

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire à deux dimensions ou l'aide à la détermination structurale des molécules organiques

Marc Bria* ingénieur d'études, Pierre Watkin** technicien de recherche et de formation

Summary : *The 2D nuclear magnetic resonance spectroscopy or a tool for structural determination of organic compounds.*

For an exact determination of the molecular structures of the majority of chemical molecules and especially of the organic compounds, the NMR spectroscopy becomes a very useful technique for research. The method relies on the nuclear magnetisation. Nuclei of some atoms have a nuclear magnetic moment so they behave like microscopic magnet characteristic by quantum magnitude : the spin.

In this article, after a brief presentation of the concepts in magnetic resonance, we describe results obtained from differents experiments useful for chemists and biochemists.

We tried to overview and to explain rapidly a few sequences of two dimensions of NMR spectroscopy like COSY, TOCSY, ROESY, COLOC, HSQC and HMBC

Mots-clés : *RMN 2D, corrélations homonucléaires, corrélations hétéronucléaires, détection inverse, détermination structurale.*

Key-words : *2D NMR, homonuclear correlations, heteronuclear correlations, J-resolved, structural determination.*

Ce document a pour but d'expliquer le rôle des séquences les plus courantes en spectroscopie de RMN à deux dimensions. Toutes les expériences présentées sont agrémentées d'exemples précis dont quelques uns ont été extraits du contenu d'un stage chez Bruker.

La résonance magnétique nucléaire en milieu liquide ou RMN liquide est une technique utilisée pour l'analyse des structures de nombreuses molécules chimiques. Elle sert principalement à la détermination structurale des composés organiques. Les principaux noyaux étudiés sont le proton ^1H , le carbone ^{13}C et le phosphore ^{31}P .

Rappel

La méthode repose sur le magnétisme nucléaire. Les noyaux de certains atomes (^1H , ^{13}C , etc.) possèdent un moment magnétique nucléaire, c'est-à-dire qu'ils se comportent comme des aimants microscopiques caractérisés par une grandeur quantique : le spin [2, 6].

* Université des sciences et technologies de Lille, Laboratoire de chimie organique et physique, URA 351, Cité scientifique, bâtiment C3, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex. Tél : 03.20.43.49.40. Fax : 03.20.43.65.61. E-mail : bria@univ-lille1.fr

** Université des sciences et technologies de Lille. Service commun de RMN, Cité scientifique, bâtiment C4 - sous-sol, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex. Tél : 03.20.43.47.83. Fax : 03.20.33.70.83. E-mail : pierre.watkin@univ.lille1.fr

Les noyaux à spin 1/2 vus par la mécanique quantique

Exemple du proton :

La physique atomique nous enseigne que certains noyaux possèdent un moment cinétique de spin P et également un moment magnétique μ . μ est définie par la relation suivante : $\mu = \gamma P$, où γ est le rapport gyromagnétique, et μ/P est une constante caractéristique du noyau considéré.

En mécanique quantique, on décrit un système atomique au moyen de fonctions d'ondes, qui proviennent de la résolution de l'équation de Schrödinger [2].

Pour un proton, noyau à nombre quantique de spin $I = 1/2$ où $m_1 = \pm 1/2$, les fonctions d'ondes propres sont appelées : α pour $m_1 = +1/2$, β pour $m_1 = -1/2$

m_l correspond au nombre quantique magnétique qui caractérise l'état stationnaire du noyau. Celui-ci est relié aux nombres de spins I du noyau. Le nombre total possible des états stationnaires ou propres du noyau est donc égal à : $2I+1$. Par conséquent, le proton ne peut exister par rapport à son moment de spin que dans deux états stationnaires.

Hors champ magnétique, les états α et β ont la même énergie : on dit qu'ils sont dégénérés. Ce n'est que dans un champ magnétique statique homogène de valeur B_0 et par suite de l'interaction entre B_0 et μ que cette dégénérescence est levée (figure 1). La séparation d'énergie ainsi produite qui est proportionnelle à l'intensité du champ B_0 , crée la condition nécessaire à l'existence d'une transition spectroscopique et constitue la base de la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire.

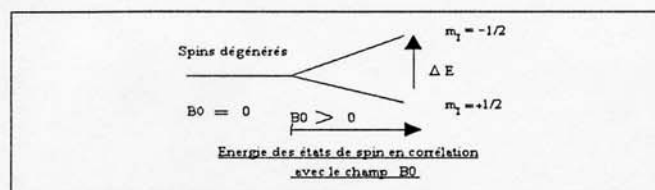


Figure 1 - Énergie des états de spin en corrélation avec le champ B_0 [2].

Le proton occupe l'état α (ou état de plus faible énergie) avec une probabilité plus grande.

Plus le champ B_0 augmente, plus la différence d'énergie (ou ΔE) entre les deux états de spins augmente. On décrit la différence d'occupation de l'état fondamental et de l'état excité par la loi de Boltzmann :

$$\left(\frac{N\beta}{N\alpha} = \exp\left(\frac{-\Delta E}{kT}\right)\right)$$

Avec ΔE qui est la différence d'énergie entre les deux états, k la constante de Boltzmann, T la température absolue en K, $N\beta$ le nombre de spins à l'état excité et $N\alpha$ le nombre de spins à l'état fondamental.

En fait, il n'existe à l'équilibre qu'un faible excès de noyaux dans le niveau inférieur. Pour un champ de 1,4 T à température ambiante $\Delta E = 0,02 \text{ J.mole}^{-1}$. L'excès de population qui d'après la théorie est déterminant pour la probabilité d'une excitation ne dépasse pas 0,001 %.

Le phénomène de résonance magnétique nucléaire

D'après l'équation de Bohr $\Delta E=h\nu$, il nous faudra donc pour induire une transition vers un état d'énergie plus élevée, un quantum d'énergie de valeur $h\nu_0=\hbar\omega_0$ [3]. Ceci est la condition de résonance, où ν_0 est la fréquence de résonance du noyau, \hbar la constante de Planck divisé par 2π ($\hbar = 1,054.10^{-34} \text{ J.s.}$) et γ le rapport gyromagnétique. La fréquence de résonance du noyau, qui est aussi appelée fréquence de Larmor, est donc d'après l'équation $\nu_0=\gamma B_0/2\pi$ proportionnelle à la valeur du champ B_0 . Elle se situe pour les protons dans le domaine des hautes fréquences : $\gamma_H = 26,75.10^7 \text{ rad.T}^{-1}.\text{s}^{-1}$ en présence d'un champ de 1,4 T soit $\nu_0 = 60 \text{ MHz}$. Ceci correspond à $\gamma = 5\text{m}$ (longueur d'onde radio ultra courte).

Schématisation des cohérences

On peut schématiser la création de la cohérence à l'équilibre thermique quand un champ B_0 est appliqué sur l'échantillon (figure 2). Il en résulte une magnétisation le long de l'axe Z [3].

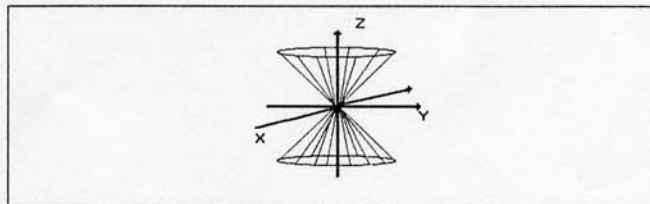


Figure 2 - Schématisation de la cohérence.

Sur cette figure, on symbolise le mouvement de précession des spins qui est induit par le champ B_0 . Par exemple, on peut considérer le proton comme un dipôle magnétique dont la composante μ_z est parallèle ou anti parallèle à l'axe z. La vitesse angulaire du mouvement de précession est $\omega_0 = \gamma B_0$.

Le repère tournant ou référentiel tournant

Pour simplifier la figure, on représente seulement les moments magnétiques des noyaux excédentaires à l'état fondamental (figure 3).

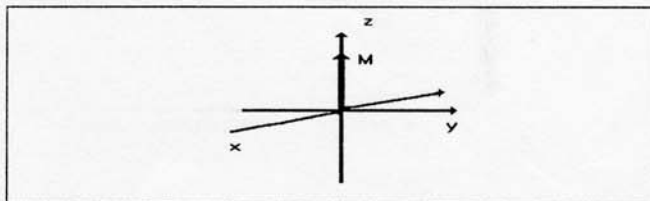


Figure 3 - La magnétisation M dans le repère tournant K' .

M représente la magnétisation macroscopique en tant que résultante des moments nucléaires individuels μ .

Il n'existe pas de composante de la magnétisation dans le plan xy. On imagine, en plus du système de coordonnées $K(x,y,z)$, un système de coordonnées $K'(x,y,z)$ tournant autour de l'axe z avec la vitesse angulaire ω d'où $B' = B_0 + \omega/\gamma$. Dans ce cas, ω/γ est un champ fictif B_f opposé à B_0 , qui n'est engendré que par le mouvement relatif des systèmes de coordonnées K et K' . Cela signifie que le vecteur μ prend une position fixe dans le système K' appelé référentiel tournant, quand ω est égal par son signe et sa valeur à ω_0 [3].

