

## Historias de la RMN

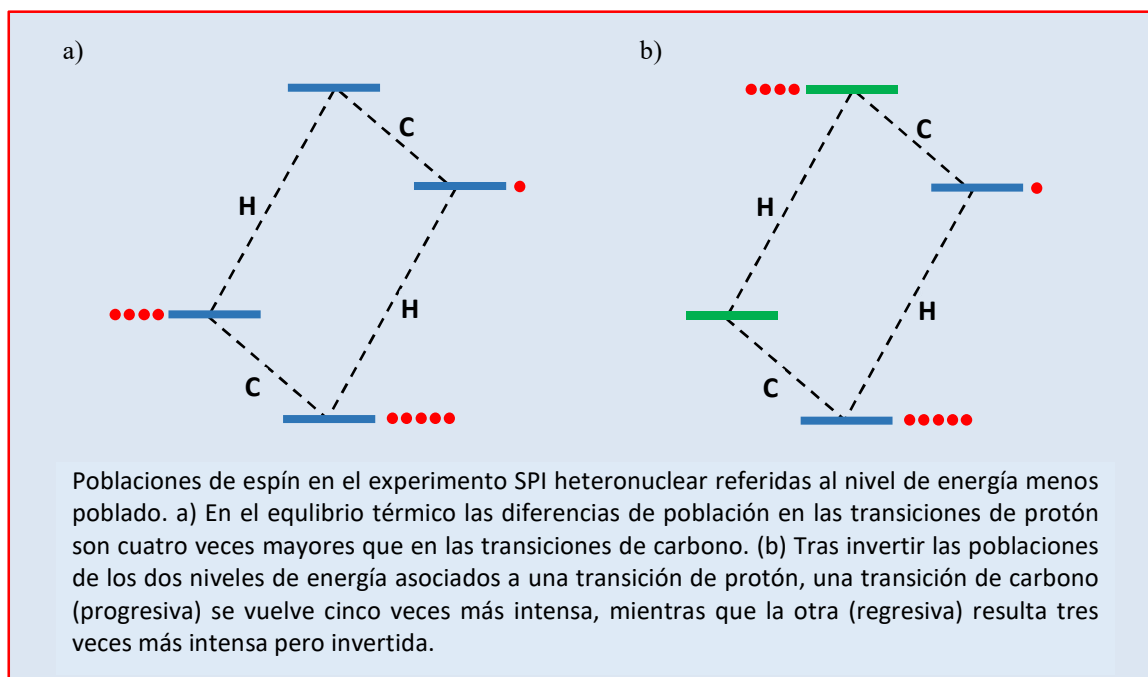
Jorge Santoro

### 15. Transferencia de polarización

Posiblemente la característica más notable de la RMN sea la posibilidad de transferir una propiedad (magnetización transversal o longitudinal) de unos espines a otros, en una aproximación al sueño de los alquimistas. Esta posibilidad se asienta en el hecho de que los espines están acoplados, es decir no son completamente independientes. Alfred Overhauser mostró cómo se puede aprovechar esta característica en el caso de la interacción de los espines nucleares con los espines electrónicos para intensificar la intensidad de las señales de RMN (1). Ionel Solomon extendió esta característica a la interacción entre espines nucleares (2). En ambos casos la modificación de la intensidad de las señales tiene su origen en la relajación, en el caso del efecto Overhauser nuclear concretamente en la contribución a la relajación del acoplamiento dipolar.

Años después Edward Baker mostró que también se pueden producir transferencias de magnetización entre espines acoplados escalarmente (3), aunque mediante un mecanismo diferente. El experimento que propuso para conseguirlo era un experimento de doble resonancia en el que se barre la frecuencia de irradiación  $\nu_2$  para valores preestablecidos de  $\nu_1$ . La radiofrecuencia  $\nu_1$  se centra en una línea experimental y se investigan las variaciones en la intensidad de la línea observada en función del valor de  $\nu_2$ . Baker denominó al experimento INDOR (*IN*ternuclear *DO*uble *RE*sonance) y lo aplicó a transferencias heteronucleares. Poco después Reinhold Kaiser presentó resultados para el caso homonuclear y ofreció una teoría cualitativa del experimento (4), que puesto que daba lugar a una modificación de intensidades se consideró como un efecto Overhauser generalizado (de hecho, en aquellos años cualquier proceso que variara la intensidad de las señales se solía designar como efecto Overhauser, aunque su origen fuera otro). Dos fueron las principales aplicaciones del INDOR. Por un lado el incremento de sensibilidad en los espectros de heteronúcleos, puesto que se observa la señal del espín de mayor constante giromagnética y se barre  $\nu_2$  a frecuencias del de menor constante giromagnética. Por otro, la determinación de la estructura del diagrama de niveles de energía, puesto que el experimento revela la conexión entre la transiciones irradiada,  $\nu_2$ , y la observada,  $\nu_1$ , así como su carácter progresivo o regresivo, de acuerdo con la nomenclatura introducida por Weston Anderson (5). En sistemas de más de dos espines acoplados esto permitía la determinación del signo relativo de las constantes de acoplamiento.

