

Applications de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone 13 en biologie : détermination de la structure primaire des glucides.

Introduction :

La résonance magnétique nucléaire (RMN) étudie l'absorption moléculaire dans le domaine des fréquences radio, de l'ordre de mégahertz (MHz), c'est-à-dire à des longueurs d'onde d'une dizaine de mètre,

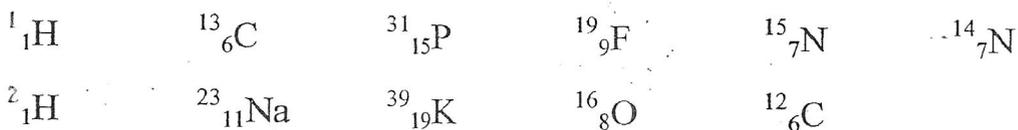
Le type d'énergie qui est utilisé concerne les noyaux en présence d'un champ magnétique extérieur.

La RMN n'est pas destructive, elle permet d'étudier un polymère (*par exemple*) sans le modifier ni le dégrader.

1-Origine des spectres :

Les noyaux avec un nombre impair de proton ou de neutron sont doués de moments magnétiques permanents et d'états de spins nucléaires quantifiés.

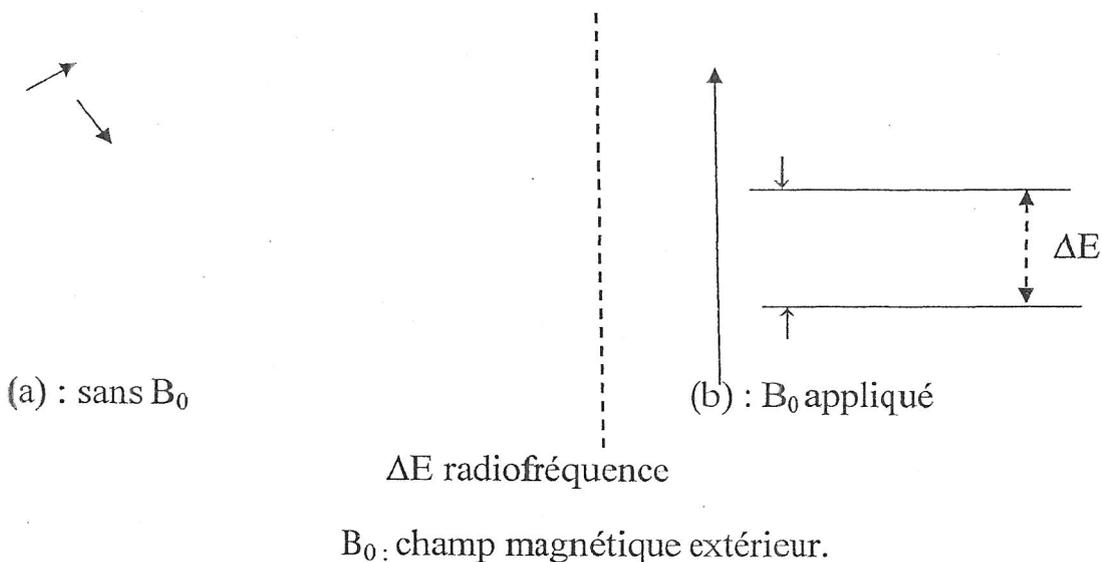
Exemples :



$I = \frac{1}{2}, I=0, I=1, I=\frac{3}{2}$ (les meilleurs spins).

Le nombre quantique de spin du noyau étant désigné par I , il existe $(2I+1)$ niveaux énergétiques du noyau.

2- RMN du proton :



Le proton ^1_1H possède un nombre quantique de spin de $\frac{1}{2}$, ainsi il est susceptible de prendre $2 \times \frac{1}{2} + 1 = 2$

Orientations possibles : soit parallèle (↑), soit antiparallèle (↓), au champ magnétique externe.

En l'absence de champ magnétique, chaque proton a la même énergie nucléaire de spin et les moments magnétiques de spin sont orientés au hasard.

Dans un champ magnétique, les spins des protons sont orientés soit parallèlement, soit antiparallèlement au champ et la différence d'énergie entre ces deux orientations est proportionnelle à l'intensité du champ magnétique externe, on a : $\Delta E = kH_0$.

