

Analyse structurale d'oligosaccharides par RMN 1D et 2D

Jean-Marc Nuzillard

Isolement, Structure, Transformations
et Synthèses de Substances Naturelles

Attribution des spectres de RMN

- Il faut disposer
 - Des spectres de RMN
 - De la structure de la molécule
- Il s'agit alors d'identifier dans les spectres les résonances des noyaux atomiques présents dans la molécule.
- L'impossibilité d'effectuer l'attribution peut inciter à remettre en cause l'exactitude de la structure.

Résonance Magnétique Nucléaire

- La RMN utilise les propriétés magnétiques des noyaux atomiques :
 - s : nombre quantique de spin
 - γ : rapport gyromagnétique
- Ces propriétés sont révélées en plongeant l'échantillon dans un champ magnétique intense B_0 .

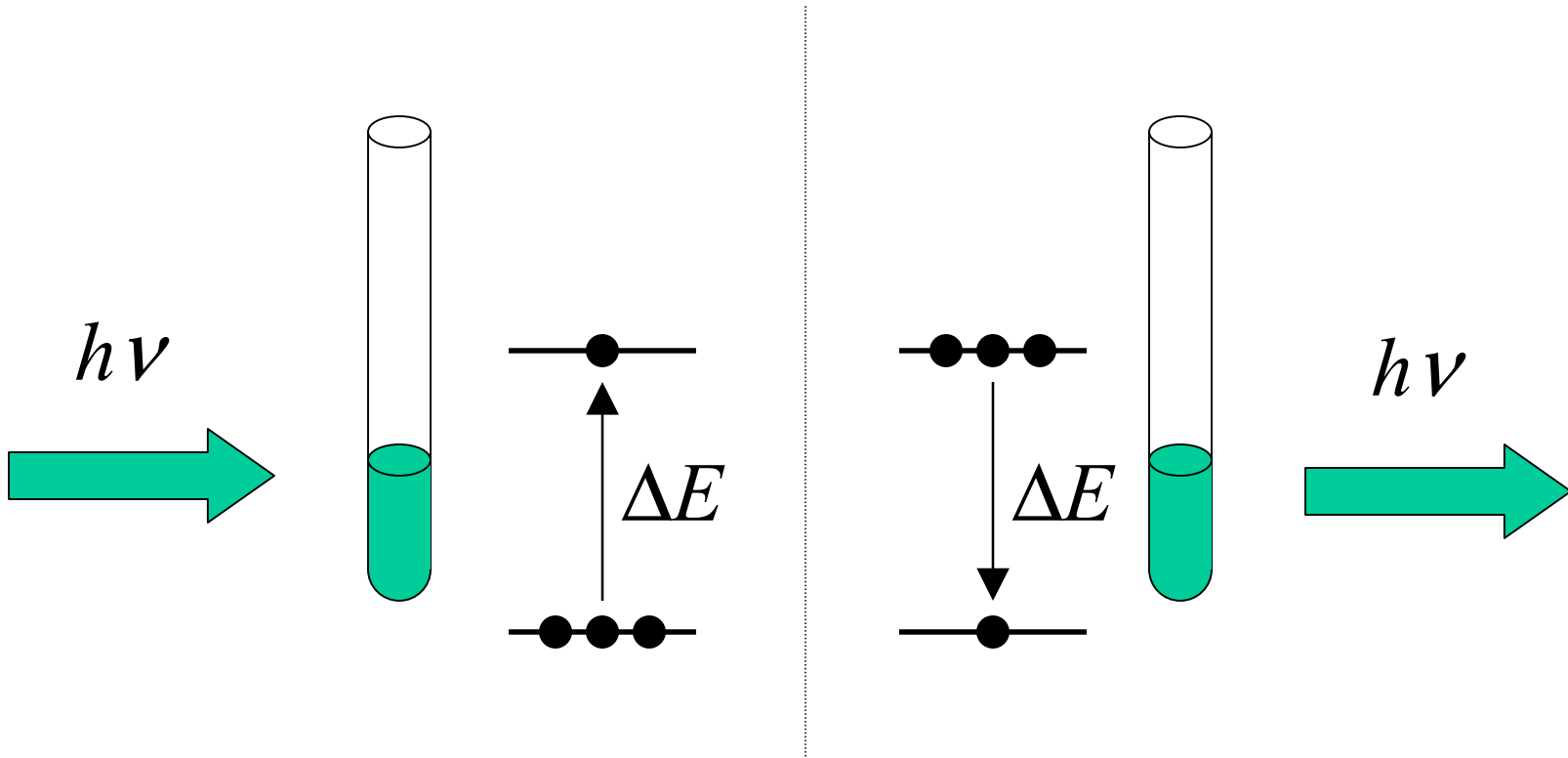
Résonance

- Un noyau ($s \neq 0$) de rapport gyromagnétique γ plongé dans le champ magnétique B_0^{local} interagit de manière privilégiée avec une onde électromagnétique de fréquence ν :

$$\nu = \frac{\gamma B_0^{\text{local}}}{2\pi}$$

- Les fréquences de résonance correspondent au domaine des radio-fréquences.

Absorption - Emission



Spectre de RMN

- Excitation non spécifique par une impulsion de radio-fréquence
- Enregistrement de l'onde électromagnétique restituée par l'échantillon (réponse)
- Analyse des fréquences par transformation de Fourier
- Tracé du graphe $I = f(\nu)$: spectre de RMN.

Déplacement chimique δ

$$B_0^{\text{local}} = B_0(1-\sigma)$$

σ : constante d'écran d'un noyau donné dans une molécule donnée.

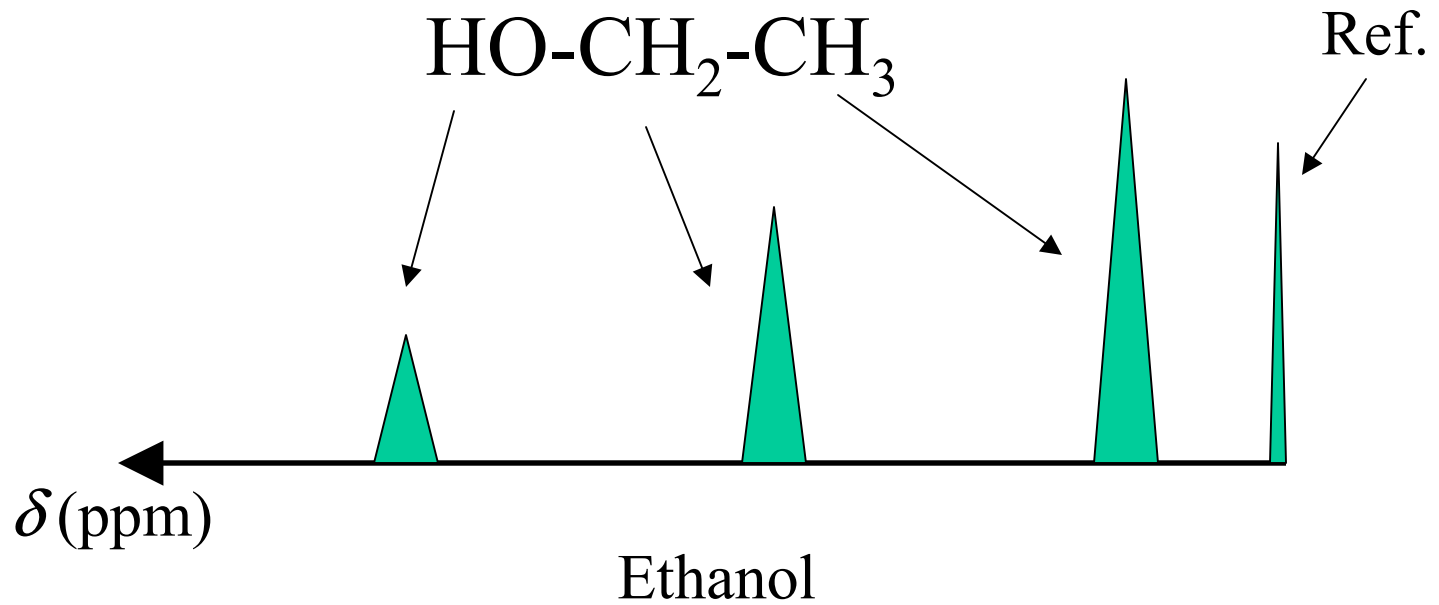
$$\delta = \frac{\nu - \nu_{\text{ref}}}{\nu_{\text{ref}}} \times 10^6$$

Référence : $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$.

$$\delta = \frac{\sigma_{\text{ref}} - \sigma}{1 - \sigma_{\text{ref}}} \times 10^6$$

δ ne dépend pas de B_0 .

Spectre simplifié



Les déplacements chimiques reflètent la distribution des charges électroniques.

