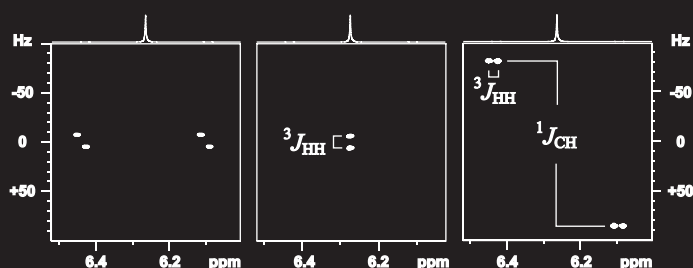
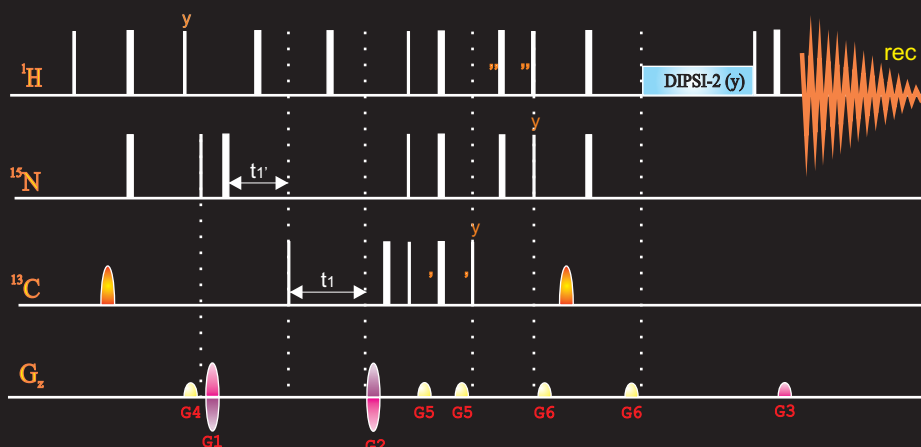


# Disseny i aplicació de nous mètodes de RMN

Avenços en polarització creuada heteronuclear, mètodes d'estat de *spin* selectius i adquisició simultània de diferents espectres



Pau Nolis Fañanás  
Tesi Doctoral  
Juny 2007

## INDEX

Resum/Abstract	v
Llistat d'acrònims	vi

### INTRODUCCIO

1.- Presentació	1
2.- Estructura de la tesi	3
3.- Antecedents del grup i objectius	7
4.- Brief introduction in English language	9
4.1.- Thesis structure	9
4.2.- Aim of the study	9

### PART TEORICA

5.- Detecció inversa. Experiments heteronuclears fonamentals	11
5.1.- Introducció	11
5.2.- Experiments heteronuclears de correlació directa	12
5.2.1.- Introducció	12
5.2.2.- Experiment HSQC	13
5.2.3.- Experiment HSQCPEP	16
5.2.4.- Experiment HMQC	18
5.3.- Experiments heteronuclears de correlació a llarga distància	20
5.3.1- Introducció	20
5.3.2- Experiment HMBC	21
5.3.3- Experiment HSQMBC	23
5.4.- Experiments heteronuclears concatenats	24
5.4.1- Introducció	24
5.4.2- Experiment HSQC-TOCSY	25
6.- Polarització creuada heteronuclear (HCP) en líquids	27
6.1.- Introducció a la HCP en líquids	27
6.2.- Descripció de la HCP utilitzant el formalisme d'operadors producte	30
6.3.- Blocs de construcció	36
6.4.- Avantatges i inconvenients de la HCP en líquids	38
7.- Metodologies per a la mesura de constants d'acoblament	41
7.1.- Introducció: J com a paràmetre per a l'elucidació estructural	41
7.2.- Experiments 2D-Jresolts	43
7.3.- Experiments d'estat de <i>spin</i> selectiu ( $S^3$ )	44
7.4.- Experiments E.COSY	48
7.5.- Experiments ZQDQ	50
7.6.- Experiments J-quantitatius	51

8.- Mètodes per a la mesura de constants d'acoblament a llarga distància ${}^nJ_{XH}$	53
8.1.- Introducció	53
8.2.- Experiments basats en una transferència de magnetització ${}^1J_{XH} + J_{HH}$	53
8.2.1.- Experiment HETLOC	53
8.2.2.- Experiment HSQC-HECADE	55
8.2.3.- Experiment HSQC-TOCSY acoblat/desacoblat	56
8.2.4.- Experiments $S^3$ HSQC-TOCSY	57
8.3.- Experiments basats en una transferència de magnetització via ${}^nJ_{XH}$	59
8.3.1.- Experiment ps-HMBC	59
8.3.2.- Experiment Jres-HMBC-2	59
8.3.3.- Experiment J-IMPEACH-MBC	61
8.3.4.- Experiment HSQMBC	61
9.- Experiments amb temps compartit	63
9.1.- Introducció	63
9.2.- Experiment TS-HSQC	65

---

## RESULTATS I DISCUSSIÓ

---

### 10.- Publicació I:

#### **IFSERF, an isotope-filtered SERF experiment for the precise measurement of proton-proton coupling constants between chemically equivalent protons**

10.1.- Introducció	69
10.2.- Article	73
10.3.- Ampliació de resultats	79
10.3.1.- IF-TOCSY-SERF	79
10.3.2.- IF-NOESY	80

### 11.- Publicació II:

#### **Measurement of coupling constants in symmetrical spin systems using a full multiple-step cross-polarization-driven NMR pulse scheme**

11.1.- Introducció	83
11.2.- Article	87
11.3.- Ampliació de resultats. Aplicació a molècules no simètriques	93
11.3.1.- E.COSY HCP-TOCSY-J(HH)	93
11.3.2.- ZQDQ HCP-TOCSY	94
11.3.3.- Millora de sensibilitat en les seqüències $S^3$ -HCP utilitzant PFG	95
11.3.4.- HCP en sistemes de $spin\ I_2S$	101

### 12.- Publicació III:

#### **Spin-edited 2D HSQC-TOCSY experiment for the measurement of homonuclear and heteronuclear coupling constants: Application to carbohydrates and peptides**

12.1.- Introducció	107
12.2.- Article	109

12.3.- Ampliació de resultats	121
12.3.1.- Contribució de Boltzmann en l'experiment E.COSY HSQC	121

**13.- Publicació IV:****Optimum spin-state selection for all multiplicities in the acquisition dimension of the HSQC experiment**

13.1.- Introducció	123
13.1.1.- HSQC- $\alpha,\beta$ de Sørensen i col·laboradors	123
13.1.2.- $S^3$ -I <sub>2</sub> S-HSQC de Pèrmi	124
13.2.- Article	125

**14.- Publicació V:****Simultaneous  $\alpha,\beta$ -spin state selection for  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  from a time-shared HSQC-IPAP experiment**

14.1.- Introducció	137
14.1.1.- F1-IPAP-HSQC	138
14.2.- Article	141

**15.- Publicació VI:****Time-sharing evolution and sensitivity enhancements in 2D HSQC-TOCSY and HSQMBC experiments**

15.1.- Introducció	155
15.2.- Article	157

**16.- Publicació VII:****CN-HMBC: A powerful NMR technique for the simultaneous detection of long range  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  connectivities**

16.1.- Introducció	163
16.2.- Article	165

---

**CONCLUSIONS**

---

17.- Conclusions	169
18.- Conclusions in English	171

---

**APENDIXS (CD-ADJUNT)**

---

A.- Seqüències de pulsos

B.- Taules de constants d'acoblament



## Resum

La present tesi doctoral és un compendi dels treballs publicats en revistes científiques d'àmbit internacional durant el transcurs del període formatiu de tercer cicle a la Universitat Autònoma de Barcelona. Durant aquest període s'han dissenyat noves metodologies (seqüències de pulsos) de Ressonància Magnètica Nuclear basades en l'espectroscòpia bidimensional de detecció inversa. Aquestes es discuteixen tant des d'un punt de vista teòric del desenvolupament metodològic així com des del punt de vista de nova aplicabilitat. S'han fet avenços en diferents camps d'investigació: la polarització creuada heteronuclear en mostres líquides, els mètodes d'estat de *spin* selectiu i mètodes amb adquisició simultània de diferents espectres. I s'ha demostrat la seva utilitat en el camp de l'elucidació estructural de molècules orgàniques i biomolècules.

## Abstract

The present thesis is a compendium of the work published in international scientific journals during the formative period of third cycle at the *Universitat Autònoma de Barcelona*. During this period new Nuclear Magnetic Resonance methodologies (pulse sequences) based on inverse detection spectroscopy have been developed. Those are discussed from the theoretical point of view of the methodological development as well as from the point of view of new application. Advances at different research fields have been performed: heteronuclear cross polarization in liquid state, spin state selective methodologies and methods for the simultaneous acquisition of two spectra within a single experiment. The utility of the new pulse sequences herein presented is demonstrated for the structural analysis of biomolecules and organic compounds.

## Llistat d'acrònims

<b>AP</b>	<b>Anti Phase</b>
<b>BIRD</b>	<b>Bilinear Rotation Decoupling</b>
<b>CIGAR</b>	<b>Constant time Inverse-detected Gradient Accordion Rescaled long-range heteronuclear multiple bond correlation</b>
<b>COLOC</b>	<b>COrrrelation Spectroscopy for LOng range COuplings</b>
<b>COS</b>	<b>Coherence Order Selective</b>
<b>COSY</b>	<b>COrrrelated SpectroscopY</b>
<b>CPD</b>	<b>Composite Pulse sequence Decoupling</b>
<b>CPMG</b>	<b>Carr–Purcell–Meiboom–Gill</b>
<b>CPMAS</b>	<b>Cross Polarization Magic Angle Spinning</b>
<b>CT</b>	<b>Coherence Transfer</b>
<b>CTP</b>	<b>Coherence Transfer Pathway</b>
<b>CW</b>	<b>Continuous Wave</b>
<b>DEPT</b>	<b>Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer</b>
<b>DIPSI</b>	<b>Decoupling In the Presence of Scalar Interactions</b>
<b>E.COSY</b>	<b>Exclusive COSY</b>
<b>EXORCYCLE</b>	<b>Cicle de fases de 4 etapes aplicat als ecos de <i>spin</i></b>
<b>FID</b>	<b>Free Induction Decay</b>
<b>GARP</b>	<b>Globally optimized Alternating-phase Rectangular Pulses</b>
<b>HCP</b>	<b>Heteronuclear Cross Polarization</b>
<b>HECADE</b>	<b>Heteronuclear Couplings from ASSCI-Domain experiments with E.COSY-type cross peaks</b>
<b>HEHAHA</b>	<b>HEteronuclear HArtmann HAhn</b>
<b>HETCOR</b>	<b>HETeronuclear COrrrelation spectroscopy</b>
<b>HETLOC</b>	<b>HETeronuclear Long range Coupling</b>
<b>HOHAHA</b>	<b>HOmonuclear HArtmann HAhn</b>
<b>HMBC</b>	<b>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</b>
<b>HMQC</b>	<b>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</b>
<b>HPLC</b>	<b>High Pressure Liquid Chromatography</b>

<b>HRMAS</b>	<b>H</b> igh <b>R</b> esolution <b>M</b> agic <b>A</b> ngle <b>S</b> pinning
<b>HSQC</b>	<b>H</b> eteronuclear <b>S</b> ingle <b>Q</b> uantum <b>C</b> orrelation
<b>HSQMBC</b>	<b>H</b> eteronuclear <b>S</b> ingle <b>Q</b> uantum <b>M</b> ultible <b>B</b> ond <b>C</b> orrelation
<b>IFSERF</b>	<b>I</b> sotope <b>F</b> ilter <b>S</b> electiv <b>E</b> <b>R</b> e <b>F</b> ocusing
<b>INEPT</b>	<b>I</b> nsensitive <b>E</b> nhancement <b>P</b> olarization <b>T</b> ransfer
<b>IP</b>	<b>I</b> n <b>P</b> hase
<b>IPAP</b>	<b>I</b> n <b>P</b> hase <b>A</b> nti <b>P</b> hase
<b>MLEV</b>	<b>M.</b> <b>LE</b> Vitt broadband decoupling sequence
<b>MRI</b>	<b>M</b> agnetic <b>R</b> esonance <b>I</b> maging
<b>NOE</b>	<b>N</b> uclear <b>O</b> verhauser <b>E</b> nhancement
<b>NOESY</b>	<b>N</b> uclear <b>O</b> verhauser <b>E</b> nhancement <b>S</b> pectroscop <b>Y</b>
<b>PEP</b>	<b>P</b> reservation of <b>E</b> quivalent <b>P</b> athways
<b>PFG</b>	<b>P</b> ulse <b>F</b> ield <b>G</b> radient
<b>RINEPT</b>	<b>R</b> efocused <b>INEPT</b>
<b>RD</b>	<b>R</b> educed <b>D</b> imensionality
<b>RMN</b>	<b>R</b> essonància <b>M</b> agnètica <b>N</b> uclear
<b>SERF</b>	<b>S</b> electiv <b>E</b> <b>R</b> e <b>F</b> ocusing
<b>S<sup>3</sup></b>	<b>S</b> pin- <b>S</b> tate <b>S</b> elective
<b>SE</b>	<b>S</b> ensitivity <b>E</b> nhancement
<b>SI</b>	<b>S</b> ensitivity <b>I</b> mprovement
<b>SPITZE</b>	<b>S</b> PIn sTate selective <b>Z</b> Ero overlap <b>HSQC</b>
<b>TOCSY</b>	<b>T</b> Otal <b>C</b> orrelation <b>S</b> pectroscop <b>Y</b>
<b>TPPI</b>	<b>T</b> ime- <b>P</b> roportional <b>P</b> hase <b>I</b> ncrementation
<b>TROSY</b>	<b>T</b> ransverse <b>R</b> elaxati <b>O</b> n <b>S</b> pectroscop <b>Y</b>
<b>TS</b>	<b>T</b> ime <b>S</b> hared
<b>WATERGATE</b>	<b>W</b> A <b>T</b> E <b>R</b> supression by <b>G</b> r <b>A</b> dient <b>T</b> ailored <b>E</b> xcitation
<b>ZQ/DQ</b>	<b>Z</b> ero <b>Q</b> uantum / <b>D</b> ouble <b>Q</b> uantum



*introducció*

## 1.- Presentació

El treball realitzat s'emmarca en la línia de recerca del nostre grup de treball. Aquesta línia té com a objectiu principal l'elaboració i estudi de noves metodologies per a la caracterització de molècules orgàniques en solució utilitzant la Ressonància Magnètica Nuclear (RMN) com a eina fonamental.

Abans d'entrar pròpiament en matèria m'agradaria dedicar unes línies a explicar **breument** la perspectiva històrica de la RMN i en quin punt es troba avui dia, per tal de situar al lector no expert en aquest petit gran món.

La RMN en fase condensada va néixer en mans dels físics Purcell i Bloch al 1945 (premi Nobel conjunt el 1952). Si bé la seva utilitat com a eina per a l'anàlisi estructural i dinàmic de molècules en solució, gràcies al fenomen del desplaçament químic i a la seva òptima escala de temps de mesura, va fer que els químics fossin els més beneficiats del descobriment.

Es ben sabut que el taló d'Aquil·les de la RMN és la seva baixa sensibilitat o baixa relació senyal/soroll (S/N) quan la comparem amb altres tècniques analítiques. Els avanços que al llarg dels anys s'han fet per tal de millorar aquest punt són impressionants. A destacar a nivell tecnològic la creació d'espectròmetres d'alt camp magnètic (major  $B_0$ ) que permeten l'obtenció de millor relació S/N. Avui dia són comercials aparells de 950MHz = 22,32T (**Fig. 1A**).

D'altra banda, l'evolució de les sondes (el cor de l'aparell), també crucial, primer amb la introducció de sondes inverses per a la detecció de protó (el nucli més sensible) en l'espectroscòpia n-dimensional, i actualment amb la incorporació de les ja famoses criosondes (**Fig. 1B**), les qual es beneficien de la minimització del soroll instrumental per guanyar sensibilitat. Sense oblidar-nos de la incorporació dels gradients de camp magnètic, que permeten l'obtenció d'espectres amb una "netedat" no vista anteriorment i l'obtenció d'imatges 3D *in vivo*, que fan que avui dia la RMN sigui una tècnica d'ús clínic. A nivell matemàtic-informàtic cal destacar tot l'avenç en la digitalització i processament de dades.

A)



B)



**Figura 1.** A) Espectròmetre d'alt camp magnètic (950MHz;  $B_0=22,32T$ ) exposat al XXII congrés internacional de RMN en sistemes biològics (ICMRBS) dut a terme a Göttingen, Alemanya, del 20 al 25 d'agost del 2006. B) Espectròmetre d'alt camp magnètic (500MHz;  $B_0=11,75T$ ) del Servei de RMN de la UAB. L'aparell està equipat amb una criosonda TXI.

Però el punt d'avanç científic que ens centra en aquesta tesi és el del desenvolupament de noves metodologies (seqüències de pulsos) que permetin l'extracció de la màxima informació, amb precisió acurada, per a la interpretació química del nostre sistema d'estudi. En aquest camp cal destacar especialment els premis Nobel de química Richard Ernst (any 1991), per la descripció dels fonaments de la RMN multidimensional, i Kurt Wüthrich (2002) amb la posada a punt de molta de la metodologia actual de la RMN multidimensional per a l'elucidació estructural de proteïnes.

¿On ens trobem avui?

Avui dia les diferents especialitats dintre del camp de la RMN juntament amb l'arsenal de seqüències de pulsos que un espectroscopista pot utilitzar, fan de la RMN la "tècnica analítica" més multidisciplinària i versàtil que existeix. Destacant que la RMN pot resoldre a nivell estructural qualsevol tipus de mostra que se li presenti, doncs, es pot fer RMN de compostos orgànics, organometàl·lics, proteïnes, de mostres sòlides (CP-MAS), de mostres que no són ni sòlides ni líquides (gels o polímers, per exemple) (HR-MAS), espectroscòpia in-vivo i mesures de imatge tant en l'àmbit veterinari com mèdic (MRI). També cal destacar que la RMN es pot acoblar a d'altres tècniques analítiques, com la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC), per a l'anàlisi de mostres amb barreges complexes de compostos. D'altra banda, la RMN, és la tècnica més ben situada per estudiar processos dinàmics a diferents escales de temps, tal com processos d'intercanvi químic, mesures de coeficients de difusió, mesures de constants de complexació, cinètica de l'efecte NOE, relaxació creuada... resumint, la RMN és com una gran caixa d'eines que el químic té a disposició per tal de resoldre molts dels problemes que se li puguin plantejar. I s'espera que d'alguna utilitat seran les eines que la tesi doctoral que a continuació s'exposa ha aportat a aquesta gran caixa d'eines.

## 2.- Estructura de la tesi

Aquesta és una tesi escrita com a *compendi de publicacions*. La solidesa que aporta aquest tipus de presentació és la raó fonamental per la qual m'he decidit per aquest format. Que vull dir amb solidesa? Sota el meu punt de vista el filtre d'especialitat i qualitat científica on s'han publicat els treballs de la present tesi són alts. També el fet que les revistes no donen massa espai per extendret fa que en les publicacions només es trobi la informació realment innovadora i destacable dels treballs. Una darrera raó per a triar aquest format ha estat que la present tesi opta a la *menció de doctor europeu*. Un requisit per a obtenir-la és que part de la tesi ha de trobar-se escrita amb llengua estrangera, i pertanyent a la unió europea. El fet de presentar les publicacions en anglès dintre de la estructura de la tesi fan que aquest punt quedi resolt.

D'altra banda, adjuntar les publicacions i presentar-les "grapades" em semblava força fred. Així, doncs, he trobat convenient revestir els articles amb una estructura de tesi més convencional. Concretament l'estructura de la tesi és la següent: una primera **part introductòria**, on se n'estableixen els seus objectius. A continuació, **una part teòrica** que introdueix al lector en els tòpics que poden ser considerats els pilars en els quals es fonamenta la tesi:

- Mètodes de detecció inversa.
- Metodologies generals per a la mesura de constants d'acoblament, fent èmfasi en les metodologies d'estat de *spin* selectiu.
- Mètodes específics per a la mesura de constants d'acoblament heteronuclears a llarga distància  ${}^nJ_{XH}$ .
- Polarització creuada heteronuclear (HCP) en líquids.
- Introducció al concepte d'experiments amb temps compartit.

En aquest apartat teòric s'ha intentat ser el més breu possible, a l'hora que donant la informació clau i bibliografia necessària, per poder seguir les publicacions que es presenten. S'ha omès teoria bàsica de la RMN com poden ser el formalisme d'operadors producte, la selecció de rutes de transferència de coherència, calibració dels pulsos..., doncs, aquests tòpics es poden trobar totalment desenvolupats en llibres bàsics de RMN<sup>1</sup>. A continuació hi trobarem el cos del treball, la **part de resultats i discussió**, on es situen les publicacions, precedides d'una petita introducció i seguides de resultats no publicats que les complementen. Finalment com a tota tesi doctoral hi trobarem les **conclusions**. També s'adjunta un CD on es situen els programes de pulsos desenvolupats en la present tesi doctoral, així com diferents

<sup>1</sup> a) Wokaun, A.; "Principles of Nuclear Magnetic Resonance in one and two dimensions"; Clarendon Press, Oxford, 1987. b) Derome, A. "Modern NMR technics in chemistry research"; Pergamon Press, Oxford, 1990 c) Levitt, M. "Spin dynamics". John Wiley & sons, Ltd, Chichester, 2001. d) Keeler, J. "Understanding NMR Spectroscopy". John Wiley & sons, Ltd, Chichester, 2005.

taules amb els valors de les constants d'acoblament obtingudes amb els nous experiments proposats.

Les publicacions en les quals es basa la present tesi doctoral són set i són les següents:

**Publicació I:**

**Títol:** IFSERF, an isotope-filtered SERF experiment for the precise measurement of proton-proton coupling constants between chemically equivalent protons.

**Autors:** Pau Nolis, Anna Roglans, Teodor Parella.

**Revista:** Journal of Magnetic Resonance. Any 2005, Volum 173, pàgines 305-309.

**Publicació II:**

**Títol:** Measurement of coupling constants in symmetrical spin systems using a full multiple-step cross-polarization-driven NMR pulse scheme.

**Autors:** Pau Nolis, Anna Roglans, Teodor Parella.

**Revista:** Magnetic Resonance in Chemistry. Any 2005, Volum 43, pàgines 979-984.

**Publicació III:**

**Títol:** Spin-edited 2D HSQC-TOCSY experiment for the measurement of homonuclear and heteronuclear coupling constants: Application to carbohydrates and peptides.

**Autors:** Pau Nolis, Teodor Parella.

**Revista:** Journal of Magnetic Resonance. Any 2005, Volum 176, pàgines 15-26.

**Publicació IV:**

**Títol:** Optimum spin-state selection for all multiplicities in the acquisition dimension of the HSQC experiment.

**Autors:** Pau Nolis, Juan Félix Espinosa, Teodor Parella.

**Revista:** Journal of Magnetic Resonance. Any 2006, Volum 179, pàgines 295-306.

**Publicació V:**

**Títol:** Simultaneous  $\alpha,\beta$ -spin state selection for  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  from a time-shared HSQC-IPAP experiment.

**Autors:** Pau Nolis, Teodor Parella.

**Revista:** Journal of Biomolecular NMR. Any 2007, Volum 37, pàgines 65-77.

**Publicació VI:**

**Títol:** Time-sharing evolution and sensitivity enhancements in 2D HSQC-TOCSY and HSQMBBC experiments.

**Autors:** Pau Nolis, Miriam Pérez, Teodor Parella.

**Revista:** Magnetic Resonance in Chemistry. Any 2006, Volum 44, pàgines 1031-1036.

**Publicació VII:**

**Títol:** CN-HMBC: a powerful technique for the simultaneous detection of long-range  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  connectivities.

**Autors:** Miriam Pérez-Trujillo, Pau Nolis, Teodor Parella.

**Revista:** Organic Letters. Any 2007, Volum 9, pàgines 29-32.

Es disposa d'una vuitena publicació recentment acceptada, la qual, per la seva categoria de *review* no s'ha introduït en l'apartat de resultats i, per tant, no entra en el que és pròpiament el compendi de publicacions. Cal comentar, però, que l'apartat de polarització creuada heteronuclear (HCP) que es troba en la introducció teòrica (punt 6) es basa extensament en l'esmentat *review*.

**Publicació VIII (review):**

**Títol:** Solution-State NMR Experiments based on Heteronuclear Cross-Polarization

**Autors:** Pau Nolis, Teodor Parella.

**Revista:** Current Analytical Chemistry. Any 2007, Volum 3, pàgines 47-68.

Un altre aspecte a comentar és que pel que fa a la numeració de les figures i de la bibliografia hi ha dues numeracions. La de la tesi en si, que segueix un ordre coherent 1, 2, 3... i la dels articles que componen la part de resultats i discussió que cada un segueix la seva numeració. D'altra banda comentar que les cites bibliogràfiques repetides es tornen a escriure a cada pàgina que surten.



### 3.- Antecedents del grup i objectius

Els objectius d'una tesi sempre van lligats a la història del grup. En aquest punt s'anomenaran, per ordre cronològic, els treballs del grup anteriors a la meua arribada al grup (Abril del 2004) que estan lligats amb els temes i objectius que es plantegen en la present tesi doctoral. No es farà aquí, però, una revisió detallada dels treballs. Puntualment en les introduccions prèvies a les publicacions presentades en la present tesi sí es faran explicacions més detallades de parts d'aquests treballs.

L'objectiu general al iniciar el present treball d'investigació era clar: **el desenvolupament de noves metodologies (seqüències de pulsos) per a l'elucidació estructural de compostos orgànics en solució**. Per a ser destacables les noves seqüències haurien d'aportar algun avantatge sobre les anteriors en algun dels següents aspectes: nova aplicabilitat, sensibilitat, precisió en la mesura, robustesa, ràpida, fàcil implementació...

Realment els objectius específics de la tesi no es van plantejar des de l'inici d'aquesta, sinó que han anat sorgint a mesura que ha anat transcorrent la mateixa. Inicialment quan vaig iniciar la meua aventura en el món de la RMN, el grup d'investigació es trobava immers en el **desenvolupament de seqüències que utilitzessin la polarització creuada heteronuclear HCP com a bloc fonamental per a la transferència de magnetització entre *spins*** (veure part teòrica, punt 6). Els primers antecedents del grup es remunten a l'any 1997 quan es publicava el primer treball del grup on s'utilitzava la HCP<sup>2</sup>. En aquest article es comparaven en termes de sensibilitat diferents esquemes de transferència de polarització per al disseny d'experiments selectius monodimensionals amb gradients, obtenint-se resultats similars per a la HCP i els usuls blocs HMQC, HSQC. L'any 1999 es van proposar experiments selectius monodimensionals<sup>3</sup>, tant de detecció de protó com de carboni, per a la mesura de constants d'acoblament heteronuclears  $^nJ_{CH}$  a llarga distància utilitzant HCP.

Un objectiu paral·lel que hi havia dins el grup era treballar en **la incorporació de les metodologies  $S^3$  per obtenir seqüències que permetin la mesura acurada de constants d'acoblament** (veure part teòrica, punt 7.3). L'any 2001 va sorgir la primera publicació<sup>4</sup> del grup enfocada envers aquest tòpic. Concretament, es van proposar seqüències que aconseguien la  $S^3$  en experiments selectius de carboni basats en les seqüències 1D HMQC i HSQC amb gradients de camp magnètic. Més endavant, l'any 2004, el grup va publicar una sèrie d'articles on es demostrava que era possible l'excitació selectiva d'estat de *spin*  $S^3$  amb gradients en experiments dissenyats amb HCP<sup>5</sup>, desenvolupant tota una sèrie d'experiments bidimensionals<sup>6</sup>, demostrant que és possible enregistrar simultàniament la selecció d'estat de

<sup>2</sup> Parella, T.; Sánchez-Ferrando, F.; Virgili, A. *J. Magn. Reson.* **1997**, *126*, 278.

<sup>3</sup> Parella, T.; Belloc, J.; Sánchez-Ferrando, F.; Virgili, A. *Magn. Reson. Chem.* **1999**, *37*, 631.

<sup>4</sup> Parella, T.; Belloc, J. *J. Magn. Reson.* **2001**, *148*, 78.

<sup>5</sup> Parella, T. *J. Magn. Reson.* **2004**, *167*, 266.

<sup>6</sup> Parella, T. *J. Biomol. NMR.* **2004**, *29*, 37.



*spin* selectivament per a diferents sistemes  $I_nS$  ( $n=1,2$ ) utilitzant HCP<sup>7</sup>, i finalment mostrant-ne una aplicació pràctica en la mesura de constants d'acoblament a llarga distància<sup>8</sup>. En aquell moment, doncs, l'objectiu era clar; **demostrar que la incorporació de la HCP en el disseny de seqüències de pulsos és de gran utilitat**. D'aquest objectiu en van sorgir les *publicacions I i II* on s'aborda el problema concret de dissenyar una seqüència que permeti la mesura de constants d'acoblament entre nuclis químicament equivalents. Arribats a aquest punt amb tot el que el grup havia après sobre el tòpic de la HCP en líquids es va escriure un article de revisió<sup>9</sup>.

Seguint la línia d'investigació del disseny de seqüències que generin selecció d'estat de *spin* ( $S^3$ ), van sorgir les idees que es presenten a les *publicacions II i III*, on els blocs de mescla E.COSY i TROSY s'utilitzen per a produir  $S^3$  en experiments bidimensionals. Un clar inconvenient de les seqüències presentades a les *publicacions II i III* es que aquestes no funcionen simultàniament per a totes les multiplicitats dels sistemes de *spin*. En aquest punt va sorgir, doncs, un nou objectiu: **trobar noves metodologies basades en la selecció d'estat de *spin*  $S^3$  que funcionessin simultàniament per a totes les multiplicitats presents en la majoria de compostos orgànics  $IS$ ,  $I_2S$  i  $I_3S$** . A la *publicació IV* es presenta una possible solució a aquest problema utilitzant la metodologia IPAP (veure part teòrica, punt 7.3) en la dimensió d'adquisició en experiments bidimensionals heteronuclears.

Finalment, el darrer objectiu de la present tesi doctoral va venir rodat de la idea fonamental de l'estratègia presentada a la *publicació IV*. L'objectiu era **demostrar la fàcil incorporació de la nova metodologia F2-IPAP en d'altres seqüències de pulsos**. Concretament, aquest punt queda palès a la *publicació V*, on aquesta metodologia s'incorpora en **experiments amb evolució simultània de diferents freqüències** (veure part teòrica, punt 9), i obrint-se amb aquest tòpic una nova via d'investigació en el grup; **l'adquisició simultània de diferents espectres amb un únic experiment**, i que ja ha començat a donar els seus primers resultats, doncs, a les *publicacions VI i VII* de la present tesi doctoral es presenten els experiments HSQC-TOCSY, HSQMBC i HMBC amb l'adquisició simultània, però independent, de correlacions  $^1H$ - $^{13}C$  i  $^1H$ - $^{15}N$ .

#### De forma més concreta i concisa els objectius són:

- Desenvolupament de noves metodologies (seqüències de pulsos) per a la caracterització estructural de compostos orgànics en solució.
- Utilització de la polarització creuada heteronuclear (HCP) per dur a terme el desenvolupament de seqüències, amb el principal objectiu de demostrar que la HCP pot ser una eina molt útil a l'hora de dissenyar una nova metodologia.
- Utilització de metodologies amb estat de *spin* selectiu  $S^3$  per dissenyar noves seqüències que permetin la mesura de constants d'acoblament amb elevada precisió.
- Obrir un nou camp d'investigació en el nostre grup de recerca: el desenvolupament de noves seqüències de pulsos amb evolució simultània de diferents freqüències, concretament  $^{13}C$  i  $^{15}N$ .

<sup>7</sup> Parella, T.; Gairí, M. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 9821.

<sup>8</sup> Parella, T.; Belloc, J.; Sánchez-Ferrando, F. *Magn. Reson. Chem.* 2004, 42, 852.

<sup>9</sup> Nolis, P.; Parella, T. *Curr. Anal. Chem.* 2007, 3, 47.

## 4.- Brief introduction in English language

### 4.1.- Thesis structure

The present thesis is a compendium of seven articles published at recognized scientific journals. The list of the publications was given in pages 4 and 5.

The thesis structure is as follows. First an introductory part, here the thesis structure and the aim of the study are explained. Then, written in catalan language, a theoretical part follows. At this point the reader is introduced to the topics that are the basis of the thesis.

- Inverse detection methodologies.
- General methodologies for the measurement of coupling constants, with special emphasis on spin state selective methodologies.
- Methodologies for the measurement of long range heteronuclear coupling constants.
- Heteronuclear cross polarization in liquid state.
- Introduction to the experiments with time shared evolution of different frequencies.

Next follows the body of the thesis, the results and discussion. Herein the publications are situated. Prior to each publication a short introduction in catalan language is done. After the publication some not published results are explained, also in catalan language.

Finally, the main conclusions are reported. Those are in catalan as well as in English language. Also a CD is given with all the new sequences in Bruker format.

### 4.2.- Aim of the study

Always the objectives of a thesis are related to the history of the research group, and this one is not an exception. In pages 7 and 8 the references of the group I have followed to do the research herein presented are given. Following all this work the main objectives of this thesis are:

- Development of new methodologies (NMR pulse sequences) for the measurement of coupling constants in organic compounds.
- Development of sequences using heteronuclear cross polarization (HCP) as building block in order to demonstrate that HCP can be a really useful tool for the development of new NMR pulse sequences.
- Use of spin state selective methodologies in order to design sequences that allow the measurement of the value and the sign of coupling constants with high accuracy.
- Open a new NMR research area in our group: the development of pulse sequences with simultaneous evolution of two different frequencies ( $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ).



## 5.- Detecció inversa. Experiments heteronuclears fonamentals

### 5.1.- Introducció

Els mètodes de detecció inversa sorgeixen de la necessitat d'augmentar la sensibilitat dels experiments de correlació heteronuclear de nuclis de baixa sensibilitat com el  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  o  $^{31}\text{P}$ , experiments HETCOR<sup>10</sup>. Tradicionalment aquests es dissenyaven de tal manera que la magnetització inicial de  $^1\text{H}$  es transferia, via INEPT, a l'heteronucli  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  o  $^{31}\text{P}$ , el qual era detectat directament. La dependència de la intensitat del senyal amb les raons giromagnètiques dels nuclis excitats i observats ( $S/N \propto \gamma_{\text{exc}}\gamma_{\text{obs}}^{3/2}$ ) va portar a pensar en una estratègia de transferència de magnetització que millorava substancialment la metodologia de detecció directa de l'heteronucli. Aquesta es basa en la detecció de  $^1\text{H}$  (detecció inversa) i és la més emprada actualment en el disseny de seqüències. A la **Figura 2** es mostren i comparen les diferents estratègies per a dur a terme experiments de correlació heteronuclear bidimensionals.

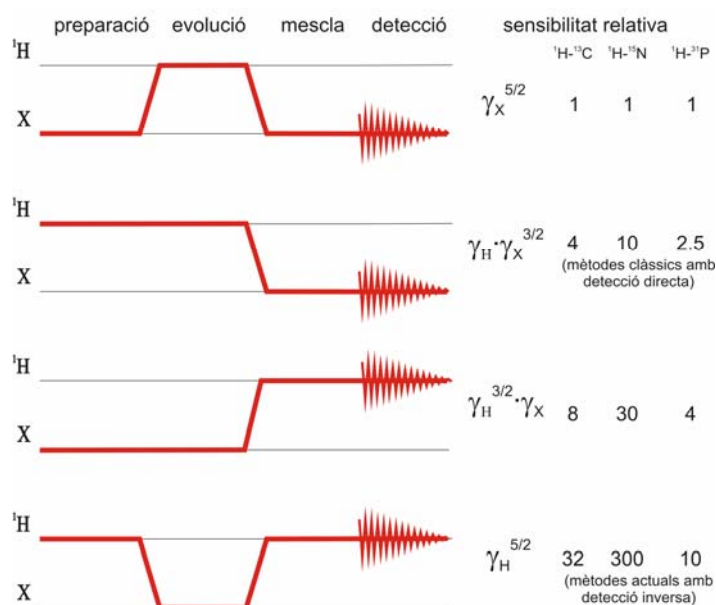


Figura 2. Esquema de les diferents maneres de transferir magnetització en el disseny de seqüències de pulsos bidimensionals. Com a exemple la sensibilitat relativa per a  $X=^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  i  $^{31}\text{P}$  s'indica en cada cas.

S'observa, doncs, que quan més petita és la raó giromagnètica de l'heteronucli en qüestió ( $\gamma(^{15}\text{N}) < \gamma(^{13}\text{C}) < \gamma(^{31}\text{P})$ ), més elevat és el guany relatiu que s'aconsegueix utilitzant mètodes de detecció inversa. Cal destacar, que un guany d'un factor de 4 correspon a un guany en temps d'un factor 16, és a dir, experiments que tradicionalment necessitaven d'una nit d'adquisició actualment es poden fer en poc més d'una hora.

<sup>10</sup> a) Bodenhausen, G.; Freeman, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 320. b) Edwards, M.W.; Bax, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 918.

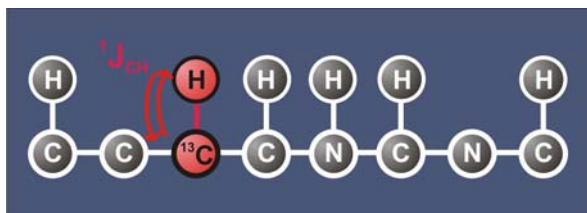
A principis dels anys 90 sorgeix la possibilitat d'utilitzar gradients de camp magnètic en el disseny de seqüències de pulsos<sup>11</sup>. Els beneficis que aquests aporten combinats amb els experiments de detecció inversa van provocar un salt de qualitat en l'obtenció d'experiments de RMN rutinaris.

A continuació s'ha cregut convenient descriure breument quines són les seqüències més bàsiques de correlació heteronuclear, avui dia rutinàries, basades en l'espectroscòpia de detecció inversa i gradients de camp magnètic, i que són fonamentals per a l'elucidació estructural de tot tipus de molècules (orgàniques, inorgàniques, organometàl·liques, biomolècules...). La raó de fer-ho és que en la present tesi doctoral les noves metodologies que s'aniran presentant es fonamenten en alguna d'aquestes seqüències.

## 5.2.- Experiments de correlació heteronuclear a un enllaç

### 5.2.1.- Introducció

Actualment hi ha bàsicament dues seqüències de detecció inversa que proporcionen la correlació a un enllaç, o directe, entre un  $^1\text{H}$  i un heteronucli X ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{29}\text{Si}$ ...): el HMQC i el HSQC (**Fig. 3**). Totes dues són de detecció inversa i troben el seu homòleg de detecció directa en l'experiment HETCOR<sup>12</sup>. Avui dia tots dos són àmpliament utilitzats i és complicat saber quin ho és més que l'altre, doncs, utilitzats com a mètodes de rutina bàsicament es pot considerar que donen la mateixa informació.



**Figura 3.** Esquema de transferència de magnetització en un experiment de detecció inversa a un enllaç. Primer es transfereix la magnetització des d'un protó a un heteronucli (en aquest cas  $^{13}\text{C}$ ) via  $^1J$ , aquesta es codifica amb el seu desplaçament químic  $\delta$ , i després es retorna la magnetització al protó via  $^1J$  per ser detectada.

Hi ha un tercer experiment de detecció inversa, que es basa en la polarització creuada heteronuclear (HCP)<sup>13</sup>, i encara que és àmpliament utilitzat en RMN de mostres sòlides, no ho és en RMN de compostos en solució. Aquest experiment no es comentarà en aquest apartat ja que s'ha dedicat un capítol introductorí sencer a aquest tòpic (punt 6).

A la **Figura 4** es mostra com a exemple l'espectre de correlació  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de la ubiquitina, una proteïna humana de 76 residus.

<sup>11</sup> Parella, T. *Magn. Reson. Chem.* **1998**, *36*, 467.

<sup>12</sup> a) Bodenhausen, G.; Freeman, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 320. b) Edwards, M.W.; Bax, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 918.

<sup>13</sup> Bertrand, D.W.; Moniz, W.B.; Garrowsay, A.N.; Chingas, G.C. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 5227.

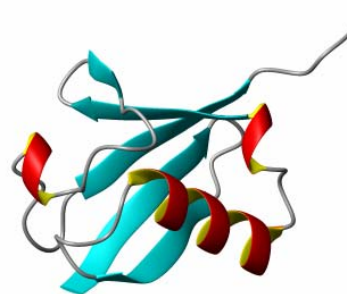
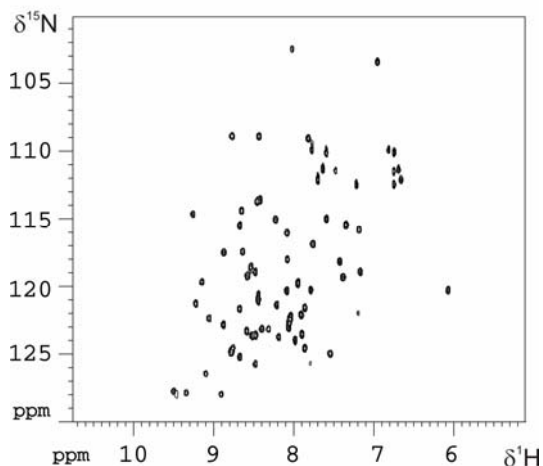


Figura 4. Espectre  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC d'una mostra de ubiquitina 1mM en  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  marcada en  $^{15}\text{N}$  i  $^{13}\text{C}$  (500MHz). Cada senyal de correlació ens dona informació del desplaçament químic de  $^1\text{H}$  i  $^{15}\text{N}$  per cada grup NH dels diferents residus de la proteïna.

### 5.2.2.- Experiment HSQC

La seqüència de pulsos bàsica del HSQC<sup>14</sup> (Heteronuclear Single Quantum Correlation) es mostra a la **Figura 5**. A continuació s'explica breument com funciona. La magnetització de protó  $-I_y$  creada després de l'aplicació del puls inicial de  $90^\circ_x$  evoluciona fins a magnetització de protó en antifase  $2I_xS_z$  durant un temps  $2\Delta$  ( $=1/2 \cdot J_{\text{XH}}$ ). És important notar que aquest temps és dependent del valor de  $J_{\text{XH}}$  i s'ha d'optimitzar per cada nucli i cas. Els valors de  $J$  per  $^{13}\text{C}$  es troben en l'interval de 160Hz a 120Hz ( $\Delta=1.56\text{ms}$  a  $2.08\text{ms}$ ), mentre els de  $J$  per  $^{15}\text{N}$  en pèptids i proteïnes es troben propers a 90Hz ( $\Delta=2.78\text{ms}$ ). Per tal de reenforçar l'evolució del desplaçament químic durant aquest temps, s'apliquen pulsos de  $180^\circ$  a cada nucli simultàniament en el mig del període (ecos de *spin*). Seguidament aquesta coherència es transferida al heteronucli mitjançant l'aplicació de dos pulsos de  $90^\circ$  simultàniament als dos nuclis ( $2I_xS_z \rightarrow 2I_zS_y$ ). Cal notar que per a que es dugui a terme la desitjada transferència de magnetització els dos primers pulsos de  $90^\circ$  de protó han de trobar-se desfasats  $90^\circ$ . Aquest mecanisme de transferència de polarització s'anomena INEPT<sup>15</sup> i és àmpliament utilitzat com a bloc de construcció de seqüències multi-dimensionals.

A continuació, es crea la segona dimensió amb l'evolució de la freqüència de l'heteronucli en el pla transversal, en forma de coherència monoquàntica (SQC), que genera dos components ortogonals de magnetització  $2I_zS_y$  i  $-2I_zS_x$  amb modulacions cosinus i sinus respectivament. El puls de  $180^\circ$  aplicat al mig d'aquest període reenforça l'evolució de la constant d'acoblament  $J_{\text{XH}}$ . El que segueix a continuació no és res més que un INEPT invers que transforma una de les dues components ortogonals a magnetització de protó detectable en fase  $I_x$ , mentre que l'altre és convertida en magnetització múltiple quàntica no detectable  $2I_yS_x$ . El fet de tenir magnetització final de protó en fase permet aplicar desacoblament heteronuclear durant l'adquisició, fet que aporta una simplificació espectral notable i un molt important guany de sensibilitat.

<sup>14</sup> Bodenhausen, G.; Ruben, D.J. *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *69*,185.

<sup>15</sup> Morris, G.; Freeman, R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 760.

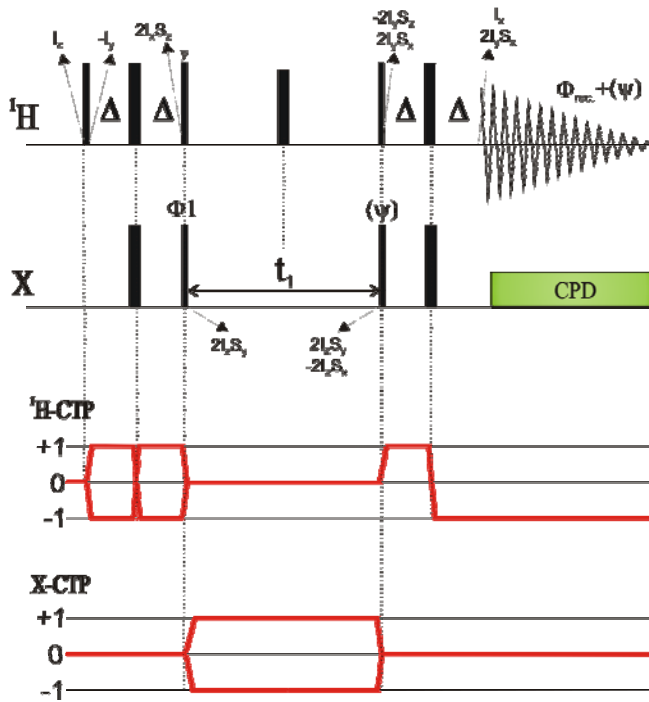


Figura 5. Diagrama de pulsos i camins de transferència de coherència (CTP) de l'experiment HSQC. Es marquen les components de magnetització en punts claus de la seqüència.  $\Delta=1/4J_{XH}$ .

Cal esmentar que amb aquesta seqüència només es selecciona el senyal cosinus modulada en amplitud, informació que no és suficient per obtenir detecció en quadratura a F1 (discriminació de freqüències positives i negatives respecte el centre de l'espectre "offset"). És necessari recollir el senyal complementari sinus modulada en amplitud (Fig. 6) que s'obté adquirint el mateix experiment però desfasant  $90^\circ$  la fase del puls  $\Psi$  juntament amb el receptor. Posteriorment aquests dos espectres es combinen via el mètode de STATES<sup>16</sup> o amb el mètode TPPI<sup>17</sup> per obtenir l'espectre desitjat.

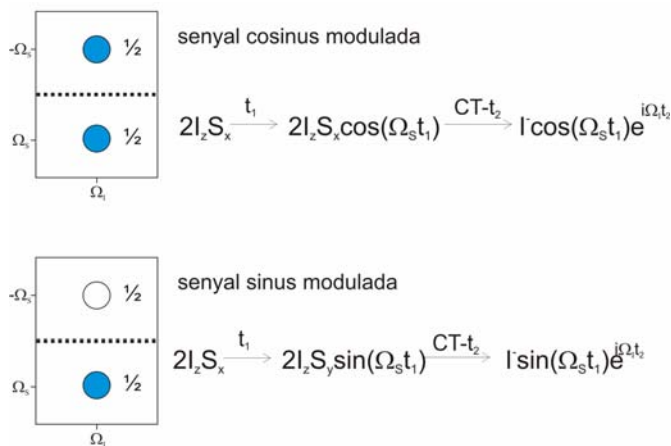


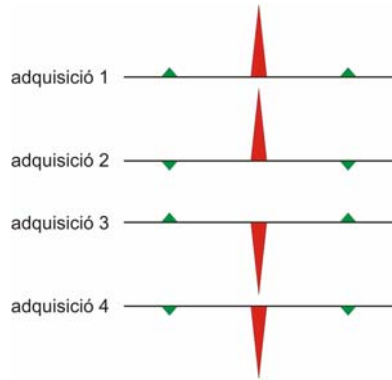
Figura 6. Esquema d'adquisició del experiment HSQC. (veure text principal).

Pel que fa a l'eliminació de la magnetització no desitjada dels protons units a  $^{12}\text{C}$  o  $^{14}\text{N}$ , es requereix d'un cicle de fases mínim de dos. Invertint la fase del primer puls de  $90^\circ$  de l'heteronucli en adquisicions alternades, la fase dels satèl·lits de  $^{13}\text{C}$  es veu invertida, mentre

<sup>16</sup> States, D.J.; Haberkorn, R.A.; Ruben, D.J. *J. Magn. Reson.* 1982, 48, 286.

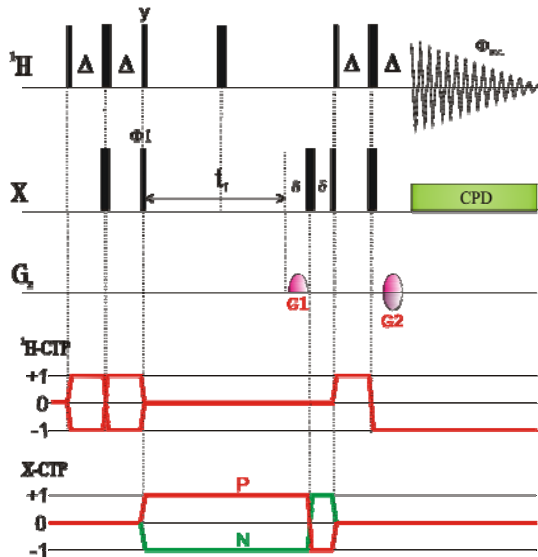
<sup>17</sup> Marion, D.; Wüthrich, K. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1983, 113, 967.

que la dels protons units a  $^{12}\text{C}$  no ho fa. La inversió simultània de la fase del detector conduirà a la suma coherent dels senyals desitjats i a l'eliminació de les indesitjats. Normalment aquesta cancel·lació no és perfecte, donant lloc a soroll  $t_1$  no desitjat. Hi ha varies estratègies que reforcen aquest procés d'eliminació del senyal  $^1\text{H}$ - $^{12}\text{C}$ . Es pot fer un cicle de fases de 4 passos (**Fig. 7**), es pot utilitzar el filtre BIRD que minimitza el senyal de  $^1\text{H}$ - $^{12}\text{C}$  al inici de la seqüència o es poden introduir períodes de *spin-lock*.



**Figura 7.** Esquema de l'eliminació dels senyals dels protons units a  $^{12}\text{C}$  mitjançant el cicle de fases en l'experiment HOSQ. Si sumen coherentment tots 4 espectres (1-2+3-4) veurem que els senyals de protons units a  $^{13}\text{C}$  romanen (verd). Es requereix un mínim de dues adquisicions, però, amb quatre la supressió és millor.

Actualment, però, la seqüència HSQC amb gradients de camp magnètic elimina aquest tipus d'artefactes amb un sola adquisició per increment i és la més recomanable i utilitzada (**Figura 8**). A la pràctica quan es treballa amb mostres diluïdes que requereixen de varies adquisicions el que es fa és combinar la selecció amb gradients i el cicle de fases.

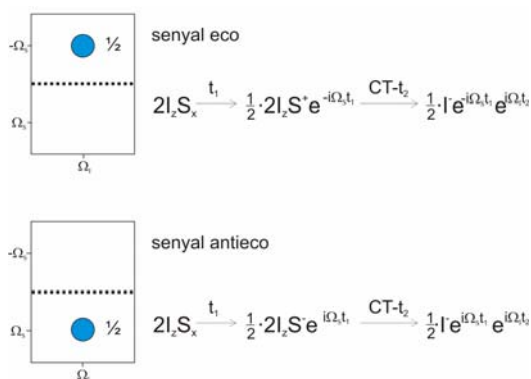


**Figura 8.** Diagrama de pulsos i CTP de l'experiment HSQC amb gradients. Cal notar que dues rutes de transferència de magnetització són possibles la N i la P (veure text principal).  $\Delta=1/4J_{\text{XH}}$ .

Un aspecte important a tenir en compte, és que quan s'apliquen gradients de camp magnètic durant  $t_1$  no s'obté senyal modulada en amplitud cosinus i sinus, sinó modulada en fase, és a dir, modulació amb el sentit de gir de la magnetització ( $S^+$  o  $S^-$ ). Aquesta codificació de la fase del senyal amb els gradients fa que només sigui possible seleccionar en cada adquisició un dels dos camins de transferència de magnetització, coneguts amb el nom de N i P (negatiu i positiu) o eco i antieco. Un altre fet que la selecció per gradients durant  $t_1$  aconsegueix per si



mateixa és la distinció del signe dels senyals a F1, és a dir, no es requereix cap tipus de processat especial per adquirir en quadratura. No obstant, no és possible obtenir espectres sensibles a la fase, doncs, per aquest fet es requereix disposar dels dos senyals cosinus i sinus modulats en amplitud. La manera rutinària de solucionar el problema és adquirir les rutes eco i antieco en adquisicions alternades (**Fig. 9**) i després combinar-les adequadament durant l'etapa de processat. Els dos senyals obtinguts estan modulats en fase, però l'addició i substracció d'aquests ho estan en amplitud, el que permet obtenir espectres sensibles a la fase<sup>18</sup>.

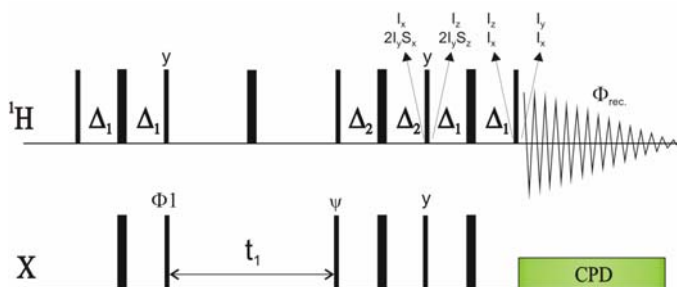


**Figura 9.** Esquema d'adquisició de l'experiment HSQC amb gradients. (veure text principal).

En termes de sensibilitat la utilització dels gradients durant  $t_1$  produeix una disminució d'un factor de  $\sqrt{2}$  respecte l'experiment original, essent aquest un dels seus desavantatges. Com a avantatges cal destacar la millor qualitat espectral, millor supressió del senyal d'aigua així com del soroll  $t_1$  i més rapidesa, ja que no cal aplicar el cicle de fases.

### 5.2.3.- Experiment HSQCPEP

L'experiment HSQCPEP<sup>19</sup> (PEP = Preservation of Equivalent Pathways) o altrament anomenat SE-HSQC (SE = Sensitivity Enhanced) proporciona un augment de sensibilitat d'un factor  $\sqrt{2}$  respecte l'original HSQC (**Fig. 10**). La idea bàsica que cal destacar és que l'experiment recupera la component de magnetització múltiple quàntica, que no es detecta en el HSQC, mentre preserva la component que ja era detectada.



**Figura 10.** Diagrama de l'experiment HSQC amb la incorporació de la metodologia PEP. Es marca l'evolució de les dues components ortogonals de magnetització durant els INEPT inversos.  $\Delta_1 = 1/4 J_{XH}$ .  $\Delta_2 = 1/4 J_{XH}$  o  $= 1/8 J_{XH}$  si es vol optimitzar per totes les multiplicitats.

<sup>18</sup> Keeler, J. "Understanding NMR Spectroscopy". John Wiley & sons, Ltd, Chichester, 2005.

<sup>19</sup> a) Cavanagh, J.; Rance, M. *J. Magn. Reson.* 1990, 88, 72. b) Cavanagh, J.; Palmer III, A.G.; Wright, M.; Rance, *J. Magn. Reson.* 1991, 91, 429. c) Palmer III, A.G.; Cavanagh, P.E.; Wright, M.; Rance, M. *J. Magn. Reson.* 1991, 93, 151.

Cal destacar també, que l'experiment HSQCPEP, a diferència del HSQC, és modulats en fase i no en amplitud. Això es deu a que es retenen, en cada adquisició, les dues components ortogonals de magnetització  $2I_zS_y$  i  $2I_zS_x$  amb modulacions cosinus i sinus respectivament. Aquest fet comporta que en una adquisició només es selecciona i transfereix un ordre de coherència,  $S^- \rightarrow I^-$  o bé  $S^+ \rightarrow I^-$  (senyals N/P o eco/antieco) (**Fig. 11**). Com s'ha comentat anteriorment si es vol un espectre sensible a la fase s'han d'enregistrar tots dos camins i combinar-los adequadament durant el processat. En l'experiment HSQCPEP això s'aconsegueix girant la fase del puls  $\Psi$   $180^\circ$  en experiments alternats.

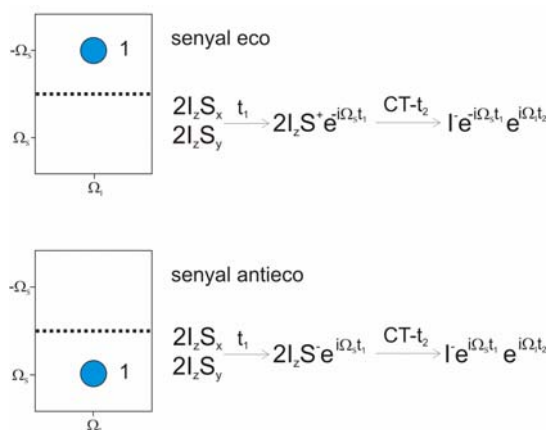


Figura 11. Esquema d'adquisició eco/antieco de l'experiment HSQCPEP (veure text principal).

Contràriament al que passava en l'experiment HSQC, quan s'introdueix la selecció per gradients en l'experiment HSQCPEP<sup>20</sup> (**Fig. 12**) no es redueix la sensibilitat de l'experiment. Aquest fet s'explica perquè l'aplicació de gradients és totalment compatible amb un experiment modulats en fase, mantenint, doncs, la millora en sensibilitat de  $\sqrt{2}$  respecte l'experiment HSQC.

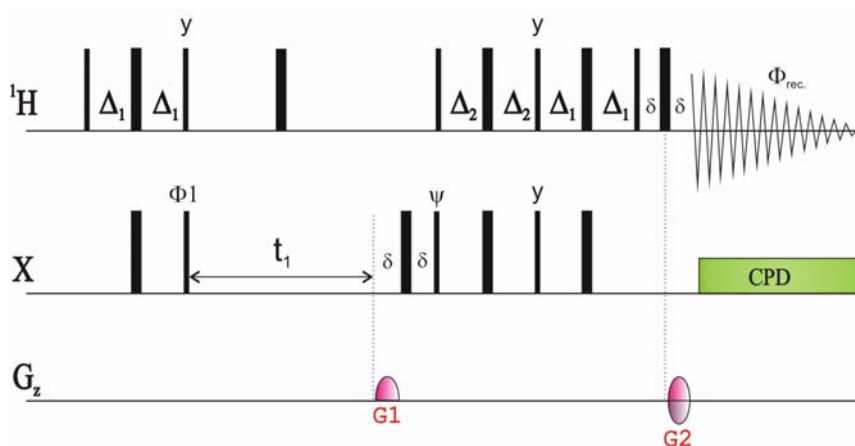


Figura 12. Diagrama de pulsos de l'experiment HSQC amb la incorporació de la metodologia PEP i selecció de coherències amb gradients via eco-antieco.  $\Delta_1=1/4J_{XH}$ .  $\Delta_2=1/4J_{XH}$  o  $=1/8J_{XH}$  si es vol optimitzar per totes les multiplicatats.

La seqüència HSQC és una de les seqüències que més modificacions ha sofert fins avui dia. Per exemple, la incorporació de gradients durant els ecos, tant de l'INEPT com del

<sup>20</sup> Kay, L.E.; Keifer, P.; Saariinen, T. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 10633.

retroINEPT, la introducció d'esquemes de supressió del senyal de l'aigua<sup>21</sup>, la incorporació de pulsos adiabàtics<sup>22</sup> de 180° de <sup>13</sup>C necessaris quan es treballa a camps superiors als 500MHz, diferents metodologies per editar la multiplicitat del sistema de *spins*<sup>23</sup>, o quan es treballa amb molècules isotòpicament marcades la necessitat de treballar amb l'esquema CT-HSQC<sup>24</sup> (CT = Constant Time) per evitar la contribució de l'evolució de les constants d'acoblament <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C en la dimensió indirecta, i finalment comentar la possibilitat de concatenar aquesta seqüència amb altres seqüències altament conegudes (veure punt 5.4 de la present tesi doctoral), o modificar-la per obtenir mètodes d'estat de *spin* selectiu S<sup>3</sup> (veure punt 7.3 de la present tesi doctoral).

#### 5.2.4.- Experiment HMQC

L'experiment HMQC<sup>25</sup> (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) és l'experiment de correlació heteronuclear a un enllaç utilitzant detecció inversa més antic que existeix. La raó per la qual, encara avui dia, és utilitzat de forma rutinària és que és més simple que el HSQC, doncs, només té 4 pulsos, la qual cosa el fa més robust en presència de pulsos descalibrats.

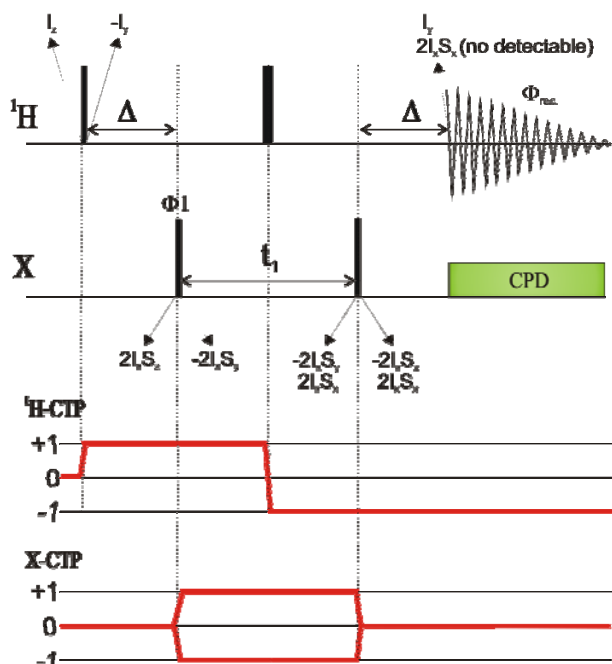


Figura 13. Diagrama de pulsos i CTP de l'experiment HMQC.  $\Delta = 1/2^{\circ}J_{XH}$ .

La seqüència (**Fig. 13**) comença portant la magnetització de <sup>1</sup>H al pla transversal, on aquesta evoluciona sota l'efecte de l'acoblament heteronuclear a un enllaç durant un període Δ ( $1/2^{\circ}J_{XH}$ ), donant lloc a magnetització en antifase de <sup>1</sup>H respecte <sup>1</sup>J<sub>XH</sub>. Aquesta magnetització

<sup>21</sup> Dötsch, V.; Oswald, R.; Wagner, G. *J. Magn. Reson. B.* **1995**, *108*, 255.

<sup>22</sup> Kupcè, E.; *Methods in Enzymology.* **2001**, *338*, 82.

<sup>23</sup> a) Vuister, G.W.; Ruiz-Cabello, J.; Van Zijl, P.C.M. *J. Magn. Reson.* **1992**, *100*, 215. b) Tate, S.I.; Masui, Y.; Inakaki, F.; *J. Magn. Reson.* **1991**, *94*, 625. c) Parella, T.; Sanchez-Ferrando, F.; Virgili, A. *J. Magn. Reson.* **1997**, *126*, 274. d) Domke, T.; Leibfritz, D.; *J. Magn. Reson.* **1990**, *88*, 401. e) Stelten, J.; Leibfritz, D. *Magn. Reson. Chem.* **1996**, *34*, 951.

<sup>24</sup> a) Santoro, J.; King, G.C. *J. Magn. Reson.* **1992**, *97*, 202. b) Vuister, G. W.; Bax, A. *J. Magn. Reson.* **1992**, *98*, 428.

<sup>25</sup> a) Müller, L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 4481. b) Bax, A.; Griffey, R.H.; Hawkins, B.L. *J. Magn. Reson.* **1983**, *55*, 301. c) Bax, A.; Subramanian, S. *J. Magn. Reson.* **1986**, *67*, 565.

es converteix a coherència múltiple quàntica protó-carboni, mitjançant l'aplicació d'un puls de  $90^\circ$  pel canal de l'heteronucli. Aquesta coherència múltiple quàntica evoluciona sota l'efecte del desplaçament químic de  $^{13}\text{C}$  durant  $t_1$ , donant lloc a dues components de magnetització. Finalment, una de les components de la magnetització és retornada "simètricament" al  $^1\text{H}$  per ser detectada, mentre l'altre roman en un terme de coherència múltiple quàntica no detectable, anàlogament al que passa en l'experiment HSQC.

Un altre aspecte a comentar és que l'evolució de la magnetització sota l'efecte del desplaçament químic de  $^1\text{H}$  es veu reenfocat gràcies al puls de  $180^\circ$  al mig de la seqüència. Com a inconvenient, mencionar que l'evolució de l'acoblament  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  té lloc durant  $t_1$  ja que la magnetització de protó es troba en el pla transversal, aquesta modulació a  $F_1$  eixampla els senyals dels pics creuats produint una pèrdua de resolució espectral, essent aquest l'aspecte diferencial més destacable respecte l'experiment HSQC on aquest fet no té lloc.

Pel que fa el cicle de fases dels pulsos necessari que cal per eliminar la magnetització dels protons units a  $^{12}\text{C}$  o  $^{14}\text{N}$  la seqüència requereix d'un cicle de fases mínim de dos anàleg a l'explicat per a l'experiment HSQC.

Versions posteriors de la mateixa seqüència han anat sorgint a la bibliografia per tal d'intentar millorar la supressió d'aquesta magnetització residual dels protons units a  $^{12}\text{C}$ . La seqüència BIRD<sup>26</sup>-HMQC n'és un exemple, però les que millor funcionen són les versions amb gradients de camp magnètic les quals amb una única adquisició aconseguen atenuacions de fins a 1000:1. Hi ha varies maneres d'implementar els gradients en aquest experiment. Es pot dissenyar un HMQC sensible a la fase, per això, cal no aplicar gradients durant  $t_1$  i processar via STATES o TPPI per obtenir detecció en quadratura a  $F_1$ <sup>27</sup>, o bé, aplicar gradients durant  $t_1$  i seleccionar els dos camins de transferència de coherència N i P en adquisicions alternades i processar-los adequadament amb la metodologia eco-antieco<sup>28</sup> (Fig. 14).

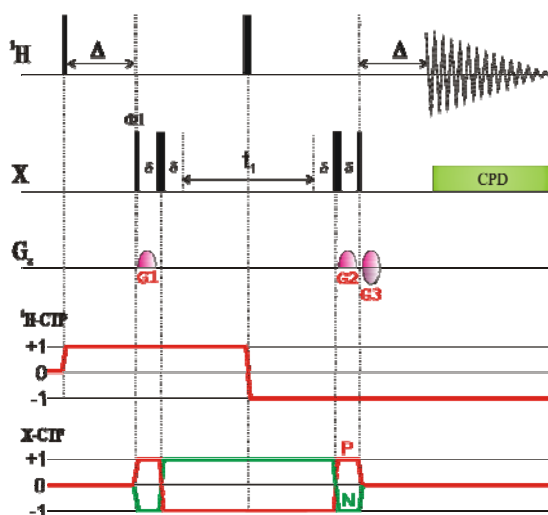


Figura 14. Diagrama de pulsos de l'experiment HMQC amb selecció per gradients eco/antieco. Es mostren els CTP eco (N) i antieco (P)  $\Delta = 1/2^n J_{\text{XH}}$ .

<sup>26</sup> Garbow, J.R.; Weitekamp, D.P.; Pines, A. *Chem. Phys. Lett.* **1982**, *93*, 504.

<sup>27</sup> a) Vuister, G.W.; Ruiz-Cabello, J.; Van Zijl, P.C.M.; *J. Magn. Reson.* **1992**, *100*, 215. b) Wilker, W.; Leibfritz, D.; Kerssebaum, R.; Bermel, W. *Magn. Reson. Chem.* **1993**, *31*, 287.

<sup>28</sup> a) Tolman, J.R.; Cheng, J.; Prestegard, J.H.; *J. Magn. Reson.* **1992**, *98*, 462. b) Davis, A.L.; Keeler, J.; Laue, E.D.; Moskau, D. *J. Magn. Reson.* **1992**, *98*, 207. c) Boyd, J.; Soffe, N.; John, B.; Plant, D.; Hard, R. *J. Magn. Reson.* **1992**, *98*, 660.

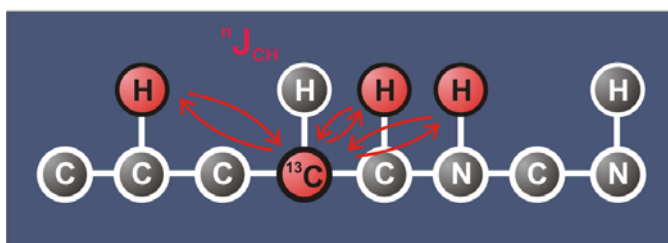
Hi hauria una tercera metodologia que seria un HMQC en mode magnitud, on només es selecciona un dels dos camins de transferència de coherència possibles durant  $t_1$ , però aquesta versió no és la òptima en termes de sensibilitat ni de resolució encara que pot utilitzar-se en l'anàlisi qualitatiu.

Per tancar aquest punt només comentar que existeix la seqüència SE-HMQC<sup>29</sup>, equivalent al HSQCPEP, que millora la sensibilitat de l'experiment. Aquesta seqüència no és, però, gaire utilitzada perquè requereix de més pulsos i és més llarga, per tant, esvaint-se la característica fonamental del experiment HMQC, la robustesa donada pels pocs pulsos que la componen. Cal dir també que anàlogament al HSQC diferents derivats del HMQC es poden utilitzar avui dia rutinàriament, com el HMQC-TOCSY o el HMQC-NOESY.

### 5.3.- Experiments de correlació heteronuclear a llarga distància

#### 5.3.1.- Introducció

Si en l'apartat anterior s'ha parlat de l'experiment HMQC i HSQC com a mètodes de detecció inversa rutinaris per establir la correlació directe  $^1\text{H-X}$ , a continuació s'explicaran breument els seus anàlegs HMBC i HSQMBC que estableixen la correlació a llarga distància (**Fig. 15**). Aquests mètodes serien els anàlegs a l'experiment de detecció directa COLOC<sup>30</sup>. Fins a quina distància? Això depèn de la existència o no de constant d'acoblament  $^n\text{J}_{\text{XH}}$ , doncs, si aquesta no existeix o és molt petita ( $<1.0\text{Hz}$ ) l'eficiència de la transferència de magnetització serà mínima i serà difícil veure senyals de correlació  $^1\text{H-X}$ . Normalment es poden establir connexions entre protons i heteronuclis fins a 2 i 3 enllaços.



**Figura 15.** Esquema de com funciona un experiment de detecció inversa a llarga distància. Inicialment es transfereix la magnetització des d'un protó a un heteronuclí (en aquest cas  $^{13}\text{C}$ ) via  $^n\text{J}_{\text{CH}}$ , ( $n=2,3$ ) aquest es codifica amb el seu desplaçament químic i després es retorna la magnetització al protó per ser detectada.

El gran avantatge d'aquestes metodologies respecte els experiments de correlació directa és que donen informació d'heteronuclis no protonats, com per exemple carbonis carbonílics.

A la **Figura 16** es mostra com a exemple l'espectre de correlació a llarga distància  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  HMBC de l'esticnina, un alcaloide natural.

<sup>29</sup> Zhu, G.; Kong, X.; Sze, K. *J. Magn. Reson.* **1998**, *135*, 232.

<sup>30</sup> Kessler, H.; Griesinger, C.; Lautz, J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, *23*, 444.

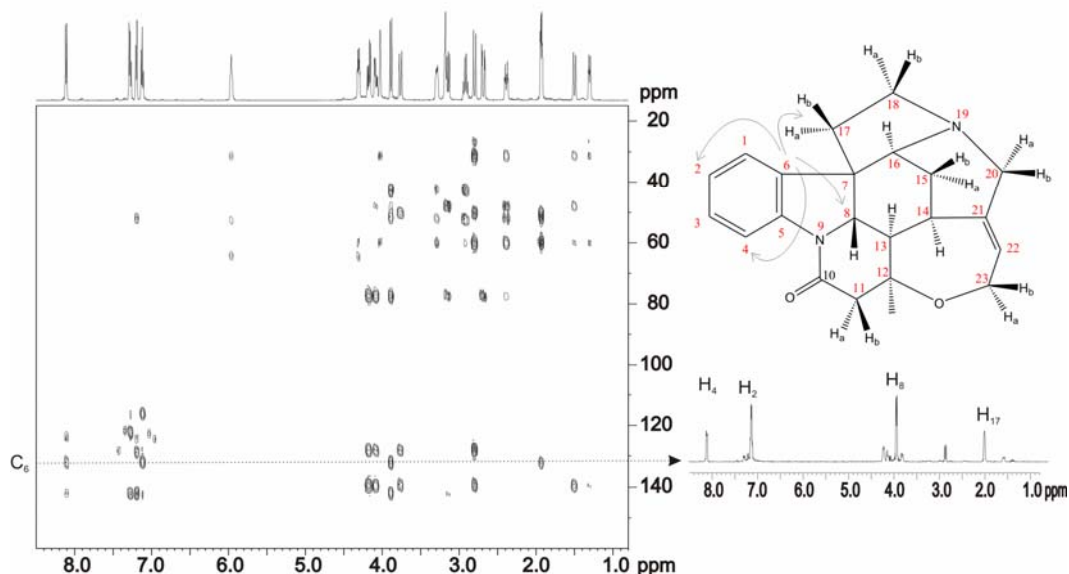


Figura 16. Espectre  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC de l'esticnina, 500MHz  $\text{CDCl}_3$ .

### 5.3.2.- Experiment HMBC

L'experiment HMBC<sup>31</sup> (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) és l'anàleg a l'experiment HMQC per això només se'n remarcaran les diferències i és un dels experiments més importants per a l'elucidació estructural de molècules petites<sup>32</sup>. A la **Figura 17** es mostra el diagrama de pulsos d'una seqüència HMBC amb gradients<sup>33</sup> que elimina de forma satisfactòria els senyals que provenen dels protons units a  $^{12}\text{C}$ .

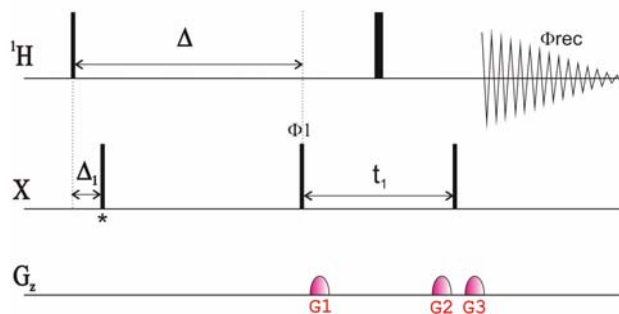


Figura 17. Diagrama de pulsos de l'experiment HMBC amb selecció de coherències amb gradients.  $\Delta=1/2^{\text{a}}J_{\text{XH}}$ .  $\Delta_1=1/2^1J_{\text{XH}}$ . El puls marcat amb asterisc no és estrictament necessari (veure text).

A primer cop d'ull pot semblar una seqüència diferent al HMQC, doncs, està una mica modificada. Les modificacions més destacables que s'hi troben són la desaparició del període de reenforc després del darrer puls de  $90^\circ$  a l'heteronucli i la desaparició del desacoblament durant l'adquisició. Aquestes modificacions tenen raó de ser i s'expliquen tenint en compte el següent aspecte, aquesta seqüència és molt més llarga que el HMQC, degut a que per tenir

<sup>31</sup> a) Bax, A.; Summers, M.F. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2093. b) Summers, M.F.; Marzilli, L.G.; Bax, A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2093.

<sup>32</sup> a) Martin, G.E.; Crouch, R.C. *Nat. Prod.* **1991**, *54*, 1. b) Martin, G.E.; Crouch, R.C. *Mod. Methods Plant. Anal.* **1994**, *15*, 25. c) Falkner, D.J. *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17*, 7.

<sup>33</sup> a) Wilker, W.; Leibfritz, D.; Kerssebaum, R.; Bermel, W. *Magn. Reson. Chem.* **1993**, *31*, 287. b) Rinaldi, P.L.; Keifer, P.A. *J. Magn. Reson. A.* **1994**, *108*, 259.

magnetització en antifase de protó  $2I_xS_z$  transferible al carboni enllaçat a llarga distància és necessari un temps  $\Delta$  al voltant de 60-70ms ajustat al valor de  ${}^nJ_{XH}$  (cal recordar que per la seqüència HMQC el temps típic per  ${}^{13}\text{C}$  és d'entre 3.12 i 4.16ms, i per  ${}^{15}\text{N}$  és d'uns 5.6ms). Aquest fet explica perquè s'ha eliminat el període de reenfoc que requeriria allargar 60-70ms més la seqüència, cosa no recomanable perquè les pèrdues per relaxació de la magnetització poden ser massa grans. Com que s'ha eliminat el període de reenfoc, al final de la seqüència s'arriba amb magnetització de protó en antifase  $2I_xS_z$  que sense la desactivació del desacoblador no seria possible de detectar. A més, cal dir que l'eliminació del període de reenfoc fa que la seqüència no sigui simètrica respecte el puls de  $180^\circ$  de  ${}^1\text{H}$  durant  $t_1$ , afegint una modulació  $J_{HH}$  extra durant el llarg període necessari per a l'evolució de l'acoblament heteronuclear a llarga distància. Aquesta evolució juntament a la produïda durant  $t_1$  fan que els senyals tinguin fase dispersiva<sup>34</sup>, per això, l'experiment es processa normalment en mode magnitud.

Hi ha una tercera modificació, l'aparició d'un primer puls de  $90^\circ$  a l'heteronucli que no apareix a l'experiment HMQC. Tot i que aquest puls no és estrictament necessari, la seva aplicació és molt recomanable, doncs, minimitza els senyals dels protons directament units a  ${}^{13}\text{C}$ . Dit d'una altra manera, actúa de filtre (*low pass filter*)<sup>35</sup> eliminant la magnetització en antifase  $I_xS_z$  produïda per  ${}^1J_{XH}$  ( $\Delta_1=1/2{}^1J_{XH}$ ) i que originaria senyal no desitjat en l'espectre final.

L'experiment HMBC pateix per la gran dispersió de valors de  ${}^nJ_{XH}$  (de 0 a 20Hz) i l'experiment només es pot optimitzar a un d'ells (normalment un valor entre 6 i 10Hz), per això, és recomanable realitzar diferents experiments optimitzats a diferents J per assegurar-nos tenir el màxim d'informació possible. Aquesta metodologia pot ser llarga i tediosa. Intentant resoldre aquest problema l'experiment ha sofert varies modificacions en els darrers anys. Una modificació molt coneguda és l'ACCORD-HMBC<sup>36</sup>, que amb un sol experiment fa un escombrat de diferents valors de  ${}^nJ_{XH}$  mitjançant la tècnica anomenada acordió. Els inconvenients de l'experiment són els problemes de relaxació que poden aparèixer degut a la utilització de decalatges de temps més llargs i que apareix una modulació extra de l'acoblament protó-protó a la dimensió indirecta. Aquest darrer problema es resol utilitzant la seqüència CIGAR-HMBC<sup>37</sup>.

Un altre problema és que l'experiment HMBC no permet discernir entre senyals de correlació que provinguin d'acoblements a 2 o 3 enllaços. Diferents propostes han sorgit per solucionar aquest problema<sup>38</sup>, essent les més recents els experiments anomenats H2BC<sup>39</sup> i HAT-HMBC<sup>40</sup> de Sørensen i col·laboradors.

<sup>34</sup> Keeler, J.; Nehaus, D.; Titman, J.J. *Chem. Phys. Lett.* **1988**, *146*, 157.

<sup>35</sup> Kogler, H.; Sørensen, O.W. Bodenhausen, G.; Ernst, R.R. *J. Magn. Reson.* **1985**, *55*, 157.

<sup>36</sup> Wagner, R.; Berger, S. *Magn. Reson. Chem.* **1998**, *36*, 44.

<sup>37</sup> Hadden, C.E.; Martin, G.E.; Krishnamurthy, V.V. *Magn. Reson. Chem.* **2000**, *38*, 143.

<sup>38</sup> a) Krishnamurthy, V.V.; Rusell, D.J.; Hadden, C.E.; Martin, G.E. *J. Magn. Reson.* **2000**, *146*, 232. b) Sprang, T.; Bigler, P. *Magn. Reson. Chem.* **2003**, *41*, 177.

<sup>39</sup> Nils, N.; Duus, J.; Sørensen, O.W. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6154.

<sup>40</sup> Benie, A.J.; Sørensen, O.W. *J. Magn. Reson.* **2007**, *184*, 258.

### 5.3.3.- Experiment HSQMBC

L'experiment HSQMBC<sup>41</sup> (Heteronuclear Single Quantum Multiple Bond Correlation) pot considerar-se la versió optimitzada a llarga distància de l'experiment HSQC. Aquest experiment conté més pulsos que el HMBC, fet que el fa menys robust. Tanmateix, aporta un avantatge molt important respecte la seqüència HMBC i és que durant  $t_1$  no hi ha evolució de l'acoblament homonuclear protó-protó. Aquest fet, juntament amb que és un experiment sensible a la fase, permet la mesura de constants d'acoblament  ${}^nJ_{\text{XH}}$  amb elevada precisió. La seqüència HSQMBC es presenta a la **Figura 18**.

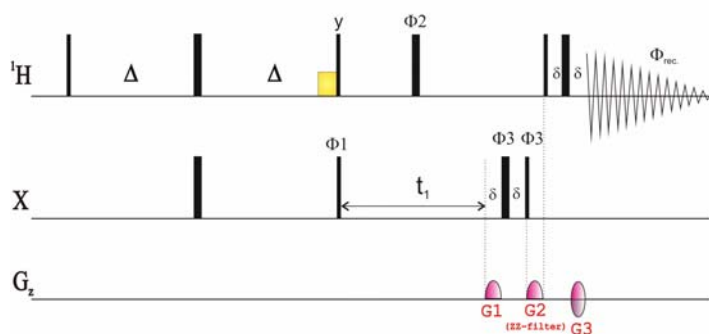


Figura 18. Diagrama de pulsos de l'experiment HSQMBC amb selecció per gradients eco/antieco.  $\Delta=1/2^nJ_{\text{XH}}$

Anàlogament al que passava en l'experiment HMBC respecte el seu anàleg del HMQC, s'han fet algunes modificacions per prevenir problemes de relaxació en l'experiment HSQMBC. Així, doncs, observem que s'ha eliminat el període de reenfoc durant el retroINEPT, fet que escurça notablement la seqüència evitant problemes de relaxació, però fent que els pics creuats presentin modulació en antifase  $2I_xS_z$  que fa que no es pugui aplicar desacoblament heteronuclear durant l'adquisició. Observem també la incorporació de dos nous elements, un gradient G2, que actua com a filtre- $zz$ <sup>42</sup>, és dir, purga tota aquella magnetització no desitjada (diferent a  $2I_zS_z$ ), que generaria contribucions dispersives en la forma de línia. I la introducció d'un puls *trim* d'elevada potència abans de produir la transferència de magnetització del protó a l'heteronucli per ajudar a desfasar magnetització no desitjada, així com ajudar en la supressió del senyal de l'aigua.

Una versió més sofisticada del HSQMBC és la seqüència G-BIRD<sub>R,X</sub>-HSQMBC<sup>43</sup> (**Fig. 19**), on la incorporació d'un filtre BIRD amb gradients durant l'INEPT permet suprimir eficientment els senyals no desitjats dels protons directament units a <sup>13</sup>C.

<sup>41</sup> Williamson, R.T.; Marquez, B.L.; Gerwick, W.H.; Köver, K.E. *Magn. Reson. Chem.* **2000**, *38*, 265.

<sup>42</sup> a) Bruhwiler, D.; Wagner, G. *J. Magn. Reson.* **1986**, *69*, 546. b) John, B.K.; Plant, D.; Hurd, R.E. *J. Magn. Reson.* **1993**, *101*, 113.

<sup>43</sup> Marquez, B.; Gerwick, W.; Williamson, T. *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39*, 499.



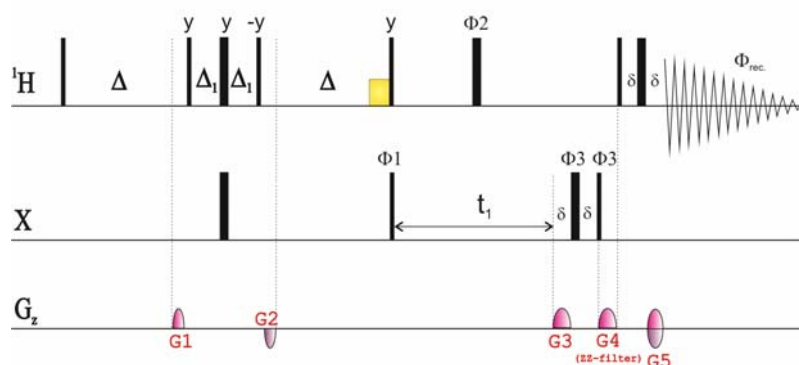


Figura 19. Diagrama de pulsos de l'experiment HSQMBBC amb selecció per gradients eco/antieco i incorporació d'un filtre BIRD per a la supressió de  $^1\text{H}$ - $^{12}\text{C}$ .  
 $\Delta = 1/2^n J_{\text{XH}}$ .  $\Delta_1 = 1/2^1 J_{\text{XH}}$

La netedat amb la que s'aconsegueixen els espectres fan que aquest experiment sigui molt aconsellable per a la mesura quantitativa de constants d'acoblament heteronuclears a llarga distància<sup>44</sup>.

## 5.4.- Experiments de correlació heteronuclears concatenats

### 5.4.1.- Introducció

En els anomenats experiments heteronuclears concatenats o híbrids, on s'enllaça un experiment de correlació heteronuclear (HMQC, HSQC) amb un bloc de correlació homonuclear (COSY, TOCSY, NOESY, ROESY), sorgeixen de la necessitat de resoldre els problemes de solapament que presenten els experiments bidimensionals homonuclears de molècules amb molts protons solapats. Aquesta estratègia es beneficia de la major dispersió dels desplaçaments químics de l'heteronucli com a mitjà per separar les correlacions protó-protó. D'altra banda, en els casos on el solapament dels protons és complet, les correlacions heteronuclears directes no permeten assignar sense ambigüitat l'heteronucli. En aquest cas els experiments concatenats, que transfereixen la informació a protons veïns no solapats prèviament identificats, ens ajuden a resoldre el problema. D'experiments concatenats n'hi ha dissenyats molts, per exemple el HSQC-COSY, HSQC-NOESY, HMQC-RELAY, HMQC-INADEQUATE..., si bé, en aquest punt només ens centrarem en el HSQC-TOCSY, doncs aquest, és un dels pilars fonamentals en el qual es basen moltes de les estratègies proposades en la present tesi doctoral.

### 5.4.2.- L'experiment HSQC-TOCSY

L'experiment HSQC-TOCSY<sup>45</sup>, com el seu propi nom indica, no és res més que la concatenació de l'experiment HSQC i un bloc de transferència de magnetització homonuclear

<sup>44</sup> veure punt 8.3.4 de la present tesi doctoral

<sup>45</sup> a) Lerner, L.; Bax, A.; *J. Magn. Reson.* **1986**, *69*, 375. b) Davix, D.G. *J. Magn. Reson.* **1989**, *84*, 417.

TOCSY<sup>46</sup>. El primer bloc codifica cada protó amb el desplaçament químic de l'heteronucli al qual s'enllaça directament, resolent així els problemes de solapament i el segon bloc connecta aquest protó amb tot el seu subsistema de *spins* (Fig. 20)

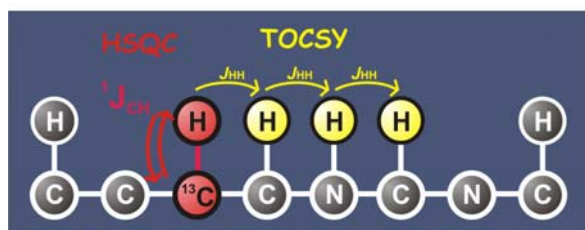


Figura 20. Esquema de com funciona l'experiment HSQC—TOCSY. Inicialment té lloc la codificació del  $^{13}\text{C}$  via HSQC i després aquesta informació es transfereix a tot el subsistema de protons mitjançant la transferència homonuclear TOCSY.

L'estratègia té l'inconvenient, respecte el TOCSY 2D homonuclear, de que a canvi d'una major resolució espectral a la dimensió indirecta es perd sensibilitat ja que la magnetització es codifica en el primer bloc amb  $^{13}\text{C}$ , és a dir, amb el 1% dels carbonis de la mostra.

La seqüència original ha anat evolucionant amb el temps paral·lelament a com ho han fet l'experiment HSQC i els trens de pulsos per produir transferència homonuclear TOCSY. Així, doncs, avui dia de forma rutinària la seqüència HSQC-TOCSY (Fig. 21) que s'utilitza gaudeix de la incorporació dels gradients, de la metodologia PEP i del tren de pulsos DIPSI-2<sup>47</sup>.

