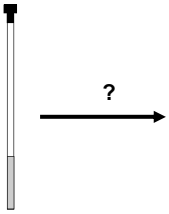
Universitat de Barcelona

Utilización combinada de experimentos 2D



Estrategias para la elucidación estructural

Spectral Interpretation

Universitat de Barcelona

General Process for Structure Elucidation of an Unknown

- **Normally the molecular formula is derived from a combination of ^{13}C NMR, DEPT and MS data.**
- **Using IR, UV and ^{13}C NMR the functional groups can be proposed**
- **^{1}H NMR coupling data or 2D NMR correlations are used to assemble substructures**
- **The substructures are then combined into 'working structures' using all possible combinations of the substructures**
- **Check structures for consistency with the 2D-NMR data and MS fragmentations *etc*.**
- **^{13}C chemical shifts of the surviving structure(s) are then compared with literature, database or predicted values to confirm the 2D structure of the molecule.**
- **To determine the relative stereochemistry of the molecule, ^{1}H coupling constant (*J*) and Nuclear Overhauser (NOE) data is used**

Need to Verify as early as possible if the structure has already been identified

- Don't want to waste time and effort re-discovering a compound
- Done by using a combination of molecular formula, substructure and chemical structure databases

Nat. Prod. Rep., 1999, 16, 241-248

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Experimentos básicos

Universitat de Barcelona

- Experimentos 1D
  - Protón
  - Carbono 13 –DEPT
- Experimentos 2D
  - gHSQC Correlación 1H-13C, identificación protones gemínales
  - Identificación de sistemas de spin
    - COSY
    - TOCSY
      - HSQC-TOCSY
  - Unión de subestructuras, asignación C cuaternarios
    - HMBC
    - H2BC
      - Inadecuate
  - Determinación estereoquímica
    - NOESY/ROESY
    - Análisis de los acoplamientos 1H-1H

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Estrategia/s

Universitat de Barcelona

Espectros 1H y 13C
Det multiplicidad y J

Experimentos correlación ^{1}H-^{13}C

Relacionar el ^{1}H con el ^{13}C

Experimentos de correlación ^{1}H-^{1}H Cosy

Identificar 1H diastereotopicos
Cosy /HSQC

Identificar subestructuras
Cosy/Tocsy

Determinar correlaciones ^{1}H-^{13}C
a larga distancia HMBC

Combinar subestructuras

Experimentos de NOESY/ROESY

Comprobar la consistencia de los estructuras propuestas con todos los datos de los experimentos 2D

En el Cosy las correlaciones a 2,3 o 4 enlaces pueden originar confusión

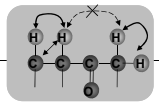
En el Tocsy no se pueden diferenciar las correlaciones a 2,3,4 o mas enlaces

En los exp de HMBC es difícil diferenciar las correlaciones a 2 y 3 enlaces (se requieren varios exp)

En los experimentos de Cosy y HMBC pueden faltar algunas señales de correlación ($^{3}J_{HH}$ y $^{3}J_{CH}$ pequeñas)

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Condiciones de adquisición I



Universitat de Barcelona

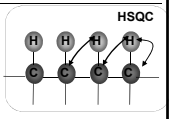
- **gCOSY y COSY 45 (muy sensibles)**
  Exp con gradientes
  Las señales fuera de la diagonal indican acoplamiento entre protones.
  Exp previo:
  at=0.3s d1=0.8s ni=128 nt=2 tiempo: 10 minutos
  Exp con más resolución y/o muestras diluidas
  at=0.3s d1=1s ni=256 nt=2-4 tiempo: 30 minutos.
  Procesado en valor absoluto, función de procesado sine-bell squared, predicción lineal 2*ni en F1

- gDQFCOSY (sensible)
  Filtro de doble cuanto (disminución intensidad de los singuletes)
  Las señales fuera de la diagonal indican acoplamiento entre protones.
  at=0.3s d1=1s ni=256-512 nt=2-4 tiempo: 30-60 minutos
  Experimento sensible a la fase, función de procesado gaussian o seno-cuadrado, predición lineal 2*ni en F1

