

Historias de la RMN

Jorge Santoro

16. Intercambio químico

La idoneidad de la RMN para estudiar procesos de intercambio químico se descubrió durante los primeros años de la aplicación de la técnica, inmediatamente después del descubrimiento del desplazamiento químico. Tras la observación de tres señales en el espectro de ^1H del etanol (1), Martin Packard y James Arnold notaron que la posición de la señal atribuida al protón del grupo OH era dependiente de la temperatura, un hecho que primero presentaron en una reunión de la *American Physical Society* y luego publicaron en *Journal of Chemical Physics* (2). En una nota que apareció publicada en la revista justo antes de ésta, Uner Liddel y Norman Ramsay propusieron (3) una explicación a dicha dependencia, que habían conocido en el congreso citado. La dependencia con la temperatura tenía explicación si existen estados moleculares alternativos cuya diferencia de energía sea del orden de $k_{\text{B}}T$. En el caso concreto del etanol estos estados se producen por asociación mediante enlaces de hidrógeno. El apantallamiento del protón del grupo OH será diferente en el estado asociado y en el estado sin asociar. Si el tiempo de vida media de cada estado es suficientemente pequeño la señal se observará a la frecuencia que corresponde al apantallamiento promedio. Puesto que el cambio de temperatura altera la población relativa de los estados, la frecuencia de resonancia será dependiente de la temperatura. Del trabajo de Ramsay se deducía que la RMN permitía estudiar fenómenos de intercambio químico.

Un segundo avance en la misma dirección se debió a Herbert Gutowsky. Gutowsky, tras su descubrimiento del acoplamiento escalar, había medido un buen número de acoplamientos escalares encontrando algunos casos en los que no se observaba ningún acoplamiento a pesar de que éste "debería estar presente" (4). Achacaba esta ausencia a que, a pesar de que dos espines, I y S, estén acoplados escalarmente, si se producen transiciones rápidas entre los distintos valores de S_z el desdoblamiento de la señal del espín I desaparece. Consideraba además dos procesos capaces de producir tales transiciones: la relajación longitudinal rápida del espín S y el intercambio entre dos especies moleculares, unos efectos que ya había considerado Erwin Hahn al estudiar la influencia del acoplamiento escalar en los ecos de espín (5). Gutowski elaboraba después la teoría del efecto considerando dos estados del espín S, A ($S_z = 1/2$) y B ($S_z = -1/2$). Para ello partía de la integración de las ecuaciones de Bloch y consideraba después la probabilidad de que el espín S permaneciera en el estado A entre el tiempo t y el tiempo $t+dt$. Esto le permitía calcular la magnetización transversal promedio a un determinado tiempo en función de su valor inicial. Promediando después el valor inicial, llegaba a expresiones que indicaban que para un intercambio lento aparecerían dos señales separadas por el acoplamiento escalar y a las mismas frecuencias que en ausencia de intercambio entre ambos estados. Por el contrario, si el intercambio fuera rápido sólo se observaría una resonancia a la frecuencia promedio y de intensidad doble; el acoplamiento J_{IS} aparente sería nulo. En un trabajo posterior (6) aplicaría este mismo método al caso en el que es el espín observado el que fluctúa entre dos estados, A y B, en los que posee distinta frecuencia de resonancia. De nuevo en el caso de intercambio lento, tiempos de residencia menores que $1/(\omega_{\text{A}} - \omega_{\text{B}})$, aparecen dos señales correspondientes a los estados A y B, con intensidades proporcionales a sus poblaciones. En el intercambio rápido solo aparecería una señal al desplazamiento químico promedio, $\delta = \delta_{\text{A}p_{\text{A}}} + \delta_{\text{B}p_{\text{B}}}$. En ambos casos la anchura de línea depende de la velocidad de intercambio. Las conclusiones

obtenidas por Gutowsky eran equivalentes a las que había obtenido Hahn (5), pero en lugar de referirse a la envolvente del eco de espín se referían al espectro en frecuencias.

