






Unitat de RMN

Tema 11

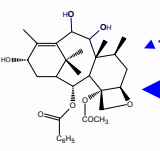
Introducción a los experimentos de 2D

Determinación estructural por RMN




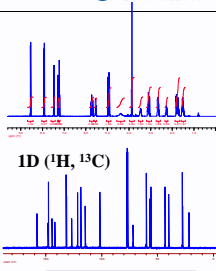
$C_{20}H_{24}N_2O_2$

MW: 324,42

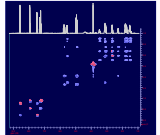


Experimentos RMN






1D (1H , ^{13}C)




2D
 1H - 1H
 1H - ^{13}C

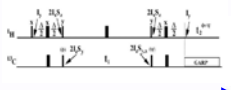
Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Aplicación en Biomacromoléculas

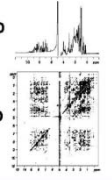




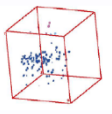
Muestra
 $^{15}N/^{13}C/^1H$



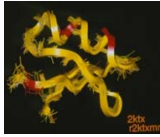
1D



2D




3D



Estructura 3D

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

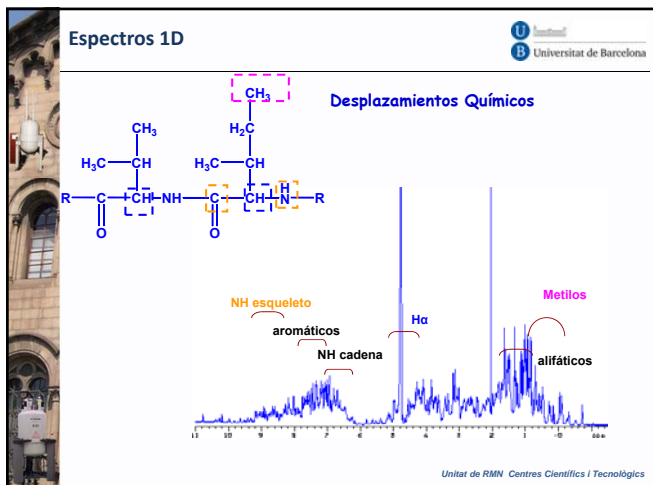
Información que se puede obtener por RMN 

