

RMN et analyses isotopiques

Serge Akoka et Gérald Remaud

Summary

NMR and isotopic analyses

At the beginning of the 80's, the direct non-destructive determination of isotope abundance was shown to be possible by using NMR. This method, patented as SNIF-NMRTM (site-specific natural-isotope fractionation by nuclear magnetic resonance), exploits the NMR spectrum of a heavy isotope of the element which the isotopic abundance must be measured. The most popular application was for detecting chaptalization of wines by ²H-NMR. However, the method has been applied in many other fields, notably the authentication of the natural origin of flavour compounds or the study of biosynthetic mechanisms. In this paper, we review the basic principles and the experimental constraints. A typical application, the determination of the origin of vanillin by ²H-NMR, is also presented. Finally, the extension of SNIF-NMR to other nuclei (¹³C, ¹⁵N or ¹⁷O) is described as the potential improvements to the method offered by recent NMR developments like multipulse experiments, cryoprobesTM and the analysis of chiral compounds in chiral liquid crystals.

Mots-clés

RMN, isotopomères, ²H.

Key-words

NMR, isotopomers, ²H.

Les rapports isotopiques ($R = \frac{\text{Lourd}}{\text{Léger}}$) peuvent être déterminés avec une grande précision par spectrométrie de masse de rapports isotopiques (SMRI). Toutefois, cette technique suppose une transformation préalable de l'échantillon (en H₂ pour la mesure du rapport ²H/¹H ou en CO₂ pour la mesure du rapport ¹³C/¹²C par exemple). La teneur isotopique mesurée est donc une valeur moyenne sur toute la molécule étudiée. Les rapports isotopiques spécifiques de certains sites peuvent être obtenus, mais seulement après une dégradation chimique de l'échantillon permettant d'isoler les fragments moléculaires intéressants. Au début des années 80, la mesure non destructive des

abondances isotopiques ($A = \frac{\text{Lourd}}{\text{Léger} + \text{Lourd}} = \frac{R}{R + 1}$) spécifiques a été rendue possible par l'utilisation de la RMN [1-2]. Cette méthode, brevetée sous le nom de SNIF-NMRTM (« site-specific natural-isotope fractionation by nuclear magnetic resonance », « trade mark » d'Eurofins, Nantes, France), utilise le spectre RMN d'un isotope lourd de l'élément dont on veut mesurer la distribution isotopique à travers la molécule. La différence de déplacements chimiques entre deux groupements permet de déterminer sélectivement les teneurs isotopiques sans traitement chimique, ce qui limite les risques de fractionnement isotopique parasite. Pour des raisons techniques, la méthode a été initialement utilisée pour l'hydrogène et cet élément est encore utilisé aujourd'hui dans la quasi-totalité des applications. Toutefois, le carbone, l'oxygène et l'azote ont également un isotope lourd détectable par RMN et les abondances isotopiques correspondantes peuvent donc être mesurées par RMN.

L'application la plus populaire de cette méthode est sans doute la mesure du degré de chaptalisation d'un vin. La répartition du deutérium sur les différents sites de l'éthanol est en effet différente entre un alcool provenant de la fermentation de sucre de raisin et un alcool provenant d'un sucre de betterave ou de canne. Il est ainsi possible, en utilisant la méthode SNIF-NMR, de doser l'éthanol de

betterave dans l'éthanol de vin ; ce qu'aucune autre méthode analytique ne permet. Mais bien évidemment, la méthode a connu de nombreuses autres applications [3-4], tant appliquées (authentification de l'origine des produits, [5-7]) que fondamentales (détermination de mécanismes de biosynthèse par exemple [8-10]).

L'idée

Un composé, même chimiquement pur, est constitué d'un mélange de molécules qui ne diffèrent les unes des autres que par leur composition isotopique (des isotopomères). Dans le cas des éléments les plus répandus dans les molécules organiques (H, C, N, O), les abondances isotopiques naturelles moyennes des isotopes lourds sont faibles (tableau I). On peut donc considérer, avec une bonne approximation, que seuls les isotopomères comportant un seul isotope lourd sont visibles par RMN. A titre d'exemple, la figure 1 présente tous les isotopomères de la molécule de glycine comportant un seul isotope lourd (l'oxygène-18 n'a pas été pris en compte puisqu'il ne produit pas de signal RMN).

