

Historias de la RMN

Jorge Santoro

24. Espectros de desplazamiento puro

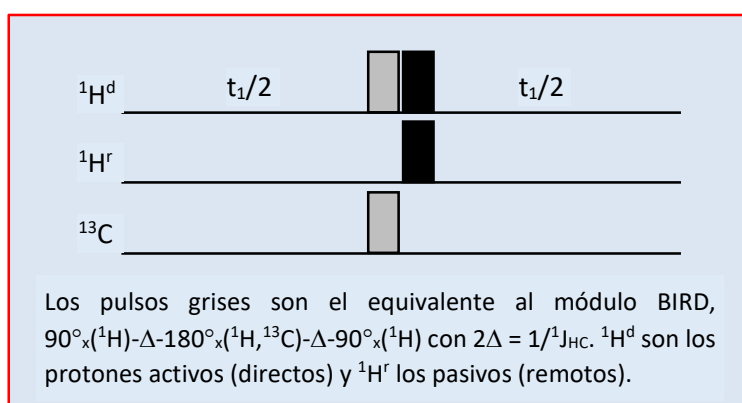
En los espectros de RMN los acoplamientos escalares proporcionan información relevante, relativa a qué núcleos se encuentran a unos pocos enlaces del observado y cuál es su disposición espacial relativa. Sin embargo, cuando no se busca este tipo de información su presencia resulta contraproducente, puesto que la señal de un núcleo se desdobra en varios componentes con la consiguiente pérdida de sensibilidad y con mayor posibilidad de solapamiento de señales. Los experimentos denominados *pure shift* persiguen la obtención de espectros que contengan tan solo información del desplazamiento químico, esto es la señal de cada núcleo sea un singlete con la consecuente mejora en la resolución. El término se aplica normalmente al caso del desacoplamiento homonuclear de banda ancha en espectros de protón. La posibilidad de obtener este tipo de espectros da lugar a una simplificación espectral beneficiosa en muchos casos; por ejemplo en experimentos DOSY, en estudios de metabonómica o en el análisis de otros tipos de mezclas complejas.

El primer método para transformar todos los multipletes en singletes fue el desacoplamiento heteronuclear de banda ancha propuesto por Richard Ernst (1), capaz de eliminar simultáneamente todos los acoplamientos heteronucleares. En su artículo Ernst demostró su método con espectros de ^{19}F desacoplados de ^1H y viceversa. En los casos sencillos en los que no existían acoplamientos homonucleares (por ejemplo, en CH_2Cl_2) las señales eran singletes. Entre las aplicaciones que sugería Ernst en el artículo estaba el incremento de la sensibilidad de los espectros de ^{13}C mediante el colapso de multipletes, a lo que se sumaría la ganancia producida por el efecto Overhauser nuclear. Los espectros de ^{13}C en abundancia natural se obtienen habitualmente de esta manera y, en cierto modo, pueden considerarse como espectros *pure shift*. Sin embargo, el problema que abordan los experimentos *pure shift* es el de eliminar todos los acoplamientos homonucleares, especialmente en espectros de ^1H , una tarea mucho más compleja.

El primer procedimiento para producir espectros 1D homonucleares con señales singlete fue la espectroscopía bidimensional J-resuelta (2). En el caso del protón el experimento produce espectros en los que en la dimensión indirecta, F1, solo aparece el efecto del acoplamiento escalar, mientras que en la dimensión directa, F2, se muestra tanto el efecto del desplazamiento químico como el del acoplamiento escalar. Una rotación de la matriz bidimensional de 45° , $S(\text{F1}, \text{F2}') = S(\text{F1}, \text{F2} - \text{F1})$, genera un espectro desacoplado en F2'. El espectro monodimensional se obtiene mediante la proyección de la matriz bidimensional sobre el eje F2'. El hecho de que la señal esté modulada en fase tanto en t_1 como en t_2 produce señales de "fase trenzada", por lo que los espectros se deben procesar en el modo de intensidad absoluta, con la consiguiente pérdida de resolución. Se han propuesto métodos para superar esta dificultad (3,4). Sin embargo, el primero de ellos (3), que necesita un posprocesado poco convencional, ha tenido poca repercusión. El segundo (4), fuertemente relacionado con los posteriores métodos de desplazamiento puro, tiene el inconveniente de que da lugar a una reducción muy considerable de la sensibilidad (los autores estiman que solo se retiene un 0,3% de la intensidad de un espectro J-resuelto convencional).

