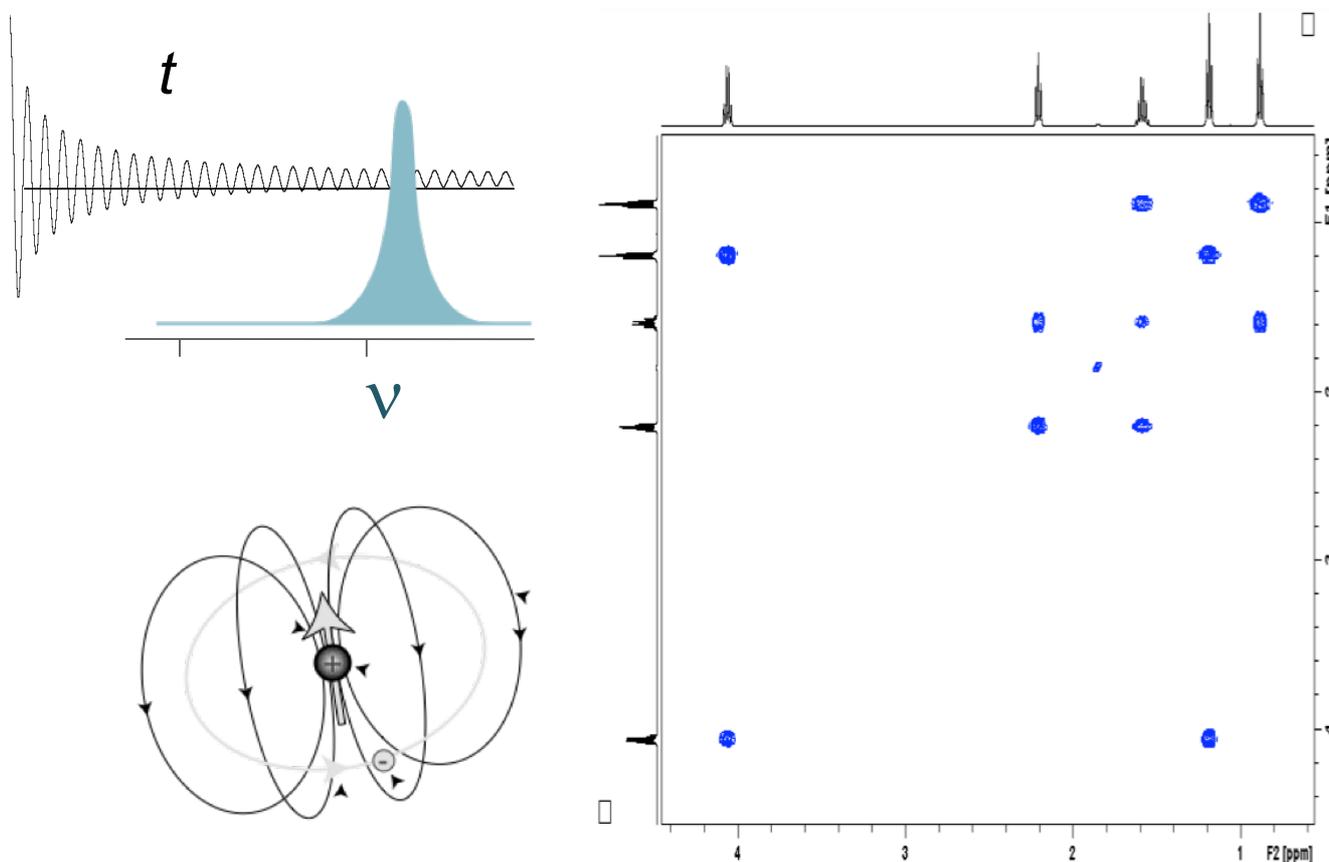


École Normale Supérieure de Lyon

Synthèse Organique L3

Cours de Résonance Magnétique Nucléaire



Sandrine DENIS-QUANQUIN

cours 1 - Introduction / Bases / Spectre

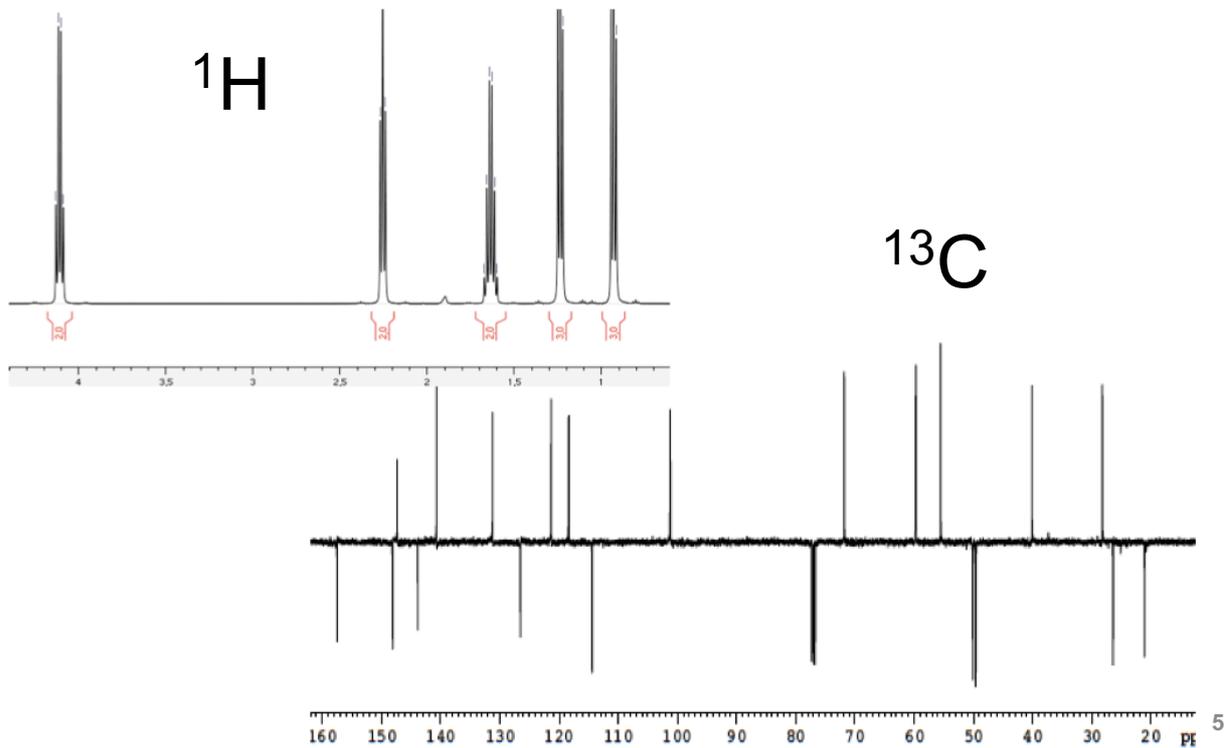
cours 2 - RMN hétéronucléaire / RMN 2D

cours 3 - Acquisition et traitement de données / Visite de la
salle RMN

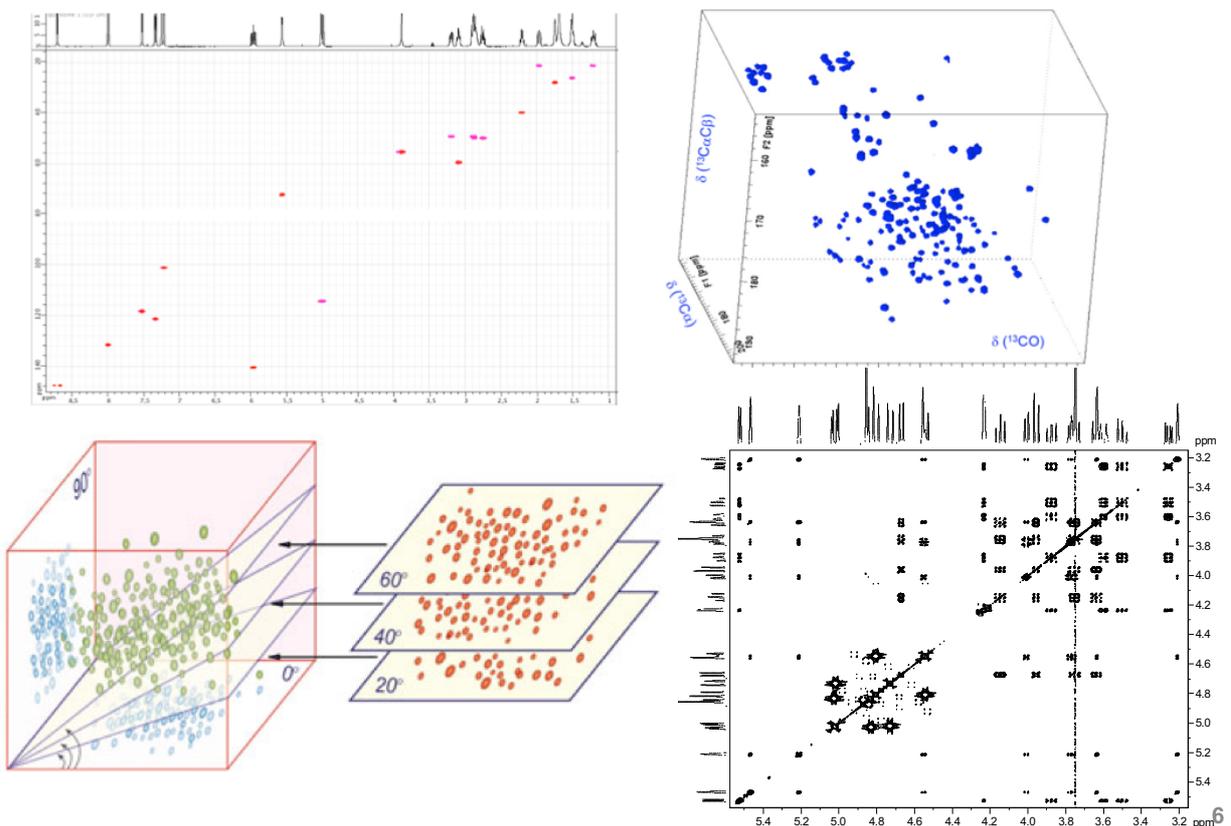
cours 4 - Exercices

RMN et Chimie organique

Spectres... Analyses... Structures...



RMN 2D... 3D... 4D...



Historique

1921	Découverte du spin de l'électron (expérience de Stern et Gerlach)
1924	Propriétés magnétiques de certains noyaux (Pauli)
1938	Le spin nucléaire (Rabi)
1946	La résonance nucléaire (Bloch et Purcell)
1950	Le déplacement chimique (Knight, Proctor & Yu)
1952	Le prix Nobel est accordé à Bloch et Purcell
1953	Premier spectromètre commercial
1957	Premier spectre RMN du ^{13}C (Lauterbur)
1965	Premier spectre ^{13}C découplé du ^1H
1966	Premier spectre par Transformée de Fourier (Ernst)
1970	Premier spectromètre à Transformée de Fourier commercialisé
1971	Jean Jeener imagine la seconde dimension
1973	Imagerie par RMN (Lauterbur)
/	
1991	Le prix Nobel est attribué à Ernst
/	
2002	Le prix Nobel est attribué à Wüthrich
2003	Le prix Nobel est attribué à Lauterbur et Mansfield

7

Bases

- **Spin nucléaire**
- **Champ magnétique**
- **Aimantation macroscopique**
- **Résonance**
- **Transformée de Fourier**

8

Le spin nucléaire

Spin = propriété physique du noyau

nb de masse A	n° atomique Z	nb de spin I	exemples
pair	pair	I = 0	¹² C, ¹⁶ O
pair	impair	I = entier	² H, ¹⁴ N
impair	pair/impair	I = (2n+1)/2	¹ H, ¹³ C, ³¹ P, ¹⁹ F, ¹⁵ N, ¹⁷ O...

Des isotopes différents d'un même atome ont des spins différents!

En RMN on s'intéresse aux noyaux de spin ≠ 0.

Moment magnétique nucléaire μ et moment de spin S sont liés:

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{S}$$

γ = rapport gyromagnétique, caractéristique de chaque noyau

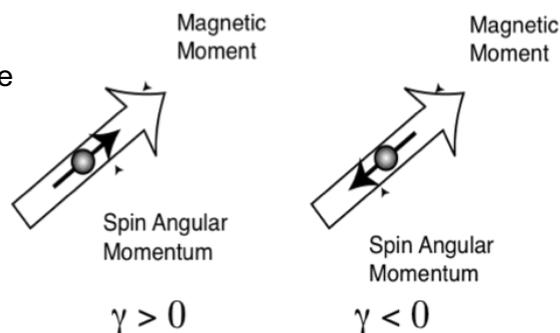


Illustration: Spin dynamics, 2nd edition, Malcom H. Levitt, Wiley, 2008

9

Propriétés de quelques noyaux

isotope	spin	γ (10 ⁷ rad.s ⁻¹ .T ⁻¹)	$\frac{\gamma_x}{\gamma_H}$ (%)	freq (MHz)	abondance naturelle (%)	Sensibilité relative ¹ H	Receptivité D ^p
¹ H	1/2	26,7522128	100	300,00	99,9885	1,00	1,00
² H	1	4,10662791	15,350609	46,051	0,0115	9,65.10 ⁻³	1,11.10 ⁻⁶
¹³ C	1/2	6,728284	25,145020	75,432	1,07	1,59.10 ⁻²	1,70.10 ⁻⁴
¹⁴ N	1	1,9337792	7,226317	21,671	99,632	1,01.10 ⁻³	1.10 ⁻³
¹⁵ N	1/2	-2,71261804	10,136767	30,398	0,368	2,91.10 ⁻²	3,84.10 ⁻⁶
¹⁹ F	1/2	25,18148	94,094011	282,231	100	0,834	0,834
²⁹ Si	1/2	-5,3190	19,867187	59,595	4,6832	7,84.10 ⁻³	3,68.10 ⁻⁴
³¹ P	1/2	10,8394	40,480742	121,442	100	6,65.10 ⁻²	6,65.10 ⁻²

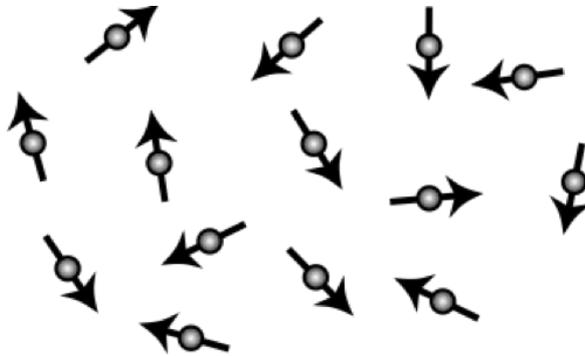
$$B_0 = 7 \text{ T}$$

$$\frac{\gamma_x^3}{\gamma_H^3} \times \text{sensibilité} \times \text{abondance}$$

10

Population de spins

En l'absence de champ magnétique externe, les moments de spin des noyaux d'un échantillon sont distribués uniformément (ils pointent dans n'importe quelle direction).
Le moment magnétique TOTAL d'un échantillon est donc NUL.



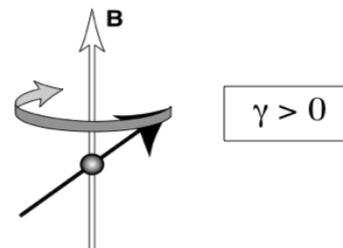
Attention par la suite à différencier le comportement d'UN spin et celui d'une POPULATION de spins.

11

Champ magnétique / effet Zeeman

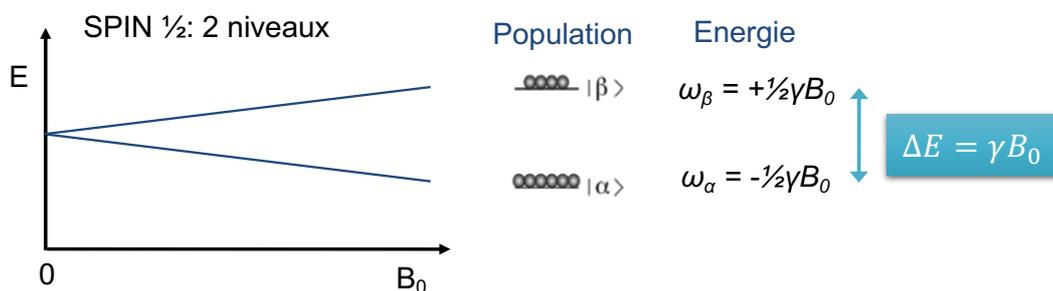
Placé dans un champ magnétique B_0 , le spin précesse autour de l'axe de B_0 à une vitesse angulaire $\omega_0 = \gamma B_0$. La fréquence ν_0 est appelée la **fréquence de Larmor**.

$$\nu_0 = \frac{-\gamma B_0}{2\pi}$$



D'un point de vue énergétique, le spin, « objet quantique », ne peut occuper que certains états (au nombre de $2I+1$): un spin $\frac{1}{2}$ occupe 2 niveaux énergétiques sous l'effet d'un champ magnétique.

L'interaction entre le champ magnétique et le spin est appelé **effet Zeeman**.



12

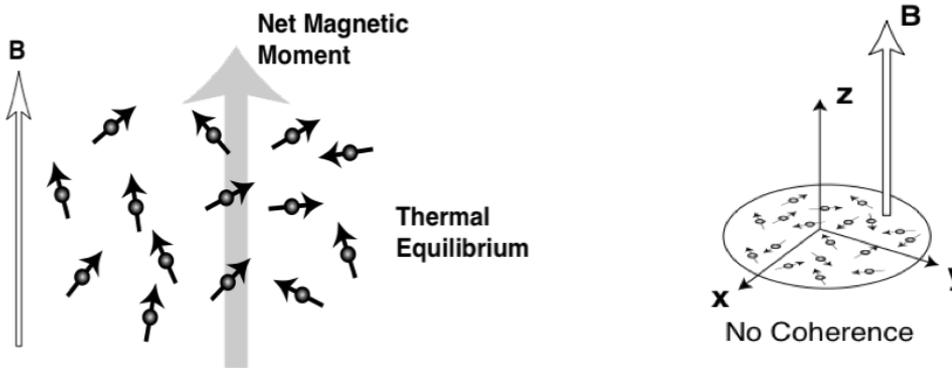
Aimantation macroscopique

Un échantillon = une population de spins nucléaires.

La population de chaque niveau énergétique obéit à la distribution de Boltzmann, avec un léger excès de population sur le niveau le plus bas.

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = e^{\Delta E / k_B T}$$

La différence de population est faible (1/10000) mais suffisante pour observer une aimantation résiduelle **M**. La RMN est une technique peu sensible.



→ moment magnétique total le long de B_0

→ (pas de composante transversale)

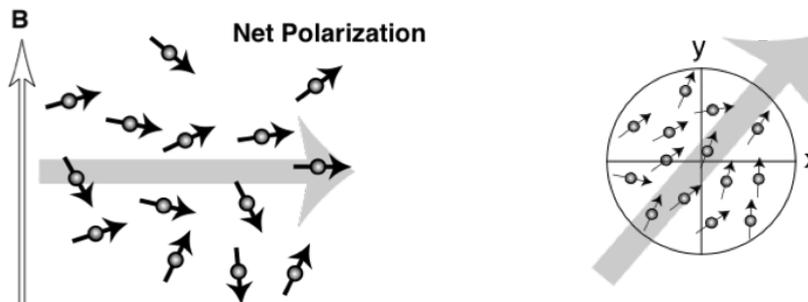
Le moment magnétique total de l'échantillon est appelé aimantation macroscopique.

Illustration: Spin dynamics, 2nd edition, Malcom H. Levitt, Wiley, 2008

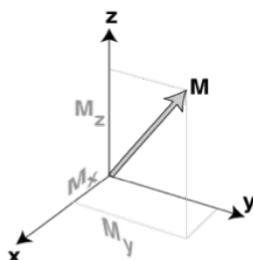
13

Résonance: perturbation de l'équilibre

Lors d'une expérience RMN on perturbe cet équilibre (**excitation des spins**): on provoque ainsi des transitions entre les niveaux d'énergie. Pour cela on applique une **impulsion RF** (champ B_1 intense, \perp à B_0 et de fréquence ν_1) pendant un temps très court qui doit respecter la condition de résonance: $\nu_1 = \nu_0$.



→ moment magnétique total : apparition de cohérence (composante transversale).



L'aimantation macroscopique possède

- une composante longitudinale M_z
- une composante transversale M_{xy}

Illustration: Spin dynamics, 2nd edition, Malcom H. Levitt, Wiley, 2008

14

Repère tournant / impulsions RF

On considère un repère Oxyz tournant autour de Oz à la vitesse ω_1 : B_1 est stationnaire dans le repère tournant et la vitesse de précession de M est $\omega_0 - \omega_1$. Ce changement de point de vue simplifie beaucoup de choses par la suite...