Condition pour l'apparition d'une résonance

L'excitation du noyau est engendrée par une impulsion B_1 de haute fréquence et de haute puissance (50 watts) de courte durée (10 à 50 μs). Le champ B_0 est intense et constant ; on suppose que B_1 est faible, perpendiculaire à B_0 et tourne dans le plan xOy à la vitesse angulaire ω_1 et dans le même sens que μ [3].

Pratiquement (figure 4) : Une petite bobine placée perpendiculairement à B_0 est parcourue par un courant. Celui-ci produit une induction oscillante le long de l'axe de la bobine. On peut représenter cette induction B_x par deux vecteurs magnétiques tournant en sens opposé $B(l)$ et $B(r)$ dont l'un des deux a le même sens de rotation que la précession. Le deuxième vecteur est pratiquement sans influence sur le phénomène.

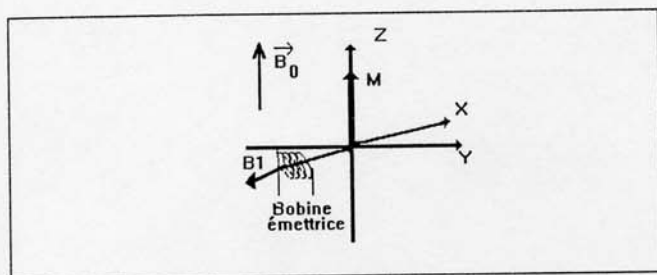


Figure 4 - Condition pour l'apparition d'une résonance [2].

On engendre au moyen de la bobine émettrice qui est placée sur l'axe x un faible champ électromagnétique B_1 linéairement polarisé de fréquence ω et d'amplitude $2 B_1$.

La mesure

Si $\omega_1 \neq \omega_0$: Il n'y a pas d'interaction entre le champ B_1 et μ (ils ne sont pas en accord) et la précession reste autour de l'axe Oz.

Si $\omega_1 \approx \omega_0$: B_1 et μ sont en accord. Par conséquent le couple exercé par B_1 tend à modifier l'angle α de μ avec Oz, donc à provoquer des transitions entre sous niveaux magnétiques. Il y a alors résonance. La valeur de la magnétisation z diminue et il apparaît, dans la direction y, la magnétisation transversale M_y .

Angle d'impulsion α et position du vecteur M dans un système de coordonnées en rotation

L'angle d'impulsion ou angle de rotation α du vecteur M (figure 5) est donné par la relation suivante : $\alpha = \gamma B_1 t_p$, avec B_1 qui représente l'amplitude ou la puissance de l'impulsion et t_p la largeur ou la durée de l'impulsion. On peut faire varier les deux grandeurs de telle sorte qu'il résulte certains angles de rotation particulièrement intéressants. Un de ces angles est l'angle $\alpha = 90^\circ$. Dans ce cas, toute la magnétisation est orientée dans le plan xy et le signal atteint son maximum d'intensité [7].

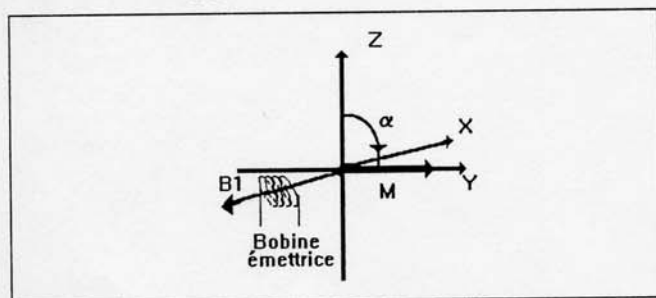


Figure 5 - Position du vecteur M après une durée d'impulsion permettant un angle α de 90° .

Un autre angle permet d'inverser le vecteur M en appliquant une impulsion π ou $\alpha = 180^\circ$. Dans cette expérience, le vecteur M est orienté en -z. En pratique, on utilise des angles $\alpha = 45^\circ$ pour obtenir un bon compromis temps de mesure/qualité de la réponse.

Le signal ou FID

Le signal du récepteur est désigné sous le nom d'interférogramme (décroissance libre d'induction, appelée plus communément FID, d'après le terme anglais « free induc-

tion decay »). Par opposition au signal à onde continue, le signal temporel que l'on enregistre dans ce cas est un signal d'émission, en effet le champ de radiofréquence B_1 est éteint pendant l'acquisition du signal. L'expérience nous donne pratiquement un champ variable et linéaire à haute fréquence suivant l'axe des y. C'est en fait un oscillateur ou un émetteur avec la fréquence de Larmor du noyau correspondant [7] (figure 6).

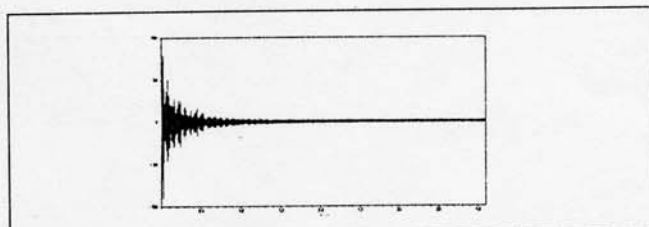


Figure 6 - FID constitué d'une superposition de sinusoides amorties.

Le signal temporel $S(t)$ engendré dans la bobine réceptrice par la composante xy de M s'affaiblit du fait de la relaxation.

Notion de cycle de phases

Les cycles de phases ou programme de phases permettent de :

- sélectionner les signaux désirés en rejetant ceux qui ne contiennent pas d'information et qui, éventuellement, sont susceptibles de masquer d'autres signaux utiles,
- discriminer le signe des fréquences en dimension f_1 ,
- compenser les imperfections d'une ou plusieurs impulsions de la séquence,
- assurer une détection en quadrature optimale dans la dimension f_2 [5].

Chaque impulsion d'une séquence possède son propre cycle de phases qui peut-être plus ou moins complexe.

Le nombre d'accumulations idéal doit cependant être égal à un multiple du nombre de phases du cycle le plus long. Pour mieux comprendre cette méthode, une nomenclature standard a été définie (figure 7).

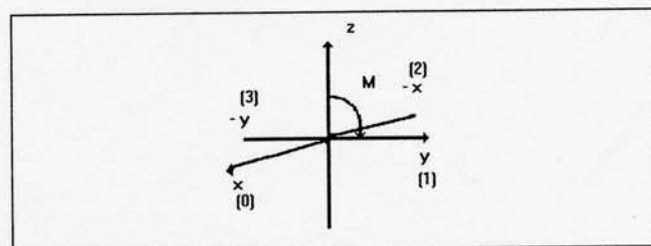


Figure 7 - Nomenclature standard pour les cycles de phases.

Exemple : Le cycle cyclops $\Phi = x, y, -x, -y$, ou 0, 1, 2, 3.

Ce cycle impose l'accumulation d'un nombre multiple de 4 transitoires de précession libre. La première impulsion B_1 se fait autour de x et la réception se fera en y, la deuxième impulsion se fera autour de -x et la réception en -y, etc.

Il existe d'autres variantes de ce cycle comme ceux ci-dessous : $\Phi = x, -x, y, -y$, ou 0, 2, 1, 3

Ou encore $\Phi = x, x, -x, -x, y, y, -y, -y$, ou 0, 0, 2, 2, 1, 1, 3, 3.

Ce dernier cycle impose un multiple de huit transitoires à accumuler.

La transformée de Fourier

Nous pouvons comparer la spectroscopie de RMN et la spectroscopie optique : en spectroscopie optique, le prisme permet l'analyse monochromatique d'un rayonnement polychromatique interagissant avec la matière. En spectroscopie de RMN, l'impulsion B_1 fournit un rayonnement à large spectre de fréquence et la transformée de Fourier permet une analyse « monochromatique » de l'interaction rayonnement/noyau.

La technique consiste à appliquer au signal $M(t)$ l'opération mathématique suivante [2] :

$$F(\nu) = \int_0^{\infty} f(t) \exp(-2i\pi\nu t) dt$$

Comme une séquence de mesure dure généralement moins d'une seconde, on peut réaliser un grand nombre d'accumulations de données avant de procéder à la transformée de Fourier. Le rapport signal sur bruit « S/B » est amélioré. (S/B) est proportionnel \sqrt{N} où N = nombre d'accumulations).

Principe de la spectroscopie de RMN à deux dimensions

Définition

L'expérience de RMN à deux dimensions appartient autant à la spectroscopie à transformée de Fourier qu'à celle à impulsions et repose sur une succession de trois intervalles de temps : Préparation, évolution et détection [3]. Dans un certain nombre d'expériences s'y ajoute encore une autre période avant la détection, le temps de mixage (figure 8).

