

00583



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO 3

FACULTAD DE QUÍMICA 28j

**Métodos Generales para la Determinación Precisa de Constantes de**

**Acoplamiento en R. M. N.**

# FALLA DE ORIGEN

T E S I S

que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Químicas  
(Fisicoquímica)

PRESENTA

M. en C. José Federico del Río Portilla



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

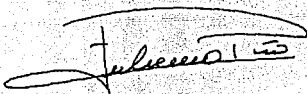
Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Jurado Asignado

Presidente:	Dr. Miguel Costas Basín
Primer Vocal:	Dra. Rosalinda Contreras
Segundo Vocal:	Dr. Georgii Lazarev
Tercer Vocal:	Dr. Luis Angel Maldonado
Secretario:	Dr. Hugo Torrens Miquel
Primer Suplente:	Dr. Armando Ariza Castolo
Segundo Suplente:	Dr. Eusebio Juaristi

Lugar donde se desarrollo el tema:  
Departamento de Química  
Universidad de Cambridge, Inglaterra.



M. en C. José Federico del Río Portilla  
Sustentante



Dr. Eduardo Díaz Torres  
Asesor

**A Alejandra por todo lo que  
hemos vivido, por su apoyo  
incondicional y por dejar su  
desarrollo profesional por dos  
años mientras yo buscaba el mío.**



**Nuevamente y no dejaré de  
hacerlo:  
a Irma Yolanda y Jesús Antonio**

**Ahora a Maik, Anilú, Yoli y Roberto**

**A Toñito, Rita María, Toñis y Rita**

## Agradecimientos

Quisiera dejar patente mi completo agradecimiento al Dr. Ray Freeman quién me aceptó para trabajar en su grupo en la Universidad de Cambridge, que dos años guió mi trabajo y me orientó para conocer más sobre la espectroscopía de resonancia magnética nuclear. I do not have English words to express all my gratitude to you Ray.

Quisiera agradecer también al Dr. Eduardo Díaz todo su apoyo para que pudiera lograr mis planes y al Dr. Francisco Lara su ayuda en el tiempo crítico para que llegaran a su fin.

Agradezco a: Dr. Eduardo Díaz Torres, Dr. Jesús Antonio del Río Portilla, Dr. Armando Ariza Castolo, M. en C. Miguel Angel del Río Portilla, M. en C. Atilano Gutiérrez Carrillo y Dr. Vicente Talanquer Artigas la revisión minuciosa y detallada de este trabajo y todos sus comentarios. No creo que sobre decirlo, la responsabilidad es completamente mía de lo que aquí se expresa.

A la maestra Claudine Chamoreau y Dr. Cecilio Alvarez Toledano por su apoyo desinteresado en las clases de francés.

Al Dr. Juventino José García Alejandre por el apoyo final para la conclusión de este trabajo y por mucho más que eso.

Agradezco a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México y al Consejo Británico por las becas otorgadas para poder desarrollar mi estancia de dos años en la Universidad de Cambridge, Inglaterra.

## Resumen

Este trabajo desarrolla y estudia cinco métodos diferentes para medir constantes de acoplamiento espín-espín en los espectros de resonancia magnética nuclear.

Los primeros dos métodos, el de desacoplamiento y reconvolución y el de depuración de  $J$ , involucra la medición de constantes de acoplamiento pequeñas usando experimentos de desacoplamiento. El primer método muestra ser el mejor para medir constantes de acoplamiento pequeñas; puede ser usado aún cuando éstas sean tan pequeñas como un tercio del ancho de la línea del espectro. El segundo método ayuda a visualizar como trabaja el método anterior.

El tercer método, el del valor menor, contrario a los dos métodos anteriores, sólo requiere de un experimento para efectuar la medición de la constante de acoplamiento. Este método no puede medir constantes de acoplamiento muy pequeñas. Es un buen método para deconvoluciones rápidas de multipletes simétricos.

El método de la aparente deconvolución en el dominio del tiempo, el cual usa el mismo truco que el de depuración de  $J$ , permite la medición de las constantes con una muy buena precisión.

El método de duplicación de  $J$  en el dominio de las frecuencias ha mostrado ser el mejor método de todos en este trabajo. Es posible medir constantes de acoplamiento pequeñas cuando apenas es posible observar evidencias de un desdoblamiento sin resolver. Este método puede ser usado para implementar deconvoluciones una vez que las constantes de acoplamiento han sido medidas.

Los ángulos diedros obtenidos a partir de los acoplamientos a tres enlaces de distancia CH de la estircinina a partir de la ecuación de Karplus se comparan con los datos obtenidos de la estructura de rayos X.

## Abstract

This work develops five different methods of measuring spin-spin coupling constants in the nuclear magnetic resonance spectroscopy.

The first two methods, decoupling-reconvolution, and stripping, involve the measurement of small coupling constants using decoupled experiments. The first method is shown to be better for measuring small couplings; it can be used even when they as small as one-third of the line width. The second method helps to visualise how the previous method works.

Three more methods were developed, but unlike decoupling-reconvolution they do not require two different experiments to be carried out. The "lower value method" can measure coupling constants but not when they are very small. This is a good method for fast deconvolution of multiplets when the signals are symmetrical.

Deconvolution in the time domain, which uses the trick of the stripping method, permits the measurement of coupling constants with very high accuracy.

The J-doubling method in the frequency domain has shown to be the best of all in this work. It is possible to measure small coupling constants when it is just possible to see evidence for an unresolved splitting. This method can be used to implement the deconvolution once the coupling constants have been measured.

The dihedral angles obtained from the measured CH couplings in strychnine through the Karplus equation are compared with data from X-Ray spectroscopy.

## Índice

### Capítulo I

<b>Fundamentos Teóricos.....</b>	<b>1</b>
<b>I.1.- Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>I.2.- Antecedentes.....</b>	<b>1</b>
<b>I.3.- Descripción Clásica.....</b>	<b>2</b>
I.2.1.- Ecuación de Bloch.....	3
<b>I.3.- Tratamiento Mecánico Cuántico.....</b>	<b>6</b>
I.3.1.- Ecuación de Schrödinger.....	6
I.3.1.1.- El Hamiltoniano de Espín.....	7
I.3.2.- El Operador de Densidad.....	8
I.3.2.1.- Sistema en Equilibrio.....	9
I.3.2.2.- Evolución de los Operadores de Espín.....	10
I.3.3.- Producto de Operadores.....	11
<b>I.4.- RMN en Dos Dimensiones.....</b>	<b>14</b>
<b>I.4.1.- Espectroscopía de Correlación.....</b>	<b>14</b>

### Capítulo II

<b>Métodos para la Determinación de Constantes de Acoplamiento.....</b>	<b>18</b>
<b>II.1.- Introducción.....</b>	<b>18</b>
<b>II.2.- Medición de Constantes de Acoplamiento.....</b>	<b>18</b>
II.2.1.- Convolución.....	19
II.2.2.- El Método DISCO.....	21
II.2.3.- Medición de Constantes de Acoplamiento Mediante Espectros de Correlación.....	21

II.2.4.- Extensión de J.....	23
II.2.5.- Duplicación de J en el dominio del tiempo.....	24
II.2.6.- Deconvolución en el Dominio del Tiempo.....	25
II.2.7.- Deconvolución en el dominio de las frecuencias.....	27
II.2.8.- Método de máxima entropía,.....	28
<b>II.3.- Excitación Selectiva Incrementando la Sensibilidad con Matrices Hadamard.....</b>	<b>29</b>
II.3.1.- El método Hadamard .....	30
II.3.2.- Desarrollo Experimental.....	31
II.3.3.- Resultados.....	33

### Capítulo III

<b>Medición Precisa de Constantes de Acoplamiento por Desacoplamiento y Reconvolución.....</b>	<b>38</b>
<b>III.1.- Desacoplamiento Coherente.....</b>	<b>38</b>
III.1.1 Efecto Bloch-Siegert .....	39
III.1.2.- Calibración del Pulso de Desacoplamiento .....	40
<b>III.2.- Desacoplamiento y Reconvolución.....</b>	<b>41</b>
III.2.1.- Fundamentos Teóricos .....	41
III.2.2.- Procedimiento experimental.....	44
III.2.3.- m-Bromo nitro benceno.....	47
III.2.4.- Comportamiento del Método .....	49
III.2.4.1 Relación señal ruido.....	50
III.2.4.2 Ensanchamiento de la señal.....	51
III.2.5.- Determinación de constantes de acoplamiento menores al ancho de la señal.....	53
III.2.5.1.- (S)-(-)-Nicotina y (-)-cotinina .....	53
III.2.5.2.- 2-Furfural.....	56

III.3.- Depuración de J.....	59
III.3.1.- Determinación Experimental.....	61
 <b>Capítulo IV</b>	
<b>El Valor Menor.....</b>	<b>66</b>
<b>IV.1.- Introducción.....</b>	<b>66</b>
<b>IV.2.- Deconvolución Mediante el Valor Menor.....</b>	<b>66</b>
IV.2.1.- Desarrollo Experimental.....	68
<b>IV.3.- Medición de Constantes de Acoplamiento.....</b>	<b>69</b>
IV.3.1.- Constantes de Acoplamiento Pasivas.....	73
IV.3.2.- Constantes de Acoplamiento Activas.....	79
IV.3.2.1.- Desarrollo Experimental.....	81
 <b>Capítulo V</b>	
<b>Medición de Constantes de Acoplamiento Mediante la Aparente Deconvolución en el Dominio del Tiempo.....</b>	<b>85</b>
<b>V.1.- Introducción.....</b>	<b>85</b>
<b>V.2.- Pseudo Deconvolución en el Dominio del Tiempo o t-         Decon.....</b>	<b>85</b>
<b>V.3.- Constantes de acoplamiento en fase.....</b>	<b>90</b>
V.3.1.- Determinación Experimental.....	92
<b>V.4.- Constantes de Acoplamiento Activas.....</b>	<b>101</b>
V.4.1.- Determinación Experimental.....	104
 <b>Capítulo VI</b>	
<b>Duplicación de J en el dominio de las frecuencias.....</b>	<b>107</b>
<b>VI.1.- Introducción</b>	
<b>VI.2.- Duplicación de J en el Dominio de las Frecuencias.....</b>	<b>107</b>

VI.2.1.- Duplicación de J de Acoplamiento Activos.....	109
VI.2.1.1.- Determinación de Constantes de Acoplamiento Activas en Multipletes Complejos.....	111
VI.2.2.- Determinación Experimental de Constantes de Acoplamiento Activas.....	116
<b>VI.3.- Constantes de Acoplamiento Pasivas.....</b>	<b>124</b>
VI.3.1.- Determinación de Constantes de Acoplamiento Pasivas de Sistemas Complejos.....	124
VI.3.2.- Determinación Experimental de Constantes de Acoplamiento Pasivas.....	127
<b>VI.4.- Deconvolución.....</b>	<b>134</b>

## Capítulo VII

<b>Discusión.....</b>	<b>136</b>
<b>VII.1.- Comparación de los Métodos para la Medición de constantes de Acoplamiento.....</b>	<b>136</b>
<b>VII.2.- Constantes de Acoplamiento Pasivas .....</b>	<b>137</b>
VII.2.1.- Dependencia con el Ancho de la Señal.....	137
VII.2.2.- Doble de Dobles.....	139
VII.2.3.- Constantes de Acoplamiento Pequeñas.....	141
<b>VII.3.- Constantes de Acoplamiento Activas.....</b>	<b>142</b>
VII.3.1.- Dependencia con el Ancho de la Señal.....	143
VII.3.2.- Sistemas Complejos en Antifase.....	144
VII.3.3.- Constantes de Acoplamiento Pequeñas.....	145
<b>VII.5.- Comparación con Resultados de Estructuras de Rayos X. .</b>	<b>148</b>

<b>Bibliografía.....</b>	<b>152</b>
--------------------------	------------

## Apéndice

<b>Publicaciones originadas por este trabajo para su consulta.....</b>	<b>157</b>
--	------------



## Abreviaturas

2-D: Dos dimensiones.

⊗: Producto de funciones una vez hecha la transformada de Fourier.

ΔB: Campo magnético aplicado fuera del origen.

COLOC: acrónimo de COrrrelation spectroscopy via LOng rang Couplings.

COSY: acrónimo de COrrrelation Spectroscopy.

DISCO: acrónimo de DIfference and Sums of traces within COsy spectra.

DMSO: Sulfoxido de dimetilo.

DQF-COSY: acrónimo de Double Quantum Filtered COSY.

FID: acrónimo de Free Induction Decay.

$I_{ix}$ : Operador de momento angular del  $i$ ésimo espín sobre el eje X.

$I_{iy}$ : Operador de momento angular del  $i$ ésimo espín sobre el eje Y.

$I_{iz}$ : Operador de momento angular del  $i$ ésimo espín sobre el eje Z.

$J_a$ : Constante de acoplamiento activa.

$J_p$ : Constante de acoplamiento pasiva.

$\Delta\nu$ : ancho de la señal en Hz.

RMN: Resonancia Magnética Nuclear.

soft-COSY: Experimento COSY que emplea el segundo pulso débil.

TOCSY: acrónimo de TOtal Correlation Spectroscopy.

WALTZ-16: Nombre de una secuencia de composición de pulsos para desacoplar eficientemente hidrógeno.

# Capítulo I

## Fundamentos Teóricos

### I.1.- Introducción

Hoy en día es prácticamente imposible concebir la Química Moderna sin la Resonancia Magnética Nuclear, RMN, ya que ha permitido el esclarecimiento estructural de un sin número de compuestos químicos, el estudio de propiedades de sistemas tanto estáticos como dinámicos, así como un gran y variado número de aplicaciones. Esta técnica espectroscópica es la que ha contribuido más al avance de la Química.

Recientemente, un gran número de investigadores se están dedicando a la determinación estructural de polímeros sintéticos y naturales en solución, lo que ha permitido avances en áreas como la Bioquímica y Química Orgánica de polímeros. Hace menos de una década, el desarrollo de la RMN de imágenes permitió el uso de esta técnica como una herramienta fundamental para el diagnóstico médico. Hoy en día es posible obtener, prácticamente, películas de como funciona el corazón en una persona viva y observar su comportamiento visual. Ninguna técnica es tan versátil en sus aplicaciones como la RMN.

Iniciamos la presentación de este trabajo mediante una vista global a los fundamentos teóricos e históricos<sup>1</sup>.

### I.2.- Antecedentes

Los primeros experimentos de Resonancia Magnética Nuclear, RMN, se remontan hasta el año de 1920 con los experimentos de Stern y Gerlach<sup>2</sup>. Los fundamentos teóricos inician con la postulación por Pauli sobre el momento angular de las partículas subatómicas<sup>3</sup>. Sin embargo, no es sino hasta 1946 que se reportan los

experimentos realizados en forma independiente y al mismo tiempo por Bloch<sup>4</sup> y Purcell<sup>5</sup> sobre RMN, la cual se considera como la fecha de su nacimiento.

En la década de los 50's con el empleo de campos magnéticos homogéneos y más intensos que un Tesla, así como el giro de la muestra, permitieron la aplicación de la RMN a la Química. Las mejoras instrumentales en los equipos de RMN permitieron el uso del desplazamiento químico<sup>6,7</sup> y, posteriormente, el acoplamiento espín-espín y el acoplamiento dipolar en las aplicaciones estructurales y de reactividad química<sup>8,9</sup>. En la década de los 60's, la implementación de la técnica llamada de transformada de Fourier incrementó sus aplicaciones a sistemas con poca cantidad de muestra y a la posibilidad de observar núcleos poco sensibles y/o no muy abundantes<sup>10</sup>. Sin embargo, algo que nadie esperaba, la técnica de transformada de Fourier, que en sí misma fue una revolución en la técnica, sentó las bases para lo que vendría a ser la segunda revolución, la RMN en dos dimensiones<sup>11</sup> y posteriormente multidimensional<sup>12</sup>.

Las investigaciones en el área se están enfocando en la actualidad al uso de pulsos selectivos para lograr mejoras en la sensibilidad<sup>13,14</sup>, en el procesamiento de los resultados una vez que ya han sido adquiridos<sup>15</sup>. También se busca el desarrollo de nuevas técnicas que permitan encontrar la solución a problemas que hoy en día parecen irresolubles para ayudar a la elucidación estructural de moléculas cada vez más complejas, como la de macromoléculas, i. e. polímeros naturales y sintéticos. Este trabajo se enfocó principalmente al desarrollo de nuevos métodos de análisis de datos posteriores a la obtención de los espectros.

Para explicar el fenómeno de la RMN existen dos modelos: el clásico y el cuántico; iniciemos la descripción del primer modelo.

### **I.3.- Descripción Clásica**

La espectroscopía estudia la interacción de la materia con la radiación electromagnética, de tal forma que la energía absorbida o emitida está definida por  $\Delta E = h\nu$ . La RMN observa las transiciones en la región de las radiofrecuencias del espectro electromagnético entre los niveles de energía de los espines nucleares, los cuales han sido diferenciados por la presencia de un campo magnético. Solamente los núcleos que poseen números cuánticos de espín 0, y por ende momentos magnéticos, tendrán niveles de energía no degenerados cuando se les coloque en un campo magnético.

El momento magnético nuclear,  $\mu$ , está definido en unidades atómicas por:

$$\mu = \gamma I, \quad [1.1]$$

donde  $I$  es el momento angular de espín y  $\gamma$  es la constante giromagnética que depende del núcleo bajo estudio. Los vectores están representados por letras negras.

Quando los núcleos son colocados en un campo magnético,  $B_0$ , los componentes del momento angular de espín paralelo a este campo externo,  $m$ , se cuantizan generando diferentes niveles energéticos restringidos por los valores:

$$\mu_z = \gamma I_z = \gamma m, \quad m = I, I-1, \dots, -I \quad [1.2]$$

donde  $I_z$  es la componente  $z$  del número cuántico de espín. Por tanto, cuando un núcleo se coloca en un campo magnético  $B_0$  los niveles de energía están definidos por:

$$E_m = -\mu \cdot B_0 = -\gamma I \cdot B_0 = -\gamma I_z B_0 \quad [1.3]$$

La diferencia poblacional, establecida por la magnitud del campo magnético y por la temperatura del sistema entre estos niveles de energía, es la responsable de la magnetización global de la muestra,  $M$ , y del fenómeno de la RMN. Uno de los problemas principales de la RMN es que esta diferencia de población no es muy grande.

Bloch<sup>16</sup> estudió el fenómeno y empleando la Física Clásica sentó las bases para describir el fenómeno.

### 1.2.1.- Ecuación de Bloch

Dos métodos teóricos se han desarrollado para describir el fenómeno de RMN. Uno de ellos es el modelo vectorial, el cual se basa en la mecánica clásica para explicar el fenómeno de la RMN y experimentos muy sencillos. Este modelo predice el movimiento de un sistema con un espín aislado o un sistema de espines múltiples en donde los espines no interactúan unos con otros. Bloch mostró que la magnetización,  $M$ , es como una barra magnética con momento angular que obedece la ecuación clásica de torque; por tanto la magnetización está gobernada por la ecuación:

$$\frac{dM}{dt} = M \times \gamma B(t). \quad [1.4]$$

Esta ecuación nos dice que cuando  $B$  es independiente del tiempo,  $B(t) = B_0$ , la magnetización permanece a un ángulo fijo con respecto a  $B_0$  y precesiona a una velocidad angular  $\omega_0 = -\gamma B_0$  como un trompo en un sistema sin fricción. La frecuencia angular  $\omega_0$  se le llama frecuencia de Larmor.

Si consideramos que en vez de estar en un sistema de coordenadas fijo, comúnmente llamado sistema del laboratorio, se considera que se está en un sistema que gira a la frecuencia de Larmor, sistema rotante, la ecuación de Bloch se resuelve más fácilmente. En este sistema rotante la magnetización parece como si se mantuviera fija y no existiera un campo magnético externo. Para un sistema que gira a una velocidad diferente a la de Larmor,  $\omega$ , la magnetización se comportará como si experimentara un campo magnético reducido expresado por  $\Delta B = (B_0 - \omega/\gamma)$ . La ecuación [1.4] se transforma en:

$$\frac{dM}{dt} = M \times (\gamma B(t) + \omega) \quad [1.5]$$

Si se aplica un campo magnético oscilante a la frecuencia de Larmor y perpendicular a  $B_0$  con intensidad  $B_1$ , la magnetización experimenta una fuerza que genera una precesión alrededor de  $B_1$ . Este campo magnético de magnitud  $B_1$  es lo que conocemos como un pulso. Este campo magnético puede ser descompuesto en dos componentes, pero sólo aquel que gira en el mismo sentido que el sistema rotante generará la resonancia. Este campo magnético se describe como:

$$B_1(t) = B_1 (i \cos(\omega t) - j \sin(\omega t)) \quad [1.6]$$

En el sistema rotante el campo magnético de la radiofrecuencia aplicada, llamado campo magnético efectivo,  $B_{ef}$ , es la suma vectorial de un campo magnético reducido  $\Delta B$  a lo largo del eje X y del campo magnético generado por la radiofrecuencia  $B_1$  a lo largo del eje Y:

$$B_{ef} = i B_1 + k (B_0 - \omega/\gamma) = i B_1 + k \Delta B \quad [1.7]$$

Este campo magnético efectivo tiene la inclinación  $\theta$  con respecto al eje X en el plano XZ, y está definido por:

$$\theta = \tan^{-1} (\Delta B / B_1) \quad [1.8]$$

En este caso la magnetización tendrá una rotación con respecto a la nueva frecuencia  $-\gamma B_{ef}$ . Al tiempo  $t_p$ , que es la duración del pulso, después de haber aplicado el pulso, la magnetización habrá girado un ángulo  $\alpha$  alrededor de  $B_{ef}$ , definido por:

$$\alpha = \gamma |B_{ef}| t_p \quad [1.9]$$

$\alpha$  es conocido como el ángulo de excitación y  $t_p$  como el ancho del pulso. Por ejemplo, un pulso de  $90^\circ$  ( $\alpha = \pi/2$ ) aplicado a lo largo del eje +X del eje rotante gira la magnetización  $M$  de la dirección del eje +Z a la dirección del eje -Y.

Una vez ahí y después de suspender el pulso, la magnetización generará una magnetización transversal en los ejes X y Y definidas por:

$$M_y = M_0 \cos \theta \sin \alpha$$

$$M_x = M_0 \sin\theta \cos\theta (1 - \cos\alpha). \quad [1.10]$$

que pueden ser detectadas por una bobina. En este modelo, estas ecuaciones son las que explican la generación de las señales de RMN.

Si  $\Delta B \gg B_1$ , el campo magnético efectivo permanece cerca del eje Z; esto provoca que la magnetización transversal generada sea pequeña. En la RMN de transformada de Fourier se aplica un campo magnético  $B_1$  fuerte por un tiempo corto, al cual se le llama pulso fuerte  $B_1 \gg \Delta B$ , lo cual garantiza que todos los núcleos excitados se encuentren en resonancia.

La ecuación [1.10] describe un sistema en donde los núcleos seguirían precesionando indefinidamente. Pero existen dos diferentes procesos que obligan a la magnetización regresar a su estado de equilibrio. A estos procesos se les conoce como relajación longitudinal y relajación transversal. Para ello Bloch introdujo dos constantes,  $T_1$  y  $T_2$ . Estas nuevas constantes modifican la ecuación [1.5] generando las ecuaciones:

$$\frac{dM_z}{dt} = \frac{M_0 - M_z}{T_1} \quad [1.11]$$

$$\frac{dM_x}{dt} = -\frac{M_x}{T_2} \quad [1.12]$$

$$\frac{dM_y}{dt} = -\frac{M_y}{T_2} \quad [1.13]$$

La ecuación [1.11] describe el intercambio de energía entre los espines y el medio para regresar a su estado de equilibrio, relajación longitudinal; mientras que las ecuaciones [1.12] y [1.13] describe la pérdida de la coherencia de la fase a través del intercambio de energía entre espines, llamada relajación transversal. La señal adquirida decae a una velocidad constante definida por  $T_2$  en un campo magnético homogéneo, pero en presencia de un campo magnético inhomogéneo hay una pérdida extra de coherencia de fase entre diferentes partes de la muestra la cual disminuye el decaimiento efectivo ahora definido por  $T_2^*$ .

El planteamiento fenomenológico de Bloch nos permite predecir y estudiar sistemas de un espín o de un sistema múltiple, pero sin interacción entre ellos. Cuando no se cumplen estas condiciones el modelo falla, al igual que si se quiere tratar de explicar experimentos con transferencia de polarización. Por esto es necesario estudiar el modelo de la mecánica cuántica.

### I.3.- Tratamiento Mecánico Cuántico<sup>17</sup>

De acuerdo con la teoría cuántica, el momento magnético de un núcleo con espín en un campo magnético produce una degeneración de los niveles para producir  $(2I + 1)$  estados, donde  $I$  es el número cuántico angular de espín del núcleo. En un experimento de RMN, las transiciones entre estados pueden ser simulados por la absorción de fotones sujetos a las reglas de selección. La resonancia magnética nuclear ocurre cuando la energía asociada a los fotones,  $h\nu$ , coincide con la energía de separación de los dos estados del núcleo.

En el tratamiento de la mecánica cuántica, en vez de usar vectores de magnetización, se estudian los estados de los sistemas y la forma en que evolucionan en función del tiempo, ello expresado como la función de onda,  $\Psi(t)$ , o el operador de densidad,  $\sigma(t)$ . Por claridad y simplicidad, los fenómenos de relajación son despreciados en la siguiente discusión.

#### I.3.1.- Ecuación de Schrödinger<sup>18</sup>

La evolución en el tiempo de los sistemas de espín en la mecánica cuántica, representados por la función de onda  $\Psi(\mathbf{r}, t)$ , está definido por la ecuación de Schrödinger en el dominio del tiempo:

$$i \frac{\partial \Psi(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = \mathcal{H} \Psi(\mathbf{r}, t) \quad [1.14]$$

donde  $\mathcal{H}$  es el operador de energía, el Hamiltoniano en unidades atómicas. Las propiedades observables son representadas por los operadores Hermitianos y el valor esperado para cualquier operador  $Q$  de una propiedad observable,  $\langle Q \rangle$ , está definida por:

$$\langle Q \rangle = \int \Psi^*(\mathbf{r}, t) Q \Psi(\mathbf{r}, t) d\mathbf{r} dt \quad [1.15]$$

o simplemente representado en la notación de Dirac como:

$$\langle Q \rangle = \langle \Psi | Q | \Psi \rangle \quad [1.16]$$

Cuando se resuelve la ecuación de Schrödinger obtenemos la función de onda de un sistema y por consecuencia todas las propiedades del mismo. Si el Hamiltoniano no depende explícitamente del tiempo, entonces la solución de la ecuación [1.14] tiene la forma:

$$\Psi(r,t) = \Psi(r) e^{-i Et/\hbar}, \quad [1.17]$$

donde  $\Psi(r)$  es la solución del estado estacionario de la ecuación de Schrödinger:

$$\mathcal{H}\Psi(r) = E \Psi(r) \quad [1.18]$$

con  $E$  como la energía del sistema en el estado  $\Psi(r)$ . Es conveniente expresar  $\Psi(r,t)$  como un conjunto completo de funciones de onda ortonormales  $|m\rangle$ ,

$$\Psi(r,t) = \sum_m c_m(t) |m\rangle, \quad [1.19]$$

donde  $|m\rangle$  satisface el problema estacionario:

$$\mathcal{H}|m\rangle = E_m |m\rangle \quad [1.20]$$

y

$$c_m(t) = \langle m | \Psi(r,t) \rangle, \quad [1.21]$$

$E_m$  es la energía del sistema en el estado  $|m\rangle$ . El operador  $Q$ , en esta base, es una matriz cuadrada con elementos:

$$Q_{mn} = \langle m | Q | n \rangle \quad [1.22]$$

El valor esperado de  $Q$  se escribe como:

$$\begin{aligned} \langle Q \rangle &= \langle \Psi(r,t) | Q | \Psi(r,t) \rangle \\ &= \sum_{m,n} c_m^*(t) c_n(t) Q_{mn} \end{aligned} \quad [1.23]$$

con lo cual podríamos encontrar las expresiones para los valores esperados del momento magnético para un sistema de un espín, los cuales están dados por:

$$\langle \mu_x \rangle = A_0 \cos(\phi_0 + \gamma B_0 t) \quad [1.24]$$

$$\langle \mu_y \rangle = -A_0 \sin(\phi_0 + \gamma B_0 t) \quad [1.25]$$

De esta manera se muestra que el valor esperado del momento magnético obedece las mismas ecuaciones que las determinadas por la mecánica clásica.

### 1.3.1.1.- El Hamiltoniano de Espín<sup>19</sup>

El Hamiltoniano es el término que contendrá la información necesaria para obtener las frecuencias de resonancia y las intensidades de las líneas de los espectros. Para un sistema de  $N$  núcleos de espín  $1/2$  en un campo magnético uniforme  $B_0$  a lo largo del eje  $Z$ , la forma general del Hamiltoniano en un sistema rotante de coordenadas esta dado por:



$$\mathcal{H} = \mathcal{H}_z + \mathcal{H}_j + \mathcal{H}_{rf} \quad [1.26]$$

donde  $\mathcal{H}_z$  se conoce como la energía de Zeeman, el cual determina el desplazamiento químico,  $\delta_i$ , y está definido por:

$$\mathcal{H}_z = \sum_i \delta_i I_{iz} \quad [1.27]$$

$\mathcal{H}_j$  es el término de acoplamiento escalar definido por:

$$\mathcal{H}_j = 2\pi \sum_{i < k} J_{ik} I_i \cdot I_k \quad [1.28]$$

donde  $J_{ik}$  es la constante de acoplamiento escalar entre el espín  $i$  y el  $k$ .  $\mathcal{H}_j$  es responsable de la transferencia de coherencia observada en los sistemas acoplados. Para sistemas débilmente acoplados, donde  $|2\pi J_{ik}| \ll |\delta_i - \delta_k|$  y comúnmente conocidos como espectros de primer orden, este término se convierte en:

$$\mathcal{H}_j = 2\pi \sum_{i < k} J_{ik} I_{iz} I_{kz} \quad [1.29]$$

y, por último,  $\mathcal{H}_{rf}$  describe la interacción del sistema de espín y el campo de la radiofrecuencia:

$$\mathcal{H}_{rf} = \omega_1 \sum_i I_{ix} \quad [1.30]$$

donde  $\omega_1$  es la amplitud de la radiofrecuencia aplicada al sistema.

Estos son los términos del Hamiltoniano a considerar cuando se quiera describir un experimento de RMN.

### 1.3.2.- El Operador de Densidad<sup>20</sup>

La señal en la RMN es una respuesta macroscópica de la muestra y debemos considerarla como tal. La función de onda  $\Psi$  variará de un sistema de espín a otro, sin embargo, el valor esperado del operador  $Q$  debe ser el promedio de la muestra en su conjunto. Por tanto, el valor esperado del operador estará definido por:

$$\langle Q \rangle = \sum_{mn} c_m^*(t) c_n(t) Q_{mn} \quad [1.31]$$

Si definimos al operador de densidad como:

$$\sigma_{mn} = c_n(t) c_m^*(t), \quad [1.32]$$

entonces se tiene que el operador  $Q$  se puede expresar como:

$$\begin{aligned}
 Q &= \sum_{mn} \sigma_{nm} Q_{mn} \\
 &= \sum_n (\sigma Q)_{nn} = \text{Tr} [\sigma Q], \\
 &= \sum_m (Q \sigma)_{mm} = \text{Tr} [Q \sigma].
 \end{aligned}
 \tag{1.33}$$

La matriz asociada al operador  $\sigma_{nm}$  es la matriz de densidad. Los elementos de la diagonal de esta matriz dan la probabilidad de encontrar al sistema con energía  $E_n$  en el estado  $|n\rangle$ , mientras que los elementos fuera de la diagonal  $\sigma_{nm}$  representan las coherencias de fases entre los estados  $|n\rangle$  y  $|m\rangle$ . La ecuación [1.33] muestra que si  $\sigma$  es conocida, cualquier cantidad física observable puede ser medida. El uso del operador de densidad en vez de la función de onda es una forma implícita de incorporar el promedio del conjunto de los sistemas dependientes del tiempo.

### 1.3.2.1.- Sistema en Equilibrio

Cuando el sistema de espines se encuentra en un estado de equilibrio, la coherencia desaparece y la matriz de densidad se convierte en una matriz diagonal. Cada elemento de la diagonal representa la población relativa de cada uno de los estados, la cual está definida por la función de partición de Boltzmann. El operador de densidad en el estado de equilibrio se escribe como:

$$\sigma_0 = \frac{e^{-\mathcal{H}/kT}}{\sum_n e^{-E_n/kT}}
 \tag{1.34}$$

en donde el numerador es la función de partición del sistema, a la cual llamamos  $Z$  y el denominador es el factor de normalización.

Dado que la temperatura a la cual se realiza el experimento de RMN es mucho mayor que  $E_n/k$ , el término  $E_n/kT$  es pequeño y la exponencial se puede expandir a primer orden:

$$e^{-\mathcal{H}/kT} \approx 1 - \mathcal{H}/kT.
 \tag{1.35}$$

Para campos magnéticos intensos, el Hamiltoniano definido en [1.27], está dominado por la energía de Zeeman, por tanto  $\mathcal{H}_z = -\gamma B_0 I_z$ , tal que  $\sigma_0$  se puede expresar como:

$$\sigma_0 = a + \epsilon I_z,
 \tag{1.36}$$

donde  $a = 1/Z$  y  $\epsilon = \gamma B_0 / ZkT$  que son constantes que no evolucionan con el tiempo. De esta manera se obtiene una señal observable. Para fines prácticos se dice que:

$$\sigma_0 = I_z. \quad [1.37]$$

Esto indica que en una muestra en un campo magnético el valor promedio de los espines se encontrarán orientados a lo largo del eje Z como lo describe el modelo vectorial.

Prosigamos con el estudio para encontrar las relaciones que permitan predecir la evolución de los espines nucleares cuando se encuentran sometidos a pulsos de radiofrecuencias.

### 1.3.2.2.- Evolución de los Operadores de Espín

La evolución en el tiempo de los operadores de espín está gobernado por la ecuación de Liouville-von Neumann:

$$\frac{d \sigma(t)}{dt} = -i [\mathcal{H}, \sigma(t)], \quad [1.38]$$

donde  $[\mathcal{H}, \sigma(t)] = \mathcal{H} \sigma(t) - \sigma(t) \mathcal{H}$  y  $\mathcal{H}$  es el Hamiltoniano independiente del tiempo. La solución de [1.38] esta dado por:

$$\sigma(t) = U(t) \sigma(0) U^{-1}(t) \quad [1.39]$$

y  $U(t)$  se conoce como el propagador del Hamiltoniano  $\mathcal{H}$  y se puede mostrar que tiene la forma:

$$U(t) = e^{-i \mathcal{H} t}. \quad [1.40]$$

La importancia de las ecuaciones [1.33] y [1.39] radica en que a partir de ellas se obtiene toda la información física de los sistemas de espín, en vez de resolver la ecuación de Schrödinger. Por ejemplo, el propagador de un pulso de radiofrecuencia se escribe como:

$$U(t) = e^{-i \alpha I_\gamma} = R_\gamma(\alpha), \quad [1.41]$$

donde  $\alpha$  representa el ángulo de aplicación del pulso y  $\gamma$  representa la fase del pulso que puede ser x, y o z.  $R_\gamma(\alpha)$  representa un operador de rotación alrededor del eje  $\gamma$ . Por ejemplo, para una rotación alrededor del eje +X se puede expresar como:

$$\begin{aligned} R_X(\alpha) &= e^{-i \alpha I_x} \\ &= \cos(\alpha/2)E - i 2\text{sen}(\alpha/2)I_x, \end{aligned} \quad [1.42]$$

donde E es el operador identidad.

### II.3.3.- Producto de Operadores<sup>21</sup>

Siguiendo los procedimientos ejemplificados en la ecuación [1.42] es posible encontrar las matrices de densidad del sistema. Sin embargo, el uso de estas matrices es poco práctico. Para evitar el tratar con matrices, ya que la dimensión aumenta como  $2^N$  donde N es el número de espines en el sistema, se escoge un conjunto completo de operadores ortogonales. El producto de operadores de momento angular Cartesianos han sido escogido para el caso de sistemas de espín 1/2 acoplado débilmente. Esta simplificación ha permitido una visualización mayor de los procesos físicos, en vez de estar perdido en la maraña del cálculo de los elementos de matrices.

Un conjunto completo de producto de operadores consiste de  $2^{2N}$  operadores base para un sistema de N núcleos de espín 1/2 acoplados débilmente. Por ejemplo, un conjunto completo para un sólo espín 1/2 consiste de 4 operadores, a saber  $I_x, I_y$  e  $I_z$ ; para un sistema de dos espines el número de productos base se incrementa a 16, estos se listan en la Tabla 1.1.

Otra ventaja de usar el producto de operadores es que la señal observada es la suma de todos los coeficientes de las componentes del operador de momento angular donde se encuentra localizado el detector y la simplicidad del cálculo de las transformaciones unitarias durante la evolución de los sistemas cuánticos, ecuación [1.39].

q = 0	$1/2 E$ (operador unitario)
q = 1	$I_x, I_y, I_z, I_x, I_y, I_z$
q = 2	$2I_x I_x, 2I_x I_y, 2I_x I_z,$ $2I_y I_x, 2I_y I_y, 2I_y I_z,$ $2I_z I_x, 2I_z I_y, 2I_z I_z.$

Tabla 1.- Base de los productos de operadores para un sistema de dos espines 1/2.

Existen tres casos que debemos considerar para comprender el comportamiento del espín nuclear y para poder describir adecuadamente el experimento de RMN. El sistema en equilibrio se perturba al aplicar un pulso de radiofrecuencia, posteriormente el sistema evoluciona libremente y dependiendo del acoplamiento con otros núcleos.

Respectivamente equivalen a la aplicación de pulsos, evolución por el desplazamiento químico y a el acoplamiento escalar. Para lograrlo se emplea el Hamiltoniano definido en [1.26] y expandido de [1.27] a [1.29].

Se puede probar que todos los operadores de momento angular en el Hamiltoniano del desplazamiento químico y de los pulsos causan una rotación en tres dimensiones, las cuales pueden ser visualizadas como:

$$I_\rho \xrightarrow{\alpha I_\phi} I_\rho \cos \alpha + I_\eta \sin \alpha \quad [1.43]$$

donde  $\phi, \rho$  y  $\eta = x, y, z$  representan permutaciones cíclicas que describen una rotación alrededor del eje  $\rho$ , Figura 1.1.

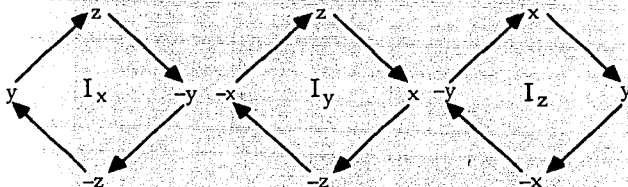
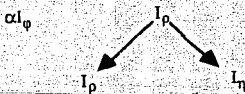


Figura 1.1.- Rotaciones empleadas en este trabajo. Los operadores en el centro del cuadro representan los operadores que se aplican a aquellos representados por las letras en los rombos para generar un nuevo operador.

En algunas ocasiones es más conveniente escribir la ecuación [1.43] en la notación de una cadena de evoluciones:



en donde la cadena izquierda implica la multiplicación por el coseno de  $\alpha$  y la cadena de la derecha implica la multiplicación por el seno correspondiente. Consideremos un ejemplo, la aplicación de un pulso  $\alpha$  a lo largo del eje  $+X$  aplicado al sistema en equilibrio, el resultado se representa como:

$$I_z \xrightarrow{\alpha I_x} I_z \cos \alpha - I_y \sin \alpha. \quad [1.44]$$

Si el ángulo aplicado es de  $90^\circ$  sólo se preserva el término  $-I_y$ ; posteriormente al evolucionar este término como función del desplazamiento químico,  $\delta_I I_z t$ , se obtiene la relación:

$$-I_y \xrightarrow{\delta_I I_z t} -I_y \cos(\delta_I t) + I_x \sin(\delta_I t) \quad [1.45]$$

Estos términos son los que se detectan en el experimento de RMN y los que producirán una corriente inducida en la bobina de detección. Este resultado concuerda con lo predicho por el modelo vectorial.

Por último, cuando existen dos o más espines acoplados débilmente,  $I_1$  e  $I_2$ , el operador responsable del cambio de la magnetización está representado por  $2I_{1z}I_{2z} \pi J_{1,2} t$ , donde  $J_{1,2}$  es la constante de acoplamiento entre los núcleos. La forma en que se representa esta modificación es:

$$I_{1y} \xrightarrow{\pi J_{12} 2I_{1z} I_{2z} t} I_{1y} \cos \pi J_{1,2} t - 2I_{1x} I_{2z} \sin \pi J_{1,2} t \quad [1.46]$$

el cual generará una magnetización en antifase a partir de una en fase y viceversa. La forma en que el operador  $I_{1z}I_{2z}$  se aplica se representa en la Figura 1.2.

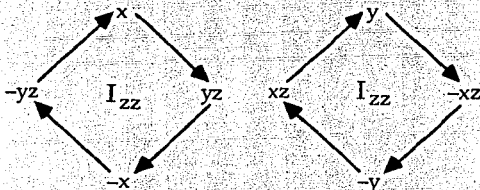


Figura 1.2.- Representación de la convención de las rotaciones producidas por el operador  $I_{zz}$  sobre algunos operadores representados por las letras en las esquinas de los rombos.

El uso del producto de operadores se ha difundido ampliamente y sirve para explicar cualquier tipo de experimento desarrollado, bajo la única condición que los espines se encuentren débilmente acoplados y se traten de núcleos con espín un medio. Este tipo de cálculo se desarrollará para explicar el experimento COSY en la RMN de dos dimensiones.

## I.4.- RMN en Dos Dimensiones

En 1971 Jeener<sup>11</sup> se adelantó a su época y propuso los experimentos en dos dimensiones. Mas tarde los grupos de Ernst<sup>22</sup> y Freeman<sup>23</sup> demostraron la versatilidad del método y mostraron sus principios. Desde ese momento la RMN en dos dimensiones se ha desarrollado enormemente ayudando a la elucidación estructural de compuestos químicos. La gran ventaja es la dispersión que se logra de las señales cuando se emplean dos dimensiones, ya que con experimentos convencionales no siempre es posible distinguir las conectividades en forma inequívoca.

Los experimentos de RMN en dos dimensiones consisten de cuatro periodos. El primero es el periodo de preparación, en este tiempo los núcleos alcanzan su estado de equilibrio o pseudo-equilibrio y se modifica la magnetización mediante la aplicación de uno o varios pulsos y tiempos de espera constantes para obtener la magnetización en donde se desea. Posteriormente viene el tiempo de evolución definido por el tiempo  $t_1$ , que es una variable que se incrementa paulatinamente, este periodo se conoce como evolución. Después se define el tiempo en donde las magnetizaciones se mezclan, tiempo de mezclado. Al final viene el periodo de detección, definido por el tiempo  $t_2$ , que es la variable normal de los experimentos en una dimensión conocido como tiempo de adquisición. Por tanto, la señal de RMN es una función modulada en amplitud y en fase de  $t_1$  y  $t_2$ , a decir  $s(t_1, t_2)$ . La transformación de Fourier en dos dimensiones da como resultado un espectro en dos dimensiones definido por  $S(\omega_1, \omega_2)$ , en la cual las señales con coordenadas  $(\delta_1, \delta_2)$  muestran la correlación existente entre diferentes coordenadas, como el desplazamiento químico de espines acoplados, el efecto nuclear Overhauser, el acoplamiento entre diferentes núcleos, etc., dependiendo de la secuencia de pulsos empleada.

En la Figura 1.3 se muestra una representación esquemática de la RMN en dos dimensiones.

### I.4.1.- Espectroscopía de Correlación<sup>24</sup>

La espectroscopía de correlación en dos dimensiones, COSY, fue la primera propuesta y ha sido la más importante y sencilla. La secuencia de pulsos consiste en dos pulsos de  $90^\circ$ , Figura 1.4, identifica los espines los cuales están acoplados escalarmente.

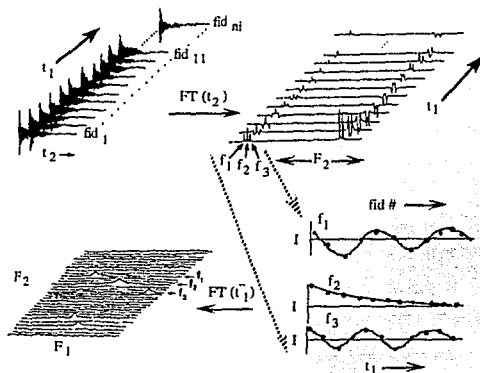


Figura 1.3.- Representación esquemática de la RMN en dos dimensiones<sup>25</sup>.

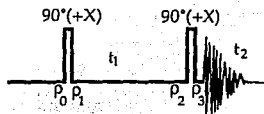


Figura 1.4.- Secuencia de pulsos del experimento COSY. Los pulsos son de  $90^\circ$  sobre el eje de las X. El tiempo  $t_1$  es una variable y  $t_2$  es el tiempo de adquisición.  $\rho_i$  representan los puntos en donde la magnetización evoluciona.

Para describir este experimento, primero consideremos que solo existen dos espines débilmente acoplados en el sistema. Al inicio del experimento, el sistema está en equilibrio  $\rho(0) = I_z$ . Cuando se aplica el primer pulso de  $90^\circ$  sobre el eje +X el Hamiltoniano que describe este fenómeno, ecuación [1.30] está dado por:

$$\mathcal{H}_{p90^\circ} = \omega_1 (I_{1x} + I_{2x}) = \omega_1 F_x = \frac{\pi}{2} F_x \quad [1.46]$$

Durante los periodos de evolución y detección,  $t_1$  y  $t_2$ , el Hamiltoniano es, ecuaciones [1.27]:

$$\mathcal{H}_{t \text{ evolución}} = \delta_1 I_{1z} + \delta_2 I_{2z} + \pi J_{12} I_{1z} I_{2z} \quad [1.47]$$



Para el análisis de este experimento conviene expresarlo como una cadena de evoluciones, Figura 1.5.

Es posible analizar los resultados que se esperan para esta secuencia de pulsos. La magnetización en el eje Z permanece sin detectarse. El operador representado con la letra M generará coherencia cuántica múltiple. El término de la diagonal está definido como:

$$D = I_{1x} \text{sen}(\delta_1 t_1) \cos(\pi J_{1,2} t_1) \quad [1.48]$$

Después del último pulso, los operadores evolucionan nuevamente, como ocurre para  $\rho_1$ , obteniéndose una señal centrada en el desplazamiento del núcleo 1 desdoblado con la constante de acoplamiento  $J_{1,2}$ .

Al mismo tiempo se genera un pico fuera de la diagonal correspondiente al término:

$$C = -2I_{1z}I_{2y} \text{sen}(\delta_1 t_1) \text{sen}(\pi J_{1,2} t_1) \quad [1.49]$$

dando un pico de absorción en antifase centrado en  $\delta_1$  en la dimensión  $F_1$  y, dado que la precesión de detección se da sobre el segundo espín, al desplazamiento  $\delta_2$  en la dimensión  $F_2$ . Esta señal indica que los protones 1 y 2 se encuentran acoplados.

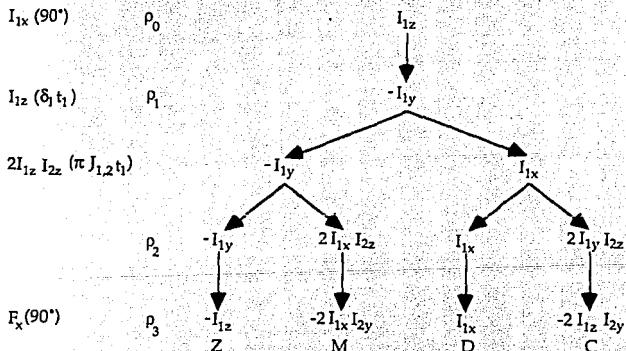


Figura 1.5.- Evolución de los productos de operadores del espín en un sistema de dos espines de acuerdo a la secuencia de pulsos de la Figura 1.4.

La ecuación [1.49] es la responsable de la transferencia de información entre los núcleos. Cuando se está trabajando con más de dos núcleos, la constante de

acoplamiento responsable de este tipo de transferencias se le llama constante de acoplamiento activa. Una característica más de este tipo de señales es que se dan en antifase. Por esta razón, todas las señales que se generan en antifase se dirán que tiene una constante activa, la responsable del desdoblamiento en antifase. En cambio, las constantes pasivas serán la que dan acoplamientos en fase. Estos conceptos serán utilizados ampliamente a lo largo de todo el trabajo.

## Capítulo II

### Métodos para la Determinación de Constantes de Acoplamiento

#### II.1.- Introducción

En este capítulo damos un breve resumen de los métodos que existen para la medición de constantes de acoplamiento diferentes a la determinación normal que se hace mediante la medición directa de la distancia entre los máximos o mínimos de las señales. En este capítulo incluimos dos incisos que podrían no estar relacionados con el tema sobre la medición, pero por ser fundamentales para el trabajo se incluyen. Estos temas son la convolución y la inclusión de los resultados experimentales obtenidos por Blechta et. al.<sup>26</sup>, ya que fueron estos resultados los que se emplearon para contrastar siempre la medición de constantes en antifase.

#### II.2.- Medición de Constantes de Acoplamiento

La determinación de las constantes de acoplamiento como una herramienta para la elucidación estructural se inició desde que Karplus propuso la relación empírica entre las constantes de acoplamiento y el ángulo diedro formado por los núcleos interactuantes<sup>27,28</sup>. La determinación de estos parámetros junto con la espectroscopía de correlación, provee uno de los mejores medios para obtener información conformacional de las moléculas. Sin embargo, frecuentemente la medición precisa de dichas constantes no es sencilla

Cuando el ancho natural de las señales es comparable con el tamaño de la constante de acoplamiento a determinar, las señales enmascaran los desdoblamientos y no es posible determinarlas mediante la medición de los máximos y mínimos de las señales del multiplete. En la Figura 2.1 se muestra el error cometido al medir las constantes de acoplamiento cuando son comparables con el ancho de la señal a mitad

de la altura. Las constantes de acoplamiento pasivas se subestiman, hasta el punto de ser enmascaradas con el ancho de la señal; mientras que las constantes de acoplamiento activas se sobrestiman.

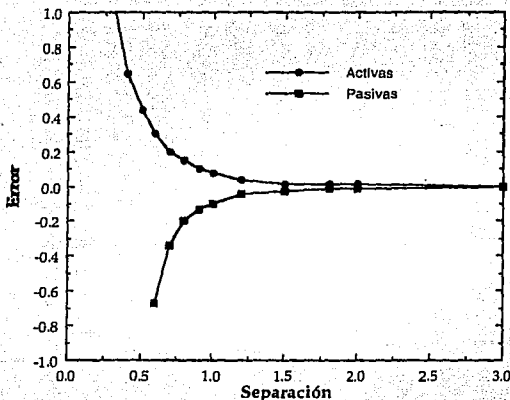


Figura 2.1.- Comportamiento de la medición de las constantes de acoplamiento activas y pasivas de sistemas simulados libres de ruido cuando se miden mediante los máximos encontrados en las señales.

En este capítulo se describirán algunos procedimientos que se desarrollaron para la medición precisa de constantes de acoplamiento previos a los realizados en este trabajo. Aunque creemos necesario describir primeramente el procedimiento de convolución que será utilizado ampliamente a lo largo de este trabajo.

## II.2.1.- Convolución

La convolución se define para dos funciones  $F(v)$  y  $G(v)$  en el dominio de las frecuencias como:

$$H(v) = \int F(v') G(v - v') dv', \quad [2.1]$$

donde la integral se realiza sobre todo el dominio  $v'$ . Esta operación es conmutativa, lo cual se representa como:

$$H(v) = F(v) \otimes G(v) = G(v) \otimes F(v). \quad [2.2]$$

A pesar de que hay sólo una definición de convolución, Ecuación [2.1], el concepto de deconvolución no ha sido definido. Podríamos explicar el término de deconvolución a partir de la ecuación [2.2]. Conociendo  $H(v)$  y  $F(v)$ , la deconvolución consiste en encontrar  $G(v)$ . Los procedimientos para lograrlo varían de caso a caso.

Si  $h(t)$ ,  $f(t)$  y  $g(t)$  son transformadas de Fourier de las funciones  $H(v)$ ,  $F(v)$  y  $G(v)$ , la ecuación en el dominio del tiempo está dada por:

$$h(t) = f(t) g(t) \quad [2.3]$$

y por tanto podemos pensar que:

$$g(t) = h(t) / f(t), \quad [2.4]$$

es una relación que se empleó para efectuar deconvoluciones en el dominio del tiempo<sup>29,30</sup>.

Si uno se enfoca a manejar los datos en el dominio del tiempo, es necesario que  $F(v)$  tenga una función recíproca  $F^{\otimes-1}(v)$  con respecto a la convolución tal que:

$$F^{\otimes-1}(v) \otimes F(v) = F(v) \otimes F^{\otimes-1}(v) = \delta(v) \quad [2.5]$$

donde la función  $\delta(v)$  es el elemento neutro con respecto a la convolución, tal que se cumple:

$$F(v) \otimes \delta(v) = \delta(v) \otimes F(v) = F(v) \quad [2.6]$$

para toda  $F(v)$ . Sin embargo, el problema radica en que  $F^{\otimes-1}(v)$  puede no existir o no ser única, y si existe, puede ser difícil determinar<sup>31</sup>.

La definición análoga de la convolución para un dominio discreto se escribe como:

$$H = \sum_{j=1}^{j \leq 1} F_j G_{i-j+1}. \quad [2.7]$$

Por último, definiremos a la función  $\delta(v)$  como:

$$\delta(v) = 0 \quad v \neq a.$$

y

$$\delta(v) = 1 \quad v = a. \quad [2.8]$$

donde  $a$  es un valor arbitrario. Por cuestión de nomenclatura a partir de este momento nos referiremos a las funciones  $\delta(v)$  simplemente como  $\delta$ .

