

Historias de la RMN

Jorge Santoro

21. DOSY

En 1950 Erwin Hahn descubrió los ecos de espín. En la publicación correspondiente (1) indicaba que la amplitud de los ecos, además de reflejar el efecto debido a la relajación, sufría una atenuación originada por la difusión traslacional como consecuencia de la inhomogeneidad del campo magnético. Aunque el artículo se dedicaba fundamentalmente a describir varios tipos de ecos de espín, al final del artículo se indicaba que éstos proporcionaban un medio de medida de los coeficientes de difusión traslacional con ventajas sobre los previamente existentes. Unos años después Herman Carr y Edward Purcell propusieron una modificación del método de Hahn de producción de ecos de espín, $90^\circ\text{-}\tau\text{-}180^\circ\text{-}\tau$ en lugar de $90^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ\text{-}\tau$ (2). La nueva secuencia daba lugar a ecos más intensos. Tanto en el título del artículo (*Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments*) como en su contenido resaltaban la importancia del método de ecos de espín para la medida de los coeficientes de difusión traslacional. La amplitud de los ecos en presencia de un gradiente del campo magnético depende tanto del tiempo de relajación T_2 como de la constante de difusión, por lo que la separación de ambos efectos no parecía fácil. Carr y Purcell indicaban en su artículo cómo eliminar (o minimizar) el efecto de uno de los dos mecanismos de modo que la determinación del otro resultara más sencilla. La medida de la constante de difusión requería el uso de un único eco durante el tiempo de difusión y la existencia de un gradiente de campo magnético intenso, de modo que el efecto de T_2 fuera despreciable frente al de la difusión. La forma que concibieron Carr y Purcell para conseguirlo fue la de colocar simétricamente a cada lado de la muestra dos cables lineales largos o dos espiras que condujeran corriente eléctrica. La dirección de la corriente debía ser opuesta en los dos componentes. No se trataba ya de considerar la inhomogeneidad intrínseca del campo magnético B_0 , tal como había considerado Hahn, sino de introducir una inhomogeneidad externa controlada, puesto que la intensidad del gradiente de campo magnético depende de la intensidad de corriente que circula por las bobinas adicionales.

Aunque los ecos de espín resultaban adecuados para medir los coeficientes de difusión traslacional, presentaban un grave problema. La medida requería la existencia de un gradiente del campo magnético y este gradiente debía ser considerable si se querían medir coeficientes de difusión pequeños. En esas condiciones, que se aplicaban durante todo el experimento, se produce un incremento de la anchura de línea. Esto da lugar a una disminución de la anchura del eco como resultado del incremento en la velocidad de relajación aparente, T_2^* , lo que complica el análisis de los ecos, que en esa época se realizaba analizando la señal temporal. Además, en presencia de un fuerte gradiente de campo los pulsos de 90° y 180° debían ser muy intensos, puesto que debían cubrir un amplio intervalo de frecuencias. Por ejemplo, entre dos puntos de la muestra en los que el campo difiera en 10 gauss (10^{-3} teslas) la frecuencia de resonancia del protón difiere en 42,5 kHz. Para solventar éstos y otros inconvenientes que presenta la aplicación de un gradiente de campo magnético durante todo el eco de espín, Edward Stejskal y John Tanner propusieron (3) la sustitución del gradiente de campo constante por dos gradientes de campo pulsados, que solo actúan durante un corto periodo de tiempo: uno entre el pulso de 90° y el de 180° y el segundo entre el pulso de 180° y el eco. De este modo se eliminaban los principales inconvenientes del método de ecos de

espín para la medida de la constante de difusión, puesto que tanto los pulsos de excitación como la detección tienen lugar en ausencia del gradiente de campo. El nuevo método permitía trabajar con gradientes de gran intensidad (100 gauss/cm en el trabajo de Stejskal y Tanner), minimizando con ello el efecto de T_2 y permitiendo la determinación de coeficientes de difusión traslacional pequeños.