El experimento INDOR presenta una incompatibilidad fundamental con la excitación mediante un pulso y posterior transformada de Fourier. Mientras que ésta se caracteriza por detectar simultáneamente todas las señales en un intervalo grande de frecuencias, en el experimento INDOR la detección es a una frecuencia fija. Casi simultáneamente, James Feeney (6) y Klaus Pachler (7) diseñaron métodos que permitían obtener la misma información que proporciona el experimento INDOR, pero manteniendo las ventajas de la FT-NMR. La idea consistía en realizar el experimento "a la inversa", es decir perturbar una línea del espectro y aplicar a continuación un pulso para observar en el espectro completo los cambios de intensidad producidos. En el experimento de Feeney, que denominó "pseudo INDOR", la perturbación consistía en una irradiación a la frecuencia de una transición espectral de modo que igualara la población de los dos niveles de energía conectados.



Pachler, en cambio, utilizaba un pulso selectivo de  $180^\circ$  para intercambiar la población de dichos niveles, es decir invertir la diferencia de población. Por motivos obvios Pachler denominó a su experimento *Selective Population Inversion*, SPI. En ambos casos al restar del espectro con perturbación el espectro obtenido sin usarla se obtiene un espectro con las mismas características que el INDOR. Puesto que en el experimento SPI se produce una mayor perturbación de las poblaciones que en el experimento de Feeney el espectro obtenido es más intenso.

Las aplicaciones del experimento SPI fueron las mismas que las del INDOR: La determinación del signo relativo de constantes de acoplamiento (8,9) y el incremento de intensidad del espectro de heteronúcleos (10). Dado que el experimento producía un cambio en la población de los niveles de energía algunos autores (8,10) denominaron al experimento *Selective Population Transfer*, SPT, una denominación que convivió con la original. La equivalencia formulada con el experimento INDOR, sin embargo, no era completa. En el caso de experimentos homonucleares el pulso de medida afecta tanto al espín cuya transición se ha invertido mediante el pulso selectivo como al resto de espines. Esto tiene como consecuencia que el efecto tan solo se manifieste con intensidad apreciable si el pulso de medida es corto, desapareciendo por completo para un pulso de medida de  $90^\circ$  (11).

