

Philippe LESOT<sup>1</sup>

## RMN du deutérium en abondance naturelle dans les cristaux liquides chiraux : évolutions technologiques, avancées méthodologiques et nouvelles applications analytiques

### RÉSUMÉ

Le contrôle de la pureté énantiomérique est plus que jamais une priorité pour les laboratoires pharmaceutiques. Dans cet article, nous présentons les derniers développements technologiques et méthodologiques associés à la RMN du deutérium en abondance naturelle dans les solvants orientés chiraux. Nous montrerons les potentialités analytiques de cet outil lorsque un spectromètre RMN « haut-champ » équipé d'une sonde de détection cryogénique deutérium est utilisé.

### MOTS-CLÉS

RMN 2D, sonde cryogénique deutérium, chiralité, cristaux liquides, pureté énantiomérique, configuration absolue, fractionnement isotopique

## Natural abundance deuterium NMR in chiral liquid crystals : technological evolutions methodological improvements and new analytical applications

### SUMMARY

Controlling the enantiomeric purity is more than ever a priority for pharmaceutical companies. In this article, we will present the latest technological and methodological developments associated with deuterium NMR at natural abundance level when chiral oriented solvents are used. We will show the potential of this analytical tool when « high-field » NMR spectrometers are coupled with the use of cryogenically cooled deuterium NMR probes.

### KEYWORDS

2D NMR, deuterium cryoprobes, chirality, liquid crystals, enantiomeric purity, absolute configuration, isotopic fractionation

### I - Introduction

Les enjeux socio-économiques et bio-éthiques liés à la vente de nouvelles substances bio-actives chirales ainsi que les procédures de contrôle mises en place à l'échelle européenne (législation en vigueur, directive REACH, ...) imposent le développement continu de nouvelles méthodes d'analyse de la chiralité. Dans ce domaine, la résonance magnétique nucléaire (RMN) constitue un outil de choix (1). Dans un article publié au début de l'année 2005 dans *Spectra Analyse*, nous présentions le potentiel analytique de la RMN utilisant les cristaux liquides chiraux (CLC) comme solvants chiraux énantiodiscriminants (2). En particulier, nous avons mis l'accent sur le récent développement de la RMN du deutérium (spin  $I = 1$ ) en abondance naturelle (RMN DAN) dans les milieux orientés polypeptidiques (3, 4). Ces systèmes lyotropes, préparés en dissolvant du poly- $\gamma$ -benzyl-L-gluta-

mate (PBLG) ou du poly- $\epsilon$ -carboboxy-L-lysine (PCBL) dans du chloroforme, du DMF, du THF, ... sont susceptibles d'orienter différentiellement des énantiomères (notés *R/S*). Les résultats présentés en 2005, déjà très prometteurs, avaient été collectés à l'aide d'un spectromètre RMN de 9,4 T (soit une fréquence de 400 MHz pour le proton) et d'une sonde sélective deutérium de 5 mm. Dans ce second article, nous présenterons les dernières avancées de cette approche analytique obtenues lorsqu'un spectromètre RMN « haut-champ » (14 T / 600 MHz) équipé d'une cryosonde sélective deutérium est utilisé (5). En particulier, nous décrirons deux applications utiles pour les chimistes et les biochimistes, l'une dédiée à la détermination de la configuration absolue de petites molécules chirales, l'autre à la mesure des rapports isotopiques Deutérium/Hydrogène, ( $^2\text{H}/^1\text{H}$ ), dans des produits naturels tels que les acides gras insaturés.

<sup>1</sup>Laboratoire de Chimie Structurale Organique – RMN en Milieu Orienté – ICMMO – UMR-CNRS 8182 – Bât. 410, Université de Paris-Sud (XI) – 91405 Orsay cedex  
Tél. : 01 69 15 47 59 / 70 17 – E-Mail : phillesot@icmo.u-psud.fr

## RMN du deutérium en abondance naturelle dans les cristaux liquides chiraux : Evolutions technologiques, avancées méthodologiques et nouvelles applications analytiques

### II - Problématique scientifique

Même si les noyaux deutérium se révèlent intrinsèquement peu abondants ( $1,55 \times 10^{-2}$  % d'isotope), la RMN DAN a été appliquée très tôt avec succès en chimie analytique et structurale, lorsque les premiers spectromètres RMN modernes à transformée de Fourier ont été commercialisés. Contrairement à la RMN des noyaux abondants (par exemple, le proton), l'analyse des spectres RMN DAN découplé des protons ( $^2\text{H}$ - $\{^1\text{H}\}$ ) est largement simplifiée puisque aucune structure de couplage entre noyaux deutériums n'est observée, à l'image de la RMN  $^{13}\text{C}$ - $\{^1\text{H}\}$ . La non-détection des isotopomères dideutérés ( $2,40 \times 10^{-6}$  %) peut se révéler un atout considérable pour certaines applications analytiques. Cette caractéristique a été exploitée pour l'étude des effets cinétiques isotopiques (KIE) ou la détermination de la distribution des profils isotopiques naturels spécifiques (RMN FINS<sup>®</sup>, fractionnement isotopique naturel spécifique) pour contrôler l'origine géographique de (bio)composés tels que l'éthanol, la vanilline, ... (6). Conséquence directe du faible rapport gyromagnétique du deutérium ( $\gamma_{^1\text{H}}/\gamma_{^2\text{H}} = 6,515$ ), cette approche (notamment en milieu isotrope) présente un inconvénient majeur lié à la faible dispersion des résonances  $^2\text{H}$  sur les spectres de RMN. De fait, l'analyse de molécules contenant un nombre élevé de sites deutérium inéquivalents est parfois difficile (recouvrement des raies), et l'attribution des transitions sur la base unique du déplacement chimique n'est pas toujours simple ou possible. Pour contourner cette limitation, l'utilisation de spectromètres opérant à très haut champ magnétique est une solution (plutôt coûteuse), en revanche, l'emploi de solvants orientés, par exemple les cristaux liquides (milieux anisotropes), est une alternative originale. En effet, l'orientation moléculaire adoptée en moyenne par toutes molécules dissoutes dans ces milieux conduit à l'apparition de doublets quadrupolaires (interaction anisotrope spécifique aux noyaux de spin  $I = 1$ ) sur les spectres RMN DAN. Cette information spectrale (inaccessible dans les liquides) possède un étonnant potentiel analytique, et permet généralement de lever les recouvrements des signaux observés en RMN des liquides.