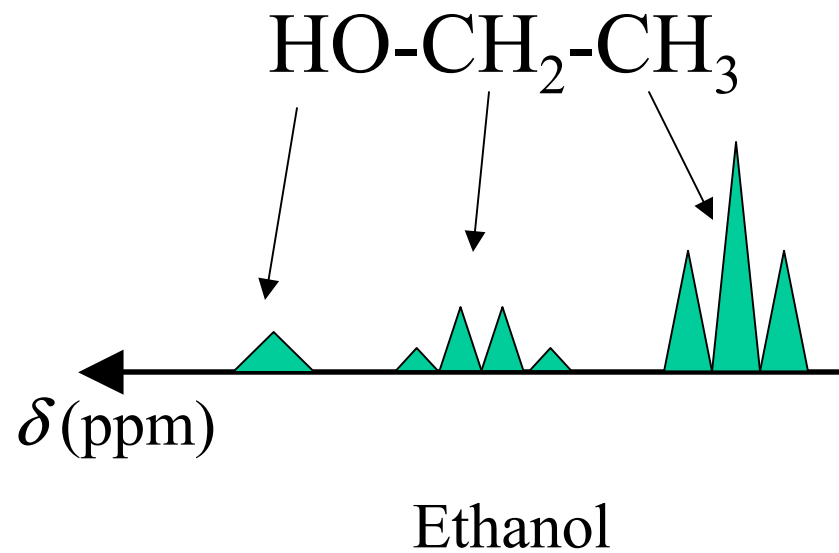
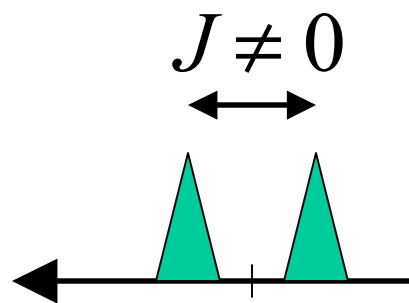
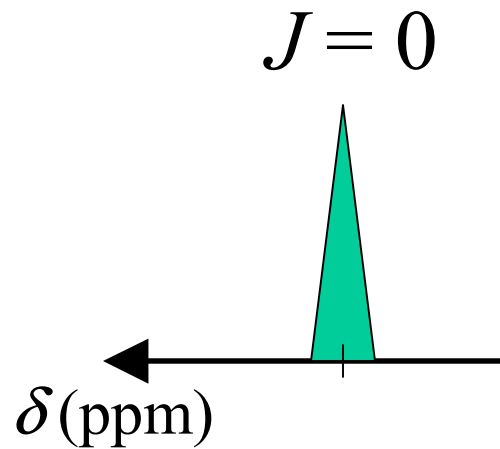
Couplage scalaire

- Interaction magnétique à travers les liaisons chimiques.
- Intensité J en Hz indépendante de B_0 .
- Couplage faible entre A et X :

$$|\nu_A - \nu_X| \gg |J_{AX}|$$

- nJ désigne un couplage à travers n liaisons.

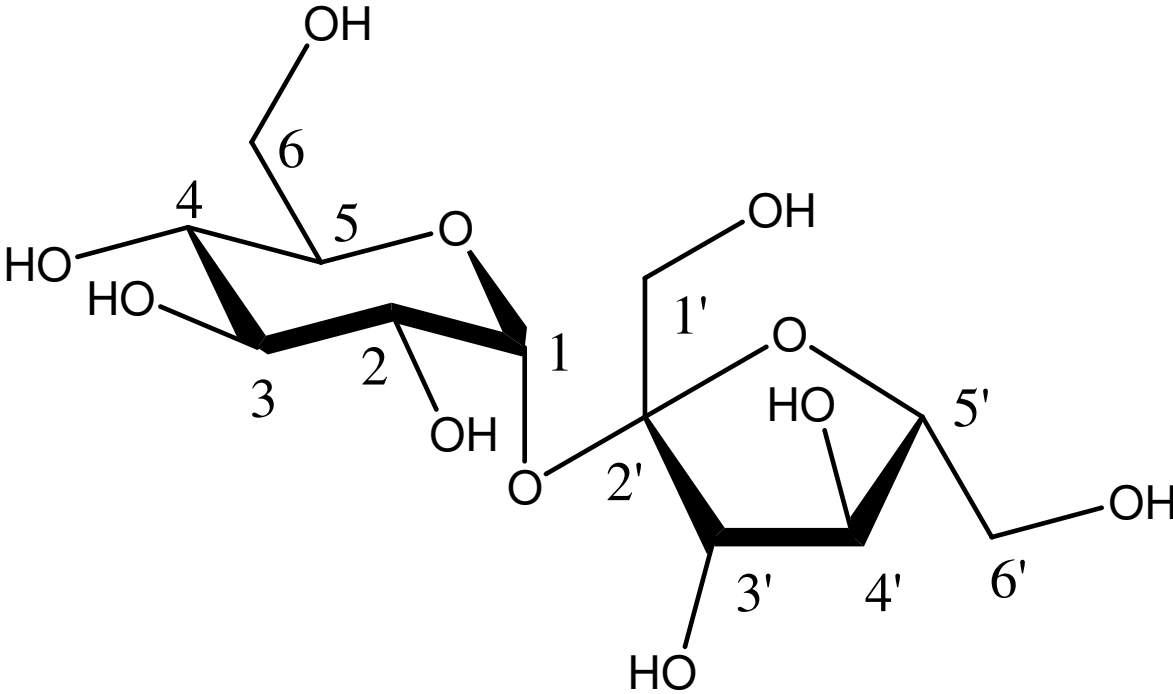
Effet du couplage scalaire



Couplage dipolaire

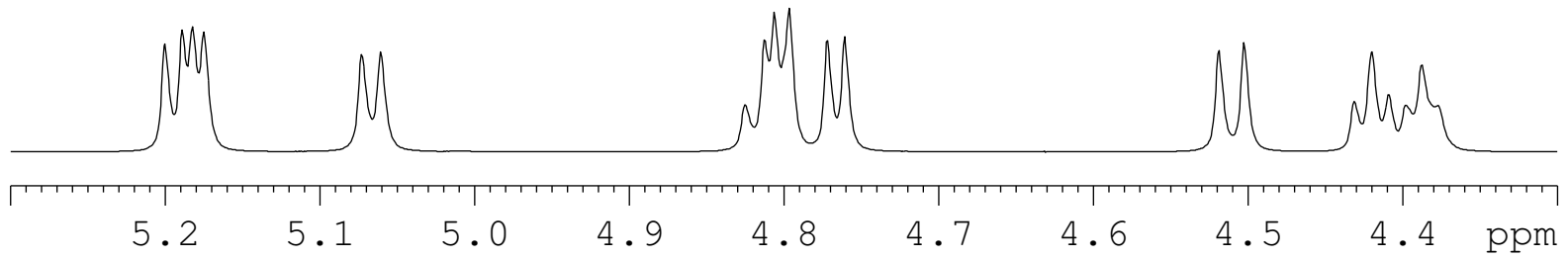
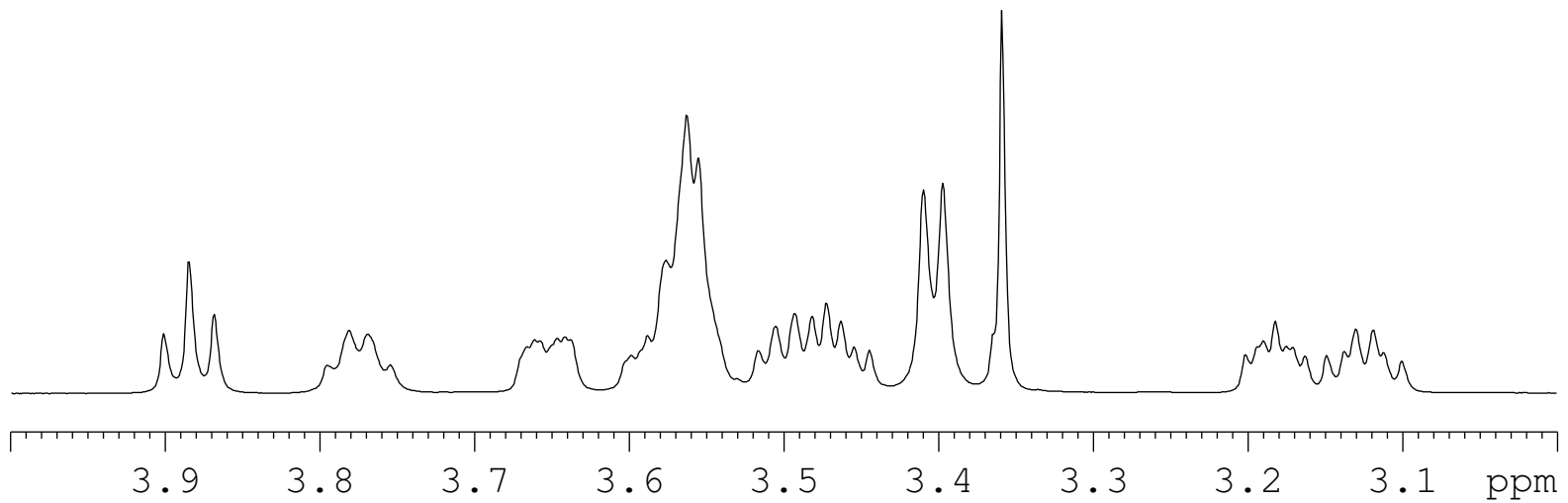
- Couplage magnétique direct (à travers l'espace).
- Invisible directement en phase liquide homogène.
- A l'origine des phénomènes de relaxation
 - T_1 , T_2 , $T_{1\rho}$, effet Overhauser nucléaire (nOe)
 - Permet l'étude de la structure 3D des macromolécules (protéines, ARN).

