



Determinación estructural

Utilización combinada de experimentos de RMN

por

Dr. Miguel Feliz y Dra. M^a Antonia Molins

2004



**U
UNIVERSITAT DE BARCELONA
B**

Serveis Científic Tècnics

Unitat de RMN



VARIAN

Indice

INTRODUCCIÓN	3
<i>Análisis preliminar de los espectros de 1D.</i>	<i>4</i>
<i>Espectro de ^{13}C</i>	<i>5</i>
<i>Espectro DEPT.....</i>	<i>6</i>
EXPERIMENTOS BIDIMENSIONALES	7
<i>Experimento gHSQC (EDITED).....</i>	<i>8</i>
<i>Experimento TOCSY</i>	<i>11</i>
Recopilación	13
<i>Experimentos COSY/DQFCOSY.....</i>	<i>14</i>
Análisis del experimento gCOSY	15
<i>Experimento gHMBC.....</i>	<i>19</i>
<i>Experimento NOESY.....</i>	<i>21</i>
<i>Experimento ROESY</i>	<i>24</i>
<i>Experimento NOESY1D PFGE.....</i>	<i>25</i>



REALIZADO POR: Miguel Feliz y M Antonia Molins

Unidad de RMN de los Servicios Científico Técnicos de la Universidad de Barcelona

BARCELONA 2003-2004

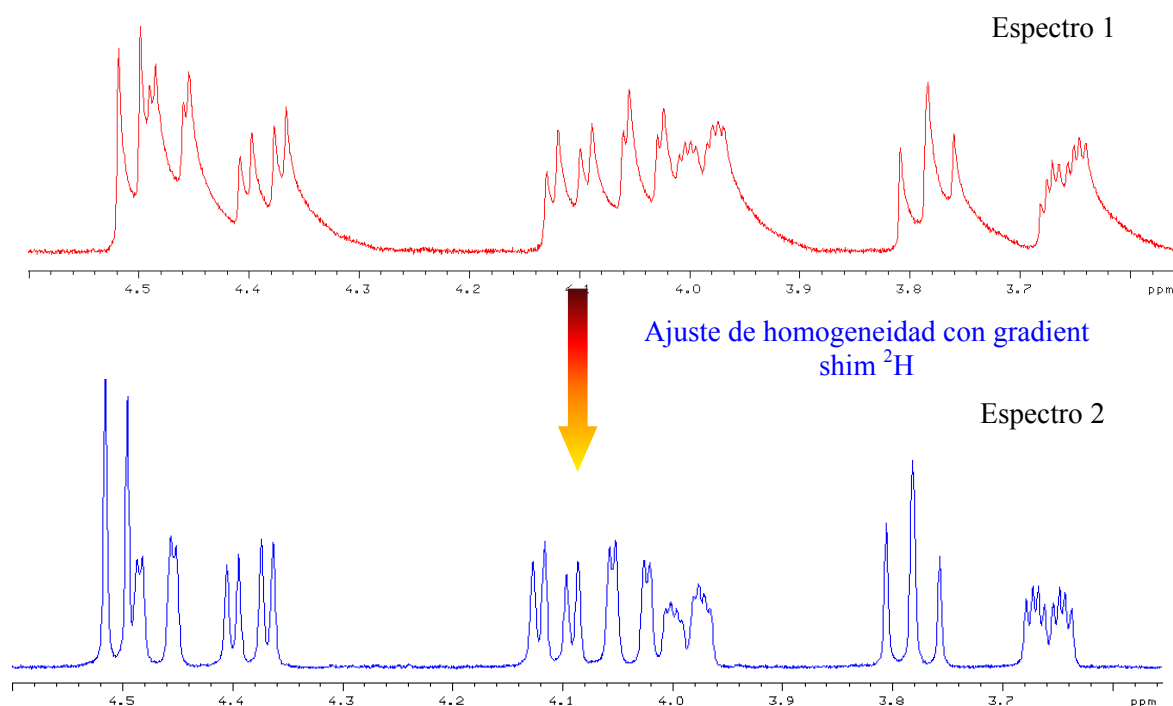
<http://www.rmn.ub.es/>

Introducción

Con este dossier se pretende proporcionar información sobre algunas de las posibilidades que ofrecen los espectrómetros de RMN de rutina avanzada para la realización de experimentos de 1D y 2D. La accesibilidad a una gran variedad de experimentos puede suponer una gran ventaja en los estudios de determinación estructural de moléculas de tamaño mediano-pequeño. También se intenta dar una guía para seleccionar los parámetros de partida más convenientes para cada uno de los experimentos que se muestran.

Todos los experimentos se han realizado en un **Varian MercuryPlus™ 400**, equipado con una sonda **ATB** en configuración $1\text{H}/19\text{F}/13\text{C}$. Durante la realización de los experimentos la temperatura se ha mantenido controlada a 25°C . La programación y el ajuste de los parámetros necesarios para cada experimento se han efectuado utilizando los menús y tcl incluidos en el programa **VNMR 6.1 C** y el **ChemPack 2.1**. La mayoría de los experimentos se han efectuado en modo automático.

El sistema de ajuste de homogeneidad es una pieza clave para la obtención de buenos resultados en un sistema automático y debe ser capaz de compensar los problemas en muestras muy diversas y condiciones no siempre ideales. El espectro 1 de la siguiente figura (celobiosa) se obtuvo con los valores de shims desajustados (Z_1 , Z_2 , Z_3 y Z_4) de modo aleatorio. El espectro 2 se obtuvo después de un proceso de ajuste de la homogeneidad utilizando el modulo de shim por gradientes de deuterio (tres iteraciones y un tiempo de aproximadamente 45 segundos).



Para la realización de los distintos experimentos se ha utilizado una muestra de quinina, peso molecular de **324.42** y formula empírica $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$. El tubo contenía 19 mg en 0.7 ml de CDCl_3 .

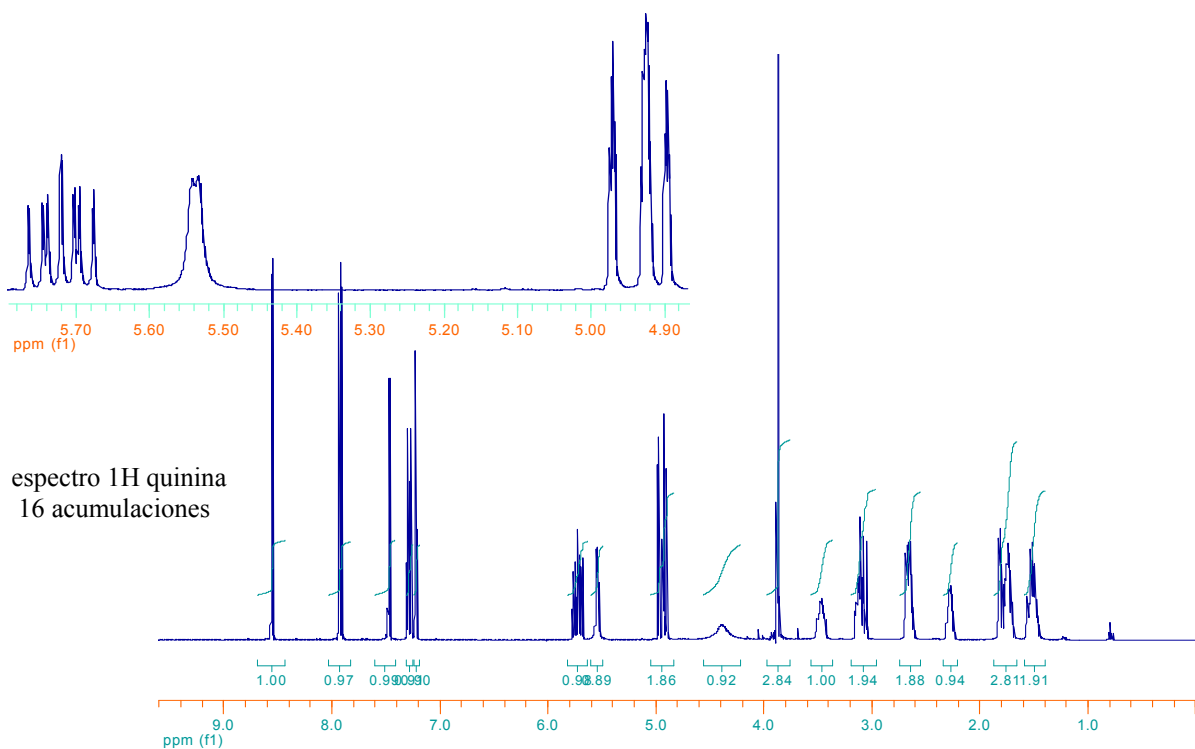
Los datos han sido procesados con el VNMR 6.1C[©] y con el programa MESTREC^{©1}, que también se ha utilizado para generar algunos de los gráficos de este documento.

¹ Programa desarrollado por el Dr. Juan Carlos Cobas y el Dr. Javier Sardina de la Universidad de Santiago de Compostela <http://www.mestrec.com>

En los procesos de identificación de compuestos y en la determinación estructural es conveniente seguir unas pautas o estrategias que permitan optimizar los recursos y el tiempo necesario para obtener la máxima información.

La primera etapa consiste en determinar las condiciones de trabajo más adecuadas y también la pureza de la muestra disponible.

- **Espectro previo de ^1H :** Determinación de la existencia de mezclas o de impurezas. Con un único espectro de ^1H de 1D es posible decidir si las señales de otros compuestos o las impurezas presentes pueden ser un obstáculo para el estudio del compuesto principal y determinar posibles superposiciones. En caso necesario debe efectuarse una purificación adicional
- **Determinación del disolvente más conveniente para efectuar el estudio.** En este punto no sólo debe tenerse en cuenta la solubilidad del compuesto, sino también la existencia de posibles interacciones o interferencias con el disolvente (por ejemplo, intercambio con protones móviles tipo NH, OH, influencia sobre los desplazamientos químicos, etc.).
- **Elección de la temperatura de trabajo,** en función de la estabilidad de la muestra y/o la existencia de procesos dinámicos (pe. rotación restringida)



Análisis preliminar de los espectros de 1D

Por lo general la calidad del registro automático es aceptable. No obstante, para poder afrontar la asignación total del espectro es conveniente efectuar un procesamiento manual que permita extraer el máximo rendimiento de los datos obtenidos, en tal caso las operaciones más usuales son:

- Comprobación de las zonas de integración y normalización de la misma
- Correcciones de la línea de base
- Realización de las ampliaciones adicionales que permitan diferenciar las señales

Con un registro en las mejores condiciones posibles y con las ampliaciones necesarias es factible obtener una información considerable mediante:

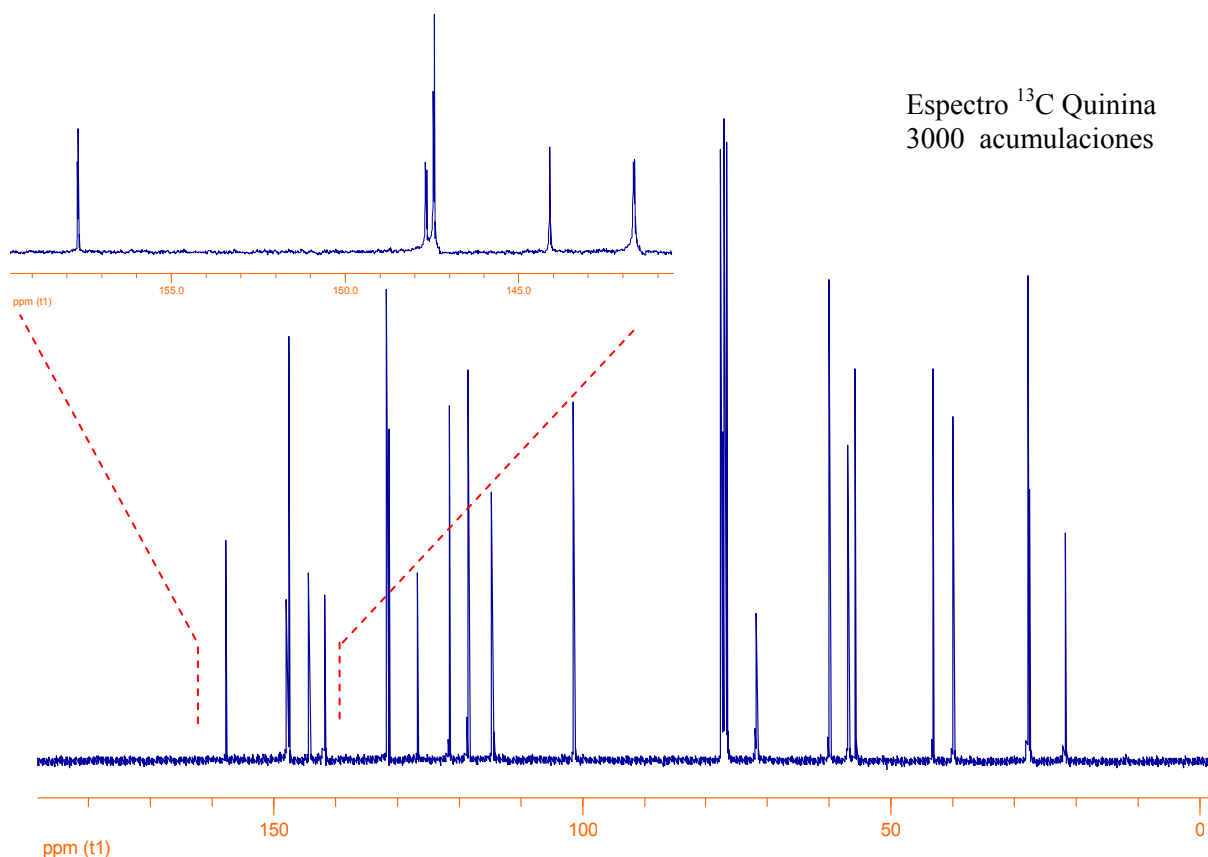
- Clasificación de zonas
- Localización de impurezas y disolvente
- Determinación de desplazamientos químicos
- Asignaciones evidentes utilizando tablas, experiencia previa y/o la información disponible
- Medida de constantes de acoplamiento

En el espectro de la Quinina realizado en el Mercury 400 se detectan varias señales claramente diferenciadas, algunas de ellas correspondientes a varios protones, tal como se determina por la relación de integraciones. Ello permite situar los 24 protones en el espectro, la posición del protón del hidroxilo y del OCH_3 son fácilmente identificables.