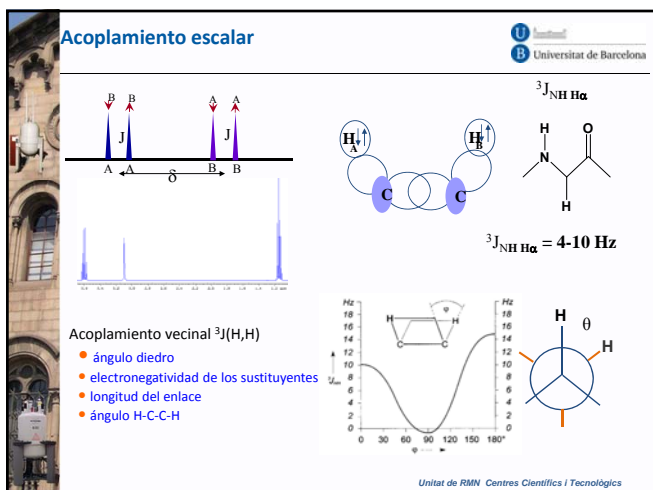
Parámetros observables

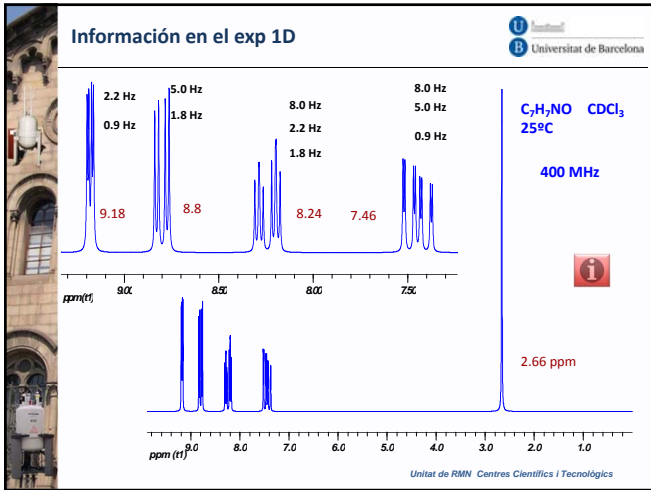
- ❑ Desplazamientos químicos
- ❑ Constantes de acoplamiento
 - Ángulos diedros
 - Transferencia de magnetización en exp de correlación
- *Tiempos de relajación*
- *Noe (relajación cruzada)*
- *Intercambio*
- *Acoplamientos dipolares residuales*
-

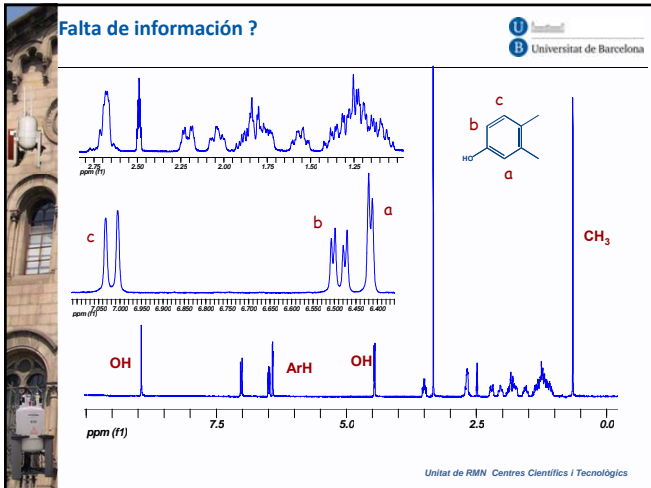
DETERMINACIÓN DE ESTRUCTURAS

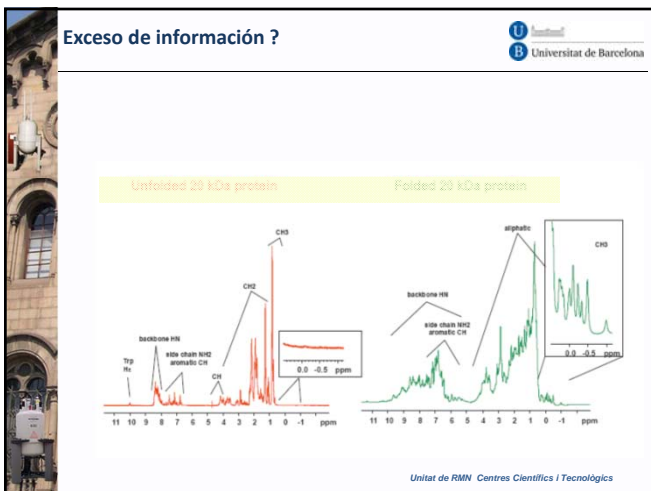
Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics











Introducción a las 2D

❖ Experimentos de 1D

- La información se presenta en un único eje de frecuencias (desplazamientos químicos, acoplamiento, etc).
- El solapamiento de señales dificulta la extracción de toda la información.
- Es necesaria la realización de experimentos complementarios (por ejemplo de desacoplamiento, etc.).

Estradiol 1H

300 MHz

500 MHz

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Experimentos de 2D

❖ Experimentos de 2D

- La información está contenida en dos ejes de frecuencia (F1 y F2).
- Los problemas de solapamiento son menores
- Es posible obtener toda la información de una propiedad en un único experimento (Cosy vs homo-desacoplamiento).