Avec $k = \hbar\gamma/2\pi$, où ΔE est la différence d'énergie entre les orientations, γ le rapport magnétogyrique (qui est une constante pour un noyau donné),

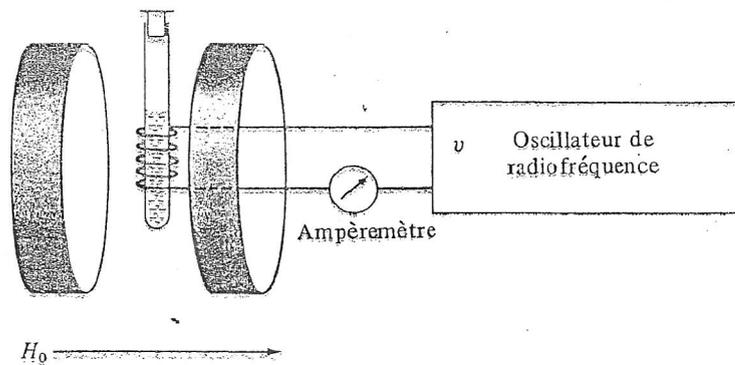
H_0 est l'intensité du champ magnétique externe et h la constante de Planck.

Pour une valeur donnée du champ magnétique, le proton pourra passer d'un niveau énergétique à un autre par absorption ou émission d'un quantum d'énergie : $\Delta E = h\lambda$ où λ est la fréquence de la radiation absorbée ou émise. En combinant les équations (1) et (2); il vient : $\lambda = (\gamma/2\pi) H_0$.

Dans un spectromètre de résonance magnétique nucléaire, l'échantillon est placé dans le champ d'un électroaimant, et un champ de radiofréquence lui est appliqué en envoyant un courant dans une bobine entourant cet échantillon (fig1).

Figure 5.2.1

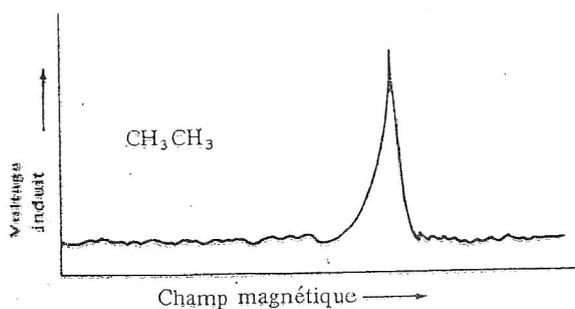
Les éléments de base d'un spectromètre de résonance magnétique nucléaire.



On augmente lentement le champ magnétique H_0 et l'excitation ou « retournement » des noyaux d'une orientation à une autre est détectée sous forme d'un voltage induit provenant de l'absorption d'énergie du champ de radiofréquence. Un spectre RMN est l'enregistrement de ce voltage induit en fonction d'un balayage du champ magnétique. La surface d'un signal dépend du nombre total de noyaux qui ont subi de « retournement ».

Figure 2.3

Spectre de RMN de l'éthane.



La différence énergétique entre les deux états correspond aux radiofréquences. Pour cette raison, les photons, à des radiofréquences, inversent les noyaux H, de leurs états de basse énergie, vers des états d'énergie élevée.

La fréquence requise est directement proportionnelle au champ magnétique. En pratique, il est plus facile de fixer la fréquence et de faire varier le champ magnétique.