## II.2.2.- El Método DISCO.

Uno de los primeros métodos empleados en la determinación de las constantes de acoplamiento fue el propuesto por Oschkinat y Freeman<sup>32</sup> bautizado como el método DISCO. Esta técnica requiere poseer las versiones en fase y en antifase de un multiplete. Mediante la substracción o la adición de los espectros en el dominio de las frecuencias es posible eliminar ciertas constante de acoplamiento, simplificando el multiplete en estudio. En esta forma se logra obtener una buena precisión en el método. Al efectuar estas operaciones se evitan los traslapes que aún se tienen en los espectros COSY.

Para efectuar estas operaciones de eliminación es necesario suponer que el ancho de la señal es igual, tal que la adición y substracción no modifica las señales remanentes.

## II.2.3.- Medición de Constantes de Acoplamiento Mediante Espectros de Correlación

Titman y Keeler<sup>33</sup> propusieron un método para determinar constantes de acoplamiento activas a partir de la obtención de dos espectros en dos dimensiones: DQF-COSY<sup>34,35</sup> y TOCSY<sup>36</sup>. Este consiste en convolucionar los trazos deseados con una función que depende de  $J^*$ .  $J^*$  representará a lo largo de todo el trabajo una constante de acoplamiento que trataremos siempre de ajustar al valor real.

Este proceso se comprende mejor si escribimos la ecuación que representa los dobletes en los trazos de los experimentos DQF-COSY en las señales fuera de la diagonal:

$$S_C(t) = A_C \exp(-i2\pi\delta t) \exp(-\lambda t) \sin(\pi J_{\text{activa}} t) \quad [2.9]$$

donde  $\delta$  es el desplazamiento químico,  $\lambda = 1/T_2^*$  es el ancho de la señal experimental a la mitad de la altura y  $A_C$  es la intensidad de la señal.

Las señales en el experimento TOCSY se representan como:

$$S_T(t) = A_T \exp(-i2\pi\delta t) \exp(-\lambda t) \cos(\pi J_{\text{activa}} t) \quad [2.10]$$

donde los términos poseen las mismas características que en la ecuación [2.9]. Esta forma de representación permite comprender el fenómeno de convolución, el cual consiste en multiplicar una señal de RMN por una función que generará más señales de RMN. Multiplicar una señal por el  $\text{sen}(\pi J t)$  genera un doblete en antifase y multiplicar una señal por  $\text{cos}(\pi J t)$  producirá un doblete en fase, con base en las propiedades de paridad de las funciones trigonométricas.

Titman y Keeler multiplican la traza del espectro de 2-D por funciones definidas por:

$$S_C(t) = S_C(t) \cos(\pi J^* t), \quad [2.11]$$

$$S_I(t) = S_I(t) \text{sen}(\pi J^* t), \quad [2.12]$$

en esta forma se originará multipletes que, por lo general, mostrarán estructuras diferentes; sin embargo, para el caso en que  $J^* = J_{\text{activa}}$  las señales serán idénticas, excepto por el factor de la amplitud.

Los resultados obtenidos poseen una precisión de  $\pm 0.3$  Hz para un valor típico de 7.0 Hz cuando la relación señal ruido es de 10:1 y anchos de señal mayores al doble que la constante de acoplamiento. Las ventajas de este método radica en que no requiere de suposición alguna en cuanto a la forma de la señal, ni tampoco del número de desdoblamientos existentes en la señal.

Las desventajas de este método es que se requiere adquirir dos conjuntos de datos experimentales de 2-D, que pueden tardar varias horas, para determinar una constante de acoplamiento. Esto implica mucho esfuerzo para determinar solo constantes de acoplamiento activas. No es posible determinar las constantes de acoplamiento pasivas si no se cuenta con el acoplamiento activo. Los experimentos en 2-D son completamente independientes, lo cual puede generar que las formas de las señales sean diferentes, afectando la determinación. Además, el proceso para obtener estas constantes de acoplamiento emplea archivos grandes y con la correspondiente demanda de equipo computacional.

Recientemente Huber *et. al.*<sup>37</sup> propusieron un método muy similar al planteado por Titman, este método consiste en la determinación de los espectros en fase y en antifase mediante las rutinas "soft-COSY" y PICSY (pure in-phase correlation spectroscopy) para la obtención de los multipletes en fase y en antifase. Con estas señales, se deconvoluciona el multiplete (ver la sección correspondiente a deconvolución en el dominio de las frecuencias) con  $J^*$ , donde es nuevamente un parámetro a variar. En vez de usar el método de mínimos cuadrados para la determinación de la constante de acoplamiento, usa el producto punto como criterio

para la determinación de la constante a determinar. Considera a las frecuencias obtenidas por los dos tratamientos como vectores,  $V_{\text{COSY}}$  y  $V_{\text{PICSY}}$ , para determinar el ángulo entre ellos. Esta función de similitud se representa como:

$$\alpha = \cos^{-1} \left( \frac{V_{\text{COSY}} \cdot V_{\text{PICSY}}}{|V_{\text{COSY}}| |V_{\text{PICSY}}|} \right) \quad [2.13]$$

Esta cantidad se grafica como una función de  $J^*$  y el mínimo corresponde cuando  $J^* = J_a$ .

#### II.2.4.- Extensión de J

El método de extensión de J fue propuesto por primera vez por McIntyre y Freeman<sup>30,38</sup>. Este método requiere tener dos trazos del mismo multiplete, uno en fase y otro en antifase con la constante que se quiere determinar. Este método trabaja incrementando el acoplamiento activo desconocido por un valor arbitrario determinado por el operador.

La ecuación que describe a los multipletes en antifase es:

$$S_{ea}(t) = A_{ea} L(t) \text{sen}(\pi J_a t) \quad [2.14]$$

donde  $A_{ea}$  es la amplitud de la señal y  $L(t)$  incorpora todos los acoplamientos pasivos, en caso de existir, el desplazamiento químico, los términos de relajación y  $J_a$  es la constante de acoplamiento que se quiere medir. La ecuación que describe la señal en fase con la constante de acoplamiento activo es:

$$S_{ef}(t) = A_{ef} L(t) \text{cos}(\pi J_a t) \quad [2.15]$$

Si consideramos a los factores de amplitud como iguales y multiplicamos la traza de antifase por  $\text{sen}(\pi J_{ext} t)$ , donde  $J_{ext}$  tiene un valor grande conocido y a la traza en fase por  $\text{cos}(\pi J_{ext} t)$ , entonces la diferencia de estos productos será:

$$\begin{aligned} S(t) &= S_{ef}(t) \text{cos}(\pi J_{ext} t) - S_{ea}(t) \text{sen}(\pi J_{ext} t) = \\ &= A L(t) \{ \text{cos}(\pi J_a t) \text{cos}(\pi J_{ext} t) - \text{sen}(\pi J_a t) \text{sen}(\pi J_{ext} t) \} = \\ &= A L(t) \text{cos}(\pi t [J_{ext} + J_a]) \end{aligned} \quad [2.16]$$

lo cual producirá un multiplete con un acoplamiento activo en fase extendido por la cantidad  $J_{ext}$ .



Si  $J_{ext}$  es lo suficientemente grande, la perturbación de las señales no interfieren en la precisión de la determinación usando la medición de la distancia de los máximos de las señales, ya que la separación entre las señales será lo suficientemente buena para conocer  $J_a$ . Este método tiene una precisión de  $\pm 0.05$  Hz.

### II.2.5.- Duplicación de J en el dominio del tiempo.

McIntyre y Freeman<sup>39</sup> propusieron el método de Duplicación de J, que como indica su nombre, duplica los acoplamientos de espín-espín sin alterar el ancho de la señal.

Este método se aplica en la determinación de constantes de acoplamientos pasivos y activos.

El primer paso consiste en aislar los multipletes en estudio y escoger exclusivamente la región en la cual aparece la señal. La función  $S(t)$  que representa a un desdoblamiento pasivo  $J_p$ , o acoplamiento en fase, es:

$$S(t) = \exp(-i2\pi\delta t) \exp(-\lambda t) \cos(\pi J_p t) \quad [2.17]$$

Esta función se multiplica por el  $\sin(\pi J^* t)$ , donde  $J^*$  es un parámetro que se variará hasta que en una cierta condición se establece que tiene el mismo valor que la constante de acoplamiento  $J_p$ . Después de varias operaciones algebraicas, la ecuación [2.17] se escribe como:

$$S_2(t) = \exp(-i2\pi\delta t) \exp(-\lambda t) \{ \sin[\pi(J^* + J_p)t] + \sin[\pi(J^* - J_p)t] \} / 2 \quad [2.18]$$

La transformada de Fourier de  $S_2(t)$  para un sistema AB es un espectro de cuatro líneas formado por dos dobletes de antifase cuando  $J^* = J_p$ . A este espectro se le llama espectro prueba. Para este sistema, se puede observar que existe un doblete de antifase central con desdoblamiento  $|J^* - J_p|$ . La ecuación [2.18] predice que este multiplete se anula cuando  $J^* = J_p$ . También existe un doblete fuera de antifase con desdoblamiento  $|J^* + J_p|$  el cual se convierte en  $2J_p$  bajo la misma condición. Se espera que la integral absoluta del espectro prueba, como función de  $J^*$  (gráfica de integral), pase a través de un mínimo cuando  $J^* = J_p$ . Esta es la condición para determinar  $J_p$ .

Siguiendo el mismo procedimiento se puede obtener subsecuentes desdoblamientos. Al efectuar desdoblamientos posteriores se van encontrando dobletes

de antifase que desaparecen cuando se obtienen condiciones subarmónicas generando diferentes mínimos locales que pueden interferir con la determinación.

La aparición de estos efectos de interferencia de subarmónicos provocarán la aparición de diferentes mínimos en las gráficas de integral. En sistemas complejos se confunden con la condición de  $J^* = J_p$ .

De la misma forma se puede trabajar con las constantes de acoplamiento activas o de antifase las cuales se representan como:

$$S(t) = \exp(-i2\pi\delta t) \exp(-\lambda t) \text{sen}(\pi J_a t) \quad [2.19]$$

por simetría, la función que representa los multipletes en antifase se multiplican por  $\cos(\pi J^* t)$  para tener resultados similares a los expuestos anteriormente.

La aparición de condiciones subarmónica para las constantes de acoplamiento activas es más seria, ya que tienden a aparecer mas subarmónicos.

La precisión en este método se calcula a partir de los incrementos que se van dando a los valores de  $J^*$ . La precisión para este método es de  $\pm 0.04$  Hz. También se ha reportado<sup>40</sup> que con el método de duplicación de  $J$  se pueden medir constantes de acoplamiento en multipletes traslapados donde el desdoblamiento es comparable con el ancho de la señal. Una medición más adecuada se logra cuando los dobletes en fase no muestran un mínimo a la condición subarmónica  $J^* = J_p / 2$ .

Las ventajas de este método son que no requiere modificar el ancho de la señal. Es posible determinar constantes de acoplamiento cuando apenas es perceptible su presencia por simple inspección, además de lograr buena precisión y reproducibilidad; sin embargo, no es posible obtener valores precisos cuando son menores que la mitad del ancho de las señales o están completamente traslapadas. La experiencia con este método muestra que puede ser el más adecuado para una rápida determinación y con muy buena precisión.

## II.2.6.- Deconvolución en el Dominio del Tiempo

El método de deconvolución fue propuesto por primera vez por Bothner-By y Dadok<sup>40</sup> y posteriormente extendido y modificado por LeParco, McIntyre y Freeman<sup>29</sup>.

Este método consiste en la deconvolución de los diferentes multipletes que forman las constantes de acoplamiento mediante la multiplicación de las señales de RMN:

$$S(t) = \exp(-i2\pi\delta t) \exp(-\lambda t) \cos(\pi J_p t), \quad [2.20]$$

por  $\sec(\pi J^* t)$ , cuando se trata de constantes de acoplamiento pasivas, y por la  $\operatorname{cosec}(\pi J^* t)$ , cuando son activas, que es equivalente a dividir por  $\cos(\pi J^* t)$  o por  $\sin(\pi J^* t)$  respectivamente. En el momento que  $J^* = J_p$  se generará la deconvolución de la señal. El problema radica en que las funciones secante y cosecante poseen singularidades en el momento en que el argumento de  $\sec(\pi J^* t)$  se aproxima a múltiplos de  $\pi / 2$ .

Las singularidades de las funciones secante y cosecante pueden evitarse si se seleccionan los valores de los argumentos de tal forma que se eviten las divisiones por cero. Los puntos que deben emplearse serán una función de:

$$t = (2k + 1) / (2nJ^*) \quad [2.21]$$

donde  $2n$  es el número de puntos por ciclo y  $k$  es un entero.

El tratamiento para constantes de acoplamiento activas y pasivas es muy similar, solo existen modificaciones en la fase de los experimentos obtenidos y de cambiar la secante por la cosecante.

Para obtener el valor esperado de  $J_p$ , se calcula la integral de la magnitud absoluta de todas las señales del espectro generado por la deconvolución; esta gráfica, conocida como gráfica de integral, debe producir un mínimo cuando las respuesta de antifase se cancelan. En esta condición mínima, se dice que  $J^* = J_p$ . Este método genera diferentes condiciones subarmónicas originados por los efectos de cancelación entre las señales de antifase y las señales laterales con los diferentes valores de  $k$ , pero estos traslapes sólo ocurren cuando  $J^* < J_p$ .

Este procedimiento requiere de espectros con buena digitalización, además debe realizarse una sincronización de los datos experimentales en el dominio del tiempo con los puntos de la digitalización de la función cosecante, esta restricción se debe a la imposición de una malla representada por la ecuación [2.21].

La precisión alcanzada por este método es del orden de  $\pm 0.04$  Hz cuando se realiza una sola deconvolución. Sin embargo, cuando se efectúan varias deconvoluciones continuas, el error se incrementa. Se encontró una dependencia con el valor de las constantes y el número de deconvoluciones realizadas<sup>29</sup>.

La desventaja de este método es la dificultad en el manejo de datos y las múltiples transformadas de Fourier que se tienen que hacer para medir las constantes

de acoplamiento, su implementación no es sencilla. También existen ciertas limitaciones en la determinación de constantes de acoplamiento pequeñas.

## II.2.7.- Deconvolución en el dominio de las frecuencias

Huber y Bodenhausen<sup>41,42</sup> se dedicaron a la tarea de efectuar la deconvolución en el dominio de las frecuencias. Para estudiar este método considérese primero que se tiene una ecuación en el dominio del tiempo  $h(t)$ , el cual podría representar al FID, y a dos funciones  $f(t)$  y  $g(t)$ , donde  $g(t)$  sería la función que representa el desplazamiento químico, que tiene información del ancho de la señal y de ciertos acoplamientos y  $f(t)$  posee la información de la constante de acoplamiento en la cual se está interesado. Estas ecuaciones están relacionadas por:

$$h(t) = f(t) g(t). \quad [2.22]$$

El equivalente de esta ecuación en el dominio de las frecuencias está dado por:

$$H(v) = F(v) \otimes G(v) \quad [2.23]$$

donde  $H(v)$  corresponde a la transformada de Fourier de  $h(t)$  al igual que  $f(t)$  de  $F(v)$  y  $g(t)$  de  $G(v)$ . Como ya se vio anteriormente, la convolución de funciones discretas está dado por:

$$H_i = \sum_{j=1}^{|s|} F_j G_{i-j+1} \quad [2.24]$$

donde se definen las secuencias  $\{H\} = \{H_1, H_2, \dots, H_n\}$ ,  $\{F\} = \{F_1, F_2, \dots, F_l\}$  y  $\{G\} = \{G_1, G_2, \dots, G_g\}$ . Si la función inversa de  $F(v)$  existe, denotada como  $F^{\otimes -1}$ , existe la relación inversa:

$$G_i = \sum_{j=1} F_j^{\otimes -1} H_{i-j+1}. \quad [2.25]$$

La longitud de la secuencia  $\{G\}$  esta dada por la longitud de la secuencia inversa de  $F$  más la longitud de  $\{H\}$  menos uno. La ecuación de recurrencia que se emplea fue definida por Bracewells<sup>43</sup>:

$$G = F_1^{-1} \left[ H_i - \sum_{j=1}^{i-1} G_j F_{i-j+1} \right]. \quad [2.26]$$

Para este ejemplo, la secuencia  $\{H\}$  representa el multiplete experimental el cual se quiere deconvolucionar, la  $\{F\}$  que representa los dobletes de las funciones  $\delta$  y  $\{G\}$  representa el espectro simplificado, el cual se quiere determinar.

Como ejemplo, sólo mencionamos que las funciones inversas de las funciones delta  $\{F\} = \{1,1\}$  es  $\{1,-1\}$  y de  $\{F\} = \{1,0,1\}$  es  $\{1,0,-1\}$ .

La forma en que Huber<sup>37</sup> asigna las constantes de acoplamiento es mediante la gráfica de integral definida por McIntyre<sup>39</sup>. Proponen también que la integral de la segunda derivada de las gráficas de integral son un buen método para encontrar los valores correctos de las constantes de acoplamiento. Sin embargo, un análisis posterior encuentra que la forma de analizar los datos es más complicada y no se llegan a obtener mejores resultados que los métodos descritos anteriormente.

Como este método trabaja en el dominio de las frecuencias, se requiere que los multipletes de las señales estén muy bien digitalizados, ya que de ello puede depender la precisión del método. En caso de no tener la digitalización adecuada, es conveniente interpolar ciertos resultados para incrementarla.

Esté método esta muy relacionado con el método de deconvolución en el dominio del tiempo, pero existen tres problemas relacionados con ello: i) la señal deconvolucionada depende fuertemente de que se encuentre bien corregida la línea base, ii) en el producto de la deconvolución no se encuentra el desplazamiento químico original, y iii) la deconvolución no es simétrica ante la dirección de la deconvolución.

## II.2.8.- Método de máxima entropía<sup>44,45</sup>

Jones *et al.*<sup>46</sup> proponen una estrategia para la extracción y determinación de constantes de acoplamiento basándose en el uso del método de máxima entropía. Esta estrategia mide constantes de acoplamiento pasivas una vez que se ha extraído la constante de acoplamiento activas, ya que el método de máxima entropía es incapaz de determinar este tipo de constantes de acoplamiento.

Para ello propone: 1.- determinar la constante de acoplamiento activas mediante el método duplicación de J en el dominio del tiempo o el de deconvolución en el dominio del tiempo. Sin embargo, propone que el método de duplicación de J es el más confiable. 2.- Deconvolucionar el multiplete con el desdoblamiento activa para solo tener uno en fase. En este caso propone usar el método de reconstrucción por máxima entropía. 3.- Estimar las constantes de acoplamiento pasivas con el multiplete deconvolucionado; para ello también propone que el método de máxima entropía es la mejor forma de hacerla. 4.- Por último, reconstruye el multiplete original con las

constantes de acoplamiento tanto activas como pasivas mediante modelos de ajuste que comparan los resultados teóricos con los experimentales, nuevamente propone que el método de máxima entropía es el más adecuado.

El método de máxima entropía, lejos de determinar con precisión las constantes de acoplamiento, debe emplearse como un método de ayuda para el análisis de multipletes complejos.

Varios de los métodos que estudiamos a lo largo de este trabajo se aplicaron en la determinación de las constantes de acoplamiento a larga distancia entre  $^{13}\text{C}$  e H. Estos experimentos se obtuvieron mediante el experimento propuesto por Blechta<sup>26</sup> el cual describiremos en breve.

### **11.3.- Excitación Selectiva Incrementando la Sensibilidad con Matrices Hadamard**

El empleo de la excitación selectiva de  $^{13}\text{C}$  han permitido obtener espectros que muestran las constantes de acoplamiento activas a larga distancia con los  $^1\text{H}$ <sup>26</sup>. Estos experimentos tienen la ventaja de dar espectros simples y la asignación de los sitios químicos involucrados es inmediata.

Los desdoblamientos a investigar aparecen como un doblete de antifase en un espectro de transferencia de polarización. Siempre se ha argumentado que la espectroscopía en dos dimensiones produce mayor sensibilidad para las mediciones de constantes de acoplamiento a larga distancia, ya que utiliza la ventaja de obtener correlaciones en forma simultánea. Esto es cierto, si los experimentos en una dimensión se efectúan uno por uno en un tiempo definido. Sin embargo, hay técnicas que se usan en resonancia magnética de imágenes que permite varios tipos de experimentos en uno, de tal forma que los experimentos de pulsos débiles pueden adquirirse con sensibilidad comparable a la de los métodos de dos dimensiones.

Una de estas técnicas es el empleo de matrices Hadamard para la obtención de experimentos en una dimensión, la cual explicamos inmediatamente.

### II.3.1.- El método Hadamard

Desde 1893 Hadamard<sup>47</sup> propuso diferentes matrices que tienen cierta simetría y su aplicación puede incrementar la sensibilidad en experimentos de RMN.

Para ejemplificar su uso<sup>48</sup> supongamos que queremos pesar  $N$  objetos en una balanza de dos platos que produce un error de  $\pm \xi$  gramos. Es razonable suponer que el error es independiente de los pesos en la balanza y no está correlacionado con la proximidad de los pesos. El procedimiento común es realizar  $N$  mediciones con un objeto a la vez. Es posible obtener mayor precisión en la determinación pesando los  $N$  objetos juntos, pero distribuyéndolos entre el plato izquierdo (+) y el plato derecho (-) en forma especial. Por ejemplo, se podría pesar 4 objetos ( $w, x, y, z$ ) en cuatro mediciones ( $a, b, c, d$ ) de acuerdo con las matrices de Hadamard, Figura 2.2. En esta figura, la primera columna significa que todos los objetos se pesarán en el plato izquierdo, mientras que la última columna tiene dos objetos en cada plato, el objeto  $w$  y el  $z$ . Traduciendo los resultados de las cuatro mediciones se obtiene el peso de los cuatro objetos individuales, por ejemplo  $(a - b + c - d)$  da cuatro veces el peso de  $x$ , los pesos de los otros objetos se cancelan exactamente. Sin embargo, si los errores de los pesos son aleatorios y no correlacionados, el error acumulado sobre las cuatro mediciones es únicamente dos veces mayor que para la determinación sencilla. Por tanto, la precisión de la determinación se duplica.

	w	x	y	z
a	+	+	+	+
b	+	-	+	-
c	+	+	-	-
d	+	-	-	+

Figura 2.2.- Representación de la matriz Hadamard  $4 \times 4$ . En ella se representa la suma de cuatro objetos en una balanza.

Consideraciones similares se aplican a la determinación de señales espectroscópicas en presencia de ruido aleatorio. El obtener información de  $N$  mediciones simultáneas es más eficiente en términos de sensibilidad que realizar  $N$  experimentos sencillos uno después de otro. Es necesario decodificar los experimentos

con la misma matriz Hadamard para obtener el espectro y, así, incrementar la sensibilidad. Esto recupera la ventaja múltiple que ha sido ampliamente explotada en espectroscopía de infrarrojo, en la RMN de transformada de Fourier y de la espectroscopía de dos dimensiones. En situaciones donde únicamente pocos números de correlación son importantes,  $N$  determinaciones en una dimensión pueden proveer una solución más rápida que el análogo de dos dimensiones.

### II.3.2.- Desarrollo Experimental

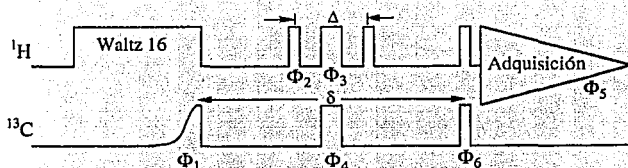
El método empleado se diseñó para medir constantes de acoplamiento  $^{13}\text{C}-^1\text{H}$  en estricnina. Esta aplicación tiene la ventaja que varias correlaciones en una dimensión puede realizarse simultáneamente sin el peligro de interferencia, dado que cada correlación involucra la intervención de un  $^{13}\text{C}$  diferente cada vez.

La secuencia de pulsos, Figura 2.3, es una versión de detección inversa de un esquema anterior y está relacionado con la técnica COLOC<sup>49</sup> para correlación de desplazamiento químico heteronuclear. Comienza con una excitación de ciertas posiciones de  $^{13}\text{C}$  en condiciones de desacoplamiento, incrementando las intensidades por el efecto nuclear Overhauser. Esta parte de la secuencia trae consecuencias importantes, ya que con esta saturación es factible incrementar la ganancia del receptor sin la interferencia de los protones no saturados. Para acoplamientos a larga distancia  $^1J_{\text{CH}}$ , el intervalo  $\delta = 0.5 / (^1J_{\text{CH}})$  permite la evolución de los vectores de  $^{13}\text{C}$  en una configuración de antifase, las cuales al punto donde dos pulsos de  $90^\circ$  transfieren la magnetización a los protones. En el punto medio del intervalo  $\delta$ , un módulo BIRD actúa como un pulso de  $180^\circ$  para protones lejanos, pero no tiene efecto sobre los protones enlazados directamente a  $^{13}\text{C}$ , pero sí sobre los protones unidos a  $^{12}\text{C}$ .

Los desdoblamientos  $^1J_{\text{CH}}$  en el espectro de  $^{13}\text{C}$  son reenfocados (a lo largo del eje Y) al final del intervalo  $\Delta$  y las correlaciones directas no son observadas en el espectro. La ciclación de fase está diseñada para minimizar cualquier transferencia de la polarización a un enlace debido a las imperfecciones de los pulsos y su objetivo es reforzarlos usando un tiempo de espera para la transferencia de polarización que no es exactamente  $\delta$ , pero es alternada entre  $(\delta + 1/2\Delta)$  y  $(\delta - 1/2\Delta)$ . Como la magnetización transversal de protón ocurre únicamente durante los intervalos  $\Delta$  y durante la



adquisición, el acoplamiento protón-protón no influye en la señal detectada excepto como un acoplamiento pasivo; no se introduce distorsión en la fase.



$\Phi_1$	=	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	
$\Phi_2$	=	0	0	0	0	2	2	2	2	0	0	0	0	2	2	2
$\Phi_3$	=	1	1	3	3	1	1	3	3	1	1	3	3	1	1	3
$\Phi_4$	=	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2
$\Phi_5$	=	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0
$\Phi_6$	=	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Figura 2.3.- Secuencia de pulsos empleada para la obtención de los espectros que muestran los acoplamientos a larga distancia de  $^{13}\text{C}$ -H. El pulso selectivo empleado tiene la forma de la mitad de una gaussiana truncada al 5%. Los rectángulos delgados representan pulsos de  $90^\circ$  y los anchos pulsos de  $180^\circ$ . El último pulso protónico tiene fase constante de 0.

Los experimentos se efectuaron en un espectrómetro Varian VXR-400 con un probe especial para detección inversa. Los pulsos débiles tuvieron una forma de la mitad de una gaussiana truncada al 5% y con una duración de 50 ms. Esto da un patrón de excitación conveniente para la componente del modo de absorción, mientras que las señales de dispersión no están involucradas en la transferencia de magnetización, lo cual da como resultado que la fase de las señales den preferentemente en fase. Cada pulso débil fue construido como un histograma de  $k$  segmentos de tiempo, representados por  $k$  vectores definiendo la fase y la amplitud<sup>50</sup>. La fase se incrementó linealmente con el tiempo para crear la frecuencia apropiada fuera del centro del ancho espectral. Ocho pulsos débiles simultáneos fueron combinados por suma vectorial a cada momento del histograma y la frecuencia resultante de los  $k$  vectores se emplearon para controlar digitalmente a un generador de formas de ondas. Se empleó el desacoplamiento WALTZ16 de banda ancha durante el tiempo de preparación con  $\gamma B_2 / 2\pi = 2.5$  kHz. El parámetro para la transferencia de polarización a larga distancia,  $\delta$ ,

tiene que cubrir un amplio rango de valores experimentales, por tanto fue deliberadamente fijado a un valor pequeño para medir constantes de acoplamiento pequeñas (33.8 ms). Esto también evita el peligro de alcanzar la condición nula para las constantes de acoplamiento grandes y permite la partición de la transferencia de polarización entre un número de protones distantes. El módulo BIRD tuvo un  $\Delta = 7.7$  ms. Los 16 pasos de la ciclación de fase se muestra en la Figura 2.3. La alternancia en el tiempo  $\delta$  extiende esta ciclación a 32 pasos y se repitieron cada cuatro pasos para promediar las señales. Para establecer un estado de pseudo-equilibrio antes de la adquisición de la señal, se efectuaron cuatro secuencias sin adquisición.

Con esta metodología se obtuvieron los siguientes resultados.

### II.3.3.- Resultados

Se empleó 0.1 g de estricnina disuelta en 1 ml de  $\text{CDCl}_3$  y fue examinada a  $27^\circ\text{C}$ . El espectro protónico se muestra en la Figura 2.4, al mismo tiempo que la asignación propuesta por Martin<sup>51</sup>. Se excitaron ocho carbonos cada vez.

Se realizaron simultáneamente ocho correlaciones, codificadas de acuerdo con la matriz Hadamard  $H_8$  mostrada en la Tabla 2.1. Después de la decodificación, se obtuvieron ocho trazos individuales por cada experimento; todos los trazos obtenidos se muestran en la Figura 2.5 como si cada experimento fuera realizado individualmente, pero con la ventaja de haber incrementado la sensibilidad con un factor igual a la raíz cuadrada de ocho.

+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	-	-	-	-
+	+	-	-	+	+	-	-
+	+	-	-	-	-	+	+
+	-	+	-	+	-	+	-
+	-	+	-	-	+	-	+
+	-	-	+	+	-	-	+
+	-	-	+	-	+	+	-

Tabla 2.1.- Matriz Hadamard  $H_8$  empleada para la decodificación de los resultados obtenidos del experimento descrito.

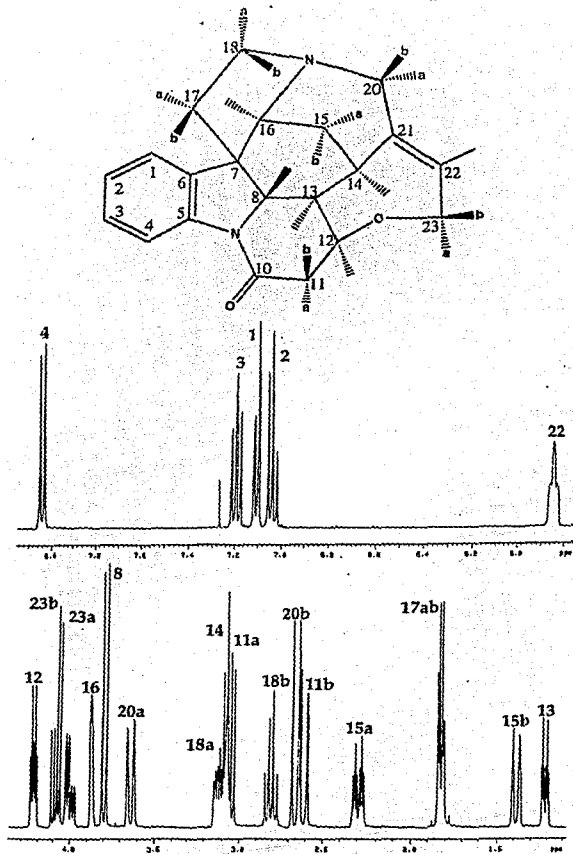


Figura 2.4- Estructura y espectro de la estricnina junto con la asignación empleada en este trabajo.

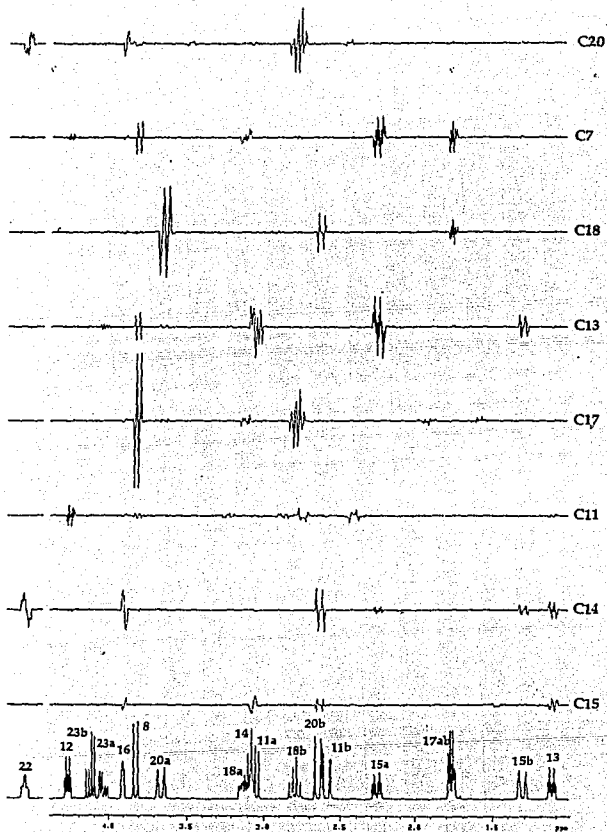


Figura 2.5.- Trazos de los espectros protónicos que muestran el acoplamiento entre los protones y los carbonos a larga distancia de la stricnina.

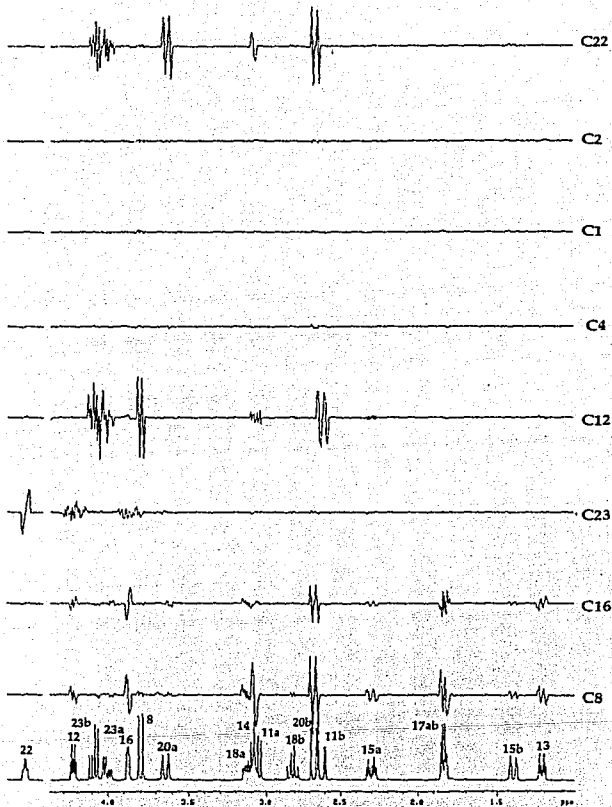


Figura 2.5 b.- Trazos de los espectros protónicos que muestran el acoplamiento entre los protones y los carbonos a larga distancia de la estricnina.

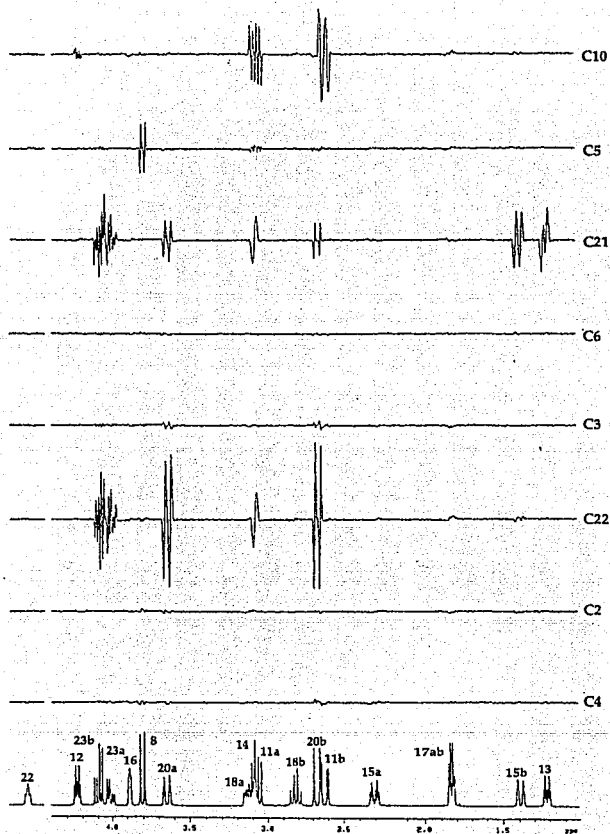


Figura 2.5 c.- Trazos de los espectros protónicos que muestran el acoplamiento entre los protones y los carbonos a larga distancia de la estricnina.

## Capítulo III

### Medición Precisa de Constantes de Acoplamiento por Desacoplamiento y Reconvolución

#### III.1.- Desacoplamiento Coherente

Desde los principios de la década de los sesenta se inició el uso de una segunda radiofrecuencia para lograr el desacoplamiento de ciertos núcleos en la RMN<sup>52,53,54</sup>.

Para explicar en que consiste el desacoplamiento, consideremos dos núcleos activos en RMN, I y S, que están acoplados. El desacoplamiento coherente implica la irradiación de un grupo de espines nucleares, digamos S, con una fuente monocromática de intensidad  $B_2$ , tal que  $\gamma B_2$  sea mayor que  $2\pi J_{IS}$ , para que pueda efectuar las transiciones de los niveles nucleares. Si la irradiación  $B_2$  está centrada en la posición del desplazamiento químico de I y está suficientemente alejada del desplazamiento químico de S, entonces el doblete generado por el sistema IS coalesce en una señal sencilla. Sin embargo, si la irradiación no se encuentra perfectamente bien centrada, el aparente desdoblamiento se ve incrementado por una serie de líneas, las cuales aumentan en número con la distancia entre la irradiación y el desplazamiento químico, producidas por transiciones cuánticas ya permitidas. Estas señales adicionales se deben a los efectos cuánticos múltiples producidos por el campo  $B_2$ <sup>55</sup>.

Cuando el sentido del desacoplamiento experimental se invierte, se observa S mientras que se irradia I en un sistema  $I_2S$  o  $I_3S$ , es muy difícil encontrar una frecuencia de irradiación capaz de generar la coalescencia completa de la señal de S en una señal sencilla. Por tal motivo, la irradiación debe cumplir con la condición:

$$\gamma B_2 / 2\pi \gg |J_{IS}| \quad [3.1]$$

Esta restricción trae como consecuencia que sólo sea posible desacoplar señales que posean constantes de acoplamiento pequeñas.

Esta técnica ha sido usada en el establecimiento de correlaciones homo y heteronucleares, antes del uso de la espectroscopía en dos dimensiones, ya que permite

simplificar las señales cuando el multiplete es muy complejo o no es posible interpretarlo de forma sencilla.

El desacoplamiento coherente ha servido por muchos años para determinar constantes de acoplamiento cuando se encuentran ocultas dentro de la señal; el desacoplamiento de alguna de las señales simplifica el multiplete, lo cual hace posible la medición de algunas de estas constantes.

• La aplicación de una segunda radiofrecuencia trae como consecuencia el efecto llamado Bloch-Siegert que será descrito a continuación.

### III.1.1 Efecto Bloch-Siegert<sup>56</sup>

Cuando las direcciones de la cuantización de I y de S en el eje rotante no son ortogonales, se genera un desplazamiento de la señal que se irradia debido a la inclusión de una segunda radiofrecuencia, por tanto es necesario efectuar una corrección en la posición del desacoplador debido al efecto llamado Bloch-Siegert. Suponiendo que se cumple la relación:

$$\Delta B \ll \gamma B_2 \quad [3.2]$$

donde  $\gamma \Delta B / 2\pi = (\delta_I - \delta_S)$ . La modificación que sufre el desplazamiento químico en la señal esta dada por:

$$\Delta f = (\gamma B_2 / 2\pi)^2 / (\delta_I - \delta_S) \text{ Hz}, \quad [3.3]$$

lo cual indica un desplazamiento lineal.

El efecto Bloch-Siegert se presenta en cualquier par de núcleos cuando existe una segunda radiofrecuencia, solo que en ciertas ocasiones no es perceptible.

En situaciones cuando hay una inhomogeneidad apreciable en el campo magnético  $B_0$ , el efecto Bloch-Siegert puede incrementar el ancho de las señales al igual que el desplazamiento químico. Esto se debe a que diferentes elementos de volumen de la muestra experimentan diferentes desplazamientos Bloch-Siegert; el consecuente ensanchamiento es acompañado usualmente por una marcada distorsión de la forma de la señal.

Este efecto es observable también en la señal que se esta analizando cuando la proximidad de las señales es pequeña y la potencia de la radiofrecuencia  $B_2$  es fuerte. Este desplazamiento está definido por:



$$\Delta f = 0.5 (\gamma B_2 / 2\pi)^2 / (\delta_1 - \delta_5) \text{ Hz.} \quad [3.4]$$

Cuando se requiere efectuar irradiaciones, es conveniente tomar en cuenta este efecto para lograr una correcta irradiación de la señal, modificando la posición de la irradiación por los Hz definidos en [3.4].

Para poder estimar con precisión el efecto Bloch-Siegert es necesario conocer el campo magnético aplicado con la segunda radiofrecuencia. Para lograrlo es necesario calibrar el pulso de desacoplamiento. Este método de calibración será descrito a continuación.

### III.1.2.- Calibración del Pulso de Desacoplamiento

La calibración es posible hacerla mediante el método que se describe a continuación empleando la técnica de cosquileo de espín (spin-tickling).

El cosquileo de espín es un efecto que se produce cuando se irradia en forma selectiva una señal solamente del núcleo I; esto genera que una de las señales del núcleo S muestre un desdoblamiento generando un doblete. Cuando la irradiación es muy pequeña, este desdoblamiento tiene un comportamiento lineal y esta dado por la relación:

$$S = \gamma B_2 / 2\pi \quad [3.5]$$

donde S es el desdoblamiento generado por la irradiación en una de las señales medida en Hz.

En nuestro caso se empleó la molécula del ácido *trans*-3-cloro acrílico, por ser una molécula que posee un sistema AX. Midiendo las separación del multiplete desacoplado se calibró el pulso de desacoplamiento. Sólo se requiere convertir a Hz los decibeles empleados para el desacoplamiento de cualquier muestra, esta relación esta dada por:

$$P_{\min} = \gamma B_2 / 2\pi. \quad [3.6]$$

donde  $P_{\min}$  es la potencia mínima expresada en Hz.

Subsecuentes incrementos de potencia estarán dados por la relación:

$$P_e = P_{\min} * 10^{(dpwr/20)} \quad [3.7]$$

donde  $P_e$  es la potencia empleada,  $P_{\min}$  es la potencia mínima y  $\rho_{\text{pwr}}$  es la potencia en decibeles<sup>57</sup> del pulso  $B_2$ .

Con estas relaciones es posible calibrar el pulso de desacoplamiento y así estimar el efecto Bloch-Siegert que sufrirán diferentes señales conociendo solamente la posición del desacoplamiento, la posición de la señal a observar y la potencia del desacoplador.

Con estos antecedentes se procederá a explicar el método de determinación de constantes de acoplamiento por desacoplamiento y reconvolución que tiene la ventaja de medir constantes de acoplamiento muy pequeñas, con buena precisión y reproducibilidad.

### **III.2.- Desacoplamiento y Reconvolución<sup>58</sup>**

El empleo de una segunda radiofrecuencia en los experimentos de RMN se han empleado para la asignación de conectividades entre los protones de la molécula y para la medición de las constantes de acoplamiento que no eran removidas al simplificarse el multiplete del protón que estaba acoplado al núcleo irradiado. Muchas veces se observaba que las señales mejoraban en resolución, lo cual indicaba la clara presencia de acoplamientos muy débiles. En esta sección se estudia un nuevo método para la medición de las constantes de acoplamiento que se remueven por el empleo de esta segunda radiofrecuencia aplicada en condiciones de desacoplamiento coherente.

#### **III.2.1.- Fundamentos Teóricos**

En esta sección se propone un nuevo método para la determinación de constantes de acoplamiento y en especial aquellas constantes de acoplamiento pequeñas comparables con el ancho de la señal experimental.

Como se ha estudiado en los métodos anteriores, es posible expresar el multiplete de una señal de RMN del sistema de espín IS en función del tiempo mediante la expresión:

$$S_N(t) = A_N \exp(-i2\pi\delta t) \exp(-\lambda t) \cos(\pi J_{IS} t). \quad [3.8]$$

Al efectuar un desacoplamiento coherente del núcleo S, la relación [3.8] se convierte en:

$$S_D(t) = A_D \exp(-i2\pi\delta' t) \exp(-\lambda t) \quad [3.9]$$

donde  $\delta'$  es el nuevo desplazamiento químico de la señal producido por el efecto Bloch-Siegert acoplada al núcleo que se está irradiando. Cuando este efecto es pequeño, puede considerarse lineal y podemos decir que  $\delta' = \delta + \Delta f$ , donde  $\Delta f$  esta definida por la ecuación [3.4].

Una vez corregido el efecto Bloch-Siegert en forma lineal en el espectro  $S_D(\nu)$ , es necesario normalizar también con respecto al espectro  $S_N(\nu)$ , dado que no siempre es cierto que  $A_N$  y  $A_D$  sean iguales, debido a los posibles cambios en la ganancia del receptor por la inclusión de una segunda radiofrecuencia. Por tanto se requiere que:

$$A_N = k A_D \quad [3.10]$$

y en el momento en que  $J^* = J_{IS}$  se cumple:

$$S_N(t) = k S_D(t) \cos(\pi J^* t). \quad [3.11]$$

Esta relación se emplea para medir constantes de acoplamiento pasivas, dado que las activas desaparecerán al momento de aplicar la segunda radiofrecuencia.

Una vez hecho este planteamiento, la interrogante está en definir la condición a la cual  $J^* = J_{IS}$ .

Se espera que la función definida como la diferencia por mínimos cuadrados,  $\Sigma$ , de los espectros de  $S_N(t)$  y  $S_D(t)\cos(\pi J^* t)$  tenga el mínimo global en el valor de la constante de acoplamiento que se está eliminando; el valor de  $J^*$  se le llamará  $J_{\text{aparente}}$ . En esta condición se espera que  $J_{IS} = J_{\text{aparente}}$ .  $\Sigma$  puede calcularse también en el dominio de las frecuencias, pero para ahorrar tiempo y memoria en el procesamiento de los datos es preferible trabajarla en el dominio del tiempo. El único cuidado que debe tenerse es que los FID's deben estar en fase para poderse comparar.

Sin embargo, estas funciones presentan varios mínimos locales; de los cuales es posible predecir la intensidad relativa y la posición, ya que corresponden a las coincidencias de las señales del espectro desacoplado y reconvolucionado con las del espectro normal. Estas coincidencias son predecibles, ya que dependerán de las constantes de acoplamiento que generan el múltipleto.

Como un ejemplo, considérese el caso de un sistema AMXY con  $J_{AM} > J_{AX} > J_{AY}$ . Se irradia X y se observa A. Las posiciones de las señales centradas en el desplazamiento químico en el espectro normal,  $S_N(\nu)$ , estarán dadas por:

- |  |   |
|--|---|
| 1.- $1/2 (J_{AM} + J_{AX} + J_{AY})$ , | 5.- $1/2 (-J_{AM} + J_{AX} + J_{AY})$ , |
| 2.- $1/2 (J_{AM} + J_{AX} - J_{AY})$ , | 6.- $1/2 (-J_{AM} + J_{AX} - J_{AY})$ , |
| 3.- $1/2 (J_{AM} - J_{AX} + J_{AY})$ , | 7.- $1/2 (-J_{AM} - J_{AX} + J_{AY})$ , |
| 4.- $1/2 (J_{AM} - J_{AX} - J_{AY})$ , | 8.- $1/2 (-J_{AM} - J_{AX} - J_{AY})$ . |

y las posiciones de las señales del espectro desacoplado,  $S_D(\nu)$ , despreciando el efecto Bloch-Siegert están dados por:

- |                                |                                 |
|--------------------------------|---------------------------------|
| 9.- $1/2 (J_{AM} + J_{AY})$ ,  | 11.- $1/2 (-J_{AM} + J_{AY})$ , |
| 10.- $1/2 (J_{AM} - J_{AY})$ , | 12.- $1/2 (-J_{AM} - J_{AY})$ . |

Para localizar los mínimos locales de  $\Sigma$  en función de  $J^*$ , es necesario encontrar las coincidencias de las señales. Esto se logra efectuando la diferencia de las posiciones de las señales desacopladas con las señales normales. Cabe mencionar que por simetría, es necesario sólo encontrar las coincidencias de 9) y de 10) con el resto de las señales normales; las cuales serán exactamente el doble.

Los resultados obtenidos para el sistema AMXY se dan en la Tabla 3.1.

Coincidencia	Número de coincidencias
$2J_{AY} - J_{AX}$	4
$J_{AX}$	8
$2J_{AY} + J_{AX}$	4
$2J_{AM} - J_{AX}$	4
$2J_{AM} + J_{AX}$	4
$2J_{AM} - J_{AX} - 2J_{AY}$	2
$2J_{AM} + J_{AX} - 2J_{AY}$	2
$2J_{AM} - J_{AX} + 2J_{AY}$	2
$2J_{AM} + J_{AX} + 2J_{AY}$	2

Tabla 3.1.- Localización de los mínimos locales de  $\Sigma$  en función de  $J^*$ . Obsérvese que el mínimo global se encontrará en el valor de  $J_{AX}$ .

Con la Tabla 3.1 es posible predecir que en las determinaciones de las constantes de acoplamiento  $J_{IS}$ , el mínimo global se encuentra en  $J_{IS}$ , ya que se espera que sea un mínimo del doble en profundidad con respecto a los mínimos locales más profundos. También se puede predecir la existencia de ocho mínimos locales; cuatro de ellos involucran sólo dos constantes pasivas y son dos veces menos profundos que el mínimo global. Aquellos mínimos que relacionan tres constantes de acoplamiento son cuatro veces menos profundos.

Con este desarrollo se ha planteado la posibilidad de determinar constantes de acoplamiento mediante desacoplamiento de la constante que se quiere determinar y por reconvolución. Se procederá ahora a explicar la implementación del método.

### III.2.2.- Procedimiento experimental

Todas las determinaciones experimentales que se mencionan en el presente trabajo se realizaron en un equipo Varian VXR-400.

Como anteriormente se estableció se requieren dos espectros: uno normal,  $S_N(\nu)$  Figura 3.1.a, y el siguiente desacoplado,  $S_D(\nu)$  Figura 3.1.b, ambos de la señal del núcleo donde se eliminó la constante de acoplamiento.

Para realizar este desacoplamiento es necesario cumplir con la condición de que el campo aplicado sea mayor que la constante de acoplamiento. También hay que tomar en cuenta el desplazamiento Bloch-Sigert de la señal a irradiar para corregirla. Para evitar distorsiones generadas por el segundo campo magnético aplicado, es necesario encender el desacoplador 200 ms antes de iniciar la adquisición de los datos. El objetivo de todos estos ajustes es producir una señal desacoplada con el menor número de distorsiones.

Una vez adquirido estos dos conjuntos de datos experimentales, se obtienen espectros muy bien digitalizados, en caso necesario se introduce un número de puntos con valor de cero en el dominio del tiempo para incrementar la digitalización, conocido como zero-filling. A cada señal del espectro desacoplado,  $S_D(\nu)$ , se le calculó el efecto Bloch-Sigert y se corrigió mediante un desplazamiento de puntos; esta forma supone un comportamiento lineal. A ambos espectros se les realiza la transformada de Fourier inversa para obtener el espectro en el dominio del tiempo,  $S_N(t)$  para el espectro normal y  $S_D(t)$  para el desacoplado.

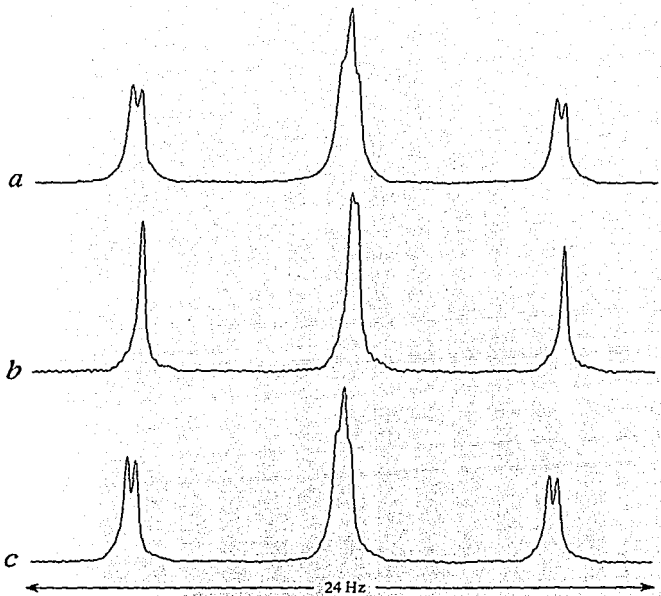


Figura 3.1.- a) Señal normal del protón  $H_a$  del *m*-bromo nitro benceno; b) señal obtenida después de haber efectuado el desacoplamiento del protón  $H_x$ ; y c) espectro reconvolucionado con un valor de  $J^* = 0.35$  Hz.

Al espectro  $S_D(t)$  se le multiplica por  $\cos(\pi J^* t)$  y se determina el error por mínimos cuadrados,  $\Sigma$ , entre  $S_N(t)$  y  $S_D(t)$ .  $J^*$  se varía dentro de los límites donde se espera encontrar  $J_{IS}$  para facilitar el procedimiento, aunque ésta no es una condición necesaria del método.

Se generó un programa de computación que realiza la búsqueda del mínimo global de  $\Sigma$ , el cual corresponderá a  $J_{aparente}$ .

La función  $\Sigma(J^*)$  tiene varios mínimos locales, Figura 3.2, pero un sólo mínimo global. Este mínimo corresponderá a  $J_{IS}$ . Los mínimos locales son producidos por las coincidencias de las señales que se están reconvolucionando con las señales del espectro normal.