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Esquema de un experimento de 2D

PREPARACION

EVOLUCION

MEZCLA

DETECCION

t_1

t_2

La señal obtenida es función de dos tiempos de adquisición

$A(t_1, t_2) \xrightarrow{FT} S(F_1, F_2)$

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Etapas de los experimentos de 2D

Evolución Tiempo de mezcla

Etapa donde se produce la evolución de la magnetización con respecto a las correlaciones a observar en el experimento. Las relaciones existentes entre núcleos acoplados de modo escalar o/dipolar tienen que estar codificadas en frecuencias. Para cada dimensión de un experimento de nD, debe haber n-1 etapas de evolución.

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Secuencia Básica 2D

¿Cómo obtener la información generada durante el tiempo de evolución?

Secuencia SEFT

Evolución de la magnetización

C13 en resonancia

$\tau=1/4J$	$\theta=90^\circ$
$\tau=1/2J$	$\theta=180^\circ$
$\tau=3/4J$	$\theta=270^\circ$
$\tau=1/J$	$\theta=360^\circ$

$\theta=2\pi\tau J$

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Modulación en J

El resultado depende de tau y del acoplamiento H-C.

A pesar de que el espectro se adquiere con el desacoplador de ^1H activo, la señal obtenida está modulada por la constante de acoplamiento J_{CH} .

$\theta=2\pi\tau J$

$\tau=1/4J$ $\tau=1/2J$ $\tau=3/4J$ $\tau=1/J$

En la secuencia SEFT el tiempo tau es fijo y se selecciona en función del valor de J (se realizan dos experimentos $\tau=1/2J$ y $\tau=1/J$).

Muestreo de la evolución de las señales en función de J y tau

El resultado final depende de la constante de acoplamiento y de la duración del tiempo tau

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Tiempo de evolución

❖ El SEFT es un experimento de 1D.
Es posible convertirlo en un experimento de 2D mediante:

La realización de una serie de experimentos con diferentes valores del tiempo tau. → la evolución de la señal.

Se obtiene una matriz con n_i filas y n_p columnas

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Construcción de interferogramas

Seleccionando un mismo punto en cada espectro se obtiene un gráfico de la oscilación de la amplitud (o fase) de la señal

El resultado es equivalente a un FID y contiene la información procedente del tiempo de evolución. La transformada según t_2 proporcionará una señal lorentziana

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Transformada FT 2D

$FT(t_2)$

$FT(t_1)$

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Clasificación de los experimentos de 2D

■ **2D resolvo**

- Homo 2D Resolvo (J H-H, δ)
- 2D-J heteronuclear

■ **Correlación**

- Homocorrelación → COSY AV, COSY PH, DQFCOSY, TOCSY
- Heterocorrelación → HETCOR, HETCOR LR, HMQC, HMBC, HSQC
- Noesy, Roesy → NOESY, ROESY
- Intercambio químico → NOESY, ROESY

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Representación 2D

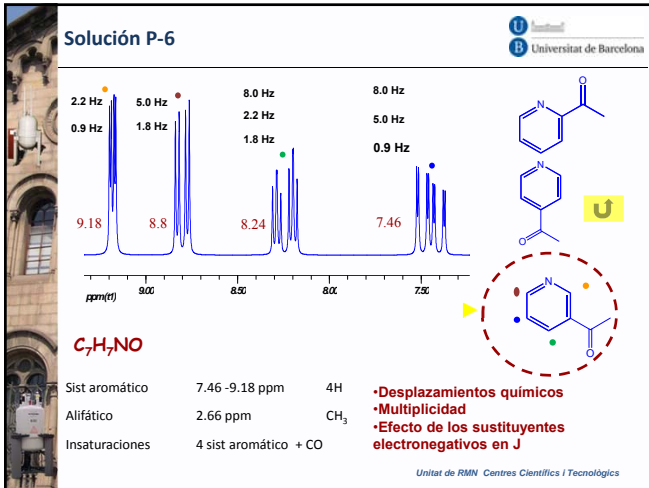
- **Mapas 3D** → staked plot ⓘ
- **Mapas de contorno**
 - Escala de color ⓘ
 - Mapa de contornos ⓘ
- **Trazas**
 - Trazas y proyecciones ⓘ
- **Proyecciones**

