

Historias de la RMN

Jorge Santoro

10. El análisis espectral

El descubrimiento del acoplamiento escalar realizado a comienzos de la década de 1950 proporcionaba un parámetro más a determinar en los espectros de RMN. El interés en la determinación de los parámetros magnéticos se debe a que los desplazamientos químicos permiten identificar grupos funcionales específicos en muchos compuestos y las constantes de acoplamiento son notablemente sensibles a la disposición relativa de los espines acoplados. Además, la comparación de los valores experimentales con su predicción teórica constituye un buen test para los métodos de Química Cuántica.

Las reglas dadas por Herbert Gutowsky (1), que permitían una medida sencilla del valor de la constante de acoplamiento, solo eran de aplicación en el caso de que la diferencia entre las frecuencias de resonancia de los dos espines acoplados fuera mucho mayor que la constante de acoplamiento, un caso conocido como de acoplamiento débil, tal como puso de manifiesto Erwin Hahn (2,3). En caso contrario, acoplamiento fuerte, incluso la determinación precisa del desplazamiento químico puede resultar compleja. Aunque Hahn expuso cómo calcular los niveles de energía y las frecuencias de transición en el caso general (3), se había ocupado principalmente en su influencia en la forma de los ecos de espín, por lo que sería Harden McConnell quien mostraría el camino para, a partir de un conjunto de parámetros magnéticos, calcular el espectro de RMN (4), tanto en el caso de acoplamiento débil como de acoplamiento fuerte. En su publicación se ocupaba fundamentalmente de la inclusión de la simetría y proporcionaba fórmulas algebraicas para analizar el sistema que se conoce actualmente como AA'XX' o [AX]₂. Poco después John Pople, William Schneider y Harold Bernstein publicaron un artículo (5) que tuvo gran trascendencia en la RMN de la época. Proponían en él el sistema utilizado ahora universalmente para la clasificación de sistemas de espín: letras cercanas entre sí en el alfabeto (por ejemplo, A y B) para denotar espines fuertemente acoplados y letras alejadas (por ejemplo, A, M y X) para núcleos acoplados débilmente; el número de espines de cada tipo se indica con un subíndice. A continuación exponían, de modo más detallado que McConnell, el procedimiento de cálculo de los niveles de energía y de las intensidades de las transiciones entre ellos. Por último, aplicaban el procedimiento a tres casos (AB, AB₂ y ABX) para los que encontraban expresiones algebraicas que permitían analizar los espectros correspondientes. Los mismos autores tratarían casos más complejos en artículos sucesivos y terminarían por escribir uno de los libros seminales de la RMN (6). La convención de signos que utilizaron es tal que el campo magnético se considera en la dirección -z, una convención que, posteriormente, se ha mantenido en los métodos de cálculo del espectro. En el prefacio del libro destacaban la importancia que tenía el análisis espectral en esa época: *In the theoretical parts, emphasis is laid on these aspects, such as spectral analysis and the interpretation of chemical shifts, which are likely to be important in connection with chemical applications.* Como dato curioso, entre los dieciséis trabajos de revisión del estado de la RMN que se citan en el libro figura la que posiblemente sea la primera revisión de la espectroscopía de RMN en español: J. Castells, Espectroscopia de resonancia nuclear magnética: especial referencia a su utilización en Química Orgánica, Revista de Ciencia Aplicada, 9, 499, 1957. La llegada de los primeros espectrómetros de RMN a nuestro país, sin embargo, no se produciría hasta varios años después.