En la Figura 3.1.c se muestra el espectro  $S_D(\nu)$  reconvolucionado con el valor de  $J_{aparente}$ . Obsérvese la similitud entre éste y el espectro normal, Figura 3.1.a.

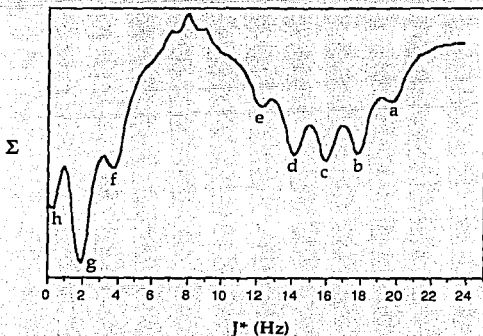


Figura 3.2.- Gráfica del error por mínimos cuadrados entre el FID del protón P desacoplado y vuelto a reconvolucionar con el del protón original P. Los mínimos corresponden a: a)  $2J_{AM} + J_{MX} + 2J_{MP}$ , b)  $2J_{AM} + J_{MX}$ , c)  $2J_{AM} + J_{MX} - 2J_{MP}$  y  $2J_{AM} - J_{MX} + 2J_{MP}$ , d)  $2J_{AM} - J_{MX}$ , e)  $2J_{AM} - J_{MX} - 2J_{MP}$ , f)  $J_{MX} + 2J_{MP}$ , g)  $J_{MX} - 2J_{MP}$ .

Cuando la constante de acoplamiento es muy grande para lograr un desacoplamiento eficiente es posible determinarla empleando los mínimos locales. Para esto es necesario conocer al menos una de las dos constantes de acoplamiento involucradas. Por experiencia, la precisión no es la misma, pero si se obtienen

resultados que tienen error del mismo orden que cuando la constante de acoplamiento se determina por el mínimo global.

Se procederá a presentar los resultados obtenidos con este método.

### III.2.3.- *m*-Bromo nitro benceno

El *m*-bromo nitro benceno, I, es un compuesto que ha sido estudiado anteriormente<sup>38,59</sup> y tiene constantes de acoplamiento que van desde 0.35 hasta 8.20 Hz, lo cual permite probar los métodos que determinan estos parámetros. El espectro de este compuesto se muestra en la Figura 3.3.

En primer lugar se escogió irradiar el protón X por ser el que satisface mejor la condición [3.2]. En esta forma se determinaron  $J_{AX}$ ,  $J_{MX}$  y  $J_{PX}$ .

Para lograr medir  $J_{MP}$ , fue necesario emplear un desacoplamiento selectivo con uno de los multipletes del protón M. Esto se requirió debido a que la potencia de la radiofrecuencia necesaria para desacoplar completamente el multiplete M era lo suficientemente fuerte para distorsionar las señales vecinas, donde se esperaba medir la constante de acoplamiento; además, origina la aparición de señales correspondientes a transiciones cuánticas múltiples y el efecto Bloch-Siegert no fue lineal debido a la proximidad de las dos señales.

En la determinación de las constantes de acoplamiento más grandes,  $J_{AM}$  y  $J_{AP}$ , no se logró un desacoplamiento total de estas señales. Sin embargo, se logró la determinación empleando los mínimos locales de las graficas de  $J^*$  vs.  $\Sigma$ .

En la Tabla 3.2 se muestran los valores obtenidos para esta molécula y se muestran los resultados obtenidos con los métodos de deconvolución y duplicación de J en el dominio del tiempo. Se observa la excelente correspondencia de los resultados obtenidos del método de desacoplamiento y reconvolución con métodos reportados anteriormente. Hay que hacer notar que las determinaciones hechas con los mínimos locales no es tan precisa, ya que los mínimos locales son más anchos y se ven afectados más por los diferentes mínimos que aparecen por la misma región. A pesar de ello se obtienen buenos resultados.



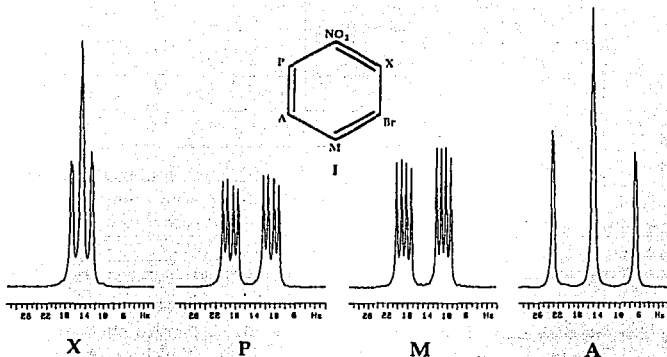


Figura 3.3.- Estructura, asignación y espectro protónico del *m*-bromo nitrobenzo en  $\text{CDCl}_3$ . El desplazamiento químico de las señales son: A = 7.47, M=7.82, P = 8.17 y X = 8.29 ppm.

Método	Deconvolución	Duplicación de J	Desacoplamiento /reconvolución
J <sub>AM</sub>	7.98±0.03	7.99±0.02	7.99±0.05*
J <sub>AP</sub>	8.28±0.04	8.28±0.03	8.24±0.05*
J <sub>MP</sub>	0.99±0.03	1.00±0.04	0.98±0.03
J <sub>MX</sub>	1.89±0.04	1.90±0.05	1.88±0.03
J <sub>PX</sub>	2.18±0.03	2.17±0.03	2.17±0.03
J <sub>AX</sub>	0.34±0.04	0.35±0.02	0.35±0.03

\* Constantes determinadas empleando los mínimos locales.

Tabla 3.2.- Comparación de las constantes de acoplamiento obtenidas por los métodos de deconvolución<sup>29</sup>, duplicación de J en el dominio del tiempo<sup>38</sup> y desacoplamiento y reconvolución<sup>58</sup>.

La determinación de las constantes de acoplamiento del *m*-bromo nitro benceno es un claro ejemplo de como este método puede determinar constantes de acoplamiento y en especial las de valores pequeños. Aunque no es posible determinar directamente constantes de acoplamiento grandes, si es posible estimarlas empleando los mínimos locales.

Con estos resultados, se procedió a estudiar el comportamiento del método bajo ciertas circunstancias que permitieron conocer sus alcances.

### III.2.4.- Comportamiento del Método

Para poder conocer los alcances y las limitaciones del método, se estudiaron dos diferentes casos: cuando se efectúa un ensanchamiento artificial de los resultados obtenidos y cuando aumenta el ruido del espectro.

Como con este método se pretende medir constantes de acoplamiento pequeñas. Este estudio se realizó con J<sub>AX</sub> = 0.35 Hz que es la más pequeña que tiene el *m*-bromo nitro benceno; se espera que las otras constantes tengan un mejor comportamiento por ser más grandes y no estar limitadas por su tamaño.

### III.2.4.1 Relación señal ruido

Se efectuaron diferentes determinaciones de  $J_{AX}$  a medida que se incrementaba el ruido del espectro  $S_N(v)$  y  $S_D(v)$ . La variación del ruido se logró modificando el tiempo del pulso de excitación empleando una muestra diluida del compuesto. Los valores de la relación señal-ruido se determinaron con el programa presente en el software del equipo Varian, el cual evalúa el error por mínimos cuadrados en el dominio de las frecuencias. Para los propósitos de esta comparación se empleó una definición alterna de relación señal-ruido pico a pico, la cual es 2.5 veces menor que la relación señal-ruido por mínimos cuadrados. Los resultados se muestran en la Figura 3.4.

Con ello se logró establecer que si se desea que el error en la determinación sea menor de  $\pm 0.03$ , es conveniente tener una relación señal-ruido mayor a cuatro. Este valor es un poco alto en comparación con los otros métodos, sin embargo era de suponerse, ya que modificaciones pequeñas en las formas de las señales trae como consecuencia que el error aumente apreciablemente. Es conveniente resaltar la excelente reproducibilidad de los resultados cuando la relación señal-ruido es mayor a 7.5.

Gráfica de la J aparente en función de la relación señal ruido

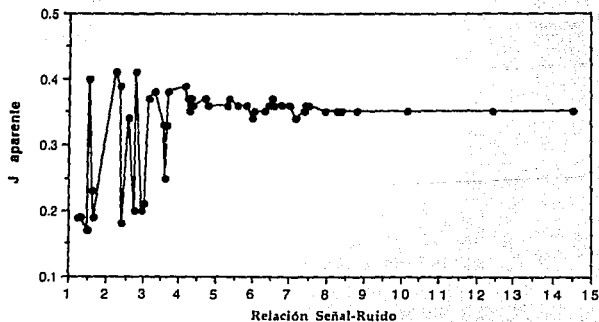


Figura 3.4.- Gráfica de J aparente en función de la relación señal ruido.

Otro factor que se modifica mucho en las determinaciones de las constantes de acoplamiento es el ensanchamiento artificial de la señal, el cual se procederá a estudiarlo.

### III.2.4.2 Ensanchamiento de la señal

Empleando nuevamente *m*-bromo nitro benceno se ponderaron los resultados antes de realizar la transformada de Fourier para lograr un ensanchamiento artificial de las señales, *lb*. Se encontró en las curvas de  $J^*$  vs  $\Sigma$  que, a medida que se incrementaba el ancho de la señal, los mínimos locales desaparecían. Los mínimos globales van perdiendo profundidad, pero es posible encontrar el mínimo global en este tipo de gráficas. El comportamiento general de estas curvas se muestra en la Figura 3.5.

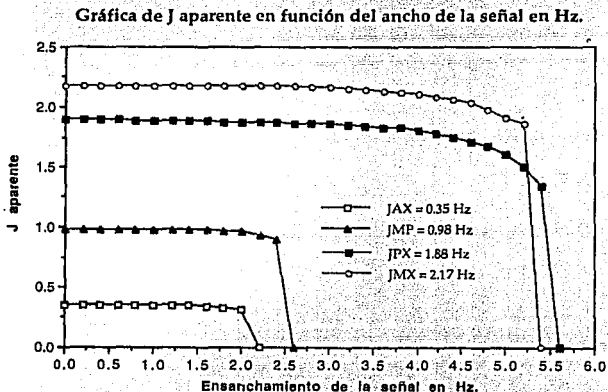


Figura 3.5.- Gráfica de J aparente en función del ancho de la señal en Hz. Nótese que  $J_{AX}$  se puede determinar con buena precisión hasta cuando el ensanchamiento de la señal es casi 6 veces la constante de acoplamiento.

Para cada una de las constantes de acoplamiento, e. g.  $J_{AX}$ ,  $J_{MX}$ ,  $J_{PX}$  y  $J_{MP}$ , se trazaron las curvas de  $J_{\text{aparente}}$  como función del ensanchamiento artificial, Figura 3.5. En estas curvas se observa que a valores pequeños de  $lb$  comienza a aparecer un mínimo local muy próximo a cero. Este mínimo será el causante que a valores grandes de  $lb$  la determinación caiga abruptamente a cero, ya que de un mínimo local pasa a ser el mínimo global; esto explica la caída abrupta de las determinaciones.

Existe un factor que hay que tomar en cuenta: el valor determinado de la constante de acoplamiento es el mismo por un intervalo relativamente grande, hasta que comienza a disminuir gradualmente. Este descenso gradual, casi imperceptible, se debe a que los anchos de las señales no son exactamente iguales debidos a un efecto Bloch-Siegert<sup>56</sup>. Esto se comprobó cuando al aumentar artificialmente el ancho de las señales, el valor de  $J_{\text{aparente}}$  se mantenía en un valor constante por un intervalo mayor.

Esta sensibilidad del método nos lleva a suponer que si mantenemos la segunda radiofrecuencia lo bastante alejada de la señal que se quiere deconvolucionar sin afectar el ancho de la señal, se podrá medir constantes de acoplamiento menores al ancho de la señal experimental.

También se encontró que si la señal no es seleccionada en forma simétrica, el incremento en el ancho de la señal trae como consecuencia que al aumentar el  $lb$ , la extracción de la señal origina la formación de discontinuidades en la frontera donde se sustrae la señal del espectro completo. Estas discontinuidades son convolucionadas también en el proceso, originando la caída de la determinación a valores pequeños de  $lb$ . Para atenuar este problema es conveniente extraer la señal en forma simétrica y realizar una corrección en la línea base.

En la Figura 3.5 se observa también que es posible hacer las determinaciones a intervalos relativamente grandes de ensanchamiento artificial de la señal. La medición de la constante de acoplamiento más pequeña se mantiene en un valor esencialmente constante hasta un  $lb$  de 2 Hz, que representa 6 veces el valor de la constante de acoplamiento, 0.35 Hz. Este resultado nos hace suponer que es posible la determinación de constantes de acoplamiento mucho más pequeñas y que no es importante que el multiplete en cuestión no este resuelto.

Las constantes de acoplamiento  $J_{MX}$  y  $J_{PX}$  dan una curva constante hasta que el ensanchamiento artificial llega alrededor de dos veces la constante de acoplamiento donde comienzan a decaer gradualmente, próximo a tres veces el valor de  $J$ . Un comportamiento similar se obtiene con  $J_{MP}$ , pero en este caso en vez de decaer

gradualmente, se obtiene una caída abrupta alrededor de dos veces el valor de  $J$ . Esto es debido a la escisión del multiplete por la mitad, lo cual provoca un pequeño salto en la intensidad en las fronteras donde se esta cortando la señal.

Los mismos experimentos determinados en la modificación del ruido, se emplearon para incrementar ahora en forma artificial el ensanchamiento de la señal. Los resultados obtenidos no muestran mayor información que los resultados mostrados hasta estos momentos, ya que al incrementar el  $1b$ , la relación señal-ruido aumenta también y los resultados son similares a los obtenidos sin ensanchamiento alguno.

### **III.2.5.- Determinación de constantes de acoplamiento menores al ancho de la señal**

La determinación de las constantes de acoplamiento del orden de magnitud del ancho de la señal siempre han sido muy difíciles o la precisión no es la adecuada. Mediante el método de desacoplamiento y reconvolución se ha logrado determinar constantes de acoplamiento muy pequeñas y con buena reproducibilidad.

Para medir constantes de acoplamiento del orden del ancho de la señal se estudiaron tres compuestos mas: (S)-(-)-nicotina, (-)-cotinina y 2-furfural.

#### **III.2.5.1.- (S)-(-)-Nicotina y (-)-cotinina**

La (S)-(-)-nicotina, II, y la (-)-cotinina, III, se conoce que poseen constantes de acoplamiento del tipo benclíco<sup>60</sup>. El espectro de la (S)-(-)-nicotina se muestra en la Figura 3.6 y el de la (-)-cotinina se muestra en la Figura 3.7. Para probar el método se determinaron estas constantes de acoplamiento las cuales se muestran en la Tabla 3.3.

Los resultados son consistentes, ya que las diferencias entre los valores de constantes de acoplamiento es muy pequeña, cuando mucho de 0.03 Hz, lo cual está dentro del error experimental.

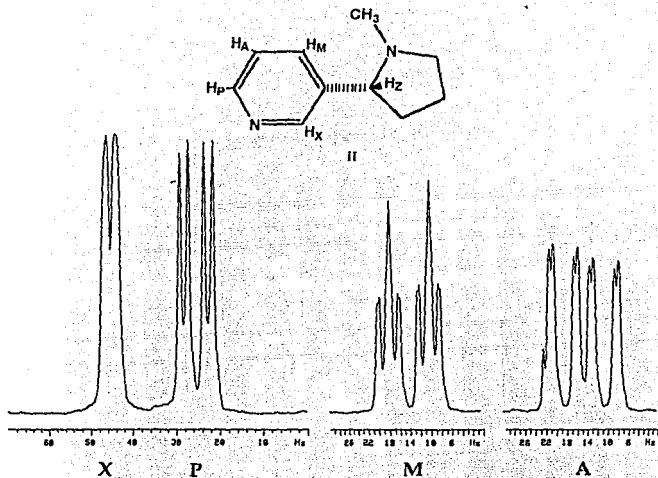


Figura 3.6.- Estructura y espectro protónico de la (S)-(-)-nicotina en  $\text{CDCl}_3$  junto con la asignación empleada en este trabajo. El desplazamiento químico de las señales son: A = 7.13, M = 7.62, P = 8.52 y X = 8.58 ppm.

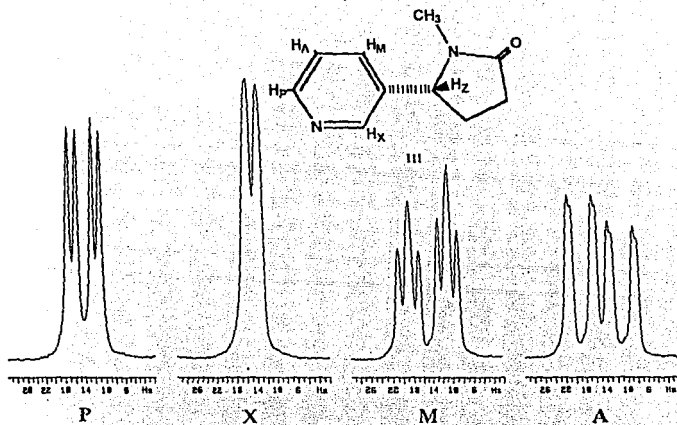


Figura 3.7.- Estructura y espectro protónico de la (-)-cotinina en CDCl<sub>3</sub> junto con la asignación empleada en este trabajo. El desplazamiento químico de las señales son: A = 7.31, M = 7.65, P = 8.66 y X = 8.49 ppm.



Compuesto	$J_{AZ}$	$J_{MZ}$	$J_{PZ}$	$J_{XZ}$
(S)-nicotina	0.38	0.48	0.21	0.44
(-)-cotinina	0.38	0.45	0.23	0.45

Tabla 3.3.- Constantes de acoplamiento en Hz a larga distancia entre el protón HZ los protones del anillo piridínico de la (S)-(-)-nicotina y de la (-)-cotinina en  $CDCl_3$ .

### III.2.5.2.- 2-Furfural

Otro compuesto que posee constantes de acoplamiento a larga distancia es el 2-furfural, Figura 3.8, el cual ha sido estudiado con anterioridad<sup>61,62</sup>. Estos estudios muestran que una de las constantes de acoplamiento,  $J_{BX}$ , es del orden de 0.06 Hz. Por tanto este compuesto representa un verdadero reto para el método descrito.

Se ha reportado<sup>63</sup> que las constantes de acoplamiento tienen una dependencia del disolvente. Para nuestro sistema se estudiaron cuatro muestras en benceno- $d_6$ , cloroformo- $d$ , acetona- $d_6$  y sulfóxido de dimetilo- $d_6$  a 300 y a 323 K. Los resultados se muestran en la Tabla 3.4 los cuales están de acuerdo con los reportados anteriormente<sup>61,64</sup>. En la mayoría de los casos las constantes de acoplamiento se midieron por duplicado, excepto para la constante de acoplamiento  $J_{AB}$ ,  $J_{BC}$  y  $J_{BX}$  en  $CDCl_3$ , ya que la señal del  $CHCl_3$  se encuentra en la misma región que la señal del protón B.

Es importante hacer notar que todos los resultados no difieren más de 0.04 Hz; que el 89% de las constantes determinadas por duplicado no difieren en más de 0.02 Hz. Esto quiere decir que el método es muy preciso y de alta confiabilidad. Esta precisión se pierde cuando las constantes de acoplamiento se aproximan a 0 Hz, lo cual era de esperarse. Para confirmar esto, se observa que la función  $\Sigma$  vs.  $J^*$  es constante cuando se aproxima a cero. La Figura 3.9 muestra la medición de una constante de acoplamiento de 0.17 Hz, en ella se muestra claramente como es posible determinarlas inequívocamente.

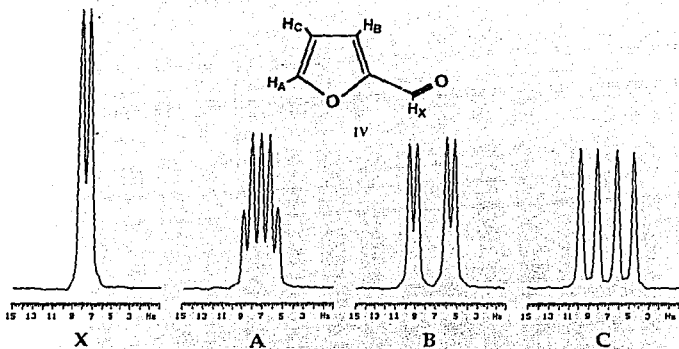


Figura 3.8.- Estructura, asignación y espectro protónico del 2-furfural en  $CDCl_3$ . El desplazamiento químico de las señales son: A = 7.61, B=7.11, C = 6.52 y X = 9.63 ppm

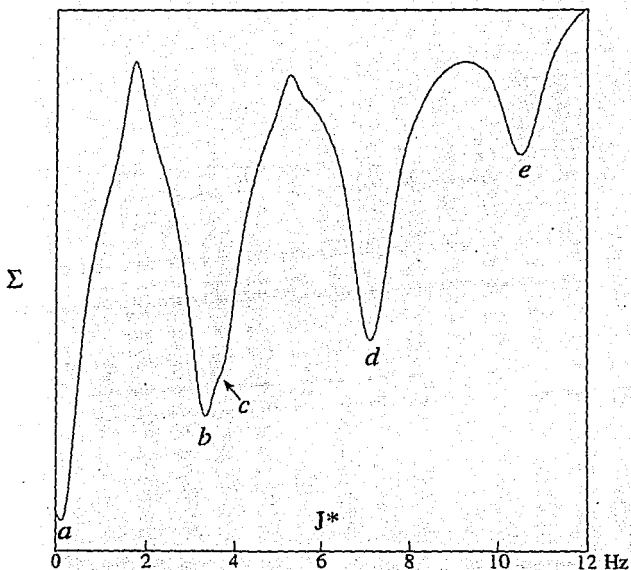


Figura 3.9.- Función  $\Sigma(J^*)$  para el protón  $H_C$  del 2-furfural en DMSO a 300 K desacoplando  $H_X$ . Los mínimos corresponden a: a)  $J_{CX}$ ; b)  $2J_{AC}$ ; c)  $2J_{BC} - 2J_{AC}$ ; d)  $2J_{BC}$ ; y e)  $2J_{BC} + 2J_{AC}$ .

	$J_{AB}$		$J_{AC}$		$J_{AX}$		$J_{BC}$		$J_{BX}$		$J_{CX}$	
	$J_{AB}$	$J_{AB}$	$J_{AC}$	$J_{AC}$	$J_{AX}$	$J_{AX}$	$J_{BC}$	$J_{BC}$	$J_{BX}$	$J_{BX}$	$J_{CX}$	$J_{CX}$
$C_6D_6$	0.77	0.78	1.69	1.69	0.63	0.62	3.56	3.56	0.12	0.13	0.32	0.32
$CDCl_3$	-	0.79	1.69	1.68	0.69	0.67	3.58	-	0.11	-	0.27	0.27
Acetona- $d_6$	0.77	0.79	1.71	1.71	0.76	0.75	3.59	3.58	0.06	0.07	0.19	0.19
DMSO- $d_6$ (300 K)	0.79	0.81	1.69	1.69	0.84	0.84	3.60	3.60	0.10	0.06	0.15	0.16
DMSO- $d_6$ (325 K)	0.78	0.82	1.70	1.69	0.82	0.81	3.60	3.60	0.10	0.07	0.17	0.17

Tabla 3.4.- Constantes de acoplamiento del 2-furfural determinadas por el método de desacoplamiento y reconvolución. Las determinaciones se realizaron en la mayoría de los casos por duplicado. Las letras negras indican el núcleo que se desacopló.

Cuando existe una constante de acoplamiento muy pequeña, también existe un mínimo global muy cerca de cero, aunque este sea apenas apreciable. Si el mínimo global se encuentra en cero, esto indica que es necesario incrementar la resolución del espectro para poder realizar la determinación.

Considerando que con el método de desacoplamiento y reconvolución se obtuvieron resultados aceptables, sugirió la siguiente idea.

### III.3.- Depuración de J

Dado que los espectros  $S_N(t)$  y  $S_D(t)$  se pueden representar de la forma:

$$S_N(t) = A_N \exp(-i2\pi\delta t) \exp(-\lambda t) \cos(\pi J_{1st}) \quad [3.12]$$

y:

$$S_D(t) = A_D \exp(-i2\pi\delta' t) \exp(-\lambda t) \quad [3.13]$$

se espera que cuando se efectúe la división de  $S_N(t)$  entre  $S_D(t)$  y habiendo corregido el efecto Bloch-Siegert se obtenga:

$$S_N(t) / S_D(t) = \cos(\pi J_{IS}t). \quad [3.14]$$

Si a este resultado se le multiplica por una función exponencial que decae en función del tiempo y se efectúa una transformación de Fourier real, se obtendrá una señal sencilla a  $J_{IS} / 2$ . Esta forma de tratar a los datos servirá, también, para medir constantes de acoplamiento<sup>65</sup>.

Los problemas de este método son bien conocidos<sup>29,40</sup>. La imposibilidad de efectuar divisiones con números muy pequeños o que se encuentren muy cerca de cero hacen que se obtengan indefiniciones debido a que se generarán puntos que aparentarán ser artefactos producidos por ruido electrónico.

Este problema se resolvió reprocesando estas singularidades en el dominio del tiempo. Aquellos puntos del espectro  $S_D(t)$  que cumplan con la condición:

$$\theta > S_D(t) > -\theta \quad [3.15]$$

se modificaría mediante las condiciones:

$$S_D(t) = \theta \quad \text{si } S_D(t) > 0 \quad [3.16]$$

ó:

$$S_D(t) = -\theta \quad \text{si } S_D(t) < 0. \quad [3.17]$$

Como  $S_D(t)$  es una función experimental, se espera que para fines prácticos se cumpla que  $S_D(t)$  siempre sea diferente de cero, debido a efectos de ruido.

A menores valores de  $\theta$  menor será el número de puntos que requieran modificarse, pero el riesgo de encontrar singularidades aumentará.

Se observó que el valor de  $\theta$  empleado puede ser tan grande, tal que, todos los puntos pueden ser redefinidos y, a pesar de ello, se obtendrá el resultado esperado. Sin embargo, esta condición no es recomendable, ya que comenzará a generar armónicos del componente de la frecuencia principal y en particular la aparición de una señal a la frecuencia correspondiente a 0 Hz.

También se encontró que con valores pequeños de  $\theta$  es aún posible efectuar la medición de la frecuencia para la determinación de las constantes de acoplamiento. La presencia de ciertas singularidades persiste, las cuales son atenuadas mediante repetidas convoluciones de ciclos 1:2:1. La transformada de Fourier del cociente  $S_N(t)/S_D(t)$  da un espectro con pocos artefactos, dominado por una fuerte resonancia a  $1/2 J_{IS}$  Hz con un ancho de señal determinado por la función exponencial que se aplicó.

### III.3.1. Determinación Experimental

Se emplearon los mismos resultados experimentales obtenidos para las cuatro diferentes soluciones del 2-furfural en benceno-d<sub>6</sub>, cloroformo-d, acetona-d<sub>6</sub> y sulfóxido de dimetilo-d<sub>6</sub>. En este último disolvente, la determinación se realizó a 300 y a 327 K para probar algún efecto de la temperatura en el isómero. La mayoría de las determinaciones se efectuaron por duplicado, excepto para el cloroformo, ya que la señal del CHCl<sub>3</sub> aparece en la misma región que la señal del protón H<sub>B</sub>. Por ejemplo, irradiando H<sub>B</sub> y observando H<sub>A</sub>, e irradiando H<sub>A</sub> mientras que se observa H<sub>B</sub>.

La señal en el dominio del tiempo S<sub>D</sub>(t) se procesó para que todos aquellos puntos que cumplan con las relaciones [3.15], [3.16] y [3.17] se procesen en la forma descrita.

Posteriormente se evaluó el cociente S<sub>N</sub>(t) / S<sub>D</sub>(t), donde S<sub>D</sub>(t) posee los puntos retransformados. Este cociente fue convolucionado por dos ciclos 1:2:1 y multiplicado por una función exponencial del tipo exp(-t/2).

Se probaron diferentes valores de  $\theta$ ,  $\theta \in [10^{-6}, 10^{-3}]$ , Figura 3.10. En todos los casos existe una sola frecuencia dominante en el "espectro" localizada en 1/2 J<sub>IS</sub> Hz. Existen ciertas señales, debidas a la inclusión de una función cuadrada, que disminuyen a medida que se incrementa  $\theta$ , dado que la amplitud de las interferencias en el cociente S<sub>N</sub>(t) / S<sub>D</sub>(t) se afecta en la misma forma. Pero existe un compromiso para encontrar el valor óptimo, ya que a medida que se incrementa  $\theta$ , comienzan a aparecer armónicos débiles. El principal armónico se encuentra en 0.0 Hz.

Por lo anteriormente expuesto, se escogió un valor que fuera lo suficientemente grande para lograr la minimización de las interferencias, pero lo suficientemente pequeño para que los armónicos no aparecieran; este valor se fija en  $\theta = 10^{-4}$ , que corresponde a tres veces la relación señal-ruido pico a pico en el espectro desacoplado en el dominio del tiempo, S<sub>D</sub>(t).

Se realizó este procedimiento para diferentes valores de  $\theta$ . En la Figura 3.11 se muestra como la posición de la señal obtenida no varía a medida que  $\theta$  cambia. La determinación de constantes de acoplamiento no depende del valor de  $\theta$  utilizado.

Este método fue empleado en la determinación de todas las constantes de acoplamiento para el 2-furfural; se empleó un valor de  $\theta = 10^{-4}$  y dos estados de convolución 1:2:1. En la Figura 3.11 se muestra que cada una de los trazos que tienen únicamente una línea fuerte de resonancia. La frecuencia se evaluó por interpolación

entre los puntos usando un programa de ajuste polinomial. La reproducibilidad es mejor que  $\pm 0.04$  Hz.

Sin embargo, las constantes de acoplamiento más pequeñas fueron imposibles determinar, ya que siempre apareció una señal a 0.0 Hz. Los resultados se muestran en la Tabla 3.5.

Los resultados obtenidos por este método están en concordancia con los resultados de desacoplamiento y reconvolución dentro de los límites de error, con lo cual se puede decir que éste es también un método preciso para la determinación de constantes de acoplamiento.

	$J_{AB}$		$J_{AC}$		$J_{AX}$		$J_{BC}$	
	$J_{AB}$	$J_{AB}$	$J_{AC}$	$J_{AC}$	$J_{AX}$	$J_{AX}$	$J_{BC}$	$J_{BC}$
$C_6D_6$	0.78	0.74	1.68	1.71	0.65	0.65	3.56	3.63
$CDCl_3$	-	0.77	1.69	1.75	0.67	0.70	3.58	-
Acetona- $d_6$		0.81	1.72	1.74	0.75	0.79	3.57	3.63
DMSO- $d_6$ (300 K)	0.77	0.76	1.70	1.71	0.85	0.82	3.60	3.60
DMSO- $d_6$ (325 K)	0.77	0.82	1.68	1.72	0.82	0.81	3.61	3.63

Tabla 3.5.- Constantes de acoplamiento del 2-furfural determinadas por el método de depuración de J. Las determinaciones se realizaron en la mayoría de los casos por duplicado. Las letras negritas indican el núcleo que se desacopló. Las constantes de acoplamiento  $J_{BX}$  y  $J_{CX}$  no fue posible determinarlas por este método.

Es importante mencionar que este método es muy sencillo de implementar. No requiere de memoria adicional y los cálculos son extremadamente rápidos.

Con este trabajo se ha podido establecer que el método de determinación de constantes de acoplamiento por desacoplamiento y reconvolución es excelente para medir constantes de acoplamiento pequeñas, no importa que se traten de constantes que están ocultas por el ancho de la señal. Esto trae como consecuencia que puedan ahora medirse en una forma rutinaria constantes de acoplamiento que anteriormente requerirían de un gran esfuerzo para poder incrementar la resolución mediante el

ajuste correcto del campo magnético y, en algunos casos, del empleo de técnicas especiales<sup>62,64</sup>.

La precisión de este método es bastante buena para usarla en estas determinaciones, solo hay que tener cuidado en que la forma de las señales sean muy parecidas para no tener resultados erróneos.

El método de depuración de J es un método que a pesar de tener muchas limitaciones, ha permitido visualizar la resolución mas sencilla cuando se emplea el método de deconvolución. En este paso, se dirigirá el esfuerzo hacia un método sencillo y preciso para la determinación de las constantes de acoplamiento.



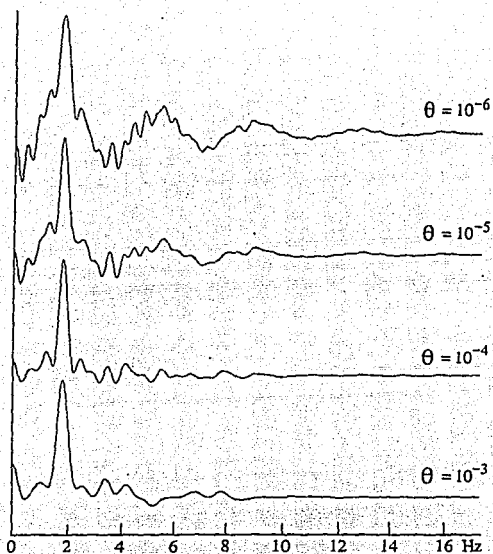


Figura 3.10.- La transformada de Fourier del cociente  $S_N(t) / S_D(t)$  del multiplete del protón  $H_C$  del 2-furfural en DMSO a 300 K. La señal a 1.80 Hz corresponde al valor de  $1/2$  de  $J_{BC}$ . Los valores empleados de  $\theta$  se muestran en la figura.

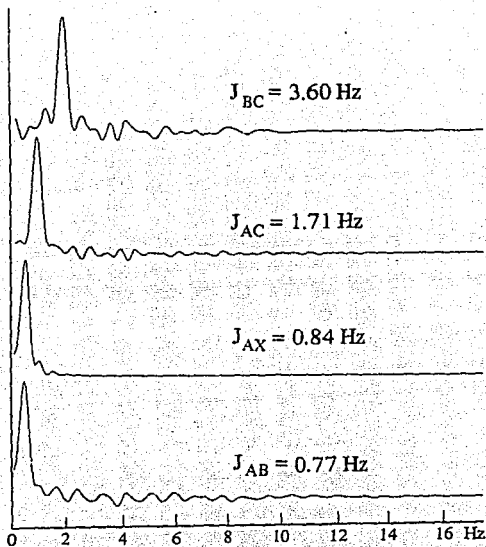


Figura 3.11.- Medición de las constantes de acoplamiento del 2-furfural en DMSO por el método de depuración de J. El valor de  $\theta$  se fijó en  $10^{-4}$  para eliminar singularidades. La frecuencia que se encuentra a  $1/2 J$  se interpoló entre los puntos experimentales para determinar la constante con mayor precisión.

## Capítulo IV

### El Valor Menor

#### IV.1.- Introducción.

Recientemente muchos han sido los trabajos que se han dedicado a procesar los resultados de los experimentos de RMN después de haber sido adquiridos. El objetivo es tratar de encontrar los desplazamientos químicos de muestras complejas, la determinación de las constantes de acoplamiento, o bien, la deconvolución de las señales de los espectros.

Todos estos análisis pretenden obtener mayor información de la que se extrae por métodos convencionales. En muchos casos la información requerida es imposible extraer debido a la complejidad de los espectros, pero en algunas ocasiones la información extra es invaluable<sup>66</sup>.

Como ya se mencionó, los trabajos de McIntyre<sup>38</sup> y Huber<sup>67</sup> han propuesto deconvoluciones tanto en el dominio del tiempo como en el dominio de las frecuencias respectivamente. Ambos métodos son atractivos, pero su complejidad hace difícil la implementación de estas técnicas.

En este capítulo explicamos un nuevo algoritmo para la deconvolución de las señales de RMN en el dominio del tiempo que es sencillo de implementar y rápido en el procesamiento de datos.

#### IV.2.- Deconvolución Mediante el Valor Menor

Es posible generar una señal doble en el dominio del tiempo a partir de la convolución por dos funciones  $\delta$  de una señal sencilla (ver Capítulo VI). Pero realizar la operación contraria no es sencilla.

Supongamos que tenemos una señal doble con constante de acoplamiento  $J_p$ , si la convolucionamos con dos funciones  $\delta$ , pero en vez de sumar el producto de las dos funciones, escogemos sólo el valor cuya magnitud sea la menor de entre los puntos localizados de las dos funciones. El punto menor se colocará a la mitad de las dos funciones  $\delta$ , Figura 4.1. Posteriormente, como cualquier convolución, las dos funciones  $\delta$  se irán recorriendo por toda la región escogida. Al final de este procesamiento se espera que la señal, que originalmente era un doble, se convierta en una señal sencilla. Cómo este método implica la selección del punto cuyo módulo sea el menor, le llamamos deconvolución del valor menor.

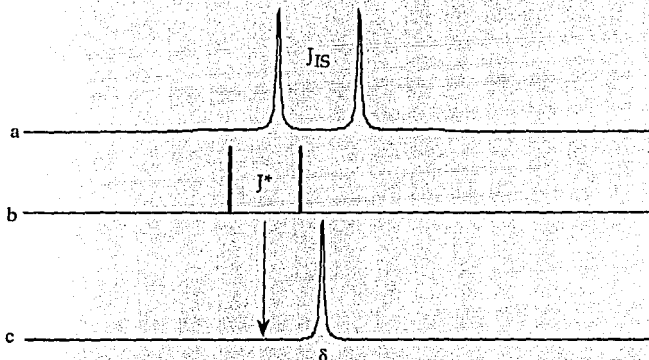


Figura 4.1.- Deconvolución en el dominio de las frecuencias por el algoritmo del valor menor. Una vez que un multiplete con constante de acoplamiento  $J_p$  se ha extraído (a) se puede deconvolucionar con dos funciones  $\delta$  con separación  $J^*$ . Al dejar solamente el valor menor, se obtendrá una señal en el desplazamiento químico  $\delta$ .

Trabajemos un poco con este método. ¿Qué ocurrirá si en vez de tener un doble tenemos una señal triple en fase? Para este caso existen varios arreglos de funciones  $\delta$  que podrían realizar la misma operación. La primera solución es aplicar dos veces el método del valor menor con dos funciones  $\delta$  como se ha explicado. La segunda opción requiere convolucionar el multiplete con tres funciones  $\delta$  con intensidades 1 : 1 : 1 y espaciadas  $J_p$ ; seleccionando el valor menor entre ellas. En ambos casos se espera obtener el mismo resultado. Existe una tercera opción, emplear

nuevamente tres funciones  $\delta$ ; pero ahora cambiando las intensidades a 2 : 1 : 2 y colocando nuevamente el valor menor en el centro de las tres funciones  $\delta$ .

La primera y la segunda solución no tienen diferencias, se espera obtener el mismo resultado, pero al igual que el método para deconvolucionar una señal sencilla, la integral del multiplete original se ve disminuida a la mitad. Con el empleo de la tercera opción se espera que la señal triple solo disminuya su integral en 1/4 en vez de disminuir en 3/4 como ocurre en el primer y segundo caso. Esta última forma de manipular los multipletes nos permite pensar en la aplicación simultánea de funciones  $\delta$  para la deconvolución de multipletes complejos.

Los acoplamientos en antifase se deconvolucionan empleando las funciones  $\delta$  en antifase. Esto es, las funciones  $\delta$  con intensidades 1 : -1 en el caso de una señal doble en antifase, las mismas intensidades, pero ahora espaciadas  $2J_A$  para el equivalente a un triple en antifase, o bien un cuarteto con las intensidades de las funciones  $\delta$ : +1, +1, -1 y -1. Con lo cual es posible deconvolucionar cualquier tipo de señal que siga un patrón de primer orden.

¿Qué ocurrirá si consideramos un triplete dobleteado? En primera instancia es posible generar un espectro de líneas con funciones  $\delta$  espaciadas por las constantes de acoplamiento involucradas y en un sólo paso deconvolucionar todo el multiplete.

#### **IV.2.1.- Desarrollo Experimental**

Para la implementación de este método es necesario el conocimiento de los desdoblamientos y de las constantes de acoplamiento en el multiplete. Con esta información es posible aplicar el método descrito anteriormente. El verdadero reto para el método es la deconvolución en los experimentos en dos dimensiones. En la Figura 4.2 se muestran las deconvoluciones sucesivas de la señal fuera de la diagonal entre el protón  $H_A$  y el protón  $H_M$  de la nicotina. Este experimento COSY de fase sensible se realizó con 1024 puntos tanto en  $t_1$  como en  $t_2$  y el espectro se transformó con 4096 puntos en cada dimensión. Para incrementar la resolución sólo se escogió la región de los multipletes bajo estudio. Se procesó una matriz de 160 X 160 puntos comprendiendo el multiplete fuera de la diagonal de los protones  $H_A$  y  $H_M$ .

El fundamento de este método plantea la posibilidad de efectuar varias convoluciones al mismo tiempo, sin necesidad de pasar por sucesivas

deconvoluciones. El principal obstáculo es la generación del multiplete con las funciones  $\delta$ , lo cual se resuelve fácilmente. La deconvolución en un sólo paso se probó en la misma señal que la trabajada en la Figura 4.2. El resultado se muestra en la Figura 4.3. Obsérvese que los resultados son prácticamente idénticos.

Una de las más grandes ventajas del método es su rapidez. La deconvolución de dos constantes de acoplamiento activas y cuatro pasivas en una sólo operación de 25,600 puntos se realizó en sólo 7 segundos en una computadora SUN 4/100. Por tanto la rapidez es una ventaja muy importante en la simplificación de espectros en dos dimensiones. En principio, un espectro de correlación en dos dimensiones podría reducirse en esta manera por un programa completamente automático.

El problema de este método es que no es un método lineal. Lo cual indica que cuando las señales no sean simétricas generaran artefactos en las señales deconvolucionadas. Estos resultados no son predecibles, ya que todas las simulaciones generaran señales completamente simétricas.

Dado que en cada ocasión que se aplica el método se escoge la señal con el menor valor absoluto, el ruido se ve disminuido. Esto se observa claramente en las Figuras 4.2 y 4.3 de los experimentos de dos dimensiones en donde el ruido disminuye considerablemente.

#### IV.3.- Medición de Constantes de Acoplamiento

El método del valor menor tienen grandes ventajas, pero ¿podría medir constantes de acoplamiento?

Para lograrlo es necesario pensar que ocurre cuando la separación de las funciones  $\delta$  (para este caso será  $J^*$ ) es distinta a la constante de acoplamiento. Nuevamente  $J^*$  es una variable dentro del intervalo donde se espera encontrar el verdadero valor de la constante de acoplamiento. Cuando  $J^*$  es ligeramente mayor o menor que la constante de acoplamiento, la integral absoluta del espectro disminuye, debido a la elección del valor menor, y debido también a la eliminación de los valores máximos.

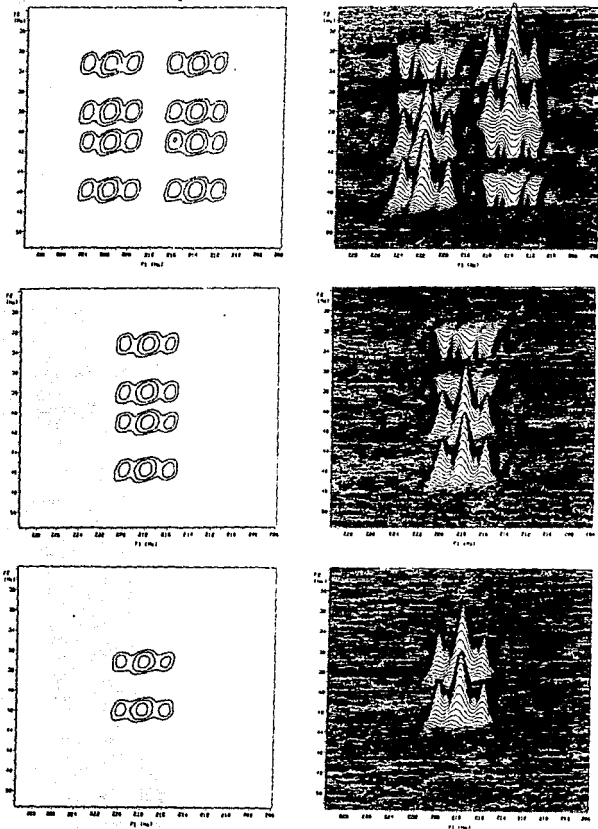


Figura 4.2a.- Deconvoluciones progresivas del multiplete de la señal del experimento COSY fuera de la diagonal ( $24 \times 24$  Hz) entre  $H_A$  y  $H_M$  de la nicotina. Se eliminan las constantes de 7.85 Hz en  $F_2$  (activa), 7.85 Hz en  $F_1$  (activa).

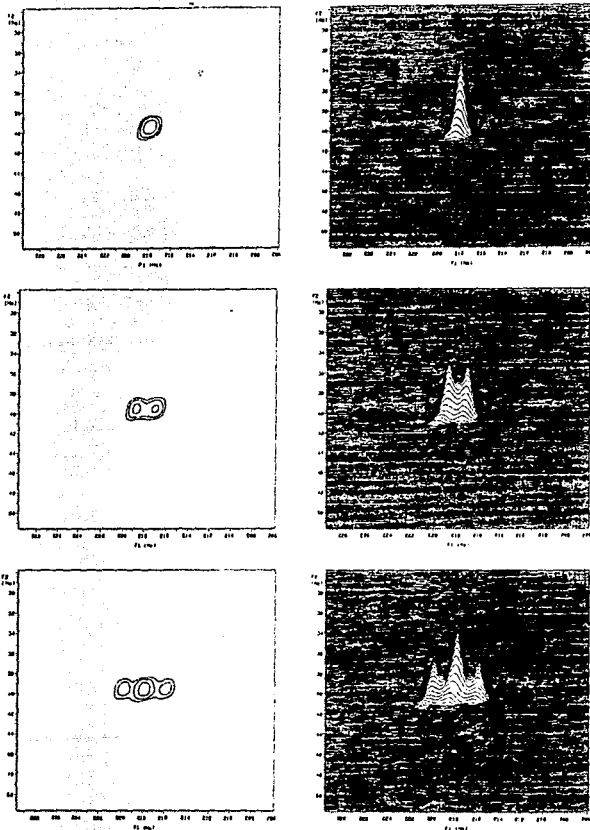


Figura 4.2b.- Deconvoluciones progresivas del multiplete de la señal del experimento COSY fuera de la diagonal ( $24 \times 24$  Hz) entre  $H_A$  y  $H_M$  de la nicotina. Se eliminan las constantes de 4.79 Hz en  $F_2$ , 2.24 Hz en  $F_1$  y 1.71 Hz en  $F_1$ .



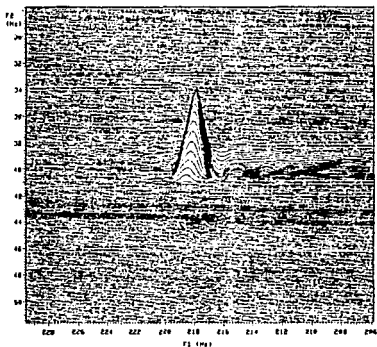
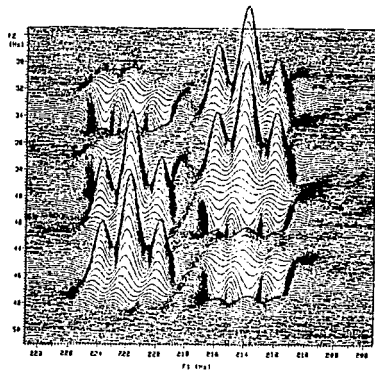


Figura 4.3.- Resultados de la deconvolución en un sólo paso del multiplete de la Figura 4.2 empleando las mismas constantes de acoplamiento.

Para confirmar esta suposición consideremos un valor de  $J^*$  mucho mayor que el ancho de la señal y menor que el valor de  $J_p$ . En esta condición aseguramos escoger sólo los puntos que son del orden de magnitud del ruido, por lo tanto la integral del espectro va disminuyendo a medida que nos alejamos del valor real de  $J$ . Si ahora escogemos un valor de  $J^*$  ligeramente mayor al valor de  $J_p$ , la mayoría de los puntos escogidos serán ruido, pero cuando haya que decidir entre puntos de la señal y los máximos, el máximo se eliminará, originando nuevamente la deconvolución un espectro cuya integral sea menor a la integral esperada cuando  $J^* = J_p$ . En ambos casos construiremos espectros prueba que prácticamente estén hechos de ruido y por consecuencia la integral absoluta estará próxima a cero.

Con este razonamiento tenemos que en las coincidencias donde se satisface que  $J^*$  es igual a las constantes de acoplamiento experimental se obtendrán máximos en las gráficas de integral. Así, para determinar las constantes de acoplamiento se tendrán que buscar los máximos de la función de integral de los espectros deconvolucionados como función de  $J^*$ .

#### IV.3.1.- Constantes de Acoplamiento Pasivas

Para la medición de constantes de acoplamiento pasivas, se deconvolucionan los multipletes en fase con dos funciones  $\delta$  con intensidades 1 : 1. Posteriormente se determina la gráfica de integral como función de  $J^*$ . Para los sistemas en donde sólo existe una sola constante de acoplamiento, se espera que el máximo global corresponda al parámetro que se quiere medir.

Si tenemos un sistema AX con constantes de acoplamiento  $J_{p1} > J_{p2}$  aparecerán dos máximos locales muy intensos los cuales corresponderán a los valores de  $J_{p1}$  y  $J_{p2}$ . Sin embargo, aparecerán un número mayor de máximos locales que corresponderán a la suma y a la diferencia de las constantes de acoplamiento. Para el caso que estamos considerando se tendrá una gráfica en forma de triplete con intensidades 1 : 2 : 1 a las frecuencias  $J_{p1} - J_{p2}$ ,  $J_{p1}$  y  $J_{p1} + J_{p2}$ . Esta propiedad de los multipletes ayudará a extraer constantes de acoplamiento que no es posible resolver por medios convencionales o, al menos, a mostrar su presencia.

Para constantes de acoplamiento pequeñas el método se dificulta bastante, ya que a valores muy pequeños de  $J^*$  se encuentra el máximo global de la función. Esto se

debe a que utilizando dos puntos sucesivos como el menor valor de  $J^*$  el multiplete tendrá la menor disminución posible en la integral. Aunque se resuelva el acoplamiento, a veces no es posible determinar el máximo correspondiente a la constante de acoplamiento pequeña. Por lo cual es conveniente medir las constantes de acoplamiento mediante el uso de máximos locales.

Consideremos el caso del protón  $H_X$  de la nicotina, Figura 4.4. La gráfica de integral muestra un máximo en el valor de  $J_{AX} = 2.24$  Hz. Los otros desdoblamiento  $J_{AX}$  y  $J_{XZ}$  generan una estructura compleja que no es posible resolver. Sin embargo la simulación de los resultados con constantes de acoplamiento  $J_{AX} = 0.87$  y  $J_{XZ} = 0.45$  Hz confirman la presencia de estas constantes.

Para el protón  $H_P$ , la gráfica de la integral es muy clara, Figura 4.5. Los máximos mayores corresponden a las constantes de acoplamiento  $J_{MP} = 1.71$  Hz y  $J_{AP} = 4.79$  Hz. Este último máximo está flanqueado por dos mínimos que corresponden a  $J_{AP} - J_{MP} = 3.08$  Hz y por  $J_{AP} + J_{MP} = 6.50$  Hz, estos valores corresponden a los máximos encontrados. Este ejemplo es un buen patrón 1 : 2 : 1 predicho para los mínimos locales que se encuentran alrededor del máximo principal.

Para el protón  $H_A$  la situación es más complicada, Figura 4.6, en la cual aparecen tres máximos principales resueltos, a saber  $J_{AX} = 0.87$  Hz,  $J_{AP} = 4.79$  Hz y  $J_{AM} = 7.85$  Hz, los cuales son apreciablemente más intensos que los locales. Para confirmar que todos los picos provienen de las constantes de acoplamiento se efectuó la simulación con los valores anteriores. En ese momento se observó que la simulación no ajusta correctamente a los resultados experimentales. Esto se debe a la existencia de una cuarta constante de acoplamiento que sólo aparece como un hombro en la gráfica experimental. Al ser incluida esta constante de acoplamiento,  $J_{AZ} = 0.38$  Hz, la comparación de la gráfica experimental y la simulada fueron prácticamente idénticas, como se muestra en la figura.

La gráfica de la señal del protón  $H_M$  es la más compleja de todas por mostrar cuatro desdoblamientos resueltos, originando más de 17 máximos en la gráfica de integral, Figura 4.7. Los cuatro máximos más altos son los correspondientes a las constantes de acoplamiento. Cuando los sistemas son tan complejos como el tratado, existe la coincidencia de mínimos debidos a las sumas y restas de las constantes de acoplamiento con los máximos que corresponden a los valores de  $J$ . Sin embargo, la simulación de este multiplete muestra el perfecto ajuste de las curvas simuladas y experimentales.

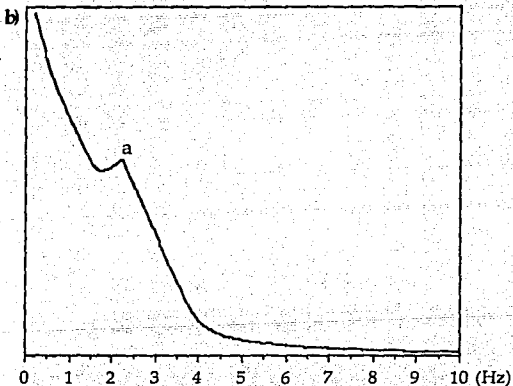
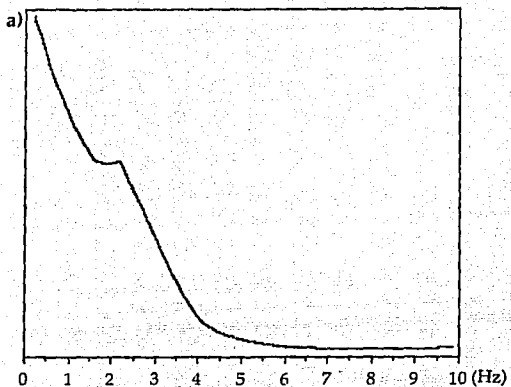


Figura 4.4.- a) Gráfica de integral del protón  $H_X$  de la nicotina en  $CDCl_3$ . b) simulación empleando los valores encontrados para este sistema con  $J_{MX} = 2.24$  Hz. El máximo de las gráficas corresponden a  $J_{MX} = 2.24$  Hz.

