

# > La RMN d'échantillons (semi)solides

Guilhem Pagés

#### INRAO

# > La RMN à l'INRAE de Theix

#### Moyens matériels

*in cellulo* 9.4T

*in vivo* rongeur 11.7T

*in processo* 4.7T



**Polariseur** 

*In situ* 0.3T





Cours RMN du solide L3 2020/21 G. Pagés / 19/11/2020

# > Quelques axes de recherche

- Quantité diffusion du sel dans les aliments
- > Effet du process sur le produit (cuisson pomme par exemple)
- Développement d'un capteur RMN pour mesurer les flux dans les plantes in situ
- > Etude d'IRMf en lien avec l'aliment



#### INRAO

> Quelques rappels sur la RMN

# > Principe de la RMN

- > Spectroscopie de noyaux ayant des spins non-nul
- Mis dans un champ magnétique intense, aimantation macroscopique
- Excitation du système et observation du retour à l'équilibre



### > Quels atomes observer

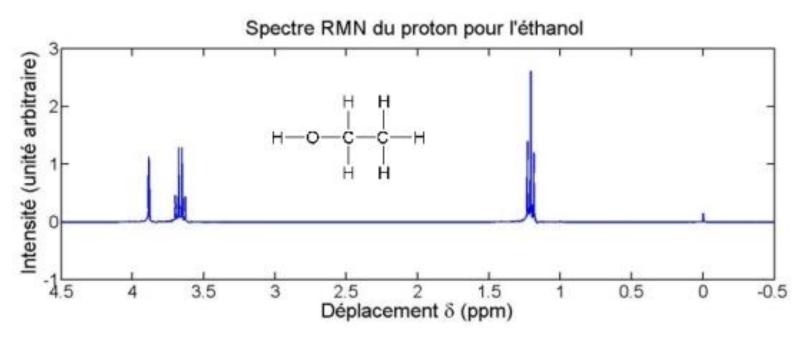
- > Sensibilité dépend de
  - Le rapport gyromagnétique
  - L'abondance naturelle de l'isotope

Noyaux	γ (x10 <sup>6</sup> rad.s <sup>-1</sup> .T <sup>-1</sup> )	Abondance naturelle (%)
<sup>1</sup> H	267,5	99,99
<sup>19</sup> F	251,7	100
31 <b>p</b>	108,3	100
13 <b>C</b>	67,3	1,1



# > Interprétation d'un spectre RMN

- > Information à exploiter
  - \* Les déplacements chimiques
  - La multiplicité des signaux
  - L'intégrale (l'aire) des signaux





#### INRAO

> Quelques notions théoriques

# > Isotropie & RMN

> Isotropie = invariance des propriétés dans toutes les directions

#### > En RMN

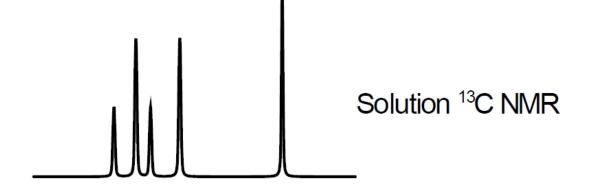
- Mouvements moléculaires rapides par rapport aux variations de toutes les interactions ressenties
- Même probabilité d'orientation



# > Isotropie & RMN

Spectre <sup>13</sup>C

Isotrope



Anisotrope



Spectre non-exploitable



# > Interactions entre spins

- > Interactions externes
  - $\Leftrightarrow$  Effet Zeeman (champ magnétique  $B_0$ )
- > Interactions internes
  - Dipôle-dipôle
  - De déplacement chimique
  - De couplage J
  - quadripolaires

Faible participation

$$\widehat{H} = \widehat{H_z} + \widehat{H_D} + \widehat{H_{CS}} + \widehat{H_J} + \widehat{H_Q}$$



# > Interaction dipolaire

> Influence du moment magnétique d'un dipôle i sur le moment magnétique du dipôle j

$$\widehat{H_{D}} = \frac{\mu_{0}}{4\pi} \sum_{i < j} \gamma_{i} \gamma_{j} \hbar r_{ij}^{-3} \left[ \widehat{\mathbf{I}_{i}} \bullet \widehat{\mathbf{I}_{j}} - 3 \left( \widehat{\mathbf{I}_{i}} \bullet r_{ij} \right) \left( \widehat{\mathbf{I}_{j}} \bullet r_{ij} \right) r_{ij}^{-2} \right]$$

r = distance entre les noyaux i et j

 $\mu_0$  = perméabilité du vide

ħ = constante de Planck

I = vecteur opérateur



# > Interaction dipolaire

> Après quelques calculs et approximations

$$\widehat{H_D^{ij}} = -2\pi\hbar d_{ij} \left( \frac{3\cos^2\beta - 1}{2} \right) \left( 3\widehat{I_{iz}}\widehat{I_{jz}} - \widehat{I_i}\widehat{\bullet I_k} \right)$$