Saccharose

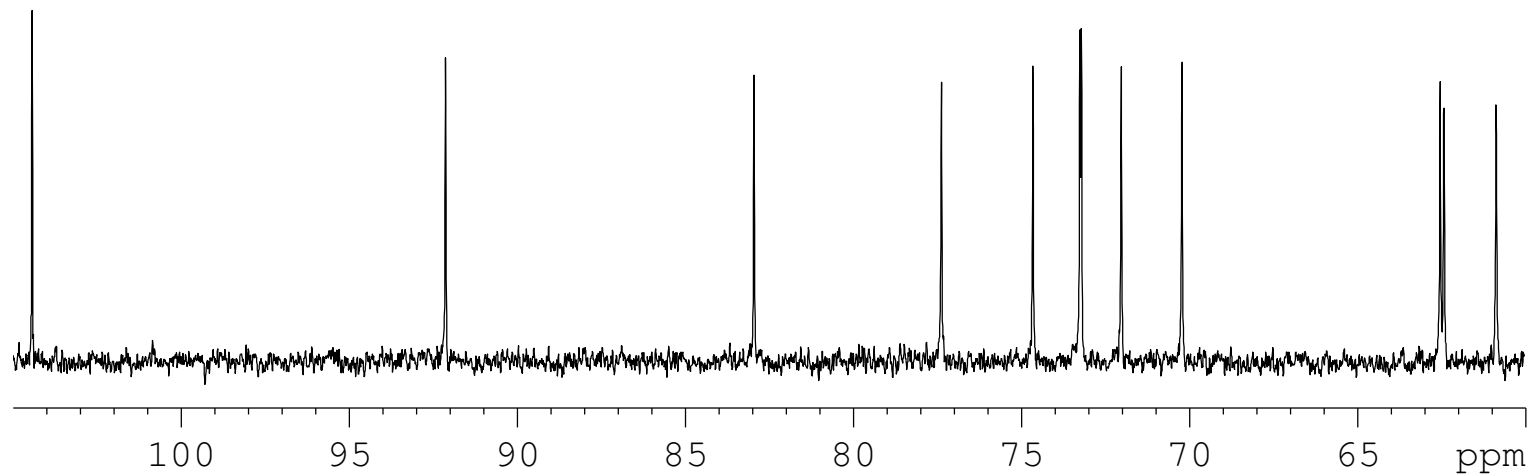


Saccharose dans le DMSO-d₆

RMN ¹H



Saccharose dans le DMSO-d₆ RMN ¹³C (découplé ¹H)



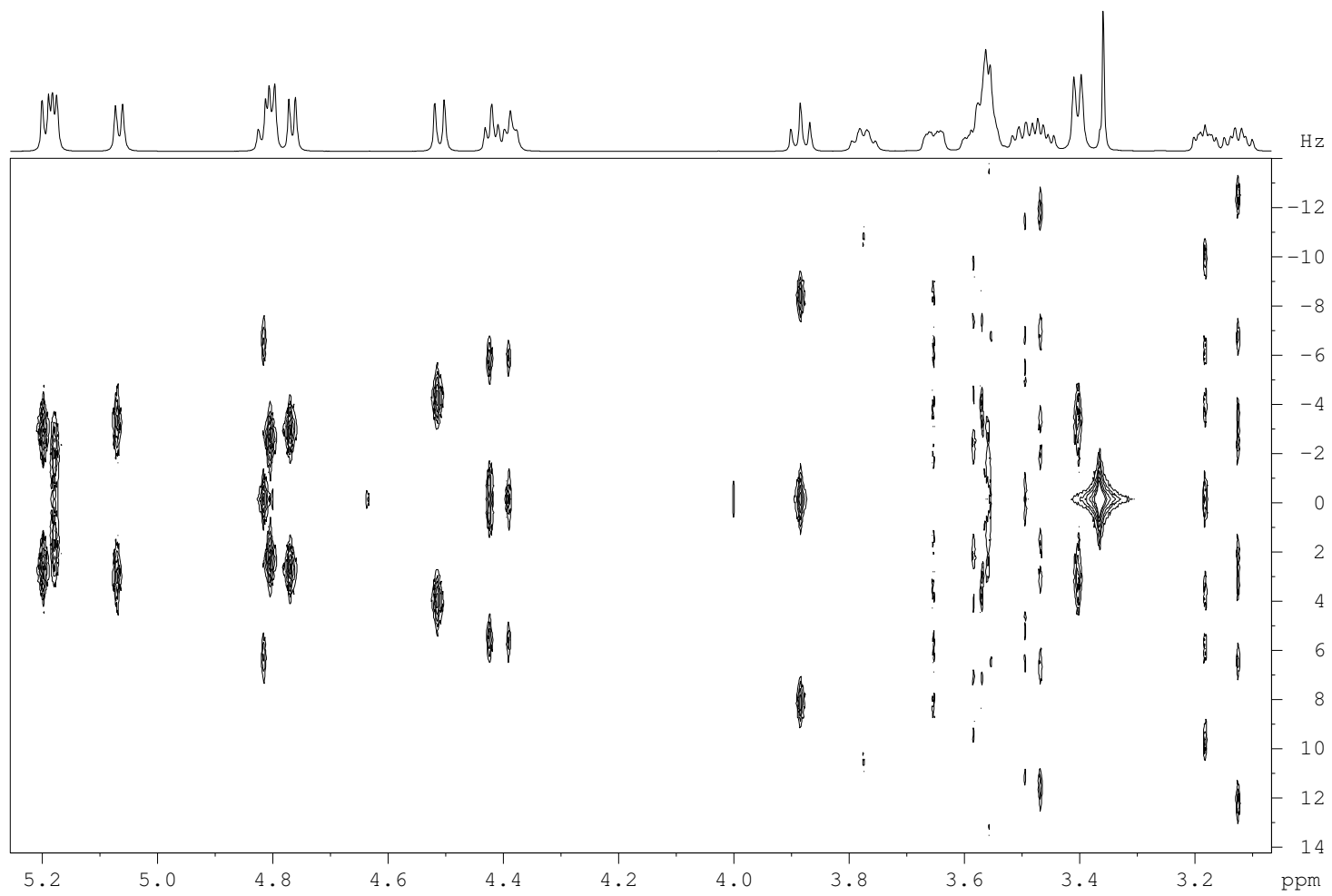
Attribution des résonances du ^{13}C et du ^1H

- Les déplacements chimiques donnent une indication de la fonctionnalité chimique :
 - Entre 4.3 ppm et 5.3 ppm : les OH et le CH anomérique.
 - Entre 3.0 ppm et 4.0 ppm : les autres ...
- Les couplages scalaires renseignent sur la proximité. Beaucoup de constantes sont identiques et leur valeur est donc peu informative.
- La mise en évidence des relations de couplage s'effectue au moyen des expériences de **RMN 2D**.

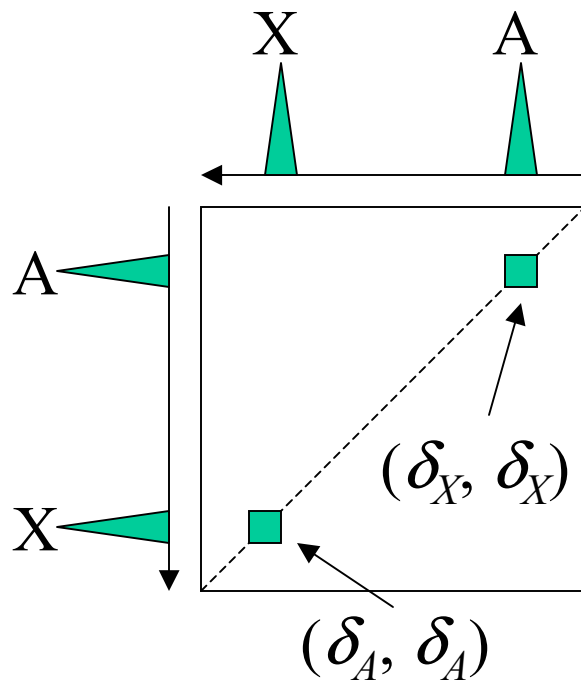
RMN 2D

- Il faut distinguer :
 - Spectroscopie de corrélation des déplacements chimiques. Mise en évidence des paires de déplacements chimiques de noyaux couplés par :
 - Couplage scalaire (COSY,...)
 - Couplage dipolaire (NOESY, ROESY)
 - Spectroscopie de séparation des interactions
- Les spectres 2D sont des représentations graphiques en courbes d'iso-valeur de fonctions de 2 variables de fréquence.