La surface (S_i) sous une raie d'un spectre RMN est directement proportionnelle au nombre N de noyaux qui produisent cette raie. N est lui-même proportionnel à la concentration (C_i) de l'isotopomère comportant le noyau

Tableau I - Caractéristiques des principaux noyaux utilisables pour la RMN isotopique.

Élément	Noyau utilisé pour la RMN isotopique	Abondance isotopique moyenne (%)	Sensibilité relative par rapport au proton
hydrogène	² H	0,016	9,6.10 ⁻³
carbone	¹³ C	1,111	1,6.10 ⁻²
azote	¹⁵ N	0,366	1,0.10 ⁻³
oxygène	¹⁷ O	0,040	2,9.10 ⁻³

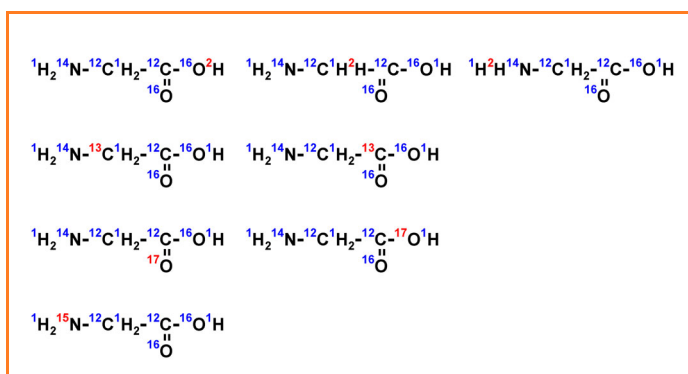


Figure 1 - Isotopomères de la glycine comportant un isotope lourd, stable et détectable en RMN.

étudié à la position i . On peut donc écrire :

$$S_i = k \cdot P_i \cdot A_i \cdot C \quad (1)$$

où P_i est le nombre de noyaux équivalents pour le site i , A_i est l'abondance isotopique spécifique de ce site et C la concentration de la molécule étudiée. Tous les isotopomères qui présentent des déplacements chimiques différents peuvent donc être quantifiés séparément à partir du spectre RMN de l'isotope lourd correspondant (par exemple par RMN- ^{13}C).

Le fractionnement isotopique

Les différents isotopomères d'une même molécule n'ont pas exactement les mêmes propriétés chimiques. Une liaison C- ^2H , par exemple, n'a pas les mêmes caractéristiques qu'une liaison C- ^1H [11]. La substitution isotopique modifie les propriétés de la liaison liées aux masses atomiques ; on peut donc considérer qu'elle affecte essentiellement les fréquences (et donc les énergies) de vibration. Lors d'une réaction chimique, les énergies de vibrations changent puisque des liaisons sont rompues et d'autres créées. La constante de vitesse n'est donc pas indépendante de la composition isotopique. Lorsque la réaction n'est pas totale, cela conduit à une modification de la composition isotopique des produits et des substrats. La distribution des isotopes lourds dans une molécule est donc le reflet de son histoire et peut être utilisée pour établir une filiation.

Détermination des abondances isotopiques spécifiques

En pratique, la constante k de l'équation (1) dépend de nombreux paramètres. Certains peuvent être mesurés avec une grande précision, mais d'autres varient de manière significative dans le temps et entre deux échantillons. C'est la raison pour laquelle les mesures quantitatives sont toujours des mesures relatives.

Lorsque l'abondance isotopique moyenne $\langle A \rangle$, sur l'ensemble des isotopomères, peut être mesurée (par exemple par SMRI), on peut écrire :

$$S = \sum_i S_i = K \cdot \langle A \rangle \cdot \sum_i P_i \cdot C \quad (2)$$

et en comparant les équations (1) et (2) :

$$A_i = \langle A \rangle \cdot \frac{f_i}{F_i} \quad (3)$$

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

le noyau étudié à la position i et $F_i = \frac{P_i}{P}$, population relative statistique du site i .