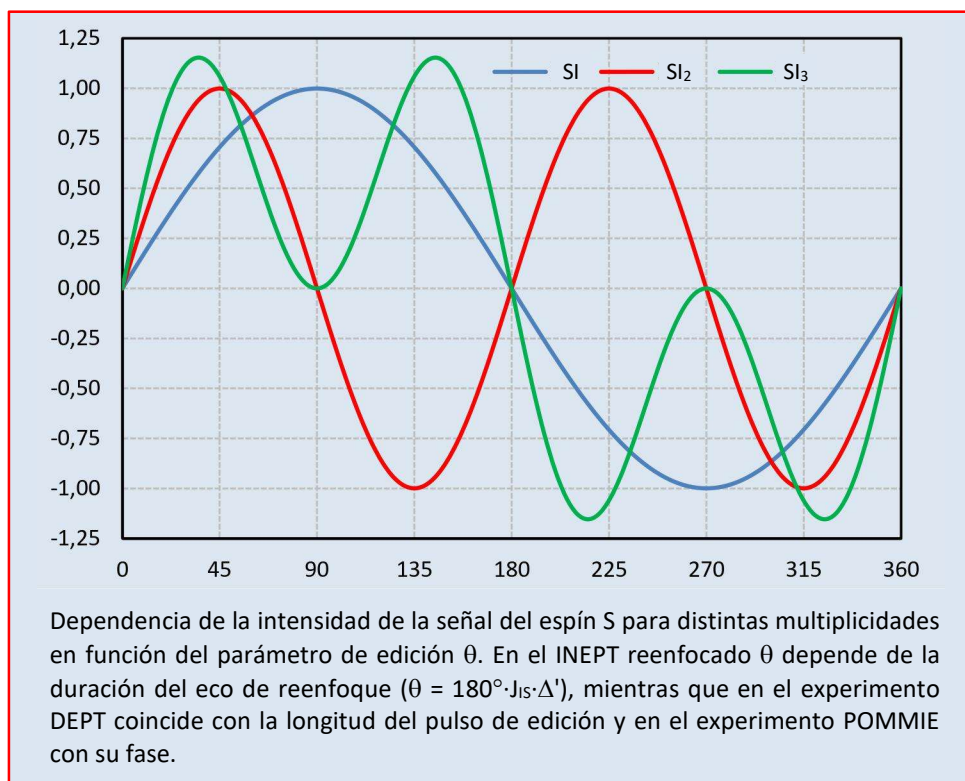
El método SPI proporcionaba un importante incremento de intensidad de las señales de heteronúcleos. Sin embargo, su mayor limitación era su falta de generalidad, puesto que en cada experimento solo puede producir el incremento de intensidad para una resonancia, la del heteronúcleo acoplado al protón perturbado inicialmente. Para observar este incremento para todas las resonancias del heteronúcleo sería necesario invertir las transiciones de los distintos núcleos de partida una a una y realizar un experimento por separado en cada caso. Un problema adicional en el caso habitual de la transferencia  $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$  era que las transiciones a invertir corresponden a los satélites de  $^{13}\text{C}$  que no siempre aparecen en el espectro con intensidad suficiente como para observar su frecuencia con precisión. Gareth Morris y Ray Freeman propusieron un experimento (12) que eliminaba estas limitaciones, experimento al que denominaron INEPT (*Insensitive Nuclei*

*Enhanced by Polarization Transfer*). El método utiliza un eco de espín de duración adecuada para efectuar una manipulación de los espines independientemente del valor del desplazamiento químico. Al final del eco de espín las dos magnetizaciones del espín I correspondientes a un sistema IS se deben encontrar en oposición de fase, de modo que un pulso de  $90^\circ$  de fase adecuada aplicado al espín I invierta la población de los dos niveles de energía asociados con una de ellas y devuelva la población de los dos niveles asociados con la otra a su valor inicial. Se consigue con ello una situación igual a la inicial del experimento SPI de Pachler, pero ahora para todos los espines I, independientemente de su frecuencia. El subsiguiente pulso aplicado al espín S da lugar a la transferencia de polarización  $I \rightarrow S$  para todos los espines I. El éxito del experimento requiere que la duración del eco de espín,  $\Delta$ , esté en sintonía con el valor del acoplamiento IS ( $\Delta = 1/2J_{IS}$ ), algo fácil de lograr si todos los acoplamientos IS a un enlace son de magnitud semejante. Además, debe cumplirse que el resto de acoplamientos del espín I sean mucho menores o inexistentes. El caso  $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$  cumple considerablemente bien ambos requisitos.

La secuencia INEPT produce señales del espín de llegada en oposición de fase respecto al espín de partida. Consecuentemente no es posible aplicar un desacoplamiento durante la detección y las señales del espín S aparecen desdobladas. Una solución a este problema la propuso Richard Ernst (13) incorporando al final de la secuencia original un eco de espín que permite reenfoque la magnetización. Esta modificación del experimento suele conocerse como INEPT reenfoque. La duración del eco de espín adicional,  $\Delta'$ , debe ajustarse al valor del acoplamiento  $J_{IS}$  y el óptimo depende del número de espines I acoplados al espín S. Si la secuencia INEPT se utiliza para incrementar la intensidad del espectro de S es necesario utilizar una duración de compromiso del eco de reenfoque ( $\Delta' \approx 1/\pi J_{IS}$  para sistemas  $SI_1$ ,  $SI_2$  y  $SI_3$ ). Por otro lado, la distinta dependencia de la intensidad del espectro de S del número de espines I acoplados a él ( $I \propto n \cdot \sin(\theta) \cdot \cos^{n-1}(\theta)$ , con  $\theta = 180^\circ \cdot J_{IS} \cdot \Delta'$ ) permite combinar espectros obtenidos con diferente duración del eco de reenfoque para obtener por separado el espectro de los espines S de sistemas  $SI_n$  con uno, dos o tres espines I ( $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$  en el caso de espectros de  $^{13}\text{C}$ ), un proceso conocido como edición de espectros.