Espectro de ^{13}C

En el espectro de 1D ^{13}C es posible obtener con facilidad la siguiente información

- Desplazamientos químicos ^{13}C $\longrightarrow$ 20 Carbonos
- Clasificación por zonas (Aromáticos, dobles enlaces, alifáticos, etc)
- Determinación previa de C cuaternarios, presumiblemente correspondientes a las señales con una intensidad menor (debido a la diferencia de tiempo de relajación y de NOE con respecto a los C protonados). Esta información se puede confirmar posteriormente con experimentos de **DEPT** y/o **gHSQC**



Mediante la inspección de los espectros de ^1H y de ^{13}C de una dimensión es posible obtener un listado de los desplazamientos químicos de todos los protones y carbonos de la Quinina.

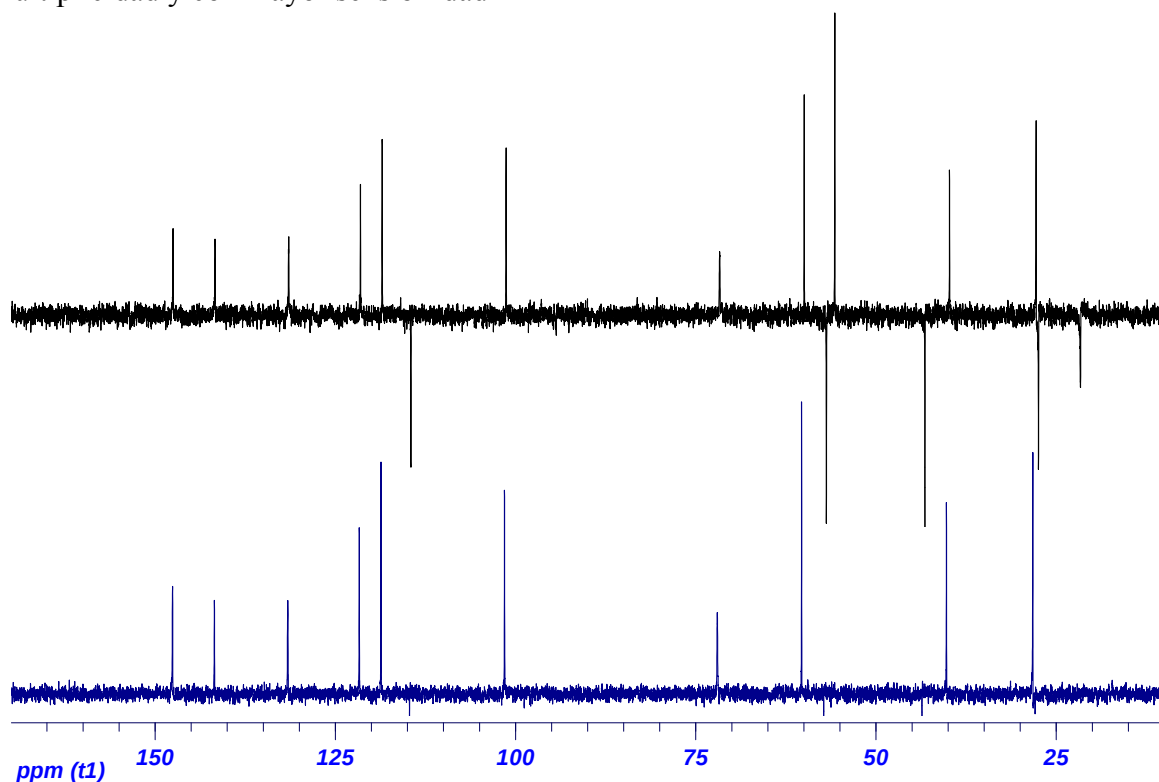
8.55 (1) d	(4.7 Hz)	157.67
7.92 (1) d	(9.2 Hz)	147.66
7.47 (1) d	(4.7 Hz)	147.43
7.29 (1) dd	(2.7 ; 9.2 Hz)	144.09
7.27 (1) d	(2.7 Hz)	141.66
5.71 (1) m	(7.6 . 10.3 16.9 Hz)	131.40
5.53 (1) d	(3.8 Hz)	126.57
4.95 (1) dt	(1.4 (t) 16.9Hz)	121.43
4.92 (1) dt	(1.2(t) 10.3 Hz)	118.44
4.37 (*) b		114.43
3.86 (3) s		101.30
3.46 (1) mb		71.74
3.12 (1) mb		59.96
3.07 (1) dd	(10.1 13.7 Hz)	56.90
2.65 (2) mc	comp	55.70
2.26 (1) mc		43.20
1.77 (2) mc		39.83
1.72 (1) mc		27.80
1.51 (2) comp		27.51
		21.72

23+1 protones

20 Carbonos

Espectro DEPT

El experimento **DEPT** permite la diferenciación de los CH, CH₂ y CH₃, así como la identificación de los carbonos cuaternarios (que no se observan en el **DEPT**). El experimento **DEPT** tiene una sensibilidad superior (x 4) que el experimento básico de ¹³C, debido a que implica transferencia de magnetización de ¹H---¹³C. No obstante, es importante tener en cuenta que la secuencia de **gHSQC** editada también permite diferenciar los carbonos según su multiplicidad y con mayor sensibilidad



El tiempo necesario para el **DEPT** se puede reducir si sólo se adquieren los espectros con $\text{mult}=1$ y $\text{mult}=1.5$. Con $\text{mult}=1$ únicamente se observan los CH, con $\text{mult}=1.5$, se obtienen todos los C protonados, pero los CH₂ con fase opuesta a CH₃ y CH. Con los 19 mg de Quinina, fue posible obtener un espectro con muy buena relación SN en sólo 16 minutos.

Experimentos bidimensionales

En el proceso que debe conducir a la determinación de la estructura de un compuesto mediante RMN es necesario:

- Determinar los protones unidos directamente a cada uno de los carbonos
- Localizar los protones acoplados escalarmente, correlaciones ^1H - ^1H a dos y tres enlaces
- Identificar los sistemas de acoplamiento ^1H - ^1H
- Establecer relaciones entre protones próximos en el espacio

Frecuentemente la complejidad de los espectros de 1D y la superposición de señales, hace que la determinación de la estructura con únicamente experimentos de 1D sea complicada y en ocasiones imposible. La combinación adecuada de experimentos 1D y 2D puede facilitar en gran manera los procesos de asignación y determinación de la estructura. En este dossier se indica una de las posibles estrategias que se pueden seguir para el estudio de moléculas con un tamaño mediano-pequeño.

Con el Mercury 400 es posible realizar con facilidad una serie de experimentos mono y bidimensionales básicos que facilitan la obtención de la información necesaria. Los más frecuentes son:

^1H 1D- RMN

Det. Número de protones, desplazamientos químicos, acoplamientos ^1H - ^1H

^{13}C 1D -RMN

Det. Número de carbonos no equivalentes

Grupos funcionales

HSQC /gHSQC

Determinación de las correlaciones directas ^1H - ^{13}C

TOCSY

Localización de los sistemas de acoplamiento.

COSY / DQFCOSY

Determinación de los acoplamientos directos ^1H - ^1H (2-3 enlaces)

HMBC / gHMBC

Correlaciones a larga distancia ^1H y ^{13}C

NOESY/ROESY

Relaciones en el espacio.

En caso necesario también puede recurrirse a

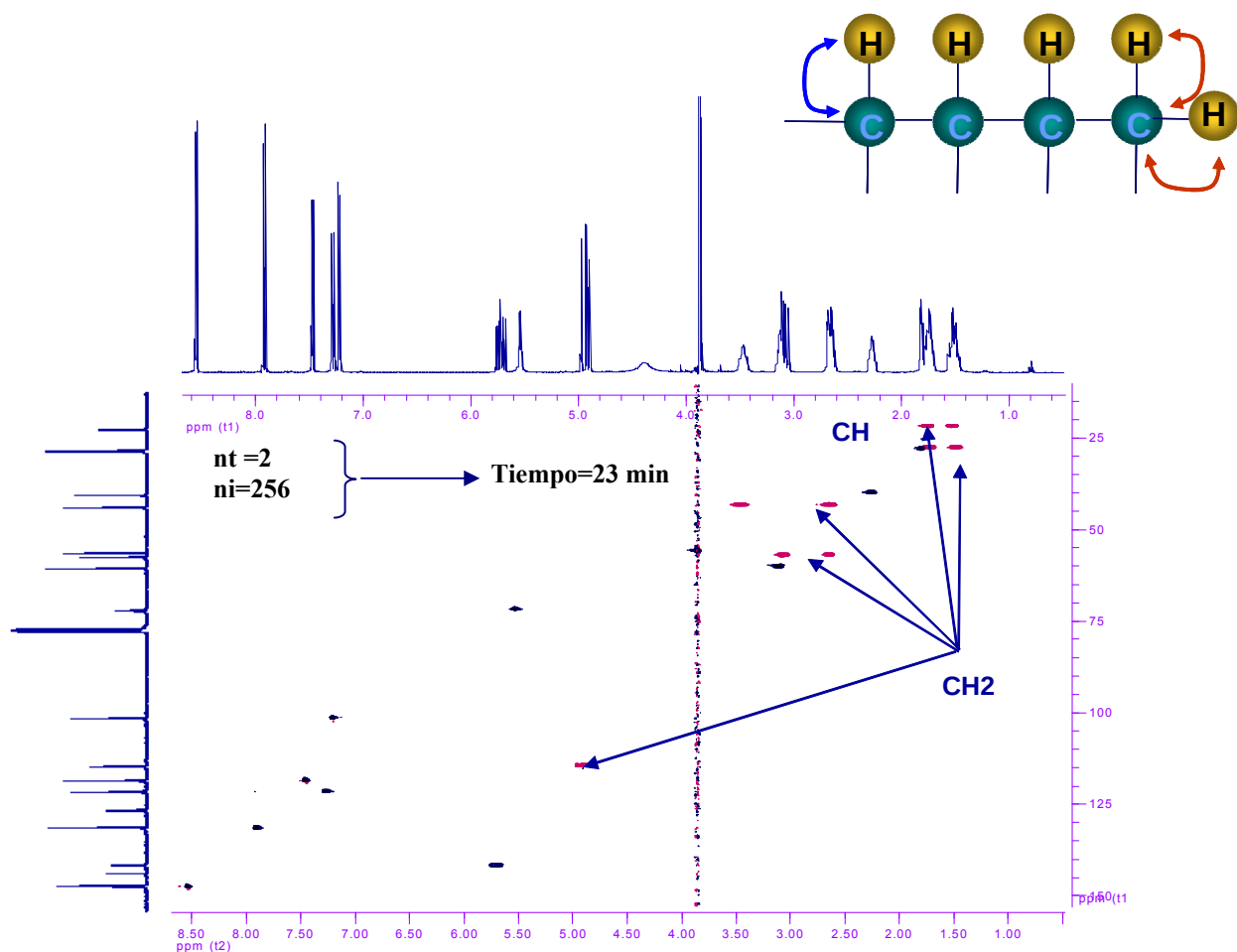
Experimentos 1D con otros núcleos

(^{31}P , ^{19}F , ^{31}P , ^{15}N ,.....)