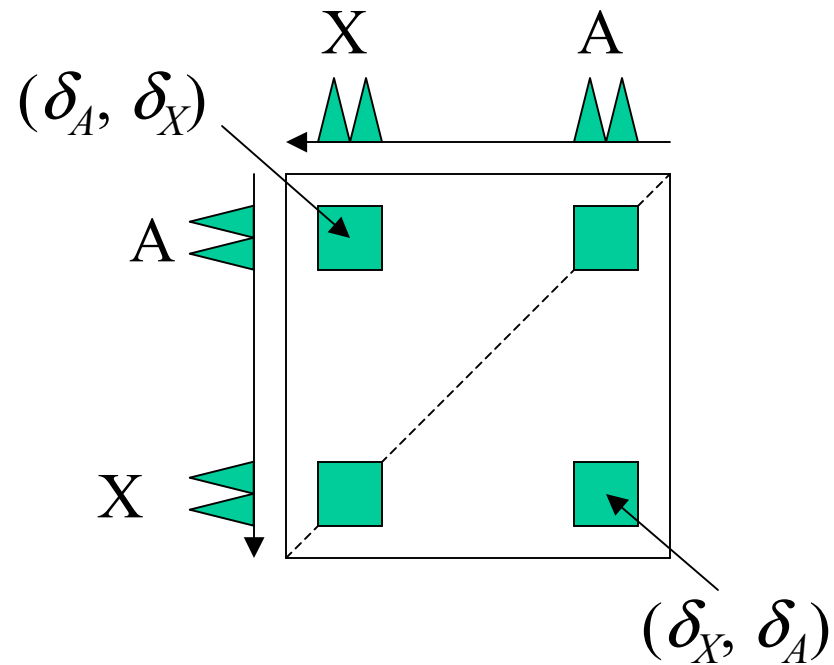
Séparation J - δ



Spectre COSY homonucléaire ^1H - ^1H : COrrrelation SpectroscopY

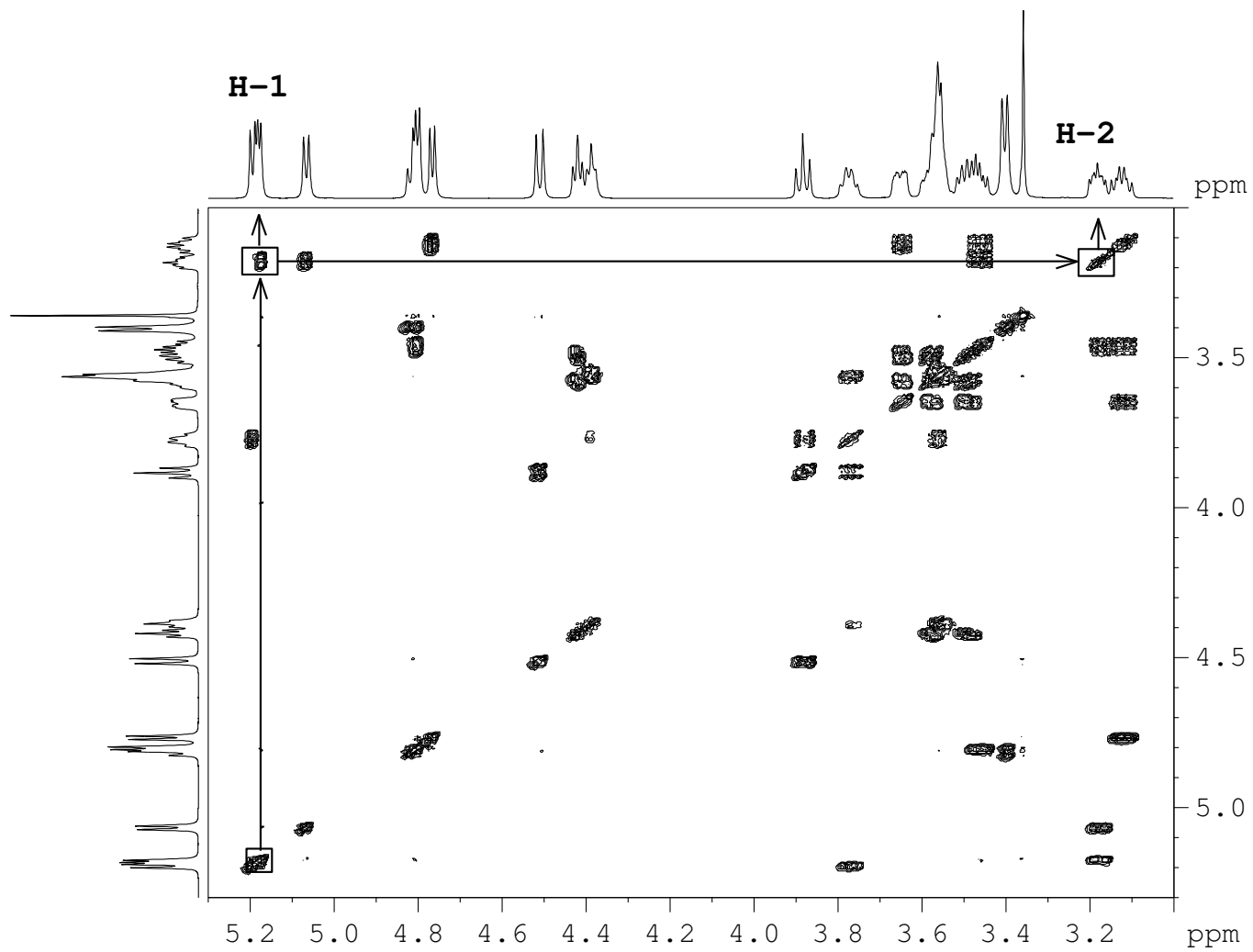


$J=0$

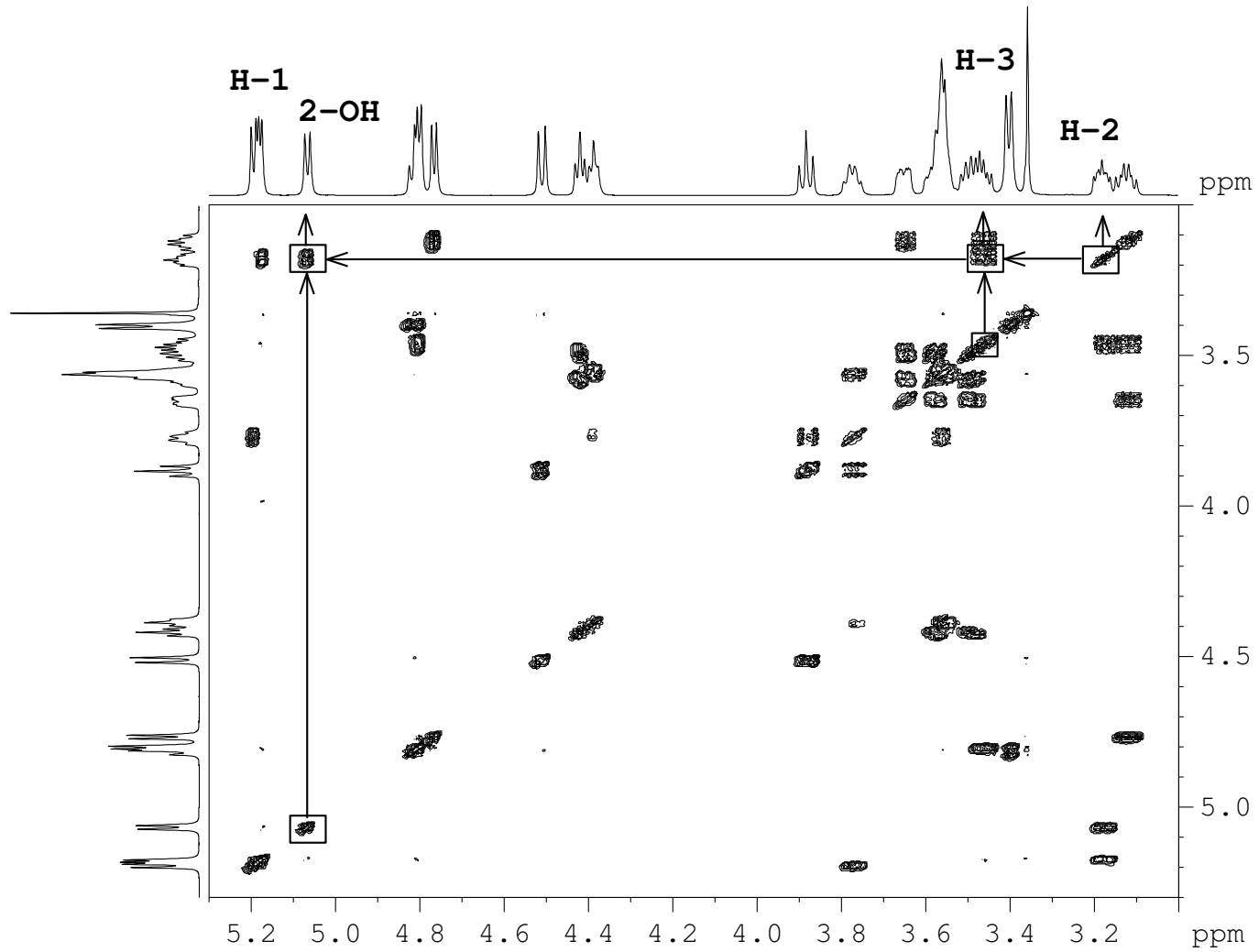


$J \neq 0$

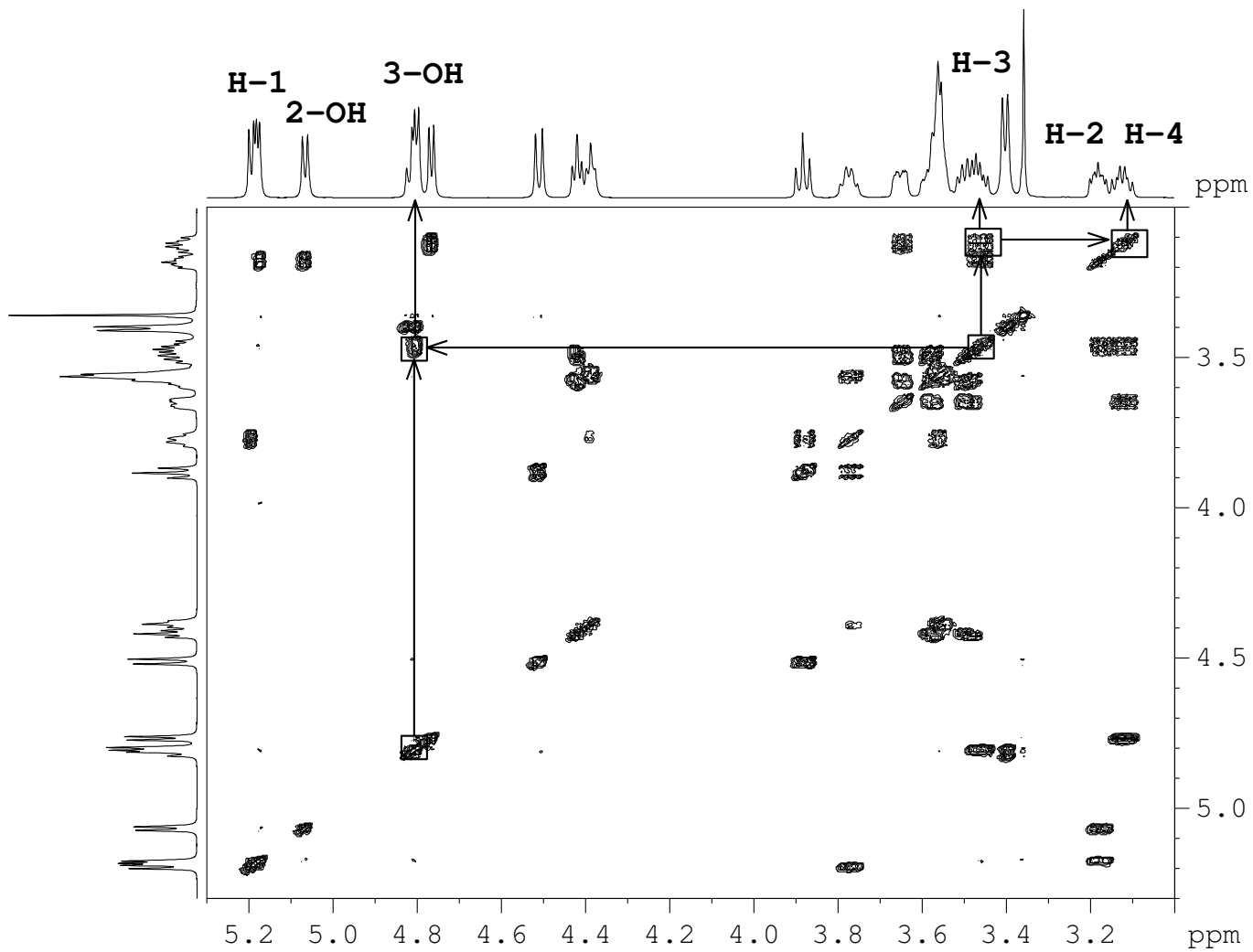