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

HSQC, HSQCAD, gHSQC, gHSQCAD, HMQC y gHMQC

Universitat de Barcelona



Correlaciones ^{1}H-^{13}C a un enlace J_{1H-13C}=110-146 Hz

- **g**: Uso de gradientes para la selección de la transferencia de coherencia (reducción de sensibilidad √2)
- **AD**: Utilización de pulsos adiabáticos, compensan la dispersión de valores de J1H-13C y mejoran los pulsos de 180º

- gHSQC y gHSQCAD óptimos cuando se dispone de suficiente muestra como para que nt=1. El gHSQCAD con nt=2 es preferible cuando el exp es editado
- En el HSQC y sus variantes las señales en F1 son más "agudas" ya que se elimina el acoplamiento ^{1}H-^{1}H (en el HMQC no)
- EL HSQC es más sensible a los errores de los pulsos que el HMQC (tiene más pulsos de 180º). HMQC preferible en los equipos antiguos sin amplificadores lineales.
- Para compuestos de elevado peso molecular el HSQC es mejor que el HMQC ya que los tiempos internos de la secuencia son más pequeños

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Condiciones de adquisición (III)

Universitat de Barcelona

- **gHSQC/gHSQCAD (elevada sensibilidad)**
  - La relación de fases permite distinguir CH2 de CH/CH3
  - Exp previo:
  - at=0.1-0.3s d1=1s ni=128 nt=1-2 J1xh=146 Hz tiempo: 15-20 minutos
  - Exp con más resolución y/o muestras diluidas
  - at=0.1-0.3s d1=1s ni=200 nt=4-8 J1xh=146 Hz tiempo: 40-60 minutos.
  - Experimento sensible a la fase, función de procesado: gaussiana o sq-sinebell,
  - predicción lineal 2-4 *ni en F1➔ Mejora de la resolución
  - Ajuste sintonía, pulso de ^{1}H y ^{13}C en especial si la muestra tiene una fuerza iónica elevada

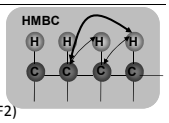
Con nuevas secuencias ASAPHMQC es posible hacer el experimento en sólo1-2 minutos

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

HMBC/gHMBCAD

Universitat de Barcelona

Correlaciones ^{1}H-^{13}C a larga distancia (2.3,4 enlaces)



- **Los delays de la seq dependen de la $1/J_{nxh}$**
  - Menor sensibilidad
  - Adquirido sin desacoplar ^{13}C (acoplamientos ^{13}C-^{1}H en F2)
  - Puede ser necesario adquirir varios experimentos para diversas J_{nxh} 3, 5 o 8 Hz

- gHMBC experimento en valor absoluto
  - Funcion de procesado sinebell en F1, F2
  - Predicción lineal 2*ni
    - Señales residuales de correlación a 1 enlace (doblete J_{H-13C})

- gHMBCAD experimento en fase en F1 y Valor absoluto en F2
  - Predición lineal 2*ni
  - Sqsinebell en F1 y sqcosine en F2

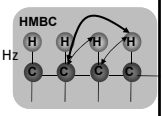
Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

HMBC Condiciones de adquisición

Universitat de Barcelona

Condiciones iniciales:

at=0.1-0.3s d1=1s ni=200-256 nt=2 J1xh=140 Hz Jnxh=8 o 5 Hz tiempo 1-2 horas por exp



- **Exp con más resolución y/o para muestras diluidas**
  - at=0.1-0.3s d1=1s ni=400 nt=4-8 J1xh=140 Hz Jnxh=8 o 5 Hz tiempo 2-3 horas.
  - Ajuste sintonía, y de los pulsos de ^{1}H y ^{13}C en especial si la muestra tiene una fuerza iónica elevada
  - No es posible distinguir las correlaciones en función del número de enlaces