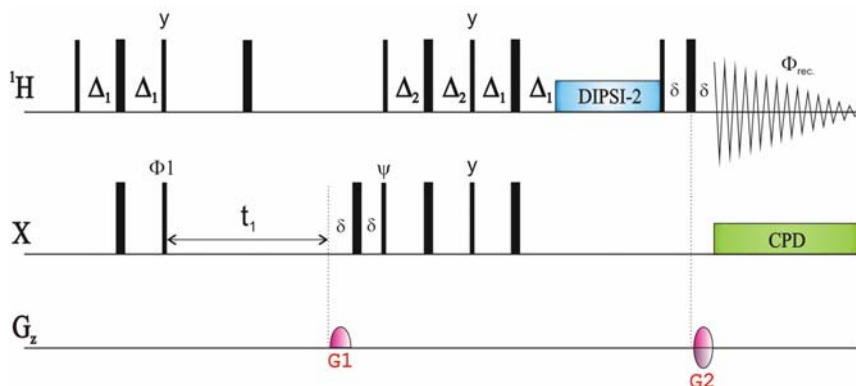


Figura 21. Diagrama de pulsos de l'experiment HSQC-TOCSY amb la incorporació de la metodologia PEP i selecció de coherències amb gradients via eco-antico.  $\Delta_1=1/4J_{\text{XH}}$ .  $\Delta_2=1/4J_{\text{XH}}$  o  $=1/8J_{\text{XH}}$  si es vol optimitzar per totes les multiplicitats. Per a la transferència TOCSY s'utilitza el tren de pulsos DIPSI-2.

Altres modificacions que permeten l'editat de les multiplicitats, o bé l'editat dels pics directes, respecte els pics TOCSY també es troben a la bibliografia<sup>48</sup>.

A la Figura 22 es mostra com a exemple l'espectre de correlació  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-TOCSY de l'eritromicina, un antibiòtic utilitzat per tractar infeccions causades per les bacteries, com bronquitis, neumonia, febre reumàtica, infeccions d'oïda, intestí, pulmó...

<sup>46</sup> Braunschweiler, L.; Ernst, R.R. *J. Magn. Reson.* **1983**, *53*, 521.

<sup>47</sup> a) Willker, W.; Leibfritz, D.; Kerssebaum, R.; Bermel, W. *Magn. Reson. Chem.* **1993**, *31*, 287. b) Köver, K.E.; Hruby, V.J.; Uhrin, D. *J. Magn. Reson.* **1997**, *129*, 125.

<sup>48</sup> Parella, T.; Belloc, J.; Sánchez-Ferrando, F.; Virgili, A. *Magn. Reson. Chem.* **1998**, *36*, 715.

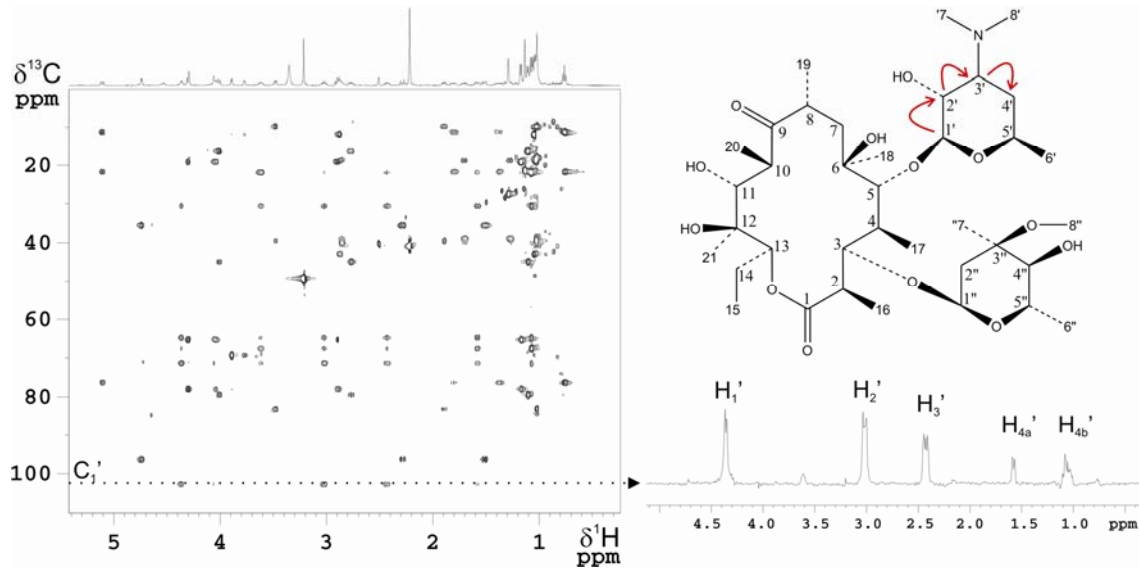


Figura 22. Espectre  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-TOCSY d'una mostra d'eritromicina en  $\text{D}_2\text{O}$  (500MHz). Cada fila ens dóna informació del subsistema de *spins* (desplaçaments químics de protó) al qual pertany el carboni seleccionat (fila estreta).

## 6.- Polarització creuada heteronuclear (HCP) en líquids<sup>49</sup>

### 6.1.- Introducció a la HCP en líquids

S'anomena polarització creuada heteronuclear (HCP) al procés de transferència de polarització entre dos *spins* I i S. Aquest fenomen és conegut des del 1962<sup>50</sup> quan, Hartmann i Hahn, van observar transferència de polarització entre dos *spins* quan els feien ressonar a freqüències prou semblants mitjançant l'aplicació de seqüències de bloqueig de *spins* (*spin lock*). En concret, van trobar que perquè la transferència fos efectiva s'havia de complir la següent condició:

$$|\omega_I - \omega_S| \ll J_{IS} \quad [1]$$

Avui dia aquesta condició rep el nom dels autors, anomenant-se la condició de Hartmann-Hahn, que ens diu que és possible aconseguir transferència de coherència heteronuclear mantenint la magnetització de les dues espècies nuclears "bloquejades" sempre que s'utilitzin amplituds de RF comparables o inferiors a la constant d'acoblament entre ells.

Els mateixos autors van observar que el fenomen es podia generar a través dels acoblaments escalars (J) o bé a través dels acoblaments dipolars (D). Quan es treballa en estat sòlid domina el procés via acoblaments dipolars. El llarg rang d'interaccions dipolars acobla els *spins* essencialment de manera termodinàmica, així que una descripció estadística en termes de temperatura de *spins* és l'apropiat. Aquest procés és àmpliament conegut com a mètode per augmentar el senyal de <sup>13</sup>C en RMN de sòlids<sup>51</sup>. En canvi, en líquids, el procés anàleg té lloc a través de l'acoblament escalar. En aquest cas la ràpida reorientació molecular permet la forta interacció dipolar a zero, mentre que l'acoblament escalar intramolecular J roman. Ja que l'acoblament escalar és feble comparat amb la interacció dipolar, l'ajustament dels camps de RF esdevé més crític, i perquè l'acoblament és intramolecular, en sistemes de *spins* acoblats escalarment via J, l'evolució és diu que és coherent enlloc d'estadística. Així, doncs, juntament amb els clàssics blocs INEPT, RINEPT o DEPT és possible l'ús de HCP en mostres en estat líquid per a transferir la magnetització entre heteronuclis<sup>52</sup>. Tot i que aquesta metodologia no és àmpliament utilitzada, cal dir, que ha trobat una àmplia acceptació en el cas homonuclear, on els experiments amb blocs HOHAHA o TOCSY són rutinaris<sup>53</sup>. Cal comentar que quan es

<sup>49</sup> Nolis, P.; Parella, T. *Curr. Anal. Chem.* **2007**, *3*, 47.

<sup>50</sup> Hartmann, S.R.; Hahn, E.L. *Phys. Rev.*, **1962**, *128*, 2042.

<sup>51</sup> Duer, M.J., *An introduction to solid-state NMR*, Blackwell Science Ltd (Oxford), **2004**.

<sup>52</sup> a) Muller, L.; Ernst, R.R. *Mol. Phys.*, **1979**, *38*, 963. b) Bertrand, D.W.; Moniz, W.B.; Garroway, A.N.; Chingas, G.C. *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, *100*, 5227. c) Bearden, D.W.; Brown, L.R. *Chem. Phys. Lett.*, **1989**, *163*, 432. d) Zuiderweg, E.R.P. *J. Magn. Reson.*, **1990**, *89*, 533. e) Levitt, M.H. *J. Chem. Phys.*, **1991**, *94*, 30. f) Ernst, M.; Griesinger, C.; Ernst, R. R.; Bermel, W. *Mol. Phys.*, **1991**, *74*, 219. g) Glaser, S.; Quant, J.J. *Adv. in Magnetic and Optical Resonance*, **1996**, *19*, 59.

<sup>53</sup> a) Braunschweiler, L.; Ernst, R. R. *J. Magn. Reson.*, **1983**, *53*, 521. b) Bax, A.; Davis, D. G. *J. Magn. Reson.*, **1985**, *65*, 355.

comparen les propietats de la propagació de transferència d'aquests blocs amb els anàlegs COSY o RELAY es veu que aquestes són completament diferents.

Una característica important que cal remarcar és que l'intercanvi de polarització entre *spins* (I i S) utilitzant HCP és sinusoidal; quan els *spins* S han rebut la màxima polarització de I, comença a tenir lloc la polarització de S cap a I, és a dir, no es convergeix a una situació d'equilibri d'igual polarització dels *spins*. El 1981, Chingas i col·laboradors<sup>54</sup> van estudiar el procés de transferència de magnetització en líquids utilitzant HCP depenent del sistema de *spins*  $I_nS$  ( $n \geq 1$ ) estudiat. Els resultats obtinguts es comparen gràficament aquí amb el clàssic RINEPT (**Fig. 23**), on s'introdueix un segon període d'evolució  $^1J$  després del primer INEPT, per tal d'obtenir magnetització final de l'heteronucli en fase. La quantitat de magnetització transferida depèn de la durada d'aquest segon període i també del sistema de *spins*  $I_nS$  involucrat, doncs, durant aquest segon període la magnetització de l'heteronucli és transversa i, per tant, evoluciona amb els diferents protons de cada sistema.

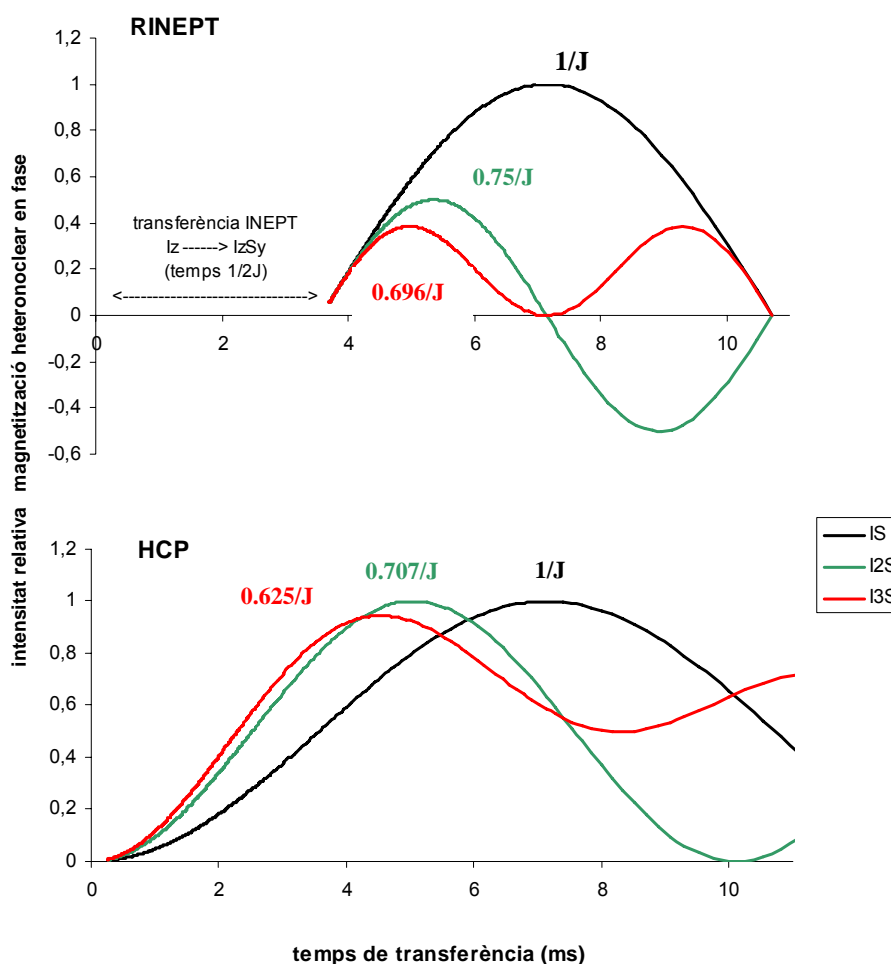


Figura 23. Comparació gràfica HCP Vs. RINEPT per a la transferència IP -> IP en diferents sistemes de *spins*  $I_nS$ . S'ha assumit una constant d'acoblament heteronuclear de 140 Hz per a tots els sistemes de *spins*.

<sup>54</sup> Chingas, G.C.; Garraway, A. N.; Bertrand, R.D.; Moniz, W.N. *J. Chem. Phys.* 1981, 74(1), 127.

En el cas HCP la intensitat de la magnetització transferida es mostra en funció de la durada del temps de *spin lock* entre nuclis. En el cas del RINEPT la intensitat de la magnetització transferida es mostra en funció de la durada del període de reenfocament de J, doncs, l'eficiència de la transferència per als diferents  $I_nS$  no depèn de la durada del primer INEPT. Aquest cal ajustar-lo a  $1/2J$  per tal d'obtenir màxima transferència heteronuclear IP- $\rightarrow$  AP. Assumint una constant d'acoblament heteronuclear de 140 Hz per a tots els sistemes de *spins*, (cas ideal) el temps total per a la transferència màxima de magnetització des de I a S per a sistemes IS és de  $1/J$  (7,14ms si  $J=140\text{Hz}$ ), tant per HCP com per RINEPT. Per a sistemes  $I_2S$  trobem que es requereix menys temps per obtenir la transferència òptima utilitzant HCP, si bé les diferències no són destacables (0,707/J Vs. 0,75/J; 5,05ms Vs. 5,36ms si  $J=140\text{Hz}$ ). Cal notar, però, que les diferències si que són molt notables pel que fa a la quantitat de senyal de l'heteronucli en fase transferida, doncs, s'observa que mentre no s'arriba a superar el 50% de transferència utilitzant el RINEPT, la transferència pot ser completa si s'optimitza el procés de HCP. Un comportament similar al descrit per sistemes  $I_2S$  s'observa per als sistemes de *spin*  $I_3S$ . La idea essencial a extreure de la comparació realitzada és que la propagació de magnetització IP- $\rightarrow$  IP entre heteronuclis utilitzant HCP té característiques diferents al del clàssic RINEPT per als diferents sistemes de *spins*, essent, doncs, una alternativa que cal tenir present a l'hora de dissenyar seqüències de pulsos.

Continuant amb la perspectiva històrica de la HCP, el seu ús per obtenir espectres monodimensionals de  $^{13}\text{C}$  va ser descrita fa uns anys, i la sensibilitat trobada estava en concordança amb la predita<sup>55</sup>. Durant els anys 90 varies metodologies basades en HCP van ser proposades, però el seu ús pràctic només ha estat aplicat en pocs casos. Una aplicació pràctica va ser la millora de l'excitació selectiva quan es compara l'INEPT selectiu utilitzant pulsos amb forma amb la HCP doblement selectiva utilitzant CW<sup>56</sup>. La raó és que l'eficiència en la transferència de polarització es veu afectada per l'evolució de l'acoblament escalar  $J_{HH}$  i la relaxació transversal durant l'aplicació de pulsos selectius. Utilitzant CW per produir la HCP s'obté una doble selectivitat d'una manera natural, i es suprimeix d'una manera efectiva l'evolució  $J_{HH}$  durant el procés de transferència de polarització. Altres exemples els trobem en experiments 1D per a la mesura de constants d'acoblament carboni-carboni a abundància natural<sup>57</sup>, experiments de correlació  $^1\text{H}$ - $^{29}\text{Si}$  en compostos organosilicats<sup>58</sup>, experiments que permeten obtenir informació de la relaxació del  $^{31}\text{P}$ , informació estructural en àcids nucleics<sup>59</sup>, estudis de  $^{117,119}\text{Cd}$  en metal-loproteïnes<sup>60</sup>, transferències protó-carboni en experiments 2D, 3D

<sup>55</sup> a) Bertrand, D.W.; Moniz, W.B.; Garroway, A.N.; Chingas, G.C. *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, *100*, 5227. b) Bearden, D.W.; Brown, L.R. *Chem. Phys. Lett.*, **1989**, *163*, 432. c) Zuiderweg, E.R.P. *J. Magn. Reson.*, **1990**, *89*, 533.

<sup>56</sup> Chiarparin, E.; Pelupessy, P.; Bodenhausen, G. *Mol. Phys. Rev.* **1998**, *95*(5), 759.

<sup>57</sup> Fäcke, S.; Berger, S. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 9547.

<sup>58</sup> a) Wagner, R.; Berger, S. *Phosphorus, Sulfur, Silicon and Rel. Element.*, **1994**, *91*, 213. b) Braun, S.; Kalinowski, H.O.; Berger, S. *150 and more basic NMR experiments, a practical course*, Wiley-VCH: Weinheim, **1998**; pp. 322-325.

<sup>59</sup> a) Simorre, J.P.; Zimmermann, G.R.; Mueller, L.; Pardi, A.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 5316. b) Sklenar, V.; Dieckmann, T.; Butcher, S.; Feijon, J. *J. Biomol. NMR.*, **1996**, *7*, 83.

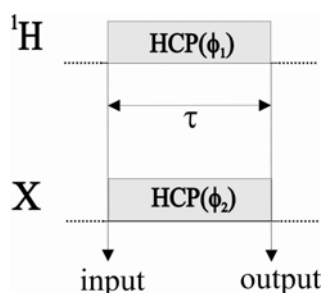
<sup>60</sup> a) Kellogg, G.W.; Schweitzer, B.I. *J. Biomol. NMR.*, **1993**, *3*, 577. b) Schweitzer, B.I.; Gardner, K.H.; Tucker-Kellogg, G. *J. Biomol. NMR.*, **1995**, *6*, 180.

i 4D amb aplicació en el camp de les proteïnes i àcids nucleics<sup>61</sup> i d'altres on la HCP s'utilitza per transferir magnetització de manera *band-selective*, és a dir, en determinades regions<sup>62</sup>.

Hi ha dues raons que expliquen el poc ús actual d'aquesta metodologia en estat líquid. La primera es pot explicar en termes de problemes tècnics, doncs, l'eficiència de la HCP en líquids es veu fortament atenuada si els camps de radiofreqüència no són perfectament homogenis. Avui dia, però, es pot considerar que les imperfeccions en els camps de RF tenen poc efecte en el procés de HCP, en part degut als avenços tècnics i en part degut a l'ús de trens de pulsos que són capaços de compensar aquestes possibles imperfeccions, això si, sempre i quan les amplituds de RF siguin comparables amb les magnituds de les constants d'acoblament heteronuclears (condició de Hartmann-Hahn). La segona raó és la poca flexibilitat que presentaven, fins avui, les seqüències en termes de manipulació dels *spins*, doncs, el mecanisme de transferència de coherència polarització amb el qual fins ara s'havia treballat portava la magnetització en fase de protó a magnetització en fase de l'heteronucli (IP  $\rightarrow$  IP), és a dir, només les components de magnetització paral·leles a la fase del procés de HCP eren eficientment transferides. Tal com s'explica als següents apartats el procés de HCP és anisotròpic i per això pot produir altres mecanismes de transferència diferents al tradicional IP  $\rightarrow$  IP, ampliant notablement les possibilitats de la metodologia.

## 6.2.- Descripció de la HCP utilitzant el formalisme d'operadors producte

En aquest apartat es descriu el comportament de la HCP utilitzant el formalisme d'operadors producte<sup>63</sup>. Algunes equacions matemàtiques són inevitables per tal d'entendre el procés, però representacions gràfiques basades en un model vectorial ens ajudaran a esquematitzar els processos anisotròpics que tenen lloc. Aquest model pretén ser intuïtiu, considerant només la magnetització d'entrada i sortida durant la HCP, sense entrar en detall del que està succeint durant la transferència de magnetització entre els dos *spins*. La **Figura 24** mostra l'esquema gràfic del procés de HCP.



**Figura 24.** Procés HCP esquematitzat. La magnetització d'entrada, així com, les fases  $\phi_1$  i  $\phi_2$  són de màxima importància per tal de controlar la magnetització de sortida. El temps de mescla per a una transferència de magnetització òptima depèn de la multiplicitat del sistema de *spins*:  $\tau = 1/J$ ,  $0.707/J$  i  $0.625/J$  per sistemes IS, I<sub>2</sub>S i I<sub>3</sub>S respectivament.

<sup>61</sup> a) Gardner, K.; Coleman, J.E. *J. Biomol. NMR.*, **1994**, *4*, 761. b) Richardson, J.M.; Clowes, R.T.; Boucher, W.; Domaille, P.J.; Hardman, C.H.; Keeler, J.; Laue, E.D. *J. Magn. Reson. B.*, **1993**, *101*, 223. c) Majumdar, A.; Zuiderweg, E.R.P. *J. Magn. Reson. A.*, **1995**, *113*, 19. d) Majumdar, A.; Wang, H.; E.R.P. Zuiderweg, E.R.P. *J. Biomol. NMR.*, **1993**, *3*, 387. e) Wijmenga, S.S.; Steensma, E.; Van Mierlo, C.P.M. *J. Magn. Reson.*, **1997**, *124*, 459.

<sup>62</sup> Zuiderweg, E.R.P.; Zeng, L.; Brutscher, B.; Morshauer, R.C. *J. Biomol. NMR.*, **1996**, *8*, 147. b) Artemov, D.; Bhujwalla, Z.M.; Glickson, J.D. *J. Magn. Reson. B.*, **1995**, *107*, 286.

<sup>63</sup> Sørensen, O.W.; Eich, G.W.; Levitt, M.H.; Bodenhausen, G.; Ernst, R.R. *Progress in NMR spectroscopy.*, **1984**, *16*, 163

Aquest consisteix en l'aplicació independent, a dos heteronuclis (I i X) acoblats escalarment per  $J_{IX}$ , de dos camps de RF simultanis amb intensitats  $\omega_{I1} = \gamma^I B_1^I / 2\pi$ , i  $\omega_{X1} = \gamma^X B_1^X / 2\pi$ . Com s'ha comentat en la introducció l'eficiència de la transferència de magnetització serà màxima si es treballa sota la condició de Hartmann-Hahn. La magnetització de sortida depèn, doncs, de la magnetització d'entrada, el temps  $\tau$  i les fases  $\phi_1$  i  $\phi_2$ , que ens indiquen la durada i els angles de rotació, respecte l'eix de referència "y", d'aplicació dels camps de *spin lock*.

Quan es treballa sobre mostres dissoltes en solució, hi ha dues maneres d'aconseguir la HCP; fer-ho de forma doblement selectiva, irradiant simultàniament dos nuclis amb una RF de baixa potència<sup>64</sup> (CW), o bé utilitzant trens de pulsos que generin una transferència de banda ampla (*broadband*). Durant el transcurs d'aquesta tesi doctoral s'ha treballat tant amb CW com amb el tren de pulsos DIPSI-2<sup>65</sup>, detallat a continuació a la **Figura 25**.

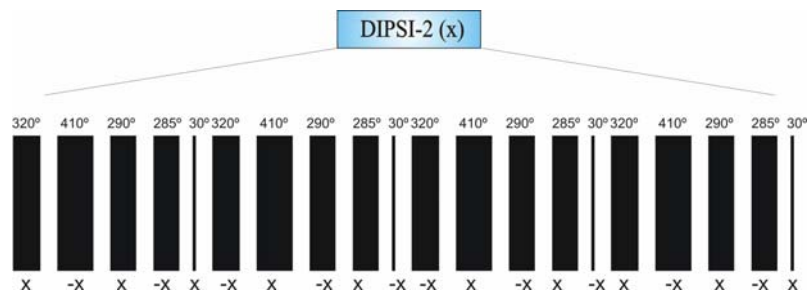


Figura 25: Detall del tren de pulsos DIPSI-2.

Quan s'aconsegueix treballar en condicions de HCP es diu que es treballa sota les condicions de Hamiltonià de mescla planar (*planar mixing Hamiltonian*). El terme efectiu d'acoblament del Hamiltonià actiu durant el procés de HCP( $\phi_1, \phi_2$ ) es descriu com:

$$H^{eff} = HCP(\phi_1, \phi_2) = \pi J_{IS}^{eff} (2I_z S_z + 2I_x S_x \cos \phi_1 \cos \phi_2 + 2I_y S_y \sin \phi_1 \sin \phi_2 + 2I_x S_y \cos \phi_1 \sin \phi_2 + 2I_y S_x \sin \phi_1 \cos \phi_2) \quad [2]$$

on la constant d'acoblament efectiva<sup>66</sup> és  $J_{IS}^{eff} = J_{IS} / 2$ . Per exemple, en el cas clàssic on els camps de *spin lock* s'apliquen des de l'eix y ( $\phi_1 = \phi_2 = 0$ ), el corresponent HCP(y, y) es simplifica a

$$H^{eff} = HCP(y, y) = \pi J_{IS}^{eff} (2I_z S_z + 2I_x S_x) \quad [3]$$

<sup>64</sup> a) Chiarparin, E.; Pelupessy, P.; Cutting, B.; Eykyn, T.R.; Bodenhausen, G. *J. Biomol. NMR.* **1999**, *13*, 61. b) Shen, J. *J. Magn. Reson. A.* **1996**, *119*, 101. c) Dalvit, C.; Bovermann, G. *J. Magn. Reson. A.* **1994**, *109*, 113. d) Parella, T.; Belloc,.; Sanchez-Ferrando, F.; Virgili, A. *Magn. Reson. Chem.* **1999**, *37*, 631. e) Luy, B. *J. Magn. Reson.* **2004**, *168*, 210.

<sup>65</sup> Shaka, A.J.; Lee, C.J.; Pines, A. *J. Magn. Reson.* **1988**, *77*, 274.

<sup>66</sup> Glaser, S.; Quant, J.J. *Adv. in Magnetic and Optical Resonance.*, **1996**, *19*, 59.



De la mateixa manera que el formalisme d'operadors producte descriu l'evolució de l'acoblament J en els corresponents plans ortogonals<sup>67</sup>, es poden calcular les transformacions de cada operador. A continuació s'exposa el desenvolupament del Hamiltonià depenen de la magnetització d'entrada en el procés de HCP per a un sistema de dos *spins* feblement acoblats:

$$\begin{aligned}
I_y \xrightarrow{HCP(\phi_1, \phi_2)} & (I_y c_J^2 + 2I_z S_x c_J s_J - 2I_x S_z c_J s_J + S_y s_J^2) c_1 c_2 \\
& + (I_y c_J - 2I_x S_z s_J) s_1 s_2 \\
& + (I_y c_J^2 + 2I_z S_y c_J s_J - 2I_x S_z c_J s_J - S_x s_J^2) c_1 s_2 \\
& + (I_y c_J - 2I_x S_z s_J) s_1 c_2
\end{aligned} \tag{4a}$$

$$\begin{aligned}
I_x \xrightarrow{HCP(\phi_1, \phi_2)} & (I_x c_J + 2I_y S_z s_J) c_1 c_2 + \\
& (I_x c_J^2 - 2I_z S_y c_J s_J + 2I_y S_z s_J c_J + S_x s_J^2) s_1 s_2 + \\
& (I_x c_J + 2I_y S_z s_J) c_1 s_2 + \\
& (I_x c_J^2 - 2I_z S_x c_J s_J + 2I_y S_z s_J c_J - S_y s_J^2) s_1 c_2
\end{aligned} \tag{4b}$$

$$\begin{aligned}
I_z \xrightarrow{HCP(\phi_1, \phi_2)} & (I_z c_J - 2I_y S_x s_J) c_1 c_2 + \\
& (I_z c_J + 2I_x S_y s_J) s_1 s_2 + \\
& (I_z c_J - 2I_y S_y s_J) c_1 s_2 + \\
& (I_z c_J + 2I_x S_x s_J) s_1 c_2
\end{aligned} \tag{4c}$$

$$\begin{aligned}
S_y \xrightarrow{HCP(\phi_1, \phi_2)} & (S_y c_J^2 + 2I_x S_z c_J s_J - 2I_z S_x s_J c_J + I_y s_J^2) c_1 c_2 + \\
& (S_y c_J - 2I_z S_x s_J) s_1 s_2 + \\
& (S_y c_J - 2I_z S_x s_J) c_1 s_2 + \\
& (S_y c_J^2 + 2I_y S_z c_J s_J - 2I_z S_x s_J c_J - I_x s_J^2) s_1 c_2
\end{aligned} \tag{4d}$$

$$\begin{aligned}
S_x \xrightarrow{HCP(\phi_1, \phi_2)} & (S_x c_J + 2I_z S_y s_J) c_1 c_2 + \\
& (S_x c_J^2 - 2I_y S_z c_J s_J + 2I_z S_y s_J c_J + I_x s_J^2) s_1 s_2 + \\
& (S_x c_J^2 - 2I_x S_z c_J s_J + 2I_z S_y s_J c_J - I_y s_J^2) c_1 s_2 + \\
& (S_x c_J + 2I_z S_y s_J) s_1 c_2
\end{aligned} \tag{4e}$$

$$\begin{aligned}
S_z \xrightarrow{HCP(\phi_1, \phi_2)} & (S_z c_J - 2I_x S_y s_J) c_1 c_2 + \\
& (S_z c_J + 2I_y S_x s_J) s_1 s_2 + \\
& (S_z c_J + 2I_x S_x s_J) c_1 s_2 + \\
& (S_z c_J - 2I_y S_y s_J) s_1 c_2
\end{aligned} \tag{4f}$$

<sup>67</sup> Sørensen, O.W.; Eich, G.W.; Levitt, M.H.; Bodenhausen, G.; Ernst, R.R. *Progress in NMR spectroscopy.*, **1984**, *16*, 163. b) Sørensen, O.W. *Progress in NMR spectroscopy.*, **1989**, *21*, 503.

$$2I_z S_z \xrightarrow{HCP(\phi_1, \phi_2)} 2I_z S_z \quad [4g]$$

$$2I_z S_x \xrightarrow{HCP(\phi_1, \phi_2)} (2I_z S_x c_J^2 - I_y c_J s_J + S_y s_J c_J + 2I_x S_z s_J^2) c_1 c_2 + (2I_z S_x c_J + S_y s_J) s_1 s_2 + (2I_z S_x c_J + S_y s_J) c_1 s_2 + (2I_z S_x c_J^2 + I_x c_J s_J + S_y s_J c_J + 2I_y S_z s_J^2) s_1 c_2 \quad [4h]$$

$$2I_z S_y \xrightarrow{HCP(\phi_1, \phi_2)} (2I_z S_y c_J - S_x s_J) c_1 c_2 + (2I_z S_y c_J^2 + I_x c_J s_J - S_x s_J c_J + 2I_y S_z s_J^2) s_1 s_2 + (2I_z S_y c_J^2 - I_y c_J s_J - S_x s_J c_J + 2I_x S_z s_J^2) c_1 s_2 + (2I_z S_y c_J - S_x s_J) s_1 c_2 \quad [4i]$$

$$2I_y S_z \xrightarrow{HCP(\phi_1, \phi_2)} (2I_y S_z c_J - I_x s_J) c_1 c_2 + (2I_y S_z c_J^2 + S_x c_J s_J - I_x s_J c_J + 2I_z S_y s_J^2) s_1 s_2 + (2I_y S_z c_J - I_x s_J) c_1 s_2 + (2I_y S_z c_J^2 - S_y c_J s_J - I_x s_J c_J + 2I_z S_x s_J^2) s_1 c_2 \quad [4j]$$

$$2I_y S_x \xrightarrow{HCP(\phi_1, \phi_2)} (2I_y S_x c_J + I_z s_J) c_1 c_2 + (2I_y S_x c_J - S_z s_J) s_1 s_2 + 2I_y S_x (c_1 s_2 + s_1 c_2) \quad [4k]$$

$$2I_y S_y \xrightarrow{HCP(\phi_1, \phi_2)} 2I_y S_y (c_1 c_2 + s_1 s_2) + (2I_y S_y c_J + I_z s_J) c_1 s_2 + (2I_y S_y c_J + S_z s_J) s_1 c_2 \quad [4l]$$

$$2I_x S_z \xrightarrow{HCP(\phi_1, \phi_2)} (2I_x S_z c_J^2 - S_y c_J s_J + I_y s_J c_J + 2I_z S_x s_J^2) c_1 c_2 + (2I_x S_z c_J + I_y s_J) s_1 s_2 + (2I_x S_z c_J^2 + S_x c_J s_J + I_y s_J c_J + 2I_z S_y s_J^2) c_1 s_2 + (2I_x S_z c_J + I_y s_J) s_1 c_2 \quad [4m]$$

$$2I_x S_x \xrightarrow{HCP(\phi_1, \phi_2)} 2I_x S_x (c_1 c_2 + s_1 s_2) + (2I_x S_x c_J - S_z s_J) c_1 s_2 + (2I_x S_x c_J - I_z s_J) s_1 c_2 \quad [4n]$$

$$2I_x S_y \xrightarrow{HCP(\phi_1, \phi_2)} (2I_x S_y c_J + S_z s_J) c_1 c_2 + (2I_x S_y c_J - I_z s_J) s_1 s_2 + 2I_x S_y (c_1 s_2 + s_1 c_2) \quad [4o]$$

on  $c_J = \cos(\pi J_{IS} \tau / 2)$ ,  $s_J = \sin(\pi J_{IS} \tau / 2)$ ,  $c_1 = \cos \phi_1$ ,  $c_2 = \cos \phi_2$ ,  $s_1 = \sin \phi_1$ ,  $s_2 = \sin \phi_2$

Els termes que contenen el terme  $c_j$  s'anul·len quan el temps de mescla és ajustat al valor de  $1/J_{IS}$ , simplificant-se considerablement les transformacions anteriors.

$$I_y \xrightarrow{HCP(\phi_1, \phi_2), \tau=1/J_{IS}} S_y c_1 c_2 - S_x c_1 s_2 - 2I_x S_z s_1 (s_2 + c_2) \quad [5a]$$

$$I_x \xrightarrow{HCP(\phi_1, \phi_2), \tau=1/J_{IS}} 2I_y S_z c_1 (c_2 + s_2) + S_x s_1 s_2 - S_y s_1 c_2 \quad [5b]$$

$$I_z \xrightarrow{HCP(\phi_1, \phi_2), \tau=1/J_{IS}} -2I_y S_x c_1 c_2 + 2I_x S_y s_1 s_2 - 2I_y S_y c_1 s_2 + 2I_x S_x s_1 c_2 \quad [5c]$$

$$S_y \xrightarrow{HCP(\phi_1, \phi_2), \tau=1/J_{IS}} I_y c_1 c_2 - 2I_z S_x s_1 s_2 - 2I_x S_z c_1 s_2 - I_x s_1 c_2 \quad [5d]$$

$$S_x \xrightarrow{HCP(\phi_1, \phi_2), \tau=1/J_{IS}} 2I_z S_y c_1 c_2 + I_x s_1 s_2 - I_y c_1 s_2 + 2I_z S_y s_1 c_2 \quad [5e]$$

$$S_z \xrightarrow{HCP(\phi_1, \phi_2), \tau=1/J_{IS}} -2I_x S_y c_1 c_2 + 2I_y S_x s_1 s_2 + 2I_x S_x c_1 s_2 - 2I_y S_y s_1 c_2 \quad [5f]$$

$$2I_z S_z \xrightarrow{HCP(\phi_1, \phi_2), \tau=1/J_{IS}} 2I_z S_z \quad [5g]$$

$$2I_z S_x \xrightarrow{HCP(\phi_1, \phi_2), \tau=1/J_{IS}} 2I_x S_z c_1 c_2 + 2I_y S_z s_1 c_2 + S_y (s_1 + c_1) s_2 \quad [5h]$$

$$2I_z S_y \xrightarrow{HCP(\phi_1, \phi_2), \tau=1/J_{IS}} -S_x (c_1 + s_1) c_2 + 2I_y S_z s_1 s_2 + 2I_x S_z c_1 s_2 \quad [5i]$$

$$2I_y S_z \xrightarrow{HCP(\phi_1, \phi_2), \tau=1/J_{IS}} -I_x c_1 (c_2 + s_2) + 2I_z S_y s_1 s_2 + 2I_z S_x s_1 c_2 \quad [5j]$$

$$2I_y S_x \xrightarrow{HCP(\phi_1, \phi_2), \tau=1/J_{IS}} I_z c_1 c_2 - S_z s_1 s_2 + 2I_y S_x (c_1 s_2 + s_1 c_2) \quad [5k]$$

$$2I_y S_y \xrightarrow{HCP(\phi_1, \phi_2), \tau=1/J_{IS}} 2I_y S_y (c_1 c_2 + s_1 s_2) + I_z c_1 s_2 + S_z s_1 c_2 \quad [5l]$$

$$2I_x S_z \xrightarrow{HCP(\phi_1, \phi_2), \tau=1/J_{IS}} 2I_z S_x c_1 c_2 + 2I_z S_y c_1 s_2 + I_y s_1 (s_2 + c_2) \quad [5m]$$

$$2I_x S_x \xrightarrow{HCP(\phi_1, \phi_2), \tau=1/J_{IS}} 2I_x S_x (c_1 c_2 + s_1 s_2) - S_z c_1 s_2 - I_z s_1 c_2 \quad [5n]$$

$$2I_x S_y \xrightarrow{HCP(\phi_1, \phi_2), \tau=1/J_{IS}} S_z c_1 c_2 - I_z s_1 s_2 + 2I_x S_y (c_1 s_2 + s_1 c_2) \quad [5o]$$

Les transformacions derivades es representen pictòricament en la **Figura 26** mitjançant un model vectorial no clàssic<sup>68</sup>. Cal remarcar que la interconversió entre els termes múltiple-quàntics i de magnetització longitudinal (transferències MQ->ZQ), i les coherències doble- i zero- quàntiques no evolucionen per l'efecte de l'acoblament entre els dos *spins* involucrats.

<sup>68</sup> Donne, D.G.; Gorenstein, D.G.; *Conc. Magn. Reson.* 1997, 9, 95.

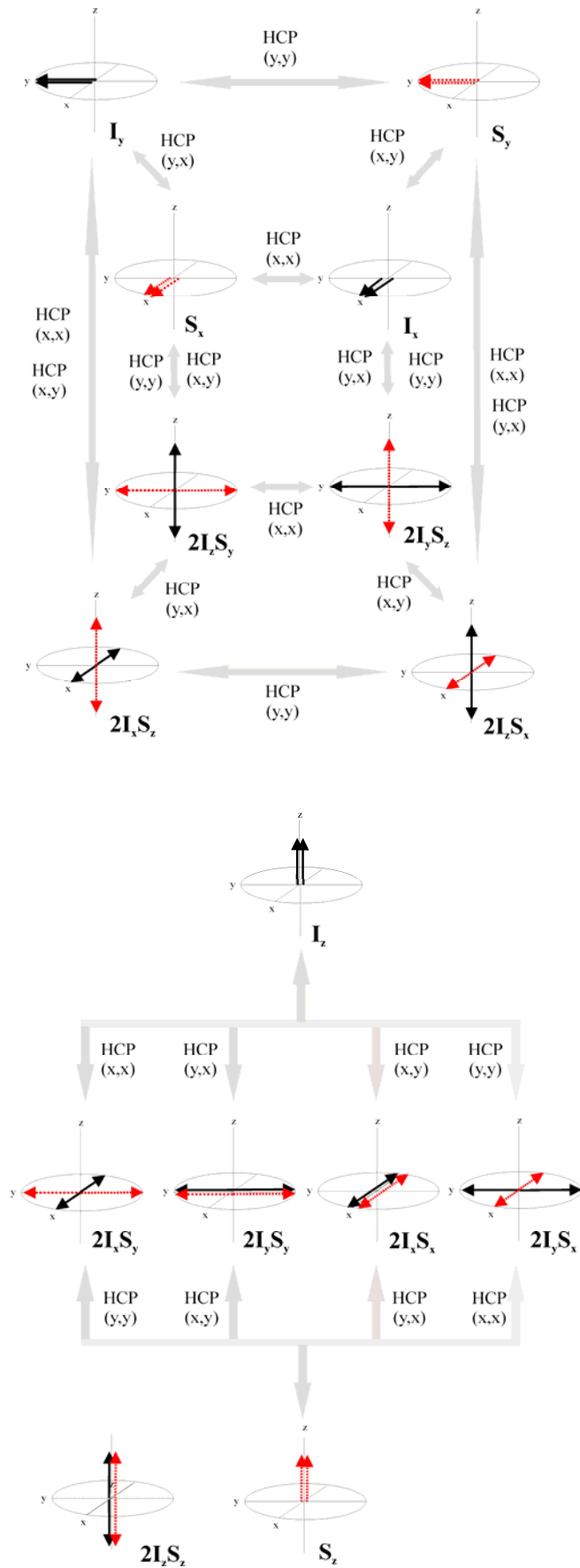


Figura 26. Esquema de l'efecte de l'aplicació de HCP( $\phi_1, \phi_2$ ) sobre un sistema feblement acoblat IS assumint que  $\tau = 1/J$ . S'ha utilitzat un sistema vectorial no clàssic per a la representació.

### 6.3.- Blocs de construcció

Un cop assentades les bases teòriques de la HCP en líquids es poden trobar els blocs de construcció de seqüències equivalents, tant de preparació com de mescla, als àmpliament coneguts utilitzant pulsos durs i períodes d'evolució. Aquests nous blocs de construcció (**Fig. 27**) ofereixen noves possibilitats a l'hora de dissenyar noves seqüències de pulsos aplicables en el camp de la RMN multidimensional tant de molècules petites i mitjanes com de grans biomolècules marcades isotòpicament.

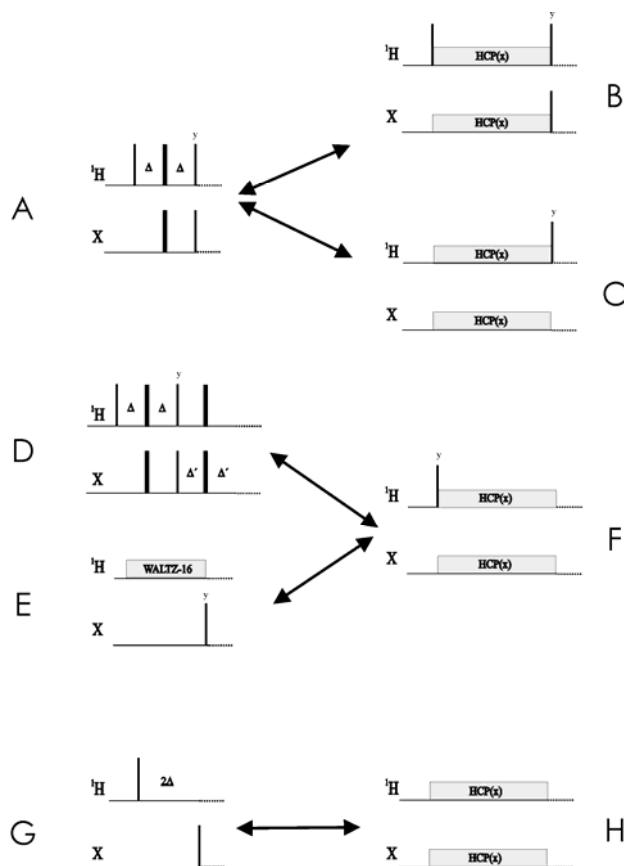


Figura 27. blocs de construcció de preparació utilitzats rutinàriament en experiments 2D (A, D, E i G) i els seus equivalents utilitzant HCP (B, C, F i H). Llegir text per detalls.

Actualment, el bloc de construcció més utilitzats per transferir la magnetització inicial  $I_z$  a magnetització transversa  $S$  es basa en el bloc INEPT (**Fig. 27-A**) que genera magnetització en antifase  $2I_zS_y$ . Altres blocs importants són el RINEPT (**Fig. 27-D**), el puls de  $90^\circ$   $S$  amb NOE previ (**Fig. 27-E**) que generen magnetització en fase  $S_y$ , i el bloc de la (**Fig. 27-G**) que genera magnetització multi-quàntica  $2I_xS_y$ . Els seus equivalents utilitzant HCP es poden dissenyar utilitzant les equacions presentades en l'apartat anterior. Per crear magnetització en antifase es poden dissenyar dues versions (**Fig. 27-B i 27-C**), equivalents a l'INEPT.

$$I_z \xrightarrow{90^\circ(I,x)} -I_y \xrightarrow{HCP_x(\tau=1/J)} 2I_xS_z \xrightarrow{90^\circ(I,y)-90^\circ(S,x)} 2I_zS_y$$

$$I_z \xrightarrow{HCP_x(\tau=1/J)} 2I_x S_y \xrightarrow{90^\circ(S,y)} 2I_z S_y$$

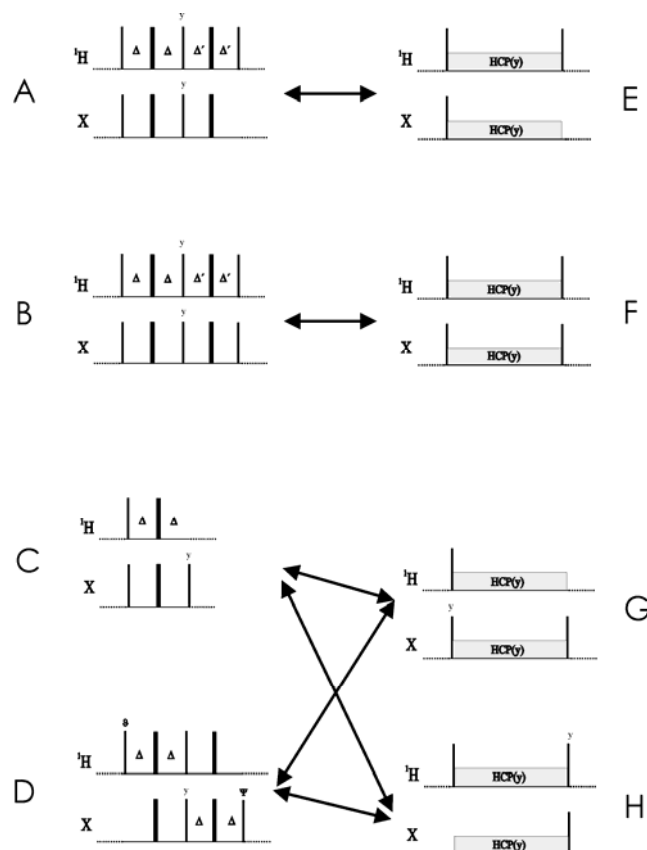
Cal esmentar, però, que aquests blocs són el doble de llargs que l'INEPT fet que pot ser un problema quan es treballa amb molècules que relaxin ràpidament. Per crear magnetització en fase s'apliquen *spin locks* paral·lels a la magnetització transversa  $I_x$  (**Fig. 27-F**):

$$I_z \xrightarrow{90^\circ(I,y)} I_x \xrightarrow{HCP_x(\tau=1/J)} S_x$$

Per crear magnetització múltiple quàntica es pot utilitzar el bloc HCP de la **Figura 27-H**. Aquest bloc té el principal avantatge que no utilitza cap puls dur en cap dels dos canals.

$$I_z \xrightarrow{HCP_x(\tau=1/J)} 2I_x S_y$$

De la mateixa manera es pot pensar en el disseny dels blocs de construcció de mescla més habituals (**Fig. 28**).



**Figura 28.** Blocs de construcció de mescla utilitzats rutinàriament en experiments 2D (A-D) i els seus equivalents utilitzant HCP (E-H). Llegir text per detalls.

Així el clàssic retroINEPT amb PEP (**Fig. 28-A**) que s'utilitza per a produir màxima transferència de magnetització antifase a en fase  $2I_z S^- \rightarrow I^-$  amb màxima sensibilitat i incorporat a moltes seqüències multidimensional amb desacoblament de protó durant  $t_1$ <sup>69</sup>, troba el seu equivalent en el bloc HCP de la **Figura 28-E**.

També el procés de transferència  $S^3CT$  tipus E.COSY (**Fig. 28-B**), també amb màxima sensibilitat, en experiments totalment acoblats a F1 i F2 té el seu anàleg utilitzant HCP (**Fig. 28-F**). El patró E.COSY resulta de la suma de la transferència anteriorment descrita  $2I_z S^- \rightarrow I^-$  i una recuperada transferència  $S^- \rightarrow 2I^- S_z$ . La versió "INEPT" ha estat àmpliament utilitzada per el grup de Kay<sup>70</sup> per observar el pic TROSY en grans biomolècules en condicions de relaxació òptimes.

En la **Figura 28-C** es mostra una versió reduïda del bloc presentat a la **Figura 28-A**, en aquesta el segon camí de transferència de coherència no evoluciona durant el segon retro-INEPT, donant lloc a una mescla final de magnetització de I en fase (IP) i en antifase (AP):  $2I_z S^- \rightarrow I^- \pm 2S_z I^-$  que ha de ser detectada sense desacoblament de S per tal d'obtenir el patró F2- $\alpha/\beta$  editat<sup>71</sup>. El seus equivalents utilitzant HCP són representats en la **Figura 28-G** i **28-H**.

En la **Figura 28-D** es mostra el bloc de mescla TROSY que aporta selecció d'estat de *spin* ( $S^3$ ) en ambdues dimensions en un experiment 2D de correlació totalment acoblat. Així, doncs, del típic patró amb quatre components d'un pic creuat d'un sistema IS només se'n selecciona un si s'utilitza el cicle de fases apropiat. L'experiment té el seus equivalents utilitzant HCP (**Fig. 28G** i **28H**).

Cal comentar que la descripció detallada de tots els blocs de mescla breument presentats aquí ja han estat prèviament descrits dintre del nostre grup d'investigació<sup>72</sup>.

## 6.4.- Avantatges i inconvenients de la HCP en líquids

El major inconvenient és la "poca" amplada de banda efectiva dels processos HCP utilitzant el tren de pulsos DIPSI-2. Això és un problema quan es treballa amb heteronuclis amb una ampla banda espectral com és el cas del <sup>13</sup>C. En el cas del <sup>15</sup>N quan es treballa amb proteïnes, l'amplada de banda és prou petita per produir la HCP eficientment. A la pràctica, camps de radiofreqüència efectius de 5.5 kHz (puls de 90° de 45µs) donen excel·lents resultats. Per augmentar l'amplada de banda es podrien aplicar camps de RF més intensos, però el problema és el notable escalfament de la mostra, sobretot quan es treballa amb mostres amb una elevada concentració salina.

<sup>69</sup> a) Kay, L.E.; Keifer, P.; Saarinen, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 10663. b) Schleucher, J.; Schwendinger, M.; Sattler, M.; Schmidt, P.; Schedletsky, O.; Glaser, S.J.; Sørensen, O.W.; Griesinger, C. *J. Biomol. NMR.*, **1994**, *4*, 301. c) Sattler, M.; Schmidt, P.; Schleucher, J.; Schedletsky, O.; Glaser, S.J.; Griesinger, C. *J. Magn. Reson. B.*, **1995**, *108*, 235. d) Untidt, T.; Schulte-Herbrüggen, T.; Luy, B.; Glaser, S.J.; Griesinger, C.; Sørensen, O.W.; Nielsen, N.C. *Mol. Phys.*, **1998**, *95*, 787.

<sup>70</sup> Yang, D.; Kay, L.E.; *J. Biomol. NMR.* **1999**, *13*, 3.

<sup>71</sup> Sørensen, M.; Meissner, A.; Sørensen, O.W.; *J. Biomol. NMR.* **1997**, *10*, 181.

<sup>72</sup> a) Parella, T.; Gairí, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9821. b) Parella, T. *J. Biomol. NMR.* **2004**, *29*, 37.

Un altre problema ve donat per la generació de transferència homonuclear (TOCSY) durant el procés de HCP. Encara que la pèrdua de magnetització és mínima en el cas de treballar amb els protons de proteïnes units a  $^{15}\text{N}$ , pot ser més complicat separar ambdues contribucions en el cas de treballar amb protons units a  $^{13}\text{C}$ . No obstant, la presència dels dos mecanismes (transferència homo- i heteronuclear) pot ser útil en algunes aplicacions, com per exemple, en experiments HCP-TOCSY per a la mesura de constants d'acoblament heteronuclears a llarga distància a abundància natural<sup>73</sup>.

Cal comentar que els experiments basats en el INEPT convencional presenten diferents avantatges sobre els experiments que utilitzen HCP, bàsicament perquè han estat modificats durant les últimes dècades amb elements molt útils com ara, gradients de purga, supressió de dissolvent efectiva (WATERGATE i tècniques *water flip-back*), pulsos *trim* o pulsos de inversió/reenfoc adiabàtics que permeten obtenir espectres d'alta qualitat mantenint una òptima sensibilitat. A més, els períodes de lliure evolució permeten el marcatge de freqüència del nucli durant el procés de transferència i també concatenar diferents mecanismes de transferència, tal com es troba en els períodes *constant-time* o en períodes d'evolució simultània de dos nuclis.

Els experiments HCP també tenen avantatges interessants, com s'ha comentat en l'apartat introductori 6.1. La HCP basada en CW pot ser considerada superior a la clàssica excitació selectiva heteronuclear basada en pulsos de protó o carboni selectius. D'altres avantatges són la seva aplicabilitat en diferents sistemes de *spin*  $I_nS$  simultàniament, o el seu ús per a produir excitació selectiva de banda ampla, útil per evitar el problema del doblegament espectral (*foldings*) que presenten els experiments multidimensionals.

Degut a que el bescanvi químic contribueix a la relaxació transversal aportant una important pèrdua de sensibilitat i un eixamplament de l'amplada de línia, els experiments de transferència de coherència basats en l'aplicació de HCP poden ser d'elevat interès per preservar l'estat de *spin* en presència d'intercanvi químic. És ben conegut que la magnetització fixada amb *spin-lock* decau més lentament que la que precessa lliurement en el pla transversal, com es troba en les seqüències convencionals basades en els períodes INEPT. Les eficiències de la transferència de coherència per experiments comuns de correlació  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  han estat estudiats en funció de processos de relaxació<sup>74</sup> i bescanvi químic<sup>75</sup>. Per exemple, la completa caracterització de processos d'intercanvi químic dels NH en proteïnes, i la completa correlació  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  en àcids nucleics per estudiar-ne la conformació requereixen d'experiments basats en el tren de pulsos CPMG<sup>76</sup>.

<sup>73</sup> Parella, T.; Belloc, J.; Sánchez-Ferrando, F. *Magn. Reson. Chem.*, 2004, 42, 852.

<sup>74</sup> Levitt, M.H. *J. Chem. Phys.* 1991, 94, 30.

<sup>75</sup> a) Krishnan, V.V.; Rance, M. *J. Magn. Reson. A.*, 1995, 116, 97. b) Zangger, K.; Armitage, I.M. *J. Magn. Reson.* 1998, 135, 70.

c) Allard, P.; Helgstrand, M.; Hard, T. *J. Magn. Reson.* 1998, 134, 7. d) Helgstrand, M.; Härd, T.; Allard, P. *J. Biomol. NMR.* 2000, 18, 49.

<sup>76</sup> a) Mulder, F.; Spronk, C.; Slijper, M.; Kaptein, R.; Boelens, R. *J. Biomol. NMR.* 1996, 8, 223. b) Mueller, L.; Legault, P.; Pardi, A. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 11043. c) Loria, J.P.; Rance, M.; Palmer, A.G. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 121, 2331. d) Korzhnev, D.; Orekhov, V.; Dahlquist, F.; Kay, L. *J. Biomol. NMR.* 2002, 26, 39.





## 7.- Metodologies per a la mesura de constants d'acoblament

### 7.1.- Introducció: J com a paràmetre per a l'elucidació estructural

L'acoblament escalar J és conseqüència de la interacció entre *spins* (nuclis magnèticament actius,  $I \neq 0$ ). La polarització del *spin* d'un àtom afecta els electrons propers polaritzant-los. La polarització dels electrons produeix un canvi en el camp magnètic que és notat pel *spin* acoblat i es manifesta en els espectres produint el desdoblament dels senyals, donant lloc al que s'anomenen multiplets. El valor de J ve donat per la separació entre les línies desdobrades, i s'acostuma a expressar en unitats de Hz. La nomenclatura que s'utilitza per a la descripció d'un acoblament entre dos *spins* A i B separats per "n" enllaços químics és la següent:  ${}^nJ_{AB}$ .

Una altra manera d'entendre com es generen aquests multiplets és pensant en termes d'estats de *spin*. Per exemple, quan tenim un *spin* A acoblat a un *spin* B, s'observarà un desdoblament del senyal a la freqüència de ressonància del *spin* A, anomenat *doblet*, i que ve originat pel fet que el *spin* B es pot trobar en un estat de *spin*  $\alpha$  o en un estat de *spin*  $\beta$ . De la mateixa manera, podem raonar que un *spin* A acoblat a tres *spins* B presenti la multiplicitat de quartet amb intensitats 1:3:3:1 (veure **Fig. 29**). Existeixen, doncs, diferents multiplicitats, *doblets*, *triplets*, *quadruplets*, *dobles doblets*... la generació de les quals ve donada pel subsistema de *spins* on es trobi el *spin* que s'observi.

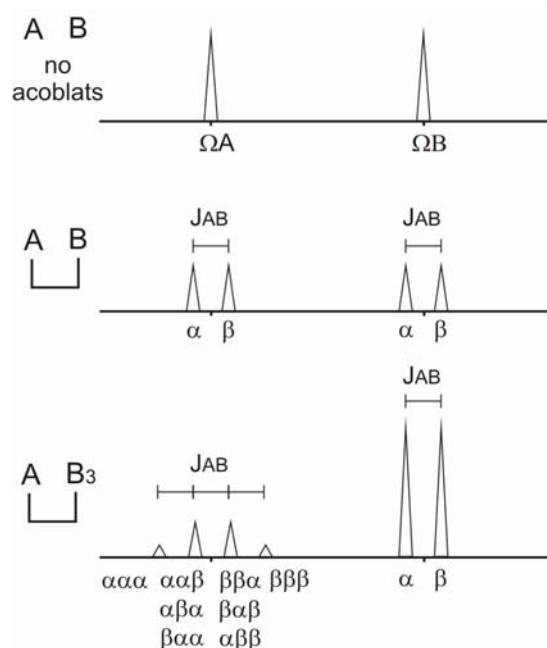


Figura 29: Representació esquemàtica de la dependència de la multiplicitat amb el sistema de *spins*.

Així, doncs, la presència d'aquests acoblaments J ens indica connectivitat entre nuclis a través dels enllaços, tenint present que rarament es troben constants d'acoblament més enllà de quatre enllaço. Nogensmenys important és determinar la magnitud d'aquests acoblaments, doncs, des dels inicis de la RMN amb els famosos treballs de Karplus<sup>77</sup>, és conegut que els valors de les constants d'acoblament  $^3J$  són sensibles a la distribució electrònica dels enllaços que hi intervenen, conseqüentment aquests valors de  $^3J$  es poden relacionar amb valors d'angles dièdres, donant una valuosa informació conformacional. Més tard, el treball de Bystrov<sup>78</sup> amb l'ajuda de càlculs *ab initio* va refinar la parametrització de les corbes de Karplus. No només els químics orgànics es beneficien d'aquestes corbes, també els bioquímics, doncs, la quantitat d'informació tant cristal·logràfica com obtinguda per RMN fan que per cada angle dièdre, tant de proteïnes com d'àcids nucleics, s'hagi parametritzat la seva pròpia "corba de Karplus", que sens dubte tenen un enorme valor a l'hora de realitzar el refinament d'aquest tipus d'estructures<sup>79</sup>. Per exemple, la mesura de la constant d'acoblament entre el  $H_\alpha$  i el  $H_N$  en un residu proteic ens pot indicar si aquest es troba en una regió  $\alpha$ -hèlix o en una fulla  $\beta$ <sup>80</sup>.

M'agradaria emfatitzar que camps de recerca com són: el desenvolupament de noves metodologies per a la mesura de constants d'acoblament, el refinament de corbes de Karplus o l'ús d'aquestes constants per estudiar aspectes conformacionals de compostos orgànics, tot i que a priori, podrien semblar actualment àrees de recerca no innovadores, obsoletes o amb poc interès, no és així, com així ho demostren articles publicats recentment en revistes amb alt índex d'impacte en el món de la química<sup>81</sup>.

Fins ara només s'ha parlat de la utilitat que té conèixer la constant d'acoblament a tres enllaços degut a la seva relació directa amb l'angle dièdre. Cal comentar que tot i que les constants geminals  $^2J_{CH}$  no tenen una relació directa evident amb cap paràmetre estructural, alguns grups d'investigació n'han trobat la seva utilitat, per exemple, per a la diferenciació de residus aldohexapiranosil<sup>82</sup>, establir l'esteroquímica relativa entre dos centres asimètrics si entre aquests hi ha un metí quiral o un metilè amb protons diastereotòpics resoluble<sup>83</sup>, o simplement com a suport per a l'elucidació estructural<sup>84</sup>. Pel que fa les constants d'acoblament directes o a un enllaço, si bé tradicionalment la seva determinació no havia tingut gran importància com a paràmetre estructural, avui dia tenen un valor excepcional quan es treballa en medis anisotròpics, on la separació en els múltiples és causa de la suma entre els

<sup>77</sup> a) Karplus, M. *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11. b) Karplus, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870.

<sup>78</sup> Bystrov, V.F. *Prog. NMR Spectrosc.* **1976**, *10*, 41.

<sup>79</sup> a) Vuister, G.W.; Bax, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7772. b) Wang, A.C.; Bax, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1810. c) Wang, A.C.; Bax, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2483. d) Hu, J.; Bax, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6360.

<sup>80</sup> Wüthrich, K. "NMR of Proteins and Nucleic Acids" **1986**, Wiley, New York, p.177.

<sup>81</sup> a) Fohrer, J.; Reinscheid, U.; Hennig, M.; Carlomagno, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7033. b) Sonntag, L.; Schweizer, S.; Oschenfeld, C.; Wennemers, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14697. c) Schmidt, J.; *J. Magn. Reson.* **2007**, *186*, 34.

<sup>82</sup> Oikawa, M.; Adachi, S.; Shoichi, K. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 661.

<sup>83</sup> Matsumori, M.; Kaneno, D.; Murata, M.; Nakamura, H.; Tachibana, K.J. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 866.

<sup>84</sup> a) Bassarello, C.; Bifulco, G.; Zampella, A.; D'Auria, M.V.; Riccio, R.; Gomez-Paloma, L. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *1*, 39. b) Kan, Y.; Sakamoto, B.; Fujita, T.; Nagai, H.; *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1599. c) Davis, A.L.; Keeler, J.; Laue, E.D.; Moskau, D. *J. Magn. Reson.* **1992**, *98*, 207. d) Ciminello, P.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Di Rosa, M.; Ianaro, A. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 578.

acoblaments escalars i els acoblaments dipolar residuals<sup>85</sup> (J+D), doncs, la seva mesura proporciona informació sobre l'orientació relativa entre, per exemple, dos enllaços NH de diferents residus en una proteïna, tot i que aquests estiguin llunyans en l'espai.

És fàcil d'entendre que a mesura que augmenta el tamany de les molècules, degut a solapament de senyals i/o multiplicitats difícils d'interpretar, els valors de les constants d'acoblament no es poden extreure fàcilment a partir dels espectres rutinaris mono- i bidimensionals i calen metodologies (seqüències de pulsos) que manipulin la magnetització de tal manera que a l'espectre final aquestes constants d'acoblament siguin fàcilment mesurables. No és la intenció d'aquest capítol anomenar tots els mètodes i aplicacions descrites a la bibliografia per a la mesura de constants d'acoblament, doncs, hi ha molt bons articles de revisió<sup>86</sup> que ja ho fan, però si, fer-ne una classificació molt bàsica i general segons com s'efectua la mesura de la constant d'acoblament. Així, doncs, podem trobar metodologies que es basen en la determinació d'una diferència de freqüències (on s'inclouen les metodologies *Spin State Selective S<sup>3</sup>*, E.COSY, ZQDQ i dels experiments 2D-Jres) i els que es basen en una mesura de la intensitat del senyal o mètodes J quantitius. A continuació s'exposa una mínima base teòrica i es descriuen els avantatges i inconvenients de les diferents metodologies. Cal comentar que, normalment, les mateixes metodologies poden ser aplicades per a la mesura d'acoblaments residuals dipolars i acoblaments a través d'enllaços d'hidrogen.

## 7.2.- Experiments 2D J-resolt

Una de les maneres més simples d'obtenir la mesura dels acoblaments és l'enregistrament d'un espectre bidimensional 2D J-resolt en el qual durant el període d'evolució variable es deixa evolucionar l'acoblament desitjat mentre es reenfoca el desplaçament químic. Aquest tipus d'experiment permet la mesura de la constant d'acoblament a la dimensió indirecte amb molta precisió, doncs, la resolució espectral que es pot aconseguir és molt elevada degut a que la finestra d'enregistrament de la dimensió indirecta es pot ajustar a uns pocs Hz.

Sens dubte, el gran problema que pateixen aquestes metodologies és l'elevat nombre de solapament de senyals degut a que no hi ha evolució del desplaçament químic en la dimensió indirecte. El problema queda resolt quan la dimensió d'adquisició correspon a un nucli amb una àmplia dispersió del senyal com pot ser el <sup>13</sup>C, però llavors el factor limitant passa a ser la sensibilitat. Un altre inconvenient sorgeix quan la constant d'acoblament d'interès és petita comparada amb l'amplada de línia. Aquest fet es pot provar de resoldre introduint algun filtre S<sup>3</sup>.

<sup>85</sup> a) Saupe, A.; Englert, G. *Phys. Rev. Lett.* **1963**, *11*, 462. b) Tolman, J.R.; Flanagan, J.M.; Kennedy, M.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1995**, *92*, 9279. c) Tjandra, N.; Bax, A. *Science*, **1997**, *278*, 1111.

<sup>86</sup> a) Eberstadt, M. Gemmecker, G.; Miere, D.; Kessler, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1671. b) Vuister, G.W.; Tessari, M.; Karimi-Nejad, Y.; Whitehead, B. *Biological Magnetic Resonance 16. "Modern Techniques in protein NMR"*, **1998**, Kluwer Academic/Plenum Publishers. c) Griesinger, C.; Henning, M.; Marino, J.P.; Reif, B.; Richter, C.; Schalbe, H. *Biological Magnetic Resonance 16. "Modern Techniques in protein NMR"*, **1998**, Kluwer Academic/Plenum Publishers, p259-367. d) Marquez, B.L.; Gerwick, W.H.; Williamson, R.T. *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39*, 499.

A la **Figura 30** es mostra a tall d'exemple un espectre HSQC-Jres que permet mesurar les constants d'acoblament  $^1J_{CH}$ . Cal remarcar la gran precisió aconseguida en la mesura, ja que, la finestra de la dimensió indirecta és molt petita (300Hz).

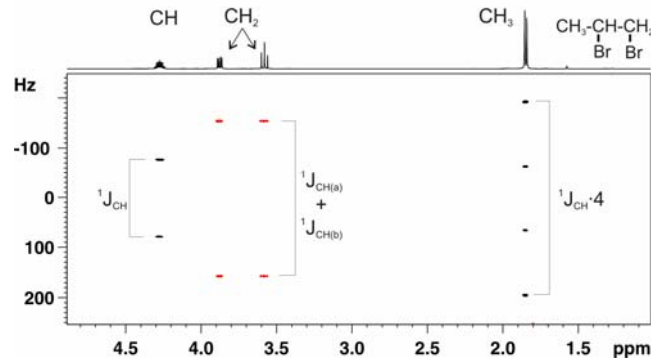


Figura 30: Espectre Jres heteronuclear del 1,2-dibromopropà d'un experiment que permet la mesura de  $^1J_{CH}$ .

### 7.3.- Experiments d'estat de *spin* selectiu ( $S^3$ )

Una de les metodologies més emprades i més general per a l'extracció de constants d'acoblament és mitjançant l'adquisició d'experiments 2D de correlació heteronuclear sense desacoblament en alguna de les dimensions, o en les dues. Hi ha diverses raons per les quals és desitjable tenir una correlació heteronuclear d'on extreure les constants d'acoblament: la gran dispersió de la dimensió de l'heteronucli comparada amb la de  $^1H$ , l'absència de pics diagonals i la possibilitat d'utilitzar els ecos de transferència de coherència amb combinació amb gradients per a la supressió d'artefactes.

A la **Figura 31** es mostra l'esquema general d'aquest tipus d'experiments. Inicialment hi ha un període de preparació on la magnetització es transfereix des del  $^1H$  a l'heteronucli X. Aquest es deixa evolucionar sota l'efecte del desplaçament químic durant un període de temps variable  $t_1$  i es codifica amb el gradient de camp magnètic G1 (opcionalment podem deixar evolucionar també l'acoblament heteronuclear ometent el puls de  $180^\circ$  de  $^1H$ ). A continuació segueix un període de mescla en el qual la magnetització retorna de l'heteronucli al  $^1H$ , finalment la magnetització és descodificada amb el gradient G2 i adquirida, amb o sense desacoblament.

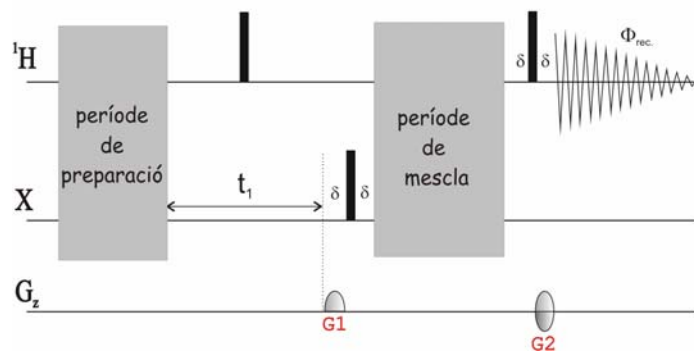


Figura 31: Esquema general d'un experiment de correlació heteronuclear bidimensional sense desacoblament de X durant l'adquisició. Opcionalment es pot desacoblar  $^1J_{XH}$  durant el període variable  $t_1$  ometent el puls de  $180^\circ$ .

Un problema obvi de la metodologia és que el desdoblament dels pics creuats en la dimensió on no es desacobla augmenta el nombre de possibilitats de trobar problemes de solapament entre senyals. Els mètodes d'estat selectiu de *spin* ( $S^3$ ) resolen el problema editant els estats  $\alpha$  i  $\beta$  del múltiplet en subespectres, tal com es representa a la **Figura 32**. Els diferents tipus d'editat reben un nom característic. Així, quan s'obté un experiment amb desacoblament a la dimensió indirecta i l'editat es produeix a la dimensió d'adquisició, es parla d'editat F2- $\alpha,\beta$ . Si no desacoblem en cap de les dues dimensions i només es seleccionen els pics diagonals del quartet es parla del patró E.COSY, el nom sorgeix per analogia al tipus de patró obtingut en l'experiment homonuclear *Exclusive* COSY (veure punt 7.4). D'altra banda, si es selecciona exclusivament un dels quatre pics del múltiplet es parla del patró TROSY. Finalment si l'editat s'obté a la dimensió indirecte i desacoblant durant l'adquisició, es parla del patró F1- $\alpha,\beta$ .

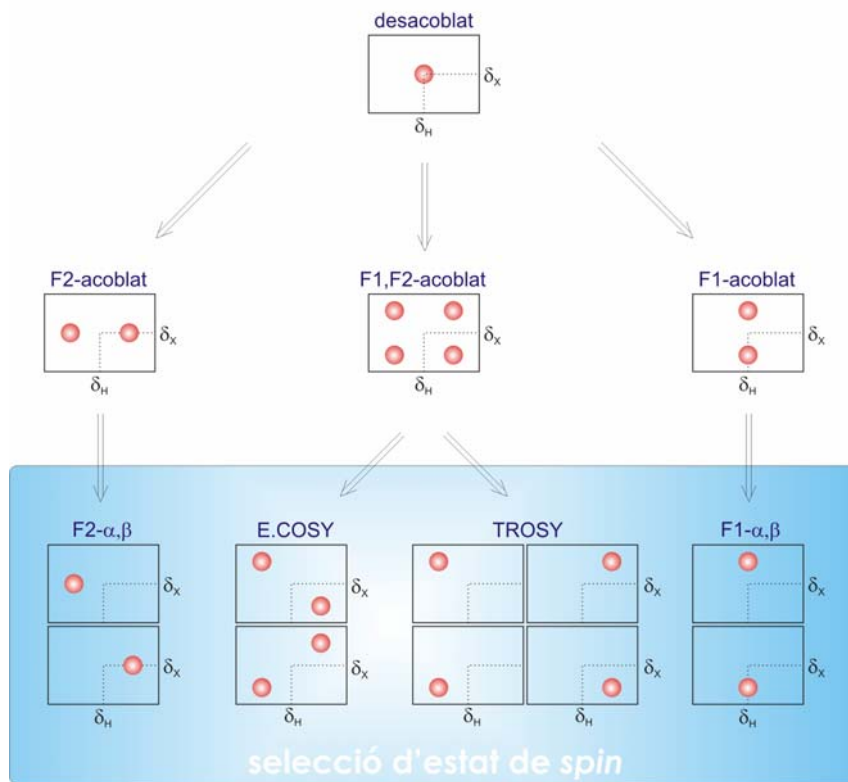


Figura 32: Topologies per a la selecció d'estat de spin  $S^3$  en experiments 2D per a sistemes de *spin* IS.

Els estats de *spin* en termes d'operadors producte es defineixen com la suma o diferència de magnetització en fase (IP) i magnetització antifase (AP):

$$2I^-S^\alpha = I^- + 2I^-S_z$$

$$2I^-S^\beta = I^- - 2I^-S_z$$

En termes d'operadors producte, la transferència de coherència que produeix cada una de les diferents topologies es descriu a la **Figura 33**:


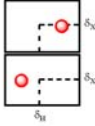
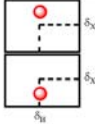
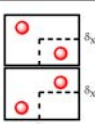
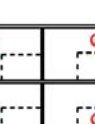
Coherence-Order Transfer Pathway	Type of Transfer Mechanism	Coupling Topology
$2S^-I_z \rightarrow I^-$	AI-COS	
$2S^-I_z \rightarrow 2S^\alpha I^-$ $2S^-I_z \rightarrow 2S^\beta I^-$	AS <sup>3</sup> -COS	
$2S^-I^\alpha \rightarrow I^-$ $2S^-I^\beta \rightarrow I^-$	S <sup>3</sup> I-COS	
$2S^-I^\alpha \rightarrow 2S^\alpha I^-$ & $2S^-I^\beta \rightarrow 2S^\beta I^-$	S <sup>3</sup> S <sup>3</sup> -COS	
$2S^-I^\alpha \rightarrow 2S^\beta I^-$ & $2S^-I^\beta \rightarrow 2S^\alpha I^-$	S <sup>3</sup> S <sup>3</sup> -COS	

Figura 33: Operadors producte que descriuen la transferència de magnetització que genera les diferents topologies S<sup>3</sup> en experiments bidimensionals per a un sistema de *spins* IS.

A continuació (Fig. 34) es mostren les esmentades topologies en experiments reals:

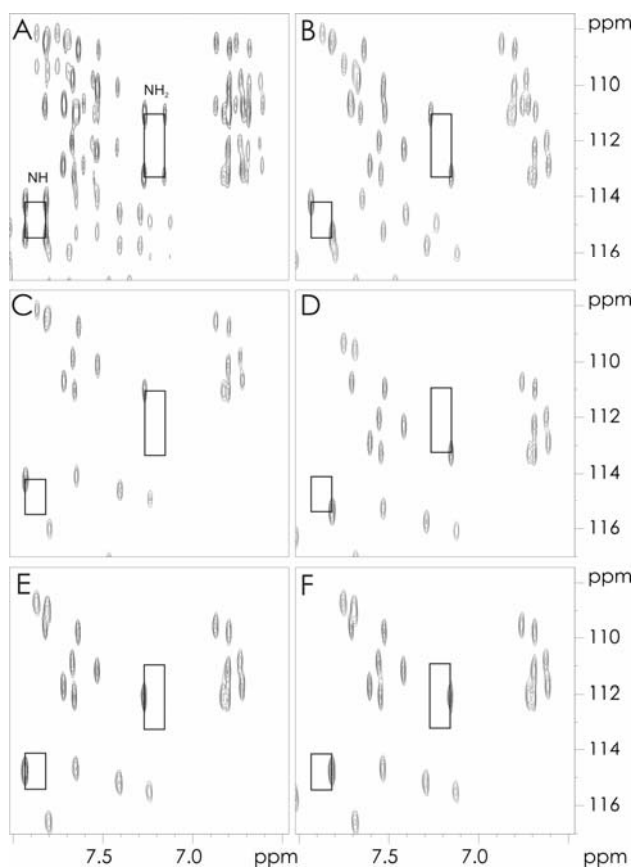
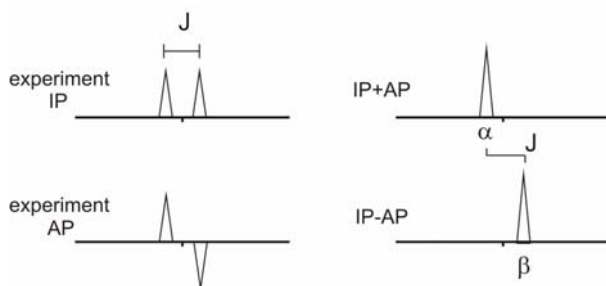


Figura 34: Topologies S<sup>3</sup> en experiments 2D de correlació directa <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N per a una mostra d'ubiquitina 1mM (800MHz). A) Totalment acoblat. B) E.COSY. C) antiTROSY. D) TROSY. E) F2- $\alpha$  F) F2- $\beta$ . Figura extreta de: Parella, T.; Gairí, M. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 9821.

Bàsicament hi ha dues estratègies per aconseguir la selecció d'estat de *spin*:

(i) Metodologia IPAP (In Phase Anti Phase).

Aquesta metodologia requereix l'enregistrament de dos experiments, un amb el doblet en fase (IP) i l'altre amb el doblet en antifase (AP). L'addició i diferència dels dos experiments en l'etapa de processament resulta en l'obtenció de dos subespectres amb les components  $\alpha$  i  $\beta$  del doblet separades (**Figura 35**).



**Figura 35:** Representació esquemàtica de la metodologia IPAP per a l'obtenció d'espectres amb selecció d'estat de *spin* ( $S^3$ ).

(ii) Transferència de coherència restringida.

Aquesta metodologia consisteix en el disseny d'esquemes de pulsos que produeixin la transferència de coherència entre nuclis, a l'hora que es du a terme la selecció d'estat de *spin* seleccionant simultàniament coherències IP i AP, just abans de l'adquisició.

Trobem diferents exemples a la bibliografia d'esquemes que generen  $S^3$  utilitzant la metodologia IPAP o bé restringint la transferència de coherència. No és la intenció explicar, en aquestes línies, el funcionament detallat de cada una d'aquestes aparicions, però sí, anomenar-les amb un cert ordre cronològic. Les primeres metodologies que generaven  $S^3$  utilitzaven pulsos selectius<sup>87</sup>. Si bé l'any 1996 van sorgir diferents treballs on s'aconseguia  $S^3$  de forma general utilitzant pulsos durs<sup>88</sup>. Posteriorment, i fins avui dia, no han parat d'aparèixer noves seqüències de pulsos i estratègies que van millorant les prèvies, moltes d'elles basades en seqüències de pulsos HSQC<sup>89</sup>. Avui dia, doncs, es disposa d'esquemes que generen l'editat a  $F_2$ <sup>90</sup> (HSQC- $\alpha,\beta$ ), d'altres que generen l'editat a  $F_1$ <sup>91</sup> ( $\alpha,\beta$ -HSQC), aquests amb la major avantatge que no hi ha l'evolució dels acoblaments  $J_{HH}$  en la dimensió de mesura  $F_1$  i que per a grans biomolècules, a vegades, la relaxació transversal durant la dimensió indirecta no és tant crítica com en la d'adquisició ( $^1H$ ). Però sens dubte, les seqüències de pulsos que han trobat

<sup>87</sup> a) Nuzillard, J. M.; Bernassau, J.M. *J. Magn. Reson. B.* **1994**, *103*, 284. b) Fukushi, E.; Kawata, J. *J. Magn. Reson. A.* **1994**, *108*, 103. c) Fäcke, T. Berger, S. *J. Magn. Reson. A.* **1996**, *119*, 260.

<sup>88</sup> a) Nielsen, N.C.; Thøgersen, H.; Sørensen, O.W. *J. Chem. Phys.* **1996**, *105*, 3962. b) Nielsen, N.C.; Thøgersen, H.; Sørensen, O.W. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *117*, 11365. c) Ross, A.; Czych, M.; Holak, T.A. *J. Magn. Reson. A.* **1996**, *118*, 221. d) Sattler, M.; Schleucher, J.; Schedletsky, O.; Glaser, S.; Griesinger, C.; Nielsen, N.C.; Sørensen, O.W. *J. Magn. Reson. A.* **1996**, *119*, 171.

<sup>89</sup> Bodenhausen, G.; Ruben, D.J.; *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *69*, 185.

<sup>90</sup> a) Sørensen, M.D.; Meissner, A.; Sørensen, O.W. *J. Biomol. NMR.* **1997**, *10*, 181. b) Sørensen, M.D.; Meissner, A.; Sørensen, O.W. *J. Magn. Reson.* **1999**, *137*, 237. c) Kozmiski, W. *J. Magn. Reson.* **1999**, *137*, 408. d)

<sup>91</sup> a) Ottiger, M.; Delaglio, F.; Bax, A.; *J. Magn. Reson.* **1998**, *131*, 373. b) Andersson, P.; Weigelt, J.; Otting, G. *J. Biomol. NMR.* **1998**, *12*, 435.



més utilitat són les que aconseguen l'editat en ambdues dimensions<sup>92</sup> ( $\alpha,\beta$ -HSQC- $\alpha,\beta$ ), o altrament anomenat editat TROSY, doncs, aquestes permeten seleccionar la component del quartet que relaxa més lentament. Aquest tipus d'editat és utilitzat rutinàriament en les seqüències de pulsos per a la caracterització estructural i/o estudis dinàmics quan es treballa amb grans biomolècules en aparells d'alt camp.

Tota metodologia té avantatges i inconvenients. El problema general de les metodologies S<sup>3</sup> rau en trobar seqüències de pulsos que produeixin la mateixa intensitat de magnetització IP i AP, doncs, si això no és així, al processar aquestes diferències d'intensitat es tradueixen en l'obtenció incompleta de la selecció d'estat de *spin*. Aquest fenomen s'anomena *cross talk*. Les fonts de *cross talk* són el *J-mismatch*, els efectes fora de ressonància (*off-resonance*) i la diferent relaxació que es pot trobar entre els diferents camins de transferència de coherència que condueixen a les magnetitzacions finals IP i AP. Un altre problema important és que moltes d'aquestes metodologies no funcionen per a totes les multiplicitats al mateix temps, requerint l'optimització de les seqüències per a cada tipus de multiplicitat. Així, doncs, trobem seqüències de pulsos especialment dissenyades per a l'editat de sistemes de *spins* I<sub>2</sub>S<sup>93</sup> i I<sub>3</sub>S<sup>94</sup>. A la publicació IV de la present memòria es proposa una metodologia que permet l'editat simultani per sistemes de *spin* IS, I<sub>2</sub>S i I<sub>3</sub>S.

## 7.4.- Experiments E.COSY

El tipus de patró que s'obté utilitzant experiments del tipus E.COSY s'ha vist en l'apartat anterior, però no s'ha entrat en detall de com es genera o com es poden mesurar les J quan tenim aquest tipus de topologia. Donat que aquesta metodologia s'utilitza al llarg de la tesi (*publicacions II i III*) s'ha trobat convenient expandir-se en aquest tòpic.

L'experiment E.COSY va ser proposat, 20 anys enrere, per a l'extracció de constants d'acoblament homonuclears<sup>95</sup>. La metodologia no ha estat àmpliament utilitzada per al cas heteronuclear fins a l'aparició de la possibilitat de treballar amb molècules isotòpicament marcades amb <sup>15</sup>N o <sup>13</sup>C. Per exemple, amb l'experiment HNCA-E.COSY per a la mesura de la constant d'acoblament <sup>3</sup>J<sup>H<sup>N</sup>H<sup>α</sup></sup> en proteïnes<sup>96</sup> i d'altres<sup>97</sup>.

<sup>92</sup> a) Pervushin, K.; Riek, R.; Wider, G.; Wüthrich, K. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94*, 12366. b) Meissner, A.; Schulte-Herbrüggen, T.; Sørensen, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7989. c) Schulte-Herbrüggen, T.; Sørensen, O.W. *J. Magn. Reson.* **2000**, *144*, 123. d) Andersson, P.; Annala, A.; Otting, G. *J. Magn. Reson.* **1998**, *133*, 364 e) Czisch, M.; Boelens, R.; *J. Magn. Reson.* **1998**, *134*, 158.

<sup>93</sup> a) Carlomagno, T.; Schwalbe, H.; Rexroth, A.; Sørensen, O.W.; Griesinger, C. *J. Magn. Reson.* **1998**, *135*, 216. b) Ottiger, M.; Delaglio, F.; Marquardt, J.; Tjandra, N.; Bax, A. *J. Magn. Reson.* **1998**, *134*, 365.

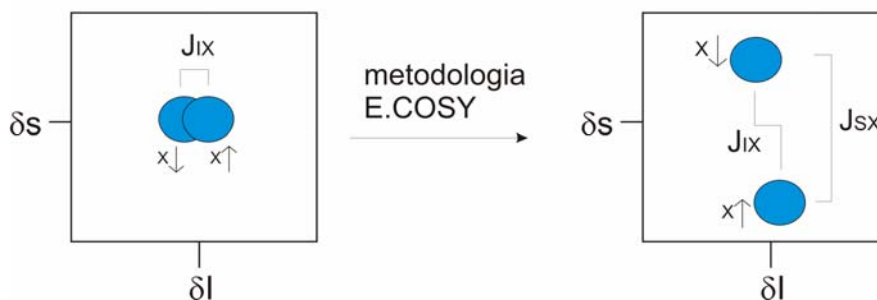
<sup>94</sup> a) Pervushin, K.; Vögeli, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9566. b) Dahlquist, F.W.; Hamel, D.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9676.

<sup>95</sup> a) Griesinger, C.; Sørensen, O.W.; Ernst, R.R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 6394. b) Griesinger, C.; Sørensen, O.W.; Ernst, R.R.; *J. Chem. Phys.* **1986**, *85*, 6837. c) Griesinger, C.; Sørensen, O.W.; Ernst, R.R.; *J. Magn. Reson.* **1987**, *75*, 474.

<sup>96</sup> a) Schmieder, P.; Thanabal, V.; McIntosh, L.P.; Dahlquist, F.W.; Wagner, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6323. b) Seip, S.; Balbach, J.; Kessler, H.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 1609. c) Seip, S.; Balbach, J.; Kessler, H.; *J. Magn. Reson. B.* **1994**, *104*, 172. d) Madsen, J.C.; Sørensen, O.W.; Sørensen, P.; Poulsen, F.M. *J. Biomol. NMR.* **1993**, *3*, 239.

<sup>97</sup> a) Montelione, G.T.; Winkler, M.E.; Rauenbuehler, P.; Wagner, G. *J. Biomol. NMR.* **1989**, *82*, 198. b) Wider, G.; Neri, D.; Otting, G.; Wüthrich, K. *J. Magn. Reson.* **1989**, *85*, 426. c) Sørensen, O.W. *J. Magn. Reson.* **1990**, *90*, 433. d) Delaglio, F.; Torchia, D.A.; Bax, A. *J. Biomol. NMR.* **1991**, *1*, 439. e) Gemmecker, G.; Fesik, S.W. *J. Magn. Reson.* **1991**, *95*, 208. f) Vuister, G.W.; Bax, A.; *J. Biomol. NMR.* **1992**, *2*, 401. g) Emerson, S.D.; Montelione, G.T.; *J. Magn. Reson.* **1992**, *99*, 413. h) Eggenberger, U.; Karimi-

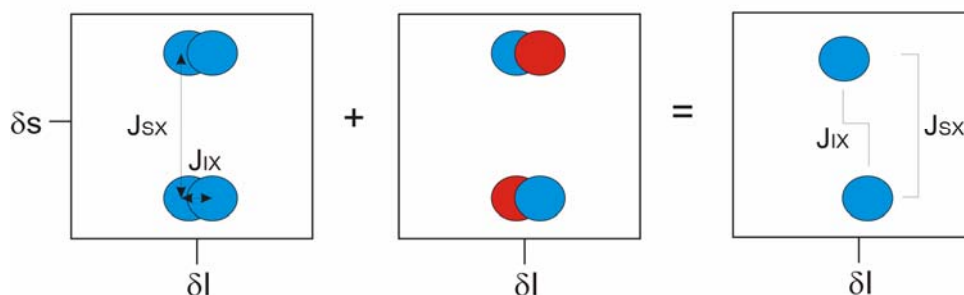
La metodologia E.COSY permet la mesura d'acoblements no resolts entre *spins* I i X ( $J_{IX}$ ), si el *spin* X a l'hora s'acobra amb un tercer *spin* S amb una constant d'acoblament elevada ( $J_{SX}$ ). Aquest acoblament gran permet la resolució de l'acoblament desitjat no resolts. Com a requisit fonamental per a l'obtenció del patró E.COSY és necessari que durant la transferència de magnetització entre el *spin* I i S no és destorbi l'estat de *spin* de X. El funcionament de la metodologia es pot veure esquematitzat a la **Figura 36**:



**Figura 36:** Representació esquemàtica de la metodologia E.COSY per a la mesura de constants d'acoblament. Interacció  $J_{SX}$  activa durant  $t_1$  i  $J_{IX}$  activa durant  $t_2$ , assumint que la transferència de magnetització de I a S no ha destorbat l'estat de spin de X.