 $\beta$  = angle entre le vecteur et le champ magnétique  $B_0$   $d_{ij}$  = Couplage direct dipolaire



- > Anisotropie de déplacement chimique
  - > CSA: δ dépend de l'orientation des molécules
    - Caractère tensoriel du blindage

$$\widehat{H_{CS}} = -\hat{I} \cdot \hat{\hat{S}} \cdot \overrightarrow{B_0}$$

S = tenseur d'écran 
$$\begin{bmatrix} \sigma_{xx} & \sigma_{xy} & \sigma_{xz} \\ \sigma_{yx} & \sigma_{yy} & \sigma_{yz} \\ \sigma_{zx} & \sigma_{zy} & \sigma_{zz} \end{bmatrix}$$



- > Anisotropie de déplacement chimique
  - > Isotropie

$$\widehat{H_{CS}} = -\sigma_i \omega_0 \widehat{I_z}$$

> Anisotropie

$$\widehat{H_{CS}} = -\sigma_i \omega_0 \widehat{I_Z} - \frac{1}{2} (3\cos^2 \beta - 1) (\sigma_{ZZ} - \sigma_i) \omega_0 \widehat{I_z}$$

 $\beta$  = Angle entre  $\mathbf{B}_0$  et le système d'axes principal du tenseur d'écran



# > Anisotropie de susceptibilité magnétique

- > Variation locale de l'aimantation
- > Aimantation si la susceptibilité est uniforme

$$\overrightarrow{M} = \chi \overrightarrow{H_0}$$
  $M = aimantation$   $H_0 = champ magnétique uniforme  $\chi = susceptibilité magnétique$$ 

$$\overrightarrow{B_0} = \left(\overrightarrow{M} + \overrightarrow{H_0}\right)\mu_0 = \left(1 + \chi\right)\mu_0\overrightarrow{H_0}$$



#### > Anisotropie de susceptibilité magnétique

> Aimantation avec une anisotropie de susceptibilité

$$\Delta H = \left(\frac{4\pi}{3} - \alpha_c\right) \chi_v H_0$$

 $\alpha_c$  = facteur numérique  $\Delta H = \left(\frac{4\pi}{3} - \alpha_c\right) \chi_v H_0 \quad \chi_v = \text{susceptibilité magnétique de volume}$ 

Variation de susceptibilité magnétique pour un échantillon en rotation

$$\Delta \chi = \frac{\Delta H}{H_0} = \left[ -\frac{4\pi \chi_v \left(3k_g - 1\right)}{3} \right] \left[ \frac{3\cos^2\theta - 1}{2} \right]$$

 $k_q$  = facteur géométrique  $\theta$  = angle entre  $\mathbf{B}_0$  et axe de rotation



#### > Annuler ces interactions

#### Responsables de l'élargissement spectral

$$\widehat{H_D^{ij}} = -2\pi\hbar d_{ij} \left( \frac{3\cos^2\beta - 1}{2} \right) \left( 3\widehat{I_{iz}}\widehat{I_{jz}} - \widehat{I_i}\widehat{\bullet I_k} \right)$$

$$\widehat{H_{CS}} = -\sigma_i \omega_0 \widehat{I_Z} - \frac{1}{2} (3\cos^2 \beta - 1) (\sigma_{ZZ} - \sigma_i) \omega_0 \widehat{I_Z}$$

$$\Delta \chi = \frac{\Delta H}{H_0} = \left[ -\frac{4\pi \chi_v \left(3k_g - 1\right)}{3} \right] \left[ \frac{3\cos^2\theta - 1}{2} \right]$$



#### > Annuler ces interactions

> Cas idéal (vitesse de rotation infinie)