Secuencias del tipo H2BC o CIGAR: filtros en función del número de enlaces

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

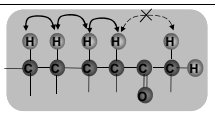
Tocsy/zTocsy

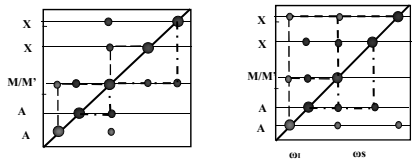
Universitat de Barcelona

- **Determinar sistemas de acoplamiento**

  Peptidos, polisacaridos

- **Resolver ambigüedades del COSY**





Condiciones

at=0.100-0.200s d1=1 ni=256 nt=2 mix=0.7-0.100

tiempo: 30-40 minutos

Experimento en fase; función de procesado: gaussiana

Predicción lineal ni*2

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

NOESY / ROESY

Universitat de Barcelona

- Determinar relaciones espaciales

  Protones próximos en el espacio (acoplamiento dipolar)

  - NOESY

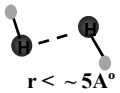
    Moléculas pequeñas: SC signo contrario que SD (NOE +)

    Moléculas grandes: SC y SD de igual signo (NOE -)

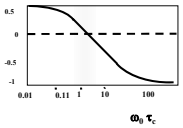
    Moléculas medianas (aprox 800-1600 Da) NOE≈0

  - ROESY

    SC signo contrario que SD. Independiente del tamaño



r < ~ 5Aº



Condiciones

at=0.100-0.200s d1=1 ni=256 nt=4-8 tiempo: 3-4 horas

Noesy mix=0.100-1.0 s

Roesy (mix=0.100- 0.300s)

Depende del tamaño del compuesto

Experimento en fase; función de procesado: gaussiana

Predicción lineal ni*2- 4

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

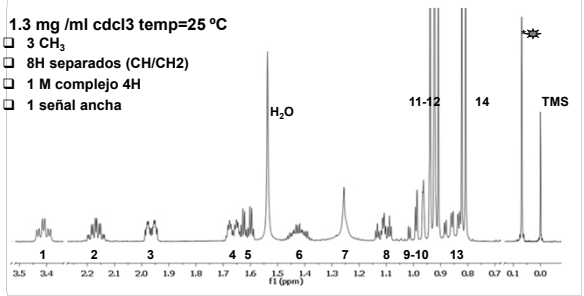
Pasos previos: Espectro de 1H

Universitat de Barcelona

Determinación del número de 1H y de su desplazamiento

1.3 mg /ml cdcl3 temp=25 ºC

- **3 CH_3**
- **8H separados (CH/CH2)**
- **1 M complejo 4H**
- **1 señal ancha**



Análisis elemental/masas/espectro de ^{13}C

U=C+1-1/2(H+X-N)

$C_{10}H_{20}O$

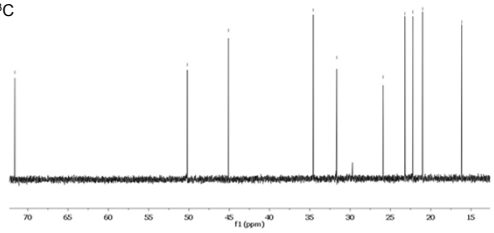
→ **1 insaturación/ciclo**

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Espectro de 13C

Universitat de Barcelona

^{13}C



Conveniente pero no imprescindible

1.3 mg/ml
- ^{13}C nt=10240 acumulaciones → 5h 46 minutos
- gHSQCAD nt=8 ni=128 LP = ni x 2 → 45 minutos

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Universitat de Barcelona

Importante: Recopilar la información disponible

- Comprobar que se han incluidos todos los datos disponibles

-Revisar las listas de desplazamientos y asegurar su concordancia

- **3 CH_3**
- **8H separados (CH/CH2)**
- **1 M complejo 4H**
- **1 señal ancha**

- **10 carbonos**
- **No hay C cuaternarios**
- **$C_{10}H_{20}O$ Molécula sin simetría**