Reconocido que la RMN permitía la determinación de la velocidad del intercambio químico, el ejemplo paradigmático lo constituyó la N,N dimetilformamida en la que, debido a la rotación impedida alrededor del enlace N-C, los dos metilos presentan frecuencias de resonancia diferentes (7). Gutowsky analizó el espectro de RMN de esta amida junto con el de otras a varias temperaturas (8), lo que le permitió obtener el valor de la barrera de potencial. En presencia de un intercambio químico la espectroscopía de RMN no solo era capaz de proporcionar información cinética sino también termodinámica.

James Arnold estudió otro tipo de intercambio químico (9), el que se produce por intercambio de los protones lábiles del grupo hidroxilo en el etanol. En este caso el intercambio es algo más complejo. Para una molécula en la que se sustituye un protón del grupo OH por otro hay un 50% de probabilidades de que el protón que llegue esté en un estado de espín distinto que el que abandona la molécula. Para la señal del CH₂ esto supone intercambiar su frecuencia entre $\nu+J/2$ y $\nu-J/2$ (a lo que hay que añadir el acoplamiento con los protones del CH₃, que permanece constante) con un velocidad que es la mitad de la del intercambio químico. Este efecto era similar al estudiado por Gutowski para el intercambio entre dos estados. Sin embargo, para el protón del hidroxilo el efecto es diferente. El protón abandona una molécula en la que hay un cierto estado de espín de los protones del CH₂. El estado de la molécula de llegada tiene un 25% de probabilidades de ser $\alpha\alpha$, 50% de ser $\alpha\beta$ y 25% de ser $\beta\beta$. Se trata de un intercambio entre tres estados que no están poblados igualmente. Arnold obtuvo una expresión para la forma de la resonancia del hidroxilo que le permitía determinar la velocidad del intercambio.

Un hito importante en el tratamiento fue la reformulación de la teoría del intercambio químico realizada por Harden McConnell (10), usando un procedimiento más directo y sencillo que el que había utilizado Gutowsky. Para el caso de dos estados McConnell añadió a las ecuaciones diferenciales de Bloch dos términos que dan cuenta del intercambio entre estados: uno da cuenta de la disminución de la magnetización del estado correspondiente, A, por conversión en el otro, B; el otro término corresponde al incremento de la magnetización de A por el proceso inverso al anterior, conversión de B en A. La solución del conjunto de ecuaciones diferenciales proporciona el espectro. A diferencia del tratamiento de Gutowsky, que solo era aplicable al caso de espectros obtenidos mediante onda continua, con barrido lento y con una radiofrecuencia de excitación débil (que no produzca saturación), la formulación de McConnell podía aplicarse en cualquier circunstancia en la que las ecuaciones de Bloch sean válidas y se podía generalizar fácilmente al intercambio entre varios estados. En presencia de acoplamiento escalar las ecuaciones de Bloch no son válidas, salvo en el caso de que el acoplamiento escalar sea débil, por lo que el tratamiento de McConnell requiere que el acoplamiento sea débil en todos los estados en equilibrio químico. En caso de acoplamiento fuerte el tratamiento debe hacerse mediante matrices densidad. Charles Johnson adaptó el método de McConnell al caso de las matrices densidad (11).

En 1963 Sture Forsén y Ragnar Hoffman propusieron un nuevo método para estudiar el intercambio químico (12, 13). La idea consistía en irradiar la resonancia de un espín correspondiente a una especie molecular en intercambio con otra, de modo que se produjera su saturación. Al saturar el espín de un núcleo en un sitio se altera la población de los estados de energía correspondientes a