Saccharose : COSY (1)



Saccharose : COSY (2)

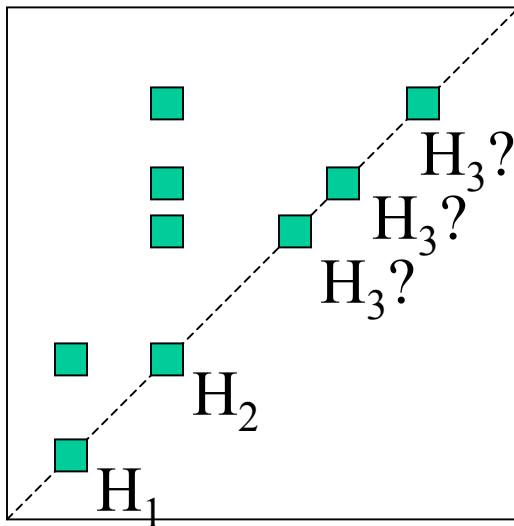


Saccharose : COSY (3)

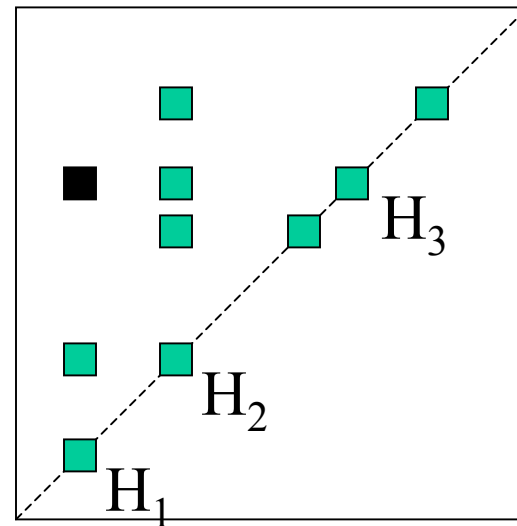


COSY relayée (RCT)

H_1 couple avec H_2 et H_2 couple avec H_3
 H_2 est superposé avec d'autres signaux
 H_1 ne couple pas avec H_3

