

1-RMN-H d'une substance glucidique :

Pour simplifier les analyses, les hydroxyles sont transformés en deutéroxyles par échange dans l'eau lourde. Ainsi seuls les signaux des protons apparaissent, les noyaux deutérium résonnant dans une autre gamme de fréquence.

Malgré cela, un pic correspondant au signal de l'eau résiduelle (HOD) est observé ; il interfère avec les signaux des protons anomériques.

Ce problème peut être évité, en déplaçant le signal de l'eau par augmentation de la température pratique, qui de surcroît améliore la qualité des spectres, les signaux s'accroissent nettement

De façon générale, le spectre RMN-H d'un polymère glucidique peut être subdivisé en quatre régions(voir figure :A).

En le parcourant des champs faibles vers les champs forts on distingue :

Région A= protons anomériques.

Régions B = HOD.

Région C= protons du squelette.

Région D= protons de substituants non glucidiques.

Le tableau ci-dessus, présente les caractéristiques d'un spectre RMN-H :

Fonctions	ppm	³ J _{H,H} (hz)
H6 des 6-désoxy-hexoses (CH ₃ C)	1,2-1,3	6
Pyruvyle (CH ₃ C)	1,5-1,6	
Acétamido (CH ₃ CON)	1,8-2,1	
Acétyle (CH ₃ CO ₂)	2,0-2,2	
H ₂ à H ₆	3,5-4,5	
H ₅	4,5-4,6	
H ₂ et H ₃ des formes furaniques	4,2-4,5	10

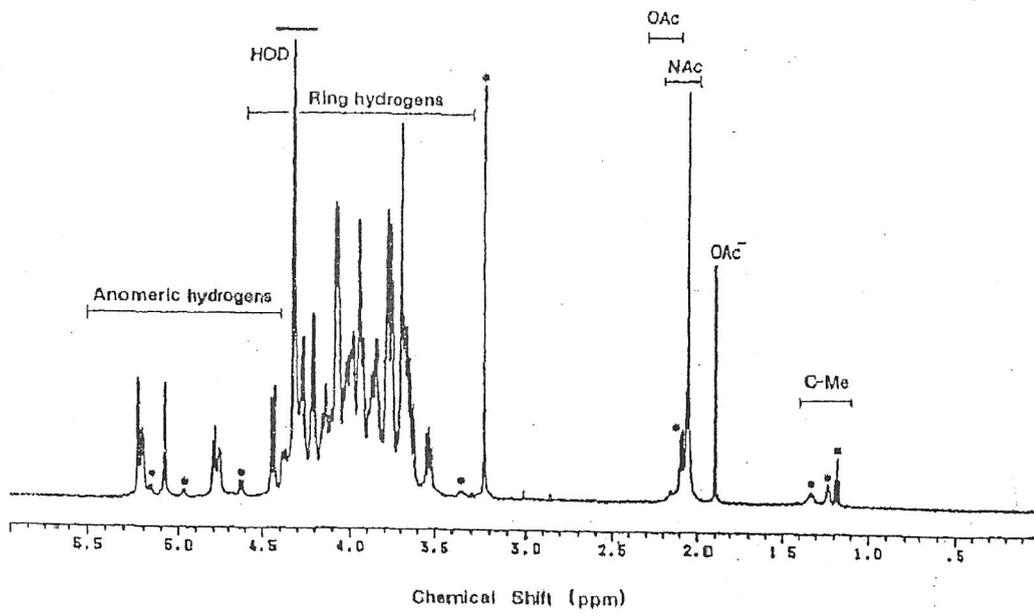


Fig A.

H₅ des acides uroniques		
H₁ axial (béta)	4,5-4,8	7 (Rha :) (³ J _{H,H} = 1)
H₁ équatorial (alfa)	5,3-5,8	4 (Rha :) (³ J _{H,H} = 1,8)
Hydroxyle (OH)	5,0-5,4	
HCO₂	5,9	

Les protons anomériques (H1 se détachent assez bien des autres pics leurs déplacements chimiques (delta) indiquent l'anomérie(alfa) ou(béta).Les constantes de couplage (³J_{H,H})entre les protons anomériques et du carbone 2 sont également caractéristiques des anoméries avec des valeurs plus faible pour les liaisons(alfa) que pour les liaisons(béta). Ces différences s'expliquent par les relations d'orientations axiales et équatoriales qui existent entre les protons considérés. Karplus a montré que la constante de couplage dépend de l'angle dièdre formé par les liaisons transmettant ce couplage.

