2 d11 p112:f2
  d11 cpd2:f2
3 d1
  p1 ph1
  p1 ph11
  d0
  p1 ph12
  p2 ph2          ; 180 deg deut
  p1 ph12
  d0
  p1 ph2          ; 90 deg deut
  d13             ; 0 quantum / 2 quanta
  p1 ph3          ; 90 deg deut

if "l0 %2 == 0"          ; experience impaire      ; special test for
NUS
{
  go=3 ph30
}
else                    ; experience paire
{
go=3 ph31
}
  d11 mc #0 to 2
    F1I(iu0, 1)          ; special increment for NUS
    F1PH(caldel(d0, +in0))
  d11 do:f2
  exit

; cyclage de base 8 scans + cyclops
ph1=0 0 0 0 2 2 2 2 1 1 1 1 3 3 3 3 2 2 2 2 0 0 0 0 3 3 3 3 1 1 1 1
```

Annexes

```
ph11=1 1 1 1 3 3 3 3 2 2 2 2 0 0 0 0 3 3 3 3 1 1 1 1 0 0 0 0 2 2 2 2
ph2=0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3 3
ph12=1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 0 0 0 0 0 0 0
ph3=0 1 2 3 0 1 2 3 1 2 3 0 1 2 3 0 2 3 0 1 2 3 0 1 3 0 1 2 3 0 1 2
ph30=0 1 2 3 2 3 0 1 1 2 3 0 3 0 1 2 2 3 0 1 0 1 2 3 3 0 1 2 1 2 3 0
ph31=1 0 3 2 3 2 1 0 2 1 0 3 0 3 2 1 3 2 1 0 1 0 3 2 0 3 2 1 2 1 0 3

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p1  : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2  : f1 channel - 180 degree high power pulse
;d0  : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1  : relaxation delay; 1-5 * T1
;in0: inF1/2
;nd0: 2
;NS: 8 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments

;MC2 : states
;d13=4u

;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2 : f2 channel 90 deg 1H for decoupling 1H sequence
```

ANNEXE H :

Séquence 2D δ -résolue

```

; Pulse scheme for 2H delta-resolved 2D NMR experiments

; delta-resolved experiment in magnitude mode using specific 2H
; composite pulse
; avance-version (00/04/28)
; d1-90-t1-90-t1-acq for spin I = 1
; with decoupling on f2 channel with 90 pulse composite (45 -90 -
135)
; with reduction of quadrupolar splittings in F1 dimension
; P. Lesot, O. Lafon -2003-

#include <Avance.incl>

"d11=30m"
"d12=20u"
"p3=p1*0.6082"
"p12=p1*0.5"
"p13=p1*1.5"

1 ze
  d11 p112:f2
  d11 cpd2:f2
2 d1
  p12 ph1
  p1 ph11 ; composite 90 pulse (45-90-135)
  p13 ph1
  d0
  p12 ph2
  p1 ph12 ;composite 90 pulse (45-90-135)
  p13 ph2
  d0
  go=2 ph31
  d1 mc #0 to 2 F1QF(id0); new acq command
  d11 do:f2
exit

;new cyclage NS min = 4

ph1=0 0 0 0 1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3
ph11=2 2 2 2 0 0 0 0 3 3 3 3 1 1 1 1

ph2=0 1 2 3 1 2 3 0 2 3 0 1 3 0 1 2
ph12=2 3 0 1 2 3 0 1 3 0 1 2 3 0 1 2
ph31=0 0 0 0 1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse

```

Annexes

```
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p12: f1 channel - 45 degree high power pulse
;p13: f1 channel - 135 degree high power pulse
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;in0: 1/(1 * SW)*nd0

;NS: 4 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree 1H pulse for 1H decoupling sequence
;fnmode : QF
;reverse F1 : thtrue
```

ANNEXE I :

Séquence 2D δ -résolue Fz

```
; Pulse scheme for 2H delta-resolved Fz 2D NMR experiments

; delta-resolved experiment in phased mode using specific deuterium
; composite pulses
; avance-version (00/04/28)
; for spin I=1
; with decoupling on f2 channel
; P. Lesot, O. Lafon -2003/2013-

#include <Avance.incl>

"d11=30m"
"d12=20u"
"p3=p1"
;"p3=p1*0.6082"
"p12=p1*0.5"
"p13=p1*1.5"

1 ze
  d11 p112:f2
  d11 cpd2:f2
2 d1
3 p12 ph1
  p1 ph11      ; composite 90 pulse (45-90-135)
  p13 ph1
  d0
  p12 ph2
  p1 ph12      ; composite 90 pulse (45-90-135)
  p13 ph2
  d0
  p3 ph3        ; Filtre gradient z = 54.7 deg
  d12
  p16:gp1
  d16
  p3 ph3        ; 54.7 deg
  go=2 ph31
  d1 mc #0 to 2 F1PH(ip1 & ip11 & id0)
  d11 do:f2
exit

; Phase cycling (NS min = 8)

ph1=0 0 0 0 2 2 2 2 1 1 1 1 3 3 3 3 2 2 2 2 0 0 0 0 3 3 3 3 1 1 1 1
ph11=2 2 2 2 0 0 0 0 3 3 3 3 1 1 1 1 0 0 0 0 2 2 2 2 1 1 1 1 3 3 3 3

ph2=0 1 2 3 0 1 2 3 1 2 3 0 1 2 3 0 2 3 0 1 2 3 0 1 3 0 1 2 3 0 1 2
ph12=2 3 0 1 2 3 0 1 3 0 1 2 3 0 1 2 0 1 2 3 0 1 2 3 1 2 3 0 1 2 3 0
```

Annexes

```
ph3=0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3 3
ph31=0 0 0 0 2 2 2 2 1 1 1 1 3 3 3 3 2 2 2 2 0 0 0 0 3 3 3 3 1 1 1 1
```

```
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p12: f1 channel - 45 degree high power pulse
;p13: f1 channel - 135 degree high power pulse

;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O [30 msec]

;nd0: 2
;DS: 16
;td1: number of experiments
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree 1H pulse for 1H decoupling sequence
;fnmode : TPPI
;MC2 = TPPI
;Ph_mod(F1) = PK
```

ANNEXE J:
Séquence 1D zgdc

```
; Pulse scheme for 2H zgdc WET 1D NMR experiments
;zgdc
;avance-version (12/01/11)
;1D sequence with decoupling
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=1D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

#include <Avance.incl>

"d11=30m"

"acqt0=-p1*2/3.1416"

1 ze
  d11 p112:f2
2 30m do:f2
  d11 cpd2:f2
  d1
  p1 ph1
  go=2 ph31
  30m do:f2 mc #0 to 2 F0(zd)
exit

ph1=0 2 2 0 1 3 3 1
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel - high power pulse
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;ns: 1 * n, total number of scans: NS * TD0
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence
```

ANNEXE K:

Séquence 1D selzgc

```
; Pulse scheme for 2H selzgc 1D NMR experiments
#include <Avance.incl>

"d11=30m"

"acqt0=-p1*2/3.1416"

1 ze
  d11 p112:f2
2 30m do:f2
  d11 cpd2:f2
  d1 p10:f1
  p11:sp1:f1 ph1
  go=2 ph31
  30m do:f2 mc #0 to 2 F0(zd)
exit

ph1=0 2 2 0 1 3 3 1
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1

; p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
; p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
; p1 : f1 channel - high power pulse
; d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
; d11: delay for disk I/O [30 msec]
; ns: 1 * n, total number of scans: NS * TD0
; cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
; pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

; $Id: zgdc,v 1.11.8.1 2012/01/31 17:56:41 ber Exp $
```

ANNEXE L:

Séquence 1D zgdc WET

```
; Pulse scheme for 2H zgdc WET 1D NMR experiments

;zgdcwet
;avance-version (12/01/11)
;1D sequence with WET solvent suppression and decoupling
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=1D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"d11=30m"

"acqt0=-p1*2/3.1416"

1 ze
  d11 p112:f2
2 30m do:f2
  d11 cpd2:f2
  d1 ;BLKGRAD
  50u ;UNBLKGRAD
  (p11:sp7 ph5):f1
  4u
  p16:gp21
  d16 p10:f1
  (p11:sp8 ph6):f1
  4u
  p16:gp22
  d16 p10:f1
  (p11:sp9 ph6):f1
  4u
  p16:gp23
  d16 p10:f1
  (p11:sp10 ph6):f1
  4u
  p16:gp24
  d16 p11:f1
  p1 ph1
  go=2 ph31
  30m do:f2 mc #0 to 2 F0(zd)
```

Annexes

```
d11 ;BLKGRAD
exit
; d11 do:f2 mc #0
to 2 F1PH(calph(ph1, +90) & calph(ph29, +90))
; d11 BLKGRAD
; ph1=0 2 2 0 1 3 3 1
; ph5=0
; ph6=2
; ph31=0 2 2 0 1 3 3 1

ph1=0 2 2 0 1 3 3 1
ph5=0
ph6=1
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1

; p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
; p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
; sp7: f1 channel - shaped pulse
; sp8: f1 channel - shaped pulse
; sp9: f1 channel - shaped pulse
; sp10: f1 channel - shaped pulse
; p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
; p11: f1 channel - 90 degree shaped pulse
; p16: homospoil/gradient pulse [2msec]
; d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
; d11: delay for disk I/O [30 msec]
; d16: delay for homospoil/gradient recovery
; nd0: 1
; ns: 4 * n
; ds: 16
; tdl: number of experiments
; FnMODE: States-TPPI, TPPI, States or QSEQ
; cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2 :
garp.p31
; pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

; use gradient ratio: gp21 : gp22 : gp23 : gp24
; 80 : 40 : 20 : 10

; for z-only gradients:
; gpz21: 80%
; gpz22: 40%
; gpz23: 20%
; gpz24: 10%

; use gradient files:
; gpnam21: SMSQ10.100
; gpnam22: SMSQ10.100
; gpnam23: SMSQ10.100
; gpnam24: SMSQ10.100

; use power levels sp7 sp8 sp9 sp10
; +0.87 -1.04 +2.27 -5.05
```

ANNEXE M:

Séquence 1D zgdc Bis-WET

```
; Pulse scheme for 2H zgdc-Bis-WET 1D NMR experiments
```

```
#include <Avance.incl>
```

```
#include <Grad.incl>
```

```
#include <Delay.incl>
```

```
"d11=30m"
```

```
"acqt0=-p1*2/3.1416"
```

```
1 ze
```

```
  d11 p112:f2
```

```
2 30m do:f2
```

```
  d11 cpd2:f2
```

```
  d1
```

```
  if "p10!=p30"
```

```
  {
```

```
    (p11:sp7 ph5):f1
```

```
    4u
```

```
    p16:gp21
```

```
    d16 p10:f1
```

```
    (p11:sp8 ph6):f1
```

```
    4u
```

```
    p16:gp22
```

```
      d16 p10:f1
```

```
    (p11:sp9 ph6):f1
```

```
    4u
```

```
    p16:gp23
```

```
    d16 p10:f1
```

```
    (p11:sp10 ph6):f1
```

```
    4u
```

```
    p16:gp24
```

```
    d16 p11:f1
```

```
  4u rpu10
```

```
  }
```

```
  else
```

```
  {
```

```
    (p10:sp11 ph5):f1
```

```
    4u
```

```
    p16:gp21
```

```
    d16 p10:f1
```

```
    (p10:sp12 ph6):f1
```

```
    4u
```

```
    p16:gp22
```

```
      d16 p10:f1
```

Annexes

```
(p10:sp13 ph6):f1
4u
p16:gp23
d16 p10:f1
(p10:sp14 ph6):f1
4u
p16:gp24
d16 p11:f1
4u ipu10
}
p1 ph1
go=2 ph31
30m do:f2 mc #0 to 2 F0(zd)
d11
exit

ph1=0 2 2 0 1 3 3 1
ph5=0 1 2 3 ;3 0 1 2;1 2 3 ;3 2 1 0
ph6=1 2 3 0 ;0 3 2 1;2 3 0 ;0 3 2 1
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1

; p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
; p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
; sp7: f1 channel - shaped pulse
; sp8: f1 channel - shaped pulse
; sp9: f1 channel - shaped pulse
; sp10: f1 channel - shaped pulse
; p1: f1 channel - 90 degree high power pulse
; p11: f1 channel - 90 degree shaped pulse
; p16: homospoil/gradient pulse [2 msec]
; d1: relaxation delay; 1-5 * T1
; d11: delay for disk I/O [30 msec]
; d16: delay for homospoil/gradient recovery
; nd0: 1
; ns: 4 * n
; ds: 16
; td1: number of experiments
; FnMODE: States-TPPI, TPPI, States or QSEQ
; cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
; pcpd2: f2 channel - 90 degree 1H pulse for 1H decoupling
sequence

; use gradient ratio: gp21 : gp22 : gp23 : gp24
; 80 : 40 : 20 : 10

; for z-only gradients:
; gpz21: 80%
; gpz22: 40%
; gpz23: 20%
; gpz24: 10%

; use gradient files:
```

Annexes

```
; gpnam21: SMSQ10.100
; gpnam22: SMSQ10.100
; gpnam23: SMSQ10.100
; gpnam24: SMSQ10.100
; use power levels      sp7      sp8      sp9      sp10
;                       sp1      +0.87   -1.04   +2.27
-5.05
```

ANNEXE N :

Séquence 1D Q-COSY Fz Bis-WET

; Pulse scheme for 2H Q-COSY Fz Bis-WET 2D NMR experiments

```
#include <Avance.incl>
```

```
"d0=3u"
```

```
"d11=30m"
```

```
"d12=0.000020s"
```

```
"d16=0.00020s"
```

```
"p2=p1*2"
```

```
"p3=p1*0.6082"
```

```
"p16=2ms" ; Gradient power max =2ms / 50%
```

```
"in0=inf1"
```

```
1 ze
```

```
2 d1
```

```
  d11 p112:f2
```

```
  d11 cpd2:f2
```

```
  if "p10!=p30"
```

```
{
```

```
  (p11:sp7 ph5):f1
```

```
  4u
```

```
  p16:gp21
```

```
  d16 p10:f1
```

```
  (p11:sp8 ph6):f1
```

```
  4u
```

```
  p16:gp22
```

```
    d16 p10:f1
```

```
  (p11:sp9 ph6):f1
```

```
  4u
```

```
  p16:gp23
```

```
  d16 p10:f1
```

```
  (p11:sp10 ph6):f1
```

```
  4u
```

```
  p16:gp24
```

```
  d16 p11:f1
```

```
  4u rpu10
```

```
}
else
{
  (p10:sp11 ph5):f1
  4u
  p16:gp21
  d16 p10:f1
  (p10:sp12 ph6):f1
  4u
  p16:gp22
  d16 p10:f1
  (p10:sp13 ph6):f1
  4u
  p16:gp23
  d16 p10:f1
  (p10:sp14 ph6):f1
  4u
  p16:gp24
  d16 p11:f1
  4u ipu10

}
3 p1 ph1
p1 ph11
d0
p1 ph12
p2 ph2
p1 ph12
d12
p3 ph3
d12
p16:gp1
d16
p3 ph3
go=2 ph31
d1 mc #0 to 2 F1PH(calph(ph1,+90) & calph(ph11,+90), caldel(d0,
+in0)) ; mode tppi
d11 do:f2
exit

ph1=0 0 0 0 1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3
ph11=1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3 0 0 0 0
ph2=0 2 1 3 1 3 2 0 2 0 3 1 3 1 0 2
```

Annexes

ph12=3 1 0 2 0 2 1 3 1 3 2 0 2 0 3 1

ph3=0 0 0 0 1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3

ph31=0 0 2 2 1 1 3 3 2 2 0 0 3 3 1 1

ph5=0

ph6=1

; pl1: f1 channel - power level for pulse (default)

; p1: f1 channel - 90 degree high power pulse

; p2: f1 channel - 180 degree high power pulse

; p3: f1 channel - 54.7 degree high power pulse

; d0: incremented delay (2D) [3 µsec]

; d1: relaxation delay; 1-5 * T1

; important: Check the coherence of IN_F1 and IN0

; IN_F1: $1/SW = 2 * DW$

; IN0: $1/(1 * SW) = 2 * DW$

; nd0: 1

; NS: 4 * n

; DS: 16

; td1: number of experiments

; FnMODE: TPPI or QSEQ

; cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2

; pcpd2 : f2 channel 90 deg proton for 1H decoupling sequence

ANNEXE O :

Séquence 2D Q-résolue Fz Bis-WET

```
; Pulse scheme for 2H Q-resolved Fz Bis-WET 2D experiments

; odd exp (1x, 3-x, 5x, 7-x,....) : 90x-t1-180x-t1-60-gradZ-60-Acq
; even exp (2y, 4-y, 6x, 8-y,....) : 90x-t1-180x-t1-45-gradZ-45-Acq

#include <Avance.incl>

"l3=td1/2"
"d0=3u"
"d11=30m"
"d12=0.000020s"
"d16=0.00020s"
"p2=p1*2"
"p3=p1*2/3"
"p4=p1*1/2"
"p16=2ms" ; Gradient power max =2ms / 50%
"in0=inf1/4"

1 ze
2 d1
   d11 p112:f2
   d11 cpd2:f2
3 4u
  if "p10!=p30"
  {
    (p11:sp7 ph5):f1
    4u
    p16:gp21
    d16 p10:f1
    (p11:sp8 ph6):f1
    4u
    p16:gp22
    d16 p10:f1
    (p11:sp9 ph6):f1
    4u
    p16:gp23
    d16 p10:f1
    (p11:sp10 ph6):f1
    4u
    p16:gp24
    d16 rpu10
    4u p11:f1
  }
  else
  {
    (p11:sp11 ph5):f1
```

```

    4u
    p16:gp21
    d16 p10:f1
    (p11:sp12 ph6):f1
    4u
    p16:gp22
    d16 p10:f1
    (p11:sp13 ph6):f1
    4u
    p16:gp23
    d16 p10:f1
    (p11:sp14 ph6):f1
    4u
    p16:gp24
    d16 ipu10
    4u p11:f1
}
p1 ph1
p1 ph11
d0
p1 ph12
p2 ph2
p1 ph12
d0
p3 ph3 ;60 deg
d12
p16:gp1
d16
p3 ph3
go=2 ph31
d11 wr #0 if #0 id0
d12 ip1
d12 ip11 zd
; second part of the sequence
4 d1
  if "p10!=p30"
  {
    (p11:sp7 ph5):f1
    4u
    p16:gp21
    d16 p10:f1
    (p11:sp8 ph6):f1
    4u
    p16:gp22
    d16 p10:f1
    (p11:sp9 ph6):f1
    4u
    p16:gp23
    d16 p10:f1
    (p11:sp10 ph6):f1
    4u
    p16:gp24
    d16 rpu10
    4u p11:f1
  }
else

```

```

{
  (p11:sp11 ph5):f1
    4u
    p16:gp21
    d16 p10:f1
    (p11:sp12 ph6):f1
    4u
    p16:gp22
    d16 p10:f1
    (p11:sp13 ph6):f1
    4u
    p16:gp23
    d16 p10:f1
    (p11:sp14 ph6):f1
    4u
    p16:gp24
    d16 ipu10
  4u p11:f1
}
p1 ph1
p1 ph11
d0
p1 ph12
p2 ph2
p1 ph12
d0
p4 ph3 ;45 deg
d12
p16:gp1
d16
p3 ph3
go=4 ph31
d11 wr #0 if #0 id0
d12 ip1
d12 ip11 zd
lo to 2 times l3
d11 do:f2
exit

ph1=0 0 0 0 1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3
ph2=0 2 1 3 1 3 2 0 2 0 3 1 3 1 0 2
ph3=0 0 0 0 1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3
ph31=0 0 2 2 1 1 3 3 2 2 0 0 3 3 1 1
ph5=0
ph6=1
ph11=1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3 0 0 0 0
ph12=3 1 0 2 0 2 1 3 1 3 2 0 2 0 3 1

; p11: f1 channel - power level for pulse (default)
; p1: f1 channel - 90 degree high power pulse
; p2: f1 channel - 180 degree high power pulse
; d0: incremented delay (2D) [3 usec]
; d1: relaxation delay; 1-5 * T1
; in0 1/(4 * SW) = DW / 2
; nd0: 4 (2 t1 period + tppi)
; NS: 4 * n

```

Annexes

```
; DS: 16
; td1: number of experiments
; l3=td1/2
; FnMODE: undefined => set mc2 : tppi
; cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
; pcpd2 : f2 channel 90 deg proton for 1H decoupling sequence
```

ANNEXE P :

Séquence 2D Q-résolue MQ BIS-WET

```
; Pulse scheme for 2H Q-resolved MQ-Bis-WET 2D NMR experiments

; odd exp : 90x-t1-180x-t1-90-d13-90-Acq (ZQ)
; even exp : 90x-t1-180x-t1-90-d13-90-Acq (DQ)

#include <Avance.incl>

"l0=0"
"d0=3u"
"d13=4u"
"d11=30m"
"p2=p1*2"
"in0=inf1/2"