Cal destacar que amb aquesta metodologia es poden mesurar constants d'acoblament amb una elevada precisió, inclús, més petites que l'amplada de banda de les pròpies senyals. I que també permet determinar el signe relatiu entre els acoblaments tenint en compte el pendent del patró E.COSY.

L'explicació formal de l'origen del patró E.COSY pot ser descrita utilitzant operadors producte, però aquí s'obviarà. El resultat és que el patró E.COSY resulta de l'addició d'un doble multiplet en fase i un doble multiplet en antifase, tal com s'esquematitza a la **Figura 37**:



**Figura 37:** Representació esquemàtica de la metodologia E.COSY generat a partir de la superposició d'un doble multiplet en fase i un doble multiplet en antifase.

Nejad, Y.; Thüning, H.; Rüterjans, H.; Griesinger, C.; *J. Biomol. NMR.* **1992**, *2*, 583. i) Griesinger, C.; Eggenberger, U.; *J. Magn. Reson.* **1992**, *97*, 426. j) Weisemann, R.; Löhr, F.; Rüterjans, H.; Schleuer, J.; Bermel, W.; Griesinger, C. *J. Biomol. NMR.* **1994**, *4*, 231. k) Wang, A.C.; Bax, A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1810. l) Wang, A.C.; Bax, A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2483. m) Löhr, F.; Rüterjans, H. *J. Biomol. NMR.* **1995**, *5*, 25. n) Löhr, F.; Rüterjans, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1468. o) Löhr, F.; Blumel, M.; Schmidt, J.; Rüterjans, H. *J. Biomol. NMR.* **1997**, *10*, 107. p) Löhr, F.; Rüterjans, H. *J. Biomol. NMR.* **1999**, *13*, 263.

Bàsicament ens podem trobar en tres situacions pel que fa la naturalesa dels *spins*:

(i) El *spin* X sigui heteronuclear respecte I i S. Aquest és el cas més senzill per a l'obtenció del patró E.COSY, ja que el *spin* X romandrà inalterat sinó apliquem cap puls sobre ell.

(ii) El cas on X és homonuclear respecte I i S. En aquest cas una situació de compromís entre la cancel·lació del múltiplet i la sensibilitat és necessària<sup>98</sup>. Alternativament, es pot jugar amb l'addició de diferents experiments amb filtres multiquàntics tal i com proposa Griesinger en l'experiment E.COSY original.

(iii) El cas on S és heteronuclear respecte I i S. En aquest cas s'han d'utilitzar seqüències que transfereixin la magnetització de I a S, mantenint l'estat de spin de X inalterat. Així, doncs, es poden utilitzar pulsos selectius sobre I, o bé utilitzar seqüències amb pulsos no selectius que restaurin l'estat original de X, com per exemple l'esquema proposat per Yang i Kay<sup>99</sup> que ha estat utilitzat en la publicació II de la present tesi doctoral.

Un punt a destacar de la metodologia és que a més de permetre l'extracció amb precisió de la constant d'acoblament, també ens dona informació sobre el signes relatius de les mateixes segons la pendent del pic diagonal. Aquest fet pot ser important per distingir entre acoblaments a 3 i 2 enllaços, ja que com a norma general els primers tenen signe positiu i els segons negatiu. També és de vital importància conèixer el signe dels acoblaments quan es mesuren acoblaments dipolars residuals, doncs aquests poden ser positius o negatius depenen de la orientació relativa dels vectors internuclears.

## 7.5.- Experiments ZQ/DQ

Els experiments de coherència zero quàntica i doble quàntica (ZQ/DQ)<sup>100</sup> requereixen com a mínim un sistema de tres *spins* (A, M, X). Suposem que A i M estan acoblats i també ho estan amb un *spin* passiu X. Si es crea coherència ZQ/DQ entre A i M i a continuació es deixa un període de lliure evolució tindrem que la coherència DQ evoluciona amb la suma dels desplaçaments químics de A i M, i amb la suma de les constants d'acoblament  $J_{AX}$  i  $J_{MX}$ . Anàlogament la coherència ZQ evolucionarà amb la diferència dels desplaçaments químics de A i M, i amb la diferència de les constants d'acoblament  $J_{AX}$  i  $J_{MX}$ . La **Figura 38** representa la metodologia ZQ/DQ esquemàticament:

<sup>98</sup> a) Bax, A.; Freeman, R. *J. Magn. Reson.* **1981**, *44*, 542. b) Bax, A.; Freeman, R. *J. Magn. Reson.* **1981**, *45*, 177.

<sup>99</sup> Yang, D., Kay, L.E. *J. Biomol. NMR.* **1999**, *13*, 3.

<sup>100</sup> a) Braunschweiler, L.; Bodenhausen, G.; Ernst, R.R. *Mol. Phys.* **1983**, *48*, 535. b) Rexroth, A.; Schmidt, P.; Szalma, S.; Geppert, T.; Schwalbe, H.; Griesinger, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10389. c) Otting, G. *J. Magn. Reson.* **1997**, *124*, 503. d) Permi, P.; Heikkinen, S.; Kilpelainen, I.; Annala, A. *J. Magn. Reson.* **1999**, *139*, 273.

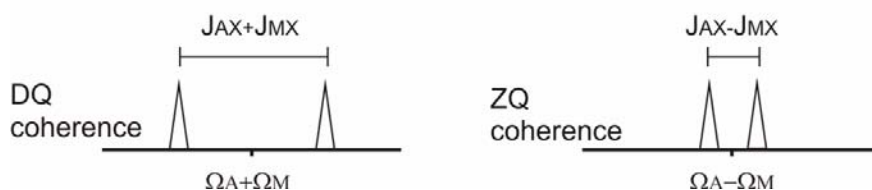


Figura 38: Esquema de la metodologia ZQDQ per a la mesura de constants d'acoblament.

És trivial que  $J_{AX}$  és  $0.5 \cdot (J_{DQ} + J_{ZQ})$  i  $J_{MX}$  és  $0.5 \cdot (J_{DQ} - J_{ZQ})$ , on  $J_{DQ}$  i  $J_{ZQ}$  són les mesures de desplaçament de freqüència obtingudes experimentalment per a les evolucions DQ i ZQ.

Aquests experiments tenen alguns avantatges sobre els tradicionals experiments basats en l'evolució de coherència mono-quàntica. És possible extreure el signe relatiu de les constants d'acoblament involucrades en la mesura. L'error aleatori de la mesura es veu reduït, doncs, la constant d'acoblament d'interès es mesura de dues distàncies diferents, i la suma i diferència es divideixen per dos. Un "desavantatge" és que els pics creuats no es troben en el seu desplaçament químic original sinó en la suma i diferència dels  $\delta$  dels spins.

A les publicacions II i IV s'utilitzen el mateix tipus de patrons que s'obtenen al utilitzar els experiments DQ/ZQ per a la mesura de constants d'acoblament, cal notar però, que el fonament no és el mateix, doncs, en els experiments proposats en les publicacions no hi ha evolució del desplaçament químic sota la influència de les coherències DQ i ZQ. Tanmateix s'obté el patró ZQDQ però basant-se en una mescla de magnetitzacions en fase i antifase mono-quàntiques, com ja s'explicarà detalladament a les publicacions.

## 7.6.- Experiments J-quantitatius

En la dècada dels anys 90 van sorgir una sèrie d'experiments basats en la mesura de les intensitats dels pics creuats en lloc de mesurar la diferència de freqüències per a la mesura de les constants d'acoblament<sup>101</sup>. Bàsicament hi ha dues maneres d'efectuar la mesura:

- (i) mesurant la intensitat relativa entre dos pics creuats en dos experiments diferents.
- (ii) mesurant la intensitat relativa entre el pic creuat i el pic diagonal d'un mateix experiment.

Per dur a terme la mesura tipus (i) es necessita registrar un experiment on hi ha un període de temps fix en el qual hi ha l'evolució de la constant d'acoblament. Aquest experiment rep el nom d'experiment J-modulat. Aquest experiment s'ha de comparar amb un d'equivalent en el qual l'acoblament ha estat efectivament desacoblat i rep el nom d'experiment de

<sup>101</sup> a) Archer, S.J.; Ikura, M.; Torchia, D.A.; Bax, A. *J. Magn. Reson.* **1991**, *95*, 636. b) Grzesiek, S.; Ikura, M.; Clore, G.M.; Gronenborn, A.M.; Bax, A. *J. Magn. Reson.* **1992**, *96*, 215. c) Blake, P.R.; Summers, M.F.; Adams, M.W.; Park, J.; Zhou, Z.; Bax, A. *J. Biomol. NMR.* **1992**, *2*, 257. d) Billeter, M.; Neri, D.; Otting, G.; Qiu Qian, Y.; Wüthrich, K.; *J. Biomol. NMR.* **1992**, *2*, 257. e) Vuister, G.W.; Bax, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7772. f) Kuboniwa, H.; Grzesiek, S.; Delaglio, F.; Bax, A. *J. Biomol. NMR*, **1994**, *4*, 871. g) Hu, J.; Bax, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8170. h) Hu, J.; Bax, A.; *J. Biomol. NMR.* **1997**, *9*, 323. i) Hu, J.; Bax, A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1803. j) Hennig, M.; Ott, D.; Schulte, P.; Lswe, R.; Krebs, J.; Vorherr, T.; Bermel, W.; Schwalbe, H.; Griesinger, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5055.

referència. Existeix una raó trigonomètrica, normalment senzilla, entre els dos experiments que permet l'extracció de  $J$ .

Per dur a terme la mesura tipus (ii) no fa falta cap espectre de referència ja que el mètode es basa en l'eficiència de transferència durant un temps finit durant l'experiment. La intensitat del pic diagonal té una dependència cosinusoidal i el pic creuat sinusoidal amb l'eficiència de la transferència de magnetització. Així, doncs, la constant d'acoblament d'interès pot ser calculada a partir de la relació cosinus i sinus modulada de la magnetització.

No s'entrarà més en detall sobre les metodologies J-quantitatives, doncs, en la present tesi doctoral no s'han utilitzat.

## 8.- Mètodes per a la mesura de constants d'acoblament ${}^nJ_{XH}$

### 8.1.- Introducció

Disposar d'un mètode que permeti extreure el valor de les constants d'acoblament heteronuclears  ${}^nJ_{XH}$  de manera senzilla i acurada no és simple, però menys simple encara és trobar un mètode universal, és a dir, que funcioni sempre. La recerca d'aquesta "possible" metodologia fa que el desenvolupament de noves metodologies sigui un camp, encara avui dia, amb elevat interès. Aquesta tesi n'és un exemple.

A continuació s'exposaran algunes de les seqüències més conegudes per a la mesura d'aquestes constants. S'han dividit les seqüències en dos grans famílies, les que es basen en un mecanisme de transferència de magnetització  ${}^1J_{XH} + J_{HH}$  i les que es basen en una transferència de magnetització heteronuclear a llarga distància via  ${}^nJ_{XH}$ . Ens centrarem a comentar els seus avantatges i inconvenients, més que en explicar en detall com funcionen les seqüències de pulsos. La gran quantitat de seqüències i modificacions de les mateixes fa impensable poder parlar de totes elles en aquesta tesi.

Abans d'entrar en matèria cal dir que molta de la informació que es dóna en aquest punt es basa àmpliament en un excel·lent article de revisió<sup>102</sup> del 2001. També, però, es comentaran mètodes que no apareixen en l'article de revisió i nous mètodes, o modificacions dels experiments ja existents, que han anat sorgint amb data posterior a l'esmentat article de revisió.

### 8.2.- Experiments basats en una transferència de magnetització ${}^1J_{XH} + J_{HH}$

#### 8.2.1.- Experiment HETLOC

L'experiment HETLOC<sup>103</sup> (HETeronuclear LOnge-range Coupling) ha sofert moltes millores des de la seva proposta original. El diagrama de pulsos que aquí es presenta és una versió bastant sofisticada proposada per Uhrín i col·laboradors<sup>104</sup> (Fig. 39).

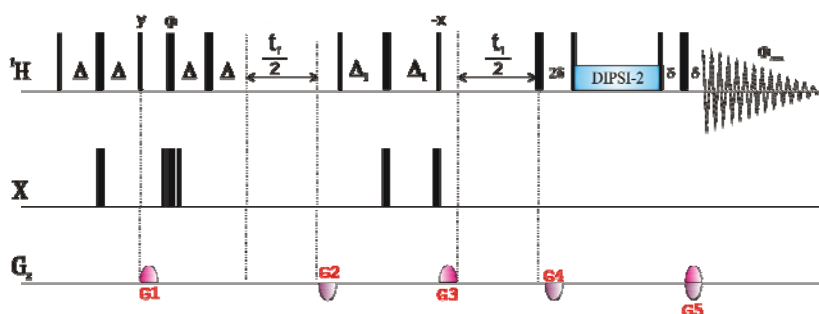


Figura 39. Diagrama de pulsos de l'experiment HETLOC proposat per Uhrín i col·laboradors<sup>104</sup>.

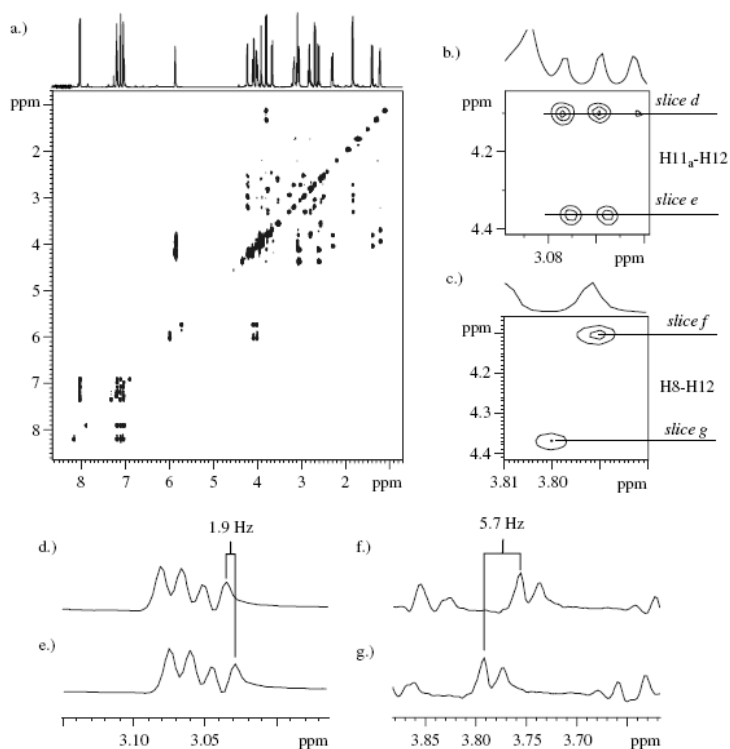
<sup>102</sup> Márquez, B.; Gerwick, W.; Williamson, T. *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39*, 499.

<sup>103</sup> Kurz, M.; Schmieder, P.; Kessler, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1329.

<sup>104</sup> Uhrín, D.; Batta, G.; Hruby, V.J.; Barlow, P.N.; Kover, K.E. *J. Magn. Reson.* **1998**, *130*, 155.

S'observa que la seqüència està modificada per aconseguir la selecció de coherència amb gradients via eco-antieco, presenta un filtre z,z-ge- $X^{105}$  i un puls compostat de  $180^\circ$ . Aquestes modificacions respecte la seqüència original permeten millorar la supressió dels senyals dels protons units a  ${}^{12}C$ . També es veu que s'hi ha introduït un bloc G-BIRD<sub>R</sub> durant  $t_1$  que desacobla eficientment els acoblaments homonuclears  ${}^1H$ - ${}^1H$ , aconseguint una substancial millora en sensibilitat.

L'experiment a primer cop d'ull sembla un experiment COSY, doncs, a totes dues dimensions hi observem el desplaçament químic de protó. Els pics de correlació creuada, però, presenten el patró E.COSY que permet efectuar la mesura de  ${}^nJ_{XH}$  a F2 mitjançant la modulació de  ${}^1J_{XH}$  a F1. A la **Figura 40** se'n mostra un exemple.



**Figura 40.** Espectre HETLOC d'una mostra d'estríchnina i ampliacions (353 mM en  $CDCl_3$ ). La mesura de  ${}^nJ_{XH}$  es fa mesurant el desplaçament entre els dos multiplets que formen el patró E.COSY. Figura 3 extreta del review<sup>102</sup> de Márquez i col.laboradors.

Pel que fa la precisió de la mesura del mètode, aquesta és òptima degut a que en el patró E.COSY es determina la  $J$  mesurant el desplaçament de freqüències en un mateix experiment. Com que la mesura es realitza a F2 es molt aconsellable adquirir molt punts en aquesta dimensió, 4K, i processar amb *zero-filling* fins a 8K, podent aconseguir amb aquest mètode determinar constants, fins i tot, més petites que l'amplada de línia. Cal recordar també que aquest tipus de patró permet determinar el signe de la constant d'acoblament.

El principal inconvenient de l'experiment és la poca dispersió dels senyals que aporta la correlació  ${}^1H$ - ${}^1H$  tipus COSY, que acostuma a presentar molts problemes de solapament i interpretació de senyals en zones properes a la diagonal. A més, els pics es desdoblen donant

<sup>105</sup> a) Bruhwiler, D.; Wagner, G. *J. Magn. Reson.* 1986, 69, 546. b) John, B.K.; Hurd, R.E. *J. Magn. Reson.* 1993, 101, 113.

lloc al patró E.COSY, amb el qual es perd sensibilitat i s'augmenta el nombre de possibles problemes de solapament. Tot i que cal comentar que la seqüència permet realitzar un factor d'escalat de la separació del patró E.COSY a F1, amb el qual es poden adquirir diferents espectres variant aquest factor per tal de resoldre problemes puntuals de solapament de senyals.

Un altre inconvenient, comú a tots els mètodes basats en el TOCSY, és que aquest es veu limitat a la transferència de polarització homonuclear al llarg de sistemes de *spins* ininterromputs. A més la intensitat dels pics depèn de la eficiència de la transferència TOCSY amb l'àtom veí. Aquesta depèn de la magnitud de la  $J_{HH}$ , així per a  $J_{HH}$  petites la poca eficiència en la transferència és un problema i encara que s'acumulin moltes adquisicions la magnetització transferida pot ser insuficient per apreciar cap senyal. Un altre variable que afecta a la transferència TOCSY és el temps de mescla, doncs, el senyal transferit acostuma a tenir una dependència cosinusoidal amb el temps. Degut a aquest fet és recomanable fer l'experiment amb diferents temps de mescla, però clar, això vol dir temps de màquina extra.

El darrer inconvenient és que la manera en que es fa la mesura, via E.COSY modulada amb  $^1J_{CH}$ , requereix que el protó del qual es vol mesurar estigui unit a un  $^{13}C$ , no podent estar unit a qualsevol altre heteronucli,  $^{15}N$  per exemple.

### 8.2.2.- Experiment HSQC-HECADE

L'experiment HSQC-HECADE<sup>106</sup> (Fig. 41) es pot dir que és anàleg a l'HETLOC, però amb l'avantatge de que a la dimensió indirecta evoluciona el desplaçament químic de l'heteronucli, augmentant-se, doncs, la dispersió dels senyals i evitant els problemes de solapament que presenta l'experiment HETLOC. La precisió en la mesura donada pel patró E.COSY roman.

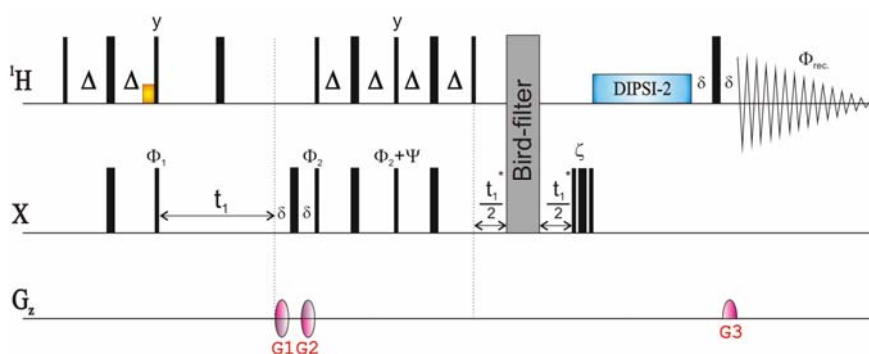


Figura 41. Diagrama de pulsos de l'experiment HSQC-HECADE proposat per Kozminski i col·laboradors<sup>106</sup>.

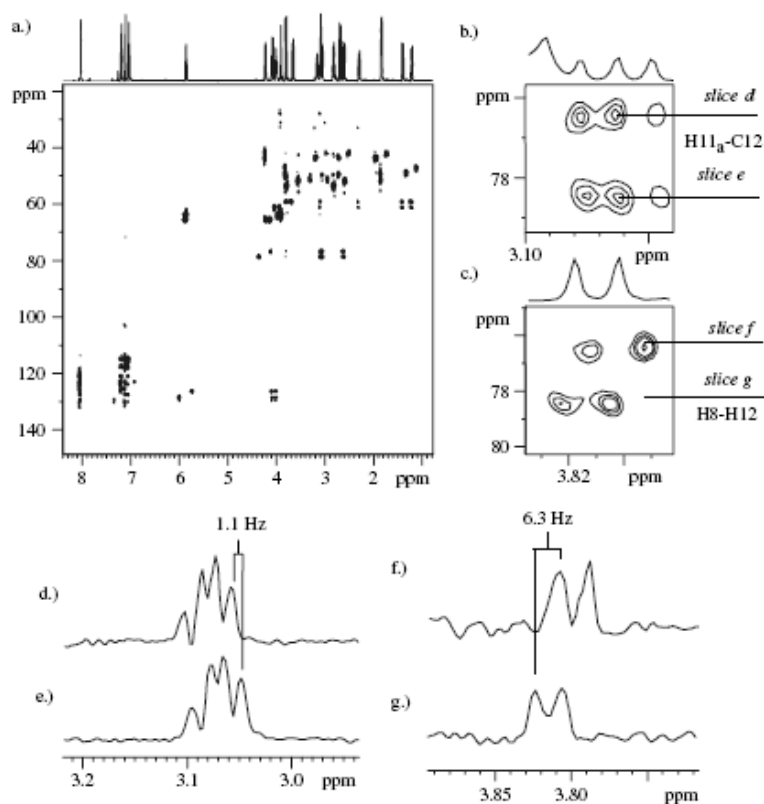
Pel que fa als inconvenients, un cop solucionat el problema de la dispersió dels senyals, podem dir que la transferència TOCSY n'és la font principal, essent aquests els mateixos que els comentats per a l'experiment HETLOC. També roman el problema de la mesura amb protons units a heteronucleis diferents a X, degut a que el patró E.COSY es produeix gràcies a

<sup>106</sup> Kozminski, W.; Nanz, D.; *J. Magn. Reson.* 2000, 142, 294.



l'evolució del acoblament  $^1J_{XH}$  a F1. Cal dir també que l'addició del període d'evolució  $t_1^*$  allarga la seqüència i això pot causar problemes de relaxació.

A la **Fig. 42** es mostra un espectre d'exemple i com s'efectua la mesura.



**Figura 42.** Espectre HSQC-HECADE d'una mostra d'estríchnina i ampliacions 353 mM en  $CDCl_3$ . La mesura de  $^nJ_{XH}$  es fa mesurant el desplaçament entre els dos multiplets que formen el patró E.COSY. Figura 7 extreta del *review*<sup>102</sup> de Márquez i col.laboradors.

### 8.2.3.- HSQC-TOCSY acoblat/desacoblat

L'experiment HSQC-TOCSY<sup>107</sup> va ser proposat per Kövér i col.laboradors per a la mesura de constants d'acoblements heteronuclears<sup>108</sup>. El mètode requereix l'enregistrament de dos experiments HSQC-TOCSY, un acoblat i l'altre desacoblat durant l'adquisició. Per fer la mesura de les constants d'acoblament s'ha d'extreure la fila de la correlació d'interès de l'espectre acoblat i s'ha de sumar amb ella mateixa desplaçada una certa quantitat fins a que la multiplicitat observada en l'espectre suma coincideixi amb la mateixa fila extreta del espectre acoblat. Es mostra un exemple del procediment a la **Figura 43**. El valor del desplaçament mesurat és la constant d'acoblament.

La virtut del mètode és la bona dispersió dels senyals que aporta la correlació  $^1H-X$ . A més els senyals no es desdoblen amb el patró E.COSY, evitant problemes de solapament deguts al desdoblament dels pics de correlació.

<sup>107</sup> Veure punt 5.4.2 de la present tesi doctoral.

<sup>108</sup> Kövér, K.E.; Hruby, V.J.; Uhrin D.; *J. Magn. Reson.* 1997, 129, 125.

Com a inconvenient, a part dels que comporta la correlació homonuclear TOCSY, només dir, que si realment es vol ser acurat en la mesura de la constant d'acoblament s'ha de dur a terme tot un protocol de simulació espectral en el procés de comparació. La limitació del mètode ve donada per la resolució espectral a F2.

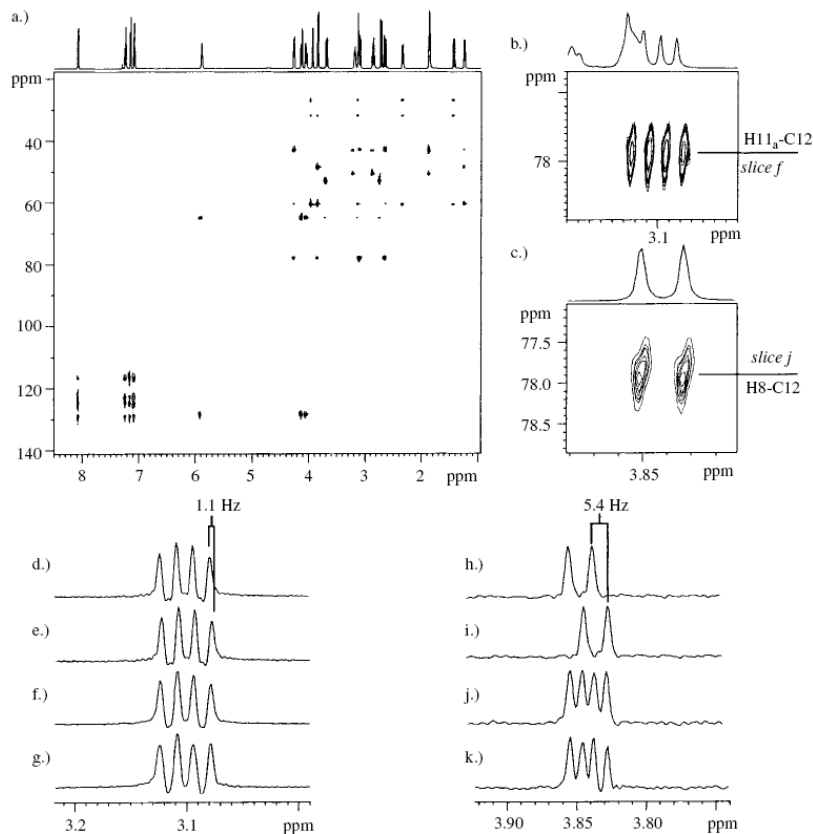


Figura 43. Espectre HSQC-TOCSY desacoblat d'una mostra d'estrícina i ampliacions (353 mM en  $\text{CDCl}_3$ ). La mesura de  ${}^nJ_{XH}$  es fa via comparació del multiplet obtingut entre els experiments HSQC-TOCSYacoblat i desacoblat (veure text principal). Figura 5 extreta del *review*<sup>102</sup> de Márquez i col·laboradors.

#### 8.2.4.- Experiments $S^3$ HSQC-TOCSY

Com s'ha comentat en el punt 7.3 de la present tesi doctoral existeixen avui dia diverses metodologies per produir la selecció d'estat de *spin*  $S^3$ . Sens dubte un dels grups pioners en el desenvolupament d'aquestes metodologies va ser el de Sørensen i col·laboradors que ja l'any 1997<sup>109</sup> van proposar esquemes de pulsos que restringien la transferència de coherència per tal de produir la selecció d'estat de *spin*, ja fos en el període de preparació ( $S^3E$ ) o bé en el període de mescla ( $S^3CT$ ) d'experiments bidimensionals. I demostrant-ne la seva utilitat tant en la mesura de constants d'acoblament  ${}^nJ_{XH}$  com  $J_{HH}$ .

Aquest mètode manté l'avantatge, respecte l'HETLOC, de la major dispersió donada per l'evolució del heteronucli a la dimensió indirecta. I com a avantatge respecte el HSQC-HECADE

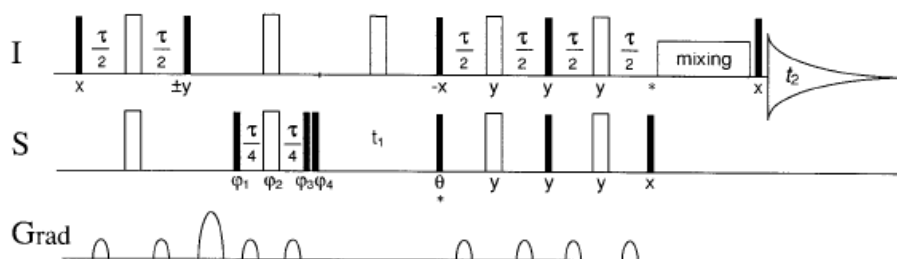
<sup>109</sup> a) Meissner, A.; Duus, J.; Sørensen, O. W. *J. Biomol. NMR.* **1997**, *10*, 89. b) Sørensen, M.D.; Meissner, A.; Sørensen, O. W. *J. Biomol. NMR.* **1997**, *10*, 181. c) Sørensen, M.D.; Meissner, A.; Sørensen, O. W. *J. Magn. Reson.* **1999**, *137*, 237.

dir que els senyals no es desdoblen a F1 via  ${}^1J_{CH}$  per formar el patró E.COSY evitant, doncs, problemes de solapament.

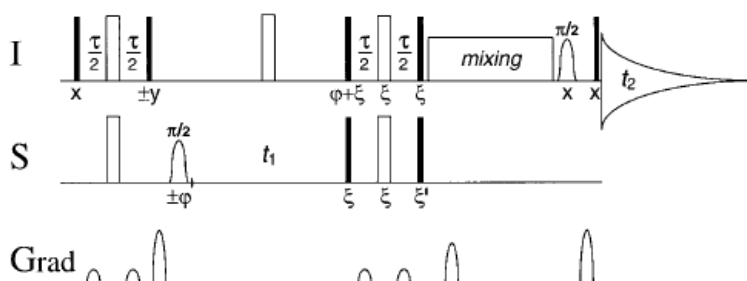
Com a inconvenient recordar que romanen els problemes comentats a l'experiment HETLOC derivats de la transferència tipus TOCSY, i remarcar que aquestes metodologies  $S^3E$  i  $S^3CT$  només produeixen la selecció d'estat de *spin* per a multiplicitats IS, és a dir, el mètode no funciona si es vol treballar sobre sistemes de *spin*  $I_2S$  o  $I_3S$ .

A la **Figura 44** es mostren els diagrames de pulsos dels experiments  $S^3E$ -HSQC-TOCSY i  $S^3CT$ -HSQC-TOCSY, així com un exemple de com es realitza la mesura.

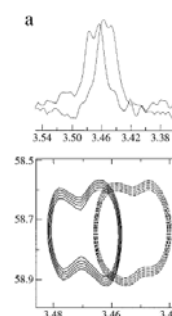
### A) $S^3E$ -HSQC-TOCSY



### B) $S^3CT$ -HSQC-TOCSY



### C) Exemple



**Figura 44.** A) Diagrama de pulsos de la seqüència  $S^3E$ -HSQC-TOCSY extret de la publicació original de Sørensen i col·laboradors. B) Diagrama de pulsos de la seqüència  $S^3E$ -HSQC-TOCSY extret de la publicació original de Sørensen i col·laboradors. C) Exemple de la mesura de  ${}^nJ_{XH}$  via el desplaçament de freqüències aconseguit amb la seqüència B corresponent al senyal de Tyr23  $C\alpha$ - $H\alpha$  ( $J=12.3\text{Hz}$ ) de la proteïna BPTI. Figura 4a extreta de la publicació original<sup>109c</sup> de Sørensen i col·laboradors.

Per tancar aquest apartat de seqüències que utilitzen una transferència TOCSY per a la mesura de  ${}^nJ_{XH}$ , comentar que Parella i col·laboradors han desenvolupat recentment un nou mètode basat en el HCP-TOCSY que permet fer la mesura d'aquestes constants simultàniament per sistemes IS i  $I_2S$ . Els diagrames de pulsos i una explicació més completa de com funciona aquesta metodologia s'exposa en el punt 11.1 de la present tesi doctoral, punt introductori a la *publicació II*.

### 8.3.- Experiments basats en una transferència de magnetització ${}^nJ_{XH}$

La capacitat d'establir correlacions de protons amb carbonis quaternaris i/o heteroàtoms no protonats fan que aquest tipus de les metodologies siguin d'aplicació més general que les seqüències comentades a l'apartat anterior basades en una transferència de magnetització concatenada  ${}^1J_{XH} + J_{HH}$ .

#### 8.3.1.- Experiment ps-HMBC sensible a la fase

L'experiment ps-HMBC<sup>110</sup> sensible a la fase (**Fig. 45**) presenta una forma de línia mesclada (*mixed-phase lineshape*) degut a que els senyals presenten la modulació addicional dels acoblaments  $J_{HH}$ . Aquest fet dificulta o impossibilita la lectura de les  ${}^nJ_{XH}$ . Per això, si es vol utilitzar amb aquest propòsit és necessari l'adquisició d'un experiment de referència amb les mateixes característiques de fase però sense l'acoblament  ${}^nJ_{XH}$  i, seguint tot un protocol de *fitting*, per comparació poder-ne extreure el valor de la constant. Normalment s'utilitza un experiment 2D TOCSY o ROESY on s'ajusta el temps de pre-adquisició al mateix temps que el període d'evolució de l'acoblament  ${}^nJ_{XH}$  de l'experiment HMBC<sup>111</sup>.

L'inconvenient del mètode rau en la dificultat que comporta trobar l'experiment de referència amb exactament les mateixes propietats de fase que l'experiment HMBC. Intentant solucionar aquest problema Sheng i Van Halbeek van proposar l'experiment psge-HMBC<sup>112</sup> que utilitza el pic de correlació directa (que el mateix experiment produeix) com a referència per al *fitting* per extreure  ${}^nJ_{XH}$ . Malauradament aquesta seqüència aporta una pèrdua de sensibilitat respecte la seqüència de Keeler i col·laboradors<sup>108</sup>.

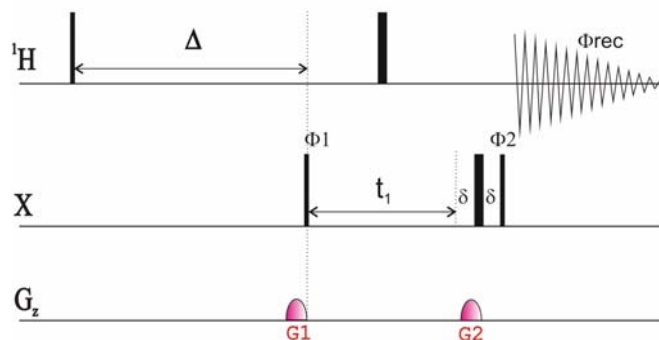


Figura 45. Diagrama de pulsos de l'experiment ps-HMBC proposat per Keeler i col·laboradors<sup>110</sup>.

#### 8.3.2.- Experiment Jres-HMBC-2

L'experiment Jres-HMBC-2<sup>113</sup> (**Fig. 46**) es basa en la seqüència HMBC. Inicialment hi ha un filtre per eliminar les contribucions degudes a  ${}^1J_{XH}$ . Tot seguit hi ha un període de temps

<sup>110</sup> Keeler, J.; Nehaus, D.; Titman, J.J. *Chem. Phys. Lett.* **1988**, *146*, 545.

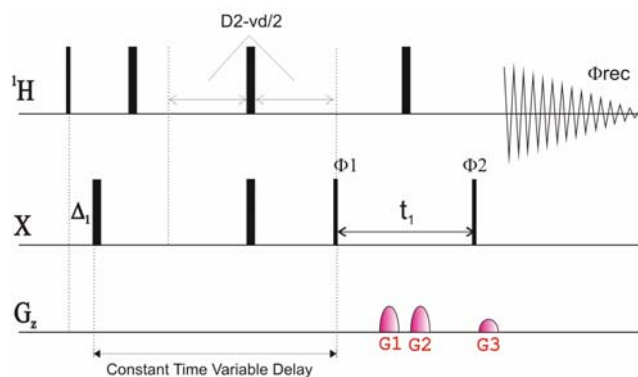
<sup>111</sup> a) Titman, J.J.; Nehaus, D.; Keeler, J. *J. Magn. Reson.* **1989**, *85*, 111. b) Richardson, J.M.; Titman, J.J.; Keeler, J.; Nehaus, D. *J. Magn. Reson.* **1991**, *93*, 533. c) Kover, K.E.; Uhrin, D.; Hruby, V.J. *J. Magn. Reson.* **1998**, *130*, 162.

<sup>112</sup> Sheng, S.; Van Halbeek, K. *J. Magn. Reson.* **1998**, *130*, 296.

<sup>113</sup> Furihata, K.; Seto, H. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 6271

variable inserit en un període de temps constant que permet l'escalat de la constant d'acoblament heteronuclear independentment de la homonuclear. L'inconvenient rau en que s'ha de triar una situació de compromís entre resolució espectral, sensibilitat i temps disponible d'espectròmetre que limita la precisió del mètode. Aquest fa que l'experiment només sigui convenient si es vol analitzar qualitativament la magnitud de  ${}^nJ_{XH}$ .

A)



B)

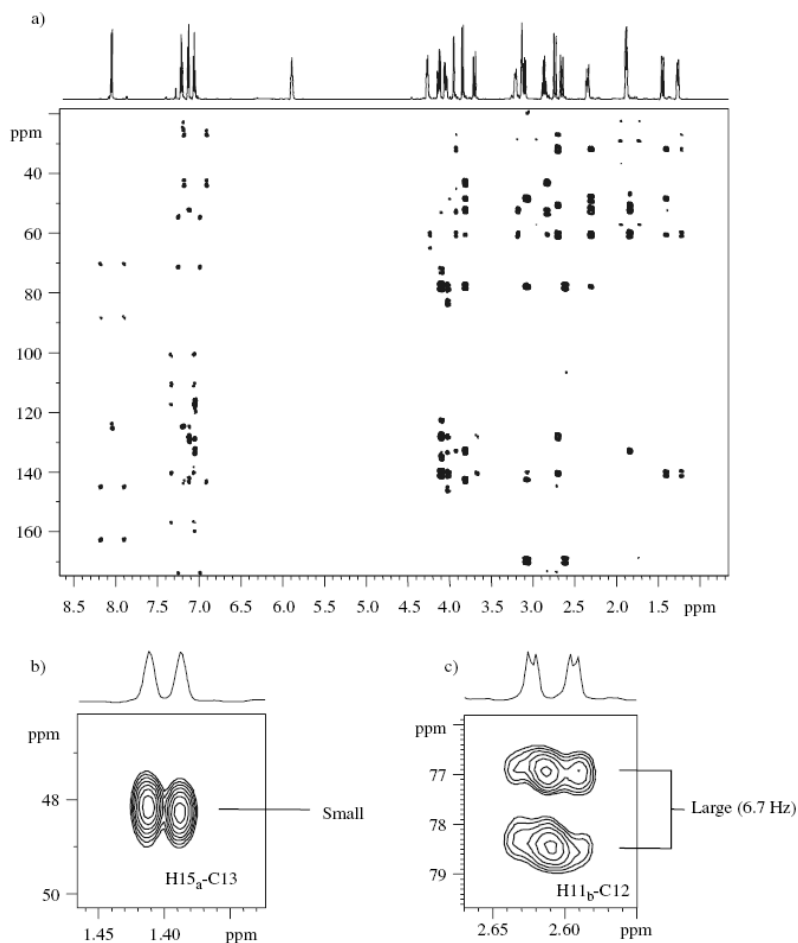


Figura 46. A) Diagrama de pulsos de l'experiment Jres-HMBC-2 proposat per Sheng i col·laboradors. B) Espectre Jres-HMBC-2 d'una mostra d'estrícina 353 Mm en  $CDCl_3$ . La mesura de  ${}^nJ_{XH}$  es fa via la mesura del desplaçament obtingut via Jres a F1. La mesura sovint només pot ser qualitativa. Figura 15 extreta del *review*<sup>102</sup> de Márquez i col·laboradors.

### 8.3.3.- Experiment J-IMPEACH-MBC

L'experiment J-IMPEACH-MBC<sup>114</sup> es basa en l'experiment IMPEACH-MBC<sup>115</sup> de Hadden i col·laboradors. En aquest experiment, anàlogament al J-res-HMBC-2, la mesura de les  ${}^nJ_{XH}$  es fa mitjançant l'escalat d'aquestes a F1, però amb l'avantatge que les constants d'acoblament homonuclears "evolucionen" en un període de temps constant, és a dir no evolucionen. Els espectres, doncs, són més senzills d'interpretar i es produeix un guany en sensibilitat. L'inconvenient segueix sent que s'ha de triar una situació de compromís entre resolució espectral i sensibilitat que limita la precisió del mètode.

### 8.3.4.- Experiment HSQMBC

A la secció 5.3.3 de la present tesi doctoral s'ha descrit l'experiment HSQMBC, i la versió millorada G-BIRD<sub>R,X</sub>-HSQMBC, per a l'obtenció d'espectres de correlació  ${}^1H$ -X a llarga distància. Com ja s'ha comentat anteriorment, el principal avantatge d'aquest experiment respecte el HMBC és que les complicacions derivades de l'evolució de les constants d'acoblament homonuclears durant el període d'evolució no es donen. Aquest fet fa que, en principi, l'extracció de constants d'acoblament sigui possible directament del patró en antifase obtingut<sup>116</sup>. No obstant, en l'estudi de multiplets complexos, o si la constant d'acoblament és més petita que l'amplada del pic es recomana dur a terme un protocol de *fitting*<sup>117</sup>. Per dur-lo a terme s'ha d'extreure la fila d'un espectre de correlació 2D HSQC (del mateix HSQMBC o del  ${}^1H$ - ${}^1H$  TOCSY) que contingui el pic d'interès i s'ha de sobreposar amb un d'identificat però desfasat  $180^\circ$  i desplaçat un cert valor de  ${}^nJ_{XH}$ . Llavors, s'han de sumar i comparar amb la fila d'interès del HSQMBC fins a que coincideixin en la forma del multiplet. Un exemple de procediment s'observa a la **Figura 47**.

Els avantatges d'aquest experiment són la seva fàcil implantació i que la mesura de  ${}^nJ_{XH}$  a través de carboni quaternaris o heteroàtoms és possible, fent-lo un candidat ideal com a seqüència estàndard per a qualsevol molècula que es vulgui estudiar.

Un inconvenient és que notables dificultats en la mesura es poden donar en el cas d'estudiar protons que presentin grans acoblaments amb d'altres protons. La raó és que durant l'INEPT inicial, optimitzat per a l'evolució de  ${}^nJ_{XH}$ , aquests acoblaments també evolucionen donant lloc a coherències múltiple quàntiques que al final de la seqüència esdevenen observables, causant distorsions en la forma de línia dels multiplets finals del experiment HSQMBC. Koskela i col·laboradors han proposat la seqüència LR-CAHSQC<sup>118</sup> que utilitza el tren de pulsos CPMG<sup>119</sup> aplicat simultàniament als canals de protó i de l'heteronucli per "desacoblar" els acoblaments homonuclears durant el INEPT. No obstant quan la dispersió dels

<sup>114</sup> Williamson, R.T.; Marquez, B.L.; Gerwick, W.H.; Martin, G.E.; Krishnamurthy, V.V. *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39*, 127.

<sup>115</sup> Hadden, C.E.; Martin, G.E.; Krishnamurthy, V.V. *J. Magn. Reson.* **1999**, *140*, 274.

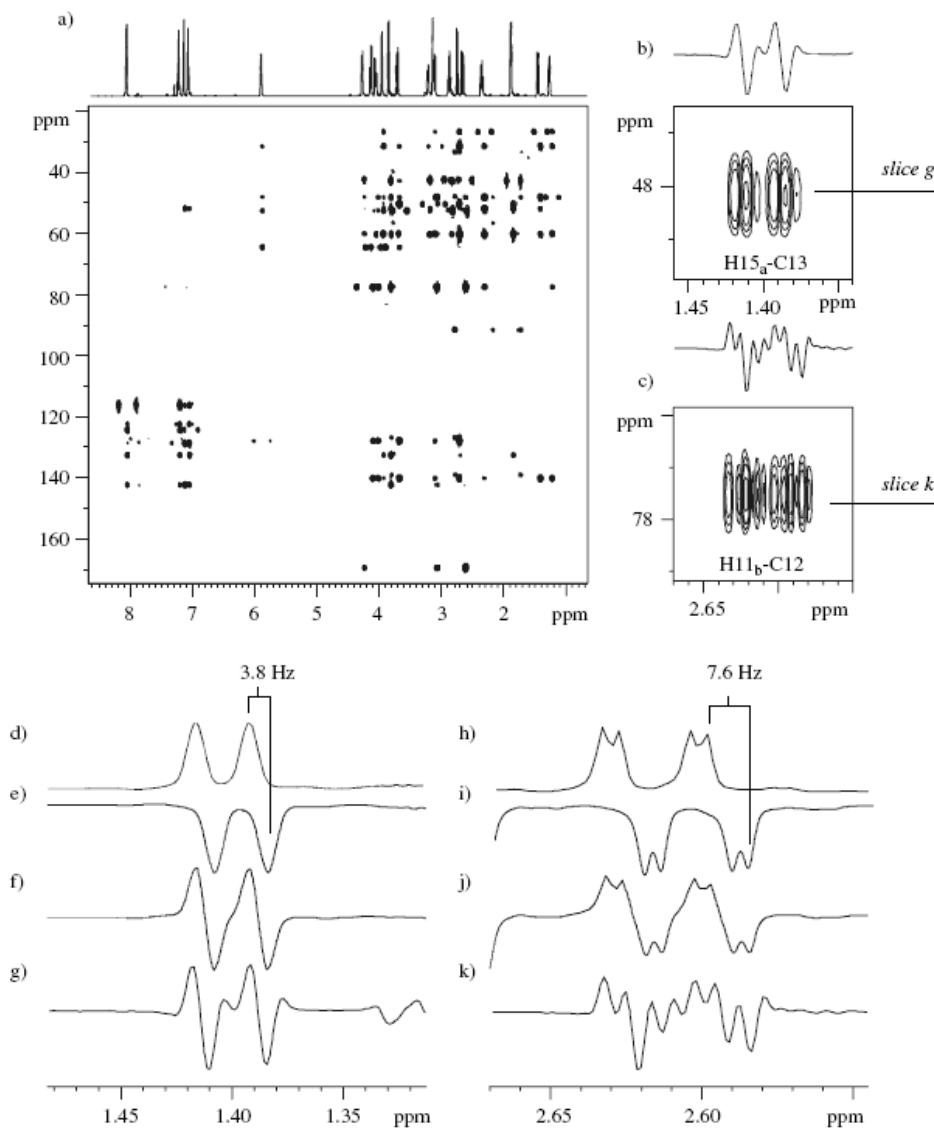
<sup>116</sup> Marek, R.; Kralik, L. Sklenar, V. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 665.

<sup>117</sup> Williamson, R.T.; Marquez, B.L. Gerwick, W.H. Kover, K.E. *Magn. Reson. Chem.* **2000**, *38*, 265.

<sup>118</sup> Koskela, H.; Kilpelainen, I.; Heikkinen, S. *J. Magn. Reson.* **2003**, *164*, 228.

<sup>119</sup> a) Carr, H.Y.; Purcell, E.M. *Phys. Rev.* **1954**, *94*, 630. b) Wells, E.J.; Gutowsky, H.S. *J. Chem. Phys.* **1965**, *43*, 3414. c) Allerhand, A. *J. Chem. Phys.* **1966**, *44*, 1.

senyals de carboni és molt gran, o és treballa amb camps magnètics elevats, l'estratègia no acaba de funcionar degut a imperfeccions dels pulsos de  $180^\circ$  que el CPMG utilitza i a problemes *off resonance*. Recentment Kóvér i col·laboradors, per solucionar aquests problemes, proposen la seqüència CPMG-HSQMBC<sup>120</sup> amb pulsos de  $180^\circ$  composts durant el tren de pulsos CPMG i en demostren la seva eficàcia.



**Figura 47.** Espectre HSQMBC d'una mostra d'esticnina 353 mM en  $\text{CDCl}_3$ . Es mostren ampliacions i com s'efectua la mesura de  ${}^nJ_{XH}$ . En aquest cas les files (d, h) per dur a terme el procediment de *fitting* s'extreuen del mateix experiment HSQMBC i contenen el pic de correlació  ${}^1J_{CH}$ . Les files (e) i (i) són (d) i (h) invertides  $180^\circ$  i desplaçades el valor de  ${}^nJ_{XH}$ . Les files (f) i (j) corresponen a la suma de les dues anteriors ( $f = a+e$ ;  $j = h+i$ ). Les files (g) i (k) són extreptes del HSQMBC i contenen el pic de correlació a llarga distància  ${}^1H-X$  del qual volem mesurar la  ${}^nJ_{XH}$  via comparació amb les files (f) i (j) respectivament. Figura 12 extreta del *review*<sup>102</sup> de Márquez i col·laboradors.

<sup>120</sup> Kóvér, K.; Batta, G.; Fehér, K. J. Magn. Reson. 2006, 181, 88.

## 9.- Experiments amb temps compartit

### 9.1.- Introducció

Obtenir la màxima informació en el mínim temps possible segueix essent avui dia un dels principals objectius en el desenvolupament de noves metodologies de RMN. Durant els darrers anys han sorgit nous mètodes que disminueixen el temps necessari per a l'adquisició de dades. Per exemple, l'espectroscopia Hadamard<sup>121</sup>, el *single scan* NMR<sup>122</sup>, mètodes de dimensionalitat reduïda RD<sup>123</sup>, o mètodes de temps compartit (TS).

En les seqüències de pulsos amb temps compartit es fan evolucionar simultàniament dues freqüències diferents, normalment de <sup>13</sup>N i <sup>15</sup>C (**Fig. 48**) durant un mateix període de temps, d'aquí el nom de temps compartit. Col·loquialment parlant, es pot dir que es fan 2 experiments en 1. Òbviament això comporta un benefici de temps important. Teòricament el 50% del temps podria ser estalviat, o el que és equivalent, un guany de sensibilitat del 41% per a cada nucli.

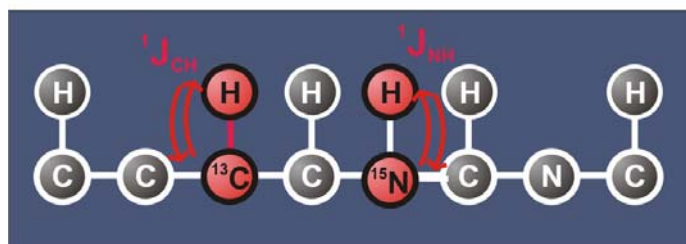


Figura 48. En un experiment de correlació directa de temps compartit la selecció de la parella <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C i <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N és simultània (no és necessari que sigui en la mateixa molècula).

El concepte inicialment proposat per Sørensen l'any 1990<sup>124</sup>, va veure els seus fruits l'any 1991 quan Farmer va proposar l'experiment de temps compartit HMQC i va demostrar-ne la seva aplicació en l'anàlisi d'un pèptid<sup>125</sup>. Al 1994, Boelens i col·laboradors van desenvolupar les versions TS del HMQC, HSQC i HMSC amb gradients (**Fig. 49**) i en van demostrar la seva utilitat en l'anàlisi de proteïnes doblement marcades amb <sup>13</sup>C i <sup>15</sup>N (**Fig. 50**). D'altres versions amb diverses aplicacions han anat sorgint des de llavors i fins ara<sup>126</sup>, essent l'aplicació més recent uns experiments 3D i 4D HSQC-NOESY publicats per Wagner i col·laboradors<sup>127</sup>.

<sup>121</sup> Kupce, E.; Nishida, T.; Freeman, R. *Prog. Nuc. Magn. Reson.* **2003**, *42*, 95.

<sup>122</sup> a) Frydman, L.; Scherf, T.; Lupulescu, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15859. b) Frydman, L.; Lupulescu, A.; Scherf, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9204.

<sup>123</sup> a) Szyperski, T.; Yeh, D.C.; Sukumaran, D.K.; H.N.B.; Moseley, H.N.B.; Montelione, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2002**, *99*, 8009.

<sup>124</sup> Sørensen, O.W. *J. Magn. Reson.* **1990**, *89*, 210.

<sup>125</sup> Farmer II, B.T. *J. Magn. Reson.* **1991**, *93*, 365.

<sup>126</sup> a) Farmer II, B.T.; Mueller, L. *J. Biomol. NMR.* **1994**, *4*, 673. b) Pascal, S.M.; Muhandiranm, D.R.; Yamazaki, T.; Forman-Kay, J.D.; Kay, L.E. *J. Magn. Reson.* **1994**, *103*, 197. c) Vis, H.; Boelens, R.; Mariani, M.; Stroop, R.; Vorgias, C.E.; Wilson, K.S.; Kaptein, R. *Biochem.* **1994**, *33*, 14858. d) Jerala, R.; Rule, G.S. *J. Magn. Reson. B.* **1995**, *108*, 294. e) Uhrin, D.; Bramham, J.; Winder, S.J.; Barlow, P.N. *J. Biomol. NMR.* **2000**, *18*, 253. f) Xia, Y.; Man, D.; Zhu, G. *J. Biomol. NMR.* **2001**, *19*, 355. g) Frueh, D.P.; Arthanari, H.; Wagner, G. *J. Biomol. NMR.* **2005**, *33*, 187.

<sup>127</sup> Frueh, D.; Vosburg, D.; Walsh, C.; Wagner, G. *J. Biomol. NMR.* **2006**, *34*, 31.



A la pràctica hi ha varies raons per les quals no s'arriba al guany teòric. Una d'elles és la presència de més pulsos en la versions TS quan es comparen amb les seqüències estàndard, un altre factor és que són més llargues per un dels nuclis, és a dir, hi ha un nucli que limita el temps de l'experiment i l'altre s'hi ha d'adaptar. Per exemple, en la seqüència TS-HSQC per  $^{15}\text{N}$  i  $^{13}\text{C}$  proposada per Boelens i col·laboradors (**Fig. 49**), la transferència de magnetització  $^1\text{H} \rightarrow ^{15}\text{N}$  requereix 5.5ms, en canvi, la transferència  $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$  3.5ms. És a dir, el nucli que limita la durada de la seqüència TS-HSQC és el  $^{15}\text{N}$ , per tant, no s'esperen pèrdues per aquest nucli, en canvi, la seqüència TS es fa més llarga comparada amb el HSQC de  $^{13}\text{C}$ , amb les pèrdues de magnetització per relaxació que això comporta, i per tant no s'arriba al 41% de guany, sinó que aquest és del 21%, guany no gens menyspreable d'altra banda.

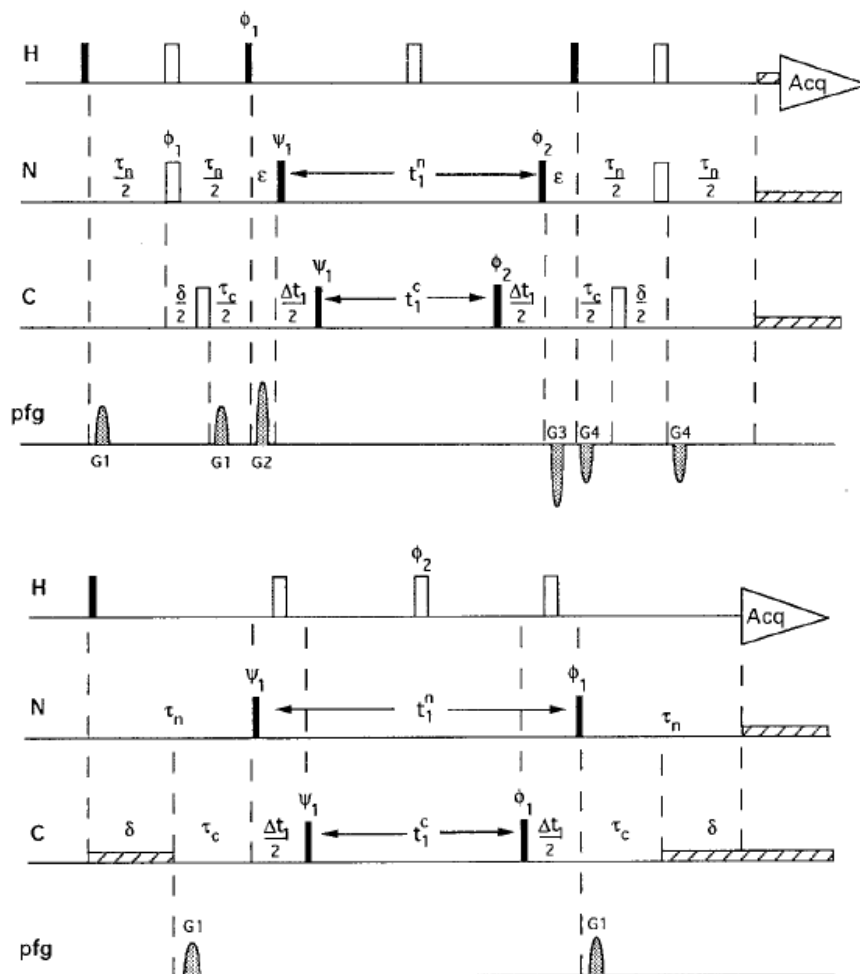
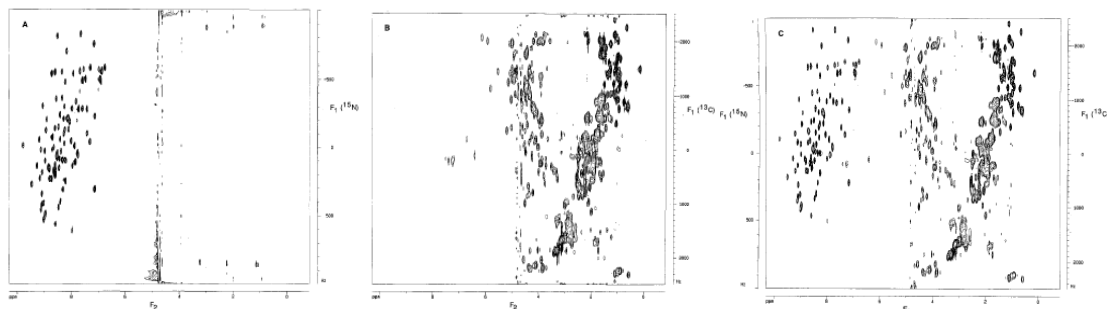


Figura 49. Diagrames de pulsos dels experiment TS-HSQC i TS-HMQC proposats per Boelens i col·laboradors. Fig.1 extreta de l'article original<sup>126c</sup>.



**Figura 50.** A) Espectre  $^{15}\text{N}$ -HSQC. B) Espectre  $^{13}\text{C}$ -HSQC (doblegat) C) Espectre TS- $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -HSQC. Els experiments són d'una mostra de la proteïna UH enriquida en  $^{13}\text{C}$  i  $^{15}\text{N}$ . Fig.1 extreta de l'article original<sup>126c</sup>.

Com es veu a la **Figura 50** en el cas de treballar amb proteïnes les senyals de correlació que pertanyen al  $^{13}\text{C}$  i les senyals que pertanyen al  $^{15}\text{N}$  es diferencien clarament pel seu desplaçament químic de protó característic. Cal dir, però, que un cicle de fases apropiat en l'experiment TS permetria diferenciar les senyals de correlació de cada nucli. Un altre aspecte a comentar és que tot i que es tracta d'experiments de temps compartit, els períodes d'evolució es poden optimitzar diferentment per a cada nucli, doncs, hi ha un cert temps en el qual l'evolució no és compartida.

Un requisit instrumental per poder realitzar experiments TS, és que cal disposar d'una sonda triple, és a dir, amb capacitat de pulsar simultàniament a tres freqüències diferents (**Fig. 51**).

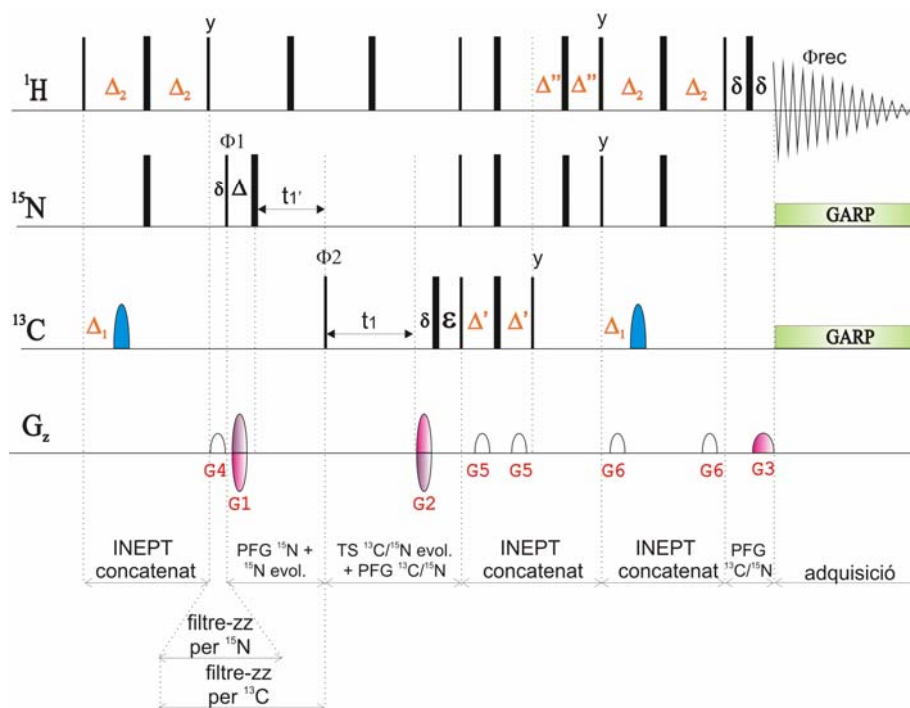


**Figura 51** Fotografia d'una sonda triple  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  i  $^{15}\text{N}$  que permet l'execució d'experiments amb temps compartit (TS).

## 9.2.- Experiment TS-HSQC

A continuació es descriu l'experiment TS- $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -HSQC que Sattler i col·laboradors l'any 1995 van posar a punt. Els autors van assajar diferents versions obtenint els millors resultats, en termes de sensibilitat, amb la seqüència que es presenta a la **Figura 52**. L'experiment amb la incorporació de la metodologia PEP, i codificació per gradients via eco-antieco. Aquest

experiment és la base dels experiments que es presenten a la *publicació V* i *VI* de la present tesi doctoral.



**Figura 52.** Diagrama de pulsos de l'experiment TS-HSQC amb la incorporació de la metodologia PEP i codificació amb gradients eco-antico. Els pulsos blaus són pulsos de  $180^\circ$  adiabàtics. Es marquen els diferents processos que tenen lloc.  $\Delta_1=1/4J_{CH}$ ,  $\Delta_2=1/4J_{NH}$ ,  $\Delta'=1/4J_{CH}$  ( $=1/8J_{CH}$  si es vol optimitzar per totes les multiplicitats),  $\Delta''=1/4J_{NH}-\Delta'$  ( $=1/8J_{NH}-\Delta'$  si es vol optimitzar per totes les multiplicitats).

La descripció de la seqüència en termes d'operadors producte és anàloga al HSQCPEP estàndard (veure punt 5.2.3 de la tesi), però tenint en compte que cal concatenar els diferents ecos de transferència de magnetització dels processos  $^1\text{H} \rightarrow ^{15}\text{N}$  i  $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$  de manera adequada, ja que aquests processos requereixen temps diferents. Per exemple, si analitzem el primer INEPT concatenat és fàcil veure que la magnetització inicial  $H_y$  evoluciona un temps  $2\Delta_2$  ( $\Delta_2 = 1/4^1J_{NH}$ ) fins a magnetització en antifase  $H_xN_z$ . No és tant trivial, però, adonar-se de que l'evolució que té lloc pel carboni és també la desitjada  $H_y \rightarrow H_xC_z$ :

$$\Delta_1 - (\Delta_2 - \Delta_1) + \Delta_2 = 2\Delta_1 \quad (\Delta_1 = 1/4^1J_{CH}).$$

Pel que fa a la força i durada dels gradients de codificació i descodificació d'ordres de coherència (G1, G2 i G3) s'ha de tenir en compte que la condició de reenfoç s'ha de complir simultàniament per als dos camins de transferència de coherència  $^1\text{H} \rightarrow ^{15}\text{N} \rightarrow ^1\text{H}$  i  $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C} \rightarrow ^1\text{H}$ . Així, doncs, s'han de complir les equacions següents:

$$\text{Condició de reenfoç per } ^{13}\text{C}: \quad \gamma_C G_2 - \gamma_H G_3 = 0$$

$$\text{Condició de reenfoç per } ^{15}\text{N}: \quad -\gamma_N G_1 + \gamma_N G_2 - \gamma_H G_3 = 0$$

Tenint en compte les relacions  $\gamma_H / \gamma_C = 4$  i  $\gamma_H / \gamma_N = 10$  les equacions queden:

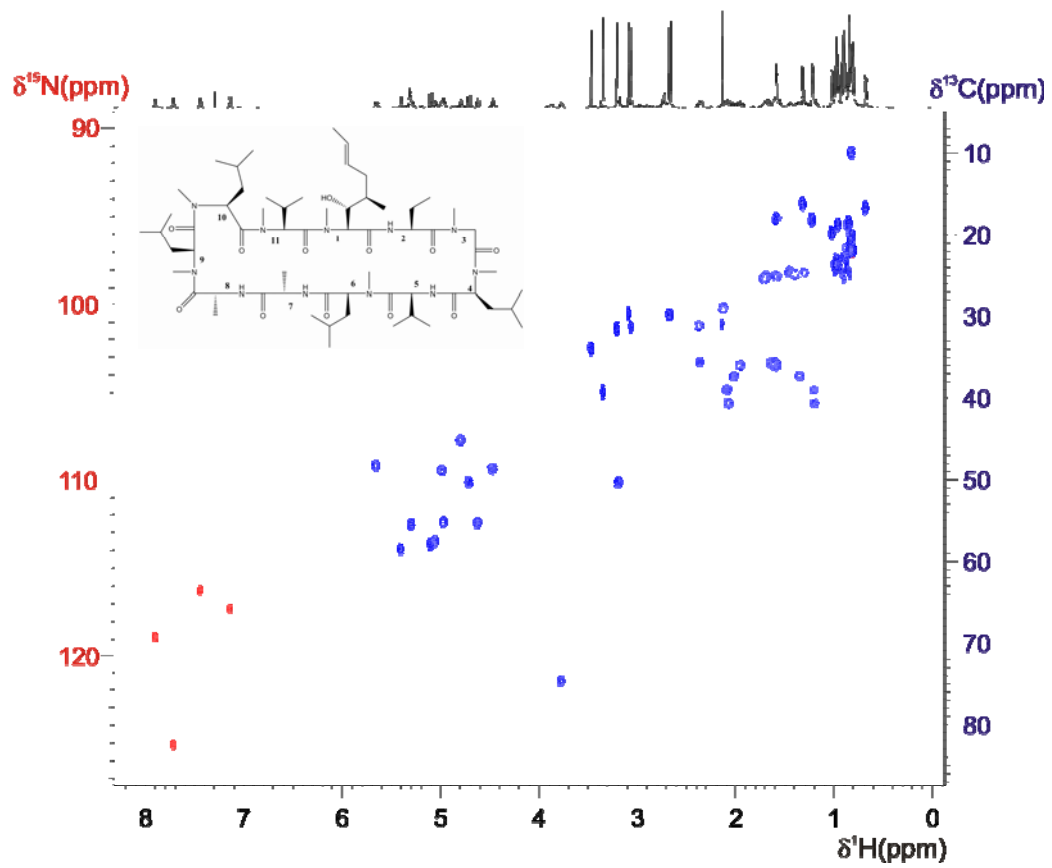
$$-G_2 - 4G_3 = 0$$

$$-G_1 + G_2 - 10G_3 = 0$$

Pel que fa al nombre de pulsos si es compara la seqüència TS-HSQCPEP amb el HSQCPEP estàndard (veure punt 5.2.3 de la tesi) es veu que en canal de  $^1\text{H}$  hi ha dos pulsos més de  $180^\circ$ , en el canal de  $^{15}\text{N}$  hi ha un puls més de  $180^\circ$ , i en el canal de  $^{13}\text{C}$  es mantenen els mateixos pulsos. Aquest darrer fet és molt important perquè la inclusió de més pulsos de  $180^\circ$  de  $^{13}\text{C}$ , degut a la gran dispersió del  $^{13}\text{C}$ , implicaria pèrdues de sensibilitat notables en les senyals allunyades de la freqüència de pulsació (efectes *off resonance*).

Pel que fa a la durada de la seqüència, la versió TS bàsicament té la mateixa durada que el  $^{15}\text{N}$ -HSQCPEP, per tant, per  $^{15}\text{N}$  s'arriba gairebé al 41% de guany en sensibilitat. En canvi, per  $^{13}\text{C}$  la seqüència és més llarga que l'experiment  $^{13}\text{C}$ -HSQCPEP, el que fa que els guanys obtinguts siguin més moderats, entre el 20% i 30%. Concretament és 2.2ms més llarga en cada INEPT concatenat (és a dir 6.6ms en total) als quals s'ha d'afegir el temps que duri el filtre-zz per  $^{13}\text{C}$  ( $t_1'$ ). Aquest darrer s'ha de fer el més curt possible, el que comporta prendre una decisió de compromís entre pèrdua de sensibilitat en  $^{13}\text{C}$  i resolució espectral per  $^{15}\text{N}$ . S'ha d'emfatitzar, però, que la sensibilitat de l'experiment bé determinada pel  $^{15}\text{N}$  que és el nucli menys sensible, per tant, la pèrdua de senyal en  $^{13}\text{C}$  no és *a priori* crítica.

A la **Figura 53** veiem un espectre d'exemple utilitzant la seqüència TS-HSQC. En aquest cas les fases dels pulsos  $\phi_1$  i  $\phi_2$  es troben desfasades  $180^\circ$  el que permet editar quines senyals pertanyen a la correlació  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (vermell) i quines a la correlació  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (blau).

Figura 53. Espectre TS-HSQC de la ciclosporina en  $\text{CDCl}_3$ . (500MHz).

\_\_\_\_\_ *resultats i discussió* \_\_\_\_\_

---

*publicació I*

**IFSERF, an isotope-filtered SERF experiment for the precise measurement of proton-proton coupling constants between chemically equivalent protons**

## 10.- Publicació I

*IFSERF, an isotope-filtered SERF experiment for the precise measurement of proton-proton coupling constants between chemically equivalent protons.*

### 10.1.- Introducció

El treball que es presenta a la següent *publicació I* per a la mesura de constants d'acoblament entre protons químicament equivalents es basa en la concatenació d'un filtre isotòpic basat en la HCP i l'experiment SERF (Selective ReFocusing) de Fäcke i Berger<sup>128</sup>. En aquest punt, doncs, s'ha trobat necessari explicar breument què són els filtres isotòpics i presentar l'experiment SERF.

Els filtres isotòpics, com el seu nom indica, permeten seleccionar un dels isotopòmers presents en la mostra mentre els altres són rebutjats o filtrats. Els filtres isotòpics van néixer de la necessitat d'eliminar la senyal del 98,9% dels protons units a <sup>12</sup>C, respecte el 1,1% units a <sup>13</sup>C (isòtop magnèticament actiu), per a l'obtenció d'espectres de correlació heteronuclear. A la **Figura 54** es mostren els diferents isotopòmers presents en una mostra en abundància natural per a l'àcid acètic i la seva relació amb els diferents experiments bàsics.

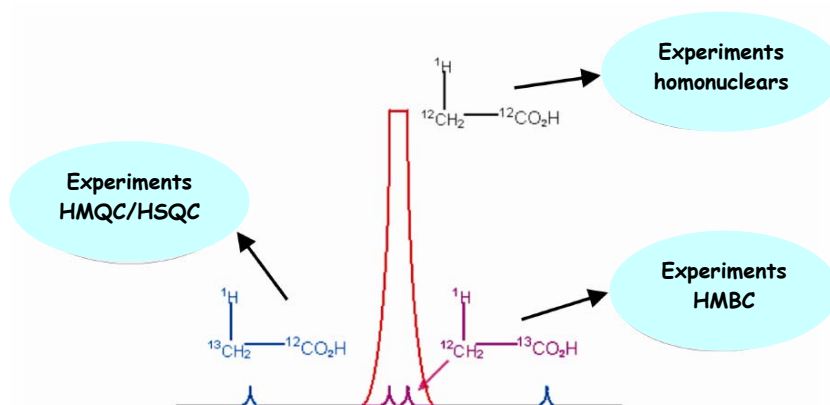


Figura 54. <sup>1</sup>H dels isotopòmers de l'àcid acètic a abundància natural i relació amb els diferents experiments de RMN bàsics.

Avui dia, però, amb les tècniques de marcatge isotòpic existents en els laboratoris de síntesi els seus usos i dissenys s'han vist multiplicats<sup>129</sup>. Alguns exemples són l'operador BIRD<sup>130</sup>, els filtre-X<sup>131</sup> i els semifiltres-X<sup>132</sup>, que permeten separar senyals de <sup>1</sup>H-<sup>12</sup>C envers <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C o bé de <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C (<sup>1</sup>J) envers <sup>1</sup>H-<sup>12</sup>C (<sup>n</sup>J).

<sup>128</sup> Fäcke, T.; Berger, S. *J. Magn. Reson. A.* **1994**, *113*, 114.

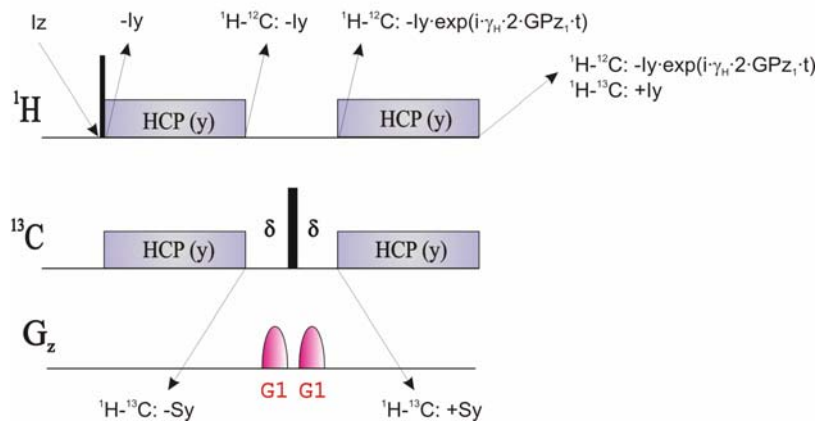
<sup>129</sup> Breeze, A. *Prog. in NMR.* **2000**, *323*, 36.

<sup>130</sup> Garbow, J.R.; Weitekamp, D.P.; Pines, A. *Chem. Phys. Lett.* **1982**, *93*, 504.

<sup>131</sup> a) Wörgötter, E.; Wagner, G.; Wüthrich, K.; *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6162. b) Otting, G.; Senn, H.; Wagner, G.; Wüthrich, K.; *J. Magn. Reson. Chem.* **1986**, *70*, 500. c) Nehaus, D.; Wagner, G.; Vasák, M.; Kägi, J.H.; Wüthrich, K. *Eur. J.*



La introducció dels gradients de camp magnètic permet dissenyar filtres isotòpics molt efectius, basats en el reenforcament de la senyal del isotòpomer desitjat, mentre la senyal de l'isotòpomer no desitjat és desfasada completament. En la seqüència IFSERF que s'ha utilitzat el filtre isotòpic que es presenta a la següent **Figura 55**. En aquest punt s'ha trobat convenient d'explicar com funciona, doncs, no es troba descrit detalladament en la publicació.



**Figura 55.** Filtre isotòpic basat en l'acció dels gradients de camp magnètic i la transferència de magnetització heteronuclear HCP. La durada del temps de HCP ha de ser optimitzada a  $1/J_{CH}$ .

Inicialment la magnetització de protó es porta a l'eix transversal amb l'aplicació d'un puls de  $90^\circ$ . Tot seguit s'aplica HCP optimitzada per tal de produir transferència de polarització dels protons al  $^{13}\text{C}$  si aquests s'hi troben directament units, mentre que la magnetització dels protons que es troba unida a  $^{12}\text{C}$  no es veu afectada per la HCP. A continuació, s'apliquen dos gradients de camp magnètic de la mateixa intensitat amb un puls de  $180^\circ$  de  $^{13}\text{C}$  entre mig. Aquest puls és fonamental per a la diferenciació dels isòtops, mentre la magnetització de protó unida a  $^{12}\text{C}$  no nota el seu efecte, per tant es desfasada per l'acció dels dos gradients, la magnetització de carboni si ho fa, invertint el seu ordre de coherència, de tal manera que la magnetització desfasada pel primer gradient es reenforcada pel segon gradient (cal notar que per a que es produeixi el reenforç la polaritat, durada i força dels dos gradients han de ser les mateixes). El darrer pas es el retorn d'aquesta magnetització de carboni al protó mitjançant HCP.

Un cop comentat el funcionament del filtre isotòpic basat en HCP passem a explicar una mica el funcionament de l'experiment SERF. El diagrama de pulsos de l'experiment SERF així com dos espectres obtinguts per l'androsterona es mostren a la **Figura 56**.

*Biochem.* **1984**, *143*, 659. d) Wörgötter, E.; Wagner, M.; Vasák, J.H.; Wüthrich, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2388. e) Otting, G.; Wüthrich, K. *Quant. Rev. Biophys.* **1990**, *23*, 39.

<sup>132</sup> a) Worgotter, E.; Wagner, G.; Vasák, M.; Kagi, J.H.R.; Wüthrich, K.; *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2388. b) Otting, G. *Encyc. of NMR.* **1996**, *4*, 2239.

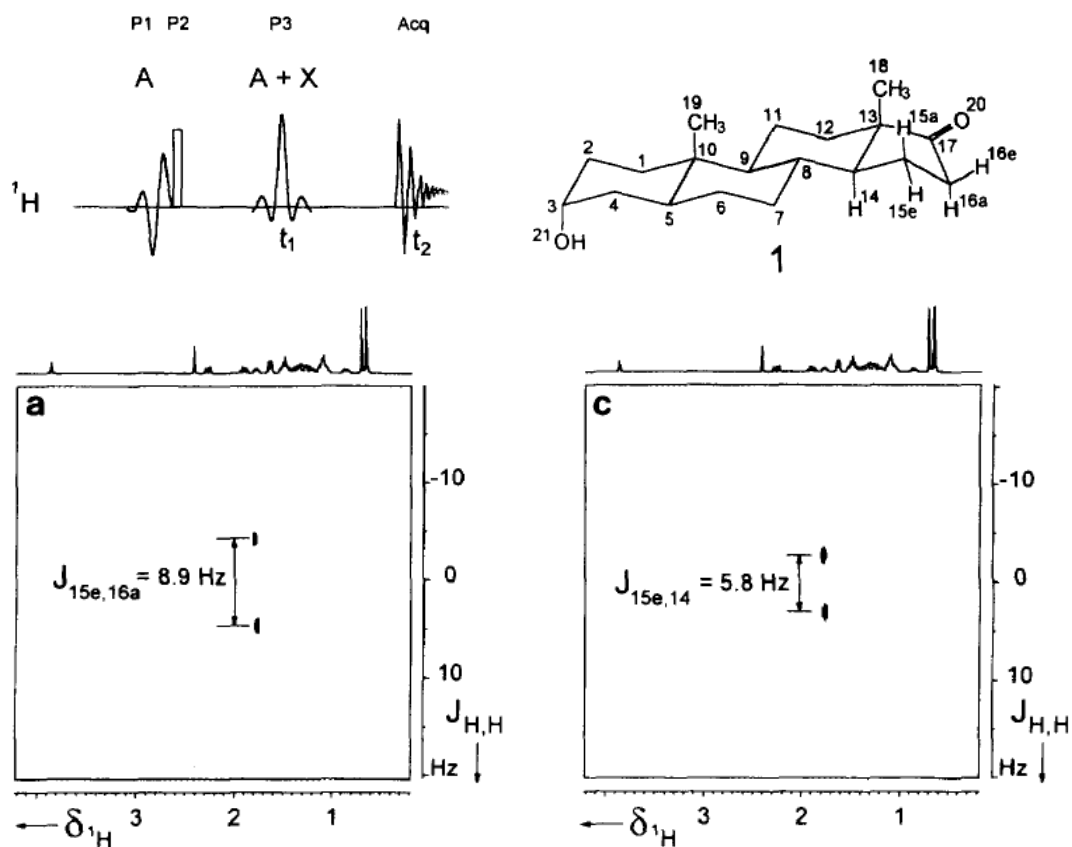


Figura 56. Esquema de pulsos de la seqüència SERF i exemples sobre l'androsterona. P1=pulse de 90° selectiu. P2=puls de purga. P3=puls doblement selectiu sobre els protons A i X. Figura extreta de la publicació original<sup>128</sup>.

Aquest experiment es pot dir que és la variant doblement selectiva del clàssic 2D-Jres publicat per Ernst i col·laboradors<sup>133</sup>, i serveix per determinar exclusivament la constant d'acoblament entre dos protons A i X. El major benefici que aporta aquesta seqüència és que durant el període de temps variable  $t_1$  exclusivament evoluciona la constant d'acoblament  $J_{HH}$  entre els protons d'interès, mentre els acoblaments passius no evolucionen, generant un doblet a F1 que permet la mesura de manera acurada i senzilla. Aquesta evolució exclusiva de l'acoblament d'interès s'aconsegueix mitjançant l'aplicació d'un puls doblement selectiu<sup>134</sup> durant aquest període. Cal dir també que és just aquí on rau la dificultat del mètode, doncs, la generació d'un puls doblement selectiu a dues freqüències simultàniament no és senzilla. En el cas particular de treballar amb molècules simètriques i voler mesurar la constant d'acoblament entre protons químicament equivalents utilitzant la metodologia SERF, no necessitem aquest puls doblement selectiu a freqüències diferents, doncs, òbviament els dos protons implicats tenen la mateixa freqüència de ressonància.

<sup>133</sup> Aue, W.P.; Karthan, J.; Ernst, R.R. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 4426.

<sup>134</sup> Geen, H.; Wu, X.L.; Xu, J.; Friedrich, J.; Freeman, R. *J. Magn. Reson.* **1989**, *646*, 81.



Communication

# IFSERF, an isotope-filtered SERF experiment for the precise measurement of proton–proton coupling constants between chemically equivalent protons

Pau Nolis<sup>a</sup>, Anna Roglans<sup>b</sup>, Teodor Parella<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Servei de Resonància Magnètica Nuclear, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain*

<sup>b</sup> *Departament de Química, Universitat de Girona, Campus de Montilivi s/n, E-17071 Girona, Spain*

Received 13 October 2004; revised 19 November 2004

Available online 22 January 2005

## Abstract

An isotope-filtered selective refocusing (IFSERF) experiment is presented for the sensitive and precise measurement of the proton–proton coupling constant between chemically equivalent protons. The 2D NMR method combines an initial doubly selective isotope filter based on heteronuclear cross-polarization followed by a selective *J*-resolved block. The coupling topologies obtained from several 2D variants of the IFSERF experiment are described for the simultaneous measurement of both proton–proton and proton–carbon coupling constants in the involved AA'XX' spin system. Application on the determination of the relative configuration of double bonds in symmetrical molecules is illustrated.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

*Keywords:* Chemical equivalence; Heteronuclear cross-polarization; proton–proton coupling constants; Molecular symmetry

## 1. Introduction

Frequently, solution-state NMR studies on symmetrical molecules present a great interest due to their non-evident spectral analysis. Thus, the measurement of the mutual proton–proton coupling constant, *J*(HH), or the detection of the corresponding NOE between two chemically equivalent protons can not be performed by routine NMR methods. This is mainly due to the degeneracy of the NMR resonances that provides an apparent spectral simplicity, even in the case of smallest and simplest molecular structures but having some characteristic symmetry element such as a *C<sub>n</sub>* axis or a symmetry plane. For instance, fundamental but not obvious structural issues such as the relative configuration of 1, 2-equally disubstituted olefinic or ethylenic oxides, the structural determination of symmetric polycyclic

aromatic hydrocarbon derivatives or of symmetric organometallic compounds could be some examples of these challenging topics already discussed in the past. So far, the measurement of *J*(HH) on these equivalent systems has been often carried out by direct analysis of 1D <sup>1</sup>H-coupled <sup>13</sup>C spectra or the corresponding <sup>13</sup>C satellites in <sup>1</sup>H spectra by optional aid of selective CW decoupling [1] or by simulation of the resulting multiplets in more complicated cases and, most recently, by analyzing the satellite lines in X-coupled inverse correlation 2D HMQC or 2D HSQC experiments [2]. However, all these classical approaches suffer of improper accuracy and precision and they are only relatively helpful in very simple spin systems. The successful application of these traditional methods is generally hampered when applied on resonances displaying complex multiplet patterns, when many different and small proton–proton coupling constants are involved, or when other overlapped resonances interfere the analysis. More recently, an innovative way to measure these coupling constants from the

\* Corresponding author. Fax: +24 25812291.

E-mail address: [teodor.parella@uab.es](mailto:teodor.parella@uab.es) (T. Parella).

indirect F1 dimension of a 2D X-filtered TOCSY–HSQC map has been reported [3]. The authors proposed a variable  $t_1$  period consisting of a selective TOCSY process between the involved protons followed by an isotope filter. The desired  $J(\text{HH})$  coupling value can be directly extracted from the doublet obtained in the indirect dimension of the 2D spectrum.

In this communication we report an alternative doubly selective NMR pulse scheme for the simple, sensitive, and precise measurement of  $J(\text{HH})$  between chemically equivalent protons. The coupling constant value is extracted directly from the doublet originated in the indirect dimension of a 2D  $J$ -resolved spectrum and without need of any post-processing protocol. The pulse scheme can be easily turned into other interesting applications, such as the measurement of the one-bond and two-bond proton–carbon coupling constants of the involved proton and carbon nuclei or the design of carbon-edited NOE experiments that can afford additional and complementary data to resolve structural question on such symmetric spin systems and, in addition, can extend its application to other molecules that do not exhibit symmetrical properties.

## 2. NMR experiments

The isotope-filtered selective refocusing (IFSERF) pulse sequence presented here (Fig. 1) to measure  $J(\text{HH})$  in symmetrical molecules of the general type  $\text{R}_1\text{CH}=\text{CHR}_1$  and  $\text{R}_1\text{R}_2\text{CH}-\text{CHR}_1\text{R}_2$ , can be under-

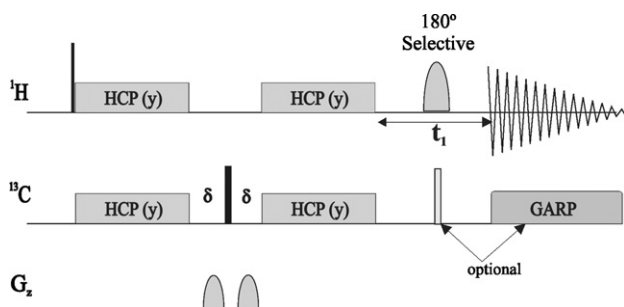


Fig. 1. General pulse scheme of the 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  IFSERF experiment to measure proton–proton and proton–carbon coupling constants in symmetrical AA'XX' spin systems. A minimum four-step exocycle phase cycle is applied on the  $180^\circ$  X pulse ( $x, y, -x, -y$ ) and the receiver ( $x, -x$ ). For selective transfer, the HCP mixing scheme is executed as selective continuous-wave CW RF-fields simultaneously applied from the  $y$  axis in both channels during a  $\Delta$  period. Pulsed-field gradients of duration  $\delta$  applied with a 1:1 ratio are indicated by shaded shapes on the line  $G_z$ .  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  offsets are set on resonance of the selected resonances through out the experiment. An optional non-selective  $180^\circ$  X pulse can be also applied simultaneously to the selective  $180^\circ$   $^1\text{H}$  pulse to refocus the large heteronuclear coupling constant in the indirect dimension. Experimental aspects such as the length of the selective  $180^\circ$  pulse, the heteronuclear X decoupling during acquisition or the application of this  $180^\circ$  X pulse in the middle of the  $t_1$  period are illustrated in Fig. 2 and discussed along the text.

stood as an isotope-filtered version of the SERF experiment [4]. The pulse scheme consists of two independent and well differentiated parts. The first part is a selective isotope filter designed to breakdown the molecular symmetry by selecting the corresponding  $^{13}\text{C}$ -bound proton signal. This filter is made by a two-way doubly selective heteronuclear cross-polarization (HCP) scheme that offers excellent selective excitation and sensitivity properties [5–7]. Briefly, after the initial  $90^\circ$  ( $^1\text{H}$ ) pulse applied from the  $x$  axis, in-phase coherence transfer takes place during the doubly selective HCP( $y$ ) period, optimized to  $\tau = 1/{}^1J(^1\text{H}-^{13}\text{C})$ , where cross-polarization, and selective excitation is performed simultaneously by applying weak RF continuous-wave fields under HCP conditions on-resonance to both  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  spins from the parallel  $y$  axis. After a dephasing period in which a gradient carbon echo purges undesired magnetization, a second HCP( $y$ ) block, identical to the first HCP block, transfers back the selected in-phase  $^{13}\text{C}$  magnetization to its directly attached  $^1\text{H}$  nucleus also via  ${}^1J(^1\text{H}-^{13}\text{C})$ . The result of this initial step is a clean in-phase proton excitation of the  $^{13}\text{C}$ -bound proton multiplet from which the direct one-bond proton–carbon,  ${}^1J(\text{CH})$ , and the vicinal proton–proton,  ${}^3J(\text{HH})$ , coupling constants could be directly extracted in a 1D spectrum only for signals displaying simple satellite multiplet patterns with clearly resolved splittings.

