

Ecole RMN du GERM

Cargèse 2008

Analyse de spectres bi-dimensionnels

But de l'atelier

- ❖ Maîtriser les bases de l'exploitation des spectres de RMN à 2 dimensions (RMN 2D) pour l'attribution des spectres et l'analyse structurale de molécules organiques.

Pré-requis

- ❖ Principe de la RMN par impulsions et transformation de Fourier.
- ❖ Déplacements chimiques et couplages scalaires en RMN du ^1H et du ^{13}C .

Plan

- ❖ Attribution d'un peptide de 7 acides aminés par RMN du proton.
- ❖ Attribution des spectres de RMN ^1H et ^{13}C de la quinidine.
- ❖ Attribution des spectres de RMN ^1H et ^{13}C de la catéchine.

Rappels sur la RMN 2D

Les valeurs des déplacements chimiques d'un noyau fournissent des informations centrées sur cet atome, en termes de nombre et nature des plus proches voisins. La détection des couplages apporte des données structurales complémentaires sous forme de relations de proximité entre atomes. Même si des méthodes expérimentales en RMN 1D ont été utilisées pour accéder aux relations de proximité, elles sont à l'usage d'un emploi fastidieux et d'une efficacité parfois limitée. La détection simultanée de tous les couplages est le but de la RMN 2D de corrélation des déplacements chimiques. Il existe aussi une RMN 2D de séparation des interactions qui ne sera pas abordée ici.

Les couplages observables sont de deux natures différentes :

scalaires : il s'agit du couplage indirect qui a pour origine les interactions entre spins nucléaires et spins électroniques. Leur portée est limitée par le nombre de liaisons chimiques qui séparent les noyaux. Le couplage scalaire se traduit dans les spectres 1D par l'éclatement des raies de résonance sous forme de motifs de couplage.

dipolaires : il s'agit du couplage direct à travers l'espace entre spins nucléaires. Sa portée dépend de la distance d qui sépare les deux noyaux couplés. Le couplage dipolaire est invisible sur les spectres 1D des liquides isotropes et son existence est révélée par la cinétique de retour à l'équilibre des spins nucléaires (relaxation). Lorsque la relaxation d'un noyau est dépendante de l'état des noyaux voisins, cela constitue le phénomène de relaxation croisée qui se manifeste sous la forme de l'effet Overhauser nucléaire (nOe). Cet effet varie selon une loi en $1/d^6$ et est généralement insignifiant pour d supérieur à 0,5 nm.

Les spectres 2D dédiés à la détection des couplages scalaires sont :

❖ Homonucléaires :

- COSY (et ses variantes) : COrrélation SpectroscopY
- TOCSY : TOtal Correlation SpectroscopY
- INADEQUATE : Incredible Natural Abundance Double QUAnTum Experiment

❖ Hétéronucléaires :

- HSQC (couplages 1J) : Heteronuclear Single Quantum Correlation
- HMBC (couplages nJ , $n>1$) : Heteronuclear Multiple Bond Correlation

La détection des couplages dipolaires est presque exclusivement réalisée entre noyaux ^1H . Dans ce cas, les spectres obtenus sont de deux types :

- ❖ NOESY : Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
- ❖ ROESY : Rotating-frame Overhauser Effect SpectroscopY

Utilisation d'un spectre de RMN 2D de corrélation

Les spectres de RMN 2D sont tracés comme des courbes d'isovaleur (ou courbes de niveau) de la fonction $S(\nu_1, \nu_2)$. L'existence d'un pic dans $S(\nu_1, \nu_2)$ prouve l'existence d'un couplage entre les noyaux de déplacements chimiques correspondants δ_1 et δ_2 (Fig. 1).