Con espectrómetros que a principio de la década de 1960 operaban a 40 o 60 MHz la mayoría de los sistemas de espín no eran susceptibles de un análisis de primer orden (acoplamiento débil). Además, muchos de ellos eran más complejos que los casos tratados por Pople, Schneider y Bernstein y no podían ser tratados por procedimientos algebraicos. La solución estaba en utilizar métodos numéricos. El cálculo de la matriz hamiltoniana, dados unos valores de las frecuencias de resonancia de cada uno de los espines y de las constantes de acoplamiento, no planteaba problemas. La construcción de la matriz hamiltoniana resultaba sencilla si se utilizaban como funciones de base los productos de las funciones α o β de cada espín. Para la diagonalización de la matriz con objeto de determinar los niveles de energía existían métodos numéricos bien establecidos. Sin embargo su aplicación de modo manual era larga, tediosa y expuesta a cometer errores (para un caso de cinco espines 1/2 es preciso diagonalizar dos matrices de dimensión 5×5 y dos matrices de 10×10). Afortunadamente empezaban a estar disponibles ordenadores que podían hacer el trabajo de modo rápido y sin errores de cálculo. Surgió así en el grupo de Aksel Bothner-By un programa de ordenador, FREQINT (7,8), capaz de calcular el espectro correspondiente a un conjunto de parámetros magnéticos y que admitía hasta siete espines. El problema del análisis, sin embargo, es el inverso: el cálculo de los parámetros magnéticos a partir del espectro. La forma inicial de utilizar el programa FREQINT para este objetivo consistía en una labor de prueba y error hasta que el espectro calculado reproducía suficientemente bien el observado. En cada paso, la comparación del espectro calculado con el observado daba claves para modificar los parámetros espectrales de prueba. Pronto el grupo de Bothner-By encontró un método más adecuado para modificar los parámetros tentativos. Además del espectro de prueba se calculaban espectros adicionales con cada parámetro modificado en una pequeña cantidad, Δp_j . Eso permitía evaluar para cada línea espectral i la cantidad $D_{ij} = \Delta v_i / \Delta p_j$, donde Δv_i es el cambio en frecuencia experimentado por la línea i y Δp_j la variación del parámetro espectral j . La resolución del sistema de ecuaciones $D \cdot \Delta p = \Delta v$, donde D es la matriz de elementos D_{ij} , Δp el vector incógnita de incremento de los parámetros magnéticos y Δv el vector de elementos $v_{obs,i} - v_{calc,i}$, proporcionaba las variaciones que se debían aplicar a los parámetros de prueba. Puesto que el problema no es lineal (D_{ij} no es constante), en general se necesitaba repetir el proceso hasta encontrar la solución óptima.

En 1960 Charles Reilly y Jerry Swalen propusieron un método de análisis (9) que acabó derivando en un par de programas de ordenador, NMREN y NMRIT, que efectuaban el análisis espectral de un modo iterativo más eficiente (10). A partir de unos parámetros de prueba se calcula la matriz hamiltoniana, H , cuya diagonalización proporciona los valores propios, Λ , y los vectores propios, S ($\Lambda = S^{-1}HS$). A partir de ellos se calcula el espectro teórico consistente en un conjunto de líneas de frecuencia $\nu_{ij} = \Lambda_i - \Lambda_j$ e intensidad I_{ij} , dependiente de S . Si el espectro calculado es próximo al experimental se pueden asignar las líneas espectrales observadas a tránsitos entre niveles de energía determinados. A partir de esta asignación es posible calcular unos valores "observados" de los niveles de energía, Λ_{obs} , mediante la resolución del sistema de ecuaciones $\Lambda_{obs,i} - \Lambda_{obs,j} = \nu_{obs,ij}$ complementado con la ecuación $\sum \Lambda_i = 0$. Utilizando ahora los vectores propios S del cálculo y los niveles de energía experimentales, Λ_{obs} , se construye una matriz hamiltoniana mejorada mediante la transformación $H^* = S\Lambda_{obs}S^{-1}$. Los elementos diagonales de la matriz H^* permiten escribir una serie de ecuaciones lineales dependientes de los parámetros magnéticos. La resolución de este sistema de ecuaciones proporciona unos valores mejorados de los parámetros magnéticos. Estos nuevos parámetros pueden utilizarse para repetir el proceso, con la salvedad de que, en principio, no es necesario efectuar una nueva asignación de las líneas observadas a parejas

de niveles de energía para efectuar el cálculo de los niveles de energía experimentales; basta con obtener los nuevos vectores propios, S .