$$\theta = 54.7^{\circ} \quad (3\cos^2\theta - 1) = 0$$

> Annulation de tous les termes d'anisotropie

Propriétés d'un spectre isotrope



# > Un peu d'histoire...

#### Removal of Dipolar Broadening of Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Solids by Specimen Rotation

E. R. Andrew

A. Bradbury

R. G. EADES

NATURE

June 27, 1959 Vol. 183

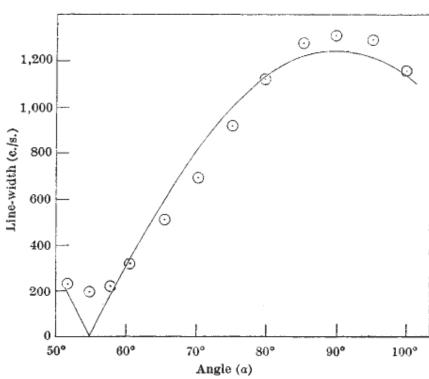


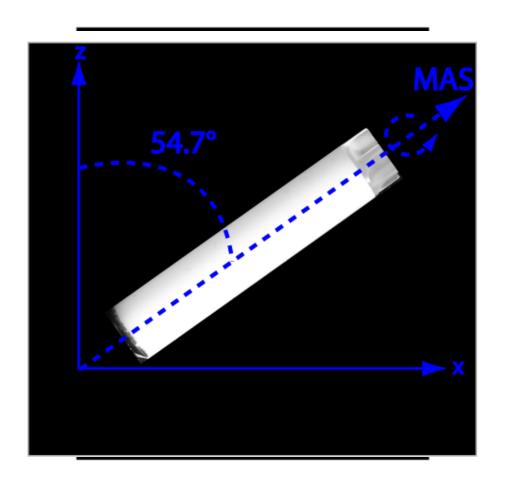
Fig. 1. Variation of line-width of the sodium-23 resonance spectrum of a rotating crystal of sodium chloride with the angle a between the axis of rotation and the direction of the applied field. The full line is the theoretical curve for a spectrum broadened solely by dipolar interactions; the circles are the experimental observations



#### INRAO

> Mise en œuvre expérimentale

# > En pratique





# > Echantillons solides vs hétérogènes

- Solides
- Fortes anisotropies
- Spectroscopie de noyaux X
- Besoin d'augmenter le signal RMN

- Hétérogènes
- Anisotropie dipolaires pas assez moyénnée
- Vitesse de rotation faible
- ❖ Séquence RMN ¹H classique



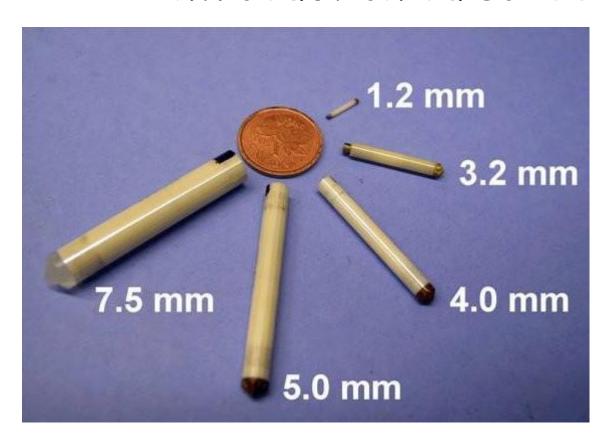


RMN HRMAS



#### > L'échantillon

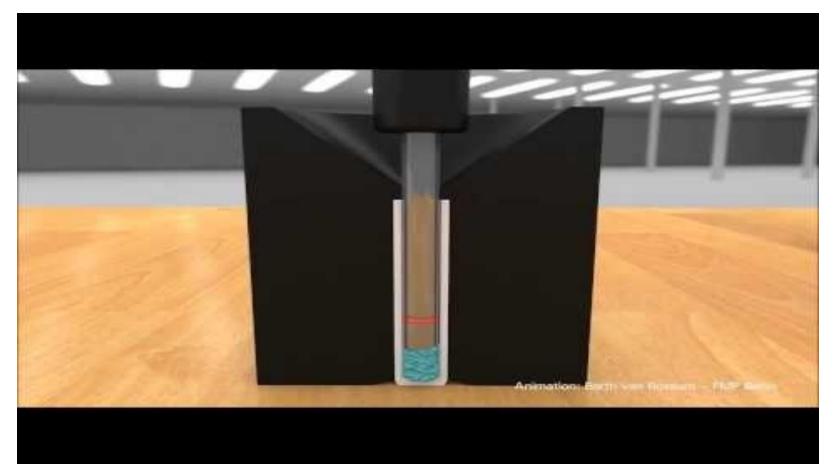
> Introduction du solide dans un rotor



Aujourd'hui rotor de 0.7 mm!

#### > L'échantillon

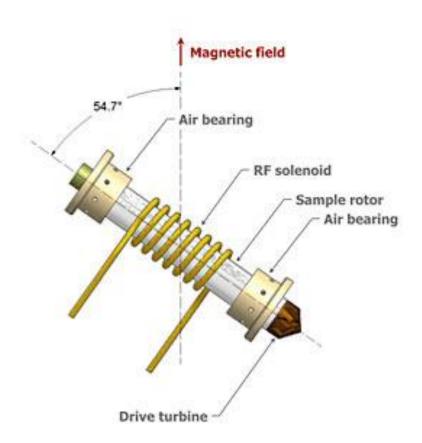
> Introduction du solide dans un rotor

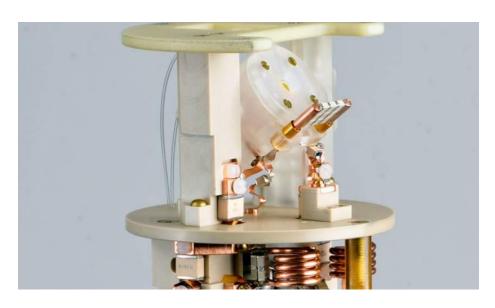




#### > Rotation de l'échantillon

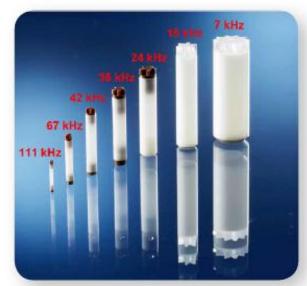
 $\triangleright$  Grâce à un flux d'air (ou d'N<sub>2</sub>)





