

UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE ARDENNE

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES FONDAMENTALES - SANTÉ N°619

# THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

*Discipline* : CHIMIE

*Spécialité* : Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Présentée et soutenue publiquement par

**FRANÇOIS PEDINIELLI**

Le 31 mars 2022

---

**Analyse de Mélanges de Composés Organiques par RMN *via* la Diffusion de Spin**

---

Thèse co-dirigée par **JEAN-MARC NUZILLARD ET PEDRO LAMEIRAS**

## JURY

Pr. Laurence VOUTQUENNE-NAZABADIOKO – Université de Reims Champagne-Ardenne (URCA)	Présidente
Dr. Carine VAN HEIJENOORT – Gif-sur-Yvette (ICSN)	Rapporteur
Pr. Hassan OULYADI – Université de Rouen Normandie (COBRA)	Rapporteur
Dr. Ludovic CARLIER – Université de Sorbonne (UPMR)	Examineur
Dr. Jane HUBERT – NatExplore	Examineur
Pr. Jean-Hugues RENAULT – Université de Reims Champagne-Ardenne (ICMR)	Examineur
Pr. Jean-Marc NUZILLARD – Université de Reims Champagne-Ardenne (ICMR)	Directeur de thèse
Dr. Pedro LAMEIRAS – Université de Reims Champagne-Ardenne (ICMR)	Directeur de thèse



## Résumé

L'objectif de mes travaux de thèse est de proposer aux chimistes une méthodologie innovante et prometteuse dans l'analyse de mélanges de composés organiques par RMN en solution. Les méthodes d'analyse proposées reposent sur l'utilisation du phénomène de diffusion de spin et ne requièrent aucune séparation physique des constituants du mélange étudié. L'observation de la diffusion de spin en RMN des liquides pour l'étude de molécules organiques de taille modérée nécessite un solvant (ou un mélange de solvants) visqueux. L'utilisation de ces solvants visqueux à une température adéquate ralentit suffisamment les mouvements de rotation des composés en mélange pour qu'un transfert de l'aimantation de chaque molécule puisse s'effectuer sur l'ensemble de ses noyaux *via* la diffusion de spin à travers une expérience RMN NOESY 1D ou 2D. En conséquence, les déplacements chimiques des noyaux d'une même molécule sont tous corrélés entre eux, il devient alors possible d'individualiser le spectre de RMN de chaque composé en mélange. Mes travaux de thèse s'articulent autour de 3 tâches : 1) la recherche de nouveaux solvants (ou mélanges de solvants) visqueux efficaces afin de déterminer les conditions d'observation du phénomène de transfert d'aimantation par la diffusion de spin, 2) la mise au point de nouvelles méthodes d'acquisition originales de spectres de RMN améliorant l'efficacité du transfert d'aimantation par la diffusion de spin, 3) l'application de nos méthodes analytiques à l'étude du suivi de réactions chimiques "*in-situ*" en milieux visqueux afin d'accéder aux structures des composés dans le mélange nouvellement formé.

**Mots-clefs : Mélanges – Solvants visqueux – RMN**

## Abstract

The analysis of small molecules within complex mixtures is a particularly difficult task when dealing with the study of metabolite mixtures or chemical reaction media. This issue has fostered in the recent years an active search for effective and practical solutions. The goal of thesis work is to provide the academic and industrial actors of organic synthetic and natural product chemistry with an innovative and promising analytical tool based on the spin-diffusion phenomenon and dedicated to mixture analysis of small molecules by means of liquid-state NMR, without resorting to any physical separation of mixture components. The spin-diffusion phenomenon requires a viscous solvent or solvents blends. When molecular tumbling is slow due to solvent viscosity, magnetization transfer by dipolar cross-relaxation is strongly favored. All  $^1\text{H}$  nuclei resonances within the same molecule tend to correlate in a 1D or 2D NOESY spectrum. In this context, it is possible to individualize the NMR spectra of small molecule components. My thesis work is structured into three task packages: 1) the search for new efficient viscous solvents or solvent blends suitable for mixture analysis, 2) the design of new NMR experimental methods for the production of mixture component spectra suitable for structure determination, 3) application of our analytical methods to the investigation of “*in-situ*” reaction monitoring in viscous media so as to access the structures of the compounds in the newly formed mixture.

**Keywords : Mixtures – Viscous solvents – NMR**

## Liste des abréviations

1D	Une Dimension
2D	Deux Dimensions
BIRD	<i>Bilinear Rotation Decoupling</i>
BPP-LED	<i>Bipolar Pulse Pair-Longitudinal Eddy-current Delay</i>
BS	Bande Sélective
BSS	<i>Blind Source Separation</i>
CaraMel	Caractérisation des Mélanges
CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Dichlorométhane deutéré
CDCl <sub>3</sub>	Chloroforme deutéré
CG	Carbonate de Glycérol
CD <sub>3</sub> OD	Méthanol deutéré
CH <sub>3</sub> OH	Méthanol
CIDNP	<i>Chemically Induced Dynamic Nuclear Polarization</i>
COSY	<i>CORrelation SpectroscopY</i>
COCONOSY	<i>COmbined CORrelated and Nuclear Overhauser enhancement SpectroscopY</i>
cP	CentiPoise
CPMG	<i>Carr-Purcell-Meiboom-Gill</i>
CS	<i>Compressed Sensing</i>
CSN	Chimie des Substances Naturelles
<i>D</i>	Coefficient de diffusion
D <sub>2</sub> O	Oxyde de Deutérium
DISPEL	Destruction of Interfering Satellites by Perfect Echo Low-pass filtration
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
DOSY	<i>Diffusion-Ordered SpectroscopY</i>
DQ	<i>Double-Quantum</i>
DQF	<i>Double-Quantum Filtered</i>
DPFGSE	<i>Double Pulsed Field Gradient Spin Echo</i>
EC	Cellule Electrochimique
EG	Ethylène Glycol
EPI	<i>Echo Planar Imaging</i>
ERETIC	<i>Electronic Reference To Access In Vivo Concentration</i>

EPSI	<i>Echo Planar Spectroscopic Imaging</i>
$F_1$	Dimension indirecte
$F_2$	Dimension directe
FESTA	<i>Fluorine-Edited Selective TOCSY Acquisition</i>
FID	<i>Free Induction Decay</i>
GEMSTONE	<i>Gradient-Enhanced Multiplet-Selective Targeted-Observation NMR Experiment</i>
GL	Glycérol
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation</i>
HOESY	<i>Heteronuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>
ICMR	Institut de Chimie Moléculaire de Reims
INADEQUATE	<i>Incredible Natural Abundance Double QUAntum Transfer Experiment</i>
INEPT	<i>Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer</i>
K	Température en Kelvin
M3S	<i>Multi-Shot Single-Scan</i>
MaxQ	Maxi-Quanta
Me <sub>2</sub> O	Diméthyl éther
MeOD	Méthanol deutéré
MQ	Multi-Quanta
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MM	Poids moléculaire en g.mol <sup>-1</sup>
NOAH	<i>NMR by Ordered Acquisition using <sup>1</sup>H-detection</i>
NOE	Effet Overhauser Nucléaire
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
NUS	<i>Non Uniform Sampling</i>
ODYSSEUS	<i>Optimal Decoupling Yielding Satellite Suppression-Edited Ultraclean Spectra</i>
PANACEA	<i>Parallel Acquisition NMR, an All-in-one Combination of Experimental Applications</i>
PCTFE ou CTFEP	PolyChloroTrifluoroEthylène
PEPSIE	<i>Perfect Echo Pure Shift Improved Experiment</i>
PIAnE	PLAteforme d'analyse et de transformation pour les biomolécules, les procédés propres et la valorisation des agro-ressources
PSYCHE	<i>Pure Shift Yielded by Chirp Excitation</i>
PUFSY	<i>Parallel Ultrafast NMR Spectroscopy</i>

QUIPU	<i>Quantitative Perfected and pUre shifted</i>
REST	<i>Relaxation Encoded Selective TOCSY</i>
RF	<i>Radio Frequency waves</i>
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROESY	<i>Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy</i>
SAPPHIRE	<i>Sidebande Averaging by Periodic Phase Incrementation of Residual J Evolution</i>
SCALPEL	<i>Spectral Component Acquisition by Localized PARAFAC Extraction of Linear components</i>
SNR	<i>Signal-to-Noise Ratio</i>
SOFAST	<i>band-Selective Optimized Flip Angle Short Transient</i>
SPEN	<i>SPatially ENcoded</i>
States-TPPI	<i>States Time-Proportional Phase Incrementation</i>
THF	Tétrahydrofurane
TR	<i>Time-Resolved</i>
TReNDS	<i>Time-Resolved-N-Dimensional Spectroscopy</i>
URCA	Université de Reims Champagne Ardenne
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
UF	<i>UltraFast</i>
ViscY	<i>Viscosity-enhanced spectroscopy</i>
$W_{0,1,2}$	Probabilités de transition par unité de temps liées aux mécanisme de relaxation dipolaire
WATERGATE	<i>WATER suppression by GrAdient Tailored Excitation</i>
WURST	<i>Wideband, Uniform Rate, Smooth Truncation</i>
v/v	volume/volume
w/w	<i>weight/weight</i>
ZS	Zangger et Sterk
Å	Ångström
$\gamma$	Rapport gyromagnétique en $\text{rad T}^{-1}.\text{S}^{-1}$
$\delta$	Durée de l'impulsion en ms
$\delta'$	Déplacement chimique en ppm
$\varepsilon$	Constante diélectrique
$\eta$	Viscosité
$t_0$	Temps mort
$t_m$	Temps de mélange
$\tau_c$	Temps de corrélation rotationnelle moléculaire globale
$\varphi$	Phase de l'impulsion (°)
$\omega$	Fréquence angulaire en $\text{rad}.\text{s}^{-1}$

## Remerciements

Ce travail de recherche a été réalisé au sein de l'équipe Chimie Substances Naturelles (CSN) à l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims (ICMR, UMR, CNRS 7312) à l'Université de Reims Champagne-Ardenne.

Je tiens dans un premier temps à remercier le Docteur **Carine VAN-HEIJENOORT** et le Professeur **Hassan OULYADI** pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de se consacrer à la lecture de mon manuscrit et d'en être les rapporteurs. Je remercie également le Professeur **Laurence VOUTQUENNE-NAZABADIOKO**, le Docteur **Ludovic CARLIER**, le Docteur **Jane HUBERT**, ainsi que le Professeur **Jean-Hugues RENAULT** d'avoir accepté de juger ce travail et pour les différentes discussions scientifiques très riches qui ont été partagées.

J'exprime mes profonds et sincères remerciements à mes deux co-directeurs de thèse, le Docteur **Jean-Marc NUZILLARD** et le Docteur **Pedro LAMEIRAS** pour m'avoir encadré et guidé afin de mener à bien ce travail. Je les remercie pour leur présence au quotidien, leurs conseils, leur patience et leur bienveillance, ainsi que leur écoute, qui m'ont été d'une grande aide pour l'aboutissement de ce travail.

Je tiens également à remercier le Professeur **Arnaud HAUDRECHY** pour nos discussions sur la compréhension mécanistique de la réaction organique qui a été suivie *in-situ* par RMN. Ces échanges ont été très précieux pour l'avancement du projet.

Mes remerciements s'adressent aussi aux personnels de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ISCN) à Gif-sur-Yvette pour m'avoir permis d'effectuer des tests sur le spectromètre 950 MHz ( $^1\text{H}$ ). Je remercie en particulier **Alda DA COSTA**, **François GIRAUD** et le Docteur **Nelly MORELLET**.

J'adresse également mes sincères remerciements à **Agathe MARTINEZ** qui a accepté de partager avec moi son temps et son enthousiasme à m'épauler jusqu'à la fin. Je la remercie aussi pour les nombreuses discussions et le soutien continu qu'elle a su m'apporter y compris lors de mon premier marathon.

Je remercie aussi **Anthony ROBERT** pour sa patience et son aide qu'il a su m'apporter pour entreprendre les essais expérimentaux sur le suivi réactionnel *in-situ* par RMN. Ils m'ont fait gagner un temps précieux.

Mes remerciements s'adressent aussi à l'équipe enseignante de l'équipe de Chimie de Coordination (CC) : le Docteur **Cyril CADIOU**, le Professeur **Françoise CHUBURU**, le Professeur **Juliette MOREAU**, le Professeur agrégé de l'enseignement du second degré français **Etienne SPITZ**, le Professeur certifié affecté dans l'enseignement supérieur **Hélène MARCENNE** et le technicien **Florent ROCHE** pour leur accueil, leur encadrement, leur disponibilité et leur soutien qui m'ont permis d'effectuer mon poste ATER à l'Institut Universitaire de Technologie (IUT) dans de très bonnes conditions. Cette expérience m'a permis d'assumer de nouvelles responsabilités et de me conforter encore plus dans ma volonté d'accéder aux fonctions d'enseignant-chercheur dans les années à venir.

Mes remerciements vont également à tous les doctorants, chercheurs et stagiaires du laboratoire que j'ai croisés au cours de ces quatre années : **Abdulmagid ALABDUL MAGID**, **Evariste AKISSI**, **Salah-Eddine AKRIAL**, **Chouaib AOUANE**, **Cédric BARTHEL**, **Benjamin BERTAUX**, **Nicolas BORIE**, **Gautier BOURBON**, **Marine CANTON**, **Julien CORDONNIER**, **Pierre DARME**, **Luminata DUMA**, **Moustapha**

**FORTUNATO, Lysiane GARNIER, Gaëla GAUCHIE, Eddy GOYER, Judith JUVIN, Alexis KOTLAND, Mariacaterina LIANZA, Catherine LAVAUD, Julien LEQUEUX, Samia LEROUL, Clara LITOT, Ritchy LEROY, Clémence MARIVAIN, Georges MASSIOT, Elodie MILLART, Laurène MINSAT, Nangouban OUATTARA, Jérémy PERRET, Robin POUYET, Simon REMY, Charlotte SAYAGH, Marie SCHMITT, Joseph THIERY et Alexandre WEBER.** Je les remercie pour leur bonne humeur, l'ambiance amicale qu'ils ont su entretenir au laboratoire, les repas partagés, les moments de bonheur passés ensemble et les cadeaux, ils resteront gravés dans mon esprit.

Je tiens ensuite à remercier mes amis qui ont partagé ma vie au quotidien pendant ces quatre années, pour leur aide, leur gentillesse, leurs encouragements et pour leurs petits cadeaux toujours bien attentionnés. Merci à toi **Thomas PARISE** et ma louve, **Lolita PILET**, qui me connaissent depuis le début du cursus universitaire, pour votre soutien continu, les moments de galères, les discussions à pas d'heure, les voyages et les très bons moments partagés ensemble ; merci à toi mon petit grenoblois, **Robinou** et à **Ludovic DOUDET** pour vos encouragements, les karaokés et les bonnes soirées. Votre amitié m'a permis de poursuivre sereinement ma thèse. Je remercie la castelthéodoricienne, **Sandrine** pour sa présence au quotidien, son dynamisme, ses nombreux conseils et pour cette amitié qui perdure. Je remercie particulièrement ma petite sœur, **Sarah Ortonovi**, pour son soutien indéfectible tout au long de ces quatre années...merci à toi pour tous les moments que nous avons partagés, les bons comme les moins bons, et surtout d'avoir su être présente au cours de ces six mois de rédaction, quand j'avais besoin d'être stimulé. Avec toi, la rédaction m'a semblé bien plus légère. J'en profite pour remercier les connaissances et amitiés TORiennes rencontrées durant cette période rédactionnelle. Vous m'avez aidé à décompresser et à rencontrer de belles personnes, merci à tous pour votre participation de près comme de loin, à ma thèse.

Un grand merci à ma famille corse, mes parents et mes frères qui m'ont soutenu et qui ont toujours cru en moi. Merci pour votre confiance.

Je remercie enfin la région Grand-Est ainsi que l'Agence Nationale de la Recherche (ANR-19-CE29-0001-01) pour le financement de mes différents travaux de thèse.



Sempre vicinu à noi, sempre ind'è i nostri cuori...

Caccara Toinette PEDINIELLI

Babbu François PEDINIELLI

Zia Jeannine LALOT

# SOMMAIRE

INTRODUCTION .....	13
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE – PARTIE I .....	18
<b>PARTIE I-A : LES DERNIERES AVANCEES METHODOLOGIQUES ET INSTRUMENTALES POUR L'ANALYSE DES MELANGES PAR RMN .....</b>	<b>19</b>
1. Introduction.....	20
1.1. Analyse des mélanges par la RMN à une dimension.....	20
1.2. La RMN multidimensionnelle pour l'analyse des mélanges.....	22
1.2.1. Expériences conventionnelles homonucléaires .....	22
1.2.2. Expériences conventionnelles hétéronucléaires.....	23
2. Les améliorations méthodologiques en RMN pour l'analyse des mélanges.....	25
2.1. Découplage homonucléaire à large bande.....	25
2.1.1. Contexte .....	25
2.1.2. Les améliorations des méthodes pure shift et l'analyse des mélanges .....	30
2.2. Les méthodes alternatives pour l'analyse des mélanges .....	31
2.3. Les expériences permettant de décomposer le mélange complexe en sous-spectres.....	32
2.4. L'analyse des mélanges par la RMN multi-quanta .....	39
2.4.1. L'approche Maxi-Quanta (MaxQ).....	39
2.4.2. La RMN multidimensionnelle « rapide ».....	44
2.4.2.1. Les expériences NOAHs.....	44
2.4.2.2. Les expériences « <i>UltraFast</i> » (UF).....	47
2.4.2.2.1. Principe de la méthode .....	48
2.4.2.2.2. Les expériences UF combinées pour l'analyse des mélanges .....	53
3. Conclusion .....	54
<b>Partie I-B : Analyse de mélanges de petites et moyennes molécules par RMN <i>via</i> la diffusion de spin en milieux visqueux .....</b>	<b>55</b>
1. Introduction.....	56
2. Théorie.....	57
3. L'utilisation de solvants composites pour individualiser les composés en mélanges.....	61
3.1. Les mélanges de solvants : DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> /glycérol (GL) et DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> /glycérol- <i>d</i> <sub>8</sub> (GL- <i>d</i> <sub>8</sub> ).....	61
3.2. Le mélange binaire DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> /eau .....	68
4. Conclusion .....	76
<b>Partie I-C : Etude du suivi réactionnel par la spectroscopie de RMN .....</b>	<b>78</b>
1. Introduction.....	79
2. L'instrumentation employée pour le « <i>static-mode</i> » et « <i>mobile mode</i> ».....	81

2.1.	« static-mode » .....	82
2.2.	« mobile-mode » .....	89
3.	Les méthodes d'acquisition appliquées au suivi réactionnel par RMN.....	95
3.1.	Les expériences d'échantillonnages non uniformes (NUS) .....	95
3.2.	Les expériences 2D « UltraFast » (UF) appliquées au suivi cinétique rapide.....	101
4.	Conclusion .....	105
<b>Partie II : Matériels et Méthodes</b> .....		<b>106</b>
1.	La diffusion de spin en milieu visqueux.....	107
1.1.	Choix du milieu .....	107
1.1.1.	Critères de choix .....	107
1.1.2.	Les solutions sucrées .....	109
1.1.2.1.	Solution de saccharose.....	109
1.1.2.2.	Gel d'agarose.....	110
1.1.3.	Le sulfolane.....	110
1.1.4.	L'acide phosphorique .....	111
1.1.5.	Procédure pour caractériser les composés en mélange .....	112
1.1.5.1.	Les mélanges modèles de composés étudiés .....	112
1.1.5.2.	Caractérisation structurale des composés purs dans un solvant non visqueux .	112
1.1.5.3.	Préparation des échantillons.....	113
1.1.5.4.	Equipement utilisé .....	113
1.2.	Expériences de RMN 1D .....	113
1.2.1.	Suppression des signaux $^1\text{H}$ du solvant .....	113
1.2.1.1.	La séquence « <i>Excitation Sculpting</i> » .....	114
1.2.1.2.	La séquence de détection en bandes sélectives .....	114
1.2.2.	Expériences de RMN 1D hétéronucléaires découplées proton ( $^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$ ) .....	115
1.3.	Expériences de RMN 2D .....	115
1.3.1.	Expériences de RMN 1D et NOESY 2D tirant profit de la diffusion de spin.....	115
1.3.1.1.	Expériences NOESY 2D $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ avec suppression de solvant .....	115
1.3.1.2.	Expériences NOESY 1D $^1\text{H}$ sélectives .....	116
1.3.1.3.	Expériences NOESY 2D $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ bande sélective en $F_1$ avec découplage en $F_1$ .....	117
1.3.1.4.	Expériences HSQC-NOESY 2D.....	117
1.3.1.5.	Expériences NOAH.....	118
1.4.	Optimisation des paramètres expérimentaux .....	119
1.5.	La diffusion moléculaire translationnelle et l'expérience 2D DOSY .....	120

2.	Le suivi réactionnel « <i>in-situ</i> » dans un tube de RMN.....	124
2.1.	Les réactifs étudiés.....	124
2.2.	Caractérisation spectroscopique des réactifs.....	124
2.3.	Préparation des échantillons pour le suivi réactionnel <i>in-situ</i> par RMN.....	124
2.3.1.	Protocole expérimental à température ambiante pour les solvants usuels.....	125
2.3.2.	Protocole expérimental à basse température pour les solvants visqueux.....	125
2.4.	Équipement utilisé.....	127
2.5.	Méthodologie pour le suivi réactionnel <i>in-situ</i> par RMN.....	127
2.5.1.	Expériences de RMN 1D.....	127
2.5.1.1.	La séquence PSYCHE.....	128
2.5.1.2.	La méthode ERETIC-2.....	129
2.5.2.	Expériences de RMN 2D.....	130
2.5.3.	Expériences de RMN tirant profit de la diffusion de spin.....	132
2.5.3.1.	Expériences NOESY 1D <sup>1</sup> H sélectives.....	132
2.5.3.2.	Optimisation des paramètres expérimentaux.....	132
2.5.3.2.1.	Détermination de la température d'expérience optimale.....	132
2.5.3.2.2.	Détermination du temps de mélange $d_8$ optimal.....	134
2.5.4.	Déplacements chimiques des produits finaux (4a) et (4b).....	135
	<b>Partie III : Résultats et Discussion</b> .....	136
	<b>Chapitre A : “Polar mixture analysis by NMR under spin diffusion conditions in viscous saccharose solution and agarose gel”</b> .....	137
1.	Introduction.....	137
2.	Publication.....	138
	<b>Chapitre B : “Mixture Analysis in Viscous Solvents by NMR Spin Diffusion Spectroscopy: <i>ViscY</i>. Application to High- and Low-Polarity Organic Compounds Dissolved in Sulfolane/Water and Sulfolane/DMSO-<i>d</i><sub>6</sub> Blends”</b> .....	160
1.	Introduction.....	160
2.	Publication.....	161
	<b>Chapitre C : “<i>ViscY</i> NMR Experiments in Phosphoric Acid as Viscous Solvent for the Individualization of Small Molecules within Mixtures by Spin Diffusion”</b> .....	191
1.	Introduction.....	191
2.	Publication.....	193
	<b>Chapitre D : Le Suivi Réactionnel « <i>in-situ</i> » dans un Tube de RMN</b> .....	224
1.	Introduction.....	224
2.	Les solvants comme catalyseurs de la réaction.....	226
2.1.	Contexte.....	226

2.2.	Le solvant binaire glycérol/DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	226
2.3.	Elucidation structurale dans le DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	228
2.4.	Optimisation des conditions expérimentales dans des solvants deutérés non visqueux.....	231
2.5.	Suivi de la réaction dans la pyridine- <i>d</i> <sub>5</sub> à 500 MHz .....	233
2.6.	Elucidation structurale des produits secondaires dans la pyridine- <i>d</i> <sub>5</sub> à 950 MHz.....	236
2.7.	Suivi de la réaction dans le solvant binaire DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> /H <sub>2</sub> O à 500 MHz .....	239
3.	Conclusion .....	246
CONCLUSION .....		247
ANNEXES .....		253
<b>Annexe 1</b> : Tableau récapitulatif regroupant les travaux scientifiques retrouvés dans la littérature portant sur la surveillance de diverses réactions utilisant l'approche « <i>in-situ</i> » dans des tubes de RMN de 5 mm. Recherche effectuée jusqu'au 03/12/2021. ....		
		254
<b>Annexe 2</b> : Tableau récapitulatif regroupant les travaux scientifiques retrouvés dans la littérature portant sur la surveillance de diverses réactions utilisant l'approche « <i>off-line</i> » dans des tubes de RMN de 5 mm. Recherche effectuée jusqu'au 03/12/2021. ....		
		265
<b>Annexe 3</b> : Tableau récapitulatif regroupant les travaux scientifiques retrouvés dans la littérature portant sur la surveillance de diverses réactions utilisant l'approche « <i>rapid-injection</i> » dans des tubes de RMN de 5 mm. Recherche effectuée jusqu'au 03/12/2021. ....		
		268
<b>Annexe 4</b> : Tableau récapitulatif regroupant les travaux scientifiques retrouvés dans la littérature portant sur la surveillance des processus redox utilisant des cellules électrochimiques couplées à la spectroscopie de RMN (EC-RMN). Recherche effectuée jusqu'au 03/12/2021. ....		
		275
<b>Annexe 5</b> : Tableau récapitulatif regroupant les travaux scientifiques retrouvés dans la littérature portant sur la surveillance de diverses réactions utilisant l'approche « <i>on-line</i> » avec l'emploi d'une sonde standard. Recherche effectuée jusqu'au 03/12/2021.....		
		279
<b>Annexe 6</b> : Elucidation structurale des structures secondaires issus de la réaction organique dans la pyridine- <i>d</i> <sub>5</sub> . ....		
		283
<b>Bibliographie</b> .....		286

## INTRODUCTION

Depuis de nombreuses années, l'analyse des mélanges complexes est au cœur des principales préoccupations des chimistes. L'identification de molécules organiques en mélange est un enjeu crucial dans la grande majorité des activités humaines liées à la chimie (santé, énergie, matériaux, etc.). Dans l'état actuel des connaissances, l'analyse des mélanges demeure une nécessité et des moyens efficaces pour la réaliser restent à développer. En particulier, l'industrie cosmétique vise à identifier et à développer de nouveaux principes actifs naturels afin de proposer des produits innovants sur le marché. Pour des raisons de sécurité et d'efficacité, les extraits naturels composés de mélanges complexes de dizaines de constituants doivent être caractérisés structurellement le plus tôt et le plus rapidement possible dans le processus de développement de leurs actifs. De plus, de nombreux actifs cosmétiques sont souvent extraits ou stabilisés par des solvants « lourds », à haut point d'ébullition (glycérol, solvants eutectiques DES ou NaDES). Ces solvants sont très difficiles à éliminer en raison de leur point d'ébullition très élevé et peuvent perturber le processus de caractérisation des principes actifs présents dans ces solvants. Les acteurs de l'industrie cosmétique recherchent ainsi des solutions innovantes pour l'étude des mélanges, faciles à mettre en œuvre et si possible peu coûteuses.

Les entreprises de chimie fine et pharmaceutiques sont également très intéressées par des outils nouveaux et innovants permettant la caractérisation structurale de molécules d'intérêt ou d'impuretés résultant de diverses réactions chimiques. La caractérisation structurale des composés organiques de bas poids moléculaire en mélange, obtenus soit par synthèse (produits d'intérêt ou sous-produits), soit par extraction à partir de ressources naturelles ou biotechnologiques est une étape obligatoire pour établir leurs relations structure-propriété et/ou structure-fonction.

La caractérisation est principalement réalisée sur des molécules purifiées, bien qu'il ait déjà été rapporté que des composés peuvent être rapidement identifiés au sein de séries de mélanges simplifiés obtenus par fractionnement physique.<sup>1</sup> Les techniques analytiques de RMN et de spectrométrie de masse (MS) sont souvent utilisées conjointement pour déterminer la structure de composés organiques inconnus.<sup>2</sup> La technique de purification la plus courante, la Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC et plus récemment UPLC) peut être couplée à ces techniques afin de fournir un puissant outil d'analyse de mélange.<sup>3-5</sup> La technique de HPLC-MS est la combinaison la plus simple de ce type. Cependant, tout en fournissant des informations précieuses, la MS n'offre pas le même niveau de détail structural que la RMN. En outre, la plupart des méthodes fondées sur la MS sont optimisées pour la détection d'une classe spécifique de composés. De telles approches ciblées sont efficaces en termes de vitesse et de résolution, mais dans le cas d'études d'extraits bruts, elles ne fournissent pas une vue complète sur l'ensemble du profil chimique des mélanges complexes. De manière complémentaire, la RMN offre un moyen plus poussé d'étudier les mélanges mais les contraintes inhérentes à la manipulation du système de couplage HPLC-SPE-RMN en termes de coûts d'exploitation au sein de la plateforme analytique PIAneT de l'Université de Reims-Champagne-Ardenne (URCA) incitent à proposer des solutions analytiques alternatives pour l'analyse de mélanges impliquant la RMN seule.

L'objectif de mes travaux de thèse s'inscrit dans une thématique de recherche globale au sein de l'équipe de recherche « Chimie des Substances Naturelles (CSN) » de l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims (ICMR) dédiée à l'exploration de la diversité chimique naturelle ainsi qu'à la caractérisation des produits naturels purs ou en mélanges.

L'analyse individuelle par RMN des composants d'un mélange sans effectuer de séparation physique est un problème récurrent pour lequel seul un nombre limité de solutions a été proposé à ce jour :

i) le coefficient de diffusion translationnelle ( $D$ ) caractérise les molécules en solution et reflète leur mobilité. En théorie, des sous-spectres du spectre de RMN d'un mélange peuvent être extraits, en utilisant  $D$  comme facteur de discrimination au moyen de l'expérience DOSY, afin d'obtenir les spectres des composants individuels du mélange.<sup>6-8</sup>

ii) le développement de récentes méthodes impliquant 1) celles pour décomposer le mélange complexe en sous-spectres,<sup>9-13</sup> 2) le découplage homonucléaire à large bande pour améliorer la dispersion du signal,<sup>14-16</sup> 3) l'approche Maxi-Quanta permettant d'isoler des fragments moléculaires appartenant aux composés en filtrant les signaux<sup>17-22</sup> et 4) celles permettant de réduire la durée expérimentale des expériences 2D qui est chronophage. C'est le cas des superséquences imbriquées NOAHs qui offrent la possibilité d'enregistrer successivement une série de spectre 2D<sup>23-29</sup> ou des expériences « ultrarapides » permettant d'acquérir un spectre en un seul scan. Ces expériences ultrarapides représentent un outil pertinent pour l'investigation des systèmes à dynamiques rapides et des espèces intermédiaires instables.<sup>30-42</sup>

iii) Des solvants visqueux (ou mélange de solvants) utilisés dans des conditions spécifiques diminuent la vitesse de rotation des molécules présentes en solution, de sorte que le régime de relaxation croisée longitudinale favorise l'observation de l'Effet Overhauser Nucléaire (NOE) négatif. Un transfert d'aimantation partiel ou complet peut alors se produire sur toute la molécule *via* le phénomène de la diffusion de spin. En conséquence, toutes les résonances des noyaux  $^1\text{H}$  au sein d'une même molécule tendent à corréliser entre elles dans un spectre NOESY 2D, donnant ainsi accès aux spectres de RMN  $^1\text{H}$  individuels des composants du mélange. L'idée originale a été mise en œuvre Williamson *et al.* en 1981<sup>43</sup> au moyen d'un solvant polymère perfluoré et a été reconsidéré par Simpson A. en 2008 ;<sup>44</sup> l'utilisation de l'eau surfondue pour adapter la dynamique de spin de petits métabolites a été publiée en 2012 par le même auteur.<sup>45</sup>

Depuis 10 ans, notre équipe de recherche concentre ses efforts sur l'individualisation des composés organiques en mélange dans des solvants binaires visqueux et les résultats obtenus ont fait l'objet de plusieurs publications dans des revues scientifiques internationales à comité de lecture. En 2011, 2016 et 2017, le glycérol, le carbonate de glycérol, le DMSO- $d_6$ /glycérol ainsi que le DMSO- $d_6$ /eau ont été utilisés comme solvants visqueux pour la création des conditions de diffusion de spin.<sup>46-48</sup>

Mes travaux de recherche visent à terme à fournir aux secteurs académiques et industriels de la chimie organique de synthèse et des produits naturels, un outil analytique innovant et prometteur basé sur le phénomène de la diffusion de spin et dédié à l'analyse de mélanges de petites molécules par la RMN du liquide, sans recourir à une séparation physique des constituants.

## Objectifs

Mes travaux de thèse ont abordé plusieurs problèmes d'analyse de mélanges par RMN. Ils ont été structurés en trois ensembles de tâches :

1) La recherche de nouveaux solvants ou mélanges de solvants visqueux plus efficaces de manière à élargir la méthodologie en la rendant encore plus simple, plus robuste et plus accessible à tous. Cette tâche consiste à déterminer les conditions d'observations du phénomène de transfert d'aimantation *via* la diffusion de spin.

2) La conception de nouvelles méthodes expérimentales de RMN améliorant l'efficacité du transfert d'aimantation par la diffusion de spin, en impliquant des noyaux qui n'ont pas encore été sollicités jusqu'à présent. Ces méthodologies permettent de simplifier l'interprétation des spectres de composants de mélange à des fins de détermination de structure.

3) Les méthodes analytiques précédemment établies, sont ensuite appliquées à l'étude du suivi réactionnel « *in-situ* » dans un tube de RMN en milieux visqueux, afin d'accéder aux structures des composés nouvellement formés dans le mélange.

Toutes les méthodes développées sont désormais disponibles depuis la plateforme d'analyses « PIAneT » de l'Université de Reims Champagne-Ardenne, pour les utilisateurs tant académiques que privés. Les nouveaux outils prometteurs, élaborés au cours de mes travaux de thèse, conviennent à un large éventail d'applications dans l'étude de petites molécules en mélange par spectroscopie de RMN.

Ce manuscrit est divisé en trois grandes parties : Les sous-parties I-A, I-B et I-C sont réunies dans une revue bibliographique. La partie II est consacrée aux Matériels et Méthodes employés durant ces trois années de recherche et la partie III est dédiée aux résultats personnels retranscrits dans trois publications avec comité de lecture international (chapitre A-B-C) et dans un chapitre D présentant les résultats obtenus lors de l'étude d'un suivi réactionnel « *in-situ* » au sein d'un tube de RMN, en milieu visqueux.

### Préambule :

« L'état d'art » regroupant les parties I-A, I-B et I-C a pour but de présenter les dernières innovations méthodologiques et instrumentales obtenues par la communauté scientifique *via* la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) pour l'analyse de composés de faibles masses dans des mélanges complexes. Dans la majorité des travaux qui seront abordés, le terme « analyse de mélanges complexes » reste vaste et ne différencie pas explicitement les composés évoluant au cours du temps lors de réactions chimiques par rapport à ceux inertes dans le temps. Ainsi, Il conviendra de faire la distinction entre ces deux approches : les parties I-A et I-B aborderont l'analyse de composés dans des mélanges complexes n'évoluant pas au cours du temps. La partie I-A abordera les dernières tendances actuelles pour défier l'analyse des mélanges complexes. La partie I-B traitera des travaux qui ont été effectués pour individualiser les composés en mélange à partir du phénomène de la diffusion de spin et la partie I-C sera dédiée à l'étude « *in-situ* », « *off-line* », « *rapid-injection* » et « *on-line* » de molécules évoluant au cours du temps dans un tube de RMN lors de suivis de synthèse.

## Participation aux communications orales/posters et formations

- **6-9 avril 2021** : Communication orale sur le sujet « *ViscY* experiments in phosphoric acid as viscous solvent for the individualization of small molecules within mixtures by spin diffusion » **au congrès virtuel** au Groupement d'Etudes de Résonances Magnétique (GERM).
- **29-31 Mars 2021** : Poster sur le sujet « *ViscY* experiments in phosphoric acid as viscous solvent for the individualization of small molecules within mixtures by spin diffusion » en **congrès international virtuel** : *Experimental Nuclear Magnetic Resonance* (ENC) (USA).
- **19 et 25 janvier 2021** : Formation sur le suivi d'une réaction organique « *in-situ* » dans un tube de RMN standard sur un spectromètre à haute résolution (950 MHz) à Gif-sur-Yvette, 1 avenue de la terrasse 91190.
- **22 octobre 2020** : Communication orale portant sur le sujet « *In-situ* chemical reaction monitoring under spin diffusion conditions » à la Journée Rémoise des Jeunes Chercheurs en Santé (JRJCS) – SFR CAP SANTE (Reims).
- **8-13 Mars 2020** : Communication orale sur le sujet « Mixture Analysis for High- and Low-polarity Organic Compounds by NMR in Sulfolane/Water and Sulfolane/DMSO-*d*<sub>6</sub> Solvents under Spin Diffusion Conditions » en **congrès international** : *61<sup>st</sup> Experimental Nuclear Magnetic Resonance* (ENC), Hilton Inner Harbor Baltimore, Maryland (USA).
- **17 octobre 2019** : Communication orale et poster sur le sujet « Apolar phosphorus and polar compounds within mixture analysis by heteronuclear NMR under spin diffusion conditions in viscous Sulfolane-DMSO and Sulfolane-Water binary solvents » à la Journée Rémoise des Jeunes Chercheurs en Santé (JRJCS) – SFR CAP SANTE (Reims) (**3<sup>e</sup> prix**).
- **17 mai 2019** : Poster sur le sujet « Polar Mixture Analysis by NMR under Spin Diffusion Conditions in Viscous Saccharose Solution and Agarose Gel » à la journée PhytoDay organisée par l'**Université Libre de Bruxelles** – Campus de la Plaine – Faculté de pharmacie.

## REVUE BIBLIOGRAPHIQUE – PARTIE I

**PARTIE I-A : LES DERNIERES AVANCEES METHODOLOGIQUES ET  
INSTRUMENTALES POUR L'ANALYSE DES MELANGES PAR RMN**

## 1. Introduction

Cette partie vise à présenter une description générale de la manière dont la spectroscopie de RMN peut être utilisée pour relever le défi de l'analyse des mélanges de petites molécules. Les expériences de RMN unidimensionnelles et multidimensionnelles conventionnelles sont présentées ainsi que leurs applications, leur pertinence et leurs limites dans l'analyse des mélanges.

L'analyse des mélanges repose souvent sur des expériences de RMN 1D, qui sont toutefois rapidement limitées par le chevauchement des signaux. Le passage à des expériences 2D conduit à des améliorations remarquables à cet égard. L'identification des composants est souvent assistée par des bases de données, ainsi que par des méthodes de traitement automatique de la grande quantité de données qui doivent être stockées. Pour résoudre les problèmes liés à l'analyse des mélanges complexes, de nombreux algorithmes ont été proposés pour démêler les spectres de RMN 1D et 2D à partir des travaux initiaux de W. Naanaa & J.-M. Nuzillard,<sup>49</sup> portant sur la séparation aveugle de source (*Blind Source Separation*) (BSS) en spectroscopie de RMN. Les tendances actuelles dans l'analyse des mélanges par RMN comprennent la recherche d'une grande sensibilité et la réduction du temps requis pour les expériences de RMN avancées. Les progrès réalisés dans ce domaine au fil des années sont dus à l'évolution de l'instrumentation de RMN, de la séquence d'impulsions et du traitement des données<sup>50-51</sup> qui a conduit à de nouvelles expériences puissantes<sup>52</sup> ainsi qu'à de nouvelles stratégies d'échantillonnage.

Bien qu'il existe diverses expériences qui utilisent des algorithmes ou une classification hiérarchique ascendante (HCA) pour le profilage métabolomique,<sup>1</sup> ces dernières ne seront pas abordées dans le manuscrit. Néanmoins, une méthode de déréplication a été élaborée en 2014, à l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims. Cette méthode baptisée CaraMel<sup>1</sup> (caractérisation des mélanges) est utilisée pour le profilage chimique rapide d'extraits issus de micro-algues, de plantes, de cultures cellulaires végétales ou de micro-organismes. Cette approche originale suscite l'intérêt des secteurs académiques et privés. Fondée sur la méthode CaraMel, la société « NatExplore » créée par le Dr. Jane Hubert utilise quotidiennement les résultats issus de la recherche académique.

### 1.1. Analyse des mélanges par la RMN à une dimension

La précision des informations obtenues par la RMN 1D <sup>1</sup>H dépend fortement de la complexité et de la pureté de l'échantillon. La petite plage spectrale des protons répartis sur environ 10-15 engendre un degré élevé de chevauchement des résonances <sup>1</sup>H, en particulier dans le cas de mélanges complexes (Figure 1). Lorsque le nombre de composés à analyser augmente dans l'échantillon, les spectres 1D <sup>1</sup>H peuvent être très encombrés et l'analyse devient plus délicate. Ce chevauchement complique la quantification des métabolites, qui est un paramètre important pour la métabolomique par exemple.<sup>53</sup> Dans de tels cas, l'appartenance des signaux à la même molécule ou provenant de plusieurs espèces peut être difficile à déterminer.

Afin de simplifier le spectre 1D des mélanges, différentes stratégies ont été développées. La première possibilité est l'utilisation d'autres noyaux que <sup>1</sup>H, la RMN du <sup>13</sup>C représente un moyen de pallier le problème de la superposition des signaux grâce à la présence quasi universelle de ce noyau dans les métabolites. En utilisant des séquences d'impulsions 1D <sup>13</sup>C avec découplage des <sup>1</sup>H lors de l'acquisition, le spectre obtenu présente une largeur spectrale élevée de 250 ppm où chaque pic correspond à un singulet,<sup>54</sup> bien que la faible abondance naturelle du <sup>13</sup>C entraîne une sensibilité 400 fois plus faible que celui du <sup>1</sup>H. Pour cette raison, l'acquisition des spectres 1D <sup>13</sup>C est longue et nécessite la plupart du temps des concentrations élevées en métabolites. Toutefois, le chevauchement des résonances est beaucoup moins important dans les spectres <sup>13</sup>C par rapport aux spectres <sup>1</sup>H. De manière complémentaire, des spectres 1D peuvent être obtenus à partir d'autres noyaux plus

sensibles tels que  $^{19}\text{F}$ <sup>55</sup> et  $^{31}\text{P}$ .<sup>56</sup> Cependant, leur présence est moins fréquente dans les métabolites de manière générale que le proton ou le carbone. Néanmoins, ces noyaux peuvent être utiles pour cibler des groupes de métabolites.

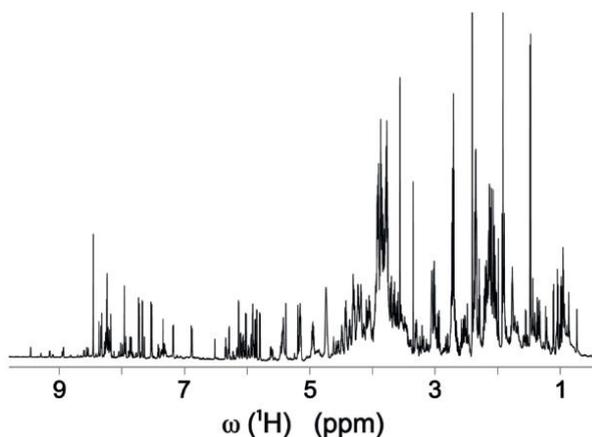


Figure 1. Spectre 1D  $^1\text{H}$  d'un lysat cellulaire d'*E. coli* représentant la complexité du chevauchement entre les résonances protons. Reproduite de la réf.<sup>57</sup>

Une autre possibilité consiste à employer des méthodes qui filtrent les signaux de RMN permettant de réduire le chevauchement spectral pouvant masquer les signaux d'intérêt. Des stratégies d'édition spectrale basées sur la différence de temps de relaxation, la mobilité moléculaire ou le réseau de couplage-*J* conduisent à une observation sélective des composants.

Le filtrage des signaux par les propriétés de relaxation laisse les spectres exempts de signaux provenant de molécules de poids moléculaire élevé, qui ont un temps de relaxation transversale  $T_2$  court.<sup>58-60</sup> L'élément de séquence d'impulsions *Carr-Purcell-Meiboom-Gill* (CPMG) est notamment utilisé pour effectuer une édition spectrale en fonction des propriétés de relaxation transversale.<sup>59</sup> L'atténuation sélective des signaux provenant de molécules de poids moléculaire élevé est utile lorsque les signaux des macromolécules dominent les spectres et masquent les signaux plus petits.<sup>60-61</sup> Une application intéressante de ce filtrage se trouve dans l'analyse des fluides biologiques tels que le plasma et le sang pour éliminer le signal des protéines et quantifier les analytes peu abondants (Figure 2).

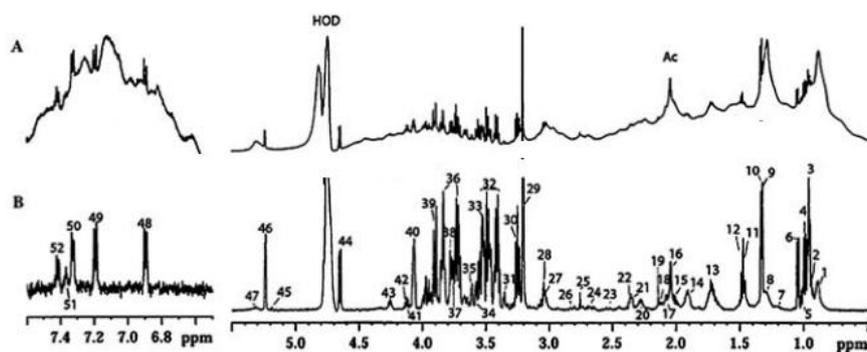


Figure 2. Spectres 1D RMN  $^1\text{H}$  d'un échantillon de plasma sanguin humain. (A) spectre 1D  $^1\text{H}$  acquis en utilisant la séquence NOESYPR 1D avec présaturation de l'eau et (B) spectre 1D  $^1\text{H}$  édité en  $T_2$ , acquis à 600 MHz. Reproduite de la réf.<sup>62</sup>

Une autre approche de filtrage est l'expérience 1D *Total Correlation Spectroscopy* (TOCSY), qui fournit une séparation basée sur les réseaux de couplage-*J*.<sup>63-65</sup> L'objectif est d'identifier les résonances issues d'un seul système de spins dans une molécule. Un multiplet doit pour cela être clairement isolé du reste des spectres. De plus, c'est une méthode sélective qui ne donne pas nécessairement accès à la molécule entière, seules les résonances appartenant à un système de spins donné peuvent être observées. Des applications de l'expérience TOCSY 1D pour l'analyse de l'urine et des mélanges de composés issus de l'huile de menthe poivrée ou dérivés de la biomasse ont été rapportées.<sup>64-67</sup>

D'autres applications incluent la quantification de métabolites dans le miel<sup>63</sup> et le vinaigre balsamique.<sup>68</sup>

L'expérience NOESY 1D constitue une autre possibilité pour cibler des groupes de spins isolés ou pour individualiser entièrement les composés en mélange. Elle permet de visualiser les corrélations dipolaires entre un proton excité sélectivement et les protons proches de celui-ci dans l'espace.<sup>69-71</sup> A cet effet, l'expérience NOESY 1D avec sélection de multiplet par double écho de spin avec gradients de champ statique (DPFGSE, *Double Pulsed Field Gradient Spin Echo*) est jusqu'à présent la plus robuste.<sup>71</sup> Récemment, cette expérience a été utilisée en tirant profit de la diffusion de spin dans des conditions de viscosité particulières pour individualiser des composés de structures proches en mélange. Lameiras, et al.<sup>72, 73-74</sup>

Une dernière possibilité, qui sera discutée dans la section suivante, est l'utilisation de la RMN multidimensionnelle, en particulier la RMN 2D.

## 1.2. La RMN multidimensionnelle pour l'analyse des mélanges

L'utilisation seule des expériences 1D ne suffit pas à analyser un mélange complexe contenant une grande variété de composés car le chevauchement des signaux empêche l'identification et la séparation précise. La solution au problème du chevauchement consiste à augmenter la dimensionnalité de l'expérience à deux ou plus. Cette procédure peut être étendue à des expériences à plus hautes dimensions où chaque dimension indirecte est issue de l'incrémentement d'un délai, allant des expériences 3D,<sup>75-77</sup> 4D,<sup>78</sup> 5D,<sup>79</sup> 6D<sup>80</sup> voire 7D.<sup>80-81</sup> Les signaux sont alors éclatés sur plusieurs dimensions, ce qui peut aider à distinguer deux ou plusieurs signaux qui se chevauchent dans le spectre 1D. Une expérience 2D suit le schéma :

### préparation----évolution ( $t_1$ )----mélange----détection ( $t_2$ )

où les **blocs de préparation** et de **mélange** sont des éléments fixes d'une séquence d'impulsions,  $t_1$  est la durée du délai incrémenté et  $t_2$  le temps physique de l'acquisition. La répétition séquentielle de ce schéma avec incrémentement de  $t_1$  et des modifications éventuelles des phases des impulsions donne un ensemble de données 2D  $S(t_1, t_2)$ . La transformation de Fourier à deux dimensions donne alors un spectre 2D riche en informations structurales et offre des possibilités pour les études dynamiques. Une variété d'expériences devient disponible et elles peuvent être classées en expériences homonucléaires et hétéronucléaires. Ces expériences et leur pertinence pour l'analyse des mélanges seront présentées dans cette section.

#### 1.2.1. Expériences conventionnelles homonucléaires

Les expériences de RMN homonucléaires impliquent le même type de noyau dans les deux dimensions. L'une des séquences d'impulsions multidimensionnelles les plus anciennes fournit des spectres de corrélation COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$  et est apparue dans la pratique en 1976 après avoir été proposée en 1971.<sup>82</sup> Cette expérience dévoile la connectivité entre des groupes adjacents de protons qui interagissent *via* des couplages- $J$ . Cette interaction donne lieu à des pics en dehors de la diagonale (pics « croisés ») dans le spectre 2D dont les coordonnées sont les déplacements chimiques des protons couplés. Plusieurs variantes de l'expérience COSY sont disponibles, telles que la méthode DQF-COSY<sup>83</sup>, filtrée à double quanta, qui permet d'atténuer fortement les signaux singulets non informatifs de la diagonale de manière à faciliter l'analyse des pics croisés. Cette expérience est couramment utilisée pour la caractérisation structurale de composés en mélange.<sup>84</sup> Elle offre une séparation significative des signaux qui se chevauchent sur la diagonale des spectres. Elle peut aussi être utilisée avec des méthodes de découplage homonucléaire à large bande<sup>85</sup> ou dans des superséquences

imbriquées telle que l'expérience CLIP-COSY<sup>86</sup> décrite par exemple pour l'analyse d'un mélange constitué d'érythromycine A, d'œstradiol et de testostérone.<sup>85</sup>

La version 2D de l'expérience TOCSY (*TOTal Correlation Spectroscopy*)<sup>87</sup> fournit des informations sur les protons appartenant à un système de spin donné dans une molécule. Cela s'ajoute aux informations sur les protons directement couplés, donnant ainsi une description complète du réseau de couplages scalaires. Les spectres TOCSY ont tendance à être plus difficiles à analyser en raison de la difficulté à interpréter les pics croisés et parce que les spectres sont plus encombrés que dans les expériences COSY. Des applications réussies ont néanmoins été rapportées pour l'analyse de mélanges telles que l'étude du venin d'insecte,<sup>88</sup> pour des mélanges d'acides aminés,<sup>89-90</sup> pour un mélange de composés issus d'extrait naturel,<sup>67</sup> dans les analyses d'un mélange de stéroïdes,<sup>91</sup> de glucides,<sup>92</sup> ou encore l'utilisation d'une séquence TOCSY intégrée dans des expériences NOAH-2-COLMAR pour l'identification des métabolites d'urine de la souris.<sup>29</sup>

Enfin, la spectroscopie de diffusion translationnelle (DOSY, *Diffusion-Ordered Spectroscopy*) est une méthode puissante pour séparer les spectres de RMN des composants d'un mélange.<sup>93-101</sup> Leur différenciation est basée sur la mesure des coefficients de diffusion translationnelle ( $D$ ), qui dépendent de la taille et de la forme des molécules. Dans la représentation classique des spectres DOSY 2D, une dimension correspond au spectre de RMN 1D de l'échantillon et l'autre indique les valeurs du coefficient de diffusion  $D$  associées aux déplacements chimiques. Dans un tel spectre, toutes les résonances d'un composé donné sont alignées le long de la valeur correspondante du coefficient de diffusion translationnelle. Cette expérience est très efficace pour séparer les spectres de RMN et est considérée comme une « forme de chromatographie virtuelle ». Très récemment, la méthode DOSY a été utilisée à travers l'encodage spatial de l'expérience DOSY (SPEN-DOSY) pour l'analyse de petites molécules en mélange<sup>100</sup> ou à travers une nouvelle approche nommée CORDY (*Concentration ORDERed NMR spectroscopy*) pour séparer et quantifier simultanément les signaux des composants d'un mélange d'acides aminés, d'urine et d'une boisson énergisante.<sup>102</sup>

#### 1.2.2. Expériences conventionnelles hétéronucléaires

Les expériences de RMN hétéronucléaires impliquent différents types de noyaux dans les différentes dimensions. En raison d'une plage de déplacements chimiques  $^1\text{H}$  restreinte, il est parfois pertinent de considérer la plus grande des autres noyaux afin d'accéder à une meilleure séparation des résonances et par conséquent à de nouvelles informations précieuses pour l'élucidation structurale. Par exemple, l'expérience HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) développée par Bodenhausen G. et Ruben D. J. en 1980,<sup>103</sup> est sans aucun doute l'une des expériences les plus largement utilisées, avec des applications dans presque tous les aspects de la RMN. L'enregistrement des spectres de RMN de noyaux moins sensibles X couplés à des protons s'est avéré significativement améliorée par une technique de transformée de Fourier bidimensionnelle impliquant un double transfert de polarisation. Cette expérience est utilisée pour enregistrer les spectres de corrélation dans lesquels les résonances des protons sont corrélés à celles des noyaux X directement liés. Bien qu'initialement décrite pour un proton directement lié à l'azote d'une fonction amide secondaire au sein d'une liaison peptique,<sup>103</sup> cette expérience a facilement été appliquée à d'autres noyaux dans les expériences HSQC 2D  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$ ,<sup>104</sup>  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ,<sup>105</sup> ou  $^1\text{H}$ - $^{19}\text{F}$ .<sup>106</sup> Le transfert d'aimantation du  $^1\text{H}$  vers le noyau X suivi du retour vers le noyau  $^1\text{H}$  après marquage en fréquence augmente la sensibilité puisque ce sont les signaux des noyaux  $^1\text{H}$  qui sont détectés pendant  $t_2$ .

Cette expérience peut s'avérer pertinente en apportant des informations pour l'identification de composés dans des mélanges complexes.<sup>107-108</sup> <sup>105</sup> <sup>109</sup> Elle a aussi su profiter de la large gamme de déplacements chimiques d'autres noyaux peu sensibles tel que le  $^{13}\text{C}$ , pour contourner le problème de la superposition des signaux dans une seule dimension. C'est le cas des expériences HSQC 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$

pour analyser des métabolites issus du plasma sanguin <sup>110</sup> ou plus récemment pour retrouver des formes tautomères de quinones <sup>111</sup> ou des expériences HSQC 2D <sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P pour caractériser des mélanges de composés contenant du phosphore. <sup>104, 112</sup>

L'expérience HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*) <sup>113</sup> donne les mêmes corrélations que la méthode HSQC, mais implique une période d'évolution multiple quanta. L'utilisation de cette séquence d'impulsions pour l'analyse de mélange est discutable dans la mesure où l'effet des couplages-*J* entraîne une dispersion des résonances provoquant l'élargissement des pics. Cela peut rendre l'identification des composants plus compliquée que nécessaire, <sup>114</sup> même si récemment, il a été rapporté dans des superséquences NOAHs que le module HMQC pouvait être préféré au module HSQC, en raison d'une plus grande préservation de l'aimantation globale. <sup>27</sup>

Une troisième expérience nommée HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Coherence*) a été décrite pour la première fois en 1986, <sup>115-116</sup> et permet de faire apparaître des signaux qui correspondent aux corrélations dues à des couplages à travers 2, 3 ou 4 liaisons (voire plus). En revanche, le signal qui résulte de la corrélation des protons et de leurs noyaux directement liés n'est pas visible, contrairement à la méthode HSQC. Cette expérience est cependant moins souvent appliquée dans l'analyse de mélanges. Elle est plus souvent utilisée dans une association de différentes méthodes 2D conventionnelles pour trouver un détail informatif sur la structure ou pour aider à confirmer les résonances qui sont attribuées par l'intermédiaire d'autres expériences.

Si les spectres 2D ont permis de rendre plus accessible l'identification des composés en mélanges par rapport aux spectres 1D, ils restent confrontés au défi des grandes superpositions de signaux que peuvent contenir les mélanges les plus complexes. Dans de tels cas, les signaux des analytes les plus abondants peuvent masquer ceux des métabolites présents en plus faibles quantités. De plus, lorsqu'il existe un rapport de concentrations important entre les entités, le réglage du gain du récepteur n'est pas optimisé pour les composés en faibles concentrations, ce qui peut rendre difficile l'analyse des composés en faibles quantités. Augmenter la dimensionnalité de l'expérience peut être avantageux de façon à pouvoir disperser les signaux dans un plus grand domaine. De nombreuses séquences d'impulsions ci-dessus peuvent être combinées afin de définir des expériences 3D et extraire plusieurs éléments d'information en même temps. Les approches les plus puissantes sont obtenues avec des méthodes combinées qui éditent des expériences de corrélation 2D en ce qui concerne la diffusion, la relaxation et le couplage-*J*. Les approches discutées dans la section 1.1 pour les expériences 1D peuvent être utilisées pour créer des expériences multidimensionnelles. Cela donne lieu à des expériences 3D telles que DOSY-COSY, DOSY-HSQC, <sup>77</sup> iDOSY-HMBC <sup>117</sup> DOSY-TOSY, <sup>76</sup> DOSY-TOCSY, <sup>118</sup> MaxQ-DOSY, <sup>75</sup> TOCSY-HSQC, <sup>119</sup> HMQC-NOESY <sup>120</sup> ou encore QUIPU-HSQC. <sup>121</sup>

Malgré leur potentialité à élucider la structure de multiples composés en mélanges, ces techniques présentent toutes une limite commune, celle d'avoir une durée d'acquisition très longue, qui augmente avec le nombre dimensions des spectres. Plusieurs heures et parfois plusieurs jours sont nécessaires pour l'acquisition d'un seul spectre. Depuis plusieurs années maintenant, la communauté scientifique cherche à réduire les temps d'acquisition des données au moyen de nouvelles innovations méthodologiques. Dans la section qui suit, plusieurs expériences de RMN courantes ou récentes sont décrites pour faciliter l'analyse des mélanges complexes. Parmi ces dernières, deux méthodes ont été employées au cours de mes travaux de thèse, le découplage homonucléaire à large bande utilisant la séquence PSYCHE et les superséquences imbriquées NOAHs.

## 2. Les améliorations méthodologiques en RMN pour l'analyse des mélanges

Les aspects les plus importants qui déterminent la qualité des spectres de RMN sont la sensibilité et la résolution spectrale. Des progrès en sensibilité se sont produits au fil des années grâce à une multitude de techniques différentes destinées à améliorer l'acquisition et le traitement des données de RMN. Le développement et les améliorations de l'instrumentation de RMN ont également joué un rôle clef pour améliorer la sensibilité avec un accent particulier dans la conception des sondes refroidies cryogéniques ou l'usage de champs magnétiques toujours plus intenses. D'autre part, la résolution spectrale est également améliorée de manière inhérente dans les champs magnétiques plus élevés qui dispersent les déplacements chimiques sur une plage de fréquences plus large, bien que les effets du chevauchement des signaux puissent toujours être un facteur limitant lors de l'analyse de mélanges complexes. Dans ce cas, l'interprétation des spectres de RMN de systèmes complexes peut être encore difficile voire être infaisable. Le développement continu de nouvelles séquences d'impulsions et l'amélioration de celles existantes ont été un facteur très important pour comprendre l'énorme potentiel de la spectroscopie de RMN. Parmi ces récentes innovations, les expériences de découplage homonucléaire à large bande, connues depuis longtemps, seront succinctement passées en revue ci-après ainsi que les expériences qui permettent de décomposer un spectre complexe en sous-spectres plus simples.

### 2.1. Découplage homonucléaire à large bande

#### 2.1.1. Contexte

Les avantages associés au découplage des interactions scalaires sont facilement compris lors de l'analyse d'un spectre  $^{13}\text{C}$ , qui est régulièrement enregistré par découplage hétéronucléaire à large bande  $\{^1\text{H}\}$  lors de l'acquisition des données. Dans un spectre  $^{13}\text{C} - \{^1\text{H}\}$  à l'abondance naturelle des noyaux de  $^{13}\text{C}$ , tous les signaux apparaissent sous la forme de singulets offrant une excellente dispersion du signal, permettant de connaître le nombre de signaux présents et de mesurer les valeurs du déplacement chimique de manière très simple. En revanche, malgré l'utilisation de champs magnétiques élevés, les spectres de RMN 1D  $^1\text{H}$  souffrent souvent d'une faible dispersion des signaux et d'un chevauchement sévère de ces derniers en raison de la plage limitée des déplacements chimiques  $^1\text{H}$  (10 à 15 ppm) et de l'effet des couplages scalaires. L'analyse de la structure des multiplets contient des informations structurales précieuses telles que le nombre et la nature des spins voisins. Cependant, dans de nombreux cas, le chevauchement des signaux entrave une analyse pertinente des multiplets où l'extraction précise des déplacements chimiques sont fondamentaux dans l'analyse et l'interprétation des spectres de RMN.

Dans les spectres de RMN  $^1\text{H}$ , la dispersion du signal pourrait être considérablement améliorée si tous les signaux étaient convertis en singulets en supprimant les effets des interactions de couplage homonucléaire. C'est l'objectif des techniques de découplage homonucléaire à large bande, également connues sous le nom des méthodes « *pure-shift* ». <sup>122</sup> Les avantages de l'obtention de spectres de RMN  $^1\text{H}$  pure-shift sont largement reconnus depuis des années, bien qu'il n'existe pas de solution simple et générale pour atteindre cet objectif. Chaque proton dans un spectre de RMN  $^1\text{H}$  présente un motif de couplage particulier en raison de ses interactions avec les protons voisins. Ainsi, certains écueils expérimentaux tels qu'un manque de dispersion du signal ou de résolution spectrale ou encore la présence de chevauchements de signaux trop marqués peuvent empêcher l'identification et l'attribution de chaque résonance individuelle. Dans ce contexte, l'utilisation des méthodes de découplage homonucléaire offrant des structures de signaux simplifiés peut s'avérer intéressante et permettre ainsi l'analyse et l'interprétation des spectres correspondants. À titre d'exemple du

potentiel de cette approche, les structures des signaux simplifiés obtenues pour les résonances aliphatiques du *R,R*-cyclohexane-1,2-diol sont une preuve claire de l'excellente complémentarité entre les spectres 1D homodécouplés et  $^1\text{H}$  standard (Figure 3). L'absence de séparations de couplage améliore la dispersion du signal, facilite et accélère la reconnaissance des déplacements chimiques et simplifie l'analyse et l'attribution de régions complexes, comme observé pour les signaux de chevauchement résonnants autour de 0,8 et 2,0 ppm.

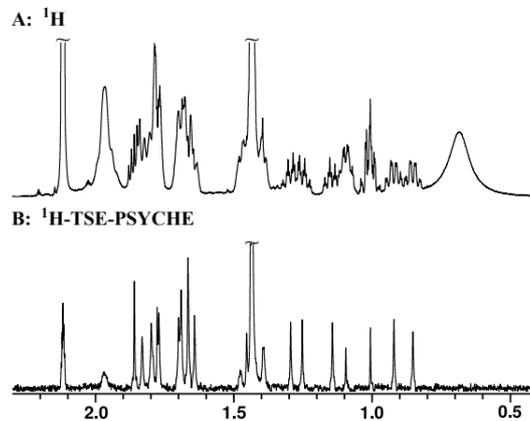


Figure 3. Spectres de RMN 1D  $^1\text{H}$  de la région aliphatique du *R,R*-cyclohexane-1,2-diol dans du toluène- $d_8$ , acquis avec a) la méthode conventionnelle et b) avec la méthode pure-shift :  $^1\text{H}$ -TSE-PSYCHE, à 700 MHz. Reproduite de la réf. <sup>123</sup>

Les méthodes de découplage homonucléaire à large bande reposent sur la distinction entre les interactions des spins avec le champ magnétique principal (déplacements chimiques) et les interactions entre eux (couplages). Elles sont basées sur l'application d'une séquence d'impulsions radiofréquence (RF) qui suppriment les effets de l'évolution des couplages- $J$  pendant une courte période. Ces éléments de refocalisation des couplages- $J$  divisent les spins en spins actifs à observer et les spins passifs. Les spins actifs fournissent le signal détecté final et les spins passifs sont manipulés afin de supprimer les effets de couplages- $J$ . Les blocs de construction des séquences les plus utilisées dans les expériences pure-shift sont représentés ci-dessous (Figure 4).

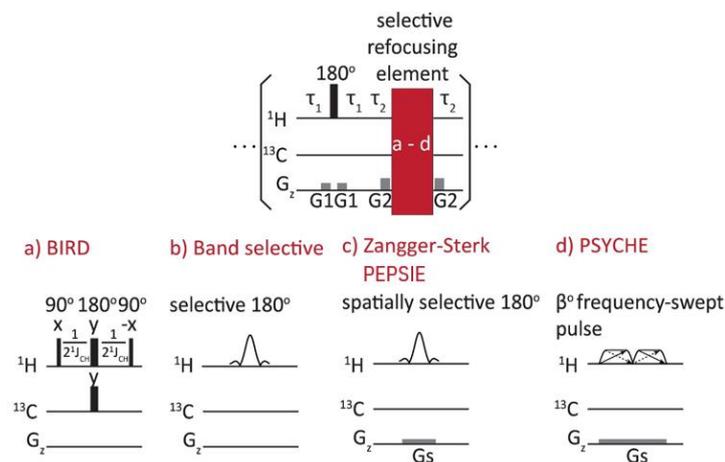


Figure 4. Blocs d'impulsions de base pour effectuer un découplage homonucléaire, composé d'une impulsion dure à  $180^\circ$  et d'un élément de refocalisation sélective qui peut être basé sur a) la séquence BIRD, b) une impulsion de  $180^\circ$  « bande sélective », c) les éléments Zangger-Sterk ou la séquence PEPsIE ou d) la séquence PSYCHE.

Quelles que soient les séquences utilisées, chacun de ces éléments inverse l'évolution du couplage scalaire et supprime ses effets pendant un temps d'évolution spécifique. Toutes les méthodes sont basées sur l'application d'un bloc de séquence d'impulsions qui se compose de deux composants de refocalisation : une impulsion dure non sélective de  $180^\circ$  et un élément de refocalisation sélectif. Le déplacement chimique du spin actif évolue pendant la première période  $\tau_1$ , subit une inversion à  $180^\circ$

qui change son sens de précession et à la fin de la seconde période  $\tau_2$ , se refocalise. En revanche, le déplacement chimique du spin passif continue d'évoluer pendant toute la période  $2\tau$  puisqu'il n'est pas perturbé par l'impulsion de refocalisation. L'évolution du couplage  $J_{\text{spin.aktif-passif}}$  revient à zéro à la fin de la période d'évolution  $2\tau$ .

L'idée originale a été proposée pour la première fois en 1982 par Garbow *et al.* qui ont utilisé un élément de découplage à rotation bilinéaire (BIRD)<sup>124</sup> pour différencier les protons attachés au  $^{13}\text{C}$  (spins actifs) et ceux attachés au  $^{12}\text{C}$  (spins passifs). Dans le spectre résultant, seuls les protons liés au  $^{13}\text{C}$  ont été observés. Cette approche présente un intérêt pour le découplage homonucléaire des systèmes de spins fortement couplés. Cependant, elle souffre de quelques inconvénients. La sensibilité est régie par l'abondance naturelle du  $^{13}\text{C}$  qui entraîne une perte de sensibilité d'environ 99% sur le spectre résultant. De plus, le découplage des protons diastéréotopes dans les  $\text{CH}_2$  prochiraux n'est pas possible car la séquence BIRD ne peut pas distinguer les protons liés directement au même noyau  $^{13}\text{C}$ . Comme conséquence, les spectres montrent des doublets pour les protons méthyléniques non équivalents.

Depuis, plusieurs éléments de refocalisation des couplages- $J$  sont devenus disponibles. En 1997, un élément de refocalisation spatial sélectif a été introduit par Zangger et Sterk (ZS).<sup>125</sup> Cette approche utilise le concept de codage spatial présenté dans la méthode ultrarapide en 2.4.2.2.1., dans laquelle l'application combinée d'une impulsion sélective de  $180^\circ$  avec un faible gradient  $z$  de champ magnétique ( $G_s$ ) provoque un découplage sélectif codé dans l'espace de différents signaux placés à différentes tranches  $z$  de l'échantillon au sein du tube de RMN. Dans ce type d'expérience, un spectre  $^1\text{H}$  complet peut être obtenu à l'aide d'impulsions et de gradients optimisés, mais chaque signal individuel provient exclusivement d'une partie différente du tube le long de l'axe  $z$  (Figure 5). Une diminution de la sensibilité globale est toujours associée à toute expérience sélective en tranches qui est proportionnelle au nombre de tranches  $z$  générées.

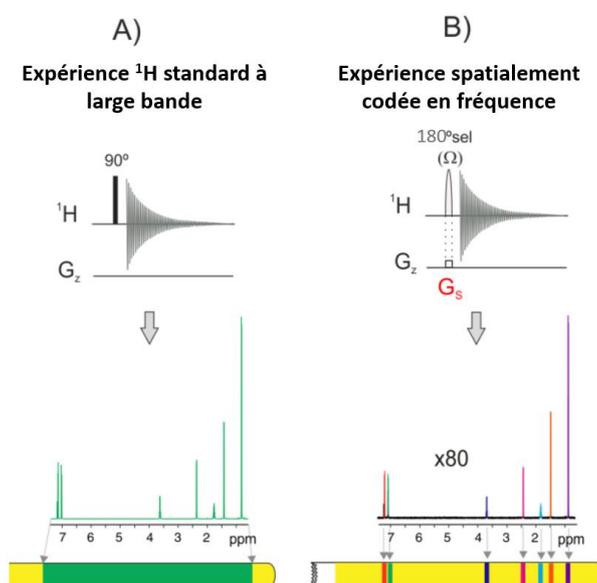


Figure 5. Illustration représentant l'excitation sélective par tranche. A) schéma d'acquisition classique pour obtenir un spectre  $^1\text{H}$  et B) sélection en tranches consistant en l'application simultanée d'une impulsion sélective de  $180^\circ$  et d'un faible gradient de codage ( $G_s$ ). Dans ce dernier cas, le spectre complet est obtenu grâce à la position  $z$  spatialement dépendante de chaque résonance individuelle le long du tube de RMN. Reproduite de la réf.<sup>126</sup>

La sensibilité de cette méthodologie est régie par la proximité des signaux couplés dans le spectre. L'épaisseur des tranches individuelles détermine la sensibilité accessible. Si le couplage est faible, le découplage (ZS) peut être très efficace lorsque de grandes différences de déplacements chimiques permettent l'utilisation d'impulsions de  $180^\circ$  courtes et moins sélectives. Lorsque les différences de déplacements chimiques des paires de protons couplés diminuent, des impulsions de refocalisation

longues et hautement sélectives sont nécessaires. La technique devient moins efficace échouant finalement lors de l'existence de couplages forts en raison de sa faible sensibilité.

Alternativement, une version plus simple en bande sélective (BS) <sup>127-128</sup> a été proposée. Ces méthodes peuvent être considérées comme un cas particulier de la méthode (ZS) dans laquelle aucun gradient de champ n'est appliqué pendant l'impulsion sélective de 180° (Figure 4b). Cela signifie que les spins actifs sont choisis uniquement sur la base du déplacement chimique. Seuls les couplages entre les spins actifs et passifs sont supprimés, tous les couplages entre les spins qui subissent l'impulsion sélective de 180° survivent. Pour cela, cette approche utilise une impulsion de 180° sélective sur un ou plusieurs signaux. Plusieurs options sont envisageables, notamment une fréquence unique, une fréquence multiple ou une sélection en bande couvrant une région spécifique du spectre <sup>1</sup>H. La seule exigence est que l'impulsion sélective choisie ne doit pas affecter des protons mutuellement couplés, pour éviter l'évolution de ce couplage mutuel. Les blocs de bandes sélectives homodécouplés (BASH) <sup>129</sup> et (HOBS) <sup>128</sup> permettent de conserver une sensibilité totale et offre un meilleur rapport signal sur bruit que les autres éléments d'homodécouplage (ZS) et (BIRD). Cependant, ces méthodes offrent un découplage partiel puisque seuls les signaux des protons sélectionnés sont présents dans le spectre.

En 2014, Foroozandeh *et al.* ont proposé la séquence PSYCHE (*Pure Shift Yielded by CHirp Excitation*). <sup>130</sup> Contrairement à la précédente méthode (BS) qui permettait un découplage homonucléaire partiel du spectre, PSYCHE permet de découpler entièrement les signaux du spectre. Si l'approche (ZS) permettait de mesurer chaque déplacement chimique à l'aide d'une tranche différente de l'échantillon, dans la séquence PSYCHE tous les spins sont irradiés dans l'ensemble de l'échantillon. Comme BS, cette méthode présente un intérêt lorsqu'il s'agit de systèmes de spins fortement couplés. Elle implique l'utilisation de deux impulsions CHIRP à faible angle de bascule  $\beta$  appliquée simultanément avec un faible gradient  $z$  de champ magnétique pour recentrer les spins passifs tout en laissant les actifs non perturbés. Les deux impulsions CHIRP agissent comme élément d'inversion sélective (Figure 4d). La sensibilité dépend de l'angle de bascule  $\beta$  de l'impulsion adiabatique. Il est possible de trouver un compromis entre une sensibilité optimale et un homodécouplage à large bande complet de tous les signaux d'un échantillon donné. En pratique, la sensibilité est réduite à 10% par rapport au spectre 1D <sup>1</sup>H conventionnel, mais elle reste supérieure à celles des méthodes précédentes (BIRD) ou (ZS). Le facteur limitant réside dans la présence d'artefacts qui est liée à l'angle de bascule  $\beta$ . Un compromis est à choisir entre un spectre très propre avec de petits artefacts mais une sensibilité moindre et un spectre moins propre avec des artefacts de recoupages plus importants, mais des signaux plus forts.

Plus récemment, Ilgen J. *et al.* ont proposé la séquence PEPSIE (*Perfect Echo Pure Shift Improved Experiment*), <sup>131</sup> une version modifiée de la méthode (ZS) qui améliore grandement la sensibilité et produit des spectres exempts d'artefacts. Cette séquence surmonte l'incapacité de la méthode (ZS) à gérer de petites différences de fréquence. Pour cela, la séquence PEPSIE utilise la combinaison de l'élément d'inversion sélective (ZS) et de l'expérience écho parfait, proposée par Takegoshi *et al.* <sup>132</sup> Contrairement à son prédécesseur qui nécessite une séparation spatiale des signaux dans différentes tranches  $z$  où la paire de spins couplée la plus proche définit l'épaisseur des tranches  $z$  et la sensibilité globale accessible, PEPSIE permet un découplage homonucléaire dans des systèmes fortement couplés même s'ils partagent le même élément de volume (Figure 6), permettant l'application de bandes passantes plus élevées. Plusieurs signaux contenus dans un plus grand volume peuvent être utilisés pour collecter le signal détecté permettant d'atteindre une sensibilité plus élevée sans compromettre la qualité spectrale.

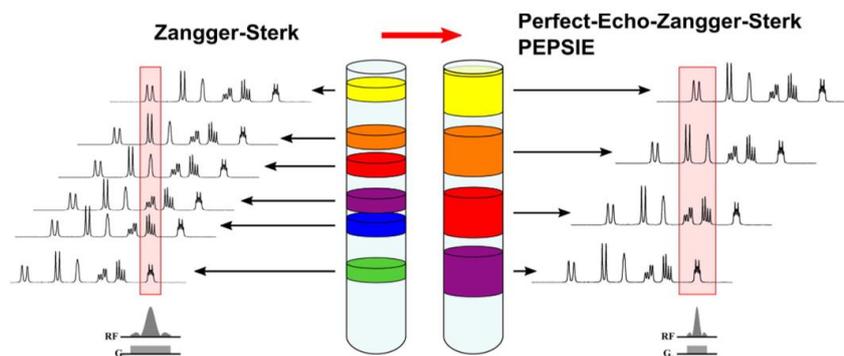


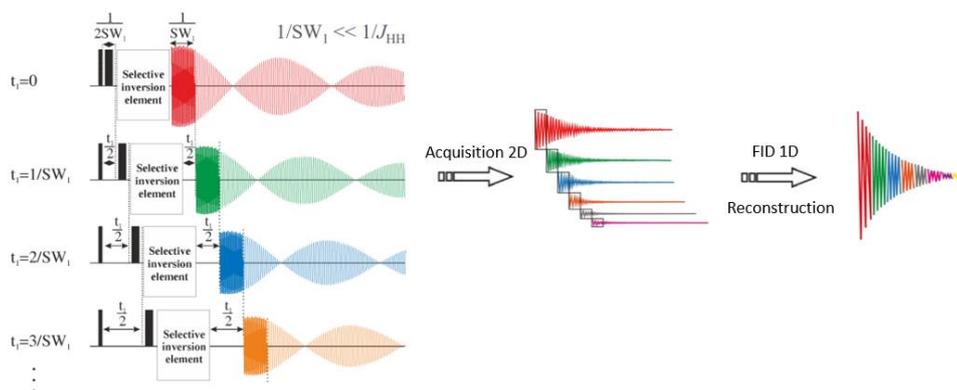
Figure 6. Comparaison du fonctionnement schématique entre les méthodes Zangger-Sterk (ZS) et Perfect-Echo-Zangger-Sterk (PEPSIE). Reproduite de la réf. <sup>131</sup>

Il existe deux stratégies d'acquisition différentes pour réaliser un découplage homonucléaire à large bande. Un mode d'acquisition pseudo-2D basé sur l'interférogramme et un mode d'acquisition en temps réel. La première méthode (l'expérience (ZS) d'origine) utilise une acquisition 2D conventionnelle incrémentée en  $t_1$  suivie d'un traitement de reconstruction de données pour générer une FID homodécouplée 1D (Figure 7A). Le bloc de découplage homonucléaire est placé au milieu d'une période d'évolution  $t_1$  pour refocaliser toute évolution du couplage  $J_{H-H}$ . Le temps d'évolution  $t_1$  est incrémenté selon  $1/SW_1$ , où  $SW_1$  est la largeur spectrale définie dans la dimension indirecte et les 10 premières ms de chaque FID individuelle sont sélectionnées et mises bout à bout pour une nouvelle reconstruction de la FID. Il est très important que le déplacement chimique évolue sans perturbation entre les morceaux successifs, tandis que les effets de couplages- $J$  doivent revenir à zéro au milieu de chaque morceau. Le spectre 1D homodécouplé final est obtenu après transformation de Fourier conventionnelle (Figure 7A). En cas de grandes constantes de couplage scalaire, les incréments doivent être réglés sur des valeurs plus petites afin d'éviter l'évolution du couplage scalaire. Cette transformée de Fourier s'accompagne de la présence d'artefacts autour de chaque signal découplé, comparable à ceux des satellites <sup>13</sup>C.

Cette **approche est compatible avec toutes les méthodes décrites précédemment**. En raison du mode d'acquisition 2D, **cette stratégie pseudo-2D présente un autre inconvénient. Elle prend plus de temps qu'une expérience 1D standard** qui est proportionnelle au nombre d'incrément  $t_1$  collectés. Typiquement 5 à 10 min sont requis pour obtenir des résultats raisonnables.

En revanche, dans l'acquisition en temps réel tous les morceaux sont acquis dans le cadre d'une seule FID dans une seule expérience. Cette méthode n'est pas compatible avec l'expérience PSYCHE. L'acquisition subit de brèves interruptions tous les  $\tau$  pour refocaliser le couplage scalaire (Figure 7B). Les morceaux de données de la FID sont mis bout à bout pour former la FID entièrement découplée. Cette expérience homodécouplée en temps réel réduit le temps expérimental par rapport à la méthode pseudo-2D. En revanche, la qualité spectrale est compromise. En effet, pendant les interruptions de l'acquisition, l'aimantation décroît, comme le montre la Figure 7B de la FID reconstruite, introduisant des discontinuités d'amplitude dans la FID finale qui entraînent davantage d'artefacts et un élargissement du signal dû à une relaxation  $T_2$  plus courte. De plus, pour les noyaux fortement couplés, les signaux ne peuvent pas être découplés efficacement. Il est donc conseillé de garder les interruptions aussi courtes que possible.

A) Acquisition pseudo-2D ou interférogramme



B) Acquisition en temps réel

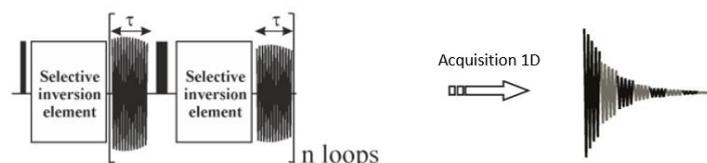


Figure 7. Schémas généraux menant à des spectres de RMN  $^1\text{H}$  homodécouplés à large bande. A) Mode d'acquisition pseudo-2D qui consiste en l'enregistrement d'un ensemble de données 2D suivi d'une reconstruction de la FID à partir des morceaux de données initiaux de chaque incrément. B) Mode d'acquisition en temps réel qui incorpore périodiquement le bloc de découplage homonucléaire au milieu de l'acquisition de la FID.

2.1.2. Les améliorations des méthodes pure shift et l'analyse des mélanges

Depuis la revue proposée par Foroozandeh M. *et al.* sur les récentes applications de l'expérience PSYCHE en 2018,<sup>133</sup> de nombreuses expériences ont été introduites. C'est le cas des expériences (BIRD)-TOCSY<sup>134</sup> ou (ZS) CPMG-HSQMBC<sup>135</sup> pour les mesures précises des couplages hétéronucléaires, des expériences 2D PSYCHE-DIAG<sup>136</sup> ou 2D CASCADE<sup>137</sup> pour la mesure sélective des petites constantes de couplages, de l'expérience PSYCHE-EASY-ROESY pour l'observation directe des NOE intermoléculaires dans des spectres encombrés,<sup>123</sup> de l'expérience COPAM-2D-J pour l'étude de composés dans un champ magnétique non homogène ou encore ATP-2D-J pour la suppression des artefacts provenant de couplages forts.<sup>138</sup>

Dans la littérature, il existe un certain nombre d'exemples récents où les méthodes de découplage homonucléaire à large bande ont été employées pour l'analyse de mélanges. Dans la plupart d'entre eux, un bloc d'impulsions d'homodécouplage est mis en œuvre dans une séquence DOSY pour améliorer la dispersion des signaux, évitant ainsi le chevauchement des signaux qui conduit à des coefficients de diffusion translationnelle incorrects. C'est le cas de l'expérience PSYCHE-iDOSY<sup>139</sup> et (ZS)-iDOSY<sup>140</sup> pour l'analyse de molécules de faibles poids moléculaires et pour différencier un mélange d'isomères de vitamine D<sub>3</sub> et provitamine D<sub>3</sub>.<sup>133</sup> Plus récemment, elle a été utilisée pour l'analyse d'une huile de pyrolyse.<sup>141</sup> D'autres nouvelles séquences basées sur l'expérience DOSY ont été proposées pour analyser un mélange de composés contenant de l'œstradiol, du 2,3-dihydrofurane et du géraniol<sup>142</sup> ou pour analyser un mélange d'alcools issus d'une réaction électrochimique « *in-situ* ». <sup>96</sup>

D'autres séquences impliquent l'expérience 1D PSYCHE-TOCSY pour l'analyse d'un mélange dérivé de biomasse,<sup>143</sup> l'utilisation d'une expérience (ZS)-HSQC<sup>144</sup> ou (BIRD)-HSQC pour l'identification et la quantification de métabolites en mélange<sup>145</sup> ainsi que son implication dans une superséquence imbriquée (comme expliqué en 2.5.2.1.) pour améliorer la dispersion des signaux dans l'analyse d'un mélange de monosaccharides.<sup>28</sup>

Comme expliqué précédemment, les expériences pure shift ne sont pas parfaites et souffrent d'artefacts pouvant interférer avec l'étude de composants présents en faibles concentrations. Ces expériences présentent des artefacts périodiques appelés bandes latérales, générés par l'évolution résiduelle du couplage  $J$ . Les signaux d'intérêts et les bandes latérales peuvent avoir des intensités similaires de phases opposées (Figure 8).

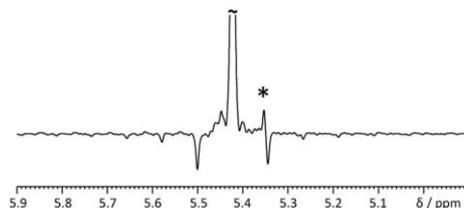


Figure 8. Artefacts périodiques présents dans un spectre de pure shift d'un mélange qui contient 97,2% du médicament anticholestérol rosuvastatine et 2,8% de son précurseur, le BEM. Le précurseur est marqué d'un astérisque. Reproduite de la réf. <sup>146</sup>

Par conséquent, leur chevauchement peut entraîner une distorsion ou même une disparition du signal d'intérêt. Dans le cas de l'analyse des mélanges, la présence des bandes latérales entrave l'identification et la quantification des impuretés dans les spectres avec des signaux dominants provenant de molécules concentrées. A ce titre, le groupe de Manchester « *NMR Methodology Group* » a développé récemment l'expérience SAPHIRE-PSYCHE <sup>14</sup> pour l'investigation de six types de groseilles. Cette méthode supprime les artefacts afin d'obtenir des spectres « ultra-propres ». Les résultats ont révélé la présence de l'acide glutamique, un métabolite qui n'est pas observé en utilisant les méthodes pure shift classiques.

## 2.2. Les méthodes alternatives pour l'analyse des mélanges

Récemment, d'autres méthodes alternatives n'impliquant pas de découplage mais plutôt un filtre pour supprimer les signaux satellites  $^{13}\text{C}$  se sont avérées intéressantes pour analyser les composés présents en très faibles quantités dans des mélanges complexes. Une solution consiste à utiliser les expériences ODYSSEUS pour enregistrer des spectres  $^{19}\text{F}$  dépourvus des signaux d'isotopomères  $^{13}\text{C}$  plutôt qu'un découplage  $^{19}\text{F}$ - $^{13}\text{C}$  qui ne fait que de réduire de moitié le nombre de ces signaux. <sup>15</sup> Ces expériences peuvent, par exemple, présenter un intérêt en chimie thérapeutique où un quart des médicaments actuels contiennent du fluor. Cependant, la grande majorité des expériences utilise la RMN  $^1\text{H}$  où l'approche utilisant l'expérience ODYSSEUS n'est pas directement applicable. De plus, une plage de déplacement chimique plus étroite augmente le risque d'une confusion entre une superposition des signaux appartenant aux espèces minoritaires et ceux appartenant aux satellites  $^{13}\text{C}$ . Pour cela, une nouvelle expérience baptisée « DISPEL » consiste à supprimer les signaux satellites  $^{13}\text{C}$  dans les spectres  $^1\text{H}$  sans avoir la nécessité d'un découplage  $^{13}\text{C}$  à large bande, permettant de retrouver les composés en quantités minoritaires (Figure 9).

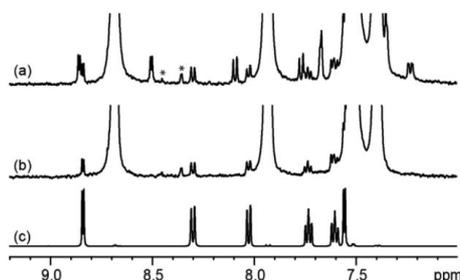


Figure 9. (a) Spectre  $^1\text{H}$  conventionnel et (b) spectre DISPEL  $^1\text{H}$  d'un échantillon de 30 mM de quinine dans le DMSO- $d_6$ . (c) Spectre  $^1\text{H}$  de la cinchonidine pour comparaison. Les astérisques indiquent des signaux provenant d'impuretés. Reproduite de la réf. <sup>16</sup>

Enfin, au laboratoire Canton M. *et al.* ont proposé en 2020 une multiple présaturation des signaux intenses de solvant en spectroscopie de RMN  $^{13}\text{C}$ , adaptée à l'analyse d'extraits complexes de plantes. <sup>147</sup> L'avantage tirée de cette opération est l'élimination des éventuels artefacts issus des signaux du

solvant dans des conditions de découplages non optimisées. La suppression des artefacts a permis de retrouver le signal d'un composé mineur contenu dans le glycérol biosourcé.

### 2.3. Les expériences permettant de décomposer le mélange complexe en sous-spectres

Comme vu dans la section précédente, l'utilisation des méthodes de découplages homonucléaires à large bande peuvent être d'une grande aide pour analyser les spectres de RMN contenant des chevauchements importants de signaux. Cependant, l'amélioration de la dispersion des signaux sur le spectre de RMN a un prix en terme de sensibilité, dans la plupart des cas. Surtout lorsque des informations structurales doivent être extraites pour les composants individuels d'un mélange, la RMN de découplage homonucléaire à large bande peut ne pas être suffisante car la suppression des signaux d'un multiplet peut entraîner une perte d'information importantes concernant la structure chimique. Parmi les récentes avancées méthodologiques employées dans l'analyse de molécules de petites tailles en mélange, certaines d'entre-elles ont pour but de décomposer le spectre de RMN encombré de plusieurs espèces en sous-spectres, facilitant une analyse plus fine des spectres individuels. Ces expériences contournent les limitations des expériences 2D courantes. Plusieurs expériences de ce type ont été proposées depuis 2017 jusqu'à maintenant : REST (*Relaxation Encoded Selective TOCSY*),<sup>13</sup> SCALPEL (*Spectral Component Acquisition by Localized PARAFAC Extraction of Linear components*),<sup>12</sup> FESTA (*Fluorine-Edited Selective TOCSY Acquisition*),<sup>11</sup> la chimiodétection basée sur la RMN <sup>19</sup>F<sup>10</sup> ou encore GEMSTONE (*Gradient-Enhanced Multiplet-Selective Targeted-Observation NMR Experiment*).<sup>9</sup>

L'édition SCALPEL<sup>12</sup> est une nouvelle méthodologie permettant de décomposer un spectre complexe de RMN <sup>1</sup>H en procédant étape par étape par « dissection » du spectre de RMN <sup>1</sup>H plutôt que d'utiliser plusieurs échantillons. Cette méthode entre dans la catégorie des méthodes puissantes de décomposition tensorielle et peut être appliquée à n'importe quel échantillon unique ou immuable.

Cette expérience permet de « disséquer » des spectres complexes au « coup par coup », en se concentrant sur de petites régions spectrales individuelles. Elle utilise une analyse multivariée pour extraire les spectres des systèmes de spins couplés qui ont une résonance dans cette région, même lorsque leurs spectres se chevauchent fortement. L'objectif consiste à analyser toutes les espèces présentes en solution en réduisant le nombre de signaux excités dans une acquisition donnée, pour restreindre le nombre d'espèces différentes observées. Comme l'expérience REST<sup>13</sup> proposée par les mêmes auteurs, cette méthode peut exploiter les propriétés de relaxation ( $T_1$ ,  $T_2$ ) ou utiliser le codage de diffusion en combinaison avec le codage d'évolution TOCSY- $t_1$  (Figure 10).

Contrairement à la diffusion, la relaxation dépend de l'environnement chimique d'un noyau individuel. Différents protons dans une espèce donnée auront en général des temps de relaxation différents, excluant à première vue l'utilisation de la relaxation pour différencier les signaux des différentes espèces à la manière de DOSY. Cependant, les différences de relaxation entre différents composés peuvent être exploitées pour séparer les signaux dans des expériences qui combinent des excitations sélectives pour garantir que tous les signaux mesurés pour une espèce donnée proviennent d'un seul proton.<sup>13</sup>

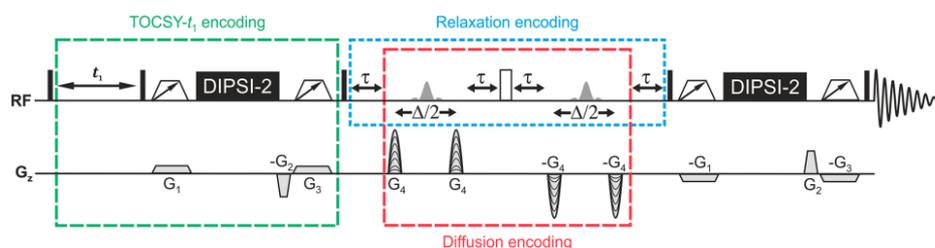


Figure 10. Séquence d'impulsions pour les expériences SCALPEL utilisant le codage d'évolution TOCSY- $t_1$  (décrit en vert) et le codage de diffusion (décrit en rouge) ou de relaxation  $T_2$  (décrit en bleu). Reproduite de la réf.<sup>12</sup>

La séquence d'impulsions SCAPEL permet de coder la dépendance du temps d'évolution TOCSY- $t_1$  (décrit en vert) à une deuxième dimension possible, soit la relaxation (décrit en bleu) ou la diffusion (décrit en rouge). Le temps d'évolution  $t_1$  correspond à un signal modulé en amplitude qui est fonction des constantes de couplage  $J$  dans le système de spin. Ainsi, lorsque certaines valeurs  $t_1$  sont choisies, seule une petite portion de signaux est sélectionnée. Ces derniers sont codés par des impulsions CHIRP et le transfert d'aimantation entre les protons partageant le même système de spin est assuré par l'élément DIPSI-2. Ensuite, suivant la deuxième dimension choisie, la variable sera différente. Pour le codage par diffusion, les délais  $\tau$  seront maintenus constants et la variable sera l'intensité des gradients  $G_4$ , tandis que pour le codage par relaxation, les intensités des gradients  $G_4$  seront maintenues constantes et les délais  $\tau$  seront incrémentés.

Dal Poggetto G. *et al.* ont mis leur méthodologie à profit pour analyser une bière forte et extraire des spectres propres de différents systèmes de spin d'unités glucose diversement fonctionnalisées à partir du spectre de RMN  $^1\text{H}$  hautement complexe (Figure 11).

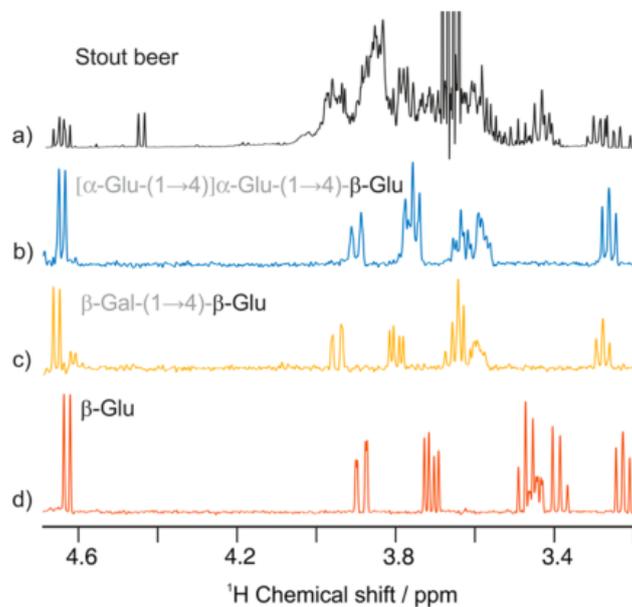


Figure 11. Spectres 1D de RMN  $^1\text{H}$  d'une bière forte révélant un haut degré de complexité dissous dans  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (80:20, v/v) (a) et le résultat des expériences SCALPEL 1D (1 h 49 min) pour les composants terminaux du  $\beta$ -glucose, du maltose/maltotriose, du lactose et du glucose libre respectivement (b-d). Reproduite de la réf. <sup>12</sup>

Le spectre de RMN  $^1\text{H}$  conventionnel d'un échantillon de bière forte montre une région fortement encombrée, avec des signaux provenant principalement des glucides et de l'éthanol (Figure 11a). La méthode SCALPEL consiste à acquérir des données expérimentales en utilisant une séquence d'impulsions TOCSY sélective à bande étroite dans laquelle uniquement les signaux anomériques autour de 4,65 ppm sont codés avec deux types de marquage sélectif d'espèce (ici la diffusion et l'évolution TOCSY- $t_1$ ). Il devient alors possible d'extraire les sous-spectres à trois composantes (Figure 11b-d). La diffusion étant l'une des dimensions utilisées ici, il est également possible de classer les composés par taille depuis le plus grand (b) au plus petit (d). Le maltose et le maltotriose (b) n'ont pas pu être séparés car les spectres de leurs fragments terminaux  $\beta$ -glucose présentent le même déplacement chimique. La Figure 11 ne montre qu'une petite fraction de la fenêtre spectrale occupée par la bière. L'application de la méthode SCALPEL à d'autres régions spectrales permettrait à son tour de disséquer une plus grande partie du spectre. Cela a été démontré par Dal Poggetto G. *et al.* <sup>12</sup> en remplaçant le codage de la diffusion par celui de la relaxation transversale  $T_2$ . Les auteurs ont ainsi incrémenté les délais  $\tau$  au lieu de l'amplitude du gradient  $G_4$  qui est resté constant.

Ainsi, l'introduction d'une nouvelle classe d'expériences SCALPEL constitue une autre approche pour analyser des mélanges complexes, à condition que les données expérimentales ne soient pas superposées comme démontré dans l'exemple précédent.

Une nouvelle autre approche qui a su élargir l'applicabilité de l'excitation sélective est l'expérience GEMSTONE.<sup>9</sup> Cette méthode utilise similairement l'excitation sélective d'une résonance d'intérêt dans un spectre 1D  $^1\text{H}$  pour cibler des groupements chimiques individuels. Un problème majeur, cependant, réside dans les spectres de RMN  $^1\text{H}$  qui se chevauchent souvent de manière extensive, de sorte qu'en pratique, seule une minorité de sites peut être sélectivement excitée. Ce problème peut être contourné en utilisant une expérience NOESY 1D sélective à multiplet amélioré par gradient (PIERRE GEMME) à scan unique, permettant une excitation sélective des signaux d'un multiplet de protons uniques. Contrairement à l'expérience SCALPEL qui ne peut pas différencier des composés si les déplacements chimiques sont indiscernables, l'expérience GEMSTONE le permet, même lorsqu'un signal est particulièrement superposé par la présence d'autres multiplets. C'est ce que Kiraly P. *et al.* ont démontré en étudiant deux composés présentant une forte superposition de signaux : un stéroïde 17 $\beta$ -estradiol dissous dans le DMSO- $d_6$  et un produit carbocyclique dissous dans du  $\text{CDCl}_3$ .<sup>9</sup>

Par exemple, le spectre de RMN  $^1\text{H}$  du stéroïde 17 $\beta$ -estradiol a révélé une superposition des signaux entre 1,7 et 1,9 ppm contenant les protons 7b, 12b et 16a qui se trouvent dans trois cycles différents de la structure (Figure 12e).

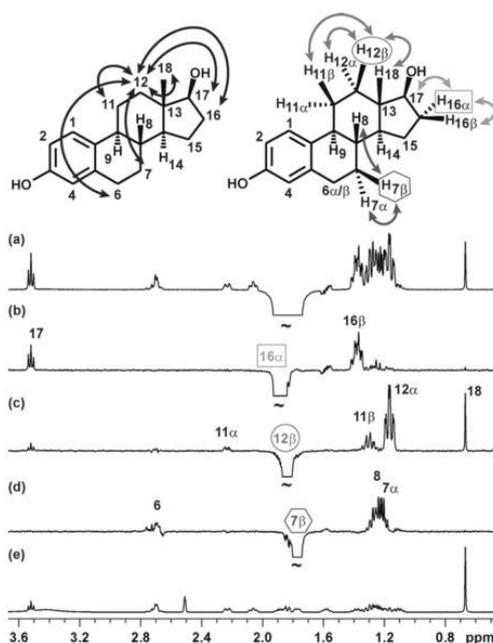


Figure 12. (a) NOESY 1D sélective conventionnelle, (b-d) NOESY 1D GEMSTONE et (e) Spectres de RMN  $^1\text{H}$  de l'œstradiol dissous dans le DMSO- $d_6$ . Une interprétation sans ambiguïté nécessite la sélectivité unique fournie par l'approche GEMSTONE. Les temps d'acquisition pour les expériences NOA (a-d) étaient de 12 min ; NS = 128. Reproduite de la réf.<sup>9</sup>

L'excitation sélective conventionnelle (Figure 12a) a permis de sélectionner les trois protons simultanément, ce qui rend les NOE observés dans une expérience NOESY 1D ambigus (flèches représentées en noire sur la molécule) et inutiles pour l'élucidation de la structure. En revanche, les différents NOE des trois multiplets ont pu être observés individuellement à l'aide de l'expérience GEMSTONE (Figure 12b-d) (flèches représentées en gris sur la molécule). La sélectivité obtenue a permis une interprétation sans ambiguïté des spectres NOESY et l'attribution de la stéréochimie. Par exemple, l'ambiguïté dans l'attribution du  $\text{H}_{12\alpha}$  ou  $\text{H}_{12\beta}$  qui sont situés au-dessus et en-dessous de la structure plane du stérane, peut être résolue en identifiant un NOE avec l'un des  $\text{H}_{17}$  ou  $\text{H}_{18}$ .

Si cette méthode a pour le moment été appliquée sur des composés purs, sa robustesse et son efficacité permettent, sans aucun doute, l'analyse de mélanges complexes par RMN. Ces mêmes

auteurs ont ainsi illustré l'efficacité de leur méthode sur un mélange de trois alcaloïdes de quinquina.  
9

Dans le cas où les molécules en mélange contiennent des hétéronoyaux, ces derniers peuvent être exploités pour améliorer la dispersion des signaux dans les spectres de RMN 1D et ainsi faciliter l'attribution des résonances qui appartiennent à différents systèmes de spin. Grâce au couplage scalaire, l'aimantation d'un hétéronoyau <sup>148-149</sup> peut être sélectivement transférée à son partenaire <sup>1</sup>H couplé, puis à tous les membres d'un même système de spin, conduisant à un sous-spectre <sup>1</sup>H unidimensionnel rapidement acquis. Cette approche est particulièrement utile dans les mélanges contenant du fluor, qui deviennent de plus en plus courants dans l'industrie pharmaceutique, par exemple comme les agents anticancéreux, les antidépresseurs ou encore les antimicrobiens. <sup>150</sup>

C'est l'objectif de l'expérience FESTA <sup>11</sup> qui vise à individualiser les spectres individuels de composés contenant du fluor en mélange en permettant la mesure de spectres <sup>1</sup>H qui ne contiennent que des protons appartenant au même système de spin qu'un <sup>19</sup>F choisi. La méthodologie FESTA fournit des sous-spectres de RMN <sup>1</sup>H d'une manière similaire à une expérience TOCSY 1D sélective conventionnelle en excitant un signal à la fois puis en transférant son aimantation aux noyaux avec lesquels il couple. Cependant, contrairement aux expériences TOCSY 1D sélectives, l'approche FESTA bénéficie d'une haute dispersion du signal sur une large gamme de déplacement chimique (environ 500 ppm) et n'est pas limitée par le chevauchement du signal <sup>1</sup>H.

Afin de mettre en place les expériences FESTA, les déplacements chimiques du <sup>1</sup>H et du <sup>19</sup>F à sélectionner doivent être connus ou déterminés expérimentalement. Dans la mesure du possible, les valeurs de  $J_{HF}$  et le nombre de noyaux du <sup>19</sup>F doivent être déterminées afin de définir les délais optimaux pour le système H-F étudié. Un bon point de départ est d'acquérir les spectres de RMN 1D <sup>1</sup>H et <sup>19</sup>F avec et sans découplage. Dans les mélanges complexes avec beaucoup de signaux qui se chevauchent, il peut être difficile d'extraire les informations requises. Il peut être envisageable d'utiliser la séquence INEPT qui inverse sélectivement l'élément <sup>19</sup>F seul afin de déterminer les protons qui sont couplés au noyau <sup>19</sup>F sélectionné. Une autre option, consiste à utiliser des expériences de pure-shift, telle que la méthode PSYCHE <sup>133</sup>, précédemment expliquée, pour déterminer les constantes des couplages hétéronucléaires sans interférence avec les couplages homonucléaires.

Barbosa, T. M. *et al* ont démontré l'application de leur méthode sur un mélange de cinq composés contenant le 1-chloro-1,1-difluoropentan-2-ol, la dexaméthasone, le 2-fluorophénol, le 3-fluorophénol et le 4-fluorophénol (Figure 13).

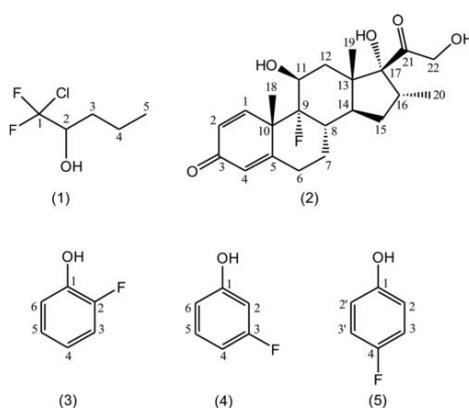


Figure 13. Mélange de composés contenant le 1-chloro-1,1-difluoropentan-2-ol (1), la dexaméthasone (2), le 2-fluorophénol (3), le 3-fluorophénol (4) et le 4-fluorophénol (5). Reproduite de la réf. <sup>11</sup>

Les composants du mélange ont été choisis pour représenter différents types de système de spin contenant du fluor. Le chloro-1,1-difluoropentan-2-ol (1) montre des atomes de fluor diastérotopes avec un couplage scalaire homonucléaire (<sup>2</sup> $J_{FF}$ ). La dexaméthasone (2) a un atome de fluor dans le cadre

d'un système de spin étendu. Le 2-fluorophénol (**3**), le 3-fluorophénol (**4**) et le 4-fluorophénol (**5**) présentent des signaux de protons aromatiques fortement couplés dans une plage de déplacement chimique étroite (6,50-7,35 ppm) avec certains signaux qui se chevauchent (Figure 14).

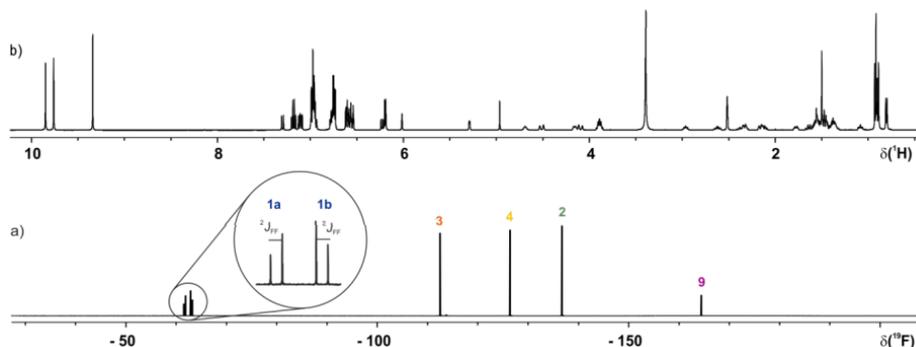


Figure 14. Spectres 1D conventionnels  $^{19}\text{F}$  (a) et  $^1\text{H}$  (b) du mélange de composés étudiés. Reproduite de la réf. <sup>11</sup>

La présence de tous ces éléments dans le mélange entraîne une augmentation du chevauchement des signaux sur le spectre  $^1\text{H}$  (Figure 15b). En revanche, l'analyse du spectre de RMN 1D  $^{19}\text{F}$  est plus aisée en raison de la dispersion des signaux sur une plus large gamme spectrale (Figure 15a).

L'application de la méthodologie FESTA permet d'acquérir l'ensemble des sous-spectres des composés, pour chacune des résonances  $^{19}\text{F}$  sélectionnées (Figure 15). Une séparation nette de tous les sous-spectres est obtenue, malgré la congestion spectrale.

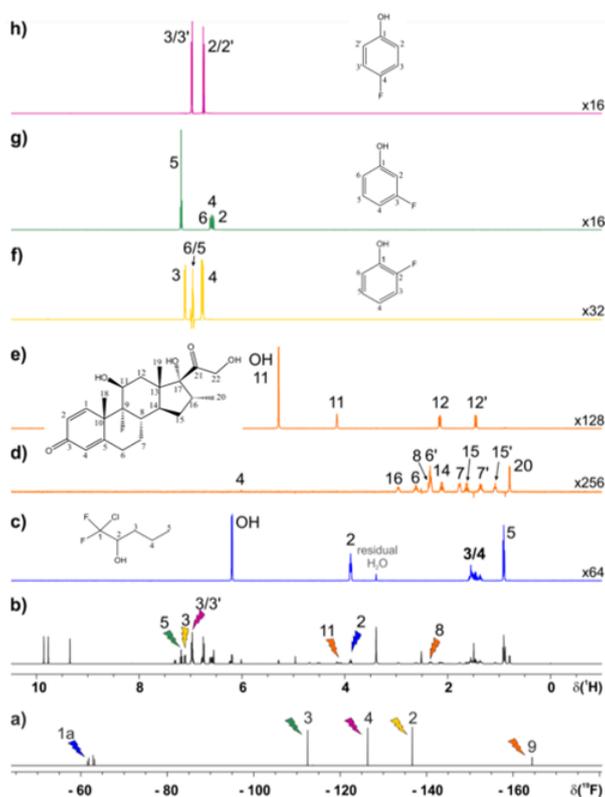


Figure 15. Spectres 1D conventionnels  $^{19}\text{F}$  (a) et  $^1\text{H}$  (b) du mélange des cinq composés étudiés. (c-h) Spectres de l'expérience MODO-FESTA des composants individuels. Reproduite de la réf. <sup>11</sup>

Par exemple, les résultats de l'expérience montrent que le composé (**1**) est isolé par l'application d'une impulsion sélective à l'une des résonances diastérotopes du  $^{19}\text{F}$  à - 61,71 ppm (Figure 15a) permettant de recentrer la résonance  $^1\text{H}$  à 3,89 ppm (Figure 15b). C'est sur la base de ce schéma que les spectres des autres composés ont été obtenus.

Néanmoins, l'application des impulsions sélectives ne se fait pas sans obstacle. Des artefacts sont à prévoir en fonction de la concentration du soluté et de la durée de l'impulsion utilisée pour exciter le signal d'intérêt. En effet, des bandes passantes petites donnent des spectres plus propres avec des artefacts plus petits mais avec un rapport signal/bruit plus faible en raison d'une plus grande relaxation pendant l'impulsion sélective. Des bandes passantes plus larges donnent un meilleur signal/bruit mais avec des artefacts accrus en raison d'une suppression plus faible des signaux indésirables.

Une autre méthode récente basée sur la RMN  $^{19}\text{F}$  utilise la chimiodétection <sup>10</sup> qui est devenue un outil précieux pour l'analyse de mélanges complexes. Cette approche s'est avérée utile pour la détection d'acides aminés, <sup>151</sup> de nitriles par des méthodes d'encapsulation <sup>152</sup> et pour l'identification des ingrédients du thé et boissons énergisantes. <sup>153</sup> Le principe repose sur la liaison réversible entre des analytes et un « capteur marqué au  $^{19}\text{F}$  » qui produit des singulets sur le spectre de RMN  $^{19}\text{F}$ . Le capteur joue le rôle « de substrat » dans lequel « se greffe » les analytes (Figure 16). <sup>10</sup>

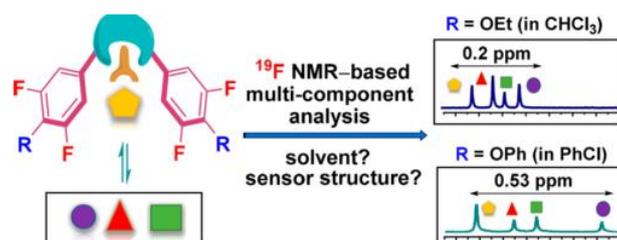


Figure 16. Représentation schématique de l'influence du solvant et de la structure du capteur jouant le rôle de « substrat » pour améliorer la dispersion des signaux issus des analytes jouant le rôle « d'enzymes ». Reproduite de la réf. <sup>10</sup>

Dans cette stratégie, la coordination d'analytes à un complexe métallique (le capteur) avec une fente de liaison ouverte génère des « structures statiques » à l'échelle de temps de RMN. Des signaux uniques sont créés en plaçant stratégiquement des atomes de fluor à proximité immédiate des analytes liés de sorte que de petites différences structurales induisent des déplacements chimiques de RMN  $^{19}\text{F}$  distincts qui peuvent être utilisés pour identifier chaque analyte. Comme la variation des déplacements chimiques du  $^{19}\text{F}$  marqué par le capteur peut être minime en fonction de la forme plus ou moins similaire des analytes, un chevauchement potentiel des signaux de RMN  $^{19}\text{F}$  limite encore le nombre d'analytes pouvant être différenciés.

L'intérêt d'une telle procédure dépendra de la nature du solvant qui influencera directement l'efficacité de la dispersion des signaux (Figure 17). La haute sensibilité des déplacements chimiques de la RMN  $^{19}\text{F}$  à son environnement local et le faible niveau de signaux interférents, doit permettre à cette méthodologie de fonctionner sur des mélanges complexes sans avoir la nécessité d'une séparation.

L'utilité de cette méthode a été illustrée pour l'identification de quatre métabolites en mélange de structures voisines : phénylalanine, tyramine, tryptamine et sérotonine dissous dans du  $\text{CDCl}_3$  et pour 17 composés biologiques de structures plus ou moins proches dissous dans un mélange chlorobenzène/méthanol (2:1, v/v).

Par exemple, dans le cadre du mélange des 4 amines, la séparation des signaux de RMN  $^{19}\text{F}$  diffère significativement dans des solvants de polarités distinctes (Figure 17).

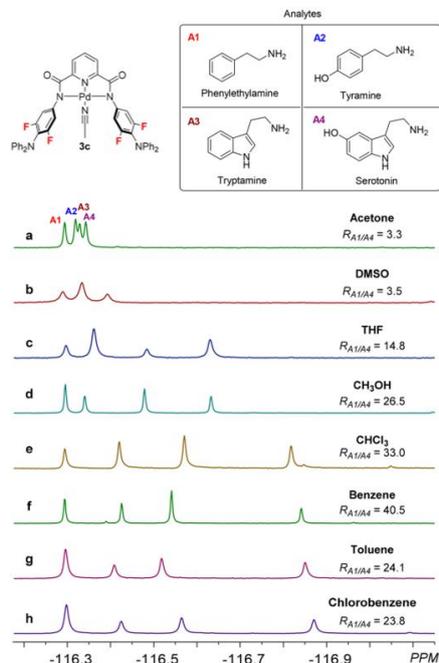


Figure 17. Etude de l'impact d'une variété de solvants sur la capacité de la dispersion des signaux de la RMN  $^{19}\text{F}$ . (a-h) Spectre de RMN  $^{19}\text{F}$  de solutions contenant quatre amines (0,5 mM chacune) et le complexe 3c (2,0 mM) dans divers solvants. Les déplacements chimiques du  $^{19}\text{F}$  des complexes 3c avec une phénéthylamine liée ont tous été calibrés à  $-116,3$  ppm. Reproduite de la réf. <sup>10</sup>

Ces observations ont suggéré que les solvants non polaires étaient pertinents pour une meilleure dispersion des résonances  $^{19}\text{F}$  (Figure 17e-h). La plus grande séparation des signaux  $^{19}\text{F}$  pour les analytes A1 et A4 a été obtenue dans le chlorobenzène, probablement en raison de son interaction  $\pi$ - $\pi$  préférable avec la paroi latérale fluorée du capteur 3c. Cette étude a montré que l'optimisation des conditions expérimentales par l'usage d'une variété de solvants est un moyen efficace de rechercher la meilleure dispersion des signaux dans le spectre de RMN  $^{19}\text{F}$ . Après avoir identifié les paramètres clés dictant la dispersion du signal, 21 analytes d'intérêt biologiques ont été analysés en mélange en présence de deux capteurs, nommés 3a et 3c pour l'analyse de RMN  $^{19}\text{F}$  (Figure 18). En raison de la solubilité distincte des analytes, un mélange chlorobenzène/méthanol (2:1, v/v) a été utilisé comme solvant binaire.

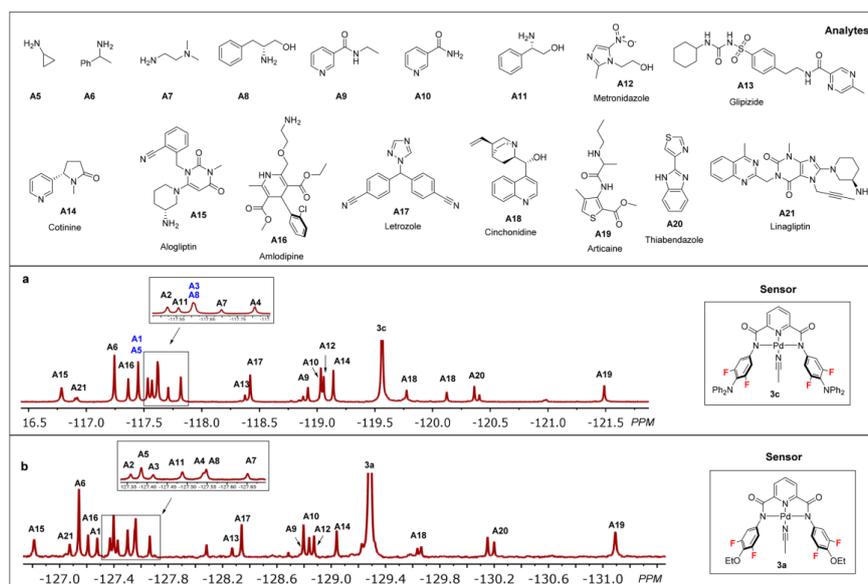


Figure 18. Analyse d'un mélange complexe de 20 analytes par chimiodétection de RMN  $^{19}\text{F}$  discriminante. (a) Spectres de RMN  $^{19}\text{F}$  contenant 21 analytes différents (0,23 mM chacun) et des complexes 3c (6,3 mM) dissous dans du chlorobenzène/méthanol (2:1, v/v). (b) Spectres de RMN  $^{19}\text{F}$  contenant 21 analytes différents (0,01 mM chacun) et des complexes 3a (0,28 mM) dissous dans du chlorobenzène/méthanol (2:1, v/v). Reproduite de la réf. <sup>10</sup>

L'inconvénient d'une telle procédure nécessite dans un premier temps que les spectres de RMN  $^{19}\text{F}$  de chaque analyte soient réalisés en amont de façon à déterminer le déplacement chimique du signal unique  $^{19}\text{F}$  caractéristique de l'analyte complexé au capteur.

Les résultats obtenus ont montré que les deux capteurs 3a et 3c permettaient de révéler des signaux  $^{19}\text{F}$  bien résolus et facilement attribuables aux différentes molécules en solution. Une inspection minutieuse des spectres a révélé que la capacité de disperser les signaux selon le type de capteurs 3a ou 3c est légèrement différente. Par exemple, le capteur 3a offre une dispersion des signaux supérieure pour les analytes A1 et A5, tandis que des signaux de RMN  $^{19}\text{F}$  encombrés ont été observés lors de l'utilisation du capteur 3c.

Ces observations ont révélé qu'une sélection prudente du capteur pourrait fournir une dispersion améliorée du signal d'un ensemble donné d'analytes. Il est à noter que les signaux de RMN  $^{19}\text{F}$  sont corrélés à la quantité de capteurs liés à l'analyte cible. Par conséquent, l'intégration du signal de RMN  $^{19}\text{F}$  ne reflète que la concentration de l'analyte lié. Pour mesurer la concentration, un étalon interne de concentration connue peut être utilisé pour construire la courbe d'étalonnage pour la quantification de l'analyte cible. Ces différents résultats ont montré que la chimiodétection basée sur la RMN  $^{19}\text{F}$  est une méthode en plein essor pour l'analyse de mélanges complexes.

A travers cette section, nous avons montré différentes approches 1D récentes permettant de décomposer un spectre complexe en sous-spectres. Que ce soit à travers des expériences d'excitation sélective de résonances telles que GEMSTONE et SCALPEL ou en exploitant la diversité des hétéronoyaux à travers les approches FESTA et de chimiodétection par RMN du  $^{19}\text{F}$ , ces méthodes ont toutes des avantages et des inconvénients. Si l'approche SCALPEL a montré son efficacité pour « disséquer » un spectre complexe en sous-spectres, elle reste néanmoins limitée dans le cas d'une superposition de résonances ayant des déplacements chimiques très similaires. Tandis que l'expérience GEMSTONE permet de contourner le problème de la superposition des résonances ayant les mêmes déplacements chimiques, cette méthode nécessite toutefois, l'acquisition d'expériences 2D conventionnelles pour obtenir les informations nécessaires à l'élucidation de structures présentant des diastéréoisomères. L'expérience FESTA quant-à-elle, présente l'avantage d'exploiter la large gamme spectrale du  $^{19}\text{F}$  pour sélectionner une résonance de RMN  $^{19}\text{F}$  et la transférer aux protons appartenant à la même molécule. Cependant, un compromis entre le rapport signal sur bruit et la présence d'artefacts liée à l'application d'impulsions sélectives, est à trouver. Enfin, la chimiodétection de la RMN du  $^{19}\text{F}$ , est une méthode qui, bien que robuste pour analyser un mélange de plus de 20 composés, nécessite de réaliser plusieurs essais en testant différents capteurs et solvants afin de trouver la combinaison la plus adaptée pour analyser le mélange. L'inconvénient d'une telle procédure se situe au niveau des spectres de RMN  $^{19}\text{F}$  de chaque analyte qui doivent être réalisés en amont de façon à déterminer le déplacement chimique du signal unique  $^{19}\text{F}$  caractéristique de l'analyte complexé au capteur.

## 2.4. L'analyse des mélanges par la RMN multi-quanta

### 2.4.1. L'approche Maxi-Quanta (MaxQ)

La richesse des spectres de RMN de mélanges de composés naturels pose de forts défis aux capacités analytiques de la RMN. Les résonances qui se chevauchent sont souvent issues de fragments moléculaires distincts faisant partie de la même molécule ou appartenant à différents composés. Outre les difficultés à distinguer les résonances qui se chevauchent, la situation est encore plus compliquée par les grandes variations de concentration des éléments du mélange. Des techniques adéquates pour résoudre ces problèmes doivent dans la mesure du possible fournir une meilleure dispersion du signal sans perdre la capacité d'élucider la structure des composés. L'isolement en sous-spectres de chacun

des systèmes de spin est une stratégie efficace pour l'analyse de tels spectres de RMN complexes, telle que les expériences permettant de décomposer le mélange complexe en sous-spectres, comme vu précédemment.

Une autre alternative consiste à utiliser la RMN Multi-Quanta (MQ) qui a initialement été introduite dès les débuts de la RMN multidimensionnelle.<sup>154-156</sup> Cette méthode permet d'isoler, dans un spectre de RMN d'un mélange, les résonances appartenant à des fragments moléculaires portant un nombre déterminé de protons  $p$  couplés entre eux. Au fur et à mesure que la valeur sélectionnée de  $p$  augmente, de plus en plus de fragments moléculaires sont retirés du spectre de RMN par l'intermédiaire d'un filtre quanta multiple. La détection des cohérences multi-quanta (MQ) permet de caractériser les signaux retenus par leur fréquence d'évolution dans la dimension indirecte d'une simple expérience bidimensionnelle. Ses applications les plus courantes sont retrouvées dans les expériences homonucléaires à deux quanta, telles que la méthode DQF-COSY<sup>83</sup> permettant de filtrer les signaux non informatifs proches de la diagonale pour faciliter l'analyse des pics croisés, l'expérience INADEQUATE  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ <sup>157</sup> permettant de déterminer des corrélations d'une liaison entre carbones voisins ( $^1J_{\text{C-C}}$ ) ou dans la mise en place de corrélation hétéronucléaires, comme dans l'expérience HMQC.<sup>158</sup>

Une autre propriété de l'expérience MQ bidimensionnelle, est que le nombre le plus élevé possible de quanta excitables (appelé ordre quanta maximum, MaxQ) fournit des dispositions de pics de corrélation très simples à analyser. Un seul signal dans la dimension indirecte est corrélé permettant de révéler les pics appartenant à un fragment spécifique dans le spectre de RMN 1D  $^1\text{H}$ . Contrairement à d'autres méthodes de RMN 2D populaires telles que HSQC ou TOCSY, le protocole RMN MaxQ a montré un potentiel original pour la séparation des composés en mélange, puisqu'il identifie successivement des fragments moléculaires en fonction de leur nombre de protons. La méthode a trouvé des applications dans la discrimination d'un grand nombre de molécules dans un mélange d'origine synthétique ou naturelle. C'est le cas par exemple pour la caractérisation de la région aromatique des spectres de RMN  $^1\text{H}$  dans un mélange d'hydrocarbures mono- et polyaromatiques,<sup>159</sup> de composés phénoliques à la fois dans un mélange modèle et dans l'huile d'olive,<sup>18, 20</sup> dans des molécules pertinentes pour l'environnement<sup>21</sup> et pour la caractérisation rapide de la cocaïne dans des échantillons de drogues illicites.<sup>19</sup>

L'amélioration de la dispersion des signaux par l'expérience MaxQ découle d'une réduction spectaculaire du nombre de signaux, due à deux facteurs. Premièrement, seuls les fragments moléculaires des protons couplés entre eux peuvent produire des signaux MQ, fournissant un premier filtre. Secondairement, plus l'ordre est élevé, moins il y a de signaux avec le cas limite d'un simple singulet pour l'ordre MaxQ (Figure 19).

	0Q	1Q	2Q	3Q	4Q	5Q
ABC	6	15	6	1		
ABCD	27	56	28	8	1	
ABCDE	110	210	120	45	10	1

Figure 19. Nombre maximal de résonances attendues dans différents systèmes de spin en fonction de l'ordre de cohérence observé. Reproduite depuis la réf.<sup>17</sup>

Par exemple, dans un réseau de cinq spins couplés, il y a un maximum d'environ 200 signaux de RMN qui peuvent être compressés en un singulet en observant indirectement la transition à cinq quanta associée à ce réseau. Cette approche facilite l'identification des molécules dans le mélange analysé. Pour les fragments moléculaires ne possédant pas le même nombre de protons couplés, plusieurs ordres  $p$  doivent en principe être envisagés pour obtenir une analyse complète. La première

preuve de principe de la spectroscopie MaxQ a été apportée en testant son pouvoir de dispersion du signal sur un mélange de 11 composés aromatiques (Figure 20).<sup>159</sup>

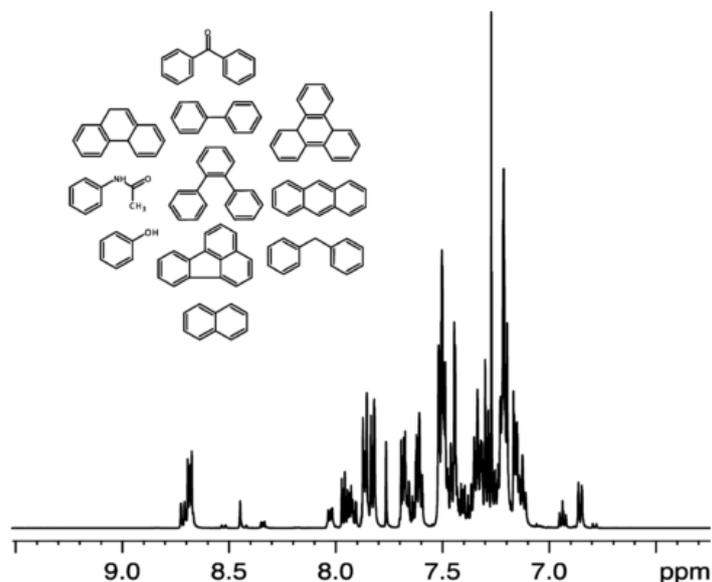


Figure 20. Spectres 1D de RMN  $^1\text{H}$  d'un mélange test de 11 molécules aromatiques. Le nombre total de protons est de 104 avec 28 déplacements chimiques différents. Reproduite depuis la réf.<sup>159</sup>

La Figure 20 représente la région des signaux aromatiques du spectre 1D  $^1\text{H}$  encombré avec 104 protons aromatiques pour 28 déplacements chimiques. Le défi analytique vient des protons aromatiques qui résonnent dans une petite fenêtre spectrale de moins de 2 ppm, avec environ 80% des signaux concentrés dans la région de 7,1 à 8,1 ppm. La taille des systèmes de spins des protons aromatiques varie de deux à cinq protons, ce qui fixe le plus grand nombre de quanta excitable à 5Q. Une série de tous les spectres de corrélations MQ possibles est illustrée à la Figure 21.

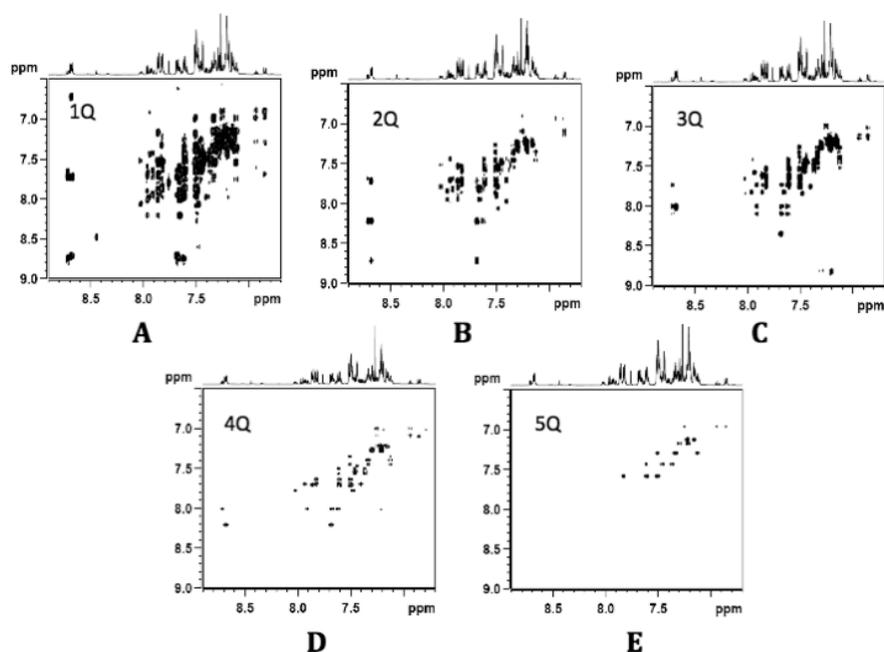


Figure 21. Série de spectres de corrélations MQ du mélange avec l'ordre de cohérence avec  $p = 1$  à 5 (A-E). La complexité spectrale diminue avec le nombre de quanta, du fait de la simplification progressive du spectre dans la dimension indirecte et du filtrage de certains fragments moléculaires. La corrélation 5Q ne présente que des signaux MaxQ. Reproduite de la réf.<sup>159</sup>

Une simplification progressive des signaux avec  $p$  croissant est due à deux phénomènes : d'une part, seuls les systèmes de spin avec le moins de protons couplés persistent dans la dimension 1Q expliquant la zone encombrée (Figure 21A) ; puis les signaux MQ persistants ont une structure de plus

en plus fine à mesure que  $p$  augmente. Le spectre de corrélation 5Q correspondant à l'expérience MaxQ, peut être utilisé pour faciliter la reconnaissance de six molécules monosubstituées (Figure 21E), du fait que tous les protons du fragment contribuent à un signal unique dans la dimension MaxQ (Figure 22).

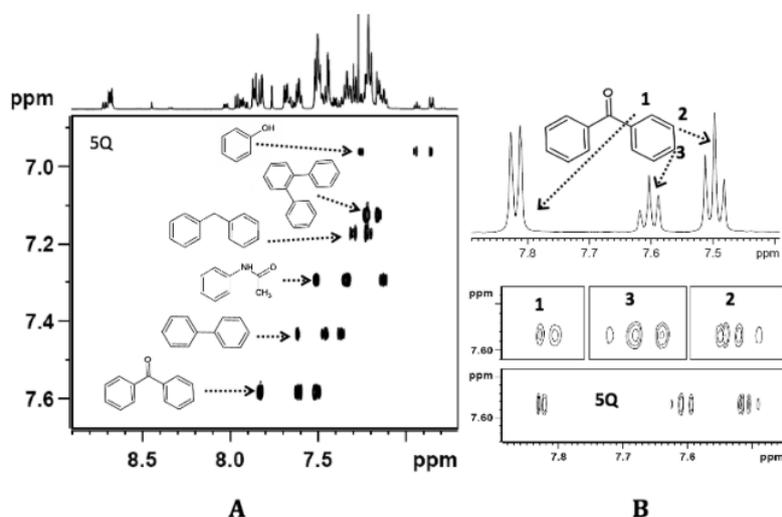


Figure 22. (A) Expansion de la région aromatique du spectre de corrélation 5Q et (B) détails du signal MaxQ de la benzophénone. Le spectre 1D <sup>1</sup>H est montré pour la comparaison de la structure du multiplet. Reproduite de la réf. <sup>159</sup>

L'information obtenue dans le spectre MaxQ est semblable à celui de l'expérience TOCSY mais avec une disposition simplifiée qui améliore la dispersion des signaux. Pour l'attribution, la structure du multiplet et le déplacement chimique des molécules individuelles peuvent être extraits, comme l'atteste la Figure 22B. La position de la résonance unique de chaque fragment dans la dimension MaxQ (indirecte), est située à la fréquence moyenne des protons participants. Ce dernier est toujours un singulet. <sup>160</sup> Dans l'article de Dalvit C., ce principe a très bien été décrit en simulant deux spectres 2D à double quanta (DQ) d'un système de spin AMX. <sup>161</sup>

Un aspect crucial à déterminer dans l'approche MaxQ est la sensibilité de l'intensité des signaux qui varie fortement avec la durée du retard  $\tau$  dans la séquence employée <sup>162-163</sup> (Figure 23) et par d'autres facteurs tels que la relaxation  $T_1$ , les effets de couplages- $J$ , la composition du mélange, la température et par le solvant. <sup>22</sup>

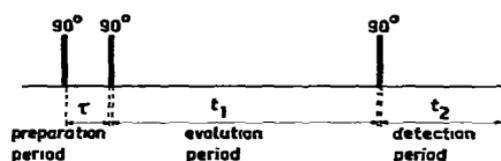


Figure 23. Représentation schématique de la séquence d'impulsions de base pour créer et détecter des cohérences multi-quanta. Deux impulsions séparées du retard  $\tau$  sont nécessaires pour créer des cohérences quantas multiples, qui évoluent pendant  $t_1$ . La troisième impulsion de 90° permet de transformer la cohérence quanta multiple en cohérence quanta unique, qui est détectée après un délai supplémentaire  $t_2$ . Reproduite de la réf. <sup>163</sup>

Si la durée du retard  $\tau$  n'est pas assez optimisée, elle pourrait entraîner l'absence de certains composants. L'inhomogénéité de l'intensité des signaux produite par un seul choix  $\tau$  a conduit Reddy *et al.* en 2013 à proposer une gamme de valeurs  $\tau$  séquentielle pour améliorer la sensibilité sur une molécule modèle et sur deux mélanges. Leurs applications ont été testées sur une molécule modèle, le phénanthrène, puis sur deux mélanges de composés de petites tailles (Figure 24).

Une série de mesures avec des délais  $\tau$  variant de 10 à 1000 ms permet de cartographier les différences d'intensité entre les composés mais une réduction du rapport signal sur bruit (SNR) peut être observée si certaines des valeurs  $\tau$  choisies produisent des cohérences MQ de faibles intensités. L'ajout de composés supplémentaires complique le choix de la liste de valeurs de  $\tau$  la plus efficace.

Plusieurs valeurs de  $\tau$  peuvent, en principe, correspondre à une intensité optimale pour les différents composés. Par exemple, les signaux de l'anthracène filtrés à 4Q sont dominants pour une valeur de  $\tau = 100$  ms, tandis que pour cette même valeur de  $\tau$ , les signaux provenant des autres composants ont des intensités négligeables. Les signaux filtrés 4Q des autres molécules sont généralement moins intenses mais deviennent détectables vers  $\tau = 320$  ms. Une région pour laquelle les signaux de l'anthracène disparaissent presque. Le compromis évident de l'utilisation d'une série de valeurs de  $\tau$  est qu'aucune valeur ne peut être optimale pour toutes les molécules.

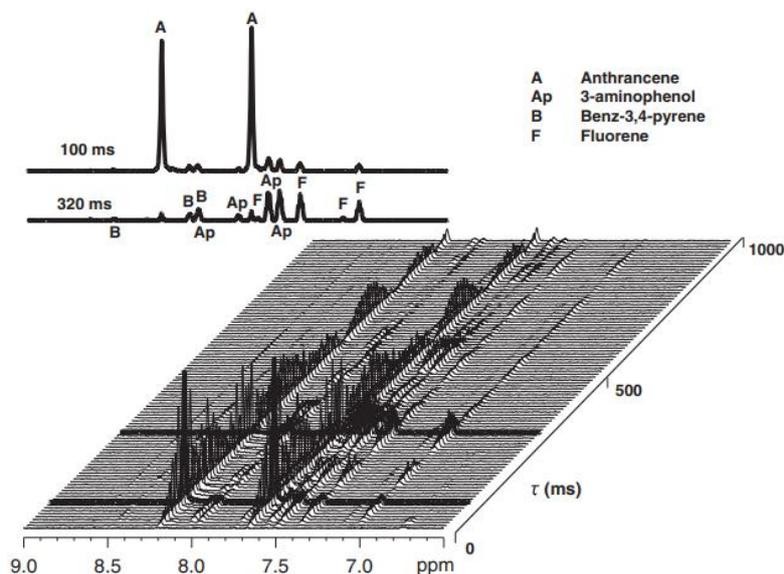


Figure 24. Evolution des signaux 4Q d'un mélange test contenant du fluorène, de l'anthracène, du benz-3,4-pyrène et du 3-aminophénol en fonction du délai  $\tau$ . En haut : spectres correspondant à 100 et 320 ms, mettant en évidence une forte variation relative de l'intensité de la composante. En bas : évolution complète des signaux 4Q sur une place de 10 à 1000 ms. Reproduite de la réf. <sup>22</sup>

Ainsi, alors que les spectres deviennent plus homogènes en intensité, la sensibilité peut être quelque peu réduite. Les avantages à utiliser une telle préparation de multiples délais de  $\tau$  par rapport à une préparation conventionnelle à une seule valeur de  $\tau$  sont représentés sur le spectre de corrélation 2D 4Q (Figure 25).

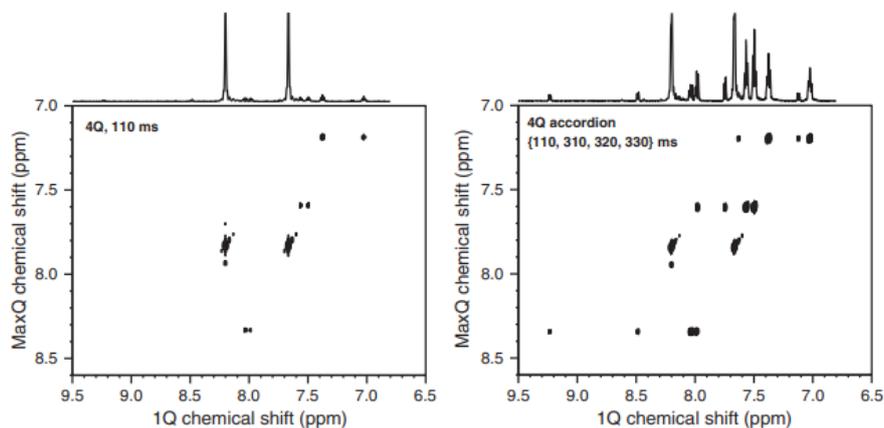


Figure 25. Spectres de corrélation MaxQ 4Q d'un mélange test enregistré à des moments expérimentaux identiques, avec un schéma de préparation conventionnel  $\tau = 110$  ms (à gauche) et en présence de quelques valeurs de  $\tau$  soigneusement sélectionnées « en accordéon » (à droite). Reproduite de la réf. <sup>22</sup>

Reddy *et al.* ont ainsi démontré qu'une co-addition synchronisée de plusieurs valeurs de  $\tau$  soigneusement sélectionnées représentait une meilleure stratégie pour récupérer l'homogénéité de la réponse du filtre MQ. Par exemple, le spectre de gauche a révélé un signal prédominant de l'anthracène avec une seule valeur de  $\tau = 110$  ms alors qu'à droite, l'utilisation séquentielle de quatre

valeurs de  $\tau$  (110, 310, 320 et 330 ms) a permis de récupérer une bien meilleure homogénéité du signal.

Ces différents travaux démontrent que l'approche MaxQ peut s'ajouter aux récents outils expérimentaux pour analyser les mélanges complexes. De plus, comme cette approche améliore la dispersion du signal dans la dimension indirecte en simplifiant grandement l'allure des spectres, Reddy G. N. *et al.* ont démontré, la même année, qu'il était possible de quantifier 16 polluants d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) en mélange en utilisant la spectroscopie MaxQ.<sup>21</sup>

Compte tenu des récents avancements réalisés et de son efficacité pour isoler des fragments moléculaires individuels permettant d'élucider la structure de composés en mélange, la spectroscopie MaxQ a récemment été combinée avec l'expérience DOSY pour l'analyse d'un mélange composé de molécules de petites tailles : anthracène, phénanthrène, naphthalène et fluorine, à travers une expérience 3D MaxQ-DOSY.<sup>75</sup>

#### 2.4.2. La RMN multidimensionnelle « rapide »

Ces dernières années, l'analyse des mélanges complexes a suscité un intérêt qui s'est développé à travers la RMN multidimensionnelle « rapide ». Ces techniques ont été élaborées à la base pour améliorer les expériences 2D conventionnelles qui nécessitent majoritairement de longues durées d'acquisition. Le développement de nouvelles méthodologies « rapides » est devenu aujourd'hui incontournable pour l'analyse des mélanges complexes et plusieurs approches combinées ont déjà été élaborées pour diminuer le temps expérimental. Par exemple, les stratégies de collectes de données telles que les expériences *Non-Uniform Sampling* (NUS) ont déjà été étudiées pour obtenir des spectres 2D à très haute résolution dans un temps d'acquisition relativement court,<sup>164</sup> ou pour des études quantitatives.<sup>165</sup> La méthodologie Hadamard a également été utilisée pour la métabolomique ciblée,<sup>166</sup> lors d'une expérience 3D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  TOCSY-HSQC pour démêler les signaux des métabolites et permettant d'accéder au profilage complet d'un mélange modèle dans un plan de projection 2D ciblé<sup>167</sup> ou en combinaison avec des expériences SOFAST<sup>168</sup> pour diminuer le temps expérimental. Ces techniques restent néanmoins limitées par la présence d'artefacts, par le manque de résolution mais aussi par l'impossibilité parfois d'associer ces méthodes intéressantes.

La section suivante se limitera aux récentes méthodologies considérées comme attrayantes dans la littérature et employées pour l'élucidation structurale de petites molécules en solution. Cette section vise dans un premier temps à explorer les principales expériences NOAH, qui reposent sur une succession de séquences imbriquées, et leurs implications dans de nouvelles séquences cherchant à optimiser toujours plus de paramètres tels que le gain de temps et la résolution jugés parfois insuffisants pour élucider les structures de composés de faibles masses en mélange. Dans un second volet, les expériences basées sur l'encodage spatial tel que l'« *UltraFast* » seront détaillées de leurs principes à leurs applications récentes.