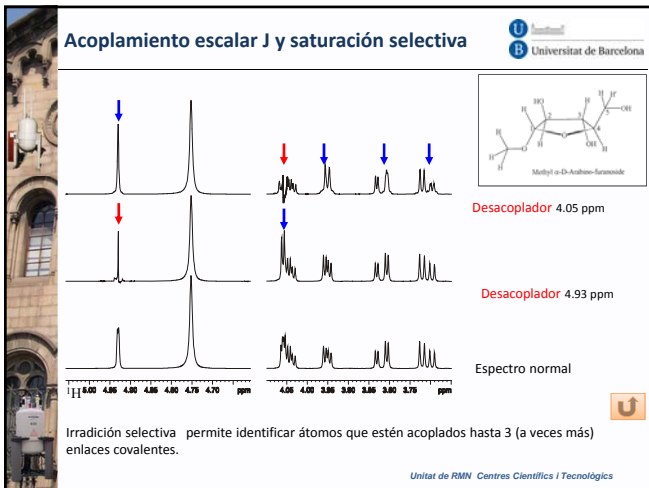
Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

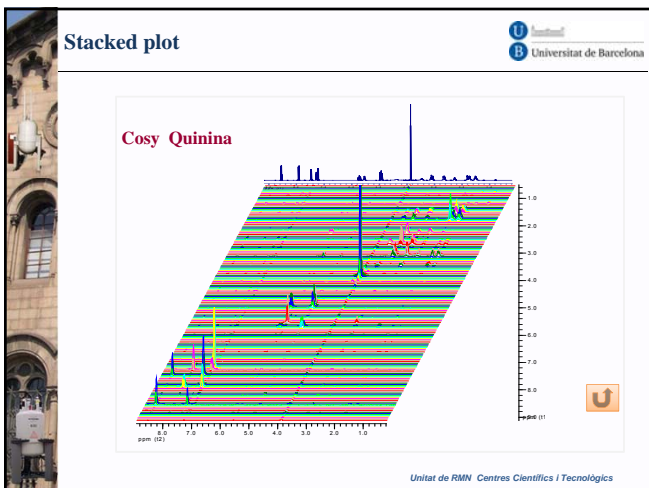
Cartoon

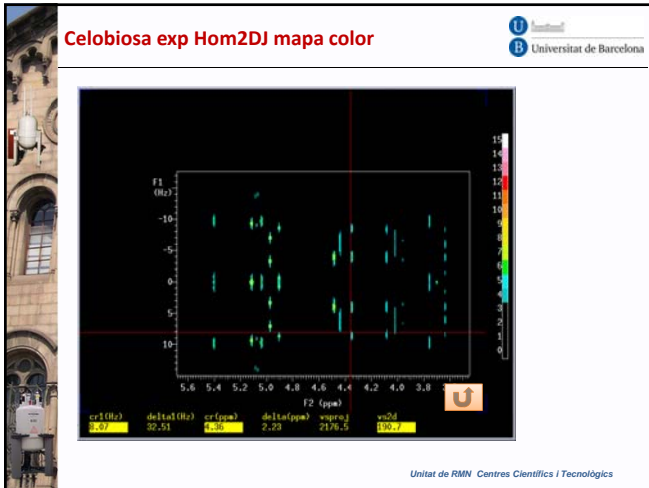
"Why, Igvgog! You've invented the wheel!"

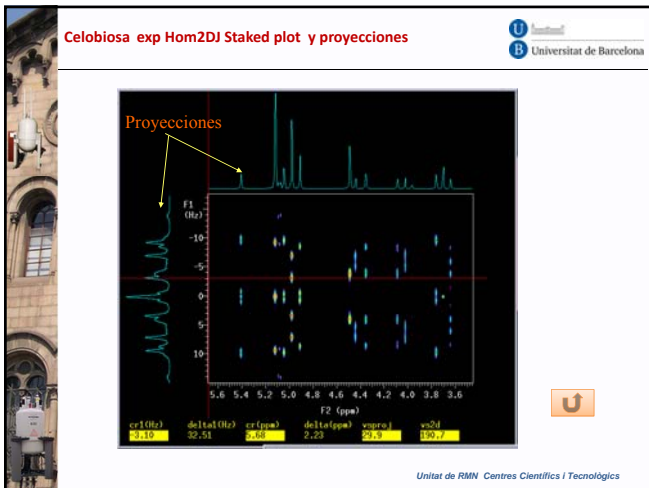
Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