Algún tiempo después Bothner-By publicó (11) un método diferente de análisis con ordenador, denominado LAOCOON (*Least-squares Adjustment of Calculated On Observed Nmr spectra*), que tendría una gran difusión. El método se basaba en la utilización de las derivadas de las frecuencias de las transiciones respecto a los parámetros magnéticos, tal y como se ha descrito antes. La gran diferencia residía en que, en lugar de obtener las derivadas a partir de un conjunto de cálculos de espectros teóricos, había conseguido demostrar que las derivadas se podían determinar algebraicamente de modo sencillo. En efecto

$$\Lambda = S^{-1}HS$$

$$d\Lambda/dp_j = dS^{-1}/dp_j HS + S^{-1}dH/dp_j S + S^{-1}H dS/dp_j$$

$$d\Lambda/dp_j = dS^{-1}/dp_j S\Lambda + S^{-1}dH/dp_j S + \Lambda S^{-1} dS/dp_j$$

Puesto que Λ es diagonal, también lo es $d\Lambda/dp_j$. Las matrices $dS^{-1}/dp_j S$ y $S^{-1} dS/dp_j$ son antisimétricas ($a_{ij} = -a_{ji}$; $a_{ii} = 0$). Su producto por una matriz diagonal da elementos nulos en la diagonal de la matriz producto. Por lo tanto, los sumandos primero y tercero de la ecuación anterior no contribuyen a la diagonal de $d\Lambda/dp_j$. Consecuentemente, los elementos de la diagonal de $d\Lambda/dp_j$ coinciden con los de $S^{-1}dH/dp_j S$. La diferenciación dH/dp_j es trivial, de modo que para el cálculo de las derivadas solo se requiere conocer los vectores propios, que ya se obtienen en la diagonalización que proporciona el valor de Λ . La derivada de las frecuencias de transición es simplemente la diferencia en las derivadas de los niveles de energía

$$dv_{mn}/dp_j = d\Lambda_m/dp_j - d\Lambda_n/dp_j$$

El procedimiento que antes utilizaba Bothner-By de un modo en parte manual podía codificarse en un programa de ordenador y además éste podía operar iterativamente mejorando la solución en cada paso hasta obtener la óptima. El método de Bothner-By trataba el problema de un modo más directo que el de Swallen y Reilly y era más eficiente, de modo que LAOCOON se convirtió en el método/programa de ordenador habitual para tratar el problema del análisis espectral. Parte de su éxito se debió a la difusión del programa de ordenador a través del *Quantum Chemistry Program Exchange* (QCPE), una iniciativa de intercambio de software científico centralizada en la Universidad de Indiana en Bloomington, EEUU.

La determinación de parámetros magnéticos con el programa LAOCOON, si bien alcanzó gran éxito, no estaba desprovista de posibles fallos. En efecto existen casos de acoplamiento fuerte en los que dos o más conjuntos de parámetros dan lugar a transiciones con la misma frecuencia, pero que difieren en su intensidad (12). Un caso bien conocido es el del sistema ABX, que posee dos soluciones que tan solo difieren en la intensidad de las señales de la parte X del espectro. Puesto que LAOCOON solo tiene en cuenta las frecuencias de las transiciones podía llegar a soluciones equivocadas. Para evitar este problema David Stephenson y Gerhard Binsch propusieron un método de análisis alternativo a los existentes (13), método que intenta reproducir el espectro teniendo en cuenta tanto las frecuencias como las intensidades. El método, denominado DAVINS (*Direct Analysis of Very Intricate Nmr Spectra*), no requiere partir de unos parámetros iniciales próximos a la solución. Además, no utiliza una asignación de líneas a transiciones concretas entre niveles de energía. En lugar