### III - Evolutions technologiques

Le second inconvénient de la RMN DAN est évidemment lié à la sensibilité naturelle des noyaux deutériums, qui sont parmi les noyaux magnétiquement actifs les moins sensibles de la classification périodique ( $I = 1$ , noyau quadrupolaire, faible rapport  $\gamma$ , ...). Pour rendre la RMN DAN plus efficace, notamment en milieu orienté, il est nécessaire d'accroître le rapport signal sur bruit (S/B) de chaque résonance, soit en travaillant avec une quantité importante de composé (pas toujours possible), soit en optimisant la détection du signal

deutérium (aspect technologique). Dans cette seconde stratégie, nous pouvons agir sur deux facteurs : i) augmenter la force du champ magnétique ( $S/B \propto B_0^{3/2}$ ), ce qui va simultanément augmenter la fréquence de résonance des noyaux deutériums, et donc accroître la dispersion des signaux RMN ; ii) améliorer la sensibilité des outils de détection du spectromètre, c'est-à-dire la sonde RMN elle-même. Dans ce domaine, des progrès considérables ont été réalisés récemment avec la mise sur le marché de sondes RMN dites « cryogéniques ». Leur principal avantage est de réduire considérablement le bruit thermique généré par les composés électroniques de la bobine et du préamplificateur, et donc d'augmenter significativement les rapports S/B, si importants en RMN (7). Pour y parvenir, la bobine et le préamplificateur sont refroidis à très basse température par de l'hélium gaz (à  $T \approx 20$  K et 70 K, respectivement), sans que la température de l'échantillon RMN en soit affectée. Un exemple de cryosonde deutérium (système Bruker Biospin, Wissembourg, France) est présenté sur l'Image 1. Le gain en sensibilité de ces sondes de nouvelle génération atteint un facteur 4 à 5, comparativement à une sonde classique non-refroidie de même diamètre.

Evidemment, l'utilisation combinée d'un spectromètre opérant à haut ou très haut champ et d'une cryosonde fournit un instrument d'analyse unique pour le développement et l'utilisation en routine de la RMN DAN en milieu isotrope et anisotrope. A titre de comparaison, un spectromètre de 11,7 T (600 MHz) muni d'une cryosonde possède la même sensibilité qu'un spectromètre de 35,2 T (1,5 GHz), qui évidemment n'existe pas encore ! Expérimentalement, les tests de sensibilité (menés dans des conditions opératoires identiques) ont

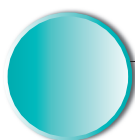
#### REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans cet article mettent en jeu diverses collaborations scientifiques : Isabelle Billault du Laboratoire d'Analyse Isotopique et Electrochimique des Métabolismes (Nantes), Jean-Marc Campagne de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (Gif-sur-Yvette), Zeev Luz du Weizmann Institute (Rehovot, Israël), et J.-M. Paris et F. Metz des Laboratoires Rodia Research



**Image 1**

Exemple de cryosonde deutérium de 5 mm avec son préamplificateur intégré.



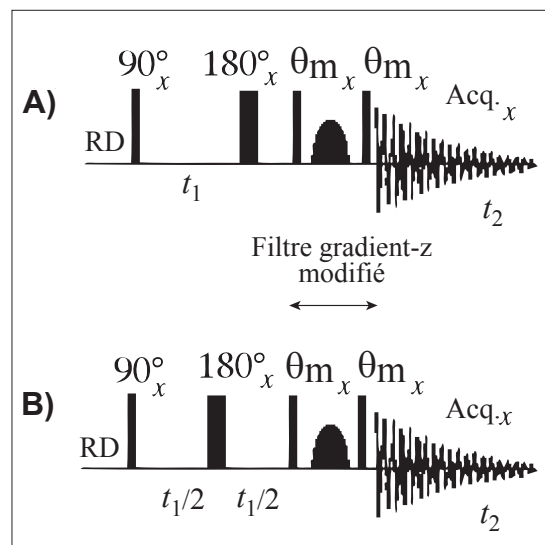
montré un gain en sensibilité d'un facteur 8-10 comparés aux résultats obtenus avec notre ancien spectromètre (9,4 T) muni d'une sonde  $^2\text{H}$  standard. Cette valeur, supérieure à la valeur théorique attendue (facteur  $\approx 7,4$ ), reflète probablement un vieillissement de l'électronique du spectromètre et/ou de la sonde RMN.