La introducción por Richard Ernst y Weston Anderson de la transformada de Fourier de la *fid* para obtener el espectro en frecuencias (4) permitió el análisis por separado de cada señal de resonancia e incluso de líneas individuales del espectro. Robert Vold (5) puso de manifiesto en 1968 las ventajas que esto suponía para la medida de tiempos de relajación. Aunque su artículo se centraba en la medida de éstos, fundamentalmente T_2 , su artículo terminaba con la siguiente frase: *The well-known method of determining diffusion coefficients by performing spin-echo experiments in the presence of a pulsed field gradient may be combined with the Fourier transform method to permit the simultaneous measurement of diffusion coefficients of chemically shifted species*. A pesar de ello esta sugerencia no tuvo repercusión, debido probablemente a la lentitud en la introducción de espectrómetros FT-NMR (los primeros espectrómetros que operaban solo en el modo FT se comercializaron en 1972). Cinco años después, en 1973, Thomas James y George McDonald redescubrieron esta posibilidad (6). Hasta entonces la medida de coeficientes de difusión mediante ecos de espín solo se podía utilizar en sistemas con una única señal o en sistemas binarios en los que los dos componentes difunden a velocidades muy diferentes. James y McDonald mostraron en su artículo que gracias a la transformada de Fourier el método se podía aplicar a sistemas con múltiples señales, incluso con varios componentes. El gradiente de campo lo obtenían a partir de la bobina correspondiente al *shim z*. Dado que éste era débil, 0,5 G/cm, usaban el gradiente durante todo el tiempo anterior y posterior al pulso de 180° del eco. Para obtener el coeficiente de difusión efectuaron experimentos con distintas duraciones del eco y comparando el resultado con gradientes y sin ellos.

La propuesta de James y McDonald tardó tiempo en tomarse en consideración. En 1977 la retomaron Jun Kida y Hisashi Uedaira intentando mejorarla (7). Para ello modificaron la sonda de su espectrómetro, incluyendo un generador de pulsos que proporcionaba un gradiente de campo de hasta 43 G/cm. Esto le permitía utilizar pulsos de gradiente de campo para las medidas, tal como habían propuesto Stejskal y Tanner. Puesto que la duración de estos pulsos era corta (1 a 3,5 ms) la perturbación del lock era pequeña y se recuperaba con facilidad. En los años siguientes la medida de coeficientes de difusión utilizando la técnica FT aumentó rápidamente.

El eco con gradientes de campo (PFGSE) era la técnica habitual de determinación de coeficientes de difusión mediante RMN. Sin embargo, no estaba carente de problemas. En primer lugar, los espectros de eco de espín presentan una modulación de la fase debida a los acoplamientos homonucleares. Además, en el caso de moléculas de elevada masa molecular la difusión es lenta y el tiempo de relajación T_2 corto. En esas condiciones la relajación transversal domina la atenuación del eco, salvo que se usen tiempos de eco cortos y gradientes de campo muy intensos. Una solución consistía en utilizar el eco estimulado (1) con gradientes, tal como había propuesto Tanner (8), puesto que en él la relajación depende fundamentalmente del tiempo de relajación T_1 . Al mismo tiempo, este método minimiza el efecto que tiene el acoplamiento escalar en el eco. Sin embargo, los intensos gradientes de campo que eran necesarios daban lugar a corrientes de Foucault (*eddy currents* en la bibliografía inglesa) que distorsionaban gravemente los espectros. En el caso del eco estimulado (PFGSTE) el problema era particularmente grave, puesto que se debía mantener corto el tiempo tras

el último pulso de radiofrecuencia con objeto de minimizar la relajación transversal. Stephen Gibbs propuso una modificación del experimento PFGSTE consistente en incluir un filtro z al final de la secuencia (9), durante el cual desaparecen las corrientes de Foucault creadas por el último gradiente. El método fue bautizado como LED (de Longitudinal Eddy-current Delay) o PFGLED. Una segunda solución consistió en construir bobinas de gradiente de campo apantalladas (10), con las que el tiempo de recuperación de las perturbaciones generadas por el pulso de gradiente disminuía de 50 ms a unos 2 ms. Otra propuesta para eliminar o reducir el efecto de las corrientes parásitas fue el uso de gradientes bipolares (11). La aplicación de un par de pulsos de gradiente de campo idénticos salvo en el signo produce respuestas transitorias de signo contrario, por lo que el efecto indeseado prácticamente se anula. Para evitar que el segundo gradiente del par reenfoque el efecto del primero se inserta un pulso de 180° entre ambos, con lo que sus efectos son aditivos. En (11) los autores ilustraron las ventajas de los gradientes bipolares aplicándolos al experimento PFGSE. Poco después el grupo de Charles Johnson Jr. los incorporaría a la secuencia LED (12). La secuencia resultante, conocida como BPPLED, es la utilizada más frecuentemente en la actualidad para la medida de coeficientes de difusión.