- **1 Insaturación**

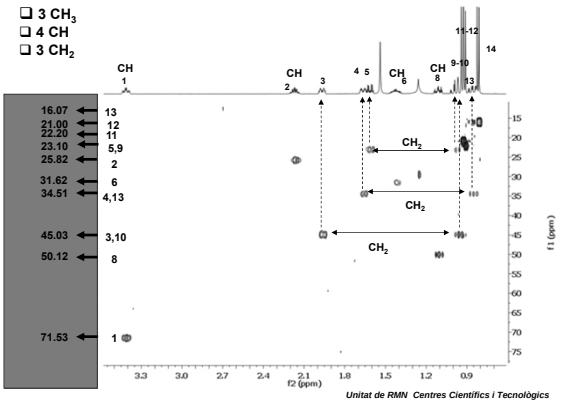
- **Hay un O y 1H y un 13C a campos bajos → RCHOR**

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Espectro gHSQCAD

Universitat de Barcelona

- **3 CH_3**
- **4 CH**
- **3 CH_2**



Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Tabla de desplazamientos químicos

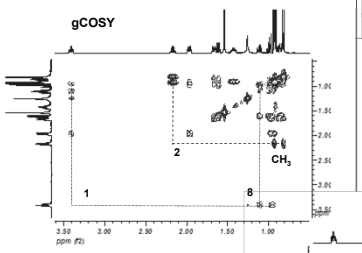
Universitat de Barcelona

ID	δ ^{1}H	δ ^{13}H	#H		multiplicidad	Acoplamientos Hz
1	3.41	71.53	1	CH	dt	10.4x2, 4.3
2	2.17	25.82	1	CH	ds[a]	7.1x6, 2.9
3	1.97	45.03	1	CH2	dddd	12.1, 3.8x2, 2.1
4	1.66	34.51	1	CH2	dddd	3.4x2, 6.1, 12.4
5	1.61	23.10	1	CH2	dq	12.9, 3.3x3
6	1.43	31.62	1	CH	m	multiplete complejo)
7	1.35	–	--	--	--	----
8	1.11	50.12	1	CH	dddd	12.1, 10.3, 3.2x2
9	0.97	23.10	1	CH2	m	------
10	0.95	45.03	1	CH2	m	--------
11	0.92	21.00	3	CH3	d	7.4
12	0.91	22.20	3	CH3	d	6.9
13	0.84	34.51	1	CH2	dddd	12.4x2, 3.2, 1.1
14	0.81	16.07	3	CH3	d	7.1

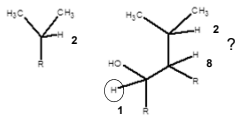
Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Correlaciones homonucleares Cosy/Tocsy

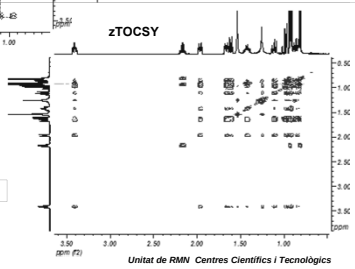
gCOSY



nt=4 ni=128 LP=nix2



zTOCSY



1->3,4,5,6,7,8

mixT=0.8s nt=4 ni=256 LP=nix2

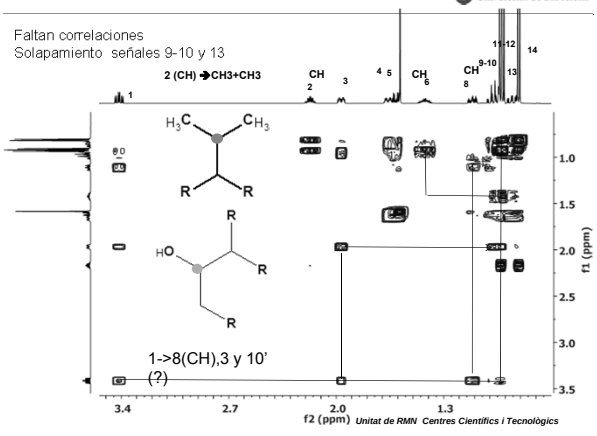
Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