Un segundo procedimiento para eliminar el desdoblamiento debido a los acoplamientos escalares homonucleares consiste en realizar experimentos bidimensionales en el modo denominado de "tiempo constante". En él, el sistema de spines evoluciona bajo el efecto del acoplamiento escalar un tiempo fijo, mientras que el desplazamiento químico lo hace durante un tiempo variable, t_1 . Las primeras propuestas (5,6) se hicieron para simplificar espectros bidimensionales de correlación ^1H - ^1H . La intensidad de las señales depende del valor y número de acoplamientos que posea el espín que evoluciona durante el tiempo constante. Puesto que tanto el número de acoplamientos ^1H - ^1H como su magnitud es muy variable el método ha sido poco utilizado. El método se ha aplicado posteriormente para eliminar los acoplamientos ^{13}C - ^{13}C en moléculas enriquecidas en dicho isótopo (7,8). Puesto que los acoplamientos ^{13}C - ^{13}C a un enlace son prácticamente constantes no existen los problemas que plantea el método en el caso del protón.

Para desacoplar un espín, el espín "activo", de todos sus vecinos, los espines "pasivos", deben manipularse de modo distinto el espín activo y los espines pasivos. Una posibilidad evidente consiste en aplicar un pulso de 180° que solo invierta los espines pasivos. En un eco de espín en el que el pulso de 180° actúa de tal modo, el espín activo evolucionará tan solo con su desplazamiento químico. Esta posibilidad es sencilla de implementar para eliminar los acoplamientos heteronucleares para todos los espines de un tipo (espines activos) y se utiliza en multitud de experimentos multidimensionales (por ejemplo, para eliminar los acoplamientos J_{HX} en la dimensión indirecta en espectros HSQC). Sin embargo, su traslado al caso homonuclear no es evidente. En 1982 el grupo de Alex Pines consiguió este objetivo (9). La base para distinguir espines activos de espines pasivos la proporcionaba el ^{13}C . Una secuencia de pulsos, que los autores denominaron BIRD (*Bilinear Rotation Decoupling*), invierte la magnetización de los protones unidos a ^{13}C y no afecta a los restantes protones. La aplicación posterior de un pulso duro de 180° resulta en una inversión de todos los protones excepto los unidos a ^{13}C , que experimentan el efecto de dos pulsos de 180° . Si la secuencia se sitúa entre dos periodos $t_1/2$, los protones unidos a ^{13}C evolucionarán durante el tiempo t_1 exclusivamente con su desplazamiento químico. Repitiendo el experimento con valores crecientes de t_1 , en el modo en que se adquieren los espectros 2D, y transformando el interferograma formado a partir del primer punto de la fids sucesivas se obtiene el espectro de desplazamiento puro.



El experimento no tuvo una difusión suficiente por varios motivos. El tiempo necesario para su aplicación era similar al de un experimento bidimensional. Por ello experimentos como el COSY resultaban más atractivos, puesto que resolvían la mayor parte de los problemas de solapamiento de señales y proporcionaban más información. Además la sensibilidad del método es baja al seleccionar solo protones unidos a ^{13}C en abundancia natural. Finalmente, conviene resaltar que no se logra la