## IV - Avancées methodologiques

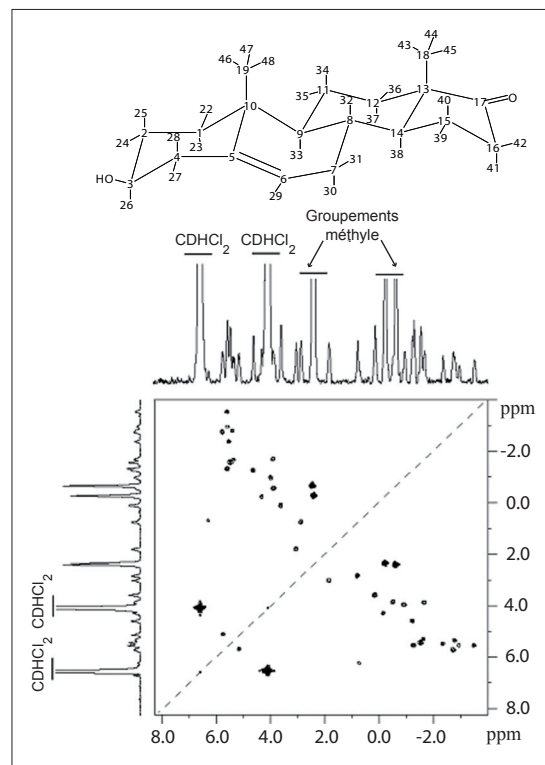
Pour simplifier l'analyse des spectres DAN complexes en milieux orientés, diverses expériences RMN bidimensionnelles (2D) de type «QUOSY» (QUadrupole Ordered Spectroscopy), comme les séquences 2D Q-COSY et Q-résolue, ont été proposées (8). L'éclatement de l'information spectrale sur deux domaines de fréquence permet de corréler les deux composantes de chaque doublet, puis de les attribuer plus facilement sur la base de leurs déplacements chimiques ( $\delta$ ). Cependant ces séquences sont caractérisées par des signaux en «phase twist» (mélange de signaux en dispersion et absorption) et la carte 2D doit être traitée en mode magnitude, ce qui conduit à élargir fortement les raies, et donc réduire la résolution des spectres. Cette situation peut s'avérer assez gênante pour l'analyse de molécules possédant de nombreux sites deutérium inéquivalents. Pour contourner cette difficulté, nous avons conçu de nouvelles expériences, baptisées Q-COSY Fz et Q-résolue Fz (voir figure 1) qui permettent d'obtenir des cartes 2D sur lesquelles les signaux deutériums sont phasables en absorption pure dans les deux dimensions spectrales (8). Même si ces nouvelles expériences sont légèrement moins sensibles que les expériences initiales (-33 % et -25 %), elles permettent d'analyser efficacement les spectres de molécules possédant un nombre élevé de résonances, la perte de sensibilité étant compensée par l'efficacité de la cryosonde.

Pour illustrer notre propos, la Figure 2 présente le spectre 2D Q-COSY Fz DAN de la 3- $\beta$ -hydroxy-androst-5- $\alpha$ -17-one, ou DHEA (1), un stéroïde particulièrement médiatisé, qui possède sept carbones asymétriques et vingt-trois directions carbone-deutérium inéquivalentes. Ce spectre a été obtenu après huit heures d'acquisition en utilisant un échantillon composé de 70 mg de soluté dissous dans 100 mg de PBLG et 550 mg de dichlorométhane. Compte tenu de la quantité de soluté et de sa masse moléculaire ( $M = 288$  g/mol), la concentration en isotopomère monodeutééré pour chaque énantiomère  $[\text{CD}]^{\circ}$  est évaluée à  $50 \mu\text{mol/L}$ .

Sur la carte 2D présentée en Figure 2, plus de vingt doublets quadrupolaires associés à la DHEA sont visibles et ont été attribués sur la base de leurs déplacements chimiques respectifs. Ce résultat montre que le produit dissous



**Figure 1**  
Séquences 2D (A) Q-COSY Fz et (B) Q-résolue Fz ( $\theta_m = 54,7^\circ$ ). Comparées aux séquences initiales, un filtre gradient-z modifié a été ajouté avant l'acquisition du signal.



**Figure 2**  
Spectre 2D Q-COSY Fz DAN de la DHEA à 300 K dissoute dans la mésophase PBLG/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $t_{\text{exp}} : 8$  h).

est énantiopur, ce qui était attendu dans cet exemple. A partir des éclatements quadrupolaires mesurés, on pourrait, par exemple, via un calcul systématique des paramètres d'ordre moléculaire (matrice de Saupe), déterminer la configuration relative (R ou S) des sept centres stéréogènes de la molécule (9). Ce travail est actuellement mené au laboratoire.

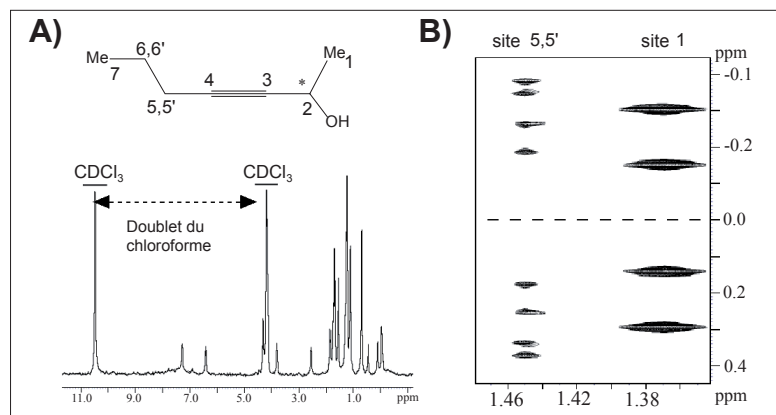
## RMN du deutérium en abondance naturelle dans les cristaux liquides chiraux : Evolutions technologiques, avancées méthodologiques et nouvelles applications analytiques

Les résultats obtenus avec la DHEA démontrent clairement que l'approche technologique choisie est une solution efficace pour pouvoir réduire les temps d'expériences, diminuer la quantité de soluté étudié (30-40 mg) ou mesurer précisément des excès énantiomériques (ee) élevés (ee > 90 %), comme nous allons le montrer dans les exemples suivants.