COSY

Universitat de Barcelona

Faltan correlaciones
Solapamiento señales 9-10 y 13

2 (CH) → CH3+CH3



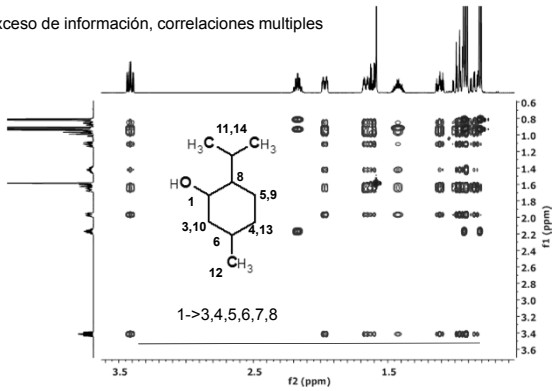
1->8(CH),3 y 10' (?)

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

TOCSY

Universitat de Barcelona

Exceso de información, correlaciones multiples

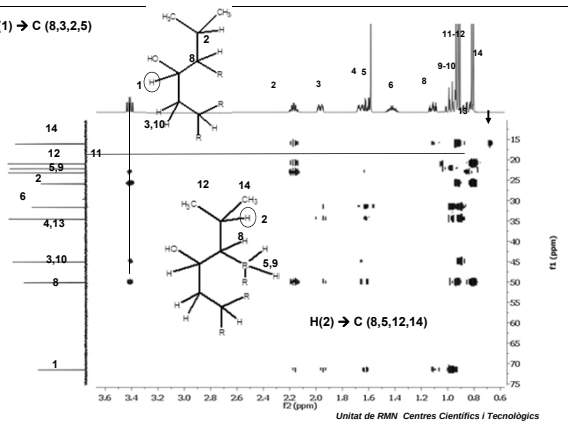


Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Correlaciones 1H-13C a larga distancia

Universitat de Barcelona

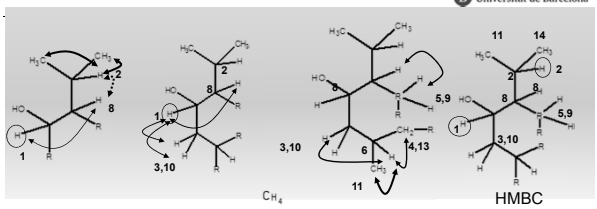
H(1) → C (8,3,2,5)



Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Identificación de fragmentos del esqueleto

Universitat de Barcelona

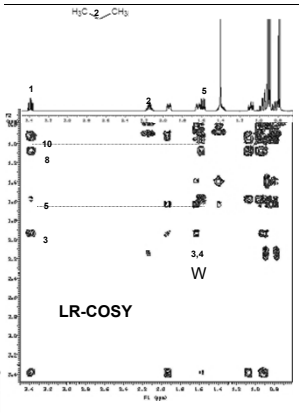


- No siempre se ven todas las correlaciones ^{1}H-^{1}H
  - JHH pequeñas
  - Solapamiento de señales
- Las correlaciones 1H-13C a larga distancia pueden ser confusas (2-3)
- Las ambigüedades se pueden solventar con exp complementarios
  - LRCosy, Cosy45
  - HMBC a dif Jnxh
  - H2BC.....