Au grand angle (180°) correspond un grand couplage, celui-ci diminuant lorsque l'angle diminue ; il est nul pour un angle de 90° et réaugmente ensuite si l'angle continue de diminuer, pour atteindre un second maximum plus faible lorsque l'angle est nul.

Bien qu'avec des réserves car d'autres facteurs interviennent, cette règle générale est applicable aux glucides. Ainsi dans la série du D-glucopyranose, et pour les oses présentant la même configuration sur le carbone 2, dans la configuration β, ces deux protons occupent des positions relatives axiale-axiale, l'angle formé est maximum (φ=180°), le couplage est donc maximum (figure ci-dessous).

Toutefois, les monosaccharides de configuration manno posent un problème compte tenu de la position équatoriale de leur proton en 2. (figure ci-dessous) :

2-RMN-¹³C d'une substance glucidique :

La RMN-¹³C à transformée de Fourier est ici obligatoire du fait de la faible quantité de Carbone 13 rencontrée naturellement (1,1%). Cette technique nécessite donc plus de produits (environ 50mg) que la RMN-H pour obtenir un spectre correct.

Les informations fournies sont néanmoins très claires. Les utilisateurs pallient au manque de quantité d'échantillon par un très grand nombre d'acquisitions.

Les principales données fournies par les déplacements chimiques d'un spectre RMN-¹³C sont présentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau des déplacements chimiques δ et constantes de couplage $^1J_{C,H}$ (hz) entre le carbone anomérique (C1) et son proton, pour quelques fonctions chimiques.

Fonctions	ppm	$^1J_{C,H}$ (hz)
C6 des 6-déoxy-hexoses(CH ₃ C)	16-18	
Pyruvyle (CH ₃ C)	22-25	
CH ₃ COH	20-23	
CH ₃ CO ₂		
Acétyle	30	
CH ₂ C	38	
CH ₃ O	55-61	
CH(NH)	58-61	
C6 libres (CH ₂ OH)	60-65	
C2 à C5	65-80	
C6 liés		
C2,C3,C4 des formes furaniques	83-87	
C1 libre, axial (extrémités)	90-95	

réductrices)		
C1 libre, équatorial (extrémités réductrices)	95-98	
C1 lié, axial (alfa)	98-103	170
C1 lié, équatorial (beta)	103-106	160
C1 lié des hexoses furaniques(béta)	106-109	172,5
COOH	174-175	
C=O	175-180	
C6(COOH des acides uroniques)	186	

Les carbones anomériques (C1) s'individualisent nettement, leurs déplacements chimiques indiquant s'il s'agit d'une anomérie α ou β sauf dans le cas du rhamnose (configuration manno). Les groupements méthyles apparaissent à haut champ (C6 des 6-désoxyhexoses à 16ppm). Les hexoses β -furaniques présentent des signaux caractéristiques (C2, C3, C4 des formes furaniques entre 83 et 87 ppm).

Quatre procédures sont utilisées en RMN du carbone 13.

2.1- Découplage total (complete proton decoupling ou proton noise decoupling) :

En irradiant aux fréquences de résonance des protons. On supprime totalement les couplages carbone- proton, mais pas les couplages carbone-deutérium, qui ne sont d'ailleurs pas visualisés puisque qu'on n'enrichit pas l'échantillon en deutérium en RMN c13. Les couplages homonucléaires carbone-carbone ne peuvent apparaitre que si l'échantillon est enrichi en C13.

L'irradiation des protons provoquent l'effet Overhauser nucléaire (NOE) qui tend à faire baisser le rapport signal / bruit et à augmenter les signaux des carbones portant un ou plusieurs protons.

Tous les signaux apparaissent sous forme de singulets ; il est donc possible de déduire le nombre de résidus osidiques de l'unité répétitive. Le NOE perturbant l'intensité des pics, il est impossible de savoir si un signal représente ou plusieurs carbones identiques.

2.2- Technique antigate.

Elle consiste à effectuer un découplage total, comme précédemment mais sans NOE.

Pour cela, on n'irradie et n'enregistre que pendant une très courte durée et à des intervalles relativement espacés. En effet, pour enregistrer, il faut que les signaux soient totalement relaxés, or le NOE est 5 fois plus lent à installer que l'effet de relaxation et d'autre part ; le découplage est instantané. Le NOE s'établit donc après l'enregistrement et disparaît entre 2 acquisitions. Le rapport signal /bruit augmente et les signaux sont plus faibles que précédemment, mais leurs intensités sont comparables car directement proportionnelles au nombre de carbone créant le signal.