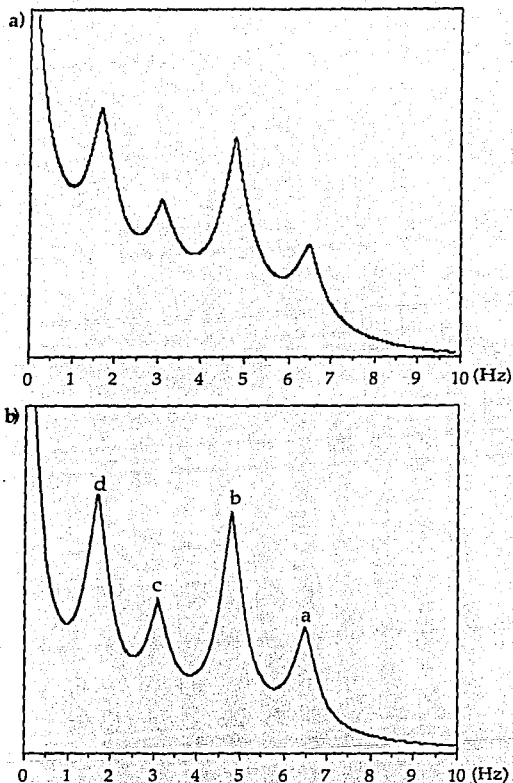


Figura 4.5.- a) Gráfica de integral del protón  $H_p$  de la nicotina en  $CDCl_3$ . b) Simulación del mismo protón con los resultados encontrados. Los máximos corresponden a: a)  $J_{AP} + J_{MP}$ , b)  $J_{AP}$ , c)  $J_{AP} - J_{MP}$ , d)  $J_{MP}$ .

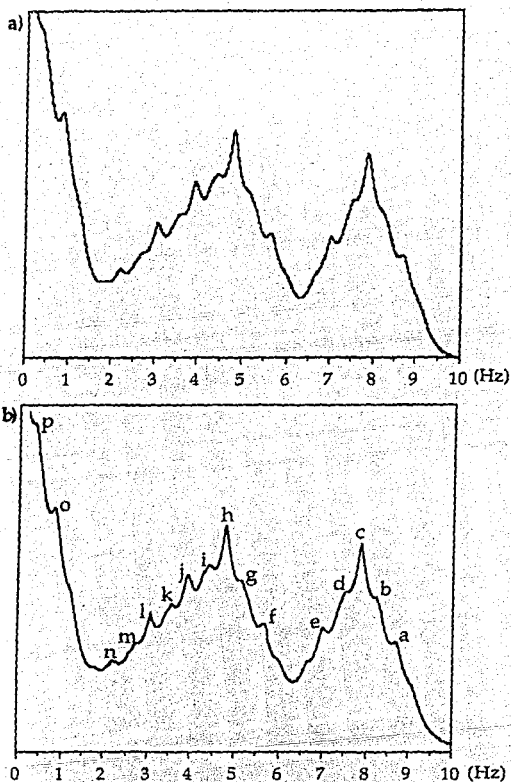


Figura 4.6.- a) Gráfica de integral del protón  $H_p$  de la nicotina en  $CDCl_3$ . b) Simulación de la gráfica de integral. Los máximos corresponden a: a)  $J_{AM} + J_{AX}$ , b)  $J_{AM} + J_{AZ}$ , c)  $J_{AM}$ , d)  $J_{AM} - J_{AZ}$ , e)  $J_{AM} - J_{AX}$ , f)  $J_{AP} + J_{AX}$ , g)  $J_{AP} + J_{AZ}$ , h)  $J_{AP}$ , i)  $J_{AP} - J_{AZ}$ , j)  $J_{AP} - J_{AX}$  y  $J_{AM} - J_{AP} + J_{AX}$ , k)  $J_{AM} - J_{AP} + J_{AZ}$ , l)  $J_{AM} - J_{AP}$ , m)  $J_{AM} - J_{AP} - J_{AZ}$ , n)  $J_{AM} - J_{AP} - J_{AX}$ , o)  $J_{AX}$  y  $J_{AZ}$ .

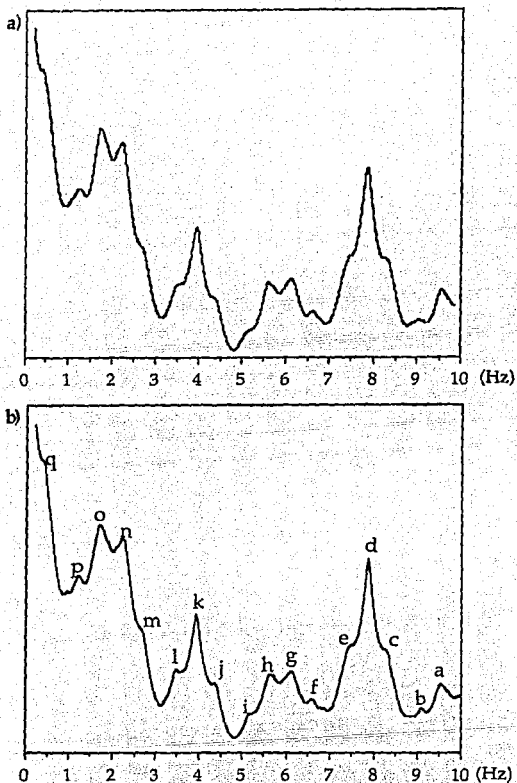


Figura 4.7.- a) Gráfica de integral del proton  $H_M$  de la nicotina en  $CDCl_3$ . b) Simulación de la gráfica de integral. Los máximos se pueden interpretar como sumas y restas de las constantes de acoplamiento.

A valores pequeños de  $J^*$ , la función de integral tiende a valores grandes, probablemente a más del doble que el máximo principal. Esto ocurre cuando el

desdoblamiento  $J^*$  del doblete de las funciones  $\delta$  es menor que el ancho de la señal experimental. Por tanto las constantes de acoplamiento escondidas en el ancho de las señales no será posible determinarlas. A pesar de ello las constantes de acoplamiento determinadas por este método son muy confiables y cuando se tienen señales con buena resolución y relación señal ruido grande es posible obtener una precisión de  $\pm 0.03$  Hz.

#### IV.3.2.- Constantes de Acoplamiento Activas

Para medir las constantes de acoplamiento activas se requiere emplear un par de funciones  $\delta$ , pero ahora con intensidades  $+1 : -1$ , convolucionar el espectro, pero escogiendo nuevamente el punto menor de los seleccionados por las funciones  $\delta$ .

La gráfica de integral para un sistema en antifase con  $J_a = 13.0$  Hz se muestra en la Figura 4.8. Se observa que el máximo principal de la función se encuentra cuando  $J^*$  tiende a cero. Esto es producto de la eliminación de puntos de la señal que contribuyen a la integral en forma significativa. Se vuelve a encontrar un máximo hasta que  $J^* = J_a$ . Una ventaja de este método es que no encuentra condiciones subarmónicas a valores de  $J_a/n$ , donde  $n$  es un número entero, como en los métodos que se estudiarán en los Capítulos V y VI.

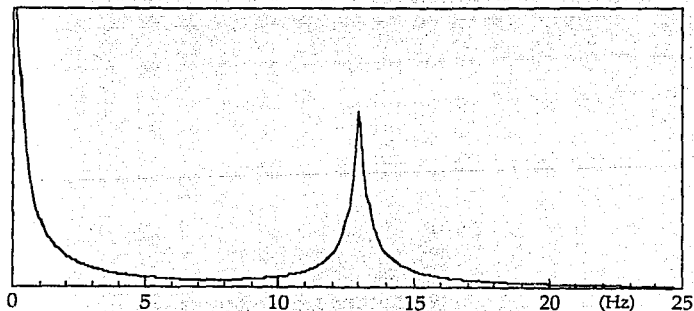


Figura 4.8.- Gráfica de integral de la simulación de un doblete en antifase de 13.0 Hz. El máximo corresponde a la constante de acoplamiento.



Si a esta señal le incrementamos la multiplicidad con una  $J_p = 5.0$  Hz, Figura 4.9.a, se espera obtener nuevamente máximos que corresponden a la suma y resta de las constantes de acoplamiento. Pero contrario a los métodos que se estudiarán posteriormente, aparece un máximo en  $J_p$ . Esto se comprueba al comparar esta función con la correspondiente a la simulación del sistema  $J_a = 5.0$  y  $J_p = 13.0$  Hz, Figura 4.9.b, que son prácticamente idénticas.

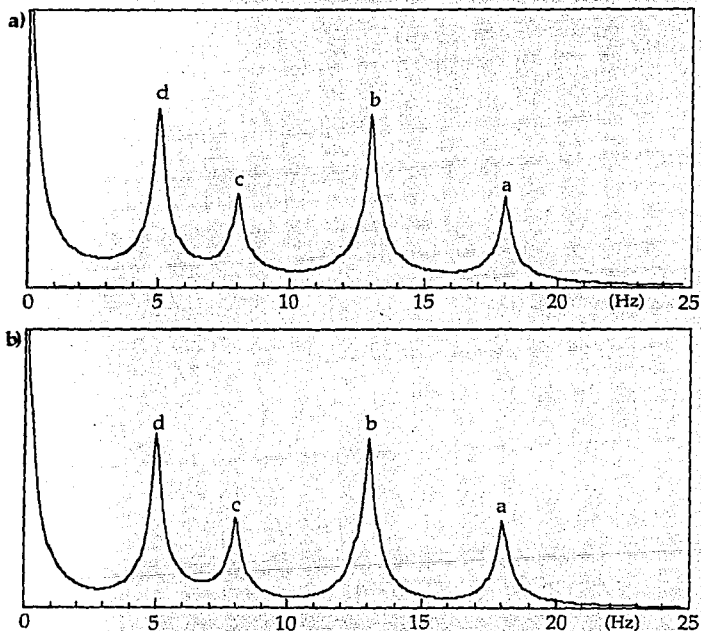


Figura 4.9.- Gráfica de integral de un doble de doble en antifase con: a)  $J_a = 13.0$  y  $J_p = 5.0$  Hz; b)  $J_a = 5.0$  y  $J_p = 13.0$  Hz. Los mínimos corresponden a: a)  $|J_a + J_p|$ , b)  $J_a$  o  $J_p$  según el caso, c)  $|J_a - J_p|$  y d)  $J_a$  o  $J_p$  según el caso.

Es de esperarse una complicación mayor en las gráficas de integral si incrementamos la multiplicidad de la señal estudiada. Consideremos el sistema  $J_a =$

5.0,  $J_{p1} = 13.0$  y  $J_{p2} = 2.0$  Hz. En las gráficas de integral, Figura 4.10, se observa nuevamente la presencia de los máximos que corresponden a las constantes de acoplamiento y a la suma y resta de ellas. Este tipo de gráficas corresponden exactamente a las funciones de constantes de acoplamiento pasivas.

Con estos estudios se procederá a determinar las constantes de acoplamiento obtenidas a partir de los experimentos reportados en el Capítulo II.

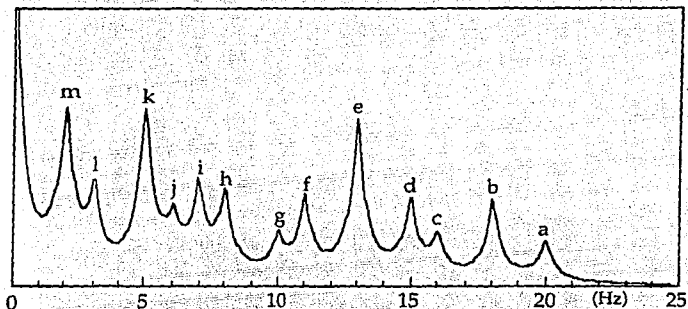


Figura 4.10.- Gráfica de integral de la simulación de un sistema con una constante de acoplamiento activa,  $J_a = 5.0$  Hz, y dos constantes de acoplamiento pasivas:  $J_{p1} = 13.0$  y  $J_{p2} = 2.0$ . Los mínimos corresponden a: a)  $J_a + J_{p1} + J_{p2}$ , b)  $J_a + J_{p1}$ , c)  $J_a + J_{p1} - J_{p2}$ , d)  $J_{p1} - J_{p2}$ , e)  $J_{p1}$ , f)  $J_{p1} - J_{p2}$ , g)  $J_{p1} - J_a + J_{p2}$ , h)  $J_p - J_a$ , i)  $J_a + J_{p2}$ , j)  $J_{p1} - J_a - J_{p2}$ , k)  $J_a$ , l)  $J_a - J_{p2}$  y m)  $J_{p2}$ .

#### IV.3.2.1.- Desarrollo experimental.

El método del valor menor se empleó para medir las constantes de acoplamiento a larga distancia de la estricnina. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.1. Hay que hacer notar que algunas veces no fue posible determinar las constantes debido a la incertidumbre que se tenía para poder definir donde se encontraban los máximos correspondientes a las constantes de acoplamiento activas. Estos resultados se apuntan en la misma tabla.

En la determinación de estas constantes de acoplamiento se observaron varios patrones como los tratados con anterioridad, Figura 4.10. Con estas gráficas fue posible

determinar al mismo tiempo la constante de acoplamiento pasiva. Por ejemplo, en el protón  $H_{20b}$  acoplado con el carbono  $C_{22}$  además de medir la constante de acoplamiento entre estos núcleos, se determinó la constante de acoplamiento de 14.7 Hz, Figura 4.11. Este gráfico también es un claro ejemplo de como no es posible diferenciar por estos métodos cuando es una constante de acoplamiento activa y cuando se trata de una pasiva.

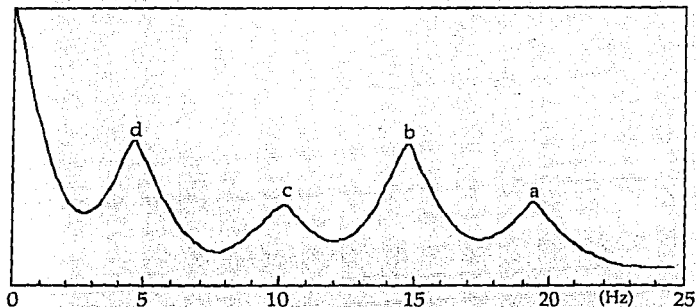


Figura 4.11.- Gráfica de integral del protón  $H_{20b}$  acoplado al carbono  $C_{22}$  de la estricnina. Los máximos concuerda con el patrón de la gráfica de la Figura 4.9, pero ahora con los valores de:  $J_a = 4.6$  y  $J_p = 14.7$  Hz.

En la Figura 4.12 se muestra la gráfica de integral del protón  $H_8$  y del carbono  $C_{17}$ , donde se observa como existen varios casos en que los mínimos correspondientes a sumas y restas de las constantes de acoplamiento interfieren en la determinación de la constante que nos interesa. También en esta gráfica es posible determinar la constante de acoplamiento pasiva del multiplete, 10.4 Hz.

Este método es muy sencillo de implementar y es muy rápido. Permite en varias condiciones determinar las constantes de acoplamiento en forma precisa siempre y cuando las condiciones de multiplicidad, relación señal-ruido y ancho de la señal lo permitan. A pesar de su falta de precisión es un método adecuado para la determinación de constantes de acoplamiento.

El método del valor menor es un método que puede utilizarse para deconvolucionar señales en una dimensión o en dos dimensiones. Es fácil y rápido de implementar. La contraparte de este método para realizar la deconvolución en el dominio de las frecuencias no satisface estos requerimientos.

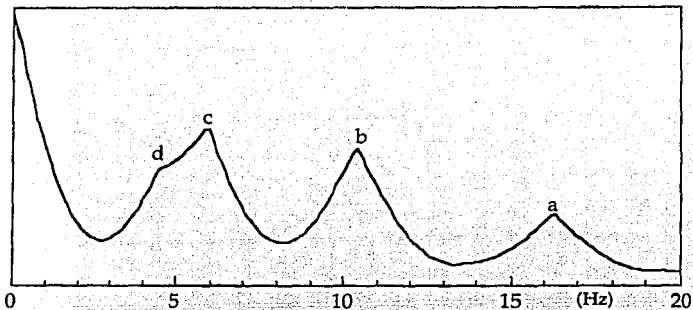


Figura 4.12.- Gráfica de integral del protón  $H_8$  acoplado con el carbono  $C_{17}$  de la estricnina. Los mínimos corresponden a: a)  $J_{p1} + J_a$ , b)  $J_{p1}$ , c)  $J_a$ , d)  $J_{p1} - J_a$  con los valores de:  $J_{p1} = 10.4$  y  $J_a = 5.9$  Hz.

Es posible aplicar este método para la determinación de constantes de acoplamiento. Esto es cierto principalmente para acoplamientos en fase, en donde los máximos más intensos corresponderán a las constantes de acoplamiento.

A pesar de que el método trabaja bien para la determinación de constantes de acoplamiento activas, es posible llegar a confundir a las constantes de acoplamiento activas con aquellas pasivas que se encuentran presentes en el multiplete.

H	C7	C8	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C20	C21	C22	C23
13		5.9					5.2	6.8	5.8				7.7		
15b						5.1	4.8		4.5				6.7		
17a b	2.2	*							3.5		1.9				
15a	7.2				2.2	7.8	2.6		4.5						
11b			7.9		7.0										
20b							5.4	2.0	6.8		3.5		2.7	4.6	
18b										4.8		7.1			
11a			6.3		*	*									
14		9.7			*	*		9.1					9.5	9.3	
18a	5.2								*	2.4					
20a											9.3		4.7	5.7	
8	2.6				5.6	*				5.9					
16		7.7					6.2	6.3				7.5			
23a						3.1							*	*	
23b													8.2	3.7	
12	1.6	5.9	2.0	1.9											
22							*					12.4			13.9
2	*														
1	3.0			*											

\*Constantes de acoplamiento que no fue posible determinar.

Tabla 4.1.- Constantes de acoplamiento a larga distancia de la estricnina determinadas por el método del valor menor.

## Capítulo V

### Medición de Constantes de Acoplamiento Mediante la Aparente Deconvolución en el Dominio del Tiempo.

#### V.1.- Introducción

Los trabajos de Bothner-By<sup>40</sup> y LeParco<sup>29</sup> plantean la deconvolución en el dominio del tiempo de los multipletes bajo estudio para la determinación de las constantes de acoplamiento y para la simplificación de las señales.

Estos trabajos mencionan la dificultad de dividir el FID de un multiplete por funciones seno o coseno, dependiendo del tipo del multiplete que se trate. El principal problema de este método es cuando las funciones pasan por cero o por valores muy cercanos. El cociente generará ciertos puntos que no concuerdan con la tendencia general de la función.

Incluir algoritmos o rutinas para tratar de resolver estos problemas no es tarea fácil. Como ejemplo tenemos el trabajo de McIntyre<sup>38</sup>, donde en una forma muy elegante resuelve este problema. Sin embargo, su implementación no es sencilla.

En este capítulo proponemos la inclusión de un ardid para intentar salvar el problema de dividir por cero, o por números muy pequeños, los puntos del FID.

#### V.2.- Pseudo Deconvolución en el Dominio del Tiempo o t-Decon<sup>68</sup>

Consideremos primero los multipletes en fase. El método trabaja en el dominio del tiempo, por lo cual hay que hacer la transformada de Fourier inversa a los multipletes en estudio. La ecuación más simple que describe una señal en fase en el dominio del tiempo esta dada por la función:

$$S(t) = \exp(-2i\pi\delta_c t) \exp(-\lambda t) \cos(\pi J_p t) \quad [5.1]$$

donde  $\delta_i$  representa el desplazamiento químico de la especie  $i$  y  $\lambda = 1/T_2^*$  el ancho de la señal experimental a la mitad de la altura. Uno puede pensar que el procedimiento más sencillo para lograr la deconvolución es la división por  $\cos(\pi J_p t)$ .

Los métodos rigurosos de deconvolución anteriormente descritos enfocan su tratamiento para evitar la división por la función coseno cuando pasa muy cerca de cero. Así se evitan indeterminaciones en el espectro por la presencia del ruido en la señal experimental. Esto se debe a la división de números sujetos a ruido aleatorio por números pequeños en intervalos alrededor de cero.

Este problema hace que la aplicación del método de deconvolución no sea inmediata en la determinación de constantes de acoplamiento. Una forma de resolver este problema es mediante el truco empleado en el método de depuración de  $J$ , en donde se emplea un valor mínimo por el cual dividir el FID para evitar la división por números muy pequeños.

La primera aproximación es definir un límite  $\pm\theta$ , con el cual se genera una nueva función para dividir al FID en vez de utilizar  $\cos(\pi J^* t)$ , esta función  $f(J^*, t)$  es:

$$\begin{aligned} f(J^*, t) &= \theta & \theta > \cos(\pi J^* t) > 0 \\ f(J^*, t) &= -\theta & -\theta < \cos(\pi J^* t) < 0 \\ f(J^*, t) &= \cos(\pi J^* t) & |\cos(\pi J^* t)| > \theta \end{aligned} \quad [5.2]$$

donde  $\theta$  es un valor arbitrario,  $J^*$  es nuevamente una variable cercana al valor de  $J_p$  y  $t$  es el tiempo. La ecuación [5.2] se representa gráficamente en la Figura 5.1.

La experiencia adquirida al implementar el método de depuración de  $J$  nos mostró que  $\theta$  podría ser tan grande como la unidad, Figura 5.1.c, así la función definida en [5.2] se transforma en:

$$\begin{aligned} f(J^*, t) &= 1 & 1 > \cos(\pi J^* t) > 0 \\ f(J^*, t) &= -1 & -1 < \cos(\pi J^* t) < 0 \end{aligned} \quad [5.3]$$

Esto indica que podría ser suficiente aplicar un sólo cambio de signo a los valores del FID. Este cambio de signo estará regido por la frecuencia del valor  $J^*$  empleada. Esta función es cuadrada y sólo preserva el signo original de la función. Bajo estas condiciones, aún no se ha definido el valor de la función cuando el coseno es igual a cero. Para ello analicemos un poco el caso donde la función coseno es cero.

El tiempo,  $t$ , en la ecuación [5.3] está definido por:

$$t = i / \text{sw} \quad [5.4]$$

donde  $i$  es una variable entera que representa la digitalización de los puntos en el dominio del tiempo y  $sw$  es la ventana espectral en Hz. Si analizamos estas relaciones tenemos que la función coseno es cero cuando:

$$i J^* / sw = \text{entero}, \quad [5.5]$$

que, en cálculos computacionales es improbable que ocurra, ya que la división por un número real fraccionario muy rara vez da exactamente el valor de cero. Por tanto, la indefinición de la función coseno es muy improbable, o imposible en cálculos computacionales. En caso de que para un cierto valor de  $J^*$  ocurra esta coincidencia sería conveniente escoger el siguiente valor de  $J^*$ , lo cual nunca ocurrió en los experimentos realizados durante todo este trabajo.

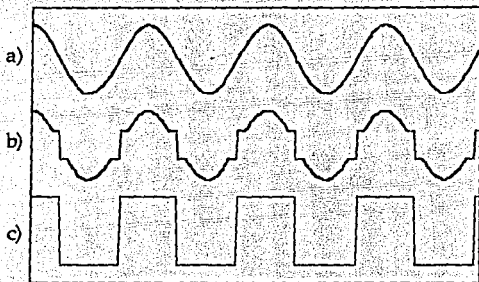


Figura 5.1.- a) Función coseno; b) función coseno modificada según [5.2] para un valor de  $\theta = \pm 0.4$ ; y c) función cuadrada definida para  $\theta = \pm 1.0$  definida en [5.3].

Obviamente esta sustitución de la función coseno por la función cuadrada no logrará deconvolucionar las señales experimentales, Figura 5.2, como el trabajo de LeParco *et al.*<sup>29</sup> Sin embargo, este método simplifica el algoritmo de la implementación, acelera y facilita los cálculos, ya que solo introduce multiplicaciones por  $\pm 1$ .

Una vez realizado la multiplicación del FID por la función cuadrada, se realiza la transformada de Fourier, lo cual generará un espectro con artefactos, Figura 5.3, cuando el valor de  $J^*$  no corresponda al valor de la constante que se desea medir. La intensidad de dichos artefactos dependerá de la proximidad de  $J^*$  con el verdadero valor de las constantes de acoplamiento del multiplete. Así, cuando el valor de  $J^*$  sea diferente a  $J_p$  o a  $J_a$ , los espectros generarán una gran cantidad de oscilaciones.



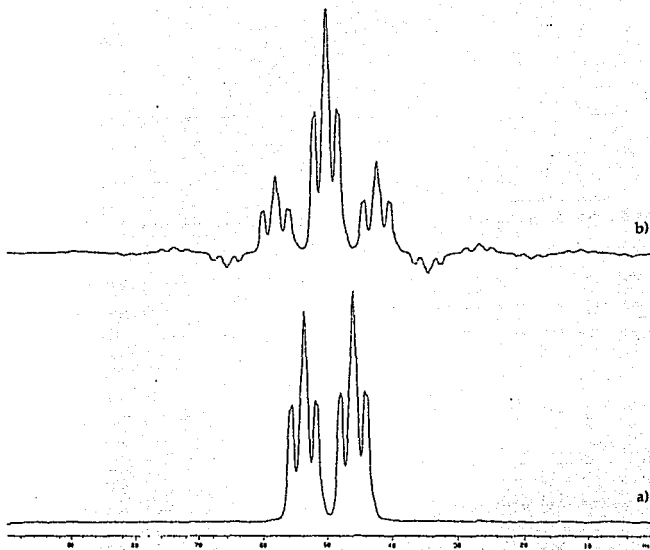


Figura 5.2.- a) Multiplete del protón  $H_M$  de la nicotina; b) señal modificada después de haber sido procesada como se describe en el texto con un valor de  $\theta = 1.0$ .

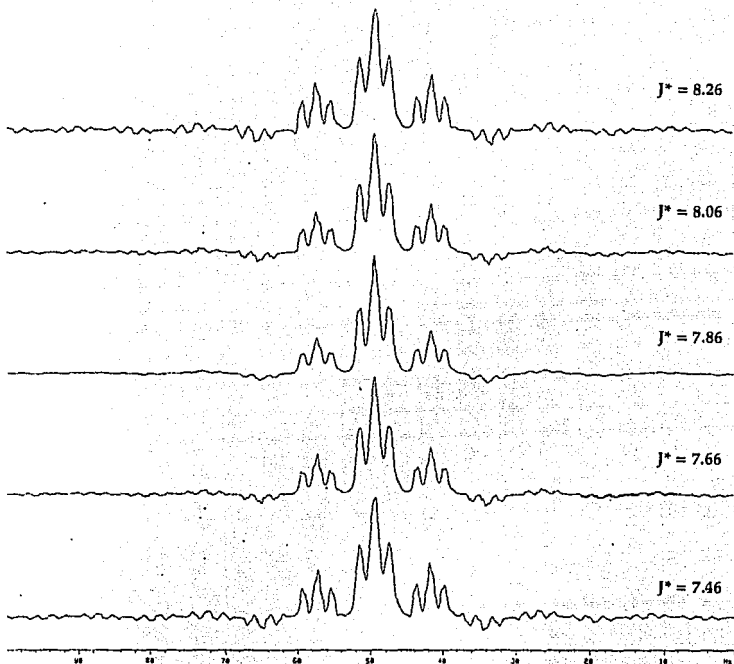


Figura 53.- Multiplete del protón  $H_M$  de la nicotina modificada por el método t-Decon empleando diferentes valores de  $J^*$ . En ella se observa como a medida que  $J^*$  se aleja de  $J_p$  se generan más artefactos en el espectro.

Al graficar la integral absoluta del espectro en función de  $J^*$  esperamos tener mínimos a las condiciones en donde  $J^*$  tenga los valores de las constantes de acoplamiento, sin embargo, también se espera tener la presencia de los subarmónicos por la introducción de la frecuencia en el cambio de signo. Estos subarmónicos en los trabajos previos dependían del número de puntos introducidos por ciclo; en este trabajo los subarmónicos esperados son mayores ya que estamos introduciendo más puntos por ciclo. También se espera la presencia de los mínimos cuando se cumplan las condiciones de sumas y restas de las constantes de acoplamiento.

Para las señales en antifase, la función [5.3] se define como:

$$\begin{aligned} f(J^*, t) &= 1 & 1 > \text{sen}(\pi J^* t) > 0 \\ f(J^*, t) &= -1 & -1 < \text{sen}(\pi J^* t) < 0 \end{aligned} \quad [5.6]$$

cuando  $\text{sen}(x) = 0$ , la función  $f$  no está definida. Se puede dar la misma explicación que en el caso del coseno en cuanto a la coincidencia exacta de los valores en 0 muy cercanos a cero, pero cuando  $t = 0$  es un punto que no es posible evitar. Por tal motivo y en forma arbitraria definimos que cuando la función seno sea cero se empleará el valor de 1. En esta forma tendremos definida la función en nuestro dominio.

Para facilitar la explicación trataremos por separado los multipletes en fase y aquellos en antifase. Iniciamos con las constantes de acoplamiento en fase.

### V.3.- Constantes de acoplamiento en fase

Al iniciar este proyecto se pensó primeramente en ajustar el valor de  $\theta$  en forma similar a lo hecho en el Capítulo III. El uso de esta manipulación de los datos disminuye el ruido, pero siempre existe un compromiso entre la aparición de los artefactos, Figura 5.3, y la generación de las señales de interferencia. Se pensó que podría obtenerse resultados confiables con un valor de  $\theta = \pm 1$ .

Siguiendo un proceso similar de aislamiento del multiplete en estudio y obteniendo la gráfica de integral del espectro procesado, se estudió el método de deconvolución con espectros simulados.

En la Figura 5.4 se muestra la gráfica de integral de la simulación de una señal con constante de acoplamiento de 13.0 Hz. En ella se aprecia la aparición de un mínimo muy profundo a 13 Hz que corresponde al valor de la constante de acoplamiento. También aparecen mínimos a las condiciones subarmónicas de  $J_p / 3, 5, 7, 9, \dots$ . La presencia de estos mínimos se explican de la misma forma en que aparecen en el

método de deconvolución en el dominio del tiempo implementado por LeParco. Si los vemos desde el dominio de las frecuencias, al dividir por la función coseno tendremos la coincidencia de varias funciones  $\delta$  dentro del intervalo que se quiere medir. Al mismo tiempo aparece un mínimo bastante ancho cercano a cero debido a las coincidencias del ancho de la señal con varios valores de  $J^*$  y a la múltiple coincidencia de los subarmónicos cerca de cero. Este mínimo ancho limitará el uso del método para la determinación de constantes de acoplamiento pequeñas. Como de alguna forma la deconvolución producida no es la exacta, los resultados se falsifican, por tanto no es de afianzar la presencia del ruido a lo largo de estas gráficas.

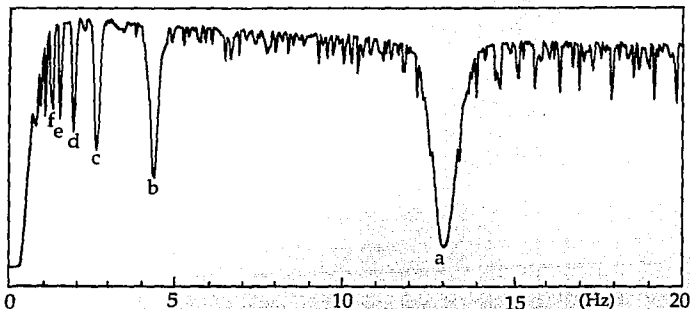


Figura 5.4.- Simulación de la gráfica de integral de una señal con constante de acoplamiento de 13.0 Hz. Los mínimos corresponden a: a)  $J_p = 13$  Hz, b)  $a/3$ , c)  $a/5$ , d)  $a/7$ , e)  $a/8$  y f)  $a/9$ .

Al emplear diferentes valores de  $\theta$  se observa en las señales que cuando  $\theta$  es muy pequeño se forman señales muy intensas en el FID, producto de la división por valores cercanos a cero de la función semicuadrada. A medida que se incrementa el valor de  $\theta$  el ruido comienza a desaparecer en el FID del multiplete transformado, pero inicia la aparición de los subarmónicos debido a la inclusión de la función cuadrada. Cuando  $\theta = 1$  el ruido es el menor posible. En esta condición es la más aproximada a una deconvolución completa, pero aún así persisten los subarmónicos.

Una vez procesados los multipletes en esta forma, se intentó medir las constantes de acoplamiento mediante la gráfica de integral como una función de  $J^*$ . La simulación de la gráfica de integral para el multiplete con  $J_{p1} = 13.0$  Hz y  $J_{p2} = 5.0$  Hz se muestra en la Figura 5.5. En ella se aprecia la aparición de dos mínimos muy profundos

correspondientes a los valores de las constantes de acoplamiento. Al mismo tiempo la aparición de mínimos que corresponden a los valores de  $J_{p1} + J_{p2}$  y de  $J_{p1} - J_{p2}$  y las condiciones subarmónicas provenientes de  $J_p / n$ , donde  $n$  es un entero.

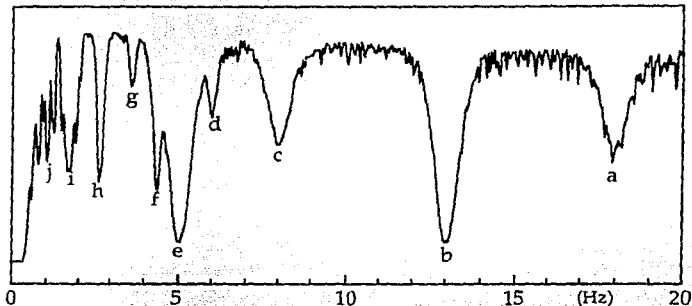


Figura 5.5.- Simulación de la gráfica de integral de un sistema doble de doble con constantes de acoplamiento:  $J_{p1} = 13$  Hz y  $J_{p2} = 5$  Hz. Los mínimos corresponden a: a)  $J_{p1} + J_{p2}$ , b)  $J_{p1}$ , c)  $J_{p1} - J_{p2}$ , d)  $a/3$ , e)  $J_{p2}$ , f)  $b/3$ , g)  $a/5$ , h)  $b/5$ , i)  $b/7$  y e/3 y j)  $b/9$ .

Como es de esperarse, a medida que se aumenta el número de acoplamientos, el número de mínimos en las gráficas de integral se incrementa. Esto se observa en la Figura 5.6 en donde se muestra la gráfica de integral de un multiplete con las constantes de acoplamiento de 2.0, 5.0 y 13.0 Hz. A pesar de la complicación de esta función es aún posible determinar los mínimos mas profundos como las constantes de acoplamiento del multiplete.

La presencia del ruido a lo largo de las gráficas de integral, los subarmónicos y la aparición de mínimos debidos a la suma y resta de las constantes de acoplamiento no interfirieron en la determinación de las tres constantes de acoplamiento.

### V.3.1.- Determinación Experimental

Como en los métodos anteriores se extrajo el multiplete deseado. Se efectuó la transformada de Fourier inversa empleando cuando menos 16384 puntos, ya que es necesario introducir un número suficientemente grande para incluir la información de  $J^*$  en la función cuadrada que se emplea. Al espectro en función del tiempo se le

multiplicó por la función cuadrada definida en [5.3]. Para cada valor de  $J^*$  se realizó la transformada de Fourier para obtener la gráfica de integral.

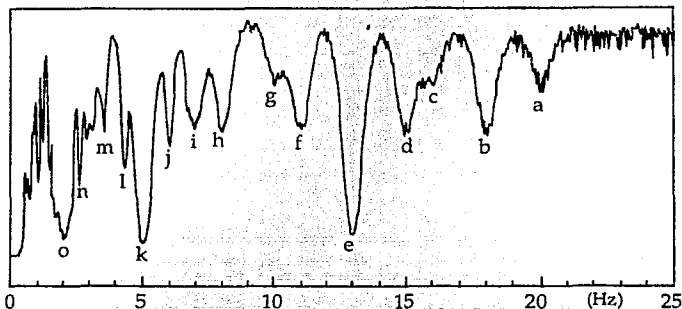


Figura 5.6.- Simulación de la gráfica de integral de un doble de doble de doble con las constantes de acoplamiento:  $J_{p1} = 13.0$  Hz,  $J_{p2} = 5.0$  Hz y  $J_{p3} = 2.0$  Hz. Los mínimos corresponden a: a)  $J_{p1} + J_{p2} + J_{p3}$ , b)  $J_{p1} + J_{p2}$ , c)  $J_{p1} + J_{p2} - J_{p3}$ , d)  $J_{p1} + J_{p3}$ , e)  $J_{p1}$ , f)  $J_{p1} - J_{p3}$ , g)  $J_{p1} - J_{p2} + J_{p3}$ , h)  $J_{p1} - J_{p2}$ , i)  $J_{p2} + J_{p3}$ , j)  $J_{p1} - J_{p2} - J_{p3}$ , k)  $J_{p3}$ , l)  $e/3$ , m)  $f/3$ , n)  $e/5$  y o)  $J_{p3}$ .

Este método se trabajó con los multipletes de la nicotina, ya que tiene constantes de acoplamiento tanto pequeñas como grandes, lo cual ofrece un amplio rango de constantes a determinar.

En la Figura 5.7a se muestra la gráfica de la integral del protón  $H_A$  de la nicotina en donde se observan cuatro mínimos profundos que corresponden a las cuatro constantes de acoplamiento que se desea medir:  $J_{AM} = 7.86$ ,  $J_{AP} = 4.79$ ,  $J_{AX} = 0.87$  y  $J_{AZ} = 0.41$  Hz. Se observa también la presencia de subarmónicos, los cuales no interfieren con la determinación. Una vez realizada la determinación se efectuó la simulación con los datos obtenidos y se observa un perfecto ajuste con los resultados experimentales.

En la Figura 5.8a se muestra la gráfica de integral del protón  $H_M$ . En ella se observa que los mínimos más profundos corresponden a las constantes de acoplamiento  $J_{AM}$ ,  $J_{MP}$ ,  $J_{MX}$  y  $J_{MZ}$ . Alrededor del valor de 7.85 Hz se observa la presencia de los mínimos correspondientes a la suma y resta de  $J_{MX}$ . También es apreciable la presencia del ruido y de las condiciones subarmónicas. En el pie de figura se dan las asignaciones de los principales mínimos encontrados. Con estos resultados se

trazó la simulación a partir de los resultados experimentales encontrados, Tabla 5.1. La similitud de ambas curvas es muy buena.

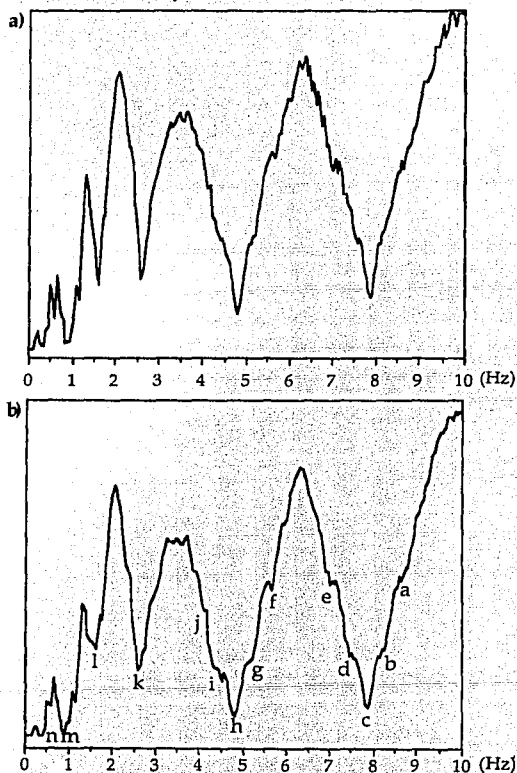


Figura 5.7.- Gráfica de integral del protón  $H_A$  de la nicotina, a), y la gráfica teórica, b). Los mínimos corresponden a: a) JAM + JAX, b) JAM + JAZ, c) JAM, d) JAM - JAZ, e) JAM - JAX, f) JAP + JAX, g) JAP + JAZ, h) JAP, i) JAP - JAZ, j) JAP - JAX y JAM - JAP + JAX, k) c/3, l) h/3, m) JAX, n) JAZ.

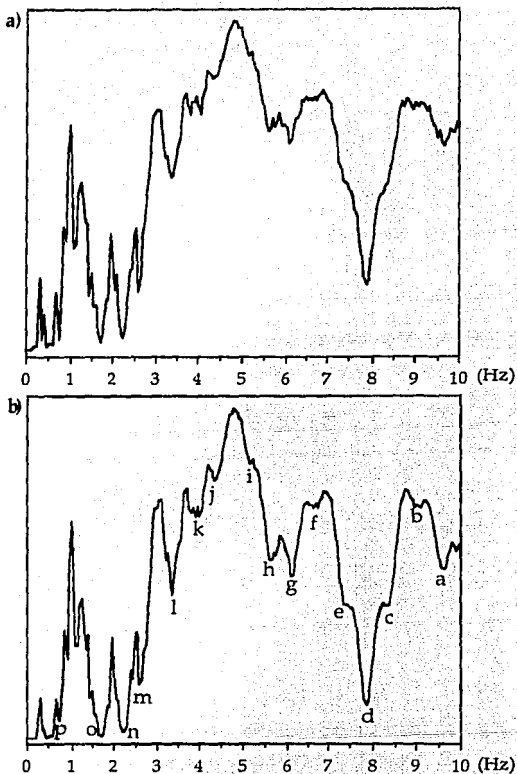


Figura 5.8.- Gráfica de integral del protón  $H_M$ , a), de la nicotina y la curva teórica empleando los valores obtenidos. Los mínimos corresponden a: a)  $J_{AM} + J_{MP}$ , b)  $J_{AM} + J_{MP} - J_{MZ}$ , c)  $J_{AM} + J_{MZ}$ , d)  $J_{AM}$ , e)  $J_{AM} - J_{MZ}$ , f)  $J_{AM} - J_{MX} + J_{MP}$ , g)  $J_{AM} - J_{MX} + J_{MZ}$ , h)  $J_{AM} - J_{MX}$ , i)  $J_{AM} - J_{MX} - J_{MZ}$ , j)  $J_{AM} - J_{MX} - J_{MP} + J_{MZ}$  y  $J_{MX} + J_{MP} + J_{MZ}$ , k)  $J_{AM} - J_{MX} - J_{MP}$  y  $J_{MX} + J_{MP}$ , l)  $J_{AM} - J_{MX} - J_{MP} - J_{MZ}$  y  $J_{MX} + J_{MP} - J_{MZ}$ , m)  $J_{MX} + J_{MZ}$  y d/3 n)  $J_{MP} + J_{MZ}$  y  $J_{MX}$ , o)  $J_{MP}$  y  $J_{MX} - J_{MZ}$ , q)  $J_{MZ}$ .



En la Figura 5.9a se muestra la gráfica de integral del protón  $H_p$  en donde se observan dos mínimos profundos que corresponden a las constantes de acoplamiento  $J_{AP}$  y  $J_{MP}$ . En este multiplete no fue posible determinar la constante de acoplamiento entre  $H_M$  y  $H_Z$  debido a que se encuentra enmascarado por el mínimo localizado alrededor de cero.

En la Figura 5.10a se muestra la gráfica de la integral del protón  $H_X$ . Con ella se pueden determinar dos constantes de acoplamiento, no así  $J_{XZ}$ . La presencia del ruido en este espectro es importante, pero la simulación, Figura 5.10b, también presenta ruido en la misma región. El mínimo ancho en 2.24 Hz corresponde a la suma y resta de la constante de acoplamiento  $J_{XZ}$ . En la Tabla 5.1 se dan los resultados obtenidos para cada uno de los multipletes trabajados por separado. Todos los resultados concuerdan con aquellos obtenidos con otros métodos y los reportados.

	$J_{AM}$	$J_{AP}$	$J_{AX}$	$J_{AZ}$	$J_{MP}$	$J_{MX}$	$J_{MZ}$
A	7.86	4.79	0.87	0.41	-	-	-
M	7.85	-	-	-	1.71	2.25	0.46
P	-	4.77	-	-	1.70	-	-
X	-	-	0.87	-	-	2.24	-

Tabla 5.1.- Constantes de acoplamiento en Hz de la nicotina en  $CDCl_3$ .

Usando el mismo procedimiento se determinaron las constantes de acoplamiento de la cotinina, ya que es una molécula muy similar a la nicotina y se espera que las constantes de acoplamiento sean muy similares. Los resultados se muestran en la Tabla 5.2. Con ella se observa que los resultados no difieren mucho de los obtenidos para la nicotina, lo cual indica que el método es lo suficientemente sensible para poder detectar pequeñas diferencias.

	$J_{AM}$	$J_{AP}$	$J_{AX}$	$J_{AZ}$	$J_{MP}$	$J_{MX}$	$J_{MZ}$
A	7.90	4.80	0.85	*	-	-	-
M	7.90	-	-	-	1.65	2.35	0.45
P	-	4.80	-	-	1.60	-	-
X	-	-	0.85	-	-	2.35	-

\*Constantes de acoplamiento que no se pudieron determinar.

Tabla 5.2.- Constantes de acoplamiento en Hz de la cotinina en  $CDCl_3$ .

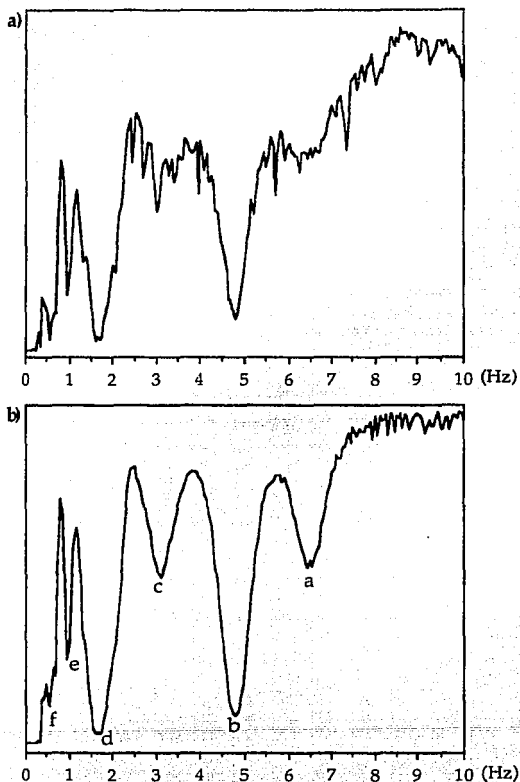


Figura 5.9.- a) Gráfica de integral del protón  $H_p$  de la nicotina en  $CDCl_3$ . b) Simulación del mismo protón con los resultados encontrados y con la inclusión de  $J_{pZ}$  como otra constante. Los mínimos corresponden a: a)  $J_{AP} + J_{MP}$ , b)  $J_{AP}$ , c)  $J_{AP} - J_{MP}$ , d)  $J_{MP}$ , e)  $c/3$  y f)  $d/3$ .

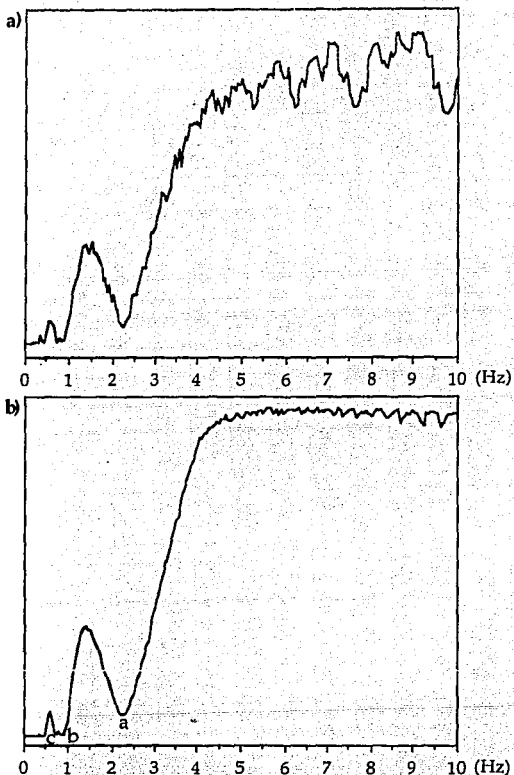


Figura 5.10.- a) Gráfica de integral del protón  $H_X$  de la nicotina en  $CDCl_3$ . b) simulación empleando los valores encontrados para este sistema. Los mínimos corresponden a: a)  $J_{MX}$ , b)  $J_{AX}$  y c)  $a/3$ .

El método se probó también con la molécula de *m*-bromo nitro benceno por ser una molécula que se ha estudiado anteriormente y se conocen sus constantes de acoplamiento por otros métodos. Esto es importante, ya que debido al método no

- riguroso que se está estudiando podría generarse ciertas falsificaciones en los resultados obtenidos. En la Tabla 5.3 se muestran los resultados obtenidos para esta molécula los cuales están de acuerdo con todos los métodos reportados anteriormente.

	JAM	JAP	JAX	JMP	JMX	JPX
A	7.97	8.27	0.35	-	-	-
M	7.98	-	-	0.99	1.90	-
P	-	8.28	-	0.96	-	2.19
X	-	-	0.37	-	1.90	2.19

Tabla 5.3.- Constantes de acoplamiento del *m*-bromo nitro benceno en  $\text{CDCl}_3$ . La columna izquierda representa al multiplete en la cual fue medida la constantes de acoplamiento.

Se muestran los resultados obtenidos para la molécula del 2-furfural en DMSO, Tabla 5.4. A pesar de que el método puede medir constantes de acoplamiento pequeñas, no fue posible determinar aquellas del 2-furfural que son menores al ancho de la señal experimental. Para los multipletes resueltos y aislados de la estricnina se muestran los resultados en la Tabla 5.5.

	JAB	JAC	JAX	JBC
A	0.81	1.70	0.81	-
B	0.79	-	-	3.60
C	-	1.68	-	3.60
X	-	-	0.82	-

Tabla 5.4.- Constantes de acoplamiento del 2-furfural en DMSO a 50 C.

	H13	H15b	H15a	H20a	H8	H16	H23a	H23b	H12	H22
J <sub>1p</sub>	10.48	14.38	14.35	14.79	10.50	3.79	13.93	13.93	8.42	6.30
J <sub>2p</sub>	3.37	2.00*	4.78	1.76		2.12	6.10	6.93	3.42	
J <sub>3p</sub>	3.10		3.95						3.25	

\*Mínimos muy anchos. Determinación imprecisa.

Tabla 5.5.- Constantes de acoplamiento en Hz para los protones alifáticos de la estricnina.

En la Figura 5.11 se muestra la gráfica de integral del protón H<sub>3</sub> de la estricnina. Esta gráfica es un patrón típico de la medición de una sola constante de acoplamiento.

También en la Figura 5.12 se muestra la gráfica del protón  $H_{15a}$ , en donde se observa la complejidad de las gráficas cuando se requiere medir más de una. En este ejemplo se determinaron tres constantes. Es conveniente aclarar que dos constantes de acoplamiento, de 4.78 y 3.95 Hz, no están resueltas en el multiplete original que aparenta ser un triplete dobleteado.

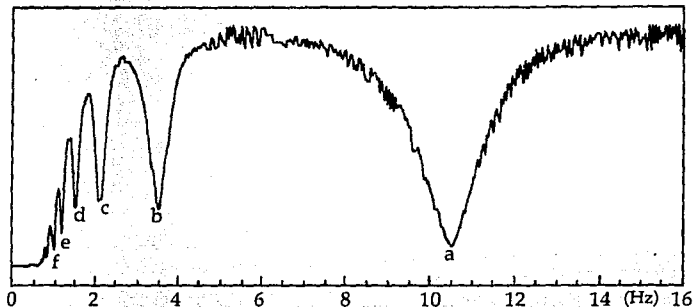


Figura 5.11.- Gráfica de integral del protón  $H_8$  de la estricnina. Los mínimos corresponden a: a)  $J_p$ , b)  $a/3$ , c)  $a/5$ , d)  $a/7$ , e)  $a/9$  y f)  $a/11$ .

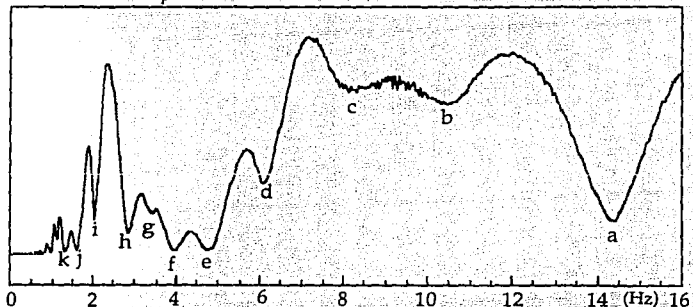


Figura 5.12.- Gráfica de integral del protón  $H_{15a}$  de la estricnina. Los mínimos corresponden a: a)  $J_{1p}$ , b)  $J_{1p} - J_{3p}$ , c)  $J_{1p} - J_{2p}$ , d)  $(J_{1p} + J_{2p})/3$ , e)  $J_{2p}$ , f)  $J_{3p}$ , g)  $(J_{1p} + J_{3p})/5$ ; h)  $a/3$ , i)  $a/7$ , j)  $e/3$ , y k)  $f/3$ .

Prosigamos ahora con el estudio de constantes de acoplamiento activas mediante el método de la aparente deconvolución en el dominio del tiempo.