L'équation (3) illustre le fait que les méthodes SNIF-NMR et SMRI ne sont pas concurrentes mais plutôt complémentaires en termes de détermination des abondances isotopiques.

Lorsqu'il est possible d'introduire dans l'échantillon un composé de référence (dont l'abondance isotopique A_{ref} et la concentration C_{ref} sont parfaitement connues), la surface sous une raie provenant de ce composé vérifie :

$$S_{\text{ref}} = k \cdot A_{\text{ref}} \cdot P_{\text{ref}} \cdot C_{\text{ref}} \quad (4)$$

Les abondances isotopiques spécifiques peuvent alors être calculées à partir de l'équation :

$$A_i = A_{\text{ref}} \cdot \frac{S_i}{S_{\text{ref}}} \cdot \frac{P_{\text{ref}}}{P_i} \cdot \frac{C_{\text{ref}}}{C} \quad (5)$$

Le composé de référence doit vérifier un certain nombre de conditions (co-solubilité, stabilité chimique, P_{ref} élevé, déplacements chimiques différents de ceux de l'échantillon...). De plus, son abondance isotopique et sa pureté doivent être parfaitement connues. Dans le cas de la RMN- ^2H , le composé de référence universellement retenu est la tétraméthylurée (TMU). C'est la référence officielle pour l'analyse de la chaptalisation. Des échantillons calibrés à partir d'une procédure européenne [12] sur l'échelle V-SMOW [13] sont commercialement disponibles.

Pour utiliser l'équation (5), il est indispensable de connaître avec une bonne précision les concentrations C et C_{ref} , ou plus exactement leur rapport. Cela peut être obtenu par mesure des masses des composés utilisées lors de la préparation de l'échantillon, mais il faut alors connaître les puretés. Il est souvent plus simple et aussi plus précis d'effectuer un dosage sur l'échantillon. Le rapport des concentrations peut par exemple être mesuré très simplement par RMN du proton [14]. Dans ce cas, le dosage est réalisé sur le même échantillon et quasiment au même moment que la mesure isotopique, ce qui réduit au minimum l'impact de toute évolution physico-chimique.

Les exigences méthodologiques

Les variations d'abondance isotopique entre deux sites d'une même molécule, ou lors d'un processus de fractionnement, ne sont parfois que de quelques % (voire quelques ‰). La mesure doit donc être réalisée avec une précision bien supérieure à celle obtenue dans les conditions d'acquisition d'un spectre de routine. Cela implique une optimisation rigoureuse de la préparation de l'échantillon (solvant, concentrations), des paramètres d'acquisition (temps de répétition, découplage, température) et de traitement des données. L'objectif est d'obtenir une distorsion minimale du spectre avec un rapport signal sur bruit élevé. Le niveau de bruit est en effet bien souvent le facteur qui limite le plus la précision [4, 15]. Par ailleurs, un contrôle qualité régulier du spectromètre est indispensable pour garantir des performances stables dans le temps et donc de bonnes répétabilité et reproductibilité des mesures.

Des difficultés qui dépendent du noyau

Tous les noyaux ne présentent pas les mêmes difficultés. Jusqu'à présent, la quasi-totalité des résultats obtenus par la méthode SNIF-NMR l'ont été à partir de l'abondance