##### 2.4.2.1. Les expériences NOAHs

La caractérisation structurale de petites molécules implique généralement la collection d'une série d'expériences de RMN 2D qui sont combinées pour élucider la connectivité des atomes au sein de la molécule et ainsi définir sa structure primaire. Ce principe repose en routine sur une série d'expériences de corrélation homonucléaire  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  et hétéronucléaire  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ . De telles expériences sont collectées sous la forme d'une série de spectres 2D individuels. Les exigences de temps pour chacune des expériences étant définies non seulement par les exigences fondamentales de sensibilité

(nombre de FID collectées) et de résolution (nombre d'incrément employés) mais aussi par la nécessité de donner suffisamment de temps entre les FID acquises pour que l'aimantation nucléaire redevienne proche de sa position d'équilibre. Le délai de relaxation  $d_1$  est typiquement l'élément le plus long de toute séquence d'impulsions. Bon nombre de ces expériences peuvent être combinées dans des « superséquences » de RMN qui fournissent les informations structurales requises en une seule mesure permettant de gagner un temps considérable. Par exemple, l'expérience PANACEA (*Parallel Acquisition NMR, an All-in-one Combination of Experimental Applications*)<sup>169-171</sup> combine les séquences d'impulsions INADEQUATE, HSQC et HMBC en une seule entité permettant l'élucidation de la structure des composés à partir d'une mesure unique. Cependant, l'expérience PANACEA est basée sur la séquence 2D INADEQUATE  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  qui nécessite une concentration élevée de l'échantillon et/ou de longs temps d'acquisitions.<sup>172</sup> Alternativement, Kupče Ě. *et al* ont récemment proposé la possibilité d'enregistrer plusieurs expériences bidimensionnelles simultanément dans des séquences imbriquées en utilisant la « RMN par acquisition ordonnée utilisant la détection  $^1\text{H}$  » ou superséquence NOAH.<sup>23</sup> Elle permettent d'obtenir l'ensemble des informations scalaires et dipolaires en une seule expérience. La notion de séquences imbriquées a déjà été introduite il y a longtemps avec l'expérience COSY/NOESY (COCONOSY)<sup>173</sup> qui a produit des spectres 2D COSY et NOESY séparés à partir de la même expérience. Les deux expériences 2D partagent le même délai de relaxation  $d_1$  et la même période d'évolution  $t_1$  avec l'acquisition COSY se produisant dans le temps de mélange NOESY, fournissant ainsi les deux expériences dans le temps requis pour une expérience NOESY seule. Ici, plusieurs expériences homonucléaires et hétéronucléaires sont enchaînées en un seul balayage avec la présence d'un seul délai de relaxation  $d_1$  pour toutes les acquisitions offrant ainsi un gain de temps significatif par rapport à l'approche conventionnelle. Les superséquences NOAH sont construites dans un ordre approprié en reliant des séquences de RMN individuelles spécialement adaptées (modules NOAH) selon le principe des dominos, la sortie personnalisée d'un module sert d'entrée au module suivant (Figure 26).<sup>23</sup>

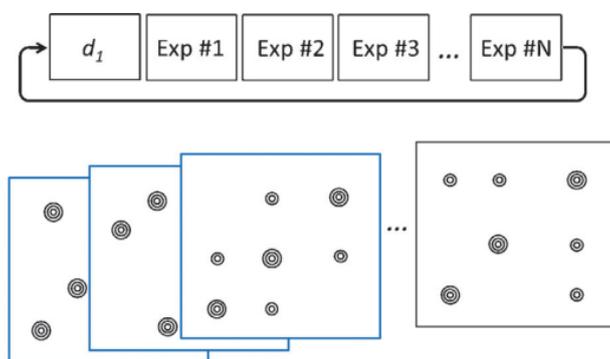


Figure 26. Représentation des superséquences NOAHs contenant un seul délai de relaxation  $d_1$  pour l'ensemble des modules  $N = X$  séquences imbriquées, permettant de gagner beaucoup de temps. Reproduite depuis la réf.<sup>23</sup>

La principale exigence pour que deux expériences ou plus soient enregistrées successivement par une séquence NOAH est que l'aimantation inutilisée d'une séquence initiale doit être préservée pour être utilisée dans la ou les expériences suivantes. Les échantillons étant constitués d'atomes en abondance naturelle tels que le carbone ou l'azote, il est nécessaire de préserver ~99% de l'aimantation du  $^1\text{H}$  non liée au  $^{13}\text{C}$  ou  $^{15}\text{N}$  dans les expériences hétéronucléaires pour une application ultérieure dans les expériences homonucléaires, telles que COSY, NOESY ou TOCSY.<sup>29</sup> A ce jour, ces expériences ont été utilisées principalement pour l'élucidation structurale de petites molécules purifiées<sup>25-26</sup> avec des échantillons disponibles à des concentrations abondantes de l'ordre de 20 à 100 mM, à travers une série d'expériences qui peut être acquise en quelques secondes.<sup>174-177</sup>

En plus des gains de temps importants apportés par l'approche NOAH, les spectres sont enregistrés dans des conditions expérimentales identiques éliminant ainsi la variabilité entre les expériences. Il existe plus de 250 combinaisons de type NOAH possibles.<sup>23</sup> Les modules NOAH imbriqués sont désignés par une lettre : S (HSQC), B (HMBC), Q (HMQC), C (COSY), D (DQF-COSY), T (TOCSY), N (NOESY) et R (ROESY) (Figure 27).

No.	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	NOAH code
1	<sup>13</sup> C HSQC	COSY	–	–	SC
2	<sup>13</sup> C HSQC	NOESY	–	–	SN
3	<sup>13</sup> C HSQC	TOCSY	–	–	ST
4	<sup>13</sup> C HSQC	DQFCOSY	–	–	SD
5	<sup>13</sup> C HSQC	<sup>13</sup> C HMBC	–	–	SB
6 <sup>[a]</sup>	<sup>13</sup> C HMQC	COSY	–	–	MC
7	<sup>13</sup> C HMQC	NOESY	–	–	MN
8	<sup>13</sup> C HMQC	TOCSY	–	–	MT
9 <sup>[b]</sup>	<sup>13</sup> C HMQC	<sup>13</sup> C HMBC	–	–	MB
10	<sup>13</sup> C HMQC	NOESY	–	–	MN
11	COSY	NOESY	–	–	CN
12	<sup>15</sup> N HMQC	<sup>13</sup> C HSQC	COSY	–	MSC
13	<sup>15</sup> N HMQC	<sup>13</sup> C HSQC	NOESY	–	MSN
14	<sup>15</sup> N HMQC	<sup>13</sup> C HSQC	TOCSY	–	MST
15	<sup>15</sup> N HMQC	<sup>13</sup> C HSQC	DQFCOSY	–	MSD
16	<sup>15</sup> N HMQC	<sup>13</sup> C HSQC	<sup>13</sup> C HMBC	–	MSB
17	<sup>15</sup> N HMQC	COSY	NOESY	–	MCN
18	<sup>13</sup> C HMQC	<sup>13</sup> C HMBC	COSY	–	MBC
19	<sup>13</sup> C HMQC	<sup>13</sup> C HMBC	DQFCOSY	–	MBD
20	<sup>13</sup> C HSQC	COSY	NOESY	–	SCN
21	<sup>13</sup> C HSQC	<sup>13</sup> C HMBC	COSY	–	SBC
22	<sup>13</sup> C HSQC	<sup>13</sup> C HMBC	DQFCOSY	–	SBD
23	<sup>15</sup> N HMQC	<sup>13</sup> C HSQC	COSY	NOESY	MSCN
24	<sup>15</sup> N HMQC	<sup>13</sup> C HSQC	<sup>13</sup> C HMBC	COSY	MSBC

Figure 27. Exemples de combinaisons utiles de superséquences NOAH 2D employées pour caractériser les composés. Les lignes en gras indiquent ceux utilisant trois canaux radiofréquences (<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N), les autres n'en nécessitent que deux (<sup>1</sup>H/X). Reproduite depuis la réf.<sup>23</sup>

A travers leurs travaux, Kupce E. *et al* ont envisagé plusieurs combinaisons possibles de modules NOAH imbriqués, allant de 3 modules (NOAH-3) à 5 modules (NOAH-5).<sup>23-25, 27</sup> Ils ont ainsi représenté les forces et faiblesses de chacune des expériences où l'ordre d'enchaînement des modules dans une superséquence NOAH a son importance. Par exemple, les expériences de bases généralement utilisées pour élucider la structure de petites molécules organiques comprennent les expériences 2D HSQC <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C, HMBC <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C et COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H. Ces modules peuvent être liés dans une superséquence NOAH-3.<sup>26-27</sup> Des informations supplémentaires sur la structure spatiale des molécules peuvent être obtenues en incorporant les modules N (NOESY) ou R (ROESY) qui aboutissent à des superséquences (NOAH-4) de type BSCN ou BSCR.<sup>25</sup> Les molécules contenant de l'azote peuvent également nécessiter des expériences de corrélation <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N pour fournir des informations importantes sur la position des atomes d'azotes dans la molécule, conduisant à l'expérience NOAH-4 MSBC.<sup>27</sup> Pour cela, le module M (HMQC) <sup>15</sup>N est préféré au module S (HSQC) <sup>15</sup>N car le premier préserve plus efficacement l'aimantation globale dans le reste de la séquence. Par la suite, d'autres nouvelles classes d'expériences NOAH ont été proposées très récemment en 2020<sup>28</sup> et 2021.<sup>29</sup>

Néanmoins, même si les superséquences NOAHs constituent une solution élégante pour « accélérer » les acquisitions, ces expériences souffrent de quelques inconvénients, notamment un nombre de scans (NS) et un nombre de points (TD1) identiques pour toutes les séquences imbriquées entraînant parfois, un faible rapport signal sur bruit avec la présence éventuelle d'artefacts pour l'expérience arrivant au bout du bloc de superséquences. De plus, elles ne permettent pas d'acquérir des données en un temps record comme celui obtenu avec les méthodes basées sur l'encodage spatiale. La mise au point de telles séquences pour un non spécialiste peut devenir assez difficile car, ces expériences alternatives appelées ultrarapides ou « *UltraFast* » (UF) doivent répondre aux

exigences de temps, en enregistrant des spectres de l'ordre de la seconde voire de quelques centaines de millisecondes.

#### 2.4.2.2. Les expériences « UltraFast » (UF)

Cette section traite de l'une des méthodes multidimensionnelles rapides les plus récentes, l'expérience de RMN dite « ultrarapide ». Cette méthodologie a été proposée pour la première fois en 2002 par Frydman *et al.* dans le but de collecter des spectres de RMN 2D homo- ou hétéronucléaires en une seule répétition, permettant d'enregistrer des données simultanément plutôt que consécutivement. Cette technique a été développée dans le but de pallier l'acquisition des expériences 2D conventionnelles qui sont de longues durées. Contrairement aux expériences NOAH qui permettent d'enregistrer successivement une série de spectres 2D en réduisant convenablement le temps d'acquisition grâce à la présence d'un seul délai de relaxation  $d_1$  pour l'ensemble du bloc de séquences, l'expérience UF repose sur le principe de l'encodage spatial, similaire à la technique pure-shift (ZS) détaillée dans la section 2.1. de cette partie, permettant de réduire la durée d'acquisition à une fraction de seconde.<sup>178</sup> La RMN UF utilise un changement méthodologique par rapport aux méthodes 2D standards, dans lequel le codage temporel du domaine indirect en RMN 2D simple est remplacé par un schéma de codage spatial. Ce dernier est suivi d'une période de mélange conventionnelle et d'un bloc de détection basé sur l'imagerie spectroscopique planaire écho (EPSI).<sup>30</sup> Cet évènement a ouvert une nouvelle dimension pour l'investigation des systèmes à dynamiques rapides et des espèces intermédiaires instables. Plusieurs revues traitant de la RMN UF ont déjà été publiées : Frydman *et al.* ont proposé en 2015 une compréhension approfondie de la théorie pour la mise en place des expériences UF,<sup>33</sup> tandis que Giraudeau P. et Frydman L. ont expliqué ce principe à partir du point de vue de la chimie analytique en 2014,<sup>32</sup> avant que Gouilleux B. et Giraudeau P. ne rendent compte des dernières améliorations méthodologiques apportées par la RMN UF jusqu'en 2018.<sup>35</sup> La même année, Dumez J.-N. a répertorié l'ensemble des méthodes basées sur l'encodage spatial et celles utilisant une sélection spatiale dérivée de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) (Tableau 1).<sup>34</sup>

Method	Parallellised quantity	Purpose	Spatial selection	Spatially-resolved acquisition
UF/SPEN 2D NMR (ultrafast/spatially-encoded)	Indirect evolution time	Accelerate 2D experiments	No	Yes
UF/SPEN DOSY	Gradient area	Accelerate DOSY experiments	No	Yes
UF/SPEN inversion-recovery	Recovery delay	Accelerate $T_1$ measurements	No	Yes
UF/SPEN Z spectroscopy	Frequency offset for the selective irradiation	Accelerate CEST experiments	No	Yes
Zangger-Sterk decoupling	Frequency offset of the active spin	Homonuclear broadband decoupling	Yes	No
G-SERF	Frequency offset of the active spin	Accurate measurement of J couplings	Yes	No
Thrippleton-Keeler Z filter	Delay	Efficient suppression of zero-quantum pathways	No	No
PSYCHE	Delay	Efficient suppression of coherence-transfer pathways	No	No

Tableau 1. Représentation des méthodes basées sur l'encodage spatiale et celles utilisant une sélection spatiale. Reproduite de la réf.<sup>34</sup>

Cette section a pour but d'expliquer les principes fondamentaux et les spécificités de l'expérience ultrarapide en s'appuyant sur les revues mentionnées précédemment. Elle constituera un point d'ancrage parmi un ensemble de méthodes dédiées à l'analyse des mélanges complexes. Cette partie sera présentée ultérieurement à travers des expériences UF combinées avec d'autres techniques. Elle servira également pour la compréhension des mécanismes de réactions ayant des durées de vie très limitées et qui ne peuvent être analysés aussi efficacement, à l'heure actuelle, par aucune autre méthode de RMN n'impliquant pas l'encodage spatial. Ce dernier point sera discuté dans la partie I-C portant sur le suivi réactionnel par la spectroscopie de RMN.

### 2.4.2.2.1. Principe de la méthode

L'expérience de RMN 2D ultrarapide est une approche qui utilise des concepts de l'IRM. En IRM, le codage spatial permet d'acquérir des données de l'image de la coupe du corps humain sous forme fréquentielle dans un espace  $k$  où est enregistré le signal. Depuis que la méthode *Echo Planar Imaging* (EPI) a été développée en IRM permettant l'acquisition d'une image 2D en un seul balayage,<sup>30</sup> des tentatives ont été faites pour transposer cette idée dans la spectroscopie de RMN. Une approche plus générale pour obtenir un spectre 2D en un scan a été développée en 1983<sup>30</sup> et a consisté à utiliser l'espace  $k$  pour cartographier les déplacements chimiques. L'étape qui a permis cette cartographie appelée encodage spatial, est développée par Frydman *et al.*<sup>178</sup> La caractéristique principale des expériences de RMN 2D ultrarapides est le remplacement du codage temporel du domaine indirect dans les expériences conventionnelles par un codage spatial (Figure 28).

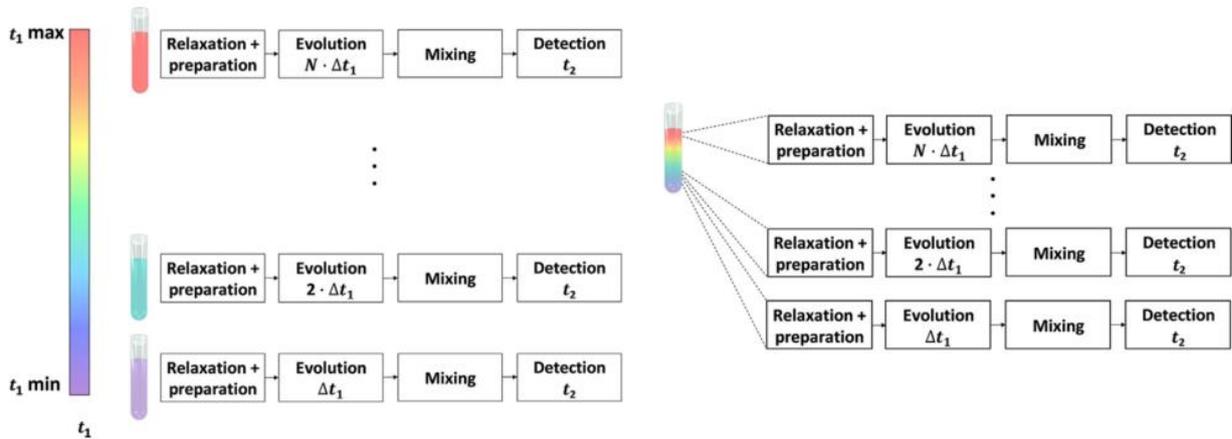


Figure 28. Schéma général des expériences 2D conventionnelles (à gauche) et des expériences de RMN ultrarapides (à droite). Alors que dans les expériences conventionnelles, la séquence d'impulsions est répétée avec une période d'évolution  $t_1$ , dans les expériences ultrarapides, chaque tranche d'échantillon subit différentes périodes d'évolution  $t_1$  au sein d'une seule répétition. Reproduite de la réf.<sup>35</sup>

Grâce à cette substitution, les spins situés à différentes positions de l'échantillon  $z$  subissent des périodes d'évolution  $t_1$  distinctes selon leur position dans le tube et ces différentes positions d'évolutions ont lieu simultanément au cours d'une même répétition. Alors que les étapes de préparations et de mélange sont similaires à celles rencontrées dans les expériences conventionnelles, un schéma de détection est nécessaire pour décoder les informations codées dans l'étape d'évolution.

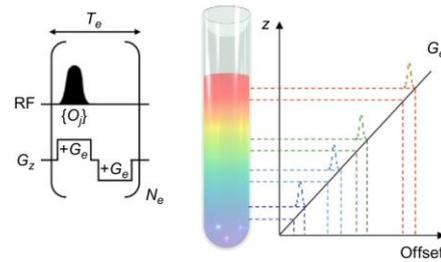
Pour réaliser ce codage spatial, deux schémas ont été proposés. La méthode de codage spatial initialement utilisée en RMN ultrarapide était basée sur un schéma discret,<sup>178</sup> mais a rapidement été remplacée par des schémas continus.<sup>31, 179-180</sup> Quel que soit le schéma de codage, un gradient de champ magnétique dit d'excitation ( $G_e$ ) est appliqué le long de l'axe de codage de sorte que les spins à différents endroits dans le tube subissent différents champs magnétiques effectifs, subissant ainsi différentes fréquences de résonance. Il en résulte des temps de rotation différents dans le plan transversal en fonction de la fréquence, directement liés à la position  $z$  des spins. La dépendance spatiale induite de la phase est de la forme :

$$\phi(z) = C \cdot \Omega_i \cdot z$$

Équation 1

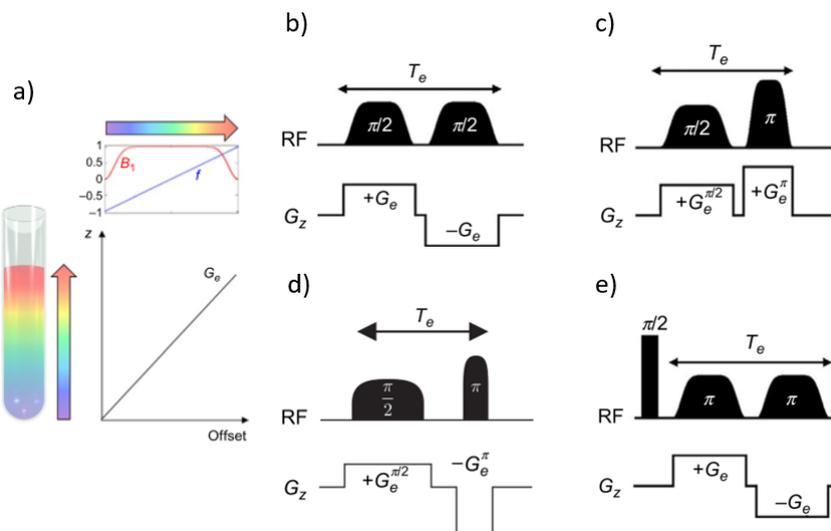
où  $C$  est une constante définie par Frydman L. comme étant la dépendance du schéma de codage,  $\Omega_i$  est la fréquence du site chimique  $i$  et  $z$  la position dans le tube. Dans le schéma de codage discret initial, ce résultat est obtenu en appliquant une série d'impulsions spatialement sélectives en

combinaison avec des paires de gradients bipolaires, qui adresse consécutivement différentes tranches de l'échantillon (Figure 29).



**Figure 29. Principe du codage spatial discret.** L'action d'un gradient d'encodage  $+G_e$  est combinée à une impulsion sélective de sorte que les spins situés dans une tranche particulière de l'échantillon soient excités. Cette combinaison est répétée en faisant varier l'offset de l'impulsion sélective pour que les différentes tranches de l'échantillon soient excités à des instants différents. L'emploi d'un gradient  $+G_e$  de signe opposé permet de compenser les déphasages. Reproduite de la réf. <sup>35</sup>

Pour compenser le déphasage induit par l'application du gradient  $G_e$ , chaque excitation est suivie d'un gradient de rephasage. Ce gradient de rephasage est de signe opposé et de même intensité que le gradient d'excitation (Figure 29 à gauche). Néanmoins, l'encodage spatial discret présente un certain nombre d'inconvénients <sup>180</sup> comprenant l'utilisation d'un train d'impulsions de gradient bipolaire qui est exigeant pour le matériel, en raison de la nécessité d'une impulsion de gradient de rephasage après chaque gradient de sélection de tranche et comprenant l'apparition de « pics fantômes » dans le spectre. Le codage discret a rapidement été remplacé par différents types de schémas de codage spatial (Figure 30).



**Figure 30. Principe du codage spatial continu.** La répétition des impulsions sélectives est remplacée par une impulsion CHIRP dont la fréquence est balayée linéairement. En combinant cette impulsion avec le gradient de codage, les spins situés à différentes positions  $Z$  dans l'échantillon sont excités à des moments différents. (b-d) Séquence d'impulsions typiques capables de réaliser le codage spatial continu, en temps réel (b, c), d) reproduite de la réf. <sup>181</sup> ou en temps constant (e). Reproduite de la réf. <sup>35</sup>

Dans ce type de schéma, le codage spatial repose sur une impulsion CHIRP appliquée en même temps qu'un gradient. Avec la combinaison des deux, il devient possible d'exciter différentes parties du volume à des moments différents. Ces dernières remplacent avantageusement la série d'impulsions sélectives, il en résulte un déphasage du signal dépendant du déplacement chimique et de la position dans le volume. Avec une seule impulsion CHIRP, la dépendance entre le déphasage et  $z$  est quadratique, c'est pourquoi la plupart de ces schémas de codage spatial <sup>31, 179, 181-182</sup> (Figure 30b, d et e) reposent sur la succession de deux impulsions CHIRP de même durée avec des gradients de signes opposés appliqués en même temps. Le résultat de ce déphasage est une hélice d'aimantation (Figure 31). Dans ces schémas de codage, l'échantillon est divisé en un nombre infini de tranches (Figure 30)

contrairement à la manière discrète où chaque impulsion sélectionne sélectivement une coupe de l'échantillon (Figure 29). Mais le plus utilisé actuellement est le schéma à temps constant proposé par Pelupessy P.<sup>180</sup> qui donne les meilleurs résultats en termes de sensibilité et est globalement plus facile à mettre en œuvre par rapport aux autres schémas disponibles dans la littérature. Ce schéma est composé d'une première impulsion dure à 90° afin de basculer l'aimantation dans le plan transversal, suivie de deux impulsions CHIRP à 180° en même temps que des gradients bipolaires de temps opposés, ce qui permet le codage spatial (Figure 30e). Le signal étant à présent déphasé, il est nécessaire d'utiliser un autre gradient pour le rephaser avant l'acquisition.

Après la phase d'excitation ultrarapide, une phase de détection de la dimension rapide basée sur la séquence EPI développée par Mansfield P.<sup>30</sup> permet l'acquisition des signaux. Dans cette configuration, un gradient de lecture  $G_a$  est appliqué lors de l'acquisition pour recentrer le déphasage linéaire créé lors du codage spatial. L'effet du gradient sur le signal déphasé est montré dans la Figure 31.

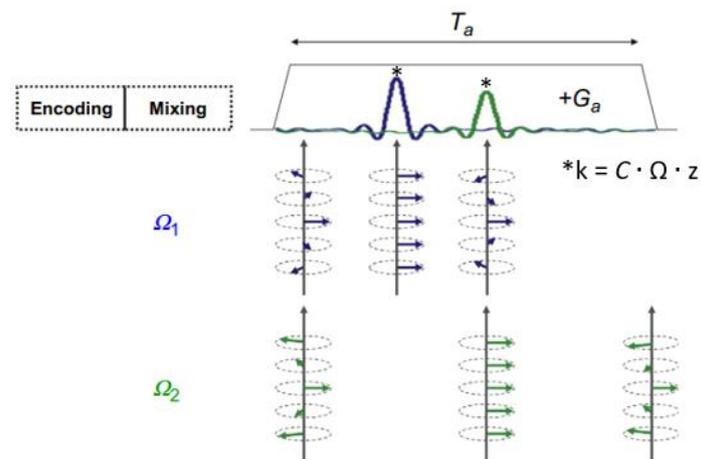


Figure 31. Principe de l'acquisition suivant la dimension ultrarapide avec un schéma de détection EPI. Les déphasages induits par le motif d'excitation sont compensés par le gradient d'acquisition  $G_a$  et un écho se forme pour  $*k = C \cdot \Omega \cdot z$ . Reproduite de la réf.<sup>35</sup>

Pendant l'application de ce gradient, l'hélice d'aimantation formée par le codage spatial se déroule jusqu'à un moment où l'aimantation redevient cohérente. A ce moment, le signal est enregistré, puis pour le reste du gradient d'acquisition, l'aimantation redevient déphasée. Comme le déphasage dépend du déplacement chimique, le moment où le signal est déphasé dépend également du déplacement chimique. En d'autres termes, la position des pics dans l'espace  $k$  dépend du déplacement chimique : l'espace  $k$  est dans ce cas l'équivalent d'un spectre RMN 1D dans le domaine fréquentiel, sans avoir à appliquer une transformée de Fourier. Ce signal est acquis et correspond à la première dimension  $k/v_1$ , dite « ultrarapide » du spectre de RMN 2D final ou référencé comme « dimension codée spatialement » dans la littérature. Le nombre de points acquis suivant cette dimension est noté  $N_1$ .

L'espace  $k$  devient l'un des domaines fréquentiels, mais cette étape à elle seule ne produira pas le spectre 2D. Afin de produire un spectre 2D, l'acquisition de la dimension conventionnelle nécessite l'usage de plusieurs gradients  $G_a$ . La méthode, issue de l'*Echo Planar Spectroscopic Imaging* (EPI)<sup>183</sup> consiste à répéter ce phénomène en alternant régulièrement et rapidement le signe du gradient  $G_a$ , de même valeur absolue et de même longueur. Ce train de gradients bipolaires remplace l'évolution libre normale et conduit à des recentrages et défocalisations périodiques du signal permettant d'obtenir un deuxième spectre d'espace  $k$ , qui est un miroir du premier spectre d'espace  $k$  (Figure 32).

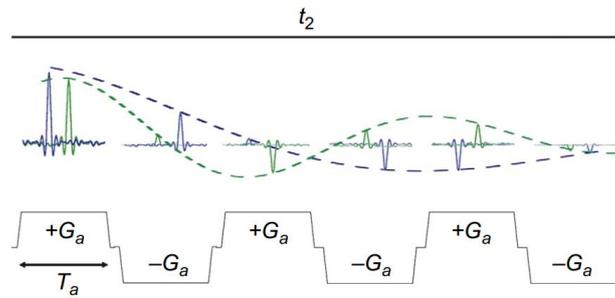


Figure 32. Schéma représentant la dimension conventionnelle de l'expérience ultrarapide. Un train de gradients bipolaires est appliqué en continu afin de cartographier l'espace  $(k, t_2)$ . Reproduite de la réf. <sup>35</sup>

A l'inverse de la dimension ultrarapide, l'acquisition suivant cette dimension est conventionnelle : il s'agit d'un échantillonnage régulier du signal 2D suivant la dimension  $t_2$ . Le nombre de points suivant cette dimension est noté  $N_2$ .

A la fin du deuxième gradient, le déphasage est le même qu'avant l'application du premier gradient. Cette succession de deux gradients de signes opposés peut donc être appliquée plusieurs fois. Au cours de cette succession de gradients, l'aimantation continue d'évoluer à cause des déplacements chimiques, du couplage  $J$  et de la relaxation. Les échos successifs acquis au cours de cette série de gradients peuvent être considérés comme les points successifs d'une FID (Figure 33a). Ce jeu de données s'enregistre suivant une trajectoire en « zigzag » dans le plan spectroscopique ultrarapide  $(k/\nu_1, t_2)$  avec évolution de l'aimantation lors de l'application des gradients (Figure 33b). Par conséquent, la répétition des trajectoires définit une FID qui constitue la deuxième dimension.

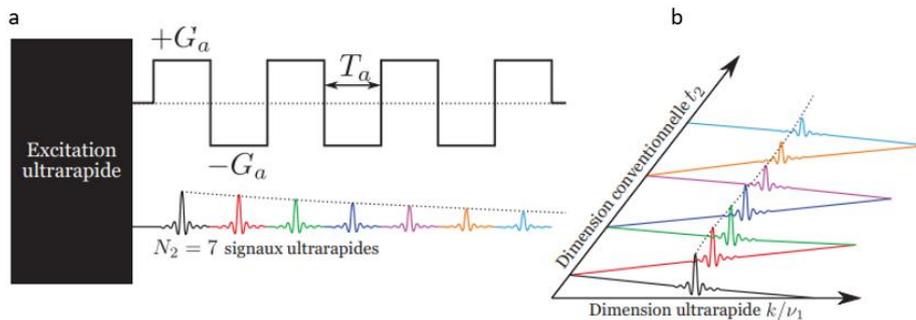


Figure 33. Principe de l'acquisition suivant la dimension conventionnelle. En alternant rapidement le signe du gradient  $G_a$  durant l'acquisition, le plan spectroscopique ultrarapide  $(k/\nu_1, t_2)$  est échantillonné avec une période  $T_a$ .

Contrairement à la transformée de Fourier des spectres de RMN conventionnels où la grille spectrale 2D est collectée en exécutant des expériences séparées, une seule FID de données brutes contient toutes les informations 2D dans les expériences ultrarapides. Lors de l'acquisition, le plan  $(k/\nu_1, t_2)$  est balayé en « zigzag ». Chaque ligne acquise dans le plan fait l'objet de l'acquisition d'un signal temporel pendant une durée  $T_a$ . Chacun de ces signaux est ensuite stocké en mémoire pour former une matrice 2D des points acquis. Le signal est séparé en deux jeux de données, l'un obtenu par des gradients positifs  $+G_a$ , les signaux « pairs » et l'autre par des gradients négatifs  $-G_a$ , les signaux « impairs ». Les signaux pairs correspondent à une trajectoire de sens inverse à celle des signaux impairs dans le plan  $(k/\nu_1, t_2)$ . Autrement dit, pour obtenir un signal pair, le plan est balayé de gauche à droite alors que le signal impair est obtenu en balayant le plan de droite à gauche. Les signaux impairs sont inversés suivant l'axe temporel par rapport aux signaux pairs (Figure 34).

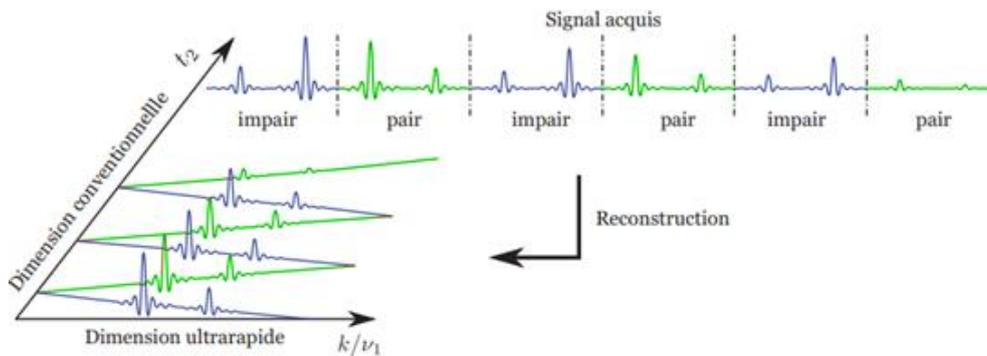


Figure 34. Les signaux « pairs » et « impairs » sont réorganisés dans un vecteur 2D correspondant au plan  $(k/v_1, t_2)$  lors de la reconstruction du spectre de RMN 2D.

La reconstruction du spectre de RMN 2D consiste à inverser l'ordre des données brutes dans la dimension ultrarapide des signaux « pairs » ou « impairs », conduisant à deux cartes d'image miroir  $S(k, t_2)$  après une transformée de Fourier le long de la dimension indirecte. Une transformée de Fourier est ensuite appliquée le long de la dimension  $t_2$ , conduisant à deux cartes symétriques  $S(F_1, F_2)$ . La carte issue des gradients négatifs est alors inversée le long de la dimension ultrarapide. Les deux jeux de données sont finalement sommés pour augmenter le rapport signal sur bruit et conduire au spectre final 2D (Figure 35).

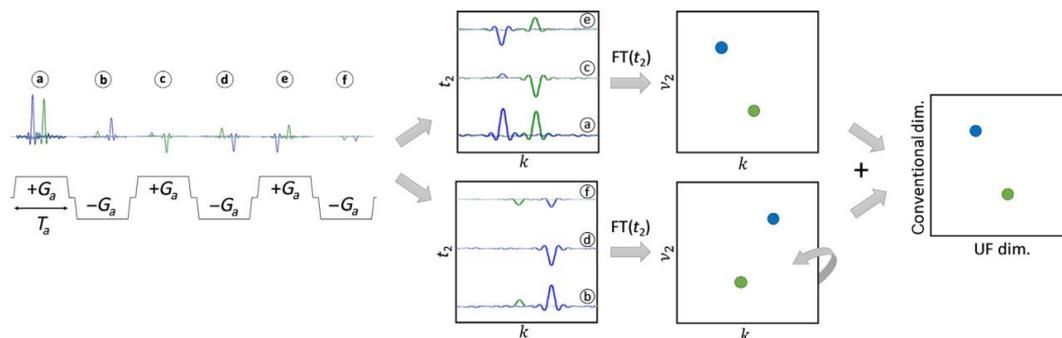


Figure 35. Schéma illustrant le traitement séparé des données « paires » et « impaires ». Les signaux « pairs » issus des gradients positifs  $+G_a$  et « impaires » issus des gradients négatifs  $-G_a$  sont respectivement reconstruits en deux spectres de RMN 2D distincts  $v_1-t_2$ . Deux cartes symétriques  $S(F_1, F_2)$  sont obtenues après une transformée de Fourier le long de la dimension  $t_2$ . La carte des gradients négatifs est alors inversée et est sommée avec l'autre pour donner le spectre de RMN 2D ultra-rapide final. Reproduite de la réf. <sup>35</sup>

Cette séparation des signaux entraîne une perte du rapport signal sur bruit et divise par deux la largeur spectrale dans la dimension directe. Un moyen contourné pour y remédier consiste à appliquer une transformée de Fourier entrelacée. <sup>184</sup> Cette dernière conduit à un meilleur rapport signal sur bruit et à une plus grande largeur spectrale dans la dimension directe par l'utilisation simultanée des échos impairs et pairs. <sup>185</sup>

La RMN ultrarapide souffre d'une sensibilité intrinsèquement faible du fait de son caractère mono-balayage par rapport aux acquisitions multi-balayages caractérisant la RMN nD conventionnelle. De plus, le rapport signal sur bruit est également impacté par plusieurs facteurs résultant de la nature spatialement codée de la RMN ultrarapide : <sup>32</sup>

- L'utilisation de forts gradients lors de la détection est en fait la principale source de perte de sensibilité dans les expériences ultrarapides. La bande de fréquence à l'acquisition suivant la dimension conventionnelle  $t_2$  est souvent limitée à quelques centaines de Hertz, tandis que la bande de fréquence suivant la dimension  $k/v_1$  s'étend à des largeurs spectrales de plusieurs milliers de Hertz. Pour cette raison, étant donné qu'une très grande bande passante d'acquisition est utilisée pour couvrir la dispersion des fréquences induite par le gradient  $G_a$ , tous les signaux dans la dimension

conventionnelle  $t_2$  sont repliés dans la fenêtre de détection. Cependant, dans la dimension ultrarapide, un tel repliement ne se produit pas et les résonances qui se recentraient pour former un écho en dehors de la plage  $\Delta k$  ne sont pas observées. Cette considération conduit à un rapport signal sur bruit inférieur à mesure que le bruit augmente et cela devient encore plus critique lorsque de grandes largeurs spectrales sont ciblées. Dans des conditions typiques, la sensibilité est réduite d'un facteur compris entre 5 et 10 par rapport à une acquisition 1D à un seul balayage.

- Cette technique souffre d'une faible largeur spectrale nécessitant un compromis entre la résolution  $\Delta\nu_{UF}$  et les largeurs spectrales  $SW_1$  et  $SW_2$  des deux dimensions. L'augmentation du champ magnétique conduira à une meilleure sensibilité mais au prix d'une largeur spectrale réduite. Par conséquent, la configuration optimale à adopter dépend de l'application visée.

- La méthodologie reste avant tout limitée par le fait que les implémentations de programmes d'impulsions pour ce type d'expérience ne sont pas distribuées par les fournisseurs de RMN et peuvent être difficiles à créer en partant de zéro. Dans ce contexte, des efforts importants ont été consentis par Giraudeau P. *et al.* pour rendre la méthode accessible à un public plus large en concevant des routines de préacquisition pour faciliter le réglage des paramètres expérimentaux.<sup>35, 186</sup>

#### 2.4.2.2.2. Les expériences UF combinées pour l'analyse des mélanges

La section précédente a introduit les concepts fondamentaux et les limites des expériences ultrarapides. Les performances analytiques de l'expérience ultrarapide ont considérablement progressé au cours des dix dernières années. Plusieurs améliorations ont été apportées pour l'acquisition et le traitement de la RMN ultrarapide 2D afin d'obtenir des spectres plus propres,<sup>185</sup> pour augmenter la résolution<sup>187-188</sup> ou pour réduire les contraintes de largeurs spectrales en rendant l'approche ultrarapide plus simple à mettre en œuvre.<sup>186</sup> Cette méthodologie est passée d'un stade de développement sur des composés modèles à un outil analytique puissant capable de fournir des spectres 2D à haute résolution en une fraction de seconde. L'enregistrement des spectres à un seul balayage devient désormais possible avec une qualité qui n'est pas significativement différente de celle obtenue avec leurs homologues classiques. L'acquisition d'un spectre 2D en un seul balayage a d'abord été démontrée pour des séquences d'impulsions classiques telles que COSY, TOCSY, HETCOR et HSQC.<sup>178, 187, 189</sup> Le concept a ensuite été étendu à une variété de séquences telles que HMQC et HMBC.<sup>37, 190</sup> Le codage spatial des cohérences multi-quanta (MQC) a également été utilisé dans des champs magnétiques spatialement non homogènes, pour coder la fréquence simple quantum des analytes.<sup>191-192</sup> Si les premières approches de la RMN 2D ultrarapide sont loin d'être routinières, ces dernières se limitaient généralement à des molécules modèles pures. Récemment, d'autres études ont été menées pour montrer les avantages de cette méthodologie dans l'analyse de mélanges complexes. C'est le cas des expériences ultrarapides 2D PUFYSY-COSY (*Parallel Ultrafast NMR Spectroscopy*) qui impliquent l'acquisition simultanée de deux spectres de type COSY 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  et  $^1\text{H}$ - $^{19}\text{F}$  en quelques  $\mu\text{s}$  pour analyser un mélange de trois petits composés dans le DMSO- $d_6$ .<sup>193</sup> En 2015, Akoka *et al.* ont rapporté des expériences 2D ultrarapides « hybrides »<sup>194</sup> qui s'écartent de l'approche mono-balayage de l'ultrarapide par l'approche *Multi-Shot Single-Scan* (M3S). Elle a montré son efficacité pour l'analyse d'extraits pour des études métabolomiques.<sup>195-196</sup> Cette approche de codage « hybride » a également servi à collecter des données 3D dans le même intervalle de temps que donnerait classiquement un spectre 2D UF et a été exploitée pour l'obtention de spectres 3D UF-J-COSY sur un extrait de cellules de *E.Coli*.<sup>197</sup> La même année, Guennec A. *et al.* ont impliqué la spectroscopie à double quanta ultrarapide (DQS) pour l'analyse d'un mélange de sept métabolites en solution<sup>168</sup> et pour l'étude d'un mélange d'acides aminés.<sup>198-199</sup> Jusqu'à présent, la méthodologie de codage spatial n'a été appliquée

que pour le codage de cohérences à double quanta. Récemment, Concilio M.G. *et al.* ont étendu son application à des ordres de cohérences supérieurs allant jusqu'à cinq pour réduire considérablement le temps d'acquisition des spectres UF-MaxQ d'un mélange de composés aromatiques.<sup>200</sup> Enfin, le codage spatial d'une expérience SPEN DOSY dans une COSY a permis d'accélérer une expérience 3D DOSY-COSY en réduisant la durée d'acquisition à 12 min au lieu de 14 h par la méthode conventionnelle. Elle a été utilisée pour séparer un mélange contenant trois alcools et un acide aminé.

201

### 3. Conclusion

Cette section a présenté une partie des dernières innovations de RMN développées par la communauté scientifique pour relever le défi de l'analyse des mélanges complexes. Ces innovations ne constituent pas une liste exhaustive de toutes les récentes découvertes mais plutôt une introduction à l'expansion continue de nouvelles séquences d'impulsions et à l'amélioration de celles existantes pour comprendre l'énorme potentiel de la spectroscopie de RMN.

Chacune des méthodes décrites présente des avantages mais a aussi ses propres limites. Ces limitations conditionnent les scientifiques à rechercher « la perfection », notamment en atteignant une sensibilité similaire aux méthodes 2D conventionnelles et une meilleure dispersion des signaux qui en son absence, pourrait entraver l'analyse des métabolites en raison d'une superposition accrue des signaux dans une région bien spécifique du spectre. La mise au point d'outils faciles à mettre en œuvre et peu coûteux est au cœur des principales exigences que requièrent les industries pharmaceutiques et cosmétiques. Si actuellement les techniques analytiques conjointement utilisées demeurent très efficaces pour déterminer la structure de composés organiques inconnus, elles n'en demeurent pas moins coûteuses en solvants et en terme de temps. L'analyse des mélanges complexes utilisant la RMN seule sans séparation physique représente une nouvelle ère où les moyens pour y parvenir restent encore à réaliser.

**PARTIE I-B : ANALYSE DE MELANGES DE PETITES ET MOYENNES MOLECULES  
PAR RMN VIA LA DIFFUSION DE SPIN EN MILIEUX VISQUEUX**

## 1. Introduction

Dans cette section, l'état de l'art concerne l'usage de solvants (ou mélanges de solvants) visqueux dans la manipulation du NOE négatif dans l'analyse de mélanges de petites molécules par RMN sans avoir recours à la séparation physique, et cela en bénéficiant du phénomène de diffusion de spin. La majeure partie de ces travaux a été réalisée au sein de l'équipe CSN de l'ICMR de 2010 à 2017.

L'analyse des mélanges par RMN est la plus souvent limitée à l'identification et à la quantification de composés connus. Trouver la structure de composés inconnus dans des mélanges est un exercice difficile, car l'ensemble de la réponse RMN doit être subdivisé en sous-ensembles, chacun étant associé à un composant du mélange. La tâche devient encore plus ardue lorsque la superposition des résonances est forte. Pouvoir relier chaque pic de résonance à une molécule spécifique réduirait la nécessité de la séparation physique chromatographique et augmenterait considérablement l'efficacité du travail des chimistes pour l'analyse des produits de synthèse et des produits naturels.

L'outil d'analyse développé par l'équipe CSN de l'ICMR repose sur l'effet Overhauser nucléaire (NOE, *Nuclear Overhauser Effect*). Le NOE est la transposition aux noyaux atomiques de l'effet Overhauser électronique dont le principe a été énoncé pour la première fois en 1953 par A. W. Overhauser, comme une augmentation de la polarisation des spins nucléaires dans des métaux au moyen de la saturation de l'aimantation des électrons auxquels ils sont magnétiquement couplés.<sup>202</sup> Deux ans plus tard, une description théorique en a été proposée par Solomon.<sup>203</sup> Deux jalons dans l'application du NOE à la résolution de problèmes de chimie structurale peuvent être soulignés. Le premier est lié à la publication du livre de Noggle et Schirmer qui résumait l'état de l'art au début des années 70, lorsque la RMN était enregistrée dans une seule dimension et que le NOE n'était utilisé que pour caractériser la structure des petites molécules.<sup>204</sup> Le second est lié aux percées réalisées par Wüthrich dans les années 80 pour le calcul de la structure de grandes biomolécules telles que les protéines et les acides nucléiques à partir des NOEs lorsque la spectroscopie bidimensionnelle a commencé à être plus facile d'accès.<sup>205</sup> Depuis ces découvertes fondamentales, le NOE est devenu un élément incontournable dans l'élucidation structurale et dans l'analyse conformationnelle et dynamique en RMN à l'état liquide.

L'utilisation de solvants (ou mélanges de solvants) visqueux dans des conditions opératoires particulières réduit les mouvements de rotation moléculaire des molécules de faible masse moléculaire, de sorte que le régime de relaxation croisée longitudinale favorise l'observation du NOE négatif, ainsi le phénomène de diffusion de spin peut se propager sur l'ensemble de la molécule.<sup>206</sup> En conséquence, les résonances peuvent être regroupées en fonction de leur capacité à échanger de l'aimantation par diffusion de spin de manière intramoléculaire. Toutes les résonances des noyaux  $^1\text{H}$  au sein de la même molécule tendent à corrélérer entre-elles dans un même spectre NOESY 2D, donnant ainsi accès aux spectres individuels RMN  $^1\text{H}$  de chaque composante du mélange. L'idée de base a été mise en œuvre par Williamson *et al.* en 1981<sup>43</sup> au moyen d'un solvant polymère perfluoré qui a de nouveau été envisagé en 2008 par Simpson et ses collaborateurs.<sup>44</sup> L'utilisation de l'eau « ultrafroide » pour modifier la dynamique de spin de métabolites de petites tailles a été rapportée en 2012 par le même auteur.<sup>45</sup> Lameiras *et al.* ont publié pour la première fois, respectivement en 2011, 2016 et 2017, l'utilisation du glycérol et du carbonate de glycérol, de mélanges binaires DMSO- $d_6$ /glycérol et DMSO- $d_6$ /eau comme solvants visqueux pour la promotion de la diffusion de spin  $^1\text{H}$  et  $^{19}\text{F}$ .<sup>46-48</sup>

Lameiras et ses collaborateurs ont également présenté des protocoles expérimentaux originaux tels que les expériences 1D et 2D sélectives  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY et  $^1\text{H}$ - $^{19}\text{F}$  HOESY.

Pour comprendre l'intérêt du phénomène de diffusion de spin en milieux visqueux, il conviendra dans un premier temps d'expliquer les bases fondamentales du NOE, avant de nous limiter à deux exemples de mélanges binaires visqueux tels que le DMSO- $d_6$ /glycérol et le DMSO/ $\text{H}_2\text{O}$  pour l'analyse de petites molécules en mélange.

## 2. Théorie

La diffusion de spin se manifeste comme étant un transfert d'aimantation étendu par le NOE. Le NOE dépend de la proximité spatiale. Lorsque deux noyaux sont suffisamment proches l'un de l'autre, ils interagissent à travers l'espace par couplage dipolaire.<sup>207</sup> Cette forme d'interaction est responsable du NOE. Ce phénomène peut être défini comme le changement d'intensité du signal d'un noyau I après saturation du noyau S. En ce sens, les populations de spin des deux noyaux impliqués sont perturbées par rapport à leurs populations d'équilibre. La perturbation d'intérêt correspond généralement soit à la saturation d'une résonance (NOE en régime permanent), c'est-à-dire à l'égalisation des populations, soit à son inversion (NOE transitoire). Il est possible d'exprimer le pourcentage du NOE du noyau I lorsque le noyau S est saturé :

$$\eta_i\{S\} = \frac{I - I_0}{I_0} \times 100(\%)$$

Équation 2

où  $\eta_i\{S\}$  indique le NOE observé pour le spin I lorsque le spin S est perturbé. Les variations d'intensité du NOE peuvent être positives (une augmentation) ou négatives (une diminution), telles qu'elles sont imposées par les propriétés de mouvement des molécules et par les signes des rapports gyromagnétiques des spins engagés.

L'intensité du NOE dépend de quatre paramètres : l'intensité du champ magnétique, le rayon hydrodynamique de la molécule, la température et la viscosité du milieu  $\eta$ . La viscosité hydrodynamique est l'une des variables les plus importantes en rhéologie. Elle détermine la résistance avec laquelle un fluide (comme un solvant) se déforme de manière irréversible lorsqu'il est sollicité par une force extérieure. Ce comportement est la conséquence des frottements internes au fluide qui se produisent lors de la déformation. Plus la viscosité d'un fluide est élevée, plus sa déformation par unité de temps est faible sous une force appliquée égale. L'unité de mesure de la viscosité dynamique dans le système SI est le Pascal x secondes (Pa.s). Le sous-multiple le plus couramment utilisé est le milliPascal x seconde (mPa.s). L'unité historique centiPoise (cP) dans le système centimètre-gramme-seconde (CGS) reste toujours d'usage général, et équivaut à un mPa.s. Selon la théorie de microviscosité de Gierer et Wirtz, le temps de corrélation moléculaire  $\tau_c$ , en supposant une molécule de soluté sphérique, peut être exprimé au moyen de la relation ci-dessous :<sup>208</sup>

$$\tau_c = \frac{4\pi\eta R^3}{3kT}$$

Équation 3

Où  $\eta$  est la viscosité du milieu,  $R$  le rayon hydrodynamique de la molécule,  $k$  est la constante de Boltzmann et  $T$  la température en Kelvin.

Le signal du NOE dépend fortement de la fréquence de Larmor  $\omega$  et du temps de corrélation moléculaire  $\tau_c$ . Le temps de corrélation moléculaire  $\tau_c$  représente la mobilité rotationnelle d'une molécule en solution et plus précisément le temps moyen nécessaire à une molécule en solution pour tourner d'un radian. Pour un champ magnétique donné  $\omega$ , la valeur de  $\tau_c$  conditionne le signe et l'amplitude du NOE (+ 50% à - 100%)

Le NOE est le résultat d'une relaxation dipolaire croisée entre deux noyaux. Pour comprendre les voies impliquées dans le NOE, considérons un système à deux spins ( $I = \frac{1}{2}$ ) incluant les noyaux I et S qui ne présentent pas de couplage scalaire ( $J_{IS} = 0$ ) mais qui sont couplés par interaction dipolaire. Quatre niveaux d'énergie peuvent être caractérisés par l'état de spin  $\alpha$  ou  $\beta$  de chaque noyau (Figure 36). Selon la distribution de Boltzmann, un excès de noyaux dans l'état d'énergie inférieure  $\alpha\alpha$  et un déficit dans l'état d'énergie plus élevée  $\beta\beta$  existeront.

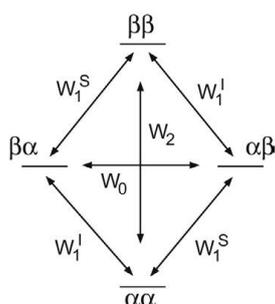


Figure 36. Les six voies possibles de relaxation dans un système à deux spins.

Parmi ces quatre niveaux, d'énergies, il existe six voies de relaxation possibles pour les spins, chacune caractérisée par une probabilité de transition par unité de temps notée  $W$ . Les voies  $W_0$  et  $W_1$  ( $W_1^I_{\alpha\alpha-\beta\alpha}$ ,  $W_1^I_{\beta\alpha-\beta\beta}$ ,  $W_1^S_{\alpha\alpha-\alpha\beta}$ ,  $W_1^S_{\beta\alpha-\beta\beta}$ ) et  $W_2$  sont relatives aux transitions à zéro, un et deux quanta respectivement. Les voies de relaxation  $W_1$  correspondent à la relaxation longitudinale et les voies de relaxation  $W_0$ ,  $W_2$  correspondent à des transitions qui ne sont pas observables par absorption ou émission d'une onde de radiofréquence. Cependant  $W_0$  et  $W_2$  sont responsables du NOE. Ces dernières représentent les voies de relaxation croisée, terme évocateur de la participation simultanée de deux spins (Figure 37). L'efficacité de la relaxation *via* le processus  $W_2$  favorisera une augmentation de l'intensité du spin  $I$  dans le spectre en transférant les spins de l'état  $\beta\beta$  à l'état  $\alpha\alpha$ . Cet état porte le nom de régime NOE positif (Figure 37a). D'une manière différente, le processus de relaxation  $W_0$  transférera les spins de l'état  $\beta\alpha$  à l'état  $\alpha\beta$ , produisant alors une réduction de l'intensité de résonance du spin  $I$  dans le spectre. Cet état se nomme régime NOE négatif (Figure 37b).

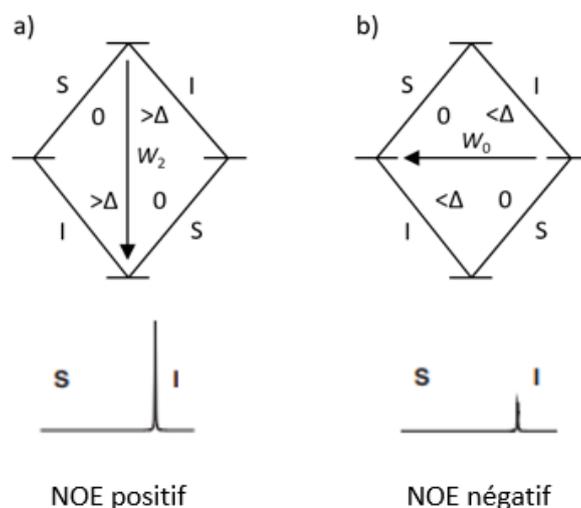


Figure 37. Diagramme schématique des quatre niveaux d'énergies et des populations différentes pour deux spins S et I qui partagent un couplage dipolaire. a) Représentation de la relaxation après le processus  $W_2$  et b) après la relaxation via le processus  $W_0$ .

L'interaction dipolaire entre deux spins peut conduire à des transitions introduites par la relaxation entre n'importe lequel de ces quatre niveaux. D'un point de vue qualitatif, les processus de relaxation croisée  $W_0$  et  $W_2$  agissent de manières opposées. La voie prédominante imposera le signe du NOE observé. De plus, les voies de relaxation longitudinale  $W_1$  rétablissent les différences de populations d'équilibre pour les transitions des noyaux I et S. Par conséquent, le régime NOE positif ou négatif ne sera détecté que si les mécanismes de relaxation des voies  $W_1$  s'avèrent moins efficaces que ceux des voies  $W_2$  et  $W_0$ . Par conséquent, la quantité de NOE détectée résultera d'un équilibre entre plusieurs voies de relaxation concurrentes. Suivant les équations de Solomon,<sup>203</sup> le NOE qui est observé après saturation de la transition S pendant un temps long par rapport au temps de relaxation du spin I peut être exprimé comme :

$$\eta_i\{S\} = \frac{\gamma_S}{\gamma_I} \left[ \frac{W_2 - W_0}{W_0 + 2W_1^I + W_2} \right] \equiv \frac{\gamma_S}{\gamma_I} \left[ \frac{\sigma_{IS}}{\rho_I} \right]$$

Équation 4

Où  $\sigma_{IS}$  correspond à la constante de vitesse de relaxation croisée pour les deux spins I et S, et  $\rho_I$  est la constante de vitesse de relaxation longitudinale dipolaire totale du spin I. Les rapports gyromagnétiques ( $\gamma_S$  et  $\gamma_I$ ) sont impliqués pour considérer les différentes populations d'équilibre qui peuvent se produire pour les spins avec des  $\gamma_S$  différents. Le numérateur  $W_2 - W_0$  de l'équation 4 définit le signe du NOE alors que les processus  $W_1$  n'y contribuent pas mais modifient son amplitude. Pour évaluer la taille et le signe du NOE, donc sa corrélation avec les mouvements moléculaires et les distances internucléaires, il est obligatoire de déterminer quels facteurs ont un impact sur les constantes de vitesse participantes et de considérer les processus de relaxation des spins impliqués. Pour un proton, les variations d'intensité du NOE peuvent être positives (jusqu'à 50%) ou négatives (jusqu'à -100%) (Figure 38). Lorsque  $W_2 > W_0$ , le régime NOE sera positif jusqu'à 50% lorsque  $\omega\tau_c \ll 1$  dans la limite de rétrécissement extrême qui est plus petit que le régime NOE négatif maximum de -100% lorsque  $W_0 > W_2$  et que  $\omega\tau_c \gg 1$ , correspondant à la limite de la diffusion de spin. Lorsque  $W_2 = W_0$ ,  $\omega\tau_c \sim 1$ , pour de nombreux composés de taille moyenne en solution, le NOE est nul.

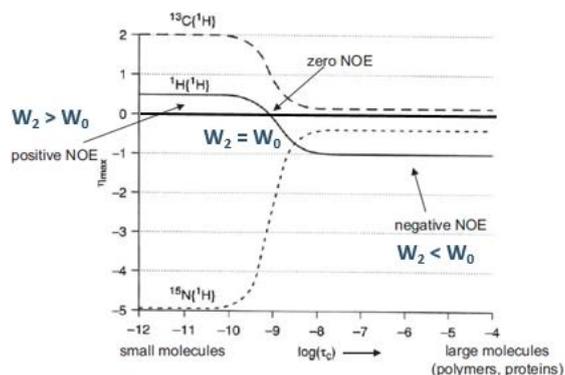


Figure 38. Variation du régime NOE permanent en fonction du temps de corrélation moléculaire  $\tau_c$ . Un régime NOE positif est observé pour les mouvements moléculaires rapides à la limite de rétrécissement extrême, tandis qu'un régime NOE négatif est atteint pour les mouvements lents.

Comme le NOE est lié à la viscosité, l'utilisation de milieux visqueux permet de réduire les mouvements de rotations moléculaires en solution. En conséquence, l'utilisation de solvants (ou mélanges de solvants) visqueux dans des conditions particulières (combinées ou non à une diminution de la température) donne lieu à une augmentation du temps de corrélation moléculaire  $\tau_c$  (régime ralenti) des petites et moyennes molécules de taille réduite en solution, de sorte que leur comportement moléculaire devient similaire à celui des molécules plus grosses telles que les polymères ou les protéines (Figure 39). Ainsi, le régime de la relaxation croisée longitudinale favorise l'observation du régime NOE négatif.

Précisément, le premier noyau saturé ou inversé va transférer son aimantation vers le noyau le plus proche qui va lui-même transférer son aimantation vers son voisin. L'aimantation se propage ainsi sur l'ensemble de la molécule, on parle de NOE relayé (Figure 39). La limite du ralentissement des rotations des molécules est appelée « limite de diffusion de spin ». Pour cette raison, le régime NOE négatif ne peut pas fournir d'informations fiables sur les distances ou la proximité des noyaux proches dans l'espace.

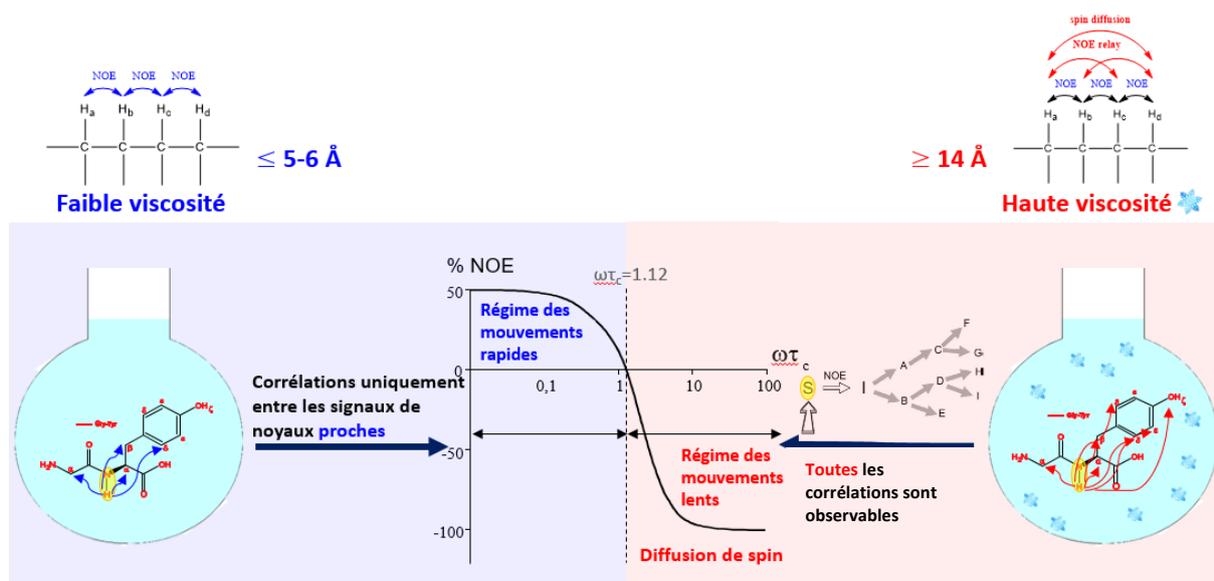


Figure 39. Intensité en pourcentage du NOE en fonction du produit  $\omega\tau_c$  de la fréquence de résonance par le temps de corrélation moléculaire.

Ainsi, en milieu de faible viscosité, seules les corrélations de noyaux proches sont observables. Le régime NOE observé est positif, le régime de mouvement est rapide et le transfert d'aimantation est partiel. Lorsque la viscosité du milieu augmente, les rotations moléculaires sont suffisamment ralenties et le transfert d'aimantation qui résulte de la diffusion de spin se produit sur l'ensemble de la molécule. Dans ces conditions, le régime NOE négatif est observé et la combinaison « NOE + NOE relayé » est efficace sur de grandes distances, supérieures à 14 Å. Par conséquent, les déplacements chimiques des noyaux d'une même molécule sont tous corrélés entre eux, et il devient alors possible d'individualiser le spectre de RMN de chaque composé en mélange.

### 3. L'utilisation de solvants composites pour individualiser les composés en mélanges

#### 3.1. Les mélanges de solvants : DMSO- $d_6$ /glycérol (GL) et DMSO- $d_6$ /glycérol- $d_8$ (GL- $d_8$ )

Le glycérol (GL) est un co-produit de la fabrication à l'échelle industrielle de biocarburants, de savons et de tensioactifs à partir de triglycérides.<sup>209</sup> La production de glycérol est actuellement surdimensionnée par rapport à la demande. Pour cette raison, de nouveaux développements et de nouveaux marchés pour le glycérol sont activement exploités. Le glycérol a de nombreuses applications, par exemple en tant que composant hydrophile dans les tensioactifs neutres et émulsifiant dans les domaines de l'industrie alimentaire, cosmétique et pharmaceutique.<sup>209</sup> Dans le domaine de la chimie organique, l'une des transformations les plus intéressantes du glycérol est la synthèse du carbonate de glycérol,<sup>210-211</sup> qui devrait prochainement jouer un rôle central dans la production à l'échelle industrielle de solvants, lubrifiants et tensioactifs à partir de sources de carbone renouvelables.<sup>210</sup> L'existence de marchés de cette dimension n'est pas incompatible avec la recherche d'applications de niche très spécifiques. Dans ce contexte, l'utilisation du GL comme solvant très visqueux ( $\eta = 934$  cP à 25°C)<sup>46</sup> peut s'avérer appropriée dans la manipulation de l'intensité du NOE de molécules polaires de petites et de moyennes tailles.

Le DMSO et le glycérol (GL) présentent respectivement des valeurs de viscosité de 2,2 cP et 1412 cP à 20°C<sup>212</sup> et un point de fusion de 18,5°C et 18,2°C.<sup>213</sup> Leur mélange constitue un système de solvants binaires visqueux, dont les propriétés dépendent de la proportion de chaque solvant et pour lequel le point de fusion peut atteindre des températures inférieures à 0°C. Plus la quantité de GL est élevée, plus le mélange de solvants est visqueux, ce qui facilite l'accroissement du NOE négatif propice à l'analyse de mélanges *via* la diffusion de spin.<sup>212</sup> En outre, les valeurs des constantes diélectriques respectives de 46,0 et 42,5 à 20°C pour le DMSO et le GL indiquent une capacité de dissolution élevée pour les composés polaires et moyennement apolaires.<sup>212</sup> De plus, le GL- $d_8$  est modérément coûteux, cependant il n'est disponible dans le commerce qu'à un niveau d'enrichissement en  $^2\text{H}$  relativement faible (98%), ce qui entraîne dans le spectre l'apparition de résonances résiduelles intenses de noyaux  $^1\text{H}$  en provenance du solvant. Lameiras *et al.* ont rapporté pour la première fois en 2016 l'utilisation de DMSO- $d_6$ /GL et DMSO- $d_6$ /GL- $d_8$  en tant que nouveaux solvants binaires hautement visqueux et efficaces pour les études de RMN de mélanges complexes de composés polaires et apolaires<sup>47</sup> compte tenu que dans cette période avait été publiée l'utilisation de solvants visqueux, tels que les polymères perfluorés<sup>44</sup> uniquement appropriés pour l'étude de composés apolaires et le glycérol, le carbonate de glycérol étant uniquement appropriés pour l'étude de composés polaires.<sup>46</sup> Les auteurs se sont concentrés sur l'évaluation du mélange binaire DMSO- $d_6$ /GL (8:2, v/v) dans l'individualisation des composantes du mélange-test des quatre dipeptides Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr et Ala-Tyr, à 288 K, à 500

MHz et sur l'évaluation du mélange DMSO- $d_6$ /GL- $d_8$  (5:5, v/v) dans l'individualisation de la  $\beta$ -ionone (MM = 192,30 g.mol<sup>-1</sup>), du ( $\pm$ )-citronellal (MM = 154,25 g.mol<sup>-1</sup>), du (+)-limonène (MM = 136,23 g.mol<sup>-1</sup>) et de la flavone (MM = 222,24 g.mol<sup>-1</sup>), en mélange à 268 K, à 600 MHz, au moyen d'expériences homonucléaires NOESY 1D et 2D sélectives, d'expériences homonucléaires NOESY-COSY, NOESY-TOCSY 2D sélectives et d'expériences hétéronucléaires HSQC-NOESY 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C et <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N. La première utilisation de l'expérience NOESY-COSY 2D sélective a également été rapportée.

### Etude du mélange polaire Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr, et Ala-Tyr dans DMSO- $d_6$ /GL (8:2, v/v)

Le glycérol « naturel » (GL) a été préféré au GL- $d_8$  dans cette étude par les auteurs afin d'empêcher l'échange chimique entre ses noyaux <sup>2</sup>H et les protons amides NH des quatre dipeptides. L'élimination des signaux résiduels <sup>1</sup>H du GL s'est avérée obligatoire pour favoriser la détection des signaux des dipeptides du mélange. Cela a été réalisé *via* des impulsions sélectives encadrées par des impulsions de gradient (Figure 78 de la section Matériels et Méthodes).<sup>70</sup> Les auteurs se sont concentrés sur la détermination de la température optimale permettant une diffusion de spin active (pics croisés NOESY positifs aussi nombreux et intenses que possible) tout en conservant une résolution spectrale de qualité. En effet, au moyen de l'expérience NOESY 2D avec détection de deux bandes de résonances à champ fort et champ faible, Lameiras *et al.* ont déterminé la température de 288 K à laquelle le spectre présente des corrélations à très longues distances entre le proton amide de chaque dipeptide et les autres résonances <sup>1</sup>H du même dipeptide (diffusion de spin observée sur des distances > 14 Å (Figure 40).

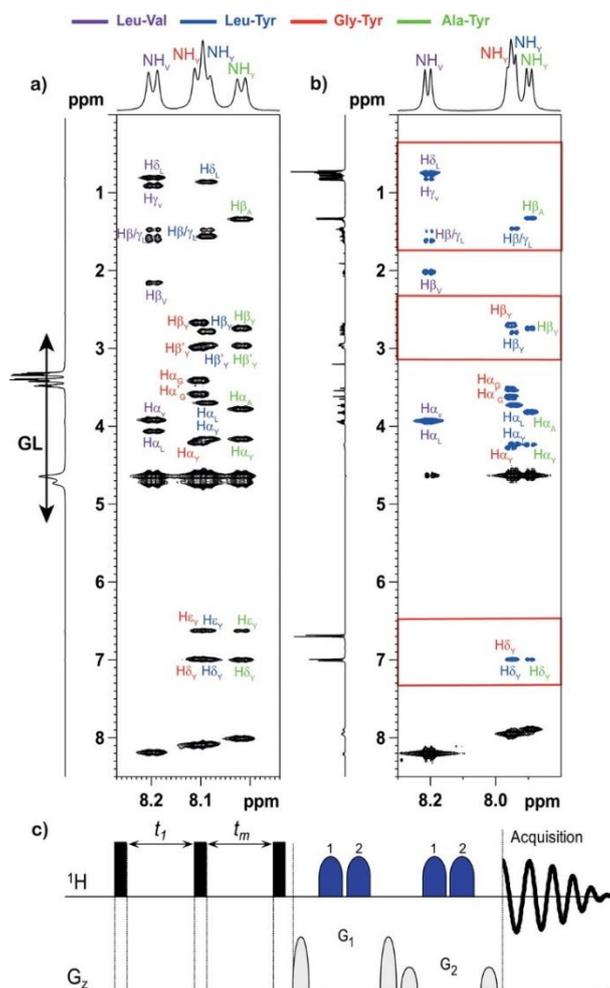


Figure 40. Régions des protons amides du spectre NOESY 2D avec détection sélective de deux bandes de résonances à champ fort et à champ faible du mélange test des quatre dipeptides (10 mM) à 500 MHz a) dissous dans DMSO- $d_6$ /GL (8:2, v/v), à 288 K, temps de mélange ( $t_m$ ) = 1 s, utilisant la séquence d'impulsions représentée dans la partie c). b) Région des protons amides du spectre NOESY 2D du même mélange test des quatre dipeptides dissous dans l'eau à 298 K,  $t_m$  = 1 s. Les cadres rouges correspondent aux régions du spectre d'intérêt dans lesquelles l'eau comme solvant a un effet majeur dans le nombre et le signe des taches de corrélations. Reproduite de la réf. <sup>47</sup>

Les auteurs ont considéré à nouveau l'utilisation des expériences NOESY 1D sélectives (décrites pour la première fois dans la section Matériels et Méthodes (Figure 83) pour la détection de toutes les résonances protons lors de l'acquisition du signal (Figure 41) afin d'éviter la perte des résonances  $H_{\alpha}$  en dimension  $F_2$  qui intervient lors de l'enregistrement des spectres NOESY 2D avec détection sélective. Un ensemble approprié de résonances protons sélectivement excités a permis d'individualiser le spectre de chaque dipeptide en tirant profit d'une diffusion de spin efficace le long du réseau de protons de chaque molécule (sur des distances > 14 Å).

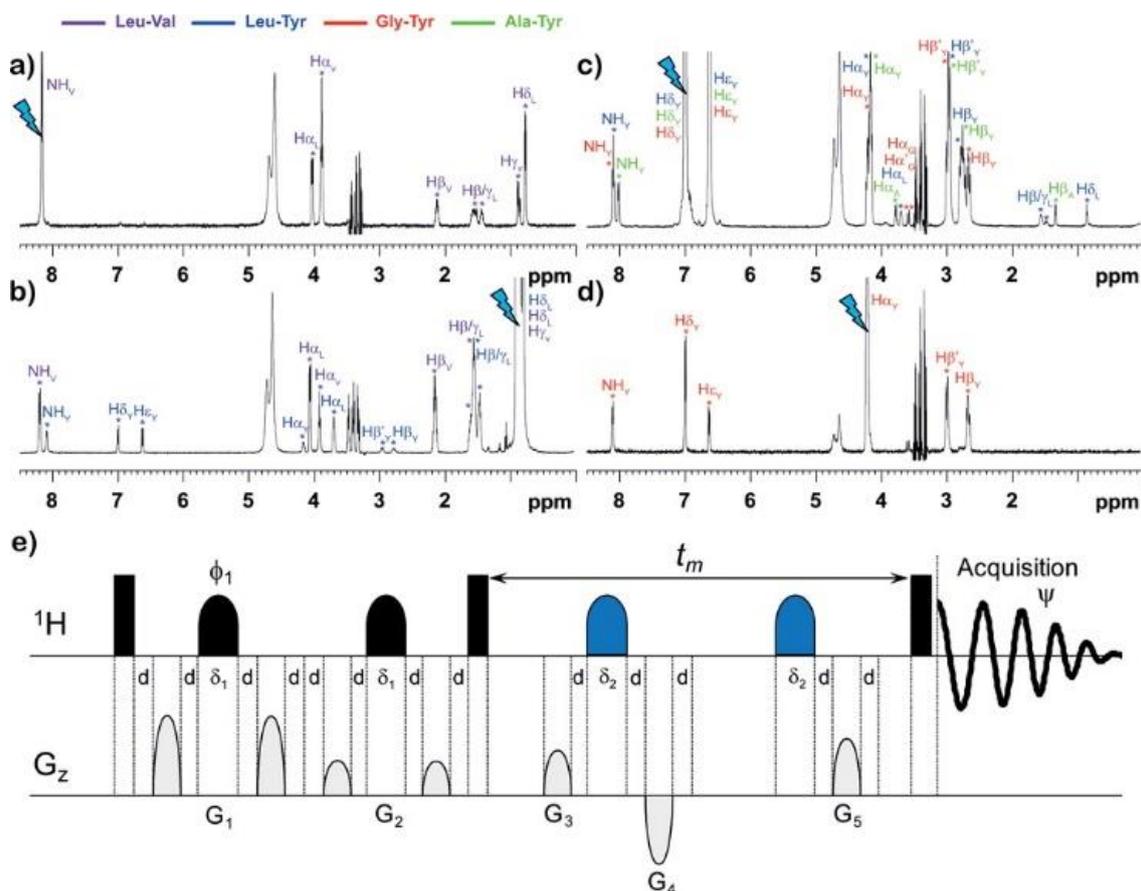


Figure 41. Spectres NOESY 1D sélective du mélange test des quatre dipeptides dissous dans DMSO- $d_6$ /GL (8:2, v/v) (a), b), c), d), 288 K), à 500 MHz ( $^1H$ ),  $t_m$  = 1 s. e) Séquence d'impulsions :  $\phi_1 = x, y, -x, -y$ ,  $\psi = x, -x$ . L'impulsion initiale d'inversion permet d'exciter sélectivement : a) la résonance proton  $NH_V(LV)$  (temps d'expérience (expt) = 400,02 min) ; b) la résonance proton  $H\delta'_i(LY)/H\delta'_i(LV)/H\gamma'_i(LV)$  (expt) = 51,72 min) ; c) les résonances protons  $H\delta'_i(LY)/H\delta'_i(GY)/H\delta'_i(AY)$  (expt = 51,67 min) ; d) la résonance proton  $H\alpha'_i(GY)$  (expt = 136,20). Reproduite de la réf. <sup>47</sup>

Lameiras *et al.* ont également mis à profit une approche plus rapide en considérant l'expérience NOESY 2D découplée en  $F_1$  avec une excitation sélective en  $F_1$  (Figure 84 de la section Matériels et Méthodes) (Figure 84). L'ensemble des protons NH reste la source initiale d'aimantation après l'étape d'excitation sélective de la bande de résonance d'intérêt.

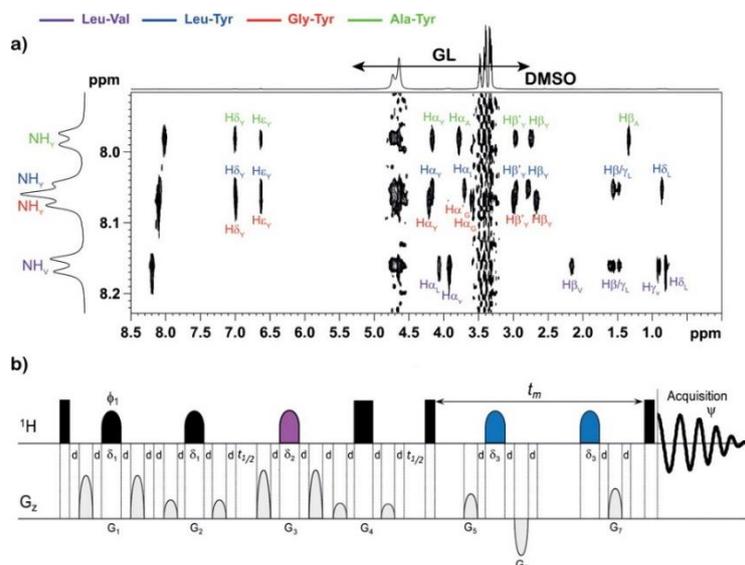


Figure 42. Spectres NOESY 1D sélective en  $F_1$  avec découplage en  $F_2$  du mélange test des quatre dipeptides dissous dans DMSO- $d_6$ /GL (8:2, v/v) à 288 K, à 500 MHz ( $^1\text{H}$ ), (256 scans par valeur de  $t_1$ , expt = 463,77 min,  $t_m = 1$  s). b) Séquence d'impulsions :  $\phi_1 = x, y, -x, -y, \psi = x, -x$ . L'impulsion initiale d'inversion de  $180^\circ$  a été réalisée avec une impulsion gaussienne et a été appliquée à l'excitation des quatre protons amides NH. Reproduite de la réf. <sup>47</sup>

### Etude du mélange de composés apolaires : $\beta$ -Ionone, ( $\pm$ )-Citronellal, (+)-Limonène et Flavone dans DMSO- $d_6$ /GL- $d_8$ (5:5, v/v)

Les auteurs ont déterminé la température de 268 K à laquelle la diffusion de spin est totalement active (sur des distances  $> 13 \text{ \AA}$ ) pour chaque composé du mélange, cela même pour la molécule de ( $\pm$ )-citronellal très flexible et avec une résolution spectrale acceptable, à l'aide d'une expérience NOESY 2D conventionnelle, à 600 MHz. La Figure 43 montre clairement quatre motifs de taches de corrélation NOE, un pour chaque élément du mélange.

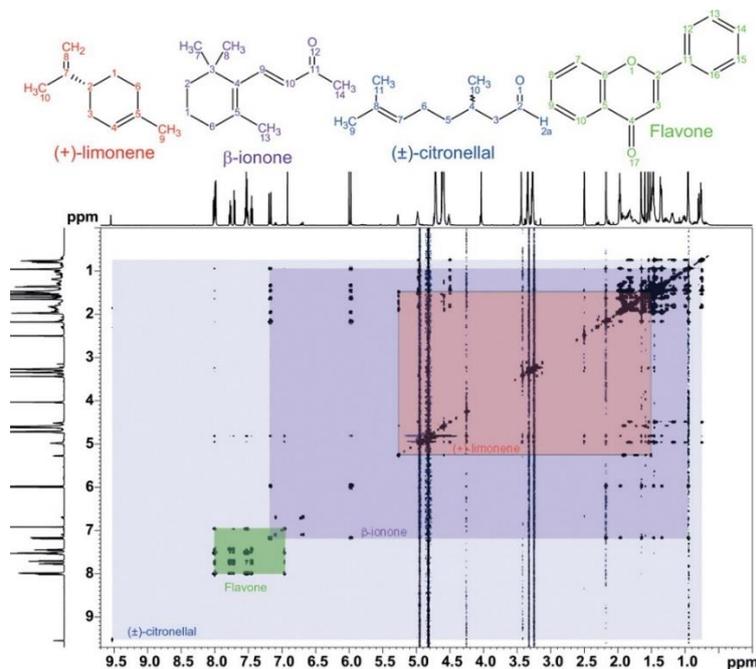


Figure 43. Spectres NOESY 2D du mélange  $\beta$ -ionone, ( $\pm$ )-citronellal, (+)-limonène et flavone dissous dans un mélange DMSO- $d_6$ /GL- $d_8$  (5:5, v/v), à 268 K, à 600 MHz ( $^1\text{H}$ ),  $t_m = 1$  s. Reproduite de la réf. <sup>47</sup>

Cependant, les auteurs ont mentionné la difficulté à attribuer chaque résonance  $^1\text{H}$  de chaque molécule en mélange en raison d'un chevauchement marqué, en particulier entre 0,6 et 2,2 ppm. Pour y remédier, ils ont mis à profit les expériences NOESY 1D sélectives (décrites précédemment pour le mélange de dipeptides) afin de regrouper les résonances protons entre elles. Cela a été rendu possible car plusieurs résonances  $^1\text{H}$  de chaque motif sont suffisamment résolues pour l'individualisation des composés dissous dans le mélange DMSO- $d_6$ /GL- $d_8$  (5:5, v/v), à 268 K, à 600 MHz. Bien que ce solvant binaire soit deutéré, de forts signaux de protons en provenance du GL- $d_8$  persistent. La séquence d'impulsions NOESY 1D sélective a permis de s'affranchir d'une réapparition trop marquée de ces derniers. Bien qu'une diminution de la résolution spectrale ait été observée à 268 K, l'individualisation de la  $\beta$ -ionone, du ( $\pm$ )-citronellal, du (+)-limonène et de la flavone a été obtenue au moyen d'une diffusion de spin observée à longues distances ( $> 13 \text{ \AA}$ ). La Figure 44 présente une comparaison des spectres NOESY 1D sélective du mélange dissous dans le mélange DMSO- $d_6$ /GL- $d_8$  (5:5, v/v) avec les spectres 1D protons classiques de chaque composé dissous dans le DMSO- $d_6$  pur. Le choix d'un ensemble approprié de résonances sélectivement excitées a permis de différencier chaque élément du mélange. En particulier, la diffusion de spin donne lieu à un échange complet d'aimantation sur l'ensemble des protons de la molécule du ( $\pm$ )-citronellal, bien que cette molécule soit extrêmement flexible.

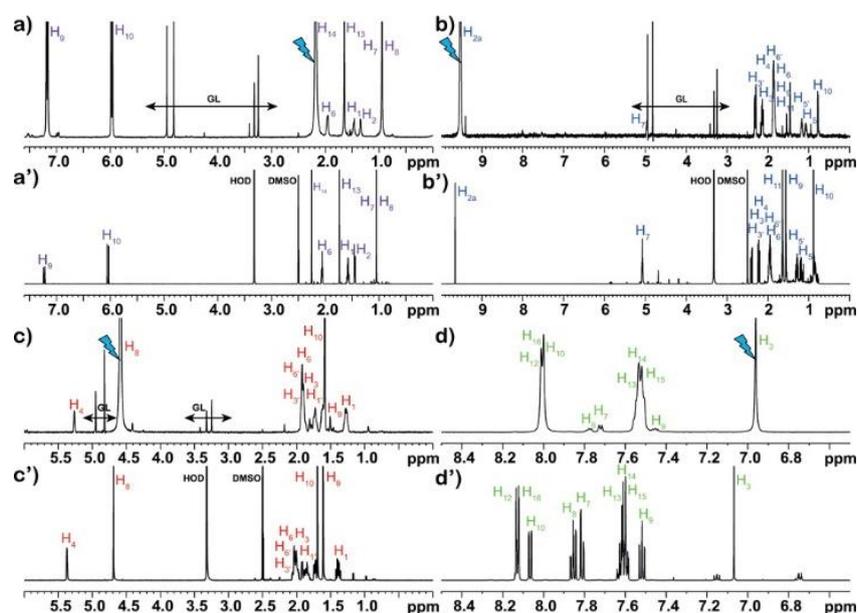


Figure 44. Comparaison à 600 MHz des spectres NOESY 1D  $^1\text{H}$  sélectifs du mélange  $\beta$ -ionone, ( $\pm$ )-citronellal, (+)-limonène et flavone dissous dans le mélange DMSO- $d_6$ /GL- $d_8$  (5:5, v/v),  $t_m = 1 \text{ s}$  à 268 K avec les spectres 1D conventionnels  $^1\text{H}$  de chaque élément du mélange dissous dans le DMSO- $d_6$  pur à 298 K. L'impulsion initiale d'inversion de  $180^\circ$  excite : a) la résonance proton  $\text{CH}_3(14)$  ( $\beta$ -ionone), b) la résonance proton  $\text{CHO}(2a)$  (( $\pm$ )-citronellal), c) la résonance proton  $\text{CH}_2(8)$  ((+)-limonène) et d) la résonance proton  $\text{H}(3)$  (flavone). Spectres 1D conventionnels  $^1\text{H}$  de chaque élément du mélange dissous dans le DMSO- $d_6$  pur à 298 K : a')  $\beta$ -ionone, b') ( $\pm$ )-citronellal, c') (+)-limonène et d') flavone. Reproduite de la réf. <sup>47</sup>

Dans d'autres mélanges plus complexes, une ou plusieurs molécules d'intérêt peuvent ne pas présenter de résonances protons résolues en raison d'un chevauchement spectral trop marqué. La plus grande dispersion des déplacements chimiques que présentent les noyaux  $^{13}\text{C}$  peut apporter une solution à cela en considérant l'expérience HSQC-NOESY 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ . Le spectre individuel complet 1D  $^1\text{H}$  peut être obtenu pour chaque molécule *via* une résonance résolue d'un noyau  $^{13}\text{C}$  protoné. Le spectre HSQC-NOESY 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  enregistré à 268 K (Figure 45) pour le même mélange de composés dans le mélange DMSO- $d_6$ /GL- $d_8$  (5:5, v/v) montre clairement que l'ensemble des protons de chaque

molécule est corrélé avec tous les autres protons et carbones protonés par diffusion de spin. Une sélection appropriée de quatre rangées extraites du spectre HSQC-NOESY 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correspondant à quatre résonances  $^{13}\text{C}$  protonées isolées produit le spectre complet  $^1\text{H}$  de chaque élément du mélange. Ces spectres ont été comparés aux spectres NOESY 1D sélective. Logiquement les profils de résonances  $^1\text{H}$  sont similaires. L'individualisation des composants du mélange a également été obtenue en considérant des colonnes sélectionnées sur le spectre HSQC-NOESY 2D afin d'obtenir les quatre motifs de déplacements chimiques des carbones protonés (Figure 45f)). La capacité à extraire l'ensemble des déplacements chimiques  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  pour un composant individuel dans un mélange peut s'avérer être un outil très utile dans l'individualisation de structures de molécules en mélanges.

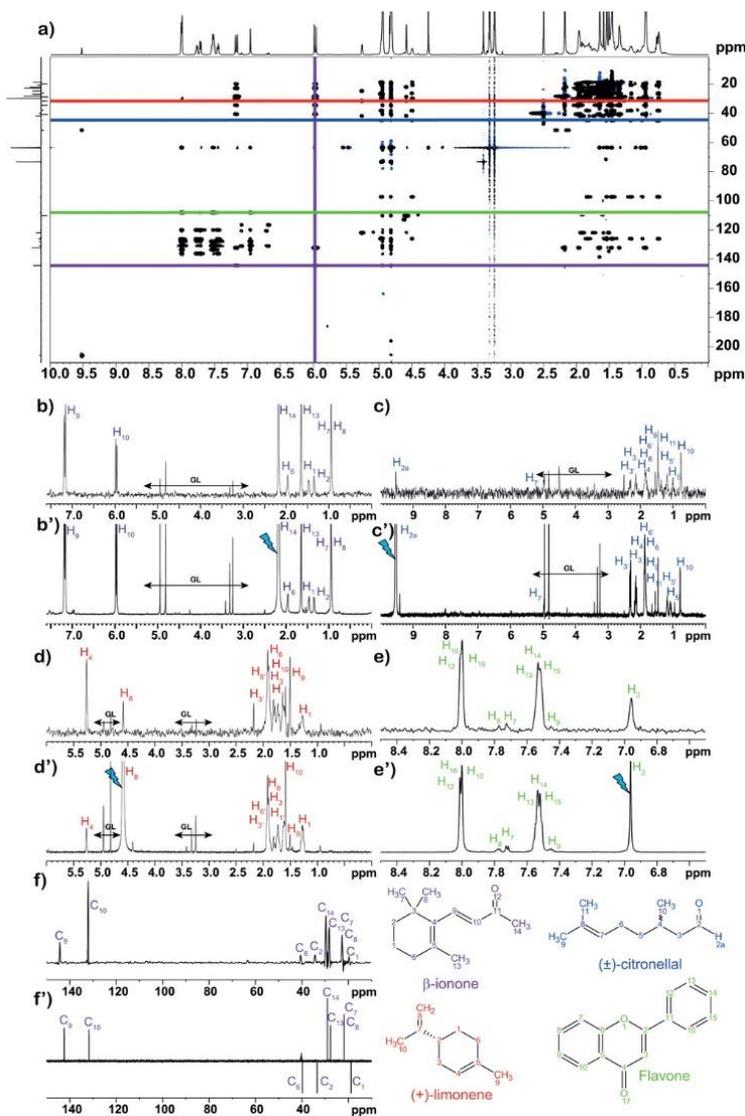


Figure 45. a) Spectre HSQC-NOESY 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  du mélange  $\beta$ -ionone, ( $\pm$ )-citronellal, (+)-limonène et flavone dissous dans le mélange DMSO- $d_6$ /GL- $d_8$  (5:5, v/v), à 268 K, à 600 MHz ( $^1\text{H}$ ),  $t_m = 1$  s. Comparaison des quatre rangées  $^1\text{H}$  extraites de l'expérience HSQC-NOESY 2D à  $\delta$   $^{13}\text{C}$  144,4 ppm (b),  $\beta$ -ionone, ligne pourpre), 44,9 ppm (c), ( $\pm$ )-citronellal, ligne bleue), 31,4 ppm (d), (+)-limonène, ligne rouge), et 108,0 ppm (e), flavone, ligne verte) avec les spectres NOESY 1D sélective (sélection des résonances protons : b')  $\text{CH}_3(14)$   $\beta$ -ionone, c')  $\text{CHO}(2a)$  ( $\pm$ )-citronellal, d')  $\text{CH}_2(8)$  (+)-limonène et e')  $\text{H}(3)$  flavone). f, f') Comparaison du spectre 1D  $^{13}\text{C}$  protoné extrait de l'expérience HSQC-NOESY à  $\delta$   $^1\text{H}$  5,97 ppm ( $\beta$ -ionone, colonne pourpre) avec le spectre conventionnel  $^{13}\text{C}$  DEPT135 de la molécule  $\beta$ -ionone dissoute dans le DMSO- $d_6$  pur à 298 K. Reproduite de la réf <sup>47</sup>

## Etude du mélange $\beta$ -Ionone, ( $\pm$ )-Citronellal, (+)-Limonène et Flavone dans le mélange DMSO- $d_6$ /GL- $d_8$ (5:5, v/v)

Les expériences NOESY 1D et 2D sélectives et HSQC-NOESY 2D ont facilement permis de regrouper les résonances provenant de la même molécule dans le mélange de peptides. Cela pourrait suffire à identifier les composants connus du mélange. Cependant, l'élucidation de la structure et même l'identification de composés organiques nécessitent généralement des données supplémentaires apportées par la connaissance des couplages scalaires homonucléaires et hétéronucléaires. Dans ce contexte, Lameiras *et al.* ont mis en œuvre pour la première fois l'expérience NOESY-COSY 2D sélective et considéré à nouveau l'expérience NOESY-TOCSY 2D sélective<sup>46</sup> pour la caractérisation des systèmes de spin de chaque élément du mélange. Les deux séquences d'impulsions sont constituées dans leur première partie d'un bloc NOESY 1D sélective, puis d'un délai incrémentable pour fabriquer la 2<sup>ème</sup> dimension, puis respectivement d'une impulsion de mélange pour l'expérience NOESY-COSY 2D et d'une période de mélange isotrope pour l'expérience NOESY-TOCSY 2D (Figure 46). Les auteurs ont enregistré les spectres NOESY-COSY et NOESY-TOCSY de la  $\beta$ -ionone en mélange dissoute dans le mélange DMSO- $d_6$ /GL- $d_8$  (5:5, v/v), à 268 K, à 600 MHz, à partir de l'excitation sélective de la résonance proton du motif de l'acétyle à 2,18 ppm (Figure 46b), car l'expérience NOESY 1D sélective enregistrée à partir de cette même résonance (Figure 44a) et celle de l'expérience HSQC-NOESY 2D (Figure 45) ne fournissent pas une attribution claire des résonances  $^1\text{H}$  du motif cyclohexène. De manière intéressante, la quantité d'aimantation transférée pendant la période de diffusion de spin sur l'ensemble de la molécule est suffisante pour permettre à l'expérience NOESY-COSY 2D de révéler un couplage  $^3J$  pertinent entre les protons éthyléniques et les protons du cyclohexène. Le spectre NOESY-TOCSY 2D a confirmé l'identification du système de spin du cyclohexène. Les expériences NOESY-COSY et NOESY-TOCSY 2D sélectives ont permis d'affecter complètement les résonances  $^1\text{H}$  de la  $\beta$ -ionone et ont ouvert la voie à la caractérisation structurale des éléments au sein de mélanges complexes par la détermination des réseaux de couplage  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ .

Lameiras *et al.* ont décrit en 2016 pour la première fois l'utilisation de solvants binaires hautement visqueux efficaces et prometteurs, tels que DMSO- $d_6$ /GL (8:2, v/v) et DMSO- $d_6$ /GL- $d_8$  (5:5, v/v) pour l'analyse de mélanges de composés polaires et apolaires en tirant profit de la diffusion de spin, observée à très longues distances ( $> 14 \text{ \AA}$ ). L'individualisation des composants du mélange Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr et Ala-Tyr dans le mélange DMSO- $d_6$ /GL (8:2, v/v) a été rapportée à 288 K, à 500 MHz, *via* des expériences NOESY 1D et 2D sélectives. La différenciation du mélange  $\beta$ -ionone, ( $\pm$ )-citronellal, (+)-limonène et flavone dans le mélange DMSO- $d_6$ /GL- $d_8$  (5:5, v/v) a été obtenue au moyen des expériences NOESY 1D et 2D sélectives, NOESY-COSY 2D, NOESY-TOCSY 2D sélectives et de l'expérience HSQC-NOESY 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , à 268 K, à 600 MHz.

Les auteurs ont souligné que la manipulation des mélanges binaires visqueux DMSO- $d_6$ /GL et DMSO- $d_6$ /GL- $d_8$  présente des avantages non négligeables par rapport à d'autres solvants visqueux rapportés ultérieurement dans la littérature, tels que le GL ou le CG,<sup>46</sup> en termes de facilité dans la préparation du tube de RMN, d'amplitude de la plage de température d'analyse, du verrouillage du champ magnétique « lock » et du réglage de son homogénéité. Bien que GL/GL- $d_8$  soit ajouté au DMSO- $d_6$  de 10 à 50% en volume, la viscosité du mélange binaire qui en résulte reste suffisamment faible pour assurer un transfert aisé de l'échantillon vers le tube de RMN. En outre, la proportion de DMSO- $d_6$  dans le solvant binaire est suffisamment élevée pour dissoudre une très grande variété de molécules polaires et apolaires. Ajuster la quantité ajoutée de GL/GL- $d_8$  dans le DMSO- $d_6$  à partir d'une

valeur minimale de 10 à 50% (en volume) permet de moduler l'efficacité de la diffusion de spin et donc d'individualiser une large gamme de composés polaires ou apolaires en mélange. Les mélanges binaires DMSO- $d_6$ /GL et DMSO- $d_6$ /GL- $d_8$  seront respectivement préférés pour l'étude des composés biologiques actifs pour lesquels les protons labiles tels que les protons amides ne doivent pas être échangés avec les noyaux de deutérium du GL- $d_8$  et pour les composés organiques pour lesquels les protons labiles ne sont pas essentiels à l'élucidation structurale. Les molécules les plus grandes nécessiteront une faible quantité de GL/GL- $d_8$  dans le DMSO- $d_6$ , tandis que les molécules plus petites et/ou plus flexibles nécessiteront plus de GL (perdeutééré ou non) jusqu'à 50% pour favoriser la diffusion du spin sous contrôle de la température de 298 à 248 K. Les solvants binaires DMSO- $d_6$ /GL et DMSO- $d_6$ /GL- $d_8$  s'avèrent être des solvants visqueux de choix pour l'individualisation de composants polaires et apolaires en mélange, et cela en tirant profit de la diffusion de spin en RMN.

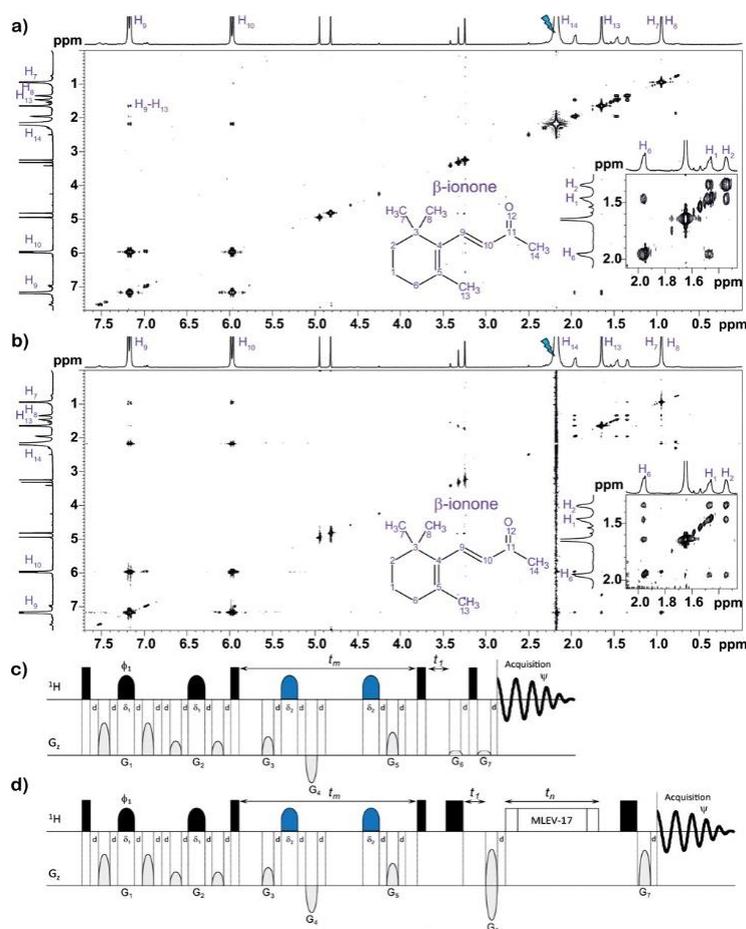


Figure 46. Spectres a) NOESY-COSY 2D et b) NOESY-TOCSY 2D du mélange  $\beta$ -ionone, ( $\pm$ )-citronellal, (+)-limonène et flavone dissous dans le mélange DMSO- $d_6$ /GL- $d_8$  (5:5, v/v), à 268 K,  $t_m = 1$  s, à 600 MHz ( $^1\text{H}$ ). Séquences d'impulsions des expériences c) NOESY-COSY 2D et d) NOESY-TOCSY 2D :  $\varphi_1 = x, y, -x, -y$ ,  $\psi = x, -x$ . Pour les deux expériences, l'impulsion initiale de  $180^\circ$  correspond à une gaussienne et a été appliqué sur la résonance  $\text{CH}_3(14)$  ( $\beta$ -ionone). Reproduit de la réf. <sup>47</sup>

### 3.2. Le mélange binaire DMSO- $d_6$ /eau

Les propriétés physiques du mélange binaire DMSO/eau ont été étudiées à de nombreuses reprises depuis plus de 50 ans. <sup>214-227</sup> Certaines propriétés inattendues de ce mélange ont été imputées à une très forte interaction moléculaire *via* les liaisons hydrogènes. <sup>219-221</sup> Une des propriétés remarquables du mélange DMSO/eau est sa viscosité élevée, comparée à celles des solvants purs. <sup>214, 224-225</sup> A  $25^\circ\text{C}$ , une viscosité maximale de 3,76 cP est mesurée pour un mélange DMSO/eau (6,5:3,5, v/v) avec une

viscosité pure du DMSO et de l'eau respectivement égale à 2,003 et 0,898 cP.<sup>214</sup> Même si la viscosité de ce mélange binaire à 25°C peut être suffisante pour observer un NOE négatif, un des avantages de ce mélange de solvants est la forte augmentation de la viscosité avec la diminution de la température. Par exemple, des augmentations de viscosité par un facteur d'environ 3 et 10 sont obtenues respectivement pour une fraction molaire à 70% de DMSO dans l'eau à 0°C ( $\eta = 9,1$  cP) et à -25°C ( $\eta = 32$  cP)<sup>221</sup> et le point de congélation atteint -130°C.<sup>215, 227</sup> En conséquence, le signe et l'intensité des NOE peuvent être efficacement modulés en modifiant simplement la température de l'expérience de RMN sur une large gamme allant de -130°C à la température ambiante (voire même au-delà).<sup>208</sup> Cette capacité à contrôler l'intensité et le nombre de NOE s'avère extrêmement utile dans les études structurales et conformationnelles, en particulier lorsque plusieurs contraintes de distance sont nécessaires pour définir avec précision les structures tridimensionnelles.<sup>228</sup> A ce jour, de nombreuses études de RMN ont été publiées, tirant profit de la viscosité du mélange DMSO/H<sub>2</sub>O ou D<sub>2</sub>O dans la manipulation de l'intensité du NOE.<sup>228-258</sup>

Dans ce contexte, Lameiras *et al.* en 2017 ont mis en œuvre le mélange binaire visqueux DMSO-*d*<sub>6</sub>/eau dans l'analyse d'un mélange de composés polaires et d'un composé apolaire au moyen de la spectroscopie de RMN homo et hétéronucléaire,<sup>48</sup> étant donné que d'autres solvants visqueux préalablement décrits, tels que les huiles perfluorées,<sup>44</sup> et le glycérol<sup>46</sup> n'étaient pas adaptés respectivement à la dissolution de molécules polaires et apolaires. Les auteurs ont utilisé un spectromètre de RMN à 500 MHz, pour évaluer le mélange binaire DMSO-*d*<sub>6</sub>/H<sub>2</sub>O (7:3, v/v), à 268 K, dans l'individualisation des éléments du mélange test constitué des quatre dipeptides Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr et Ala-Tyr et du mélange binaire DMSO-*d*<sub>6</sub>/H<sub>2</sub>O (8:2, v/v), à 238 K, dans l'étude d'un dinucléotide difluoré de synthèse, <sup>2'</sup>αF T p <sup>3'</sup>αF T (MM = 566,40 g.mol<sup>-1</sup>, Figure 47). Dans le but d'individualiser une large gamme de composés polaires et modérément apolaires au sein de mélanges complexes par RMN, les auteurs ont mentionné les avantages et prodigué quelques conseils pratiques quant à l'usage du mélange DMSO-*d*<sub>6</sub>/eau. Le principal avantage de ce mélange binaire de solvants réside dans sa faible viscosité à température ambiante,<sup>214, 217, 221, 224-225, 243</sup> ce qui permet une introduction aisée de l'échantillon dans le tube de RMN, en opposition avec la manipulation du glycérol et du carbonate de glycérol très visqueux. L'addition de H<sub>2</sub>O au DMSO-*d*<sub>6</sub> ouvre également la voie aux études de RMN à la température ambiante voire en dessous, ce qui est particulièrement approprié pour les composés fragiles thermiquement. Les auteurs ont également signalé que le point de fusion le plus bas observé avec le mélange DMSO/eau avoisine 228 K après l'ajout de 30% (v/v) d'eau dans le DMSO-*d*<sub>6</sub>. La grande quantité de DMSO-*d*<sub>6</sub> permet d'utiliser les outils de routine des spectromètres de RMN modernes tels que le verrouillage automatique du champ magnétique « lock » et l'optimisation de son homogénéité de la même manière que lors de l'utilisation de solvants deutérés usuels. De plus, la résonance résiduelle de l'eau est facilement éliminée avec les méthodes de suppression habituelles telles que la présaturation ou l'« *Excitation Sculpting* ». <sup>259</sup> Ajouter une quantité de H<sub>2</sub>O (ou D<sub>2</sub>O) dans le DMSO-*d*<sub>6</sub> d'une quantité minimale de 10 à 30% (v/v), voire plus, permet de moduler l'efficacité de la diffusion du spin et donc d'individualiser un large éventail de composés polaires et modérément apolaires au sein de mélanges complexes. Les auteurs recommandent l'utilisation du mélange DMSO-*d*<sub>6</sub>/H<sub>2</sub>O pour l'étude de composés biologiquement actifs de manière à empêcher l'échange chimique entre des protons labiles tels que les protons amides avec les noyaux deutérium du D<sub>2</sub>O. Le mélange DMSO-*d*<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O doit être privilégié selon les auteurs pour les composés organiques dans lesquels les protons labiles ne sont pas indispensables à l'élucidation de la structure. Les molécules de taille moyenne nécessitent seulement une faible quantité de H<sub>2</sub>O (ou D<sub>2</sub>O) dans le DMSO-*d*<sub>6</sub>, tandis que les

molécules plus petites et/ou plus flexibles nécessitent plus de H<sub>2</sub>O (ou D<sub>2</sub>O), jusqu'à 30% (v/v), pour favoriser la diffusion du spin de 298 à 238 K.

En fonction de la complexité des mélanges, l'analyse spectrale des spectres <sup>1</sup>H peut s'avérer impossible à réaliser en raison du chevauchement trop intense des résonances <sup>1</sup>H. Dans ce cadre, Lameiras *et al.* ont considéré d'autres noyaux que <sup>1</sup>H afin de bénéficier d'un éclatement des déplacements chimiques plus grand le long du second axe de fréquences. En conséquence, les spectres HSQC-NOESY 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C obtenus sous des conditions de diffusion de spin fournissent simultanément des listes de déplacements chimiques <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C pour les composants du mélange.<sup>47</sup> Les auteurs ont étendu cette approche à l'expérience HSQC-NOESY 2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N. En outre, ils ont également jugé approprié d'impliquer des noyaux <sup>19</sup>F dans des expériences de diffusion de spin. Le noyau <sup>19</sup>F a une abondance naturelle de 100% et présente un rapport gyromagnétique élevé ( $\gamma(^{19}\text{F})/\gamma(^1\text{H}) = 0,941$ ). Ils ont mis en œuvre cette approche originale pour l'analyse de mélanges de composés fluorés et l'ont illustrée à l'aide d'expériences HOESY 1D et 2D <sup>1</sup>H-<sup>19</sup>F sélectives.

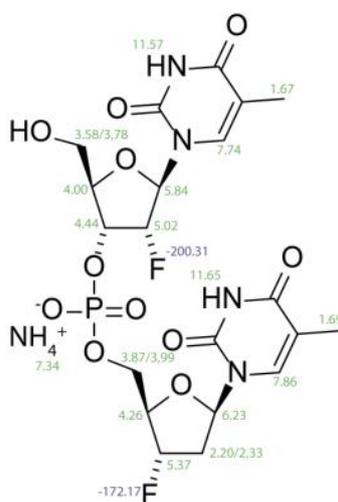


Figure 47. Structure chimique du dinucléotide difluoré 2' $\alpha$ FTP3' $\alpha$ FT. Reproduite de la réf.<sup>48</sup>

### Etude du mélange polaire Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr et Ala-Tyr dans DMSO-*d*<sub>6</sub>/H<sub>2</sub>O (7:3, v/v)

Le spectre NOESY 2D du mélange de test constitué des quatre dipeptides, enregistré à 268 K, à 500 MHz, a révélé *via* la diffusion de spin un transfert complet d'aimantation de la résonance des protons amides sur l'ensemble des résonances protons de chaque dipeptide, sans élargissement significatif du signal (Figure 48a). Par conséquent, l'individualisation des peptides en mélange a été accessible facilement. Les auteurs ont également considéré la détection de l'ensemble des résonances d'intérêt lors de l'acquisition du signal au moyen des expériences NOESY 1D sélective (Figure 49).<sup>46-47</sup> Un ensemble approprié de résonances protons sélectivement excités permet de différencier chaque dipeptide. Un échange complet d'aimantation a été observé sur des distances supérieures à 14 Å. Les spectres HSQC-NOESY 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C et <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N du mélange de test des quatre dipeptides acquis à 268 K, à 600 MHz dans DMSO-*d*<sub>6</sub>/H<sub>2</sub>O (7:3, v/v) ont révélé que tous les protons de chaque dipeptide du mélange corrélaient avec tous les autres protons et carbones protonés ou azotes protonés par diffusion de spin (Figure 50). Par conséquent, une sélection appropriée de rangées avec comme point de départ des résonances carbone ou azote isolées, permet de produire le spectre complet proton de chaque dipeptide. Ces quatre spectres sont similaires à ceux des dipeptides purs.

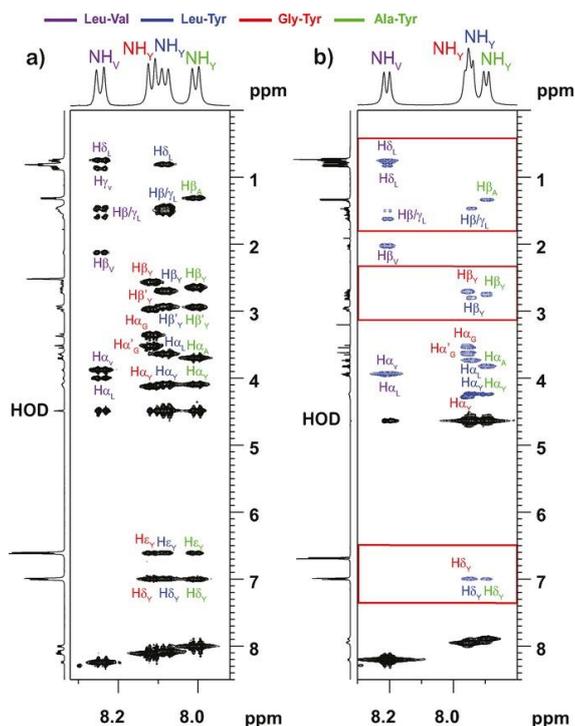


Figure 48. Région des protons amides du spectre NOESY 2D du mélange test des quatre dipeptides (10 mM) à 500 MHz a) dissous dans DMSO- $d_6$  (7:3, v/v), à 268 K, temps de mélange ( $t_m$ ) = 1 s, b) dissous dans du H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9:1, v/v), à 298 K,  $t_m$  = 1 s. Les cadres rouges correspondent aux régions du spectre d'intérêt dans lesquelles l'eau comme solvant a un effet majeur dans le nombre et le signe des taches de corrélation. Reproduite de la réf. <sup>48</sup>

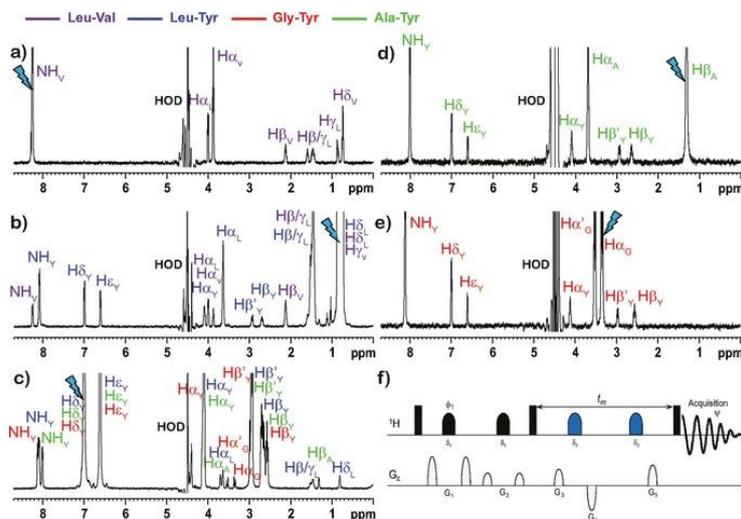


Figure 49. Spectres NOESY 1D sélective du mélange test des quatre dipeptides (10 mM) dissous dans le mélange DMSO- $d_6$ /H<sub>2</sub>O (7:3, v/v) (a, b, c, d, 268 K) à 500 MHz ( $^1\text{H}$ ),  $t_m$  = 1 s. L'impulsion initiale d'inversion permet d'exciter sélectivement : a) la résonance proton NH<sub>V</sub>(LV) ; b) la résonance proton H $\delta_L$ (LY)/H $\delta_L$ (LV)/H $\gamma_V$ (LV) ; c) les résonances protons H $\delta_V$ (LY)/H $\delta_V$ (GY)/H $\delta_V$ (AY) ; d) la résonance proton H $\beta_A$ (AY) ; e) la résonance proton H $\alpha_V$ (GY). f) Séquence d'impulsions :  $\varphi_1 = x, y, -x, -y, \psi = x, -x$ . Reproduite de la réf. <sup>48</sup>

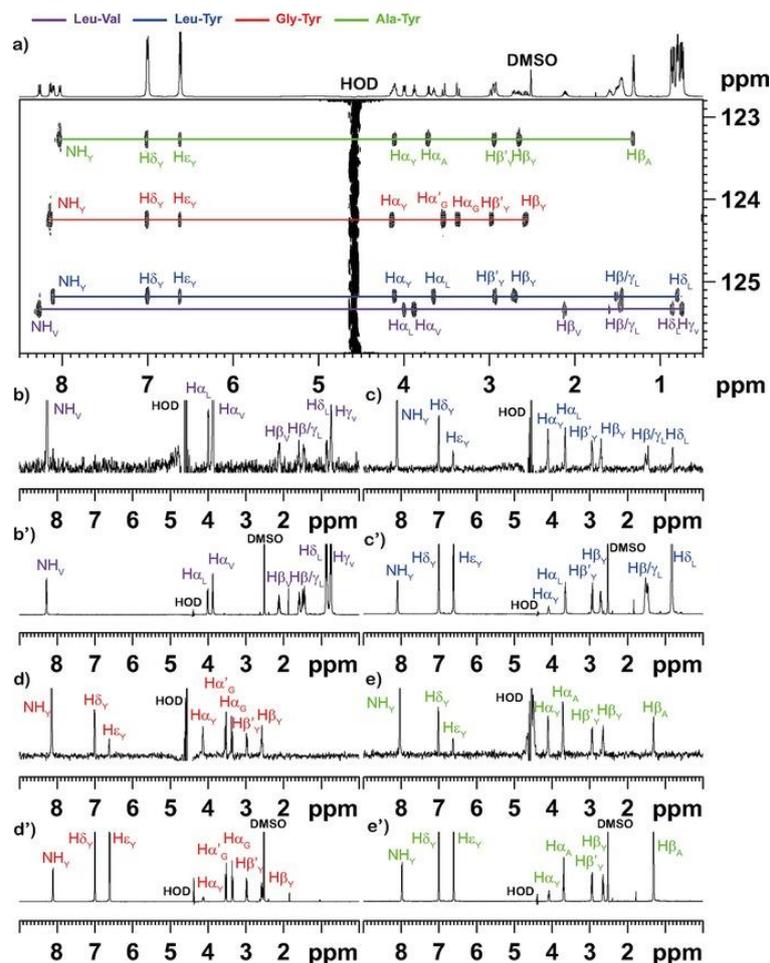


Figure 50. a) Spectre HSQC-NOESY 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  du mélange test des quatre dipeptides (20 mM) dissous dans  $\text{DMSO-}d_6/\text{H}_2\text{O}$  (7:3, v/v) à 268 K,  $t_m = 1$  s, à 600 MHz ( $^1\text{H}$ ). Comparaison des quatre rangées  $^1\text{H}$  extraites de l'expérience HSQC-NOESY 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  à 125,33 ppm (b), b'), Leu-Val, ligne pourpre), à 125,19 ppm (c), c'), Leu-Tyr, ligne bleue), à 124,26 ppm (d), d'), Gly-Tyr, ligne rouge), et à 123,29 ppm (e), e'), Ala-Tyr, ligne verte), avec les spectres conventionnels 1D  $^1\text{H}$  de chaque dipeptide pur dissous dans le mélange  $\text{DMSO-}d_6/\text{H}_2\text{O}$  (7:3, v/v), à 268 K, à 600 MHz ( $^1\text{H}$ ). Reproduite de la réf. <sup>48</sup>

### $2'_{\alpha\text{F}}\text{Tp}3'_{\alpha\text{F}}\text{T}$ dans $\text{DMSO-}d_6/\text{H}_2\text{O}$ (8:2, v/v)

Les auteurs ont étendu la simplification de l'analyse de mélanges en considérant la spectroscopie de RMN du  $^{19}\text{F}$ . L'introduction du fluor dans les molécules synthétiques offre une grande variété de propriétés moléculaires originales, en particulier dans les domaines des polymères, des sciences des matériaux et des agents thérapeutiques, de sorte que l'étude des composés contenant du fluor en mélange devient tout à fait pertinente. La gamme des déplacements chimiques plus large du  $^{19}\text{F}$  par rapport au noyau  $^1\text{H}$  facilite l'individualisation des composés fluorés en mélange. <sup>260-261</sup>

La diffusion de spin appliquée aux expériences de RMN hétéronucléaires décrites précédemment ne concernait que les noyaux  $^1\text{H}$  des molécules d'intérêt. Les auteurs ont intégré le noyau  $^{19}\text{F}$  dans le réseau de spin moléculaire dans lequel l'aimantation est transférée par relaxation croisée longitudinale en solvant visqueux. Cette approche a été considérée comme potentiellement efficace car les taux de relaxation croisée longitudinale sont proportionnels au produit des carrés des rapports gyromagnétiques  $\gamma$  des noyaux concernés. L'observation de la diffusion de spin  $^1\text{H}$ - $^{19}\text{F}$  et  $^{19}\text{F}$ - $^1\text{H}$  à travers l'expérience HOESY devient alors un objectif atteignable. Le dinucléotide synthétique difluoré,  $2'_{\alpha\text{F}}\text{Tp}3'_{\alpha\text{F}}\text{T}$  (Figure 47) a été choisi pour illustrer cette approche. Les spectres ont été enregistrés dans le

mélange binaire DMSO- $d_6$ /H<sub>2</sub>O au lieu du mélange DMSO- $d_6$ /D<sub>2</sub>O pour empêcher l'échange chimique des protons NH avec le deutérium provenant du D<sub>2</sub>O.

Les auteurs ont d'abord déterminé la température qui offre le meilleur compromis entre la diffusion de spin et la résolution spectrale à l'aide d'expériences NOESY 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H et HOESY 2D <sup>1</sup>H-<sup>19</sup>F de 268 à 238 K, avec un bloc « *Excitation Sculpting* » pour la suppression du signal d'eau.<sup>259</sup> Un transfert d'aimantation complet est détecté à 238 K sur l'ensemble des noyaux <sup>1</sup>H et <sup>19</sup>F de <sup>2'</sup><sub>αF</sub>Tp<sup>3'</sup><sub>αF</sub>T, observés sur des distances supérieures à 18 Å (Figure 51). Les spectres individuels <sup>1</sup>H et <sup>19</sup>F de la molécule <sup>2'</sup><sub>αF</sub>Tp<sup>3'</sup><sub>αF</sub>T ont été facilement obtenus par extraction d'un ensemble approprié de rangées et de colonnes. Comme prévu, les spectres extraits sont similaires aux spectres classiques 1D <sup>1</sup>H et <sup>19</sup>F. Néanmoins, le chevauchement des résonances <sup>1</sup>H peut entraver l'élucidation de la structure lors de l'étude de mélanges de composés fluorés complexes. Les auteurs ont proposé une solution de contournement en excitant sélectivement une seule résonance <sup>19</sup>F après avoir mis en œuvre pour la première fois une séquence d'impulsions de RMN dédiée, composée d'un bloc correspondant à un double écho de gradient de champ magnétique suivi d'un bloc HOESY 1D (Figure 52). Chaque noyau <sup>19</sup>F excité sélectivement à - 172,19 et - 200,30 ppm transfère son aimantation sur l'ensemble des protons de la molécule. Dans l'autre sens, l'excitation sélective, en particulier des résonances protons NH à 11,57 et 11,65 ppm conduit au spectre <sup>19</sup>F de l'échantillon (Figure 53).

Lameiras *et al.* ont démontré que le mélange binaire DMSO- $d_6$ /H<sub>2</sub>O s'avère être le mélange visqueux le plus approprié à ce jour pour l'individualisation de composés polaires et (modérément) apolaires au sein de mélanges complexes, en tirant bénéfice de la diffusion de spin en spectroscopie de RMN <sup>1</sup>H et <sup>19</sup>F. Les auteurs ont souligné que l'utilisation de DMSO- $d_6$ /H<sub>2</sub>O comme solvant binaire visqueux présente des avantages précieux par rapport à d'autres solvants visqueux déjà décrits dans la littérature tels que le glycérol, le carbonate de glycérol en termes de préparation des échantillons, de plage de températures d'analyse, de verrouillage facile du champ magnétique principal « lock » et ainsi que de l'optimisation de l'homogénéité de celui-ci. L'individualisation du mélange test des quatre dipeptides Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr et Ala-Tyr a été réalisée avec succès dans le mélange DMSO- $d_6$ /H<sub>2</sub>O (7:3, v/v) à 268 K à 500 MHz au moyen des expériences sélectives NOESY 1D, 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H et des expériences HSQC-NOESY 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C et <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N. Les noyaux <sup>13</sup>C et <sup>15</sup>N ont été impliqués en tant que marqueurs de déplacements chimiques afin d'améliorer la lisibilité du spectre, cependant au prix d'une sensibilité plus faible causée par leur faible abondance. L'approche de diffusion de spin en milieu visqueux *via* la spectroscopie de RMN hétéronucléaire a également été illustrée en considérant les noyaux <sup>19</sup>F du composé difluoré <sup>2'</sup><sub>αF</sub>Tp<sup>3'</sup><sub>αF</sub>T dans DMSO- $d_6$ /H<sub>2</sub>O (8:2, v/v) à 238 K à 500 MHz au moyen des expériences sélectives NOESY 1D, 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H et HOESY 1D, 2D <sup>1</sup>H-<sup>19</sup>F et <sup>19</sup>F-<sup>1</sup>H.

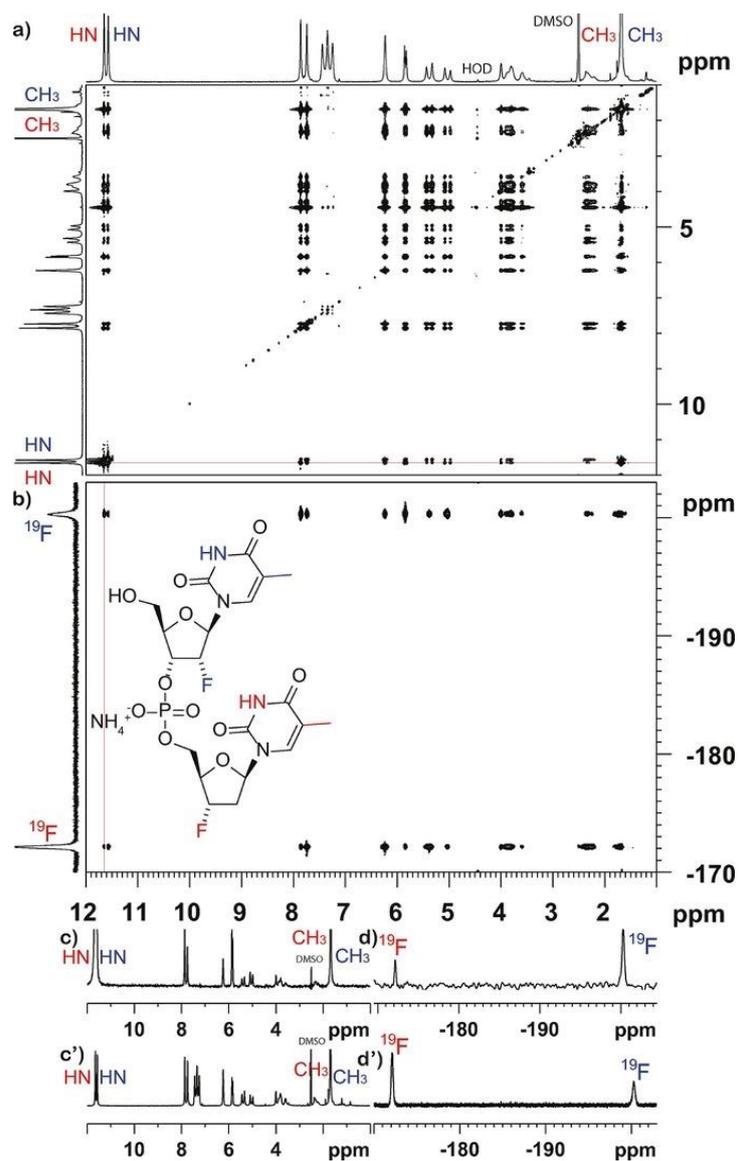


Figure 51. a) Spectres NOESY 2D  $^1\text{H}-^1\text{H}$  et b) HOESY 2D  $^1\text{H}-^{19}\text{F}$  du  $2'\alpha\text{F}-\text{TP}3'\alpha\text{F}-\text{T}$  (20 mM) dissous dans le mélange binaire DMSO- $d_6$ /H $_2$ O (8:2, v/v), à 238 K, avec un temps de mélange ( $t_m$ ) = 1 s, à 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). Comparaison de la rangée  $^1\text{H}$  extraite de l'expérience NOESY 2D  $^1\text{H}-^1\text{H}$  à 11,65 ppm avec le spectre conventionnel 1D  $^1\text{H}$  (c), c'), ligne rouge) et comparaison de la colonne en  $^{19}\text{F}$  extraite du spectre HOESY 2D  $^1\text{H}-^{19}\text{F}$  à 11,65 ppm avec le spectre conventionnel 1D  $^{19}\text{F}$  (d), d'), colonne rouge). Reproduite de la réf. <sup>48</sup>

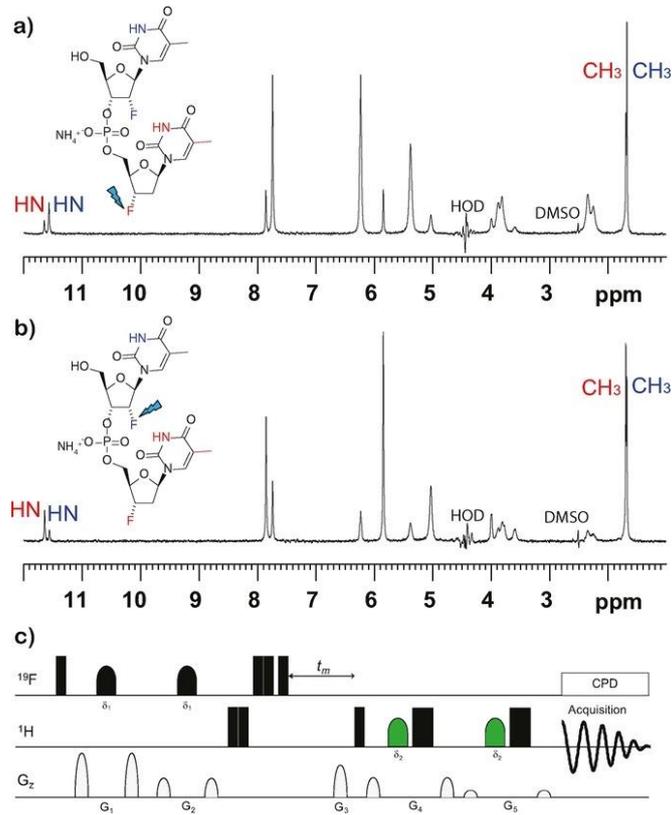


Figure 52. Spectres HOESY 1D  $^1\text{H}$ - $^{19}\text{F}$  sélective du composé  $2'\alpha\text{FTp}3'\alpha\text{FT}$  (20 mM) dissous dans le mélange binaire DMSO- $d_6$ /H $_2$ O (8:2, v/v) (a, b, 238 K),  $t_m = 1$  s, à 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). L'impulsion initiale d'inversion permet d'exciter sélectivement : la résonance fluor a) à -172,17 ppm et b) à -200,31 ppm. c) Séquence d'impulsions. Reproduite de la réf. <sup>48</sup>

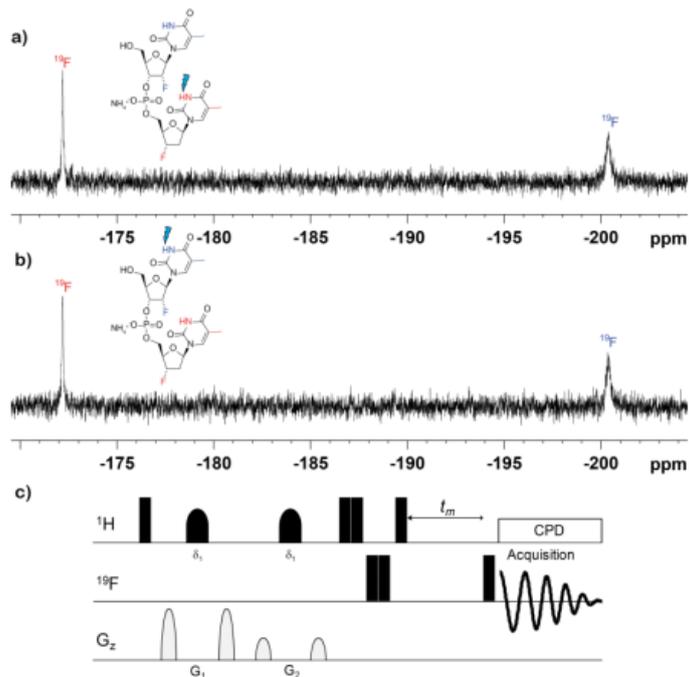


Figure 53. Spectres HOESY 1D  $^{19}\text{F}$ - $^1\text{H}$  sélective du composé  $2'\alpha\text{FTp}3'\alpha\text{FT}$  (20 mM) dissous dans le mélange binaire DMSO- $d_6$ /H $_2$ O (8:2, v/v) (a, b, 238 K),  $t_m = 1$  s, à 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). L'impulsion initiale d'inversion permet d'exciter sélectivement : la résonance proton NH a) à 11,65 ppm et b) à 11,57 ppm. c) Séquence d'impulsions. Reproduite de la réf. <sup>48</sup>

#### 4. Conclusion

Cette section a présenté une partie des investigations développées au laboratoire, portant sur la manipulation de l'intensité du NOE négatif de molécules de petites ou de moyennes tailles dédiées à l'analyse par RMN de mélanges complexes sans séparation physique, au moyen de solvants (ou mélanges de solvants) visqueux. La modulation de l'intensité du NOE dépend du choix de la fréquence de précession de Larmor  $\omega$  et du temps de corrélation rotationnelle moléculaire globale  $\tau_c$ , et par conséquent de l'altération possible de la viscosité du solvant, étant donné que la théorie de la microviscosité de Gierer et Wirtz<sup>208</sup> exprime la dépendance du temps de corrélation moléculaire  $\tau_c$  en fonction de la viscosité du milieu. Pour une même intensité de champ magnétique, l'augmentation de la viscosité de la solution permet de ralentir les réorientations moléculaires et donc d'augmenter le temps de corrélation  $\tau_c$ . En conséquence, les molécules de petites et moyennes tailles entrent dans le régime du NOE négatif de sorte que l'augmentation maximale atteignable de celui-ci est de 100%. Ainsi, pour une longue période de saturation (« *steady-state NOE* ») ou pour un long temps de mélange (« *transient NOE* »), un échange d'aimantation intramoléculaire partiel ou complet *via* la diffusion de spin est possible. En cas de diffusion de spin très active, la détermination des distances internucléaires, donc de la structure moléculaire et de la conformation, peut être entravée. Néanmoins, cette diffusion de spin active est précieuse dans l'individualisation des composés polaires et apolaires au sein de mélanges sans séparation physique.

L'observation de l'accroissement significatif du NOE négatif dans les solvants peu visqueux ( $\eta > 2$  cP), tel que le DMSO- $d_6$ , devrait être d'application générale pour les composés rigides de taille moyenne ( $MM > 700 \text{ g.mol}^{-1}$ ) qui en solution se réarrangent de manière isotrope, en considérant des spectromètres de RMN de routine à une fréquence de fonctionnement supérieure à 300 MHz, à température ambiante, pour des études de RMN d'élucidations structurales et conformationnelles. L'observation du NOE négatif pour des petites molécules rigides ( $MM > 150 \text{ g.mol}^{-1}$ ) nécessite une augmentation de l'intensité du champ magnétique ou de la viscosité du milieu (ou des deux), à savoir une combinaison de la fréquence de fonctionnement d'au moins 500 MHz et d'une viscosité minimale de 7-11 cP du solvant tel que le mélange binaire EG/eau à température ambiante.<sup>258, 262-263</sup> Dans la volonté d'individualiser les éléments des mélanges complexes sans séparation physique, pour une même fréquence de Larmor, la détection de la diffusion de spin active (corrélations NOE à longues distances supérieures à 13 Å) nécessitera l'utilisation d'un solvant très visqueux ( $\eta > 80$  cP) tel que le GL ou le CG à la température ambiante ou des mélanges de solvants binaires tels que DMSO- $d_6$ /GL, DMSO- $d_6$ /EG, DMSO- $d_6$ /eau, de la température ambiante à des températures inférieures à zéro.

Ci-dessous est représenté un récapitulatif des avantages et inconvénients des différents solvants ou mélanges de solvants visqueux décrits à ce jour dans la littérature pour l'étude de mélanges complexes *via* la diffusion de spin en RMN (Tableau 2).

	PCTFE/ $\text{CDCl}_3$		Eau « ultrafroide »		Glycérol		Carbonate de Glycérol (CG)		DMSO- $d_6$ / Glycérol		DMSO- $d_6$ / Glycérol- $d_8$		DMSO- $d_6$ / Ethylène Glycol (EG)		DMSO- $d_6$ /eau	
Préparation de l'échantillon	✓		✗		✗		✗		✓		✓		✓		✓	
Pouvoir de dissolution des composés polaires	✗		✓		✓		✓		✓		✓		✓		✓	
Pouvoir de dissolution des composés apolaires	✓		✗		✗		✗		✓		✓		✓		✓	
Coût des solvants	✗		✓		✓		✗		✓		✗		✓		✓	
Efficacité de la diffusion de spin	278 K d > 25 Å	✓	258 K d > ? Å	✗	318 K d > 14 Å	✓	288 K d > 14 Å	✓	288 K d > 14 Å	✓	268 K d > 13 Å	✓	268 K d > 14 Å	✓	268/238 K d > 18 Å	✓
Résolution des spectres de RMN	✓		✓		✓		✓		✓		✓		✓		✓	
Echange de protons labiles	✗		✓		✓		✓		✓		✗		✓		✓	
RMN de routine (lock, shim)	✓		✓		✗		✗		✓		✓		✓		✓	
Suppression du solvant	✓		✓		✗		✗		✗		✓		✗		✓	

Tableau 2. Récapitulatif des avantages et inconvénients des différents solvants ou mélanges de solvants visqueux décrits à ce jour dans la littérature pour l'étude de mélanges complexes *via* la diffusion de spin en RMN.

## PARTIE I-C : ÉTUDE DU SUIVI REACTIONNEL PAR LA SPECTROSCOPIE DE RMN

## 1. Introduction

Une synthèse organique se déroule le plus souvent dans un milieu complexe de réactifs, de solvants et de catalyseurs qui évolue dans le temps vers l'obtention de produits et de sous-produits. Que ce soit pour des applications en chimie fine, cosmétique, agro-alimentaire ou pharmaceutique, les chimistes doivent trouver un moyen d'élucider rapidement les structures des produits et sous-produits résultant d'une réaction. Le défi d'une telle investigation réside dans la compréhension des mécanismes impliqués, qui passent bien souvent par la formation d'un ou de plusieurs intermédiaires. Les industries pharmaceutiques exigent que toutes les impuretés présentes en proportion supérieure à 0,1% d'un ingrédient pharmaceutique soient aujourd'hui identifiées. Pour répondre à cette demande, la spectroscopie de RMN est devenue un outil essentiel, en raison de sa rapidité d'analyse obtenue par la disponibilité de champs magnétiques de plus en plus intenses, par l'amélioration de la technologie des sondes, par le développement continu de nouvelles séquences d'impulsions et l'amélioration de celles existantes.

A l'échelle du laboratoire, les chimistes organiciens rencontrent fréquemment des cas où la synthèse d'une molécule souhaitée se réalise en plusieurs étapes, impliquant parfois plusieurs intermédiaires dont la durée de vie est beaucoup trop courte pour être décelable par les méthodes de RMN conventionnelles. De ce fait, le chimiste organicien n'est pas toujours suffisamment armé pour faire l'investigation complète et approfondie des mécanismes de synthèse qu'il développe, le conduisant à ne suggérer que des hypothèses plausibles. Dans ce contexte, une mauvaise compréhension générale des réactions impliquées empêche d'optimiser les conditions de la réaction ou de généraliser la méthodologie employée à d'autres réactifs.

Dans ce contexte, la spectroscopie de RMN a connu une véritable avancée technologique et méthodologique pour l'étude du suivi réactionnel au cours de ces vingt dernières années. D'un point de vue instrumental, il existe deux modes de fonctionnement possibles : le « *static-mode* » et le « *mobile-mode* ».

Le « *static-mode* » est similaire à la procédure usuelle qui est employée pour analyser un échantillon contenu dans un tube de RMN standard. Il se décline en trois approches « *in-situ* », « *off-line* » et « *rapid-injection* ». L'objectif consiste soit à mettre au point un protocole pour introduire rapidement les réactifs dans le tube de RMN à l'extérieur de l'aimant avant d'insérer ce dernier dans le spectromètre, soit à élaborer un dispositif permettant de mélanger les réactifs directement dans la zone de détection de la bobine de la sonde de mesure. Par la suite, la stratégie de suivi habituelle consiste à enregistrer une série de spectres 1D et 2D en fonction de l'avancement de la réaction chimique.

Le « *mobile-mode* » cherche à « mimer » les conditions d'une synthèse en utilisant un équipement adapté qui ne nécessite pas le transfert manuel de l'échantillon dans le tube de RMN.<sup>264</sup> Le mélange réactionnel circule depuis un récipient de réaction situé à l'extérieur de l'aimant vers la zone de détection de la bobine grâce à un capillaire où l'analyse peut être effectuée en flux continu (« *continuous-flow* ») ou en flux arrêté (« *stopped-flow* »).

Avec l'apport significatif des récentes méthodes développées dans le but de réduire la durée d'acquisitions des expériences 2D, certaines d'entre-elles sont tout à fait adaptées à l'analyse de mélanges complexes dont la composition évolue au cours du temps. Parmi ces méthodes, l'échantillonnage non uniforme (NUS) constitue une possibilité intéressante ; elle emploie un modèle mathématique pour reconstituer artificiellement des FIDs manquantes à partir de l'enregistrement de certaines d'entre-elles aléatoirement choisies. Jusqu'à présent, elle était principalement employée sur

des échantillons dits « stationnaires » fournissant une résolution similaire aux expériences 2D en un temps réduit. Cependant, peu de publications suggèrent son application pour le suivi des réactions chimiques. Mais ces dernières années, de récents travaux ont démontré que l'expérience NUS est actuellement en passe de franchir un seuil dans ce domaine.

Au-delà de cet aspect, les expériences fondées sur le codage spatial telles que les méthodes ultrarapides sont sans nul doute les plus appropriées dans ce domaine par leur capacité à pouvoir atteindre des temps d'acquisitions de l'ordre de la seconde voire de quelques centaines de millisecondes. En combinaison avec une instrumentation de type « *on-line* », l'effet synergique produit doit permettre d'obtenir un gain de temps optimal pour une analyse plus fine de la réaction étudiée en « contrôlant » sa dynamique à tout moment. Ces caractéristiques doivent permettre de positionner l'expérience ultrarapide comme candidat idéal pour étudier les réactions chimiques contenant des espèces instables ou des intermédiaires ayant des durées de vie limitées.

L'objectif de cette section est de présenter une partie des dernières innovations instrumentales et méthodologiques employées en RMN pour le suivi de réactions chimiques. Cette partie se consacrera uniquement à la spectroscopie de RMN liquide à haut champ (aimant supraconducteur), même si ces dernières années la RMN à bas champ (aimant permanent) est en pleine expansion en raison de son côté pratique (absence de la maintenance des fluides cryogéniques) permettant d'analyser rapidement des réactions sans avoir la nécessité d'utiliser un équipement encombrant et coûteux. La nouvelle génération de spectromètres transportables répond à des exigences économiques et pratiques en amenant la RMN directement sur le plan de travail du chimiste organicien ou en étant intégrée dans des lignes de production industrielles. De plus, le système de verrouillage externe est capable de compenser la dérive du champ magnétique au cours du temps, s'affranchissant de l'utilisation de solvants deutérés. Cependant, la résolution et la dispersion des résonances sont impactées, obligeant l'amélioration des méthodes préexistantes. Le matériel qui a été utilisé jusqu'à présent pour réaliser le suivi de réactions chimiques en employant des expériences de RMN conventionnelles sera abordé en première sous-partie. La deuxième sous-partie sera dédiée à l'emploi de méthodes rapides permettant d'acquérir des expériences en quelques secondes, et ainsi de refléter à la manière de « photos prises consécutivement », les changements se produisant au cours de la réaction, fournissant alors des informations pertinentes sur le mécanisme réactionnel.

## 2. L'instrumentation employée pour le « *static-mode* » et « *mobile mode* »

Un problème rencontré par l'opérateur qui souhaite suivre une réaction chimique par la spectroscopie de RMN réside dans la présence d'une durée qualifiée de « temps mort ». Durant cette dernière, aucun changement dynamique de la réaction ne peut être observé, en raison du temps qui s'écoule nécessairement entre le mélange de tous les réactifs et l'acquisition du premier spectre de RMN (Figure 54).



Figure 54. Procédure conventionnelle « *in-situ* » pour la surveillance d'une réaction chimique.

Un premier retard est dû à la nécessité de préparer le tube et de l'insérer dans le spectromètre. Le deuxième retard est causé par « l'accord de sonde » et par « le shim », même si ces étapes peuvent être effectuées à l'avance sur un échantillon analogue et dans ce cas, seul le « lock » nécessite un délai spécifique. Cette durée, pendant laquelle la réaction n'est pas observable, prend généralement quelques minutes empêchant malheureusement toutes analyses de cinétiques trop rapides. Pour pallier à cet inconvénient, la communauté scientifique propose des outils instrumentaux depuis une vingtaine d'années, dont le but est de minimiser le temps mort en développant des équipements de moins en moins encombrants, faciles d'utilisation et bon marché. Selon la littérature, deux modes de fonctionnement sont possibles. Elles sont décrites ci-dessous (Figure 55).

Avant de présenter l'application des différents modes, il convient de montrer la différence qui existe entre les approches. Le premier, appelé « *static-mode* » (Figure 55a), est subdivisé en trois approches et emploie un tube de RMN standard de 5 à 10 mm de diamètre à partir duquel le suivi de la réaction peut être réalisé directement à l'intérieur de celui-ci sans modification de la sonde de mesure. Dans l'approche « *in-situ* », les réactifs sont introduits rapidement dans le tube de RMN où débute la réaction tandis que dans l'approche « *off-line* », la réaction est momentanément arrêtée et des aliquotes sont prélevées périodiquement depuis le milieu réactionnel avant d'être ajoutées dans un tube de RMN. Cette dernière procédure présente l'avantage de pouvoir suivre la réaction (préalablement quenchée) à tout instant et d'analyser l'échantillon par des méthodes de RMN conventionnelles sans trop subir l'avancement de la réaction dans le temps contrairement à la précédente approche. Enfin, l'approche « *rapid-injection* » nécessite de placer un insert à l'intérieur d'un tube de RMN et d'utiliser une seringue à injection rapide à l'extérieur de l'aimant. Les réglages automatiques habituels du spectromètre sont effectués sur le tube de RMN qui est positionné dans l'aimant, tandis que la seringue permet de délivrer le ou les réactifs nécessaires pour que la réaction puisse démarrer. Le mélange s'effectue seulement en quelques dizaines de millisecondes<sup>265</sup> favorisant ainsi l'étude de réactions ayant des cinétiques plus rapides que les approches « *in-situ* » et « *off-line* » ne peuvent étudier.