However, in the general case of more complex multiplet shapes it is essentially impossible the direct extraction of  $J(\text{HH})$  from these 1D spectra with some reasonable accuracy and, therefore, improved NMR methods to be applied on a wide range of situations are strongly required. Thereby, in these cases the addition of a doubly selective spin–echo building block after the described isotope filter can greatly facilitate such measurements. The general idea we propose is quite similar to the SERF experiment which was reported to measure specifically the coupling constant value between two previously chosen proton resonances using a  $J$ -resolved type experiment [4]. However, as a major feature of our IFSERF experiment, the selective  $180^\circ$  proton pulse applied in the middle of the variable  $t_1$  period does not need to be double-frequency selective. Thus, a standard gaussian shaped  $180^\circ$  pulse with a duration around 3 ms will invert simultaneously both  $^{13}\text{C}$ - and  $^{12}\text{C}$ -bound protons and, therefore, only this mutual coupling constant will be modulated during the  $t_1$  period whereas all other homonuclear couplings will be efficiently refocused. At the end, proton detection with  $^{13}\text{C}$  GARP decoupling recovers the magnetic equivalence and the multiplet structure is conveniently collapsed in the detected F2 dimension, resulting in an optimum gain in sensitivity. Thus, the active  $J(\text{HH})$  coupling constant value can be directly extracted with good precision from the doublet originated in the indirect F1 dimension of the 2D  $J$ -resolved map. The starting isotope filter offers

excellent  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  suppression and therefore the use of gradients for coherence selection is not really necessary.

### 3. Results and discussion

To demonstrate the main features of the proposed IFSERF experiment, we have chosen a mixture of the

Table 1

Experimental chemical shifts and coupling constants involving the olefinic protons of **1** and **2**

NMR parameter	Chemical structures	
	<b>1</b>	<b>2</b>
$\delta$	Ethyl fumarate (1)	Ethyl maleate (2)
$^1J(\text{CH})$	+169.1	+167.6
$^2J(\text{CH})$	-4.5	-2.0
$^3J(\text{HH})$	+15.9	+12.2

two symmetrical diethyl fumarate, **1**, and diethyl maleate, **2**, isomers. The conventional proton spectrum shows two singlets resonating at 6.82 $\delta$  and 6.27 $\delta$  ppm, respectively. Although that *cis/trans* configuration in double bonds could be tentatively ascertained from proton chemical shift data, it can be dangerous to apply this trend to other systems and therefore it is highly advisable to get additional and most conclusive NMR data to confirm such verification (Table 1).

Fig. 2 shows several coupling topologies obtained after applying several versions of the 2D IFSERF sequence on the  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  olefinic pair of **2**. The non-symmetrical multiplet structure consists of a large one-bond proton–carbon-coupling constant and a smaller vicinal proton–proton-coupling constant. The experimental variables used on these spectra has been the length/selectivity of the selective  $180^\circ$  proton pulse, the application of an optional hard  $180^\circ$  carbon pulse simultaneously to this selective pulse (an heteronuclear echo) in order to refocus heteronuclear coupling evolution in the F1 dimension and the use of optional  $^{13}\text{C}$  decoupling during proton acquisition. When applying a very selective  $^1\text{H}$   $180^\circ$  pulse (with a gaussian shape of 48 ms, effective

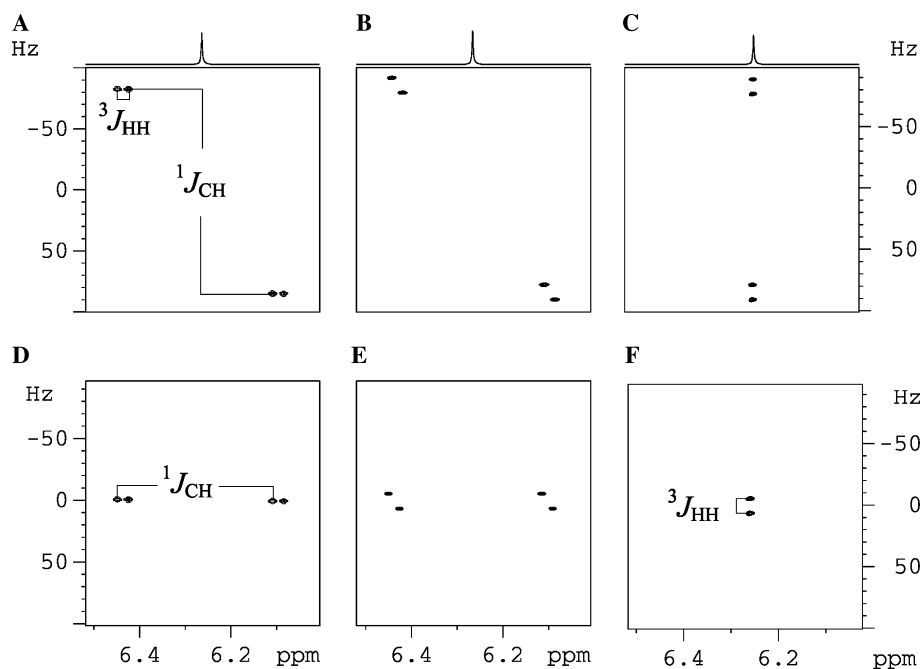


Fig. 2. Experimental spin coupling topology of the  $^1\text{H}_\text{A}$  spin belonging to a  $^1\text{H}_\text{A}$ – $^{13}\text{C}_\text{A}$ – $^{12}\text{C}_\text{B}$ – $^1\text{H}_\text{B}$  moiety after applying the IFSERF experiment of Fig. 1 under different conditions: (A) Selective  $180^\circ$   $^1\text{H}$  pulse of 48 ms and no heteronuclear decoupling during acquisition; (B) Selective  $180^\circ$   $^1\text{H}$  pulse of 3 ms applied simultaneously to a hard  $^{13}\text{C}$   $180^\circ$  pulse and without heteronuclear decoupling during acquisition; (C) as B but with decoupling during acquisition; (D) as A but applying a hard  $180^\circ$   $^{13}\text{C}$  pulse simultaneously to the selective pulse; (E) as B but without the  $180^\circ$   $^{13}\text{C}$  pulse; and (F) as E with heteronuclear decoupling during acquisition. All 2D spectra have been recorded on a BRUKER AVANCE 500 MHz spectrometer equipped with a triple-resonance inverse probe head incorporating a z-gradient coil. The sample used consists of a mixture of 30 mg of **1** and 12 mg of **2** dissolved in 0.7 ml  $\text{CDCl}_3$ . The amplitudes of the selective CW RF-fields have been matched to  $\gamma^l B_1^l / 2\pi = \gamma^s B_1^s / 2\pi = 65$  Hz and placed on-resonance to the desired  $^1\text{H}_\text{A}$ – $^{13}\text{C}_\text{A}$  pair of compound **2**. The following general experimental conditions were applied: pre-scan delay of 1 s, HCP mixing delay of  $\Delta = 1/J(\text{CH}) = 7$  ms. Eight scans were acquired for each one of the 32 increments (spectral width of 250 Hz) in the F1 dimension with 1K data points in the F2 dimension. For convenience, data were processed in magnitude mode using an unshifted sinusoidal window function in both dimension and zero filling in F1 to 128 real data points but there is no inconvenient to present data in a phase sensitive mode. See text for more details.

bandwidth of 25 Hz) only the  $^{12}\text{C}$ -bound  $^1\text{H}$  signal is inverted and the satellites  $^{13}\text{C}$ -bound signals are not affected during  $t_1$ , therefore, a typical E.COSY coupling pattern results showing the one-bond  $J(\text{CH})$  as a passive spin (Fig. 2A). If the proton pulse (with a gaussian shape of 3 ms, effective bandwidth of 400 Hz) affects both  $^{12}\text{C}$ - and  $^{13}\text{C}$ -bound proton resonances, the mutual  $J(\text{HH})$  evolves during  $t_1$  whereas the heteronuclear  $J(\text{CH})$  is refocused (Fig. 2E). Simultaneously to this selective proton pulse, it is also possible to apply an inversion carbon  $180^\circ$  pulse that modifies the coupling topology accordingly to the refocusing of the heteronuclear coupling during  $t_1$  (compare Figs. 2A and E with D and B, respectively). Finally, if heteronuclear decoupling is applied during acquisition (Figs. 2C and F, with and without the  $180^\circ$  carbon pulse, respectively), the double-doublet splitting is collapsed to the original singlet multiplet structure in the detected F2 dimension affording an important sensitivity gain and allowing the direct extraction of the homonuclear coupling from the doublet displayed in the high-resolved indirect F1 dimension and without further multiplet component analysis (Fig. 2F).

Similar conclusions can be extracted from the analysis of the relayed  $^1\text{H}_\text{B}$  spin (belonging to the  $^1\text{H}_\text{A}$ - $^{13}\text{C}_\text{A}$ - $^{12}\text{C}_\text{B}$ - $^1\text{H}_\text{B}$  moiety) in a IFSERF-TOCSY experiment in which a homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY mixing period is added after the isotope filter to transfer the in-phase magnetization from the selected  $^{13}\text{C}$ -bound  $^1\text{H}$  to the  $^{12}\text{C}$ -bound  $^1\text{H}$ . In this case, a different modulation for the corresponding geminal  $^2J(\text{CH})$  and the vicinal  $J(\text{HH})$  coupling constants take place (data not shown) and, in cases of small  $^2J(\text{CH})$  values, spin-state selective editing properties could be also incorporated obtaining two separate spin-edited multiplets from which the sign and the magnitude of  $^2J(\text{CH})$  can be easily measured [6,7].

For simplest spin systems lacking of additional proton-proton coupling constants, such as those found in both **1** and **2** compounds, the IFSERF pulse sequence can be also applied under broadband conditions that means the application of a non-selective isotope filter consisting of a DIPSI-2 pulse scheme simultaneously to both  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  channels as a HCP scheme and a conventional hard proton  $180^\circ$  pulse in the middle of the  $t_1$  period as the non-selective inversion element. This approach enables the simultaneous measurement of several  $J(\text{HH})$  at the same time from a single spectrum and would extend the application of the IFSERF methodology to mixture analysis of isomers. The broadband IFSERF spectrum for the mixture of **1** and **2** shows well-resolved doublet splittings for each resonance (Fig. 3) allowing the quick distinction and unambiguous assignment of the relative *cis/trans* configuration in basis of the general trend that *trans* isomers always exhibit larger  $J(\text{HH})$  values than *cis* isomers.

We have also make use of the IFSERF experiment to differentiate and to characterize two symmetrical nitro-

gen-containing 15-membered macrocycle isomers, the *trans* isomer **3** showing a  $\text{C}_2$  axis and the *cis* isomer **4** showing a symmetry plane [8]. The classical analysis of their  $^{13}\text{C}$  satellites by 1D or 2D spectra is highly complicated because of the neighbouring methylene groups rendering the  $J(\text{HH})$  determination practically impossible. Individual IFSERF spectra for each isomer (Fig. 4)

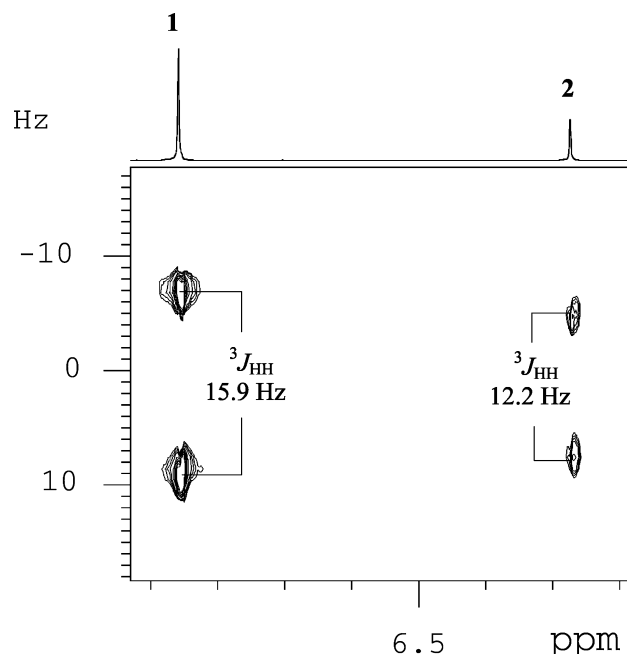


Fig. 3. 2D broadband IFSERF spectrum of a mixture of **1** and **2** using a 5.5 KHz DIPSI-2 pulse train as a non-selective HCP mixing in the initial isotope filter. Eight scans were acquired for each one of the 32 increments (spectral width of 50 Hz) in the F1 dimension with 1K data points in the F2 dimension. All other experimental conditions as described in legend of Fig. 2.

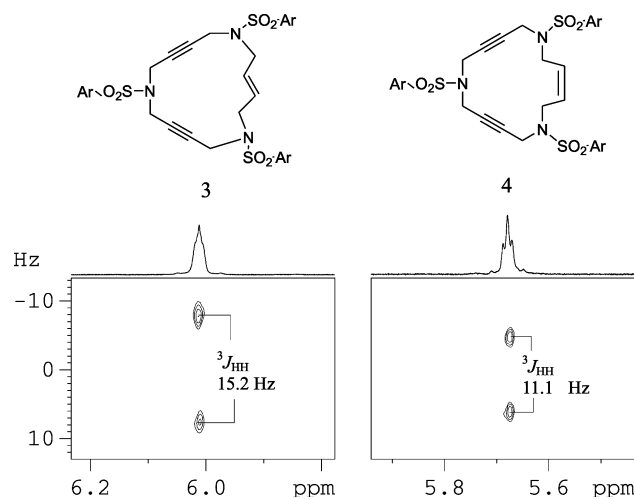
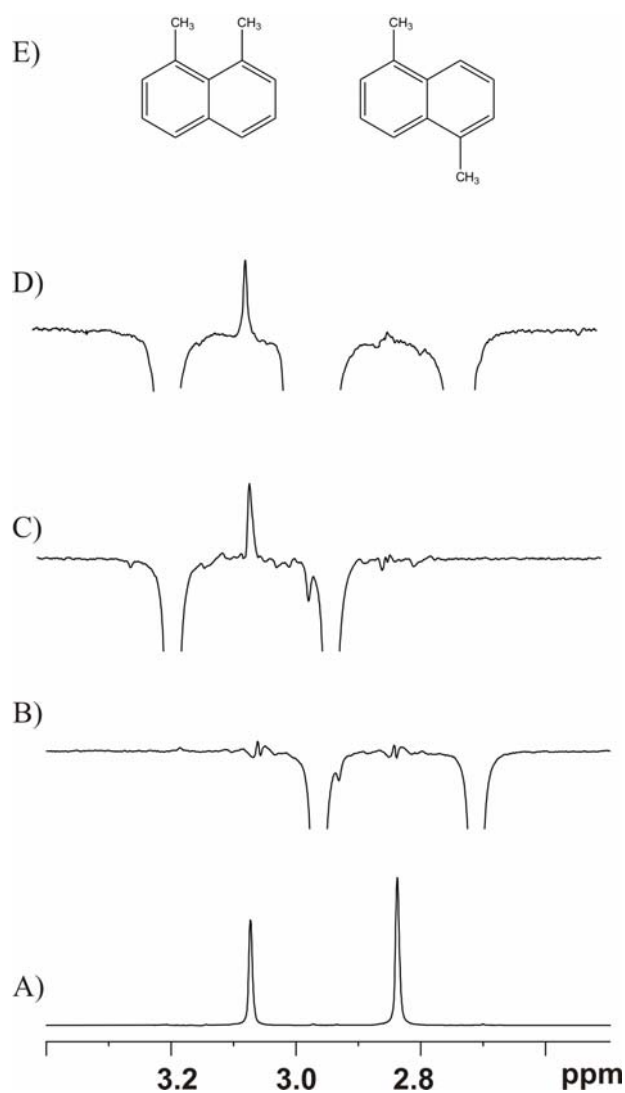


Fig. 4. Separate 2D IFSERF spectra of **3** and **4** acquired as described in Fig. 2. One hundred and twenty-eight scans were acquired for each one of the 32 increments (spectral width of 50 Hz) in the F1 dimension with 1K data points in the F2 dimension.



**Figura 60:** A)  $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 500MHz. Es mostra la regió espectral dels metils. B) Espectre IF-NOESY selectiu sobre el metil de l'1,8-dimetilnafté. No s'observa NOE. C) Espectre IF-NOESY selectiu sobre el metil de l'1,5-dimetilnafté. S'observa NOE. D) Espectre IF-NOESY *broadband*. S'observa NOE només en el  $\text{CH}_3$  de l'1,5-dimetilnafté. E) Estructures de l'1,5- i 1,8-dimetilnafté.



show clearly the usefulness and the simplicity of the proposed experiment.

Because of the resulting in-phase magnetization after the HCP block, the isotope-filter scheme can be also amenable to be combined with other mixing blocks providing, for instance, useful isotope-filtered NOE-type experiments (IF-NOESY or IF-ROESY experiments) (see [5b]) that could be also found enormous interest in the NOE measurements in other symmetric spin systems lacking for protons, such as tri- and tetra-substituted olefinic systems, in a similar way as reported using a variety of NMR methods such as direct heteronuclear NOE or HOESY experiment [9], HSQC–NOESY-type experiments [10], NOESY–HSQC experiments [11], and selective 1D NOE applied on the satellite lines by double-frequency excitation [12].

#### 4. Conclusions

In summary, a remarkable sensitive and selective method has been developed to yield accurate measurement of the proton–proton coupling constant between chemically equivalent protons. The benefits of the proposed IFSERF experiment has been highlighted in the determination of the relative configuration of symmetrical double bonds and also could be exemplified to many other structural studies involving other different symmetrical spin systems as well as to non-equivalent mutually coupled protons but having the same or similar proton chemical shifts. Due to the highly selective properties of the initial isotope-filtered building block, the experiment can be applicable even in overcrowded proton and carbon spectral regions. As demonstrated for related versions of the SERF experiment, the proposed sequence could be also suitable to other applications as, for instance, in the spectral analysis of enantiomers dissolved in weakly oriented chiral liquid crystals or the measurement of enantiomeric excess [13].

#### Acknowledgments

Financial support for this research provided by MCYT (Projects BQU2003-01677 and BQU2002-04002) is gratefully acknowledged. P. Nolis thanks “Generalitat de Catalunya” for a predoctoral grant. We also thank the Servei de Ressonància Magnètica Nuclear, UAB, for allocating instrument time to this project.

#### References

[1] R. Radeaglia, H. Poleschner, M. Heydenreich, The (Z)/(E)-configurational analysis of isolated double bonds in pheromones and unsaturated fatty acids. The use of 1D and 2D *J*-resolved <sup>1</sup>H

off-resonance techniques in <sup>13</sup>C NMR spectroscopy, *Magn. Reson. Chem.* 29 (1991) 1028–1035.

[2] A. Mucci, F. Parenti, L. Schenetti, On the recovery of <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> and the reduction of molecular symmetry by simple NMR inverse detection experiments, *Eur. J. Org. Chem.* (2002) 938–940.

[3] B. Luy, G. Hauser, A. Kirschning, S.J. Glaser, Optimized NMR spectroscopic method for the configurational analysis of chemically equivalent vicinal protons, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 42 (2003) 1300–1302.

[4] T. Fäcke, S. Berger, SERF a new method for H,H spin-coupling measurement in organic chemistry, *J. Magn. Reson. A* 113 (1995) 114–116.

[5] (a) E. Chiarparin, P. Pelupessy, G. Bodenhausen, Selective cross-polarization in solution-state NMR, *Mol. Phys.* 95 (1998) 759–767; (b) E. Chiarparin, P. Pelupessy, B. Cutting, T.R. Eykyn, G. Bodenhausen, Normalized one-dimensional NOE measurements in isotopically labeled macromolecules using two-way cross-polarization, *J. Biomol. NMR* 13 (1999) 61–65; (c) P. Pelupessy, E. Chiarparin, G. Bodenhausen, Excitation of selected proton signals in NMR of isotopically labeled macromolecules, *J. Magn. Reson.* 138 (1999) 178–181; (d) P. Pelupessy, E. Chiarparin, Hartmann–Hahn polarization transfer in liquids: an ideal tool for selective experiments, *Conc. Magn. Reson.* 12 (2000) 103–124.

[6] T. Parella, J. Belloc, F. Sánchez-Ferrando, Measurement of the sign and the magnitude of heteronuclear coupling constants from spin-state-edited *J*-cross-polarization NMR experiments, *Magn. Reson. Chem.* 42 (2004) 852–862.

[7] (a) T. Parella, Spin-state-selective excitation in gradient-selected heteronuclear cross-polarization NMR experiments, *J. Magn. Reson.* 167 (2004) 266–272; (b) B. Luy, Spin state selectivity and heteronuclear Hartmann–Hahn transfer, *J. Magn. Reson.* 168 (2004) 210–216.

[8] I. González, A. Pla-Quintana, A. Roglans, A. Torrent, M. Moreno-Mañas, T. Parella, J. Benet-Buchholz, Transition metal-mediated intramolecular [2 + 2 + 2] cycloadditions of cyclic triynes and enediyne, *Chemistry*, Eur. J., in press.

[9] O. Walker, P. Mutzenhardt, D. Canet, Heteronuclear Overhauser experiments for symmetric molecules, *Magn. Reson. Chem.* 41 (2003) 776–781.

[10] (a) R. Wagner, S. Berger, Heteronuclear edited gradient selected 1D and 2D NOE spectra: determination of the NOE effect between chemically equivalent protons, *Magn. Reson. Chem.* 35 (1997) 199–202; (b) J. Kawabata, E. Fukushi, J. Mizutani, 2D <sup>13</sup>C-coupled HMQC–ROESY: a probe for NOEs between equivalent protons, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 1115–1117.

[11] (a) R.M. Gschwind, X. Xie, P.R. Rajamohanam, Gs-HSQC–NOESY versus gs-NOESY–HSQC experiments: signal attenuation due to diffusion; application to symmetrical molecules, *Magn. Reson. Chem.* 42 (2004) 308–312; (b) R.E. Hoffman, R. Shenhar, I. Willner, H.E. Bronstein, L.T. Scott, A. Rajca, M. Rabinovitz, Heteronuclear editing method for detecting NOE between chemically equivalent protons: application to polycyclic aromatic hydrocarbons, *Magn. Reson. Chem.* 38 (2000) 311–314.

[12] L. Lunazzi, A. Mazzanti, A new NMR approach for the assignment of symmetric isomers, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 12155–12157.

[13] (a) J. Farlon, J.P. Baltaze, P. Lesot, D. Merlet, J. Courtieu, Heteronuclear selective refocusing 2D NMR experiments for the spectral analysis of enantiomers in chiral oriented solvents, *Magn. Reson. Chem.* 42 (2004) 594–599; (b) J. Farlon, D. Merlet, P. Lesot, J. Courtieu, Enantiomeric excess measurements in weakly oriented chiral liquid crystal solvents through 2D <sup>1</sup>H selective refocusing experiments, *J. Magn. Reson.* 158 (2002) 169–172.

## 10.3.- Ampliació de resultats

### 10.3.1.- IF-TOCSY-SERF

En aquest apartat es presenta una versió modificada de l'IFSERF, anomenada IF-TOCSY-SERF, on s'ha introduït un període de transferència de polarització homonuclear TOCSY (utilitzant el tren de pulsos MLEV17) entre el filtre isotòpic i el període de temps variable SERF (Fig. 57). L'experiment permet la mesura de la  $J_{HH}$  entre protons equivalents i introduir la modulació de la  ${}^nJ_{CH}$ .

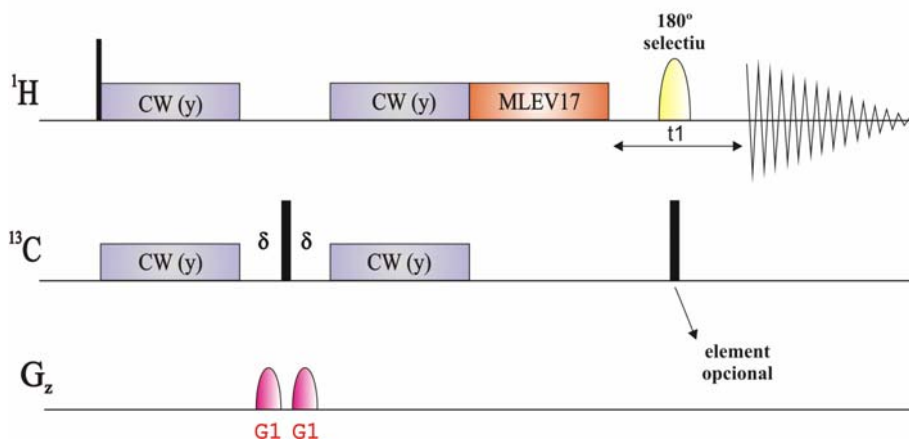


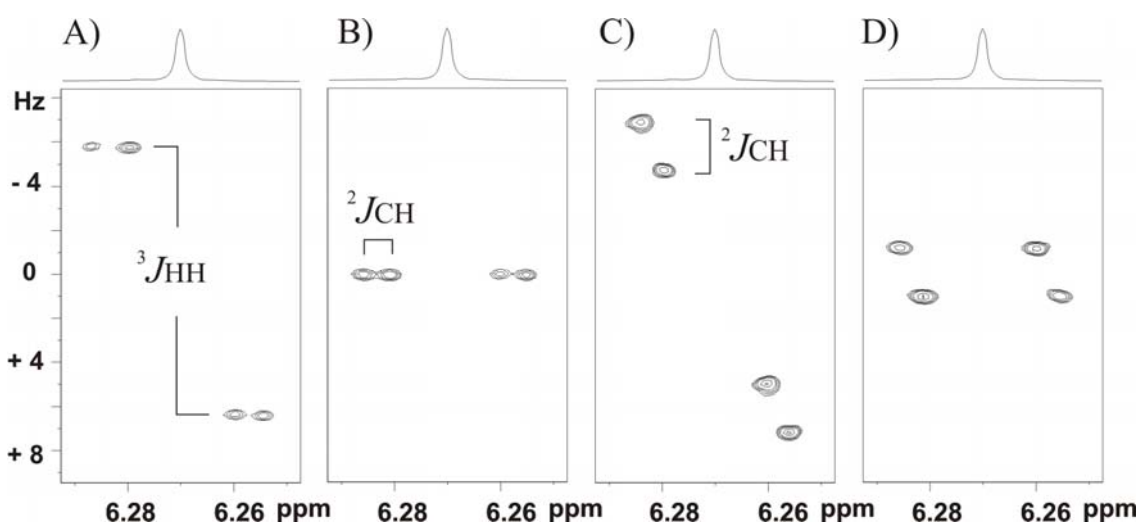
Figura 57: Diagrama de pulsos de l'IF-TOCSY-SERF. S'utilitza el cicle de fases EXORCYCLE al 1<sup>er</sup> impuls de  $180^\circ$  de  ${}^{13}\text{C}$  (x, y, -x, -y) i al receptor (x, -x). El període d'aplicació de CW és  $1/J_{CH}$ . Els *offsets* de  ${}^1\text{H}$  i  ${}^{13}\text{C}$  s'han de posar *on resonance*. Els PFG s'apliquen amb una relació relació 1:1. El 2<sup>on</sup> impuls de  $180^\circ$  de  ${}^{13}\text{C}$  és un element opcional (veure text). El control de l'amplada del impuls de  $180^\circ$  selectiu de  ${}^1\text{H}$  és un paràmetre important de la seqüència.

El filtre isotòpic inicial basat en HCP serveix per seleccionar les molècules amb un dels protons químicament equivalents unit a  ${}^{13}\text{C}$ , és a dir, estem treballant sobre el sistema de *spins*  ${}^1\text{H}_A$ - ${}^{13}\text{C}_A$ - ${}^{12}\text{C}_B$ - ${}^1\text{H}_B$  on  $\text{H}_A$  i  $\text{H}_B$  són químicament equivalents però no ho són magnèticament, doncs, s'acoblen diferentment al  ${}^{13}\text{C}_A$ . La incorporació del TOCSY fa que, després del filtre isotòpic, la magnetització del protó  $\text{H}_A$ , unit al  ${}^{13}\text{C}$ , es transfereixi al protó químicament equivalent  $\text{H}_B$ , unit al  ${}^{12}\text{C}_B$ , essent aquest el protó finalment detectat. El temps de mescla del TOCSY dependrà de l'eficiència de la transferència de polarització homonuclear. En el cas concret d'estudiar sistemes olefínics aquest temps no haurà de ser llarg (15 ms és suficient), doncs, en dobles enllaços el valor de les constants d'acoblament és gran.

Anàlogament al vist per l'experiment IFSERF, en la seqüència IF-TOCSY-SERF, també podem jugar amb l'amplada del impuls selectiu de  $180^\circ$  de  ${}^1\text{H}$  i amb la incorporació d'un impuls dur de  $180^\circ$  de  ${}^{13}\text{C}$ , per tal d'obtenir diferents modulacions dels senyals durant  $t_1$ , però en comptes de veure involucrada la  ${}^1J_{CH}$  (entre el  $\text{H}_A$  i el  ${}^{13}\text{C}_A$ ) hi trobem la  ${}^2J_{CH}$  (entre el  $\text{H}_B$  i el  ${}^{13}\text{C}_A$ ). En aquesta versió no s'aconsella la utilització de desacoblament durant l'adquisició. La raó és que

si la transferència homonuclear des del protó  $H_A$  al protó  $H_B$  via TOCSY no és completa, poden quedar senyals residuals dels satèl·lits (protó  $H_A$ ) que al desacoblar interferiran amb els pics creuats desitjats del protó  $H_B$ .

A la **Figura 58** es mostren els espectres obtinguts en una mostra de maleat de dietil sota diferents condicions experimentals. Quan apliquem el puls selectiu de  $^1H$  amb una amplada de banda de 400Hz (puls Gaussià de 3ms) invertim els protons  $H_A$  i  $H_B$  simultàniament, observant la modulació de la  $^3J_{HH}$  a F1 (espectre A). En canvi, si el puls té una amplada de 25Hz (puls Gaussià de 48ms) només invertim el  $H_B$  i la  $^3J_{HH}$  no modula durant  $t_1$  (espectre B). És a dir el puls selectiu desacobla la constant homonuclear durant l'eco. Quan es realitzen els experiments afegint el puls de  $^{13}C$  observem la modulació de la  $^2J_{CH}$  a F1 (espectres C i D). L'evolució de la  $^3J_{HH}$  a F1 segueix depenen de l'amplada del puls selectiu de protó. Si aquesta és de 400Hz modula (espectre C) i si és de 25Hz no ho fa (espectre D). Tots els experiments s'han realitzat sense desacoblament de  $^{13}C$  durant l'adquisició, el que comporta observar les modulacions tant de la  $^3J_{HH}$  com de la  $^2J_{CH}$  a F2 en tots els experiments.

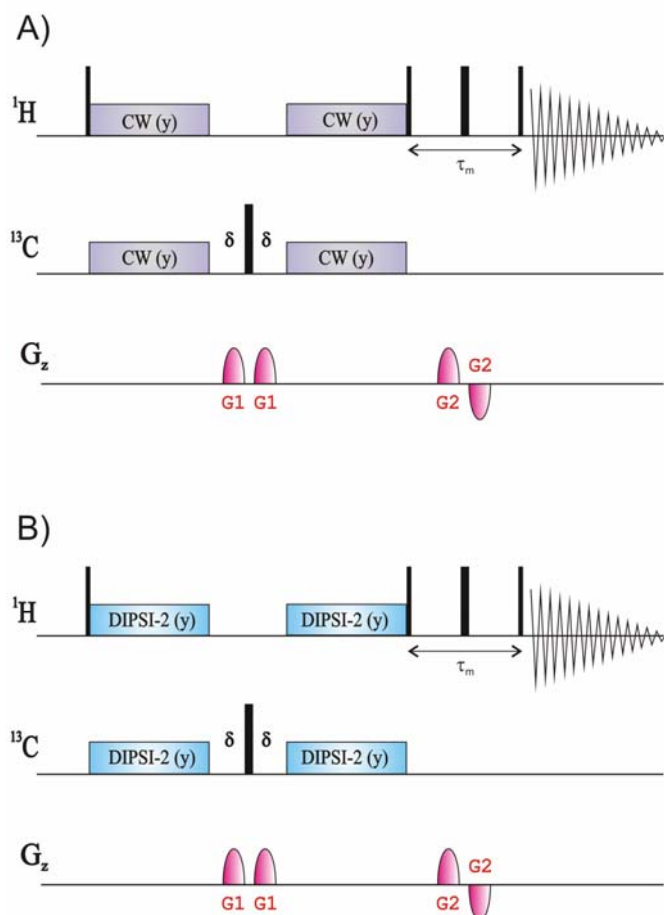


**Figura 58:** Diferents topologies del  $^1H_B$  del sistema de *spins*  $^1H_A$ - $^{13}C_A$ = $^{12}C_B$ - $H_B$  després d'aplicar la seqüència IF-TOCSY-SERF a la mostra de maleat de dietil sota diferents condicions experimentals. A) puls selectiu de  $180^\circ$  de 3ms. B) puls selectiu de 48ms. C) Com A + puls de  $^{13}C$  durant  $t_1$ . D) com B + puls de  $^{13}C$  durant  $t_1$ . Les amplituds dels camps selectius de RF amb CW s'han ajustat a  $\gamma^1B^1(I)/2\pi = \gamma^S B^1(S)/2\pi = 65\text{Hz}$ , situant l'*offset on resonance* del parell  $^1H_A$ - $^{13}C_A$ . S'ha utilitzat 1s com a interval pre-scan, el temps de mescla de HCP ha estat de 7ms. 8 Scans han estat adquirits per cada un dels 32 increments (amplada espectral de 50Hz) a la dimensió F1 amb 1K punts a la dimensió F2. S'ha processat els espectres en mode magnitud amb *zero filling* en ambdues dimensions.

### 10.3.2.- IF-NOESY

L'IF-NOESY és un experiment que permet la mesura de NOE entre protons químicament equivalents. Es basa en l'aplicació d'un filtre isotòpic basat en HCP, que genera magnetització en fase, seguit d'un període de temps variable on la magnetització es troba a l'eix z per tal d'observar relaxació creuada (NOE). De fet, l'experiment ja havia estat dissenyat per

Bodenhausen i col·laboradors<sup>135</sup> en la seva versió selectiva (**Fig. 59A**), però no s'havia assajat per a la mesura de NOE entre protons químicament equivalents. En aquesta tesi s'ha provat que també pot ser útil en aquest cas, i a més, s'ha posat a punt la versió no selectiva utilitzant el tren de pulsos DIPSI-2 per a produir HCP (**Fig. 59B**).



**Figura 59:** A) Diagrama de pulsos de la versió selectiva de l'1H-NOESY. Els *offsets* de  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  s'han de posar *on resonance* durant tot l'experiment. B) Diagrama de pulsos de la versió *broadband* de l'1H-NOESY. En totes dues versions s'utilitza el cicle de fases EXORCYCLE al 1er puls de  $180^\circ$  de  $^{13}\text{C}$  (x, y, -x, -y) i al receptor (x, -x). El període d'aplicació de HCP és de  $1/{}^1\text{JCH}$  s. La relació de gradients que s'aplica és G1:G2 40:13. El temps de mescla ( $\tau_m$ ) utilitzat és de 400ms.

A la **Figura 60** es mostren els espectres obtinguts en una barreja de 1,8-dimetilnafté i 1,5-dimetilnafté. Aquests s'han pogut diferenciar mitjançant l'observació de NOE entre els protons dels metils químicament equivalents. Cal notar que la dificultat rau en què el NOE s'ha d'observar a la mateixa freqüència de ressonància on és troben els protons del metil units a  $^{12}\text{C}$  (99% dels protons), fent necessària una bona qualitat espectral per discernir entre efecte NOE o artefactes de resta del cicle de fases.

<sup>135</sup> Chiarparin, E.; Pelupessy, P.; Cutting, B.; Eykyn, T.; Bodenhausen, G. *J. Biomol. NMR*. 1999, 13, 61.

---

*publicació II*

**Measurement of coupling constants in symmetrical spin systems  
using a full multiple-step cross-polarization-driven NMR pulse scheme**

## 11.- Publicació II

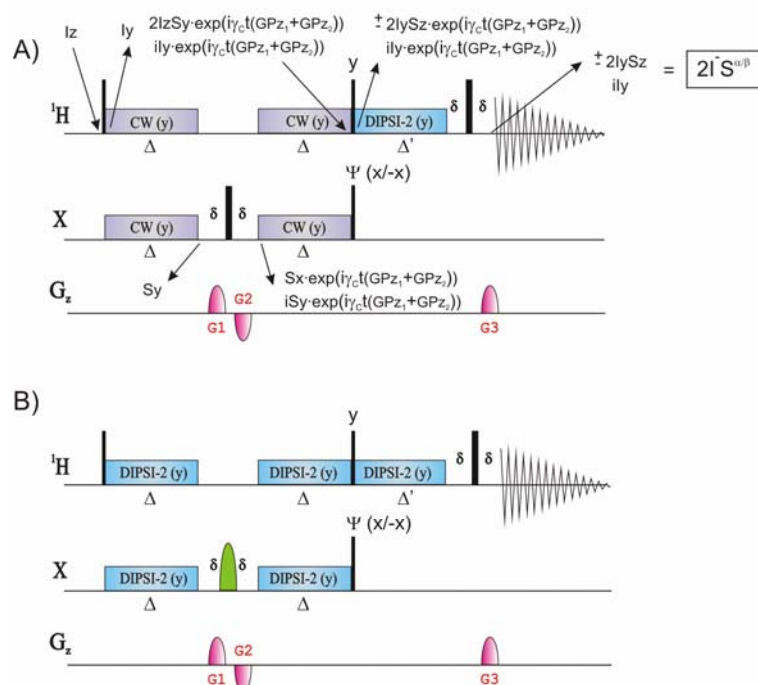
*Measurement of coupling constants in symmetrical spin systems using a full multiple-step cross-polarization-driven NMR pulse scheme.*

### 11.1.- Introducció

En aquesta introducció s'explicarà resumidament el treball presentat al 2004 per Parella i col·laboradors<sup>136</sup>, doncs, es pot considerar que la *publicació II* de la present tesi doctoral n'és la continuació. En l'anomenat treball es presenten diferents variants de la seqüència HCP-TOCSY amb editat  $S^3$ , per a la mesura de la magnitud i el signe de constants d'acoblament  $^nJ_{CH}$  a llarga distància. A continuació es descriuen breument les seqüències, sense entrar en els detalls experimentals i teòrics que poden ser trobats a la publicació original.

#### 1D<sup>4</sup>H-X $\alpha,\beta$ -HCP-TOCSY

Les seqüències que es presenten a la **Figura 61** són versions 1D selectives. Els operadors producte presents a diferents punts només s'especifiquen a la seqüència (A), per la (B) valdrien els mateixos (s'han omès els factors trigonomètrics i els signes).

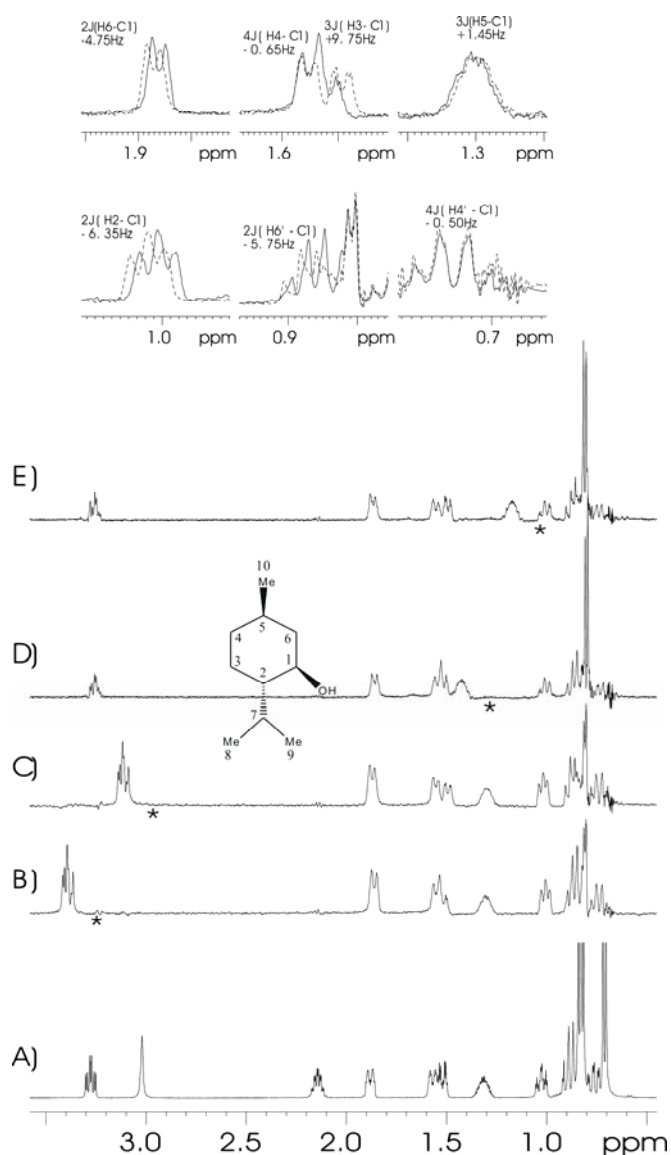


**Figura 61:** Seqüències de pulsos per als experiments 1D  $^1\text{H-X } \alpha,\beta\text{-HCP-TOCSY}$ <sup>136</sup> per a la mesura de  $^nJ_{XH}$ . A) La transferència HCP és du a terme selectivament amb CW. B) La transferència HCP amb DIPSI-2 no és selectiva. La selectivitat s'aconsegueix amb un puls amb forma al canal de l'heteronucli. Figura extreta de la publicació original on es detallen les condicions experimentals<sup>136</sup>.

<sup>136</sup> Parella, T.; Belloc, J.; Sanchez-Ferrando, F. *J. Magn. Reson. Chem.* **2004**, *42*, 852.

Les seqüències consisteixen en un primer bloc HCP per a la codificació de la magnetització dels protons units a  $^{13}\text{C}$  i el retorn de la magnetització al protó, la qual és editada amb l'estat de *spin*  $\alpha$  o  $\beta$  del carboni segons la fase del puls  $\Psi$  aplicada, que fa que les magnetitzacions en fase i antifase presents en aquest punt es sumin o es restin. Tot seguit es produeix transferència homonuclear de protó mitjançant el tren de pulsos DIPSI-2 (transferència TOCSY). L'important durant aquest període és que l'editat d'estat de *spin* selectiu es preserva, permetent la determinació acurada de les constants d'acoblament  $^nJ_{\text{CH}}$  mitjançant la mesura del desplaçament dels senyals corresponents als subespectres  $\alpha$  i  $\beta$ .

A la **Figura 62** es mostren els espectres 1D per als parell  $\text{C}_1\text{-H}_1$  i  $\text{C}_5\text{-H}_5$  del mentol obtinguts amb la seqüència de la **Figura 61.A**.

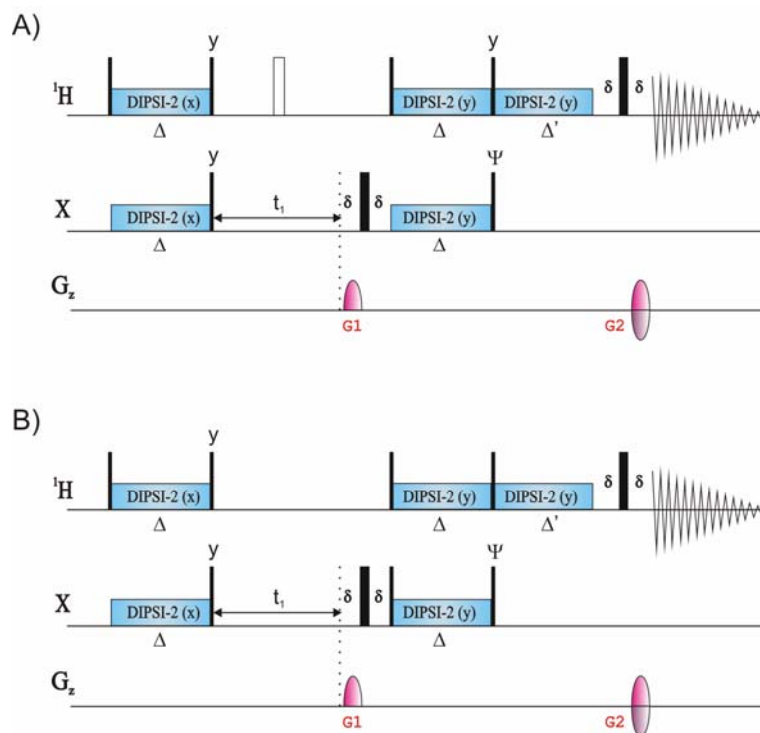


**Figura 62:** A) Espectre  $^1\text{H}$  del mentol. B) Espectre 1D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$   $\alpha$ -HCP-TOCSY sobre el parell  $\text{C}_1\text{-H}_1$ . C) Espectre 1D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$   $\beta$ -HCP-TOCSY sobre el parell  $\text{C}_1\text{-H}_1$ . D) Espectre 1D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$   $\alpha$ -HCP-TOCSY sobre el parell  $\text{C}_5\text{-H}_5$ . E) Espectre 1D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$   $\beta$ -HCP-TOCSY sobre el parell  $\text{C}_5\text{-H}_5$ . Figura extreta de la publicació original on es detallen les condicions experimentals<sup>136</sup>.

Cal comentar que aquestes seqüències també poden ser utilitzades optimitzant els temps  $\Delta$  de HCP a  ${}^nJ_{CH}$ , enlloc de fer-ho a  ${}^1J_{CH}$ , i sense l'aplicació del TOCSY, el qual permet la determinació de constants d'acoblament a llarga distància  ${}^nJ_{CH}$  en carbonis no protonats, solucionant un dels majors inconvenients de les seqüències HCP-TOCSY. Exemples es mostren en la publicació original<sup>136</sup>.

## 2D- ${}^1H$ -X $\alpha,\beta$ -HCP-TOCSY

A la **Figura 63** es presenten les versions 2D, el funcionament de les qual es anàleg a les monodimensionals. Es poden dissenyar diferents versions segons el tipus de topologia dels pics creuats que es necessiti. La diferència rau en les diferents restriccions en les transferències de coherència durant els períodes de mescla (després de  $t_1$ ). Així podem triar entre diferents editats<sup>137</sup>: E.COSY, el TROSY i el F2- $\alpha,\beta$ . El primer es recomana per a molècules petites on no hi hagi problemes de solapament. Qualsevol dels altres dos seria l'adequat en cas de tenir solapament.



**Figura 63.** Esquemes de pulsos per a la seqüència HCP amb diferents editats. A) F2- $\alpha/\beta$ -editat, o TROSY si no s'aplica el puls de  $180^\circ$  durant  $t_1$ . B) Editat E.COSY. El procediment eco-antiteco s'aplica invertint el gradient G2 i la fase  $\Psi$  en scans alternats. Figura extreta de la publicació original on es detallen les condicions experimentals<sup>136</sup>.

Com a exemple es mostren els experiments amb diferents editats per a la molècula de mentol (**Fig. 64**)

<sup>137</sup> Parella, T. J. *Biomol. NMR*. 2004, 29, 37.



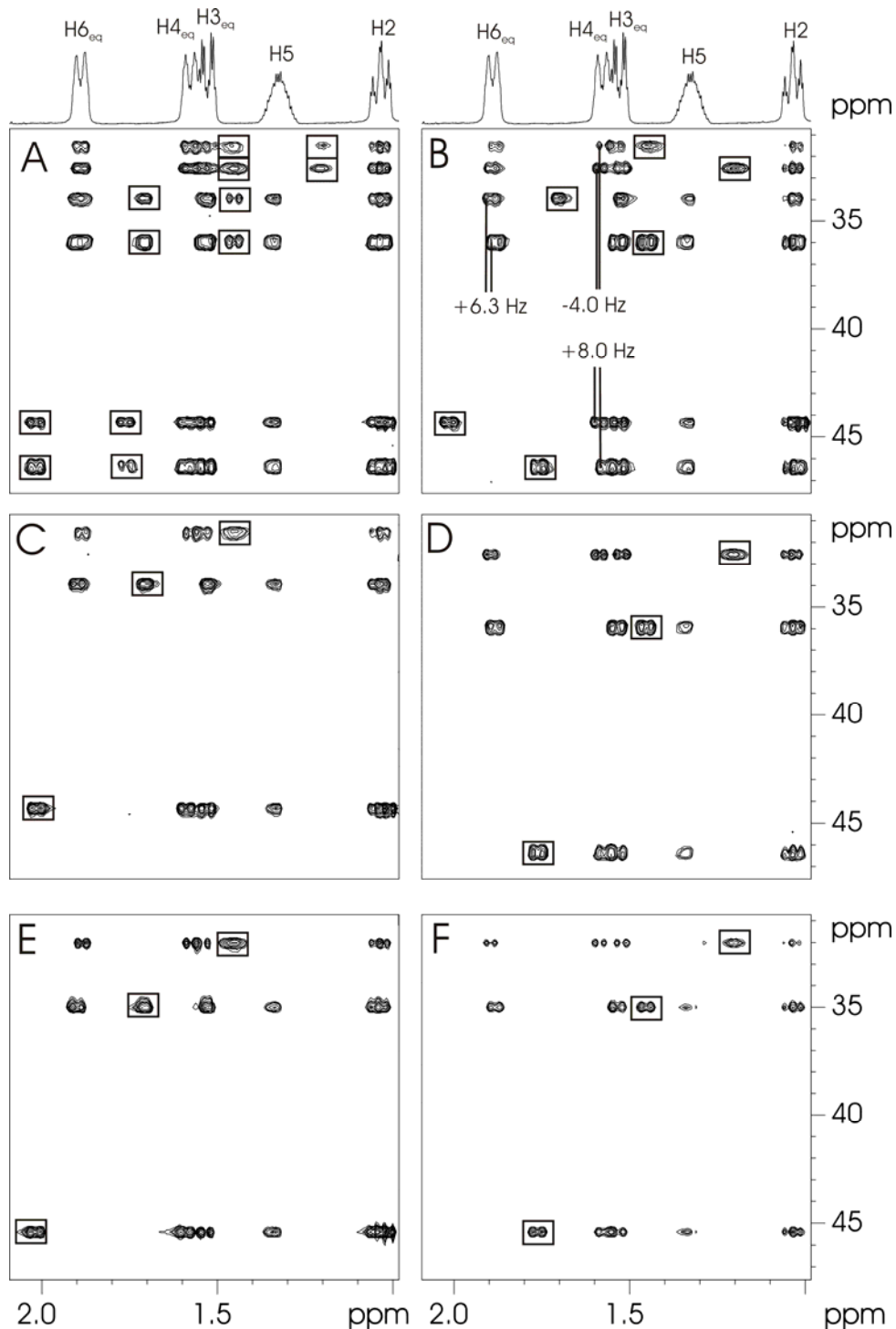


Figura 64. Espectres del mentol utilitzant experiments 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HCP-TOCSY amb diferents editats. A) Totalment acoblat. B) Editat E.COSY. C) Editat anti-TROSY. D) Editat TROSY. E) F2- $\alpha$ -editat F) F2- $\beta$ -editat. Figura extreta de la publicació original on es detallen les condicions experimentals<sup>136</sup>.

Un cop presentades aquestes seqüències ja es pot passar a lectura de la publicació, on s'ha partit d'aquestes seqüències, tant 1D i 2D, i s'hi ha afegit un altre bloc HCP després del TOCSY per tal de manipular la magnetització de tal manera que es permet la mesura de constants homonuclears. Les noves seqüències s'han aplicat a la mesura de constants d'acoblament entre protons químicament equivalents, però bé tot això s'explica a la publicació que segueix a continuació.

# Measurement of coupling constants in symmetrical spin systems using a full multiple-step cross-polarization-driven NMR pulse scheme

Pau Nolis,<sup>1</sup> Anna Roglans<sup>2</sup> and Teodor Parella<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Servei de Resonància Magnètica Nuclear, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193, Bellaterra, Barcelona, Spain

<sup>2</sup> Departament de Química, Universitat de Girona, Campus de Montilivi s/n, E-17071 Girona, Spain

Received 4 March 2005; Revised 10 June 2005; Accepted 5 July 2005

New NMR pulse schemes completely driven under homonuclear and heteronuclear cross-polarization conditions are proposed for the study and the measurement of coupling constants in symmetrical molecules in solution. The appropriate superimposition of independent magnetization components can afford several spin-selective multiplet patterns that are suitable for the determination of the magnitude and the sign of proton–proton and proton–carbon coupling constants with optimum sensitivity levels. A detailed product operator formalism analysis for the proposed doubly selective 1D and nonselective 2D HCP-TOCSY versions is provided and experimental verification for the configurational analysis of symmetric olefinic systems having chemical equivalence is demonstrated. Copyright © 2005 John Wiley & Sons, Ltd.

**KEYWORDS:** chemical equivalence; heteronuclear cross-polarization; proton–proton coupling constants; proton–carbon coupling constants; molecular symmetry

## INTRODUCTION

The determination of proton–proton coupling constants,  $J(\text{HH})$ , can become a key parameter to quickly distinguish the relative stereochemistry or configuration through a symmetry center in symmetrical molecules. In principle, this coupling cannot be extracted directly and with simplicity from the conventional proton or carbon NMR spectra because of degenerated resonances and, therefore, modified NMR experiments are required to extract them with accuracy. Classical approaches based on the direct detection of the satellite resonances in the conventional proton<sup>1</sup> or in the 2D correlation HMQC/HSQC spectra<sup>2</sup> suffer from poor precision and they show very limited applicability for the optimal measurement of  $J(\text{HH})$ . Recently, two related approaches yielding the same type of spectra have been reported for such measurements. Luy *et al.*<sup>3</sup> proposed a 2D  $J$ -selective TOCSY-HSQC pulse scheme and our group also reported an isotope-filtered version of the SERF (selective refocusing) experiment,<sup>4</sup> called *IFSERF*, to measure this coupling from the clean doublet originated from the indirect dimension of a 2D  $J$ -resolved map.<sup>5</sup>

In our aim to find improved NMR methods to measure these  $J(\text{HH})$  values in more general conditions and with better precision, we exploit a further extension of the principles

previously described to achieve spin-state selection ( $S^3$ ) and heteronuclear coherence transfer by means of heteronuclear cross-polarization (HCP) instead of traditional INEPT-like pulse trains.<sup>6</sup> The reasons for this choice are the excellent selectivity properties,<sup>7</sup> the optimal performance and the high flexibility to manipulate the different magnetization components as a function of the relative axis orientation of the applied HCP field.<sup>6</sup>

To achieve these particular  $S^3$  states, a two-way out-and-back approach consisting of efficient heteronuclear coherence transfer by applying low-power, continuous-wave HCP fields simultaneously to a directly attached  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  pair has been described.<sup>6</sup> The addition of a homonuclear TOCSY transfer after this spin-editing step allows the efficient measurement of long-range proton–carbon coupling constants.<sup>8</sup> Here we describe a further extension of this pulse sequence by using an additional planar mixing transfer also based on the HCP principles. This idea was already proposed in earlier works focused on the measurement of  $J(\text{HH})$  coupling constants at natural abundance<sup>9</sup> and labeled<sup>10</sup> molecules and also for the measurement of  $J(\text{HF})$  in fluoro-containing compounds,<sup>11</sup> but always using INEPT-type building blocks. A similar sequence using a NOESY block instead of the TOCSY block was also been reported to measure the magnitude and the sign of residual H,H-dipolar couplings in labeled proteins.<sup>12</sup> To our knowledge, this is the first pulse scheme for liquid-state NMR samples that uses exclusively four independent homonuclear or heteronuclear transfer steps under cross-polarization (CP) conditions. The short

\*Correspondence to: Teodor Parella, Servei de Resonància Magnètica Nuclear, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193, Bellaterra, Barcelona, Spain. E-mail: teodor.parella@uab.es  
Contract/grant sponsor: MCYT; Contract/grant number: BQU2003-01677 and BQU2002-04002.

echo delays included into the pulse sequence to accommodate the two decoding/encoding gradients are the only pseudo, free-evolution periods and the obtained results confirms that CP-driven experiments can be a reliable alternative to conventional pulse-interrupted delay schemes.

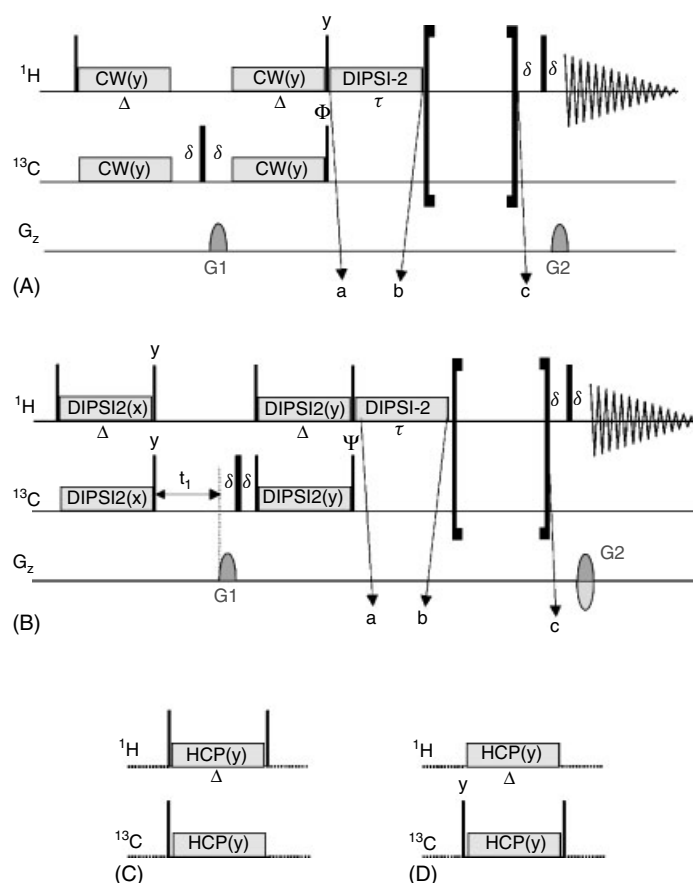
### NMR experiments

Figure 1 shows the general pulse scheme of the proposed HCP-TOCSY experiment. It can be readily observed that the pulse timing looks like a typical solid-state NMR pulse sequence because of its CP nature. Analogue selective 1D and nonselective 2D versions of the experiment are proposed, and the role of the building blocks C and D will be explained in detail subsequently. The one-dimensional, double-frequency version of the experiment (Fig. 1(A)) is suitable to be used on simple spin systems and provides excellent sensitivity and resolution with reduced experimental time for well-isolated resonances. Otherwise, a more general spin-edited 2D E.COSY approach (Fig. 1(B)) is also proposed for the measurement of the sign and the magnitude of heteronuclear  $J(\text{CH})$  and homonuclear  $J(\text{HH})$  values from a single 2D spectrum. This can be highly helpful

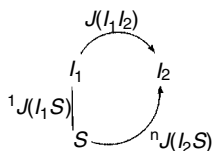
in cases where selective excitation can be strongly restricted because of overlapping effects or to the presence of several compounds in the same sample, such as mixture of isomers. Other spin-edited coupling patterns, such as F2- $\alpha/\beta$  or TROSY/antiTROSY-like experiments could be also designed with minor modifications, and they would afford the same results as the reported E.COSY version but in two separate and more simplified spectra. No experimental details of these later approaches will be given here but more information can be found in Ref. (13).

Let us to consider the step-by-step product operator formalism analysis in the HCP-TOCSY experiment on an isolated heteronuclear three-spin system (Scheme 1). Four different homonuclear/heteronuclear steps driven under HCP conditions can be clearly distinguished, taken as a reference the doubly selective 1D version (Fig. 1(A) and (C)). The overall transformations at each point in the pulse sequence (time a, b, and c in Fig. 1) can be summarized in the following observable magnetization components:

$$I_{1z} \xrightarrow{\text{start}} I_1 + S^{\alpha/\beta} \xrightarrow{\text{time} - a} I_2 + S^{\alpha/\beta} \xrightarrow{\text{time} - b} I_2 + I_1^{\alpha/\beta} \xrightarrow{\text{time} - c} \quad (1)$$

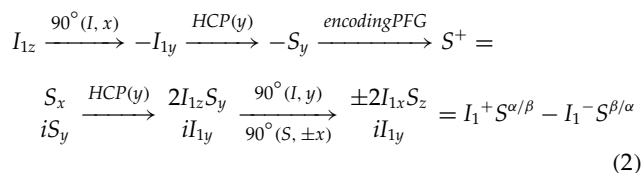


**Figure 1.** 1D and 2D full HCP-driven pulse schemes to measure the magnitude and the sign of  $1J(\text{CH})$  (point a),  ${}^nJ(\text{CH})$   $n > 1$  (point b) and  $J(\text{HH})$  coupling constants (point c). (A) Doubly-selective 1D version based on the application of H,C-doubly selective CP transfer based on low-power continuous-wave radio-frequency fields; (B) 2D E.COSY-type  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlation version based on the exclusive application of nonselective DIPS1-2 pulse trains. (C) HCP building block to achieve spin-edited IP-to-IP transfer that allows the E.COSY-style measurement of  $J(\text{HH})$ . (D) HCP-based building block to achieve IP-to-AP transfer that allows the simultaneous measurement of  $J(\text{CH})$  and  $J(\text{HH})$  using the DQ-ZQ methodology. The duration of each HCP and homonuclear TOCSY periods are set to  $\Delta = 1/J(\text{XH})$  and  $\tau$ , respectively. The HCP mixing process described in blocks C and D can be a low-power CW (selective transfer) or a DIPS1-2 pulse train (broadband transfer). See text for more details on the use of blocks C and D.

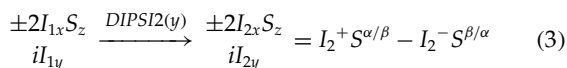


Scheme 1

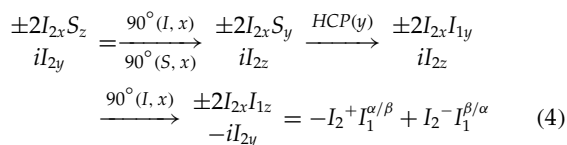
The last echo gradient at the end of the pulse sequence affords the detectable  $I_1^-$  or  $I_2^-$  components. First, in-phase  $I_{1y}$  to in-phase  $S_y$  magnetization transfer is achieved using a parallel HCP mixing process.<sup>6</sup> Then, in-phase  $S$  magnetization encoded by the gradient effect in the form of a mixture of  $S^+$  and  $S^-$  is transferred to a mixture of in-phase (IP) and anti-phase (AP)  $I$  magnetization. Addition and subtraction of these two independent components, by setting  $\Phi = x$  or  $-x$ , yield clean  $S^3$  proton multiplets in which the  $I_1$  proton shows the  $\alpha/\beta$  spin state of the directly-attached  $S$  nucleus (see point a in Fig. 1(A)).



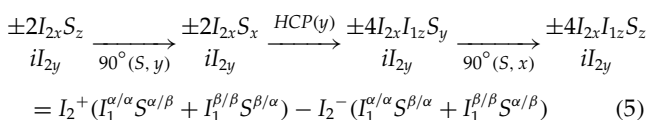
Only the first  $I_1^+S^{\alpha/\beta}$  term becomes observable after the last gradient echo. This  $S^3$  magnetization can be further relayed to other  $J$ -coupled protons by an isotropic  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY transfer consisting of a DIPSI-2 pulse scheme, which retains the original  $S$  spin state. At this point, the analysis of the relative displacement in the relayed  $I_2$  peak is amenable for the measurement of the sign and the size of long-range proton-carbon coupling constants<sup>7</sup> (point b).



In the optional last step marked between brackets, a bilinear rotation element made under the same planar mixing conditions as the initial HCP step can be inserted to restore the initial  $I_1$  magnetization (Fig. 1(C)). The resulting clean spectra allow the measurement of  $J(\text{HH})$  by the relative displacement between the two separated spin-edited multiplets (point c).

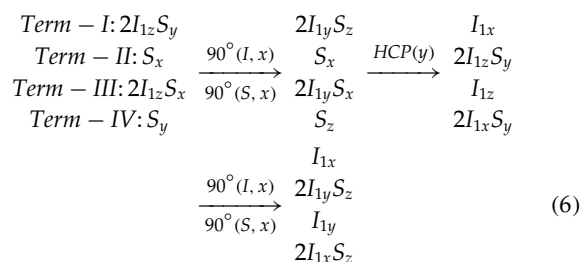


On the other hand, a different spin manipulation arises with a simple modification of this last HCP element (Fig. 1(D)) that combines two independent IP and double-AP terms. This option allows the simultaneous determination of  $J(\text{HH})$  and  $J(\text{CH})$  values using a double-quantum/zero-quantum (DQ-ZQ) methodology in which the resulting two 1D spectra, acquired separately with  $\Phi = x$  and  $\Phi = -x$ , yield two multiplets displaying  $J(\text{HH}) \pm J(\text{CH})$  values, respectively.

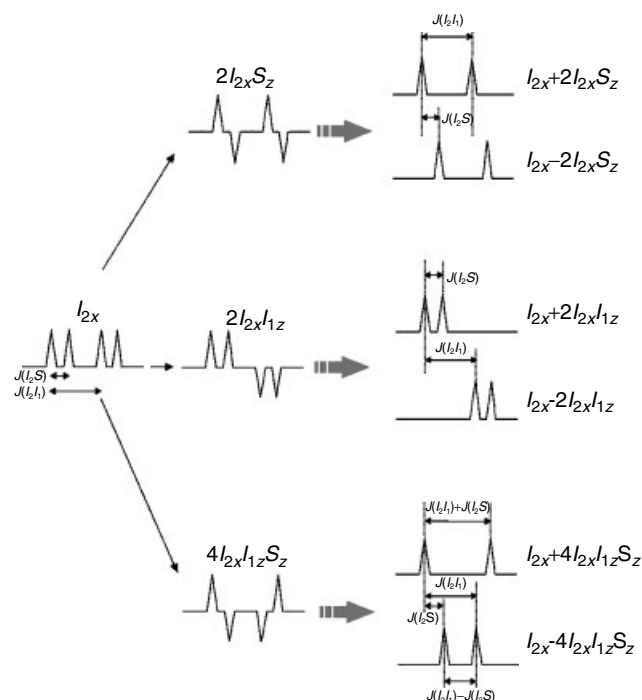


The different theoretical spin coupling patterns originated by the addition of these two-spin or three-spin AP components on the IP  $I_{1x}$  component (Eqns 2, 3 and 4) are graphically summarized in Scheme 2.

Figure 1(B) shows the pulse scheme of the 2D counterparts. HCP is applied under broadband conditions and the indirect dimension is created by allowing the indirect, free  $^{13}\text{C}$  evolution without  $^1\text{H}$  decoupling in a conventional way. In the proposed case, no  $^{13}\text{C}$  decoupling is applied during acquisition and therefore clean E.COSY peak patterns are obtained after convenient data acquisition and processing using the echo-antiecho protocol. In order to obtain in-phase absorption multiplets in both dimensions, the phase of the initial HCP process must be orthogonal (from the  $x$ -axis) with respect to the available  $I_y$  magnetization and the pulses bracketing the second HCP block must be set accordingly to achieve E.COSY-style transfer.<sup>8</sup> The evolution at time a is defined by the following E.COSY-type transfer in which two independent  $S^3$ -to- $S^3$  coherence transfers (terms I + II and III + IV) take place (signs and trigonometric factors are omitted for simplicity):



At time point b, the isotropic homonuclear TOCSY transfer creates magnetization of the relayed  $I_2$  spin, which afford information about the long-range heteronuclear

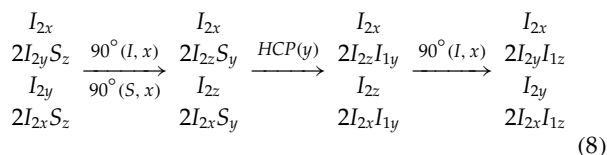


Scheme 2

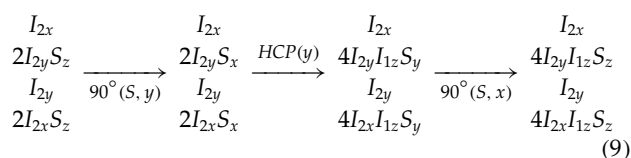
coupling constant.

$$\begin{array}{ccc} I_{1x} & & I_{2x} \\ 2I_{1y}S_z & \xrightarrow{\text{DIPSI}-2} & 2I_{2y}S_z \\ I_{1y} & & I_{2y} \\ 2I_{1x}S_z & & 2I_{2x}S_z \end{array} \quad (7)$$

And the final step (point c) can be understood as a partial  $S_z$  in-phase to in-phase  $I_{1z}$  transfer in which two of the four available components are not affected:



In the case of the 2D DQ–ZQ approach (Scheme 1B incorporating the block 1D), the final step based on the application of HCP from the  $y$ -axis can be summarized as a partial  $S_z$  to  $2I_{1z}S_z$  transfer, whereas, the transverse  $I_{2x,y}$  components are unaltered:



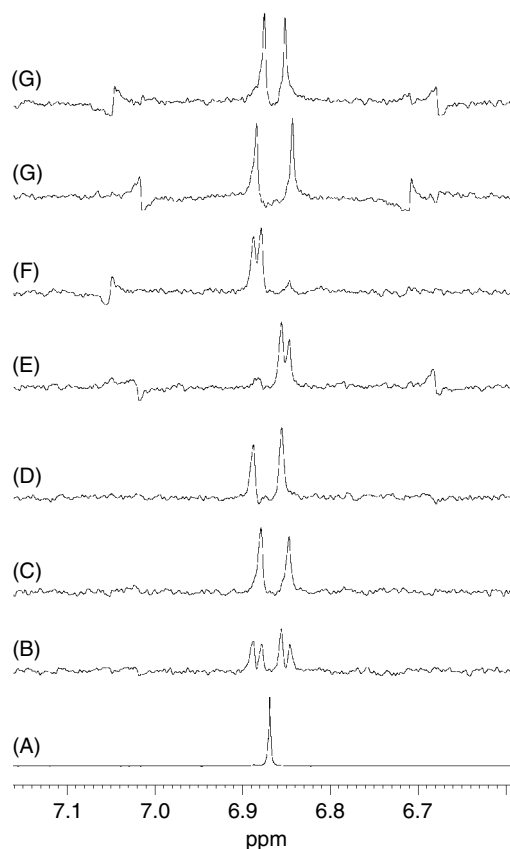
Although our efforts have been concentrated in the design of 2D  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  correlation maps because of the better dispersion in the indirect  $^{13}\text{C}$  dimension, it should be also possible to design equivalent  $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  correlation maps.

## RESULTS AND DISCUSSION

In order to compare the performance of the proposed experiments with the recently reported IFSERF pulse scheme<sup>5</sup> and to check for the proposed spin coupling patterns displayed in Scheme 2, a sample consisting of two small and symmetrical isomeric molecules (ethyl fumarate, **1**, and ethyl maleate, **2**) has been chosen. On the other hand, the experiments have been also successfully applied on two symmetrical medium-sized macrocycles<sup>14</sup> in order to distinguish the double bond geometry from the  $J(\text{HH})$  values measured between the chemically equivalent protons.

Figure 2 shows a series of experimental 1D spectra acquired at times b and c with the pulse sequence sketched in Fig. 1(A). Whereas spectra 2B is the relayed resonance acquired without spin-editing ( $\Phi = y$ ), spectra 2C, 2D are obtained using spin editing at time point b ( $\Phi = x$  and  $-x$ , respectively). The sign and the magnitude of two-bond proton–carbon coupling constants can be extracted comparing the displacement between both spectra. Spectra 2E and 2F are the same spin-edited multiplets obtained at point c using the building block displayed in Fig. 1(C). In these cases, the homonuclear  $J(\text{HH})$  value can be easily extracted from the relative multiplet displacement. Spectra 2G and 2H are the two spin-edited DQ and ZQ multiplets acquired at point c using the block 1D. In this case, both  $^2J(\text{CH})$  and  $^3J(\text{HH})$  coupling values between the chemically equivalent olefinic protons can be simultaneously extracted.

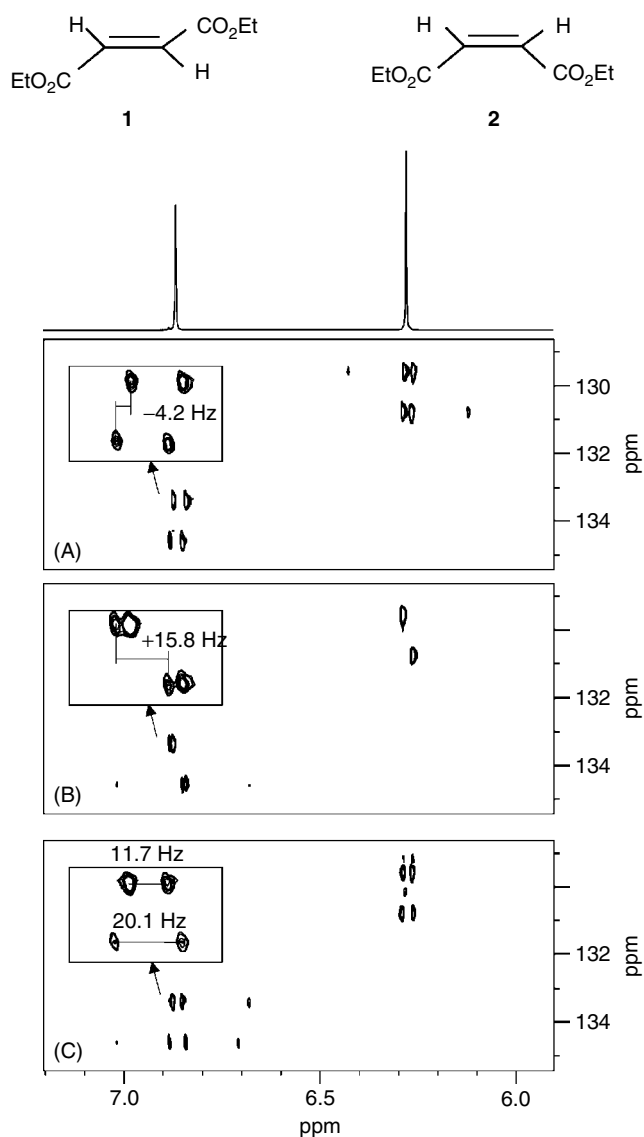
A more flexible implementation is required for a more general use. Figure 3 shows the equivalent 2D correlation



**Figure 2.** Experimental multiplet patterns obtained from the pulse sequence of Fig. 1(A) with the optional blocks depicted in 1C and 1D. For comparison purposes, all 1D spectra have been acquired and processed in the same way and plotted with the same vertical scaling. (A) Expanded  $^1\text{H}$  region of **1** showing a unique singlet at 6.86 ppm due to its symmetry; (B) Isotope-edited spectra acquired without spin-editing ( $\Phi = y$ ); (C,D) 1D spectra acquired at point b using  $\Phi = x$  and  $-x$ , respectively; (E,F) 1D spectra acquired at point c using the block 1C and  $\Phi = x$  and  $-x$ , respectively; (G,H) 1D spectra acquired at point c using the block 1D and  $\Phi = x$  and  $-x$ , respectively.

maps acquired using the pulse sequence of Fig. 1(B) with the additional blocks 1C and 1D, in which both edited peaks are obtained in the same spectrum. In all steps, coherence transfer is achieved under broadband HCP conditions using DIPSI-2 in both channels. In particular, the 2D DQ–ZQ experiment (Fig. 3(c)) can become highly interesting for the simultaneous measurement of  $^1J(\text{CH})$ ,  $^2J(\text{CH})$  and  $^3J(\text{HH})$  from a single spectrum and could be also applied on other type of spin systems.

The described 1D and 2D versions of the HCP-TOCSY experiment have been also applied on two symmetrical nitrogen-containing 15-membered macrocycle isomers, the *trans* isomer **3** showing a  $C_2$  axis and the *cis* isomer **4** showing a symmetry plane<sup>14</sup> (Figs 4 and 5). It can be stated that the main features of the proposed HCP approaches are several: (i) the 1D version is highly selective and presents good sensitivity and excellent precision in the  $J$  measurement; (ii) because the measurement is performed from the relative displacement between spin-edited multiplets, both 1D and

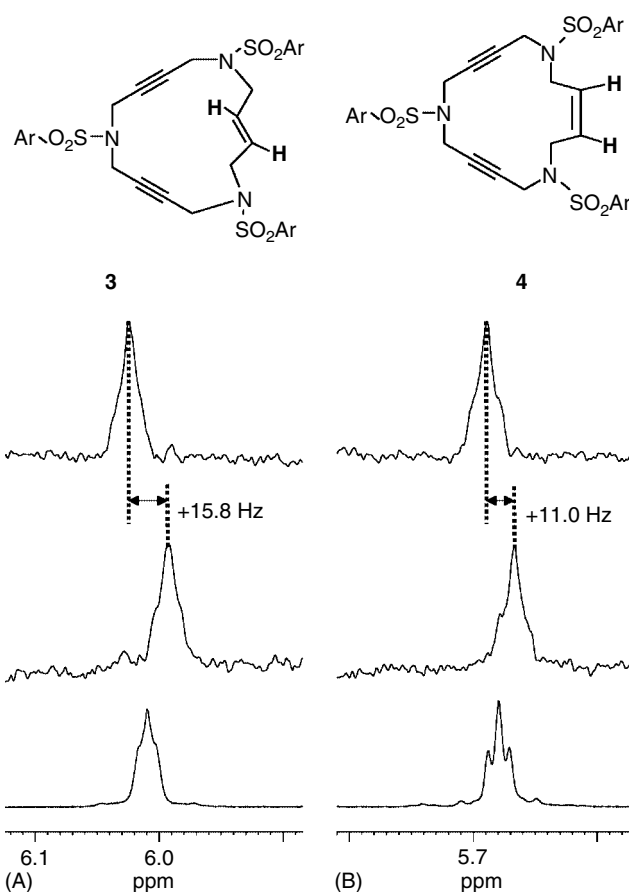


**Figure 3.** Several 2D spin-edited HCP-TOCSY spectra of a mixture of **1** and **2** collected with the sequences (A) 1B at point b; (B) 1B + 1C at point c; and (C) 1B + 1D at point c. Expansions are shown for the olefinic cross-peak of **1**.

2D versions afford the sign and the size of the coupling value even for small  $J$  values; (iii) because the experiment is based on the magnetization transfer via TOCSY, the experiment cannot be applied when quaternary carbons or heteronuclei are involved in the coupling pathway or when the  $J(\text{HH})$  is near zero; (iv) as reported recently for the proposed IFSERF experiment, the HCP-TOCSY experiment is also advisable to measure  $J(\text{HH})$  between protons having the same or similar chemical shift with good precision, selectivity and sensitivity; (v) the 2D version has a more general applicability and the precise measurement of  $J(\text{CH})$  and  $J(\text{HH})$  can be made even for complex mixtures; (vi) in contrast to analog INEPT-like transfer, HCP experiments can efficiently work for  $1\text{S}$  and  $1\text{S}_2$  spin systems at the same time.<sup>13b</sup>

## CONCLUSIONS

In summary, it has been illustrated that CP is a serious candidate to be in mind in the future design of new NMR

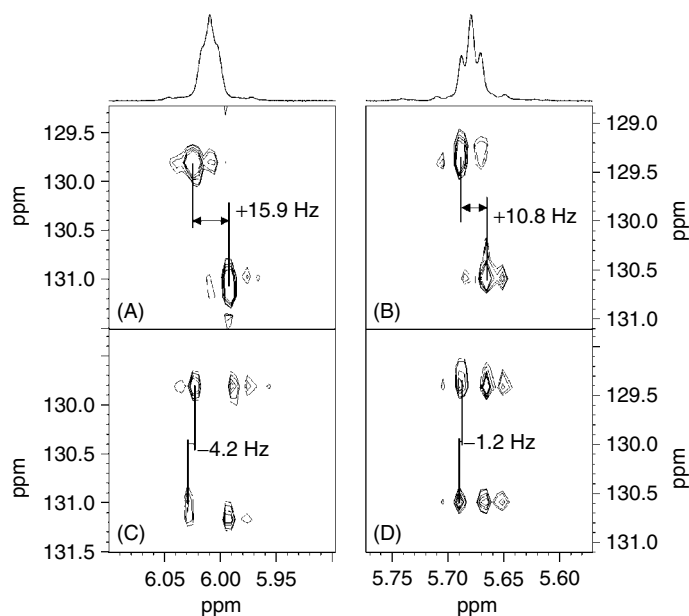


**Figure 4.** Selective 1D HCP-TOCSY spectra acquired separately for compounds **3** and **4** using the pulse sequence 1A + 1C to measure  $J(\text{HH})$ .

experiments dedicated to liquid-state samples. As predicted theoretically, it is possible design mimetic INEPT-like building blocks using the old Hartmann–Hahn concept. Although there are a lot of experimental details to be improved in HCP experiments, a versatile approach for the measurement of homonuclear and heteronuclear coupling constants at natural abundance has been proposed, and examples have been particularly provided in the case of such accurate determination between magnetically equivalent spin systems. As a major advantage with respect to the existing methods for these measurements, the experiment can be successfully applied even for complex mixtures and also on complex multiplets, and the only limitations are closely related to the efficiency of the TOCSY transfer. Although not illustrated in this work, the proposed experiments can be also applied for the measurement of  $J(\text{CH})$  and  $J(\text{HH})$  in more general spin systems not necessarily presenting symmetry properties.

## EXPERIMENTAL

All spectra were recorded on a BRUKER AVANCE 500 MHz spectrometer equipped with a triple-resonance inverse probehead incorporating a z-gradient coil. The three different samples used consist of (i) a mixture of 30 mg of ethyl fumarate, **1**, and 22 mg of ethyl maleate **2**; (ii) 15 mg of **3**, and (iii) 15 mg of **4**, all dissolved in 0.6 ml of  $\text{CDCl}_3$ . For



**Figure 5.** Expansions of the 2D E.COSY HCP-TOCSY spectra for **3** (A and C) and **4** (B and D) using the pulse sequence of Fig. 1(B) with (A and B) and without (C and D) the block depicted in Fig. 1(D).

all 1D and 2D experiments, the duration of gradients were of 1 ms and they were set to a 4:1 ratio. Broadband HCP and homonuclear TOCSY were achieved by 7-KHz DIPSI-2 pulse trains.

For selective 1D spectra of Fig. 2, the amplitudes of the continuous-wave rf fields were matched to  $\gamma^1 B_1^1 / 2\pi = \gamma^S B_1^S / 2\pi = 65$  Hz and placed on-resonance to the desired  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  pair. The following experimental conditions were applied. In Fig. 2, 16 scans were accumulated with a prescan delay of 1 s, HCP contact time of  $\Delta = 1/J(\text{CH}) = 5.92$  ms and a TOCSY period of 24 ms. In Fig. 4, 64 scans were accumulated for each 1D spectrum using a recycle delay of 1 s, a CW HCP period of 6 ms and a mixing TOCSY time of 15 ms. All 1D data were always processed with an exponential window function using a line-broadening of 1 Hz.

2D spectra of Figs 3 and 5 were recorded using four scans (Fig. 3) and 16 scans (Fig. 5) for each individual  $t_1$  increments of 2K data points each one.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  offsets were centered to both olefinic regions, 6.5 ppm and 130 ppm, respectively. Other experimental details are as described for the analogous 1D experiments. 2D data were processed using the echo-antiecho protocol, in which the refocusing G2 gradient and the phase  $\Psi(=x)$  are inverted on alternate scans, and applying zero filling in the  $F_1$  dimension up to  $1024 \times 1024$  points and a  $90^\circ$ -shifted q-sine window function in both dimensions.

### Acknowledgements

Financial support for this research provided by MCYT (projects BQU2003-01677 and BQU2002-04002) is gratefully acknowledged.

P.N thanks 'Generalitat de Catalunya' for a predoctoral grant. We also thank the Servei de Ressonància Magnètica Nuclear, UAB, for allocating instrument time to this project.

### REFERENCES

- (a) Radeglia R, Poleschner H, Heydenreich M. *Magn. Reson. Chem.* 1991; **29**: 1028; (b) Buevich AV, Chan T, Wang CH, McPhail AT, Ganguly AK. *Magn. Reson. Chem.* 2005; **43**: 187.
- Mucci A, Parenti F, Schenetti L. *Eur. J. Org. Chem.* 2002; 938.
- Luy B, Hauser G, Kirschning A, Glaser SJ. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003; **42**: 1300.
- Fäcke T, Berger S. *J. Magn. Reson. A* 1995; **113**: 114.
- Nolis P, Roglans A, Parella T. *J. Magn. Reson.* 2005; **173**: 305.
- (a) Parella T. *J. Magn. Reson.* 2004; **167**: 266; (b) Luy B. *J. Magn. Reson.* 2004; **168**: 210.
- (a) Chiarparin E, Pelupessy P, Bodenhausen G. *Mol. Phys.* 1998; **95**: 759; (b) Pelupessy P, Chiarparin E. *Conc. Magn. Reson.* 2000; **12**: 103.
- Parella T, Belloc J, Sánchez-Ferrando F. *Magn. Reson. Chem.* 2004; **42**: 852.
- (a) Willker W, Leibfritz D. *J. Magn. Reson.* 1992; **99**: 421; (b) Sorensen MD, Meissner A, Sorensen OW. *J. Magn. Reson.* 1999; **137**: 237.
- (a) Sorensen MD, Meissner A, Sorensen OW. *J. Biomol. NMR* 1997; **10**: 181; (b) Meissner A, Duus JO, Sorensen OW. *J. Magn. Reson.* 1997; **128**: 92; (c) Meissner A, Duus JO, Sorensen OW. *J. Biomol. NMR* 1997; **10**: 89.
- Luy B, Barchi JJ, Marino JP. *J. Magn. Reson.* 2001; **152**: 179.
- Peti W, Griesinger C. *J. Am. Chem. Soc.* 2000; **122**: 3975.
- (a) Parella T. *J. Biomol. NMR* 2004; **29**: 37; (b) Parella T, Gairi M. *J. Am. Chem. Soc.* 2004; **126**: 9821.
- Torrent A, González I, Pla-Quintana A, Roglans A, Moreno-Mañas M, Parella T, Benet-Buchholz J. *J. Org. Chem.* 2005; **70**: 2033.

### 11.3.- Ampliació de resultats. Aplicació a molècules no simètriques

#### 11.3.1.- E.COSY HCP-TOCSY-J(HH).

En aquest punt es mostrarà que les diferents seqüències presentades a la *publicació II* no només tenen aplicació en la determinació de constants d'acoblament homo- i heteronuclears en molècules simètriques, sinó que també poden aplicar-se en la resta de compostos orgànics. El cas de la mesura de constants d'acoblament heteronuclear, amb l'editat E.COSY, ja havia estat descrit anteriorment en el nostre grup d'investigació<sup>138</sup> utilitzant la seqüència HCP-TOCSY. Si bé no havia estat descrit encara pel cas homonuclear.

Per a la determinació de constants d'acoblament homonuclears s'ha utilitzat la nova seqüència presentada a la *publicació II* (Figura 1B+C de la publicació), anomenada aquí E.COSY HCP-TOCSY-J(HH) l'explicació teòrica utilitzant el formalisme d'operadors producte feta a la *publicació II* roman vàlida per a molècules no simètriques. L'obtenció del patró E.COSY permet fer la mesura de les constants d'acoblament homonuclears permet extreure d'una manera precisa tant la magnitud com el signe de la constant d'acoblament. A continuació, com a exemple, es mostra l'espectre obtingut per a l'estricnina (**Fig. 65**) i algunes ampliacions del mateix (**Fig. 66**).

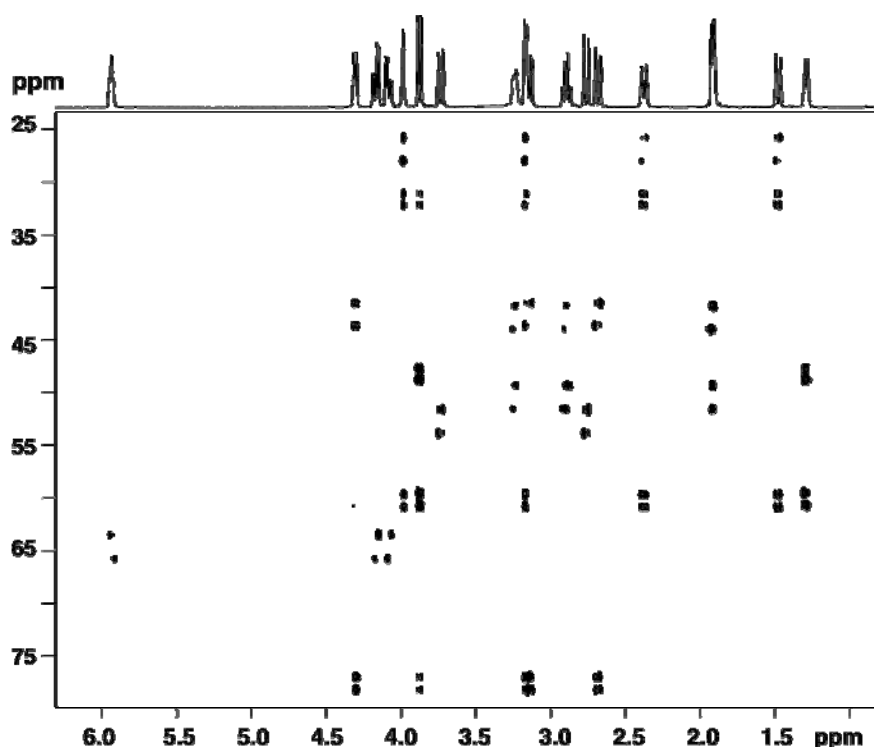


Figura 65. Espectre  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  E.COSY HCP-TOCSY-J(HH) per a la mesura de constants d'acoblaments homonuclears en molècules no simètriques. Estrictina 20mg, 6ml  $\text{CDCl}_3$ , 500MHz. Temps de mescla del TOCSY 40ms. Els detalls experimentals de l'aplicació de HCP són anàlegs als comentats a la *publicació II*.

<sup>138</sup> Parella, T.; Belloc, J.; Sánchez-Ferrando, F. *Magn. Reson. Chem.* 2004, 42, 852.



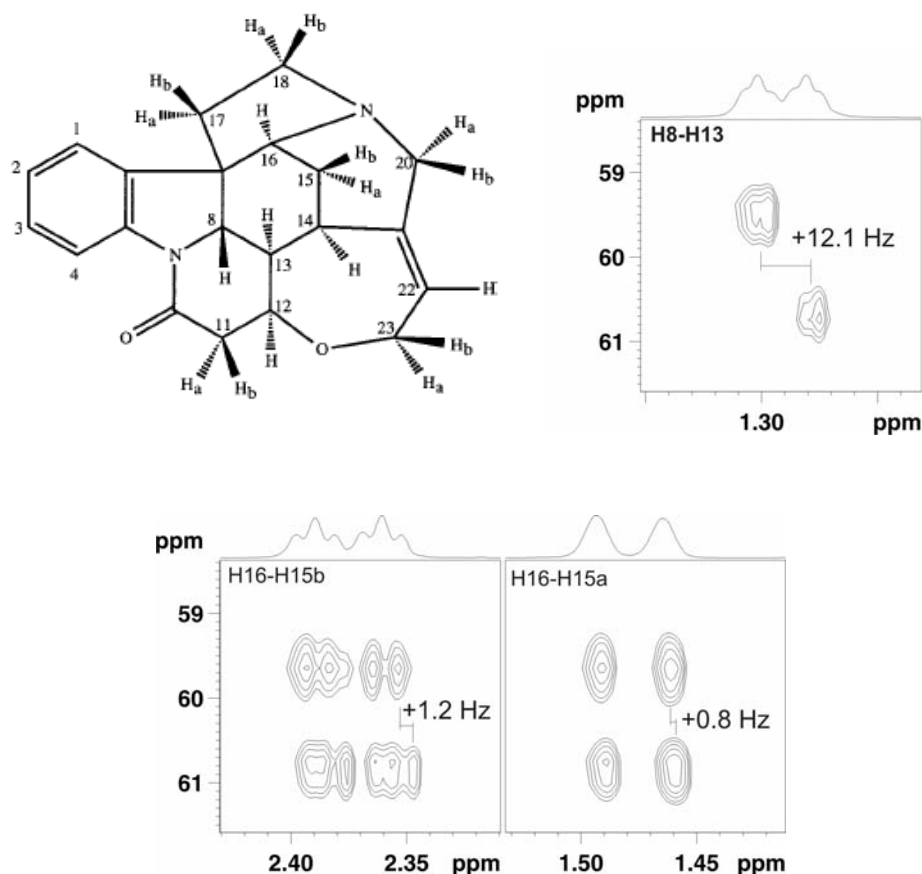


Figura 66. Estructura i numeració per a l'strychnina. Algunes ampliacions de l'espectre de la Figura 65.

Cal remarcar, però, que la metodologia no és vàlida per a sistemes de *spins* I<sub>2</sub>S diastereòtics. El problema rau en que el pic creuat on s'hauria de produir la mesura es genera a partir de la mescla de transferència homonuclear TOCSY de tots dos protons diastereòtics, és a dir, no sabem quin dels dos protons crea el desplaçament observat (en realitat veurem una mescla de les dues J però tampoc sabem en quina proporció, doncs, dependrà de l'eficiència del TOCSY que serà diferent per a cada protó i del temps de mescla utilitzat).

### 11.3.2.- ZQDQ HCP-TOCSY.

Pel que fa la aplicabilitat de la nova seqüència, presentada a la Fig. 1B+D de la *publicació II*, a molècules no simètriques cal dir que queda restringida a molècules que presentin un cert tipus de sistemes de *spin*. En concret, per a la correcta mesura, és necessari que el protó en el qual mesurem només s'acobli a un sol protó, el protó que li transfereix la magnetització via TOCSY. Tot i que és una restricció molt gran, la seva utilitat no se'n veu ressentida, doncs, els pèptids presenten aquest tipus de sistemes, els protons amínics dels quals només presenten acoblament homonuclear amb els protons alfa. Així doncs, en el cas de treballar amb pèptids utilitzant l'esmentada seqüència podem determinar simultàniament la  $^2J_{C\alpha H_N}$  i  $^3J_{H\alpha H_N}$  via patrons ZQ/DQ en els pics creuats. A continuació, a la **Figura 67**, es mostra l'espectre de

correlació  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ZQDQ HCP-TOCSY de la ciclosporina, un pèptid macrocíclic d'onze residus, tot i que només disposa de quatre residus amb nitrògens protonats, els altres són N-metilats.

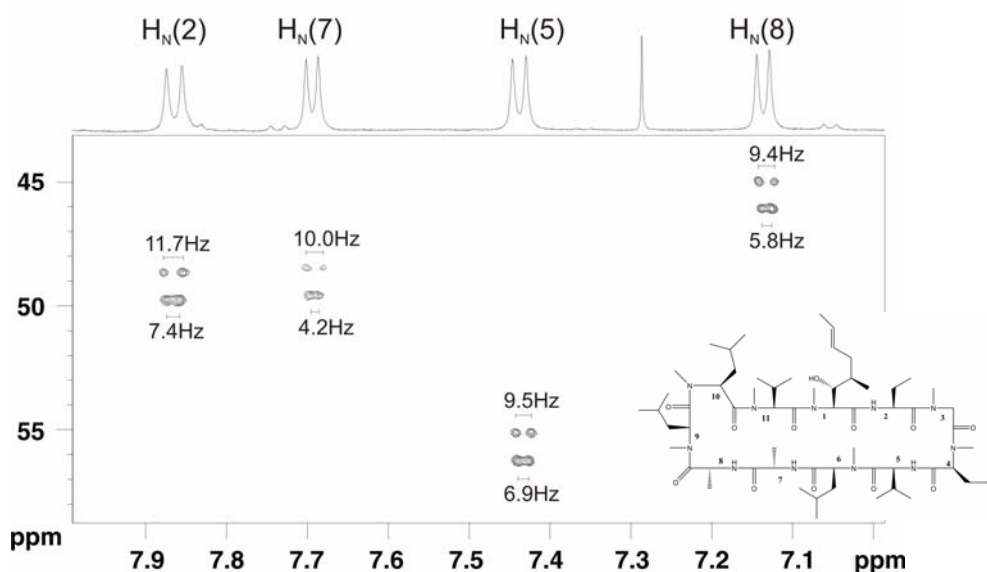


Figura 67. Ampliació espectral del experiment  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ZQDQ HCP-TOCSY realitzat a una mostra de ciclosporina. L'experiment permet la mesura simultànea de  $^2\text{J}_{\text{C}\alpha\text{H}_\text{N}}$  i  $^3\text{J}_{\text{H}_\text{N}\text{H}_\alpha}$  via el patró ZQDQ a F2 resol't per la constant d'acoblament  $^1\text{J}_{\text{C}\alpha\text{H}_\alpha}$  a F1.

Els valors de les constants d'acoblament desitjades s'extreuen fàcilment dels patrons ZQDQ obtinguts experimentalment, tal com s'ha explicat a la part teòrica de la tesi (punt 7.5). Els resultats obtinguts es mostren a la següent taula:

residu	DQ (Hz)	ZQ (Hz)	$^3\text{J}_{\text{H}_\text{N}\text{H}_\alpha}$ (Hz)	$^2\text{J}_{\text{C}\alpha\text{H}_\text{N}}$ (Hz)
2	11.7	7.4	9.4	-2.1
7	10.0	4.2	7.1	-2.9
5	9.5	6.9	8.2	-1.3
8	9.4	5.8	7.6	-1.8

### 11.3.3.- Millora de sensibilitat en les seqüències $\text{S}^3$ -HCP utilitzant PFG

En aquest punt es presenten dues noves seqüències, anomenades SI-IPAP-HCP i SI- $\text{S}^3\text{CT}$ , que milloren en sensibilitat les actuals IPAP-HCP i  $\text{S}^3\text{CT}$ -HCP. Aquestes seqüències utilitzen gradients de camp magnètic per a la selecció d'ordres de coherència.

Per entendre perquè aquestes noves versions milloren les actuals cal fer una descripció simplificada d'aquestes utilitzant el formalisme d'operadors producte per a un sistema IS (els factors trigonomètrics i els signes seran omesos en aquesta descripció).

**Versió IPAP-HCP:**

Aquesta versió és basa en la metodologia IPAP per aconseguir la selecció d'estat *spin*  $S^3$ . El diagrama de pulsos és el següent (Fig. 68):

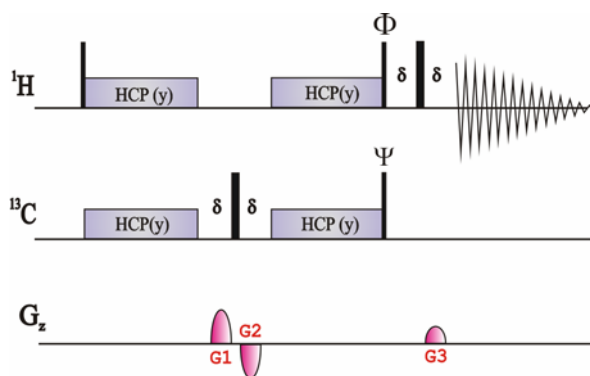


Figura 68. Diagrama de pulsos del IPAP-HCP. S'utilitza el cicle de fases EXORCYCLE al 1er puls de  $180^\circ$  de  $^{13}\text{C}$  (x, y, -x, -y) i al receptor (x, -x). El període d'aplicació d'HCP és de  $1/J_{\text{CH}}$  s. Els PFG s'apliquen amb una relació 4:-4:1. Per obtenir l'espectre IP cal  $\Phi = 1$  i  $\Psi = 1$ . Per obtenir l'espectre AP cal  $\Phi = 0$  i  $\Psi = 0$ .

Per a l'obtenció d'un espectre amb els doblets en fase (IP)  $\Phi=1$  i  $\Psi=1$ . I per a l'obtenció d'un espectre amb els doblets en antifase (AP)  $\Phi=0$  i  $\Psi=0$ . A continuació es descriu el camí que segueix la magnetització, tant la inicial de  $^1\text{H}$  com la inicial provinent del  $^{13}\text{C}$ .

**$^1\text{H}$  (IP):**

$$I_z \xrightarrow{90^\circ_x(I)} I_y \xrightarrow{HCP(y,y)} S_y \xrightarrow{\text{gradients}} S_y \xrightarrow{HCP(y,y)} I_y \xrightarrow{90^\circ_y(I);90^\circ_y(S)} I_y$$

$S_x \qquad 2I_z S_y \qquad 2I_x S_y$

**$^1\text{H}$  (AP):**

$$I_z \xrightarrow{90^\circ_x(I)} I_y \xrightarrow{HCP(y,y)} S_y \xrightarrow{\text{gradients}} S_y \xrightarrow{HCP(y,y)} I_y \xrightarrow{90^\circ_x(I);90^\circ_x(S)} I_z$$

$S_x \qquad 2I_z S_y \qquad 2I_y S_z$

**$^{13}\text{C}$ :**

$$S_z \xrightarrow{90^\circ_x(I)} S_z \xrightarrow{HCP(y,y)} 2I_x S_y \xrightarrow{\text{gradients}} \emptyset$$

S'observa que en tots dos casos (IP i AP) només la meitat de la magnetització de partida del  $^1\text{H}$  arriba al detector com a senyal detectable, mentre que la magnetització Boltzman no és seleccionada pels gradients. Per tal d'obtenir els espectres amb  $S^3$  cal sumar/restar tots dos espectres.

**Versió SI-IPAP-HCP:**

El guany en sensibilitat d'aquesta nova versió (**Fig. 69**) ve donat per l'aprofitament de les dues components ortogonals de la magnetització inicial de  $^1\text{H}$ . Concretament s'obté el doble de senyal per unitat de temps, és a dir, un guany del 100%.

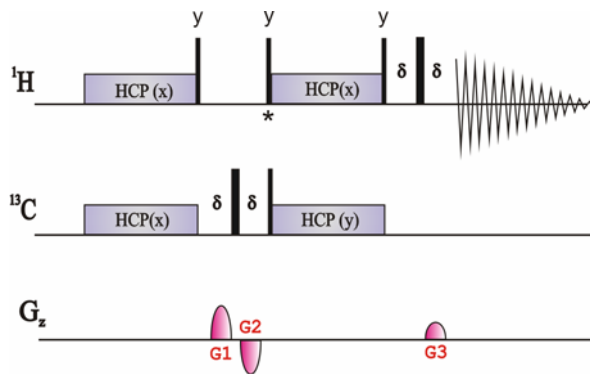


Figura 69: Diagrama de pulsos del SI-IPAP-HCP. S'utilitza el ciclat de fases EXORCYCLE al 1er puls de  $180^\circ$  de  $^{13}\text{C}$  (x, y, -x, -y) i al receptor (x, -x). El període d'aplicació d'HCP és de  $1/J_{\text{CH}}$  s. Els PFG s'apliquen amb una relació 4:-4:1. Per obtenir l'espectre IP cal aplicar el puls marcat amb \*, per obtenir l'espectre AP no.

Per a l'obtenció dels espectres amb els dobles en fase (IP) s'ha d'aplicar el puls marcat amb asterisc. Per a l'obtenció dels espectres en antifase (AP) aquest s'ha d'ometre. El formalisme d'operadors producte ve descrit a continuació.

**$^1\text{H}$  (IP):**

$$I_z \xrightarrow{HCP(x,x)} 2I_x S_y \xrightarrow{90^\circ y(I)} 2I_z S_y \xrightarrow{\text{gradients}} \begin{matrix} 2I_z S_y \\ 2I_z S_x \end{matrix} \xrightarrow{90^\circ y(I); 90^\circ x(S)} \begin{matrix} 2I_x S_z \\ 2I_x S_x \end{matrix} \xrightarrow{HCP(x,y)} \begin{matrix} I_y \\ I_z \end{matrix} \xrightarrow{90^\circ y(I)} \begin{matrix} I_y \\ I_x \end{matrix}$$

**$^1\text{H}$  (AP):**

$$I_z \xrightarrow{HCP(x,x)} 2I_x S_y \xrightarrow{90^\circ y(I)} 2I_z S_y \xrightarrow{\text{gradients}} \begin{matrix} 2I_z S_y \\ 2I_z S_x \end{matrix} \xrightarrow{90^\circ x(S)} \begin{matrix} 2I_z S_z \\ 2I_z S_x \end{matrix} \xrightarrow{HCP(x,y)} \begin{matrix} 2I_z S_z \\ 2I_y S_z \end{matrix} \xrightarrow{90^\circ y(I)} \begin{matrix} 2I_x S_z \\ 2I_y S_z \end{matrix}$$

**$^{13}\text{C}$ :**

$$S_z \xrightarrow{HCP(x,x)} 2I_y S_x \xrightarrow{90^\circ y(I)} 2I_y S_x \xrightarrow{\text{gradients}} \emptyset$$

**Versió S<sup>3</sup>CT-HCP:**

Aquesta versió genera la S<sup>3</sup> durant el retorn de la magnetització de <sup>13</sup>C a <sup>1</sup>H degut a que les dos components ortogonals generades per la selecció d'ordre de coherència amb els gradients acaben transformant-se en magnetització IP i AP, la mescla de les quals produeix la S<sup>3</sup>. El diagrama de pulsos és el mateix que el representat a la **Figura 68** amb l'única modificació de les fases dels pulsos. Així per a l'obtenció dels diferents estats de *spins* α/β es requereixen les fases Φ=y/Ψ=x i Φ=y/Ψ=-x. A continuació es descriu el camí que segueix la magnetització, tant la inicial de <sup>1</sup>H com la de <sup>13</sup>C.

**<sup>1</sup>H:**

$$I_z \xrightarrow{90^\circ x(I)} I_y \xrightarrow{HCP(y,y)} S_y \xrightarrow{\text{gradients}} S_y \xrightarrow{HCP(y,y)} I_y \xrightarrow{90^\circ y(I); 90^\circ x/-x(S)} I_y$$

$S_x$                        $2I_z S_y$                        $\pm 2I_x S_z$

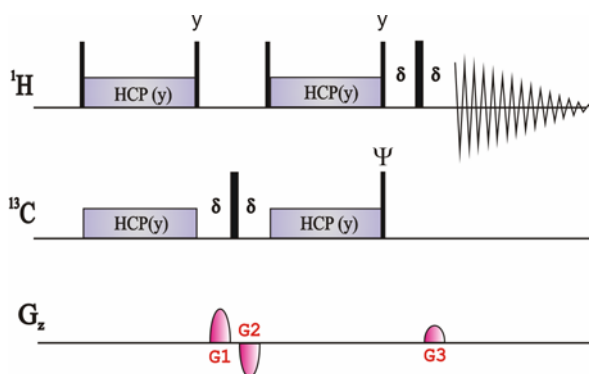
**<sup>13</sup>C:**

$$S_z \xrightarrow{90^\circ x(I)} S_z \xrightarrow{HCP(y,y)} 2I_x S_y \xrightarrow{\text{gradients}} \emptyset$$

El fet que s'aprofiten les dos components de la magnetització de <sup>1</sup>H fa que aquesta versió sigui més sensible que la versió IPAP-HCP. Concretament un 41%. Cal notar que el guany no és del 100% (doble de senyal) perquè aquesta versió no es beneficia del guany intrínsec del 41% de la metodologia IPAP. Així, doncs, aquesta versió és menys sensible que la SI-IPAP-HCP on el guany si que és del doble.

**Versió SI-S<sup>3</sup>CT-HCP:**

La versió es presenta a la següent **Figura 70**:



**Figura 70.** Diagrama de pulsos del SI-S<sup>3</sup>CT-HCP. S'utilitza el cíclic de fases EXORCYCLE al 1<sup>er</sup> puls de 180° de <sup>13</sup>C (x, y, -x, -y) i al receptor (x, -x). El període d'aplicació d'HCP és de 1/<sup>1</sup>JCH s. Els PFG s'apliquen amb una relació 4:-4:1. Per obtenir els espectres α i β cal Ψ = 0 i Ψ = 2.

El guany en sensibilitat ve donat perquè el senyal que arriba al detector es beneficia de la magnetització inicial de  $^{13}\text{C}$ , tal i com es veu en el formalisme d'operadors que a continuació es presenta.

$^1\text{H}$ :

$$I_z \xrightarrow{90^\circ_x(I)} I_y \xrightarrow{HCP(y,y)} S_y \xrightarrow{90^\circ_y(I)} S_y \xrightarrow{Gz} S_y \xrightarrow{90^\circ_x(I)} S_y \xrightarrow{HCP(y,y)} I_y \xrightarrow{90^\circ_y(I);90^\circ_x/-x(I)} I_y$$

$$S_x \qquad S_x \qquad 2I_z S_y \qquad \pm 2I_x S_z$$

$^{13}\text{C}$ :

$$S_z \xrightarrow{90^\circ_x(I)} S_z \xrightarrow{HCP(y,y)} 2I_x S_y \xrightarrow{90^\circ_y(I)} 2I_z S_y \xrightarrow{Gz} 2I_z S_y \xrightarrow{90^\circ_x(I)} 2I_y S_y \xrightarrow{HCP(y,y)} 2I_y S_y \xrightarrow{90^\circ_y(I);90^\circ_x/-x(I)} 2I_y S_y$$

$$2I_z S_x \qquad 2I_y S_x \qquad I_z \qquad \pm I_x$$

Aquest fet proporciona un 25% més de senyal respecte la versió S3CT-HCP, però encara no suficient per arribar als nivells de sensibilitat de la versió SI-IPAP-HCP.

Tot seguit es representa esquemàticament la sensibilitat de cada versió (**Fig. 71**). Així com la verificació experimental, en la seva versió 1D, utilitzant CW per a efectuar la HCP selectiva (**Fig. 72**). Els experiments s'han dut a terme sobre el parell CH (1) del mentol.

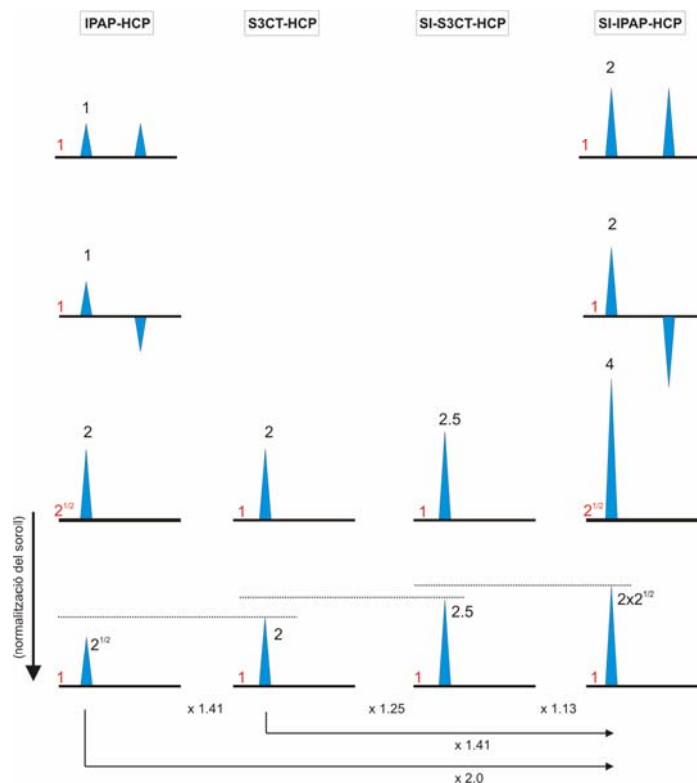


Figura 71. Esquema de la sensibilitat relativa entre els diferents blocs S<sup>3</sup>-HCP.

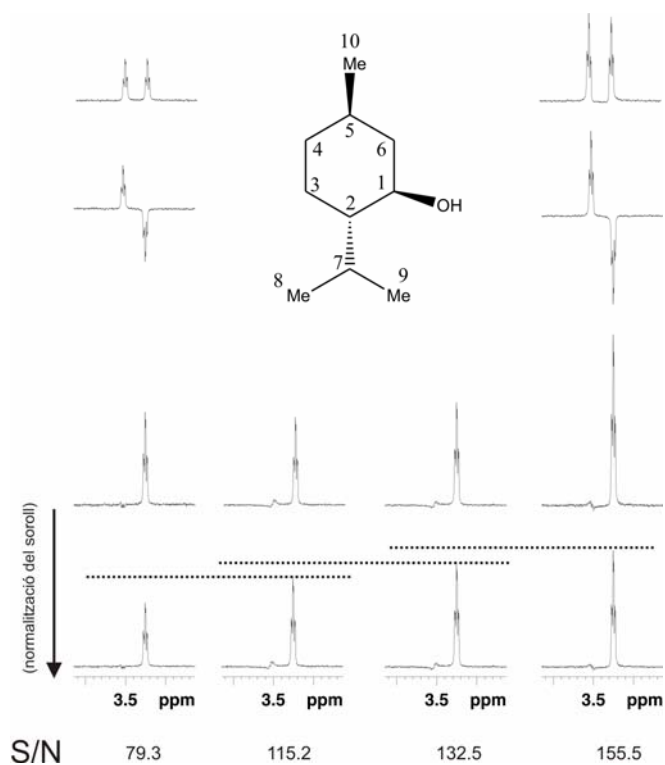


Figura 72. Comprovació pràctica del predit teòricament segons esquema de la Fig. 71. Experiments realitzats sobre el parell C<sub>1</sub>-H<sub>1</sub> del mentol

Les millores presentades també es poden introduir en les versions 2D, per exemple, la nova versió SI-S3CT-TROSY-HCP (Fig. 73) es compara amb la versió prèviament publicada el 2004 per Parella<sup>139</sup>.

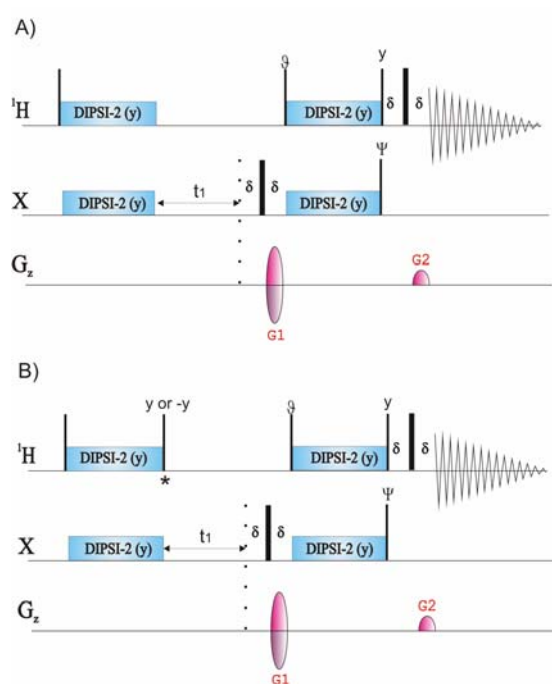


Figura 73.  
A) TROSY-HCP.  
B) nova versió SI-S3CT-HCP-TROSY

<sup>139</sup> Parella, T. *J. Biomol. NMR.* 2004, 29, 37.

Com a exemple s'ha utilitzat una mostra de dibromopropà (**Fig. 74**) amb el propòsit de demostrar que el guany s'aconsegueix simultàniament per sistemes IS i sistemes I<sub>2</sub>S diastereòtics. Cal anar amb compte, però, amb el signe de la fase del puls marcat amb un asterisc, doncs, és important de cara a sumar, i no restar, la contribució de Boltzmann a l'espectre final. Els espectres obtinguts es mostren a la següent figura, on s'aprecia la selecció dels 4 pics TROSY seleccionats separatament variant les fases dels pulsos  $\vartheta$  i  $\Psi$ .

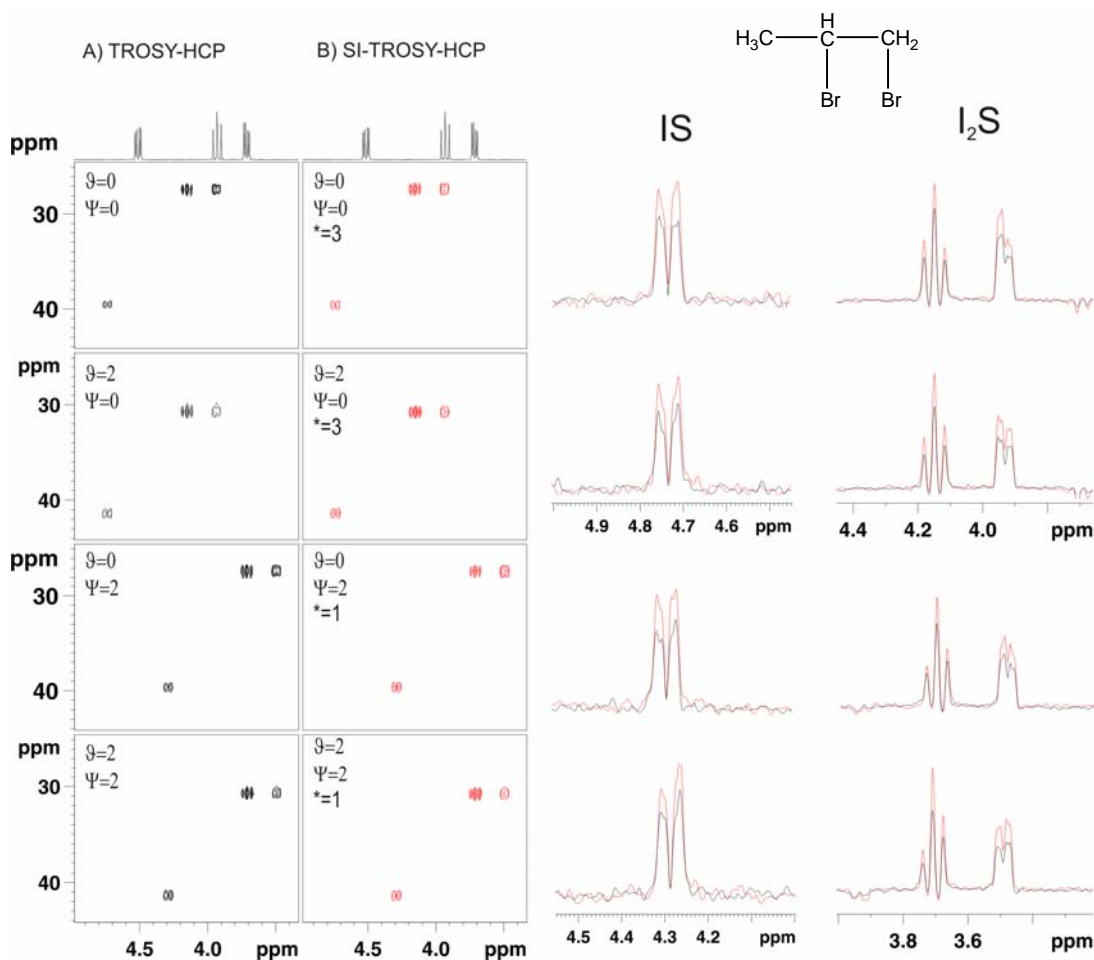


Figura 74: Comparació de sensibilitat de les seqüències TROSY-HCP (negre) i SI-TROSY-HCP (vermell) utilitzant una mostra d'àcid dibromopropionic. A les files extrems dels 2D s'observa un guany del 25% per a cada un dels pics TROSY, tal com es preveu teòricament. La fase dels pulsos utilitzada s'indica a cada espectre.

#### 11.3.4.- HCP en sistemes de spin I<sub>2</sub>S

Una dels trets diferencials més destacables de la transferència de magnetització utilitzant HCP respecte la transferència habitual INEPT (RINEPT) és el seu comportament en sistemes de spin I<sub>2</sub>S. Aquest fet fa de la HCP una eina fonamental per al disseny de seqüències amb selecció de estat de spin per aquest tipus de sistemes. Parella i Gairí van utilitzar aquest



comportament per a produir la selecció d'estat de spin per sistemes IS i I<sub>2</sub>S simultàniament<sup>140</sup>. A continuació es mostren i es descriuen els resultats obtinguts en l'estudi del grup CH<sub>2</sub> del α-pirinè utilitzant la seqüència S<sup>3</sup>-HCP de la **Figura 75** que ja havia estat presentada per Parella<sup>141</sup> i que es capaç de produir l'editat E.COSY i TROSY segons la fase aplicada als pulsos marcats.

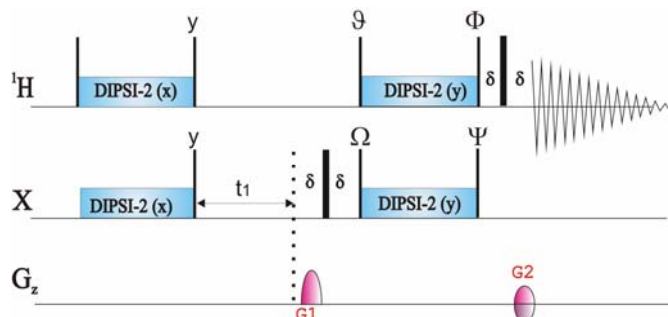
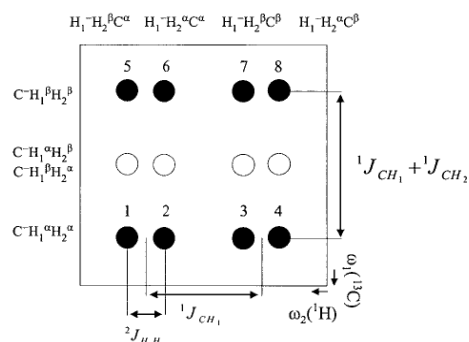
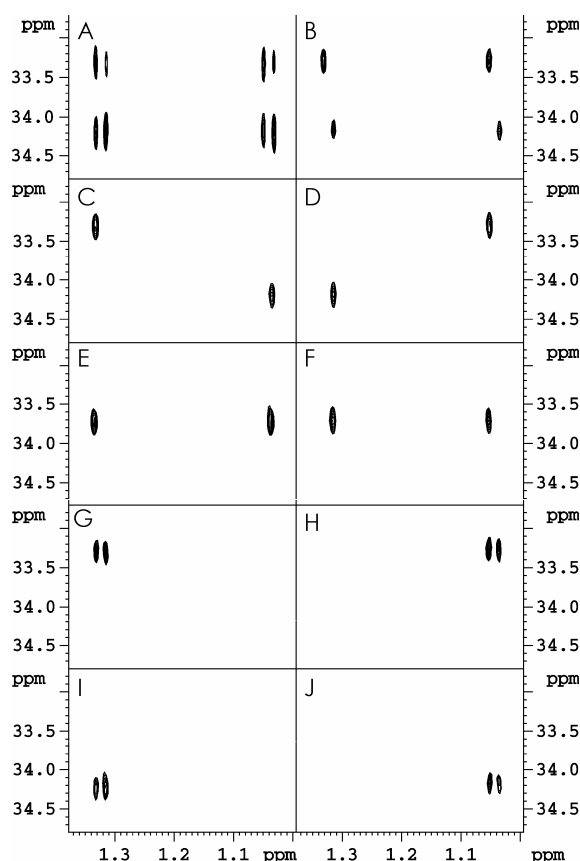


Figura 75.  
Diagrama de pulsos 2D S<sup>3</sup>-HCP

A la **Figura 76** es mostren diferents resultats depenen de les fases dels pulsos utilitzades. L'espectre (A) correspon a un experiment HSQCPEP estàndard acoblat a ambdues dimensions. S'observen els 4 senyals esperats degut a <sup>1</sup>J<sub>CH</sub>, però a més, aquests es veuen desdoblats per l'acoblament veïnal <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H a F2 donant lloc a 8 senyals perfectament separats (**Figura 77**). Quan realitzem l'experiment anàleg amb HCP (espectre B) només s'observen 4 de les 8 línies, és a dir, la utilització de la HCP crea una restricció en termes de transferència de coherència produint una simplificació espectral. Els espectres (C) i (D) corresponen a l'experiment E.COSY-HCP i veiem que, anàlogament al vist anteriorment, es produeix una restricció extra, doncs, veiem que el patró E.COSY s'ha simplificat a un patró DQ en el cas (C) i a un patró ZQ en el cas (D). Els espectres (E) i (F) són els anàlegs però desacoblant <sup>1</sup>J<sub>CH</sub> a F1, és a dir, s'ha aplicat un puls de 180° de <sup>1</sup>H durant t<sub>1</sub>. Els espectres (E), (H), (I) i (J) són les 4 variants TROSY de l'experiment, s'observa però, que la restricció extra en aquest cas desapareix, doncs, apareixen les dues components del doblet en cada pic TROSY.

<sup>140</sup> Parella, T.; Gairí, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9821.

<sup>141</sup> Parella, T. *J. Biomol. NMR.* **2004**, *29*, 37.

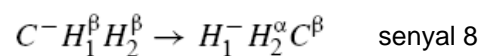
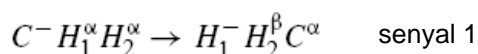


**Figura 77.** Representació esquemàtica dels senyals d'un grup CH<sub>1</sub>H<sub>2</sub> a la freqüència del carboni a F1 i del H<sub>1</sub> a F2 (veure Fig. 83.A). Els senyals centrals (cercles buits) es cancel·len degut a que  $^1J_{CH1} = ^1J_{CH2}$ . Els pics 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 i 8 es troben separats per  $J_{H1H2}$  a F2.

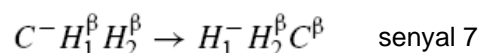
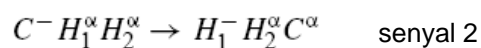
**Figura 76.** Diferents espectres sobre una mostra de  $\alpha$ -pinè A) HSQC totalment acoblat. Es veuen els 8 senyals. B) 2D-HCP utilitzant  $\vartheta=0, \Omega=0, \Phi=0$  and  $\Psi$ =no aplicat. Es veuen els senyals 2, 4, 5 i 7. C/D)  $\vartheta=0, \Omega=0, \Phi=0$  i  $\Psi=0/2$ . Es veuen senyals 1-8 (DQ) i 2-7 (ZQ) respectivament E/F) com C/D, respectivament, però amb desacoblament de  $^1J_{CH}$  a F1 (aplicant un puls de 180° de  $^1H$  durant  $t_1$ ). G/J)  $\vartheta=0/2, \Omega=1, \Phi$ =no aplicat i  $\Psi=0/2$ . H/I)  $\vartheta=0/2, \Omega=3, \Phi$ =no aplicat i  $\Psi=0/2$ . Es veuen les parelles 1-2, 3-4, 5-6 i 7-8.

Sens dubte els resultats més interessants són els obtinguts en els experiments C i D de la **Figura 77** (o els anàlegs F1 desacoblats E i G) ja que aquests permeten la mesura acurada de  $^2J_{H1H2}$  i  $^1J_{CH1}$  mitjançant l'editat DQ/ZQ (veure part teòrica 7.5). És a dir, la HCP com a bloc de mescla aconseguix la transferència selectiva entre els següents operadors:

#### Experiments C i E



#### Experiments D i F



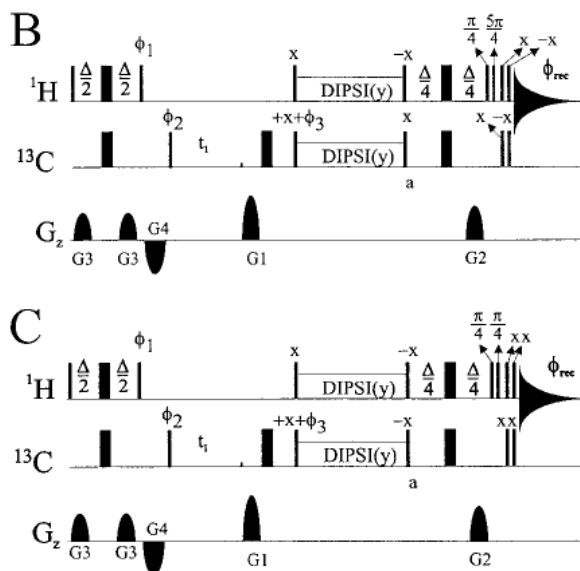
**Fig. 78**

Carlomagno i col·laboradors<sup>142</sup> van proposar l'experiment SPITZE-HSQC, on ja utilitzaven la HCP per produir aquesta transferència de coherència restringida, i la van explicar detalladament des del punt de vista teòric. La diferència més notable és que ells utilitzaven un bloc INEPT durant el període de preparació i aquí es proposa una seqüència on el període de

<sup>142</sup> Carlomagno, T.; Peti, W.; Griesinger, C. *J. Biomol. NMR.* 2000, 17, 99.

preparació es produeix via HCP. A més a més, aquí s'introdueix l'esquema d'editat TROSY (experiments G, H, I i J).

En el mateix article de Carlomagno i col.laboradors encara es proposen anar més enllà en la simplificació espectral, produint l'editat de cada un dels 8 pics per separat. L'estratègia consisteix en l'addició de dos espectres obtinguts amb dues seqüències complementàries que proporcionin l'editat via IPAP. Aquestes seqüències utilitzen un període de mescla més llarg i introdueixen uns quants pulsos de més en ambdós canals (**Fig. 79**).



**Figura 79.** seqüències SPITZE-HSQC per a l'editat complet de les 8 senyals d'un grup CH<sub>1</sub>H<sub>2</sub>. En aquest cas l'addició i resta dels espectres obtinguts amb aquestes dues seqüències produeixen la selecció de les senyals 1 i 8 per separat. Figura extreta de l'article original<sup>142</sup>.

En la present tesi doctoral es proposa una nova estratègia, totalment basada en HCP, per a produir la selecció de les 8 línies espectrals per separat. El benefici de l'estratègia que a continuació es proposa, respecte el SPITZE-HSQC, és la major senzillesa pel que fa al disseny de la mateixa. L'estratègia també es basa en la metodologia IPAP, i per tant, en la combinació de dos experiments complementaris que produeixin la selecció de les línies 1-8 (o 2-7). L'experiment que produeix l'espectre IP ja el teníem (**Fig. 75**) i calia trobar l'experiment que produís l'espectre complementari AP. Basant-se en la estratègia F1-IPAP proposada per Ottiger i col.laboradors<sup>143</sup> i també explicada en la present tesi doctoral (veure punt 14.1.1) es va dissenyar la següent seqüència (**Fig. 80**) on el període HCP del bloc de preparació produeix la transferència  $I_y \rightarrow S_y$ , anàloga al bloc RINEPT. A la seqüència de la **Fig. 80** durant el període de preparació la transferència que té lloc és l'anàloga al INEPT  $I_y \rightarrow I_z S_x$ . Aquesta modificació permet obtenir el senyal a F1 en antifase (veure exemples a la **Fig. 81**). Cal destacar que el bloc de mescla roman inalterat, i per tant, la durada de les dues seqüències és la mateixa.

<sup>143</sup> Ottiger, M.; Delaglio, F.; Bax, A. *J. Magn. Reson.* 1998, 131, 373.

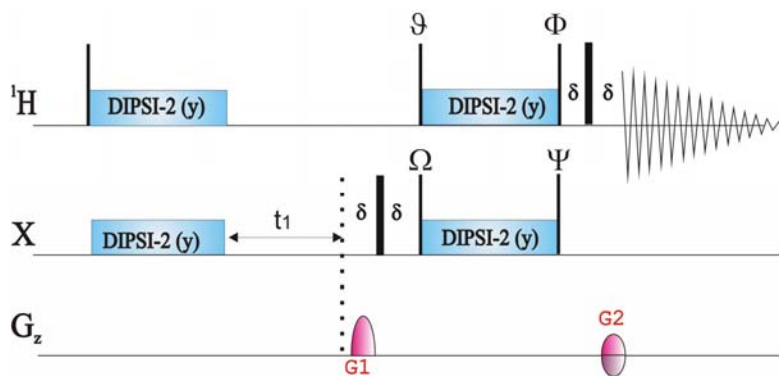


Figura 80. Diagrama de pulsos 2D-HCP (AP a F1).

A la **Figura 81** es mostren els espectres anàlegs als de la **Figura 76B, C i D**, però aquest cop amb els senyals en antifase a F1. L'addició i substracció d'aquests dona lloc al desitjat editat dels senyals individuals en espectres separats. Combinant aquests dos experiments i "jugant" amb les fases dels pulsos és possible tenir les 8 línies per separat, així doncs, solucionant totalment els possibles problemes de solapament (**Fig. 82**).

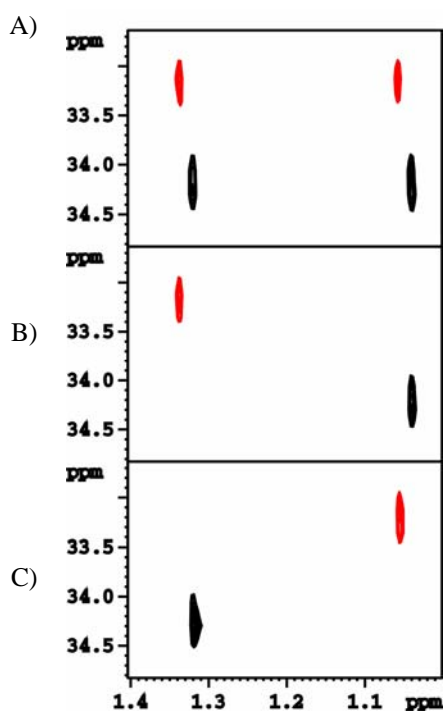
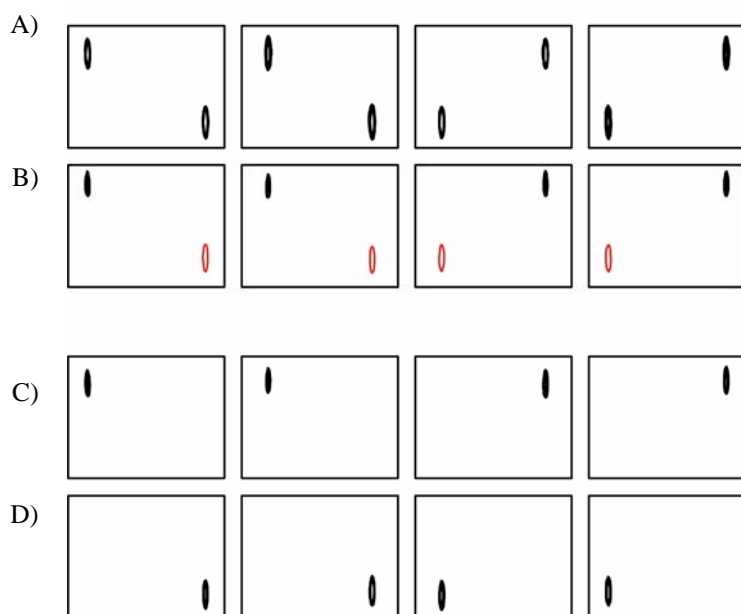


Figura 81. Espectres obtinguts amb la seqüència presentada a la **Figura 80**. A) Utilitzant  $\theta=x$ ,  $\Omega=x$ ,  $\Phi=x$  and  $\Psi$ =no aplicat. Es veuen els senyals 2, 4, 5 i 7. B)  $\theta=x$ ,  $\Omega=x$ ,  $\Phi=x$  i  $\Psi=x$ . Es veuen els senyals 1-8 (DQ) C)  $\theta=x$ ,  $\Omega=x$ ,  $\Phi=x$  i  $\Psi=-x$ . Es veuen els senyals 2-7 (ZQ)



**Figura 82.** Estratègia per a l'edició de les 8 senyals en sistemes de spin  $I_2S$ , com a exemple es mostren els espectres obtinguts per al grup  $CH_2$  del  $\alpha$ -pinè A) 4 combinacions possibles per als espectres IP. B) 4 combinacions possibles per als espectres AP. C) Combinacions lineals A+B D) Combinacions lineals A-B.

Per finalitzar aquest punt és important emfatitzar quina utilitat o aplicabilitat podria tenir l'estratègia d'estat de *spin* selectiu en sistemes  $I_2S$  aquí proposada. Potser la més interessant és la mesura de la constant d'acoblament  $^1H-X$  i geminals  $^1H-^1H$ , tant escalars com residuals<sup>144</sup>, però també d'altres com l'assignació estereoespecífica dels protons geminals<sup>145</sup>, l'estudi de les propietats estructurals i dinàmiques d'aquests tipus de sistemes<sup>146</sup> i el disseny d'experiments optimitzats per a l'estudi de la relaxació d'aquest tipus de sistemes<sup>147</sup>, com per exemple, l'estudi publicat sobre els  $CH_2$  dels residus de glicina en proteïnes i àcids nucleics<sup>148</sup>.

<sup>144</sup> a) Carlomagno, T.; Peti, P.; Griesinger, C. *J. Biomol. NMR.* **2000**, *17*, 99. b) Permi, P.; J. Magn. Reson. 2001, 153, 267. c) Permi, P.; J. Biomol. NMR. 2002, 22, 27. c) Miclet, E.; O'Neil-Cabello, E.; Nikonowicz, E.P.; Live, D.; Bax, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15740.

<sup>145</sup> McIntosh, L.P; Brun, E.; Kay, L.E. *J. Biomol. NMR.* **1997**, *9*, 306.

<sup>146</sup> a) Sattler, S.; Schleucher, J.; Schedletsky, O.; Glaser, S.J.; Griesinger, C.; Nielsen, N.C.; Sørensen, O.W. *J. Magn. Reson. A.* **1996**, *119*, 171. b) Untidt, T.S.; Schulte-Herbrüggen, T.; Luy, b.; Glaser, S.; Griesinger, C.; Sorensne, O.W.; Nielsen, N.C. *Mol. Phys.* **1998**, *95*, 787. c) Untidt, T.S.; Schulte-Herbrüggen, T.; Sørensen, O.W.; Nielsen, N.C. *J. Phys. Chem. A.* **1999**, *103*, 8921.

<sup>147</sup> Pervushin, K.; Braun, D.; Fernández, S.; Wütrich, K. *J. Biomol. NMR.* **2000**, *17*, 195.

<sup>148</sup> Miclet, E.; Williams, D.C.; Clore, G.M.; Bryce, D.L.; Boisbouvier, J.B.; Bax, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10560.

---

*publicació III*

**Spin-edited 2D HSQC-TOCSY experiment for the measurement of homonuclear and heteronuclear coupling constants: Application to carbohydrates and peptides**

## 12.- Publicació III

### *Spin-edited 2D HSQC-TOCSY experiments for the measurement of homonuclear and heteronuclear coupling constants: Application to carbohydrates and peptides*

#### 12.1.- Introducció

En aquesta publicació es presenten quatre seqüències de pulsos per a la mesura de la magnitud i el signe de constants d'acoblament a llarga distància tant homo- com heteronuclears i se'n proposa la seva utilitat en pèptids i carbohidrats. Les seqüències es basen en l'experiment HSQC-TOCSY amb PEP, sense desacoblament heteronuclear en cap de les dues dimensions i on s'ha modificat el retro-INEPT per tal de produir la selecció d'estat de *spin* amb diferents editats. Bàsicament s'han fet dues versions, una basada en la seqüència TROSY original<sup>149</sup> de Wütrich i col·laboradors (**Fig. 83A**), essent aquesta la seqüència que dona nom a l'editat. Cal dir, però, que nosaltres hem utilitzat la versió proposada per Chiz i Boelens<sup>150</sup> (**Fig. 83B**) que es beneficia d'un guany de  $\sqrt{2}$  en sensibilitat via la selecció de coherències amb gradients i detecció amb quadratura a F1 utilitzant via el processament eco-antieco.

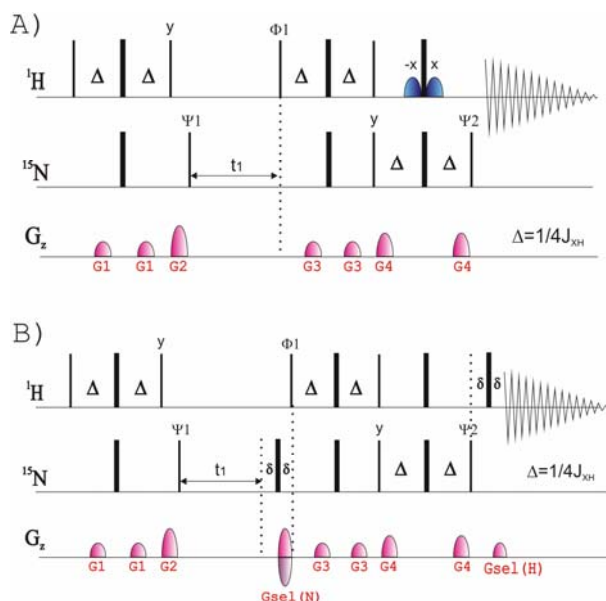


Figura 83. A) Diagrama de pulsos de la seqüència TROSY original<sup>144</sup>. B) Diagrama de pulsos de la seqüència TROSY amb selecció per gradients eco/antieco<sup>145</sup>.

L'altre és una versió que genera l'editat E.COSY. Aquesta es basa en el retroINEPT que Kay i col·laboradors<sup>151</sup> van fer servir en una seqüència HNCO per obtenir el pic TROSY al treballar en camps magnètics elevats, on el patró E.COSY esdevé TROSY degut a fenòmens de relaxació que aquí no es comentaran.

<sup>149</sup> Pervushin, K.; Riek, R.; Wider, G.; Wütrich, K.; *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1997**, *94*, 12366.

<sup>150</sup> Chiz, M.; Boelens, R. *J. Magn. Reson.* **1998**, *134*, 158.

<sup>151</sup> Yang, D.; Kay, L. *Journal of Biomolecular NMR*, **1999**, *13*, 3.





# Spin-edited 2D HSQC–TOCSY experiments for the measurement of homonuclear and heteronuclear coupling constants: Application to carbohydrates and peptides

Pau Nolis, Teodor Parella\*

*Servei RMN, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain*

Received 8 February 2005; revised 4 May 2005

Available online 8 June 2005

## Abstract

Simple modifications of the sensitivity-improved HSQC–TOCSY pulse sequence are proposed for the easy determination of the sign and the magnitude of homonuclear and heteronuclear coupling constants. Whereas in well-resolved regions, a clean two-component E.COSY-like pattern allows a direct measurement from a single 2D spectrum, separate acquisition of equivalent single-component TROSY/anti-TROSY spectra becomes highly interesting when spectral crowding complicates the spectral analysis. It is also demonstrated that an additional restricted planar mixing element after the isotropic TOCSY process completely retains all spin-editing features and permits the accurate measurement of the sign and the size of the corresponding homonuclear proton–proton coupling constants. Among others, the proposed techniques are particularly suited for molecules presenting a great number of CH and NH spin systems. Examples and practical details of the implementation of these techniques on standard carbohydrates and peptides at  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  natural abundance are provided.

© 2005 Published by Elsevier Inc.

*Keywords:* E.COSY; Coupling constants; TROSY/anti-TROSY; HSQC–TOCSY; Spin-state selection

## 1. Introduction

Heteronuclear-edited correlation experiments of the type 2D  $^1\text{H}$ –X HSQC–TOCSY or HMQC–TOCSY have been developed into powerful NMR tools for structural studies of molecules in which the analysis of homonuclear TOCSY spectra can fail due to undesired overlapping effects [1]. In particular, the gradient-enhanced version of the HSQC–TOCSY experiment allows (i) a careful analysis and straightforward interpretation from clean spectra, (ii) can take profit of the sensitivity-enhanced features traditionally associated to the regular HSQC pulse scheme, and (iii) offers excellent dispersion/resolu-

tion properties associated to the much better resolved F1 X dimension [2]. In addition to the classical structure elucidation strategy based on  $^1\text{H}$  and X chemical shift assignments, typically applied for  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  in molecules such as carbohydrates and peptides, the regular HSQC–TOCSY pulse scheme has also been largely modified in many different ways with the aim to measure heteronuclear long-range coupling constants,  $^nJ(\text{XH})$   $n > 1$ , in both natural abundance and labelled molecules [3–21].

Basically, all these X-edited TOCSY experiments contain two independent building blocks. First, an isotope-edited block in which magnetization is first transferred from  $^1\text{H}$  to the heteronucleus X and then come back to  $^1\text{H}$  again via  $^1J(\text{XH})$ . The resulting in-phase  $^1\text{H}$  magnetization obtained at the end of this initial step is suitable for further propagation via a homonuclear

\* Corresponding author. Fax: +34 93 5812291.

E-mail address: [teodor.parella@uab.es](mailto:teodor.parella@uab.es) (T. Parella).

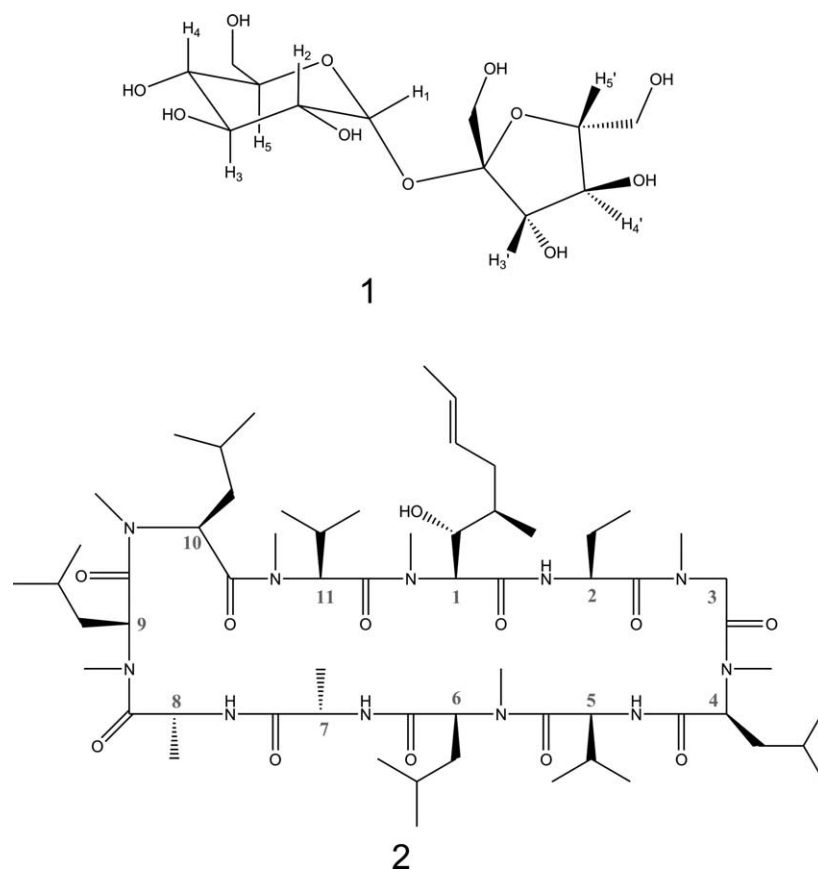
$^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  TOCSY transfer to other relayed protons. Since the initial heteronuclear coherence transfer is based on the large and rather uniform  $^1J(\text{HX})$  values, this approach is very useful to determine even small, several-bond away  $^nJ(\text{XH})$  coupling constants which are difficult to obtain using other NMR methods, such as HMBC [4] or long-range optimized HSQC experiments [5], in where the inter-pulse delays are directly optimized on small  $^nJ(\text{XH})$  values and where the final measurements are often performed on highly complicated anti-phase or mixed-mode multiplet patterns. On the contrary, the main drawbacks of HSQC–TOCSY-type experiments rely in the fact that only couplings on protonated heteronucleus can be measured and the overall sensitivity largely depends of the transfer efficiency during the TOCSY step [3].

Several years ago,  $w_1$ -edited 2D TOCSY experiments, in which the indirect detection was based on  $^1\text{H}$  evolution instead of X evolution, were proposed for this purpose. The original experiment, known as HETLOC experiment [6,7], has been further improved in several ways, sometimes using rather sophisticated but useful pulse schemes to measure  $^nJ(\text{XH})$  [8–11]. In these experiments, a conventional 2D  $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  correlation map is obtained displaying the satellite lines of the proton resonances as a diagonal peaks and the resulting cross-peaks showing the typical E.COSY-style patterns from which the sign and the magnitude of the corresponding  $^nJ(\text{XH})$  can be extracted. Because only the relative signal displacement between spin-edited signals along the detected dimension is measured, small values even than the natural linewidth can be determined with excellent accuracy. The major inconvenient of such experiments is the poor chemical shift dispersion in the F1  $^1\text{H}$  dimension that requires high digitization ratios in this dimension and, therefore, long acquisition times.

Based on the principles of the HETLOC experiment, several related  $^1\text{H}$ –X heteronuclear correlation approaches have been also reported [12–17] offering (i) a much better dispersion in the indirect F1 dimension, (ii) the absence of diagonal peaks, and (iii) the achievement of the finest signal-to-noise ratios by combining the different available magnetization components with pulsed field gradient coherence-order selection. A very simple approach to measure these  $^nJ(\text{XH})$  should be from a  $w_2$ -X-coupled HSQC–TOCSY spectrum, in which the active coupling, found into the final multiplet pattern as an additional in-phase splitting in the detected dimension, can be measured from computer-aided coupled/decoupled multiplet analysis [18,19]. On the other hand, a phase-cycled 2D HSQC–TOCSY experiment using spin-state selection in both dimensions was described several years ago [20]. Most recently, an improved E.COSY-type approach termed HSQC–HECADE was proposed in which the evolution of the X chemical shift and the heteronuclear coupling took

place in independent evolution periods [15,16]. Other useful approaches based on spin-state selection have been also reported [8,13,14,17] and, in particular, selective 1D versions are very attractive tools for such measurements in small-to-medium-sized molecules because offer excellent accuracy, individual optimization parameter settings, enhanced resolution and reduced experimental time [21].

The current paper is concerned with the development of more robust NMR experiments to measure both homonuclear and heteronuclear coupling constants in a variety of conditions. We propose modifications of the sensitivity-improved gradient-enhanced 2D HSQC–TOCSY pulse scheme that yields a set of different selective spin-state cross-peak pattern correlation spectra with optimal sensitivity and without extra experimental setup requirements than the original decoupled experiment. The original pulse timing is fully preserved and no additional delays are introduced into the new basic pulse schemes, the inter-pulse delays can be particularly optimized for IS spin systems if required and accurate  $J$ -coupling measurements are reliable from several spin-edited cross-peak patterns generated in fully coupled 2D heteronuclear  $^1\text{H}$ –X correlation maps. As it is known, the extraction of  $J$ -coupling values from E.COSY patterns are highly valuable in spectra showing clean well-resolved resonances but, unfortunately, the number of peaks is doubled when compared to the equivalent decoupled experiment. It will be shown that the individual edition of each E.COSY component, the corresponding  $\alpha\alpha$  and  $\beta\beta$  cross-peaks, into two separate spectra using a double-coherence TROSY-like transfer can be of enormous utility because strongly minimizes the overlapping problems and also reduces the spectral resolution requirements. Combined with these techniques, the incorporation of an optional restricted planar mixing transfer also allows the additional measurement of the corresponding proton–proton coupling constants,  $J(\text{HH})$  [22–24]. This restricted element do not alter the spin editing E.COSY or TROSY-like features and, therefore, the determination of the sign and the magnitude of these  $J(\text{HH})$  is made exactly in the same conditions as performed for  $^nJ(\text{XH})$ . Although the proposed experiments are limited to IS spin systems, it can be of general interest in molecules having a great number of CH and NH spin systems as, for instance, in carbohydrates and peptides. For instance, in the particular case of peptides, a complete set of heteronuclear and homonuclear coupling constants, namely  $^2J(\text{N–H}^\alpha)$ ,  $^3J(\text{N–H}^\beta)$ ,  $^2J(\text{C}^\alpha\text{–NH})$ ,  $^2J(\text{C}^\alpha\text{–H}^\beta)$ ,  $^3J(\text{C}^\alpha\text{–H}^\gamma)$ ,  $^3J(\text{NH–H}^\alpha)$ , and  $^3J(\text{H}^\alpha\text{–H}^\beta)$ , can be measured with good precision starting from the backbone NH and  $\text{C}^\alpha\text{H}^\alpha$  spin systems. The proposed NMR methods have been successfully tested and results are provided for two classical standard compounds such as sucrose, **1**, and cyclosporine, **2** (see Scheme 1).



Scheme 1.

## 2. Results and discussion

Fig. 1 shows the sensitivity-enhanced spin-edited 2D HSQC–TOCSY pulse schemes designed to measure  ${}^nJ(\text{XH})$  and  $J(\text{HH})$  coupling constants. Both schemes consist of three independent steps where data can be separately recorded at the different marked a, b, and c times (in each case, the acquisition should be performed by adding the last gradient echo period for proper refocusing). First, an out-and-back  ${}^1\text{H}$ -to- $\text{X}$ -to- ${}^1\text{H}$  transfer based on the regular HSQC–PEP pulse scheme in which the last retro-inept mixing transfer has been modified accordingly in each version to achieve a specific spin-state transfer selection via  ${}^1J(\text{XH})$  (point a). Second, a conventional homonuclear mixing TOCSY process, executed with a DIPSI-2 pulse train, that preserves all proton magnetization components thanks to its isotropic properties. The resulting data acquired at point b afford spin-edited cross-peaks from which the size and the sign of  ${}^nJ(\text{XH})$  can be determined if proton is acquired without X decoupling. At this point, the overall duration of the proposed schemes is kept at a minimum length and, therefore, the additional sensitivity  $T_2$  losses with respect to the original sequence can be neglected. Finally, a restricted planar mixing element (see marked box in schemes of Fig. 1) can be optionally inserted at the

end of the sequence to measure  $J(\text{HH})$  under the same experimental conditions described above if data is acquired with X-decoupling (point c). Although this additional double retro-INEPT sequence has a overall duration of  $1/J(\text{XH})$  ms, about 7 ms for CH and 11 ms for NH, this is not a critical factor in small and medium-size molecules. As major features of the proposed spin-edited HSQC–TOCSY  $J(\text{CH})$  and  $J(\text{HH})$  versions, heteronuclear coupling can evolve freely in the indirect  $t_1$  and in the acquisition  $t_2$  periods and maximum sensitivity is obtained by using the gradient-enhanced coherence-order echo/anti-echo protocol for both data acquisition and data processing. The maximum sensitivity gains traditionally associated to the PEP protocol can be fully reached because the interpulse delays in all INEPT clusters can be finely adjusted for IS spin systems.

For a stepwise understanding of each involved transfer, Tables 1 and 2 summarize the different magnetization components present in each time point of the two proposed approaches. All available coherence transfer pathways and the particular spin-state labelling are completely preserved during the entire pulse sequence. The most important aspect of the pulse sequence of Fig. 1A is the last  $90^\circ(\text{X})$  pulse (marked with an asterisk) placed at the end of the double retro-INEPT block.

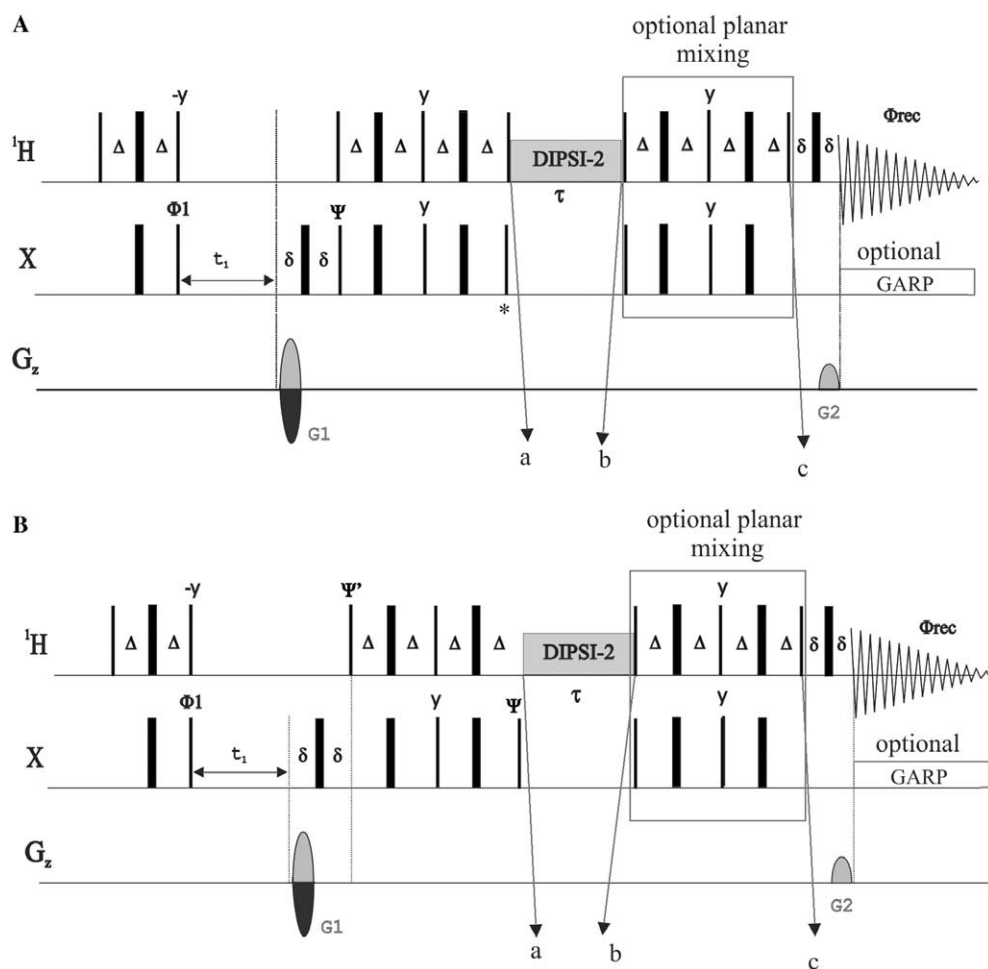


Fig. 1. Pulse schemes of the sensitivity-enhanced 2D (A) E.COSY-type and (B) TROSY-type HSQC–TOCSY experiments for the determination of heteronuclear  $^1\text{H}$ – $\text{X}$  and homonuclear  $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  (with the optional planar mixing box and the optional X GARP decoupling during acquisition) coupling constants. After the TOCSY transfer of duration  $\tau$  (point b) the experiment is suitable to extract  ${}^nJ(\text{HX})$  ( $n > 1$ ) coupling constants from protonated X nuclei. At point c, the experiment is suitable for the measurement of  $J(\text{HH})$  in IS spin systems. Thin and thick vertical lines represents hard  $90^\circ$  and  $180^\circ$  pulses, respectively, with phase  $x$  unless otherwise indicated. When the  $90^\circ(\text{X})$  pulse marked with an asterisk (\*) is not applied, the pulse sequence becomes a conventional HSQC–PEP experiment. A minimum basic two-phase cycle is applied in which the first X  $90^\circ$  pulse ( $\phi_1 = x, -x$ ) and the receiver ( $\phi_{\text{rec}} = x, -x$ ) are inverted each alternate scan. The phases  $\Psi$  and  $\Psi'$  are set to  $x$  and  $y$ , respectively. The delay  $\Delta$  is set to  $1/(4*J_{\text{XH}})$ . Pulsed field gradients of duration  $\delta$  are inserted as indicated for coherence transfer pathway selection and the G1:G2 strength ratio is set to  $\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{X}}:1$ . The echo/anti-echo gradient-coherence selection protocol is applied in which for each  $t_1$  increment, pure N- and P-type data are collected alternately by inverting the polarity of G1 gradient with the pulse together with phases  $\Psi$  and  $\Psi'$ , stored separately and then combined accordingly to generate pure absorptive line shapes in both dimensions.

Table 1

Product operator components present at different times of the E.COSY-type HSQC–TOCSY (Fig. 1A) following the evolution time  $t_1$  (for  $\Delta = 1/(4*J_{\text{XH}})$ )

Term No.	$t_1^a$	$90_x(^1\text{H})$	$90_x(\text{X})$	$2\Delta$	$90_y(^1\text{H})$	$90_y(\text{X})$	$2\Delta$	$90_x(^1\text{H})$	$90_x(\text{X})^b$ (time a)	TOCSY (time b)
I	$\text{H}_{1z}\text{S}_x \cos(\Omega t_1) \cos(\pi J t_1)$	$\text{H}_{1y}\text{S}_x$	$\text{H}_{1y}\text{S}_x$	$\text{H}_{1y}\text{S}_x$	$\text{H}_{1y}\text{S}_z$	$\text{H}_{1x}$	$\text{H}_{1x}$	$\text{H}_{1x}$	$\text{H}_{1x}$	$\text{H}_{2x}$
II	$\text{S}_y \cos(\Omega t_1) \sin(\pi J t_1)$	$\text{S}_z$	$\text{S}_z$	$\text{S}_x$	$\text{H}_{1z}\text{S}_y$	$\text{H}_{1z}\text{S}_y$	$\text{H}_{1y}\text{S}_y$	$\text{H}_{1y}\text{S}_z$	$\text{H}_{1y}\text{S}_z$	$\text{H}_{2y}\text{S}_z$
III	$\text{H}_{1z}\text{S}_y \sin(\Omega t_1) \cos(\pi J t_1)$	$\text{H}_{1y}\text{S}_z$	$\text{H}_{1x}$	$\text{H}_{1z}$	$\text{H}_{1z}$	$\text{H}_{1z}$	$\text{H}_{1y}$	$\text{H}_{1y}$	$\text{H}_{1y}$	$\text{H}_{2y}$
IV	$\text{S}_x \sin(\Omega t_1) \sin(\pi J t_1)$	$\text{S}_x$	$\text{H}_{1z}\text{S}_y$	$\text{H}_{1x}\text{S}_y$	$\text{H}_{1x}\text{S}_y$	$\text{H}_{1x}\text{S}_y$	$\text{H}_{1x}\text{S}_y$	$\text{H}_{1x}\text{S}_z$	$\text{H}_{1x}\text{S}_z$	$\text{H}_{2x}\text{S}_z$

<sup>a</sup> Trigonometric factors are shown only on this column.

<sup>b</sup> This pulse is optional. If applied, an E.COSY coupling pattern is obtained. See text and Fig. 1A for more details.

If this pulse is omitted, only the terms I and III will be detected because the other terms II and IV would represent non-observable multiple-quantum coherences (see

Table 1). Thus, this option is equivalent to a regular HSQC–PEP experiment recorded with full coupling in both dimensions and it generates a typical fully coupled

Table 2

Product operator components present at different times of the TROSY-type HSQC–TOCSY (Fig. 1B) following the evolution time  $t_1$  (for  $\Delta = 1/(4*^1J_{XH})$ )

Term No.	$t_1^a$	$90_y(^1\text{H})$	$2\Delta$	$90_x(^1\text{H})$	$90_y(\text{X})$	$2\Delta$	$90_x(\text{X})$ (time a)	TOCSY (time b)
I	$\text{H}_{1z}\text{S}_x \cos(\Omega t_1) \cos(\pi J t_1)$	$\text{H}_{1x}\text{S}_x$	$\text{H}_{1x}\text{S}_x$	$\text{H}_{1x}\text{S}_z$	$\text{H}_{1y}$	$\text{H}_{1y}$	$\text{H}_{1y}$	$\text{H}_{2y}$
II	$\text{S}_y \cos(\Omega t_1) \sin(\pi J t_1)$	$\text{S}_y$	$\text{H}_{1z}\text{S}_x$	$\text{H}_{1y}\text{S}_z$	$\text{H}_{1x}$	$\text{H}_{1x}$	$\text{H}_{1x}$	$\text{H}_{2x}$
III	$\text{H}_{1z}\text{S}_y \sin(\Omega t_1) \cos(\pi J t_1)$	$\text{H}_{1x}\text{S}_y$	$\text{H}_{1x}\text{S}_y$	$\text{H}_{1x}\text{S}_y$	$\text{H}_{1x}\text{S}_y$	$\text{H}_{1x}\text{S}_z$	$\text{H}_{1x}\text{S}_z$	$\text{H}_{2x}\text{S}_z$
IV	$\text{S}_x \sin(\Omega t_1) \sin(\pi J t_1)$	$\text{S}_x$	$\text{H}_{1z}\text{S}_y$	$\text{H}_{1y}\text{S}_y$	$\text{H}_{1y}\text{S}_y$	$\text{H}_{1y}\text{S}_z$	$\text{H}_{1y}\text{S}_z$	$\text{H}_{2y}\text{S}_z$

<sup>a</sup> Trigonometric factors are shown only on this column.

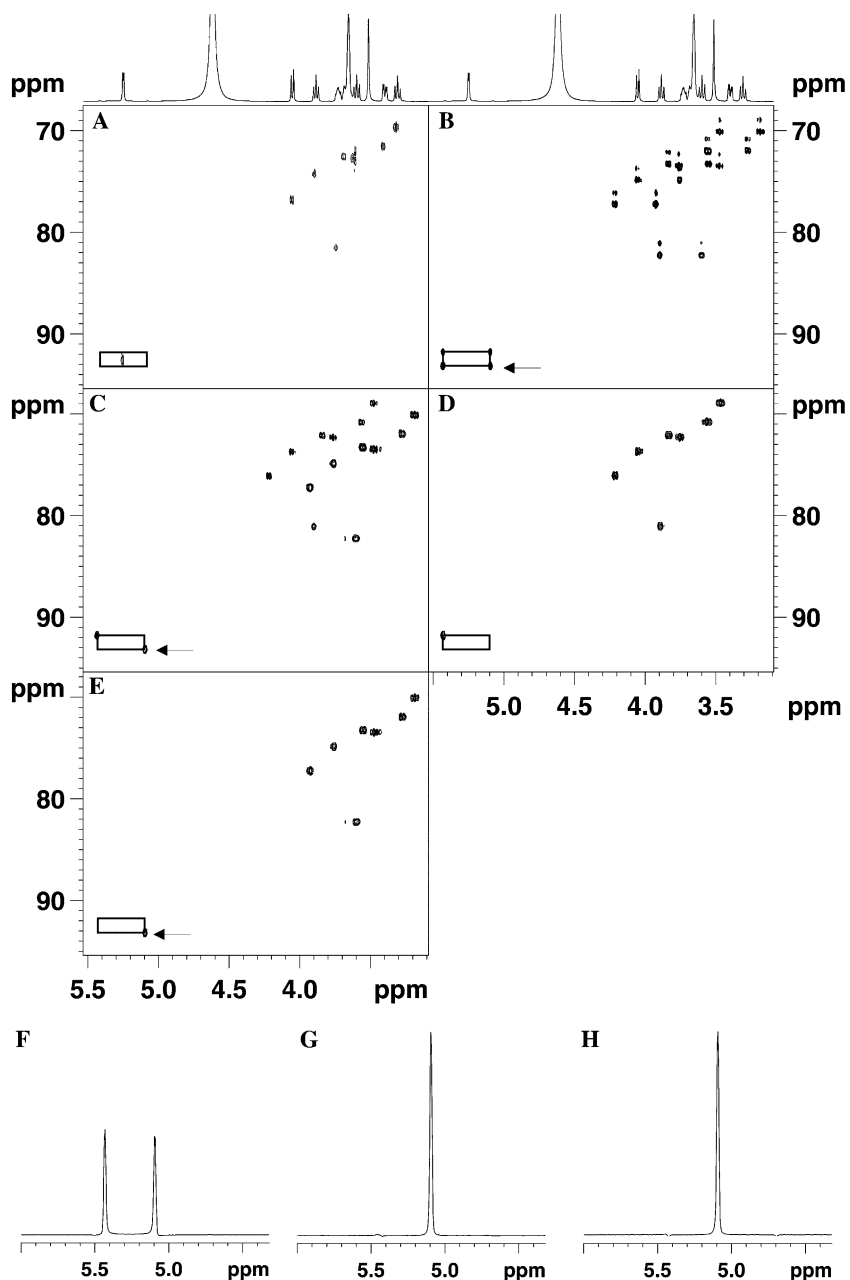


Fig. 2. 2D  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  HSQC spectra of **1** recorded at time point a using the pulse sequences of Figs. 1A and B: (A) fully decoupled and (B) four-component coupling pattern spectra acquired with pulse sequence 1A without the last editing  $90^\circ(\text{X})$  marked with an asterisk; (C) two-component E.COSY coupling pattern acquired exactly as (B) but adding the marked editing  $90^\circ(\text{X})$  pulse; (D–E) Single-component TROSY-type spectra acquired with  $\Psi = y/\Psi' = x$  and  $\Psi = -y/\Psi' = -x$ , respectively, using the sequence Fig. 1B. (F–H) 1D slices were taken from spectra of Fig. 2B (fully coupled), 2C (E.COSY), and 2E (TROSY), respectively, to show sensitivity comparisons.

four-component multiplet with an unwanted 50% of sensitivity loss (see Fig. 2B and the corresponding 1D trace in Fig. 2F). These two observable terms (I and III) correspond to antiphase-to-in-phase transfer and this is the reason why the widely accepted HSQC–PEP pulse scheme offer maximum attainable sensitivity when acquired under decoupling conditions in both dimensions (Fig. 2A). If the editing  $90^\circ(X)$  pulse is applied, as shown in Fig. 1A, all four terms become observables and a full spin-state-selective to spin-state-selective coherence transfer takes place. The result is an interesting simplified two-component E.COSY-like multiplet pattern for the direct auto-correlation peaks with maximum sensitivity ratios (see Fig. 2C and the corresponding 1D trace in Fig. 2G).

Similar magnetization components are also obtained when analyzing the TROSY-type HSQC version (Fig. 1B). However, a detailed product operator analysis shows that the resulting components come from different pathways (Table 2) and can be understood as the addition of two independent spin-state-selection to in-phase transfer (terms I + II) and spin-state-selection to anti-phase transfer (terms III + IV), respectively. The result is a double coherence transfer providing single-component TROSY or anti-TROSY cross-peaks in separate spectra, as a function of the  $\Psi$  and  $\Psi'$  phases (Figs. 2D and E, respectively, and the corresponding 1D trace in Fig. 2H). Improved sensitivity in TROSY/anti-TROSY spectra can be also achieved if separate in-phase and anti-phase E.COSY spectra are recorded by introducing a  $S^3E$  element just prior to the  $t_1$  period in Fig. 1A and with further addition/subtraction data processing. Alternatively, it is also possible to achieve spin-selection only in the F2 dimension by inserting a  $180^\circ X$  pulse in the middle of the  $t_1$  period (not shown in scheme of Fig. 1B). In this way, only the terms I and III in Table

2 should be considered and both contribute to the detected signal. This approach affords sensitivity-enhanced F2-spin-selected 2D spectra as described early for other related experiments [8,13,14,17].

Once this clean spin-edited selection procedure is achieved by any of the described E.COSY-type or TROSY-type blocks (at point a), the isotropic properties associated to a TOCSY mixing process assures that this spin-editing information is propagated without alteration to other relayed protons (point b). The different  $^1H$ – $^{13}C$  spin-edited HSQC–TOCSY spectra of **1** are shown in Fig. 3. Very clean spectra are obtained with excellent sensitivity and from which accurate  $^nJ(CH)$  values can be reliable extracted by direct analysis of multiplet displacements along the detected F2 dimension.

As mentioned above, the major inconvenient of the E.COSY-type HSQC–TOCSY methodology (Fig. 3A) is the increased number of cross-peaks compared to a conventional decoupled spectrum that can complicate the spectral analysis if accidental resonance overlapping occurs. To circumvent this complication, the use of the TROSY/anti-TROSY-like approach can be a very interesting alternative. As theoretically predicted, the sensitivity of each individual TROSY-peak (Figs. 3B and C) is the same as the E.COSY counterpart and, in practical terms, the E.COSY spectrum is the sum of the two separate TROSY spectra. Whereas the main advantage of the E.COSY approach is that coupling constants can be extracted from a single spectrum, the advantages to use separate TROSY approach is clearly appreciated. In addition to avoid problematic overlapping, the requirements for high resolution levels in the indirect F1 dimensions are strongly reduced and this is an important factor when deciding the number of points to be indirectly sampled and, consequently, to fix the

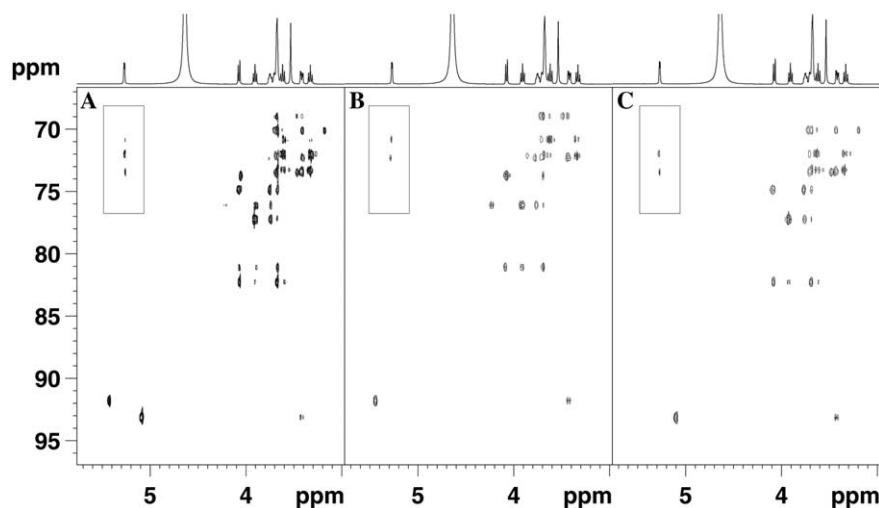


Fig. 3. 2D  $^1H$ – $^{13}C$  spin-edited HSQC–TOCSY spectra of **1**: (A) E.COSY and (B, C) TROSY and anti-TROSY spectra acquired as described in Figs. 2B–D, respectively, but with an additional TOCSY step.

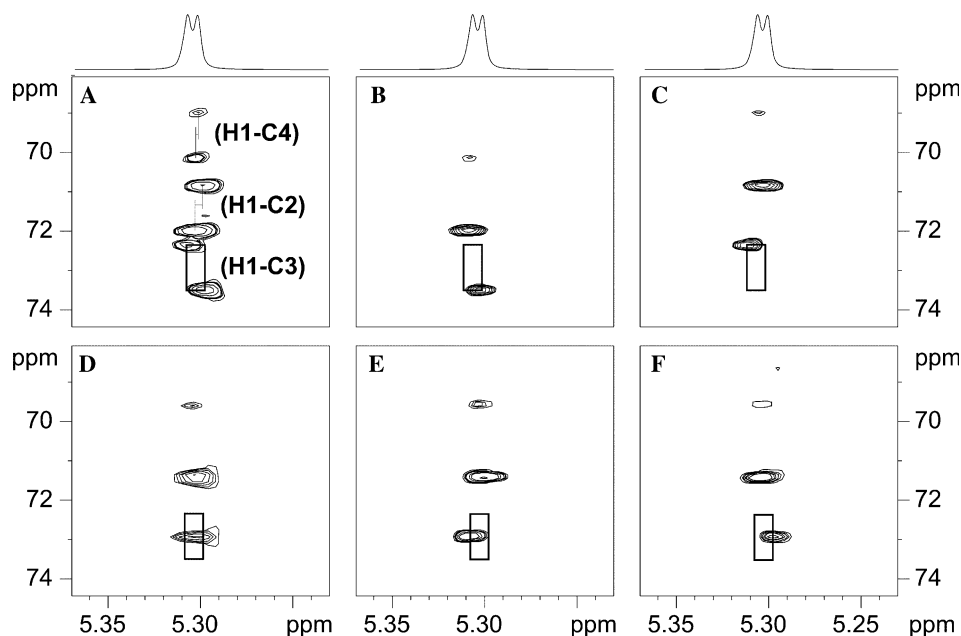


Fig. 4. Different multiplets patterns obtained from several versions of the HSQC–TOCSY- $J(\text{CH})$  experiment of **1** acquired as described in caption of Fig. 3 but with better resolution in the F1 dimension to resolve overlapped cross-peaks. (A) E.COSY (Fig. 1A); (B, C) TROSY/anti-TROSY (Fig. 1B); (D) conventional  $w_1$ -decoupled (19); (E, F)  $w_1$ -decoupled version acquired as spectra B and C, respectively, but inserting a hard  $180^\circ$   $^{13}\text{C}$  pulse in the middle of the  $t_1$  period. For clarity, a reference box selecting the H1–C3 cross-peak highlights the coupling pattern.

overall acquisition time. The positive effect to increase the F1 resolution by a factor of 2 in E.COSY-type spectra (Fig. 4A) and a summary of the different coupling patterns that can be achieved using the different versions of the HSQC–TOCSY experiment are exemplified on the different 2D spectra shown in Fig. 4.