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

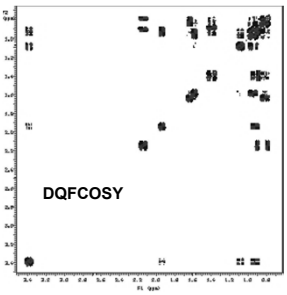
Otros experimentos

Universitat de Barcelona



Incremento de la resolución

Posibilidad de ver correlaciones debidas a J pequeñas



Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

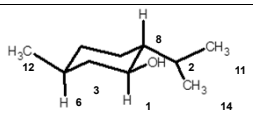
Determinación de la estereoquímica

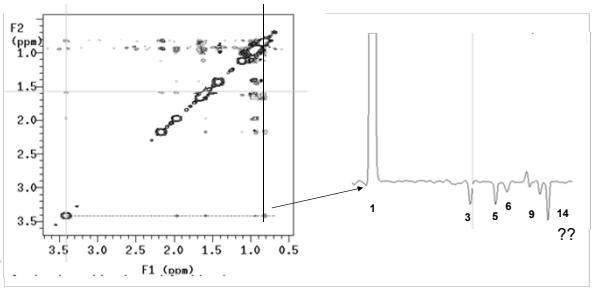
Universitat de Barcelona

NOE/ROESY

Baja Sensibilidad

MW < 300





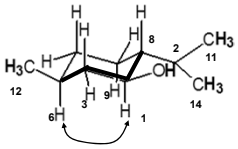
Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

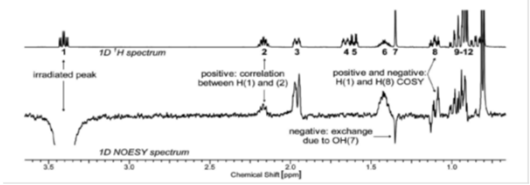
Determinación de la estereoquímica

Universitat de Barcelona

- **NOE1D**

Recomendable para MW pequeño
Es más fácil diferenciar señales
Limite de Noe menor



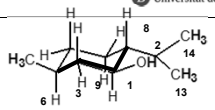


Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Valores de las Constantes de acoplamiento 1H-1H

Universitat de Barcelona

ID	δ ^{1}H	Acoplamientos Hz
1	3.41	10.4x2, 4.3
2	2.17	7.1x6, 2.9
3	1.97	12.1, 3.8x2, 2.1
4	1.66	3.4x2, 6.1, 12.4
5	1.61	12.9, 3.3x3
6	1.43	multiplete complejo)
7	1.35	----
8	1.11	12.1, 10.3, 3.2x2
9	0.97	------
10	0.95	--------
11	0.92	7.4
12	0.91	6.9
13	0.84	12.4x2, 3.2, 1.1
14	0.81	7.1

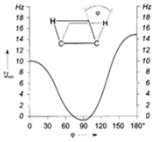


Acoplamiento vecinal ^{3}J(H,H)

- ángulo diedro
- electronegatividad del sustituyente

J_{AX}= 8-14

J_{BX} =2-4



J_{AX}= 2-4

J_{BX} =2-4

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

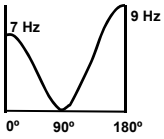
Constantes de acoplamiento 1H-13C

Universitat de Barcelona

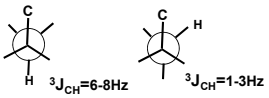
Acoplamientos C-H a tres enlaces

Dependencia de la disposición

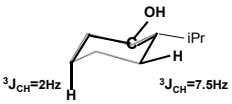
Relación de Karplus para sistemas alifáticos



$^3J_{CH}$= 3.6cos^{2}θ-1.0 cos θ+4.3

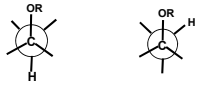


$^3J_{CH}$=6-8Hz $^3J_{CH}$=1-3Hz

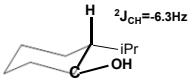


$^3J_{CH}$=2Hz $^3J_{CH}$=7.5Hz

Acoplamientos C-H a dos enlaces



$^2J_{CH}$=0-2Hz $^2J_{CH}$=5-7Hz



$^2J_{CH}$=-6.3Hz

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

NMR Spectroscopy

Universitat de Barcelona

Proposed Structure Needs to Be Consistent with ALL the observed data

- missing peak predicted by the structure may indicate a wrong structure.