Au-delà de l'aspect « *static-mode* », un deuxième mode appelé « *mobile-mode* » élimine le besoin de l'intervention de l'opérateur une fois l'expérience lancée, mais nécessite un capillaire semblable à un tube de RMN 5 mm, à partir duquel un dispositif sophistiqué est élaboré (Figure 55b). Ce système utilise des méthodes d'écoulements qui peuvent fonctionner en flux continu (« *continuous-flow* ») ou arrêté (« *stopped-flow* »). Ces configurations nécessitent l'emploi de réactifs initialement séparés qui s'écoulent en plusieurs courants différents soit dans une cuve de réaction située à l'extérieur de l'aimant jusque dans la cellule d'observation, soit directement dans une chambre de mélange située à

proximité de la cellule d'observation. Elles ont pour objectif de reproduire les conditions de la réaction tout en permettant en parallèle une analyse par RMN.

L'approche « *on-line* » transfère un flux du mélange réactionnel depuis un récipient de réaction situé à l'extérieur de l'aimant vers la sonde où l'analyse est effectuée en « flux continu ». La vitesse d'écoulement est optimisée de manière à rendre le temps de séjour de l'échantillon au niveau de la sonde suffisant pour l'acquisition. Le mélange réactionnel peut ensuite être renvoyé dans la cuve de réaction ou dirigé vers un conteneur à déchet. Suivant les exigences de l'expérience, elle nécessitera soit une sonde spécifique, soit un tube de RMN « personnalisé ».

L'approche « *stopped-flow* » partage le même principe que l'approche « *rapid-injection* » en mélangeant les réactifs directement dans la chambre d'analyse. Elle est généralement utilisée pour la détection de cinétiques rapides (dans un délai de 2,5 à 100 ms du mélange des réactifs), une caractéristique que les approches « *in-situ* » et « *on-line* » ne peuvent pas fournir en raison du temps nécessaire pour mélanger et amener les réactifs dans la région de détection.<sup>266</sup> La RMN à débit interrompu nécessite l'usage de sondes personnalisées pour faire circuler les réactifs d'abord dans la zone de mélange, puis dans la zone de détection de la sonde de mesure avec des débits élevés pour minimiser les temps morts. Avant l'acquisition, le flux est arrêté en raison des temps de séjours courts de l'échantillon au niveau de la sonde.

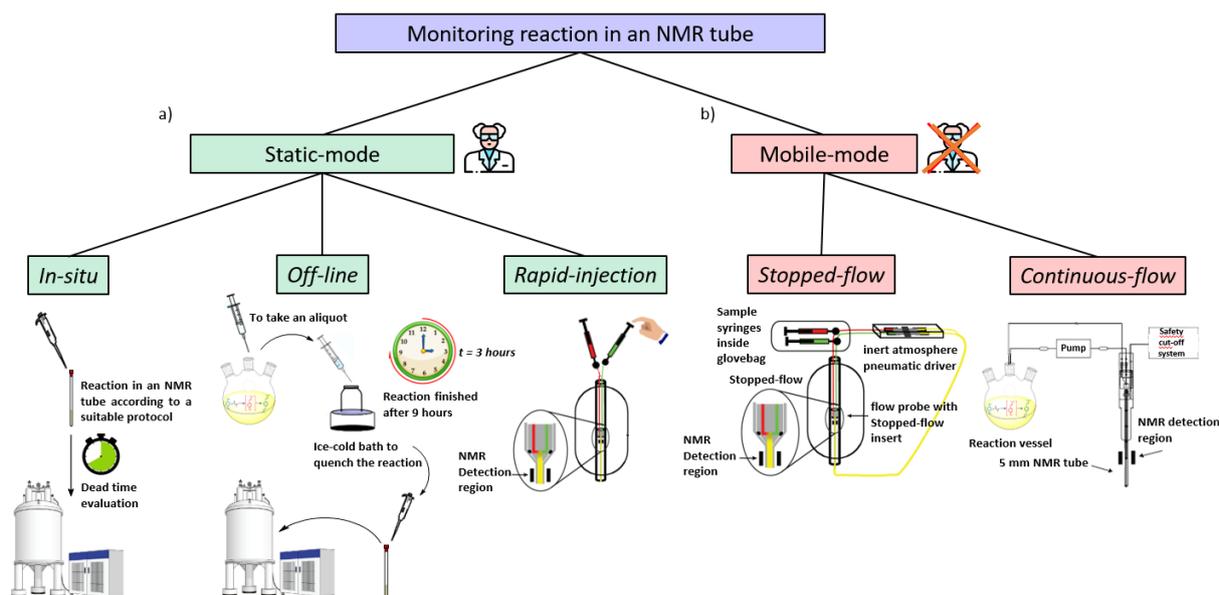


Figure 55. Représentation schématique des "deux voies" utilisables et des procédures utilisées pour suivre une réaction chimique en RMN impliquant a) « *static-mode* » a) et b) « *mobile-mode* ».

### 2.1. « *static-mode* »

Parmi toutes les procédures du « *static-mode* », le suivi réactionnel « *in-situ* » (Figure 55a) dans des tubes de RMN « classiques » reste l'approche la plus employée dans la majorité des cas. A notre connaissance, aucune revue ne répertorie la réalisation de ces travaux. Depuis 1999 jusqu'à décembre 2021, quarante publications ont été éditées. Ces articles présentés dans l'Annexe 1 sont regroupés chronologiquement suivant le champ magnétique utilisé et le(s) noyau(x) étudié(s), les solvants ou mélanges de solvants utilisés pour étudier des réactions organiques ou inorganiques, suivant également les protocoles employés pour minimiser le temps mort de la réaction ainsi que la durée totale des expériences.

L'approche « *in-situ* » est la plus populaire par sa procédure conventionnelle qui ne nécessite aucun dispositif particulier pour suivre la réaction organique. Néanmoins, elle reste limitée dans son champ d'action par le temps mort de quelques minutes nécessaires avant l'acquisition du premier spectre. De ce fait, elle n'est pas compatible avec l'étude de cinétiques très rapides. Pour essayer de réduire ce délai, différents protocoles ont été proposés pour étudier des réactions chimiques ayant des cinétiques lentes (de quelques dizaines de minutes à quelques jours). Cela est réalisable i) en agitant la solution directement après introduction de tous les réactifs dans le tube de RMN et en le plaçant dans la zone de détection de la bobine avant d'effectuer les réglages automatiques habituels du spectromètre et la stabilisation de la température, <sup>55, 267, 268</sup> ii) en retirant le tube de RMN du spectromètre avant chaque nouvelle acquisition et en le mélangeant à plusieurs reprises avant de l'insérer à nouveau, <sup>55</sup> iii) en préparant les paramètres d'automatisation du spectromètre sur un échantillon de composition similaire avant l'introduction du tube contenant la réaction à étudier, <sup>269-271</sup> iv) en plaçant le tube de RMN en rotation, <sup>272-274</sup> v) en absence de solvant deutéré <sup>273</sup> et vi) en quenchant la réaction en positionnant la solution initiale dans un bac de glace avant de l'analyser à 298 K <sup>275</sup> ou dans de l'azote liquide avant d'étudier la cinétique de cette réaction à plus basse température. <sup>276-277</sup>

Un exemple d'application de cette approche est rapporté par Susanne F. *et al.* qui ont publié en 2011 des travaux dans le cadre du développement de procédés pharmaceutiques. <sup>270</sup> En suivant la réaction d'hydrolyse de l'anhydride acétique par l'eau, dont le mécanisme est bien connu, les auteurs ont démontré que la RMN pouvait être adaptée pour établir les profils cinétiques de la réaction à différentes concentrations et températures (Figure 56), à condition que la réaction soit suffisamment lente. Le descriptif est résumé dans l'Annexe 2. Le délai  $t_0$  entre le début de la réaction et le début de l'acquisition a été mesuré avec précision pour la plupart des conditions de réaction.

N	$t_0$	temperature (°C)		D <sub>2</sub> O	acetic anhydride		acquisition	
		bath	spectro-meter		mass (mg)	[ ] (M)	pad (min)	total (h)
1	~5'	24.8	25	750	78.0	0.91	1	1
2	~5'	14.8	15	750	77.9	0.91	2	3
3	5' 5''	5.0	5	750	77.7	0.91	10	10
4	4' 15''	24.5	25	750	38.4	0.47	1	2
5	4' 19''	24.9	25	750	19.2	0.24	2	4

Figure 56. Résumé des conditions réactionnelles expérimentales de l'hydrolyse de l'anhydride acétique par l'eau. N = numéro de l'expérience,  $t_0$  = temps mort, V = volume, [ ] = concentration, pad = délai de pré-acquisition. Reproduite de la réf. <sup>270</sup>

Pour ce faire, ils ont intégré deux résonances d'intérêts dans la région aliphatique, le signal correspondant aux protons méthyle de l'anhydride acétique 2,03-2,19 ppm et celui de l'acide acétique 1,86-2,01 ppm et ont converti leurs intensités en moles au cours du temps à partir du logiciel Dynochem (Figure 57).

Les résultats de ces travaux ont montré que les études cinétiques nécessitent une mesure et un contrôle précis des conditions de réaction (Figure 57c). Dans ce cas, le délai entre le début de la réaction et le début de l'acquisition, expérience 2, n'a pas été mesuré avec autant de précision que pour l'expérience 3, révélant la principale limite de cette procédure. Les facteurs qui pourraient contribuer à l'erreur expérimentale sont l'incapacité à contrôler avec précision la température tout au long de la réaction et la mesure précise de la masse des réactifs qui est difficile à déterminer lorsque la concentration initiale est faible.

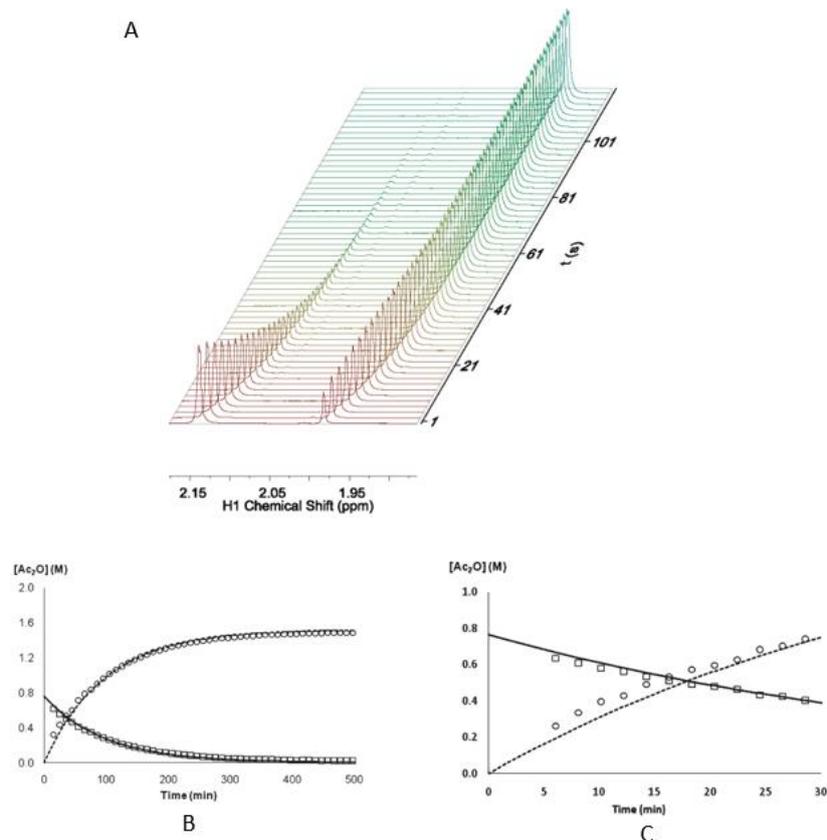


Figure 57. (A) Spectre de RMN 1D  $^1\text{H}$  montrant le suivi de l'hydrolyse de l'anhydride acétique par l'eau dans la région aliphatique en fonction du temps. (B) et (C) profils cinétiques pour les expériences 3 et 2 réalisées respectivement avec 0,91 M d'anhydride acétique. La disparition de l'anhydride acétique est représentée par des carrés et la formation d'acide acétique par des cercles. Les lignes pleines et en pointillées représentent la prédiction calculée par Dynochem. Reproduite de la réf. <sup>270</sup>

Une autre alternative qui peut être intéressante, entre autres, pour l'industrie pétrolière consiste à utiliser l'approche « *off-line* » (Figure 55a) qui permet de suivre les processus de transestérification pour garantir la qualité du produit final. <sup>278</sup> Les changements de comportement de phase au cours de la réaction de transestérification ont été suivis en continu avec l'aide d'un densimètre tandis que des échantillons ont été prélevés du réacteur à différents moments pour suivre la conversion de l'huile par RMN  $^1\text{H}$ . Pour ce faire, les aliquotes prélevées ont été dissoutes dans du  $\text{CDCl}_3$  et placées dans un bain de glace pour que la réaction ne se poursuive pas avant d'être ajoutées dans un tube de RMN, puis analysées. Le descriptif est détaillé dans l'Annexe 2 (Talavero-Pietro N.M. *et al.* 2019). La progression de la réaction de transestérification est suivie par l'acquisition de dix spectres de RMN  $^1\text{H}$  enregistrés à différents moments de la réaction (Figure 58). Les spectres ont clairement montré la diminution du signal de l'huile à 4,05-4,35 ppm et l'augmentation du signal de l'ester à 3,67 ppm.

A partir de ces observations et considérant que la réaction de méthanolyse est un équilibre chimique dans laquelle un excès d'alcool est nécessaire, les chercheurs ont cherché à optimiser les conditions de la réaction en modifiant le rapport méthanol/huile pour avoir le meilleur rendement en esters méthyliques (Figure 59).

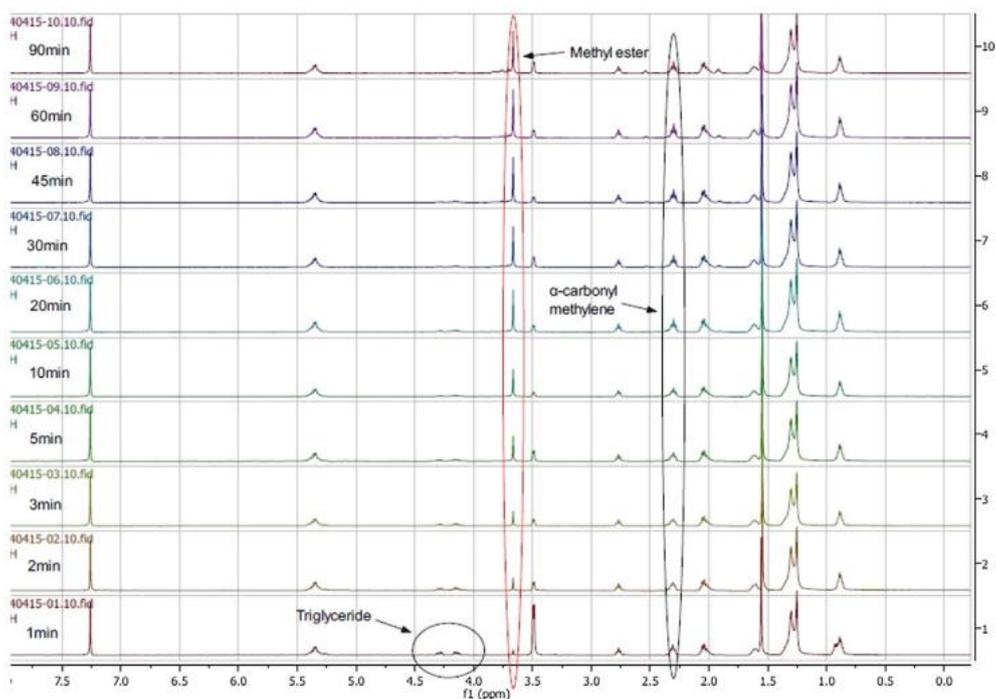


Figure 58. Spectres de RMN  $^1\text{H}$  d'échantillons collectés à différents moments de la réaction de transestérification dans du méthanol/huile (4,5:5,5). Reproduite de la réf. <sup>278</sup>

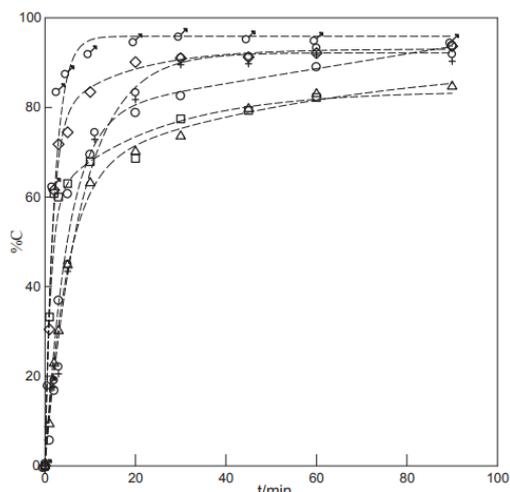


Figure 59. Conversion de l'huile de coton en fonction du temps de réaction à partir de l'analyse de RMN pour différents rapports alcool/huile à 323 K et 343 K. A 323 K :  $\Delta$   $r = 4,5$ ,  $\circ$   $r = 6,0$  et  $\varnothing$   $r = 7,0$ . A 343 K :  $\square$   $r = 4,5$ ,  $\diamond$   $r = 6,0$  et  $\sigma$   $r = 7,5$ . Reproduite de la réf. <sup>278</sup>

Les auteurs ont rapporté que le rapport méthanol/huile optimal était de 6:1 pour une durée de réaction de 90 min, permettant de produire un rendement de 96,9% d'esters méthyliques à 323 K.

A travers cette publication, les auteurs ont ainsi démontré l'intérêt d'une procédure fondée sur la RMN, adaptable à l'échelle industrielle et ne nécessitant pas les équipements coûteux de méthodes analytiques qui, bien qu'elles soient d'une grande précision, restent peu pratiques et souvent longues à mettre en œuvre.

Les approches décrites jusqu'à présent se limitaient à l'étude de réactions ayant des cinétiques plutôt lentes, de quelques minutes à plusieurs heures et qui n'étaient pas compatibles avec des cinétiques plus rapides de l'ordre de quelques secondes. Un moyen pour y parvenir consiste à utiliser l'approche « *rapid-injection* » (Figure 55a). La description du premier appareil de RMN « *rapid-*

*injection* » a été rapporté par McGarrity en 1981<sup>279</sup> à travers l'observation de la réaction de complexes de Meisenheimer formés à partir de l'ajout de méthylamine au 2,4,6-trinitroanisole (temps d'expérience de 22 s à 233 K)<sup>279</sup> (Figure 60) et la détection d'intermédiaires d'hydrolyse d'ions oxocarbénium (temps d'expérience de 40 s à 296,4 K).<sup>279-280</sup>

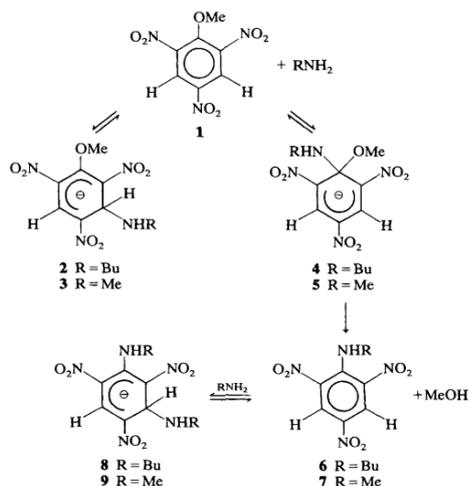


Figure 60. Schéma réactionnel des complexes transitoires de Meisenheimer dans la réaction du 2,4,6-trinitroanisole avec la méthylamine. Reproduite de la réf.<sup>279</sup>

McGarrity et Prodollet l'ont également utilisé pour étudier l'ozonolyse du tétraméthyléthylène et du cis-but-2-ène et ont mesuré les demi-vies de décomposition des ozonides primaires correspondants ( $t_{1/2} = 0,74$  et  $0,06$  s respectivement à 181 K).<sup>281</sup> L'appareil McGarrity original se compose d'un ensemble d'injection contenant une seringue étanche au gaz couplée à un long capillaire d'injection terminé par une pointe perforée (Figure 61).<sup>281</sup>

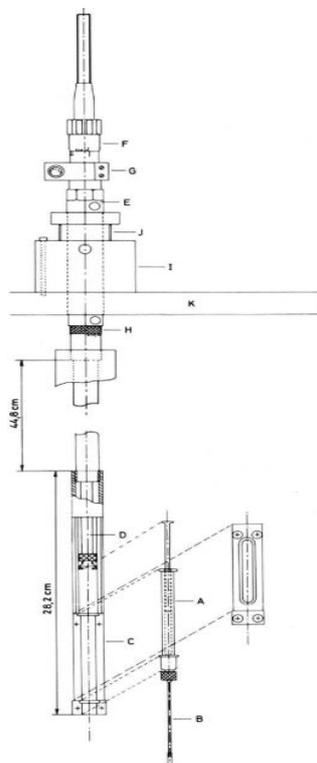


Figure 61. Schéma du montage de l'appareil « rapid-injection » de McGarrity employé pour étudier des cinétiques rapides. Reproduit depuis la réf.<sup>281</sup>

Une fois complètement abaissée dans l'aimant, la pointe repose juste en dessous de l'échantillon de réaction dans le tube de RMN. La seringue est entraînée par un piston pneumatique dont la course est réglée par une vis micrométrique. Le mouvement du piston déclenche l'impulsion du spectromètre et la séquence d'acquisition (le mode de fonctionnement est brièvement décrit dans l'Annexe 3). L'inconvénient majeur de cette conception est que la seringue et le capillaire restent immobiles tout au long de l'expérience, ce qui entraîne la diffusion du liquide le long du capillaire d'injection qui passe à travers la pointe perforée pour finir dans le milieu réactionnel à l'intérieur du tube de RMN en rotation. De plus, l'ensemble du système d'injection et le capillaire provoquent une perturbation de l'homogénéité du champ magnétique, entraînant un élargissement des résonances. Bien que cet effet soit minime dans des conditions d'acquisition lentes, l'élargissement des résonances est inévitable pour les réactions rapides. Malgré ces limitations, divers groupes ont utilisé avec succès la technique développée par McGarrity pour observer des intermédiaires réactifs ainsi que pour déterminer les cinétiques de différentes réactions (Annexe 3 de 1984 à 2007).

Au cours des dix dernières années, des instruments de RMN « *rapid-injection* » plus sophistiqués ont été développés pour surmonter les limitations de la conception d'origine ainsi que pour incorporer les fonctionnalités nécessaires à une application spécifique. Par exemple, un instrument développé par Mok *et al.*, comprend l'option d'insertion d'une fibre optique à utiliser dans des expériences photo-CIDNP<sup>265</sup> pour étudier les phénomènes de repliements d'une protéine, le lysozyme de poule. Outre la fibre optique, ce dispositif se compose de deux parties principales, un insert en verre coaxial monté à l'intérieur du tube de RMN et un injecteur pneumatique positionné à l'extérieur de l'aimant. Unique par rapport aux autres appareils, l'insert est constitué d'un morceau de tube capillaire en verre fusionné à une extrémité avec une micropipette. La micropipette est positionnée juste en dessous de la surface de la solution dans le tube de RMN. Pendant l'injection, la solution contenue dans le capillaire est projetée à travers la micropipette pour améliorer le mélange. L'utilisation de tubes Shigemi de 5 mm améliore l'efficacité du mélange et réduit considérablement le volume de réaction requis.

En 2007, un appareil avancé a été décrit par Jones A. C. *et al.*<sup>282</sup> Jusqu'à sa création, aucun autre appareil n'a été utilisé pour des expériences en dessous de -100°C. Dans cette conception, une seringue logée au-dessus de l'aimant est couplée à une longue aiguille flexible en Téflon qui est insérée dans un tube de RMN. Contrairement à l'instrumentation de McGarrity où des injections multiples sont possibles mais aussi limitées par le temps nécessaire pour retirer et réinitialiser l'injecteur, cet appareil est conçu pour loger deux seringues permettant des injections multiples au cours d'une même expérience. L'aspect le plus pratique de cet appareil est la présence d'un agitateur mécanique. Le moteur est monté au-dessus de l'aimant et assure un mélange efficace jusqu'au point de congélation du solvant. L'élévation et l'abaissement de la pale de l'agitateur ainsi que les injections de l'une ou de l'autre seringue peuvent être contrôlées manuellement ou par le programme d'impulsions du spectromètre (le mode de fonctionnement est fourni dans l'Annexe 3). Les auteurs font remarquer que l'instrument a été conçu pour fonctionner avec des tubes de RMN 10 mm. Bien que l'augmentation de la taille de l'échantillon puisse être avantageuse dans certaines situations, elle constitue un inconvénient lorsque des volumes d'échantillons minimaux sont nécessaires. Malgré cette limitation, la même équipe a démontré en 2008 le potentiel de leur technique avec d'autres réactions ayant des cinétiques rapides (Annexe 3).

Pour contourner les contraintes liées à la conception de telles instrumentations complexes à utiliser, Mix A. *et al.* ont développé un équipement plus simple pour observer des réactions chimiques en 2009.<sup>283</sup> Ce dispositif comporte un tube coaxial à double chambre présentant deux compartiments

distincts et permet de placer deux solutions de réactifs dans un tube de RMN. Le mélange des réactifs se produit dans la région de la sonde et est initié manuellement depuis l'extérieur de l'aimant. Le tube convient aux composés sensibles à l'air et l'humidité et peut être utilisé sur une plage de températures assez étendue de -80°C à 130°C (Annexe 3). Cette technique innovante et simple d'utilisation a toutefois montré une certaine limite dans le suivi de réactions chimiques très rapides où seuls les spectres du mélange initial et d'arrivée sont visibles après avoir mélangé les deux solutions sans observation d'un spectre contenant des espèces transitoires. Ce dispositif pourrait être appréciable pour étudier des réactions ayant des cinétiques moins rapides de l'ordre de quelques minutes.

Les instruments précédemment décrits ont été élaborés pour l'étude de réactions particulières. Denmark S. E. *et al.*<sup>284</sup> ont conçu un nouvel appareil de RMN « *rapid-injection* » universel pour permettre l'injection et le mélange rapide (< 2 s) d'un volume dosé d'un réactif dans un tube de RMN en rotation suivi d'une acquisition rapide des données résultant du processus chimique. Cette conception offre la possibilité de délivrer n'importe quel réactif chimique à n'importe quelle température sous atmosphère inerte et permet l'observation de n'importe quel type de noyau en quelques secondes après injection. La précision et la reproductibilité d'une telle instrumentation sont fiables et ont été utilisées pour élucider divers mécanismes de réactions chimiques (Annexe 3, 2010). La principale limite de cette instrumentation est sa conception qui est très élaborée et qui nécessite la participation de différents spécialistes pour sa fabrication et son installation. De plus, les auteurs exhortent les scientifiques à ne pas se lancer dans la construction de leur propre instrument et invitent ceux dont les problèmes de recherche pourraient se prêter à ce genre d'analyse à contacter l'auteur correspondant pour accéder à ce type d'appareil. Malgré la complexité de l'appareil, il s'est avéré robuste dans un certain nombre d'autres études mécanistiques dans lesquelles les méthodes actuellement disponibles pour l'acquisition de données cinétiques précises n'étaient pas adaptées.<sup>285-</sup>

293

Il existe d'autres domaines d'applications pour lesquels la spectroscopie de RMN pourrait être intéressante, qui ouvrent des perspectives pour étudier d'autres processus chimiques bien particuliers nécessitant l'usage de « tubes spécifiques ». Ils viennent compléter les différentes approches décrites jusqu'à présent dont la liste est loin d'être exhaustive. C'est le cas des techniques électrochimiques combinées à la RMN (EC-RMN) qui ont été rapportées pour la première fois par Richards J. A. *et al.* en 1975<sup>294</sup> pour des études environnementales de dégradation oxydative ou de métabolisme. D'une manière générale, une cellule de EC-RMN se compose d'un assemblage de trois parties principales : i) un tube de RMN en verre de 5 à 10 mm, ii) une cellule électrochimique contenant l'ensemble des électrodes et iii) le support de la cellule électrochimique qui peut être de différentes dimensions suivant le système de RMN (Figure 62).

Le dispositif expérimental classique en électrochimie consiste en un montage à trois électrodes plongées dans une solution. Une électrode de travail (ET) est portée à un potentiel donné par rapport à une électrode de référence (ER) (Ag/AgCl). Pour bien contrôler ce potentiel, il faut éviter de faire passer un courant par l'électrode de référence, qui aurait pour conséquence de le modifier. Pour cette raison, une troisième électrode est utilisée : la contre-électrode (CE). Le courant circule alors entre l'électrode de travail et cette contre électrode grâce au contrôle du montage par un potentiostat. Cette technique permet d'acquérir des spectres de RMN tout en contrôlant un potentiel électrique au niveau de l'électrode de travail, pour caractériser les espèces produites électrochimiquement. Depuis la conception originale, plusieurs cellules électrochimiques ont été construites pendant ces vingt dernières années avec une variété de matériaux différents comprenant du métal, de l'argent, du platine, du palladium, du cuivre, de l'aluminium ou de l'or. Ces cellules électrochimiques ont chacune

leurs avantages et inconvénients et ont été élaborées pour améliorer l'homogénéité du champ magnétique et le rapport signal sur bruit et/ou pour réduire le coût de la fabrication des électrodes complexes et les rendre accessibles à un large public. A notre connaissance, les deux dernières revues qui ont proposé une vue d'ensemble de la spectroélectrochimie où seulement une partie des recherches scientifiques y est présentée, datent de 2015.<sup>295-296</sup> L'Annexe 4 présente un résumé de l'ensemble des travaux de la littérature depuis 1975 à 2020 où l'intensité du champ magnétique, le type de noyau étudié, le solvant, la réaction étudiée, les types d'électrodes utilisées ainsi que les avantages et inconvénients, y sont renseignés.

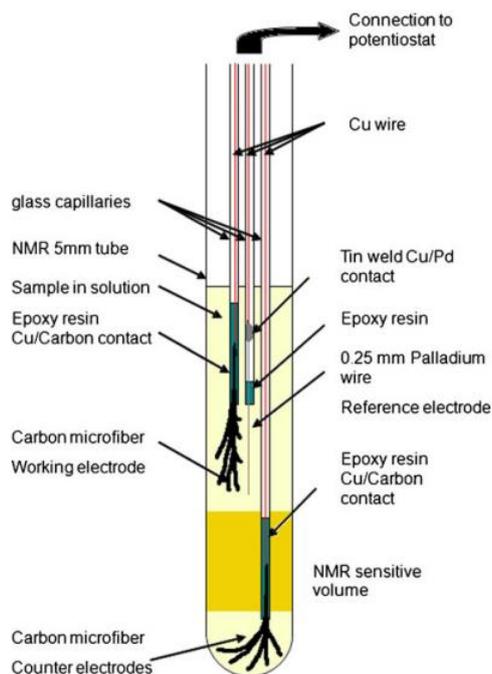


Figure 62. Exemple de dispositif à trois électrodes pour des expériences de couplage EC-RMN utilisé pour étudier des processus redox. Reproduite de la réf.<sup>297</sup>

Le « *static-mode* » a démontré à travers toutes ces approches, qu'il pouvait être un outil remarquable pour la compréhension mécanistique en dressant des profils cinétiques de diverses réactions dans des tubes standards de 5 ou 10 mm, ne nécessitant aucune modification de la sonde. Néanmoins, les principales limitations retrouvées sont spécifiques à chaque approche et peuvent se situer sur i) l'incapacité à estimer correctement le temps mort  $t_0$  qui peut entraîner un contrôle moins précis des conditions de réactions, ii) la mise en place de procédures souvent longues à réaliser et parfois peu pratiques et iii) la création d'instruments complexes qui ne conviennent qu'à des réactions spécifiques, qui peuvent être prohibitifs et qui sont moins adaptés pour un non spécialiste. Un moyen pouvant, en partie, contourner ces contraintes consiste à employer le « *mobile-mode* ».

## 2.2. « *mobile-mode* »

Le « *mobile-mode* » est aujourd'hui l'outil le plus répandu et fait partie des plus efficaces pour le suivi de réactions chimiques. Il est appliqué à la chimie analytique en flux également appelée « *on-line* », qui nécessite l'utilisation d'équipements spécialement conçus, en particulier des cellules à écoulement (*flow-cell*) et/ou des sondes à flux (*flow-probe*). Keifer P. A. *et al.* ont défini la RMN en flux<sup>298</sup> comme une technique dans laquelle un échantillon s'écoule à travers un tube dans la sonde de RMN à un moment donné au cours du processus de mesure.

Dans la littérature, les termes d'analyse « *in-line* » et « *on-line* » sont couramment rencontrés. Pour éviter toute incertitude, il convient de faire la distinction entre ces deux approches. Elles font toutes deux référence à des méthodes d'analyse qui ne nécessitent pas le transfert manuel d'échantillons, contrairement au « *static-mode* ». <sup>299</sup> Lorsque la sonde de RMN et le système réactionnel sont connectés en série, tout le mélange réactionnel passe à travers l'instrument de RMN et est analysé en continu par une technique « *in-line* ». L'échantillon n'est pas retiré du flux de processus et peut être invasive ou non invasive. Pour l'analyse « *on-line* », le système de RMN n'est pas directement connecté au système de réaction et l'échantillon est transféré de la réaction au système de RMN avec des aliquotes représentatives collectées périodiquement pendant la réaction. L'échantillon est détourné du processus de fabrication et peut être renvoyé dans le flux de processus. <sup>300</sup>

C'est à travers cette dernière approche que la discussion est orientée. Par ailleurs, il peut y avoir une confusion avec l'approche « *rapid-injection* » décrite plus tôt dans le « *static-mode* ». En effet, cette dernière a tendance à être regroupée parmi les techniques « *flow-NMR* », car elle entraîne « un flux » d'un ou de plusieurs réactifs introduits depuis une pipette, qui sont mélangés dans un tube de RMN contenant un autre échantillon au niveau de la sonde. Cependant, cette approche a été décrite d'un point de vue « matériel » utilisant des tubes de RMN standards et non pas à la manière « écoulement ». Par conséquent, elle ne sera pas discutée ici.

Les techniques de RMN en flux existent depuis des décennies, cependant avec un développement tout particulier à partir du milieu des années 90. <sup>298</sup> Historiquement, la mise en place initiale de quasiment l'ensemble des techniques de RMN en flux était basé sur le développement de la RMN couplée à la chromatographie liquide (LC-RMN). <sup>298, 301</sup> Les autres techniques de RMN en flux ont ensuite évolué à partir de la LC-RMN. <sup>301-302</sup> La première utilisation signalée d'une technique de RMN en flux remonte à 1951, <sup>303</sup> lorsqu'un spectre de RMN <sup>1</sup>H de l'eau dopé au FeCl<sub>3</sub> a été enregistré alors qu'il s'écoulait à travers la sonde de RMN, permettant d'évaluer les valeurs de  $T_1$  et  $T_2$  de l'échantillon. Dans les années 70, un groupe de techniques apparentées qui étaient appelées « RMN à flux interrompu » <sup>304</sup> ou « RMN à flux continu » <sup>302</sup> a été introduit, et l'utilisation de ces techniques s'est poursuivie jusqu'à nos jours. A cette époque, le développement des méthodes de RMN en flux a été ralenti par des obstacles tels qu'une sensibilité limitée, le besoin éventuel de solvants deutérés coûteux et les restrictions imposées par l'utilisation de certains solvants. <sup>305</sup> Toutes ces techniques utilisent une sonde à flux spécialement conçue pour acquérir des données de RMN sur un échantillon introduit dans l'aimant et la sonde *via* un tube capillaire. La sonde à flux est élaborée pour s'interfacer facilement avec d'autres méthodes et matériels analytiques. L'objectif est d'acquérir des données de RMN sur des échantillons instables ou à réaction rapide. La limitation est à faire avec l'approche « *in-situ* » où l'acquisition des données de RMN est trop longue pour permettre l'observation des « espèces transitoires » en raison du temps requis pour transporter l'échantillon jusqu'à la sonde de RMN ; en revanche dans l'approche « *on-line* », la stratégie consiste à s'affranchir de ce délai en créant « les espèces transitoires » au niveau de la bobine, afin d'éliminer le temps du transport de l'échantillon.

Dans cette configuration (Figure 63), deux tubes de débit **1** et **2** contiennent chacun un liquide qui s'écoule séparément. Les solutions sont ensuite réunies pour former un seul tube de sortie. <sup>298</sup> Les deux réactifs se mélangent et, pendant qu'ils réagissent, s'écoulent à travers un seul tube dans la bobine de l'aimant.

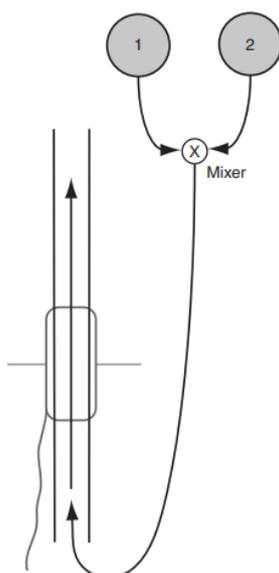


Figure 63. Approche « on-line » qui consiste à faire circuler les réactifs 1 et 2 dans un mélangeur situé à l'extérieur de l'aimant (en haut à droite). Le volume "actif" (détecté) de la sonde est représenté par le trait noir vertical. Reproduite de la réf. <sup>298</sup>

Deux classes de sondes à flux ont été conçues en fonction de la position du tube de prélèvement (Figure 64) : i) les sondes dans lesquelles le tube échantillon est positionné verticalement semblable à un tube de RMN standard, et qui utilisent des bobines RF en forme de selle (type 1) et ii) des sondes dans lesquelles un capillaire d'échantillon est positionné horizontalement et qui utilisent des bobines enroulées en hélice (solénoïdales) pour la transmission et la réception (type 2). <sup>298, 300, 305</sup>

Les fabricants ont conçu des sondes à flux de RMN commerciales de type 1 qui peuvent être intégrées dans les spectromètres de RMN à haute et basse résolution. Les sondes de type 2 ont été conçues par différents groupes de recherche et sont intégrées dans des instruments de RMN standard.

300

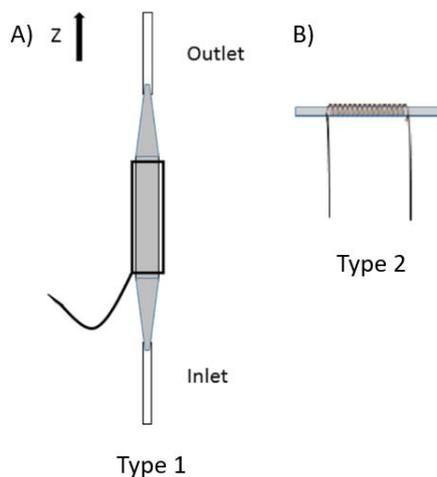


Figure 64. Représentation graphique de A) une cellule à écoulement conventionnelle avec une bobine RF en forme de selle et B) un capillaire d'écoulement sur lequel est enroulée une bobine RF de forme hélicoïdale (solénoïde). Reproduite depuis la réf. <sup>300</sup>

La construction des sondes à flux de RMN commerciales diffère principalement des sondes classiques de RMN, par le fait qu'elle supporte une cellule d'écoulement. De plus, contrairement aux sondes conventionnelles, les échantillons traversent toute la longueur de la sonde et s'écoulent à proximité d'une grande partie des circuits RF internes de la sonde.

La cellule à écoulement est un tube à échantillon constitué généralement de verre ou de quartz, bien que le Pyrex®, le saphir et l'alumine puissent également être envisagés.<sup>300</sup> Le quartz est le matériau de choix en raison de son uniformité et de sa résistance mécanique. De plus, c'est un matériau usinable qui présente d'excellentes propriétés électriques. Les connexions des tubes sont en PEEK (Poly-EthEr-Ketone) en raison de la résistance mécanique de ce matériau. Elle contient des ouvertures aux extrémités qui correspondent à de petits segments en haut (sortie) et en bas (entrée) pour permettre la connexion au système d'écoulement. Les extrémités doivent être suffisamment solides pour supporter les raccords utilisés pour connecter et sceller les tuyaux flexibles d'entrée et de sortie.<sup>305</sup> La cellule à écoulement présente généralement un diamètre intérieur plus grand au centre qu'à ses extrémités (Figure 64A). La plus grande partie centrale de la cellule d'écoulement est la chambre d'échantillon, c'est-à-dire la zone de détection.<sup>300</sup>

La majorité du fonctionnement des sondes à flux commerciales est réalisée en « *continuous-flow* », c'est-à-dire que le flux de solvant s'écoule toujours pendant l'analyse et ne s'arrête pas. Cependant, cette analyse continue peut parfois entraîner un faible rapport signal sur bruit avec un élargissement des résonances en raison d'un débit trop rapide créant une inhomogénéité du champ magnétique. Le rapport signal sur bruit peut être amélioré en faisant la moyenne du signal,<sup>298</sup> pour cela une alternative consiste à utiliser l'approche « *stopped-flow* ». Elle consiste à régler manuellement le débit en arrêtant le flux du solvant aussi longtemps que nécessaire au niveau de la sonde pour enregistrer le signal avec un rapport signal sur bruit acceptable. Cette méthode a été utilisée, par exemple, pour l'étude cinétique de la polymérisation du 1-hexène dans du toluène-*d*<sub>8</sub> à température ambiante sur des échelles de temps de 100 ms. Jusqu'à présent, le suivi d'une telle réaction à température ambiante était difficile en raison de sa rapidité et pour l'étudier, une analyse à très basse température était nécessaire. Christianson M. D. *et al.*<sup>306</sup> ont utilisé une sonde à flux commerciale contenant deux injecteurs à partir desquels s'écoulent deux flux de réactifs à travers un mélangeur à quatre jets dans la région de la bobine (Figure 55 « *stopped-flow* »). La particularité d'un tel dispositif est le mélange complet des réactifs qui se produit en moins de cinq millisecondes permettant à la solution d'atteindre la zone de détection en seulement quelques dizaines de millisecondes. L'arrêt mécanique du dispositif déclenche le système d'acquisition des données de RMN. Ainsi, un spectre de qualité peut être obtenu vingt millisecondes après l'arrêt du système à écoulement. Cette technique a permis de fournir des données suffisamment complètes en quantifiant dans le temps les réactifs, les produits et toutes les espèces catalytiques observables dans des conditions ambiantes, à partir d'un seul ensemble d'analyses à débit arrêté.

La RMN en flux comporte deux avantages par rapport à la RMN traditionnelle. Premièrement, le « lock » du champ magnétique n'est pas nécessaire ainsi que la procédure du réglage des « shims » pour chaque échantillon lorsque le solvant est maintenu constant pendant l'expérience. Deuxièmement, les solvants deutérés ne sont pas essentiels en raison de la suppression des solvants protonés aux moyens de séquences d'impulsions WET.<sup>298</sup>

Les publications relatant de l'application des sondes à flux commerciales pour le suivi cinétique de diverses réactions sont nombreuses<sup>306-313</sup> et ont largement été référencées dans plusieurs revues. Keifer P. A. *et al.*<sup>298</sup> ont présenté le sens général du terme « *Flow NMR* » en montrant les premières techniques qui ont été employées, Haner R. L. *et al.*<sup>305</sup> en détaillant les composants d'une sonde à écoulement et Gomez M. V. *et al.*<sup>300</sup> en révélant ses applications à haut champ, à bas champ et en démontrant que la sensibilité d'un instrument de RMN pour de petits volumes d'échantillons pouvait être améliorée en diminuant le diamètre de la bobine de détection. Cette miniaturisation a permis de suivre des réactions chimiques avec seulement quelques centaines de microlitres voire nanolitres en

employant des « sondes spécifiques » dotées de microbobines ayant des formes géométriques particulières.<sup>300, 314</sup>

Cependant, l'utilisation de sondes à écoulement traditionnelles et spécifiques peut être restrictif en termes de variétés de noyaux disponibles pour l'analyse, et problématique si des particules solides sont présentes dans le mélange réactionnel. De plus, les cellules microlitres contenues dans les sondes à flux ont tendance à avoir des voies capillaires très étroites, qui sont particulièrement resserrées au niveau de l'union avec le transfert capillaire, conduisant souvent à l'obstruction de la cellule par des particules. Comme alternative, un certain nombre de conceptions de tubes de RMN personnalisés ont été signalées comme étant peu coûteuses à l'utilisation de sondes à flux. Les résultats sont regroupés dans l'Annexe 5 qui présente chronologiquement les travaux recensés pour le suivi réactionnel à flux continu ou arrêté utilisant des tubes à écoulement en absence de sonde à flux. Ces cellules à écoulement en forme de tube permettent une plus grande flexibilité, car elles sont conçues pour être utilisées dans n'importe quelle sonde de RMN ordinaire.

Par exemple, Foley A. D. *et al.* ont décrit en 2014 la conception d'un tube à écoulement qui a été créé pour être utilisé par des spécialistes et des non spécialistes et qui présente un certain nombre d'avantages par rapport aux sondes à flux commerciales. La valeur économique de cet appareil est grande car le coût d'une sonde à écoulement dédiée peut s'avérer prohibitif pour de nombreux laboratoires intéressés par ce type de dispositif. Le tube à écoulement imite la conception d'un tube et peut être utilisé dans une sonde de RMN standard de 5 mm. Cela permet à la configuration d'être utilisée sur des spectromètres de différentes intensités de champ magnétique. Les auteurs ont démontré l'efficacité de cet appareil pour suivre la réaction de la *p*-phénylènediamine **1** et de l'isobutyraldéhyde **2** pour former le produit diimine **4** avec de bons résultats et une bonne reproductibilité (Figure 65).

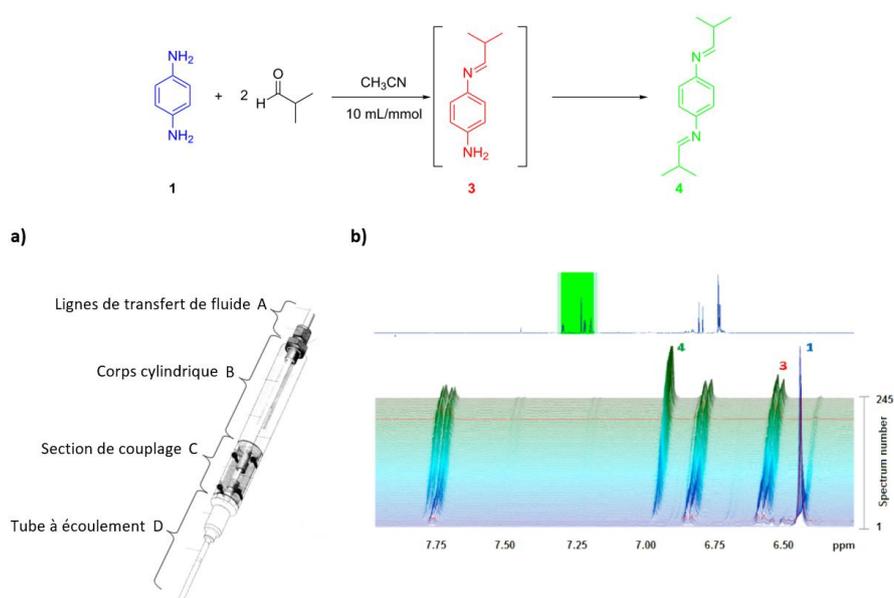


Figure 65. Réaction de la *p*-phénylènediamine avec l'isobutyraldéhyde. a) Tube d'écoulement et b) tracé empilé de spectre de RMN <sup>1</sup>H, à 400 MHz. Un total de 245 spectres a été enregistré en 47 h. Reproduite depuis la réf.<sup>264</sup>

Pour qu'un tel tube à écoulement puisse fonctionner, quatre critères doivent être remplis : i) permettre la polyvalence pour une large application à la spectroscopie de RMN, ii) maintenir les conditions et les caractéristiques de la réaction dans tout le système, iii) minimiser le délai entre la sortie de l'échantillon depuis le récipient de réaction et la détection de ce dernier dans la cellule et iv) contrôler la température de l'échantillon pendant toute la réaction.

Pour cela, il se compose de quatre composants principaux (Figure 65 a)). Les tubes concentriques **A** permettent d'assurer le transfert et le contrôle de la température du mélange réactionnel depuis la cuve de réaction vers le tube à écoulement. Le corps cylindrique **B** permet d'assurer la rigidité et la stabilité du tube à écoulement en maintenant une température constante dans le système. Le tube à écoulement **D** est conçu pour imiter un tube de RMN en plaçant l'échantillon à la bonne hauteur dans les bobines. Le tube à écoulement **D** et le corps cylindrique **B** sont couplés à l'aide d'un raccord **C**.

Cette cellule à écoulement a ensuite été reprise par d'autres scientifiques (Annexe 5). A cet égard, Foley A. D. *et al.*<sup>55</sup> ont rapporté une comparaison de trois approches différentes pour étudier des réactions homogènes et hétérogènes : RMN « *on-line* », « *in-situ* » et avec plusieurs mélanges du tube de RMN, en utilisant un spectromètre à 400 MHz. Parmi les réactions étudiées, les réactions homogènes avec des temps de réaction courts et les réactions hétérogènes avec des temps de réaction longs (Figure 66a) ont montré que le mélange a un effet important sur le résultat final.

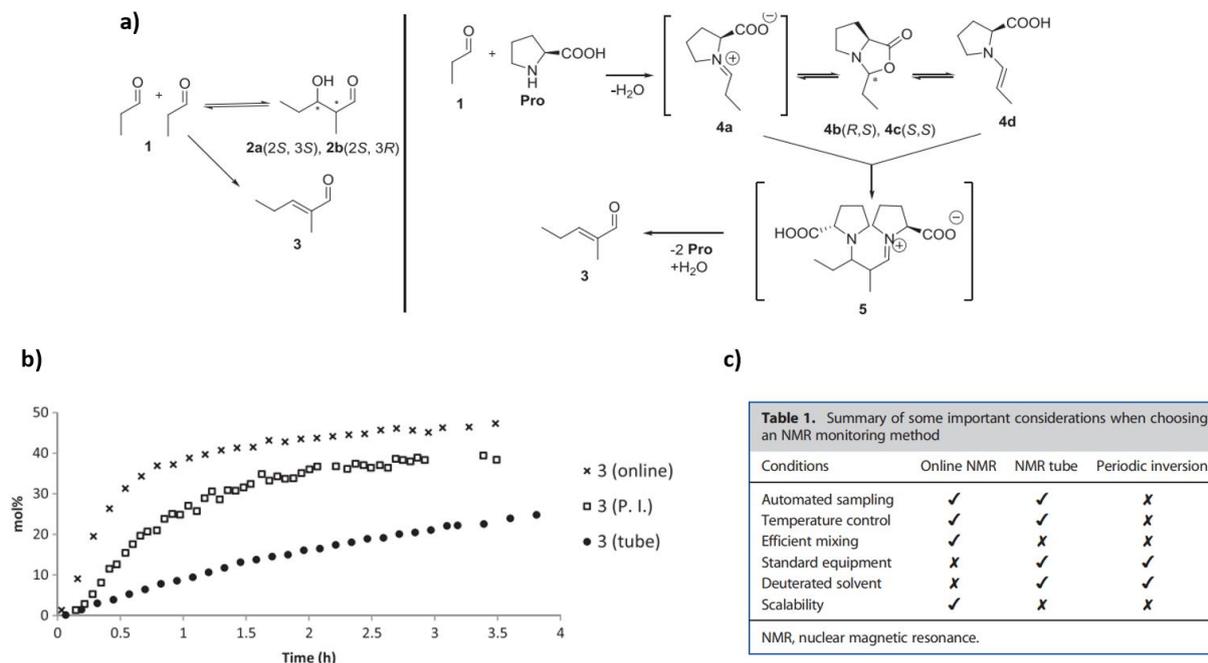


Figure 66. a) Réaction hétérogène étudiée avec une addition d'aldol pour former 2a/2b et la condensation de l'aldol 3. b) Superposition des profils de la formation des produits par toutes les méthodes utilisées : (x) « *on-line* », (□) inversion périodique et (●) « *in-situ* » dans un tube standard. c) tableau comparatif des différentes approches de la RMN « *on-line* » vs RMN pour la surveillance des réactions. Reproduite depuis la réf.<sup>55</sup>

Une évaluation minutieuse des trois méthodes analytiques et des conditions de réaction a montré que la technique de RMN a une influence significative sur les résultats de l'analyse. Compte tenu de l'application d'intérêt, le choix de l'une ou de l'autre méthode pourrait être crucial. A cet égard, la RMN « *on-line* » a donné des résultats plus précis pour les études cinétiques en contrôlant des paramètres tels que la température, la vitesse de mélange et la vitesse d'ajout des réactifs, tandis que la RMN « *in-situ* » convient pour obtenir des informations structurales et la détermination du mécanisme.

Alors que de nombreuses transformations chimiques ont été analysées par l'approche « *static-mode* » dans des tubes de RMN ordinaires, il existe des limites physiques et chimiques aux types de réactions auxquelles cette forme de surveillance est applicable. Le manque de mélange suffisant, en particulier pour les procédés hétérogènes,<sup>55</sup> peut avoir des effets significatifs sur la vitesse d'une réaction. Pour contourner ces problèmes et permettre l'application des caractéristiques avantageuses

de la spectroscopie de RMN au suivi des réactions et à la leur cinétique, d'autres configurations technologiques ont été décrites dans la littérature. Ces conceptions ont tenté de relever les défis de la préservation des informations précieuses que la spectroscopie de RMN peut fournir, tout en élargissant sa portée à l'analyse des systèmes de dynamiques plus complexes. Les approches « flux continu » et « flux arrêté » sont toutes deux des techniques librement utilisées qui peuvent répondre à ces besoins. Il est également assez courant d'utiliser ces deux techniques sur un échantillon donné à des fins différentes. La majorité de leurs utilisations implique des sondes à flux, même si plusieurs travaux ont rendu cette démarche moins onéreuse en la rendant compatible avec des sondes standards de RMN à l'état liquide (Annexe 5).

### 3. Les méthodes d'acquisition appliquées au suivi réactionnel par RMN

#### 3.1. Les expériences d'échantillonnages non uniformes (NUS)

Comme mentionné à plusieurs reprises, le problème du chevauchement des résonances pourrait être résolu par des méthodes de RMN multidimensionnelles, fournissant des informations sur les corrélations et permettant de résoudre les pics dans des dimensions supplémentaires. Cependant, pour un signal multidimensionnel, les exigences concernant l'échantillonnage doivent être remplies séparément dans chaque dimension, ce qui entraîne une croissance de type exponentielle du temps d'acquisition avec le nombre de dimensions. En conséquence, les expériences 2D conventionnelles durent de plusieurs minutes à quelques heures, tandis que les expériences 3D et 4D nécessitent plusieurs jours voire des semaines. La solution aujourd'hui couramment utilisée pour résoudre le problème des mesures longues est d'omettre une proportion importante des points d'échantillonnage dans les dimensions indirectes lors de la mesure, et de reconstruire leur valeur ensuite à l'aide d'algorithmes mathématiques. C'est l'objectif des expériences d'échantillonnage non uniforme (NUS) qui permettent d'acquérir des expériences de RMN multidimensionnelles en un temps beaucoup plus court sans compromettre la résolution.

L'idée initiale de se débarrasser de certains points dans les dimensions indirectes a été proposée pour la première fois en 1987 par Barna *et al.*<sup>315</sup> L'objectif était d'avoir une plus haute « densité » de points d'échantillonnage au début d'une FID où le rapport signal sur bruit est plus élevé. Depuis, de nombreux algorithmes utilisant différents types d'hypothèses sur la reconstruction du spectre ont été proposés au cours des années qui sont référencées dans la récente revue de Golowicz D *et al.*<sup>316</sup> Chacune de ces hypothèses a ses avantages et inconvénients avec pour la plupart, des temps de calcul importants et nécessitant généralement l'ajustement de certains paramètres. De nos jours, le NUS est disponible prêt à l'emploi dans presque tous les logiciels d'acquisition de données et peut être utilisé avec toutes les séquences d'impulsions de RMN à plusieurs dimensions, permettant de choisir la séquence la plus appropriée pour un échantillon donné.

Lorsque les échantillons changent dynamiquement, l'échantillonnage uniforme des dimensions indirectes dans les expériences 2D est inefficace. Les réactions chimiques entraînant des changements progressifs des déplacements chimiques des réactifs sont particulièrement difficiles à suivre en utilisant la RMN 2D. L'utilisation du NUS pour la surveillance de la réaction permet de surmonter le problème de chevauchement des résonances. Parmi les hypothèses proposées dans la littérature, l'une d'entre-elles exploite un modèle mathématique appelé détection compressée (CS)<sup>317-318</sup> qui présente des avantages significatifs en améliorant le rapport signal sur bruit et en minimisant les artefacts. Contrairement à d'autres modèles mathématiques qui ne peuvent être utilisés que sur des pics stationnaires, la détection compressée peut être appliquée sur des pics non stationnaires, ce qui

la rend compatible pour l'étude des réactions chimiques lorsqu'elle est appliquée avec le NUS.<sup>319</sup> Pour rendre cela possible, la théorie CS affirme que certains signaux peuvent être récupérés à partir de beaucoup moins de points d'échantillonnage que les méthodes traditionnelles. Il suppose que le spectre de RMN a une quantité importante de régions vides. En d'autres termes, cela signifie que dans un spectre de RMN, le nombre de points correspondant aux résonances est beaucoup plus petit que le nombre total de points dans l'ensemble du spectre. Selon la théorie, le nombre minimum de points à échantillonner doit être égale au nombre de taches de corrélations dans le spectre. En conséquence, CS trouve le spectre le plus clairsemé à partir d'une quantité de données relativement faible (plus le nombre de données est petit et plus le spectre est clairsemé).<sup>319</sup> La Figure 67A montre le concept de traitement CS des données NUS.

Depuis 2014, la CS a prouvé son efficacité pour étudier des réactions chimiques complexes et déterminer des intermédiaires de réaction. C'est le cas de l'expérience COSY CS-NUS 2D<sup>320</sup> qui a été réalisée avec succès pour étudier la réduction des aldéhydes et cétones en alcools qui conduit à une variété de réactions secondaires dans le cas d'une cinétique lente. Cette réaction a été choisie car elle fournit une complexité suffisante pour qu'une expérience 2D soit nécessaire pour identifier les espèces présentes, dans laquelle l'attribution est facilitée par la capacité de suivre l'évolution temporelle des résonances sur le spectre. Wu Y *et al.* ont démontré que l'application du CS-NUS a permis de réduire la durée d'acquisition d'une COSY 2D conventionnelle de 5 heures à 1,5 heure avec une résolution similaire, permettant d'enregistrer plusieurs COSY sur la durée totale de la réaction. Si la mise en œuvre de l'expérience conventionnelle est utilisée, des temps d'acquisition longs sont nécessaires pour que les intensités spectrales soient quantitatives, ce qui est essentiel pour que les données soient utilisables dans des études cinétiques. Les données obtenues ont été semi-quantifiables dans la mesure où il a été possible de suivre l'apparition et la disparition des corrélations suivant leurs intensités sur environ 25 heures de réaction. Un moyen simple d'identifier les pics appartenant à différentes espèces a été de comparer les intensités des pics en fonction du temps de réaction. Les pics correspondant à la même molécule doivent présenter une variation d'intensité très similaire. Cette approche de correspondance de motifs a été appliquée avec succès pour attribuer des pics inconnus aux produits secondaires. De plus, il a été possible de visualiser des pics croisés résultant de l'état intermédiaire de la réaction, fournissant des informations précieuses sur le mécanisme réactionnel. Le principal désavantage d'une telle procédure est que la détection compressée nécessite de grandes concentrations de réactifs de l'ordre de 100 mM. Autrement, les résonances ne sont pas détectables.

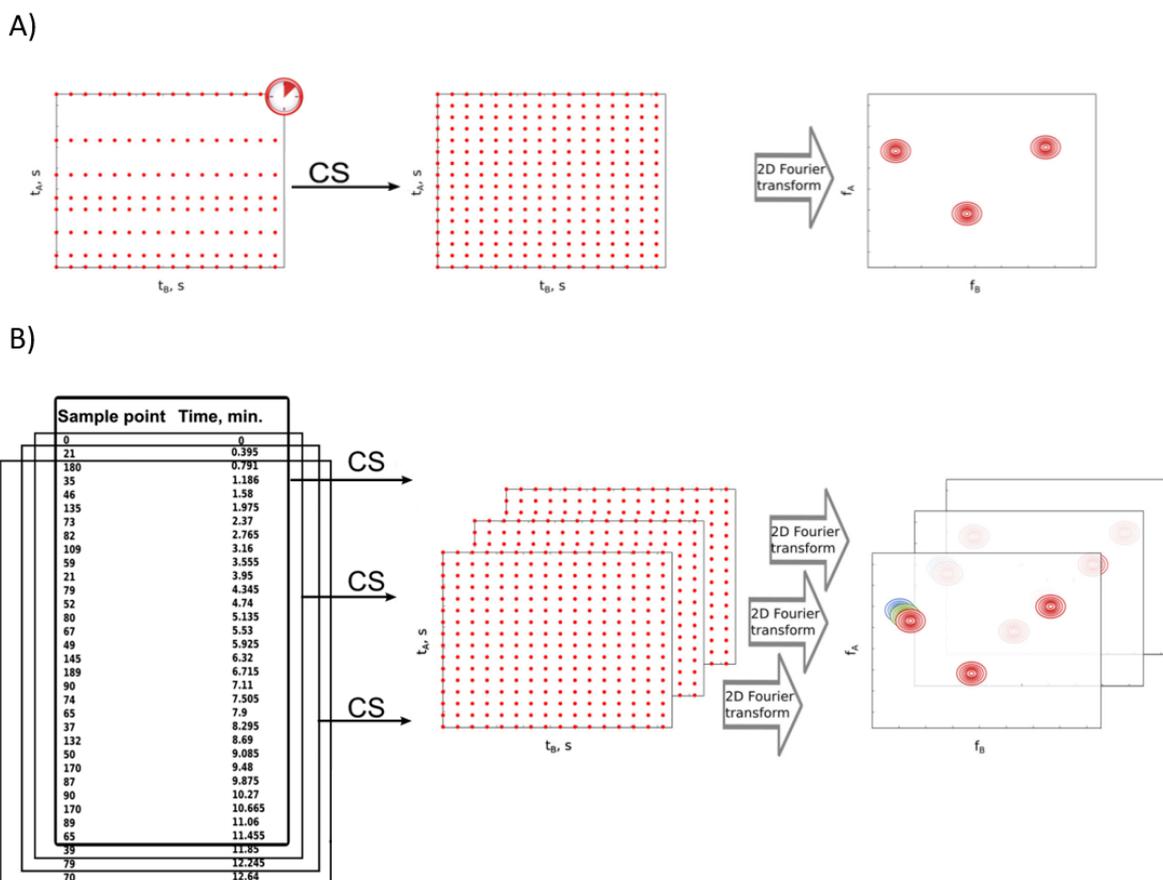


Figure 67. Echantillonnage non uniforme (NUS) et sa variante résolue en temps (TR). A) Echantillonnage non uniforme de la dimension temporelle indirecte dans une expérience de RMN 2D.  $t_A$  et  $t_B$  représentent respectivement les domaines temporels indirects et directs. Les points d'échantillonnage omis dans  $t_A$  sont reconstruits à l'aide de la détection compressée (CS). Le temps expérimental est beaucoup plus court que dans le cas d'un échantillonnage complet. B) NUS résolu en temps (TR-NUS). Des ensembles de données consécutifs sont créés en échantillonnant un nouveau point  $t_A$  et en supprimant le point le plus ancien de l'ensemble de données précédent. Les ensembles de données NUS sont traités comme dans A et forment une pile de spectres. La pile de spectres obtenue montre les changements se produisant dans l'échantillon avec le temps. Reproduite depuis les refs. <sup>319, 321</sup>

Une autre variante de NUS appelée échantillonnage non uniforme à résolution temporelle ou résolu en temps (TR-NUS) a été introduite en 2014 par Orekhov *et al.* <sup>322</sup> pour suivre des processus se produisant plus rapidement. Dans l'article original, les données échantillonnées de manière non uniforme ont été collectées en parallèle à la réaction se produisant dans le tube de RMN. Le programme d'échantillonnage est un ensemble de points mélangés et répétitifs qui est suffisamment long pour couvrir toute la durée de la réaction. Des sous-ensembles de points de données sont formés et chaque sous-ensemble est traité à l'aide de la décomposition multidimensionnelle (MDD) pour reconstruire un spectre. Cependant, une telle procédure n'est compatible qu'à partir du moment où les pics sont stables. L'approche exploitant le traitement CS est adaptée au cas des spectres où les positions des résonances peuvent varier. <sup>321</sup>

En 2015, ces mêmes auteurs ont proposé de modifier le TR-NUS en introduisant le traitement CS. L'algorithme a été utilisé pour reconstruire les points manquants dans chaque sous-ensemble se chevauchant et obtenir une énorme pile de spectres bidimensionnels 2D. Dans cet empilement, le temps de réaction agit comme une troisième pseudo-dimension (Figure 67 B). Cela permet de voir à la manière de « photos prises consécutivement », divers changements chimiques pour surveiller les réactions se produisant dans les mélanges naturels <sup>321</sup> ou pour surveiller le métabolisme des bactéries en présence de glucose. <sup>319</sup> Si un processus étudié affecte les positions ou les intensités des pics, l'effet

est moyenné sur le temps d'acquisition d'un seul sous-ensemble. Le modèle mathématique sert à réaligner les résonances.

Dans ce dernier article, les auteurs ont par exemple employé une expérience 2D TOCSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  avec CS-TR-NUS pour suivre les changements intervenant sur la totalité du processus. Cette expérience a été choisie en raison de sa capacité à corrélérer tous les protons dans un système de spin, rendant possible l'élucidation structurale. Un empilement de 1791 spectres a été obtenu correspondant à une moyenne de 11 min du temps de réaction. Une petite partie des spectres obtenus avec une fenêtre spectrale réduite est représentée (Figure 68). L'objectif était d'étudier le métabolisme d'une bactérie sous l'influence d'une lotion bactériostatique de nettoyage du visage. Le métabolisme a été déclenché à l'aide de glucose et les expériences TR-NUS ont été répétées pour des concentrations croissantes de lotion.

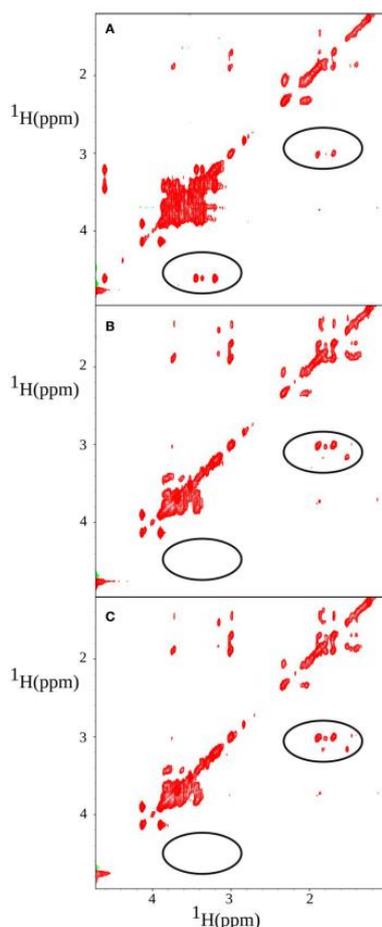


Figure 68. Spectre 2D z-TOCSY CS-TR-NUS obtenu après ajout de 0,2% de tonique facial et de 0,01% de glucose à un culot bactérien dissout dans du  $\text{D}_2\text{O}$ . A = 11 min, B = 139 min et C = 349 min après l'ajout de lotion tonique faciale. Les régions de changements sont marquées par des cercles : glucose (à gauche) et putrescine (à droite). Reproduite de la réf. <sup>319</sup>

Le métabolisme s'est avéré dépendant de la concentration d'un ingrédient actif dans la solution de nettoyage du visage. La consommation du glucose et la production de la putrescine ont ainsi été évaluées. La plus-value de cet article a été de montrer l'application du TR-NUS avec des expériences bidimensionnelles pour étudier des échantillons bactériens qui varient dans le temps. Jusqu'à présent, ces études n'avaient été effectuées qu'avec des spectres de RMN 1D. Cependant cette méthode est capable de suivre uniquement les principaux métabolites abondants et n'est pas en mesure de rendre détectable les analytes moins abondants.

Jusqu'à présent, l'algorithme CS en combinaison avec le NUS et/ou de sa variante TR a été appliqué avec succès pour suivre des réactions ou des processus se déroulant sur plusieurs heures et nécessitant de grandes concentrations de réactifs de départ de l'ordre de 100 mM. Toutefois, la limitation d'une telle procédure pour des concentrations de réactifs plus faibles et pour des composés moins abondants, rend la reconstruction des points d'échantillonnage difficile à atteindre en raison d'un faible rapport signal sur bruit. De plus, il arrive que des pics stationnaires s'élargissent et disparaissent sous le bruit, rendant délicat l'emploi d'une telle procédure. Plus récemment, Nawrocka E. K. *et al.* ont présenté une nouvelle correction baptisée « *Nonstationary* »<sup>323</sup> qui a pour objectif de corriger la non-stationnarité des pics à travers une série de spectres reconstruits, sur la base de spectres de RMN <sup>1</sup>H mesurés entre l'acquisition de deux points hypercomplexes NUS 2D. Cette méthode exploite le même principe que CS-TR-NUS mais utilise un logiciel TReNDS (*Time-Resolved-N-Dimensional Spectroscopy*)<sup>324</sup> qui fonctionne par une acquisition entrelacée permettant de réaliser jusqu'à quatre expériences simultanément. De manière similaire à la méthode TR-NUS classique qui acquiert un empilement de spectres 2D pour une seule expérience, le concept d'acquisition entrelacée consiste à échantillonner une série de points en sautant entre différentes expériences NUS. Les ensembles de données sont ensuite traités séparément permettant de recréer des empilements de spectres pour chaque expérience en acquérant peu de points de chaque signal (Figure 69). Cette méthode a permis de suivre la cinétique de l'hydrolyse enzymatique du saccharose en intégrant des pics et en suivant leurs positions spectrales au cours du temps à travers quatre expériences NUS acquises simultanément : 2D HSQC, HMBC, TOCSY et 1D <sup>1</sup>H.<sup>324</sup>

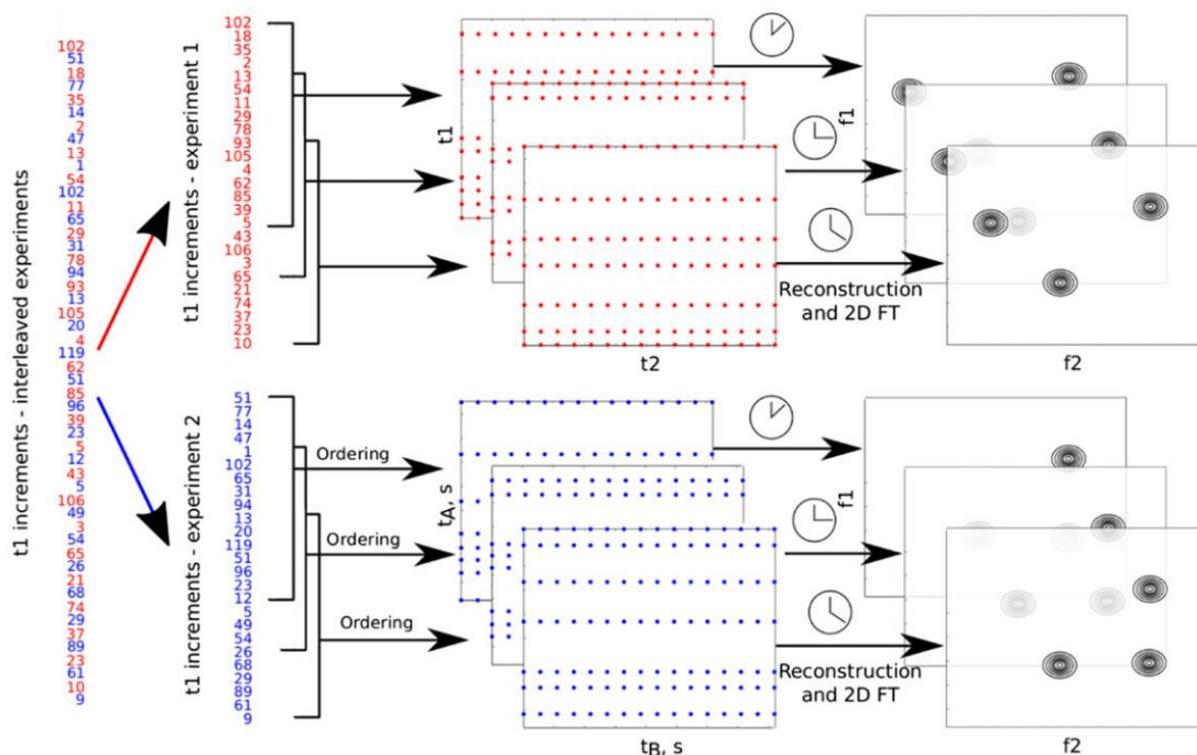


Figure 69. Schéma d'échantillonnage et de traitement exploités utilisant le logiciel TReNDS pour une acquisition entrelacée. Les données TR-NUS sont collectées en sautant entre les expériences NUS (marquées en bleu et en rouge). Les ensembles de données sont traités séparément et forment une pile de spectres permettant de refléter les changements de l'échantillon dans divers types de spectres. Reproduite de la réf.<sup>324</sup>

Le changement des paramètres physico-chimiques qui intervient pendant l'acquisition du signal peut être reflété par la non-stationnarité d'une ou plusieurs fréquences qui peut conduire à une forte déformation des pics correspondants. La correction « *Nonstationary* » stipule que les changements de

fréquences intervenant dans la dimension directe  $f_2$ , peuvent être corrigés sur la base de spectres 1D mesurés entre l'acquisition de deux points NUS 2D hypercomplexes (Figure 69), à condition que le chevauchement des pics en 1D n'entrave pas complètement la détermination de la fréquence de résonance d'un pic en mouvement. De manière succincte, cette correction change de référentiel en passant d'une fréquence pour un pic stationnaire à  $t = 0$  à une fréquence pour un pic non-stationnaire à  $t = + 1$ , rendant ce dernier immobile. Ces variations de fréquences sont rendues possibles par la réaction étudiée qui implique des radicaux libres entraînant des phénomènes de blindages et déblindages sur les résonances.<sup>323</sup> Cette façon de procéder permet d'aligner les résonances qui se décalent, mais déforment, en revanche, les pics stationnaires en même temps. Le traitement doit ainsi être répété pour chaque région spectrale contenant des pics non stationnaires et les résultats doivent être analysés simultanément avec les spectres corrigés et non corrigés (Figure 70).

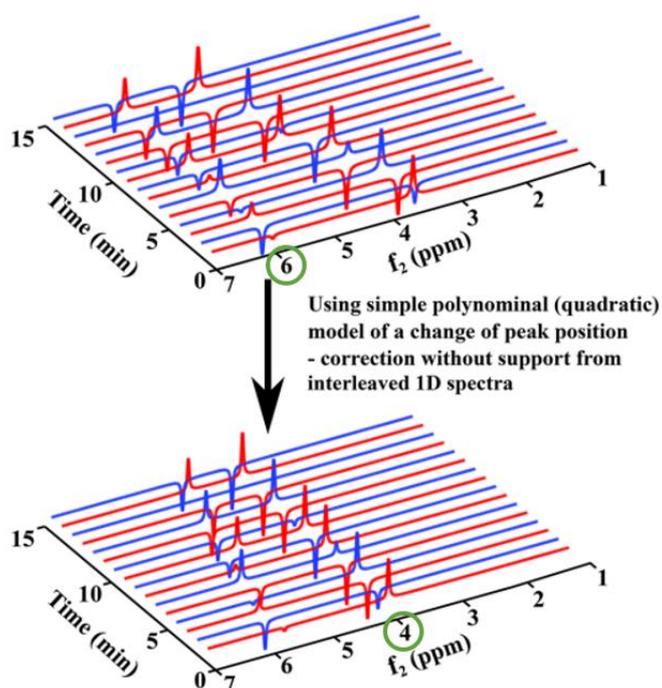


Figure 70. Correction des données de l'expérience 2D échantillonnée de manière conventionnelle. La FID après la transformée de Fourier dans la dimension directe ( $f_2$ ) est alignée pour supprimer les changements de fréquence de résonance en  $f_2$  au fil du temps d'une réaction. La procédure de correction redresse le pic qui a décalé à 4 ppm mais perturbe le pic stationnaire à environ 6 ppm. Ainsi, les spectres corrigés et non corrigés doivent être utilisés pour l'analyse. Reproduite de la réf.<sup>323</sup>

Cette correction a permis de détecter des espèces transitoires qui ne peuvent pas être détectées en temps normal par les méthodes NUS classiques car les résonances se retrouvent dans le bruit. Cette correction permet d'augmenter les limites de détection de dix fois par rapport aux méthodes NUS traditionnelles.<sup>323</sup> Les auteurs ont démontré le mécanisme de synthèse d'une réaction « quasi instantanée » de composés de type diphénylméthane induite par l'ion  $\text{AgSO}_4^-$  avec la structure d'un intermédiaire, qui reste difficilement observable en RMN. Le résultat de l'utilisation de cette correction est présenté sur la Figure 71 avec l'effet indésirable de la correction pour le pic stationnaire.

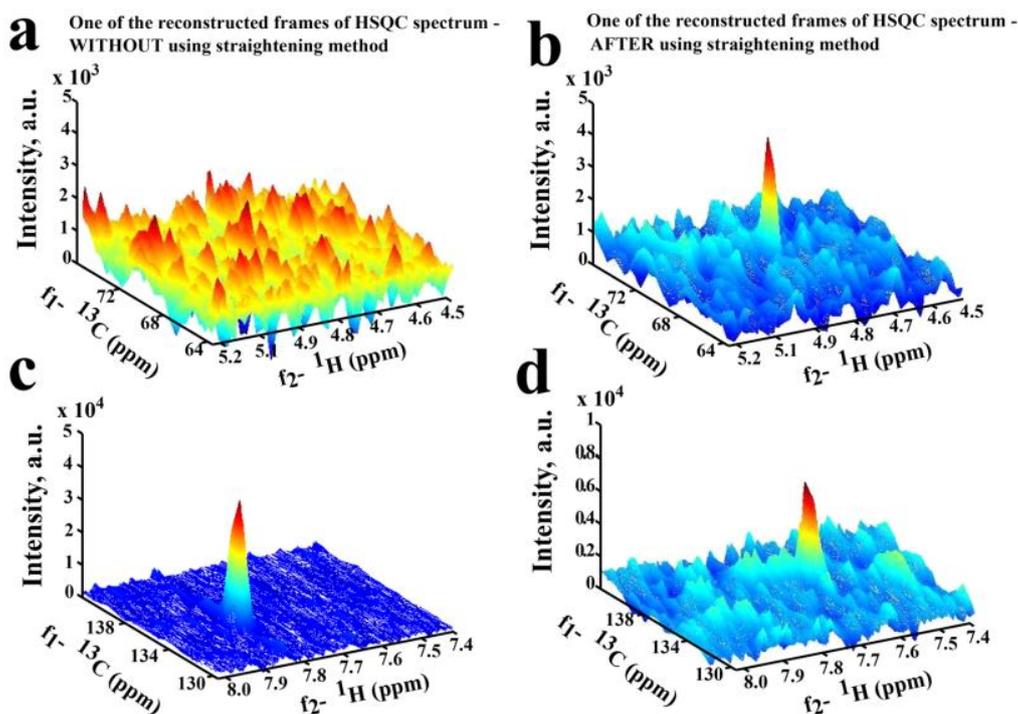


Figure 71. Reconstruction des spectres 2D TR-NUS HSQC (en « oblique-mode »). Les données montrent des régions avec des pics non stationnaires et stationnaires : a) un pic non stationnaire sans correction pour le décalage de fréquence  $^1\text{H}$ , b) le même pic après correction en prenant les coordonnées  $^1\text{H}$  à partir de spectres 1D entrelacés avec des points NUS 2D, c) un pic stationnaire avant la correction et d) le même pic dégradé par la correction. Les spectres corrigés et non corrigés doivent être utilisés pour l'analyse. Reproduite de la réf. <sup>323</sup>

Les auteurs ont ainsi démontré qu'en absence de correction, le pic appartenant à l'intermédiaire de réaction est fortement élargi et se retrouve caché sous le bruit (Figure 71a). La correction basée sur des spectres 1D entrelacés avec du NUS en dimension indirecte a permis de révéler le pic et d'identifier l'intermédiaire de réaction « à la volée » (Figure 71b). Cependant, le pic stationnaire est dégradé après correction (Figure 71d). Par conséquent, les spectres corrigés pour les pics non stationnaires et les spectres non corrigés pour les pics stationnaires doivent être utilisés pour l'analyse.

Les récentes publications citées dans cette sous-partie ont démontré l'applicabilité du NUS pour le suivi de réactions chimiques en employant le modèle mathématique CS pour la reconstruction des points manquants. La détection compressée (CS) est compatible avec la non-stationnarité des pics qui évoluent au cours du temps permettant de suivre des réactions sur plusieurs heures ou pour suivre des réactions presque « instantanées », ce qui est impossible avec les méthodes de RMN conventionnelles. Chacun des algorithmes existants dans la littérature présente des forces et des faiblesses. Un compromis est à trouver entre un meilleur rapport signal sur bruit et la présence d'artefacts de construction. Les limites de détection qui posaient des difficultés dans la reconstruction des pics pour les composés en faibles abondances, peuvent maintenant être détectables au moyen de la procédure « *Nonstationary* ».

### 3.2. Les expériences 2D « *UltraFast* » (UF) appliquées au suivi cinétique rapide

L'application de la RMN ultrarapide ne se limite pas à l'analyse des mélanges complexes qui « n'évoluent pas au cours du temps ». Peu de temps après leur publication initiale en 2002, <sup>178</sup> Frydman L. *et al.* ont étudié le potentiel de la RMN ultrarapide 2D pour sa capacité à acquérir des données en quelques secondes, permettant d'élucider des mécanismes complexes et de détecter des espèces

intermédiaires transitoires. Plusieurs revues ont rapporté l'ensemble des travaux qui ont été élaborés par la communauté scientifique.<sup>32, 35, 41</sup>

Pour la très grande majorité d'entre eux, les expériences ultrarapides ont été testées sur des tubes conventionnels de RMN « *in-situ* » de 5 mm. En revanche, pour la surveillance de la réaction « *on-line* », ce type d'expérience a surtout été employé pour la RMN à bas champ,<sup>325-326</sup> mais la faible résolution limite l'applicabilité de cette approche. Récemment, Jacquemmoz C. *et al.*<sup>42</sup> ont démontré ce concept sur un spectromètre de 600 MHz en étudiant une réaction de saponification. A notre connaissance, ces travaux sont la première preuve d'une application de l'approche « *on-line* » exploitant des expériences UF-COSY 2D pour suivre une réaction organique *via* la RMN à haut champ. Pour cela, ils ont remplacé le codage longitudinal de l'axe Z (Figure 72a) par un codage transversal de l'axe X (Figure 72b) afin d'éviter des fluctuations de l'intensité des signaux qui entravaient l'analyse des données cinétiques (Figure 72b et d).

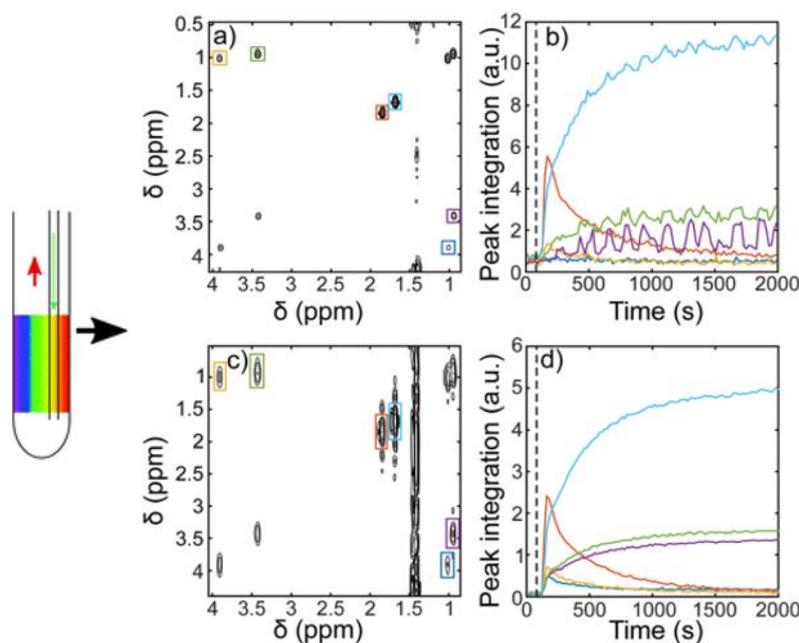


Figure 72. Spectres 2D UF-COSY avec codage dans l'axe Z (a) et axe X (c) révélant l'évolution de l'intensité des signaux sélectionnés (b et d) au cours d'une réaction de saponification. En rouge, jaune et bleu : acétate d'éthyle, cyan : acide acétique et vert/violet : éthanol. La ligne en pointillée indique le moment où l'acétate d'éthyle a été introduit dans le mélange réactionnel. Reproduite de la réf.<sup>42</sup>

Le codage transversal a entraîné une perte de résolution dans la dimension codée spatialement en raison du diamètre du tube qui est plus fin sur l'axe X que la longueur de l'échantillon sur l'axe Z. Par conséquent l'intensité des gradients reste limitée. Les spectres 2D UF-COSY ont été acquis en moins d'une seconde toutes les 10 s d'intervalle à un débit de 3 ml/min.

Ces résultats ont encouragé les scientifiques à élargir l'application de la méthode ultrarapide sur différents domaines d'applications. C'est le cas de Concilio M. G. *et al.* qui ont démontré que la méthode MaxQ était compatible pour étudier une réaction de cycloaddition de Diels-Alder inverse (Figure 73).<sup>200</sup>

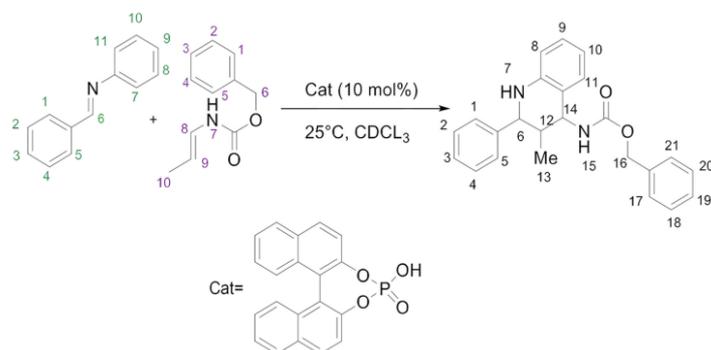


Figure 73. Réaction de cycloaddition inverse de Diels-Alder catalysée par un acide BINOL-phosphorique racémique. Reproduite de la réf. 200

En utilisant une séquence ultrarapide et en fixant le plus grand nombre de quanta excitables du produit final attendu à 4Q, le codage spatial des signaux dans la dimension indirecte a permis de réduire la durée totale des expériences MQ conventionnelles de 10 min en seulement 1 min et 22 secondes. Cette expérience a permis de suivre l'évolution des corrélations en enregistrant des expériences ultrarapides toutes les 2 min pendant 2 heures (Figure 74).

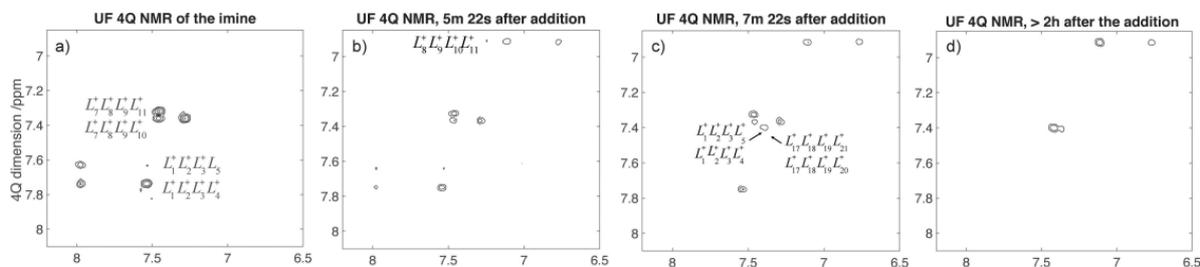


Figure 74. Suivi d'une réaction de cycloaddition de Diels-Alders catalysée par un acide BINOL-phosphorique racémique par des spectres de RMN UF 4Q. Les spectres ont été acquis à différents stades de la réaction. a) Composé imine avant l'ajout du catalyseur et du diénophile, b) mélange réactionnel 5 minutes et 22 secondes après l'ajout du diénophile et du catalyseur (environ 4 minutes ont été nécessaires pour les paramètres automatiques du spectromètre « lock » et « shim »), c) mélange réactionnel après 7 minutes et 22 secondes après l'ajout du diénophile et du catalyseur et d) mélange réactionnel en fin de réaction. Reproduite de la réf. 200

Précédemment, nous avons montré que la technique EC-RMN pouvait être un outil utile pour observer des intermédiaires instables, mais aussi pour élucider les voies des réactions métaboliques (Annexe 4). Néanmoins, cette méthode reste compliquée par la proximité du dispositif électrochimique à la sonde de RMN, provoquant un élargissement des signaux avec une dégradation du signal et par conséquent un chevauchement des résonances (Figure 75).

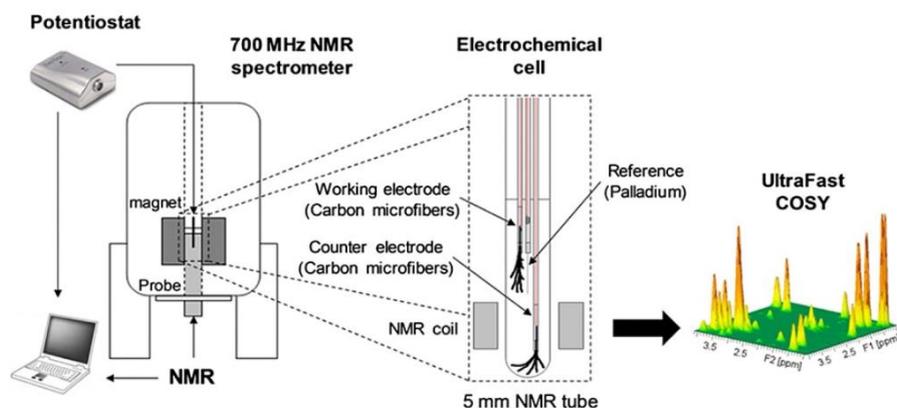


Figure 75. Schéma d'une expérience de RMN 2D UF-EC. Reproduite de la réf. 327

De plus, les longs délais nécessaires à l'acquisition de données de RMN 2D sont incompatibles avec les études de processus rédox rapides. Divers dispositifs ont été proposés pour surmonter les limitations pratiques de la cellule électrochimique « *in-situ* » (Annexe 4), mais malgré cela, leurs applications sont limitées aux situations où les résonances sont bien séparées. Les expériences ultrarapides sont une excellente alternative qui peut être appliquée à l'étude en temps réel des réactions rédox, impliquant des intermédiaires de réaction. L'étude rapportée en 2014 par Boisseau R. *et al.* sur la réduction électrochimique du 9-chloroanthracène, suivie par des expériences 2D UF-COSY montre des possibilités intéressantes pour les méthodologies couplées. Les expériences ont été enregistrées sur un spectromètre de 700 MHz avec une sonde cryogénique, dans un tube de RMN 5 mm avec une solution de 25 mM de réactifs dans l'acétonitrile- $d_3$ /D<sub>2</sub>O (95:5, v/v). Chaque spectre 2D UF-COSY a été acquis toutes les 3 min avec 32 scans pendant 80 min, conduisant à l'identification sans ambiguïté d'un intermédiaire et de deux produits de réaction (Figure 76).

L'évolution de l'intensité des corrélations de RMN 2D au cours du temps a permis de mieux comprendre le mécanisme de la réaction impliquant un intermédiaire instable. Les spectres 2D UF-COSY ont révélé les corrélations attendues de l'espèce participante (Figure 76). Ainsi, la présence des réactifs 9-chloroanthracène (en vert), anthracène comme intermédiaire (en rouge), le dimère 10,10'-dihydroxy-9,9',10,10'-tétrahydro-9,9'-bianthryl (en bleu) et de l'anthraquinone (en jaune) en tant que produits a été observée.

Plus récemment, Zhan H *et al.*<sup>96</sup> ont mis en œuvre une approche DOSY spatialement sélective basée sur la méthode pure-shift employant le schéma (ZS)<sup>125</sup> (introduit dans la partie A en 2.1.1). Les auteurs ont étudié un processus d'électro-oxydation d'alcools mélangés « *in-situ* » en suivant leurs propriétés d'autodiffusion dans des conditions de champ magnétique défavorable. Cette stratégie a permis de s'affranchir des effets d'élargissement inhomogènes du champ magnétique en fournissant des singulets le long de la dimension du déplacement chimique. Ce qui a rendu possible le calcul des coefficients de diffusion et d'obtenir les informations dynamiques souhaitées le long de la dimension de diffusion. Les auteurs ont ainsi démontré le potentiel de cette approche pour suivre des réactions électrochimiques « *in-situ* ».

Grâce aux développements méthodologiques et analytiques des 15 dernières années, la spectroscopie de RMN ultrarapide s'est imposée comme une alternative intéressante à son homologue conventionnelle où le temps nécessaire pour enregistrer des données peut être considérablement réduit en atteignant des échelles de temps de l'ordre de la sonde voire d'une fraction de seconde d'acquisition. Elle est devenue une solution attractive pour de nombreuses applications, donnant ainsi accès au contrôle des processus rapides qui sont bien souvent inaccessibles de manière conventionnelle.

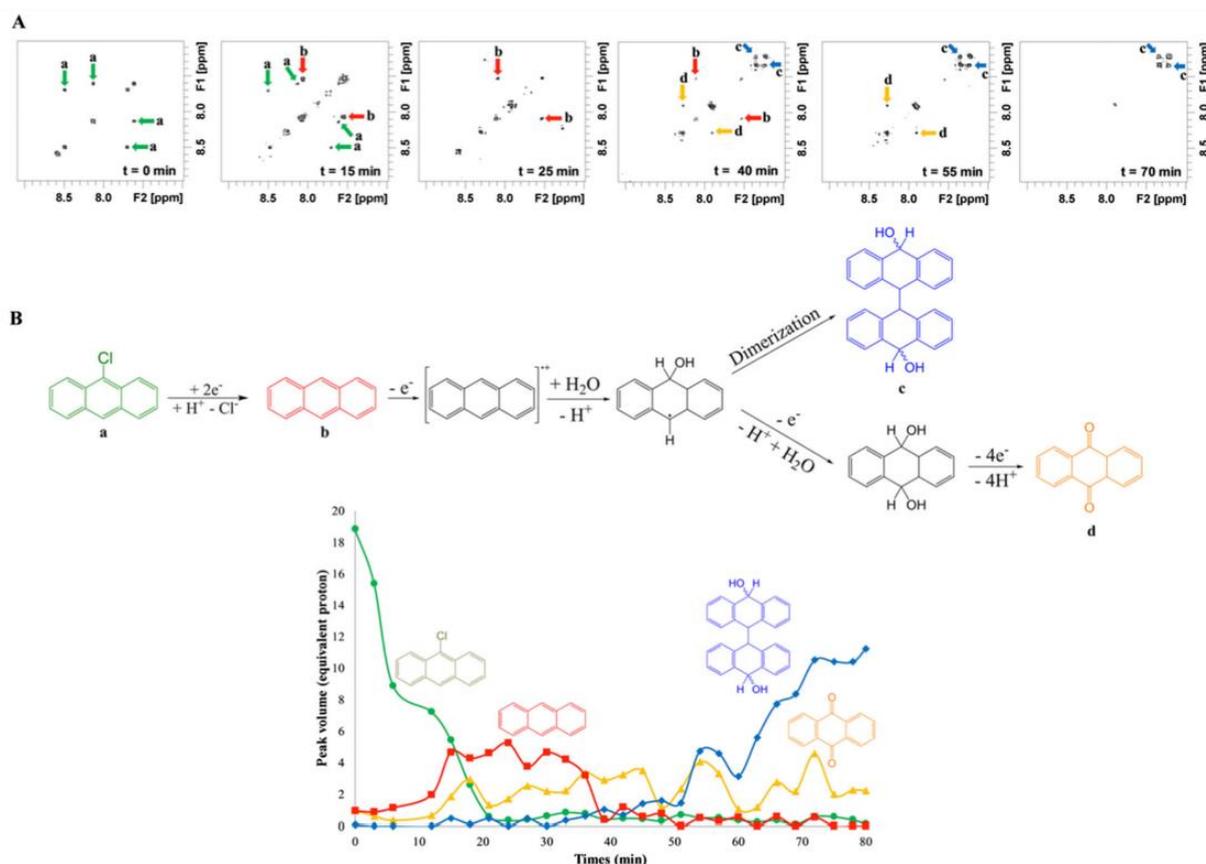


Figure 76. A) Spectres de RMN COSY 2D enregistrés à différents moments lors de la réduction électrochimique du 9-chloroanthracène. Les corrélations de chaque composé présent sont mises en évidence par des flèches de couleurs différentes. B) Evolution de l'intensité des corrélations sur les spectres COSY 2D. Reproduite de la réf.<sup>41</sup>

#### 4. Conclusion

Nous avons regroupé dans cette section la majorité des approches détaillées dans la littérature qui emploient des dispositifs plus au moins sophistiqués pour l'étude de réactions organiques en RMN. D'après nos informations, peu de revues relatent les recherches qui attestent d'une compréhension mécanistique de plus en plus poussée depuis plus de 20 ans pour la spectroscopie de RMN liquide à haut champ. Les principales méthodes retrouvées dans la littérature ont également été décrites dans la deuxième sous-partie.

Bien que l'approche « *on-line* » soit sans équivoque la plus appropriée et la plus utilisée pour le suivi de réaction ayant des cinétiques rapides, elle nécessite néanmoins, dans la majorité des cas, une sonde spécifique pour chaque type de réaction étudiée. Cela reste onéreux et requiert une infrastructure nécessitant généralement des connaissances adéquates, rendant de ce fait cette approche moins adaptée pour un non spécialiste.

Un moyen plus simple d'étudier des réactions chimiques, consiste à exploiter l'approche « *in-situ* » dans un tube de RMN classique en milieu visqueux, de manière à ralentir suffisamment la vitesse de rotation des molécules en solution afin de mettre à profit les expériences *ViscY* décrites dans ce manuscrit, pour individualiser plus rapidement les composés présents dans le milieu réactionnel à une température donnée. Ces résultats seront détaillés dans la Partie III-D.

**PARTIE II :**  
**MATERIELS ET METHODES**

## 1. La diffusion de spin en milieu visqueux

### 1.1. Choix du milieu

Depuis dix ans, notre équipe de recherche emploie de nouveaux solvants (ou mélanges de solvants) visqueux pour individualiser des composés de faibles masses au sein de mélanges.<sup>46-48, 72-74, 328</sup> La découverte de nouveaux solvants (ou mélanges de solvants) visqueux doit encore être poursuivie afin de répondre encore plus efficacement aux nombreux besoins existants et futurs des chimistes. Les éléments de réflexion pris en compte pour la recherche d'un solvant visqueux approprié au but que nous poursuivons seront exposés ci-après.

#### 1.1.1. Critères de choix

##### 1. Le pouvoir de dissolution

La capacité à dissoudre autant que possible un large éventail de composés doit être évaluée. Il est raisonnable de classer les mélanges d'analytes en deux catégories : polaires et apolaires. Dans ce contexte, les interactions ions-dipôles, les liaisons hydrogènes ou les liaisons de Van der Waals participent à la solvatation de l'analyte en solution. Les solvants polaires à constante diélectrique élevée tels que le glycérol ( $\epsilon = 42,5$ <sup>212</sup> à 25°C ou le carbonate de glycérol ( $\epsilon = 111,5$ <sup>329</sup> à 25°C) solvantent facilement les composés polaires en mélange. En revanche, les solvants polaires tels que les polymères perfluorés (mêlés à des solvants organiques apolaires) conviennent à l'étude des composés apolaires.<sup>44</sup>

##### 2. La préparation des échantillons

L'introduction de l'échantillon d'intérêt dans un tube de RMN doit être la plus simple possible. Par exemple, le glycérol qui a une viscosité élevée ( $\eta = 934$  cP à 25°C) rend la préparation des échantillons peu pratique.<sup>46</sup>

##### 3. Efficacité de la diffusion de spin

Selon la théorie de la micro-viscosité exprimant la dépendance du temps de corrélation moléculaire  $\tau_c$  sur la viscosité du milieu, une augmentation de la viscosité de la solution entraîne une augmentation de  $\tau_c$  en abaissant la fréquence de la réorientation moléculaire des solutés. En conséquence, les molécules présentent un régime NOE négatif jusqu'à 100% en intensité pour de longues durées de saturation (NOE permanent) ou de mélange (NOE transitoire). Un échange d'aimantation intramoléculaire partiel ou total peut alors avoir lieu par diffusion de spin. L'accroissement du NOE négatif dans un solvant à faible viscosité ( $\eta > 2$  cP) tel que le DMSO- $d_6$  sera généralement observé pour les composés rigides de taille moyenne qui se réarrangent de manière isotrope en solution ( $MM > 1000$  g.mol<sup>-1</sup>) au moyen de la RMN <sup>1</sup>H à haut champ de routine, à une fréquence de résonance supérieure à 300 MHz, à température ambiante, et cela pour les analyses d'élucidation de la structure moléculaire et de la conformation.<sup>330</sup> Les molécules rigides plus petites ( $MM > 150$  g.mol<sup>-1</sup>) nécessiteront une valeur de  $\omega\tau_c$  plus importante et donc une augmentation soit de l'intensité du champ magnétique, soit de la viscosité du milieu (ou des deux), à savoir une combinaison d'un champ magnétique de fréquence d'au moins 500 MHz et d'une viscosité de solvant minimale de 7 à 11 cP tel qu'un mélange éthylène glycol/eau à température ambiante.<sup>263</sup> Pour une même fréquence de Larmor, la détection de la diffusion de spin active (NOE longue portée sur une distance  $> 2,5$  nm) nécessitera un solvant très

visqueux ( $\eta > 80$  cP) tel que le glycérol (GL) ou le carbonate de glycérol (GC) à température ambiante ou des mélanges de solvants tels que DMSO- $d_6$ /GL, DMSO- $d_6$ /eau à des températures inférieures à zéro pour l'analyse du mélange.<sup>46-48</sup>

Par la suite, des expériences de RMN NOESY 1D et 2D (sélectives ou non), en fonction de la température, permettront d'évaluer le comportement des molécules en solution et par conséquent de déterminer la qualité de la diffusion de spin intramoléculaire.

#### 4. Résolution spectrale de RMN

La diffusion de spin est d'autant plus efficace que la relaxation transversale  $T_2$ , responsable de l'élargissement des raies de résonances, reste modérée avec la réduction de la température afin de maintenir une qualité spectrale suffisante. Il faut sélectionner la meilleure température pour parvenir au meilleur compromis entre une résolution spectrale suffisamment bonne et une diffusion de spin suffisamment active.

#### 5. Point de congélation

Un point de congélation aussi bas que possible est le critère de sélection car plus il est bas, plus la viscosité du milieu sera augmentée à basse température favorisant ainsi la diffusion de spin selon la théorie de la micro-viscosité.<sup>208</sup> A titre de comparaison, un mélange DMSO- $d_6$ /eau (7:3, v/v) permet d'atteindre une très basse température de congélation à 228 K alors que le DMSO- $d_6$  et l'eau gèlent respectivement à 293 K et 273 K, offrant en même temps une large plage de températures sur lesquelles la diffusion de spin peut être modulée.<sup>48</sup> Nous explorons des mélanges de solvants originaux avec des points de congélation plus bas que ceux de chaque élément du mélange. En tant que tel, le DMSO- $d_6$  et le D<sub>2</sub>O sont de très bons candidats comme co-solvants pour la préparation de mélanges binaires visqueux.

#### 6. Echanges de protons labiles

L'observation des protons échangeables des solutés nécessite l'usage de solvants deutérés ne présentant pas d'atomes de deutérium échangeables, en particulier pour l'étude de composés biologiques tels que les peptides pour lesquels les protons amides sont essentiels à l'analyse structurale par RMN. Autrement, des solvants visqueux deutérés peuvent être envisagés.

#### 7. Coût de préparation de l'échantillon

La présence de nombreux sites de deutération peut augmenter considérablement le coût d'achat de solvants de telle manière que cela puisse se révéler prohibitif. La mise en œuvre de l'élimination des résonances résiduelles de solvants et/ou l'application des méthodes de détection ou d'excitation sélectives est alors nécessaire.

#### 8. Suppression du signal du solvant

Le solvant (ou mélange de solvants) visqueux peut être évalué en minimisant le nombre de résonances à supprimer de manière à assurer une suppression facile et à éviter que trop de résonances provenant des analytes ne soit cachées par celles du solvant.

## 9. Outils de spectromètre de RMN de routine

Le solvant (ou mélange de solvants) visqueux est d'autant plus appréciable qu'il présente une quantité importante de noyaux deutérés pour garantir l'utilisation des outils spectrométriques de RMN de routine tels que le verrouillage du champ magnétique automatique « lock » et du réglage de son homogénéité, le « shim ».

### Exemples de candidats

Les candidats à évaluer en tant que solvants (ou mélanges de solvants) visqueux sont potentiellement nombreux dans l'analyse de mélanges dans des conditions de diffusion de spin. A cet effet, nous avons exploré des mélanges binaires originaux en considérant le D<sub>2</sub>O et le DMSO-*d*<sub>6</sub> polaires comme co-solvants deutérés qui sont employés couramment pour les outils d'automatisation de RMN (« lock » et « shim »), pour leur capacité à présenter un point de congélation du mélange bas selon la proportion du co-solvant ajouté <sup>48</sup> et le DMSO-*d*<sub>6</sub> pour son grand réservoir de deutérium, et pour sa résonance résiduelle étroite. Dans ce contexte, nous avons étudié des mélanges binaires capables de dissoudre des composés polaires et modérément apolaires tels que le saccharose/eau (1 :1, m/m,  $\eta = 27$  cP), <sup>331-332</sup> D<sub>2</sub>O ( $\eta = 0,898$  cP) <sup>214</sup>/gel d'agarose à 1%, DMSO-*d*<sub>6</sub> ( $\eta = 2,20$  cP à 20°C) <sup>212</sup> /sulfolane ( $\eta = 10,3$  cP à 30°C), <sup>333</sup> DMSO-*d*<sub>6</sub>/thiodiglycol ( $\eta = 65$  cP à 20°C), <sup>334</sup> DMSO-*d*<sub>6</sub>/éthylène glycol ( $\eta = 17$  cP à 25°C), <sup>335</sup> DMSO-*d*<sub>6</sub>/acide phosphorique ( $\eta = 37,59$  cP à 20°C à 85% dans l'eau) et acide phosphorique/D<sub>2</sub>O (9:1, w/w,  $\eta = 64,75$  cP à 298 K). <sup>336</sup>

#### 1.1.2. Les solutions sucrées

##### 1.1.2.1. Solution de saccharose

Dissoudre du sucre de table dans l'eau produit très simplement une solution visqueuse qui permet d'étudier des mélanges complexes polaires en tirant profit de la diffusion du spin. Par exemple, la viscosité du mélange saccharose/eau (1:1, m/m) est d'environ 27 cP à 283 K. <sup>331-332</sup> Comparativement, celle de l'eau à la même température est de 1,307 cP. <sup>337</sup> A température ambiante, la viscosité de ce même mélange saccharose/eau est suffisamment faible pour que les échantillons puissent être préparés et transférés dans un tube de RMN sans aucune difficulté, contrairement aux solvants très visqueux tels que le glycérol ( $\eta = 934$  cP à 298 K) <sup>210</sup> et le carbonate de glycérol ( $\eta = 85,4$  cP à 298 K). <sup>210</sup> L'ajout de saccharose à l'eau (deutérée ou non) ouvre également la voie à des études par RMN à 20°C ou moins, <sup>332</sup> ce qui convient particulièrement aux molécules thermiquement instables telles que certaines molécules bioactives. La diffusion de spin peut ainsi se produire sur une large plage de températures allant de 243 K <sup>332</sup> à la température ambiante, voire au-dessus. De plus, le coût de préparation des échantillons est très faible en raison de la grande accessibilité du sucre de table. Cependant, le principal écueil expérimental réside dans la présence de signaux résiduels intenses en RMN du <sup>1</sup>H en provenance du saccharose non deutéré, ce qui oblige leur élimination. Les molécules de taille moyenne ne nécessitent qu'une faible quantité de saccharose dans l'eau, tandis que les molécules plus petites et/ou plus flexibles nécessitent davantage de saccharose pour favoriser la diffusion du spin de la température ambiante à des températures inférieures à 0 °C. En 2019, nous avons évalué pour la première fois une solution de saccharose dans l'individualisation des composantes du mélange test constitué des quatre dipeptides Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr et Ala-Tyr à l'aide d'expériences NOESY 1D et 2D sélectives et HSQC-NOESY <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N, à 600 MHz (publication 1). <sup>72</sup>

#### 1.1.2.2. Gel d'agarose

Le gel d'agarose est couramment utilisé pour la séparation de molécules biologiques par électrophorèse, et a déjà été employé dans le contexte de la RMN pour étudier l'effet du confinement moléculaire sur la dynamique conformationnelle de l'apomyoglobine.<sup>338</sup> Le principal problème de la préparation de l'échantillon est l'ajout de la molécule d'intérêt à la poudre d'agarose préalablement dissoute dans de l'eau à haute température (363 K pour la fusion du gel d'agarose solidifié et à environ 338 K pour l'agarose à l'état liquide à bas point de fusion). Les solutions peptidiques ou protéiques peuvent souffrir de l'exposition à de hautes températures empêchant les études structurales et conformationnelles en RMN, causée par une gélification prématurée. En pratique, le chauffage ne dure que quelques minutes. La préparation de l'échantillon est donc compatible avec des molécules de petite taille raisonnablement résistantes à la chaleur, telles que les acides nucléiques, les peptides ou les saccharides. De plus, la forme et la finesse des pics de résonances peuvent être considérablement altérées dans le cas d'échantillons non homogènes en raison de la présence d'agarose non parfaitement fondu ou de l'incorporation de bulles d'air. Fait intéressant, le gel d'agarose n'interagit pas avec la plupart des biomolécules et des composés organiques, de sorte que l'ADN, l'ARN et les protéines peuvent être récupérés à partir de ce gel d'agarose.<sup>339-340</sup> Son point de congélation est rapporté à 260 K et 264 K respectivement avec des gels d'agarose à 1% à base de H<sub>2</sub>O et D<sub>2</sub>O,<sup>341</sup> ce qui limite la plage de températures sur laquelle la diffusion de spin peut agir. Par conséquent, le gel d'agarose sera davantage dédié à l'étude de molécules rigides de petites ou moyennes tailles en mélange présentant des temps de corrélation plus élevés que les petites molécules très flexibles. De plus, de manière remarquable, en raison de la rigidité du gel d'agarose et donc de la relaxation transversale  $T_2$  très active, l'ensemble des résonances protons et carbones sont trop larges pour être détectées en spectroscopie de RMN.<sup>341-342</sup> En conséquence, seul le signal proton résiduel de l'eau doit être éliminé, ce qui représente un autre avantage par rapport aux nombreux signaux protons intenses en provenance des solvants visqueux non deutérés préalablement décrits dans la littérature tels que le saccharose, le glycérol, le carbonate de glycérol ou encore l'éthylène glycol. En 2019, nous avons évalué pour la première fois l'utilisation du gel d'agarose à 1% dans l'individualisation des composantes du mélange test constitué des quatre dipeptides Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr et Ala-Tyr à l'aide d'expériences NOESY 1D et 2D sélectives et HSQC-NOESY <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N, à 600 MHz (publication 1).<sup>72</sup>

#### 1.1.3. Le sulfolane

Le sulfolane est un solvant aprotique dipolaire peu réactif et incolore avec des stabilités chimique et thermique importantes et des propriétés de solvants inhabituelles. Il est composé de molécules globulaires et possède une constante diélectrique assez élevée ( $\epsilon = 43,4$  à 300 K)<sup>333</sup> responsable de sa capacité à dissoudre une très grande variété de composés organiques polaires et de molécules modérément apolaires. Il présente également une viscosité assez importante ( $\eta = 10,295$  cP à 30°C),<sup>343</sup> Le sulfolane est entièrement miscible avec l'eau et avec d'autres solvants organiques polaires et aromatiques. Son point de congélation est considérablement diminué, jusqu'à des températures inférieures à 0°C, après ajout d'eau (50%, v/v, à 256 K) ou de DMSO-*d*<sub>6</sub> (30%, v/v, à 238 K)<sup>73</sup> Ceci est particulièrement utile pour l'étude des molécules thermosensibles. En raison de l'augmentation de la viscosité de ces solvants binaires avec la diminution de la température, les espèces dissoutes peuvent afficher une diffusion de spin à température ambiante et en dessous.<sup>344</sup> A température ambiante, les viscosités des deux mélanges sont raisonnablement faibles, bien que le sulfolane pur possède une

valeur de 10,29 cP à 303 K,<sup>345</sup> supérieure à 0,898 cP pour l'eau et à 2,007 cP pour le DMSO-*d*<sub>6</sub> à 298 K.<sup>214</sup> Le sulfolane est donc pratique pour la préparation d'échantillons de RMN, contrairement aux alternatives de solutions à haute viscosité telles que le glycérol ( $\eta = 934$  cP à 298 K) et le carbonate de glycérol ( $\eta = 85,4$  cP à 298 K).<sup>210</sup> L'inconvénient expérimental majeur de l'utilisation de deux mélanges à base de sulfolane est l'apparition de signaux protons intenses, provenant du sulfolane non deutéré et de l'eau, qui doivent être supprimés. De plus, bien que disponible dans le commerce à un niveau d'enrichissement relativement faible (98%), le nombre total de sites à deutérer du sulfolane-*d*<sub>8</sub> coûte cher car il peut entraîner un chevauchement de ses signaux intenses avec ceux des molécules d'intérêt.

#### 1.1.4. L'acide phosphorique

L'acide phosphorique ou orthophosphorique, de formule  $H_3PO_4$  s'avère être un solvant candidat idéal pour individualiser les composés en mélange. C'est un triacide faible qui dissout facilement les sels et est très visqueux en présence d'un co-solvant tel que l'eau ( $H_3PO_4$ /eau, 9:1, w/w,  $\eta = 64,75$  cP à 298 K).<sup>336</sup> L'acide phosphorique-*d*<sub>3</sub> a déjà été utilisé comme solvant pour favoriser les NOEs négatifs de la brucine-*d*<sub>2</sub> ( $MM = 396,5$  g.mol<sup>-1</sup>) qui présente alors, à température ambiante, des mouvements de rotation moléculaire considérablement ralentis.<sup>346</sup> Cet acide minéral joue un rôle important en chimie inorganique et en biochimie. A température ambiante, l'acide phosphorique pur est un solide cristallin. L'utilisation dominante de l'acide phosphorique est la production d'engrais, consommant environ 90% de la production. Il est généralement vendu sous la forme d'un « sirop » incolore à 85% de concentration dans l'eau. C'est un solvant miscible avec n'importe quel solvant polaire tels que l'éthanol, l'eau et la plupart des solvants non polaires.<sup>347</sup> La solution d'acide phosphorique (85%) présente un point de fusion autour de 299 K.<sup>348</sup> Son point de fusion peut être réduit en ajoutant plus d'eau ou de DMSO-*d*<sub>6</sub>. D'ailleurs, les points de fusion de la solution d'acide phosphorique (85%) atteignent respectivement 248 K et 258 K après addition de 20% d'eau et 30% de DMSO-*d*<sub>6</sub> en volume. Cette propriété permet de préparer des échantillons de RMN à l'état liquide à température ambiante ou en dessous, ce qui est particulièrement adapté aux molécules de faible stabilité thermique. En conséquence, la diffusion de spin peut se produire sur une large plage de température, de la température ambiante à des températures inférieures à 0°C en raison de l'augmentation de la viscosité des deux mélanges de solvants lors de la diminution de la température.<sup>336</sup> Cependant, la viscosité des mélanges à base d'acide phosphorique à température ambiante reste modérément faible, même l'acide phosphorique (85% dans l'eau) présentant une viscosité faible ( $\eta = 37,59$  cP à 298 K).<sup>336</sup> En conséquence, les tubes d'échantillons de RMN peuvent être préparés sans aucun problème, contrairement aux solvants très visqueux comme le glycérol ( $\eta = 934$  cP à 298 K).<sup>210</sup> De plus, la faible acidité des solutions aqueuses d'acide phosphorique ( $pK_a = 2,148, 7,198$  et  $12,319$  à 298 K) rend son utilisation compatible avec la plupart des petites molécules sans risque de les altérer. Cependant, compte tenu de la présence de ces solvants à base d'acide phosphorique, il est nécessaire de supprimer le signal <sup>1</sup>H résiduel du solvant comme pour les solutions sucrées<sup>72</sup> et le sulfolane<sup>73</sup>. De plus, les quantités élevées de DMSO-*d*<sub>6</sub> et de D<sub>2</sub>O ajoutés permettent facilement le verrouillage du champ magnétique « lock » et du réglage de son homogénéité « shim », comme pour tout autre solvant usuel. Néanmoins, l'inconvénient majeur de l'utilisation de l'acide phosphorique reste la formation de sels pouvant perturber certains paramétrages automatiques du spectromètre tel que l'accord de sonde. Ceci nécessite la plus grande précaution lors de la manipulation d'une cryosonde. De ce fait, la durée des impulsions peut être plus longue que celle rencontrée dans les solvants organiques usuels.

### 1.1.5. Procédure pour caractériser les composés en mélange

Cette section présente la procédure qui a été employée pour caractériser les éléments d'un mélange. Elle présente les différents composés modèles utilisés pour nos investigations, ainsi que leurs préparations (concentrations et dilutions) dans des tubes de RMN selon le type de mélanges binaires visqueux impliqués.

#### 1.1.5.1. Les mélanges modèles de composés étudiés

Dans le cadre des deux premières tâches de mes travaux de thèse qui a consisté à i) rechercher de nouveaux solvants (ou mélanges de solvants) visqueux efficaces afin de déterminer les conditions d'observations du phénomène de transfert d'aimantation par la diffusion de spin et ii) à mettre en place de nouvelles méthodes d'acquisition originales de spectres de RMN améliorant l'efficacité du transfert d'aimantation par la diffusion de spin, deux mélanges modèles de composés de faibles masses moléculaires ont été sélectionnés (Figure 77).

Le mélange 1 contient quatre dipeptides polaires de structures proches :

Leu-Val (MM = 230,31 g.mol<sup>-1</sup>), Leu-Tyr (MM = 294,35 g.mol<sup>-1</sup>), Gly-Tyr (MM = 238,24 g.mol<sup>-1</sup>) et Ala-Tyr (MM = 252,27 g.mol<sup>-1</sup>).

Le modèle 2 contient quatre composés phosphorés :

dicyclohexyl(4-(*N,N*-diméthylamino)phényl)phosphine (MM = 317,45 g.mol<sup>-1</sup>), *exo*-phényl kwon [2.2.1] bicyclic phosphine (MM = 345,40 g.mol<sup>-1</sup>), allyltriphenylphosphonium bromide (MM = 383,26 g.mol<sup>-1</sup>) et (methoxyméthyl)triphenylphosphonium chloride (MM = 342,80 g.mol<sup>-1</sup>).

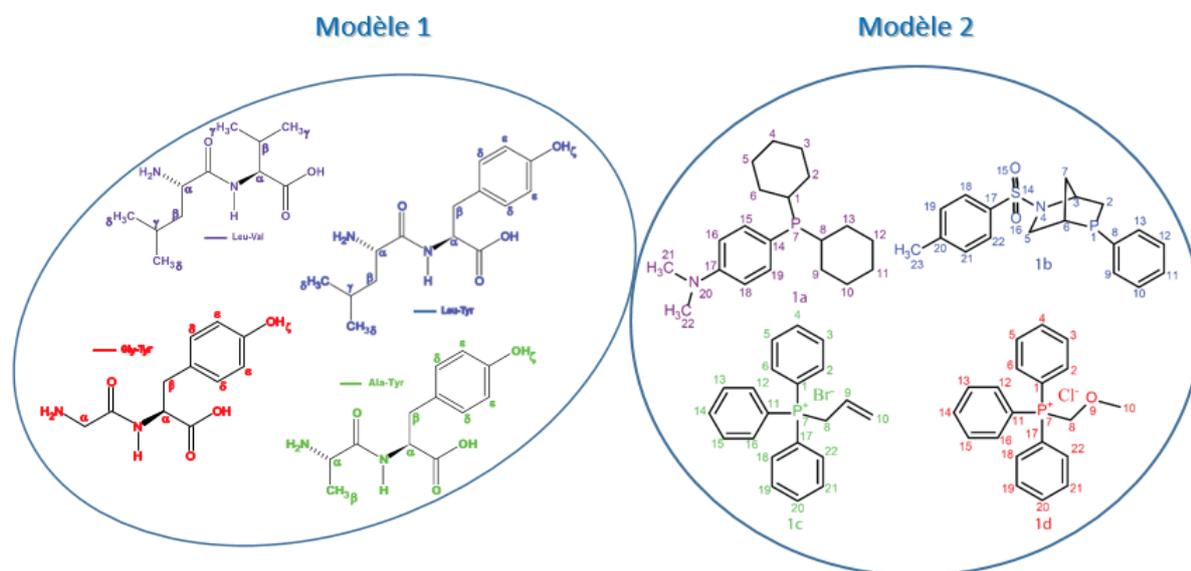


Figure 77. Les deux mélanges modèles de composés étudiés au cours de mes travaux de thèse.

#### 1.1.5.2. Caractérisation structurale des composés purs dans un solvant non visqueux

Avant d'envisager l'étude de chaque mélange modèle, les composés ont été individuellement dissous dans un solvant de RMN classique (DMSO-*d*<sub>6</sub> ou eau) puis caractérisés. Cette étude a permis

d'attribuer les résonances des protons de tous les composés étudiés pour contourner le manque d'information lié aux chevauchements de résonances couramment observés lors de l'analyse des composés en mélange.

#### 1.1.5.3. Préparation des échantillons

Chaque échantillon contient quatre solutés dissous à une concentration de 10 ou 20 mM dans 750  $\mu\text{l}$  d'un mélange binaire de solvants.

La viscosité du mélange binaire visqueux saccharose/eau ( $\eta = 22$  cP à 283 K) et du sulfolane seul ( $\eta = 10,295$  cP à 30°C) est suffisamment faible pour que les échantillons puissent être préparés et transférés dans un tube de RMN sans aucune difficulté, contrairement aux solvants très visqueux tels que le mélange binaire acide phosphorique/eau (9:1, m/m,  $\eta = 64,75$  cP à 298 K) ou l'utilisation du gel d'agarose qui nécessitent de chauffer préalablement l'échantillon pendant plusieurs minutes. La solution a consisté à refondre l'échantillon directement dans le tube de RMN à l'aide par exemple d'un sèche-cheveux pendant quelques minutes, à le mélanger vigoureusement puis à le laisser refroidir à la température ambiante.

#### 1.1.5.4. Equipement utilisé

L'évaluation des solvants binaires visqueux pour l'analyse des mélanges complexes a été entreprise grâce à deux spectromètres de RMN Bruker : AVANCE III de 11,7 T (500 MHz,  $^1\text{H}$ ) équipé d'une SmartProbe capable de générer des champs de gradients jusqu'à 51  $\text{G}\cdot\text{cm}^{-1}$  et AVANCE III de 14,1 T (600 MHz,  $^1\text{H}$ ) équipé d'une crysonde TCI de 5 mm.

### 1.2. Expériences de RMN 1D

#### 1.2.1. Suppression des signaux $^1\text{H}$ du solvant

Un spectre proton a été acquis avant, pendant et après chaque série d'expériences de RMN 2D afin de s'assurer que les analytes restent inchangés au cours du temps. L'optimisation des différents paramètres nécessaires : la durée d'une impulsion radiofréquence (RF) d'un angle de  $90^\circ$ , la puissance associée et le délai de recyclage, est une étape obligatoire pour chaque noyau étudié. L'optimisation de ces paramètres d'acquisition permet de minimiser la perte d'aimantation lors du déroulement de la séquence d'impulsions RF et ainsi optimiser l'intensité du signal enregistré. Le saccharose, le sulfolane et l'acide phosphorique utilisés pour préparer les solvants binaires visqueux ne sont pas deutérés. L'intensité de leurs signaux  $^1\text{H}$  est trop forte pour exploiter les résonances  $^1\text{H}$  des analytes en mélange, ce qui provoque un problème de dynamique au niveau du récepteur et du convertisseur analogique-digital. Le rapport signal sur bruit est alors désastreux pour les solutés. Ces signaux intenses sont sources de distorsions de la ligne de base et de bruit  $t_1$  sur les spectres 2D. Plusieurs techniques de suppression du signal du solvant existent pour s'affranchir de ces problèmes. Les deux méthodes qui ont été employées sont celles qui détruisent les signaux du solvant par l'utilisation d'impulsions gradients de champ magnétique selon le principe d'« *Excitation Sculpting* » et les méthodes qui ne détectent pas la résonance de l'eau par la séquence de détection en bandes sélectives.

### 1.2.1.1. La séquence « *Excitation Sculpting* »

La séquence d'« *Excitation Sculpting* »<sup>259</sup> repose sur le même principe que la séquence WATERGATE (*WATER suppression by GrAdient-Tailored Excitation*)<sup>349</sup> qui élimine le signal de l'eau juste avant l'acquisition du signal. Cette séquence d'impulsions détruit (ou défocalise, plus précisément) l'aimantation du signal du solvant grâce à un écho de gradients de champ magnétique et des impulsions de 180° sélectives (« *shaped pulse* ») appliquées à la fréquence de résonance du solvant (Figure 78).

La première impulsion de 90° appliquée selon X bascule l'aimantation de tous les noyaux de l'échantillon sur l'axe Y. Le premier gradient déphase les résonances de l'échantillon et du solvant qui ont été excités par la première impulsion. Ensuite, les impulsions « *shaped pulse* » appliquée selon -X inversent le sens de précession de tous les spins, exceptés ceux du solvant à éliminer car sa fréquence de résonance a été précédemment placée sur la porteuse. Le second gradient refocalise l'aimantation des spins de l'échantillon mais pas celle du solvant, qui ne sera pas détectée. La séquence « *Excitation Sculpting* » présente l'avantage de produire des spectres avec une distorsion de la ligne de base réduite par rapport à la séquence WATERGATE.

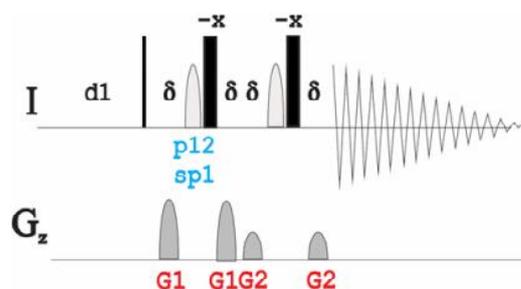


Figure 78. Séquence d'impulsion "Excitation Sculpting" : zgesgp.

### 1.2.1.2. La séquence de détection en bandes sélectives

La séquence de détection en bandes sélectives utilise des impulsions sélectives impliquées dans une séquence d'impulsions DPGSE (Figure 79). Les impulsions sélectives inversent l'aimantation d'équilibre des solutés dans deux bandes de fréquences de part et d'autre des signaux du solvant et laissent intacts ces derniers. Il en résulte un spectre contenant « la portion de résonances détectées » avec un meilleur rapport signal sur bruit que le spectre initial mais avec une suppression des signaux des solutés dans la bande de fréquence du solvant.

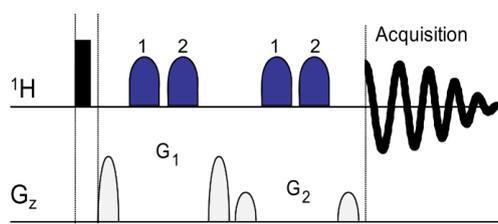


Figure 79. Séquence d'impulsions de détection de deux bandes sélectives. Les labels « 1 » et « 2 » mentionnent respectivement leur application de part et d'autre des signaux du solvant.

### 1.2.2. Expériences de RMN 1D hétéronucléaires découplées proton ( $^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$ )

Les expériences 1D hétéronucléaires ont toutes été réalisées avec un découplage des protons pour améliorer la résolution et le rapport signal sur bruit des spectres (Figure 80). Ces expériences ont été réalisées pour les noyaux  $^{13}\text{C}$  et  $^{31}\text{P}$ . De plus, il est très avantageux notamment pour des noyaux peu sensibles comme le noyau  $^{13}\text{C}$  de mettre à profit le découplage proton pendant le délai de recyclage car chaque proton va pouvoir ainsi transférer une partie de son aimantation à l'hétéroatome auquel il est lié par le couplage dipolaire, ce qui entraîne une meilleure sensibilité.

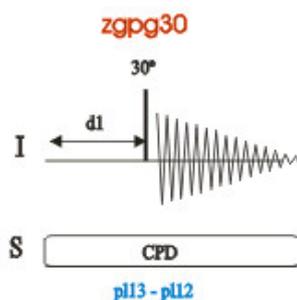


Figure 80. Séquence d'impulsions 1D avec la détection du noyau I découplé du noyau S.

### 1.3. Expériences de RMN 2D

#### 1.3.1. Expériences de RMN 1D et NOESY 2D tirant profit de la diffusion de spin

##### 1.3.1.1. Expériences NOESY 2D $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ avec suppression de solvant

L'expérience NOESY 2D permet d'observer les interactions dipolaires homonucléaires directes entre noyaux proches dans l'espace ou relayées par diffusion de spin. Deux types de séquences ont été utilisés, l'une intégrant le bloc « *Excitation Sculpting* » pour réduire l'intensité, voire supprimer les résonances résiduelles du solvant (Figure 81), et l'autre utilisant une séquence de détection en bandes sélectives impliquées dans une séquence d'impulsions DPGFSE pour inverser l'aimantation d'équilibre des solutés dans des bandes de fréquences situées de part et d'autre du signal du solvant et supprimer celles du solvant (Figure 82).

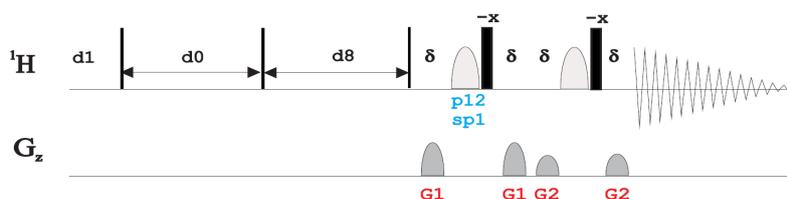


Figure 81. Séquence d'impulsions de l'expérience NOESY 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  : noesyegpph avec suppression du solvant via un bloc d'« *Excitation Sculpting* ». <sup>259</sup>

Pour les expériences référencées dans le SI de la troisième publication (Partie III - Chapitre C), la matrice de données est enregistrée à 500 MHz ( $^1\text{H}$ ), en mode States-TPPI ; sa taille est de 512 x 4k avec 8 scans par FID, un délai de relaxation de 1,5 s et un temps de mélange de 0,5 s ( $t_m$ ), résultant en un temps d'enregistrement de 183,32 min pour les dipeptides et 171,02 min pour les composés contenant du phosphore (expt). La largeur spectrale est de 4500 Hz pour les composés phosphorés et de 5000 Hz pour les dipeptides dans les deux dimensions. G1:G2 = 70:30. La matrice de données a été multipliée dans les deux dimensions par une arche de fonction sinusoïdale décalée (SSB = 2) avant le « zero filling » jusqu'à une taille de 1k x 4k. Une paire d'impulsions d'inversion de forme rectangulaire de 2

ms a été appliquée sur la résonance du signal de l'eau. La durée des impulsions de gradient de suppression du signal de l'eau était de 1 ms et leur intensité de 31% pour la première paire et de 11% pour la deuxième paire.

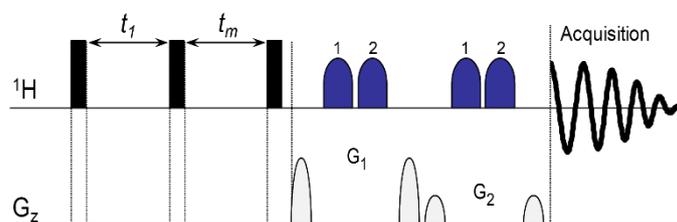


Figure 82. Séquence d'impulsions de l'expérience NOESY 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  utilisée avec détection sélective de deux bandes de résonances. La partie NOESY de la séquence a été adaptée de la séquence d'impulsions noesyph.

Pour les expériences référencées dans le SI des deux premières publications (Partie III – Chapitre A et-B), la matrice de données a été enregistrée en mode States-TPPI ; sa taille était de 512 x 4k avec 8 scans par FID, un délai de relaxation de 1,5 s et un temps de mélange variant de 0,5 s pour la solution saccharose/eau, à 1 s pour les solutions de sulfolane/eau et sulfolane/DMSO- $d_6$  ( $t_m$ ), résultant en un temps d'enregistrement variable. La largeur spectrale était de 5000 Hz (à 500 MHz,  $^1\text{H}$ ) pour les solutions de sulfolane/eau et sulfolane/DMSO- $d_6$  et de 6000 Hz (à 600 MHz,  $^1\text{H}$ ) pour la solution saccharose/eau dans les deux dimensions.  $G_1:G_2 = 70:30$ . La matrice de données a été multipliée dans les deux dimensions par une fonction sinusoïdale en cloche décalée (SSB = 2) avant le « zero filling » jusqu' à une taille de 1k x 4k. Une paire d'impulsions d'inversion de forme rectangulaire de 2 ms a été appliquée sur la résonance du signal du solvant. La durée des impulsions de gradient de suppression du solvant était de 1 ms et leur intensité de 31% pour la première paire et de 11% pour la deuxième paire.

L'inconvénient de cette expérience est la disparition des résonances des solutés dans la zone des signaux résiduels du solvant non deutéré. Dans le cadre de l'étude de dipeptides en solution, les  $\text{H}_\alpha$  ne sont pas détectés en  $F_2$  mais uniquement en  $F_1$ . Les expériences NOESY 1D sélectives permettent de remédier à cet inconvénient.

### 1.3.1.2. Expériences NOESY 1D $^1\text{H}$ sélectives

Les expériences NOESY 1D  $^1\text{H}$  sélectives permettent de visualiser les corrélations dipolaires entre un proton excité sélectivement et les protons proches de celui-ci dans l'espace (Figure 83). La diffusion de spin permet d'isoler le spectre  $^1\text{H}$  de chaque molécule en mélange par une combinaison d'excitations sélectives.

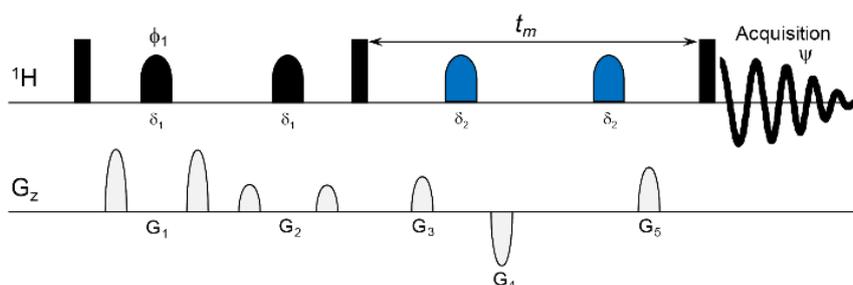
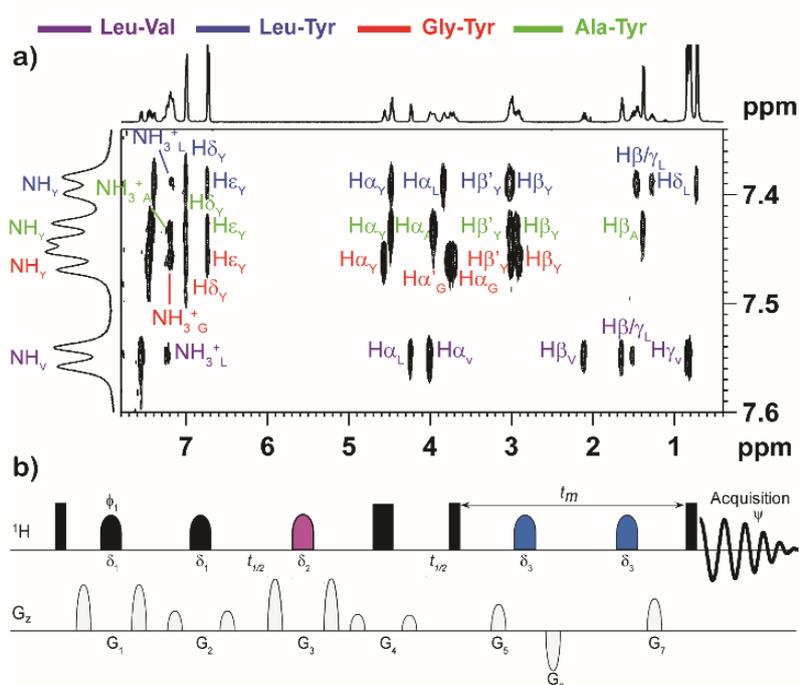


Figure 83. Séquence d'impulsions de l'expérience NOESY 1D  $^1\text{H}$  sélective.

Dans cette séquence d'impulsions, les échos de gradients défocalisent l'aimantation qui n'est pas inversée par la « *shaped pulse* », seule la bande de résonances excitées sélectivement est refocalisée à la suite des deux échos de gradients. Les impulsions de refocalisation à large bande « WURST » présentes durant le temps de mélange  $t_m$  servent à nettoyer l'aimantation transversale en provenance des résonances  $^1\text{H}$  du solvant non deutéré.

### 1.3.1.3. Expériences NOESY 2D $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ bande sélective en $F_1$ avec découplage en $F_1$

Une autre façon d'individualiser les composantes du mélange dipeptidique qui prend moins de temps que l'acquisition de quatre spectres NOESY 1D sélectifs appropriés a été de recourir à une expérience NOESY 2D bande sélective en  $F_1$  avec découplage  $F_1$ .<sup>74</sup> Les résonances amides NH sont la source initiale d'aimantation après l'étape d'excitation sélective d'une bande de déplacements chimiques, excitation rendue possible puisque leurs résonances sont proches en fréquence et les noyaux correspondants non couplés scalairement entre eux (Figure 84). Le bloc du temps de mélange, comprenant des impulsions d'inversion à larges bandes pour éviter la réapparition du signal du solvant, permet à la diffusion de spin de s'étendre à travers le réseau de protons de chaque dipeptide.<sup>72,74</sup>



### 1.3.1.4. Expériences HSQC-NOESY 2D

Les expériences de RMN 1D et 2D homonucléaires  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  peuvent parfois souffrir de la superposition de certaines résonances en raison d'une gamme spectrale limitée. Pour y remédier et donc mettre en évidence le phénomène de diffusion de spin plus facilement, il est possible de recourir à une gamme spectrale plus étendue *via* l'étude des noyaux  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  et  $^{31}\text{P}$  dans des expériences de RMN HSQC-NOESY 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ,<sup>72</sup>  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ <sup>72,74</sup> et  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$ .<sup>73-74</sup> L'expérience HSQC-NOESY 2D permet d'observer dans un

premier temps les couplages scalaires hétéronucléaires  $^1\text{H-X}$  (marquage des déplacements chimiques X dans la dimension indirecte  $F_1$ ), puis d'observer le transfert d'aimantation entre les protons proches dans l'espace (Figure 85). Ainsi, dans le cadre de notre étude sous certaines conditions de température avec un solvant binaire visqueux adapté, la diffusion de spin a pu être observée tout en bénéficiant d'une résolution spectrale accrue de l'hétéroatome analysé X ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  et  $^{31}\text{P}$ ) en  $F_1$ . L'obtention du spectre individuel de chaque molécule en mélange sera envisageable même en cas de superposition des résonances  $^1\text{H}$ .

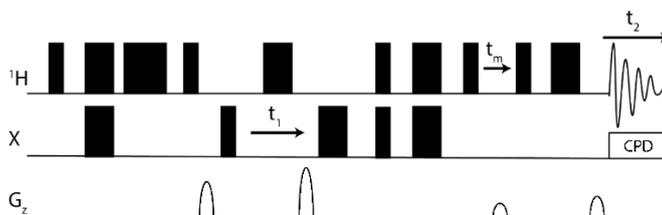


Figure 85. Séquence d'impulsions hsqcetgpn0 de l'expérience HSQC-NOESY 2D  $^1\text{H-X}$ .

### 1.3.1.5. Expériences NOAH

Dans notre étude portant sur l'analyse des mélanges par l'utilisation de l'acide phosphorique (85%), deux types d'expériences NOAH ont été testés en fonction du modèle de composés étudiés.<sup>74</sup> Par souci de concision, les modules NOAH sont nommés par une seule lettre.<sup>23</sup> Pour le modèle 1 comprenant les dipeptides polaires, l'expérience NOAH-5 BMSCN a été réalisée à 288 K : B (HMBC), M (HMQC), S (HSQC), N (NOESY) et pour le modèle 2 représentant les composés contenant du phosphore, la séquence nommée NOAH-4 BSCN a été réalisée à 298 K : B (HMBC), S (HSQC), C (COSY), N (NOESY). Ces expériences ont été réalisées en tenant compte des hétéroatomes  $^{15}\text{N}$  et  $^{31}\text{P}$  qui jouent le rôle de marqueurs de déplacements chimiques dans la dimension indirecte  $F_1$  pour les expériences HMQC 2D  $^1\text{H-}^{15}\text{N}$  pour les dipeptides et HMBC/HSQC 2D  $^1\text{H-}^{31}\text{P}$  pour les composés contenant du phosphore. Dans un souci de sensibilité, la séquence BMSCN a été préférée à celle MSBCN initialement prévue par Kupče *et al.* en 2019.<sup>27</sup> Les deux séquences et les conseils avisés ont été fournis par le Pr. Tim Claridge du « Department of Chemistry at University of Oxford ».

L'expérience NOAH est configurée comme une expérience unique d'une manière similaire aux techniques conventionnelles 2D hétéronucléaires  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^{31}\text{P}$ , mais avec les exigences spécifiques suivantes :<sup>23</sup>

- La mémoire d'acquisition des données doit être définie avec le paramètre d'acquisition *NBL*. Ce dernier doit être égal au nombre de modules NOAH dans la séquence, par exemple  $NBL = 4$  pour une expérience NOAH-4.
- La taille des données TD1 doit être augmentée en fonction du nombre de modules NOAH dans la séquence. Ainsi, un NOAH-4 nécessitant 256 points  $t_1$  pour chaque module NOAH dicte que la valeur TD1 soit définie à  $256 \times 4 = 1024$  points.
- Etant donné qu'un seul domaine de fréquence  $F_1$  est explicitement défini, les constantes d'échelle pour les largeurs spectrales  $F_1$  de toutes les autres dimensions  $F_1$  ( $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  et/ou  $^{31}\text{P}$ ) doivent être comprises dans la première gamme de fréquence  $F_1$  défini.
- *cnst10* définit le rapport de la largeur spectrale  $^{13}\text{C}:^1\text{H}$ .