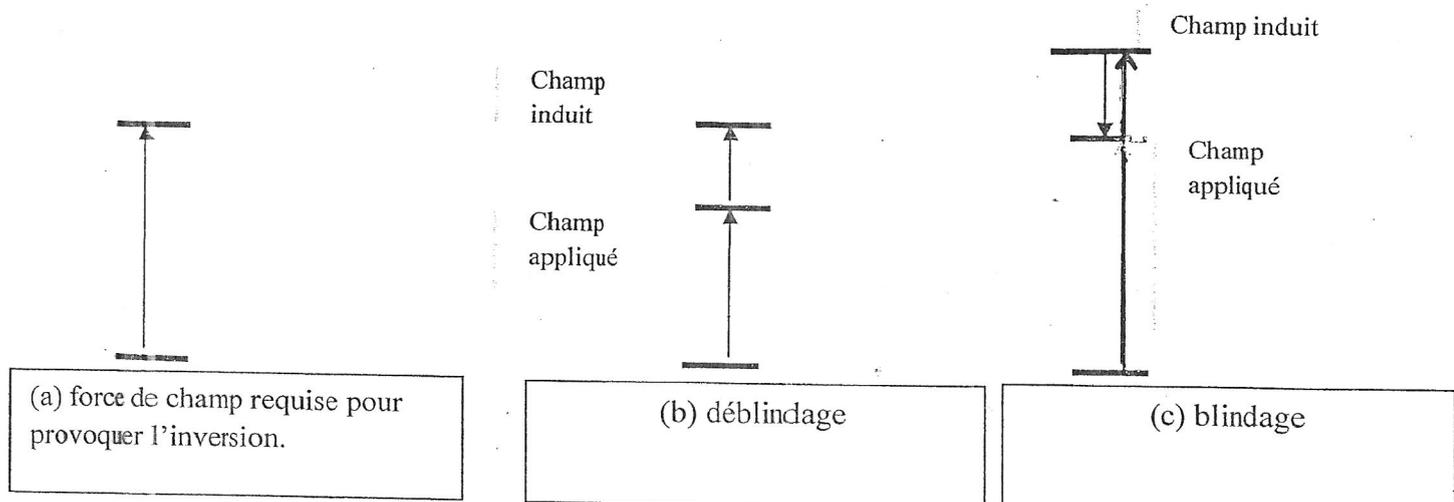
Un spectre RMN représente la variation de l'absorption en fonction de la force du champ magnétique.

La spectroscopie RMN est utile parce que les H ne changent pas tous de spin au même champ extérieur, parce que l'énergie absorbée dépend de l'environnement chimique du H, c'est-à-dire de la structure moléculaire

(exemple : le spectre RMN-H de $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$).

2 1-Blindage des noyaux d'hydrogène :

Le champ magnétique ressenti par un H n'est pas nécessairement celui qui appliquée par l'aimant parce que les électrons de la liaison du H et les électrons des liaisons π avoisinantes induisent leurs propres champs magnétiques. Le champ induit peut s'opposer ou renforcer ^{le champ} appliquée. Le champ ressenti par le H et alors celui qui résulte des champs appliquées et induits tels que représentés dans la figure :



$$H_{\text{effectif}} = H_{\text{extérieur}} - H_{\text{induit}}$$

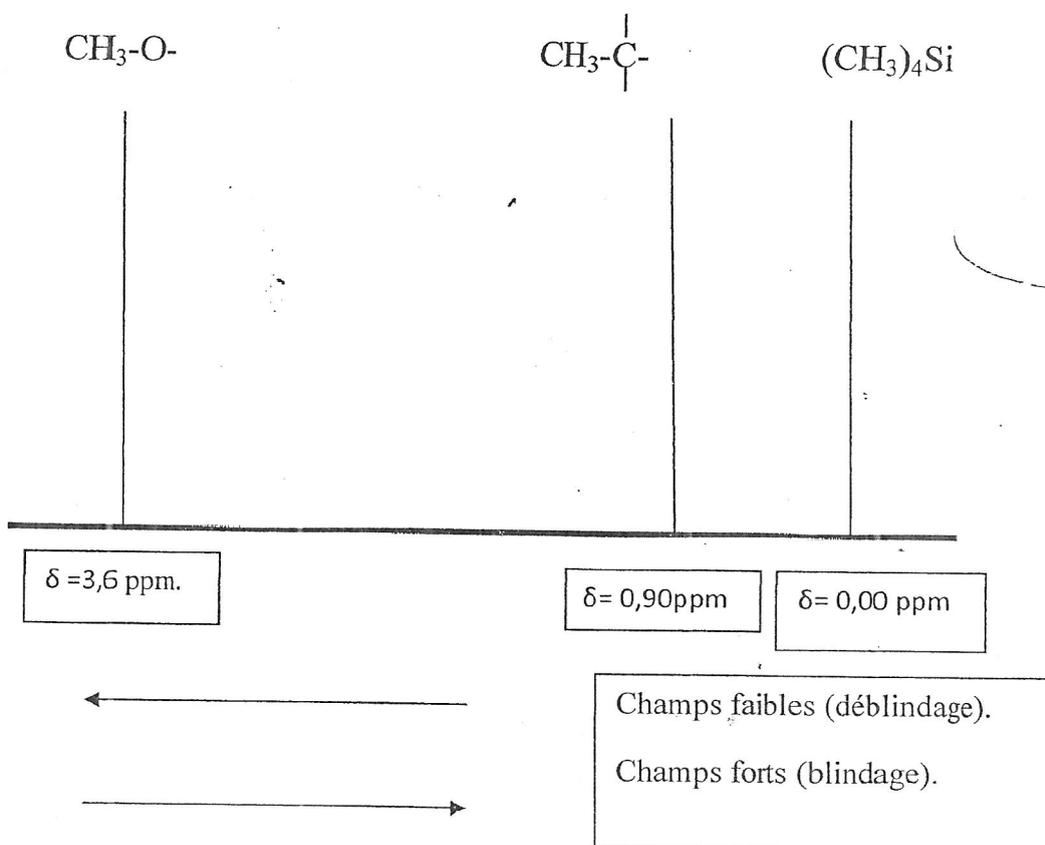
Quand les deux champs se renforcent comme dans (b), le champ nécessaire pour provoquer l'inversion est plus faible. On dit que ce proton est déblindé et il absorbe à champ faible.