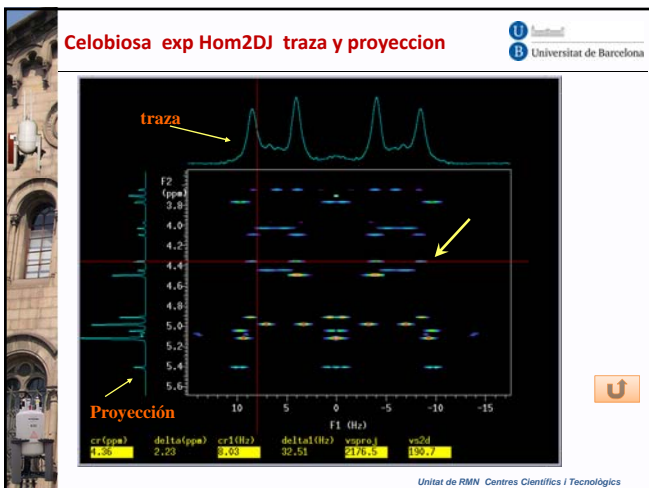















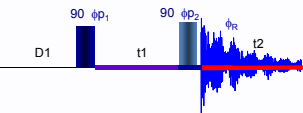


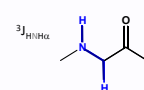
Tema-12
Experimentos Homocorrelación



COSY

Determinación de conectividades de spins acoplados entre si





- MARCAJE DE FRECUENCIAS
- TRANSFERENCIA DE MAGNETIZACIÓN EN ANTIFASE
- DETECCIÓN MODULADA POR LA EVOLUCIÓN DURANTE t1
- Transferencia de coherencia

I_y

$\xrightarrow{\text{Acoplamiento}}$


$2I_y I_{sz}$
Spin I

$\xrightarrow{\text{Pulso } 90 (I, S)}$

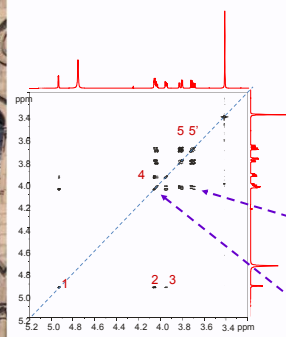
$2I_x I_{sy}$
Spin S

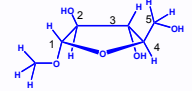
Transferencia de magnetización entre dos spins (I, S) vía acoplamiento escalar

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics



Información obtenida en el Cosy





α. metil D arabinofuranosido

En el experimento Cosy se detecta simultáneamente toda la información de acoplamiento escalar (recordar el exp homodecoupling)

Los protones acoplados entre si tienen una señal de correlación fuera de la diagonal

Las señales de la diagonal son equivalentes al espectro 1D

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Cosy en AV

Combinación de los datos modulados en seno y coseno para cada t_1

	N_type			P_type		
	pulso1	pulso2	detect	pulso1	pulso2	detect
C_1	x	x	x	x	x	x
C_2	y	x	-x	y	x	x

$\sqrt{R^2+I^2}=AV$

PHASE TWIST
Señales en F1 moduladas en fase y no en amplitud

Función de procesado
Pseudoecho o sinebell

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Ciclo de fases Cosy

- Los procesos de relajación durante el periodo de evolución generan una magnetización en Z.
- El segundo pulso de 90° la transforma en magnetización longitudinal, que evoluciona sólo durante t_2 . Tiene un desplazamiento químico constante en F1