- cnst20 définit le rapport de la largeur spectrale  $^{13}\text{C}:\text{X}$ .

Pour les expériences HSQC  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ , l'édition de multiplicité facultative est activée en donnant la valeur –DEDIT au paramètre d'acquisition ZGOPTNS.

Le traitement des données utilise les scripts de traitement AU suivants :

- sliptx : divise l'ensemble des données NOAH uniques en un ensemble de données individuels *NBL* pour un traitement manuel en tant qu'expériences distinctes. Pour une expérience NOAH acquise dans EXPNO X, splitx produira des jeux de données numérotés X001, X002, X00N, etc. selon le nombre N de modules NOAH.

- splitx\_au : divise l'ensemble de données comme ci-dessus et traite automatiquement l'ensemble de données dérivées. Ces scripts AU sont exécutés pour chaque expérience individuelle par le programme splitx\_au pour produire les spectres finaux entièrement traités. Ils incluent les routines fixF1 appropriées pour la correction de l'axe de déplacement chimique des expériences homonucléaires  $^1\text{H}$ .

- fixF1 : corrige l'axe de déplacement chimique  $F_1$  pour les expériences homonucléaires  $^1\text{H}$  (utilise cnst10 comme entrée).

- fixF1n : corrige l'axe de déplacement chimique  $F_1$  pour les hétéronoyaux X (utilise cnst20 comme entrée).

#### 1.4. Optimisation des paramètres expérimentaux

Un des critères essentiels pour réaliser l'ensemble des expériences mentionnées précédemment a été de déterminer la température optimale d'enregistrement.

Pour chaque mélange binaire visqueux étudié, il a donc fallu trouver la température optimale d'analyse qui correspondait au meilleur compromis entre la résolution spectrale et une diffusion de spin efficace. Cette température optimale a été déterminée expérimentalement par l'acquisition de plusieurs spectres NOESY 2D  $^1\text{H}-^1\text{H}$  depuis la température ambiante à des températures plus basses en dessous de  $0^\circ\text{C}$  (Tableau 3).

	<b>Modèle 1 : 4 dipeptides</b>	<b>Temps de mélange <math>d_g</math></b>	<b>Modèle 2 : 4 composés phosphorés</b>	<b>Temps de mélange <math>d_g</math></b>
<b>Saccharose/H<sub>2</sub>O (5:5, w/w + 10% D<sub>2</sub>O)</b>	(10 mM) à 283 K	0,5 s		
<b>Gel d'agarose 1%</b>	(10 mM) à 273 K	0,5 s		
<b>Sulfolane/H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (5:4:1, v/v/v)</b>	(10 mM) à 258 K	1 s		
<b>Sulfolane/DMSO-<math>d_6</math> (7:3, v/v)</b>			(20 mM) à 258 K	1 s
<b>Acide phosphorique (85%)/D<sub>2</sub>O (8:2, v/v)</b>	(20 mM) à 288 K	1 s		
<b>Acide phosphorique (85%)/DMSO-<math>d_6</math> (7:3, v/v)</b>			(20 mM) à 298 K	0,5 s

Tableau 3. Récapitulatif montrant la température optimale et le temps de mélange optimal choisis en fonction des différents modèles de composés étudiés dissous dans des mélanges binaires visqueux. <sup>72-74</sup>

Après avoir déterminé la température optimale, trois expériences NOESY 2D ont été réalisées, une pour chaque temps de mélanges  $t_m = 0,5 ; 1$  et  $1,5$  s. L'ensemble des résultats est représenté dans le Tableau 3.

### 1.5. La diffusion moléculaire translationnelle et l'expérience 2D DOSY

Les molécules à l'état liquide se déplacent indépendamment les unes des autres. Leur mouvement désordonné est connu sous le nom de mouvement brownien. Au niveau macroscopique, il en résulte le phénomène de diffusion translationnelle, quantifié par un coefficient de diffusion ( $D$ ) qui dépend de la viscosité du milieu, du rayon hydrodynamique du soluté et de la température du milieu. En admettant que la forme de la molécule soit sphérique, le coefficient de diffusion ( $D$ ) est donné par la relation de Stokes-Einstein (Equation 5) :

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r_s}$$

Équation 5. Relation de Stokes-Einstein

avec  $k$  la constante de Boltzmann,  $T$  la température absolue,  $\eta$  la viscosité de la solution et  $r_s$  le rayon hydrodynamique de la molécule.

L'étude de la diffusion translationnelle par RMN donne accès à des informations spécifiques sur le comportement physique des molécules. Cette méthode permet une caractérisation de composés, à la fois par l'ensemble de ses déplacements chimiques et par son coefficient de diffusion moléculaire. Elle combine la sélectivité de la RMN à haute résolution et celle d'une mesure physique caractéristique de chaque composé. En effet, si les composés étudiés possèdent des signatures de RMN similaires, elles peuvent toutefois présenter des tailles ou des mobilités différentes. Ceci est particulièrement utile pour l'analyse d'un mélange complexe.

L'expérience de RMN bidimensionnelle qui permet ces mesures de coefficient de diffusion s'appelle l'expérience DOSY. Elle corrèle les déplacements chimiques des molécules, représentés dans la dimension d'acquisition ( $F_2$ ), avec les coefficients de diffusion translationnelle, reportés dans la dimension indirecte ( $F_1$ ).<sup>6-7, 350-351</sup> Dans cette expérience (Figure 86), une première impulsion de gradient de champ magnétique ( $G_\delta$ ) réalise l'encodage de la position de la molécule dans l'espace du tube de RMN, selon l'axe  $z$ , généralement. Ainsi, si cette dernière effectue un mouvement translationnel pendant le temps de diffusion  $\Delta$ , la nouvelle position sera décodée différemment par une seconde impulsion de gradient ( $G_\delta$ ). La perte de signal de RMN qui s'ensuit dépend du temps de diffusion  $\Delta$  et des paramètres caractérisant l'impulsion de gradient ( $g, \delta$ ). Le changement d'intensité est décrit par la relation suivante :

$$I = I_0 e^{-D\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \frac{\delta}{3})}$$

Équation 6

avec  $I$  l'intensité du signal observé,  $I_0$  l'intensité du signal lorsque  $g$  est nul,  $D$  le coefficient de diffusion,  $\gamma$  le rapport gyromagnétique du noyau observé,  $g$  l'intensité de l'impulsion de gradient,  $\delta$  la durée de l'impulsion de gradient et  $\Delta$  le temps de diffusion.

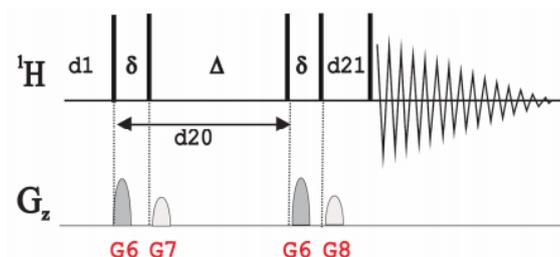


Figure 86. Séquence d'impulsions de l'expérience DOSY 2D : ledgp2s.

Pour la mise en œuvre de l'expérience DOSY, le respect de certaines conditions expérimentales est très important. Afin de mesurer de manière précise les coefficients de diffusion, la qualité de l'amplificateur gradient et des bobines gradients de la sonde de mesure joue un rôle capital. L'amplificateur et la sonde de mesure doivent être capable de produire des variations de champ magnétique linéaires à travers le volume de l'échantillon. En effet, l'emploi de gradients de champ magnétique a tendance à induire des courants de Foucault dans les parties métalliques au voisinage de la sonde. Ces courants dépendent de l'intensité de l'impulsion de gradient et peuvent créer des distorsions dans les spectres de RMN ou des changements anormaux de l'atténuation.

La stabilité en température est aussi d'une extrême importance lors de la mesure de coefficients de diffusion. Une mauvaise stabilité conduira à des gradients de température à travers l'échantillon. Selon la viscosité du solvant utilisé et la température de mesure, des mouvements de convection pourront intervenir dans le tube de RMN. La conséquence directe est un mouvement moléculaire prononcé qui évidemment faussera les mesures de diffusion.

La difficulté dans la réalisation de l'expérience DOSY est l'optimisation des paramètres expérimentaux. De manière à maintenir constant le temps d'une expérience de diffusion et de ne pas introduire de variation d'intensité des signaux liée à la relaxation, seule l'intensité des gradients  $g$  est variable, entre  $g_{\min}$  et  $g_{\max}$  ; en revanche le temps de diffusion  $\Delta$  (entre 50 et 150 ms) et la durée des gradients  $\delta$  (entre 1 et 2,5 ms) sont constants.

Trois cas sont possibles (Figure 86) :

- a)  $g_{\max}$  ou  $\Delta$  ou  $\delta$  trop faible : les molécules n'ont pas beaucoup diffusé ce qui entraîne une faible atténuation des signaux.
- b)  $g_{\max}$  ou  $\Delta$  ou  $\delta$  trop fort : les molécules ont beaucoup diffusé ce qui entraîne une forte atténuation des signaux voire une totale disparition des signaux.
- c) Paramètres bien optimisés.

Les trois paramètres doivent être choisis de telle façon à ce que l'atténuation du signal de RMN soit la plus optimisée possible avec l'augmentation de la force des impulsions gradients (Figure 87).

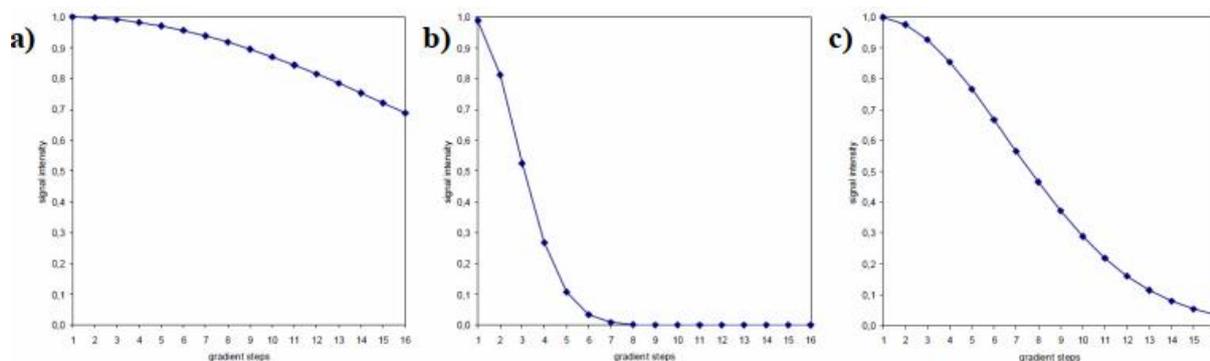


Figure 87. Courbes théoriques de l'intensité du signal de RMN en fonction de la force des gradients (de 2 à 95% sur 16 pas) pour différentes valeurs de  $\Delta$  et  $\delta$ , a) trop faibles, b) trop grandes et c) appropriées.

A l'échelle du laboratoire, des expériences bidimensionnelles DOSY ont été réalisées pour le mélange de dipeptides (modèle 1) dissous dans du  $H_2O/D_2O$  (9:1, v/v)<sup>72-74</sup> et pour le mélange des quatre composés contenant du phosphore (modèle 2) dissous dans le  $DMSO-d_6$ .<sup>73-74</sup>

Pour minimiser l'influence des courants de Foucault, une séquence d'impulsions LED utilisant deux gradients bipolaires (BPP-LED)<sup>352-353</sup> a été mise en œuvre pour l'investigation des composés contenant du phosphore, et une séquence d'impulsion STE utilisant deux gradients bipolaires (BPP-STE) a été réalisée pour l'étude du mélange de dipeptides avec l'ajout d'une séquence d'élimination du signal de l'eau par « *Excitation Sculpting* ».

La séquence BPP-LED (Bipolar Pulse Pair-Longitudinal Eddy-current Delay) permet de diminuer les courants de Foucault, responsables des perturbations du champ magnétique principal et par conséquent, des signaux de RMN. Elle consiste à remplacer l'impulsion de gradient responsable des courants de Foucault par des paires d'impulsions de gradient de polarité inversée (BPP) et de durées plus courtes séparées par une impulsion de  $180^\circ$  (Figure 88). En procédant ainsi, le gradient effectif reste le même mais cette série d'impulsions permet de compenser l'effet des courants induits qui se forment après chaque impulsion de gradient.<sup>350</sup>

Les paires d'impulsions de gradient de polarité inversée permettent une élimination supérieure à 95% des courants de Foucault, et la durée  $T_e$  de récupération peut être réduite d'un facteur 20 tout en éliminant la distorsion des spectres.

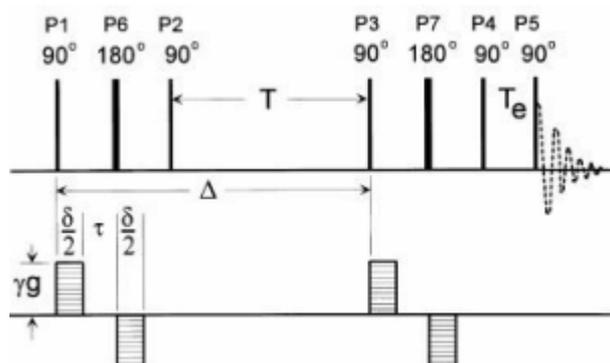


Figure 88. Séquence d'impulsions BPP-LED utilisée pour le mélange de composés contenant du phosphore : ledbpgp2s. Reproduite de la ref.<sup>352</sup>

Le seul inconvénient de la séquence BPP-LED est qu'elle réduit le signal de RMN d'environ 10% par rapport à la séquence LED. Cela peut s'expliquer par l'inhomogénéité du champ radiofréquence  $B_1$  qui

ne permet pas un basculement parfait de 180° de l'aimantation après une impulsion de gradient. Avec l'utilisation d'impulsions de gradients bipolaires, l'intensité du signal de RMN s'écrit de la manière suivante :

$$I = I_0 e^{-D\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \frac{\delta}{3} - \frac{\tau}{2})}$$

Équation 7

Lorsque nous nous intéressons aux quatre dipeptides dissous dans l'eau, un problème récurrent en RMN peut intervenir. Celui-ci provient du signal de l'eau qui est souvent trop intense pour mesurer proprement la diffusion des solutés. Un moyen pour contourner cette difficulté consiste à insérer un schéma WATERGATE dans la séquence BPP à l'emplacement habituel du délai LED (Figure 89), c'est-à-dire entre la quatrième impulsion à 90° permettant de conserver sur la direction longitudinale l'aimantation pendant que les courants induits s'affaiblissent et la cinquième impulsion à 90° permettant l'acquisition du signal en basculant l'aimantation dans le plan transversal.

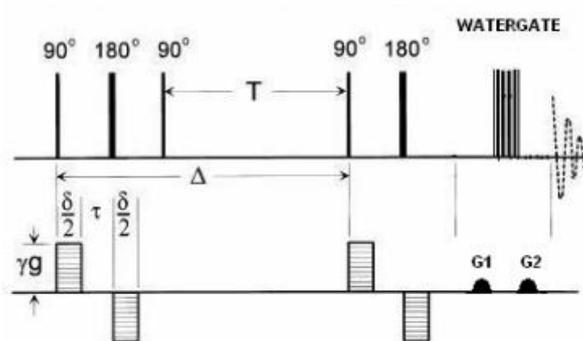


Figure 89. Représentation schématique de la séquence STE-BPP utilisée pour le mélange de dipeptides avec un schéma WATERGATE intégré : stebpp1s19.

Les principaux paramètres d'acquisition, tels que la durée des impulsions gradients bipolaires  $\delta$  et le temps de diffusion  $\Delta$ , sont résumés dans le Tableau 4. Le traitement des données a été effectué à l'aide de l'algorithme MaxEnt<sup>354</sup> pour le calcul de la transformation inverse de Laplace. Le programme de traitement MaxEnt qui permet une meilleure estimation du nombre de composés dans un mélange et une mesure plus précise des coefficients de diffusion par rapport aux autres traitements existants.<sup>7, 355-356</sup> En revanche, cette méthode présente l'inconvénient d'avoir un temps de calcul relativement long.

DOSY	Acquisition				
	TD ( $F_2$ )	Nombre d'incrément ( $F_1$ )	$\delta$ (ms)	$\Delta$ (ms)	SWH ( $F_2$ )
Modèle 1 dissous dans H <sub>2</sub> O/D <sub>2</sub> O (9:1, v/v) <sup>72-74</sup>	8 k	32	2	50	5000
Modèle 2 dissous dans DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> <sup>73-74</sup>	16 k	32	2,8	70	5000

Tableau 4. Principaux paramètres d'acquisition de l'expérience DOSY 2D en milieu aqueux et dans le DMSO-*d*<sub>6</sub>.

## 2. Le suivi réactionnel « *in-situ* » dans un tube de RMN

### 2.1. Les réactifs étudiés

Deux mélanges de réactifs ont été utilisés pour évaluer la cinétique d'une réaction de synthèse organique (Figure 90).

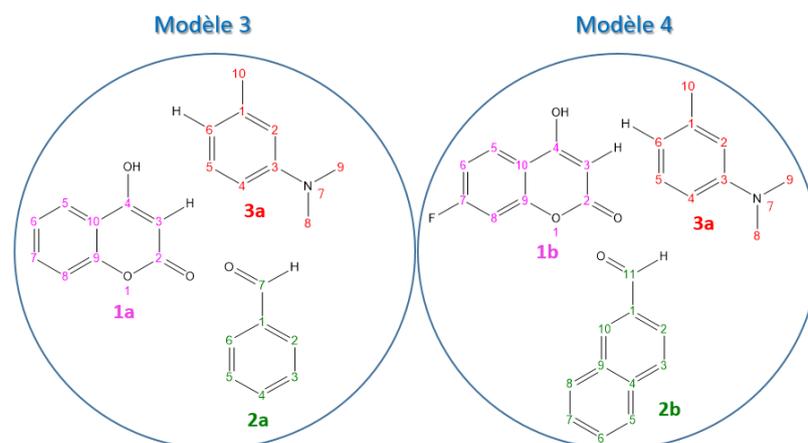


Figure 90. Les deux mélanges modèles des réactifs utilisés pour la synthèse organique.

Le mélange réactionnel 3 contient initialement de la 4-hydroxycoumarine (1a) (MM = 162,14 g.mol<sup>-1</sup>), du benzaldéhyde (2a) (MM = 106,12 g.mol<sup>-1</sup>) et de la *N,N*-diméthyl-*m*-toluidine (3a) (MM = 135,21 g.mol<sup>-1</sup>).

Le mélange réactionnel 4 contient initialement de la 7-fluoro-4-hydroxycoumarine (MM = 180,13 g.mol<sup>-1</sup>), du 6-méthoxy-2-naphtaldéhyde (MM = 186,21 g.mol<sup>-1</sup>) et de la *N,N*-diméthyl-*m*-toluidine (3a) (MM = 135,21 g.mol<sup>-1</sup>) et le nombre de scans à ces mêmes valeurs d'un soluté de référence.

### 2.2. Caractérisation spectroscopique des réactifs

Avant d'envisager l'étude de la réaction *in-situ*, chacun des trois réactifs a été dissous individuellement dans les solvants deutérés de la réaction envisagée (DMSO-*d*<sub>6</sub> et pyridine-*d*<sub>5</sub>) ou mélange de solvants composites (glycérol/DMSO-*d*<sub>6</sub>, DMSO-*d*<sub>6</sub>/eau). Ces composés ont été caractérisés et le suivi de certaines résonances des protons a été fait pour évaluer la cinétique de la réaction.

### 2.3. Préparation des échantillons pour le suivi réactionnel *in-situ* par RMN

Afin de minimiser le temps qui s'écoule entre l'ajout des réactifs dans le tube de RMN (l'instant *t*=0 de la réaction) et la première acquisition, deux protocoles ont été développés. Le premier a été utilisé pour suivre la réaction organique avec l'usage du DMSO-*d*<sub>6</sub>/glycérol et de solvants deutérés non visqueux (DMSO-*d*<sub>6</sub>, pyridine-*d*<sub>5</sub>) à 298 K (Figure 91). Le second a été mis en place à basse température en utilisant un solvant binaire visqueux (DMSO-*d*<sub>6</sub>/eau) dans le but de ralentir considérablement l'avancement de la réaction (Figure 92).

### 2.3.1. Protocole expérimental à température ambiante pour les solvants usuels

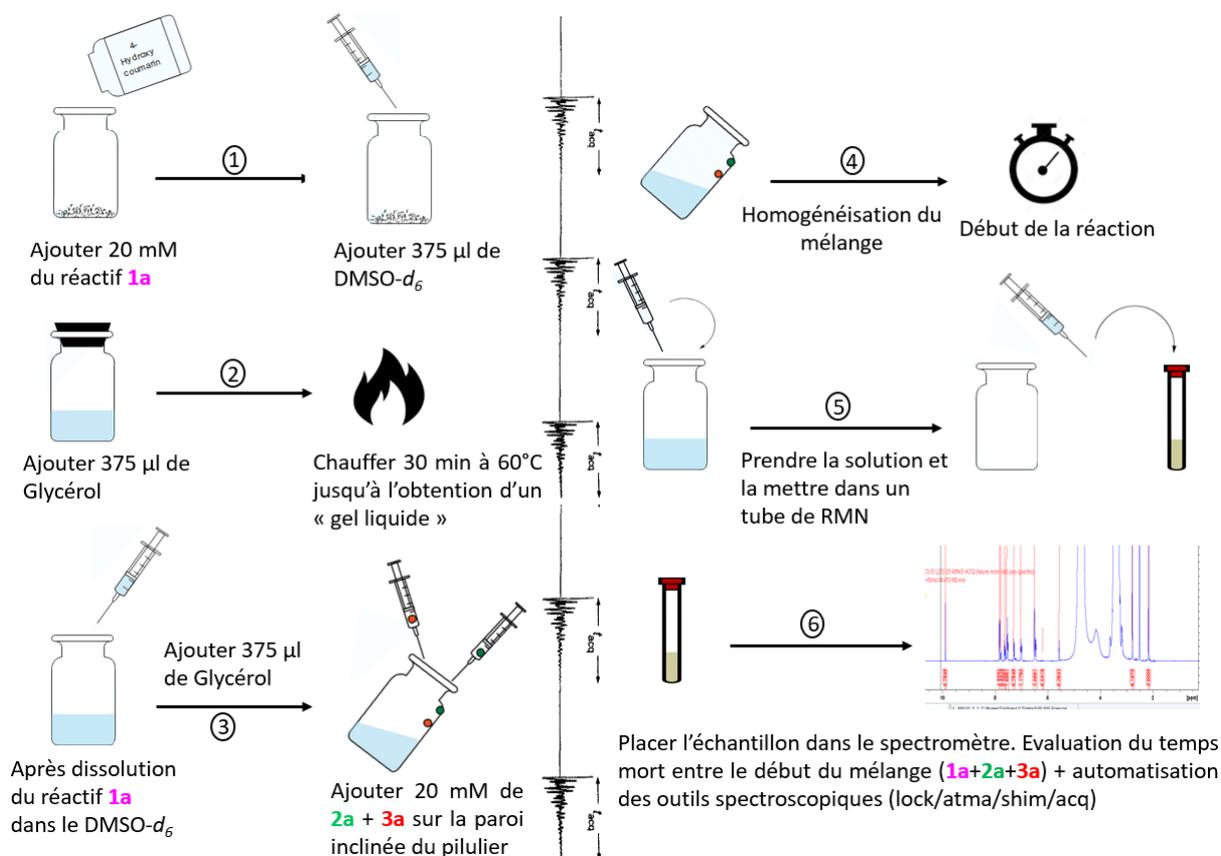


Figure 91. Protocole expérimental à 298 K pour l'évaluation de la réaction dans du DMSO- $d_6$ /glycérol (5:5, v/v).

Dans cette approche, la première étape a consisté à solubiliser la 4-hydroxycoumarine (**1a**) (**1**) dans un pilulier contenant du DMSO deutéré seul, tandis que le glycérol est chauffé à 60°C (**2**) ce qui permet de récupérer un volume suffisant pour les expériences sans que celui-ci ne s'accroche à la paroi de la verrerie (Figure 91). Dès lors que le glycérol est ajouté (**3**), le mélange binaire de solvants devient moins visqueux et peut facilement être prélevé. Les réactifs benzaldéhyde (**2a**) et la *N,N*-diméthyl-*m*-toluidine (**3a**) sont alors déposés sur la paroi inclinée du pilulier, en prenant soin de ne pas les mettre en contact avec le solvant. Le mélange est ensuite homogénéisé par vortex (**4**). Dès lors, la réaction débute. La solution est rapidement introduite dans un tube de RMN avec l'aide d'une pipette Pasteur (**5**), puis le tube est inséré dans le spectromètre jusqu'au début de l'acquisition qui marque la fin du temps mort (**6**). Les outils spectroscopiques (lock, accord de sonde, shim) sont incontournables mais freinent l'estimation du début de la réaction.

Le protocole présenté ici a été reproduit avec succès pour étudier la réaction dans du DMSO- $d_6$  et dans de la pyridine- $d_5$ . Les résultats sont présentés dans la partie III – Chapitre D.

### 2.3.2. Protocole expérimental à basse température pour les solvants visqueux

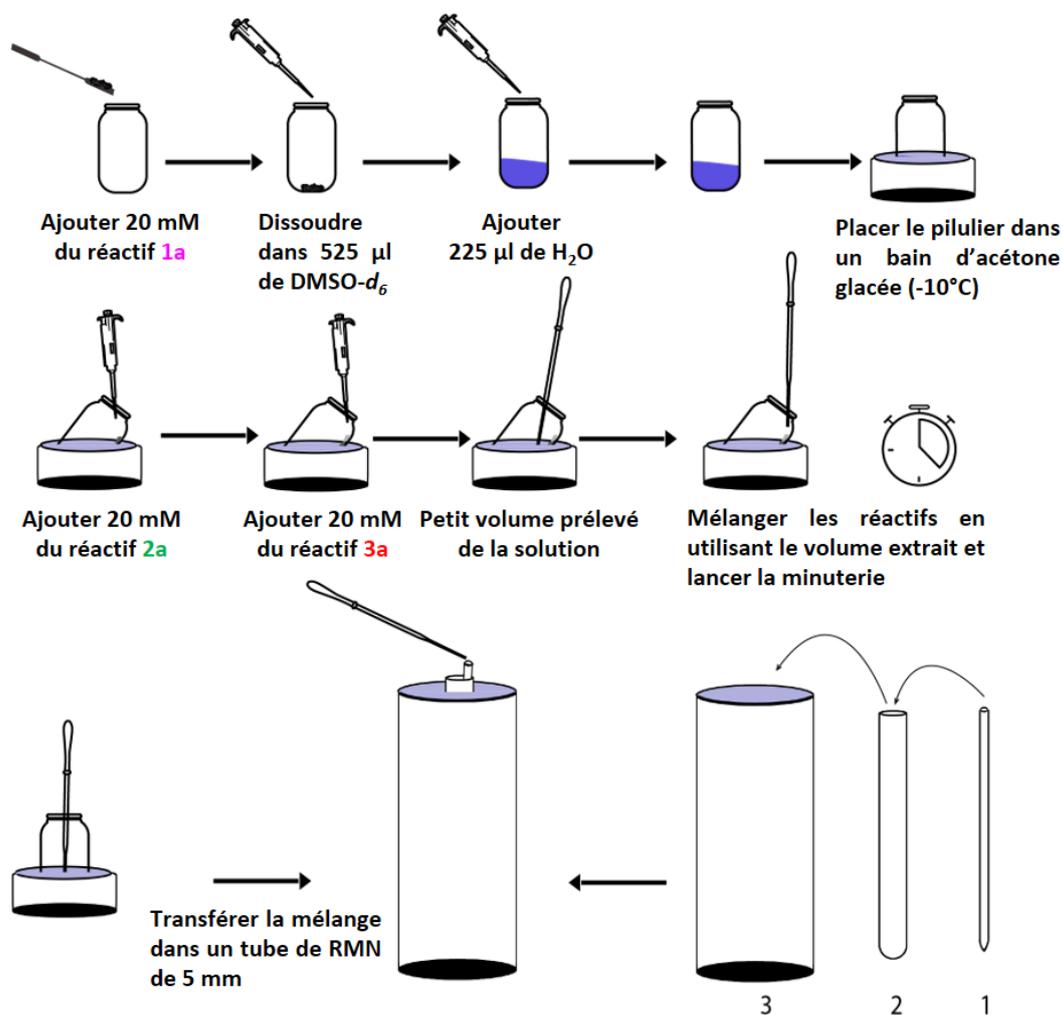


Figure 92. Protocole expérimental à basse température pour l'évaluation de la réaction dans du DMSO- $d_6$ /H<sub>2</sub>O (7:3, v/v).

Un protocole à basse température a été développé dans le but de « quencher » la réaction (Figure 92). Pour cela, la 4-hydroxycoumarine (**1a**) a d'abord été dissoute dans 525 µl de DMSO- $d_6$  seul car cette molécule est insoluble dans l'eau. 225 µl de H<sub>2</sub>O ont été ajoutés au flacon afin d'obtenir le mélange binaire visqueux DMSO- $d_6$ /H<sub>2</sub>O (7:3, v/v). Le flacon a été placé dans un bain d'acétone glacé (-10°C) puis, le benzaldéhyde (**2a**) et la *N,N*-diméthyl-*m*-toluidine (**3a**) ont été ajoutés sur les parois du flacon avec l'aide d'une pipette Pasteur. La solution a été homogénéisée en mettant en contact la 4-hydroxycoumarine (**1a**) dissoute dans le mélange composite, avec les réactifs sur les parois du flacon.

A l'intérieur d'un récipient Dewar, un bain d'acétone glacé a été préparé dans lequel un tube de RMN de 10 mm a été positionné, puis un tube de RMN de 5 mm a été placé à l'intérieur de celui-ci. Le double système a été utilisé pour refroidir le tube de 5 mm sans le mettre en contact direct avec le bain d'acétone glacé. Cette démarche a permis d'éviter de perdre du temps à sécher le tube de RMN. Entre temps, le spectromètre a été stabilisé et réglé (lock, accord de sonde, shim) à 238 K avec l'aide d'un tube témoin contenant la même composition. Aussitôt fait, le mélange résultant a été transféré dans un tube de RMN de 5 mm et ce dernier a été introduit dans le spectromètre de RMN à 238 K. Le temps mort a pu être évalué après application des paramètres automatiques du spectromètre jusqu'au début de l'acquisition. Les résultats sont présentés dans la partie III – Chapitre D.

Une procédure a été mise en place pour réaliser le suivi de la réaction à température ambiante et enregistrer les expériences 2D à basse température (Figure 93).

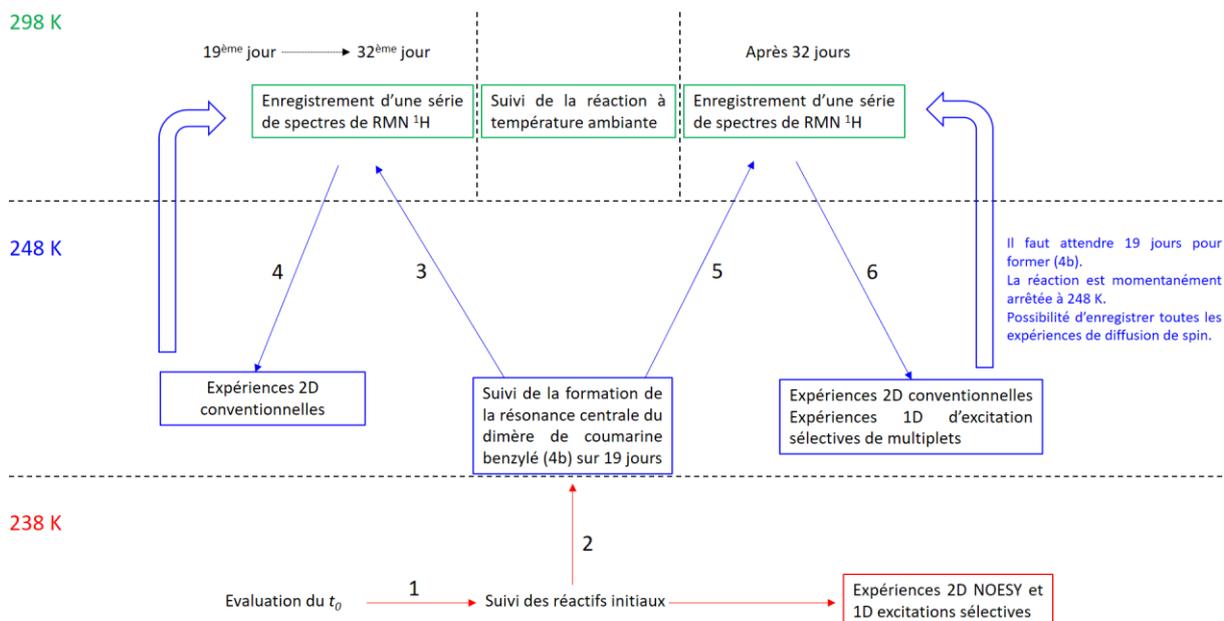


Figure 93. Procédure d'enregistrement des expériences de RMN 1D et 2D  $^1\text{H}$  réalisées pour le suivi de la réaction organique dans du  $\text{DMSO-}d_6/\text{H}_2\text{O}$  (7:3, v/v) en fonction de la température.

Après évaluation du temps mort ( $t_0$ ) à 238 K, aucune évolution de la réaction a été constatée (1). Les réactifs initiaux ont été individualisés en tirant profit de la diffusion de spin aux moyens successivement des expériences NOESY 2D  $^1\text{H-}^1\text{H}$  et 1D  $^1\text{H}$  d'excitations sélectives (2). La température a été stabilisée à 248 K et la formation du dimère de coumarine benzylé (4b) est apparu à partir du 19<sup>ème</sup> jour. A cette température, la réaction est momentanément « quenchée ». Il est possible d'enregistrer toutes les expériences de diffusion de spin. Pour favoriser la réaction préalablement quenchée, le tube est ensuite « réchauffé » par pas de 20 K jusqu'à 298 K, afin de maintenir une bonne qualité de shims (3), puis une série de spectres  $^1\text{H}$  est acquise pendant plusieurs jours, avant de retourner à 248 K pour l'acquisition des spectres conventionnels 2D (4). Une succession d'expériences à 298 K et 248 K a permis d'isoler les spectres des produits formés (4a) et (4b) après 32 jours de réaction (5 et 6).

#### 2.4. Equipement utilisé

L'évaluation cinétique de la réaction organique dans un tube de RMN « *in-situ* » a été entreprise grâce au spectromètre de 500 MHz de la plateforme d'analyse « PIAneT » de l'Université de Reims Champagne-Ardenne, déjà décrit précédemment et par un spectromètre AVANCE III de 22,1 T (950 MHz,  $^1\text{H}$ ) équipé d'une cryosonde TCI 5 mm de la plateforme de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN), au sein de l'infrastructure de recherche iR-RMN à Gif-Sur-Yvette.

#### 2.5. Méthodologie pour le suivi réactionnel *in-situ* par RMN

##### 2.5.1. Expériences de RMN 1D

Comme mentionné en 1.2.1., les spectres protons ont été acquis avant, pendant et après chaque série d'expériences de RMN 2D afin de constater la disparition, puis l'apparition des tâches de corrélation appartenant aux résonances des produits recherchés. Pour chaque solvant catalyseur de la réaction étudiée, une série de spectres de RMN  $^1\text{H}$  a été acquise à différents moments afin d'évaluer le comportement cinétique de la réaction (se reporter au Tableau 7 dans la partie III - Chapitre D). Afin

que les spectres 1D soient le plus quantitatifs possible, le délai de la relaxation  $d_1$  des composés a été évalué au moyen de la séquence « t1r1d » en utilisant l'équation :

$$d_1 = \frac{d_7}{\ln(2)} \times 5 \text{ en s}$$

Équation 8. Evaluation du délai de relaxation  $d_1$  par l'utilisation de la séquence t1r1d.

Les temps de relaxation  $d_1$  des composés dissous dans le DMSO- $d_6$  et la pyridine- $d_5$  ont été évalués à 298 K, tandis que pour le mélange binaire DMSO- $d_6$ /eau, il a été évalué à 238 K.

Pour le mélange DMSO- $d_6$ /eau, la séquence d'« *Excitation Sculpting* » a été employée pour réduire l'intense signal de l'eau, comme expliqué en 1.2.1.1.

Pour chaque solvant employé, des expériences 1D hétéronucléaires  $^{13}\text{C}$  ont été réalisées avec un découplage proton.

#### 2.5.1.1. La séquence PSYCHE

L'expérience de découplage homonucléaire à large bande a été réalisée par le programme d'impulsion « reset\_psyche\_1D » avec une séquence pseudo 2D (Figure 94).

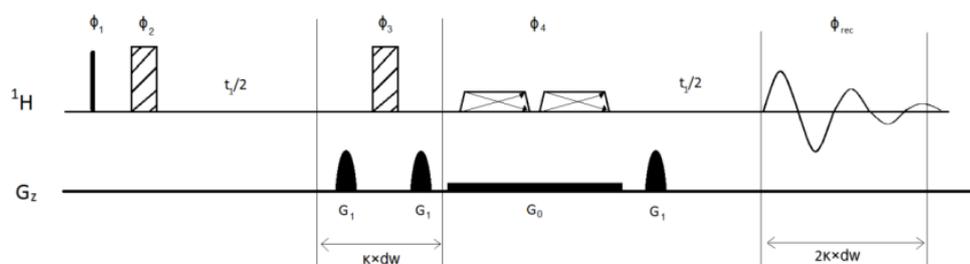


Figure 94. Séquence d'impulsion reset\_psyche\_1D pour l'expérience PSYCHE utilisé durant l'étude portant sur le suivi réactionnel dans un tube de RMN *in-situ*.

Dans cette séquence d'impulsions, le rectangle noir étroit est une impulsion à  $90^\circ$ . Les blocs larges diagonaux sont des impulsions de refocalisation à  $180^\circ$  (Bip720,50,10.1). Les trapèzes sont des impulsions de type CHIRP (Crp\_psyche.20). Un faible gradient de champ  $G_0$  est appliqué pendant les impulsions CHIRP. Pour chaque incrément de  $t_1$ , un bloc de longueur  $2k \times dw$  a été utilisé pour construire la FID finale, où  $k$  correspond aux nombres de points complexes de la dimension directe (131 dans le programme d'impulsions).  $dw$  est la période d'échantillonnage en microsecondes. La valeur DIGMOD a été réglée sur « digital ».

Les principaux paramètres d'acquisition sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 5) :

Paramètre d'acquisition	Description	Valeurs utilisées dans le DMSO- $d_6$	Valeurs obtenues dans la pyridine- $d_5$
NS	Nombre de scan	8	8
L30	Nombre de points complexes supprimés au début de chaque FID	2	2
L31	Nombre de points complexes utilisés dans la reconstruction de la FID	100	100

<b>dw</b>	Temps entre les points de mesure	71,4 $\mu$ s	90,9 $\mu$ s
<b>Chunk</b>	Durée d'une seule FID en ms (= 2*dw*L31)	15 ms	18 ms
<b>Cnst60</b>	Largeur de balayage de l'élément CHIRP simple	10 KHz	10 KHz
<b>Cnst61</b>	Angle de l'impulsion CHIRP	20°	20°
<b>Gpz0</b>	Intensité du gradient pendant les impulsions CHIRP	2%	2%
<b>d<sub>1</sub></b>	Temps de relaxation	1,5 s	1,5 s
<b>TD(F<sub>1</sub>)</b>	Nombre de points dans la dimension indirecte	16384	16384
<b>TD(F<sub>2</sub>)</b>	Nombre de points dans la dimension directe	32	32
<b>SWH (F<sub>1</sub>*F<sub>2</sub>)</b>	Largeur du spectre dans les dimensions F <sub>1</sub> et F <sub>2</sub>	7000*50	5500*50
<b>Durée de l'expérience</b>		12 min 50 s	14 min 29 s

Tableau 5. Principaux paramètres d'acquisition des expériences PSYCHE réalisées pour l'étude de la réaction dans le DMSO-*d*<sub>6</sub> et dans la pyridine-*d*<sub>5</sub> respectivement.

### 2.5.1.2. La méthode ERETIC-2

$$C_U = C_R \frac{I_U \Theta_{90}^U}{I_R \Theta_{90}^R}$$

Rapport d'intégrale

Corrigé par le rapport des durées d'impulsion calibrées à 90 degrés

C = concentration    I = intégration  
T = température     $\Theta$  = durée des impulsions calibrées  
R = référence    U = inconnu

Équation 9. Principe de réciprocité utilisé par la méthode ERETIC-2 permettant de déterminer la concentration inconnue d'un soluté.

Cette méthode nécessite d'acquérir des spectres 1D mesurés en condition « quantitative », c'est-à-dire entre autres que le temps de relaxation  $d_1$  doit être égale à au moins 5 x  $T_1$  et 3 x  $T_2$  pour une durée d'impulsion de 90°.

Cette méthode nécessite deux étapes :

- Une étape de calibration : le pic ERETIC est calibré sur la résonance (ou plusieurs résonances) d'un soluté dont la concentration est connue.
- Une étape de quantification : le signal ERETIC sert de référence pour quantifier des solutés inconnus.

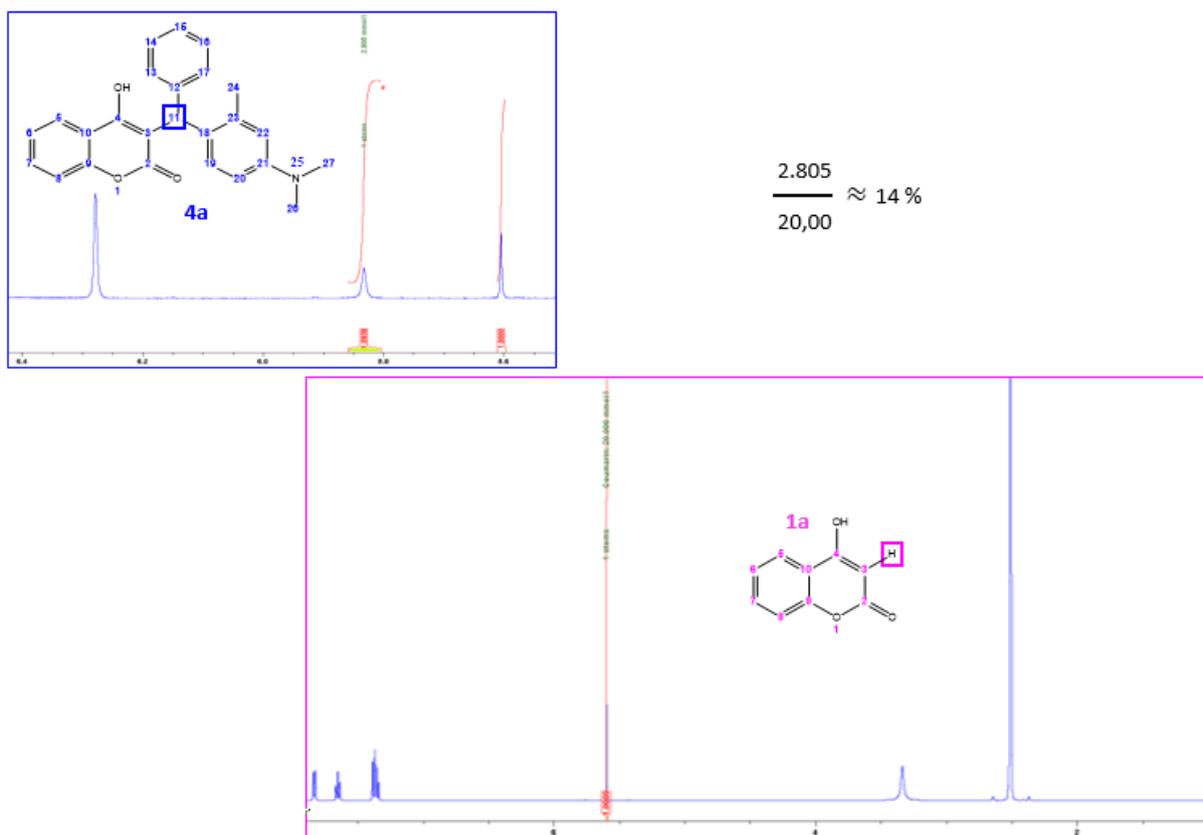


Figure 95. Exemple de l'utilisation de la méthode ERETIC-2 pour la quantification du produit final (4a) dans le DMSO- $d_6$  (spectre encadré en bleu) à partir d'une référence externe : la 4-hydroxycoumarine (20 mM) (spectre encadré en mauve) dissoute dans le même solvant.

Le rendement de la réaction a ainsi été déterminé dans plusieurs solvants deutérés (MeOD, acétonitrile- $d_3$ , toluène- $d_8$ ,  $CDCl_3$ , DMSO- $d_6$  et pyridine- $d_5$ ) et dans le mélange binaire visqueux DMSO- $d_6$ /eau. Les résultats sont fournis dans la partie III – Chapitre D.

Par exemple, en préparant un tube contenant de la 4-hydroxycoumarine seule (20 mM) dans les mêmes conditions que celle de la réaction, c'est-à-dire dans le DMSO- $d_6$ , il a été possible de déterminer le rendement de la réaction en divisant l'intégral du proton  $H_{11}$  du produit final (4a) par celui du réactif (1a) en calibrant le proton  $H_3$  comme la référence ERETIC-2 (Figure 95).

### 2.5.2. Expériences de RMN 2D

Des expériences 2D courantes (COSY, NOESY, HSQC, HMBC) ont été réalisées pour suivre la formation des résonances des produits recherchés. Les principaux paramètres d'acquisition utilisés sont reportés sur le Tableau 6.

Expériences, à 500 MHz														
Solvant	DMSO- $d_6$ à 298 K					Pyridine- $d_5$ à 298 K					DMSO- $d_6$ /H <sub>2</sub> O à 248 K			
Acquisition	COSY	NOESY	DOSY	HSQC	HMBC	COSY	NOESY	DOSY	HSQC	HMBC	COSY	NOESY	HSQC	HMBC
PULPROG	cosygpppqf	noesyegpph	ledbpgp2s	hsqcedetgpsisp2.2	hmbcetgp13nd	cosygpppqf	noesyegpph	ledbpgp2s	hsqcedetgpsisp2.2	hmbcetgp13nd	cosygpppqf	noesyegpph	hsqcedetgpsisp2.2	hmbcndprf
DS	16	16	4	32	16	16	16	4	32	16	16	16	16	16
NS	8	4	8	2	4	2	4	8	2	4	2	8	8	8
TD(F <sub>2</sub> *F <sub>1</sub> )	4K*256	4K*1K	65K*32	4K*256	4K*1K	4K*256	4K*1K	16K*32	4K*256	4K*1K	4K*256	4K*512	4K*512	4K*400
SWH(F <sub>2</sub> *F <sub>1</sub> )	7002*7002	6002*6002	7000	5098*26411	6024*27624	5500*5500	5500*5500	5500	5098*26411	5098*26411	5500*5500	5498*5498	5498*26412	6009*26411
$d_1$	1 s	1 s	2 s	1 s	1 s	1 s	1 s	24 s	1 s	1 s	1 s	1,5 s	1,5 s	1 s
CNST2				145 Hz					145 Hz				145 Hz	
CNST6					120 Hz					120 Hz				
CNST7					170 Hz					170 Hz				
CNST13					8 Hz					4 Hz				8 Hz
$\delta$ (2*p30)			3 ms					3 ms						
$\Delta$ ( $d_{20}$ )			80 ms					50 ms						
$d_g$		1,5 s					1,5 s					0,5 s		
Durée de l'expérience	11 min 54 s	3 h 13 min 33 s	29 min 24 s	12 min 45 s	1 h 38 min	12 min 39 s	3 h 15 min 57 s	1 h 51 min 13 s	12 min 45 s	1 h 44 min 32 s	12 min 39 s	2 h 44 min 54 s	2 h 12 min 39 s	1 h 17 min 23 s

Tableau 6. Récapitulatif des principaux paramètres d'acquisitions des expériences de RMN 2D réalisées dans le DMSO- $d_6$ , dans la pyridine- $d_5$  et dans le DMSO- $d_6$ /H<sub>2</sub>O. Dans le DMSO- $d_6$ /H<sub>2</sub>O, l'expérience HMBC a été accompagnée d'une présaturation du signal de l'eau.

### 2.5.3. Expériences de RMN tirant profit de la diffusion de spin

Les paramètres qui ont été utilisés pour les expériences NOESY 1D et 2D sélectives dans la partie III : Résultats et Discussion – Chapitre D : Le suivi réactionnel « *in-situ* » dans un tube de RMN, sont détaillés dans cette section.

#### 2.5.3.1. Expériences NOESY 1D $^1\text{H}$ sélectives

Les paramètres des expériences NOESY 1D d'excitation sélective de multiplets employés pour isoler le spectre  $^1\text{H}$  des **réactifs initiaux** (Figure 117) et des **produits finaux** (Figure 120) issus du milieu réactionnel, sont décrits ci-dessous.

**Figure 117.** Spectres NOESY 1D  $^1\text{H}$  d'excitation sélective de multiplets du mélange des trois réactifs (20 mM) dissous dans le DMSO- $d_6$ /H $_2$ O (7:3, v/v) (a et b),  $t_m = 0,5$  s, à 238 K, à 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). L'excitation sélective initiale a été obtenue par une impulsion gaussienne tronquée à  $180^\circ$  à 1%. G1:G2 = 70:30. Les impulsions d'inversion adiabatique à large bande WURST,  $\delta_2 = 1,5$  ms, ont commencé entre  $t_m$  à 0,33 et 0,83  $t_m$  avec G3:G4:G5 = 40:-60:50. La longueur d'impulsion du gradient était de 1 ms.  $d = 200$   $\mu\text{s}$ . Le délai de relaxation était de 1,0 s. Les FID (8k points, largeur spectrale 5500 Hz) ont été multipliés par une fonction exponentielle (LB = 0,5) avant le « zero filling » à 64k points. Les impulsions d'inversion sélective initiales excitent : a) la résonance proton **H $_5$**  de la 4-hydroxycoumarine (**1a**) ( $\delta_1 = 100$  ms, 4k scans, temps d'expérience (expt) = 237,87 min) ; b) la résonance proton **H $_{10}$**  de la *N,N*-diméthyl-*m*-toluidine ( $\delta_1 = 40$  ms, 2k scans, expt = 115,87 min). Séquence d'impulsions utilisée :  $\varphi_1 = x, y, -x, -y, \psi = x, -x$ .

**Figure 120.** Spectres NOESY 1D  $^1\text{H}$  d'excitation sélective de multiplets du mélange des trois réactifs (20 mM) dissous dans le DMSO- $d_6$ /H $_2$ O (7:3, v/v) (a et b),  $t_m = 0,5$  s, à 248 K, à 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). L'excitation sélective initiale a été obtenue par une impulsion gaussienne tronquée à  $180^\circ$  à 1 %. G1:G2 = 70:30. Les impulsions d'inversion adiabatique à large bande WURST,  $\delta_2 = 1,5$  ms, ont commencé entre  $t_m$  à 0,33 et 0,83  $t_m$  avec G3:G4:G5 = 40:-60:50. La longueur des impulsions gradients était de 1 ms.  $d = 200$   $\mu\text{s}$ . Le délai de relaxation était de 2,0 s. Les FID (8k points, largeur spectrale 5500 Hz) ont été multipliés par une fonction exponentielle (LB = 0,5) avant le « zero filling » à 64k points. Les impulsions d'inversion sélective initiales excitent : a) la résonance proton **H $_{11}$**  du dimère de coumarine benzylé (**4b**) ( $\delta_1 = 30$  ms, 2k scans, temps d'expérience (expt) = 114,07 min) ; b) la résonance proton **H $_{11}$**  du produit final (**4a**) ( $\delta_1 = 60$  ms, 5k scans, expt = 361,75 min). Séquence d'impulsions utilisée :  $\varphi_1 = x, y, -x, -y, \psi = x, -x$ .

#### 2.5.3.2. Optimisation des paramètres expérimentaux

##### 2.5.3.2.1. Détermination de la température d'expérience optimale

La température optimale d'analyse qui correspondait au meilleur compromis entre la résolution spectrale et une diffusion de spin efficace a été déterminée expérimentalement en enregistrant une série de spectres NOESY2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  à différentes températures dans le DMSO- $d_6$ /H $_2$ O (Figure 96).

Pour cela, un tube témoin de même composition que celui étudié dans la partie résultat chapitre D, a été préparé et analysé avant la préparation du tube final.

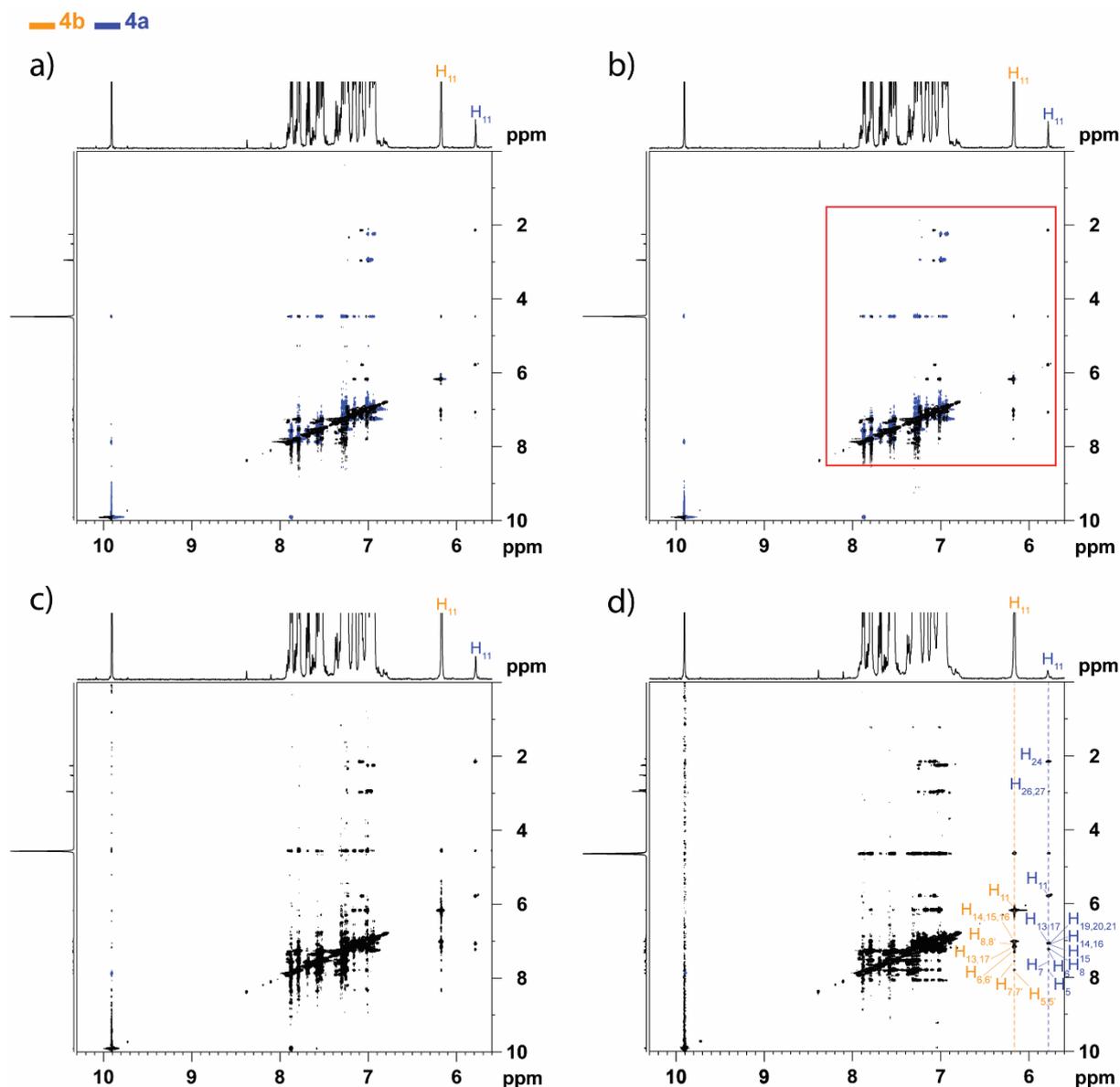


Figure 96. Spectres NOESY 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de la réaction organique (20 mM de chaque réactif) dans le  $\text{DMSO-}d_6/\text{H}_2\text{O}$  (7:3, v/v), à a) 278 K, b) 268 K, c) 258 K et d) 248 K,  $t_m = 1$  s, à 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). Le cadre rouge correspond aux régions spectrales d'intérêt dans lesquelles les variations de température montrent un effet majeur sur l'intensité du signal.

**Figure 96.** Spectres NOESY 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de la réaction organique (20 mM de chaque réactif), dans le  $\text{DMSO-}d_6/\text{H}_2\text{O}$  (7:3, v/v), à a) 278 K, b) 268 K, c) 258 K et d) 248 K,  $t_m = 1$  s, à 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). Séquence d'impulsions utilisée : noesyegpph. La matrice de données a été enregistrée en mode States-TPPI ; sa taille était de  $256 \times 4\text{k}$  avec 16 scans par FID, un délai de relaxation de 1,5 s et un temps de mélange de 1 s ( $t_m$ ), résultant en un temps d'enregistrement de 99,58 min (expt). La largeur spectrale était de 5500 Hz dans les deux dimensions.  $G1:G2 = 70:30$ . La matrice de données a été multipliée dans les deux dimensions par une fonction sinusoïdale en cloche décalée ( $\text{SSB} = 2$ ) avant le « zero filling » jusqu'à une taille de  $1\text{k} \times 4\text{k}$ . Une paire d'impulsions d'inversion de forme rectangulaire de 2 ms a été appliquée sur la résonance du signal de l'eau. La durée des impulsions de gradient de suppression d'eau était de 1 ms et leur intensité de 31% pour la première paire et de 11% pour la deuxième paire.

### 2.5.3.2.2. Détermination du temps de mélange $d_8$ optimal

La durée du temps de mélange  $d_8$  peut avoir une conséquence sur l'intensité des taches qui résultent de la diffusion de spin. Deux spectres NOESY 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  du mélange réactionnel ont été acquis à différents temps de mélange ( $d_8 = 0,5$  s ou 1 s), à 248 K, à 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) (Figure 97). Le spectre a) a révélé une meilleure qualité spectrale avec moins de bruit et des taches de corrélations légèrement plus intenses pour un  $d_8 = 0,5$  s.

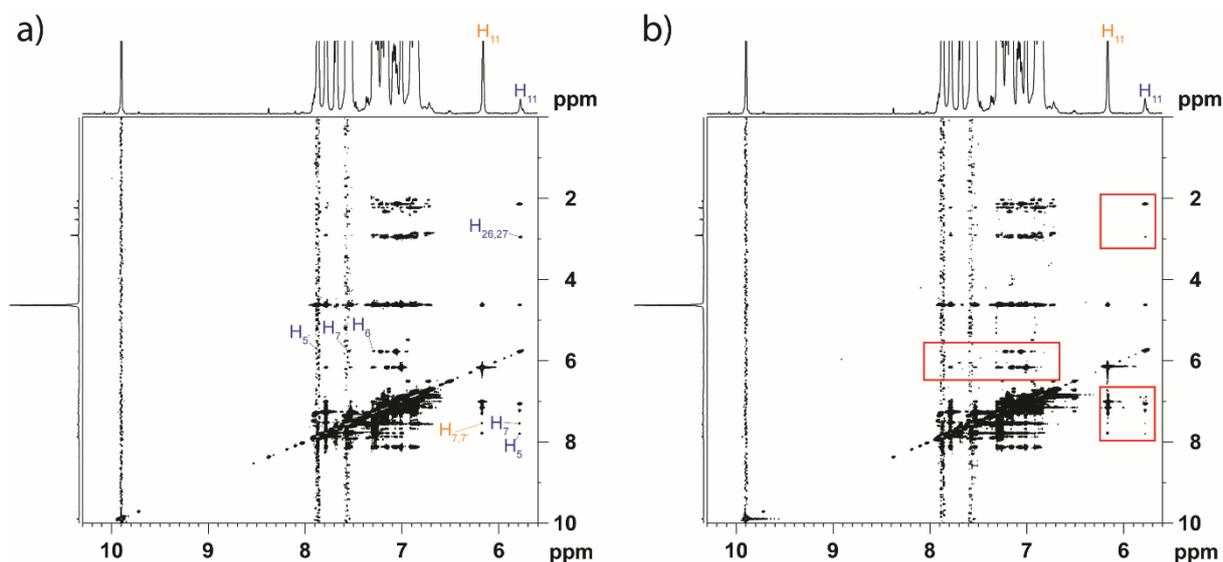


Figure 97. Spectres NOESY 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de la réaction organique (20 mM de chaque réactif) dans le  $\text{DMSO-}d_6/\text{H}_2\text{O}$  (7:3, v/v), à 248 K avec a)  $d_8 = 0,5$  s et b)  $d_8 = 1$  s, à 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). Les cadres rouges correspondent aux régions spectrales d'intérêt dans lesquelles les variations dans la valeur du temps de mélange montrent un effet majeur sur l'intensité du signal.

**Figure 97.** Spectres NOESY 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de la réaction organique (20 mM de chaque réactif), dans le  $\text{DMSO-}d_6/\text{H}_2\text{O}$  (7:3, v/v), à 248 K,  $d_8 = 0,5$  ou 1 s, à 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). Séquence d'impulsions utilisée : noesyegpph. La matrice de données a été enregistrée en mode States-TPPI ; sa taille était de  $512 \times 4\text{k}$  avec 16 scans par FID, un délai de relaxation de 1,5 s et un temps de mélange de 0,5 s (a) ou 1 s (b) ( $t_m$ ), résultant en un temps d'enregistrement de 164,90 min (a) et 199,17 min (b) (expt). La largeur spectrale était de 5500 Hz dans les deux dimensions. G1:G2 = 70:30. La matrice de données a été multipliée dans les deux dimensions par une fonction sinusoïdale en cloche décalée (SSB = 2) avant le « zero filling » jusqu'à une taille de  $1\text{k} \times 4\text{k}$ . Une paire d'impulsions d'inversion de forme rectangulaire de 2 ms a été appliquée sur la résonance du signal de l'eau. La durée des impulsions de gradient de suppression d'eau était de 1 ms et leur intensité de 31% pour la première paire et de 11% pour la deuxième paire.

2.5.4. Déplacements chimiques des produits finaux (4a) et (4b)

Déplacements chimiques $^1\text{H}$ du produit final ( <b>4a</b> ) dans $\text{DMSO-}d_6/\text{H}_2\text{O}$ (7:3, v/v), à 248 K, à 500 MHz ( $^1\text{H}$ )	
<b>4a</b>	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)
<b>H<sub>6</sub></b>	7,31
<b>H<sub>7</sub></b>	7,56
<b>H<sub>8</sub></b>	7,23
<b>H<sub>5</sub></b>	7,90
<b>H<sub>11</sub></b>	5,78
<b>H<sub>13,17</sub></b>	7,19
<b>H<sub>14,16</sub></b>	7,23
<b>H<sub>15</sub></b>	7,23
<b>H<sub>19</sub></b>	7,11
<b>H<sub>20</sub></b>	7,11
<b>H<sub>22</sub></b>	7,11
<b>H<sub>24</sub></b>	2,15
<b>H<sub>26,27</sub></b>	2,98

Déplacements chimiques $^1\text{H}$ du dimère de coumarine benzylé ( <b>4b</b> ) dans $\text{DMSO-}d_6/\text{H}_2\text{O}$ (7:3, v/v), à 248 K, à 500 MHz ( $^1\text{H}$ )	
<b>4b</b>	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)
<b>H<sub>8,8'</sub></b>	7,10
<b>H<sub>7,7'</sub></b>	7,54
<b>H<sub>6,6'</sub></b>	7,30
<b>H<sub>5,5'</sub></b>	7,79
<b>H<sub>11</sub></b>	6,17
<b>H<sub>13,17</sub></b>	7,16
<b>H<sub>14,16</sub></b>	7,02
<b>H<sub>15</sub></b>	7,02

**PARTIE III :**  
**RESULTATS ET DISCUSSION**

## CHAPITRE A : “POLAR MIXTURE ANALYSIS BY NMR UNDER SPIN DIFFUSION CONDITIONS IN VISCOUS SACCHAROSE SOLUTION AND AGAROSE GEL”

### 1. Introduction

L'utilisation de solution de saccharose et de gel d'agarose, deux milieux très visqueux, est rapportée pour la première fois pour donner accès aux spectres RMN individuels de composés polaires et potentiellement bioactifs en mélange. Les solvants (ou mélanges de solvants) visqueux dans des conditions de température appropriées abaissent la vitesse de rotation des molécules de petites et moyennes tailles en solution de sorte que la relaxation croisée longitudinale favorise l'observation de la diffusion de spin. Par conséquent, les molécules présentent un régime NOE négatif et leurs résonances peuvent être regroupées selon leur capacité à partager l'aimantation intramoléculaire par la diffusion de spin. Toutes les résonances des noyaux  $^1\text{H}$  au sein d'une même molécule ont tendance à corrélérer entre elles dans un spectre NOESY 2D, donnant ainsi accès aux spectres de RMN  $^1\text{H}$  individuels des composants du mélange. Notre équipe a rapporté pour la première fois, respectivement en 2011,<sup>46</sup> 2016 et 2017, l'utilisation du glycérol et du carbonate de glycérol, du DMSO/glycérol et des solvants binaires DMSO/eau comme milieux visqueux pour la promotion de la diffusion de spin  $^1\text{H}$  et  $^{19}\text{F}$ .<sup>47-48</sup>

Ce travail rapporte l'individualisation de quatre dipeptides structuralement proches en mélange : Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr et Ala-Tyr dissous d'une part dans une solution de saccharose et d'autre part dans du gel d'agarose. Cette étude a été effectuée aux moyens d'excitations sélectives NOESY 1D et d'expériences NOESY 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  et HSQC-NOESY 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ .

Pour plus de précisions concernant les propriétés physico-chimiques du saccharose et du gel d'agarose utilisés en tant que solvants visqueux, se reporter dans la partie dédiée Matériels et Méthodes – 1. La diffusion de spin en milieu visqueux.

## 2. Publication



View Article Online  
DOI: 10.1039/C8FD00226F

Journal Name

ARTICLE

## Polar Mixture Analysis by NMR under Spin Diffusion Conditions in Viscous Sucrose Solution and Agarose Gel

Pedro Lameiras,\*†<sup>a</sup> Simon Mougeolle<sup>a</sup>, François Pedinielli<sup>a</sup> and Jean-Marc Nuzillard\*†<sup>a</sup>

Received 00th January 20xx,  
Accepted 00th January 20xx

DOI: 10.1039/x0xx00000x

www.rsc.org/

The use of two new viscous solvents, sucrose solution and agarose gel, is reported for the first time for giving access to the individual NMR spectra of polar and potentially bioactive compounds in mixture. Under viscous conditions, the tumbling rate of small and mid-sized molecules falls down in solution, so that the longitudinal cross-relaxation encourages the observation of spin diffusion. As a result, all the resonances of the <sup>1</sup>H nuclei within the same molecule tend to correlate together in a 2D NOESY spectrum, thus opening the way to mixture analysis. This work describes the individualization of four structurally close mixed dipeptides: Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr dissolved respectively in sucrose solution and agarose gel by means of spin diffusion in homonuclear selective 1D NOESY, selective 2D NOESY experiments and heteronuclear 2D HSQC-NOESY. Sucrose solution should be preferred to agarose gel for the investigation of mixtures made of small and flexible polar compounds due to its capability to give rise to more suitable viscous conditions mandatory for efficient spin diffusion even though agarose gel reveals the benefit of not offering intense residual proton solvent due to active transverse relaxation.

### Introduction

The identification of organic molecules in mixture is a crucial issue in the vast majority of human activities related to chemistry (healthcare, energy, materials, etc.). Transformation processes that lead from natural resources, either from fossil carbon industry or biomass exploitation, to low-value products in large amounts or to high-value speciality products including pharmaceutical and cosmetic active ingredients, rarely produce chemically pure compounds. In the current state of knowledge, mixture analysis remains a necessity and to date addressing this issue by NMR spectroscopy has been explored in a reduced number of ways. i) Translational diffusion coefficient (D) characterizes molecules in solution and reflects their mobility. In theory, sub-spectra of the NMR spectrum of a mixture can be extracted using D as discriminating factor, so as to reach the spectra of the individual mixture components.<sup>1-3</sup> Nonetheless, D values are poorly discriminant, although experimental tricks enable an increase of the resolving power in special cases: introduction of various chromatographic solid phases in the sample, interaction of analytes with soluble polymers or lanthanide shift reagents, analyte inclusion in micelles.<sup>4-14</sup> ii) Multi-quantum spectroscopy combined (or not) with broadband homonuclear decoupling, sparse sampling and pure

shift data acquisition may be pertinent for individualizing molecules in a mixture. For example, a simple 2D TOCSY spectrum or series of 1D selective TOCSY spectra points out <sup>1</sup>H nuclei coupled together, which may turn out to be useful for molecules composed only of one single spin system.<sup>15-21</sup> iii) Viscous solvents (or solvent blends) under specific operating conditions lower the tumbling rate of small and mid-sized molecules in solution since the value of the molecular overall correlation time  $\tau_c$  depends upon the medium viscosity according to the microviscosity theory of Gierer and Wirtz.<sup>22</sup> The longitudinal cross-relaxation regime thus favours the detection of spin diffusion. Consequently, the molecules present a negative nuclear Overhauser effect (NOE) regime and their resonances can be grouped according to their ability to share magnetization through intramolecular diffusion of spin magnetization. All the resonances of the <sup>1</sup>H nuclei within the same molecule tend to correlate together in a 2D NOESY spectrum, thus giving access to the individual <sup>1</sup>H NMR spectra of the mixture components. The original idea was implemented in 1981<sup>23</sup> by means of a perfluorinated polymer solvent and was considered again in 2008;<sup>24</sup> the use of supercooled water for tailoring the spin dynamics of small metabolites was published in 2012 by the same author.<sup>25</sup> Our team reported for the first time, respectively in 2011, 2016 and 2017, the use of glycerol and glycerol carbonate, of DMSO/glycerol and of DMSO/water binary solvents as viscous media for <sup>1</sup>H and <sup>19</sup>F spin diffusion promotion.<sup>26-28</sup>

The present work focusses on the assessment of sucrose solution and agarose gel in the individual NMR characterization of four polar structurally close dipeptides: Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr within a single mixture by means of spin diffusion in homonuclear

<sup>a</sup> Université de Reims Champagne-Ardenne, Institut de Chimie Moléculaire de Reims, CNRS UMR 7312, SFR CAP-Santé, BP 1039, 51687 Reims Cedex 02, France.  
E-mail: pedro.lameiras@univ-reims.fr, Tel : +33 3 26 91 82 28.  
E-mail: jm.nuzillard@univ-reims.fr, Tel : +33 3 26 91 82 10

† Contributed equally to the work.

Electronic Supplementary Information (ESI) available: [details of any supplementary information available should be included here]. See DOI: 10.1039/x0xx00000x

## ARTICLE

## Journal Name

selective 1D NOESY, selective 2D NOESY experiments and heteronuclear 2D HSQC-NOESY.

Dissolving “table sugar” in water yields a viscous solution that enables us to take profit from spin diffusion from room temperature to a below temperature due to the overall decrease in the tumbling rate of molecules in solution. For instance, the viscosity of a sucrose/water (1:1, w/w) blend is around 27 cP at 283 K.<sup>29, 30</sup> In comparison, that of water at the same temperature is 1.307 cP.<sup>31</sup> At room temperature, the viscosity of the same sucrose/water blend is sufficiently low, so that NMR samples may be prepared and transferred into an NMR tube without any difficulty, in contrast to highly viscous solvents such as glycerol ( $\eta = 934$  cP at 298 K)<sup>32</sup> and glycerol carbonate ( $\eta = 85.4$  cP at 298 K).<sup>32</sup> Adding sucrose to water (deuterated or not) also opens the way of working from room to sub-zero temperature,<sup>30</sup> which is especially suitable for thermally unstable molecules such as bioactive molecules. Spin diffusion may thus happen on a wide range of temperatures, from 243 K<sup>30</sup> to room temperature and even higher. In addition, the sample preparation cost is very low since the “table sugar” is a widespread staple. However, the major experimental pitfall is strong residual proton signals of non-deuterated sucrose that obliges its mandatory elimination. Mid-sized molecules will only necessitate a low amount of sucrose in water whereas smaller molecule will require more sucrose for driving spin diffusion under temperature control from room temperature to sub-zero temperature.

Agarose gel is commonly used for the separation of biological molecules by electrophoresis even if it was already proposed as a confinement medium for investigating the molecular confinement effect on the conformational dynamics of apomyoglobin.<sup>33</sup> The main problem in the sample preparation is the addition of molecules of interest to the agarose powder previously dissolved in water at high temperature (363 K for melting regular agarose and at around 338 K for low-melting agarose). Peptide or protein solutions may suffer from the high temperature exposition preventing NMR structural and conformational studies and premature gelation might occur. In practice, the heat time only takes a few minutes, thus the sample preparation is compatible with quite small molecules reasonably heat resistant such as nucleic acids, peptides or saccharides. In addition, NMR signal line sharpness can dramatically be altered in the case of inhomogeneous samples due to partially unmelted agarose or incorporation of air bubbles. The solution consists to melt the sample again directly inside the NMR tube, then to mix thoroughly it and chill again at ambient temperature. Interestingly, agarose is non-interactive with most biomolecules and organic compounds so that DNA, RNA and protein can be recovered from agarose gels.<sup>34, 35</sup> Its freezing point is reported from 260 K and 264 K routinely reached respectively with H<sub>2</sub>O- and D<sub>2</sub>O-based 1% agarose gels<sup>36</sup> limiting the temperature range for which spin diffusion may occur compared to sucrose solution. Hence, agarose gel will be more dedicated to the study of rigid small or medium-sized molecules in mixture presenting higher correlation times than very flexible small molecules. Remarkably, due to the rigidity of the agarose gel thus the

too active transverse relaxation, all resulting proton and carbon resonances are too broad to be detected in NMR spectroscopy.<sup>36, 37</sup> As a result, only the residual proton signal of water has to be removed compared to numerous proton signals of non-deuterated sucrose.

The criterion for optimal temperature selection is a compromise between overall spectral resolution and intensity of NOESY cross peaks between nuclei that are not close enough to show a NOE signal in a low viscosity medium. A temperature reduction enhances spin diffusion but also reduces peak height through line broadening caused by a more efficient transverse relaxation process. Sample cooling is therefore required if the NOESY spectrum shows positive NOE responses (diagonal and off-diagonal peaks of opposite signs).

Depending on the complexity of the mixtures, the analysis of <sup>1</sup>H NMR spectra may become intractable due to the overlapping of <sup>1</sup>H resonances. A usual remedy to this issue consists in the spreading of the spectroscopic information along a second axis that encodes chemical shifts of nuclei other than <sup>1</sup>H such as <sup>13</sup>C or <sup>15</sup>N.<sup>27, 28</sup> This approach to mixture analysis is exemplified in sucrose solution by 1D and 2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N and <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC-NOESY spectra providing <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N chemical shift lists for the mixture components.

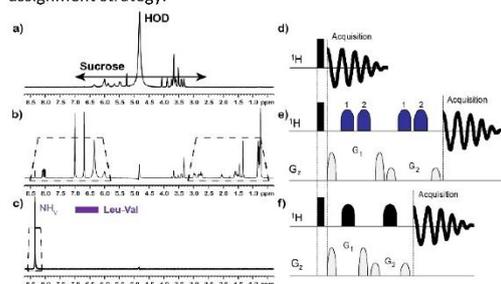
## Results and discussion

### Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr mixture in sucrose solution.

These four dipeptides in pure water solution do not reveal any differentiation based on their translational diffusion behaviour, due to their similar molecular weight and shape (Figure S-1 in the Electronic Supplementary Information (ESI)). This observation encouraged us to investigate the dipeptide mixture dissolved in viscous solution sucrose by considering the resolving power of homo- and heteronuclear NOESY-based spin diffusion experiments for offering pertinent alternatives to DOSY experiments. The main experimental drawback of our approach was the mandatory elimination of the strong <sup>1</sup>H signals of sucrose and water (see Figure 1a) for avoiding to excessively obscure solute signals since deuterated sucrose would be too expensive to produce and deuterated water would give rise to the chemical exchange between the deuterium nuclei of the latter and the amide proton of the dipeptides mixture. The elimination of these signals can be achieved by means of selective excitation and detection pulses when included in an excitation sculpting sequence.<sup>38</sup> The selective pulses invert the equilibrium magnetization of the nuclei of interest and leave untouched the one of the solvent nuclei. For this purpose, resonance inversion in the two frequency bands on either side of the solvent signal was successfully realized by means of two consecutive band selective pulses. The spectrum in Figure 1b proves the quality of solvent suppression that was achieved by band selective detection (see pulse sequence in Figure 1e).

Since the temperature is an important parameter in spin diffusion experiments because it is directly related to solvent viscosity and as a result to overall rotational correlation times  $\tau_c$ ,<sup>22, 26</sup> we have determined the optimal temperature at which NOESY cross peaks were positive (negative NOE enhancements, slow motion regime), well-resolved, and as intense as possible between nuclei

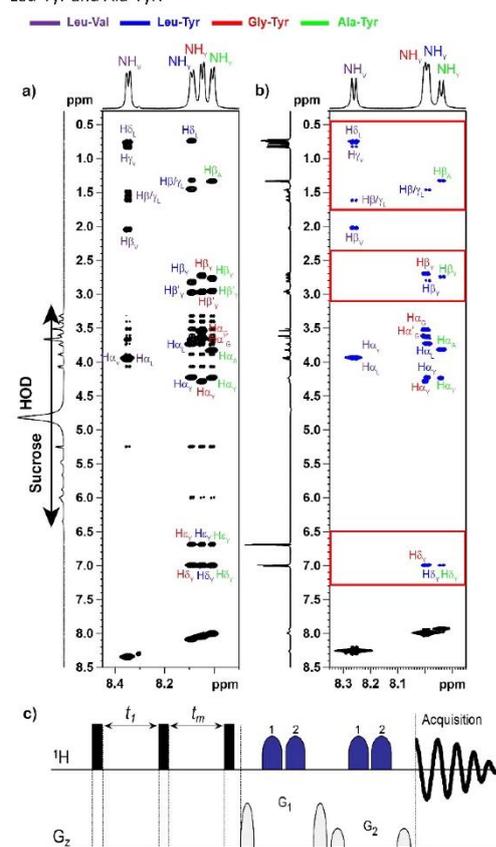
that were not supposed to be close enough to present a NOE in low viscous medium. The optimized temperature of 283 K has been defined by means of band-selective detection NOESY experiments (see Figure 2a, Figures S-2: amide proton region NOESY spectra at 298, 288, 283, 278 and 273 K and S-3: full NOESY spectrum at 283 K in ESI). We have clearly observed that the use of viscous sucrose solution makes possible full intramolecular magnetization transfer through spin diffusion, observed over distances of  $> 14 \text{ \AA}$  within each very small and flexible dipeptide. In comparison, the NOESY spectrum recorded in water at 298 K displays less numerous NOE cross peaks of opposite sign (positive NOE enhancements, fast motion regime, see Figure 2b, full NOESY spectrum in Figure S-4 in ESI). Hence, under viscous conditions, the grouping of proton resonances together is accessible allowing the individualization of the mixture components since the chemical shift pattern of each dipeptide is predictable. The individualization of the four dipeptides in water would have necessitated the concomitant use of NOESY and TOCSY (and COSY) experiments, according to the common resonance assignment strategy.<sup>39</sup>



**Fig. 1.** 1D  $^1\text{H}$  spectra (8 scans), at 600 MHz ( $^1\text{H}$ ), and corresponding NMR pulse sequence of the dipeptide test mixture in sucrose solution (a, b, c, 283 K). G1:G2 = 70:30. The FIDs (32k points, spectral width = 6 010 Hz) were processed with LB = 0.3 Hz and zero-filled to 32k points. a, d) Non-selective excitation and detection. b, e) Selective detection of two resonance bands. The 3 ms I-BURP-2 pulses cover 1 560 Hz (dotted trapezium). The "1" and "2" labels respectively indicate their application to the high and low chemical shift regions. c, f) Selective excitation of the valine amide proton doublet of Leu-Val (dotted trapezium) using a 10 ms, 1% truncated,  $180^\circ$  Gaussian pulse.

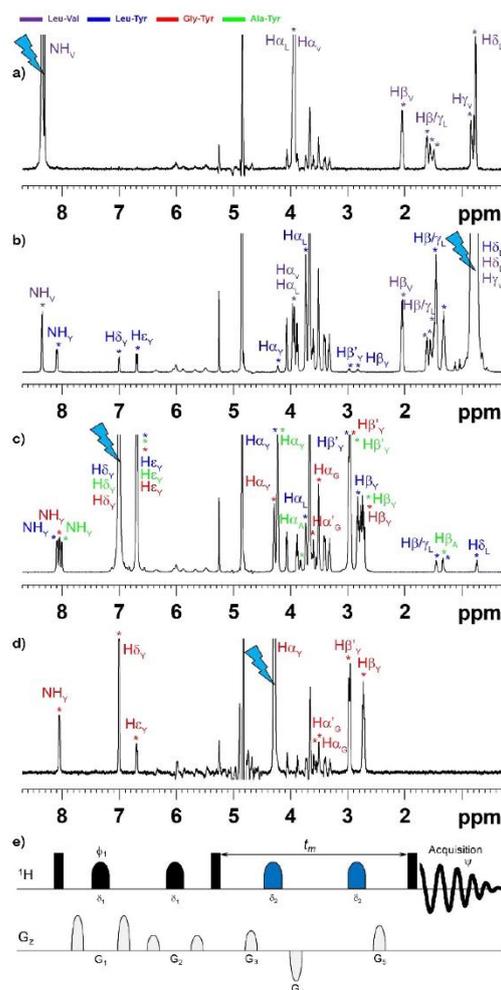
For analytical reasons, it appeared relevant to collect supplementary structural information of mixture components by detecting  $\text{H}_\alpha$  proton resonances in  $F_1$  during signal acquisition, that was not the case by means of band selective transient NOESY experiments. By the way, we implemented a 1D selective NOESY pulse sequence composed of a double pulse field gradient block for the multiplet selective excitation<sup>38, 40</sup> of the resonance of interest followed by a mixing time including two wideband adiabatic inversion pulses flanked with gradient pulses so as to avoid the reintroduction of strong sucrose and water solvent signals during the mixing time that arise from longitudinal relaxation. Figure 3 undoubtedly proves that all dipeptides are differentiated by spin

diffusion in sucrose solution by means of an appropriate set of selectively excited proton resonances. Indeed, the selective excitation of the NH amide proton, at  $\delta 8.35$  in sucrose solution, shows a magnetization exchange exclusively with the protons of the Leu-Val dipeptide because the tyrosine  $\text{H}_\delta/\text{H}_\epsilon$  proton resonances do not appear in the 1D NOESY spectra (see Figure 3a). The selective excitation of the side chain  $\text{H}_\delta$  and  $\text{H}_\gamma$  protons (between 0.7 and 0.9 ppm) displays a magnetization exchange with all protons of the two Leu-Val and Leu-Tyr dipeptides (see Figure 3b). By comparison with the 1D NOESY spectra in Figures 3a and 3b, a complete proton assignment of Leu-Tyr is possible. The selective excitation of the aromatic  $\text{H}_\delta/\text{H}_\epsilon$  protons of Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr reveals all the proton resonances of Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr (see Figure 3c). One of the three tyrosine  $\text{H}_\alpha$  protons at  $\delta 4.14$  has been selectively excited in order to differentiate all proton resonances from Gly-Tyr and Ala-Tyr (see Figure 3d). Figure 3d clearly shows the transfer of the tyrosine  $\text{H}_\alpha$  magnetization over all protons of Gly-Tyr because of the absence of the side chain proton ( $\text{H}_{\beta_A}/\beta_U/\gamma_U/\delta_U$ ) resonances of Leu-Tyr and Ala-Tyr.



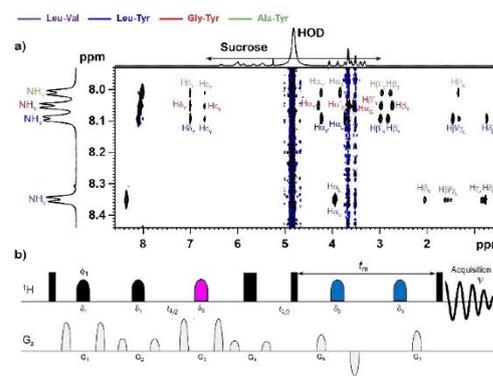
**Fig. 2.** a) Amide proton region of band-selective detection 2D NOESY spectrum of the dipeptide test mixture (10 mM), mixing time ( $t_m$ ) = 0.5 s, at 600 MHz ( $^1\text{H}$ ) using the pulse sequence in part c, dissolved

in sucrose solution, at 283 K. b) Amide proton region of 2D NOESY spectrum of the same dipeptide test mixture (10 mM),  $t_m = 0.5$  s, at 600 MHz ( $^1\text{H}$ ), using noesyegpph pulse sequence, dissolved in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1, v/v), at 298 K. The red frames correspond to spectral regions of interest in which water as solvent has a major effect on the number and sign of observable NOESY cross peaks.



**Fig. 3.** Multiplet selective excitation 1D  $^1\text{H}$  NOESY spectra of the dipeptide test mixture (10 mM) dissolved in sucrose solution (a, b, c, d, 283 K),  $t_m = 0.5$  s, at 600 MHz ( $^1\text{H}$ ). The initial selective inversion pulses excite: a) the  $\text{NH}_V(\text{LV})$  proton resonance (experiment time (expt) = 134.65 min); b) the  $\text{H}\delta_L(\text{LY})/\text{H}\delta_L(\text{LV})/\text{H}\gamma_V(\text{LV})$  proton resonances (expt = 33.67 min); c) the  $\text{H}\delta_V(\text{LY})/\text{H}\delta_V(\text{GY})/\text{H}\delta_V(\text{AY})$  proton resonances (expt = 25.32 min); d) the  $\text{H}\alpha_V(\text{GY})$  proton resonance (expt = 275.07 min). e) Pulse sequence:  $\phi_1 = x, y, -x, -y, \psi = x, -x$ .

Another way to the individualization of dipeptide mixture which is less time-consuming than the acquisition of four suitable selective 1D NOESY spectra has been to focus on the close NH amide resonances as an initial source of magnetization and to resort to a  $F_1$  band selective  $F_1$  decoupled 2D NOESY experiment<sup>41, 42</sup> since these selected nuclei have their resonances in the same frequency band and they are not scalarly coupled together (see Figure 4). Carrying out this latter experiment in sucrose solution allows the assignment of all proton resonances of Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr by taking profit from spin diffusion acting during the mixing time.

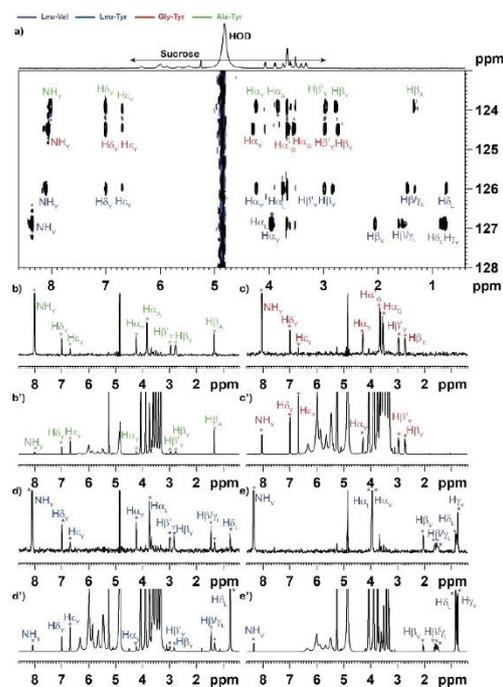


**Fig. 4.** a)  $F_1$  band selective  $F_1$  decoupled 2D NOESY spectrum of the dipeptide test mixture (10 mM) in sucrose solution, at 283 K, at 600 MHz ( $^1\text{H}$ ), (64 scans per  $t_1$  value, expt = 222.54 min,  $t_m = 0.5$  s). b) Pulse sequence:  $\phi_1 = x, y, -x, -y, \psi = x, -x$ . The initial selective  $180^\circ$  pulses had a Gaussian shape and were applied to the four NH amide proton resonances.

The selective excitation of isolated proton resonances makes possible the individualization of each peptide within the mixture by taking advantage of spin diffusion. Nonetheless, it may happen in other complex mixtures that a component of interest does not present resolved proton resonances owing to strong spectral overlap. In such cases, the larger chemical shift dispersion of  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  nuclei may prove to be helpful. By coupling the HSQC and NOESY experiments, a complete proton spectrum should be achieved for a molecule starting only from a single carbon or nitrogen resonance.

The 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-NOESY spectra of the dipeptide test mixture have been acquired at 283 K in sucrose solution (Figure S-5 in ESI and Figure 5). Under these viscous conditions, all protons of each dipeptide of the mixture are able to propagate its own magnetization with all other protons and protonated carbons or protonated nitrogen by spin diffusion. A suitable selection of horizontal rows through carbon resonances at 18.14 and 38.08 ppm (Ala-Tyr), 22.64 and 37.66 ppm (Leu-Tyr), 31.43 and 53.64 ppm (Leu-Val) and 38.11 ppm (Gly-Tyr) allows the extraction of the four complete proton spectra respectively corresponding to Ala-Tyr, Leu-Tyr, Leu-Val and Gly-Tyr. These four spectra have been compared to the conventional 1D  $^1\text{H}$  spectra (Figures S-5b, b', S-5c, c', S-5d, d' and S-5e, e' in ESI) and they logically reveal similar peak patterns. In the

same way, an appropriate selection of four horizontal slices through nitrogen resonances at 123.93 (Ala-Tyr), 124.49 (Gly-Tyr), 126.01 (Leu-Tyr), and 126.91 ppm (Leu-Val) allows to produce four complete  $^1\text{H}$  spectra respectively corresponding to Ala-Tyr, Gly-Tyr, Leu-Tyr, and Leu-Val. These four spectra present resonance patterns similar to those of the conventional 1D  $^1\text{H}$  spectra as well (Figures 5b, b', 5c, c', 5d, d' and 5e, e'). Interestingly, another way is possible to individualize the compounds of the mixture by considering appropriate vertical slices from the 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-NOESY (Figure S-5). In this case, the resulting spectra should reveal all the protonated carbons of the four dipeptides in the mixture. By the way, Figure S-5 (d'', c'', e'' and b'') presents the four protonated carbon spectra obtained by extracting the column of amide protons at 8.35, 8.09, 8.05 and 8.01 ppm, respectively corresponding to Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr, and Ala-Tyr. The ability to extract all the protonated carbon chemical shifts for an individual component in a mixture may turn out to be a very convenient tool in the structure assignment of molecules within mixtures.



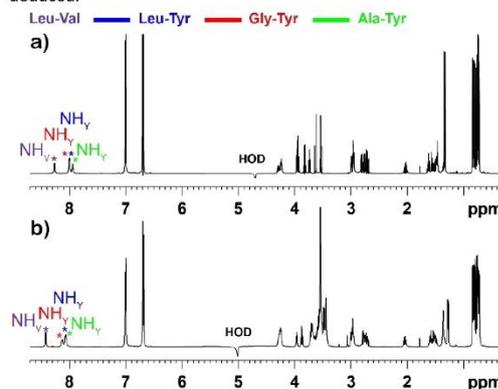
**Fig. 5.** a) 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-NOESY spectrum of the dipeptide test mixture (20 mM) dissolved in sucrose solution, at 283 K,  $t_m = 0.5$  s, with solvent multiple presaturation, at 600 MHz ( $^1\text{H}$ ). Comparison of four  $^1\text{H}$  horizontal slices extracted from the 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-NOESY at 123.93 (b, b', Ala-Tyr, green row), 124.49 (c, c', Gly-Tyr, red row), 126.01 (d, d', Leu-Tyr, blue row), and 126.91 ppm (e, e', Leu-Val, purple row) with the conventional 1D proton spectra of each pure

dipeptide dissolved (20 mM) in sucrose solution, at 283 K, at 600 MHz ( $^1\text{H}$ ).

#### Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr mixture in agarose gel

As previously published,<sup>36, 37</sup> owing to the active transverse relaxation of agarose gel, all the proton resonances from agarose are remarkably not visible (see Figure 6). This aspect is probably the main advantage of using this viscous medium in the individualization of components within polar mixtures because that makes easier the solvent suppression.

We also determined the temperature that provides the best compromise between spin diffusion and spectral resolution by means of usual NOESY experiments with water suppression using excitation sculpting (see Figure S-6 in ESI). The optimized temperature of 273 K enables to detect as much as possible negative NOE enhancements (positive NOESY cross peaks) due to the molecular tumbling slowdown. The use of viscous agarose gel yields full intramolecular magnetization transfer through spin diffusion, over distances of  $> 14$  Å for Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr owing to the stiffness of the aromatic moiety. In comparison, the NOESY spectrum acquired in water at 298 K presents less NOE cross peaks of opposite sign (positive NOE enhancements, fast molecular tumbling, see Figure 2b). However, the remaining flexibility of Leu-Val peptide in agarose gel at 273 K prevents the observation of full magnetization transfer over the entire molecule by means of spin diffusion. Only positive NOE enhancements are detected. Nonetheless, under sufficiently viscous conditions, the grouping of proton resonances of Tyr-based dipeptides together is reachable, thus allowing the individualization of these three Tyr-based mixture components since the chemical shift pattern of each dipeptide is predictable. By subtraction, the proton resonance pattern of Leu-Val is then deduced.



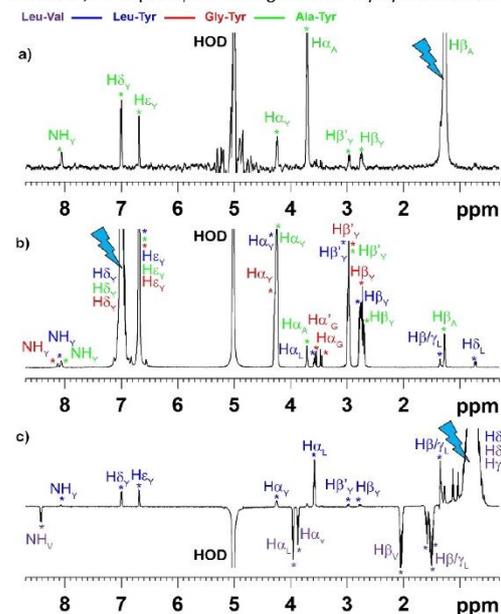
**Fig. 6.** 1D  $^1\text{H}$  spectra of the dipeptide test mixture (10 mM) dissolved a) in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1, v/v), at 298 K, at 600 MHz ( $^1\text{H}$ ) and b) in agarose gel 1%, at 273 K, at 600 MHz ( $^1\text{H}$ ) with water suppression using excitation sculpting.

We sought to highlight the discrepancy of the molecular behaviour of the four dipeptides in agarose gel by only collecting the

## ARTICLE

## Journal Name

resonances of interest during the signal acquisition for accessing to supplementary structural information. This approach may turn out to be pertinent in case of proton overlapping especially for complex mixtures. Selectively exciting one suitable set of proton resonances illustrates this approach. By the way, we reused the 1D selective NOESY experiment previously described in this work. The only one HOD signal of agarose gel arising from longitudinal relaxation during the mixing time is more easily suppressed than the multiple ones of sucrose. Figure 7 illustrates that all Tyr-based dipeptides are differentiated by spin diffusion in agarose gel by means of an appropriate set of selectively excited proton resonances. Indeed, the selective excitation of  $\text{CH}_{\beta}$  at  $\delta$  1.27 in agarose gel, shows a magnetization exchange exclusively with the protons of the Ala-Tyr dipeptide (Figure 7a). The selective excitation of the aromatic  $\text{H}_{\delta}/\text{H}_{\epsilon}$  protons of Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr at  $\delta$  7.00 reveals all the proton resonances of Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr (Figure 7b). The selective excitation of the side chain  $\text{H}_{\delta}$  and  $\text{H}_{\gamma}$  protons (between 0.7 and 0.9 ppm) displays a magnetization exchange with all protons of the two Leu-Val and Leu-Tyr dipeptides (Figure 7c). Due to a different molecular tumbling rate, the NOE enhancements are negative (active spin diffusion, positive peaks) for Leu-Tyr and positive for Leu-Val (negative peaks). As a result, the distinction of the two proton patterns is immediate by considering the change in the sign of the NOE peaks. By comparison with the 1D NOESY spectra in Figures 7a, 7b and 7c, a complete proton assignment of Gly-Tyr is accessible.



**Fig. 7.** Multiplet selective excitation 1D  $^1\text{H}$  NOESY spectra of the dipeptide test mixture (10 mM) dissolved in agarose gel 1% (a, b, c, 273 K),  $t_m = 0.5$  s, at 600 MHz ( $^1\text{H}$ ). The initial selective inversion pulses excite: a) the  $\text{H}_{\beta\gamma}(\text{AY})$  proton resonance (expt = 186,25 min); b) the  $\text{H}_{\delta}(\text{LY})/\text{H}_{\delta}(\text{GY})/\text{H}_{\delta}(\text{AY})$  proton resonances (expt = 67,25

min); c) the  $\text{H}_{\delta}(\text{LY})/\text{H}_{\delta}(\text{LV})/\text{H}_{\gamma}(\text{LV})$  proton resonances (expt = 67,08 min); Pulse sequence:  $\varphi 1 = x, y, -x, -y, \psi = x, -x$  (see Figure 3e).

View Article Online  
DOI: 10.1039/C8FD00226F

## Experimental

**Chemical reagents.**  $\text{D}_2\text{O}$  was purchased from Eurisotop (Gif-sur-Yvette, France). Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr were purchased from TCI Europe (Zwijndrecht, Belgium). Agarose/TBE blend powder 1% was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). All peptides had 95% or higher purity and were dissolved at a concentration from 10 to 20 mM in sucrose/ $\text{H}_2\text{O}$  (5:5, w/w + 10%  $\text{D}_2\text{O}$ , v/v), and agarose gel 1%/ $\text{D}_2\text{O}$  (9:1, v/v).

**NMR Spectroscopy:** All the NMR experiments on the dipeptide mixture were performed on a Bruker Avance AVIII-600 NMR spectrometer equipped with a 5 mm TCI cryoprobe using the Bruker TOPSPIN Software (Rheinstetten, Germany). Static field gradient pulses were generated by a 10 A amplifier, so that the sample is submitted to a nominal  $0.613 \text{ Tm}^{-1}$  gradient. Gradient pulses were followed by a 200  $\mu\text{s}$  recovery delay. Temperature control was performed using a Bruker variable temperature (BVT) unit in combination with a Bruker cooling unit (BCU-05) to provide chilled air.

Dipeptide mixture spectra were calibrated so that the tyrosine  $\text{H}_{\alpha}$  proton and  $\text{C}_{\alpha}$  carbon resonances appeared respectively at 7.00 and 132.00 ppm. Additional NMR data acquisition and processing parameters for Figure 1 up to Figure 7 are described in the Electronic Supplementary Information S-1 to S-6.

## Conclusions

We have established for the first time that the use of sucrose solution and agarose gel makes the resolution of polar components within complex mixtures possible, by taking advantage of NMR spin diffusion. We have pointed out that using sucrose blends as viscous binary solvent presents valuable advantages compared to agarose gel: spin diffusion is active in a wider temperature range, NMR sample preparation (no heating) is compatible with thermally fragile compounds and user-friendly, even though agarose gel presents the considerable benefit of not producing intense residual proton solvent due to active transverse relaxation that is the major drawback of the use of non-deuterated sucrose solution. Mid-sized molecules will only require a small amount of sucrose in water whereas smaller molecules will require more sucrose until 50% (w/w) for driving spin diffusion from room temperature to sub-zero temperature. Agarose gel may be a suitable alternative to the use of sucrose solution for the study of small rigid or mid-sized compounds in mixture presenting quite long correlation times for which spin diffusion should be more active than that of very small and flexible molecules.

The component individualization within a Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr mixture was respectively achieved at 283 K and 273

## Journal Name

## ARTICLE

K in sucrose solution and agarose gel by means of selective 1D, 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-NOESY experiments were implemented for sucrose solution since  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  nuclei were considered as chemical shift markers that increase the spectrum readability, at the price of a lower sensitivity caused by their low natural abundance.

Future investigations will deal the study of other polar mixtures of medium-sized molecules for assessing spin diffusion power of agarose gel and of the solute-solvent interaction.

## Conflicts of interest

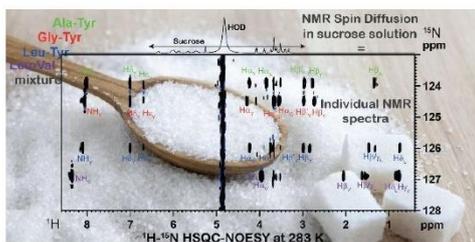
The authors declare no conflict of interest.

## Acknowledgements

We wish to thank CNRS, Conseil Regional Champagne Ardenne, Conseil General de la Marne and the EU-programme FEDER to the PIAneT CPER project is gratefully acknowledged.

## Notes and references

1. K. F. Morris and C. S. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 3139-3141.
2. K. F. Morris and C. S. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 4291-4299.
3. K. F. Morris, P. Stilbs and C. S. Johnson, *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 211-215.
4. S. Viel, F. Ziarelli and S. Caldarelli, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, **100**, 9696-9698.
5. G. Pages, C. Delaurent and S. Caldarelli, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, **45**, 5950-5953.
6. G. Pages, C. Delaurent and S. Caldarelli, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 561-566.
7. S. Caldarelli, *Magn. Reson. Chem.*, 2007, **45**, 548-555.
8. C. Carrara, S. Viel, F. Ziarelli, G. Excoffier, C. Delaurent and S. Caldarelli, *J. Magn. Reson.*, 2008, **194**, 303-306.
9. M. E. Zielinski and K. F. Morris, *Magn. Reson. Chem.*, 2008, **47**, 53-56.
10. R. Evans, S. Haiber, M. Nilsson and G. A. Morris, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 4548-4550.
11. M. E. Zielinski and K. F. Morris, *Magn. Reson. Chem.*, 2009, **47**, 53-56.
12. J. S. Kavakka, V. Parviainen, K. Wähälä, I. Kilpeläinen and S. Heikkinen, *Magn. Reson. Chem.*, 2010, **48**, 777-781.
13. A. K. Rogerson, J. A. Aguilar, M. Nilsson and G. A. Morris, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 7063-7064.
14. C. Pemberton, R. Hoffman, A. Aserin and N. Garti, *J. Magn. Reson.*, 2011, **208**, 262-269.
15. J. C. Hoch, M. W. Maciejewski and B. Filipovic, *J. Magn. Reson.*, 2008, **193**, 317-320.
16. M. Mobli, M. W. Maciejewski, A. D. Schuyler, A. S. Stern and J. C. Hoch, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, **14**, 10835-10843.
17. N. H. Meyer and K. Zangger, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, **52**, 7143-7146.
18. K. Kazimierczuk and V. Orekhov, *Magn. Reson. Chem.*, 2015, **53**, 921-926.
19. C. Papaemmanouil, C. G. Tsiafoulis, D. Alivertis, O. Tzamaloukas, D. Miltiadou, A. G. Tzakos and I. P. Gerothanassis, *J. Agric. Food Chem.*, 2015, **63**, 5381-5387.
20. K. Zangger, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 2015, **86-87**, 1-20.
21. G. D. Poggetto, L. Castañar, G. A. Morris and M. Nilsson, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 100063-100066.
22. A. Gierer and K. Wirtz, *Zeitschrift Für Naturforschung Section A*, 1953, **8**, 532-538.
23. M. P. Williamson and D. H. Williams, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1981, **4**, 165-166.
24. A. J. Simpson, G. Woods and O. Mehrzad, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 186-194.
25. H. Farooq, R. Soong, D. Courtier-Murias, C. Anklin and A. Simpson, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 6759-6766.
26. P. Lameiras, L. Boudesocque, Z. Mouloungui, J. H. Renault, J. M. Wieruszkeski, G. Lippens and J. M. Nuzillard, *J. Magn. Reson.*, 2011, **212**, 161-168.
27. P. Lameiras and J.-M. Nuzillard, *Anal. Chem.*, 2016, **88**, 4508-4515.
28. P. Lameiras, S. Patis, J. Jakhilal, S. Castex, P. Clivio and J. M. Nuzillard, *Chem. Eur. J.*, 2017, **23**, 4923-4928.
29. V. R. N. Telis, J. Telis-Romero, H. B. Mazzotti and A. L. Gabas, *Int. J. Food Prop.*, 2007, **10**, 185-195.
30. M. P. Longinotti and H. R. Corti, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 2008, **37**, 1503-1515.
31. C. H. Cho, J. Urquidi, S. Singh and G. W. Robinson, *J. Phys. Chem. B*, 1999, **103**, 1991-1994.
32. M. O. Sonnati, S. Amigoni, E. P. Taffin De Givenchy, T. Darmanin, O. Choulet and F. Guittard, *Green Chem.*, 2013, **15**, 283-306.
33. E. Bismuto and G. Irace, *FEBS Lett.*, 2001, **509**, 476-480.
34. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and S. K., *Mol. Reprod. Dev.*, 1989, **1**, 146-146.
35. R. Kim, H. Yokota and S. H. Kim, *Anal. Biochem.*, 2000, **282**, 147-149.
36. A. M. Spring and M. W. Germann, *Anal. Biochem.*, 2012, **427**, 79-81.
37. A. Pastore, S. Salvadori and P. A. Temussi, *J. Pept. Sci.*, 2007, **13**, 342-347.
38. K. Stott, J. Stonehouse, J. Keeler, T.-L. Hwang and A. J. Shaka, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 4199-4200.
39. K. Wüthrich, 1986, New York: Wiley.
40. K. Stott, J. Keeler, Q. N. Van and A. J. Shaka, *J. Magn. Reson.*, 1997, **125**, 302-324.
41. R. Brüschweiler, C. Griesinger, O. W. Sørensen and R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.*, 1988, **78**, 178-185.
42. B. Plainchont, A. Martinez, S. Tisse, J. P. Bouillon, J. M. Wieruszkeski, G. Lippens, D. Jeannerat and J. M. Nuzillard, *J. Magn. Reson.*, 2010, **206**, 68-73.



View Article Online  
DOI: 10.1039/C8FD00226F

Published on 17 December 2018. Downloaded by Goltzenburg University Library on 1/21/2019 11:45:26 AM.

Viscous sucrose solution used for the first time to access individual NMR spectra of mixture components in spin diffusion conditions.

Faraday Discussions Accepted Manuscript

## Polar Mixture Analysis by NMR under Spin Diffusion Conditions in Viscous Sucrose Solution and Agarose Gel

Pedro Lameiras\*,<sup>[a]</sup> Simon Mougeolle,<sup>[a]</sup> François Pedinielli,<sup>[a]</sup> and Jean-Marc Nuzillard\*<sup>[a]</sup>

<sup>[a]</sup>Université de Reims Champagne-Ardenne, Institut de Chimie Moléculaire de Reims, CNRS

UMR 7312, IFR 53 Biomolécules, BP 1039, 51687 Reims Cedex 02

### Table of contents

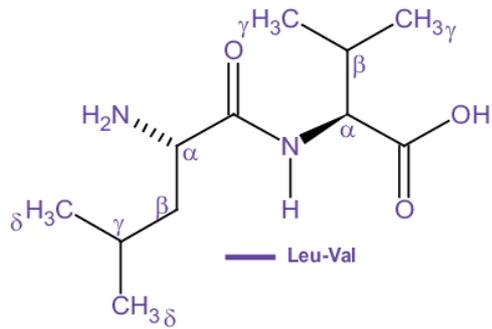
<u>Subject</u>	<u>page #</u>
Peptide structures	page S-3
Additional NMR data acquisition and processing parameters for Figure 1 up to Figure 7	page S-4
<b>Figure S-1:</b> 2D <sup>1</sup> H DOSY spectrum of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), 10 mM, dissolved in H <sub>2</sub> O/D <sub>2</sub> O (9:1, v/v), at pH = 5.0, at 298 K, at 600 MHz ( <sup>1</sup> H).	page S-7
<b>Figure S-2:</b> Amide proton region of band-selective detection 2D NOESY spectra of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), 10 mM, dissolved in sucrose/H <sub>2</sub> O (5:5, w/w + 10% D <sub>2</sub> O v/v), at a) 298 K, b) 288 K, c) 283 K, d) 278 K and e) 273 K, at 600 MHz ( <sup>1</sup> H)	page S-8
<b>Figure S-3:</b> Band-selective detection 2D <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H NOESY spectrum of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), 10 mM, in sucrose/H <sub>2</sub> O (5:5, w/w + 10% D <sub>2</sub> O v/v), at 283 K, at 600 MHz ( <sup>1</sup> H).	page S-9
<b>Figure S-4:</b> 2D <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H NOESY spectrum of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), 10 mM, dissolved in H <sub>2</sub> O/D <sub>2</sub> O (9:1, v/v), at pH = 5.0, at 298 K, at 600 MHz ( <sup>1</sup> H).	page S-10

**Figure S-5:** a) 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-NOESY spectrum of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), (20 mM) in sucrose/ $\text{H}_2\text{O}$  (5:5, w/w + 10%  $\text{D}_2\text{O}$  v/v), at 283 K, using the hsqcetgpnosp pulse sequence with solvent multiple presaturation, at 600 MHz ( $^1\text{H}$ ). **page S-11**

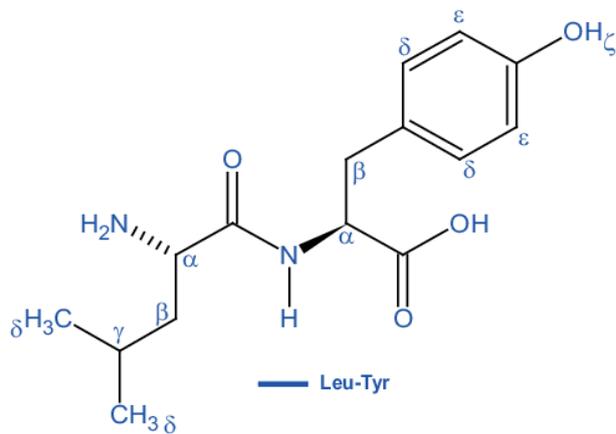
**Figure S-6:** 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY spectrum of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), 10 mM, dissolved in agarose gel, at 273 K, at 600 MHz ( $^1\text{H}$ ). **page S-13**

**Peptide structures:**

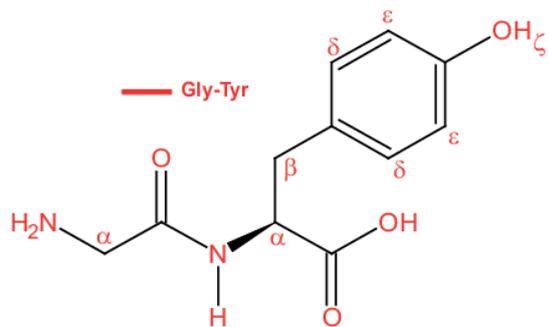
Leucine-Valine = Leu-Val = LV



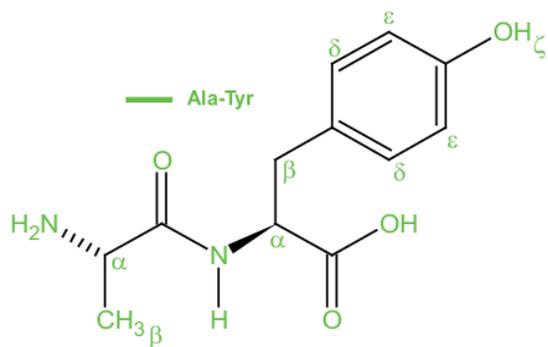
Leucine-Tyrosine = Leu-Tyr = LY



Glycine-Tyrosine = Gly-Tyr = GY



Alanine-Tyrosine = Ala-Tyr = AY



### Additional NMR data acquisition and processing parameters for Figure 1 up to Figure 5:

**Fig. 1.** 1D proton spectra (8 scans), at 600 MHz ( $^1\text{H}$ ), and corresponding NMR pulse sequence of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr) dissolved in sucrose/ $\text{D}_2\text{O}$  (5:5, w/w + 10%  $\text{D}_2\text{O}$ , v/v) (a, b, c, 283 K). G1: G2 = 70: 30. The FIDs (32k points, spectral width = 6 010 Hz) were processed with LB = 0.3 Hz and zero-filled to 32k points. a, d) Non-selective excitation and detection. b, e) Selective detection of two resonance bands. The 3 ms I-BURP-2 pulses cover 1 560 Hz (dotted trapezium). The "1" and "2" labels respectively indicate their application to the high and low chemical shift regions. c, f) Selective excitation of the valine amide proton doublet of Leu-Val (dotted trapezium) using a 10 ms, 1% truncated,  $180^\circ$  Gaussian pulse.

**Fig. 2.** a) Amide proton region of band-selective detection 2D NOESY spectrum of dipeptide test mixture (10 mM), at 600 MHz ( $^1\text{H}$ ) dissolved in sucrose/ $\text{H}_2\text{O}$  (5:5, w/w + 10%  $\text{D}_2\text{O}$ , v/v), at 283 K. Data matrix was recorded in States-TPPI mode; its size was  $512 \times 4\text{k}$  with 8 scans per FID, a 1.5 s relaxation delay and a 0.5 s mixing time ( $t_m$ ), resulting in a 165.97 min recording time (expt). Shaped pulses and gradient pulses were identical to those in Figures 1b and 1e in ESI. The NOESY part of the sequence was adapted from the noesyph pulse sequence. The spectral width was 6 009.615 Hz in both dimensions. G1: G2 = 70: 30. Data matrix was multiplied in both dimensions by a shifted sine bell function (SSB = 2) before zero filling to a  $1\text{k} \times 4\text{k}$  size. b) Amide proton region of 2D NOESY spectrum of dipeptide test mixture dissolved in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1, v/v), at pH = 5,0, at 298 K. Spectrum b) was recorded and processed with the same parameters as those in 2a using the noesyegpph pulse sequence. A pair of 2 ms rectangular shaped inversion pulses was applied on the water signal resonance. The length of the water suppression gradient pulses was 1 ms and their intensity 31% for the first pair and 11% for the second pair. The red frames correspond to spectral regions of interest in which water as solvent has a major effect on the number and sign of observable NOESY cross peaks.

**Fig. 3.** Multiplet selective excitation 1D  $^1\text{H}$  NOESY spectra of the dipeptide test mixture (10 mM) dissolved in sucrose/ $\text{H}_2\text{O}$  (5:5, w/w + 10%  $\text{D}_2\text{O}$ , v/v) (a, b, c, d, 283 K),  $t_m = 0.5$  s, at 600 MHz ( $^1\text{H}$ ). e) Pulse sequence:  $\varphi_1 = x, y, -x, -y$ ,  $\psi = x, -x$ . The initial selective excitation was achieved by a 1% truncated  $180^\circ$  Gaussian pulse. G1:G2 = 70:30. WURST wideband adiabatic inversion pulses,  $\delta_2 = 1.5$  ms, starting within  $t_m$  at 0.33 and 0.83  $t_m$  with G3: G4: G5 = 40: -60: 50. Gradient pulse length was 1 ms. d = 200  $\mu\text{s}$ . Relaxation delay was 2 s. The FIDs (16k points, spectral width 6 009.615 Hz) were multiplied by an

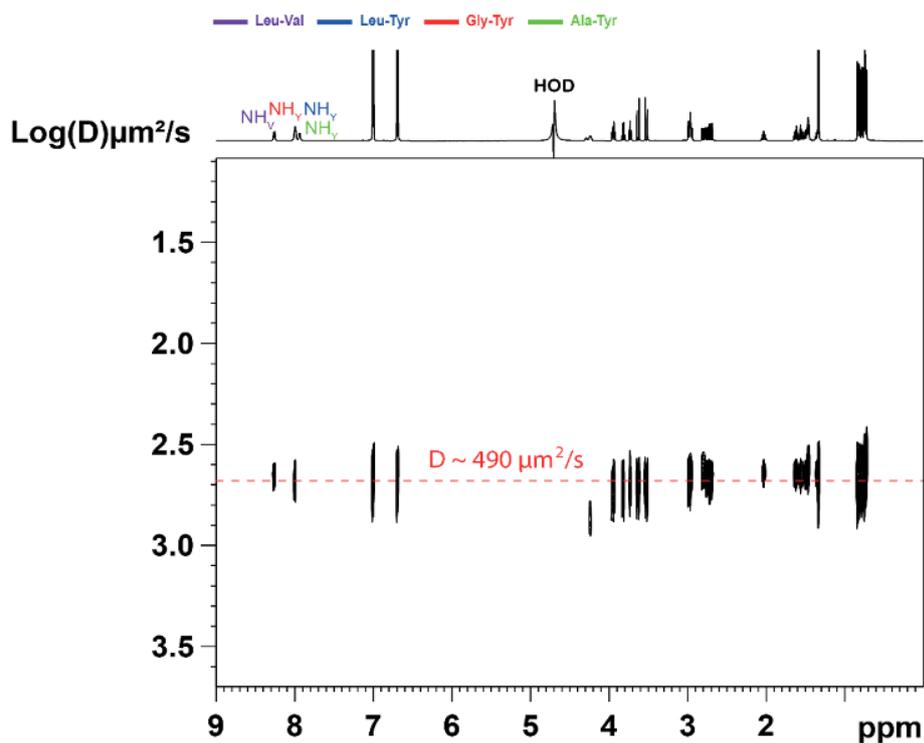
exponential function (LB = 0.3) before zero filling to 64k points. The initial selective inversion pulses excite: a) the NH<sub>v</sub>(LV) proton resonance ( $\delta_1 = 10$  ms, 2 048 scans, experiment time (expt) = 134.65 min); b) the H $\delta_L$ (LY)/H $\delta_L$ (LV)/H $\gamma_V$ (LV) proton resonances ( $\delta_1 = 5$  ms, 512 scans, expt = 33.67 min); c) the H $\delta_V$ (LY)/H $\delta_V$ (GY)/H $\delta_V$ (AY) proton resonances ( $\delta_1 = 10$  ms, 800 scans, expt = 25.32 min); d) the H $\alpha_V$ (GY) proton resonance ( $\delta_1 = 60$  ms, 4 096 scans, expt = 275.07 min).

**Fig. 4.** a) F<sub>1</sub> band selective F<sub>1</sub> decoupled 2D NOESY spectrum of the dipeptide test mixture (10 mM) dissolved in sucrose/H<sub>2</sub>O (5:5, w/w + 10% D<sub>2</sub>O, v/v), at 283 K, at 600 MHz (<sup>1</sup>H), (64 scans per t<sub>1</sub> value, expt = 222.54 min, t<sub>m</sub> = 0.5 s). b) Pulse sequence:  $\varphi_1 = x, y, -x, -y, \psi = x, -x$ . The initial selective 180° pulses ( $\delta_1 = 3$  ms) had a Gaussian shape and were applied to the four NH amide proton resonances. G1: G2 = 70: 30. The following refocusing pulse was also applied to the NH protons and was a RE-BURP ( $\delta_2 = 24$  ms). G3: G4 = 80: 23. WURST wideband adiabatic inversion pulses,  $\delta_3 = 1$  ms, start within t<sub>m</sub> at 0.33 and 0.83 t<sub>m</sub> with G5: G6: G7 = 40: -60: 50. Gradient pulse length was 1 ms. d = 200  $\mu$ s. Relaxation delay was 2 s. Data matrix was acquired in the States-TPPI mode, its size was 64  $\times$  4k. Spectral widths were 5 699.088 Hz in F2 and 312 Hz in F1. Data matrix was multiplied in both dimensions by a shifted sine bell function (SSB = 2) before zero filling to a 128  $\times$  4k size.

**Fig. 5.** a) 2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC-NOESY spectrum of the dipeptide test mixture (20 mM) dissolved in sucrose/H<sub>2</sub>O (5:5, w/w + 10% D<sub>2</sub>O, v/v), at 283 K, using the hsqcetgpnosp pulse sequence with solvent multiple presaturation, at 600 MHz (<sup>1</sup>H). Data matrix was recorded in Echo-Antiecho mode; its size was 128  $\times$  2k with 512 scans per FID, a 1.5 s relaxation delay and a 0.5 s mixing time (t<sub>m</sub>), resulting in a 2451,8 min recording time. The spectral widths were respectively 6009.615 Hz in <sup>1</sup>H dimension and 1824.63 Hz in <sup>15</sup>N dimension. Data matrix was multiplied in both dimensions by a shifted sine bell function (SSB = 2) before zero filling to a 1k  $\times$  2k size. Comparison of four <sup>1</sup>H horizontal slices extracted from the 2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC-NOESY at 123.93 (b, b', Ala-Tyr, green row), 124.49 (c, c', Gly-Tyr, red row), 126.01 (d, d', Leu-Tyr, blue row), and 126.91 ppm (e, e', Leu-Val, purple row) with the conventional 1D proton spectra of each pure dipeptide dissolved (20 mM) in sucrose/H<sub>2</sub>O (5:5, w/w + 10% D<sub>2</sub>O, v/v), at 283 K, at 600 MHz (<sup>1</sup>H).

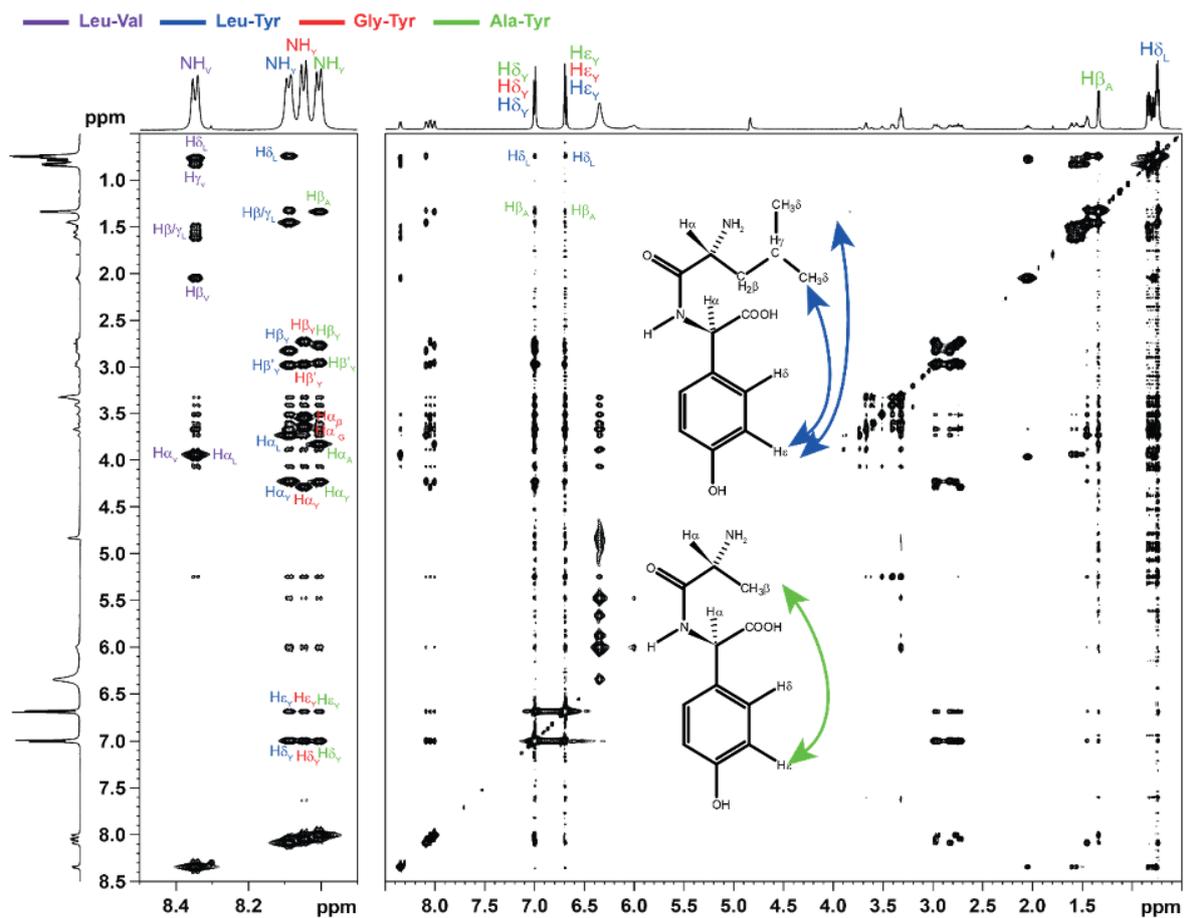
**Fig. 6.** 1D <sup>1</sup>H spectra of the dipeptide test mixture (10 mM) dissolved a) in H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9:1, v/v), at 298 K, at 600 MHz (<sup>1</sup>H) and b) in agarose gel 1%, at 273 K, at 600 MHz (<sup>1</sup>H) with water suppression using excitation sculpting.

**Fig. 7.** Multiplet selective excitation 1D  $^1\text{H}$  NOESY spectra of the dipeptide test mixture (10 mM) dissolved in agarose gel 1% (a, b, c, 273 K),  $t_m = 0.5$  s, at 600 MHz ( $^1\text{H}$ ). The initial selective inversion pulses excite: a) the  $\text{H}\beta_{\text{V}}(\text{AY})$  proton resonance ( $\delta_1 = 40$  ms, 2 800 scans, expt = 186,25 min; b) the  $\text{H}\delta_{\text{V}}(\text{LY})/\text{H}\delta_{\text{V}}(\text{GY})/\text{H}\delta_{\text{V}}(\text{AY})$  proton resonances ( $\delta_1 = 10$  ms, 1 024 scans, expt = 67,25 min); c) the  $\text{H}\delta_{\text{L}}(\text{LY})/\text{H}\delta_{\text{L}}(\text{LV})/\text{H}\gamma_{\text{V}}(\text{LV})$  proton resonances ( $\delta_1 = 5$  ms, 1 024 scans, expt = 67,08 min); Pulse sequence:  $\varphi_1 = x, y, -x, -y, \psi = x, -x$  (see Figure 3e).

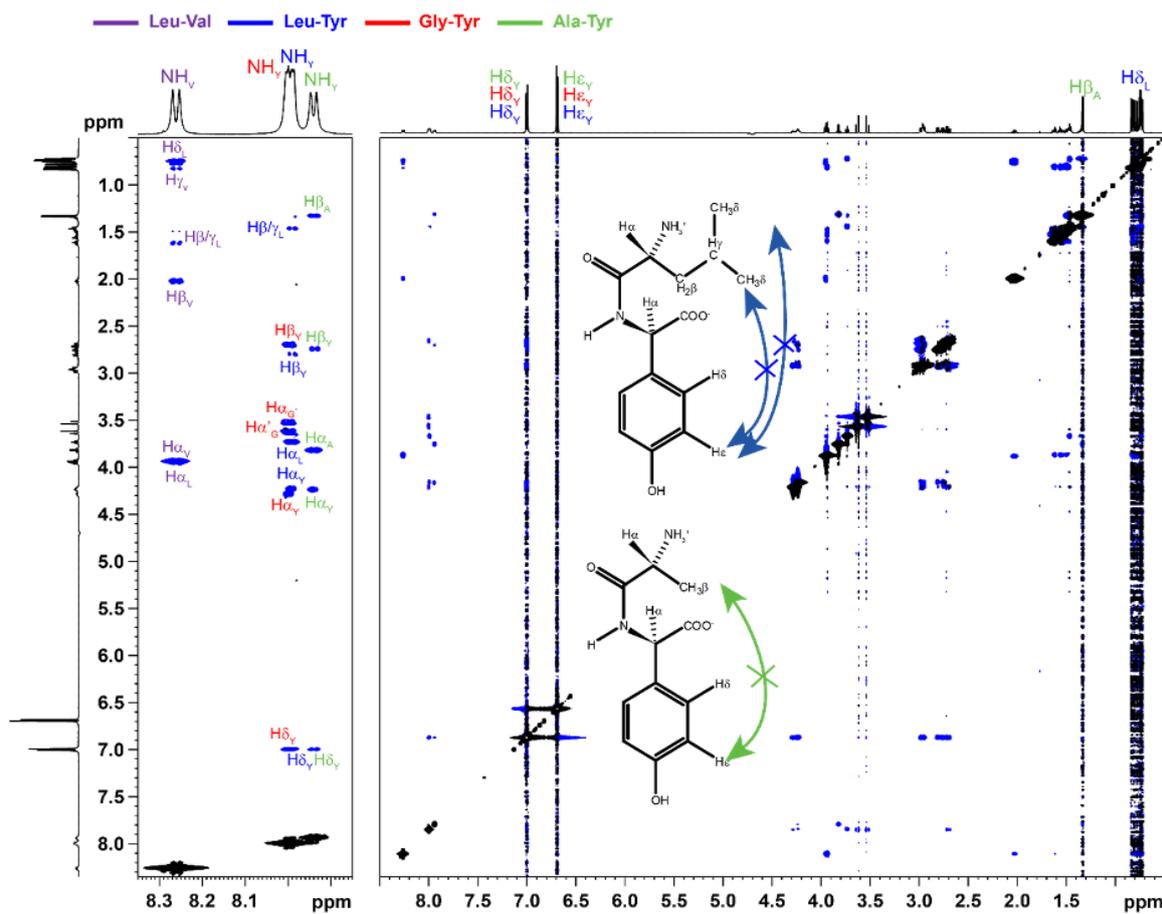


**Fig. S-1.** 2D <sup>1</sup>H DOSY spectrum of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), 10 mM, dissolved in H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9:1, v/v), at pH = 5.0, at 298 K, at 600 MHz (<sup>1</sup>H). Data were acquired by means of the stebpgp1s19 pulse sequence. The diffusion time ( $\Delta$ ) was 50 ms and the gradient pulse length ( $\delta$ ) was 1.2 ms. The size of the raw data set was 32 x 16 384, with 8 scans per FID, and a 10 s relaxation delay, resulting in a 49.78 min recording time. The gradient intensity values were equally spaced from 2% to 95%. Water suppression was achieved by a 3-9-19 pulse sequence with 1 ms gradient pulses of -20% intensity (WATERGATE). The DOSY spectrum was calculated using the Bruker TOPSPIN Software. Inverse Laplace transformation in the indirectly detected dimension was carried out by means of the MaxEnt algorithm. Log ( $D$ ) was calculated with  $D$  expressed in ( $\mu\text{m}$ )<sup>2</sup>/s.

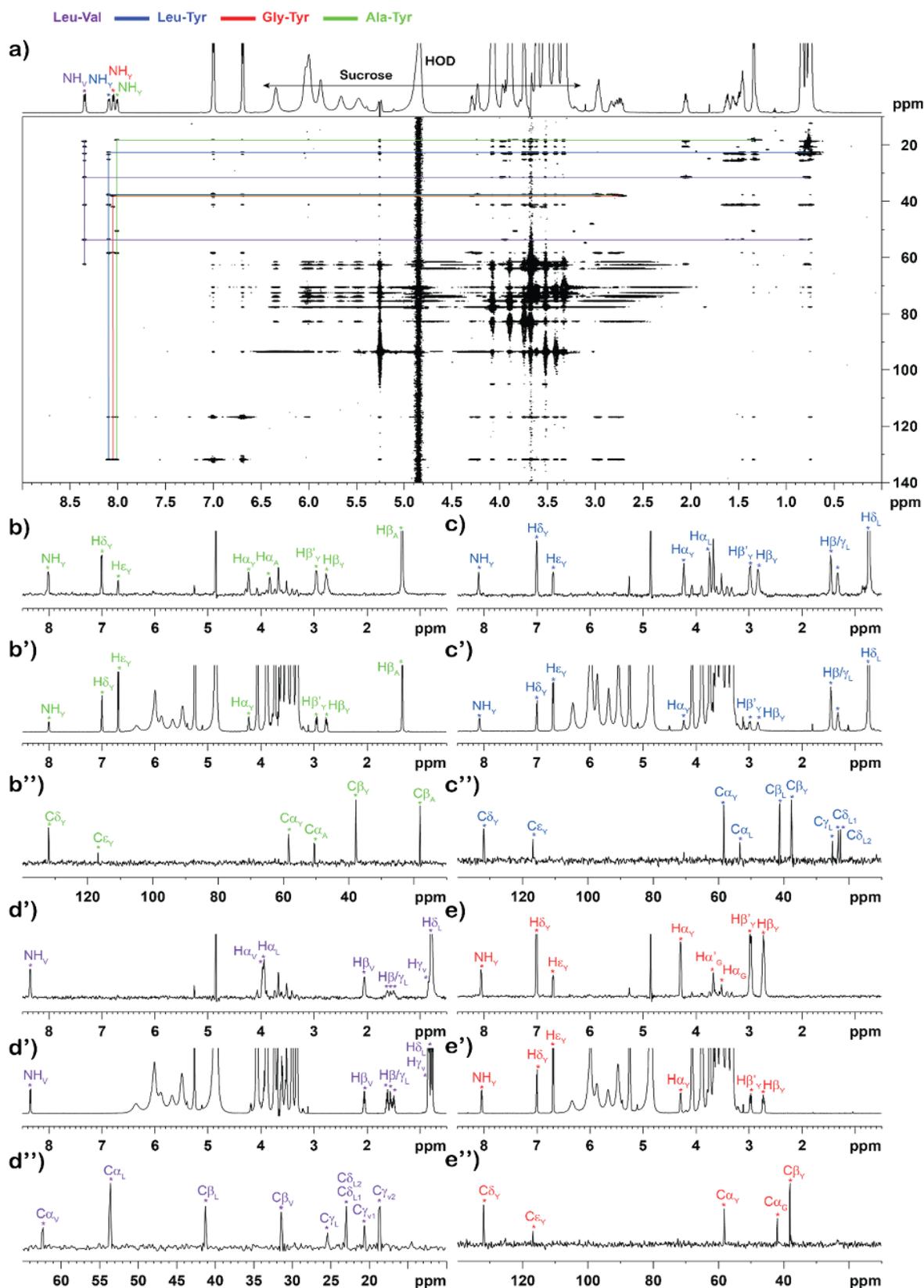




**Fig. S-3.** Band-selective detection 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY spectrum of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), 10 mM, in sucrose/ $\text{H}_2\text{O}$  (5:5, w/w + 10%  $\text{D}_2\text{O}$ , v/v), at 283 K, at 600 MHz ( $^1\text{H}$ ). See caption of Figure 2a in ESI for the NMR acquisition and processing parameters.

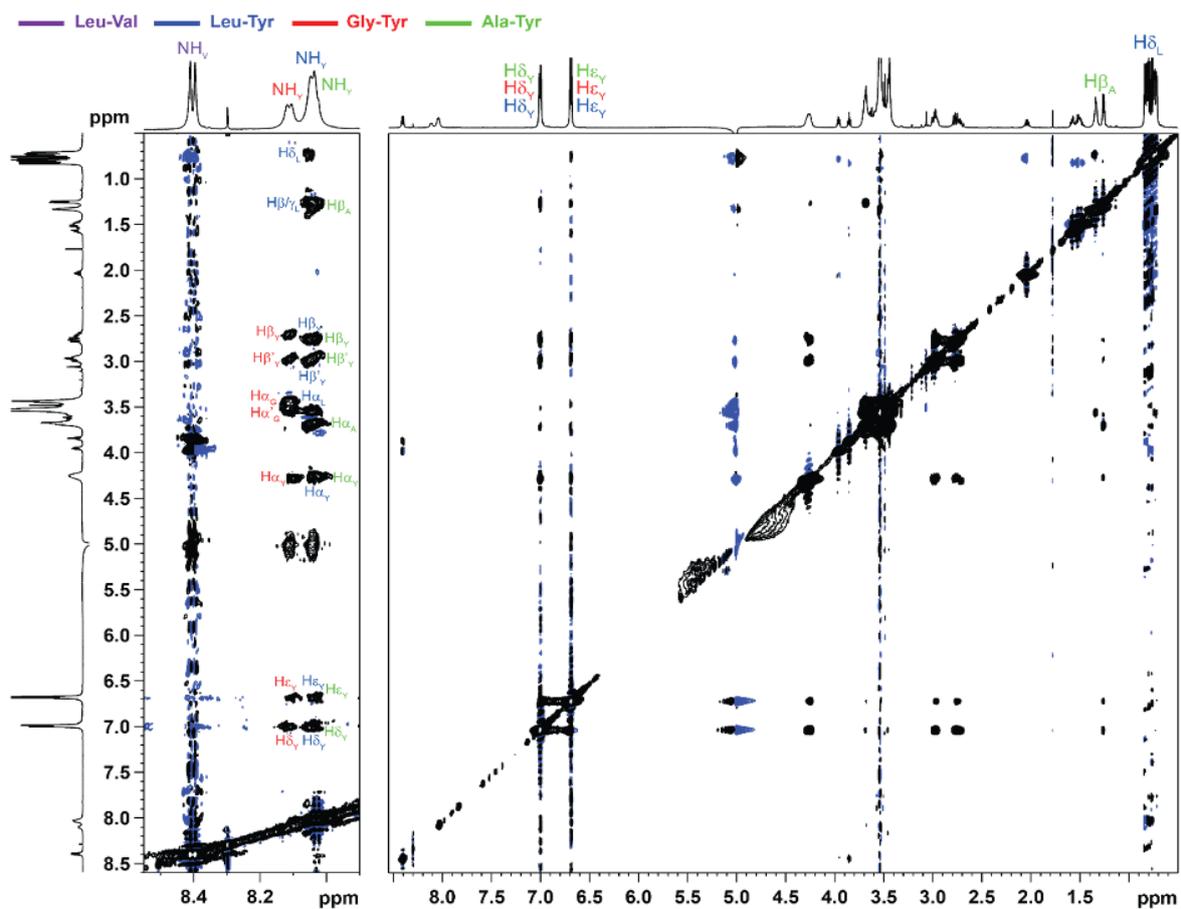


**Fig. S-4.** 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY spectrum of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), 10 mM, dissolved in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1, v/v), at pH = 5.0, at 298 K, at 600 MHz ( $^1\text{H}$ ). See caption of Figure 2b in ESI for the NMR acquisition and processing parameters.



**Fig. S-5.** a) 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-NOESY spectrum of the dipeptide test mixture (20 mM) in sucrose/ $\text{H}_2\text{O}$  (5:5, w/w + 10%  $\text{D}_2\text{O}$ , v/v), at 283 K, at 600 MHz ( $^1\text{H}$ ), using the hsqcetgpnosp pulse sequence with solvent

multiple presaturation. Data matrix was recorded in Echo-Antiecho mode; its size was  $1k \times 2k$  with 48 scans per FID, a 1.5 s relaxation delay and a 0.5 s mixing time ( $t_m$ ), resulting in a 1843.58 min recording time. The spectral widths were respectively 6 009.615 Hz in  $^1\text{H}$  dimension and 21 129.352 Hz in  $^{13}\text{C}$  dimension. Data matrix was multiplied in both dimensions by a shifted sine bell function (SSB = 2) before zero filling to a  $1k \times 2k$  size. Comparison of  $^1\text{H}$  horizontal slices extracted from the 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-NOESY at 18.14 and 38.08 ppm (b, b', Ala-Tyr, green rows (sum)), 22.64 and 37.66 ppm (c, c', Leu-Tyr, blue rows (sum)), 31.43 and 53.64 ppm (d, d', Leu-Val, purple rows (sum)) and 38.11 ppm (e, e', Gly-Tyr, red row) with the conventional 1D proton spectra of each pure dipeptide dissolved (20 mM) sucrose/ $\text{H}_2\text{O}$  (5:5, w/w + 10%  $\text{D}_2\text{O}$ , v/v), at 273 K, at 600 MHz ( $^1\text{H}$ ).  $^{13}\text{C}$  vertical slices extracted from the 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-NOESY at 8.35 ppm (d'', Leu-Val, purple column), at 8.09 ppm (c'', Leu-Tyr, blue column), at 8.05 ppm (e'', Gly-Tyr, red column), and at 8.01 ppm (a'', Ala-Tyr, green column).



**Fig. S-6.** 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY spectrum of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), 10 mM, dissolved in agarose gel 1%, at 273 K, at 600 MHz ( $^1\text{H}$ ). See caption of Figure 2b in ESI for the NMR acquisition and processing parameters.

## CHAPITRE B : “MIXTURE ANALYSIS IN VISCOUS SOLVENTS BY NMR SPIN DIFFUSION SPECTROSCOPY: *VISCY*. APPLICATION TO HIGH- AND LOW-POLARITY ORGANIC COMPOUNDS DISSOLVED IN SULFOLANE/WATER AND SULFOLANE/DMSO-*D*<sub>6</sub> BLENDS”

### 1. Introduction

Jusqu'à présent, l'analyse des composants individuels de mélanges par RMN sans aucune séparation physique a été explorée dans un nombre limité de manières. L'utilisation de solvants (ou mélanges de solvants) visqueux offre une approche analytique intéressante dans l'étude de mélanges complexes. Ces solvants abaissent la vitesse de rotation des molécules de petites et moyennes tailles en solution puisque la valeur du temps de corrélation moléculaire global  $\tau_c$  dépend de la viscosité du milieu. La relaxation croisée longitudinale favorise ainsi la diffusion de spin. En conséquence, les molécules subissent le régime négatif de l'effet Overhauser nucléaire (NOE) et leurs résonances peuvent être regroupées en fonction de leur capacité à partager l'aimantation par diffusion de spin intramoléculaire. Toutes les résonances des noyaux <sup>1</sup>H au sein de la même molécule ont tendance à corrélérer entre elles dans un spectre NOESY 2D, donnant ainsi accès aux spectres de RMN <sup>1</sup>H individuels des composants du mélange. L'idée initiale a été mise en œuvre par Williamson *et al.* en 1981<sup>43</sup> au moyen d'un polymère perfluoré utilisé comme solvant, idée qui a été réexaminée par Simpson et ses collaborateurs en 2008<sup>44</sup> ; l'utilisation d'eau en état de surfusion pour moduler la dynamique de relaxation de spin de petits métabolites a été rapportée en 2012 par la même équipe.<sup>45</sup> Notre équipe a publié des résultats originaux dans le domaine de l'analyse de mélanges par RMN à l'aide de glycérol et carbonate de glycérol en 2011,<sup>46</sup> DMSO/glycérol en 2016,<sup>47</sup> DMSO/eau en 2017,<sup>48</sup> et de solution de saccharose et d'agarose gel en 2019<sup>72</sup> comme solvants visqueux pour la création des conditions de diffusion de spin en RMN <sup>1</sup>H et <sup>19</sup>F.

Nous avons établi pour la première fois que l'utilisation du sulfolane/eau et sulfolane/DMSO-*d*<sub>6</sub> comme solvants binaires visqueux permet l'individualisation de composants respectivement de haute et basse polarités au sein de mélanges complexes, en tirant parti de la diffusion de spin en RMN. L'individualisation des composants au sein du mélange Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr et Ala-Tyr et celui composé de dicyclohexyl(4-(*N,N*-diméthylamino)phényl) phosphine, exophényl kwon [2.2.1] phosphine bicyclique, allyltriphénylphosphonium bromide et (méthoxyméthyl)triphénylphosphonium chloride, a été réalisée à 258 K et 500 MHz (<sup>1</sup>H) par des expériences NOESY 1D <sup>1</sup>H sélectives homonucléaires, NOESY 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H sélectives et par une expérience 2D <sup>1</sup>H hétéronucléaire <sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P HSQC-NOESY dans les solvants binaires sulfolane/eau et sulfolane/DMSO-*d*<sub>6</sub> respectivement.