Original Structure

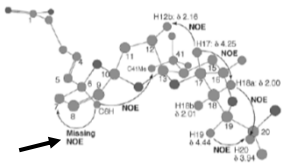


Figure 2. Original assignment of the (6S*,10R*,13R*,14S*,16S*,17S*,19R*,20S*)-A−D rings of AZA-1 and key NOEs.[1,8]

Corrected Structure

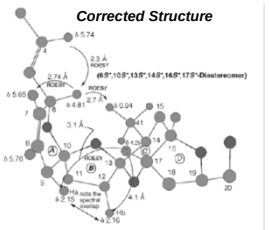


Figure 3. Minnesota structural model of the (6S*,10S*,13S*,14S*,16S*,17S*)-C3−C20 truncated domain of **1**.[3] The natural product has been assigned the enantiomeric configuration.[5]

Org. Lett., Vol. 6, No. 23, 2004

Assignment change resolved missing NOE problem

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

NMR Spectroscopy

Universitat de Barcelona

Validate or Verify Accuracy of Structure by Consistency with Databases

¿ is the structure and experimental chemical shift assignments consistent with *predicted* chemicals shifts based on the experimental structures?

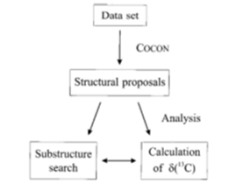
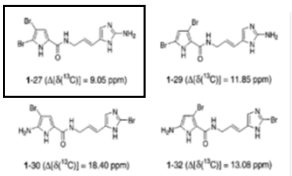


Figure 1. General scheme for a systematic analysis of natural products based on NMR spectroscopic data as presented in this contribution.

Correct Structure



J. Chem. Inf. Comput. Sci. **2002**, *42*, 241-248

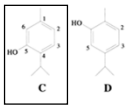
Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

NMR Spectroscopy

Universitat de Barcelona

Validate or Verify Accuracy of Structure by Consistency with Databases
¿is the structure and experimental chemical shift assignments consistent with *predicted* chemicals shifts based on the experimental structures?

Correct Structure →



(a) ^{1}H NMR calculated shifts.

Experimental shifts	Calculated shifts (Table 3.10) C	Calculated shifts (Table 3.10) D	Computer calculated shifts ACD[12] C	Computer calculated shifts ACD[12] D
6.71	H2 = 6.53	H3 = 6.56	H2 = 6.55	H3 = 6.53
7.07	H3 = 6.89	H2 = 6.86	H3 = 6.97	H2 = 6.81
6.53	H6 = 6.42	H5 = 6.45	H6 = 6.68	H6 = 6.42
2.25			Me = 2.38	Me = 2.12

(b) ^{13}C NMR calculated shifts.

Experimental shifts	Calculated shifts (Table 3.11) C	Calculated shifts (Table 3.11) D	Computer calculated shifts ACD[12] C	ACD[12] D	SoftShell[9] C	SoftShell[9] D
136.6	C1 = 135.8 ✓	C4 = 146.6	C1 = 137	C4 = 148	C1 = 136	C4 = 147
121.9	C2 = 121.0	C3 = 118.3	C2 = 122	C3 = 120	C2 = 122	C3 = 119
126.3	C3 = 127.1 ✓	C2 = 130.1	C3 = 118	C2 = 131	C3 = 128	C2 = 130
131.7	C4 = 132.4 ✓	C1 = 121.6	C4 = 132	C1 = 122	C4 = 133	C1 = 122
152.5	C5 = 152.6	C6 = 155.3	C5 = 151	C6 = 153	C5 = 155	C6 = 158
116.3	C6 = 115.6	C5 = 112.9	C6 = 115	C5 = 113	C6 = 116	C5 = 113
20.8			Me = 22	Me = 15	Me = 21	Me = 15

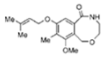
Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

NMR Spectroscopy

Universitat de Barcelona

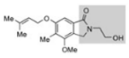
Numerous Examples of Incorrect Structures in the Literature

Example:



porritoxin
Suemitsu et al. (1992)[16]

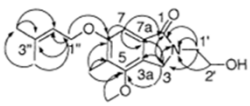
Incorrect



2D NMR experiments
Horiuchi et al. (2002)[17b]