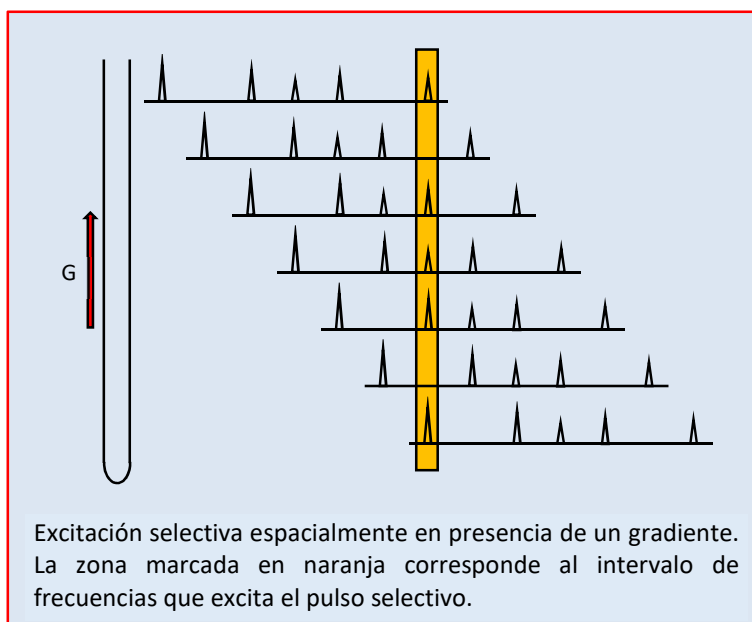
eliminación del acoplamiento escalar entre protones CH_2 , puesto que ambos están unidos al mismo ^{13}C (ambos son espines activos). Sin embargo, el módulo BIRD encontraría su utilidad en determinados experimentos heteronucleares. A este respecto, se propondrían diversas modificaciones de la secuencia BIRD primitiva capaces de equivaler a un pulso de 180° exclusivamente para los protones "directos" (los unidos a ^{13}C) o para los "remotos" (los unidos a ^{12}C) y en ambos casos invirtiendo o no el espín del heteronúcleo (10).

Un cierto avance en la búsqueda de la obtención de espectros de desplazamiento puro lo constituyen dos aportaciones del grupo de Ernst. En la primera (11) mostraban que el par de pulsos $90^\circ_{\beta+\phi}90^\circ_{\pi+\phi}$ actúa como un filtro de cuanto múltiple. Ciclando convenientemente tanto la fase β como la fase ϕ se selecciona exclusivamente la transferencia en la que el orden de coherencia cambia en $\Delta p = 0$ y en la que se produce una inversión de la evolución con el acoplamiento escalar. Por lo tanto, insertando este elemento en el centro del tiempo de evolución t_1 de un experimento 2D el ciclo de fases selecciona la magnetización que evoluciona exclusivamente con el desplazamiento químico. Ilustraban su propuesta con un espectro NOESY en el que en la dimensión indirecta las señales aparecían como singletes, si bien indicaban que el procedimiento era de aplicación en todos los experimentos en los que al final del tiempo de evolución t_1 se selecciona magnetización en fase. A pesar de su indudable interés teórico el método no ha tenido aplicación. Probablemente por lo sofisticado de su utilización, ya que la cantidad de experimentos con diferentes fases que se deben sumar depende del número máximo de acoplamientos existentes y estos experimentos individuales deben pesarse de manera diferente antes de sumarlos. Además el método da lugar a una importante pérdida de sensibilidad. La segunda aportación de Ernst (12), que también procedía a desacoplar espectros 2D en la dimensión indirecta, tiene más interés, puesto que como se verá más adelante fue redescubierta 25 años después y utilizada para obtener espectros de desplazamiento puro. La idea consistía en utilizar un pulso de 180° selectivo de banda seguido de un pulso de 180° no selectivo en el centro del periodo de evolución. Se reenfoca con ello el acoplamiento entre protones de la banda excitada selectivamente por el primer pulso y el resto de protones. Los autores ilustraban el procedimiento con el espectro NOESY de un deca péptido en el que el pulso selectivo afectaba a los protones H_α . En el espectro bidimensional las señales de los protones H_α en la dimensión indirecta aparecían como singletes con el consiguiente aumento en la resolución y en la sensibilidad.

Los espectros monodimensionales de desacoplamiento homonuclear en los que se elimina un acoplamiento se obtienen (13) irradiando a una frecuencia fija, la del espín a desacoplar, durante la adquisición de la fid en un modo de tiempo compartido, (detección-irradiación)_n. En 1994, Anna Hammarström y Gottfried Otting adaptaron el procedimiento para eliminar los acoplamientos con todos los espines presentes en una banda espectral (14). En el experimento, que denominaron SESAM (*SEmiSelective Acquisition Modulated*), un pulso de inversión selectivo de banda se divide en pequeños fragmentos, que se aplican sucesivamente durante la adquisición en un modo de tiempo compartido en el que el receptor y los fragmentos del pulso de desacoplamiento se activan alternativamente. En el artículo mostraban la aplicación a un péptido irradiando con un pulso G3 en la zona de los H_α . Un problema de SESAM es que aparecen bandas laterales a múltiplos del inverso de la duración del pulso selectivo de banda.

