



**HAL**  
open science

# Détection d'Isotopomères $2\text{H}$ - $13\text{C}$ en Abondance Naturelle par RMN 2D Isotrope et Anisotrope, ou Comment Distinguer Expérimentalement une Molécule parmi 600 000?

Philippe Lesot, Olivier Lafon

► **To cite this version:**

Philippe Lesot, Olivier Lafon. Détection d'Isotopomères  $2\text{H}$ - $13\text{C}$  en Abondance Naturelle par RMN 2D Isotrope et Anisotrope, ou Comment Distinguer Expérimentalement une Molécule parmi 600 000?. Spectra Analyse, 2012, 287, pp.24-30. <hal-02317494>

**HAL Id: hal-02317494**

**<https://hal.science/hal-02317494v1>**

Submitted on 6 Aug 2025

**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.



HAL Authorization

# Détection d'Isotopomères $^2\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ en Abondance Naturelle par RMN 2D Isotrope et Anisotrope, ou Comment Distinguer Expérimentalement une Molécule parmi 600 000 !

Philippe Lesot<sup>a,b\*</sup> et Olivier Lafon<sup>c</sup>

(a) Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay (ICMMO - ERMN), UMR CNRS 8182, Université Paris-Saclay, UFR des Sciences d'Orsay, Bâtiment 410, F-91400 Orsay, France.

(b) Institut National de Chimie (INC), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), 3, Rue Michel Ange, F-75016 Paris, France.

(c) Unité de Catalyse et de Chimie du Solide, UMR-CNRS 8181 Université de Lille Nord de France, Univ Lille 1, ENSCL, France.

**E-mail** : philippe.lesot@universite-paris-saclay.fr / philippe.lesot@u-psud.fr

**ORCID** : - **Philippe Lesot** : 0000-0002-5811-7530

- **Olivier Lafon** : 0000-0002-5214-4060

**Résumé** : Les avancées récentes dans le domaine de la spectroscopie RMN conduisent à repousser toujours plus loin ses limites de détection. Ainsi, nous avons montré récemment [Lesot & Lafon, Anal. Chem., 84, 4569, (2012)] la possibilité de détecter par RMN des isomères isotopiques  $^2\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (isotopomères  $^2\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) en abondance naturelle ( $1,7 \times 10^{-4}\%$ ) dans les liquides et dans les phases orientées chirales polypeptidiques. Cette première mondiale a été possible en enregistrant des expériences RMN 2D hétéronucléaires  $^2\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  sur un spectromètre opérant à hauts champs magnétiques (21,1 T) et d'une sonde cryogénique inverse. Les premiers résultats RMN, certes obtenus avec une molécule prochirale modèle, ont ainsi montré la possibilité de détecter expérimentalement, et pour la première fois, une molécule parmi 600 000, mais aussi de séparer des isotopomères énantiomères (énantio-isotopomères). Ce travail pionnier RMN repousse une nouvelle fois les frontières de la RMN et ouvrent des perspectives dans de nombreux domaines analytiques tels que l'analyse chirale, l'authentification moléculaire, les études de métabolisme ou la lutte contre la contrefaçon.

**Mots clés** : RMN 2D hétéronucléaire, isotopomère-( $^2\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ), cristaux liquides, chiralité, rapport isotopique

**Summary**: Recent advances in the field of NMR spectroscopy steadily decrease its detection limits. We have shown recently [Lesot & Lafon, Anal. Chem., 84, 4569, (2012)] that NMR allows the detection of  $^2\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  isotope isomers ( $^2\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  isotopomers) at natural abundance level ( $1.7 \times 10^{-4}\%$ ) in the liquid and chiral oriented solvents polypeptide. Such a challenge was achieved by combining the use of an NMR spectrometer operating at very high magnetic field (21.1 T) and an inverse 5-mm cryoprobe, while choosing the most appropriate 2D heteronuclear correlation technique in terms of sensitivity. The NMR results, obtained with a model prochiral molecule, have shown the ability to detect experimentally for the first time, a single molecule from 600,000, but also to separate the enantio-isotopomers of the compound. This pioneer work pushes the limits of NMR and opens exciting prospects in various analytical areas such as chiral analysis, molecular authentication, studies of metabolism or the fight against counterfeiting.

**Key words** : Heteronuclear 2D NMR, ( $^2\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )-isotopomer, liquid crystals, chirality, isotope ratio

## I – Préambule

D'après la nomenclature IUPAC actuelle, les isomères isotopiques (dénommés ci-dessous "isotopomère ") sont des isomères stéréochimiques ou de constitution possédant le même nombre d'isotopes, mais dont les positions diffèrent dans la structure. Ces légères différences à l'échelle atomique fournissent des informations précieuses sur l'origine des substances analysées et/ou leurs voies de synthèse. La RMN constitue une des rares méthodes analytiques permettant de mesurer la proportion des différents isotopomères.

## II – Introduction

La détection d'isotopomères en abondance naturelle (AN) par spectroscopie RMN est indispensable pour de nombreuses applications analytiques. Elle est, bien entendu, indissociable de l'analyse de produits naturels, comme la matière organique chondritique, dont le marquage isotopique est difficile voir impossible [1]. En outre, et de façon plus générale, les techniques d'enrichissement isotopique (sélectives) sont souvent lourdes et fastidieuses [2], et ne peuvent, en aucun cas, être utilisées pour déterminer le fractionnement isotopique naturel qui fournit des informations précieuses sur l'origine (géographique, botanique) de biomolécules et/ou les mécanismes enzymatique conduisant à leur formation [3]. Du point de vue de la spectroscopie RMN, l'analyse des spectres d'isotopes peu abondants est généralement plus simple du fait de l'absence de couplage homo-nucléaire. Enfin, la détection d'isotopomères peu abondants permet aussi de déterminer les effets isotopiques sur les déplacements chimiques, sans marquage isotopique [4].

La détection RMN d'isotopes faiblement abondants est un défi, étant donné la faiblesse des moments magnétiques nucléaires [5]. Toutefois, la limite de détection de la RMN a été fortement abaissée par les récents progrès dans le domaine de l'instrumentation (RMN à très haut champ magnétique (18.8 (800 MHz) – 23,5 T (1 GHz)), développement de sondes cryogéniques inverses ou directes) et de la méthodologie (polarisation dynamique nucléaire, acquisition des données, traitement du signal post-acquisition, ...) [6]. Ces divers développements ont ainsi permis la détection d'isotopes peu sensibles et/ou de faible abondance naturelle, comme le  $^{13}\text{C}$  (1,10%, valeur Vienne-PDB) [7] ou  $^2\text{H}$  ( $1,55 \times 10^{-2}\%$ , valeur Vienne-SMOW) [7] à des concentrations relativement basse à la fois dans les solvants isotropes, les milieux anisotropes (cristaux liquides), mais aussi plus récemment dans les solides [8].