#### V.4.- Constantes de Acoplamiento Activas

El problema que enfrenta el tratamiento de las constantes de acoplamiento activas es la indeterminación del primer punto. Con este tipo de multipletes el FID está definido por una función seno y el primer punto de la ecuación [5.6] es cero. La pregunta es: ¿cómo debemos definir a  $\theta$  cuando el primer punto del seno es cero? Dado que sólo estamos introduciendo la información de la constante de acoplamiento por un cambio de signos en el FID, una buena propuesta es definir el primer valor de  $\theta$  como +1 y proseguir el tratamiento como se hizo para las constantes de acoplamiento pasivas. Es obvio suponer la aparición del multiplete en antifase y no se espera la deconvolución del multiplete en forma completa.

Al igual que para la deconvolución en el dominio del tiempo, se espera la presencia de subarmónicos a los valores de  $J/n$ , donde  $n$  tendrá los valores de 2, 3, 4, . . . Un ejemplo claro se muestra en la simulación de la gráfica de integral de un doblete en antifase con  $J_a = 13.0$  Hz, Figura 5.13. En ella se observa nuevamente la aparición de un mínimo muy profundo el cual corresponde a la constante de acoplamiento y a la aparición de subarmónicos. También es posible apreciar la aparición del ruido en este tipo de gráficas.

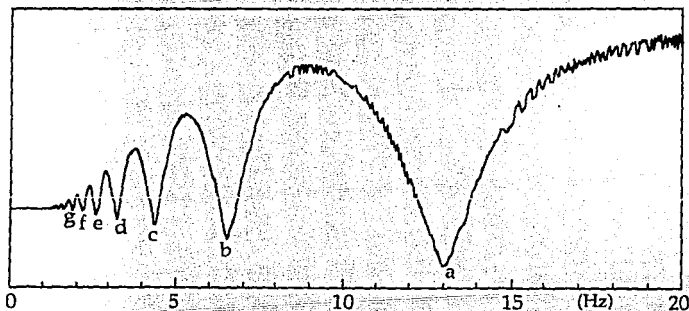


Figura 5.13.- Gráfica de integral de un acoplamiento en antifase simulado de 13.0 Hz. Los mínimos corresponden a: a)  $J_a$ , b)  $a/2$ , c)  $a/3$ , d)  $a/4$ , e)  $a/5$ , f)  $a/6$  y g)  $a/7$ .

Cuando el multiplete bajo estudio posee una constante de acoplamiento pasiva, las gráficas de integral muestran el patrón de sumas y restas de espectros, ver Capítulo VI. Así que cuando se obtiene la gráfica de integral de un multiplete con

constantes de acoplamiento:  $J_a = 5.0$  y  $J_p = 13.0$  Hz se espera la aparición de mínimos en 8 y 18 Hz, Figura 5.14, al igual que las respuestas subarmónicas. Sin embargo el mínimo global corresponde a la constante de acoplamiento activa.

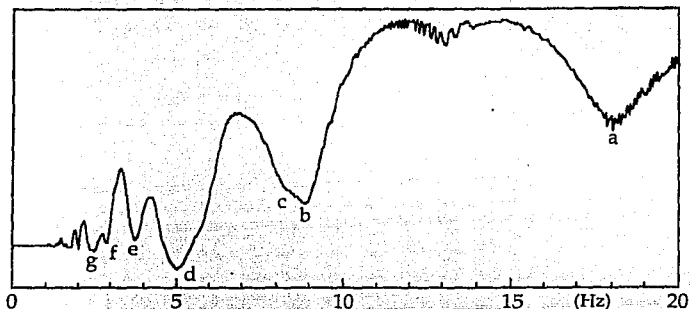


Figura 5.14.- Gráfica de integral del multiplete simulado con  $J_a = 5.0$  Hz y  $J_p = 13.0$  Hz. Los mínimos corresponden a: a)  $J_p + J_a$ , b)  $a/2$ , c)  $J_p - J_a$ , d)  $J_a$  y  $a/3$  e)  $a/5$ , f)  $a/6$  y g)  $d/2$ .

Si ahora comparamos la gráfica de integral con el sistema en donde  $J_a = 13.0$  y  $J_p = 5.0$  Hz, Figura 5.15, los patrones son muy diferentes y, nuevamente, el mínimo global corresponde a la constante de acoplamiento, se observa más claramente la presencia del mínimo cuando  $J_a$  es mayor.

Al considerar un sistema más complejo:  $J_a = 13.0$ ,  $J_{p1} = 5.0$  y  $J_{p2} = 2.0$  Hz la gráfica de integral se complica bastante, Figura 5.16. A pesar de ello, el mínimo global continúa siendo la constante de acoplamiento activa, aunque los mínimos debidos a las sumas y restas de las constantes de acoplamiento se incrementan. También aparecen los mínimos debidos a los subarmónicos de estos mínimos.

Con estos antecedentes es posible iniciar la determinación de las constantes de acoplamiento de sistemas que presentan acoplamientos en antifase.

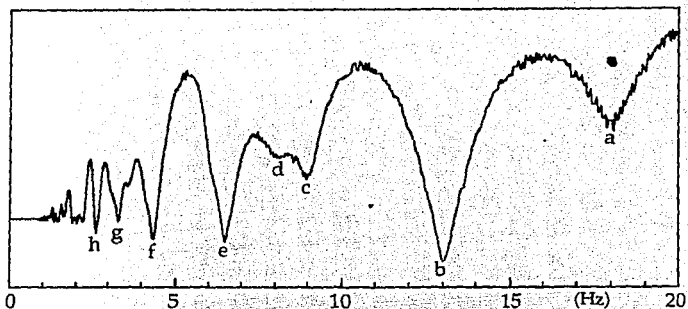


Figura 5.15.- Gráfica de integral de la simulación del multiplete con  $J_a = 13.0$  Hz y  $J_p = 5.0$  Hz. Los mínimos corresponden a: a)  $J_a + J_p$ , b)  $J_a$ , c)  $a/2$ , d)  $J_a - J_p$ , e)  $b/2$ , f)  $b/3$ , g)  $b/4$  y h)  $b/5$ .

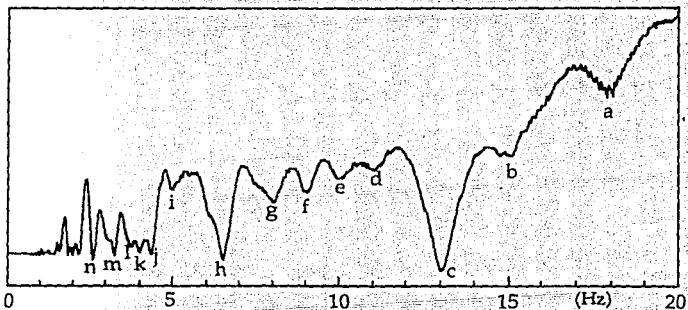


Figura 5.16.- Gráfica de integral del espectro simulado con  $J_a = 13.0$  Hz,  $J_{p1} = 5.0$  Hz y  $J_{p2} = 2.0$  Hz. Los mínimos corresponden a: a)  $J_a + J_{p1}$ , b)  $J_a + J_{p2}$ , c)  $J_a$ , d)  $J_a - J_{p2}$ , e)  $J_a - J_{p1} + J_{p2}$ , f)  $a/2$ , g)  $J_a - J_{p1}$ , h)  $c/2$ , i)  $b/5$ , j)  $c/3$ , k)  $g/2$ , l)  $b/4$ , m)  $c/4$  y n)  $c/5$ .



#### V.4.1.- Determinación Experimental

Como en todos los métodos tratados, primero es necesario seleccionar y aislar los multipletes bajo estudio. Una vez realizado, se efectúa la transformada de Fourier inversa para obtener el FID, el cual será dividido por la función definida en [5.6] para un valor de  $J^*$  definido. Al producto de esta división se retransforma para obtener la función en el dominio de las frecuencias, al cual se le determina la integral de los valores absolutos.  $J^*$  se varía dentro del intervalo que se espera se encuentre  $J_a$  y el mínimo de la gráfica será la constante de acoplamiento que se quiere medir.

Se trabajó con los espectros que se obtuvieron en el Capítulo II. Con estos espectros se determinaron la mayoría de las constantes de acoplamiento a larga distancia entre los protones y los  $^{13}\text{C}$  de la estricnina, los resultados se muestran en la Tabla 5.6.

En las determinaciones de las constantes de acoplamiento activas cuando el multiplete protónico era sencillo las gráficas de integral fueron muy sencillas de interpretar y encontrar el valor de la constante deseada, Figura 5.17.

La dificultad que se presenta en las determinaciones de los multipletes trabajados se debe a que la relación señal ruido no es muy buena y a que la resolución de los espectros no es la mejor. Cuando la resolución no es lo suficientemente grande, la determinación se ve afectada, ya que los mínimos se ven en forma de hombros o como mínimos muy anchos, esto se observa en la Figura 5.18.

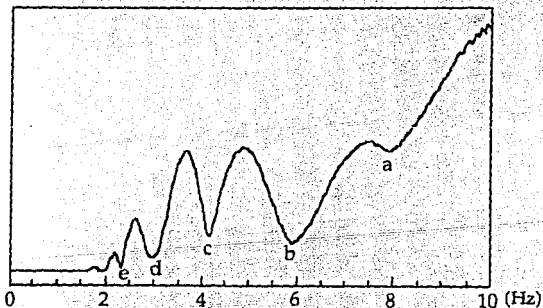


Figura 5.17.- Gráfica de integral del protón  $\text{H}_8$  de la estricnina acoplado con el carbono  $\text{C}_{17}$ . Los mínimos corresponden a: a)  $J_a + J_{p1}$ , b)  $J_a$ , c)  $a/2 + J_a - J_{p1}$ , d)  $b/2 + J_a/3$ .

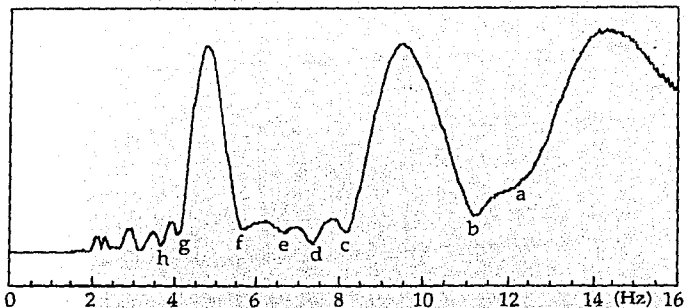


Figura 5.18.- Gráfica de integral del protón  $H_{15a}$  de la estricnina acoplado al carbono  $C_7$ . Los mínimos corresponden a: a)  $J_a + J_{p2}$ , b)  $J_a + J_{p3}$  y  $(J_a + J_{p1})/2$ , c)  $J_{p1} - J_a + J_{p2} - J_{p3}$ , d)  $J_a$  y  $J_{p1} - J_a$ , e)  $(J_a + J_{p1})/3$ , f)  $b/2$ , g)  $a/3$  h)  $b/3$ .

Con los resultados aquí mostrados se puede concluir que a pesar de no estar empleando la deconvolución en forma rigurosa es posible efectuar la determinación de las constantes de acoplamiento. El ruido y el ancho de las señales no interfieren en la precisión del método.

Cuando se miden las constantes de acoplamientos pasivas se hace a partir de la misma gráfica de integral empleando los mínimos más profundos. Sin embargo, también se encuentran los mínimos debidos a la sumas y restas de las constantes de acoplamiento presentes en el multiplete.

Sólo es posible determinar las constantes de acoplamiento activas al localizar los mínimos globales de las gráficas de integral. Con los mínimos locales es posible tener una estimación de las constantes de acoplamiento pasivas presentes en el multiplete, pero no es posible medirlas directamente.

Este método, al igual que el método riguroso, encuentra las condiciones subarmónicas a  $J/n$ , donde  $J$  es la frecuencia a la cual se encuentran las constantes a determinar o las sumas y restas de aquellas presentes en el multiplete y  $n$  es un número entero para constantes de acoplamiento activas y un entero non para constantes de acoplamiento pasivas.

H	C7	C8	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C20	C21	C22	C23
13		6.0					4.7	6.9	6.2				7.6		
15b						4.4	4.7		4.5				6.5		
17a b	*	5.0							3.3		2.1				
15a	7.3				1.9	7.9	3.2		4.8						
11b			8.0		7.0										
20b							5.4	2.0	6.8		3.5		2.4	4.7	
18b										4.8		7.4			
11a			6.3		*	*									
14		9.5			*	*		9.0					9.6	9.1	
18a	5.2								*	2.3					
20a											9.5		6.0	5.5	
8	2.6				5.6	2.0				5.9					
16		7.1					6.4	6.7				7.2			
23a						3.3							4.2	4.0	
23b													8.2	3.7	
12	1.9	5.9	2.5	2.3											
22							8.8					12.5			14.3
2	*														
1	2.9														

\*Constantes de acoplamiento que no fue posible determinar.

Tabla 5.6.- Constantes de acoplamiento a larga distancia entre los protones y lo <sup>13</sup>C de la estricnina medidos a partir de la aparente deconvolución en el dominio del tiempo.

## Capítulo VI

### Duplicación de J en el dominio de las frecuencias

#### VI.1.- Introducción:

Se ha mencionado anteriormente que uno de los mejores métodos para la determinación de las constantes de acoplamiento es el de duplicación de J en el dominio del tiempo. Sin embargo, una gran desventaja de este método es tener que realizar un número muy grande de transformadas de Fourier para cada punto de la gráfica de integral, lo cual hace lenta la extracción de las constantes de acoplamiento.

Para emplear un método que realice el mismo procedimiento, sin el uso de las transformadas de Fourier, se requiere implementar el método de duplicación de J en el dominio de las frecuencias. Este capítulo tratará sobre el tema.

#### VI.2.- Duplicación de J en el Dominio de las Frecuencias.

Comenzamos la explicación de este método de duplicación de J en el dominio de las frecuencias duplicando un doblete, Figura 6.1. Existen varias formas de lograrlo. Consideremos que la señal está formada por un acoplamiento  $J_p$ , Figura 6.1a. Este acoplamiento se puede duplicar si se convoluciona con dos funciones  $\delta$  separadas por  $J_p$ , Figura 6.1b. La señal resultante es un triplete que a pesar de que la distancia entre las señales extremas sea de  $2J_p$ , Figura 6.1c, no es la duplicación donde se cancelen las señales intermedias. Si a la señal a) se le convoluciona ahora con una función  $\delta$  en antifase, Figura 6.1d, se logrará la duplicación del doblete, Figura 6.1e. Con la aniquilación de la señal central debido al empleo de la función  $\delta$  en antifase. En caso de requerir subsecuentes duplicaciones del multiplete en antifase, ahora sólo es necesario convolucionar el multiplete en e) con funciones  $\delta$  en fase y siempre separadas por la misma distancia  $J_p$ .

Este razonamiento nos lleva a la siguiente conclusión: cuando se tienen señales en antifase es posible duplicar los desdoblamiento mediante funciones  $\delta$  que se encuentren en fase. Mientras que señales en fase sólo serán posibles duplicarlas con funciones  $\delta$  en antifase.

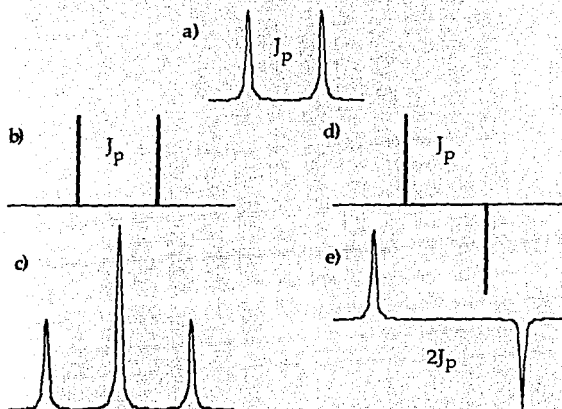


Figura 6.1.- Duplicación de un doblete, a), con dos funciones  $\delta$  en fase, b), y con dos funciones  $\delta$  en antifase, d). En el primer caso se generará un triplete, c), y en el segundo un doblete en antifase, e).

La duplicación se puede efectuar cuantas veces se requiera. Es posible realizar múltiples convoluciones al mismo tiempo empleando un arreglo de funciones  $\delta$  espaciadas una distancia constante. Por ejemplo, para un acoplamiento en antifase no existe restricción alguna, sólo es necesario que las funciones  $\delta$  se encuentren en fase e igualmente espaciadas con la distancia deseada. Sin embargo, para los acoplamientos en fase se requiere emplear un número par de funciones  $\delta$  en antifase. Estas condiciones son indispensables para lograr la aniquilación de las señales intermedias formadas por la convolución.

Es necesario hacer una aclaración. Dado que este método trabaja en el dominio de las frecuencias, el valor mínimo de  $J^*$  que se puede emplear dependerá de la distancia entre dos puntos consecutivos,  $\Delta_p$ , lo cual estará definido por el múltiplo de potencia de dos empleada para realizar la transformación del FID al dominio de las

frecuencias. Al mismo tiempo  $\Delta p$  limitará los valores de  $J^*$ . Estos valores estarán definidos por:  $J^* = n\Delta p$ , donde  $n$  es un entero. Esto implica que la digitalización del espectro sea una limitante en la precisión del método.

Una vez explicado la forma en que se tienen que implementar la duplicación de  $J$  en el dominio de las frecuencias procederemos a estudiar las duplicaciones de multipletes en fase y en antifase por separado.

### VI.2.1.- Duplicación de $J$ de Acoplamientos Activos.

Para lograr la duplicación de una señal en antifase, Figura 6.2a, se requiere emplear funciones  $\delta$  espaciadas por el valor de  $J_a$ . Pero existe un problema, el valor que se quiere medir es precisamente  $J_a$ . Si intentamos duplicar el multiplete con un par de funciones  $\delta$  separados por  $J^* < J_a$ , Figura 6.2b, resultará una señal intermedia en antifase que no se cancela, no lográndose la duplicación deseada, Figura 6.2c. Esto es factible en la condición  $J^* = J_a$ . Este resultado es muy importante, ya que nos permitirá la determinación de  $J_a$ . Este proceso se representa en la Figura 6.2e.

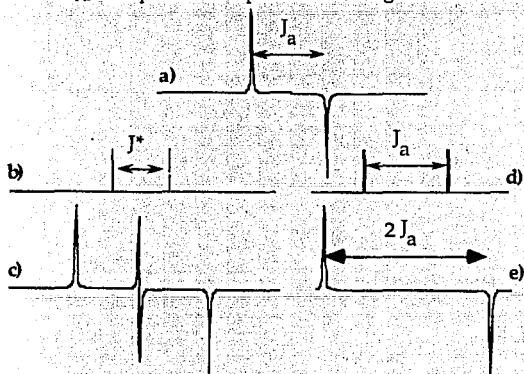


Figura 6.2.- El multiplete de antifase (a) se convolucionaba con dos funciones  $\delta$  separadas por  $J^*$ , b). Cuando  $J^* < J_a$ , se genera una señal de antifase en el centro de la señal deconvolucionada, c). En el momento en que  $J^* = J_a$ , d), la señal de antifase desaparece del espectro convolucionado, e).

Supóngase que determinamos la integral absoluta de las señales de la Figura 6.2c y 6.2e. Esperamos que la integral absoluta en la condición donde  $J^* = J_a$  sea mayor que en la condición donde  $J^* = J_a/2$ . Si determinamos la integral absoluta de varios espectros procesados para un intervalo de  $J^*$  que comprenda el valor de  $J_a$ , tendremos lo que llamamos la gráfica de integral, en la cual el mínimo global corresponderá al valor de  $J_a$ .

Consideremos un multiplete simulado con constante de acoplamiento de 15 Hz y duplicado con dos funciones  $\delta$ . La gráfica de integral, Figura 6.3, presenta sólo un mínimo el cual corresponderá a la constante de acoplamiento activa. Pero también es posible, como se mencionó anteriormente, convolucionar la señal mediante más funciones  $\delta$ . Si en vez de emplear dos funciones  $\delta$ , se emplean 3, 4, ..., n funciones  $\delta$  la gráfica de la integral generará varios mínimos locales. ¿A que se debe la aparición de estos mínimos locales?

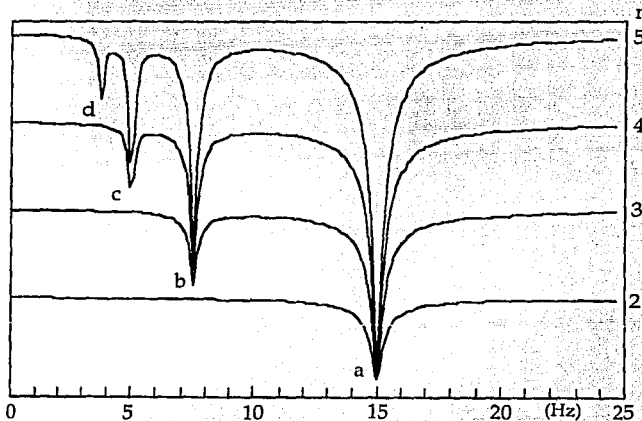


Figura 6.3.- Se presentan las simulaciones de diferentes desdoblamientos de  $J$  en el dominio de las frecuencias para  $n = 2, 3, 4$  y  $5$  funciones  $\delta$ . Los mínimos corresponden a:  $a = J_a$ ,  $b = J_a/2$ ,  $c = J_a/3$  y  $d = J_a/4$ . Nótese como en la medida que se incrementa el número de funciones  $\delta$  se incrementa el número de mínimos locales.

Consideremos el caso donde el número de funciones  $\delta$  es igual a tres,  $n = 3$ , Figura 6.3. Al iniciar las convoluciones con valor de  $J^*$  muy pequeñas no existe coincidencias entre las funciones  $\delta$  y las señales que estamos generando. Pero a medida que vamos aumentando el valor de  $J^*$ , la distancia entre los extremos de las tres funciones delta se aproxima al valor de  $J_a$ . En el momento que esta distancia es igual a la constante de acoplamiento activa se sufre una aniquilación de algunas de las señales que se están generando en antifase produciendo un mínimo local. Pero la aniquilación de todas las señales en antifase sólo se logra cuando se cumple la condición  $J^* = J_a$ . A este tipo de coincidencias parciales se debe la aparición de mínimos locales en el método de duplicación de  $J$  en el dominio de las frecuencias.

A medida que se incrementa el número de funciones  $\delta$  se incrementa el número de coincidencias entre las funciones  $\delta$  y la señal, su correspondiente análogo en el dominio del tiempo se le llamó armónicos. Estas condiciones se dan a  $J^* = J_a/2, J_a/3, J_a/4$ , etc. dependiendo del número de funciones  $\delta$  que se estén empleando. A mayor número de funciones  $\delta$  mayor número de mínimos locales. El número de mínimos debido a condiciones armónicas estará definido por  $n - 1$  donde  $n$  es el número de funciones  $\delta$  empleadas, el cual puede ser cualquier valor entero positivo.

Una de las ventajas que tiene este método es la posibilidad de utilizar cualquier número de funciones  $\delta$ , lo cual provocará la multiplicación de  $J$  a medir por cualquier número entero; contrariamente a la técnica implementada en el dominio del tiempo donde es requisito fundamental trabajar con múltiplos de potencia de dos para lograr el desdoblamiento.

### VI.2.1.1.- Determinación de Constantes de Acoplamiento Activas en Multiplétes Complejos.

Estudemos ahora sistemas más complejos. Empecemos con un multipléte que posee una constante de acoplamiento pasiva  $J_p$  y una activa  $J_a$  con la siguiente restricción:  $J_p > J_a$ , Figura 6.4. Analizando el multipléte se observa que existen ciertas distancias que podrían interpretarse como posibles constantes de acoplamiento activas si las aislamos. Los métodos para la determinación de constantes de acoplamiento no distinguen la diferencia. Estas distancias están definidas por la suma y la resta de  $J_p$  y  $J_a$ . Cualquier método que intente medir constantes de acoplamiento activas medirá también las distancias  $|J_p + J_a|$  y  $|J_p - J_a|$ .



La ventaja que se tiene al medir la constante de acoplamiento activa es que existen para el caso tratado dos condiciones en donde la distancia que determina el método corresponde a  $J_a$ , y sólo una condición para cada uno de los casos de  $J_p + J_a$  y  $J_p - J_a$ . Con ello se espera que el mínimo global de las gráficas de integral corresponda a la constante de acoplamiento activa que se desea determinar. En este momento conviene mencionar que si  $J_p > J_a$ , en vez de esperar un mínimo en la condición  $J_a - J_p$ , se espera un mínimo en  $J_p - J_a$ .

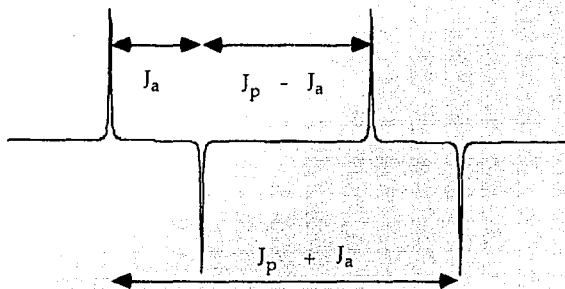


Figura 6.4.- La aparición de diferentes condiciones subarmónicas cuando el multiplete en estudio posee una constante pasiva y una activa. Cualquier método que intente medir las constantes de acoplamiento considerará, además de la distancia conocida como  $J_a$ , las combinaciones  $J_p + J_a$  y  $J_p - J_a$  como otras distancias a determinar.

Al mismo tiempo que se determinan estos mínimos, también se obtienen mínimos en  $(J_a + J_p) / 2, 3, 4, \dots, n - 1$  y cuando  $(J_a - J_p) / 2, 3, 4, \dots, n - 1$  dependiendo del número de funciones  $\delta$  que se empleen.

En la Figura 6.5 se muestra la gráfica de integral del multiplete en antifase con constantes de acoplamiento:  $J_a = 5.0$  Hz y  $J_p = 11.0$  Hz. En ella se observa las condiciones descritas anteriormente y la prominencia del mínimo global como la constante de acoplamiento que se quiere determinar. Es posible asignar todos los mínimos principales y caracterizar fácilmente el valor de la constante de acoplamiento activa que se quiere medir.

Compliquemos un poco más la situación al incluir una segunda constante pasiva. Si consideramos los posibles multipletes que se forman, se observará que

existen tres casos a considerar: 1.- cuando  $J_a$  es la menor de las tres constantes de acoplamiento,  $J_a < J_{p2} < J_{p1}$ ; 2.-  $J_{p2} < J_a < J_{p1}$ ; y, 3.-  $J_{p2} < J_{p1} < J_a$ .

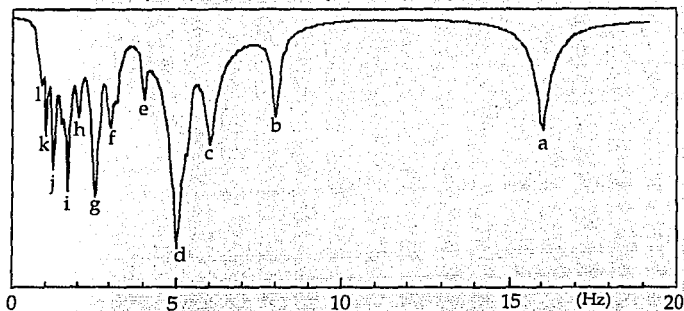


Figura 6.5.- Gráfica de integral del multiplete simulado con constantes de acoplamiento  $J_a = 5.0$  Hz y  $J_p = 11.0$  Hz aplicando ocho funciones  $\delta$ . Los mínimos corresponden a: a)  $J_a + J_p$ , b)  $a/2$ , c)  $J_p - J_a$ , d)  $a/3$  y  $J_a$ , e)  $a/4$ , f)  $c/2$ , g)  $d/2$ , h)  $c/3$ , i)  $d/3$ , j)  $d/4$ , k)  $d/5$  y l)  $d/6$ .

Para este tipo de estudio se trabajó con simulaciones con los valores de las constantes de acoplamiento de 2.0, 5.0 y 15.0 Hz. En todos los casos siguientes se efectuó la convolución con ocho funciones  $\delta$ .

Para la primera condición se trazó la gráfica de la integral en la Figura 6.6. En ella se observa que el mínimo global corresponde a  $J_a$ ; existen condiciones de mínimos locales a sumas y restas de los valores 2.0, 5.0 y 15.0 Hz, pero la intensidad dependerá del número de coincidencias de las sumas y restas que haya en el multiplete. Obsérvese en esta gráfica que no aparece ningún mínimo en los valores de 5.0 o 15.0 Hz que corresponderían a los valores de  $J_{p2}$  y  $J_{p1}$ . La asignación de las diferentes mínimos se dan en el pie de la figura.

Para la segunda situación, Figura 6.7, donde el valor de  $J_a = 5.0$  Hz,  $J_{p1} = 15.0$  y  $J_{p2} = 2.0$  Hz, se obtiene el mínimo global en 5.0 Hz, sin embargo existe un mínimo local muy profundo en 10.0 Hz generado por las coincidencias de los mínimos de:  $(J_a + J_{p1}) / 2$  y  $(J_{p1} - J_a)$ , lo cual en ciertas condiciones se prestaría a confusiones. Observamos también que no aparecen mínimos en los valores de las constantes de acoplamiento pasivas. La aparición de las coincidencias en los mínimos es una de las posibles fuentes de confusión para lograr la determinación.

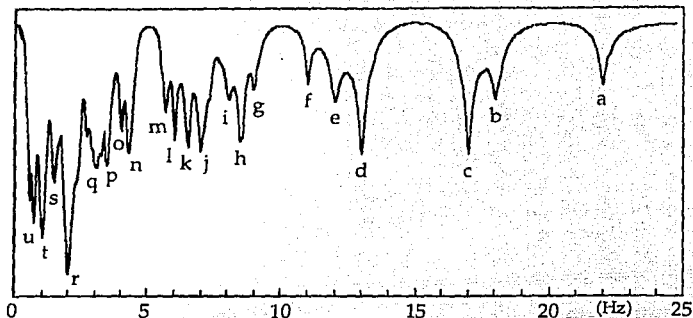


Figura 6.6.- Se muestra la gráfica de intensidad absoluta de la simulación de un sistema AMX con  $J_a = 2.0$  Hz y dos constantes de acoplamiento pasivas  $J_{p1} = 15$  Hz y  $J_{p2} = 5$ . Los principales mínimos corresponden: a)  $J_{p1} + J_{p2} + J_a$ ; b)  $J_{p1} + J_{p2} - J_a$ ; c)  $J_{p1} + J_a$ ; d)  $J_{p1} - J_a$ ; e)  $J_{p1} - J_{p2} + J_a$ ; f)  $a/2$ ; g)  $a/3$  y  $b/2$ ; h)  $c/2$ ; i)  $J_{p1} - J_{p2} - J_a$ ; j)  $J_{p2} + J_a$ ; k)  $d/2$ ; l)  $b/3$ ; m)  $c/3$ ; n)  $d/3$ ; o)  $i/2$ ; p)  $j/2$ ; q)  $J_{p2} - J_a$ ; r)  $J_a$ ; s)  $q/2$ ; t)  $r/2$ ; y, u)  $r/3$ .

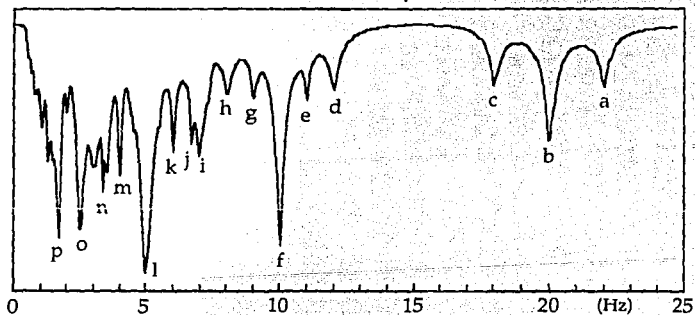


Figura 6.7.- Gráfica de integral absoluta vs.  $J^*$  para un sistema simulado AMX con  $J_a = 5.0$  Hz y dos constantes de acoplamientos pasivas:  $J_{p1} = 15.0$  y  $J_{p2} = 2.0$  Hz. Se emplearon 8 funciones  $\delta$  para la duplicación. Los distintos mínimos locales corresponden a: a)  $J_a + J_{p1} + J_{p2}$ ; b)  $J_a + J_{p1}$ ; c)  $J_a + J_{p1} - J_{p2}$ ; d)  $J_{p1} - J_a + J_{p2}$ ; e)  $a/2$ ; f)  $J_{p1} - J_a$  y  $b/2$ ; g)  $c/2$ ; h)  $J_{p1} - J_a - J_{p2}$ ; i)  $J_a + J_{p2}$ ; j)  $b/3$ ; k)  $c/3$  y  $d/2$ ; l)  $J_a$ ; m)  $d/3$  y  $h/2$ ; n)  $f/3$ ; o)  $l/2$ ; y p)  $l/3$ .

Para este mismo sistema se observa que no existen coincidencias en los valores de las constantes de acoplamiento pasivas. Además, a valores grandes los mínimos están flanqueados por sumas y restas de las constantes de acoplamiento y la presencia de condiciones subarmónicas.

Para el último caso, Figura 6.8, donde el valor de  $J_a = 15.0$  Hz,  $J_{p1} = 5.0$  y  $J_{p2} = 2.0$  Hz, se obtiene el mínimo global en 15.0 Hz que corresponde al valor de la constante de acoplamiento activa. Nuevamente se obtiene un mínimo local profundo a 10.0 Hz generado por las coincidencias de los mínimos de:  $(J_a - J_{p1})$  y  $(J_a + J_{p1})/2$ .

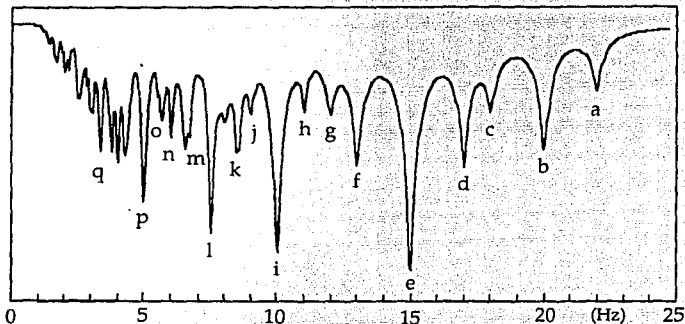


Figura 6.8.- Gráfica de intensidad absoluta de la simulación de un sistema AMX con  $J_a = 15.0$  Hz y dos constantes de acoplamiento pasivas  $J_{p1} = 5$  Hz y  $J_{p2} = 2$ . Los principales mínimos corresponden: a)  $J_a + J_{p1} + J_{p2}$ ; b)  $J_a + J_{p1}$ ; c)  $J_a + J_{p1} - J_{p2}$ ; d)  $J_a + J_{p2}$ ; e)  $J_a$ ; f)  $J_a - J_{p2}$ ; g)  $J_a - J_{p1} + J_{p2}$ ; h)  $a/2$ ; i)  $J_a - J_{p1}$ , y  $b/2$ ; j)  $c/2$ ; k)  $d/2$ ; l)  $e/2$ ; m)  $b/3$  y  $f/2$ ; n)  $c/3$  y  $g/2$ ; o)  $d/3$ ; p)  $e/3$ ; q) mínimos subsecuentes de las divisiones de orden menor.

Observando las Figuras 6.6, 6.7 y 6.8 se concluye que no es posible confundir los valores de constantes de acoplamiento activas con los valores de las constantes de acoplamiento pasivas que se encuentran en el multiplete. Los mínimos globales siempre corresponden a los valores de las constantes de acoplamiento que se desea determinar. Los mínimos locales a frecuencias menores pueden interferir con la determinación de las constantes de acoplamiento activas pequeñas. Es interesante además la presencia de diferentes patrones dependiendo de los valores relativos de las constantes de acoplamiento. A pesar de la gran cantidad de mínimos que se forman, es

posible explicar todos los mínimos una vez que se tienen todas las constantes de acoplamiento y tener una estimación de las constantes de acoplamiento pasivas presentes en el multiplete.

## VI.2.2.- Determinación Experimental de Constantes de Acoplamiento Activas

Este método fue probado con los resultados de los experimentos obtenidos mediante la nueva secuencia de pulsos explicada en el Capítulo II. Hay que hacer notar que estos experimentos implican condiciones de relaciones señal ruido pequeñas y al realizar los experimentos sin girar la muestra provoca un ensanchamiento adicional de la señal; todo ello en detrimento de la determinación de la constante de acoplamiento activa. Si a esto le aunamos que en varios casos las señales poseen acoplamientos muy pequeños o que el multiplete es complejo, genera un verdadero reto para el método en estudio.

Para efectuar las determinaciones, primero fue necesario aislar el multiplete en cuestión. Posteriormente se determinaron las gráficas de integral empleando el mismo procedimiento anteriormente descrito. Se emplearon ocho funciones  $\delta$  para la duplicación de  $J_a$  y  $J^*$  se varió desde 0.12 a 32.0 Hz. La digitalización en los espectros experimentales fue de 0.125 Hz / punto, por tanto la precisión en las mediciones no será mayor a 0.13 Hz.

En la Figura 6.9 se muestran las variaciones que se obtienen cuando  $J^*$  no corresponde precisamente al valor de la constante de acoplamiento. Para este ejemplo se observa que el ruido es menor para el valor de  $J^* = 7.92$ , que corresponde a la determinación de  $J_a$ .

La gráfica de la integral del protón  $H_{11b}$  acoplado con el carbono  $C_{10}$  se muestra en la Figura 6.10. En primera instancia se observa que los mínimos son mucho más anchos que los correspondientes a los de las simulaciones. Esto se debe a que las señales experimentales son más anchas que las simuladas. El mínimo global corresponde a la constante de acoplamiento a dos enlaces de distancia entre el  $H_{11b}$  y el  $C_{10}$ . Con las señales a mayores valores de  $J^*$  es posible estimar en forma relativamente precisa las constantes de acoplamiento del multiplete protónico, los cuales están de acuerdo dentro de los niveles de precisión de la determinación.

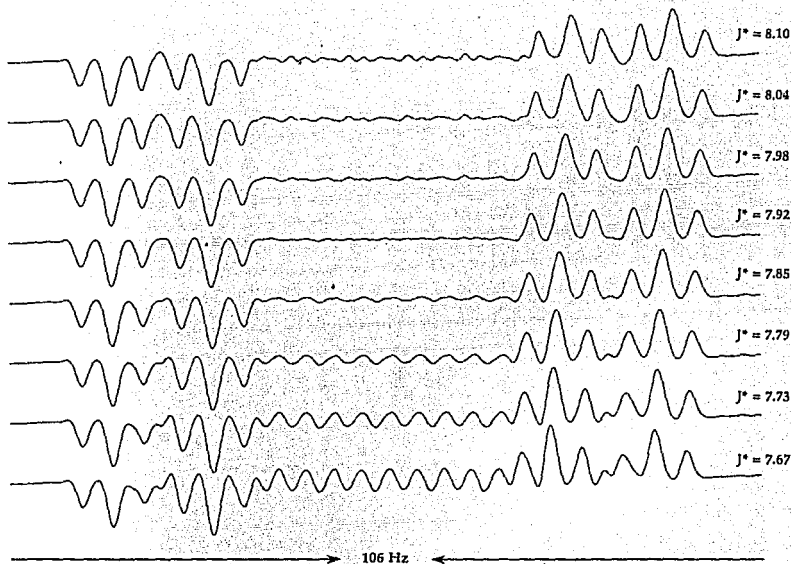


Figura 6.9.- Variaciones en el espectro prueba del multiplete del protón  $H_{15a}$  acoplado con el  $C_7$  de la estricnina con diferentes valores de  $J^*$ . El espectro con menor número de oscilaciones,  $J^* = 7.92$  Hz, corresponde al valor de la constante de acoplamiento.

Una vez extraída la constante de acoplamiento es posible efectuar la duplicación del multiplete bajo estudio, Figura 6.11a. Todas las distorsiones de las señales serán tomadas en cuenta y el ruido tendrá un factor importante en la apariencia del espectro duplicado, Figura 6.11b.

Consideremos un segundo ejemplo, el multiplete del protón  $H_{15a}$  acoplado a tres enlaces de distancia con el carbono  $C_{13}$ , ver Figura 6.12. En primer lugar tenemos que considerar que no es un sistema  $AM_2X$ , sino uno  $AMM X$  lo cual complicará la gráfica de integral. A pesar de ello es posible determinar la constante de acoplamiento activa y, conociendo los valores de las constantes de acoplamiento pasivas, predecir los mínimos locales.

En la Figura 6.13a se observa el multiplete como aparece en el espectro después de la transformación Hadamard y no es posible predecir o estimar cual sería el valor de  $J_a$ . Sin embargo, al duplicar ocho veces el valor de  $J_a$ , Figura 6.13b, se recuperan las señales en antifase del multiplete original. Esta es la forma más adecuada de comprobar que la determinación de la constante de acoplamiento ha sido la correcta.

Esta determinación permite ejemplificar varias ventajas del método. Cuando no es posible interpretar a simple vista el multiplete debido a las complicaciones de las constantes pasivas se puede emplear la duplicación para confirmar el valor extraído. Cuando hay cancelaciones de las diferentes señales, es posible regenerar la señal original y las aniquilaciones de las señales en el multiplete también pueden ser regeneradas, Figura 6.14.

En la Tabla 6.1 se reportan todos los valores de constantes de acoplamiento encontrados a larga distancia para la estricnina. En algunos casos, cuando existen dos multipletes que se traslapan, no fue posible efectuar la determinación por el método descrito a pesar de la existencia de la correlación.

Las constantes de acoplamiento a larga distancia entre los protones aromáticos con los carbonos en la estricnina se muestran en la Tabla 6.2.

Con estos ejemplos se ha mostrado la utilidad del método de duplicación de  $J$  en el dominio de las frecuencias para la determinación de constantes de acoplamiento activas; procedamos ahora al estudio de las constantes de acoplamiento pasivas.

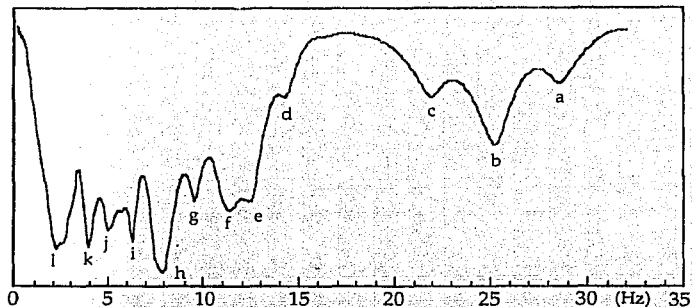


Figura 6.10.- Gráfica de integral del multiplete del protón  $H_{11b}$  acoplado con el carbono  $C_{10}$  de la estricnina a 2 enlaces de distancia. Considerando que las constantes de acoplamiento pasivas corresponden a:  $J_{p1} = 17.3$  y  $J_{p2} = 3.34$  Hz los mínimos de esta gráfica corresponden a: a)  $J_a + J_{p1} + J_{p2}$ , b)  $J_a + J_{p1}$ , c)  $J_a + J_{p1} - J_{p2}$ , d)  $a/2$ , e)  $J_{p1} - J_a + J_{p2}$  y b/2, f)  $J_a + J_{p2}$  y c/2, g)  $J_{p1} + J_a$ , h)  $J_a$ , i)  $J_{p1} - J_a - J_{p2}$ , j)  $J_a - J_{p2}$ , k)  $h/2$  y l)  $h/3$ .

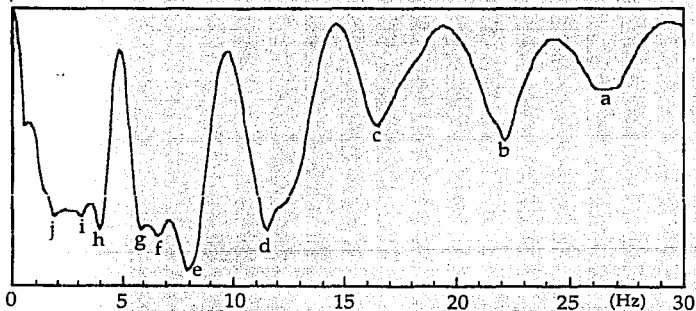


Figura 6.12.- Gráfica de integral del multiplete del protón  $H_{15a}$  acoplado al  $C_{13}$  de la estricnina. Los mínimos corresponden a: a)  $J_a + J_{p1} + J_{p2} + J_a + J_{p1} + J_{p3}$ , b)  $J_a + J_{p1}$ , c)  $J_a + J_{p2} + J_{p3}$ , d)  $J_a + J_{p1}$  y  $J_a + J_{p3}$ , e)  $J_a$ , f)  $J_{p1} - J_a$ , g)  $d/2$ , h)  $d/3$ , e/2,  $J_a - J_{p2}$  y  $J_a - J_{p3}$ , i)  $e/3$  y j)  $e/4$ . Donde los valores de  $J_{p1} = 14.35$ ,  $J_{p2} = 4.76$  y  $J_{p3} = 3.96$  Hz, obtenidos mediante la duplicación del multiplete en fase.



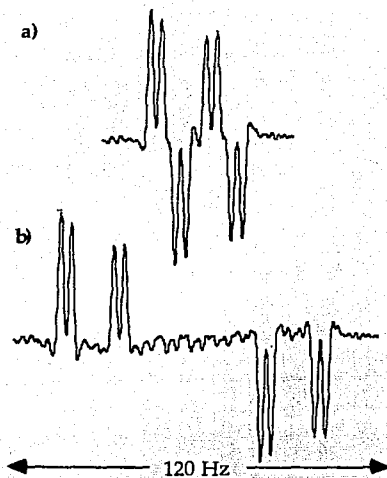


Figura 6.11.- Señal del multiplete del protón  $H_{11b}$  acoplado con el carbono  $C_{10}$ , a); duplicación en el dominio de las frecuencias con ocho funciones  $\delta$  espaciados 7.91 Hz que corresponde a la constante de acoplamiento activa, b).

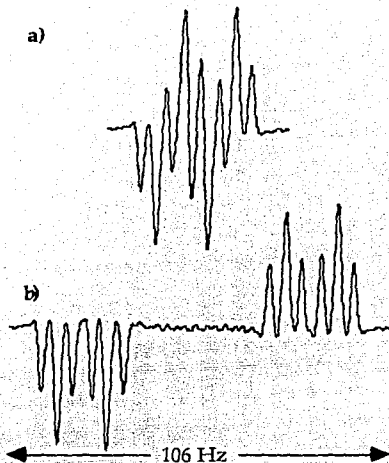


Figura 6.13.- Duplicación del multiplete del protón  $H_{15a}$  acoplado con el carbono  $C_{13}$ , a), mediante la deconvolución en el dominio de las frecuencias mediante ocho funciones  $\delta$  espaciados 7.9 Hz que corresponde a la constante de acoplamiento activa. Obsérvese como no es sencilla la extracción de la constante de acoplamiento a simple vista. Una vez efectuada la duplicación con el valor adecuado correspondiente a la constante de acoplamiento, prácticamente no aparecen artefactos entre las señales duplicadas.

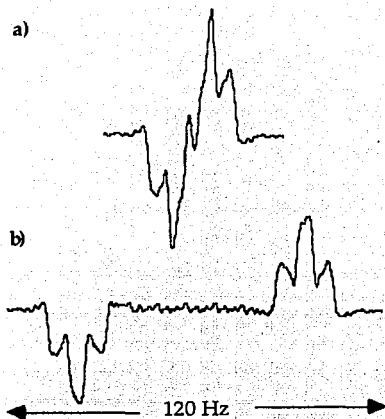


Figura 6.14.- Duplicación del multiplete del protón  $H_{22}$  acoplado con el carbono  $C_{20}$  de estricnina, a), mediante el método de duplicación de  $J$  en el dominio de las frecuencias usando ocho funciones  $\delta$ , b). Es importante observar la generación del multiplete original en antifase una vez que se a determinado el valor de  $J_a$  y duplicado el multiplete.

H	C7	C8	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C20	C21	C22	C23
13		6.1					4.7	6.6	6.1				7.7		
15b						4.6	4.8		4.6				6.6		
17ab	3.2	5.0							3.3		2.1				
15a	7.3				1.9	7.9	3.2		4.6						
11b			7.9		7.1										
20b							5.5	2.0	6.8		3.6		2.4	4.7	
18b											4.9		7.4		
11a			6.3		*	*									
14		9.5			*	*		9.1					9.8	9.3	
18a	5.2								*	2.4					
20a											9.5		4.3	5.6	
8	2.6				5.6	2.0				5.9					
16		7.1					6.4	6.7				7.3			
23a						3.3							4.2	3.9	
23b													8.2	3.8	
12	1.9	5.8	2.5	2.5											
22							8.9					12.5			14.2
2	1.4														
1	2.9														

\* Acoplamiento detectado, pero no se logró medir la constante de acoplamiento.

Tabla 6.1.- Constantes de acoplamiento a larga distancia de estricnina de los carbonos alifáticos determinadas por el método de duplicación de J en el dominio de las frecuencias.

	C1	C2	C3	C4	C5
H1			7.3		7.9
H2				7.7	
H3	8.8			2.7	9.9
H4	1.9	7.5			2.5

Tabla 6.2.- Constantes de acoplamiento determinadas por el método de duplicación de J en el dominio de las frecuencias para los protones aromáticos de la estricnina.

### VI.3.- Constantes de Acoplamiento Pasivas

Anteriormente mencionamos que para la duplicación de J es necesario efectuar las convoluciones con funciones  $\delta$  en antifase y en número par. Esta condición es indispensable para lograr la anulación de las señales de antifase que se generan cuando se convolucionan las señales al cumplirse la condición  $J^* = J_p$ .

El emplear un número par de funciones  $\delta$ , lejos de ser una desventaja, produce que los mínimos locales generados por coincidencias se reduzca. Comparamos los siguientes dos casos, cuando se efectúa la convolución de señales en antifase con 8 funciones  $\delta$  generarán mínimos locales en  $J_a / n$ , donde  $n = 2, 3, 4, 5, 6$  y  $7$ . Para el mismo número de funciones  $\delta$ , pero trabajando con un multiplete en fase, los mínimos locales en  $J_p / n$  estarán localizados cuando  $n = 3, 5$  y  $7$ , Figura 6.15. Esto reduce el número de mínimos locales a valores pequeños. Sin embargo, a valores muy pequeños de  $J^*$  se espera la anulación de gran parte del espectro, por lo cual existirá un mínimo global cuando  $J^*$  tiende a cero.

Procederemos a estudiar los sistemas con más de una constante de acoplamiento en la señal bajo estudio.

#### VI.3.1.- Determinación de Constantes de Acoplamiento Pasivas de Sistemas Complejos

Cuando se requiere medir constantes de acoplamiento de multipletes en fase surgen ciertas particularidades que es conveniente apuntar. Primero, aparecerán como

mínimos locales todas las frecuencias producto de las sumas y restas de las constantes de acoplamiento presentes en el multiplete. Además de estos valores también se esperan las condiciones subarmónicas, Figura 6.16.

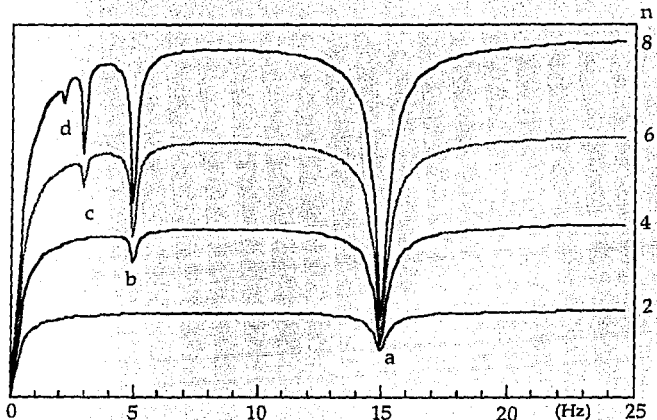


Figura 6.15.- Gráfica de integral de las duplicaciones de  $J$  para un sistema AX con  $J_p = 15.0$  Hz, utilizando 2, 4, 6 y 8 funciones  $\delta$  en antifase. Los mínimos corresponden a: a)  $J_p$ , b)  $J_p / 3$ , c)  $J_p / 5$ , y d)  $J_p / 7$ .

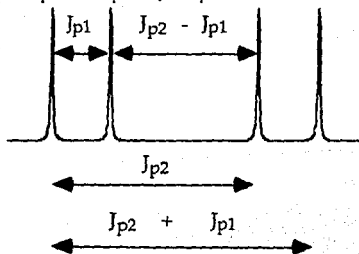


Figura 6.16.- El método de duplicación de  $J$  encontrará mínimos a  $J_{p1}$ ,  $J_{p2}$ ,  $J_{p2} + J_{p1}$ , y a  $J_{p2} - J_{p1}$ . Existen dos condiciones en las que se mide  $J_{p1}$  y  $J_{p2}$ , lo cual generará mínimos más profundos que en la suma y la resta de las respectivas constantes de acoplamiento.

Considerando lo anterior, estudiamos el sistema simulado doble de dobles con constantes de acoplamiento  $J_{p1} = 15.0$  y  $J_{p2} = 2.0$  Hz. En la Figura 6.17 se observan la presencia de la suma y restas de las coincidencias explicadas anteriormente y la presencia de las respuestas subarmónicas de ellas y de las correspondientes a las constantes de acoplamiento. Es preciso señalar que ahora en una sola gráfica de integral es posible determinar todas las constantes de acoplamiento pasivas, ya que los mínimos más intensos corresponden a  $J_{p1}$  y a  $J_{p2}$ .

