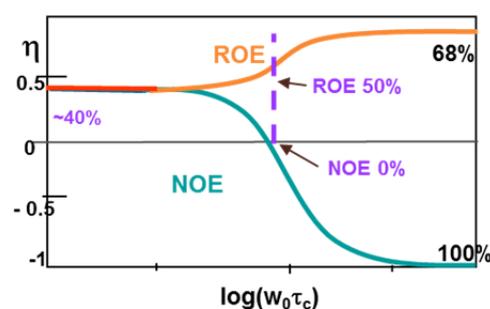


Experimentos 2D selectivos: BASHDROESY

Los experimentos ROESY y NOESY son de gran utilidad para obtener información sobre la estereoquímica. El efecto NOE/ROE se puede observar cuando entre los protones implicados hay un proceso de relajación dipolar y su distancia es menor de 4-5 Å. De todos los experimentos bidimensionales básicos el NOESY y el ROESY son los que presentan un mayor índice de fracasos. Ello se debe a su baja sensibilidad y también a la competencia con otras fuentes de relajación. Aun en las mejores condiciones, los experimentos ROESY y NOESY requieren un tiempo mínimo de entre 3 y 4 horas (256 variaciones del tiempo de evolución y 16 acumulaciones). Los intentos de reducir este tiempo mínimo suelen desembocar en fracaso, ya sea por falta de resolución o por la baja intensidad de las señales de correlación. La opción de aumentar la concentración de la muestra para mejorar la sensibilidad, puede ser contraproducente debido a la posibilidad de confundir interacciones intermoleculares con intramoleculares.

En el NOE, la situación es más compleja debido a que el valor y signo del efecto dependen del tiempo de correlación de la molécula. El NOE es positivo para moléculas pequeñas y negativo en el caso de moléculas grandes, como las proteínas. Ello implica la existencia de una zona intermedia con valores muy pequeños o cero. En tales casos, la alternativa es el experimento ROESY ya que el efecto es siempre positivo.



La complejidad en el espectro de 1D, por el solapamiento de señales, es un factor adicional que puede dificultar la obtención de la información deseada. En tales situaciones, los experimentos de 2D selectivos como el **BASHDRoesy** son una alternativa válida. En esencia, estos experimentos utilizan módulos de pulsos selectivos que permiten elegir en la dimensión F1 una zona reducida del espectro. De este modo, con pocos incrementos se tiene una gran resolución digital y se reduce significativamente el tiempo del experimento. Las ventajas de esta alternativa son:

- Diferenciación de señales muy próximas y sus correspondientes correlaciones
- Reducción del tiempo del experimento en un factor de 4 a 6 en relación al experimento completo

El inconveniente de esta aproximación reside en que previamente debe seleccionarse una región limitada y que sólo se observan las correlaciones de esta región con el resto del espectro. El experimento puede complicarse en el caso de acoplamiento entre los protones de la zona seleccionada.

En la Unitat de RMN, el experimento **BASHDRoesy** y otras secuencias 2D selectivas en F1 están disponibles en el equipo Agilent VNMR500. Es recomendable utilizar la opción con desacoplamiento de protón, que aplica un pulso de reenfoque para eliminar los acoplamientos escalares procedentes del exterior de la región seleccionada. Así, las señales de correlación se simplifican y se obtiene una ganancia de sensibilidad adicional, tal como se observa en los dos ejemplos que se indican a continuación.

Ejemplo1: Estradiol (en DMSO)

- Roesy: F1=F2=3955 Hz (7.64-0.25ppm), tiempo de mezcla 300 ms, 256 incrementos, 16 acumulaciones: tiempo total 4 h. En F1 se obtiene 15.5 Hz por incremento.
- BASHDRoesy: F2=3995, F1=147 Hz (entre 1.9-1.7 ppm), tiempo de mezcla 300 ms, 64 incrementos, 16 acumulaciones, tiempo total 1h. En F1 se obtiene 2.2 Hz por incremento.