### V - Exemples d'analyse énantiomérique

La synthèse totale de molécules bioactives requiert la préparation de synthons chiraux précurseurs dont le contrôle de la pureté énantiomérique est crucial. La RMN DAN dans les CLC est parfaitement adaptée pour ce type d'analyse. Cependant quels que soient les moyens technologiques à disposition, l'une des clés du succès de la méthode repose indéniablement sur une homogénéité irréprochable des échantillons RMN. Généralement, les largeurs de raies en RMN  $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$  varient entre 2 et 4 Hz lorsque le soluté interagit «normalement» avec la mésophase, et si la préparation de l'échantillon est optimale. Il est clair qu'un échantillon faiblement homogène conduit à un élargissement gênant des résonances, et donc à une dégradation significative du rapport S/B. Obtenir un spectre RMN 1D DAN rapidement est un atout important. Pour des quantités de soluté élevées, nous pouvons enregistrer des spectres 1D DAN en moins de 30 minutes avec un rapport S/B satisfaisant, permettant ainsi une analyse succincte des données (figure 3A). Loin d'être inutile, ce type de test permet un contrôle rapide et efficace de l'homogénéité de l'échantillon, et par conséquent garantit généralement l'obtention de spectres 2D DAN de bonne qualité après plusieurs heures d'acquisition des données.

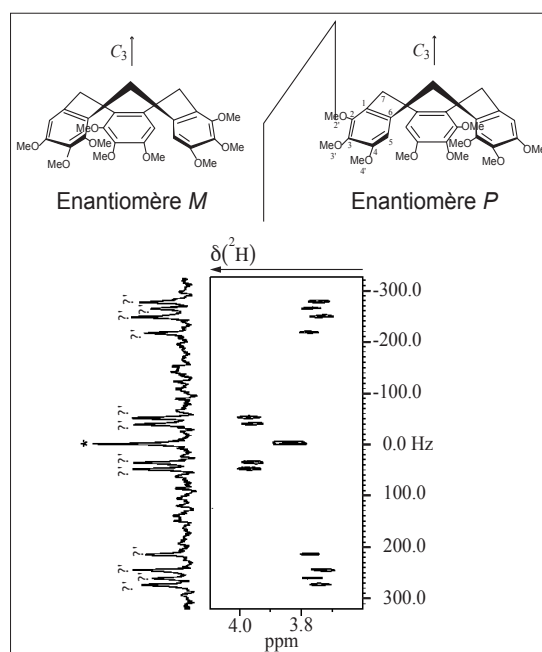
Cet exemple illustre également l'intérêt de la RMN 2D pour analyser des spectres 1D DAN « encombrés ». En effet, même pour une molécule chirale aussi simple que le ( $\pm$ )-hept-6-yn-2-ol (II) (sept carbones), l'attribution des doublets sur le spectre 1D n'est pas triviale. En revanche, la carte RMN 2D partielle présentée sur la Figure 3B montre que la discrimination énantiomérique est observée au niveau du deutérium porté par le centre stéréogène (deux doublets centrés sur le même  $\delta$ ), ainsi qu'au niveau des deutériums diastéréotopes du groupement méthylène 5,5' (quatre doublets centrés sur deux  $\delta$  légèrement différents). Ces résultats sont à comparer avec ceux reportés dans la référence 10. L'augmentation significative de la sensibilité des expériences RMN 2D DAN nous permet d'envisager de travailler maintenant avec des quantités de soluté extrêmement faibles, soit parce que les chimistes ne possèdent que quelques milligrammes de composé à étudier, soit parce que ces derniers sont peu solubles dans la mésophase. Cette seconde situation a été rencontrée lors de l'ana-



**Figure 3**  
(A) Spectre 1D DAN du ( $\pm$ )-II (100 mg /  $[\text{CD}]^e = 111 \mu\text{mol/L}$ ) dissous dans PBLG/ $\text{CHCl}_3$  à 301 K et enregistré en 20 min. (B) Zoom de la carte 2D Q-résolue Fz DAN du même produit ( $t_{\text{exp}}$ : 3 h).

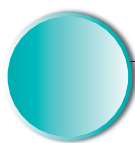
lyse du ( $\pm$ )-nonaméthoxycyclotrivératrylène (III), un composé chiral sans carbone stéréogène, mais possédant des formes énantiomères notées M et P. Pour ce composé, seulement huit milligrammes de racémate ont pu être dissous dans la mésophase PBLG/DMF (11). Compte tenu de la masse moléculaire élevée du composé ( $M = 540 \text{ g/mol}$ ), et malgré sa haute symétrie (symétrie axiale,  $C_3$ ), la concentration en énantiomère monodeutééré,  $[\text{CD}]^e$ , est de  $4,3 \mu\text{mol/L}$ . L'analyse de la carte 2D Q-résolue Fz DAN (figure 4) montre que seuls les doublets des groupements méthyles ( $[\text{CDH}_2]^e = 3 \times [\text{CD}]^e = 14 \mu\text{mol/L}$ ) émergent distinctement du bruit spectral et sont discriminés. Quoique dépendant de la largeur des raies, ce résultat semble indiquer que la limite de détection en isotopomère monodeutééré (avec nos moyens actuels) se situe aux environs de 4 à 5  $\mu\text{mol/L}$ .