#### > Rotation de l'échantillon

- > Vitesse de rotation =  $f(\emptyset_{rotor})^{-1}$
- > Quelques ordres de grandeur
  - ❖ HRMAS: rotor 4 mm, SR ~5 kHz
  - \* MAS: rotor 2.5 mm, SR 25 kHz
    - rotor 1.2 mm, SR 60 kHz
    - rotor 0.7 mm, SR 111 kHz



# > Optimisation des séquences d'impulsions

- > Découplage
  - Besoin d'éliminer des interactions dipolaires larges (kHz)
- > Augmenter la sensibilité
  - ❖ Transfert de l'aimantation d'un noyau vers un autre (¹H vers ¹³C par ex.)
  - Technique nommée polarisation croisée

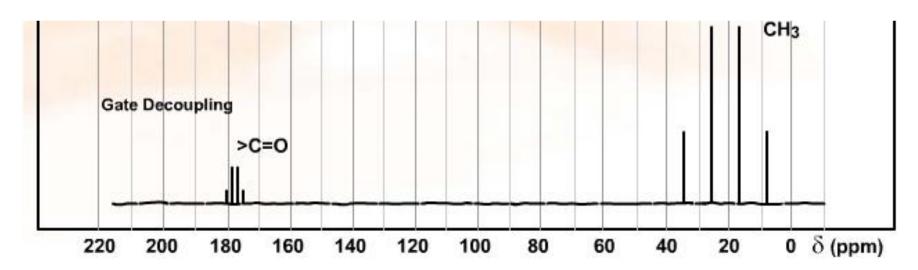


# > Découplage

- Rappel: il existe un couplage J entre des spins proches
- Problématique lorsqu'on regarde des noyaux X



# > Découplage





- > Possible si
  - Système contient beaucoup de spin
  - Couplages dipolaires forts
- > Dit autrement
  - ❖ Présence de ¹H
  - Echantillon solide



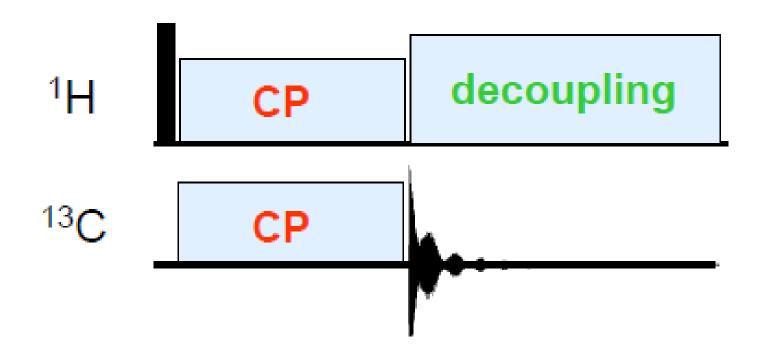
#### > Principe

- Aimantation bloquée sur l'axe de rotation (spin-lock)
- Conditions expérimentales pour que les énergies entre les niveaux de populations soient égales pour les 2 noyaux
- L'aimantation peut alors être échangée