Les signaux des carbones quaternaires (ne portant aucun proton) n'étant pas affectés par le NOE, ont la même intensité que précédemment.

2.3- Découplage partiel :

Les couplages $^1\text{J}_{\text{C,H}}$ subsistent mais les couplages indirectes (^2J , ^3J , ect) sont supprimés par une irradiation monochromatique .

Le NOE subsiste en partie. On distingue aisément les différents types de carbones : les carbones quaternaires (apparaissent sous forme de singulets) , tertiaires (doublets), secondaires (triplets), primaires (quadruplets). Cette technique permet de mesurer les constantes de couplage $^1\text{J}_{\text{C,H}}$ des carbones (C1) qui ont des valeurs caractéristiques de l'anomérie.

2.4-Irradiation sélective (hétéronucléaire ou double) :

C'est aussi un découplage partiel mais on supprime le couplage $^1\text{J}_{\text{C,H}}$ d'un carbone particulier en irradiant à la fréquence du proton qu'il porte. Le signal de ce carbone apparaît sous forme de singulet et bénéficie

complètement du NOE ; son intensité est donc plus forte que celle des autres signaux.

3-Techniques RMN à deux dimensions :

L'attribution complète des données de RMN et la vérification est généralement menée à l'aide de spectre de simulation DEPT (distortionless enhancement by polarisation transfert) et de techniques RMN à 2 dimensions tel que COSY (correlation spectroscopique du couplage ^1H , ^1H), HMQC (heteronuclear multiple quantum coherence de couplage $^1\text{H}^{13}\text{C}$).

HMBC (heteronuclear multiple bond correlation, $^1\text{H}^{13}\text{C}$ coupling).

4- RMN d'autres noyaux :

Alors que la RMN- ^{13}C permet aussi d'analyser certains polysaccharides microbiens phosphorylés, les couplages $^3\text{J}^{31}\text{P}$, ^{13}C ; donnant des informations intéressantes sur la conformation, la RMN- ^{23}Na peut s'avérer très utile dans le cas de sels de sodium de polysaccharides acides. En outre : il est possible d'examiner des polymères enrichis en deutérium, tritium et bien sur ^{13}C .

A partir des deux spectres RMN C13 du glucosane (figure ci-jointe), il est possible de déterminer la structure primaire et la structure fine de ce polymère.

Tous les signaux du C1 apparaissent à 103 ppm ce qui indique que la configuration de tous les résidus est de type *béta*. Ceci peut être confirmé par le déplacement chimique des C5 (76,8 ppm et 74,5 pour le C5C : voir plus loin).

La position de la majorité des signaux du C6 (61,8 ppm) est caractéristique de résidus monosaccharidiques d'un cycle pyranosique. Le déplacement chimique d'un signal (C6C) vers les champs faibles de +6,5 ppm indique qu'il est substitué en C6. Ceci est confirmé par un déplacement du C5C vers les champs forts de -1,5 ppm.

Le déplacement chimique du C3, des résidus A,B,C vers les champs faibles de +10,5 ppm ; +9,3 ppm et +9,8 ppm respectivement, indique que ces résidus sont impliqués dans des liaisons osidiques de type *béta*(1---3).

La comparaison des signaux du résidu D du polysaccharide avec les signaux d'un *béta*-D-glucopyranose libre montre qu'il y a une coïncidence parfaite à l'exception du signal du C1 car il est impliqué dans une liaison osidique.

L'intensité des différents signaux obtenus sur un « antigate spectrum » donne un taux de 4 :1 pour les signaux à 103 ppm et les signaux individualisés dans la région 87 ppm. Un taux de 2 :1 pour le signal à 77,3 ppm comparé aux signaux à 77,55 ppm ou 77,05 ppm et un taux de 4 :1 pour le signal complexe à 69,4 ppm et ce à 71,15 ppm.

Compte tenu de ces signaux, 24 carbones peuvent être identifiés (18 signaux sont visibles). Ceci confirme que le scleroglucane (*Sclerotium rolfsii*) est un polymère avec un tétrasaccharide comme unité répétitive.