Durante estos años de desarrollo y utilización de los métodos de medida de constantes de difusión traslacional mediante RMN Peter Stilbs había propuesto su utilización en el análisis de mezclas (13). La idea era sencilla. Puesto que las distintas señales de una molécula presentan el mismo coeficiente de difusión, su determinación proporciona un medio para asignar las diferentes señales de una mezcla a las distintas moléculas que la componen. La propuesta prácticamente no recibió ninguna atención y Stilbs en su revisión del estudio de la difusión por RMN de varios años después (14) tan solo dedicó un párrafo al método, que denominó *Size Resolved NMR*, y la única cita relativa al método fue la correspondiente a su trabajo previo. En la siguiente década Charles S. Johnson Jr. propuso de nuevo la utilización de las medidas de difusión por RMN como método de identificación de los componentes de mezclas (15). La propuesta incluía ciertas diferencias con la de Stilbs. En lugar de presentar los resultados en una tabla de valores de la constante de difusión de cada señal, proponía la representación de los resultados en un "espectro" 2D, en el que la dimensión directa corresponde al desplazamiento químico y la indirecta al coeficiente de difusión. Para ello se asociaba a cada desplazamiento químico en la dimensión perpendicular una gaussiana centrada en el valor ajustado del coeficiente de difusión y de anchura igual a su desviación estándar. Siguiendo la moda de la espectroscopía multidimensional bautizó el método como DOSY (Difusion Ordered SpectroscopY). A diferencia de lo que había ocurrido con la propuesta de Stilbs, la propuesta de Johnson tuvo un éxito creciente y al final de la década de los 90 del siglo pasado existían multitud de estudios realizados con DOSY. Varios son los motivos de este éxito. En primer lugar, la presentación de los resultados en forma de espectro 2D resulta mucho más atractiva que en forma de tabla de valores. Además, hay que tener en cuenta la oportunidad temporal de la propuesta de Johnson. Mientras que en 1981 la difusión de la espectroscopía de RMN bidimensional era limitada, en 1992 estaba totalmente implantada, por lo que los espectroscopistas estaban habituados a ella. Además, las sondas con gradientes de campo magnético eran comerciales, por lo que estaban al alcance de todos los grupos de investigación. Finalmente, la incorporación de los métodos de procesado necesarios en los softwares de las casas comerciales daría el impulso final a la implantación del DOSY.

La aplicación del DOSY requiere que no haya solapamiento de señales en el espectro. Una solución para evitarlo consiste en utilizar el espectro de ^{13}C , que presenta una mayor dispersión de desplazamientos químicos que el protón, por lo que el solapamiento de señales es más improbable.

El precio de esta sustitución es doble: una menor sensibilidad, especialmente si se trabaja en abundancia natural, y un menor efecto de los gradientes, puesto que su efecto es proporcional a la constante giromagnética del núcleo. El segundo de los problemas puede eliminarse combinando el eco de protón con gradientes, durante el que se produce la atenuación debida a la difusión, con una transferencia de polarización, INEPT o DEPT (16), de modo que el espectro que se registra es el de ^{13}C . El método reduce además el primer problema. Otra solución para eliminar el solapamiento de señales consiste en la extensión al denominado 3D DOSY (17,18), en el que se añade una coordenada de difusión a un espectro 2D convencional (COSY, TOCSY, NOESY, HMQC, etc.). Un último método para eliminar los solapamientos consiste en registrar espectros DOSY de desplazamiento puro (*pure shift*), en los que las señales no muestran los acoplamientos escalares (19). El desacoplamiento se consigue a expensas de una reducción en la relación señal/ruido, ya que en los métodos *pure shift* sólo una fracción de la muestra contribuye a las señales del espectro.

La importancia que ha adquirido la técnica DOSY se debe a que no solo permite efectuar un análisis de mezclas, sino que también es de utilidad en otros muchos estudios. Por citar algunos: determinación de constantes de asociación (20), encapsulación (21), formación de enlaces de hidrógeno (22), cribado de ligandos (23) o determinación de la masa molecular efectiva (24).