As an extra feature of the proposed spin-edited HSQC–TOCSY schemes, it is also possible to add a second heteronuclear planar mixing element after the TOCSY transfer period which allows for the measurement of homonuclear  $J(\text{HH})$  coupling constants without supplementary requisites. This element (marked into a box in Fig. 1) achieves the full re-conversion of the anti-phase  $\text{H}_{2x,y}\text{X}_z$  heteronuclear components to anti-phase  $\text{H}_{2x,y}\text{H}_{1z}$  homonuclear components whereas all in-phase  $\text{H}_{2x,y}$  terms are unaffected (see Table 3). Because all final terms do not include any X magnetization component, the proton signal is best detected under X decoupling in order to avoid the presence of extra passive in-phase heteronuclear splitting in the resulting multiplet. Fig. 5 shows the highly resolved H1 cross-peak region of the TROSY-type spectra of **1** recorded at times b (HSQC–

TOCSY- $J(\text{XH})$ ) and c (HSQC–TOCSY- $J(\text{HH})$ ) under the same experimental conditions. The analysis of the most congested area, for instance around 3.3–3.8 ppm in carbohydrates as shown in Fig. 6, is a clear example how separate TROSY editing can avoid undesired resonance overlapping in more complex spectra and how the  $J(\text{HH})$  version yields much more cleaner spectra because of direct correlation peaks are strongly attenuated and only residual contributions are usually present.

It should be pointed out that the proposed experiments also work finely on other highly interesting heteronuclei, such as  $^{15}\text{N}$ . They can be used to extract the sign and the magnitude of  $^nJ(\text{NH})$  and  $J(\text{HH})$  from NH spin systems such those found in peptides. Fig. 7 shows the N– $\text{H}^\alpha$  and NH– $\text{C}^\alpha$  areas of 2D E.COSY-type  $^1\text{H}$ – $^{15}\text{N}$  and  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  HSQC–TOCSY  $J(\text{NH})$  and  $J(\text{HH})$  spectra, respectively, recorded on **2**, in which the,  $^2J(\text{C}^\alpha\text{–NH})$  and  $^3J(\text{NH–H}^\alpha)$  values can be easily determined. Note that all  $^2J(\text{N–H}^\alpha)$  values are positive. On the other hand, the analysis of the aliphatic  $^{13}\text{C}$  region in peptides also permits the simultaneous determination of a great number of coupling values, such as  $^2J(\text{C}^\alpha\text{–H}^\beta)$ ,

Table 3

Product operator components present at different times in the optional planar mixing transfer (Figs. 1A and B) after the TOCSY mixing process (for  $\Delta = 1/(4*^1J_{\text{XH}})$ )

Term No.	TOCSY (time b)	$90_x(^1\text{H}) 90_x(\text{X})$	$2\Delta$	$90_y(^1\text{H}) 90_y(\text{X})$	$2\Delta$	$90_x(^1\text{H})$ (time c)
I	$\text{H}_{2x}$	$\text{H}_{2x}$	$\text{H}_{2x}$	$\text{H}_{2z}$	$\text{H}_{2z}$	$\text{H}_{2y}$
II	$\text{H}_{2y}\text{S}_z$	$\text{H}_{2z}\text{S}_y$	$\text{H}_{2z}\text{H}_{1z}\text{S}_x$	$\text{H}_{2x}\text{H}_{1x}\text{S}_z$	$\text{H}_{2x}\text{H}_{1y}$	$\text{H}_{2x}\text{H}_{1z}$
III	$\text{H}_{2y}$	$\text{H}_{2z}$	$\text{H}_{2z}$	$\text{H}_{2x}$	$\text{H}_{2x}$	$\text{H}_{2x}$
IV	$\text{H}_{2x}\text{S}_z$	$\text{H}_{2x}\text{S}_y$	$\text{H}_{2x}\text{H}_{1z}\text{S}_x$	$\text{H}_{2z}\text{H}_{1x}\text{S}_z$	$\text{H}_{2z}\text{H}_{1y}$	$\text{H}_{2y}\text{H}_{1z}$

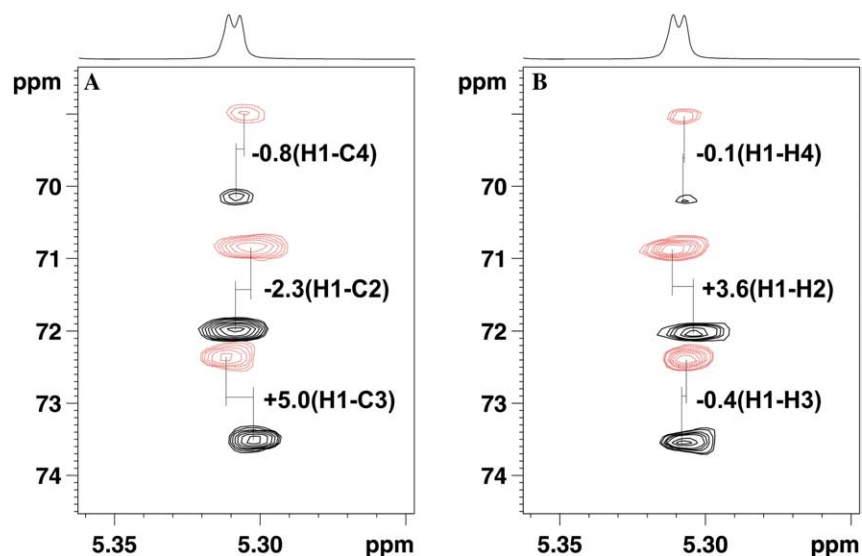


Fig. 5. Part of the TROSY-type HSQC–TOCSY (A)  $J(\text{CH})$  and (B)  $J(\text{HH})$  spectra of **1** acquired as described in Fig. 4. The measured values are given in Hz with an experimental error of less than 0.6 Hz.

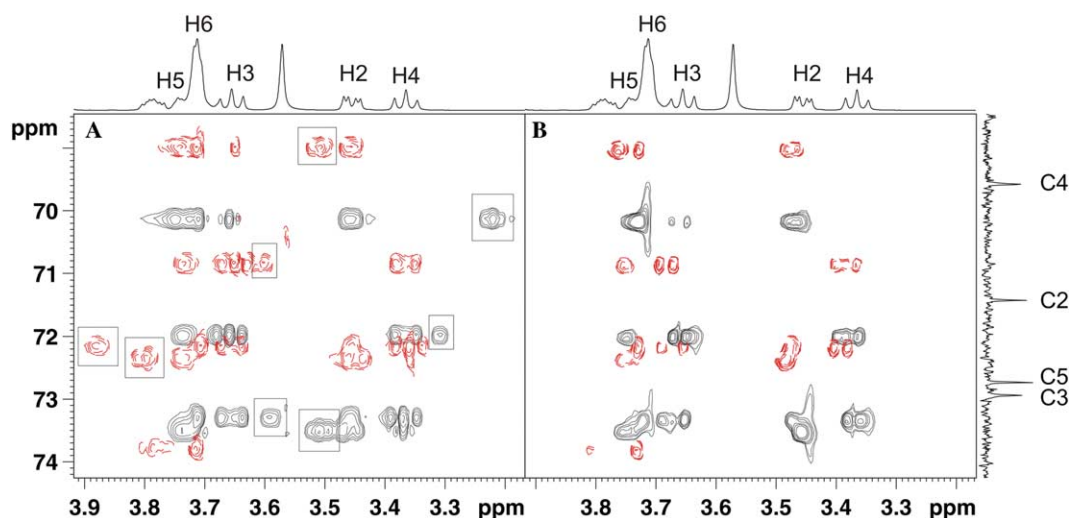


Fig. 6. Part of the separate 2D  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  TROSY (black solid lines)/anti-TROSY (red dashed lines) HSQC–TOCSY correlation spectra of **1** acquired as described in Fig. 5 for the measurement of the sign and the magnitude of (A)  $^3J(\text{CH})$  and (B)  $J(\text{HH})$  coupling constants, respectively, using the TROSY version (Fig. 1B). To make clear, direct correlation peaks are marked into a box in (A) but they are strongly minimized in (B).

$^3J(\text{C}^\alpha\text{--H}^\gamma)$ ,  $^4J(\text{C}^\alpha\text{--H}^\delta)$ ,  $^3J(\text{H}^\alpha\text{--H}^\beta)$ , and  $^4J(\text{H}^\alpha\text{--H}^\gamma)$  in addition of the simultaneous confirmation and validation of  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , and/or  $^{15}\text{N}$  chemical shift assignments (Fig. 8). It is also interesting to note that the magnitude of other homonuclear passive couplings can be simultaneously extracted from the  $J(\text{HH})$  version. All upfield/downfield  $\text{H}^\alpha\text{--N}$  cross-peaks in Fig. 7D are decoupled with respect to the active  $J(\text{H}^\alpha\text{--NH})$  coupling constant and therefore the  $J(\text{H}^\alpha\text{--H}^\beta)$  coupling constant can be also measured if there is enough resolution. For instance, the  $\text{H}^\alpha$  proton at 4.57 ppm belonging to the val-5 residue shows an apparent triplet about 9.2 Hz in the conventional proton spectrum. Clearly, this pattern is splitted in two very clean doublets in the edited spec-

tra allowing the easy determination of the two different  $J(\text{H}^\alpha\text{--NH})$  and  $J(\text{H}^\alpha\text{--H}^\beta)$  values (see Fig. 9B).

The overall duration of both proposed E.COSY and TROSY approaches are exactly the same, only some pulses and/or phases change, and the possible deleterious effect due to undesired  $T_2$  relaxation upon the addition of the last mixing planar can be neglected for small molecules (compare 1D slices in Fig. 9).

### 3. Methods and materials

All experiments were performed on a BRUKER DRX-500 spectrometer at 298 K equipped with a



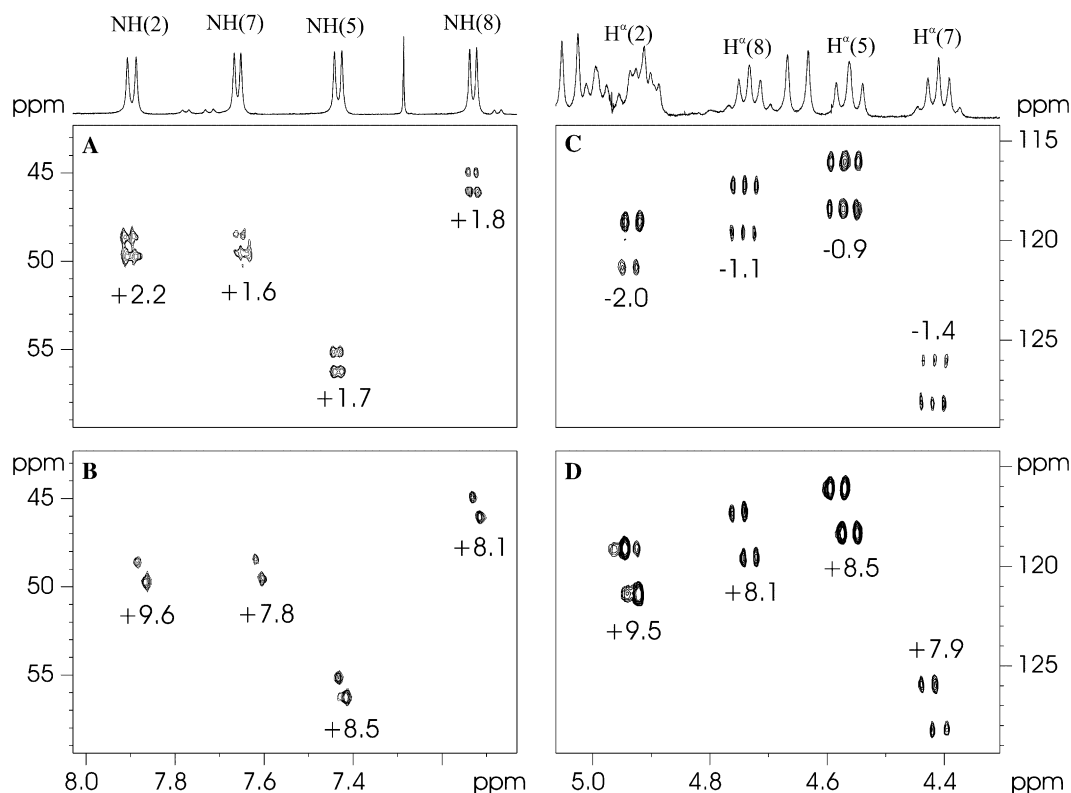


Fig. 7. Expanded (A, B)  $C^{\alpha}$ -NH and (C, D)  $N-H^{\alpha}$  regions of the 2D  $^1H$ -X E.COSY-type HSQC-TOCSY spectra of **2** acquired using the pulse sequences of Fig. 1A for (A, B)  $X = ^{13}C$  and (C, D)  $X = ^{15}N$ , respectively: (A) measurement of  $^2J(C^{\alpha}-NH)$  by performing  $^1H$  acquisition without  $^{13}C$  decoupling at point b; (B) measurement of  $^3J(HN-H^{\alpha})$  by performing the  $^1H$  acquisition with  $^{13}C$  decoupling at point c; (C) measurement of  $^2J(N-H^{\alpha})$  by performing  $^1H$  acquisition without  $^{15}N$  decoupling at point b; (D) measurement of  $^3J(HN-H^{\alpha})$  by performing the  $^1H$  acquisition with  $^{15}N$  decoupling at point c.

5 mm inverse triple-resonance TXI probe incorporating Z-gradients. All spectra were acquired and processed with TOPSPIN v1.2 (pulse programs are available on request for this platform). Samples of 0.1 M Sucrose in  $D_2O$ , **1**, and 50 mM cyclosporine in  $CDCl_3$ , **2**, were chosen as model samples. The isotropic homonuclear TOCSY mixing process consists of a 7 kHz DIPSI-2 pulse train in all experiments. All 2D  $^1H$ - $^{13}C$  HSQC spectra of Fig. 2 have been recorded with no  $^{13}C$  decoupling during  $^1H$  acquisition (except spectrum of Fig. 2A which was decoupled in both dimensions), recycle delay = 1 s, inter-pulse delay  $\Delta (=1/4 \cdot ^1J(CH))$  set to 1.75 ms, number of  $t_1$  increments = 128, number of data points in  $t_2 = 1K$ , and number of scans = 2. Sine-shaped pulsed field gradients of 1 ms of duration were set to a 80:20.1 ratio. The spectral windows in both dimensions were 2000 Hz (F2) and 7500 Hz (F1), respectively. Data were processed applying a zero filling in the F1 dimension and a 90°-shifted qsin window function in both dimensions, consisting of 1024\*1024 points. The total experiment time was 10 min for each 2D spectrum. The 2D  $^1H$ - $^{13}C$  HSQC-TOCSY spectra of Fig. 3 were recorded and processed exactly as described in caption of Fig. 2 but with an additional 40 ms DIPSI-2 mixing

time and 4 scans for each one of the 128  $t_1$  increments. The total experiment time was 20 min for each 2D spectrum. The 2D  $^1H$ - $^{13}C$  HSQC-TOCSY spectra of Fig. 4 were recorded as described before but using 256  $t_1$  increments of 2K data points each one to increase the F1 resolution. The total experiment time was about 40 min for each 2D spectrum.

Experimental conditions for  $^1H$ - $^{13}C$  HSQC-TOCSY spectra on **2** (Figs. 7A, B and 8A, B): recycle delay = 1 s, inter-pulse period  $\Delta$  set to 1.75 ms ( $1/4 \cdot ^1J(CH)$ ), number of  $t_1$  increments = 256, number of data points in  $t_2 = 4K$ , number of scans = 64. Gradients of 1 ms of duration are set to a 80:20.1 ratio. Spectral widths: 5000 Hz (F2) and 12,600 Hz (F1). The overall acquisition time was about 6 h for each spectrum. Experimental conditions for  $^1H$ - $^{15}N$  HSQC-TOCSY spectra on **2** (Figs. 7C and D): recycle delay = 1 s, inter-pulse period  $\Delta$  set to 2.7 ms ( $1/4 \cdot ^1J(NH)$ ), number of  $t_1$  increments = 64, number of data points in  $t_2 = 4K$ , number of scans = 160. Gradients of 1 ms of duration are set to a 80:8.1 ratio. Spectral widths: 4000 Hz (F2) and 1600 Hz (F1). The overall acquisition time was about 4 h for each spectrum. The duration of the TOCSY process in all these experiments were of 40 ms.

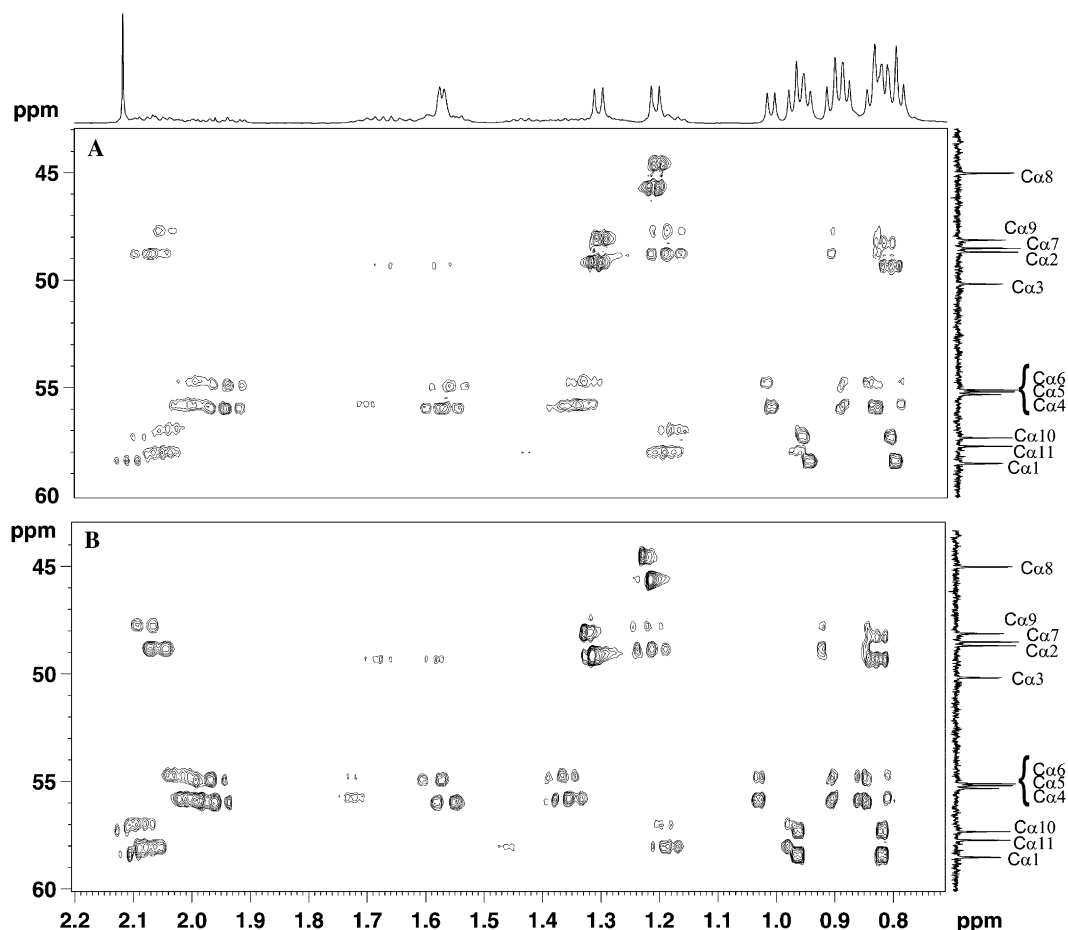


Fig. 8. Expansions plots corresponding to the aliphatic  $C^\alpha$  region of the  $^1H$ - $^{13}C$  E.COSY HSQC-TOCSY (A)  $J(CH)$  and (B)  $J(HH)$  spectra of **2** acquired as described for Figs. 7A and B. From these spectra, the sign and the size of many different heteronuclear ( $^2J(C^\alpha-H^\beta)$ ,  $^3J(C^\alpha-H^\gamma)$  and  $^4J(C^\alpha-H^\delta)$ ) and homonuclear ( $^3J(H^\alpha-H^\beta)$  and  $^4J(H^\alpha-H^\gamma)$ ) coupling constants can be directly extracted with excellent accuracy.

#### 4. Conclusions

In summary, a different number of long-range heteronuclear CH (and NH) and homonuclear HH coupling constants can be accurately measured from spin-edited sensitivity-enhanced HSQC-TOCSY spectra in molecules having a great number of IS spin systems, as demonstrated for peptides and carbohydrates. Their simplicity, the optimal sensitivity, the excellent high F1 dispersion and the extraction of both the magnitude and the sign of homonuclear and heteronuclear coupling constants values make of these methodologies interesting tools to be applied in a variety of conditions and increase the number of techniques currently available for their measurements. Whereas E.COSY-like spectra allow such measurements from a single spectrum, the separate acquisition of each one of these E.COSY multiplets offer improved resolution and dispersion features making this approach highly interesting where cross-peak overlapping can obscure such determinations.

We believe the proposed techniques can find widespread application in many different topics and, in par-

ticular, in  $J$ -based configurational analysis of acyclic compounds [25], natural products [26], and also for carbohydrates, as recently exemplified for the differentiation of aldohexopyranosyl residues from geminal  $^2J(CH)$  values [27]. We are also interested at which extension the long-range  $J(NH)$  coupling constants could be included in the conformational analysis of nitrogen containing compounds and more studies on this topic is under investigation. In addition, what is especially beneficial in these experiments is that also the signs of coupling constants could be determined. This would be especially valuable for experiments in aligned media, where the signs of dipolar coupling constants are unpredictable. This particular application would however require a mixing sequence that would work on dipolar couplings. Because HSQC pulse timing is the basis of many multidimensional NMR experiments, the substitution of the traditional double-retro-INEPT PEP block by the proposed E.COSY and TROSY/anti-TROSY concepts affords a variety of possible general approaches to be applied for the measurement of scalar and residual dipolar couplings at natural

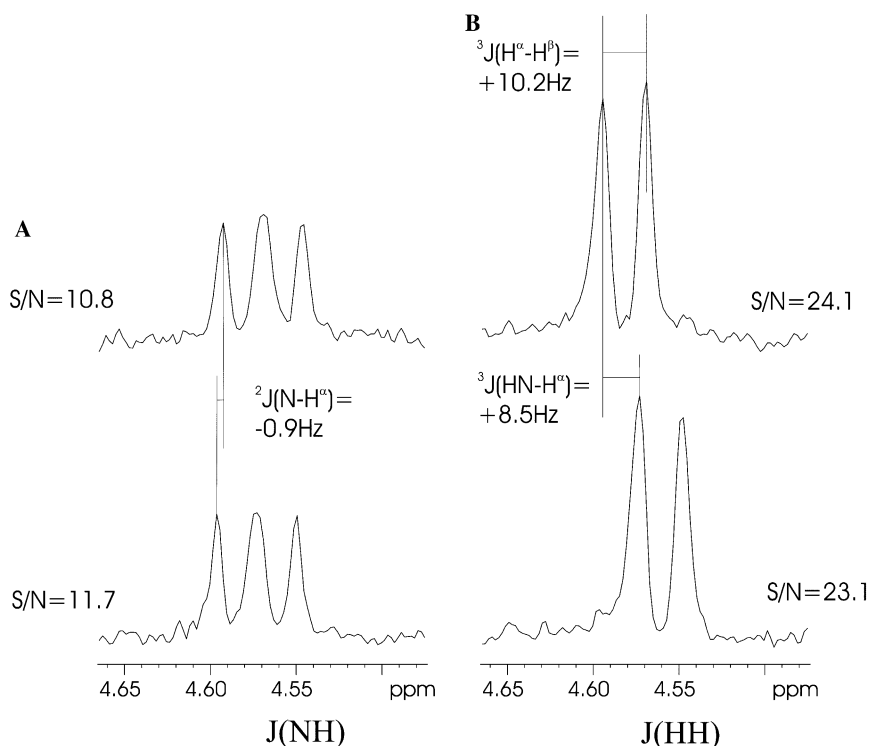


Fig. 9. 1D Slices extracted from Figs. 7C and D belonging to the N(5) amide nitrogen in **2**. It can be clearly observed that the last optional block in sequence 1A practically do not affect the overall sensitivity of the experiment. On the contrary, better relative sensitivity is obtained in the  $J(\text{HH})$  version (slices B) because data is acquired under  $^{15}\text{N}$  GARP decoupling and passive couplings can be also measured from the simplified multiplets. For each 1D row, the experimental signal-to-noise ratio is indicated.

abundance and also for labelled bio-molecules without sacrificing sensitivity and performance [28,29].

### Acknowledgments

Financial support for this research provided by MCYT (projects BQU2003-01677) is gratefully acknowledged. P.N thanks “Generalitat de Catalunya” for a predoctoral grant. We also thank the Servei de Resonància Magnètica Nuclear, UAB, for allocating instrument time to this project.

### References

- [1] L. Lerner, A. Bax, Sensitivity-enhanced two-dimensional heteronuclear relayed coherence transfer NMR spectroscopy, *J. Magn. Reson.* 69 (1986) 375–380.
- [2] V.V. Krishnamurthy, sensitivity-enhanced 3D HSQC–TOCSY experiments, *J. Magn. Reson. B* 106 (1995) 170–177.
- [3] B.L. Marquez, W.H. Gerwick, R.T. Williamson, Survey of NMR experiments for the determination of  $^nJ(\text{C},\text{H})$  heteronuclear coupling constants in small molecules, *Magn. Reson. Chem.* 39 (2001) 499–530.
- [4] R.A.E. Edden, J. Keeler, Development of a method for the measurement of long-range  $^{13}\text{C}$ – $^1\text{H}$  coupling constants from HMBC spectra, *J. Magn. Reson.* 166 (2004) 53–68.
- [5] R.T. Williamson, B.L. Marquez, W.H. Gerwick, K.E. Kover, One- and two-dimensional gradient-selected HSQMBC NMR experiments for the efficient analysis of long-range heteronuclear coupling constants, *Magn. Reson. Chem.* 38 (2000) 265–273.
- [6] M. Kurz, P. Schmieder, H. Kessler, HETLOC, an efficient method for determining heteronuclear long-range couplings with heteronuclei in natural abundance, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30 (1991) 1329–1331.
- [7] P. Schmieder, M. Kurz, H. Kessler, Determination of heteronuclear long-range couplings to heteronuclei in natural abundance by two- and three-dimensional NMR spectroscopy, *J. Biomol. NMR* 1 (1991) 403–420.
- [8] M.D. Sorensen, A. Meissner, O.W. Sorensen, Spin-state-selective coherence transfer via intermediate states of two-spin coherence in IS spin systems. Application to E.COSY-type measurement of J coupling constants, *J. Biomol. NMR* 10 (1997) 181–186.
- [9] D. Uhrin, G. Batta, V.J. Hruby, P.N. Barlow, K.E. Kover, Sensitivity- and gradient-enhanced hetero(w1) half-filtered TOCSY experiment for measuring long-range heteronuclear coupling constants, *J. Magn. Reson.* 130 (1998) 155–161.
- [10] G. Xu, B. Zhang, J.S. Evans, PFG-w1-filtered TOCSY experiments for the determination of long-range heteronuclear and homonuclear coupling constants and estimation of J-coupling cross-talk artefacts in 2D w1-filtered E.COSY-style spectra, *J. Magn. Reson.* 138 (1999) 127–134.
- [11] G. Xu, J.S. Evans, Determination of long-range  $J(\text{XH})$  coupling using excitation-sculpting gradient-enhanced heteronuclear correlation experiments, *J. Magn. Reson. A* 123 (1996) 105–110.
- [12] U. Wollborn, W. Willker, D. Leibfritz, Heteronuclear long-range coupling constants from inverse 2D NMR spectra dispersed by

- the heteronuclear chemical shift, *J. Magn. Reson. A* 103 (1993) 86–89.
- [13] A. Meissner, J.O. Duus, O.W. Sorensen, Integration of spin-state-selective excitation into 2D NMR correlation experiments with heteronuclear ZQ/DQ  $\pi$  rotations for  $^1J_{\text{XH}}$ -resolved E.COSY-type measurement of heteronuclear coupling constants in proteins, *J. Biomol. NMR* 10 (1997) 89–94.
- [14] M.D. Sorensen, A. Meissner, O.W. Sorensen,  $^{13}\text{C}$  natural abundance  $\text{S}^3\text{E}$  and  $\text{S}^3\text{CT}$  experiments for measurement of J coupling constants between  $^{13}\text{C}^\alpha$  or  $^1\text{H}^\alpha$  and other protons in a protein, *J. Magn. Reson.* 137 (1999) 237–242.
- [15] W. Kozminski, D. Nanz, HECADe: HMQC- and HSQC-based 2D NMR experiments for accurate and sensitive determination of heteronuclear coupling constants from E.COSY-type cross peaks, *J. Magn. Reson.* 124 (1997) 383–392.
- [16] W. Kozminski, D. Nanz, Sensitivity improvement and new acquisition scheme of heteronuclear active-coupling-pattern-tilting spectroscopy, *J. Magn. Reson.* 142 (2000) 294–299.
- [17] W. Kozminski, Simplified multiplet pattern HSQC–TOCSY experiment for accurate determination of long-range heteronuclear coupling constants, *J. Magn. Reson.* 137 (1999) 408–412.
- [18] K.E. Köver, O. Prakash, V.J. Hruby,  $z$ -filtered heteronuclear coupled-HSQC–TOCSY experiment as a means for measuring long-range heteronuclear coupling constants, *J. Magn. Reson. A* 103 (1993) 92–96.
- [19] K.E. Köver, V.J. Hruby, D. Uhrin, Sensitivity- and gradient-enhanced heteronuclear coupled/decoupled HSQC–TOCSY experiments for measuring long-range heteronuclear coupling constants, *J. Magn. Reson.* 129 (1997) 125–129.
- [20] W. Willker, U. Wollborn, D. Leibfritz, Exact measurement of  $^3J_{\text{CH}}$  coupling constants using proton-detected editing and selection sequences, *J. Magn. Reson. B* 101 (1993) 83–86.
- [21] T. Parella, J. Belloc, Spin-state-selective excitation in selective 1D inverse NMR experiments, *J. Magn. Reson.* 148 (2001) 78–87.
- [22] U. Wollborn, D. Leibfritz, Accurate measurement of homonuclear coupling constants using JHH–TOCSY, *J. Magn. Reson.* 98 (1992) 142–146.
- [23] A. Meissner, J.O. Duus, O.W. Sorensen, Spin-state-selective excitation. Application for E.COSY-type measurement of  $J(\text{HH})$  coupling constants, *J. Magn. Reson.* 128 (1997) 92–97.
- [24] W. Peti, C. Griesinger, Measurement of magnitude and sign of H,H-dipolar couplings in proteins, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 3975–3976.
- [25] N. Matsumori, D. Kaneno, M. Murata, H. Nakamura, K. Tachibana, Stereochemical determination of acyclic structures based on carbon–proton spin-coupling constants. A method of configuration analysis for natural products, *J. Org. Chem.* 64 (1999) 866–876.
- [26] M. Murata, S. Matsuoka, N. Matsumori, G.K. Paul, K. Tachibana, Absolute configuration of amphidinol 3, the first complete structure determination from amphidinol homologues. Application of a new configuration analysis based on carbon–hydrogen spin-coupling constants, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 870–871.
- [27] M. Oikawa, S. Adachi, S. Kusumoto,  $^2J(\text{C,H})$  index: a non-destructive NMR method for differentiation of aldohexopyranosyl residues, *Org. Lett.* 7 (2005) 661–664.
- [28] K. Ding, A.M. Gronenborn, Sensitivity-enhanced 2D IPAP, TROSY-anti-TROSY, and E.COSY experiments: alternatives for measuring dipolar  $^{15}\text{N}$ – $^1\text{H}^{\text{N}}$  couplings, *J. Magn. Reson.* 163 (2003) 208–214.
- [29] K.E. Köver, G. Batta, More line narrowing in TROSY by decoupling of long-range couplings: shift correlation and  $^1J_{\text{NC}}$  coupling constants measurements, *J. Magn. Reson.* 170 (2004) 184–190.

## 12.3.- Ampliació de resultats

### 12.3.1.- Contribució de Boltzmann en l'experiment E.COSY-HSQC

Hi ha un fet que no es comenta a la *publicació III* i és que en l'obtenció del patró E.COSY els doblets presenten una certa asimetria, és a dir, una component del doblet presenta més intensitat que l'altre. Inicialment vàrem atribuir aquest fet a algun efecte de *cross correlation relaxation*, tot i que ens semblava estrany, doncs, treballant amb molècules petites a l'espectròmetre de 500 MHz aquests efectes normalment són mínims. Per tal, de veure si era algun efecte de *J-mismatch*, o bé algun efecte atribuïble a problemes *off resonance*, es va simular la seqüència utilitzant la versió 1D que es presenta a la **Figura 84**. El resultat va ser el mateix que l'experimental, l'asimetria en el doblet persistia. Així, doncs, era clar que és la pròpia seqüència de pulsos que genera aquest efecte.

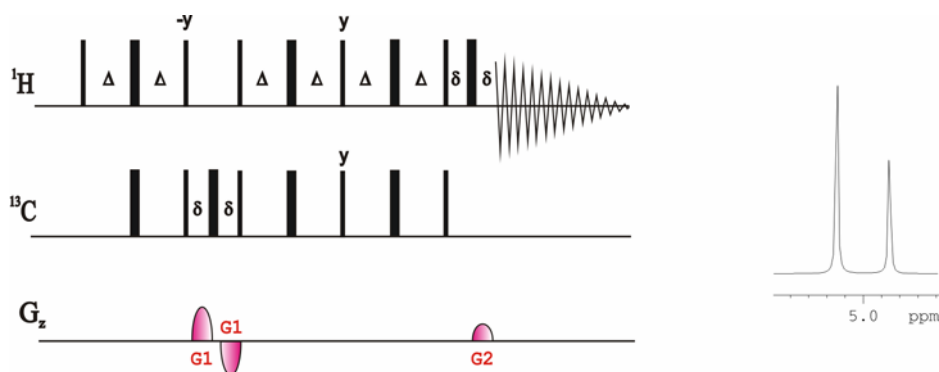
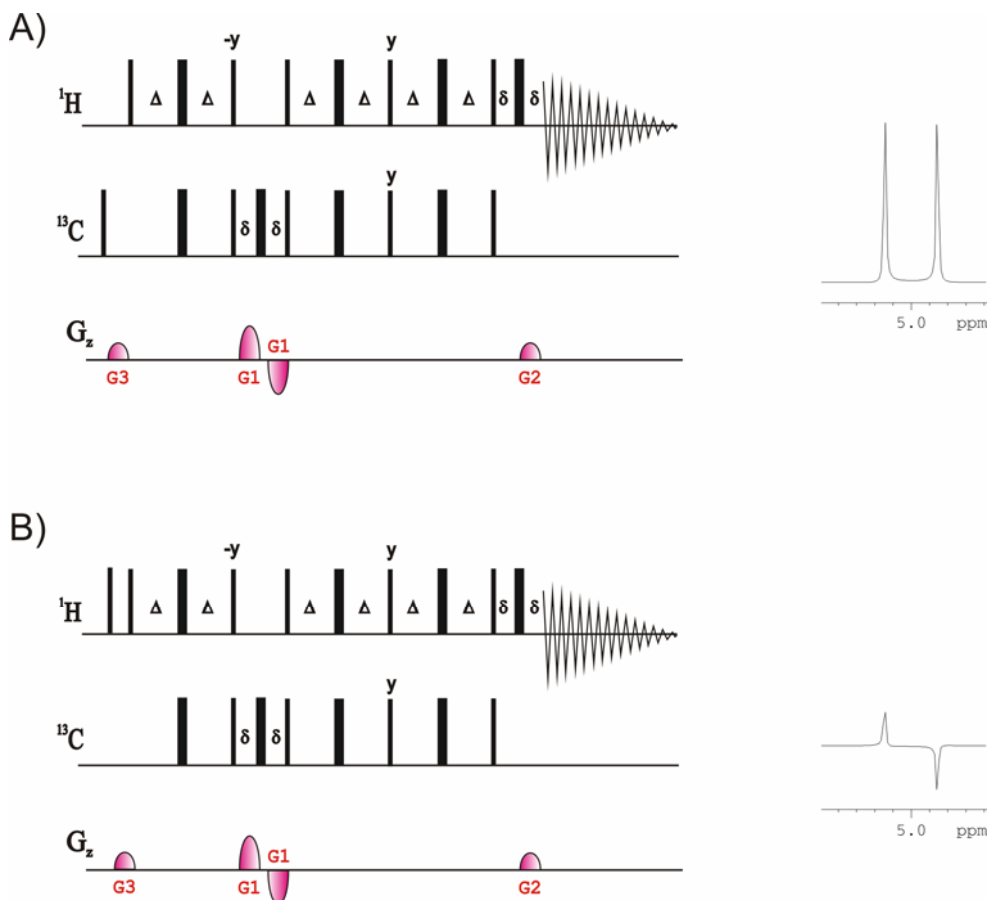


Figura 84: Diagrama de pulsos de la seqüència 1D-E.COSY-HSQC i resultat simulat per a un sistema de spins CH, observant-se una notable asimetria en el doblet. Els PFG s'apliquen amb una relació 4:-4:1.

Ja un cop acceptada la publicació se'ns va ocórrer que aquest fet s'explica tenint en compte la magnetització inicial de  $^{13}\text{C}$ , o altrament anomenada magnetització de Boltzmann. Aquesta magnetització passa de  $S_z$  a  $S_y$  després del primer INEPT, i per tant, és codificada pels gradients. L'esmentada magnetització de Boltzmann es reconverteix a magnetització monoquàntica de protó durant el període de mescla, descodificada pels gradients i adquirida com a doblet en antifase amb el patró E.COSY, el qual es suma al doblet en fase desitjat donant lloc a la asimetria observada. Cal notar que aquesta magnetització contribueix una quarta part a l'espectre final respecte la magnetització inicial de protó (fet donat per les raons giromagnètiques dels nuclis en qüestió).

Per tal de corroborar el fet es van simular dues seqüències de pulsos en les quals es van afegir al inici un puls i un gradient de purga, amb la idea de fer arribar al detector per separat les magnetitzacions inicials de protó i de carboni. Els resultats obtinguts corroboren la hipòtesi inicial. Així, doncs, quan purguem la magnetització de Boltzmann (**Fig. 85A**). Obtenim el doblet en fase sense cap tipus d'asimetria. I quan purguem la magnetització inicial de protó, és a dir,

detectem només la contribució de Boltzmann, observem un doblet en antifase, la intensitat del qual és una quarta part (25%) respecte el doblet en fase (**Fig. 85B**).



**Figura 85:** 1D E.COSY-HSQC. Els PFG s'apliquen amb una relació relació 4:-4:1. A) Es detecta només la contribució inicial de la magnetització de  $^1\text{H}$ . B) Es detecta la magnetització de  $^{13}\text{C}$  inicial (Boltzmann).

Així, doncs, cal incloure l'element de purga de la magnetització inicial de carboni en les seqüències E.COSY HSQC-TOCY i E.COSY HSQC-TOCY-J(HH) proposades a la *publicació III* per a la mesura de constants d'acoblament.

Cal comentar que en l'experiment estàndard HSQCPEP la contribució de Boltzmann no arriba a ser detectada perquè el període de mescla no la reconverteix en magnetització monoquàntica de protó, i per tant, no és descodificada pel gradient G2. Pel que fa la seqüència TROSY la magnetització Boltzmann si que es detectada, però, al detectar només un sol del pic es pot fer que aquesta se sumi coherentment a la magnetització desitjada<sup>152</sup>. S'ha d'anar amb compte amb la fase de  $90^\circ$  del darrer de puls de  $^1\text{H}$  l'INEPT (y o  $-y$ ) ja que es amb aquesta fase que es fa l'addició coherent de senyal, o bé l'efecte invers, és a dir, la pèrdua de senyal. L'aplicació de la fase d'aquest puls depèn de quin sigui el pic TROSY que volem seleccionar, i de com es trobi muntat l'esquema de detecció del nostre aparell en concret.

<sup>152</sup> Pervushin, K.; Riek, R.; Wider, G.; Wütrich, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6394.

---

*publicació IV*

**Optimum spin-state selection for all multiplicities  
in the acquisition dimension of the HSQC experiment**

## 13.- Publicació IV

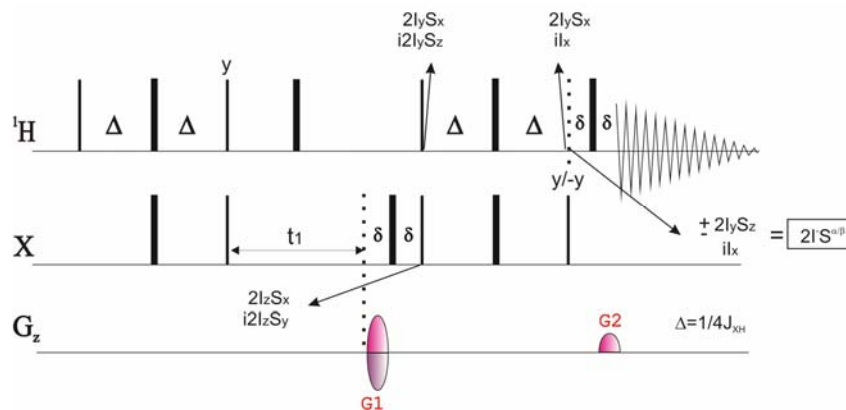
### *Optimum spin-state selection for all multiplicities in the acquisition dimension of the HSQC experiment*

#### 13.1.- Introducció

En aquesta publicació es proposa una metodologia per a la selecció d'estat de *spin* per a totes les multiplicitats, que s'ha anomenat F2-IPAP-HSQC(y). Al llarg de la publicació es compara aquesta amb la seqüència HSQC- $\alpha,\beta$  de Sørensen i col·laboradors que només funciona per a sistemes IS. D'altra banda, també es presenta una modificació sobre la mateixa, anomenada F2-IPAP-HSQC(x), la qual permet l'editat ZQDQ en sistemes  $I_2S$  mantenint l'editat  $\alpha,\beta$  en les altres multiplicitats (IS i  $I_3S$ ). Aquesta es compara amb la seqüència  $S^3-I_2S$ -HSQC presentada per Permi i que com el seu nom indica només funciona per sistemes  $I_2S$ . Per aquesta raó en aquesta introducció s'ha cregut convenient descriure breument aquestes dues seqüències.

##### 13.1.1- HSQC- $\alpha,\beta$ de Sørensen i col·laboradors

L'any 1997 Sørensen i col·laboradors van publicar<sup>153</sup> una sèrie d'experiments HSQC-TOCSY i HSQC-NOESY per a la mesura de constants d'acoblament  $^nJ_{CH}$  i  $J_{HH}$ . El bloc HSQC d'aquests experiments està modificat per tal de produir l'editat  $\alpha,\beta$  i es discutirà a continuació. La seqüència, anomenada aquí HSQC- $\alpha,\beta$  (**Fig. 86**), és ben senzilla d'implementar, doncs, només s'ha d'afegir un sol puls de  $90^\circ$  de carboni al final de la seqüència HSQC original. Aquest puls permet la recuperació d'una component DQ/ZQ usualment no detectada transformant-la en magnetització de protó en antifase detectable, la qual se suma o resta (depenen de la fase d'aplicació del puls (y o -y) a la component de magnetització en fase de protó.



<sup>153</sup> Sørensen, M.D.; Meissner, A.; Sørensen, O.W. *J. Biomol. NMR.* 1997, 10, 181.

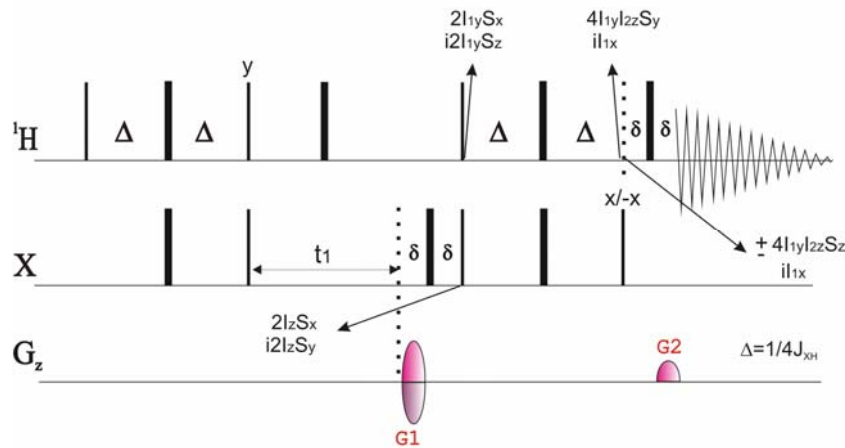


**Figura 86.** Seqüència de pulsos HSQC- $\alpha,\beta$  per a l'editat  $S^3$  en sistemes de *spin* IS. Es marquen les components de magnetització presents en alguns punts de la seqüència.

Com a major inconvenient de la seqüència, cal dir, que aquesta només produeix l'editat correctament per sistemes IS. Per a sistemes  $I_1I_2S$  la magnetització DQ/ZQ  $2I_1S_x$  evoluciona amb  $^1J_{XH}$  durant l'eco del INEPT revers degut a la presència del segon protó, donant lloc al terme  $4I_1I_2S_y$  que no es veu afectat pel darrer puls de  $90^\circ_{y/-y}$  des de l'heteronucli. Aquest és un terme DQ/ZQ, per tant, no es detecta.

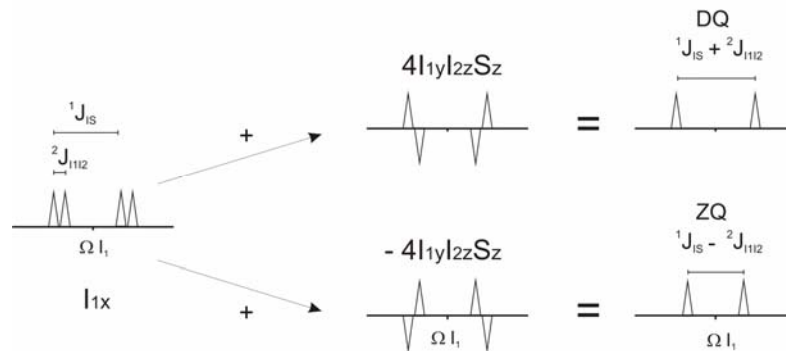
### 13.1.2- $S^3$ - $I_2S$ -HSQC de Permi

L'any 2002 Permi va publicar<sup>154</sup> una seqüència (**Fig. 87**) que solucionava el problema pels sistemes de tres spins  $I_1I_2S$ .



**Figura 87.** Seqüència de pulsos HSQC- $\alpha,\beta$  per a l'editat  $S^3$  en sistemes de *spin*  $I_2S$ . Es marquen les components de magnetització presents en alguns punts de la seqüència.

La seqüència és anàloga al HSQC- $\alpha,\beta$  de Sørensen i col·laboradors amb la única diferència que la fase d'aplicació del darrer puls en aquest cas és x o  $-x$ . Aquest puls genera abans de l'adquisició magnetització en antifase de  $I_1$  respecte l'acoblament amb  $I_2$  i amb l'heteronucli S. Aquesta se sumarà, o restarà, a la magnetització en fase per donar el patró desitjat DQ/ZQ, tal com s'esquemmatitza a la **Figura 88**.



**Figura 88.** Estratègia DQ/ZQ per a la mesura simultània de  $^1J_{XH}$  i  $^2J_{HH}$  en sistemes  $I_1I_2S$ .

<sup>154</sup> Permi, P. *J. Biomol. NMR.* 2002, 22, 27.



# Optimum spin-state selection for all multiplicities in the acquisition dimension of the HSQC experiment

Pau Nolis<sup>a</sup>, Juan Félix Espinosa<sup>b</sup>, Teodor Parella<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Servei de Resonància Magnètica Nuclear, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain*

<sup>b</sup> *Centro de Investigación Lilly, Avda. de la Industria 30, E-28108 Alcobendas, Spain*

Received 22 November 2005; revised 29 December 2005

Available online 30 January 2006

## Abstract

Most conventional heteronuclear spin-state-selective ( $S^3$ ) NMR experiments only work for a specific multiplicity, typically  $IS$  spin systems. Here, we introduce a general and efficient IPAP strategy to achieve  $S^3$  editing simultaneously for all multiplicities in the acquisition dimension of the HSQC experiment. Complementary in-phase (HSQC-IP) and anti-phase (HSQC-AP) data are separately recorded with a simple phase exchange of two  $90^\circ$  proton pulses involved in the mixing process of the F2-coupled sensitivity-improved HSQC pulse sequence. Additive and subtractive linear combination of these IP/AP data generates simplified F2- $\alpha/\beta$ -spin-edited HSQC subspectra for all  $IS$ ,  $I_2S$ , and  $I_3S$  spin systems and combines enhanced and optimized sensitivity with excellent tolerance to unwanted cross-talk contributions over a considerable range of coupling constants. Practical aspects such as pulse phase settings, transfer efficiency dependence, inter-pulse delay optimization, and percentage of cross-talk are theoretically analyzed and discussed as a function of each  $I_nS$  multiplicity. Particular emphasis on the features associated to spin-editing in diastereotopic  $I_2S$  spin systems and application to the measurement of long-range proton–carbon coupling constants are also provided.

© 2006 Published by Elsevier Inc.

**Keywords:** NMR; HSQC; Spin-state selection; Coupling constants; Spin-editing

## 1. Introduction

The heteronuclear single-quantum correlation (HSQC) experiment is one of the most important tools for high-resolution NMR studies of molecules in solution. It is the basis of many different and very important multidimensional NMR experiments developed for the study of small-to-medium sized molecules at natural abundance and also for large isotopic labeled bio-molecules, in particular proteins and nucleic acids. Thus, any modification in the regular HSQC pulse scheme can have a great impact in the design of new and improved NMR methodologies because of the easy extrapolation on many different applications. Examples on the importance of some improvements introduced into the basic HSQC pulse sequence

have been the incorporation of pulsed-field gradients for coherence selection combined with the PEP principle for sensitivity-improved versions [1,2], the use of water-flip back techniques for a proper application in bio-molecules dissolved in non-deuterated water, or the modification of the coherence-transfer mixing period to afford specific spin-state-selective ( $S^3$ ) editing, as established in the widely known TROSY experiment [3]. The principles associated to homonuclear and heteronuclear spin-editing have emerged as an important feature in modern heteronuclear NMR spectroscopy in order to simplify spectra and to avoid peak overlapping and it has been widely used to measure scalar and residual dipolar couplings or to study the relaxation properties of the different lines belonging to the same multiplet. All  $S^3$ -based NMR experiments employ two different ways to perform the addition/subtraction procedure of the in-phase (IP) and anti-phase (AP) data: (i) design of a specific pulse train that combines coherently the two

\* Corresponding author. Fax: +34 93 5812291.

E-mail address: [teodor.parella@uab.es](mailto:teodor.parella@uab.es) (T. Parella).

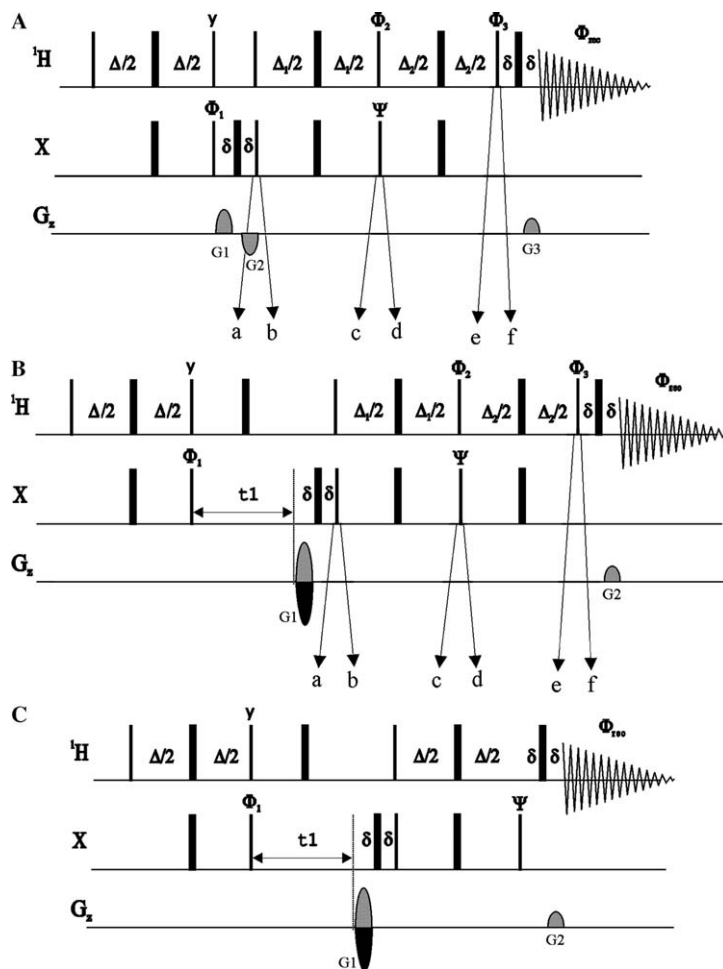


Fig. 1. Pulse sequences of the (A) 1D and (B) 2D versions of the F2-coupled  $^1\text{H}$ -X sensitivity-improved HSQC experiment to achieve spin-selected spectra simultaneously for all IS,  $\text{I}_2\text{S}$ , and  $\text{I}_3\text{S}$  spin systems: (i) HSQC-IP( $y$ ): ( $\phi_2 = y$ ,  $\phi_3 = x$ ,  $\Psi = y$ ); (ii) HSQC-AP( $y$ ): ( $\phi_2 = x$ ,  $\phi_3 = y$ ,  $\Psi = y$ ); (iii) HSQC-IP( $x$ ): ( $\phi_2 = y$ ,  $\phi_3 = x$ ,  $\Psi = x$ ); (iv) HSQC-AP( $x$ ): ( $\phi_2 = x$ ,  $\phi_3 = y$ ,  $\Psi = x$ ). (C) Original HSQC- $\alpha/\beta$  pulse train, as reported in [4–7] ( $\Psi = y$ ) and in [24] ( $\Psi = x$ ). Thick and thin rectangles represent  $90^\circ$  and  $180^\circ$  pulses, respectively. A basic two-step phase cycle was used ( $\phi_1 = \phi_{\text{rec}} = x, -x$ ). The delay  $\Delta$  is optimized to  $1/2J(\text{IS})$  whereas  $\Delta_1$  and  $\Delta_2$  are optimized as a function of the experiment and multiplicity (see Table 4 for details). See Tables 1–3 for magnetization components available at times a–f.

observable IP and AP magnetization components prior to data acquisition, or (ii) separate recording of the IP and AP components using equivalent pulse schemes followed by a post-processing mathematical protocol. In principle, this second approach should be much more attractive from the sensitivity point of view because if two spectra are added prior to acquisition, one component is lost, while both are retained when post-acquisition editing is used.

Nowadays, heteronuclear spin-editing in 2D HSQC spectra can be achieved in the directly detected F2-dimension (referred as HSQC- $\alpha/\beta$  experiment) [4–7], in the indirect F1-dimension ( $\alpha/\beta$ -HSQC or also known as IPAP-HSQC experiment) [8], or in both dimensions by E.COSY- or TROSY-type selection in F1,F2-coupled HSQC experiments ( $\alpha/\beta$ -HSQC- $\alpha/\beta$ ) [3,9,10]. These reported  $\text{S}^3$ -edited HSQC experiments only work properly for IS spin systems and they have been mainly applied to backbone NH and  $\text{C}_\alpha\text{H}_\alpha$  spin systems in labeled proteins. During the last years, a different number of methylene-specific [11–16] and methyl-specific [17–20] spin-edited HSQC-type pulse

Table 1  
Product operator components of a IS spin system present at different times of the HSQC experiment (Fig. 1B) following the evolution time  $t_1$ <sup>b,c</sup>

Phases	$t_1$ <sup>a</sup>	b	c	d	e	f
$\phi_2 = y$	$H_z S_x \cos(\Omega_S t_1)$	$H_y S_x$	$H_y S_x$	$H_z S_z$	$H_x S'$	$\mathbf{H}_x \mathbf{S}'$
$\phi_3 = x$	$H_z S_y \sin(\Omega_S t_1)$	$H_y S_z$	$H_x S$	$H_z S$	$H_z S$	$\mathbf{H}_y \mathbf{s}$
$\Psi = y$						
$\phi_2 = x$	$H_z S_x \cos(\Omega_S t_1)$	$H_y S_x$	$H_y S_x$	$H_z S_z$	$H_z S_z$	$\mathbf{H}_x \mathbf{S}_z$
$\phi_3 = y$	$H_z S_y \sin(\Omega_S t_1)$	$H_y S_z$	$H_x S$	$H_x S$	$H_y S_z S'$	$\mathbf{H}_y \mathbf{S}_z \mathbf{S}'$
$\Psi = y$						
$\phi_2 = y$	$H_z S_x \cos(\Omega_S t_1)$	$H_y S_x$	$H_y S_x$	$H_y S_x$	$H_y S_x$	$H_y S_x$
$\phi_3 = x$	$H_z S_y \sin(\Omega_S t_1)$	$H_y S_z$	$H_x S$	$H_z S$	$H_z S$	$\mathbf{H}_y \mathbf{s}$
$\Psi = x$						
$\phi_2 = x$	$H_z S_x \cos(\Omega_S t_1)$	$H_y S_x$	$H_y S_x$	$H_z S_x$	$S_y S'$	$S_y S'$
$\phi_3 = y$	$H_z S_y \sin(\Omega_S t_1)$	$H_y S_z$	$H_x S$	$H_x S$	$H_y S_z S'$	$\mathbf{H}_y \mathbf{S}_z \mathbf{S}'$
$\Psi = x$						

<sup>a</sup> Trigonometric factors showing chemical shift dependence are shown only on this column.

<sup>b</sup>  $\Delta = 1/(2J)$ .

<sup>c</sup> Trigonometric simplifications:  $s = \sin(\pi J_{HS} \Delta_1)$ ;  $c = \cos(\pi J_{HS} \Delta_1)$ ;  $s' = \sin(\pi J_{HS} \Delta_2)$ ;  $c' = \cos(\pi J_{HS} \Delta_2)$ .

schemes have been designed and analyzed in terms of sensitivity and spin-editing. In a recent paper, heteronuclear cross-polarization (HCP) has been demonstrated to be a useful mixing element in heteronuclear correlation experiments to achieve different spin-selection patterns simultaneously for IS and I<sub>2</sub>S spin systems [21].

In this work, we describe an improved way to obtain spin-editing in HSQC- $\alpha/\beta$  spectra. This experiment has been previously reported for the measurement of several homo- and heteronuclear coupling constants in small and medium-sized natural-abundance molecules and also in labeled proteins [4–7,22–26] or to increase the sensitivity in carbon-detected 2D and 3D HACACO- $\alpha/\beta$  experiments [27,28]. We show that a phase exchange of some 90° proton pulses involved in the coherence-order-selective (COS)

coherence-transfer (CT) mixing process of a F2-coupled sensitivity-improved HSQC experiment can afford a separate and fully complementary AP magnetization component to the traditional IP one. After additive/subtractive linear combination, heteronuclear spin-editing in the acquisition dimension is achieved for IS spin systems as described previously in the HSQC- $\alpha/\beta$  experiment [4–7]. In addition, our scheme offers two important benefits: (i) spin-editing is also achieved for other I<sub>n</sub>S multiplicities and, (ii) its sensitivity is optimized using the same principles as known for the sensitivity-improved HSQC experiment [2]. We examine our method theoretically, by using the product-operator formalism, and by spectra simulation and also experimentally. Experimental verification is illustrated for CH, CH<sub>2</sub>, and CH<sub>3</sub> spin systems in molecules

Table 2

Product operator components of a I<sub>1</sub>I<sub>2</sub>S spin system present at different times of the HSQC experiment (Fig. 1B) following the evolution time  $t_1^{b,c}$

Phases	$t_1^a$	b	c	d	e	f
$\phi_2 = y$	$H_{1z}S_x \cos(\Omega_S t_1)$	$H_{1y}S_x$	$H_{1y}S_x c$	$H_{1y}S_z c$	$H_{1x}c s'$	$H_{1x}c s'$
$\phi_3 = x$	$H_{1z}S_y \sin(\Omega_S t_1)$	$H_{1y}S_z$	$H_{1y}H_{2z}S_y s$	$H_{1y}H_{2x}S_y s$	$H_{1y}H_{2x}S_y s$	$H_{1z}H_{2x}S_y s$
$\Psi = y$			$H_{1xs}$	$H_{1zs}$	$H_{1zs}$	$H_{1ys}$
$\phi_2 = x$	$H_{1z}S_x \cos(\Omega_S t_1)$	$H_{1y}S_x$	$H_{1y}S_x c$	$H_{1z}S_z c$	$H_{1z}S_z c$	$H_{1x}S_z c$
$\phi_3 = y$	$H_{1z}S_y \sin(\Omega_S t_1)$	$H_{1y}S_z$	$H_{1y}H_{2z}S_y s$	$H_{1z}H_{2y}S_y s$	$H_{2y}S_x s s'$	$H_{2y}S_x s s'$
$\Psi = y$			$H_{1xs}$	$H_{1xs}$	$H_{1y}S_z s s$	$H_{1y}S_z s s'$
$\phi_2 = y$	$H_{1z}S_x \cos(\Omega_S t_1)$	$H_{1y}S_x$	$H_{1y}S_x c$	$H_{1y}H_{2x}S_z s$	$H_{1y}H_{2x}S_z s c'^2$	$H_{1x}H_{2x}S_z s c'^2$
$\phi_3 = x$	$H_{1z}S_y \sin(\Omega_S t_1)$	$H_{1y}S_z$	$H_{1y}H_{2z}S_y s$	$H_{1zs}$	$H_{1x}H_{2y}S_z s s'^2$	$H_{1x}H_{2z}S_z s s'^2$
$\Psi = x$			$H_{1xs}$		$H_{1zs}$	$H_{1ys}$
$\phi_2 = x$	$H_{1z}S_x \cos(\Omega_S t_1)$	$H_{1y}S_x$	$H_{1y}S_x c$	$H_{1z}H_{2y}S_z s$	$H_{1z}H_{2x}S_z s'$	$H_{1x}H_{2z}S_z s'$
$\phi_3 = y$	$H_{1z}S_y \sin(\Omega_S t_1)$	$H_{1y}S_z$	$H_{1y}H_{2z}S_y s$	$H_{1xs}$	$H_{1y}S_z s s'$	$H_{1y}S_z s s'$
$\Psi = x$			$H_{1xs}$			

<sup>a</sup> Trigonometric factors showing chemical shift dependence are shown only on this column.

<sup>b</sup>  $\Delta = 1/(2J)$ .

<sup>c</sup> Trigonometric simplifications:  $s = \sin(\pi J_{HS} \Delta_1)$ ;  $c = \cos(\pi J_{HS} \Delta_1)$ ;  $s' = \sin(\pi J_{HS} \Delta_2)$ ;  $c' = \cos(\pi J_{HS} \Delta_2)$ .

Table 3

Product operator components of a I<sub>1</sub>I<sub>2</sub>I<sub>3</sub>S spin system present at different times of the HSQC experiment (Fig. 1B) following the evolution time  $t_1^{b,c}$

Phases	$t_1^a$	b	c	d	e	f <sup>d</sup>
$\phi_2 = y$	$H_{1z}S_x \cos(\Omega_S t_1)$	$H_{1y}S_x$	$H_{1y}S_x c^2$	$H_{1y}S_z c^2$	$H_{1x}c^2 s'$	$H_{1x}c^2 s'$
$\phi_3 = x$	$H_{1z}S_y \sin(\Omega_S t_1)$	$H_{1y}S_z$	$H_{1y}H_{2z}H_{3z}S_x s^2$	$H_{1y}H_{2x}H_{3x}S_z s^2$	$H_{1y}H_{2x}H_{3y}S_z^2 c'^2 s'$	$H_{1z}H_{2x}H_{3z}S_z^2 c'^2 s'$
$\Psi = y$			$H_{1xs}$	$H_{1zs}$	$H_{1y}H_{2y}H_{3x}S_z^2 c'^2 s'$	$H_{1z}H_{2z}H_{3x}S_z^2 c'^2 s'$
					$H_{1y}H_{2y}H_{3x}S_z^2 c' s'^2$	$H_{1z}H_{2z}H_{3x}S_z^2 c' s'^2$
					$H_{1x}H_{2y}H_{3y}S_z^2 s'^3$	$H_{1x}H_{2z}H_{3z}S_z^2 s'^3$
					$H_{1zs}$	$H_{1ys}$
$\phi_2 = x$	$H_{1z}S_x \cos(\Omega_S t_1)$	$H_{1y}S_x$	$H_{1y}S_x c^2$	$H_{1z}S_z c^2$	$H_{1z}S_z c^2$	$H_{1x}S_z c^2$
$\phi_3 = y$	$H_{1z}S_y \sin(\Omega_S t_1)$	$H_{1y}S_z$	$H_{1y}H_{2z}H_{3z}S_x s^2$	$H_{1z}H_{2y}H_{3y}S_z s^2$	$H_{1z}H_{2x}H_{3x}S_z^2 s'^2$	$H_{1x}H_{2z}H_{3z}S_z^2 s'^2$
$\Psi = y$			$H_{1xs}$	$H_{1xs}$	$H_{1y}S_z s s'$	$H_{1y}S_z s s'$
$\phi_2 = y$	$H_{1z}S_x \cos(\Omega_S t_1)$	$H_{1y}S_x$	$H_{1y}H_{2z}S_y s c$	$H_{1y}H_{2x}S_z s c$	$H_{1y}H_{2x}S_z s c c'^2$	$H_{1z}H_{2y}S_z s c c'^2$
$\phi_3 = x$	$H_{1z}S_y \sin(\Omega_S t_1)$	$H_{1y}S_z$	$H_{1y}H_{3z}S_y s c$	$H_{1y}H_{3x}S_z s c$	$H_{1x}H_{2y}S_z s c s'^2$	$H_{1x}H_{2z}S_z s c s'^2$
$\Psi = x$			$H_{1xs}$	$H_{1zs}$	$H_{1y}H_{3x}S_z s c c'^2$	$H_{1z}H_{3x}S_z s c c'^2$
					$H_{1x}H_{3y}S_z s c s'^2$	$H_{1x}H_{3z}S_z s c s'^2$
					$H_{1zs}$	$H_{1ys}$
$\phi_2 = x$	$H_{1z}S_x \cos(\Omega_S t_1)$	$H_{1y}S_x$	$H_{1y}H_{2z}S_y s c$	$H_{1z}H_{2y}S_z s c$	$H_{1z}H_{2x}c s s'$	$H_{1x}H_{2z}c s s'$
$\phi_3 = y$	$H_{1z}S_y \sin(\Omega_S t_1)$	$H_{1y}S_z$	$H_{1y}H_{3z}S_y s c$	$H_{1z}H_{3y}S_z s c$	$H_{1z}H_{3x}c s s'$	$H_{1x}H_{3z}c s s'$
$\Psi = x$			$H_{1xs}$	$H_{1xs}$	$H_{1y}S_z s s'$	$H_{1y}S_z s s'$

<sup>a</sup> Trigonometric factors showing chemical shift dependence are shown only on this column.

<sup>b</sup>  $\Delta = 1/(2J)$ .

<sup>c</sup> Trigonometric simplifications:  $s = \sin(\pi J_{HS} \Delta_1)$ ;  $c = \cos(\pi J_{HS} \Delta_1)$ ;  $s' = \sin(\pi J_{HS} \Delta_2)$ ;  $c' = \cos(\pi J_{HS} \Delta_2)$ .

<sup>d</sup> Homonuclear anti-phase terms should be only observable for non-degenerate protons.

Table 4  
Amplitude transfer and maximum relative intensity for IS, I<sub>2</sub>S and I<sub>3</sub>S spin systems in HSQC-IP and HSQC-AP experiments

NMR experiment	Phases	Amplitude transfer for I <sub>n</sub> S spin system <sup>a</sup>	Maximum theoretical intensity <sup>b</sup>	Optimal delay settings
HSQC-IP(y)	$\phi_2 = y; \phi_3 = x \Psi = y$	$s + s'c^{n-1}$	IS: 2 I <sub>2</sub> S: 1.41 I <sub>3</sub> S: 1.25	IS: $\Delta_1 = \Delta_2 = 1/2J$ I <sub>2</sub> S: $\Delta_1 = 1/4J; \Delta_2 = 1/2J$ I <sub>3</sub> S: $\Delta_1 = 1/6J; \Delta_2 = 1/2J$
HSQC-AP(y)	$\phi_2 = x; \phi_3 = y \Psi = y$	$ss' + c^{n-1}$	IS: 2 I <sub>2</sub> S: 1.41 I <sub>3</sub> S: 1.25	IS: $\Delta_1 = \Delta_2 = 1/2J$ I <sub>2</sub> S: $\Delta_1 = 1/4J; \Delta_2 = 1/2J$ I <sub>3</sub> S: $\Delta_1 = 1/6J; \Delta_2 = 1/2J$
HSQC-IP(x)	$\phi_2 = y; \phi_3 = x \Psi = x$	$s[1 + (n-1)c^{n-2}]$	IS: 1 I <sub>2</sub> S: 2 I <sub>3</sub> S: 1.76	IS: $\Delta_1 = 1/2J; \Delta_2^c$ I <sub>2</sub> S: $\Delta_1 = 1/2J; \Delta_2^c$ I <sub>3</sub> S: $\Delta_1 = 1/3, 35J; \Delta_2^c$
HSQC-AP(x)	$\phi_2 = x; \phi_3 = y \Psi = x$	$ss'[1 + (n-1)c^{n-2}]$	IS: 1 I <sub>2</sub> S: 2 I <sub>3</sub> S: 1.76	IS: $\Delta_1 = \Delta_2 = 1/2J$ I <sub>2</sub> S: $\Delta_1 = \Delta_2 = 1/2J$ I <sub>3</sub> S: $\Delta_1 = 1/3, 35J; \Delta_2 = 1/2J$

<sup>a</sup> Trigonometric simplifications:  $s = \sin(\pi J_{HS}\Delta_1)$ ;  $c = \cos(\pi J_{HS}\Delta_1)$ ;  $s' = \sin(\pi J_{HS}\Delta_2)$ ;  $c' = \cos(\pi J_{HS}\Delta_2)$ .

<sup>b</sup> Relative intensities compared to a conventional HSQC-IP experiment acquired at point *c* and a HSQC-AP experiment acquired at point *b* in Fig. 1B (normalized to 1 for all multiplicities).

<sup>c</sup> The  $\Delta_2$  delay is not necessary in the HSQC-IP(x) version. In practice,  $\Delta_2$  is optimized to  $1/2J$  for any multiplicity in order that IP(x) data should be fully complementary to the equivalent AP(x) data.

at natural abundance and also for NH and NH<sub>2</sub> spin systems in labeled proteins. Examples will be provided for the measurement of long-range proton–carbon coupling constants and also for the single-line component selection in diastereotopic methylene resonances.

## 2. Results and discussion

The one-dimensional (1D) and two-dimensional (2D) pulse schemes used in this work (Fig. 1) are simple modifications of the sensitivity-enhanced HSQC experiment [1,2], with omission of the X-decoupling during <sup>1</sup>H acquisition. The 1D version (Fig. 1A) has been used to simulate the theoretical behavior of different I<sub>n</sub>S ( $n = 1-3$ ) spin systems. On the other hand, 2D experiments have been experimentally recorded using the pulse sequence of Fig. 1B and compared to the previously reported HSQC- $\alpha/\beta$  experiment (Fig. 1C) [4–7]. A detailed analysis of the different magnetization components present at different stages of the coherence-transfer mixing element (times a–f) for different IS, I<sub>2</sub>S, and I<sub>3</sub>S spin systems as a function of the phase of 90° I ( $\phi_2, \phi_3$ ) and S ( $\Psi$ ) pulses (Fig. 1) has been made and the results are summarized in Tables 1–3. Henceforth, experiments recorded with  $\phi_2 = y$  and  $\phi_3 = x$  will be termed HSQC-IP experiments whereas HSQC-AP will make reference to spectra obtained with  $\phi_2 = x$  and  $\phi_3 = y$ . On the other hand, experiments recorded with  $\Psi = y$  or  $\Psi = x$  will be called HSQC(y) and HSQC(x), respectively. Thus, four combinations HSQC-IP(y), HSQC-AP(y), HSQC-IP(x), and HSQC-AP(x) are possible (Table 4). The conventional sensitivity-enhanced HSQC pulse sequence [1,2] is identical to the HSQC-IP(y) ( $\phi_2 = y, \phi_3 = x$  and  $\Psi = y$ ).

In principle, simultaneous S<sup>3</sup> editing for all multiplicities in the HSQC experiment could be achieved by combining separate IP and AP data. The AP component could be obtained by starting the acquisition just before the

90°(I,S) pulse following the variable evolution period (point b in Fig. 1) while the IP component after the refocusing period of the conventional HSQC pulse scheme

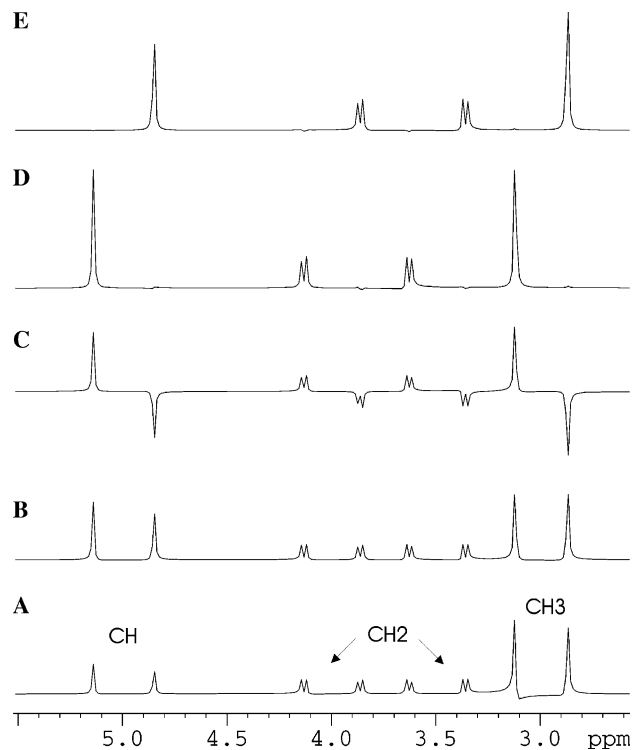


Fig. 2. Simulated 1D <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C HSQC spectra obtained without <sup>13</sup>C decoupling during <sup>1</sup>H acquisition (see Fig. 1A) for isolated CH ( $J_{CH} = 145$  Hz), CH<sub>2</sub> ( $J_{CH} = 135$  Hz,  $J_{H_1H_2} = 10$  Hz), and CH<sub>3</sub> ( $J_{CH} = 125$  Hz) spin systems. All inter-pulse delays were optimized to an average value of 135 Hz ( $\Delta = \Delta_1 = \Delta_2 = 1/2J = 3.7$  ms). (A) Conventional 1D HSQC without the PEP approach; (B) 1D HSQC-IP(y); (C) 1D HSQC-AP(y); (D–E) Addition and subtraction of IP and AP spectra afford spin-state-selective HSQC-IPAP- $\alpha/\beta$  spectra for all multiplicities. All one-dimensional spectra are drawn with the same relative intensity scale.

(point c in Fig. 1). The major drawback of this approach is that only half of the available magnetization becomes observable (Tables 1–3). In this approach the percentage of undesired cross-talk should be defined by  $\frac{I_{\text{sub}}}{I_{\text{add}}} = \frac{1-s}{1+s}$ , the overall sensitivity of the experiment depends only on  $\sin(\pi J_{\text{IS}}\Delta)$  and is independent of the multiplicity. As mentioned previously, the incorporation of the PEP concept in combination with gradient echoes into the HSQC pulse scheme (see mixing sequence in Fig. 1B) provides sensitivity enhancement as a function of the inter-pulse delay  $\Delta_1$  settings. The expected signal-to-noise enhancements of the PEP approach (HSQC-IP( $y$ )) experiment) are well established in terms of delay optimization and  $I_nS$  multiplicity, as summarized in line 1 of Table 4 [2]. This Table 4 also contains the analysis of the remaining three experiments proposed here with the corresponding amplitude transfer functions.

In order to evaluate performance of the new experiments, the corresponding COS-CT  $2I_zS^- \rightarrow I^-$  HSQC-IP and COS-CT  $2I_zS^- \rightarrow 2I^-S_z$  HSQC-AP spectra were simulated using the 1D pulse sequence of Fig. 1A and the effects on different  $I_nS$  multiplicities as a function of the delays

( $\Delta_1$  and  $\Delta_2$ ) were analyzed (Fig. 2). A realistic case consisting of an isolated methine CH group, with a  $^1J_{\text{CH}}$  of 145 Hz, a diastereotopic  $\text{CH}_2$  methylene spin system, with a  $^1J_{\text{CH}}$  of 135 Hz and a geminal  $^2J_{\text{H}_1\text{H}_2}$  value of 10 Hz, and a methyl  $\text{CH}_3$  group with a  $^1J_{\text{CH}}$  of 125 Hz was considered. As can be appreciated from Figs. 2D and E, separate co-addition and subtraction of these IP and AP data afford a general approach to achieve COS-CT  $2I_zS^- \rightarrow 2I^-S^{\alpha/\beta}$  for all  $I_nS$  multiplicities. Transfer efficiencies for each multiplicity follow the theoretical predictions (Fig. 3). Thus, for a IS spin system, the addition (or subtraction) of the two spectra increases the signal intensity by a factor of 2 while the noise is increased only by a square root of 2, thus resulting in S/N being increased by the square root of 2. It is also deduced that the overall sensitivity, the gain factor, and the  $\Delta_1$  delay optimization associated to each  $I_nS$  multiplicity in the HSQC-AP( $y$ ) experiment (Fig. 3B) show similar trends as already known for the HSQC-IP( $y$ ) experiment (Fig. 3A): Ideally,  $\Delta_2$  must be always set to  $1/2J$  in both experiments and IS systems reach out the maximum amplitude transfer for  $\Delta_1 = 1/2J$  whereas  $I_2S$  and  $I_3S$  offer maximum sensitivity at  $\Delta_1 = 1/4J$  and  $\Delta_1 = 1/6J$ , respectively.

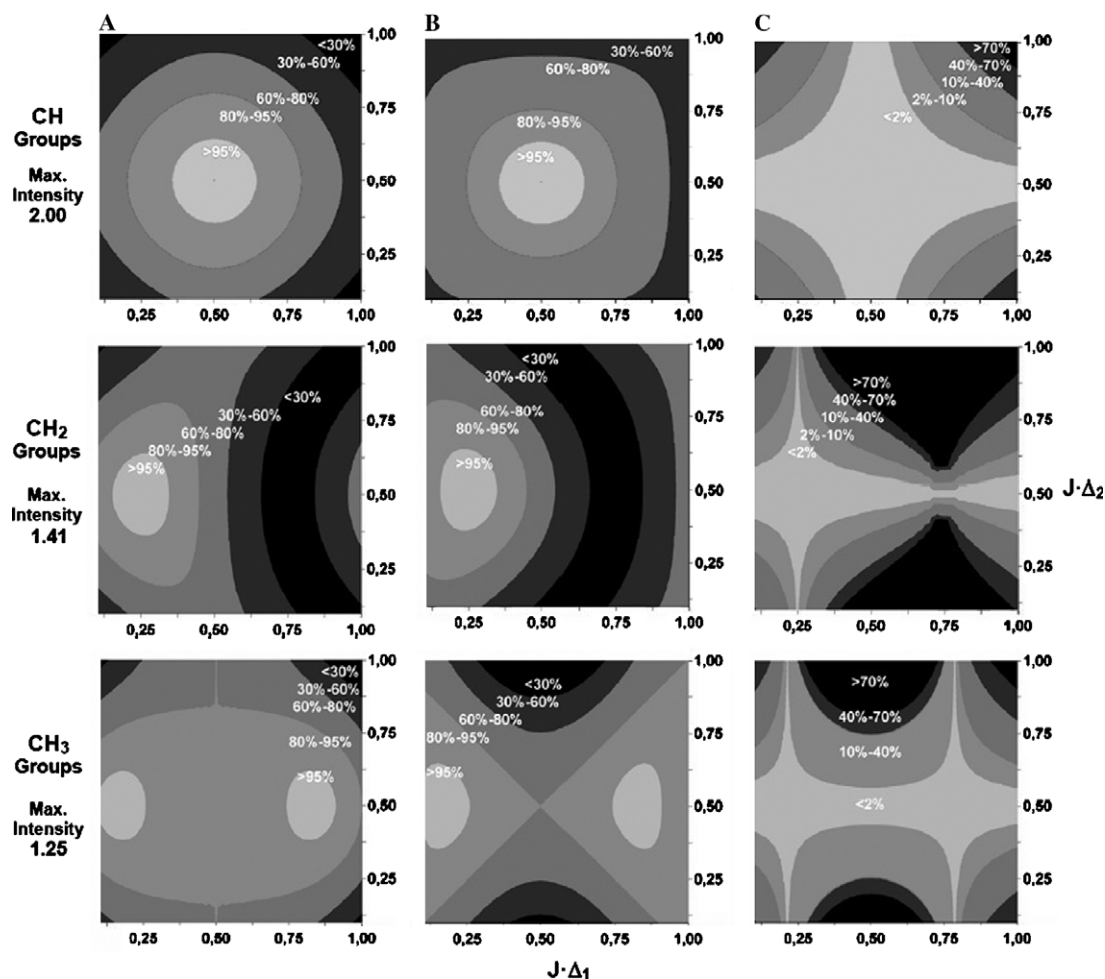


Fig. 3. Theoretical transfer efficiency as a function of the  $\Delta_1$  (x-axis) and  $\Delta_2$  (y-axis) delays for each IS,  $I_2S$  and  $I_3S$  multiplicity in the (A) HSQC-IP( $y$ ) and (B) HSQC-AP( $y$ ) experiments, and (C) cross-talk percentage in the resulting HSQC-IPAP( $y$ ) experiment. The transfer efficiency represents the percentage of the maximum signal intensity described in Table 4.

The cross-talk in the resulting HSQC-IPAP( $y$ ) experiment is defined by

$$\frac{I_{\text{sub}}}{I_{\text{add}}} = \frac{(c^{n-1} - s)(s' - 1)}{(c^{n-1} + s)(s' + 1)}$$

As a consequence, the theoretical percentage of cross-talk is independent of the delay  $\Delta_1$  if  $\Delta_2$  exactly match  $1/2J_{\text{IS}}$  (Fig. 3C). Therefore, the  $\Delta_1$  delay optimization only affects the relative intensity deviation of each IS, I<sub>2</sub>S, and I<sub>3</sub>S groups from their theoretical maxima. As could be deduced from the simulations (Fig. 3C), the percentage of cross-talk is below 2.5% for all multiplicities in a  $J$  interval around  $\pm 15$  Hz. The diastereotopic CH<sub>2</sub> spin system should be the most sensitive multiplicity to cross-talk effects. For instance, in the case of <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C experiments, by optimizing both  $\Delta_1$  and  $\Delta_2$  delays to  $1/2J_{\text{CH}}$  (3.6 ms for  $J_{\text{CH}} = 140$  Hz), the relative intensities (and cross-talk percentage) for CH, CH<sub>2</sub>, and CH<sub>3</sub> groups with  $J_{\text{CH}} = 125$  Hz are 1.976 (0.01%), 1.14 (0.90%), and 1.01 (1.19%), respectively, whereas for  $J_{\text{CH}} = 155$  Hz are 1.967 (0.01%), 0.80 (2.45%), and 1.02 (1.57%), respectively. If  $\Delta_1$  is optimized to  $1/4J_{\text{CH}}$  for maximizing CH<sub>2</sub> signal intensities (1.8 ms for  $J_{\text{CH}} = 140$  Hz), the relative intensities are 1.64 (0.26%), 1.40 (0.10%), and 1.22 (0.67%) for  $J_{\text{CH}} = 125$  Hz and 1.75 (0.22%), 1.40 (0.15%), and 1.17 (0.51%) for  $J_{\text{CH}} = 155$  Hz. The simulated spectra of Fig. 4 clearly show the main advantages of our approach compared to the original HSQC- $\alpha/\beta$  experiment: Improved sensitivity and optimum spin-editing are achieved for all multiplicities in the same experiment. Unfortunately, stronger  $J$  deviations around  $\pm 30$  Hz would affect the relative intensity and the cross-talk percentage ( $>5$ – $6\%$ ) in a major extent for all multiplicities.

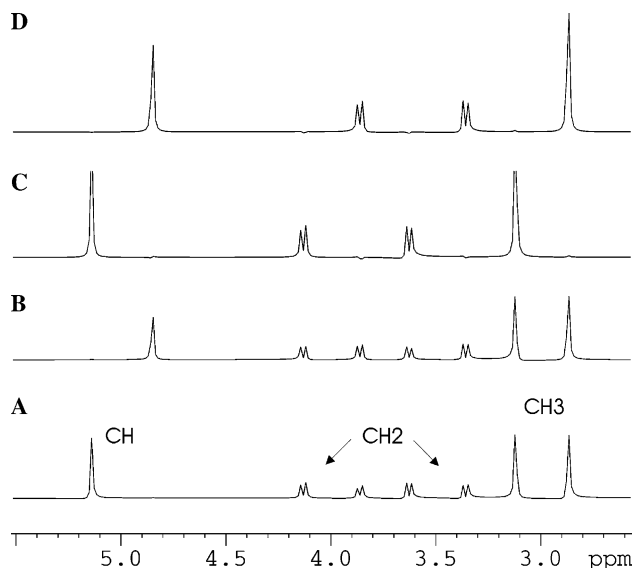


Fig. 4. Comparison of the theoretical sensitivity and spin-editing capabilities for different CH, CH<sub>2</sub>, and CH<sub>3</sub> spin systems between (A and B) the original HSQC- $\alpha/\beta$  experiment [3] and (C and D) the HSQC-IPAP( $y$ ) spectra obtained with the procedure outlined here. All inter-pulse delays were optimized to an average value of 135 Hz ( $\Delta = \Delta_1 = \Delta_2 = 1/2J = 3.7$  ms). See caption of Fig. 2 for more details of the simulations.

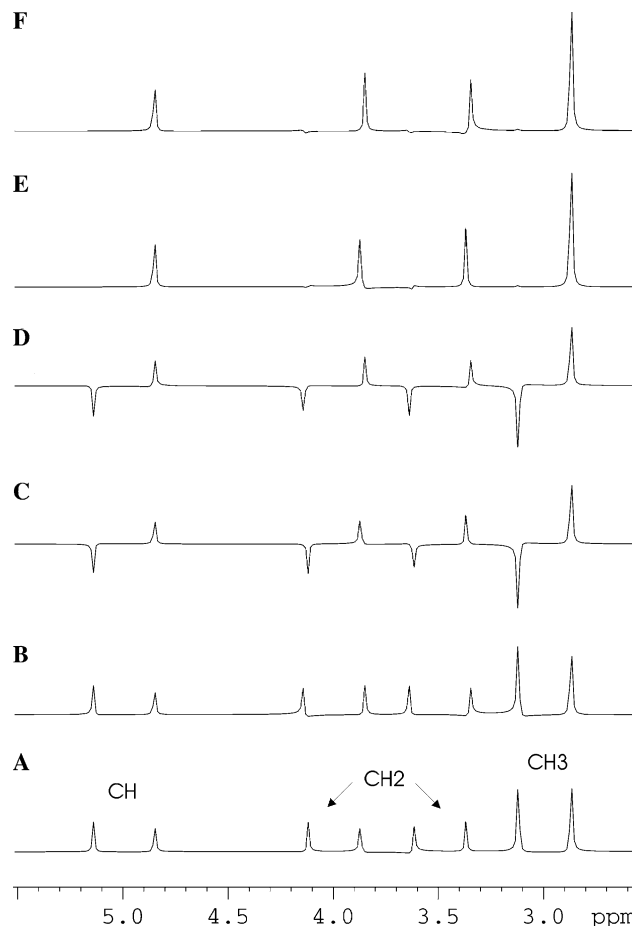


Fig. 5. Comparison of the theoretical sensitivity ratios and spin-editing capabilities for different CH, CH<sub>2</sub>, and CH<sub>3</sub> spin systems in the HSQC-IP( $x$ ) experiment. (A and B) HSQC-IP( $x$ ) and HSQC-IP( $-x$ ) that show the same ZQ (the splitting is defined by  $^1J_{\text{CH}} - ^2J_{\text{HH}}$ ) and DQ (the splitting is defined by  $^1J_{\text{CH}} - ^2J_{\text{HH}}$ ) coupling patterns and relative sensitivity for the CH<sub>2</sub> spin system (diastereotopic protons appearing at 4.0 and 3.5 ppm) as the conventional CH<sub>2</sub>-optimized HSQC- $\alpha/\beta$  experiment [11]; (C and D) HSQC-AP( $x$ ) and HSQC-AP( $-x$ ) showing anti-phase ZQ and DQ patterns for the CH<sub>2</sub> groups in addition to the anti-phase multiplets with respect to  $^1J(\text{CH})$  for CH and CH<sub>3</sub> groups; (E and F) Representative HSQC-IPAP( $x$ ) and HSQC-IPAP( $-x$ ) spectra after addition of A + C and B + D, respectively.