Quand les champs s'opposent comme en (c), on doit appliquer un champ plus fort. Le proton est maintenant blindé et il absorbe à champ fort; On dit que de tels déplacements dans la position de l'absorption RMN provoqués par l'environnement spécifique des H, sont des déplacements chimiques.

2 2-Déplacement chimique :

On mesure les positions (Déplacement chimique) des pics par rapport à un point de référence produit par H du $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ (*par exemple*). On a attribué une valeur $\delta = 0$ ppm à ce point de référence.

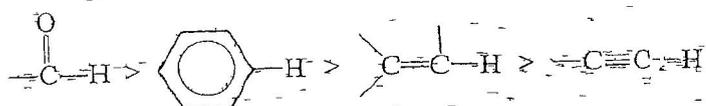
$$\delta = \frac{\text{Déplacement observé (Hz)} \cdot 10^6}{\text{fréquence du spectrophotomètre (Hz)}} = (\text{en ppm}).$$



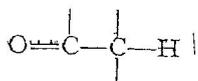
221- Généralisation :

A- Les atomes électro-négatifs comme N, O ou X, déblindent les H. Le degré du déblindage est directement proportionnel à l'électro-négativité de l'atome N, O ou X et de la proximité de l'atome par rapport au H.

B- Les électrons d'un noyau aromatique, d'un $-C \equiv C-$, $\begin{array}{c} \diagup \\ C=O \\ \diagdown \end{array}$ et d'une $\begin{array}{c} \diagup \\ C=C \\ \diagdown \end{array}$ déblindent un H qui est attaché. L'ordre du déblindage est

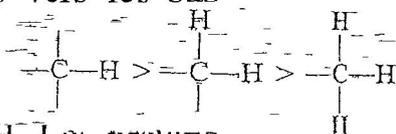


C- Le carbone d'un groupe $\begin{array}{c} \diagup \\ C=O \\ \diagdown \end{array}$ est électro-attracteur et déblindé un H sur le carbone, voisin comme dans



D- $\text{Ar}-\begin{array}{c} | \\ -C-H \\ | \end{array}$ (benzylique) et $\begin{array}{c} \diagup \\ C=C \\ \diagdown \end{array} -\begin{array}{c} | \\ -C-H \\ | \end{array}$ (allylique). Les H sont déblindés parce que les groupes $\text{Ar}-$ et $\begin{array}{c} \diagup \\ C=C \\ \diagdown \end{array}$ sont électro-attracteurs par induction.

E- Dans le cas des groupes alkyles, leurs déplacements vers les bas champs est dans l'ordre :



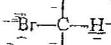
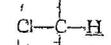
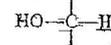
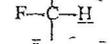
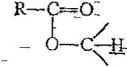
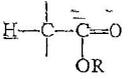
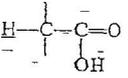
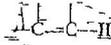
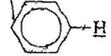
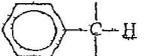
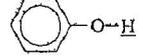
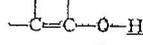
F- Les atomes électropositifs comme le Si blindent les H. Les protons (H) du $(\text{CH}_3)\text{-Si}$ sont tellement blindés et déplacés vers les hauts champs qu'ils sont généralement complètement isolés de tous les autres types de H. C'est la raison pour laquelle on utilise le $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ comme référence interne.

G- Les H attachés à un cyclopropane ainsi que ceux qui sont situés dans le nuage π d'un système aromatique sont fortement blindés. Quelques uns ont même des valeurs δ négatives.