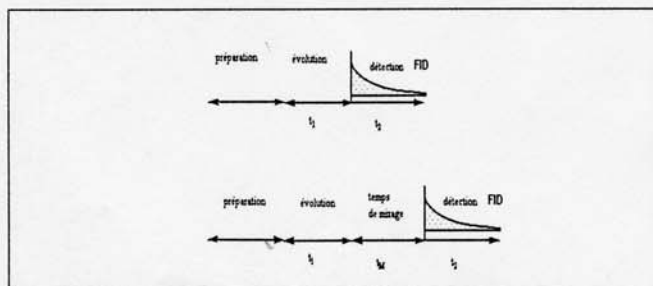


Figure 8 - Schématisation des intervalles de temps pour une expérience de RMN à deux dimensions [3].

Le temps de préparation

Lors du temps de préparation, on prépare le système de spins à étudier pour l'expérience, que ce soit par exemple en appliquant une expérience de découplage ou simplement en créant une magnétisation transversale à l'aide d'une impulsion à 90° . Il est destiné à permettre le retour des noyaux excités à leur état d'équilibre entre deux exécutions successives de la séquence [5].

Le temps d'évolution t_1

Pendant le temps d'évolution t_1 , le système de spins évolue sous l'influence de divers facteurs, chaque cohérence évolue à sa fréquence caractéristique en fonction du déplacement chimique et des couplages scalaires du noyau correspondant.

Le temps de mixage

Il se compose d'une séquence d'impulsion qui a pour objet de réaliser des transferts de cohérence de manière à pouvoir corrélérer des fréquences différentes.

Le temps de détection

L'acquisition du signal modulé à lieu pendant la période de détection.

La séquence que nous venons de décrire ne constitue pas encore à elle seule une expérience de RMN 2D.

La RMN 2D

L'idée de Jeener

L'idée de Jeener consiste à augmenter à pas réguliers la valeur du temps d'évolution t_1 . Ceci permettra d'obtenir un signal de RMN sous forme d'une collection de signaux de précession libre du type $s(t_2)$. Ces FID ne seront différentes les unes des autres que par la durée de la période t_1 représentées sous la forme matricielle $s(t_1, t_2)$ [5]. Le délai t_1 est le temps entre le premier et le deuxième pulse (figure 9).

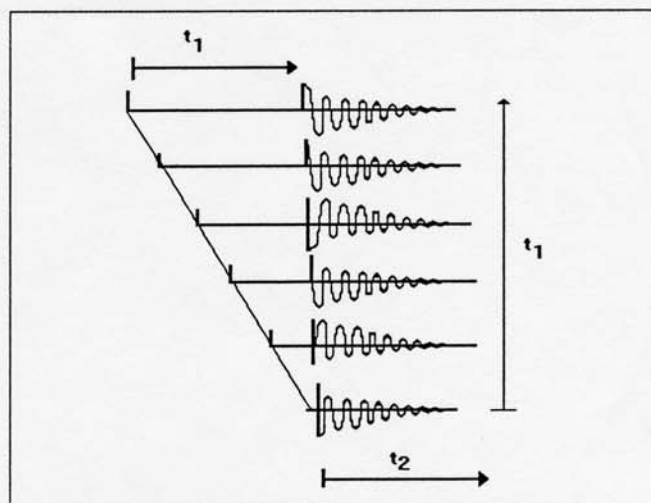


Figure 9 - Collection de signaux de précession libre du type $s(t_2)$ [4].

La première transformée de Fourier par rapport à t_1 nous donne un interférogramme de la forme $s(t_2, \omega_1)$ (figure 10).

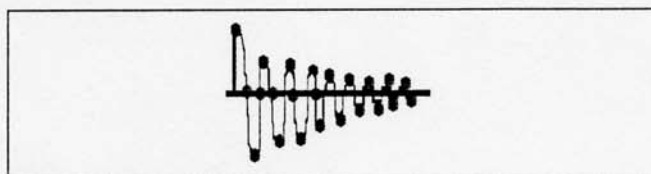


Figure 10 - Interférogramme de la forme $s(t_2, \omega_1)$ [4].

Une deuxième transformée de Fourier, par rapport à la deuxième variable t_2 , donne un spectre de RMN à deux dimensions fréquentielles F_1 et F_2 (figure 11). Le résultat de cette double transformée de Fourier ne constitue pas deux spectres $s(\omega_1)$ et $s(\omega_2)$ mais un seul spectre, en fonction de deux fréquences indépendantes, ayant un pic de coordonnée (Ω_1, Ω_2) . En effet, une aimantation évoluant à la fréquence Ω_1 au cours du temps t_1 a été convertie en une autre cohérence évoluant à la fréquence Ω_2 pendant la période t_2 .

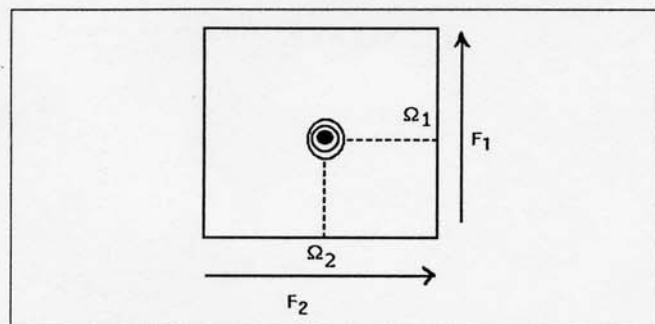
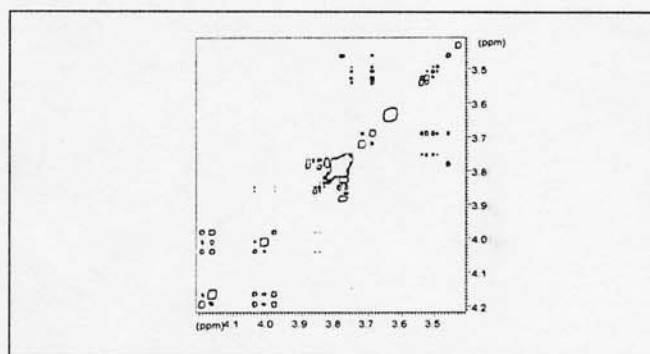


Figure 11 - Spectre de RMN à deux dimensions après la deuxième transformée de Fourier [4].

Cette double transformée de Fourier bidimensionnelle fournit donc une matrice $s(\omega_1, \omega_2)$ (spectre 1).



Spectre 1 - COSY 90°, les deux impulsions sont de 90°.

Le rôle des séquences de RMN 2D

(Tableau I)

Les corrélations homonucléaires

Quelques séquences facilement utilisables, leurs rôles et leurs exemples

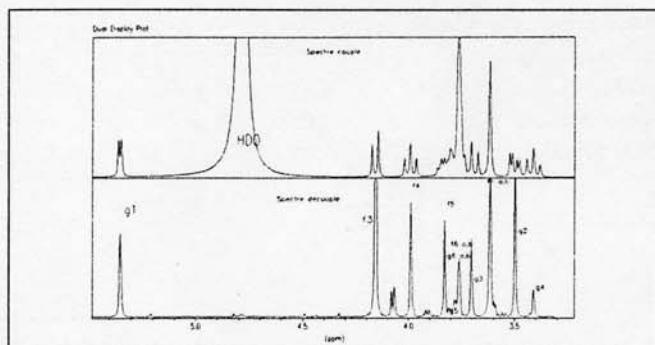
2D J-résolue homonucléaire

Cette séquence permet d'obtenir les constantes de couplages sur l'axe F_1 et le déplacement chimique de chaque

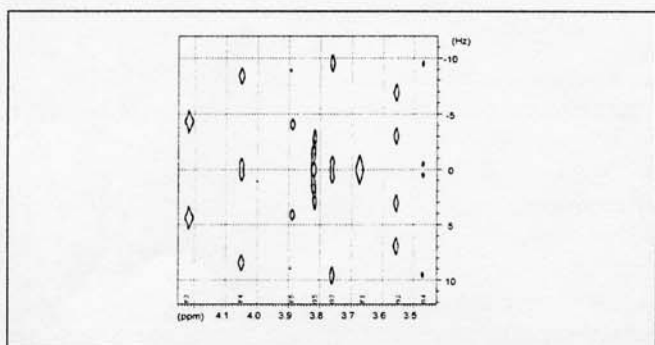
Tableau I
Résumé du rôle de quelques séquences 2D homonucléaires et hétéronucléaire [11].