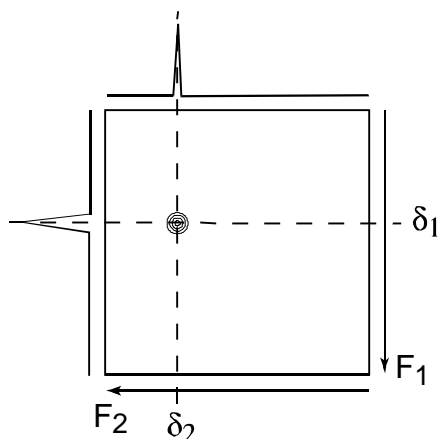


Fig. 1. Corrélation entre 2 déplacements chimiques

Cas des spectres homonucléaires

Des pics de coordonnées $(\delta_1, \delta_2 = \delta_1)$ sont observés en plus de ceux attendus et constituent la diagonale du spectre. A chaque valeur de déplacement chimique du spectre 1D correspond un pic dit « d'autocorrélation » sur le spectre 2D. Pour un système AX dans un spectre COSY on obtient ainsi (Fig. 2) :

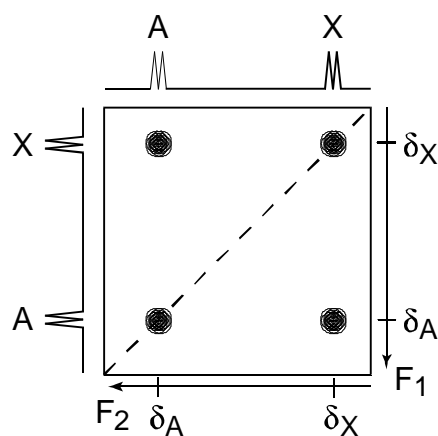


Fig. 2. Spectre COSY d'un système AX homonucléaire

Si le spectre est symétrique (ce qui est le cas avec les spectres de type usuel) on peut identifier le ou les noyaux couplés à un noyau donné comme indiqué (Fig. 3a) :

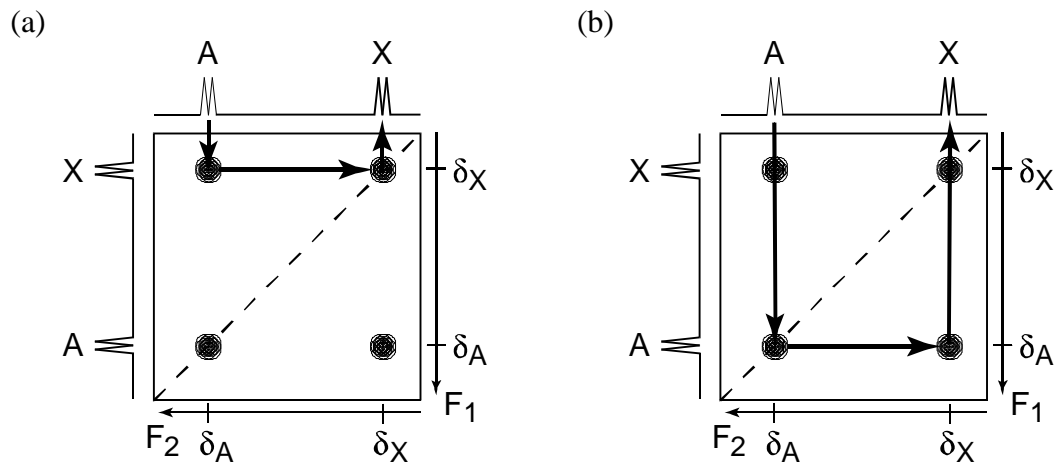
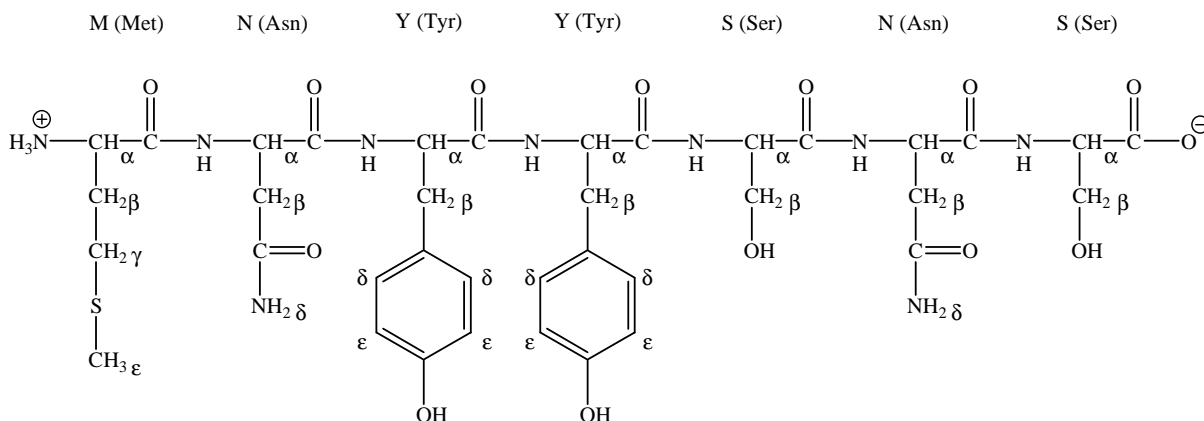