2 3- Les surfaces relatives sous les pics, calcul des H :

La surface sous la (C) d'un signal est directement proportionnelle au nombre H équivalent donnant lieu à ce signal (*Exemple RMN-H du chloro-1 diméthyl-2,4 pentane*)

Déplacements chimiques des protons

δ ppm	τ ppm	Type des protons soulignés	δ ppm	τ ppm	Type des protons soulignés
0,2	9,8	Cyclopropane 	4-2,5	6-7,5	Bromure 
0,9	9,1	Primaire $R-CH_3$	4-3	6-7	Chlorure 
1,3	8,7	Secondaire R_2CH_2	4-3,4	6-6,6	Alcool 
1,5	8,5	Tertiaire R_3CH	4-4,5	6-5,5	Fluorure 
1,7	8,3	Allylique $-C=C-CH_3$	4,1-3,7	5,9-6,3	Ester (I) H en α du O de l'alkyle 
2,0-4,0	8,0-6,0	Iode H en α 	5,0-1,0	5,0-9,0	Amine $R-NH_2$
2,2-2,0	7,8-8,0	Ester (II) H en α du C=O 	5,5-1,0	4,5-9,0	Hydroxyle $RO-H$
2,6-2,0	7,4-8,0	Acide carboxylique H en α 	3,9-4,6	4,1-5,4	Oléfinique 
2,7-2,0	7,3-8,0	Carbonyle H en α 	8,5-6,0	4,5-4,0	Aromatique  (Ar-H)
3-2	7-8	Acetylenique $-C\equiv C-H$	10,0-9,0	0-1,0	Aldehyde 
3-2,2	7-7,8	Benzylque 	12,0-10,5	(-2)-(-0,5)	Carboxyle 
3,3-4,0	6,7-6,0	Éther H en α $R-O-CH_3$	12,0-4,0	(-2)-6	Phénolique 
			15,0-17,0	(-5)-(-7)	Énolique 

La spectroscopie RMN intègre les surfaces de la façon suivante : il trace une ligne horizontale lorsqu'il n'y a pas de signal, Lorsque'on atteint le signal, la ligne monte, et se stabilise lorsque le signal arrête. La distance relative d'un plateau à un autre fournit une mesure de la surface relative. On peut noter pour le spectre du chloro-1 diméthyl-2,4 pentane que le signal avec la valeur δ la plus élevée est un doublet qui intègre 2H Cl-CH₂. Il y a présence de 9H des 3CH₃, aux champs les plus élevés et des 4H (2° et 3°) à des positions intermédiaire.

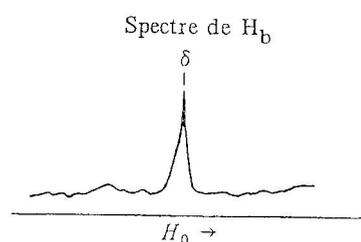
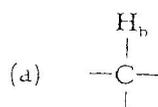
2 4- Dédoublément des pics, couplage spin-spin (Multiplicité) .

Lorsque les moments magnétiques des protons à s'aligner avec le champ magnétique extérieur, il peut se produire entre eux une interaction appelée « couplage spin/spin »

L'effet du spin d'un noyau (H_a) se transmet aux noyaux voisins chimiquement différents (H_b) en général par l'intermédiaire des électrons de liaisons.

Ce phénomène n'a pas que des inconvénients, il fournit cependant des informations très précieuses sur le nombre et le type des protons liés aux atomes de carbone adjacents à celui portant le proton étudié.

Couplage spin spin de H_b, (a) en l'absence de proton voisin et (b) avec un proton en position vicinale



(b) en présence de proton voisin



Le mouvement du noyau H_a pouvant être soit parallèle soit antiparallèle au champ appliqué, le très faible champ produit par H_a pourra soit augmenter soit diminuer le champ réel subi par H_b . Afin de maintenir la résonance il faudra alors soit réduire soit augmenter le champ appliqué d'une quantité correspondante en vue de compenser l'effet de H_a .