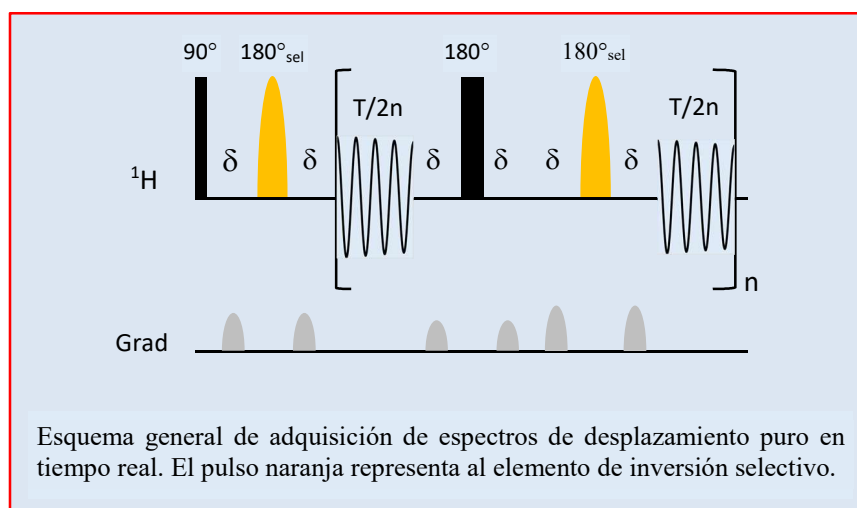
El siguiente avance, y el de mayor relevancia, se debe a Klaus Zangger y Heinz Sterk (15). Un pulso selectivo aplicado en presencia de un gradiente de campo excita señales diferentes en distintas posiciones de la muestra, pero excita todas las señales de la muestra. En un corte particular, el

reenfoque de la evolución del espín excitado con los acoplamientos escalares se logra aplicando un pulso selectivo de 180° en presencia del gradiente en combinación con un pulso de 180° no selectivo. La señal de esta rodaja que en presencia del gradiente está en resonancia experimenta dos rotaciones de 180° , sin efecto neto, mientras que todas las demás señales se invierten. La evolución del acoplamiento escalar anterior a la pareja de pulsos de 180° se reenfoca tras éstos. Al igual que en el caso del método basado en BIRD, el procedimiento de Zangger y Sterk requiere ubicar la combinación de pulsos entre dos periodos $t_1/2$ y repetir el experimento con valores crecientes de t_1 . Sin embargo, y esta fue una contribución trascendental, en lugar de construir los datos de desplazamiento puro punto a punto, se dieron cuenta de que, puesto que el acoplamiento escalar evoluciona lentamente, se podían usar varios puntos de cada fid. Puesto que al comienzo de la detección el efecto del acoplamiento se ha reenfocado por completo, y dado que J evoluciona muy lentamente, Zangger y Sterk proponían utilizar una porción de la fid de duración $d \ll 1/J_{HH}$ (unos pocos milisegundos) en la construcción del interferograma *pure shift*. De ese modo el número de experimentos necesarios para la construcción del interferograma, que en lugar de punto a punto se hace por pedazos (*chunks*), se reducía considerablemente.