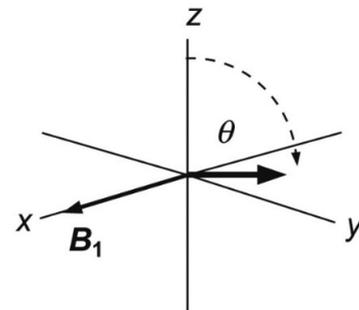
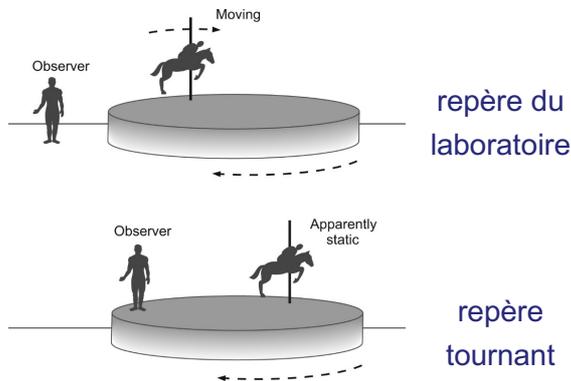
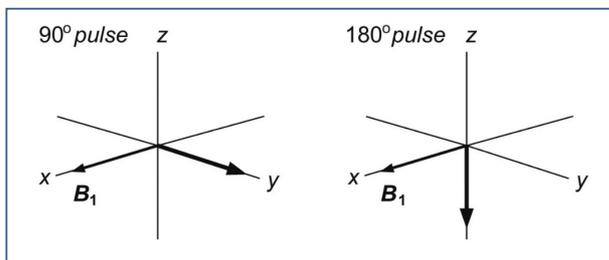


illustration d'une impulsion d'angle θ selon x



L'application d'un champ RF en résonance ($\nu_1 = \nu_0$) pendant une durée τ fait basculer l'aimantation M d'un angle $\theta = \gamma B_1 \tau$.

illustration: High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry, Timothy Claridge

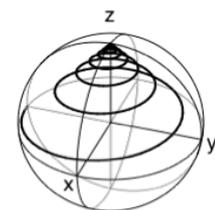
15

Retour à l'équilibre: relaxation

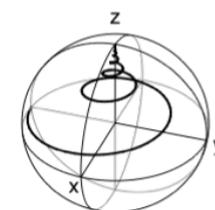
A la fin de l'impulsion d'excitation, l'aimantation retourne à sa position d'équilibre en précessant autour de B_0 . On observe la disparition de la composante transverse M_{xy} et la restauration de l'aimantation longitudinale M_z .

Ce retour à l'équilibre est défini par deux temps caractéristiques.

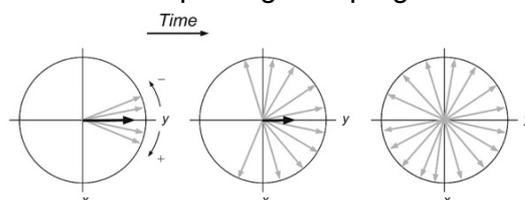
- le temps de relaxation longitudinal (ou spin-réseau) T_1 . Dans le cas de spin $\frac{1}{2}$ les interactions dipôle-dipôle sont la source majoritaire de relaxation T_1 . Les noyaux voisins induisent des champs magnétiques locaux qui peuvent permettre des transferts d'énergie s'ils sont en résonance.
- le temps de relaxation transversal (ou spin-spin) T_2 . Les spins ne précessent pas tous exactement à la même vitesse: après leur excitation par B_1 (qui a apporté de la cohérence au système) ils se désynchronisent. Ce déphasage est progressif et irréversible.



$$T_1 = T_2 = 2 \text{ s}$$



$$T_1 = 2 \text{ s} \quad T_2 = 1 \text{ s}$$



T1 et T2
indépendants

 $T_2 \leq T_1$

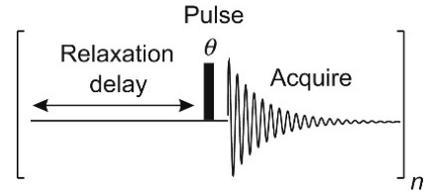
illustration: High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry, Timothy Claridge

16

FID et Transformée de Fourier

Après excitation le système revient à l'équilibre en induisant dans la bobine de réception un champ RF, détecté dans le plan transversal.

Ce signal sinusoïde est appelé FID (Free Induction Decay). Il peut être écrit sous forme d'un nombre complexe

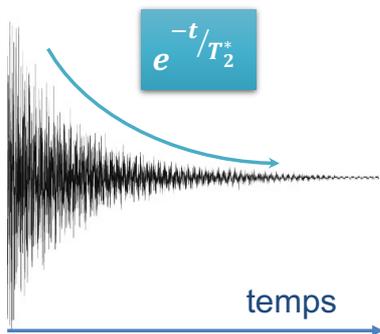


$$S(t) = S_x + iS_y$$

$$S(t) = S_0 \cos \omega t + i \sin \omega t$$

$$S(t) = S_0 e^{i\omega t}$$

$$S(t) = S_0 e^{i\omega t} e^{-Rt} \text{ avec } R = \frac{1}{T_2}$$



Transformée de Fourier:

$$F(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) \cdot e^{i\omega t} dt$$

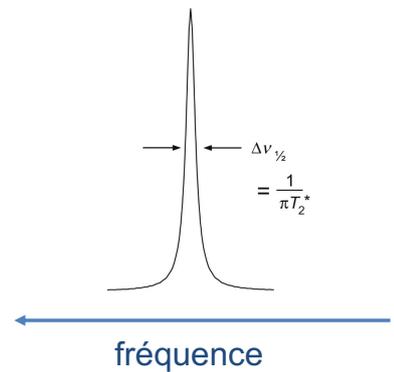
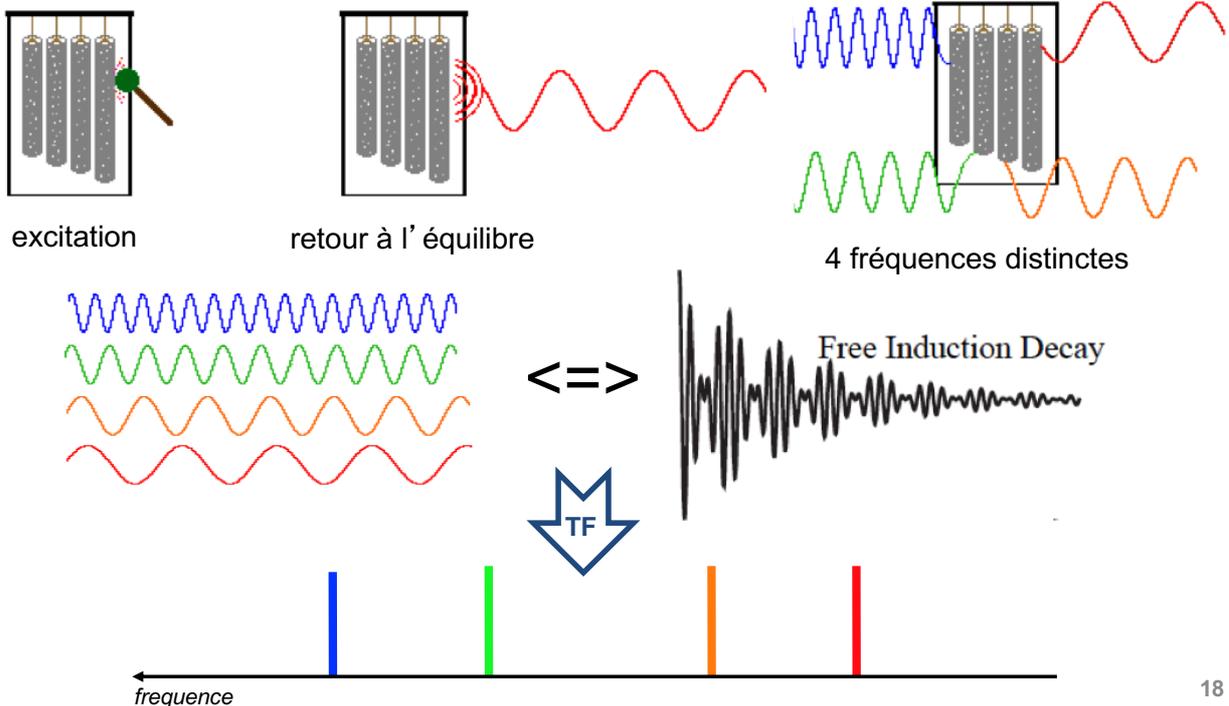


illustration: High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry, Timothy Claridge

17

On commence à parler spectre RMN...

Dans un échantillon RMN on trouve en fait plusieurs ensembles de spins ayant chacun une fréquence de résonance légèrement différente. Le FID est donc composé de plusieurs signaux entrelacés et la TF donne un spectre avec plusieurs pics.



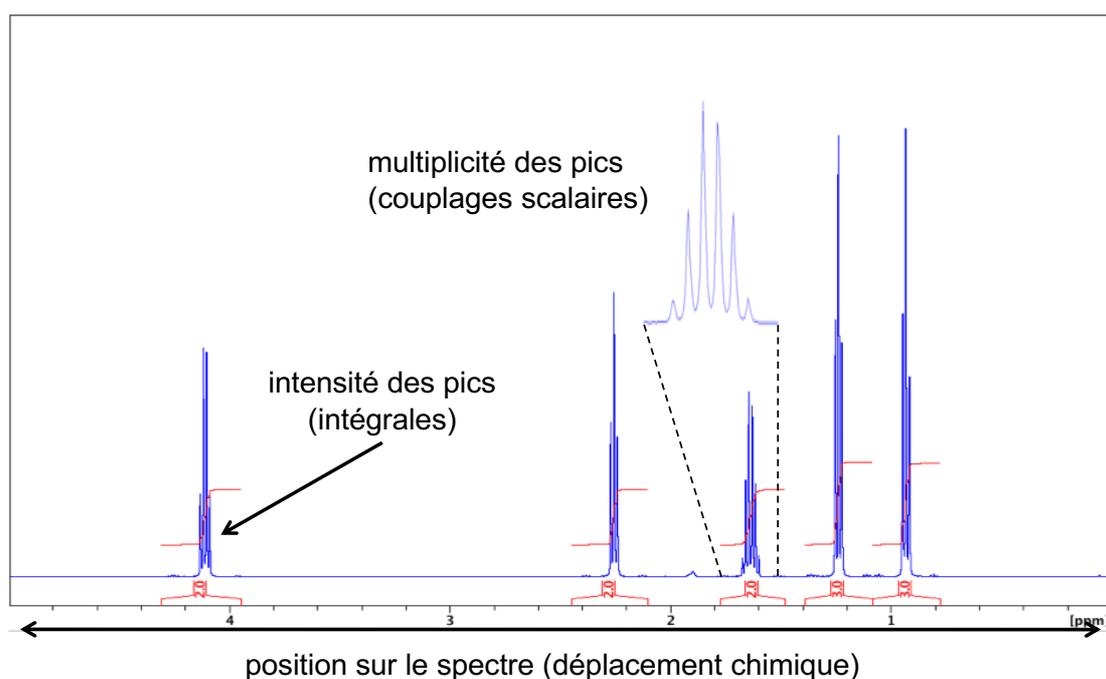
18

RMN ^1H

- **Intensité/intégrales**
- **Déplacement chimique**
- **Couplages scalaires**

19

Spectre RMN: interprétation

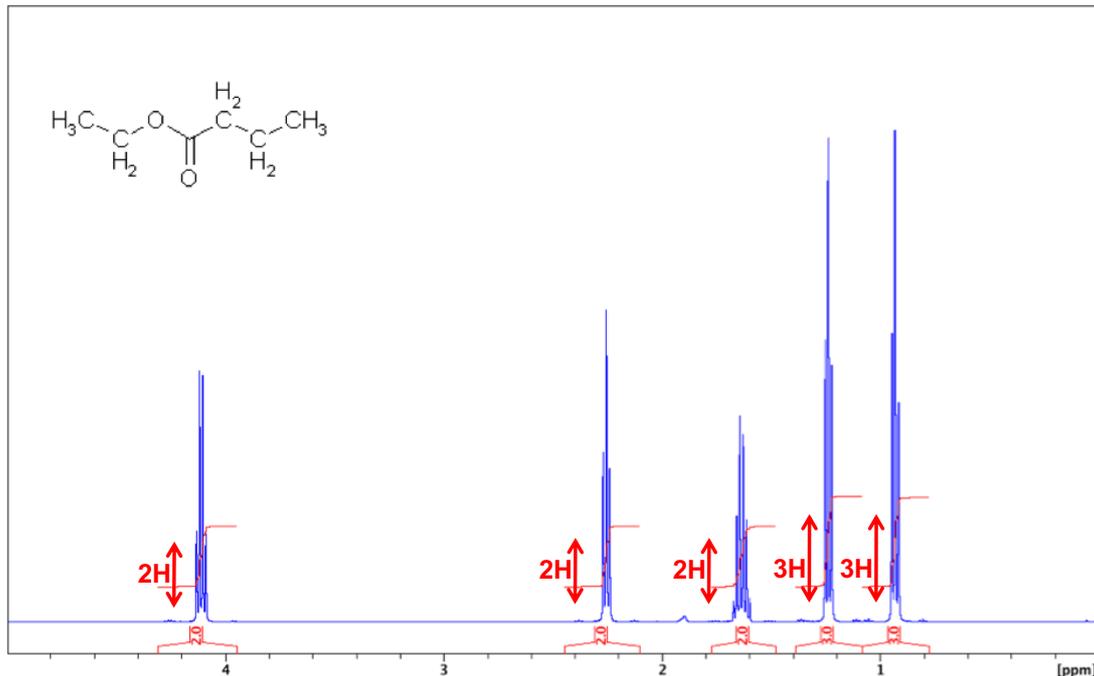


D'autres paramètres (temps de relaxation...) apportent des informations supplémentaires sur la structure, la dynamique... des molécules étudiées.

20

Intensités / Intégrales

Mesure de l'aire d'un signal \propto Nombre de spins impliqués (de façon plus ou moins exacte selon les paramètres expérimentaux... cf temps de relaxation T_1)



21

Déplacement chimique

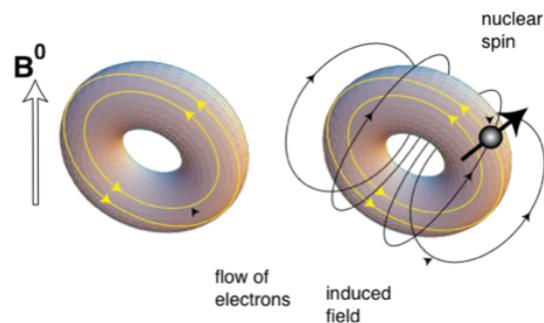
Le champ magnétique B_0 induit des courants dans les nuages électroniques autour des noyaux. Ces courants induisent en réponse des champs magnétiques locaux B^{induit} .

Les noyaux i « ressentent » un champ local

$$B_i^{\text{loc}} = B_0 + B_i^{\text{induit}}$$

$$B_i^{\text{induit}} = \sigma_i B_0 \text{ où } \sigma_i \text{ est le tenseur d'écran}$$

$$B_i^{\text{loc}} = (1 - \sigma_i) B_0$$



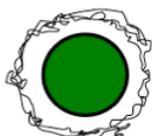
La fréquence de résonance de chaque noyau est donc dépendante de son environnement électronique: on parle de déplacement chimique.

$$\nu_i = \frac{\gamma(1 - \sigma_i)B_0}{2\pi} \quad \delta_i = \frac{\nu_i - \nu_{\text{ref}}}{\nu_{\text{ref}}} \times 10^6$$

Rq: pour éviter de manipuler des valeurs élevées (de l'ordre du MHz) le déplacement chimique δ est normalisé par rapport à une référence (le TMS dans le cas du proton). Il est donc indépendant du champ et on a alors des valeurs de δ en ppm (parties par million).

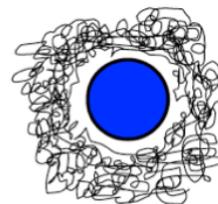
22

Électronégativité selon Pauly: **Si** (1,8) < **P** et **H** (2,1) < **C** (2,5) < **N** (3,0) < **O** (3,5) < **F** (4,0)



RCOOH
- densité électronique faible
- déblindage

RCH₃
- densité électronique élevée
- blindage



Effet de courant de cycle: exemple du benzène

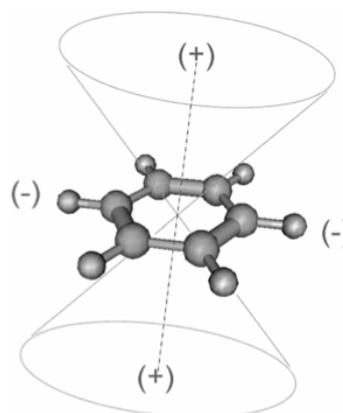
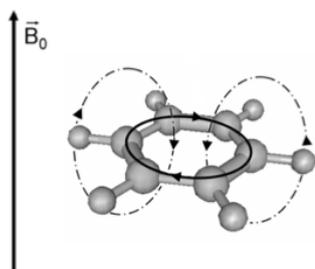


Illustration: Spin dynamics, 2nd edition, Malcom H. Levitt, Wiley, 2008

23

Isotropie/Anisotropie

La distribution électronique étant anisotrope au niveau des liaisons chimiques, B_i^{loc} , et donc δ_i , dépend de l'orientation de la liaison par rapport à B_0 . On parle d'anisotropie de déplacement chimique (CSA).

Dans un liquide isotrope (solvant) les molécules tournent rapidement sur elles même et on observe un déplacement chimique moyenné qu'on appelle déplacement chimique isotrope.

Attention, le cas est différent en RMN solide où l'anisotropie du milieu donne lieu à un déplacement chimique différent pour chaque orientation.

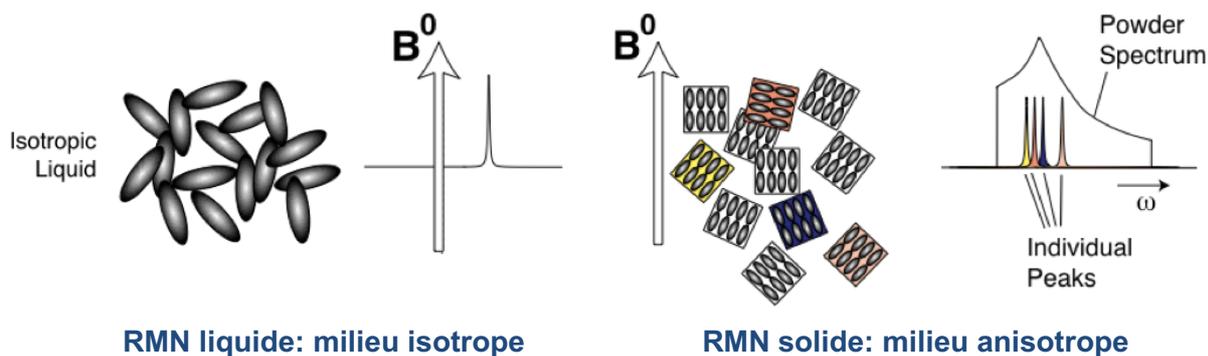


Illustration: Spin dynamics, 2nd edition, Malcom H. Levitt, Wiley, 2008

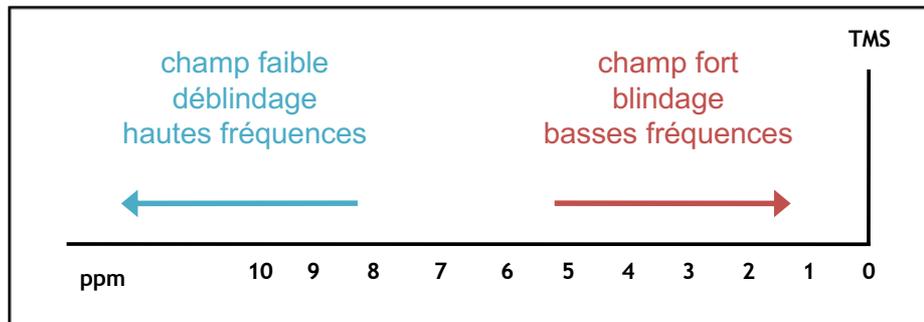
24

Des ppm aux Hz

Exemples de conversions ppm/Hz:

- avec un spectromètre 200 MHz (c.a.d. 4,7T): 1ppm \Leftrightarrow 200Hz
- avec un spectromètre 500 MHz (c.a.d. 11,7T): 1ppm \Leftrightarrow 500Hz

Ainsi on peut comparer des spectres obtenus sur des appareils de champs différents.



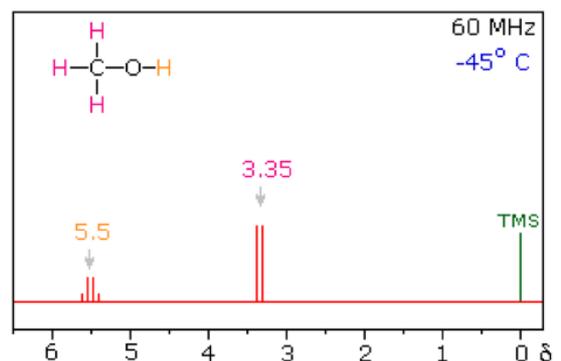
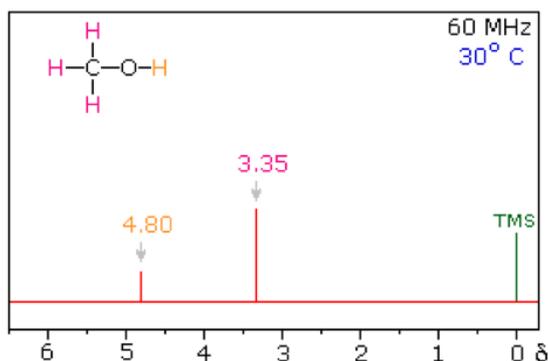
200MHz:	10ppm: 2000Hz
500MHz:	10ppm: 5000Hz
1GHz:	10ppm: 10000Hz

25

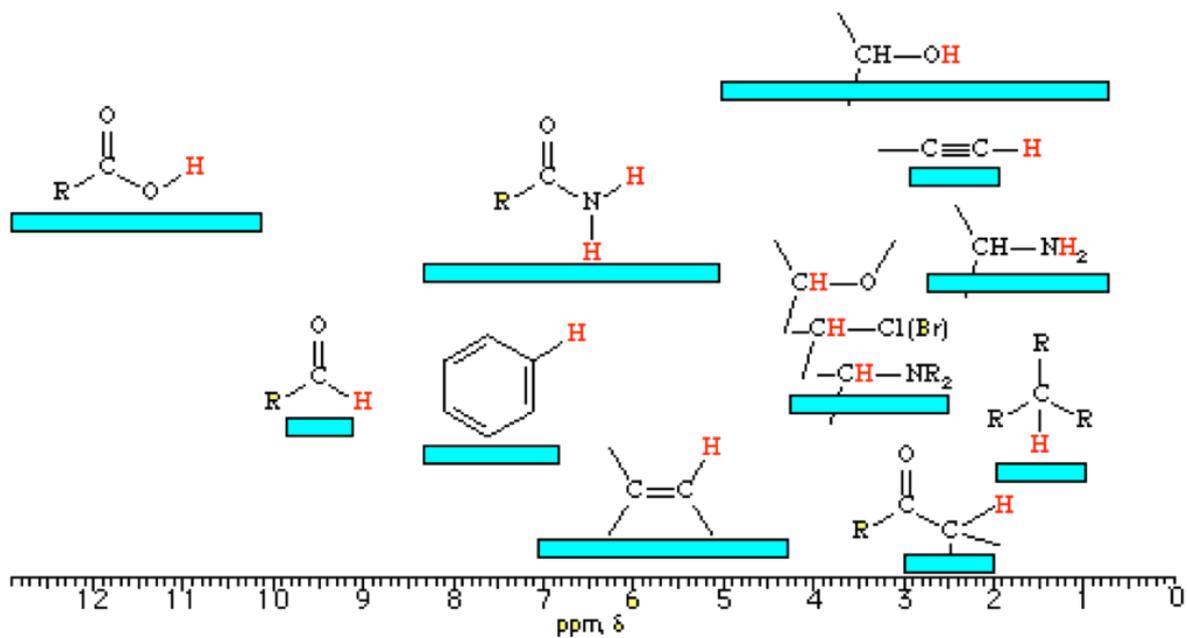
Déplacement chimique ^1H

Le déplacement chimique $\delta(^1\text{H})$ dépend de nombreux facteurs :

- densité électronique (importance des effets inductifs)
- existence de liaisons-H (intra ou intermoléculaire)
- solvant
- concentration
- délocalisation (électrons π)
- échange chimique (cas des protons labiles OH, NH ...)