de ello, considera tanto el espectro experimental como el calculado (en el que a cada transición espectral se le asigna una lorenciana) como vectores de números reales (intensidades a valores sucesivos de frecuencia) que se deben hacer coincidir. El método de ajuste utiliza una función de error que evita los mínimos locales. La función habitual de mínimos cuadrados se sustituye por la función de error $\phi = (I_{\text{obs}} - I_{\text{cal}})^T \cdot W \cdot (I_{\text{obs}} - I_{\text{cal}})$, donde la matriz W , que se va actualizando en iteraciones sucesivas, incluye términos no diagonales. Con ello se disminuye la importancia de los ajustes locales frente al ajuste global. El programa, a pesar de sus ventajas, ha tenido una difusión mucho menor que sus antecesores. Por un lado, su aplicación no siempre es sencilla, puesto que es dependiente de la calidad de la línea base, de la fase del espectro y de la desviación de la forma de línea de una lorenciana. Por otro, en 1980 los espectrómetros de alto campo empezaban a ser comunes (en 1964 se comercializó el primer espectrómetro de 220 MHz y en 1979 el primero de 500 MHz) por lo que, en general, los espectros eran de primer orden y su análisis elemental. El problema del análisis espectral, que durante años había sido una faceta importante de la RMN, perdió gran parte de su interés. La necesidad del análisis espectral persiste, sin embargo, en determinados casos; fundamentalmente en moléculas simétricas en las que existe equivalencia química pero no magnética, con lo que los espectros son siempre de segundo orden.

Lamentablemente, la desaparición del QCPE ha hecho que LAOCOON, DAVINS y otros programas de ordenador derivados de ellos (por ejemplo, con la introducción explícita de la simetría o de la aproximación X o adaptados al caso de moléculas orientadas) hayan dejado de ser accesibles. Una alternativa para realizar el análisis espectral, disponible actualmente, es el programa ANATOLIA (*ANALYSIS of TOtal LIneshApe*) desarrollado recientemente (14). El programa, con algunas modificaciones, sigue la propuesta de Stephenson y Binsch y persigue reproducir tanto las frecuencias como las intensidades de las transiciones espectrales.

Obtenidos los parámetros magnéticos por alguno de los procedimientos descritos, el análisis espectral se puede dar por terminado en la mayoría de los casos. El análisis espectral de un sistema de N espines proporciona para cada uno de ellos los valores de la frecuencia de resonancia y el valor de $N-1$ acoplamientos, uno con cada uno de los restantes espines. La identificación de estos N conjuntos de valores con espines concretos de la molécula bajo estudio puede hacerse de $N!$ maneras. Normalmente los valores que definen el sistema de espines se han elegido asignando a cada un núcleo concreto de la molécula un número del espín en el hamiltoniano, por lo que para realizar la asignación estructural final basta con efectuar la atribución inversa. Solo en casos muy especiales (por ejemplo, cuando dos espines poseen frecuencia de resonancia y acoplamientos similares con el resto de espines) habrá que considerar la posibilidad de asignaciones estructurales alternativas.

En el caso de moléculas con simetría, que dan lugar a sistemas carentes de equivalencia magnética, la asignación estructural final es más compleja. La simetría da lugar a dos hechos. Por un lado, ciertas constantes de acoplamiento son idénticas necesariamente, lo que confiere simetría al sistema de espines en el hamiltoniano y disminuye el número de parámetros a determinar. Por otro, es posible efectuar intercambios de los valores de las constantes de acoplamiento que producen el mismo espectro calculado: la solución al análisis es múltiple. Un caso sencillo y bien conocido es el del ortodichlorobenceno (sistema $AA'BB'$) en el que el intercambio del valor del acoplamiento ${}^3J_{AB} = {}^3J_{A'B'}$ con el del acoplamiento ${}^4J_{AB} = {}^4J_{A'B}$ deja el espectro invariante. En este caso la decisión entre ambas posibilidades es obvia (${}^3J > {}^4J$). Otros casos resultan más complejos, tanto a la hora de

determinar todas las soluciones posibles (posiblemente el caso de mayor multiplicidad es el de los heterociclos pentagonales, que da lugar a 24 soluciones relacionadas por cambios concertados de los valores de varias constantes de acoplamiento) como de discernir cuál de las soluciones es la correcta fisicoquímicamente. La primera tarea puede abordarse teniendo en cuenta la simetría del sistema de espines (15). La segunda requiere incorporar consideraciones acerca de los signos y valores relativos de los acoplamientos compatibles con la estructura molecular. Con suerte, permite determinar una única solución aceptable químicamente.