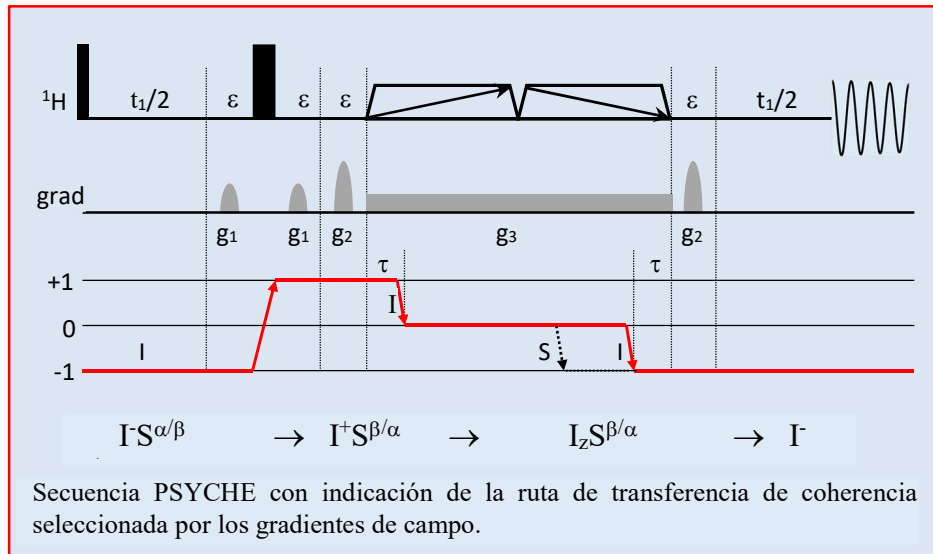
El trabajo pasó desapercibido a pesar de que constituía un método eficaz para obtener espectros de desplazamiento puro. Esta falta de atención posiblemente se debió a que la espectroscopía bidimensional solucionaba la mayor parte de los problemas de solapamiento de señales y proporcionaba más información que un espectro monodimensional. Años después se recuperó la idea de Zangger y Sterk, fundamentalmente por parte de Gareth Morris, debido a las necesidades de los espectros DOSY en los que la separación de señales en el espectro monodimensional es imprescindible para obtener buenos resultados (16,17). Los autores indicaban en (16) que era posible utilizar en la reconstrucción pedazos de la fid de t_1-d a t_1+d , siendo t_1 el instante en el que se reenfoca el efecto de los acoplamientos escalares. De ese modo el número de experimentos se reduce a la mitad respecto a la propuesta de Zangger y Sterk. Posteriormente mostrarían (18) que cuando hay acoplamiento fuerte los resultados que se obtienen con BIRD son mejores que con ZS.

El gran avance en la obtención de espectros de desplazamiento puro se produjo con la propuesta de adquisición en tiempo real, en la que la adquisición de fragmentos de la fid se intercala con elementos de reenfoque del acoplamiento homonuclear. El método fue propuesto inicialmente por el grupo de Lucio Frydman utilizando BIRD para el desacoplamiento (19). Poco después Helge Meyer y Klaus Zangger generalizarían el procedimiento y lo ilustrarían aplicando el método ZS (20).



Casi inmediatamente a la publicación de Meyer y Zangger el grupo de Teodor Parella presentó una variante del método ZS con adquisición en tiempo real (21) en la que se omite el gradiente durante el pulso selectivo al que denominó *homodecoupled band-selective*, HOBS. En ese caso los espines activos son los que resuenan en la banda excitada por el pulso selectivo y los pasivos el resto. Si bien no se consiguen eliminar los acoplamientos en todo el espectro, el método es útil en casos en los que el interés se centra en la señales de un intervalo de desplazamientos químicos (por ejemplo en los protones NH en proteínas). A diferencia de los métodos ZS o BIRD, en este caso no hay una pérdida de sensibilidad puesto que la excitación afecta a todos los espines de la muestra. El método es similar al de la propuesta de Ernst comentada antes (12), si bien es aplicable a espectros monodimensionales. Unos meses después el grupo de Ad Bax haría una propuesta equivalente (22), aparentemente desconociendo la previa de Parella, denominando "BASH decoupling" (*BAnd-Selective Homonuclear decoupling*) al método.

Un último método (23) de obtención de espectros *pure shift* es el denominado PSYCHE (*Pure Shift Yielded by CHirp Excitation*), una modificación del experimento anti-z-COSY (24), en el que para la inversión selectiva se utilizan dos pulsos cortos (10-20°) con barrido de frecuencia (pulsos CHIRP) en presencia de un gradiente. El método utiliza de un modo inteligente varias estrategias que permiten obtener los espectros desacoplados sin necesidad de efectuar una proyección, tal como ocurre en el experimento anti-z-COSY. En primer lugar flanquea el elemento $180^\circ\text{-}\beta\text{-}t_z\text{-}\beta$ del anti-z-COSY por dos periodos de duración $t_1/2$. Mediante parejas de gradientes que flanquean al pulso de 180° y al elemento $\beta\text{-}t_z\text{-}\beta$ se seleccionan las transferencias totales $I^S\alpha \rightarrow I^S\beta$ e $I^S\beta \rightarrow I^S\alpha$. De este modo al final de la secuencia los spines para los que no se haya producido una transferencia COSY habrán evolucionado exclusivamente con su desplazamiento químico durante el tiempo t_1 . La eliminación del resto de señales (fundamentalmente las debidas a la transferencia $I \rightarrow S$) se consigue sustituyendo los pulsos β rectangulares del anti-z-COSY por pulsos CHIRP aplicados en presencia de