Expériences	Dimension F_2	Dimension F_1	Exemples d'informations ou n est le nombre de liaisons
	Corrélations	Homonucléaires	
2D Homonucléaire J-résolue	δ_H	J_{HH}	 Vicinaux $n_{J_{HH}}(n \leq 3)$
COSY 45 et 90 COSY DQF TOCSY	δ_H, J_{HH}	δ_H, J_{HH}	 Vicinaux $n_{J_{HH}}(n \leq 3)$
COSY L.R. TOCSY	δ_H, J_{HH}	δ_H, J_{HH}	 $n_{J_{HH}}(n > 3)$
COSY avec un Relais Homonucléaire	δ_H, J_{HH}	δ_H, J_{HH}	 $n_{J_{HH}}(n > 3)$
NOESY ROESY	δ_H, J_{HH}	δ_H, J_{HH}	 N.O.E.
2D-Inadéquate	δ_C, J_{CC}	δ_C, J_{CC}	 $I_{J_{CC}}$
	Corrélations	Hétéronucléaires	
XHCORR, HSQC (inverse) 2D J-résolue	δ_C	δ_H, J_{HH}	 $I_{J_{CH}}$
Long-Range XCORFE COLOC, HSBC (inverse)	δ_C	δ_H, J_{HH}	 $I_{J_{CH}}(n > 1)$

proton découplé sur l'axe F_2 (spectres 2 et 3). Bien sûr, les couplages provenant d'hétéronoyaux (^{31}P , ^{19}F couplés aux ^1H) sont toujours présents en dimension F_2 . On peut ainsi déterminer le couplage entre un proton qui est dans un multiplet d'un spectre couplé et un phosphore [8].



Spectre 2 - Spectre proton 1D couplé et découplé.



Spectre 3 - 2D J-résolue. Le doublet, qui est situé à 4,18 ppm, montre que le proton f_3 a un proton voisin. La constante de couplage est directement lue sur l'axe F_2 . Le triplet f_4 à 4,05 ppm indique que celui-ci a deux protons qui lui sont voisins, etc.

Pour la séquence 2D J-résolue, (figure 12) la séquence de pulse utilisée est une séquence d'écho de spin. Dans notre cas, nous avons étudié la molécule de saccharose (formule 1).

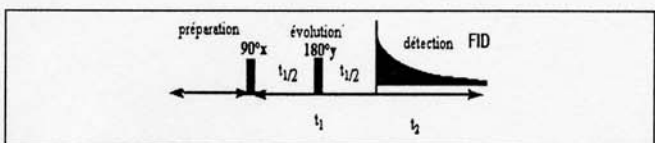
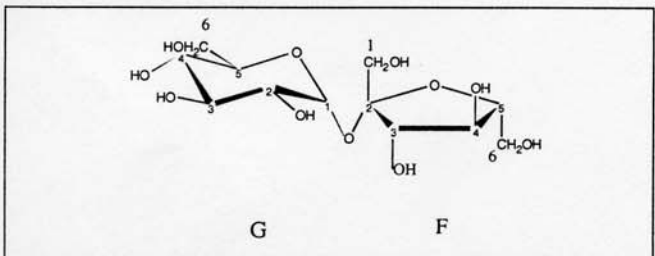


Figure 12 - La séquence 2D J-résolue.



Formule 1 - Le saccharose.

Comme toutes les expériences « écho », la période d'évolution t_1 est divisée en deux parts égales. Après la première impulsion de $(90^\circ)_x$, tous les vecteurs d'aimantations commencent à précesser en fonction de leurs déplacements chimiques et des constantes de couplages. L'impulsion de (180°) sur l'axe y permet pour chaque spin refocalisé d'associer les vecteurs avec leurs déplacements chimiques.

La séquence COSY 90 (acronyme de COrrélation SpectroscopY)

L'exemple étudié est le saccharose. Cette séquence a pour objet de corrélérer les signaux de noyaux de même nature couplés scalairement. Pour un noyau isolé, elle est composée de deux impulsions $(\pi/2)_x$ encadrant la période d'évolution t_1 (figure 13). La préparation débute par un délai de relaxation permettant le retour à l'équilibre de l'aimantation, puis la période t_1 correspond au moment où la valeur du temps t_1 est augmentée à pas régulier et enfin la période t_2 est le temps d'acquisition [8].

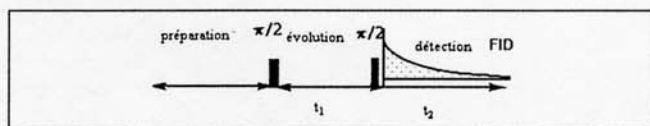


Figure 13 - L'expérience COSY.

Après la double transformée de Fourier, le spectre que nous obtenons est en déplacement chimique sur les deux axes. De plus, les pics d'intersection indiquent les noyaux qui sont couplés entre eux et permettent donc une attribution directe des protons voisins.

On peut comprendre la formation des signaux diagonaux et d'intersection du spectre COSY à l'aide de simples considérations qualitatives [8]. En fait, si nous considérons un signal singulet A sans couplage spin-spin scalaire, la préparation permet de mettre le maximum de noyaux à leur place et la première impulsion $\pi/2$ engendre une magnétisation A transversale $M(A)$ qui tourne autour de l'axe y (figure 14).

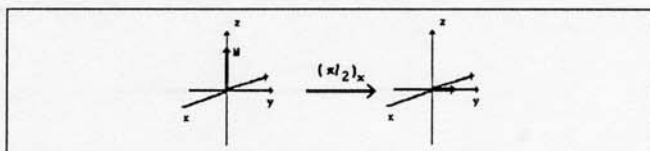


Figure 14 - Après la première impulsion $(\pi/2)_x$.

Au cours de la période d'évolution, l'aimantation $M(A)$ précesse à la fréquence de résonance du noyau correspondant $\Omega = 2\pi\nu$ dans le référentiel tournant ; il y a donc une répartition des spins entre l'axe x et l'axe y (figure 15).

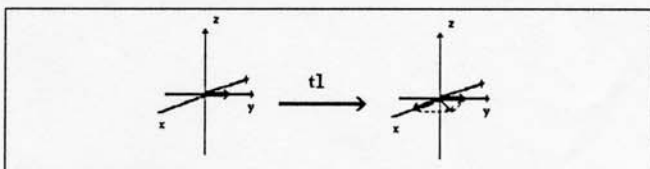


Figure 15 - Évolution de la magnétisation durant le temps t_1 .

Les composantes M_x et M_y de l'aimantation transversale à la fin de la période d'évolution selon les axes Ox et Oy du référentiel tournant sont alors : $M_x = M_0 \sin 2\pi\nu t_1 \exp(-t_1/T_2^*)$.

$M_y = M_0 \cos 2\pi\nu t_1 \exp(-t_1/T_2^*)$ où M_0 représente le module de l'aimantation présente avant l'exécution de la première impulsion et T_2^* le temps de relaxation transversale apparent du noyau correspondant.

La deuxième impulsion $\pi/2$ permet de basculer la portion y qui demeure dans le plan xy , dans la direction z négative

(-z). Celle-ci ne sera pas détectée (figure 16). En revanche, la portion x, qui demeure dans le plan xy, sera repérée.

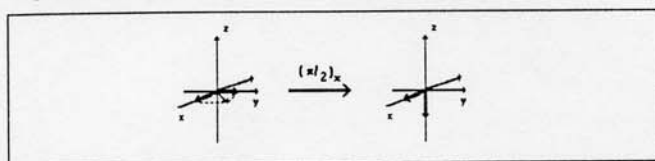


Figure 16 - Après la deuxième impulsion $(\pi/2)_x$.

La magnétisation qui va être détectée est de la forme : $M_0 \sin 2\pi \nu t_1$. En revanche, la magnétisation qui est située sur l'axe des -z est de la forme : $M \cos 2\pi \nu t_1$.

L'intensité du signal qui va être enregistrée, dépend alors de la position momentanée du vecteur M(A) à la fin du temps d'évolution. Cette même intensité est déterminée par la fréquence de Larmor du noyau A. L'amplitude est modulée en t_1 par rapport à cette fréquence et la transformée de Fourier fournit dans les deux dimensions la fréquence ν_A et ensuite un signal diagonal. En cas de couplage spin-spin, la deuxième impulsion $\pi/2$ n'induit pas seulement une modification de la magnétisation de A transversale, mais encore des changements de populations pour d'autres transitions dans le système de spins en question.

Ainsi, il y a échange de magnétisation entre tous les noyaux qui sont couplés entre eux. Leurs signaux, dans une série d'expériences t_1 , sont également modulés par rapport aux fréquences des noyaux voisins. Cela aboutit aux pics d'intersections du spectre 2D en (ν_A, ν_X) et (ν_X, ν_A) et nous permet d'obtenir un spectre où les corrélations homonucléaires de couplage scalaire sont représentées par les taches qui sont hors de la diagonale. Par exemple, on peut voir le couplage entre le proton f_3 et f_4 à l'intersection de 4,05 et 4,18 ppm (spectre 1).

La séquence COSY 45

L'exemple est donné pour le saccharose.