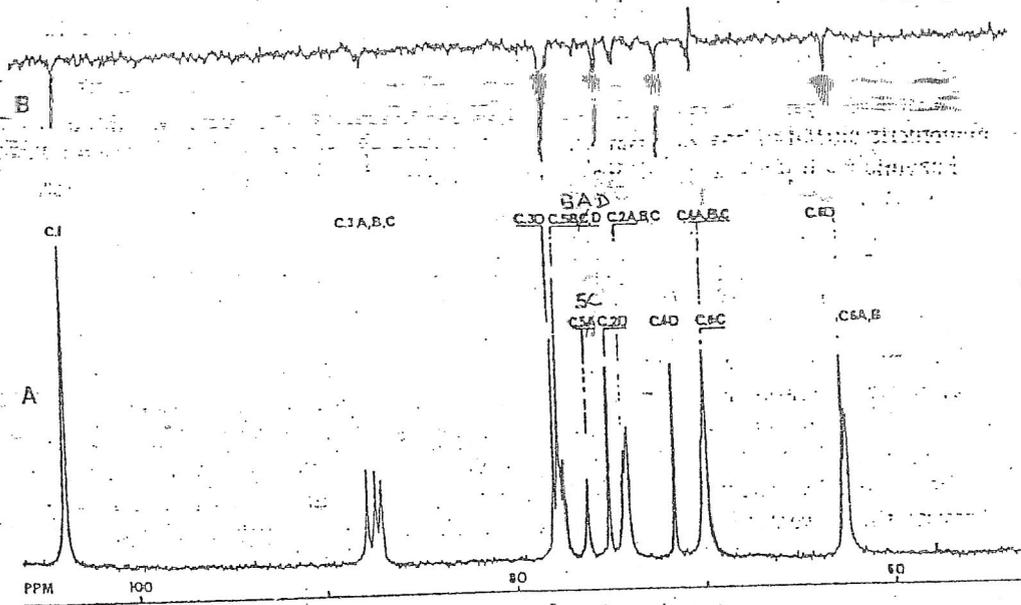


Fig. 2. (A) ^{13}C NMR spectrum of scleroglucan in DMSO-d_6 solution at 60°C . (B) ^{13}C NMR spectrum of the partially relaxed atoms (same conditions).

(B) ^{13}C NMR

α -Glc	92.9	72.5	73.8	70.6	72.3	61.6
β -	96.7	75.1	76.7	70.6	76.8	61.7

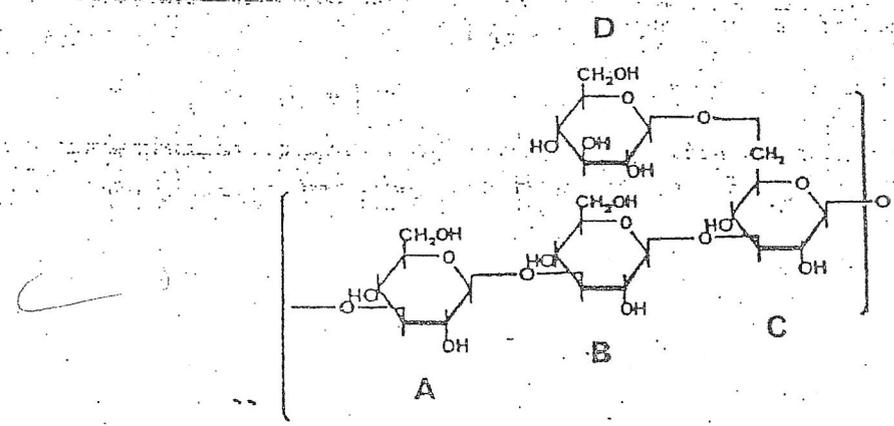


Fig. 1. Structural unit of scleroglucan.

Apartir du spectre RMN-13C du galactomannane (de la figure ci-jointe), on peut faire les observations suivantes :

Une comparaison des déplacements chimiques des atomes de carbone du résidu galactosyl avec les signaux du galactose libre indique que seul le C1 de ce résidu monosaccharidique est déplacé vers les champs faibles (+6,7 ppm), montrant qu'il est engagé dans une liaison O-glycosidique. La valeur du déplacement chimique est caractéristique d'une configuration *alpha* (autrement le signal du C1 pourrait être aussi observé à champ faible mais vers 103 ppm).

Les déplacements chimiques des autres signaux de ce résidu galactosyl ne diffèrent pratiquement pas de ceux des atomes C2, C3, C4, C5, C6 du galactose libre, indiquant l'absence de substituants sur ces carbones.