un gradiente. La dirección de cambio de frecuencia es contraria en ambos pulsos β . De este modo las transferencias $I^+S^{\beta/\alpha} \rightarrow I_2S^{\beta/\alpha}$ se producen un tiempo τ (que debido a la presencia del gradiente g_3 es distinto para cada posición z de la muestra) después del comienzo del primer pulso CHIRP y las transferencias $I_2S^{\beta/\alpha} \rightarrow I^+S^{\beta/\alpha}$ un tiempo idéntico, τ , antes del final del segundo pulso CHIRP. El efecto del gradiente g_3 durante los dos periodos τ se compensa. En el tiempo entre ambos periodos τ el gradiente g_3 no afecta al espín I , puesto que forma parte de una coherencia de orden cero. En el caso de transferencias que involucran al espín S y que se producen durante uno de los pulsos CHIRP (por ejemplo, $I_2S^{\beta/\alpha} \rightarrow I_2S^-$), éstas tienen lugar a un tiempo $\tau' \neq \tau$ y el gradiente g_3 desenfoca la señal. Además de las transferencias totales deseadas, $I^+S^\alpha \rightarrow I^+S^\beta$ e $I^+S^\beta \rightarrow I^+S^\alpha$, sobreviven las transferencias $I^+S^\alpha \rightarrow I^+S^\alpha$ e $I^+S^\beta \rightarrow I^+S^\beta$ que dan lugar a una evolución con el acoplamiento escalar. Sin embargo, la intensidad de las primeras transferencias depende del ángulo como $\sin^2\beta \cdot [\cos^4(\beta/2) + \sin^4(\beta/2)]$ y la de las segundas como $\sin^2\beta \cdot \sin^2(\beta/2) \cdot \cos^2(\beta/2)$, por lo que para valores pequeños del ángulo β (menores de 20°) solo son relevantes las primeras.

Al igual que en los métodos ZS o BIRD en experimentos pseudo-2D, el experimento PSYCHE se repite con valores crecientes de t_1 y los diversos fragmentos de las fids (*chunks*) se utilizan para construir el interferograma del que se obtiene el espectro desacoplado. La sensibilidad se reduce en comparación con los espectros 1D convencionales, pero esta reducción es menor que con el método ZS o con el método BIRD. Cabe señalar que, sin embargo, el elemento PSYCHE no se puede utilizar en el modo de adquisición en tiempo real.

Referencias

1. R. R. Ernst, *Nuclear Magnetic Double Resonance with an Incoherent Radio-Frequency Field*, J. Chem. Phys., 45, 3845-3861, 1966.
2. W.P. Aue, J. Karhan, R.R. Ernst, *Homonuclear broad band decoupling and two-dimensional J-resolved NMR spectroscopy*, J. Chem. Phys., 64, 4226-4227, 1976.
3. A.J. Shaka, J. Keeler, R. Freeman, *Separation of Chemical Shifts and Spin Coupling in Proton NMR. Elimination of Dispersion Signals from Two-Dimensional Spectra*, J. Magn. Reson., 56, 294-313, 1984.