La deuxième impulsion est de 45° . L'inconvénient de cette deuxième impulsion est de diminuer le rapport signal sur bruit (figure 17). En revanche, cela permet de simplifier l'attribution des signaux du spectre dans les cas de forts cou-

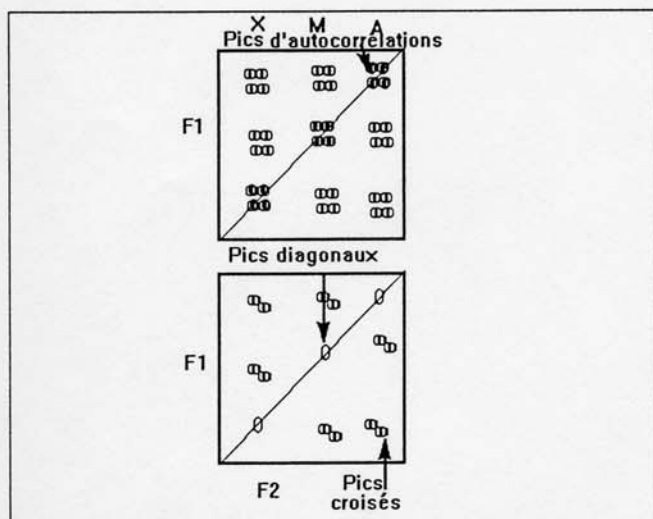
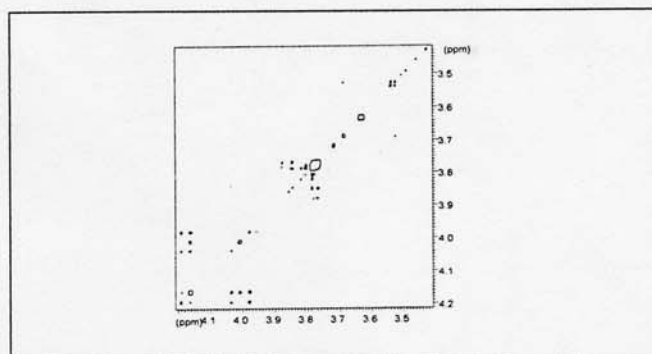


Figure 17 - Comparaison des spectres COSY (en haut) et COSY 45 d'un système de type AMX.

plages type AB. En effet, les pics de corrélations (ou croisés) qui sont situés à proximité de la diagonale ne sont plus susceptibles d'être masqués par les pics d'auto corrélations (spectre 4).



Spectre 4 - COSY 45° . On observe une forte diminution des pics d'autocorrélation.

COSY longue distance

Cette expérience permet de détecter des pics de corrélations dus à de faibles valeurs de constante de couplage (inférieures au hertz) et qui ne sont pas détectables avec une COSY 90 [8]. Pour la séquence COSY « longue distance », on augmente artificiellement la durée des périodes d'évolution et de détection en introduisant un délai fixe Δ de part et d'autre de l'impulsion de mélange (figure 18).

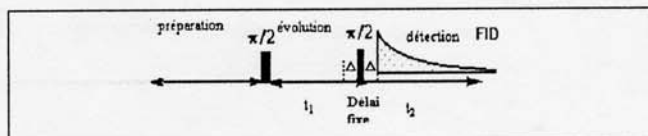
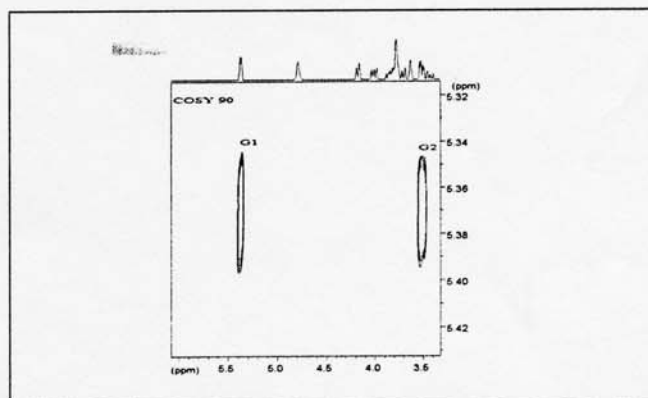


Figure 18 - La séquence COSY longue distance.

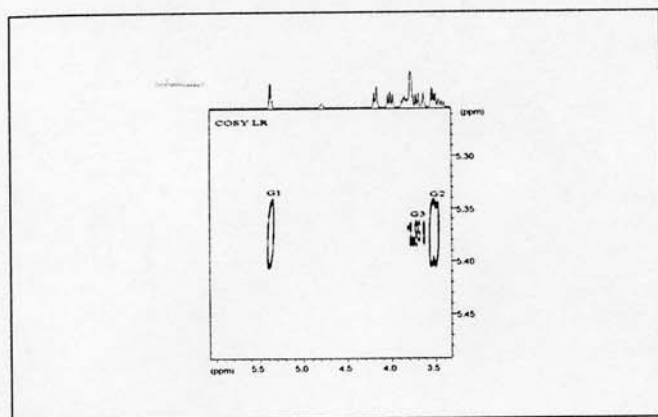
L'exemple proposé, est la molécule de saccharose.

Le spectre 5 est une COSY 90. Les couplages scalaires entre protons vicinaux G_1 et G_2 sont bien présents.



Spectre 5 - COSY 90.

Le spectre 6 est une COSY LR. Les couplages longues distances apparaissent entre le proton G_1 et les protons G_3 et G_4 .



Spectre 6 - COSY LR.

COSY relayée ou COSY avec un relais homonucléaire

Un spectre COSY peut parfois se révéler insuffisant pour une attribution non ambiguë des différents signaux, en particulier dans le cas d'équivalence fortuite de noyaux. Un exemple typique est celui des peptides (figure 19) où les protons portés par les carbones α des différents aminoacides ont des déplacements chimiques voisins ; le spectre COSY donne les informations de corrélation entre protons α et protons β d'une part, et entre protons α et protons NH d'autre part. Malheureusement, du fait du recouvrement des signaux des protons, l'attribution des signaux des protons β ne peut pas être obtenue à partir de celles des protons NH (ou inversement). Pour lever cette ambiguïté, il faut pouvoir corréler les signaux des protons NH à ceux des protons β ; une telle corrélation peut être obtenue soit par une COSY « longue distance » si le couplage 4j correspondant n'est pas trop petit ou mieux, par une expérience COSY relayée qui permet de corréler les signaux de deux noyaux à la seule condition qu'ils soient tous les deux couplés à un troisième noyau [8].

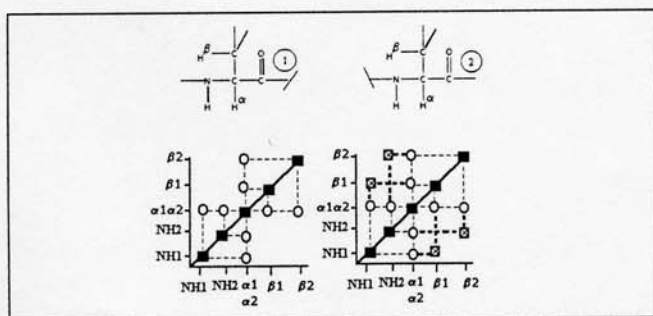


Figure 19 - Représentation schématique des spectres COSY (à gauche) et COSY avec relais de deux systèmes de types AMX (ex: NH-CH α -CH β) avec $J_{AX} = 0$.

Cette expérience permet de différencier l'appartenance des NH en fonction des CH β 1 ou CH β 2. Elle est souvent utilisée pour déterminer la structure des sucres.

La séquence d'impulsion de l'expérience est dérivée de la séquence COSY en faisant suivre l'impulsion de mélange d'un délai fixe τ et d'une impulsion de 90° (figure 20). Une impulsion de 180°, exécutée au milieu de la nouvelle période de mélange, est également nécessaire pour éliminer l'évolution des aimantations (refocalisation) due au déplacement chimique au cours de ce délai supplémentaire.

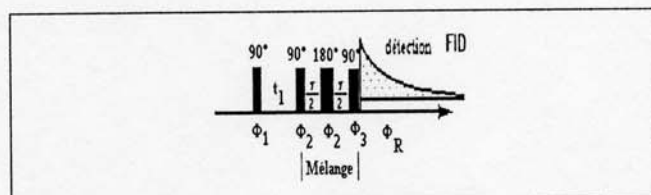


Figure 20 - La séquence d'impulsion de la COSY relayée.

Appliquée à un système de type AMX, cette séquence réalise un premier transfert de cohérence de A vers M comme celui observé dans l'expérience COSY. Au cours de la période de mélange, les aimantations évoluent de manière à ce qu'idéalement les différentes composantes de l'aimantation du noyau M soient en antiphase par rapport au couplage J_{MX} . La troisième impulsion de 90° réalise alors le transfert du noyau M vers le noyau X.