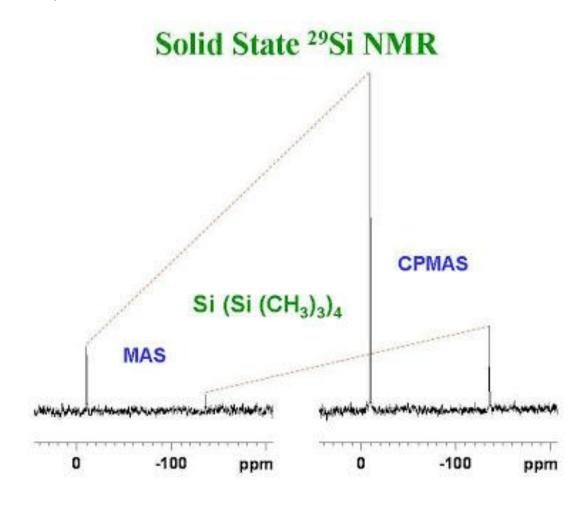


> En pratique





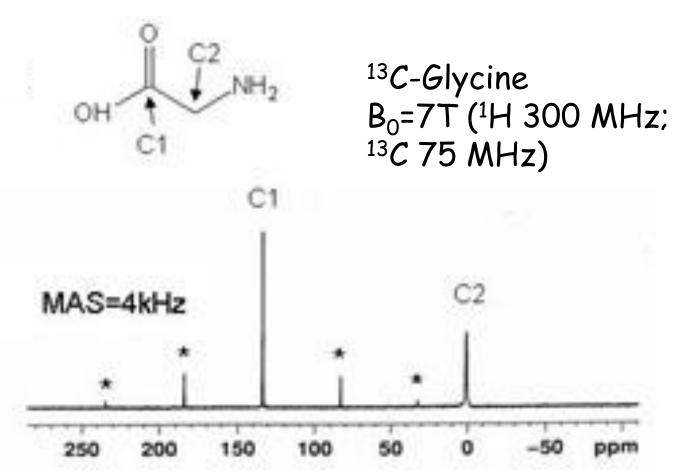
#### > Exemple





# > Rotation et spectre RMN

> Présence de bandes de rotation





#### INRAO

> Premier exemple: RMN HRMAS appliqué à la nourriture

Shintu L., Magn. Reson. Chem., 2004, 42, 396 Shintu L., J. Agric. Food Chem., 2005, 53, 4026

## > Echantillon intact de fromage

- > Fromage = échantillon « mou »
- But: mieux caractériser pour éviter des fraudes
  - Temps d'affinage
  - Provenance géographique
- > Cas du Parmigiano Reggiano



# > Préparation de l'échantillon

- > Fromage rapé
- > Ajout de D<sub>2</sub>0 tamponnée (mobilité)



## > Quelle information dans quelle partie de l'échantillon



# > Avantages de l'HRMAS

- Pas ou peu de préparation de l'échantillon
- Observation simultanée des fractions lipidiques et des petites molécules
- Excellente résolution spectrale (largeur à mi-hauteur de 20 Hz pour les acides gras et 2 Hz pour les molécules solubles)

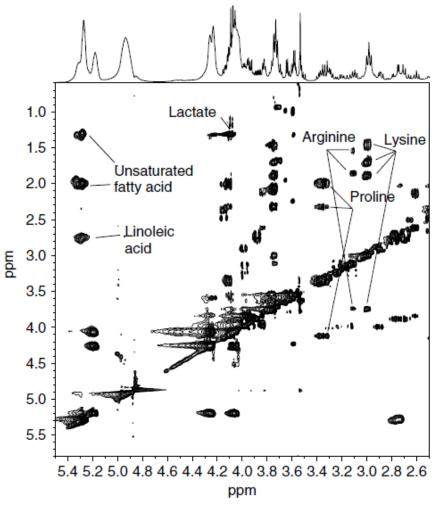


Identification possible

G. Pagés / 19/11/2020

## > Identification des métabolites

#### > RMN multidimensionnelle





## > Identification des métabolites

#### > RMN multidimensionnelle

Compound	Multiplicity	<sup>1</sup> H shift (ppm)	<sup>13</sup> C shift (ppm)	Assignment
Alanine	d	1.46	16	βCH <sub>3</sub>
	q	3.77	51	αCH
Arginine and citrulline	Unresolved	1.54	25	$\gamma CH_2$
	Unresolved	1.84	34	$\beta$ CH <sub>2</sub>
	t	3.11	39	δCH <sub>2</sub>
	Unresolved	3.74	55	αCH
Asparagine	dd	2.87	35	βCH
	dd	2.94	35	β'CH
	Unresolved	3.99	56	αCH
Aspartic acid	dd	2.70	37	$\beta$ CH
	dd	2.77	37	β'CH
	dd	3.87	56	αCH
Fatty acid	_	0.89	11	CH <sub>3</sub>
	_	1.27	30	CH <sub>2</sub>
	_	1.55	25	OCO-CH2-CH2
	_	2.21	3.4	OCO - CH <sub>2</sub>
Formic acid	5	8.42	Not detected	HCOX
Glutamic acid and glutamine	Unresolved	2.07	27	βCH
	dt	2.31	31	γCH;
	t	3.74	55	σCH
Glycine	5	3.52	42	αCH <sub>2</sub>
Isoleucine	d	0.98	17	$\delta CH_3$
	Unresolved	1.23	24	γCH
	Unresolved	1.44	24	y/CH
	m	1.95	36	βCH
	d	3.65	55	αCH
Lactate	d	1.30	20	$\beta CH_3$
	q	4.09	69	αCH
Leucine	d+d	0.93	19	$\delta CH_3 + \delta' CH_3$
	Unresolved	1.67	40, 25	$\beta$ CH <sub>2</sub> + $\gamma$ CH
				***