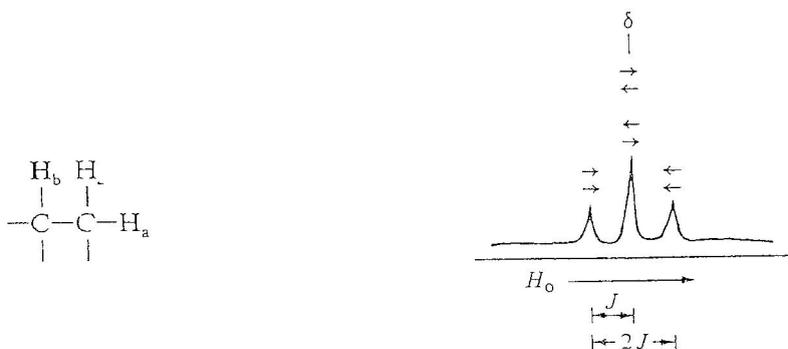
Le signal fournit par H_b en présence de H_a apparaîtra ainsi comme un doublet

Le signal original de H_b se trouvera ainsi dédoublé, par le proton vicinal H_a , poussant d'un singlet de surface 0,5 est situé à égale distance de part et d'autre de la valeur initiale δ

Considérant maintenant le cas le plus complexe où le proton étudié H_b possède deux protons chimiquement équivalents (H_a) en position vicinale (ces derniers étant chimiquement différents de H_b). Ces deux protons H_a peuvent présenter quatre combinaisons de spins qui influenceront H_b

- 1 Les deux sont parallèles à H_0
- 2 Le premier spin est parallèle, l'autre est antiparallèle
- 3 Le premier spin est parallèle, l'autre est antiparallèle
- 4 Les deux spins sont antiparallèles

Couplage spin-spin de H_b avec deux protons H_a vicinaux

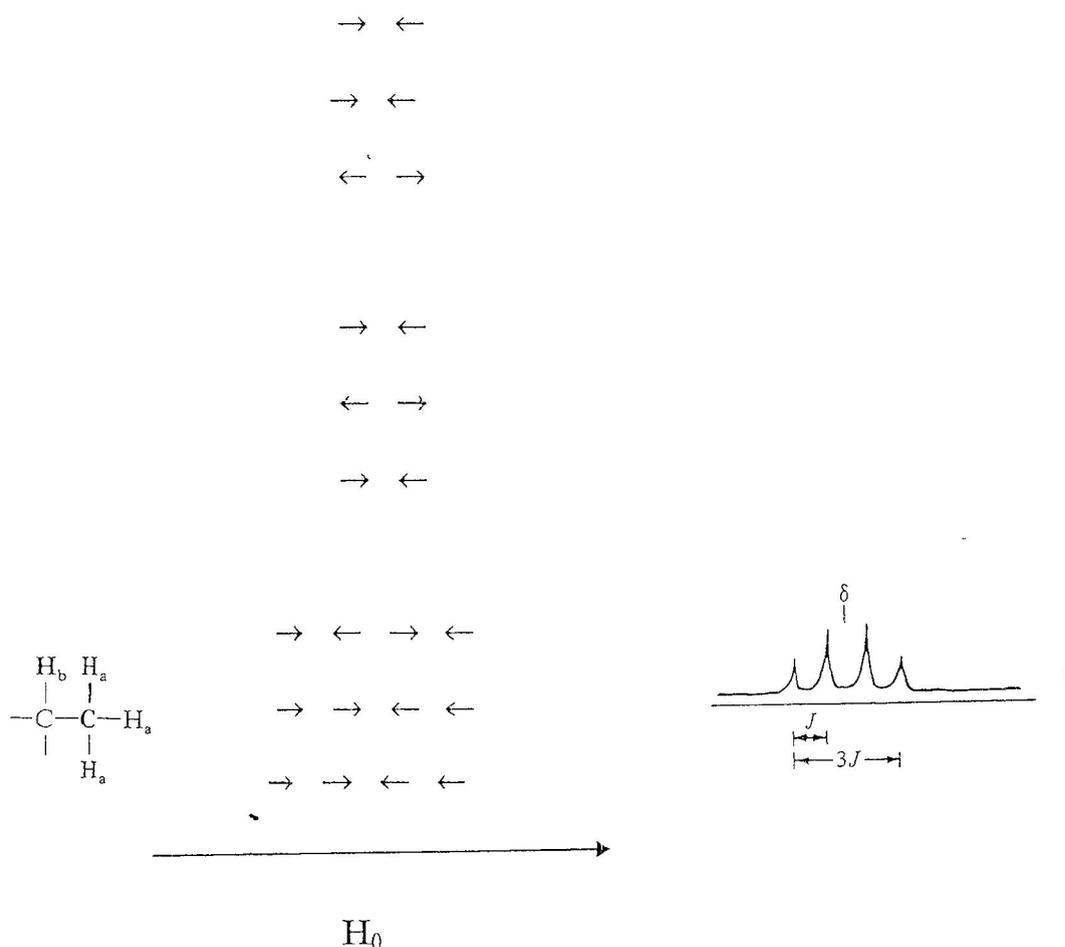


Les surfaces des composants des triplets sont dans le rapport 1 :2 :1. La constante de couplage J correspond au changement d'orientation de l'un des spins.