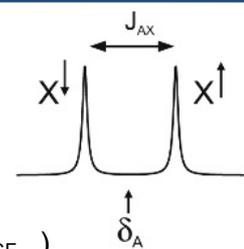


26



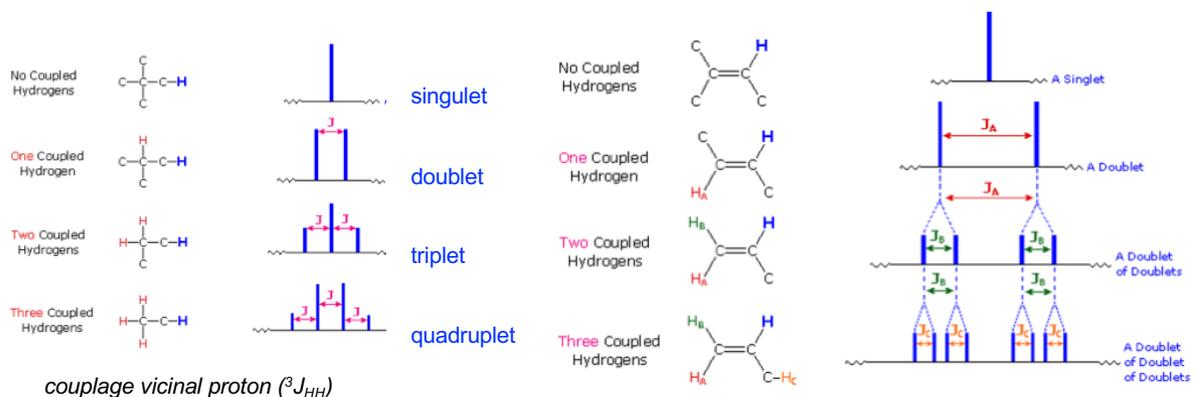
Couplage scalaire

Le couplage scalaire ${}^nJ_{ij}$ traduit une interaction entre 2 noyaux i et j par le biais des électrons des n liaisons. Il s'agit d'une interaction dipôle-dipôle *indirecte* (à ne pas confondre avec l'interaction dipôle-dipôle *directe* dont nous parlerons plus tard).



Le couplage scalaire peut être homo- ($J_{HH}...$) ou hétéronucléaire (J_{CH} , $J_{CF}...$).

La multiplicité des signaux dépend du nombre de voisins impliqués dans le couplage.

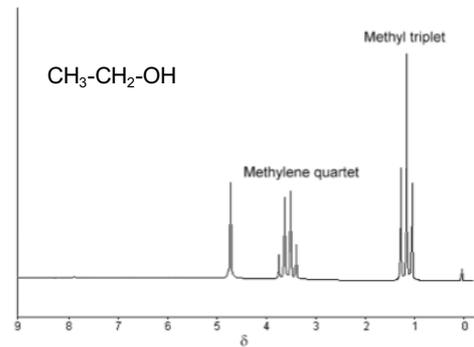
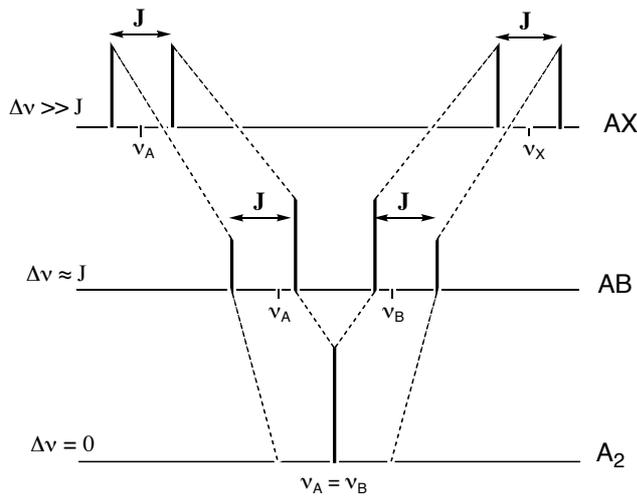


Nomenclature des systèmes de spins

Système de spins = ensemble de spins couplés les uns aux autres

La notation de Pople permet de décrire les systèmes de spins: des spins ayant des déplacements chimiques proches sont désignés par des lettres proches dans l'alphabet (A et B par exemple). On utilise des lettres éloignées dans l' alphabet (A et X par exemple) dans le cas de couplage faible.

couplage fort $\frac{\Delta\nu}{J} \leq 10$



$\Delta\nu = 2,4\text{ppm}$ et $J = 7\text{Hz}$

à 500MHz: $\Delta\nu/J = 171$

→ système A_3X_2

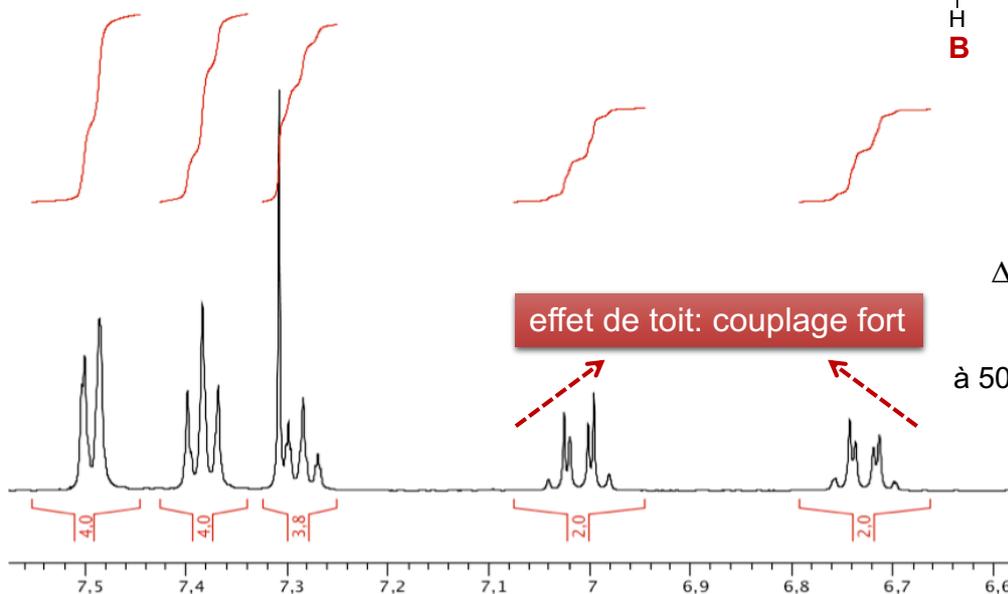
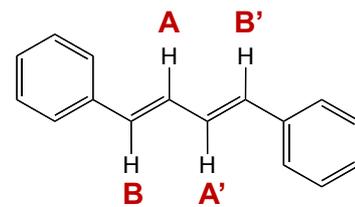
29

molécule de TP: C16H14

Système $AA'BB'$: $J_{AB} \neq J_{A'B'} \neq J_{AB'} \neq J_{A'B}$

Complicé par la présence de $J_{AA'}$ et $J_{BB'}$

Comment expliquer la multiplicité des signaux?



$\Delta\nu = 0,28\text{ppm}$

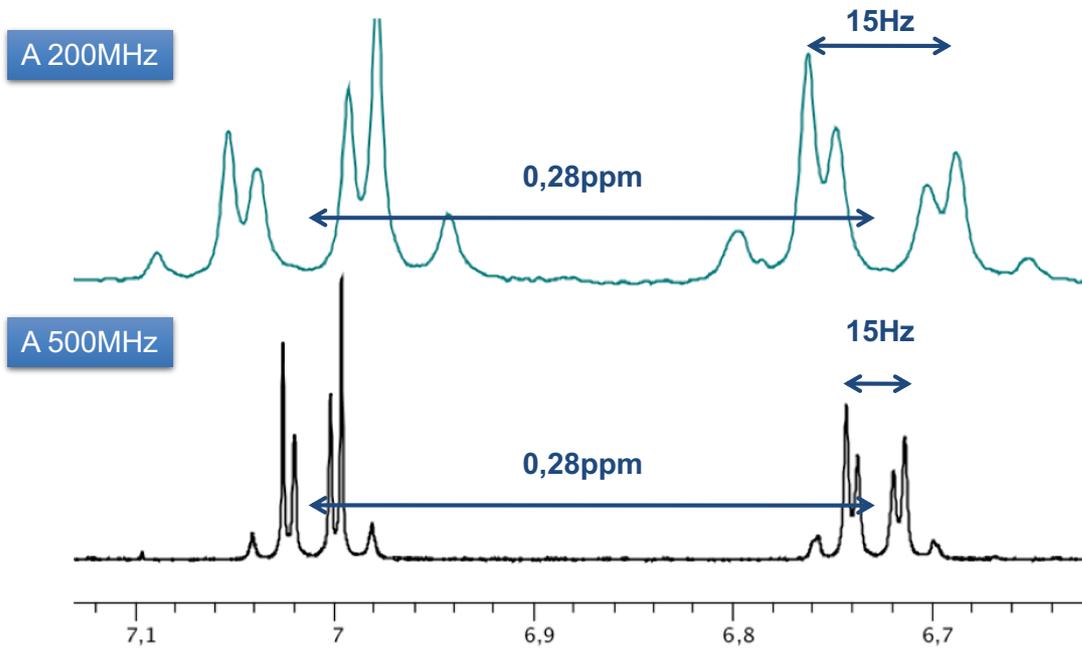
$J \approx 15\text{Hz}$

à 500MHz: $\Delta\nu/J \approx 9$

30

Rq: spectre à 2 champs différents

Les déplacements chimiques en ppm sont invariables selon le champ.
Attention à la conversion ppm/Hz pour les couplages scalaires!!!

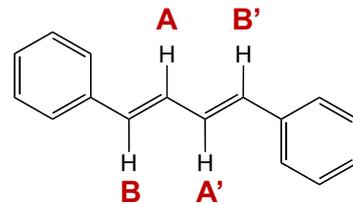


31

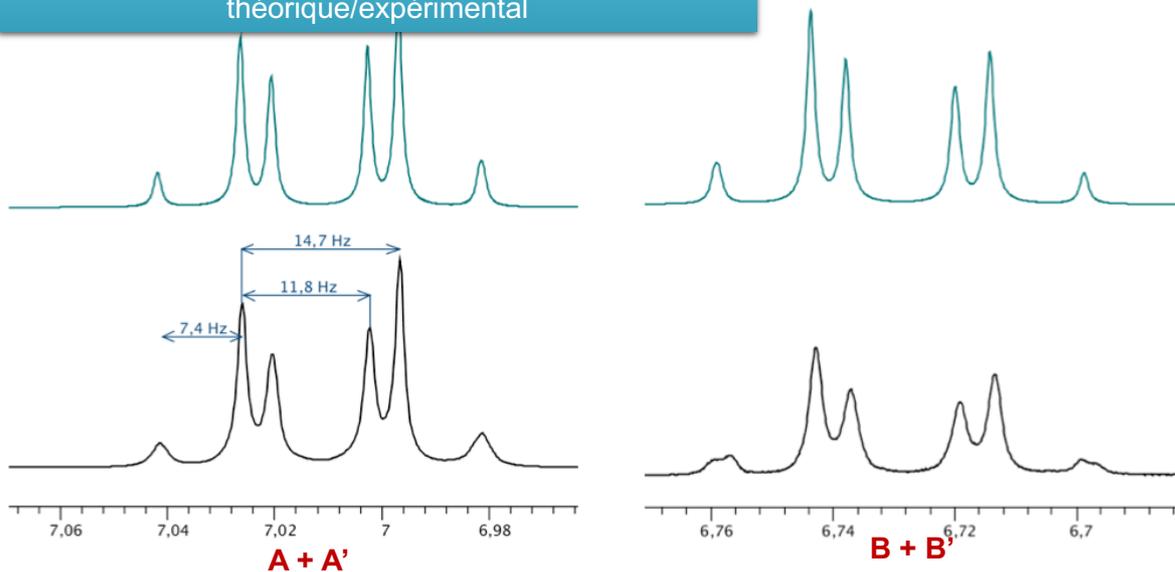
Simulation de spectre

Simulation de spectre avec

$J_{AB} = 15,6\text{Hz}$	$J_{A'B'} = 15,6\text{Hz}$
$J_{AB'} = -0,9\text{Hz}$	$J_{A'B} = -0,9\text{Hz}$
$J_{AA'} = 10,7\text{Hz}$	$J_{BB'} = 0,2\text{Hz}$



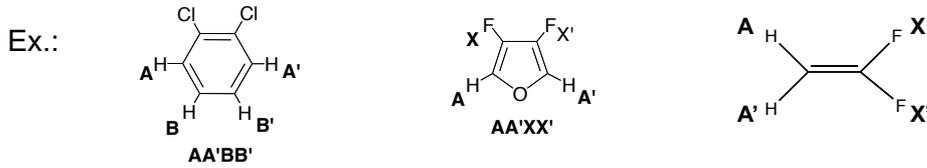
Les valeurs ne peuvent être lues sur le spectre... il faut simuler le système et affiner jusqu'à superposition théorique/expérimental



Rq: la simulation ne prend pas en compte le faible couplage entre BB' et les H_{ar} en ortho 32

Equivalence chimique / Equivalence magnétique

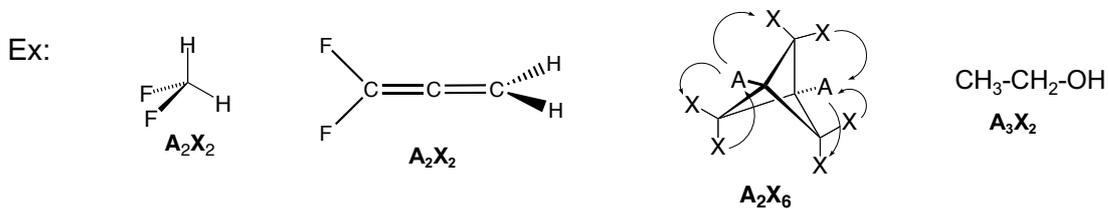
Des spins sont dits **chimiquement équivalents** s'ils possèdent le même environnement électronique : ils sont isochrones et ont même déplacement chimique δ .



Des spins chimiquement équivalents sont dits **magnétiquement équivalents** s'ils sont couplés de façon identique à tous les autres protons du système de spins.

Une seule valeur de J entre chaque classe ($J_{AB} = J_{A'B'} = J_{AB'} = J_{A'B}$) : systèmes A_2B_2 , A_3X_2

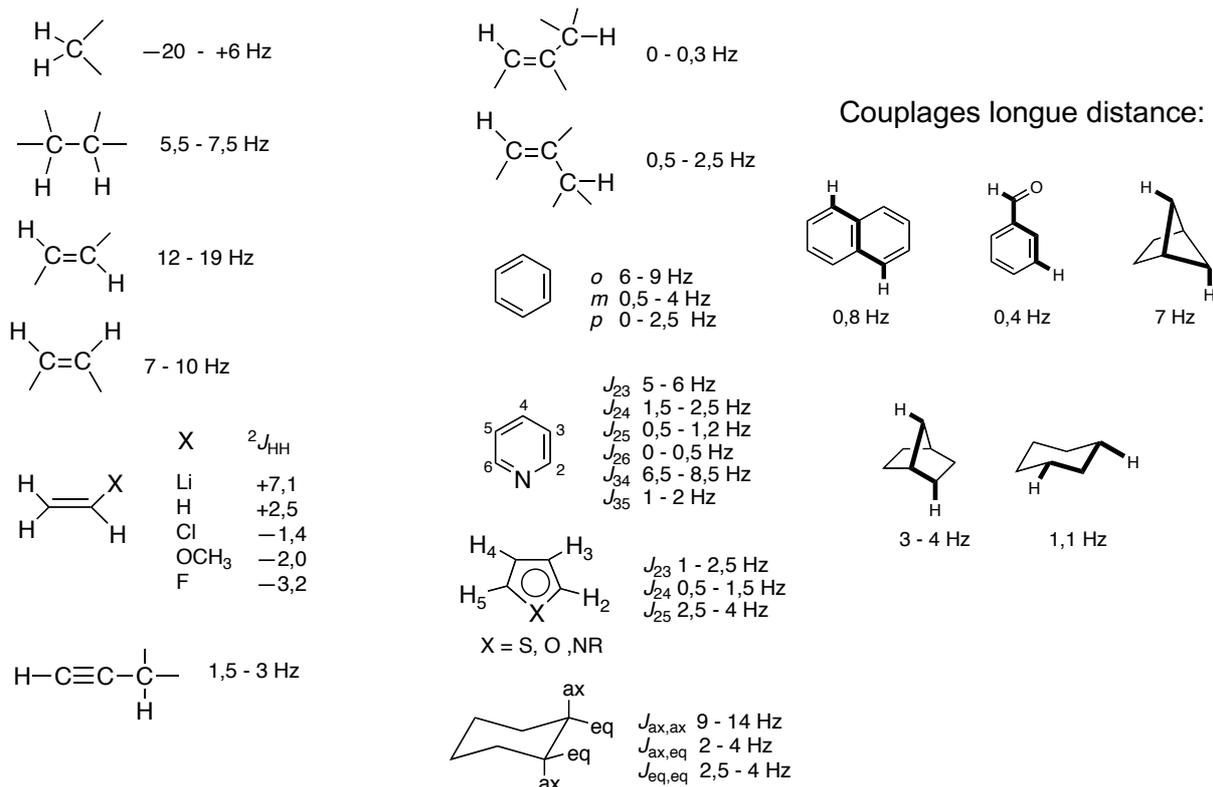
L' équivalence magnétique est plus courante que l' équivalence "seulement" chimique.



Attention: les couplages entre noyaux équivalents ne donnent pas lieu à un multiplet.

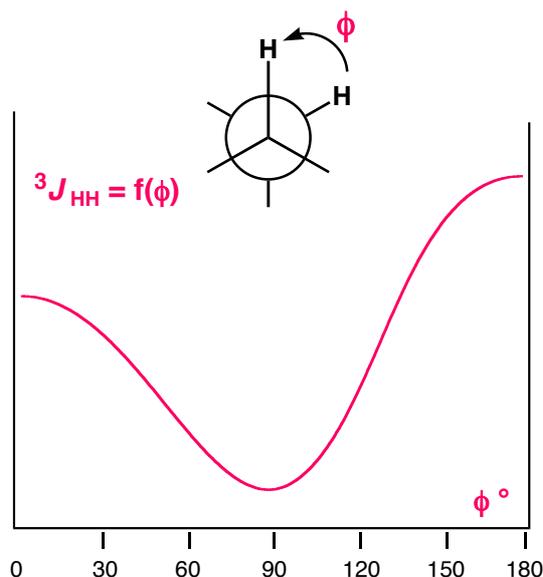
33

Quelques valeurs de constantes J_{HH}



34

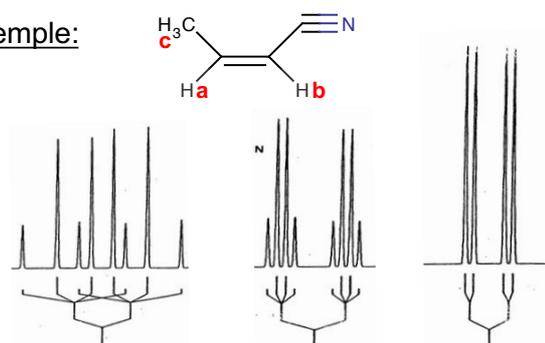
Cas particulier de $^3J_{HH}$: la relation de Karplus



Quelques valeurs types des constantes de couplages $^3J_{HH}$

cyclopropane	<i>cis</i>	6-10 Hz	=CH-CH=	9-13 Hz
	<i>trans</i>	3-6 Hz		
cyclobutane	<i>cis</i>	6-10 Hz	-CH=CH2	<i>cis</i> 5-14 Hz
	<i>trans</i>	5-9 Hz		<i>trans</i> 11-19 Hz
cyclohexane	<i>a,a</i>	6-14 Hz	>CH-CHO	1-3 Hz
	<i>a,e</i>	3-5 Hz	=CH-CHO	5-8 Hz
	<i>e,e</i>	0-5 Hz		
benzene	<i>ortho</i>	6-10 Hz	HC-NH	4-8 Hz
pyridine	2,3	5-6 Hz	HC-OH	4-10 Hz
	3,4	7-9 Hz		
CH-CH		0-12 Hz	HC-SH	6-8 Hz

exemple:



La valeur de la constante $^3J_{HH}$ peut donner des informations sur la conformation de la molécule.