Combinant la fluidité des solvants liquides et la richesse analytique du solide, la RMN en phase orientée chirale (RMN anisotrope chirale) a connu un essor formidable durant la dernière décennie. D'un point de vue analytique la RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^2\text{H}$  en abondance naturelle de solutés

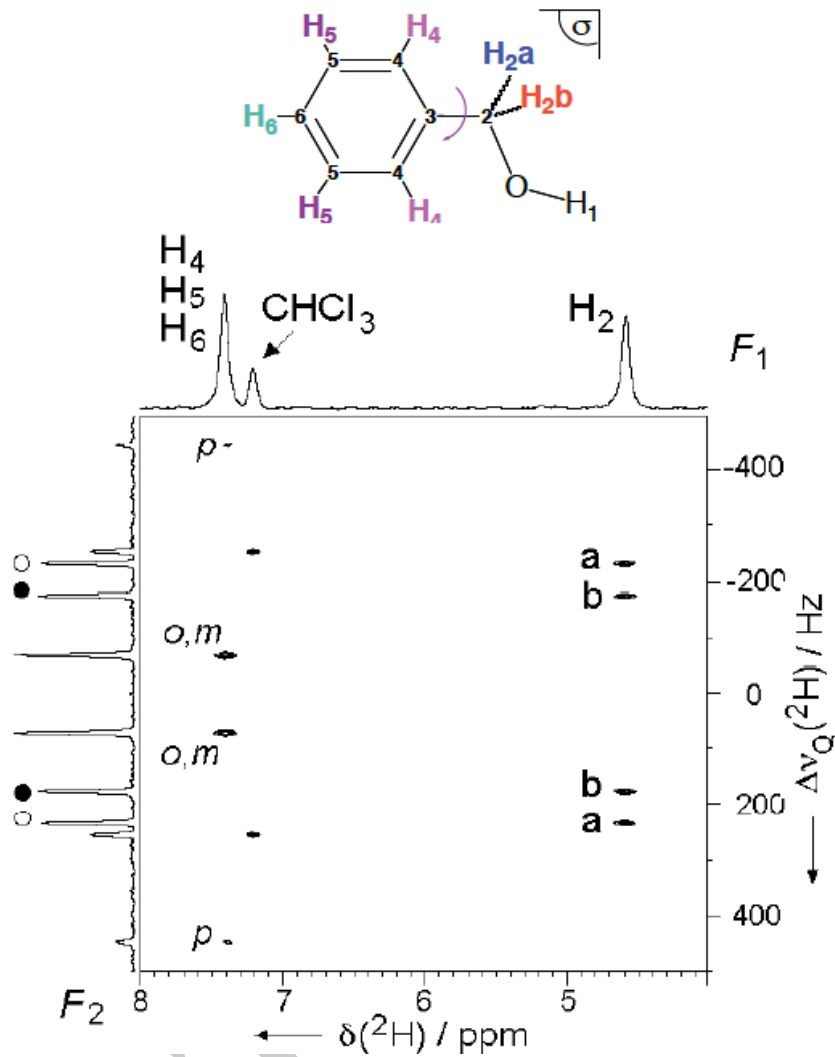
faiblement orientés dans des cristaux liquides chiraux (CLC) polypeptidiques (PBLG, PCBL) s'est révélée être un outil extrêmement puissant [9,10]. Cette approche a ainsi été utilisée avec succès dans le cadre de diverses applications telles que: i) la discrimination d'énantiomères, y compris les énantiomères isotopiques dont la chiralité trouve son origine dans la substitution isotopique  $^2\text{H}/^1\text{H}$  autour d'un centre stéréogène [8,11,12] ; ii) la détermination de la configuration empirique absolue de petites molécules chirales [13] ; iii) la mesure du fractionnement isotopique de produits naturels, très utiles pour l'étude stéréochimique des voies de (bio)synthèse [14].

### III – Avantages de la RMN $^2\text{H}$ anisotrope chirale

Comparée à la RMN dite "isotrope", l'avantage majeur de la RMN "anisotrope" est l'accès aux paramètres spectraux anisotropes tels que l'anisotropie de déplacement chimique (CSA), les couplages résiduels dipolaires (D) ou quadrupolaires ( $\Delta\nu_Q$ ). Ces interactions RMN, qui sont moyennées à zéro dans les liquides, fournissent des informations sur la géométrie et l'orientation des molécules.

En pratique, la RMN du deutérium est une méthode de choix pour l'étude de l'orientation des solutés mais aussi de leur dynamique car l'interaction quadrupolaire  $^2\text{H}$  est très sensible aux paramètres d'ordre moléculaire. De plus, les spectres RMN  $^2\text{H}$  en abondance naturelle (DAN) en phase isotrope permettent de sonder simultanément l'orientation et la dynamique de tous les sites deutérium inéquivalents d'une molécule.[15] Par ailleurs, si la mésophase est chirale, les interactions énantiosélectives soluté-solvant conduisent à orienter en moyenne différemment des énantiomères (molécule chirale) ou des directions énantiotopes (molécule prochirale), ce qui permet de les différencier spectralement.

Les spectres RMN 1D DAN anisotropes peuvent être difficiles à analyser pour des molécules complexes. Dans ce contexte, des expériences d'autocorrélation 2D/3D homo-nucléaire  $^2\text{H}$  comme les expériences 2D Q-COSY Fz ou Q-résolue Fz (cf. **Figure 1**) ont été proposées pour l'analyse spectrale et attribuer les signaux  $^2\text{H}$  sur la base d'une différence de déplacement chimique [16]. Toutefois, la résolution de ces techniques est limitée par la faible gamme de déplacement chimique du deutérium ( $0 \leq \delta(^2\text{H}) \leq 12$  ppm) qui rend parfois difficile ou impossible une attribution indiscutable des doublets quadrupolaires.



**Figure 1.** Spectre 2D Q-résumé Fz DAN (138 MHz) de l'alcool benzylique dissous dans la mésophase PBLG/CHCl<sub>3</sub>. Après basculement du spectre 2D symétrisé, les  $\delta(^2\text{H})$  et les  $\Delta\nu_Q$  apparaissent, respectivement, en dimension  $F_2$  et  $F_1$ . Noter la présence de deux doublets pour le groupe méthylène, qui traduit la discrimination des  $^2\text{H}$  énantiotopes.

#### IV – Corrélations hétéronucléaires $^2\text{H}/^{13}\text{C}$

Une solution lorsqu'il n'est pas possible de résoudre les déplacements chimiques  $^2\text{H}$  est de corréler les signaux des noyaux  $^2\text{H}$  à ceux des noyaux  $^{13}\text{C}$  voisins. En effet, la gamme de déplacements chimiques  $^{13}\text{C}$  ( $\approx 200$  ppm) est 16 fois plus grande que celle du  $^2\text{H}$ , d'où une "décompression" spectrale significative [17].

Pour les molécules deutérées, il a été démontré, des 2003, que des expériences 2D de corrélations hétéro-nucléaires  $^2\text{H}/^{13}\text{C}$  (baptisée "CDCOM") constituaient un outil efficace pour l'attribution des doublets quadrupolaires [17]. En outre, les corrélations 2D  $^2\text{H}/^{13}\text{C}$  observées en milieux orientés permettaient de corréler simplement des informations associées au CSA ( $^{13}\text{C}$ ) et à l'interaction quadrupolaire  $^2\text{H}$ , et donc de potentiellement faciliter le calcul des paramètres

d'ordre moléculaire des solutés [18].