Aunque habitualmente el espectro del espín S se obtiene con desacoplamiento del espín I, en el caso del espectro acoplado, tanto en el INEPT como en el INEPT reenfoque los multipletes aparecen con intensidades relativas diferentes de las correspondientes a la observación directa (por ejemplo 1:0:1 en el caso  $SI_2$ ). David Doddrell propuso un experimento de transferencia de polarización alternativo al INEPT (DEPT, *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) en el que, en caso de no utilizar desacoplamiento, los multipletes aparecen con la misma relación de intensidades que en la observación directa (14,15). Sin embargo, lo habitual es registrar los espectros DEPT con desacoplamiento del espín I (protón en el caso de espectros de  $^{13}\text{C}$ ), por lo que esta ventaja no es especialmente relevante. En el experimento DEPT la intensidad de los distintos sistemas de espín  $SI_n$  depende de la longitud de uno de los pulsos de la secuencia, por lo que también permite la edición de espectros. Puesto que el ángulo del pulso de edición es independiente del acoplamiento  $J_{IS}$ , mientras que la duración del eco de reenfoque del INEPT reenfoque depende de  $J_{IS}$ , el experimento DEPT resulta más robusto en la edición espectral.

A pesar del nombre y de las expectativas de Doddrell el experimento DEPT, cuando los espectros se obtienen sin desacoplamiento, da lugar a algunas anomalías en las intensidades relativas de los multipletes y a contribuciones dispersivas a las líneas. Ernst, en la que posiblemente fue la primera aplicación del formalismo de los operadores producto que publicaría poco después (16),



analizó el origen de dichas anomalías (17) tanto en el DEPT como en el INEPT reenforcado. En el caso del DEPT las anomalías derivan del desajuste de la condición  $\Delta = 1/2J_{IS}$  de los tiempos de evolución, por lo que las anomalías suelen ser pequeñas. Por el contrario, en el INEPT reenforcado no existe ningún tiempo del eco de reenfoque que no origine anomalías y éstas son importantes. En el artículo se proponían modificaciones de las secuencias, INEPT<sup>+</sup>, DEPT<sup>+</sup> y DEPT<sup>++</sup>, que eliminan por completo las anomalías.

En el modo habitual las secuencias de transferencia de polarización se utilizan para transferir polarización de un núcleo con una relación magnetogírica alta, como el <sup>1</sup>H, a un núcleo con una relación magnetogírica baja, como el <sup>13</sup>C. También es posible utilizarlas para transferir la polarización de un núcleo con una relación magnetogírica baja a uno con una relación magnetogírica más alta. Puesto que se utilizan en la dirección contraria a la que fueron concebidas se las suele conocer como INEPT inverso (18) y DEPT inverso (19).

Intentando mejorar las características del experimento DEPT para la edición de subspectros el grupo de Doddrell publicó una técnica alternativa (20) a la que denominó POMMIE (*Phase Oscillations to Maximize Editing*). La secuencia es prácticamente igual al DEPT, pero en lugar de conseguir la edición modificando la duración de un pulso lo hace modificando su fase. Este otorga a POMMIE pequeñas ventajas sobre DEPT, tales como ser menos sensible a la inhomogeneidad de la radiofrecuencia o a efectos de offset. Sin embargo, tal como se apuntaba en el artículo su aplicación requería que los espectrómetros permitieran los desplazamientos de fase necesarios, que no corresponden a múltiplos de 90°, algo que no era habitual en esa época. Posiblemente este fue uno de los motivos de que la secuencia POMMIE prácticamente no se haya aplicado. El otro, el que los experimentos DEPT proporcionan resultados suficientemente satisfactorios. Debido a ello el

experimento DEPT se ha convertido en habitual tanto para la edición de subspectros como para incrementar la intensidad de la señal de espines de baja relación magnetogírica.