Le choix du sulfolane en tant que solvant visqueux, et ses paramètres physico-chimiques, sont détaillés dans la partie II : Matériels et Méthodes – 1. La diffusion de spin en milieu visqueux.

## 2. Publication

# Mixture Analysis in Viscous Solvents by NMR Spin Diffusion Spectroscopy: ViscY. Application to High- and Low-Polarity Organic Compounds Dissolved in Sulfolane/Water and Sulfolane/DMSO- $d_6$ Blends

François Pedinielli, Jean-Marc Nuzillard, and Pedro Lameiras\*

Cite This: *Anal. Chem.* 2020, 92, 5191–5199

Read Online

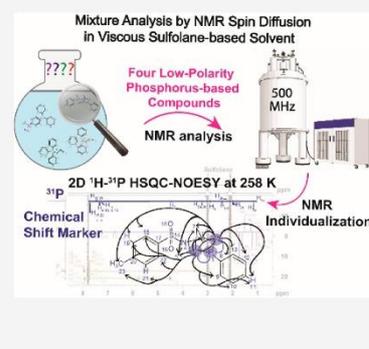
ACCESS |

Metrics &amp; More

Article Recommendations

Supporting Information

**ABSTRACT:** The sulfolane/water and sulfolane/DMSO- $d_6$  binary NMR solvents are reported for the individualization of mixture components by spin diffusion when molecular tumbling is slow due to solvent viscosity, thus strongly favoring magnetization transfer by dipolar cross-relaxation. All  $^1\text{H}$  nuclei resonances within the same molecule tend then to correlate in a 2D NOESY spectrum, opening the way to mixture analysis. Till now, analysis of organic compounds by NMR spin diffusion in viscous solvents involved  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ , and  $^{19}\text{F}$ . We offer a new way to analyze mixtures by considering  $^{31}\text{P}$  nuclei as chemical shift markers. We report the individualization of four polar dipeptides and of four nonpolar phosphorus-containing compounds respectively dissolved in sulfolane/water and sulfolane/DMSO- $d_6$  solvents blends by means of homonuclear selective 1D and 2D  $^1\text{H}$  experiments and a heteronuclear 2D  $^1\text{H}$ – $^{31}\text{P}$  HSQC-NOESY experiment by taking advantage from spin diffusion. The name ViscY is proposed to refer to the class of all NMR spectroscopy experiments that rely on viscous solvents for mixture analysis.



Over the past few years, identification of organic compounds in mixtures has become a key research subject. Cosmetics, fine chemical, and pharmaceutical companies always seek for innovative solutions for the structural characterization of organic compounds of low molecular weight in mixtures, obtained either by synthesis (products of interest or byproducts) or by extraction from natural or biotechnological resources, that are easy and cheap to implement and in conformity with current regulations. Analytical techniques for the determination of the structure of unknown organic compounds within mixtures rely often on the coupling of chromatographic and spectroscopic methods, such as high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with NMR (LC-SPE-NMR) or/and mass spectrometry (LC-MS).<sup>1</sup> When physical separation is not possible, NMR must be performed on mixtures as they are. Being able to assign each NMR peak to a specific molecule reduces the need for chromatographic separation and thus would greatly increase the efficiency of natural products and synthetic chemists.

So far, analysis of individual mixture components by NMR without any physical separation has been investigated in a limited number of means: (i) in the 2D DOSY experiment, NMR signals are labeled according to the value of the translational diffusion coefficient ( $D$ ) of each molecule in mixture.<sup>2,3</sup> However, this experiment provides only limited resolution along the  $D$  axis. NMR signals from structurally close molecules may be therefore difficult to group according

to their parent compound, even though experimental tips may enhance the resolution of the 2D DOSY experiment by addition of chromatographic phases to the sample, interaction of molecules of interest with soluble polymers or lanthanide shift reagents, and compound inclusion in micelles.<sup>4–9</sup> (ii) Multiquantum spectroscopy combined (or not) with broadband homonuclear decoupling, sparse sampling, pure shift, ultrafast data acquisition or tensor decomposition methods may be relevant for individualizing molecules in the mixture.<sup>10–14</sup> (iii) The use of viscous solvents (or solvent blends) provides an interesting analytical approach in the study of complex mixtures. These solvents reduce the tumbling rate of small- and medium-sized molecules in solution<sup>15–25</sup> since the value of the overall correlation time  $\tau_c$  is governed by the medium viscosity according to the microviscosity theory of Gierer and Wirtz.<sup>26</sup> Hence, the corresponding longitudinal cross-relaxation regime favors spin diffusion. As a result, molecules fall in the negative nuclear Overhauser effect (NOE) regime, and their resonances can be clustered depending on

Received: December 18, 2019

Accepted: March 6, 2020

Published: March 6, 2020



their capability to exchange magnetization by intramolecular spin diffusion. The 2D  $^1\text{H}$  NOESY spectrum of a mixture reveals correlations between all  $^1\text{H}$  of each analyte, therefore giving access to the individual  $^1\text{H}$  NMR spectra of the mixture components. The initial idea was implemented in 1981 by Williamson et al. with chlorotrifluoroethylene polymer (CTFEP) as a viscous solvent for the determination of the conformation of the antibiotic Echinomycin after manipulating NOEs in solution.<sup>15</sup> In 1992, Luck et al. also considered CTFEP mixed in organic solvent for extending solution structure determination to organometallic complexes and organic compounds by the benefit of large and negative NOE enhancements under viscous conditions.<sup>16</sup> In 2008, Simpson et al. first introduced the use of a highly viscous solvent such as CTFEP for organic mixture separation by means of 1D and 2D NOESY spectroscopy.<sup>19</sup> The use of supercooled water (in narrow capillaries) was reported in 2012 by the same team for mixture individualization of small metabolites.<sup>21</sup> Our team published original results in the field of mixture analysis by NMR through the use of glycerol and glycerol carbonate (in 2011), DMSO/glycerol (in 2016), DMSO/water (in 2017), and sucrose solution and agarose gel (in 2019) as viscous solvents for the creation of spin diffusion conditions in  $^1\text{H}$  and  $^{19}\text{F}$  NMR.<sup>20,22–25</sup> Henceforth, we propose the name ViscY (the second syllable is pronounced like that in “whisky”) for referring to all NMR methods in which viscous solvents or solvent blends promote the individualization of mixture components by NMR spin diffusion spectroscopy.

To date, only a few viscous solvents have been described in the literature for the study of high- and low-polarity compounds within mixtures. In this context, the present work focuses on the assessment of two viscous sulfolane-based solvent blends, namely sulfolane/water and sulfolane/DMSO- $d_6$ , in the individual NMR characterization of four highly polar, structurally close dipeptides: Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr, and Ala-Tyr and of four lowly polar phosphorus-containing compounds by spin diffusion in homonuclear selective 1D  $^1\text{H}$  NOESY, selective 2D  $^1\text{H}$  NOESY experiments, and a heteronuclear 2D  $^1\text{H}$ – $^{31}\text{P}$  HSQC-NOESY.

Sulfolane is a cheap, colorless, nonreactive dipolar aprotic solvent with high chemical and thermal stability and unusual solvent properties. It is made of globular molecules and presents a moderately high dielectric constant ( $\epsilon = 43.4$  at 300 K)<sup>27</sup> and a high dipole moment ( $\mu = 4.80$  D).<sup>28</sup> Sulfolane is completely miscible with water and other polar and aromatic organic solvents. First produced and patented in the 1940s, it has been used in a wide variety of industrial production processes for aromatic solvent extraction, petroleum production, and refining.<sup>29</sup> It is also employed in polymer technology as a solvent, plasticizer, and synthesis medium. It is a solvent of choice for acid-catalyzed reactions at high temperatures such as Friedel–Crafts acylations and Bischler–Napieralski condensations. It has also been used as a solvent for oxidations, nitrations, chemical rearrangements, phosphonylations, and condensation reactions.<sup>30</sup> Although sulfolane presents a higher melting point (300.5 K) than water (273 K) and DMSO- $d_6$  (292 K), its melting point can be drastically lowered by addition of water or DMSO- $d_6$ .<sup>31</sup> For instance, melting points of the sulfolane/water and sulfolane/DMSO- $d_6$  solvent blends respectively reach 256 and 238 K after adding 50% of water and 30% of DMSO- $d_6$  by volume. This observation opens a way to work at or below room temperature, which is especially

appropriate for thermally unstable compounds. Spin diffusion may therefore take place on a wide range of temperatures, from room to subzero temperatures due to the viscosity increase of both solvent blends upon temperature lowering.<sup>32</sup> Nevertheless, the viscosity of the sulfolane-based solvents at room temperature remains sufficiently low, even if pure sulfolane reveals a higher viscosity ( $\eta = 10.29$  cP at 303 K)<sup>33</sup> than the ones of water ( $\eta = 0.898$  cP at 298 K) and of DMSO- $d_6$  ( $\eta = 2.007$  cP at 298 K),<sup>34</sup> so that samples are prepared and moved into the NMR tube without any difficulty, in opposition to highly viscous solvents such as glycerol ( $\eta = 934$  cP at 298 K) and glycerol carbonate ( $\eta = 85.4$  cP at 298 K).<sup>35</sup> Nonetheless, the major experimental drawback of considering these sulfolane-based solvent blends lies in the strong  $^1\text{H}$  NMR signals of nondeuterated sulfolane and water that force their suppression. This is easily managed via selective excitation and detection pulses involved in a double pulsed field gradient spin echo (DPFGSE) sequence.<sup>36</sup> In addition, the high amount of added DMSO- $d_6$  (compared to 10% of  $\text{D}_2\text{O}$  in volume in sulfolane/ $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  solvent blend) facilitates the use of spectrometer tools such as automatic field-locking and shimming, like for any other usual NMR solvent.

Due to the dielectric constant of water which is higher than that of DMSO- $d_6$ ,<sup>37</sup> the sulfolane/water solvent blend is more appropriate for the study of high-polarity compounds whereas the viscous sulfolane/DMSO- $d_6$  binary solvent is more adapted to the investigation of compounds of low-polarity. Midsized polar and lowly polar molecules necessitate a low amount of water or DMSO- $d_6$  in sulfolane, whereas smaller or more flexible molecules require more water or DMSO- $d_6$  for driving spin diffusion under temperature control from room temperature to subzero temperatures.

The choice of an optimal operating temperature results from a compromise between overall spectral resolution and intensity of NOE cross-peaks between protons that are not nearby enough to reveal a NOE signal in a low-viscosity medium. A temperature decrease favors spin diffusion but alters peak height through line widening due to a more active transverse relaxation. Sample cooling is thus needed if the NOESY spectrum presents positive NOE correlations (diagonal and off-diagonal cross-peaks of opposite signs). In accordance with the complexity of the mixtures, the analysis of  $^1\text{H}$  NMR spectra may turn out to be impossible because of the  $^1\text{H}$  resonance overlying. A conventional alternative solution consists in the spreading of the spectroscopic information along an indirect dimension that encodes chemical shifts of nuclei other than  $^1\text{H}$ .<sup>22–24</sup> This approach to mixture analysis is exemplified in the sulfolane/DMSO- $d_6$  solvent blend by means of the 2D  $^1\text{H}$ – $^{31}\text{P}$  HSQC-NOESY experiment providing  $^1\text{H}/^{31}\text{P}$  chemical shift lists for the mixture of low polarity compounds.

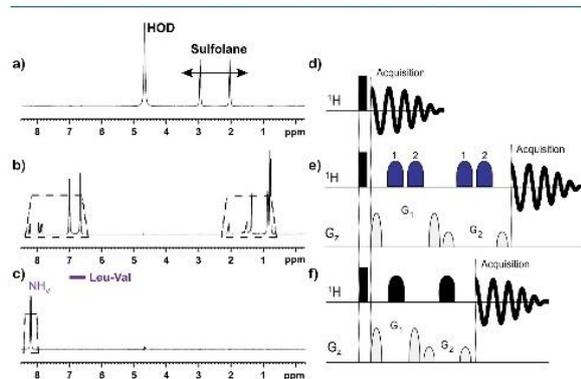
## EXPERIMENTAL SECTION

**Chemical Reagents.** DMSO- $d_6$  and  $\text{D}_2\text{O}$  were bought from Eurisotop (Gif-sur-Yvette, France). Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr, and Ala-Tyr were bought from TCI Europe (Zwijndrecht, Belgium). Sulfolane, dicyclohexyl(4-(*N,N*-dimethylamino)phenyl)phosphine, and exophenyl Kwon [2.2.1] bicyclic phosphine were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Allyltriphenylphosphonium bromide and (methoxymethyl)triphenylphosphonium chloride were purchased from Acros Organics (Geel, Belgium). All peptides and phosphorus-based compounds had 95% or higher

purity and were dissolved at a concentration of 20 mM, respectively, in sulfolane/H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (5:4:1 v/v/v) and in sulfolane/DMSO-*d*<sub>6</sub> (7:3 v/v).

**NMR Spectroscopy.** The NMR experiments on the dipeptide and phosphorus-based compound test mixtures were performed on a Bruker AVIII500 NMR spectrometer equipped with a 5 mm BBFO+ probe using the TOPSPIN software (Rheinstetten, Germany). Gradient pulses (maximum 0.535 Tm<sup>-1</sup>) were generated by a 10 A amplifier. Temperature was controlled by a Bruker variable temperature (BVT) unit supplied with chilled air produced by a Bruker cooling unit.

Each dipeptide mixture spectrum was calibrated so that the tyrosine H $\alpha$  proton resonances were observed at  $\delta$  7.00. Additional NMR data acquisition and processing parameters for Figures 1–4 and 6–8 are described in the Supporting Information.



**Figure 1.** 1D proton spectra and corresponding NMR pulse sequence of Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr, and Ala-Tyr (20 mM) dissolved in sulfolane/H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (5:4:1 v/v/v), at 258 K, at 500 MHz (<sup>1</sup>H). (a, d) Nonselective excitation and detection. (b, e) Selective detection of two resonance bands. The 4 ms I-BURP-2 pulses cover 1250 Hz (dotted trapezium). The “1” and “2” labels respectively mention their application to the high and low-field regions. (c, f) Selective excitation of the valine amide proton doublet of Leu-Val (dotted trapezium) using a 30 ms, 1% truncated, 180° Gaussian pulse.

## RESULTS AND DISCUSSION

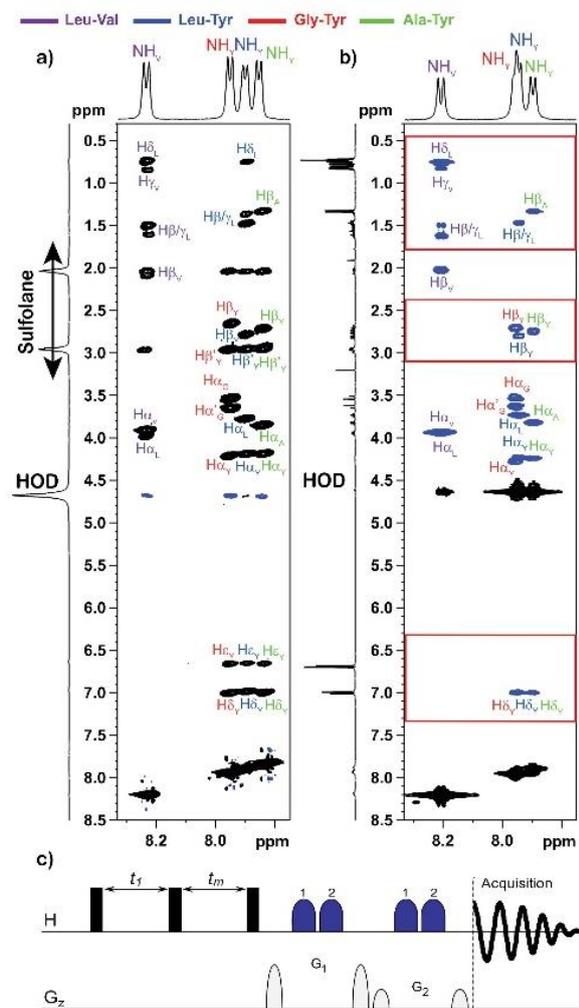
**Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr, and Ala-Tyr Mixture in Sulfolane/H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (5:4:1 v/v/v).** These four dipeptides do not present any differentiation in the DOSY spectrum when dissolved in pure water because of their comparable molecular weight and shape (Figure S1). The use of viscous solvents such as sulfolane/water has opened the way to other strategies than DOSY, namely ViscY, relying on homo- and heteronuclear NOESY-based spin diffusion experiments for mixture analysis. The main experimental pitfall of our analytical approach is the obligatory suppression of the intense <sup>1</sup>H signals of sulfolane and water (Figure 1a) for avoiding drastically obscure analyte signals, since deuterated sulfolane would be too costly to synthesize and full deuterated water would result in the chemical exchange between the deuterium nuclei of the water and the NH protons of the dipeptides. The elimination of solvent signals was obtained by using selective pulses when involved in a DPFGE pulse sequence (Figure 1b,e, and c,f).<sup>36</sup> The selective pulses invert the equilibrium magnetization of the dipeptide nuclei and leave untouched the one of the sulfolane and water nuclei. For this aim, resonance inversion in

the two frequency bands on either side of the sulfolane signals was successfully achieved via two successive band-selective pulses. The spectrum in Figure 1b demonstrates the efficiency of solvent suppression that was obtained by band-selective detection (see Figure 1e). All solute signals in the solvent frequency band are eliminated as well. Nevertheless, this is not an issue for the band-selective 2D NOESY experiment, provided that at least one resonance per analyte is preserved. This resonance can correlate with all others along the *F*<sub>1</sub> axis, including those located in the solvent spectral region by taking advantage of spin diffusion.

Since the operating temperature is a crucial parameter in spin diffusion experiments due to its direct influence on solvent viscosity and as a result on overall rotational correlation times  $\tau_C$ ,<sup>19,20,26</sup> we have searched for the optimized temperature at which NOE cross-peaks were positive (negative NOE enhancements, slow motion regime, see Figure S2f), well-resolved, and as strong as possible between protons that were not expected to be nearby enough to present a NOE in a low-viscous medium. The optimal temperature of 258 K has been determined via band-selective detection NOESY experiments (see Figure 2a, Figures S2a–e: amide proton region NOESY spectra at 298, 288, 278, 268, and 258 K and S3: full NOESY spectrum at 258 K in the Supporting Information). The use of viscous sulfolane/water solvent mixture clearly allows complete intramolecular magnetization exchange by spin diffusion, detected over distances of >14 Å within all small and flexible dipeptides. On the contrary, the NOESY spectrum acquired in water at 298 K reveals fewer NOE cross-peaks, all of reverse sign (positive NOE enhancements, fast motion regime, see Figure 2b, full NOESY spectrum in Figure S4). As a result, the grouping of proton resonances is possible under ViscY conditions, making the individualization of the mixture constituents possible since the chemical shift pattern of each dipeptide is expectable. The individualization of each dipeptide in water would have required the associated use of NOESY and TOCSY (and COSY) experiments, depending on the well-established resonance assignment method.<sup>38</sup>

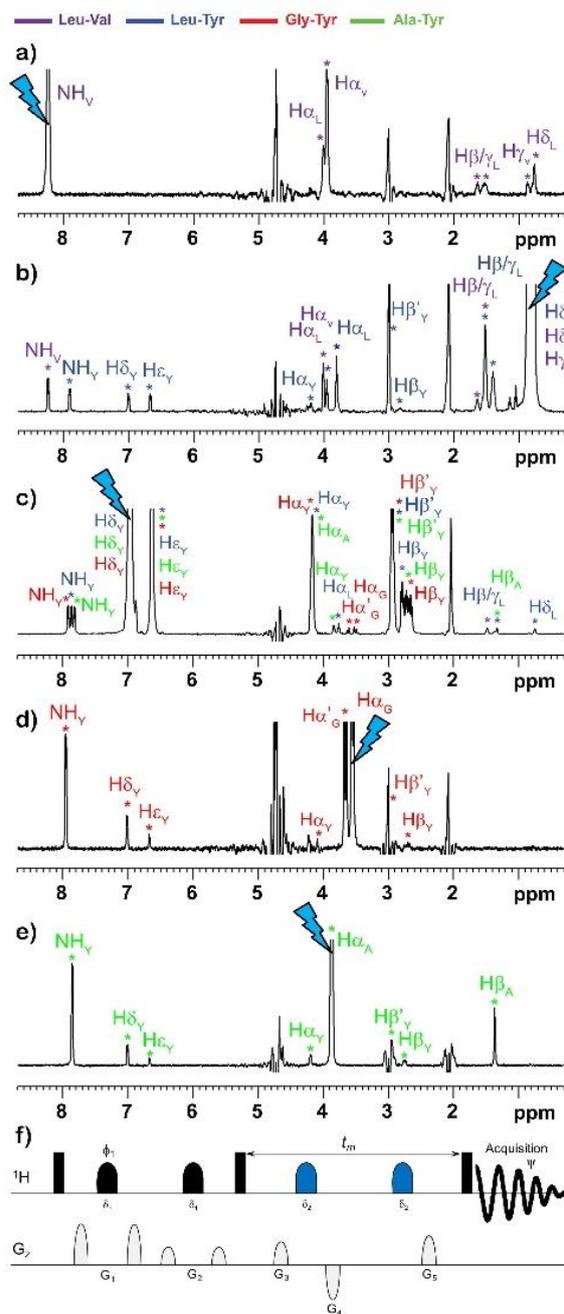
In band-selective detection 2D NOESY spectra, H $\alpha$  and H $\beta$  proton resonances are only detected in *F*<sub>1</sub> because they are suppressed in *F*<sub>2</sub> owing to their proximity with solvent signals. Therefore, it seemed pertinent to record additional structural information on mixture constituents by observing these H $\alpha$  and H $\beta$  resonances in *F*<sub>2</sub> during signal acquisition. For this purpose, an appropriate set of resolved proton resonances was selectively excited by means of 1D selective-NOESY experiments which are constituted of a double pulse field gradient block for the multiplet selective excitation of the resonance of interest followed by a mixing period (Figure 3f). The latter includes two wideband adiabatic inversion pulses framed by gradient pulses in order to avoid the resurgence of strong sulfolane and water signals during the mixing time that arise from longitudinal relaxation.<sup>36,39</sup> This analytical approach involving the detection of only resonances of interest may become relevant in case of intense proton resonance overlying particularly for complex mixtures.

Figure 3 clearly demonstrates that each dipeptide is distinguished through spin diffusion in sulfolane/water blend via a suitable set of selectively excited proton resonances. Indeed, the selective excitation of the NH amide proton at  $\delta$  8.23 leads to a magnetization transfer solely with the protons of the Leu-Val dipeptide because the tyrosine H $\delta$ /H $\epsilon$  proton resonances do not exist in the 1D NOESY spectrum (Figure



**Figure 2.** (a) Amide proton region of band-selective detection 2D NOESY spectrum of Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr, and Ala-Tyr (20 mM) dissolved in sulfolane/H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (5:4:1 v/v/v), mixing time ( $t_m$ ) = 1 s, at 258 K, at 500 MHz (<sup>1</sup>H), using the pulse sequence in part (c). (b) Amide proton region of 2D NOESY spectrum of Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr, and Ala-Tyr (20 mM) dissolved in H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9:1 v/v),  $t_m$  = 1 s, at 298 K, at 500 MHz (<sup>1</sup>H), using the noesyegpph pulse sequence. The red frames point out spectral regions in which water has a major influence on the number and sign of NOE cross-peaks.

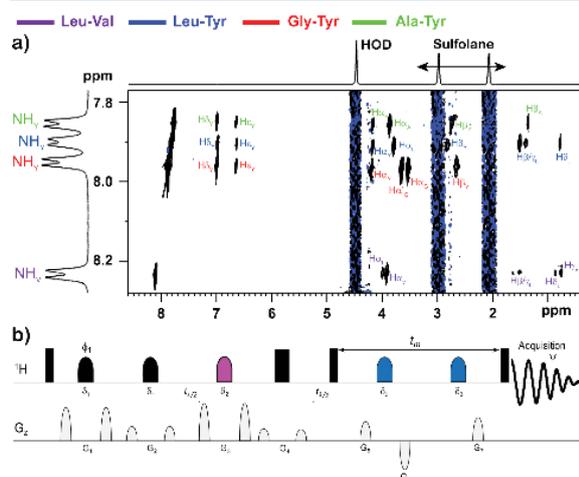
3a). The selective excitation of the side chain H $\delta$  and H $\gamma$  protons (between 0.72 and 0.90 ppm) reveals a magnetization transfer with all protons of the two Leu-Val and Leu-Tyr dipeptides (Figure 3b). As compared to both 1D NOESY spectra in Figure 3a,b, an entire proton assignment of Leu-Tyr is produced. The selective excitation of the aromatic H $\delta$ /H $\epsilon$  protons of Leu-Tyr, Gly-Tyr, and Ala-Tyr at 7.00 ppm shows all the proton resonances of Leu-Tyr, Gly-Tyr, and Ala-Tyr (Figure 3c). In order to differentiate all proton resonances from Gly-Tyr and Ala-Tyr, one of the H $\alpha$  protons at  $\delta$  3.53 has been selectively excited (Figure 3d). Figure 3d obviously reveals the exchange of the glycine H $\alpha$  magnetization over all protons of Leu-Tyr because of the absence of the side chain proton (H $\beta_N$ / $\beta_L$ / $\gamma_L$ / $\delta_L$ ) resonances of Leu-Tyr and Ala-Tyr.



**Figure 3.** Multiplet selective excitation 1D <sup>1</sup>H NOESY spectra of Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr, and Ala-Tyr (20 mM) dissolved in sulfolane/H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (5:4:1 v/v/v) (a, b, c, d, and e),  $t_m$  = 1 s, at 258 K, at 500 MHz (<sup>1</sup>H). The initial selective inversion pulses excite: (a) NH<sub>v</sub>(LV), (b) H $\delta_L$ (LY)/H $\delta_L$ (LV)/H $\gamma_V$ (LV), (c) H $\delta_V$ (LY)/H $\delta_V$ (GY)/H $\delta_V$ (AY), (d) H $\alpha_G$ (GY), and (e) H $\alpha_A$ (AY) proton resonances. (f) Pulse sequence:  $\varphi_1 = x, y, -x, -y, \psi = x, -x$ .

Another way to distinguish Gly-Tyr from Ala-Tyr has been to selectively excite the H $\alpha_A$  resonance at 3.86 ppm, which unveils a magnetization transfer exclusively with all Ala-Tyr protons (Figure 3e).

A faster experimental strategy than the recording of five appropriate selective 1D NOESY spectra was to focus on the close NH amide resonances and to resort to a  $F_1$  band selective  $F_1$  decoupled 2D NOESY experiment<sup>40,41</sup> since they appear in the same frequency band and they do not arise from nuclei that are scalar coupled (see Figure 4). Only the amide protons

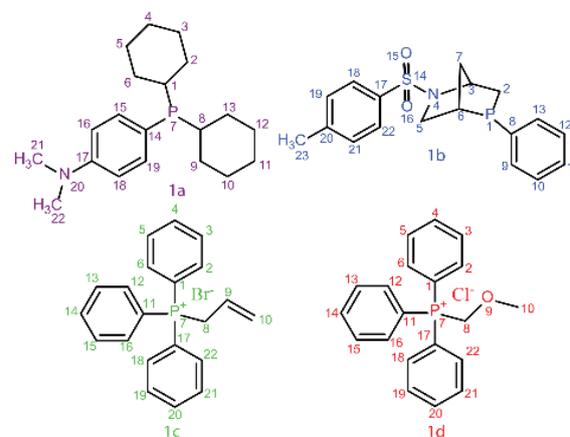


**Figure 4.** (a)  $F_1$  band selective  $F_1$  decoupled 2D NOESY spectrum of Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr, and Ala-Tyr (20 mM) dissolved in sulfolane/ $H_2O/D_2O$  (5:4:1 v/v/v),  $t_m = 1$  s, at 258 K, at 500 MHz ( $^1H$ ), (b) pulse sequence:  $\phi I = x, y, -x, -y, \psi = x, -x$ . The initial selective  $180^\circ$  pulses ( $\delta_1 = 4$  ms) had a Gaussian shape and were applied to the four NH amide proton resonances.

provided the transverse magnetization after the initial band selective excitation step. Afterward, the doublet amide proton signal of each dipeptide was collapsed into a singlet of higher intensity by means of a selective echo followed by a nonselective echo in the middle of  $t_1$ , both framed by gradient pulses. The mixing time block, including wideband inversion pulses for thwarting the reintroduction of sulfolane and water signals, let spin diffusion spread along the proton network of each molecule. As a result, carrying out this NOESY experiment in sulfolane/water solvent blend makes it possible to assign almost all proton resonances of Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr, and Ala-Tyr (except Tyr  $H\beta'$  resonances hidden by sulfolane signals) by taking advantage from spin diffusion under viscous conditions.

**Dicyclohexyl(4-(*N,N*-dimethylamino)phenyl) Phosphine, Exophenyl Kwon [2.2.1] Bicyclic Phosphine, Allyltriphenylphosphonium Bromide and (Methoxymethyl)triphenylphosphonium Chloride Mixture in Sulfolane/ $DMSO-d_6$  (7:3 v/v).** The simplification of mixture analysis by means of heteronuclear chemical shift resonance labeling has been extended to  $^{31}P$  NMR spectroscopy. Phosphorus is a chemical element that is present in many chemical synthesis intermediates and biological molecules of interest. It has a natural abundance of 100% and reveals moderate relaxation times that provide sharp lines.<sup>42</sup> The broad range of  $^{31}P$  chemical shift covers about 2000 ppm and is thus 1 order of magnitude larger than that of carbon and 2 orders of magnitude larger than that of proton, what should facilitate the individualization of phosphorus-containing molecules within mixtures.<sup>43</sup> In 2017, we reported that  $^{19}F$  nuclei, similarly to  $^1H$  nuclei, participated in spin diffusion

along the molecular spin network of a difluorinated compound in the viscous  $DMSO-d_6/H_2O$  solvent, at 238 K and 500 MHz ( $^1H$ ).<sup>23</sup> However, unlike  $^{19}F$  nucleus which has a magnetogyric ratio close to the one of  $^1H$ , the  $^{31}P$  nucleus reveals positive HOE (heteronuclear NOE) that tends toward zero in the spin diffusion limit.<sup>44</sup> As a result, phosphorus-based compounds will never produce negative HOE when long molecular overall correlation times are observed. A remedy to this experimental issue is to consider  $^{31}P$  nuclei as chemical shift markers and to induce magnetization transfer along the intramolecular proton network by means of the 2D  $^1H-^{31}P$  HSQC-NOESY experiment. The same approach, with  $^{13}C$  nuclei involved, was first demonstrated relevant to separate mixture components in highly viscous solvents by Simpson et al. in 2008.<sup>19</sup> Hereby, we describe a promising approach in the individualization of four mixed phosphorus-based compounds (Figure 5)



**Figure 5.** Chemical structures of the four phosphorus-containing compounds within a mixture, 1a: dicyclohexyl (4-(*N,N*-dimethylamino)phenyl) phosphine; 1b: exophenyl Kwon [2.2.1] bicyclic phosphine; 1c: allyltriphenylphosphonium bromide; and 1d: (methoxymethyl)triphenylphosphonium chloride.

dissolved in sulfolane/ $DMSO-d_6$  (7:3 v/v) solvent blend under spin diffusion conditions by means of homonuclear selective 1D NOESY, selective 2D NOESY experiments, and a heteronuclear 2D HSQC-NOESY experiment.

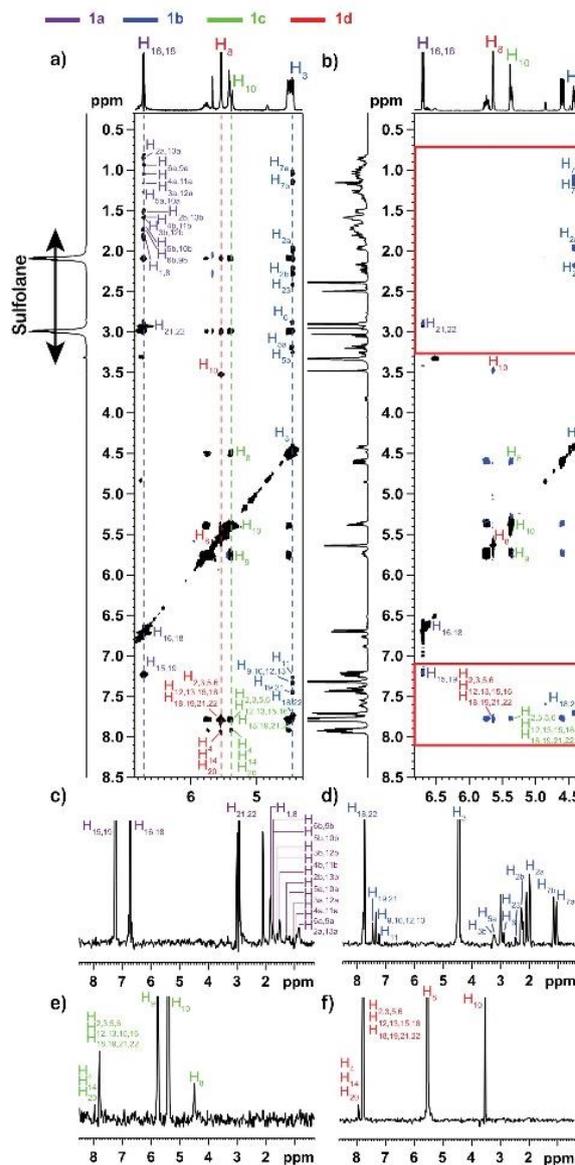
As for the dipeptide test mixture dissolved in water, the four mixed phosphorus-containing compounds do not reveal any differentiation by translational diffusion in pure  $DMSO-d_6$ , due to their similar molecular mass (Figure S5). This observation prompted us to examine this mixture dissolved in a sulfolane-based solvent blend compatible with low polarity molecules such as the sulfolane/ $DMSO-d_6$  binary solvent. The resolving power of NOESY-based spin diffusion experiments should allow us to individualize each mixture component. Once again, the main experimental drawback in considering nonperdeuterated sulfolane solvent was the mandatory suppression of its strong  $^1H$  signals (see the conventional 1D  $^1H$  spectrum in Figure S6a). The elimination of these signals was also achieved by selective pulses involved in an excitation sculpting block (Figures S6b,c).<sup>36</sup>

The impact of temperature on intramolecular spin diffusion has been discussed in the previous section. Similarly, we have determined the temperature that offers the best compromise between efficient  $^1H$  spin diffusion and relevant  $^1H$  and  $^{31}P$

spectral resolution by means of band-selective detection 2D  $^1\text{H}$  NOESY at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) and  $^1\text{H}$ -decoupled  $^{31}\text{P}$  experiments at 298, 288, 278, 268, 258, and 248 K, at 202.46 MHz ( $^{31}\text{P}$ ). Positive NOE enhancements (negative NOE cross-peaks, fast motion regime) are still observed at 278 K (Figure S7). Spin diffusion starts to be active at 268 K for all molecules. A complete magnetization transfer along the proton network of each compound is clearly visible at 248 K. However, compound 1a reveals too much active  $T_2$  transverse relaxation, responsible for  $^{31}\text{P}$  resonance line broadening (Figure S10). Consequently, the optimized temperature of 258 K has been retained for further studies because it offered efficient  $^1\text{H}$  spin diffusion (negative NOE enhancements, positive NOE cross-peaks, and slow motion regime) and suitable  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$  spectral resolution.

The band-selective detection 2D NOESY spectrum at 258 K clearly revealed four positive NOE cross-peak patterns, each corresponding to a single mixture component (see Figure 6 and full NOESY spectrum in Figure S8). The pattern identification of 1a is guided by the distinctive aromatic protons  $\text{H}_{16,18}$  at 6.72 ppm (see Figure 6c for individual 1D  $^1\text{H}$  spectrum of 1a vertically extracted from 2D NOESY). The pattern of 1b is distinguished by means of the tropic ring  $\text{H}_3$  at 4.45 ppm (individual 1D  $^1\text{H}$  spectrum of 1b in Figure 6d). The proton  $\text{H}_{10}$  at 5.40 ppm makes it possible to distinguish the proton pattern of 1c (individual 1D  $^1\text{H}$  spectrum of 1c in Figure 6e). The proton resonance  $\text{H}_8$  at 5.54 ppm is a relevant starting point for identifying the complete resonance pattern of 1d (individual 1D  $^1\text{H}$  spectrum of 1d in Figure 6f). We have clearly observed that the sulfolane/DMSO- $d_6$  solvent allows a complete intramolecular magnetization transfer by spin diffusion, detected over distances greater than 13 Å within each phosphorus-containing compound, in part because of the stiffness of the cycloalkyl and aromatic moieties. In contrast, when the conventional 2D NOESY spectrum is recorded in neat DMSO- $d_6$  at 298 K, the four mixed phosphorus-based molecules rapidly reorient and present a positive NOE regime thus preventing spin diffusion to be observed (Figure 6b and full NOESY spectrum in Figure S9).

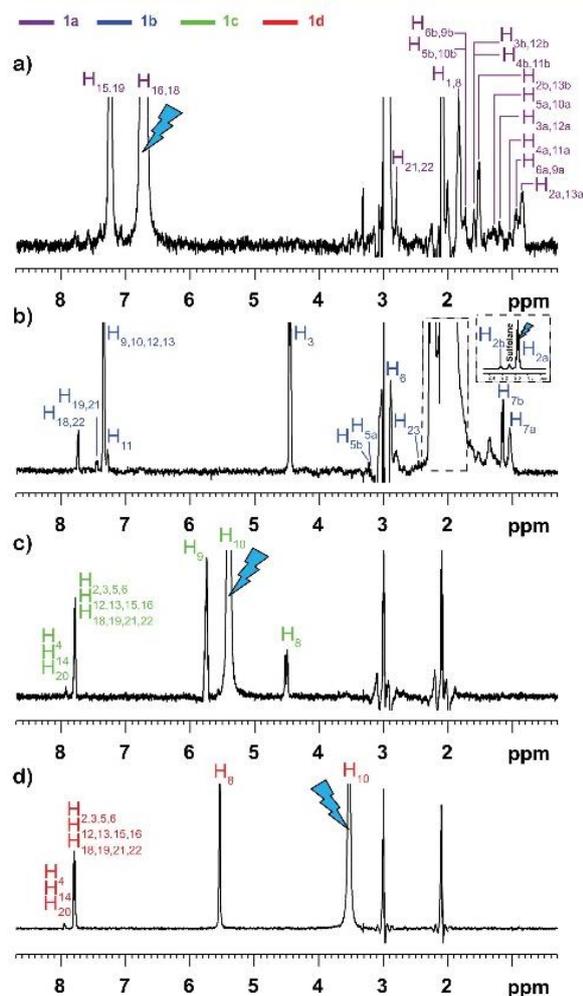
Due to resonance peaks overlapping in the 1D and 2D spectra of the four mixed phosphorus-containing compounds, it was quite challenging to unambiguously assign each proton resonance to a specific molecule within their mixture. The multiplet selective excitation 1D NOESY experiment, previously described in this work for the dipeptide test mixture, should address this issue by grouping proton resonances belonging to the same compound. The main experimental pitfall regarding the reintroduction of strong  $^1\text{H}$  nonperdeuterated sulfolane signals during the mixing time of the NOESY block is still treated by means of wideband pulses framed by gradient pulses.<sup>36</sup> Choosing an suitable set of selectively excited proton resonances allows one to obtain the individual 1D  $^1\text{H}$  spectrum of each mixed molecule in the viscous sulfolane/DMSO- $d_6$  (7:3 v/v) binary solvent by taking profit from spin diffusion. Figure 7 shows the selective excitation 1D NOESY spectrum of each mixed phosphorus-based compound. In particular, the individualization of 1a is carried out by the selective excitation of the aromatic protons  $\text{H}_{16,18}$  at 6.72 ppm (Figure 7a). All proton resonances of 1b are observed by means of the selective excitation of the tropic ring proton  $\text{H}_{24}$  at 1.96 ppm. Interestingly, spin diffusion is able to connect signals from the two aromatic moieties of 1b (Figure 7b). Selective excitations of the ethylene protons  $\text{H}_{10}$  at 5.40



**Figure 6.** (a) Low-field proton region of the band-selective detection 2D NOESY spectrum of the phosphorus-based compound test mixture (20 mM) dissolved in sulfolane/DMSO- $d_6$  (7:3 v/v),  $t_m = 1$  s, at 258 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ).  $^1\text{H}$  vertical slices extracted from the 2D  $^1\text{H}$  NOESY at 6.72 ppm (c,  $\text{H}_{16,18}$ (1a), purple dotted line), at 4.45 ppm (d,  $\text{H}_3$ (1b), blue dotted line), at 5.40 ppm (e,  $\text{H}_{10}$ (1c), green dotted line), and at 5.54 ppm (f,  $\text{H}_8$ (1d), red dotted line). (b) Low-field proton region of the 2D NOESY spectrum of the same phosphorus-based compound test mixture dissolved in neat DMSO- $d_6$ ,  $t_m = 1$  s, at 298 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). The red frames correspond to spectral regions of interest in which DMSO- $d_6$  has a major influence on the number and sign of observable NOE cross-peaks.

ppm and the methyl group  $\text{H}_{10}$  at 3.53 ppm make it possible respectively to group together all proton resonances of 1c and 1d (Figure 7c,d).

The multiplet selective excitation 1D  $^1\text{H}$  NOESY experiment has demonstrated that grouping proton resonances belonging to the same compound within a mixture, thus

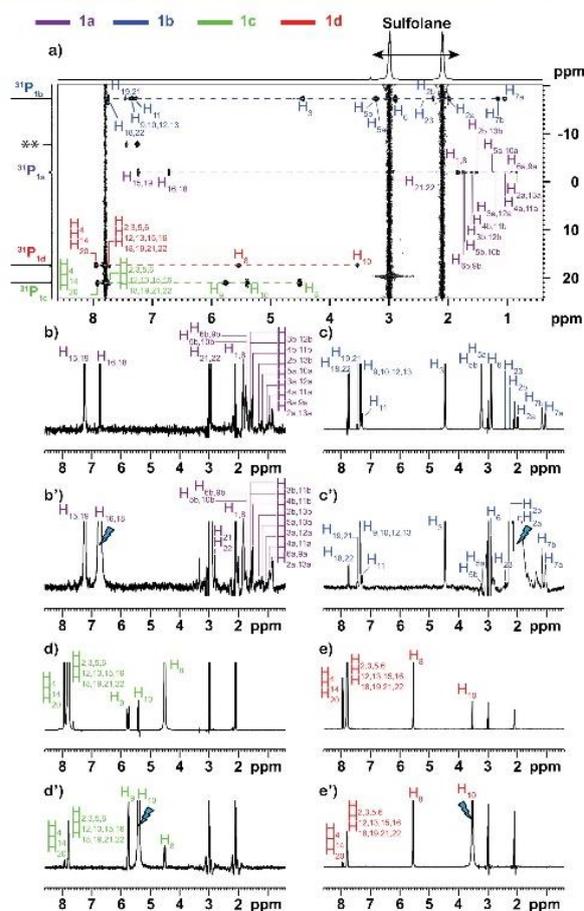


**Figure 7.** Multiplet selective excitation 1D  $^1\text{H}$  NOESY spectra of the phosphorus-based compound test mixture (20 mM) dissolved in sulfolane/DMSO- $d_6$  (7:3 v/v) (a, b, c, and d),  $t_m = 1$  s, at 258 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). The initial selective inversion pulses excite: (a)  $\text{H}_{16,18}$ (1a), (b)  $\text{H}_{2a}$ (1b), (c)  $\text{H}_{10}$ (1c), and (d)  $\text{H}_{10}$ (1d) proton resonances.

allowing its individualization, is possible by taking benefit from spin diffusion. However, in the study of other more complex mixtures,  $^1\text{H}$  spectral overlap may occur. As a result, compounds of interest may not present resolved proton resonances, thus preventing the use of 1D and 2D  $^1\text{H}$  selective NOESY experiments.

In such cases, the broad chemical shift range of  $^{31}\text{P}$  may turn out to be relevant. By coupling 2D HSQC and NOESY experiments, a complete proton spectrum should be obtained for each component within the mixture starting only from one single phosphorus resonance in the indirect dimension.<sup>19,22–24</sup>

The 2D  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HSQC-NOESY spectrum of the phosphorus-based compound test mixture dissolved in sulfolane/DMSO- $d_6$  (7:3 v/v) solvent blend recorded at 258 K is drawn in Figure 8. Under these ViscY operating conditions, all the protons of each molecule are able to correlate with all other protons by spin diffusion after having marked the phosphorus chemical shift in  $F_1$ . The selection of



**Figure 8.** a) 2D  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HSQC-NOESY spectrum of the phosphorus-based compound test mixture (20 mM) dissolved in sulfolane/DMSO- $d_6$  (7:3 v/v),  $t_m = 1$  s, at 258 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). Comparison of four  $^{31}\text{P}$  horizontal slices extracted from the 2D  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HSQC-NOESY at -2.00 (b, b', 1a, purple dotted line), -17.34 (c, c', 1b, blue dotted line), 21.01 (d, d', 1c, green dotted line), and 17.32 ppm (e, e', 1d, red dotted line) with the 1D selective NOESY spectra (selection of, b')  $\text{H}_{16,18}$ (1a), c')  $\text{H}_{2a}$ (1b), d')  $\text{H}_{10}$ (1c) and e')  $\text{H}_{10}$ (1d) protons resonances). \*\* Impurity.

four slices through  $^{31}\text{P}$  resonances at -2.00 (Figure 8b, 1a, purple row), -17.34 (Figure 8c, 1b, blue row), 21.01 (Figure 8d, 1c, green row), and 17.32 ppm (Figure 8e, 1d, red row) allows one to produce, respectively, four complete proton spectra corresponding to 1a, 1b, 1c, and 1d. These four spectra are compared to the previous selective 1D NOESY spectra (Figures 8b, b'; c, c'; d, d'; and e, e'), and the proton resonance patterns are similar, as expected. As a result, we have demonstrated the capability to individualize phosphorus-containing compounds within a mixture by means of the 2D  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HSQC-NOESY experiment under viscous conditions.

## CONCLUSIONS

We have established that the use of sulfolane/water and sulfolane/DMSO- $d_6$  as viscous binary solvents makes possible the individualization of respectively high- and low-polarity components within complex mixtures, by taking profit from NMR spin diffusion.

The constituent individualization within the Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr, and Ala-Tyr mixture and within the dicyclohexyl-(4-(*N,N*-dimethylamino)phenyl) phosphine, exophenyl Kwon [2.2.1] bicyclic phosphine, allyltriphenylphosphonium bromide, and (methoxymethyl)triphenylphosphonium chloride mixture, respectively, in sulfolane/H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (5:4:1 v/v/v) and sulfolane/DMSO-*d*<sub>6</sub> (7:3 v/v) solvents has been achieved at 258 K by homonuclear selective 1D <sup>1</sup>H NOESY, selective 2D <sup>1</sup>H NOESY, and heteronuclear 2D <sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P HSQC-NOESY experiments. The latter offers a new analytical way, never described up to now under viscous conditions, in order to extract the individual spectrum of phosphorus-containing compounds within mixture by taking advantage of the relevant spectrum readability brought by the broad <sup>31</sup>P chemical shift range.

We have pointed out that viscous sulfolane-based solvents present valuable advantages compared to previously described highly viscous solvents such as glycerol and glycerol carbonate.<sup>20</sup> The spin diffusion is efficient in a wider temperature range, compatible with thermally fragile compounds, and the NMR sample preparation is easy. The viscous sulfolane/water solvent blend is recommended for the study of polar compounds within a mixture, whereas sulfolane/DMSO-*d*<sub>6</sub> is more dedicated to the investigation of mixed low-polarity compounds. Midsized high- and low-polarity molecules require a low amount of water or DMSO-*d*<sub>6</sub> in sulfolane, whereas smaller or more flexible molecules necessitate more water or DMSO-*d*<sub>6</sub> in sulfolane until 50% (v/v) for driving spin diffusion from room to subzero temperatures.

Future investigations in the field of mixture analysis following the ViscY approach will cover the study of other polar and apolar mixtures made of small-sized compounds for assessing spin diffusion power of viscous sulfolane-based binary solvents.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.9b05725>.

Relevant NMR data acquisition and processing parameters used for the study and additional 2D <sup>1</sup>H NOESY and 1D <sup>31</sup>P spectra (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

Pedro Lameiras – Université de Reims Champagne-Ardenne, CNRS ICMR UMR 7312, 51097 Reims, France; [orcid.org/0000-0001-8416-750X](https://orcid.org/0000-0001-8416-750X); Email: [pedro.lameiras@univ-reims.fr](mailto:pedro.lameiras@univ-reims.fr)

### Authors

François Pedinielli – Université de Reims Champagne-Ardenne, CNRS ICMR UMR 7312, 51097 Reims, France

Jean-Marc Nuzillard – Université de Reims Champagne-Ardenne, CNRS ICMR UMR 7312, 51097 Reims, France; [orcid.org/0000-0002-5120-2556](https://orcid.org/0000-0002-5120-2556)

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.9b05725>

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

Financial support by CNRS, Conseil Regional Champagne Ardenne, Conseil General de la Marne, Ministry of Higher Education and Research (MESR), and EU-programme FEDER to the PLAnT CPER project is gratefully acknowledged. The authors thank Ms. Manon Haudrechy for her technical help.

## ■ REFERENCES

- (1) Wolfender, J.-L.; Nuzillard, J.-M.; van der Hooft, J. J. J.; Renault, J.-H.; Bertrand, S. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 704–742.
- (2) Morris, K. F.; Johnson, C. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3139–3141.
- (3) Morris, K. F.; Stilbs, P.; Johnson, C. S. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 211–215.
- (4) Viel, S.; Ziarelli, F.; Caldarelli, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 9696–9698.
- (5) Pages, G.; Delaurent, C.; Caldarelli, S. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 561–566.
- (6) Caldarelli, S. *Magn. Reson. Chem.* **2007**, *45*, S48–S55.
- (7) Zielinski, M. E.; Morris, K. F. *Magn. Reson. Chem.* **2009**, *47*, 53–56.
- (8) Kavalka, J. S.; Parviainen, V.; Wähälä, K.; Kilpeläinen, L.; Heikkinen, S. *Magn. Reson. Chem.* **2010**, *48*, 777–781.
- (9) Rogerson, A. K.; Aguilar, J. A.; Nilsson, M.; Morris, G. A. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 7063–7064.
- (10) Tal, A.; Frydman, L. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2010**, *57*, 241–292.
- (11) Meyer, N. H.; Zangger, K. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 7143–7146.
- (12) Kazimierczuk, K.; Orekhov, V. *Magn. Reson. Chem.* **2015**, *53*, 921–926.
- (13) Zangger, K. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2015**, *86*–87, 1–20.
- (14) Dal Poggetto, G.; Castanar, L.; Adams, R. W.; Morris, G. A.; Nilsson, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, S766–S771.
- (15) Williamson, M. P.; Williams, D. H. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1981**, 165–166.
- (16) Luck, L. A.; Landis, C. R. *Organometallics* **1992**, *11*, 1003–1005.
- (17) Landis, C. R.; Luck, L. L.; Wright, J. M. *J. Magn. Reson., Ser. B* **1995**, *109*, 44–59.
- (18) Lienin, S. F.; Brüschweiler, R.; Ernst, R. R. *J. Magn. Reson.* **1998**, *131*, 184–190.
- (19) Simpson, A. J.; Woods, G.; Mehrzad, O. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 186–194.
- (20) Lameiras, P.; Boudesocque, L.; Mouloungui, Z.; Renault, J. H.; Wieruszki, J. M.; Lippens, G.; Nuzillard, J. M. *J. Magn. Reson.* **2011**, *212*, 161–168.
- (21) Farooq, H.; Soong, R.; Courtier-Murias, D.; Anklin, C.; Simpson, A. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 6759–6766.
- (22) Lameiras, P.; Nuzillard, J.-M. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 4508–4515.
- (23) Lameiras, P.; Patis, S.; Jakhlal, J.; Castex, S.; Clivio, P.; Nuzillard, J. M. *Chem. - Eur. J.* **2017**, *23*, 4923–4928.
- (24) Lameiras, P.; Mougeolle, S.; Pedinielli, F.; Nuzillard, J.-M. *Faraday Discuss.* **2019**, *218*, 233–246.
- (25) Adair, E.; Afonso, C.; Bell, N. G. A.; Davies, A. N.; Delsuc, M. A.; Godfrey, R.; Goodacre, R.; Hawkes, J. A.; Hertkorn, N.; Jones, D.; Lameiras, P.; Le Guennec, A.; Lubben, A.; Nilsson, M.; Paša-Tolić, L.; Richards, J.; Rodgers, R. P.; Rüger, C. P.; Schmitt-Kopplin, P.; Schoenmakers, P. J.; et al. *Faraday Discuss.* **2019**, *218*, 247–267.
- (26) Gierer, A.; Wirtz, K. *Z. Naturforsch., A: Phys. Sci.* **1953**, *8*, 532–538.
- (27) Jannelli, L.; Pansini, M.; Jalenti, R. *J. Chem. Eng. Data* **1984**, *29*, 263–266.
- (28) Riddick, J. A.; Bunger, W. B.; Sakano, T. K. *Organic Solvents: Physical Properties and Methods of Purification*, 4th ed.; Wiley-Interscience: New York, 1986.

- (29) Clark, E. In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*; John Wiley & Sons, Inc., 2000.
- (30) Tilstam, U. *Org. Process Res. Dev.* **2012**, *16*, 1273–1278.
- (31) Măca, J.; Sedlářiková, M.; Vondrák, J.; Bartušek, K. *ECS Trans.* **2011**, *40*, 53–57.
- (32) Sacco, A.; Petrella, G.; Castagnolo, M.; Dell'atti, A. *Thermochim. Acta* **1981**, *44*, 59–66.
- (33) Janelli, L.; Rakshit, A. K.; Sacco, A. *Z. Naturforsch., A: Phys. Sci.* **1974**, *29*, 355–358.
- (34) Cowie, J. M. G.; Toporowski, P. M. *Can. J. Chem.* **1961**, *39*, 2240–2243.
- (35) Sonnati, M. O.; Amigoni, S.; Taffin de Givenchy, E. P.; Darmanin, T.; Choulet, O.; Guittard, F. *Green Chem.* **2013**, *15*, 283–306.
- (36) Stott, K.; Stonehouse, J.; Keeler, J.; Hwang, T.-L.; Shaka, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4199–4200.
- (37) Douzou, P.; Petsko, G. A. *Adv. Protein Chem.* **1984**, *36*, 245–361.
- (38) Wüthrich, K. *NMR of proteins and nucleic acids*; Wiley: New York, 1986.
- (39) Stott, K.; Keeler, J.; Van, Q. N.; Shaka, A. J. *J. Magn. Reson.* **1997**, *125*, 302–324.
- (40) Brüschweiler, R.; Griesinger, C.; Sørensen, O. W.; Ernst, R. R. *J. Magn. Reson.* **1988**, *78*, 178–185.
- (41) Plainchont, B.; Martinez, A.; Tisse, S.; Bouillon, J. P.; Wieruszkeski, J. M.; Lippens, G.; Jeannerat, D.; Nuzillard, J. M. *J. Magn. Reson.* **2010**, *206*, 68–73.
- (42) Gorenstein, D. G.; Luxon, B. A. In *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*; Elsevier Ltd, 1999; pp 2204–2212.
- (43) Kühn, O. *Phosphorus-31 NMR Spectroscopy: A Concise Introduction for the Synthetic Organic and Organometallic Chemist*; Springer, 2009.
- (44) Tritton, T. R.; Armitage, I. M. *Nucleic Acids Res.* **1978**, *5*, 3855–3869.

**Mixture Analysis in Viscous Solvents by NMR spin diffusion spectroscopy Y: Visc Y. Application to High- and Low-polarity Organic Compounds dissolved in Sulfolane/Water and Sulfolane/DMSO-*d*<sub>6</sub> blends**

François Pedinielli, Jean-Marc Nuzillard and Pedro Lameiras\* <sup>[a]</sup>

<sup>[a]</sup> Université de Reims Champagne-Ardenne, CNRS, ICMR UMR 7312, 51097 Reims, France

**Table of contents**

<b>Subject</b>	<b>page #</b>
<b>Dipeptide chemical structures</b>	<b>page S3</b>
<b>Additional NMR data acquisition and processing parameters for Figure 1 -&gt; 4 and Figure 6 -&gt; 8</b>	<b>page S4</b>
<b>Figure S1:</b> 2D <sup>1</sup> H DOSY spectrum of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), 20 mM, dissolved in H <sub>2</sub> O/D <sub>2</sub> O (9:1 v/v), at pH = 5.0, at 298 K, at 500 MHz ( <sup>1</sup> H).	<b>page S7</b>
<b>Figure S2:</b> a-e) Amide proton region of band-selective detection 2D NOESY spectra of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), 20 mM, dissolved in sulfolane/H <sub>2</sub> O/D <sub>2</sub> O (5:4:1 v/v/v), at a) 298 K, b) 288 K, c) 278 K, d) 268 K and e) 258 K, at 500 MHz ( <sup>1</sup> H). f) Plots of NOE cross-peak volume observed with temperature of H <sub>α<sub>v</sub></sub> (LV), H <sub>α<sub>i</sub></sub> (LY), H <sub>α'<sub>6</sub></sub> (GY) and H <sub>α<sub>A</sub></sub> (AY) proton resonances of the dipeptide test mixture.	<b>page S8</b>
<b>Figure S3:</b> Band-selective detection 2D <sup>1</sup> H NOESY spectrum of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), 20 mM, in sulfolane/H <sub>2</sub> O/D <sub>2</sub> O (5:4:1: v/v/v), at 258 K, at 500 MHz ( <sup>1</sup> H).	<b>page S10</b>
<b>Figure S4:</b> 2D <sup>1</sup> H NOESY spectrum of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), 20 mM, dissolved in H <sub>2</sub> O/D <sub>2</sub> O (9:1 v/v), at pH = 5.0, at 298 K, at 500 MHz ( <sup>1</sup> H).	<b>page S11</b>

**Figure S5:** 2D  $^1\text{H}$  DOSY spectrum of the phosphorus-based compound test mixture (1a, 1b, 1c and 1d), 20 mM, dissolved in neat  $\text{DMSO-}d_6$ , at 298 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). **page S14**

**Figure S6:** 1D proton spectra of the phosphorus-based compound test mixture (1a, 1b, 1c and 1d), 20 mM, dissolved in sulfolane/ $\text{DMSO-}d_6$  (7:3 v/v), at 258 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) and corresponding NMR pulse sequence. **page S15**

**Figure S7:** Low-field proton region of band-selective detection 2D  $^1\text{H}$  NOESY spectra 2D of the phosphorus-based compounds test mixture (1a, 1b, 1c and 1d), 20 mM, dissolved in sulfolane/ $\text{DMSO-}d_6$  (7:3 v/v), at a) 288 K, b) 278 K, c) 268 K, d) 258 K and e) 248 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). **page S16**

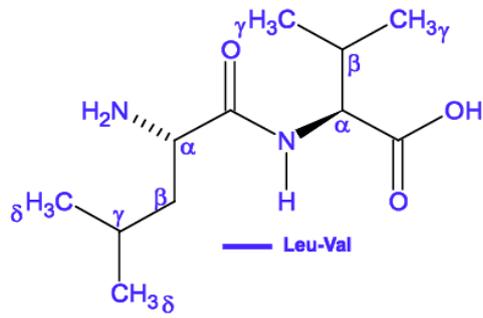
**Figure S8:** Band-selective detection 2D  $^1\text{H}$  NOESY spectrum of the phosphorus-based compound test mixture (1a, 1b, 1c and 1d), 20 mM, dissolved in sulfolane/ $\text{DMSO-}d_6$  (7:3 v/v), at 258 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). **page S17**

**Figure S9:** 2D  $^1\text{H}$  NOESY spectrum of the phosphorus-based compound test mixture (1a, 1b, 1c and 1d), 20 mM, dissolved in neat  $\text{DMSO-}d_6$ , at 298 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). **page S18**

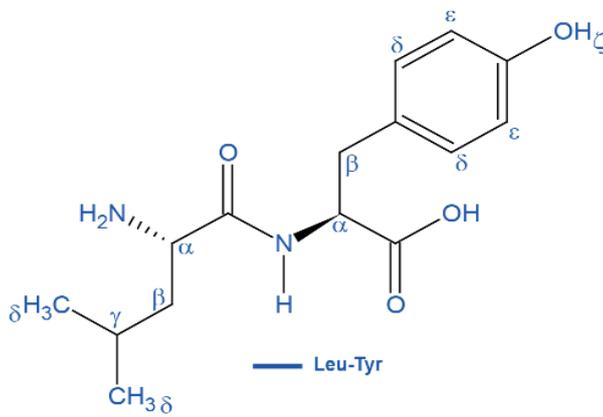
**Figure S10.** 1D  $^{31}\text{P}$  spectra (64 scans) of the phosphorus-based compound test mixture (1a, 1b, 1c and 1d), 20 mM, at a) 298 K, b) 288 K, c) 278 K, d) 268 K, e) 258 K and f) 248 K, dissolved in sulfolane/ $\text{DMSO-}d_6$  (7:3 v/v), at 202.46 MHz ( $^{31}\text{P}$ ). **page S19**

**Dipeptide chemical structures:**

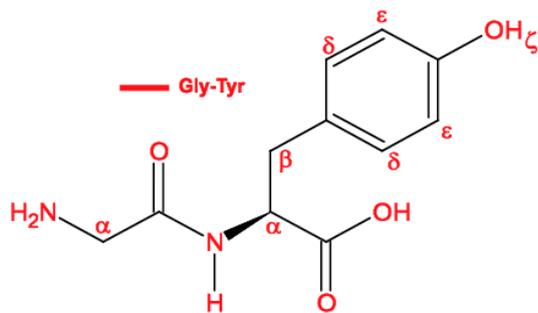
Leucine-Valine = Leu-Val = LV



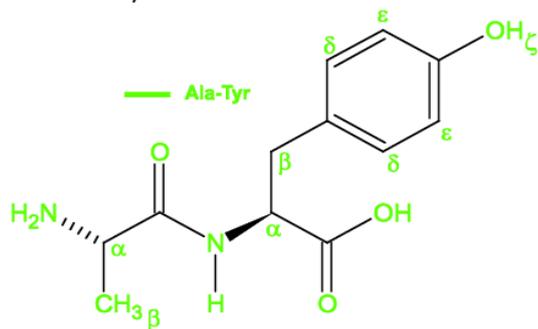
Leucine-Tyrosine = Leu-Tyr = LY



Glycine-Tyrosine = Gly-Tyr = GY



Alanine-Tyrosine = Ala-Tyr = AY



**Additional NMR data acquisition and processing parameters for Figure 1 -> 4 and 6 -> 8:**

**Figure 1.** 1D proton spectra (16 scans) and corresponding NMR pulse sequence of the dipeptide test mixture: Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr (20 mM) dissolved in sulfolane/H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (5:4:1 v/v/v), at 258 K, at 500 MHz (<sup>1</sup>H). G1:G2 = 70:30. The FIDs (32k points, spectral width = 5000 Hz) were processed with LB = 0.3 Hz and zero-filled to 64k points. a, d) Non-selective excitation and detection. b, e) Selective detection of two resonance bands. The 4 ms I-BURP-2 pulses cover 1250 Hz (dotted trapezium). The “1” and “2” labels respectively indicate their application to the high and low chemical shift regions. c, f) Selective excitation of the valine amide proton doublet of Leu-Val (dotted trapezium) using a 30 ms, 1% truncated, 180° Gaussian pulse.

**Figure 2.** a) Amide proton region of band-selective detection 2D NOESY spectrum of dipeptide test mixture (20 mM) dissolved in sulfolane/H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (5:4:1 v/v/v), at 258 K, at 500 MHz (<sup>1</sup>H). Data matrix was recorded in States-TPPI mode; its size was 512 × 4k with 8 scans per FID, a 1.5 s relaxation delay and a 1 s mixing time (*t<sub>m</sub>*), resulting in a 202.82 min recording time (expt). Shaped pulses and gradient pulses were identical to those in Figures 1b and 1e in SI. The NOESY part of the sequence was adapted from the noesyph pulse sequence. The spectral width was 5000 Hz in both dimensions. G1: G2 = 70: 30. Data matrix was multiplied in both dimensions by a shifted sine bell function (SSB = 2) before zero filling to a 1k × 4k size. b) Amide proton region of 2D NOESY spectrum of the same dipeptide test mixture (20 mM) dissolved in H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9:1 v/v), at pH = 5.0, *t<sub>m</sub>* = 1 s, at 298 K, at 500 MHz (<sup>1</sup>H). Spectrum b) was recorded and processed with the same parameters as those in 2a using the noesyegpph pulse sequence, resulting in a 171.02 min recording time (expt). A pair of 2 ms rectangular shaped inversion pulses was applied on the water signal resonance. The length of the water suppression gradient pulses was 1 ms and their intensity 31% for the first pair and 11% for the second pair. The red frames correspond to spectral regions of interest in which water as solvent has a major effect on the number and sign of observable NOESY cross peaks.

**Figure 3.** Multiplet selective excitation 1D  $^1\text{H}$  NOESY spectra of the dipeptide test mixture (20 mM) dissolved in sulfolane/ $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (5:4:1 v/v/v) (a, b, c, d and e),  $t_m = 1$  s, at 258 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). The initial selective excitation was achieved by a 1% truncated  $180^\circ$  Gaussian pulse. G1:G2 = 70:30. WURST wideband adiabatic inversion pulses,  $\delta_2 = 1.5$  ms, starting within  $t_m$  at 0.33 and 0.83  $t_m$  with G3:G4:G5 = 40:-60:50. Gradient pulse length was 1 ms. d = 200  $\mu\text{s}$ . Relaxation delay was 2.0 s. The FIDs (8k points, spectral width 5000 Hz) were multiplied by an exponential function (LB = 0.3) before zero-filled to 64k points. The initial selective inversion pulses excite: a) the  $\text{NH}_\nu(\text{LV})$  proton resonance ( $\delta_1 = 30$  ms, 6k scans, experiment time (expt) = 400.02 min); b) the  $\text{H}\delta_\text{L}(\text{LY})/\text{H}\delta_\text{L}(\text{LV})/\text{H}\nu_\nu(\text{LV})$  proton resonances ( $\delta_1 = 6$  ms, 1k scans, expt = 65.85 min); c) the  $\text{H}\delta_\nu(\text{LY})/\text{H}\delta_\nu(\text{GY})/\text{H}\delta_\nu(\text{AY})$  proton resonances ( $\delta_1 = 12.5$  ms, 1k scans, expt = 64.07 min); d) the  $\text{H}\alpha_\text{G}(\text{GY})$  proton resonance ( $\delta_1 = 40$  ms, 4k scans, expt = 268.47 min); e) the  $\text{H}\alpha_\text{A}(\text{AY})$  proton resonance ( $\delta_1 = 70$  ms, 4k scans, expt = 272.20 min). f) Pulse sequence:  $\varphi_1 = x, y, -x, -y, \psi = x, -x$ .

**Figure 4.** a)  $F_1$  band selective  $F_1$  decoupled 2D NOESY spectrum of the dipeptide test mixture (20 mM) dissolved in sulfolane/ $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (5:4:1 v/v/v), at 258 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ), (256 scans per  $t_1$  value, expt = 495.42 min,  $t_m = 1$  s). b) Pulse sequence:  $\varphi_1 = x, y, -x, -y, \psi = x, -x$ . The initial selective  $180^\circ$  pulses ( $\delta_1 = 4$  ms) had a Gaussian shape and were applied to the four NH amide proton resonances. G1:G2 = 70:30. The following refocusing pulse was also applied to the NH protons and was a RE-BURP ( $\delta_2 = 30$  ms). G3:G4 = 80:23. WURST wideband adiabatic inversion pulses,  $\delta_3 = 1.5$  ms, start within  $t_m$  at 0.33 and 0.83  $t_m$  with G5:G6:G7 = 40:-60:50. Gradient pulse length was 1 ms. d = 200  $\mu\text{s}$ . Relaxation delay was 1 s. Data matrix was acquired in the States-TPPI mode, its size was 48  $\times$  4k. Spectral widths were 5000 Hz in  $F_2$  and 240 Hz in  $F_1$ . Data matrix was multiplied in both dimensions by a shifted sine bell function (SSB = 2) before zero filling to a 128  $\times$  2k size.

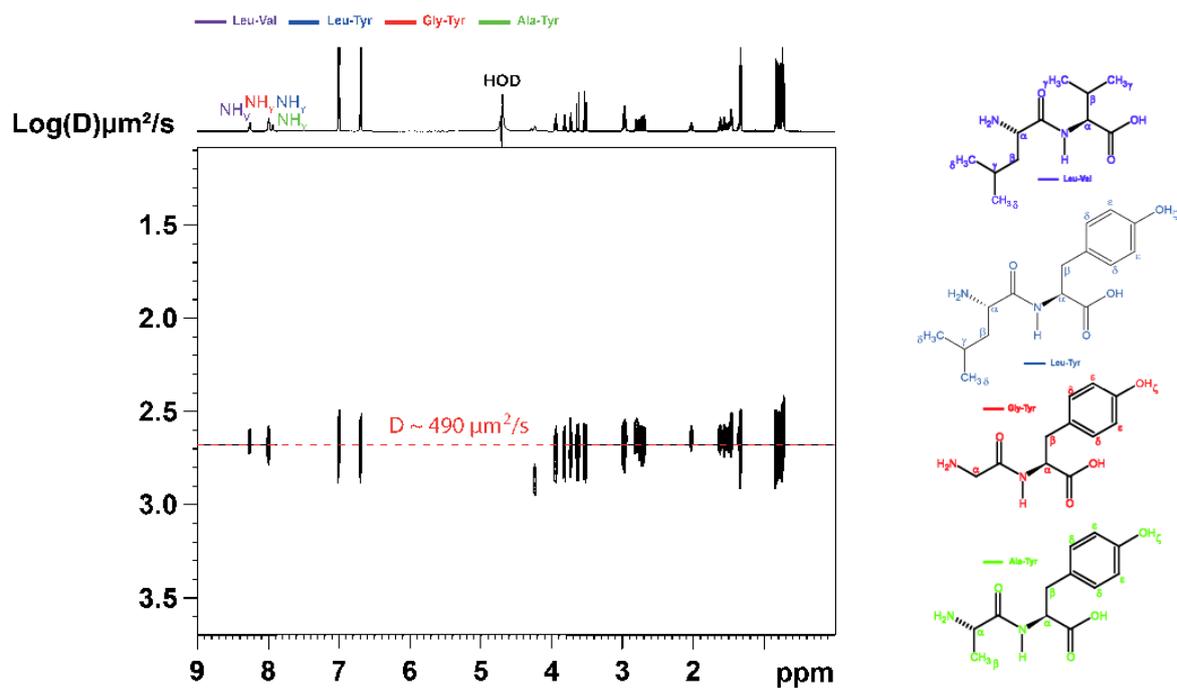
**Figure 6.** a) Low-field proton region of the band-selective detection 2D NOESY spectrum of the phosphorus-based compound test mixture (1a, 1b, 1c, and 1d, 20 mM) dissolved in sulfolane/ $\text{DMSO}-d_6$  (7:3 v/v), using the pulse sequence in Figure 2c, at 258 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). Data matrix was recorded in States-TPPI mode; its size was 730  $\times$  4k with 8 scans per FID, a 1.5 s relaxation delay and a 1 s mixing time ( $t_m$ ), resulting in a 289.88 min recording time (expt). Shaped pulses and gradient pulses were identical to those in Figure 2a in SI. The NOESY part of the sequence was adapted from the noesyph pulse sequence. The spectral width was 5000 Hz in both dimensions. G1:G2 = 70:30. Data matrix was multiplied in both dimensions by a shifted sine bell function (SSB = 2) before zero filling to a 1k  $\times$  4k size.  $^1\text{H}$  vertical slices extracted from the 2D  $^1\text{H}$  NOESY at 6.72 ppm (c, 1a,  $\text{H}_{16,18}$ , purple dotted line), at 4.45 ppm (d, 1b,  $\text{H}_3$ , blue dotted line), at 5.40 ppm (e, 1c,  $\text{H}_{10}$ , green dotted line), and at 5.54 ppm (f, 1d,  $\text{H}_8$ , red dotted line). b) Low-field proton region of the 2D NOESY spectrum of the same phosphorus-based compounds test mixture dissolved in neat  $\text{DMSO}-d_6$ , at 298 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). Spectrum b) was recorded and processed with the same parameters as those in 6a using the noesypphpp pulse sequence, resulting in

S5

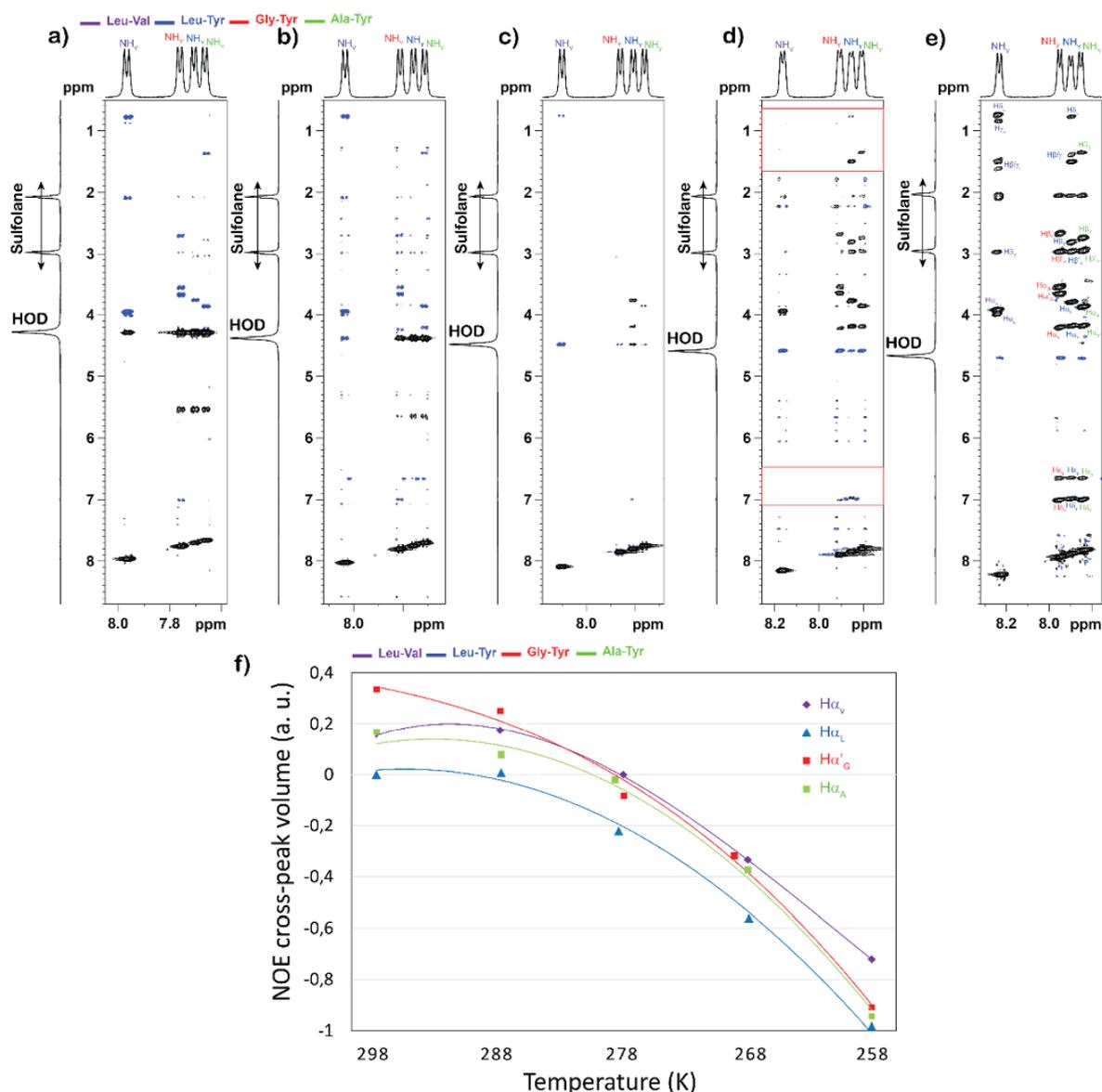
291.48min recording time (expt). The red frames correspond to spectral regions of interest in which DMSO- $d_6$  as solvent has a major effect on the number and sign of observable NOESY cross peaks.

**Figure 7.** Multiplet selective excitation 1D  $^1\text{H}$  NOESY spectra of the phosphorus-based compound test mixture (1a, 1b, 1c and 1d, 20 mM) dissolved in sulfolane/DMSO- $d_6$  (7:3 v/v) (a, b, c and d), at 258 K,  $t_m = 1$  s, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). Pulse sequence:  $\varphi 1 = x, y, -x, -y, \psi = x, -x$  (Figure 3f). The initial selective excitation was achieved by a 1% truncated  $180^\circ$  Gaussian pulse. G1:G2 = 70:30. WURST wideband adiabatic inversion pulses,  $\delta_2 = 1.5$  ms, starting within  $t_m$  at 0.33 and 0.83  $t_m$  with G3: G4: G5 = 40:-60: 50. Gradient pulse length was 1 ms.  $d = 200 \mu\text{s}$ . Relaxation delay was 2 s. The FIDs (8k points, spectral width 5000 Hz) were multiplied by an exponential function (LB = 0.3) on before zero filling to 64 k points. The initial selective inversion pulses excite: a) the  $\text{H}_{16,18}$  (1a) proton resonances ( $\delta_1 = 40$  ms, 4k scans, experiment time (expt) = 267.30 min); b) the  $\text{H}_{2a}$  (1b) proton resonances ( $\delta_1 = 40$  ms, 4k scans, expt = 267.30 min); c) the  $\text{H}_{10}$  (1c) proton resonance ( $\delta_1 = 30$  ms, 4k scans, expt = 265.93 min); d) the  $\text{H}_{10}$  (1d) proton resonance ( $\delta_1 = 25$  ms, 4k scans, expt = 265.25 min).

**Figure 8.** a) 2D  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HSQC-NOESY spectrum of the phosphorus-based compounds test mixture (1a, 1b, 1c and 1d, 20 mM) dissolved in sulfolane/DMSO- $d_6$  (7:3 v/v), using the hsqcetgpn0 pulse sequence, at 258 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). Data matrix was recorded in Echo-Antiecho mode; its size was  $128 \times 2\text{k}$  with 256 scans per FID, a 1.5 s relaxation delay and a 1 s mixing time ( $t_m$ ), resulting in a 1518.5 min recording time. The spectral widths were respectively 5000 Hz in  $^1\text{H}$  dimension and 21382.46 Hz in  $^{31}\text{P}$  dimension. Data matrix was multiplied in both dimensions by a shifted sine bell function (SSB = 2) before zero filling to a  $1\text{k} \times 4\text{k}$  size. Comparison of four  $^{31}\text{P}$  horizontal slices extracted from the 2D  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HSQC-NOESY at -2.00 (b, b', 1a, purple dotted line), -17.34 (c, c', 1b, blue dotted line), 21.01 (d, d', 1c, green dotted line), and 17.32 ppm (e, e', 1d, red dotted line) with the 1D selective NOESY spectra (selection of, b') the  $\text{H}_{16,18}$  proton resonances of 1a, c') the  $\text{H}_{2a}$  proton resonances of 1b, d') the  $\text{H}_{10}$  proton resonance of 1c and e') the  $\text{H}_{10}$  proton resonance of 1d).



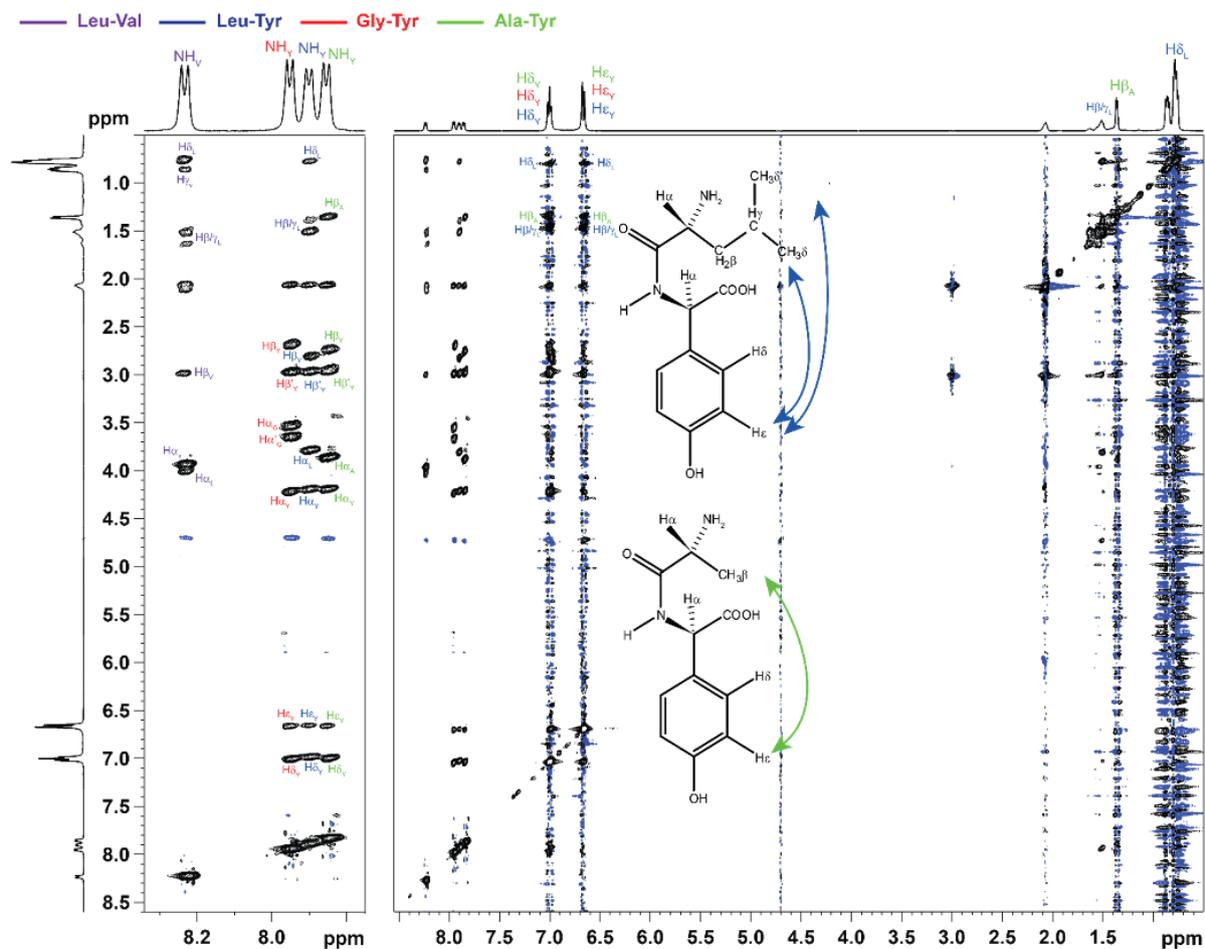
**Figure S1.** 2D  $^1\text{H}$  DOSY spectrum of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), 20 mM, dissolved in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1 v/v), at pH = 5.0, at 298 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). Data were acquired by means of the `stebppg1s19` pulse sequence. The diffusion time ( $\Delta$ ) was 50 ms and the gradient pulse length ( $\delta$ ) was 2 ms. The size of the raw data set was 32 x 8 192, with 16 scans per FID, and a 1.5 s relaxation delay, resulting in a 20.52 min recording time. The gradient intensity values were equally spaced from 2% to 95%. Water suppression was achieved by a 3-9-19 pulse sequence with 1 ms gradient pulses of - 20% intensity (WATERGATE). The DOSY spectrum was calculated using the Bruker TOPSPIN Software. Inverse Laplace transformation in the indirectly detected dimension was carried out by means of the MaxEnt algorithm.  $\text{Log}(D)$  was calculated with  $D$  expressed in  $(\mu\text{m})^2/\text{s}$ .



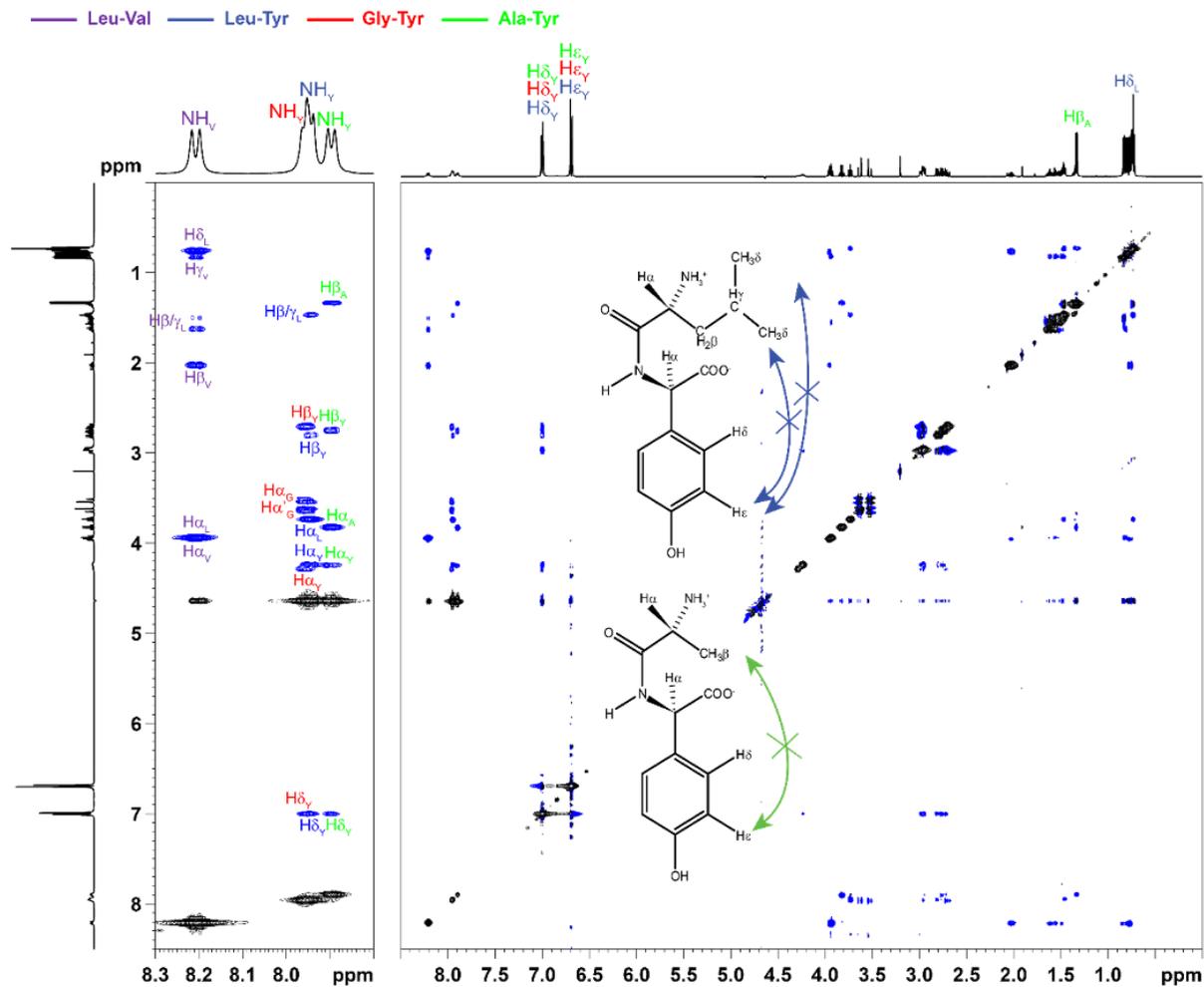
**Figure S2.** a-e) Amide proton region of band-selective detection 2D NOESY spectra of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), 20 mM, sulfolane/H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (5:4:1 v/v/v), at a) 298 K, b) 288 K, c) 278 K, d) 268 K and e) 258 K, at 500 MHz (<sup>1</sup>H). The red frames correspond to spectral regions of interest in which temperature variations show a major effect on signal intensity. See caption of Figure 2a in SI for the acquisition and processing parameters. f) Plots of NOE cross-peak volume observed with temperature of H $\alpha_V$ (LV), H $\alpha_L$ (LY), H $\alpha'_G$ (GY) and H $\alpha_A$ (AY) proton resonances of the dipeptide test mixture (polynomial regression of order 2). Figure S2 a-e) reports evolution of amide proton NOESY cross peaks upon sample temperature modification. The spectra reveal expected intra-molecular correlations but also present some magnetization transfer between labile dipeptide amide protons and sulfolane protons. Ambient and lower temperatures (298 K, 288 K, 278 K, 268 K and 258 K) have been tested in sulfolane/water binary solvent. The NH magnetization reaches the tyrosine H<sub>c</sub> protons

at 258 K and not at all at 268 K. Consequently, all following NMR spectra in sulfolane/water solvent blend have been recorded at 258 K, being the optimal temperature at which the NOESY spectrum of the dipeptide test mixture presents correlations from the amide proton resonance of each dipeptide to all proton resonances of the same dipeptide without significant signal broadening.

Figure S2f depicts negative NOE enhancements of each mixed dipeptide with temperature, namely from 278 K to 258 K.



**Figure S3.** Band-selective detection 2D  $^1\text{H}$  NOESY spectrum of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), 20 mM, dissolved in sulfolane/ $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (5:4:1: v/v/v), at 258 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). See caption of Figure 2a in SI for the NMR acquisition and processing parameters.



**Figure S4.** 2D  $^1\text{H}$  NOESY spectrum of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), 20 mM, dissolved in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1 v/v), at pH = 5.0, at 298 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). See caption of Figure 2b in SI for the NMR acquisition and processing parameters.

**Phosphorus-based compound structures:**

**1a:** Dicyclohexyl(4-*N,N*-dimethylamino)phenyl) phosphine

<sup>1</sup> H and <sup>31</sup> P chemical shifts in sulfolane/DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> (7:3 v/v), at 258 K, at 500 MHz ( <sup>1</sup> H)		
<b>1a: N°</b>	<b>δ <sup>1</sup>H (ppm)</b>	<b>δ <sup>31</sup>P (ppm)</b>
H <sub>2a,13a</sub>	0.85	-
H <sub>6a,9a</sub>	0.95	-
H <sub>4a,11a</sub>	1.05	-
H <sub>3a,12a</sub>	1.18	-
H <sub>5a,10a</sub>	1.28	-
H <sub>2b,13b</sub>	1.52	-
H <sub>4b,11b</sub>	1.59	-
H <sub>3b,12b</sub>	1.62	-
H <sub>5b,10b</sub>	1.72	-
H <sub>6b,9b</sub>	1.76	-
H <sub>1,8</sub>	1.83	-
H <sub>21,22</sub>	2.94	-
H <sub>16,18</sub>	6.72	-
H <sub>15,19</sub>	7.24	-
P <sub>7</sub>	-	- 2.00

**1b:** Exo-phenyl Kwon [2.2.1] bicyclic phosphine

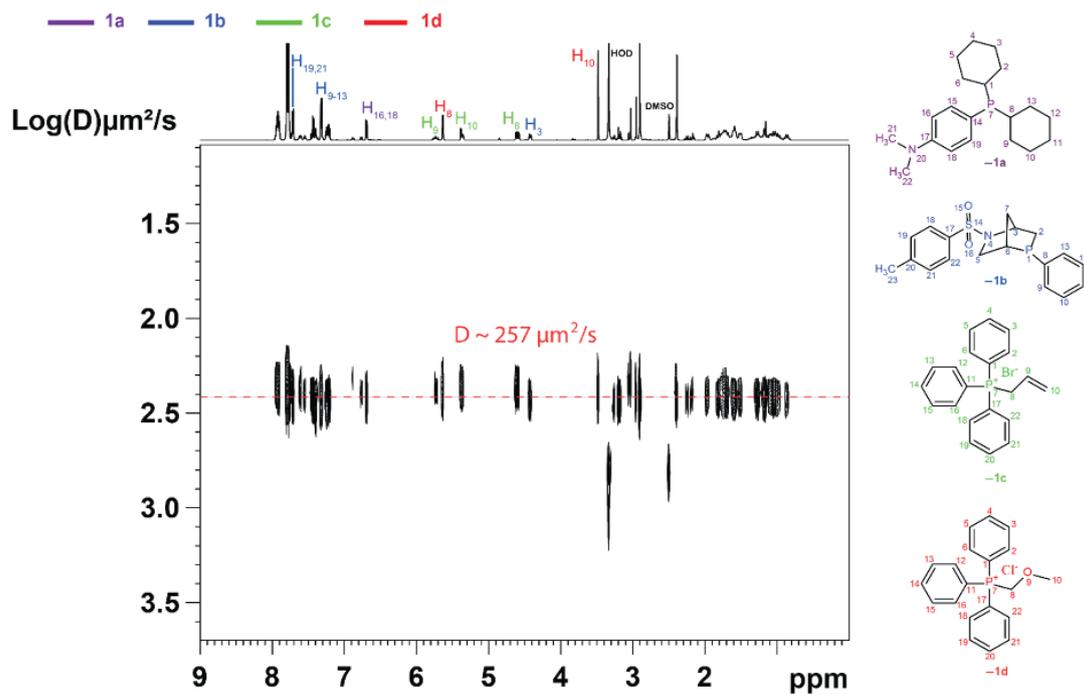
<sup>1</sup> H and <sup>31</sup> P chemical shifts in sulfolane/DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> (7:3 v/v), at 258 K, at 500 MHz ( <sup>1</sup> H)		
<b>1b: N°</b>	<b>δ <sup>1</sup>H (ppm)</b>	<b>δ <sup>31</sup>P (ppm)</b>
H <sub>7a</sub>	1.04	-
H <sub>7b</sub>	1.16	-
H <sub>2a</sub>	1.96	-
H <sub>2b</sub>	2.23	-
H <sub>23</sub>	2.42	-
H <sub>6</sub>	2.89	-
H <sub>5a</sub>	3.19	-
H <sub>5b</sub>	3.25	-
H <sub>3</sub>	4.45	-
H <sub>11</sub>	7.28	-
H <sub>9,10,12,13</sub>	7.34	-
H <sub>19,21</sub>	7.46	-
H <sub>18,22</sub>	7.74	-
P <sub>1</sub>	-	- 17.34

**1c: Allyltriphenylphosphonium bromide**

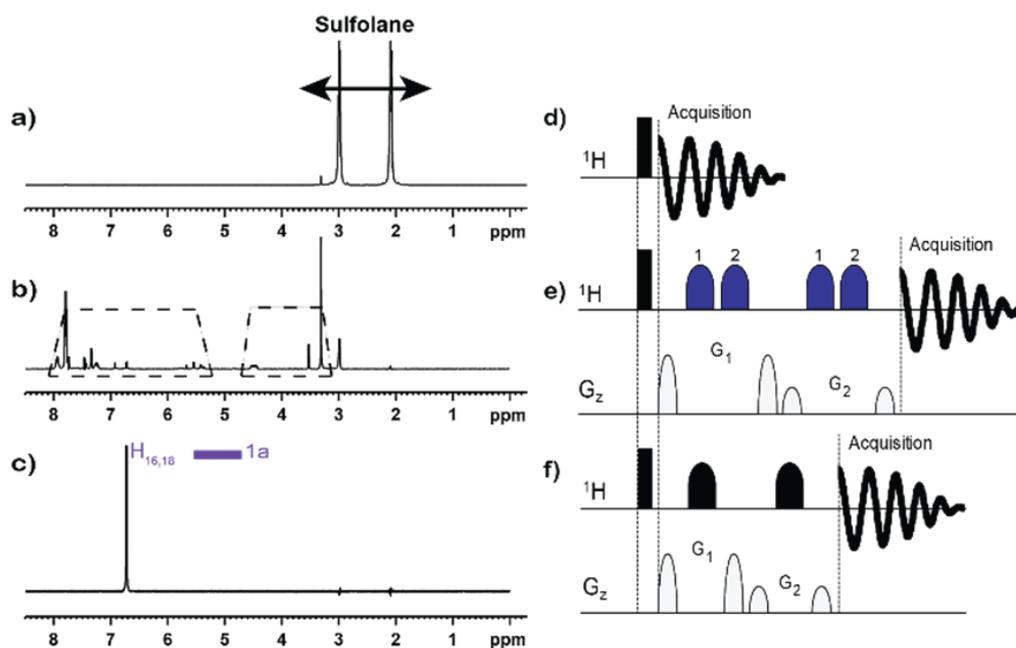
<sup>1</sup> H and <sup>31</sup> P chemical shifts in sulfolane/DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> (7:3 v/v), at 258 K, at 500 MHz ( <sup>1</sup> H)		
<b>1c: N°</b>	<b>δ <sup>1</sup>H (ppm)</b>	<b>δ <sup>31</sup>P (ppm)</b>
<b>H<sub>8</sub></b>	4.51	-
<b>H<sub>10</sub></b>	5.40	-
<b>H<sub>9</sub></b>	5.75	-
<b>H<sub>2,3,5,6</sub></b>	7.79	-
<b>H<sub>12,13,15,16</sub></b>	7.79	-
<b>H<sub>18,19,21,22</sub></b>	7.79	-
<b>H<sub>4</sub></b>	7.92	-
<b>H<sub>14</sub></b>	7.92	-
<b>H<sub>20</sub></b>	7.92	-
<b>P<sub>7</sub></b>	-	21.01

**1d: (Methoxymethyl)triphenylphosphonium chloride**

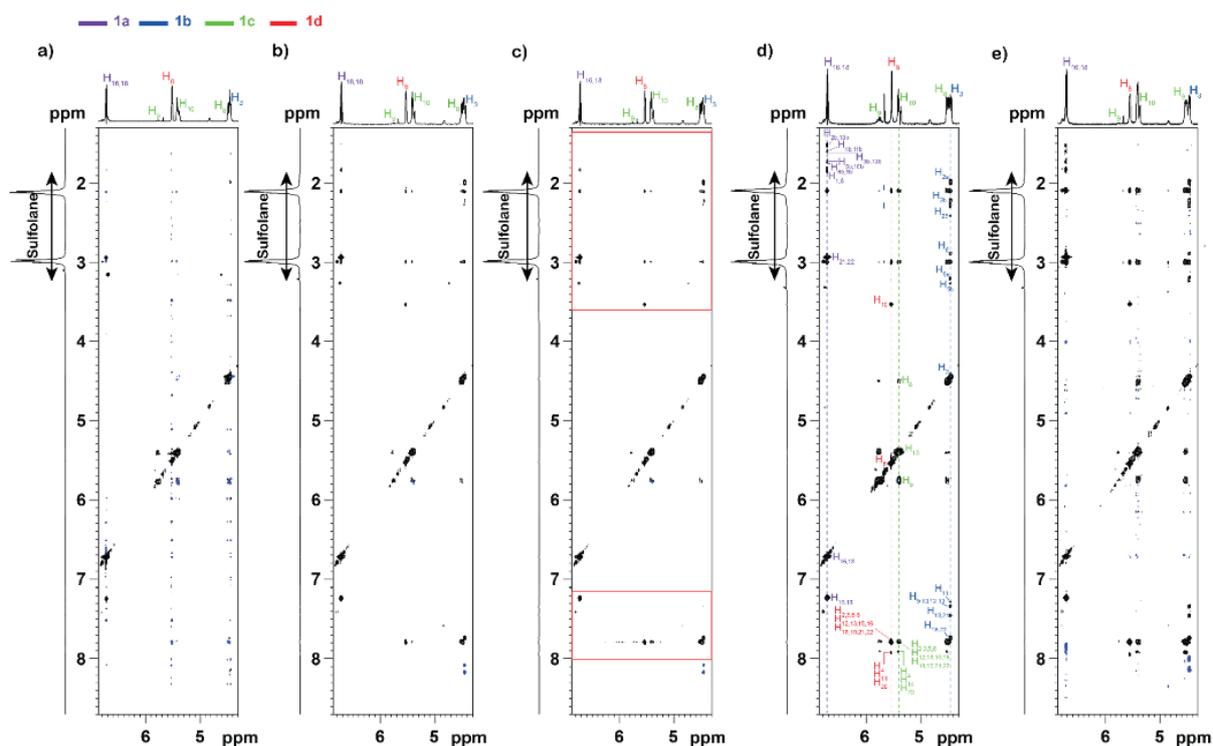
<sup>1</sup> H and <sup>31</sup> P chemical shifts in sulfolane/DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> (7:3 v/v), at 258 K, at 500 MHz ( <sup>1</sup> H)		
<b>1d: N°</b>	<b>δ <sup>1</sup>H (ppm)</b>	<b>δ <sup>31</sup>P (ppm)</b>
<b>H<sub>10</sub></b>	3.53	-
<b>H<sub>8</sub></b>	5.54	-
<b>H<sub>2,3,5,6</sub></b>	7.79	-
<b>H<sub>12,13,15,16</sub></b>	7.79	-
<b>H<sub>18,19,21,22</sub></b>	7.79	-
<b>H<sub>4</sub></b>	7.95	-
<b>H<sub>14</sub></b>	7.95	-
<b>H<sub>20</sub></b>	7.95	-
<b>P<sub>7</sub></b>	-	17.32



**Figure S5.** 2D  $^1\text{H}$  DOSY spectrum of the phosphorus-based compound test mixture (1a, 1b, 1c and 1d), 20 mM, dissolved in neat  $\text{DMSO-}d_6$ , at 298 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). Data were acquired by means of the ledbpgp2s pulse sequence. The diffusion time ( $\Delta$ ) was 70 ms and the gradient pulse length ( $\delta$ ) was 1.9 ms. The size of the raw data set was 32 x 16 384, with 8 scans per FID, and a 15 s relaxation delay, resulting in a 72.95 min recording time. The gradient intensity values were equally spaced from 2% to 95%. The DOSY spectrum was calculated using the Bruker TOPSPIN Software. Inverse Laplace transformation in the indirectly detected dimension was carried out by means of the MaxEnt algorithm.  $\text{Log}(D)$  was calculated with  $D$  expressed in  $(\mu\text{m})^2/\text{s}$ .

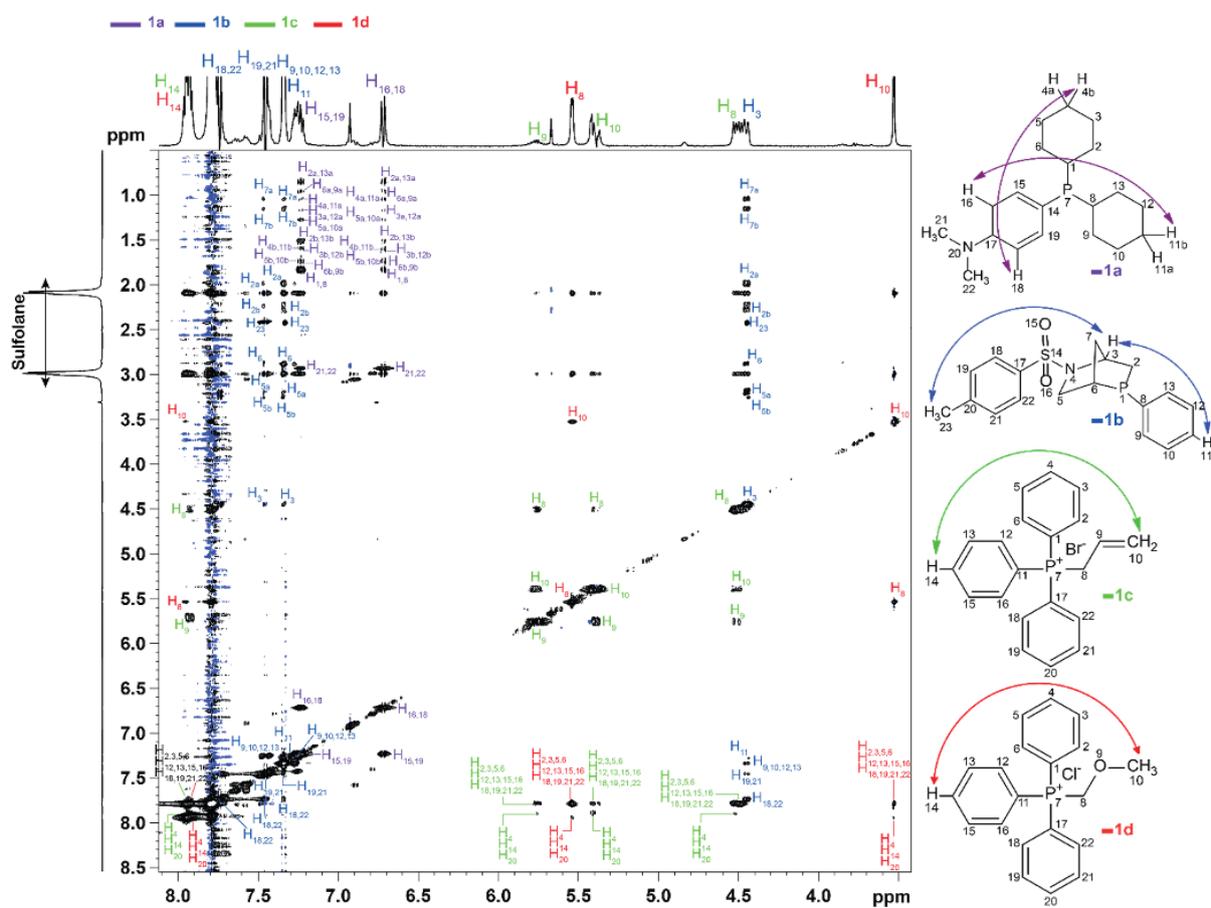


**Figure S6.** 1D proton spectra (16 scans) of the phosphorus-based compound test mixture (1a, 1b, 1c and 1d), 20 mM, dissolved in sulfolane/DMSO- $d_6$  (7:3 v/v), at 258 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) and corresponding NMR pulse sequence. G1:G2 = 70:30. The FIDs (32k points, spectral width = 5000 Hz) were processed with LB = 0.3 Hz and zero-filled to 64k points. a, d) Non-selective excitation and detection. b, e) Selective detection of two resonance bands. The 4 ms I-BURP-2 pulses cover 1250 Hz (dotted trapezium). The “1” and “2” labels respectively indicate their application to two successive low-field proton regions. c, f) Selective excitation of the aromatic H<sub>16-18</sub> protons of 1a (dotted trapezium) using a 55 ms, 1% truncated, 180° Gaussian pulse.

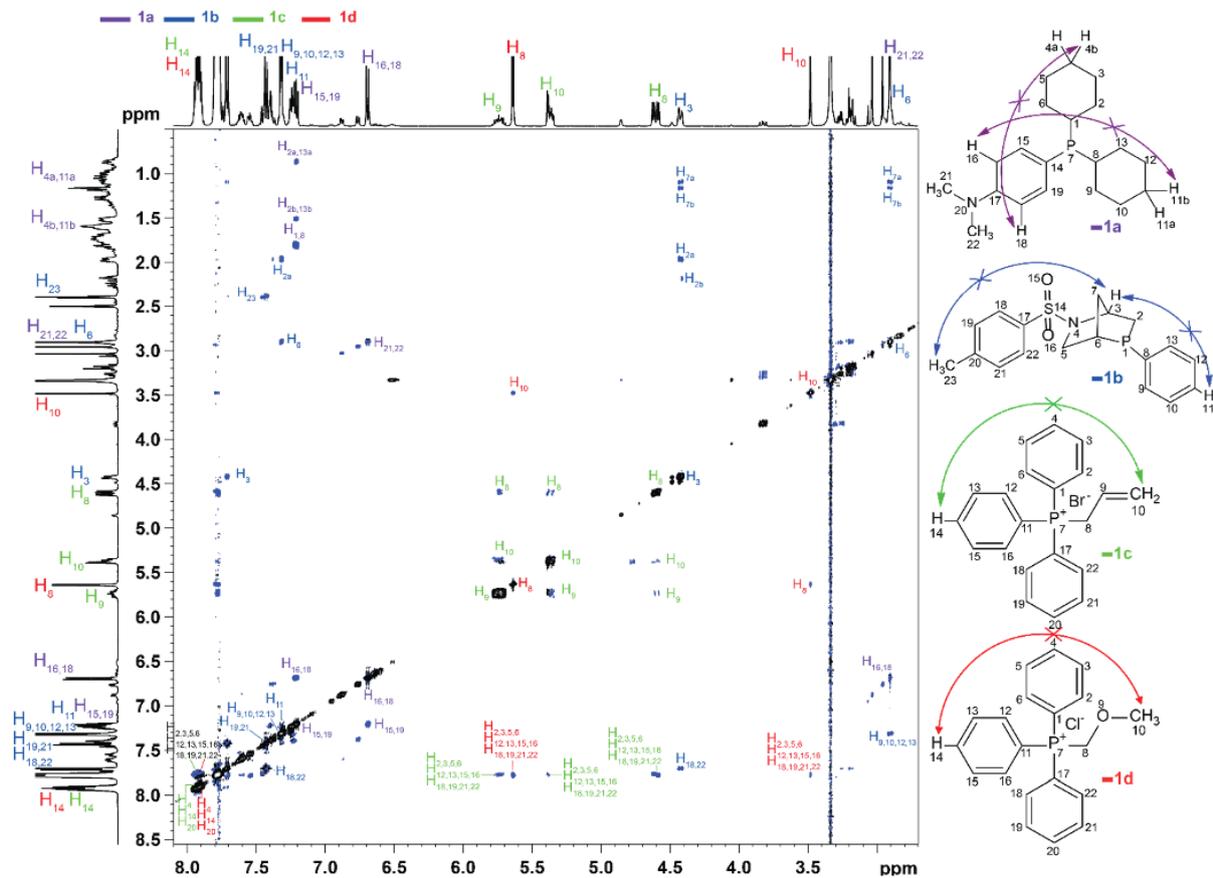


**Figure S7.** Low-field proton region of band-selective detection 2D NOESY spectra of the phosphorus-based compound test mixture (1a, 1b, 1c and 1d), 20 mM, dissolved in sulfolane/DMSO- $d_6$  (7:3 v/v), at a) 288 K, b) 278 K, c) 268 K, d) 258 K, and e) 248 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). The red frames correspond to spectral regions of interest in which temperature changes present a major effect on signal intensity. See caption of Figure 6a in SI for the acquisition and processing parameters.

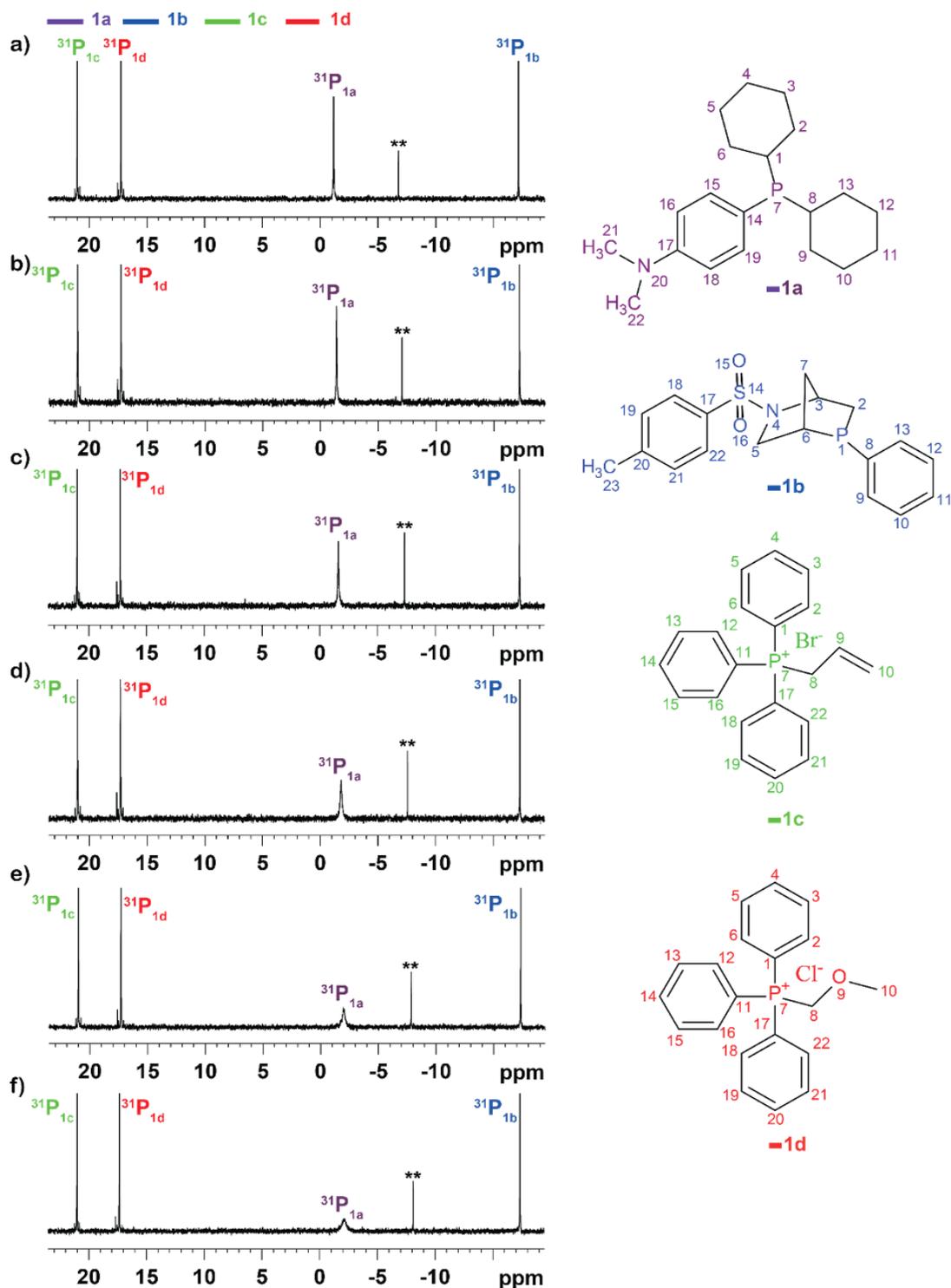
Figure S7 reports evolution of proton NOESY cross peaks upon sample temperature alteration. The spectra reveal the expected intra-molecular correlations but also present some magnetization transfer between phosphorus-based compound protons and sulfolane protons. Ambient and lower temperatures (288 K, 278 K, 268 K, 258 K and 248 K) have been tested in sulfolane/DMSO- $d_6$ . Efficient spin diffusion all over mixture components is only observed at 258 and 248 K. Nonetheless, at 248 K, overall spectral resolution (especially compound 1a) is damaged due to active transverse relaxation inducing peak broadening. Consequently, all following NMR spectra in sulfolane/DMSO- $d_6$  have been recorded at 258 K, being the optimal temperature at which the NOESY spectrum of the phosphorus-based compound test mixture shows correlations between all proton resonances of each compound without signal broadening.



**Figure S8.** Band-selective detection 2D  $^1\text{H}$  NOESY spectrum of the phosphorus-based compound test mixture (1a, 1b, 1c and 1d), 20 mM, dissolved in sulfolane/DMSO- $d_6$  (7:3 v/v), at 258 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). See caption of Figure 6a in SI for the NMR acquisition and processing parameters.



**Figure S9.** 2D <sup>1</sup>H NOESY spectrum of the phosphorus-based compound test mixture (1a, 1b, 1c and 1d), 20 mM, dissolved in neat DMSO-*d*<sub>6</sub>, at 298 K, at 500 MHz (<sup>1</sup>H). See caption of Figure 6b in SI for the NMR acquisition and processing parameters.



**Figure S10.** 1D  $^{31}\text{P}$  spectra (64 scans) of the phosphorus-based compound test mixture (1a, 1b, 1c and 1d), 20 mM, at a) 298 K, b) 288 K, c) 278 K, d) 268 K, e) 258 K and f) 248 K, dissolved in sulfolane/DMSO- $d_6$  (7:3 v/v), at 202.46 MHz ( $^{31}\text{P}$ ), using the zgpg pulse sequence. The FIDs (64k points, spectral width = 8 500 Hz) were processed with LB = 1 Hz and zero-filled to 128k points. \*\* Impurity.

The choice of the temperature range from 248 to 298 K has been guided by capability to observe efficient  $^1\text{H}$  spin diffusion and relevant  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$  spectral resolution by means of band-selective detection 2D NOESY spectra at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) (see Figure S7 in SI) and  $^1\text{H}$ -decoupled  $^{31}\text{P}$  experiments, at 202.46 MHz ( $^{31}\text{P}$ ). Spin diffusion starts to be active at 268 K for all phosphorus-containing compounds. A full magnetization exchange along proton network of each compound is clearly noticeable at 248 K. Nonetheless, at this temperature the compound 1a reveals too much active  $T_2$  transverse relaxation, responsible for  $^{31}\text{P}$  peak-line broadening.

# CHAPITRE C : “*ViscY* NMR EXPERIMENTS IN PHOSPHORIC ACID AS VISCOUS SOLVENT FOR THE INDIVIDUALIZATION OF SMALL MOLECULES WITHIN MIXTURES BY SPIN DIFFUSION”

## 1. Introduction

Le problème de l'analyse des mélanges de petites molécules a suscité ces dernières années une recherche active de solutions efficaces et pratiques. Les domaines d'application incluent l'étude des mélanges de métabolites et des milieux réactionnels chimiques. La complexité des mélanges est un facteur déterminant pour le succès de la caractérisation des composants des mélanges, qui est souvent l'objectif principal de telles études. L'analyse des mélanges est souvent limitée à l'identification et à la quantification de composés connus. Les techniques usuelles pour la détermination de la structure de composés inconnus impliquent le couplage de méthodes de séparation physique et spectroscopiques, telles que la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée à la RMN (LC-SPE-NMR) ou/et la spectrométrie de masse (LC-MS), approches qui ne sont pas dénuées de limitations. La séparation physique par chromatographie analytique nécessite bien souvent la recherche des conditions appropriées à travers différents essais et erreurs, un processus qui a un coût en équipement, en temps de développement de la méthode, en quantité de solvants et en colonnes. Lorsque la séparation physique n'apporte pas de solution satisfaisante à un problème donné, la spectroscopie de RMN doit être réalisée sur les mélanges. Pouvoir regrouper efficacement les pics de RMN selon les composés dont ils sont issus, réduirait la nécessité d'une séparation chromatographique et faciliterait ainsi considérablement l'étude des mélanges de produits naturels et synthétiques. La détermination de la structure de composés dans des mélanges par RMN, sans effectuer de séparation physique, reste à ce jour d'usage restreint, même si des méthodes dédiées ont été rapportées dans la littérature.

Dans ce contexte, les expériences RMN *ViscY* ont apporté une valeur ajoutée pour l'étude structurale de mélanges complexes. *ViscY* est un nom collectif pour les expériences de RMN qui tirent profit de la diffusion de spin dans des solvants très visqueux pour l'individualisation des spectres de RMN des composants de mélange de petites molécules. Selon la théorie de la microviscosité de Gierer et Wirtz,<sup>208</sup> la valeur du temps de corrélation moléculaire global  $\tau_c$  d'un composé en solution dépend de la viscosité du milieu. Par conséquent, lorsque la viscosité du milieu augmente suffisamment, la vitesse de rotation des molécules de petites et moyennes tailles est ralentie, de sorte que l'échange d'aimantation par la relaxation croisée longitudinale devient très efficace et favorise ainsi la diffusion de spin. En conséquence, les molécules présentent un régime de NOE négatif et leurs résonances peuvent être regroupées selon leur capacité à partager l'aimantation par diffusion de spin intramoléculaire. Les résonances des noyaux  $^1\text{H}$  au sein d'une même molécule peuvent corrélérer entre-elles au moyen d'un spectre NOESY 2D, donnant ainsi accès aux spectres de RMN  $^1\text{H}$  individuels des composants du mélange. Ce sujet a été exploré à différentes reprises au cours des quatre dernières décennies : l'idée initiale a été mise en œuvre par Williamson M.-P. *et al* en 1981<sup>43</sup> en utilisant du CTFEP, un solvant polymère perfluoré. En 2008, Simpson *et al.* ont introduit pour la première fois l'utilisation du CTFEP pour l'analyse des mélanges.<sup>44</sup> et ont utilisé l'eau surfondue pour moduler la dynamique de spin de petits métabolites en 2012.<sup>45</sup> Notre équipe de recherche a publié en 2011, 2016, 2017, 2019 et 2020 des articles portant sur l'utilisation de solvants visqueux pour la création des

conditions de diffusion de spin  $^1\text{H}$  et  $^{19}\text{F}$  et l'utilisation de noyaux  $^{13}\text{C}$  et  $^{31}\text{P}$  comme marqueurs de déplacements chimiques. <sup>46-48, 72-73</sup>

Dans ce contexte, le présent travail se concentre sur l'évaluation de deux milieux visqueux qui ont été préparés à partir d'acide orthophosphorique (85%) par dilution avec du  $\text{D}_2\text{O}$  ou  $\text{DMSO-}d_6$ , fournissant ainsi des mélanges de solvants avec des polarités légèrement différentes dans lesquelles les expériences de RMN liquide peuvent être réalisées facilement. Deux mélanges ont été utilisés, un mélange de quatre dipeptides et un mélange de quatre composés contenant du phosphore de faible polarité.

Les paramètres physico-chimiques de l'acide phosphorique (85%) sont détaillés dans la partie II : Matériels et Méthodes – 1. La diffusion de spin en milieu visqueux.

## 2. Publication

## PAPER

Cite this: *Analyst*, 2021, **146**, 5316

## ViscY NMR experiments in phosphoric acid as a viscous solvent for individualization of small molecules within mixtures by spin diffusion†

Francois Pedinielli, Ritchy Leroy, Agathe Martinez, Jean-Marc Nuzillard  and Pedro Lameiras \*

The analysis of small molecules within complex mixtures is a particularly difficult task when dealing with the study of metabolite mixtures or chemical reaction media. This issue has fostered in recent years an active search for effective and practical solutions. In this context, the ViscY NMR approach has been recently proposed. ViscY collectively designates the NMR experiments that take advantage of spin diffusion in highly viscous solvents or solvent blends for the individualization of the NMR spectra of small molecule mixture components. Two viscous media were prepared from *ortho*-phosphoric acid (85%) solution by dilution with either D<sub>2</sub>O or DMSO-*d*<sub>6</sub>, thus providing solvent blends with slightly different polarities in which all liquid-state NMR experiments can be carried out easily. Two mixtures, one of four structurally close dipeptides and one of four low-polarity phosphorus-containing compounds, were used for the method assessment, using ViscY experiments such as homonuclear selective 1D and 2D <sup>1</sup>H NOESY experiments, heteronuclear 2D <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N/<sup>1</sup>H–<sup>31</sup>P HSQC-NOESY and <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C/<sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N/<sup>1</sup>H–<sup>31</sup>P NOAH experiments.

Received 19th May 2021.  
Accepted 26th June 2021  
DOI: 10.1039/d1an00899d  
rsc.li/analyst

### Introduction

Liquid-state NMR spectroscopy plays a key role in the structure elucidation of unknown organic compounds, provided that sample purity is fair to excellent. Real-life situations may preclude resorting to purification methods and force to analyse mixtures. For instance, the substances produced by chemical synthesis often contain starting materials, by-products, and the desired end product. Also, the natural or biotechnological extracts may contain several hundred organic molecules. In this context, simultaneous purification and NMR spectroscopy through LC-SPE-NMR or LC-SPE-MS/NMR coupling strategies may be carried out.<sup>1–4</sup> The physical separation of mixture constituents may be helpful but is not always practical. Moreover, chromatography cannot be applied to highly reactive molecules, is unappealing if crucial molecular associations are shattered by separation and maybe simply too time-consuming and therefore too expensive to employ. Consequently, using NMR without prior physical separation may turn out to be relevant.

The study of mixtures by liquid-state NMR mainly focuses on the identification and quantification of already known

molecules. Determining their structures may be demanding in case of accidental strong peak overlap. Being able to assign each resonance to a specific compound should limit the necessity of chromatographic separation, help scientists analyse unknown compounds within mixtures, and thus significantly improve the efficiency of synthetic and natural product chemistry. So far, NMR spectroscopy has been considered for mixture analysis in a reduced number of ways: (i) the translational diffusion coefficient in solution (*D*) is a molecular property and describes its mobility. The individual 1D NMR spectrum of each mixture component can be extracted by considering *D* as a discriminating factor, using the 2D DOSY method.<sup>5–8</sup> Nonetheless, *D* values are only weakly discriminating, even if experimental techniques may improve their resolving power in special cases (adjunction of a chromatographic solid phase, interaction of the molecules of interest with soluble polymers, lanthanide shift reagents, or micelles).<sup>9–18</sup> (ii) Multi-quantum spectroscopy coupled (or not) with broadband homonuclear decoupling/pure shift NMR, ultrafast data acquisition, sparse sampling, and tensor decomposition methods may all help separate the spectra of molecules within mixtures.<sup>19–23</sup> (iii) The use of viscous solvents under appropriate conditions slows down the tumbling rate of small and mid-sized molecules in solution,<sup>24–36</sup> so that the longitudinal cross-relaxation regime induces spin diffusion over the entire molecular spin networks. Therefore, the resonances of different species may be distinguished according to their ability to

Université de Reims Champagne-Ardenne, CNRS, ICMR UMR 7312, 51097 Reims, France. E-mail: pedro.lameiras@univ-reims.fr; Tel: +33 3 26 91 82 28  
† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/d1an00899d

share magnetization through intramolecular spin diffusion. All  $^1\text{H}$  resonances from each molecule may correlate together in a 2D NOESY spectrum, making it possible to individualize the  $^1\text{H}$  NMR spectrum of each mixture constituent. In 2008, Simpson and co-workers first published the use of a high-viscosity solvent, the chlorotrifluoroethylene polymer, for organic mixture analysis by means of 1D and 2D NOESY spectroscopy.<sup>29</sup> The same team reported in 2012 the use of super-cooled water in narrow capillaries to manipulate the rotational dynamics of small molecules for identifying mixed small metabolites.<sup>31</sup> Lameiras *et al.* published original results for mixture analysis by NMR spectroscopy using glycerol and glycerol carbonate (in 2011),<sup>30</sup> DMSO/glycerol (in 2016),<sup>32</sup> DMSO/water (in 2017),<sup>33</sup> sucrose solution and agarose gel (in 2019),<sup>34</sup> and sulfolane-based solvents (in 2020)<sup>36</sup> as viscous solvents for  $^1\text{H}$  and  $^{19}\text{F}$  spin diffusion promotion. In 2020, Lameiras and co-workers introduced the term *ViscY* for NMR methods in which viscous solvents promote the mixture component individualization by NMR spin diffusion spectroscopy.<sup>36</sup>

To date, the investigation of high- and low-polarity molecules within mixtures has been only carried out in a few viscous solvents. In this context, two viscous media were prepared from *ortho*-phosphoric acid (85%) by dilution with either  $\text{D}_2\text{O}$  or  $\text{DMSO-}d_6$ , thus providing solvent blends with slightly different polarities. For the method assessment, two mixtures, one of four structurally close dipeptides and one of four low-polarity phosphorus-containing compounds, were studied by *ViscY* experiments, including homonuclear selective 1D and 2D  $^1\text{H}$  NOESY experiments, heteronuclear 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ / $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HSQC-NOESY and  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ / $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ / $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  NOAH experiments.

Orthophosphoric acid ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), also named phosphoric acid, is a weak mineral triacid. It plays an important role in inorganic chemistry and biochemistry. About 90% of its production is engaged in the industry of fertilizers. At room temperature, pure phosphoric acid is a crystalline solid. It is usually sold as a colourless syrup of 85% concentration in water. This liquid is miscible with polar solvents such as alcohol, water, and most non-polar solvents.<sup>37</sup> Phosphoric acid (85%) solution presents a melting point around 299 K.<sup>38</sup> Its melting point can be reduced by the addition of more water or  $\text{DMSO-}d_6$ . By the way, melting points of phosphoric acid (85%) solution respectively reached 248 K and 258 K after the addition of 20% of water and 30% of  $\text{DMSO-}d_6$  by volume. This property enabled us to prepare liquid-state NMR samples at or below room temperature, which is particularly suitable for molecules of poor thermal stability. As a result, spin diffusion may occur at a wide temperature range, from room to negative Celsius temperatures owing to the viscosity increase of both solvent blends upon temperature decrease.<sup>39</sup> However, the viscosity of the phosphoric acid-based blends at room temperature stays relatively low, even though phosphoric acid (85% in water) presents a viscosity of 37.59 cP at 298 K<sup>39</sup> (for comparison,  $\eta_{\text{water}} = 0.898$  cP and  $\eta_{\text{DMSO-}} = 2.003$  cP at 25 °C)<sup>40</sup> As a consequence, NMR sample tubes can be prepared without any issues, contrary to highly viscous solvents such as glycerol ( $\eta = 934$  cP at

298 K)<sup>41</sup> Furthermore, the weak triacidity of phosphoric acid solutions ( $\text{p}K_a = 2.148, 7.198, \text{ and } 12.319$  at 298 K) makes its use compatible with most of the small molecules without the risk of altering them. However, considering these phosphoric acid-based solvents forces the suppression of the strong  $^1\text{H}$  NMR signal of water, a requirement that it is easily fulfilled by the excitation sculpting sequence.<sup>42</sup> In addition, the high amount of the added  $\text{DMSO-}d_6$  and  $\text{D}_2\text{O}$  easily enables automatic field-locking and shimming, like for any other common NMR solvent. Nonetheless, the major disadvantage of using phosphoric acid solutions is the formation of salts that may disturb the matching of the spectrometer probe head, which requires care when handling a cryoprobe. As a result, the duration of pulses may be longer than that measured in usual organic deuterated solvents. Owing to the higher dielectric constant of water compared to  $\text{DMSO-}d_6$ ,<sup>43</sup> the phosphoric acid (85%)/ $\text{D}_2\text{O}$  mixture is more suitable for the investigation of high-polarity molecules while the binary phosphoric acid (85%)/ $\text{DMSO-}d_6$  mixture is more appropriate for the study of low-polarity compounds. Medium-sized compounds require a low amount of water or  $\text{DMSO-}d_6$  in phosphoric acid (85%) solutions whereas smaller or more flexible compounds necessitate more water or  $\text{DMSO-}d_6$  for driving spin diffusion from room temperature to negative Celsius temperatures.

The criterion for optimal temperature selection is a compromise between the overall spectral resolution and the intensity of NOESY cross-peaks between nuclei that are not nearby to reveal an NOE signal that would be absent in a low-viscosity solution. A temperature reduction enhances spin diffusion but also reduces the peak height through line broadening due to a more active transverse relaxation. Sample cooling is therefore required if the NOESY spectrum shows positive NOE responses (diagonal and off-diagonal peaks of opposite signs). Following the complexity of the mixtures, the analysis of  $^1\text{H}$  NMR spectra may become intractable owing to  $^1\text{H}$  resonance overlapping. A conventional remedy to this involves the spreading of the spectroscopic information along a second dimension that encodes chemical shifts of nuclei other than protons.<sup>32-34,36</sup> This approach to NMR mixture analysis is illustrated in phosphoric acid (85%)/ $\text{D}_2\text{O}$  solution using 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-NOESY and  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ / $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  NOAH experiments and in phosphoric acid (85%)/ $\text{DMSO-}d_6$  solution using 2D  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HSQC-NOESY and  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  NOAH experiments offering  $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  and  $^1\text{H}/^{31}\text{P}$  chemical shifts of respectively every mixed high- and low-polarity molecule.

## Results and discussion

### Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr mixtures in phosphoric acid (85%)/ $\text{D}_2\text{O}$ (8 : 2, v/v) solution

These dipeptides when dissolved in pure water are not discriminated according to their translational diffusion behaviour, owing to their comparable molecular weight and shape (Fig. S1 in the ESI<sup>†</sup>). In this context, we have considered the resolving power of homo- and heteronuclear NOESY-based

spin diffusion experiments in viscous phosphoric acid solutions to offer a working alternative to the DOSY experiment.

An experimental issue of handling phosphoric acid solution is the mandatory suppression of its strong residual  $^1\text{H}$  water signal (see Fig. S2a†) to fully benefit from the high dynamic range of the NMR spectrometer receiver since the deuterated phosphoric acid solution is quite expensive and the chemical exchange between the solvent deuterium nuclei and dipeptide amide protons may occur. Nonetheless, the suppression of the HOD signal is easily achieved by using an excitation sculpting sequence (Fig. S2b†).<sup>42</sup>

Since temperature is a crucial parameter to observe spin diffusion because it is related to solvent viscosity and therefore to overall rotational correlation times  $\tau_C$ ,<sup>30,44</sup> we have determined the optimal temperature at which the NOE cross-peaks were positive (negative NOE enhancements, slow motion regime), well-resolved, and as intense as possible between nuclei (not close enough to display an NOE in a low viscosity solvent). The optimized temperature of 288 K has been chosen by recording NOESY experiments with water suppression by excitation sculpting (see Fig. 1a; amide proton region NOESY spectra at 298, 288 and 278 K in Fig. S3 and full NOESY spectrum at 288 K in Fig. S4 in the ESI†).

The use of an aqueous phosphoric acid solution enables a thorough intramolecular magnetization transfer through spin diffusion, observed over distances of  $>14$  Å within each small and flexible dipeptide in the NOESY spectrum at 288 K, whereas in water at 298 K the NOESY spectrum reveals fewer NOESY cross-peaks and of opposite sign (positive NOE enhancements, fast motion regime, see Fig. 1b; full NOESY spectrum in Fig. S5 of ESI†). As a result, under *ViscY* conditions, the compound by compound clustering of proton resonances is achieved, making possible the individualization of each mixture component since the chemical shift pattern of each dipeptide is predictable. The individualization of the four dipeptides in water would have necessitated the concomitant use of  $J$ -coupling and dipolar-coupling  $^1\text{H}$  NMR experiments such as COSY/TOCSY and NOESY, following the usual peptide resonance assignment method.<sup>45</sup>

For complex mixture investigations, detecting only the resonances of interest during signal acquisition may deliver additional structural information by preventing proton resonance overlapping. Selectively exciting a suitable set of proton resonances in 1D selective NOESY experiments exemplifies this approach.

In the 1D selective NOESY experiment, a single spin is excited, and its magnetization is further flipped to bring it to the  $z$ -axis where it can spread by spin diffusion along with the molecular proton network. The 1D selective NOESY pulse sequence starts with a multiplet selective excitation block (Fig. 2e).<sup>46,47</sup> Two wideband inversion pulses have been included during the mixing time. Their positions have been adjusted to circumvent the resurgence of the strong water signal during the acquisition time that comes from longitudinal relaxation.<sup>47</sup>

The 1D selective NOESY spectra in Fig. 2 show that each dipeptide is discriminated by spin diffusion in phosphoric

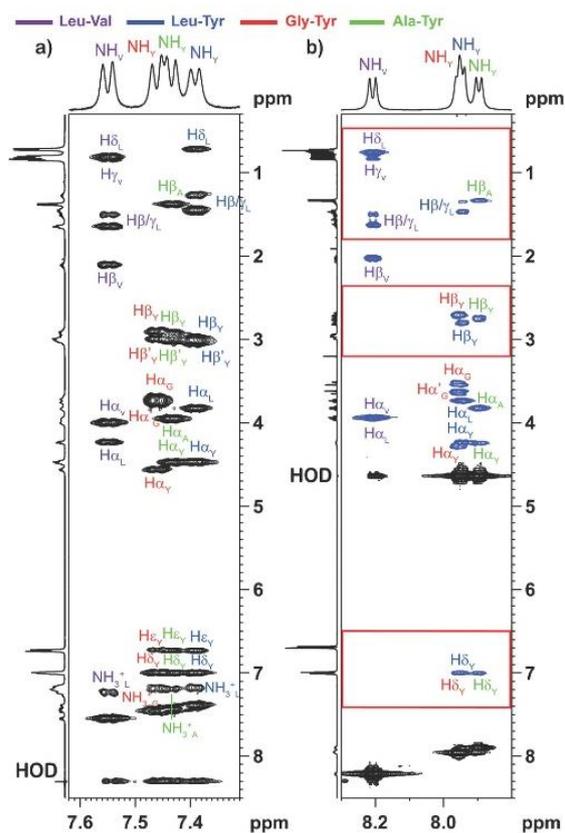
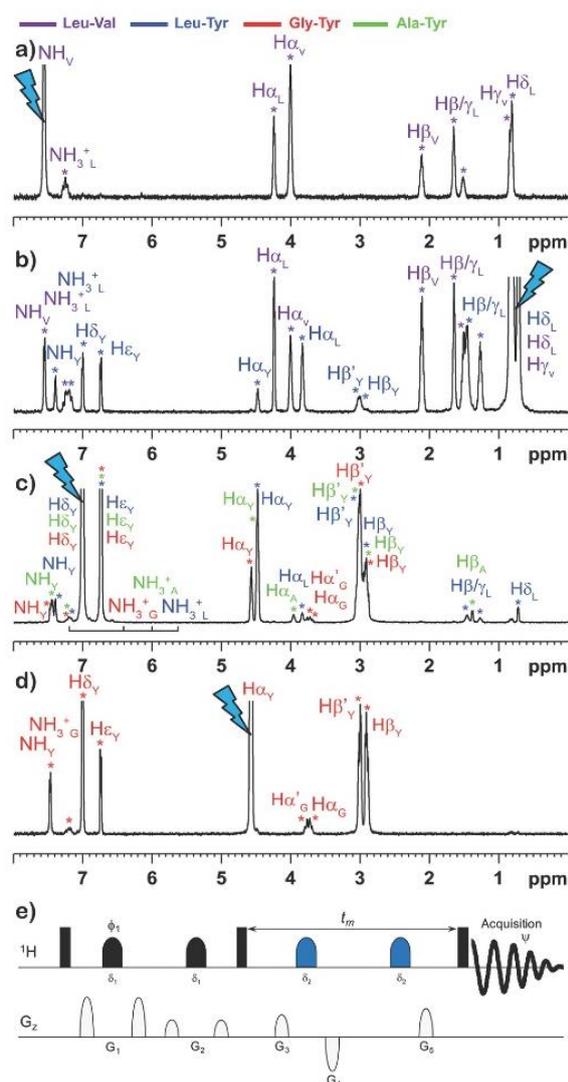


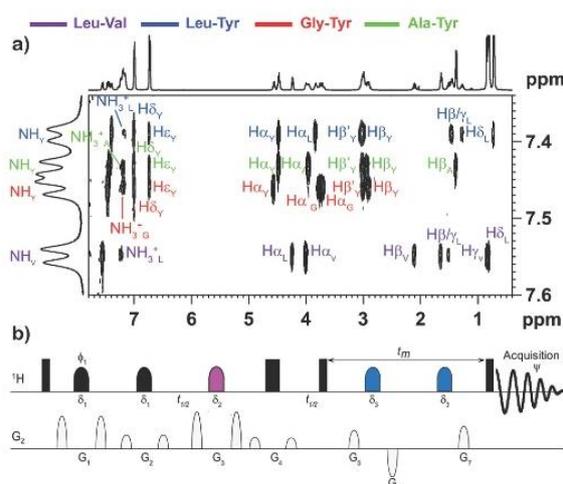
Fig. 1 Amide proton region of 2D NOESY spectra of the dipeptide test mixture (20 mM), mixing time ( $t_m$ ) = 1 s, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ), dissolved (a) in phosphoric acid (85%)/ $\text{D}_2\text{O}$  (8 : 2, v/v) solution, at 288 K, (b) dissolved in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9 : 1, v/v), at 298 K. The red frames correspond to spectral regions of interest in which water as a solvent has a major effect on the number and sign of observable NOESY cross-peaks.

acid (85%)/ $\text{D}_2\text{O}$  (8 : 2, v/v) solution at 288 K, using a suitable set of selectively excited proton resonances. Incidentally, the selective excitation of the NH amide proton at 7.55 ppm discloses a magnetization exchange solely with the protons of the Leu-Val dipeptide, even with the terminal ammonium protons  $\text{NH}_3^+$  of leucine (Fig. 2a) due to the acidity of the medium allowing to sufficiently slow down the chemical exchange with water. The selective excitation of the side chain  $\text{H}\delta$  and  $\text{H}\gamma$  protons (between 0.65 and 0.95 ppm) reveals a magnetization exchange with all protons of the two Leu-Val and Leu-Tyr dipeptides (even with the terminal ammonium protons  $\text{NH}_3^+$  of both leucines) (Fig. 2b). By comparison with the 1D NOESY spectra in Fig. 2a and b, a full proton assignment of Leu-Tyr is achievable. The selective excitation of the aromatic  $\text{H}\delta$  protons of Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr presents all proton resonances of Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr (including the terminal ammonium protons  $\text{NH}_3^+$  of alanine and glycine) (Fig. 2c). The complete individual  $^1\text{H}$  spectrum of Gly-Tyr is obtained after selectively exciting the  $\text{H}\alpha$  proton at 4.57 ppm (Fig. 2d).



**Fig. 2** Multiplot selective excitation 1D  $^1\text{H}$  NOESY spectra of the dipeptide test mixture (20 mM) dissolved in phosphoric acid (85%)/ $\text{D}_2\text{O}$  (8 : 2, v/v) solution (a, b, c, d, 288 K),  $t_m = 1$  s, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). The initial selective inversion pulses excite (a) the  $\text{NH}_V(\text{LV})$  proton resonance; (b) the  $\text{H}\delta_L(\text{LY})/\text{H}\delta_L(\text{LV})/\text{H}\gamma_V(\text{LV})$  proton resonances; (c) the  $\text{H}\delta_V(\text{LY})/\text{H}\delta_V(\text{GY})/\text{H}\delta_V(\text{AY})$  proton resonances; and (d) the  $\text{H}\alpha_V(\text{GY})$  proton resonance. (e) Pulse sequence:  $\phi = x, y, -x, -y, \psi = x, -x$ .

Another way to discriminate each mixed dipeptide, by detecting only resonances of interest during signal acquisition, has been to resort to only one selective NOESY experiment, namely an  $F_1$  band selective  $F_1$  decoupled 2D NOESY experiment.<sup>48,49</sup> Amide NH resonances have been the initial source of magnetization after the initial band selective excitation step since their resonances are close in frequency and they are not scalarly coupled together (Fig. 3). The mixing time block, including wideband inversion pulses to avoid the



**Fig. 3** (a)  $F_1$  band selective  $F_1$  decoupled 2D  $^1\text{H}$  NOESY spectrum of the dipeptide test mixture (20 mM) in phosphoric acid (85%)/ $\text{D}_2\text{O}$  (8 : 2, v/v) solution, at 288 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ),  $t_m = 1$  s. (b) Pulse sequence:  $\phi_1 = x, y, -x, -y, \psi = x, -x$ . The initial selective  $180^\circ$  pulses had a Gaussian shape and were applied to the four NH amide proton resonances.

reappearance of the HOD signal, allowed spin diffusion to extend throughout the proton network of each dipeptide. Carrying out this latter experiment in phosphoric acid solution allows the assignment of all proton resonances of Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr under *ViscY* conditions.

It may happen in more complex mixtures that the resolved proton resonances of the components of interest are not revealed due to too severe spectral overlap. In such cases, the larger chemical shift dispersion of  $^{15}\text{N}$  nuclei may turn out to be useful. By coupling the HSQC and NOESY experiments, an entire proton spectrum should be recorded for a molecule, starting only from a single nitrogen resonance. Along this way, the 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-NOESY spectrum of the dipeptide test mixture, recorded at 288 K, in phosphoric acid (85%)/ $\text{D}_2\text{O}$  (8 : 2, v/v) solution unveils that all protons of each dipeptide within the mixture correlate with all other protons (except all terminal ammonium protons  $\text{NH}_3^+$  for a sensitivity issue) after having marked the nitrogen chemical shift in  $F_1$  under *ViscY* conditions (Fig. 4).