Authentification de l'origine de la vanilline

L'arôme vanille naturel est extrait des gousses de vanille (*vanilla planifolia*). Il y a un écart de prix très important entre l'arôme naturel et sa reconstitution synthétique à base de vanilline de synthèse à partir de gâïacol ou de lignine de bois. De ce fait, une pratique frauduleuse consistant à substituer tout ou partie de la vanilline issue de gousse par celle de synthèse devient très lucrative. Dans ce contexte, plusieurs approches ont été développées pour caractériser l'authenticité de la vanilline contenue dans un extrait commercial. Les méthodes basées sur des analyses compositionnelles (rapports molaires entre les principaux ingrédients de l'arôme, en particulier vanilline/para-hydroxybenzaldéhyde (pHB) et vanilline/acide vanillique) ont très rapidement montré leur limite et ont été supplantées, dans les années 70, par les analyses isotopiques par SMRI. L'assimilation du CO₂ et de H₂O de la vanille au cours de sa croissance est telle qu'elle entraîne un enrichissement en ¹³C de tous les métabolites constituant la plante. Ainsi, la teneur en ¹³C de la vanilline naturelle de gousse est nettement supérieure à celle de ses homologues synthétiques. Cependant, cette approche par SMRI a été contournée par la possibilité d'enrichir (par marquage sélectif) en ¹³C les groupements CHO et/ou OCH₃ de la vanilline. L'apport de la RMN-²H a été déterminant [5]. La capacité de la RMN à quantifier les espèces monodeutériées de la vanilline conduit à une forte discrimination entre les différentes origines. En utilisant les 4 D/H obtenus par RMN-²H (seuls 4 sites sont résolus, OH n'étant pas pris en compte pour des raisons d'échange avec le milieu) dans une analyse factorielle, les 3 groupes principaux (gousse, gâïacol et lignine) sont nettement séparés. Pendant plusieurs années, la méthode SNIF-NMR a été appliquée en routine à l'étude de l'authenticité de l'arôme vanille. Puis des indices montrant des tentatives « d'ajustement » en deutérium de certains sites ont été mis en évidence. Par exemple, certains échantillons qui avaient un profil isotopique D/H « normal » présentaient, en RMN-²H, un léger épaulement à droite du pic correspondant à l'espèce deutériée du site OCH₃ [5]. Aucune impureté (par CLHP, CPG ou RMN-¹H) ne pouvait rendre compte

de ce fait. Sa détection exclusive par RMN-²H implique que la raie parasite ne pouvait provenir que d'un produit contenant du deutérium. En fait, une molécule de vanilline ayant un site OCD₃ présente un spectre RMN-²H légèrement différent de l'isotopomère constitué par le groupement OCH₂D (le décalage en fréquence dû à des substitutions isotopiques (effet de blindage) est un phénomène bien connu en RMN [21]). Un ajustement de la teneur en deutérium du site méthoxy par la synthèse de la vanilline impliquant l'emploi d'agent méthylant de type RCD₃ (ICD₃, par exemple) a donc été frauduleusement réalisé.

L'analyse RMN-²H s'est alors déplacée vers un métabolite secondaire de l'arôme vanille : le para-hydroxybenzaldéhyde (pHB). Le spectre RMN-²H du pHB présente une résolution adéquate des pics pour son exploitation en termes de discrimination d'origine [5]. Cependant, la principale difficulté de cette approche réside dans l'extraction et la purification du pHB. En effet, il est présent dans des proportions de 10 à 20 fois moins importantes que la vanilline. Obtenir plusieurs centaines de mg de pHB pur représente un véritable challenge en chimie isotopique. Il est nécessaire de garder à l'esprit que le but n'est pas uniquement l'obtention de la molécule pure, mais de la purifier à un degré élevé tout en préservant l'intégrité isotopique. Pour ne pas séparer artificiellement les molécules lourdes des molécules légères, les paramètres cinétiques et thermodynamiques doivent être maîtrisés à chaque étape liée à la purification (extraction, purification sur colonne chromatographique, recristallisation...). Une analyse factorielle discriminante (AFD) des différentes origines du pHB montre le pouvoir discriminant de la RMN-²H [5]. La figure 2 présente les profils ²H de la vanilline et du pHB issus de gousse de vanille.

Depuis quelques années, la situation s'est encore compliquée par l'introduction sur le marché d'une vanilline provenant de la biosynthèse de l'acide férulique. En effet, lorsque cet acide est issu de produit végétaux (comme la betterave), le produit obtenu peut alors prétendre au statut naturel.

isotopique du deutérium. Ce noyau présente en effet un certain nombre d'avantages qui sont moins marqués ou inexistant pour ¹³C, ¹⁵N ou ¹⁷O.