35

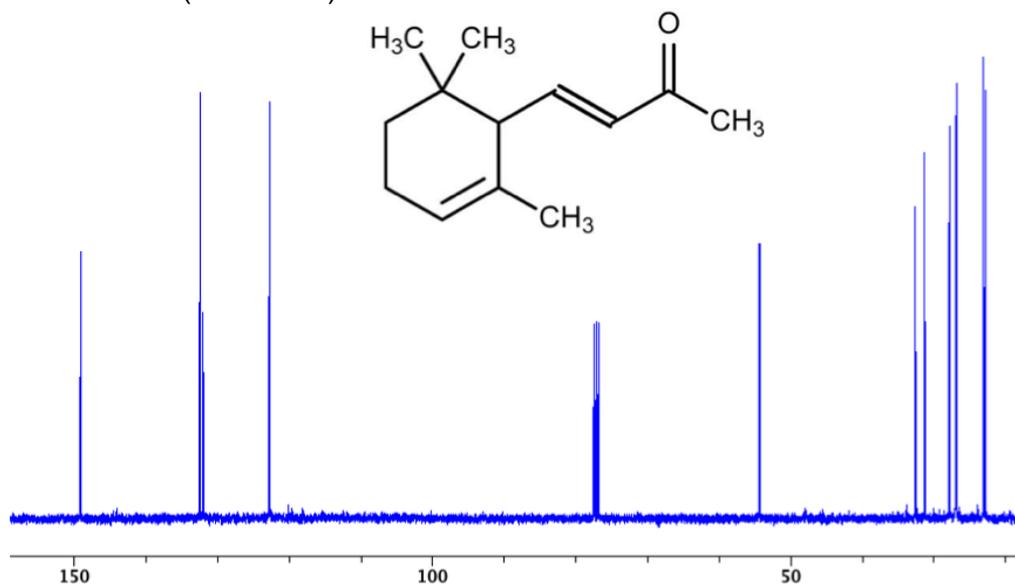
RMN hétéronucléaire

- carbone ^{13}C
- phosphore ^{31}P
- fluor ^{19}F
- azote $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$
- exemple d'analyse multi noyaux

36

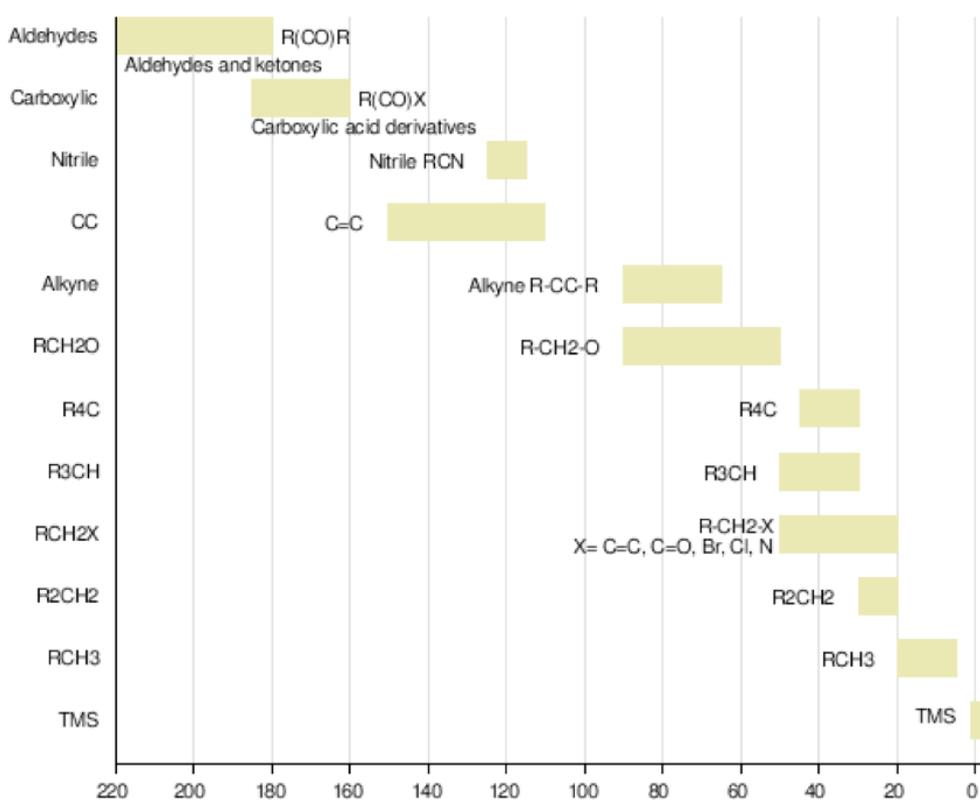
RMN ^{13}C

- Abondance naturelle : 1,1%
- Sensibilité faible
- Multiplicité des signaux due aux couplages avec les protons voisins
- Relaxation T_1 parfois longue (intensité des signaux)
- Fréquence: 75MHz (à 300MHz)



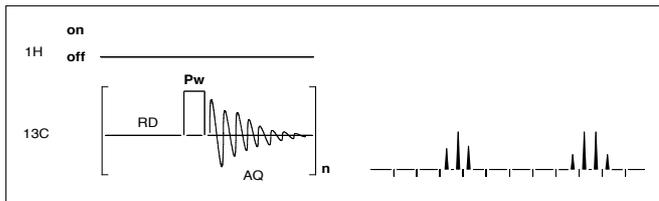
37

Déplacement chimique ^{13}C

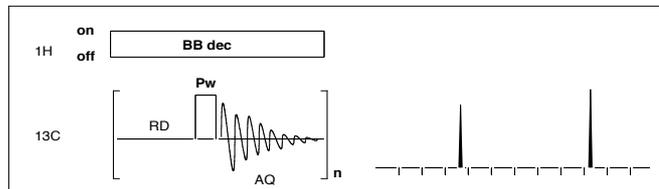


38

Séquences usuelles employées en RMN ^{13}C



Pas de découplage ^1H



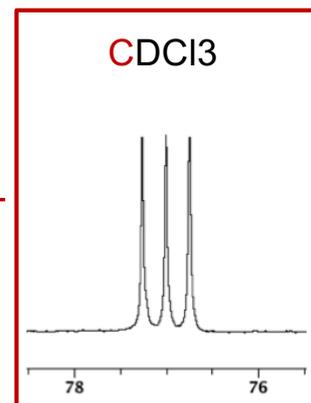
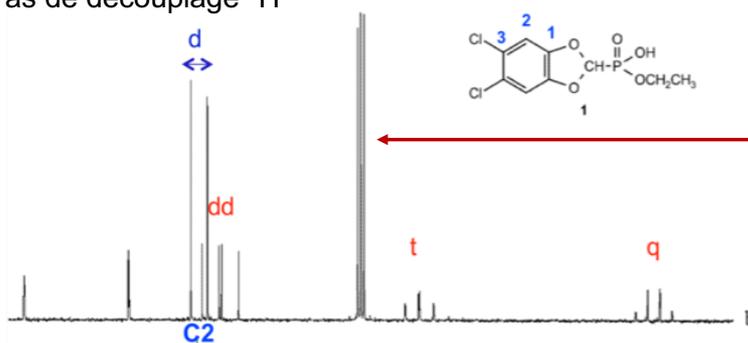
Découplage large bande (BB decoupling)

Le découplage consiste ici à irradier les protons par une onde continue qui entraîne des transitions entre les niveaux d'énergie: les carbones ne « voient plus » les protons

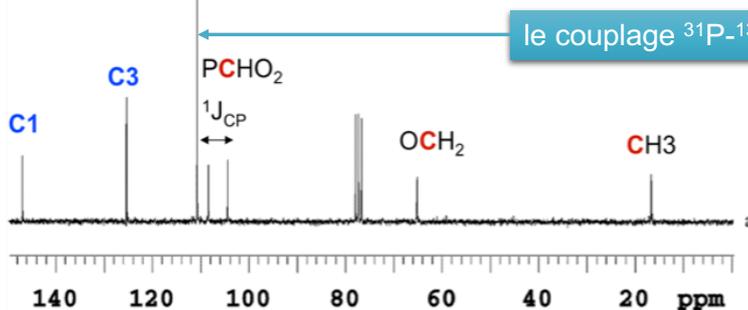
+ séquences permettant une édition du spectre: jmod et dept

Spectre ^{13}C couplé / découplé ^1H

• Pas de découplage ^1H



• Découplage ^1H

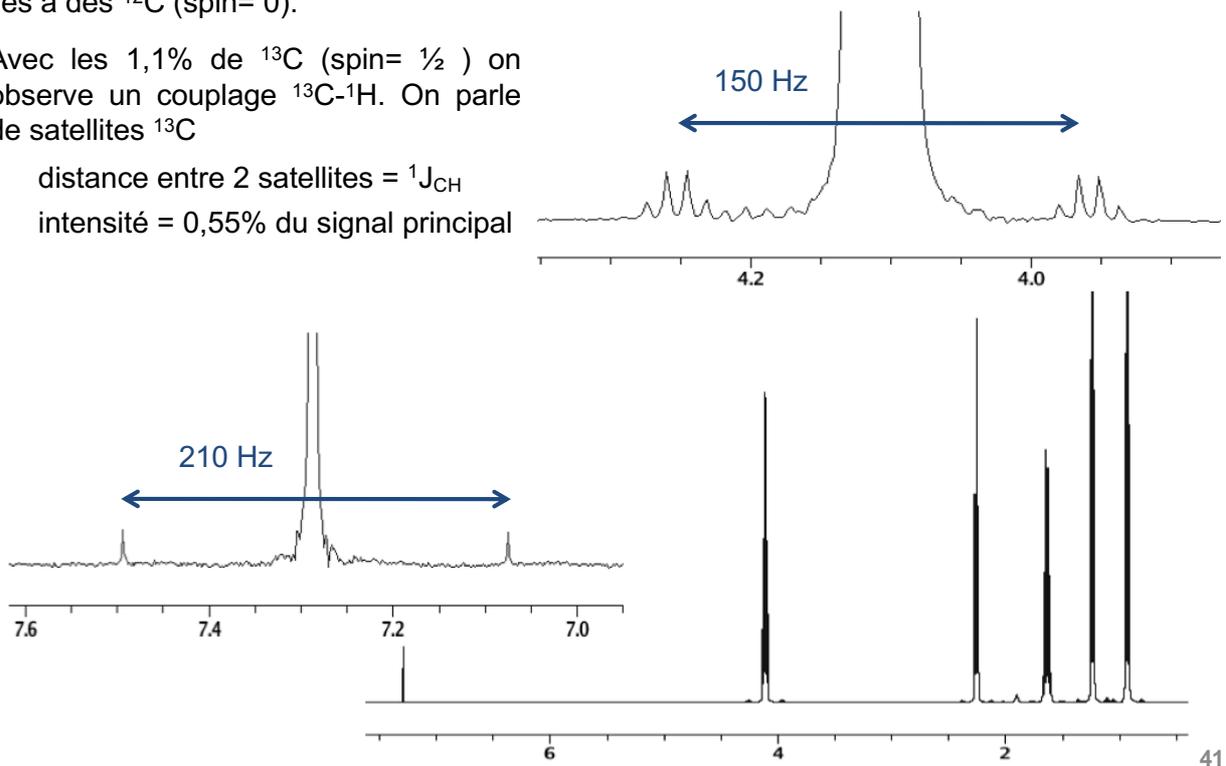


Voit on le couplage ^{13}C sur un spectre ^1H ?

En abondance naturelle, il y a presque 99% de ^{12}C : on observe majoritairement des protons liés à des ^{12}C (spin= 0).

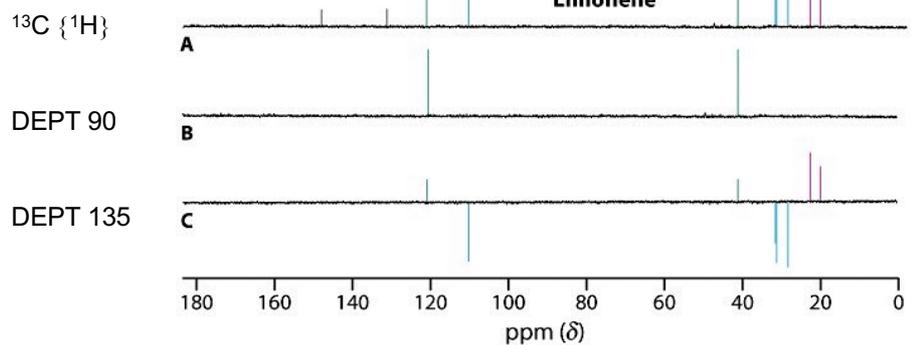
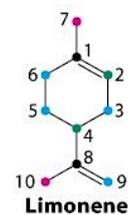
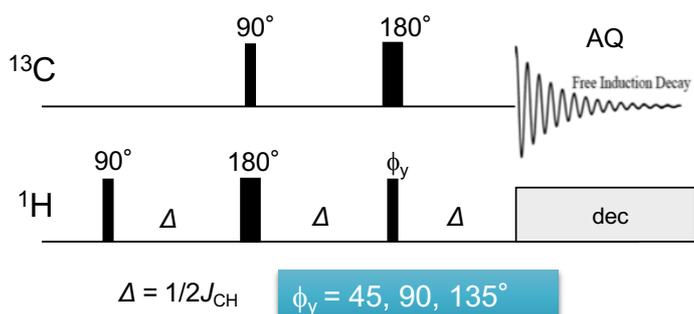
Avec les 1,1% de ^{13}C (spin= $\frac{1}{2}$) on observe un couplage ^{13}C - ^1H . On parle de satellites ^{13}C

- distance entre 2 satellites = J_{CH}
- intensité = 0,55% du signal principal



Comment déterminer le nombre de ^1H lié à chaque ^{13}C ?

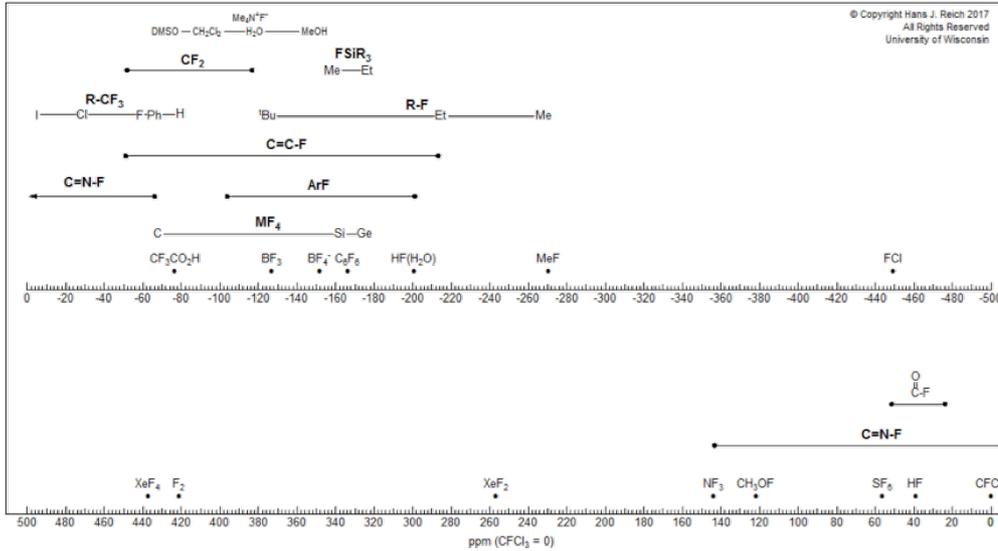
Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (DEPT)



RMN ^{19}F

- Abondance naturelle : 100%
- Excellente sensibilité (idem proton)
- Large gamme spectrale (environ 700ppm)
- Fréquence 282MHz (à 300MHz)
- Couplages ^{19}F - ^1H , ^{19}F - ^{13}C , ^{19}F - ^{19}F non négligeables...

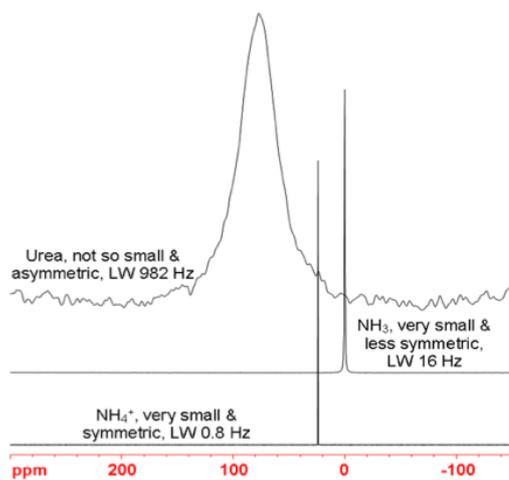
-Fluorine Shifts Overview



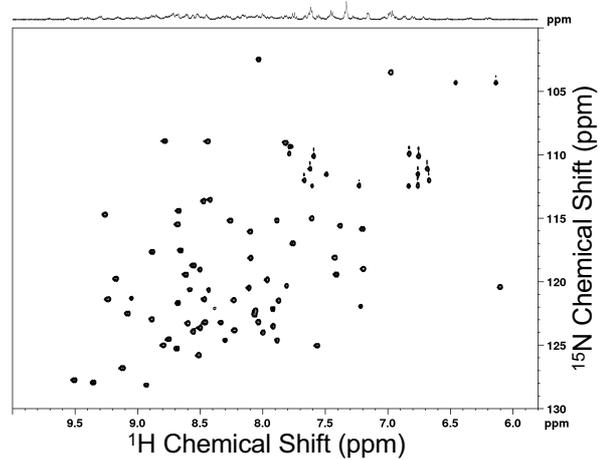
45

RMN $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$

- Abondance naturelle : 99,63% pour ^{14}N , 0,37% pour ^{15}N
- Noyau peu sensible
- L'azote 14 est un noyau quadropolaire (spin 1), la relaxation quadropolaire a pour conséquence des signaux larges. La relaxation dépend de la valeur du moment quadropolaire du noyau observé, ainsi que de la taille et de la symétrie de la molécule.
- Les biologistes étudient des protéines enrichées en ^{15}N .



signaux ^{14}N plus ou moins larges



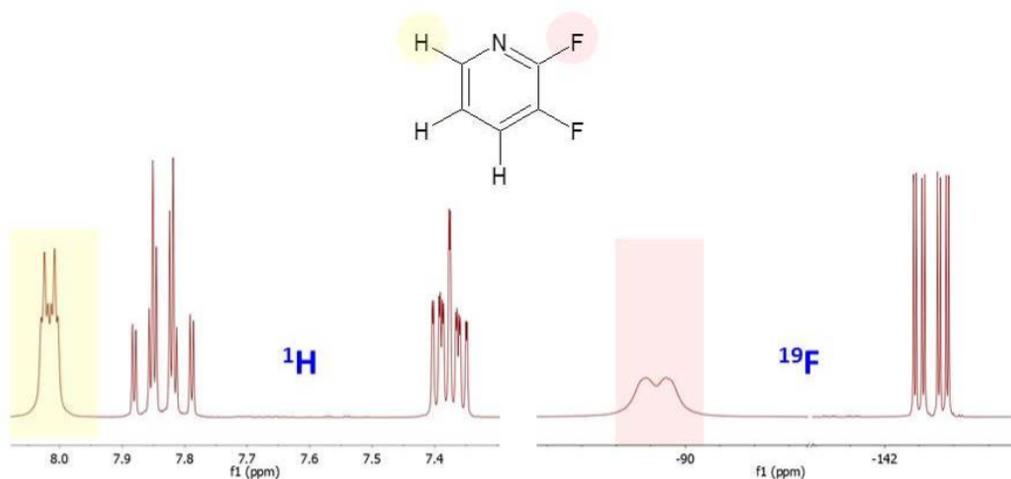
HSQC ^1H - ^{15}N de l'ubiquitine

46

RMN $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$

Le couplage avec un noyau ^{14}N peut se voir sur les spectres proton ou X (élargissement des signaux, multiplicité)!