Fig. 3. Recherche des relations de couplage homonucléaire

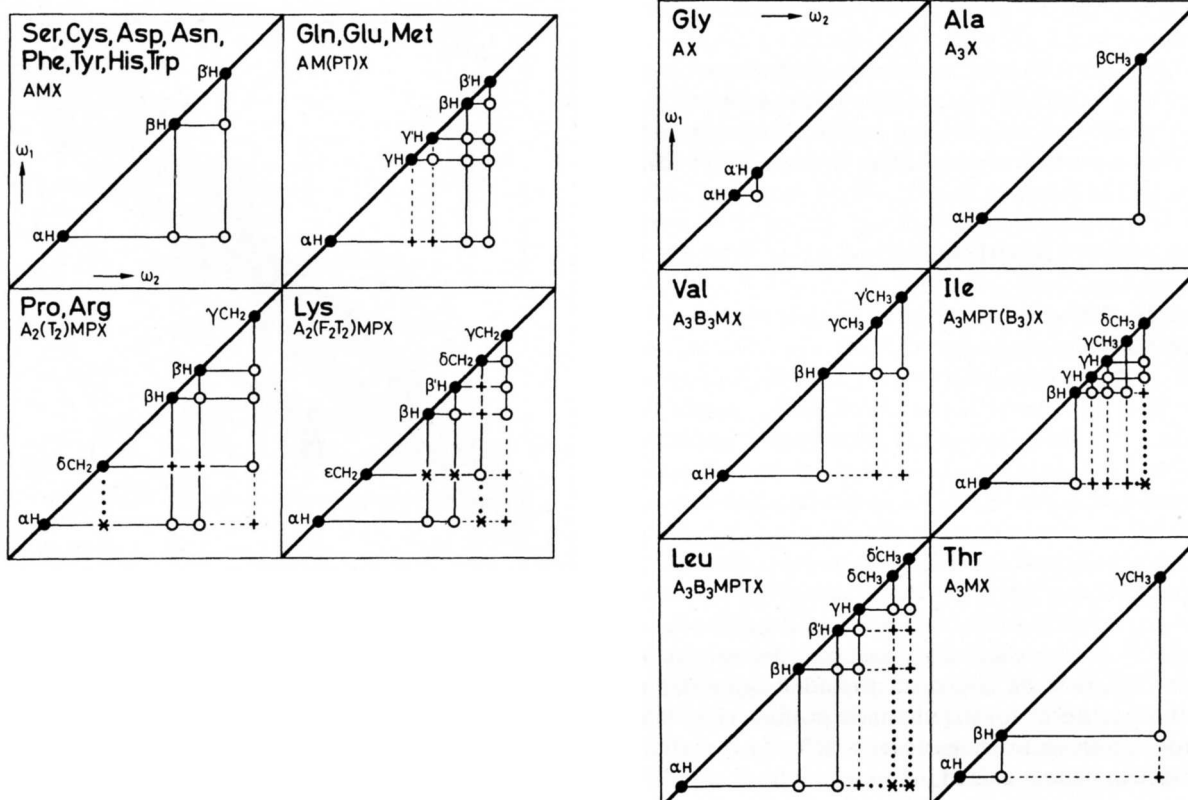
- ❖ en partant du signal de A (δ_A) sur le spectre 1D, on recherche tous les pics hors diagonale situés dans la colonne du spectre 2D.
- ❖ à partir d'une corrélation (δ_A, δ_X) on cherche sur la même rangée le signal (δ_X, δ_X) sur la diagonale.
- ❖ le signal de X est observable sur le spectre 1D dans la colonne correspondante.