D'un point de vue pratique, la situation idéale est évidemment l'observation des corrélations hétéro-nucléaires  $^2\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  en abondance naturelle, ce qui nécessite la détection expérimentale des divers isotopomères contenant simultanément un noyau  $^2\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  (couplés entre eux). La difficulté majeure de cette approche est que l'abondance naturelle de ces isotopomères est de  $1,70 \times 10^{-4}\%$ , (soit une 1 molécule sur 600 000 !), si les valeurs standards pour les rapports isotopiques ( $^2\text{H}/^1\text{H}$ ) et ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) sont adoptées et en supposant que les distributions isotopiques intramoléculaires ne soient pas corrélées. En termes d'applications, la détection de ces isotopomères devrait permettre de mettre en évidence d'éventuelles corrélations entre la distribution intramoléculaire isotopique  $^2\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , informations difficilement accessibles par spectrométrie de masse dans la mesure où la fragmentation moléculaire peut potentiellement redistribuer le fractionnement isotopique sur différents sites atomiques. Clairement l'utilisation en routine de cet outil RMN pourrait donc avoir un impact sur différents domaines comme l'authentification géographique/botanique de composés naturels, les études de métabolisme ou la lutte contre la contrefaçon. Ces expériences pourront également permettre de déterminer les effets isotopiques  $^1\text{H}/^2\text{H}$  sur les déplacements chimiques isotopiques  $^{13}\text{C}$ , comme nous le verrons.

## V – Instrumentation et molécule modèle

Dépasser les frontières analytiques d'une méthode en repoussant ses limites de détection par exemple, exige de se placer dans des conditions instrumentales et expérimentales optimales. Pour bénéficier d'un maximum de sensibilité, les expériences RMN ont été réalisées sur l'une des *très grandes infrastructures de recherche* du CNRS (**TGIR-RMN de Lille**, FR3050), en utilisant un spectromètre RMN Bruker de 21,1 T muni d'une sonde cryogénique inverse (TCI) de 5-mm. Les spectres  $^2\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  ont donc été enregistrés à 138 et 224 MHz, respectivement.

Par ailleurs, et compte tenu de la faible probabilité de détecter les isotopomères  $^2\text{H}/^{13}\text{C}$ , la molécule test a été choisie selon quatre critères : i) un faible poids moléculaire ; ii) une bonne solubilité en phase isotrope et anisotrope ; iii) une structure présentant des sites  $^2\text{H}/^{13}\text{C}$  spectralement équivalents et inéquivalents ; iv) la présence d'isotopomères chiraux. En pratique, il s'avère que l'alcool benzylique (**ABz**) remplit ces diverses conditions (cf. **Figure 1**). En effet, cette molécule semi-rigide de symétrie  $C_s$  en moyenne est prochirale, et possède des isotopomères- ( $^2\text{H}-^{13}\text{C}$ ) achiraux (cycle aromatique) et chiraux (groupe méthylène) susceptibles d'être discriminés par RMN  $^2\text{H}$  dans un CLC polypeptidiques [8,10,11].

## VI – Choix de la séquence RMN 2D

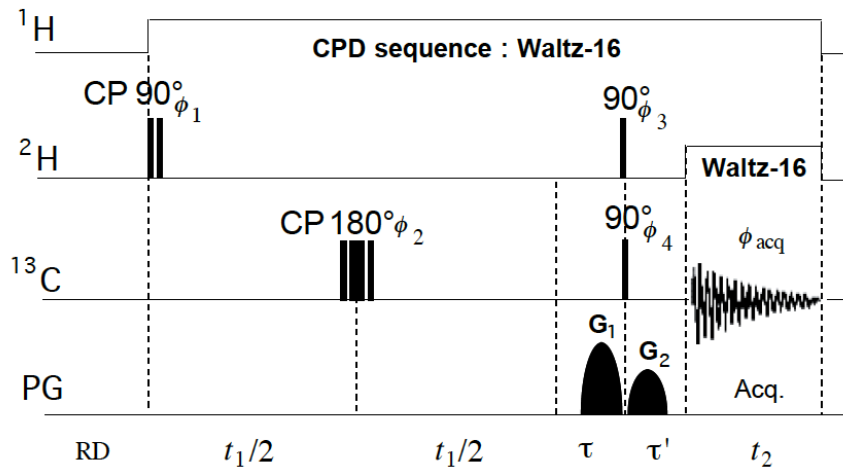
Baptiser une nouvelle méthode RMN d'un acronyme "accrocheur" est l'un des péchés véniels de la confrérie des RMNistes. En ces temps de faibles indices boursiers, l'acronyme angliciste "NASDAC" (Natural Abundance Spectroscopy Deuterium And Carbon) a été choisi pour désigner l'observation RMN des isotopomères-( $^2\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) en abondance naturelle [19].

La première séquence d'impulsions 2D NASDAC, utilisée est représentée schématiquement sur la **Figure 2**. Si elle découle de la séquence classique RMN 2D HETCOR  $^2\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  [17], elle intègre deux spécificités importantes pour cette étude [19] : i) des impulsions composites (première impulsion de  $90^\circ$  et  $180^\circ$ ) afin de compenser la dispersion des fréquences de résonance et de corriger les imperfections du champ de radiofréquence  $B_1$  pendant les impulsions ; ii) la combinaison d'un cyclage de phase de 128 étapes et de deux impulsions de gradients de champ ( $G_1$  et  $G_2$ ) afin de sélectionner idéalement les isotopomères-( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ). L'application d'impulsions  $^{13}\text{C}$  de présaturation avant la première impulsion  $^{13}\text{C}$  aurait pu être aussi envisagée pour éliminer les isotopomères-( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ), mais cette solution n'a pas été explorée.

Dans la séquence NASDAC, la cohérence  $^2\text{H}$  à un quantum ( $+1\text{Q}$ ) évolue au cours de la période d'évolution indirecte,  $t_1$ , sous l'effet des déplacements chimiques  $^2\text{H}$  ( $\delta(^2\text{H})^{\text{iso}}$  ou  $\text{aniso}$ ) et des  $\Delta\nu_Q$  (si l'échantillon est anisotrope), tandis que l'impulsion  $^{13}\text{C}$  de  $180^\circ$  au milieu de la période  $t_1$  refocalise les couplages hétéronucléaires  $^{13}\text{C}$ - $^2\text{H}$  scalaires ( $^1J_{\text{CD}}$ ) en milieu liquide ou spin-spin totaux ( $^1T_{\text{CD}} = ^1J_{\text{CD}} + 2^1D_{\text{CD}}$  ou  $^1D_{\text{CD}}$  est le couplage dipolaire) en solvant anisotrope. La cohérence  $^2\text{H} +1\text{Q}$  est ensuite convertie en cohérence  $^{13}\text{C} 1\text{Q}$  détectable, par application simultanée d'une impulsion  $^2\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de  $90^\circ$ . L'utilisation combinée d'une paire de gradients de champ pulsé selon l'axe z et du cyclage de phase est absolument nécessaire pour éliminer les signaux des isotopomères-( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) à plus de 99,9845%, c'est-à-dire leur abondance naturelle. En effet, la simple application des gradients ou du cyclage de phase ne permet pas de supprimer totalement le signal des isotopomères-( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) sous le seuil du bruit. Dans cet exemple, les gradients de champ conduisent à supprimer environ 99% des signaux correspondant aux isotopomères-( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ). De ce fait, en l'absence de cyclage phase, les signaux résiduels correspondant aux isotopomères-( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) reste environ 15 fois plus grands que ceux associés aux isotopomères-( $^2\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )! La contrepartie "douloureuse" est que la sélection des cohérences  $^2\text{H}$  à  $+1\text{Q}$  à l'aide des gradients de champ diminue l'intensité du signal recherché d'un facteur 2!