Au-delà de la capacité des polypeptides chiraux à orienter différenciellement des énantiomères, ce qui permet d'étudier les mécanismes de reconnaissance chirale dans ces mésophases, l'objectif ultime de ces analyses est évidemment de déterminer la pureté énantiomérique de mélanges scalémiques ( $0 < ee \% < 100$ ). En collaboration

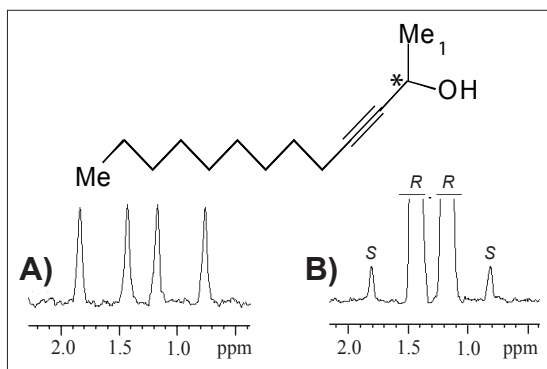


**Figure 4**  
Carte partielle 2D Q-résolue Fz DAN tiltée de ( $\pm$ )-III dissous dans PBLG/DMF à 320 K ( $t_{\text{exp}}$ : 13 h). Seuls les doublets quadrupolaires associés aux méthyles sont montrés.





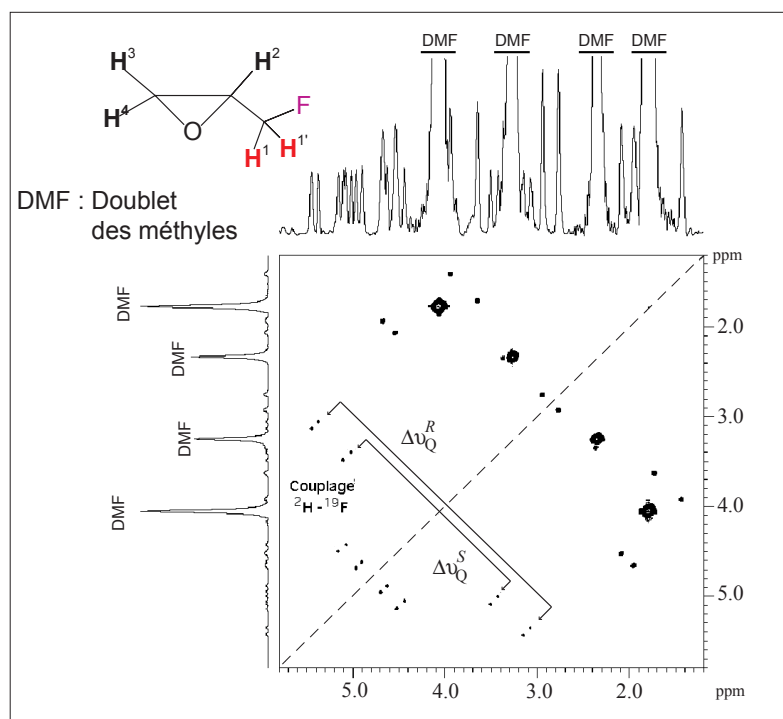
**Figure 5**  
Signaux  $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$  du méthyle 1 extrait du spectre 2D Q-résolue Fz DAN de IV (dissous dans  $\text{PBLG}/\text{CHCl}_3$ ) en mélange (A) racémique (36 mg /  $[\text{CDH}_2]^F$ : 75  $\mu\text{mol/L}$ ) et (B) scalémique (36 mg / ee > 97 %) ( $t_{\text{exp}}$ : 4 h).



avec des chimistes de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles à Gif-sur-Yvette, nous avons analysé le spectre 2D Q-COSY DAN du tridec-3-yn-2-ol (IV) en mélange racémique et énantiomériquement enrichi, ces deux substances ayant été obtenues par deux approches synthétiques différentes (figure 5). Les résultats montrent que les doublets quadrupolaires associés au groupe méthyle 1 sont fortement séparés ( $\Delta\Delta\nu_Q = 81$  Hz), et que l'excès énantiomérique du mélange énantiomériquement enrichi préparé par voie énantiosélective était supérieur à 97 %.

Les molécules chirales possédant des hétéroéléments magnétiquement actifs, comme le Fluor-19 ( $I = 1/2$ ), sont susceptibles de donner des structures de couplages «  $^2\text{H}\text{-noyaux X}$  » sur les cartes 2D QUOSY DAN. De telles structures fines ont été observées, pour la première fois, avec le ( $\pm$ )-2-(fluorométhyle)oxirane (V) dissous dans la phase PCBLL/DMF à 310 K (figure 6) (12). En effet, l'analyse du spectre 2D montre que les deutériums couplés à l'atome de Fluor (groupe méthylène 1,1') sont caractérisés par des doublets quadrupolaires dont les composantes sont dédoublées, parallèle-

**Figure 6**  
Spectre 2D Q-COSY Fz DAN de ( $\pm$ )-V (60 mg,  $t_{\text{exp}}$ : 5 h) à 300 K. L'attribution R/S montrée sur la carte est arbitraire.



ment à la diagonale principale du spectre (ligne pointillée). Cette séparation des informations spectrales permet une lecture directe des couplages (scalaires et dipolaires)  $^2\text{H}\text{-}^{19}\text{F}$ . Nous accédons, ainsi, à de nouvelles informations spectrales qui peuvent se révéler utiles pour le calcul des paramètres d'orientation moléculaire du soluté.