$\omega_1=0$ $\omega_2=\omega_s$ $\omega_1=0$ $\omega_2=\omega_l$

Cancelación de las señales axiales

Ciclo de fases total en el Cosy (AV) $2(d\text{ freq}) + 2(\text{sup axial}) = 4$

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Límites del Cosy

$^3J_{H-H\alpha}$

Ubiquitina, proteína con 76 aminoácidos de 8.5 KDa

Protein NMR Spectroscopy John Cavanagh
Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

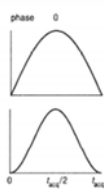
Cosy en AV del compuesto C18H24O2

Funciones de apodización pseudo echo o campana de seno

Varios sistemas de acoplamiento independientes

Campana de seno 0°

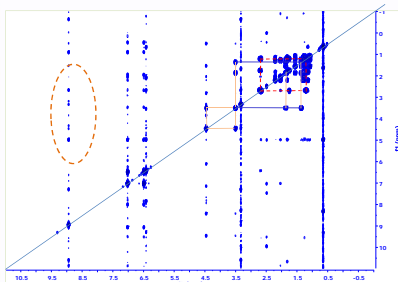
Campana de seno cuadrado 0°



La información es igual a ambos lados de la diagonal

Simetrización

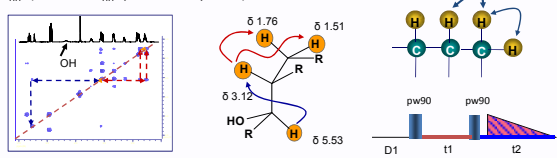
Disminuye la intensidad de artefactos e imperfecciones



Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Ficha del Cosy

El Cosy AV permite determinar conectividades entre protones acoplados escalarmemente $^2J_{HH}$ y $^3J_{HH}$ (valores de J_{HH} aprox entre 2 y 15 Hz).



En el experimento COSY-AV (90°) no es posible ajustar simultáneamente la fase de las señales de correlación y de la diagonal. Se procesa y representa en valor absoluto. $\sqrt{R^2+I^2} = AV$

Es necesario utilizar funciones de procesado tipo campana de seno. Las colas de las señales de la diagonal pueden enmascarar las señales de correlación próximas.

Es un experimento rápido ($nt = 4-8$) y sin dificultad para compuestos de tamaño mediano-pequeño $DR = Sw_1/Ni$

El número de incrementos depende de la ventana espectral, entre 128 y 512 $AT(1) = Ni/Sw_1$

Ref: J. Jeener, *Ampere International Summer School, Basko Polje (1971)*;

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

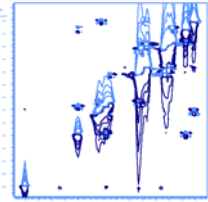
Cosy en Fase

Ventajas del Cosy en fase:

- Se recupera la información sobre las constantes de acoplamiento.
- Mejora la definición de la estructura fina de las señales de correlación

Inconvenientes del Cosy en fase:

- Las señales de la diagonal tienen un carácter de dispersión.
- Se requiere la adquisición de dos conjuntos de experimentos (States) El número mínimo de acumulaciones es 8 /16.



Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

DQF-COSY

- Las señales de la diagonal y de correlación son de absorción
- Las señales de la diagonal y correlación tienen estructura en antifase.
- Los efectos de cancelación afectan por igual a las señales de la diagonal y de correlación: **Mayor igualdad en la intensidad de las señales.**
- Disminución de la intensidad de los singuletes.

La selección se efectúa mediante el ciclo de fases de los dos primeros pulsos. El tercer pulso permite la transformación de las coherencias de doble cuanto en observables

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

DQFCOSY vs COSY

- Es posible ver señales de correlación próximas a la diagonal.
- Disminución de la intensidad de los singuletes, **filtro de DQC**
- Precisa más resolución (det. correlaciones prov de J pequeñas)
- Necesidad de realizar un **mínimo de acumulaciones 8/16** (ciclo de fases)
- Tiene menos sensibilidad que el Cosy en fase

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

DQFCOSY vs COSY

Polisacrido de 8-9 unidades

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Relación de fases en el DQFCOSY

