

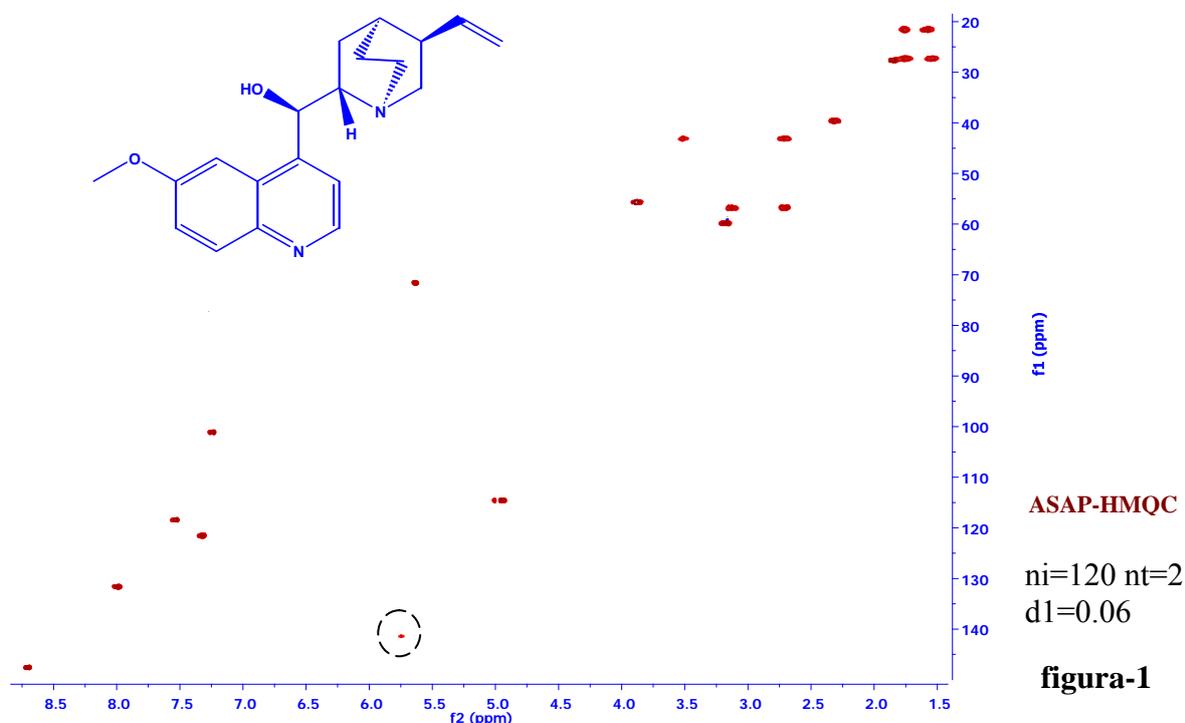
EXPERIMENTO ASAP-HMQC

COMO HACER UN EXPERIMENTO DE HETEROCORRELACIÓN EN UNOS MINUTOS

Debido a la baja sensibilidad intrínseca de la RMN, es ineludible el desarrollo de nuevos métodos y alternativas que permitan la reducción del tiempo de realización de los experimentos. Esto aún es más necesario en los espectros de 2D y de nD. Inicialmente en los experimentos bidimensionales se requería la realización de un número mínimo de acumulaciones, independientemente de la muestra disponible, determinado por el ciclo de fases que permitía la selección de los órdenes de coherencia. La incorporación de secuencias con gradientes, ha posibilitado eliminar esta dependencia y reducir el tiempo. Por ejemplo, el paso del HSQC al gHSQC supone una reducción del tiempo a la mitad si se dispone de suficiente muestra. No obstante, una parte importante del tiempo que requiere un experimento de RMN no corresponde a los pulsos o a la adquisición, sino al llamado delay de relajación (d1). Se han desarrollado alternativas para reducir más la duración de los experimentos, que se basan en eliminar o disminuir al máximo el tiempo dedicado a la recuperación de la magnetización longitudinal. Inicialmente esta alternativa sólo es válida si el sistema se relaja muy rápidamente (proteínas y otras macromoléculas). No obstante, recientemente Eriks Kupce y Ray Freeman¹, han desarrollado un método, aplicable a los experimentos de heterocorrelación, que permite la recuperación de la magnetización compartiéndola con los protones próximos. El experimento ASAP-HMQC¹ se basa en esta alternativa y se encuentra implementado en los equipos Varian 500 de la Unidad de RMN.

La secuencia ASAP-HMQC permite utilizar tiempos de espera entre pulsos de sólo 0.06 segundos, gracias a que la magnetización de los ¹H unidos a ¹³C se recupera mediante la transferencia procedente del resto de los protones presentes en la molécula (¹H unidos a ¹²C), proceso que se realiza mediante un módulo de Hartmann-Hahn (spin.locking) situado al principio de la secuencia. Este proceso es similar al que se utiliza en los experimentos de CPMAS. Al no depender de la difusión, es factible su aplicación en moléculas de pequeño tamaño.