Compound	Multiplicity	<sup>1</sup> H shift (ppm)	13C shift (ppm)	Assignment
Serine	dd	3.84	56	αCH
	dd	3.95	60	CH
Threonine	Unresolved	1.31	20	$\gamma$ CH <sub>3</sub>
	d	3.59	60	αCH
	Unresolved	4.22	66	βCH
Triglyceride	_	4.06	62	CH <sub>2</sub> —α-glycerol
	_	4.26	62	CH <sub>2</sub> —α'-glycerol
	_	5.19	69	CH-glycerol
Tyrosine	dd	3.14	39	βCH
	dd	3.24	39	β'CH
	dd	3.98	60	αCH
	d	6.88	116	H ar
	d	7.16	130	H ar
Valine	d	0.95	17	$\gamma$ CH <sub>3</sub>
	d	1.00	18	y/CH <sub>3</sub>
	Unresolved	2.24	29	βCH
	d	3.59	60	αCH
Unsaturated fatty acid	_	1.29	20	CH <sub>2</sub>
	_	1.30	20	CH <sub>2</sub>
	_	1.94	24	$CH_2$ — $CH$ = $CH$ — $CH_2$
	_	1.98	27	CH2-CH=CH-CH2-
	_	5.28	128, 129	CH=CH
	_	5.33	130	CH-CH

8.42

2.07

2.31

3.74

Not detected

27

31

55

Formic acid			5
Glutamic acid and glu	tamine		Unresolved
			dt
			t
	77.00	120	

	t	7.30	129	C <sub>4</sub> H, ring
	dd + dt	7.37	129	$C_{2,6}$ , ring $+C_{3,5}$ , ring
Proline	m	1.95	24	yCH <sub>2</sub>
	m	2.03	29	βCH
	m	2.32	29	β'CH
	m	3.32	46	8CH
Pyroglutamic acid	m	3.39	46	8'CH <sub>2</sub>
	Unresolved	4.11	58	αCH
	Unresolved	2.01	33, 27	βCH
	Unresolved	2.37	30	CH <sub>2</sub>
	Unresolved	2.48	25	β'CH
	dd	4.15	58	αCH



HCOO

 $\beta$ CH

 $yCH_2$ 

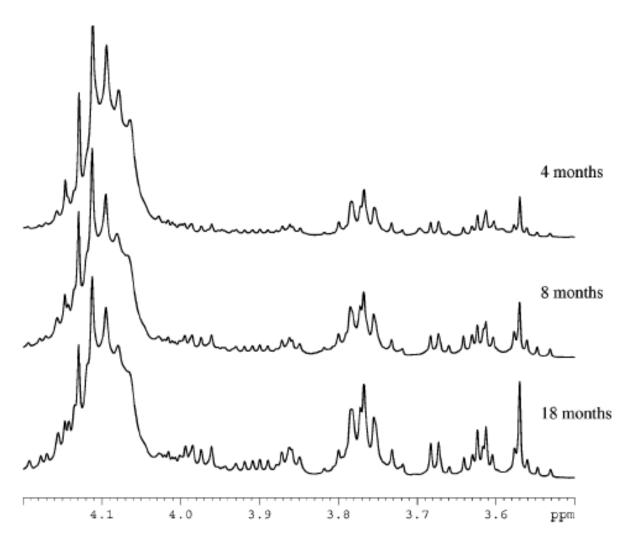
 $\alpha$ CH.

#### > Comment caractériser?

- > Métabolomique: étude de l'ensemble des métabolites (petites molécules)
  - Identification
  - Analyse statistique
  - Interprétation/Explication



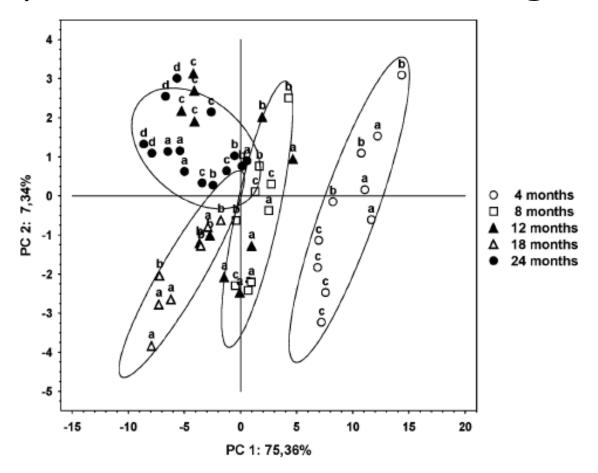
## > Echantillons de référence





# > Analyse statistique

## > Séparation des différents âges



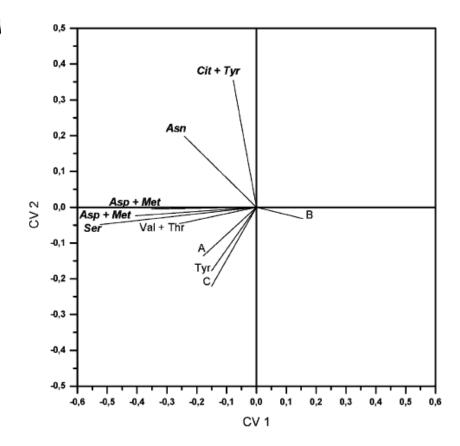


# > Analyse statistique

> Séparation des différents âges

> Métabolites responsables de cette

discrimination





#### INRAO

> Second exemple: RMN du solide et matériaux

H. Yeman, J. Sep. Sci., 2012, 35, 1585 Courtois C., Anal. Bioanal. Chem., 2008, 392, 451

## > Applications en RMN du solide

- > Semi-conducteurs
- > Verres
- > Complexes inorganiques
- Silicates
- > Bois
- > Protéines, ...