- DI y CR tienen la misma modulación
- Antifase en las dos dimensiones
- Ajuste de fase en F1 y F2

cancelación de señales en antifase por falta de resolución

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

DQFCOSY Sistema AMX

Serina sistema AMX

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

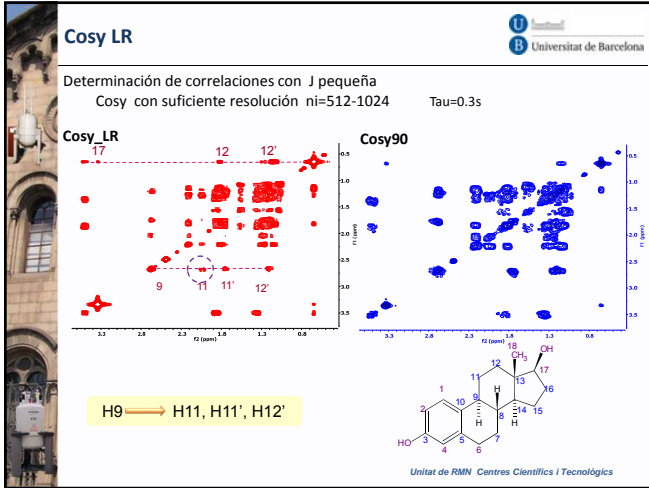
LR-COSY

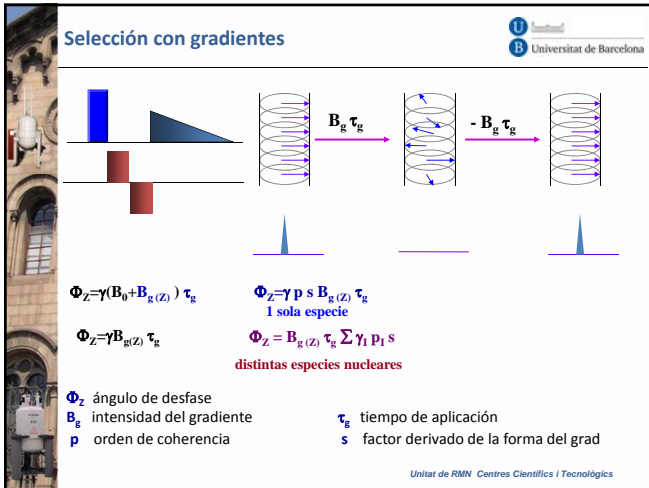
La introducción de unos pequeños tiempos de espera antes y después del último pulso favorece la detección de señales de correlación debidas a J pequeñas

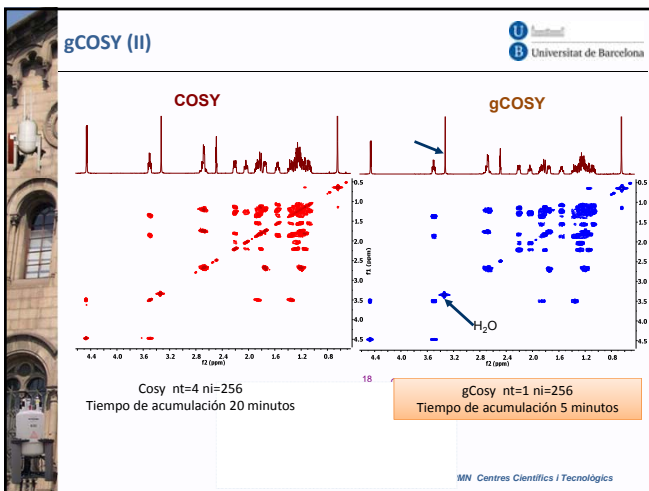
Para ^1H con un rango de T_2 comprendido entre 0.2 y 0.6 s el valor de Δ oscila entre 0.05 y 0.45 s (suponiendo un tiempo de adquisición de aprox 0.3s).