Verified by total synthesis

Correct



key HMBC correlations

Table 1. NMR Assignments for Porritoxin (**1**) in DMSO-d_6

position	δ_H	δ_C	δ_N	COSY
1		168.4		
2			120.0	
3	4.63	50.0		
3a		133.2		
4		154.2		
4-OMe	3.87	60.2		
5		121.8		
5-Me	2.09	10.6		
6		158.6		
7	6.97	101.5		
7a		124.2		
1'	3.54 (t 5.5 Hz)	45.8		
2'	3.60 (m 5.0, 5.5 Hz)	60.4		H-2'-OH
2'-OH	4.82 (t 5.0 Hz)			H-2'
1"	4.58 (d 6.5 Hz)	66.3		H-2", H-3"-Me, H-4"
2"	5.42 (t 6.5 Hz)	121.1		H-1", H-3"-Me, H-4"
3"		138.2		
3"-Me	1.72	19.3		H-1", H-2"
4"	1.75	26.6		H-1", H-2"

Angew. Chem. Int. Ed. 2005, 44, 1012 – 1044

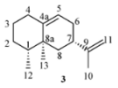
Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

NMR Spectroscopy

Universitat de Barcelona

Numerous Examples of Incorrect Structures in the Literature

- coupling correlation not always sufficient to properly determine a structure
- NOEs can provide critical correlations that are not evident simply from coupling



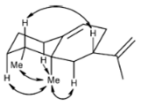


Table 1. NMR Data for Compound **3**[a]

position	proton[b]	δ/H	COSY	NOESY	δ/ppm C	HBMC
1	H-1	1.64 (m)	H-2, H-2′, H-12	H-7, H-6	38.71	H-2, H-2′, H-9′, H-13
2	H-2	1.49 (m)	H-1, H-2′, H-3′		31.40	H-12
	H-2′	1.39 (m)	H-1, H-2, H-3, H-3′	H-13		
3	H-3	1.76 (m)	H-3′, H-4′		29.26	H-2′, H-4′
	H-3′	1.28 (m)	H-2, H-2′, H-3, H-4, H-4′			
4	H-4	1.90 (m)	H-3′, H-4′	H-5	32.30	H-3, H-5
	H-4′	2.17 (m)	H-3, H-3′, H-4	H-13		
4a					146.39	H-13, H-1, H-3, H-3′, H-4, H-4′, H-6, H-6′, H-8′
5	H-5	5.33 (bed, 6.0)	H-6, H-6′	H-4	117.90	H-4, H-4′, H-6, H-6′, H-8′
6	H-6	1.98 (m)	H-5, H-6′, H-7		31.50	H-8, H-8′, H-5
	H-6′	1.84 (m)	H-5, H-6, H-7			
7	H-7	2.12 (bed, 13.0)	H-6, H-6′, H-8′	H-1	37.71	H-5, H-8′, H-10
8	H-8	1.90 (bed, 13.0)	H-8	H-12	39.65	H-7, H-13
	H-8′	1.11 (dd, 13.0,13.0	H-7, H-8	H-13		
8a					39.43	H-1, H-5, H-13
9					150.29	H-7, H-8, H-8′, H-10, H-11
10	H-10	1.72 (s)	H-11	H-11	21.09	H-7, H-11
11	H-11	4.70 (bs)	H-10	H-10	108.26	H-7, H-10
	H-11′	4.71 (bs)	H-10	H-10		
12	H-12	0.78 (d,7.0)	H-1	H-13, H-8	20.77	H-1, H-2, H-2′
13	H-13	0.91 (s)		H-12b, H-2′, H-4′, H-8	15.76	H-1, H-8

[a] All spectra were recorded on a Bruker AMX 500, in $CDCl_3$. Chemical shifts are expressed in ppm, and *J* values in parentheses are in Hz. [b] In proton numbering, protons at pseudoaxial positions are denoted with prime symbol (′).

J. Nat. Prod. 2004, 67, 1996-2001

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics