

OBTENCIÓN RÁPIDA DE ESPECTROS DE RMN MULTIDIMENSIONALES MEDIANTE INCREMENTO DE RELAJACIÓN POR ADICIÓN DE SUSTANCIAS PARAMAGNÉTICAS

RAPID ACQUISITION OF MULTIDIMENSIONAL NMR SPECTRA BY RELAXATION ENHANCEMENT ADDING PARAMAGNETIC SUBSTANCES

Marino Vega-Vázquez y Manuel Martín-Pastor*

Universidad de Santiago de Compostela, Unidad de Resonancia Magnética, RIAIDT, Edif. CACTUS, campus Sur, Santiago de Compostela, A Coruña 15706 (España)

*autor de contacto (e-mail: manuel.martin@usc.es)

Recibido: 12/02/2010 - Evaluado: 07/03/2010 - Aceptado: 19/03/2010

RESUMEN

Se propone un método para acelerar la obtención de experimentos de RMN multidimensionales (nD-RMN) mediante la adición de sustancias paramagnéticas que inducen un incremento de la relajación en el soluto que se quiere estudiar. Escogiendo adecuadamente el tipo de sustancia paramagnética y ajustando su concentración en la muestra, el efecto llamado PRE (Paramagnetic Relaxation Enhancement) puede modularse adecuadamente permitiendo pérdidas mínimas de sensibilidad y una reducción sustancial del tiempo en los experimentos nD-RMN. Este tipo de metodología denominada Fast-PRE-NMR se ha probado para los experimentos 2D-COSY, 2D-TOCSY, 2D-HMQC y 2D-HMBC con moléculas de tamaño pequeño y mediano, utilizando sustancias paramagnéticas de bajo coste, como Mn^{2+} o Fe^{3+} . El método permitió una reducción del tiempo de obtención en un factor 3 proporcionando espectros de buena calidad y sin artefactos. Basándose en estos resultados, se propone un protocolo sencillo para la optimización de la concentración de paramagnético para unas condiciones experimentales particulares.

ABSTRACT

A method is proposed to speed-up the acquisition of multidimensional NMR experiments (nD-NMR) by addition of paramagnetic substances, which increases relaxation in the studied solute. By properly choosing the type of paramagnetic and adjusting its concentration in the sample, the PRE effect (Paramagnetic Relaxation Enhancement) is conveniently modulated, allowing a substantial reduction of experiment time of many nD-NMR, with minimum losses in sensitivity. This type of Fast-PRE-NMR methodology was optimized for 2D COSY, 2D TOCSY, 2D HMQC and 2D HMBC experiments for small and medium size- molecules and using low cost paramagnetic substances, such as Mn^{2+} . This method allowed a reduction of the experimental time by a factor of three, providing good quality spectra and no use of artifacts. Based on these results, it is proposed a general protocol for rapid set-up of optimum paramagnetic concentration for particular solute and sample experimental conditions.

Palabras clave: RMN rápida, saturación progresiva, incremento de relajación paramagnética
Keywords: Fast-NMR, progressive saturation, fast-NMR, paramagnetic relaxation enhancement

INTRODUCCIÓN

En años recientes, se han desarrollado varios métodos para acelerar la adquisición de experimentos de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) (Freeman y Kupce, 2003). Además del interés de esos métodos para acortar el tiempo de medida de los experimentos multidimensionales de RMN (nD-RMN), pueden ser la única alternativa para estudios de RMN en escalas de tiempo cortas o intermedias, o para realizar medidas con muestras relativamente inestables.

Hay un tipo de métodos rápidos de RMN que tienen como objetivo reducir el tiempo de espera necesario para que se produzca la relajación completa de las señales entre acumulaciones (*scans*) sucesivas. Algunos ejemplos recientes son los experimentos SOFAST/BEST (Schanda y Brutscher, 2005; Schanda et al., 2005. Schanda y Brutscher, 2006; Gal et al., 2007) aplicables a péptidos y proteínas enriquecidas isotópicamente en ^{15}N . El tiempo de espera entre *scans* sucesivos normalmente supone una parte considerable del tiempo que dura un experimento de RMN, éste debe ser al menos 5 veces el máximo valor de relajación longitudinal T_1 de los núcleos a estudiar, para así garantizar que todas las resonancias afectadas por el anterior *scan* han vuelto al equilibrio (> 99 %). Si no se cumple esta condición, se produce saturación que afecta a la integral de la señal (pérdida de cuantitatividad) y provocar aparición de ruido t_1 y otros artefactos en los espectros nD (Kupce y Freeman, 2007).

La interacción intermolecular entre el soluto y los iones paramagnéticos añadidos a la muestra pueden producirle al soluto una disminución de los tiempos de relajación longitudinal (T_1) y transversal (T_2) de sus espines nucleares. Este efecto, denominado incremento de velocidad de relajación mediante paramagnéticos (PRE), ha sido muy usado para el estudio de estructura y propiedades dinámicas de moléculas (Bertini y Luchinat, 1996), y también históricamente para incrementar la velocidad de adquisición de espectros 1D de ^{13}C así como para acelerar la relajación de la señal correspondiente al H_2O . Recientemente la estrategia PRE se ha usado con éxito en la aceleración de la adquisición de experimentos nD en moléculas grandes (Cai et al., 2006). El efecto PRE en el caso de pequeñas y medianas moléculas es teóricamente menos favorable que para macromoléculas (Cai et al., 2006) porque teóricamente además de acortarse los tiempos T_1 también pueden acortarse significativamente los T_2 , lo que conduce a un ensanchamiento de señal y la correspondiente pérdida de sensibilidad en los espectros. En este punto, uno de los objetivos de este artículo es poner de manifiesto que si se eligen cuidadosamente las condiciones experimentales, el efecto PRE también permite acelerar los experimentos nD-RMN de moléculas medianas-pequeñas con mínimas pérdidas de sensibilidad y resolución.

En este estudio se ha considerado el uso de PRE para acelerar experimentos de rutina 2D RMN que proporcionan correlaciones a través del acoplamiento escalar (^1H - ^1H , ^1H - ^{13}C ,..., etc.). En concreto se ha utilizado PRE para los experimentos 2D g-COSY, 2D TOCSY, 2D g-HMQC, y 2D g-HMBC en moléculas de tamaño mediano-pequeño, un método al que se denominará fast-PRE-NMR. Mediante la optimización en cada uno de estos experimentos del efecto PRE óptimo, en concordancia con una duración optimizada de los eventos de la propia secuencia de pulsos, se puede obtener la mejor relación de sensibilidad y velocidad del experimento posibles. Finalmente, se presenta un protocolo sencillo para la rápida optimización de las condiciones de fast-PRE-NMR en el conjunto de los experimentos considerados para cualquier tipo de soluto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de muestras

Se prepararon varias muestras de sacarosa a concentración 9.75 mM, disolviendo 20 mg de sacarosa en 0.6 ml de D_2O a concentración de Mn^{2+} 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 mM. Para la adquisición de experimentos de medida de tiempos de relajación T_1 y T_2 se prepararon muestras adicionales con concentraciones de Mn^{2+} de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 y 0.9 mM.

Espectroscopía RMN

Los espectros se adquirieron a 300 K en un espectrómetro BRUKER DRX-500. Los datos fueron procesados y analizados con MestRe-C v 4.9 (*Mestrelab Research*). El ajuste de los datos de intensidad/integral a funciones matemáticas y su representación gráfica fueron realizados con Origin v 6.1 (*Originlab Corporation*). La asignación de las señales de ^1H y ^{13}C de sacarosa se llevó a cabo con los espectros adquiridos, completando la asignación de la literatura (Bock et al., 1984). Para nombrar las señales de RMN de la sacarosa se usan las iniciales g y f para el monosacárido de glucosa y fructosa, respectivamente. A no ser que se indique otra cosa, todos los espectros fueron adquiridos con 32 *dummy-scans* para asegurar el estado estacionario de espín antes de la adquisición de las FIDs. En los experimentos 2D se insertó un bloque de purga $90^\circ(^1\text{H})\text{-gradiente-}G_z$ justo antes del periodo de relajación d_1 , para purgar magnetización residual del scan anterior y así reducir la presencia de artefactos (Kupce y Freeman, 2007).

Medidas de relajación longitudinal (T_1) y relajación transversal (T_2)

Los tiempos de relajación longitudinal T_1 y transversal T_2 de protón se determinaron a partir de 14 muestras de sacarosa con concentraciones de metal paramagnético entre 0 y 2 mM.

Tiempos de relajación longitudinal T_1 : Se determinaron con el experimento de saturación progresiva (Mitrovic et al., 2001) ($d_1\text{-}90^\circ\text{-acq.}$). Para cada muestra se adquirieron 16 espectros a los siguientes tiempos de d_1 $4 \cdot 10^{-6}$, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 y 1.5 s. Cada espectro fue adquirido con 128 *dummy-scans* seguidos por 32 *scans*. Las FIDs fueron detectadas con 1024 puntos complejos y el tiempo de adquisición fue de 0.225 en cada experimento. El tiempo de relajación longitudinal para cada señal no solapada de protón de sacarosa fue determinada por un ajuste no lineal de la integral de las señales siguiendo la siguiente ecuación (Mitrovic et al., 2001):

$$\frac{I(\tau)}{I_{\max}} = 1 - \exp(-\tau/T_1) \quad (1)$$

Donde $\tau = d_1 + aq$, $I(\tau)$ es la integral de la señal medida en el espectro al valor correspondiente de τ e I_{\max} es la integral de la señal al mayor valor de τ

Tiempos de relajación transversal T_2 : Las medidas se hicieron usando la secuencia clásica de CPMG (Meiboom y Gill, 1958) ($d_1\text{-}90^\circ\text{-}(\delta\text{-}180^\circ\text{-}\delta)_n\text{-acq.}$). El número de ciclos n se varió linealmente en 50 pasos para obtener duraciones variables del bloque CPMG entre 3 y 700 ms. Los espectros fueron adquiridos con 16 *dummy scans* seguidos por 16 *scans*. Las FIDs fueron detectadas con 2048 puntos. El tiempo de relajación T_2 para cada señal de protón no solapada de (1) fue determinada por el ajuste no lineal de la integral a la siguiente ecuación:

$$\frac{I(\tau)}{I_0} = \exp(-\tau/T_2) \quad (2)$$

Donde $\tau = 2n\delta$ es la duración del bloque CPMG. $I(\tau)$ es la integral de la señal al valor correspondiente de τ , e I_0 es la integral de la señal al mínimo valor de τ .

Tiempos de relajación longitudinal efectivos en experimentos 2D (T_1^{eff}): Los tiempos de relajación efectivos de protón (T_1^{eff}) se determinaron para los picos de cruce no solapados de sacarosa en los experimentos 2D g-COSY, 2D TOCSY, 2D g-HMQC y 2D g-HMBC. Se utilizó el método de saturación progresiva (Mitrovic et al.,

2001) aplicado al experimento en cuestión. En cada experimento, el T_1^{eff} de un pico de cruce se determina por ajuste no lineal a la Ec. 1 de la intensidad del pico de cruce a los valores de d_1 que se utilizaron en cada caso (ver abajo).

Espectros 2D g-COSY

Se adquirieron en modo magnitud con el experimento COSY que emplea gradientes para la selección de coherencias (secuencia *cosygp* de Bruker). Para cada relación de sacarosa: Mn^{2+} se determinó el T_1^{eff} explorando el valor de d_1 en un rango desde 4.10^{-6} a 1.4 s obteniéndose 15 espectros. La única excepción es la muestra con Mn^{2+} 2mM en la que se exploró un rango de d_1 desde 4.10^{-6} a 0.7 s. Los espectros se adquirieron con 8 *scans* y el tiempo de adquisición fue de 0.255 s. El número de puntos detectados fue de 128 y 1024 para las dimensiones F1 y F2, respectivamente.

Espectros 2D TOCSY

Se adquirieron en el modo sensible a la fase (secuencia *mlevst* de Bruker). Para cada relación de sacarosa: Mn^{2+} se determinó el T_1^{eff} explorando el valor de d_1 en un rango desde 4.10^{-6} a 1.4 s obteniéndose 15 espectros. La única excepción es la muestra con Mn^{2+} 2mM en la que se usó un rango de d_1 desde 4.10^{-6} a 0.7 s. Los espectros se adquirieron con 8 *scans* y el tiempo de adquisición fue de 0.255 s. Se usó el esquema MLEV-17 para el periodo de mezcla isotrópica con un tiempo de mezcla de 80 ms. El número de puntos detectados fue de 128 y 1024 en las dimensiones F1 y F2, respectivamente.

Espectros 2D g-HMQC

Se adquirieron en modo magnitud usando la secuencia HMQC que emplea los gradientes para la selección de coherencias (*inv4gp* en la biblioteca de Bruker). Para cada muestra de sacarosa: Mn^{2+} se determinó el T_1^{eff} adquiriendo 15 experimentos con valores de d_1 en un rango desde 4.10^{-6} a 1.4 s. Las únicas excepciones fueron las muestras con Mn^{2+} 1.5 y 2 mM en las que se usó un rango de d_1 desde 4.10^{-6} a 0.72 s. Los espectros se adquirieron con 16 *scans* y los tiempos de espera en la secuencia se ajustaron a un valor nominal de $^1J_{\text{CH}}$ de 145 Hz. Se utilizó desacoplamiento de banda ancha de carbono durante el tiempo de adquisición (0.12 s) con el esquema GARP. El número de puntos detectados fue de 128 y 384 en las dimensiones F1 y F2, respectivamente.

2D g-HMBC

Estos experimentos se adquirieron en modo magnitud usando la secuencia HMBC que emplea los gradientes para la selección de coherencias (secuencia *inv4gplprnd* de Bruker). Para cada muestra de sacarosa: Mn^{2+} se determinó el T_1^{eff} adquiriendo 15 experimentos con valores de d_1 en un rango desde 4.10^{-6} a 1.4 s para las muestras con Mn^{2+} 0 y 0.5 mM, mientras que para las muestras con Mn^{2+} 1, 1.5 y 2 mM se usó un rango de d_1 desde 4.10^{-6} a 0.72 s. Los espectros se adquirieron con 16 *scans* y un tiempo de adquisición de 0.255 s. Los tiempos de espera en la secuencia se ajustaron a unos valores nominales de $^1J_{\text{CH}}$ de 145 Hz y $^nJ_{\text{CH}}$ of 7.7 Hz. Se utilizó desacoplamiento de banda ancha de carbono durante el tiempo de adquisición (0.12 s) con ese esquema GARP. El número de puntos detectados fue de 200 y 1024 en f1 y f2 respectivamente.

TEORÍA

Tiempo de medida del experimento de RMN, sensibilidad y relajación longitudinal T_1

En general, en los experimentos de RMN la relación señal-ruido por unidad de tiempo de medida (SN_t), referido como la sensibilidad del experimento por *scan*, viene dada por Ec. 3 (Ernst et al., 1987; Pervushin et al., 2002).

$$SN_i = c(1 - \exp(-\frac{1}{T_1} d_1)) / (\sqrt{d_0 + d_1}) \quad (3)$$

Donde T_1 es el tiempo de relajación longitudinal del espín a estudiar, d_0 es la duración de la propia secuencia desde el primer pulso de excitación hasta el final de la adquisición de la FID, d_1 es el tiempo de espera de relajación antes del primer pulso del scan y c es un coeficiente de proporcionalidad.

Para obtener espectros cuantitativos se debe cumplir la condición $d_1 + d_0 \geq 5 T_1$ con objeto de asegurar que se recupera >99% de la señal en cada scan. Cuando no se desea obtener espectros cuantitativos sino la máxima sensibilidad por unidad de tiempo de medida (Pervushin et al., 2002), ésta viene dada por $SN_i^{\max} = \frac{c \cdot 0.71}{\sqrt{d_1^{\text{opt}}}} \sim$

$c \cdot 0.64 \sqrt{1/T_1}$ lo que resulta en un tiempo de espera óptimo d_1^{opt} dado por Ec. 4 (Ernst et al., 1987; Pervushin et al., 2002):

$$d_1^{\text{opt}} = 1.25 \cdot T_1 - d_0 \quad (4)$$

De las relaciones anteriores se deduce que la relajación longitudinal T_1 de los espines define la sensibilidad y duración de los experimentos de RMN cuando se realizan muchas repeticiones de ciclos de excitación/detección (scans).

Incremento de relajación mediante sustancias paramagnéticas (PRE)

Los tiempos de relajación T_1 y T_2 que pueden medirse en un soluto al añadir sustancias paramagnéticas son la suma de las contribuciones diamagnética y paramagnética a la relajación. Si la concentración no es muy alta, el PRE es proporcional a la concentración del paramagnético (Ec. 5) (Cai et al., 2006)

$$\frac{1}{T_i^{\text{obs}}} = \frac{1}{T_i^{\text{dia}}} + c \frac{1}{T_i^{\text{para}}} \quad i = 1, 2 \quad (5)$$

Donde T_i se refiere a las relajaciones longitudinal y transversal, T_1 y T_2 respectivamente, c es un parámetro proporcional a la concentración de la especie paramagnética que también tiene en cuenta el intercambio químico (Cai et al., 2006). Cuando el soluto es una molécula mediana-pequeña, puede asumirse que todos los protones son igualmente accesibles al disolvente y que por tanto, los cambios esperados en T_1^{obs} e independientemente en T_2^{obs} serán esencialmente iguales para todos ellos, con una dependencia lineal con la concentración dada por Ec. 5. Desviaciones de esa linealidad podrán ser útiles para refutar la presunción inicial de la ausencia de interacciones específicas con el soluto (ej. formación de aductos). Las condiciones más favorables para el método fast-PRE-NMR propuesto son aquellas que producen la menor relación $T_1^{\text{obs}}/T_2^{\text{obs}}$.

Dado que no existen contacto directo entre los espines que interactúan, solo la interacción intermolecular dipolo-dipolo entre un núcleo y electrones desapareados pueden dar lugar a PRE significativo (relajación "outer-sphere") (Freed, 1978; Ayant et al., 1975). A campos magnéticos altos (frecuencia de $^1\text{H} \geq 400$ MHz) las velocidades de relajación paramagnéticas dipolares $R_1^{\text{para,dd}}$ y $R_2^{\text{para,dd}}$ (son las inversas de los tiempos de relajación $1/T_1^{\text{para,dd}}$ y $1/T_2^{\text{para,dd}}$, respectivamente) vienen dadas por la teoría de Solomon-Bloembergen (Ecs. 6 y 7) (Solomon, 1955; Bloembergen y Morgan, 1961):

$$R_1^{para,dd} = \frac{2}{15} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \gamma_I^2 g^2 \mu_B^2 S(S+1) r^{-6} \left\{ \frac{3\tau_c}{1+(\omega_H \tau_c)^2} + \frac{7\tau_c}{1+(\omega_S \tau_c)^2} \right\} \quad (6)$$

$$R_2^{para,dd} = \frac{1}{15} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \gamma_I^2 g^2 \mu_B^2 S(S+1) r^{-6} \left\{ 4\tau_c + \frac{3\tau_c}{1+(\omega_H \tau_c)^2} \right\} \quad (7)$$

Donde r es la distancia entre el centro paramagnético y el núcleo observado; μ_0 la permeabilidad del vacío; γ_I la constante giromagnética; g el factor g electrónico; μ_B el magnetón de Bohr; S el número cuántico de espín electrónico (S=5/2 para Mn^{2+} , S=1/2 para Cu^{2+}), ω_H y ω_S las frecuencias de Larmor de 1H y del electrón, respectivamente, y $\omega_S = 658 \omega_H$. El tiempo de correlación τ_c en las Ecs. 6 y 7 viene dado por:

$$\frac{1}{\tau_c} = \frac{1}{T_{1e}} + \frac{1}{\tau_M} + \frac{1}{\tau_R} \quad (8)$$

Donde T_{1e} es el tiempo de relajación electrónico, τ_R es el tiempo de correlación rotacional del soluto y τ_M es el tiempo de residencia del paramagnético en la superficie del soluto. De estos tres, el proceso más rápido será el que tenga un mayor peso en τ_c .

T_{1e} depende del ión metálico paramagnético, con unos valores situados en el rango de 10^{-12} a 10^{-9} s. τ_R es aproximadamente 10^{-10} a 10^{-8} en moléculas medianas-pequeñas (MW < 2000). τ_M ha sido calculado (Pintacuda y Otting, 2002) usando $\tau_M = x^2/6D$, donde D es la distancia de difusión x requerida por el paramagnético para salir de la interacción del complejo, para Mn^{2+} la distancia x es 34 Å (Iwahara y Clore, 2006), para distancias mayores que este valor el efecto del paramagnético se vuelve indetectable.

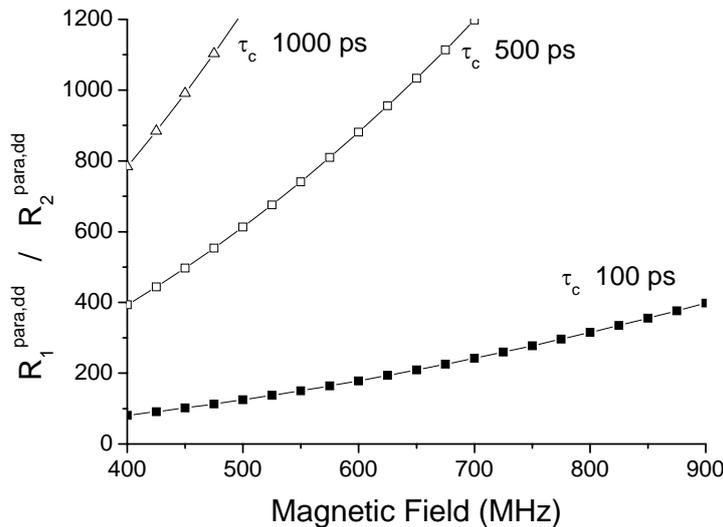


Fig. S1: Dependencia teórica de la relación $R_1^{para,dd} / R_2^{para,dd}$ con el campo magnético. Las curvas representadas corresponden a tiempos de correlación τ_c 1000 ps (triángulos), 500 (cuadrados sin relleno) y 100 ps (cuadrados con relleno).

A campos magnéticos altos, $\omega_{S, H} \cdot \tau_c \gg 1$ en Ecs. 6 y 7 y la función de densidad espectral $J(\omega)$ disminuye, así pues, para la misma concentración de paramagnético el PRE disminuye con el aumento de la fuerza del campo. Por otro lado, a mayor fuerza de campo magnético se incrementa la relación $R_1^{\text{para,dd}} / R_2^{\text{para,dd}}$ especialmente en casos de mayor τ_c y por lo tanto son favorables para el método fast-PRE-NMR aquí propuesto (Fig. S1). Para moléculas de tamaño mediano-pequeño en solventes no viscosos, τ_M es mucho mayor que τ_R y por lo tanto no contribuye al valor de τ_c en la Ec. 8. Dado que el más rápido de ambos procesos T_{1e} o τ_R será el que más influya en τ_c , la única condición que se le requiere al paramagnético para obtener la mayor relación $R_1^{\text{para,dd}} / R_2^{\text{para,dd}}$ es que $T_{1e} \geq \tau_R$. Existen iones paramagnéticos bastante asequibles que satisfacen esta condición tales como, Mn^{2+} and Fe^{3+} que tienen un T_{1e} en el rango de 100 a 1000 ps, lo cual está cerca del τ_R típico de moléculas pequeñas y medianas

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para moléculas de pequeño y mediano tamaño a frecuencias de resonancia entre 400 y 500 MHz, el efecto PRE depende principalmente de las propiedades de la sustancia paramagnética (espín electrónico, tipo de coordinación del metal y tiempo de relajación electrónica T_{1e}) y de su concentración en la muestra. El efecto PRE introduce una disminución en los tiempos de relajación T_1 's y T_2 's del núcleo de interés (ver sección de teoría). Mientras que un efecto PRE en T_1 es útil para la reducción del tiempo de espera entre scans (d_1^{opt} en Ec. 4) de los experimentos de RMN, el efecto PRE en T_2 causa ensanchamiento de señales y pérdida de sensibilidad en los espectros. Las condiciones más favorables para fast-PRE-NMR pueden encontrarse experimentalmente de forma que se produzca la menor relación PRE- T_1 / PRE- T_2 en moléculas de tamaño mediano-pequeño. Esto requiere el ajuste de la concentración del paramagnético a su valor idóneo en la muestra y para el experimento de RMN en cuestión.

La forma práctica de optimizar fast-PRE-NMR para una sustancia paramagnética que se utiliza por primera vez, es determinar la concentración óptima con una muestra de referencia de un soluto de tamaño medio-pequeño (datos de referencia PRE) bajo las condiciones experimentales a utilizar (campo magnético, temperatura, disolvente, etc.). Es esperable que esta concentración óptima sea fácilmente extrapolable a otros solutos de similares características y que presumiblemente vayan a interactuar de forma similar con el paramagnético.

En lo que sigue se presenta un análisis completo de efecto PRE con una muestra de referencia de sacarosa en D_2O utilizando como paramagnético el ión Mn^{2+} . Basándonos en estos resultados de referencia, finalmente se propone un protocolo simplificado para la determinación rápida de la concentración óptima de esta especie paramagnética en solutos de características similares.

Optimización de PRE- T_1 y PRE- T_2

El efecto PRE- T_1 y PRE- T_2 de un paramagnético se determina en una muestra de referencia mediante una valoración con el paramagnético elegido. En este estudio se obtuvieron datos de referencia PRE con una muestra de sacarosa en D_2O y el paramagnético Mn^{2+} . A cada concentración de paramagnético se midieron los tiempos de relajación T_1 y T_2 de los protones no solapados de la sacarosa. Estos resultados se dan en la Tabla 1 y se representan en las Figs. 1a y 1b. Para cada protón analizado en la Fig. 1a ó 1b, la correspondiente curva claramente se separa de la linealidad predicha por la Ec. 5, sugiriendo la formación de aductos (Slappendel et al., 1982). Cada curva puede descomponerse en dos zonas con cierto carácter lineal, una entre 0 a 0.3 mM que sugiere la formación de aducto 1:1, y otra en el rango 1 a 2 mM que sugiere un aducto 1:2.

En las Figs. 1a y 1b puede verse que la mayor caída de los tiempos T_1 y T_2 se produce en el rango de $[Mn^{2+}]$ entre 0 a 1.0 mM. A concentraciones superiores, el decaimiento es mucho más moderado y asintótico. Es interesante apuntar que la magnitud del PRE es mayor cuanto mayor es el T_1 (o T_2) original en ausencia de

paramagnético. Como consecuencia de esto, el incremento de $[Mn^{2+}]$ tiende a reducir la dispersión en los T_1 and T_2 observados de los diferentes protones de la sacarosa considerados.

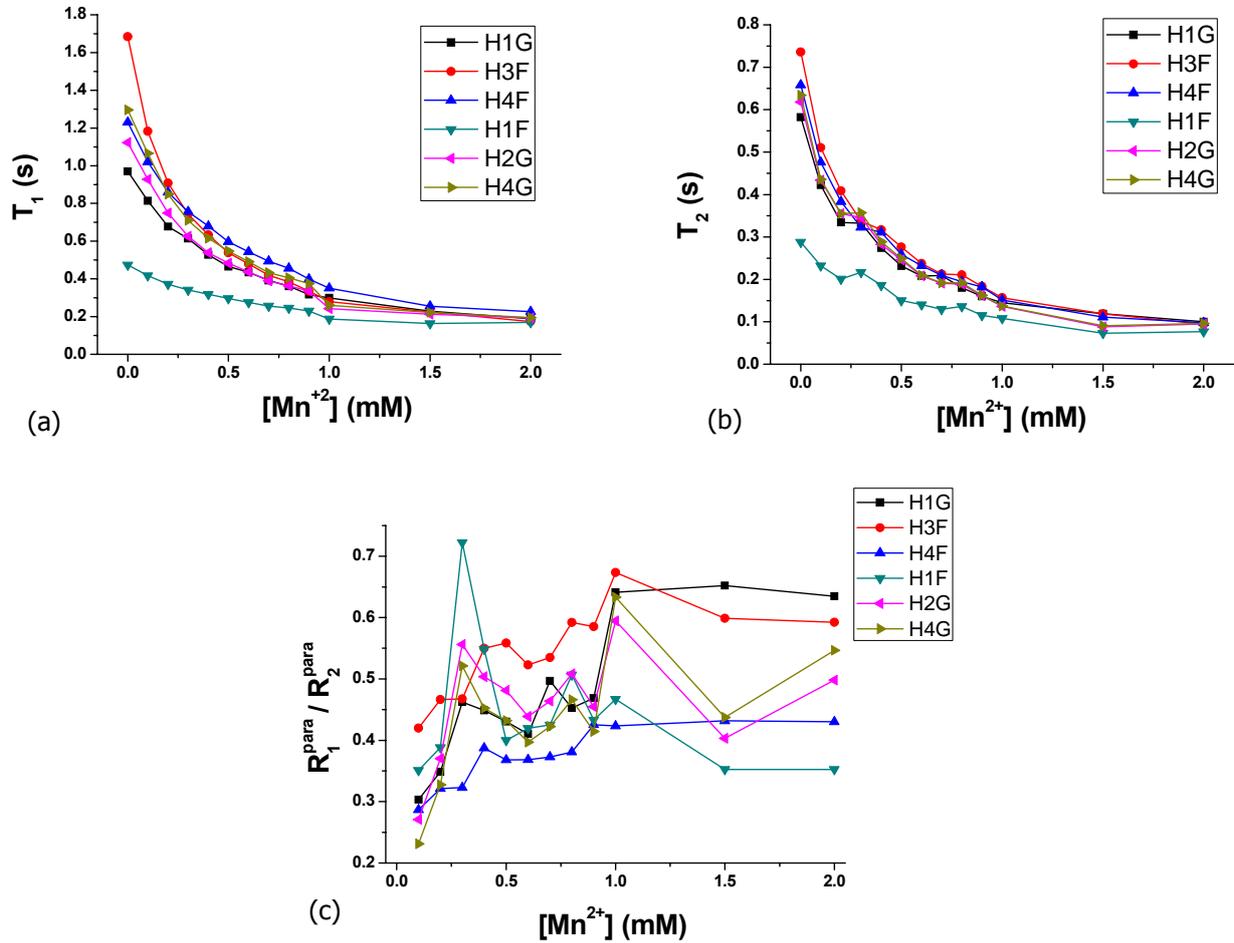


Fig. 1: Curvas de valoración para los protones no solapados de la sacarosa 1 en función de la concentración de Mn^{2+} (mM). a) Tiempos de relajación longitudinal T_1 (s), b) Tiempos de relajación transversal T_2 (s) y c) relación experimental R_{1para}/R_{2para} .

La contribución paramagnética a la relajación R_1^{para} y R_2^{para} se calculó para los protones de la sacarosa a cada concentración de Mn^{2+} usando los datos de la Tabla 1 con las Ecs. 3 y 4, respectivamente y la relación experimental R_1^{para} / R_2^{para} está representada en la Fig. 1c. Para la mayor parte de los protones de la Fig. 1c hay una tendencia significativa en el cociente R_1^{para} / R_2^{para} a aumentar con la concentración del Mn^{2+} , indicando que el paramagnético causa una mayor caída en el T_1 que en el T_2 de los protones. La única excepción es la señal H1f que tiene un comportamiento errático; aumenta rápidamente en las muestras con concentración de Mn^{2+} 0 a 0.25 mM y entonces disminuye para concentraciones más altas. La interacción paramagnética dipolar entre Mn^{2+} y la sacarosa por sí sola no explica las curvas representadas en la Fig. 1c, dado que la teoría de Solomon-Bloembergen en las Ecs. 5 y 6 predice un cociente R_1^{para} / R_2^{para} constante a concentraciones diferentes de Mn^{2+} . La conclusión es que otros mecanismos deben tener una contribución relevante en la relajación paramagnética en este sistema (por ej. contacto y/o mecanismos de Curie). Estos resultados señalan la influencia del

paramagnético y del tipo de muestra a medir cuando se quiere optimizar la relación PRE- T_1 / PRE- T_2 de cara a utilizar el método fast-PRE-NMR.

Tabla 1: Tiempos de relajación de protón T_1 (s) y T_2 (s) determinados a 500 MHz para las señales seleccionadas de la sacarosa a diferentes concentraciones de Mn^{2+} .

Mn²⁺ (mM)	T₁(s) H-1g	T₁(s) H-2g	T₁(s) H-4g	T₁(s) H-1f	T₁(s) H-3f	T₁(s) H-4f
0.0	0.970	1.122	1.296	0.474	1.684	1.230
0.1	0.814	0.928	1.066	0.417	1.182	1.021
0.2	0.677	0.748	0.849	0.372	0.908	0.860
0.3	0.614	0.626	0.710	0.341	0.743	0.756
0.4	0.527	0.538	0.615	0.318	0.633	0.680
0.5	0.465	0.483	0.548	0.296	0.538	0.597
0.6	0.435	0.437	0.490	0.275	0.480	0.544
0.7	0.392	0.389	0.433	0.256	0.419	0.494
0.8	0.361	0.362	0.405	0.246	0.385	0.456
0.9	0.317	0.336	0.375	0.229	0.335	0.399
1.0	0.299	0.242	0.260	0.187	0.279	0.351
1.5	0.229	0.213	0.222	0.163	0.224	0.255
2.0	0.189	0.193	0.195	0.170	0.174	0.226
Mn²⁺ (mM)	T₂(s) H1g	T₂(s) H2g	T₂(s) H4g	T₂(s) H1f	T₂(s) H3f	T₂(s) H4f
0.0	0.583	0.618	0.634	0.288	0.736	0.658
0.1	0.422	0.434	0.436	0.232	0.510	0.476
0.2	0.334	0.355	0.355	0.201	0.409	0.383
0.3	0.332	0.346	0.357	0.217	0.337	0.323
0.4	0.274	0.283	0.289	0.186	0.317	0.311
0.5	0.232	0.246	0.249	0.150	0.276	0.259
0.6	0.208	0.208	0.210	0.140	0.237	0.232
0.7	0.209	0.191	0.192	0.130	0.212	0.210
0.8	0.180	0.189	0.192	0.136	0.211	0.195
0.9	0.160	0.161	0.163	0.115	0.183	0.182
1.0	0.145	0.136	0.137	0.108	0.157	0.151
1.5	0.119	0.088	0.091	0.073	0.119	0.111
2.0	0.100	0.095	0.096	0.077	0.094	0.098

Fast-PRE-NMR con moléculas de tamaño mediano-pequeño

Para el desarrollo de un protocolo general de fast-PRE-NMR para acelerar los experimentos 2D g-COSY, 2D TOCSY, 2D g-HMQC y 2D g-HMBC, en paralelo con el estudio de PRE- T_1 y PRE- T_2 descrito arriba, se hizo una valoración con el paramagnético Mn^{2+} para determinar el efecto PRE en los tiempos de relajación longitudinal efectivos, PRE- T_1^{eff} de aquellos picos no solapados de cada experimento 2D. Esto se llevó a cabo utilizando el método de saturación progresiva (Mitrovic et al., 2001) con el propio experimento 2D (parte experimental).

El PRE- T_1^{eff} se determina para un pico del espectro mediante el ajuste a la Ec. 1 de su intensidad normalizada (I/I_{max}) para una serie de valores de d_1 . El PRE- T_1^{eff} determina cómo de rápido un pico de cruce recupera su

máxima intensidad de equilibrio en función del tiempo de espera entre *scans* d_1 para una concentración dada de paramagnético. El $\text{PRE-T}_1^{\text{eff}}$ depende del tiempo de relajación de todas las coherencias generadas durante la secuencia de pulsos, no solo aquellas detectadas, y por lo tanto es más apropiado que el T_1 para definir el tiempo óptimo de relajación entre *scans* en un experimento 2D (Pervushin et al., 2002).

La Fig. 2 muestra dos curvas de saturación progresiva de 2D g-COSY para el pico de cruce H1g-H2g de sacarosa a concentraciones de Mn^{2+} 0 y 1.0 mM. Para $d_1 = 0$ s, la cantidad de señal recuperada en la primera muestra es solo de $\sim 30\%$ de la máxima intensidad, mientras que es $\sim 75\%$ en el segundo caso. Los valores correspondientes de $\text{PRE-T}_1^{\text{eff}}$ 1.84s, y 0.25 s para Mn^{2+} 0 y 1.0 mM, respectivamente, son consistentes con estas observaciones.

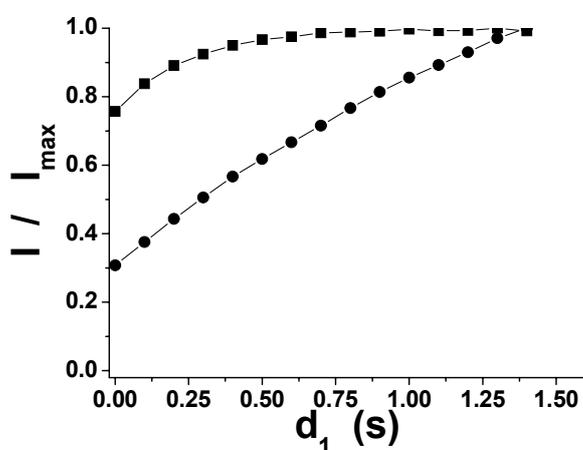


Fig. 2: Grafica de la intensidad de señal normalizada (%) vs. tiempo entre scans d_1 (s) obtenido para el pico de cruce H1G-H2G de 1 con el experimento 2D g-COSY. Los círculos y las cajas corresponden a Mn^{2+} 0 mM y 1.0 mM, respectivamente.

Los valores de $\text{PRE-T}_1^{\text{eff}}$ determinados para diversos picos de cruce de la sacarosa en los espectros 2D g-COSY, 2D TOCSY, 2D g-HMQC y 2D g-HMBC están representados en las Figs. 3a, 3b, 3c, and 3d, respectivamente. En estas figuras se puede observar que el mayor cambio en $\text{PRE-T}_1^{\text{eff}}$ ocurre a concentraciones de Mn^{2+} situadas en el rango de 0 a 1 mM en todos los espectros. Para concentraciones por encima de 1.0 mM los $\text{PRE-T}_1^{\text{eff}}$ siguen disminuyendo pero su caída es menos acusada y por lo tanto no causan un gran impacto en la cantidad de señal recuperada en esos experimentos, por el contrario, puede amplificar efectos adversos para la sensibilidad como incrementar PRE-T_2 e incluso disminuir la sensibilidad de la sonda de RMN en el caso de sondas de detección inversa con un elevado factor-Q y poca tolerancia salina.

Los resultados de $\text{PRE-T}_1^{\text{eff}}$ de la Fig. 3 indican que si la duración se hace similar en los diferentes tipos de espectros 2D considerados ($d_0 =$ tiempo de pulsos + adquisición FID ~ 0.3 s), una concentración de Mn^{2+} entre 1.0 y 1,5 mM resulta la mejor elección para maximizar la cantidad de señal recuperada en los diferentes picos de cruce analizados al mínimo valor de d_1 .

Cuando se introducen en la Ec. 4 los datos de $\text{PRE-T}_1^{\text{eff}}$ obtenidos para sacarosa a concentración Mn^{2+} 1.5 mM, se calcula un d_1^{opt} de 0.253 s, 0.196 s, 0.205 s, y 0.181 s para 2D g-COSY, 2D TOCSY, 2D g-HMQC y 2D g-HMBC, respectivamente. Estos valores de d_1^{opt} son mucho más cortos que los generalmente asumidos de d_1 1.2 a 1.6 s para este tipo de experimentos y suponen un considerable ahorro de tiempo de espectrómetro.

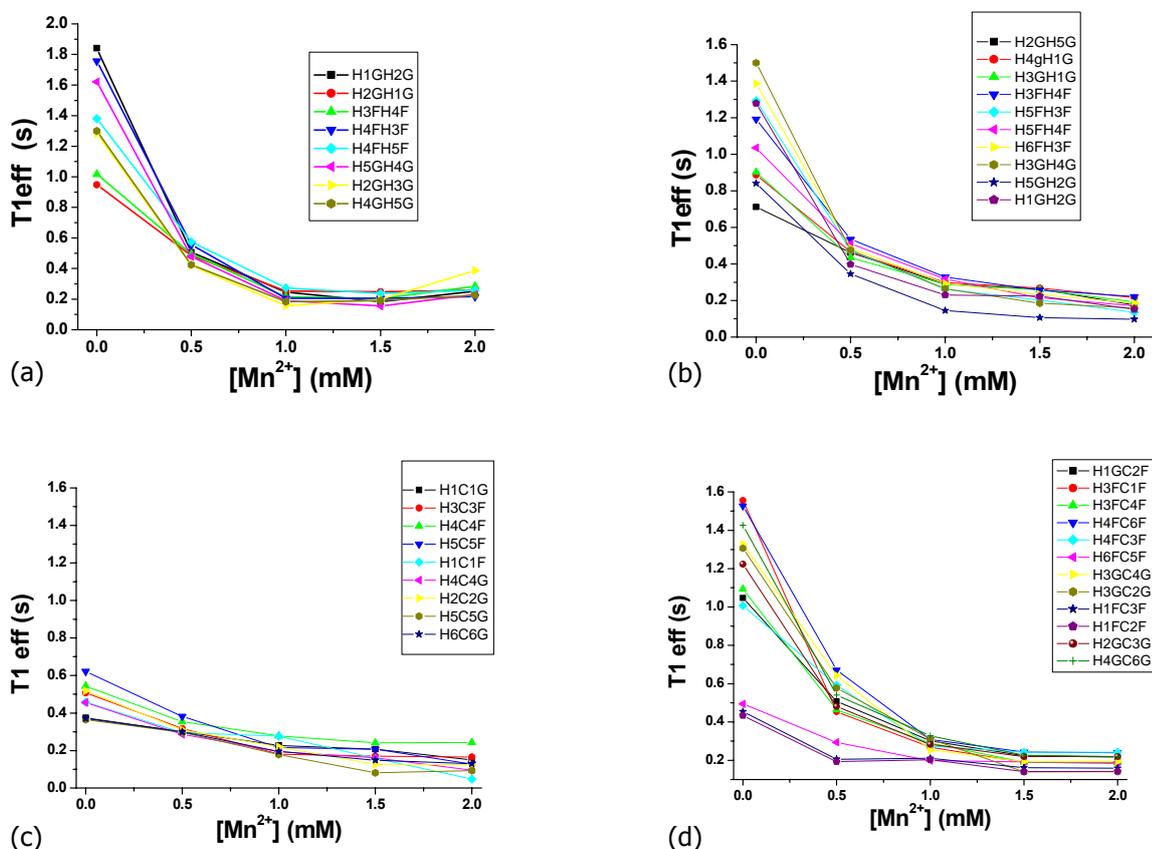


Fig. 3: Tiempos de relajación longitudinal efectivos (T_{1eff}) para diferentes picos de correlación de los espectros de 1 a diferentes concentraciones de Mn^{2+} . a) T_{1eff} obtenidos de 2D g-COSY con saturación progresiva, b) T_{1eff} obtenidos de de 2D TOCSY con saturación progresiva, c) T_{1eff} obtenidos de de 2D g-HMQC con saturación progresiva, d) T_{1eff} obtenidos de de 2D g-HMBC con saturación progresiva.

Para el caso del experimento 2D-g-HMQC, dado que se utiliza desacoplamiento heteronuclear, en vez del d_1^{opt} calculado de 0.205 s, se alargo a 0.3 s para prevenir daños en la sonda como resultado de los ciclos de trabajo excesivamente rápidos. Existen algunas versiones recientes del experimento HMQC como el 2D IPAP-HMQC (Kern et al., 2008) que no emplean desacoplamiento heteronuclear y por lo tanto no sería necesario aumentar el d_1^{opt} .

Los espectros de las Figs. 4 ejemplifican los resultados obtenidos con el método fast-PRE-NMR para la muestra de sacarosa. El espectro 2D-gHMBC de la Fig. 4a se adquirió en 17 minutos sin la adición de Mn^{2+} y sufre los efectos perniciosos de utilizar un d_1 muy corto (d_1 0.181 s). La baja calidad de este espectro se refleja en las muchas bandas de ruido t_1 y la pérdida evidente de sensibilidad cuando se le compara con el espectro convencional (Fig. 4b) adquirido en 60 min. (d_1 1.4 s). Sin embargo, cuando a la muestra se le añade Mn^{2+} 1.5 mM, el espectro puede adquirirse en 17 min. (Fig. 4c) obteniéndose picos perfectamente resueltos y con una calidad similar a la del espectro convencional y sin ningún tipo de artefactos.

La Tabla 2 resume los resultados experimentales del método fast-PRE-NMR aplicado a 2D-g-COSY, 2D-TOCSY, 2D-g-HMQC y 2D-g-HMBC con la muestra de sacarosa a una concentración de Mn^{2+} 1.5 mM. A esa

concentración de paramagnético, el tiempo de experimento se reduce en un factor de 3 sin la aparición de artefactos y con una resolución de pico de cruce igual a la de los experimentos convencionales.

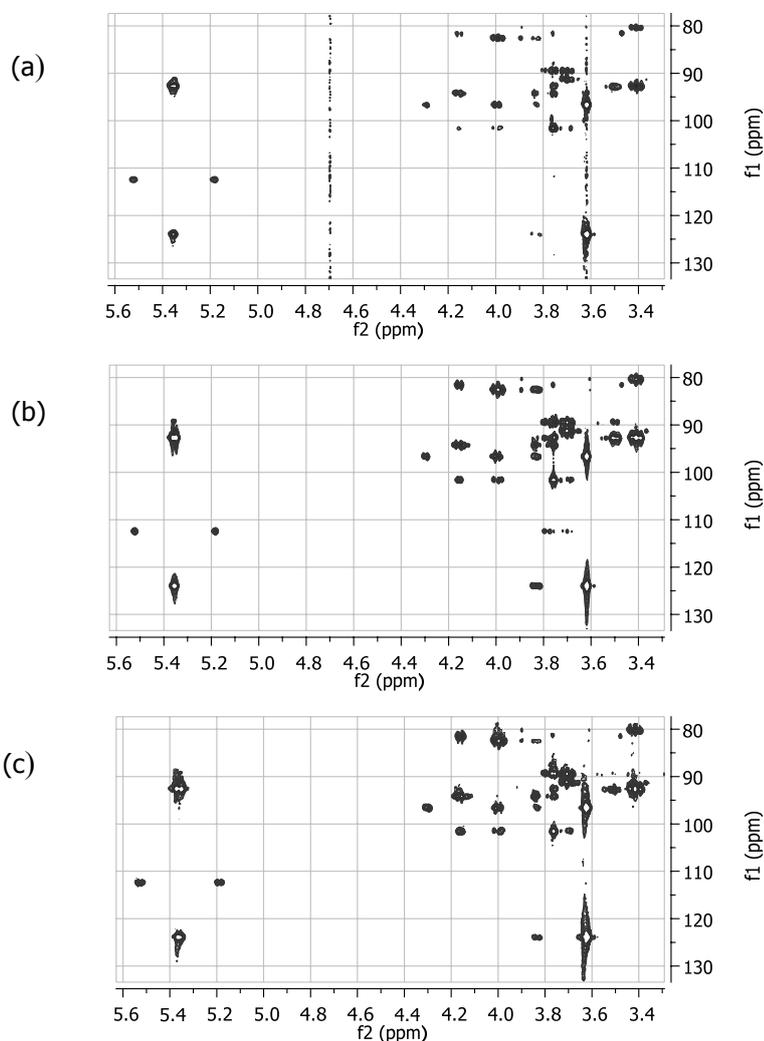


Fig. 4: Comparación de espectro 2D g-HMBC de 1. a) Experimento convencional con d1 0.181 s en una muestra sin Mn²⁺ adquirido en 17 minutos b) Experimento convencional con d1 1.4 s en una muestra sin Mn²⁺ adquirido en 60 minutos y c) Experimento Fast-PRE-NMR con d1 0.181 s en una muestra con Mn²⁺ 1.5 mM adquirido en 17 minutos. El resto de condiciones experimentales fue igual en los 3 espectros.

Un aspecto importante del experimento fast-PRE-NMR se refiere a la sensibilidad absoluta respecto al experimento convencional. El efecto PRE- T_2 asociado al uso de paramagnéticos inevitablemente introduce pérdidas de sensibilidad en los espectros. Los resultados de la Tabla 2 muestran que los experimentos fast-PRE-NMR 2D g-COSY, 2D-TOCSY y 2D-g HMQC tienen una sensibilidad siempre por encima del 45% en las muestras de oligosacáridos estudiados. La situación más desfavorable ocurre para el fast-PRE 2D g-HMBC en el cual la sensibilidad de ciertos picos se reduce hasta un 20% respecto del experimento convencional (Tabla 2). La razón de esa baja sensibilidad está relacionada con que las coherencias heteronucleares ^1H - ^{13}C de múltiple cuanto gastan un tiempo relativamente mayor en este experimento (65 ms) expuesto a los procesos de relajación PRE- T_2 .

Tabla 2: Resultados experimentales para Fast-PRE-NMR de 2D-COSY, 2D-TOCSY, 2D-HMBC y 2D-HMQC para la muestra de sacarosa y Mn²⁺ 1.5 mM. Los resultados se comparan con el experimento análogo de la muestra sin paramagnético bajo las mismas condiciones exceptuando que el tiempo de espera entre scans d1 es 1.4 s.

Experimento	Fast-PRE-NMR d ₁ ^{opt(a)} (s)	Fast-PRE-NMR Exp. time ^(b) (min.)	Conventional NMR Exp. time ^(c) (min.)	Time saving factor	Fast-PRE-NMR Sensitivity ^(f) (%)
2D g-COSY	0.253	9	28	3.1	56 to 80%
2D TOCSY ^(d)	0.196	19	60	3.1	45 to 64%
2D g-HMQC	0.300 ^(e)	10	30	3.0	56 to 87%
2D g-HMBC	0.181	17	60	3.5	20 to 40%

(a) d_{1opt} está calculado con Eq. 4 para un tiempo T₁ nominal de protón de 0.225 s.

(b) 8 scans para 2D g-COSY, 2D TOCSY y 2D g-HMQC, 16 scans para 2D g-HMBC. Numero de incrementos en t₁ 128. Tiempo de adquisición 0.255 en todos los experimentos menos 2D g-HMQC en que fue 0.12 s.

(c) Los experimentos convencionales utilizaron las mismas condiciones que los fast-PRE-NMR excepto el d₁, que fue de 1.4 s.

(d) Experimento sensible a la fase.

(e) El d_{1opt} teórico fue 0.205 s pero el valor final utilizado fue 0.300 s debido a los requisitos del ciclo de trabajo del desacoplamiento heteronuclear.

(f) Calculado como una media de la relación señal-ruido de los picos de en fast-PRE-NMR respecto de los experimentos convencionales.

En conjunto, la reducción de la sensibilidad obtenida en Tabla 2 para los experimentos fast-PRE-NMR indica que el método es más apropiado para estudiar muestras que no estén limitadas por la sensibilidad del espectrómetro.

Método rápido de ajuste de condiciones de fast-PRE-NMR

Los resultados obtenidos de PRE-T₁, PRE-T₂ y PRE-T₁^{eff} con la muestra de sacarosa y el paramagnético Mn²⁺ (Figs. 1 y 3) proporcionan la base para conseguir resultados óptimos con el método fast-PRE-NMR en otras moléculas de tamaño mediano-pequeño utilizando este paramagnético. Básicamente, lo que se requiere es ajustar la concentración de paramagnético hasta que el efecto PRE-T₁ esté aproximadamente en el valor óptimo PRE-T₁^{opt} ~ 0.225 s (valor medio de PRE-T₁ en Fig. 1a para Mn²⁺ 1.5 mM) que se ha comprobado que es adecuado para el conjunto de experimentos 2D considerados aquí.

Una receta para poder ajustar rápidamente la concentración necesaria de paramagnético en un soluto cualquiera para conseguir PRE-T₁^{opt} se da en la Fig. 5. La concentración de paramagnético se incrementa en pequeños pasos y su efecto PRE-T₁ se determina con el experimento de inversión-recuperación (180°-τ-90°-Acq). Este ajuste puede hacerse en un solo paso mediante el método conocido como anulación de señal T₁ (T₁-null). Para conseguir PRE-T₁^{opt} ≤ 0.225 s, la condición es que se anule o cambie de negativa a positiva la señal del experimento de inversión-recuperación al utilizar un valor τ_{null} = T₁^{opt} * ln(2) = 0.156 s.

Dado que PRE-T₂ no se ha considerado para este protocolo de ajuste rápido de la condición de fast-PRE-NMR, es aconsejable comprobar que la calidad del propio espectro de protón (anchuras de línea y sensibilidad) es aceptable para estas condiciones.