Les cycles de phase des impulsions et du récepteur est calqué sur celui de l'expérience COSY. Toutefois, il est nécessaire de lui adjoindre un cycle de base supplémentaire destiné à éliminer les artefacts dus à des transferts de type NOESY. Ceci consiste à inverser la phase de la seconde impulsion sans modifier la phase de réception. Il en résulte un cycle global à 8 composantes :

$$\phi_1 = 0, \phi_2 = 00112233, \phi_3 = 0213, \phi_R = 0022$$

Pour optimiser le temps de mélange, on doit définir le délai τ entre chaque impulsion. Celui-ci, est calculé par la formule suivante, où J_{max} représente la valeur de la plus grande constante de couplage :

$$\tau = \frac{1}{1,6 J_{max}}$$

Expérience COSY avec filtre double quantum (ou COSY DQF)

La séquence COSY avec filtre double quantum présente des avantages par rapport à la séquence COSY conventionnelle [2]. Les pics diagonaux et les pics de corrélation ne sont pas déphasés de 90° et ont la même structure antiphase (figure 21). Il est donc possible de phaser l'ensemble des pics du spectre en absorption positive ou négative permettant ainsi une identification plus facile des pics de corrélation proches de la diagonale.

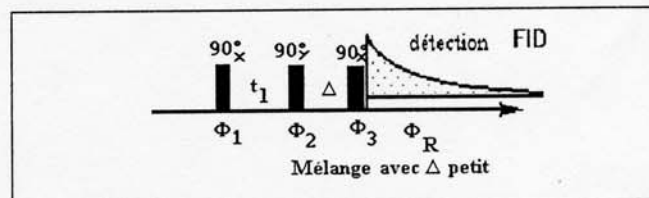
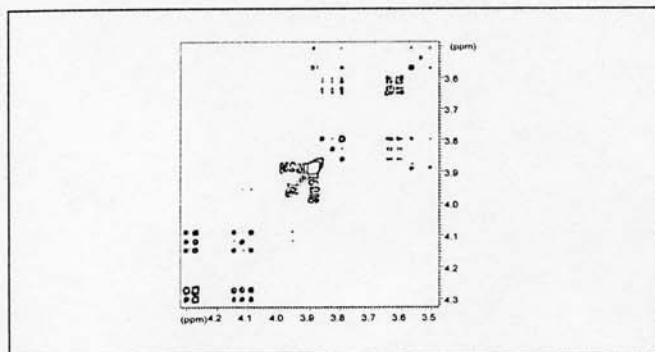


Figure 21 - La séquence d'impulsion COSY DQF.

Les pics diagonaux correspondant à des signaux singulets sont éliminés. En contrepartie, une perte de sensibilité d'un facteur 2 est à déplorer.

La molécule qui sert d'exemple est le saccharose.

On peut remarquer, sur le spectre 7 (COSY DQF), une forte diminution du singulet du proton F $_1$ qui est situé à 3,68 ppm par rapport au spectre 1.



Spectre 7 - COSY DQF.

La séquence NOESY
ou (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)

Elle permet d'accéder au terme de relaxation croisée σ qui gouverne l'effet Overhauser [2]. La terminologie NOESY est plutôt réservée à la détermination du terme de relaxation croisée homonucléaire.

La séquence d'impulsion est schématisée figure 22.

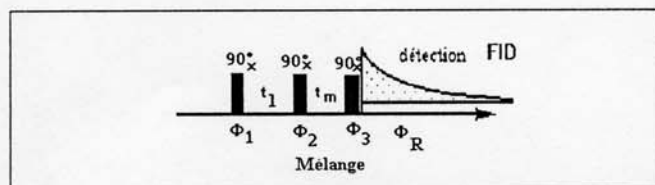
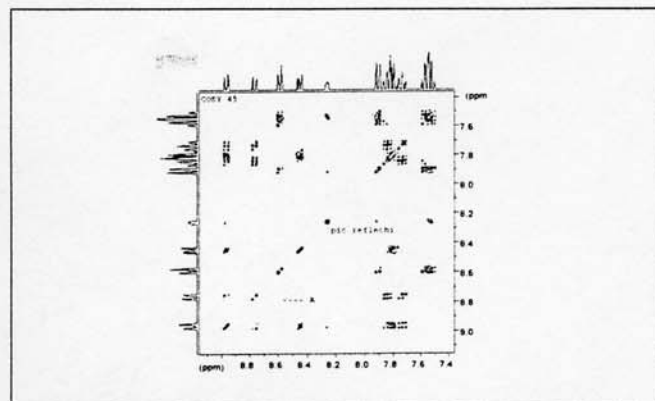


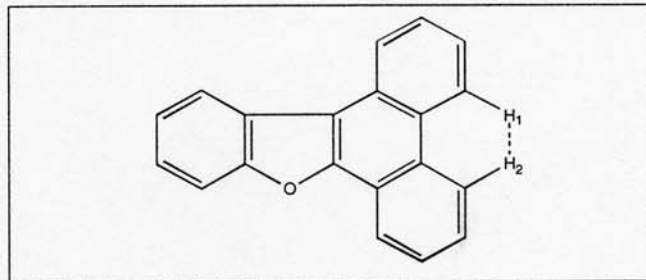
Figure 22 - La séquence d'impulsion : NOESY.

Les taches de corrélations (pics hors diagonaux) traduisent, soit une interaction dipolaire, donc une certaine proximité spatiale (2 à 5 Å) entre les spins considérés, soit un échange chimique. Cette expérience permet de déterminer la structure de grosses molécules telles que les protéines.

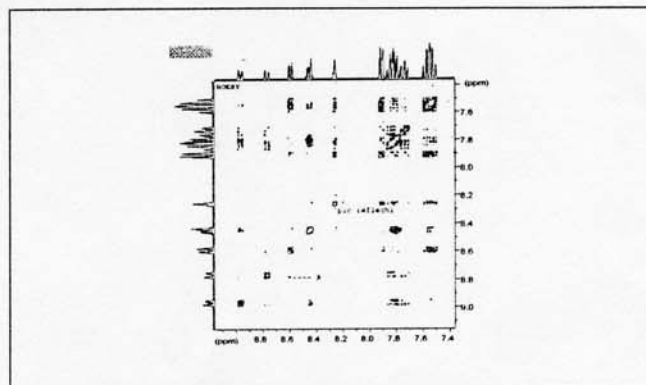
Le spectre 8 est un spectre COSY 45° du phénanthro-benzofuranne (PBF) (formule 2). Le spectre 9 est le spectre NOESY correspondant. On observe une tache de corrélation supplémentaire entre le proton qui est à 8,8 ppm et le proton qui a un déplacement chimique de 8,6 ppm. Cette tache qui est symbolisée par un A, traduit une interaction dipolaire entre les deux protons H₁ et H₂.



Spectre 8 - COSY du PBF.



Formule 2 - Le phénanthro-benzofuranne (PBF).



Spectre 9 - NOESY du PBF.

COSY et NOESY en modephasé

La technique TPPI (Time Proportional Phase Incrementation) permet une détection en quadrature séquentielle. Grâce à cette méthode, on peut résoudre le problème de discrimination du signe des fréquences lors de la détection d'un signal de précession libre dans une expérience de RMN impulsionnelle. Il existe d'autres méthodes en modephasé comme la technique STATES où la détection est en quadrature simultanée. Il est préférable d'effectuer une NOESY phasée plutôt qu'une NOESY classique, car cette technique est bien plus sensible. De plus, les pics de corrélations traduisant une proximité spatiale sont en négatif par rapport aux taches de corrélations dues aux couplages spin-spin [5].

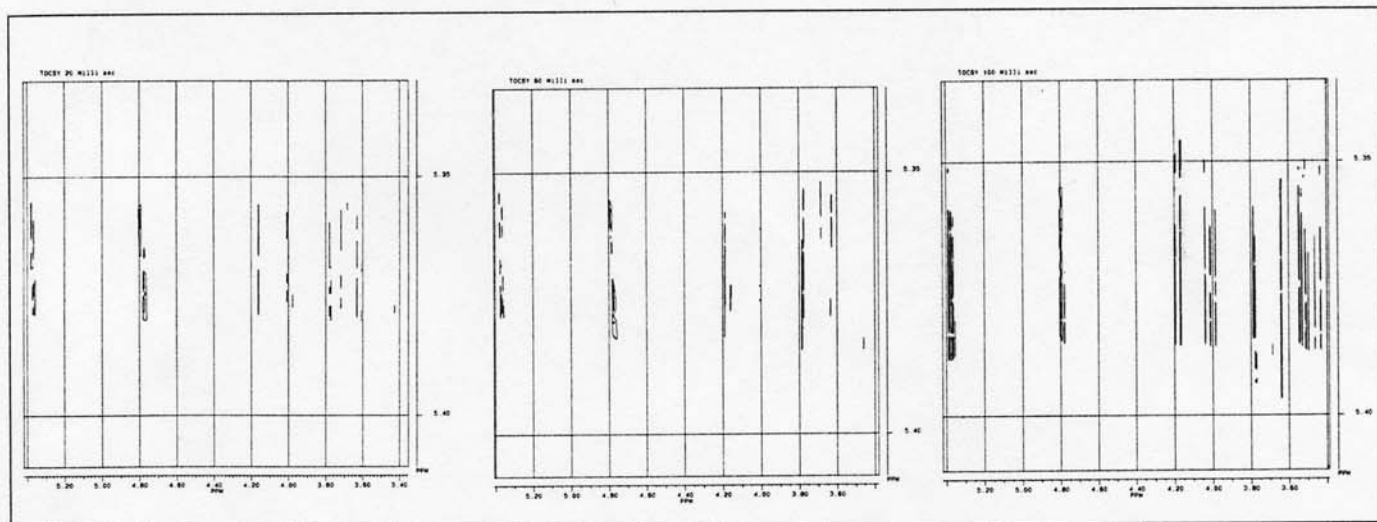
TOCSY et ROESY

Ces expériences sont caractérisées par un temps de mélange pendant lequel l'aimantation d'un spin A, soumise à un champ de radiofréquence B₁, est transférée à un spin relié à A soit par un couplage scalaire, soit par un couplage dipolaire. Pendant le temps de mélange, les aimantations sont verrouillées selon une direction de l'espace déterminée par la direction du champ B₁ et les décalages en fréquence des spins par rapport à la porteuse. Ce verrouillage de spin est couramment appelé spin-lock [2].