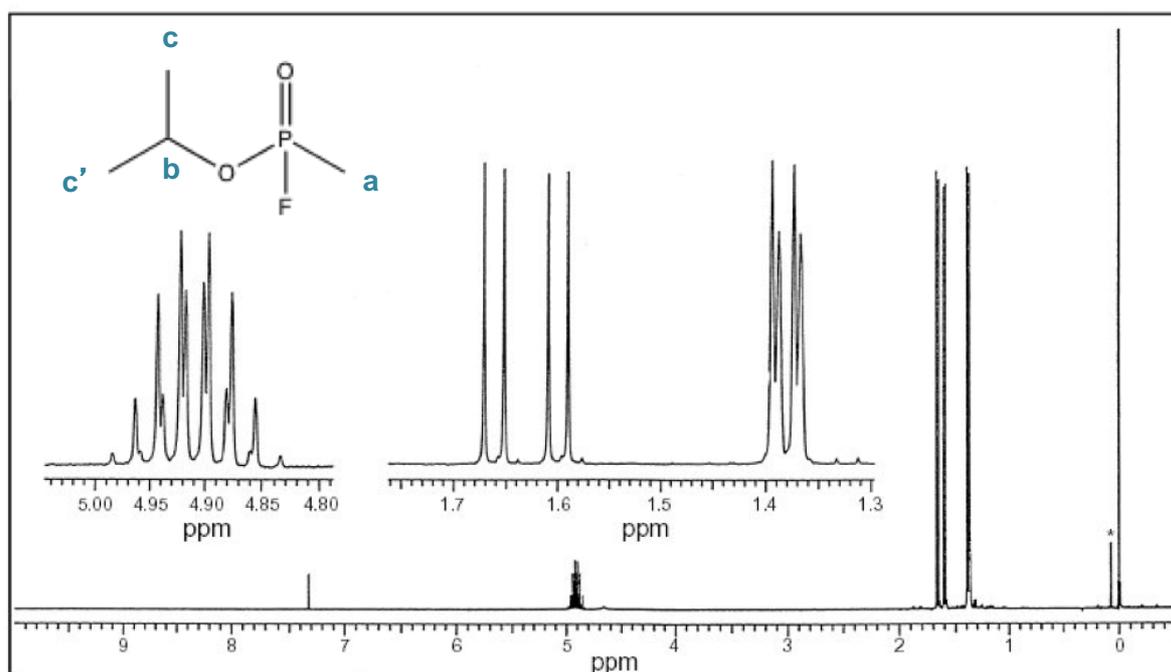
Broadening due to ^{14}N



47

Exemple d'analyse multi noyaux

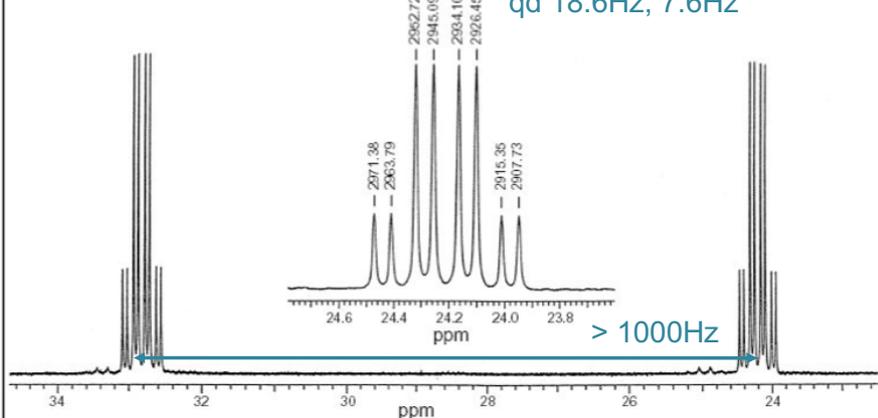
Gaz sarin $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{PF}$: spectre enregistré à 300 MHz, solvant CDCl_3



48

RMN ³¹P du sarin

spectre ³¹P non découplé

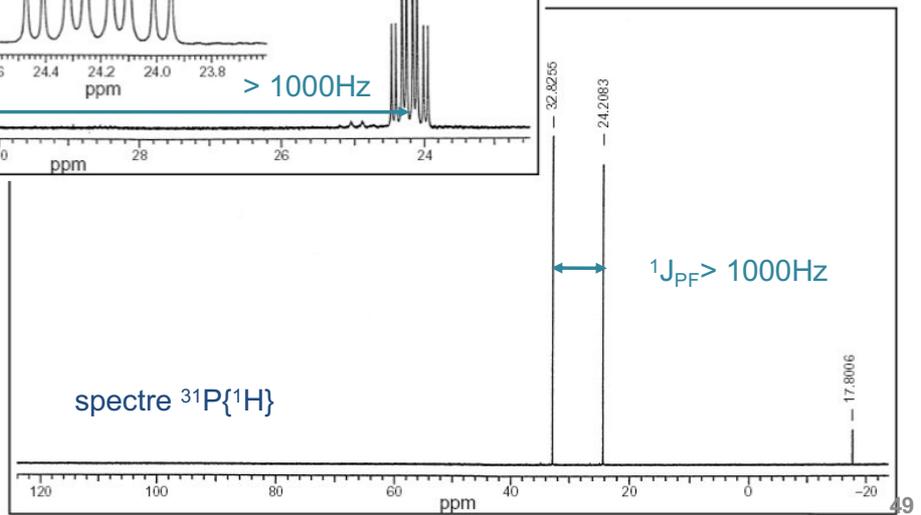


qd 18.6Hz, 7.6Hz

ici: 1ppm \Leftrightarrow 121Hz

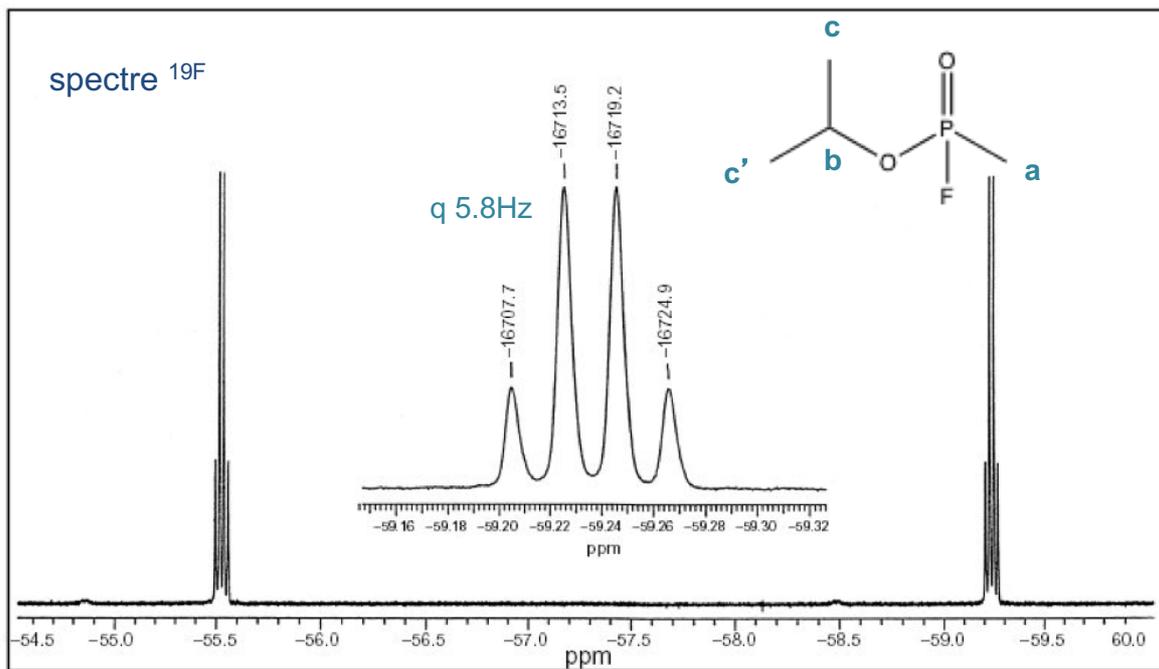
- $^1J_{PF} > 1000\text{Hz}$
- $^2J_{PHa} = 18.6\text{Hz}$
- $^3J_{PHb} = 7.6\text{Hz}$

spectre ³¹P{¹H}



RMN ¹⁹F du sarin

spectre ¹⁹F

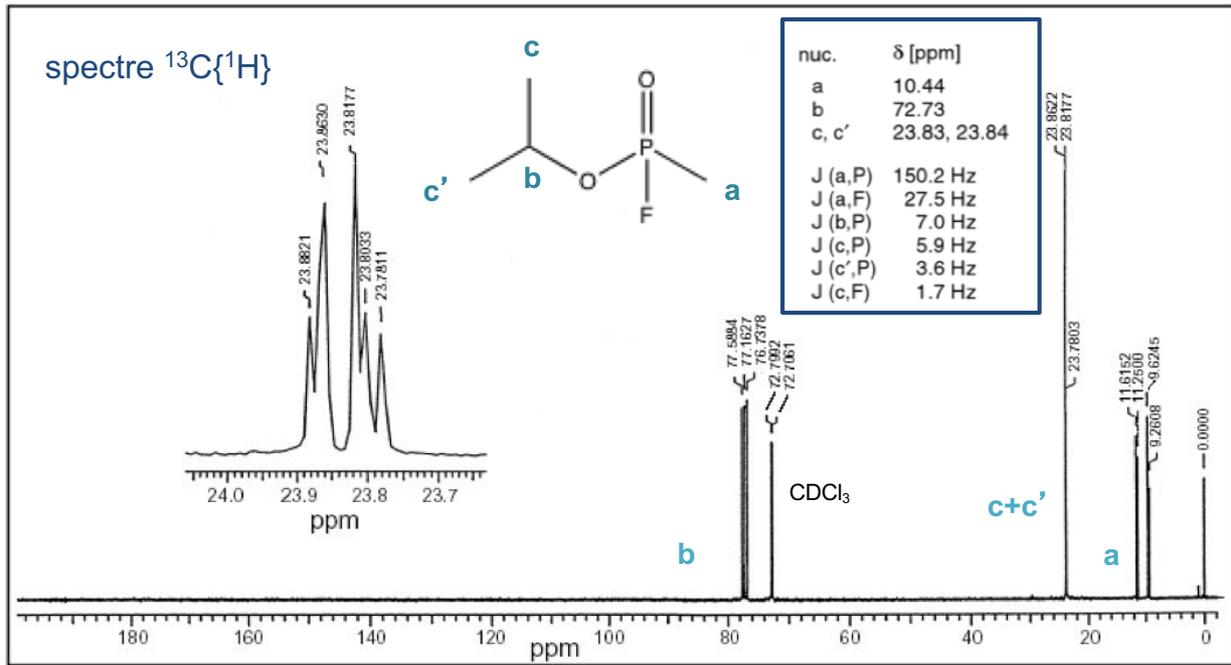


q 5.8Hz

ici: 1ppm \Leftrightarrow 282Hz

- $^1J_{PF} > 1000\text{Hz}$
- $^3J_{FHa} = 5.8\text{Hz}$

RMN ¹³C du sarin



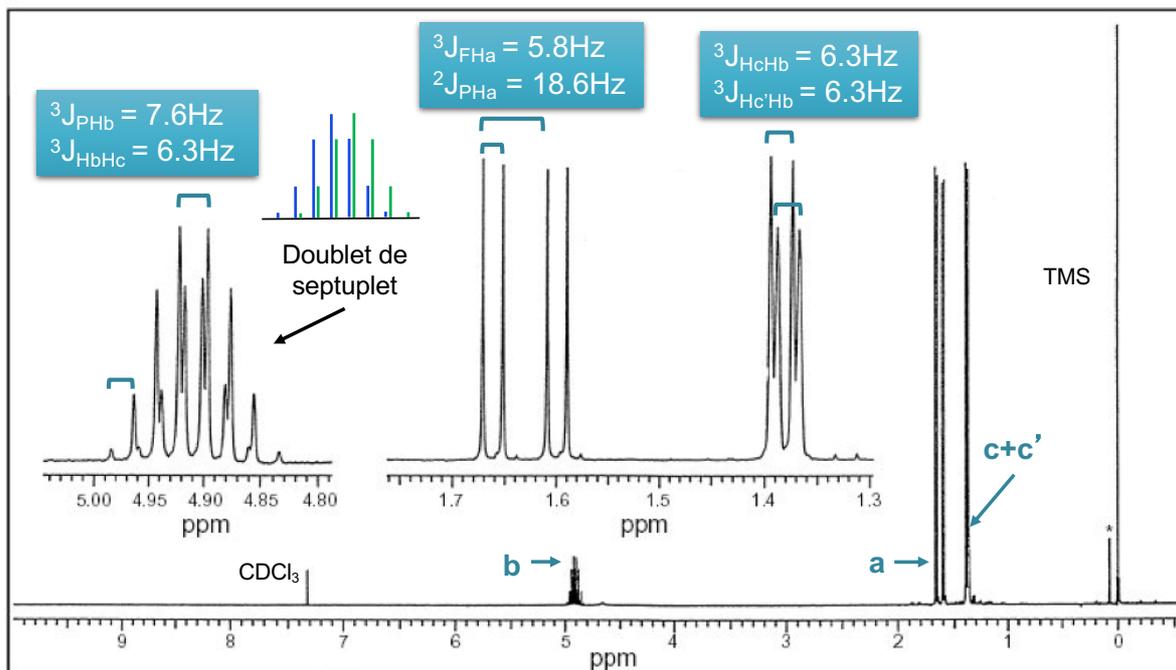
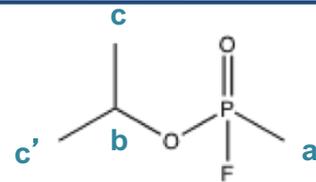
ici: 1ppm ⇔ 75Hz

Le spectre ¹³C montre des couplages absents des spectres ¹⁹F et ³¹P: la faute à l'abondance naturelle!

51

RMN ¹H du sarin

Les protons c et c' sont diastereotopiques, donc non équivalents.



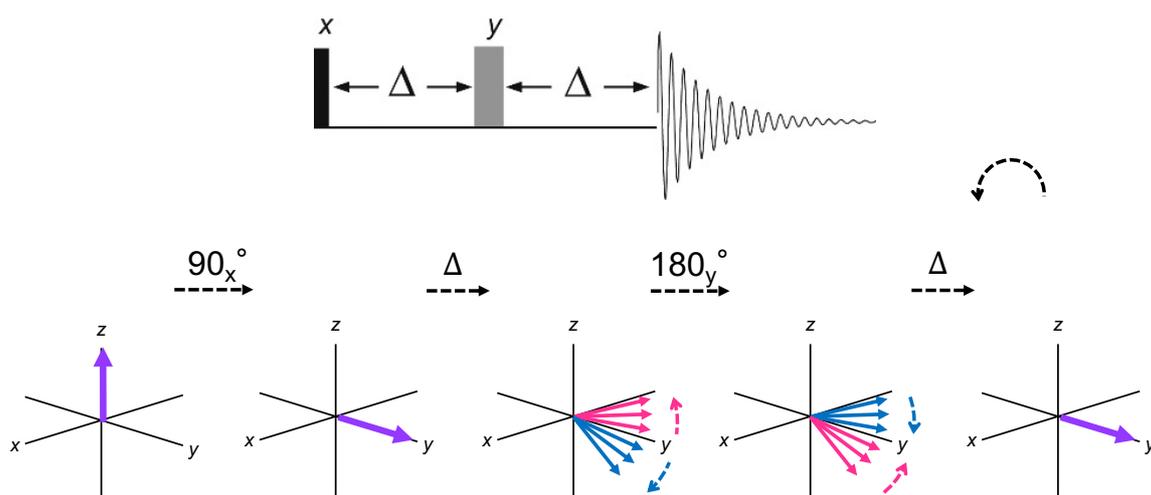
52

ça se complique

- RMN multi-impulsionnelle
- impulsions sélectives
- gradients de champs pulsés

53

Un aperçu de RMN multi impulsionnelle: l'écho de spin



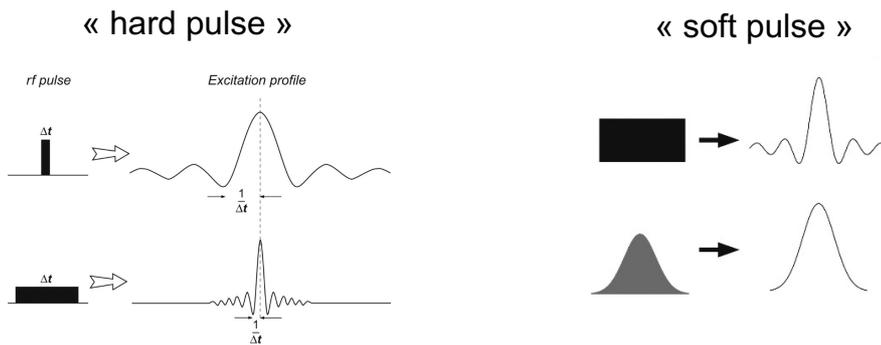
L'écho de spin refocalise les déplacements chimiques et laisse évoluer les couplages scalaires. Il permet ainsi de manipuler les spins selon leurs couplages avec les noyaux voisins, de supprimer des inhomogénéités de champ magnétique... L'écho de spin est utilisé dans de nombreuses séquences d'expériences 2D.

54

Impulsions sélectives

Une impulsion de durée Δt permet d'exciter une largeur spectrale $SW = 2 \cdot (1/\Delta t)$. Pour exciter $SW = 10$ ppm en proton (4000 Hz à 400 MHz) il faut une impulsion de moins de 500 μs . Une impulsion typique rectangulaire de 10 μs garantit une excitation uniforme.

Si l'on veut exciter un signal en particulier (par exemple un signal de solvant) on utilise typiquement une impulsion plus longue à basse puissance (soft pulse) et d'une forme non rectangulaire (shaped pulse).

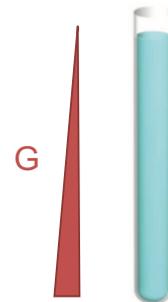


55

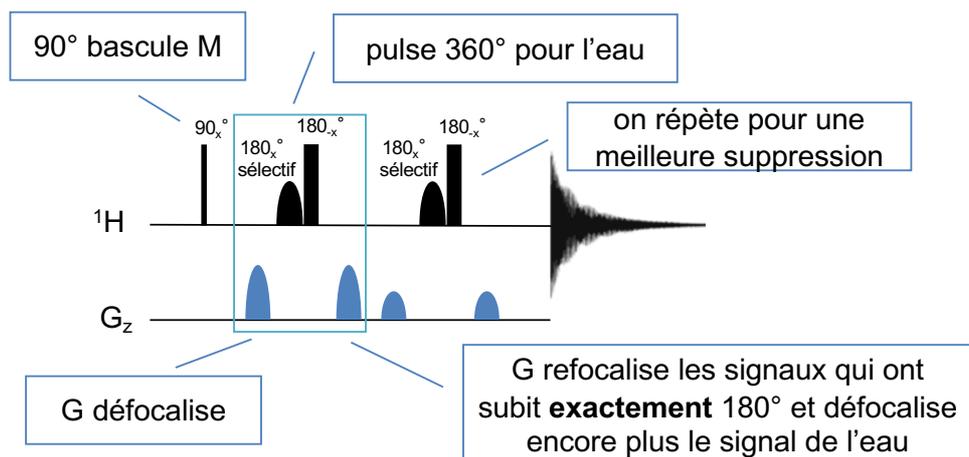
Gradients de champs pulsés

Des gradients de champs pulsés (PFG) sont utilisés dans un grand nombre de séquences multi-impulsionnelles.

Un gradient est une impulsion RF dont l'intensité varie selon un axe (z en général). Ils permettent notamment de sélectionner des signaux (impulsions sélective...) ou d'en supprimer (signaux de solvants, artefacts...).



Exemple: suppression de solvant par excitation sculpting



56

RMN 2D

- Introduction, principe
- COSY
- TOCSY
- HSQC
- HMBC
- NOe et NOESY

57

Introduction à la RMN 2D

séquence 1D

préparation

mélange

détection

séquence 2D

préparation

évolution

mélange

détection

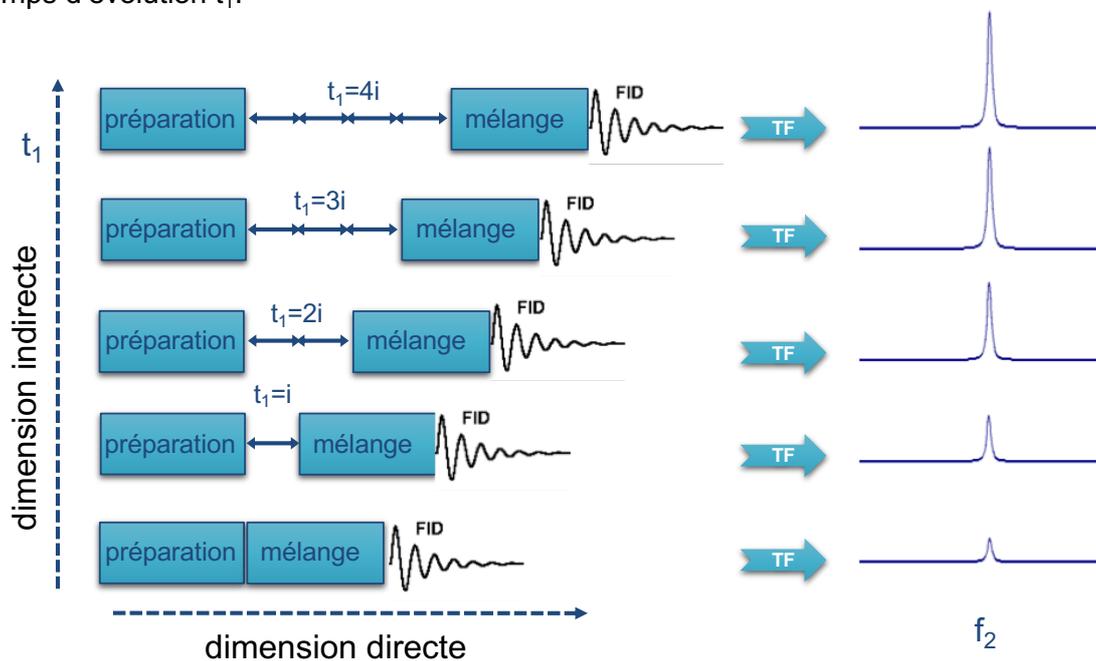
- Période de **préparation**: le système est perturbé (hors équilibre).
- Période d'**évolution** (d'une durée variable) : les spins évoluent en fonction de leur fréquence de résonance et des interactions permises par la période de préparation.
- Période de **mélange** : la polarisation est transférée entre les spins via des interactions scalaires, dipolaires...
- Période de **détection**

58

Acquisition d'un spectre 2D

On répète l'expérience, en incrémentant la période d'évolution t_1 (incrément fixe i) à chaque nouvelle acquisition.