## VI - Applications analytiques

Derrière la possibilité ou non de discriminer des énantiomères par RMN en milieu orienté chiral se cache un autre enjeu plus fondamental : celui de l'attribution de la configuration absolue des signaux RMN. Une telle attribution n'est pas réalisable directement à partir du calcul de la matrice d'ordre des énantiomères (9). Des calculs de modélisation moléculaire pourraient fournir des réponses, cependant, une approche empirique est envisageable et a été explorée en 2007. Elle repose sur une idée simple : des paires d'énantiomères iso-structuraux devraient s'orienter dans un CLC de façon similaire (12). De fait, ces énantiomères devraient présenter des empreintes spectrales identiques sur les cartes 2D QUOSY DAN. En d'autres termes, l'amplitude des éclatements quadrupolaires pour un (ou plusieurs) site(s)  $^2\text{H}$  donné(s) dans une série de molécules iso-structurales devraient être relativement proches, si leur homologie structurale est forte. Cette situation est intéressante car elle suggère a priori la possibilité de corréler les doublets quadrupolaires (interne/externe) et la configuration absolue de l'énantiomère correspondant si l'on possède une référence spectrale dont l'attribution est connue. Une application possible de ce concept de reconnaissance de forme consiste à déterminer la configuration absolue de l'énantiomère majoritaire d'un mélange scalémique (12). La stratégie proposée est la suivante : i) optimisation des discriminations chirales (RMN 2D DAN) pour le mélange dont la configuration absolue de l'énantiomère majoritaire est inconnue (composé X1) (figure 7A) ; ii) analyse des spectres 2D QUOSY DAN d'une série de molécules de référence X2-X6 (mélanges racémiques et/ou enrichis pour lesquels l'ee en R ou S est connu par ailleurs) ; iii) attribution des signaux de X1 à partir des résultats RMN obtenus pour les molécules de référence.

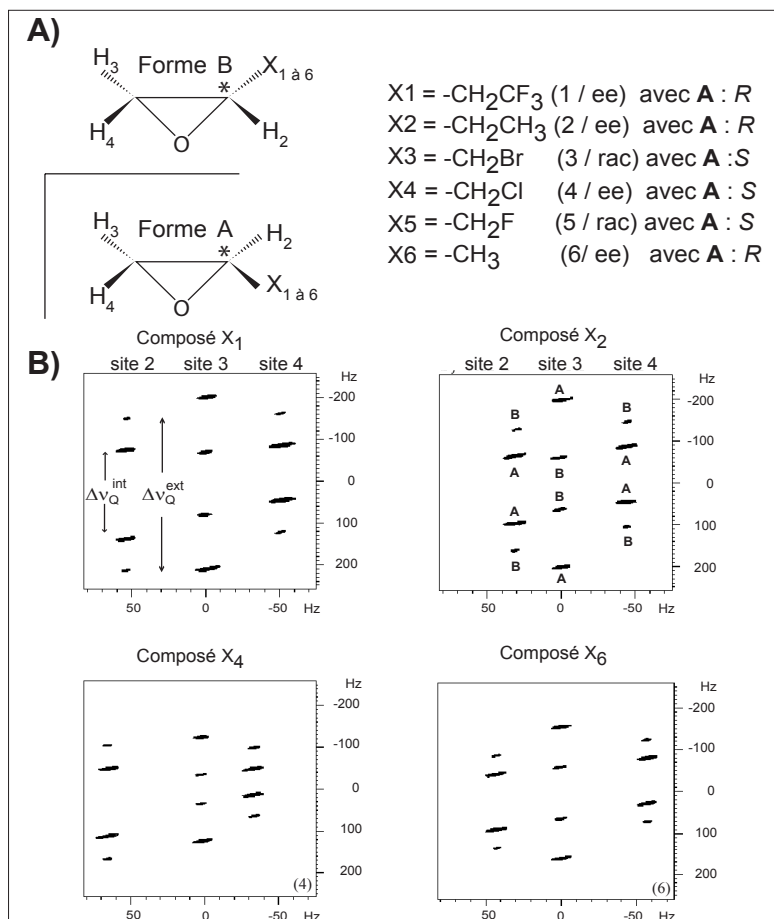
Pour les différentes molécules considérées, la corrélation entre les descripteurs stéréochimiques R/S et les éclatements quadrupolaires observés n'est pas directe. En effet, en accord avec les règles de Cahn-Ingold-Prelog (règles CIP), basées sur le numéro atomique, les descripteurs R/S ne correspondent pas toujours à la même forme moléculaire (X devant ou derrière le cycle époxyde) pour toutes les molécules de référence (voir figure 7A). Pour contourner ce problème, il est préférable de définir deux formes énantiomères (notées A et B) pour lesquelles le substituant X est soit devant le cycle époxyde (forme A), soit derrière (forme B) quand l'oxygène pointe vers le bas. Cette astuce permet d'éviter des inversions et souligne l'intérêt de réfléchir en termes de reconnaissance de forme et non en termes de nomenclature CIP. Les enrichissements énantiomériques pour les mélanges de référence (II,