TOCSY ou HOHAHA

Cette méthode permet de montrer les couplages scalaires (spectre 10).

La séquence d'impulsion est schématisée figure 23. La première impulsion de 90°x bascule les vecteurs d'aimantations dans le plan xOy, dans lequel ils évoluent librement



Spectre 10 - TOCSY pour 3 temps de mélange différents.

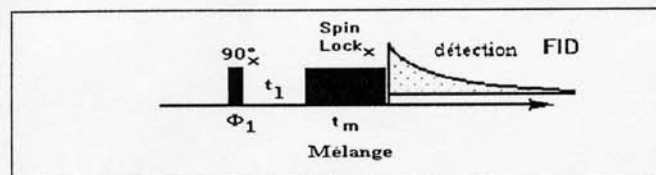


Figure 23 - La séquence d'impulsion TOCSY ou HOHAHA.

pendant le temps t_1 , sous l'influence de leur déplacement chimique et des constantes de couplages scalaires. On applique ensuite un spin-lock sur l'axe x, c'est-à-dire une impulsion de faible puissance ou un train d'impulsions, dont la durée représente le temps de mélange t_m . Pendant ce temps, la cohérence des spins du système est échangée. En augmentant le temps de mélange, on augmente le nombre des relais visibles. C'est-à-dire que, avec une même expérience, on a les informations d'une COSY, d'une COSY LR et d'une COSY relayée. La séquence d'impulsions couramment utilisée est basée sur la séquence MLEV-17 qui comporte une série de 17 impulsions [5].

Le spectre 10 montre le résultat de trois temps de mélange différents pour le saccharose. Ceux-ci sont donnés en millisecondes (20, 60, 100 ms). Pour chaque temps de mélange, on voit apparaître de nouvelles taches de corrélations. Il y a donc une augmentation du nombre de relais avec le temps de spinlock. Celles-ci correspondent à des corrélations longues distances.

ROESY ou CAMELSPIN

L'objectif des expériences de corrélation dipolaire à deux dimensions est de mettre en valeur la proximité de certains noyaux dans l'espace. Le résultat de ce type d'expériences est une carte 2D dont les signaux hors diagonales proviennent de l'effet Overhauser entre deux noyaux proches dans l'espace [2] (figure 24).

Dans ce cas, on applique un spin-lock sur l'axe y. Les pics de corrélation provenant de l'effet ROE sont de signes opposés aux pics de la diagonale et d'intensité non nulle. Par contre, les pics de corrélation provenant d'un phénomène d'échange chimique sont de mêmes signes que la diagonale.

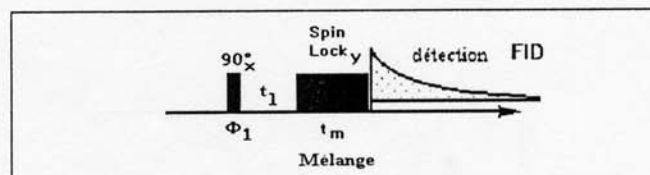


Figure 24 - La séquence d'impulsion : ROESY.

L'expérience ROESY permet ainsi de séparer facilement les contributions dipolaires des contributions d'échange. La séquence ROESY est donc complémentaire de la séquence NOESY et elle est surtout utilisée pour déterminer la structure des petites molécules.

Corrélation hétéronucléaire

Définition

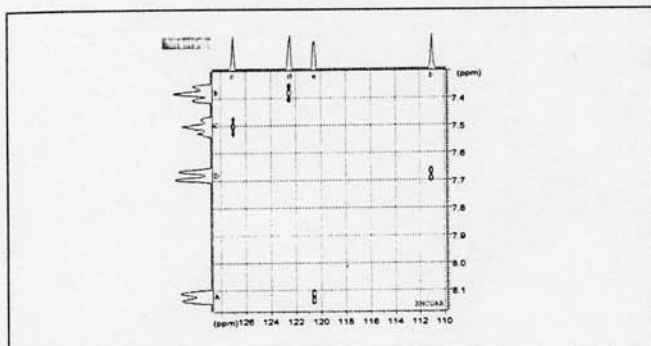
La corrélation hétéronucléaire de déplacements chimiques par couplage scalaire exploite l'existence du couplage scalaire hétéronucléaire permettant un transfert d'aimantation du noyau le plus sensible (^1H) vers le noyau le moins sensible (^{13}C). L'expérience modèle est la corrélation $\delta(^{13}\text{C})/\delta(^1\text{H})$ qui utilise le grand couplage direct $^1\text{J}(^{13}\text{C}-^1\text{H})$ compris entre 100 et 280 Hz et qui permet de corréler les signaux d'un proton à celui du noyau ^{13}C auquel il est lié [5].

La séquence XHCORR

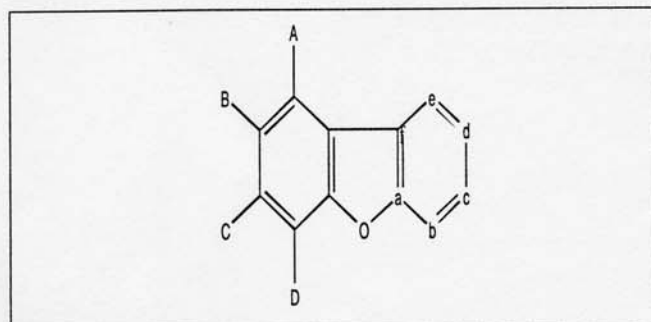
Cette séquence permet de corréler les signaux des ^1H et des ^{13}C liés entre eux [13]. Le spectre 11 (XHCORR), montre les corrélations pour le dibenzofuranne (formule 3) entre carbones et protons liés.

Les déplacements chimiques des protons de cette molécule sont dans le tableau II, ceux des carbones sont dans le tableau III.

Lors de la séquence XHCORR (figure 25), une impulsion $\pi/2$ (^1H) crée des aimantations transversales qui évoluent durant la période t_1 . L'impulsion $\pi(^{13}\text{C})$, située au centre de celle-ci, refocalise les couplages hétéronucléaires. L'optimi-



Spectre 11 - XHCORR du DBF.



Formule 3 - Le dibenzofuranne (DBF).

Tableau II
Déplacements chimiques des protons du DBF.

¹ H	Déplacement en PPM
A	8,15
B	7,4
C	7,5
D	7,7

Tableau III
Déplacements chimiques des carbones du DBF.

¹³ C	Déplacement en PPM
A	156,2
B	111,6
C	127,0
D	122,6
E	120,6
F	124,2

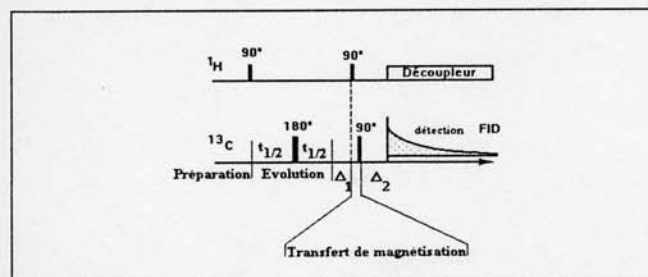


Figure 25 - La séquence d'impulsion XHCORR.

sation des délais Δ_1 et Δ_2 permet de sélectionner des corrélations hétéronucléaires à longues distances, c'est-à-dire qu'au lieu de voir la corrélation entre ¹³C et protons directement liés (H_L), on favorise l'apparition des taches de corrélations entre ¹³C et protons non liés (H_{NL}). Par exemple, pour une constante de couplage $J = 10$ Hz alors $\Delta_1 = 50$ ms et $\Delta_2 = 33$ ms.

La séquence COLOC (Corrélation via Long range Coupling)

La séquence qui est utilisée (figure 26) permet généralement une bonne corrélation entre les carbones quaternaires et les protons voisins. Sur le spectre 12 (COLOC), on symbolise la corrélation entre le carbone quaternaire (¹³C = a = 156,2) et son proton voisin (D = 7,7) par Cq. En revanche, elle ne donne pas d'excellents résultats pour les corrélations longues distances concernant des carbones protonés [14]. Cette remarque a conduit à écrire une séquence dénommée XCORFE (X nucleus proton CORrelation with Fixed Evolution time). Celle-ci est très proche de la séquence COLOC.