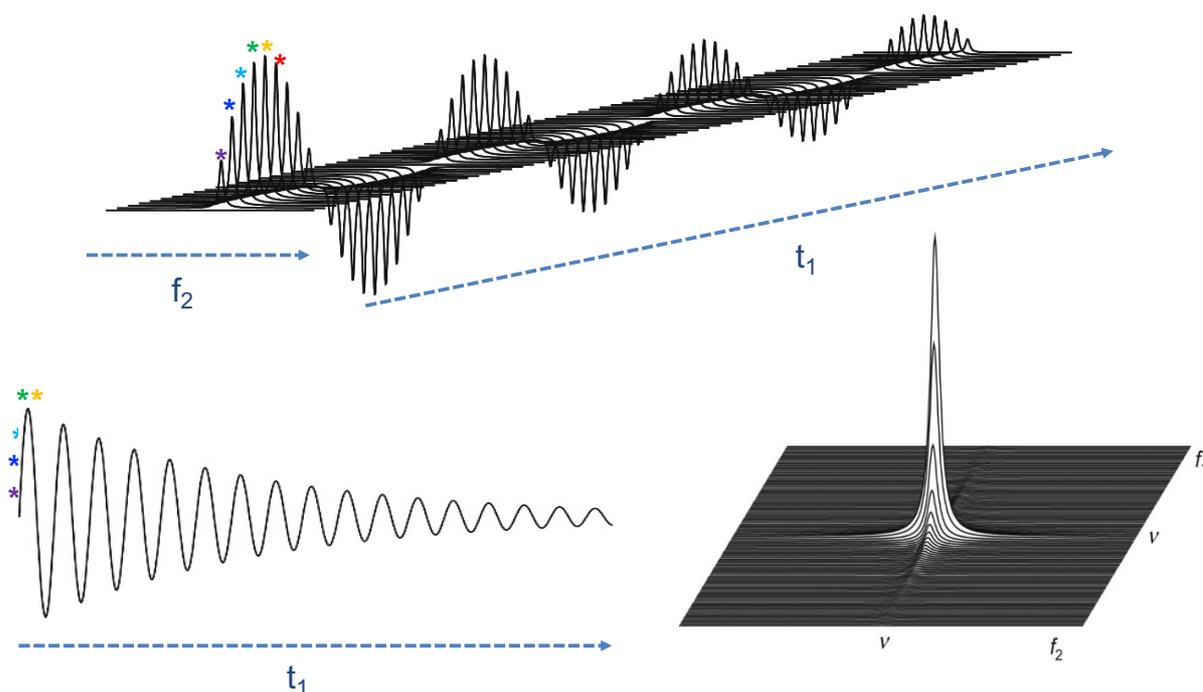
Après TF on obtient une série de spectres, et l'intensité des signaux varie selon la durée du temps d'évolution t_1 .



59

2^e dimension

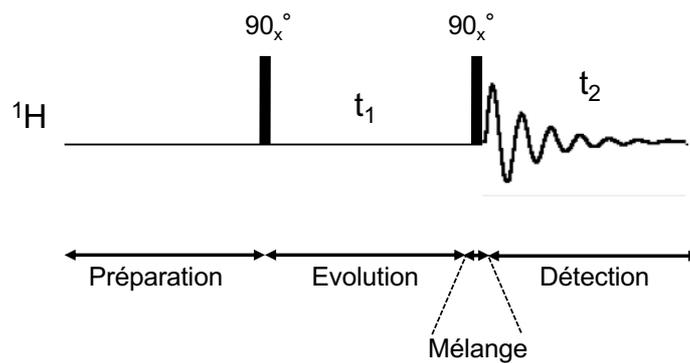
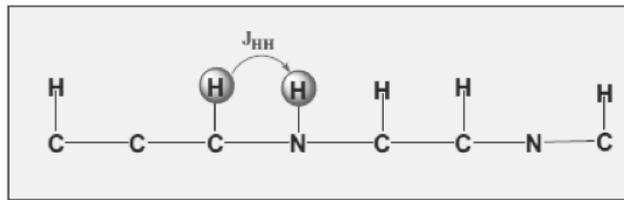
La variation d'intensité des signaux en fonction de la durée de t_1 donne un FID: c'est l'origine de la 2^{ème} dimension.



60

COSY

= **C**orrelation **S**pectroscop**Y**, permet de mettre en évidence les protons qui sont couplés de façon scalaire

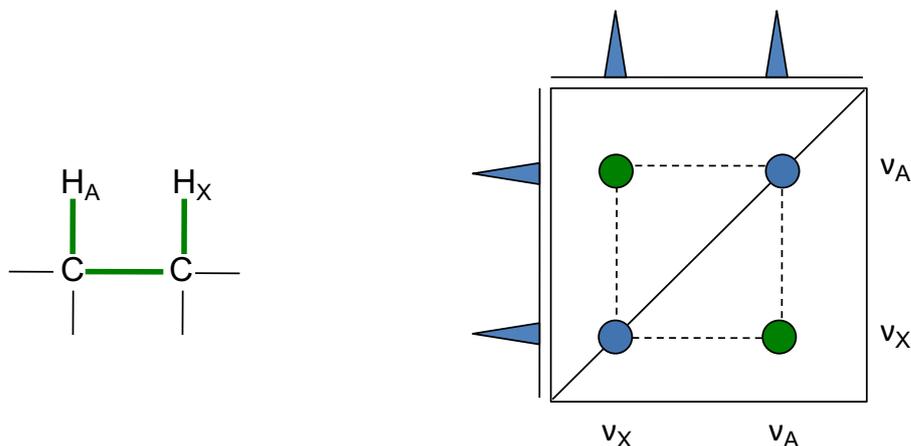


61

Transfert de polarisation dans la COSY

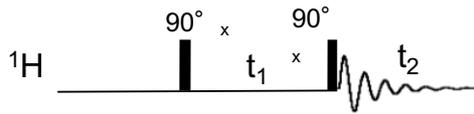
On considère 2 protons A et X couplés en 3J , que se passe-t-il pour A pendant une COSY?

- **préparation**: l'aimantation de A bascule dans le plan transversal
- **évolution** selon la fréquence ν_A pendant t_1
- **mélange**: transfert partiel de l'aimantation A vers X
- **détection**: une partie de l'aimantation A évolue à ν_A , la partie transférée vers X évolue à ν_X



62

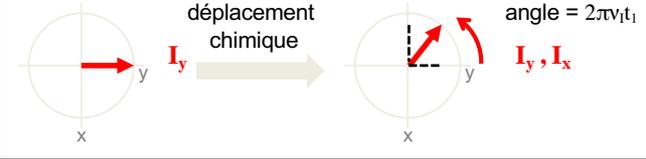
COSY



système: 2 spins I et S couplés de façon scalaire

préparation ($\pi/2$ selon x): $I_z \rightarrow I_y$

exemple:



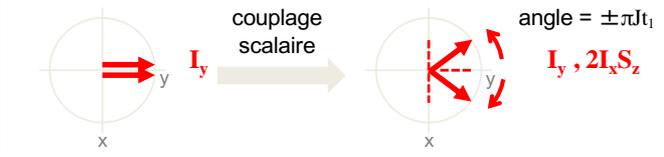
évolution sous l'effet du déplacement chimique:

$$I_y \rightarrow I_y \cos(2\pi\nu_1 t_1) + I_x \sin(2\pi\nu_1 t_1)$$

évolution sous l'effet d'un couplage scalaire:

$$\rightarrow I_y \cos(2\pi\nu_1 t_1) \cos(\pi J t_1) + 2I_x S_z \cos(2\pi\nu_1 t_1) \sin(\pi J t_1) + I_x \sin(2\pi\nu_1 t_1) \cos(\pi J t_1) + 2I_y S_z \sin(2\pi\nu_1 t_1) \sin(\pi J t_1)$$

exemple:



mélange ($\pi/2$ selon x):

$$\rightarrow I_x \cos(2\pi\nu_1 t_1) \cos(\pi J t_1) + 2I_x S_y \cos(2\pi\nu_1 t_1) \sin(\pi J t_1)$$

$$\rightarrow + I_x \sin(2\pi\nu_1 t_1) \cos(\pi J t_1) + 2I_z S_y \sin(2\pi\nu_1 t_1) \sin(\pi J t_1)$$

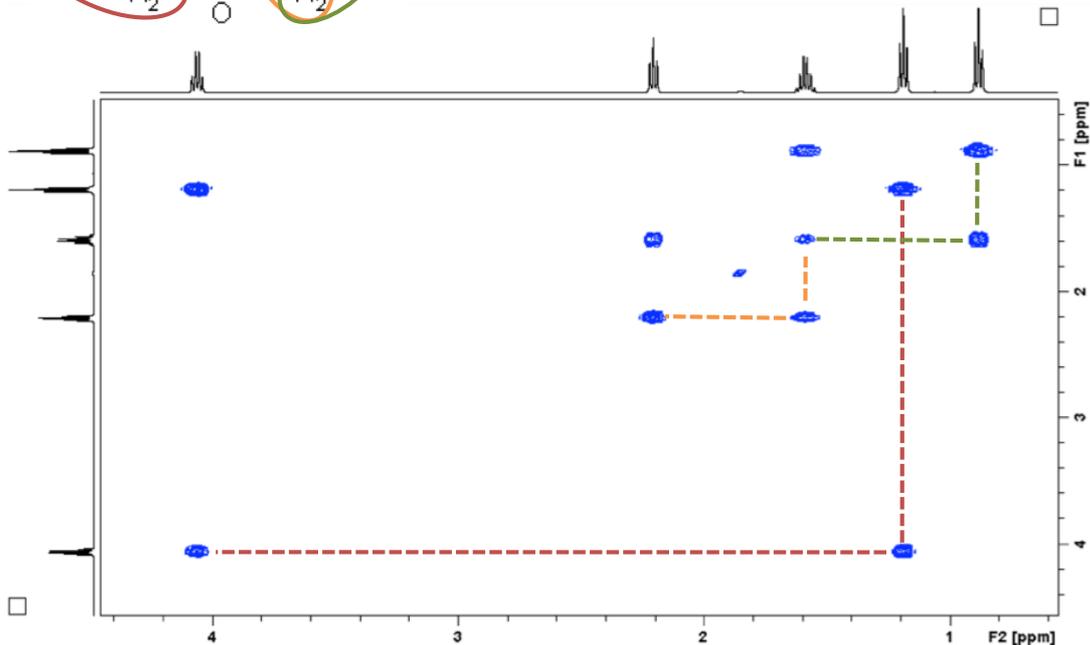
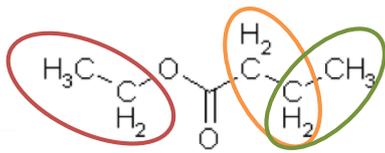
détection: $I_x \cos(2\pi\nu_1 t_1) \cos(\pi J t_1)$ et $2I_x S_y \cos(2\pi\nu_1 t_1) \sin(\pi J t_1)$ transitions (cohérences) pas observables en RMN

$I_x \sin(2\pi\nu_1 t_1) \cos(\pi J t_1)$ évolue à la **fréquence ν_1**

$2I_z S_y \sin(2\pi\nu_1 t_1) \sin(\pi J t_1)$ évolue à la **fréquence ν_s**

63

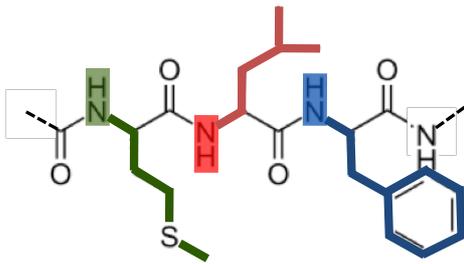
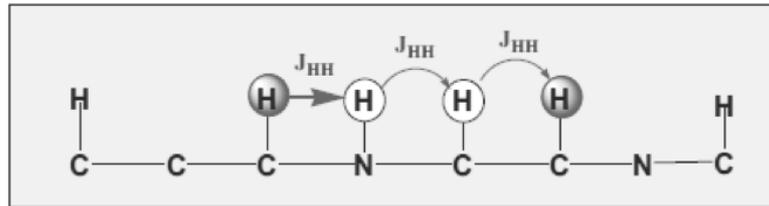
COSY



64

Une autre 2D: la TOCSY

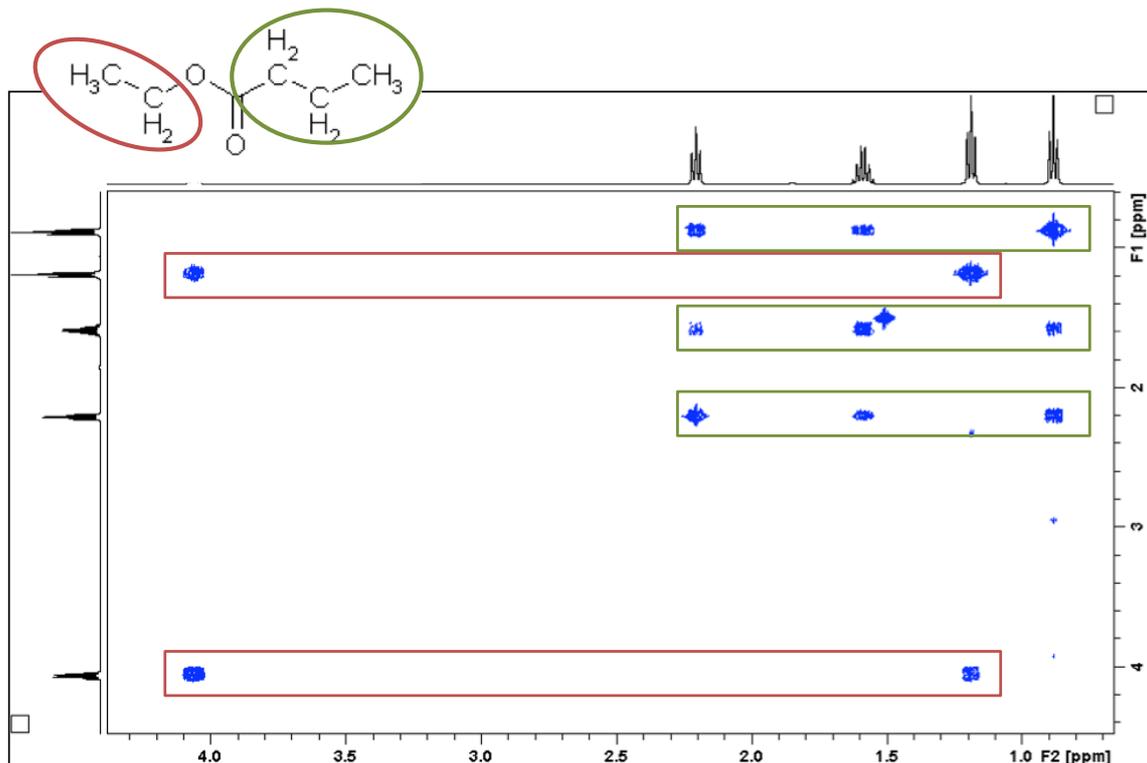
= **T**otal **C**orrelation **S**pectroscop**Y**, permet de mettre en évidence les systèmes de spins (ensemble de protons couplés de façon scalaire)



Analyse d'un peptide: en partant des signaux des NH on peut identifier les chaînes latérales des acides aminés

65

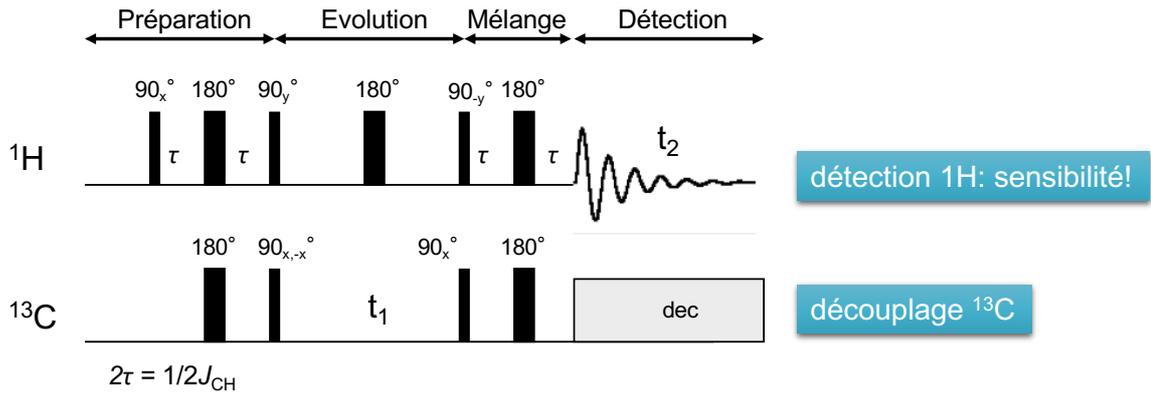
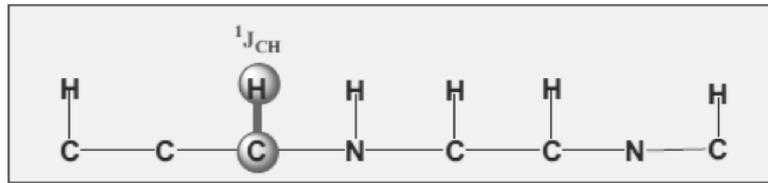
TOCSY



66

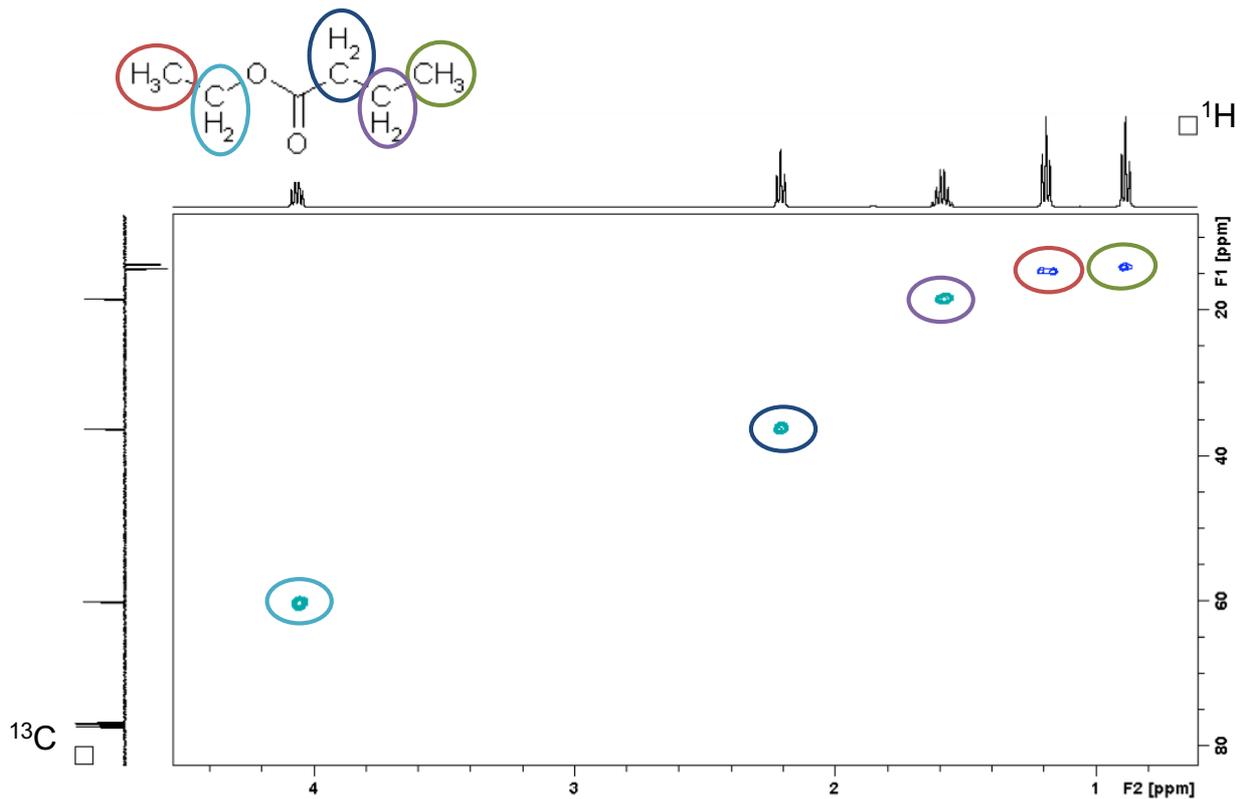
Corrélation hétéronucléaire: l'HSQC

= Heteronuclear Single Quantum Correlation, met en évidence les couplages scalaires $^1J_{CH}$