Les expériences 2D NASDAC utilisent une séquence d'impulsions de type 2D HETCOR  $^2\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (avec détection  $^{13}\text{C}$ ) car cette séquence présente, dans le cas des corrélations  $^2\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , une sensibilité supérieure aux expériences 2D HMQC et HSQC, notamment pour des temps de

recyclage ( $T_R$ ) courts entre deux expériences consécutives. Pour des temps de relaxation longitudinale  $^2\text{H}$  plutôt courts (typiquement  $T_1 = 0,25$  s), la sensibilité optimale pour la séquence HETCOR  $^2\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  est obtenue pour une valeur théorique de  $T_R$  d'environ 0,3 s [19]. Expérimentalement, un délai  $T_R$  plus grand ( $\approx 0,6$  s) a été employé. En effet, le découplage simultané des noyaux  $^1\text{H}$  et  $^2\text{H}$  durant l'acquisition par des trains d'impulsions composites (tels que la séquences Waltz-16) induit un échauffement de l'échantillon difficilement compatible avec la grande stabilité thermique requise pour enregistrer les spectres anisotropes. Notons, cependant, que même dans ces conditions sous-optimales, la sensibilité du schéma HETCOR est encore 2,3 fois plus grande que celle des séquences HMQC et HSQC avec détection  $^{13}\text{C}$ .



**Figure 2.** Séquence d'impulsions utilisée pour les expériences NASDAC en milieu isotrope et anisotrope. Compte tenu de l'absence d'effet nOe ( $^1\text{H} \rightarrow ^2\text{H}$ ), le découplage est seulement appliqué après le délai de relaxation (RD). Pour la séquence R-NASDAC, l'impulsion composite  $180^\circ$  est appliquée sur le canal  $^2\text{H}$  (voir texte). Dans les deux séquences, le rapport  $G_1/G_2$  est égal e 1.67/1. Le cyclage de phase complet est donnée dans la réf. 19.

Abstraction faite des termes de relaxation et de phase, l'expression générale du signal RMN pour un paire  $^2\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  couplée mutuellement et enregistrée avec la séquence 2D NASDAC est:

$$S(t_1, t_2) = A \times \frac{2}{3} \left\{ \exp[-(\omega_D - \omega_Q)(t_1 + \tau)] + \exp[-(\omega_D + \omega_Q)(t_1 + \tau) \right. \quad (\text{Eq.1}) \\ \left. \times \left\{ \sin(\omega_{CD}\tau) \times \sin(2\omega_{CD}\tau') \times \exp[i\omega_C(\tau' + t_2)] \right\} \right\}$$

Dans cette équation  $\omega_D = 2\pi\nu_{2\text{H}}$ ,  $\omega_C = 2\pi\nu_{13\text{C}}$ ,  $\omega_Q = \pi\Delta\nu_Q$  et  $\omega_{CD} = \pi^1J_{CD}$  (isotrope) ou  $\pi^1T_{CD}$  (anisotrope) et  $\nu_{2\text{H}}$  et  $\nu_{13\text{C}}$  sont les fréquences en Hz des noyaux  $^2\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ . En milieu liquide, toutes les interactions RMN anisotropes sont nulles et les termes correspondants ( $\omega_Q$ ) dans l'Eq. 1 disparaissent, tandis que  $\omega_{CD} = \pi^1J_{CD}$ .

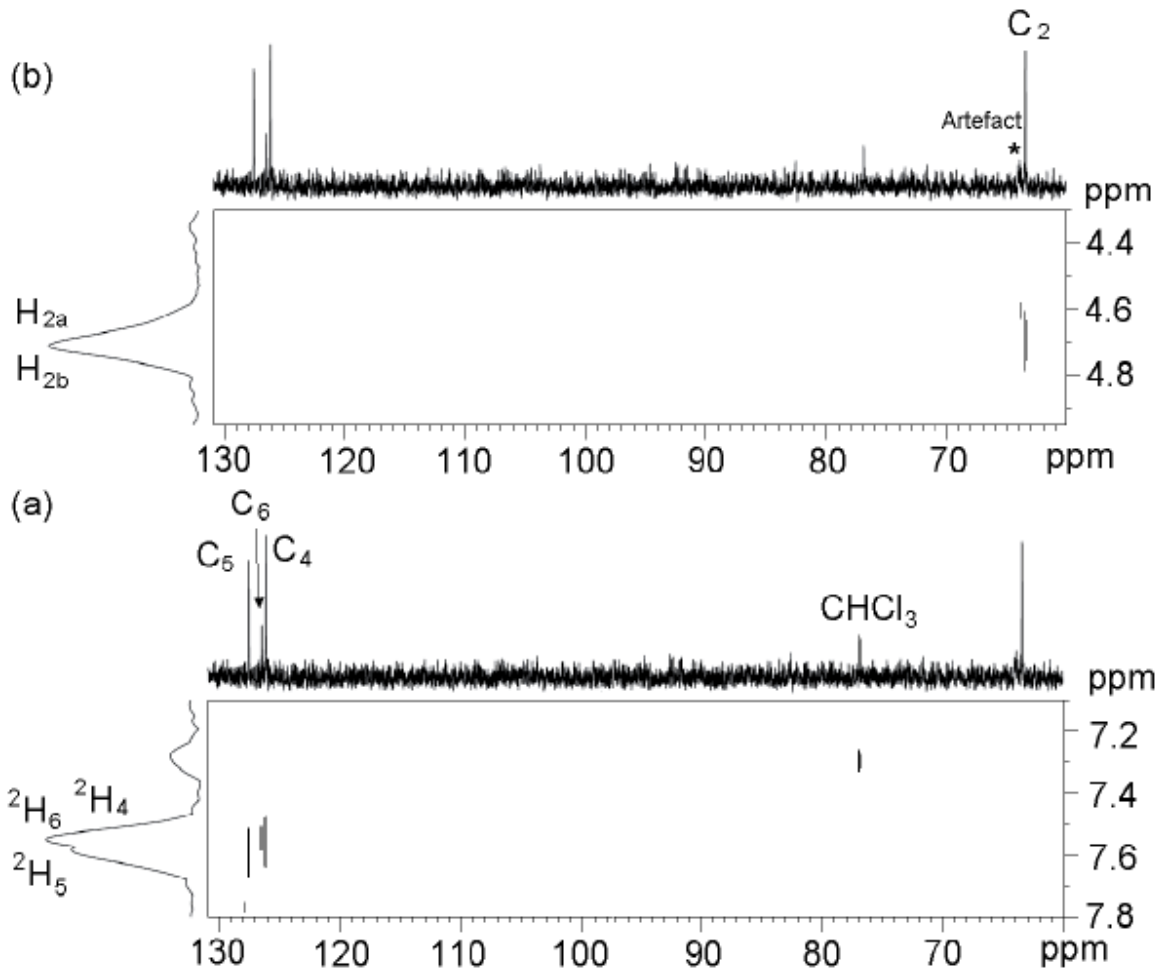
Pour compléter l'étude, une variante intéressante de l'expérience NASDAC a été explorée et expérimentalement testée [19]. Dans cette nouvelle séquence, intitulée *R*-NASDAC, l'impulsion composite de 180° pendant  $t_1$  est appliquée sur le canal  $^2\text{H}$ , ce qui permet de refocaliser les déplacements chimiques  $^2\text{H}$  dans la dimension spectrale  $F_1$ . Là encore, la sélection des chemins de cohérence est obtenue en combinant deux gradients de champ pulsé avec un cyclage de phases de 256 étapes [19]. Évidemment en milieu isotrope, l'expérience 2D *R*-NASDAC ne présente aucun intérêt car la refocalisation des déplacements chimiques empêche de distinguer les sites  $^2\text{H}$ . De ce fait, en milieu isotrope, seule l'expérience NASDAC est utile. À l'inverse, dans les milieux anisotropes, la séquence *R*-NASDAC est plus avantageuse pour deux raisons : i) la réduction de la largeur spectrale  $F_1$  minimise les effets de troncature des signaux le long de la dimension  $F_1$  lorsque le nombre d'incrément  $t_1$  est faible ; ii) la possibilité de symétriser la carte 2D, comme pour l'expérience 2D *Q*-résolue  $F_z$  (cf. **Figure 1**) [16]. L'expression du signal de l'expérience *R*-NASDAC diffère uniquement par l'absence du terme  $\omega_D$  dans l'**Eq. 1**.