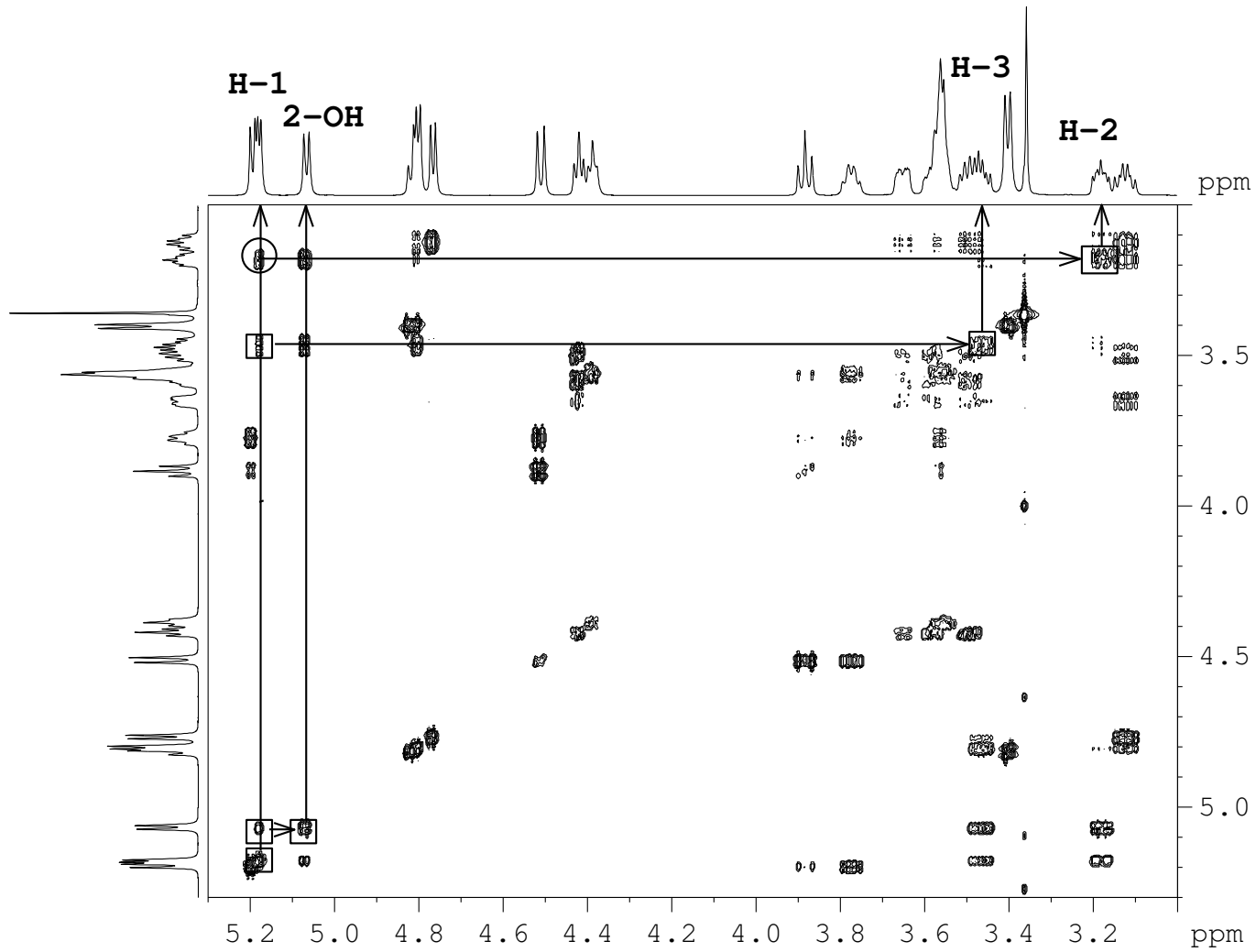


COSY

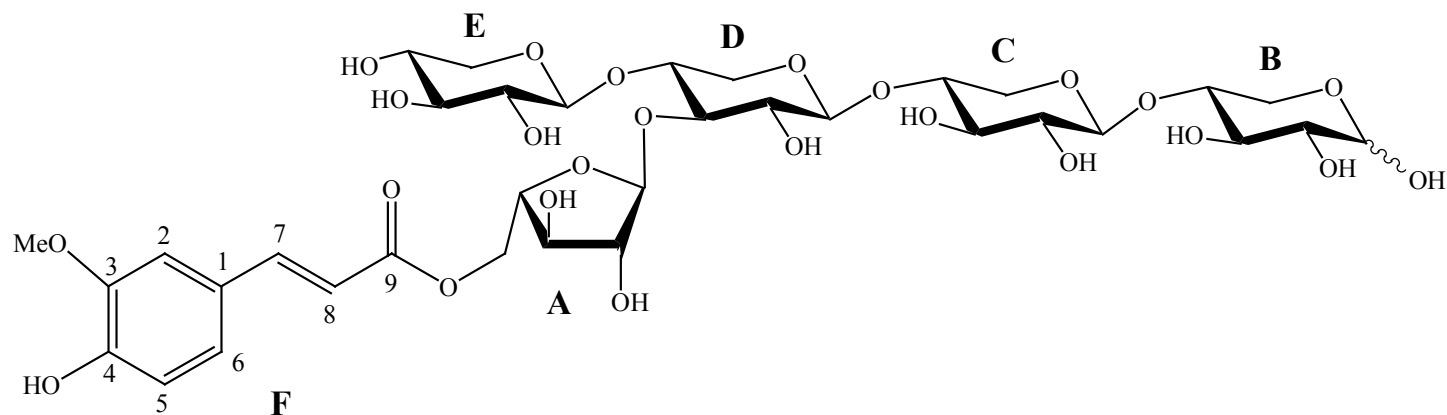


COSY-RCT

Saccharose : COSY-RCT



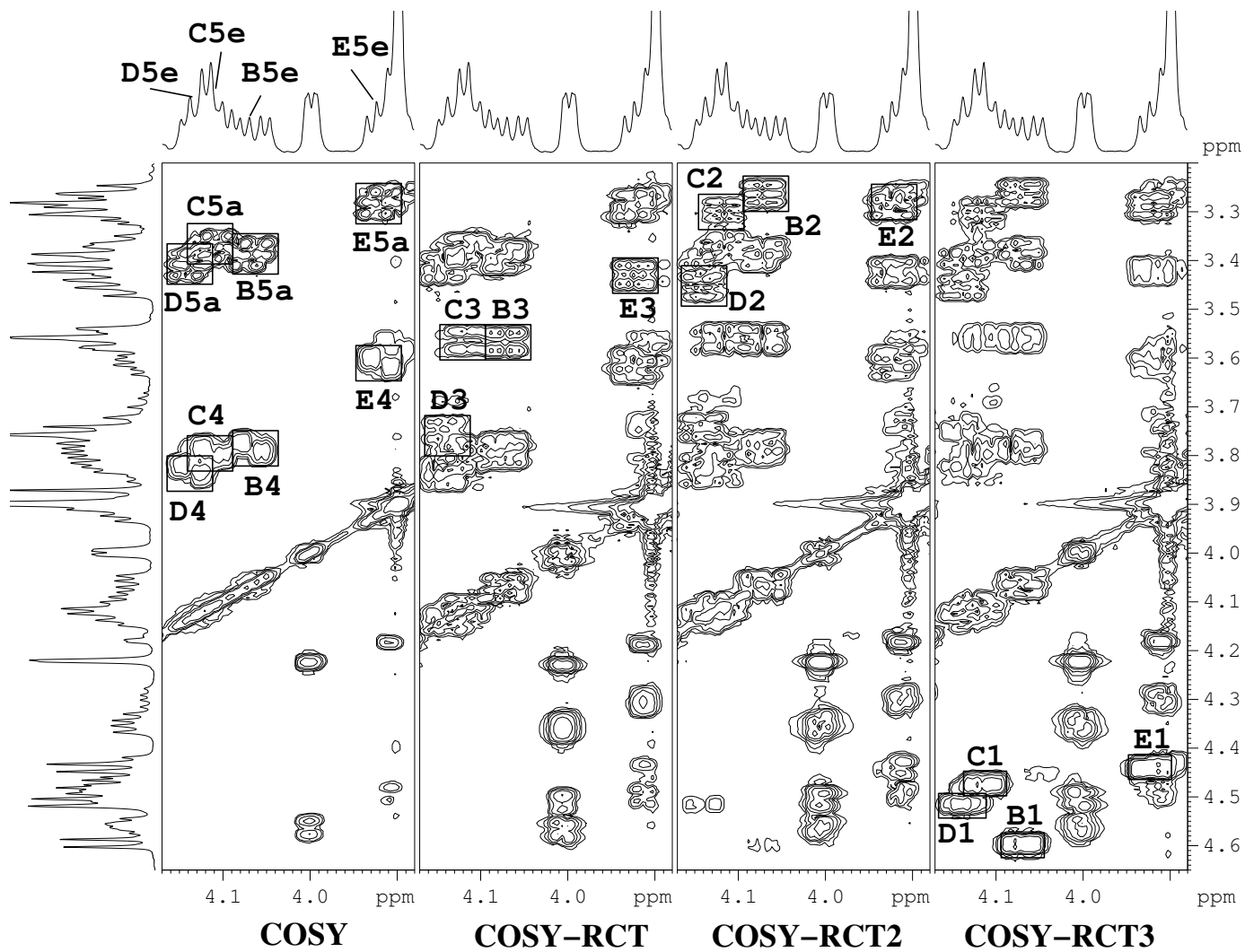
Substance B2



Hydrolysis of wheat bran and straw by an endoxylanase: production and structural characterization of cinnamoyl-oligosaccharides.

C. Lequart, J.-M. Nuzillard, B. Kurek, P. Debeire, *Carbohydrate research* 319 (1999) 102-111

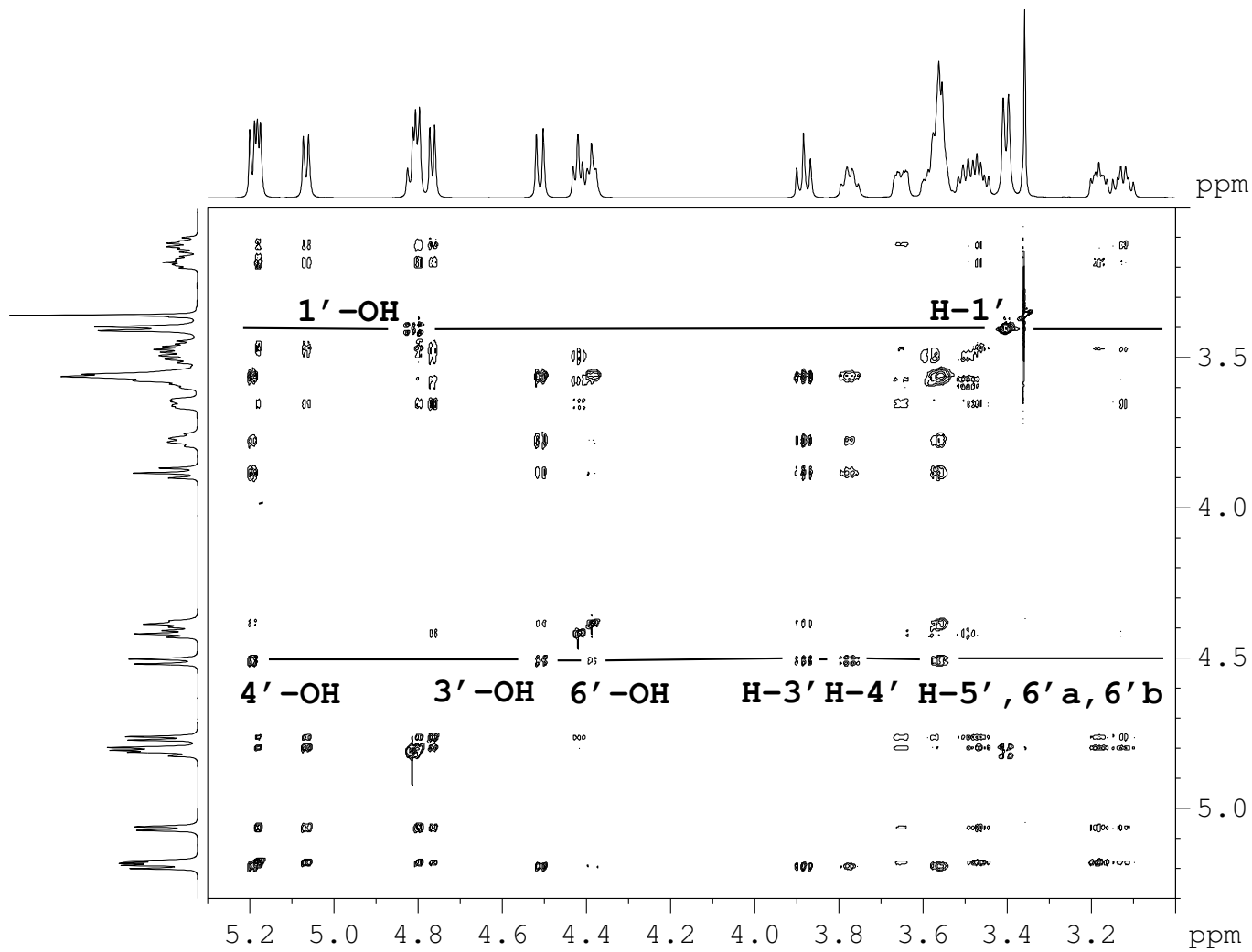
B2 : COSY-RCT_n



TOCSY

- Un spectre TOCSY permet d'individualiser les systèmes de spin.
- Un système de spin est un ensemble de noyaux tel qu'il existe toujours un chemin couplage entre 2 noyaux donnés.
- S'interprète comme un spectre COSY-RCT n mais le principe physique utilisé est différent.
- Le spectre TOCSY ne donne pas d'indication de « distance » entre noyaux.