7 veces más resolución en F1 y un tiempo cuatro veces menor

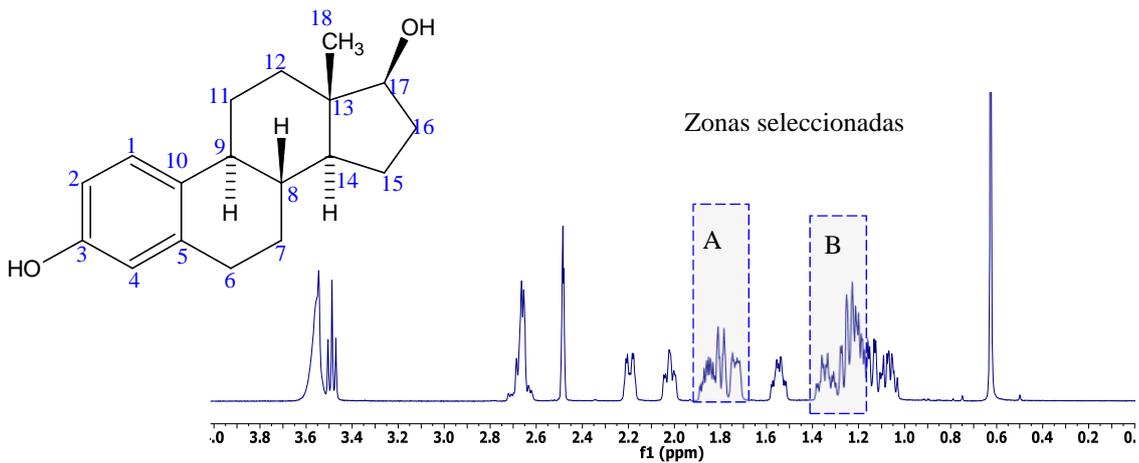


Figura 1 espectro 1D estradiol (dmsol_{d6})

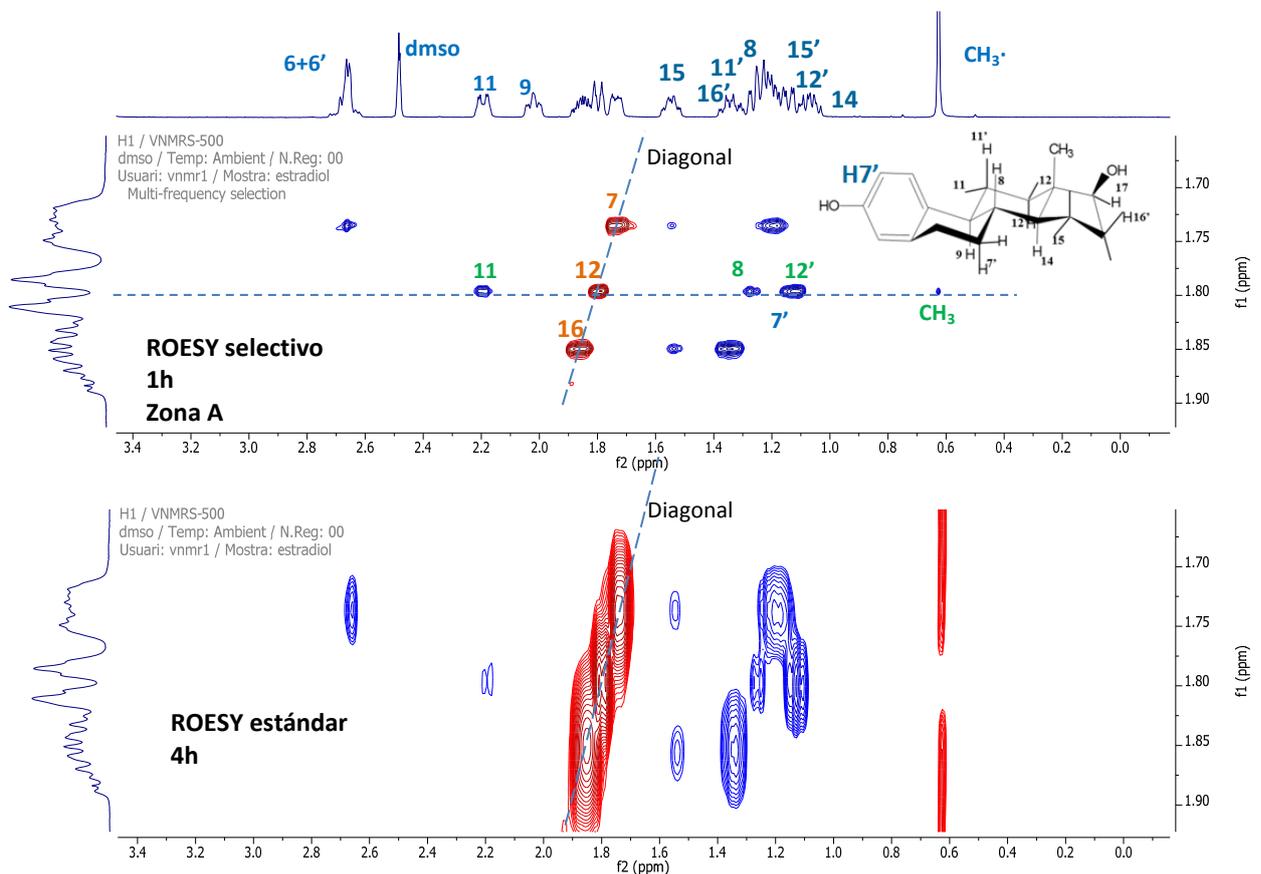


Figura2 Comparación experimentos ROESY Estradiol Zona A

Ejemplo2: Celobiosa (cdcl₃)