Experimentos con pulsos selectivos

PFG NOESY 1D, TOCSY 1D

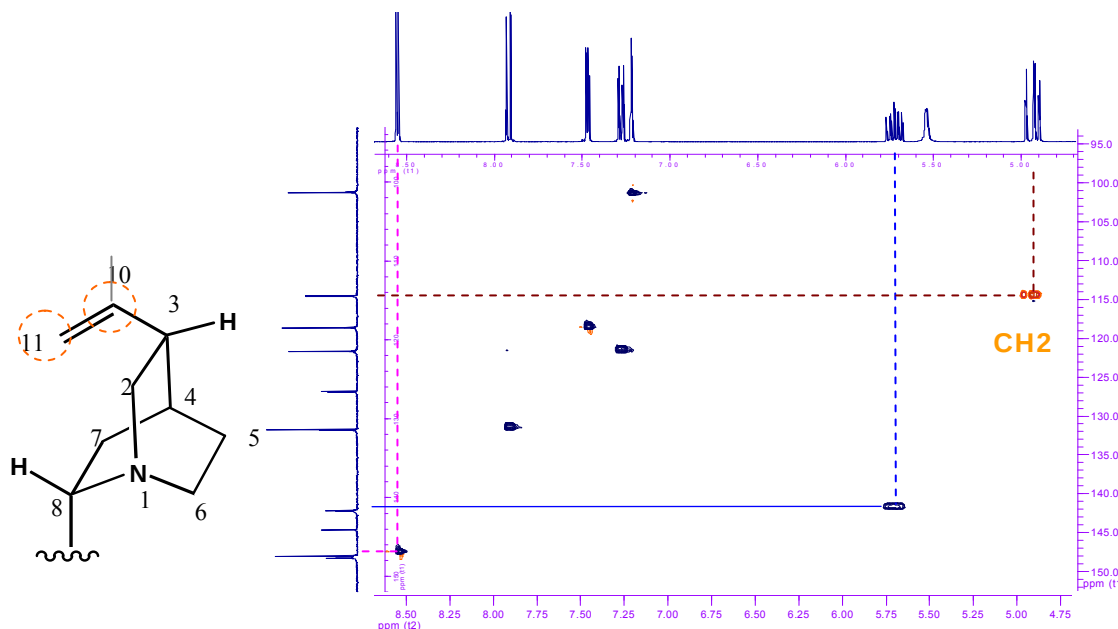
Experimento gHSQC (EDITED)

Determinación de correlaciones ^1H - ^{13}C a un enlace, con diferenciación de CH y CH_3 de CH_2 

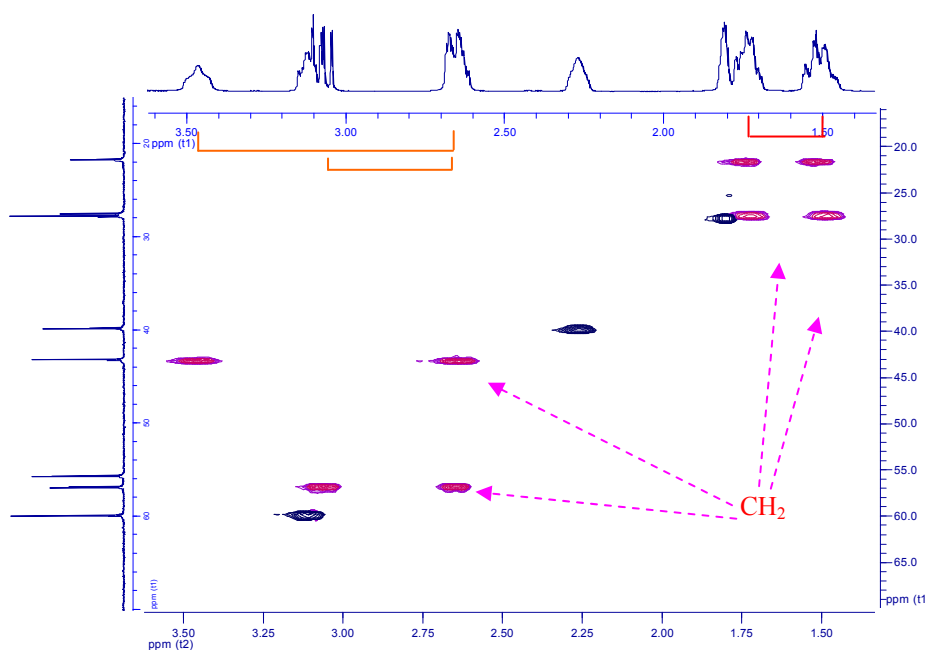
En el experimento **gHSQC Edited**, los CH_2 tienen la fase inversa con respecto a la de las señales de CH_3 y CH. En el experimento de heterocorrelación no se detectan los carbonos cuaternarios, sólo se observan las correlaciones entre ^1H y ^{13}C unidos directamente (en este caso la J_{CH} de selección utilizada fue de 140-150 Hz). También es posible determinar las correlaciones entre protón carbono mediante otros experimentos de heterocorrelación como el **HETCOR** (detección directa). No obstante, los experimentos de detección inversa como el **HSQC**, **HMQC**, tienen una mayor sensibilidad debido a una doble transferencia ^1H - ^{13}C ^{13}C - ^1H (detección final en ^1H). La utilización de secuencias con gradientes permite obtener espectros con una mayor calidad sin los problemas debidos a los ciclos de fases. En el experimento con gradientes no es necesario efectuar un número mínimo de acumulaciones. Así en este caso el experimento se efectuó con sólo dos acumulaciones y 256 variaciones del tiempo de evolución, con un tiempo total próximo a los 30 minutos. Si se dispone de una menor cantidad de muestra (~2mg) también se puede obtener un espectro con un nivel de ruido aceptable, aunque el número de acumulaciones debe ser mayor (≈ 8). En muchas ocasiones utilizando sólo 128 variaciones del tiempo de evolución se obtiene una resolución aceptable en F1, teniendo en cuenta la posibilidad de aplicar una predicción lineal en esta dimensión.

En el mapa de contorno se indican las señales correspondientes a los CH_2 , que tienen fase contraria al resto de los carbonos protonados. En la señal del OCH_3 se observa una banda de ruido paralela a F1 (mayor intensidad de OCH_3)

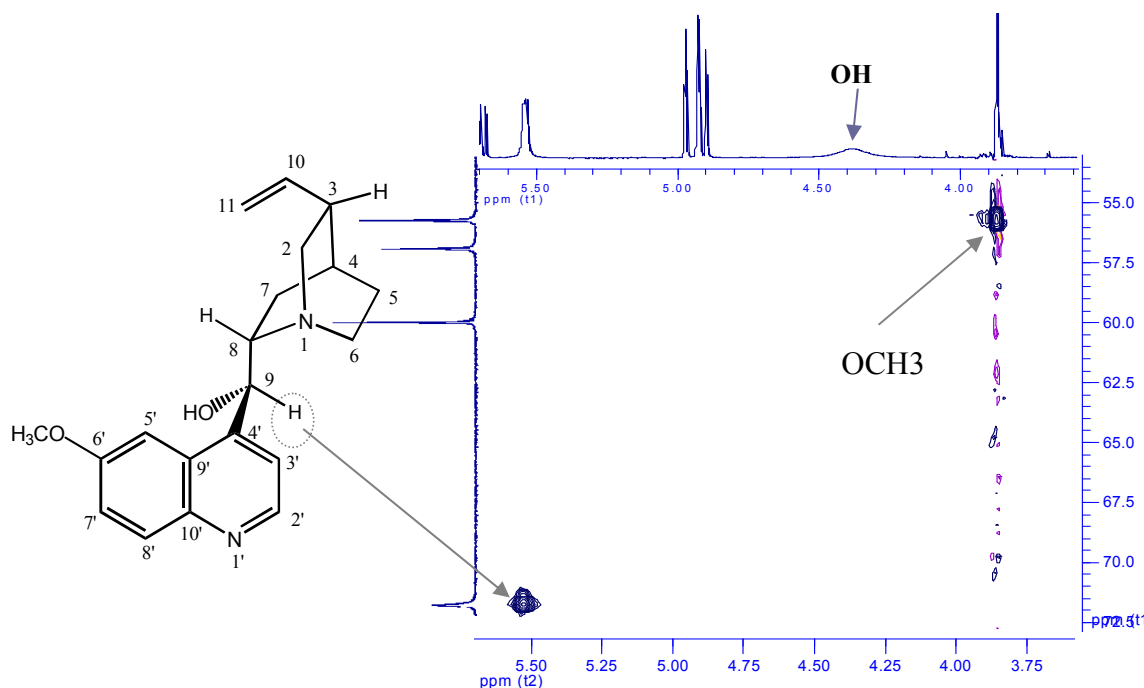
En las siguientes figuras se muestran los mapas de contorno correspondientes a distintas ampliaciones del experimento **gHSQC**. La primera corresponde a la zona aromática y de los C de doble enlace. La dispersión de las señales de ^{13}C facilita el análisis del espectro, estableciendo las correspondientes relaciones ^1H -- ^{13}C sin ninguna dificultad. Así la señal compleja a $\delta 4.95$ -- 4.91 ppm en el espectro de protón (2H) correlaciona con un único carbono a $\delta 114.43$ ppm y corresponde al CH_2 del doble enlace, el resto de señales tienen la fase contraria y pertenecen a los CH aromáticos y al CH del doble enlace.



La siguiente figura corresponde a la ampliación de la zona alifática. En este caso gracias a las diferencias de fase es posible localizar de modo inequívoco los 4 CH_2 , tanto en C como en protón. Los protones de cada uno de los CH_2 son diastereotópicos y en el espectro de protón corresponden a señales complejas que no permiten el análisis de las constantes de acoplamiento protón-protón.



El protón a $\delta 4.37$ ppm (banda ancha) no muestra correlación con ningún carbono, lo que confirma que corresponde al OH (la anchura de la señal ya apuntaba en este sentido). Un modo fácil de comprobar este extremo sería la adición de una pequeña cantidad de D_2O . Los cambios de temperatura también pueden ocasionar cambios de desplazamiento químicos de las señales OH. En la última ampliación se aprecia la correlación 1H , ^{13}C correspondiente al $-CH_3$



En base al análisis del experimento de **gHSQC** es posible establecer las relaciones entre las señales de protón y carbono, localizándose claramente todos los carbonos cuaternarios.

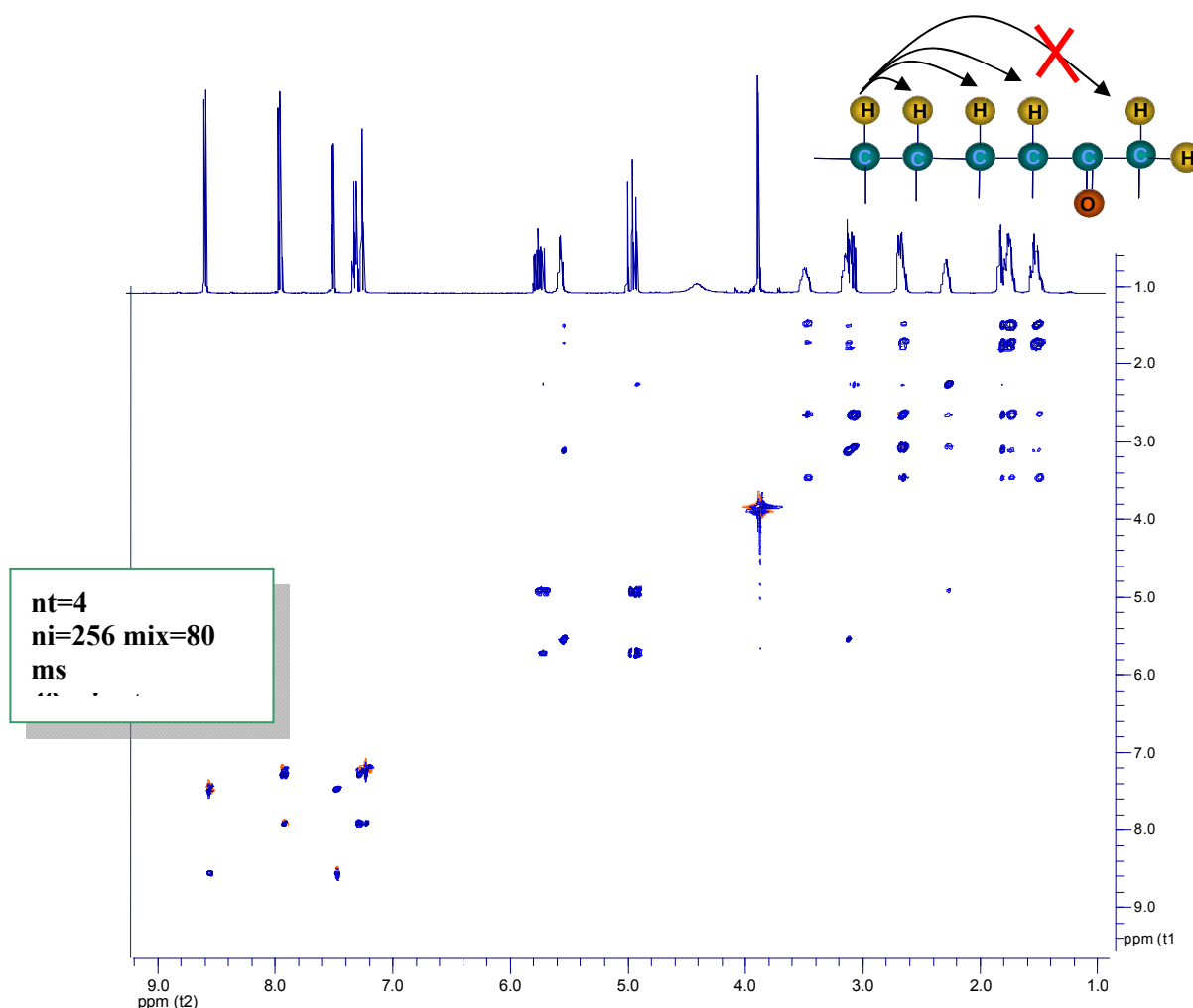
1H	^{13}C	1H	^{13}C
8,55 (1) d	147,43	3,12 (1) mb	59,96
7,92 (1) d	131,40	2,65 (1) 3,07 (1) dd	56,90 CH_2
7,47 (1) d	118,44	2,26 (1) mc	39,83
7,29 (1) dd	121,43	1,77 (1) mc	27,80
7,27 (1) d	101,30	1,50 (1) 1,76 (1) mc	27,51 CH_2
5,71 (1) m	141,66	1,51 (1) 1,75 (1) mc	21,72
5,53 (1) d	71,74		
4,92 (1) 4,95 (1) dt	114,43a CH_2	Cuaternarios	
4,37 (*) b $\leftarrow$ OH			157,67
3,86 (3) s	55,70 OCH_3		147,66
2,65 (1) 3,47 (1) mb	43,20 b CH_2		144,09
			126,57

Con el experimento **gHSQC** editado también es posible obtener de modo adicional a la correlación 1H - ^{13}C , información sobre la multiplicidad de los carbonos. Con respecto al experimento **DEPT** se tiene una ganancia de sensibilidad significativa.