Alternatively, another way of spin selection in I<sub>2</sub>S spin systems can be obtained by setting  $\Psi = x$  (HSQC-IP( $x$ ) experiment) (see third line in Tables 1–3). As similarly reported in [24], a double-quantum (DQ) multiplet pattern displaying only the inner lines is obtained for each diastereotopic proton (Fig. 5A). The separation between these lines equals to  $^1J(\text{CH}) + ^2J(\text{HH})$ . On the other hand, an equivalent HSQC-IP( $-x$ ) experiment ( $\Psi = -x$ ) yields a zero-quantum (ZQ) pattern in which only the outer lines are obtained (Fig. 5B), representing the  $^1J(\text{CH}) - ^2J(\text{HH})$  value. In fact, as shown from the amplitude transfer factors of Table 4, the second retro-INEPT  $\Delta_2$  period is not necessary in the HSQC-IP( $x$ ) or ( $-x$ ) experiment. Thus, although the sequence is a little longer than the original experiment (Fig. 1C), all the advantages on I<sub>2</sub>S spin systems are fully retained: (i) all magnetization components



are observable and therefore, signal intensity is maximized (see line 3 in Table 4); (ii) the inter-pulse  $\Delta_1$  delay can be specifically optimized for methylene systems ( $=1/2J$ ); (iii) the experiment allows the simultaneous measurement of the sign and the magnitude of geminal  $^2J(\text{HH})$  and  $^1J(\text{IS})$  using the described DQ–ZQ methodology (Figs. 5A and B); (iv) these IP data can be combined accordingly with the corresponding HSQC-AP( $x$ ) and HSQC-AP( $-x$ ) data. These fully complementary AP data are obtained by exchanging  $\phi_2$  and  $\phi_3$  in both HSQC-IP( $x$ ) and HSQC-IP( $-x$ ) experiments; and (v) editing for all other multiplicities is also feasible in the same spectra. The theoretical transfer efficiencies in the HSQC-IP( $x$ ) and HSQC-AP( $x$ ) experiments for each  $I_n\text{S}$  multiplicity are represented in Figs. 6A and B and the corresponding simulated 1D HSQC-AP( $x$ ) and HSQC-AP( $-x$ ) spectra are shown in Figs. 5C and D, respectively. The same post-acquisition addition/subtraction procedure described above affords sensitivity-improved multiplet-selective line editing for  $I_2\text{S}$  spin systems (see Figs. 5E and F and multiplet expansions in Fig. 7), equivalent to a COS  $2I_{1z}S^- \rightarrow 2I_{1z}I_2^{\alpha/\beta}S^{\alpha/\beta}$  transfer, whereas heteronuclear  $S^3$  editing is also achieved for IS and  $I_3\text{S}$  groups (Figs. 5E and F). Thus, a different and complete homonuclear and heteronuclear spin-editing in  $\text{CH}_2$  systems is possible after combination of four spectra

(Fig. 7). Although half of signal is lost for IS spin system compared to the HSQC( $y$ ) experiment, this can be a price to be paid for the additional information provided in this version.

The cross-talk in HSQC-IPAP( $x$ ) experiment, defined by

$$\frac{I_{\text{sub}}}{I_{\text{add}}} = \frac{1-s}{1+s},$$

is independent of the multiplicity (Fig. 6C). As an example, optimizing a  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  HSQC( $x$ ) experiment to  $J_{\text{CH}} = 140$  Hz (both  $\Delta_1$  and  $\Delta_2$  delays at  $1/2J = 3.6$  ms) the relative intensities (and cross-talk percentages) are 0.99 (1.25%), 1.97 (1.25%), and 1.29 (1.25%) for  $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_2$ , and  $\text{CH}_3$  groups, whereas for  $J = 155$  Hz they are 0.98 (1.68%), 1.97 (1.68%), and 0.62 (1.68%).

In order to test the above theoretical predictions, the performance of the proposed IPAP principle was tested on a standard sample of menthol because it contains several  $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_2$ , and  $\text{CH}_3$  spin systems. Fig. 8 clearly distinguishes the spin coupling pattern obtained for each multiplicity in the conventional HSQC- $\alpha/\beta$  and in our HSQC-IPAP( $y$ ) subspectra. As expected, the analysis of relative sensitivities and spin-editing features for some selected 1D slices (Fig. 9) confirms the theoretical results. Thus, whereas the spectrum shown in Fig. 9B was acquired

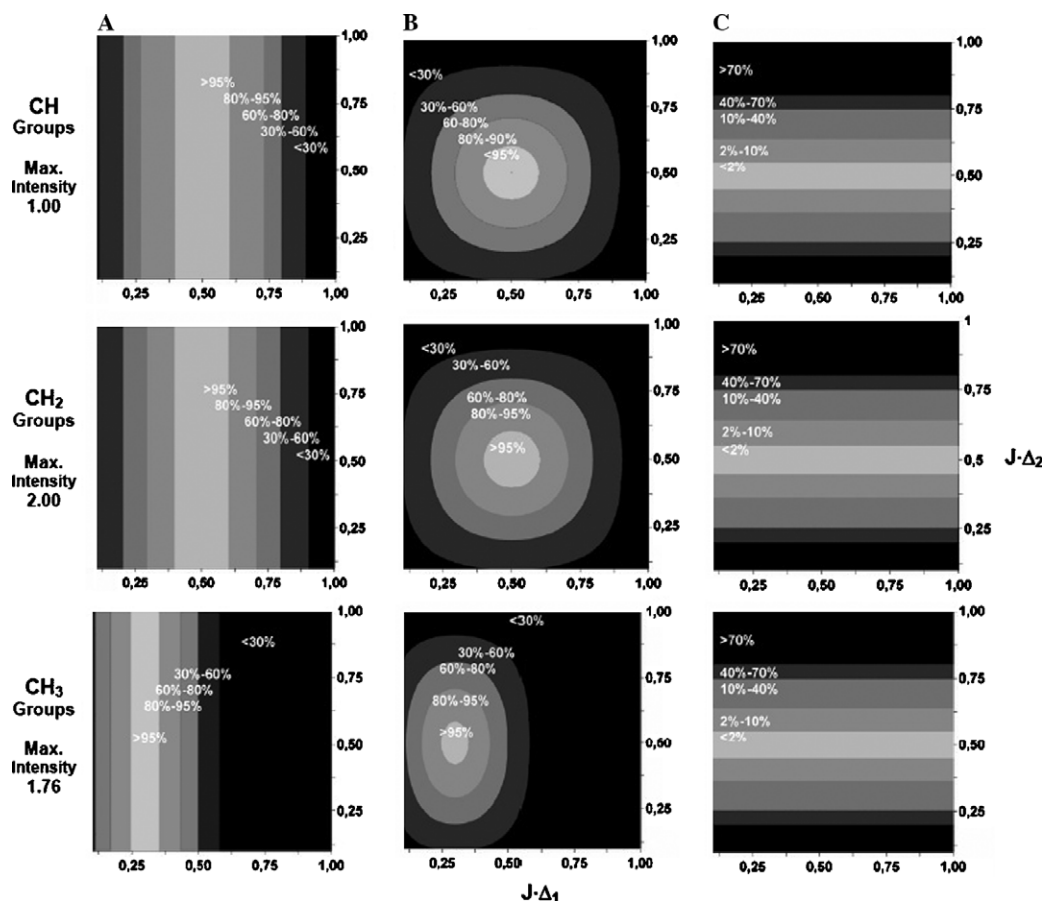


Fig. 6. Theoretical transfer efficiency as a function of the  $\Delta_1$  and  $\Delta_2$  delays for each IS,  $I_2\text{S}$ , and  $I_3\text{S}$  multiplicity in the (A) HSQC-IP( $x$ ) and (B) HSQC-AP( $x$ ) experiments, and (C) cross-talk percentage in the resulting HSQC-IPAP( $x$ ) experiment. The transfer efficiency represents the percentage of the maximum signal intensity described in Table 4.

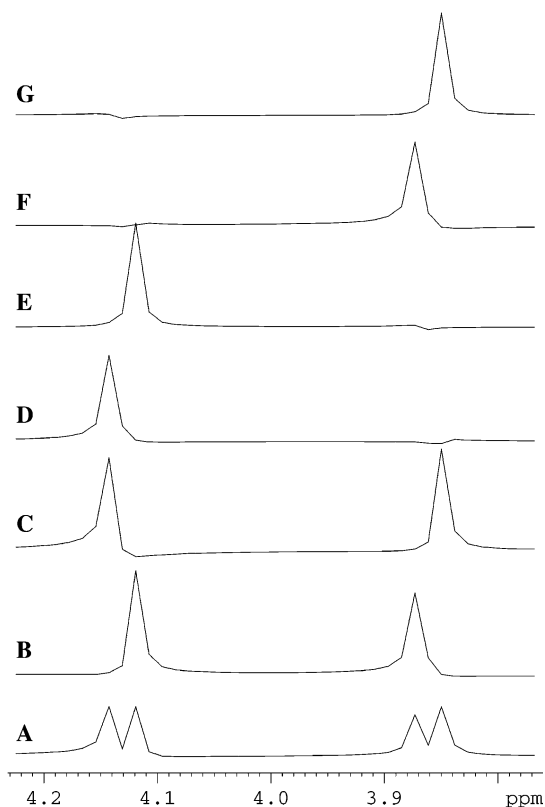


Fig. 7. Spin-editing features of a proton belonging to a diastereotopic  $\text{CH}_2$  spin system in the HSQC-IPAP( $x$ ) experiment. (B and C) The HSQC-IP( $x$ ) and HSQC-IP( $-x$ ) experiment showing the ZQ and DQ coupling pattern, respectively; (D–G) The four lines can be individually selected by proper combination of the following four spectra: HSQC-IP with  $\Psi = x$  and  $-x$ , and HSQC-AP with  $\Psi = x$  and  $-x$ .

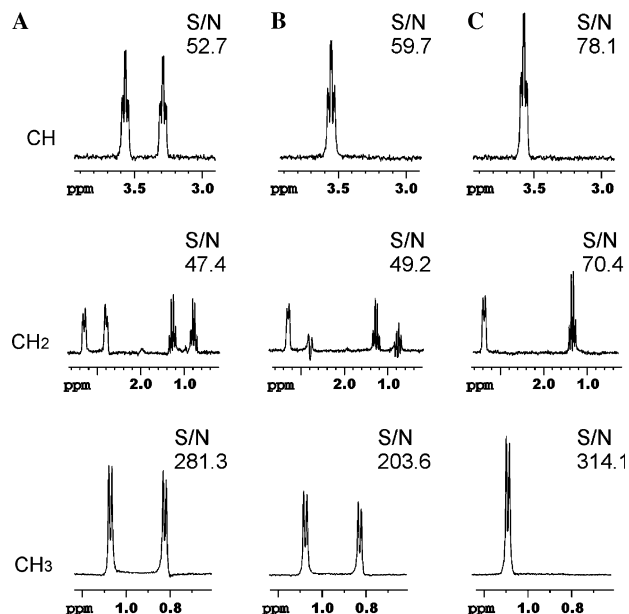


Fig. 9. Experimental 1D slices at 71.8 (CH), 45.4 ( $\text{CH}_2$ ), and 21.4 ( $\text{CH}_3$ ) extracted from the (A) 2D HSQC-IP( $y$ ) acquired with four scans, (B) the original 2D HSQC- $\alpha$  also acquired with four scans (Fig. 8A), and (C) the 2D HSQC-IPAP( $y$ ) spectrum resulting of the addition of the two IP and AP spectra acquired with four scans each one (Fig. 8C). The experimental signal-to-noise (S/N) ratio is indicated in each case for comparison. See Section 3 for more details.

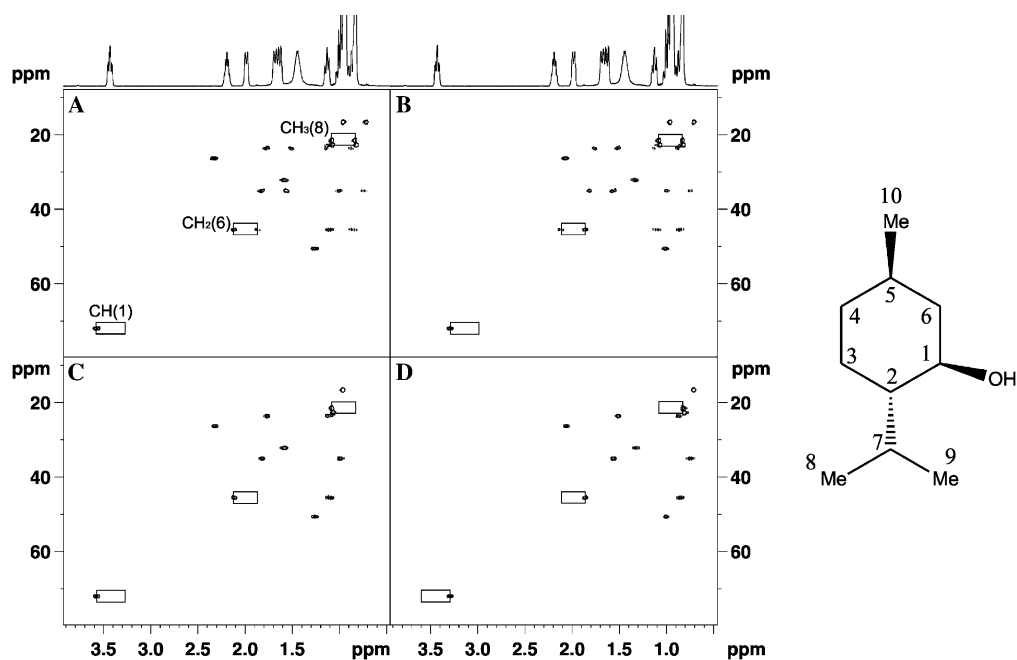


Fig. 8. 2D spin-edited HSQC- $\alpha/\beta$  spectra of menthol. (A and B) Acquired with the original pulse sequence of Fig. 1C; (C and D) 2D HSQC-IPAP( $y$ ) spectra obtained after acquisition of the IP and AP data using the sequence displayed in Fig. 1B and further addition(IP + AP)/subtraction(IP - AP) as described in the main text. For simplicity, spin-editing in some selected CH,  $\text{CH}_2$ , and  $\text{CH}_3$  cross-peaks are marked with a box. The  $\Delta_1$  and  $\Delta_2$  delays were set at  $1/4J$  (1.85 ms) and  $1/2J$  (3.7 ms), respectively. See Section 3 for more details.

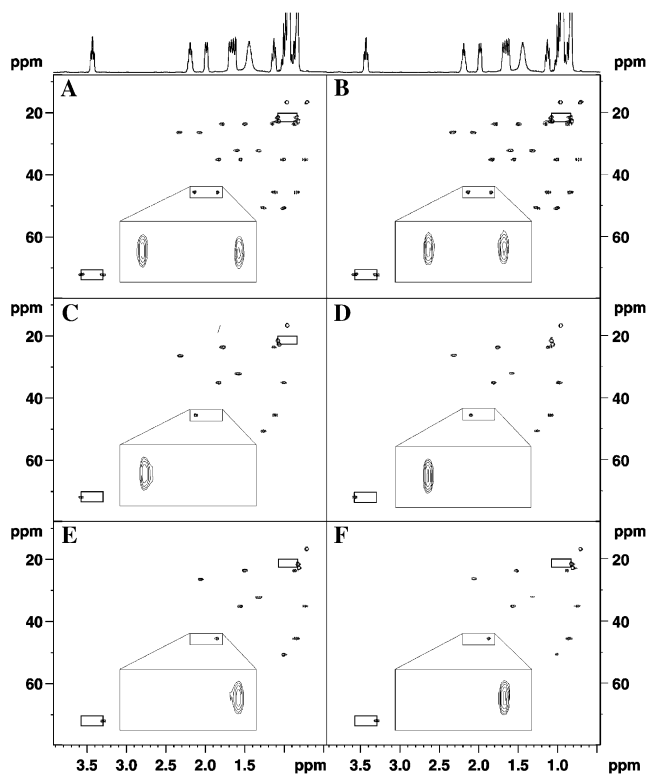


Fig. 10. 2D spin-edited HSQC( $x$ ) spectra of menthol with expanded boxes to show the spin-editing for a diastereotopic proton belonging to a CH<sub>2</sub> spin system: (A) 2D HSQC-IP( $x$ ) showing DQ splitting for CH<sub>2</sub> resonances; (B) 2D HSQC-IP( $-x$ ) showing ZQ splitting for CH<sub>2</sub> resonances; (C and E) 2D HSQC-IPAP( $x$ ) and (D and F) 2D HSQC-IPAP( $-x$ ) obtained after addition or subtraction of the corresponding IP and AP data. Note the individual line selection for CH<sub>2</sub> resonances whereas heteronuclear spin selection is simultaneous achieved for CH and CH<sub>3</sub> groups. Both  $\Delta_1$  and  $\Delta_2$  delays were set at  $1/2J$  (3.7 ms). See Section 3 for more details.

with the HSQC- $\alpha/\beta$  editing method with four scans, another four scans were needed to be accumulated to obtain the second part of the doublet for the CH spin system (data not shown). This affords an unwanted sensitivity lost per time unit which is clearly observed from the same edited spectrum obtained with the addition of the IP + AP data, each one also accumulated with four scans (Fig. 9C). In addition, clean editing and improved sensitivity is also achieved for the CH and CH<sub>3</sub> groups. Similar conclusions can be extracted after careful examination of the corresponding HSQC( $x$ ) subspectra (Fig. 10) and some corresponding 1D traces (Fig. 11). In order to compare the overall sensitivity of the different approaches presented here we have used a sensitivity-per-time factor for CH<sub>2</sub> groups that can be defined as the signal-to-noise ratio obtained for each multiplet with respect to the required time needed to acquire all line multiplets. Thus, in analogy with Fig. 9, it has been necessary to accumulate two data with four scans to achieve the separate DQ and ZQ spectra (Fig. 11B) whereas to obtain line-selective editing for CH<sub>2</sub> spin systems four different data with two scans each one are needed. The corresponding slices in Fig. 11B belong to a HSQC-IP( $x$ ) spectrum acquired with four scans whereas

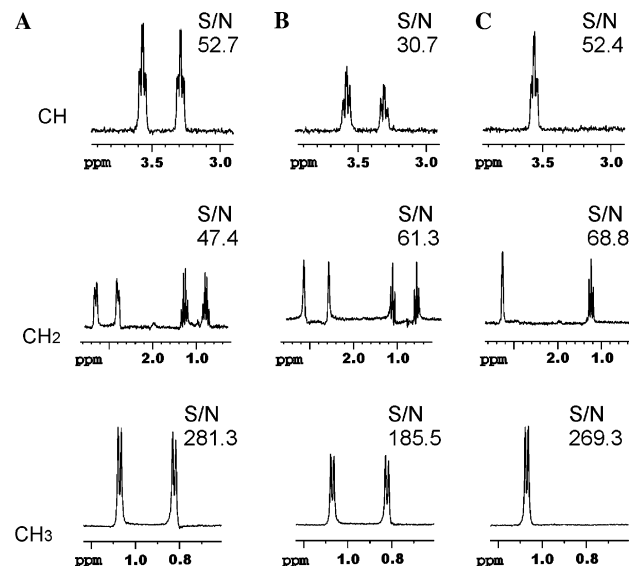


Fig. 11. Experimental 1D slices at 71.8 (CH), 45.4 (CH<sub>2</sub>), and 21.4 (CH<sub>3</sub>) extracted from (A) the conventional 2D HSQC-IP( $y$ ) acquired with four scans, (B) 2D HSQC-IP( $x$ ), acquired also with four scans, where the simplified ZQ pattern for the CH<sub>2</sub> multiplet can be observed (extracted from Fig. 10B) and (C) 2D HSQC-IPAP( $x$ ) spectrum resulting of the addition of the two IP( $x$ ) and AP( $x$ ) spectra acquired with two scans each one. The experimental signal-to-noise (S/N) ratio is indicated in each case for comparison.

Fig. 11C show the resulting spectra after addition of HSQC-IP( $x$ ) and HSQC-AP( $x$ ) data acquired with two scans each one (the other possible three combinations are not shown but display similar signal-to-noise ratios). In the traces of Fig. 11C, the clean spin-editing for CH and CH<sub>3</sub> spin systems combined with the line-selective spin-editing for CH<sub>2</sub> groups (DQ or ZQ) is clearly illustrated and a direct comparison with the traces from Fig. 9C confirms that all experimental signal-to-noise values are in good agreement with the expected enhancements.

To illustrate a useful application of the IPAP method proposed here, all long-range proton-carbon coupling constants ( ${}^nJ_{\text{CH}}$ ,  $n > 1$ ) of menthol were measured from a F2-coupled sensitivity-improved HSQC-TOCSY-IPAP experiment [29]. The excerpt of Fig. 12 shows that the sign and the magnitude of  ${}^nJ_{\text{CH}}$  can be accurately extracted for all CH, CH<sub>2</sub>, and CH<sub>3</sub> carbons with optimum sensitivity compared to the original spin-edited HSQC-TOCSY experiment, which is strongly limited only to CH spin systems [22,23].

It is worth to mention that the proposed IPAP approach shows excellent tolerance to the presence of cross-talk and takes advantage of the high digital resolution in the acquisition dimension and the high sensitivity related to the HSQC experiment. However, it is also recognized that the major inconvenient to measure  $J$  from the directly detected F2 dimension is the possible presence of strong coupling and other line distortion effects, that could afford asymmetric multiplets that make the accurate measurement more difficult. The idea can be successfully applied to achieve spin-editing for both

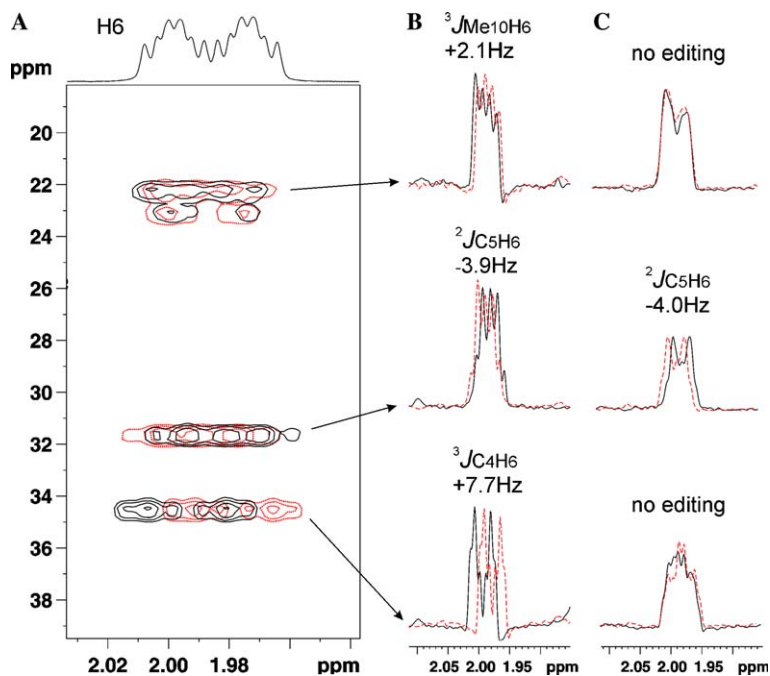


Fig. 12. (A) Expansion region of the 2D F2-spin-edited HSQC-TOCSY-IPAP experiment showing several relayed correlations involving the methylene H6 proton of menthol. (B and C) 1D slices for the methine C5, methylene C4, and methyl C10 carbons extracted from the (B) IPAP experiment and (C) the original spin-edited HSQC-TOCSY experiment [22].

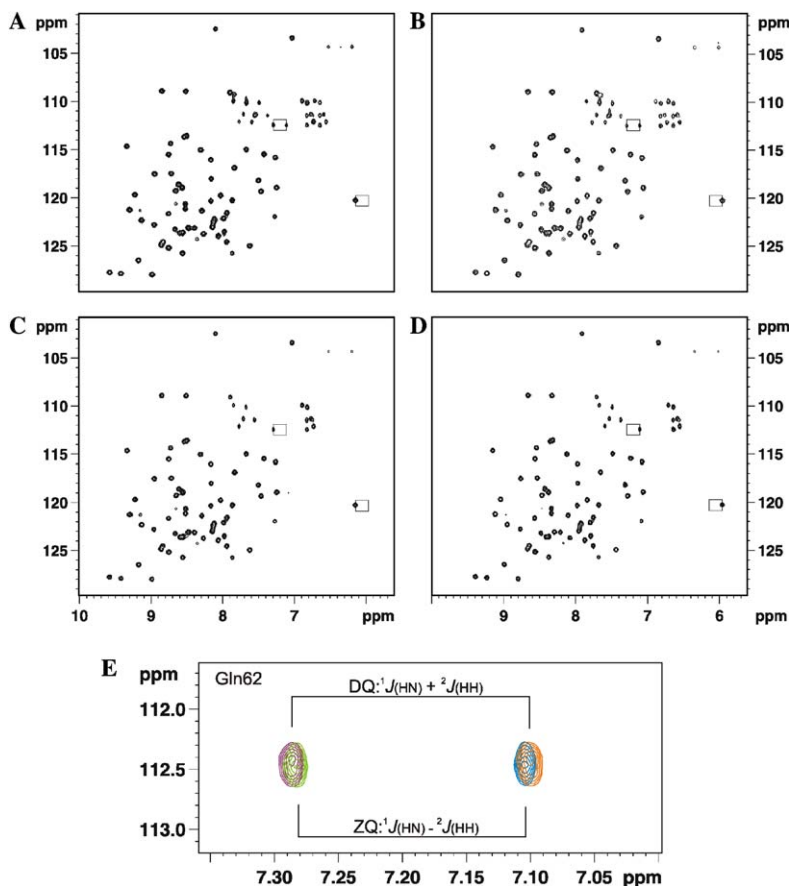


Fig. 13. 2D spin-edited  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-IPAP spectra of ubiquitin. Spin-editing for a target NH and  $\text{NH}_2$  resonance is marked with a box in the (A and B) HSQC- $\alpha/\beta$  and the (C and D) HSQC-IPAP(y) spectra. (E) Individual spin-edited DQ/ZQ multiplet patterns in  $\text{NH}_2$  protons obtained after proper combination of separate HSQC-IP( $x, -x$ ) and HSQC-AP( $x, -x$ ) experiments.

NH and NH<sub>2</sub> spin systems in isotopic labeled proteins (Fig. 13) and also easily applied in more sophisticated triple-resonance multidimensional NMR experiment in which the sensitivity-enhanced block is usually inserted prior to acquisition. However, cross-correlation effects could be affect expected signal intensities in large biomolecules and a more detailed and comparative study of relaxation properties between in-phase and anti-phase magnetization components is under study.

### 3. Experimental part

All experimental 2D spectra reported in this paper were recorded on a Bruker Avance500 spectrometer operating at 500.13 MHz for <sup>1</sup>H at 298 K. <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C experiments were recorded on a 5 mm TXI probe using a sample of 20 mg of menthol dissolved in 600 μl of CDCl<sub>3</sub>. If otherwise indicated, each HSQC experiment used a pre-scan delay of 1 s and four scans for each *t*<sub>1</sub> increment, with an overall experimental time of 11 min for each 2D spectrum. All inter-pulse delays were optimized to 135 Hz: The  $\Delta$  and  $\Delta_2$  delays were always set at  $1/2J$  (3.7 ms), whereas  $\Delta_1$  was set to  $1/4J$  (1.85 ms) in Figs. 8 and 9 and to  $1/2J$  (3.7 ms) in Figs. 10 and 11. The same acquisition and processing conditions were used for the 2D HSQC-TOCSY experiment of Fig. 12, only changing the number of scans to 16 and incorporating a 7 kHz DIPSI-2 multiple pulse TOCSY scheme with a duration of 35 ms. The experimental time was of 32 min. In all <sup>13</sup>C experiments discussed here, all 180° <sup>13</sup>C pulses could be replaced by adiabatic pulses if necessary for a good inversion/refocusing.

Spin-edited <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N HSQC experiments were recorded on a 5 mm TCI <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N cryoprobe using a 1 mM sample of doubly labeled ubiquitin sample dissolved in 90% H<sub>2</sub>O/10% D<sub>2</sub>O. The same pulse sequences of Figs. 1B and C were used but applying a purgus gradient pulse during the *zz* filter. Experimental conditions to record <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N HSQC spectra of Fig. 13 were: 1 s of pre-scan delay and four scans for each *t*<sub>1</sub> increment. All inter-pulse delays were optimized to 90 Hz: The  $\Delta$  and  $\Delta_2$  delays were set at  $1/2J$  (2.77 ms) whereas  $\Delta_1$  was set to  $1/4J$  (1.39 ms). Total experimental time for each 2D spectrum was of 10 min.

All 2D HSQC spectra were acquired with 128 *t*<sub>1</sub> increments and with 1K data points in the acquisition dimension. Phase-sensitivity data were obtained for all 2D experiments using the conventional gradient-based echo-antiecho protocol for data acquisition and data processing (see Figs. 1B and C). The phase  $\Psi$  was incremented by 180° together with the de-phasing gradient G1. A gradient ratio of 4:1 (for <sup>13</sup>C experiments) and 10:1 (for <sup>15</sup>N experiments) was used and gradients were 1 ms long. Data were processed using a zero-filling up to 256 and a cosine window was applied in both *t*<sub>1</sub> and *t*<sub>2</sub> dimensions prior to Fourier transformation. In the IPAP approach, IP and AP data were separately recorded and stored, and further processed (added or subtracted) before Fourier transformation.

Calculated 1D spectra were simulated using the program NMRSIM (Bruker AG) using the pulse sequence of Fig. 1A. All 1D fully coupled <sup>1</sup>H proton spectra were simulated with a 2:–2:1 gradient ratio and with experimental details described in the corresponding figure captions.

### 4. Conclusions

A versatile spin-state selection approach for all multiplicities in the HSQC experiment has been introduced, combining optimized sensitivity and minimal undesired cross-talk. Methylene-specific multiplet-line selection can also be achieved with maximum sensitivity whereas spin selection for all other multiplicities is retained. It can be anticipated that this novel methodology can have an important impact in the simultaneous measurement of the magnitude and the sign of homonuclear and heteronuclear scalar and/or residual dipolar coupling constants from the same spectra. Different multidimensional NMR experiments could be also benefit of the proposed approach. We are currently investigating this application to experiments designed for the measurement of heteronuclear coupling constants involved in both backbone (NH and CH) and side-chain (CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, and NH<sub>2</sub>) frameworks in labeled proteins.

### Acknowledgments

This work was supported by MCYT (Project BQU2003-01677) and Centro de Investigación Lilly. We are also grateful to the Servei de Ressonància Magnètica Nuclear, UAB, for allocating instrument time to this project and to Bruker Española S.A. for its continuing support. P.N. thanks “Generalitat de Catalunya” for a predoctoral grant.

### References

- [1] L.E. Kay, P. Keifer, T. Saarinen, Pure absorption gradient-enhanced heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 10663–10665.
- [2] J. Schleucher, M. Schwendinger, M. Sattler, P. Schmidt, O. Schedletsky, S.J. Glaser, O.W. Sorensen, C. Griesinger, A general enhancement scheme in heteronuclear multidimensional NMR employing pulsed field gradients, *J. Biomol. NMR* 4 (1994) 301–306.
- [3] K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wüthrich, Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole–dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 12366–12371.
- [4] M.D. Sorensen, A. Meissner, O.W. Sorensen, Spin-state-selective coherence transfer via intermediate states of two-spin coherence in IS spin systems. Application to E.COSY-type measurement of *J* coupling constants, *J. Biomol. NMR* 10 (1997) 181–186.
- [5] A. Meissner, J.O. Duss, O.W. Sorensen, Integration of spin-state-selective excitation into 2D NMR correlation experiments with heteronuclear ZQ/DQ  $\pi$  rotations for <sup>1</sup>J(XH)-resolved E.COSY-type measurement of heteronuclear coupling constants in proteins, *J. Biomol. NMR* 10 (1997) 89–94.
- [6] P. Andersson, J. Weigelt, G. Otting, Spin-state selection filters for the measurement of heteronuclear one-bond coupling constants, *J. Biomol. NMR* 12 (1998) 435–441.

- [7] M.D. Sorensen, A. Meissner, O.W. Sorensen,  $^{13}\text{C}$  natural abundance  $\text{S}^3\text{E}$  and  $\text{S}^3\text{CT}$  experiments for measurement of  $J$  coupling constants between  $^{13}\text{C}^\alpha$  or  $^1\text{H}^\alpha$  and other protons in a protein, *J. Magn. Reson.* 137 (1999) 237–242.
- [8] M. Ottiger, F. Delaglio, A. Bax, Measurement of  $J$  and dipolar couplings from simplified two-dimensional NMR spectra, *J. Magn. Reson.* 131 (1998) 373–378.
- [9] D. Yang, L.E. Kay, Improved NH-detected triple-resonance TROSY-based experiments, *J. Biomol. NMR* 13 (1999) 3–10.
- [10] D. Nietlispach, Suppression of anti-TROSY lines in a sensitivity enhanced gradient selection TROSY scheme, *J. Biomol. NMR* 31 (2005) 161–166.
- [11] M. Sattler, J. Schleucher, O. Schedletsky, S.J. Glaser, C. Griesinger, N.C. Nielsen, O.W. Sorensen, a&b HSQC, an HSQC-type experiment with improved resolution for  $\text{I}_2\text{S}$  groups, *J. Magn. Reson. A* 119 (1996) 171–179.
- [12] T.S. Untidt, T. Schulte-Herbruggen, O.W. Sorensen, N.C. Nielsen, Nuclear Magnetic Resonance coherence-order and spin-state-selective correlation in  $\text{I}_2\text{S}$  spin systems, *J. Phys. Chem. A* 103 (1999) 8921–8926.
- [13] E. Miclet, E. O'Neil-Cabello, E.P. Nikonowicz, D. Live, A. Bax,  $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  dipolar couplings provide a unique probe of RNA backbone structure, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 15740–15741.
- [14] E. Miclet, J. Boisbouvier, A. Bax, Measurement of eight scalar and dipolar couplings for methine–methylene pairs in proteins and nucleic acids, *J. Biomol. NMR* 31 (2005) 201–216.
- [15] E. Miclet, D.C. Williams Jr., G.M. Clore, D.L. Bryce, J. Boisbouvier, A. Bax, Relaxation-optimized NMR spectroscopy of methylene groups in proteins and nucleic acids, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 10560–10570.
- [16] T. Carlomagno, W. Peti, C. Griesinger, A new method for the simultaneous measurement of magnitude and sign of  $^1\text{D}_{\text{CH}}$  and  $^1\text{D}_{\text{HH}}$  dipolar couplings in methylene groups, *J. Biomol. NMR* 17 (2000) 99–109.
- [17] V. Tugarinov, P.M. Hwang, J.E. Ollerenshaw, L.E. Kay, Cross-correlated relaxation enhanced  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy of methyl groups in very high molecular weight proteins and protein complexes, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 10420–10428.
- [18] J.E. Ollerenshaw, V. Tugarinov, L.E. Kay, Methyl TROSY: explanation and experimental verification, *Magn. Reson. Chem.* 41 (2003) 843–862.
- [19] G. Kontaxis, A. Bax, Multiplet component separation for measurement of methyl  $^{13}\text{C}$ – $^1\text{H}$  dipolar couplings in weakly aligned proteins, *J. Biomol. NMR* 20 (2001) 77–82.
- [20] K. Pervushin, B. Vögeli, Observation of individual transitions in magnetically equivalent spin systems, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 9566–9567.
- [21] T. Parella, M. Gairí, Simultaneous recording of spin-state-selective NMR spectra for different  $\text{I}_n\text{S}$  spin systems, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 9821–9826.
- [22] W. Kozminski, Simplified multiplet pattern HSQC-TOCSY experiment for accurate determination of long-range heteronuclear coupling constants, *J. Magn. Reson.* 137 (1999) 408–412.
- [23] T. Parella, J. Belloc, Spin-state-selective excitation in selective 1D inverse NMR experiments, *J. Magn. Reson.* 148 (2001) 78–87.
- [24] P. Permi, A spin-state-selective experiment for measuring heteronuclear one-bond and homonuclear two-bond couplings from an HSQC-type spectrum, *J. Biomol. NMR* 22 (2002) 27–35.
- [25] P. Permi, Two simple NMR experiments for measuring dipolar couplings in asparagines and glutamine side chains, *J. Magn. Reson.* 153 (2001) 267–272.
- [26] K. Ding, A.M. Gronenborn, Sensitivity-enhanced E.COSY-type HSQC experiments for accurate measurements of one-bond  $^{15}\text{N}$ – $^1\text{HN}$ ,  $^{15}\text{N}$ – $^{13}\text{C}'$  and two-bond  $^{13}\text{C}'$ – $^1\text{HN}$  residual couplings in proteins, *J. Magn. Reson.* 158 (2002) 173–177.
- [27] D. Lee, B. Vögeli, K. Pervushin, Detection of  $\text{C}'$ ,  $\text{C}^\alpha$  correlations in proteins using a new time- and sensitivity-optimal experiment, *J. Biomol. NMR* 31 (2005) 273–278.
- [28] P. Würtz, K. Fredriksson, P. Permi, A set of HA-detected experiments for measuring scalar and residual dipolar coupling, *J. Biomol. NMR* 31 (2005) 321–330.
- [29] K.E. Köver, V.J. Hruby, D. Uhrin, Sensitivity- and gradient-enhanced heteronuclear coupled/decoupled HSQC-TOCSY experiments for measuring long-range heteronuclear coupling constants, *J. Magn. Reson.* 129 (1997) 125–129.

---

*publicació V*

**Simultaneous  $\alpha,\beta$ -spin state selection for  
 $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  from a time-shared HSQC-IPAP experiment**

## 14.- Publicació V

### *Simultaneous $\alpha,\beta$ -spin state selection for $^{13}\text{C}$ and $^{15}\text{N}$ from a time-shared HSQC-IPAP experiment*

#### 14.1.- Introducció

La publicació que segueix a continuació es pot considerar la continuació del treball recentment presentat a la *publicació IV* en el qual s'ha vist que és possible la selecció d'estat de *spin* per a totes les multiplicitats simultàniament. L'objectiu bàsic que ens plantejàvem al iniciar el present treball era comprovar si la mateixa metodologia es podia aplicar a més d'un nucli simultàniament. Per això, es va pensar en seqüències de pulsos on el desplaçament químic de dos nuclis, en concret  $^{13}\text{C}$  i  $^{15}\text{N}$ , evolucionessin simultàniament durant un temps variable  $t_1$ . A la part introductòria de la present tesi doctoral (punt 9) s'han vist diferents exemples de seqüències de pulsos que estan dissenyades amb temps variable compartit, i s'han discutit els diferents avantatges i inconvenients d'aquest tipus de metodologia.

Per dur a terme l'objectiu que ens havíem plantejat vàrem agafar la seqüència de temps compartit TS-HSQC que Griesinger i col·laboradors havien publicat ja l'any 1995 i que s'ha presentat en la part teòrica de la present tesi doctoral (punt 9.2). La raó per considerar-la com el nostre punt de partida va ser que, anàlogament a la nostra estratègia presentada a la *publicació IV*, aquesta ja estava dissenyada amb selecció per gradients utilitzant la metodologia eco-antieco i utilitzant la metodologia PEP amb els beneficis de sensibilitat que això comporta. Aquesta analogia ens va dur a pensar que la incorporació de la estratègia IPAP a F2 no hauria de portar grans dificultats.

Altres aspectes importants plantejats un cop vàrem veure que la estratègia funcionava van ser la introducció del editat ZQDQ per sistemes  $I_2S$ , com diferenciar si les senyals pertanyien a  $^{13}\text{C}$  o  $^{15}\text{N}$ , comprovar quins eren els guanys en termes de sensibilitat que aportava la metodologia de temps compartit respecte les seqüències originals i si es podria dur a terme el disseny d'una seqüència de temps compartit que produís la selecció de estat de *spin* a F1 enlloc de a F2. Aquest darrer punt permetria determinar el valor de les constants d'acoblament sense el problema de tenir la presència dels acoblaments protó-protó en la dimensió de la mesura, que inevitablement evolucionen durant la dimensió d'adquisició F2. En el cas de mesurar RDC aquest benefici seria d'elevada importància, doncs, els RDC protó-protó causen l'eixamplament de les senyals, reduint doncs, la sensibilitat i precisió en la mesura. Durant la publicació es veurà que s'ha proposat la seqüència TS-F1-IPAP-HSQC que soluciona el problema comentat. Aquesta seqüència es basa en la seqüència F1-IPAP-HSQC de Bax i col·laboradors<sup>155</sup> i per això s'ha trobat convenient, en aquesta introducció, descriure'n breument el seu funcionament.

<sup>155</sup> Ottiger, M.; Delaglio, F.; Bax, A. *J. Magn. Reson.* **1998**, *131*, 373.



### 14.1.1- F1-IPAP-HSQC

La metodologia F1-IPAP-HSQC permet la separació de les dues components  $\alpha, \beta$  del doblet  $^1J$ -acoblat a la dimensió indirecta de l'experiment HSQC. La metodologia es basa en l'adquisició de dos espectres complementaris un primer que generi el doblet en fase (IP) i l'altre que generi el doblet en antifase (AP). La suma i diferència d'aquests dos permet obtenir la selecció d'estat de *spin*, i per tant, la mesura de la  $^1J$  sense problemes de solapament (**Fig. 89**).

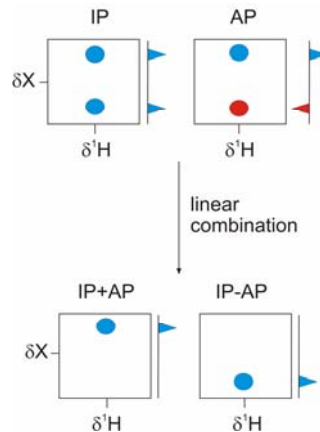


Figura 89: Esquema de la estratègia IPAP a F1 per aconseguir la selecció d'estat de *spin*. L'estratègia resol l'acoblament  $^1J_{XH}$ .

La **Figura 90** mostra el diagrama de pulsos del F1-IPAP-HSQC. Per a l'obtenció del doblet a F1 en fase, s'ha d'adquirir l'experiment HSQC però deixant evolucionar l'acoblament heteronuclear durant  $t_1$ . Per a l'obtenció de l'experiment en antifase s'ha de reenforçar l'acoblament heteronuclear, és a dir, s'ha d'afegir un eco de reenfoc de J després de l'INEPT (pulsos marcats amb vermell), o amb altres paraules utilitzar el RINEPT com a període de preparació.

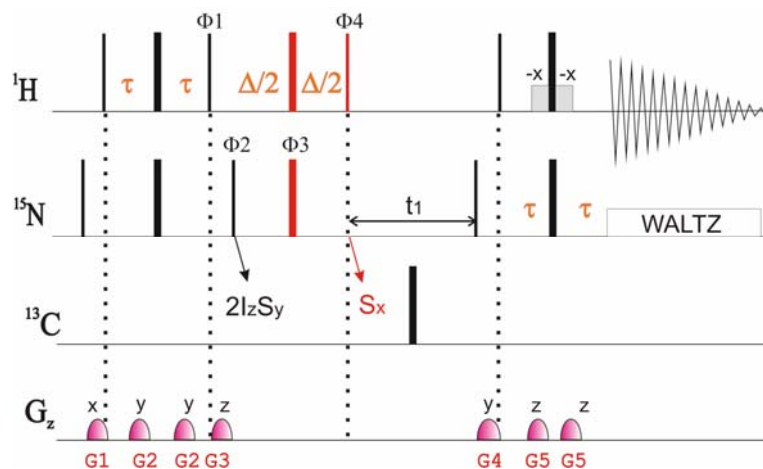


Figura 90. Diagrama de pulsos de l'experiment F1-IPAP-HSQC. Veure publicació original per als detalls experimentals<sup>155</sup>.

L'explicació del perquè s'obtenen modulacions en fase i en antifase en la dimensió indirecta es pot explicar en termes d'operadors producte tenint en compte l'evolució tant de desplaçament químic com de  $^1J$  durant el període  $t_1$ . El procés matemàtic desenvolupat es pot trobar en l'article original. A continuació en descriurem el resultat final. Per a l'experiment IP tenim que la senyal complexa detectable és:

$$\cos(\pi J_{NH}t_1) \cdot \exp(-i\delta t_1) \cdot I_x$$

Per a l'experiment AP tenim que la senyal complexa detectable és:

$$iR \cdot \sin(\pi J_{NH}J\Delta) \cdot \sin(\pi J_{NH}t_1) \cdot \exp(-i\delta t_1) \cdot I_x$$

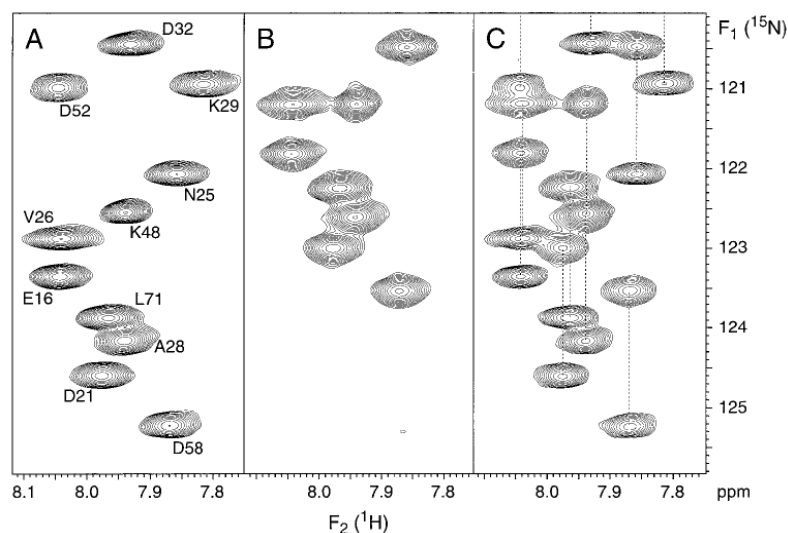
on el factor R és un factor d'atenuació de la senyal degut a la relaxació present durant el període addicional del RINEPT respecte l'INEPT. Multiplicant la senyal de l'experiment AP per un factor empíric  $k=1/[R \cdot \sin(\pi J_{NH}J\Delta)]$  i sumant-la a la de l'experiment IP tindrem:

$$\exp[-i(\delta - \pi J_{NH})t_1]$$

Anàlogament la diferència ens dona:

$$\exp[-i(\delta + \pi J_{NH})t_1]$$

La transformada de Fourier de les quals ens donarà espectres amb senyals a  $F_1$  a les freqüències  $\delta - \pi J_{NH}$  i  $\delta + \pi J_{NH}$  respectivament, és a dir, les dos components del doblet en espectres separats. A la **Figura 91** es mostren els espectres originals d'Ottiger i col·laboradors obtinguts en una mostra de ubiquitina.



**Figura 91.** A) Espectre que mostra la component més desantallada del doblet B) Espectre que mostra la component menys desantallada del doblet C) Espectre que mostra les dues components del doblet. Figura extreta de la publicació original<sup>155</sup>.



# Simultaneous $\alpha/\beta$ spin-state selection for $^{13}\text{C}$ and $^{15}\text{N}$ from a time-shared HSQC-IPAP experiment

Pau Nolis · Teodor Parella

Received: 1 May 2006 / Accepted: 19 October 2006 / Published online: 12 December 2006  
© Springer Science+Business Media B.V. 2006

**Abstract** Two novel HSQC-IPAP approaches are proposed to achieve  $\alpha/\beta$  spin-state editing simultaneously for  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  in a single NMR experiment. The pulse schemes are based on a time-shared (TS) 2D  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}/^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC correlation experiment that combines concatenated echo elements for simultaneous J(CH) and J(NH) coupling constants evolution, TS evolution of  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  chemical shifts in the indirect dimension and heteronuclear  $\alpha/\beta$ -spin-state selection by means of the IPAP principle. Heteronuclear  $\alpha/\beta$ -editing for all  $\text{CH}_n$  ( $n = 1-3$ ) and  $\text{NH}_n$  ( $1-2$ ) multiplicities can be achieved in the detected F2 dimension of a single TS-HSQC-F2-IPAP experiment. On the other hand, an alternative TS-HSQC-F1-IPAP experiment is also proposed to achieve  $\alpha/\beta$ -editing in the indirect F1 dimension. Experimental and simulated data is provided to evaluate these principles in terms of sensitivity and performance simultaneously on backbone and side-chain CH,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ , NH, and  $\text{NH}_2$  spin systems in uniformly  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labeled proteins and in small natural-abundance peptides.

**Keywords** NMR · HSQC · Spin-state selection · Coupling constants · IPAP · Time-sharing

## Introduction

Time-shared (TS) evolution of different coherences (Sørensen 1990; Farmer II 1991; Boelens et al. 1994;

Mariani et al. 1994; Sattler et al. 1995; Uhrin et al. 2000; Frueh et al. 2005) and reduced-dimensionality (RD) experiments (Szyperski et al. 2002; Kim and Szyperski 2003) have been introduced in high-resolution bio-molecular NMR spectroscopy to provide valuable time savings in data collection. These concepts rely on the joint sampling of independent NMR parameters in indirect evolution times and it has been successfully applied for multiple frequency labeling of several nuclei into the same indirect dimension of multidimensional NMR experiments. One illustrative example is the TS- $^1\text{H}, ^{13}\text{C}/^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC experiment which allows the simultaneous acquisition of 2D  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$  correlation HSQC spectra (Sattler et al. 1995). In this experiment, both  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  chemical shifts evolve simultaneously during the variable  $t_1$  period and therefore all heteronuclear  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  correlations with the detected  $^1\text{H}$  can be traced out in the same indirect dimension but from independent spectral widths. It has been recognized that the incorporation of the TS concept in traditional NMR experiments can open new frontiers for structural and dynamic NMR studies. The practical absence of overlapping problems between  $^1\text{H}(\text{N})$  and  $^1\text{H}(\text{C})$  resonances in proteins, the tolerable sensitivity losses associated to additional pulses and longer delays in TS versions compared with regular experiments (Sattler et al. 1995) and the no introduction of considerable extra artifacts makes of the TS approach an attractive NMR tool to speed up data acquisition and to introduce new NMR approaches for further developments into time-consuming higher dimensional triple-resonance or NOESY-edited NMR experiments.

On the other hand, it has been described that several spin-state selective ( $S^3$ ) coupling patterns, such as

P. Nolis · T. Parella (✉)  
Servei de Resonància Magnètica Nuclear, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona,  
E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain  
e-mail: teodor.parella@uab.es

E.COSY, TROSY/anti-TROSY or  $\alpha/\beta$ -editing in the indirect F1- or the detected F2-dimension of 2D correlation experiments based on heteronuclear cross-polarization, can be realized simultaneously for different multiplicities, namely NH/NH<sub>2</sub> or CH/CH<sub>2</sub> spin systems (Parella and Gairí 2004). Here, we expand this idea by proposing two different versions of the TS-HSQC experiment in order to obtain S<sup>3</sup> editing simultaneously for <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N using the IPAP principle. Thus, two complementary in-phase (IP) and anti-phase (AP) spectra are separately collected and conveniently added/subtracted to provide two different upfield/downfield-multiplet component spectra (Ottiger et al. 1998). Our first proposed experiment relies on the recently described strategy to achieve S<sup>3</sup> for all multiplicities in the acquisition F2 dimension of a sensitivity-enhanced HSQC experiment (Nolis et al. 2006). This TS-HSQC-F2-IPAP pulse scheme involves TS evolution of coupling constants and chemical shifts, sensitivity-enhanced coherence-order-selective transfer schemes for both <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N, specific-nucleus <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N-editing, and appropriate combination of complementary IP and AP data to provide  $\alpha/\beta$ -spin-editing simultaneously for all CH<sub>*n*</sub> (*n* = 1–3) and NH<sub>*n*</sub> (*n* = 1–2) spin systems in the same experiment. Experimental and simulated data is provided to evaluate these principles on all backbone and side-chain CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, NH, and NH<sub>2</sub> spin systems in uniformly <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N-labeled ubiquitin. The second proposed approach offers the possibility to obtain  $\alpha/\beta$ -spin-editing simultaneously for <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N in the indirect F1 dimension of a TS-HSQC-F1-IPAP experiment that could allow the determination of heteronuclear scalar and/or residual dipolar coupling (RDC) constants without contamination by homonuclear HH couplings (Ottiger et al. 1998; Ding and Gronenborn 2003; Fehér et al. 2003; Kövér and Batta 2004; Ishii et al. 2001) or the measurement of CSA-dipolar cross-correlation (Hall et al. 2003; Hall and Fushman 2003). Experimental data on a natural-abundance peptide (cyclosporine) demonstrate the successful application of this experiment simultaneously on CH/CH<sub>2</sub> and NH/NH<sub>2</sub> spin systems.

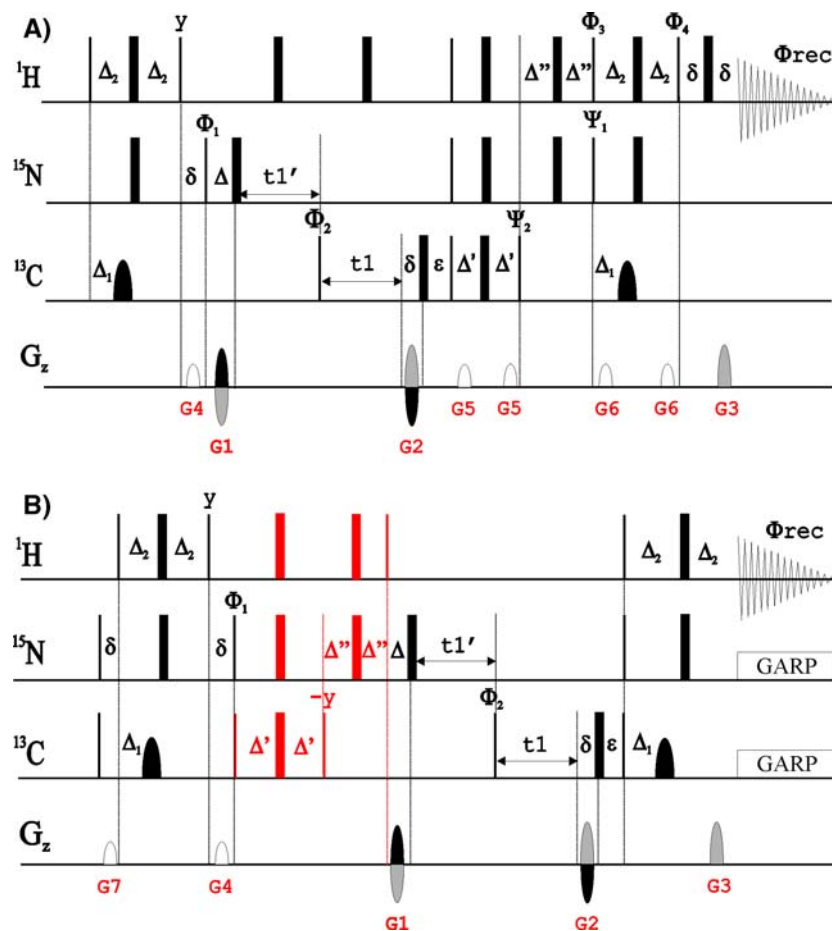
## Results and discussion

The proposed TS-HSQC-F2-IPAP (Fig. 1A) and TS-HSQC-F1-IPAP (Fig. 1B) pulse schemes are closely related to the original TS-HSQC experiment (Sattler et al. 1995). There are several general features to be highlighted. Basically, two different <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N magnetization transfer pathways are superim-

posed within the same radio-frequency pulse scheme in order to minimize undesired effects of additional pulses and longer delays, particularly suffered for <sup>13</sup>C. The advantages offered with the TS approach compared to separate acquisition of single-nucleus experiments have already been discussed and carefully evaluated. Theoretically, a sensitivity enhancement per time unit of 41% should be expected individually for <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N when both data are required. Our experimental data, extracted from TS-HSQC spectra of ubiquitin, are in excellent agreement with the averaged 30–40% and 15–25% sensitivity gains previously reported for <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C, respectively (Sattler et al. 1995). Both pulse schemes use concatenated heteronuclear spin-echo periods for simultaneous IP-to-AP dephasing or AP-to-IP refocusing of CH and NH coupling constants. In practical terms, these concatenated double-INEPT elements have the same duration as conventional <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N INEPT periods ( $2\Delta_2 = 1/2J(\text{NH}) \sim 5.5$  ms) and therefore the expected sensitivity gains for <sup>15</sup>N will be minimally affected. However, in the case of <sup>13</sup>C, each concatenated block is about 2 ms longer ( $2\Delta_1 = 1/4J(\text{CH}) \sim 3.5$  ms) than the corresponding <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C INEPT periods and the resulting relaxation losses can explain the more moderate sensitivity gains. Finally, spectral width and resolution in the indirect dimension can be independently set for <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N because <sup>15</sup>N chemical shift evolves during a period  $t_1' + t_1$  whereas <sup>13</sup>C chemical shift only evolves during the period  $t_1$ .

## TS-HSQC-F2-IPAP experiment

The proposed TS-HSQC-F2-IPAP experiment can be understood as a sensitivity-enhanced TS-HSQC pulse scheme without heteronuclear decoupling during acquisition (Fig. 1A). Following the first concatenated INEPT block that creates anti-phase proton magnetization with respect to <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N, the gradient G<sub>4</sub> applied after the 90°<sub>y</sub>(<sup>1</sup>H) pulse acts as a zz-filter and also dephases any residual transverse water magnetization. Although not shown, water-flip back can be also incorporated during the zz filter to get improved water suppression if needed. Then, heteronuclear chemical shift evolution takes place in two consecutive  $t_1'$  and  $t_1$  steps. During the initial  $t_1'$  period, the transverse <sup>15</sup>N magnetization created by the first 90°(<sup>15</sup>N) pulse evolves under the only effect of its chemical shift whereas <sup>13</sup>C remains as H<sub>z</sub>C<sub>z</sub> magnetization. On the other hand, frequency labeling of both <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N chemical shifts takes place simultaneously during the



**Fig. 1** Schematic representation of the TS-<sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C/<sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N—(A) HSQC-F2-IPAP and (B) HSQC-F1-IPAP experiments. All narrow and wide rectangular pulses are applied with flip angles of 90° and 180° along the *x*-axis unless indicated otherwise. The shaped <sup>13</sup>C 180° pulses can be a 500 μs smoothed chirp pulse for broadband inversion or a 256 μs Q3 Gaussian cascade for selective aliphatic inversion. The inter-pulse delays are optimized to Δ<sub>1</sub> = 1/4J<sub>CH</sub>, Δ<sub>2</sub> = 1/4J<sub>NH</sub>, Δ' = Δ<sub>1</sub> and Δ'' = Δ<sub>2</sub> - Δ' for CH and NH multiplicities. On the other hand, Δ' and Δ'' should be set to Δ<sub>1</sub>/2 for CH<sub>2</sub>-optimized and Δ<sub>2</sub>/2 - Δ<sub>1</sub> for NH<sub>2</sub>-optimized, respectively. The periods ε and Δ compensate evolution during the variable *t*<sub>1</sub> and *t*<sub>1</sub>' periods and the time increments are set to Δ*t*<sub>1</sub> = 1/SW(C) and Δ*t*<sub>1</sub>' = 1/SW(N) - 1/SW(C). A basic two-step phase cycle is employed: φ<sub>1</sub> = φ<sub>2</sub> = (*x*, -*x*), φ<sub>rec</sub> = (*x*, -*x*). <sup>15</sup>N cross peaks can be inverted with respect to <sup>13</sup>C cross peaks by inverting the phase of the first 90°(N) pulse, φ<sub>1</sub> = (-*x*, *x*). In Fig. B, the initial 90°(C) and 90°(N) pulses and the gradient G7 are applied to avoid recovery of the Boltzmann populations that could produce undesired contributions and multiplet line

distortions. All gradients have a sine shape and their durations (δ in ms) and strengths (G/cm) are: G1 = (1 ms, -29.53), G2 = (1 ms, 20.06), G3 = (1 ms, 5.05), G4 = (600 μs, 49.60), G5 = (600 μs, 6.82), G6 = (600 μs, -3.10), G7 = (600 μs, 9.30). (A) In TS-HSQC-F2-IPAP experiments, α-edited and β-edited spectra are generated by addition/subtraction of in-phase (IP) and anti-phase (AP) data separately collected as a function of phases φ<sub>3</sub> and φ<sub>4</sub>: (i) HSQC-IP(*y*): (φ<sub>3</sub> = *y*, φ<sub>4</sub> = *x*); (ii) HSQC-AP(*y*): (φ<sub>3</sub> = *x*, φ<sub>4</sub> = *y*). Frequency discrimination in F1 was achieved using sensitivity-enhanced gradient selection. The echo and anti-echo signals were collected separately by inverting the sign of gradients G1 and G2 together with the inversion of ψ<sub>1</sub> (= -*y*) and ψ<sub>2</sub> (= *y*). (B) In TS-HSQC-F1-IPAP experiments, α-edited and β-edited spectra are generated by addition/subtraction of in-phase (IP) and anti-phase (AP) data separately collected without and with the pulses marked in red, respectively. Frequency discrimination in F1 was achieved using gradient selection. The echo and anti-echo signals were collected separately by inverting the sign of G1 and G2 gradients

subsequent *t*<sub>1</sub> period. The dephasing gradient strengths G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> are conveniently adjusted as a function of these available transverse coherences. The following concatenated retro-INEPT blocks refocus anti-phase <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N magnetization in a manner that increases the sensitivity for both nuclei thanks to the PEP approach (Kay et al. 1992; Schleucher et al. 1994) whereas the gradient pairs G<sub>5</sub> and G<sub>6</sub> remove artifacts

associated with imperfect 180° pulses. Finally, observable proton magnetization is rephased by the gradient G<sub>3</sub> (the ratio between G<sub>1</sub>:G<sub>2</sub>:G<sub>3</sub> is -6:4:1) and acquisition is performed without heteronuclear <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N decoupling in order to achieve the corresponding IP and AP spectra as a function of the phases φ<sub>3</sub> and φ<sub>4</sub> (Nolis et al. 2006). Sensitivity-enhanced α- and β-edited TS-HSQC sub-spectra are generated by addition/

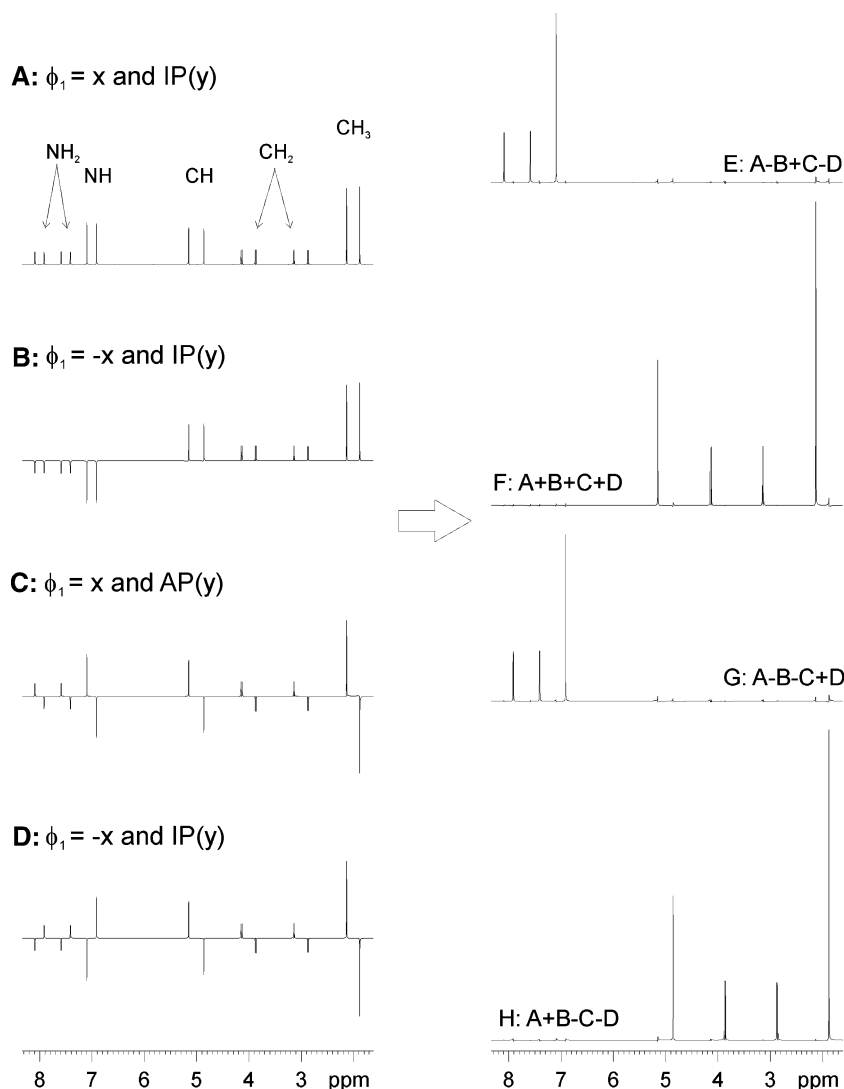
subtraction of complementary in-phase (IP(y):  $\phi_3 = y$ ,  $\phi_4 = x$ ,  $\psi_1 = -y$ ,  $\psi_2 = y$ ) and anti-phase (AP(y):  $\phi_3 = x$ ,  $\phi_4 = y$ ,  $\psi_1 = -y$ ,  $\psi_2 = y$ ) data. Although not strictly necessary because  $\alpha/\beta$ -editing is achieved in the acquisition F2 dimension, further enhancements could be introduced in the indirect F1 dimension when applied specifically on  $^{13}\text{C}$ -labeled compounds such as, for instance, spectral aliasing, selective  $^{13}\text{CO}$  decoupling during  $t_1$  or implementation of combined constant-time (CT)  $^{13}\text{C}$  and variable-time (VT)  $^{15}\text{N}$  chemical shift labeling periods (Uhrin et al. 2000).

To avoid confusion during spectral analysis and without sensitivity penalties, the phase of cross-peaks correlating amide proton and nitrogen coherences can optionally be inverted by means of the first  $90^\circ$   $^{15}\text{N}$  pulse ( $\phi_1 = x$  or  $-x$ ). In practice and as clearly shown from simulated data (Fig. 2), four separate data can be recorded in an interleaved manner by inverting  $\phi_1$  and

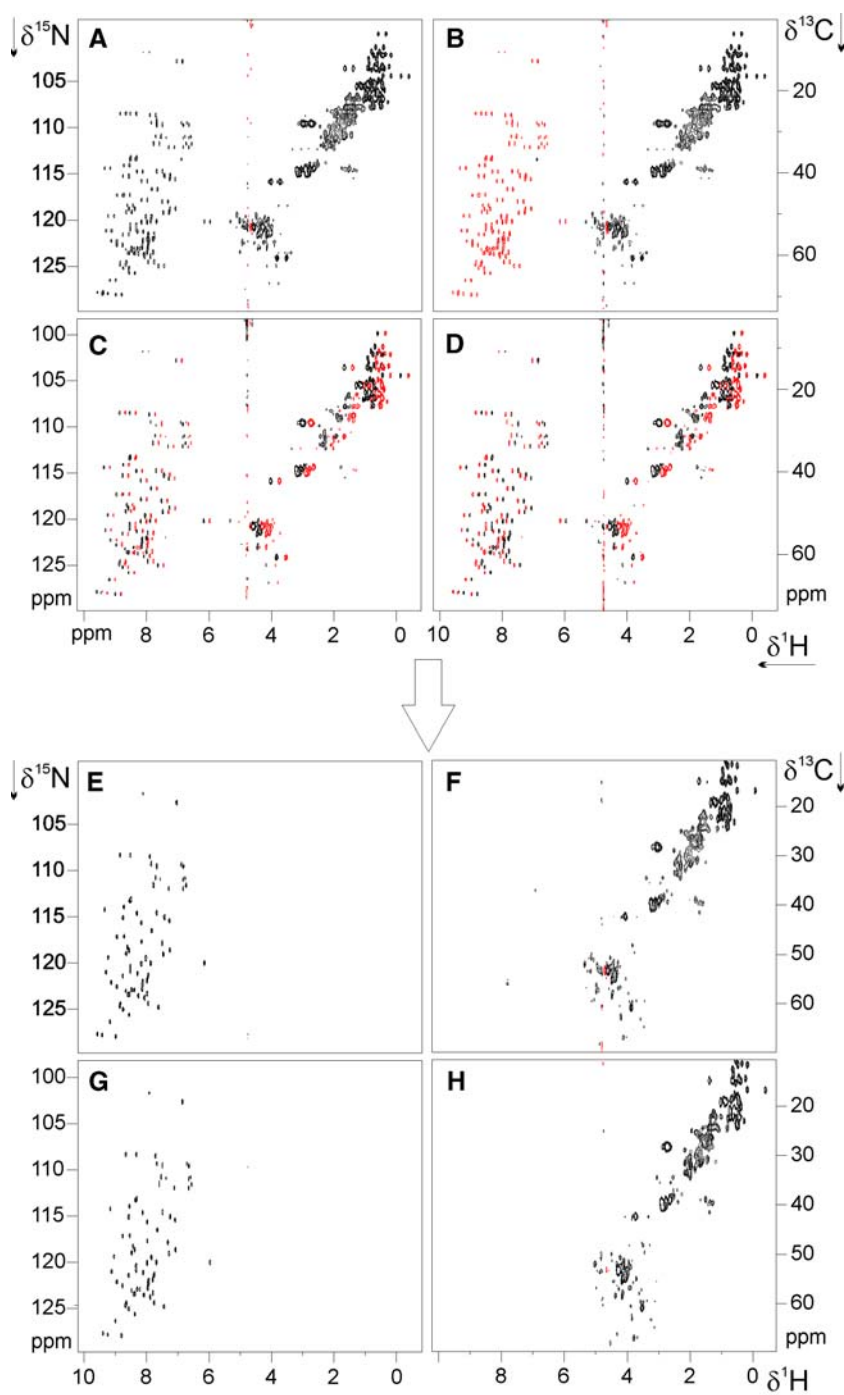
$\phi_3/\phi_4$  (A–D in Fig. 2) and properly combined to afford four individual  $\alpha/^{13}\text{C}$ -,  $\beta/^{13}\text{C}$ -,  $\alpha/^{15}\text{N}$ -,  $\beta/^{15}\text{N}$ -edited HSQC spectra with optimum sensitivity (E–H in Fig. 2). For experimental verification, TS-HSQC-F2-IPAP data were recorded on uniformly  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labeled ubiquitin to yield clean and simplified spectra with excellent solvent suppression (Fig. 3). The main  $\text{S}^3$  features of this approach are more visible from the different expanded regions of the same spectra (Fig. 4) that are suitable for the measurement of coupling constants involving all  $\text{CH}_n$  and  $\text{NH}_n$  spin systems.

The key topics of this IPAP strategy already discussed in regular sensitivity-improved HSQC-IPAP experiments (Nolis et al. 2006), that includes overall transfer efficiencies, inter-pulse delay optimization, setting of pulse phases or percentage of undesired cross-talk present for any type of multiplicity, can be applied to the proposed scheme of Fig. 1A. For in-

**Fig. 2** Simulated 1D TS-HSQC-IPAP spectra showing the schematic data acquisition/processing strategy designed to achieve simultaneous spin-state (IP(y) with  $\phi_3 = y$  and  $\phi_4 = x$ ; or AP(y) with  $\phi_3 = x$  and  $\phi_4 = y$ ) and nucleus ( $\phi_1 = x$  or  $-x$ ) editing for all  $\text{CH}_n$  and  $\text{NH}_n$  multiplicities. Four data are collected (A, B, C, D) and combined (E, F, G, H) accordingly. Spin system used in the simulation: CH ( $\delta(^1\text{H}) = 5$  ppm,  $\delta(^{13}\text{C}) = 55$  ppm,  $^1J_{\text{CH}} = 145$  Hz);  $\text{CH}_2$  ( $\delta(^1\text{H}) = 3$  and 4 ppm,  $\delta(^{13}\text{C}) = 30$  ppm,  $^1J_{\text{CH}} = 135$  Hz;  $^2J_{\text{HH}} = 10$  Hz);  $\text{CH}_3$  ( $\delta(^1\text{H}) = 2$  ppm,  $\delta(^{13}\text{C}) = 20$  ppm,  $^1J_{\text{CH}} = 125$  Hz); NH ( $\delta(^1\text{H}) = 7$  ppm,  $\delta(^{15}\text{N}) = 115$  ppm,  $^1J_{\text{NH}} = 90$  Hz);  $\text{NH}_2$  ( $\delta(^1\text{H}) = 7.5$  and 8 ppm,  $\delta(^{15}\text{N}) = 105$  ppm,  $^1J_{\text{NH}} = 90$  Hz;  $^2J_{\text{HH}} = 2$  Hz)



**Fig. 3** Experimental 2D TS- $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-F2-IPAP spectra of uniformly  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labeled ubiquitin. The original time-domain data (A–D) were conveniently combined and processed as described in Fig. 2 to yield separate (F and H)  $\alpha/\beta$ -edited  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and (E and G)  $\alpha/\beta$ -edited  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQC maps

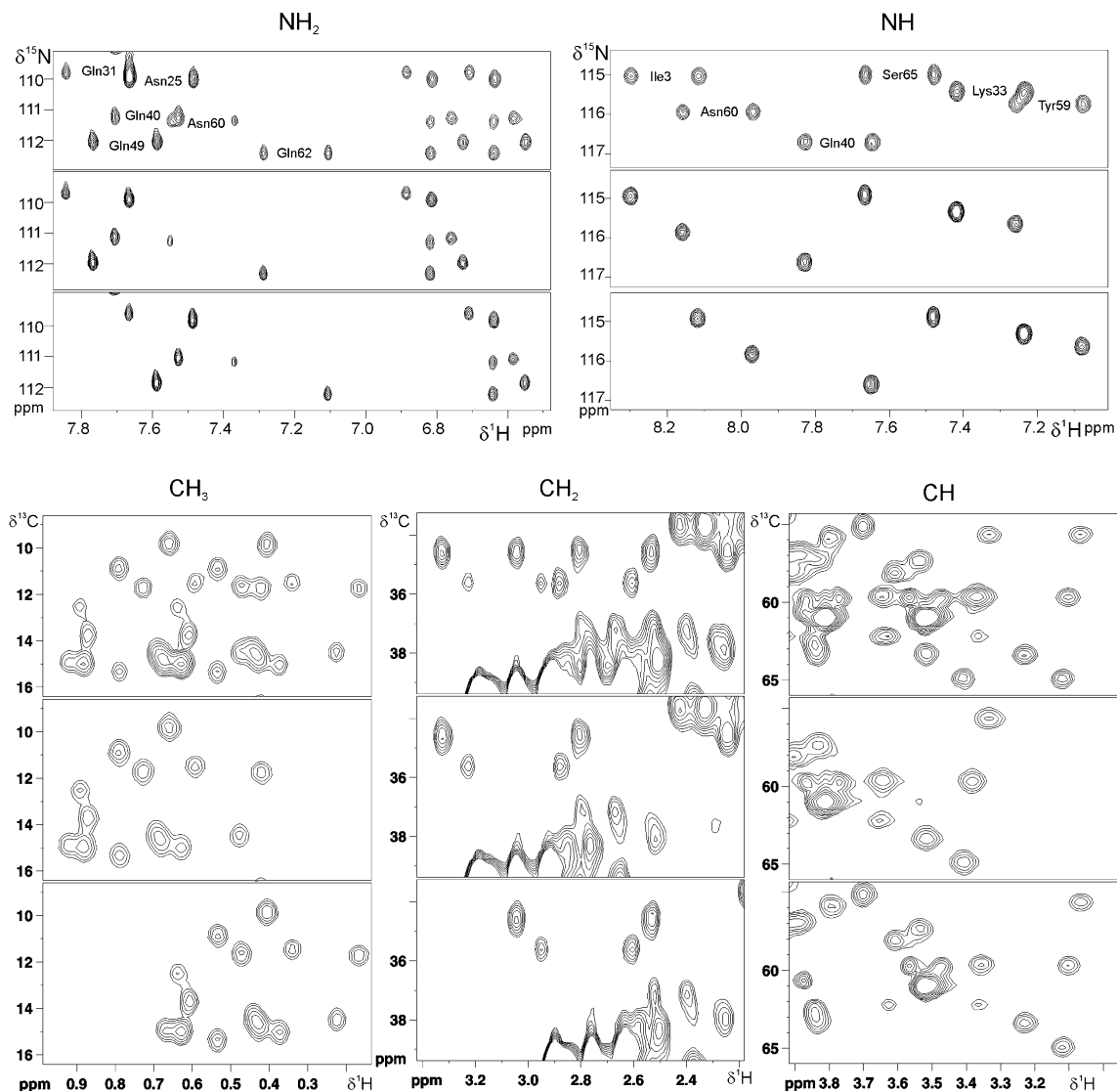


stance, the presence of undesired cross-talks when different coupling values are present have been evaluated from simulated data on NH and CH spin systems (Fig. 5). It is clear that excellent results are obtained into a range of  $\Delta J(\text{CH})$  and  $\Delta J(\text{NH})$  about  $\pm 30\%$ . It was also reported that cross-talk is much more sensitive for  $\text{CH}_2$  and  $\text{NH}_2$  spin systems but good results are still obtained into a range of  $\Delta J(\text{XH}) = \pm 15\%$ . According to this theoretical predictions, experimental

data fully confirm the excellent tolerance to cross-talk for all multiplicities in a wide range of coupling values. In Fig. 6 it can be seen that practically cross talk is below 2% in a complete range of 120–160 Hz for  $J(\text{CH})$  and 70–110 Hz for  $J(\text{NH})$  and for all  $\text{CH}_n$  and  $\text{NH}_n$  multiplicities.

As described in our previous work (Nolis et al. 2006), analogue TS-HSQC-F2-IPAP sub-spectra obtained from addition/subtraction of complementary IP(x)





**Fig. 4** Selected expanded areas extracted from the 2D TS-HSQC-F2-IPAP spectra of Fig. 3 (E–H) showing the clean and simultaneous  $\alpha/\beta$ -editing achieved for all NH, NH<sub>2</sub>, CH, CH<sub>2</sub>

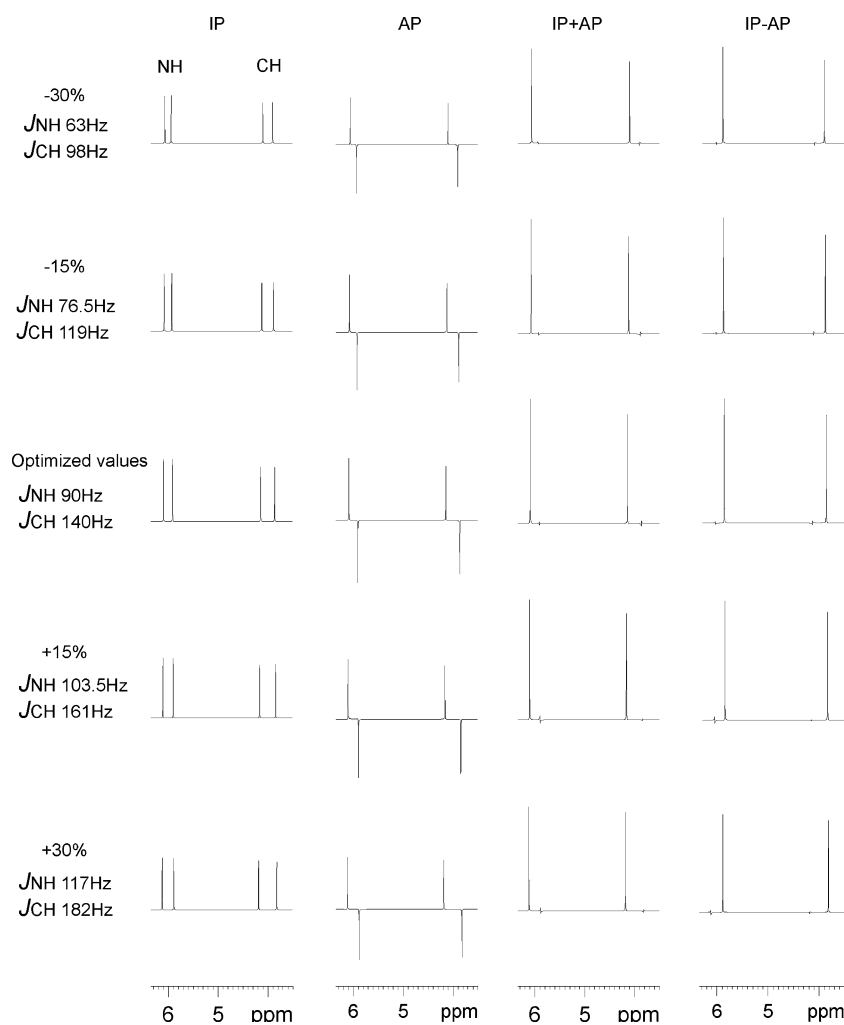
and CH<sub>3</sub>. The same region of the F2 fully-coupled IP(y) spectrum (top) is also shown for comparison in each expansion

( $\phi_3 = y$ ,  $\phi_4 = x$ ,  $\psi_1 = \psi_2 = x$ ) and AP( $x$ ) ( $\phi_3 = x$ ,  $\phi_4 = y$ ,  $\psi_1 = \psi_2 = x$ ) data could be used to measure simultaneously all  $^1J_{\text{CH}}$  ( $^1D_{\text{CH}}$ ) and  $^1J_{\text{NH}}$  ( $^1D_{\text{NH}}$ ) coupling values for all multiplicities and also the geminal  $^2J_{\text{HH}}$  ( $^2D_{\text{HH}}$ ) in NH<sub>2</sub> and CH<sub>2</sub> groups via the analysis of DQ/ZQ (Permi 2002; Nolis et al. 2006) or multiplet-line-selective (Carlomagno et al. 2000; Miclet et al. 2003, 2004) coupling patterns. Eight complementary data can be acquired in an interleaved way as a function of phases  $\phi_1/\phi_2$  (nucleus editing),  $\phi_3/\phi_4$  ( $\alpha/\beta$ -editing; IP or AP) and  $\psi_1/\psi_2$  (set to  $x$  or  $-x$ , to generate DQ ( $^1J_{\text{XH}} + ^2J_{\text{HH}}$ ) or ZQ ( $^1J_{\text{XH}} - ^2J_{\text{HH}}$ ) doublet patterns for XH<sub>2</sub> groups, respectively) (Fig. 7) and further processed to afford eight simplified S<sup>3</sup> spectra accordingly

to simple linear combinations. Experimental 1D slice taken for different CH<sub>2</sub> and NH<sub>2</sub> groups in the 2D TS-HSQC-IPAP spectra of ubiquitin shows excellent line selection for all multiplicities (Fig. 8).

It is worth to say that the sensitivity of  $^{13}\text{C}$  signals in the proposed TS experiment will depend on the required resolution in the  $^{15}\text{N}$  dimension that will be defined by the maximum value of the variable  $t_1'$  period,  $t_1'$  (max). For this reason, a compromise value between the maximum  $t_1'$  value and the spectral width in the N dimension is required. On the other hand, the use of PEP can restrict the utility to small peptides and or proteins below molecular weight of 10–15 kDa due to short relaxation times for  $^{13}\text{C}$ . Cross-correlation

**Fig. 5** Effectiveness of the  $\alpha/\beta$ -spin editing encoding and presence of cross-talk for two isolated NH and CH spin systems in a range of  $\Delta J = \pm 30\%$ .  $^1J_{CH}$  and  $^1J_{NH}$  values were varied as described in each row. All simulated 1D TS-HSQC spectra were optimized to  $\Delta_1 = 1.8$  ms ( $^1J(CH) = 140$  Hz) and  $\Delta_2 = 2.7$  ms ( $^1J(NH) = 90$  Hz) and with the following phases:  $\phi_1 = x$ ,  $\phi_2 = x$ ,  $\psi_1 = -y$ ,  $\psi_2 = y$ . IP and AP data were generated using  $\phi_3 = y$ ,  $\phi_4 = x$  and  $\phi_3 = x$ ,  $\phi_4 = y$ , respectively



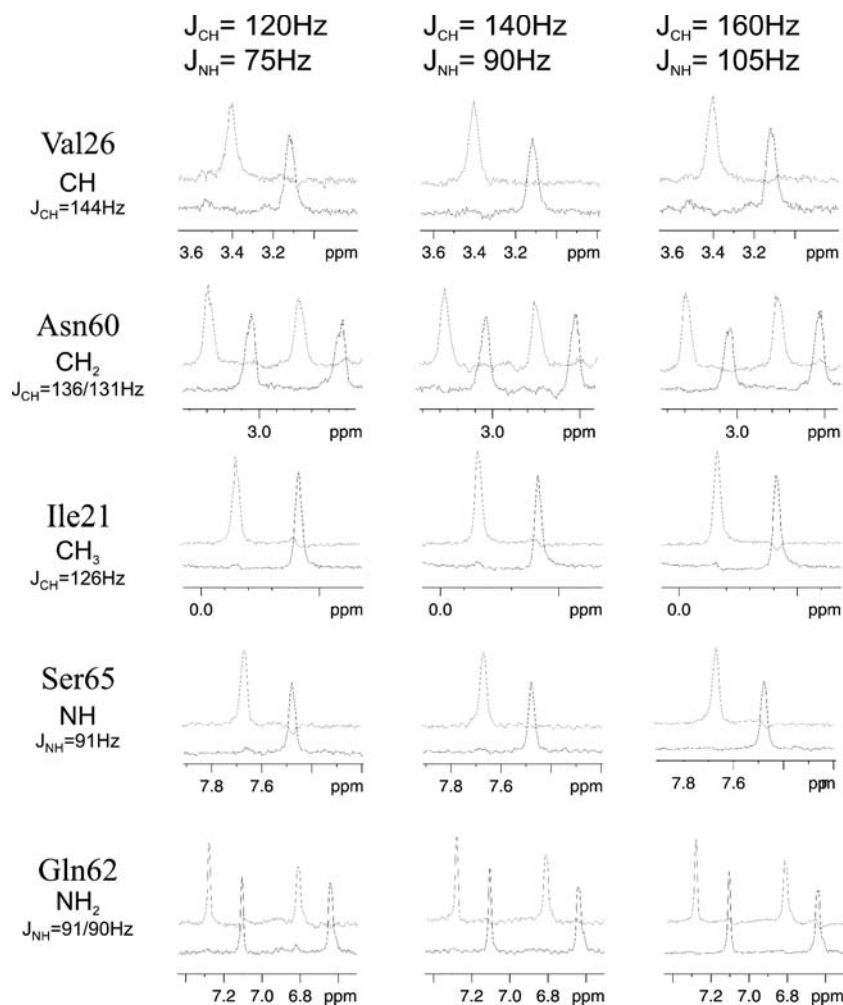
effects could also produce non-complementary IP and AP data and cross-talks could be more prominent in such cases. The use of different scaling  $k$  factors when process  $IP \pm k \cdot AP$  data could be a good post-processing practice to minimize such artifacts if they are present.