Alternativement, il est possible de procéder comme indiqué sur la Figure 3b.

Attribution du spectre de RMN ^1H du peptide MNYYSNS enregistré à 500 MHz dans le DMSO- d_6 .



L'attribution d'un spectre consiste à chercher quel atome de la molécule étudiée (de structure connue) est responsable de chaque signal observé. Pour un petit peptide en solution, les expériences COSY et NOESY suffisent pour attribuer le spectre de RMN ^1H . Chaque résidu est constitué d'un ou plusieurs systèmes de spins. Le spectre COSY permet d'identifier partiellement la nature des amino-acides, en utilisant le réseau de corrélations scalaires observé sur des spectres COSY ou TOCSY. Ces motifs de corrélation sont présentés sur la figure suivante :



L'attribution des systèmes de spins est également facilitée par la connaissance des déplacements chimiques mesurés pour chaque type d'acide aminé. Ces données sont disponibles sous forme de tableaux comme celui-ci :

TABLE 2.3. Random Coil ¹H Chemical Shifts for the 20 Common Amino Acid Residues^a

Residue	NH	αH	βH	Others
Gly	8.39	3.97		
Ala	8.25	4.35	1.39	
Val	8.44	4.18	2.13	γCH ₃ 0.97, 0.94
Ile	8.19	4.23	1.90	γCH ₂ 1.48, 1.19 γCH ₃ 0.95 δCH ₃ 0.89
Leu	8.42	4.38	1.65, 1.65	γH 1.64 δCH ₃ 0.94, 0.90
Pro ^b		4.44	2.28, 2.02	γCH ₂ 2.03, 2.03 δCH ₂ 3.68, 3.65
Ser	8.38	4.50	3.88, 3.88	
Thr	8.24	4.35	4.22	γCH ₃ 1.23
Asp	8.41	4.76	2.84, 2.75	
Glu	8.37	4.29	2.09, 1.97	γCH ₂ 2.31, 2.28
Lys	8.41	4.36	1.85, 1.76	γCH ₂ 1.45, 1.45 δCH ₂ 1.70, 1.70 εCH ₂ 3.02, 3.02 εNH ₃ ⁺ 7.52
Arg	8.27	4.38	1.89, 1.79	γCH ₂ 1.70, 1.70 δCH ₂ 3.32, 3.32 NH 7.17, 6.62
Asn	8.75	4.75	2.83, 2.75	γNH ₂ 7.59, 6.91
Gln	8.41	4.37	2.13, 2.01	γCH ₂ 2.38, 2.38 δNH ₂ 6.87, 7.59
Met	8.42	4.52	2.15, 2.01	γCH ₂ 2.64, 2.64 εCH ₃ 2.13
Cys	8.31	4.69	3.28, 2.96	
Trp	8.09	4.70	3.32, 3.19	2H 7.24 4H 7.65 5H 7.17 6H 7.24 7H 7.50 NH 10.22
Phe	8.23	4.66	3.22, 2.99	2,6H 7.30 3,5H 7.39 4H 7.34
Tyr	8.18	4.60	3.13, 2.92	2,6H 7.15 3,5H 6.86
His	8.41	4.63	3.26, 3.20	2H 8.12 4H 7.14

^a Data for the nonterminal residues X in tetrapeptides GGXA, pH 7.0, 35°C [from Bundi and Wüthrich (1979a), except that more precise data were obtained for Leu, Pro, Lys, Arg, Met, and Phe using new measurements at 500 MHz].

^b Data for *trans*-Pro.

Tableau donnant les déplacements chimiques pour des peptides non-structurés. Le repliement de la chaîne peptidique peut modifier ces valeurs de plusieurs dizaines de ppm. Extrait du livre "NMR of proteins and Nucleic acids" Kurt Wüthrich, Wiley 1986.