1 ze
2 d11 p112:f2
  d11 cpd2:f2
3 d1
  3u
  if "p10!=p30"
  {
    (p11:sp7 ph5):f1
    4u
    p16:gp21
    d16 p10:f1
    (p11:sp8 ph6):f1
    4u
    p16:gp22
    d16 p10:f1
    (p11:sp9 ph6):f1
    4u
    p16:gp23
    d16 p10:f1
    (p11:sp10 ph6):f1
    4u
    p16:gp24
    d16 p11:f1
    4u rpu10
  }
  else
  {
    (p10:sp11 ph5):f1
    4u
    p16:gp21
    d16 p10:f1
    (p10:sp12 ph6):f1
    4u
    p16:gp22
```

Annexes

```
        d16 p10:f1
        (p10:sp13 ph6):f1
        4u
        p16:gp23
        d16 p10:f1
        (p10:sp14 ph6):f1
        4u
        p16:gp24
        d16 p11:f1
        4u ipu10
    }
    p1 ph1
    p1 ph11
    d0
    p1 ph12
    p2 ph2          ; 180 deg 2H pulse
    p1 ph12
    d0
    p1 ph2          ; 90 deg 2H pulse
    d13             ; 0 quantum / 2 Quanta
    p1 ph3          ; 90 deg 2H pulse
if "l0 %2 == 0"          ; odd experiment (impaire)
{
    go=3 ph30
}
else                      ; even experiment (paire)
{
    go=3 ph31
}
    d11 mc #0 to 2
        F1I(iu0, 1)
        F1PH(caldel(d0, +in0))
    d11 do:f2
    exit

; cyclage de base 8 scans + cyclops

ph1=0 0 0 0 2 2 2 2 1 1 1 1 3 3 3 3 2 2 2 2 0 0 0 0 3 3 3 3 1 1 1 1
ph11=1 1 1 1 3 3 3 3 2 2 2 2 0 0 0 0 3 3 3 3 1 1 1 1 0 0 0 0 2 2 2 2

ph2=0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3 3
ph12=1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 0 0 0 0 0 0 0 0

ph3=0 1 2 3 0 1 2 3 1 2 3 0 1 2 3 0 2 3 0 1 2 3 0 1 3 0 1 2 3 0 1 2
ph30=0 1 2 3 2 3 0 1 1 2 3 0 3 0 1 2 2 3 0 1 0 1 2 3 3 0 1 2 1 2 3 0
ph31=1 0 3 2 3 2 1 0 2 1 0 3 0 3 2 1 3 2 1 0 1 0 3 2 0 3 2 1 2 1 0 3

ph5=0
ph6=1

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p1  : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2  : f1 channel - 180 degree high power pulse
;d0  : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1  : relaxation delay; 1-5 * T1
;in0: inF1/2
```

Annexes

```
;nd0: 2
;NS: 8 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments

;MC2 : states
;d13=4u

; cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
; pcpd2 : f2 channel 90 deg proton for 1H decoupling sequence

;use gradient ratio:      gp21 : gp22 : gp23 : gp24
;                          80 :   40 :   20 :   10

;for z-only gradients:
;gpz21: 80%
;gpz22: 40%
;gpz23: 20%
;gpz24: 10%

;use gradient files:
;gpnam21: SMSQ10.100
;gpnam22: SMSQ10.100
;gpnam23: SMSQ10.100
;gpnam24: SMSQ10.100