Las secuencias de transferencia de polarización descritas previamente proporcionan una mejora de la señal de los núcleos de baja relación magnetogírica, pero los espectros correspondientes no muestran las señales de los espines que no reciben dicha transferencia. Ese es el caso los carbonos cuaternarios en los espectros DEPT de  $^{13}\text{C}$ , que no aparecen en los subspectros. Una primera secuencia de pulsos capaz de conseguir la edición completa en subspectros (21), incluyendo los carbonos cuaternarios, fue la secuencia SEMUT (*Subspectral Editing using a MULTiple quantum Trap*). SEMUT, sin embargo, no utiliza la transferencia de polarización, sino que parte de la magnetización del heteronúcleo. Consecuentemente los espectros SEMUT son mucho menos intensos que los INEPT o DEPT. Posteriormente se han propuesto modificaciones de estas secuencias de pulsos capaces de incluir a los carbonos cuaternarios en los subspectros. John Homer propuso una modificación del INEPT reenfocado (22) a la que denominó PENDANT (*Polarization Enhancement that is Nurtured During Attached Nucleus Testing*). Años después Peter Bigler presentó una modificación de la secuencia DEPT que al igual que PENDANT retiene la respuesta de los carbonos cuaternarios (23). Debido a esta característica apodó a la secuencia DEPTQ. Dado que la secuencia origina espectros en los que aparecen todas las señales de  $^{13}\text{C}$ , DEPTQ tiene cierto atractivo en el análisis de moléculas orgánicas pequeñas.

Las secuencias POMMIE e INEPT también han encontrado su utilidad. Una versión de POMMIE denominada MUSIC (*Multiplicity Selective In-phase Coherence transfer*) se ha utilizado para diseñar experimentos HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de proteínas selectivos del tipo de aminoácido (24,25). En otra aplicación se ha usado POMMIE en la división de los espectros HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de proteínas en subspectros debidos a aminoácidos con una topología común del carbono beta (26). Por su parte la secuencia INEPT encontró muy pronto su aplicación en el experimento HSQC (27) y actualmente se utiliza como componente básico en multitud de experimentos nD.

## Referencias

1. W. Overhauser, *Polarization of Nuclei in Metals*, Phys. Rev., 92, 411-415, 1953.
2. I. Solomon, *Relaxation Processes in a System of Two Spins*, Phys. Rev., 99, 559-565, 1955.
3. E.B. Baker, *Two Synthesizer Nuclear Spin Decoupling; INDOR Spectra of  $\text{C}^{13}\text{F}_3\text{COOH}$  and  $\text{CF}_3\text{C}^{13}\text{OOH}$ ,  $\text{N}^{14}\text{H}_4^+$ , and  $(\text{CH}_3)_4\text{Si}^{29}$* , J. Chem. Phys., 37, 911-912, 1962.
4. R. Kaiser, *Use of the Nuclear Overhauser Effect in the Analysis of High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectra*, J. Chem. Phys. 39, 2435-2442, 1963.
5. W.A. Anderson, R. Freeman, C.A. Reilly, *Assignment of NMR Spectra with the Aid of Double-Quantum Transitions*, J. Chem. Phys. 39, 1518-1531, 1963.
6. J. Feeney, P. Partington, *Pseudo INDOR Nuclear Magnetic Resonance Spectra Using Double Resonance Difference Spectroscopy and the Fourier Transform Technique*, J. Chem. Soc. Chem. Comm., 611-612, 1973.
7. K.G.R. Pachler, P.L. Wessels, *Selective Population Inversion (SPI). A Pulsed Double Resonance Method in FT NMR Spectroscopy Equivalent to INDOR*, J. Magn. Reson. 12, 337-339, 1973.
8. S. Sørensen, R.S. Hansen, H.J. Jakobsen, *Assignments and Relative Signs of  $^{13}\text{C}$ -X Coupling Constants in  $^{13}\text{C}$  FT NMR from Selective Population Transfer (SPT)*, J. Magn. Reson. 14, 243-245, 1974.