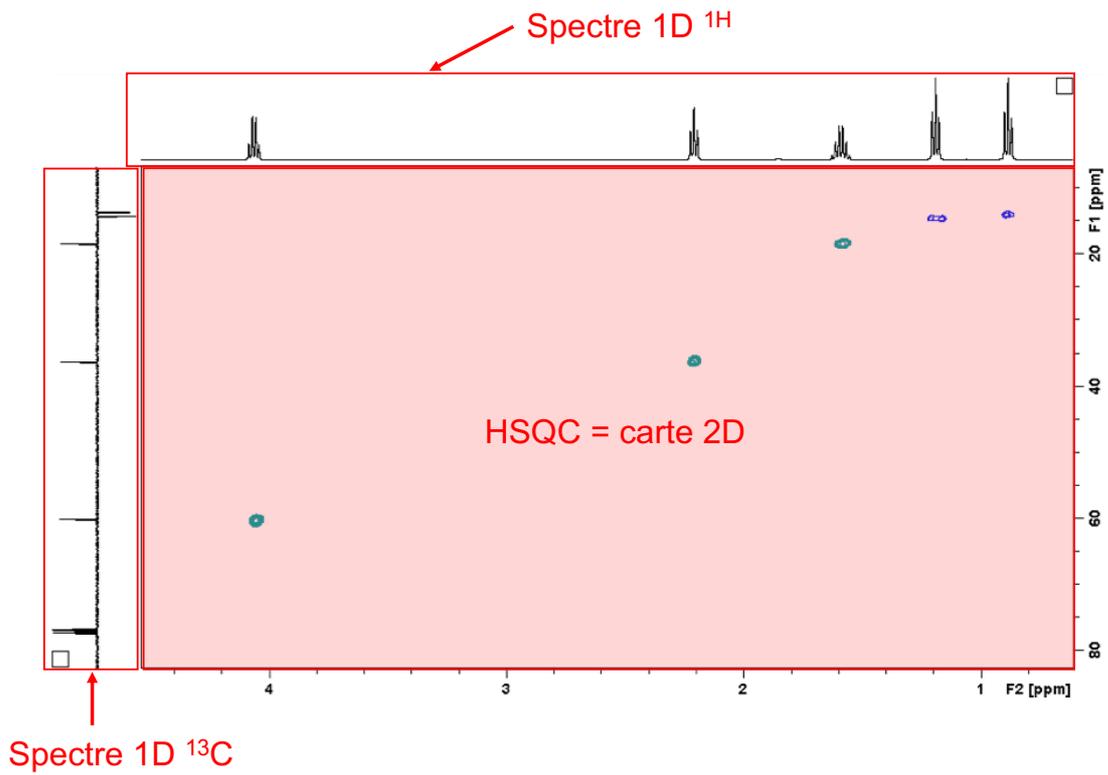
67

HSQC éditée: une alternative au DEPT



68

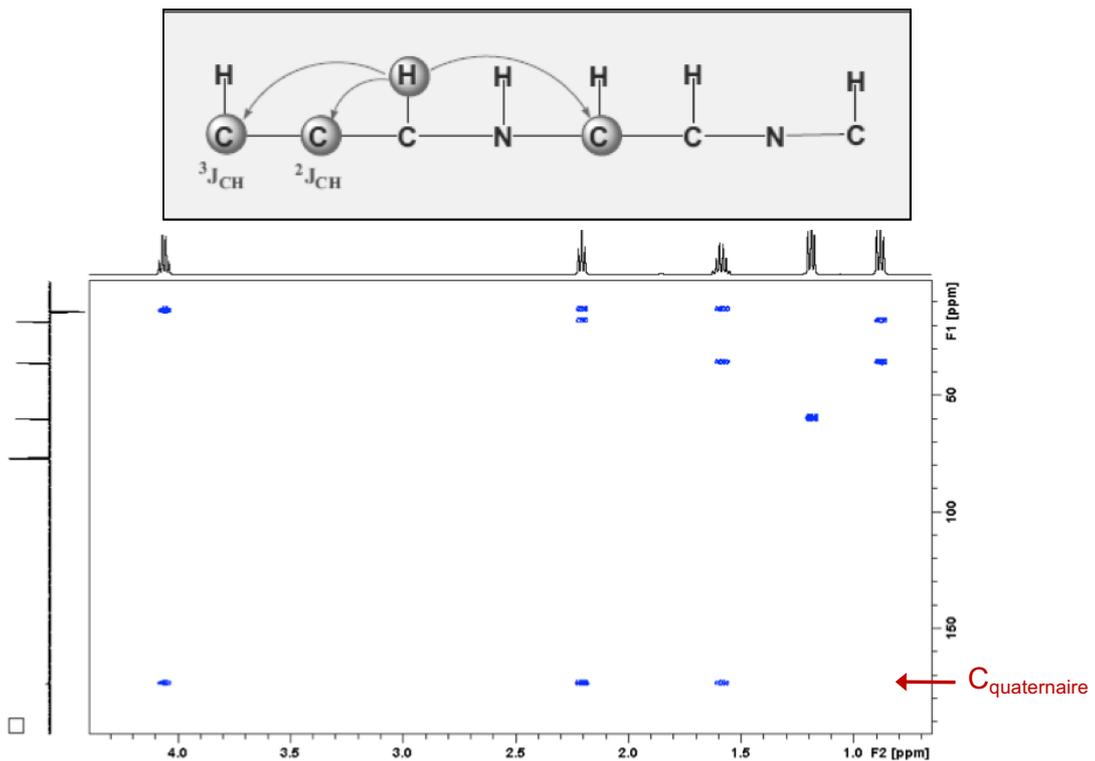
HSQC éditée: une alternative au DEPT



69

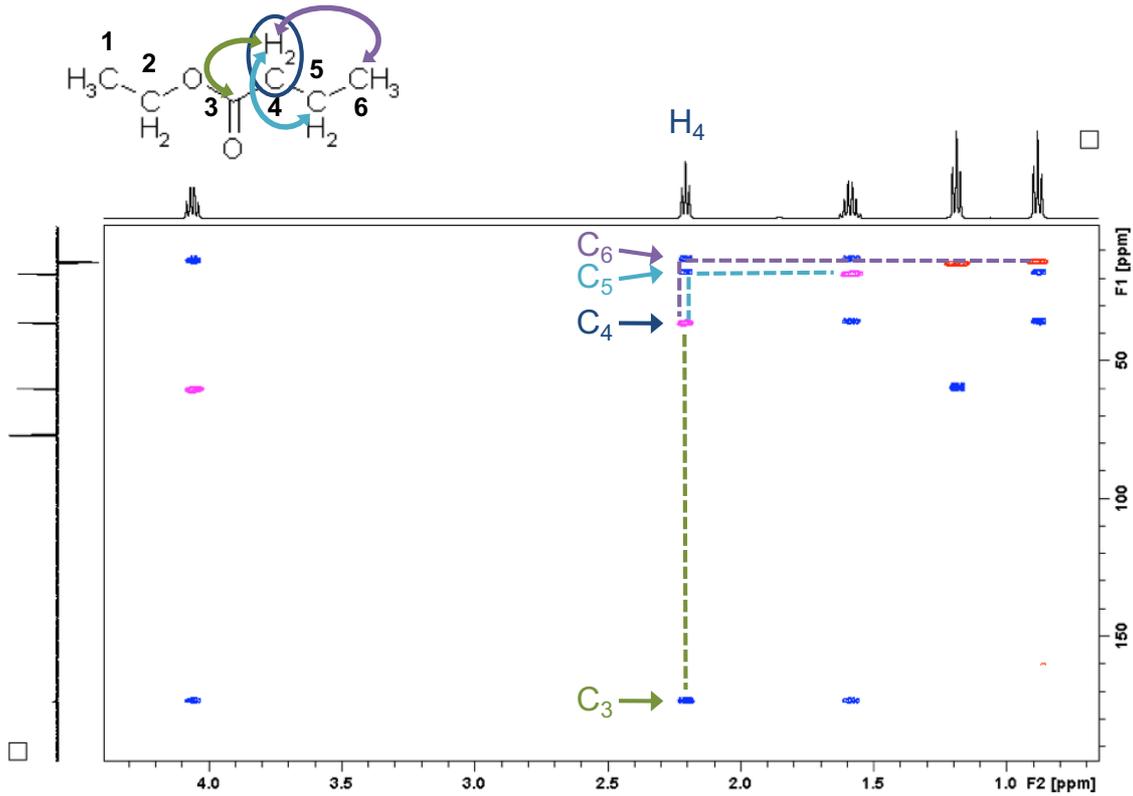
HMBC

= Heteronuclear Multiple Bond Correlation, met en évidence les couplages scalaires $^2\text{J}_{\text{CH}}$ et $^3\text{J}_{\text{CH}}$



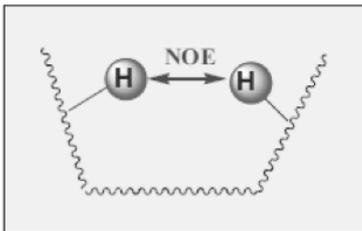
70

Superposition HSQC / HMBC



71

nOe

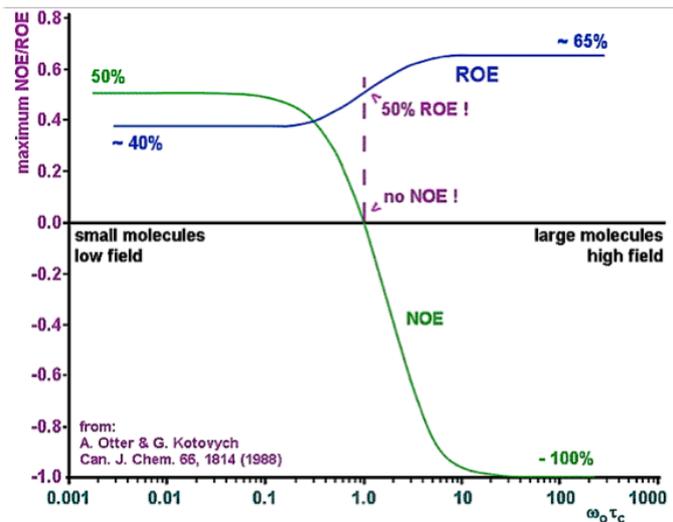


Nuclear Overhauser Effect = changement d'intensité des signaux de 2 noyaux en interaction dipolaire
Le nOe est inversement proportionnel à la distance entre les 2 noyaux (distance max. ≈ 5Å).

$$nOe \propto \tau_c / r^6$$

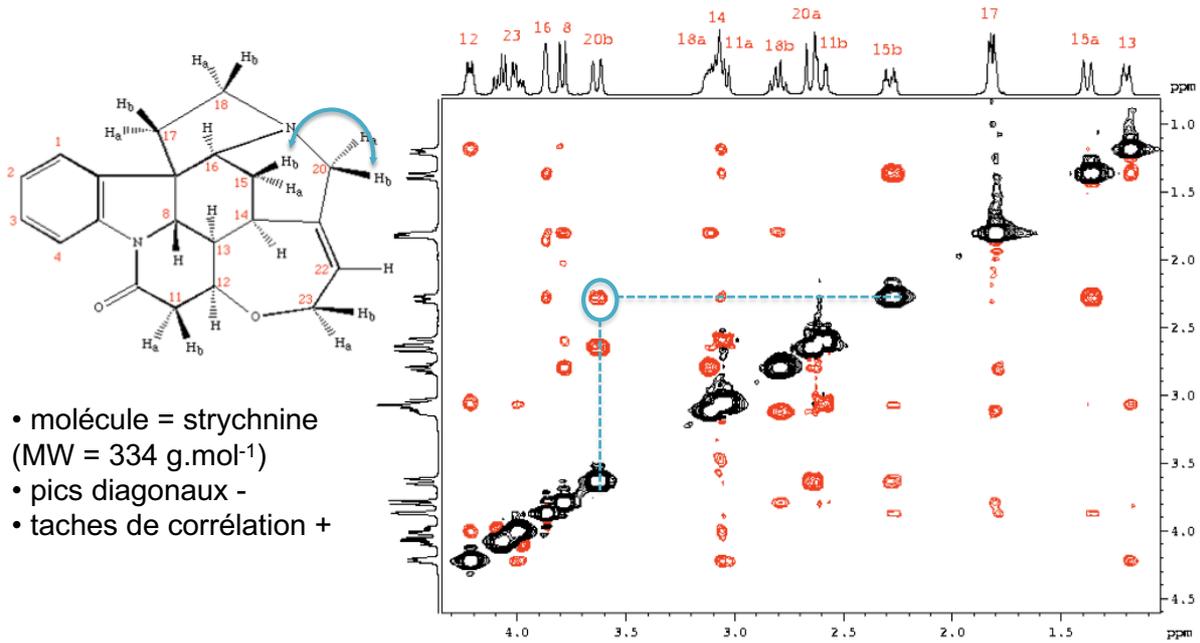
2 types d'expériences

- la NOESY, pas adaptée à l'étude de molécules de poids 800-1500 g/mol (nOe ≈ 0)
- la ROESY: signaux moins intenses mais toujours ≠ 0



72

NOESY



- molécule = strychnine (MW = 334 g.mol⁻¹)
- pics diagonaux -
- taches de corrélation +

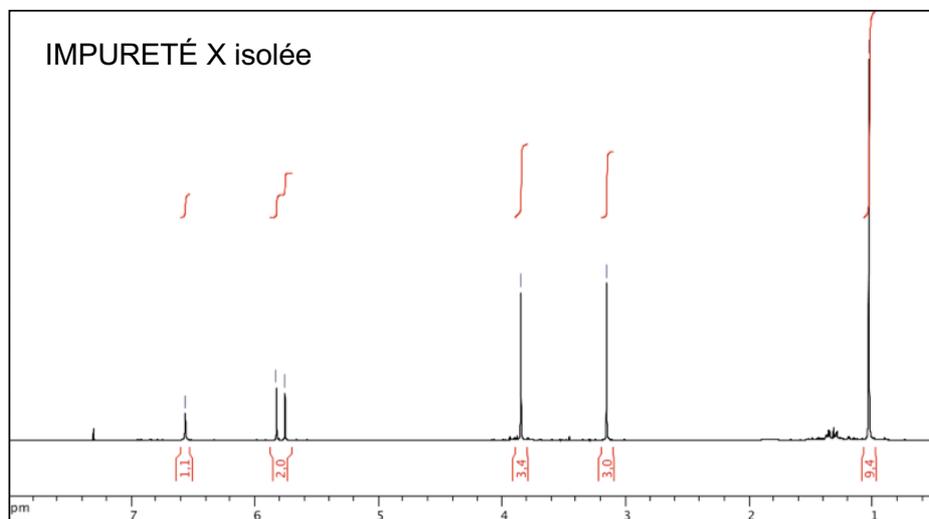
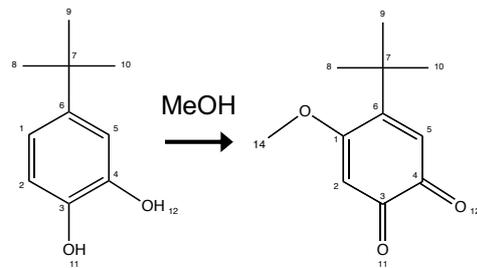
	petite mol	moyenne mol	grosse mol
ROESY	+	+	+
NOESY	+	0	-

phase des signaux
(pour une diagonale négative)

73

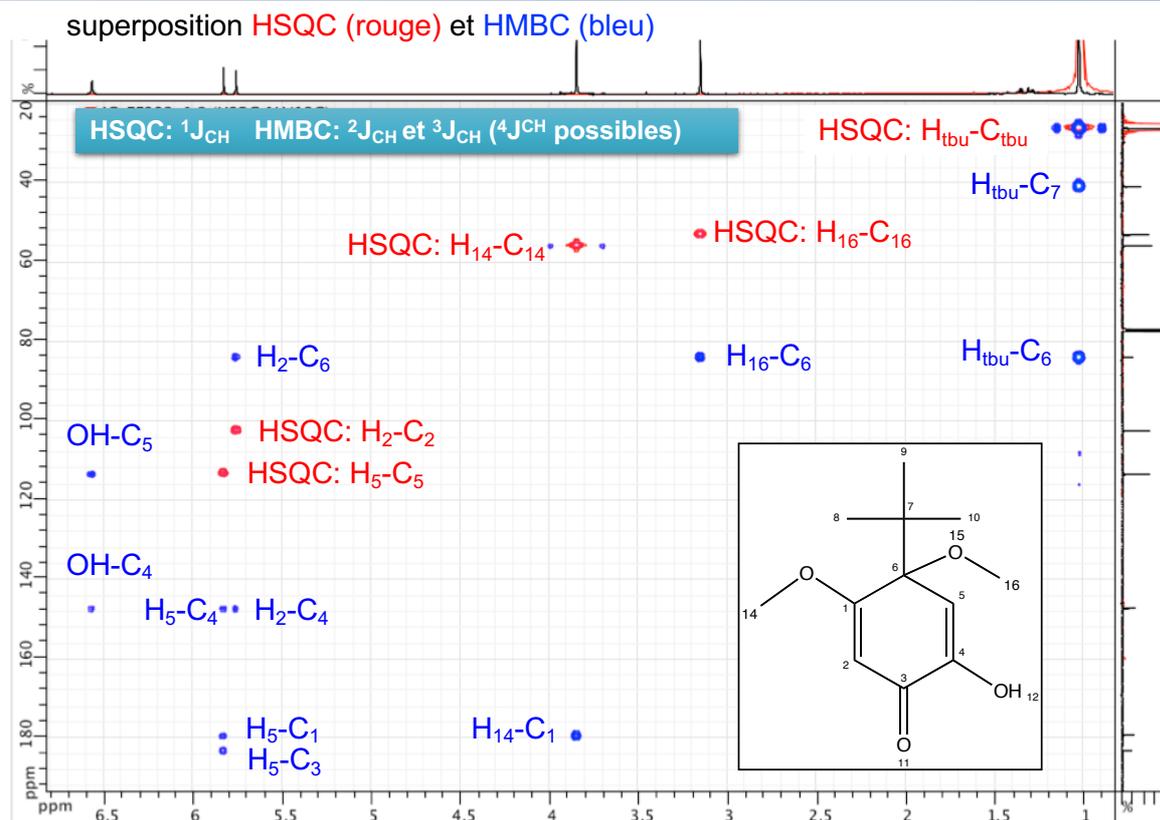
Exemple d'élucidation structurale

Synthèse: l'étudiant obtient 50% du produit attendu et 50% d'une impureté X.
Le spectre proton de X ne donne pas beaucoup d'informations. Des 2D sont alors enregistrées (HSQC et HMBC) et plusieurs hypothèses sont mises à l'épreuve: il faut pouvoir attribuer chaque signal de façon logique.



74

Exemple d'élucidation structurale



Acquisition et traitement de données RMN

- Lock et shims
- Échantillonnage du signal
- Angle d'impulsion et S/B
- Zero filling / Prédiction linéaire
- Apodisation

Le spectromètre

Cet aimant de 4,7 T (200 MHz) est un don de Bruker BioSpin Ltd.

Coupage professionnel par Trevor Cheney
(Services de conception et de fabrication du CNRC)

Logistique par Eric Curran (SCF-CNRC) Jamie Bennett (ISSM-CNRC)

Chambre à vide externe

La gaine externe de l'aimant (1) est faite d'acier inoxydable de 3 mm d'épaisseur. L'espace intérieur (2) est rempli de couches d'isolant au mylar aluminium. On fait un vide poussé dans cet espace lors de l'utilisation normale de l'aimant.

3. Cuve d'azote liquide

faite d'aluminium de 3 mm d'épaisseur. Cet espace est rempli d'azote liquide (77 K) lors de l'utilisation normale de l'appareil. (4) Remplissage d'azote liquide

5. Écran contre les rayonnements

fait d'aluminium et enveloppé de couches d'aluminium en feuille. L'écran contre les rayonnements atteint une température de près de 20 K et est entouré d'un vide poussé pendant l'utilisation normale de l'appareil.

6. Cuve d'hélium liquide

faite d'acier inoxydable de 2 mm d'épaisseur. (7) Remplissage d'hélium liquide. Le tube de cuivre et la bobine supraconductrice (8) sont visibles à l'intérieur. La bobine contient environ 10 km de fil supraconducteur fait d'un alliage de niobium-titane enrobé de cuivre.

Résistances d'extinction et port de charge

Les résistances d'extinction protègent l'aimant pendant l'extinction en dissipant la chaleur produite par l'énergie stockée dans l'aimant énergisé. (9) Port de chargement

Shims supraconductrices

Des pièces supraconductrices sont enroulées à l'extérieur de la bobine. Elles servent à régler les gradients du champ magnétique à la sonde, de manière semblable aux shims utilisées à la température de la pièce.



NMR 800 National Ultrahigh-Field NMR Facility for Solids
Centre national de RMN à ultrahaut champ pour les solides

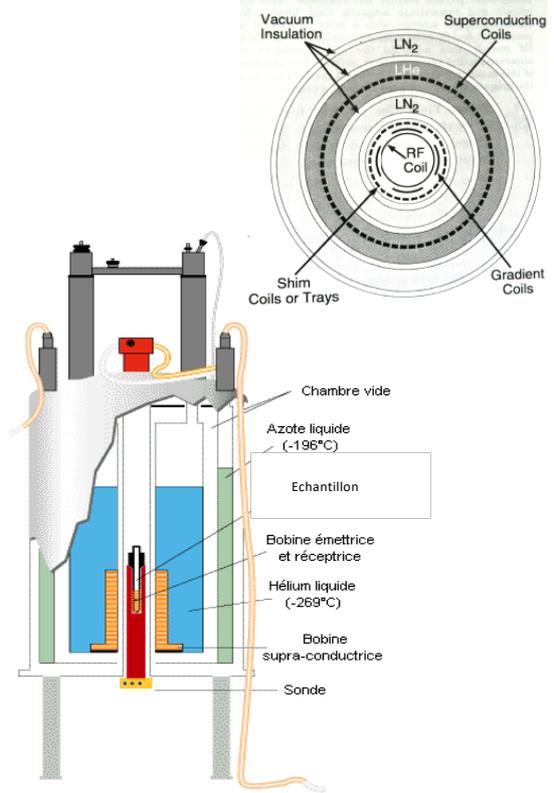
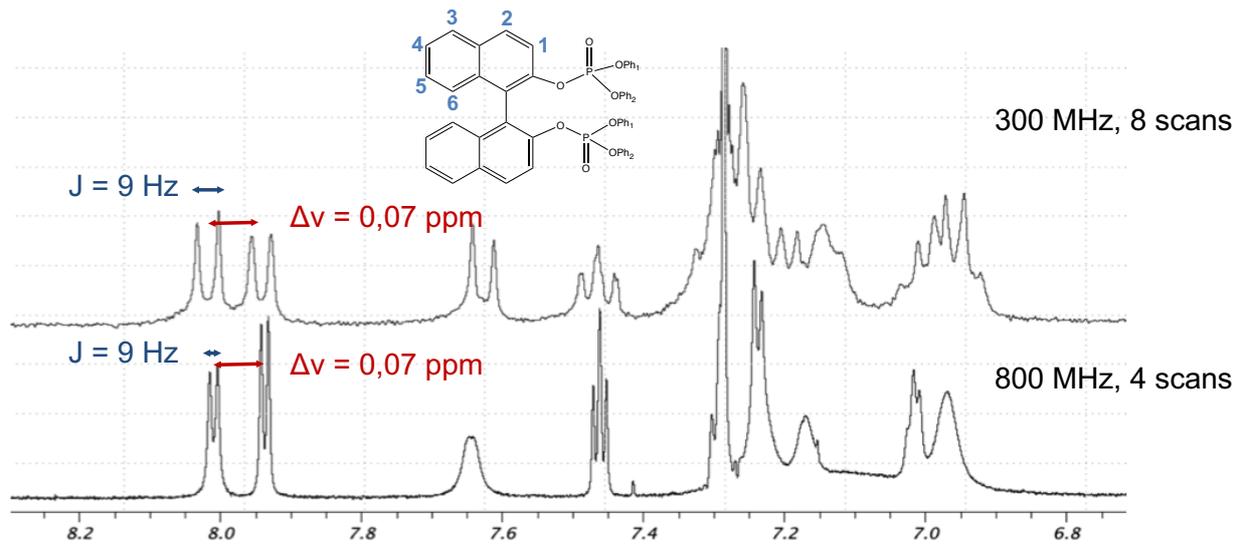


Illustration: <http://www.astrosurf.com/luxorion/technologies-futur7.htm>

77

RMN à haut champ



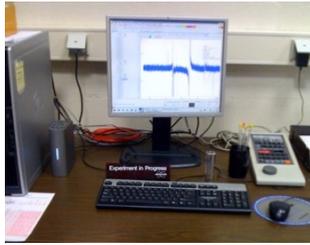
300 MHz: 1 ppm \Leftrightarrow 300 Hz
800 MHz: 1 ppm \Leftrightarrow 800 Hz

9 Hz: 0,011 ppm
9 Hz: 0,03 ppm

Plus sensible, mieux résolu

78

poste de contrôle



console (électronique)



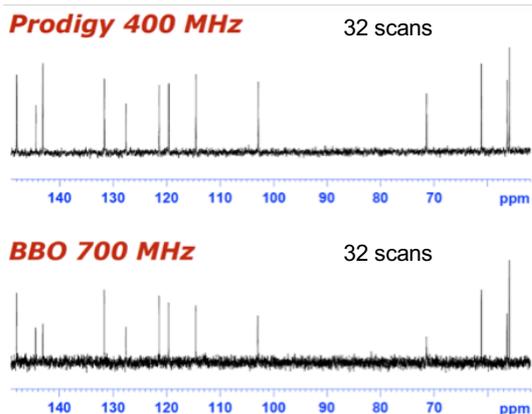
aimant

79

La sonde et l'échantillon

Elle permet d'observer différents noyaux. La plupart du temps 2 ou 3 bobines: une bobine spécifique ^1H et une large bande ou bien 3 bobines spécifiques (^1H , ^{13}C et ^{15}N pour l'étude de protéines par exemple).