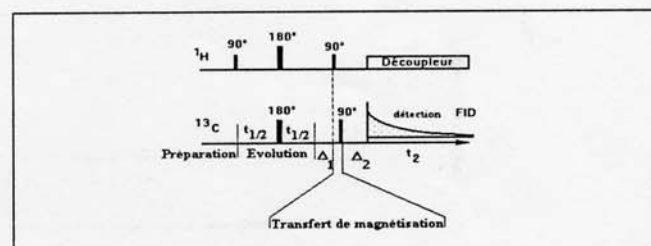
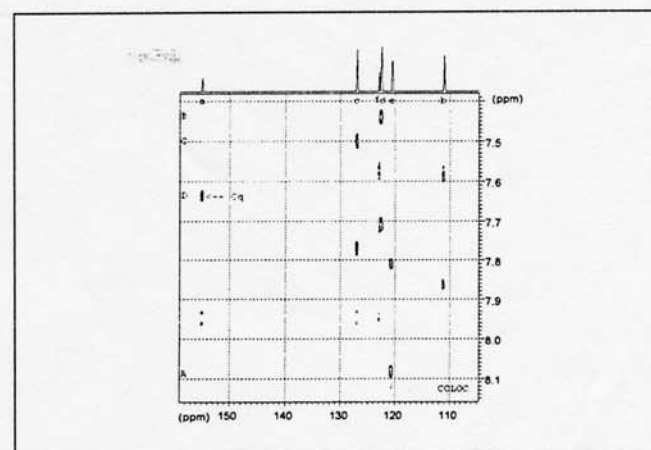


Figure 26 - La séquence d'impulsion COLOC [14].



Spectre 12 - COLOC du DBF.

La séquence hétéronucléaire J-résoyée 2D

Dans cette expérience, on observe le couplage J entre les noyaux X (¹³C, ¹⁵N, ³¹P ...) et les protons qui leur sont liés (figure 27). Un spectre 1D normal XH couplé peut-être très compliqué à interpréter. Ceci est dû à l'enchevêtrement des multiplets [12]. Pour simplifier les spectres, on va répartir les données des couplages en dimension F_1 et les informations provenant des déplacements chimiques en dimensions F_2 .

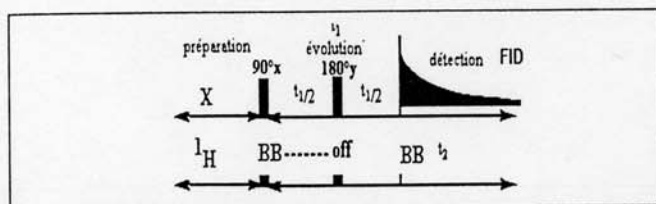
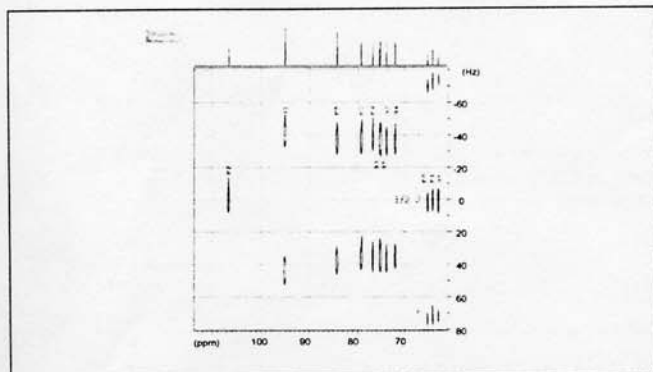


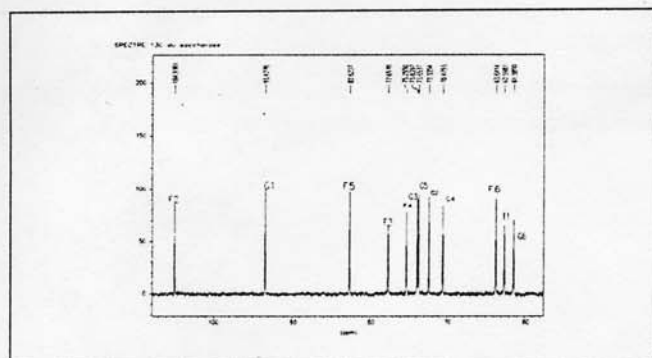
Figure 27 - La séquence hétéronucléaire J-résolue 2D.

Les résultats sont pour le saccharose.

Le carbone F₂ (108 ppm) est un quaternaire car il n'y a qu'une tache sans couplage. Le carbone G₁ (95 ppm) est un CH car il ya deux taches de corrélations. De plus, la constante de couplage entre ce ¹³C et ce ¹H est de 80 Hz environ (spectres 13 et 14).



Spectre 13 - 2D J-résolue hétéronucléaire.



Spectre 14 - ¹³C du saccharose.

Corrélations hétéronucléaires de déplacements chimiques en détection inverse

Qu'est-ce que la détection inverse ? La détection inverse ou indirecte consiste à obtenir les paramètres RMN (déplacements chimiques, t₁...) d'un noyau X peu sensible, en observant le signal RMN d'un noyau beaucoup plus sensible (proton en général) [1, 5].

Les avantages de la détection indirecte

La technique de détection inverse est devenue de plus en plus populaire grâce, d'une part, aux développements électroniques des spectromètres et, d'autre part, à l'accroissement de la sensibilité de la détection d'un noyau X par voie

indirecte. En effet, la détection indirecte résout le problème des solutions peu concentrées.

Enfin, elle permet d'atteindre des paramètres de RMN tels que les déplacements chimiques, les constantes de couplage et les temps de relaxation spin réseau d'hétéronucléaires impossibles à mesurer par détection directe (figure 28). Par exemple, il n'est malheureusement pas toujours évident d'obtenir des spectres RMN de noyaux tels que ⁵⁷Fe, ¹⁸³W, ¹⁸⁷Os et même parfois ¹⁵N en observation directe. Par conséquent, la détection inverse devient alors la solution de secours que ce soit pour des corrélations ¹H-¹⁵N dans le cas des peptides ou des protéines ou aussi pour des corrélations ¹H-X dans le cas de composés organométalliques.

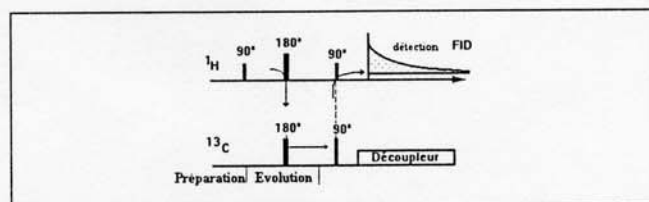


Figure 28 - Schématisation d'une séquence de détection inverse. Les flèches représentent le transfert de magnétisation du proton vers le ¹³C puis du ¹³C vers le proton.

Dans tous ces exemples, la technique de corrélation inverse a permis de déterminer les déplacements chimiques de l'hétéronucléaire ainsi que les constantes de couplage J(X-H).

Les séquences existantes

La séquence HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) est spécialement utilisée pour la détermination structurale des petites protéines. L'HMBC (Heteronuclear Multiple Coherence) est optimisée pour des couplages longues distances et fonctionne mieux qu'une COLOC.

Références

- [1] Boudonneu M., La détection inverse en RMN, *Analisis*, 1990, vol. 1, 18.
- [2] Canet D., *La RMN concepts et méthodes*; Inter Éditions, 1991.
- [3] Günther H., *La spectroscopie de RMN*, Masson, 1994.
- [4] Williamson M.-P., NMR in protein studies, *Chem. in Britain*, April 1991 (335-337).
- [5] *RMN 2D*, Bruker, Poly. 1, 2 et 3, 1993.
- [6] Girault J.-P., Résonance magnétique nucléaire : Évolution instrumentale et analyse de structure, le technoscope de *biofutur*, n° 38, sept. 1990.
- [7] Rabenteck D.-L., Sensitivity enhancement by signal averaging in pulsed by Fourier transform NMR spectroscopy, *J. of Chem. Ed.*, Oct. 1984, vol. 61, n° 70.
- [8] *Séquence Cosy Poly*, Bruker, 1993.
- [9] King W., Williams K.-R., Topic in chemical instrumentation, part 3 and 4., 2D Methods, *J. of Chem. Educ.*, vol.67, n° 4.
- [10] King W., Williams K.-R., *Topics in chemical instrumentation*.
- [11] Croumum W.-R., Carlson R.M.K., Two dimensional NMR spectroscopy, applications for chemists and biochemists, vol. 9.
- [12] Two dimensional NMR Aspect 2000 - 3000, Bruker.
- [13] Freeman G.-E., Morris, *J. Chem. Soc., Chem. Comm*, 1978, 684.
- [14] Kessler H., Bernel W., Griesinger C., *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, 107, 1083.