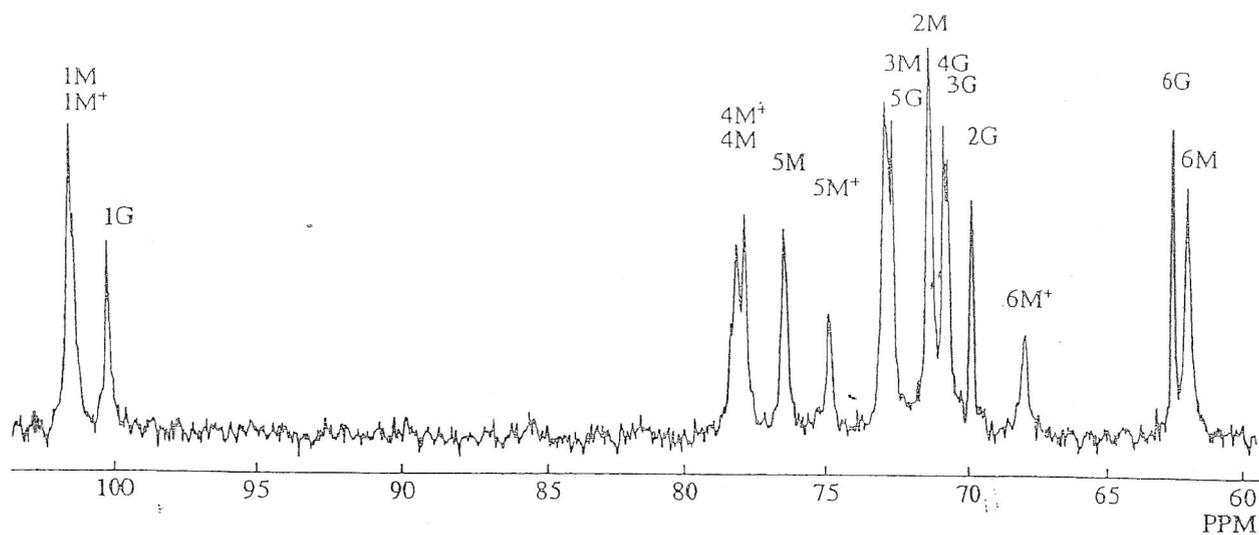
La position du signal du C6 (62,6 ppm) et l'absence de signal dans l'intervalle : 63-64 ppm suggèrent que le polysaccharide contient des résidus D-galactosyls de forme pyranosique.

Concernant les résidus du D-mannose, leur nombre est supérieur à ceux des signaux des atomes du D-galactose, parce que le C1, le C5 et le C6 donnent chacun deux signaux, et le C4 montre trois signaux. La configuration anomérique des résidus mannosyls est identifiée comme étant *bêta* par la valeur du déplacement chimique du C5 (76,5 ppm), autrement le signal apparaîtrait à 73,4 ppm.

En comparant les positions sur le spectre des signaux des atomes de carbone des résidus mannosyls et les positions des signaux du *bêta*-D-mannose libre, on constate que les signaux du C1, du C4 et du C6 subissent un déplacement vers les champs faibles (+6,7 ppm ; +10,5 ppm et +6,0 ppm) respectivement. Ainsi le C1, le C4 et le C6 des résidus D-mannose sont impliqués dans la formation de liaisons covalentes.

L'engagement du C6 dans la formation d'une liaison covalente est confirmée par le déplacement du C5 voisin, celui-ci donne un pic à 74,9 ppm, il est alors déplacé vers les champs forts de -1,6 ppm.

La position du pic du C6(62,0ppm) et l'absence de signaux dans l'intervalle de 63-64ppm confirment que les résidus mannose du polymère sont de forme pyranosique.



^{13}C NMR spectrum of depolymerized galactomannan from seeds of *Gleditsia triacanthos f. inermis*. Designations: M, 4-O-substituted *D*-mannopyranose residue; M^+ , 4,6-di-O-substituted *D*-mannopyranose residue; G, *D*-galactopyranose residue. The numbers of the carbon atoms of the monosaccharide residues are shown.

Position and interpretation of ^{13}C NMR spectrum of depolymerized galactomannan from seeds of *Gleditsia triacanthos f. inermis*

α -Gal	93.2	69.4	70.2	70.3	71.4	62.2
β -	97.3	72.9	73.8	69.7	76.0	62.0
α -Man	95.0	71.7	71.3	68.0	73.4	62.1
β -	94.6	72.3	74.1	67.8	77.2	62.1