## RMN du deutérium en abondance naturelle dans les cristaux liquides chiraux : Evolutions technologiques, avancées méthodologiques et nouvelles applications analytiques

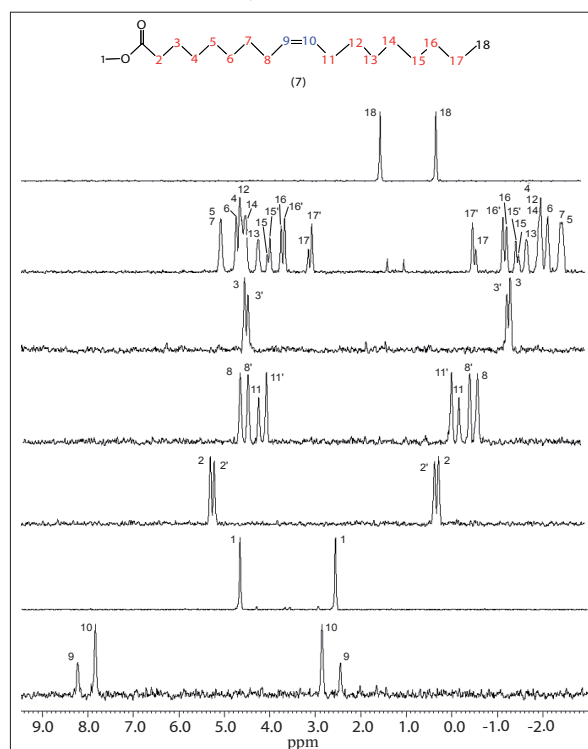
IV et VI) sont en fait préparés avec la même forme énantiomérique majoritaire (forme A). L'analyse des empreintes spectrales 2D et la corrélation entre les formes A/B et les descripteurs *R/S* pour le mélange X1 deviennent alors très simples. Dans le cas des dérivés époxydes étudiés ici, nous constatons que le doublet interne pour les sites 2 et 4, et le doublet externe pour le site 3, correspond à la forme énantiomérique A (majoritaire), soit l'énantiomère *R* dans le cas de X1. Nous pouvons alors affirmer que le mélange X1 est enrichi en énantiomère *R* selon la nomenclature CIP. Ce résultat à été confirmé en utilisant deux polypeptides (PBLG et PCBLL) dissous dans deux co-solvants de polarité très différente (DMF et  $\text{CHCl}_3$ ). Les résultats de cette étude soulèvent d'intéressantes questions théoriques telles que : comment définir le degré d'homologie existant entre deux objets moléculaires ? Quels critères physico-chimiques pertinents (volume de Van der Waals, anisotropie de distribution électronique,...) doit-on adopter ? Dans cet exemple, nous avons choisi des substituants X dont le volume et/ou la nature électronique ne devaient pas modifier dramatiquement l'orientation moyenne du cycle époxyde vis-à-vis des hélices polypeptidiques.

Dans un domaine assez différent, le potentiel analytique de la RMN  $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$  en abondance naturelle dans les CLC a été exploité pour déterminer les rapports isotopiques spécifiques Deutérium/Hydrogène ( $^2\text{H}/^1\text{H}$ ) dans un produit d'origine naturelle, le bis(phénylthiohexane), BPTH, fragment moléculaire issu de l'acide linoléique, un acide gras (AG) insaturé possédant 18 carbones et deux doubles liaisons (13). L'avantage de cette approche par rapport à la technique RMN FINS<sup>®</sup> est double : i) séparation des signaux deutériums fortuitement isochrones sur la base de leurs éclatements quadrupolaires ; ii) détermination des teneurs isotopiques pour des directions énantiotopes, en particulier au niveau des groupements méthylènes présents dans les molécules prochirales à longue chaîne ( $\text{R}-\text{CH}_2-\text{R}'$ ).

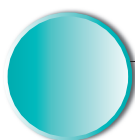
Les résultats issus de l'étude du BPTH furent très prometteurs, puisqu'il a été démontré que des déplétions isotopiques existaient entre les sites énantiotopes d'une molécule prochirale (chaîne aliphatique) et pouvaient être quantifiés (13). Plus récemment, une attribution de la configuration absolue des doublets quadrupolaires  $^2\text{H}$  a même été réalisée (14). Cependant cette première étude présentait deux inconvénients : i) utilisation d'une quantité de soluté importante (200 mg) pour compenser la faible sensibilité de nos expériences (spectromètre de 9,4 T) ; ii) la nécessité de fragmenter le linoléate de méthyle pour obtenir le BPTH, ce qui impose que le clivage chimique ne modifie pas les rapports isotopiques en alpha des doubles liaisons. Pour éviter ce dernier problème, il est impératif d'analyser l'AG insaturé complet (comme l'acide linoléique ou oléique), sans le couper. Les spectres 2D DAN de ces deux composés (formes esterifiées) ont pu être obtenus en milieux orientés en utilisant 100 mg de soluté dissous dans un mélange PBLG/ $\text{CHCl}_3$  (15). La Figure 8



**Figure 7**  
(A) Structure des formes énantiomériques A et B, et nature des substituants (X1 à X6). La correspondance entre la forme A et les descripteurs *R/S* est donnée. (B) Empreintes spectrales 2D DAN associées aux sites époxydes notés 2, 3 et 4 pour les mélanges enrichis (ee = 33%) I, II, IV et VI à 300 K ( $t_{\text{exp}}$  : 5 h). La mésophase utilisée est le PCBLL/ $\text{CHCl}_3$ .