9. A. A. Chalmers, K.G.R. Pachler, P.L. Wessels, *Difference Selective Population Inversion Spectra and Their Application to the Study of  $^{13}\text{C}$ -H Coupling Constants in 2,3-Dibromothiophene*, J. Magn. Reson., 15, 415-419, 1974.
10. H.J. Jakobsen, S.A. Linde, S. Sørensen, *Sensitivity Enhancement in  $^{13}\text{C}$  FT NMR from Selective Population Transfer (SPT) in Molecules with Degenerate Proton Transitions*, J. Magn. Reson., 15, 385-388, 1974.
11. K.G.R. Pachler, P.L. Wessels, *Homonuclear Selective Population Inversion: An INDOR Equivalent in Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, J. Chem. Soc. Chem. Comm., 1038-1039, 1974.
12. G.A. Morris, R. Freeman, *Enhancement of Nuclear Magnetic Resonance Signals by Polarization Transfer*, J. Am. Chem. Soc., 101, 760-762, 1979.
13. D.P. Burum, R.R. Ernst, *Net Polarization Transfer via a J-Ordered State for Signal Enhancement of Low-Sensitivity Nuclei*, J. Magn. Reson., 39, 163-168, 1980.
14. D.M. Doddrell, D.T. Pegg, M.R. Bendall, *Distortionless Enhancement of NMR Signals by Polarization Transfer*, J. Magn. Reson., 48, 323-327, 1982.
15. D.T. Pegg, D.M. Doddrell, M.R. Bendall, *Proton-Polarization Transfer Enhancement of a Heteronuclear Spin Multiplet with Preservation of Phase Coherency and Relative Component Intensities*, J. Chem. Phys., 77, 2745-2752, 1982.
16. O.W. Sørensen, G.W. Eich, M.H. Levitt, G. Bodenhausen, R.R. Ernst, *Product Operator Formalism for the Description of NMR Pulse Experiments*, Prog. Nucl. Mag. Res. Sp., 16, 163-192, 1983.
17. O.W. Sørensen, R.R. Ernst, *Elimination of Spectral Distortion in Polarization Transfer Experiments. Improvements and Comparison of Techniques*, J. Magn. Reson., 51, 477-489, 1983.
18. R. Freeman, T.H. Mareci, G.A. Morris, *Weak Satellite Signals in High-Resolution NMR Spectra: Separating the Wheat from the Chaff*, J. Magn. Reson., 42, 341-345, 1981.
19. M.R. Bendall, D.T. Pegg, D.M. Doddrell, J. Field, *Inverse DEPT Sequence. Polarization Transfer from a Spin-1/2 Nucleus to n Spin-1/2 Heteronuclei via Correlated Motion in the Doubly Rotating Reference Frame*, J. Magn. Reson., 51, 520-526, 1983.
20. J.M. Bultsing, W.M. Brooks, J. Field, D.M. Doddrell, *Polarization Transfer via an Intermediate Multiple-Quantum State of Maximum Order*, J. Magn. Reson. 56, 167-173, 1984.
21. H. Bildsøe, S. Dønstrup, H.J. Jakobsen, O.W. Sørensen, *Subspectral Editing Using a Multiple Quantum Trap: Analysis of J Cross-Talk*, J. Magn. Reson., 53, 154-162, 1983.
22. J. Homer, M.C. Perry, *New Method for NMR Signal Enhancement by Polarization Transfer, and Attached Nucleus Testing*, Chem. Commun., 373-374, 1994.
23. R. Burger, P. Bigler, *DEPTQ: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer Including the Detection of Quaternary Nuclei*, J. Magn. Reson., 135, 529-534, 1998.
24. P. Schmieder, M. Leidert, M. Kelly, H. Oschkinat, *Multiplicity-Selective Coherence Transfer Steps for the Design of Amino Acid-Selective Experiments - A Triple-Resonance Experiment Selective for Asn and Gln*, J. Magn. Reson., 131, 199-202, 1998.
25. M. Schubert, *Development and Application of Novel Triple-Resonance Experiments for the Assignment of Protein NMR Spectra* (Tesis Doctoral), Mensch-und-Buch-Verlag, Berlín, 2002.
26. D. Pantoja-Uceda, J. Santoro, *Amino Acid Type Identification in NMR Spectra of Proteins via  $\beta$ - and  $\gamma$ -Carbon Edited Experiments*, J. Magn. Reson., 195, 187-195, 2008.
27. G. Bodenhausen, D.J. Ruben, *Natural Abundance Nitrogen-15 NMR by Enhanced Heteronuclear Spectroscopy*, Chem. Phys. Lett., 69, 185-189, 1980.