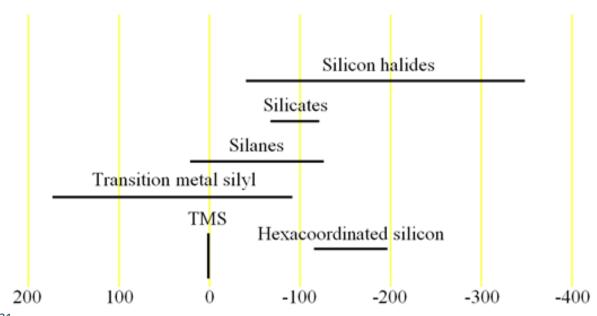
# > Les phases chromatographiques

- > Silices greffées
- > Polaires ou apolaires
- $\succ$  Longueur chaine carbonée ( $C_8$ ,  $C_{18}$ , ...)
- > Fonctions plus complexes (amino, ...)
- > Endcapped
  - Besoin de caractériser la phase stationnaire

### > RMN du <sup>29</sup>Si

$$> \gamma = -1/5 \, {}^{1}\text{H}$$

- > Abondance naturelle 4,7%
- $\succ$  Large échelle  $\delta$

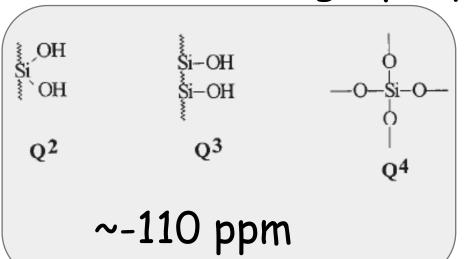


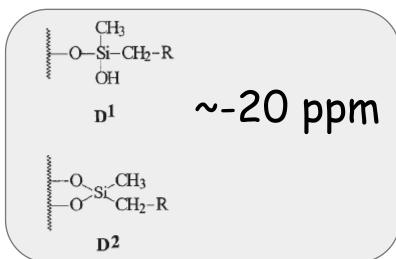
INRAe

p. 51

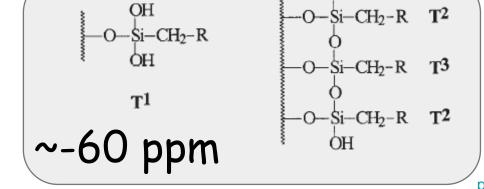
## > RMN du <sup>29</sup>Si

Les différents « Si » des phases chromatographiques





Pursch M., Solid State Nucl. Magn. Reson., 1997, 9, 191



## > Nouvelles phases stationnaires

> Greffage de cholestérol: phase stationnaire hautement ordonnée

HO

III

I- NaH, THF

2- Br

$$(I)$$
 $H_2PtCl_6/iPrOH$ 
 $(CH_3O)_3SiH$ 
 $(CH_3O)_3SiH$ 
 $(III)$ 

Silica

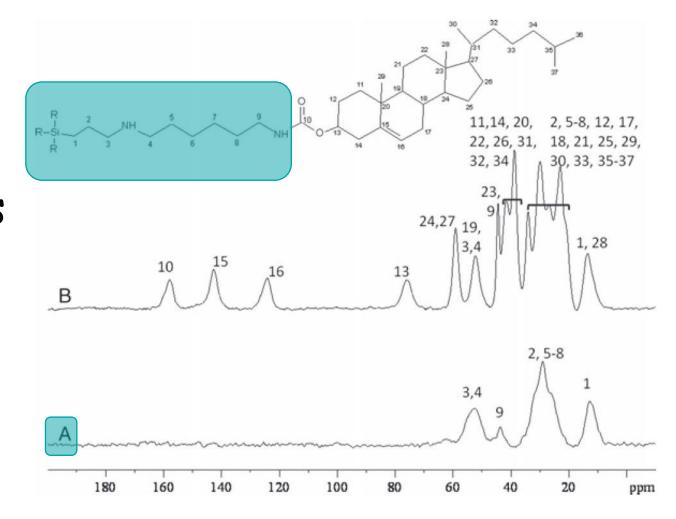
 $HCI, THF$ 
 $X = OSi \text{ or OMe}$ 



# > Attribution des signaux 13C

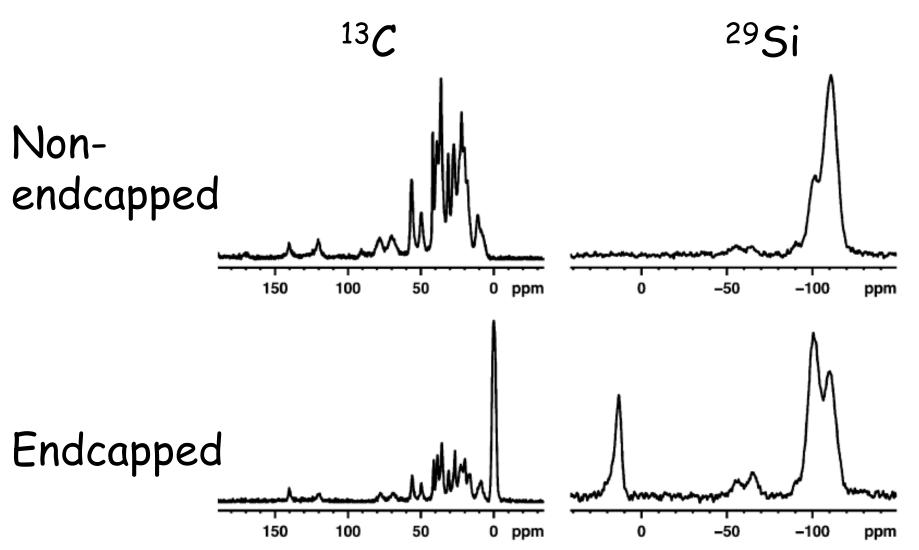


## Différents greffages





## > RMN du 13C et du 29Si

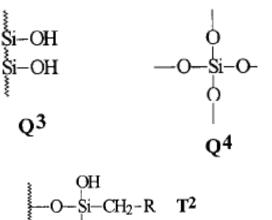