Se precisan resoluciones elevadas en f_1, f_2

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics







GDQFCOSY

Unitat de RMN
Universitat de Barcelona

- Tiempo menor, es posible hacer los experimentos con $nt=1-2$ (5-15 minutos)
- Mejora en la eliminación de imperfecciones, menos ruido t_1
- Supresión de singuletes hasta 10.000 :1 frente a 100 :1 (ciclos de fase)
- Menor sensibilidad (en relación al de ciclo de fases) $\text{aprox } \sqrt{2}$
- Posibles problemas debido a la difusión

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Unitat de RMN
Universitat de Barcelona

Tema-12b
Homocorrelación 2D Tocsy

Tocsy

Unitat de RMN
Universitat de Barcelona

Coincidencia de señales → Ambigüedad en la identificación de sistemas

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Heterocorrelación 2D

Objeto

Los experimentos de heterocorrelación 2D permiten establecer conectividades entre pares núcleos distintos, por lo general entre un protón y un heteronúcleo (^{13}C , ^{15}N), relacionados mediante acoplamiento escalar

Aplicaciones

Identificación del número de protones unidos directamente a un átomo de carbono

Transferencia de la información de las asignaciones del espectro de carbono (heteronúcleo) al de protón y viceversa, vía uniones directas

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Experimentos de Heterocorrelación 2D

Experimentos correlación Heteronuclear

- Detección directa (heteronúcleo)
 - Correlación a un enlace → HETCOR
 - Correlación a larga distancia → long-range HETCOR, COLOC
- Detección inversa (protón)
 - Correlación a un enlace → HSQC, HMQC
 - Correlación a larga distancia → HMBC

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Hetcor secuencia básica

Etapas de la secuencia Hetcor (básica)

- Excitación del protón
- Marcaje de las frecuencias de protón durante el tiempo de evolución t_1
- Transferencia de polarización entre el protón (I) y el heteronúcleo (S)
- Detección del heteronúcleo S (t_2)

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Sondas

Sonda ASW

BBO

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Aspectos instrumentales II

- Desacoplamiento de ^{13}C**
 - Desacoplamiento de ^{13}C durante el tiempo de adquisición. Debido al rango de frecuencias sobre las que hay que actuar (≈ 160 ppm), se utilizan procedimientos de desacoplamiento (**GARP**, **WURST**), que tienen una gran efectividad a potencias relativamente pequeñas.
- Supresión de las señales de ^1H asociadas a $^{13}\text{CH}_n$ y detección únicamente de los ^1H unidos a $^{13}\text{CH}_n$.**
 - En el caso de compuestos sin marcaje isotópico es necesario **eliminar señales con una intensidad de 100 veces superior** a las que se detectan ($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$).

Modulo Bird

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

HSQC I

HSQC Etapas básicas

El experimento se inicia con la magnetización de protón, d_1 debe basarse en el tiempo de relajación de ^1H ($1.26 T_1$)

Transferencia de magnetización del protón ^1H al heteronucleo ^{13}C vía secuencia INEPT

Evolución de la magnetización de ^{13}C durante el tiempo de evolución (marcaje de frecuencias)

Transferencia de magnetización de ^{13}C al protón, vía INEPT inverso

Adquisición de la magnetización de protón en t_2 , desacoplando el heteronucleo

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Protones detectados

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Experiments Homonucleares

HMQC o HSQC

HMBC

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Comparación de los Métodos utilizados para la supresión de 1H-12C

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

- HMQC, HMBC y HSQC se basan en la supresión de las señales del isotópomo $^1\text{H}-^{12}\text{C}$ (99%) y la selección de señales de $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ (1%)

Comparación de los resultados obtenidos con los distintos métodos de eliminación de las señales de $^1\text{H}-^{12}\text{C}$

(a) 1H convencional, (b) ciclado de fases, (c) modulo BIRD, (d) gradientes de campo

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

HMQC/gHMQC

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics

Estradiol
(10 mg /0.75 ml DMSO-d6)
tiempo: 58 min, nt=4

$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMQC

$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ gHMQC

Unitat de RMN Centres Científics i Tecnològics