;use power levels      sp7      sp8      sp9      sp10
;                      sp1      +0.87   -1.04   +2.27   -5.05
```

ANNEXE Q :

Exemple de liste d'échantillonnage de points utilisée pour des expériences 2D QUOSY intégrant le protocole NUS

Dans le cadre d'une expérience 2D utilisant le protocole « Non Uniform Sampling », il est nécessaire de générer une liste de points d'échantillonnage à partir de la fenêtre de paramétrage « eda » du logiciel Topspin (cf. **Figure A.40**). Par exemple, la « VDlist » présentée ci-dessous, correspond à liste générée pour enregistrer 50 % des incréments t_1 , en considérant que le temps de relaxation T_2 le plus long est égale à 1 seconde (cf. **Figure A.40a**). Cette liste a été utilisée pour enregistré le spectre 2D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ Q -resolved Fz d'un échantillon modèle (cf. **Figure III.22**)

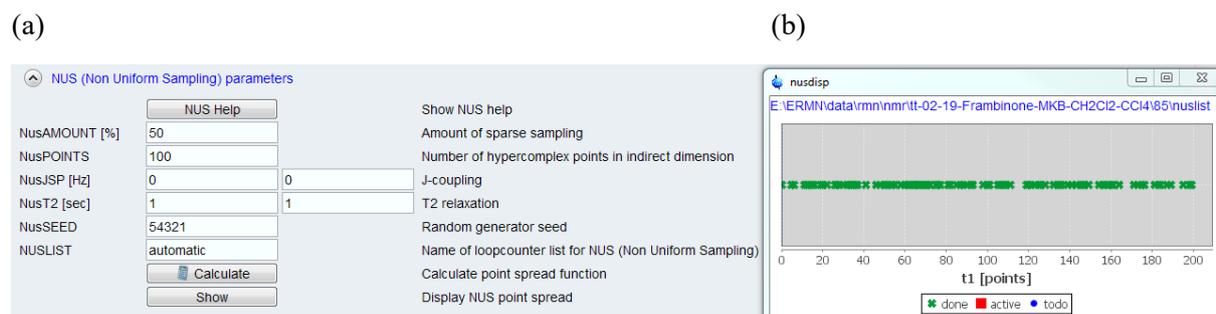


Figure A.40 : (a) Fenêtre du menu EDA permetnt d'introduire les paramètres NUS désirés. (b) Visualisation graphique de la liste.

Exemple de listes de points (VDlist):

0 ; 71 ; 184 ; 61 ; 175 ; 120 ; 125 ; 26 ; 72 ; 85 ; 41 ; 136 ; 111 ; 46 ; 58 ; 22 ; 68 ; 109 ; 60 ;
 62 ; 20 ; 128 ; 181 ; 76 ; 55 ; 87 ; 70 ; 66 ; 146 ; 88 ; 132 ; 11 ; 5 ; 159 ; 51 ; 33 ; 82 ; 30 ; 16 ;
 161 ; 63 ; 135 ; 123 ; 19 ; 37 ; 105 ; 171 ; 100 ; 101 ; 107 ; 64 ; 154 ; 13 ; 81 ; 48 ; 183 ; 36 ;
 145 ; 27 ; 121 ; 195 ; 173 ; 139 ; 6 ; 35 ; 34 ; 50 ; 52 ; 143 ; 69 ; 199 ; 147 ; 189 ; 17 ; 157 ;
 93 ; 32 ; 116 ; 90 ; 65 ; 23 ; 113 ; 7 ; 31 ; 176 ; 187 ; 192 ; 191 ; 102 ; 9 ; 43 ; 168 ; 91 ; 198 ;
 80 ; 89 ; 119 ; 49 ; 3 ; 118

ANNEXE R :

Table des caractéristiques RMN des trois isotopes de l'hydrogène

ISOTOPE	¹H	²H	³H
Nom	Protium	Deutérium	Tritium
Notation habituelle	H	D	T
Radioactivité	No	No	Yes (émission β)
Demi-temps de vie (jour)	Stable	Stable	4540
Abondance Naturelle (%)	0,015	99,985	< 10 ⁻¹⁶
Nombre quantique de spin (sans unité)	1/2	1	1/2
Rapport gyromagnétique γ (MHz.T⁻¹)	42,576	6,536	45,403
Moment quadrupolaire (10⁻²⁴ cm²)	0	+2,87 10 ⁻³	0
Fréquence de Larmor à 14.09 T (MHz)	600,00	92,10	639,98
Sensibilité relative^(a) (sans unité)	1,00	9,65 10 ⁻³	1,21
Sensibilité absolue^(b) (sans unité)	1,00	1,45 10 ⁻⁶	-
Gamme de déplacements chimiques (ppm)	0 à 20	0 à 20	0 à 20
Gamme (typique) des temps de relaxation T₁ (s)	0,1 à 20	0,1 à 10	0,1 à 10
Gamme (typique) des temps de relaxation T₂ (s)	0,1 à 20	0,1 à 10	0,1 à 10
Gamme (typique) des couplages scalaires J_(X-X) (Hz)	0 à 20	0 à 3 ^(c)	0 à 22 ^(d)
Effet NOE par découplage ¹H	Oui	Négligeable	Oui

(a) Valeur à champ magnétique et à nombre égal de noyaux

(b) Produit de la sensibilité relative et de l'abondance naturelle

(c) $J_{(D,H)} = J_{(H,H)} \times (\gamma_D / \gamma_H)$

(d) $J_{(T,H)} = J_{(H,H)} \times (\gamma_T / \gamma_H)$

Liste des Figures annexes

Figure A.1 : Représentation de la BSMS Bruker avec les éléments de verrouillage du système (touche « LOCK ON/OFF») et du balayage du champ (touche «SWEEP ») à désactiver.....	239
Figure A.2: Câblage électronique du spectromètre RMN pour l'acquisition d'expériences ^1H . Ici, le signal ^1H (canal F1) est synthétisé par la « SGU2 », puis est amplifié par l'amplificateur « 100 W » et passe par le préamplificateur noté « $^1\text{H LNA}$ »	240
Figure A.3: Fenêtre de commande de l'outil « Topshim gui »: (a) à l'entrée des paramètres de l'opération; (b) Fenêtre de sortie des résultats obtenus selon les paramètres sélectionnés.....	241
Figure A.4: Câblage électronique du spectromètre pour l'acquisition d'expérience ^2H découplé du ^1H . Le signal généré pour le noyau ^2H .passe par l'amplificateur 300 W et le préamplificateur ^2H	242
Figure A.5: Diagramme schématique de la séquence « zgdc »	243
Figure A.6: Exemple de spectre $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ anisotrope avec la composante blindée du co-solvant centrée sur la valeur de O_1P . Le solvant utilisé ici est le dichlorométhane ($\delta(\text{CH}_2\text{Cl}_2) = 5.3$ ppm). La valeur de O_1P déterminée est égale à 3,351 ppm.....	243
Figure A.7: Mesure de l'éclatement quadrupolaire sur le spectre 1D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ anisotrope avec la composante blindée du co-solvant centrée sur la valeur d' O_1P . Ici, la valeur mesurée est égale à 217,0 Hz. ($\text{P}_1 = 21 \mu\text{s}$, $\text{PLW}_1 = 32 \text{ W}$, $\text{PLdB}_1 = -15 \text{ dB}$, $\text{NS} = 32$). (Centre de la fenêtre spectrale)	244
Figure A.8: Fenêtre initiale de l'outil « Shapetool » correspondant au spectre $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ étudié.	244
Figure A.9: Sélection du type d'impulsion dans l'outil « Shapetool ».....	244
Figure A.10: Profil d'excitation d'impulsion sélective de type « Sinus Cardinal » (a) comparé à une d'impulsion sélective de type « Gaussien » (b).....	245
Figure A.11: Représentation de l'impulsion de type « Sinus Cardinal » dans l'outil « Shapetool ». L'affichage de cette fenêtre est automatique.	245
Figure A.12: Ouverture de la fenêtre de sélection de la durée de l'impulsion sélective.	246
Figure A.13: Affichage de la fenêtre de sélection de la durée de l'impulsion sélective. La valeur choisie ici est de 300 ms (300 000 μs). Cette valeur n'est pas figée et peut être réduite (gain de temps mais perte de sélectivité) en fonction de la proximité des signaux ^2H de l'analyte autour des deux composantes du doublet quadrupolaire du co-solvant à éliminer.....	246
Figure A.14: Apparition de la fenêtre de l'offset de l'impulsion sélective dans l'outil « Shapetool ».	247
Figure A.15: Enregistrement de l'impulsion sélective sur l'onglet « Shape » pour l'option sauvegarde.	247
Figure A.16: Boîte de dialogue pour le choix du nom de l'impulsion sélective (ici « tt-11-19-1 ») et de son emplacement sur le disque dur. Validation via « OK ».....	248
Figure A.17: Diagramme schématique de la séquence « selzgd »	248
Figure A.18: Sélection des paramètres d'acquisition de la séquence « selzg ». La valeur de O_1P utilisée est égale à 3,351 ppm (cf. Figure A.6). Le nom de l'impulsion sélective (ici « tt-11-19-1 ») est surligné en bleu. Noter à ce stade qu'une impulsion sélective de faible puissance $\text{SPdB}_1 = 60 \text{ dB}$ est utilisée (valeur non optimisée). ...	249
Figure A.19: Spectre 1D DAN sélectif (expérience « selzg ») montrant uniquement la composante (blindée) du DQ du co-solvant de l'échantillon centrée sur O_1P ($\text{P}_{11} = 300 \text{ ms}$, $\text{SPdB}_1 = 60 \text{ dB}$, $\text{SPNAM}_1 = \text{tt-11-19-1}$, $\text{NS} = 32$). Le dédoublement observé est associé au couplage dipolaire résiduel $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ ($\text{D}_{\text{HD}} = 5 \text{ Hz}$). La valeur SPdB_1 utilisée (60 dB) ici n'est pas forcément optimale (cf. Para. 4.6).	249
Figure A.20: Introduction de l'offset de la seconde impulsion sélective dans l'outil « Shapetool » puis « OK » pour valider. La valeur de offset introduite est de 217 Hz (cf. Figure A.7).....	250
Figure A.21: Construction de la seconde impulsion sélective dans l'outil « Shapetool ». Noter la modification de la phase de l'impulsion comparée celle observé sur la Figure A.13	250
Figure A.22: Spectre 1D DAN sélectif (expérience 1D « selzg ») centrée sur O_1P (3,351 ppm) et montrant uniquement la composante (déblindée) du DQ du co-solvant de l'échantillon ($\text{P}_{11} = 300 \text{ ms}$, $\text{SPdB}_1 = 60 \text{ dB}$, $\text{SPNAM}_1 = \text{tt-11-19-2}$, $\text{NS} = 32$).	251

Figure A.23: Ouverture de la boîte de dialogue « Add Pulse » dans l'outil « Shapetool ».....	251
Figure A.24: Construction de la double impulsion sélective dans l'outil « Shapetool ».....	252
Figure A.25: Représentation de la double impulsion sélective à partir de l'outil « Shapetool ». Noter la modification de la forme et de la phase de l'impulsion comparée celle observée sur la Figure A.12 ou A.18. ..	252
Figure A.26: Spectre 1D DAN sélectif (expérience 1D « selzg ») centrée sur O ₁ P (3.351 ppm) utilisant la double impulsion sélective à faible puissance (60 dB) (P11 = 300 ms, SPdB1 = 60 dB, SPNAM1 = tt-11-19, NS =32) comparé au spectre 1D DAN- ¹ H (« zgdc ») de la Figure A.5	253
Figure A.27: Fenêtre de paramétrage de l'outil « popl » (« parameters optimization »).	254
Figure A.28: Visualisation de la succession d'expériences 1D (« selzg / selzgc ») obtenu <i>via</i> l'outil « popl » pour déterminer la puissance des impulsions sélective de 90° et 270°	254
Figure A.29: Diagramme schématique de la séquence « zg-doublewet-dc ».....	255
Figure A.30: Exemples de valeurs pour la séquence 1D choisie (« zg-doublewet-dc »), incluant la valeur de la variable P30 et INP10. (a) Visuel sur les paramètres généraux (« General »); (b) Visuel sur les paramètres de découplage (« Channel f2 »); (c) Visuel sur les paramètres de gradient (« Gradient channel ») associés à la séquence WET (GPNAM21,22,23,24 (ici SMSQ10.100) et GPZ21,22,23,24 [%] = 80, 40, 20, 10).	256
Figure A.31: Exemples de valeurs utilisées pour les impulsions ² H (visuel « Channel f1 ») pour: (a) le paramétrage des impulsions dures, (b et c) et le paramétrage des impulsions sélectives de séquence BIS-WET.	257
Figure A.32: Spectre 1D DAN- ¹ H (« zg-doublewet-dc ») montrant la saturation du signal DAN du co-solvant (NS = 256).....	257
Figure A.33: Diagramme schématique de la séquence 2D « Q-resolved MQ_MC2017-Bis-WET ».....	257
Figure A.34: Exemples de valeurs pour la séquence QUOSY choisie (Q-résolue MQ Bis-WET), incluant la valeur de la variable P30 et INP10. (a) Visuel sur les paramètres généraux (« General »); (b) Visuel sur les paramètres de découplage (« Channel f2 »); (c) Visuel sur les paramètres de gradient (« Gradient channel ») associés à la séquence WET (GPNAM21,22,23,24 (ici SMSQ10.100) et GPZ21,22,23,24 [%] = 80, 40, 20, 10) et du filtre gradient-z (P ₁₆).	258
Figure A.35: Exemples de valeurs utilisées pour les impulsions ² H (visuel « Channel f1 ») pour : (a) le paramétrage des impulsions dures, (b et c) et le paramétrage des impulsions sélectives de séquence BIS-WET.	259
Figure A.36: Spectre 2D Q-resolved MQ_MC2017-Bis-WET DAN- ¹ H montrant la saturation du signal DAN du co-solvant. Après la double TF, le spectre 2D est symétrisé et tilté. Notez la disparition du signal du co-solvant. Les satellites ¹³ C au pied du co-solvant sont visibles (¹ T _{CH} = 33 Hz). Le spectre est enregistré avec TD ₂ = 3700, TD1 = 400, NS = 256, Texp = 21 h.	260
Figure A.37: Exemples de valeurs utilisées pour le paramétrage du protocole NUS. (a) Visuel « Experiment ». (b) Visuel « NUS (Non Uniform sampling) parameters ».	261
Figure A.38: Exemples de valeurs utilisées pour le paramétrage du protocole « NUS ». Visuel « NUS » dans la fenêtre « EDP ».	261
Figure A.39: Message d'erreur affiché lorsque le phasage des lignes est demandé.....	262
Figure A.40 : (a) Fenêtre du menu EDA permetnt d'introduire les paramètres NUS désirés. (b) Visualisation graphique de la liste.	294

Production Scientifique

Publications scientifiques

Texier-Bonniot T., Berdagué P., Robins R.J., Remaud G., Lesot P., Analytical contribution of deuterium 2D-NMR in oriented media to $^2\text{H}/^1\text{H}$ isotopic characterization: the case of vanillin, *Flav. Frag. J.*, **2018**, 33, 217-229.

Texier-Bonniot T., Berdagué, Lesot P., Anisotropic DAN WET-QUOSY 2D-NMR experiments: Methodology and application for the authenticity control, **2020**, en cours de redaction.

Communication orales (réalisées)

Texier-Bonniot T., Contribution of deuterium 2D-NMR spectroscopy in liquid crystals to the isotopic analysis: The interesting case of vanillin, *8^{ème} Journée des Jeunes Chercheurs de la SFIS*, 10 octobre 2017

Texier-Bonniot T., New developments of NAD 2D-NMR spectroscopy in chiral-liquid crystals for authenticity control: Application to the study of frambinone, *Journée des Doctorants ICMMO*, 27 juin 2018

Texier-Bonniot T., Development of optimized natural abundance Deuterium WET-QUOSY 2D Experiments in lyotropic liquid crystals: A new Tool for the Authenticity Control, *4^{ème} Journée de l'Ecole Doctorale 2MIB*, 18 octobre 2018

Texier-Bonniot T., Anisotropic WET-QUOSY 2D experiments: Methodology and application for the authenticity control by NAD NMR, *Réunion RMN-GBP Automne 2018*, 20 novembre 2018

Texier-Bonniot T., Discrimination of enantiotopic positions by anisotropic ^2H WET-QUOSY 2D-NMR experiments: Case of Frambinone, *4^{ième} Journée RMN Paris-Saclay*, 24 mai 2019

Communication par affiches

Texier-Bonniot T., Berdagué P., Robins R.J., Rémaud G., Lesot P., Study of the Vanillin by anisotropic Deuterium 2D-NMR Spectroscopy: Contribution in Liquid Crystals analysis, *Journée Des Doctorants de l'ICMMO*, 12 septembre 2017

Texier-Bonniot T., Berdagué P., Luy B., Lesot P., Selective Suppression of the Quadrupolar Doublets of Solvent in ^2H 2D-NMR Experiments in Lyotropic Liquid Crystals, *3^{ème} Journée de l'Ecole Doctorale 2MIB*, 17 octobre 2017

Texier-Bonniot T., Berdagué P., Lesot P., Methodological Developments of Natural Abundance ²H ²D-NMR of Organic Molecules in Oriented Solvents, *16^{ème} Rencontres de Chimie Organique*, 5 avril 2018

Texier-Bonniot T., Berdagué P., Robins R.J., Rémaud G., Lesot P., Determination of the Biotechnological or Natural Origin of Vanillin by Deuterium ²D-NMR in Lyotropic Liquid Crystals: a new Analytical Tool for Fighting Against Counterfeiting ?, *EUROMAR 2018*, 1-5 juillet 2018

Texier-Bonniot T., Berdagué P., Robins R.J., Rémaud G., Lesot P., Study of Vanillin and Frambinone molecules by Natural Abundance Deuterium ²D-NMR in Lyotropic Liquid Crystals: Analytical Tool for Fighting Against Counterfeiting in food industry, *5^{ème} Journée de l'Ecole Doctorale 2MIB*, 11 juin 2019

SPECIAL ISSUE: RESEARCH ARTICLE**Analytical contribution of Deuterium 2D-NMR in oriented media to $^2\text{H}/^1\text{H}$ isotopic characterization: the case of vanillin**Tristan Texier–Bonnio¹ | Philippe Berdagué¹ | Richard J. Robins² | Gérald Remaud² |Philippe Lesot^{1,*} **Abstract**

¹RMN en Milieu Orienté, ICMMO, UMR CNRS 8182, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Bâtiment 410, 15, rue du Doyen Georges Poitou. F-91405 Orsay cedex, France.

²Elucidation of Biosynthesis by Isotopic Spectrometry Group, CEISAM, University of Nantes-CNRS UMR6230, F-44322 Nantes, France.

Correspondence

Lesot, ¹RMN en Milieu Orienté, ICMMO, UMR CNRS 8182, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Phone: +33 1 69 15 47 59; fax: +33 1 69 15 81 05; e-mail: philippe.lesot@u-psud.fr
ORCID ID:0000-0002-5811-7530 / ID: M-3390-2017

The evaluation of intramolecular ^2H or ^{13}C isotopic composition of vanillin by liquid-state NMR is an illustrative example of the analytical challenges associated with molecular authenticity/traceability investigations in food products, and the determination/understanding of metabolic/synthetic pathways. Although isotopic ratio monitoring by ^{13}C NMR (irm- ^{13}C NMR) provides a valuable new source of isotopic information, the analysis of position-specific ($^2\text{H}/^1\text{H}$) isotopic fractionation of vanillin remains incomplete due to the overlap of two aromatic ^2H resonances, and the impossibility of separating these fortuitous isochronous nuclei by isotropic NMR. Exploiting the analytical potential of ^2H 2D-NMR in media containing polypeptide-based liquid crystals, we show that all aromatic monodeuterated isotopomers can be spectrally discriminated on the basis of ^2H residual quadrupolar couplings, $\Delta\nu_Q(^2\text{H})$, thus enabling the determination of their relative proportions for the first time. After discussing the multiple relevant co-factors leading to the best discrimination and the optimization of experimental conditions for reliable quantitative measurements by anisotropic 2D NMR, a comparative analysis of six vanillin samples from diverse origins is reported. How the ^2H distribution might relate to the biosynthesis of vanillin is discussed.

KEYWORDS

^2H NMR, vanillin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde), liquid crystals, isotope ratio, (bio)synthetic pathway

TYPE OF ARTICLE: Invited Research Article (Special Issue Review entitled “Authentication of natural products”)

1 | INTRODUCTION

Undoubtedly, the use of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectra nowadays plays a key role in chemistry both for structural elucidation and for quantitative analysis of (bio)chemical samples. Within this second application, NMR-based isotope analysis methodologies have proved to be a unique source of reliable information on the intramolecular distribution of isotopes, knowledge that can be exploited both for the study of metabolic/synthetic pathways and enzyme reaction mechanisms, and for authenticity/traceability investigations.¹ During (bio)synthesis, a non-statistical distribution of isotopes occurs due to the sensitivity of reactions to the presence of a heavier nucleus in an atom at a defined position.

The first methodology developed for the direct position specific isotopic analysis (PSIA) using isotope ratio monitoring (irm) by NMR was quantitative $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ 1D-NMR (at natural abundance level) using isotopic solvents (historically, named as

by Martin et al.² The toolkit for irm-NMR has more recently been strengthened by the development of irm- ^{13}C 1D-NMR, which accesses the carbon skeleton of the molecule,^{3,4,5,6,7} provide additional isotopic information to that obtained by ^2H NMR. However, neither of these techniques always gives access to all the desired information.

An illustrative achievement of the power of PSIA concerns vanillin (4-hydroxy-3-methoxy-benzaldehyde). This is one of the most well-known flavours used in food products, and is one of the first complex molecular targets for which the ($^2\text{H}/^1\text{H}$) isotopic fractionation was investigated in detail. Remarkably, the measurement of the $^2\text{H}/^1\text{H}$ isotope ratio by ^2H 1D-NMR (irm- ^2H 1D-NMR) was able to identify the commercial, geographical or botanical origin of vanillin.^{8,9,10,11} It could also be used to discern between natural and synthetic vanillin. Other techniques were used to have partly position-specific information, mainly by mass spectrometry, for fighting against the false labelling of natural vanillin products and distinguishing *Vanilla* from vanillin made by biotechnological processes.^{12,13,14,15}

Nevertheless, although very efficient in many cases, isotopic irm- ^2H 1D-NMR possesses certain limitations both

site-specific isotope fractionation NMR (SNIF-NMR®)

associated to properties of the compound under investigation and to analytical principles of liquid-state NMR. Among them we can mention:

i) the low solubility of analyte in suitable solvents, reducing the amount detectable by NMR;

ii) the short transversal relaxation times, $T_2(^2\text{H})$, leading to line broadening;

iii) a poor dispersion of ^2H resonances due to a low magnetogyric ratio ($\gamma^{2\text{H}} = \gamma^{1\text{H}}/6.515$) yielding poorly-resolved spectral regions;

iv) the presence of peak overlaps due to isochronous positions (same chemical shift $\delta(^2\text{H})$), a problem that remains spectrally non-resolvable whatever the strength of the magnetic field of the spectrometer.