La détermination de la position relative du système de spin au sein du polymère peptidique repose sur l'attribution séquentielle des protons du squelette peptidique H_N (amide) et H_α à l'aide des spectres NOESY ou ROESY. Ces spectres permettent d'établir une corrélation entre le H_α ainsi que les protons de la chaîne latérale (H_{β1}, H_{β2} ...) du résidu *n* et le H_N du résidu *n*+1. L'exemple présenté utilise le spectre ROESY car la taille des molécules (qui conditionne le temps de

corrélation τ_c) et le champ utilisé (11.7 T, 500 MHz pour ^1H) peuvent conduire à des problèmes de sensibilité dans le spectre NOESY, problème qui n'existe pas avec le spectre ROESY.

L'attribution de l'ensemble des résonances du peptide se déroulera suivant les étapes ci-dessous:

- ❖ Identifier les δ des noyaux pour chacun des systèmes de la chaîne principale (COSY ou TOCSY)
- ❖ Rechercher à quel type de résidu ils appartiennent (COSY et ROESY)
- ❖ Rechercher à quel résidu ils correspondent exactement (ROESY)
- ❖ Attribuer les signaux des chaînes latérales (COSY et ROESY).

Identification des systèmes de spins

Le domaine spectral compris entre 6,5 et 9,3 ppm contient les signaux des protons aromatiques, des NH et NH_2 d'amides et des OH phénoliques. On observe six corrélations COSY entre de tels signaux et ceux du reste du spectre. Elles ne peuvent qu'être dûs aux couplages H_N - H_α . Les δ des H_α sont compris entre 4,2 et 4,7 ppm et ne sont pas significativement différents pour être attribuables à un résidu plutôt qu'à un autre. A chaque signal de H_α correspond deux signaux des H_β auxquels ils sont couplés. On distingue ainsi dans le spectre COSY, six systèmes de spins notés A à F par ordre de δ décroissant des H_α (Table 1).

Table 1

Système	H_N	H_α	$\text{H}_{\beta 1}$	$\text{H}_{\beta 2}$
A	8,25	4,65	2,6	2,4
B	8,6	4,6	2,65	2,35
C	8,1	4,45	2,95	2,7
D	8,05	4,32	3,65	3,55
E	8,1	4,3	2,82	2,6
F	7,85	4,25	3,7	3,66

On observe aussi les corrélations entre $\text{H}_{\beta 1}$ et $\text{H}_{\beta 2}$ diastéréotopes. Le regroupement des résonances en systèmes de spins est facilité par le spectre TOCSY où tout noyau possède une corrélation avec tout autre noyau du même système de spins. Le spectre TOCSY donne ainsi accès aux δ des H_β d'un résidu à partir du H_N , même si le signal du H_α est fortement superposé à d'autres signaux, ce qui n'est pas le cas ici.

Reporter l'identifiant du système de spins (A,B,...,F)

1. sur l'encart de la carte COSY
2. sur les projections de la carte ROESY

Identification des types d'acides aminés

L'identification des types d'acides aminés sera réalisée en se basant sur les observations suivantes :

- ❖ Les δ élevés des protons H_β sont une marque distinctive des sérines, car l'oxygène porté par les C_β déblindé les H_β .

- ❖ Les tyrosines et les asparagines, qui montrent le même motif de corrélations scalaires sur la COSY peuvent être distinguées en recherchant les corrélations ROESY entre les signaux des protons aromatiques (δ et ϵ) et des H_β qui sont spécifiques des seules tyrosines.
- ❖ L'attribution de la méthionine se fera par élimination et en vérifiant la cohérence des déplacements chimiques obtenus avec le tableau "Wüthrich". D'autre part, le groupe aminoterminal de la méthionine ne conduit à aucun signal observable à cause de l'échange rapide avec les protons de l'eau.

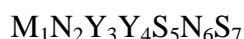
A l'aide des indications ci-dessus, identifier les systèmes de spins
 Reporter vos attributions sur le tableau ci dessous :

Système	A	B	C	D	E	F	G
Résidu							

L'étape suivante consiste à lever les ambiguïtés entre les attributions des paires de systèmes (A, B), (C, E), et (D, F).

Attribution séquentielle.