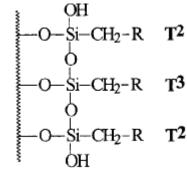


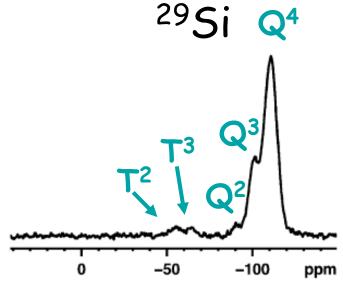
# > Interpréation des spectres <sup>29</sup>Si

OH Si OH

Non- Q<sup>2</sup> endcapped





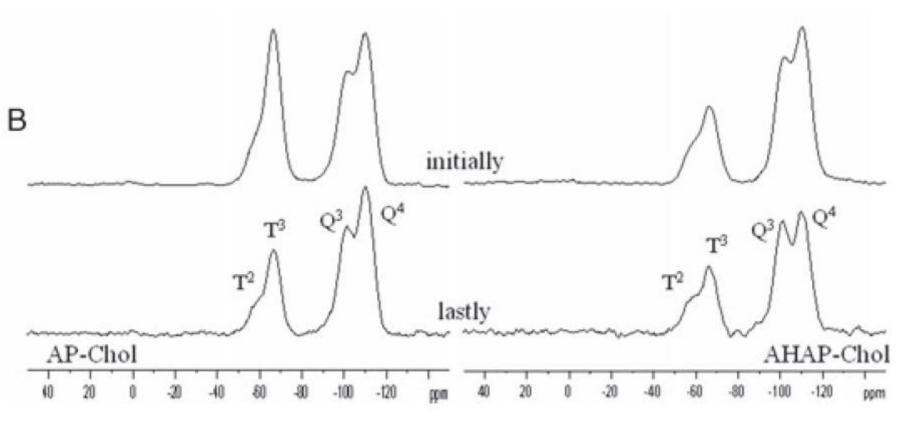


# Endcapping -50 -100 ppm

## Endcapped



## > Evolution de la colonne





#### Perte de liaisons



#### INRAO

> Résumé: les points importants

#### Les échantillons solides en RMN

- Apparition de différents types d'anisotropies, entrainant une forte dégradation du spectre RMN
- Pour moyenner à 0 ces anisotropies et retrouver un spectre RMN exploitable, rotation à l'angle magique



#### > Cas des échantillons mous

- > Rotation à vitesses faibles de l'échantillon (quelques kHz)
- Conditions expérimentales de la RMN du liquide (¹H, RMN nD classique)
- On parle de RMN HRMAS (high resolution magic angle spinning)



### > Cas des échantillons solides

- > Rotation à vitesses élevées de l'échantillon (dizaines de kHz)
- Observation de noyaux X. Besoin d'augmenter la sensibilité de l'expérience. Principalement découplage et polarisation croisée
- > On parle de RMN du solide ou MAS