Vanillin is an example of a molecule in which fortuitous nuclear isochrony is found. Although no molecular symmetry exists, the cumulative effect of various shielding/deshielding contributions (+I/-I, +M/-M) of the three substituents results in the aromatic sites $^2\text{H}_a$ and $^2\text{H}_b$ resonating at the same chemical

shift. Thus in CH_3CN , $\delta(^2\text{H}_a)$ and $\delta(^2\text{H}_b)$ are both equal to 7.67 ppm while $\delta(^2\text{H}_c)$ is 7.24 ppm (Figure 1).¹⁰ The absence of individual isotopic data for aromatic sites H_a and H_b is detrimental when it is desirable to interpret the pertinent isotope fractionation mechanisms or to discern between different metabolic/synthetic pathways (e.g. natural aromatic core vs synthetic one).

The status of 'natural' for vanillin should include (i) the natural origin for the precursor (starting material) and (ii) the process of the transformation should not require chemicals. Measurement of the ^2H content of each aromatic position could help in that purpose. A possible approach with which to discriminate spectrally the positions $^2\text{H}_a$ and $^2\text{H}_b$ of vanillin, hence access the individual ($^2\text{H}/^1\text{H}$) isotopic values of the three aromatic sites, is to replace the liquid solvents by fluid orientationally ordered matrices such as lyotropic liquid crystals in combination with the use of $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ 2D-NMR experiments.^{16,17,18,19} It is then expected that valuable information on the origin of the aromatic ring (natural vs synthetic) in vanillin could help in its authentication.

First successfully exploited for natural products by Lesot and co-workers for resolving the *pro-R* and *pro-S* $^2\text{H}/^1\text{H}$ ratios at methylene groups of long-chain fatty acids,^{20,21,22,23,24} the method has more recently been applied to the isotopic study of miliacine (a pentacyclic terpene), a useful geo-biomarker for geochemists.²⁵

In this article, a re-examination of the ^2H PSIA of vanillin using $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ 2D-NMR at natural abundance level in organic solutions of poly- γ -benzyl-L-glutamate (PBLG) polypeptide is proposed. PBLG systems are well-known lyotropic, chiral liquid-crystal phases able to discriminate between enantiotopic directions in prochiral molecules or enantiomers.^{17,19}

In the case of long-chain fatty acids, the properties of PBLG systems allowed spectral discrimination of enantiotopic sites. In the case of vanillin, however, although enantiodiscrimination is not the objective, we select this phase because the rather weak degree of alignment of solutes, the ability of these mesophases to form homogenous and uniform environments and their long term alignment stability of samples (up to 24 hours), generally leads to high-resolution anisotropic natural abundance ^2H NMR spectra that are analytically exploitable.

2 | ANISOTROPIC ^2H 2D-NMR PSIA

2.1 | Molecular order and ^2H NMR consequences

Replacing isotropic solvents by liquid crystals where guest molecules are oriented on average, is spectrally advantageous.^{17,19} First, it gives access to new anisotropic NMR interactions, as ^2H quadrupolar interaction ($I = 1$) generate a better spectral distribution of ^2H resonances, and are predisposed to minimize excessive peak overlaps on 1D-NMR spectra. Second, the analysis of complex ^2H 1D

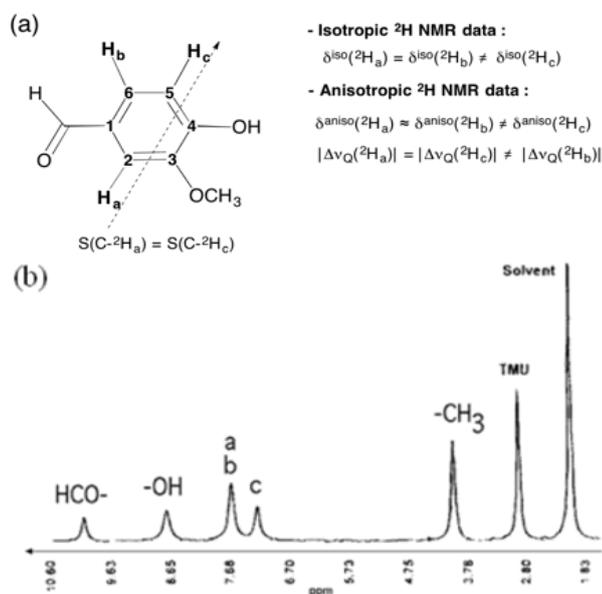


Figure 1 (a) Structure of vanillin numbered according to the preferred IUPAC name (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde). To a first approximation, the interatomic vectors $\text{C}-^2\text{H}_a$ and $\text{C}-^2\text{H}_c$ can be considered collinear. (b) Example of isotropic $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ 1D-NMR spectrum of vanillin (77.76 MHz) recorded in CH_3CN in the presence of TMU. Due to their pseudo-isochrony, the $^2\text{H}_a$ and $^2\text{H}_b$ resonances are not resolved. Figure partially extracted and adapted from ref. 10 with permission.

spectra can be simplified by recording specific ^2H 2D-NMR experiments.^{18,26}

Theoretically, anisotropic ^2H - $\{^1\text{H}\}$ NMR spectra of solutes are dominated by two NMR observables: the anisotropic ^2H chemical shifts, $\delta_{\text{D}}^{\text{aniso}}$, and the ^2H residual quadrupolar couplings (RQCs).^{15,23} In practice, each non-equivalent ^2H site gives rise to quadrupolar doublets (QDs) centred on $\delta_{\text{D}}^{\text{aniso}}$,^{16,18} the splitting between components, noted $\Delta\nu_{\text{Q}}$, is equal (in Hz) to :

$$Dn_{\text{Qi}} = \frac{3}{2} C_{\text{Qi}} \times S_{\text{C-}^2\text{H}_i} \quad (1)$$

with :

$$S_{\text{C-}^2\text{H}_i} = \frac{\langle 3\cos^2(\theta_{\text{C-D}_i}) - 1 \rangle}{2} \quad (2)$$

In these equations, C_{Q} is the ^2H quadrupolar coupling (150 to 210 kHz) and $S_{\text{C-}^2\text{H}_i}$ is the order parameter of the internuclear vector $\text{C-}^2\text{H}_i$ (10^{-3} to 10^{-5}). Due to the low degree of alignment of solutes in polypeptide systems, the range of splittings (in absolute values) generally varies from 0 to 1000 Hz.

From a structural viewpoint, $S_{\text{C-D}}$ depends on the angle between the $\text{C-}^2\text{H}_i$ bond and the magnetic field axis, $\theta_{\text{C-D}_i}$. Consequently, the magnitude of ^2H -RQCs for a given ^2H site is structurally related to its position in a (rigid) molecule, and hence give access to new molecular data, very useful for the assignment of QDs (see below).^{25,27} For instance, in planar molecules, two collinear $\text{C-}^2\text{H}$ internuclear directions show the same RQC values (see **Fig. 1a**).²⁵ Interestingly, the presence of RQCs offers therefore the possibility of discriminating the signal of deuterons resonating at the same chemical shift if their $\text{C-}^2\text{H}$ bonds are oriented differently.

2.2 | Simplification of analysis by 2D-NMR experiments

If the presence of QDs, an anisotropic ^2H 1D-NMR spectrum can provide an elegant way to discriminate overlapping ^2H signals in liquids. Although it leads to a more complex spectrum by doubling the number of possible resonances (compared to isotropic ^2H NMR), this drawback is substantially eliminated by performing 2D-NMR experiments (named "QUOSY"). Such sequenced enable the ^2H information to be split on two spectral dimensions, hence to autocorrelate both

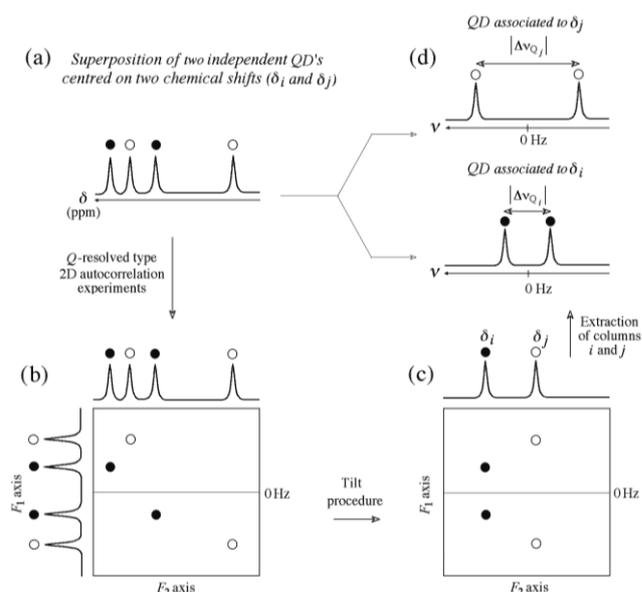


Figure 2 Schematic principle (a to d) of decomposition of complex NAD 1D spectrum (example of two QDs centred on two $\alpha(^2\text{H})$) but showing an interpolation of components) into a series of two 1D NAD sub-spectra extracted in the case of a Q-resolved-type 2D experiment. As the $\alpha(^2\text{H})$ are refocused in F_1 , all ^2H 1D sub-spectra are centred on 0 Hz instead of δ 's. The tilting procedure consists of applying a tilt to the diagonal peaks to line them up parallel to the F_1 axis, leading to the formal elimination of quadrupolar splittings in the F_2 dimension, as depicted in c.

components of each QD (**Fig. 2**).^{28,29,30} On these maps, all ^2H sites expected to be theoretically non-equivalent (by symmetry) can be identified on the basis of their $\alpha(^2\text{H})$, their $\Delta\nu_{\text{Q}}(^2\text{H})$ or both. According to the QUOSY 2D sequence chosen, the associated map can be decomposed into a series of slices (rows or columns) corresponding to each monodeuterated isotopomer of the molecule as depicted in **Figure 2** (here the case of Q-COSY F_z experiment). In the case of prochiral and chiral compounds dissolved in CLC, we have access to the signals of the various enantio-isotopomers and/or diastereoisotopomers of mixtures (see **Figure 2**).

3 | EXPERIMENTAL SECTION

3.1 | Sources of vanillin investigated

All analytical developments (samples **S-1** to **S-7**) were conducted using vanillin purchased from ACROS (lot N° A017649501). For the comparative study, six samples of vanillin from different sources were analysed (five known and one unknown samples; **S-8** to **S-13**). In this work, in which the focus is on the aromatic part, the relative ^2H abundance of each aromatic position is determined. Therefore two categories of the origin of

the precursor are considered: natural or synthetic, independently of the natural status of the final vanillin. For

example we placed the precursor 'lignin' as natural (from wood) even if vanillin ex-lignin cannot be classified as natural (semi-synthetic). The samples correspond respectively to the following precursors:

- i) from natural lignin (N) (**S-8**);
- ii) from natural ferulic acid (N) (**S-9**);
- iii) from *Vanilla* beans (N) (**S-10**);
- iv) from guaiacol via a synthetic route using the "Rhodia" process (S) (**S-11**);
- v) from synthesized ferulic acid (S) (**S-12**);
- vi) from an unknown origin (N or S) (**S-13**).

3.2 | Oriented samples

Practical aspects for preparing oriented samples (fired-sealed, high-precision 5-mm NMR tubes) have been described in previous papers and will not be repeated here.^{18,19,25} It is, however, crucial to bear in mind that minimizing solute orientational inhomogeneities (due to matter gradients) is essential to ensure the highest possible resolution of anisotropic ^2H spectra (namely a full width at half-maximum (FWHM) < 3 Hz), hence an optimal S/N ratio (SNR).³¹

Samples **S-1** to **S-7** were composed of 80 mg of vanillin, 90 mg of PBLG (Sigma) with a DP = 768 (M = 168 100 g/mol) and 600 mg of chlorinated organic co-solvent (neat or a mixture) corresponding to a mass percentage of solute and PBLG equal to 10.4% and 11.7%, respectively. Samples **S-8** to **S-12** were prepared with the same masses of vanillin and PBLG (DP = 743, M = 160 200 g/mol) as above, 575 mg of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CCl}_4$ mixture with a ratio 47.8/52.2 (*i.e.* 275 mg / 300 mg) and 25 mg of tetramethylurea (TMU). Note that, as the TMU used in this study was not isotopically calibrated, it could not be used as an internal reference.²⁴ Sample components were weighed with a precision of ± 1 mg.

As sensitivity is the main limiting factor of anisotropic ^2H 2D experiments (QDs are observed instead of singlets), preparation of samples with a smaller co-solvent mass (volume) should be more advantageous. However, as the effective length of the antenna in cryoprobes is assumed greater than in conventional probes, using a working quantity of co-solvent over 500 mg (namely between 0.3 and 0.5 mL) ensures easier shimming and an optimal magnetic homogeneity.

3.3 | ^2H 2D-NMR spectroscopy

All anisotropic ^2H (1D/2D)-NMR spectra were recorded at 14.1 T (92.1 MHz for ^2H) on a Bruker Avance II spectrometer equipped with a 5-mm o.d. selective cryogenic probe. All ^2H - ^1H scalar and dipolar couplings are removed in ^2H (1D/2D) experiments by the classical WALTZ-16 CPD sequence (< 0.1 W) without polarization transfer due to any nuclear Overhauser effect (nOe). Sample temperature was controlled

by the BVT 3000 unit with a stability of ± 0.1 K. Anisotropic ^2H 2D experiments of vanillin were obtained using the Q-resolved Fz 2D sequence. This sequence minimizes the effects of magnetic field inhomogeneities and is the most sensitive among the QUOSY experiments developed so far.^{28,30} All 2D spectra were acquired with a duration of 15 - 16 hours with $1300(t_2) \times 350(t_1)$ data points, and 200 scans per t_1 increment. Exponential filtering ($\text{LB}_{1,2} = 2.0$ Hz) and zero-filling to $4k(t_2) \times 4k(t_1)$ were applied prior to the double FT.

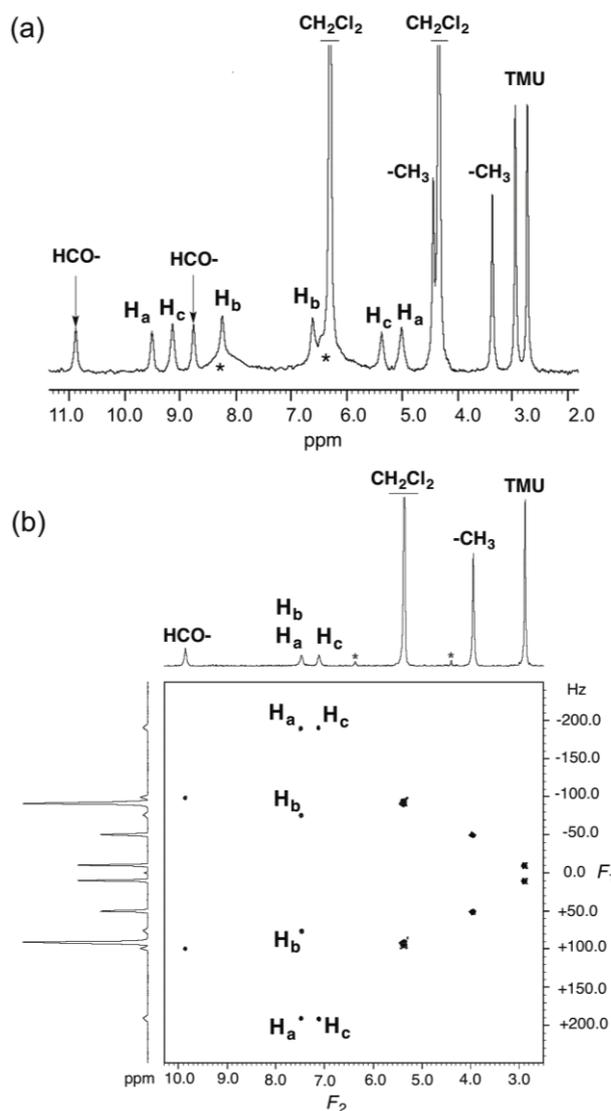


Figure 3. Anisotropic ^2H - $\{^1\text{H}\}$ NMR spectra of vanillin dissolved in PBLG/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CCl}_4/\text{TMU}$ mixture at 311 K. (a) 1D spectrum recorded by summing 2048 scans. Broad lines (asterisk) originated from the hydroxyl group. (b) Tilted Q-resolved Fz map recorded in 16 h. In contrast to the 1D spectrum, no components of the DQs interfere with each other. Compared to **Fig. 2**, all QDs in the F_1 dimension are centred on 0 Hz. Small peaks seen on F_2 (asterisk) originate from the residual axial peaks ($\nu = 0$ Hz) of most intense

Final 2D maps can be tilted and symmetrized as displayed in **Figure 3**. When necessary, further experimental details are given in the Figure captions.

3.4 | Quantitative analysis of aromatic sites

The quantification of the isotope ratios ($^2\text{H}/^1\text{H}$) for the three aromatic ^2H sites in oriented samples of vanillin of various sources, **S-8** to **S-13**, was conducted as follows. To evaluate the precision of the measurement and calculate the standard deviation (SD), at three Q-resolved Fz 2D experiments were recorded with the same conditions and mathematically processed for each sample. Note that the sealed NMR tubes were recentrifuged between each NMR experiment.³¹ As in 1D-NMR experiments, the phasing of the 2D maps were made with great care to reduce maladjustments that can lead to erroneous results. In this work, the surface values of both components of ^2H QD associated with sites H_a , H_b and H_c were determined by peak deconvolution on the F_2 projection of the untilted and non-symmetrized 2D experiments to avoid possible peak distortions. A polynomial baseline correction was applied on the extracted 1D projections prior to deconvolution processes performed with the “line shapes” module of Top-spin (3.5.7) software. Best fits of lines were obtained with a Gaussian percentage varying from 0.9 to 1.1%. A recycling time, T_R , of 0.7 s was used. This T_R is long enough to provide quantitative conditions ($T_R > 5 \times T_1(^2\text{H})$) for the aromatic sites of vanillin, but not for TMU, for which the anisotropic $T_1(^2\text{H})$ was determined as 853 ms at 311 K (see the discussion below).³²

4. | RESULTS AND DISCUSSION

4.1 | Assignment of aromatic quadrupolar doublets

Figure 3a shows an example of a ^2H 1D-NMR spectrum of vanillin (**S-8**) recorded in the PBLG system in the presence of TMU. Here a mixture of co-solvent ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CCl}_4$) was used (see the discussion below). Compared to an isotropic spectrum (**Figure 1**), 14 sharp lines associated with seven ^2H QDs centred on six chemical shifts are now detected. The broad lines located at 7.35 ppm (marked with an asterisk) originate from monodeuterated isotopomers of the OH group.³³ The total number of QDs shows that $^2\text{H}_a$ and $^2\text{H}_b$ sites yield two separated QDs ($|\Delta\nu_Q(^2\text{H}_a)| \neq |\Delta\nu_Q(^2\text{H}_b)|$). If no peaks are totally overlapped, the superposition of signals of the OH group and $^2\text{H}_b$ or the close proximity of some resonances ($-\text{CH}_3$ and CH_2Cl_2), prevents a simple deconvolution procedure of all signals and can be a source of inaccuracies in the measurements.

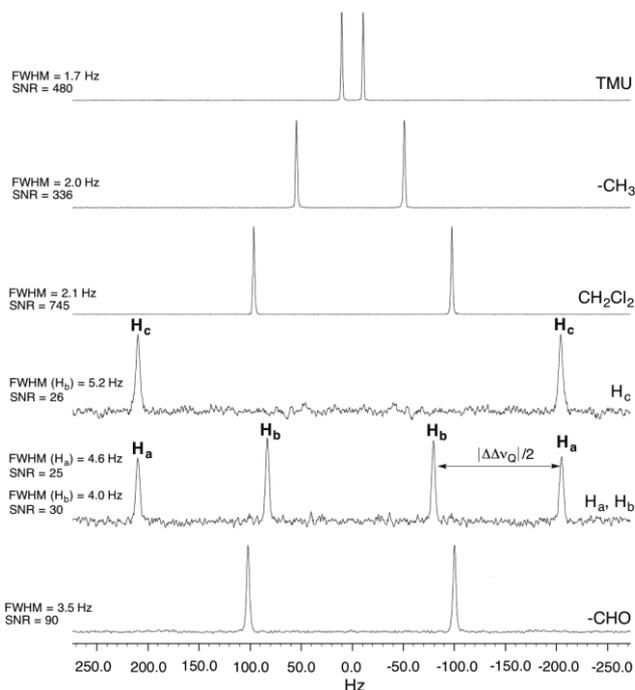


Figure 4 The series of ^2H 1D sub-spectra of vanillin (**S-7**) extracted from the Q-resolved Fz 2D map shown in **Fig. 3** following the procedure depicted in **Fig. 2**.

As seen in **Figures 3b** and **4**, this problem disappears on the Q-resolved Fz 2D spectrum where the δ and $\Delta\nu_Q$ information are now formally “separated” onto the F_2 and F_1 axes, respectively. Disregarding the line intensity and neglecting the ^2H chemical shift anisotropy, CSA, the F_2 spectral projection of the map is formally identical to the isotropic 1D spectrum. Hence,

the assignment of QD’s in F_1 can be achieved on the basis of isotropic $\delta(^2\text{H})$ s for a given co-solvent.³⁴ For the isochronous sites, $^2\text{H}_a$ and $^2\text{H}_b$, the assignment of their QD’s can be deduced by comparing $|\Delta\nu_Q(^2\text{H}_a)|$ and $|\Delta\nu_Q(^2\text{H}_b)|$ to $|\Delta\nu_Q(^2\text{H}_c)|$. Disregarding possible very weak distortions of the aromatic ring due to combined effects of three substituents, the C- $^2\text{H}_a$ and C- $^2\text{H}_c$ bonds can be considered as collinear to a first approximation.^{25,35} Consequently, their respective ^2H -RQCs are expected to be equal, namely $|\Delta\nu_Q(^2\text{H}_a)| = |\Delta\nu_Q(^2\text{H}_c)|$ (see **Figs. 1a** and **4**). *De facto*, the assignment of $^2\text{H}_a$ and $^2\text{H}_b$ can be done unambiguously, in particular if their splittings strongly differ as in the case of the PBLG- $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CCl}_4$ phase.

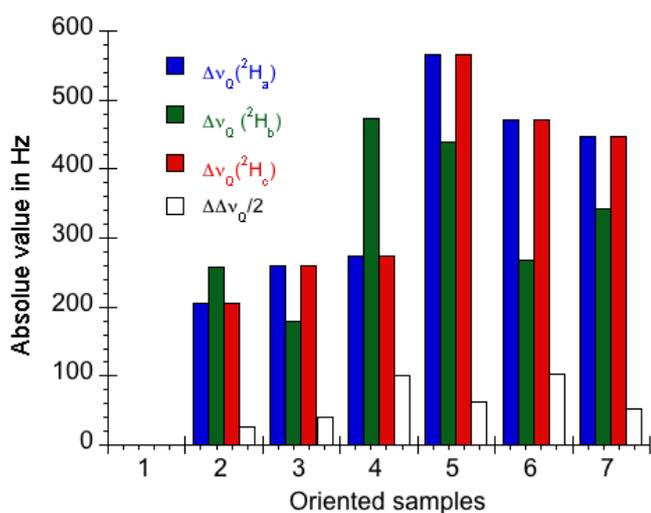
4.2 | Experimental pre-requisites and spectral consequences

NMR spectrometry in oriented samples of polypeptides has the advantage that it is very flexible. Thus, PBLG

Table 1. Data relative to various co-solvents (neat or mixtures) used (S-1 to S-7) and spectral data associated to aromatic sites $^2\text{H}_a$, $^2\text{H}_b$ and $^2\text{H}_c$ of vanillin, and co-solvent recorded at 296 K in PBLG oriented phase

Nb.	Co-solvent	μ^a / D	M^b /g.mol $^{-1}$	N^c / mol $\times 10^{-3}$	R^d / no unit	$\bar{\alpha}(^2\text{H})$ / ppm	$ \Delta\nu_Q(\text{co-s.}) $ / Hz	$ \Delta\nu_Q(^2\text{H}_a) $ / Hz	$ \Delta\nu_Q(^2\text{H}_b) $ / Hz	$ \Delta\nu_Q(^2\text{H}_c) $ / Hz	$ \Delta\Delta\nu_Q/2 $ / Hz
S-1	CCl_4	0	153.8	0.00	0.00	NA	NA	-	-	-	-
S-2	CHCl_3	1.04	119.4	5.02	9.56	7.27	309	206	258	206	26
S-3	CH_2Cl_2	1.14	84.9	14.1	26.9	5.30	161	260	180	260	40
S-4	$\text{Cl}_2\text{CHCHCl}_2$	1.32	167.2	7.17	13.6	5.96	303	273	471	273	99
S-5	$\text{CHCl}_3/\text{CCl}_4^e$	1.04/0	119.4	2.51	4.78	7.27	409	565	439	565	63
S-6	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CCl}_4^e$	1.14/0	84.9	7.06	13.4	5.30	197	471	268	471	102
S-7	$\text{Cl}_2\text{CHCHCl}_2/\text{CCl}_4^{e,f}$	1.32/0	167.2	7.17	6.81	5.96	301	447	343	447	52

^aDipole moment in debye. ^bMolecular weight of protonated co-solvent. ^cNumber of mole of monodeuterated isotopomers for a mass of co-solvent of 600 mg. ^dRatio (R) calculated from Eq. 3 with $m^{\text{vanillin}} = 80$ mg, $M^{\text{vanillin}} = 152.1$ g.mol $^{-1}$ and $m^{\text{co-solvent}} = 600$ mg. ^eFor S-5 to S-7 mixtures, the mass ratio between co-solvents (X/CCl_4) is 50%. ^fFor S-7, the dissolution of vanillin is incomplete at 296 K and the ^2H -RQC values listed here were measured at 320 K.



S-1: CCl_4 ; S-2: CHCl_3 ; S-3: CH_2Cl_2 ; S-4: $(\text{CHCl}_2)_2$; S-5: $\text{CHCl}_3/\text{CCl}_4$
S-6: $(\text{CH}_2\text{Cl}_2)/\text{CCl}_4$; S-7: $(\text{CHCl}_2)_2/\text{CCl}_4$

Figure 5 Variation of $|\Delta\nu_Q|$'s for the three aromatic sites and the associated half-difference ($|\Delta\Delta\nu_Q/2|$) between H_a and H_b versus the co-solvent used (see Table 1). As seen, if $|\Delta\nu_Q(^2\text{H}_a)|$ is always equal to $|\Delta\nu_Q(^2\text{H}_c)|$, but $|\Delta\nu_Q(^2\text{H}_b)|$ can be smaller or larger than $|\Delta\nu_Q(^2\text{H}_{a,c})|$ (see text).

matrices can be formed with various organic co-solvents, from weakly polar to polar ones (chloroform, THF, DMF, etc) and a wide range of working temperatures can be used for recording ^2H spectra. However, accordingly to the properties of sample components and considering the experimental prerequisites

for reliable isotope measurements, the choice of co-solvent and temperature must be carefully examined. In this section we discuss the way we proceeded for vanillin, but these guiding principles are general.