- Roesy: F1=F2=4095 Hz \approx 7.75-0.4 ppm, tiempo de mezcla 300 ms, 256 incrementos, 16 acumulaciones: tiempo total 4 h. En F1 se obtiene 15.9 Hz por incremento.
- BASHDRoesy: F2=4095, F1=110 Hz (entre 4.56-4.35), tiempo de mezcla 300 ms, 64 incrementos, 16 acumulaciones, tiempo total 1h. En F1 se obtiene 1.7 Hz por incremento.

Unas 9 veces más resolución en F1 y un tiempo cuatro veces menor

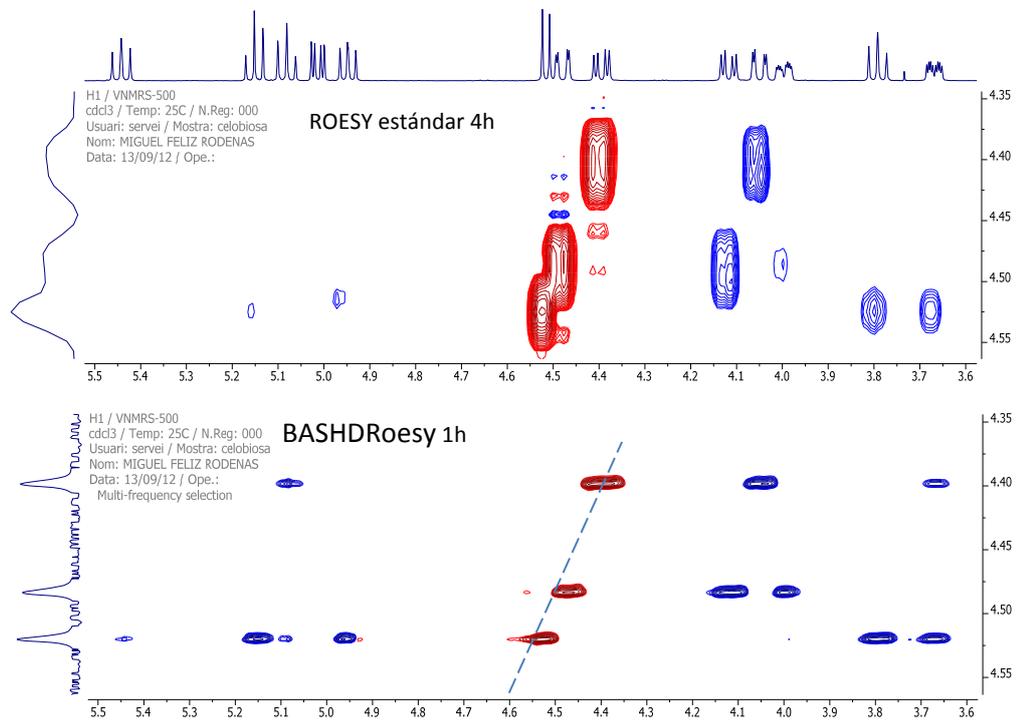


Figura3 Comparación experimentos ROESY celobiosa

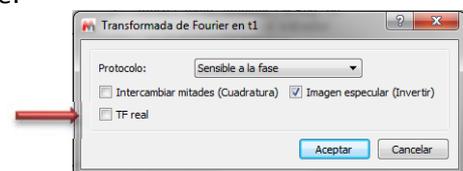
En la proyección vertical de la figura 3 se puede observar la capacidad de separación e incremento de resolución en F1 obtenida con esta secuencia

Procesado MNovo:

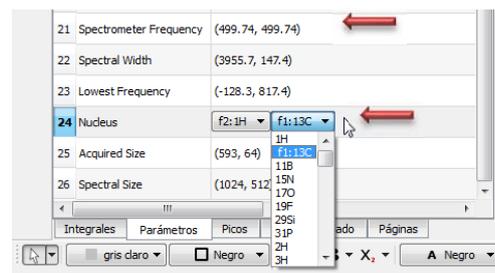
Por el momento, el programa no reconoce directamente los parámetros de procesado, por lo que es necesario introducir de modo manual las opciones correctas para obtener un resultado comparable con el obtenido con el VNMRJ3.1.