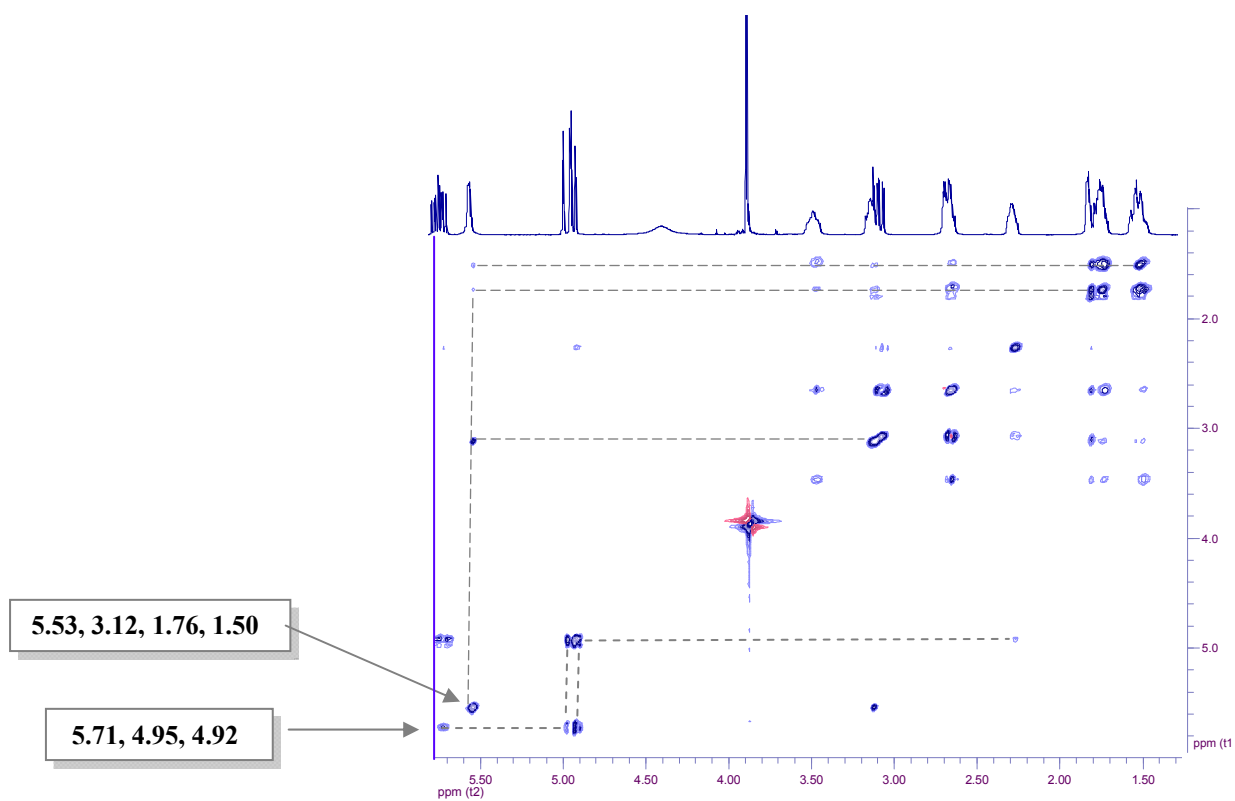
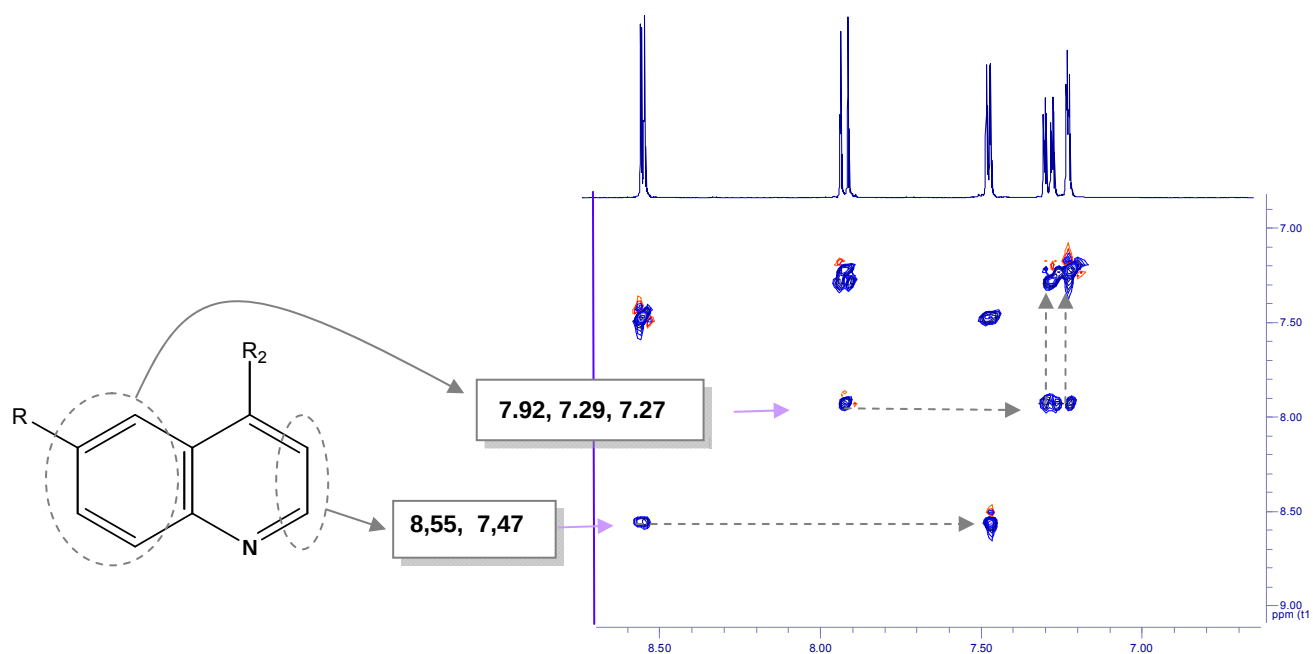
Experimento TOCSY

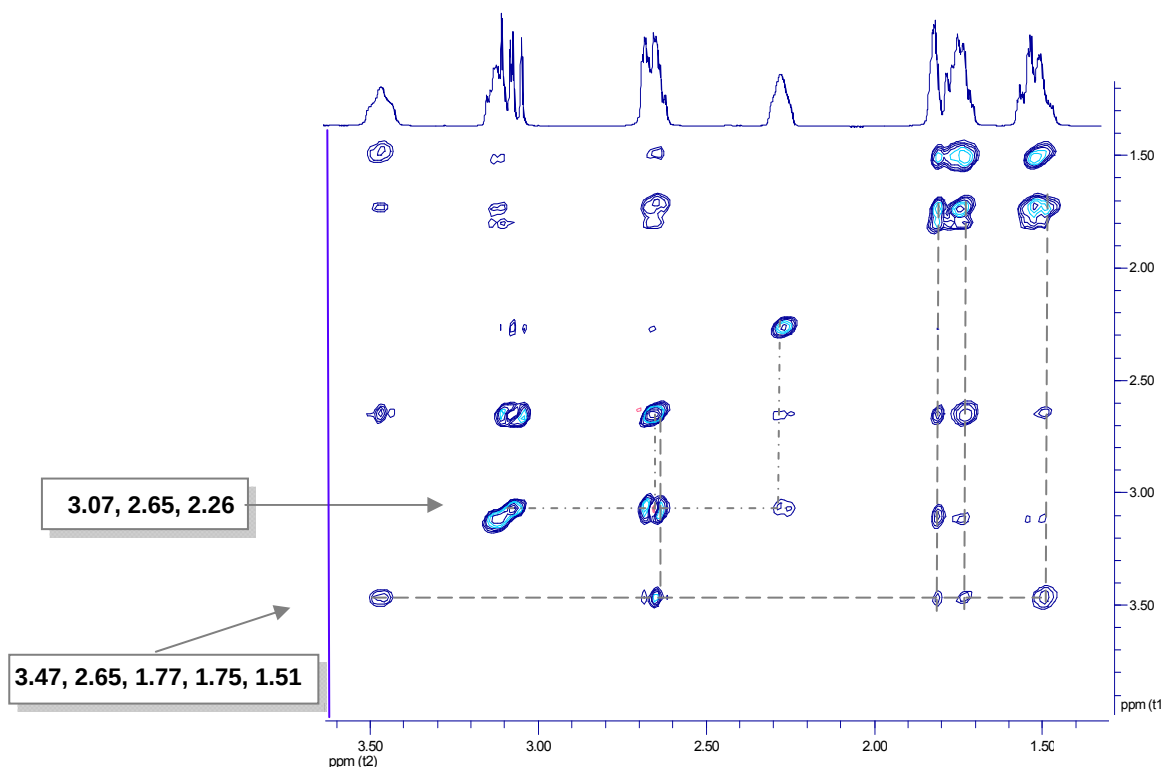
El experimento **TOCSY** permite determinar los protones pertenecientes a un mismo sistema de acoplamiento. Así desde un protón es posible observar las señales de correlación de los protones que forman parte de un mismo sistema, aunque no exista un acoplamiento directo con el protón inicial. Por ejemplo con el TOCSY es posible localizar los protones de un aminoácido partiendo del NH, o bien desde el protón anomérico de un azúcar es posible determinar total o parcialmente los protones del ciclo. La posición hasta donde se puede llegar depende del valor del parámetro tiempo de mezcla (mix). En el caso de péptidos pequeños-medianos se suelen utilizar tiempos de mezcla en el rango de 80-70 ms. En el caso de la aplicación a los azúcares se suelen utilizar tiempos algo mayores 100-125 ms, ya que las constantes de acoplamiento del protón anomérico (alfa) pueden ser relativamente pequeñas. Cuando el tiempo de mezcla es pequeño, el resultado es similar al que se obtiene con el **COSY** (correlaciones debidas a acoplamientos directos). La cadena de correlación se interrumpe cuando hay una discontinuidad en el acoplamiento ^1H - ^1H , por ejemplo un carbonilo, o bien cuando el protón inicial está muy alejado en la cadena.

El siguiente gráfico corresponde a un mapa de contorno del **TOCSY** de la Quinina.



En el procesamiento de este experimento se ha efectuado una predicción lineal que ha incrementado los 256 puntos complejos en F1 hasta un total de 512. En las sucesivas ampliaciones, se muestra cómo es posible identificar los distintos sistemas de acoplamiento existentes en la Quinina.





Con estos datos es posible localizar seis grupos de protones (sistemas de acoplamiento), con un total de 23 protones.

8.55, 7.47	8,55 (1)
7.92, 7.29, 7.27	7,92 (1)
5.53, 3.12, 1.76, 1.50	7,47 (1)
5.71, 4.95, 4.92	7,29 (1)
3.47, 2.65, 1.77, 1.75, 1.51	7,27 (1)
3.07, 2.65, 2.26	5,71 (1)
	5,53 (1)
	4,92 (1) 4,95 (1)
	4,37 (*)
	3,86 (3)
	2,65 (1) 3,47 (1)
	3,12 (1)
	2,65 (1) 3,07 (1)
	2,26 (1)
	1,77 (1)
	1,50 (1) 1,76 (1)
	1,51 (1) 1,75 (1)