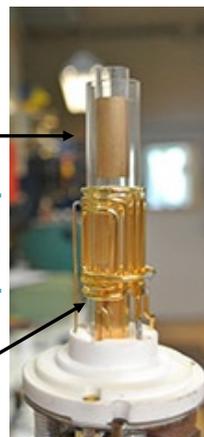
La bobine la plus proche du tube est la plus sensible. Le volume actif est celui qui est situé au niveau de cette bobine. Une partie du volume d'échantillon, au dessus et en dessous de cette zone, n'est pas observée mais permet de faciliter les réglage dans la zone d'intérêt. C'est pourquoi la hauteur du tube dans le spinner est importante.



2 quartz

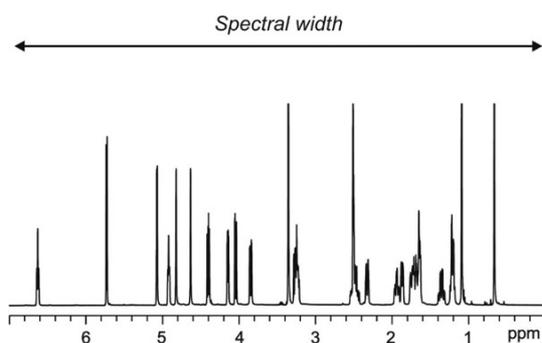
volume actif

2 bobines



80

TF: digitalisation, temps d'échantillonnage



Théorème de Nyquist: il faut 2 points par période au minimum pour représenter correctement l'ensemble des fréquences.

Condition de Nyquist
 $DW = 1/2SW$

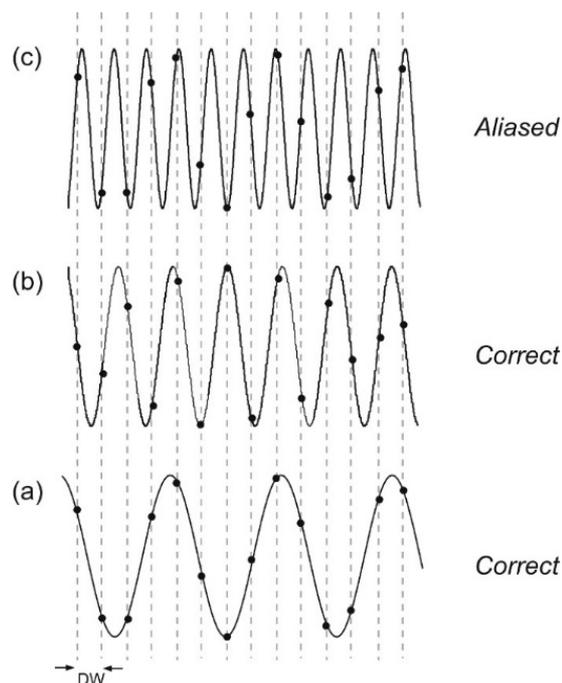
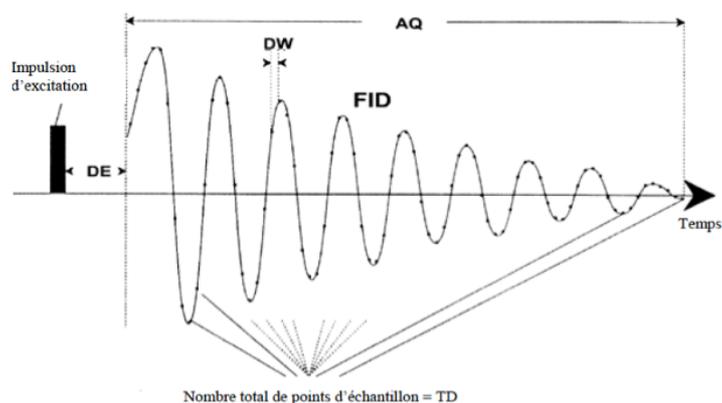


illustration: High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry, Timothy Claridge

81

Echantillonnage du signal



Le temps d'acquisition AQ est défini par la vitesse d'échantillonnage ($DW = \frac{1}{2SW}$) et par le nombre de points enregistrés.

$$AQ = DW \cdot TD = \frac{TD}{2 \cdot SW}$$

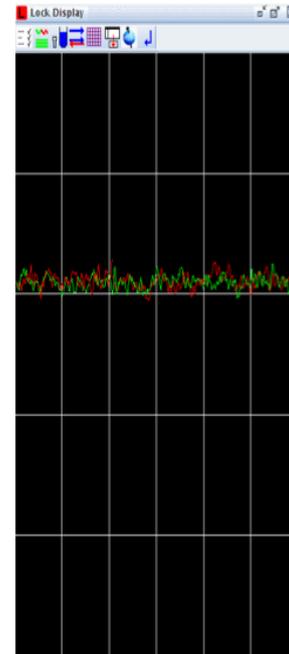
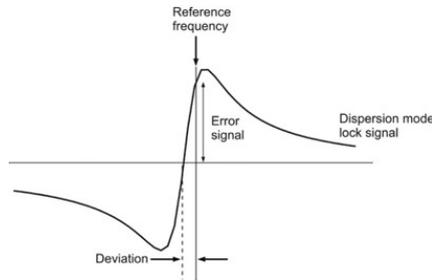
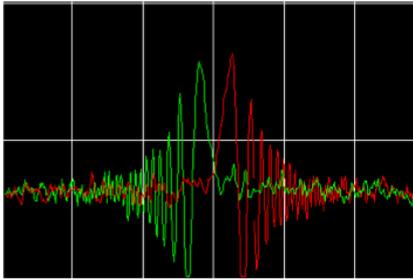
TD est divisé en 2 jeux de points (partie réelle et imaginaire du FID) : $SI = \frac{TD}{2}$ points sont utilisés pour représenter le spectre.

Illustration: Bruker Beginner's guide

82

Stabilité du champ: lock

L'aimant n'est jamais parfaitement stable et le champ magnétique dérive légèrement au cours du temps. Cette dérive est significative en RMN liquide car les signaux sont fins et une dérive aussi faible que 1 Hz se verrait sur le spectre.



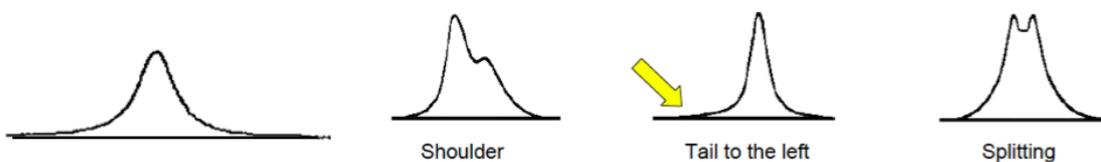
Le spectromètre comporte un système de verrouillage champ-fréquence appelé lock, dédié à l'observation du deutérium dans l'échantillon (solvant). La fenêtre de lock montre un balayage en fréquence avec un signal en dispersion à la fréquence du deutérium du solvant.

Le spectromètre corrige la valeur du champ magnétique B_0 en fonction de la dérive observée sur ce signal. Cette mesure est faite plusieurs milliers de fois par seconde pendant que le lock est actif (boucle de feedback).

83

Homogénéité du champ: shims

Le champ magnétique B_0 de l'aimant n'est jamais parfaitement homogène sur tout le volume actif d'échantillon. En RMN liquide ^1H les signaux ont une largeur à mi hauteur > 1 Hz, de faibles variations du champ affectent l'aspect des signaux!



Des bobines « de shims » sont utilisées pour compenser les inhomogénéités du champ magnétique. Elles génèrent de faibles champs magnétiques locaux qui vont s'ajouter au champ B_0 . Le réglage de l'homogénéité est maintenant optimisé automatiquement par le logiciel de pilotage (Topspin pour un appareil Bruker).



champ homogène: signal fin et symétrique

Attention: les réglages dépendent de l'échantillon (volume, solubilité, solvant, sels...)

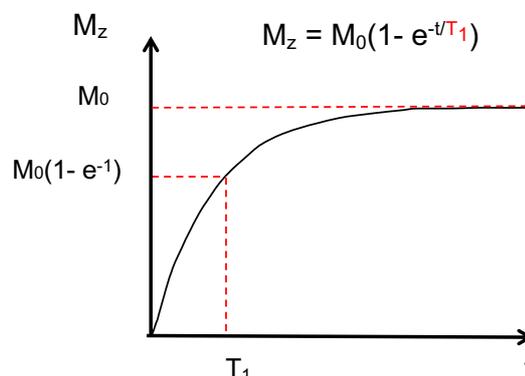
84

Délai de relaxation (D1)

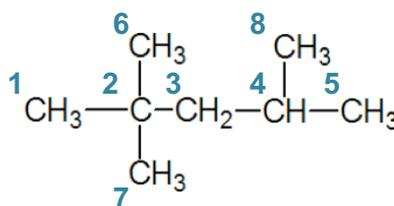
Il permet le retour à l'équilibre de l'aimantation des noyaux entre 2 scans. Il est déterminé en fonction du T_1 (temps de relaxation longitudinal) qui varie selon le type de noyau étudié et la taille de la molécule.

Le T_1 est défini comme étant le temps nécessaire pour restaurer 2/3 de l'aimantation selon z.

Pour une expérience quantitative il faut que le temps de répétition T_R (AQ+D1) soit supérieur à $5 \times T_1$. En pratique $T_R = 2 \times T_1$ suffit pour une estimation correcte.



C	T_1
1,6,7	9,3 s
2	68 s
3	13 s
4	23 s
5,8	9,8 s



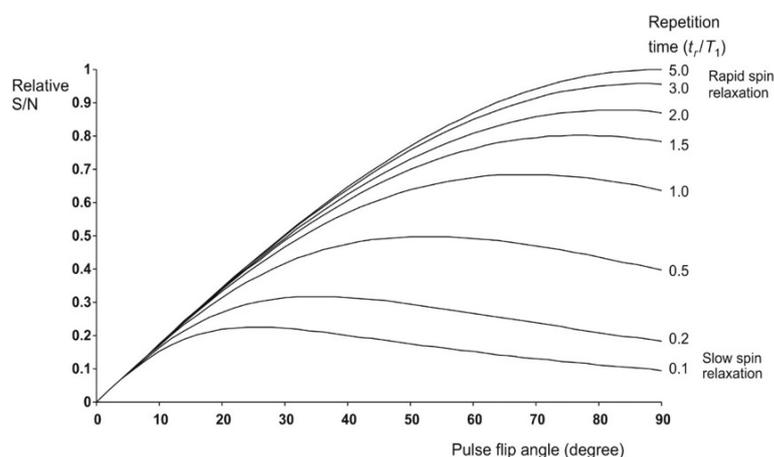
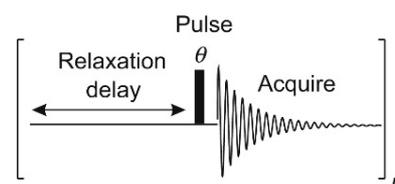
85

Angle de Ernst / Accumulation de signal

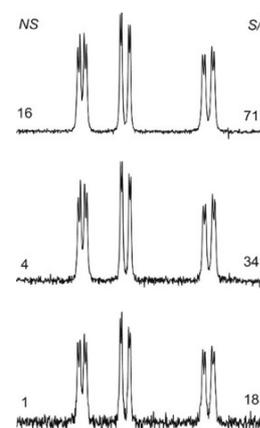
Quand on utilise une séquence d'impulsions basée sur des impulsions précises une erreur de calibration peut affecter le spectre final. Il faut aussi être vigilant quand on veut obtenir des résultats quantitatifs.

En 1D de routine on cherche à avoir le meilleur rapport S/B possible. On va utiliser l'angle de Ernst: c'est celui qui permet d'obtenir un maximum de signal avec un temps de répétition le plus court possible.

Il est défini par $\cos \theta = \exp(-t_r/T_1)$



S/B varie selon \sqrt{NS}



86

Traitement du signal: zero filling et prédiction linéaire

Il est possible d'améliorer la résolution digitale artificiellement en ajoutant des points d'intensité zéro à la fin du FID, on appelle ce traitement zero filling (fig 1).

Cependant si on applique du zero filling à un FID tronqué (c.a.d. qui n'est pas revenu à zéro à la fin de l'acquisition) le spectre présente des artefacts appelés wiggles (fig 2b). Il vaut mieux appliquer une multiplication exponentielle au FID obtenu (fig 2c) voire même appliquer une prédiction linéaire (fig 2d).

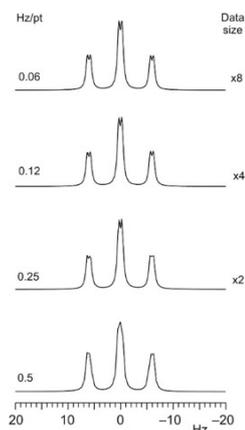


Figure 1: zero filling

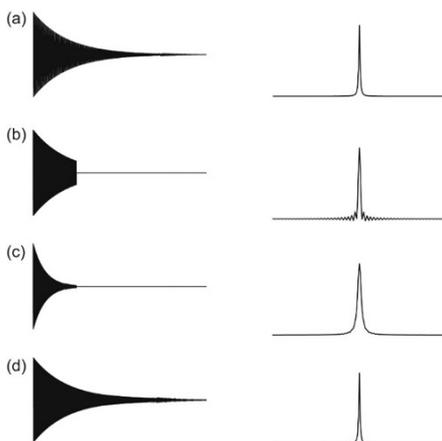


Figure 2:

- (a) FID correct
- (b) FID tronqué + zero filling
- (c) FID tronqué + zero filling + multiplication exponentielle
- (d) FID tronqué + zero filling + prédiction linéaire

illustration: High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry, Timothy Claridge

87

Traitement du signal: apodisation

Consiste à multiplier le FID par une fonction (exponentielle, sinus...) avant la transformée de Fourier. L'intensité des signaux décroît durant l'acquisition alors que le niveau de bruit reste constant.

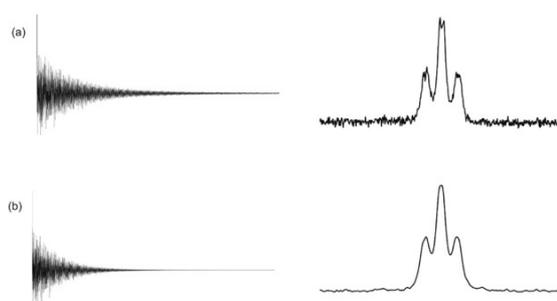
En « taillant » la queue du FID on supprime donc du bruit et on améliore la sensibilité.

En favorisant le milieu du FID c'est la résolution qu'on peut améliorer.

L'apodisation est essentielle pour traiter les expériences 2D dans la dimension indirecte car le FID est toujours fortement tronqué dans cette dimension (cf aussi diapos suivantes).

Exemple: multiplication exponentielle:

Améliore la sensibilité MAIS les signaux sont élargis. Le paramètre LB (line broadening) caractérise la vitesse de décroissance de l'exponentielle. LB doit être raisonnable en regard de la largeur initiale des signaux.

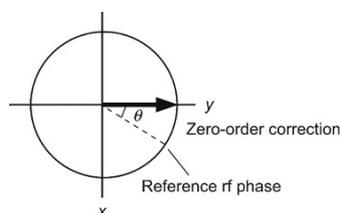
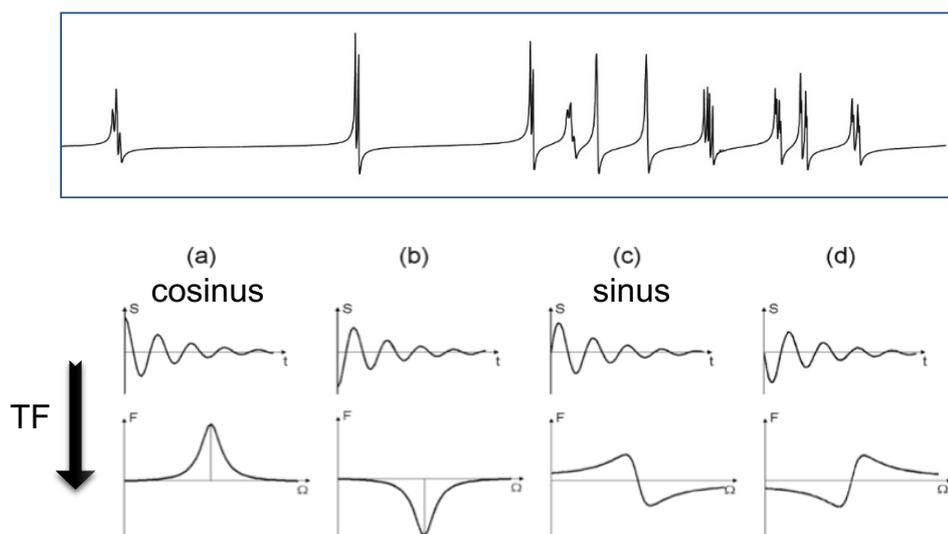


(a) pas d'apodisation (b) multiplication exponentielle, LB= 1Hz

illustration: High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry, Timothy Claridge

88

Correction de phase: erreur d'ordre 0

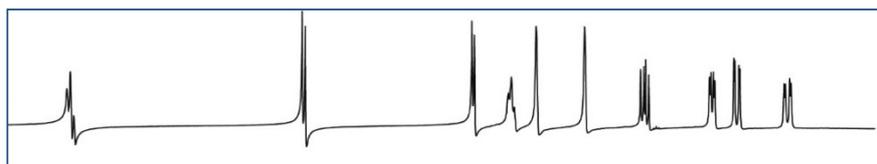


La phase du récepteur est décalée par rapport à la phase des signaux : l'erreur de phase est alors la même pour tous les pics, on parle d'erreur d'ordre 0.

illustration: *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, Timothy Claridge

89

Correction de phase: erreur d'ordre 1



Un délai mort (DE) est nécessaire pour que la bobine passe du mode excitation au mode récepteur. Pendant ce délai le système commence à revenir à l'équilibre mais les signaux ne sont pas enregistrés.

L'erreur de phase d'ordre 1 dépend de la fréquence des signaux.

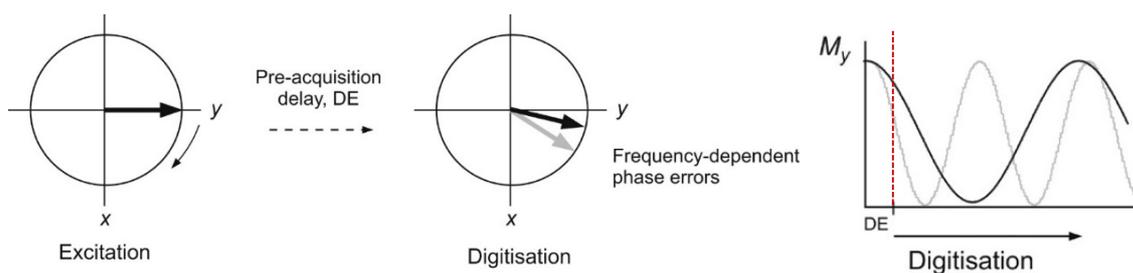


illustration: *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, Timothy Claridge

90

Références

- Understanding NMR Spectroscopy, *James Keeler*, Wiley, 2005
- Spin dynamics, 2nd edition, *Malcom H. Levitt*, Wiley, 2008
- *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, *Thimoty D. W. Claridge*, Pergamon Press, 3rd edition
- http://www.unice.fr/cdiec/cours/rmn_web/rmn_theorie/c_theorie.htm
cours de RMN simplifiée de l'Université de Nice (en français)
- <https://ceisam.univ-nantes.fr/espace-enseignement-pedagogie/>
cours de l'université de Nantes (en français)
- <http://www.u-of-o-nmr-facility.blogspot.com/>
blog de la plateforme de RMN de l'Université d'Ottawa
- https://organicchemistrydata.org/links/#spectroscopy_resources
ressources diverses (cours, recueil de déplacements chimiques et de constantes de couplages ^1H , ^{13}C , ^{19}F et ^{31}P notamment)