1. En F1 modificar las condiciones de procesado como sigue:

- Intercambiar mitades: **No**
- Imagen especular: **Ok**
- TF real: **No**



2. En la ventana de los parámetros se tiene que cambiar la frecuencia en la dimensión de F1 ya que por defecto está asignada como ^{13}C y debe ser ^1H . Modificar la entrada de *Spectrometer Frequency* y también la del *nucleus*.
3. Ajustar la fase F1 y en F2, del modo habitual.
4. En las pruebas realizadas (estradiol y celobiosa) la aplicación de la opción de eliminación del ruido en t1 mejora sensiblemente el resultado.



Limitaciones del método.

En el caso que la zona seleccionada contenga protones acoplados entre si, el resultado del experimento selectivo es más complicado. La secuencia incluye un pulso de reenfoque no selectivo que elimina los acoplamientos escalares con los protones de fuera de la región seleccionada. Los acoplamientos entre los protones situados dentro de la zona excitada selectivamente no se eliminan y se observa la estructura fina, tanto en las señales de la diagonal como en las de correlación (figura4). Las consecuencias son una mayor complejidad de los mapas de correlación y una pérdida de sensibilidad del experimento, que limitan su utilidad.

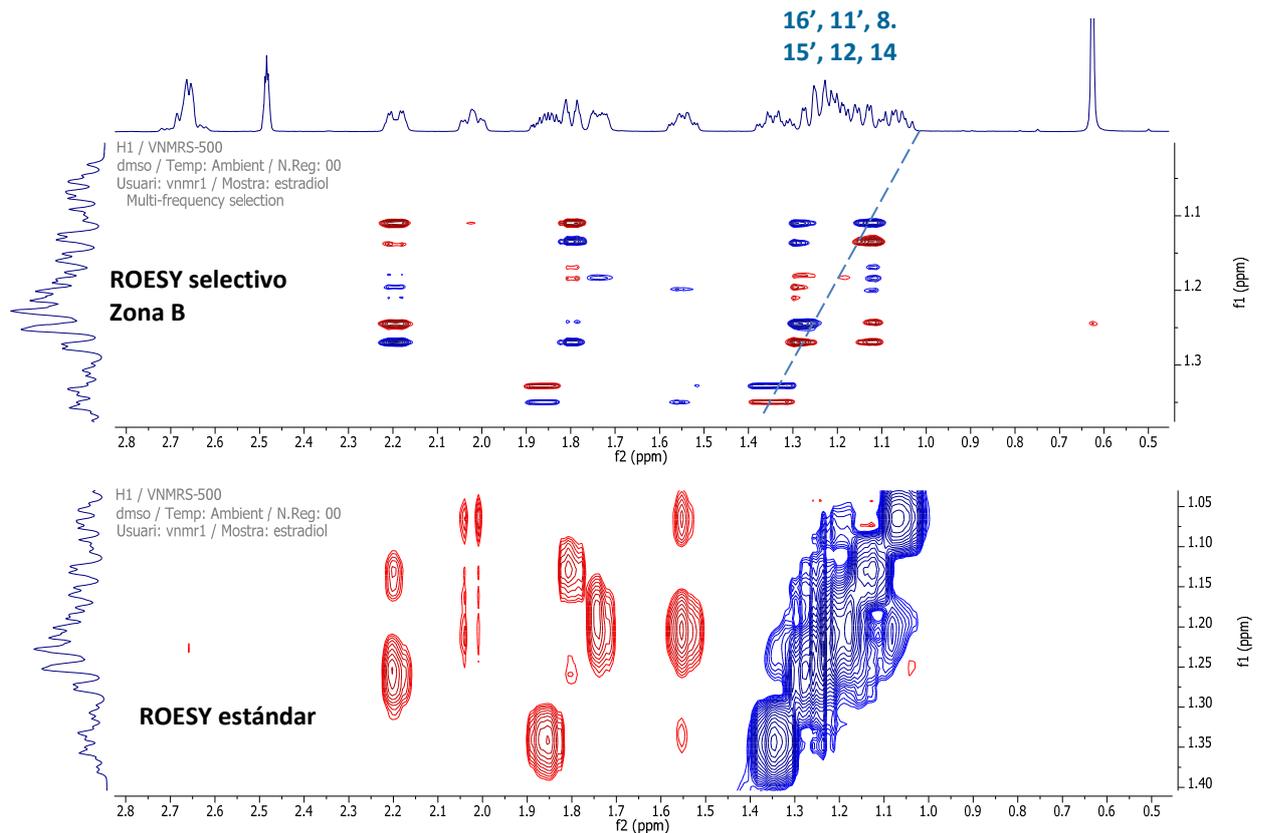


Figura4 Comparación experimentos ROESY Estradiol Zona B

Bibliografía:

SPINSIGHTS Agilent 12/9/2012