Dans les expériences NASDAC et *R*-NASDAC l'intensité du signal dépend fortement de la valeur des délais de défocalisation et de refocalisation,  $\tau$  et  $\tau'$ . En abondance naturelle, seule les paires isolées  $^2\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  paires sont détectées, et par conséquent les délais optimaux,  $\tau$  et  $\tau'$ , sont égaux à  $1/(2^1T_{CD})$  et  $1/(4^1T_{CD})$ , respectivement.

Avant d'explorer les expériences sur l'**ABz** en abondance naturelle, les deux séquences d'impulsions ont d'abord été testées avec succès sur des échantillons d'**ABz** enrichie (**ABz**-[ $^2\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , 2- $^2\text{H}_2$ ] et **ABz**-[2- $^2\text{H}_2$ ]) en milieu isotrope puis orienté [19].

## VII- Applications en solvant isotrope

La **Figure 3** présente le spectre 2D NASDAC de l'**ABz** sans modification isotopique (300 mg) dissous dans du chloroforme (450 mg) et enregistré à 305 K. Adoptant les valeurs de V-SMOW ( $^2\text{H}$ ) et V-PBD ( $^{13}\text{C}$ ) [7], la concentration en abondance naturelle pour un isotopomère donné contenant simultanément un atome  $^2\text{H}$  couplé à un atome  $^{13}\text{C}$  [ $^{13}\text{C}$ - $^2\text{H}$ ] $^{\text{iso}}$  est estimée à environ  $8 \mu\text{mol.L}^{-1}$  dans cet échantillon. Compte tenu des valeurs de  $^1J_{CD}$ , les délais  $\tau$  et  $\tau'$  ont été choisis égaux à 21,7 et 7,2 ms, respectivement. Comme espéré, le spectre NASDAC 2D isotrope montre clairement toutes les corrélations hétéro-nucléaires  $^2\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  attendues pour l'**ABz**.



**Figure 3.** Zoom sur les régions aromatique (a) et aliphatique (b) du spectre 2D NASDAC isotrope (avec les projections  $F_1$  et  $F_2$ ) de l'ABz.

Dans l'histoire de la RMN, ce spectre 2D NASDAC isotrope enregistré en novembre 2011 (puis publié en avril 2012) constitue donc une première puisqu'il présente la toute première détection expérimentale d'isotopomères- $(^2\text{H}-^{13}\text{C})$  en abondance naturelle publiée à ce jour [19].

Après 18 heures d'acquisition, le rapport signal-sur-bruit (S/B) de cette expérience est d'environ 17 au niveau des sites  $^2\text{H}$  méthylène, *ortho* et *méta* de la molécule. La plus grande intensité des corrélations associées aux sites *ortho* et *méta* par rapport au site *para* vient essentiellement de la présence de deux atomes de carbone et deutérium équivalents contribuant, par rapport à la paire unique  $^2\text{H}-^{13}\text{C}$  du site *para*, en supposant évidemment une distribution intramoléculaire uniforme en  $^2\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  pour ces différents sites.

Comme prévu, les résonances des noyaux  $^{13}\text{C}$  liés à un deutérium sont plus blindées que celles des noyaux liés à un proton (effet isotopique  $^1\text{H}/^2\text{H}$ ). Ceci se traduit par un déplacement des fréquences  $^{13}\text{C}$  de la projection  $F_2$  du spectre 2D NASDAC par rapport au spectre 1D  $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$  isotrope. Ce décalage systématique des déplacements chimiques  $^{13}\text{C}$  varie de -273 à -327

ppb pour l'**ABz**. Un effet isotopique de -185 ppb a également été mesuré sur le signal  $^{13}\text{C}$  du chloroforme. Ces valeurs sont conformes à celles attendues pour des carbones hybridés  $\text{sp}^2$  et  $\text{sp}^3$ . Cet effet a été initialement mis en évidence en comparant des spectres de composés non enrichis et non enrichis en deutérium, mais jamais détecté directement à partir des isotopomères- $(^2\text{H}-^{13}\text{C})$  en abondance naturelle [4].

## VIII – Applications en milieu orienté chiral

L'intérêt principal des spectres 2D NASDAC dans les milieux anisotropes chiraux ou achiraux est triple : i) améliorer la résolution spectrale des doublets quadrupolaires dans la dimension  $F_2$  ; ii) lever les effets de pseudo-isochronie sur certaines résonances  $^2\text{H}$  (même pour des solutés de petite taille) ; iii) faciliter leur attribution sur la base des  $\delta(^{13}\text{C})$  et non plus  $\delta(^2\text{H})$ . Cette situation est typiquement rencontrée dans le cas de l'**ABz** puisque comme nous pouvons le constater sur le spectre 2D Q-résolue- $F_z$  (cf. **Figure 1**), les signaux des sites  $^2\text{H}$  *ortho* et *méta* du cycle aromatique ne sont pas différenciés spectralement, et donne naissance à un doublet unique pour ces deux sites.