Supposant maintenant qu'il ait trois protons équivalents H_a vicinaux par rapport à H_b .

Quelle sera la structure observée pour le signal H_b ?

Il existe huit combinaisons de spins possibles pour les trois protons H_a :



-Couplage spin-spin de H_b , avec trois protons H_a vicinaux.-

Une règle générale se déduit des exemples précédents : si un proton H_b possède n protons équivalents H_a sur des carbones adjacents (protons en position vicinale) son signal présentera $(n+1)$ pics. Cette valeur $(n+1)$ est appelée la multiplicité.

Cette loi déterminant la multiplicité n'est valable que si la différence de déplacement chimique entre les protons couplés est très grande par rapport à la constante de couplage.

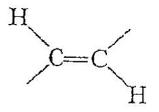
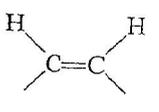
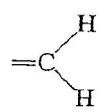
En résumé le spectre de RMN d'un composé nous fournit trois genres d'informations :

- Le déplacement chimique d'un multiplet nous renseigne sur l'environnement d'un proton correspondant.
- La surface des signaux nous renseigne sur le nombre de protons mis en jeu.
- La multiplicité nous indique avec combien de protons voisins et couplés le proton considéré.

2.5- Constante de couplage :

La figure 25-1 résume le spectre RMN de CH_3-CH_2Cl en utilisant des lignes verticales pour chaque pic.

L'intervalle entre les lignes d'un multiplet est une constante caractéristique, l'intervalle dans chaque multiplet couplé est aussi une constante de couplage J , et elle exprimée en hertz « Hz ». La valeur de la constante de couplage dépend de la relation structurale entre les H couplés et elle devient un outil utile pour les preuves de structures. On rapporte quelques valeurs typiques dans le tableau ci-dessous :

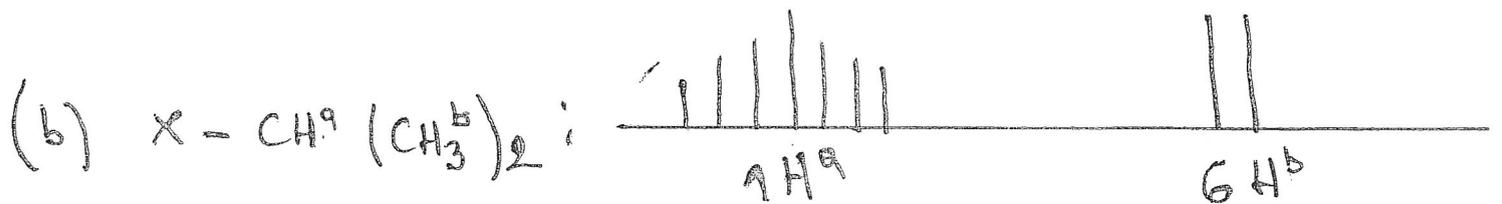
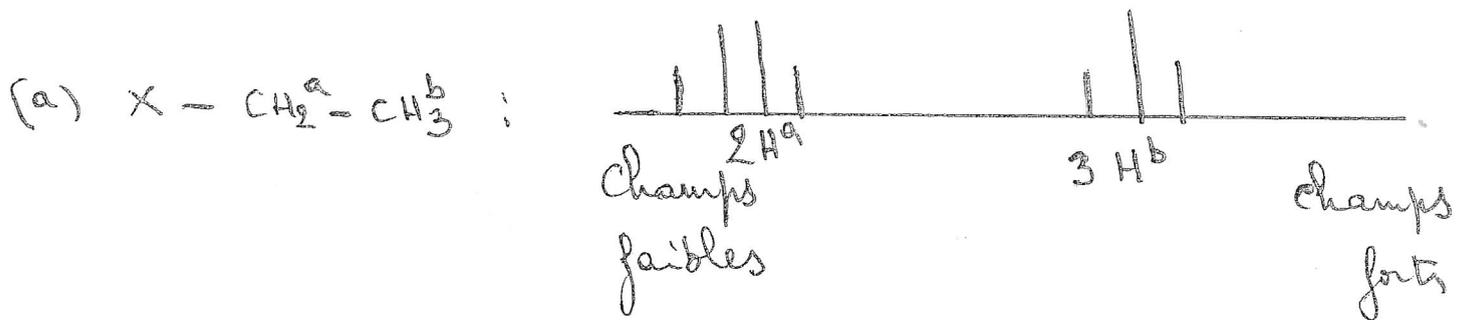
Types de H	J, Hz
$\text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{H}$ (rotation libre autour de C-C)	~7
 <i>trans</i>	13-18
 <i>cis</i>	7-12
	0-3
H de phényles <i>ortho</i> <i>mé</i> ta <i>para</i>	6-9 1-3 0-1