From a chemical viewpoint, four main criteria (A to D) should be taken into account for selecting the most appropriate co-solvent:

A: the need to dissolve both the polymer and the solute;

B: the degree of solubility of the analyte in the phase;

C: the values of $\bar{\alpha}(^2\text{H})$'s of the co-solvent relative to those of the solute (signals of PBLG are not observed);

D: the half-difference of RQCs ($|\Delta\Delta\nu_Q/2|$) between the ^2H sites resonating at the same $\bar{\alpha}(^2\text{H})$ in liquids.

In addition, from an instrumental viewpoint, problems associated with the dynamic range of the analog-to-digital converter (ADC) cannot be neglected even if modern spectrometers are able to encode the signal with 12 or 16 bits. Hence special attention has to be paid (solute) to the ability to measure correctly small signals of analyte in the presence of the highly intense ones (co-solvent), thus yielding a further criterion (E).³⁶

In practice, the selection of co-solvent is not so simple and a poor choice can adversely affect the quality of the quantitative results. Each co-solvent

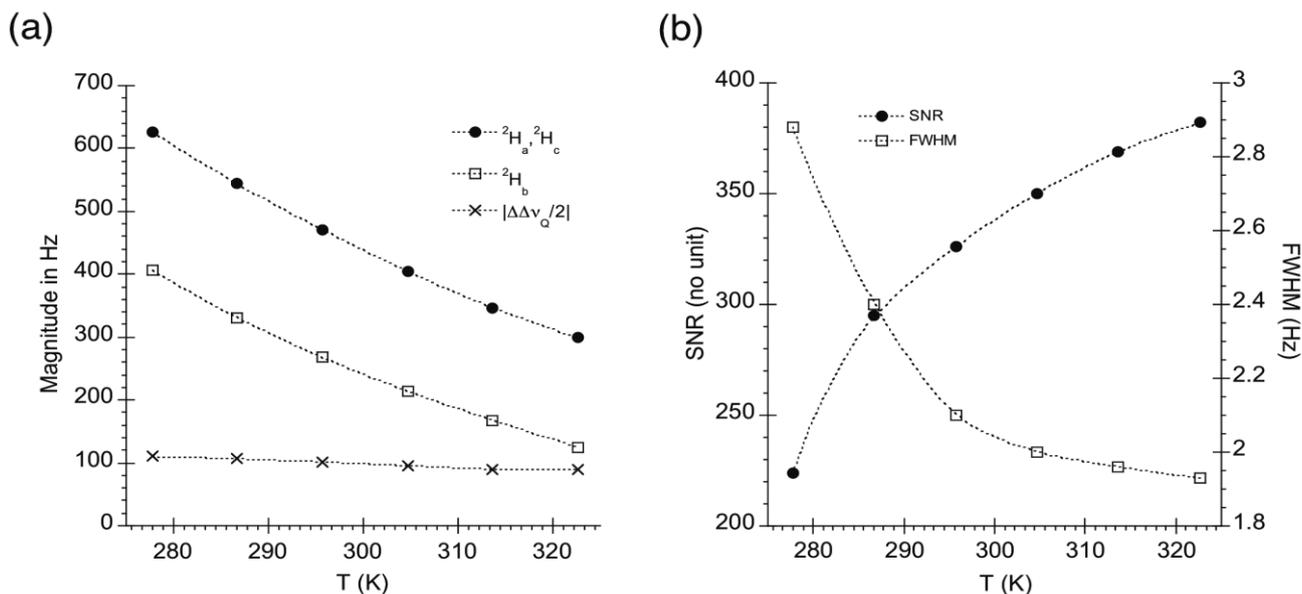


Figure 6 (a) Variation of $|\Delta v_Q$'s for ${}^2\text{H}_a$, ${}^2\text{H}_b$ and ${}^2\text{H}_c$ and the half-difference between sites ${}^2\text{H}_{a,c}$ and ${}^2\text{H}_b$ vs. T (K). (b) Example of variation of FWHM and associated SNR for the O-methyl site (measured on tilted 2D maps) vs. T (K). As expected, FWHM and S/N values vary monotonically but inversely when T increases. (b) These data were measured for sample **S-6**.

possesses specific advantages and drawbacks in relation to criteria A to D. Although in this article we specifically discuss the various guiding conditions and criteria to optimise the acquisition of spectra for vanillin, this approach is applicable for any another analyte. Data relative to the organic co-solvents (neat or mixture) tested and the spectral separations are reported in **Table 1** and plotted in **Figure 5**.

Despite vanillin being highly soluble in CH_3CN (see **Figure 1a**),¹⁰ this solvent does not dissolve PBLG

fibres, and hence does not satisfy the first criterion (A). CHCl_3 (**S-2**) is generally the most used co-solvent for PBLG systems due its large solubilisation power (B), its high molecular weight and its single ${}^2\text{H}$ site (E). However its anisotropic chemical shift is close to the aromatic resonances of vanillin (C) and the small half-difference of RQCs between H_a and H_b ($|\Delta\Delta v_Q/2| = 26$ Hz) (D) are not fully resolved. Replacing CHCl_3 by other chlorinated solvents such as CCl_4 (**S-1**), CH_2Cl_2 (**S-3**) or $\text{Cl}_2\text{CHCHCl}_2$ (**S-4**) ensures that there are no ${}^2\text{H}$ signals around the aromatic region, while the ${}^2\text{H}$ sites of the analyte resonate at the same δ values. Results obtained with CH_2Cl_2 and $\text{Cl}_2\text{CHCHCl}_2$ (**S-3** and **S-4**) show larger spectral separations, $|\Delta\Delta v_Q/2|$, compared to CHCl_3 . This advantage is, however, counterbalanced by the presence of two magnetically equivalent ${}^2\text{H}$ sites, which contribute to the same ${}^2\text{H}$ signal and strongly increases their intensity compared to the aromatic signals from the analyte (E). This difference of peak intensity can be roughly quantified following the ratio, R:

$$R = \frac{P_i^{\text{co-solv.}} \cdot M^{\text{anal.}} \cdot m^{\text{solv.}}}{P_i^{\text{anal.}} \cdot M^{\text{co-solv.}} \cdot m^{\text{anal.}}}, \quad (3)$$

assuming that the $({}^2\text{H}/{}^1\text{H})_i$ isotopic ratios and FWHM of the ${}^2\text{H}$ signals for solute and co-solvent are the same. In **Eq. (3)**, $P_i^{\text{co-solv.}}$ and $P_i^{\text{anal.}}$ are the stoichiometric number of sites i of co-solvent and that of analyte contributing to the ${}^2\text{H}$ signals to compare, whilst m and M are their mass and molecular weight, respectively. Depending on the nature of the co-solvents, the parameter R can vary from 0 to 27 (**Table 1**, column 5). *A priori*, CCl_4 could appear as an ideal co-solvent due to the absence of any ${}^2\text{H}$ signal. Unfortunately, neither vanillin nor PBLG molecules are soluble in CCl_4 used alone (C_a). Nevertheless, mixtures of CCl_4 with a protonated solvent leads to reduced R values, making the solubilisation of solute and polymer possible. Such an alternative has been also employed in the SNIF-NMR® protocol for the isotope analysis of long-chain fatty acids.³⁷ A comparison of the data obtained with neat solvents (**S-1** to **S-4**) or mixtures (**S-3** to **S-7**) indicates that:

i) the $\text{CHCl}_3/\text{CCl}_4$ mixture (**S-5**) produces larger inter-line separations between H_a and H_b ($|\Delta\Delta v_Q/2| = 63$ Hz) compared to **S-2**, but the QDs of H_c and of CHCl_3 partly overlap on the map (same δ and Δv_Q) (C_c);

ii) the CH₂Cl₂/CCl₄ mixture (**S-6**) offers larger separations ($|\Delta\Delta\nu_Q/2| = 102$ Hz) while the contribution to the signal solvent is reduced by a factor 2;

iii) the Cl₂CHCHCl₂/CCl₄ mixture (**S-7**) is less adapted than the others because the vanillin partly recrystallizes at 296 K. Working at higher T (over 320 K) reduces the problem, but concomitantly increases significantly the T₁(²H)^{max} of the solute. Note that for ratios over 55% of CCl₄, the solubilisation of vanillin and PBLG becomes notably incomplete for all mixtures.

Regarding the advantages/drawbacks balance, the mixture PBLG-CH₂Cl₂/CCl₄ (**S-6**) appears to be the most relevant co-solvent at 296 K. For valid quantitative measurements of **S-8** to **S-12** in this system, the optimal sample temperature was set at 311 K. In practice, this new choice is a compromise between three temperature-dependant NMR factors varying differentially with temperature:

- i) the magnitude of ²H-RQC (RQC \searrow when T \nearrow);
- ii) the ²H FWHM which affects inversely the SNR (FWHM \searrow (SNR \nearrow) when T \nearrow);
- iii) the anisotropic T₁(²H)^{max} of solute (T₁(²H)^{max} \nearrow when T \nearrow).

To illustrate the two first points, the variation of RQCs for aromatic sites and the variation of FWHM and S/N for methyl group are plotted in **Fig. 6a** and **Fig. 6b**, respectively. In practice, the FWHM directly affects the SNR, and so in turn the standard deviation value (SD); the T₁(²H) factor affects the recycling time of the NMR experiment (T_R = 5 × T₁(²H)^{max}) and so the total acquisition time required. Note here that, anisotropic T₁(²H) values of solute are significantly shorter than isotropic ones due to the natural viscosity of the liquid crystal and a slower dynamic of solute inside the polypeptide fibers. Generally, classical anisotropic T₁(²H) values do not exceed 200 ms, and hence T_R values of about 1 s is sufficient to reach reliable quantitative conditions. In case of vanillin that is characterized by isotropic T₁(²H) value of 1 or less,^{10,38} we evaluated the anisotropic T₁(²H) of the aromatic sites in the range 100 – 130 ± 20 ms.³⁹

4.3 | Orientational behaviour

From an orientational viewpoint, the analysis of NMR results for vanillin deserves some comments, in particular to illustrate some specific aspects associated with NMR in oriented media. Whatever the mesophase, it is observed that $|\Delta\nu_Q(^2H_a)|$ is always equal to $|\Delta\nu_Q(^2H_c)|$ (as expected), but $|\Delta\nu_Q(^2H_{a,c})|$ can be greater or smaller than $|\Delta\nu_Q(^2H_b)|$ as in the case of CHCl₃ or Cl₂CHCHCl₂ co-solvent (**S-2** and **S-4**). This

implies the existence of different alignment tensors in each solvent, but where in every single case two RQCs are identical and can therefore be assigned to H_a and H_c. The variations of magnitude between $|\Delta\nu_Q(^2H_a)|$ and $|\Delta\nu_Q(^2H_b)|$ indicate that the different chlorinated co-solvents do not play the same role in terms of alignment properties, leading to either $S_{C-^2H_a} < S_{C-^2H_b}$ or $S_{C-^2H_a} > S_{C-^2H_b}$.

As seen also, the nature of co-solvent affects the magnitude of ²H-RQCs. Thus, the partial replacement of protonated solvent by CCl₄ increases the degree of alignment of solute by a factor of about two. This variation in ordering can be related to the smaller amount (about half) of co-solvent able to dissolve the polymers. This diminution leads to an increase of the mass of PBLG in the phase from 11.7 to 19.1%, thus increasing the density of fibres *per* volume (package effect), hence the degree of solute orientation.⁴⁰ Another difference compared to isotropic ²H NMR is the dependence of anisotropic NMR interaction (RQC) with temperature. This can be seen as a further adjustable parameter for controlling the order of solute, hence the magnitude of RQC (and their difference). Thus, a study of the variation of RQCs *versus* T (over 50 K) in the case the sample **S-1** (see **Fig. 6b**) showed that ²H splittings can be reduced by a factor varying from 2 (H_{a,c}) to 4 (H_b). More interestingly, we can see that the variation in ²H splitting in the range of T explored can be fitted by a decreasing exponential function of the form " $\Delta\nu_Q[\text{Hz}] = A \exp(-E/kT)$ ", as already reported for PBLG phases.⁴¹ As these sites belong to the same rigid bloc (aromatic ring), the variations of orientational behavior *vs.* T are expected to be very similar, leading to a rather small variation of their differences.

4.4 | Analysis of different vanillin sources

The samples **S-8** to **S-13** were analysed according to the aforementioned experimental procedure. For these samples, 25 mg of CH₂Cl₂ has been replaced by TMU to evaluate the possibility to use this traditional isotopic internal standard directly incorporated in the mesophase. Compared to other molecular standards (e.g. pyridine), TMU is a good choice when combining with an oriented solvent, such as PBLG systems:

- i) TMU is able to dissolve in the PBLG fibres and is compatible with all co-solvents of PBLG³²
- ii) due to its 12 equivalent hydrogen sites a single doublet is expected to be observed in aligned media;
- iii) the fast dynamics of this symmetrical small molecule and the free rotation of its methyl groups both act to average its ²H-RQC to a very small value.²⁴

Table 2 Relative distribution coefficients^a of deuterium, k and k' (in %), associated with the aromatic-site pairs ²H_a/²H_b, ²H_a/²H_c and ²H_b/²H_c, as well as the internal distribution coefficients over the three sites, ²H_a, ²H_b and ²H_c, calculated from the analysis of three NAD anisotropic experiments for samples **S-8** to **S-13**

N°.	Vanillin	Relative data normalized to 100 %					
	Source	k(H _a) / k(H _b) ^a %	k(H _a) / k(H _c) ^a %	k(H _b) / k(H _c) ^a %	k'(H _a) ^b %	k'(H _b) ^b %	k'(H _c) ^b %
S-8	Lignin (N)	46.9 / 53.1 (0.6) ^c	44.3 / 55.7 (0.9)	47.4 / 52.6 (0.3)	29.5 (0.6)	33.4 (0.3)	37.1 (0.5)
S-9	Ferulic acid (N)	48.0 / 52.0 (3.0)	44.1 / 55.9 (1.5)	46.1 / 53.9 (1.6)	29.9 (1.4)	32.3 (2.0)	36.8 (0.3)
S-10	Bean (N)	45.5 / 54.5 (1.7)	44.0 / 56.0 (1.6)	48.4 / 51.6 (0.9)	28.7 (1.3)	34.4 (1.0)	36.9 (1.0)
S-11	Guaiacol (S)	45.4 / 54.6 (1.9)	49.1 / 50.8 (1.2)	53.7 / 46.3 (1.2)	30.9 (1.2)	37.1 (1.4)	32.0 (0.6)
S-12	Ferulic acid (S)	43.9 / 56.1 (1.6)	45.4 / 54.6 (1.0)	51.5 / 48.5 (2.1)	28.3 (1.7)	36.9 (1.9)	34.8 (0.6)
S-13	Unknown (N or S)	45.3 / 54.7 (0.6)	43.9 / 56.1 (0.5)	48.5 / 51.5 (0.7)	28.7 (0.3)	34.6 (0.6)	36.7 (0.5)

^aDistribution coefficients, k, over two sites. ^bDistribution coefficients, k', over the three sites. The values listed are the average of three experimental datasets extracted from 2D-NMR experiments. ^cIn parenthesis is given the simple standard deviation (σ_n) on $k^2(H_i)$ calculated as: $S_n = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$ where $n = 3$.

As expected, TMU shows a single QD with a small splitting ($|\Delta\nu_Q(\text{TMU})| = 21$ Hz) centred at 2.9 ppm and does not interfere with any solute QD's (see **Fig. 3**). Comparison with sample **S-6** shows that the presence of TMU (at 3%) slightly modifies the RQCs of vanillin but the variation remains small.

Results reported for vanillin show that TMU can be pragmatically included in any PBLG phase, hence may serve as a basic isotopic internal reference for quantitative measurements in oriented samples. To explore further and validate this idea, a study of feasibility using model analytes is currently in progress. In the present study, this option has not been considered for three reasons:

- the lack of a suitable certified calibrated TMU standard;
- priority was given to obtaining the maximum number of scans (NS) *per* t_1 increment, thus increasing the SNR; consequently the T_R value chosen is adapted for the $T_1(^2\text{H})$ of aromatic sites at 311 K but not for that of TMU;⁴²
- more pragmatically, as the main aim of this work was to access isotopic data of all aromatic sites and in particular the distribution coefficient, k, between H_a and H_b sites, the knowledge of absolute ($^2\text{H}/^1\text{H}$)_i ratios was not a pre-requisite: the analysis of the relative distribution in the three aromatic isotopomers is sufficient to interpret the results.

Within the experimental framework of this study, the mean SNR measured for each aromatic QD on the three anisotropic 2D maps ranges from 25 to 30. These SNR are not as high as those obtained in 1997 for vanillin, when using about 1 g of

pure vanillin recorded at 11.7 T with a 10 mm o.d. conventional probe.¹ These smaller values originated from three factors:

- the lower quantity of vanillin in the PBLG samples (10 % of that used in 1997);
- the distribution of ²H signals into two components (QD) instead of a single lines as in liquids;
- the larger FWHM values due to systematically smaller

$T_2(^2\text{H})$ values in oriented systems and the site-specific dynamic behaviour of vanillin. This latter effect was particularly noticeable for the aromatic positions (4 - 5 Hz) compared to the methyl group (2.1 Hz) or TMU (1.7 Hz).

These drawbacks, both specific to vanillin and anisotropic NMR, are however partially compensated by the use of a more modern spectrometer (with improved electronic circuitry) operating at 14.1 T (a higher field) and equipped with a selective ²H cryoprobe (basic sensitivity increased by a factor of 4-5), and a higher filling factor (5 mm o.d. instead of 10 mm o.d.). In practice, the protocol adopted and the SNR reached should be sufficient to yield reliable data on the relative ²H content for each aromatic site.

Table 2 lists the averaged value (over three different anisotropic NAD 2D experiments, the tube being recentrifuged between each NMR experiments³¹) of various relative distribution coefficients in deuterium, k and k', (%) associated with three aromatic-site pairs ²H_a/²H_b, ²H_a/²H_c and ²H_b/²H_c, as well as over the three sites, ²H_a, ²H_b and ²H_c for samples **S-8** to

S-13. Thus, the $k'(^2\text{H}_i)$ coefficients are simply expressed as the fraction of peak surfaces of the three aromatic sites, namely:

$$k'_{^2\text{H}_i(i=a,b,c)}(\%) = 100 \cdot \frac{S_{^2\text{H}_i}}{\sum_{i=a,b,c} S_{^2\text{H}_i}} \quad (4)$$

For a better view of results, **Figure 7** displays graphically the variation of relative distribution coefficients, k' , over the three sites. In SI, are given the three graphs corresponding to the k coefficients over two aromatic sites.

The comparative analysis of distribution coefficients, k and k' , is informative, and several deductions can be drawn from the examination of all data collected for this series of vanillin samples.

i) the comparison between sites H_a and H_b shows a noticeable systematic deuterium depletion for position H_a compared to H_b . The same trend is observed when comparing sites H_a and H_c . In terms of isotopic ratios, the results allows us to establish that $(^2\text{H}/^1\text{H})_a < (^2\text{H}/^1\text{H})_b$ and $(^2\text{H}/^1\text{H})_a < (^2\text{H}/^1\text{H})_c$, whatever the origin of precursor of the vanillin (**S-8** to **S-13**).

ii) in contrast, the comparison between sites H_b and H_c indicates a depletion effect on site H_b relative to site H_c ($(^2\text{H}/^1\text{H})_c > (^2\text{H}/^1\text{H})_b$) except for the two synthetic aromatic moieties in vanillin samples (**S-11** and **S-12**).

iii) a difference between vanillin from synthetic (**S-11** and **S-12**) or natural (**S-8** to **S-10**) sources is also observed, when comparing the normalised distribution coefficients, k_a , k_b , k_c over the three sites, even if the effect seems to be less marked for sample **S-12** (ferulic acid).

iv) the strong similarity between the distribution coefficients over two and three sites indicates that the unknown sample (**S-13**) should have a natural origin for the aromatic ring.

At this stage, these experimental observations indicate that new insights into the origin of vanillin samples can be obtained based on the relative $^2\text{H}/^1\text{H}$ ratios found in the aromatic ring hydrogens. Crucially, it appears that the ratio is $\text{H}_a < \text{H}_b < \text{H}_c$ for the samples of natural origin, be it from *Vanilla* pod or from a natural precursor (ferulic acid or lignin), whereas the two synthetic samples (S) both show $\text{H}_a < \text{H}_b > \text{H}_c$. However, this relationship needs to be established with a larger number of samples.

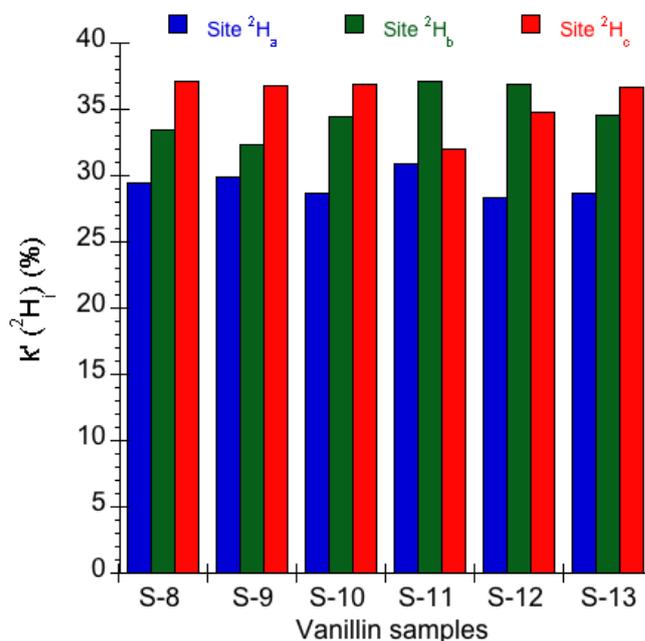


Figure 7 Variations of the relative distribution coefficients of deuterium for the three sites (H_a , H_b and H_c) for samples **S-8** to **S-13**. $k'(^2\text{H}_a) + k'(^2\text{H}_b) + k'(^2\text{H}_c) = 100\%$.

4.5 | Possible interpretation of results in relation to biosynthesis

As indicated earlier, isotopic distributions can give insight into biosynthetic processes. What then might be deduced about the biosynthesis of vanillin from these relative $^2\text{H}/^1\text{H}$ ratios?

The biosynthesis of vanillin in *V. planifolia* has received much attention but is still poorly understood. While it is considered that natural vanillin is derived from the general phenylpropanoid pathway via shikimate, L-phenylalanine, cinnamic acid, and 4-coumaric acid (see **Figure 8**), the order of introduction of the 3-hydroxyl, the methylation and the chain shortening are open to debate (see ref. 43 for a detailed discussion). The convention is that 4-coumaric acid undergoes 3-hydroxylation, methylation to feruloyl-CoA and, finally chain-shortening. The crucial chain-shortening reaction has not been fully elucidated in *Vanilla* spp.: a putative 'vanillin synthase' from *V. planifolia* has been proposed,⁴⁴ but this identification has been seriously questioned.⁴⁵

Two striking features arise from the analysis of the $^2\text{H}/^1\text{H}$ ratios of the three aromatic hydrogens in natural vanillin herein reported and those previously measured by Remaud et al.¹⁰ In that paper, the $\text{C}_2\text{-H}$ ($^2\text{H}_a$) and the $\text{C}_6\text{-H}$ ($^2\text{H}_b$) are not resolved, but their mean value is

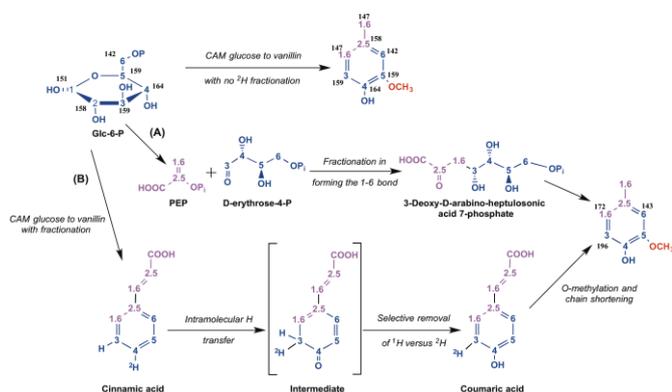