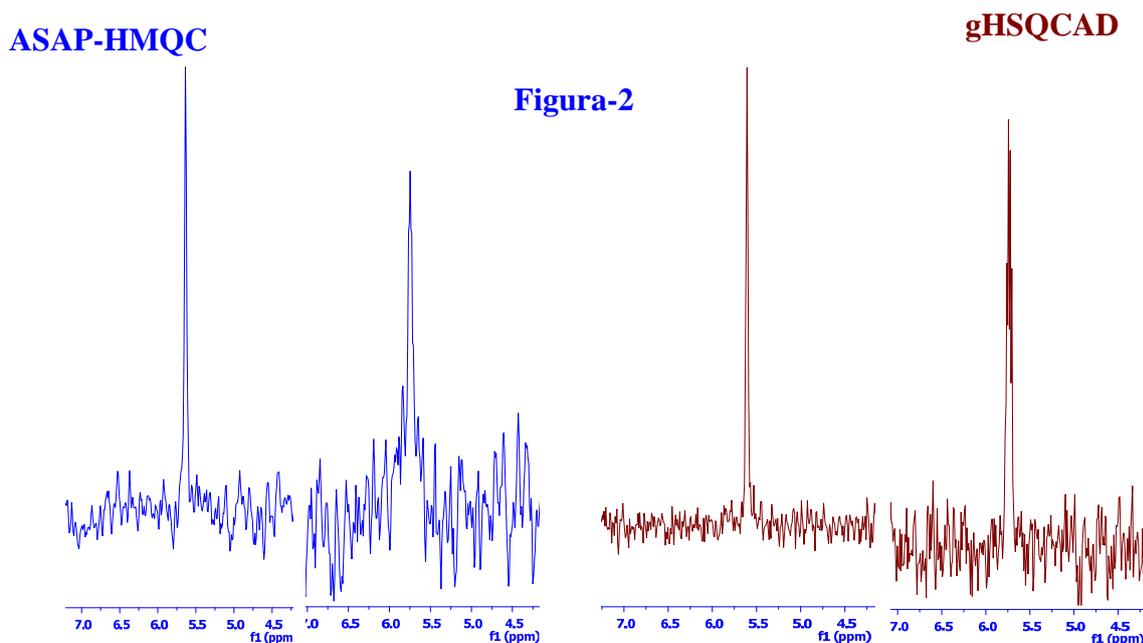
Utilizando este experimento es posible obtener un espectro de heterocorrelación ¹H-¹³C en un tiempo de dos-cuatro minutos.



El experimento ASAP-HMQC que se muestra en la **Figura 1** ha precisado algo menos de 2 minutos, en cambio el gHSQCAD equivalente ha requerido unos 15 minutos. La diferencia fundamental está en que en el experimento ASAP el d1 es sólo de 0.06 segundos, mientras que en el gHSQCAD tiene un valor de

1s. La transferencia de polarización se efectúa mediante un corto periodo de spin-locking al inicio de la secuencia ASAP con un valor de 40-50 milisegundos.

La calidad del experimento es muy buena, sin observarse los artefactos propios de una repetición rápida. Comparado con el experimento de gHSQCAD, la sensibilidad es ligeramente menor (aprox un 10-15%) en la mayoría de las señales de la quinina. No obstante en la señal del $\text{CH}=\delta 141$ ppm, la pérdida de sensibilidad es mayor ($\sim 40\%$). En la **Figura 2** se comparan las trazas de los dos experimentos a un delta de 70 ppm y 141 ppm, pudiéndose observar las diferencias en la relación SN



El ahorro de tiempo se incrementa cuando el gHSQC precisa 4-8 o más acumulaciones. La secuencia ASAP-HMQC puede ser muy adecuada en aplicaciones de HTS si es posible seguir el proceso de asociación con variaciones del desplazamiento químico del ligando en el HMQC.

El experimento esta disponible en los dos equipos Varian 500

Limitaciones:

- No es posible hacer una edición de las señales de correlación con lo que se pierde la información de la multiplicidad de los ^{13}C .
- En comparación con el gHSQCAD el experimento el exp ASAP-HMQC tiene una menor sensibilidad. Se ha observado que la disminución de la sensibilidad no afecta por igual a todas las señales y puede ocasionar la perdida de las mismas (ver la señal a 5.6/141 ppm de la Quinina, **figura 1**).
- Si la cantidad de muestra es muy limitada, su aplicación puede resultar problemática. (problemas de calentamiento y nivel de ruido)

TEMAS RELACIONADOS.

Para más información puede consultar las siguientes notas de aplicación:

- ALTERNATIVAS A LA ADQUISICIÓN DE ESPECTROS DE ^{13}C (HSQC), abril 2008

ⁱ **Bibliografía:** E.Kupřce and R. Freeman Magn. Reson. Chem. 2007; 45: 2–4