Tout d'abord, la gamme des déviations isotopiques naturelles est beaucoup plus large pour le deutérium [4]. L'abondance isotopique peut varier de plusieurs dizaines de % entre deux sites d'une même molécule alors que les déviations isotopiques sont au maximum de quelques ‰ pour les autres noyaux. De ce fait, il y a un ordre de grandeur entre la précision minimale nécessaire en RMN du deutérium et celle imposée par les isotopes lourds du carbone, de l'azote ou de

l'oxygène. Il n'y a en fait que quelques années que les qualités technologiques des spectromètres RMN permettent d'obtenir une telle précision de manière répétable.

Par ailleurs, les caractéristiques RMN-²H (essentiellement au niveau de sa relaxation) font que les paramètres d'acquisition sont beaucoup moins critiques que pour le carbone 13 ou l'azote 15 [3]. Quant à l'oxygène 17, il produit des raies très larges qui rendent très coûteuse en temps l'obtention du rapport signal sur bruit nécessaire.

Malgré ces difficultés, il faut signaler que des résultats ont été obtenus en utilisant la RMN-¹³C dès 1991 [16] et les progrès de l'appareillage réalisés depuis ont permis de démontrer la cohérence des mesures de SNIF-NMR et de SMRI pour ce noyau dans le cas d'une petite molécule comme le glycérol [17].

Perspectives

Jusqu'à présent, la technique SNIF-NMR n'a été employée essentiellement que sur le noyau ²H. De plus, la plupart des études ont été menées sur des molécules purifiées, de faible taille (nombre de carbone < 15) et sur des quantités relativement élevées (> 500 mg). Grâce à ces travaux, une meilleure compréhension de la distribution isotopique naturelle a été obtenue. Des améliorations notables peuvent toutefois être attendues au cours des prochaines années.

Les limites en sensibilité vont être repoussées grâce à la mise en œuvre des technologies les plus récentes. L'utilisation des méthodes RMN multi-impulsionnelles permet à la fois une augmentation du signal détecté et un

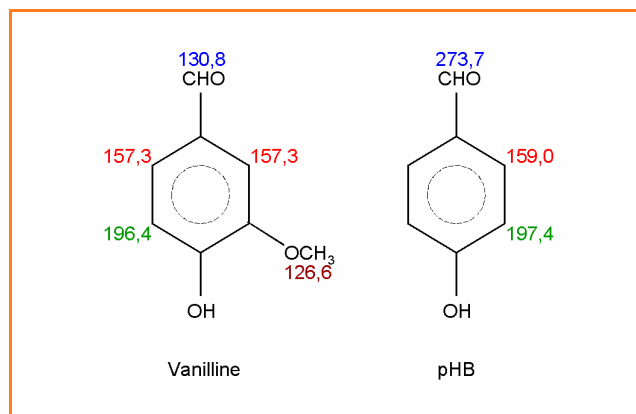


Figure 2 - Répartition du deutérium dans les molécules de vanilline et de pHB extraites de gousses de vanille. Abondance isotopiques mesurées par RMN-²H et exprimées en ppm.

gain en sensibilité. Ces méthodes, souvent considérées comme non quantitatives jusqu'à un passé récent, offrent aujourd'hui la robustesse indispensable à la RMN isotopique [18]. D'autre part, l'arrivée sur le marché des cryosondes [19] permet, toutes choses égales, la réduction d'un facteur 4 du niveau de bruit.

Il est donc raisonnable d'envisager à court terme l'utilisation en routine de la RMN isotopique de ^{13}C , ^{15}N ou ^{17}O . Grâce à ces avancées, il sera également possible d'étudier, dans certains cas, les molécules en mélange dans leur matrice. La RMN servira alors à doser les constituants du mélange (comme par CLHP ou CPG), ainsi que les isotopomères de chaque molécule. Enfin, des travaux expérimentaux récents sembleraient montrer que l'analyse du fractionnement isotopique menée sur des molécules chirales ou prochirales soit envisageable à l'aide de la RMN- ^2H en abondance naturelle dans une phase anisotrope chirale (utilisation de cristaux liquides chiraux) [20].