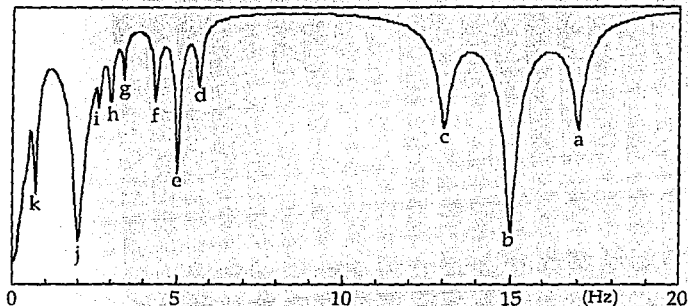


Figura 6.17.- Gráfica de integral del multiplete simulado con constantes de acoplamiento de:  $J_{p1} = 15.0$  y  $J_{p2} = 2.0$  Hz. Los mínimos corresponden a: a)  $J_{p1} + J_{p1}$ , b)  $J_{p1}$ , c)  $J_{p1} - J_{p2}$ , d)  $a/3$ , e)  $b/3$ , f)  $c/3$ , g)  $a/5$ , h)  $b/5$ , i)  $c/5$ , j)  $J_{p2}$  y k)  $j/3$ .

Tratemos ahora un ejemplo con tres constantes de acoplamiento pasivas, ya que el ejemplo anterior con dos acoplamientos pasivos es sencillo. Para ello sólo es necesario tratar un sólo caso, ya que el multiplete en cuestión no se ve afectado por las variaciones de estos valores.

Consideremos el multiplete con constantes de acoplamiento:  $J_{p1} = 15.0$ ,  $J_{p2} = 5.0$  y  $J_{p3} = 2.0$  Hz, Figura 6.18. En esta gráfica se aprecia que los mínimos más profundos se generan en los valores de las constantes de acoplamiento. Al igual que el número de mínimos locales es mayor que los encontrados en las gráficas para las constantes de acoplamiento activas. También se observan las respuestas subarmónicas esperadas.

Una consideración importante que hay que hacer notar es que esta gráfica parece ser la suma de las tres gráficas anteriores del estudio de las constantes de acoplamiento activas, Figuras 6.5, 6.6 y 6.7, sin considerar la región cercana a cero.

En un principio parece que estas gráficas son complejas y no son fáciles de interpretar, pero es posible generar algoritmos para encontrar los mínimos principales y determinar las constantes de acoplamiento en los sistemas bajo estudio casi en forma automática. Prácticamente es posible asignar todos los mínimos en este tipo de gráficas, lo cual facilita su uso.

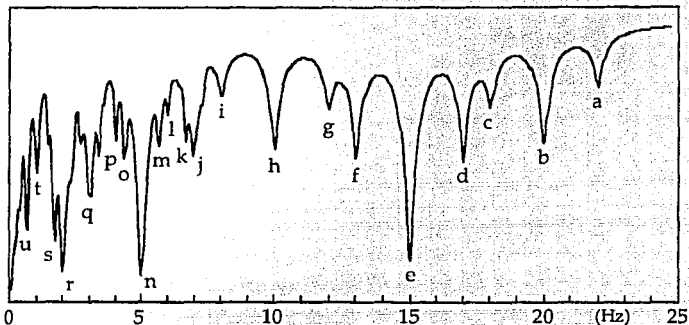


Figura 6.18.- Se muestra la gráfica de la integral absoluta de los espectros duplicados por ocho funciones  $\delta$  vs.  $J^*$  de la simulación de un sistema AMX con constantes de acoplamiento:  $J_{p1} = 15.0$ ,  $J_{p2} = 5.0$  y  $J_{p3} = 2.0$  Hz. Los principales mínimos corresponden a: a)  $J_{p1} + J_{p2} + J_{p3}$ , b)  $J_{p1} + J_{p2}$ , c)  $J_{p1} + J_{p2} - J_{p3}$ , d)  $J_{p1} - J_{p3}$ , e)  $J_{p1}$ , f)  $J_{p1} - J_{p3}$ , g)  $J_{p1} - J_{p2} + J_{p3}$ , h)  $J_{p1} - J_{p2}$ , i)  $J_{p1} - J_{p2} - J_{p3}$ , j)  $J_{p2} + J_{p3}$ , k)  $b/3$ , l)  $c/3$ , m)  $d/3$ , n)  $J_{p3}$  y  $e/3$ , o)  $f/3$ , p)  $g/3$ , q)  $J_{p2} - J_{p3}$ , r)  $J_{p3}$ , s)  $n/3$ , t)  $q/3$  y u)  $r/3$ .

### VI.3.2.- Determinación Experimental de Constantes de Acoplamiento Pasivas.

Para la determinación experimental de constantes de acoplamiento pasivas se decidió trabajar con las moléculas de 2-furfural en DMSO- $d_6$ , con los hidrógenos aromáticos de la cotinina y nicotina, con el *m*-bromo nitro benceno y con algunos multipletes de la estricnina que se encuentran aislados.

En la Figura 6.19 se muestra el multiplete del protón  $H_{20a}$  de la estricnina en donde se aprecia la existencia de dos acoplamientos resueltos y de un tercero que no es



posible resolver. En la Figura 6.20 se muestra la gráfica de integral para el mismo multiplete y en el cual se confirma que no es posible determinar la constante de acoplamiento que no fue resuelta en el experimento de RMN. Lo único que nos indica de la existencia de una tercera constante de acoplamiento en este tipo de gráficas es la anchura de los mínimos locales.

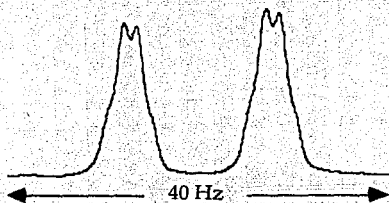


Figura 6.19.- Multiplete correspondiente al protón  $H_{20a}$  de la estricnina. Se pueden observar la presencia de tres constantes de acoplamiento, dos resueltas y una sin resolver.

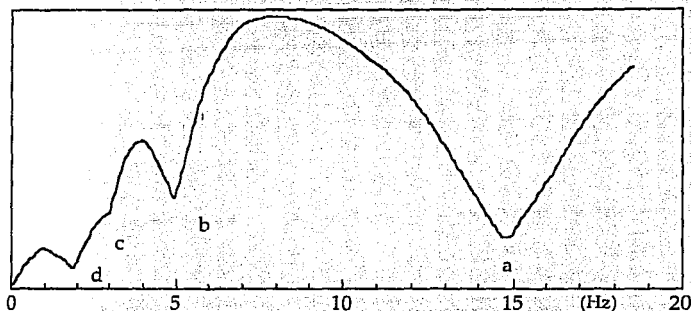


Figura 6.20.- Gráfica de integral vs.  $J^*$  para el protón  $H_{20a}$  de la estricnina. Los mínimos corresponden a: a)  $J_{p1} = 14.84$  Hz, b)  $a/3$ , c)  $a/5$ , y d)  $J_{p2} = 1.86$  Hz.

En algunos multipletes se obtuvieron resultados interesantes. Los más notables es la determinación de constantes de acoplamiento que no se resuelven en los multipletes experimentales. Este es el caso de los protones  $H_A$  y  $H_X$  del *m*-bromo nitro benceno; del  $H_{16}$ ,  $H_{13}$ ,  $H_{15a}$ ,  $H_{15b}$ ,  $H_{12}$  y  $H_8$  de la estricnina; y del protón  $H_M$  de la cotinina y nicotina.

Consideremos el multiplete del protón  $H_8$  de la estricnina, Figura 6.21. En el sólo se observa la presencia de una constante de acoplamiento, aunque podría notarse que las señales son un poco anchas. La gráfica de integral de este multiplete se presenta en la Figura 6.22, en ella se observa claramente la presencia de una constante de acoplamiento. El mínimo en e) corresponde a un artefacto, ya que no aparecen los mínimos correspondientes a sumas y restas de las constantes de acoplamiento. Este fenómeno se debe al ancho de la señal

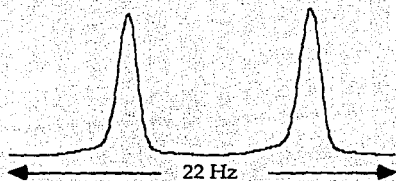


Figura 6.21.- Multiplete del protón  $H_8$  de la estricnina. Al parecer sólo se aprecia la presencia de una constante de acoplamiento.

Otro caso interesante es el protón  $H_{15a}$  de la estricnina, en donde se observan en el multiplete tres constantes de acoplamiento, de las cuales dos son muy similares. Al obtener la gráfica de integral, Figura 6.23, observamos que es posible resolver las tres constantes de acoplamiento que forman el multiplete. El mínimo en 0.49 Hz varía a medida que se incrementa el número de funciones  $\delta$  para convolucionarlo. Este mínimo también corresponde a un mínimo debido al ancho de las señales.

Con estos resultados se ha tratado de mostrar la utilidad de la duplicación de  $J$  en el dominio de las frecuencias como una herramienta que ha permitido no sólo la determinación de constantes de acoplamiento, sino también su uso como una herramienta para el descubrimiento de constantes de acoplamiento que no es posible determinarlas a simple vista o mediante cursores. También hay que apuntar la rapidez con la que este método trabaja, en cuestión de segundos es posible realizar los cálculos y las determinaciones de los multipletes que se desean trabajar.

Merece una mención especial las constantes de acoplamiento medidas para la estricnina. Los valores de las constantes de acoplamiento para esta molécula ha traído una polémica desde 1974, cuando Carter *et. al.*<sup>69</sup> reportaron por primera vez las constantes de acoplamiento de esta molécula. Por tal motivo decidimos medir sus constantes de acoplamiento.

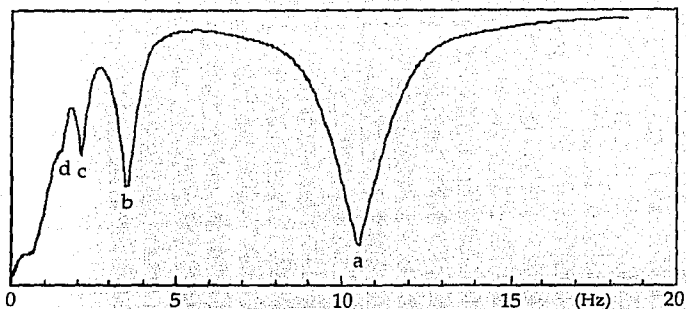


Figura 6.22.- Gráfica de la integral del multiplete del protón  $H_8$  donde se predice la existencia de la constantes de acoplamiento:  $J_p = 10.51$  Hz. Los mínimos corresponden a: a)  $J_p$ , b)  $a/3$ , c)  $a/5$ , d)  $a/7$ .

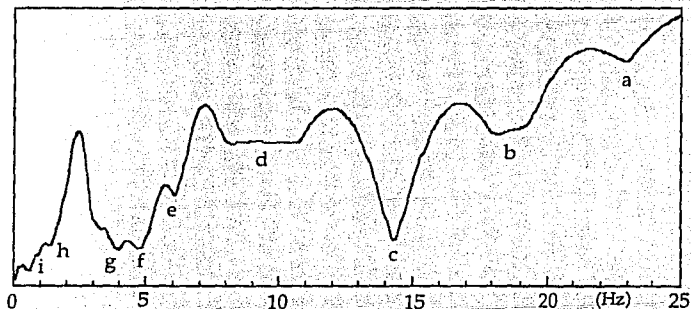


Figura 6.23.- Gráfica de integral del protón  $H_{15a}$  de la estircina. En ella se aprecian 4 constantes de acoplamiento:  $J_{p1} = 14.35$ ,  $J_{p2} = 4.76$ ,  $J_{p3} = 3.96$ . Los mínimos corresponden a: a)  $J_{p1} + J_{p2} + J_{p3}$ , b)  $J_{p1} + J_{p2}$  y  $J_{p1} + J_{p3}$ , c)  $J_{p1}$ , d)  $J_{p1} - J_{p2}$ ,  $J_{p1} - J_{p3}$  y  $a/3$ , e)  $b/3$ , f)  $J_{p2}$ , g)  $J_{p3}$ , h) e i) corresponden a los subarmónicos de g y f.

	H13	H15b	H15a	H20a	H8	H16	H23a	H23b	H12	H22
J <sub>1p</sub>	10.45	14.28	14.35	14.84	10.51	3.77	13.5*	13.92	8.41	6.3
J <sub>2p</sub>	3.34	1.8*	4.76	1.86	0.50	2.10	6.06	6.93	3.40	
J <sub>3p</sub>	3.09		3.96						3.28	

\*Mínimos muy anchos. Determinación imprecisa.

Tabla 6.3.- Constantes de acoplamiento en Hz para los protones alifáticos de la estricnina obtenidos por el método de duplicación de J en el dominio de las frecuencias.

En la Tabla 6.3 se muestran los valores de las constantes de acoplamiento determinadas a partir de los multipletes de la estricnina. La constante de acoplamiento J<sub>1p</sub> de H23a es un valor muy incierto, ya que el mínimo generado es muy ancho, además que la señal no es precisamente un doble de dobles. En la Tabla 6.4 se muestran los valores de las constantes de acoplamiento pasivas de los protones aromáticos de la estricnina. Estos resultados están de acuerdo con los reportados anteriormente<sup>69,70</sup>

	J <sub>12</sub>	J <sub>13</sub>	J <sub>14</sub>	J <sub>23</sub>	J <sub>24</sub>	J <sub>34</sub>
H1	7.30	1.42	*	-	-	-
H2	7.30	-	-	7.30	1.05	-
H3	-	1.42	-	7.30	-	8.04
H4	-	-	*	-	1.05	8.04

\*Mínimos muy anchos. Determinación imprecisa.

Tabla 6.4.- Constantes de acoplamiento en Hz de los protones aromáticos de la estricnina medidas mediante el método de duplicación en el dominio de las frecuencias.

Uno de los mejores ejemplos que se han encontrado se muestran en la Figura 6.24 en donde se observa la gráfica de integral del protón H<sub>A</sub> del *m*-bromo nitro benceno. La resolución de las constantes de acoplamiento a 7.99 y 8.27 Hz es muy buena, al igual que se observa la existencia de un mínimo a 0.35 Hz correspondiente a J<sub>AX</sub>. La factibilidad de medir esta constante se debe a la diferencia entre las constantes de acoplamiento mayores y la pequeña, además de la buena resolución obtenida en el espectro original.

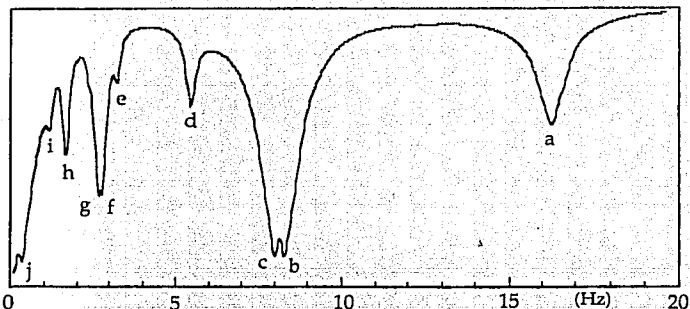


Figura 6.24.- Gráfica de integral del protón  $H_A$  del *m*-Bromo nitro benceno. Obsérvese la resolución de las dos constantes de acoplamiento a  $J_{p1} = 8.27$  y  $J_{p2} = 7.99$  Hz, al igual que la determinación de la constante de acoplamiento a  $J_{p3} = 0.35$  Hz. Los mínimos corresponden a: a)  $J_{p1} + J_{p2}$ , b)  $J_{p1}$ , c)  $J_{p2}$ , d)  $a/3$ , e)  $a/5$ , f)  $b/3$ , g)  $c/3$ , h)  $b/5$  y  $c/5$ , i)  $b/7$  y  $c/7$ , j)  $J_{p3}$ .

Cuando se trabaja con el multiplete del protón  $H_X$ , no es posible determinar la constante de acoplamiento de 0.35 Hz debido a la interferencia de las condiciones subarmónicas de las constantes de acoplamiento de 2.17 y 1.89. En la Tabla 6.5 se reportan los valores obtenidos para las constantes de acoplamiento del *m*-bromo nitro benceno. En la mayoría de los casos que fue posible la determinación por el método de duplicación de  $J$ , el error cometido es menor a 0.03 Hz.

	$J_{AM}$	$J_{AP}$	$J_{AX}$	$J_{MP}$	$J_{MX}$	$J_{PX}$
A	7.99	8.26	0.35	-	-	-
M	7.99	-	-	1.00	1.90	-
P	-	8.27	-	0.98	-	2.19
X	-	-	*	-	1.89	2.19

\*Constante no determinada por la anchura del mínimo.

Tabla 6.5.- Constantes de acoplamiento de *m*-bromo nitro benceno medidas con el método de duplicación de  $J$ .

En la Tabla 6.6 se presentan las constantes de acoplamiento obtenidas para el 2-furfural. Para esta molécula en DMSO no fue posible determinar las constantes pequeñas, ya que se encuentran ocultas dentro del ancho de la señal. La precisión de las determinaciones es menor o igual a 0.03 Hz.

	J <sub>AB</sub>	J <sub>AC</sub>	J <sub>AX</sub>	J <sub>BC</sub>	J <sub>BX</sub>	J <sub>CX</sub>
A	0.79	1.71	0.79	-	-	-
B	0.79	-	-	3.60	*	-
C	-	1.68	-	3.60	-	*
X	-	-	0.82	-	*	*

\*Mínimo no determinado por la anchura del mínimo.

Tabla 6.6.- Constantes de acoplamiento en Hz del 2-furfural en DMSO medidas con el método de duplicación de J.

En la Tabla 6.7 se presentan los valores obtenidos para la nicotina. En esta molécula tampoco fue posible la determinación de constantes de acoplamiento pequeñas. La precisión es similar a los casos anteriores

	J <sub>AM</sub>	J <sub>AP</sub>	J <sub>AX</sub>	J <sub>AZ</sub>	J <sub>MP</sub>	J <sub>MX</sub>	J <sub>MZ</sub>
A	7.86	4.78	*	0.38	-	-	-
M	7.83	-	-	-	1.69	2.25	0.47
P	-	4.79	-	-	1.70	-	-
X	-	-	0.85	-	-	2.23	-

\*No se logró la determinación debido al ancho del mínimo.

Tabla 6.7.- Constantes de acoplamiento en Hz la nicotina en CDCl<sub>3</sub> medidas con el método de duplicación de J en el dominio de las frecuencias.

En la Tabla 6.8 se presentan los datos obtenidos para la cotinina. Las conclusiones son similares a las reportadas anteriormente. Además, es posible con estos estudios encontrar la diferencia de las constantes de acoplamiento de moléculas muy parecidas, como lo son la nicotina y la cotinina.

	J <sub>AM</sub>	J <sub>AP</sub>	J <sub>AX</sub>	J <sub>AZ</sub>	J <sub>MP</sub>	J <sub>MX</sub>	J <sub>MZ</sub>
A	7.86	4.76	*	0.37	-	-	-
M	7.82	-	-	-	1.62	2.37	0.48
P	-	4.78	-	-	1.60	-	-
X	-	-	0.74	-	-	2.35	-

\*No se logró la determinación debido al ancho del mínimo.

Tabla 6.8.- Constantes de acoplamiento en Hz de la cotinina en CDCl<sub>3</sub> medidas con el método de duplicación de J en el dominio de las frecuencias.

Los valores reportados para el *m*-bromo nitro benceno, nicotina, cotinina y 2-furfural están de acuerdo con los valores reportados por otros métodos y por los métodos tratados anteriormente en este trabajo.

#### VI.4.- Deconvolución

Al estar trabajando con este método observamos que la duplicación de las constantes de acoplamiento, junto con la determinación de la misma era posible lograr la deconvolución del multiplete trabajado.

Esto es posible lograrlo si al multiplete duplicado con el verdadero valor de la constante de acoplamiento se le deconvoluciona con dos funciones delta en antifase separados mediante  $nJ_{\text{mínima}}$ , donde *n* es el número de funciones delta empleadas para la duplicación y  $J_{\text{mínima}}$  es el valor de la constante de acoplamiento encontrada como el valor real. Esta deconvolucion es necesaria hacerla sólo en el intervalo donde esta definido el multiplete duplicado, ya que en caso contrario se genera una señal duplicada  $2nJ_{\text{mínima}}$  con las señales extremas en antifase y una señal en el centro.

En la Figura 6.25 es posible observar el multiplete del protón  $H_A$  extraído del espectro del *m*-bromo nitro benceno. A esta señal se le determinó las constantes de acoplamiento. Se seleccionó la constante de acoplamiento de 8.27 Hz para efectuar la duplicación de la señal empleando 3 pares de funciones  $\delta$  en antifase. A esta señal duplicada se le deconvolucionó con una par de funciones  $\delta$  separadas por 49.62 Hz, pero sólo comprendiendo la región donde esta definido el multiplete duplicado. En esta forma se obtiene la señal deconvolucionada mediante este método.

Hay que hacer notar que no siempre es posible lograr la duplicación libre de ruido ya que cuando las señales no tienen la misma intensidad la anulación no es completa. Sin embargo, es posible efectuar la deconvolución en forma muy sencilla.

Una de las desventajas de este método es que al mismo tiempo que uno duplica la señal, duplica también el ruido provocando que el método sea muy sensible a la relación señal ruido. Al igual que en las determinaciones visuales, a medida que se incrementa el número de señales en el multiplete, aumenta la dificultad para la determinación de las constantes. Esto se explica por la posible superposición de las señales. También la proximidad de los valores de las constantes afecta la determinación.

Este método fue el más preciso y rápido para la determinación de constantes de acoplamiento, tanto activas como pasivas<sup>71</sup>. Además abre la posibilidad de emplearlo como un método para la deconvolución de las señales. Los requerimientos computacionales son mínimos comparados con otros métodos.

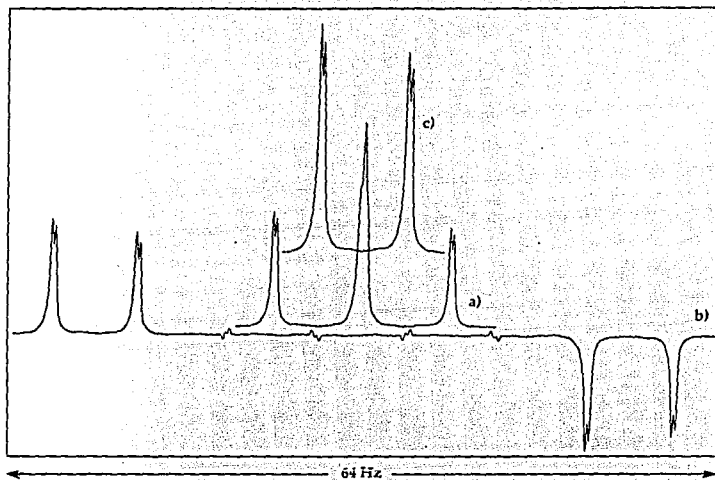


Figura 6.25.- Esquema de deconvolución del multiplete del protón  $H_A$  del *m*-bromo nitro benceno; a) señal original; b) duplicación con 3 funciones  $\delta$  con  $J^* = 8.27$  Hz; y c) deconvolución con  $J^* = 49.62$  Hz dentro de la región del espectro mostrado en b).



## Capítulo VII

### Discusión

#### VII.1.- Comparación de los Métodos para la Medición de constantes de Acoplamiento

Hasta el momento sólo hemos estudiado como es posible determinar constantes de acoplamiento por los métodos de duplicación de J en el dominio del tiempo, por el método del valor menor y por el método de la deconvolución por una función cuadrada y hemos explicado en todos los casos como trabajan. Sin embargo, no hemos encontrado los límites donde estos métodos son aplicables o razonablemente válidos. Tampoco hemos encontrado cuales son las constantes de acoplamiento más pequeñas que se puede medir, así como decir cual sería el mejor método en determinadas condiciones.

Para resolver estas incógnitas estudiamos los métodos empleando multipletes simulados para tener certeza de los valores de las constantes de acoplamiento del multiplete bajo estudio y la reproducibilidad en los datos. Para ello, trabajamos con espectros simulados y comparamos los resultados de las determinaciones de las constantes de acoplamiento con los tres métodos implementados en los capítulos V, VI y VII. Los espectros empleados tuvieron una resolución de 0.01 Hz por punto; para el método de duplicación se emplearon 32 funciones  $\delta$  y para la deconvolución se emplearon 65536 puntos complejos para realizar la transformada de Fourier en el dominio del tiempo. El ancho de la señal a la mitad de la altura se determinó por:

$$\nu_{1/2 \max} = 1 / (\pi T_2^*) \quad [7.1]$$

que se emplea para medir el ancho de la señal lorentziana a mitad de la altura. En todos los casos nos referiremos a ella solamente como el ancho de la señal.

Para seguir la misma lógica seguida a lo largo del trabajo, se mostraran primero los resultados obtenidos para la determinación de constantes de acoplamiento pasivas en señales sencillas y posteriormente en multipletes para observar el comportamiento de los diferentes métodos.

## VII.2.- Constantes de Acoplamiento Pasivas

La importancia de encontrar un método que permita la determinación de las constantes de acoplamiento es la rapidez con la que se obtienen las señales en fase, ya sea con experimentos normales en una dimensión, o a partir de trazos de los experimentos TOCSY.

Primeramente estudiaremos el comportamiento de los tres métodos desarrollados cuando el ancho de la señal varía.

### VII.2.1.- Dependencia con el Ancho de la Señal

En muchos experimentos de RMN, la determinación de las constantes de acoplamiento se ve limitada por el ancho de la señal. Conocer los límites del método hasta donde es posible determinar las constantes de acoplamiento nos darán una idea global de los alcances del mismo. Para ello se simuló espectros con una constante y se determinó empleando los tres métodos a partir de los mismos parámetros a medida que se incrementaba el ancho de la señal. La constante de acoplamiento medida es irrelevante, ya que la precisión en la determinación dependerá de la relación ancho de la señal y el valor de  $J$ , Figura 7.1. En esta gráfica se muestra como el método del Valor menor rápidamente comienza a obtener valores que se alejan del valor real. Cuando el cociente es del orden de 0.58, ya no es posible determinar la constante de acoplamiento por este método.

Para el método de  $t$ -decon hay varias cosas que mencionar. Cuando se incrementa el ancho de la señal, el número de mínimos producidos por el ruido de la inclusión de la función cuadrada provoca que se generen una gran cantidad de mínimos locales en la región donde se encuentra el mínimo que corresponde a la constante de acoplamiento. Con el valor del ancho de la señal entre  $J$  de 0.63 Hz, comienzan a aparecer mínimos que se van desplazando cada vez más a valores mayores que se prestan a confusiones y a cierta fluctuación de los valores obtenidos. A pesar de ello, siempre es posible encontrar un mínimo que se aproxime al valor real, lo cual generará que la curva se parezca al obtenido por el método de duplicación de  $J$ . En la Figura 7.1 siempre se gráfico el mínimo en la región por donde se espera el valor de la constante de acoplamiento, ya que es el único criterio que *a priori* el investigador

tiene para poder determinar las constantes de acoplamiento desconocidas. En esta forma, aparentemente este método no es mejor que la determinación normal midiendo los máximos en las señales.

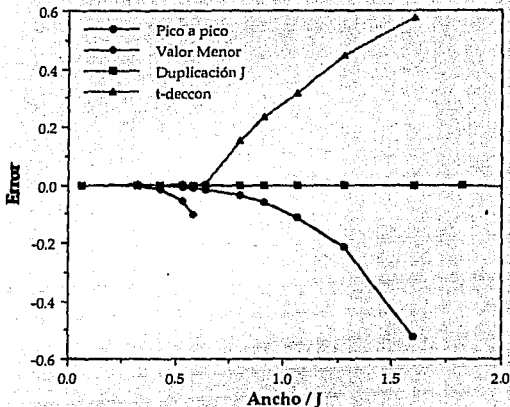


Figura 7.1.- Gráfica del error cometido en las simulaciones como función del cociente del ancho de la señal y el valor de J.

El método de duplicación de J resulto ser el mejor de todos para la medición de constantes de acoplamiento en señales dobles, ya que es posible lograr la determinación de las constantes a valores muy grandes de relación ancho de la señal / J. Por observaciones sucesivas del espectro generado y de la gráfica de la integral, se concluye que el método es muy confiable antes de una relación de 2.00, ya que después de este valor el método genera varios mínimos. Por coincidencia, uno de estos mínimos se puede asignar al valor de J, pero no tendrá relación con la constante de acoplamiento que se requiere determinar.

Esta forma de estudio sólo contempla señales dobles, para estudiar sistemas que tiendan un poco más a la realidad proseguiremos nuestro estudio con multipletes en fase de sistemas de dos constantes de acoplamiento.

#### VII.2.2.- Doble de Dobles.

En esta sección estudiamos dos sistemas doble de doble, uno con constantes de acoplamiento de  $J_{p1} = 5.0$  y  $J_2 = 2.0$  Hz, ver Figura 7.2. Primeramente observemos que es posible superponer con sus respectivas dimensiones las mediciones de ambas constantes de acoplamiento. Sin embargo, la determinación de la constante de acoplamiento de 5.0 Hz por el método convencional muestra un comportamiento diferente debido a la desaparición de las señales de 2.0 Hz; esto provoca que la determinación de la constante de 5.0 Hz caiga abruptamente y posteriormente recupere la tendencia original.

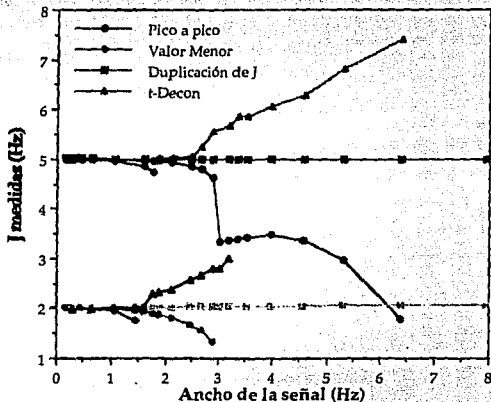


Figura 7.2.- Medición de  $J_{p1} = 5.00$  y  $J_{p2} = 2.00$  Hz a medida que se incrementa el ancho de la señal.

El método del valor menor, al igual que en el caso de una sola constante de acoplamiento, rápidamente deja de ser capaz de determinar las constantes. El método de t-decon sigue la misma tendencia que para el caso de una sola constante de acoplamiento, no se ve afectado por la presencia de una segunda constante.

Nuevamente el método de duplicación de J en el dominio del tiempo es capaz de medir las dos constantes de acoplamiento con variaciones muy pequeñas o nulas a lo largo de la variación del ancho de la señal.

Al estar trabajando con los diferentes multipletes observamos que existen varias señales que parecen tripletes, pero que los métodos determinan dos constantes en vez de una sola. Para ello estudiamos el sistema con constantes:  $J_{p1} = 5.0$  y  $J_{p2} = 4.0$  Hz, ver Figura 7.3.

Para este sistema, la medición de las constantes de acoplamiento se aleja rápidamente de los valores reales convergiendo en el promedio de ambas constantes a partir del cual comienza a decaer como si se tratara de una sola constante de acoplamiento. Nuevamente el método del valor menor decae y debido a la proximidad de ambas constantes deja rápidamente de medir la constante de 5.0 Hz y prosigue un comportamiento de decaimiento normal del método.

El método de t-decon logra diferenciar muy bien las dos constantes de acoplamiento hasta que nuevamente se observa la sobrestimación característica para este método.

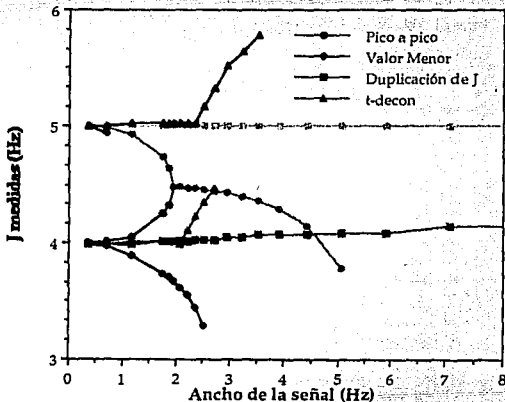


Figura 7.3.- Medición de constantes de acoplamiento por: el método convencional, el del valor menor, duplicación de J en el dominio de las frecuencias y t-decon para el sistema  $J_{p1} = 5.00$  y  $J_{p2} = 4.00$  Hz.

El método de duplicación de J es el que observa un intervalo mayor en donde es posible determinar con precisión las constantes, sin embargo hay un pequeño aumento en el valor de  $J_{p2}$  a medida que se aumenta el ancho de la señal. Lo

sorprendente de este tipo de determinaciones es que el método de duplicación de  $J$  extrae el valor de las constantes por la información contenida en el ancho de la señal. Las determinaciones son factibles siempre y cuando se pueda observar que la señal bajo estudio no parece una señal sencilla, con sólo verse el posible desdoblamiento la determinación es factible y con buena precisión.

Prosigamos ahora con la medición de constantes de acoplamiento pequeñas.

### VII.2.3.- Constantes de Acoplamiento Pequeñas

Los cálculos anteriores se realizaron manteniendo los acoplamientos constantes, los puntos del espectro en función del tiempo y de las frecuencias constantes y siempre se uso la misma región. En esta sección los cálculos se realizaron en una forma diferente. Los puntos en ambos espectros se mantuvieron constantes, pero esta vez en lugar de variar el ancho de la señal, se mantuvo constante y lo que se varió fue las constantes de acoplamiento.

Esta sencilla modificación no altera apreciablemente los resultados para las determinaciones por el método del valor menor y la medición de la distancia pico a pico; la duplicación de  $J$  ahora muestra un límite a 0.3; mientras que el método de t-decon es la que muestra cambios más apreciables, ver Figura 7.4.

La determinación mediante la medición de los máximos de la señal no es posible hacerla a valores menores de  $0.5 J /$  (ancho de la señal). Para el método del valor menor este valor ocurre antes,  $1.8 J /$  (ancho de la señal). Para estos sistemas el método de t-decon es mejor que la medición directa de las señales y se observa un error positivo. El método de duplicación de  $J$  en el dominio del tiempo, nuevamente es el que permite las mediciones más precisas aunque con valores menores de la relación  $J/\text{ancho de señal} = 0.4$  ya no es posible lograr una determinación.

Para el método del valor menor queda poco que decir, este método no es el más adecuado para la medición de constantes de acoplamiento en sistemas en fase.

La medición de constantes de acoplamiento por el método de t-decon se comporta muy parecido al método convencional, sólo que siempre encuentra valores sobrestimados. Su utilidad principal radica en la determinación de constantes de acoplamiento pequeñas y en sistemas donde dos o mas constantes tienen valores parecidos, ya que es posible diferenciarlas. Las constantes de acoplamiento pequeñas se describen mejor que las grandes, ya que la frecuencia de repetición es mayor. Esto

provoca que las constantes de acoplamiento mayores tengan un incremento abrupto después de un determinado valor.

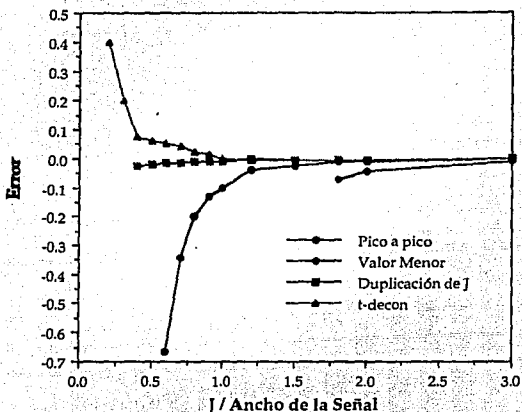


Figura 7.4.- Error cometido en la determinación de las constantes de acoplamiento pasivas al disminuir el valor de J.

Con este estudio podemos concluir que para la medición de constantes de acoplamiento de señales en fase el mejor método es el de duplicación de J en el dominio de las frecuencias. Con ella es posible alcanzar la mejor precisión en constantes pequeñas. También es posible lograr la mejor precisión cuando los valores de ancho de la señal /  $J \leq 2.0$ .

Prosigamos nuestro estudio para los sistemas de constantes de acoplamiento en antifase.

### VII.3.- Constantes de Acoplamiento Activas

Los multipletes en antifase han mostrado ser sistemas confiables, cuando su complejidad lo permite, para la determinación de las constantes de acoplamiento activas. Pero, ¿qué se puede decir sobre los métodos propuestos para su medición?

Para ello iniciamos el estudio de la medición de constantes de acoplamiento activas cuando se modifica el ancho de la señal y se mantienen constantes los acoplamientos.

### VII.3.1.- Dependencia con el Ancho de la Señal

En muchos de los experimentos de transferencia de polarización y, recientemente, con el empleo de técnicas de detección inversa es posible obtener señales en antifase, pero el ancho de la señal es apreciable por las condiciones de no giro requeridas por el experimento.

Por ello, la Figura 7.5 muestra el comportamiento de los métodos bajo estudio en la determinación de constantes de acoplamiento activas cuando se modifica el ancho de la señal. Nuevamente, es solo necesario obtener una gráfica y generalizarla para todas las constantes cuando se trata de una sola constante.

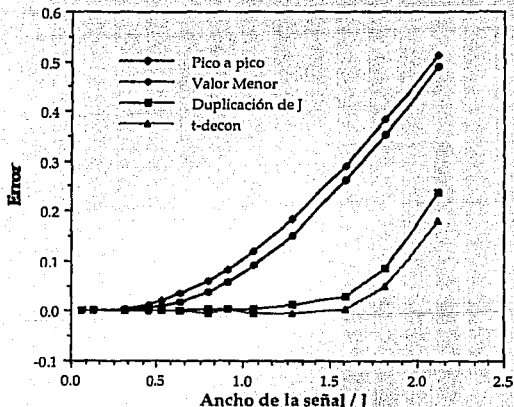


Figura 7.5.- Determinación de las constantes de acoplamiento en función del (ancho de la señal / J) para los métodos estudiados.

El método de medición de pico a pico se realizó mediante la búsqueda de los valores máximos y mínimos y obteniendo la diferencia entre ellos.



Para este tipo de sistemas el método del valor menor obtiene mejores resultados que para las constantes de acoplamiento activas, sin embargo, aún sigue dando resultados no muy aceptables siendo la determinación convencional mejor que este método.

Para el método de duplicación de  $J$  se obtienen que los resultados son más precisos. El error cometido en la determinación es menor al 5% para valores menores de 1.6 de relación (ancho de señal /  $J$ ).

El método de  $t$ -decon es el que mejor resultados da. Para este método el intervalo de precisión mejor del 5% es hasta 1.8. Sin embargo es el que obtiene mayores variaciones alrededor de 0% de error.

Prosigamos nuestro estudio para sistemas no tan simples, con más de una constante de acoplamiento en el multiplete.

### VII.3.2.- Sistemas Complejos en Antifase

Iniciemos primero con la comparación de las mediciones de constantes de acoplamiento con una sola constante de acoplamiento pasiva.

Para ello estudiemos el caso cuando  $J_a = 5.00$  y  $J_p = 2.00\text{Hz}$ , ver Figura 7.6. En este sistema esperamos que a medida que se incrementa el ancho de la señal,  $J_p$  desaparezca primero. A ello se debe que la medición mediante los métodos convencionales den un error mayor, lo cual está representado por el salto abrupto alrededor de 0.5. Pero a medida que las líneas se confunden completamente retorna al comportamiento de la medición de una sola constante.

Los tres métodos en estudio tienen comportamientos similares que cuando se mide la constante activa sencilla. Hay que hacer notar que el método del valor menor, a pesar de ser el más impreciso, se evita el problema con la medición de dos constantes de acoplamiento muy parecidas.

Tratemos ahora el caso de un sistema con  $J_a = 13.00$ ,  $J_{p1} = 5.00$  y  $J_{p2} = 2.00\text{ Hz}$ , ver Figura 7.7. El comportamiento en las mediciones en este sistema no varía con respecto al anterior. Nuevamente se encuentra una discontinuidad cuando la segunda constante de acoplamiento desaparece ya que la primera no es observable. Las tendencias en los métodos son similares a las obtenidas con el sistema anterior. Solo hay que hacer

notar que el método de t-decon y el método de duplicación de J se comportan en forma muy similar para estos sistemas.

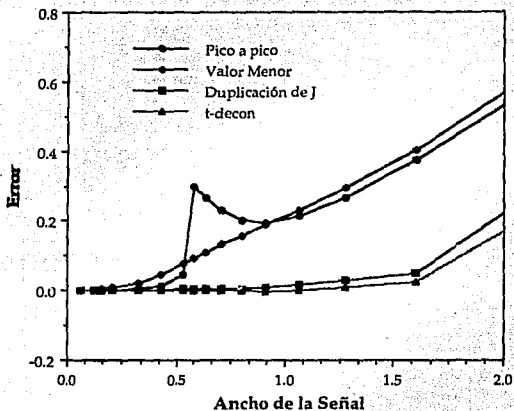


Figura 7.6.- Gráfica del error cometido en las determinaciones por los diferentes métodos al medir  $J_a = 5.00$  con  $J_p = 2.00$  Hz.

Por último consideremos cuando las constantes de acoplamiento tienen valores pequeños.

### VII.3.3.- Constantes de Acoplamientos Pequeñas

Para las constantes de acoplamiento activas pequeñas seguimos el mismo procedimiento que para las constantes de acoplamiento pasivas. Para este caso esperabamos obtener mediciones más precisas, lo cual no fue del todo cierto.

En la Figura 7.8 se muestran los resultados cuando se varió la constante de acoplamiento manteniendo constante el ancho de la señal y se calcula el error cometido en la determinación.

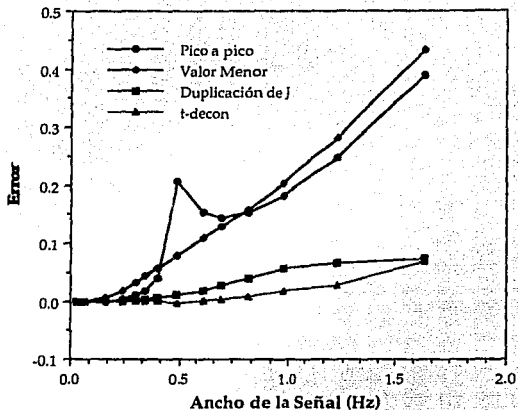


Figura 7.7.- Determinación de las constantes de acoplamiento para el sistema:  $J_a = 13.00$ ,  $J_{p1} = 5.00$  y  $J_{p2} = 2.00$  Hz.

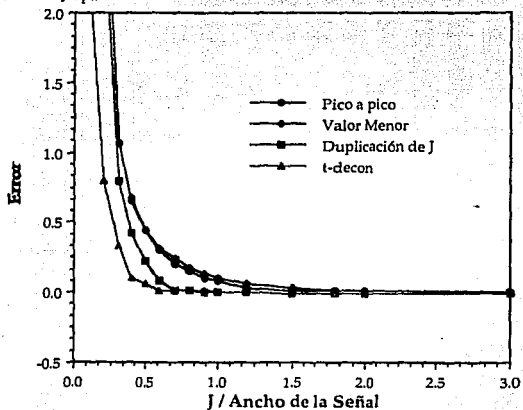


Figura 7.8.- Error en las determinaciones de  $J_a$  a medida que va disminuyendo el cociente  $J /$  (ancho de la señal).

En esta gráfica es posible apreciar que la variación entre el método del valor menor y la medición mediante la diferencia entre el pico más intenso y el menor dan resultados similares. Es posible observar ciertas ventajas al emplear el método de duplicación de J en el dominio de las frecuencias, la cual se pierde a medida que se va aproximando a valores pequeños por la aniquilación que va sufriendo la señal de antifase. El método de t-decon es el que más tarda en dar valores alejados del valor real, aunque la diferencia no es tan marcada como en los casos vistos anteriormente para los diferentes métodos.

Con estos resultados podemos concluir que para la medición de constantes de acoplamiento activas los métodos de duplicación de J en el dominio de las frecuencias y t-decon son métodos muy similares. Estrictamente hablando, se podría pensar que el método t-decon es el mejor para la medición de este tipo de constantes de acoplamiento, pero las diferencias obtenidas no son muy grandes entre los métodos y hay que considerar que el ruido obtenido por este método puede interferir en las mediciones precisas de las constantes.

Con todo lo anterior podemos resumir ciertas conclusiones que ya se han planteado a lo largo del trabajo:

El método del valor menor para la medición de las constantes de acoplamiento no dará un mejor valor que por el método obtenido mediante la medición directa en el espectro. Sin embargo, en ciertas condiciones de complejidad en el multiplete es conveniente emplearlo, aunque se espera que el error sea grande. La gran ventaja de este método es la rapidez con la que se pueden determinar las constantes de acoplamiento.

El método de t-decon es un método preciso para la determinación de las constantes de acoplamiento, pero el tiempo requerido para lograr la determinación implica varios minutos, dependiendo de la precisión requerida y del número de puntos empleado para efectuar las múltiples transformadas de Fourier. Otra desventaja más es la inclusión de ruido en las gráficas de integral lo cual en ciertos casos podría alterar la determinación en forma significativa. A pesar de ello, puede emplearse como un método que complementa al método de duplicación de J.

El método de duplicación de J en el dominio de las frecuencias es con mucho el método más viable, rápido de implementar y usar y el que en la mayoría de los casos ofrece la mejor precisión en las determinaciones. De los tres es el más recomendable. Además de que es posible descubrir acoplamientos que están ocultos en las señales y de tener la gran ventaja de poder confirmar que la determinación realizada fue la correcta.

Como ultimo ejemplo se muestra en la Figura 7.9 tres multipletes de la estricnina donde es casi imposible medir las constantes de acoplamiento escondidas en el ancho de la señal; sólo es perceptible la presencia de las constantes por la forma de la señal. El método de duplicación de J en el dominio de las frecuencias es capaz de extraerlas y de medirlas con buena precisión.

### VII.5.- Comparación con Resultados de Estructuras de Rayos X.

Por último, dado que el método de duplicación de J es uno de los métodos más precisos para la determinación de constantes de acoplamiento activas, haremos un ejercicio de comparación con los resultados obtenidos por espectroscopia de rayos X<sup>72</sup> y los resultados que se mostraron en el Capítulo VI de la estricnina para la correlación de acoplamiento  $^3J(^{13}\text{C}, \text{H})$ .

Cuando uno se ha dedicado un cierto periodo a medir constantes de acoplamiento, surge la pregunta: ¿por qué queremos medir estos parámetros en forma precisa?

Las respuestas han sido dadas desde finales de los años 50 por Karplus y estudios posteriores<sup>28,29</sup>. Se ha encontrado que las constantes de acoplamiento entre  $^{13}\text{C}$  e hidrógeno a tres enlaces de distancia,  $^3J(^{13}\text{C}, \text{H})$ , depende principalmente del ángulo diedro formado. Esto ha traído como consecuencia el desarrollo de relaciones semi-empíricas para relacionar dichos parámetros.

El primero en proponer una relación semi-empírica para la medición de los ángulos diedros y las constantes de acoplamiento entre  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  fue Wasylishen<sup>73</sup>, el cual encuentra una relación empleando como modelo la molécula del propano. La relación es:

$$^3J(^{13}\text{C}, \text{H}) = 4.26 - 1.00 \cos\phi + 3.56 \cos 2\phi \quad [72]$$

donde  $\phi$  es el ángulo diedro entre los núcleos.

En 1982 Kessler<sup>74</sup> propuso una segunda relación entre el ángulo diedro y  $^3J(^{13}\text{C}, \text{H})$  considerando al norbornano como la molécula patrón:

$$^3J(^{13}\text{C}, \text{H}) = 7.66 \cos^2\phi - 0.90 \cos\phi - 0.02 \quad [73]$$

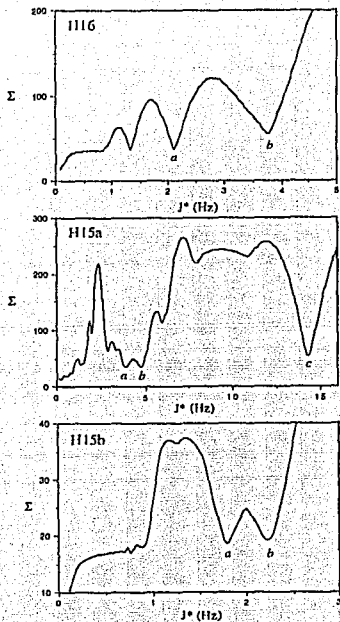
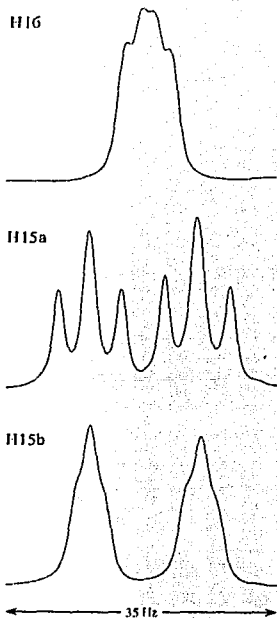


Figura 7.9.- Multipletes protónicos de la estricnina examinados a partir del método de duplicación de J en el dominio de las frecuencias y las gráficas de integral de estos multipletes, donde se observa la medición de constantes de acoplamiento que no pudieron ser resueltas.

Se compararon los resultados obtenidos con los valores teóricos de las ecuaciones [7.2] y [7.3] y los resultados obtenidos por el método de duplicación de J.

Esta comparación se muestra en la Figura 7.9. La variación entre los valores teóricos con nuestros valores tienen diferentes fuentes de error; además de los múltiples errores experimentales, la comparación no es del todo formal por el uso de moléculas diferentes.

Karplus planteó la necesidad de considerar diferentes contribuciones a las constantes de acoplamiento, como la dependencia del tipo de enlace y la contribución de los sustituyentes diferentes a carbono, y no sólo la dependencia del ángulo diedro, que como se muestran para los datos a través de dobles enlaces, no corresponden con los modelos comparados, este tipo de ángulo se muestra como una cruz en la Figura 7.10. La importancia de estas contribuciones se observa cuando se consideran las constantes de acoplamiento que se establecen a través del doble enlace de los carbonos C<sub>21</sub> y C<sub>22</sub>. Los errores observados en la predicción de estos parámetros son apreciables.

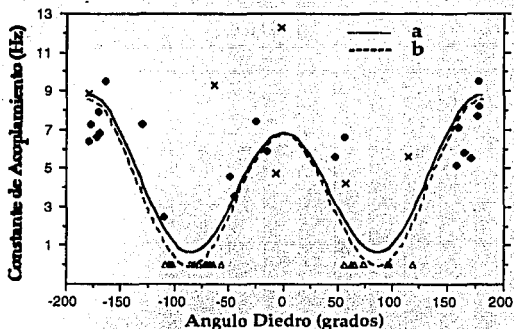


Figura 7.10.- Comparación de  $^3J(^{13}\text{C}, \text{H})$  de la estricnina obtenidos experimentalmente por el método de Duplicación de J en el dominio de las frecuencias y el ángulo diedro obtenido mediante datos de rayos X y los datos teóricos predichos para la molécula de propano, a) línea continua; y el norbornano, b) línea discontinua. Los valores mostrados en cruz representan aquellos valores de constantes de acoplamiento que pasan a través del doble enlace.

Sin embargo, a pesar de que parece que los valores obtenidos no se ajustan correctamente a la curva teórica, es conveniente decir que sí es un buen ajuste, ya que las moléculas usadas como modelo no son las mejores para compararlas con la molécula de la estricnina.

Existen muchos trabajos tanto teóricos como prácticos en la correlación de constantes de acoplamiento con la estructura molecular, las referencias sobre las correlaciones entre  $^3J(^{13}\text{C}, \text{H})$  y conformación han sido obstaculizados por la carencia de datos experimentales<sup>75</sup>. Dos son los principales motivos de esta carencia: 1.- No contar con las secuencias de pulsos sensibles para la detección de las constantes de acoplamiento a larga distancia de estos sistemas; y 2.- La carencia de métodos que permitan la extracción de las constantes de acoplamiento en forma precisa.

La mayoría de los experimentos de transferencia de polarización están modulados por funciones seno de las constantes de acoplamiento responsables de dicha transferencia. Esto hace que si al mismo tiempo se esta tratando de observar una constante de acoplamiento grande y otra pequeña, la amplitud de la mayor no permite observar la constante de acoplamiento pequeña. Para poder observar las constantes de acoplamiento pequeñas es necesario optimizar los parámetros del experimento para lograrlo, pero los resultados no tendrán la misma relación señal ruido que cuando se optimizan para constantes de acoplamiento mayores.

Con los resultados de este último inciso podemos concluir lo siguiente:

El experimento propuesto por Blechta *et al.* obtiene resultados bastante sensibles para poder determinar las constantes de acoplamiento a larga distancia y que están de acuerdo con los resultados teóricos disponibles;

El metodo de Duplicación de J calcula las constantes de acoplamiento activas con la precisión suficiente que permitiría el estudio de las variaciones teóricas de estos parámetros.

Con estos resultados es posible plantearse ahora el estudio de la inclusión de diferentes términos en la ecuación de Karplus que permitan la predicción mas precisa de las constantes de acoplamiento. Todo esto ayudará a comprender mejor la relación de las constantes de acoplamiento con la estructura molecular.