Recopilación

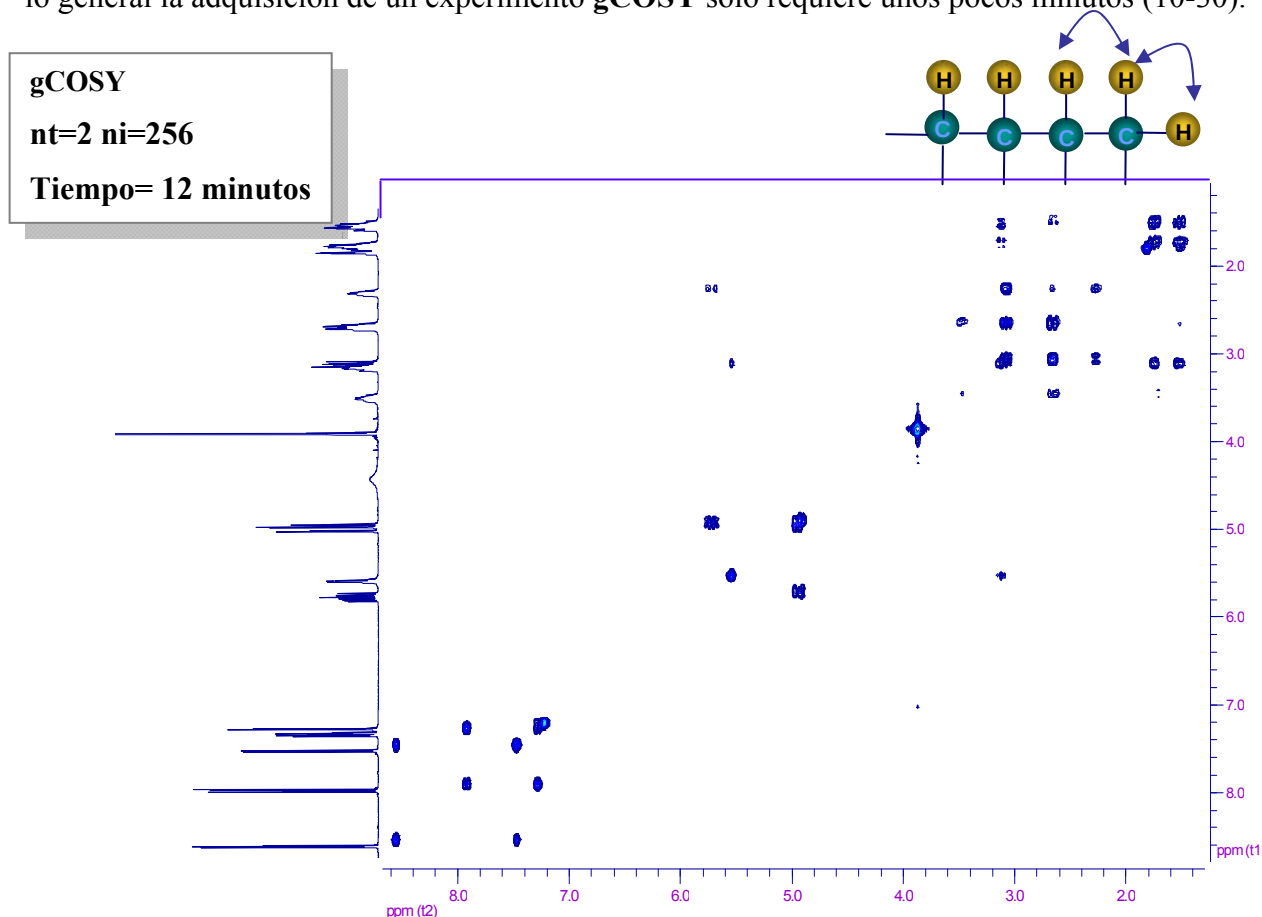
Mediante el experimento **TOCSY** ha sido posible identificar los protones que constituyen cada uno de los seis fragmentos de la Quinina. Con el experimento de **HSQC** se había determinado la relación entre las señales de ^{13}C y los correspondientes protones. Por otra parte también se habían identificado los carbonos cuaternarios. A través del **TOCSY** es difícil determinar la posición relativa de los distintos protones que forman parte de un sistema de acoplamiento, sólo en el caso de que los desplazamientos químicos teóricos sean muy diferenciados será posible efectuar una hipótesis ajustada. La determinación de la posición

relativa en el sistema puede efectuarse por la realización de diversos experimentos **TOCSY** con distintos valores de mixing, de modo que pueda estudiarse la evolución de las intensidades de correlación. Una buena alternativa consiste en la realización de un experimento de homocorrelación ^1H - ^1H **COSY** o **DQFCOSY** y comparar los resultados.

Experimentos COSY/DQFCOSY

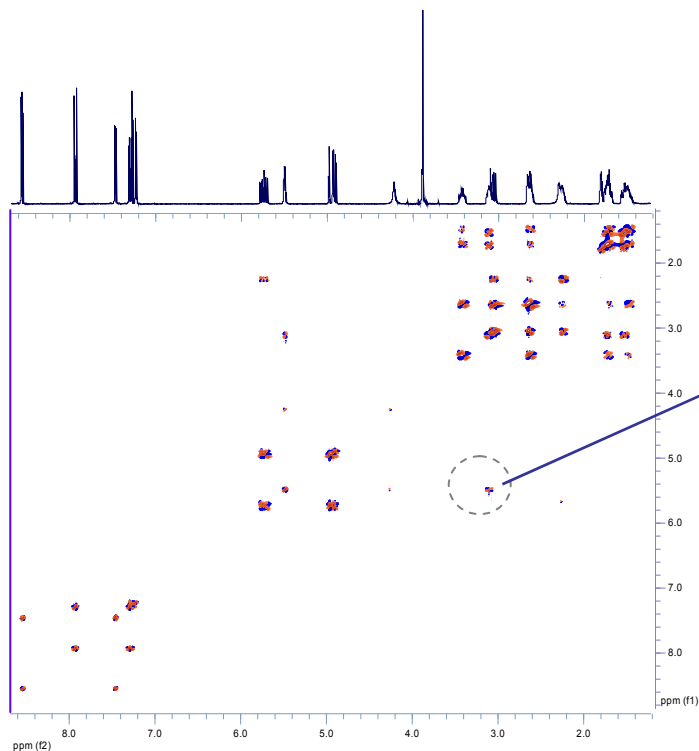
Los experimentos de correlación ^1H - ^1H **COSY** y **DQFCOSY** permiten establecer la existencia de relaciones debidas al acoplamiento escalar protón-protón geminales y /o vecinales. Mediante estos experimentos sólo se observan correlaciones en el caso de que exista un acoplamiento directo entre dos protones. Por ello se puede decir que la información obtenida a través del **COSY** y del **DQFCOSY** tiene un mayor grado de selección que la que proporciona el **TOCSY**. La combinación **COSY/TOCSY** permite establecer no sólo los distintos fragmentos, sino la posición de los protones en estas unidades, con la ventaja añadida de tener varias opciones para superar posibles solapamientos de señales.

El **COSY** y su versión con gradientes **gCOSY** son experimentos adquiridos en valor absoluto y con una cierta tolerancia a posibles desajustes en los parámetros de adquisición. Por lo general la adquisición de un experimento **gCOSY** sólo requiere unos pocos minutos (10-30).

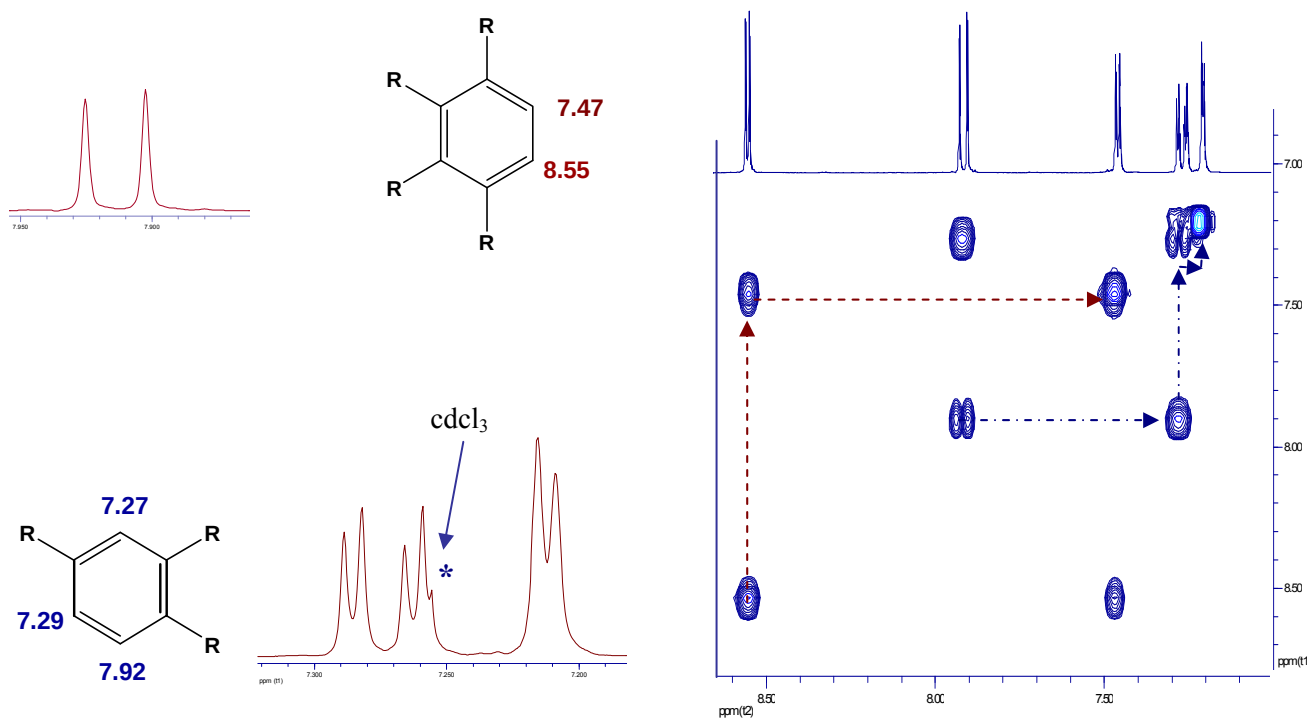


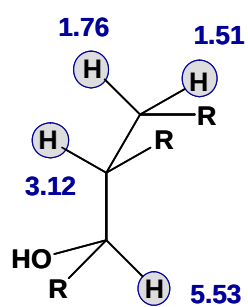
El **DQFCOSY** es un experimento de homo correlación con un filtro de doble cuanto, y se adquiere en fase. Este experimento es menos sensible que el **COSY** y debe adquirirse con una mayor resolución, por lo que el tiempo de realización es algo mayor. En el experimento **DQFCOSY** las señales tienen estructura fina y en algunos casos, siempre que la resolución sea

suficiente, puede proporcionar información del valor de las constantes de acoplamiento. Otra de las características de **DQFCOSY** es la atenuación de la intensidad de los singletes, debida a la acción del filtro de doble cuanto.

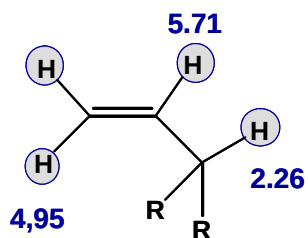
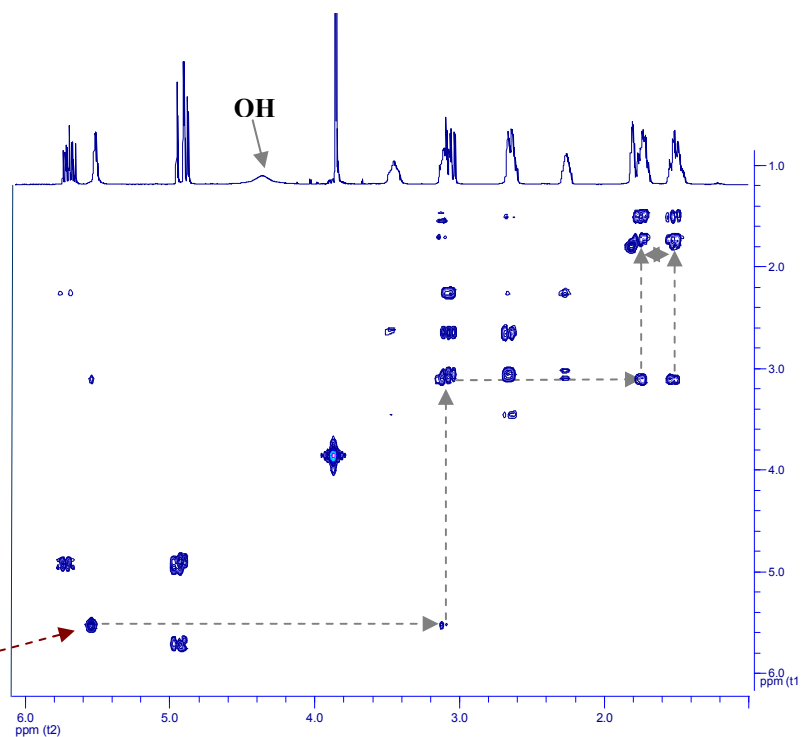