Dans un petit peptide linéaire et donc peu structuré, des corrélations ROESY intenses sont observables entre H_N et H_α d'un même résidu ainsi qu'entre H_α du résidu n et H_N du résidu $n+1$. La structure du peptide peut être réécrite de manière à faire apparaître les indices des résidus :



En vous basant sur les corrélations séquentielles ainsi que sur les identifiants reportés sur les projections 1D du spectre ROESY,

1. Vous identifierez les corrélations intra-résidus (correspondant aux pics de corrélations observés sur la COSY). Afin de faciliter la suite, ces pics pourront être entourés d'un carré.
2. Vous identifierez ensuite les corrélations inter-résidus qui vous permettront de placer les différents systèmes les uns par rapport aux autres.

Reporter vos attributions sur le tableau ci-dessous :

Résidu	M_1	N_2	Y_3	Y_4	S_5	N_6	S_7
Système							

Résonances des chaînes latérales

Cette dernière étape s'appuie sur la comparaison des déplacements chimiques observés sur les spectres et le tableau des déplacements chimiques donné ci-dessus, ainsi que sur les corrélations observés sur la COSY entre les protons H_β précédemment attribués et les autres protons de la chaîne latérale. On veillera en particulier à attribuer :

- ❖ les protons des cycles aromatiques des tyrosines
- ❖ les protons NH_2 des asparagines

RMN hétéronucléaire

Les déplacements chimiques des ^{13}C apportent une information structurale complémentaire. Leurs corrélations au moyen des spectres HSQC et HMBC ont considérablement facilité l'élucidation de structures complexes de molécules organiques et a amélioré la fiabilité des solutions proposées. Il est aussi possible de réaliser des corrélations entre noyaux 1H et ^{15}N , qui peuvent apporter une aide précieuse dans l'étude d'un grand nombre de molécules d'origine naturelle ou synthétique. L'exemple traité ici ne concernera que les corrélations 1H - ^{13}C .

Un spectre HSQC corréle les δ des 1H et des ^{13}C directement liés. Malgré la faible abondance isotopique du ^{13}C (1 %), c'est l'expérience de RMN 2D hétéronucléaire la plus sensible. Elle ne donne toutefois pas d'information sur les carbones quaternaires. Ceux-ci sont accessibles grâce à l'expérience HMBC, qui corréle les δ des 1H et des ^{13}C séparés par plus de une liaison, leur nombre étant principalement 2 ou 3, voire plus, si certaines conditions structurales sont réunies (systèmes aromatiques, conjugués, systèmes plans).

Une corrélation HMBC C_A - H_B à travers n liaisons et une corrélation HSQC C_B - H_B indiquent que C_A et C_B sont séparés par $n-1$ liaisons. En considérant que n vaut 2 ou 3, cela signifie que C_A et C_B sont soit liés ensemble, soit liés à un atome commun indéterminé X. Si tous les voisins de C_A ou de C_B sont connus, le nombre de possibilités pour X est restreint (par rapport à la situation où les listes de voisins de C_A et C_B ne sont pas totalement connues). Il faut donc en priorité analyser les corrélations des atomes dont les voisins sont tous connus. Un méthyle n'ayant qu'un seul voisin, l'analyse des corrélations des groupes méthyles doit s'effectuer de manière prioritaire. Ceci est d'autant plus vrai que toutes les corrélations des protons d'un groupe méthyle sont toujours visibles. L'ordre dans lequel les corrélations sont choisies, soit pour attribuer des spectres, soit pour trouver une structure, est optimal lorsqu'il n'y a qu'un nombre minimal de possibilités de déduction. Il n'est cependant pas toujours possible de réduire ce nombre à 1 pour toutes les corrélations HMBC.