Références

- [1] Martin G.J., Martin M.L., *Tetrahedron Lett.*, **1981**, 22(36), p. 3525.
 [2] Grant D.M., Groasmun W.R., Dalling D.K., Wehrli F.W., Wehrli S., *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, 104, p. 4492.
 [3] Martin M.L., Martin G.J., *NMR Basic Principles and Progress*, H.F. Linkens, J.F. Johnson (eds), Springer-Verlag, Berlin, **1990**.
 [4] Martin G.J., Martin M.L., *Ann. Rep. NMR Spect.*, **1995**, 31, p. 81.
 [5] Remaud G., Martin Y.-L., Martin G.G., Martin G.J., *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, p. 859.
 [6] Remaud G., Debon A.A., Martin Y.-L., Martin G.G., Martin G.J., *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, p. 4042.
 [7] Gonzalez J., Jamin E., Remaud G., Martin Y.-L., Martin G.G., Martin M.L., *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, 46, p. 2200.
 [8] Zhang B.-L., Buddrus S., Trierweiler M., Martin G.J., *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, 46, p. 1374.
 [9] Billault I., Guiet S., Mabon F., Robins R.J., *ChemBioChem*, **2001**, 2, p. 425.
 [10] Markai S., Marchand P.A., Mabon F., Baguet E., Billault I., Robins R.J., *ChemBioChem*, **2002**, 3, p. 212.
 [11] Wada E., Ando T., *Kumazawa in stable isotopes in the biosphere*, E. Wada, T. Yoneyama, M. Minagawa, T. Ando, B.D. Fry (eds), **1995**, 7-4.
 [12] Martin G.J., Trierweiler M., Bureau communautaire de références Information, **1992**, EUR 14395 EN.
 [13] Craig H., *Science*, **1961**, 133, p. 1833.
 [14] Fahl C., Wittkowski R., *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **1996**, 203(6), p. 541.
 [15] Martin G.J., Naulet N., *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **1988**, 332, p. 648.
 [16] Caer V., Trierweiler M., Martin G.J., Martin M.L., *Anal. Chem.*, **1991**, 63, p. 2306.
 [17] Zhang B., Trierweiler M., Jouitteau C., Martin G.J., *Anal. Chem.*, **1999**, 71, p. 2301.
 [18] Karabulut N., thèse de doctorat de l'université de Nantes, **2002**.
 [19] Serber Z., Richter C., Dötsh V., *ChemBioChem*, **2001**, 2, p. 247.
 [20] Sarfati M., Lesot P., Merlet D., Courtieu J., *Chem Commun.*, **2000**, p. 2069.
 [21] Martin M.L., Martin G.J., *Manuel de résonance magnétique*, Azoulay, Paris, **1971**.



S. Akoka

Serge Akoka

est professeur à l'université de Nantes*.

Gérald Remaud

est consultant**.



G. Remaud

* LAIEM, UMR 6006 CNRS-Université de Nantes, Faculté des sciences de Nantes, 2 rue de la Houssinière, BP 92208, 44322 Nantes Cedex 3.

E-mail : serge.akoka@chimbio.univ-nantes.fr

** E-mail : pharmacie.remnaud@cario.fr



PUBLICATION
RÉGIE PUBLICITAIRE
EDITION
IMPRESSION

Depuis 1988

Les Editions D'Île de France

Expérience,
la différence

www.edif.fr

Notre société est spécialisée dans l'édition d'annuaires et de revues professionnelles pour sociétés savantes, associations d'anciens élèves d'écoles d'ingénieurs, fédérations professionnelles,...

Notre présence depuis près de 15 ans dans un secteur d'activités en mutation permanente, la transparence de nos résultats régulièrement positifs depuis la création de notre société, la fidélité de nos partenaires éditoriaux sont autant de preuves du professionnalisme de notre équipe et constituent de fait notre meilleure « carte de visite ».

Notre atout majeur, et c'est aussi notre spécialité, est de vous garantir la gratuité de vos ouvrages papiers en contrepartie de l'exclusivité de la régie publicitaire entièrement assurée par notre service commercial.

Régisseur exclusif
de la Revue l'Actualité Chimique

Editions D'Île de France
102, avenue Georges Clémenceau • 94700 Maisons-Alfort
Tél. : 33 1 43 53 64 00 • Fax : 33 1 43 53 48 00
e-mail : edition@edif.fr