Referencias

1. E. L. Hahn, *Spin Echoes*, Phys. Rev., 80, 580-594, 1950.
2. H.Y. Carr, E.M. Purcell, *Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments*, Phys. Rev., 94, 630-638, 1954.
3. E. O. Stejskal, J.E. Tanner, *Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradients*, J. Chem. Phys., 42, 288-292, 1965.
4. R.R. Ernst, W.A. Anderson, *Application of Fourier Transform Spectroscopy to Magnetic Resonance*, Rev. Sci. Instrum., 37, 93-102, 1966.
5. R.L. Vold, J.S. Waugh, M.P. Klein, D.E. Phelps, *Measurement of Spin Relaxation in Complex Systems*, J. Chem. Phys., 48, 3831-3832, 1968.
6. T.L. James, G.G. McDonald, *Measurement of the Self-Diffusion Coefficient of Each Component in a Complex System Using Pulsed-Gradient Fourier Transform NMR*, J. Magn. Reson., 11, 58-61, 1973.
7. J. Kida, H. Uedaira, *Selective Measurements of the Self-Difusion Coeficients in Acetic Acid-Water and Methanol-Water Systems by Pulsed-Gradient Fourier-Transform NMR*, J. Magn. Reson., 27, 253-259, 1977.
8. J.E. Tanner, *Use of the Stimulated Echo in NMR Difussion Studies*, J. Chem. Phys., 52, 2523-2526, 1970.
9. S.J. Gibbs, C.S. Johnson Jr., *A PFG NMR Experiment for Accurate Diffusion and Flow Studies in he Presence of Eddy Currents*, J. Magn. Reson., 93, 395-402, 1991.
10. S.J. Gibbs, K.F. Morris, C.S. Johnson Jr., *Design and Implementation of a Shielded Gradient Coil for PFG NMR Diffusion and Flow Studies*, J. Magn. Reson., 94, 165-169, 1991.
11. G. Wider, V. Dötsch, K. Wüthrich, *Self Compensating Pulsed Magnetic-Field Gradients for Short Recovery Times*, J. Magn. Reson. Ser. A, 108, 255-258, 1994.
12. D. Wu, A. Chen, C.S. Johnson Jr., *An Improved Diffusion-Ordered Spectroscopy Experiment Incorporating Bipolar-Gradient Pulses*, J. Magn. Reson. Ser. A, 115, 260-264, 1995.

13. P. Stilbs, *Molecular Self-diffusion Coefficients in Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectrometric Analysis of Complex Mixtures*, *Anal. Chem.*, 53, 2135-2137, 1981.
14. P. Stilbs, *Fourier Transform Pulsed-Gradient Spin-Echo Studies of Molecular Diffusion*, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 19, 1-45, 1987.
15. K.F. Morris, C.S. Johnson Jr., *Diffusion-Ordered Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 3139-3141, 1992.
16. D. Wu, A. Chen, C.S. Johnson Jr., *Heteronuclear-Detected Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy through Coherence Transfer*, *J. Magn. Reson. Ser. A*, 123, 215-218, 1996.
17. D. Wu, A. Chen, C.S. Johnson Jr., *Three-Dimensional Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy: The Homonuclear COSY-DOSY Experiment*, *J. Magn. Reson. Ser. A*, 121, 88-91, 1996.
18. H. Barjat, G.A. Morris, A.G. Swanson, *A Three-Dimensional DOSY-HMQC Experiment for the High-Resolution Analysis of Complex Mixtures*, *J. Magn. Reson.*, 131, 131-138, 1998.
19. M. Nilsson, G.A. Morris, *Pure Shift Proton DOSY: Diffusion-Ordered ¹H Spectra without Multiplet Structure*, *Chem. Commun.*, 933-935, 2007.
20. L. Fielding, *Determination of Association Constants (K_a) from Solution NMR Data*, *Tetrahedron*, 56, 6151-6170, 2000.
21. L. Frish, S.E. Matthews, V. Böhmer, Y. Cohen, *A Pulsed Gradient Spin Echo NMR Study of Guest Encapsulation by Hydrogen-Bonded Tetraurea Calix[4]arene Dimers*, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 669 - 672, 1999.
22. E.J. Cabrita, S. Berger, *DOSY Studies of Hydrogen Bond Association: Tetramethylsilane as a Reference Compound for Diffusion Studies*, *Magn. Reson. Chem.*, 39, S142-S148, 2001.
23. A. Chen, M.J. Shapiro, *Affinity NMR*, *Anal. Chem.*, 71, 669A-675A, 1999.
24. P. Groves, M. Palczewska, M.D. Molero, G. Batta, F.J. Cañada, J. Jiménez-Barbero, *Protein Molecular Weight Standards Can Compensate Systematic Errors in Diffusion-Ordered Spectroscopy*, *Anal. Biochem.*, 331, 395-397, 2004.