4. A.J. Pell, J. Keeler, *Two-dimensional J-spectra with absorption-mode lineshapes*, J. Magn. Reson., 189, 293-299, 2007.
5. A. Bax, R. Freeman, *Investigation of complex networks of spin-spin coupling by two-dimensional NMR*, J. Magn. Reson., 44, 542-561, 1981.
6. M. Rance, G. Wagner, O.W. Sørensen, K. Wüthrich, R.R. Ernst, *Application of ω_1 -decoupled 2D correlation spectra to the study of proteins*, J. Magn. Reson., 59, 250-261, 1984.
7. J. Santoro, G.C. King, *A Constant-Time 2D Overbroadenhausen Experiment for Inverse Correlation of Isotopically Enriched Species*, J. Magn. Reson., 97, 202-204, 1992.
8. G.W. Vuister, A. Bax, *Resolution Enhancement and Spectral Editing of Uniformly ^{13}C -Enriched Proteins by Homonuclear Broadband ^{13}C Decoupling*, J. Magn. Reson., 98, 428-435, 1992.
9. J.R. Garbow, D.P. Weitekamp, A. Pines, *Bilinear Rotation Decoupling of Homonuclear Scalar Interactions*, Chem. Phys. Lett., 93, 504-509, 1982.
10. D. Uhrín, T. Liptaj, K.E. Kövér, *Modified BIRD Pulses and Design of Heteronuclear Pulse Sequences*, J. Magn. Reson. A, 101, 41-46, 1993.
11. O.W. Sørensen, C. Griesinger, R.R. Ernst, *Time Reversal of the Evolution under Scalar Spin-Spin Interactions in NMR. Application for ω_1 Decoupling in Two-Dimensional NOE Spectroscopy*, J. Am. Chem. Soc., 107, 1179-1180, 1985.
12. R. Brüschweiler, C. Griesinger, O.W. Sørensen, R.R. Ernst, *Combined Use of Hard and Soft Pulses for ω_1 Decoupling in Two-Dimensional NMR Spectroscopy*, J. Magn. Reson., 78, 178-185, 1988.
13. J.P. Jesson, P. Meakin, G.J. Kneissel, *Homonuclear Decoupling and Peak Elimination in Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance*, J. Am. Chem. Soc., 95, 618-620, 1973-
14. A. Hammarström, G. Otting, *Improved Spectral Resolution in ^1H NMR Spectroscopy by Homonuclear Semiselective Shaped Pulse Decoupling during Acquisition*, J. Am. Chem. Soc., 116, 8847-8848, 1994.
15. K. Zangger, H. Sterk, *Homonuclear Broadband-Decoupled NMR Spectra*, J. Magn. Reson., 124, 486-489, 1997.
16. M. Nilsson, G.A. Morris, *Pure shift proton DOSY: diffusion-ordered ^1H spectra without multiplet structure*, Chem. Commun., 9, 933-935, 2007.
17. J.A. Aguilar, S. Faulkner, M. Nilsson, G.A. Morris, *Pure Shift ^1H NMR: A Resolution of the Resolution Problem?*, Angew. Chem. Int. Ed., 49, 3901-3903, 2010.
18. J.A. Aguilar, M. Nilsson, G.A. Morris, *Simple Proton Spectra from Complex Spin Systems: Pure Shift NMR Spectroscopy Using BIRD*, Angew. Chem. Int. Ed., 50, 9716-9717, 2011.
19. A. Lupulescu, G.L. Olsen, L. Frydman, *Toward Single-Shot Pure-Shift Solution ^1H NMR by Trains of BIRD-Based Homonuclear Decoupling*, J. Magn. Reson., 218, 141-146, 2012.
20. N.H. Meyer, K. Zangger, *Simplifying Proton NMR Spectra by Instant Homonuclear Broadband Decoupling*, Angew. Chem. Int. Ed., 52, 7143-7146, 2013.
21. L. Castañar, P. Nolis, A. Virgili, T. Parella, *Full Sensitivity and Enhanced Resolution in Homodecoupled Band-Selective NMR Experiments*, Chem. Eur. J., 19, 17283-17286, 2013.
22. J. Ying, J. Roche, A. Bax, *Homonuclear Decoupling for Enhancing Resolution and Sensitivity in NOE and RDC Measurements of Peptides and Proteins*, J. Magn. Reson., 241, 97-102, 2014.
23. M. Foroozandeh, R.W. Adams, N.J. Meharry, D. Jeannerat, M. Nilsson, G.A. Morris, *Ultra-high-Resolution NMR Spectroscopy*, Angew. Chem. Int. Ed., 53, 6990-6992, 2014.

24. H. Oschkinat, A. Pastore, P. Pfändler, G. Bodenhausen, *Two-Dimensional Correlation of Directly and Remotely Connected Transitions by z-Filtered COSY*, J. Magn. Reson., 69, 559- 566, 1986.