Análisis del experimento gCOSY

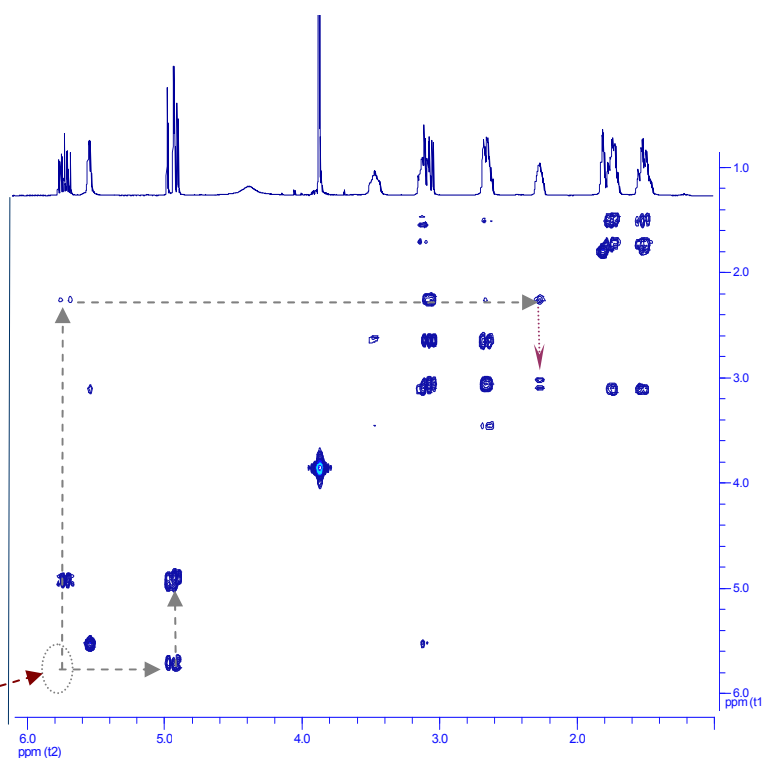


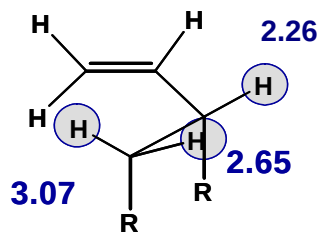


5.53, 3.12, 1.76, 1.51

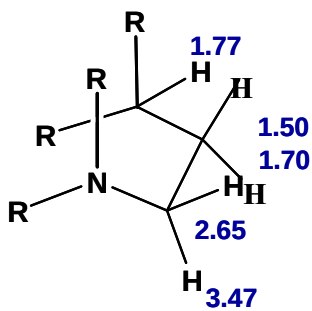
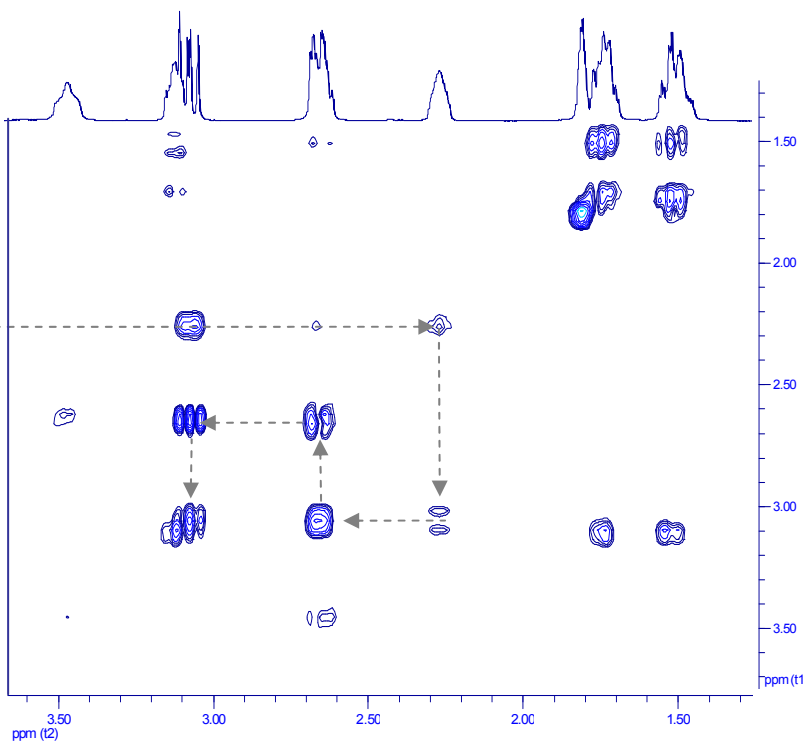


4.95, 4.92, 5.71, 2.26

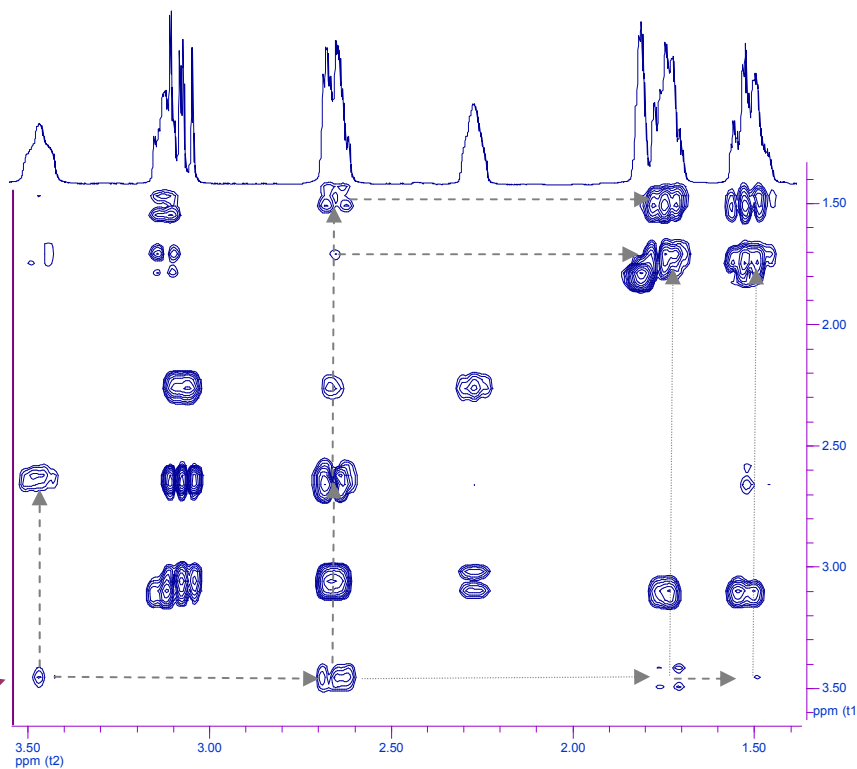




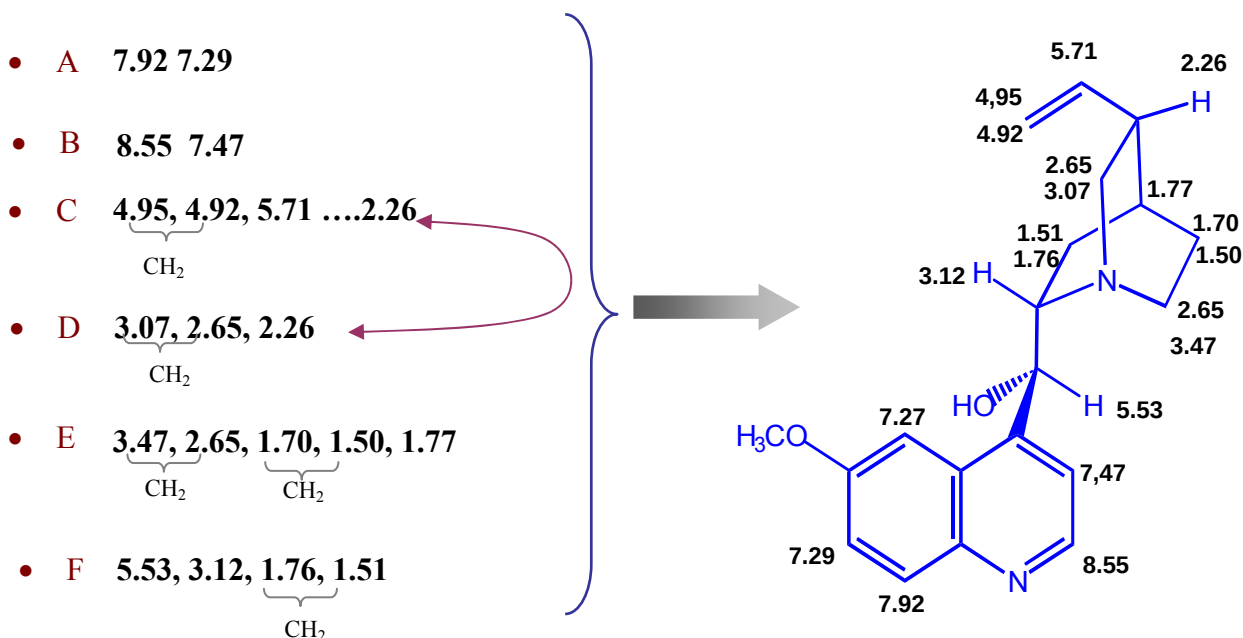
3.07, 2.65, 2.26



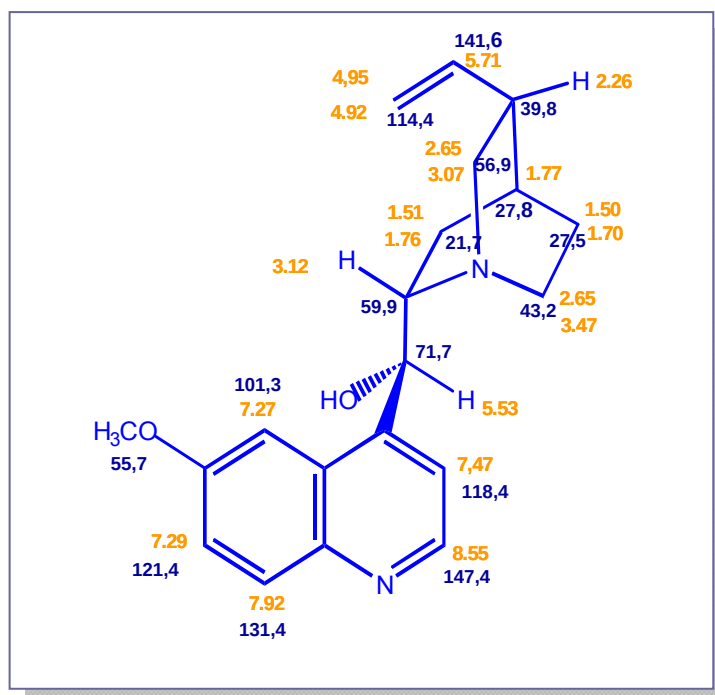
3.47, 2.65, 1.70, 1.50, 1.77



Hasta el momento se tienen identificados 6 fragmentos, conociendo las posiciones relativas de cada uno de los protones que los componen. A partir del **gHSQC** también se ha determinado que protones forman parte de un mismo CH_2 y los que son de un CH . La unión entre fragmentos puede realizarse buscando protones que presenten correlaciones comunes, como es el caso de los fragmentos C y D. La correlación entre los protones de la posición 4 y el 3 de la quinina tiene una intensidad muy débil y no se aprecia con facilidad en **gCOSY**



En base a las correlaciones, los valores de desplazamiento químico y al número fragmentos se puede hacer la siguiente propuesta para situar tanto los protones como los carbonos en la estructura de la Quinina.



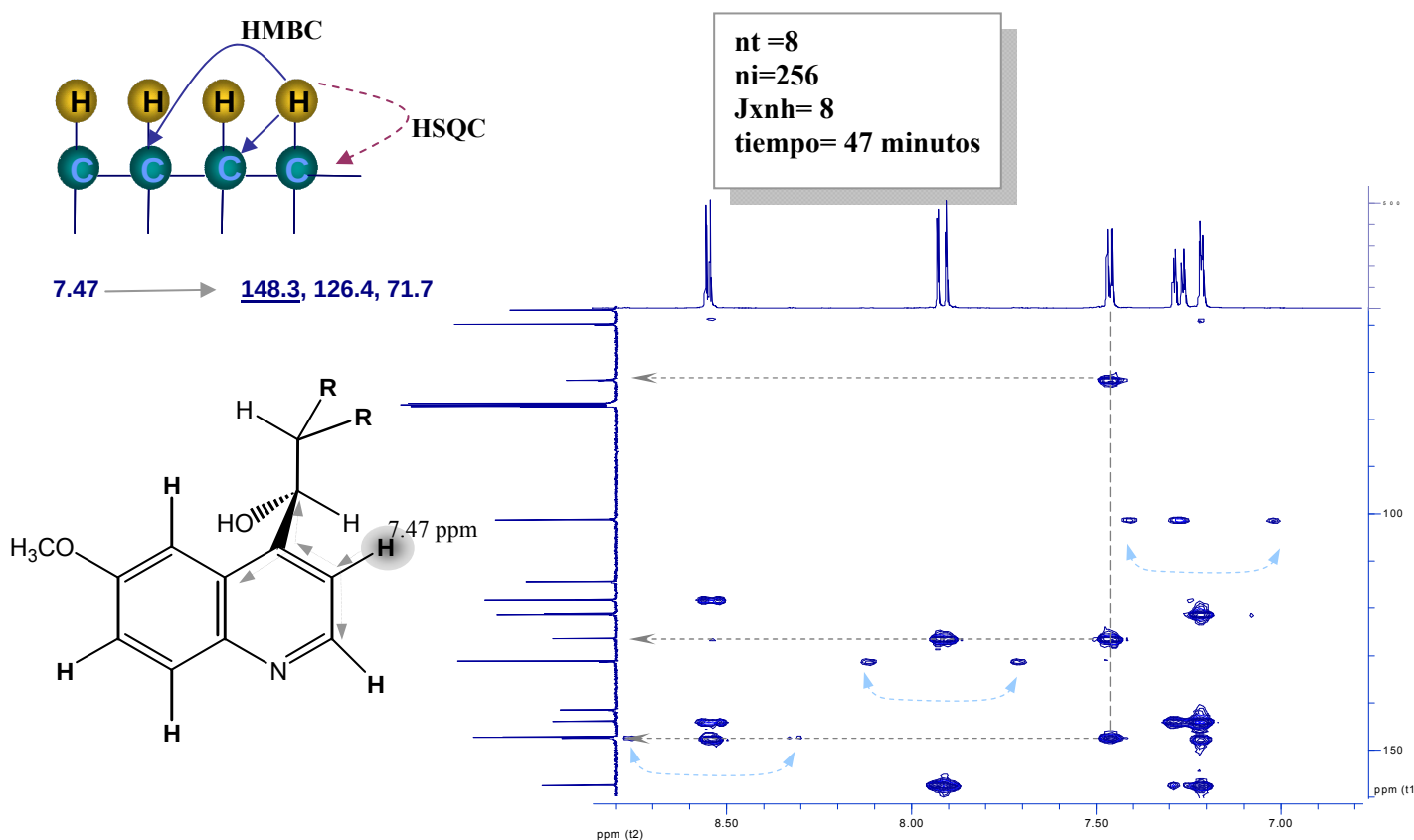
Falta por confirmar la unión entre los fragmentos F, E con C-D. También está pendiente la asignación de los carbonos cuaternarios. Por último debe determinarse la estereoquímica del conjunto.