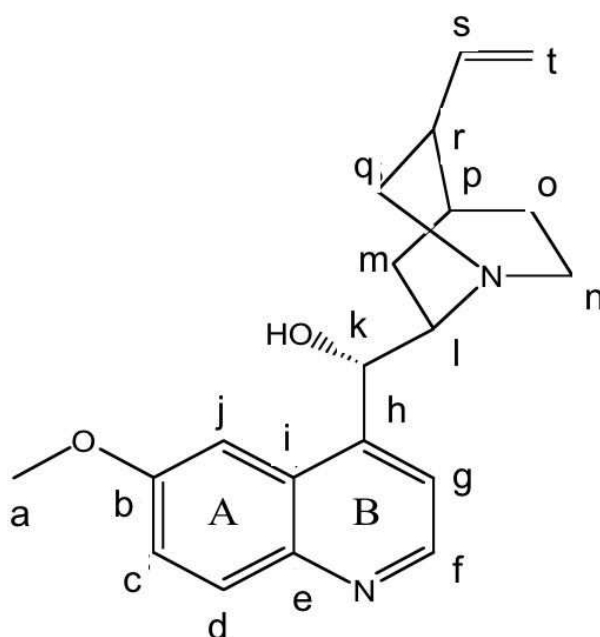
Les informations fournies par un spectre COSY se traduisent aussi en relations de proximité entre carbones si on dispose d'un spectre HSQC : Une corrélation COSY H_A - H_B à travers n liaisons et les corrélations HSQC C_A - H_A et C_B - H_B indiquent que C_A et C_B sont séparés par $n-2$ liaisons. Dans le cas où n vaut 2, le spectre HSQC permet de détecter immédiatement si les 2 noyaux 1H (de δ différents) sont portés par le même carbone. Les corrélations à travers 3 liaisons permettent de déduire des liaisons entre atomes de carbone.

Pour faciliter l'exploitation simultanée des spectres COSY, HSQC et HMBC, il peut être commode d'identifier les atomes d'hydrogène et de carbone, non pas par leur déplacement

chimique mais par un numéro donné arbitrairement. On utilise dans un premier temps le spectre de ^{13}C et on numérote les résonances par ordre de δ croissants ou décroissants. Le spectre HSQC est ensuite utilisé pour donner le même numéro à un ^1H et un ^{13}C directement liés. Plusieurs signaux de ^1H peuvent ainsi porter le même numéro. Les spectres COSY et HMBC se réduisent alors à un ensemble de paires de numéros d'atome, chacun étant relié à une position particulière de la molécule étudiée. Une relation $\text{COSY}(n_A, n_B)$ indique que C_A et C_B sont liés, et une relation $\text{HMBC}(n_A, n_B)$ indique soit que C_A et C_B sont liés, soit que C_A et C_B sont liés au même atome X (en excluant un chemin de couplage de longueur strictement supérieure à 3 liaisons).

Attribution des résonances de la quinidine

Ce travail commence par la numérotation des résonances des δ du ^{13}C , par ordre décroissant sur le spectre "J-modulé" (C_1 pour celui résonant à 157,5 ppm, C_{20} pour celui à 21 ppm). Sur ce spectre, les carbones quaternaires et les CH_2 apparaissent négatifs, les CH et CH_3 en positif. Le signal à 77 ppm correspond au solvant (chloroforme). Cette numérotation sera reportée sur l'ensemble des projections 1D des spectres HSQC et HMBC. La formule ci-dessous montre la structure chimique de la quinidine.



Quinidine

Il y a plusieurs stratégies pour arriver à l'attribution complète : les étapes détaillées ci-dessous en proposent une.

❖ Attribution des noyaux aromatiques

- Sur la COSY, repérer les deux groupes de protons couplés correspondant aux cycles A (3 protons) et B (2 protons).
- Sur la HSQC, attribuer les 5 carbones correspondants dans la région aromatique (100-160 ppm).
- Attribuer les carbones quaternaires du bicyclic en utilisant la HMBC (agrandissement correspondant à la région aromatique). On se basera en particulier sur les corrélations suivantes :

- C_b (en principe déblindé à cause de la proximité de l'oxygène) : $C_b - H_d$ (fort), $C_b - H_c$ (faible), $C_b - H_j$ (faible)
 - C_h : $C_h - H_f$, $C_h - H_j$
 - C_e : $C_e - H_c$, $C_e - H_f$, $C_e - H_j$
 - C_i : $C_i - H_g$, $C_i - H_d$

- ❖ Attribution du carbone méthyle C_a
 - L'attribution de C_b permet de trouver C_a : C_b doit en effet corrélérer avec des protons méthyles H_a (HMBC + HSQC: $C_a - H_a$)