Atribución inicial		Una atribución alternativa
2J_A (A ₁ -A ₂ y A ₃ -A ₄)		2J_A (A ₁ -A ₂ y A ₃ -A ₄)
${}^4J_{A^c}$ (A ₁ -A ₄ y A ₂ -A ₃)		${}^4J_{A^t}$ (A ₁ -A ₄ y A ₂ -A ₃)
${}^4J_{A^t}$ (A ₁ -A ₃ y A ₂ -A ₄)	1	${}^4J_{A^c}$ (A ₁ -A ₃ y A ₂ -A ₄)
2J_B (B ₁ -B ₂ y B ₃ -B ₄)	→	2J_B (B ₁ -B ₂ y B ₃ -B ₄)
${}^3J_{B^c}$ (B ₁ -B ₄ y B ₂ -B ₃)		${}^3J_{B^t}$ (B ₁ -B ₄ y B ₂ -B ₃)
${}^3J_{B^t}$ (B ₁ -B ₃ y B ₂ -B ₄)	←	${}^3J_{B^c}$ (B ₁ -B ₃ y B ₂ -B ₄)
${}^3J_{AB^c}$ (A ₁ -B ₁ , A ₂ -B ₂ , A ₃ -B ₃ y A ₄ -B ₄)		${}^3J_{AB^t}$ (A ₁ -B ₁ , A ₂ -B ₂ , A ₃ -B ₃ y A ₄ -B ₄)
${}^3J_{AB^t}$ (A ₁ -B ₂ , A ₂ -B ₁ , A ₃ -B ₄ y A ₄ -B ₃)	2	${}^3J_{AB^c}$ (A ₁ -B ₂ , A ₂ -B ₁ , A ₃ -B ₄ y A ₄ -B ₃)
${}^4J_{AB^c}$ (A ₁ -B ₄ , A ₂ -B ₃ , A ₃ -B ₂ y A ₄ -B ₁)		${}^4J_{AB^c}$ (A ₁ -B ₄ , A ₂ -B ₃ , A ₃ -B ₂ y A ₄ -B ₁)
${}^4J_{AB^t}$ (A ₁ -B ₃ , A ₂ -B ₄ , A ₃ -B ₁ y A ₄ -B ₂)		${}^4J_{AB^t}$ (A ₁ -B ₃ , A ₂ -B ₄ , A ₃ -B ₁ y A ₄ -B ₂)
	Hamiltoniano	
	J ₁ (I ₁ I ₂ + I ₃ I ₄)	
	J ₂ (I ₁ I ₄ + I ₂ I ₃)	
	J ₃ (I ₁ I ₃ + I ₂ I ₄)	
	J ₄ (I ₅ I ₆ + I ₇ I ₈)	
	J ₅ (I ₅ I ₈ + I ₆ I ₇)	
	J ₆ (I ₅ I ₇ + I ₆ I ₈)	
	J ₇ (I ₁ I ₅ + I ₂ I ₆ + I ₃ I ₇ + I ₄ I ₈)	
	J ₈ (I ₁ I ₆ + I ₂ I ₅ + I ₃ I ₈ + I ₄ I ₇)	
	J ₉ (I ₁ I ₈ + I ₂ I ₇ + I ₃ I ₆ + I ₄ I ₅)	
	J ₁₀ (I ₁ I ₇ + I ₂ I ₈ + I ₃ I ₅ + I ₄ I ₆)	