Experimento gHMBC

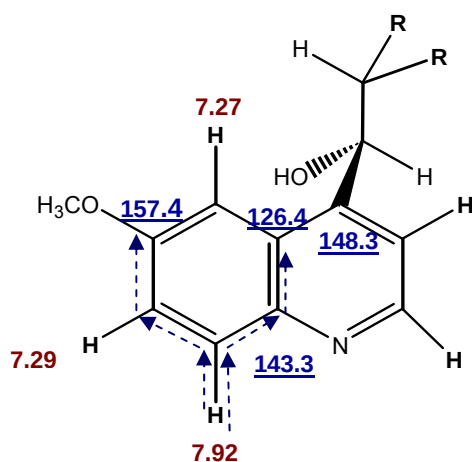
Determinación de las correlaciones ^1H ^{13}C a larga distancia (tres o más enlaces). La heterocorrelación a larga distancia permite la identificación de los carbonos no protonados, mediante el establecimiento de relaciones con los protones situados a varios enlaces. De igual modo es posible determinar la conexión entre distintos fragmentos protonados que tienen entre sí un punto de discontinuidad. La correlación entre el ^1H y el ^{13}C (no unidos directamente) se establece en función de su acoplamiento escalar a larga distancia. El valor del parámetro τ_{amb} está relacionado con la $^nJ_{\text{CH}}$. En el caso de ^1H - ^{13}C situados en sistemas alifáticos los valores de $^nJ_{\text{CH}}$ suelen ser relativamente pequeños 1-6 Hz, si se trata de un sistema aromático o con dobles enlaces el valor es algo mayor 5-8 Hz. En los sistemas aromáticos debe tenerse en cuenta que un acoplamiento a dos enlaces tiene una constante de acoplamiento menor (1-5 Hz) que cuando se trata de tres enlaces (7-10Hz). También debe tenerse en cuenta que las constantes de acoplamiento a tres enlaces muestran una dependencia con el ángulo diedro análoga a la que existe en el caso de protón-protón. Todos estos factores deben tenerse en consideración al realizar el análisis de los resultados de un experimento de correlación a larga distancia.

El valor del tiempo de espera τ_{amb} (necesario para el paso de información) es inversamente proporcional a la $^nJ_{\text{CH}}$, por ello a J pequeñas este tiempo de espera es relativamente grande. Este punto debe tenerse en cuenta ya que supone una pérdida de sensibilidad debido a los procesos de relajación.

En ocasiones las señales de correlación directa no se eliminan totalmente y también aparecen en el espectro. El experimento se adquiere sin desacoplar la dimensión de ^{13}C , por ello las señales residuales de correlación directas (^{13}C - ^1H a un enlace) aparecen desdobladas con la J_{HC} (entre 125 y 170 Hz). La comparación de los mapas del **HSQC** con el **HMBC** permite identificar con facilidad estas señales residuales. En este experimento los registros de los mapas de correlación se realizan en valor absoluto.



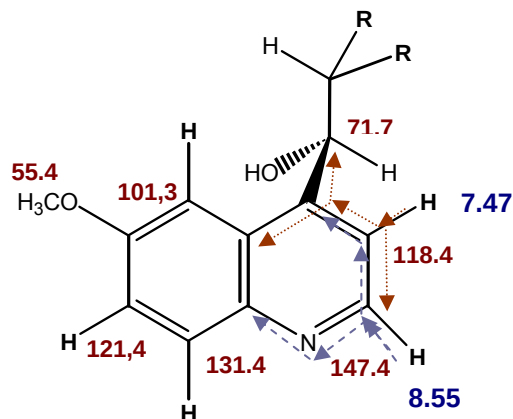
En la figura anterior se indica el resultado del análisis de las correlaciones de los protones del sistema aromático. La identificación de estos protones se había efectuado en base a su multiplicidad y correlaciones observadas en el experimento **COSY**. A su vez mediante el experimento **gHSQC** se había determinado qué protón estaba unido a cada carbono del sistema aromático. En este fragmento de la Quinina faltaba únicamente asignar los cuatro carbonos cuaternarios



7.92 → 157.4, 126.4

7.29 → 157.4, 143.4, 101.3

7.27 → 157.4, 148.3, 143.4, 121.4

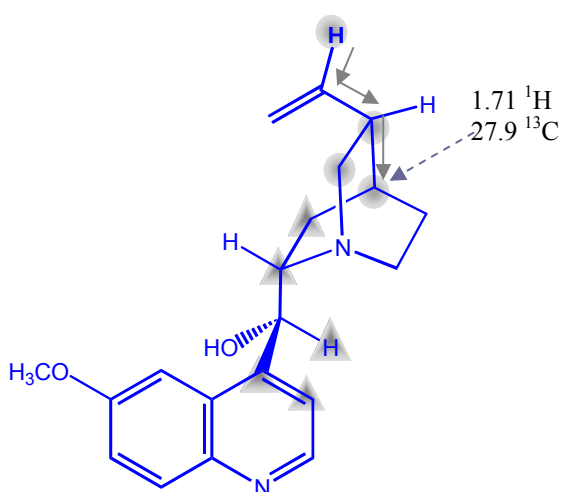


8.55 → 143.3, 148.3, 118.4

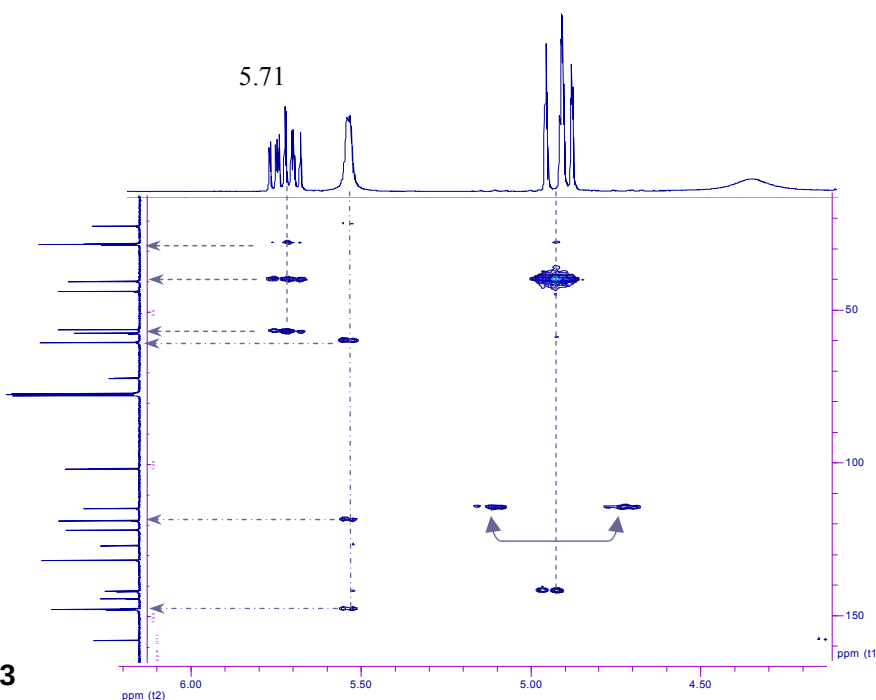
7.47 → 148.3, 126.4, 71.7

Las correlaciones ^1H - ^{13}C a larga distancia del protón a 5.71 ppm (doble enlace) permite confirmar que la posición 4 tiene un protón de 1.71 ppm (^{13}C a 27.9 ppm) que es el que actúa de punto unión entre los distintos fragmentos

5.71 → 27.9, 39.8, 56.9



5.53 → 21.5, 59.9, 118.6, 148.13



En este momento se dispone de la asignación de cada uno de los protones y carbonos de la quinina, incluso los carbonos cuaternarios. La unión de los fragmentos se ha confirmado mediante distintas correlaciones a larga distancia. Queda pendiente la determinación de la estereoquímica. para ello es necesario analizar los resultados obtenidos en el experimento **NOESY**

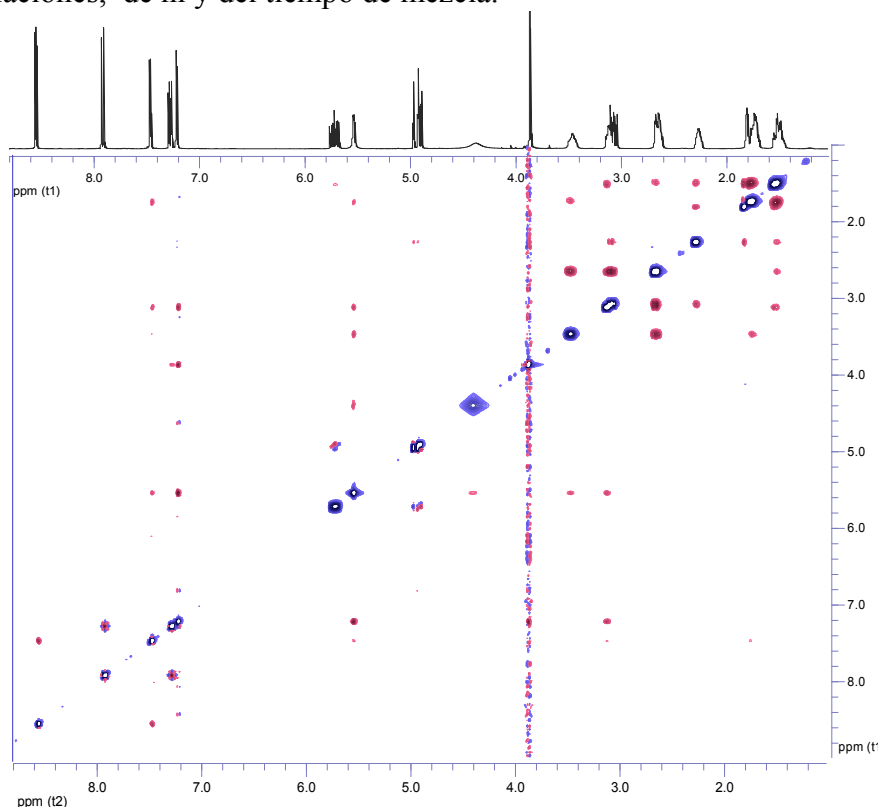
Experimento NOESY

El experimento de **NOESY** 2D permite obtener información sobre la proximidad en el espacio de los protones del compuesto. La secuencia **NOESY** se adquiere en modo sensible a la fase y la relación de fases entre las señales de correlación (señales de NOE) y las de la diagonal depende del tamaño de la molécula. En el caso de moléculas pequeñas o medianas las señales de correlación tienen signo opuesto a las de la diagonal. Las posibles señales de intercambio químico tienen el mismo signo que la diagonal.

- Para $\tau\omega_c \ll 1$ (moléculas pequeñas) el signo de las señales de correlación y de la diagonal es opuesto
- Para $\tau\omega_c \gg 1$ (moléculas grandes) la relajación spin-red es menos eficaz que la relajación cruzada. Las señales de correlación y de la diagonal tienen el mismo signo
- Las señales de correlación procedentes de procesos de intercambio químico tienen el mismo signo que las señales de la diagonal

Una de las principales dificultades de este experimento es la relativa baja sensibilidad, agravada porque las moléculas pequeñas-medianas tienen valores de NOE pequeños. Por ello, es necesario realizar un número relativamente elevado de acumulaciones y evitar en lo posible todas las inestabilidades del entorno. En la siguiente figura se muestra el mapa de correlación del NOESY correspondiente a la muestra de quinina. En este caso se efectuaron 16 acumulaciones con 256 variaciones del tiempo de evolución. Para incrementar la resolución digital se aplicó una predicción lineal hasta obtener 512 puntos complejos. También se aplicó una corrección de la línea de base polinomial para compensar las distorsiones de la misma. La programación del experimento se efectuó de modo automático, prefijando previamente los valores del número de acumulaciones, de n_1 y del tiempo de mezcla.