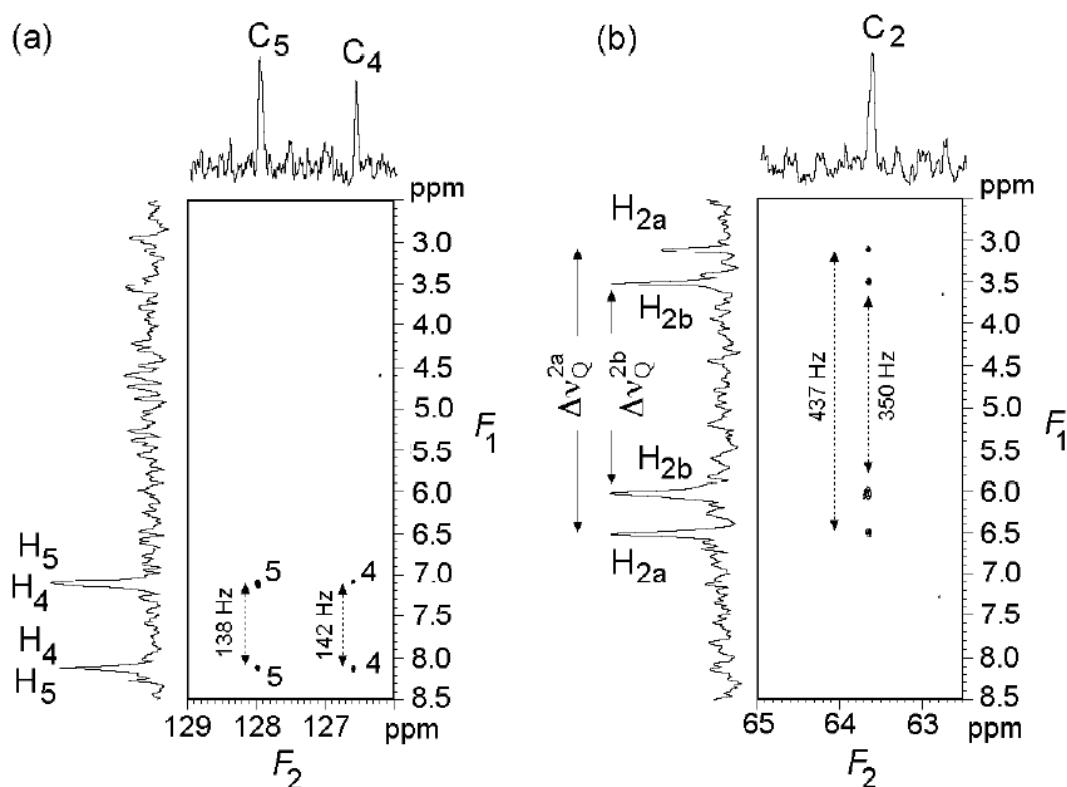
D'un point de vue expérimental, l'enregistrement de spectres NASDAC anisotropes (analytiquement exploitables) se révèle plus difficile à obtenir comparés aux expériences NASDAC isotropes. Trois raisons sont à l'origine de ces difficultés: i) l'interaction quadrupolaire donne naissance à un doublet pour chaque site  $^2\text{H}$  et de ce fait, l'intensité des composantes est divisée, au mieux, par un facteur deux par rapport au signal isotrope (en supposant que la largeur de raie est identique dans les deux cas) ; ii) la distribution des paramètres d'ordre moléculaires résultant des inhomogénéités de la mésophase peut produire un élargissement non négligeables des raies et donc une diminution supplémentaire du signal ; iii) si le milieu est chiral, les signaux des énantio-isotopomères ( $^2\text{H}-^{13}\text{C}$ ) sont potentiellement discriminés, ce qui divise encore par deux l'intensité du signal comparé aux spectres anisotropes achiraux.

Une autre difficulté inhérente à la séquence NASDAC est le choix des valeurs  $\tau$  et  $\tau'$  pour optimiser le transfert  $^2\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ . En effet, dans les milieux orientés, la dispersion des valeurs  $|^1T_{\text{CD}}|$  pour les différentes paires ( $^2\text{H}-^{13}\text{C}$ ) complique sévèrement le choix de ces valeurs par rapport aux solvants isotropes. Les délais optimaux  $\tau$  et  $\tau'$  peuvent être estimés à partir de l'expression de l'efficacité du transfert  $^2\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$  en fonction de  $\tau$  et  $\tau'$ . Dans cet exemple, il apparaît que le couplage total  $|^1T_{\text{CD}}|$  du site *para* est beaucoup plus petit que pour les autres sites et comparable à  $1/T_2$  ( $^2\text{H}$ ). De fait, il s'est avéré plus judicieux de ne pas prendre en compte ce site pour optimiser les deux délais. Pour l'expérience NASDAC anisotrope, les valeurs de 18,2 ms et 9,1

ms pour  $\tau$  et  $\tau'$  ont été retenues.

La **Figure 4** présente deux zooms de la carte NASDAC de l'**ABz** (300 mg) dissous dans la mésophase chirale PBLG (100 mg) /CHCl<sub>3</sub> (300 mg). L'analyse de la carte 2D montre que les différents isotopomères-(<sup>2</sup>H-<sup>13</sup>C) et énantio-isotopomères-(<sup>2</sup>H-<sup>13</sup>C) peuvent être détectés en abondance naturelle dans une mésophase chirale (ici [<sup>2</sup>H-<sup>13</sup>C]<sup>aniso</sup> ≈ 9 μmol.L<sup>-1</sup>). Ce résultat constitue également une autre première dans l'histoire de la RMN !

Après 18 h d'acquisition, les signaux et les corrélations attendues émergent clairement du bruit puisque les rapports S/B varient entre 5 à 12. Comme prévu, nous observons quatre doublets quadrupolaires (les signaux <sup>2</sup>H/<sup>13</sup>C du site *para* n'ayant pas été considérés). Deux doublets <sup>2</sup>H ( $|\Delta\nu_Q| = 142$  et  $138$  Hz) centrés sur deux  $\delta(^{13}\text{C})$  sont détectés dans la région aromatique, l'un pour le site *ortho* ( $\delta = 126,6$  ppm) et l'autre pour le site *méta* ( $\delta = 127,9$  ppm). Dans la région aliphatique, deux doublets centrés sur le même  $\delta(^{13}\text{C}) = 63,6$  ppm et correspondant au groupe méthylène sont obtenus. La présence de deux doublets ( $|\Delta\nu_Q| = 437$  et  $350$  Hz) indique que les énantio-isotopomères-(<sup>2</sup>H-<sup>13</sup>C) sont différenciés et détectés pour la première fois. Le spectre 2D NASDAC permet l'attribution définitive des sites <sup>2</sup>H en position *ortho* et *méta* du cycle aromatique. Sans surprise, l'effet isotopique <sup>1</sup>H/<sup>2</sup>H sur le blindage des résonances <sup>13</sup>C a également été observé en milieu orienté.