Figure 8. Reduced schematic pathway for the biosynthesis of vanillin, showing the probable key steps introducing isotopic fractionation. The top line indicates the predicted values for $^2\text{H}/^1\text{H}$ (ppm) based on CAM glucose in the absence of any fractionation. (A) illustrates the suggested cause of ^2H enrichment at the C_6 position. (B) illustrates the suggested cause of ^2H enrichment at the C_5 position. Atoms in vanillin derived from glucose via D-erythrose-4-phosphate molecule are shown in blue, while sections in violet are derived from glucose via phosphoenolpyruvate (PEP). Arrows represent multiple steps.

consistently lower than the $\text{C}_5\text{-H}$ ($^2\text{H}_c$) by 39 and 37 ppm for natural vanillin or vanillin from lignin, respectively (see **Figure 1** for atomic numbering of carbons).¹⁰ From the ratios measured in the present dataset, in which the $\text{C}_2\text{-H}$ ($^2\text{H}_a$) and the $\text{C}_6\text{-H}$ ($^2\text{H}_b$) are resolved, the distribution coefficients (**Table 2**) indicate a difference of 28 and 16 ppm respectively, with the $\text{C}_6\text{-H}$ ($^2\text{H}_b$) being the richer position. It is notable that almost the same coefficients are seen between the positions in the vanillin derived from natural ferulic acid (**S-9**) as in the lignin-derived sample (**S-8**). This would indicate that these fractionations are introduced during the biosynthesis of L-phenylalanine, the common precursor to both vanillin and lignin.

The measured values will represent a combination of biosynthetic origin and the isotope effects associated with reactions in the long pathway to L-phenylalanine. Let us consider first the C_2 and C_6 positions, derived respectively from the C-6 of glucose via D-erythrose-4-phosphate and the C-1+C-6 of glucose via phosphoenolpyruvate (PEP) (**Figure 8**). During the fusion of PEP and D-erythrose-4-phosphate to form 3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate, a new bond is created between the carbons that will become respectively the C_6 and C_5 of vanillin. During this reaction, the methylene of PEP undergoes an sp^2 to sp^3 transition, typically associated with an inverse secondary KIE, which tends to enrich the product in ^2H relative to the substrate. Hence the approximate 20 ppm enrichment relative to the estimated value based on glucose⁴⁶ may, at least partially, be explained in relation to this step in the pathway. The difference observed between the C_2 and C_6 positions may also be related to their relationships to glucose. At the C-6 of glucose from *Ananas*, a

plant that like *Vanilla* exploits Crassulacean acid metabolism (CAM) for carbon-fixation, the two H positions have a difference of 14 ppm.⁴⁷ Stereospecific removal of the richer of these during chorismate synthesis would tend to impoverish the $^2\text{H}_a$ relative to the $^2\text{H}_b$, fully compatible with the observed relationship.

Turning to the $^2\text{H}/^1\text{H}$ ratio found at the $\text{C}_5\text{-H}$ ($^2\text{H}_c$), a different explanation is required. The H_c is considerably richer than might be predicted on the same basis: calculated at 159 ppm from its only origin, the C-3 of CAM glucose; measured at 196 ppm in natural vanillin. Schmidt et al evoked the probable intervention of an intramolecular hydrogen transfer associated with the introduction of the 4-hydroxyl group.⁴⁷ In this mechanism, the H at the position of hydroxylation makes a vicinal transfer to the adjacent position, one H then being removed to re-establish the aromatic ring.⁴⁸ The effect of this will be that the position adjacent to the site of hydroxylation will become enriched in ^2H , as the sp^3 to aromatic transition will select in favour of the lighter isotope. Taking a typical secondary KIE(^2H) of 1.1 - 1.2 for the isotope selectivity, and estimated values for the $\text{C}_4\text{-H}$ and $\text{C}_5\text{-H}$ obtained from glucose of 164 and 159 ppm respectively, this would lead to a value between 190 ppm (0% retention of ^2H from C_4) and 197 ppm (100% retention of ^2H from C_4). These values are close to those measured by isotropic NMR,¹⁰ indicating that this may be the major cause of relative enrichment at this position.

Indirect support for this conclusion can be drawn from a paper that appeared just after Schmidt's careful analysis of the theoretical fractionation.⁴⁷ Martin et al. reported the mean $^2\text{H}/^1\text{H}$ ratio values for the C_3 and C_5 positions of a range of 4-hydroxylated natural aromatic compounds.⁴⁹ In all cases these positions are enriched relative to that also reported for the C_4 of benzaldehyde and methyl cinnamate. However, such interpretations need to be treated with caution. As detailed in this paper,⁴⁹ considerable variation in values for precursors, variation in pathways, exchange reactions during biosynthesis or during extraction and purification, and uncertainties such as the extent to which the NAD(P)H pool is depleted relative to cell water can all act to introduce 'noise' into the processing.

5. | CONCLUSION

In this paper we have used the analytical power of 2D NMR in oriented solvents for the full ^2H isotopic characterization of vanillin, the most widely-used aroma molecule in food products and an important component of perfumery. Critically, the technique is demonstrated capable of spectrally distinguishing between all ^2H aromatic signals by combining two complementary sets of anisotropic information: the $\delta_{\text{aniso}}(^2\text{H})$ and $\Delta\nu_{\text{Q}}(^2\text{H})$. This means that, for the first time, access to all the relative individual isotopic ratios is achieved, with implicit applications in traceability and biochemical studies.

The analysis of isotopic data on the three aromatic sites reveals that considerable biosynthetic data is available in the obtained results. Relating this to the underlying biochemistry and, in particular, using it to distinguish between different biosynthetic options is potentially feasible, but much groundwork is required before this can be done on a sound basis. An advantage of using such an approach is that it avoids the confusion that can be introduced from conventional isotope-enrichment studies. Fed precursors can be incorporated due to the plasticity of pathways and the promiscuity of enzymes, leading to conclusions that may be based on the availability of a fed compound rather than on its being a component of the natural route used *in planta* (see ref. 43 for a discussion of this in relation to vanillin).

Promoting a new analytical methodology in the frame of isotopic measurements is both an exciting and difficult challenge. It requires the adoption of new usages and/or thought mechanisms. Unfortunately, novel approaches are all too often seen as sidetracking, thus limiting their interest as an alternative to existing methods. In this work, we have shown how to rationalize the principles of usage that should lead to systematically developing suitably optimized experimental conditions to guarantee optimal quantitative results when anisotropic media are used as solvents. Obviously, the principles presented in the frame of this investigation are generic and should serve as a template for studying any analyte of interest.

The next step in methodological developments of anisotropic 2D-NMR applied to isotopic analysis will consist in the elimination of co-solvent ^2H signals using adequate selective saturation experiments. This work is currently in progress.⁵⁰

ACKNOWLEDGMENTS

P.L. and P.B. acknowledge both the CNRS and the University of Paris-Sud for their recurrent funding of fundamental research. T.T.B. thanks MESRI for his Ph.D. grant. P.L. Thanks Dr. J.-P. Bayle for his critical reading of the manuscript. R.R. and G.R. acknowledge their recurrent funding from the University of Nantes and the CNRS, and the Région Pays de la Loire for financial support through the project PLAISIR.

REFERENCES AND NOTES

- Jézéquel T, Valentin Joubert, V, Giraudeau P, Remaud GS, Akoka S. The new face of isotopic NMR at natural abundance. *Magn. Reson. Chem.* 2017;55:77-90.
- Martin GJ, Martin ML. Deuterium labelling at the natural abundance level as studied by high-field quantitative H-2 NMR. *Tetrahedron Lett.* 1981;22:3525-3528.
- A recent overview on the ^{13}C PSIA of vanillin has been published in this journal. See Remaud GS, Akoka S. A review of flavors authentication by position specific isotope analysis by nuclear magnetic resonance spectrometry: the example of vanillin. *Flavour Fragrance J.* 2016;32:77-84.
- Tenailleau E, Lancelin P, Robins RJ, Akoka S. Authentication of the origin of vanillin using quantitative natural abundance C-13 NMR. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52:7782-7787.
- Thibaudeau C, Remaud G, Silvestre V, Akoka S. Performance Evaluation of Quantitative Adiabatic ^{13}C NMR Pulse Sequences for Site-Specific Isotopic Measurements. *Anal. Chem.* 2010;82:5582-5590.
- Remaud GS, Bussy U, Lees M, Thomas F, Desmurs JR, Jamin E, Silvestre V, Akoka S. NMR spectrometry isotopic fingerprinting: A tool for the manufacturer for tracking Active Pharmaceutical Ingredients from starting materials to final medicines. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2013;48:464-467.
- Merchak N, Bejjani J, Rizk T, Silvestre V, Remaud GS, Akoka S. C-13 isotopomics of triacylglycerols using NMR with polarization transfer techniques. *Anal. Meth.* 2015;7:4889-4891
- Toulemonde B, Horman I, Egli H, Derbesy M. Differentiation between natural and synthetic vanillin samples using ^2H NMR. *Helv Chim Acta* 1983;66:2342-2345.
- Maubert C, Guérin C, Mabon F, Martin GJ. Determination of the origin of vanillin by multivariate analysis of the sitespecific natural isotope fractionation factors of hydrogen. *Analisis* 1988;16:434-439.
- Remaud GS, Martin Y-L, Martin GG, Martin GJ. Detection of sophisticated adulterations of natural vanilla flavors and extracts: Application of the SNIF-NMR method to vanillin and p-hydroxybenzaldehyde. *J. Agric. Food Chem.* 1997;45:859-866.
- Jamin E, Martin F, Martin GJ. Determination of site-specific (deuterium/hydrogen) ratios in vanillin by ^2H -nuclear magnetic resonance spectrometry: collaborative study. *J. AOAC Int.* 2007;90:187-195.
- Greule M, Tumino LD, Kronewald T, Hener U, Schleucher J, Mosandl A, Kepple F. Improved rapid authentication of vanillin using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^2\text{H}$ values. *Eur. Food Res. & Technol.* 2010;231:933-941.
- Bensaid FF, Wietzerbin K, Martin G, J. Authentication of natural vanilla flavorings: Isotopic characterization using degradation of vanillin into guaiacol. *Agric Food Chem.* 2002;50:6271-6275
- Gu F, Chen Y, Hong Y, Fang Y, Tan L. Comparative metabolomics in vanilla pod and vanilla bean revealing the biosynthesis of vanillin during the curing process of vanilla. *AMB Expr.* 2017;7;116-125.
- Geißler K, Greule M, Schäfer U, Hans J, Geißler T, Meier L, Keppler F, Krammer G. Vanilla authenticity control by DNA barcoding and isotope data aggregation. *Flavour Fragrance J.* 2017;32:228-237.
- Lesot P, Merlet D, Loewenstein A, Courtieu J. Enantiomeric Visualisation using Proton-Decoupled Natural Abundance Deuterium NMR in Poly(γ -benzyl-L-glutamate) Liquid Crystalline Solutions. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1998;9:1871-1881.
- Sarfati, M, Lesot P, Merlet D, Courtieu J. Theoretical and experimental aspects of enantiomeric differentiation using natural abundance multinuclear NMR spectroscopy in polypeptide liquid crystals. *Chem. Commun.* 2000;2069-2081.

18. Lesot P, Sarfati M, Courtieu J. Natural abundance deuterium NMR spectroscopy in polypeptide liquid crystals as a new and incisive means for enantiodifferentiation of chiral hydrocarbons. *Chem. Eur. J.* 2003;9:1724-1745.
19. Lesot P, Aroulanda C, Zimmermann H, Luz Z. Enantiotopic discrimination in the NMR spectrum of prochiral solutes in chiral liquid crystals. *Chem. Soc. Rev.* 2015;44:2330-2375.
20. Lesot P, Aroulanda C, Billault I. Exploring the analytical potential of NMR spectroscopy in chiral anisotropic media for the study of the natural abundance deuterium distribution in organic molecules. *Anal. Chem.* 2004;76: 2827-2835.
21. Baillif V, Robins RJ, Billault I., Lesot P. Assignment of absolute configuration of natural abundance deuterium signals associated with (*R*)- and (*S*)-enantioisotopomers in a fatty acid aligned in a chiral liquid crystal: enantioselective synthesis and NMR Analysis. *J. Am. Chem. Soc.*, 2006;128:11180-11187.
22. Serhan Z, Martel L, Billault I, Lesot P. Complete determination of site specific bio-enantiomeric excesses in linoleic acid using natural abundance deuterium 2D NMR in polypeptide mesophase. *Chem. Commun.* 2010;46:6599-6601.
23. Baillif V, Robins R, Le Feunten S, Lesot P, Billault I. Investigation of fatty acid elongation and desaturation steps in *Fusarium lateritium* by quantitative two-dimensional deuterium NMR spectroscopy in chiral oriented media. *J. Biol. Chem.*, 2009;284:10783-10792.
24. Lesot P, Serhan Z, Billault I. Recent advances in the analysis of the site-specific isotopic fractionation of metabolites such as fatty acids using anisotropic natural abundance ^2H NMR spectroscopy: application on conjugated linolenic methyl esters. *Anal. Bioanal. Chem.* 2011;399:1187-1200.
25. Berdagué P, Lesot P, Jacob J, Terwilliger VJ, Le Milbeau C. Contribution of NAD 2D-NMR in liquid crystals to the determination of hydrogen isotope profile of methyl groups in Miliacin. *Geochim. Cosmochim. Acta* 2016;173:337-351.
26. Lesot P. Deuterium NMR of Liquid-crystalline Samples at Natural Abundance, *Encyclopedia of Magnetic Resonance* (eMagRes), 2013;3:315-334.
27. Navarro-Vazquez A, Berdagué P, Lesot P. Integrated computational protocol for analyzing quadrupolar splittings from natural abundance deuterium NMR spectra in (chiral) oriented media. *ChemPhysChem.*, 2017;18:1252-1266.
28. Lafon O, Lesot P, Merlet D, Courtieu J. Modified z-gradient filtering as a new mean to obtain phased deuterium autocorrelation 2D NMR spectra in oriented solvents. *J. Magn. Reson.* 2004;171:135-142.
29. Lesot P, Lafon O. Experimental detection of achiral and chiral naturally abundant ^{13}C - ^2H isotopomers by 2D-NMR in liquids and chiral oriented solvents. *Anal. Chem.*, 2012;84:4569-4573.
30. Lesot P, Lafon O, in *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, 2017, 3rd Edition, Vol. 3, 1-14. Eds. Linton, Tranter and Kopenaal, Elsevier. DOI:10.1016/B978-0-12-409547-2.12110-9.
31. High degree of homogeneity of phase can be achieved by a series of low-speed centrifugation cycles of the tube at short time repetition (between each centrifugation cycle, the tube is inverted).
32. The $T_1(^2\text{H})$ of TMU in oriented samples can be determined by classical ^2H inversion-recovery 1D experiments.
33. The assignment of doublet of OH has been confirmed by adding a drop of $^2\text{H}_2\text{O}$ in the sample.
34. The shielded/deshielded contribution of ^2H chemical shift anisotropy to the ^2H line position is small and does not exceed a few Hz.
35. Velavan R, Sureshkumar P, Sivakumar K. Vanillin-I. *Acta. Cryst.*, 1995;C51:1131-1133.
36. Haláček J, Višćor I, Kasal M. Dynamic range and acquisition system. *Measurement Science Review*, 2001;1:71-74.
37. Billault I, Guiet S, Mabon F, Robin RR. Natural deuterium distribution in long-chain fatty acids is nonstatistical: A site-specific study by quantitative H-2 NMR spectroscopy. *ChemBioChem*, 2001;6:425-431.
38. Guillou C, Remaud G, Martin GJ. Application of deuterium NMR and isotopic analysis to the characterization of foods and beverages. *Trends in Food Science & Technology*, 1991;2:85-89.
39. The range of T_1 values is consistent with the FWHM values measured for these sites (4 to 6 Hz), assuming that $T_2(^2\text{H}) \approx T_1(^2\text{H})$ and considering that the mesophase is uniformly and homogeneously oriented with no major magnetic inhomogeneities ($T_2(^2\text{H}) \approx T_2(^2\text{H})$). In practice, the control of the lineshapes (symmetry of peak) and the linewidths (typically 1.5 - 2 Hz) of co-solvent provide good indications on the orientational and magnetic homogeneity of the sample.
40. The analysis of spectral data obtained with a 19% w/w PBLG/ CHCl_3 sample [$\Delta\nu_Q(\text{CHCl}_3)$] (580 Hz) has confirmed the increasing of ordering, but has also shown that [$\Delta\nu_Q(^2\text{H}_{a,o})$] (441 Hz) < [$\Delta\nu_Q(^2\text{H}_b)$] (733 Hz) as for the sample at 11.7% (**S-2**). This indicates that CCl_4 plays also a non-negligible role in the alignment process (overall and local effect) of vanillin and shows the complexity of orientational mechanisms in co-solvent mixtures.
41. Lafon O, Lesot P, Fan CA, Kagan HB. Analysis of intramolecular dynamic processes in enantiomeric diaryl atropisomers and related derivatives through ^2H NMR in polypeptide liquid crystals. *Chem. Eur. J.*, 2007;13:3772-3786.
42. Note here that the majority of PBLG samples remain very stable in the magnet for periods varying between 15-18 hours. Beyond the sample homogeneity is not always guarantee and a significant loss of spectral resolution can be observed. De facto, a balance between T_R and NS can be found to reach acceptable SNR.
43. Dixon RA, in *Handbook of Vanilla Science and Technology* (Eds.: D. Havkin-Frenkel, F. C. Belanger), Blackwell Publishing Ltd., 2011;pp. 292-298.
44. Gallage. NJ., Hansen EH, Kannangara R, Olsen C.E., Motawia MS, Jørgensen K, Holme I, Hebelstrup K, Grisoni M, Møller BL. Vanillin formation from ferulic acid in *Vanilla planifolia* is catalysed by a single enzyme. *Nature Communications* 2014;5:article N° 4037.

45. Yang H, Barros-Rios J, Kourteva G, Rao X, Chen F, Shen H, Liu C, Podstolski A, Belanger F, Havkin-Frenkel D, Dixon RA. A re-evaluation of the final step of vanillin biosynthesis in the orchid *Vanilla planifolia*. *Phytochemistry* 2017;139:33-46.
46. Zhang B-L, Billault I, Li X-B, Mabon F, Remaud GS, Martin ML. Hydrogen isotopic profile in the characterization of sugars. Influence of the metabolic pathway. *J. Agric. Food. Chem.* 2002;50:1574-1580.
47. Schmidt H-L, Werner RA, Eisenreich W, Fuganti C, Fronza G, Remaud GS, Robins RJ. The prediction of isotopic patterns in phenylpropanoids from their precursors and the mechanism of the NIH-shift: Basis of the isotopic characteristics of natural aromatic compounds. *Phytochemistry* 2006;67:1094-1103.
48. Daly JW, Jerina D, Witkop B. Arene oxides and NIH shift - Metabolism, toxicity and carcinogenicity of aromatic-compounds. *Experientia* 1972;28:1129-1149.
49. Martin GJ, Heck G, Djamaris-Zainal R, Martin ML. Isotopic criteria in the characterization of aromatic molecules. 1. Hydrogen affiliation in natural benzenoid/phenylpropanoid molecules. *J. Agric. Food. Chem.* 2006;54:10112-10119.
50. Giraudeau P, Silvestre V, Akoka S. Optimizing water suppression for quantitative NMR-based metabolomics: a tutorial review. *Metabolomics* 2015;11:1041-1055.

Study of the Vanillin by anisotropic Deuterium 2D-NMR: Contribution of polypeptide Liquid Crystals to Isotope Analysis



T. Texier Bonniot⁽¹⁾, Ph. Berdagué⁽¹⁾, R. Robins⁽²⁾, G. Rémaud⁽²⁾ and Ph. Lesot⁽¹⁾

(1)UMR CNRS 8182, RMN en Milieu Orienté, ICMMO, Université Paris-Sud / Université Paris-Saclay, Bât 410, 15, rue Georges Clémenceau, 91405 Orsay Cedex.