ese sitio y el intercambio químico hace que esa perturbación afecte al segundo sitio. Forsén y Hoffman lo explicaban del modo siguiente (13): *Intuitively one expects that when a nuclear species X is reversibly transferred between two nonequivalent sites A and B a disturbance of the magnetization in Site B would be detectable at Site A, provided that the spin-lattice relaxation time (T_{1A}) in Site A is not negligible compared with the lifetime (τ_A) of X in Site A.* La cinética del cambio de magnetización del segundo sitio permite calcular tanto el tiempo de residencia como su tiempo de relajación longitudinal. Esta idea está en la base de un buen número de experimentos posteriores, tales como STD, CEST o EXSY. La realización de los experimentos en el caso de espectros de onda continua no resultaba sencilla, puesto que se trataba de estudiar la cinética del cambio de población, lo que obligaba a los autores a obtener espectros aproximadamente cada segundo barriendo una anchura espectral limitada a unas dos veces la anchura de la señal de resonancia investigada. En una publicación posterior (14) los autores generalizaron el tratamiento al caso de intercambio entre más de dos estados.

El mismo año 1963 Saul Meiboom publicó un trabajo (15) en el que mostraba que en el caso de intercambio entre dos sitios la atenuación que se observa en experimentos Carr-Purcell-Meiboom-Gill del tipo $[\tau-180^\circ-\tau]_n$ es dependiente, además del tiempo de relajación T_2 , del desplazamiento químico entre los dos sitios, de la velocidad de intercambio y del tiempo entre los pulsos de 180° , τ_{CP} . Utilizando varios supuestos derivó una ecuación aproximada para el valor aparente de T_2 en el caso de intercambio rápido. Adam Allerhand y Herbert Gutowsky, puesto que consideraron que los supuestos de Meiboom eran demasiado drásticos, reexaminaron dicho trabajo (16). Dadas las dificultades con sus primeras derivaciones analíticas, que proporcionaban ecuaciones excesivamente complejas, simularon numéricamente el resultado esperable para diversos valores de los parámetros relevantes. Estas simulaciones les permitieron concluir que el amortiguamiento de los ecos en presencia de intercambio era exponencial excepto por ligeras desviaciones a valores grandes de τ_{CP} . Asimismo que la ecuación aproximada de Meiboom era válida para un amplio rango de parámetros, incluso aunque no se cumplieran algunos de los supuestos usados para derivarla. Por ejemplo, que el tiempo de relajación T_2 fuera el mismo para ambos sitios. A continuación publicaron una fórmula válida para el intercambio entre dos sitios con el mismo tiempo de relajación transversal (17). Años después Jeremy Carver y sir Rex Richards abordaron el caso general, publicando las fórmulas correspondientes (18). El método de los ecos de espín, bautizado posteriormente como de dispersión de la relajación, tenía el inconveniente de la falta de resolución espectral puesto que aún no se había generalizado el uso de la transformada de Fourier, por lo que el valor aparente de T_2 se obtenía de la intensidad de la señal en el instante del eco. Debido a ello su aplicación estaba limitada, puesto que solo resultaba sencillo estudiar casos con una única señal de resonancia. Sin embargo, en el siglo actual el método ha adquirido cierta importancia debido fundamentalmente a los trabajos sobre proteínas de Lewis Kay, que lo ha utilizado para estudiar movimientos en la escala milisegundos a microsegundos (19) y para describir el proceso de plegamiento (20).

La llegada de la excitación mediante un pulso y posterior transformada de Fourier facilitó grandemente el estudio de procesos de intercambio, pero el gran avance fue la llegada de la espectroscopía bidimensional, que proporcionó un nuevo experimento, EXSY, para la observación del intercambio químico (21). La gestación del experimento la cuenta Jan Jeener, el padre de la espectroscopía bidimensional, del modo siguiente (22): *In 1977, Richard Ernst was describing the many different ways of using 2D NMR in such a clear and systematic presentation that it soon struck me that my original goal, investigating spin-lattice relaxation, was absent from the list but could be*