Exercice n°1: Représentez les types schématisés de couplage en montrant les déplacements chimiques relatifs observés pour les groupes alkyles des halogènes suivants :

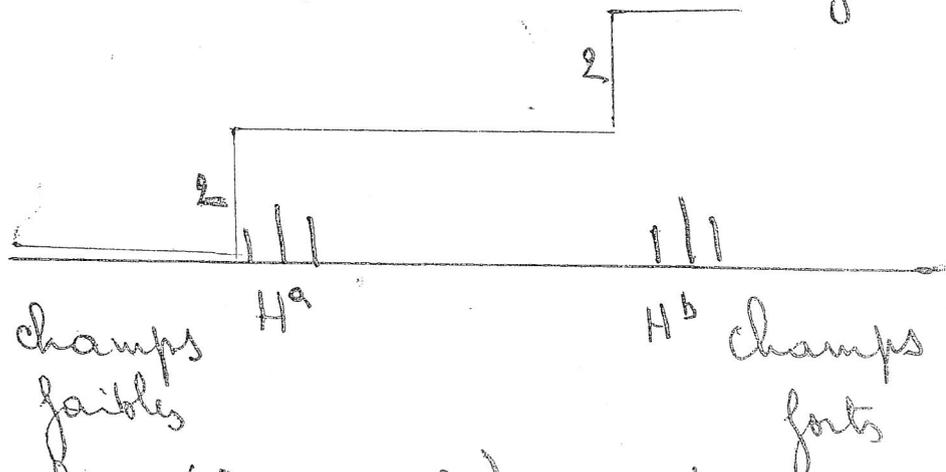
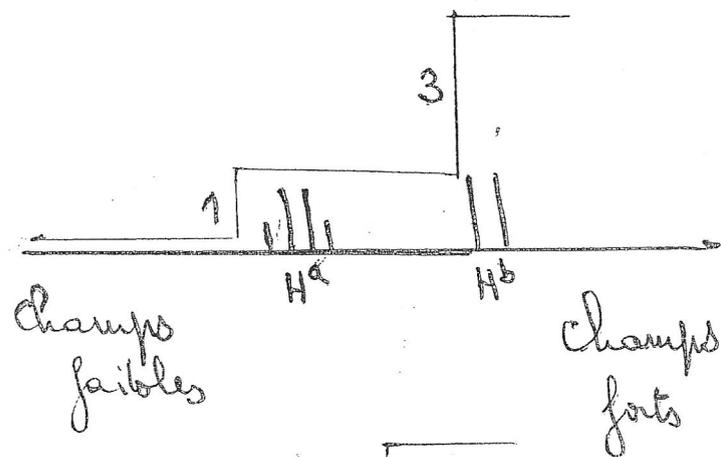
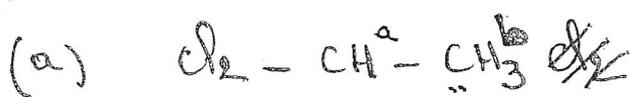
$X-CH_2-CH_3$, $X-CH(CH_3)_2$, $X-C(CH_3)_3$.

Exercice n°2: Donnez une représentation schématique des spectres RMN montrant l'intégration du (a) dichloro-1.1éthane, (b) bromo-1-chloro-2éthane.

Exercice n° 1 -



Exercice n° 2 -



H^a est à champ plus bas (champ faible) que H^b parce que le chlore (Cl_2) est plus électro-attracteur que le brome (Br).