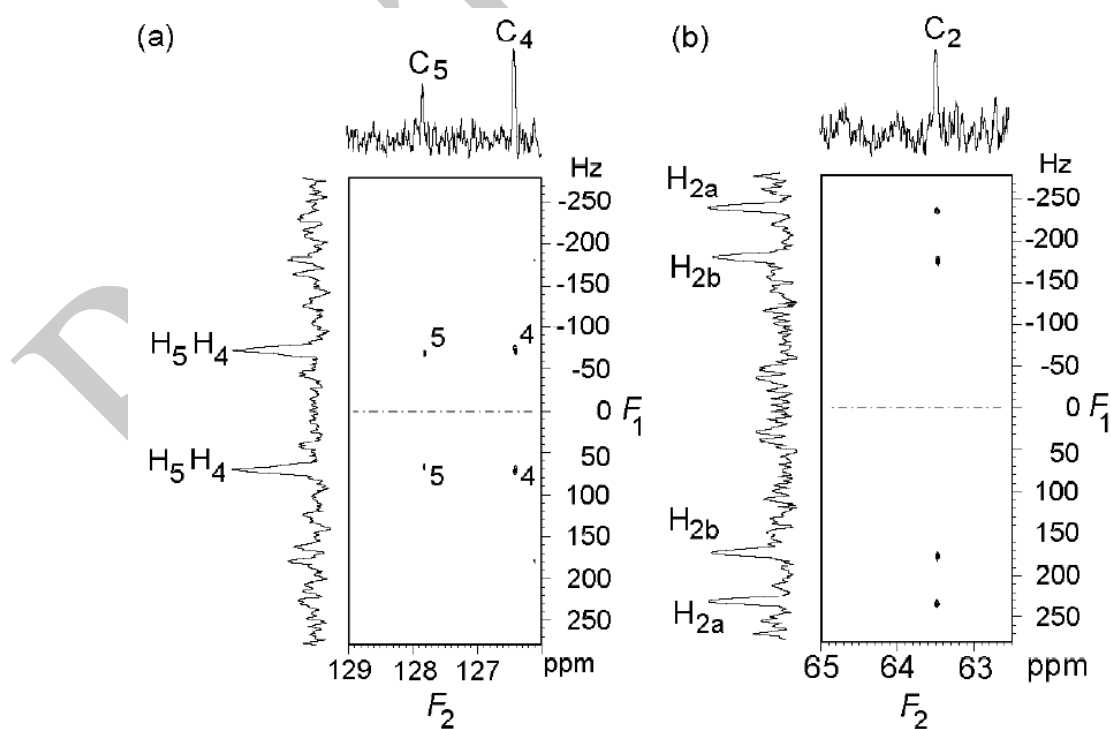
**Figure 4.** Zoom sur les régions aromatique (a) et aliphatique (b) du spectre 2D NASDAC anisotrope (avec les projections  $F_1$  et  $F_2$ ) de l'**ABz**. L'attribution des doublets pour les positions H<sub>2a</sub>/H<sub>2b</sub> est arbitraire.

## IX – NASDAC contre R-NASDAC

Compte tenu des instabilités à long terme de la mésophase et de l'absence de lock  $^2\text{H}$ , il est difficile d'accroître le temps d'acquisition des expériences NASDAC au-delà de 18 h. Par conséquent, le choix des paramètres d'acquisition du signal est crucial pour maximiser la sensibilité des expériences isotropes et anisotropes.

Sachant que les rapports S/B sont plus grands pour des temps d'évolution  $t_1$  courts, les expériences 2D NASDAC ont donc été enregistrées en additionnant un très grand nombre de scans (NS = 1152) pour un nombre restreint d'incrément dans la dimension indirecte (N1 = 64). Pour réduire significativement (voir même éliminer) les effets indésirables (sinus-cardinal) sur les signaux  $^2\text{H}$  associés à la troncature du FID en dimension  $F_1$ , un algorithme de prédiction linéaire (implanté sur le logiciel de traitement du spectromètre a été utilisé afin de reconstituer l'évolution du signal pendant  $t_1$  [20]. Une autre option existe et consiste en la réduction de la largeur spectrale  $F_1$  ( $\text{SW}_1$ ). Cette solution est envisageable en utilisant l'expérience 2D R-NASDAC où seule l'interaction quadrupolaire évolue au cours de  $t_1$ , puisque les déplacements chimiques  $^2\text{H}$  sont éliminés par refocalisation. Dans cette approche, la valeur de  $\text{SW}_1$  doit être seulement légèrement supérieure à la plus grande valeur des  $\Delta\nu_Q$ .

Semblable au spectre 2D NASDAC, le spectre 2D R-NASDAC (cf. **Figure 5**) présente les pics de corrélation  $^2\text{H}/^{13}\text{C}$  correspondant aux quatre isotopomères- ( $^2\text{H}-^{13}\text{C}$ ) attendus.



**Figure 5.** Zoom sur la région aromatique (a) et aliphatique (b) du spectre 2D R-NASDAC anisotrope de l'ABz.

Cependant, le spectre *R*-NASDAC 2D a été obtenu avec une largeur spectrale  $F_1$  de 600 Hz, tandis que le spectre 2D NASDAC avait été enregistré avec  $SW_1 = 1000$  Hz (cf. **Figure 4**). La réduction de la valeur de  $SW_1$  permet de réduire les artefacts de troncature. En outre, la position symétrique des composantes de chaque doublet quadrupolaire par rapport à  $F_1 = 0$  Hz permet de symétriser la dimension  $F_1$ . Notons finalement que la carte *R*-NASDAC est formellement identique à celle de la carte Q-résolue Fz sauf que les doublets quadrupolaires sont distribués sur une plus grande largeur spectrale  $F_2$  en raison de la forte dispersion chimique du  $^{13}\text{C}$  (cf. **Figure 1**).[16,17]

## X – Conclusion et perspectives

Pour la première fois dans l'histoire de la RMN, la détection expérimentale d'isotopomères- ( $^2\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) naturellement abondants a été obtenue en utilisant un spectromètre RMN de 21,1 T, une crysonde inverse et des expériences 2D de corrélation hétéronucléaire optimisées. Grâce à l'utilisation d'un cristal liquide polypeptidique chiral comme solvant de RMN, la première discrimination spectrale entre des énanti-isotopomères- ( $^2\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) naturellement abondants a également été possible, permettant ainsi de dépasser de nouvelles frontières dans le domaine de l'analyse chirale.

Si les quantités de soluté utilisées dans cette étude sont relativement élevées, ces quantités sont comparables à celle utilisées dans les toutes premières expériences RMN 1D  $^2\text{H}$  en abondance naturelle et enregistrées en 1998 sur un spectromètre Bruker AM 250 de 5.8 T.[10] Même si cette technique nécessitait une bonne centaine de milligrammes d'échantillon (jusqu'au développement des sondes cryogéniques  $^2\text{H}$ ), la RMN 1D/2D DAN dans les solvant chiraux anisotropes ont permis de résoudre diverses problèmes analytiques, rendant ainsi de nombreux services aux chimistes.[8]

Compte tenu de la large gamme de déplacements chimiques  $^{13}\text{C}$ , les expériences NASDAC sont des outils uniques pour faciliter l'attribution des doublets quadrupolaires, impossible à réaliser sans ambiguïté sur des spectres RMN 2D QUOSY DAN trop encombrés. Par ailleurs, elles devraient éviter l'enrichissement isotopique sélectif des analytes.