implemented 'easily' (by the method now called NOESY, much simpler than my original dreams). I mentioned this to Ernst at the NMR Gordon Conference. He asked whether we intended to develop the method in Brussels; the answer was 'no' for lack of practice and of suitable instrumentation, and I was delighted to accept the proposal of developing NOESY as a joint project between Zurich and Brussels. Curiosamente, el artículo publicado (21) se centraba en la aplicación de la secuencia de pulsos desarrollada al estudio del intercambio químico, aunque contenía un pequeño apartado en el que, identificando la constante de velocidad de intercambio con la velocidad de relajación cruzada, mostraba que también era útil para estudiar el efecto NOE. El experimento puede considerarse la versión bidimensional del que habían propuesto Forsén y Hoffman (12,13). Con posterioridad el mismo principio del EXSY se ha aplicado al intercambio de otros elementos de la matriz densidad tales como el orden de espín (23-25).

Para la determinación cualitativa de las vías de intercambio basta con un experimento EXSY. En los casos más sencillos este único experimento es suficiente para obtener también información cuantitativa. Sin embargo, en otros casos la obtención de información cuantitativa requiere observar la transferencia de magnetización en función del tiempo de mezcla del experimento. Eso hace necesario registrar varios experimentos EXSY con el consiguiente incremento del tiempo experimental. Geoffrey Bodenhausen y Richard Ernst concibieron una modificación del EXSY que permite obtener la información cuantitativa a partir de un único experimento (26). La idea consistía en hacer el tiempo de mezcla proporcional al tiempo de evolución

$$t_m = K \cdot t_1$$

de modo que ambos se incrementan simultáneamente. En su artículo mostraban que en esas condiciones los valores de las constantes de velocidad de intercambio se podían obtener a partir de la forma de línea de las señales de correlación. Puesto que el alargamiento concertado de los tiempos de evolución y de mezcla recuerda al movimiento de un acordeón denominaron al experimento *Accordion*. El experimento contenía conceptos (el incremento concertado de tiempos o la representación de dos parámetros en el mismo eje de un espectro nD) que darían lugar años después a diversos experimentos usados para disminuir los tiempos de adquisición de espectros multidimensionales, tales como proyección-reconstrucción, GFT o APSY.

Referencias

1. J.T. Arnold, S.S. Dharmatti, M.E. Packard, *Chemical Effects on Nuclear Induction Signals from Organic Compounds*, J. Chem. Phys., 19, 507, 1951.
2. J.T. Arnold, M.E. Packard, *Variations in Absolute Chemical Shift of Nuclear Induction Signals of Hydroxyl Groups of Methyl and Ethyl Alcohol*, J. Chem. Phys., 19, 1608-1609, 1951.
3. U. Liddel, N.F. Ramsay, *Temperature Dependent Magnetic Shielding in Ethyl Alcohol*, J. Chem. Phys., 19, 1608, 1951.
4. H.S. Gutowsky, D.W. McCall, C.P. Slichter, *Nuclear Magnetic Resonance Multiplets in Liquids*, J. Chem. Phys., 21, 279-292, 1953.
5. E.L. Hahn, D.E. Maxwell, *Spin Echo Measurements of Nuclear Spin Coupling in Molecules*, Phys. Rev., 88, 1070-1084, 1952.
6. H.S. Gutowsky, A. Sayka, *Dissociation, Chemical Exchange, and the Proton Magnetic Resonance in Some Aqueous Electrolytes*, J. Chem. Phys., 21, 1688-1694, 1953.