- ❖ Attribution de la jonction bicyclic aromatique - quinuclidine (aza-bicyclo[2.2.2]octane)
 - On utilise $H_g - C_k$ pour trouver C_j , confirmer cette attribution en cherchant $H_k - C_g$ (HMBC + HSQC) ainsi que $H_k - C_i$
 - H_l et C_l seront attribués en se basant sur la corrélation $H_k - H_l$ dans la COSY, puis $H_l - C_l$ sur la HSQC

- ❖ Un second point d'entrée sur le bicyclic quinuclidine sera obtenu en attribuant les noyaux du groupe vinylique
 - Le groupe vinyl sera identifié en cherchant le carbone C_t , le seul carbone CH_2 déblindé (à ce stade, l'ensemble des carbones quaternaires ont été attribués)
 - Attribuer H_t (HSQC)
 - C_r : $H_t - C_r$ (HMBC) puis H_r à partir de la HSQC
 - La HMBC permet également d'attribuer C_s : $H_t - C_s$
 - Vérifier C_s en utilisant $C_s - H_s$ (HSQC) et $H_s - H_t$ sur la COSY

- ❖ Attribution des noyaux du bicyclic quinuclidine
 - On utilisera préférentiellement la COSY (agrandissement 0,7-3,7 ppm) car certaines corrélations sont absentes sur les spectres carbone. On confirmera les attributions sur la base des spectres carbones, en particulier pour vérifier C_p .
 - Attribuer les deux H_m à partir de H_l (COSY) (Note : la corrélation $H_m - C_m$ est absente sur le spectre HSQC)
 - Les deux H_q seront trouvés à partir de H_r (COSY)
 - A ce stade, il est utile de revenir aux spectres carbone
 - 3 corrélations HMBC sont disponibles à partir de H_s : elles correspondent aux carbones C_p , C_q et C_r . H_q et H_r sont en principe connus, ce qui permet de confirmer leurs attributions.
 - H_q permet de trouver C_n (HMBC) puis la paire de H_n (HSQC)
 - La corrélation $H_n - H_o$ est forte sur le spectre COSY

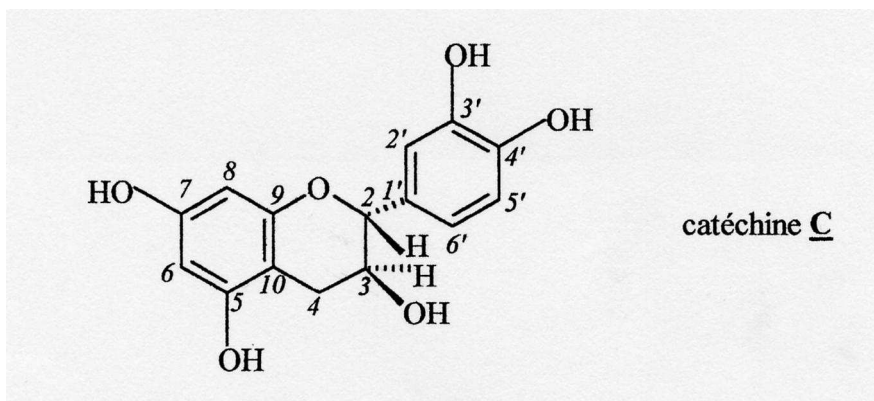
Tableau d'attribution

Carbone N°	type	attribution
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14	CH ₃	a
15		
16		
17		
18	CH	p
19		
20		

Attribution des résonances de la catéchine (C)

1) La Figure Ia présente les expansions des différents signaux du spectre RMN ^1H d'une solution de Catéchine (notée *C* par la suite) (enregistré à 500 MHz dans le méthanol CD_3OD). La Figure Ib présente la modification des signaux lors de l'irradiation sélective de la résonance à 4,02 ppm.

Attribuer les différents signaux.



2) Si l'on enregistre le spectre dans du DMSO- d_6 , 5 nouveaux signaux apparaissent : 4 singulets intégrant chacun pour un proton (vers 9 ppm) et un doublet intégrant pour un proton vers 5 ppm.

Interpréter l'apparition de ces signaux et la multiplicité observée.

3) Le spectre ^{13}C de *C* en solution dans le DMSO- d_6 est présenté sur la Figure II (J modulation par écho de spin). La carte de corrélation $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ est présentée sur la Figure III.

Attribuer les différents signaux ^{13}C .