nt =16
ni=256
mix=0.5 s
Tiempo=4 horas

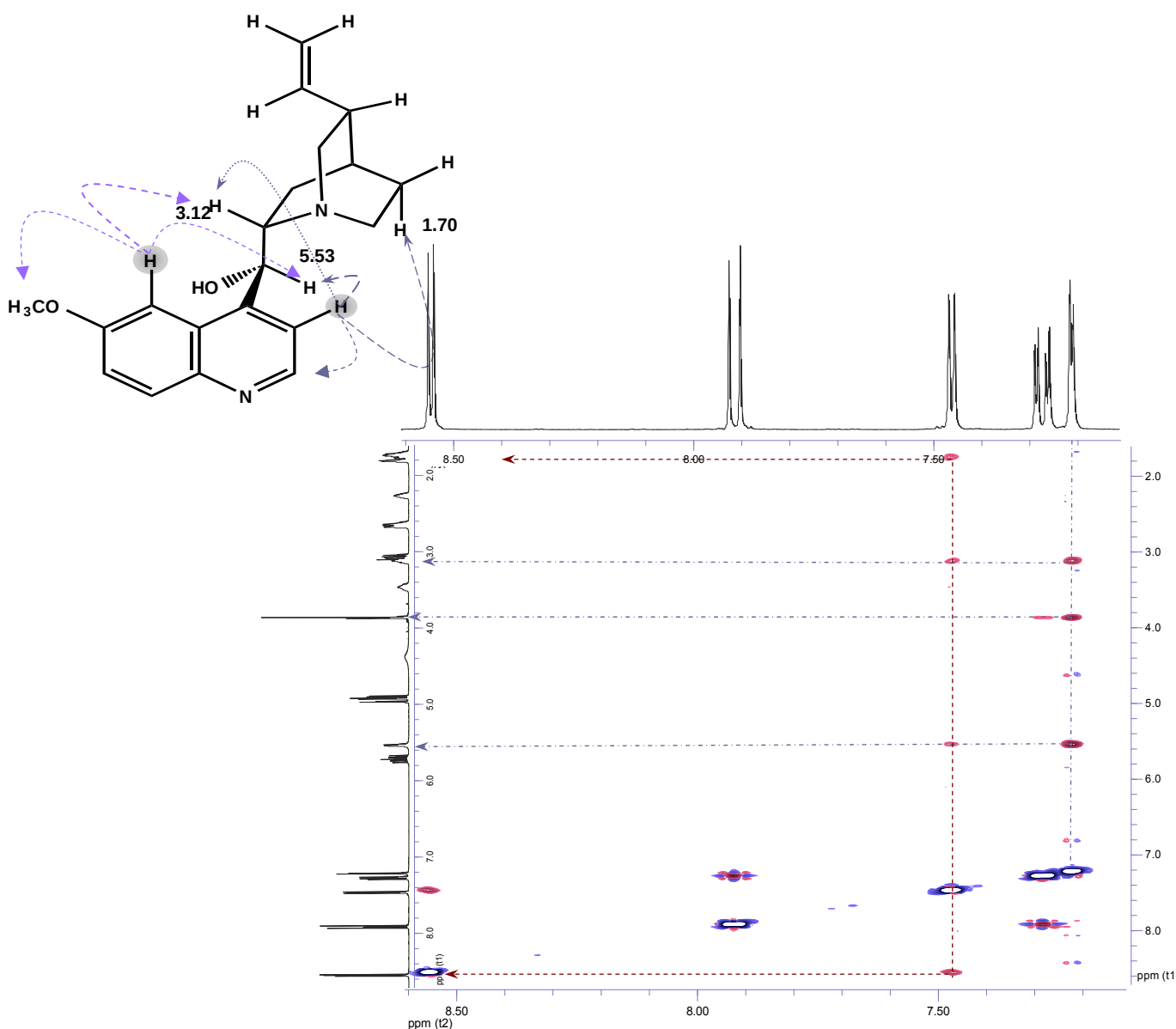


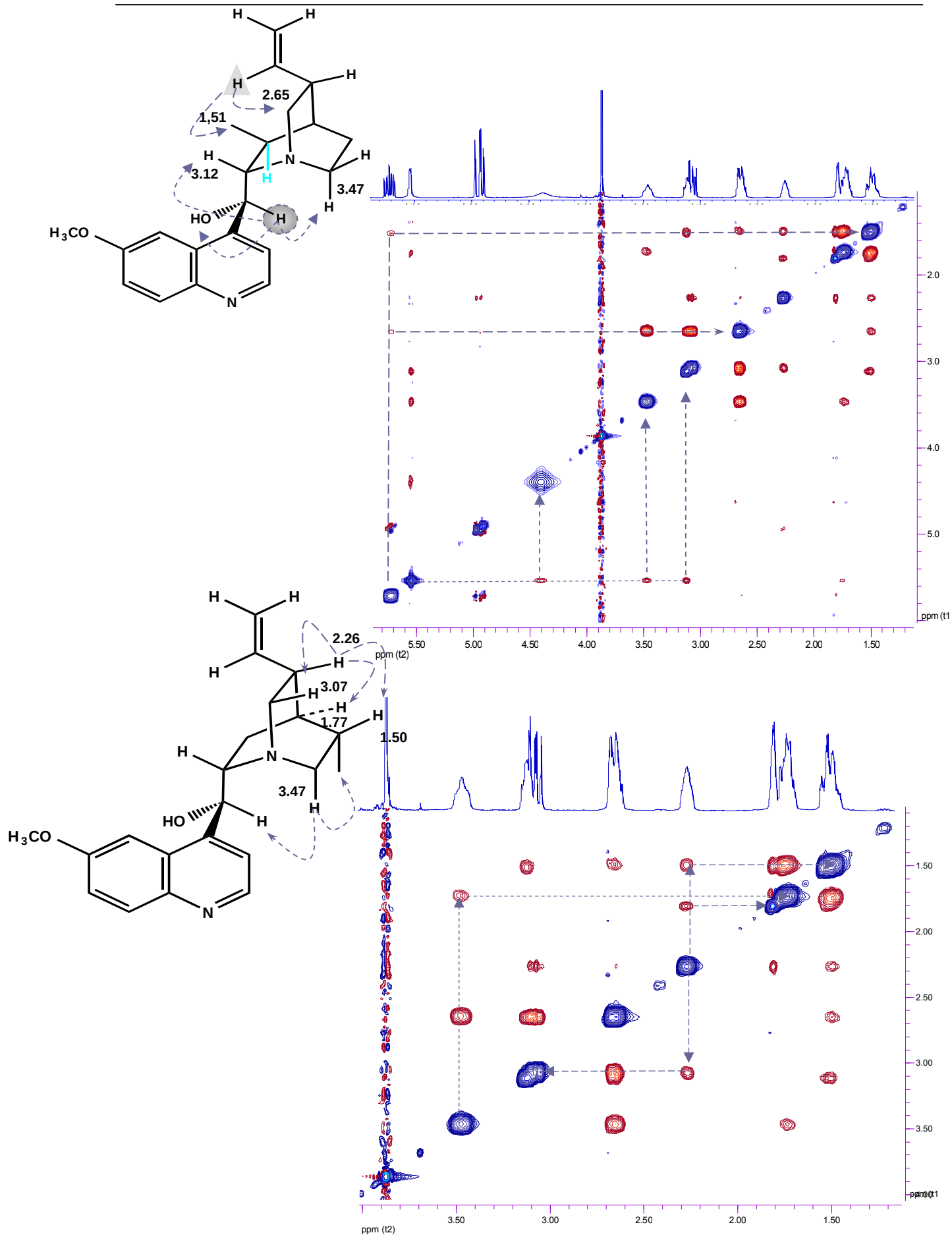
En la realización de los experimentos de **NOESY** la elección del valor del tiempo de mezcla es crítica. Como guía puede indicarse que el mix debe ser próximo al T_1 de los protones implicados. En el caso de moléculas de gran tamaño el mix debe ser de aproximadamente $0.5 T_1$.

- τ_m de 1400 a 200 ms mol pequeñas
- τ_m de 600 a 200 ms mol medianas
- τ_m de 400 a 100 ms macromoléculas

En el análisis de los resultados del experimento de **NOESY**, debe tenerse presente la posibilidad de la existencia de difusión. En tal caso puede ser conveniente estimar el crecimiento del noe en relación al valor del tiempo de mezcla.

A continuación se muestran diversos mapas de contorno correspondientes al experimento de **NOESY** de la Quinina, que permiten realizar la asignación stereoquímica de los distintos protones.





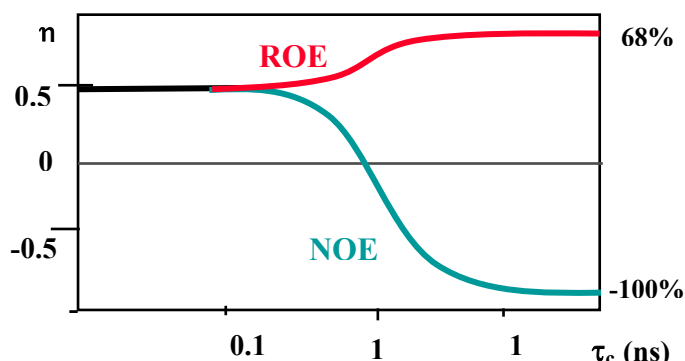
Experimento ROESY

En función del tamaño y movilidad del compuesto ($\omega \tau_c \approx 1.12$), el Noe puede ser cero o muy pequeño, en tales casos la alternativa es el experimento de **ROESY** que proporciona la misma información.

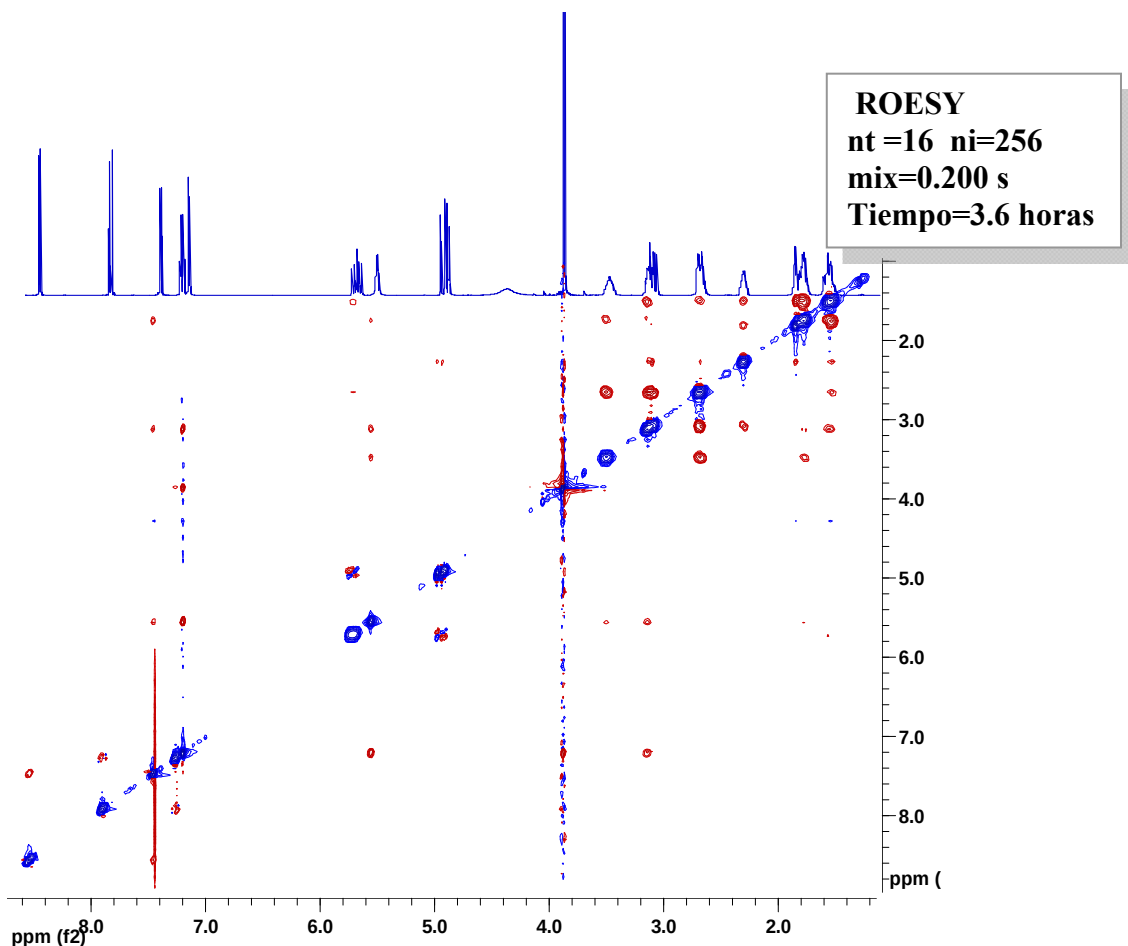
En el Roesy las señales de la diagonal y las de correlación tienen el signo de la fase distinto. Las correspondientes a intercambio tienen igual fase que las de la diagonal, lo que permite diferenciarlas de las de roe independientemente de cual sea el valor de $\tau\omega$

En el experimento **ROESY** no hay región donde el Roe sea nulo.

Curvas del Noe/Roe en función del tiempo de correlación. Frecuencia del equipo 500 MHz y distancia entre protones 2.9 Å.



En los experimentos de Roesy se utilizan tiempos de mix menores. En el caso de la quinina, el experimento de Roesy con un tiempo de mezcla de 250 ms, cuyo mapa de contorno se muestra a continuación, los resultados son similares a los obtenidos con el Noesy (excepto un ligero incremento del nivel de ruido del experimento).



ROESY
nt=16 ni=256
mix=0.200 s
Tiempo=3.6 horas

Experimento NOESY1D PFGE

Una alternativa para determinar correlaciones debidas a acoplamientos dipolares es la utilización de la secuencia de NOESY1D PFGE, que gracias a la utilización de pulsos selectivos y gradientes de campo permite obtener espectros de una gran calidad y un nivel de artefactos muy bajo. En la siguiente figura se muestran los espectros correspondientes a la excitación selectiva de los ^1H con δ 3.4 y 2.26 ppm. En este caso el experimento se realizó de forma manual.