## Bibliografía

- 
- 1.- R. Freeman and J. B. Robert; "A Brief History of High Resolution NMR"; *NMR Basic Principles and Progress* 25 (1993) 1-16.
  - 2.- W. Gerlach and O. Stern; *Z. Phys.* 8 (1924) 741.
  - 3.- W. Pauli; *W. Naturwiss* 12 (1921) 85.
  - 4.- F. Bloch, W. W. Hansen and M. E. Packard; *Phys. Rev.* 69 (1946) 127.
  - 5.- E. M. Purcell, H. C. Torrey and R. V. Pound; *Phys. Rev.* 69 (1946) 37.
  - 6.- W. G. Proctor and F. C. Yu; *Phys. Rev* 84 (1951) 1246.
  - 7.- J. T. Arnold, S. S. Dharmati and M. E. Packard; *J. Chem. Phys.* 19 (1951) 507.
  - 8.- E. L. Hanh and D. E. Maxwell; *Phys. Rev.* 84 (1951) 1246.
  - 9.- H. S. Gutowsky, D. W. McCall and C. P. Slichter; *Phys. Rev.* 84 (1951) 589.
  - 10.- R. R. Ernst and W. A. Anderson; "Application of Fourier Transform Spectroscopy to Magnetic Resonance"; *Rev. Sci. Instr.* 37 (1966) 93.
  - 11.- J. Jeener; Ampere Summer School, Basko Polje, Yugoslavia, 1971.
  - 12.- H. Oschkinat, C. Griesinger, P. J. Kraulis, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, A. M. Gronenborn and G. M. Clore; *Nature (London)* 332 (1988) 374.
  - 13.- G. A. Morris and R. Freeman; *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 760.
  - 14.- R. Freeman; "Selective Excitation in High-Resolution NMR"; *Chem. Rev.* 91 (1991) 1397-1412.
  - 15.- a) P. Xu, X. L. Wu and R. Freeman; "Proton NMR Spectra without Spin-Spin Splittings"; *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 3596-3597.  
b) H. Barkhuysen, R. de Beer, W. M. Bovée and D. van Ormondt; *J. Magn. Reson.* 61 (1985) 465.
  - 16.- F. Bloch; *Phys. Rev.* 94 (1954) 496.
  - 17.- J. W. Hennel and J. Klinowski; "Fundamentals of Nuclear Magnetic Resonance" Longman Scientific & Technical, England, 1993.
  - 18.- X. L. Wu; "New Techniques in Nuclear Magnetic Resonance" Tesis Doctoral, Universidad de Cambridge, Inglaterra, 1991.

- 
- 19.- P. Xu; "New Methods in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy" Tesis Doctoral, Universidad de Cambridge, Inglaterra, 1992.
- 20.- M. Goldman; "Quantum Description of High-Resolution NMR in Liquids", Clarendon Press, Oxford, 1988.
- 21.- O. W. Sørensen, G. W. Eich, M. H. Levitt, G. Bodenhausen and R. R. Ernst; *Prog. NMR Spectrosc.* **16** (1983) 163.
- 22.- W. P. Aue, E. Bartholdi and R. R. Ernst; *J. Chem. Phys.* **64** (1976) 2229.
- 23.- R. Freeman and G. A. Morris; *Bull. Magn. Reson.* **1** (1979) 5.
- 24.- A. Bax and R. Freeman; "Investigation of Complex Networks of Spin-Spin Coupling by Two-Dimensional NMR" *J. Mag. Res.*, **44** (1981) 542-561.
- 25.- W. R. Croasmun and R. M. K. Carlson Ed.; "Two-Dimensional NMR Spectroscopy: Applications for Chemists and Biochemists" *Methods in Stereochemical Analysis V. 9*, New York, VCH Publishers Inc., 1987.
- 26.- V. Blechta, F. del Río-Portilla and R. Freeman; "Long-Range Carbon-Proton Couplings in Strychnine"; *Magn. Reson. Chem.* **32** 134-137 (1994).
- 27.- M. Karplus; *J. Chem. Phys.* **11** (1959) 11.
- 28.- V. F. Bystrov; *Prog. NMR Spectrosc.* **2** (1976) 10.
- 29.- J. M. LeParco, L. McIntyre and R. Freeman; "Accurate Coupling Constants from Two-Dimensional Correlation Spectra by J Deconvolution"; *J. Magn. Reson.* **97** (1992) 553-67.
- 30.- R. Freeman and L. McIntyre; "Fine Structure in NMR Correlation Spectroscopy"; *Isr. J. Chem.* **32** (1992) 231-244.
- 31.- Y. G. Biraud; *Rev. Phys. Appl.* **11** (1976) 203.
- 32.- H. Oschkinat and R. Freeman; "Fine Structure in Two-Dimensional NMR Correlation Spectroscopy"; *J. Magn. Reson.* **60** (1984) 164.
- 33.- J. J. Titman and J. Keeler; "Measurements of Homonuclear Coupling Constants from NMR Correlation Spectra"; *J. Magn. Reson.* **89** (1990) 640-6.
- 34.- U. Piantini, O. W. Sørensen and R. R. Ernst; *J. Am. Chem. Soc.* **104** (1982) 6800.
- 35.- A. J. Shaka and R. Freeman; *J. Magn. Reson.* **51** (1989) 169.
- 36.- L. Braunschweiler and R. R. Ernst; *J. Magn. Reson.* **53** (1983) 521.

- 
- 37.- P. Huber, C. Zwaalen, S. J. F. Vincent and G. Bodenhausen; "Accurate Determination of Scalar Couplings by Convolution of Complementary Two-Dimensional Multiplets"; *J. Magn. Reson.* **A103** (1993) 118-121.
- 38.- L. McIntyre; "New Techniques in Nuclear Magnetic Resonance", Tesis Doctoral, Universidad de Cambridge, Inglaterra, 1992.
- 39.- L. McIntyre and R. Freeman; "Accurate Measurement of Coupling Constants by J Doubling" *J. Magn. Reson.* **96** (1992) 425-31.
- 40.- A. A. Bothner-By and J. Dadok; *J. Magn. Reson.* **72** (1987) 540.
- 41.- P. Huber and G. Bodenhausen; "Simplification of Multiplets by Deconvolution in One- and Two-Dimensional NMR Spectra"; *J. Magn. Reson.* **A102** (1993) 81-89.
- 42.- P. Huber and G. Bodenhausen; "Bidirectional Deconvolution, an Improvement for the Stepwise Simplification of Multiplets"; **A104** (1993) 96-102.
- 43.- R. M. Bracewell; "The Fourier Transform and its Applications"; New York, McGraw-Hill, 1965.
- 44.- G. J. Daniell and P. J. Hore; "Maximum Entropy and NMR - A New Approach"; *J. Magn. Reson.* **84** (1989) 515-536.
- 45.- M. A. Delsuc and G. C. Levy; "The Application of Maximum Entropy Processing to the Deconvolution of Coupling Patterns in NMR"; *J. Magn. Reson.* **76** (1988) 306-315.
- 46.- J. A. Jones, D. S. Grainger, P. J. Hore and G. J. Daniell; "Analysis of COSY Cross Peaks by Deconvolution of the Active Splittings"; *J. Magn. Reson.* **A101** (1993) 162-169.
- 47.- J. Hadamard; *Bull. Sci. Math.* **17** 240 (1893).
- 48.- R. Freeman comunicación personal.
- 49.- H. Kessler, C. Griesinger, J. Zarboch and H. R. Loosli; *J. Magn. Reson.* **57** (1984) 331-5.
- 50.- E. Kupče and R. Freeman; *J. Magn. Reson.* **A105** (1993) 234.
- 51.- D. A. Craig and G. E. Martin; "Proton Double Quantum and Relayed Proton Double Quantum Coherence Two-Dimensional NMR Mapping of Proton-Proton Connectivity Networks in Natural Products: a Model study of Strychnine"; *J. Nat. Prod.* **49** (1986) 456-465.

- 
- 52.- A. Abragam; "The Principles of Nuclear Magnetism"; Oxford, Clarendon, 1961.
- 53.- R. Freeman and W. A. Anderson J. Chem Phys. 37 (1962) 85.
- 54.- R. Freeman and W. A. Anderson; J. Chem Phys. 37 (1962) 2053.
- 55.- R. Freeman; "A Handbook of Nuclear Magnetic Resonance" First Ed. England, Longman Scientific & Technical, 1987.
- 56.- F. Bloch and A. Siebert; Phys. Rev. 57 (1940) 522.
- 57.- A. E. Derome; "Modern NMR Techniques for Chemistry Research" 1st Ed. Pergamon Press, England, 1988.
- 58.- F. del Río Portilla and R. Freeman; "Measurement of Spin Coupling Constants by Decoupling and Reconvolution"; J. Magn. Reson. A104 (1993) 358-362.
- 59.- X. L. Wu, P. Xu and R. Freeman; "NMR Three-Spin Coherence; Combination Lines and Triple-Quantum Transitions"; J. Magn. Reson. 88 (1991) 417-424.
- 60.- T. Nishida comunicación personal.
- 61.- R. A. Hoffman, B. Gestblom, S. Gronowitz and S. Forsén; "The Signs of the Side-Chain Spin Couplings in Furanaldehydes as Determined by Nuclear Magnetic Triple Resonance"; J. Mol. Spect. 11 (1963) 454-64.
- 62.- R. Freeman and R. C. Jones; "High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance by Fourier Transformation"; J. Chem. Phys. 52 (1970) 465-6.
- 63.- R. A. Hoffman and S. Gronowitz; Arkiv. Kemi. 16 (1960) 563.
- 64.- A. Bax and R. Freeman; "Enhanced NMR Resolution by Restricting the Effective Sample Volume"; J. Magn. Reson. 37 (1980) 177-81.
- 65.- F. del Río Portilla and R. Freeman; "Accurate Determination of Small Nuclear Magnetic Resonance Coupling Constants from Decoupling Experiments"; J. Chem. Soc. Faraday Trans. 89 (1993) 4275-4278.
- 66.- M. L. Woodley and R. Freeman; "Decoupled Proton NMR-Spectra"; J. Magn. Reson. A109 (1994) 103-112.
- 67.- P. Huber; Tesis Doctoral, Universidad de Lausanne, Suiza, 1993.
- 68.- F. del Río Portilla and R. Freeman; "A Fast Algorithm for the Deconvolution of Spin-Spin Splittings"; J. Magn. Reson. A108 (1994) 124-129.

---

69.- J. C. Carter, G. W. Luther and T. C. Long; "Proton Magnetic Resonance Spectra and Assignments of Strychnine and Selective Deuterated Strychnine"; *J. Magn. Reson.* **15** (1974) 122-131.

70.- W. J. Chazin, L. D. Colebrook and J. T. Edward; "Relaxation Pathways Analysis by  $^1\text{H}$  spin-lattice relaxation and Nuclear Overhauser effect difference Measurements"; *Can. J. Chem.* **61** (1983) 1749-1755.

71.- F. del Río Portilla, V. Blechta and R. Freeman; "Measurement of Poorly-Resolved Splittings by J-Doubling in the Frequency Domain"; *J. Magn. Reson. en prensa.*

72.- A. Mostad; *Acta Chem. Scand.* **B39** (1985) 705.

73.- R. Wasylshen and T. Schäfer; *Can. J. Chem.* **50** (1972) 2719.

74.- H. Kessler and W. Bermel; "Conformational Analysis of Peptides by Two-Dimensional NMR Spectroscopy" in *Applications of NMR Spectroscopy to Problems in Stereochemistry and Conformational Analysis*; Ed. Takeuchi, Y. and Marchand, A. P.; USA, VCH, 1986.

75.- J. L. Marshall; "Carbon-Carbon and Carbon-Proton NMR Couplings: Applications to Organic Stereochemistry and Conformational Analysis"; Deerfield Beach, V.C.I., 1983.

## **Apéndice**

### **Publicaciones originadas por este trabajo para su consulta**

Measurement of Spin Coupling Constants  
by Decoupling and Reconvolution

FEDERICO DEL RÍO PORTILLA\* AND RAY FREEMAN

*Department of Chemistry, Cambridge University, Lensfield Road, Cambridge CB2 1EW, England*

Received June 10, 1993

Spin-spin coupling constants are usually measured directly from one- or two-dimensional spectra by software routines that locate the line centers and measure the appropriate splittings directly. However, where the coupling constants are comparable with the linewidth or where there are several overlapping responses, more sophisticated techniques may be required. Several such postacquisition procedures have recently been proposed. Some require two versions of the same spin multiplet, one with the doublet in phase and the other with the antiphase configuration (1-5). The more generally applicable schemes operate on a single spectrum by  $J$  deconvolution (6-9) or  $J$  doubling (4, 10), or they employ indirect methods (11-13). These procedures are broadly related in that they search for the best fit between a trial value of the coupling constant  $J^*$  and the experimental spin-spin splitting  $J_{IS}$ , invoking certain trigonometrical identities. When used with care, these methods yield accurate estimates for the coupling constants, but with complicated spin multiplets there is always the danger that the search algorithm may find false minima.

We suggest a new scheme which may prove more direct in certain circumstances and which identifies the source of the measured splitting. It is illustrated with reference to homonuclear spin-spin coupling but the same principles also apply to the heteronuclear case. The raw data set is a well-digitized spin multiplet (a) extracted from a conventional spectrum or a suitable section through a two-dimensional cross peak (Fig. 1). Only in-phase splittings may be treated by this method. The idea is to decouple the splitting of interest ( $J_{IS}$ ) by standard coherent double-irradiation methods, giving a decoupled spectrum (b). Reconvolution artificially introduces a trial splitting  $J^*$ , giving a multiplet (c) that is a good match to multiplet (a) only when  $J^* = J_{IS}$ . This matching procedure may be performed in the frequency domain or the time domain, using a criterion such as the global mini-

mum in the sum of the squares of the differences ( $\Sigma$ ) between corresponding ordinates of multiplets (a) and (c), or between time-domain samples of their Fourier transforms ( $a^*$ ) and ( $c^*$ ).

Consider the simplest case of a coupled two-spin system IS. Since only one coupling is treated at a time, multiplet-selective decoupling suffices, and this is most readily implemented with a single coherent radiofrequency ( $B_2$ ). It is of course crucial to reduce the residual splitting to a vanishingly small value; otherwise there is a systematic error on the derived coupling constant. This requires that the decoupler frequency be tuned to the chemical shift of the I spin, with the level satisfying the condition  $\gamma B_2/2\pi \gg |J_{IS}|$ . Unless  $|\delta_I - \delta_S|$  is large compared with  $|J_{IS}|$  there are two small corrections to be taken into account. There is a small Bloch-Siegert shift (14, 15) of the observed resonance away from the decoupler frequency:  $\Delta f = 0.5(\gamma B_2/2\pi)^2/(\delta_I - \delta_S)$ .

Furthermore, the optimum decoupling condition requires that the directions of quantization of I and S in the rotating frame be orthogonal (15). This means that the decoupler frequency must be moved from the exact chemical shift  $\delta_I$  toward the chemical shift  $\delta_S$  by  $\Delta f' = (\gamma B_2/2\pi)^2/(\delta_I - \delta_S)$ . Since the technique is of the most interest for small, poorly resolved splittings, only weak decoupling fields are normally used. In cases where a small coupling  $J_{IS}$  is to be measured in the presence of a larger "passive" splitting  $J_{SR}$  it may be advantageous to set up a selective decoupling experiment where the small splitting  $J_{IS}$  is removed from the S multiplet in the subspectrum corresponding to a particular spin state of the passive spin R. In this way the decoupler level  $\gamma B_2/2\pi$  may be reduced, making the shifts  $\Delta f$  and  $\Delta f'$  much smaller. Alternatively, doubly selective decoupling may be employed, or even band-selective decoupling (16).

Care must also be taken to ensure that the decoupling field  $B_2$  does not perturb any of the other splittings in the multiplet under investigation. This would only be a real danger where there is a coupling to another proton with a similar chemical shift. Intensity changes, due to saturation transfer

\* Permanent address: Instituto de Química, Ciudad Universitaria, México D. F., México.

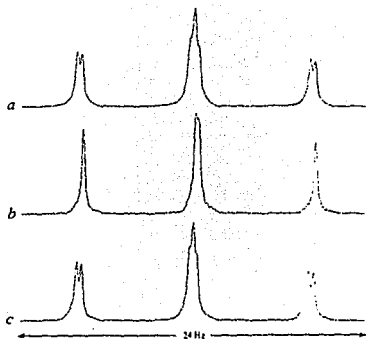


FIG. 1. Decoupling-reconvolution illustrated for the A proton of meta-bromonitrobenzene. (a) Original multiplet. (b) Decoupled from X with  $\gamma B_2/2\pi = 17.2$  Hz, renormalized to give the same integral as (a) and corrected for a 0.3 Hz Bloch-Siegert shift. (c) Reconvoluted with  $J^* = 0.35$  Hz, which gives the best fit with trace (a) as judged by the value of  $\Sigma$ , the sum of the squares of the residuals.

or nuclear Overhauser effects, may be avoided by confining the decoupling to the acquisition period, preceded by appropriately long preparation delays. Since the apparent receiver gain may change during decoupling, the intensity scale of the decoupled trace (b) is normalized to give the same total integral as the original multiplet (a).

In the reconvolution stage, the decoupled spin multiplet (b) is zero-filled and Fourier transformed to give a time-domain signal ( $b^*$ ). This is then multiplied by  $\cos(\pi J^* t)$  to give ( $c^*$ ). We then evaluate  $\Sigma$ , the sum of the squares of the differences between corresponding points of the time-

domain signals ( $a^*$ ) and ( $c^*$ ) or alternatively, between corresponding ordinates in the frequency domain (a) and (c). In order to avoid distorting this comparison, it is important that the multiplets (a) and (c) cover the same frequency range and remain in exact registration. Any Bloch-Siegert shift is corrected before the comparison is made, either by calculation, using spin-tickling (17) to calibrate  $B_2$ , or simply by moving (a) with respect to (b) by the appropriate shift.

Experimental tests of the method were carried out on a Varian VXR-400 spectrometer using a sample of meta-bromonitrobenzene for which the coupling constants had been previously measured by  $J$  deconvolution (4, 8). The conventional spectrum and the assignment are shown in Fig. 2. The small para coupling  $J_{AX}$  provides a convenient example of a partially resolved splitting to test the new technique.

As with the related techniques employing  $J$  deconvolution,  $J$  doubling, or maximum entropy (13), the present method finds several subsidiary minima in the plot of  $\Sigma$  as a function of the trial coupling constant  $J^*$ . Figure 3 shows such a graph for the M proton when the X proton is decoupled. The best fit of the reconvoluted multiplet with the conventional multiplet occurs at b, where  $J^* = 1.88$  Hz, in excellent agreement with the value measured earlier by  $J$  deconvolution (4, 8). However, partial fits are obtained where accidental coincidences occur between some of the lines of the reconvoluted trace and the conventional multiplet. These minima may be readily predicted; they occur at frequencies that are sums and differences of the three coupling constants  $J_{AM}$ ,  $J_{MX}$ , and  $J_{MP}$ . They are necessarily shallower than the principal minimum. For example, the principal minimum b is flanked by two shallow minima a and c at separations  $\pm 2J_{MP}$ . Once the subsidiary minima have been identified they can be used to extract values for the other two coupling constants,  $J_{MP} = 0.98$  Hz and  $J_{AM} = 7.99$  Hz.

Instrumental noise interferes with the determination of  $J_{IS}$  by introducing noise onto the curve of  $\Sigma$  versus  $J^*$ . To test the influence of the signal-to-noise ratio, a series of spectra were recorded with progressively reduced flip angles. A Varian software routine evaluates the ratio of signal height to

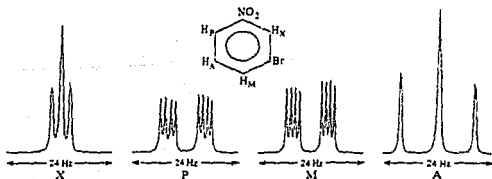


FIG. 2. Assignment of the four spin multiplets of meta-bromonitrobenzene. A very slight broadening of protons P and X is apparent, attributed to coupling to the rapidly relaxing nitrogen-14 spin.



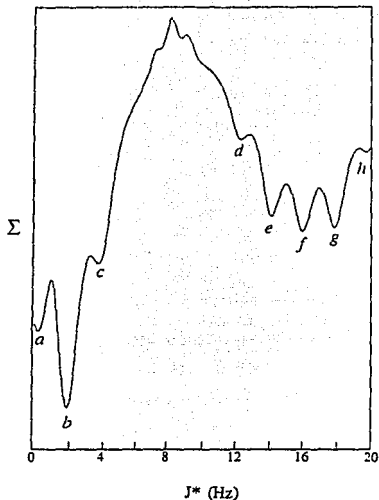


FIG. 3. Evaluation of  $\Sigma$  as a function of  $J^*$  for the M proton of meta-bromonitrobenzene decoupled from the X proton. The principal minimum (b) gives  $J_{MX} = 1.88$  Hz. The subsidiary minima occur at (a)  $J_{MX} - 2J_{MP}$ , (c)  $J_{MX} + 2J_{MP}$ , (d)  $2J_{AM} - J_{MX} - 2J_{MP}$ , (e)  $2J_{AM} - J_{MX}$ , (f)  $2J_{AM} - J_{MX} - 2J_{MP}$  and  $2J_{AM} - J_{MX} + 2J_{MP}$ , (g)  $2J_{AM} + J_{MX}$ , (h)  $2J_{AM} + J_{MX} + 2J_{MP}$ .

twice the root-mean-square noise in the frequency-domain spectra. For the purposes of this comparison we use an alternative definition—the ratio of signal height to peak-to-peak noise (a number 2.5 times smaller). For the small coupling of meta-bromonitrobenzene, erratic values for the apparent coupling begin to appear when the signal falls below about four times the peak-to-peak noise (Fig. 4); for stronger signals, the same value ( $J_{AX} = 0.35$  Hz) is obtained throughout. One concludes that spectra with poor signal-to-noise ratios should be treated with a suitable sensitivity-enhancement function so that noise does not introduce spurious shifts in the minimum value of  $\Sigma$ .

The main thrust of decoupling-reconvolution is to measure small, poorly resolved splittings, and at some point the method must break down for couplings much smaller than the instrumental linewidth. This was tested by recalculating

the dependence of  $\Sigma$  on  $J^*$  with increasing amounts of line broadening, introduced by the standard exponential-weighting algorithm. The measurements for the small coupling  $J_{AX}$  are well behaved, the minimum in  $\Sigma$  becoming increasingly broad in step with the imposed line broadening (Fig. 5, top). The very flat minima (f) and (g) are slightly skewed toward low  $J^*$  values. At very high levels of line broadening, a new minimum appears at  $J^* = 0$ , and this eventually becomes the global minimum. The measurement of the larger coupling  $J_{PX}$  is shown in Fig. 5 (bottom). Here two subsidiary minima are in evidence, flanking the principal minimum at  $J^* = 2.17$  Hz. However, since they have the same depths and are symmetrically disposed there is no perceptible shift of the principal minimum as the line broadening is increased, although it eventually becomes very flat.

When the splitting of interest is appreciably smaller than the linewidth, lineshape is the key parameter that allows us to extract an accurate value of  $J_{IS}$ . Consequently it is important to avoid lineshape distortion during decoupling. For example, if  $B_2$  is intense and spatially inhomogeneous, and if the decoupler offset is relatively small, the Bloch-Siegert effect may give rise to a significant distortion of the lineshape in addition to the expected displacement ( $\Delta\delta$ ). This must be avoided. In less extreme situations, the Bloch-Siegert effect is only a slight line broadening and may be compensated by a matching broadening of the (a) multiplet.

It is also essential to eliminate any intensity discontinuity at the edge of the decoupled (a) and (b) multiplets since the reconvolution process transforms this into two discontinuities with a variable frequency separation. Baseline correction can be used to minimize these intensity steps at the edges of the (broadened) multiplet. A study of the dependence of the optimum value of  $J^*$  on the amount of additional line broadening usually brings these imperfections to light, introducing a systematic error in the derived  $J^*$  value as a function of the linewidth.

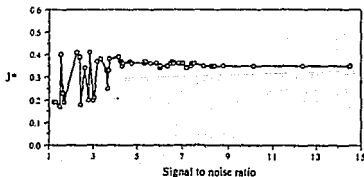


FIG. 4. Apparent values of  $J_{AX}$  extracted from plots of  $\Sigma$  versus  $J^*$  when the signal-to-noise ratio is varied by changing the flip angle. The measurement becomes increasingly erratic when the signal height is less than about four times the peak-to-peak noise.

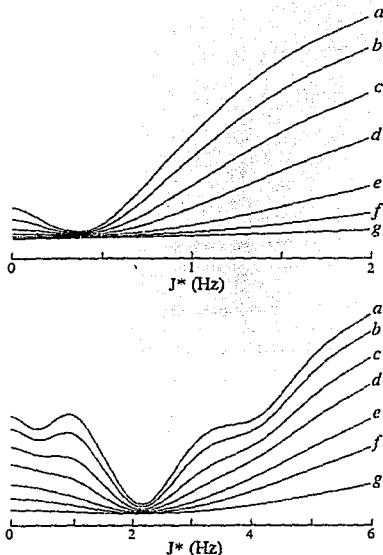


FIG. 5. Influence of line broadening on the plots of  $\Sigma$  against the trial coupling constant  $J^*$  for the small coupling  $J_{AX} = 0.35$  Hz (top) and the intermediate coupling  $J_{PX} = 2.17$  Hz (bottom). The additional line broadening was (a) none, (b) 0.05 Hz, (c) 0.15 Hz, (d) 0.30 Hz, (e) 0.60 Hz, (f) 1.00 Hz, (g) 2.00 Hz. The presence of subsidiary minima in the bottom graphs has no appreciable effect on the measurement.

In general we wish to suppress a splitting  $J_{IS}$  on the S-spin resonance by irradiating the I-spin resonance which may have one or more passive splittings. In the two-spin case there is a decoupling frequency that gives zero residual splitting, but the introduction of a passive coupling  $J_{IR}$  ensures that the decoupler will always be offset by at least  $J_{IR}/2$ , and a small residual splitting of the S multiplet will persist whatever the decoupler frequency. If  $|J_{IR}| \gg |J_{IS}|$ , so that the observed S multiplet can be readily separated into two parts, one for each spin state of R, then a selective-decoupling experiment can be performed on one of these two subspectra. This technique was used for the measurement of  $J_{MP}$ , where there is a large passive splitting  $J_{AM} = 7.99$  Hz. However, care must

be taken to avoid any intensity step where the multiplet is divided into two parts. For the more general case that  $J_{IR}$  and  $J_{IS}$  have comparable magnitudes, an increase in  $B_2$  is the only means of reducing the residual splitting. The consequent Bloch-Siegert effects are appreciable unless there is a sufficiently large ratio  $Q$  of the chemical-shift difference  $|\delta_I - \delta_S|$  compared with the magnitude of the passive splitting  $|J_{IR}|$ . Practical problems with decoupling are aggravated as  $Q$  decreases.

Figure 6 illustrates the effect of introducing an additional (Lorentzian) line broadening on the determination of four of the coupling constants in meta-bromonitrobenzene. As reported above, the measurement of the small coupling ( $J_{AX} = 0.35$  Hz) is well behaved ( $Q = 187$ ) and an essentially constant value is obtained until the additional line broadening approaches 2 Hz. This is almost *six times* the coupling constant, a performance far better than that achieved with the larger couplings. The intermediate coupling ( $J_{MX} = 1.88$  Hz, with  $Q = 110$ ) gives a flat curve until the line broadening reaches about twice the coupling constant. Similarly the other intermediate coupling (with  $Q = 42$ ) gives an essentially constant value  $J_{PX} = 2.17$  Hz until the imposed line broadening approaches twice the coupling constant. The situation is easier for the smaller coupling  $J_{MP} = 0.98$  Hz, since this may be decoupled selectively and the result monitored on one-half of the M multiplet, giving an increased value of  $Q = 73$ . However, the process of excising this half multiplet causes a small intensity step at one edge which should be corrected before reconvolution. Reliable values for  $J_{MP}$  are obtained until the broadening approaches about twice the coupling constant.

Decoupling and reconvolution provide one additional weapon in a large armory of techniques (1-13) for measuring coupling constants. A reproducibility better than  $\pm 0.03$  Hz was achieved in these tests. The new method is not applicable to the antiphase doublets that appear in two-dimensional correlation spectra (because the signal would vanish during decoupling) but it appears to be quite reliable for in-phase splittings. Subsidiary minima in the graph of  $J^*$  against  $\Sigma$

TABLE I  
Coupling Constants in Meta-bromonitrobenzene

	$J$ deconvolution <sup>a</sup>	Decoupling-reconvolution
$J_{AM}$	$7.98 \pm 0.03$	$7.99 \pm 0.03^b$
$J_{AP}$	$8.28 \pm 0.04$	$8.24 \pm 0.03^b$
$J_{MP}$	$0.99 \pm 0.03$	$0.98 \pm 0.03$
$J_{MX}$	$1.89 \pm 0.04$	$1.88 \pm 0.03$
$J_{PX}$	$2.18 \pm 0.03$	$2.17 \pm 0.03$
$J_{AX}$	$0.34 \pm 0.04$	$0.35 \pm 0.03$

<sup>a</sup> From Ref. (5).

<sup>b</sup> Measured from subsidiary minima.

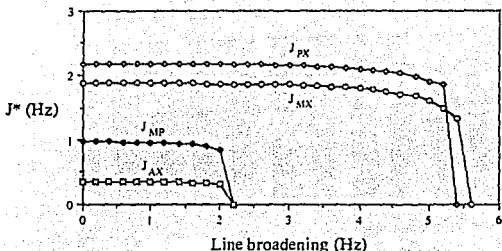


FIG. 6. Coupling constants extracted from graphs of  $\Sigma$  versus  $J^*$  for increasing amounts of (Lorentzian) line broadening. Eventually a new global minimum appears at  $J^* = 0$ . Note that reliable values of  $J_{AX}$  are obtained until the broadening approaches six times the splitting.

are readily predictable and are at most only half as deep as the principal minimum. A comparison with values of the same coupling constants measured by  $J$  deconvolution (Table 1) shows excellent agreement. The method works surprisingly well for small, poorly resolved couplings. For larger couplings (which can usually be measured by direct methods) some care needs to be taken with the quality of decoupling.

#### REFERENCES

1. H. Oschkinat and R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **60**, 164 (1984).
2. H. Kessler, A. Müller, and H. Oschkinat, *Magn. Reson. Chem.* **23**, 844 (1985).
3. J. J. Titman and J. H. Keeler, *J. Magn. Reson.* **89**, 640 (1990).
4. R. Freeman and L. M. McIntyre, *Isr. J. Chem.* **32**, 231 (1992).
5. P. Huber, C. Zwiahlen, S. J. F. Vincent, and G. Bodenhausen, *J. Magn. Reson. A* **103**, 118 (1993).
6. A. A. Bothner-By and J. Dadok, *J. Magn. Reson.* **72**, 540 (1987).
7. M. A. Delsuc and G. C. Levy, *J. Magn. Reson.* **76**, 306 (1988).
8. J. M. Le Parco, L. McIntyre, and R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **97**, 553 (1992).
9. P. Huber and G. Bodenhausen, *J. Magn. Reson. A* **102**, 81 (1993).
10. L. McIntyre and R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **96**, 425 (1992).
11. J. Keeler, D. Neuhaus, and J. J. Titman, *Chem. Phys. Lett.* **148**, 545 (1988).
12. J. J. Titman, D. Neuhaus, and J. Keeler, *J. Magn. Reson.* **85**, 111 (1989).
13. J. A. Jones, D. S. Grainger, P. J. Hora, and G. J. Daniell, *J. Magn. Reson. A* **101**, 162 (1993).
14. F. Bloch and A. Siegert, *Phys. Rev.* **57**, 522 (1940).
15. R. Freeman and W. A. Anderson, *J. Chem. Phys.* **37**, 85 (1962).
16. E. Kupce and R. Freeman, *J. Magn. Reson. A* **102**, 364 (1993).
17. R. Freeman and W. A. Anderson, *J. Chem. Phys.* **37**, 2053 (1962).
18. R. Freeman, "A Handbook of Nuclear Magnetic Resonance," p. 15, Longman, Harlow, 1988.

# Accurate Determination of Small Nuclear Magnetic Resonance Coupling Constants from Decoupling Experiments

Federico del Rio Portilla and Ray Freeman\*

Department of Chemistry, University of Cambridge, Lensfield Road, Cambridge, UK CB2 1EW

A new technique is described for the accurate determination of small NMR spin coupling constants. The multiplet under investigation is recorded under coupled and decoupled conditions, and then corresponding ordinates of the time-domain signals are divided, leaving only the modulation term,  $\cos^2(\pi J_{IS} t)$  where  $n$  is the number of equivalent protons in the irradiated group. Precautions are taken to avoid division by zero or near-zero values. The Fourier transform of the quotient is a single multiplet (1:1 doublet, 1:2:1 triplet, or 1:3:3:1 quartet) giving a direct measure of the coupling constant. The technique is illustrated with reference to the proton-proton couplings in furan-2-aldehyde in various solvents. The reproducibility of the measurements is superior to  $\pm 0.04$  Hz and the results are in good agreement with those from a related technique where the decoupled multiplet is reconvoluted with a trial coupling  $J^*$  which is varied to give best fit with the fully coupled multiplet.

Long-range NMR spin-spin coupling constants, which can be of interest for conformational studies, are often so small that they can be 'lost' within the instrumental linewidth unless special techniques are employed. Recent papers describe an entire armoury of data processing techniques for extracting coupling constants from experimental NMR spectra.<sup>1-9</sup> For coupling constants that are small in magnitude, we propose a new technique which records the chosen spin multiplet under coupled and decoupled conditions and takes the ratio of corresponding ordinates of the two time-domain signals. This strips away all modulation terms except  $\cos^2(\pi J_{IS} t)$  where  $n$  is the number of equivalent protons in the irradiated group and  $J_{IS}$  is the splitting that was decoupled. The method is illustrated with reference to a homonuclear system but the same principles also apply to the heteronuclear case. The results are compared with those obtained from the same sample by a recently proposed technique<sup>14</sup> involving 'decoupling-reconvolution.'

## Decoupling

The raw data set is a well digitized spin multiplet  $I(a)$  extracted from a conventional spectrum, or a suitable section through a two-dimensional cross peak. Only in-phase splittings may be treated by this method. The splitting of interest ( $J_{IS}$ ) is removed by coherent irradiation of the  $S$  spin, giving a decoupled multiplet  $I(b)$ . It is essential to reduce any residual splitting to a negligible value to avoid any systematic error on the derived coupling constant; fortunately this is easily achieved when the coupling of interest is already quite small. The multiplets  $I(a)$  and  $I(b)$  are recorded with all other spectral parameters identical, and are corrected for any slight Bloch-Siegert shift<sup>15</sup> caused by the decoupling field.<sup>16</sup> When there are large passive splittings of both the  $I$ -spin and the  $S$ -spin multiplets, it can be advantageous to perform the decoupling experiment in a selective manner, effective in just one of the two subspectra. Any spurious intensity changes due to chemical exchange or nuclear Overhauser effects are excluded by confining the decoupling to the acquisition period, preceded by a generous preparation period for the establishment of Boltzmann equilibrium. Any change in receiver gain between the two recordings is corrected by re-normalizing to the same total integral for  $I(a)$  and  $I(b)$ .

## 'J-Stripping'

The time-domain signals  $I(a^*)$  and  $I(b^*)$  may be written:

$$I(a^*) = M \cos(2n\delta_1 t) \cos(\pi J_{IS} t) \prod_R \cos(\pi J_{IR} t) \exp(-t/T_2^*)$$

$$I(b^*) = M \cos(2n\delta_2 t) \prod_R \cos(\pi J_{IR} t) \exp(-t/T_2^*)$$

where  $n$  is the number of equivalent protons in the irradiated group,  $R$  represents all the passive spins in the molecule, and  $T_2^*$  is the inverse of the instrumental linewidth. If the ordinates of  $I(a^*)$  are divided by the corresponding ordinates of  $I(b^*)$  this leaves only the modulation term  $\cos^2(\pi J_{IS} t)$  which does not decay with time. After multiplication with a suitably mild decaying exponential, followed by Fourier transformation, this gives just a simple multiplet. If we are decoupling a single proton ( $n=1$ ) this spectrum is a doublet. When the irradiated group consists of two or three equivalent protons, the corresponding modulation term is  $\cos^2(\pi J_{IS} t)$  or  $\cos^2(\pi J_{IS} t)$ , and the frequency-domain spectrum is a 1:2:1 triplet or a 1:3:3:1 quartet, respectively. In all that follows, only single protons are decoupled and since the real Fourier transform is used, only positive frequencies are plotted, giving just a single line at  $J_{IS}$  Hz.

The practical problems with the division step are well known,<sup>9</sup> the computer cannot accept a zero ordinate in the denominator  $I(b^*)$  and any near-zero ordinate may interact with noise in the numerator  $I(a^*)$  to generate large spikes in the quotient. We tackle the problem of these singularities by preprocessing the time-domain signal  $I(b^*)$  to test for values with a modulus less than a specified threshold  $\theta$ , resetting such values to  $\theta$  with the appropriate sign. The lower the setting of  $\theta$ , the fewer ordinates are altered but the higher the risk of spikes in the quotient. Surprisingly high values of  $\theta$  can be employed, even to the extent that every ordinate is replaced by either  $+\theta$  or  $-\theta$ , although such extreme signal distortion is not recommended since it generates harmonics of the principal frequency component. We might expect that the threshold should be set somewhere near the peak-to-peak level of the noise in the time-domain signal  $I(b^*)$ . With a modest setting of  $\theta$ , the quotient  $I(a^*)/I(b^*)$  still contains some attenuated spikes which may then be smoothed by repeated cycles of 1:2:1 convolution. Real Fourier transformation of  $I(a^*)/I(b^*)$  gives a spectrum with few artifacts, dominated by a strong resonance at  $J_{IS}$  Hz, with a linewidth determined by the exponential weighting function that was applied.

\* Permanent address: Instituto de Química, Ciudad Universitaria, México D. F., México.

## Decoupling-Reconvolution

The  $J$ -stripping results may be checked by comparison with an alternative scheme<sup>12</sup> that employs reconvolution to replace the splitting removed by decoupling. We may think of it as convolution of  $I(b)$  in the frequency domain with a trial splitting  $J^*$  that is varied until the result  $I(c)$  is a good match to  $I(a)$ . This occurs when  $J^* = J_{AB}$ . In actual practice we chose to work in the time domain. Convolution by a doublet delta function in the frequency domain is equivalent to multiplication of the Fourier transform with a cosine term:

$$I(c^*) = I(b^*) \cos(\pi J^* t)$$

If the irradiated resonance represents two or three equivalent protons, then the reconvolution involves a 1:2:1 triplet or 1:3:3:1 quartet in the frequency domain, which corresponds to multiplication by  $\cos^2(\pi J^* t)$  or  $\cos^3(\pi J^* t)$  in the time domain.

As a criterion for the best match between  $I(a^*)$  and  $I(c^*)$ , we use the global minimum in the sum of the squares of the differences ( $\Sigma$ ) between corresponding ordinates of  $I(a^*)$  and  $I(c^*)$ . Partial matches between multiplets  $I(a)$  and  $I(c)$  arise when there is overlap of some fraction (usually one-half or one-quarter) of the component lines. These conditions give rise to subsidiary minima in the graph of  $\Sigma$  against  $J^*$  but these are always shallower than the global minimum. Subsidiary minima occur at sums and differences of the couplings to the observed spin and can be used as a measure of the passive couplings. Under favourable conditions of signal-to-noise ratio, fineness of digitization and spectrometer resolving power, the value found for  $J_{AB}$  is reproducible to better than  $\pm 0.03$  Hz. The method is applicable even for poorly resolved splittings as the furan-2-aldehyde results demonstrate.

## Experimental and Results

 $J$ -Stripping

Four different samples of furan-2-aldehyde were examined, i.e. solutions in [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]benzene, [<sup>2</sup>H]chloroform, [<sup>3</sup>H<sub>4</sub>]acetone and [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]dimethyl sulfoxide. The very small long-range couplings to the aldehyde proton are known to be solvent dependent<sup>11,12</sup> due to rotational isomerism about the C-CHO bond. The [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]dimethyl sulfoxide solution was examined at two different probe temperatures (27 and 50°C) to test for any temperature effect on the isomerism. The measurements were made on a Varian VXR-400 spectrometer with no modifications. Fig. 1 shows the four spin multiplets and the assignment used in the experiment. Wherever possible, the measurements were performed in complementary pairs, for example

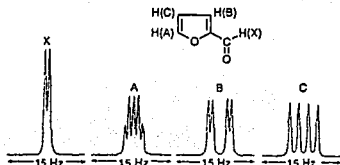


Fig. 1 Multiplets from the 400 MHz proton spectrum of furan-2-aldehyde with the assignment used in the text

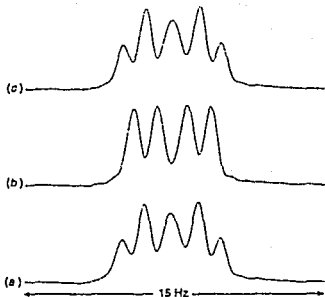


Fig. 2 Multiplet of proton A of furan-2-aldehyde in [<sup>3</sup>H<sub>4</sub>]DMSO at 27°C (a) coupled and (b) decoupled from proton B. Multiplet (c) was reconvoluted with  $J^* = 0.80$  Hz, exhibiting a close fit to multiplet (a).

irradiation of B while observing A and irradiation of A while observing B. Fig. 2 shows the unperturbed multiplet  $I(a)$  and the decoupled trace  $I(b)$ . The corresponding time-domain signal  $I(b^*)$  was processed to set all values with a modulus less than a threshold  $\theta$ , to either  $+\theta$  or  $-\theta$  depending on the sign of that ordinate. Then the ratio  $I(a^*)/I(b^*)$  was evaluated, smoothed by two cycles of 1:2:1 convolution and multiplied by a mild exponential function  $\exp(-t/2)$ .

Fig. 3 demonstrates the effect on the Fourier transform of  $I(a^*)/I(b^*)$  of choosing different thresholds  $\theta$ , in the range  $10^{-6}$ – $10^{-3}$ . In each case, there is only one strong frequency

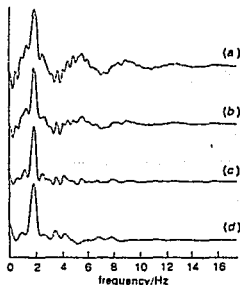


Fig. 3 The Fourier transform of  $I(a^*)/I(b^*)$ , where  $I(b^*)$  has been processed to remove any values near to zero. The threshold value,  $\theta$ , is (a)  $10^{-6}$ , (b)  $10^{-5}$ , (c)  $10^{-4}$  and (d)  $10^{-3}$  and any ordinates in  $I(b^*)$  with a modulus below  $\theta$  have been reset to  $\theta$ , retaining the original sign. The peak at 1.80 Hz gives the value of  $\frac{1}{2}J_{AC}$  for furan-2-aldehyde in [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]dimethyl sulfoxide at 27°C.

component in this 'spectrum' and it falls at  $\frac{1}{2}J_{12}$  Hz, but the level of artifacts decreases as  $\theta$  is made larger, since this reduces the amplitude of any spikes in  $I(a^*)/I(b^*)$ . For the highest setting of  $\theta$  weak harmonics of the main resonance are beginning to make their appearance. We chose to use the trace with a threshold  $\theta = 10^{-6}$ , which is just three times higher than the peak-to-peak noise level in the decoupled time-domain signal  $I(b^*)$ . It is evident from this diagram that the choice of threshold is by no means critical to the success of the measurement.

Fourier transforms of  $I(a^*)/I(b^*)$  for the four largest couplings of furan-2-aldehyde are set out in Fig. 4. Singularities were removed with a threshold value of  $\theta = 10^{-6}$  and two stages of 1:2:1 convolution. Each trace shows only a single strong resonance line, and the frequency is evaluated by interpolation between sample points using a polynomial fitting program. The reproducibility is better than  $\pm 0.04$  Hz. It was not possible to determine the two very small couplings ( $J_{AX}$  and  $J_{CX}$ ) by this method, probably because the spectral width that had to be employed (17.4 Hz) was too wide and the digitization steps too coarse. The results are set out in Table 1 where they are compared with those derived by the decoupling-reconvolution method. Values obtained by the two different processing schemes agree within the quoted error limits.

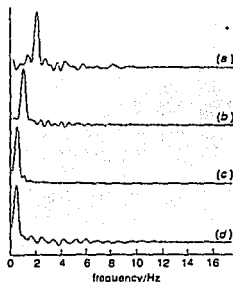


Fig. 4 Measurement of coupling constants in furan-2-aldehyde by  $J$ -stripping. Fourier transforms of  $I(a^*)/I(b^*)$  after processing with  $\theta = 10^{-6}$  to remove singularities (a)  $J_{AC} = 3.60$  Hz, (b)  $J_{AC} = 1.71$  Hz, (c)  $J_{AX} = 0.84$  Hz and (d)  $J_{AX} = 0.77$  Hz. The resonance line frequencies, which occur at  $\frac{1}{2}J$ , are determined by interpolation between sampling points. The reproducibility is better than  $\pm 0.04$  Hz.

### Decoupling-Reconvolution

This technique involves a search for the best fit between the original multiplet and the decoupled-reconvoluted multiplet. To give a measure of the quality of the fit in a typical case, Fig. 2(c) shows an experimental result after reconvolution of the decoupled spectrum with  $J^* = 0.80$  Hz.

Determination of the coupling constant involves a search for a global minimum in the graph of the error parameter  $\Sigma$  plotted as a function of  $J^*$ . A typical example is shown in Fig. 5 for the active coupling  $J_{CX}$  in furan-2-aldehyde in  $[^2H_6]DMSO$ . Four minima are clearly apparent and there is a perceptible shoulder (c) on one of these, indicating a further unresolved minimum. The deepest minimum gives the desired coupling constant  $J_{CX} = 0.16$  Hz. The weaker (subsidiary) minima occur at sums and differences of the other coupling constants. In fact each subsidiary minimum represents an unresolved 0.16 Hz doublet.

Wherever possible, each coupling was measured by two independent experiments, but in the  $CDCl_3$  solution, overlap with a residual proton resonance from the solvent interfered with one of these determinations. In most cases the results

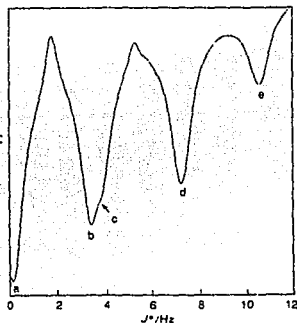


Fig. 5 Decoupling-reconvolution for furan-2-aldehyde in  $[^2H_6]DMSO$ . Plot of  $\Sigma$  against  $J^*$  showing the principal minimum a at  $J_{CX} = 0.16$  Hz. All the subsidiary minima are in fact unresolved doublets of splitting  $J_{CX}$ . The subsidiary minimum b is centred at  $2J_{AC} - 2J_{AX} = 3.82$  Hz (with an unresolved shoulder c centred at  $2J_{AC} = 7.20$  Hz and the minimum e is centred at  $2J_{AC} + 2J_{AX} = 10.58$  Hz).

Table 1 Coupling constants (Hz) in furan-2-aldehyde in various solvents

solvent	$J_{AB}$		$J_{AC}$		$J_{BC}$		$J_{AX}$		$J_{BX}$		$J_{CX}$	
	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
$[^2H_6]benzene$	0.78	0.76	1.69	1.70	3.56	3.60	0.63	0.65	0.13	—	0.32	—
$[^2H_6]chloroform$	0.79	0.77	1.69	1.72	3.58	3.58	0.68	0.69	0.11	—	0.27	—
$[^2H_6]acetone$	0.78	0.79	1.71	1.73	3.59	3.60	0.76	0.77	0.07	—	0.19	—
$[^2H_6]DMSO (27^\circ C)$	0.80	0.77	1.69	1.71	3.60	3.60	0.84	0.84	0.08	—	0.16	—
$[^2H_6]DMSO (50^\circ C)$	0.80	0.80	1.70	1.70	3.60	3.62	0.82	0.82	0.09	—	0.17	—

(a) By decoupling-reconvolution; reproducibility  $\pm 0.03$  Hz. (b) By  $J$ -stripping; reproducibility  $\pm 0.04$  Hz.

agree within  $\pm 0.01$  Hz, and in all cases the differences are within the  $\pm 0.03$  Hz error limit (Table 1). Note that the intra-ring couplings,  $J_{AB}$ ,  $J_{BC}$  and  $J_{AC}$  are invariant within the experimental error, whereas the couplings to the aldehyde proton  $J_{AX}$ ,  $J_{BX}$  and  $J_{CX}$  are noticeably dependent on the solvent used. The 23 °C temperature change for the dimethyl sulfoxide solution produces no significant change in the coupling constants.

### Conclusions

Unlike the majority of methods for extracting coupling constants,  $J$ -<sup>13</sup> these schemes involve spin decoupling. This additional effort is repaid by the good reproducibility that can be achieved if the double irradiation experiment is properly set up and, as an additional bonus, the measured coupling is assigned unambiguously.  $J$ -Stripping is probably most useful when the multiplet under investigation is complicated, since the process strips away all the passive splittings to leave just the primitive pattern (doublet, triplet or quartet). From the evidence presented here, it appears that the decoupling-reconvolution method is slightly more reliable than  $J$ -stripping, perhaps because the latter involves some falsification of the data.

Time-domain deconvolution by dividing a free induction signal by  $\cos(\pi J^*t)$ , first proposed by Bothner-By and Dadok,<sup>2</sup> has always been beset by difficulties with numerical instability, that is to say, division by zero or near-zero values. The present  $J$ -stripping results suggest that this problem is not insurmountable after all. In some ways direct deconvolution is simpler than  $J$ -stripping since the denominator

$\cos(\pi J^*t)$  is noise free. Further investigations along these lines are under way.

### References

- 1 H. Oschkinat and R. Freeman, *J. Magn. Reson.*, 1984, 60, 164.
- 2 H. Kessler, A. Müller and H. Oschkinat, *Magn. Reson. Chem.*, 1985, 23, 844.
- 3 A. A. Bothner-By and J. Dadok, *J. Magn. Reson.*, 1981, 72, 540.
- 4 M. A. Delsuc and G. C. Levy, *J. Magn. Reson.*, 1988, 76, 306.
- 5 J. Keeler, D. Neuhaus and J. J. Titman, *Chem. Phys. Lett.*, 1988, 146, 545.
- 6 J. J. Titman, D. Neuhaus and J. Keeler, *J. Magn. Reson.*, 1989, 85, 111.
- 7 J. J. Titman and J. Keeler, *J. Magn. Reson.*, 1990, 89, 640.
- 8 L. McIntyre and R. Freeman, *J. Magn. Reson.*, 1992, 96, 425.
- 9 J. M. Le Parco, L. McIntyre and R. Freeman, *J. Magn. Reson.*, 1992, 97, 553.
- 10 R. Freeman and L. M. McIntyre, *Israel J. Chem.*, 1992, 32, 231.
- 11 P. Huber and G. Bodenhausen, *J. Magn. Reson., Ser. A*, 1993, 102, 81.
- 12 J. A. Jones, D. S. Grainger, P. J. Horc and G. J. Daniell, *J. Magn. Reson., Ser. A*, 1993, 101, 162.
- 13 P. Huber, C. Zwaalen, S. J. F. Vincent, and G. Bodenhausen, *J. Magn. Reson., Ser. A*, 1993, 103, 118.
- 14 F. del Rio Portilla and R. Freeman, *J. Magn. Reson., Ser. A*, 1993, 104, 358.
- 15 F. Bloch and A. Slegert, *Phys. Rev.*, 1940, 57, 522.
- 16 R. Freeman and W. A. Anderson, *J. Chem. Phys.*, 1962, 37, 85.
- 17 R. A. Hoffman and S. Gronowitz, *Arkiv. Kemi*, 1960, 16, 563.
- 18 R. A. Hoffman, B. Grönbom, S. Gronowitz and S. Forsén, *J. Mol. Spectrosc.*, 1963, 11, 454.

Paper 3/04561G; Received 30th July, 1993

# Long-Range Carbon-Proton Couplings in Strychnine

Vratislav Blechta,<sup>†</sup> Federico del Río-Portilla<sup>‡</sup> and Ray Freeman\*

Department of Chemistry, Cambridge University, Cambridge CB2 1EW, UK

Long-range  $^{13}\text{C}$ -H NMR coupling constants were measured in strychnine at 400 MHz by a method that employs selective excitation of individual  $^{13}\text{C}$  sites under decoupled conditions followed by polarization transfer to protons. The sensitivity was improved by performing eight simultaneous soft-pulse experiments coded ( $\pm$ ) according to a Hadamard matrix and later separated by reference to the same matrix. The antiphase  $^{13}\text{C}$ -H splittings were measured by  $J$ -doubling performed in the frequency domain.

KEY WORDS NMR  $^{13}\text{C}$ -H long-range couplings Strychnine Hadamard spectroscopy

## INTRODUCTION

Given a suitable theoretical framework like the Karplus equation,<sup>1</sup> long-range coupling constants can provide useful information about molecular conformation. One attractive approach to the measurement of long-range carbon-proton couplings is through one-dimensional experiments initiated with a soft radiofrequency pulse. This has the advantage of giving simple spectra and a direct assignment of the two chemical sites involved. Improvements in spectrometer pulse-shaping hardware and control software have made such selective excitation experiments widely accessible. Typically, the splitting under investigation appears as an antiphase doublet in a polarization transfer spectrum. Recently, several workers have introduced data processing schemes<sup>2-13</sup> aimed at extracting accurate values of coupling constants. Some of these methods are applicable under adverse circumstances, where, for example, there is excessive line broadening or several additional passive splittings. We demonstrate some of these techniques with a determination of long-range carbon-proton couplings in strychnine.

It has always been argued that two-dimensional spectroscopy affords much higher sensitivity for these types of measurement since it benefits from the multiplex advantage, gathering information about all correlations simultaneously.<sup>16,17</sup> This is certainly true if the one-dimensional experiments are carried out one at a time and within the same aggregate spectrometer time. However, there are techniques used in magnetic resonance imaging<sup>18,19</sup> that allow this crucial multiplex advantage to be retrieved<sup>20,21</sup> so that the soft-pulse

experiments achieve comparable sensitivity to the ubiquitous two-dimensional methods.

Gathering information from  $N$  simultaneous measurements is more efficient in terms of sensitivity than performing  $N$  single experiments one after another. All that is necessary to retrieve the individual experimental traces is to code them according to a Hadamard matrix<sup>22</sup> and then decode them later by means of the same matrix. For example, when  $N = 4$  we may take four scans with soft pulses at four sites, alternating the pulse phases according to the Hadamard  $H_4$  matrix:

	Site A	Site B	Site C	Site D
Scan 1	+	+	+	+
Scan 2	+	+	-	-
Scan 3	+	-	+	-
Scan 4	+	-	-	+

Then the appropriate combination, for example [scan 1 + scan 2 - scan 3 - scan 4], would give the spectrum from site B while suppressing the rest. The signal strength increases fourfold whereas the noise is only doubled. This recovers the multiplex advantage that has long been exploited in infrared spectroscopy,<sup>23</sup> Fourier transform NMR<sup>24</sup> and two-dimensional spectroscopy.<sup>16,17</sup> For situations where only a small number ( $N$ ) of correlations is important,  $N$  one-dimensional determinations may provide a quicker solution than the full-blown two-dimensional analogue.