(2)UMR CNRS 6230, Chimie Et Interdisciplinarité : Synthèse Analyse Modélisation, Université de Nantes, 2, rue de la Houssinière, 44322 Nantes Cedex.

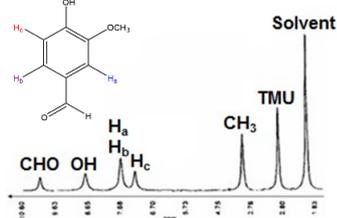
université
PARIS-SACLAY



The deuterium SNIF-NMR® protocol is the powerful technique for the measurement of intramolecular ²H isotopic ratios (at natural abundance). For the Vanillin, the analysis of site-specific isotopic fractionation remains incomplete due to the overlap of two aromatic ²H resonances. In this study, we present the analytical potential of ²H-¹H 2D-NMR at natural abundance level in polypeptide liquid-crystals compared to isotopic ²H 1D-NMR.

Advantage of NMR in liquid crystal solvents

In the case of Vanillin, the position specific (²H/¹H) isotopic analysis (PSIA) remains ²H incomplete due to the overlap of two resonance on the aromatic ring and the impossibility of separating these fortuitous isochronous nuclei by isotropic ²H 1D-NMR method used in the SNIF-NMR® protocol (using isotropic liquid). We can see below this non-discrimination of ²H_a and ²H_b sites on the 1D-NMR spectrum recorded in CH₃CN.



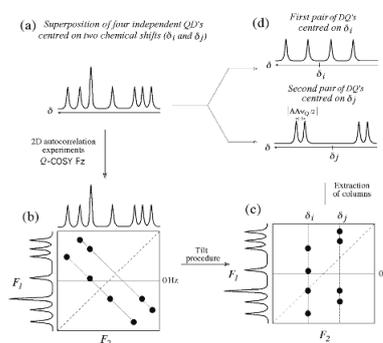
²H-¹H 1D-spectrum of the vanillin recorded in CH₃CN in presence of TMU recorded at 77.7 MHz.

If the isotropic solvent is replaced by a liquid crystal where molecules are oriented in average, we can access to new **anisotropic NMR interaction**, as **²H quadrupolar interaction** that generates a better spectral distribution of ²H resonances susceptible to reduce the peak overlapping on 1D-NMR spectra.

The anisotropic ²H-¹H NMR spectra are governed by the anisotropic ²H chemical shift and the ²H residual quadrupolar coupling (²H-RQC). Each inequivalent ²H sites gives a quadrupolar doublet (QD) centred on anisotropic chemical shift δ_{aniso} .

The important **drawback** of anisotropic 1D-NMR spectra is the **complexity of spectrum**. In fact, each isotropic signals presents on the spectra is split on two components (QD). This drawback is substantially **eliminated by 2D-NMR** experiments which split the ²H information on the two spectral dimensions (F_1 and F_2) and **autocorrelate both components for each QD**.

As seen on this map, each **inequivalent ²H site is discriminated** and can be **extracted** after a tilt procedure (see below).

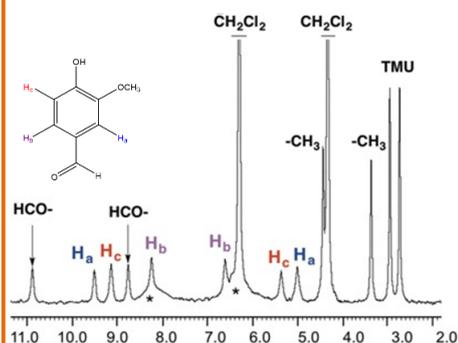


Principle of discrimination on 1D spectrum into two sub-spectra in the case of ²H Q-COSY-Fz 2D experiment.

Application of anisotropic NMR for the vanillin

For minimizing the orientational inhomogeneities and reach the highest possible resolution of ²H anisotropic spectra, samples of **vanillin** are prepared with 80 mg of vanillin, 90 mg of **PBLG** (chiral polymer) and 600 mg of **chlorinated organic co-solvent**.

We can see below the complete discrimination of all inequivalent ²H sites on the anisotropic 1D-NMR spectra (H_a , H_b , H_c).

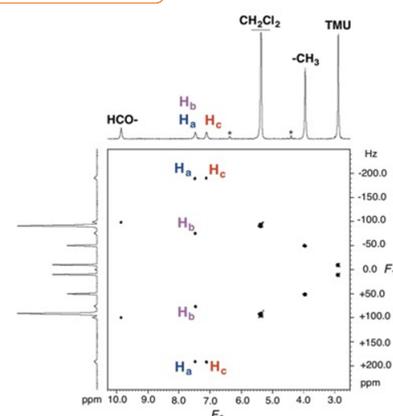


91.2 MHz ²H-¹H 1D-spectrum of the vanillin recorded in a mixture of PBLG/CH₂Cl₂/CCl₄ in presence of TMU.

The application of the ²H-¹H 2D-NMR **spectra** for the sample of vanillin (right panel) shows the discrimination of each inequivalent ²H sites of the molecule. Surface of peaks can be evaluated to determine the relative isotope ²H/¹H ratios at H_a , H_b , H_c sites. Due to the presence of TMU, we can study the isotopic ratio for each ²H sites accordingly to the SNIF-NMR® protocol. Table below shows the isotopic ratio difference between aromatic site of vanillin assuming (²H/¹H)_c = 100 ppm. Analysis of results from reaction mechanisms viewpoint is in progress.

Investigation of ²H isotopic profile allows to determinate the origin (natural or synthetic) of analytes. As the natural vanillin sample is sold for several hundred euros/kg, it is necessary to know the origin of sample for fighting against frauds (adulteration).

Vanillin	H_a (ppm)	H_b (ppm)	H_c (ppm)	$H_a + H_b$ (ppm)	$K_{a/b}$
Lignin	75.6	90.2	100	165.8	45.6/54.4
Guaiacol	90.9	91.8	100	182.7	49.7/50.3
Ferulic (S)	81.3	95.3	100	186.6	43.5/56.5
Ferulic (N)	80.3	93.7	100	174.0	46.1/53.9
Bean	76.2	88.1	100	164.3	44.4/55.6



91.2 MHz NAD Q-resolved 2D map of the vanillin recorded in 15 hours and where all ²H QDs are spectrally discriminated.

Reference :

1) Martin G. J., Martin M. L., *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 3525

2) Lesot P., Aroulanda C., Zimmermann H., Luz Z., *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 2330–2375

3) Texier-Bonniot T., Berdagué P., Robins R., Rémaud G., Lesot P., **2017**, in preparation

Selective Suppression of the Quadrupolar Doublets of Solvent in ^2H 2D-NMR Experiments in Lyotropic Liquid Crystals

T. Texier Bonniot⁽¹⁾, Ph. Berdagué⁽¹⁾, B. Luy⁽²⁾ and Ph. Lesot^{*(1)}

(1) UMR CNRS 8182, RMN en Milieu Orienté, ICMMO, Université Paris-Sud / Université Paris-Saclay, Bât 410, 15, rue Georges Clémenceau, 91405 Orsay Cedex.

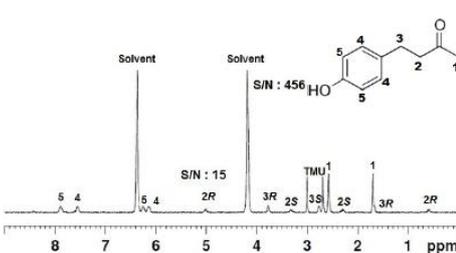
(2) Karlsruhe Institute of Technology, Institut für Biologische Grenzflächen 4 (IBG-4), Campus Nord, Hermann-von-Helmholtz-Platz 1, Geb. 351, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen, Germany.



NMR spectroscopy is nowadays an unavoidable analytical tool for chemistry and related domains. By replacing isotropic solvents by organic lyotropic liquid crystals (LLC), solute molecules adopt an averaged orientational order. Thus, the use of these anisotropic media makes possible to access to all order-sensitive NMR anisotropic interactions (RDC, RQC, RCSA) which are averaged to zero in liquids. A possible drawback of LLCs is the presence of intense ^2H signals on Natural Abundance Deuterium NMR (NAD NMR) spectra, due to large amount of the organic co-solvent. In this work, we present a NMR strategy to experimentally eliminate the two components of ^2H quadrupolar doublet (QD) of co-solvent.

Suppression using the selective "WET" pulse train

In the case of NAD NMR in LLC systems, the molar concentration of solute (amount, MW of analyte) is generally much lower than the organic co-solvent one. Hence the intensity of ^2H -QD of co-solvent is sometimes much higher than ^2H -QDs of solute signals. The figure below clearly shows the intensity difference between the Frambinone NAD signals and the co-solvent one (CH_2Cl_2).



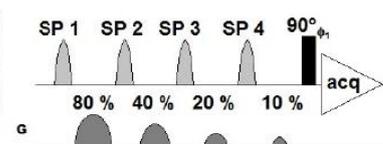
NAD- ^1H 1D-spectrum of the Frambinone recorded in PBLG/ CH_2Cl_2 liquid-crystal in presence of TMU recorded at 91.2 MHz. Note the large difference signal-to-noise ratio (SNR) of signal $^2\text{H}_{2R}$ (arbitrary assign.) compared to co-solvent one.

The presence of intense ^2H signals due to a large amount of organic co-solvent (compared to signal of analyte) can lead to a **biased digitalization** of NAD signals (dynamic range of ADC) that in turn is not compatible with accurate/robust ^2H quantitative measurements.

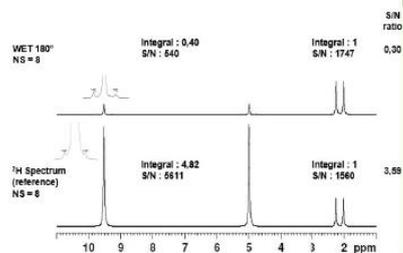
In isotropic media, the elimination of solvent signals has been solved by using a mono-frequency selective pulse (or train of mono-frequency selective pulses) centered on the undesired resonance. Such approach cannot be applied in case of ^2H -NAD NMR in anisotropic environment because ^2H QDs are observed for ^2H signals.

In order to eliminate the co-solvent signal, we developed a selective pulse sequence based on the WET-type (Water suppression Enhanced through T_1 effects) suppression by applying a simultaneous doubly selective shape pulses centred on each component of QD.

The WET shape-pulse sequence and the suppression effect on Acetone- d_6 in PBLG/ CDCl_3 LLC are shown on the right panel.



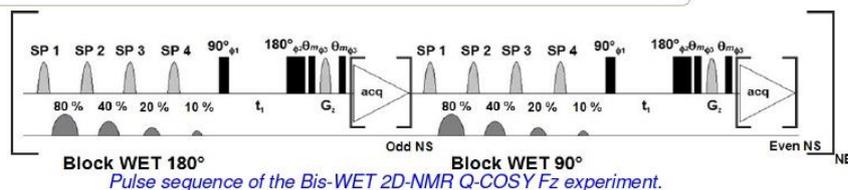
Scheme of selective pulse sequence applied for the suppression of co-solvent ^2H QD.



Elimination of ^2H QD of co-solvent: Here the SNR ratio of CDCl_3 signal is reduced by 10. Note the presence of ^{13}C satellite signals.

Advanced developments and application to NAD 2D-NMR spectroscopy

After observing the effect of doubly selective shape pulses (WET), we designed a two-step experiment with two trains of selective pulses for maximizing the signal suppression. The first block corresponds to a selective saturation with a 90° angle while the second corresponds to a selective saturation with a 180° angle. With these two blocks (Bis-WET), the residual signals of the co-solvent will be acquired positively (90°) or negatively (180°) each two scans. Thus, the final signal will reduce up to 95% relative to the initial signal of the co-solvent.

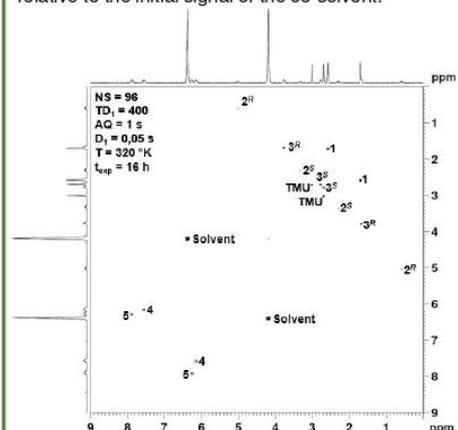


We have incorporated this two blocks selective suppression in 2D pulses experiments (QUOSY) used for simplifying the analysis of complex NAD 1D spectra (Q-COSY Fz and Q-resolved Fz). The results show again a suppression of 95% for the co-solvent QD.

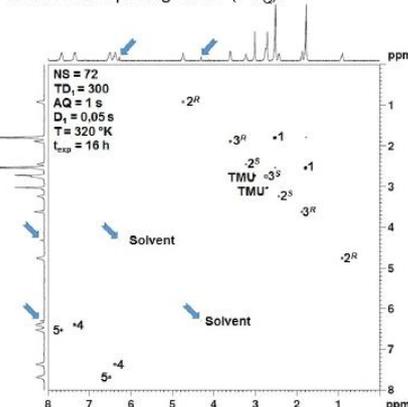
The main drawback of the WET sequence is the increase of experimental time by scans. Indeed, to obtain a sharp selectivity of excitation, each pulse block is composed of four selective pulses with a duration of 200 ms [range of 100-400 ms]. Thus for each scan, the WET pulse duration increases to 800 ms. In the case of Frambinone, we acquired 400 experiments with 96 scans each (left panel). Compared to the NAD 2D classical experiment in a mixture of PBLG/ CH_2Cl_2 the experimental time would increase by 30720 seconds ($0.8 \times 96 \times 400$) leading to a global experimental time of 24 h 30. Assuming a stability of the LCC of about 18-20 hours, it can be preferable to perform the "Bis-WET" QUOSY experiments by reducing the number of t_1 transients and/or scans (see Figure in right panel)

In order to address this problematic, the implementation of the Non-Uniform Sampling (NUS)

protocol is under study as well as the implementation of ^2H pulse sequence able to reduce the splitting of QD ($\Delta\nu_Q$).



92.1 MHz NAD- ^1H Q-COSY Fz map of Frambinone recorded in 16 hours (400 t_1 transients, 96 scans).



91.2 MHz NAD- ^1H Bis-WET Q-COSY Fz map of Frambinone recorded in 16 hours (300 t_1 transients, 72 scans).

Reference :

Lesot P., EmagRes, 2013, 2, 315-334
 Lesot P., Serhan Z., Billault I., Anal. Bioanal. Chem., 2011, 399, 1187-1200
 Merlet D., Ancian B., Courtieu J., Lesot P., J. Am. Chem. Soc., 1999, 121, 5249-5258

Bax A., J. Magn. Res. A, 1985, 65, 142-145
 Smallcombe S., Patt S., Keifer P., J. Magn. Res. A, 1995, 117, 295-303
 Thibaudeau C., Remaud G., Silvestre V., Akoka S., Anal. Chem., 2010, 82, 5582-5590
 Hyberts S., Robson S., Wagner G., J. Biomol. NMR, 2013, 55, 167-178

Methodological Developments of Natural Abundance ^2H 2D-NMR of Organic Molecules in Oriented Solvents

T. Texier Bonniot, Ph. Berdagué, and Ph. Lesot*

UMR CNRS 8182, RMN en Milieu Orienté, ICMMO, Université Paris-Sud / Université Paris-Saclay, Bât 410, 15, rue Georges Clémenceau, 91405 Orsay Cedex.

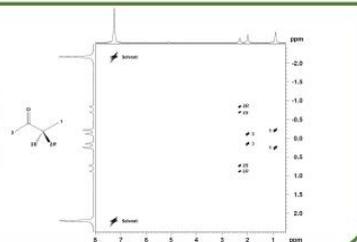
The use of (chiral) lyotropic liquid crystals (LLCs) for NMR analysis, instead of isotropic solvents, makes it possible to obtain an average orientational order for solutes at the NMR time scale. These anisotropic media leads to the detection of order-dependant (anisotropic) NMR interactions (^{13}C - ^1H -RDC, ^{13}C -RCSA, ^2H -RQC) that can be related to key molecular information in organic chemistry^{1,2,3,4}. Interestingly, Anisotropic Natural Abundance Deuterium NMR (ANAD NMR) can provide data on molecular structures⁵ or site specific isotope distribution⁶. In ANAD 2D NMR (involving Q-resolved Fz experiments), there are two experimental drawbacks known : i) the presence of intense ^2H signals on spectra, due to large amount of the organic co-solvent and ii) the experimental NMR times limited by the degradation of homogeneity reducing the quality of NMR spectra. In this work, we present a NMR strategy to eliminate the two components of ^2H quadrupolar doublet (QD) of co-solvent and reduce the experimental NMR time using the Non-Uniform Sampling (NUS) protocol.

Principle of Q-resolved Fz experiments

Due to residual quadrupolar couplings (RQC), detected in anisotropic media, the ^2H NMR spectra in LLCs lead to the observation of quadrupolar doublets (QDs) for each inequivalent ^2H site. Homonuclear NMR experiments of ^2H QUOSY type (QUadrupolar cORrelation Spectroscopy) yield 2D maps where the ^2H signals correspond to the autocorrelations between the two components of each QD.

The figure shows the anisotropic Q-resolved-Fz tilted 2D-spectrum of Butanone where the chemical shifts (δ) and quadrupolar splittings ($\Delta\nu_Q$) are observed in F_2 dimension but, due to the chemical shift refocussing, only $\Delta\nu_Q$ are observed in F_1 dimension.

91.2 MHz NAD- ^1H Q-resolved Fz tilted 2D-spectrum of Butanone dissolved in the PBLG/ CHCl_3 systems (512 t_1 increments and 64 scans) and recorded in 11 hours. The assignment for $^2\text{H}_\alpha$ and $^2\text{H}_\beta$ is arbitrary.

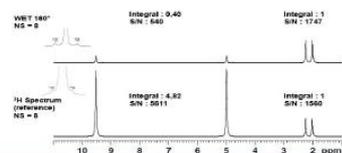
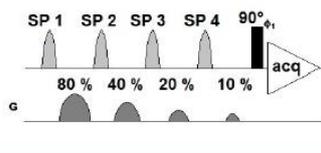


Peak suppression with selective "WET" pulse train

In NAD 2D NMR in LLC systems, the molar concentration of solute is much lower than the organic co-solvent one. Hence the intensity of ^2H -QD of co-solvent (CHCl_3) is much higher than ^2H -QDs of solute. The intense ^2H signals due to a large amount of organic co-solvent can generate a digitalization problems for the analyte signals, that is not compatible with accurate ($^2\text{H}/^1\text{H}$) isotopic quantitative measurements. In isotropic media, we use a mono-frequency selective pulse (or train of mono-frequency selective pulses) centered on the undesired resonance for eliminating the solvent signals^{5,6,7} but in case of ^2H -NAD NMR in anisotropic environment, this approach cannot be possible because ^2H QDs (two components) are observed for ^2H signals.

In order to eliminate the co-solvent ^2H signal, we have developed a selective pulse based on the WET suppression sequence (Water suppression Enhanced through T_1 effects) by applying a simultaneous doubly selective shape pulses centered on each component of QD undesired. Below is shown the effect of the WET shape-pulse sequence tested on a sample of Acetone- d_6 dissolved in PBLG/ CDCl_3 LLC. In this example, a strong reduction of co-solvent signal (over 90%) is obtained. The very high selectivity of signal suppression leaves untouched the ^{13}C satellites of co-solvent signals (1.1% of abundant signal).

Scheme of selective pulse sequence applied for the suppression of co-solvent ^2H QD.

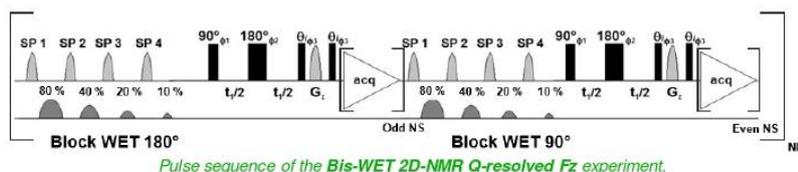


Elimination of ^2H QD of co-solvent: Here the SNR ratio of CDCl_3 signal is reduced by 10. Note the presence of ^{13}C satellite signals.

Development of WET QUOSY 2D-NMR experiments

We designed a new experiment for maximizing the signal suppression for 2D experiments. This decomposes in two steps with one train of selective pulses for each. The first contains one block corresponding to a selective saturation with a 180° angle, while the second contains a block with a 90° angle. With these two blocks (Bis-WET), the residual signals of the co-solvent will be acquired positively (90°) or negatively (180°) each two scans. Thus, the residual co-solvent signals are compensated between two scans and the initial ^2H signal can be reduced up to 95%.

For 2D experiments purposes, the Bis-WET Block have been incorporated into QUOSY (Q-resolved Fz).¹⁸ The pulse program of Bis-WET-Q-resolved Fz is depicted below. For each experiment, we have the 180° block for odd scans and 90° block for even scan. The experiment must necessarily consist of an even number of scans (NS). The results for the Butanone (A) shows a suppression of 95% for the co-solvent QD.



Pulse sequence of the Bis-WET 2D-NMR Q-resolved Fz experiment.

Second problem in NAD NMR in LLCs is the limitation of experimental time due to the degradation of the sample homogeneity versus time. The WET sequence increases the experimental time because to obtain a sharp selectivity of excitation, each pulse block is composed of four selective pulses. For the Butanone sample, the selective pulse lasts 100 ms and so each scan, the WET pulse duration increases to 400 ms. As we acquired 512 experiments with 64 scans each, the experimental time increase by 13110 seconds ($0.4 \times 64 \times 512$).

Instead of reducing the number of t_1 transients and/or scans for ensuring experimental times compatible with the long-term stability of LCC, we have adopted the NUS protocol (Non-Uniform Sampling).^{8,19} This recent protocol is a particular acquisition mode of t_1 data for multidimensional NMR experiments, where data are randomly "acquired" in t_1 dimension according to the percentage (transients t_1) parametrized. Prior to the Fourier transformation, the algorithm associated with the NUS rebuilds the whole spectrum in F_1 dimension.

First, we worked with NUS 50% parameter to halve the experimental time (B). This experiment lasted 7.5 hours and gave a signal-to-noise ratio (SNR) equal to 73% of the SNR of the reference spectrum (for CH_3 group : 538 and 413 for the reference (A) and 393.4 and 302.3 with the NUS (B)). This experiment shows that the SNR loss with the NUS protocol is compensated by the time saved.

Second, we profit the time gain due to 50% NUS protocol by increasing the number of scans compared with the results obtained without NUS protocol. As illustrative example, we performed the experiment (C) in 15 hours with 128 scans and with NUS at 50%. With the same duration, the NUS experience gained 7.5% of SNR compared to the reference experiment (for CH_3 group: 538 and 413 for the reference (A) and 577.3 and 444.2 with the NUS (C)). Thus, the use of NUS protocol increased SNR of solute for the same experimental time.

91.2 MHz NAD- ^1H Bis-WET Q-resolved Fz tilted map of Butanone :

- A) without NUS recorded in 15 hours (512 t_1 , 64 scans).
- B) with NUS at 50% recorded in 7.5 hours (256 t_1 acquired and 256 t_1 reconstructed (512 t_1 total), 64 scans).
- C) with NUS at 50% recorded in 15 hours (256 t_1 acquired and 256 t_1 reconstructed (512 t_1 total), 128 scans).

In conclusion, the use of Bis-WET selective suppression shows interesting properties for NAD 2D-NMR experiments in LLC systems. This allows amplification of solute signals improving the quality of studies. Furthermore, if this technique leads to a longer experimental time, the combination with the NUS protocol appears as a good alternative presenting two possibilities: i) A significant reduction of NMR experimental time with a reasonable reduction of the solute SNR stripped of co-solvent signals; ii) no reduction of the experimental time but higher solute SNR by increasing the number of scans per t_1 increment. The next step will be the isotopic ^2H quantification using this double methodological strategy.

Reference :

¹⁸ Lesot P., *Emag Res.* 2013, 2, 315-334
¹⁹ Lesot P., Serhan Z., Billault I., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 399, 1187-1200
²⁰ Navarro-Vazquez A., Berdagué P., Lesot P., *Chem. Phys. Chem.* 2017, 18, 1252-1266
²¹ Texier Bonniot T., Berdagué P., Robins R., Renaud G., Lesot P., *Flav. Frag. J.*, 2018, 34, 1-13
²² Bax A., *J. Magn. Res. A.* 1985, 65,142-145

²³ Smallcombe S., Patt S., Keiler P., *J. Magn. Res. A.* 1995, 117, 295-303