7. W.D. Phillips, *Restricted Rotation in Amides as Evidenced by Nuclear Magnetic Resonance*, J. Chem. Phys., 23, 1363-1364, 1955.
8. H.S. Gutowsky, C.H. Holm, *Rate Processes and Nuclear Magnetic Resonance Spectra. II. Hindered Internal Rotation of Amides*, J. Chem. Phys., 25, 1228-1234, 1956.
9. J.T. Arnold, *Magnetic Resonances of Protons in Ethyl Alcohol*, Phys. Rev. 102, 136-150, 1956.
10. H.M. McConnell, *Reaction Rates by Nuclear Magnetic Resonance*, J. Chem. Phys., 28, 430-431, 1958.
11. C.S. Johnson, Jr., *On the Calculation of Nuclear Magnetic Resonance Spectra for Coupled Nuclear Spins in Intramolecular Reactions*, J. Chem. Phys. 41, 3277-3278, 1964.
12. S. Forsén, R.A. Hoffman, *A New Method for the Study of Moderately Rapid Chemical Exchange Rates Employing Nuclear Magnetic Double Resonance*, Acta Chem. Scand., 17, 1787-1788, 1963.
13. S. Forsén, R.A. Hoffman, *Study of Moderately Rapid Chemical Exchange Reactions by Means of Nuclear Magnetic Double Resonance*, J. Chem. Phys., 39, 2892-2901, 1963.
14. S. Forsén, R. A. Hoffman, *Exchange Rates by Nuclear Magnetic Multiple Resonance. III. Exchange Reactions in Systems with Several Nonequivalent Sites*, J. Chem. Phys., 40, 1189-1196, 1964.
15. Z. Luz, S. Meiboom, *Nuclear Magnetic Resonance Study of the Protolysis of Trimethylammonium Ion in Aqueous Solution – Order of the Reaction with Respect to Solvent*, J. Chem. Phys., 39, 366-370, 1963.
16. A. Allerhand, H.S. Gutowsky, *Spin-Echo NMR Studies of Chemical Exchange. I. Some General Aspects*, J.Chem.Phys., 41, 2115-2126, 1964.
17. A. Allerhand, H.S. Gutowsky, *Spin-Echo NMR Studies of Chemical Exchange. II. Closed Formulas for Two Sites*, J.Chem.Phys., 42, 1587-1599, 1965.
18. J.P. Carver, R.E. Richards, *A General Two-Site Solution for the Chemical Exchange Produced Dependence of T_2 Upon the Carr-Purcell Pulse Separation*, J. Magn. Reson., 6, 89-105, 1972.
19. F.A.A. Mulder, B. Hon, A. Mittermaier, F.W. Dahlquist, L.E. Kay, *Slow Internal Dynamics in Proteins: Application of NMR Relaxation Dispersion Spectroscopy to Methyl Groups in a Cavity Mutant of T4 Lysozyme*, J. Am. Chem. Soc., 124, 1443-1451, 2002.
20. P. Neudecker, P. Lundström, L.E. Kay, *Relaxation Dispersion NMR Spectroscopy as a Tool for Detailed Studies of Protein Folding*, Biophys. J., 96, 2045-2054, 2009.
21. J. Jeener, B.H. Meier, P. Bachmann, R.R. Ernst, *Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy*, J. Chem. Phys., 71, 4546-4553, 1979.
22. J. Jeener, *Reminiscences about the Early Days of 2D NMR*, en Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance (D.M. Grant, R.K. Harris, eds), Vol 1: *Historical Perspectives*, John Wiley and Sons Ltd, Chichester, 1996.
23. G. Wagner, G. Bodenhausen, N. Müller, M. Rance, O.W. Sørensen, R.R. Ernst, K. Wüthrich, *Exchange of Two-Spin Order in Nuclear Magnetic Resonance: Separation of Exchange and Cross-Relaxation Processes*, J. Am. Chem. Soc., 1985, 107, 6440-6446.
24. G.T. Montelione, G. Wagner, *2D Chemical Exchange NMR Spectroscopy by Proton-Detected Heteronuclear Correlation*, J. Am. Chem. Soc., 111, 3096-3098, 1989.
25. G. Wider, D. Neri, K. Wüthrich, *Studies of slow conformational equilibria in macromolecules by exchange of heteronuclear longitudinal 2-spin-order in a 2D difference correlation experiment*, J. Biomol. NMR, 1, 93-98, 1991.
26. G. Bodenhausen, R.R. Ernst, *Direct Determination of Rate Constants of Slow Dynamic Processes by Two-Dimensional "Accordion" Spectroscopy in Nuclear Magnetic Resonance*, J. Am. Chem. Soc., 104, 1304-1309, 1982.