Another alternative way to individualize each dipeptide within the mixture has been also to focus on the NOAH-5 BMSCN supersequence allowing in a row, with only one recycling delay, the acquisition of  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (B),  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMQC (M),  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (S),  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (C) and  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY (N) spectra under *ViscY* conditions (Fig. S6 in the ESI†).<sup>50</sup> In addition to the full assignment of every proton resonance of mixed Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr, thanks to the active spin diffusion occurring during the mixing time of the NOESY experiment, heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$   $J$ -scalar correlations are also obtained (in particular, all nitrogen chemical shifts of terminal ammonium groups  $\text{NH}_3^+$ ). This additional information obtained by a single NMR experi-

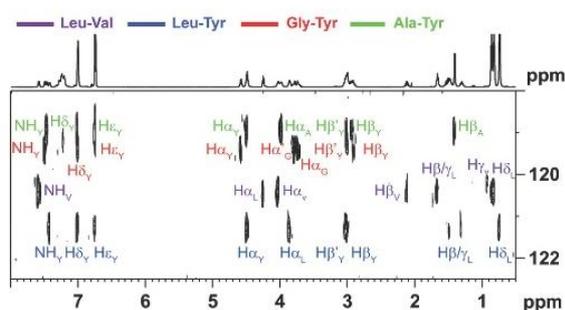


Fig. 4 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-NOESY spectrum of the dipeptide test mixture (50 mM) dissolved in phosphoric acid (85%)/ $\text{D}_2\text{O}$  (8 : 2, v/v) solution,  $t_m = 1$  s, at 288 K, at 600 MHz ( $^1\text{H}$ ).

ment in a shorter time may prove to be relevant in the case of strong  $^1\text{H}$  resonance overlapping in the study of complex mixtures.

**Dicyclohexyl(4-(*N,N*-dimethylamino)phenyl) phosphine, exophenyl Kwon [2.2.1] bicyclic phosphine, allyltriphenylphosphonium bromide and (methoxymethyl)triphenylphosphonium chloride mixture in phosphoric acid (85%)/ $\text{DMSO-}d_6$  (7 : 3, v/v) solution**

The simplification of small molecule mixture analysis has been extended to  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy using heteronuclear chemical shift resonance labelling. Phosphorus is common in synthetic intermediates and biological compounds. It has a 100% natural abundance and presents sharp NMR peaks.<sup>51</sup> Its chemical shift range covers about 2000 ppm, which facilitates the individualization of phosphorus-containing compounds in mixtures.<sup>52</sup> In the slow tumbling limit, unlike  $^{19}\text{F}$  and  $^1\text{H}$  nuclei that reveal negative NOEs and HOEs,  $^{31}\text{P}$  nuclei show

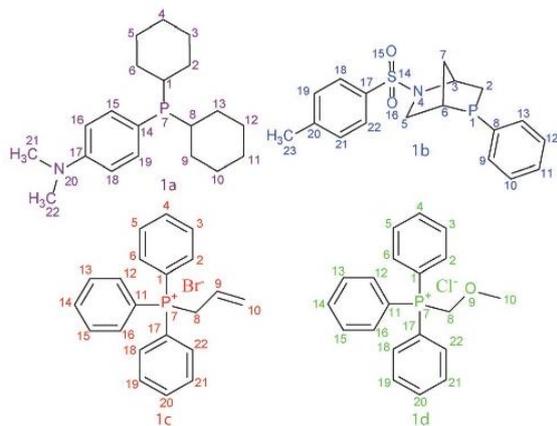


Fig. 5 Chemical structures of the four phosphorus-containing compounds within the mixture. 1a: dicyclohexyl (4-(*N,N*-dimethylamino) phenyl) phosphine, 1b: exophenyl Kwon [2.2.1] bicyclic phosphine, 1c: allyltriphenylphosphonium bromide and 1d: (methoxymethyl)triphenylphosphonium chloride.

only positive HOEs that tend towards zero with slower tumbling owing to the particular value of its magnetogyric ratio.<sup>53</sup> A workaround to this experimental issue is to consider  $^{31}\text{P}$  nuclei as chemical shift markers and to induce magnetization exchange along the intramolecular proton network using the 2D  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HSQC-NOESY experiment under *ViscY* conditions. We report here the individualization of four mixed phosphorus-containing compounds dissolved in the phosphoric acid (85%)/ $\text{DMSO-}d_6$  (7 : 3, v/v) solvent blend under spin diffusion conditions by homonuclear selective 1D and 2D  $^1\text{H}$  NOESY experiments, heteronuclear 2D  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HSQC-NOESY and  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  NOAH experiments.

Like the dipeptides dissolved in pure water, the four phosphorus-containing molecules (Fig. 5) do not present any differentiation by translational diffusion in pure  $\text{DMSO-}d_6$ , owing to their similar molecular weight (Fig. S7 in the ESI<sup>†</sup>). This observation led us to assess phosphoric acid (85%) mixed with  $\text{DMSO-}d_6$  in the individualization of these four low-polarity

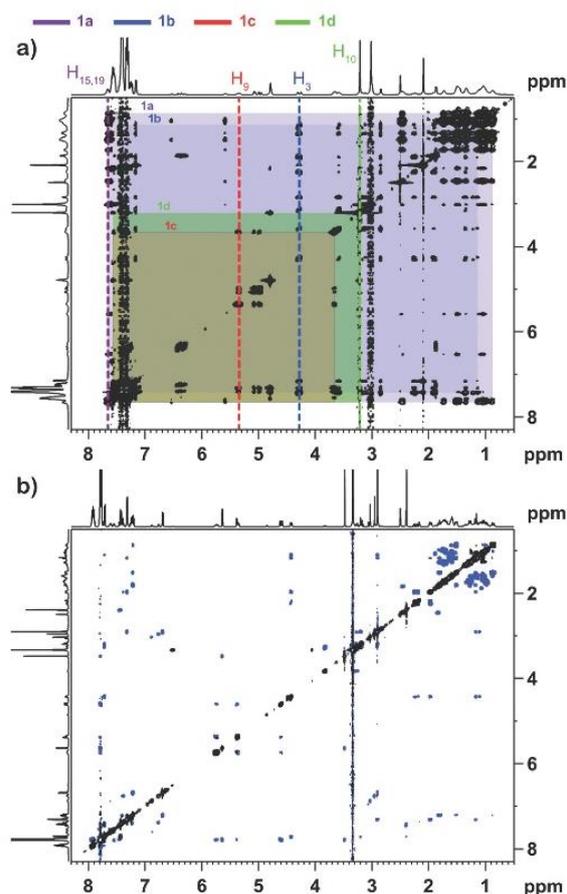


Fig. 6 2D  $^1\text{H}$  NOESY spectra of the phosphorus-containing compound test mixture (20 mM), mixing time ( $t_m$ ) = 0.5 s, at 298 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ): (a) dissolved in phosphoric acid (85%)/ $\text{DMSO-}d_6$  (7 : 3, v/v) solution and (b) dissolved in neat  $\text{DMSO-}d_6$ .

molecules by taking advantage of the resolving power of NOESY-based spin diffusion experiments. Proton NMR in phosphoric acid (85%)/DMSO- $d_6$  (7 : 3, v/v) solution forces the elimination of its strong residual H<sub>2</sub>O signal. This water signal suppression has been easily accomplished using the excitation sculpting sequence (Fig. S8b in the ESI†).<sup>42</sup>

The effect of temperature on intramolecular spin diffusion has been already discussed in the preceding section. Likewise, we have established the optimal temperature that gives the best compromise between the efficient <sup>1</sup>H spin diffusion and spectral resolution by using 2D <sup>1</sup>H NOESY experiments with water suppression by excitation sculpting, at 500 MHz (<sup>1</sup>H) and at 308, 298, and 288 K. Spin diffusion is already active at 308 K for all molecules (Fig. S9 in the ESI†). Nonetheless, a full magnetization exchange along the proton network of every molecule is visible at 298 K. At 288 K, full spin diffusion is efficient but spectral resolution is a bit damaged due to more active  $T_2$

transverse relaxation, responsible for <sup>1</sup>H resonance line broadening (Fig. S9 in ESI†). As a result, the optimal temperature of 298 K has been chosen for the following NMR studies because it offered efficient <sup>1</sup>H spin diffusion (negative NOE enhancements, positive NOE cross-peaks, slow tumbling regime) and suitable <sup>1</sup>H spectral resolution.

The 2D NOESY spectrum at 298 K discloses four positive NOE cross-peak patterns, each corresponding to a single mixture component (Fig. 6a and Fig. S10 in the ESI†). The pattern identification of 1a is driven by the distinctive aromatic protons H<sub>15,19</sub> at 7.67 ppm (Fig. 6a, purple pattern). The pattern of 1b is identified by means of the tropanic ring proton H<sub>3</sub> at 4.29 ppm (Fig. 6a, blue pattern). The proton H<sub>9</sub> at 5.36 ppm helps distinguish the proton pattern of 1c (Fig. 6a, red pattern). The proton resonance H<sub>10</sub> at 3.21 ppm is a relevant starting point for recognizing the complete resonance pattern of 1d (Fig. 6a, green pattern). As a result, the use of phosphoric acid (85%)/DMSO- $d_6$  binary solvent enables an entire intramolecular magnetization exchange within every mixed phosphorus-containing compound by spin diffusion, observed over distances greater than 13 Å, in part due to the rigidity of the cycloalkyl and aromatic parts. In contrast, when the conventional 2D NOESY spectrum is acquired in pure DMSO- $d_6$  at 298 K, the four mixed phosphorus-containing compounds quickly reorient and reveal negative NOE cross-peaks (positive NOE enhancements, fast motion regime) thus avoiding spin diffusion being detected (Fig. 6b and Fig. S11 in the ESI†).

It is not easy to unambiguously assign each proton resonance to each specific compound within the mixture due to resonance peak overlaps, particularly in the proton 1D and 2D spectra from 0.6 to 2.6 and from 7.1 to 7.8 ppm. The multiplet selective excitation 1D NOESY experiment,<sup>46,47</sup> formerly

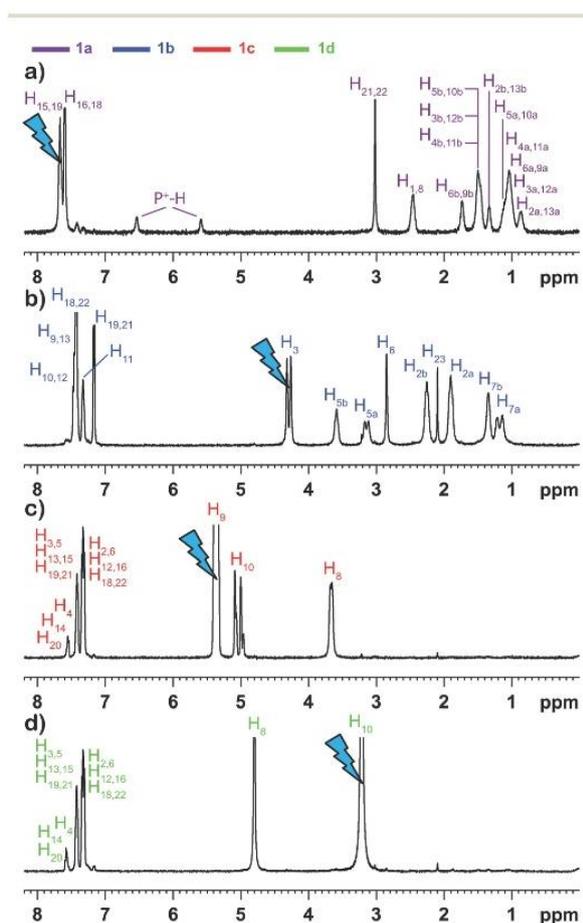


Fig. 7 Multiplet selective excitation 1D <sup>1</sup>H NOESY spectra of the phosphorus-containing compound test mixture (20 mM) dissolved in phosphoric acid (85%)/DMSO- $d_6$  (7 : 3, v/v) solution (a, b, c and d),  $t_m$  = 0.5 s, at 298 K, 500 MHz (<sup>1</sup>H). The initial selective inversion pulses excite (a) H<sub>15,19</sub>(1a), (b) H<sub>3</sub>(1b), (c) H<sub>9</sub>(1c) and (d) H<sub>10</sub>(1d) proton resonances.

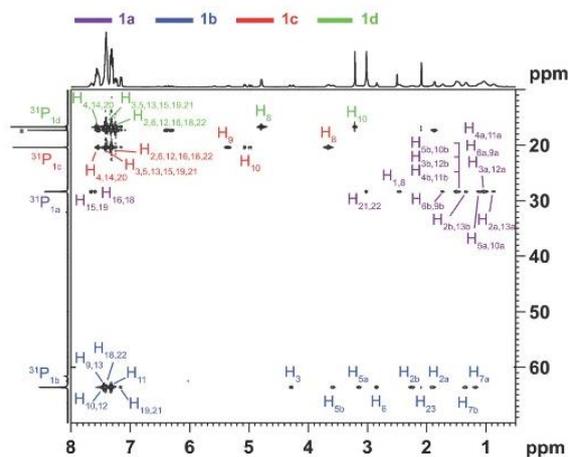


Fig. 8 (a) 2D <sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P HSQC-NOESY spectrum of the phosphorus-containing compound test mixture (20 mM) dissolved in phosphoric acid (85%)/DMSO- $d_6$  (7 : 3, v/v) solution,  $t_m$  = 0.5 s, at 298 K, 500 MHz (<sup>1</sup>H). \* Impurity.

described in the context of dipeptide mixture analysis, addresses this pitfall by clustering proton resonances belonging to the same molecule. The resurgence of the strong  $^1\text{H}$  water signal during the mixing time of the NOESY block is still prevented by wideband inversion pulses enclosed in gradient pulse pairs.<sup>47</sup> Choosing an appropriate set of selectively excited proton resonances enables the acquisition of the individual 1D  $^1\text{H}$  spectrum of every mixed compound by taking benefit from spin diffusion under *ViscY* conditions (Fig. 7). In particular, the individualization of 1a is achieved by the selective excitation of the aromatic protons  $\text{H}_{15,19}$  at 7.67 ppm (Fig. 7a). All proton resonances of 1b are detected by means of the selective excitation of the tropane ring proton  $\text{H}_3$  at 4.29 ppm. By the way, spin diffusion is sufficiently active to correlate proton signals from the two aromatic groups (Fig. 7b). Selective excitations of the ethylene protons  $\text{H}_9$  at 5.36 ppm and the methyl group proton  $\text{H}_{10}$  at 3.21 ppm

respectively group together all proton resonances of 1c and 1d (Fig. 7c and d).

The selective excitation of resolved proton resonances has permitted individualizing each mixture component by taking advantage of spin diffusion under *ViscY* conditions. Nonetheless, in the investigation of more complex phosphorus-containing mixtures, the isolated proton resonances of the molecules of interest may not be revealed due to severe  $^1\text{H}$  spectral overlap, thus preventing the use of selective 1D and 2D  $^1\text{H}$  NOESY experiments. A remedy may be to take advantage of the broad chemical shift range of  $^{31}\text{P}$ . By coupling 2D HSQC and NOESY experiments, a complete proton spectrum should be obtained for each component within the mixture starting only from one single phosphorus resonance in the indirect dimension.<sup>29,32–34,36</sup> The 2D  $^1\text{H}$ – $^{31}\text{P}$  HSQC-NOESY spectrum of the phosphorus-containing compound test mixture dissolved in phosphoric acid (85%)/DMSO- $d_6$  (7:3, v/v) solution,

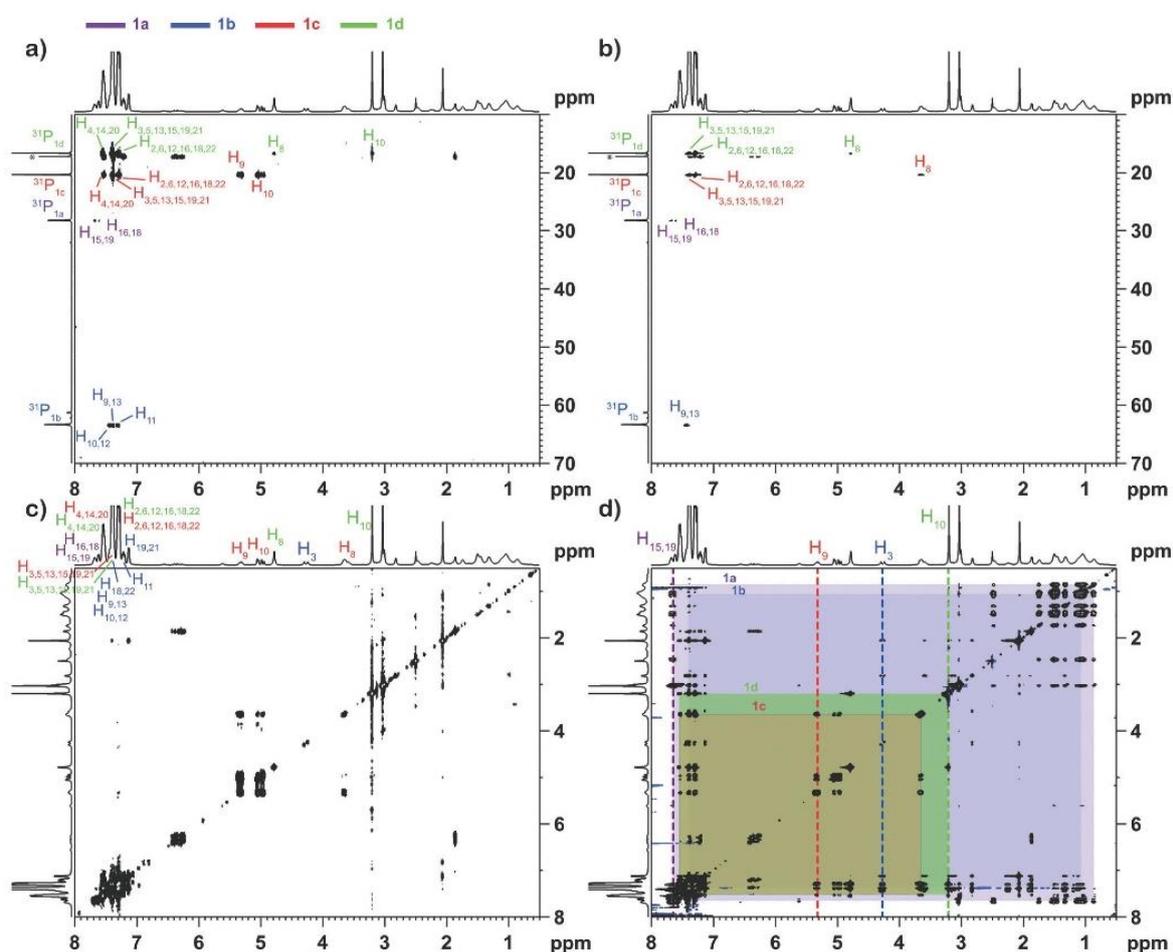


Fig. 9 (a) 2D  $^1\text{H}$ – $^{31}\text{P}$  HMBC, (b)  $^1\text{H}$ – $^{31}\text{P}$  HSQC, (c)  $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  COSY and (d)  $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  NOESY ( $t_m = 0.5$  s) spectra using the NOAH-4 BSCN sequence of phosphorus-containing compound test mixture (50 mM) dissolved in phosphoric acid (85%)/DMSO- $d_6$  (7:3, v/v) solution, at 298 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). \* Impurity.

recorded at 298 K, shows that all protons of each molecule can correlate with all other protons by spin diffusion after having marked the phosphorous chemical shift in  $F_1$  (Fig. 8). As a result, the capability to individualize phosphorous-containing compounds within the mixture is achievable by using the 2D  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HSQC-NOESY experiment under *ViscY* conditions, even if CSSF<sup>54</sup> or GEMSTONE<sup>55</sup> experiments may be a pertinent alternative to reach the required resolution in traditional NMR solvents.

Another alternative way for the individualization of each mixed phosphorous-containing molecule has been also to concentrate on the NOAH-4 BSCN supersequence to acquire, consecutively, with only one recycling delay,  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HMBC (B),  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HSQC (S),  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (C) and  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY (N) spectra under *ViscY* conditions (Fig. 9).<sup>50</sup> The full assignment of the proton resonances of each mixed compound is reachable by taking benefit from the active spin diffusion acting during the mixing time of the NOESY experiment, even though the signal/noise ratio is somewhat reduced compared to that of the NOESY spectrum acquired alone due to signal loss by transverse relaxation. Furthermore, multiple bond  $J$ -scalar  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  and  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  correlations are additionally observed allowing access to all  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$  chemical shifts. This supplementary information trapped in a single NMR experiment, in complement with the HSQC-NOESY experiment, in a reduced time may turn out to be significant in the case of strong  $^1\text{H}$  resonance overlapping in the study of complex mixtures of unknown molecules.

## Experimental

### Chemical reagents

DMSO- $d_6$  and  $\text{D}_2\text{O}$  were purchased from Eurisotop (Gif-sur-Yvette, France). Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr were purchased from TCI Europe (Zwijndrecht, Belgium). Dicyclohexyl (4-(*N,N*-dimethylamino)phenyl)phosphine, exophenyl Kwon [2.2.1] bicyclic phosphine and phosphoric acid (85%, w/w) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Allyl triphenylphosphonium bromide and (methoxymethyl)triphenylphosphonium chloride were purchased from Acros Organics (Geel, Belgium). All peptides and phosphorous-containing compounds had 95% or higher purity and were dissolved at a concentration from 20 to 50 mM respectively in phosphoric acid (85%)/ $\text{D}_2\text{O}$  (8 : 2, v/v) and phosphoric acid (85%)/DMSO- $d_6$  (7 : 3, v/v) solutions without exothermic reactions.

### NMR spectroscopy

NMR experiments on the dipeptide and phosphorous-containing compound test mixtures were carried out on Bruker Avance AVIII500 and AVIII600 NMR spectrometers respectively equipped with a 5 mm BBFO + probe and a 5 mm TCI cryoprobe using TOPSPIN software (Rheinstetten, Germany). Gradient pulses (respectively maximum  $0.535 \text{ Tm}^{-1}$  and  $0.613 \text{ Tm}^{-1}$ ) were generated by a 10 A amplifier. Sample temperature

was controlled by a Bruker variable temperature (BVT) unit supplied with chilled air produced by a Bruker cooling unit.

All spectra of the dipeptide mixtures were referenced so that the tyrosine  $\text{H}\alpha$  proton and  $\text{C}\alpha$  carbon resonances respectively appeared at 7.00 and 132.00 ppm.

All spectra of phosphorous-containing compounds were referenced so that the residual proton signal of DMSO- $d_6$  was observed at 2.50 ppm and the phosphorous signal of  $\text{H}_3\text{PO}_4$  was observed at 0.00 ppm. Additional NMR data acquisition and processing parameters for Fig. 1–4 and 6–9 are reported in the ESI.†

## Conclusions

The use of phosphoric acid (85%) mixed with  $\text{D}_2\text{O}$  or DMSO- $d_6$  as viscous binary solvents has been reported for the first time for the individualization of respectively high- and low-polarity components within complex mixtures, by taking benefit from NMR spin diffusion, under *ViscY* conditions, at the usual magnetic field strengths.

The component individualization of the Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr mixture and the dicyclohexyl(4-(*N,N*-dimethylamino)phenyl) phosphine, exophenyl Kwon [2.2.1] bicyclic phosphine, allyltriphenylphosphonium bromide and (methoxymethyl)triphenylphosphonium chloride mixture has been respectively carried out, at 288 K, in phosphoric acid (85%)/ $\text{D}_2\text{O}$  (8 : 2, v/v) solution using homonuclear selective 1D  $^1\text{H}$  NOESY, selective 2D  $^1\text{H}$  NOESY and heteronuclear 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-NOESY and  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ / $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  NOAH experiments and at 298 K in phosphoric acid (85%)/DMSO- $d_6$  solution using homonuclear selective 1D  $^1\text{H}$  NOESY, selective 2D  $^1\text{H}$  NOESY and heteronuclear 2D  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HSQC-NOESY and  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  NOAH experiments.

The viscous phosphoric acid-based solvents reveal significant benefits compared to previously described viscous solvents such as glycerol, glycerol carbonate or agarose gel.<sup>30,31</sup> The spin diffusion is active over a large temperature range, compatible with heat-sensitive molecules, and the preparation of NMR sample tubes is simple. The viscous phosphoric acid (85%)/water solution blend is rather suitable for the investigation of high-polarity molecules, whereas phosphoric acid (85%)/DMSO- $d_6$  solution is rather recommended for the study of low-polarity compounds. Medium-sized, high- and low-polarity compounds necessitate a low concentration of water or DMSO- $d_6$  in phosphoric acid (85%), whereas smaller or more flexible compounds demand more water or DMSO- $d_6$  in phosphoric acid (85%) until 50% (v/v) for driving spin diffusion from room to negative Celsius temperatures, under *ViscY* conditions. However, phosphoric acid (85%) solutions may interact with or alter fragile chemical compounds preventing NMR analysis and they may unsettle the probe matching when using a cryoprobe.

Upcoming studies involving the *ViscY* approach will deal with the study of other polar and apolar mixtures composed of small-sized molecules for assessing the spin diffusion power in viscous phosphoric acid-based solutions.

## Author contributions

F. P. and P. L. performed NMR data acquisition and processing. F. P., R. L. and A. M. assisted in NMR data analysis. P. L. conceived the study, analysed NMR data, and wrote the article with the contribution from J.-M. N.

## Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

## Acknowledgements

Financial support for the PLAnE<sup>T</sup> CPER project was provided by CNRS, Conseil Régional Champagne Ardenne, Conseil Général de la Marne, Ministry of Higher Education and Research (MESR), and EU-programme FEDER. Research work was funded by ANR (ANR-19-CE29-0001-01). We kindly thank Dr Ě. Kupĉe and Dr T. D. W. Claridge for having given us the microprograms of the NOAH pulse sequences.

## Notes and references

- 1 M. Spraul, A. S. Freund, R. E. Nast, R. S. Withers, W. E. Maas and O. Corcoran, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 1546–1551.
- 2 O. Corcoran and M. Spraul, *Drug Discovery Today*, 2003, **8**, 624–631.
- 3 M. Godejohann, L.-H. Tseng, U. Braumann, J. Fuchser and M. Spraul, *J. Chromatogr. A*, 2004, **1058**, 191–196.
- 4 J.-L. Wolfender, J.-M. Nuzillard, J. J. J. van der Hoof, J.-H. Renault and S. Bertrand, *Anal. Chem.*, 2019, **91**, 704–742.
- 5 K. F. Morris and C. S. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 3139–3141.
- 6 K. F. Morris and C. S. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 4291–4299.
- 7 K. F. Morris, P. Stilbs and C. S. Johnson, *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 211–215.
- 8 A. A. Colbourne, G. A. Morris and M. Nilsson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 7640–7643.
- 9 S. Viel, F. Ziarelli and S. Caldarelli, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2003, **100**, 9696–9698.
- 10 G. Pages, C. Delaurent and S. Caldarelli, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006, **45**, 5950–5953.
- 11 G. Pages, C. Delaurent and S. Caldarelli, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 561–566.
- 12 S. Caldarelli, *Magn. Reson. Chem.*, 2007, **45**, S48–S55.
- 13 C. Carrara, S. Viel, F. Ziarelli, G. Excoffier, C. Delaurent and S. Caldarelli, *J. Magn. Reson.*, 2008, **194**, 303–306.
- 14 R. Evans, S. Haiber, M. Nilsson and G. A. Morris, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 4548–4550.
- 15 M. E. Zielinski and K. F. Morris, *Magn. Reson. Chem.*, 2009, **47**, 53–56.
- 16 J. S. Kavakka, V. Parviainen, K. Wähälä, I. Kilpeläinen and S. Heikkinen, *Magn. Reson. Chem.*, 2010, **48**, 777–781.
- 17 A. K. Rogerson, J. A. Aguilar, M. Nilsson and G. A. Morris, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 7063–7064.
- 18 C. Pemberton, R. Hoffman, A. Aserin and N. Garti, *J. Magn. Reson.*, 2011, **208**, 262–269.
- 19 A. Tal and L. Frydman, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 2010, **57**, 241–292.
- 20 N. H. Meyer and K. Zangger, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2013, **52**, 7143–7146.
- 21 K. Kazimierzczuk and V. Orekhov, *Magn. Reson. Chem.*, 2015, **53**, 921–926.
- 22 K. Zangger, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 2015, **86–87**, 1–20.
- 23 G. Dal Poggetto, L. Castanar, R. W. Adams, G. A. Morris and M. Nilsson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2019, **141**, 5766–5771.
- 24 A. A. Bothner-By and P. E. Johner, *Biophys. J.*, 1978, **24**, 779–790.
- 25 M. P. Williamson and D. H. Williams, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1981, 165–166, DOI: 10.1039/C39810000165.
- 26 L. A. Luck and C. R. Landis, *Organometallics*, 1992, **11**, 1003–1005.
- 27 C. R. Landis, L. L. Luck and J. M. Wright, *J. Magn. Reson., Ser. B*, 1995, **109**, 44–59.
- 28 S. F. Lienin, R. Brüschweiler and R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.*, 1998, **131**, 184–190.
- 29 A. J. Simpson, G. Woods and O. Mehrzad, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 186–194.
- 30 P. Lameiras, L. Boudesocque, Z. Mouloungui, J. H. Renault, J. M. Wieruszkeski, G. Lippens and J. M. Nuzillard, *J. Magn. Reson.*, 2011, **212**, 161–168.
- 31 H. Farooq, R. Soong, D. Courtier-Murias, C. Anklin and A. Simpson, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 6759–6766.
- 32 P. Lameiras and J.-M. Nuzillard, *Anal. Chem.*, 2016, **88**, 4508–4515.
- 33 P. Lameiras, S. Patis, J. Jakhilal, S. Castex, P. Clivio and J. M. Nuzillard, *Chem. – Eur. J.*, 2017, **23**, 4923–4928.
- 34 P. Lameiras, S. Mougeolle, F. Pedinielli and J.-M. Nuzillard, *Faraday Discuss.*, 2019, **218**, 233–246.
- 35 E. Adair, C. Afonso, N. G. A. Bell, A. N. Davies, M. A. Delsuc, R. Godfrey, R. Goodacre, J. A. Hawkes, N. Hertkorn, D. Jones, P. Lameiras, A. Le Guennee, A. Lubben, M. Nilsson, L. Paša-Tolić, J. Richards, R. P. Rodgers, C. P. Rüger, P. Schmitt-Kopplin, P. J. Schoenmakers, P. Sidebottom, D. Staerk, S. Summerfield, D. Uhrin, P. van Delft, J. J. J. van der Hoof, F. H. M. van Zelst and A. Zhrebker, *Faraday Discuss.*, 2019, **218**, 247–267.
- 36 F. Pedinielli, J.-M. Nuzillard and P. Lameiras, *Anal. Chem.*, 2020, **92**, 5191–5199.
- 37 A. Seidell and W. F. Linke, *Solubilities of Inorganic and Organic Compounds: A Compilation of Solubility Data from the Periodical Literature*, Van Nostrand, 1952.
- 38 A. Smith and A. W. C. Menzies, *J. Am. Chem. Soc.*, 1909, **31**, 1183–1191.

- 39 X. Jiang, Y. Zhao, B. Hou, M. Zhang and Y. Bao, *J. Chem. Eng. Data*, 2011, **56**, 205–211.
- 40 J. M. G. Cowie and P. M. Toporowski, *Can. J. Chem.*, 1961, **39**, 2240–2243.
- 41 M. O. Sonnati, S. Amigoni, E. P. Taffin de Givenchy, T. Darmanin, O. Choulet and F. Guittard, *Green Chem.*, 2013, **15**, 283–306.
- 42 T. L. Hwang and A. J. Shaka, *J. Magn. Reson., Ser. B*, 1995, **112**, 275–279.
- 43 P. Douzou and G. A. Petsko, *Adv. Protein Chem.*, 1984, **36**, 245–361.
- 44 A. Gierer and K. Wirtz, *Zeitschrift Für Naturforschung Section A*, 1953, **8**, 532–538.
- 45 K. Wuthrich, *NMR of proteins and nucleic acids*, New York, Wiley, 1986.
- 46 K. Stott, J. Stonehouse, J. Keeler, T.-L. Hwang and A. J. Shaka, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 4199–4200.
- 47 K. Stott, J. Keeler, Q. N. Van and A. J. Shaka, *J. Magn. Reson.*, 1997, **125**, 302–324.
- 48 R. Brüschweiler, C. Griesinger, O. W. Sørensen and R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.*, 1988, **78**, 178–185.
- 49 B. Plainchont, A. Martinez, S. Tisse, J. P. Bouillon, J. M. Wieruszkeski, G. Lippens, D. Jeannerat and J. M. Nuzillard, *J. Magn. Reson.*, 2010, **206**, 68–73.
- 50 Ě. Kupĉe and T. D. W. Claridge, *J. Magn. Reson.*, 2019, 307.
- 51 D. G. Gorenstein and B. A. Luxon, in *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, Elsevier Ltd, 1999, pp. 2204–2212. DOI: 10.1016/B978-0-12-374413-5.00242-6.
- 52 O. Kühn, *Phosphorus-31 NMR Spectroscopy: A Concise Introduction for the Synthetic Organic and Organometallic Chemist*, Springer, 2009.
- 53 T. R. Tritton and I. M. Armitage, *Nucleic Acids Res.*, 1978, **5**, 3855–3869.
- 54 P. T. Robinson, T. N. Pham and D. Uhrin, *J. Magn. Reson.*, 2004, **170**, 97–103.
- 55 P. Király, N. Kern, M. P. Plesniak, M. Nilsson, D. J. Procter, G. A. Morris and R. W. Adams, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2021, **60**, 666–669.

## ViscY NMR experiments in phosphoric acid as viscous solvent for the individualization of small molecules within mixtures by spin diffusion

François Pedinielli, <sup>a</sup> Ritchy Leroy, <sup>a</sup> Agathe Martinez, <sup>a</sup> Jean-Marc Nuzillard <sup>a</sup> and Pedro LAMEIRAS <sup>a,\*</sup>

<sup>[a]</sup> Université de Reims Champagne-Ardenne, CNRS, ICMR UMR 7312, 51097 Reims, France

### Table of contents

<u>Subject</u>	<u>page #</u>
Dipeptide chemical structures	page S3
Additional NMR data acquisition and processing parameters for Fig. 1 -> 4 and Fig. 6 -> 9	page S4
Fig. S1 2D <sup>1</sup> H DOSY spectrum of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), 20 mM, dissolved in H <sub>2</sub> O/D <sub>2</sub> O (9:1 v/v), at pH = 5.0, at 298 K, at 500 MHz ( <sup>1</sup> H).	page S7
Fig. S2 1D <sup>1</sup> H spectra and corresponding NMR pulse sequence of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), 20 mM, dissolved in phosphoric acid (85%)/D <sub>2</sub> O (8:2, v/v) solution, at 288 K, at 500 MHz ( <sup>1</sup> H).	page S8
Fig. S3 a-c) Amide proton region of 2D NOESY spectra of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), 20 mM, mixing time ( $t_m$ ) = 1 s, at 500 MHz ( <sup>1</sup> H) using the noesyegpph pulse sequence, dissolved in phosphoric acid (85%)/D <sub>2</sub> O (8:2, v/v) solution, at a) 298 K, b) 288 K, and c) 278 K. d) Plots of NOE cross-peak volume observed with temperature of H $\alpha_V$ (GY), H $\alpha_L$ (LY), H $\beta_A$ (AY) and H $\alpha_L$ (LV) proton resonances of the dipeptide test mixture.	page S9

Fig. S4 2D  $^1\text{H}$  NOESY spectrum of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), 20 mM, dissolved in phosphoric acid (85%)/ $\text{D}_2\text{O}$  (8:2, v/v) solution, at 288 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). **page S11**

Fig. S5 2D  $^1\text{H}$  NOESY spectrum of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), 20 mM, dissolved in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1 v/v), at pH = 5.0, at 298 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). **page S12**

Fig. S6 a) 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC, b)  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMQC, c)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, d)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and e)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY ( $t_m = 1$  s) spectra using the NOAH-5 BMSN sequence of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), 50 mM, dissolved in phosphoric acid (85%)/ $\text{D}_2\text{O}$  (8:2, v/v) solution, at 288 K, at 600 MHz ( $^1\text{H}$ ). **page S13**

**Phosphorus-containing compound chemical structures** **page S14**

Fig. S7 2D  $^1\text{H}$  DOSY spectrum of the phosphorus-containing compound test mixture (1a, 1b, 1c and 1d), 20 mM, dissolved in neat  $\text{DMSO}-d_6$ , at 298 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). **page S16**

Fig. S8 1D  $^1\text{H}$  spectra and corresponding NMR pulse sequence of the phosphorus-containing compound test mixture (1a, 1b, 1c and 1d), 20 mM, dissolved in phosphoric acid (85%)/ $\text{DMSO}-d_6$  (7:3, v/v) solution, at 298 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). **page S17**

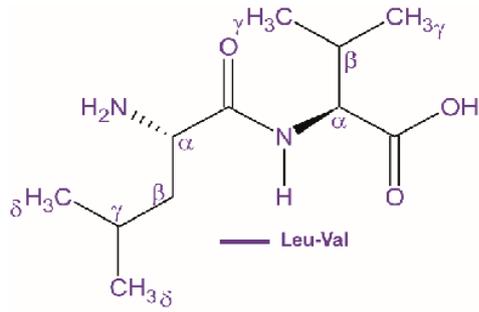
Fig. S9 2D  $^1\text{H}$  NOESY spectra of the phosphorus-containing compound test mixture (1a, 1b, 1c and 1d), 20 mM, dissolved in phosphoric acid (85%)/ $\text{DMSO}-d_6$  (7:3, v/v) solution, mixing time ( $t_m$ ) = 0.5 s, at a) 308 K, b) 298 K and c) 288 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) using the noesyegpph pulse sequence. **page S18**

Fig. S10 2D  $^1\text{H}$  NOESY spectrum of the phosphorus-containing compound test mixture (1a, 1b, 1c and 1d), 20 mM, dissolved in phosphoric acid (85%)/ $\text{DMSO}-d_6$  (7:3, v/v) solution, mixing time ( $t_m$ ) = 0.5 s, at 298 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) using the noesyegpph pulse sequence. **page S19**

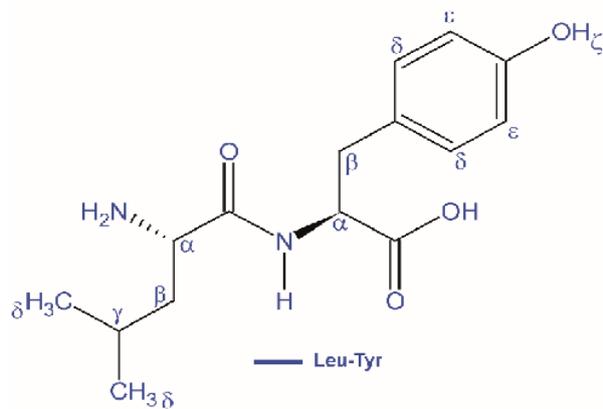
Fig. S11 2D  $^1\text{H}$  NOESY spectrum of the phosphorus-containing compound test mixture (1a, 1b, 1c and 1d), 20 mM, dissolved in neat  $\text{DMSO}-d_6$ , mixing time ( $t_m$ ) = 0.5 s, at 298 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) using the noesygpphpp pulse sequence. **page S20**

**Dipeptide chemical structures:**

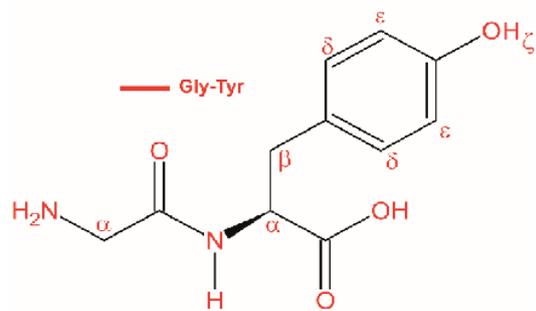
Leucine-Valine = Leu-Val = LV



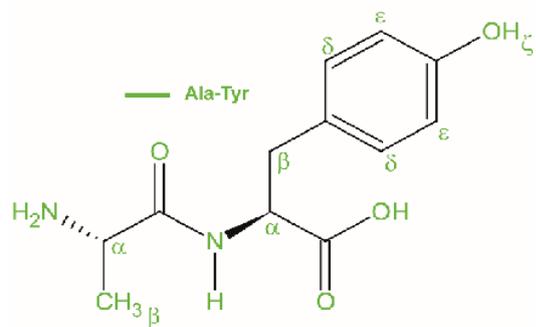
Leucine-Tyrosine = Leu-Tyr = LY



Glycine-Tyrosine = Gly-Tyr = GY



Alanine-Tyrosine = Ala-Tyr = AY



**Additional NMR data acquisition and processing parameters for Fig. 1 -> 4 and Fig. 6 -> 9:**

Fig. 1 a) Amide proton region of 2D NOESY spectrum of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), 20 mM, dissolved in phosphoric acid (85%)/D<sub>2</sub>O (8:2, v/v) solution, at 288 K, at 500 MHz (<sup>1</sup>H) using the noesyegpph pulse sequence. Data matrix was recorded in States-TPPI mode; its size was 512 × 4k with 8 scans per FID, a 1.5 s relaxation delay and a 1 s mixing time ( $t_m$ ), resulting in a 183.32 min recording time (expt). The spectral width was 5000 Hz in both dimensions. G1: G2 = 70: 30. Data matrix was multiplied in both dimensions by a shifted squared sine bell function (SSB = 2) before zero filling to a 1k × 4k size. A pair of 2 ms rectangular shaped inversion pulses was applied on the water signal resonance. The length of the water suppression gradient pulses was 1 ms and their intensity 31% for the first pair and 11% for the second pair. b) Amide proton region of 2D NOESY spectrum of the same dipeptide test mixture (20 mM) dissolved in H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9:1 v/v), at pH = 5.0,  $t_m$  = 1 s, at 298 K, at 500 MHz (<sup>1</sup>H). Spectrum b) was recorded and processed with the same parameters as those in 1a using the same noesyegpph pulse sequence, resulting in a 171.02 min recording time (expt). The red frames correspond to spectral regions of interest in which water as solvent has a major effect on the number and sign of observable NOESY cross peaks.

Fig. 2 Multiplet selective excitation 1D <sup>1</sup>H NOESY spectra of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), 20 mM, dissolved in phosphoric acid (85%)/D<sub>2</sub>O (8:2, v/v) solution (a, b, c, and d),  $t_m$  = 1 s, at 288 K, at 500 MHz (<sup>1</sup>H). The initial selective excitation was achieved by a 1% truncated 180° Gaussian pulse. G1:G2 = 70:30. WURST wideband adiabatic inversion pulses,  $\delta_2$  = 1.5 ms, starting within  $t_m$  at 0.33 and 0.83  $t_m$  with G3:G4:G5 = 40:-60:50. Gradient pulse length was 1 ms. d = 200  $\mu$ s. Relaxation delay was 2.0 s. The FIDs (8k points, spectral width 5000 Hz) were multiplied by an exponential function (LB = 0.3) before zero-filled to 64k points. The initial selective inversion pulses excite: a) the NH<sub>v</sub>(LV) proton resonance ( $\delta_1$  = 40 ms, 8k scans, experiment time (expt) = 425.07 min); b) the H $\delta_l$ (LY)/H $\delta_l$ (LV)/H $\gamma_v$ (LV) proton resonances ( $\delta_1$  = 8 ms, 1k scans, expt = 51.85 min); c) the H $\delta_v$ (LY)/H $\delta_v$ (GY)/H $\delta_v$ (AY) proton resonances ( $\delta_1$  = 20 ms, 1k scans, expt = 52.27 min); d) the H $\alpha_6$ (GY) proton resonance ( $\delta_1$  = 40 ms, 4k scans, expt = 211.20 min); e) Pulse sequence:  $\varphi_1 = x, y, -x, -y, \psi = x, -x$ .

Fig. 3 a)  $F_1$  band selective  $F_1$  decoupled 2D NOESY spectrum of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), 20 mM, dissolved in phosphoric acid (85%)/D<sub>2</sub>O (8:2, v/v) solution, at 288 K, at 500 MHz (<sup>1</sup>H), (256 scans per  $t_2$  value, expt = 832.60 min,  $t_m$  = 1 s). b) Pulse sequence:  $\varphi_1 = x, y, -x, -y, \psi = x, -x$ . The initial selective 180° pulses ( $\delta_1$  = 12 ms) had a Gaussian shape and were applied to the four NH amide proton resonances. G1:G2 = 70:30. The following refocusing pulse was also applied to the NH protons and was a RE-BURP ( $\delta_2$  = 30 ms). G3:G4

= 80:23. WURST wideband adiabatic inversion pulses,  $\delta_3 = 1.5$  ms, start within  $t_m$  at 0.33 and 0.83  $t_m$  with G5:G6:G7 = 40:-60:50. Gradient pulse length was 1 ms.  $d = 200$   $\mu$ s. Relaxation delay was 1.5 s. Data matrix was acquired in the States-TPPI mode, its size was 64  $\times$  4k. Spectral widths were 5000 Hz in  $F_2$  and 240 Hz in  $F_1$ . Data matrix was multiplied in both dimensions by a shifted squared sine bell function (SSB = 2) before zero filling to a 128  $\times$  2k size.

Fig. 4 a) 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-NOESY spectrum of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), 20 mM, dissolved in phosphoric acid (85%)/ $\text{D}_2\text{O}$  (8:2, v/v) solution, at 288 K, at 600 MHz ( $^1\text{H}$ ), using the `hsqcetgpn` pulse sequence. Data matrix was recorded in Echo-Antiecho mode; its size was 256  $\times$  2k with 200 scans per FID, a 1.5 s relaxation delay and a 1 s mixing time ( $t_m$ ), resulting in a 2158.07 min recording time. The spectral widths were respectively 6010 Hz in  $^1\text{H}$  dimension and 1825 Hz in  $^{15}\text{N}$  dimension. Data matrix was multiplied in both dimensions by a shifted squared sine bell function (SSB = 2) before zero filling to a 1k  $\times$  2k size.

Fig. 6 a) 2D  $^1\text{H}$  NOESY spectrum of the phosphorus-containing compound test mixture (20 mM), at 298 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) using the `noesyegpph` pulse sequence, dissolved in phosphoric acid (85%)/ $\text{DMSO-}d_6$  (7:3, v/v) solution. Data matrix was recorded in States-TPPI mode; its size was 512  $\times$  4k with 8 scans per FID, a 1.5 s relaxation delay and a 0.5 s mixing time ( $t_m$ ), resulting in a 170.92 min recording time (expt). The spectral width was 4500 Hz in both dimensions. G1: G2 = 70: 30. Data matrix was multiplied in both dimensions by a shifted squared sine bell function (SSB = 2) before zero filling to a 1k  $\times$  4k size. A pair of 2 ms rectangular shaped inversion pulses was applied on the water signal resonance. The length of the water suppression gradient pulses was 1 ms and their intensity 31% for the first pair and 11% for the second pair. b) 2D  $^1\text{H}$  NOESY spectrum of the same phosphorus-containing compound test mixture (20 mM), mixing time ( $t_m$ ) = 0.5 s, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) using the `noesygpphpp` pulse sequence, dissolved in neat  $\text{DMSO-}d_6$ . Spectrum b) was recorded and processed with the same parameters as those in 6a, resulting in a 145.74 min recording time (expt).

Fig. 7 Multiplet selective excitation 1D  $^1\text{H}$  NOESY spectra of the phosphorus-containing compound test mixture (1a, 1b, 1c and 1d, 20 mM) dissolved in phosphoric acid (85%)/ $\text{DMSO-}d_6$  (7:3 v/v) solution (a, b, c and d), at 298 K,  $t_m = 0.5$  s, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). Pulse sequence:  $\varphi 1 = x, y, -x, -y, \psi = x, -x$  (Fig. 2e). The initial selective excitation was achieved by a 1% truncated  $180^\circ$  Gaussian pulse. G1:G2 = 70:30. WURST wideband adiabatic inversion pulses,  $\delta_2 = 1.5$  ms, starting within  $t_m$  at 0.33 and 0.83  $t_m$  with G3: G4: G5 = 40:-60: 50. Gradient pulse length was 1 ms.  $d = 200$   $\mu$ s. Relaxation delay was 2 s. The FIDs (4k points, spectral width 5000 Hz, zero filling 64 k points). The initial selective inversion pulses excite: a) the  $\text{H}_{15,19}$  (1a) proton resonances ( $\delta_1 = 40$  ms, 4k scans, experiment time (expt)

= 234.67 min); b) the H<sub>3</sub> (1b) proton resonance ( $\delta_1 = 10$  ms, 2k scans, expt = 115.27 min); c) the H<sub>9</sub> (1c) proton resonance ( $\delta_1 = 20$  ms, 2k scans, expt = 115.93 min); d) the H<sub>10</sub> (1d) proton resonance ( $\delta_1 = 40$  ms, 2k scans, expt = 117.33 min).

Fig. 8 a) 2D <sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P HSQC-NOESY spectrum of the phosphorus-containing compound test mixture (20 mM) dissolved in phosphoric acid (85%)/DMSO-*d*<sub>6</sub> (7:3, v/v) solution, using the hsqcetgpn0 pulse sequence, at 298 K, at 500 MHz (<sup>1</sup>H). Data matrix was recorded in Echo-Antiecho mode; its size was 256 × 2k with 64 scans per FID, a 1.5 s relaxation delay and a 0.5 s mixing time (*t<sub>m</sub>*), resulting in a 692.97 min recording time. The spectral widths were respectively 4500 Hz in <sup>1</sup>H dimension and 12148 Hz in <sup>31</sup>P dimension. Data matrix was multiplied in both dimensions by a shifted squared sine bell function (SSB = 2) before zero filling to a 1k × 4k size. \* Impurity.

Fig. 9 a) 2D <sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P HMBC, b) <sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P HSQC, c) <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY and d) <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY (*t<sub>m</sub>* = 0.5 s) spectra using the NOAH-4 BSCN sequence of phosphorus-containing compound test mixture (50 mM) dissolved in phosphoric acid (85%)/DMSO-*d*<sub>6</sub> (7:3, v/v) solution, at 298 K, at 500 MHz (<sup>1</sup>H). Data matrix was recorded in Echo-Antiecho mode; its size was 2k × 2k with 120 scans per FID and 512 *t<sub>1</sub>*-increments per module, a 1.5 s relaxation delay, resulting in a 3833.97 min recording time. The spectral widths were respectively 4500 Hz in <sup>1</sup>H dimension and 12148 Hz in <sup>31</sup>P dimension. After splitting, matrix was multiplied in both dimensions by a shifted squared sine bell function (SSB = 0 or 2) before zero filling to a 1k × 4k size. \* Impurity.

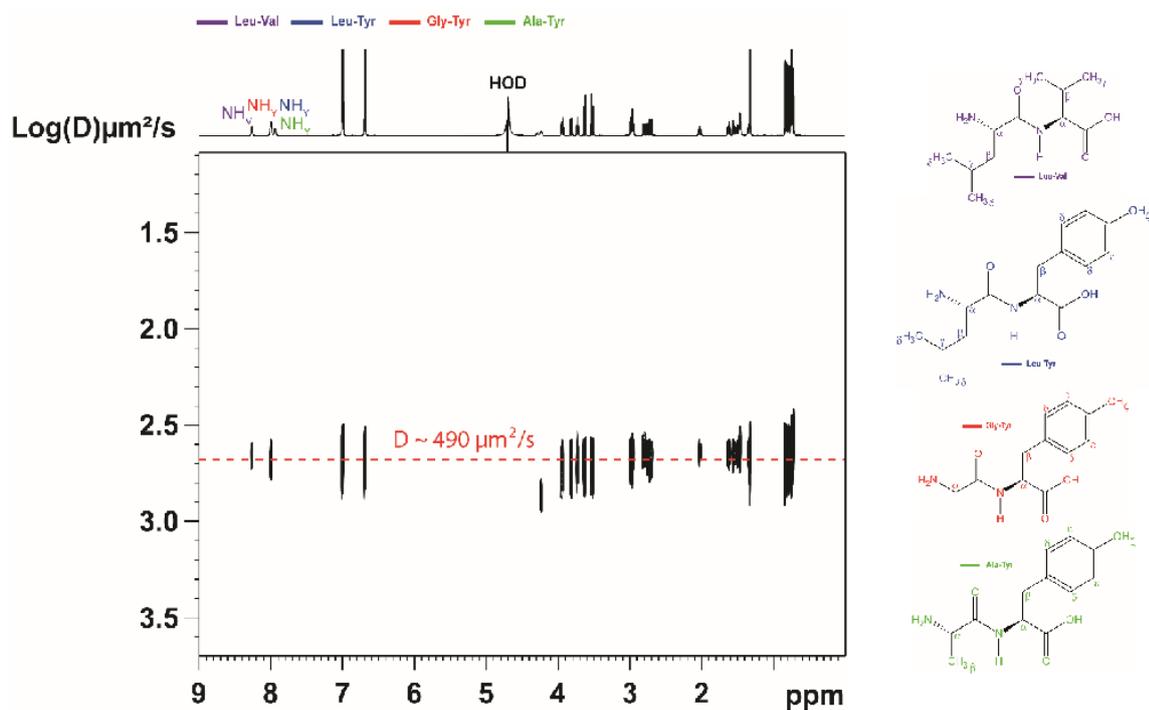


Fig. S1 2D  $^1\text{H}$  DOSY spectrum of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), 20 mM, dissolved in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1 v/v), at pH = 5.0, at 298 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). Data were acquired by means of the `stebpp1s19` pulse sequence. The diffusion time ( $\Delta$ ) was 50 ms and the gradient pulse length ( $\delta$ ) was 2 ms. The size of the raw data set was 32 x 8 192, with 16 scans per FID, and a 1.5 s relaxation delay, resulting in a 20.52 min recording time. The gradient intensity values were equally spaced from 2% to 95%. Water suppression was achieved by a 3-9-19 pulse sequence with 1 ms gradient pulses of - 20% intensity (WATERGATE). The DOSY spectrum was calculated using the Bruker TOPSPIN Software. Inverse Laplace transformation in the indirectly detected dimension was carried out by means of the MaxEnt algorithm.  $\text{Log}(D)$  was calculated with  $D$  expressed in  $(\mu\text{m})^2/\text{s}$ .

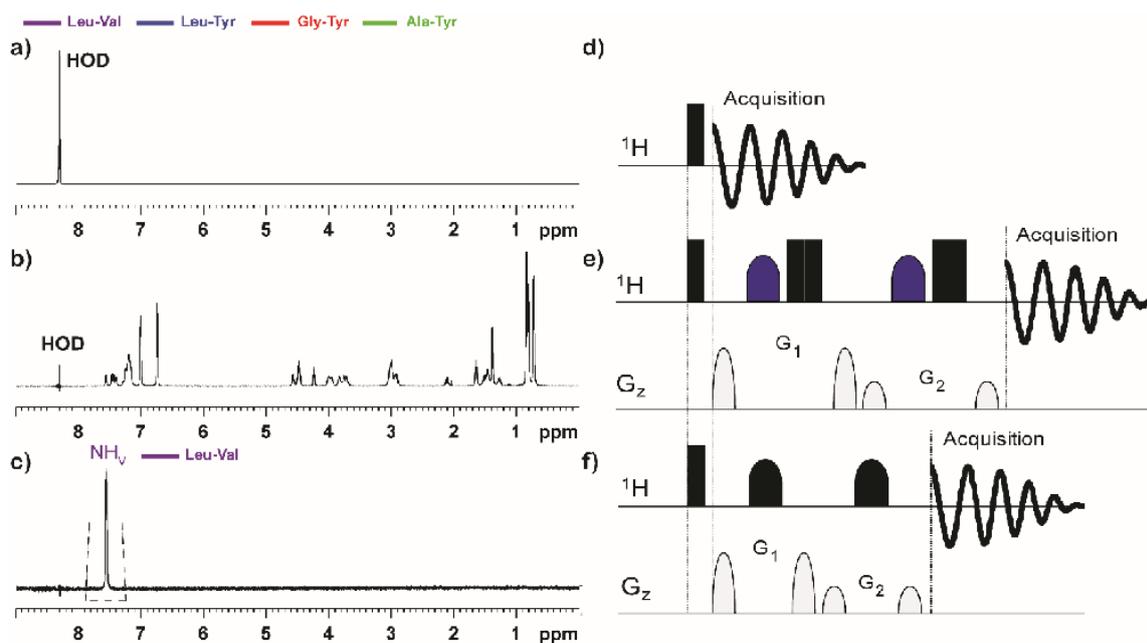


Fig. S2 1D  $^1\text{H}$  spectra (8 scans) and corresponding NMR pulse sequence of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), 20 mM, dissolved in phosphoric acid (85%)/ $\text{D}_2\text{O}$  (8:2, v/v) solution, at 288 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ).  $G_1:G_2 = 70:30$ . The FIDs (32k points, spectral width = 5000 Hz) were zero-filled to 64k points. a, d) Non-selective excitation and detection. b, e) Water suppression by excitation sculpting sequence using a pair of 2 ms rectangular shaped inversion pulses applied on the water signal resonance. The length of the gradient pulses was 1 ms and their intensity 31% for the first pair and 11% for the second pair. c, f) Selective excitation of the valine amide proton doublet of Leu-Val (dotted trapezium) using a 40 ms, 1% truncated,  $180^\circ$  Gaussian pulse.



Fig. S3a-c reports the evolution of amide proton NOESY cross-peaks upon sample temperature modification. Ambient and lower temperatures (298 K, 288 K, and 278 K) have been chosen in phosphoric acid (85%)/water binary solvent. The NH magnetization reaches the tyrosine H<sub>e</sub> protons at 278 K and 288 K and hardly at 298 K, nonetheless line broadening is too active at 278 K due to transverse relaxation. Consequently, all following NMR spectra in phosphoric acid (85%)/water solution have been carried out at 288 K, being the optimal temperature at which the NOESY spectrum of the dipeptide test mixture presents correlations from the amide proton resonance of each dipeptide to all proton resonances of the same dipeptide without significant signal broadening.

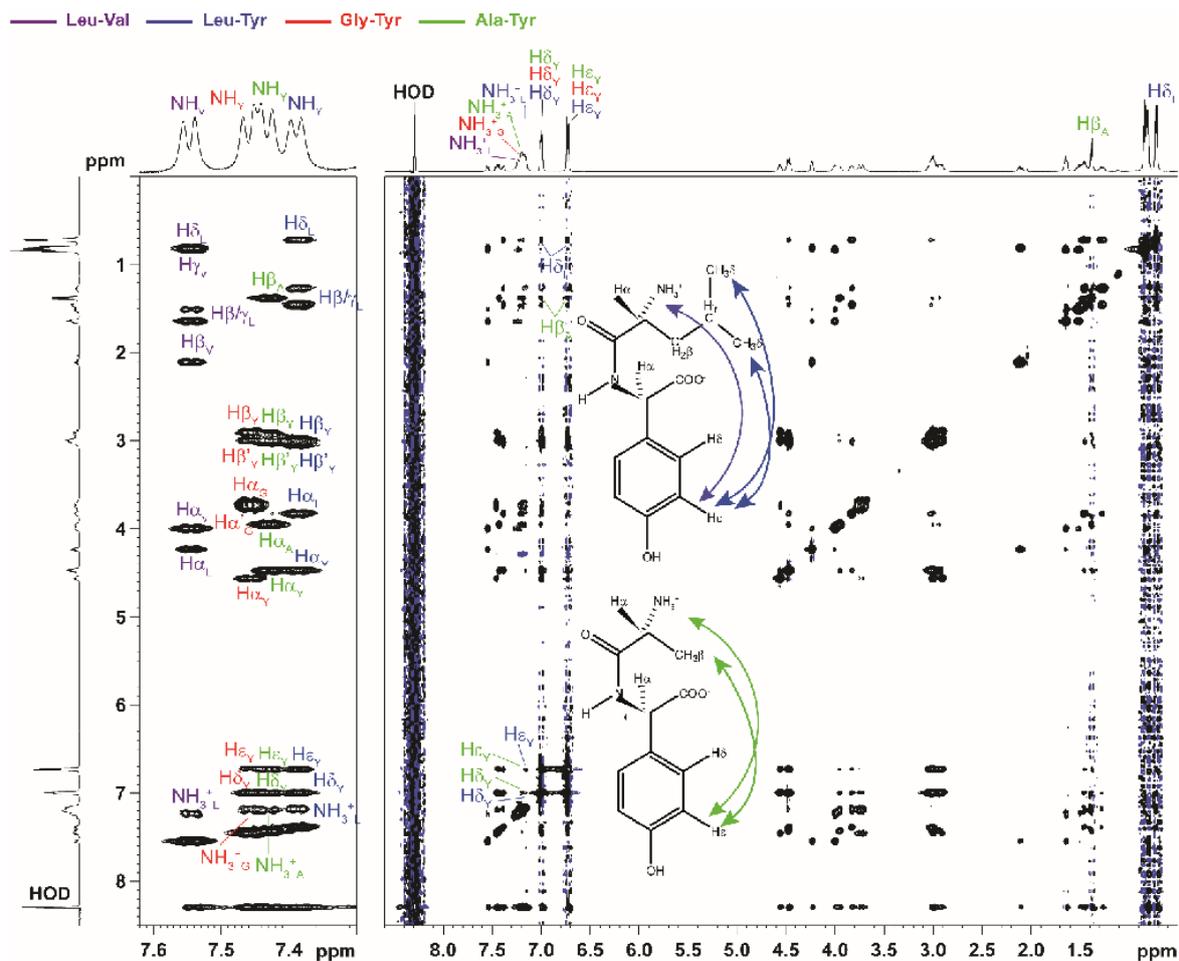


Fig. S4 2D  $^1\text{H}$  NOESY spectrum of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), 20 mM, dissolved in phosphoric acid (85%)/ $\text{D}_2\text{O}$  (8:2, v/v) solution, mixing time ( $t_m$ ) = 1 s, at 288 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). See caption of Fig. 1a in ESI for the NMR acquisition and processing parameters.

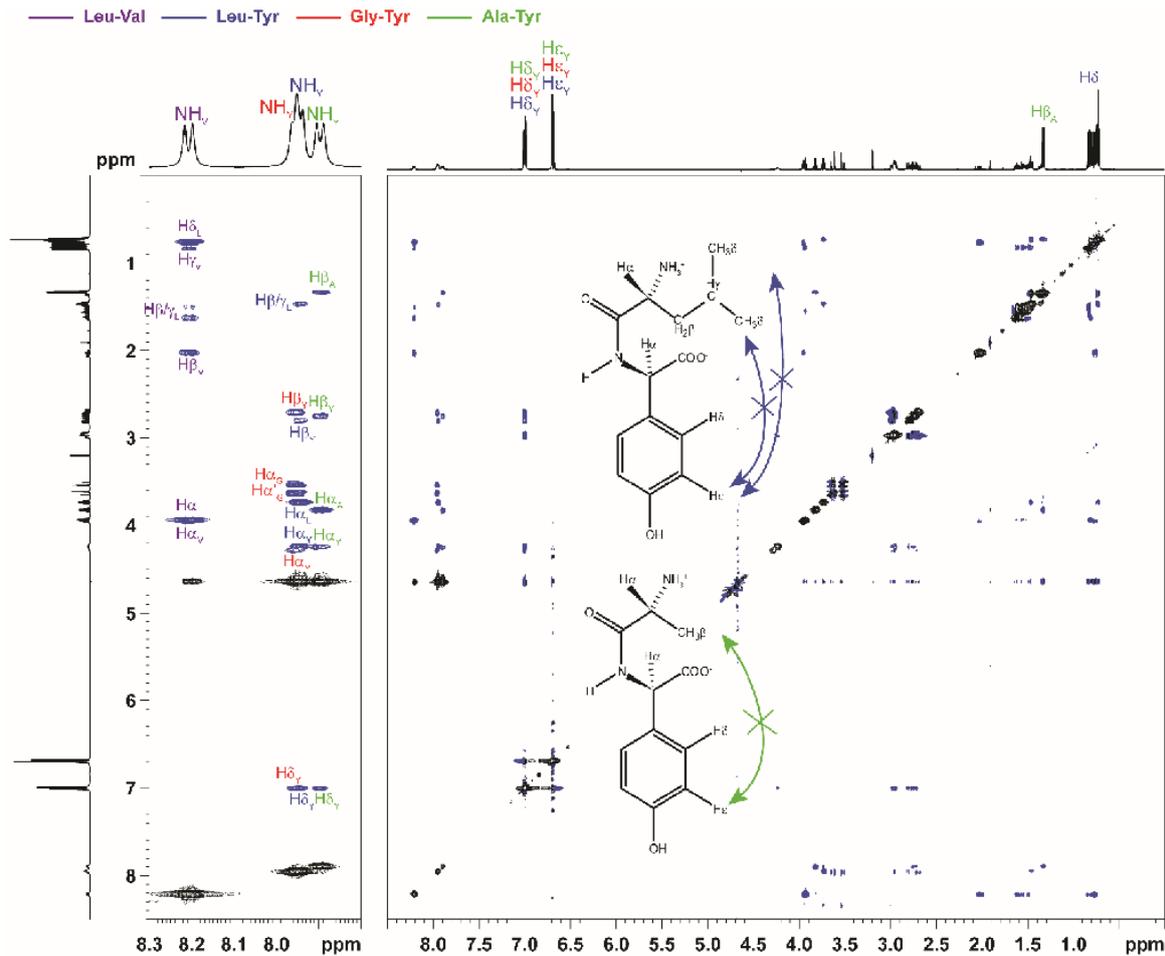


Fig. S5 2D  $^1\text{H}$  NOESY spectrum of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), 20 mM, dissolved in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1 v/v), at pH = 5.0, mixing time ( $t_m$ ) = 1 s, at 298 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). See caption of Fig. 1b in ESI for the NMR acquisition and processing parameters.

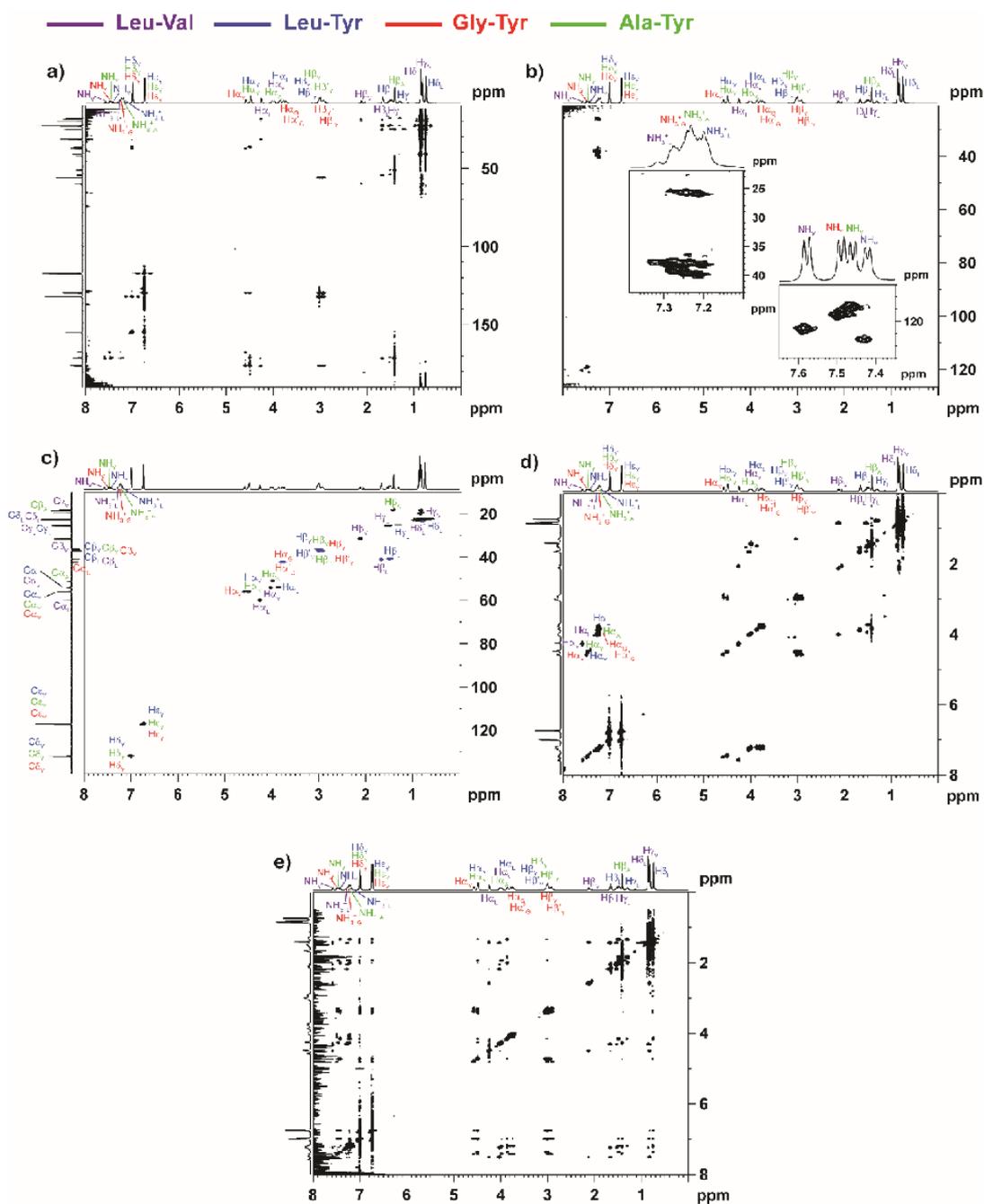


Fig. S6 a) 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC, b)  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMQC, c)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, d)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and e)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY ( $t_m = 1$  s) spectra using the NOAH-5 BMSCN sequence of the dipeptide test mixture (Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr and Ala-Tyr), 50 mM, dissolved in phosphoric acid (85%)/ $\text{D}_2\text{O}$  (8:2, v/v) solution, at 288 K, at 600 MHz ( $^1\text{H}$ ). Data matrix was recorded in Echo-Antiecho mode; its size was  $2.5\text{k} \times 2\text{k}$  with 80 scans per FID and 512  $t_1$ -increments per module, a 1.5 s relaxation delay, resulting in a 2030.73 min recording time. The spectral widths were respectively 6010 Hz in  $^1\text{H}$  dimension and 27166 Hz/6264 Hz in  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  dimension. After splitting, matrix was multiplied in both dimensions by a shifted squared sine bell function (SSB = 0 or 2) before zero filling to a  $1\text{k} \times 4\text{k}$  size.

S13

**Phosphorus-containing compound structures:**

**1a:** Dicyclohexyl(4-*N,N*-dimethylamino)phenyl) phosphine

<sup>1</sup> H and <sup>31</sup> P chemical shifts in Phosphoric Acid (85%)/DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> (7:3, v/v), at 298 K, at 500 MHz ( <sup>1</sup> H)		
<b>1a: N°</b>	<b>δ <sup>1</sup>H (ppm)</b>	<b>δ <sup>31</sup>P (ppm)</b>
H <sub>2a,13a</sub>	0.87	-
H <sub>3a,12a</sub>	1.02	-
H <sub>6a,9a</sub>	1.04	-
H <sub>4a,11a</sub>	1.05	-
H <sub>5a,10a</sub>	1.11	-
H <sub>2b,13b</sub>	1.34	-
H <sub>4b,11b</sub>	1.46	-
H <sub>3b,12b</sub>	1.49	-
H <sub>5b,10b</sub>	1.50	-
H <sub>6b,9b</sub>	1.73	-
H <sub>1,8</sub>	2.46	-
H <sub>21,22</sub>	3.02	-
H <sub>16,18</sub>	7.61	-
H <sub>15,19</sub>	7.67	-
P <sub>7</sub>	-	28.36

**1b:** Exo-phenyl Kwon [2.2.1] bicyclic phosphine

<sup>1</sup> H and <sup>31</sup> P chemical shifts in Phosphoric Acid (85%)/DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> (7:3, v/v), at 298 K, at 500 MHz ( <sup>1</sup> H)		
<b>1b: N°</b>	<b>δ <sup>1</sup>H (ppm)</b>	<b>δ <sup>31</sup>P (ppm)</b>
H <sub>7a</sub>	1.18	-
H <sub>7b</sub>	1.35	-
H <sub>2a</sub>	1.90	-
H <sub>23</sub>	2.10	-
H <sub>2b</sub>	2.25	-
H <sub>6</sub>	2.85	-
H <sub>5a</sub>	3.14	-
H <sub>5b</sub>	3.59	-
H <sub>3</sub>	4.29	-
H <sub>19,21</sub>	7.16	-
H <sub>11</sub>	7.32	-
H <sub>18,22</sub>	7.42	-
H <sub>9,13</sub>	7.43	-
H <sub>10,12</sub>	7.45	-
P <sub>1</sub>	-	63.64

**1c: Allyltriphenylphosphonium bromide**

<sup>1</sup> H and <sup>31</sup> P chemical shifts in Phosphoric Acid (85%)/DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> (7:3, v/v), at 298 K, at 500 MHz ( <sup>1</sup> H)		
<b>1c: N°</b>	<b>δ <sup>1</sup>H (ppm)</b>	<b>δ <sup>31</sup>P (ppm)</b>
<b>H<sub>8</sub></b>	3.66	-
<b>H<sub>10</sub></b>	5.03	-
<b>H<sub>9</sub></b>	5.36	-
<b>H<sub>2,6</sub></b>	7.32	-
<b>H<sub>12,16</sub></b>	7.32	-
<b>H<sub>18,22</sub></b>	7.32	-
<b>H<sub>3,5</sub></b>	7.41	-
<b>H<sub>13,15</sub></b>	7.41	-
<b>H<sub>19,21</sub></b>	7.41	-
<b>H<sub>4</sub></b>	7.55	-
<b>H<sub>14</sub></b>	7.55	-
<b>H<sub>20</sub></b>	7.55	-
<b>P<sub>7</sub></b>	-	20.41

**1d: (Methoxymethyl)triphenylphosphonium chloride**

<sup>1</sup> H and <sup>31</sup> P chemical shifts in Phosphoric Acid (85%)/DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> (7:3, v/v), at 298 K, at 500 MHz ( <sup>1</sup> H)		
<b>1d: N°</b>	<b>δ <sup>1</sup>H (ppm)</b>	<b>δ <sup>31</sup>P (ppm)</b>
<b>H<sub>10</sub></b>	3.21	-
<b>H<sub>8</sub></b>	4.79	-
<b>H<sub>2,6</sub></b>	7.32	-
<b>H<sub>12,16</sub></b>	7.32	-
<b>H<sub>18,22</sub></b>	7.32	-
<b>H<sub>3,5</sub></b>	7.42	-
<b>H<sub>13,15</sub></b>	7.42	-
<b>H<sub>19,21</sub></b>	7.42	-
<b>H<sub>4</sub></b>	7.58	-
<b>H<sub>14</sub></b>	7.58	-
<b>H<sub>20</sub></b>	7.58	-
<b>P<sub>7</sub></b>	-	16.71

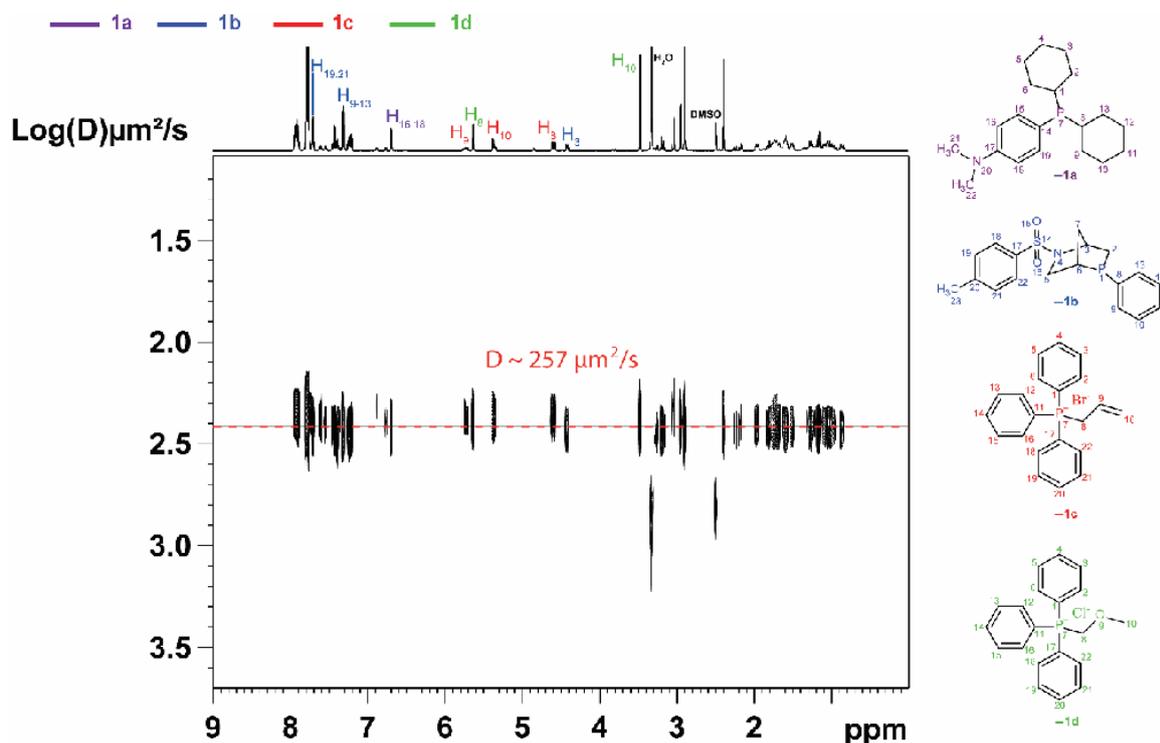


Fig. S7 2D  $^1\text{H}$  DOSY spectrum of the phosphorus-containing compound test mixture (1a, 1b, 1c and 1d), 20 mM, dissolved in neat  $\text{DMSO-}d_6$ , at 298 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). Data were acquired by means of the ledbpgp2s pulse sequence. The diffusion time ( $\Delta$ ) was 70 ms and the gradient pulse length ( $\delta$ ) was 1.9 ms. The size of the raw data set was 32 x 16k, with 8 scans per FID, and a 15 s relaxation delay, resulting in a 72.95 min recording time. The gradient intensity values were equally spaced from 2% to 95%. The DOSY spectrum was calculated using the Bruker TOPSPIN Software. Inverse Laplace transformation in the indirectly detected dimension was carried out by means of the MaxEnt algorithm.  $\text{Log}(D)$  was calculated with  $D$  expressed in  $(\mu\text{m})^2/\text{s}$ .

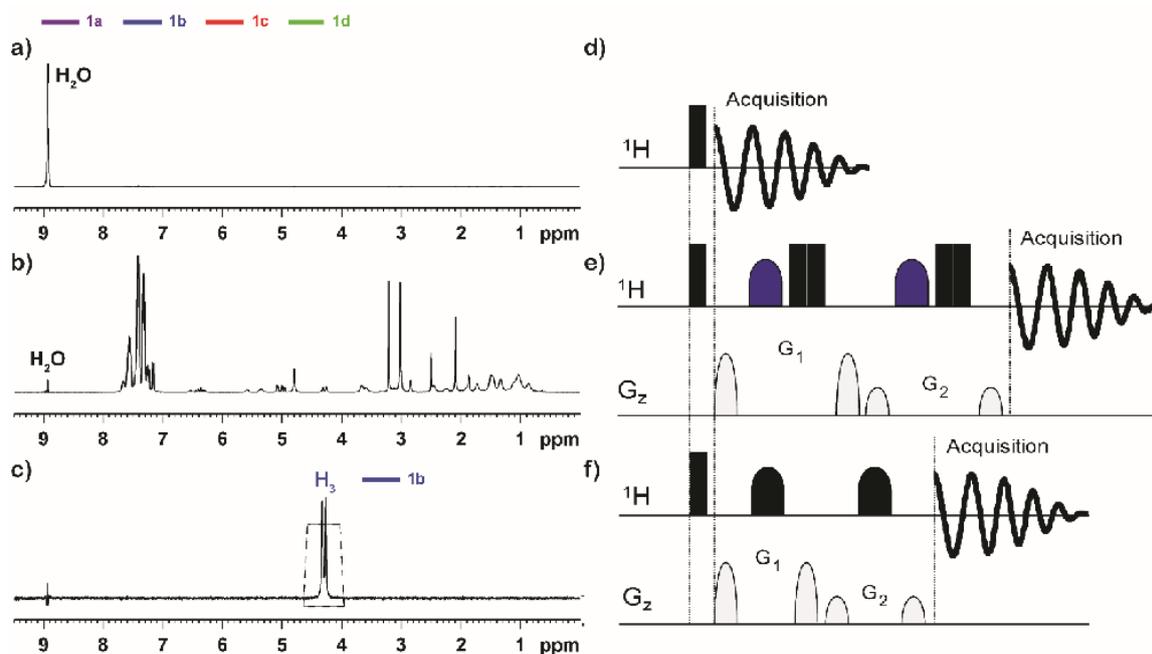


Fig. S8 1D  $^1\text{H}$  spectra (8 scans) and corresponding NMR pulse sequence of the phosphorus-containing compound test mixture (1a, 1b, 1c and 1d), 20 mM, dissolved in phosphoric acid (85%)/DMSO- $d_6$  (7:3, v/v) solution, at 298 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). G1:G2 = 70:30. The FIDs (32k points, spectral width = 5000 Hz) were zero-filled to 64k points. a, d) Non-selective excitation and detection. b, e) Water suppression by excitation sculpting sequence using a pair of 2 ms rectangular shaped inversion pulses applied on the water signal resonance. The length of the gradient pulses was 1 ms and their intensity 31% for the first pair and 11% for the second pair. c, f) Selective excitation of the proton H3 of 1b (dotted trapezium) using a 10 ms, 1% truncated,  $180^\circ$  Gaussian pulse.

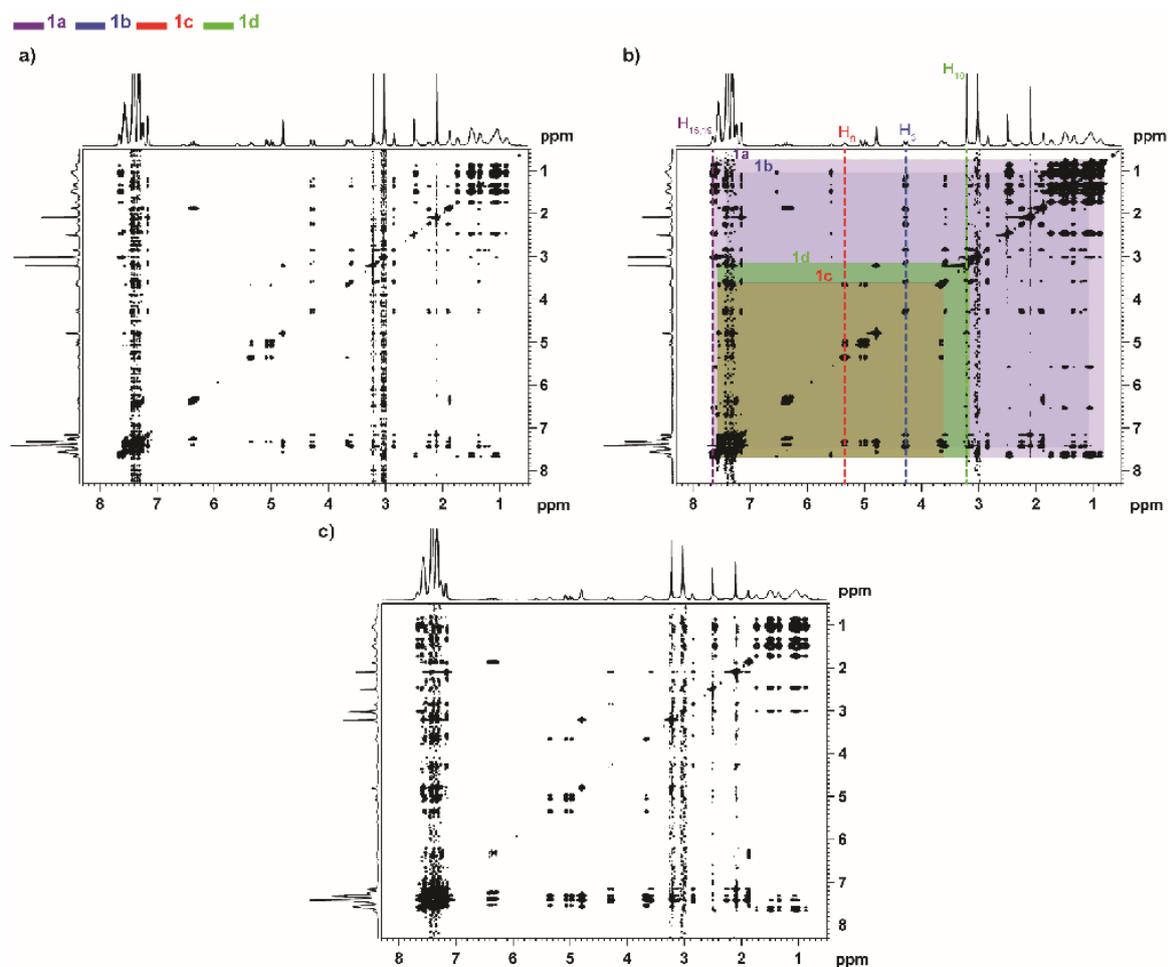


Fig. S9 2D  $^1\text{H}$  NOESY spectra of the phosphorus-containing compound test mixture (1a, 1b, 1c and 1d), 20 mM, dissolved in phosphoric acid (85%)/DMSO- $d_6$  (7:3, v/v) solution, mixing time ( $t_m$ ) = 0.5 s, at a) 308 K, b) 298 K and c) 288 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) using the noesyegpph pulse sequence.

Fig. S9 reports the evolution of proton NOESY cross-peaks upon sample temperature change. Full spin diffusion over each mixture component is only observed at 298 K. Nonetheless, at 288 K, efficient spin diffusion is still observed but the spectral resolution is damaged due to active transverse relaxation inducing peak broadening. Consequently, all *ViscY* NMR experiments in phosphoric acid (85%)/DMSO- $d_6$  (7:3, v/v) solution have been carried out at 298 K, being the optimal temperature at which the NOESY spectrum of every phosphorus-containing compound within mixture present correlations between all proton resonances of each compound without signal broadening.

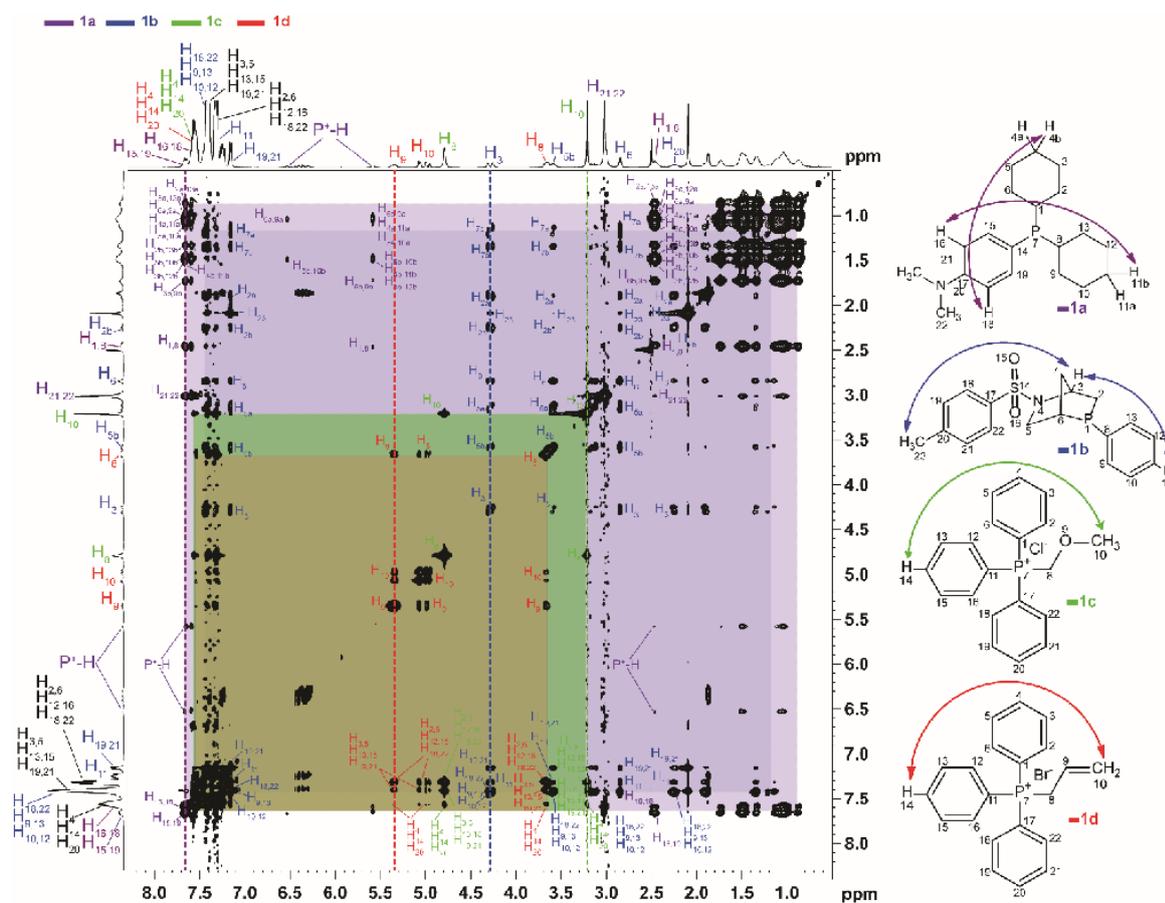


Fig. S10 2D  $^1\text{H}$  NOESY spectrum of the phosphorus-containing compound test mixture (1a, 1b, 1c and 1d), 20 mM, dissolved in phosphoric acid (85%)/DMSO- $d_6$  (7:3, v/v) solution, mixing time ( $t_m$ ) = 0.5 s, at 298 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) using the noesyegpph pulse sequence. See caption of Fig. 6a in ESI for the NMR acquisition and processing parameters.

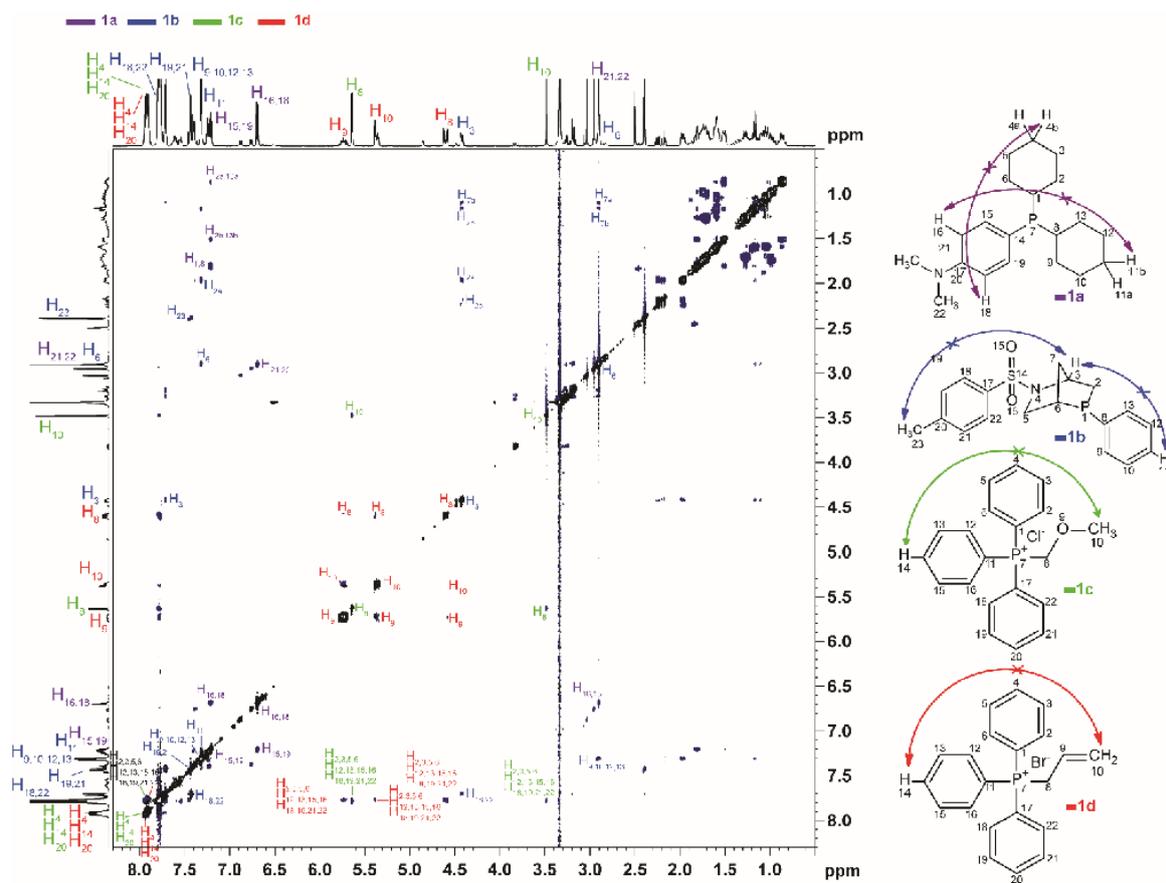


Fig. S11 2D  $^1\text{H}$  NOESY spectrum of the phosphorus-containing compound test mixture (1a, 1b, 1c and 1d), 20 mM, dissolved in neat  $\text{DMSO-}d_6$ , mixing time ( $t_m$ ) = 0.5 s, at 298 K, at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) using the noesygp ppp pulse sequence. See caption of Fig. 6b in ESI for the NMR acquisition and processing parameters.

## CHAPITRE D : LE SUIVI REACTIONNEL « *IN-SITU* » DANS UN TUBE DE RMN

### 1. Introduction

Cette section traite du suivi « *in-situ* » des réactions chimiques par RMN. Un milieu de réaction chimique organique est un mélange complexe de réactifs, de produits finaux, d'intermédiaires de réaction, de solvants et éventuellement de catalyseurs. L'analyse rapide de tels mélanges complexes dont la composition évolue au cours du temps représente un défi considérable avec des enjeux à la fois pour les secteurs industriels et académiques. Une telle investigation est motivée par la compréhension des mécanismes impliqués pour la formation des produits finaux, qui passe bien souvent par la formation d'un ou de plusieurs intermédiaires. Sa difficulté devient encore plus grande lorsqu'il s'agit d'identifier un intermédiaire dont la durée de vie est beaucoup trop courte pour être détecté par les méthodes analytiques conventionnelles. La spectroscopie de RMN constitue une alternative pour résoudre ce problème. Depuis plus de 20 ans, la communauté scientifique propose des outils instrumentaux de plus en plus sophistiqués pour l'étude du suivi réactionnel par RMN. Si la majorité des propositions fait appel à la surveillance de la réaction « *in-situ* » dans des tubes de RMN « standards », d'autres utilisent le mode « *on-line* » qui nécessite la présence de sondes spécifiques ou de tubes de RMN « personnalisés ». Ces approches ont pour but d'effectuer des études cinétiques de réactions organiques pour la recherche des intermédiaires parfois instables et pratiquement indécélables par les méthodes analytiques conventionnelles.

L'une des approches la plus connue date de 2014, elle a nécessité la conception d'un « tube à écoulement » ou plus communément appelé « *flow-tube* ». <sup>264</sup> La mise en place d'une telle instrumentation n'est pas forcément aisée pour un expérimentateur novice et peut être assez coûteuse. L'approche la plus simple consiste à utiliser un tube de RMN « standard ».

Notre approche est une extension de nos précédents résultats obtenus en analyse de mélange par RMN et mettant en jeu le phénomène de « diffusion de spin ». Comme mentionné à plusieurs reprises, cet effet est visible dans un spectre NOESY, qui est généralement enregistré pour détecter l'échange d'aimantation de spin longitudinale par le NOE résultant de l'interaction dipolaire entre les noyaux proches. L'échange d'aimantation par le NOE peut s'étendre à l'ensemble des noyaux <sup>1</sup>H au sein d'une molécule si les mouvements de rotation moléculaire sont « suffisamment ralentis », correspondant à un régime où le caractère aléatoire des mouvements moléculaires est décrit par des temps de corrélation « longs ». Dans ce cas, un spectre de RMN NOESY 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H corrèle deux à deux tous les déplacements chimiques de RMN de chaque molécule séparément, permettant ainsi d'analyser un mélange complexe sans aucune séparation physique de ses constituants. La rotation lente est obtenue pour les petites molécules en les diluant dans un solvant visqueux. Comme expliqué dans le chapitre C de la partie III, la stratégie résultante d'analyse de mélange par RMN a été nommée « **ViscY** » pour « **Viscosity-enhanced spectroscopY** ». <sup>74</sup> La mise en place d'une expérience *ViscY* est généralement réalisée sans recourir à un dispositif particulier, de sorte qu'une sonde de RMN « standard » peut être utilisée pour le suivi des réactions « *in-situ* », contrairement à la majorité des autres approches « *rapid-injection* » ou « *on-line* » par RMN.

Dans ce contexte, l'utilisation des solvants visqueux offre une toute nouvelle possibilité d'analyser les mélanges complexes de composition variable au cours du temps dans un tube de RMN. Parvenir à ralentir suffisamment la vitesse de rotation moléculaire des composés en mélange permet de contrôler

la dynamique réactionnelle à chaque instant et de regrouper les pics de RMN selon les composés dont ils sont issus *via* la diffusion de spin.

Le glycérol a été retenu pour la mise en place d'une première expérience de preuve de concept car c'est un solvant très visqueux ( $\eta = 934$  cP à 298 K)<sup>210</sup> qui est également un solvant de réactions chimiques. De plus, il est facilement disponible, bon marché, non toxique, ininflammable, biodégradable, hautement polaire, recyclable et respectueux de l'environnement (solvant vert). Dans ce contexte, nous avons choisi de nous concentrer sur les résultats proposés par Kumar *et al.*,<sup>357</sup> sur la synthèse de dérivés 3-substitués de la 4-hydroxycoumarine et de la 4-hydroxypyrrone (**4a**) par C-alkylation de dérivés 4-hydroxycoumarine (**1a**) et de dérivés de 4-hydroxypyrrone (**2a**) *via* des méthides *o*-quinone (*o*-QM) formés « *in-situ* » dans du glycérol à température ambiante (Figure 98).<sup>357</sup>

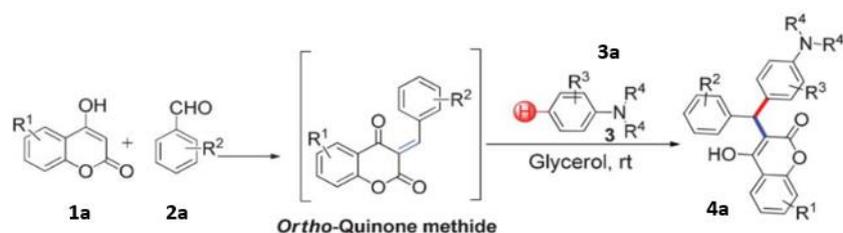


Figure 98. Réaction entre (1a) 4-hydroxycoumarine, (2a) 4-hydroxypyrrone et (3a) le *N,N*-dimethyl-*m*-toluidine, dans du glycérol, à 298 K, conduisant au produit final (4). Reproduite de la réf.<sup>357</sup>

Dans ces travaux, les auteurs démontrent que les rendements obtenus avec le glycérol surpassent ceux obtenus avec l'eau ou avec des solvants organiques courants.

La stratégie de suivi de la réaction est réalisée par l'enregistrement de plusieurs séries de spectres issues d'expériences conventionnelles 1D  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  et 2D COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , ainsi que par des expériences NOESY 1D sélectives pour l'identification des composants du mélange réactionnel et l'extraction des données cinétiques de la réaction.

Dans un premier temps, nous avons effectué une « phase exploratoire » qui a consisté à tester une série de solvants deutérés non visqueux compatibles avec la réaction organique à 298 K, pour identifier tous les produits directement dans le milieu réactionnel. Dans un second temps, nous avons cherché les conditions nécessaires pour optimiser le rendement de la réaction étudiée. Il nous a alors semblé innovant d'envisager un suivi réactionnel en milieux visqueux, ce qui n'avait pas encore été effectué. Nous avons décidé d'utiliser un solvant binaire visqueux DMSO- $d_6$ /H $_2$ O, déjà mis en œuvre précédemment par Lameiras et Nuzillard,<sup>48</sup> pour isoler les spectres individuels des composés présents directement dans le milieu réactionnel, en considérant une température compatible avec la synthèse organique. Ces travaux feront l'objet d'une publication scientifique.

## 2. Les solvants comme catalyseurs de la réaction

### 2.1. Contexte

En 2012, Kumar *et al.* ont développé un protocole dans lequel différents réactifs ont été envisagés pour accéder au rendement le plus élevé (Figure 98).<sup>357</sup> En condition stœchiométrique, 1 mmol de chaque réactif a été mélangée dans différents solvants tels que l'eau, le DMSO et le glycérol. L'ensemble des spectres ont ensuite été acquis dans du CDCl<sub>3</sub>.

Le rendement le plus élevé, de 95%, a été obtenu par réaction entre de la 4-hydroxycoumarine (**1a**), du benzaldéhyde (**2a**) et de la *N,N*-diméthyl-*m*-toluidine (**3a**) dans du glycérol à température ambiante. Le mélange réactionnel a été agité à température ambiante pendant 3 h. Aucun sous-produit n'a été signalé dans cet article.

Kumar *et al.* ont rapporté que le produit final attendu (**4a**) se distingue en RMN du <sup>1</sup>H par la présence d'un singulet à 5,89 ppm correspondant à l'atome d'hydrogène central, faisant la jonction entre les trois groupements dérivés de coumarine, de benzaldéhyde et de toluidine (Figure 99).

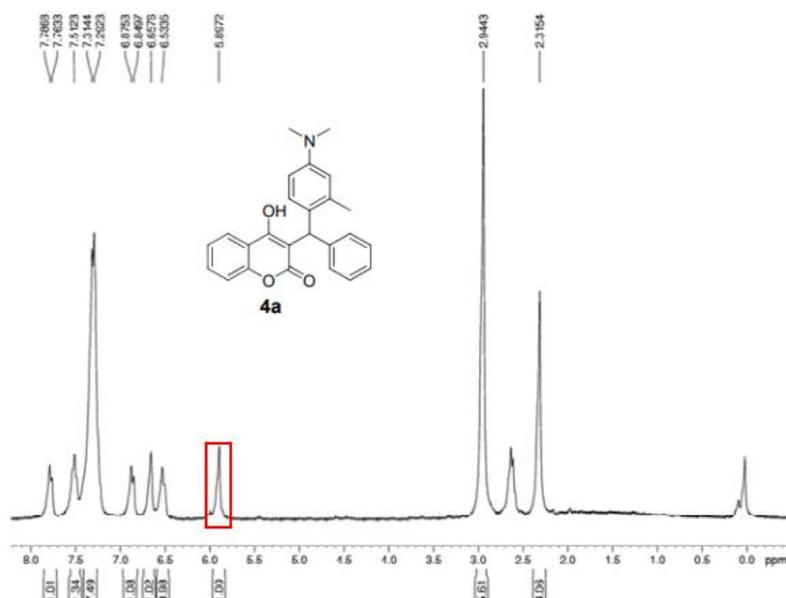


Figure 99. Spectre de RMN <sup>1</sup>H du produit final isolé (**4a**) dissous dans du CDCl<sub>3</sub>, à 300 MHz, à 298 K. Reproduite de la réf.<sup>357</sup>

Le rendement décrit est excellent et la réaction répond à nos critères puisqu'elle est lente et se déroule à température ambiante en milieu visqueux. Ces conditions opératoires sont propices à une diffusion de spin de qualité.

### 2.2. Le solvant binaire glycérol/DMSO-*d*<sub>6</sub>

La surveillance de la réaction dans un tube de RMN peut être faite de différentes manières. Quelles que soient les approches décrites dans la littérature, le facteur limitant est le temps qui s'écoule entre le début de la réaction, c'est-à-dire lorsque les réactifs sont mis en mélange, jusqu'au début de l'acquisition des données spectroscopiques (le « temps mort » (*t<sub>0</sub>*)). L'utilisation du glycérol ( $\eta = 934$  cP à 298 K)<sup>210</sup> hautement visqueux, rend la préparation des échantillons peu pratiques. Pour cela, un protocole a été développé. Il est décrit dans la section II - Matériels et Méthodes.

Nos recherches exploratoires ont consisté à suivre la réaction en enregistrant une série de spectres  $^1\text{H}$  toutes les 20 min pendant une semaine dans le but d'établir un profil cinétique, suivi de l'acquisition d'une série de spectres 2D conventionnels en vue d'attribuer les résonances aux molécules correspondantes. Le temps mort a été estimé à 16 min 18 s, en raison de différents problèmes ayant pour origines l'opérateur, le passeur d'échantillon et les opérations de « lock » et de « shim ».

En comparant le spectre 1 obtenu après évaluation du temps mort avec le dernier spectre acquis n° 535, nous avons observé des différences importantes. Cinq singulets sont apparus (représentés dans l'ellipse en rouge) dans la zone de déplacements chimiques comprise entre 5.7 et 6.2 ppm (Figure 100 et Figure 101).

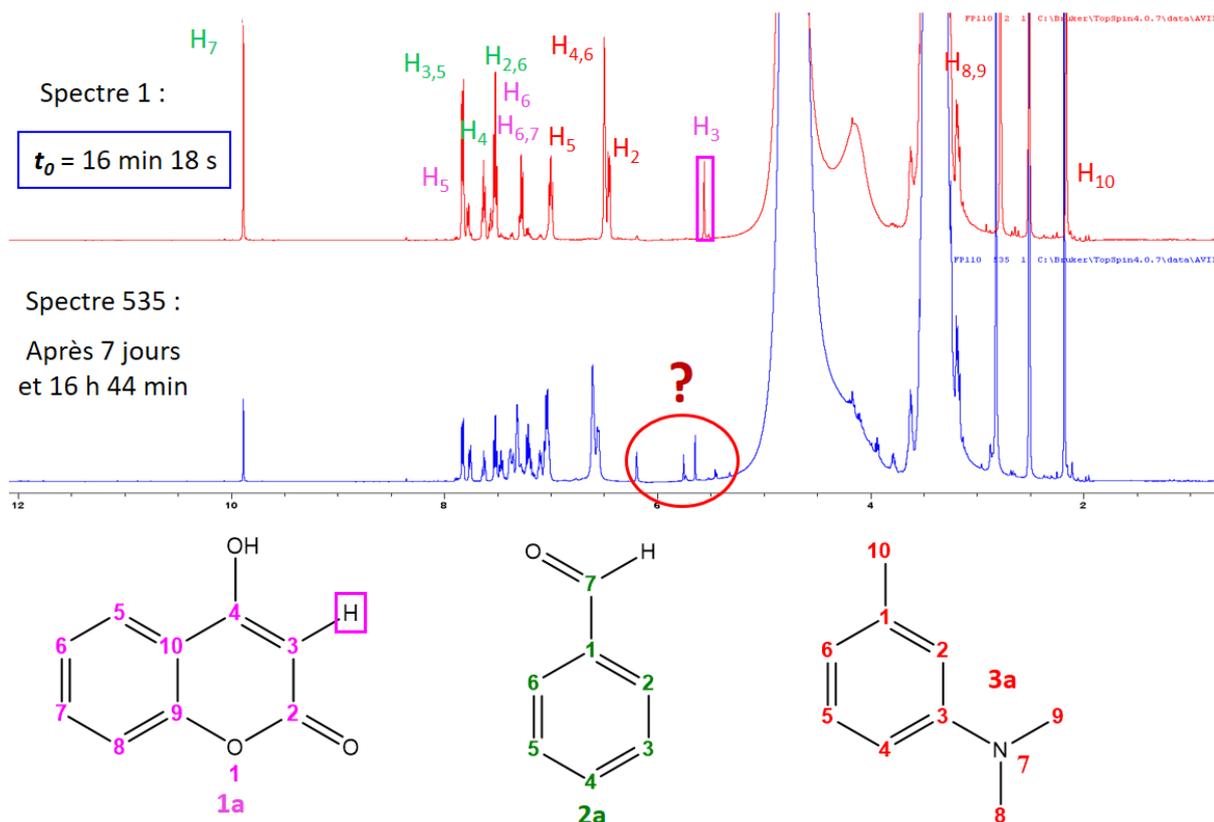


Figure 100. Comparaison du premier spectre de RMN  $^1\text{H}$  obtenu après évaluation du temps mort = 16 min 18s (en rouge) et du dernier spectre (535) obtenu (en bleu) après 7 jours et 16 h 44 min dans le glycérol/DMSO- $d_6$  (5:5, v/v), à 500 MHz, à 298 K. Cinq singulets sont apparus et mis en évidence par l'ellipse rouge. Les structures des trois réactifs : benzaldéhyde (20 mM) (en vert), *N,N*-*m*-diméthyltoluidine (20 mM) (en rouge) et 4-hydroxycoumarine (20 mM) (en violet) ainsi que la numérotation des protons sont représentées.

D'après les résultats de Kumar *et al.*, le glycérol serait le meilleur solvant pour cette réaction, avec un rendement de 95% et sans produit secondaire. Cependant, en effectuant cette réaction dans le glycérol/DMSO $d_6$  (5:5, v/v), le produit final n'a pas pu être observé mais plusieurs sous-produits ont été détectés. La plupart de ces produits secondaires proviennent de la réaction entre le glycérol et le benzaldéhyde, comme rapporté dans la littérature.<sup>358-360</sup> Une autre molécule parmi les sous-produits a été identifiée majoritairement et nommée le dimère de coumarine benzylé (Figure 101, composé 4b).

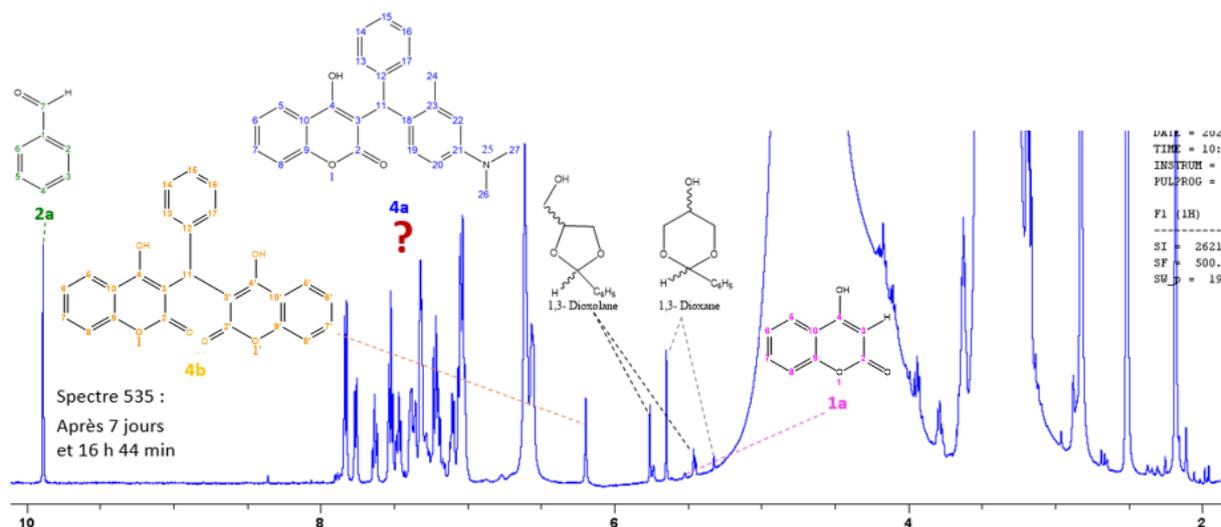


Figure 101. Spectre de RMN  $^1\text{H}$  du mélange réactionnel réalisée dans le glycérol/ $\text{DMSO-}d_6$  (5:5, v/v) enregistré à 500 MHz, à 298 K, après 7 jours et 16 h 44 min. La 4-hydroxycoumarine (1a) est représentée par la résonance  $\text{H}_3$  à 5,52 ppm, le benzaldéhyde (2a) par le proton  $\text{H}_7$  vers 9,80 ppm, le dimère de coumarine benzylé (4a) par le signal du proton  $\text{H}_{12}$  et les sous-produits par la présence de 4 singulets correspondant à deux paires de diastéréoisomères : 1,3-dioxolane par les résonances à 5,32 ppm et 5,64 ppm ; 1,3-dioxane par les résonances à 5,46 ppm et 5,75 ppm.

Nous avons observé une nette disparition du proton  $\text{H}_7$  du benzaldéhyde qui a été évaluée à 64%, en divisant l'intégrale de cette résonance du spectre final par celle du premier spectre. Concernant le proton éthylénique  $\text{H}_3$  de la 4-hydroxycoumarine, ce dernier a totalement disparu, laissant suggérer que de nouveaux produits se sont formés. Les sous-produits qui ont été formés sont les diastéréoisomères du 1,3-dioxolane et du 1,3-dioxane obtenus par réaction du benzaldéhyde avec le glycérol. Il y a par conséquent quatre singulets attribuables à ces sous-structures.

En raison d'une superposition accrue des signaux dans la région des aromatiques entre 7 et 8 ppm, il n'a pas été envisageable d'identifier les signaux du produit final souhaité (4a). Pour contourner cet écueil et pour éviter toute réaction potentielle entre le glycérol et le benzaldéhyde (2a), nous avons repris les résultats de Kumar *et al.* en effectuant la réaction dans le  $\text{DMSO-}d_6$  pur, dans lequel les auteurs ont estimé un rendement de réaction de 6%.<sup>357</sup> Bien que le rendement était faible, l'utilisation du  $\text{DMSO-}d_6$  seul devait permettre une dispersion plus nette des signaux, évitant la présence des résonances résiduelles du glycérol pouvant masquer la présence des signaux d'intérêts. De plus, ce faible rendement n'a pas été considéré comme un problème majeur puisque les mélanges binaires à base de  $\text{DMSO-}d_6$  sont considérés comme les meilleurs solvants visqueux permettant de retrouver par RMN les spectres individuels des composés en mélanges.<sup>47-48</sup>

### 2.3. Elucidation structurale dans le $\text{DMSO-}d_6$

L'analyse des spectres de RMN  $^1\text{H}$  à 298 K, a révélé que la réaction n'était pas totale, qu'elle était instantanée et qu'elle n'évoluait pas au cours du temps. En reproduisant la même logique pour le protocole, un temps mort de 5 min 56 s a été évalué (Figure 102).

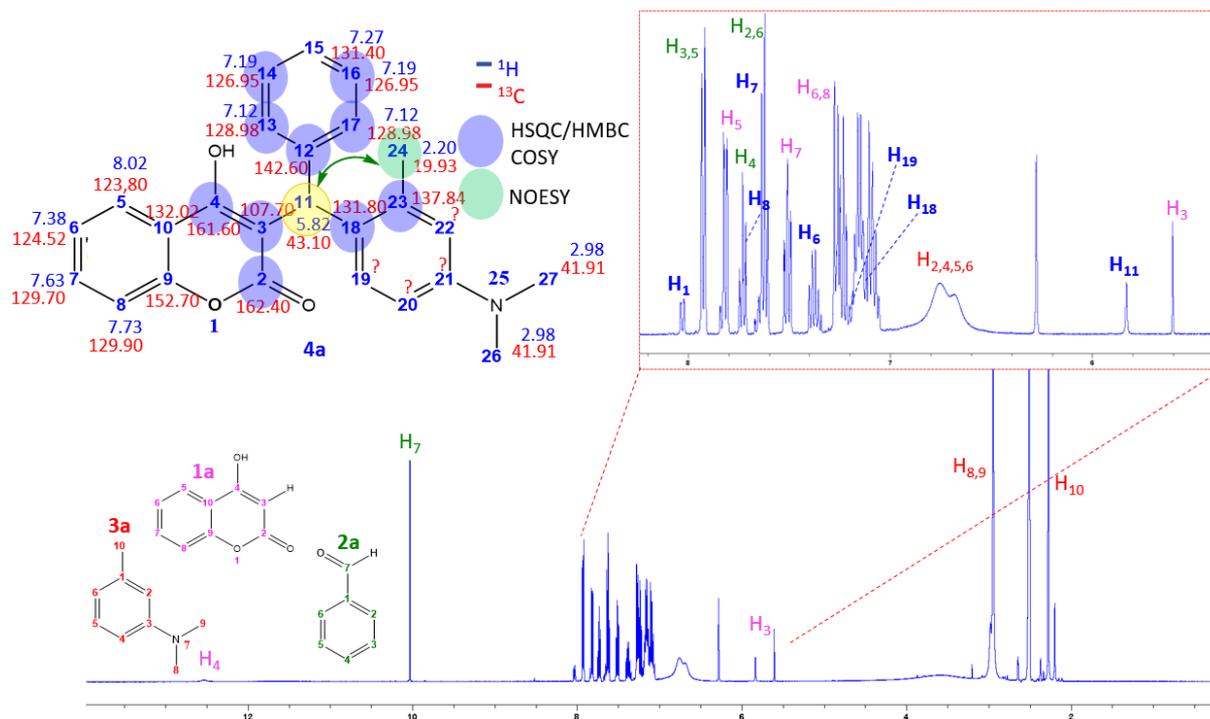


Figure 102. Spectre de RMN  $^1\text{H}$  du mélange réactionnel (20 mM de chaque réactif) réalisé dans le DMSO- $d_6$  enregistré à 500 MHz, à 298 K. Le temps mort a été évalué à 5 min 56 s. La 4-hydroxycoumarine (1a) est représentée en mauve par la résonance H<sub>3</sub> à 5,60 ppm, le benzaldéhyde (2a) en vert, par le proton H<sub>7</sub> à 10,02 ppm ; la *N,N*-diméthyl-*m*-toluidine en rouge, par les protons H<sub>8,9</sub> à 2,95 ppm et H<sub>10</sub> à 2,27 ppm et le produit final (4a) par le signal du proton central H<sub>11</sub> à 5,82 ppm. Sur la base d'une série de spectres 2D, une attribution partielle du produit final (4a) a pu être réalisée (représentée à gauche).

Le spectre a révélé des signaux plus dispersés que celui obtenu dans le mélange glycérol/DMSO- $d_6$ , facilitant une attribution des résonances des composés dans le mélange réactionnel. Contrairement au spectre précédent révélant cinq singulets dans le glycérol, ici deux singulets ont été formés avec la présence de nouveaux massifs. Par ailleurs, on a constaté que la *N,N*-diméthyl-*m*-toluidine (3a) présentait un massif large de 6,60 à 6,90 ppm qui correspond aux protons aromatiques H<sub>2,4,6,8</sub>. Cette observation pourrait être expliquée par une relaxation transversale  $T_2$  plus active pour ces protons.

La stratégie habituelle a consisté à enregistrer une série de spectres 2D conventionnels et un spectre 1D PSYCHE, décrit plus tôt dans la partie bibliographique. Bien que nous ayons observé une perte de sensibilité, la méthode PSYCHE est un outil puissant d'analyse permettant de simplifier un spectre surpeuplé de résonances, en de simples résonances uniques par suppression des couplages homonucléaires. De cette façon, une partie des déplacements chimiques  $^1\text{H}$  du produit final (4a) a été retrouvée avec précision (Figure 103).

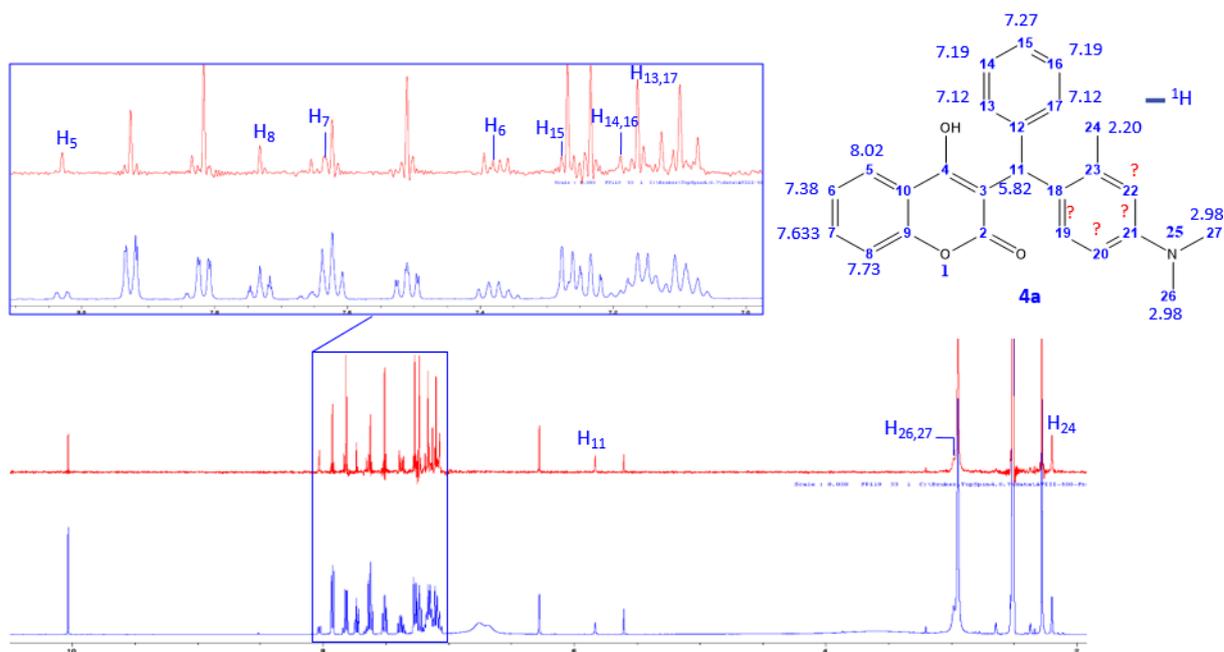


Figure 103. Spectres de RMN  $^1\text{H}$  du mélange réactionnel : (en bleu) conventionnel, (en rouge) issu de la méthode PSYCHE. Les déplacements chimiques du produit final (4a) sont retrouvés avec précision par la méthode PSYCHE qui permet de simplifier le spectre proton, constitué alors de résonances simples issues d'un découplage homonucléaire.

Nous avons pu identifier le proton central  $\text{H}_{11}$  du produit final (4a) à 5,82 ppm et d'après les spectres COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  et HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , ce même proton présente des taches de corrélation entre les protons de la partie benzaldéhyde (2a), les carbones quaternaires de la partie 4-hydroycoumarine (1a) et de la *N,N*-diméthyl-*m*-toluidine (3a) (Figure 102). Néanmoins, en raison d'un faible temps de relaxation  $T_2$  des signaux aromatiques de la *N,N*-diméthyl-*m*-toluidine (3a), il n'a pas été envisageable de poursuivre l'attribution complète de la molécule finale (4a). Sur la base de la méthode ERETIC-2, décrite dans la partie « Matériels et Méthodes », un rendement de 14% a été estimé, qui est deux fois supérieur à celui obtenu par Kumar *et al* dans le DMSO- $d_6$ .

Compte tenu de la faible superposition des signaux dans la région aromatique, il a également été possible de réaliser une expérience DOSY 2D  $^1\text{H}$  permettant de différencier l'ensemble des composés du mélange réactionnel suivant leur coefficient de diffusion translationnelle ( $D$ ) (Figure 104).

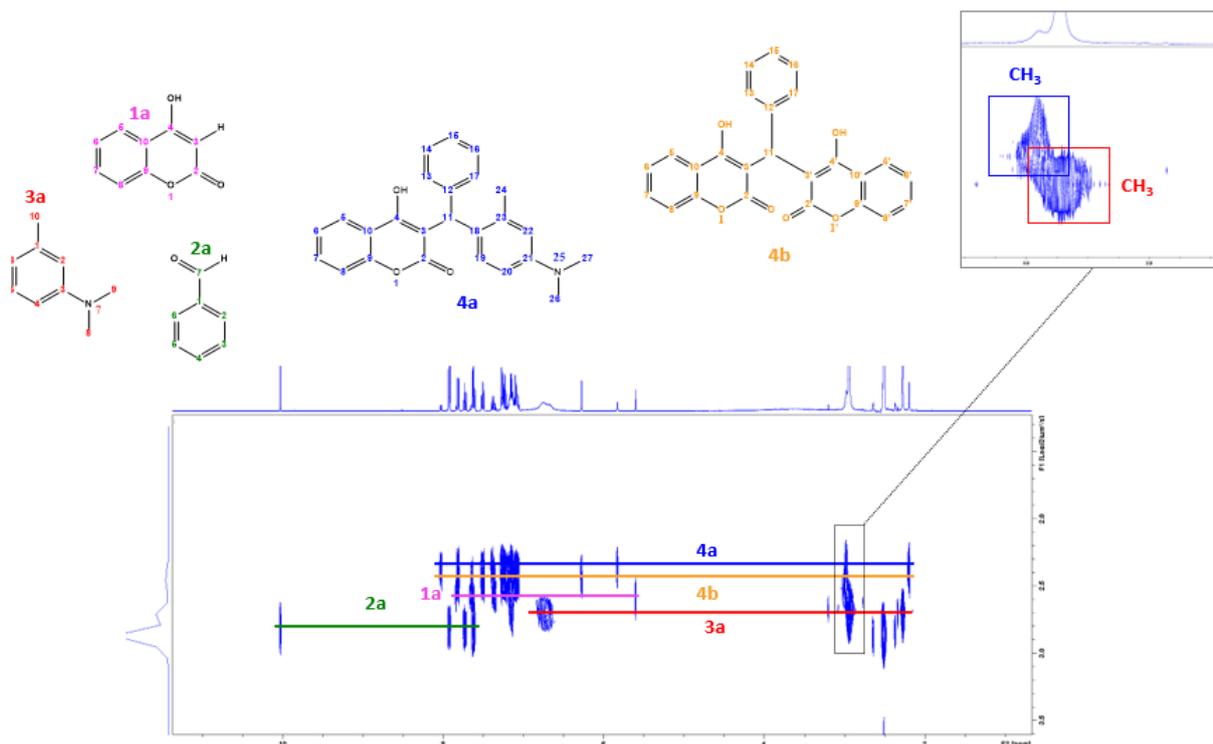


Figure 104. Spectre DOSY 2D  $^1\text{H}$  du mélange réactionnel : 1a (20 mM), 2a (20mM) et 3a (20 mM) dissous dans le  $\text{DMSO-}d_6$ , à 500 MHz, à 298 K .

Cette expérience a permis de confirmer l'existence du produit final (4a) et du dimère de coumarine benzylé (4b). De plus, si la partie aromatique de la *N,N*-diméthyl-*m*-toluidine présente un faible temps de relaxation  $T_2$ , les deux  $\text{CH}_3$  liés à l'azote de la *N,N*-diméthyl-*m*-toluidine (3a) et du produit final (4a) sont moins concernés par ce phénomène et leurs déplacements chimiques ont pu être déterminés.

Contrairement au mélange binaire glycérol/ $\text{DMSO-}d_6$ , l'utilisation du  $\text{DMSO-}d_6$  a permis une élucidation structurale plus simple du produit final attendu (4a) aux moyens de différentes expériences de RMN 1D et 2D. Toutefois, la réaction est beaucoup trop rapide pour envisager de dresser un profil cinétique et le rendement reste faible, bien qu'il soit deux fois supérieur à celui obtenu par Kumar *et al.*

L'objectif a ensuite consisté à tester la réaction dans différents solvants deutérés non visqueux. Pour cela, plusieurs aspects ont été considérés :

- Evolution de la réaction sur un temps plus long.
- Optimisation du rendement de la réaction en produit final souhaité.
- Recherche des conditions nécessaires au déplacement de l'équilibre de la formation du dimère de coumarine benzylé (4b) vers la formation du produit final (4a).

#### 2.4. Optimisation des conditions expérimentales dans des solvants deutérés non visqueux

Des essais ont consisté à préparer différents tubes de RMN contenant de la 4-hydroxycoumarine (1a) (20 mM), du benzaldéhyde (2a) (20 mM) et de la *N,N*-diméthyl-*m*-toluidine (3a) (20 mM) dans différents solvants deutérés : MeOD, acétonitrile- $d_3$ , toluène- $d_8$ ,  $\text{CDCl}_3$  et pyridine- $d_5$  (Tableau 7). Le temps de réaction est défini comme le temps nécessaire pour que les concentrations n'évoluent plus.

Solvant	Produit final (4a)	Dimère de coumarine benzylé (4b)	Sous-produit	Rendement en %	Temps des expériences
MeOD	✓	✓	✓	~ 3% 4a ~ 17% 4b	4 jours
Acétonitrile- $d_3$	✓	✓	✗	Trace de 4a ~ 17% 4b	3 jours
Toluène- $d_8$	✓	✓	✗	21% 4a * 8% 4b	13 jours
$CDCl_3$	✓	✓	✗	15% 4a * 11% 4b	14 jours
Pyridine- $d_5$	✓	✓	✓	25% 4a * 70% 4b	26 jours

Tableau 7. Récapitulatif des essais envisagés en testant la réaction organique dans différents solvants deutérés non visqueux. L'ensemble des expériences a été réalisé en enregistrant un spectre de RMN  $^1H$  tous les jours pendant la durée de l'expérience correspondante, à 298 K, à 500 MHz. Tous les spectres de RMN  $^1H$  ont été acquis avec  $d_1 = 30$  s, NS = 8, DS = 4, TD = 65 k points, SW = 11 ppm, Acqu = 7 min 11 s. Les données avec l'astérisque \* représentent les rendements calculés à partir de la méthode ERETIC-2.

Les résultats obtenus ont démontré que le toluène- $d_8$ , le  $CDCl_3$  et la pyridine- $d_5$  satisfont au mieux les critères recherchés pour accroître le rendement du produit final (4a) contrairement aux résultats obtenus par Kumar *et al.* pour lesquels le rendement était nul avec l'utilisation de ces solvants.<sup>357</sup> Si le toluène- $d_8$  et le  $CDCl_3$  ont permis d'inverser la tendance sur la formation du produit majoritaire entre le dimère de coumarine benzylé (4b) et le produit final attendu (4a), les solvants MeOD et l'acétonitrile- $d_3$  ne fournissant que très peu de produit final (4a), en conséquence ils n'ont pas été retenus. Cependant, en raison de la faible solubilité de la 4-hydroxycoumarine (1a) dans le toluène- $d_8$  ou dans le  $CDCl_3$  (Figure 105), nous avons poursuivi nos expériences avec de la pyridine- $d_5$ , malgré la prédominance du dimère de coumarine benzylé (4b). La pyridine- $d_5$  s'avère être le solvant répondant au mieux à nos attentes, logiquement elle a été considérée pour la suite des travaux de suivi de synthèse.

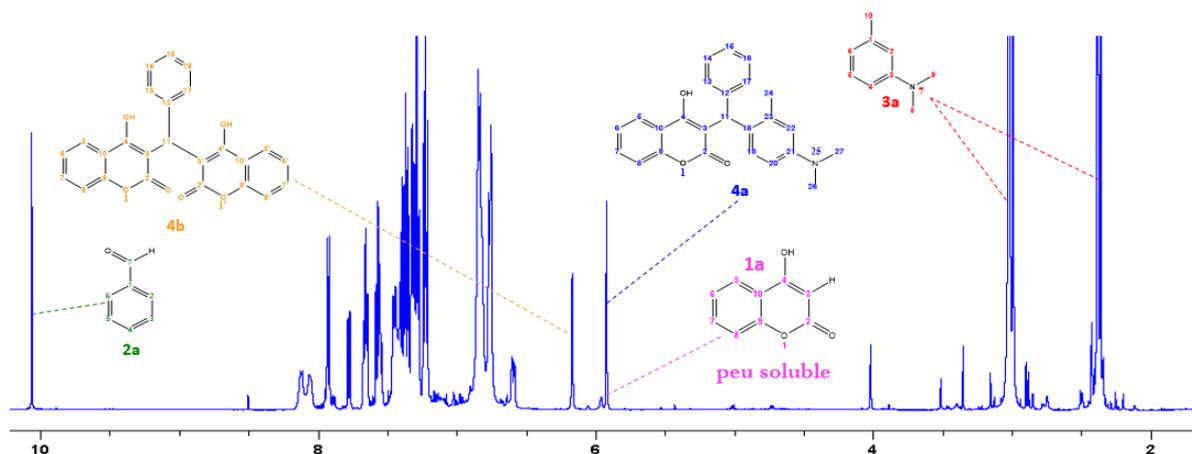


Figure 105. Spectre de RMN  $^1H$  du mélange réactionnel obtenu entre la 4-hydroxycoumarine (20 mM) (en violet), le benzaldéhyde (20 mM) (en vert) et la *N,N*-diméthyl-*m*-toluidine (20 mM) (en rouge) dans du  $CDCl_3$ , après 14 jours, à 298 K, à 500 MHz ; conduisant à la formation du dimère de coumarine benzylé (4b) (en orange) et au produit final attendu (4a) (en bleu). Le spectre a été acquis avec  $d_1 = 30$  s, NS = 8, DS = 4, TD = 64 k points, SW = 11 ppm, Acqu = 7 min 11 s. 1a est représenté par le signal du proton H<sub>3</sub>, 2a par le proton H<sub>7</sub>, 3a par les résonances H<sub>8,9</sub> et H<sub>10</sub>, 4b par le proton H<sub>11</sub> et 4a par le proton H<sub>11</sub>.

## 2.5. Suivi de la réaction dans la pyridine- $d_5$ à 500 MHz

Dans une récente revue publiée en 2019, Abdou M. M. *et al.*<sup>361</sup> ont démontré que la pyridine pouvait être un solvant de choix pour synthétiser des formes **intermédiaires (64)** avec de bons rendements à partir de la 4-hydroxycoumarine (**1**) et du benzaldéhyde (**63**) (Figure 106).

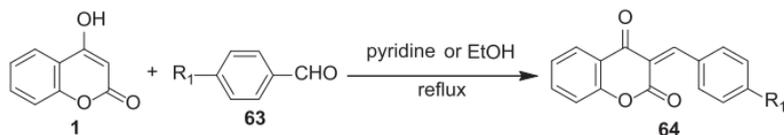


Figure 106. Exemple de réaction faisant intervenir la 4-hydroxycoumarine (**1**) et un dérivé du benzaldéhyde (**63**) conduisant au produit (**64**) avec un rendement de 78% (R = H) ou 80 (R = O-Me). Reproduite de la réf.<sup>361</sup>

Ce constat nous a orienté à tester la réaction (20 mM de chaque réactif) dans un tube de RMN contenant de la pyridine- $d_5$ . Les réactifs ont été introduits dans le tube de RMN selon le protocole déjà décrit pour le glycérol et le DMSO- $d_6$ . Le temps mort a été évalué à 4 min 16 s (Figure 107).

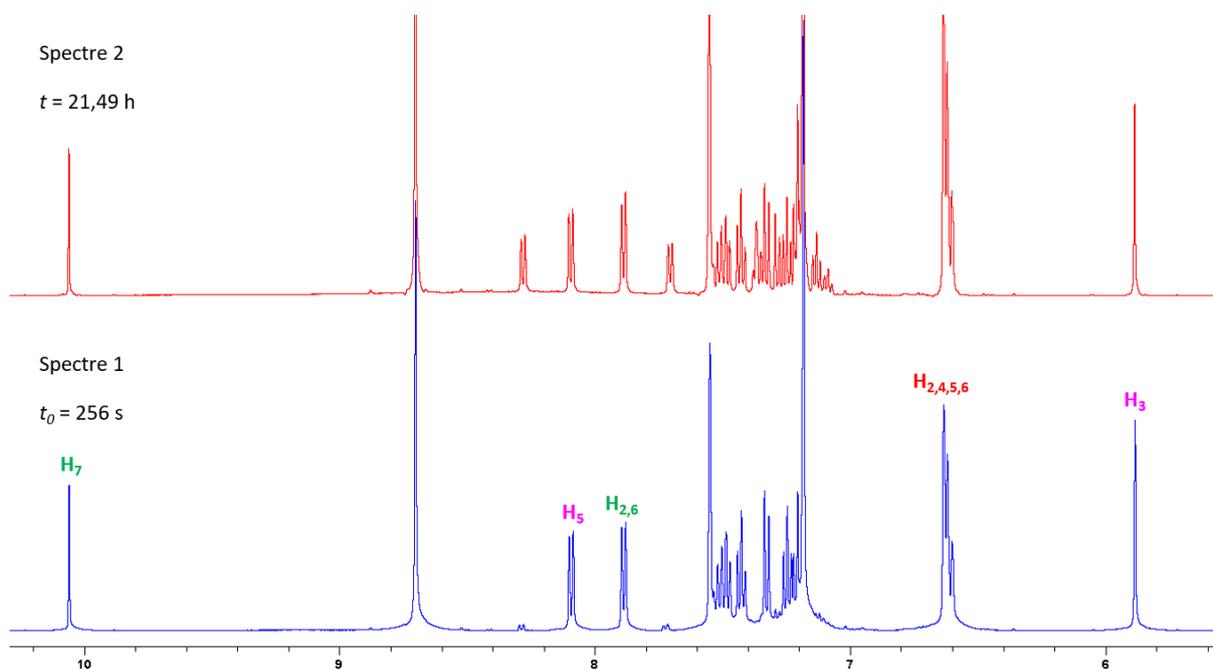
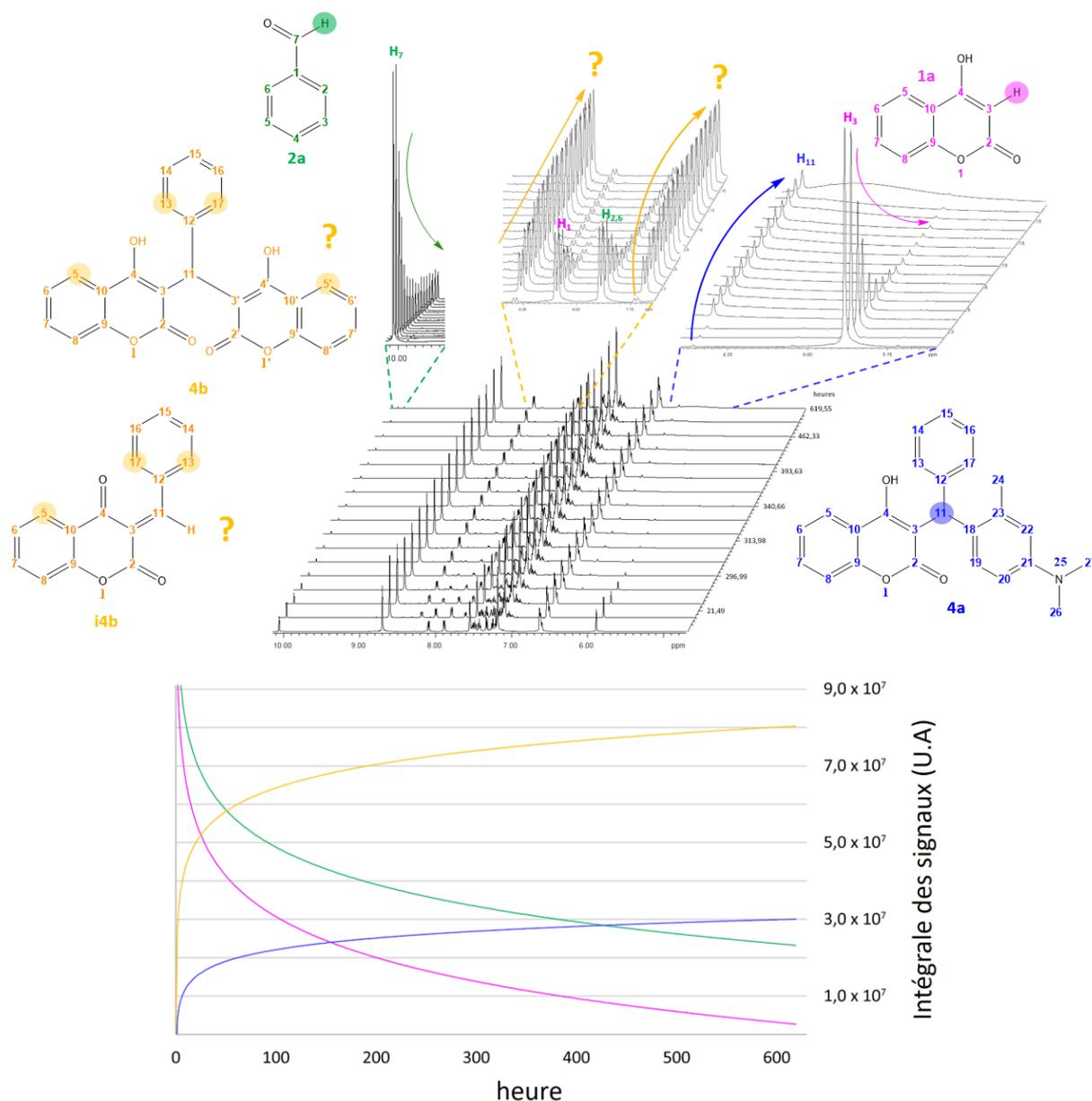


Figure 107. Comparaison entre deux spectres de RMN <sup>1</sup>H acquis à 21,49 h d'intervalle révélant l'apparition de deux nouveaux doublets aromatiques à 7,70 et 8,28 ppm, à 298 K, à 500 MHz. Le spectre 1 (en bleu) présente une qualité de résolution qui est mauvaise, en raison des paramètres automatiques du spectromètre qui ont été rapides afin de minimiser le temps mort t<sub>0</sub>. Les deux spectres ont été acquis avec d<sub>1</sub> = 30 s, NS = 8, DS = 4, TD = 65 k points, SW = 11 ppm, Acqu = 7 min 11 s.

La réaction a été suivie sur 26 jours en enregistrant une série de 33 spectres de RMN <sup>1</sup>H qui a permis de dresser un profil cinétique (Figure 108). Les résonances ont été attribuées sur la base des expériences 2D conventionnelles.

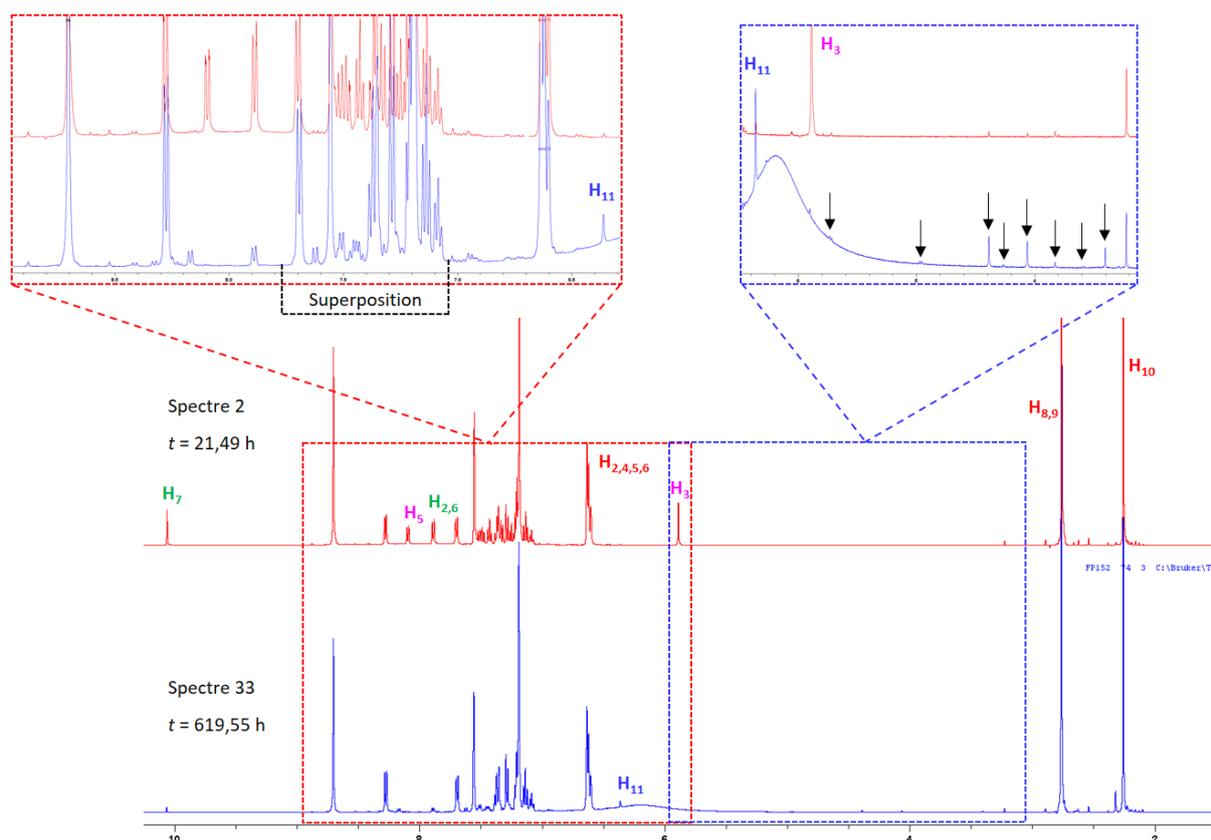


**Figure 108.** Profil cinétique de la réaction chimique entre la 4-hydroxycoumarine (20 mM) (1a), le benzaldéhyde (20 mM) (2a) et la *N,N*-diméthyl-*m*-toluidine (20 mM) (3a) dissous dans la pyridine-*d*<sub>5</sub>, à 298 K, à 500 MHz. La molécule *N,N*-diméthyl-*m*-toluidine (3a) n'est pas représentée en raison de la superposition des signaux du réactif seul avec ceux attendus pour le produit final (4a). L'ensemble des résultats ont été obtenus par le logiciel Dynamic Center (Bruker) à partir des mesures d'une série de spectres de RMN <sup>1</sup>H sur 26 jours. En bas, les courbes représentent l'évolution de la réaction à partir de la disparition des protons H<sub>3</sub> pour la 4-hydroxycoumarine (1a), H<sub>7</sub> pour du benzaldéhyde (2a) et l'apparition de nouveaux produits avec les signaux H<sub>11</sub> pour le produit final (4a) et H<sub>5</sub> et H<sub>13,17</sub> s'il s'agit d'un intermédiaire ou H<sub>5,5'</sub> et H<sub>13,17</sub> pour le dimère de coumarine benzylé (4b).