En el ejemplo se ha usado la estructura de la izquierda para construir la matriz hamiltoniana. Efectuada la determinación de los parámetros magnéticos que reproducen el espectro, la identificación de los acoplamientos J₁ a J₁₀ puede hacerse tanto con la estructura de la izquierda (J₁ = 2J_A , J₂ = ${}^4J_{A^c}$, etc.) como con la estructura de la derecha (J₁ = 2J_A , J₂ = ${}^4J_{A^t}$, etc.), pues ambas dan lugar a la misma forma funcional del matriz hamiltoniano. Inversamente, la sustitución en el hamiltoniano de los valores obtenidos a partir de la estructura de la izquierda para J₁ a J₁₀ por los valores de los acoplamientos que indica la disposición de espines de la derecha (intercambio de valores J₂ ↔ J₃, J₅ ↔ J₆ y J₇ ↔ J₈) deja invariante el espectro. Para esta molécula existen 22 soluciones adicionales.

Referencias

1. H.S. Gutowsky, D.W. McCall, *Nuclear Magnetic Resonance Fine Structure in Liquids*, Phys. Rev., 82, 748-749, 1951.
2. E.L. Hahn, D.E. Maxwell, *Chemical Shift and Field Independent Frequency Modulation of the Spin Echo Envelope*, Phys. Rev., 84, 1246-1247, 1951.
3. E.L. Hahn, D.E. Maxwell, *Spin Echo Measurements of Nuclear Spin Coupling in Molecules*, Phys. Rev., 88, 1070-1084, 1952.
4. H.M. McConnell, A.D. McLean, C.A. Reilly, *Analysis of Spin-Spin Multiplets in Nuclear Magnetic Resonance Spectra*, J. Chem. Phys., 23, 1152-1159, 1955.

5. H.J. Bernstein, J.A. Pople, W.G. Schneider, *The Analysis of Nuclear Magnetic Resonance Spectra. I. Systems of Two and Three Nuclei*, Can. J. Chem., 35, 67-83, 1957.
6. J.A. Pople, W.G. Schneider, H.J. Bernstein, *High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance*, McGraw-Hill, 1959.
7. A.A. Bothner-By, C. Naar-Colin, *The Proton Magnetic Resonance Spectra of Olefins. I. Propene, Butene-1 and Hexene-1*, J. Am. Chem. Soc., 83, 231-236, 1961.
8. A.A. Bothner-By, C. Naar-Colin, H. Günther, *The Proton Magnetic Resonance Spectra of Olefins. II. Internal Rotation in Alkylethylenes*, J. Am. Chem. Soc., 84, 2748-2751, 1962.
9. C.A. Reilly, J.D. Swalen, *Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Some Simple Epoxides*, J. Chem. Phys., 32, 1378-1385, 1960.
10. J.D. Swalen, C.A. Reilly, *Analysis of Complex NMR Spectra. An Iterative Method*, J. Chem. Phys., 37, 21-29, 1962.
11. S. Castellano, A.A. Bothner-By, *Analysis of NMR Spectra by Least Squares*, J. Chem. Phys., 41, 3863-3869, 1964.
12. S. Castellano, J.S. Waugh, *Strong Coupling in Nuclear Resonance Spectra. IV. Exact Analysis of Three-Spin Spectra*, J. Chem. Phys., 34, 295-309, 1961.
13. D.S. Stephenson, G. Binsch, *Automated Analysis of High-Resolution NMR Spectra. I. Principles and Computational Strategy*, J. Magn. Reson., 37, 395-407, 1980.
14. D.A. Cheshkov, K.F. Sheberstov, D.O. Sinitsyn, V.A. Chertkov, *ANATOLIA: NMR Software for Spectral Analysis of Total Lineshape*, Magn. Reson. Chem., 56, 449-457, 2018.
15. E. Díez, J. Santoro, A.L. Esteban, *NMR Multiple Solutions Arising from Nuclear Permutations in Symmetrical Spin Systems*, J. Magn. Reson., 46, 440-452, 1982.