**Figure 8**  
Série de doublets quadrupolaires extraits du spectre 2D Q-COSY Fz de VI ( $t_{\text{exp}}$  : 15 h). La forme esterifiée de l'AG est montrée ici.



présente les différents signaux deutériums de l'oléate de méthyle (VI) extraits du spectre 2D Q-COSY Fz enregistré en environ 15 heures. L'analyse du spectre indique que la plupart des sites deutériums ont été spectralement discriminés, notamment les sites méthylènes prochiraux notés 8/8' et 11/11', apportant ainsi une source d'information sur les rapports isotopiques des directions énantiotopes inédite jusqu'à présent. On pourra également noter la forte différence d'enrichissement isotopique entre les sites éthyléniques 9 et 10, ainsi que sur les sites méthylènes énantiotopes notés 15/15' ou 17/17' (15).

La contribution analytique de la RMN DAN dans les CLC pour l'analyse du fractionnement isotopique de molécules naturelles est considérable. Rapidement, elle pourrait constituer une alternative de choix à la méthode RMN FINS<sup>®</sup>, notamment lorsque les mesures quantitatives avec étalon interne chimique (TMU) ou électronique (ERETIC) seront réalisées. Par ailleurs, la capacité de mesurer

les rapports ( $^2\text{H}/^1\text{H}$ )<sup>pro-R/pro-S</sup> au niveau des sites énantiotopes apporte des informations inaccessibles en milieu isotrope, mais incontournables pour améliorer la compréhension des mécanismes stéréosélectifs enzymatiques (ici la famille des « Fatty acid desaturases ») à l'origine de la désaturation des AG saturés précurseurs.

### VII - Conclusions

La combinaison technologique de spectromètres RMN « haut champ » et de cryosondes  $^2\text{H}$  offre une solution inégalée pour l'utilisation en routine de la RMN DAN, à la fois en milieu isotrope et anisotrope. Les champs d'applications de cette RMN, notamment dans le domaine de la chiralité, sont maintenant ouverts à l'imagination, et laissent espérer des développements importants à l'image de la RMN du  $^{13}\text{C}$  dans les années 1990, lorsque les spectromètres RMN opéraient à plus bas champ et les cryosondes n'existaient pas encore !

### BIBLIOGRAPHIE

- (1) WENZEL TJ, Discrimination of chiral compounds using NMR spectroscopy, 2007, Eds. Wiley Interscience.
- (2) LESOT P, Développement et applications de la RMN du deutérium en abondance naturelle dans les cristaux liquides chiraux: Une autre approche de l'analyse en chimie organique, *Spectra Analyse*, 2005, 242, 37-42.
- (3) LESOT P, MERLET D, LOEWENSTEIN A, COURTIEU J, Enantiomeric visualisation using proton-decoupled natural abundance deuterium NMR in poly- $\gamma$ -benzyl-L-glutamate liquid crystalline solutions, *Tetrahedron: Asym.*, 1998, 9, 1871-1881.
- (4) 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.
- (5) 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.
- (6) MARTIN GJ, In *Stable Isotopes in the Biosphere*, Wada E, Yoneyama T, Minagawa M, Ando T. & Fry BD (eds), Kyoto University Press, Kyoto, 1995.
- (7) KOVACS H, MOSKAU D, SPRAUL M, Cryogenically cooled probes, a leap in NMR technology, *Prog. NMR Spectrosc.*, 2005, 45, 131-155.
- (8) 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.
- (9) AROULANDA C., LESOT P, MERLET D., COURTIEU J., Structural ambiguities in bridged ring systems resolved using natural abundance deuterium NMR in chiral liquid crystals, *J. Phys. Chem. A*, 2003, 107, 10911-10918.
- (10) PARENTY A., CAMPAGNE JM, AROULANDA C., LESOT P., Routine use of natural abundance deuterium NMR in a polypeptidic chiral oriented solvent for determination of the enantiomeric composition of chiral building blocks, *Org. Lett.*, 2002, 4, 1663-1666.
- (11) LAFON O., LESOT P., ZIMMERMANN H., POUPKO P., LUZ Z., Chiral discrimination in the  $^{13}\text{C}$ - and  $^2\text{H}$ -NMR of the crown and saddle isomers of nonamethoxy-cyclotrimeratrylene in chiral liquid-crystalline solutions, *J. Phys. Chem. B*, 2007, 111, 9453-9467.
- (12) ZIANI L., LESOT P., MEDDOUR A., COURTIEU J., Empirical determination of the absolute configuration of small chiral molecules using natural abundance  $^2\text{H}$  NMR in chiral liquid crystals, *Chem. Commun.*, 2007, 4737-4739.
- (13) 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.
- (14) BAILLIF V., BILLAULT I., ROBINS. R., LESOT P., assignment of absolute configuration of natural abundance deuterium signals associated with (R)- and (S)-enantiomers in a fatty acid aligned in a chiral liquid crystal: enantioselective synthesis and NMR analysis, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 11180-11187.
- (15) LESOT P., BAILLIF V., BILLAULT I., Combined analysis of four C-18 unsaturated fatty acids using natural abundance deuterium 2D NMR spectroscopy in chiral oriented solvents, *Anal. Chem.*, Article ASAP, 10.1021/ac702443b, publication sur le Web le 08/03/2008.