²⁴ Thibault au C., Renaud G., Silvestre V., Akoka S., *Anal. Chem.*, 2010, 82, 5582-5590
²⁵ Lalou C., Lesot P., Merlet D., Courteu J., *Magn. Reson.* 2004, 171, 135-142
²⁶ Kuzmierzuk K., Zowadzka A., Kozmiski W., Zuker L., *J. Biomol. NMR* 2011, 17, 6716-6724
²⁷ Lafon O., Hu B., Amoureux J-P., Lesot P., *Chem. Eur. J.* 2011, 17, 6176-6724

Determination of the Biotechnological or Natural Origin of Vanillin by Deuterium 2D-NMR in Lyotropic Liquid Crystals: a new Analytical Tool for Fighting Against Counterfeiting ?

T. Texier Bonniot⁽¹⁾, Ph. Berdagué⁽¹⁾, R. Robins⁽²⁾, G. Rémaud⁽²⁾ and Ph. Lesot^{(1)*}

(1)UMR CNRS 8182, RMN en Milieu Orienté, ICMMO, Université Paris-Sud / Université Paris-Saclay, Bât 410, 15, rue Georges Clémenceau, 91405 Orsay Cedex.
(2)UMR CNRS 6230, Chimie Et Interdisciplinarité : Synthèse Analyse Modélisation, Université de Nantes, 2, rue de la Houssinière, 44322 Nantes Cedex.
Mail : tristan.texier-bonniot@u-psud.fr / philippe.lesot@u-psud.fr



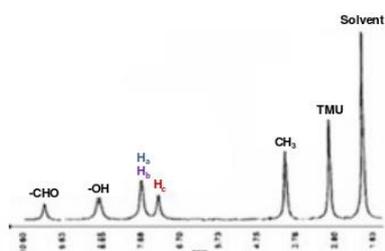
The SNIF-NMR® protocol is a powerful technique developed around the quantitative ²H-¹H NMR at natural abundance level (NAD-NMR) in isotropic organic solvents dedicated to the authentication/determination of biocompounds. Despite the recent achievements of ¹³C-¹H NMR for (¹³H/¹²C) isotope analyses, vanillin remains an analytical challenge in ²H NMR¹, because the analysis of site-specific natural isotopic fractionation (SNIF) remains incomplete due to the fortuitous isochrony of two aromatic ²H resonances. In this study, we present the analytical potential of NAD-¹H 2D-NMR in polypeptide lyotropic liquid-crystals as an alternative to isotopic ²H 1D-NMR approaches.

The position-specific (²H/¹H) isotopic analysis (PSIA) of Vanillin remains incomplete due to the overlap of two aromatic resonances, and the impossibility of separating these fortuitous isochronous nuclei by isotopic ²H 1D-NMR (the well-known SNIF-NMR® protocol²) whatever the isotropic solvent used.

Below is presented an example of SNIF-NMR® spectrum recorded in CH₃CN where the ²H_a and ²H_b sites are not spectrally differentiated.

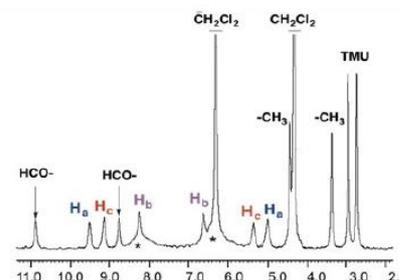
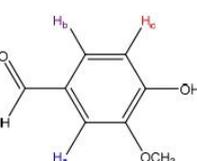
The use of polypeptide liquid crystals (as PBLG), that allows any solute to be oriented in average, is an interesting technique because we can access to **anisotropic NMR interactions**, such as ²H quadrupolar interactions³. In these media, anisotropic ²H-¹H NMR spectra are governed by quadrupolar doublets (QD), which **quadrupolar splittings** ($\Delta\nu_Q$) related to ²H residual quadrupolar coupling (²H-RQC) and the **anisotropic chemical shift** δ^{anis} , are specific for each inequivalent ²H site.

In case of vanillin, the complete spectral discrimination of anisotropic NAD signals of three aromatic ²H sites (H_a, H_b, H_c) has been achieved by preparing a sample of vanillin made of 80 mg of solute, 90 mg of PBLG and 600 mg of chlorinated organic co-solvent (see below).



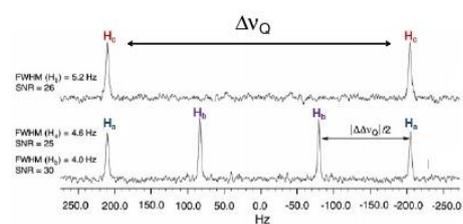
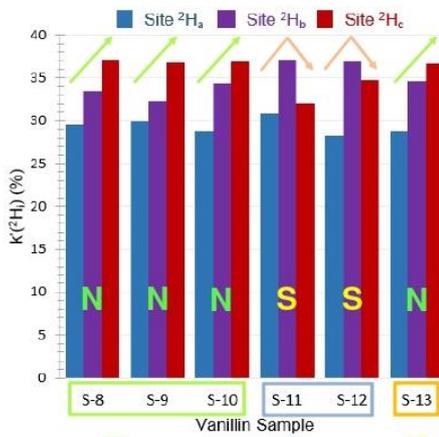
Example of 77.7 MHz ²H-¹H 1D-spectrum of the vanillin recorded in CH₃CN in presence of TMU³.

Use of Lyotropic Liquids Crystals



Example of 92.1 MHz ²H-¹H 1D-spectrum of vanillin recorded in the PBLG/CH₂Cl₂/CCl₄ phase (90 mg/ 300 mg/ 300 mg) with TMU.

Variations of the relative distributions coefficients of deuterium for three aromatic sites.



NAD 1D sub-spectra of vanillin extracted from the tilted 92.1 MHz NAD Q-resolved Fz map.

$$k'_{H_i} (\%) = \left(100 \times \frac{S_{H_i}}{\sum_{a,b,c} S_{H_i}} \right)$$

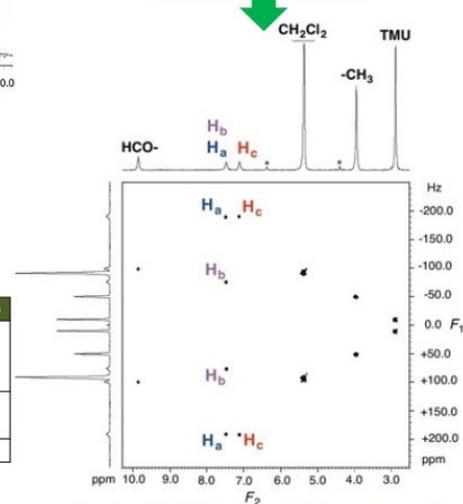
Vanillin	Sample	k'(² H _a)	k'(² H _b)	k'(² H _c)
Lignin (N)	S-8	29.5	33.4	37.1
Ferulic Acid (N)	S-9	29.9	32.3	36.8
Bean (N)	S-10	28.7	34.4	36.9
Guaiacol (S)	S-11	30.9	37.1	32.0
Ferulic Acid (S)	S-12	28.3	36.9	34.8
Unknown	S-13	28.7	34.6	36.7

$k'(^2H_a) < k'(^2H_b)$
 $k'(^2H_b) < k'(^2H_c)$

$k'(^2H_a) < k'(^2H_b)$
 $k'(^2H_b) > k'(^2H_c)$

$k'(^2H_a) < k'(^2H_b)$
 $k'(^2H_b) < k'(^2H_c)$

Use of 2D-NMR experiments



Tilted 92.1 MHz NAD Q-resolved Fz 2D map of the vanillin recorded in 15 hours where all the ²H QDs of the aromatic ring, CH₃ and CHO group are spectrally shown.

To study the isotopic information on aromatic part, series of three ²H-¹H 2D-NMR spectra were experimentally recorded on three samples of vanillin originating from natural precursors (N) (vanilla pod, lignin and natural ferulic acid) and two from synthetic origins (S) (synthetic ferulic acid and guaiacol). Surfaces of peaks at each inequivalent ²H aromatic site are evaluated to determine the relative distributions coefficients k' of ²H at H_a, H_b, H_c aromatic sites.

The analysis of results has evidenced: i) the relative distribution coefficient is ²H_a/²H_b < ²H_b/²H_c < ²H_a/²H_c for natural Vanillin sample; ii) the relative distribution coefficient is ²H_a/²H_b < ²H_b/²H_c > ²H_a/²H_c for synthetic sample.

To confirm these results, an unknown sample of vanillin has been also analyzed. The determination of the coefficients of relative distributions has shown that we have ²H_a/²H_b < ²H_b/²H_c < ²H_a/²H_c, thus indicating a natural source for this specific sample.

In 1D-NMR, the complexity of anisotropic NAD spectra due to the presence of numerous QD is an important drawback. However, significant spectral simplification can be obtained using "QUOSY" 2D-NMR experiments for which the ²H information is split into two spectral dimensions (F₁ and F₂) and both components for each QD are autocorrelated.

As seen on this 2D map, each inequivalent ²H site is spectrally discriminated and respective NAD 1D NMR signal can be extracted after a tilt procedure (see above).

In conclusion, the combination of $\delta^{anis}(\text{2H})$ and $\Delta\nu_Q(\text{2H})$ observables allowed the spectral discrimination of three aromatic sites of Vanillin, for the first time⁵. From the analysis of their isotopic data, we have been able to discriminate between different precursors of Vanillin (natural versus biotechnological process), a new essential element for traceability and the fight against counterfeits of this molecule of economical interest, one of the most used aroma in food production. Clearly, the use of NAD 2D-NMR in weakly orienting liquid crystals (as PBLG) is a powerful analytical technique that can provide an alternative technique to the classical SNIF-NMR protocol or new complementary isotopic information to existing data.

Reference :
1) Greule M., Tumino L., Schleucher J., Keppler F., *Eur. Food. Res. Technol.*, 2010, 231, 933-941
2) Martin G. J., Martin M. L., *Tetrahedron Lett.* 1981, 22, 3525-3528
3) Rémaud G., Martin Y-L, Martin G.G., Martin G.J., *J. Agric. Food. Chem.*, 1997, 45, 859-866.
4) Lesot P., Aroulanda C., Zimmermann H., Luz Z., *Chem. Soc. Rev.* 2015, 44, 2330-2375
5) Texier-Bonniot T., Berdagué P., Robins R., Rémaud G., Lesot P., *Flav. Frag. J.*, 2018, 33, 217-229

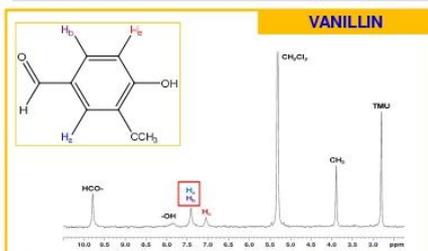
Study of Vanillin and Frambinone molecules by Natural Abundance Deuterium 2D-NMR in Lyotropic Liquid Crystals: Analytical Tool for Fighting Against Counterfeiting in food industry

Tristan Texier Bonniot^a, Philippe Berdagué^a, Richard Robins^b, Gérald Rémaud^b and Philippe Lesot^c

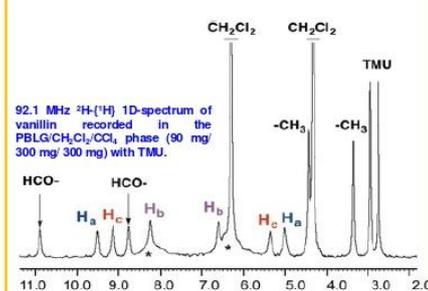
^aUMR CNRS 8182, RMN en Milieu Orienté, ICMMO, Université Paris-Sud / Université Paris-Saclay, Bât 410, 15, rue Georges Clémenceau, 91405 Orsay Cedex.
^bUMR CNRS 6230, Chimie Et Interdisciplinarité : Synthèse Analyse Modélisation, Université de Nantes, 2, rue de la Houssinière, 44322 Nantes Cedex.
^cMail : tristan.texier-bonniot@u-psud.fr



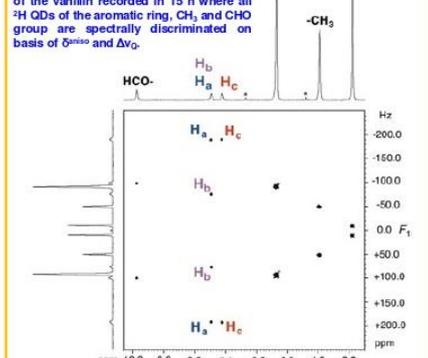
The SNIF-NMR[®] protocol¹ is a powerful technique developed around the quantitative ²H-¹H NMR at natural abundance level (NAD-NMR) in isotropic organic solvents dedicated to the determination of their origin (geographical and botanical) as well as their authentication in the context of the fight against counterfeiting. Nowadays, molecules used in food industry is still an analytical challenge in ²H NMR², because the analysis of site-specific natural isotopic (²H/¹H) fractionation (SNIF) remains incomplete for several molecules: i) the fortuitous isochrony of two aromatic ²H resonances for the vanillin; ii) the non-discrimination of enantiotopic positions of methylene groups for the frambinone. In this study, we present the analytical potential of NAD-¹H 2D-NMR in polypeptide liquid-crystals as an alternative to isotopic ²H 1D-NMR.



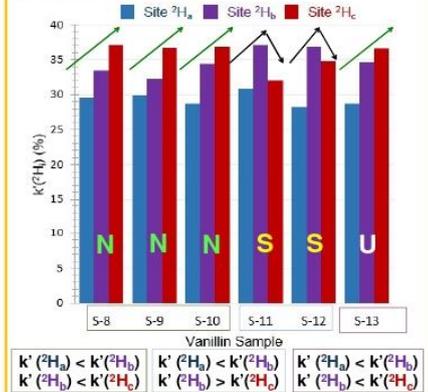
91.2 MHz ²H-¹H 1D-spectrum of Vanillin recorded in CH₂Cl₂ with TMU³.



92.1 MHz tilted NAD Q-resolved F2 2D map of the vanillin recorded in 15 h where all ²H QDs of the aromatic ring, CH₃ and CHO group are spectrally discriminated on basis of δ^{anis} and $\Delta\nu_Q$.



Variations of the relative distribution coefficients of deuterium for three aromatic sites of Vanillin



Fortuitous isochrony (δ) of two aromatic ²H resonances

Non-discrimination of enantiotopic positions in methylene groups

The use of polypeptide (chiral) liquid crystals (PBLG/organic co-solvent) allows any solutes to be oriented in average. It becomes possible to access to **anisotropic NMR observables**, such as ²H quadrupolar doublets (QD)⁴ which quadrupolar splittings ($\Delta\nu_Q$) named also ²H residual quadrupolar coupling (²H-RQC) and the anisotropic chemical shift δ^{anis} , are specific for each inequivalent ²H site.

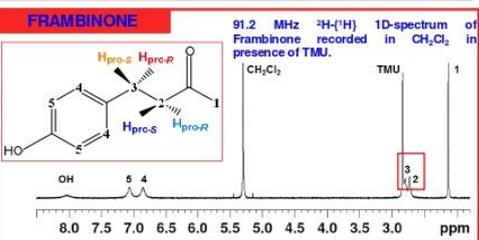
In anisotropic NAD NMR, each inequivalent site (associated to a given monodeuterated isotopomer) generates a single ²H-QD. This situation may lead to highly complex 1D-NMR spectra which the ²H assignment of QDs is difficult or even impossible.

Significant spectral simplification can be obtained using "QOQSY" 2D-NMR experiments for which the ²H information is split into two spectral dimensions (F_1 and F_2) where both components of each QD are autocorrelated.

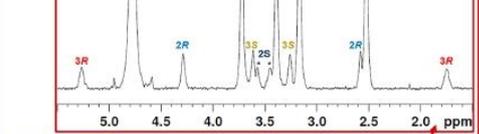
As seen on these 2D maps, each inequivalent ²H site is spectrally discriminated and respective NAD 1D-NMR signal can be extracted after a tilting procedure.

To study the isotopic data on aromatic part of vanillin, series of three ²H-¹H 2D-NMR spectra (quantitative conditions) were experimentally recorded on **three** samples of vanillin originating from **natural precursors (N)** (vanilla pod, lignin and natural ferulic acid) and **two** samples from **synthetic origins (S)** (synthetic ferulic acid and guaiacol). Surfaces of peaks at each inequivalent ²H aromatic site are measured to determine the **relative distributions coefficients k'** of ²H at H_a, H_b, H_c aromatic sites. The analysis of results has evidenced: i) the relative distribution coefficient is $^2H_a/^2H_b < ^2H_b/^2H_c$ for **natural Vanillin** sample; ii) the relative distribution coefficient is $^2H_a/^2H_b < ^2H_b/^2H_c > ^2H_a/^2H_b$ for **synthetic sample**. To confirm these results, an **unknown** sample of vanillin has been also analyzed. The determination of the coefficients of relative distributions has shown that we have $^2H_a/^2H_b < ^2H_b/^2H_c < ^2H_a/^2H_b$, thus indicating a natural source for this specific sample.

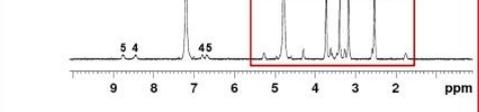
For the study the isotopic data of enantiotopic positions of Frambinone, the protocol described above was applied on **four** samples: i) **one natural sample (N)** issue of strawberry; ii) **two synthetic samples (S)** (EUROFINS, ACROS) and iii) an unknown sample (U). Surfaces of peaks at each inequivalent ²H aromatic site are measured to determine the **enantiotopic excess (eie)** on each methylene group (2 and 3). The analysis of the **eie values** indicates: i) an excess of 5% and 4.2% for methylene 2 and 3 for the **natural sample**; ii) an eie varying between 1 and 2% for the both methylenes for **synthetic samples**. The values of the **eie** of the **unknown** sample are similar to those obtained for synthetic samples, suggesting a synthetic origin for this fourth sample.



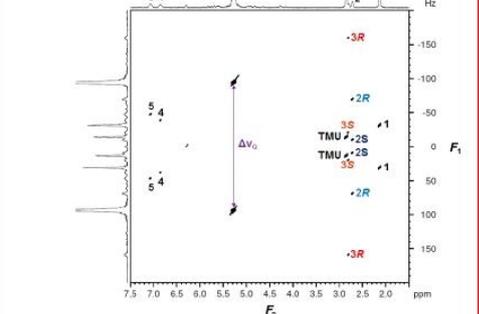
91.2 MHz ²H-¹H 1D-spectrum of Frambinone recorded in CH₂Cl₂ in presence of TMU.



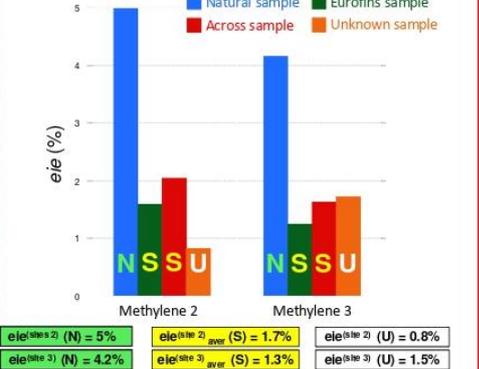
92.1 MHz ²H-¹H 1D-spectrum of frambinone recorded in the PBLG/CH₂Cl₂/CCl₄ phase (100 mg/375 mg/125 mg) with TMU.



92.1 MHz tilted NAD Q-resolved F2 2D map of Frambinone recorded in 16 h where all the ²H enantiotopic positions are discriminated on the basis of δ^{anis} and $\Delta\nu_Q$.



Measurement of enantiomeric isotopic excesses (eie) for methylene groups of different samples of Frambinone.



In conclusion, for the first time⁵, the combination of $\delta^{anis}(\text{2H})$ and $\Delta\nu_Q(\text{2H})$ observables allowed the complete spectral discrimination of all monodeuterated isotopomers of Vanillin (achiral molecule) and Frambinone (prochiral molecule) (including enantio-isotopomers). From the analysis of their isotopic data, we have been able to discriminate between different precursors of molecule (natural versus biotechnological process), a new essential element for traceability and the fight against counterfeiters of these molecules of economical interest, two of the most used aroma in food production. Clearly, the use of NAD 2D-NMR in weakly orienting liquid crystals (as PBLG) is a powerful analytical technique that can provide an alternative technique to the classical SNIF-NMR protocol leading to new isotopic information complementary to existing data.

Reference :
 1) Martin G. J., Martin M. L., *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 3525-3528
 2) Greule M., Tumino L., Schleucher J., Keppler F., *Eur. Food. Res. Technol.*, **2010**, 231, 933-941
 3) Rémaud G., Martin Y.-L., Martin G.G., Martin G.J., *J. Agric. Food. Chem.*, **1997**, 45, 859-866
 4) Lesot P., Aroulanda C., Zimmermann H., Luz Z., *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 2330-2375
 5) Texier-Bonniot T., Berdagué P., Robins R., Rémaud G., Lesot P., *Flav. Frag. J.*, **2018**, 33, 217-229

Titre : Apport de la RMN du deutérium en abondance naturelle dans les cristaux liquides chiraux pour le contrôle d'authenticité : Applications aux molécules d'intérêts économiques

Mots clés : RMN 2D; Deutérium ; Abondance naturelle ; (Pro)chiralité ; Cristaux liquides chiraux ; Isotopomère

Résumé : L'évaluation de la composition isotopique naturelle site-spécifique, ($^2\text{H}/^1\text{H}$), de produits alimentaires est un défi important et continu pour la détermination ou l'authentification de leurs origines. Depuis 1981, le protocole RMN-FINS® développé autour de la RMN 1D quantitative $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ en abondance naturelle dans les solvants isotropes est l'outil de choix pour déterminer le profil isotopique des molécules, indispensable pour étudier leur synthèse (métabolique ou synthétique) ou pour les authentifier. Cependant, l'analyse du fractionnement isotopique naturel de certaines molécules de grande valeur économique comme la vanilline ou frambinone, très utilisées comme arôme alimentaire, reste incomplète en raison : i) de chevauchements fortuits des pics ^2H , ou ii) de l'équivalence stéréochimique de certaines positions comme les sites énantiotopes de molécules prochirales. La RMN 1D/2D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ en abondance naturelle (DAN) dans les cristaux liquides lyotropes polypeptidiques (PBLG) s'est révélée être une alternative puissante pour obtenir les informations isotopiques manquantes. L'avantage de RMN anisotrope réside dans l'accès

aux interactions sensibles à l'ordre orientationnel, telles que le couplage quadrupolaire ^2H résiduel ($\text{RQC}(^2\text{H}) / \Delta\nu_Q(^2\text{H})$), spécifique aux noyaux de spin $I > 1/2$. Ainsi, la combinaison de mésophases chirales optimisées et d'expériences RMN 2D QUOSY tiltée (de type Q -résolue) séparant $\delta^{\text{aniso}}(^2\text{H})$ et $\Delta\nu_Q(^2\text{H})$ sur deux dimensions spectrales F_1 et F_2 , a permis, pour la première fois, la détermination de la distribution relative en deutérium des trois sites aromatiques de la vanilline et des positions énantiotopes de la frambinone. Cette nouvelle source d'information isotopique peut fournir potentiellement un nouvel outil pour distinguer l'origine biologique ou synthétique de ces molécules, et ainsi lutter contre la contrefaçon. D'un point de vue méthodologique, nous montrons l'intérêt analytique d'appliquer : i) une saturation doublement sélective sur le signal ^2H du co-solvant de la phase à l'aide de la séquence Bis-WET et ii) un échantillonnage non-uniforme des données en dimension indirecte, t_1 , des expériences 2D QUOSY pour réduire leur temps total d'acquisition.

Title : Contribution of deuterium NMR in natural abundance in chiral-liquid crystals for authenticity control : Applications to molecules of economic interest

Keywords : 2D-NMR ; Deuterium ; Natural abundance ; (Pro)chirality ; Chiral liquid crystals; Isotopomer

Abstract : The evaluation of the site-specific ($^2\text{H}/^1\text{H}$) natural isotopic composition in food products is an important and continuous challenge for the determination or the authentication of their origins. From 1981, the SNIF-NMR® protocol developed around the quantitative $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ 1D-NMR at natural abundance level in isotropic solvents is the tool of choice to understand their synthesis (metabolic or synthetic pathway) or for authentication purposes. However, the analysis of natural isotope fractionation, ($^2\text{H}/^1\text{H}$)_i, of some molecules of high economical value such as vanillin or frambinone involved in the food aroma industry remains incomplete due to : i) fortuitous ^2H peak overlaps or ii) stereochemical equivalence of particular positions such as enantiotopic sites in prochiral molecules. The use of $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ 1D/2D-NMR at natural abundance level (NAD) in lyotropic liquid crystals made of polypeptide (PBLG) revealed to be an interesting alternative to reach missing ($^2\text{H}/^1\text{H}$)_i isotopic information. The advantage of anisotropic NMR lies in

access to orientational order-sensitive interactions such as the residual ^2H quadrupolar coupling ($\text{RQC}(^2\text{H}) / \Delta\nu_Q(^2\text{H})$), specific to nuclei with spin $I > 1/2$. Thus the combination of optimised (chiral) mesophases and tilted QUOSY 2D-NMR experiments (Q -resolved-type) separating $\delta^{\text{aniso}}(^2\text{H})$ and $\Delta\nu_Q(^2\text{H})$ on the F_1 and F_2 spectral dimensions, lead, for the first time, to the complete determination of the relative distribution in deuterium within the vanillin aromatic core and the enantiotopic positions of frambinone. We demonstrate that this new source of isotopic information can potentially provide a new tool for distinguishing between the biological or synthetic origin of these molecules, and so fight against counterfeit. From methodological point of view, we show the analytical interest to apply a doubly selective saturation of ^2H signal of co-solvent of the mephase by the Bis-WET sequence and a non-uniform sampling of data in indirect dimension, t_1 , of QUOSY 2D experiments for reducing their total acquisition times.