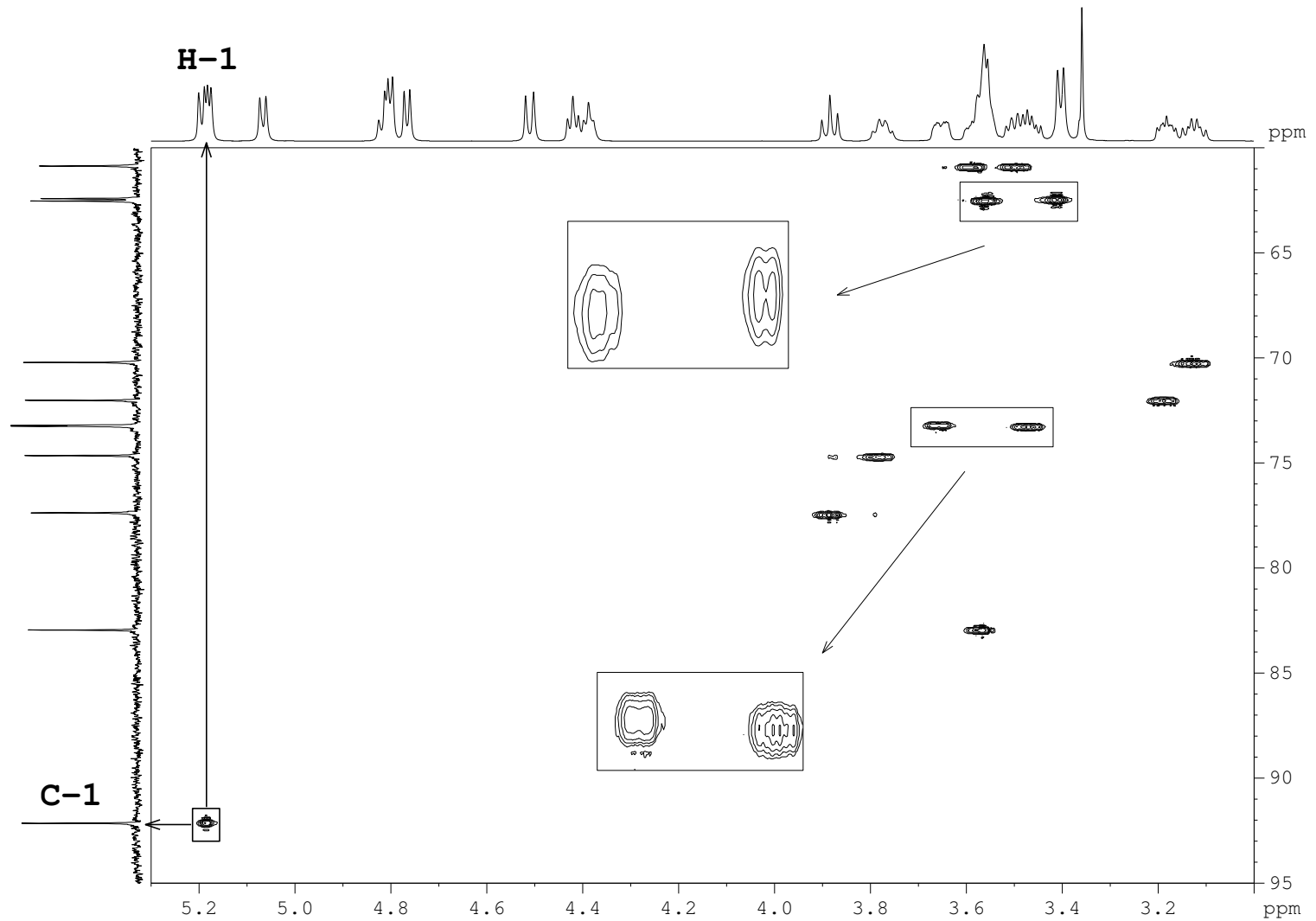
Saccharose : TOCSY



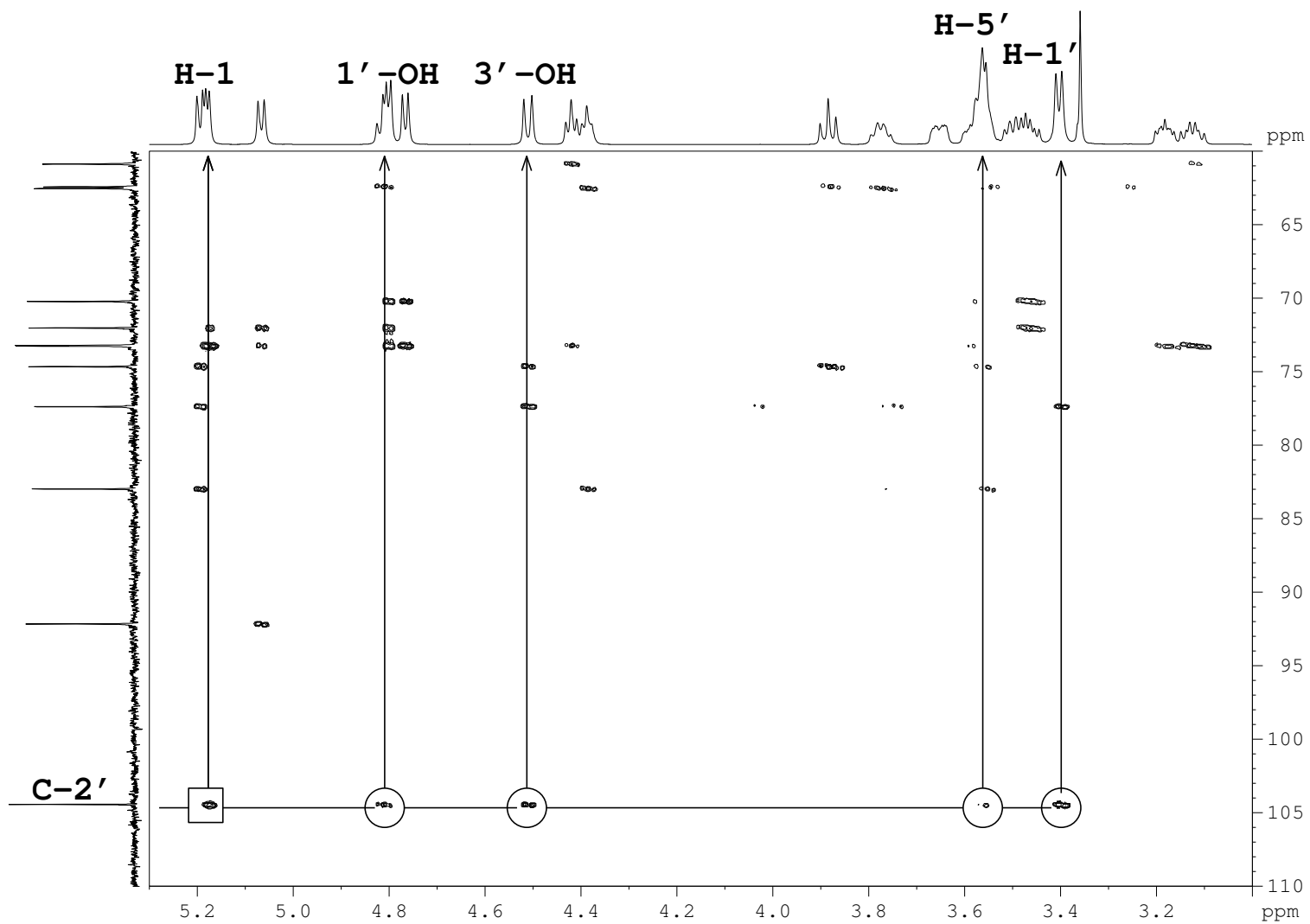
RMN 2D hétéronucléaire

- HSQC (ou HMQC) : corrélation des déplacements chimiques des ^1H et ^{13}C par les couplages directs 1J .
- HMBC : corrélation des déplacements chimiques des ^1H et ^{13}C par les couplages à longue distance 2J et 3J .