## EXPERIMENTAL

The method is illustrated by reference to experiments designed to measure long-range  $^{13}\text{C}$ -H coupling constants in strychnine. This application has the advantage that several one-dimensional correlations can be carried out simultaneously without danger of interference, since each correlation involves a different  $^{13}\text{C}$  isotope.

\* Author to whom correspondence should be addressed.

<sup>†</sup> On leave from the Institute of Chemical Process Fundamentals, Rozvojova 135, Prague 6-Suchbát, Czech Republic.

<sup>‡</sup> Permanent address: Instituto de Química, Ciudad Universitaria, 04510 México, D. F., México.



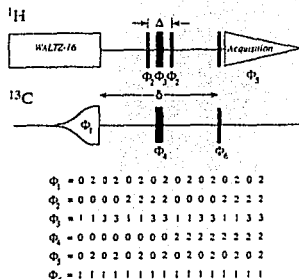


Figure 1. Pulse sequence and phase cycle for selective determination of long-range carbon-proton couplings. The soft excitation pulse has a half-Gaussian shape. The narrow black rectangles are hard  $90^\circ$  pulses and the wide black rectangles are hard  $180^\circ$  pulses. The hard  $90^\circ$  proton read pulse has phase 0. In practice, the long delay  $\delta$  was alternated between  $(\delta + \frac{1}{2}\Delta)$  and  $(\delta - \frac{1}{2}\Delta)$ .

The pulse sequence (Fig. 1) is a 'reverse detection' version of an earlier scheme<sup>25</sup> and is also related to the COLOC technique<sup>16</sup> for heteronuclear shift correlation. It begins with selective excitation of a chosen  $^{13}\text{C}$  site under decoupled conditions, enhanced by the nuclear Overhauser effect. For long-range couplings  $^kJ(\text{CH})$ , the interval  $\delta = 0.5/[^kJ(\text{CH})]$  allows evolution of  $^{13}\text{C}$  vectors into an antiphase configuration, at which point two hard  $90^\circ$  pulses transfer this magnetization to protons. At the mid-point of the  $\delta$  interval, a BIRD module<sup>27</sup> with  $\Delta = 1/[^kJ(\text{CH})]$  acts as a  $180^\circ$  pulse for distant protons but has no overall effect for the directly bound protons. Consequently, the  $^kJ(\text{CH})$  splittings in the  $^{13}\text{C}$  spectrum are refocused (along either the  $+y$  or  $-y$  axes) at the end of the  $\delta$  interval and no direct correlations are observed in the spectrum. The phase cycle is designed to minimize any residual one-bond polarization transfer due to pulse imperfections and this aim is reinforced by using a polarization transfer delay that is not exactly  $\delta$  but is alternated between  $(\delta + \frac{1}{2}\Delta)$  and  $(\delta - \frac{1}{2}\Delta)$ . Since *transverse proton magnetization* occurs only during the short  $\Delta$  interval and during acquisition, proton-proton couplings do not influence the detected signal except as passive splittings; no phase distortion is introduced.

Experiments were carried out on a Varian VXR-400 spectrometer with a 'reverse detection' probe. The soft pulses have a half-Gaussian shape<sup>28</sup> truncated at the leading edge at 5% of maximum intensity, and with a duration of 50 ms. This gives a convenient excitation profile for the absorption-mode component, while dispersion signals are not involved in the polarization transfer so no 'purging' is necessary. Each soft pulse is constructed as a histogram of  $k$  time segments, represented by  $k$  vectors defining the phase and amplitude. The phase is incremented linearly with time to create the appropriate frequency offset. Eight simultaneous

soft pulses are combined by vector addition at each time segment of the histogram<sup>21,29</sup> and the resultant sequence of  $k$  vectors used to drive a digitally controlled waveform generator. Broadband WALTZ decoupling is used during the preparation period with  $\gamma B_2/2\pi = 2.5$  kHz. The long-range polarization transfer parameter  $\delta$  has to cover a range of experimental values. It is deliberately set rather short (33.8 ms). This avoids the danger of reaching the null condition for the largest long-range coupling and allows for the partitioning of the transferred polarization between a number of distant proton sites. The BIRD module has  $\Delta = 7.7$  ms. The 16-step phase cycle is extended to 32 steps by the alternation of the timing and then to 768 scans for time averaging.

## RESULTS AND DISCUSSION

The sample was 0.1 g of strychnine dissolved in 1 ml of  $\text{CDCl}_3$  ( $0.3 \text{ mol l}^{-1}$ ) and was examined at  $27^\circ\text{C}$ . The proton assignment<sup>30,31</sup> based on Scheme 1 is shown at the bottom of Fig. 2. The eight lowest-field carbon sites were chosen for selective excitation. All eight correlations were performed simultaneously, coded in accordance with the Hadamard matrix  $H_8$  set out in Table 1. After decomposition, eight individual traces are obtained (Fig. 2) just as if each experiment had been performed separately, but with a (theoretical) sensitivity advantage equal to the square root of eight. Several

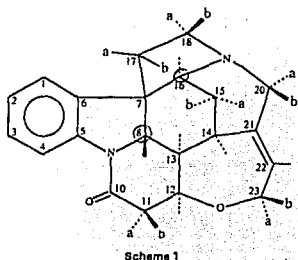


Table 1. The Hadamard  $H_8$  matrix

+	+	-	+	+	+	+	+
+	+	-	+	+	-	-	-
+	-	-	+	-	+	-	-
+	-	-	+	-	-	+	-
+	-	+	-	+	-	+	-
+	-	+	-	-	+	-	-
+	-	-	-	+	-	+	-
+	-	-	-	-	+	-	-

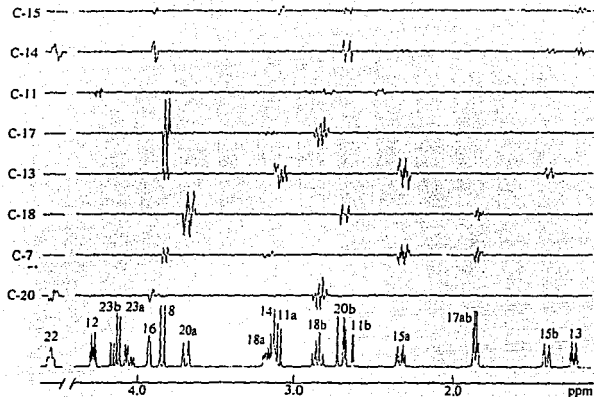


Figure 2. Long-range carbon-proton splittings (antiphase doublets) generated by polarization transfer from specific carbon sites in styrene. Eight experiments were performed (768 scans) using different combinations of eight *simultaneous* soft pulses. The individual traces were then separated by taking combinations based on a Hadamard matrix. The measured splittings are set out in Table 2.

long-range couplings are displayed on each trace. There is considerable overlap of the coherence transfer signals from C-13 to H-11a and H-14, leaving some ambiguity in the coupling constants which are therefore not reported.

An examination of Fig. 2 reveals that the coherence transfer signals for the C-13 and C-14 sites are inverted with respect to those in all the other traces; the antiphase doublets are 'up-down' rather than 'down-up'. This reflects the fact that these two carbon sites carry only a single directly attached proton whereas the other sites all have two such protons or none (C-7). In the product operator vocabulary, the pair of  $180^\circ$  pulses in the BIRD module cause the identity operations  $S_x \rightarrow S_x$  for a quaternary site,  $2S_x I_x \rightarrow 2S_x I_x$  when there is one directly attached proton ( $I$ ), and  $4S_x I_{1z} I_{2z} \rightarrow 4S_x I_{1z} I_{2z}$  when there are two directly attached protons ( $I_1$  and  $I_2$ ). Consequently, they allow  $^{13}\text{C}$  vectors to continue to diverge throughout the  $\Delta$  interval irrespective of the number of directly attached protons. However, the vectors for a quaternary site achieve a negligible divergence, remaining near the  $+y$  axis since  $^n J(\text{CH})$  is so small. The vectors corresponding to a CH group diverge by  $\pm 180^\circ$ , thus reaching the  $-y$  axis and giving an inverted  $^{13}\text{C}$  signal, whereas the vectors from a  $\text{CH}_2$  site diverge through  $0^\circ$  and  $\pm 360^\circ$ , ending up on the  $+y$  axis and generating a positive  $^{13}\text{C}$  signal. As a result, the sense of the observed polarization transfer signal depends on whether there is an odd or even numbers of directly attached protons.

The carbon-proton couplings were extracted by a variant of the  $J$ -doubling method.<sup>11</sup> We chose to imple-

ment this in the frequency domain by convoluting the experimental multiplet with a uniform 'comb' made up of eight delta functions at regular intervals equal to the trial coupling constant  $J^*$ . (In principle the comb may have an arbitrary number of delta functions.) The method works best if the multiplet under investigation is well separated from its neighbours so that there are appreciable sections of baseline on each side, with negligible steps at the extremities. Fortunately, in the case of selective C $\rightarrow$ H correlation, the proton spectra are

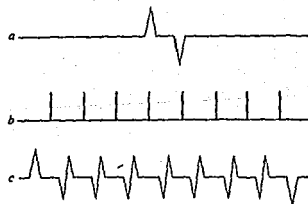


Figure 3.  $J$ -doubling by convolution in the frequency domain. An experimental antiphase doublet (a) of splitting  $^n J(\text{CH})$ , convoluted with the set of eight delta functions (b) with a regular separation  $J^*$ , gives a spectrum (c) where the two outer lines have a separation  $[^n J(\text{CH}) + 7J^*]$  and where the inner antiphase doublets have a splitting  $[^n J(\text{CH}) - J^*]$ . These inner doublets are subject to mutual cancellation and vanish when  $J^* = ^n J(\text{CH})$ .

Table 2. Long-range carbon-proton couplings (Hz) in strychnine

	H-22	H-12	H-23a	H-18	H-8	H-20a	H-15a	H-14	H-18b	H-20b	H-15a	H-17ab	H-15b	H-13
C-15 (26.70 ppm)	—	—	—	6.7	—	—	—	9.1	—	2.0	—	—	—	6.6 <sup>6,7</sup>
C-14 (31.44 ppm)	8.9 <sup>7</sup>	—	—	6.4	—	—	—	—	—	5.5	3.2	—	4.8	4.7 <sup>7,8</sup>
C-11 (42.31 ppm)	—	2.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C-17 (42.72 ppm)	—	—	—	—	5.9	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C-13 (45.05 ppm)	—	—	3.3	—	2.0	—	2.4	—	4.9	—	—	—	—	—
C-18 (50.18 ppm)	—	—	—	—	—	9.5 <sup>7</sup>	—	—	—	—	—	—	—	—
C-7 (51.77 ppm)	—	1.9	—	—	2.6 <sup>7</sup>	—	—	—	—	—	—	3.6	2.1	—
C-20 (52.52 ppm)	12.5 <sup>7</sup>	—	—	7.3	3.1	—	5.2	—	—	—	—	7.3	3.2	—

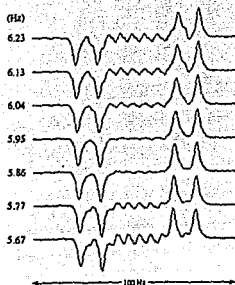


Figure 4. Determination of a long-range (antiphase) splitting between C-17 and H-8 in strychnine. Convolution in the frequency domain with a set of eight delta functions with a separation  $J^*$  varied from 5.67 to 6.23 Hz in 0.09 Hz steps. The antiphase doublets in the centre of the spectrum pass through a minimum amplitude when the test splitting  $J^*$  is between 5.86 and 5.95 Hz.

naturally sparse. Frequency-domain convolution with a comb consisting of eight delta functions is equivalent to multiplication of the time-domain signal by  $\cos(\pi J^* t) \cos(2\pi J^* t) \cos(4\pi J^* t)$  giving three stages of  $J^*$ -doubling. Figure 3 shows schematically how this convolution operation modifies an antiphase doublet for the case where  $J^*$  is close to the correct value  $^*J(\text{CH})$ . The doublet splitting  $^*J(\text{CH})$  is reproduced eight times at intervals equal to  $J^*$ . We may think of this as having increased the  $^*J(\text{CH})$  splitting by  $7J^*$ , leaving a sequence of antiphase doublets in the central region with small splittings  $|J^* - ^*J(\text{CH})|$ . When  $J^* = ^*J(\text{CH})$  these antiphase doublets disappear, and this is a good criterion for an accurate determination of  $^*J(\text{CH})$ . Figure 4 shows experimental results for one of the correlations in strychnine taken with 0.09 Hz increments in  $J^*$ . There is an appreciable change in the level of the antiphase doublets between traces. This may be monitored as a minimum in the summation of the moduli of all ordinates in the spectrum.<sup>11</sup> The long-range coupling results are set out in Table 2. We estimate an accuracy of  $\pm 0.1$  Hz.

#### Acknowledgements

One of the authors (V.B.) acknowledges the support of the Royal Society Cashtolovak Postdoctoral Fellowship Program. We thank Dr Jean-Marc Luzzat for helpful discussions.

#### REFERENCES

- M. Karplus, *J. Chem. Phys.* **30**, 11 (1959).
- B. U. Meier, G. Bodenhausen and R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **80**, 161 (1984).
- H. Oshikiri and R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **80**, 164 (1984).
- H. Kessler, A. Müller and H. Oshikiri, *Magn. Reson. Chem.* **23**, 844 (1985).
- P. Pfändler, G. Bodenhausen, B. U. Meier and R. R. Ernst, *Anal. Chem.* **57**, 2510 (1985).
- A. A. Bothner-By and J. Dedok, *J. Magn. Reson.* **72**, 540 (1987).
- P. Pfändler and G. Bodenhausen, *Magn. Reson. Chem.* **26**, 888 (1988).
- M. A. Delsuc and G. C. Levy, *J. Magn. Reson.* **78**, 308 (1988).
- Y. Kim and J. H. Prestegard, *J. Magn. Reson.* **84**, 9 (1989).
- J. Titman and J. H. Keeler, *J. Magn. Reson.* **89**, 640 (1990).
- L. McIntyre and R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **96**, 426 (1992).
- J. M. Le Pasco, L. McIntyre and R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **97**, 553 (1992).
- J. A. Jonas, D. S. Grainger, P. J. Hore and G. J. Daniell, *J. Magn. Reson.* **A 102**, 162 (1993).
- P. Huber and G. Bodenhausen, *J. Magn. Reson.* **A 102**, 81 (1993).
- P. Huber and G. Bodenhausen, *J. Magn. Reson.* **A 104**, 96 (1993).
- J. Jeener, paper presented at the Ampere International Summer School, Basko Polje, Yugoslavia, 1971.
- W. P. Ae. E. Bartholdi and R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **64**, 2229 (1976).
- R. J. Oridige, A. Connelly and J. B. Lohman, *J. Magn. Reson.* **66**, 285 (1986).
- L. Solinger and J. S. Leigh, *J. Magn. Reson.* **80**, 162 (1988).
- C. Müller and P. Blügel, *J. Magn. Reson.* **A 102**, 42 (1993).
- V. Blechle and R. Freeman, *Chem. Phys. Lett.* **215**, 341 (1993).
- J. Hadamard, *Bull. Sci. Math.* **17**, 240 (1893).
- M. J. E. Golay, *J. Opt. Soc. Am.* **39**, 437 (1949).
- R. R. Ernst and W. A. Anderson, *Rev. Sci. Instrum.* **37**, 93 (1966).
- C. Bauer, R. Freeman and S. Wimpey, *J. Magn. Reson.* **58**, 526 (1984).
- H. Kessler, C. Griestinger, J. Zarbak and H. R. Loosli, *J. Magn. Reson.* **57**, 331 (1984).
- J. R. Garbow, D. E. Weitekamp and A. Pines, *Chem. Phys. Lett.* **93**, 514 (1982).
- J. Friedlich, S. Davies and R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **75**, 390 (1987).
- E. Kupče and R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **A 105**, 234 (1993).
- W. J. Chazin, L. D. Colebrook and J. T. Edward, *Can. J. Chem.* **61**, 1749 (1983).
- D. A. Craig and G. E. Martin, *J. Nat. Prod.* **49**, 456 (1986).

## A Fast Algorithm for the Deconvolution of Spin-Spin Splittings

FEDERICO DEL RÍO-PORTILLA\* AND RAY FREEMAN

Department of Chemistry, Cambridge University, Lensfield Road, Cambridge CB2 1EW, England

Received January 7, 1994

Techniques for the accurate determination of spin-spin coupling constants have attracted considerable attention in the past few years (1-16). There is a great deal to be said in favor of methods designed to extract  $J$  values automatically without involving the operator in tedious measurements of line frequencies by hand. There are several possible approaches—deconvolution of the desired splitting (3, 9, 10, 12), introduction of an equal splitting or "J doubling" (8, 10, 15), and indirect fitting procedures (4-7, 11, 13), for example, the maximum-entropy method (11). All these schemes eventually run into difficulties when the splitting disappears within the instrumental linewidth or when the signal-to-noise ratio is very low. Where these procedures are used in two-dimensional spectroscopy, for example, for reducing COSY cross peaks to a single response at the chemical-shift coordinates, it is important to have a simple algorithm that processes the data rapidly.

We report here a new method of  $J$  deconvolution that employs a particularly simple data-processing algorithm. Since it operates on frequency-domain data there are no repeated Fourier transformation steps and the execution is very fast. The processing starts by isolating the spin multiplet of interest, either from a conventional spectrum or as a trace through a two-dimensional spectrum. It works best with fine digitization, achieved through long acquisition times or judicious zero-filling.

While a formal frequency-domain deconvolution algorithm would be quite complicated (12) we use a simple trick adapted from a procedure first proposed by Baumann *et al.* (17) for reducing  $t_1$  noise in two-dimensional spectra. The principle is illustrated in Fig. 1 for an experimental doublet ( $J_{IS}$ ) deconvolved by a trial doublet ( $J^*$ ) which is moved through the spectrum (in Fig. 1a) one step at a time. At each step, the ordinates corresponding to the two delta functions in (Fig. 1b) are compared and the lower absolute value is retained, keeping the original sign (negative values will normally be noise excursions). This ordinate is placed in the spectrum in (Fig. 1c) at a frequency corresponding to the midpoint of the  $J^*$  doublet (indicated by the arrow). When

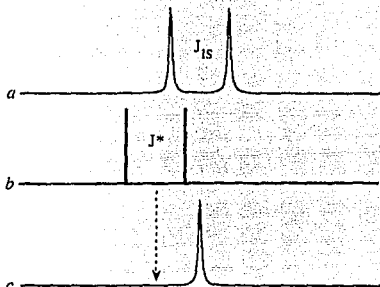


FIG. 1. Deconvolution in the frequency domain using the lower-value algorithm. The trial doublet (b) is moved through the experimental spectrum (a) and, at each step, the lower experimental ordinate is placed at the tip of the arrow, giving the deconvolved spectrum (c).

$J^* = J_{IS}$  the result is a deconvolved spectrum with half the total integral of the experimental doublet. When both  $|J^* - J_{IS}|$  and  $J^*$  are greater than the experimental linewidth, the spectrum (in Fig. 1c) comprises very little intensity. Note that partial overlap of the deconvolution function with the experimental multiplet gives a negligible signal by virtue of the lower-value algorithm. A strong signal is obtained only when there is registration within the experimental linewidth. This "f-Decon" technique measures unknown splittings by a repeated search through the frequency-domain data table (Fig. 1a) with different values of the trial coupling  $J^*$ . The criterion for the best match of  $J^*$  to  $J_{IS}$  is a maximum in the sum of the ordinates in the deconvolved spectrum (Fig. 1c).

When there is spin coupling to groups of two or three equivalent protons the processing may employ a cascade of two or three successive deconvolutions with a doublet stick spectrum or, alternatively, a single deconvolution with a 1:1:1 triplet or a 1:1:1:1 quartet. An experimental 1:2:1 triplet

\* Permanent address: Instituto de Química, Ciudad Universitaria, Mexico D. F., Mexico.

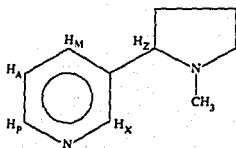
or a 1:3:3:1 quartet is reduced to a singlet at the chemical-shift frequency, although the loss in total integral is now a factor of four or eight, respectively. This description for an in-phase multiplet is readily extended to an antiphase (active) splitting characteristic of coherence-transfer spectra. This is handled by deconvolving with an antiphase pattern, for example, a  $J^*$  doublet with intensities +1 and -1, or a  $2J^*$  doublet with intensities +1 and -1, or a  $J^*$  quartet with intensities +1, +1, -1, and -1.

One advantage of f-Decon over other deconvolution schemes is that there are no maxima at subharmonic conditions such as  $J^* = J_S/2$ ,  $J_S/3$ . This is a consequence of the lower-value test. However, the new method does find subsidiary maxima at sums and differences of the coupling constants. For example, if there is a large splitting  $J_L$  and a smaller splitting  $J_S$  the graph of the summation versus  $J^*$  shows a 1:2:1 triplet at the frequencies  $J_L - J_S$ ,  $J_L$ , and  $J_L + J_S$ . This property can often be exploited to extract more than one coupling constant at a time.

Deconvolution in this fashion does not discover splittings that are so small that they are hidden within the experimental linewidth. It must always be remembered that the lower-value test is a nonlinear operation which can distort the lineshape if  $J^*$  is sufficiently small, falsifying the experimental evidence. For unresolved splittings the  $J$ -doubling technique (8, 10) is to be preferred; if several stages of  $J$  doubling are used the small splitting can usually be made to exceed the linewidth.

We demonstrate the f-Decon algorithm with reference to the proton-proton couplings in nicotine (Scheme 1) measured at 400 MHz by standard techniques. Consider first the case of proton  $H_X$ . The graph of the summation of ordinates in the processed spectrum shows a single maximum at the value  $J^* = 2.24$  Hz (Fig. 2, top trace). The other two splittings  $J_{AX} = 0.87$  Hz and  $J_{XZ} = 0.45$  Hz generate a complex unresolved structure, as confirmed by the simulation based on the measured coupling constants and an estimated (Lorentzian) linewidth (Fig. 2, bottom trace).

Proton  $H_P$  shows four clear maxima, attributable to  $J_{MP} = 1.71$  Hz,  $J_{AP} - J_{MP} = 3.08$  Hz,  $J_{AP} = 4.79$  Hz, and  $J_{AP} + J_{MP} = 6.50$  Hz (Fig. 3, top trace). Note that the two intense maxima represent actual coupling constants whereas the two



SCHEME 1

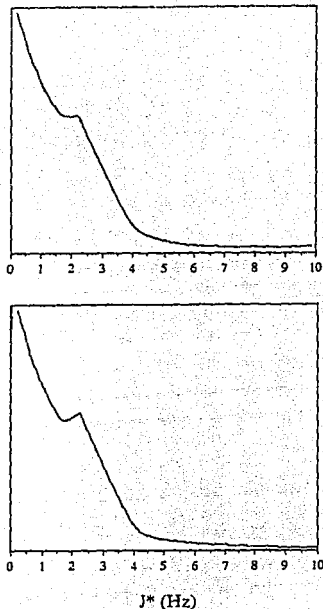


FIG. 2. (Top) Plot of the sum of all ordinates in the processed  $H_X$  multiplet versus  $J^*$ , showing a maximum where  $J^* = J_{MX} = 2.24$  Hz. The bottom trace was obtained from a simulated multiplet.

weaker maxima arise from combinations of coupling constants. This is a good example of the 1:2:1 pattern predicted for subsidiary maxima flanking a principal maximum.

The situation is more complicated for proton  $H_A$ , which has four resolvable splittings. The principal maxima appear at  $J_{AX} = 0.87$  Hz,  $J_{AP} = 4.79$  Hz, and  $J_{AM} = 7.85$  Hz (Fig. 4, top trace) and they are appreciably stronger than all the subsidiary maxima, which are listed in the legend to the figure. Confirmation that these are all genuine is obtained by comparison with the simulation; all the experimental maxima are accounted for (Fig. 4, bottom trace). The simulation also predicts a maximum at  $J_{AZ} = 0.38$  Hz, but this appears only as an unresolved shoulder on the experimental curve,

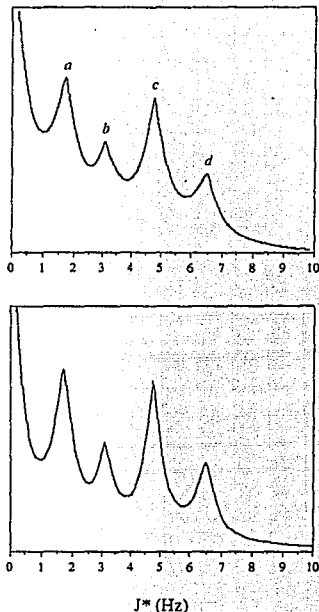


FIG. 3. (Top) Plot of the sum of all ordinates in the processed  $H_A$  multiplet versus  $J^*$ . The maxima occur at (a)  $J_{AP} = 1.71$  Hz, (b)  $J_{AP} - J_{MP} = 3.08$  Hz, (c)  $J_{AP} = 4.79$  Hz, (d)  $J_{AP} + J_{MP} = 6.50$  Hz. The bottom trace was obtained from a simulated multiplet.

illustrating an important limitation of the method when  $J^*$  approaches the experimental linewidth. More convincing evidence for this small splitting can be obtained by recalculating the simulated graph, omitting  $J_{AZ}$  (Fig. 4, middle trace). Clearly this is a much poorer fit to the experimental graph.

Proton  $H_M$  has four resolvable splittings  $J_{AM} = 7.85$  Hz,  $J_{MX} = 2.24$  Hz,  $J_{MP} = 1.71$  Hz, and  $J_{MZ} = 0.45$  Hz, giving rise to at least 17 maxima, set out in the legend to Fig. 5. The four tallest are "principal" maxima representing the four coupling constants (Fig. 5, top trace). The only possible challenge to the rule that the strong maxima are actual cou-

pling constants occurs if there is an accidental coincidence of (two or more subsidiary maxima. In this example there is a double maximum at g arising from the coincidence of subsidiary maxima at  $(J_{AM} - J_{MZ} - J_{MP})$  and  $(J_{MX} + J_{MP})$ . The principal maxima at c and d represent coupling constants but are also boosted by accidental coincidences. Confirmation of this interpretation is obtained by processing a simulated multiplet (Fig. 5, bottom trace) which gives a graph

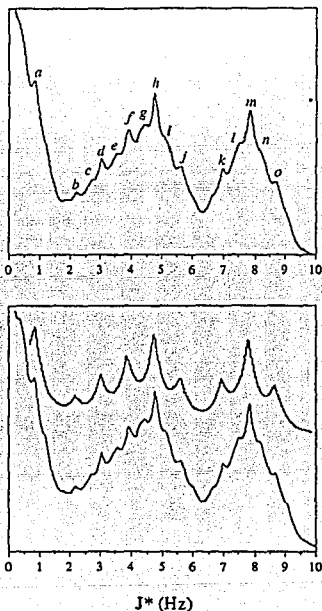


FIG. 4. (Top) Plot of the sum of all ordinates in the processed  $H_A$  multiplet versus  $J^*$ . The maxima occur at (a)  $J_{AX} = 0.87$  Hz, (b)  $J_{AM} - J_{AP} - J_{AX} = 2.19$  Hz, (c)  $J_{AM} - J_{AP} - J_{AZ} = 2.68$  Hz, (d)  $J_{AM} - J_{AP} = 3.06$  Hz, (e)  $J_{AM} - J_{AP} + J_{AZ} = 3.44$  Hz, (f)  $J_{AP} - J_{AX} = 3.92$  Hz and  $J_{AM} - J_{AP} + J_{AX} = 3.93$  Hz, (g)  $J_{AP} - J_{AZ} = 4.41$  Hz, (h)  $J_{AP} = 4.79$  Hz, (i)  $J_{AP} + J_{AZ} = 5.17$  Hz, (j)  $J_{AP} + J_{AX} = 5.66$  Hz, (k)  $J_{AM} - J_{AX} = 6.98$  Hz, (l)  $J_{AM} - J_{AZ} = 7.47$  Hz, (m)  $J_{AM} = 7.85$  Hz, (n)  $J_{AM} + J_{AZ} = 8.23$  Hz, (o)  $J_{AM} + J_{AX} = 8.72$  Hz. The middle trace is a simulation assuming  $J_{AZ} = 0$  while the bottom trace has  $J_{AZ} = 0.38$  Hz.

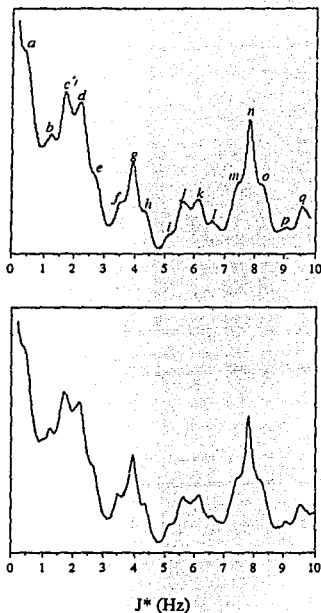


FIG. 5. (Top) Plot of the sum of all ordinates in the processed  $H_{\alpha}$  multiplet versus  $J^*$ . The maxima occur at (a)  $J_{M2} = 0.45$  Hz, (b)  $J_{M1} - J_{M2} = 1.26$  Hz, (c)  $J_{M1} = 1.71$  Hz and  $J_{M3} - J_{M2} = 1.79$  Hz, (d)  $J_{M1} + J_{M2} = 2.16$  Hz and  $J_{M3} = 2.24$  Hz, (e)  $J_{M3} + J_{M2} = 2.69$  Hz, (f)  $J_{M2} - J_{M1} - J_{M3} - J_{M2} = 3.45$  Hz and  $J_{M3} + J_{M1} - J_{M2} = 3.50$  Hz, (g)  $J_{M1} - J_{M3} - J_{M1} = 3.90$  Hz and  $J_{M3} + J_{M1} = 3.95$  Hz, (h)  $J_{M1} - J_{M3} - J_{M1} + J_{M2} = 4.35$  Hz and  $J_{M3} + J_{M1} + J_{M2} = 4.40$  Hz, (i)  $J_{M1} - J_{M3} - J_{M1} + J_{M2} = 5.16$  Hz, (j)  $J_{M1} - J_{M3} = 5.61$  Hz, (k)  $J_{M1} - J_{M3} + J_{M2} = 6.05$  Hz, (l)  $J_{M1} - J_{M3} + J_{M1} = 7.32$  Hz, (m)  $J_{M1} - J_{M2} = 7.40$  Hz, (n)  $J_{M1} = 7.85$  Hz, (o)  $J_{M1} + J_{M2} = 8.30$  Hz, (p)  $J_{M1} + J_{M1} - J_{M2} = 9.11$  Hz, (q)  $J_{M1} + J_{M1} = 9.56$  Hz.

that is an excellent match to the experimental data. If necessary, the simulated graph may be calculated for a slightly narrower linewidth so as to emphasize maxima that appear only as shoulders in the experimental graph.

At low values of  $J^*$ , the summation tends toward a high value, roughly twice that of the principal maxima. This oc-

cur when the splitting ( $J^*$ ) of the convolving doublet becomes smaller than the linewidth. The technique cannot detect splittings hidden within the experimental linewidth and it therefore falls short of the  $J$ -doubling method (8, 10) in this respect. Otherwise the derived values of the coupling constants (Table I) are very reliable and are in excellent agreement with independent determinations (18). The estimated accuracy is better than  $\pm 0.03$  Hz.

Once the coupling constants have been determined, several deconvolution operations may be cascaded so as to remove the splittings one by one until the multiplet is reduced to a singlet at the chemical-shift frequency (9). This can be particularly useful for the simplification of cross peaks in two-dimensional correlation spectroscopy. Figure 6 illustrates the progressive simplification of the AM cross peak from the COSY spectrum of nicotine which is dominated by the antiphase (active) splitting ( $J_{AM} = 7.85$  Hz) in the  $F_1$  and  $F_2$  dimensions. This large splitting is first removed in the  $F_1$  dimension (Fig. 6b) and then in  $F_2$  (Fig. 6c), leaving only positive-going signals. Deconvolution of the remaining four passive splittings ( $J_{MX}$ ,  $J_{MP}$ ,  $J_{AP}$ , and  $J_{AX}$ ) leaves a singlet response at the chemical-shift coordinates (Fig. 6d).

One of the useful properties of the lower-value algorithm is that several couplings may be removed in a single pass—deconvolution in the frequency domain with a stick spectrum that is a doublet of doublets of doublets collapses three different splittings at the same time. Since the algorithm is very simple and does not involve repeated Fourier transformations, it is also very fast. Neglecting the time required for reading and writing the  $160 \times 160$ -point data matrix, the processing time to convert the cross peak (Fig. 6a) into a singlet response (Fig. 6d) was only seven seconds on an obsolescent Sun 4/110 computer. This is an important practical advantage for simplification of two-dimensional spectra. In principle an entire two-dimensional correlation spectrum could be reduced in this manner by a completely automated

TABLE I  
Coupling Constants (in Hertz) Measured for Nicotine

	a	b	c
$J_{AM}$	7.85	7.86	7.86
$J_{AP}$	4.79	4.79	4.79
$J_{AX}$	0.67	0.89	0.88
$J_{AZ}$	0.38 <sup>d</sup>	0.37	0.36
$J_{MP}$	1.71	1.70	1.71
$J_{MX}$	2.24	2.27	2.25
$J_{M2}$	0.45 <sup>d</sup>	0.45	0.46
$J_{M1}$	0.45 <sup>d</sup>	0.51	0.48

<sup>a</sup> From  $t$ -Decon.

<sup>b</sup> From Ref. (18).

<sup>c</sup> From  $t$ -Decon.

<sup>d</sup> From subsidiary maxima.

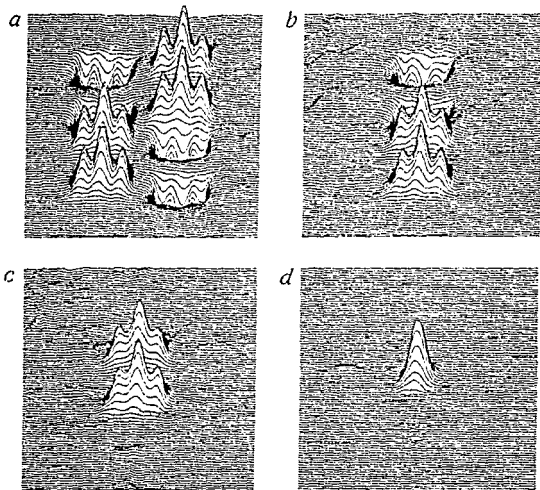


FIG. 6. Progressive deconvolution of splittings in a COSY cross peak ( $24 \times 24$  Hz) between  $H_A$  and  $H_M$  in nicotine. (a) The unprocessed cross peak. (b) After removing the active splitting  $J_{AM} = 7.85$  Hz in the  $F_1$  dimension. (c) After removing the active splitting in the  $F_2$  dimension. (d) After removing the remaining passive splittings.

program, giving a result equivalent to the well-known pattern recognition routines (19-21).

We have also investigated a related scheme "t-Decon" for fast deconvolution in the time domain. It evolved from the idea of dividing  $S(t)$ , the Fourier transform of the chosen multiplet, by a cosine wave  $\cos(\pi J^* t)$ , where  $J^*$  is a trial value of the coupling constant (3, 9). To avoid dividing by zero or near-zero values, the cosine wave was converted into a square wave of the same frequency. This is equivalent to multiplication by a square wave consisting of the values +1 and -1. The program simply modifies the appropriate sign bits in the experimental data table  $S(t)$  and is consequently a very fast operation. Let us call the processed signal  $S^*(t)$  and its Fourier transform  $S^*(f)$ . When  $J^*$  differs from  $J_{IS}$ ,  $S^*(f)$  contains many sideband responses at multiples of  $J^*$  but these mutually interfere as  $J^*$  passes through  $J_{IS}$ . The sum of the moduli of the ordinates in  $S^*(f)$  passes through a minimum at this condition. Minima also occur at the odd subharmonics  $J^* = J_{IS}/3, J_{IS}/5$ , etc., and at sums and differences of the coupling constants. Antiphase splittings are

processed with a square wave that has been advanced by one-quarter of a cycle, corresponding to a clipped sine wave rather than a clipped cosine wave. Applied to the nicotine problem, t-Decon gives values of the coupling constants that are in good agreement with those from f-Decon (Table 1). In general we have found that f-Decon gives appreciably clearer results than t-Decon in practice. Furthermore, there are no subharmonic responses as a function of  $J^*$  and the calculation does not entail multiple Fourier transformations. Frequency-domain deconvolution is therefore recommended.

#### REFERENCES

1. H. Oschkinat and R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **60**, 164 (1984).
2. H. Kessler, A. Müller, and H. Oschkinat, *Magn. Reson. Chem.* **23**, 844 (1985).
3. A. A. Bothner-By and J. Dadok, *J. Magn. Reson.* **72**, 540 (1987).
4. M. A. Delsuc and G. C. Levy, *J. Magn. Reson.* **76**, 306 (1988).
5. J. Keeler, D. Neuhaus, and J. J. Titman, *Chem. Phys. Lett.* **148**, 545 (1988).



6. J. J. Titman, D. Neuhaus, and J. Keeler, *J. Magn. Reson.* **85**, 111 (1989).
7. J. J. Titman and J. Keeler, *J. Magn. Reson.* **89**, 640 (1990).
8. L. McIntyre and R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **96**, 425 (1992).
9. J. M. Le Parco, L. McIntyre, and R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **97**, 553 (1992).
10. R. Freeman and L. M. McIntyre, *Isr. J. Chem.* **32**, 231 (1992).
11. J. A. Jones, D. S. Grainger, P. J. Hore, and G. J. Danielli, *J. Magn. Reson. A* **101**, 162 (1993).
12. P. Huber and G. Bodenhausen, *J. Magn. Reson. A* **102**, 81 (1993); **104**, 96 (1993).
13. P. Huber, C. Zwahlen, S. J. F. Vincent, and G. Bodenhausen, *J. Magn. Reson. A* **103**, 118 (1993).
14. F. Del Rio-Portilla and R. Freeman, *J. Magn. Reson. A* **104**, 358 (1993).
15. V. Blechta, F. Del Rio-Portilla, and R. Freeman, *Magn. Reson. Chem.* **32**, 134 (1994).
16. F. Del Rio-Portilla and R. Freeman, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **89**, 4275 (1993).
17. R. Baumann, G. Wider, R. R. Ernst, and K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.* **44**, 402 (1981).
18. T. P. Pittner, W. B. Edwards, R. L. Bassfield, and J. F. Whidby, *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 246 (1978).
19. B. U. Meier, G. Bodenhausen, and R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **60**, 161 (1984).
20. P. Pfandler, G. Bodenhausen, B. U. Meier, and R. R. Ernst, *Anal. Chem.* **57**, 2510 (1985).
21. S. Glaser and H. K. Kalbitzer, *J. Magn. Reson.* **74**, 540 (1987).

## Measurement of Poorly Resolved Splittings by $J$ Doubling in the Frequency Domain

FEDERICO DEL RÍO-PORTILLA, VRATISLAV BLECHTA,\* AND RAY FREEMAN

Department of Chemistry, Cambridge University, Lensfield Road, Cambridge, United Kingdom

Received August 26, 1994

All forms of spectroscopy eventually run up against limitations in resolving power and high-resolution NMR is no exception. When a particular splitting is sufficiently well resolved that the individual maxima are clearly discriminated, then there are standard peak-finding routines to measure it with reasonable accuracy. For less-well-resolved splittings many alternative procedures have been suggested, including maximum entropy reconstruction (1, 2),  $J$  deconvolution (3-7), and  $J$  doubling (8, 9). Having compared several of these techniques in practice, we would like to advocate the use of  $J$  doubling in the frequency domain as the simplest and most reliable method.

We consider the case of in-phase multiplets as recorded in conventional spectroscopy; antiphase multiplets from coherence-transfer spectra may be handled by closely related schemes (9). Any measurement procedure based on locating peak maxima breaks down near the point where the full linewidth at half-height becomes comparable with about 1.7 times the splitting. For a doublet, the two maxima merge near this condition, while for a triplet the outer maxima degenerate into points of inflection. A similar limitation applies to the measurement of two large couplings that have only a small difference. Figure 1 shows a simulation for the case of a multiplet with two coupling constants (4 and 5 Hz) subject to a Lorentzian line-broadening function. As the linewidth is increased the peak-finding program makes increasingly large errors, overestimating the smaller coupling and underestimating the larger until the two central lines quite suddenly coalesce and the program indicates the arithmetic mean value (4.5 Hz). Increasing broadening further degrades this measurement as all the lines of the multiplet begin to coalesce. Under the same conditions  $J$  doubling continues to give accurate values of the splittings.

It accomplishes this trick by making the splitting so large (by several stages of doubling) that there is no longer any overlap between the broad component lines. The procedure involves a search with a trial coupling  $J^*$  and may be implemented in either domain. In the time domain, the free-

induction decay is multiplied by  $\sin(\pi J^*t)$  and the result is multiplied by  $\cos(2\pi J^*t)$  and then  $\cos(4\pi J^*t)$  and so on, depending on the number of stages of doubling required. In the frequency domain the multiplet spectrum is convolved with an array made up of an even number ( $2k$ ) of alternating-phase delta functions of splitting  $J^*$ . An earlier restriction to  $2^\circ$  delta functions (8) turns out to be artificial; any even number suffices, permitting  $J$  tripling or  $J$  quintupling, etc. Figure 2 illustrates the case of two-stage  $J$  doubling ( $2k = 4$ ), equivalent to multiplication of the time-domain signal by  $\sin(\pi J^*t) \cos(2\pi J^*t)$ . Suppose that  $J^*$  is slightly larger than  $J_{exp}$ . Convolution of the experimental doublet (Fig.

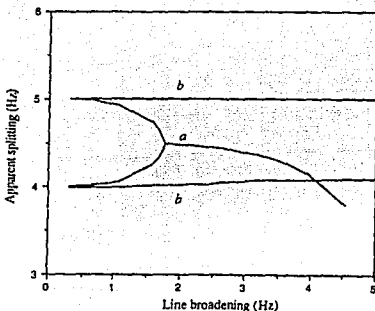


FIG. 1. Simulation showing two methods for extracting the splittings in a multiplet with  $J_1 = 4.0$  Hz and  $J_2 = 5.0$  Hz, studied as a function of the full (Lorentzian) linewidth. (a) The peak-finding routine underestimates the larger splitting and overestimates the smaller. When the broadening reaches approximately 1.7 times the small splitting (1 Hz) the two central lines coalesce and the program reports the mean value of  $J_1$  and  $J_2$ . The indicated value continues to fall off as the broadening is further increased until eventually complete coalescence occurs. (b) Frequency-domain  $J$  doubling gives values that deviate very little as a function of the line broadening.

\* Present address: Institute of Chemical Process Fundamentals, Rozvojova 135, Prague 6-Suchbát, Czech Republic.

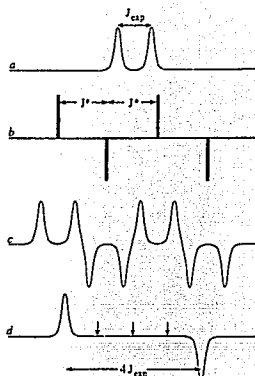


FIG. 2. Schematic diagram illustrating two-stage frequency-domain  $J$  doubling. The experimental doublet (a) is convolved with a set of four delta functions alternating in phase (b) to give the convolved spectrum (c) of eight lines. With  $J^*$  slightly larger than  $J_{exp}$ , the six inner lines are just beginning to show destructive interference. When  $J^* = J_{exp}$ , these antiphase doublets disappear (arrows), leaving only an antiphase doublet (d) with splitting  $4J_{exp}$ .

2a) with the stick spectrum (Fig. 2b) generates an eight-line pattern (Fig. 2c) where the inner six lines are just beginning to overlap and interfere. When  $J^* = J_{exp}$  the mutual cancellation is complete, leaving only an antiphase doublet (Fig. 2d) of splitting  $4J_{exp}$ , with essentially no overlap.

A search program varies the trial splitting  $J^*$  over a suitable range. The critical condition  $J^* = J_{exp}$  is detected by monitoring  $\Sigma$ , the sum of the moduli of all the ordinates in the processed spectrum; it shows a pronounced minimum when the inner antiphase doublets disappear. Provided that sufficiently fine digitization is achieved, both  $J$ -doubling methods offer high accuracy, approaching a few hundredths of one hertz in favorable cases. However, the time-domain version requires a calculation of the inverse Fourier transform for each increment in  $J^*$  and is therefore far slower than the frequency-domain alternative.

Both methods involve an initial Fourier transformation into the frequency domain so that the multiplet of interest may be excised from the rest of the spectrum. To avoid any problem with edge effects during the convolution, care is taken to include adequate sections of baseline on each side of the experimental multiplet wherever possible. Any baseline offset is corrected (7) and the tails on each side of the multiplet are extended with zeroes for a distance equal to the

width of the convolving spectrum of delta functions. By appropriate choice of the acquisition time of the free-induction decay and by zero filling, the digitization steps in the experimental spectrum are kept very small, comparable with the desired precision of the measurement, for example, 0.03 Hz. The same digitization steps are employed for the delta-function spectrum. Typically we used four or five stages of  $J$  doubling.

$J$  doubling in general is not without some minor complications. The principal minimum at  $J^* = J_{exp}$  is not the only one in the graph of  $\Sigma$  versus  $J^*$ . If  $2k$  delta functions are used in the convolution, there are  $k-1$  weaker minima at the odd subharmonics  $J^* = \frac{1}{2}J_{exp}, \frac{1}{3}J_{exp}$ , etc. (8). If there are other splittings present in the experimental multiplet they generate subsidiary minima at sums and differences of experimental splittings, forming 1:2:1 triplets (5). All these additional minima are predictable and do not normally cause ambiguity.

The frequency-domain  $J$ -doubling procedure was tested on some poorly resolved multiplets in the 400 MHz proton spectrum of strychnine. Altogether nine multiplets were investigated (16 couplings) and the results, set out in Table 1, are compared with those from the peak-finding routine and with earlier measurements (10-12). Certain assignments of geminal proton pairs proposed by Carter *et al.* (10) were reversed by Chazin *et al.* (11) and later changed again by Craig and Martin (12); we adopt this last scheme. Except where prevented by overlap problems, we were usually able to make two independent measurements of each coupling

TABLE 1  
Selected Proton-Proton Coupling Constants  
in Strychnine (in Hertz)

Protons A-X	$J$ doubling		Peak finding		Previous work*
	$J_{AX}$	$J_{XA}$	$J_{AX}$	$J_{XA}$	
1-2	7.33	7.30	7.52	7.42	7.41
1-3	1.42	1.42	1.21	1.38	1.18
1-4	0.59	0.56	—	—	0.45
2-3	7.30	7.30	7.42	7.30	7.46
2-4	1.08	1.05	1.05	—	1.12
3-4	8.07	8.04	8.05	8.03	8.10
8-13	10.48	10.45	10.51	10.46	10.47
11a-12	—	8.41	—	8.42	8.44
11b-12	—	3.28	—	3.33	3.28
12-13	3.40	3.37	3.33	3.22	3.12
13-14	3.09	—	3.22	—	3.10
14-15b	—	1.89	—	—	1.98
14-15a	—	4.76	—	4.35	4.58
15a-15b	14.32	14.38	14.36	14.35	14.37
15a-16	3.89 <sup>b</sup>	3.80 <sup>b</sup>	4.35	3.23	4.11
15b-16	2.16	2.13	—	2.12	1.82

\* Carter, Luther, and Long (10).

<sup>b</sup> These values fall just outside the estimated error band of  $\pm 0.03$  Hz.

constant (designated  $J_{AX}$  and  $J_{XA}$ ). In all the pairs save one, the two measurements were consistent within experimental error, estimated to be  $\pm 0.03$  Hz, but there were significant discrepancies with results from peak finding and the earlier work (10).

Three typical proton multiplets were chosen for illustration (Fig. 3). The graphs of  $\Sigma$  against  $J^*$  for the corresponding frequency-domain  $J$ -doubling measurements are shown in Fig. 4. The multiplet from H16 gives the simplest graph, indicating couplings of  $H(16-15b) = 2.13$  Hz and  $H(16-15a) = 3.80$  Hz, with a subharmonic response at  $\frac{1}{2}J(16-15a)$ . In fact this particular multiplet is just amenable to direct measurement by a peak-finding routine but the marginal resolution pulls the peaks together and increases the experimental errors. The average value for the smaller splitting (2.12 Hz) is close to the  $J$ -doubling result, whereas the larger splitting (3.23 Hz) is spuriously low.

The challenge presented by site H15a is to measure two couplings that are close enough in magnitude that we see only 1:2:1 triplets (Fig. 3) and peak finding can report only the mean value. In contrast,  $J$  doubling finds three principal minima at  $J(15a-16) = 3.89$  Hz,  $J(15a-14) = 4.76$  Hz, and  $J(15a-15b) = 14.32$  Hz.

Finally, we address the case of H15b (Fig. 3), neglecting

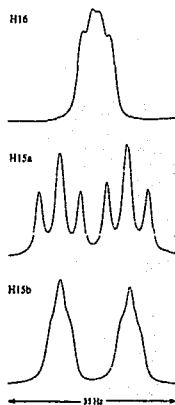


FIG. 3. Three selected spin multiplets from the 400 MHz proton spectrum of strychnine. These are examined by frequency-domain  $J$  doubling in Fig. 4. For the H16 site (top) a peak-finding routine gives the splittings  $J(16-15b) = 2.07$  and  $2.17$  Hz, and  $J(16-15a) = 3.18$  and  $3.28$  Hz.

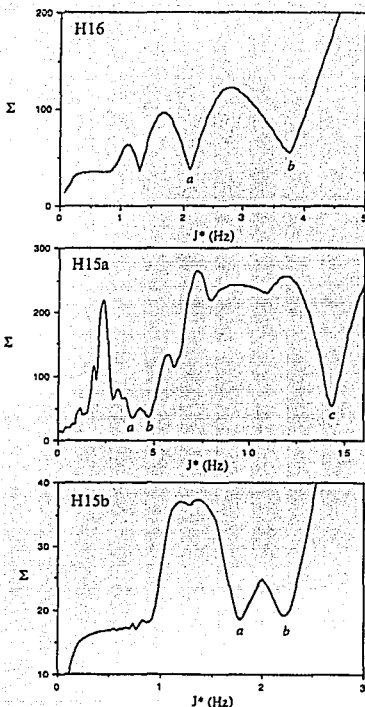


FIG. 4. Proton multiplets from three selected sites in strychnine examined by frequency-domain  $J$  doubling. The sum of the moduli of all ordinates in the processed spectrum ( $\Sigma$ ) is plotted against the trial coupling  $J^*$ . The principal minima indicate coupling constants. Top graph, (a)  $J(16-15b) = 2.13$  Hz, (b)  $J(16-15a) = 3.80$  Hz. Middle, (a)  $J(15a-16) = 3.89$  Hz, (b)  $J(15a-14) = 4.76$  Hz, (c)  $J(15a-15b) = 14.32$  Hz. Bottom, (a)  $J(15b-14) = 1.89$  Hz, (b)  $J(15b-16) = 2.16$  Hz.

the large splitting (14.38 Hz) which is easily measured. The remaining structure was vestigial shoulders but is clearly not suitable for peak-finding methods. The  $J$ -doubling procedure works better if we select just one of

these two submultiplets as the raw data. The corresponding graph in Fig. 4 indicates two clear minima at  $J(15b-14) = 1.89$  Hz and  $J(15b-16) = 2.16$  Hz, demonstrating the separation of two splittings differing by only 0.27 Hz.

We conclude that frequency-domain  $J$  doubling has similar attributes to the corresponding time-domain analog (5, 8) but is considerably faster to implement because it does not require repeated inverse Fourier transformations. It should lend itself to an automated computer analysis that would make the proper allowance for the expected subharmonic responses and subsidiary minima. Note that once a coupling has been determined, multistage  $J$  doubling *effectively deconvolves* that particular splitting. It divides the remaining multiplet structure into two identical, well-separated (antiphase) submultiplets which can then be recombined and placed at the correct chemical-shift frequency.

## REFERENCES

1. M. A. Delsuc and G. C. Levy, *J. Magn. Reson.* **76**, 306 (1988).
2. J. A. Jones, D. S. Grainger, P. J. Hore, and G. J. Daniell, *J. Magn. Reson. A* **101**, 162 (1993).
3. A. A. Bothner-By and J. Dadok, *J. Magn. Reson.* **72**, 540 (1987).
4. J. M. Le Parco, L. McIntyre, and R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **97**, 553 (1992).
5. R. Freeman and L. M. McIntyre, *Israel J. Chem.* **32**, 231 (1992).
6. P. Huber and G. Bodenhausen, *J. Magn. Reson. A* **102**, 81 (1993).
7. P. Huber, C. Zwielen, S. J. F. Vincent, and G. Bodenhausen, *J. Magn. Reson. A* **103**, 118 (1993).
8. L. McIntyre and R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **96**, 425 (1992).
9. V. Blechta, F. Del Rio-Portilla, and R. Freeman, *Magn. Reson. Chem.* **32**, 134 (1994).
10. J. C. Carter, G. W. Luther, and T. C. Long, *J. Magn. Reson.* **15**, 122 (1974).
11. W. J. Chazin, L. D. Colebrook, and J. T. Edward, *Can. J. Chem.* **61**, 1749 (1983).
12. D. A. Craig and G. E. Martin, *J. Nat. Prod.* **49**, 456 (1986).