Une nette disparition du proton éthylénique de la 4-hydroxycoumarine H<sub>3</sub> et de la résonance de l'aldéhyde du benzaldéhyde H<sub>7</sub> a été observée. Cette disparition a été accompagnée de l'apparition de deux signaux à 7,70 et 8,28 ppm et de l'apparition du signal H<sub>11</sub> à 6,36 ppm, correspondant au produit final recherché (4a). Toutefois, un doute subsiste concernant la formation de l'un des deux produits (4b) ou (i4b). En effet, comme l'ont suggéré Abdou M. M. *et al.*,<sup>361</sup> les deux réactifs 4-hydroxycoumarine (1a) et benzaldéhyde (2) pourraient réagir ensemble pour conduire à la formation d'un intermédiaire (i4b) (Figure 106). Contrairement à l'utilisation du DMSO-*d*<sub>6</sub> qui a révélé le proton central H<sub>11</sub> du dimère de coumarine benzylé (4b) à 6,28 ppm lié à son carbone C<sub>12</sub> à 36,32 ppm ; dans la pyridine-*d*<sub>5</sub>, cette même résonance est plus déblindée et se situerait à 7,35 ppm et son carbone à 37,65 ppm.

Dans le but d'identifier la molécule intermédiaire (i4b), trois logiciels de simulation de spectres de RMN  $^1\text{H}$  tels que « *NMR predict* », directement accessible depuis le net, « *ACD* »<sup>362</sup> et « *NMR-Wizard* » ont été utilisés afin de prédire ses déplacements chimiques. Les résultats ont prévu que le proton central  $\text{H}_{11}$  de l'intermédiaire (i4b) devrait se situer à 8,61 ppm pour « *NMR predict* », 8,24 ppm pour « *ACD* » et 8,38 ppm pour « *NMR-Wizard* ». Ces prévisions ont suggéré l'idée que le produit inconnu pouvait être l'intermédiaire (i4b).

Une autre option aurait été d'intégrer les signaux aromatiques à 7,70 et 8,28 ppm. Cependant, la réaction n'a pas été totale et a conduit à une diversité de sous-produits (Figure 109).



**Figure 109.** Comparaison entre deux spectres de RMN  $^1\text{H}$  acquis à 598,06 h d'intervalle, à 298 K, à 500 MHz. Le spectre 33 (en bleu) correspond au dernier spectre acquis et le spectre 2 (en rouge) après 21,49 h de réaction. En haut à droite, les flèches en noirs représentent les résonances des sous-produits identifiés et en haut à gauche, la superposition des résonances  $^1\text{H}$  rend difficile toutes intégrations des signaux. Les deux spectres ont été acquis avec  $d_1 = 30$  s, NS = 8, DS = 4, TD = 65 k points, SW = 11 ppm, Acqu = 7 min 11 s.

La présence des réactifs initiaux, du produit final attendu (4a) et des produits secondaires ayant des résonances qui se superposent, ont rendu difficile l'intégration des résonances protons aromatiques.

De plus, la très faible quantité des sous-produits identifiés ne nous a pas permis d'élucider leur structure à travers des expériences de RMN 2D classiques sur les spectromètres de 500 et 600 MHz, directement accessibles depuis la plateforme PIAneT.

Concernant la formation de l'intermédiaire (i4b), une hypothèse suggérerait la participation de la pyridine- $d_5$  dans le mécanisme réactionnel décrit ci-dessous (Figure 110).

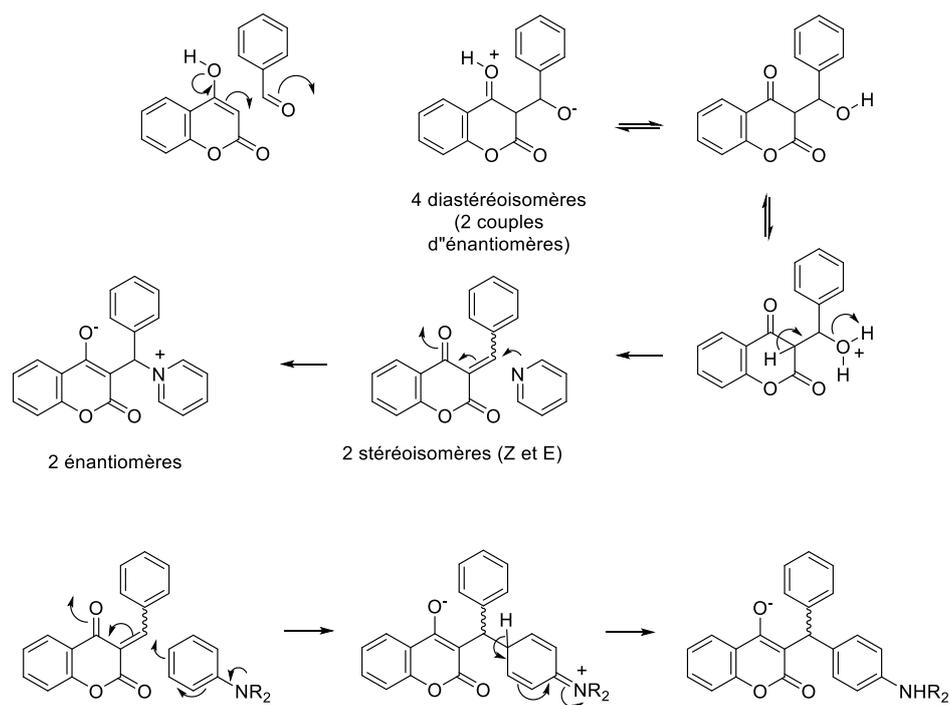


Figure 110. Mécanisme réactionnel proposé avec l'implication de la pyridine.

L'ensemble de ces observations nous ont poussé à exploiter la potentialité du spectromètre de RMN à 950 MHz ( $^1\text{H}$ ) de l'infrastructure de recherche iR-RMN (Gif-sur-Yvette) en termes de résolution et de sensibilité. L'utilisation d'un champ magnétique plus élevé nous a permis en effet d'améliorer la résolution spectrale et d'accroître la dispersion des signaux afin d'identifier les produits secondaires et l'intermédiaire (i4b) potentiel.

#### 2.6. Elucidation structurale des produits secondaires dans la pyridine- $d_5$ à 950 MHz

Des expériences de RMN 1D et 2D ont été réalisées 11 jours après la préparation de deux tubes de RMN. Le premier contenait 20 mM des trois réactifs dans de la pyridine- $d_5$  et le second de la 4-hydroxycoumarine (20 mM) et du benzaldéhyde (20 mM) dans de la pyridine- $d_5$  afin de déterminer la présence de l'intermédiaire (i4b) suggéré.

Des expériences 2D HMBC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  ont été réalisées avec les deux tubes afin de détecter si l'atome d'azote de la pyridine pouvait contribuer à la formation de l'intermédiaire (Figure 111). Aucune tache de corrélation n'a été observée entre la pyridine et l'intermédiaire hypothétique, suggérant que la pyridine n'est pas impliquée dans le mécanisme réactionnel.

De plus, en réalisant la synthèse d'une série du dimère de coumarine benzylé (4b) et de ses dérivés, Završnik D. *et al.* ont démontré que le proton central qui fait le pont entre les trois groupements aromatiques, était toujours **déblindé** et présentait un carbone **blindé** (Figure 112).<sup>359</sup>

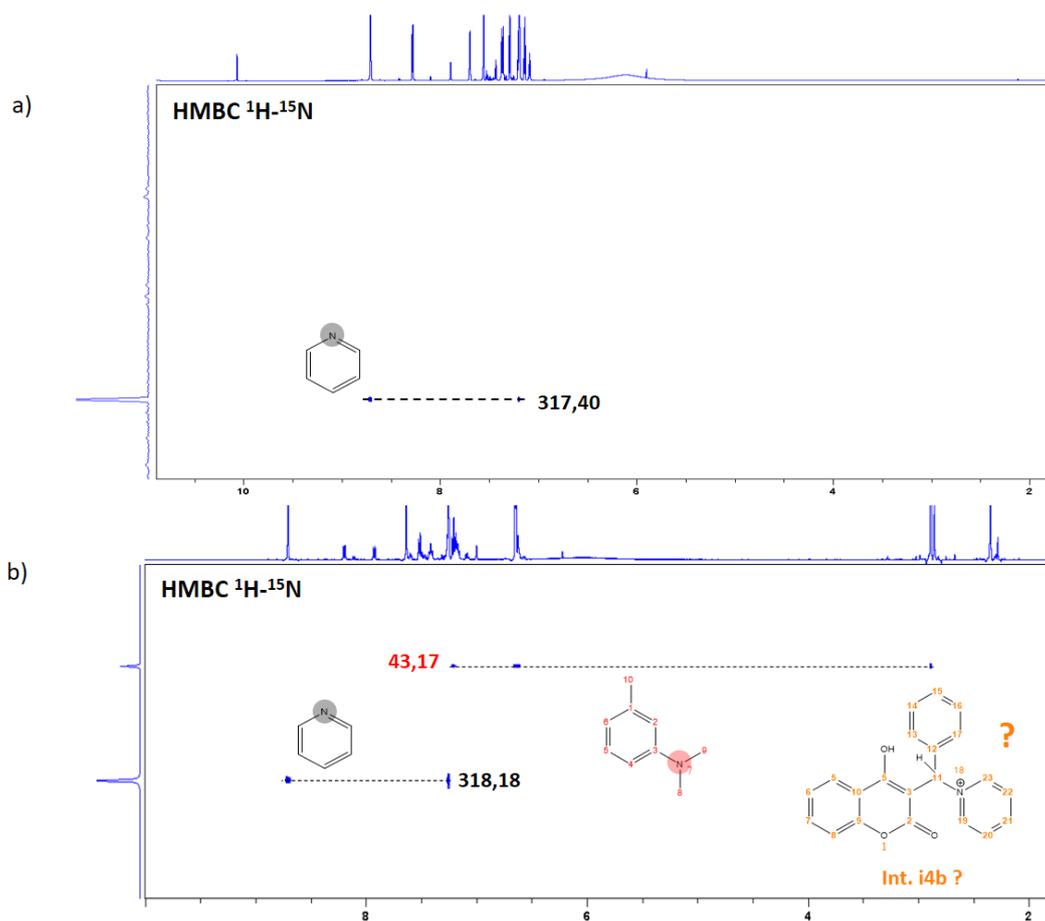


Figure 11. Spectres 2D HMBC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  avec a) 4-hydroxycoumarine (20 mM) et benzaldéhyde (20 mM) et b) 4-hydroxycoumarine (20 mM) et benzaldéhyde (20 mM) et *N,N*-diméthyl-*m*-toluidine (20 mM) dissous dans la pyridine-*d*<sub>5</sub>, à 298 K, à 950 MHz. La structure de l'intermédiaire suggéré est représentée en bas à droite (en orange). Les deux spectres ont été acquis avec  $d_1 = 1$  s, DS = 16, NS = 32, SW ( $F_2 = 11$  ppm et  $F_1 = 800$  ppm), TD ( $F_2 = 4$  K) ( $F_1 = 256$ ), Acqu = 1 h 54 min.

a)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
$R^1$	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	NO <sub>2</sub>	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
$R^2$	H	H	Br	H	H	H	H	H	H	H	H	H	OH	H	OCH <sub>3</sub>
$R^3$	H	Br	H	Cl	H	F	CF <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	SCH <sub>3</sub>	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH	H	OH
$R^4$	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>

### 3.2.2. Compound data

3,3'-(Benzilidene)-bis-[4-hydroxycoumarin] (**1**) [11,14,16]. Yield 77.5%; mp 233.3 °C; IR (KBr) ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2901 (CH); 1658 (C=O); 1600, 1584, 1497, 1450 (C=C ar.); 1199 (OH);  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.11 (H\*, s, 1H), 7.23 (H2/H6', m, 2H), 7.27 (H4', m, 1H), 7.33 (H3'/H5', m, 2H), 7.38 (H6/H6'', m, 2H), 7.42 (H8/H8'', m, 2H), 7.63 (H7/H7'', m, 2H), 8.00 (H5/H5'', d,  $J = 7.3$ , 1H), 8.08 ppm (H5/H5'', d,  $J = 6.8$ , 1H), 11.41 (OH, b, 2H);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  36.16 (C\*), 103.90/105.63 (C3/C3''), 116.63 (C8/C8''), 116.91 (C10/C10''), 124.39 (C5/C5''), 124.88 (C6/C6''), 126.47 (C2'/C6'), 126.87 (C4'), 128.63 (C3'/C5'), 132.85 (C7/C7''), 135.17 (C1'), 152.29/152.53 (C9/C9''), 164.60/165.80 (C4/C4''), 166.87/169.31 ppm (C2/C2''); ES-MS  $m/z$  413 [M-H].

Figure 12. Structure du dimère de coumarine benzylé (**4b**) et de ses dérivés (en haut) avec ses déplacements chimiques (**4b**) (en bas) dans le  $\text{CDCl}_3$ . Reproduite de la réf. <sup>359</sup>

Ces résultats semblent évoquer que l'intermédiaire (i4b) n'a pas été présent au sein de la réaction que nous avons étudiée. Enfin, l'étude de la réaction entre la 4-hydroxycoumarine et le benzaldéhyde dans le second tube de RMN, a confirmé la présence du dimère de coumarine benzylé (4b) (Figure 113).

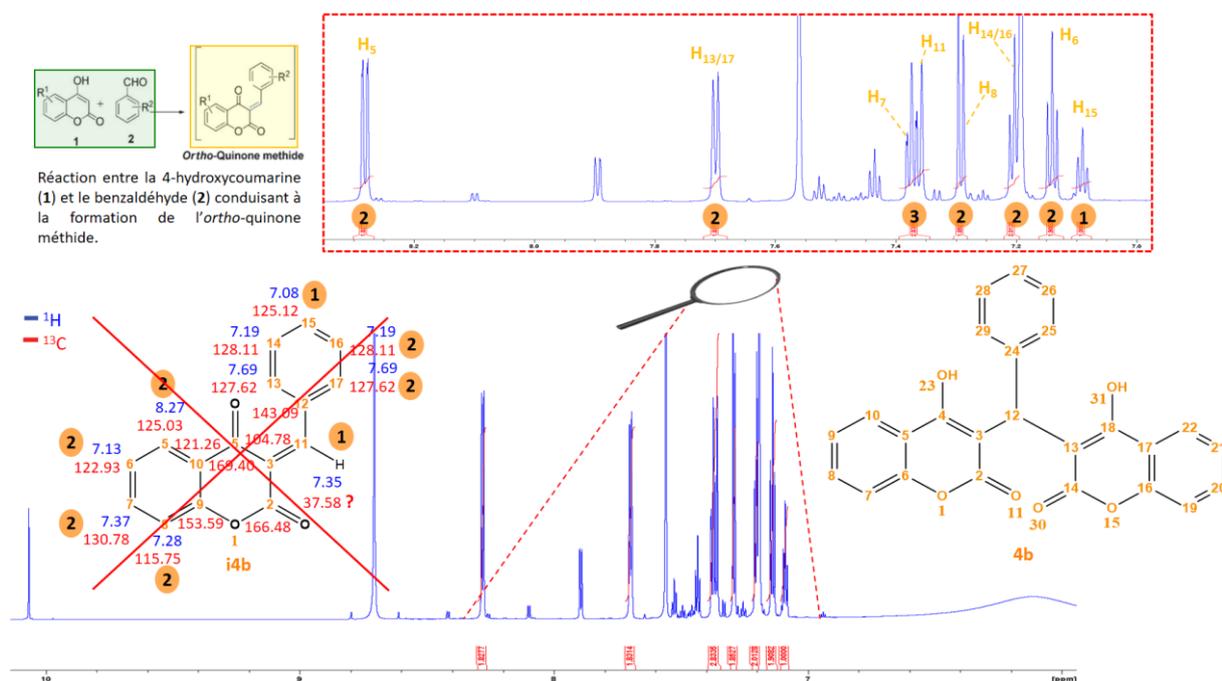


Figure 113. Spectre de RMN  $^1\text{H}$  de la 4-hydroxycoumarine (20 mM) et du benzaldéhyde (20 mM) dans de la pyridine- $d_5$ , à 298 K, à 950 MHz. Le spectre a été acquis avec  $d_1 = 30$  s, NS = 8, DS = 4, TD = 65 k points, SW = 11 ppm, Acqu = 7 min 11 s.

Les résultats ont montré que les signaux étaient plus dispersés et moins encombrés en absence de la *N,N*-diméthyl-*m*-toluidine (3a). De plus, comme aucun produit secondaire n'était visible, une intégration de tous les signaux de la molécule formée a pu être réalisée. En suggérant que la molécule étudiée était l'intermédiaire (i4b), l'intégration a été faite à partir du triplet  $\text{H}_{15}$  qui présente une résonance bien résolue pour un proton, contrairement à cette même résonance qui est superposée dans l'étude des trois réactifs en mélange. Cette intégration a permis de confirmer que les protons les plus déblindés  $\text{H}_5$  et  $\text{H}_{13,17}$  intégraient pour 2 protons chacun. Cette observation nous a permis d'en déduire que le produit formé était bien le dimère de coumarine benzylé (4b) et qu'en aucun cas, l'intermédiaire a pu être détecté dans notre étude.

L'utilisation d'un très haut champ magnétique à 950 MHz ( $^1\text{H}$ ) nous a permis de détecter de nouvelles taches de corrélations aux moyens des expériences 2D et d'effectuer une attribution partielle ou complète des produits secondaires, ce qui confirme la présence de quatre produits nouvellement formés (4c, 5a, 5b et 5c) (Figure 114). Leur spectre se trouve en Annexe 6 (Sl. 1., Sl. 2., Sl. 3., Sl. 4., Sl. 5. et Sl. 6.).

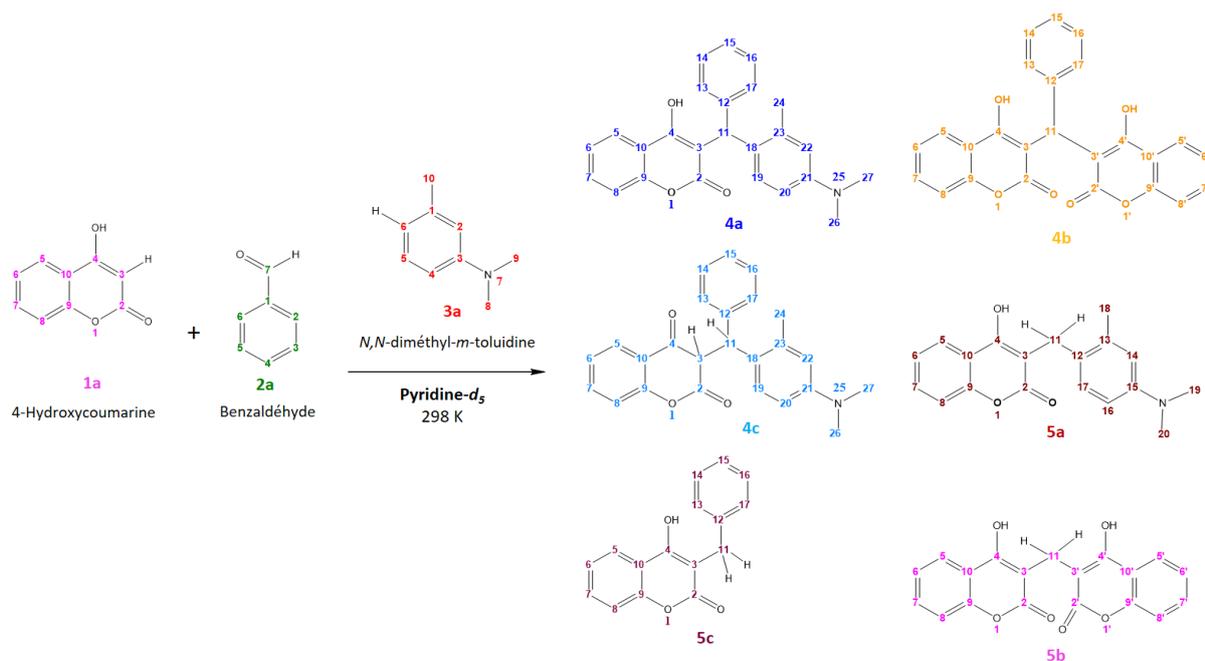


Figure 114. Récapitulatif des produits formés (4a, 4b, 4c, 5a, 5b et 5c) par réaction de la 4-hydroxycoumarine (20 mM), du benzaldéhyde (20 mM) et de la *N,N*-diméthyl-*m*-toluidine (20 mM) dans de la pyridine-*d*<sub>5</sub>, à 298 K, à 950 MHz.

Sur la base des résultats obtenus dans la pyridine-*d*<sub>5</sub> et dans le DMSO-*d*<sub>6</sub>, deux solvants binaires visqueux ont été sélectionnés de manière à bénéficier du phénomène de la diffusion de spin afin d'identifier plus rapidement la structure de tous les produits directement au sein du milieu réactionnel.

La première proposition a été inspirée des travaux de Simpson *et al.* en 2008 qui ont utilisé une huile perfluorée (polychlorotrifluoroéthylène) (PCTFE) hautement visqueux ( $\eta = 1550$  cP à 298 K)<sup>43</sup> en présence de 20% de CDCl<sub>3</sub> pour l'édition spectrale de composés organiques en mélange en tirant profit de la diffusion de spin dans des conditions de viscosités particulières.<sup>44</sup> Ce solvant est beaucoup plus visqueux que d'autres solvants décrits dans la partie III, tels que le diméthylsulfoxyde ( $\eta = 2$  cP à 298 K),<sup>214</sup> le sulfolane ( $\eta = 10,29$  cP à 303 K),<sup>73</sup> l'acide phosphorique (85%) ( $\eta = 37,59$  cP à 298 K),<sup>336</sup> l'éthylène glycol ( $\eta = 17$  cP à 298 K),<sup>335</sup> le carbonate de glycérol ( $\eta = 85,4$  cP à 298 K)<sup>46,210</sup> ou encore le glycérol ( $\eta = 934$  cP à 298 K).<sup>46-47</sup> Le PCTFE est un solvant huileux exempt d'atomes d'hydrogènes qui est facilement miscible avec de nombreux solvants organiques usuels tels que le dichlorométhane ou la pyridine-*d*<sub>5</sub>, ce qui facilite la solubilisation des composés plutôt apolaires.

La deuxième proposition a été d'utiliser un mélange de solvants à base de DMSO-*d*<sub>6</sub>. Comme mentionné précédemment, Lameiras *et al.* ont utilisé des mélanges de DMSO-*d*<sub>6</sub>/glycérol<sup>47</sup> et DMSO-*d*<sub>6</sub>/H<sub>2</sub>O<sup>48</sup> comme solvants binaires visqueux pour individualiser des molécules de petites tailles en mélange. Si la réaction est instantanée dans le DMSO-*d*<sub>6</sub>, en revanche, elle ne conduit pas à différents sous-produits comme c'est le cas avec l'utilisation de la pyridine-*d*<sub>5</sub>. De plus, une meilleure dispersion des signaux est observée dans la région aromatique et le signal du proton central du dimère de coumarine benzylé (4b) est isolé, facilitant l'attribution des signaux des produits formés.

Dans ce contexte, notre choix s'est porté sur le mélange binaire visqueux DMSO-*d*<sub>6</sub>/H<sub>2</sub>O plutôt que le mélange PCTFE/Pyridine-*d*<sub>5</sub> pour étudier la cinétique de la synthèse organique.

## 2.7. Suivi de la réaction dans le solvant binaire DMSO-*d*<sub>6</sub>/H<sub>2</sub>O à 500 MHz

Comme mentionné à plusieurs reprises (Partie I-C), le temps mort ( $t_0$ ) est le facteur limitant de notre approche. Pour le contourner, une autre approche expérimentale en milieu visqueux a été développée.

Cette dernière est décrite dans la section « Matériels et Méthodes » (Figure 92). Elle a été mise en place dans le but de « quencher » la réaction à très basse température, en présence d'acétone contenant de la glace pilée.

Un tube de RMN contenant de la 4-hydroxycoumarine (20 mM), du benzaldéhyde (20 mM) et de la *N,N*-diméthyl-*m*-toluidine (20 mM) a ainsi été préparé en suivant le protocole établi dans le DMSO- $d_6$ /H<sub>2</sub>O (70:30, v/v) à 238 K. L'utilisation du H<sub>2</sub>O a été préférée au D<sub>2</sub>O afin d'éviter un échange du proton éthylénique de la 4-hydroxycoumarine H<sub>8</sub> avec le solvant. Entre temps, le spectromètre a été stabilisé à la température souhaitée avec l'aide d'un tube témoin contenant la même composition. Aussitôt fait, l'analyse a pu commencer.

En suivant cette méthode, le temps mort a été évalué à 7 min 13 s à 238 K. Cette température a été choisie pour s'assurer que la réaction ne débute pas (Figure 115).

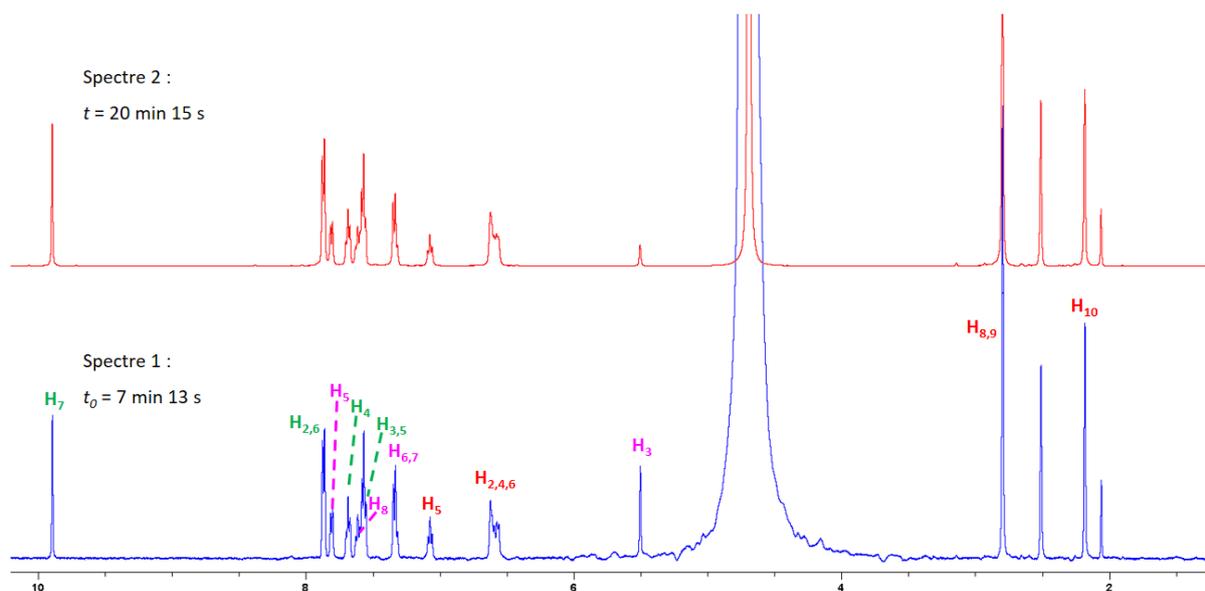


Figure 115. Comparaison entre deux spectres de RMN <sup>1</sup>H acquis à 13 min 2 s d'intervalle par les séquences d'impulsions zg (spectre 1) et zgesgp (spectre 2), à 238 K, à 500 MHz. Le spectre 1 a été acquis avec  $d_1 = 25$  s, NS = 16, DS = 4, TD = 65 k points, SW = 11 ppm, Acqu = 7 min 11 s et le spectre 2 avec  $d_1 = 2$  s, NS = 8, DS = 4, TD = 32 k points, SW = 11 ppm, Acqu = 1 min 0 s.

Connaissant les déplacements chimiques des trois réactifs dans le DMSO- $d_6$ , une attribution de toutes leurs résonances a été effectuée sans difficulté *via* le spectre initial après  $t_0$  (spectre 1). Sur ce spectre, le signal de l'eau est beaucoup trop intense, entraînant des distorsions de la ligne de base. Le rapport signal sur bruit pour les solutés est alors très faible en raison d'une valeur de gain très faible. L'application d'une séquence d'impulsions « *Excitation Sculpting* », visant à réduire le signal de l'eau, améliore le rapport signal/bruit pour les solutés sur le nouveau spectre qui est estimé à 13 comme ordre de grandeur (spectre 2).

Comme la réaction n'évolue pas à 238 K, il a été possible d'évaluer l'efficacité de la diffusion de spin à cette température dans le but d'individualiser les réactifs initiaux aux moyens d'expériences NOESY 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H avec suppression de l'eau *via* la séquence « *Excitation Sculpting* » et d'expériences NOESY 1D sélectives (Figure 116 et Figure 117).

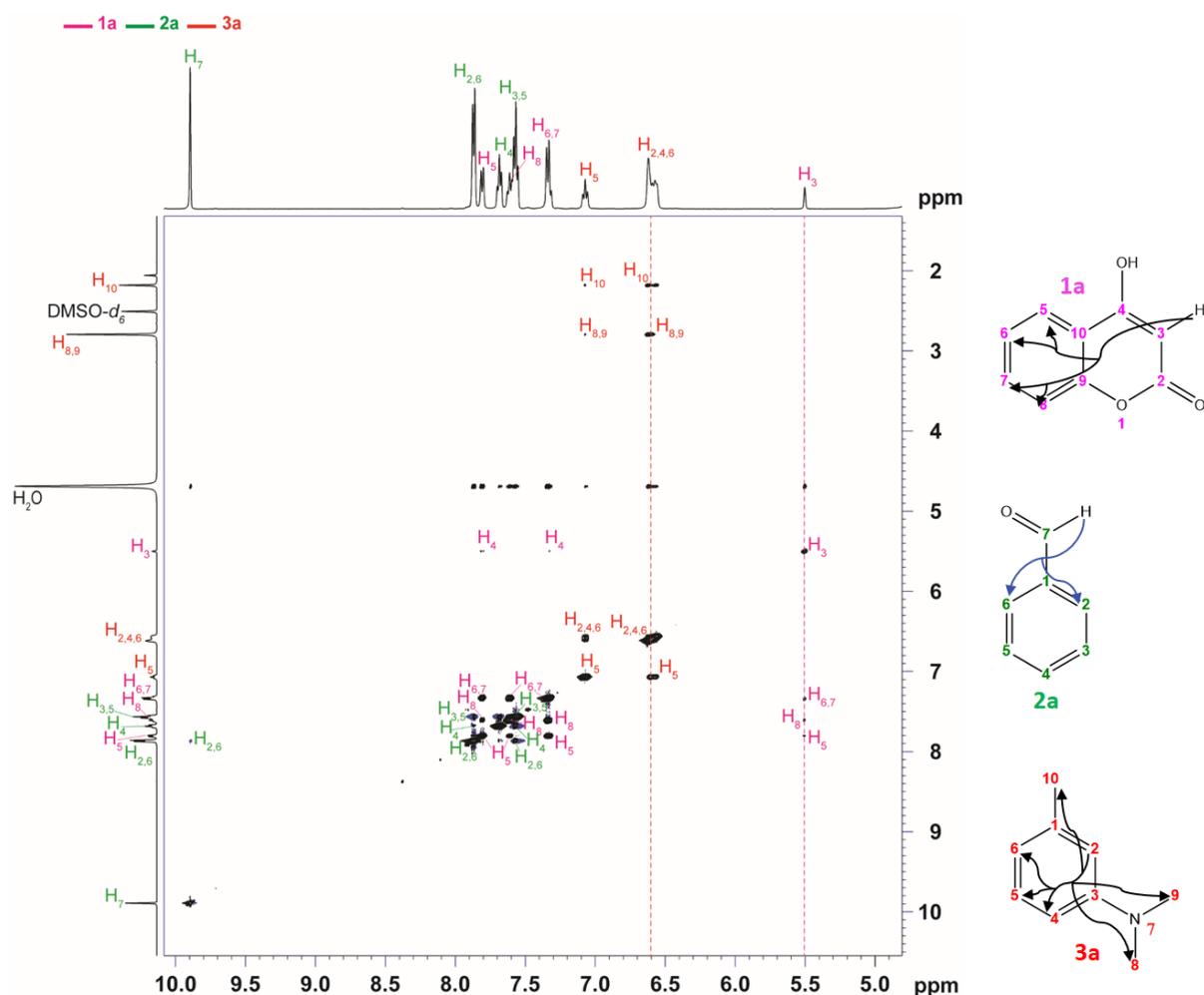


Figure 116. Spectre NOESY 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de la région déblindée des résonances protons des trois réactifs : 4-hydroxycoumarine (20 mM) (1a), benzaldéhyde (20 mM) (2a) et *N,N*-diméthyl-*m*-toluidine (20 mM) (3a) dissous dans  $\text{DMSO-}d_6/\text{H}_2\text{O}$  (7:3, v/v),  $d_3 = 0,5$  s, à 238 K, à 500 MHz ( $^1\text{H}$ ), après 2 heures 45 min de réaction, utilisant la séquence d'impulsion noesyegpph. Se reporter à la Figure 97 pour les paramètres d'acquisition et de traitement.

Le spectre NOESY 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  obtenu après 2 heures 45 min de réaction, a révélé que l'utilisation du  $\text{DMSO-}d_6/\text{H}_2\text{O}$  (7: 3, v/v) permettait d'avoir des pics croisés NOE de même signe que la diagonale à 238 K, à l'exception du benzaldéhyde (2a). L'identification du motif de (1a) est guidée par le proton éthylénique  $\text{H}_3$  à 5,50 ppm. Le motif (2a) se distingue au moyen du proton de la fonction aldéhyde  $\text{H}_7$  à 9,90 ppm. Les protons aromatiques  $\text{H}_{2,4,6}$  sont un point de départ pour identifier toutes les résonances de (3a). A cette température, les rotations moléculaires sont suffisamment ralenties et le transfert d'aimantation qui résulte de la diffusion de spin se produit sur l'ensemble des molécules 4-hydroxycoumarine (1a) et *N,N*-diméthyl-*m*-toluidine (3a). En revanche, pour le benzaldéhyde, les taches de corrélations ne sont observables qu'entre les protons proches les uns des autres. Les pics croisés NOE sont de signes opposés à la diagonale. Le transfert d'aimantation est partiel et n'a pas permis d'individualiser ce composé par le raisonnement usuel.

Un autre moyen pour individualiser les spectres des réactifs initiaux, a consisté à employer les expériences NOESY 1D d'excitation sélective de multiplets, précédemment décrites dans la section Matériels et Méthodes (Partie II en 2.5.3.1). Cette méthode nous a permis en effet de regrouper les résonances protons appartenant au même composé. Le principal écueil expérimental concerne la réintroduction du signal  $^1\text{H}$  de l'eau pendant le temps de mélange du bloc NOESY. Ce dernier est traité

aux moyens d'impulsions à large bande encadrées par des impulsions de gradient.<sup>46-48, 73-74</sup> Le choix d'un ensemble approprié de résonances protons sélectivement excitées permet d'obtenir les spectres individuels 1D  $^1\text{H}$  de la 4-hydroxycoumarine (1a) et de la *N,N*-diméthyl-*m*-toluidine (3a) dans le  $\text{DMSO-}d_6/\text{H}_2\text{O}$  (7:3, v/v) (Figure 117).

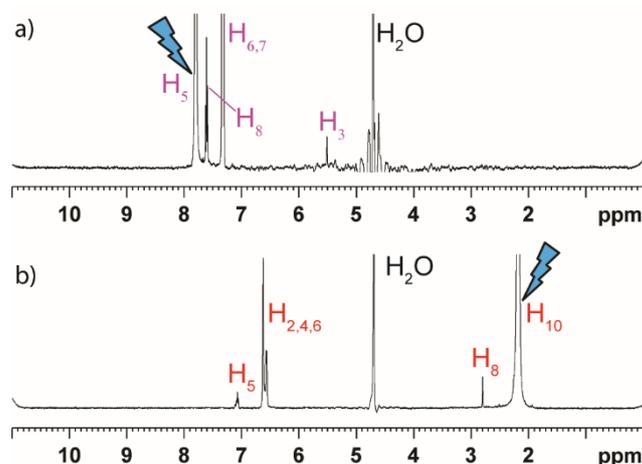


Figure 117. Spectres NOESY 1D  $^1\text{H}$  d'excitations sélectives de multiplets de la réaction étudiée après évaluation du temps mort dans le  $\text{DMSO-}d_6/\text{H}_2\text{O}$  (7:3, v/v),  $t_m = 0,5$  s, à 238 K, à 500 MHz ( $^1\text{H}$ ), après 8 h 45 min de réaction. L'impulsion sélective initiale excite : a) le proton  $\text{H}_5$  de la 4-hydroxycoumarine (1a) et b) le proton  $\text{H}_{10}$  de la *N,N*-diméthyl-*m*-toluidine (3a). Le descriptif expérimental est détaillé dans la section « Matériels et Méthodes » (Partie II en 2.5.3).

En particulier, l'individualisation du composé (1a) est réalisée après l'excitation sélective du proton aromatique  $\text{H}_5$  à 7,81 ppm (Figure 117 a). Toutes les résonances de (3a) sont observées au moyen de l'excitation sélective du méthyl  $\text{H}_{10}$  à 2,18 ppm. En revanche, il n'a pas été possible de différencier le proton aldéhydique  $\text{H}_7$  du benzaldéhyde (2a) car ce dernier se trouve dans le régime NOE nul  $W_2 = W_0$ . Pour le différencier, il aurait fallu acquérir cette expérience à plus basse température (228 K).

L'expérience d'excitation sélective de multiplets NOESY 1D  $^1\text{H}$  a démontré que le regroupement de résonances protons appartenant à un même composé est possible en tirant parti de la diffusion de spin, à condition qu'un transfert d'aimantation complet se propage sur toute la molécule.

Partant de ce constat, la température à 248 K a été choisie comme la température optimale d'analyse de la réaction. Elle correspondait au meilleur compromis entre la résolution spectrale et une diffusion de spin efficace. Pour cela, un tube de RMN de même composition que le tube étudié a été analysé avant la préparation du tube final. Cette température optimale a été déterminée expérimentalement par l'acquisition de plusieurs spectres NOESY 2D  $^1\text{H-}^1\text{H}$  depuis la température à 278 K à des températures plus basses jusqu'à ce que la résolution soit moins bonne. Les résultats sont regroupés dans la section « Matériels et Méthodes » (Figure 96). Comme mentionné précédemment, 228 K aurait été la température où la diffusion de spin serait la plus efficace. Cependant, en raison d'une relaxation transversale  $T_2$  plus active pour le produit final recherché (4a), la résonance du proton centrale  $\text{H}_{11}$  est élargie, responsable d'une perte de l'information (spectre non fourni). En conséquence, la température optimale de 248 K a été choisie pour les études suivantes de RMN car elle offrait des améliorations efficaces de diffusion de spin  $^1\text{H}$  (régime de NOE négatif) et une résolution spectrale  $^1\text{H}$  appropriée.

La réaction a été suivie pendant 42 jours en alternant l'acquisition de spectres  $^1\text{H}$  à 298 K pour permettre l'évolution de la réaction et « son arrêt momentanée » à 248 K favorisant ainsi l'acquisition des expériences 2D plus longues. La procédure qui a été employée est décrite dans la section Matériels

et Méthodes (Figure 93). L'acquisition d'une série de spectres de RMN  $^1\text{H}$  à 298 K a permis de dresser un profil cinétique de la réaction (Figure 118).

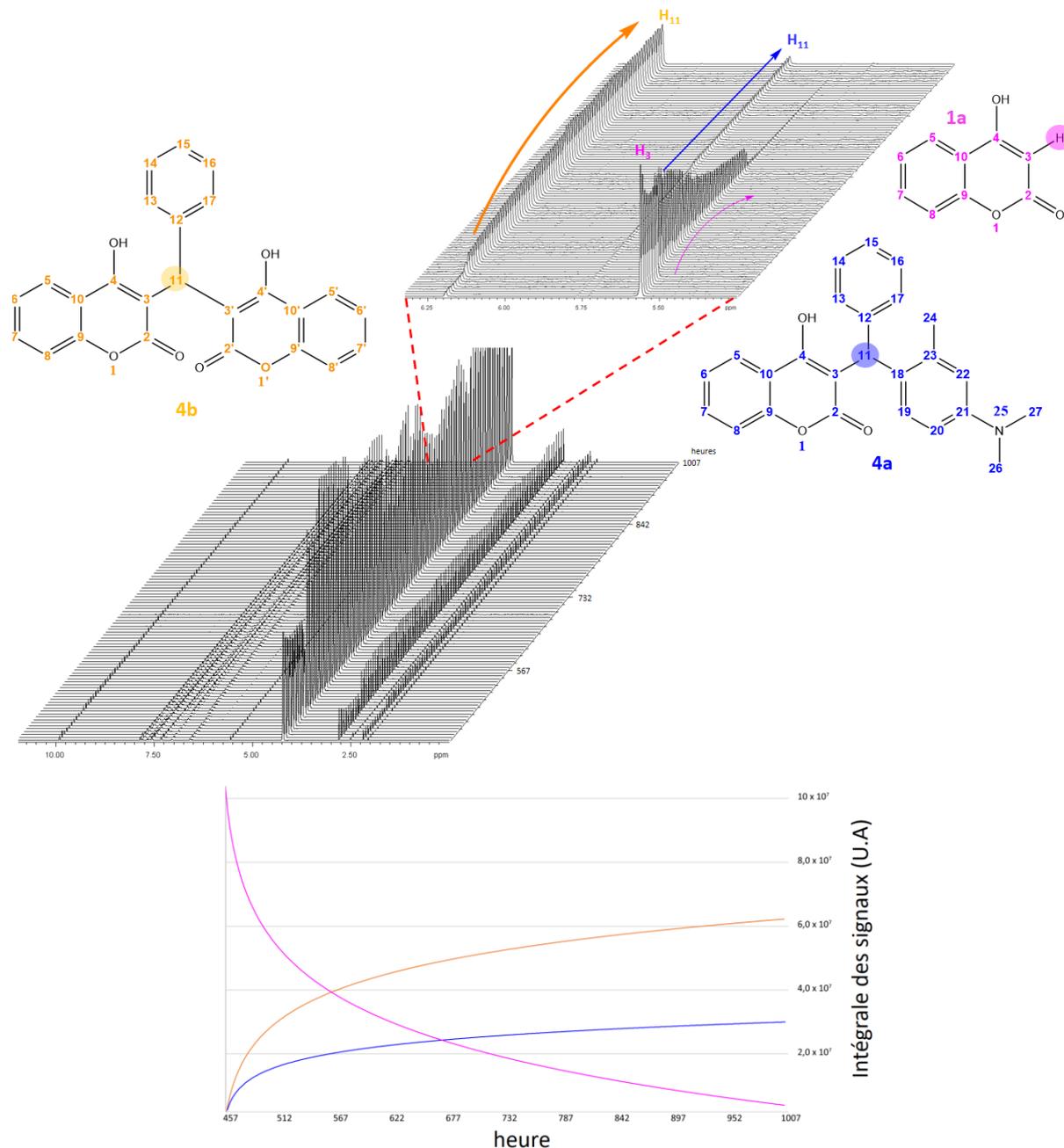


Figure 118. Profil cinétique de la réaction organique pendant 42 jours contenant de la 4-hydroxycoumarine (20 mM) (1a), du benzaldéhyde (20 mM) (2a) et de la *N,N*-diméthyl-*m*-toluidine (20 mM) (3a) dissous dans  $\text{DMSO-}d_6/\text{H}_2\text{O}$  (7:3, v/v), à 298 K, à 500 MHz. Les résultats ont été obtenus par le logiciel Dynamic center à partir des mesures d'une série de spectres de RMN  $^1\text{H}$ , suivant le protocole à basse température détaillé dans la partie « Matériels et Méthodes ». En bas, les courbes représentent l'évolution de la réaction à partir de la disparition de la résonance proton  $\text{H}_3$  de la 4-hydroxycoumarine (1a) et l'apparition de nouveaux produits avec les signaux  $\text{H}_{11}$  pour le produit final (4a) et  $\text{H}_{11}$  pour le dimère de coumarine benzylé (4b).

Le profil cinétique a révélé une nette disparition du proton aromatique  $\text{H}_3$  de la 4-hydroxycoumarine au bout de 1003 heures. Cette disparition est accompagnée de la formation de deux singulets correspondant aux protons centraux  $\text{H}_{11}$  du dimère de coumarine benzylé (4b) et  $\text{H}_{11}$  du produit final (4a). A 1007 heures, la réaction n'évoluant plus, un **rendement de 17%** a été mesuré en utilisant la méthode ERETIC-2, décrite dans la partie « Matériels et Méthodes ». Ce rendement avoisine celui obtenu dans le  $\text{DMSO-}d_6$  seul.

Au bout du 42<sup>ème</sup> jour, les spectres des composés (4a) et (4b) ont pu être différenciés en tirant profit de la diffusion de spin à 248 K (Figure 119).

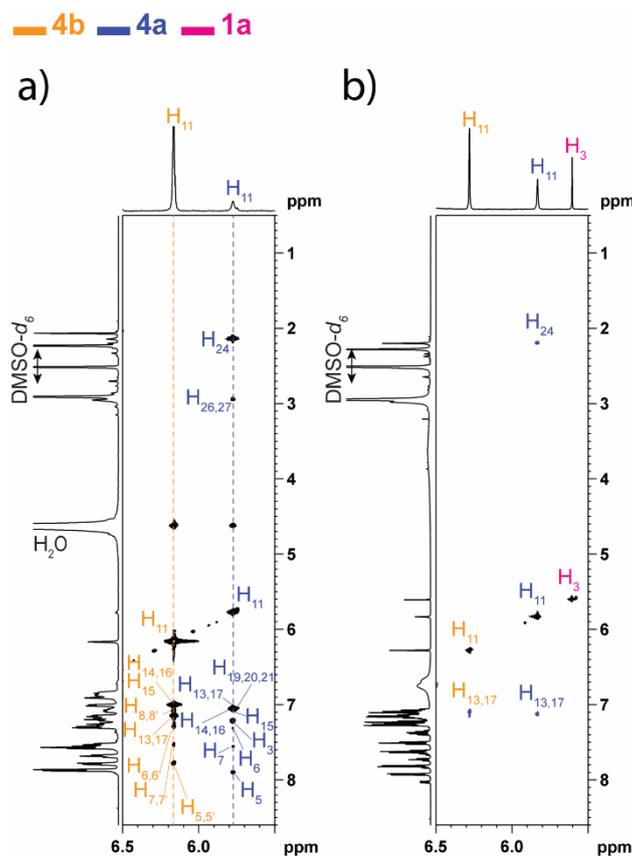


Figure 119. Spectres NOESY 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de la région des protons nouvellement formés issus de la réaction organique (20 mM de chaque réactif),  $d_8 = 0,5$  s, à 500 MHz ( $^1\text{H}$ ), après 42 jours (a), utilisant la séquence d'impulsion noesyegpph, dissous a) dans  $\text{DMSO-}d_6/\text{H}_2\text{O}$  (7:3, v/v), à 248 K, b) dissous dans  $\text{DMSO-}d_6$ , à 298 K. Le spectre b) a été enregistré avec les mêmes paramètres d'acquisition et de traitement. Le descriptif expérimental est détaillé dans la section « Matériels et Méthodes » (Figure 97).

Le spectre NOESY 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  utilisant la séquence « *Excitation Sculpting* » pour supprimer la résonance de l'eau, a clairement révélé deux motifs de pics croisés de même signe que la diagonale. Chacun des motifs correspond à un seul composant du mélange (Figure 119a). L'identification du motif (4a) est guidée par le proton central  $\text{H}_{11}$  à 5,77 ppm. Le motif de (4b) est visualisable à partir du proton central  $\text{H}_{11}$  à 6,16 ppm. Nous avons clairement observé que le solvant binaire  $\text{DMSO-}d_6/\text{H}_2\text{O}$  (7:3, v/v) permettait un transfert d'aimantation intramoléculaire complet par la diffusion de spin, détecté sur des distances supérieures à 13 Å. En revanche, lorsque le spectre NOESY 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  conventionnel est enregistré dans le  $\text{DMSO-}d_6$  pur à 298 K, les deux molécules se réorientent rapidement et présentent un régime NOE positif empêchant ainsi l'observation de la diffusion de spin (Figure 119b).

Il est rarement facile d'attribuer sans ambiguïté chaque résonance proton à un composé spécifique dans le mélange réactionnel en raison des chevauchements de pics de résonance entre les réactifs initiaux et les produits formés, en particulier dans les spectres protons 1D et 2D de 6,5 à 8,0 ppm. L'expérience NOESY 1D d'excitation sélective de multiplets, précédemment décrite dans ce travail pour les trois réactifs initiaux, résout ce problème regroupant les résonances des protons qui appartiennent au même composé. La résurgence du fort signal  $^1\text{H}$  de l'eau pendant le temps de mélange du bloc NOESY est empêchée par des impulsions d'inversion à large bande encadrées par des paires d'impulsions de gradient. Le choix d'un ensemble approprié de résonances protons sélectivement excitées permet d'acquérir le spectre 1D  $^1\text{H}$  individuel de chacun des produits formés en tirant parti de la diffusion de spin dans des conditions *ViscY* (Figure 120).<sup>74</sup>

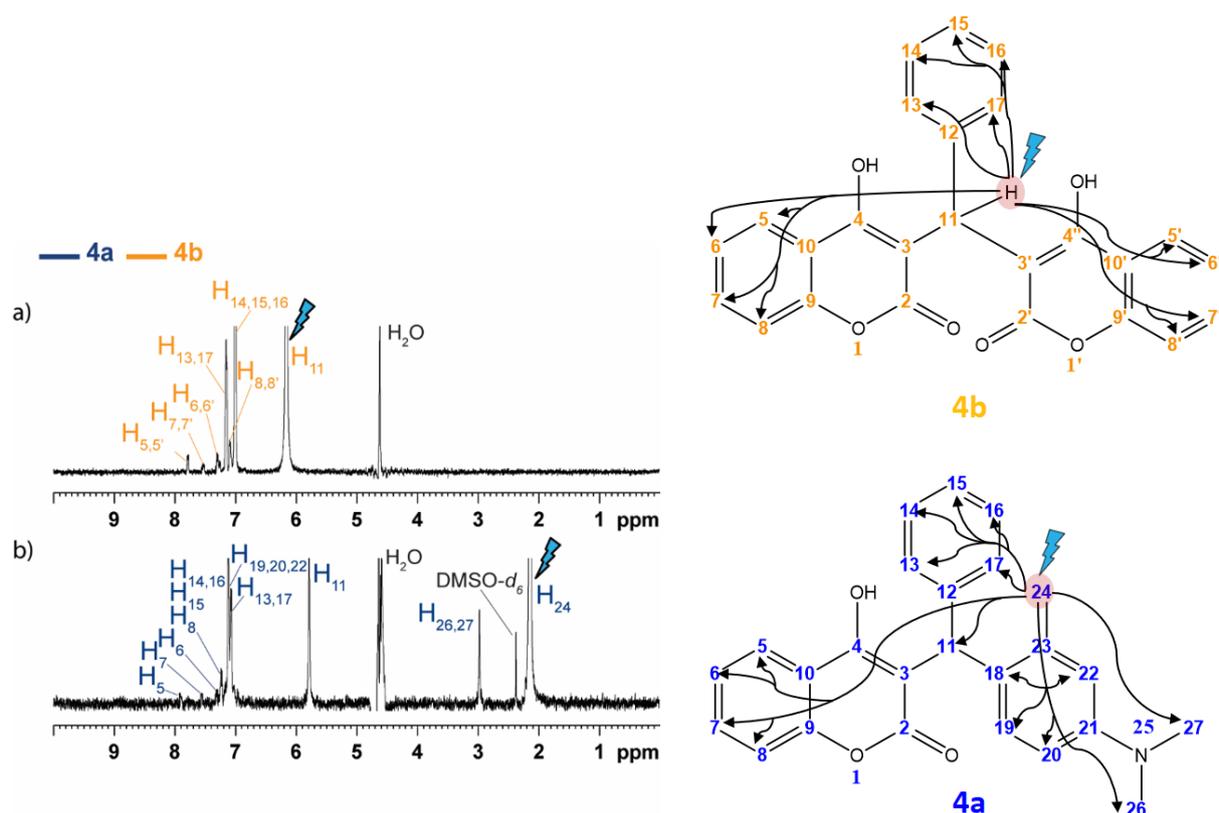


Figure 120. Spectres NOESY 1D  $^1\text{H}$  d'excitations sélectives de multiplets de la réaction étudiée après 42 jours dans  $\text{DMSO-}d_6/\text{H}_2\text{O}$  (7:3, v/v),  $t_m = 0,5$  s, à 248 K, à 500 MHz ( $^1\text{H}$ ). L'impulsion sélective initiale excite : a) le proton  $\text{H}_{11}$  du dimère de coumarine benzylé (4b) et b) le proton  $\text{H}_{11}$  du produit final (4a). Le descriptif expérimental est détaillé dans la section Matériels et Méthodes dans la section 2.5.3.

La Figure 120 prouve clairement que les deux produits formés sont différenciés dans une solution de  $\text{DMSO-}d_6/\text{H}_2\text{O}$ . En effet, l'excitation sélective du proton central  $\text{H}_{11}$  à 6,16 ppm a conduit à un transfert d'aimantation complet avec tous les protons du dimère de coumarine benzylé (4b) car les résonances protons des groupements méthyles du produit final (4a) n'apparaissent pas sur le spectre NOESY 1D (Figure 120a). Afin de différencier toutes les résonances protons du produit final (4a), l'un des groupements méthyles  $\text{H}_{24}$  a été sélectivement excité (Figure 120b). Cette excitation sélective a montré un transfert d'aimantation exclusivement avec tous les protons de ce composé, y compris les protons distants de la partie « coumarine ».

Ces expériences ont ainsi démontré qu'il était possible d'extraire le spectre complet de la molécule cible en utilisant la méthode *ViscY*.

L'ensemble des déplacements chimiques de (4a) et (4b) sont répertoriés dans la section « Matériels et Méthodes » (Partie II en 2.5.4.).

### 3. Conclusion

Dans cette section, nous avons montré que l'utilisation du solvant binaire visqueux DMSO- $d_6$ /H<sub>2</sub>O (70:30, v/v) a répondu à nos attentes en permettant d'isoler les spectres individuels des composés présents directement dans le milieu réactionnel, en considérant une température compatible avec la synthèse organique. Ce mélange binaire visqueux est rapporté pour la première fois pour le suivi d'une réaction organique « *in-situ* » par spectroscopie de RMN en phase liquide, sans séparation physique et en tirant profit de la diffusion de spin, dans des conditions *ViscY*.

L'individualisation des produits formés au cours de la réaction organique a été rendu possible à basse température, aux moyens des expériences homonucléaires telles que les expériences NOESY 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H et NOESY 1D <sup>1</sup>H d'excitation sélective de multiplets, ainsi que par des expériences 2D hétéronucléaires telles que les expériences HSQC <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C et HMBC <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C.

La mise en place d'un protocole à basse température a rendu possible « l'arrêt momentané » de la réaction chimique, en contournant le facteur limitant qui est le temps mort ( $t_0$ ). En outre, l'ajout d'une petite quantité de 30% de H<sub>2</sub>O (en volume) dans le DMSO- $d_6$  pur a été essentiel pour obtenir un solvant suffisamment visqueux, facile à manipuler permettant la dissolution des composés moyennement polaires. Le mélange cryoprotecteur formé détient un point de congélation bas qui a favorisé l'acquisition des expériences *ViscY* à basse température. De cette façon, une plus grande plage de température a pu être considérée pour moduler efficacement la diffusion de spin et contrôler la dynamique de la réaction à chaque instant. De plus, la grande quantité de DMSO- $d_6$  présente dans le mélange réactionnel, a rendu facile l'utilisation des outils automatiques du spectromètre tels que le « lock et le shim ».

L'utilisation de la pyridine- $d_5$  comme solvant de réaction a été essentielle pour comprendre le cheminement de la réaction et déterminer la nature des sous-produits formés dont le dimère de coumarine benzylé (4b).

Si la cinétique de la réaction a pu jusqu'ici être évaluée dans le mélange binaire DMSO- $d_6$ /H<sub>2</sub>O, qu'advierait-elle si le solvant de la réaction était un autre solvant binaire visqueux tel que le mélange pyridine- $d_5$ /PCTFE ? Cette question sera traitée ultérieurement au sein du laboratoire.

L'ensemble des travaux obtenus relatant l'utilisation du mélange binaire DMSO- $d_6$ /eau pour le suivi de la réaction entre la 4-hydroxycoumarine, la 4-hydroxypyronne et le *N,N*-diméthyl-*m*-toluidine au sein d'un tube de RMN « *in-situ* » fera l'objet prochainement d'une publication dans une revue à comité de lecture internationale.

## CONCLUSION

La thématique de l'analyse des mélanges complexes par la spectroscopie de RMN exploitant le phénomène de la diffusion de spin en milieu visqueux, sans séparation physique, constitue une approche innovante, facile à mettre en œuvre et à faible coût, et complémentaire des récentes méthodes proposées par la communauté scientifique.

L'objectif de mes travaux de thèse a été de poursuivre les investigations menées au sein du laboratoire depuis dix ans portant sur l'individualisation par RMN de composés de faibles tailles en mélange dans des solvants binaires visqueux (Figure 121). En 2020, notre équipe de recherche a désigné l'ensemble des expériences basées sur la diffusion de spin en milieux visqueux par le terme générique **ViscY** (*Viscosity-enhanced spectroscopy*). Ces études ont été menées de manière à élargir l'éventail des méthodes et de leurs applications en les rendant plus robustes et plus accessibles à tous. Pour cela, mes travaux de thèse ont été articulés autour de trois tâches.

La première tâche a consisté à rechercher de nouveaux solvants visqueux originaux qui répondent à trois critères i) être compatibles avec la dissolution des composés étudiés en tenant compte de leurs paramètres physico-chimiques, ii) contourner le coût élevé des solvants deutérés par des méthodes de suppression des résonances des solvants non deutérés et iii) permettre une évaluation « *in-situ* » de la viscosité intrinsèque du mélange en fonction de la température, afin de prédire les conditions d'une diffusion de spin efficace avec une résolution spectrale suffisante.

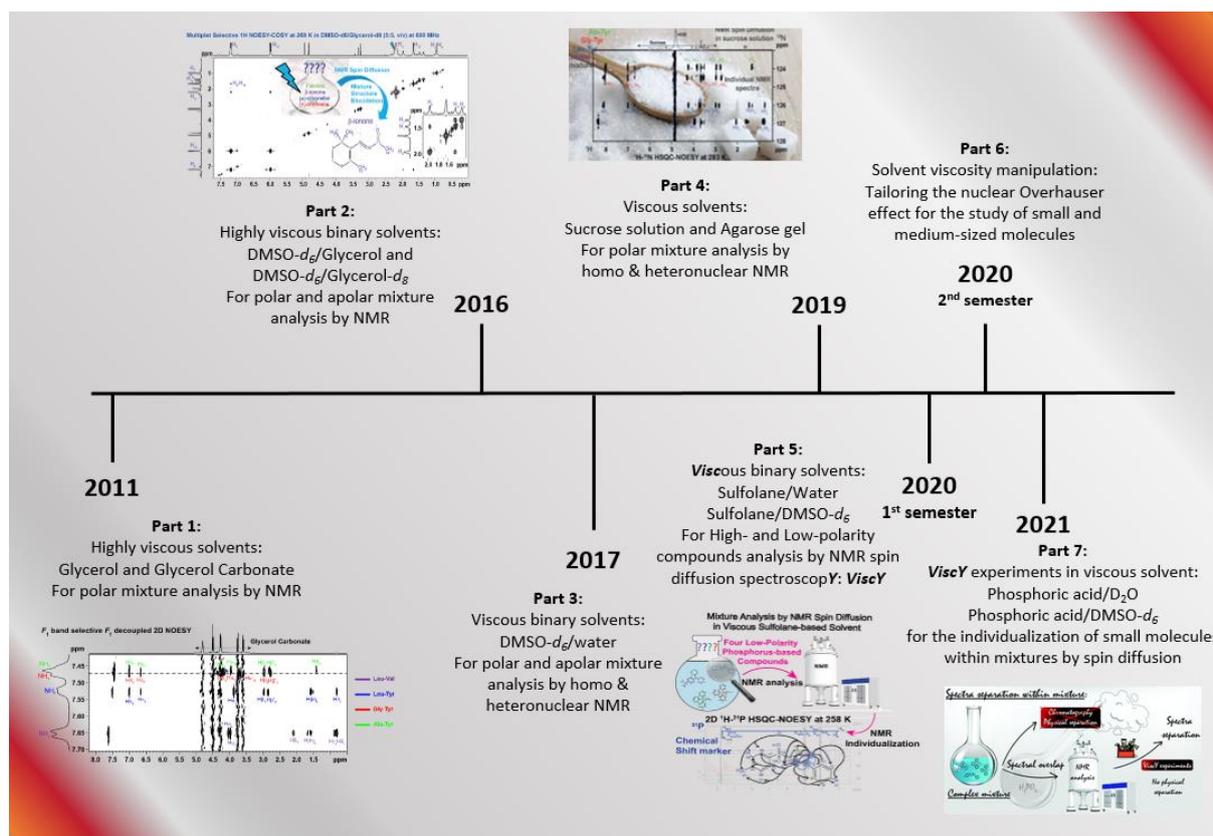


Figure 121. Schéma représentant l'ensemble des investigations menées par le laboratoire pour individualiser les composés en mélange via le phénomène de la diffusion de spin.

Dans ce contexte, nous avons proposé des mélanges visqueux composites à partir de co-solvants deutérés qui sont employés couramment tels que le  $D_2O$  ou le  $DMSO-d_6$ . Ces co-solvants ont permis de faciliter les outils d'automatisation spectroscopiques tels que « l'accord de sonde » et le « shim » et ont la caractéristique d'avoir un point de congélation bas selon la proportion de l'autre co-solvant

non deutéré ajouté. Depuis 2019, nous avons rapporté que les solvants binaires visqueux saccharose/H<sub>2</sub>O (5:5, w/w + 10% D<sub>2</sub>O v/v), gel d'agarose 1%/D<sub>2</sub>O (9:1, v/v), sulfolane/H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (5:4:1, v/v/v) et acide phosphorique (85%)/D<sub>2</sub>O (8:2, v/v) sont plus adaptés pour l'étude de composés de petites tailles à haute polarité, tandis que les solvants binaires sulfolane/DMSO-*d*<sub>6</sub> (7:3, v/v) et acide phosphorique (85%)/DMSO-*d*<sub>6</sub> (7:3, v/v) sont plus pertinents pour l'investigation des composés modérément polaires ou apolaires.

Au cours de ces travaux, les deux mélanges modèles de composés de faibles masses utilisés ont été un mélange de quatre dipeptides polaires de structures proches : Leu-Val, Leu-Tyr, Gly-Tyr et Ala-Tyr et un mélange de quatre composés contenant du phosphore : Dicyclohexyl(4-(*N,N*-diméthylamino)phényl)phosphine, Exo-Phényl Kwon [2.2.1] Bicyclic Phosphine, Allyltriphenylphosphonium bromide et (Méthoxyméthyl)triphenylphosphonium chloride.

Afin d'observer le régime NOE négatif, une viscosité minimale du milieu de 7 à 11 cP est nécessaire pour ces petites molécules rigides ( $MM > 150 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). La viscosité du milieu a été augmentée par un choix de solvants non deutérés bon marché tels que le saccharose (saccharose/eau (1:1, m/v)  $\eta = 27 \text{ cP}$  à 283 K),<sup>331-332</sup> le sulfolane ( $\eta = 10,29 \text{ cP}$  à 303 K)<sup>343</sup> et l'acide phosphorique (85%) ( $\eta = 37,59 \text{ cP}$  à 298 K).<sup>336</sup> L'emploi de ces solvants visqueux a révélé certains avantages par rapport au gel d'agarose 1%/D<sub>2</sub>O (9:1, v/v). La diffusion de spin est active sur une plage de température plus étendue. Après ajout d'une petite quantité d'eau ou de DMSO-*d*<sub>6</sub>, les nouveaux mélanges cryoprotecteurs formés présentent des points de congélation bas : saccharose/eau à 243 K, sulfolane/eau à 256 K, sulfolane/DMSO-*d*<sub>6</sub> à 238 K, acide phosphorique (85%)/eau à 248 K et acide phosphorique (85%)/DMSO-*d*<sub>6</sub> à 258 K. La préparation des échantillons est à la fois compatible avec les composés thermiquement fragiles, et simple à réaliser, contrairement aux alternatives à haute viscosité tels que le glycérol ( $\eta = 934 \text{ cP}$  à 298 K) et le carbonate de glycérol ( $\eta = 85,4 \text{ cP}$  à 298 K), même si le gel d'agarose non deutéré présente l'avantage de ne pas avoir de résonance résiduelle de protons en raison d'une relaxation transversale  $T_2$  très active. En conséquence, seul le signal résiduel des protons de l'eau doit être éliminé, ce qui constitue le principal inconvénient des autres solvants non deutérés. De plus, l'utilisation d'une solution d'acide phosphorique (85%) entraîne la possible formation de sels et en conséquence peut occasionner des difficultés dans l'accord de la sonde de mesure du spectromètre, surtout s'il s'agit d'une cryosonde.

L'utilisation de ces mélanges de solvants visqueux a permis, dans des conditions de fonctionnement spécifiques, de diminuer la vitesse de rotation des molécules présentes en solution, de sorte que le régime de la relaxation croisée longitudinale a favorisé l'observation du NOE négatif. L'évaluation de ces différents solvants binaires visqueux est retranscrite sous la forme d'un tableau (Tableau 8) qui récapitule les avantages et inconvénients de leur utilisation.

Pour cela, les méthodes expérimentales dédiées à l'observation de la diffusion de spin ont été focalisées dans un premier temps sur des expériences NOESY 2D en intégrant deux types de séquences. La première utilise un bloc « *d'Excitation Sculpting* » pour réduire l'intensité des résonances résiduelles du solvant et a été appliquée pour l'étude des mélanges visqueux à base d'acide phosphorique (85%). La seconde emploie une séquence de détection en bandes sélectives impliquées dans une séquence d'impulsions DPGSE pour inverser l'aimantation d'équilibre des solutés dans des bandes de fréquences situées de part et d'autre du signal du solvant, et laisser intacte celle des solutés. Elle a été employée pour les solvants composites à base de saccharose et sulfolane.

	Saccharose/H <sub>2</sub> O (5:5, m/m) (+10% D <sub>2</sub> O v/v)	Gel d'agarose 1% /D <sub>2</sub> O (9:1, v/v)	Sulfolane/H <sub>2</sub> O/D <sub>2</sub> O (5:4:1, v/v/v)	Sulfolane/DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> (7:3, v/v)	Acide phosphorique (85%)/D <sub>2</sub> O (8:2, v/v)	Acide phosphorique (85%)/DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> (7:3, v/v)
Préparation de l'échantillon	✓	✗	✓	✓	✓	✓
Pouvoir de dissolution des composés polaires	✓	✓	✓	✗	✓	✗
Pouvoir de dissolution des composés apolaires	✗	✗	✗	✓	✗	✓
Coût des solvants	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Efficacité de la diffusion de spin	283 K d > 13 Å ✓	273 K d > 13 Å ✓	258 K d > 13 Å ✓	258 K d > 14 Å ✓	288 K d > 13 Å ✓	298 K d > 14 Å ✓
Résolution des spectres de RMN	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Echange de protons labiles	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Suppression du solvant	✗	✓	✗	✗	✓	✓
RMN de routine ( <i>lock</i> , <i>accord de sonde</i> , <i>shim</i> )	✓	✓	✓	✓	✗	✗

Tableau 8. Récapitulatif des avantages et inconvénients des mélanges de solvants visqueux utilisés lors de ces travaux pour l'étude de mélanges complexes *via* la diffusion de spin en RMN.

Ces expériences nous ont aidé à déterminer la température optimale correspondant au meilleur compromis entre la résolution spectrale globale et l'intensité des pics croisés observables dans un spectre NOESY 2D entre les résonances de noyaux qui ne seraient pas assez proches pour montrer un NOE dans un milieu de faible viscosité. Le refroidissement de l'échantillon s'avère nécessaire si les corrélations présentes sur la diagonale et hors diagonale d'un spectre NOESY 2D sont de signes opposés. Cependant, une diminution de la température peut entraîner un élargissement des résonances causé par un processus de relaxation transversale  $T_2$  plus actif.

### La seconde tâche a consisté à mettre au point de nouvelles séquences d'acquisition de données de RMN améliorant l'efficacité du transfert d'aimantation par la diffusion de spin.

Une série d'expériences NOESY 1D sélectives a été mise en place pour détecter toutes les résonances d'intérêts lors de l'acquisition du signal afin d'obtenir des informations structurales supplémentaires. Dans ce type d'expérience, un seul spin est excité, son aimantation est alors inversée pour l'amener sur l'axe  $-z$  où elle peut se propager par la diffusion de spin sur l'ensemble des protons appartenant à la même molécule. La principale difficulté est d'éviter la réintroduction des signaux du solvant non deutéré au moment de la détection. Pour ce faire, deux impulsions d'inversion à large bande ont été insérées pendant le temps de mélange. Leur position a été ajustée afin de minimiser la quantité d'aimantation de solvant qui peut réapparaître lors de la relaxation longitudinale.

Une autre approche qui est plus courte que l'utilisation de plusieurs spectres NOESY 1D sélectifs a été de se concentrer sur la bande de résonances NH amide du mélange test de dipeptides comme source initiale d'aimantation et de recourir à une expérience NOESY 2D découplée sélective en bande  $F_1$ . Le bloc du temps de mélange, comprenant des impulsions d'inversion à large bande pour éviter la réapparition du signal du solvant, a permis à la diffusion de spin de s'étendre sur tous les protons de chaque dipeptide.

L'approche de la diffusion de spin a également été étendue à des expériences de RMN 2D hétéronucléaires impliquant d'autres types de noyaux tels que  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  et  $^{31}\text{P}$ . Ces expériences peuvent s'avérer utiles pour analyser des mélanges complexes où les composés d'intérêts ne présentent pas de résonances protons résolues en raison d'un fort chevauchement spectral. Dans de tels cas, une plus grande dispersion du déplacement chimique dans la deuxième dimension d'un hétéronoyau  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  ou  $^{31}\text{P}$  peut s'avérer pertinente. En couplant une expérience HSQC 2D avec une expérience NOESY, un

spectre complet de protons peut être obtenu pour une molécule à partir d'une seule résonance carbone, azote ou phosphore en  $F_1$ . Dans ce contexte, nous avons montré l'individualisation des composés au sein du mélange test de dipeptides polaire (LV, LY, GY et AY) aux moyens des expériences HSQC-NOESY 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  dans les solvant binaires visqueux saccharose/ $\text{H}_2\text{O}$  (5:5, w/w + 10%  $\text{D}_2\text{O}$  v/v) à 283 K et acide phosphorique (85%)/ $\text{D}_2\text{O}$  (8:2, v/v) à 288 K, et pour le mélange test des composés phosphorés, au moyen des expériences HSQC-NOESY 2D  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  dans les solvants binaires visqueux sulfolane/ $\text{DMSO-}d_6$  (7:3, v/v) à 258 K et acide phosphorique (85%)/ $\text{DMSO-}d_6$  (7:3, v/v) à 298 K.

Dans ces conditions, tous les protons de chaque dipeptide et composé apolaire ont propagé leur propre aimantation avec tous les autres protons par la diffusion de spin. En sélectionnant une rangée appropriée par résonance de l'hétéronoyau dans la dimension indirecte, il a été possible d'extraire les spectres individuels de chaque composé en utilisant la méthode *ViscY*.

Enfin, une dernière méthode a consisté à enregistrer plusieurs expériences bidimensionnelles simultanément en utilisant des superséquences NOAH pour discriminer les composés dans des milieux visqueux. Ces modules sont constitués de plusieurs séquences imbriquées intégrant plusieurs expériences 2D homonucléaires et hétéronucléaires. Elles sont acquises simultanément en partageant le même délai de relaxation  $d_1$  avec un nombre de scans (NS) et de points en dimension indirecte (TD1) identiques. Ces séquences imbriquées ont permis d'obtenir l'ensemble des informations scalaires et dipolaires en une seule expérience. Nous avons employé les modules NOAH-5 BMSCN pour différencier les dipeptides dans le solvant binaire acide phosphorique (85%)/ $\text{D}_2\text{O}$  (8:2, v/v) à 288 K et NOAH-4 BSCN pour les composés contenant du phosphore dans le solvant binaire acide phosphorique (85%)/ $\text{DMSO-}d_6$  (7:3, v/v) à 298 K. Ces expériences ont été réalisées en tenant compte des hétéroatomes  $^{15}\text{N}$  et  $^{31}\text{P}$  qui jouent le rôle de marqueurs de déplacements chimiques dans la dimension indirecte pour les expériences HMQC 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  pour les dipeptides, et HMBC/HSQC 2D  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  pour les composés contenant du phosphore. Afin que les expériences NOAH puissent fonctionner, la principale exigence est une préservation de l'aimantation inutilisée d'une séquence initiale pour qu'elle puisse être utilisée dans les expériences suivantes. A cette fin, nous avons employé une séquence HMQC 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (S) plutôt que la méthode HSQC 2D (C) initialement utilisée.

**La troisième tâche a permis d'élargir l'application de la méthodologie *ViscY* en la rendant accessible pour le suivi d'une réaction chimique « *in-situ* » en milieu visqueux dans un tube de RMN standard.**

Si l'approche « *on-line* » reste la plus appropriée pour suivre des changements de résonances au cours du temps, l'approche « *in-situ* » combinant les méthodes *ViscY* dans des milieux visqueux a révélé qu'elle pouvait être un outil précieux, à faible coût et facile d'utilisation. La réaction qui a été étudiée est une synthèse de dérivés 3-substitués de la 4-hydroxycoumarine et de la 4-hydroxypyronone par C-alkylation de dérivés 4-hydroxycoumarine et de dérivés de 4-hydroxypyronone *via* des méthides *o*-quinone (*o*-QM). Cette synthèse nous a semblé intéressante puisqu'elle a déjà été décrite dans la littérature par Kumar A. *et al.* <sup>357</sup> qui préconisaient l'emploi de glycérol pour obtenir d'excellents rendements. Le glycérol est connu pour être hautement visqueux ( $\eta = 934$  cP à 25°C). <sup>46</sup> En combinaison avec 50% de  $\text{DMSO-}d_6$  en volume, le mélange cryoprotecteur formé est propice pour l'analyse de mélanges complexes de petits composés polaires et apolaires *via* la diffusion de spin, comme l'ont rapporté Lameiras P. *et al.* en 2017. <sup>48</sup> Cependant, le glycérol ne nous a pas apporté les résultats espérés dans le cadre de notre procédure. Ce dernier réagit avec la 4-hydroxycoumarine pour conduire à la formation de produits secondaires. Pour contourner cet obstacle, l'utilisation d'un autre solvant binaire visqueux  $\text{DMSO-}d_6/\text{H}_2\text{O}$  (70:30, v/v) a permis d'isoler les spectres individuels des réactifs initiaux et des produits formés dans le milieu réactionnel, en considérant une température appropriée aux moyens d'expériences NOESY 1D sélectives et NOESY 2D conventionnelles. Pour cela, une

approche expérimentale en milieu visqueux a été développée. Elle a été mise en place dans le but de « quencher » le début de la réaction, permettant de s'affranchir du temps mort en positionnant le tube de RMN contenant l'ensemble des réactifs dans un bac d'acétone glacée. Le suivi de la réaction a ensuite été effectué à température ambiante, tandis qu'à des intervalles de temps appropriés, la réaction a été « momentanément arrêtée » à plus basse température pour enregistrer des expériences 2D bénéficiant du NOE négatif *via* la diffusion de spin.

## Perspectives

Mes travaux de thèse contribuent à apporter aux chimistes des solutions efficaces pour l'analyse de mélanges complexes en bénéficiant de la diffusion de spin en milieux visqueux, et cela sans avoir recours à la séparation physique.

Les industries dermo-cosmétique, de la chimie fine et pharmaceutique recherchent activement des solutions innovantes faciles à mettre en œuvre et/ou ne nécessitant pas l'acquisition de matériels onéreux supplémentaires pour la caractérisation structurale de leurs matières premières et de leurs produits finis. A titre d'exemple, l'industrie dermo-cosmétique développe aujourd'hui de nouveaux actifs issus de matrices biologiques (plantes terrestres, aquatiques, micro-organismes, cultures cellulaires végétales etc.) afin de répondre à une demande des consommateurs tout en revendiquant un apport en matière d'innovation. C'est le cas des huiles essentielles qui ont une action efficace de bien-être humain et qui sont de plus en plus répandues, allant des parfums aux épices et médicaments. Ces dernières sont principalement constituées de composés à faible polarité ou apolaires. La majorité d'entre elles consiste en un mélange assez complexe de monoterpènes, sesquiterpènes, alcools, cétones, esters, aldéhydes, oxydes, etc. Ce sont des liquides hydrophobes contenant des composés chimiques volatils extraits des plantes. Dans ces travaux, les outils d'analyse qui ont été développés seront testés sur des huiles essentielles en utilisant par exemple, des mélanges de solvants visqueux de faible polarité tels que le polymère chlorotrifluoroéthylène (CTFEP,  $\eta = 1\ 550$  cP à 25°C)/CDCl<sub>3</sub>, le polystyrène (PS)/toluène-*d*<sub>8</sub> ( $\eta = 34,8$  cP, 34% w/w à 30°C) et le mélange PS/THF-*d*<sub>8</sub>, en raison de leur capacité à dissoudre les composés apolaires et modérément polaires et à induire la diffusion de spin dans des conditions de viscosité particulières.

## ANNEXES

**Annexe 1 :** Tableau récapitulatif regroupant les travaux scientifiques retrouvés dans la littérature portant sur la surveillance de diverses réactions utilisant l'approche « *in-situ* » dans des tubes de RMN de 5 mm. Recherche effectuée jusqu'au 03/12/2021.

Année	Auteur	RMN	Noyaux étudiés	Solvant	Réaction étudiée	Mode de fonctionnement	Temps d'expérience
1999	Balch A. L. <i>et al.</i> <sup>363</sup>	300 MHz (Electric-QE)	<sup>1</sup> H	CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /pyr- <i>d</i> <sub>5</sub> (13/87, v/v)	Processus d'oxydation de l'octaéthylporphyrine (OEP)Fe <sup>II</sup> -(pyr) <sub>2</sub> en présence d'hydrazine- <i>d</i> <sub>4</sub>	Le tube de RMN a été agité 30 s puis disposé dans le spectromètre à 243 K. Les spectres <sup>1</sup> H ont été enregistrés entre 50 s et 4 min 16 s d'acquisition.	~ 40 min
	Pokorny D. <i>et al.</i> <sup>364</sup>	200 MHz (Varian Gemini) – 600 MHz (Varian Unity)	<sup>1</sup> H	D <sub>2</sub> O/H <sub>2</sub> O (2/8, v/v)	Hydrolyse de l'acétopyruvate en pyruvate et acétate	Enregistrement de 18 spectres <sup>1</sup> H, NS = 128 en 13 min (200 MHz) ou 6 min (600 MHz), à 298 K.	3 h
2001	Grover, R. K <i>et al.</i> <sup>365</sup>	300 MHz (Bruker Avance DRX)	<sup>13</sup> C	CD <sub>3</sub> OD	Translactonisation de l'érythromycine A pendant la réaction d'oximation	Enregistrement de 11 spectres <sup>13</sup> C de 1 h 20 min d'acquisition, à 298 K.	13 h 20 min
	Aguilar M. R. <i>et al.</i> <sup>272</sup>	400 MHz (Varian)	<sup>1</sup> H	D <sub>2</sub> O	Réaction de copolymérisation entre 2-hydroxyéthyl méthacrylate (HEMA)/acide 2-acrylamido-2-méthylpropanesulfonique (AMP S et <i>N,N</i> -diméthylacrylamide (DMAA)/AMPS	Une vitesse de rotation des échantillons a été appliquée durant le suivi « <i>in-situ</i> » dans un tube de RMN à 313 K ou 323 K. Un délai <i>d</i> <sub>1</sub> = 60 s a été appliqué pour permettre la relaxation totale des protons. Enregistrement de 5 à 6 spectres <sup>1</sup> H, NS = 1 pour chaque acquisition.	HEMA-AMPS : 45 min DMAA-AMPS : 75 min
2002	Durazo A. <i>et al.</i> <sup>366</sup>	500 MHz (Bruker Avance)	<sup>1</sup> H	D <sub>2</sub> O et D <sub>2</sub> O/liquide ionique	Réaction de dihydroxylation du styrène- <i>d</i> <sub>8</sub> en présence de D <sub>2</sub> O Réaction d'époxydation du styrène- <i>d</i> <sub>8</sub> et d'autres substrats en présence d'un mélange D <sub>2</sub> O/liquide ionique (IL)	Le tube de RMN contenant les réactifs a été mélangé et des spectres <sup>1</sup> H ont été collectés toutes les 5 min à 298 K.	Dihydroxylation du styrène- <i>d</i> <sub>8</sub> : ~ 90 min Réaction d'époxydation : les temps d'acquisitions varient en fonction du substrat utilisé : entre 25 et 60 min.
	Weber H. <i>et al.</i> <sup>367</sup>	500 MHz (Varian INOVA)	<sup>1</sup> H	Benzène- <i>d</i> <sub>6</sub>	Réactions de biocatalyses : acétylation de l'acétate d'éthyle ou de l'acétate de vinyle catalysées par la lipase de	Enregistrement de spectres <sup>1</sup> H toutes les 10 min à 303 K.	24 h

					porcine pancréatique (PPL de la 2-hydroxyméthylpipéridine)		
	Rule J. D. <i>et al.</i> <sup>368</sup>	500 MHz (Varian UNITY INOVA)	<sup>1</sup> H	Toluène- <i>d</i> <sub>8</sub>	Polymérisation par métathèse par ouverture du cycle (ROMP) de l' <i>endo</i> - et de l' <i>exo</i> -dicyclopentadiène, de l' <i>endo</i> -1,2-dihydrocyclopentadiène (DCP) et du norbornène en présence d'un catalyseur de Grubbs	Après ajout du monomère dans le tube de RMN, l'échantillon a été agité puis directement placé dans le spectromètre à la température désirée. Les réactions cinétiques du ROMP de l' <i>endo</i> - et de l' <i>exo</i> -DCP, du dérivé <i>endo</i> -1,2-dihydro et du norbornène ont été quantifiées à 293 K par des spectres <sup>1</sup> H puis, une autre expérience <sup>1</sup> H a permis de quantifier la forme <i>exo</i> -DCP à 288 K et la forme <i>endo</i> -DCP à 313 K.	~ 50 min
<b>2004</b>	Hoye T. R. <i>et al.</i> <sup>273</sup>	500 MHz (Varian INOVA)	<sup>1</sup> H	Proton sans deutérium (No-D)	- Réactions d'estérification de Fischer de l'acide acétique dans l'éthanol (1/4 ratio molaire) - métallation du benzène en présence de <i>n</i> -BuLi dans de l'hexane avec du TMEDA - décomposition du THF en présence de <i>n</i> -BuLi et formation de l'éthylène et l'acétaldéhyde - réaction de métathèse d'oléfine : RCM d'acrylate d'allyle pour produire du $\gamma$ -buténolide	Le paramètre « lock » étant désactivé, la méthode a consisté à calibrer le « lock » manuellement et à utiliser le « shim » sur l'échantillon en rotation. L'ensemble des expériences, sauf indication contraire, a été réalisé à 298 K.	Estérification de Fischer : 18 h Métallation du benzène : 96 h Décomposition du THF en présence de <i>n</i> -BuLi : 48 h Métathèse d'oléfine : 75 min
	Vallikivi I. <i>et al.</i> <sup>369</sup>	500 MHz (AMX)	<sup>1</sup> H	CDCl <sub>3</sub>	Réactions catalysées par la lipase des prostaglandines (PG) : synthèse des esters méthyliques ainsi que l'acétylation des prostaglandines (PG) F <sub>2<math>\alpha</math></sub> et E <sub>2</sub> et des esters méthyliques par la lipase B de <i>Candida antarctica</i> (CALB)	Après ajout de la lipase B de <i>Candida antarctica</i> , les tubes de RMN ont été secoués avant chaque mesure de RMN. L'ensemble des mesures a été réalisé à 293 K.	La durée d'acquisition varie en fonction des PGs impliquées : 13 h à ~ 67 h
<b>2007</b>	Stockman B. J. <i>et al.</i> <sup>370</sup>	500 MHz (Bruker DRX)	<sup>1</sup> H	H <sub>2</sub> O/D <sub>2</sub> O (9/1, v/v)	Conversion de l'acide nicotinique adénine dinucléotide en nicotinamide adénine dinucléotide par la	Enregistrement de 96 spectres <sup>1</sup> H à l'aide d'un passeur d'échantillons. La durée du changement d'échantillons, du « lock », du « shim » et de la collecte des données a été d'environ 7 min par échantillon à 298 K.	~ 11h

nicotinamide adénine dinucléotide synthétase (NadE)							
	Chaudhuri P. D. <i>et al.</i> <sup>371</sup>	400 MHz	<sup>1</sup> H	CDCl <sub>3</sub>	Réaction d'annulation stœchiométrique : formation de benzofuranes entre des cycles Pd(II) stables et des sels de vinyle et d'alcyanyl(phényl)iodonium hypervalents	A l'ajout des réactifs, le tube de RMN est secoué puis rapidement placé dans le spectromètre à la température désirée. Enregistrement de 5 spectres <sup>1</sup> H à 288 K après ajout du palladacycle dans une première solution contenant du(E)-1-octényl(phényl)iodonium tétrafluoroborate. Enregistrement de 4 spectres <sup>1</sup> H à 223 K après ajout du E)-1-octényl(phényl)iodonium tétrafluoroborate dans une deuxième solution contenant du palladacycle. Le détail des paramètres d'acquisition n'est pas précisé.	Suivi réactionnel « <i>in-situ</i> » à -10°C : 1 h Suivi réactionnel à -50°C : 1 h 30 min
<b>2008</b>	Rivera A. <i>et al.</i> <sup>372</sup>	400 MHz (Bruker Avance DRX)	<sup>1</sup> H	D <sub>2</sub> O	Conversion du 1,3,6,8-tétrazaazatricyclo[4.4.1.1]dodécane en 1,,3,6,8-tétrazaazatricyclo[4.3.1.1]undécane	Après ajout des réactifs, le tube de RMN est inséré rapidement dans le spectromètre à 298 K. Enregistrement d'une série de 4 spectres <sup>1</sup> H pour le suivi réactionnel « <i>in-situ</i> ». Le détail des paramètres d'acquisition n'est pas précisé.	8 h
	Edge R. <i>et al.</i> <sup>373</sup>	200 MHz (Bruker DPX)	<sup>31</sup> P	Acétone- <i>d</i> <sub>6</sub>	Réaction de la diphosphine primaire 1,2-(PH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> avec un mélange de métaux <i>n</i> -BuLi/Sb(NMe <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> conduisant à une série d'étapes de déprotonation suivies d'un clivage de la liaison C-P	Après l'ajout des réactifs, le tube de RMN a été mélangé et placé immédiatement dans le spectromètre à 195 K. La solution a ensuite été agitée à T.A pendant 1 h, puis chauffée à 389 K pendant 2 h.	~ 3 h
	Crimmin M. R. <i>et al.</i> <sup>374</sup>	400 MHz 160 MHz	<sup>1</sup> H <sup>31</sup> P	Benzène- <i>d</i> <sub>6</sub>	Hydrophosphination des carbodiimides	Le détail des paramètres d'acquisition n'est pas précisé.	6 h pour le meilleur rendement obtenu « <i>in-situ</i> »
<b>2009</b>	Cheung F. K. <i>et al.</i> <sup>375</sup>	700 MHz (Bruker DPC)	<sup>1</sup> H	Benzène- <i>d</i> <sub>6</sub>	Décomposition de l'acide formique et formation d'un hydride	Enregistrement de 59 spectres <sup>1</sup> H à 298 K. Le premier spectre <sup>1</sup> H a été enregistré 10 min après avoir réalisé les paramètres d'automatisation du spectromètre : « lock » et « shim », puis les spectres ont été enregistrés toutes les 5 min	5 h

						d'intervalle. Le détail des paramètres d'acquisition n'est pas précisé.	
<b>2010</b>	Schmid M. B. <i>et al.</i> <sup>376</sup>	600 MHz (Bruker Avance III)	<sup>1</sup> H	DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Auto-aldolisation du propionaldéhyde catalysée par la L-proline.	Le tube de RMN a été transféré dans le spectromètre immédiatement après l'ajout des réactifs à 300 K. Le détail des paramètres d'acquisition n'est pas précisé.	~ 19 h
	Yokoyama Y. <i>et al.</i> <sup>377</sup>	400 – 500 MHz (JEOL-ECP)	<sup>1</sup> H	Acide acétique- <i>d</i> <sub>6</sub>	Synthèse de dérivés tryptophane à partir d'indole et de sérine	La synthèse du 5-méthoxyindole avec la <i>N</i> -acétylsérine et la réaction de la <i>N</i> -acétylsérine avec l'acide acétique- <i>d</i> <sub>6</sub> ont été réalisées à 353 K. Le détail des paramètres d'acquisition n'est pas précisé.	Synthèse du 5-méthoxyindole avec la <i>N</i> -acétylsérine : 1 h Réaction de la <i>N</i> -acétylsérine avec l'acide acétique- <i>d</i> <sub>6</sub> : 1 h 30 min
	Bordegé V. <i>et al.</i> <sup>378</sup>	400 MHz (Varian INOVA)	<sup>1</sup> H	DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Synthèse d'un glycomonomère : et de sa polymérisation avec du méthyl métacrylate (MMA)	Le suivi réactionnel « <i>in-situ</i> » a été réalisé à 343 K. L'ensemble des spectres <sup>1</sup> H a été acquis avec NS = 128, <i>d</i> <sub>1</sub> = 2, 5 ou 10 s.	5 h
<b>2011</b>	Morten C. J. <i>et al.</i> <sup>379</sup>	500 MHz (Varian INOVA)	<sup>1</sup> H	D <sub>2</sub> O	Cascades d'ouvertures d'époxydes	Après ajout des réactifs, le tube a été placé dans le spectromètre, après avoir réalisé les paramètres d'automatisation du spectromètre : « lock » et « shim », les données ont été acquises à 343 K pour former un époxyde.	Epoxyde 10 : 11 h 25 min Epoxyde 8 : ~ 11 h Epoxyde 4 : ~ 2 h Epoxydes 10, 3 et 8 : ~ 16 h
	Schmid M. B. <i>et al.</i> <sup>380</sup>	600 MHz	<sup>1</sup> H	DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> DMF- <i>d</i> <sub>7</sub>	Auto-aldolisation du propionaldéhyde, du butyraldéhyde catalysée par la L-proline	Après ajout de tous les réactifs, le tube de RMN a été placé dans le spectromètre immédiatement après le mélange de tous les composants réactifs. L'ensemble des données a été acquis à 300 K. Le détail des paramètres d'acquisition n'est pas précisé.	Propionaldéhyde : ~ 12 h Butyraldéhyde : ~ 18 h
	Burés J. <i>et al.</i> <sup>381</sup>	500 MHz (Bruker DRX)	<sup>1</sup> H	Toluène- <i>d</i> <sub>8</sub>	Compréhension mécanistique d'un intermédiaire cyclobutane formé à partir de l'addition conjuguée d'aldéhydes conduisant à la formation de nitro-oléfines	Après ajout des réactifs dans le tube de RMN, la solution a été agitée et a été considérée comme le début de la réaction à t = 0. Le tube de RMN a été placé dans le spectromètre puis les spectres <sup>1</sup> H ont été acquis toutes les 115 secondes en moyenne avec NS = 4 et <i>d</i> <sub>1</sub> = 24 s à 298 K.	Formation du produit énamine : ~ 5 h

					Les auteurs ont cherché à optimiser la réaction en jouant sur différents critères : la concentration des réactifs, la présence d'acide ou non et l'ajout d'eau.	
Clegg I. M. <i>et al.</i> <sup>269</sup>	500 MHz (Varian INOVA)	<sup>1</sup> H <sup>13</sup> C	Acétonitrile- <i>d</i> <sub>3</sub>	Compréhension mécanistique d'une réaction hétérogène impliquant différentes voies possibles et différents intermédiaires pour la synthèse d'un ingrédient pharmaceutique actif (API)	Les réactifs ont été ajoutés dans un flacon contenant de la glace et sous agitation. La réaction a ensuite été transférée dans un tube de RMN. Après avoir réalisé les paramètres d'automatisation du spectromètre : « lock » et « shim » avec un échantillon de composition similaire, les données ont été acquises à 298 K. Le « temps mort » séparant le début de la réaction à t = 0 et le début de la première acquisition a été évaluée à 9 min. Les spectres <sup>1</sup> H ont été acquis toutes les min pendant la première heure puis toutes les 10 min durant les 10 h suivantes. NS = 1, <i>d</i> <sub>1</sub> = 1 s, Acq = 1,9 s. Des expériences courtes HSQC 2D (NS = 2, <i>d</i> <sub>1</sub> = 1s, <i>F</i> <sub>1</sub> = 106) et HMBC 2D (NS = 4) ont été acquises pour élucider les intermédiaires.	11 h
Nga M. Do. <i>et al.</i> <sup>382</sup>	400 MHz (Bruker)	<sup>1</sup> H <sup>19</sup> F	DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Suivi réactionnel « <i>in-situ</i> » d'un ingrédient pharmaceutique par la RMN quantitative (qNMR) – méthode ERETIC	Le détail du protocole opératoire pour la préparation de l'échantillon dans un tube de RMN n'est pas précisé. L'ensemble des données a été acquis à 298 K. Les spectres <sup>1</sup> H ont été acquis avec 32 K points, NS = 32, <i>d</i> <sub>1</sub> = 30 s et Acqu = 5,12 s. Les spectres <sup>19</sup> F ont été acquis avec 66 K points, NS = 32, <i>d</i> <sub>1</sub> = 30 s et Acqu = 0,7 s. L'acide 4-Fluorobenzoïque (PFBA) a été utilisé comme référence standard pour la quantification en RMN.	7 h
Flavien S. <i>et al.</i> <sup>270</sup>	500 MHz (Varian INOVA)	<sup>1</sup> H	D <sub>2</sub> O	Hydrolyse de l'anhydride acétique par l'eau	Les auteurs ont effectué plusieurs séries de mesures en évaluant le temps mort séparant le début de la réaction à t = 0 et le début de la première acquisition à différentes températures et différentes concentrations du réactif (entre 4min 19 s	Entre 1 h et 10 h suivant la température à laquelle la réaction a été réalisée

						~ 5 min 5 s). Avant chaque mesure, les paramètres d'automatisation du spectromètre : « lock » et « shim » ont été réalisés avec un échantillon de composition similaire. Les réactifs ont été ajoutés dans un tube de RMN placé dans un bain d'huile à une température donnée. Après avoir mélangé la solution, le tube de RMN est placé immédiatement dans le spectromètre à la même température que celui du bain d'huile. Une série de spectres $^1\text{H}$ a été enregistrée toutes les NS = 1 min ~ 10 min suivant le type d'expérience.	
<b>2012</b>	Burés J. <i>et al.</i> <sup>267</sup>	600 MHz (Bruker DRX)	$^1\text{H}$	$\text{CDCl}_3$	Formation d'énamines entre les aldéhydes et les catalyseurs chiraux à base de pyrrolidine	Après ajout des réactifs dans un tube de RMN, la solution est agitée puis, le tube de RMN est rapidement placé dans le spectromètre. Le détail des paramètres d'acquisition n'est pas précisé.	La durée des expériences varie en fonction de la concentration des réactifs et des types d'aldéhydes et de catalyseurs employés : ~ 8 min à 16 h
	Anderson L. A. <i>et al.</i> <sup>271</sup>	600 MHz (VNMRS)	$^1\text{H}$	$\text{CDCl}_3$	Réaction de transestérification du triacylglycérol en biodiesel	Les réactifs ont été ajoutés directement dans le tube de RMN avant l'acquisition avec le catalyseur ajouté le plus rapidement possible. Le tube a été scellé avec du parafilm pour empêcher l'évaporation du $\text{CDCl}_3$ . Les paramètres d'automatisation du spectromètre : « lock » et « shim » ont été réalisés avec un échantillon de composition similaire pour minimiser le temps mort. L'ensemble des spectres $^1\text{H}$ a été acquis à 296 K ou 333 K avec $d_1 = 1$ s pour un nombre de NS qui varie en fonction du type d'expérience.	La durée des expériences varie en fonction des réactifs et catalyseurs employés : 20 min à ~ 10 h
	Rajković S. <i>et al.</i> <sup>383</sup>	200 MHz (Varian Gemini)	$^1\text{H}$	$\text{D}_2\text{O}$	Synthèse de peptides contenant de la méthionine et de l'histidine en présence de complexes carboplatines et clivage hydrolytique de la liaison	Le détail du protocole opératoire et des paramètres d'acquisition n'est pas précisé. A l'exception des spectres $^1\text{H}$ à des intervalles de temps appropriés à 310 K.	Synthèse des peptides : 48 h

					amide Met-Gly dans le dipeptide Ac-L-Met-Gly en présence de différents complexes de Pt(II)	Clivage hydrolytique : 7 j	
<b>2014</b>	Leskinen M. V. <i>et al.</i> <sup>274</sup>	400 – 300 MHz (Bruker Avance)	<sup>1</sup> H	Dioxane- <i>d</i> <sub>8</sub> Acide acétique- <i>d</i> <sub>4</sub>	Réaction de couplage de déshydrogénation croisée entre $\beta$ -cétoesters et indoles en présence de Pd(II)	<p>Première approche en présence de dioxane-<i>d</i><sub>8</sub> : après ajout des réactifs dans un flacon, ce dernier est agité 1 à 3 min à 300 K dans un bloc chauffant en aluminium pour stabiliser la température de réaction. Le mélange a ensuite été transféré dans un tube de RMN qui a été placé dans le spectromètre. Une vitesse de rotation de 20 Hz a été appliquée. L'ensemble des spectres 1D <sup>1</sup>H a été acquis à des intervalles de 1 ou 2 min à 300 K. Le détail des paramètres d'acquisition et le nombre de spectres acquis n'est pas fourni.</p> <p>Seconde approche en présence d'acide acétique-<i>d</i><sub>4</sub> : Après avoir ajouté le Pd(II) et l'acide acétique-<i>d</i><sub>4</sub> à l'aide d'une pipette jetable dans un flacon contenant déjà les réactifs, la solution est mélangée 30 s puis le temps <i>t</i><sub>0</sub> de la réaction est évalué aussitôt que le Pd(II) a été entièrement dissous. Le mélange résultant est ensuite transféré dans un tube de RMN. Après avoir placé ce dernier dans le spectromètre, des spectres 1D <sup>1</sup>H sont acquis avec NS = 16 et sous rotation à 303 K. Le détail des paramètres d'acquisition et du nombre de spectres acquis n'est pas fourni.</p>	<p>Approche 1 : ~ 16 h</p> <p>Approche 1 avec l'indole-D : ~ 15 h</p> <p>Approche 1 avec le <math>\beta</math>-cétoester-D : ~ 12 h 30 min</p> <p>Approche 1 avec l'indole-D et le <math>\beta</math>- cétoester-D : ~ 11h</p> <p>Approche 2 avec du malonate : ~ 50 min</p>
<b>2015</b>	Niklas T. <i>et al.</i> <sup>384</sup>	400 MHz 155 MHz	<sup>1</sup> H <sup>7</sup> Li	Acétonitrile- <i>d</i> <sub>3</sub> Toluène- <i>d</i> <sub>8</sub>	Etude de la complexation d'un ion <sup>7</sup> Li avec le 12-crown-4 et du <i>n</i> -BuLi avec le <i>N,N,N',N'',N''</i> - pentaméthyl-diéthylène-triamine (PMDTA)	<p>Après que le réactif 12-crown-4 ait été ajouté dans le tube de RMN, la solution est refroidie à 5°C. Une solution de LiClO<sub>4</sub> dans de l'acétonitrile-<i>d</i><sub>3</sub> est déposée sur le dessus de l'éther solide. Cette procédure a empêché le mélange initial des deux composants avant les mesures. Le tube de RMN a ensuite été positionné dans le</p>	<p><sup>7</sup>Li + 12-crown-4 : 9 h</p> <p><i>n</i>-BuLi + PMDTA : 3 j</p>

					<p>spectromètre à 298 K. A cette température, l'éther fond et diffuse lentement dans la solution de LiClO<sub>4</sub>. Des spectres <sup>1</sup>H et <sup>7</sup>Li ont ensuite été acquis à des intervalles de temps appropriés.</p> <p>Pour la seconde expérience, une solution de <i>n</i>-BuLi dans du toluène non deutéré est versée dans un tube de RMN et un polymère est induit à environ 1 cm au-dessus du fond du tube. Après 7 jours, la solution surnageante de <i>n</i>-BuLi-toluène au-dessus du polymère a été retirée et remplacée par une solution de PDMTA dans du toluène-<i>d</i><sub>8</sub>. Les mesures par RMN <sup>1</sup>H et <sup>7</sup>Li ont commencé après 3 h de réaction. Le détail des paramètres d'acquisition n'est pas précisé.</p>	
Foley D. A. <i>et al.</i> <sup>55</sup>	400 MHz (Avance III)	<sup>1</sup> H <sup>19</sup> F	DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> Acétonitrile- <i>d</i> <sub>3</sub> Méthanol- <i>d</i> <sub>4</sub>	<p>Etude d'une réaction hétérogène : condensation d'aldol catalysée par la L-proline.</p> <p>Etude d'une réaction homogène : couplage d'une aniline avec du 4-Fluorobenzaldéhyde.</p> <p>Etude d'une réaction homogène à cinétique rapide : transestérification catalysée par de l'acide sulfurique de l'acide acétique anhydre et de l'isopropanol</p>	<p>Dans la première approche, les réactifs ont été ajoutés dans un tube de RMN. La solution a été inversée à trois reprises et le tube de RMN est inséré dans le spectromètre avant de lancer les acquisitions rapidement. Dans la seconde approche, le tube de RMN a été retiré du spectromètre avant chaque nouvelle acquisition, inversé à trois reprises avant d'être à nouveau réinséré dans le spectromètre. Les spectres <sup>1</sup>H et <sup>19</sup>F découplés protons ont été respectivement acquis à 300 K avec NS = 4, <i>d</i><sub>1</sub> = 10 s et NS = 8, <i>d</i><sub>1</sub> = 30 s. La précision sur l'évaluation du temps mort et sur l'intervalle de spectres <sup>1</sup>H et <sup>19</sup>F enregistrés pendant les réactions n'est pas précisée.</p>	<p>Réaction hétérogène : 20 h</p> <p>Réaction homogène : 6 h</p> <p>Réaction à cinétique rapide : 40 min</p>
Her C. <i>et al.</i> <sup>385</sup>	400 MHz (Varian-Agilent)	<sup>1</sup> H	D <sub>2</sub> O	Réaction d'hydrolyse du saccharose catalysée par une enzyme, l'invertase par la RMN quantitative (qNMR)	Les réactifs ont été ajoutés dans un tube Eppendorf avant d'être transférés dans un tube de RMN. Après ajout de l'enzyme, le temps mort a été évalué à 3,3 min jusqu'à l'acquisition du premier spectre <sup>1</sup> H. Un ensemble de 80 spectres <sup>1</sup> H a été collecté	~ 2 h

						(NS = 24, 32 K points, $d_1 = 1$ s, Acqu = 2,75 s pour une durée totale de 1,5 min par spectre) à 303 K.	
<b>2018</b>	Beguirie M. <i>et al.</i> <sup>276</sup>	300 – 400 – 500 MHz (Bruker Avance III)	<sup>1</sup> H <sup>31</sup> P	Toluène- <i>d</i> <sub>8</sub>	Synthèse catalytique d'hétérocycles 1 <i>H</i> -2,1-Benzazaboroles en présence de Ru	Après ajout des réactifs dans un tube de RMN à basse pression et congelé dans de l'azote liquide avant analyse, le complexe de Ru est ajouté dans ce dernier. Le tube de RMN est alors agité avant d'être inséré dans le spectromètre de RMN, préalablement équilibré à 193 K pour quencher la réaction. L'ensemble des expériences 1D <sup>1</sup> H et <sup>31</sup> P a ensuite été acquis soit à 233 K, soit à 298 K. Le nombre de spectres acquis et les paramètres d'acquisition ne sont pas renseignés.	30 min
	Kaplan J. M. <i>et al.</i> <sup>56</sup>	400 MHz (Bruker)	<sup>1</sup> H <sup>31</sup> P	Toluène- <i>d</i> <sub>8</sub>	Addition oxydative de la 3-chlorocyclohex-2-ènone catalysée par du Pd	Les réactifs ont été transférés dans un tube de RMN surmonté d'un septum. Le Pd a été ajouté au tube de RMN <i>via</i> une seringue. L'ensemble des spectres de RMN <sup>1</sup> H et <sup>31</sup> P a été acquis avec NS = 1 et collecté plusieurs heures pour surveiller la réaction d'addition oxydative à 295 K.	~ 6 h
	Sundekilde U. K. <i>et al.</i> <sup>386</sup>	600 MHz (Bruker)	<sup>1</sup> H	D <sub>2</sub> O	Réaction d'hydrolyse d'une protéine de viande de poulet catalysée par deux enzymes : alcalase et papaine	Après avoir placé les réactifs dans un tube de RMN, l'enzyme testée a été introduite rapidement (<2 min). Les mesures sont effectuées sous agitation. L'évaluation de la réaction d'hydrolyse a été effectuée à 328 K. Les paramètres d'acquisitions ne sont pas spécifiés.	3 h 30 min
<b>2019</b>	Cox N. <i>et al.</i> <sup>387</sup>	800 MHz (Bruker Avance III HD)	<sup>1</sup> H <sup>31</sup> P	D <sub>2</sub> O	Réaction de phosphorylation du glucose catalysée par une hexokinase et évaluation du pH de la réaction par une expérience pseudo-2D Inhibition du tréhalose-6-phosphate en présence d'hexokinase	Un échantillon test comprenant les réactifs a été placé dans le spectromètre et deux spectres 1D : <sup>1</sup> H et <sup>31</sup> P ont été enregistrés avant l'ajout de l'hexokinase. Le tube de RMN est alors sorti du spectromètre et l'enzyme est ajoutée. Après une courte période de 2-3 min pour le calibrage de la température et des paramètres d'automatisation du spectromètre : « lock » et « shim », les spectres ont été	2 h

					acquis à 293 K avec NS = 64, $d_1 = 1$ s, 8 K points pour $^{31}\text{P}$ et 16 K points pour $^1\text{H}$ .		
	Marullo S. <i>et al.</i> <sup>388</sup>	300 MHz (Bruker)	$^1\text{H}$	DMSO- $d_6$ / mélange de liquides ioniques	Conversion du fructose en 5-hydroxyméthylfurfural (5-HMF) en présence de différents mélanges de liquides ioniques	Après l'ajout des réactifs dans le tube de RMN, ce dernier est rapidement placé dans la chambre du spectromètre où une série de 11 spectres $^1\text{H}$ a été acquise à 333 K à des temps sélectionnés. Le détail des paramètres d'acquisition n'est pas mentionné.	2 h 30 min
	Tuttle R. R. <i>et al.</i> <sup>389</sup>	500 MHz (Agilent INOVA)	$^1\text{H}$	$\text{D}_2\text{O}$	Décomposition de la S-Nitrosoglutathione (GSNO) en présence de glutathione (GSH) catalysée par du Cu	Les réactifs ont été introduits dans un tube de RMN sous $\text{N}_2$ . La solution est agitée manuellement suivie de 2 s de sonication pour enlever les bulles d'air. L'échantillon est gardé à l'obscurité, sans air et est analysé aussitôt que possible. Le détail des paramètres d'acquisition pour suivre la décomposition du GSNO en présence du GSH catalysée par du Cu n'est pas précisé.	16 h
	Kopp D. <i>et al.</i> <sup>268</sup>	500 MHz (Bruker Avance III HD)	$^{13}\text{C}$	$\text{D}_2\text{O}$	Cascade de réactions enzymatiques de la conversion du mannose en acide lactique par une mannonate déshydratase	Le point zéro de la réaction a été acquis avec une solution de substrat en absence d'enzymes, puis les réactifs ont été introduits dans un tube de RMN contenant un mélange d'enzymes pour démarrer la réaction. Le tube a alors été placé dans le spectromètre et une série de spectres $^{13}\text{C}$ $\{^1\text{H}\}$ (NS = 16, $d_1 = 3$ s) a été acquise à 323 K, toutes les 6 min 30 s. Les spectres des intermédiaires ont été acquis avec NS = 512 et $d_1 = 3$ s. Les auteurs ont effectué un marquage du substrat au $^{13}\text{C}$ pour tracer chaque carbone pendant l'évolution de la réaction.	16 h
2020	Bjelopetrovic A. <i>et al.</i> <sup>390</sup>	400 MHz (Bruker AV)	$^1\text{H}$	DMF- $d_7$	Cyclopalladation des azobenzènes et leurs dérivés monopalladés en présence de Pd(II)	Après ajout des réactifs dans un tube de RMN, le tube est placé dans le spectromètre et les mesures ont été acquises à 298 K à différents intervalles de temps. Les paramètres d'acquisitions et le nombre de spectre $^1\text{H}$ enregistrés ne sont pas mentionnés, sauf indication contraire.	De quelques minutes à plusieurs heures ~ 8 h en fonction de la concentration des azobenzènes et du Pd(II) utilisé

2021	Santana A. G. <i>et al.</i> <sup>277</sup>	500 MHz - 126 MHz (Bruker Avance)	<sup>1</sup> H <sup>13</sup> C	CDCl <sub>3</sub>	Réactions de glycosylation	<p>Une solution mère contenant les réactifs a été préparée en amont dans un flacon séché au four et purgé avec de l'Ar. Une aliquote de la solution mère a été transférée dans un tube de RMN muni d'un septum et purgée avec de l'Ar. Après ajout d'une solution du sulfoxyde donneur, le tube de RMN a été secoué pour mélanger l'échantillon, puis refroidit dans un bain d'azote liquide/acétone à la température de réaction choisie. Après traitement à l'anhydride triflique, le tube de RMN a été immédiatement transféré au spectromètre de RMN, préalablement équilibré à la température de travail appropriée. Les paramètres d'automatisation du spectromètre : « lock » et « shim » ont été réalisés avec un échantillon de composition similaire contenant tous les composants de la réaction pour minimiser le temps mort. Les réactions de glycosylation ont été suivies par des expériences de RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C à basse température. L'ensemble des spectres <sup>1</sup>H a été acquis à 208 K, 213 K, 228 K, ou 253 K avec <i>d</i><sub>1</sub> = 1 s. Les expériences HSQC 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C ont été acquises aux mêmes températures que pour les spectres 1D <sup>1</sup>H avec NS = 2, 64 points pour <sup>13</sup>C, <i>d</i><sub>1</sub> = 110 s, Acqu = 2-3 min.</p>	De plusieurs minutes pour l'observation des intermédiaires à 1 h pour les produits finaux
------	---	--	-----------------------------------	-------------------	----------------------------	--	---

**Annexe 2 :** Tableau récapitulatif regroupant les travaux scientifiques retrouvés dans la littérature portant sur la surveillance de diverses réactions utilisant l'approche « *off-line* » dans des tubes de RMN de 5 mm. Recherche effectuée jusqu'au 03/12/2021.

Année	Auteur	RMN	Noyaux étudiés	Solvant	Réaction étudiée	Mode de fonctionnement en RMN	Temps d'expérience
1992	Bartik T. <i>et al.</i> <sup>391</sup>	200 – 400 MHz (Bruker & Varian RU) 162 MHz (Varian RU)	<sup>1</sup> H <sup>31</sup> P	Méthanol- <i>d</i> <sub>4</sub> /THF- <i>d</i> <sub>8</sub> /D <sub>2</sub> O (5/3/2, v/v/v)	Synthèse de la triphénylphosphine trisulfonée (TPPTS)	Des aliquotes ont été prélevées du mélange réactionnel au fur et à mesure de la réaction, neutralisées à 273 K et extraites avec du méthanol chaud avant d'être analysées <i>via</i> le spectromètre de RMN à 295 K. Un ensemble de spectres 1D <sup>1</sup> H et <sup>31</sup> P a été acquis à des intervalles de temps appropriés.	150 h
1999	Balch A. L. <i>et al.</i> <sup>363</sup>	300 MHz (Electric-QE)	<sup>1</sup> H	Pyridine- <i>d</i> <sub>5</sub>	Réaction de l'octaéthylporphyrine (OEP)Fe <sup>II</sup> -(pyr) <sub>2</sub> en présence d'hydrazine- <i>d</i> <sub>4</sub>	Les titrages ont été effectués par addition d'aliquotes d'hydrazine- <i>d</i> <sub>4</sub> au moyen d'une seringue microlite. Trois spectres <sup>1</sup> H ont été collectés à 243 K : avant ajout de l'hydrazine- <i>d</i> <sub>4</sub> , après 18 équiv et 72 équiv de l'hydrazine- <i>d</i> <sub>4</sub> .	-
2001	Pieper D. H. <i>et al.</i> <sup>392</sup>	600 MHz (Bruker Avance DMX)	<sup>1</sup> H	D <sub>2</sub> O	Dégradation chloroaromatiques de catalysée par des enzymes	Les auteurs ont évalué la transformation « <i>in-situ</i> » de la cis-diènelactone en présence d'enzymes et de pH en mode « <i>off-line</i> ». Ce mode a consisté à acquérir à chaque fois un spectre 1D <sup>1</sup> H après transformation complète du réactif <i>via</i> l'enzyme ou par action du pH, en produit attendu. Des aliquotes sont ainsi prélevées à un moment précis de la réaction. Six spectres de RMN 1D <sup>1</sup> H ont ainsi été acquis à 300 K en utilisant la séquence de suppression de spectroscopie à effet Overhauser Nucléaire 1D avec NS = 280 chacun avec Acqu = 1,8 s et <i>d</i> <sub>1</sub> = 1,3 s. Le signal de l'eau a été supprimé et utilisé comme référence interne. Le premier spectre est celui de la cis-diènelactone en absence d'enzyme. Le dernier spectre est celui du produit final attendu après l'action d'enzymes, de pH, et de périodes	~ 50 h

						d'incubations. Le détail protocolaire pour la préparation des tubes de RMN n'est pas mentionné.	
<b>2011</b>	Cabeça L. F. <i>et al.</i> <sup>393</sup>	400 MHz (INOVA)	<sup>1</sup> H	CDCl <sub>3</sub>	Réaction de transestérification entre de l'huile et du méthanol catalysée par du NaOH pour la production de biodiesel	A des intervalles de temps compris entre 10 et 90 min, des aliquotes ont été prélevées du milieu réactionnel et dissous dans du CDCl <sub>3</sub> pour arrêter la réaction. Un total de huit spectres est enregistré à différents moment de la réaction à 298 K. Chaque spectre <sup>1</sup> H a été collecté avec NS = 16, <i>d</i> <sub>1</sub> = 15s et Acqu = 5 s.	~ 1 h 30 min
<b>2017</b>	Liu S. Y. <i>et al.</i> <sup>275</sup>	600 - 400 - 300 MHz (Varian UNITYplus)	<sup>1</sup> H	Toluène- <i>d</i> <sub>8</sub>	Alkylation de cétones avec des alcools primaires catalysés par des complexes de Ru(II)	Les réactifs ont été placés dans un tube de Schlenk et agité à 393 K pendant un temps requis. Une aliquote a ensuite été prélevée après refroidissement du milieu réactionnel à 298 K et a été transférée dans un tube de RMN. Une série de 11 spectres 1D <sup>1</sup> H a été acquise à des intervalles de temps appropriés à 393 K. Les paramètres d'acquisition ne sont pas renseignés.	18 h
<b>2018</b>	Williamson K. <i>et al.</i> <sup>394</sup>	700 MHz (Bruker Avance III)	<sup>1</sup> H	CDCl <sub>3</sub>	Réaction d'époxydation du marc de café pour la production de précurseurs bioplastiques	Deux aliquotes ont été prélevées du milieu réactionnel après 5 h et 10 h de réaction. Après un traitement pour éliminer l'acétate d'éthyle, l'huile époxydée a été dissoute dans du CDCl <sub>3</sub> . Les trois spectres 1D <sup>1</sup> H ont été acquis sans rotation avec DS = 4, NS = 16, 64 K points, <i>d</i> <sub>1</sub> = 10 s pour des mesures quantitatives à 298 K. Les produits époxydés ont été déterminés par une HSQC-DEPT <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C après 10 h de réaction.	10 h
<b>2019</b>	Talavera-Prieto N. M. <i>et al.</i> <sup>278</sup>	400 MHz (Bruker Avance III)	<sup>1</sup> H	CDCl <sub>3</sub>	Réaction de transestérification de différents triglycérides avec du méthanol pour la production de biodiesel	Une série de 10 aliquotes a été prélevée du milieu réactionnel à différents intervalles de temps compris entre 1 et 90 min. A chaque prélèvement, la réaction est quenchée dans un bac de glace pour s'assurer que la réaction ne se poursuit pas. Les échantillons sont ensuite transférés dans un tube de RMN, puis analysés par RMN. Un ensemble de 10	1 h 30 min

spectres 1D  $^1\text{H}$  a été acquis correspondant aux 10 aliquotes prélevées à différents moments au cours de la réaction. Chaque spectre a été acquis avec NS = 16,  $d_1 = 1$  s et Acq = 9 s à 298 K.

**Annexe 3** : Tableau récapitulatif regroupant les travaux scientifiques retrouvés dans la littérature portant sur la surveillance de diverses réactions utilisant l'approche « *rapid-injection* » dans des tubes de RMN de 5 mm. Recherche effectuée jusqu'au 03/12/2021.

Année	Auteur	RMN	Noyaux étudiés	Solvant	Réaction étudiée	Mode de fonctionnement en RMN	Temps d'expérience
1984	McGarrity J. F. <i>et al.</i> <sup>281</sup>	360 MHz (Bruker WH)	<sup>1</sup> H	CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Ozonolyse du tétraméthyléthylène et du <i>cis</i> -2-butène	<p><b>Technique de McGarrity.</b> Une solution d'ozone de 300 µl dans du CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a été transférée dans un tube de RMN standard de 5 mm, coupé à une longueur de 11 cm, de sorte que le haut du tube affleure le spinner. Le tube est ensuite inséré dans le spectromètre à la température souhaitée. A ce moment, les paramètres automatiques du spectromètre tels que « l'accord de sonde » et le « shim » sont effectués, puis l'insert comprenant une seringue couplée à un long capillaire d'injection est installé. 10 à 15 µl d'une solution de réactif sont positionnés dans la seringue. Le tube de RMN est alors mis en rotation. Le liquide contenu dans la seringue est alors poussé vers le bas pour remplir complètement le capillaire. Le système d'acquisition est déclenché automatiquement par l'injection. L'injection doit être effectuée le plus tôt possible après l'insertion du réactif dans le capillaire pour réduire le risque de diffusion. Un délai de 40 ms en plus du temps mort de l'ordinateur de 15 ms, est nécessaire pour permettre un mélange homogène de la solution avant l'acquisition du premier spectre. Pour les expériences se déroulant à basse température, l'insert doit être abaissé le plus rapidement. En effet, la température au niveau du capillaire, avant introduction du réactif dans l'échantillon, ne peut pas être calibrée. Le refroidissement de l'insert entraîne une contraction du liquide dans la seringue. Un ensemble de 16 spectres ont été collectés par injection à 188 K ou 173 K.</p>	14 s
1987	Frye S. V. <i>et al.</i> <sup>395</sup>	360 MHz (Bruker WH)	<sup>1</sup> H	THF- <i>d</i> <sub>8</sub>	Chélation du diméthylimagnésium (MgMe <sub>2</sub> ) avec des cétones	<p><b>Technique de McGarrity.</b> 20 µl de MgMe<sub>2</sub> dans du THF-<i>d</i><sub>8</sub> ont été injectés dans un tube de RMN contenant une solution de cétone (0,06 M) à 243 K. Le</p>	37 min 38 s

						premier spectre a été acquis 1 s après l'injection et quelques spectres ont été acquis à des intervalles de temps souhaités. Cette étude a permis de mettre en évidence le mécanisme rapide de cette chélation, longtemps postulé par le modèle de Cram.	
	Palmer C. A. <i>et al.</i> <sup>396</sup>	360 MHz (Bruker WH)	<sup>1</sup> H	CDCl <sub>3</sub>	Réaction des énolates de lithium avec des composées carbonylés dans du méthylcyclohexane- <i>d</i> <sub>14</sub>	<b>Technique de McGarrity.</b> Une solution contenant du benzaldéhyde a été préparée dans une fiole jaugée de 1 ml et transférée dans une seringue étanche au gaz du système d'injection. Le capuchon du tube de RMN a été retiré et le système d'injection a été placé dans l'aimant, de sorte que la pointe en Téflon du capillaire de l'injecteur se trouve juste au-dessus du niveau de la solution dans le tube de RMN. La vitesse de rotation du tube a été ajustée et le « shim » a été effectué. Environ 20 µl de la solution du benzaldéhyde sont alors injectés. La première FID a été acquise après un délai de 85 ms pour le mélange puis toutes les 85 ms jusqu'à la fin de l'expérience. Toutes les réactions ont été effectuées en suivant la même procédure sur la même échelle de temps.	5 min
1992	Chen X. <i>et al.</i> <sup>397</sup>	200 MHz (Bruker AC200)	<sup>1</sup> H	THF- <i>d</i> <sub>8</sub>	Chélation du diméthylimagnésium (MgMe <sub>2</sub> ) avec plusieurs alkoxy cétones	<b>Technique de McGarrity.</b> Extension des premiers résultats rapportés par la même équipe en 1987 dans du THF- <i>d</i> <sub>8</sub> à 243 K. <sup>395</sup> La procédure employée pour l'acquisition des spectres n'est pas mentionnée.	La vitesse de réaction dépend des cétones employées : ~ 8 s à 13 min 33 s
	Reetz M. T. <i>et al.</i> <sup>398</sup>	400 MHz (Bruker WH)	<sup>1</sup> H	CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Cyclopropylation contrôlée par chélation des alkoxy aldéhydes chiraux en utilisant des acides de Lewis et des C-nucléophiles	<b>Technique de McGarrity.</b> Une solution initiale contenant du TiCl <sub>4</sub> et du CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> a été préparée dans un ballon à fond rond sous argon à 253 K. Des aliquotes ont été transférées par canule dans des tubes de RMN à des moments appropriés. Pour la réaction d'aldolisation de Mukaiyama, une solution de 1,0 M de TiCl <sub>4</sub> dissoute dans du CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> a été placée dans un tube de RMN à injection rapide pour compléter à 0,5 ml de solution. Le tube de RMN a été refroidit à 203 K et l'aldéhyde racémique est ajouté. L'énolesilane a été rapidement injecté. Le premier spectre de RMN <sup>1</sup> H a été enregistré 0,02 s après	10 s

						l'injection, moment à partir duquel 5% de conversion a été observé.	
1993	Geletneky C. <i>et al.</i> <sup>399</sup>	400 MHz (Bruker AM)	<sup>31</sup> P	THF	Réaction de Wittig de plusieurs ylures de phosphore avec du benzaldéhyde	<p><b>Technique de McGarrity.</b> La solution d'ylure de phosphore a été placée dans le tube de RMN de 10 mm ouvert dans l'aimant. Des aliquotes de benzaldéhyde ont été placées dans la seringue de l'appareil « <i>rapid-injection</i> ». L'appareil a été monté sur l'aimant et la réaction est déclenchée par injection du contenu de la seringue. Le temps d'acquisition pour une seule FID a été réglé à 90 ms afin d'acquérir 10 spectres par seconde (NS = 1) à 213 K. Le premier spectre de RMN <sup>31</sup>P est acquis au bout de 0,5 s.</p>	4 h
1995	Ogle C. A. <i>et al.</i> <sup>400</sup>	300 MHz (QE)	<sup>1</sup> H <sup>7</sup> Li	THF- <i>d</i> <sub>8</sub>	Polymérisation du styrène par différents isomères du BuLi	<p><b>Technique de McGarrity.</b> La manipulation des matériaux sensibles à l'air a été réalisée sous azote en utilisant une boîte à gants. Dans une expérience typique, 20 µl d'une solution à 25% de styrène dans du 3-méthylcyclohexane deutéré ont été injectés dans une solution initiale contenant du THF-<i>d</i><sub>8</sub> et du <i>n</i>-BuLi à 193 K. Lorsque du <i>sec</i>-BuLi ou du <i>tert</i>-BuLi ont été utilisés, ces derniers ont été ajoutés au tube de RMN en dehors de la boîte à gant, après son refroidissement à 193 K. Du 2,2-diméthoxypropane ou du ferrocène ont alors été ajoutés comme standard interne pour déterminer les concentrations. L'objectif de cette étude a été de comprendre la réactivité de la polymérisation du styrène à basse température à 193 K. Une partie des analyses a été effectuée par RMN <sup>1</sup>H et lorsque les protons adjacents au lithium et les protons méthyle du groupe <i>tert</i>-butyl sont difficiles à distinguer entre les espèces ayant réagi et n'ayant pas réagi, par RMN <sup>7</sup>Li. La vitesse de polymérisation dépend du type de butyllithium utilisé. Le suivi réactionnel a permis de mettre en évidence la structure d'un dimère (<i>n</i>-BuLi)<sub>2</sub>PS.</p>	1 min 48 s
2000	Mayr H. <i>et al.</i> <sup>401</sup>	400 MHz (Varian VRX)	<sup>1</sup> H	Acétonitrile- <i>d</i> <sub>3</sub>	Réaction de Diels-Alder : cycloadditions d'ions iminium avec des diènes	<p><b>Technique de McGarrity.</b> Initialement, un tube de RMN contenant une solution de sel d'iminium dissous dans de l'acétonitrile-<i>d</i><sub>3</sub> a été placé dans un tube de RMN sous argon. Le tube a été scellé avec un septum et placé dans un spectromètre ARX 300 afin de</p>	-

						<p>préparer les paramètres automatiques du spectromètre habituels et d'enregistrer le premier spectre avant réaction. Ensuite, la technique de McGarrity a été employée mais le temps expérimental de la réaction et la procédure ne sont pas détaillés.</p> <p>L'objectif de cette étude a été de comprendre l'aspect mécanistique et cinétique des réactions de cycloaddition de Diels-Alder.</p>	
2002	Bertz S. H. <i>et al.</i> 402	- (Non précisé)	<sup>1</sup> H	THF- <i>d</i> <sub>8</sub>	Additions conjuguées d'organocuprates sur du 2-cyclohexène	<p><b>Technique de McGarrity.</b> Le mode opératoire n'est pas précisé. Les expériences ont été réalisées à 73 K. Une série de 100 spectres de RMN <sup>1</sup>H a été collectée au cours des premières minutes pour obtenir des données cinétiques, suivie de quelques expériences 2D (COSY, EXSY) pendant plusieurs heures pour confirmer la présence des complexes stables.</p>	40 s
2007	Jones A. C. <i>et al.</i> 282	360 MHz (Bruker Avance)	<sup>7</sup> Li	THF/Me <sub>2</sub> O	Etude de la réactivité entre les agrégats du <i>n</i> -BuLi en présence d'acétylènes	<p><b>Technique de Jones.</b> Les échantillons scellés par un septum sont préparés dans un tube de RMN de 10 mm scié à une longueur de 18 cm. Le matériau à injecter est pesé dans un flacon séparé purgé sous argon et scellé par un septum. Le tube de RMN de 10 mm est inséré dans la sonde et des spectres préliminaires sont collectés pour ajuster les réglages automatiques du spectromètre et vérifier la température. L'échantillon est ensuite enlevé, le septum est retiré et le tube de RMN ouvert est abaissé dans le spectromètre avec grand soin pour minimiser l'exposition à l'air ambiant. La purge sous argon est alors lancée en continu. La première boucle de pré-injection (10-20 s) permet de surveiller l'échantillon avant injection du réactif et de vérifier la saturation du signal. Elle consiste à lancer le programme d'impulsion piloté par l'ordinateur qui comprend un certain nombre de balayages définis par l'utilisateur. Après les balayages de pré-injection, le programme d'impulsions automatisé abaisse la partie mobile, démarre l'agitateur et injecte l'échantillon. La solution est agitée pendant 0,6 s après l'injection puis s'arrête. Après quoi, la partie mobile est relevée et les spectres sont collectés. Selon la durée de</p>	2 h

					l'expérience, les spectres sont collectés à des intervalles de 0,8 s pendant quelques minutes. Cette partie se nomme « acquisition rapide ». Enfin, un intervalle de temps plus long (15-60 s) est sélectionné pour le reste de l'expérience, cette période est appelée « acquisition lente ». L'ensemble du montage est automatisé. Les expériences ont été effectuées à 143 K permettant d'accroître la demi-vie des dérivés du <i>n</i> -BuLi de quelques secondes à une heure.		
	Bertz S. H. <i>et al.</i> <sup>403</sup>	500 MHz (JEOL ECA)	<sup>1</sup> H <sup>13</sup> C	THF- <i>d</i> <sub>8</sub>	Préparation d'un intermédiaire Cu (III) « insaisissable » à partir de dérivé de Li.	<p><b>Technique de McGarrity.</b> Une solution de 2-cyclohexénone a été introduite directement dans un tube de RMN en rotation contenant Me<sub>2</sub>CuLiI ou Me<sub>2</sub>CuLi·CN sous azote à 73 K. Deux voies existent pour la préparation de l'intermédiaire :</p> <p>I - une solution de Me<sub>2</sub>CuLiI dissous dans du THF-<i>d</i><sub>8</sub> a été injectée dans un tube de RMN contenant le réactif 2-cyclohexénone dissous dans du THF-<i>d</i><sub>8</sub> à 73 K, afin d'obtenir un complexe.</p> <p>II – La seconde injection introduit une solution de cyanure de triméthylsilyle (TMSCN) dissous dans du THF-<i>d</i><sub>8</sub> pour induire la conversion du complexe précédemment formé en intermédiaire de Cu (III). La durée totale de l'expérience et la procédure employée pour l'acquisition des spectres ne sont pas mentionnées mais la partie expérimentale reprend les travaux précédents du même auteur. <sup>402</sup></p>	-
2008	Jones A. C. <i>et al.</i> <sup>404</sup>	360 MHz (Bruker Avance)	<sup>1</sup> H	THF/Me <sub>2</sub> O (1/3 v/v)	Réaction entre le tris(méthylsilyl)méthyllithium et différents aldéhydes	<p><b>Technique de Jones.</b> Les auteurs ont employé la même procédure qui a été développée par l'équipe en 2007. <sup>282</sup></p> <p>Les spectres de RMN <sup>1</sup>H ont été collectés avec un temps d'acquisition de 1 s sans délai entre l'acquisition des spectres suivants. Lorsque les vitesses des réactions étaient plus lentes, un délai plus long de 15 à 60 s a été sélectionné jusqu' à la fin des expériences. Ces expériences ont été effectuées à différentes températures : 142 K, 180 K et 186 K. L'objectif de cette étude a été de comprendre l'aspect mécanistique et cinétique des réactions étudiées.</p>	La vitesse de réaction dépend des aldéhydes employés et de la température : ~ de quelques dizaines de secondes à une heure

2009	Mix A. <i>et al.</i> 283	600 MHz (Bruker)	<sup>1</sup> H	CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>  1,2- Diméthoxyéth ane- <i>d</i> <sub>10</sub>	<p>Réaction du décaméthylsilicocène avec du H(OEt)<sub>2</sub><sup>+</sup>B(C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>)<sub>4</sub><sup>-</sup></p> <p>Réaction du pentaméthylcyclopentadi énylsilylénium Tétrakis(pentafluorophén yl)borate avec du cyclopentadiényl lithium</p>	<p><b>Technique de Mix.</b> Cette approche se différencie des autres techniques par le fait qu'elle est constituée d'un dispositif simple, permettant le mélange immédiat de deux réactifs dans la zone de la bobine à partir d'un tube coaxial à double chambre présentant deux compartiments distincts, un tube externe de 5 mm et d'un insert en verre de 3 mm. Ce dispositif permet de placer deux solutions de réactifs dans un même tube de RMN et favorise un réglage correct des conditions de réactions souhaitées. Les réactifs sont mélangés en dévissant manuellement l'insert depuis l'extérieur de l'aimant et en le soulevant au-dessus de la position des bobines. Pour garder l'étanchéité, le fond du tube de RMN de 5 mm a été rempli d'une petite goutte de silicone. Le soulèvement de l'insert se fait en 0,2 s permettant une homogénéité suffisante de la solution en seulement 1 s. Les expériences ont été testées sur des réactifs thermiquement instables à 223 K et 203 K respectivement. Une fois que la température souhaitée a été ajustée et avant d'initier la réaction, les procédures habituelles « lock », « accord de sonde » et « shims » sont appliquées et la solution initiale peut être vérifiée en enregistrant un spectre de RMN <sup>1</sup>H.</p>	Instantané
2010	Denmark S. E. <i>et al.</i> 284	500 - 600 MHz (Varian)	<sup>1</sup> H	CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	<p>Additions d'aldols asymétriques d'éthers de trichlorosilyl énol catalysées par une base de Lewis</p> <p>Ouverture d'époxyde catalysée par une base de Lewis avec du tétrachlorure de silicium (SiCl<sub>4</sub>)</p>	<p><b>Technique de Denmark.</b> L'appareil utilise une pompe en céramique pour injecter avec précision les solutions de réactifs dans un tube de RMN en rotation (20 Hz) de 5 à 10 mm contenant le substrat à l'intérieur de la sonde. Deux pompes pneumatiques sont utilisées pour contrôler la pointe de l'injecteur dans la solution et la ramener en position de repos indépendamment. La pointe et le tube de l'injecteur, fabriqués en titane, sont logés dans une gaine en polycarbonate qui guide l'injecteur dans le tube de RMN à l'intérieur du spectromètre de RMN. Une palette « en forme de S » sur la pointe de l'injecteur contenant trois orifices de distribution, injecte radialement les réactifs pour faciliter le mélange. Ces pièces sont coordonnées dans un module de</p>	Dépend du type de réactions étudiées : quelques minutes à 1 h 30 min

commande central de telle sorte qu'un volume prédéterminé puisse être distribué, tandis que la pointe de l'injecteur se déplace vers le haut/ou vers le bas du tube à des vitesses définies et indépendantes pour assurer un bon mélange. Après l'injection, la collecte des données commence simultanément. En fonction de l'aire des pics, la quantification de chaque espèce en solution peut être obtenue en présence d'un étalon interne. Un temps mort d'environ 3 s a été observé pour obtenir l'homogénéité de l'échantillon. Les expériences ont été réalisées à basses températures.

**Annexe 4 :** Tableau récapitulatif regroupant les travaux scientifiques retrouvés dans la littérature portant sur la surveillance des processus redox utilisant des cellules électrochimiques couplées à la spectroscopie de RMN (EC-RMN). Recherche effectuée jusqu'au 03/12/2021.

Auteur/année	Mode de couplage	RMN	Noyaux étudiés	Solvant	Réaction étudiée	Electrodes : de travail : Et de référence : ER contre-électrodes : CE	Caractéristiques	
							Avantages	Inconvénients
<b>Richards, J.A et al</b> 1975 <sup>294</sup>	« On-line »	60 MHz Varian A60A	<sup>1</sup> H	Méthanol/eau	Réduction trans-1-phényl-1--butèn-3-one	ET : Fil Pt/Hg ER : Pas applicable CE : Fil Pt	- Ne nécessite pas de modifier la sonde RMN	- Elargissement de la raie - Faible résolution - Utilisation du Hg
<b>Albert, K. et al</b> 1987 <sup>405</sup>	« On-line »	22.63 MHz WH-90 100,6 MHz Bruker WM 400	<sup>13</sup> C	CH <sub>3</sub> OH/CD <sub>3</sub> OD	Réduction du 2,4,6-tri-tert-butylphénol	ET : Fil Pt ER : Fil Ag/AgCl CE : C vitreux	- Absence d'élargissement de la raie	- Sonde flow-RMN - Consommation du solvant
<b>Mincey, D.W et al</b> 1990 <sup>406</sup>	« In-situ »	60 MHz varian A-60	<sup>1</sup> H	D <sub>2</sub> O	Réduction de la benzoquinone	ET : Film Sb-SnO <sub>2</sub> ER : Fil Ag/AgCl CE : Fil Ag	- Temps ~ (12 min) - Faible modification du champ magnétique	- Destruction du tube - Modification de la sonde RMN - Utilisation de Hg
<b>Sandifer, M.E et al</b> 1993 <sup>407</sup>	« In-situ »	400 MHz Bruker	<sup>1</sup> H	D <sub>2</sub> O	Susceptibilité paramagnétique de [Fe(CN)6] <sup>3-</sup> et [Fe(CN)6] <sup>4-</sup> réduction de la benzoquinone	ET : Fil Au ER : Calomel CE : Fil Au	- Faible modification du champ magnétique	- Positionnement <i>ex situ</i> de l'électrode de référence
<b>Penzler, P.D et al</b> 2000 <sup>408</sup>	« In-situ »	300 MHz Varian VXR	<sup>1</sup> H	D <sub>2</sub> O	Réduction benzoquinone	ET : Film Au ER : Capillaire Ag/AgCl CE : Cylindre Pt	- Faible modification du champ magnétique	- Processus de fabrication d'électrodes complexes - Temps ~ (2 h) - Tube RMN 10 mm
<b>Webster, R.D et al</b> 2004 <sup>409</sup>	« In-situ »	500 MHz Varian INOVA	<sup>1</sup> H	Acétonitrile- <i>d</i> <sub>3</sub>	Réduction 9-chloroanthracène, 9-bromoanthracène, 4-bromobenzophénone	ET : Film Au ER : Métal Ag CE : Maille Pt	- Convient pour l'analyse de routine	- Processus de fabrication d'électrodes complexes - Tube RMN 10 mm
<b>Klod, S et al</b> 2009 <sup>410</sup> <b>Application :</b> <sup>411</sup> , <sup>412</sup> , <sup>413</sup> , <sup>414</sup>	« In-situ »	500 MHz Bruker	<sup>1</sup> H <sup>13</sup> C	D <sub>2</sub> O	Réduction benzoquinone et oxydation de la phénacétine	ET : Microfibres C ER : Fil AgCl CE : Microfibres C	- Faible coût - Electrodes jetables - Facilité de développement	- Faible courant - Spécifique à certains analytes, Temps long ~ (6 h)

							- Présente moins d'interférences sur la largeur de raie que l'Au/Pt	
<b>Zhang, X et al 2011</b> 415	« <i>In-situ</i> »	250 MHz Bruker/Tecmag	<sup>1</sup> H	Acétonitrile- <i>d</i> <sub>3</sub>	Réduction de la 1,4-benzoquinone, de la 9-chloroanthracène et oxydation de l'acide cafféique	ET : Film mince Au ER : Ag/AgCl CE : Feuille Pt	- Rapport signal/bruit augmenté	- Processus de fabrication d'électrodes complexes
<b>Simon H et al 2012</b> 416	« <i>On-line</i> »	600 MHz Bruker Avance (II)	<sup>1</sup> H	Acétonitrile- <i>d</i> <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> O	Oxydation de l'acétaminophène (APAP)	ET : C vitreux ER : Pd CE : Non spécifié	- Détection très rapide des produits générés par oxydation	- Nécessite sonde flow RMN
<b>Bussy U et al 2013</b> 297 <b>Application : 417</b>	« <i>In-situ</i> »	400 MHz Bruker Avance (I)	<sup>1</sup> H	Acétonitrile- <i>d</i> <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> O	Oxydation phénacétine	ET : Microfibres C ER : Fil Pd CE : Microfibres C	- Présente moins d'interférences sur la largeur de raie que l'Au/Pt	- Processus de fabrication d'électrodes complexes
<b>Huang, L et al 2016</b> 418	« <i>In-situ</i> »	500 MHz Hybrid Bruker/P-B-G-CYJ-500	<sup>13</sup> C	D <sub>2</sub> O/H <sub>2</sub> O	Oxydation du glycérol	ET : C vitreux ER : Fil Pt CE : Plaque Pt	- Meilleure sensibilité pour détecter le <sup>13</sup> C	- Maîtrise de l'outillage complexe - La bobine est sensible au positionnement des fibres C - Temps long ~ (8 h)
<b>Sorte E-G. et al 2016</b> 419 <b>Application : 420</b>	« <i>In-situ</i> »	300 MHz Hybrid Bruker/Tecmag	<sup>1</sup> H <sup>13</sup> C	Acétonitrile- <i>d</i> <sub>3</sub>	Oxydoréduction du Ferrocène Oxydation du méthanol	ET : Au interdigitées ER : Fil Ag/AgCl CE : Au interdigitées	- Faible coût - Simple à construire compatible avec RMN à haute résolution - Utilisation avec sonde conventionnelle - Pas de perte de sensibilité Application : 420	- Pas simple d'utilisation - Marquage au <sup>13</sup> C
<b>Cao S-H et al 2017</b> 421	« <i>In-situ</i> »	500 MHz Argilent Technologies	<sup>1</sup> H	Acétonitrile- <i>d</i> <sub>3</sub>	Réduction benzoquinone	ET : Film Au ER : Fil Pt CE : Fil Pt	- Première mesure RMN liquide dépendant du potentiel « <i>in-situ</i> » - Réduit les interférences de mesure et améliore la capacité d'analyse électrochimique	- Processus de fabrication d'électrodes complexes
<b>Ni, Z-R et al 2017</b> 422	« <i>In-situ</i> »	500 MHz	<sup>1</sup> H	D <sub>2</sub> O	Réduction benzoquinone	ET : Fine pellicule d'Au ER : Fil Ag/AgCl	- champ radiofréquence (RF) uniforme	- Processus de fabrication

		Argilent Technologies				CE : Plaque Pt	- Augmente sensibilité de détection en RMN	d'électrodes complexes
<b>Zhang, X-P et al 2018</b> <sup>423</sup>	« <i>In-situ</i> »	500 MHz Varian Argilent Technologies	<sup>1</sup> H	Eau/DMSO	Oxydation de l'hydroquinone	ET : Film PAn/ITO RE : Fil Ag CE : Fil Pt	- Suivi quantitatif de produits formés - Améliore la capacité d'analyse électrochimique - Elimination des interférences	- Processus de fabrication d'électrodes complexes
<b>Cao S-H et al 2019</b> <sup>424</sup>	« <i>In-situ</i> »	500 MHz Bruker	<sup>1</sup> H	deutéroxyde	Oxydation d'alcool	ET : Oxyde d'étain fluoré ER : Fil Pd CE : Fil Pt	- Simple à construire et robuste - Peu de perte de sensibilité et de résolution - Améliore la capacité d'analyse électrochimique	- Electrolyse à potentiel constant
<b>da Silva P.F. et al 2019</b> <sup>425</sup> <b>Basé sur Richards, J.A et al 1975</b> <sup>294</sup> <b>sans configuration de flow</b>	« <i>In-situ</i> »	600 MHz Bruker	<sup>1</sup> H	D <sub>2</sub> O	Oxydation acide ascorbique	ET : Fil Pt ER : Fil Ag CE : Fil Pt	- Faible coût - Electrodes jetables - Construction facile - Pas besoin de modifier la sonde RMN	- Electrodes placées au-dessus de la région de détection
<b>Zhang, X-P. et al 2020</b> <sup>426</sup>	« <i>In-situ</i> »	600 MHz Bruker Avance HD (III)	<sup>1</sup> H	Eau	Oxydation de dopamine	ET : Au/PAn/ITO ER : Fil Ag CE : Fil Pt	- Améliore la capacité d'analyse électrochimique - Meilleure sensibilité et résolution - Meilleure compréhension des mécanismes	- Processus de fabrication d'électrodes complexes

**Annexe 5 :** Tableau récapitulatif regroupant les travaux scientifiques retrouvés dans la littérature portant sur la surveillance de diverses réactions utilisant l'approche « *on-line* » avec l'emploi d'une sonde standard. Recherche effectuée jusqu'au 03/12/2021.