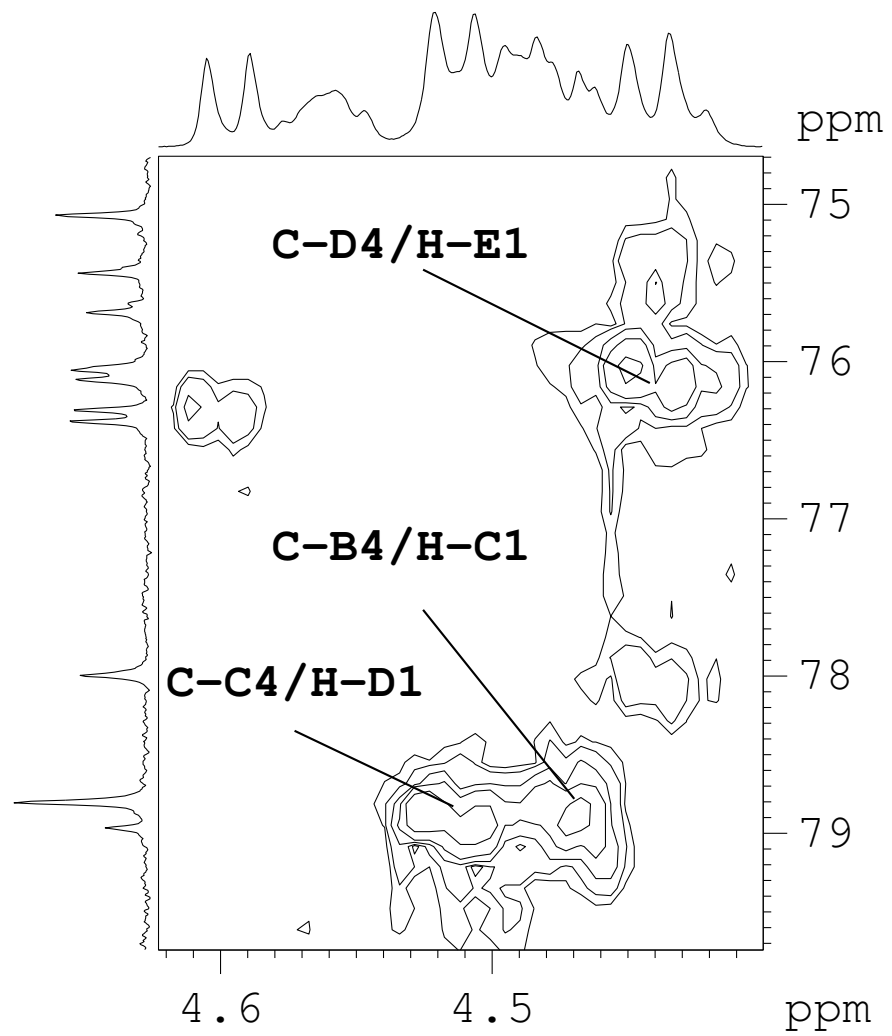
Saccharose : HSQC



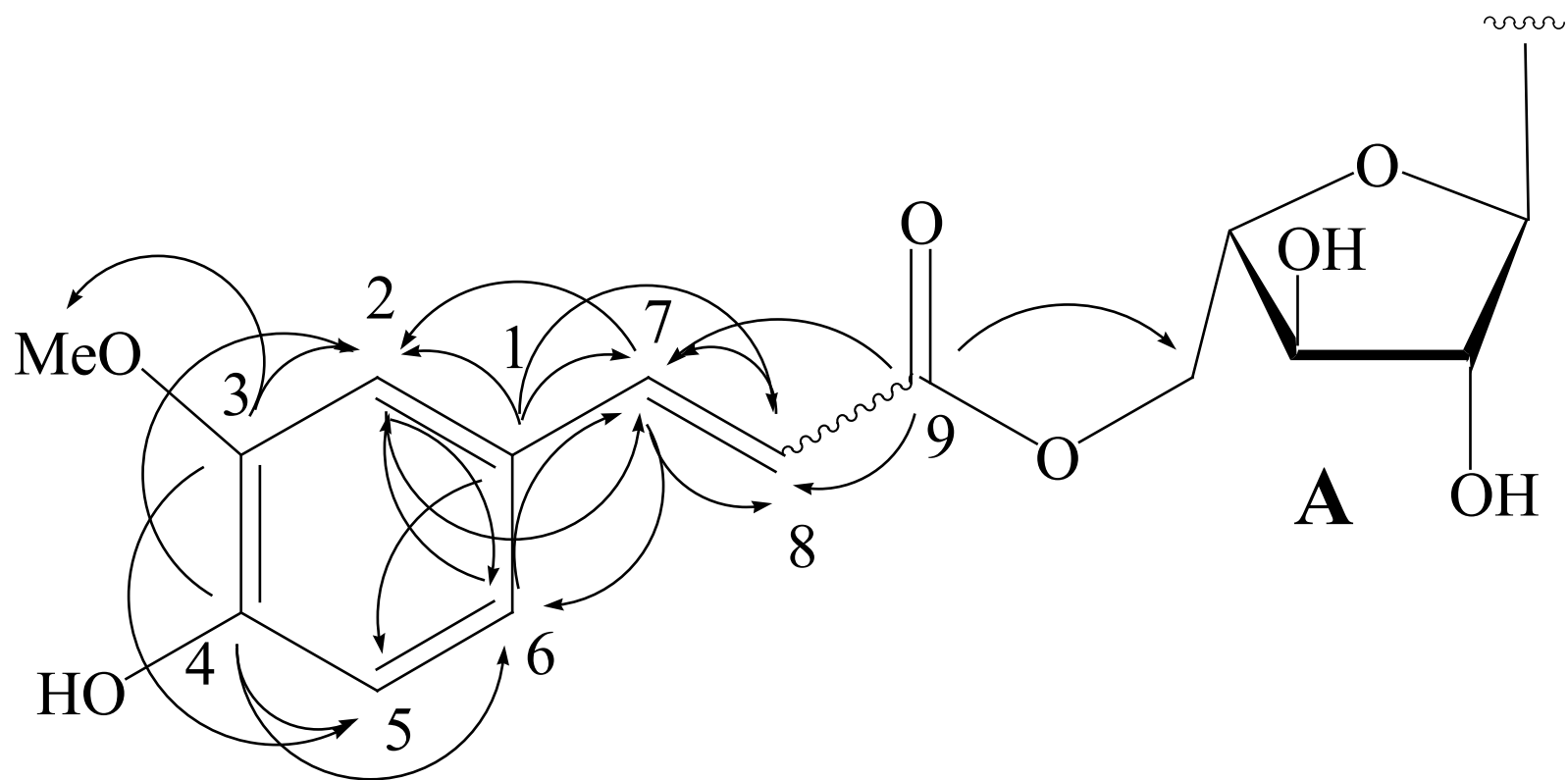
Saccharose : HMBC



B2 : HMBC



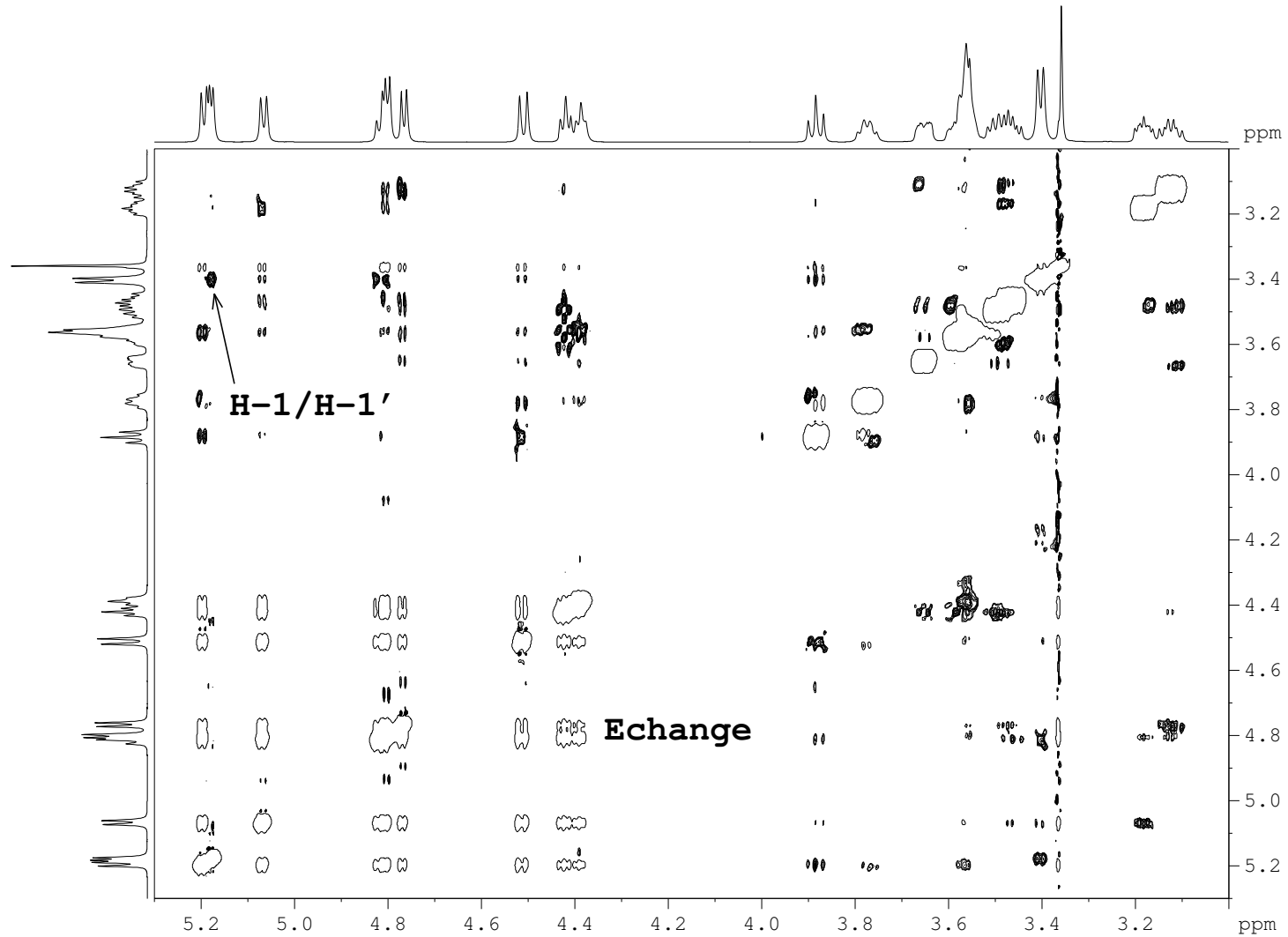
B2 : identification de l'acide férulique par HMBC



NOESY

- Mise en évidence de la relaxation dipolaire croisée
- Indique des relations de proximité à travers l'espace (< 0.5 nm)
- Outil d'étude privilégié pour les macromolécules
- Permet d'étudier l'échange chimique

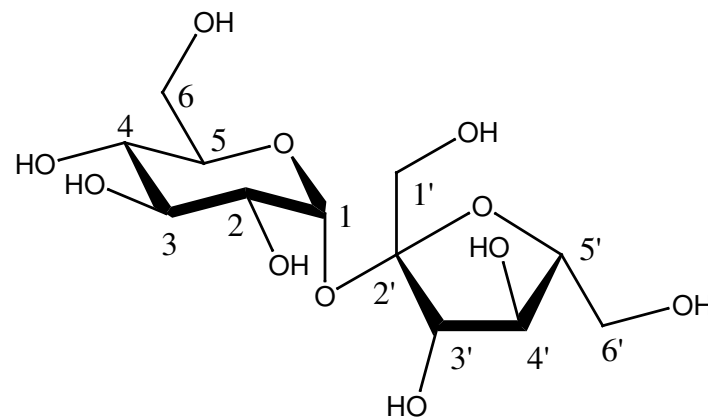
Saccharose : NOESY



Résumé

- Identification des systèmes de spin
 - ^1H : COSY, COSY-RCTn, TOCSY, J - δ
 - ^{13}C : HSQC, HMBC
- Identification des sucres
 - Analyse des valeurs de J
 - Analyse des déplacements chimiques
- Liaison entre les systèmes de spin
 - HMBC et HSQC
 - NOESY

Saccharose



B2