Dans un avenir proche, les améliorations technologiques RMN déjà disponibles et/ou en développement (RMN Gigahertz, sonde cryogénique  $^{13}\text{C}$  avec détection optimisée, techniques DNP ou parahydrogène, ...) devraient fournir de nouvelles solutions pour augmenter la sensibilité de cette classe d'expériences RMN 2D.

De toute évidence, ces résultats pionniers (même si une molécule modèle a été utilisée) ouvre des perspectives intéressantes et stimulantes pour le développement des expériences NASDAC

(an)isotropes, et pas seulement pour la communauté des RMNistes. En particulier, la mesure RMN des rapports entre les différents isotopomères- $(^2\text{H}-^{13}\text{C})$  pourrait compléter, dans un avenir proche, les mesures des rapports isotopiques site-spécifiques  $^1\text{H}/^2\text{H}$  et  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ , facilitant, par exemple, la compréhension et la détermination des sources d'hydrogène ou de carbones dans les cycles enzymatiques. Plus excitant encore, les expériences NASDAC pourraient également fournir, à terme, de nouveaux outils originaux pour lutter contre la contrefaçon, jusqu'à l'échelle moléculaire.

## XI – Références

- [1] *Establishing a Molecular Relationship between Chondritic and Cometary Organic Solids*, G. Cody, E. Heying, C. M. O. Alexander, L. R. Nittler, A. L. D. Kilcoyne, S. A. Sandford, R. M. Stroud *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 19171-19176.
- [2] *Cryogenic Probe  $^{13}\text{C}$  NMR Spectroscopy of Urine for Metabonomic Studies*, H. C. Keun, O. Beckonert, J. L Griffin, C. Richter, D. Moskau, J. C. Lindon, J. K. Nicholson, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 4588-4593.
- [3] G. J. Martin, M. L. Martin, G. S. Remaud, in *Modern Magnetic Resonance* (Ed: G. A. Webb), Springer, Berlin, **2006**, pp. 1647-1657.
- [4] *Isotope Effects on Nuclear Shielding*, P. E. Hansen, *Ann. Report NMR Spectrosc.* **1983**, *15*, 105-231.
- [5] R. Freeman, *Handbook of Nuclear Magnetic Resonance*, Pearson, 1987.
- [6] *Cryogenically cooled probes-a Leap in NMR Technology*, H. Kovacs, D. Moskau, M. Spraul, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2005**, *46*, 131-155.
- [7] *Isotope-abundance Variations of Selected Elements*, T. B. Coplen, J. K. Böhlke, P. De Bièvre, T. Ding, N. E. Holden, J. A. Hopple, H. R. Krouse, A. Lamberty, H. S. Peiser, K. Révész, S. E. Rieder, K. J. R. Rosman, E. Roth, P. D. P. Taylor, R. D. Vocke, Jr., Y. K. Xiao *Pure and Applied Chemistry* **2002**, *74*, 1987-2017.
- [8] *Natural Abundance Deuterium NMR Spectroscopy: Developments and Analytical Applications in Liquids, Liquid Crystals and Solid Phases*, P. Lesot, J. Courtieu *Prog. Nucl. Magn. Reson Spectrosc.* **2009**, *55*, 128-159, and references citées.
- [9] *Visualization of Enantiomers in a Polypeptide Liquid Crystal Solvent through Carbon-13 NMR Spectroscopy*, P. Lesot, D. Merlet, A. Meddour, A. Loewenstein, J. Courtieu, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1995**, *91*, 1371-1375.
- [10] *Enantiomeric Visualisation using Proton-Decoupled Natural Abundance Deuterium NMR in Poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate) Liquid Crystalline Solutions*, P. Lesot, D. Merlet, A. Loewenstein, J. Courtieu, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 1871-1881.
- [11] *Natural Abundance Deuterium NMR Spectroscopy in Polypeptide Liquid Crystals as a New and Incisive Means for Enantiodifferentiation of Chiral Hydrocarbons*, P. Lesot, M. Sarfati, J. Courtieu, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 1724-1745.
- [12] *Analysis of the  $^{13}\text{C}$  NMR Spectra of Molecules, Chiral by Isotopic Substitution, Dissolved in a Chiral Oriented Environment: Toward the Absolute Assignment of the pro-R/pro-S Character of Enantiotopic Ligands in Prochiral Molecules*, P. Lesot, O. Lafon J. Courtieu, P. Berdagué, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 3741-3746.

- [13] *Empirical Determination of the absolute Configuration of Small Chiral Molecules using Natural Abundance  $^2\text{H}$  NMR in Chiral Liquid Crystals*, L. Ziani, P. Lesot, A. Meddour, J. Courtieu, *Chem. Commun.* **2007**, 4737-4739.
- [14] *Recent Advances in the Analysis of the Site-specific Isotopic Fractionation of Metabolites such as Fatty Acids using Anisotropic Natural Abundance  $^2\text{H}$  NMR Spectroscopy: Application on Conjugated Linolenic Methyl Esters*, P. Lesot, Z. Serhan, I. Billault, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 399, 1187-1200.
- [15] *Enantiodiscrimination of Flexible Cyclic Solutes using Deuterium NMR Spectroscopy in Polypeptide Chiral Mesophases: Investigation of cis-Decalin and THF*, C. Aroulanda, O. Lafon, P. Lesot, *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 10628-10640.
- [16] *Modified z-gradient Filtering as a New Mean to Obtain Phased Deuterium Autocorrelation 2D NMR Spectra in Oriented Solvents*, O. Lafon, P. Lesot, D. Merlet, J. Courtieu, *J. Magn. Reson.* **2004**, 171, 135-142.
- [17] *2D-NMR Strategy Dedicated to the Analysis of Perdeuterated Enantiomer Solute in Weakly Ordered Chiral Liquid Crystals*, P. Lesot, M. Sarfati, D. Merlet, B. Ancian, J.W. Emsley, B.A. Timimi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 7689-7695.
- [18] *Use of Two-dimensional Correlation between  $^2\text{H}$  quadrupolar splittings and  $^{13}\text{C}$  CSA's for Assignment of NMR Spectra in Chiral Nematics*, O. Lafon, P. Berdagué, P. Lesot, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, 6, 1080-1084.
- [19] *Experimental Detection of Achiral and Chiral Naturally Abundant  $^{13}\text{C}$ - $^2\text{H}$  Isotopomers by 2D-NMR in Liquids and Chiral Oriented Solvents*, P. Lesot, O. Lafon, *Anal. Chem.* **2012**, 84, 4569-4573.
- [20] *Two-dimensional Linear-prediction NMR Spectroscopy*, H. Gesmar, J. J. Led, *J. Magn. Reson.* **1989**, 83, 53-64.