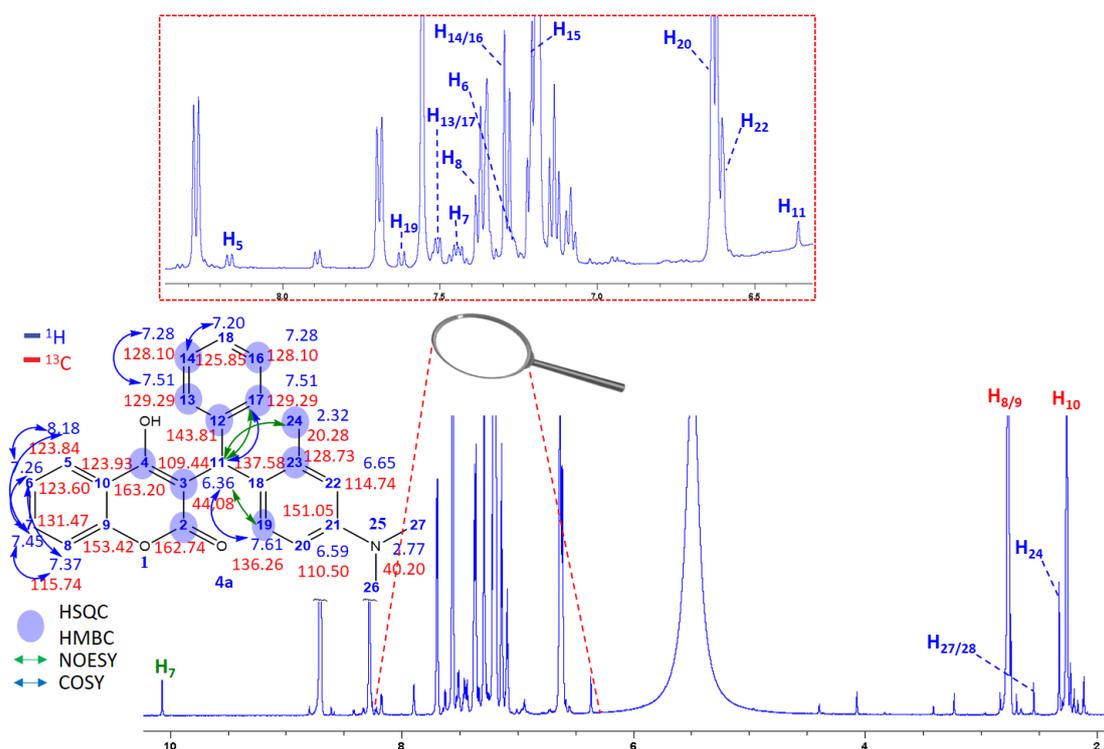
Année	Auteur	RMN	Noyaux étudiés	Solvant	Réaction étudiée	Mode de fonctionnement en RMN	Temps d'expérience
2005	Yushmanov P. V. <i>et al.</i> <sup>266</sup>	300 MHz (Bruker AMX)	<sup>1</sup> H	H <sub>2</sub> O/éthanol H <sub>2</sub> O/éthylène glycol	Visualisation des échanges de protons labiles entre l'eau et l'éthanol Etude du comportement de la D-alanine en fonction du pH	Evaluation d'une conception « <i>stopped-flow</i> » pour une cinétique rapide (10 <sup>-2</sup> – 10 s) d'un mélange de deux liquides.	H <sub>2</sub> O/éthanol : 10 min
2010	Khajeh M. <i>et al.</i> <sup>427</sup>	300 MHz (Varian INOVA)	<sup>1</sup> H	D <sub>2</sub> O THF/acide acétique	Réaction homogène : réaction de transésterification entre le 2-méthoxyphényl acétate et la phanyléthylamine Réaction hétérogène : amination réductrice d'un aldéhyde entre benzylamine et <i>p</i> -tolualdéhyde en condition non-deutérée (No-D)	Cellule d'écoulement appliquée sur un tube de RMN 5 mm ne nécessitant pas de sonde personnalisée, conçue pour une utilisation « <i>continuous-flow</i> » ou « <i>stopped-flow</i> ». Ce concept ne permet pas d'étudier des réactions sur des échelles de temps inférieures à la minute. La cuve de réaction située à l'extérieur de l'aimant permet de modifier la composition de l'échantillon à tout moment au cours de l'expérience avec un mélange de réactifs mis en circulation par un système basse pression. L'ensemble des expériences a été acquis à 293 K.	Réaction homogène : ~ 5 h Réaction hétérogène : ~ 2 h
2013	Foley D. A. <i>et al.</i> <sup>428</sup>	400 MHz (Varian)	<sup>19</sup> F	Méthanol/acétonitrile (50/50 v/v)	Réaction de l'aniline avec du 4-fluorobenzaldéhyde pour un processus de développement pharmaceutique	Combinaison de la spectroscopie de RMN, et de la HPLC. La surveillance de la réaction a été effectuée en faisant circuler un flux du mélange de la réaction vers une cellule à écoulement modifiée dans la bobine de RMN. La cellule à écoulement a été conçue pour être utilisée avec n'importe quel aimant et sonde de RMN ordinaires. Pour cela 5,59 mmol du 4-fluorobenzaldéhyde ont été dissous dans 85 ml d'un mélange de méthanol/acétonitrile (50:50) dans un récipient de 100 ml. 0,59 mmol d'aniline ont ensuite été ajoutées en une seule fois. Un débit plus lent de 3 à 4 ml/min était	~ 28 h

						nécessaire pour assurer un temps de séjour suffisant de l'échantillon dans la région de la sonde de RMN. Les spectres de RMN $^{19}\text{F}$ ont été acquis « sans lock », à des intervalles de 5 min pour les deux premières heures et à des intervalles de 15 min pour le reste de la réaction. Chaque spectre avait un temps d'Acqu = 123 s et comprenait NS = 4 et $d_1 = 30$ s. L'ensemble des expériences a été effectué à 298 K.	
2014	Foley D. A. <i>et al.</i> <sup>264</sup>	400 MHz (Bruker Avance III)	$^1\text{H}$	Acétonitrile- $d_3$	Réaction de la 1,4-benzènediamine avec l'isobutyraldéhyde en condition non-deutérée (No-D)	De l'acétonitrile anhydre (45 ml) a été chargée dans un récipient de 50 ml et de la <i>p</i> -phénylènediamine (4,6 mmol) a été ajoutée. La température a été réglée à 293 K dans tout le système et le mélange réactionnel a été mis en circulation pendant 10 min pour permettre à la solution de s'équilibrer en termes de température et de concentration. Un spectre de RMN $^1\text{H}$ de la solution circulant dans la cellule à écoulement a été enregistré pour établir la concentration initiale de la <i>p</i> -phénylènediamine. Les spectres de RMN $^1\text{H}$ ont été enregistrés à des intervalles de 1,5 min entre les acquisitions pendant les 15 premières minutes. Cet intervalle de temps a ensuite été augmenté à 10,5 min puis à 20,5 min pour le reste de la surveillance de la réaction avec NS = 2, Acqu = 4s et $d_1 = 10$ s.	47 h
2015	Drexler M. T. <i>et al.</i> <sup>429</sup>	400 MHz (Varian)	$^1\text{H}$	THF	Addition nucléophile d'analogues de benzimidazole à un sel de pyridinium	Combinaison de la spectroscopie de RMN et spectroscopie Infra-Rouge (IR). Le mélange réactionnel a été transféré du récipient de réaction vers la zone de détection de la bobine à un débit de 3 ml/min. Les spectres de RMN ont été acquis à des intervalles de 70 s. Chaque acquisition comprenait NS = 4 et $t_1 = 10$ s. Le THF (20 ml) a été chargé dans un récipient de réaction de 50 ml et la	~ 6 h

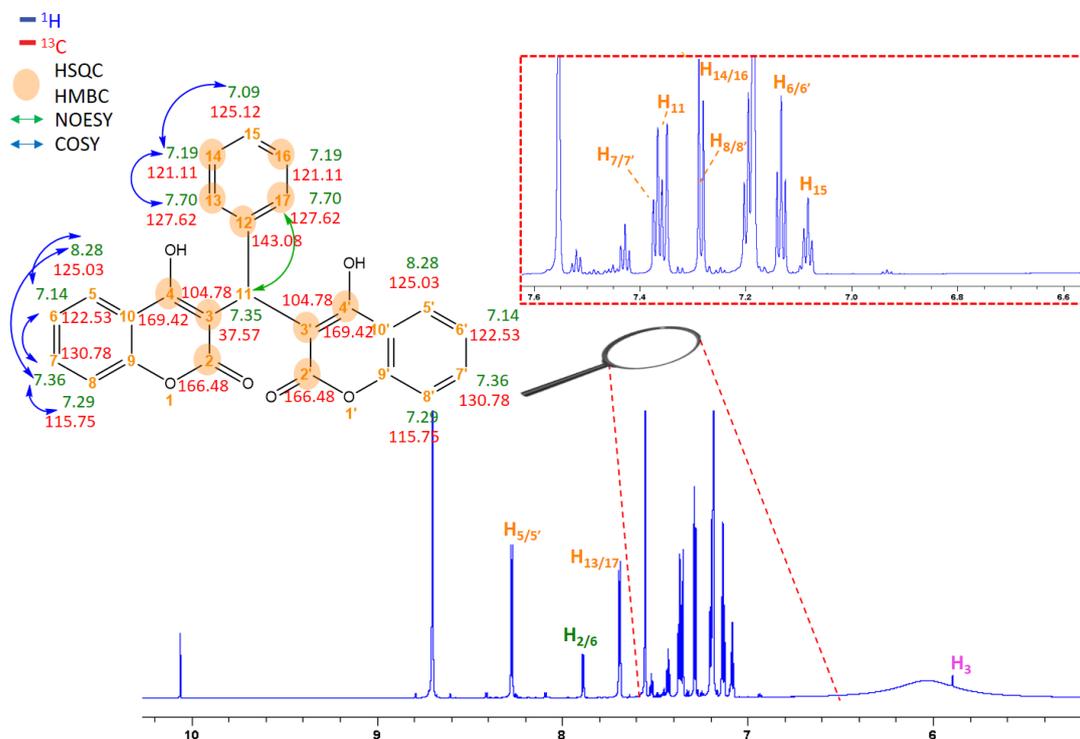
				température a été refroidie à 253 K. 9,60 mmol de 1-benzylbenzimidazole ont été ajoutés et la solution a été mise en circulation autour de la boucle d'échantillonnage. Ensuite, 2,0 mmol de LDA dissout dans 5,8 ml d'une solution de THF/heptane/éthylbenzène ont été ajoutés à un débit de 0,5 ml/min. L'avancement de la réaction a été suivi par RMN <sup>1</sup> H. 9,62 mmol de sel de pyridinium ont été dissous dans 10 ml de THF et la solution résultante a été ajoutée au mélange réactionnel à un débit de 1,0 ml/min. Cette étape est suivie par RMN et IR.		
Dunn A. L. <i>et al.</i> <sup>430</sup>	400 MHz	<sup>1</sup> H	Acétonitrile/ acétonitrile- <i>d</i> <sub>3</sub>	Compréhension mécanistique de la synthèse d'un ingrédient pharmaceutique actif (API) : réaction de l'acide 3-méthylpentanoïque et de l'acide de Meldrum en présence de chlorure de pivaloyle	Les auteurs ont repris le système de RMN « <i>on-line</i> » décrit par Foley D.A. <i>et al.</i> <sup>428</sup> L'acide 3-méthylpentanoïque, l'acide de Meldrum et le 1-méthylimidazole ont été dissous dans de l'acétonitrile- <i>d</i> <sub>3</sub> dans un récipient de réaction de 50 ml. La solution réactionnelle a été mise en circulation dans tout le système pour assurer l'équilibre de la température à 298 K. Le chlorure de pivaloyle a ensuite été ajouté à l'aide d'une seringue au bout de 10 min, tandis que le système circulait à un débit de 3 ml/min. Les spectres de RMN <sup>1</sup> H ont été acquis avec NS = 4, <i>d</i> <sub>1</sub> = 10 μs à des intervalles de 2 min pour les 20 premiers spectres, à des intervalles de 6 min jusqu'à ce que le temps de réaction atteigne 185 min, puis à des intervalles de 16 min jusqu'à la fin de la réaction. Ces travaux ont permis de découvrir de nouveaux détails sur la transformation synthétique. Des preuves concluantes ont aidé à identifier de nouveaux intermédiaires réactifs.	5 h

2018	Chen X. <i>et al.</i> 431	600 MHz – 119 MHz (Bruker Avance HD III)	<sup>1</sup> H <sup>29</sup> Si	THF- <i>d</i> <sub>8</sub> /THF (65/35, w/w)	Réactions d'hydrolyse et de condensation du méthyltriméthoxysilane (MTMS) et du phényltriméthoxysilane (PTMS)	<p>Combinaison de la spectroscopie de RMN, spectroscopie Raman et spectroscopie infra-rouge (IR) pour suivre simultanément la même réaction. La cellule d'écoulement et la boucle de recirculation ont été rincées préalablement avec du THF avant chaque expérience. Le volume total de THF dans la boucle s'est avéré être d'environ 7 ml, ce qui a été considéré comme faisant partie du mélange réactionnel. Une fois que le THF-<i>d</i><sub>8</sub> et les silanes (PTMS et MTMS) ont été ajoutés au réacteur, tout le contenu a été mis en circulation jusqu'à ce que la composition devienne homogène. Le débit a été fixé à 2 ml/min. La longueur totale du tube capillaire depuis le réacteur à la cellule de RMN et de son retour au réacteur a été d'environ 6 m. A ce stade, une surveillance continue par toutes les techniques analytiques a été lancée. Une solution d'acide acétique a ensuite été introduite dans le réacteur pendant une heure à l'aide d'une pompe à seringue à un débit constant. Les spectres de RMN <sup>1</sup>H ont été acquis avec Acq = 1,5 s, NS = 1. Les spectres 2D HMBC <sup>1</sup>H-<sup>29</sup>Si ont été acquis successivement pour suivre les espèces formées dans la réaction d'hydrolyse. Les données ont été acquises avec 1k points en <i>F</i><sub>2</sub> et 128 point en <i>F</i><sub>1</sub> et NS = 2. Les techniques analytiques multiples et simultanées décrites dans cette étude sont complémentaires et ont permis une analyse chimique sensiblement plus robuste. En apportant des informations supplémentaires, elles ont permis de caractériser des espèces qui étaient insolubles et donc non observables par l'utilisation d'une seule technique.</p>	~ 4 h
------	------------------------------	---	------------------------------------	--	---	---	-------

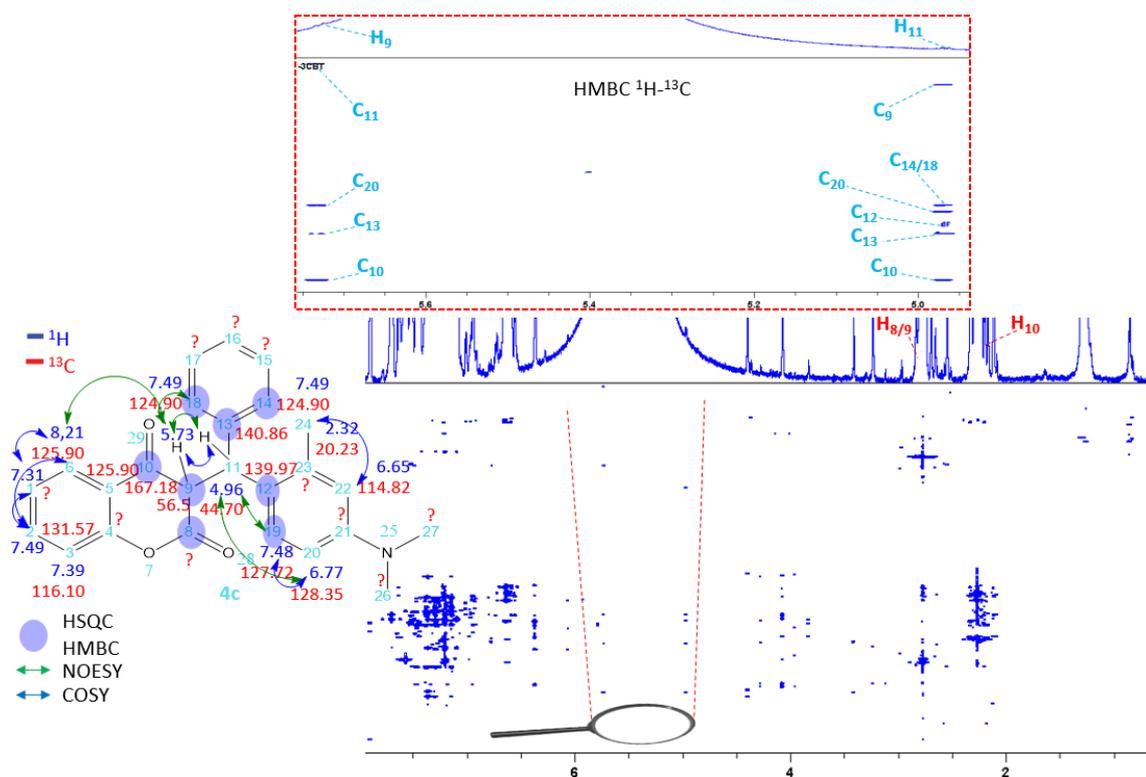
Annexe 6 : Elucidation structurale des structures secondaires issus de la réaction organique dans la pyridine- $d_5$ .



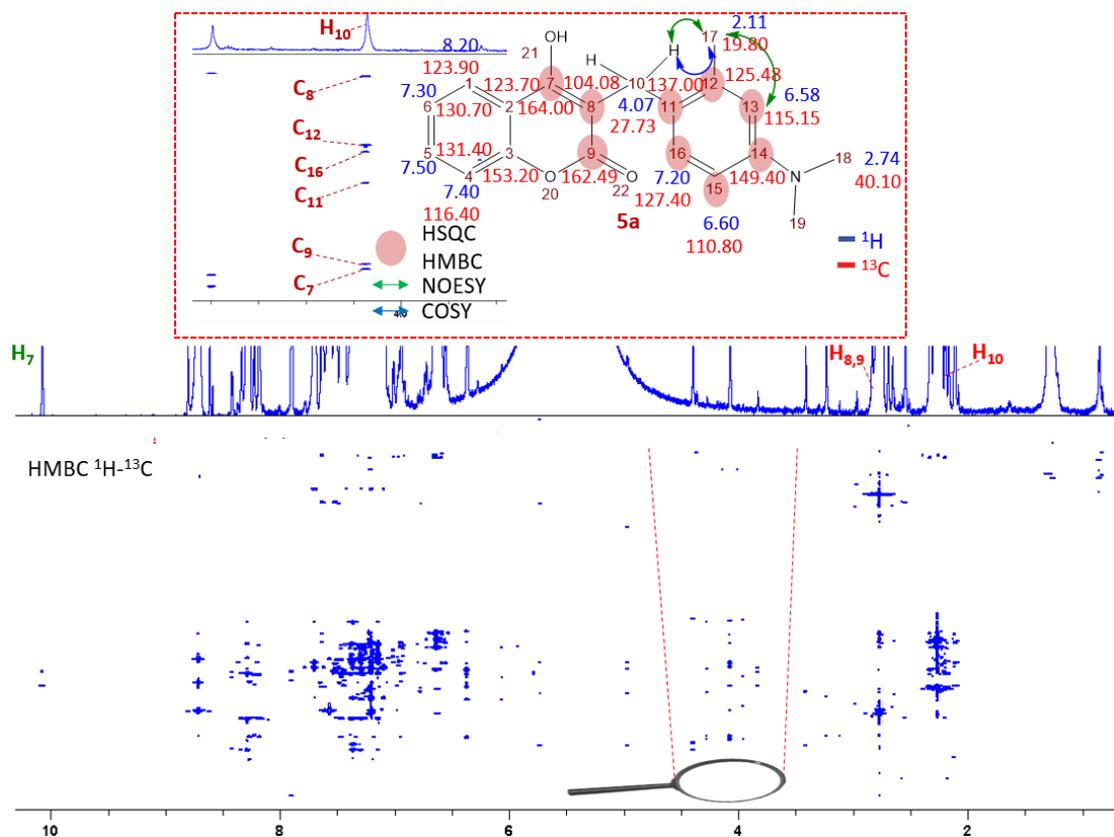
SI. 1. Elucidation structurale du produit final (4a) à partir des expériences 2D conventionnelles du mélange des trois réactifs : 4-hydroxycoumarine (20 mM), benzaldéhyde (20 mM) et *N,N*-diméthyl-*m*-toluidine (20 mM) dans la pyridine- $d_5$ , à 298 K, à 950 MHz ( $^1\text{H}$ ). Les cercles bleus correspondent aux taches de corrélations visibles depuis le proton central  $\text{H}_{11}$ .



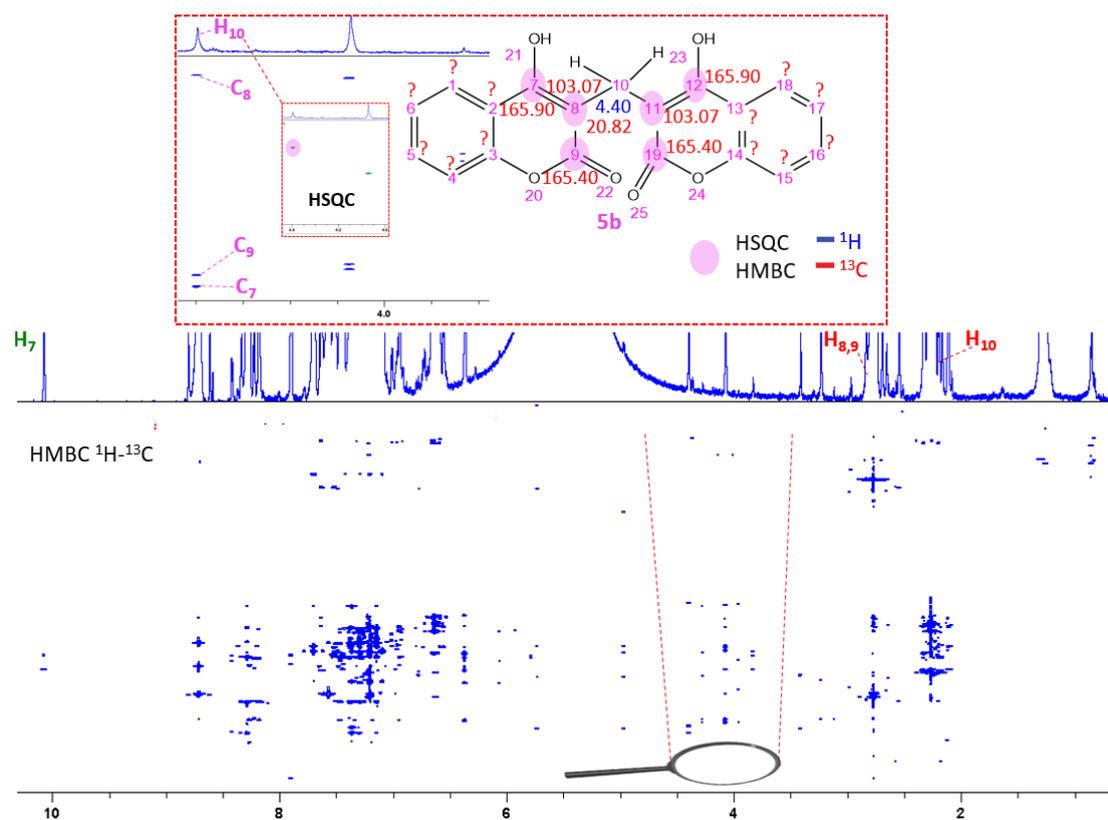
SI. 2. Elucidation structurale du dimère de coumarine benzylé (4b) à partir des expériences 2D conventionnelles du mélange des deux réactifs : 4-hydroxycoumarine (20 mM) et benzaldéhyde (20 mM) dans la pyridine- $d_5$ , à 298 K, à 950 MHz. Les cercles orange correspondent aux taches de corrélations visibles depuis le proton central  $\text{H}_{11}$ .



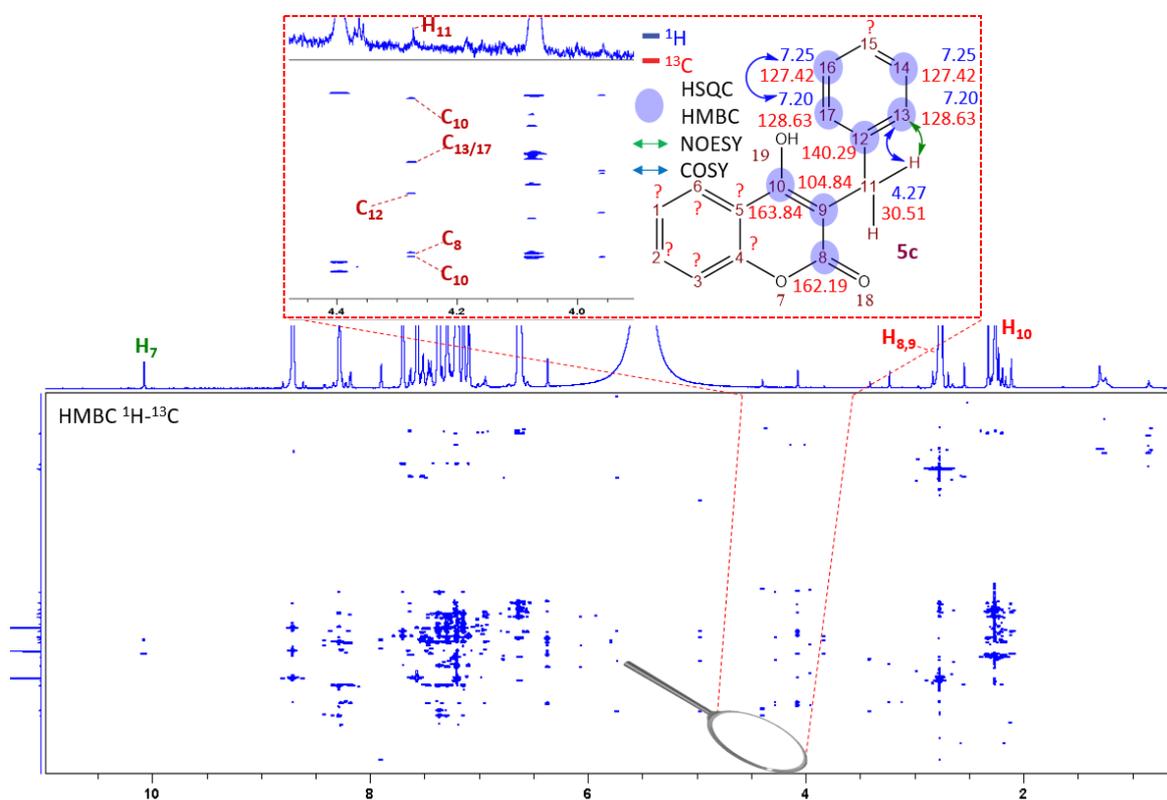
SI. 3. Elucidation structurale du sous-produit (4c) à partir des expériences 2D conventionnelles du mélange des trois réactifs : 4-hydroxycoumarine (20 mM), benzaldéhyde (20 mM) et *N,N*-diméthyl-*m*-toluidine (20 mM) dans la pyridine-*d*<sub>5</sub>, à 298 K, à 950 MHz. Les cercles bleus correspondent aux taches de corrélations visibles depuis le proton central  $\text{H}_{11}$ .



SI. 4. Elucidation structurale du sous-produit (5a) à partir des expériences 2D conventionnelles du mélange des trois réactifs : 4-hydroxycoumarine (20 mM), benzaldéhyde (20 mM) et *N,N*-diméthyl-*m*-toluidine (20 mM) dans de la pyridine-*d*<sub>5</sub>, à 298 K, à 950 MHz ( $^1\text{H}$ ). Les cercles marrons correspondent aux taches de corrélations visibles depuis le proton central  $\text{H}_{10}$ .



SI. 5. Elucidation structurale du dimère de coumarine (5b) à partir des expériences 2D conventionnelles du mélange des trois réactifs : 4-hydroxycoumarine (20 mM), benzaldéhyde (20 mM) et *N,N*-diméthyl-*m*-toluidine (20 mM) dans de la pyridine- $d_5$ , à 298 K, à 950 MHz. Les cercles roses correspondent aux taches de corrélations visibles depuis le proton central  $\text{H}_{10}$ .



SI. 6. Elucidation structurale de la coumarine benzylée (5c) à partir des expériences 2D conventionnelles du mélange des trois réactifs : 4-hydroxycoumarine (20 mM), benzaldéhyde (20 mM) et *N,N*-diméthyl-*m*-toluidine (20 mM) dans la pyridine- $d_5$ , à 298 K, à 950 MHz ( $^1\text{H}$ ). Les cercles marrons correspondent aux taches de corrélations visibles depuis le proton central  $\text{H}_{11}$ .

## BIBLIOGRAPHIE

1. Hubert, J.; Nuzillard, J.-M.; Purson, S.; Hamzaoui, M.; Borie, N.; Reynaud, R.; Renault, J.-H., Identification of Natural Metabolites in Mixture: A Pattern Recognition Strategy Based on <sup>13</sup>C NMR. *Analytical chemistry* **2014**, *86* (6), 2955-2962.
2. Wolfender, J.-L.; Nuzillard, J.-M.; van der Hoof, J. J. J.; Renault, J.-H.; Bertrand, S., Accelerating Metabolite Identification in Natural Product Research: Toward an Ideal Combination of Liquid Chromatography–High-Resolution Tandem Mass Spectrometry and NMR Profiling, in Silico Databases, and Chemometrics. *Analytical chemistry* **2019**, *91* (1), 704-742.
3. Spraul, M.; Freund, A. S.; Nast, R. E.; Withers, R. S.; Maas, W. E.; Corcoran, O., Advancing NMR Sensitivity for LC-NMR-MS Using a Cryoflow Probe: Application to the Analysis of Acetaminophen Metabolites in Urine. *Analytical chemistry* **2003**, *75* (6), 1536-1541.
4. Corcoran, O.; Spraul, M., LC–NMR–MS in drug discovery. *Drug Discovery Today* **2003**, *8* (14), 624-631.
5. Godejohann, M.; Tseng, L.-H.; Braumann, U.; Fuchser, J.; Spraul, M., Characterization of a paracetamol metabolite using on-line LC-SPE-NMR-MS and a cryogenic NMR probe. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1058* (1), 191-196.
6. Morris, K. F.; Johnson, C. S., Diffusion-ordered two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114* (8), 3139-3141.
7. Morris, K. F.; Johnson, C. S., Resolution of discrete and continuous molecular size distributions by means of diffusion-ordered 2D NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115* (10), 4291-4299.
8. Morris, K. F.; Stilbs, P.; Johnson, C. S., Analysis of mixtures based on molecular size and hydrophobicity by means of diffusion-ordered 2D NMR. *Analytical chemistry* **1994**, *66* (2), 211-215.
9. Kiraly, P.; Kern, N.; Plesniak, M. P.; Nilsson, M.; Procter, D. J.; Morris, G. A.; Adams, R. W., Single-Scan Selective Excitation of Individual NMR Signals in Overlapping Multiplets. *Angewandte Chemie International Edition* **2021**, *60* (2), 666-669.
10. Dong, C.; Xu, Z.; Wen, L.; He, S.; Wu, J.; Deng, Q.-H.; Zhao, Y., Tailoring Sensors and Solvents for Optimal Analysis of Complex Mixtures Via Discriminative <sup>19</sup>F NMR Chemosensing. *Analytical chemistry* **2021**, *93* (5), 2968-2973.
11. Barbosa, T. M.; Castañar, L.; Moutzouri, P.; Nilsson, M.; Morris, G. A.; Rittner, R.; Tormena, C. F., Improving the Sensitivity of FESTA Methods for the Analysis of Fluorinated Mixtures. *Analytical chemistry* **2020**, *92* (2), 2224-2228.
12. Dal Poggetto, G.; Castañar, L.; Adams, R. W.; Morris, G. A.; Nilsson, M., Dissect and Divide: Putting NMR Spectra of Mixtures under the Knife. *Journal of the American Chemical Society* **2019**, *141* (14), 5766-5771.
13. Dal Poggetto, G.; Castañar, L.; Adams, R. W.; Morris, G. A.; Nilsson, M., Relaxation-encoded NMR experiments for mixture analysis: REST and beer. *Chemical Communications* **2017**, *53* (54), 7461-7464.
14. Moutzouri, P.; Chen, Y.; Foroozandeh, M.; Kiraly, P.; Phillips, A. R.; Coombes, S. R.; Nilsson, M.; Morris, G. A., Ultraclean pure shift NMR. *Chemical Communications* **2017**, *53* (73), 10188-10191.
15. Moutzouri, P.; Kiraly, P.; Phillips, A. R.; Coombes, S. R.; Nilsson, M.; Morris, G. A., Clearing the undergrowth: detection and quantification of low level impurities using <sup>19</sup>F NMR. *Chemical Communications* **2017**, *53* (1), 123-125.
16. Moutzouri, P.; Kiraly, P.; Phillips, A. R.; Coombes, S. R.; Nilsson, M.; Morris, G. A., <sup>13</sup>C Satellite-Free <sup>1</sup>H NMR Spectra. *Analytical chemistry* **2017**, *89* (22), 11898-11901.
17. Caldarelli, S.; Yemloul, M., Chapter One - Multiple-Quantum NMR Studies on Molecular Mixtures. In *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, Webb, G. A., Ed. Academic Press: 2016; Vol. 87, pp 1-39.
18. Manjunatha Reddy, G. N.; Mannina, L.; Sobolev, A. P.; Caldarelli, S., Polyphenols Fingerprinting in Olive Oils Through Maximum-Quantum NMR Spectroscopy. *Food Anal. Methods* **2018**, *11* (4), 1012-1020.

19. Yemloul, M.; Adyatmika, I. M.; Caldarelli, S.; Ollivier, D.; Campredon, M., Rapid characterization of cocaine in illicit drug samples by 1D and 2D NMR spectroscopy. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2018**, *410* (21), 5237-5244.
20. Reddy, G. N. M.; Caldarelli, S., Maximum-quantum (MaxQ) NMR for the speciation of mixtures of phenolic molecules. *Chemical Communications* **2011**, *47* (14), 4297-4299.
21. Reddy, G. N. M.; Caldarelli, S., Identification and quantification of EPA 16 priority polycyclic aromatic hydrocarbon pollutants by Maximum-Quantum NMR. *The Analyst* **2012**, *137* (3), 741-746.
22. Manjunatha Reddy, G. N.; Caldarelli, S., Improved excitation uniformity in multiple-quantum NMR experiments of mixtures. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2013**, *51* (4), 240-244.
23. Kupče, Ě.; Claridge, T. D. W., NOAH: NMR Supersequences for Small Molecule Analysis and Structure Elucidation. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2017**, *56* (39), 11779-11783.
24. Kupče, Ě.; Sørensen, O. W., 2BOB – extracting an H2BC and an HSQC-type spectrum from the same data set, and H2OBC – a fast experiment delineating the protonated <sup>13</sup>C backbone. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2017**, *55* (6), 515-518.
25. Kupče, Ě.; Claridge, T. D. W., Molecular structure from a single NMR supersequence. *Chemical Communications* **2018**, *54* (52), 7139-7142.
26. Claridge, T. D. W.; Mayzel, M.; Kupče, Ě., Triplet NOAH supersequences optimised for small molecule structure characterisation. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2019**, *57* (11), 946-952.
27. Kupče, Ě.; Claridge, T. D. W., New NOAH modules for structure elucidation at natural isotopic abundance. *Journal of magnetic resonance* **2019**, *307*, 106568.
28. Rao Kakita, V. M.; Hosur, R. V., All-in-one NMR spectroscopy of small organic molecules: complete chemical shift assignment from a single NMR experiment. *RSC Advances* **2020**, *10* (36), 21174-21179.
29. Hansen, A. L.; Kupče, E. r.; Li, D.-W.; Bruschiweiler-Li, L.; Wang, C.; Brüschweiler, R., 2D NMR-Based Metabolomics with HSQC/TOCSY NOAH Supersequences. *Analytical chemistry* **2021**, *93* (15), 6112-6119.
30. Mansfield, P., Spatial mapping of the chemical shift in NMR. *Magnetic Resonance in Medicine* **1984**, *1* (3), 370-386.
31. Shrot, Y.; Shapira, B.; Frydman, L., Ultrafast 2D NMR spectroscopy using a continuous spatial encoding of the spin interactions. *Journal of magnetic resonance* **2004**, *171* (1), 163-170.
32. Giraudeau, P.; Frydman, L., Ultrafast 2D NMR: An Emerging Tool in Analytical Spectroscopy. *Annual Review of Analytical Chemistry* **2014**, *7* (1), 129-161.
33. Gal, M.; Frydman, L., Multidimensional NMR spectroscopy in a single scan. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2015**, *53* (11), 971-985.
34. Dumez, J.-N., Spatial encoding and spatial selection methods in high-resolution NMR spectroscopy. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2018**, *109*, 101-134.
35. Gouilleux, B.; Rouger, L.; Giraudeau, P., Chapter Two - Ultrafast 2D NMR: Methods and Applications. In *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, Webb, G. A., Ed. Academic Press: 2018; Vol. 93, pp 75-144.
36. Herrera, A.; Fernández-Valle, E.; Martínez-Álvarez, R.; Molero, D.; Pardo, Z. D.; Sáez, E.; Gal, M., Real-Time Monitoring of Organic Reactions with Two-Dimensional Ultrafast TOCSY NMR Spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48* (34), 6274-6277.
37. Herrera, A.; Fernández-Valle, E.; Gutiérrez, E. M.; Martínez-Álvarez, R.; Molero, D.; Pardo, Z. D.; Sáez, E., 2D Ultrafast HMBC: A Valuable Tool for Monitoring Organic Reactions. *Organic Letters* **2010**, *12* (1), 144-147.
38. Pardo, Z. D.; Olsen, G. L.; Fernández-Valle, M. E.; Frydman, L.; Martínez-Álvarez, R.; Herrera, A., Monitoring mechanistic details in the synthesis of pyrimidines via real-time, ultrafast multidimensional NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (5), 2706-2715.
39. Queiroz Jr, L. H. K.; Giraudeau, P.; dos Santos, F. A. B.; de Oliveira, K. T.; Ferreira, A. G., Real-time mechanistic monitoring of an acetal hydrolysis using ultrafast 2D NMR. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2012**, *50* (7), 496-501.
40. Fernández-Valle, M. E.; Martínez-Álvarez, R.; Molero-Vílchez, D.; Pardo, Z. D.; Sáez-Barajas, E.; Herrera, A., 2D Ultrafast HMBC 1H,31P: Obtaining Mechanistic Details on the Michaelis–Arbuzov Reaction. *The Journal of organic chemistry* **2015**, *80* (2), 799-805.

41. Herrera, A.; Fernández-Valle, E.; Martínez-Álvarez, R.; Molero-Vílchez, D.; Pardo-Botero, Z. D.; Sáez-Barajas, E., Monitoring organic reactions by UF-NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2015**, *53* (11), 952-970.
42. Jacquemmoz, C.; Giraud, F.; Dumez, J. N., Online reaction monitoring by single-scan 2D NMR under flow conditions. *The Analyst* **2020**, *145* (2), 478-485.
43. Williamson, M. P.; Williams, D. H., Manipulation of the nuclear overhauser effect by the use of a viscous solvent: the solution conformation of the antibiotic echinomycin. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1981**, (4), 165-166.
44. Simpson, A. J.; Woods, G.; Mehrzad, O., Spectral Editing of Organic Mixtures into Pure Components Using NMR Spectroscopy and Ultraviscous Solvents. *Analytical chemistry* **2008**, *80* (1), 186-194.
45. Farooq, H.; Soong, R.; Courtier-Murias, D.; Anklin, C.; Simpson, A., Tailoring 1H Spin Dynamics in Small Molecules via Supercooled Water: A Promising Approach for Metabolite Identification and Validation. *Analytical chemistry* **2012**, *84* (15), 6759-6766.
46. Lameiras, P.; Boudesocque, L.; Mouloungui, Z.; Renault, J.-H.; Wieruszkeski, J.-M.; Lippens, G.; Nuzillard, J.-M., Glycerol and glycerol carbonate as ultraviscous solvents for mixture analysis by NMR. *Journal of Magnetic Resonance* **2011**, *212* (1), 161-168.
47. Lameiras, P.; Nuzillard, J.-M., Highly Viscous Binary Solvents: DMSO-d<sub>6</sub>/Glycerol and DMSO-d<sub>6</sub>/Glycerol-d<sub>8</sub> for Polar and Apolar Mixture Analysis by NMR. *Analytical Chemistry* **2016**, *88* (8), 4508-4515.
48. Lameiras, P.; Patis, S.; Jakhilal, J.; Castex, S.; Clivio, P.; Nuzillard, J.-M., Small Molecule Mixture Analysis by Heteronuclear NMR under Spin Diffusion Conditions in Viscous DMSO–Water Solvent. *Chemistry – A European Journal* **2017**, *23* (20), 4923-4928.
49. Naanaa, W.; Nuzillard, J.-M., Blind source separation of positive and partially correlated data. *Signal Processing* **2005**, *85* (9), 1711-1722.
50. Toumi, I.; Torrèسانی, B.; Caldarelli, S., Effective Processing of Pulse Field Gradient NMR of Mixtures by Blind Source Separation. *Analytical chemistry* **2013**, *85* (23), 11344-11351.
51. Kuhn, S.; Wieske, L. H. E.; Trevorrow, P.; Schober, D.; Schlörner, N. E.; Nuzillard, J.-M.; Kessler, P.; Junker, J.; Herráez, A.; Farès, C.; Erdélyi, M.; Jeannerat, D., NMReDATA: Tools and applications. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2021**, *59* (8), 792-803.
52. Wist, J., Complex mixtures by NMR and complex NMR for mixtures: experimental and publication challenges. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2017**, *55* (1), 22-28.
53. Nielsen, J.; Oliver, S., The next wave in metabolome analysis. *Trends Biotechnol.* **2005**, *23* (11), 544-546.
54. Wei, F.; Furihata, K.; Hu, F.; Miyakawa, T.; Tanokura, M., Complex mixture analysis of organic compounds in green coffee bean extract by two-dimensional NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2010**, *48* (11), 857-865.
55. Foley, D. A.; Dunn, A. L.; Zell, M. T., Reaction monitoring using online vs tube NMR spectroscopy: seriously different results. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2016**, *54* (6), 451-456.
56. Kaplan, J. M.; Hruszkewycz, D. P.; Strambeanu, I. I.; Nunn, C. J.; Vangelder, K. F.; Dunn, A. L.; Wozniak, D. I.; Dobreiner, G. E.; Leitch, D. C., Scalable and Chemoselective Synthesis of  $\hat{I}$ -Keto Esters and Acids via Pd-Catalyzed Carbonylation of Cyclic  $\beta$ -Chloro Enones. *Organometallics* **2019**, *38* (1), 85-96.
57. Bingol, K.; Brüscheweiler, R., Multidimensional Approaches to NMR-Based Metabolomics. *Analytical chemistry* **2014**, *86* (1), 47-57.
58. Liu, M.; Nicholson, J. K.; Lindon, J. C., High-Resolution Diffusion and Relaxation Edited One- and Two-Dimensional 1H NMR Spectroscopy of Biological Fluids. *Analytical chemistry* **1996**, *68* (19), 3370-3376.
59. McKenzie, J. S.; Donarski, J. A.; Wilson, J. C.; Charlton, A. J., Analysis of complex mixtures using high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and chemometrics. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2011**, *59* (4), 336-359.
60. Novoa-Carballal, R.; Fernandez-Megia, E.; Jimenez, C.; Riguera, R., NMR methods for unravelling the spectra of complex mixtures. *Natural Product Reports* **2011**, *28* (1), 78-98.
61. van Duynhoven, J.; van Velzen, E.; Jacobs, D. M., Chapter Three - Quantification of Complex Mixtures by NMR. In *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, Webb, G. A., Ed. Academic Press: 2013; Vol. 80, pp 181-236.

62. Tang, H.; Wang, Y.; Nicholson, J. K.; Lindon, J. C., Use of relaxation-edited one-dimensional and two dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy to improve detection of small metabolites in blood plasma. *Anal. Biochem.* **2004**, *325* (2), 260-272.
63. Sandusky, P.; Raftery, D., Use of Selective TOCSY NMR Experiments for Quantifying Minor Components in Complex Mixtures: Application to the Metabonomics of Amino Acids in Honey. *Analytical chemistry* **2005**, *77* (8), 2455-2463.
64. Sandusky, P.; Appiah-Amponsah, E.; Raftery, D., Use of optimized 1D TOCSY NMR for improved quantitation and metabolomic analysis of biofluids. *Journal of Biomolecular NMR* **2011**, *49* (3), 281-290.
65. Lyu, Z.; Gao, F.-e.; Wen, L.; Shi, K.; Ma, M.; Li, C.; Wang, Y.; Qiao, Y., DOSY Plus Selective TOCSY: An Efficient NMR Combination for Analyzing Hydrogenation/Hydrogenolysis Mixtures of Biomass-Derived Platform Compounds. *Energy & Fuels* **2018**, *32* (3), 3551-3558.
66. Sandusky, P.; Raftery, D., Use of Semiselective TOCSY and the Pearson Correlation for the Metabonomic Analysis of Biofluid Mixtures: Application to Urine. *Analytical chemistry* **2005**, *77* (23), 7717-7723.
67. Dal Poggetto, G.; Castañar, L.; Morris, G. A.; Nilsson, M., A new tool for NMR analysis of complex systems: selective pure shift TOCSY. *RSC Advances* **2016**, *6* (102), 100063-100066.
68. Consonni, R.; Cagliani, L. R.; Benevelli, F.; Spraul, M.; Humpfer, E.; Stocchero, M., NMR and Chemometric methods: A powerful combination for characterization of Balsamic and Traditional Balsamic Vinegar of Modena. *Analytica Chimica Acta* **2008**, *611* (1), 31-40.
69. Stonehouse, J.; Adell, P.; Keeler, J.; Shaka, A. J., Ultrahigh-Quality NOE Spectra. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116* (13), 6037-6038.
70. Stott, K.; Stonehouse, J.; Keeler, J.; Hwang, T.-L.; Shaka, A. J., Excitation Sculpting in High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Application to Selective NOE Experiments. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117* (14), 4199-4200.
71. Stott, K.; Keeler, J.; Van, Q. N.; Shaka, A. J., One-Dimensional NOE Experiments Using Pulsed Field Gradients. *Journal of magnetic resonance* **1997**, *125* (2), 302-324.
72. Lameiras, P.; Mougeolle, S.; Pedinielli, F.; Nuzillard, J.-M., Polar mixture analysis by NMR under spin diffusion conditions in viscous sucrose solution and agarose gel. *Faraday Discussions* **2019**, *218* (0), 233-246.
73. Pedinielli, F.; Nuzillard, J.-M.; Lameiras, P., Mixture Analysis in Viscous Solvents by NMR spin diffusion spectroscopy: ViscY. Application to High- and Low-polarity Organic Compounds dissolved in Sulfolane/Water and Sulfolane/DMSO-d<sub>6</sub> blends. *Analytical chemistry* **2020**.
74. Pedinielli, F.; Leroy, R. R. L.; Martinez, A.; Nuzillard, J. M.; Lameiras, P., ViscY NMR experiments in phosphoric acid as viscous solvent for the individualization of small molecules within mixtures by spin diffusion. *The Analyst* **2021**.
75. Manjunatha Reddy, G. N.; Yemloul, M.; Caldarelli, S., Combined maximum-quantum and DOSY 3D experiments provide enhanced resolution for small molecules in mixtures. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2017**, *55* (5), 492-497.
76. Vaneckhaute, E.; De Man, W. L.; Duerinckx, K.; Delcour, J. A.; Martens, J. A.; Taulelle, F.; Breynaert, E., <sup>13</sup>C-DOSY-TOSY NMR Correlation for In Situ Analysis of Structure, Size Distribution, and Dynamics of Prebiotic Oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2020**, *68* (10), 3250-3259.
77. Ma, H.; Pedersen, C. M.; Zhao, Q.; Jia, S.; Yuan, B.; Hou, X.; Wang, Y., Utilizing 3D DOSY NMR in the characterization of organic compounds in coal chemical wastewater. *Magnetic Resonance Letters* **2021**, 100021.
78. Tossavainen, H.; Salovaara, S.; Hellman, M.; Ihalin, R.; Permi, P., Dispersion from C $\alpha$  or NH: 4D experiments for backbone resonance assignment of intrinsically disordered proteins. *Journal of Biomolecular NMR* **2020**, *74* (2), 147-159.
79. Pustovalova, Y.; Mayzel, M.; Orekhov, V. Y., XLSY: Extra-Large NMR Spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition* **2018**, *57* (43), 14043-14045.
80. Yao, X.; Becker, S.; Zweckstetter, M., A six-dimensional alpha proton detection-based APSY experiment for backbone assignment of intrinsically disordered proteins. *Journal of Biomolecular NMR* **2014**, *60* (4), 231-240.

81. Žerko, S.; Koźmiński, W., Six- and seven-dimensional experiments by combination of sparse random sampling and projection spectroscopy dedicated for backbone resonance assignment of intrinsically disordered proteins. *Journal of Biomolecular NMR* **2015**, *63* (3), 283-290.
82. Jeener, J.; Alewaeters, G., "Pulse pair technique in high resolution NMR" a reprint of the historical 1971 lecture notes on two-dimensional spectroscopy. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2016**, *94-95*, 75-80.
83. Chandrakumar, N., Chapter 3 1D Double Quantum Filter NMR Studies. In *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, Webb, G. A., Ed. Academic Press: 2009; Vol. 67, pp 265-329.
84. Carpenter, T. A.; Colebrook, L. D.; Hall, L. D.; Pierens, G. K., Applications of gradient-selective COSY and DQCOSY to brucine and gibberellic acid. *Magnetic Resonance in Chemistry* **1992**, *30* (8), 768-773.
85. Kakita, V. M. R.; Bharatam, J., Real-time homonuclear broadband decoupled pure shift COSY. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2018**, *56* (10), 963-968.
86. Koos, M. R. M.; Kummerlöwe, G.; Kaltschnee, L.; Thiele, C. M.; Luy, B., CLIP-COSY: A Clean In-Phase Experiment for the Rapid Acquisition of COSY-type Correlations. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55* (27), 7655-7659.
87. Braunschweiler, L.; Ernst, R. R., Coherence transfer by isotropic mixing: Application to proton correlation spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1983**, *53* (3), 521-528.
88. Zhang, F.; Dossey, A. T.; Zachariah, C.; Edison, A. S.; Brüschweiler, R., Strategy for Automated Analysis of Dynamic Metabolic Mixtures by NMR. Application to an Insect Venom. *Analytical chemistry* **2007**, *79* (20), 7748-7752.
89. Zhang, F.; Brüschweiler, R., Robust Deconvolution of Complex Mixtures by Covariance TOCSY Spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46* (15), 2639-2642.
90. Hansen, A. L.; Li, D.; Wang, C.; Brüschweiler, R., Absolute Minimal Sampling of Homonuclear 2D NMR TOCSY Spectra for High-Throughput Applications of Complex Mixtures. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2017**, *56* (28), 8149-8152.
91. Kakita, V. M. R.; Hosur, R. V., Non-Uniform-Sampling Ultrahigh Resolution TOCSY NMR: Analysis of Complex Mixtures at Microgram Levels. *ChemPhysChem* **2016**, 2304-2308.
92. Kakita, V. M. R.; Vemulapalli, S. P. B.; Bharatam, J., Band-selective excited ultrahigh resolution PSYCHE-TOCSY: Fast screening of organic molecules and complex mixtures. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2016**, *54* (4), 308-314.
93. Barjat, H.; Morris, G. A.; Smart, S.; Swanson, A. G.; Williams, S. C. R., High-Resolution Diffusion-Ordered 2D Spectroscopy (HR-DOSY) - A New Tool for the Analysis of Complex Mixtures. *Journal of Magnetic Resonance, Series B* **1995**, *108* (2), 170-172.
94. Hoffman, R. E.; Arzuan, H.; Pemberton, C.; Aserin, A.; Garti, N., High-resolution NMR "chromatography" using a liquids spectrometer. *Journal of magnetic resonance* **2008**, *194* (2), 295-299.
95. Heisel, K. A.; Goto, J. J.; Krishnan, V. V., NMR Chromatography: Molecular Diffusion in the Presence of Pulsed Field Gradients in Analytical Chemistry Applications. *American Journal of Analytical Chemistry* **2012**, *2012*, 401-409.
96. Zhan, H.; Hao, M.; Feng, Y.; Cao, S.; Ni, Z.; Huang, Y.; Chen, Z., Diffusion Analysis on Complex Mixtures under Adverse Magnetic Field Conditions by Spatially-Selective Pure Shift-Based DOSY. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2021**, *12* (3), 1073-1080.
97. Xu, C.; Wan, Y.; Chen, D.; Gao, C.; Yin, H.; Fetherston, D.; Kupce, E.; Lopez, G.; Ameduri, B.; Twum, E. B.; Wyzgoski, F. J.; Li, X.; McCord, E. F.; Rinaldi, P. L., 19F DOSY diffusion-NMR spectroscopy of fluoropolymers. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2017**, *55* (5), 472-484.
98. Trefi, S.; Gilard, V.; Balayssac, S.; Malet-Martino, M.; Martino, R., The usefulness of 2D DOSY and 3D DOSY-COSY 1H NMR for mixture analysis: application to genuine and fake formulations of sildenafil (Viagra). *Magnetic Resonance in Chemistry* **2009**, *47* (S1), S163-S173.
99. Pagès, G.; Gilard, V.; Martino, R.; Malet-Martino, M., Pulsed-field gradient nuclear magnetic resonance measurements (PFG NMR) for diffusion ordered spectroscopy (DOSY) mapping. *The Analyst* **2017**, *142* (20), 3771-3796.

100. Jacquemmoz, C.; Mishra, R.; Guduff, L.; van Heijenoort, C.; Dumez, J.-N., Optimisation of spatially-encoded diffusion-ordered NMR spectroscopy for the analysis of mixtures. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2021**, *n/a* (n/a).
101. Nilsson, M.; Morris, G. A., Pure shift proton DOSY: diffusion-ordered <sup>1</sup>H spectra without multiplet structure. *Chemical Communications* **2007**, (9), 933-935.
102. Yuan, B.; Zhou, Z.; Jiang, B.; Kamal, G. M.; Zhang, X.; Li, C.; Zhou, X.; Liu, M., NMR for Mixture Analysis: Concentration-Ordered Spectroscopy. *Analytical chemistry* **2021**, *93* (28), 9697-9703.
103. Bodenhausen, G.; Ruben, D. J., Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chemical Physics Letters* **1980**, *69* (1), 185-189.
104. Vestergren, J.; Vincent, A. G.; Jansson, M.; Persson, P.; Ilstedt, U.; Gröbner, G.; Giesler, R.; Schleucher, J., High-Resolution Characterization of Organic Phosphorus in Soil Extracts Using 2D <sup>1</sup>H–<sup>31</sup>P NMR Correlation Spectroscopy. *Environmental Science & Technology* **2012**, *46* (7), 3950-3956.
105. Öman, T.; Tessem, M.-B.; Bathen, T. F.; Bertilsson, H.; Angelsen, A.; Hedenström, M.; Andreassen, T., Identification of metabolites from 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC NMR using peak correlation plots. *BMC Bioinformatics* **2014**, *15* (1), 413.
106. Marchione, A. A.; Dooley, R. J.; Conklin, B., Comparison of <sup>1</sup>H–<sup>19</sup>F two-dimensional NMR scalar coupling correlation pulse sequences. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2014**, *52* (4), 183-189.
107. Jeeves, M.; Roberts, J.; Ludwig, C., Optimised collection of non-uniformly sampled 2D-HSQC NMR spectra for use in metabolic flux analysis. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2021**, *59* (3), 287-299.
108. Charlier, C.; Cox, N.; Prud'homme, S. M.; Geffard, A.; Nuzillard, J. M.; Luy, B.; Lippens, G., Virtual decoupling to break the simplification versus resolution trade-off in nuclear magnetic resonance of complex metabolic mixtures. *Magn. Reson.* **2021**, *2* (2), 619-627.
109. Le Guennec, A.; Dumez, J.-N.; Giraudeau, P.; Caldarelli, S., Resolution-enhanced 2D NMR of complex mixtures by non-uniform sampling. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2015**, *53* (11), 913-920.
110. Gowda, G. A. N.; Tayyari, F.; Ye, T.; Suryani, Y.; Wei, S.; Shanaiah, N.; Raftery, D., Quantitative Analysis of Blood Plasma Metabolites Using Isotope Enhanced NMR Methods. *Analytical chemistry* **2010**, *82* (21), 8983-8990.
111. Mesiti, F.; Maruca, A.; Silva, V.; Rocca, R.; Fernandes, C.; Remião, F.; Uriarte, E.; Alcaro, S.; Gaspar, A.; Borges, F., 4-Oxoquinolines and monoamine oxidase: When tautomerism matters. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2021**, *213*, 113183.
112. Albaret, C.; Lœillet, D.; Augé, P.; Fortier, P.-L., Application of Two-Dimensional <sup>1</sup>H–<sup>31</sup>P Inverse NMR Spectroscopy to the Detection of Trace Amounts of Organophosphorus Compounds Related to the Chemical Weapons Convention. *Analytical chemistry* **1997**, *69* (14), 2694-2700.
113. Bax, A.; Subramanian, S., Sensitivity-enhanced two-dimensional heteronuclear shift correlation NMR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1986**, *67* (3), 565-569.
114. Bax, A.; Pochapsky, S. S., Optimized recording of heteronuclear multidimensional NMR spectra using pulsed field gradients. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1992**, *99* (3), 638-643.
115. Bax, A.; Aszalos, A.; Dinya, Z.; Sudo, K., Structure elucidation of the antibiotic desertomycin through the use of new two-dimensional NMR techniques. *Journal of the American Chemical Society* **1986**, *108* (25), 8056-8063.
116. Summers, M. F.; Marzilli, L. G.; Bax, A., Complete proton and carbon-13 assignments of coenzyme B12 through the use of new two-dimensional NMR experiments. *Journal of the American Chemical Society* **1986**, *108* (15), 4285-4294.
117. Perea-Buceta, J.; Rico del Cerro, D.; Kilpeläinen, I.; Heikkinen, S., Incorporated diffusion ordered heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy, 3D iDOSY-HMBC. Merging of diffusion delay with long polarization transfer delay of HMBC. *Journal of magnetic resonance* **2021**, *323*, 106892.
118. Viel, S.; Caldarelli, S., Improved 3D DOSY-TOCSY experiment for mixture analysis. *Chemical Communications* **2008**, (17), 2013-2015.
119. Reardon, P. N.; Marean-Reardon, C. L.; Bukovec, M. A.; Coggins, B. E.; Isern, N. G., 3D TOCSY-HSQC NMR for Metabolic Flux Analysis Using Non-Uniform Sampling. *Analytical chemistry* **2016**, *88* (5), 2825-2831.

120. Bell, N. G. A.; Graham, M. C.; Uhrín, D., Isotope-filtered nD NMR spectroscopy of complex mixtures to unravel the molecular structures of phenolic compounds in tagged soil organic matter. *The Analyst* **2016**, *141* (15), 4614-4624.
121. Mauve, C.; Khlifi, S.; Gilard, F.; Mouille, G.; Farjon, J., Sensitive, highly resolved, and quantitative <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C NMR data in one go for tracking metabolites in vegetal extracts. *Chemical Communications* **2016**, *52* (36), 6142-6145.
122. Adams, R. W., Pure Shift NMR Spectroscopy. In *eMagRes*, pp 295-310.
123. Ilgen, J.; Nowag, J.; Kaltschnee, L.; Schmidts, V.; Thiele, C. M., Gradient selected pure shift EASY-ROESY techniques facilitate the quantitative measurement of <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-distance restraints in congested spectral regions. *Journal of magnetic resonance* **2021**, *324*.
124. Garbow, J. R.; Weitekamp, D. P.; Pines, A., Bilinear rotation decoupling of homonuclear scalar interactions. *Chemical Physics Letters* **1982**, *93* (5), 504-509.
125. Zangger, K.; Sterk, H., Homonuclear Broadband-Decoupled NMR Spectra. *Journal of magnetic resonance* **1997**, *124* (2), 486-489.
126. Castañar, L.; Parella, T., Broadband <sup>1</sup>H homodecoupled NMR experiments: Recent developments, methods and applications. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2015**, *53* (6), 399-426.
127. Adams, R. W.; Byrne, L.; Király, P.; Foroozandeh, M.; Paudel, L.; Nilsson, M.; Clayden, J.; Morris, G. A., Diastereomeric ratio determination by high sensitivity band-selective pure shift NMR spectroscopy. *Chemical Communications* **2014**, *50* (19), 2512-2514.
128. Castañar, L.; Nolis, P.; Virgili, A.; Parella, T., Full Sensitivity and Enhanced Resolution in Homodecoupled Band-Selective NMR Experiments. *Chemistry – A European Journal* **2013**, *19* (51), 17283-17286.
129. Brüschweiler, R.; Griesinger, C.; Sørensen, O. W.; Ernst, R. R., Combined use of hard and soft pulses for  $\omega_1$  decoupling in two-dimensional NMR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1988**, *78* (1), 178-185.
130. Foroozandeh, M.; Adams, R. W.; Meharry, N. J.; Jeannerat, D.; Nilsson, M.; Morris, G. A., Ultrahigh-resolution NMR spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (27), 6990-6992.
131. Ilgen, J.; Kaltschnee, L.; Thiele, C. M., A pure shift experiment with increased sensitivity and superior performance for strongly coupled systems. *Journal of magnetic resonance* **2018**, *286*, 18-29.
132. Takegoshi, K.; Ogura, K.; Hikichi, K., A perfect spin echo in a weakly homonuclear J-coupled two spin-12 system. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1989**, *84* (3), 611-615.
133. Foroozandeh, M.; Morris, G. A.; Nilsson, M., PSYCHE Pure Shift NMR Spectroscopy. *Chemistry – A European Journal* **2018**, *24* (53), 13988-14000.
134. Nolis, P.; Parella, T., Multiplicity-edited <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H TOCSY experiment. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2018**, *56* (10), 976-982.
135. Timári, I.; Kövér, K. E., Broadband homonuclear decoupled HSQMBC methods. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2018**, *56* (10), 910-917.
136. Tassoti, S.; Novak, P.; Butts, C. P.; Zangger, K., High Resolution for Chemical Shifts and Scalar Coupling Constants: The 2D Real-Time J-Upscaled PSYCHE-DIAG. *ChemPhysChem* **2018**, *19* (22), 3166-3170.
137. Zeng, Q.; Chen, J.; Zhan, C.; Lin, Y.; Chen, Z., Fully Exploiting the Power of 2D NMR J-Resolved Spectroscopy. *Analytical chemistry* **2020**, *92* (10), 6893-6899.
138. Zhan, H.; Zhan, F.; Gao, C.; Lin, E.; Huang, C.; Lin, X.; Huang, Y.; Chen, Z., Multiplet analysis by strong-coupling-artifact-suppression 2D J-resolved NMR spectroscopy. *The Journal of Chemical Physics* **2021**, *155* (3), 034202.
139. Foroozandeh, M.; Castañar, L.; Martins, L. G.; Sinnaeve, D.; Poggetto, G. D.; Tormena, C. F.; Adams, R. W.; Morris, G. A.; Nilsson, M., Ultrahigh-Resolution Diffusion-Ordered Spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55* (50), 15579-15582.
140. Concilio, M. G.; Kiraly, P.; Morris, G. A., Diffusional attenuation during soft pulses: A Zangger-Sterk pure shift iDOSY experiment. *Journal of magnetic resonance* **2019**, *301*, 85-93.

141. Le Gresley, A.; Broadberry, G.; Robertson, C.; Peron, J.-M. R.; Robinson, J.; O'Leary, S., Application of pure shift and diffusion NMR for the characterisation of crude and processed pyrolysis oil. *J Anal Appl Pyrolysis* **2019**, *140*, 281-289.
142. Li, C.; Zhan, H.; Yan, J.; Hao, M.; Lin, E.; Huang, Y.; Chen, Z., A pure shift and spin echo based approach for high-resolution diffusion-ordered NMR spectroscopy. *Journal of magnetic resonance* **2019**, *305*, 209-218.
143. Zhao, Q.; Ma, H.; Pedersen, C. M.; Dou, M.; Qiao, Y.; Hou, X.; Qi, Y.; Wang, Y., Pure Shift NMR: Application of 1D PSYCHE and 1D TOCSY-PSYCHE Techniques for Directly Analyzing the Mixtures from Biomass-Derived Platform Compound Hydrogenation/Hydrogenolysis. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2021**, *9* (6), 2456-2464.
144. Kiraly, P.; Morris, G. A.; Quanxiu, L.; Nilsson, M., Sharpening up your spectra: broadband homonuclear decoupling in hsqc by real-time pure shift acquisition. *Synlett* **2019**, *30* (9), 1015-1025.
145. Timári, I.; Wang, C.; Hansen, A. L.; Costa Dos Santos, G.; Yoon, S. O.; Bruschweiler-Li, L.; Bruschweiler, R., Real-Time Pure Shift HSQC NMR for Untargeted Metabolomics. *Analytical chemistry* **2019**, *91* (3), 2304-2311.
146. Moutzouri, P. In *New and improved methods for mixture analysis by NMR*, 2018.
147. Canton, M.; Roe, R.; Poigny, S.; Renault, J. H.; Nuzillard, J. M., Multiple solvent signal presaturation and decoupling artifact removal in  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  nuclear magnetic resonance. *Magn. Reson.* **2020**, *1* (2), 155-164.
148. Davis, D. G.; Bax, A., Simplification of proton NMR spectra by selective excitation of experimental subspectra. *Journal of the American Chemical Society* **1985**, *107* (24), 7197-7198.
149. Freeman, R.; Mareci, T. H.; Morris, G. A., Weak Satellite Signals in High-Resolution NMR Spectra: Separating the Wheat from the Chaff *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1981**, *42*, 341-345.
150. Wang, J.; Sánchez-Roselló, M.; Aceña, J. L.; del Pozo, C.; Sorochinsky, A. E.; Fustero, S.; Soloshonok, V. A.; Liu, H., Fluorine in Pharmaceutical Industry: Fluorine-Containing Drugs Introduced to the Market in the Last Decade (2001–2011). *Chemical Reviews* **2014**, *114* (4), 2432-2506.
151. Sakamoto, T.; Qiu, Z.; Inagaki, M.; Fujimoto, K., Simultaneous Amino Acid Analysis Based on  $^{19}\text{F}$  NMR Using a Modified OPA-Derivatization Method. *Analytical chemistry* **2020**, *92* (2), 1669-1673.
152. Zhao, Y.; Markopoulos, G.; Swager, T. M.,  $^{19}\text{F}$  NMR Fingerprints: Identification of Neutral Organic Compounds in a Molecular Container. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136* (30), 10683-10690.
153. Zhao, Y.; Chen, L.; Swager, T. M., Simultaneous Identification of Neutral and Anionic Species in Complex Mixtures without Separation. *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55* (3), 917-921.
154. Levitt, M. H.; Ernst, R. R., Multiple-quantum excitation and spin topology filtration in high-resolution NMR. *The Journal of Chemical Physics* **1985**, *83* (7), 3297-3310.
155. Levitt, M. H.; Radloff, C.; Ernst, R. R., Coherence transfer selection rules induced by symmetry: Application to NMR correlation spectroscopy. *Chemical Physics Letters* **1985**, *114* (5), 435-440.
156. Bodenhausen, G., Multiple-quantum NMR. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1980**, *14* (3), 137-173.
157. Ismail, F. M. D.; Nahar, L.; Sarker, S. D., Application of INADEQUATE NMR techniques for directly tracing out the carbon skeleton of a natural product. *Phytochemical Analysis* **2021**, *32* (1), 7-23.
158. Rodrigues, I. G.; Miguel, M. G.; Mnif, W., A Brief Review on New Naturally Occurring Cembranoid Diterpene Derivatives from the Soft Corals of the Genera Sarcophyton, Sinularia, and Lobophytum Since 2016. *Molecules* **2019**, *24* (4).
159. G. N, M. R.; Caldarelli, S., Demixing of Severely Overlapping NMR Spectra through Multiple-Quantum NMR. *Analytical chemistry* **2010**, *82* (8), 3266-3269.
160. Wokaun, A.; Ernst, R. R., The use of multiple quantum transitions for relaxation studies in coupled spin systems. *Mol. Phys.* **1978**, *36* (2), 317-341.
161. Dalvit, C.; Böhlen, J.-M., Proton Phase-Sensitive Pulsed Field Gradient Double-Quantum Spectroscopy. In *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, Webb, G. A., Ed. Academic Press: 1999; Vol. 37, pp 203-271.
162. Murdoch, J. B.; Warren, W. S.; Weitekamp, D. P.; Pines, A., Computer simulations of multiple-quantum NMR experiments. I. Nonselective excitation. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1984**, *60* (2), 205-235.
163. Bax, A.; De Jong, P. G.; Mehlkopf, A. F.; Smidt, J., Separation of the different orders of NMR multiple-quantum transitions by the use of pulsed field gradients. *Chemical Physics Letters* **1980**, *69* (3), 567-570.

164. Rai, R. K.; Sinha, N., Fast and Accurate Quantitative Metabolic Profiling of Body Fluids by Nonlinear Sampling of  $1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Analytical chemistry* **2012**, *84* (22), 10005-10011.
165. Hyberts, S. G.; Heffron, G. J.; Tarragona, N. G.; Solanky, K.; Edmonds, K. A.; Luithardt, H.; Fejzo, J.; Chorev, M.; Aktas, H.; Colson, K.; Falchuk, K. H.; Halperin, J. A.; Wagner, G., Ultrahigh-Resolution  $1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  HSQC Spectra of Metabolite Mixtures Using Nonlinear Sampling and Forward Maximum Entropy Reconstruction. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129* (16), 5108-5116.
166. Ludwig, C.; Ward, D. G.; Martin, A.; Viant, M. R.; Ismail, T.; Johnson, P. J.; Wakelam, M. J. O.; Günther, U. L., Fast targeted multidimensional NMR metabolomics of colorectal cancer. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2009**, *47* (S1), S68-S73.
167. Pontoizeau, C.; Herrmann, T.; Toulhoat, P.; Elena-Herrmann, B.; Emsley, L., Targeted projection NMR spectroscopy for unambiguous metabolic profiling of complex mixtures. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2010**, *48* (9), 727-733.
168. Schanda, P.; Brutscher, B., Hadamard frequency-encoded SOFAST-HMQC for ultrafast two-dimensional protein NMR. *Journal of magnetic resonance* **2006**, *178* (2), 334-339.
169. Kupče, E. r.; Freeman, R., Molecular Structure from a Single NMR Experiment. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (32), 10788-10792.
170. Kupče, Ě.; Freeman, R., Molecular structure from a single NMR sequence (fast-PANACEA). *Journal of magnetic resonance* **2010**, *206* (1), 147-153.
171. Kupce, E.; Freeman, R., High-resolution NMR correlation experiments in a single measurement (HR-PANACEA). *Magn. Reson. Chem.* **2010**, *48* (5), 333-6.
172. Bax, A.; Freeman, R.; Kempell, S. P., Investigation of  $^{13}\text{C}$ – $^{13}\text{C}$  long-range couplings in natural-abundance samples. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1980**, *41* (2), 349-353.
173. Gurevich, A. Z.; Barsukov, I. L.; Arseniev, A. S.; Bystrov, V. F., Combined COSY-NOESY experiment. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1984**, *56* (3), 471-478.
174. Kupče, E.; Freeman, R., Fast multidimensional NMR by polarization sharing. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2007**, *45* (1), 2-4.
175. Schulze-Sünninghausen, D.; Becker, J.; Luy, B., Rapid Heteronuclear Single Quantum Correlation NMR Spectra at Natural Abundance. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136* (4), 1242-1245.
176. Becker, J.; Luy, B., CLIP-ASAP-HSQC for fast and accurate extraction of one-bond couplings from isotropic and partially aligned molecules. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2015**, *53* (11), 878-885.
177. Becker, J.; Koos, M. R. M.; Schulze-Sünninghausen, D.; Luy, B., ASAP-HSQC-TOCSY for fast spin system identification and extraction of long-range couplings. *Journal of magnetic resonance* **2019**, *300*, 76-83.
178. Frydman, L.; Scherf, T.; Lupulescu, A., The acquisition of multidimensional NMR spectra within a single scan. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99* (25), 15858.
179. Tal, A.; Shapira, B.; Frydman, L., A continuous phase-modulated approach to spatial encoding in ultrafast 2D NMR spectroscopy. *Journal of magnetic resonance* **2005**, *176* (1), 107-114.
180. Pelupessy, P., Adiabatic Single Scan Two-Dimensional NMR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (40), 12345-12350.
181. Andersen, N. S.; Köckenberger, W., A simple approach for phase-modulated single-scan 2D NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2005**, *43* (10), 795-797.
182. Shrot, Y.; Tal, A.; Frydman, L., New developments in the spatial encoding of spin interactions for single-scan 2D NMR. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2009**, *47* (5), 415-422.
183. Matsui, S.; Sekihara, K.; Kohno, H., High-speed spatially resolved high-resolution NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **1985**, *107*, 2817-2818.
184. Mishkovsky, M.; Frydman, L., Interlaced Fourier transformation of ultrafast 2D NMR data. *Journal of magnetic resonance* **2005**, *173* (2), 344-350.
185. Giraudeau, P.; Akoka, S., Sensitivity and lineshape improvement in ultrafast 2D NMR by optimized apodization in the spatially encoded dimension. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2011**, *49* (6), 307-313.
186. Pathan, M.; Charrier, B.; Tea, I.; Akoka, S.; Giraudeau, P., New practical tools for the implementation and use of ultrafast 2D NMR experiments. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2013**, *51* (3), 168-175.

187. Pelulessy, P.; Duma, L.; Bodenhausen, G., Improving resolution in single-scan 2D spectroscopy. *Journal of magnetic resonance* **2008**, *194* (2), 169-174.
188. Shrot, Y.; Frydman, L., Spatial/spectral encoding of the spin interactions in ultrafast multidimensional NMR. *The Journal of Chemical Physics* **2009**, *131* (22), 224516.
189. Frydman, L.; Lupulescu, A.; Scherf, T., Principles and Features of Single-Scan Two-Dimensional NMR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (30), 9204-9217.
190. Gal, M.; Schanda, P.; Brutscher, B.; Frydman, L., UltraSOFASST HMQC NMR and the Repetitive Acquisition of 2D Protein Spectra at Hz Rates. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129* (5), 1372-1377.
191. Lin, Y.; Huang, Y.; Cai, S.; Chen, Z., Chapter Five - Intermolecular Zero Quantum Coherence in NMR Spectroscopy. In *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, Webb, G. A., Ed. Academic Press: 2013; Vol. 78, pp 209-257.
192. Lin, Y.; Zhang, Z.; Cai, S.; Chen, Z., High-Resolution 2D J-Resolved Spectroscopy in Inhomogeneous Fields with Two Scans. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133* (20), 7632-7635.
193. Donovan, K. J.; Kupče, E.; Frydman, L., Multiple Parallel 2D NMR Acquisitions in a Single Scan. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52* (15), 4152-4155.
194. Akoka, S.; Giraudeau, P., Fast hybrid multi-dimensional NMR methods based on ultrafast 2D NMR. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2015**, *53* (11), 986-994.
195. Le Guennec, A.; Tea, I.; Antheaume, I.; Martineau, E.; Charrier, B.; Pathan, M.; Akoka, S.; Giraudeau, P., Fast Determination of Absolute Metabolite Concentrations by Spatially Encoded 2D NMR: Application to Breast Cancer Cell Extracts. *Analytical chemistry* **2012**, *84* (24), 10831-10837.
196. Jézéquel, T.; Deborde, C.; Maucourt, M.; Zhendre, V.; Moing, A.; Giraudeau, P., Absolute quantification of metabolites in tomato fruit extracts by fast 2D NMR. *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society* **2015**, *11* (5), 1231-1242.
197. Giraudeau, P.; Cahoreau, E.; Massou, S.; Pathan, M.; Portais, J.-C.; Akoka, S., UFJCOZY: A Fast 3D NMR Method for Measuring Isotopic Enrichments in Complex Samples. *ChemPhysChem* **2012**, *13* (13), 3098-3101.
198. Guennec, A. L.; Giraudeau, P.; Caldarelli, S.; Dumez, J.-N., Ultrafast double-quantum NMR spectroscopy. *Chemical Communications* **2015**, *51* (2), 354-357.
199. Rouger, L.; Gouilleux, B.; Pourchet-Gellez, M.; Dumez, J.-N.; Giraudeau, P., Ultrafast double-quantum NMR spectroscopy with optimized sensitivity for the analysis of mixtures. *The Analyst* **2016**, *141* (5), 1686-1692.
200. Concilio, M. G.; Jacquemmoz, C.; Boyarskaya, D.; Masson, G.; Dumez, J. N., Ultrafast Maximum-Quantum NMR Spectroscopy for the Analysis of Aromatic Mixtures. *ChemPhysChem* **2018**, *19* (23), 3310-3317.
201. Guduff, L.; Kuprov, I.; van Heijenoort, C.; Dumez, J.-N., Spatially encoded 2D and 3D diffusion-ordered NMR spectroscopy. *Chemical Communications* **2017**, *53* (4), 701-704.
202. Overhauser, A. W., Polarization of Nuclei in Metals. *Physical Review* **1953**, *92* (2), 411-415.
203. Solomon, I., Relaxation Processes in a System of Two Spins. *Physical Review* **1955**, *99* (2), 559-565.
204. Joseph H. Noogle; Schirmer, R. E., The Nuclear Overhauser Effect - Chemical Applications. *Academic Press: New York* **1971**, 25.
205. Wüthrich, K., NMR of Proteins and Nucleic Acids. *Journal of the American Chemical Society* **1986**.
206. Bothner-By, A. A.; Johner, P. E., Specificity of interproton nuclear Overhauser effects in gramicidin-S dissolved in deuterated ethylene glycol. *Biophysical Journal* **1978**, *24* (3), 779-790.
207. Keeler, J., *Understanding NMR spectroscopy*. John Wiley & Sons: 2011.
208. Gierer, A.; Wirtz, K., Molekulare Theorie der Mikroreibung. *Zeitschrift für Naturforschung A* **1953**, *8* (9), 532-538.
209. García, J. I.; García-Marín, H.; Pires, E., Glycerol based solvents: synthesis, properties and applications. *Green Chemistry* **2014**, *16* (3), 1007-1033.
210. Sonnati, M. O.; Amigoni, S.; Taffin de Givenchy, E. P.; Darmanin, T.; Choulet, O.; Guittard, F., Glycerol carbonate as a versatile building block for tomorrow: synthesis, reactivity, properties and applications. *Green Chemistry* **2013**, *15* (2), 283-306.

211. Ochoa-Gómez, J. R.; Gómez-Jiménez-Aberasturi, O.; Ramírez-López, C.; Belsué, M., A Brief Review on Industrial Alternatives for the Manufacturing of Glycerol Carbonate, a Green Chemical. *Organic Process Research & Development* **2012**, *16* (3), 389-399.
212. Angulo, G.; Brucka, M.; Gerecke, M.; Grampp, G.; Jeannerat, D.; Milkiewicz, J.; Mitrev, Y.; Radzewicz, C.; Rosspeintner, A.; Vauthey, E.; Wnuk, P., Characterization of dimethylsulfoxide/glycerol mixtures: a binary solvent system for the study of "friction-dependent" chemical reactivity. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18* (27), 18460-18469.
213. Haynes, W. M.; Lide, D. R.; Bruno, T. J., *CRC handbook of chemistry and physics : a ready-reference book of chemical and physical data*. 97th edition, 2016-2017 / Editor-in-Chief: W.M. Haynes. ed.; CRC Press: Boca Raton, Florida, 2017.
214. Cowie, J. M. G.; Toporowski, P. M., ASSOCIATION IN THE BINARY LIQUID SYSTEM DIMETHYL SULPHOXIDE – WATER. *Can. J. Chem.* **1961**, *39* (11), 2240-2243.
215. Havemeyer, R. N., Freezing point curve of dimethyl sulfoxide--water solutions. *J Pharm Sci* **1966**, *55* (8), 851-3.
216. Packer, K. J.; Tomlinson, D. J., Nuclear spin relaxation and self-diffusion in the binary system, dimethylsulphoxide (DMSO)+ water. *Transactions of the Faraday Society* **1971**, *67* (0), 1302-1314.
217. Schichman, S. A.; Amey, R. L., Viscosity and local liquid structure in dimethyl sulfoxide-water mixtures. *The Journal of Physical Chemistry* **1971**, *75* (1), 98-102.
218. Tokuhito, T.; Menafra, L.; Szmant, H. H., Contribution of relaxation and chemical shift results to the elucidation of the structure of the water-DMSO liquid system. *The Journal of Chemical Physics* **1974**, *61* (6), 2275-2282.
219. Fox, M. F.; Whittingham, K. P., Component interactions in aqueous dimethyl sulphoxide. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases* **1975**, *71* (0), 1407-1412.
220. Schott, H., Determination of Extent of Hydration of Water-Miscible Organic Liquids in Aqueous Solution from Viscosity Data. *J. Pharm. Sci.* **1980**, *69* (4), 369-378.
221. Madigosky, W. M.; Warfield, R. W., Ultrasonic measurements and liquid structure of DMSO–water mixture. *The Journal of Chemical Physics* **1983**, *78* (4), 1912-1916.
222. Douzou, P.; Petsko, G. A., Proteins at Work: "Stop-Action" Pictures at Subzero Temperatures. In *Advances in Protein Chemistry*, Anfinsen, C. B.; Edsall, J. T.; Richards, F. M., Eds. Academic Press: 1984; Vol. 36, pp 245-361.
223. Luzar, A.; Chandler, D., Structure and hydrogen bond dynamics of water–dimethyl sulfoxide mixtures by computer simulations. *The Journal of Chemical Physics* **1993**, *98* (10), 8160-8173.
224. Catalán, J.; Díaz, C.; García-Blanco, F., Characterization of Binary Solvent Mixtures of DMSO with Water and Other Cosolvents. *The Journal of organic chemistry* **2001**, *66* (17), 5846-5852.
225. Palaiologou, M. M.; Molinou, I. E.; Tzierkezos, N. G., Viscosity Studies on Lithium Bromide in Water + Dimethyl Sulfoxide Mixtures at 278.15 K and 293.15 K. *Journal of Chemical & Engineering Data* **2002**, *47* (5), 1285-1289.
226. Płowaś, I.; Świergiel, J.; Jadzyn, J., Relative Static Permittivity of Dimethyl Sulfoxide + Water Mixtures. *Journal of Chemical & Engineering Data* **2013**, *58* (6), 1741-1746.
227. Wen, Y.-C.; Kuo, H.-C.; Guo, J.-L.; Jia, H.-W., Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Investigation on Ultralow Melting Temperature Behavior of Dimethyl Sulfoxide–Water Solutions. *The Journal of Physical Chemistry B* **2016**, *120* (51), 13125-13135.
228. Fesik, S. W.; Bolis, G.; Sham, H. L.; Olejniczak, E. T., Structure refinement of a cyclic peptide from two-dimensional NMR data and molecular modeling. *Biochemistry* **1987**, *26* (7), 1851-9.
229. Rae, I. D.; Stimson, E. R.; Scheraga, H. A., Nuclear overhauser effects and the conformation of gramicidin S. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1977**, *77* (1), 225-229.
230. Fesik, S. W.; Olejniczak, E. T., Increased NOEs for small molecules using mixed solvents. *Magnetic Resonance in Chemistry* **1987**, *25* (12), 1046-1048.
231. Motta, A.; Picone, D.; Tancredi, T.; Temussi, P. A., NOE measurements on linear peptides in cryoprotective aqueous mixtures. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1987**, *75* (2), 364-370.

232. Motta, A.; Tancredi, T.; Temussi, P. A., Nuclear Overhauser effects in linear peptides A low-temperature 500 MHz study of Met-enkephalin. *FEBS Letters* **1987**, *215* (2), 215-218.
233. Motta, A.; Picone, D.; Tancredi, T.; Temussi, P. A., Low temperature nmr studies of leu-enkephalins in cryoprotective solvents. *Tetrahedron* **1988**, *44* (3), 975-990.
234. Nieto, J. L.; Jiménez, M. A.; Rico, M.; Santoro, J.; Herranz, J., Nuclear Overhauser effects in aqueous solution as dynamic probes in short linear peptides. *FEBS Letters* **1988**, *239* (1), 83-87.
235. Di Bello, C.; Gozzini, L.; Tonellato, M.; Corradini, M. G.; D'Auria, G.; Paolillo, L.; Trivellone, E., Mono and two-dimensional 500-MHz characterization of synthetic bombesin and related peptides in DMSO and DMSO-water. *Biopolymers* **1989**, *28* (1), 421-440.
236. Mueller, L.; Heald, S. L.; Hempel, J. C.; Jeffs, P. W., Determination of the conformation of molecular complexes of the aridicin aglycon with Ac<sup>2</sup>-L-Lys-D-Ala-D-Ala and Ac-L-Ala- $\gamma$ -D-Gln-L-Lys-(Ac)-D-Ala-D-Ala: an application of nuclear magnetic resonance spectroscopy and distance geometry in the modeling of peptides. *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111* (2), 496-505.
237. Tancredi, T.; Zanotti, G.; Rossi, F.; Benedetti, E.; Pedone, C.; Temussi, P. A., Comparison of the conformations of cyclolinopeptide a in the solid state and in solution. *Biopolymers* **1989**, *28* (1), 513-523.
238. Temussi, P. A.; Picone, D.; Tancredi, T.; Tomatis, R.; Salvadori, S.; Marastoni, M.; Balboni, G., Conformational properties of deltorphin: New features of the  $\delta$ -opioid receptor. *FEBS Letters* **1989**, *247* (2), 283-288.
239. Motta, A.; Temussi, P. A.; Wuensch, E.; Bovermann, G., A proton NMR study of human calcitonin in solution. *Biochemistry* **1991**, *30* (9), 2364-2371.
240. Saviano, G.; Temussi, P. A.; Motta, A.; Maggi, C. A.; Rovero, P., Conformation-activity relationship of tachykinin neurokinin A(4-10) and of some [Xaa<sup>8</sup>] analogs. *Biochemistry* **1991**, *30* (42), 10175-10181.
241. Tancredi, T.; Temussi, P. A.; Picone, D.; Amodeo, P.; Tomatis, R.; Salvadori, S.; Marastoni, M.; Santagada, V.; Balboni, G., New insights on  $\mu/\delta$  selectivity of opioid peptides: Conformational analysis of deltorphin analogues. *Biopolymers* **1991**, *31* (6), 751-760.
242. Amodeo, P.; Motta, A.; Tancredi, T.; Salvadori, S.; Tomatis, R.; Picone, D.; Saviano, G.; Temussi, P. A., Solution structure of deltorphin I at 265 K: a quantitative NMR study. *Pept Res* **1992**, *5* (1), 48-55.
243. Temussi, P. A.; Picone, D.; Saviano, G.; Amodeo, P.; Motta, A.; Tancredi, T.; Salvadori, S.; Tomatis, R., Conformational analysis of an opioid peptide in solvent media that mimic cytoplasm viscosity. *Biopolymers* **1992**, *32* (4), 367-372.
244. Moroder, L.; Dursi, A.; Picone, D.; Amodeo, P.; Temussi, P. A., Solution Conformation of CCK9, a Cholecystokinin Analog. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1993**, *190* (3), 741-746.
245. Tallon, M.; Ron, D.; Halle, D.; Amodeo, P.; Saviano, G.; Temussi, P. A.; Selinger, Z.; Naider, F.; Chorev, M., Synthesis, biological activity, and conformational analysis of [pGlu<sup>6</sup>, N-MePhe<sup>8</sup>, Aib<sup>9</sup>] substance P (6-11): A selective agonist for the NK-3 receptor. *Biopolymers* **1993**, *33* (6), 915-926.
246. Amodeo, P.; Rovero, P.; Saviano, G.; Temussi, P. A., Solution conformation of c-[Gln-Trp-Phe-Gly-Leu-Met], a NK-2 tachykinin antagonist. *International Journal of Peptide and Protein Research* **1994**, *44* (6), 556-561.
247. Tancredi, T.; Salvadori, S.; Amodeo, P.; Picone, D.; Lazarus, L. H.; Bryant, S. D.; Guerrini, R.; Marzola, G.; Temussi, P. A., Conversion of Enkephalin and Dermorphin into  $\delta$ -Selective Opioid Antagonists by Single-Residue Substitution. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *224* (1), 241-247.
248. Crescenzi, O.; Amodeo, P.; Cavicchioni, G.; Guerrini, R.; Picone, D.; Salvadori, S.; Tancredi, T.; Temussi, P. A.,  $\delta$ -Selective Opioid Peptides Containing a Single Aromatic Residue in the Message Domain: An NMR Conformational Analysis. *J. Pept. Sci.* **1996**, *2* (5), 290-308.
249. Caliendo, G.; Grieco, P.; Perissutti, E.; Santagada, V.; Saviano, G.; Tancredi, T.; Temussi, P. A., Conformational Analysis of Three NK1 Tripeptide Antagonists: A Proton Nuclear Magnetic Resonance Study. *Journal of Medicinal Chemistry* **1997**, *40* (4), 594-601.
250. Amodeo, P.; Naider, F.; Picone, D.; Tancredi, T.; Temussi, P. A., Conformational sampling of bioactive conformers: a low-temperature NMR study of <sup>15</sup>N-Leu-enkephalin. *J. Pept. Sci.* **1998**, *4* (4), 253-265.

251. D'Ursi, A.; Albrizio, S.; Fattorusso, C.; Lavecchia, A.; Zanotti, G.; Temussi, P. A., Solution Conformation of a Potent Cyclic Analogue of Tuftsin: Low-Temperature Nuclear Magnetic Resonance Study in a Cryoprotective Mixture. *Journal of Medicinal Chemistry* **1999**, *42* (10), 1705-1713.
252. Spadaccini, R.; Crescenzi, O.; Picone, D.; Tancredi, T.; Temussi, P. A., Solution structure of dynorphin A (1–17): a NMR study in a cryoprotective solvent mixture at 278 K. *J. Pept. Sci.* **1999**, *5* (7), 306-312.
253. Picone, D.; Riviaccio, A.; Crescenzi, O.; Caliendo, G.; Santagada, V.; Perissutti, E.; Spisani, S.; Traniello, S.; Temussi, P. A., Peptide T revisited: conformational mimicry of epitopes of anti-HIV proteins. *J. Pept. Sci.* **2001**, *7* (4), 197-207.
254. Albrizio, S.; Carotenuto, A.; Fattorusso, C.; Moroder, L.; Picone, D.; Temussi, P. A.; D'Ursi, A., Environmental Mimic of Receptor Interaction: Conformational Analysis of CCK-15 in Solution. *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45* (4), 762-769.
255. Amodeo, P.; Guerrini, R.; Picone, D.; Salvadori, S.; Spadaccini, R.; Tancredi, T.; Temussi, P. A., Solution structure of nociceptin peptides. *J. Pept. Sci.* **2002**, *8* (9), 497-509.
256. Zhang, Y. J.; Tanaka, T.; Betsumiya, Y.; Kusano, R.; Matsuo, A.; Ueda, T.; Kouno, I., Association of tannins and related polyphenols with the cyclic peptide gramicidin S. *Chemical & pharmaceutical bulletin* **2002**, *50* (2), 258-62.
257. Giannecchini, S.; Di Fenza, A.; D'Ursi Anna, M.; Matteucci, D.; Rovero, P.; Bendinelli, M., Antiviral Activity and Conformational Features of an Octapeptide Derived from the Membrane-Proximal Ectodomain of the Feline Immunodeficiency Virus Transmembrane Glycoprotein. *Journal of Virology* **2003**, *77* (6), 3724-3733.
258. D'Ursi, A.; Caliendo, G.; Perissutti, E.; Santagada, V.; Severino, B.; Albrizio, S.; Bifulco, G.; Spisani, S.; Temussi, P. A., Conformation-activity relationship of peptide T and new pseudocyclic hexapeptide analogs. *J. Pept. Sci.* **2007**, *13* (6), 413-421.
259. Hwang, T. L.; Shaka, A. J., Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Waveforms and Pulsed-Field Gradients. *Journal of Magnetic Resonance, Series A* **1995**, *112* (2), 275-279.
260. Dalvit, C.; Vulpetti, A., Technical and practical aspects of <sup>19</sup>F NMR-based screening: toward sensitive high-throughput screening with rapid deconvolution. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2012**, *50* (9), 592-597.
261. Vulpetti, A.; Dalvit, C., Design and Generation of Highly Diverse Fluorinated Fragment Libraries and their Efficient Screening with Improved <sup>19</sup>F NMR Methodology. *ChemMedChem* **2013**, *8* (12), 2057-2069.
262. Picone, D.; D'Ursi, A.; Motta, A.; Tancredi, T.; Temussi, P. A., Conformational preferences of [Leu<sup>5</sup>]enkephalin in biomimetic media. *Eur. J. Biochem.* **1990**, *192* (2), 433-439.
263. Amodeo, P.; Motta, A.; Picone, D.; Saviano, G.; Tancredi, T.; Temussi, P. A., Viscosity as a conformational sieve. NOE of linear peptides in cryoprotective mixtures. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1991**, *95* (1), 201-207.
264. Foley, D. A.; Bez, E.; Codina, A.; Colson, K. L.; Fey, M.; Krull, R.; Piroli, D.; Zell, M. T.; Marquez, B. L., NMR Flow Tube for Online NMR Reaction Monitoring. *Analytical chemistry* **2014**, *86* (24), 12008-12013.
265. Mok, K. H.; Nagashima, T.; Day, I. J.; Jones, J. A.; Jones, C. J. V.; Dobson, C. M.; Hore, P. J., Rapid Sample-Mixing Technique for Transient NMR and Photo-CIDNP Spectroscopy: Applications to Real-Time Protein Folding. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (41), 12484-12492.
266. Yushmanov, P. V.; Furó, I., A rapid-mixing design for conventional NMR probes. *Journal of magnetic resonance* **2005**, *175* (2), 264-270.
267. Burés, J.; Armstrong, A.; Blackmond, D. G., Kinetic correlation between aldehyde/enamine stereoisomers in reactions between aldehydes with  $\alpha$ -stereocenters and chiral pyrrolidine-based catalysts. *Chem. Sci.* **2012**, *3* (4), 1273-1277.
268. Kopp, D.; Willows, R. D.; Sunna, A., Cell-Free Enzymatic Conversion of Spent Coffee Grounds Into the Platform Chemical Lactic Acid. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2019**, *7*.
269. Clegg, I. M.; Gordon, C. M.; Smith, D. S.; Alzaga, R.; Codina, A., NMR reaction monitoring during the development of an active pharmaceutical ingredient. *Anal. Methods* **2012**, *4* (6), 1498-1506.
270. Susanne, F.; Smith, D. S.; Codina, A., Kinetic Understanding Using NMR Reaction Profiling. *Organic Process Research & Development* **2012**, *16* (1), 61-64.

271. Anderson, L. A.; Franz, A. K., Real-time monitoring of transesterification by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy: Catalyst comparison and improved calculation for biodiesel conversion. *Energy and Fuels* **2012**, *26* (10), 6404-6410.
272. Aguilar, M. R.; Gallardo, A.; Fernández, M. d. M.; Román, J. S., In Situ Quantitative  $^1\text{H}$  NMR Monitoring of Monomer Consumption: A Simple and Fast Way of Estimating Reactivity Ratios. *Macromolecules* **2002**, *35* (6), 2036-2041.
273. Hoye, T. R.; Eklov, B. M.; Ryba, T. D.; Voloshin, M.; Yao, L. J., No-D NMR (No-Deuterium Proton NMR) Spectroscopy: A Simple Yet Powerful Method for Analyzing Reaction and Reagent Solutions. *Organic Letters* **2004**, *6* (6), 953-956.
274. Leskinen, M. V.; Madarász, A.; Yip, K. T.; Vuorinen, A.; Pápai, I.; Neuvonen, A. J.; Pihko, P. M., Cross-dehydrogenative couplings between indoles and  $\beta$ -keto esters: Ligand-assisted ligand tautomerization and dehydrogenation via a proton-assisted electron transfer to Pd(II). *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136* (17), 6453-6462.
275. Liu, S. Y.; Xu, L. Y.; Liu, C. Y.; Ren, Z. G.; Young, D. J.; Lang, J. P., Efficient alkylation of ketones with primary alcohols catalyzed by ruthenium(II)/P,N ligand complexes. *Tetrahedron* **2017**, *73* (17), 2374-2381.
276. Beguerie, M.; Dinoi, C.; Del Rosal, I.; Faradji, C.; Alcaraz, G.; Vendier, L.; Sabo-Etienne, S., Mechanistic Studies on the Catalytic Synthesis of BN Heterocycles (1H-2,1-Benzazaboroles) at Ruthenium. *ACS Catal.* **2018**, *8* (2), 939-948.
277. Santana, A. G.; Montalvillo-Jiménez, L.; Díaz-Casado, L.; Mann, E.; Jiménez-Barbero, J.; Gómez, A. M.; Asensio, J. L., Single-Step Glycosylations with  $^{13}\text{C}$ -Labelled Sulfoxide Donors: A Low-Temperature NMR Cartography of the Distinguishing Mechanistic Intermediates. *Chemistry – A European Journal* **2021**, *27* (6), 2030-2042.
278. Talavera-Prieto, N. M. C.; Ferreira, A. G. M.; Moreira, R. J.; Portugal, A. T. G., Monitoring of the transesterification reaction by continuous off-line density measurements. *Fuel* **2020**, *264*, 116877.
279. McGarrity, J. F.; Prodolliet, J.; Smyth, T., Rapid injection NMR: A simple technique for the observation of reactive intermediates. *Organic Magnetic Resonance* **1981**, *17* (1), 59-65.
280. McGarrity, J. F.; Prodolliet, J. W., Hydrolysis of very reactive methylation agents - a rapid injection N. M. R. investigation. *Tetrahedron Letters* **1982**, *23* (4), 417-420.
281. McGarrity, J. F.; Prodolliet, J., High-field rapid injection NMR: observation of unstable primary ozonide intermediates. *The Journal of organic chemistry* **1984**, *49* (23), 4465-4470.
282. Jones, A. C.; Sanders, A. W.; Bevan, M. J.; Reich, H. J., Reactivity of Individual Organolithium Aggregates: A RINMR Study of n-Butyllithium and 2-Methoxy-6-(methoxymethyl)phenyllithium. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129* (12), 3492-3493.
283. Mix, A.; Jutzi, P.; Rummel, B.; Hagedorn, K., A Simple double-chamber NMR tube for the monitoring of chemical reactions by NMR spectroscopy. *Organometallics* **2010**, *29* (2), 442-447.
284. Denmark, S. E.; Williams, B. J.; Eklov, B. M.; Pham, S. M.; Beutner, G. L., *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (16), 5558.
285. Dale, E. J.; Vermeulen, N. A.; Thomas, A. A.; Barnes, J. C.; Juríček, M.; Blackburn, A. K.; Strutt, N. L.; Sarjeant, A. A.; Stern, C. L.; Denmark, S. E.; Stoddart, J. F., ExCage. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136* (30), 10669-10682.
286. Jones, A. C., *Spectroscopic Advances in Organolithium Reactivity: The Contribution of Rapid-Injection NMR (RINMR)*. 2014.
287. Thomas Andy, A.; Denmark Scott, E., Pre-transmetalation intermediates in the Suzuki-Miyaura reaction revealed: The missing link. *Science* **2016**, *352* (6283), 329-332.
288. Wilson, T. W.; Denmark, S. E., *Reactions of Epoxides ( $n^{\circ} \rightarrow ?\sigma^*$ )*. Wiley Online Library: 2016.
289. Schönbein, A.-K.; Wagner, M.; Blom, P. W. M.; Michels, J. J., Quantifying the Kinetics of the Gilch Polymerization toward Alkoxy-Substituted Poly(p-phenylene vinylene). *Macromolecules* **2017**, *50* (13), 4952-4961.
290. Thomas, A. A.; Wang, H.; Zahrt, A. F.; Denmark, S. E., Structural, Kinetic, and Computational Characterization of the Elusive Arylpalladium(II)boronate Complexes in the Suzuki-Miyaura Reaction. *Journal of the American Chemical Society* **2017**, *139* (10), 3805-3821.

291. Rossi, S.; Denmark, S. E., *Lewis Base Activation of Silicon Lewis Acids*. Wiley Online Library: 2019.
292. Zhukhovitskiy, A. V.; Kobylanskiy, I. J.; Thomas, A. A.; Evans, A. M.; Delaney, C. P.; Flanders, N. C.; Denmark, S. E.; Dichtel, W. R.; Toste, F. D., A Dinuclear Mechanism Implicated in Controlled Carbene Polymerization. *Journal of the American Chemical Society* **2019**, *141* (16), 6473-6478.
293. Delaney, C. P.; Kassel, V. M.; Denmark, S. E., Potassium Trimethylsilylanolate Enables Rapid, Homogeneous Suzuki–Miyaura Cross-Coupling of Boronic Esters. *ACS Catal.* **2020**, *10* (1), 73-80.
294. Richards, J. A.; Evans, D. H., Flow cell for electrolysis within the probe of a nuclear magnetic resonance spectrometer. *Analytical chemistry* **1975**, *47* (6), 964-966.
295. Bussy, U.; Boujtita, M., Review of advances in coupling electrochemistry and liquid state NMR. *Talanta* **2015**, *136*, 155-160.
296. Falck, D.; Niessen, W. M. A., Solution-phase electrochemistry-nuclear magnetic resonance of small organic molecules. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2015**, *70*, 31-39.
297. Bussy, U.; Giraudeau, P.; Silvestre, V.; Jaunet-Lahary, T.; Ferchaud-Roucher, V.; Krempf, M.; Akoka, S.; Tea, I.; Boujtita, M., In situ NMR spectroelectrochemistry for the structure elucidation of unstable intermediate metabolites. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2013**, *405* (17), 5817-5824.
298. Keifer, P. A., Flow techniques in NMR spectroscopy. Annual reports on NMR spectroscopy. *Elsevier* **2007**, *62*, 1-47.
299. Browne, D. L.; Wright, S.; Deadman, B. J.; Dunnage, S.; Baxendale, I. R.; Turner, R. M.; Ley, S. V., Continuous flow reaction monitoring using an on-line miniature mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2012**, *26* (17), 1999-2010.
300. Gomez, M. V.; de la Hoz, A., NMR reaction monitoring in flow synthesis. *Beilstein journal of organic chemistry* **2017**, *13*, 285-300.
301. Watanabe, N.; Niki, E., Direct-Coupling of FT-NMR to High Performance Liquid Chromatography. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* **1978**, *54* (4), 194-199.
302. Bayer, E.; Albert, K., Continuous-flow carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Chromatography A* **1984**, *312*, 91-97.
303. Suryan, G., Nuclear resonance in flowing liquids. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Section A* **1951**, *33* (2), 107.
304. Sudmeier, J. L.; Pesek, J. J., Fast kinetics by stopped-flow chlorine-35 nuclear magnetic resonance. Reactions of mercury(II)-bovine serum albumin with various ligands. *Inorganic Chemistry* **1971**, *10* (4), 860-863.
305. Haner, R. L.; Keifer, P. A., *Flow Probes for NMR Spectroscopy*. Wiley Online Library: 2009.
306. Christianson, M. D.; Tan, E. H. P.; Landis, C. R., Stopped-Flow NMR: Determining the Kinetics of [rac-(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>(1-indenyl)<sub>2</sub>ZrMe][MeB(C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>)<sub>3</sub>]-Catalyzed Polymerization of 1-Hexene by Direct Observation. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132* (33), 11461-11463.
307. Maiwald, M.; Fischer, H. H.; Kim, Y.-K.; Hasse, H., Quantitative on-line high-resolution NMR spectroscopy in process engineering applications. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2003**, *375* (8), 1111-1115.
308. Maiwald, M.; Grütznert, T.; Ströfer, E.; Hasse, H., Quantitative NMR spectroscopy of complex technical mixtures using a virtual reference: chemical equilibria and reaction kinetics of formaldehyde–water–1,3,5-trioxane. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2006**, *385* (5), 910-917.
309. Bernstein, M. A.; Štefinović, M.; Sleigh, C. J., Optimising reaction performance in the pharmaceutical industry by monitoring with NMR. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2007**, *45* (7), 564-571.
310. Foley, D. A.; Doecke, C. W.; Buser, J. Y.; Merritt, J. M.; Murphy, L.; Kissane, M.; Collins, S. G.; Maguire, A. R.; Kaerner, A., ReactNMR and ReactIR as Reaction Monitoring and Mechanistic Elucidation Tools: The NCS Mediated Cascade Reaction of  $\alpha$ -Thioamides to  $\alpha$ -Thio- $\beta$ -chloroacrylamides. *The Journal of organic chemistry* **2011**, *76* (23), 9630-9640.
311. Barrios Sosa, A. C.; Williamson, R. T.; Conway, R.; Shankar, A.; Sumpter, R.; Cleary, T., A Safe and Efficient Synthetic Route to a 2,5-Dimethyl-1-aryl-1H-imidazole Intermediate. *Organic Process Research & Development* **2011**, *15* (2), 449-454.

312. Buser, J. Y.; McFarland, A. D., Reaction characterization by flow NMR: Quantitation and monitoring of dissolved H<sub>2</sub> via flow NMR at high pressure. *Chemical Communications* **2014**, *50* (32), 4234-4237.
313. Michalik-Onichimowska, A.; Kern, S.; Riedel, J.; Panne, U.; King, R.; Maiwald, M., "Click" analytics for "click" chemistry – A simple method for calibration-free evaluation of online NMR spectra. *Journal of magnetic resonance* **2017**, *277*, 154-161.
314. Bart, J.; Kolkman, A. J.; Vries, A. J. O. D.; Koch, K.; Nieuwland, P. J.; Janssen, H. J. W. G.; Van Bentum, J. P. J. M.; Ampt, K. A. M.; Rutjes, F. P. J. T.; Wijmenga, S. S.; Gardeniers, H. J. G. E.; Kentgens, A. P. M., A Microfluidic high-resolution NMR flow probe. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131* (14), 5014-5015.
315. Barna, J. C. J.; Laue, E. D.; Mayger, M. R.; Skilling, J.; Worrall, S. J. P., Exponential sampling, an alternative method for sampling in two-dimensional NMR experiments. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1987**, *73* (1), 69-77.
316. Gołowicz, D.; Kasprzak, P.; Orekhov, V.; Kazimierczuk, K., Fast time-resolved NMR with non-uniform sampling. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2020**, *116*, 40-55.
317. Kazimierczuk, K.; Orekhov, V. Y., Accelerated NMR Spectroscopy by Using Compressed Sensing. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50* (24), 5556-5559.
318. Holland, D. J.; Bostock, M. J.; Gladden, L. F.; Nietlispach, D., Fast Multidimensional NMR Spectroscopy Using Compressed Sensing. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50* (29), 6548-6551.
319. Dass, R.; Grudziak, K.; Ishikawa, T.; Nowakowski, M.; Dbowska, R.; Kazimierczuk, K., Fast 2D NMR spectroscopy for in vivo monitoring of bacterial metabolism in complex mixtures. *Frontiers in microbiology* **2017**, *8* (JUL).
320. Wu, Y.; D'Agostino, C.; Holland, D. J.; Gladden, L. F., In situ study of reaction kinetics using compressed sensing NMR. *Chemical Communications* **2014**, *50* (91), 14137-14140.
321. Dass, R.; Koźmiński, W.; Kazimierczuk, K., Analysis of Complex Reacting Mixtures by Time-Resolved 2D NMR. *Analytical chemistry* **2015**, *87* (2), 1337-1343.
322. Mayzel, M.; Rosenlöw, J.; Isaksson, L.; Orekhov, V. Y., Time-resolved multidimensional NMR with non-uniform sampling. *Journal of Biomolecular NMR* **2014**, *58* (2), 129-139.
323. Nawrocka, E. K.; Kasprzak, P.; Zawada, K.; Sadło, J.; Grochala, W.; Kazimierczuk, K.; Leszczyński, P. J., Nonstationary Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance: A Method for Studying Reaction Mechanisms in Situ. *Analytical chemistry* **2019**, *91* (17), 11306-11315.
324. Urbańczyk, M.; Shchukina, A.; Gołowicz, D.; Kazimierczuk, K., TRenDS—Software for reaction monitoring with time-resolved non-uniform sampling. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2019**, *57* (1), 4-12.
325. Gouilleux, B.; Charrier, B.; Danieli, E.; Dumez, J.-N.; Akoka, S.; Felpin, F.-X.; Rodriguez-Zubiri, M.; Giraudeau, P., Real-time reaction monitoring by ultrafast 2D NMR on a benchtop spectrometer. *The Analyst* **2015**, *140* (23), 7854-7858.
326. Giraudeau, P.; Felpin, F.-X., Flow reactors integrated with in-line monitoring using benchtop NMR spectroscopy. *Reaction Chemistry & Engineering* **2018**, *3* (4), 399-413.
327. Boisseau, R.; Bussy, U.; Giraudeau, P.; Boujtita, M., In Situ Ultrafast 2D NMR Spectroelectrochemistry for Real-Time Monitoring of Redox Reactions. *Analytical chemistry* **2015**, *87* (1), 372-375.
328. Lameiras, P.; Nuzillard, J.-M., Tailoring the nuclear Overhauser effect for the study of small and medium-sized molecules by solvent viscosity manipulation. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2021**, *123*, 1-50.
329. Chernyak, Y., Dielectric Constant, Dipole Moment, and Solubility Parameters of Some Cyclic Acid Esters. *Journal of Chemical & Engineering Data* **2006**, *51* (2), 416-418.
330. Uma, K.; Balaram, H.; Raghothama, S.; Balaram, P., Simultaneous observation of positive and negative nuclear overhauser effects in oligopeptides due to segmental motion. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1988**, *151* (1), 153-157.
331. Telis, V. R. N.; Telis-Romero, J.; Mazzotti, H. B.; Gabas, A. L., Viscosity of Aqueous Carbohydrate Solutions at Different Temperatures and Concentrations. *International Journal of Food Properties* **2007**, *10* (1), 185-195.

332. Longinotti, M. P.; Corti, H. R., Viscosity of concentrated sucrose and trehalose aqueous solutions including the supercooled regime. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **2008**, *37* (3), 1503-1515.
333. Jannelli, L.; Sacco, A., Thermodynamic and physical behavior of binary mixtures involving sulfolane II. Viscosity, dielectric constant, solid + liquid phase diagram of mixtures of benzene + sulfolane. *The Journal of Chemical Thermodynamics* **1972**, *4* (5), 715-722.
334. Larranaga, M. D.; Lewis, R. J.; Lewis, R. A., Hawley's Condensed Chemical Dictionary 16th Edition. *John Wiley & Sons, Inc. Hoboken* **2016**, 1334.
335. Artemchenko, A. I., Viscosity and structure of potassium iodide solutions in ethylene glycol. *Fiz. Khim. Rastvorov.* **1972**, 128-134.
336. Jiang, X.; Zhao, Y.; Hou, B.; Zhang, M.; Bao, Y., Density, Viscosity, and Thermal Conductivity of Electronic Grade Phosphoric Acid. *Journal of Chemical & Engineering Data* **2011**, *56* (2), 205-211.
337. Cho, C. H.; Urquidi, J.; Singh, S.; Robinson, G. W., Thermal Offset Viscosities of Liquid H<sub>2</sub>O, D<sub>2</sub>O, and T<sub>2</sub>O. *The Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *103* (11), 1991-1994.
338. Bismuto, E.; Irace, G., The effect of molecular confinement on the conformational dynamics of the native and partly folded state of apomyoglobin. *FEBS Letters* **2001**, *509* (3), 476-480.
339. Frederick M. Ausubel; Roger Brent; Robert E. Kingston; David D. Moore; J.G. Seidman; John A. Smith; Kevin Struhl; Patricia Wang-Iverson; Bonitz, S. G., Current protocols in molecular biology, edited by M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl. Volumes 1 and 2. John Wiley & Sons, Inc., Media, PA, 1988, \$165.00. *Molecular Reproduction and Development* **1989**, *1* (2), 146-146.
340. Kim, R.; Yokota, H.; Kim, S. H., Electrophoresis of proteins and protein-protein complexes in a native agarose gel. *Anal Biochem* **2000**, *282* (1), 147-9.
341. Spring, A. M.; Germann, M. W., Supercooled aqueous nuclear magnetic resonance using agarose gels. *Anal. Biochem.* **2012**, *427* (1), 79-81.
342. Pastore, A.; Salvadori, S.; Temussi, P. A., Peptides and proteins in a confined environment: NMR spectra at natural isotopic abundance. *J. Pept. Sci.* **2007**, *13* (5), 342-347.
343. Riddick, J. A.; Bunger, W. B.; Sakano, T. K., *Organic solvents: physical properties and methods of purification. Fourth edition.* John Wiley and Sons, New York, NY: United States, 1986.
344. Sacco, A.; Petrella, G.; Castagnolo, M.; Dell'atti, A., Excess volumes and viscosity of water—sulfolane mixtures at 30, 40 and 50°C. *Thermochim Acta* **1981**, *44* (1), 59-66.
345. Janelli, L.; Rakshit, A. K.; Sacco, A., Viscosity of Binary Liquid Mixtures Involving Sulfolane and Alcohols. *Zeitschrift für Naturforschung A* **1974**, *29* (2), 355-358.
346. Szeverenyi, N. M.; Bothner-By, A. A.; Bittner, R., Kinetics of spin diffusion in the protons of brucine-d<sub>2</sub> in solution in deuteriophosphoric acid. *The Journal of Physical Chemistry* **1980**, *84* (22), 2880-2883.
347. Atherthon Seidell; Linke, W. F., Solubilities of Inorganic and Organic Compounds. A compilation of quantitative solubility data from the periodical literature, by Atherton Seidell, Ph. D., Washington. Supplement to the second edition containing data published during the years 1917–1926 inclusive. D. van Nostrand Company, Inc., New York/Gauthier-Villars et Cie., Paris, 1928. 569 Seiten. *Archiv der Pharmazie* **1928**, *266* (7), 544c-544.
348. Smith, A.; Menzies, A. W. C., THE SOLUBILITIES OF ORTHOPHOSPHORIC ACID AND ITS HYDRATES. A NEW HYDRATE. *Journal of the American Chemical Society* **1909**, *31* (11), 1183-1191.
349. Piotto, M.; Saudek, V.; Sklenář, V., Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *Journal of Biomolecular NMR* **1992**, *2* (6), 661-665.
350. Johnson, C. S., Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1999**, *34* (3), 203-256.
351. Antalek, B., Using pulsed gradient spin echo NMR for chemical mixture analysis: How to obtain optimum results. *Concepts in Magnetic Resonance* **2002**, *14* (4), 225-258.
352. Fordham, E. J.; Gibbs, S. J.; Hall, L. D., Partially restricted diffusion in a permeable sandstone: Observations by stimulated echo PFG NMR. *Magnetic Resonance Imaging* **1994**, *12* (2), 279-284.
353. Wu, D. H.; Chen, A. D.; Johnson, C. S., An Improved Diffusion-Ordered Spectroscopy Experiment Incorporating Bipolar-Gradient Pulses. *Journal of Magnetic Resonance, Series A* **1995**, *115* (2), 260-264.

354. Delsuc, M. A.; Malliavin, T. E., Maximum Entropy Processing of DOSY NMR Spectra. *Analytical chemistry* **1998**, *70* (10), 2146-2148.
355. Windig, W.; Antalek, B., Direct exponential curve resolution algorithm (DECRA): A novel application of the generalized rank annihilation method for a single spectral mixture data set with exponentially decaying contribution profiles. *Chemometr. Intelligent Lab. Syst.* **1997**, *37* (2), 241-254.
356. Armstrong, G. S.; Loening, N. M.; Curtis, J. E.; Shaka, A. J.; Mandelshtam, V. A., Processing DOSY spectra using the regularized resolvent transform. *Journal of magnetic resonance* **2003**, *163* (1), 139-148.
357. Kumar, A.; Kumar, M.; Gupta, M.; Gupta, L., A catalyst-free C–H hydroarylation of coumarin derived ortho-quinone methide (o-QM) with electron rich arenes in glycerol. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 8277-8280.
358. Narkhede, N.; Patel, A., Room temperature acetalization of glycerol to cyclic acetals over anchored silicotungstates under solvent free conditions. *RSC Advances* **2014**, *4* (37), 19294-19301.
359. Završnik, D.; Muratović, S.; Makuc, D.; Plavec, J.; Cetina, M.; Nagl, A.; Clercq, E. D.; Balzarini, J.; Mintas, M., Benzylidene-bis-(4-Hydroxycoumarin) and Benzopyrano-Coumarin Derivatives: Synthesis, <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-NMR Conformational and X-ray Crystal Structure Studies and In Vitro Antiviral Activity Evaluations. *Molecules* **2011**, *16* (7).
360. Montagut-Romans, A.; Boulven, M.; Lemaire, M.; Popowycz, F., Efficient C-3 reductive alkylation of 4-hydroxycoumarin by dehydrogenative oxidation of benzylic alcohols through ruthenium catalysis. *New Journal of Chemistry* **2014**, *38* (4), 1794-1801.
361. Abdou, M. M.; El-Saeed, R. A.; Bondock, S., Recent advances in 4-hydroxycoumarin chemistry. Part 1: Synthesis and reactions. *Arabian Journal of Chemistry* **2019**, *12* (1), 88-121.
362. Pagenkopf, B., ACD/HNMR Predictor and ACD/CNMR Predictor Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Labs), 90 Adelaide Street West, Suite 600, Toronto, ON M5H 2V9, Canada. [www.acdlabs.com](http://www.acdlabs.com). See Web site for pricing information. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (9), 3232-3232.
363. Balch, A. L., In situ monitoring of the degradation of iron porphyrins by dioxygen with hydrazine as sacrificial reductant. Detection of paramagnetic intermediates in the coupled oxidation process by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Inorganic Chemistry* **1999**, *38* (4), 684-691.
364. Pokorny, D.; Brecker, L.; Pogorevc, M.; Steiner, W.; Griengl, H.; Kappe, T.; Ribbons, D., Proton-Nuclear Magnetic Resonance Analyses of the Substrate Specificity of a  $\beta$ -Ketolase from *Pseudomonas putida*, Acetopyruvate Hydrolase †. *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 5051-9.
365. Grover, R. K.; Joshi, B. S.; Batra, S.; Roy, R.; Bhaduri, A. P., Translactonization of erythromycin a during oximation: Mixture analysis and reaction monitoring by NMR. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2001**, *39* (6), 355-360.
366. Durazo, A.; Abu-Omar, M. M., Deuterium NMR spectroscopy is a versatile and economical tool for monitoring reaction kinetics in ionic liquids. *Chemical Communications* **2002**, *2* (1), 66-67.
367. Weber, H.; Brecker, L.; De Souza, D.; Griengl, H.; Ribbons, D. W.; Weber, H. K., Online NMR for monitoring biocatalysed reactions - The use of lipases in organic solvents. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2002**, *19* (20), 149-157.
368. Rule, J. D.; Moore, J. S., ROMP Reactivity of endo- and exo-Dicyclopentadiene. *Macromolecules* **2002**, *35* (21), 7878-7882.
369. Vallikivi, I.; Järving, I.; Pehk, T.; Samel, N.; Tõugu, V.; Parve, O., NMR monitoring of lipase-catalyzed reactions of prostaglandins: Preliminary estimation of reaction velocities. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2004**, *32* (1-2), 15-19.
370. Stockman, B. J.; Lodovice, I. J.; Fisher, D. A.; McColl, A. S.; Xie, Z., A nuclear magnetic resonance-based functional assay for nicotinamide adenine dinucleotide synthetase. *J. Biomol. Screen.* **2007**, *12* (4), 457-463.
371. Chaudhuri, P. D.; Guo, R.; Malinakova, H. C., Formation of benzofurans in a stoichiometric annulation reaction between stable Pallada (II) Cycles hypervalent vinyl- and alkynyl(phenyl)iodonium salts. *J. Organomet. Chem.* **2008**, *693* (3), 567-573.
372. Rivera, A.; Núñez, M. E.; Avella, E.; Ríos-Motta, J., An NMR study of sequential intermediates and collateral products in the conversion of 1,3,6,8-tetraazatricyclo[4.4.1.13,8]dodecane (TATD) to 1,3,6,8-tetraazatricyclo[4.3.1.13,8]undecane (TATU). *Tetrahedron Letters* **2008**, *49* (13), 2154-2158.

373. Edge, R.; Less, R. J.; Naseri, V.; McInnes, E. J. L.; Mulvey, R. E.; Wright, D. S., A mechanistic study of the C–P bond cleavage reaction of 1,2-(PH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> with nBuLi/Sb(NMe<sub>2</sub>)<sub>3</sub>. *Dalton Trans.* **2008**, (45), 6454-6460.
374. Crimmin, M. R.; Barrett, A. G. M.; Hill, M. S.; Hitchcock, P. B.; Procopiou, P. A., Heavier Group 2 Element Catalyzed Hydrophosphination of Carbodiimides. *Organometallics* **2008**, *27* (4), 497-499.
375. Cheung, F. K.; Clarke, A. J.; Clarkson, G. J.; Fox, D. J.; Graham, M. A.; Lin, C.; Crivillé, A. L.; Wills, M., Kinetic and structural studies on 'tethered' Ru(ii) arene ketone reduction catalysts. *Dalton Trans.* **2010**, *39* (5), 1395-1402.
376. Schmid, M. B.; Zeitler, K.; Gschwind, R. M., The Elusive Enamine Intermediate in Proline-Catalyzed Aldol Reactions: NMR Detection, Formation Pathway, and Stabilization Trends. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49* (29), 4997-5003.
377. Yokoyama, Y.; Nakakoshi, M.; Okuno, H.; Sakamoto, Y.; Sakurai, S., Mechanism for the direct synthesis of tryptophan from indole and serine: a useful NMR technique for the detection of a reactive intermediate in the reaction mixture. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2010**, *48* (10), 811-817.
378. Bordegé, V.; Muñoz-Bonilla, A.; León, O.; Sánchez-Chaves, M.; Cuervo-Rodríguez, R.; Fernández-García, M., Glycopolymers with glucosamine pendant groups: Copolymerization, physico-chemical and interaction properties. *React Funct Polym* **2011**, *71* (1), 1-10.
379. Morten, C. J.; Byers, J. A.; Jamison, T. F., Evidence That Epoxide-Opening Cascades Promoted by Water Are Stepwise and Become Faster and More Selective After the First Cyclization. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133* (6), 1902-1908.
380. Schmid, M. B.; Zeitler, K.; Gschwind, R. M., NMR Investigations on the Proline-Catalyzed Aldehyde Self-Condensation: Mannich Mechanism, Dienamine Detection, and Erosion of the Aldol Addition Selectivity. *The Journal of organic chemistry* **2011**, *76* (9), 3005-3015.
381. Burés, J.; Armstrong, A.; Blackmond, D. G., Mechanistic Rationalization of Organocatalyzed Conjugate Addition of Linear Aldehydes to Nitro-olefins. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133* (23), 8822-8825.
382. Do, N. M.; Olivier, M. A.; Salisbury, J. J.; Wager, C. B., Application of Quantitative <sup>19</sup>F and <sup>1</sup>H NMR for Reaction Monitoring and In Situ Yield Determinations for an Early Stage Pharmaceutical Candidate. *Analytical chemistry* **2011**, *83* (22), 8766-8771.
383. Rajković, S.; Ašanin, D. P.; Živković, M. D.; Djuran, M. I., <sup>1</sup>H NMR study of the reactions between carboplatin analogues [Pt(en)(Me-mal-O,O')] and [Pt(en)(Me<sub>2</sub>-mal-O,O')] and various methionine- and histidine-containing peptides under physiologically relevant conditions. *Inorg. Chim. Acta* **2013**, *395*, 245-251.
384. Niklas, T.; Stalke, D.; John, M., Single-shot titrations and reaction monitoring by slice-selective NMR spectroscopy. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (7), 1275-1277.
385. Her, C.; Alonzo, A. P.; Vang, J. Y.; Torres, E.; Krishnan, V. V., Real-Time Enzyme Kinetics by Quantitative NMR Spectroscopy and Determination of the Michaelis-Menten Constant Using the Lambert-W Function. *J Chem Educ* **2015**, *92* (11), 1943-1948.
386. Sundekilde, U. K.; Jarno, L.; Eggert, N.; Bertram, H. C., Real-time monitoring of enzyme-assisted animal protein hydrolysis by NMR spectroscopy – An NMR reactomics concept. *LWT* **2018**, *95*, 9-16.
387. Cox, N.; Kuemmerle, R.; Millard, P.; Cahoreau, E.; François, J. M.; Parrou, J. L.; Lippens, G., Integrated pH measurement during reaction monitoring with dual-reception <sup>1</sup>H- <sup>31</sup>P NMR spectroscopy. *Analytical chemistry* **2019**, *91* (6), 3959-3963.
388. Marullo, S.; Rizzo, C.; D'Anna, F., Task-specific organic salts and ionic liquids binary mixtures: A combination to obtain 5-hydroxymethylfurfural from carbohydrates. *Front. Chem.* **2019**, *7*.
389. Tuttle, R. R.; Rubin, H. N.; Rithner, C. D.; Finke, R. G.; Reynolds, M. M., Copper ion vs copper metal-organic framework catalyzed NO release from bioavailable S-Nitrosoglutathione en route to biomedical applications: Direct <sup>1</sup>H NMR monitoring in water allowing identification of the distinct, true reaction stoichiometries and thiol dependencies. *J. Inorg. Biochem.* **2019**, *199*.
390. Bjelopetrović, A.; Barišić, D.; Duvnjak, Z.; Džajić, I.; Juribašić Kulcsár, M.; Halasz, I.; Martínez, M.; Budimir, A.; Babić, D.; Čurić, M., A Detailed Kinetic-Mechanistic Investigation on the Palladium C–H Bond Activation in Azobenzenes and Their Monopalladated Derivatives. *Inorganic Chemistry* **2020**, *59* (23), 17123-17133.

391. Bartik, T.; Bartik, B.; Hanson, B. E.; Glass, T.; Bebout, W., Comments on the synthesis of trisulfonated triphenylphosphine: reaction monitoring by NMR spectroscopy. *Inorganic Chemistry* **1992**, *31* (12), 2667-2670.
392. Pieper, D. H.; Pollmann, K.; Nikodem, P.; Gonzalez, B.; Wray, V., Monitoring Key Reactions in Degradation of Chloroaromatics by In Situ  $^1\text{H}$  Nuclear Magnetic Resonance: Solution Structures of Metabolites Formed from  $\text{cis}$ -Dienelactone. *J. Bacteriol.* **2002**, *184* (5), 1466.
393. Cabeça, L. F.; Marconcini, L. V.; Mambrini, G. P.; Azeredo, R. B. V.; Colnago, L. A., Monitoring the transesterification reaction used in biodiesel production, with a low cost unilateral nuclear magnetic resonance sensor. *Energy and Fuels* **2011**, *25* (6), 2696-2701.
394. Williamson, K.; Hatzakis, E., NMR analysis of roasted coffee lipids and development of a spent ground coffee application for the production of bioplastic precursors. *Food Res. Int.* **2019**, *119*, 683-692.
395. Frye, S. V.; Eliel, E. L.; Cloux, R., Rapid-injection nuclear magnetic resonance investigation of the reactivity of  $\alpha$ - and  $\beta$ -alkoxy ketones with dimethylmagnesium: kinetic evidence for chelation. *Journal of the American Chemical Society* **1987**, *109* (6), 1862-1863.
396. Palmer, C. A.; Ogle, C. A.; Arnett, E. M., Mechanistic studies on the base-promoted addition of lithiopinacolonate to several aromatic carbonyl compounds in nonhydroxylic solvents. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114* (14), 5619-5625.
397. Chen, X.; Hortelano, E. R.; Eliel, E. L.; Frye, S. V., Chelates as intermediates in nucleophilic additions to alkoxy ketones according to Cram's rule (cyclic model). *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114* (5), 1778-1784.
398. Reetz, M. T.; Raguse, B.; Marth, C. F.; Hügel, H. M.; Bach, T.; Fox, D. N. A., A rapid injection NMR study of the chelation controlled Mukaiyama aldol addition:  $\text{TiCl}_4$  versus  $\text{LiClO}_4$  as the Lewis acid. *Tetrahedron* **1992**, *48* (27), 5731-5742.
399. Geletneky, C.; Försterling, F.-H.; Bock, W.; Berger, S., A Dynamic Equilibrium of Oxaphosphetanes. *Chemische Berichte* **1993**, *126* (11), 2397-2401.
400. Ogle, C. A.; Johnson, H. C.; Wang, X. L.; Strickler, F. H.; Bucca, D.; Gordon, B., III, A Rapid-Injection Nuclear Magnetic Resonance Study of the Butyllithium-Initiated Polymerization of Styrene. *Macromolecules* **1995**, *28* (15), 5184-5191.
401. Mayr, H.; Ofial, Armin R.; Sauer, J.; Schmied, B., [2+4] Cycloadditions of Iminium Ions – Concerted or Stepwise Mechanism of Aza Diels–Alder Reactions? *European Journal of Organic Chemistry* **2000**, *2000* (11), 2013-2020.
402. Bertz, S. H.; Carlin, C. M.; Deadwyler, D. A.; Murphy, M. D.; Ogle, C. A.; Seagle, P. H., Rapid-Injection NMR Study of Iodo- and Cyano-Gilman Reagents with 2-Cyclohexenone: Observation of  $\pi$ -Complexes and Their Rates of Formation. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (46), 13650-13651.
403. Bertz, S. H.; Cope, S.; Murphy, M.; Ogle, C. A.; Taylor, B. J., Rapid Injection NMR in Mechanistic Organocopper Chemistry. Preparation of the Elusive Copper(III) Intermediate. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129* (23), 7208-7209.
404. Jones, A. C.; Sanders, A. W.; Sikorski, W. H.; Jansen, K. L.; Reich, H. J., Reactivity of the Triple Ion and Separated Ion Pair of Tris(trimethylsilyl)methyl lithium with Aldehydes: A RINMR Study. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (19), 6060-6061.
405. Albert, K.; Dreher, E. L.; Straub, H.; Rieker, A., Monitoring electrochemical reactions by  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry* **1987**, *25* (10), 919-922.
406. Mincey, D. W.; Popovich, M. J.; Faustino, P. J.; Hurst, M. M.; Caruso, J. A., Monitoring of electrochemical reactions by nuclear magnetic resonance spectrometry. *Analytical chemistry* **1990**, *62* (11), 1197-1200.
407. Sandifer, M. E.; Zhao, M.; Kim, S.; Scherson, D. A., In situ nuclear magnetic resonance determination of paramagnetic susceptibilities of electrogenerated species. *Analytical chemistry* **1993**, *65* (15), 2093-2095.
408. Prenzler, P. D.; Bramley, R.; Downing, S. R.; Heath, G. A., High-field NMR spectroelectrochemistry of spinning solutions: simultaneous in situ detection of electrogenerated species in a standard probe under potentiostatic control. A preliminary account of this work was presented at AISAS 99, Melbourne, Australia, July 1999 [1]. *Electrochemistry Communications* **2000**, *2* (7), 516-521.

409. Webster, R. D., In Situ Electrochemical-NMR Spectroscopy. Reduction of Aromatic Halides. *Analytical chemistry* **2004**, *76* (6), 1603-1610.
410. Klod, S.; Ziegs, F.; Dunsch, L., In Situ NMR Spectroelectrochemistry of Higher Sensitivity by Large Scale Electrodes. *Analytical chemistry* **2009**, *81* (24), 10262-10267.
411. Nunes, L. M. S.; Moraes, T. B.; Barbosa, L. L.; Mazo, L. H.; Colnago, L. A., Monitoring electrochemical reactions in situ using steady-state free precession <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* **2014**, *850*, 1-5.
412. Huang, L.; Sorte, E. G.; Sun, S. G.; Tong, Y. Y. J., A straightforward implementation of in situ solution electrochemical <sup>13</sup>C NMR spectroscopy for studying reactions on commercial electrocatalysts: ethanol oxidation. *Chemical Communications* **2015**, *51* (38), 8086-8088.
413. Ferreira Gomes, B.; Ferreira da Silva, P.; Silva Lobo, C. M.; da Silva Santos, M.; Colnago, L. A., Strong magnetoelectrolysis effect during electrochemical reaction monitored in situ by high-resolution NMR spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* **2017**, *983*, 91-95.
414. Klod, S.; Haubner, K.; Jähne, E.; Dunsch, L., Charge stabilisation by dimer formation of an endcapped thiophene tetramer—an in situ NMR spectroelectrochemical study. *Chem. Sci.* **2010**, *1* (6), 743-750.
415. Zhang, X.; Zwanziger, J. W., Design and applications of an in situ electrochemical NMR cell. *Journal of magnetic resonance* **2011**, *208* (1), 136-147.
416. Simon, H.; Melles, D.; Jacquilleot, S.; Sanderson, P.; Zazzeroni, R.; Karst, U., Combination of Electrochemistry and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for Metabolism Studies. *Analytical chemistry* **2012**, *84* (20), 8777-8782.
417. Bussy, U.; Giraudeau, P.; Tea, I.; Boujtita, M., Understanding the degradation of electrochemically-generated reactive drug metabolites by quantitative NMR. *Talanta* **2013**, *116*, 554-558.
418. Huang, L.; Sun, J.-Y.; Cao, S.-H.; Zhan, M.; Ni, Z.-R.; Sun, H.-J.; Chen, Z.; Zhou, Z.-Y.; Sorte, E. G.; Tong, Y. J.; Sun, S.-G., Combined EC-NMR and In Situ FTIR Spectroscopic Studies of Glycerol Electrooxidation on Pt/C, PtRu/C, and PtRh/C. *ACS Catal.* **2016**, *6* (11), 7686-7695.
419. Sorte, E. G.; Tong, Y. J., Interdigitated metal electrodes for high-resolution in situ electrochemical NMR. *J Electroanal Chem* **2016**, *769*, 1-4.
420. Sorte, E. G.; Jilani, S.; Tong, Y. J., Methanol and Ethanol Electrooxidation on PtRu and PtNiCu as Studied by High-Resolution In Situ Electrochemical NMR Spectroscopy with Interdigitated Electrodes. *Electrocatalysis* **2017**, *8* (2), 95-102.
421. Cao, S.-H.; Ni, Z.-R.; Huang, L.; Sun, H.-J.; Tang, B.; Lin, L.-J.; Huang, Y.-Q.; Zhou, Z.-Y.; Sun, S.-G.; Chen, Z., In Situ Monitoring Potential-Dependent Electrochemical Process by Liquid NMR Spectroelectrochemical Determination: A Proof-of-Concept Study. *Analytical chemistry* **2017**, *89* (7), 3810-3813.
422. Ni, Z.-R.; Cui, X.-H.; Cao, S.-H.; Chen, Z., A novel in situ electrochemical NMR cell with a palisade gold film electrode. *AIP Adv.* **2017**, *7* (8), 085205.
423. Zhang, X. P.; Jiang, W. L.; Cao, S. H.; Sun, H. J.; You, X. Q.; Cai, S. H.; Wang, J. L.; Zhao, C. S.; Wang, X.; Chen, Z.; Sun, S. G., NMR spectroelectrochemistry in studies of hydroquinone oxidation by polyaniline thin films. *Electrochim Acta* **2018**, *273*, 300-306.
424. Cao, S.-H.; Liu, S.; Sun, H.-J.; Huang, L.; Ni, Z.-R.; Jiang, W.-L.; Zhan, M.; Zhou, Z.-Y.; Sun, S.-G.; Chen, Z., Versatile, Robust, and Facile Approach for in Situ Monitoring Electrocatalytic Processes through Liquid Electrochemical NMR Spectroscopy. *Analytical chemistry* **2019**, *91* (3), 1686-1691.
425. Silva, P. F. d.; Gomes, B. F.; Lobo, C. M. S.; Queiroz Júnior, L. H. K.; Danieli, E.; Carmo, M.; Blümich, B.; Colnago, L. A., Electrochemical NMR spectroscopy: Electrode construction and magnetic sample stirring. *Microchemical Journal* **2019**, *146*, 658-663.
426. Zhang, X.-P.; Sun, W.; Cao, S.-H.; Jiang, W.-L.; Peng, H.; Cai, S.-H.; Chen, Z., NMR Spectroelectrochemistry in Studies of Dopamine Oxidation. *Electrochemistry* **2020**, *88* (3), 200-204.
427. Khajeh, M.; Bernstein, M. A.; Morris, G. A., A simple flowcell for reaction monitoring by NMR. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2010**, *48* (7), 516-522.
428. Foley, D. A.; Wang, J.; Maranzano, B.; Zell, M. T.; Marquez, B. L.; Xiang, Y.; Reid, G. L., Online NMR and HPLC as a Reaction Monitoring Platform for Pharmaceutical Process Development. *Analytical chemistry* **2013**, *85* (19), 8928-8932.

429. Drexler, M. T.; Foley, D. A.; Ward, H. W.; Clarke, H. J., IR and NMR Reaction Monitoring Techniques for Nucleophilic Addition Reactions: In Situ Monitoring of the Addition of Benzimidazole to a Pyridinium Salt. *Organic Process Research & Development* **2015**, *19* (9), 1119-1127.
430. Dunn, A. L.; Codina, A.; Foley, D. A.; Marquez, B. L.; Zell, M. T., A detailed mechanistic investigation into the reaction of 3-methylpentanoic acid with Meldrum's acid utilizing online NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2016**, *54* (6), 477-484.
431. Chen, X.; Eldred, D.; Liu, J.; Chiang, H.; Wang, X.; Rickard, M. A.; Tu, S.; Cui, L.; LaBeaume, P.; Skinner, K., Simultaneous In Situ Monitoring of Trimethoxysilane Hydrolysis Reactions Using Raman, Infrared, and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy Aided by Chemometrics and Ab Initio Calculations. *Appl Spectrosc* **2018**, *72* (9), 1404-1415.

---

## Analyse de Mélanges de Composés Organiques par RMN *via* la Diffusion de spin

---

L'objectif de mes travaux de thèse est de proposer aux chimistes une méthodologie innovante et prometteuse dans l'analyse de mélanges de composés organiques par RMN en solution. Les méthodes d'analyse proposées reposent sur l'utilisation du phénomène de diffusion de spin et ne requièrent aucune séparation physique des constituants du mélange étudié. L'observation de la diffusion de spin en RMN des liquides pour l'étude de molécules organiques de taille modérée nécessite un solvant (ou un mélange de solvants) visqueux. L'utilisation de ces solvants visqueux à une température adéquate ralentit suffisamment les mouvements de rotation des composés en mélange pour qu'un transfert de l'aimantation de chaque molécule puisse s'effectuer sur l'ensemble de ses noyaux *via* la diffusion de spin à travers une expérience RMN NOESY 1D ou 2D. En conséquence, les déplacements chimiques des noyaux d'une même molécule sont tous corrélés entre eux, il devient alors possible d'individualiser le spectre de RMN de chaque composé en mélange. Mes travaux de thèse s'articulent autour de 3 tâches : 1) la recherche de nouveaux solvants (ou mélanges de solvants) visqueux efficaces afin de déterminer les conditions d'observation du phénomène de transfert d'aimantation par la diffusion de spin, 2) la mise au point de nouvelles méthodes d'acquisition originales de spectres de RMN améliorant l'efficacité du transfert d'aimantation par la diffusion de spin, 3) l'application de nos méthodes analytiques à l'étude du suivi de réactions chimiques *in-situ* en milieux visqueux afin d'accéder aux structures des composés dans le mélange nouvellement formé.

---

Mots-clés : Mélanges – Solvants visqueux - RMN

---

### Analysis of Organic Compounds within Mixtures by NMR using Spin Diffusion

---

The analysis of small molecules within complex mixtures is a particularly difficult task when dealing with the study of metabolite mixtures or chemical reaction media. This issue has fostered in the recent years an active search for effective and practical solutions. The goal of thesis work is to provide the academic and industrial actors of organic synthetic and natural product chemistry with an innovative and promising analytical tool based on the spin-diffusion phenomenon and dedicated to mixture analysis of small molecules by means of liquid-state NMR, without resorting to any physical separation of mixture components. The spin-diffusion phenomenon requires a viscous solvent or solvents blends. When molecular tumbling is slow due to solvent viscosity, magnetization transfer by dipolar cross-relaxation is strongly favored. All  $^1\text{H}$  nuclei resonances within the same molecule tend to correlate in a 1D or 2D NOESY spectrum. In this context, it is possible to individualize the NMR spectra of small molecule components. My thesis work is structured into three task packages: 1) the search for new efficient viscous solvents or solvent blends suitable for mixture analysis, 2) the design of new NMR experimental methods for the production of mixture component spectra suitable for structure determination, 3) application of our analytical methods to the investigation of *in-situ* reaction monitoring in viscous media so as to access the structures of the compounds in the newly formed mixture.

---

Keywords: Mixtures – Viscous solvents - NMR

---

**Discipline : CHIMIE**

**Spécialité : Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)**

---



Université de Reims Champagne-Ardenne  
ICMR - UMR CNRS 7312  
UFR des Sciences Exactes et Naturelles  
BP 1039 – Case postale 44  
51687 Reims Cedex 2