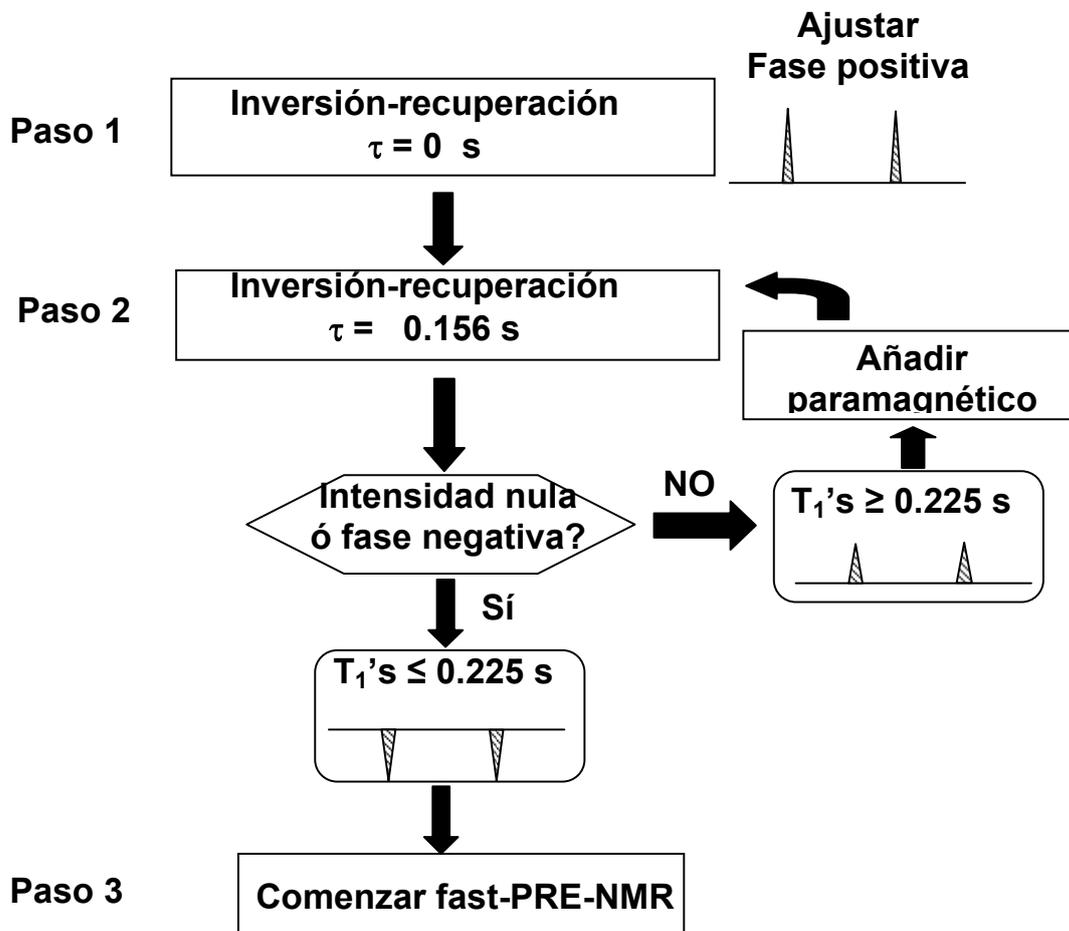


Fig. 5: Protocolo propuesto para el ajuste rápido de la concentración de paramagnético. Se utiliza el experimento de inversión-recuperación con el método de T1-null. La concentración de paramagnético se aumenta en pequeños pasos hasta que el T1max del soluto es igual o inferior a 0.225 s.

CONCLUSIONES

La validez de esta estrategia de ajuste rápido de la condición de fast-PRE-NMR se ha probado con excelentes resultados en el laboratorio de la Unidad de Resonancia Magnética de la Universidad de Santiago de Compostela, para varios oligosacáridos (lactosa y un trisacárido formado por manosas). En definitiva, puede concluirse que el método fast-PRE-NMR permite adquirir experimentos nD-RMN con un ahorro considerable de tiempo de espectrómetro evaluado en un factor 3 para los experimentos fast-PRE-NMR 2D g-COSY, 2D TOCSY, 2D g-HMQC and 2D g-HMBC obteniéndose espectros de una calidad similar a los convencionales.

La simplicidad del método Fast-PRE-NMR, que no requiere secuencias de pulsos o procesamiento de datos especiales, y el hecho de que se puedan utilizar especies paramagnéticas de bajo coste (ej. Mn²⁺ o Fe³⁺) hace que pueda tener aplicaciones para la aceleración de análisis rutinarios de nD-RMN de otros solutos de tamaño mediano-pequeño por ejemplo para acelerar determinados protocolos de control de calidad basados en RMN.

ABREVIATURAS

nD	RMN multidimensional
PRE	(Paramagnetic Relaxation Enhancement) Incremento de Relajación mediante adición de sustancias Paramagnéticas
SNR	Relación Señal-Ruido
FID	(Free Induction Decay) Caída libre de la Inducción, señal de RMN
d_1	Tiempo de espera para relajación antes de pulsar un scan
d_0	Tiempo desde el primer pulso de excitación hasta el final de la adquisición de la FID.
T_1^{eff}	Tiempo de relajación longitudinal o espín-red efectivo
T_1	Tiempo de relajación longitudinal o espín-red
T_2	Tiempo de relajación transversal o espín-espín
$Scan$	Acumulación con adquisición de FID
$Dummy-Scan$	Acumulación sin adquisición de FID

AGRADECIMIENTOS

M. V-V agradece la financiación de una beca de la Comisión Europea (proyecto artizymes FP6-2003-NEST-B3 15471).

REFERENCIAS

- Ayant, Y.; Belorizky, E.; Alizon, J.; Gallice, J. (1975): "*Calcul des densités spectrales résultant d'un mouvement aléatoire de translation en relaxation par interaction dipolaire magnétique dans les liquides*", J. Phys.: 36, 991-1004.
- Bertini, I.; Luchinat, C. (1996); "*NMR of paramagnetic substances*"; Coord. Chem. Rev.: 150, Elsevier. Amsterdam, pp 1-300.
- Bloembergen, N.; Morgan, L.O. (1961); "*Proton Relaxation Times in Paramagnetic Solutions. Effects of Electron Spin Relaxation*", J. Chem. Phys.: 34, 842-850.
- Bock, K.; Pedersen, C.; Pedersen, H. (1984); "*Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Data for Oligosaccharides*", Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.: 42, 193-225.
- Cai, S.; Seu, C.; Kovacs, Z.; Sherry, A.D.; Chen, Y. (2006); "*Sensitivity Enhancement of Multidimensional NMR Experiments by Paramagnetic Relaxation Effects*", J. Am. Chem. Soc.: 128, 13474-13478.
- Ernst, R.R.; Bodenhausen, G.; Wokaum, A. (1987); "*The Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*" Clarendon, Oxford.
- Freeman, R.; Kupce, E. (2003); "*New methods for fast multidimensional NMR*", J. Biomol. NMR: 27, 101-113.
- Freed, J.H. (1978); "*Dynamic effects of pair correlation functions on spin relaxation by translational diffusion in liquids. II. Finite jumps and independent T1 processes*", J. Chem. Phys.: 68, 4034-4037.
- Gal, M.; Schanda, P.; Brutscher, B.; Frydman, L. (2007); "*UltraSOFAST HMQC NMR and the Repetitive Acquisition of 2D Protein Spectra at Hz Rates*", J. Am. Chem. Soc.: 129, 1372-1377.
- Iwahara, J.; Clore, G.M. (2006); "*Detecting transient intermediates in macromolecular binding by paramagnetic NMR*", Nature: 440, 1227-1230.

- Kern, T.; Schanda, P.; Brutscher, B. (2008); "*Sensitivity-enhanced IPAP-SOFAST-HMQC for fast-pulsing 2D NMR with reduced radiofrequency load*", J. Magn. Reson.: 190, 333-338.
- Kupce, E.; Freeman, R. (2007); "*Fast multidimensional NMR by polarization sharing*", Magn. Reson. Chem.: 45, 2-4.
- Meiboom, S.; Gill, D. (1958); "*Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times*". Rev. Sci. Instr.: 29, 688-691.
- Mitrovic, V.F.; Sigmund, E.E.; Halperin, W.P. (2001); "*Progressive saturation NMR relaxation*", Phys. Review B.: 64, 24520-24527.
- Pervushin, K.; Vögeli, B.; Eletsky, A. (2002); "*Longitudinal 1H Relaxation Optimization in TROSY NMR Spectroscopy*", J. Am. Chem. Soc.: 124, 12898-12902.
- Pintacuda, G.; Otting, G. (2002); "*Identification of Protein Surfaces by NMR Measurements with a Paramagnetic Gd(III) Chelate*", J. Am. Chem. Soc.: 124, 372-373.
- Schanda, P.; Brutscher, B. (2005); "*Very Fast Two-Dimensional NMR Spectroscopy for Real-Time Investigation of Dynamic Events in Proteins on the Time Scale of Seconds*", J. Am. Chem. Soc.: 127, 8014-8015.
- Schanda, P.; Kupče, E.; Brutscher, B. (2005); "*SOFAST-HMQC Experiments for Recording Two-dimensional Deteronuclear Correlation Spectra of Proteins within a Few Seconds*", J. Biomol. NMR: 33, 199-211.
- Schanda, P.; Brutscher, B. (2006); "*Hadamard frequency-encoded SOFAST-HMQC for ultrafast two-dimensional protein NMR*", J. Magn. Reson.: 178, 334-339.
- Slappendel, S.; Aasa, R.; Falk, K.E.; Malmstrom, B.G.; Vliegthart, T.V. (1982); "*¹H-NMR spectroscopic study on the binding of alcohols to soybean lipoxygenase-1*", Biochim. et Biophys. Acta: 708, 266-271.
- Solomon, I. (1955); "*Relaxation Processes in a System of Two Spins*", Phys. Rev.: 99, 559-565.