### TS-HSQC-F1-IPAP experiment

The TS-HSQC-F1-IPAP experiment (Fig. 1B) is another variant of the regular TS-HSQC pulse sequence in which evolution of both heteronuclear CH and NH couplings take place simultaneously during the variable  $t_1'$  and  $t_1$  periods because decoupling  $180^\circ(^1H)$  pulses are not applied. The advantage to measure heteronuclear  $J(CH)$  and  $J(NH)$  from the indirect dimension of the HSQC map relies on the absence of proton–proton coupling splittings. Whereas the IP spectrum is just a F1-coupled TS-HSQC experiment, the AP counterpart

employs an additional refocusing period just prior to the  $t_1'$  period (see pulses and delays marked in red in Fig. 1B) in an analogue way as reported in the original HSQC-IPAP sequence (Ottiger et al. 1998). For IS spin systems, the AP building block works as follows: After the application of simultaneous  $90^\circ_x(^{13}C)$  and  $90^\circ_x(^{15}N)$  pulses, antiphase  $^{15}N$  and  $^{13}C$  magnetizations are modulated during the double heteronuclear and concatenated echo. At the end of the  $\Delta' (= 1/4JCH)$  period, in-phase  $C_x$  magnetization is stored as  $C_z$  magnetization by a  $90^\circ_{-y}(^{13}C)$  pulse whereas  $J(NH)$  continues evolving during an additional  $\Delta'' = \Delta_2 - \Delta'$  delay up to achieve in-phase  $N_x$  magnetization. After this,  $^{15}N$  chemical shift and  $J(NH)$  evolves during the free evolution  $t_1'$  period whereas  $^{13}C$  is retained at  $+z$  axis. The gradient  $G_1$  labels transverse  $^{15}N$  coherence and also acts as a purge gradient for  $^{13}C$  magnetization. Transverse  $^{13}C$  magnetization is then created by a  $90^\circ(^{13}C)$  pulse and during the  $t_1$  period, all  $J(CH)$ ,  $J(NH)$ ,  $\delta(^{15}N)$  and  $\delta(^{13}C)$  components evolve freely to create a mixture of

**Fig. 6** 1D slices extracted from F2-IPAP TS-HSQC spectra of ubiquitin showing the excellent behaviour of  $\alpha/\beta$  editing and absence of cross-talk for all multiplicities in a considerable range of coupling constant values. Spectra were recorded as described in experimental section with the inter-pulse periods optimized to the  $J(\text{CH})$  and  $J(\text{NH})$  values shown in top of each column. The experimental  $J(\text{CH})$  and  $J(\text{NH})$  values for each target multiplicity are also included in each row



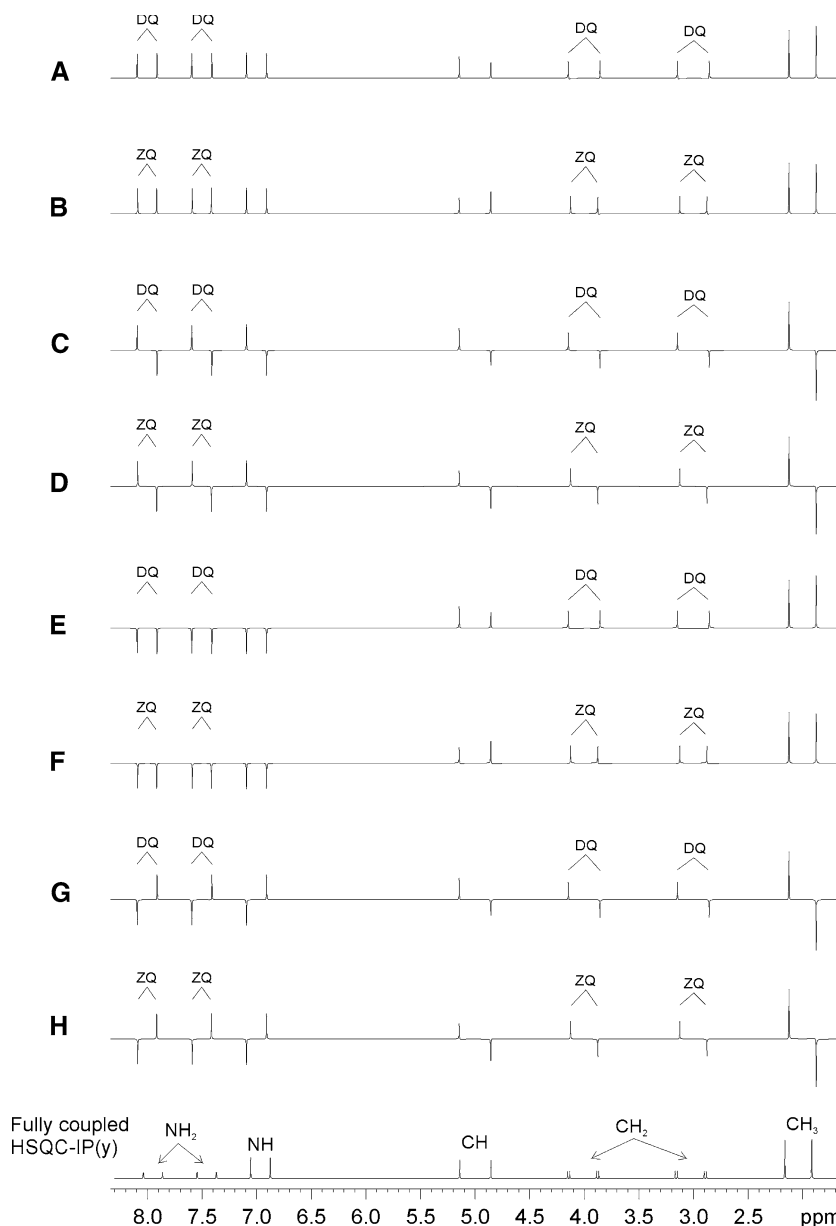
in-phase and anti-phase  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  coherences which are labeled with the G2 gradient. Then,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  magnetization are back converted to detectable  $^1\text{H}$  magnetization by a concatenated INEPT transfer and coherence selection is achieved using a gradient G1:G2:G3 ratio of  $-6:4:1$ . Finally, proton acquisition is performed with simultaneous  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  decoupling to ensure that heteronuclear couplings do not appear in the acquisition dimension. The F1-IPAP sequence in Fig. 1B has a reduced sensitivity compared to the F2-IPAP experiment since PEP is not applied. However, the sensitivity gain ratios when compared TS versus standard F1-IPAP sequences will remain the same, about a factor of 1.41.

Figure 9 shows expanded regions of the acquired 2D IP and AP and the resulting  $\alpha$ - and  $\beta$ -edited TS-HSQC spectra of cyclosporine in which clean spin-state editing is achieved simultaneously for all CH and NH groups. As predicted theoretically, the experimental sensitivity gains per time unit for  $^{15}\text{N}$  are about +30/+40% mainly

because the duration of each concatenated block in the TS version is the same (optimized to  $1/2J(\text{NH})$ ) than in the original  $^{15}\text{N}$ -HSQC-IPAP pulse sequence. However, the poorer sensitivities gains achieved for  $^{13}\text{C}$  (between +15% and +25%) can be attributed to relaxation of  $^{13}\text{C}$  zz magnetization during the  $t_1'$  period in the AP experiment and also to additional  $^{13}\text{C}$   $T_2$  relaxation during the longer concatenated INEPT steps.

The features for measuring scalar and/or RDC constants from the indirect dimension of TS-HSQC-F1-IPAP spectra are analogous to the original HSQC-IPAP experiment (Ottiger et al. 1998). As a major drawbacks, the measured splitting will depend somewhat on the linewidth, the quality of CH correlations for large protein can be degraded by an extensive overlap in the carbon dispersed region and, in addition, a number of  $\text{H}^\alpha$  proton resonances could be covered by the residual water signal. Furthermore, differences on signal intensities between IP and AP data can be attributed to differential relaxation properties, non-

**Fig. 7** Schematic representation of the strategy followed for data acquisition in IP( $x$ ) and AP( $x$ ) experiments. Eight separated TS-HSQC data were simulated as a function of the phases  $\phi_1/\phi_2$  (nucleus editing),  $\phi_3/\phi_4$  (IP or AP editing) and  $\psi_1/\psi_2$  (DQ/ZQ editing for I<sub>2</sub>S groups). **(A)**  $\phi_1 = x$ ,  $\phi_2 = x$ ,  $\phi_3 = y$ ,  $\phi_4 = x$ ,  $\psi_1 = x$ ,  $\psi_2 = -x$ ; **(B)**  $\phi_1 = x$ ,  $\phi_2 = x$ ,  $\phi_3 = y$ ,  $\phi_4 = x$ ,  $\psi_1 = -x$ ,  $\psi_2 = x$ ; **(C)**  $\phi_1 = x$ ,  $\phi_2 = x$ ,  $\phi_3 = x$ ,  $\phi_4 = y$ ,  $\psi_1 = x$ ,  $\psi_2 = -x$ ; **(D)**  $\phi_1 = x$ ,  $\phi_2 = x$ ,  $\phi_3 = x$ ,  $\phi_4 = y$ ,  $\psi_1 = -x$ ,  $\psi_2 = x$ ; **(E)**  $\phi_1 = -x$ ,  $\phi_2 = x$ ,  $\phi_3 = y$ ,  $\phi_4 = x$ ,  $\psi_1 = x$ ,  $\psi_2 = -x$ ; **(F)**  $\phi_1 = -x$ ,  $\phi_2 = x$ ,  $\phi_3 = y$ ,  $\phi_4 = x$ ,  $\psi_1 = -x$ ,  $\psi_2 = x$ ; **(G)**  $\phi_1 = -x$ ,  $\phi_2 = x$ ,  $\phi_3 = x$ ,  $\phi_4 = y$ ,  $\psi_1 = x$ ,  $\psi_2 = -x$ ; **(H)**  $\phi_1 = -x$ ,  $\phi_2 = x$ ,  $\phi_3 = x$ ,  $\phi_4 = y$ ,  $\psi_1 = -x$ ,  $\psi_2 = x$ . The same spin system definition as Fig. 2 was used. Linear combination of these eight acquired afford eight separated multiplet-line selective spectra as shown in Fig. 8

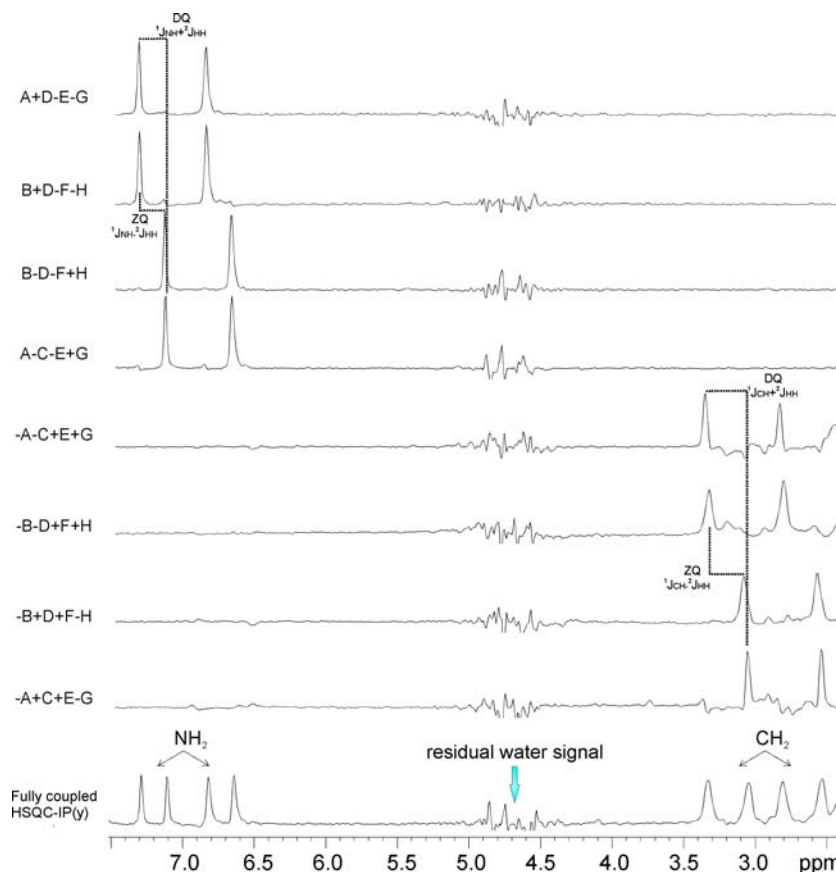


optimal optimization of inter-pulse delays or off-resonance mismatch effects. In practice, the use of different scaling factors ( $k$ ) when IP and AP data are combined can minimize undesired cross-talk. In the case of cyclosporine, experimental  $k$  values of 1 and 1.1 yields clean S<sup>3</sup> editing for NH and CH, respectively (Fig. 9). On the other hand, it is interesting to note that signals intensities of CH<sub>2</sub> and NH<sub>2</sub> systems strongly depend on the length of the refocused INEPT period. Thus, the resonance lines from XH<sub>2</sub> and XH<sub>3</sub> groups disappear from the spectra in typical experiments optimized to achieve maximum intensity for XH ( $\Delta'$  and/or  $\Delta''$  adjusted to  $1/4J$ ). On the other hand, spin-selection for CH<sub>2</sub> and NH<sub>2</sub> can be achieved when AP data is

acquired with  $\Delta' = \Delta_1/2 = 1/8J(\text{CH})$  and  $\Delta'' = \Delta_2/2 - \Delta' = 1/8J(\text{NH})$ , respectively (Fig. 10). Under these conditions, spin-selection is also achieved for CH and NH but at expense of some sensitivity attenuation. Unfortunately, the proposed experiment fails for CH<sub>3</sub> groups but a particular solution was previously reported to generate four separate single-component spectra (Kontaxis and Bax 2001).

When working with <sup>13</sup>C labeled compounds, constant-time evolution in the <sup>13</sup>C dimension could be used to avoid J(CC) splitting in the indirect dimension and to simplify the spectra at expense of some sensitivity loss due to <sup>13</sup>C relaxation. In this case, the last 90°(<sup>15</sup>N) pulse could be moved at the end of  $t_1'$  period,

**Fig. 8** Experimental data showing homonuclear and heteronuclear  $\alpha\alpha/\alpha\beta/\beta\alpha/\beta\beta$  spin-selection on  $\text{CH}_2$  and  $\text{NH}_2$  spin systems. Each 1D row (corresponding to  $\delta^{13}\text{C} = 34.3$  ppm (Asn-60) and  $\delta^{15}\text{N} = 114.4$  ppm (Gln-62)) was extracted from the corresponding 2D spectra resulting of the suitable combination of different eight 2D TS-HSQC data acquired as described in Fig. 7 and with the same experimental conditions as Fig. 3. The measured coupling values for the selected signals are  $^1J_{\text{CH}} = 135.9$  Hz and  $131.6$  Hz,  $^1J_{\text{NH}} = 90.9$  Hz and  $89.5$  Hz,  $^2J_{\text{HH}}(\text{C}) = 12.4$  Hz and  $^2J_{\text{HH}}(\text{N}) = 2.1$  Hz. At the bottom, the selected row extracted from the F2-coupled 2D TS-HSQC-IP(y) experiment is also shown for comparison. Note the practical absence of undesired cross-talk



just prior to the  $t_1$  period, without affect the overall sensitivity of the experiment. In this way,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  could be stored as  $zz$  magnetization in the IP experiment, and as  $z$  and  $zz$  magnetization in the AP experiment during the periods  $t_1'$  and  $t_1$ , respectively. Practicalities to measure  $J(\text{C}^2\text{H}^\alpha)$  coupling values in selectively isotopically enriched proteins in backbone  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{CA}$ ,  $^{13}\text{CO}$  atoms using the  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-IPAP experiment has been described (Giesen et al. 2001).

## Material and experiments

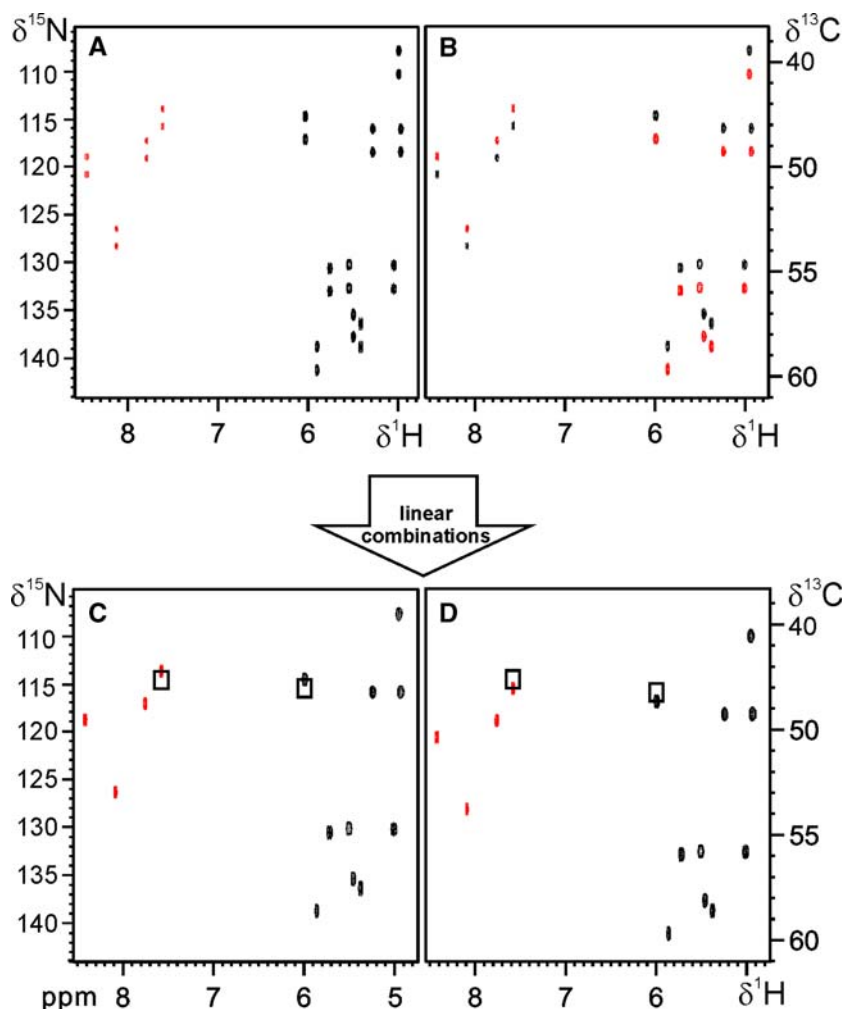
NMR data sets in this work were recorded at  $25^\circ\text{C}$  using a Bruker Avance 500 MHz NMR spectrometer equipped with a 5 mm TCI  $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  cryoprobe. All data were acquired and processed using TOPSPIN v1.3 (Bruker Biospin, Germany).

The 2D TS-HSQC-F2-IPAP pulse scheme (Fig. 1A) was applied on an uniformly  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$ -labeled ubiquitin sample (concentration of 1.1 mM dissolved in 90%  $\text{H}_2\text{O}/10\%$   $\text{D}_2\text{O}$ ). The experimental conditions were as follows: pre-scan delay of 1 s;

inter-pulse delays of  $\Delta_1 = 1/4J_{\text{CH}} = 1.72$  ms (140 Hz for  $^{13}\text{C}$ ),  $\Delta_2 = 1/4J_{\text{NH}} = 2.77$  ms (90 Hz for  $^{15}\text{N}$ ),  $\Delta' = \Delta_1/2 = 0.86$  ms (optimized to  $1/8J_{\text{CH}}$  for all carbon multiplicities) and  $\Delta'' = \Delta_2 - \Delta' = 1.91$  ms (optimized to  $1/4J_{\text{NH}}$  for NH spin systems);  $\delta = 4$   $\mu\text{s}$  + gradient + field recovery delay = 1204  $\mu\text{s}$ ;  $\varepsilon = \delta + t_1(0)*2 + \text{pw}(180^\circ-^{13}\text{C}) + \text{pw}(180^\circ-^1\text{H})$ ;  $\Delta = 2\varepsilon + t_1(0)*2 + \text{pw}(180^\circ-^{15}\text{N}) + \text{pw}(180^\circ-^1\text{H}) + \text{pw}(90^\circ-^{13}\text{C})$ . For each 2D spectrum,  $128(t_1)*2\text{K}(t_2)$  complex points with 4 scans and acquisition  $t_{1\text{max}}$  and  $t_1'_{\text{max}}$  times of 6.36 ms ( $\text{F}_1, \text{C}$ ) and 29.95 ms ( $\text{F}_1, \text{N}$ ), respectively, were accumulated in about 10 min. Frequency discrimination in  $\text{F}_1$  was obtained using sensitivity-enhanced gradient selection. After linear prediction and zero-filling in the indirect dimension, a final spectrum consisting of  $256(\text{F}_1)*2\text{K}(\text{F}_2)$  real points was obtained. The original time-domain data were conveniently combined and processed as described in Fig. 2 to yield separate  $\alpha/\beta$ -F2-edited  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQC maps as shown in (E–H).

The 2D TS-HSQC-F1-IPAP pulse scheme (Fig. 1B) was applied on a natural-abundance 50 mM cyclosporine sample dissolved in deuterated benzene. The experimental conditions were as follows: pre-scan

**Fig. 9** (A) IP and (B) APT HSQC spectra of cyclosporine acquired with the sequence of Fig. 1B. The phase of the first  $^{15}\text{N}$   $90^\circ$  pulse was set to  $-x$  to invert the corresponding NH resonances with respect to the CH resonances. (C, D) Separate F1 spin-state-selective HSQC-IPAP spectra obtained after IP  $\pm$  AP data combination



delay of 0.7 s; inter-pulse  $\Delta_1$  and  $\Delta_2$  delays optimized at 140 Hz for CH (1.72 ms) and 90 Hz for NH (2.77 ms), respectively;  $\delta = 4 \mu\text{s} + \text{gradient} + \text{field recovery delay} = 1204 \mu\text{s}$ ;  $\varepsilon = \delta + t_1(0) \cdot 2 = 1.21 \text{ ms}$ ;  $\Delta = 2\varepsilon + t_1'(0) \cdot 2 + \text{pw}(90^\circ-^{13}\text{C}) + \text{pw}(180^\circ-^{13}\text{C}) = 2.47 \text{ ms}$ . For each 2D spectrum,  $128(t_1) \cdot 2K(t_2)$  complex points with 8 scans and acquisition  $t_{1\text{max}}$  and  $t_{1'\text{max}}$  times of 18.5 ms ( $F_1, C$ ) and 4.5 ms ( $F_1, N$ ), respectively, were accumulated in about 15 min. Frequency discrimination in  $F_1$  was obtained using sensitivity-enhanced gradient selection. After linear prediction and zero-filling in the indirect dimension, a final spectrum consisting of  $512(F_1) \cdot 2K(F_2)$  real points was obtained. The original time-domain IP and AP data were conveniently combined and processed to yield separate  $\alpha/\beta$ -F1-edited  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$  HSQC maps.

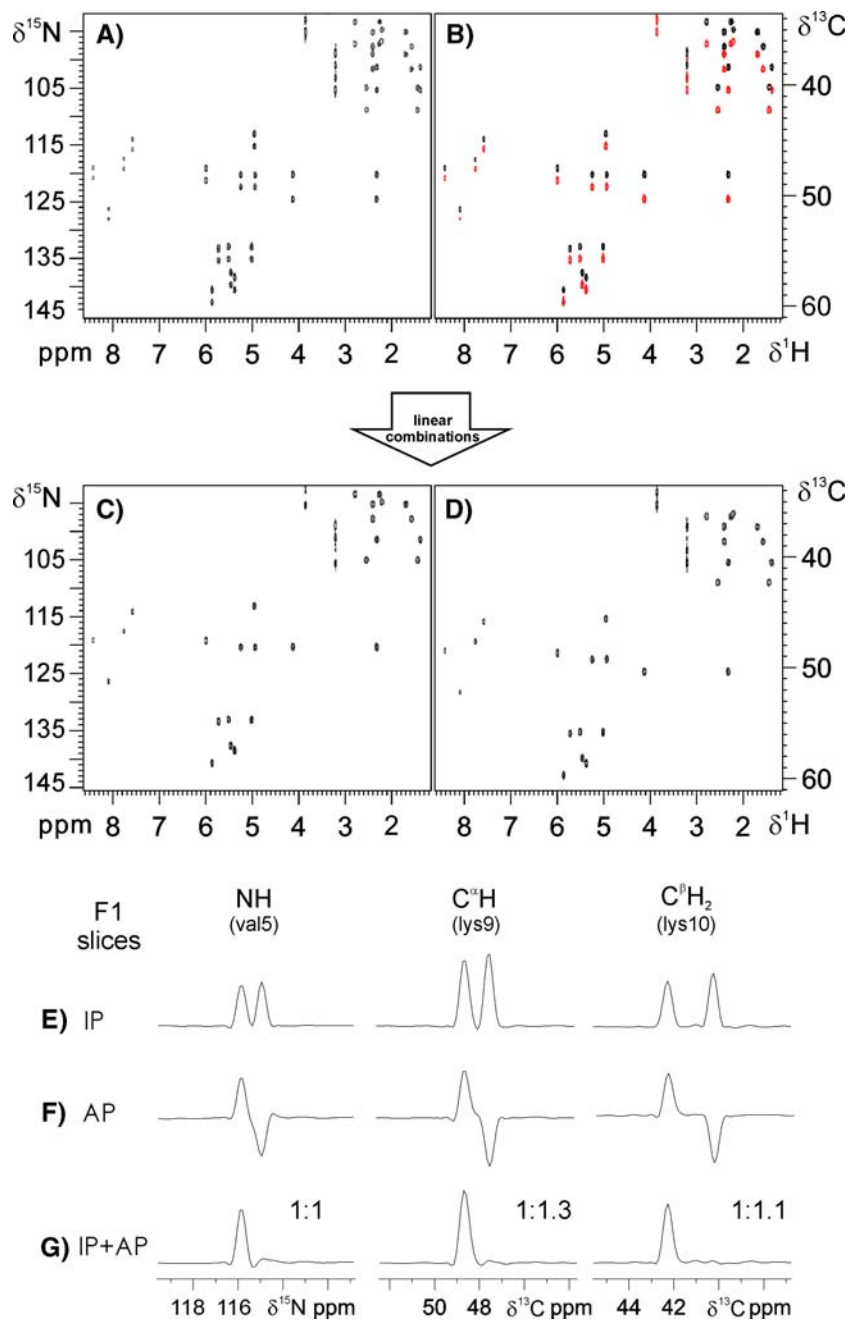
1D spectra were simulated using the program NMR-SIM (Bruker-Biospin AG) and the pulse sequence of Fig. 1A with  $t_1 = t_1' = 0$ . General simulation conditions: Basic frequency of 500 MHz, carrier frequencies at

5 ppm ( $^1\text{H}$ ), 55 ppm ( $^{13}\text{C}$ ), and 110 ppm ( $^{15}\text{N}$ ) and inter-pulse delays set to  $\Delta_1 = 1.8 \text{ ms}$  (optimized to  $^1J_{\text{CH}} = 138.9 \text{ Hz}$ ) and  $\Delta_2 = 2.7 \text{ ms}$  (optimized to  $^1J_{\text{CH}} = 92.6 \text{ Hz}$ ). Spin system definition used in Figs. 2 and 7: CH ( $\delta(^1\text{H}) = 5 \text{ ppm}$ ,  $\delta(^{13}\text{C}) = 55 \text{ ppm}$ ,  $^1J_{\text{CH}} = 145 \text{ Hz}$ );  $\text{CH}_2$  ( $\delta(^1\text{H}) = 3$  and  $4 \text{ ppm}$ ,  $\delta(^{13}\text{C}) = 30 \text{ ppm}$ ,  $^1J_{\text{CH}} = 135 \text{ Hz}$ ;  $^2J_{\text{HH}} = 10 \text{ Hz}$ );  $\text{CH}_3$  ( $\delta(^1\text{H}) = 2 \text{ ppm}$ ,  $\delta(^{13}\text{C}) = 20 \text{ ppm}$ ,  $^1J_{\text{CH}} = 125 \text{ Hz}$ ); NH ( $\delta(^1\text{H}) = 7 \text{ ppm}$ ,  $\delta(^{15}\text{N}) = 115 \text{ ppm}$ ,  $^1J_{\text{NH}} = 90 \text{ Hz}$ );  $\text{NH}_2$  ( $\delta(^1\text{H}) = 7.5$  and  $8 \text{ ppm}$ ,  $\delta(^{15}\text{N}) = 105 \text{ ppm}$ ,  $^1J_{\text{NH}} = 90 \text{ Hz}$ ;  $^2J_{\text{HH}} = 2 \text{ Hz}$ ). Spin system definition used in Fig. 5: CH ( $\delta(^1\text{H}) = 4 \text{ ppm}$ ,  $\delta(^{13}\text{C}) = 55 \text{ ppm}$ ); NH ( $\delta(^1\text{H}) = 6 \text{ ppm}$ ,  $\delta(^{15}\text{N}) = 110 \text{ ppm}$ ). In Fig. 5,  $^1J_{\text{CH}}$  and  $^1J_{\text{NH}}$  values were varied as described in each row.

## Conclusions

Often, most of the existing spin-state edited NMR methods are optimal only for a particular multiplicity

**Fig. 10 (A, B)** TS-HSQC-F1-IPAP spectra of cyclosporine optimized for  $\text{CH}_2$  spin systems (the delay  $\Delta' = \Delta_1/2$  was optimized to  $1/8J(\text{CH})$ ) in order to observe spin editing simultaneously for CH,  $\text{CH}_2$  and NH spin systems in the resulting  $\alpha, \beta$ -edited spectra shown in (C, D). Although sensitivity of CH resonances are partially attenuated with respect to an experiment specifically optimized to  $1/4J(\text{CH})$  (see Fig. 9), minimum cross-talk can be achieved for all spin systems when different scaling  $k$  factors are individually applied on each multiplicity (E–G)



and for a certain heteronucleus, usually backbone CH or NH spin systems. For the first time, we have developed here novel HSQC-IPAP methods to extract valuable information simultaneously for  $\text{CH}_n$  and  $\text{NH}_n$  multiplicities in a single NMR experiment. The incorporation of combined advantages associated to time-sharing evolution and IPAP editing do not severely affect the main features of traditional single-nucleus experiments in terms of relative sensitivity and performance (Meissner et al. 1997; Sørensen et al. 1997, 1999; Andersson et al. 1998; Ottiger et al. 1998; Nolis

et al. 2006). The time savings and the substantial amount of additional information provided by this methodology can have a significant impact in the development of powerful NMR techniques that might allow complete studies simultaneously on all backbone and side-chain frameworks in small peptides and also labeled proteins. We are also exploring the design of new time-sharing NMR experiments for a broader application to mass-limited and low-concentrated samples as well as to high-throughput structure determination.

**Acknowledgments** This work was supported by MCYT (project BQU2003-01677). The authors are grateful to the Servei de Ressonància Magnètica Nuclear, UAB, for allocating instrument time to this project and to Dr. W. Bermel for providing us a TS pulse program code. P.N thanks “Generalitat de Catalunya” for a predoctoral grant.

## References

- Andersson P, Weigelt J, Otting G (1998) Spin-state selection filters for the measurement of heteronuclear one-bond coupling constants. *J Biomol NMR* 12:435–441
- Boelens R, Burgering M, Fogh RH and Kaptein R (1994) *J Biomol NMR* 4:201–213
- Carlomagno T, Peti W, Griesinger C (2000) A new method for the simultaneous measurement of magnitude and sign of  $^1D_{CH}$  and  $^1D_{HH}$  dipolar couplings in methylene groups. *J Biomol NMR* 17:99–109
- Ding K, Gronenborn AM (2003) Sensitivity-enhanced 2D IPAP, TROSY/anti-TROSY, and E.COSY experiments: Alternatives for measuring dipolar  $^{15}N$ - $^1H$  couplings. *J Magn Reson* 163:208–214
- Farmer II BT (1991) Simultaneous [ $^{13}C$ ,  $^{15}N$ ]-HMOC, A pseudo-triple-resonance Experiment. *J Magn Reson* 93:635–641
- Fehér K, Berger S, Kövér KE (2003) Accurate determination of small one-bond heteronuclear residual dipolar couplings by F1 coupled HSQC modified with a G-BIRD(r) module. *J Magn Reson* 163:340–346
- Frueh DP, Arthanari H, Wagner G (2005) Unambiguous Assignment of NMR Protein Backbone Signals with a Time-shared Triple-resonance Experiment. *J Biomol NMR* 33:187–196
- Giesen AW, Bae LC, Barrett CL, Chyba JA, Chaykovsky MM, Cheng M-C, Murray JH, Oliver EJ, Sullivan SM, Brown JM, Dahlquist FW, Homans SW (2001) Measurement of one-bond  $^1H\alpha$ - $^{13}C\alpha$  couplings in backbone-labelled proteins. *J Biomol NMR* 19:255–260
- Hall JB, Dayie KT, Fushman D (2003) Direct measurement of the  $^{15}N$  CSA/dipolar relaxation interference from coupled HSQC spectra. *J Biomol NMR* 26:181–186
- Hall JB, Fushman D (2003) Direct measurement of the transverse and longitudinal  $^{15}N$  chemical shift anisotropy-dipolar cross-correlation rate constants using  $^1H$ -coupled HSQC spectra. *Magn Reson Chem* 41:837–842
- Ishii Y, Markus MA, Tycko R (2001) Controlling residual bipolar couplings in high-resolution NMR of proteins by strain induced alignment in a gel. *J Biomol NMR* 21:141–151
- Kay LE, Keifer P, Saarinen T (1992) Pure absorption gradient-enhanced heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity. *J Am Chem Soc* 114:10663–10665
- Kim S, Szyperski T (2003) GFT NMR, A new approach to rapidly obtain precise high-dimensional NMR spectral information. *J Am Chem Soc* 125:1385–1393
- Kontaxis G, Bax A (2001) Multiplet component separation for measurement of methyl  $^{13}C$ - $^1H$  dipolar couplings in weakly aligned proteins. *J Biomol NMR* 20:77–82
- Kövér KE, Batta G (2004) More line narrowing in TROSY by decoupling of long-range couplings: shift correlation and  $^1J_{NC}$  coupling constant measurements. *J Magn Reson* 170:184–190
- Mariani M, Tessari M, Boelens R, Vis H, Kaptein R (1994) Assignment of the Protein Backbone from a Single 3D, N-15, C-13, Time-Shared HxyH Experiment. *J Magn Reson Series B* 104:294–297
- Meissner A, Duus JO, Sørensen OW (1997) Integration of spin-state-selective excitation into 2D NMR correlation experiments with heteronuclear ZQ/DQ  $\pi$  rotations for  $^1J(XH)$ -resolved E.COSY-type measurement of heteronuclear coupling constants in proteins. *J Biomol NMR* 10:89–94
- Miclet E, O’Neil-Cabello E, Nikonowicz EP, Live D, Bax A (2003)  $^1H$ - $^1H$  dipolar couplings provide a unique probe of RNA backbone structure. *J Am Chem Soc* 125:15740–15741
- Miclet E, Williams Jr DC, Clore GM, Bryce DL, Boisbouvier J, Bax A (2004) Relaxation-optimized NMR spectroscopy of methylene groups in proteins and nucleic acids. *J Am Chem Soc* 126:10560–10570
- Nolis P, Espinosa JF, Parella T (2006) Optimum spin-state selection for all multiplicities in the acquisition dimension of the HSQC experiment. *J Magn Reson* 180:39–50
- Ottiger M, Delaglio F, Bax A (1998) Measurement of J and dipolar couplings from simplified two-dimensional NMR spectra. *J Magn Reson* 131:373–378
- Parella T, Gairí M (2004) Simultaneous recording of spin-state-selective NMR spectra for different  $I_nS$  spin systems. *J Am Chem Soc* 126:9821–9826
- Permi P (2002) A spin-state-selective experiment for measuring heteronuclear one-bond and homonuclear two-bond couplings from an HSQC-type spectrum. *J Biomol NMR* 22:27–35
- Sattler M, Maurer M, Schleucher J, Griesinger C (1995) A simultaneous  $^{15}N$ ,  $^1H$  and  $^{13}C$ ,  $^1H$ -HSQC with sensitivity enhancement and a heteronuclear echo. *J Biomol NMR* 5:97–102
- Schleucher J, Schwendinger M, Sattler M, Schmidt P, Schedletsky O, Glaser SJ, Sørensen OW, Griesinger C (1994) A general enhancement scheme in heteronuclear multidimensional NMR employing pulsed field gradients. *J Biomol NMR* 4:301–306
- Sørensen MD, Meissner A, Sørensen OW (1997) Spin-state-selective coherence transfer via intermediate states of two-spin coherence in IS spin systems. Application to E.COSY-type measurement of J coupling constants. *J Biomol NMR* 10:181–186
- Sørensen MD, Meissner A, Sørensen OW (1999)  $^{13}C$  natural abundance  $S^3E$  and  $S^3CT$  experiments for measurement of J coupling constants between  $^{13}C\alpha$  or  $^1H\alpha$  and other protons in a protein. *J Magn Reson* 137:237–242
- Sørensen OW (1990) Aspects and prospects of multidimensional time-domain spectroscopy. *J Magn Reson* 89:210–216
- Szyperski T, Yeh DC, Sukumaran DK, Moseley HN, Montelione GT (2002) Reduced Dimensionality NMR spectroscopy for high-throughput protein resonance assignment. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:8009–8014
- Uhrin D, Bramham J, Winder SJ, Barlow PN (2000) Simultaneous CT- $^{13}C$  and VT- $^{15}N$  chemical shift labelling. Application to 3D NOESY- $CH_3NH$  and 3D  $^{13}C$ ,  $^{15}N$  HSQC-NOESY- $CH_3NH$ . *J Biomol NMR* 18:253–259



---

*publicació VI*

**Time-sharing evolution and sensitivity enhancements  
in 2D HSQC-TOCSY and HSQMBC experiments**

## 15.- Publicació VI

### *Time-sharing evolution and sensitivity enhancements in 2D HSQC-TOCSY and HSQMBC experiments*

#### 15.1.- Introducció

Un cop s'havia constatat que en l'experiment de temps compartit  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -HSQC era possible la incorporació de la selecció d'estat de *spin* per a totes les multiplicitats simultàniament, permetent la mesura de  $^1J_{\text{CH}}$  i  $^1J_{\text{NH}}$  a F2 en un sol experiment, i que sobretot, s'havia corroborat que el mètode era avantatjós en termes de sensibilitat respecte els experiments estàndard  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC i  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC, el següent pas a seguir era clar, anàlogament al realitzat a la *publicació IV*, s'havia d'introduir el bloc TOCSY al final de la seqüència per tal de transferir la informació a tot el subsistema de *spins* i poder mesurar la magnitud i el signe de constants d'acoblament  $^nJ_{\text{XH}}$  simultàniament per  $^{13}\text{C}$  i  $^{15}\text{N}$ . Abans però caldria establir quins eren els guanys reals de sensibilitat que l'experiment de temps compartit  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -HSQC-TOCSY respecte els anàlegs  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-TOCSY i  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-TOCSY.

La segona part del treball que es presenta en la publicació va sorgir de la necessitat de solucionar el problema que tenen totes les seqüències que per mesurar  $^nJ_{\text{XH}}$  es basen en una transferència TOCSY, i és que aquestes no funcionen per a carbonis quaternaris o nitrògens no protonats. Com s'ha explicat a la part teòrica (punt 5.3.3) la seqüència HSQMBC sí permet fer-ho. Per aquest fet el que s'ha dissenyat és la seqüència de temps compartit  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -HSQMBC i es mostren exemples de la seva utilitat en la mesura simultània de  $^nJ_{\text{CH}}$  i  $^nJ_{\text{NH}}$ . També se n'ha valorat el guany de sensibilitat que això permet respecte fer els dos experiments  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQMBC i  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQMBC per separat.



# Time-sharing evolution and sensitivity enhancements in 2D HSQC-TOCSY and HSQMBC experiments

Pau Nolis, Miriam Pérez and Teodor Parella\*

Servei de Resonància Magnètica Nuclear, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193, Bellaterra, Barcelona, Spain

Received 7 July 2006; Revised 29 July 2006; Accepted 1 August 2006

Modifications of time-shared (TS) HSQC-like experiments originally developed by Griesinger and co-workers (Sattler M, Maurer M, Schleucher J, Griesinger C. *J. Biomol. NMR* 1995; **5**: 97) are proposed to extract different types of information from a single NMR pulse scheme. It is shown that simultaneous acquisition of  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQC-TOCSY and HSQMBC experiments can afford experimental sensitivity enhancements of 20–40% with respect to the separate acquisition of individual  $^{13}\text{C}$  or  $^{15}\text{N}$  data. In addition, the incorporation of a number of independent editing elements can be easily used for different purposes, for instance, to assign unambiguously  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , and  $^{15}\text{N}$  chemical shifts, to differentiate directly from relayed cross-peaks, or to measure simultaneously long-range proton–carbon and proton–nitrogen coupling constants. The suggested methodologies can be applied to many different classes of nitrogen-containing compounds and illustrative examples are provided for the peptide cyclosporine as a demonstration of the performance of such experiments. Copyright © 2006 John Wiley & Sons, Ltd.

**KEYWORDS:** NMR spectroscopy; heteronuclear coupling constants; IPAP; sensitivity enhancement; time-sharing

## INTRODUCTION

Whereas 2D  $^1\text{H}$ -X HMQC-TOCSY and HSQC-TOCSY correlation experiments<sup>1–8</sup> have become useful alternatives to the TOCSY experiment to identify proton spin subsystems from the better dispersed heteronuclear X dimension, the 2D  $^1\text{H}$ -X HMBC or long-range optimized HSQC (HSQMBC) experiments<sup>8,9</sup> are crucial NMR tools to assign non-protonated heteronuclei via long-range heteronuclear connectivities. The relative high sensitivity and the excellent performance of these inverse proton-detected experiments have allowed their fruitful and wide application in many structural studies, indistinctively for X =  $^{13}\text{C}$  or  $^{15}\text{N}$ . In addition, a different number of interesting versions of both experiments have been also reported for the accurate measurement of small, long-range heteronuclear coupling constant values,  $^nJ(\text{XH})$  ( $n > 1$ ),<sup>5–9</sup> and they have been successfully applied to many stereochemical and conformational studies of natural products, peptides, carbohydrates, acyclic or five- and six-membered cyclic compounds.<sup>10</sup>

Here, a combined strategy is proposed to increase the sensitivity in equivalent NMR experiments that are routinely recorded for different heteronuclei using similar pulse schemes and experimental set-up conditions. The widely used HSQC-TOCSY and HSQMBC experiments have been chosen as candidates to evaluate the advantages to combine several well-known concepts into the same pulse scheme, namely time-sharing (TS) evolution of different chemical

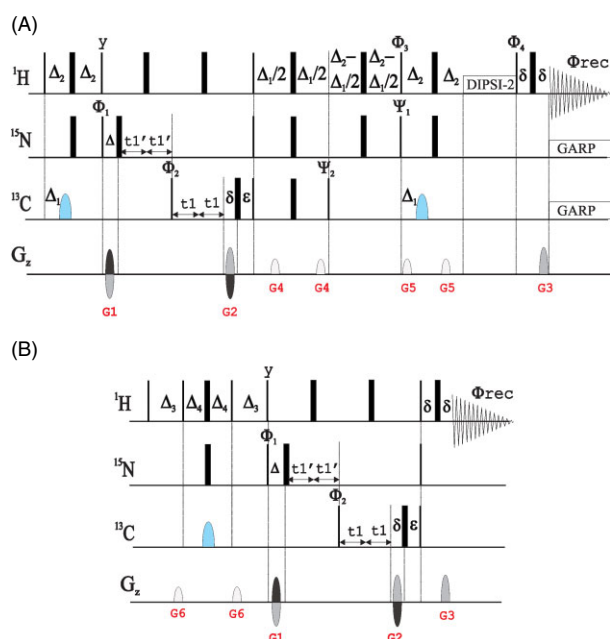
shifts and several multiple-editing capabilities. Thus, the incorporation of a number of independent editing elements can be easily used, for instance, to assign unambiguously  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , and  $^{15}\text{N}$  chemical shifts, to differentiate directly from the relayed cross-peaks, to know the multiplicity of the original  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  centre or to measure simultaneously long-range proton–carbon and proton–nitrogen coupling constants from a single NMR experiment. Experimental data on a naturally abundant peptide, cyclosporine, (Scheme 1) are provided to demonstrate the advantages to use TS chemical-shift evolution compared over the separate acquisition of equivalent  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  data in small chemical compounds.

## RESULTS AND DISCUSSION

The use and the main features associated to TS chemical-shift evolution into the HMQC and HSQC pulse schemes have been previously described in a series of related works.<sup>11–17</sup> Thus, it was already recognized that simultaneous evolution of  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  chemical shifts in the same indirect dimension could afford considerable sensitivity gains per time unit for both  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  nuclei. Of these approaches, sensitivity-enhanced versions of the TS-HSQC experiment<sup>15</sup> must be highlighted and are particularly interesting because combine enhanced signal-to-noise ratios related to the Preservation of Equivalent Pathways (PEP) approach,<sup>18,19</sup> which allow independent adjustment of  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  spectral widths and also take advantage of the benefits to use gradient echoes for coherence selection and for efficient solvent suppression.

Figure 1 shows the triple-resonance NMR pulse schemes proposed in this work for the simultaneous acquisition of  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQC-TOCSY or  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQMBC

\*Correspondence to: Teodor Parella, Servei de Resonància Magnètica Nuclear, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193, Bellaterra, Barcelona, Spain. E-mail: teodor.parella@uab.es



**Figure 1.** Basic pulse schemes of (A)  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  TS-HSQC-TOCSY and (B)  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  TS-HSQMBC experiments. Thin and thick bars represent  $90^\circ$  and  $180^\circ$  non-selective pulses and are applied along the  $x$ -axis unless otherwise stated. The shaped  $^{13}\text{C}$   $180^\circ$  pulses were a 500  $\mu\text{s}$  smoothed chirp pulse for broadband  $^{13}\text{C}$  inversion. A basic two-step phase cycle was employed:  $\phi_1 = \phi_2 = (x, -)$ ,  $\phi_{\text{rec}} = (x, -x)$  and quadrature in the F1 dimension was achieved via states-TPPI of  $\phi_1$  and  $\phi_2$ . Phase sensitive data was obtained using the sensitivity-enhanced gradient echo-antiecho protocol (by default:  $\phi_3 = y$ ,  $\phi_4 = x$ , and  $\Psi_1 = \Psi_2 = y$ ). The delays  $\varepsilon$  and  $\Delta$  compensate evolution during the variable  $t_1$  and  $t_1'$  periods and the time increments were set to  $\Delta t_1 = 1/\text{SW}(\text{C})$  and  $\Delta t_1' = 1/\text{SW}(\text{N}) - 1/\text{SW}(\text{C})$ . The inter-pulse delays are set to  $\Delta_1 = 1/4^1J(\text{CH})$ ,  $\Delta_2 = 1/4^1J(\text{NH})$ ,  $\Delta_3 = 1/4^1J(\text{XH})$  and  $\Delta_4 = 1/2^1J(\text{CH})$ . All gradients had a sine shape and their durations ( $\delta$ ) and strengths (percentage with respect to 32.6 G/cm) were set to: G1 = (1 ms, 47.63), G2 = (1 ms, 32.37), G3 = (1 ms, 8.14), G4 = (600  $\mu\text{s}$ , 11), G5 = (600  $\mu\text{s}$ , -5), G6 = (1 ms, 30). For the measurement of long-range heteronuclear coupling constants, the different  $\alpha, \beta$ -spin-state edited HSQC-TOCSY spectra were generated by the addition/subtraction of the in-phase (IP:  $\phi_3 = y$  and  $\phi_4 = x$ ) and anti-phase (AP:  $\phi_3 = x$  and  $\phi_4 = y$ ) data separately collected without  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  GARP decoupling during  $^1\text{H}$  acquisition.

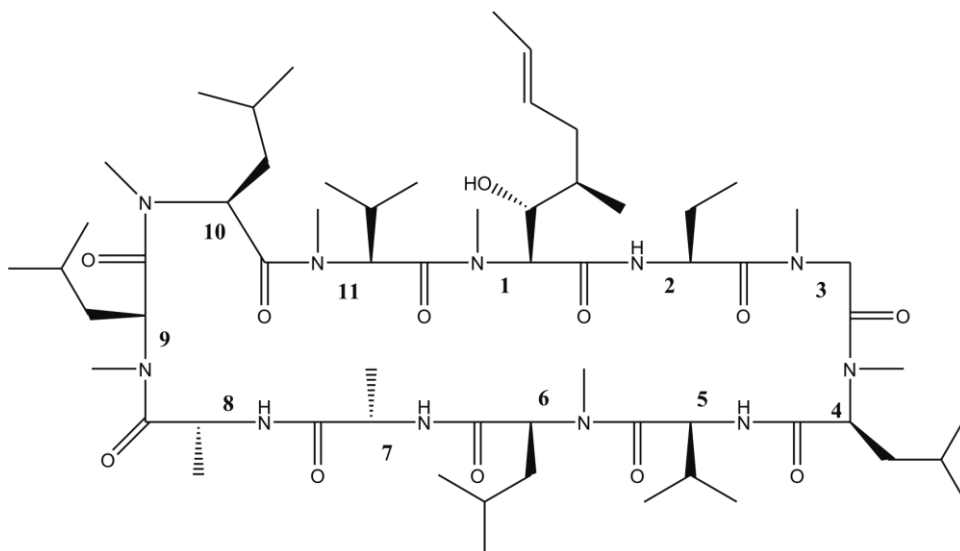
spectra on nitrogen-containing chemical compounds. These schemes are modifications of the previously reported sensitivity-enhanced TS-HSQC experiment (see Scheme 1C in Ref. 15) that was first proposed to study doubly labelled  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  proteins and in which two different magnetization transfer pathways were implemented within the same radio-frequency pulse scheme.<sup>15</sup> The proposed sequences are conveniently rearranged to include simultaneous evolution of the different  $J(\text{XH})$  coupling constants and X chemical shifts during the concatenated  $\Delta_1$  and  $\Delta_2$  periods, and the variable  $t_1$  and  $t_1'$  periods. A complete and detailed

description of the original pulse scheme and its experimental features can be found in Ref. 15 and therefore no more details will be given here.

In the newly introduced 2D TS-HSQC-TOCSY experiment (Fig. 1(A)), a DIPSI-2 scheme is incorporated after the sensitivity-enhanced schemes simultaneously employed for  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$ . Data can be optionally recorded with simultaneous  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  decoupling during  $^1\text{H}$  acquisition to obtain a 2D spectrum, which is amenable for routine structural analysis and full  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  chemical shifts assignment. On the other hand, it will be shown that the precise measurement of the magnitude and the sign of both long-range proton-carbon,  $^1J(\text{CH})$ , and proton-nitrogen coupling constants,  $^1J(\text{NH})$ , can be also performed with enhanced sensitivity after the incorporation of a very simple  $\alpha/\beta$  spin-state editing protocol.<sup>20</sup>

The incorporation of a series of editing elements can introduce additional information without an important penalty on sensitivity and spectral quality. Nucleus editing is highly advisable to differentiate cross-peaks originated from  $^{15}\text{N}$  or from  $^{13}\text{C}$ . Experimentally, the relative phase of  $^{15}\text{N}$  cross-peaks can be inverted by simple inversion of the  $\phi_1$  phase (Fig. 2(A), (B)). Thus, instead of acquiring N scans for a single TS data that could present undesired resonance overlapping or generate some confusion when analysing the resulting 2D map, two separate data are recorded in an interleaved manner with  $\phi_1 = x$  (with N/2 scans) and  $\phi_1 = -x$  (with N/2 scans). Addition and subtraction of the time-domain nucleus-edited TS-HSQC-TOCSY data affords separate  $^{13}\text{C}$ -HSQC-TOCSY (Fig. 2(C)) and  $^{15}\text{N}$ -HSQC-TOCSY (Fig. 2(D)) spectra, respectively, with enhanced sensitivity because all detected signal contributes to these edited spectra. Furthermore, differentiation between direct and relayed cross-peaks can be easily made by introducing an heteronuclear echo (individually for  $^{13}\text{C}$  and for  $^{15}\text{N}$  or for both at the same time) during the last refocusing gradient period.<sup>21</sup> Multiplicity editing has been also recognized as a helpful element in HSQC experiments and this element could be also implemented independently for  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  during the indirect X-evolution period with a similar duration of the direct-editing element.<sup>21</sup> In fact, nucleus-editing, direct-responses editing and multiplicity editing are completely independent and any combination between them could be done.

Theoretically, the proposed strategy would afford an important time saving factor of 2 compared with the separate acquisition of  $^{13}\text{C}$ - and  $^{15}\text{N}$ -HSQC-TOCSY spectra or, in other words, a substantial sensitivity gain of about 41% for each individual  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  spectra should be expected. In practice, these predicted enhancements are only minimally reduced because of the additional number of pulses and some longer delays involved in the TS experiment when compared with the original single-nucleus schemes. On average, experimental signal-to-noise enhancements around  $36 \pm 4\%$  and  $21 \pm 4\%$  have been obtained for  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$ , respectively, in the TS-HSQC-TOCSY experiment (Fig. 3) as closely reported in the original TS-HSQC experiment.<sup>15</sup> The decreased sensitivity found for  $^{13}\text{C}$  can be mainly attributed to relaxation effects experienced during the  $t_1'$



Scheme 1. Molecular structure of cyclosporine.

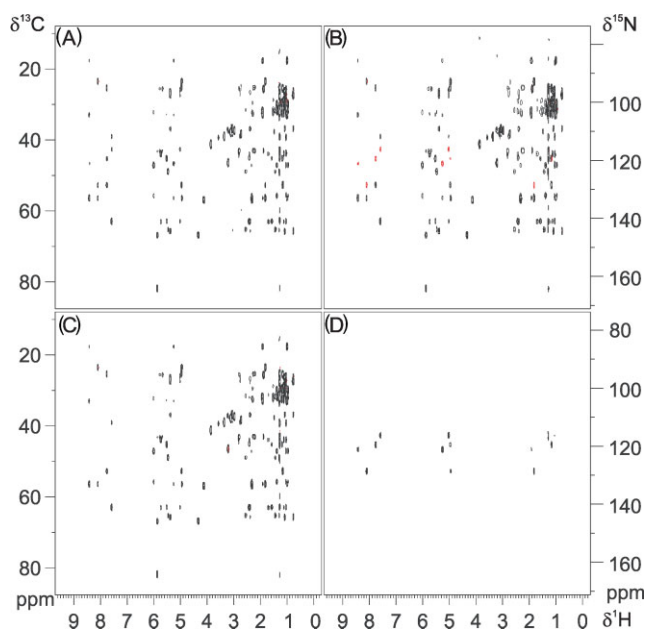


Figure 2. 2D TS- $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  HSQC-TOCSY spectrum of **1** acquired with  $\phi_1 = x$  (A) and  $\phi_1 = -x$  (B). Separate  $^{13}\text{C}$ -HSQC-TOCSY (C) and  $^{15}\text{N}$ -HSQC-TOCSY (D) obtained after time-domain data addition (A + B) and data subtraction (A – B), respectively.

period and during the simultaneous COS-INEPT block, which is about 5 ms longer than a conventional  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC.<sup>18,19</sup> In practice, this does not seem to be a serious problem because the detection limits will be mostly governed by the lowest sensitivity related to the  $^{15}\text{N}$  nuclei properties.

It is also worth mentioning that the incorporation of  $\alpha/\beta$  spin-state editing into the TS-HSQC-TOCSY scheme allows the simultaneous and sensitive measurement of the sign and the magnitude of both  $^nJ(\text{CH})$  and  $^nJ(\text{NH})$  coupling constants from the same F2-coupled IPAP experiment.<sup>20</sup> This multiplicity-independent F2-IPAP strategy is implemented into the sensitivity-enhanced scheme<sup>18,19</sup> and the measurement of  $^nJ(\text{XH})$  can be performed for all  $\text{CH}_n$  and  $\text{NH}_n$

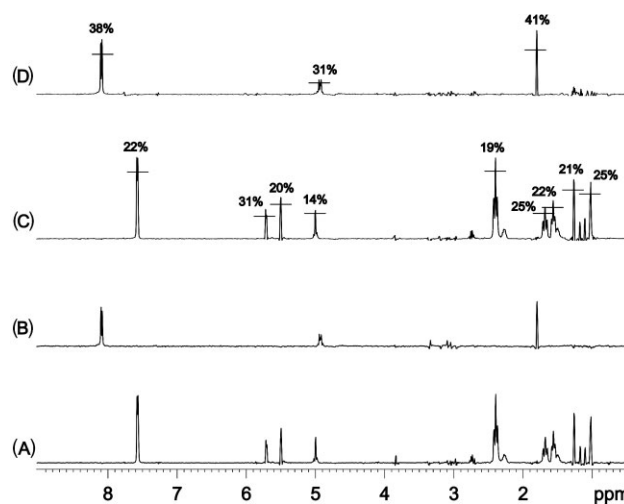
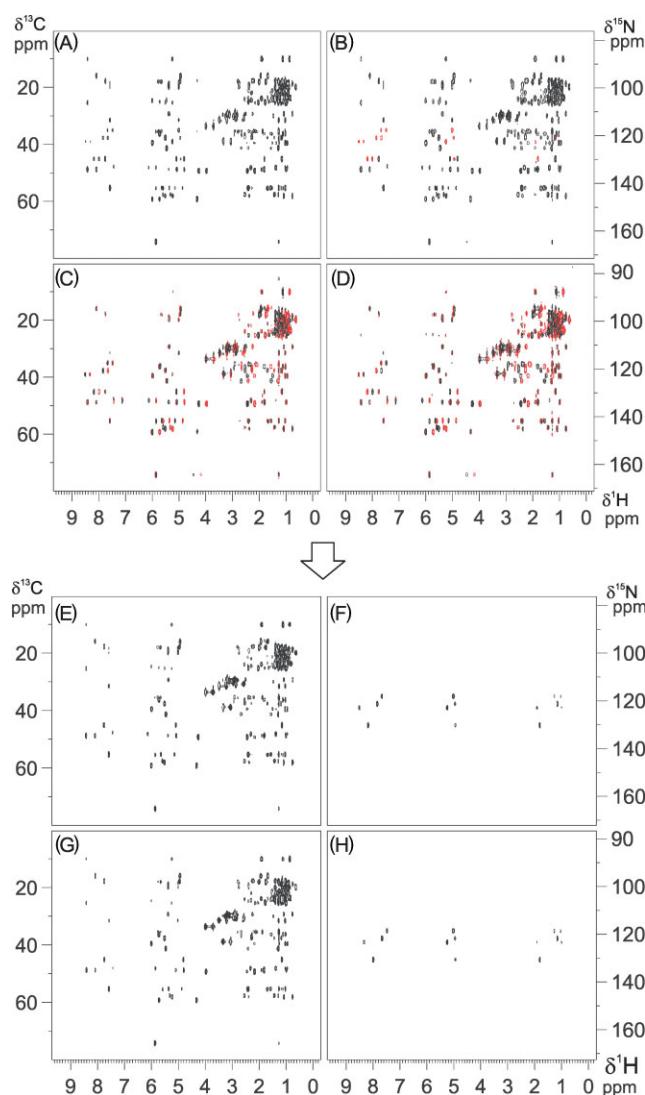


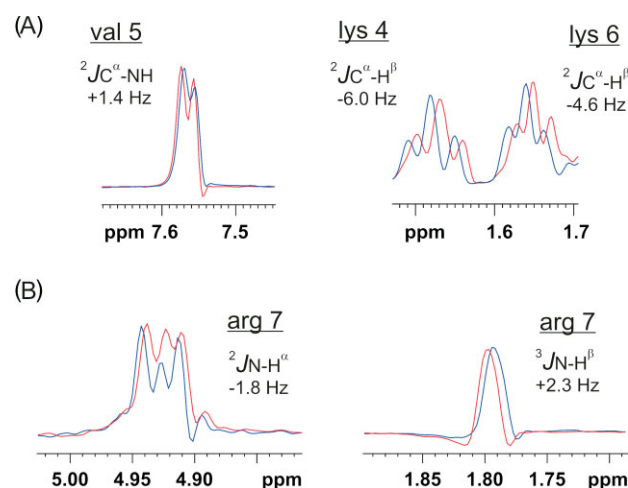
Figure 3. Experimental sensitivity gains per time unit achieved in the TS- $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  HSQC-TOCSY. (A–B) Separate single-nucleus  $^{13}\text{C}$ - and  $^{15}\text{N}$ -HSQC-TOCSY experiment (obtained with 16 scans per  $t_1$  increment one each). (C–D) Nucleus-edited TS- $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  HSQC-TOCSY spectra (16 scans with  $\phi_1 = x$  and 16 scans with  $\phi_1 = -x$ ). The selected 1D rows were taken at ((A) and (C))  $\delta(^{13}\text{C}) = 55.2$  ppm and ((B) and (D))  $\delta(^{15}\text{N}) = 119.1$  ppm.

multiplicities at the same time and with important sensitivity enhancements when compared to traditional experiments.<sup>20</sup> Two complementary in-phase (IP) and anti-phase (AP) data are obtained with a simple exchange of the  $\phi_3$  and  $\phi_4$  phases. Addition and subtraction of these data afford two separate and simplified  $\alpha$ -edited and  $\beta$ -edited HSQC-TOCSY spectra with enhanced sensitivity. In practice, the features associated to  $\alpha/\beta$ -editing and nucleus editing are fully combined in a single experiment (Fig. 4) and the predicted sensitivity enhancements are not affected because no extra delays and pulses are required. The analysis of the relative displacement of relayed cross-peaks in the acquisition dimension affords the accurate and simultaneous measurement of  $^nJ_{\text{CH}}$  and  $^nJ_{\text{NH}}$  (Fig. 5).

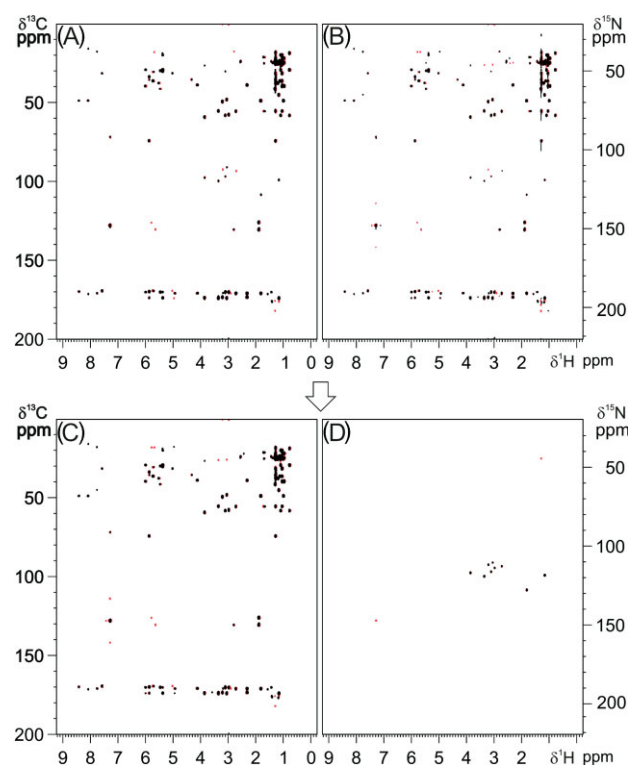


**Figure 4.** Nucleus-edited 2D TS-HSQC-TOCSY spectra of **1** obtained without heteronuclear decoupling during acquisition. The four spectra shown in (A) – (D) (acquired with 16 scans one each) was the result of combining nucleus editing ( $\phi_1 = x$  and  $\phi_1 = -x$ ) and F2-IPAP editing (IP:  $\phi_3 = y$  and  $\phi_4 = x$ ; AP:  $\phi_3 = x$  and  $\phi_4 = y$ ). Negative peaks are shown in red. Linear combination of all these acquired data yields four separate single-line 2D spectra for all  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  multiplicities at the same time (E–H).

The TS-HSQMBC experiment of Fig. 1(B) has been easily designed from the original TS-HSQC pulse scheme to get simultaneously all long-range  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  correlations (Fig. 6). The inter-pulse  $\Delta_3$  delay is optimized to a smaller  $1/2^{\prime\prime}J(\text{XH})$  value (typically  $^{\prime\prime}J(\text{XH}) = 5\text{--}8\text{ Hz}$ ), a  $^1J(\text{XH})$ -optimized G-BIRD element can be optionally introduced into the initial non-concatenated INEPT period to minimize direct responses, and the mixing coherence transfer element is reduced to the application of simultaneous  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$   $90^\circ$  pulses just prior to the refocusing gradient element. In addition, it is also recognized that the sensitivity of HSQMBC experiments suffers from the competitive evolution of  $J(\text{HH})$  coupling constants during the first INEPT step and CPMG pulse trains could also be introduced.<sup>22,23</sup> This method can be considered as the first general NMR experiment

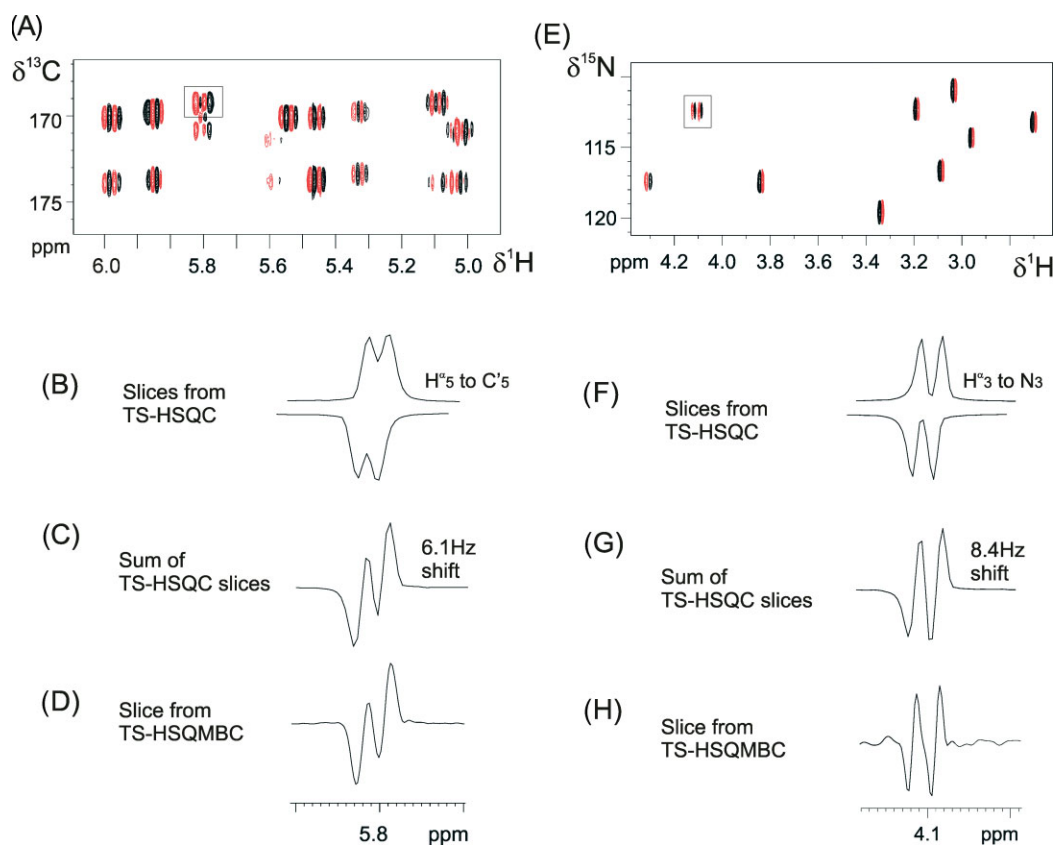


**Figure 5.** Simultaneous measurement of the sign and the magnitude of  $^1J_{\text{CH}}$  and  $^1J_{\text{NH}}$  can be performed by the simple analysis of the relative displacement of all cross-peaks in  $\alpha/\beta$ -edited TS-HSQC-TOCSY spectra.

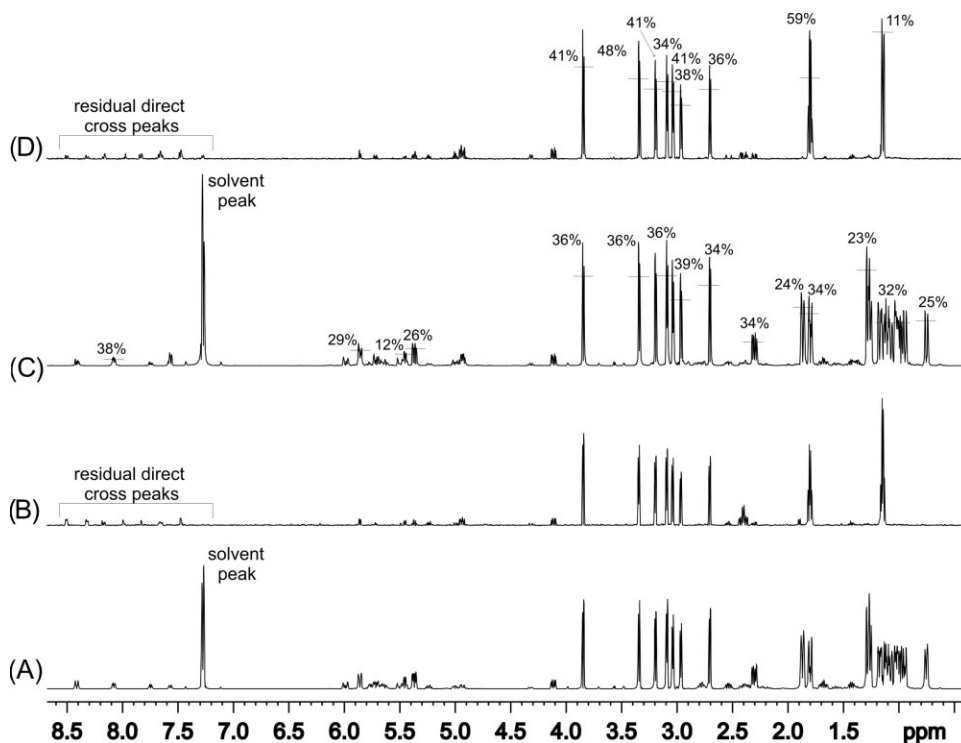


**Figure 6.** (A–B) 2D TS-HSQMBC spectra of **1** acquired with the pulse sequence of Fig. 1(B) with  $\phi_1 = x$  and  $\phi_1 = -x$ , respectively. Linear combination of all these acquired data yields separate 2D  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  HSQMBC spectra (C and D).

for the simultaneous measurement of  $^{\prime\prime}J(\text{CH})$  and  $^{\prime\prime}J(\text{NH})$  coupling constant values in protonated and non-protonated  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  nuclei. The resulting cross-peaks present the characteristic anti-phase coupling pattern with respect to the active  $J$  coupling values and the analysis and measurement of  $^{\prime\prime}J(\text{XH})$  by means of fitting procedures follow the same criteria as described in the original experiments (Fig. 7).<sup>8,9</sup> As expected, the sensitivity enhancements achieved in the TS-HSQMBC experiments are, in average, even slightly better to those reported for the TS-HSQC-TOCSY experiment because



**Figure 7.** Expansions of the TS-HSQMBC spectra of Fig. 6 showing the anti-phase character of cross-peaks and the corresponding fitting procedure to measure proton–carbon and proton–nitrogen coupling constants.



**Figure 8.** Experimental sensitivity gains per time unit observed in the corresponding 1D  $^{13}\text{C}$  (C) and  $^{15}\text{N}$  (D) projections of a single TS- $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  HSQMBC experiment compared to the individually acquired  $^{13}\text{C}$  (A) and  $^{15}\text{N}$  (B) HSQMBC experiments. For simplicity, data were processed in magnitude mode and the noise is kept at the same level for a direct visual comparison.



of the large reduction in the number of delays and pulses involved during the last retro inept steps (Fig. 8).

In summary, a useful approach for the simultaneous acquisition of  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQC-TOCSY or HSQMBC experiments has been described. The incorporation of a number of independent and multiple-purpose editing elements can be easily used to assign simultaneously  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , and  $^{15}\text{N}$  chemical shifts, to differentiate directly from the relayed cross-peaks, to know the multiplicity of the original C/N centre or to measure simultaneously the size and the sign of all long-range proton-carbon and proton-nitrogen coupling constants from a single TS-HSQC-TOCSY or TS-HSQMBC experiment. We expect the proposed strategy should be of high interest when both  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  data will be required in the structural and conformational analysis of nitrogen-containing compounds. Most importantly, it has been also shown that proper data encoding affords important gains in sensitivity and it can be anticipated that successful implementation of these ideas in the simultaneous acquisition of other type of NMR experiments can provide new developments. The benefits to obtain maximum NMR information from the analysis of a single experiment, with optimal sensitivity and with minimized acquisition times, and the combination with automated processing and peak-picking procedures can establish good fundamentals to exploit in more detail the rapid and fully automated structure characterization of small- and medium-sized chemical compounds.

## EXPERIMENTAL

All NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE spectrometer operating at 500.13 MHz for  $^1\text{H}$  and equipped with a cryogenically cooled triple-resonance TCI  $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  probe. The sample used was 50 mM of cyclosporine (**1**) dissolved in benzene. The  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  carriers were centred at 4.7 ppm, 40 ppm and 122 ppm, respectively. For all the experiments, the duration of the pre-scan period was 1 s. The maximum  $t_1$  and  $t_1'$  times were 10.2 ms and 25.6 ms, respectively, that correspond to spectral widths of 25 153 Hz and 10 274 Hz for  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$ , respectively. In TS-HSQC-TOCSY experiments, the inter-pulse delays were optimized to  $\Delta_1 = 1/4^1J(\text{CH})$  ( $^1J(\text{CH}) = 140$  Hz) and  $\Delta_2 = 1/4^1J(\text{NH})$  ( $^1J(\text{NH}) = 90$  Hz), the homonuclear TOCSY transfer was achieved by a 7 KHz DIPSI-2 pulse train of duration 40 ms and  $\varepsilon$  and  $\Delta$  were set to 1.31 ms and 2.87 ms, respectively.

In TS-HSQMBC experiments, the inter-pulse  $\Delta_3$ ,  $\Delta_4$ ,  $\varepsilon$  and  $\Delta$  delays were set to 30 ms (optimized to  $^nJ(\text{XH}) = 8$  Hz), 3.5 ms (optimized to  $^1J(\text{XH}) = 140$  Hz), 1.21 ms and 2.61 ms, respectively. The data matrix containing  $256 \times 2048$  complex points in  $t_1$  (and  $t_1'$ ) and  $t_2$ , respectively, was zero-filled to  $512 \times 2048$  complex points. Cosine square weighting function was applied prior to Fourier transformation in both dimensions.

## Acknowledgements

This work was supported by MCYT (project BQU2003-01677). We are also grateful to the Servei de Ressonància Magnètica Nuclear, UAB, for allocating instrument time to this project. P.N. thanks 'Generalitat de Catalunya' for a pre-doctoral grant.

## REFERENCES

- Lerner L, Bax A. *J. Magn. Reson.* 1986; **69**: 375.
- Willker W, Leibfritz D, Kerssebaum R, Bermel W. *Magn. Reson. Chem.* 1993; **31**: 287.
- Krishnamurthy VV. *J. Magn. Reson. Ser. B* 1995; **106**: 170.
- Williamson RT, Márquez BL, Gerwick WH. *Tetrahedron* 1999; **55**: 2881.
- Köver KE, Hruby VJ, Uhrin D. *J. Magn. Reson.* 1997; **129**: 125.
- Kozminski W. *J. Magn. Reson.* 1999; **137**: 408.
- Nolis P, Parella T. *J. Magn. Reson.* 2005; **176**: 15.
- Márquez BL, Gerwick WH, Williamson RT. *Magn. Reson. Chem.* 2001; **39**: 499.
- Williamson RT, Márquez BL, Gerwick WH, Köver KE. *Magn. Reson. Chem.* 2000; **38**: 265.
- See for instance: Riccio R, Bifulco G, Cimino P, Bassarello C, Gomez-Paloma L. *Pure Appl. Chem.* 2003; **75**: 295.
- Sørensen OW. *J. Magn. Reson.* 1990; **89**: 210.
- Farmer BT II. *J. Magn. Reson.* 1991; **93**: 635.
- Boelens R, Burgering M, Fogh RH, Kaptein R. *J. Biomol. NMR* 1994; **4**: 201.
- Mariani M, Tessari M, Boelens R, Vis H, Kaptein R. *J. Magn. Reson., Ser. B* 1994; **104**: 294.
- Sattler M, Maurer M, Schleucher J, Griesinger C. *J. Biomol. NMR* 1995; **5**: 97.
- Uhrin D, Bramham J, Winder SJ, Barlow PN. *J. Biomol. NMR* 2000; **18**: 253.
- Frueh DP, Arthanari H, Wagner G. *J. Biomol. NMR* 2005; **33**: 187.
- Kay LE, Keifer P, Saarinen T. *J. Am. Chem. Soc.* 1992; **114**: 10663.
- Schleucher J, Schwendinger M, Sattler M, Schmidt P, Schedletsky O, Glaser SJ, Sørensen OW, Griesinger C. *J. Biomol. NMR* 1994; **4**: 301.
- Nolis P, Espinosa JF, Parella T. *J. Magn. Reson.* 2006; **180**: 39.
- Parella T. *Magn. Reson. Chem.* 1998; **36**: 467.
- Koskela H, Kilpeläinen I, Heikkinen S. *J. Magn. Reson.* 2003; **164**: 228.
- Köver K, Batta G, Free K. *J. Magn. Reson.* 2006; **181**: 88.

---

*publicació VII*

**CN-HMBC: A powerful NMR technique for the simultaneous detection of long range  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  connectivities**

## 16.- Publicació VII

*CN-HMBC: A powerful NMR technique for the simultaneous detection of long range  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  connectivities*

### 16.1.- Introducció

Un cop constatats els beneficis en sensibilitat de les seqüències basades en el HSQC amb evolució simultània de  $^{13}\text{C}$  i  $^{15}\text{N}$  (F2-IPAP-HSQC, F1-IPAP-HSQC, HSQC-TOCSY i HSQCMBC) respecte els experiments estàndard amb evolució d'una única freqüència, el següent pas va ser estudiar quins beneficis s'obtenien per la seqüència HMBC. Així, doncs, en el següent treball es compara en termes de sensibilitat les seqüències  $^{13}\text{C}$ -HMBC i  $^{15}\text{N}$ -HMBC amb la nova seqüència de temps compartit CN-HMBC. En el treball es mostren exemples amb molècules químicament molt diverses per tal d'avaluar també la robustesa de la nova metodologia.



# CN-HMBC: A Powerful NMR Technique for the Simultaneous Detection of Long-Range $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ and $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ Connectivities

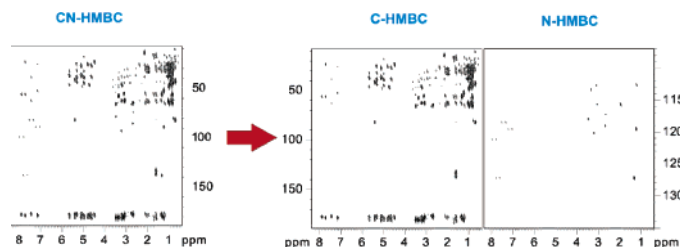
Miriam Pérez-Trujillo, Pau Nolis, and Teodor Parella\*

Servei de Ressonància Magnètica Nuclear, Universitat Autònoma de Barcelona,  
08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

teodor.parella@uab.es

Received October 11, 2006

## ABSTRACT



A new one-shot NMR experiment (CN-HMBC) is proposed for the simultaneous acquisition of 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HMBC spectra. Important sensitivity enhancements (up to 41% simultaneously for both  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$ ) or time savings (about 50%) can be achieved when compared to the separate acquisition of individual HMBC spectra. The experiment is highly recommended for the complete structural analysis and simultaneous chemical shift assignments of protonated and nonprotonated  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  resonances in nitrogen-containing organic compounds.

The HMBC (heteronuclear multiple-bond correlation) experiment<sup>1</sup> is an indispensable strategic NMR tool in the structural determination and chemical shift assignment of organic molecules. With the advent of pulsed-field gradients, clean  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  HMBC (C-HMBC) spectra are now routinely obtained under fully automated acquisition setup conditions, and therefore, it can be considered the gold standard to trace out long-range heteronuclear connectivities to protonated and non-protonated  $^{13}\text{C}$  nuclei.<sup>2</sup> The HMBC experiment also finds unlimited applicability for establishing heteronuclear correlations on a wide number of other different X heteronuclei as reported for  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{29}\text{Si}$ , or  $^{31}\text{P}$ . Particularly,  $^{15}\text{N}$  NMR parameters are sensitive indicators of important structural and electronic arrangements and the use of  $^1\text{H}$ – $^{15}\text{N}$  HMBC (N-HMBC) spectra to get experimental evidence of the

presence of protonated and nonprotonated nitrogen atoms in organic, bio-organic, and organometallic compounds is of particular interest.<sup>3</sup> Long-range N-HMBC data can be used to study and resolve a great number of chemical questions such as the full characterization of natural and synthetic products,<sup>4</sup> to differentiate regioisomers,<sup>5</sup> to determine the site of N-protonation,<sup>6</sup> N-oxidation,<sup>7</sup> nitration,<sup>8</sup> N-protection,<sup>9</sup> or N-substitution,<sup>10</sup> to analyze degradation products and metabolic pathways, to study tautomeric equilibria and hydrogen

(3) (a) Martín, G. E.; Hadden, C. E. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 543. (b) Martín, G. E.; Williams, A. J. *Ann. Rep. NMR Spectrosc.* **2005**, *55*, 1 and references cited herein.

(4) (a) Köck, M.; Junker, J.; Lindel, T. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 2041. (b) Marek, R.; Marek, J.; Dostál, J.; Tábořská, E.; Slavík, J.; Dommissé, R. *Magn. Reson. Chem.* **2002**, *40*, 687.

(5) (a) McDonnell, P. A.; Gauthier, A. D.; Ferro, M. P. *Magn. Reson. Chem.* **1998**, *36*, 35. (b) Ferreira, V. F.; Jorqueira, A.; Leal, K. Z.; Pimentel, H. R. X.; Seidl, P. R.; da Silva, M. N.; da Souza, M. C. B. V.; Pinto, A. V.; Wardell, J. L.; Wardell, M. S. V. *Magn. Reson. Chem.* **2006**, *44*, 481.

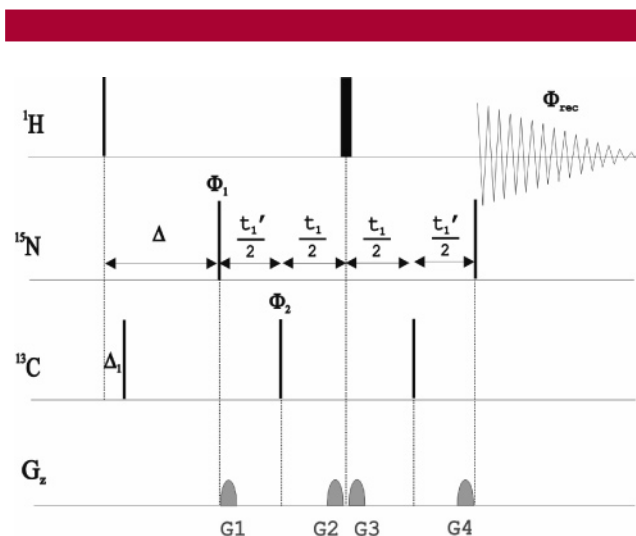
(6) García-Ortega, H.; Crusats, J.; Feliz, M.; Ribó, J. M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4170.

(1) Bax, A.; Summers, M. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2093.

(2) (a) Hurd, R. E.; John, B. K. *J. Magn. Reson.* **1991**, *91*, 648. (b) Willker, W.; Leibfritz, D.; Kerssebaum, R.; Bermel, W. *Magn. Reson. Chem.* **1993**, *31*, 287. (c) Parella, T. *Magn. Reson. Chem.* **1998**, *36*, 467.

bonding,<sup>11</sup> or to probe metal-binding in organometallic chemistry.<sup>12</sup>

Because a concerted analysis of <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N HMBC spectra is usually required for establishing unambiguous heteronuclear correlations or for structure verification in nitrogen-containing compounds, an one-shot NMR experiment (termed CN-HMBC) (Figure 1) is proposed for the



**Figure 1.** Basic pulse scheme of the CN-HMBC experiment suitable for the simultaneous acquisition of absolute-mode <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N 2D HMBC spectra. To discriminate correlations originated from N and C nuclei, two datasets are recorded with a minimum two-phase cycle: (A)  $\phi_1 = \phi_2 = x, -x$  and (B)  $\phi_1 = -x, x$  and  $\phi_2 = x, -x$  with the receiver phase always set to  $\phi_{rec} = (x, -x)$ . After data acquisition, these two time-domain datasets are added/subtracted to afford separate C- and N-HMBC spectra after conventional data processing. More experimental details are provided in the Supporting Information.

simultaneous acquisition of these two different C- and N-HMBC spectra under advantageous conditions.

This approach offers important sensitivity enhancements per time unit for both <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N or, in other words, reduced acquisition times when compared to the separate acquisition of individual C- and N-HMBC data. Furthermore, the new CN-HMBC pulse retains all features and simplicity related to the traditional HMBC experiment such as the use of pulsed-field gradients for coherence selection, a similar

(7) (a) Besse, P.; Combourieu, B.; Boyse, G.; Sancelme, J.; De Wever, H.; Delort, A. M. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 1412. (b) Martin, G. E.; Hadden, C. E.; Blinn, J. R.; Sharaf, M. H.M.; Tackie, A. N.; Schiff, P. L. *Magn. Reson. Chem.* **1999**, *37*, 1. (c) Hadden, C. E.; Kaluzny, B. D.; Robins, R. H.; Martin, G. E. *Magn. Reson. Chem.* **1999**, *37*, 325.

(8) Pezzella, A.; Manini, P.; Di Donato, P.; Boni, R.; Napolitano, A.; Palumbo, A.; d'Ischia, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2927.

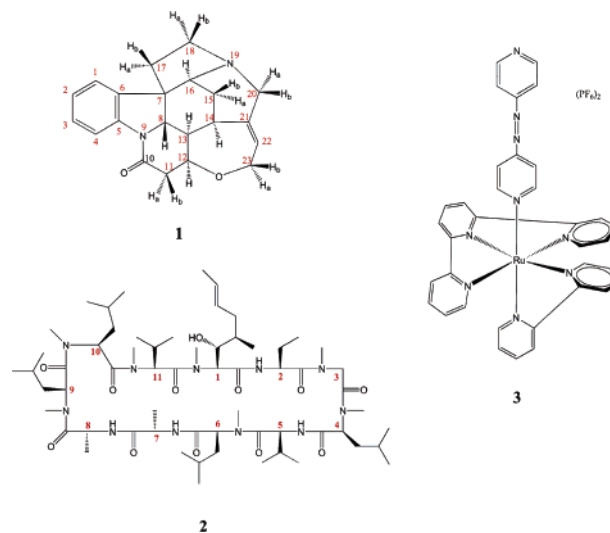
(9) Zaramella, S.; Heinonen, P.; Yeheskielyh, E.; Strömberg, R. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 7521.

(10) Csámpai, A.; Kövér, P.; Hajós, G.; Riedl, Z. *J. Mol. Struct.* **2002**, *616*, 73.

(11) (a) Simunek, P.; Bertolasi, V.; Macháček, V. *J. Mol. Struct.* **2002**, *642*, 41. (b) Claramunt, R. M.; López, C.; García, M. A.; Otero, M. D.; Torres, M. R.; Pinilla, E.; Alarcón, S. H.; Alkorta, I.; Elguero, J. *New J. Chem.* **2001**, *25*, 1061.

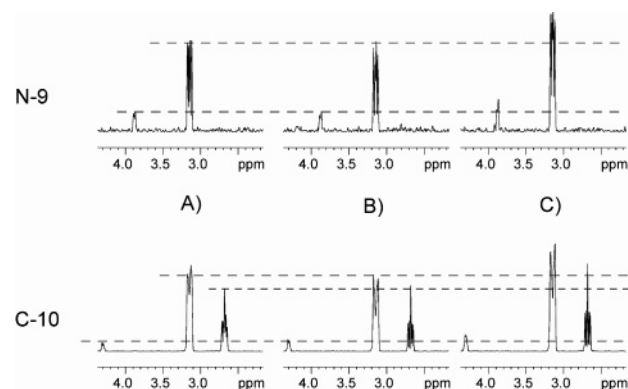
(12) (a) Satake, A.; Koshino, H.; Nakata, T. *J. Organomet. Chem.* **2000**, *595*, 208. (b) Anderberg, P. I.; Harding, M. M.; Luck, I. J.; Turner, P. *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 1365.

overall duration and pulse timing design, a minimum number of pulses, and easy setup protocols that yield clean C- and N-HMBC spectra in a very simple, automated way.<sup>13</sup> For example, CN-HMBC spectra were recorded on a natural product (the alkaloid strychnine, **1**), a cycloundecapeptide (cyclosporine, **2**), and an organometallic ruthenium(II) complex containing several nitrogen-multidentate ligands **3** (Figure 2).



**Figure 2.** Test nitrogen-containing molecules used in this study

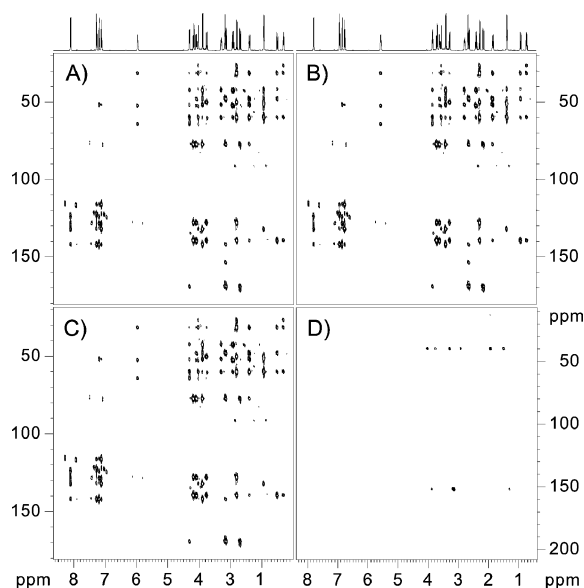
Similar signal-to-noise ratios are obtained when comparing the sensitivity of a single CN-HMBC spectrum (Figure 3B)



**Figure 3.** 1D row sections taken at C-10 (172 ppm) and N-9 (151 ppm) of **1**: (A) individual slices extracted from 2D C- and N-HMBC spectra acquired separately; (B) individual slices extracted from the 2D CN-HMBC spectrum acquired with the same number of scans as each individual HMBC experiment shown in A; (C) Individual slices taken from the 2D CN-HMBC spectra acquired with the same total measuring time as both spectra in A.

acquired with the same number of scans and with the same experimental time as each individual C- and N-HMBC

spectra acquired separately with the standard sequences (Figure 3A). This demonstrates that the CN-HMBC pulse sequence does not introduce additional drawbacks, and it works similarly to single-nucleus HMBC experiments in terms of sensitivity, relaxation, and effectiveness. The main advantage of the CN-HMBC experiment relies in its better sensitivity levels achieved per time unit because two different spectra are obtained simultaneously. Thus, assuming that  $N$  scans are needed for an individual C-HMBC and another additional  $N$  scans for the N-HMBC, a total of  $2N$  scans should be required to dedicate the same acquisition time for the simultaneous CN-HMBC experiment. In this way, a theoretical 41% signal-to-noise enhancement is expected to be reached. In practice, to separate the two types of responses found in the CN-HMBC experiment, two datasets are separately stored for each  $t_1$  increment with phase inversion of the first  $90^\circ$   $^{15}\text{N}$  pulse ( $N$  scans with  $\phi_1 = x$  (data A) and  $N$  scans for  $\phi_1 = -x$  (data B). After linear combination ( $A \pm B$ ), separate N- and C-HMBC spectra are obtained with an important sensitivity enhancement (compare parts A and C of Figure 3). The resulting CN-HMBC spectra are best presented in absolute value, and phase or baseline corrections are therefore not required after Fourier transformation.

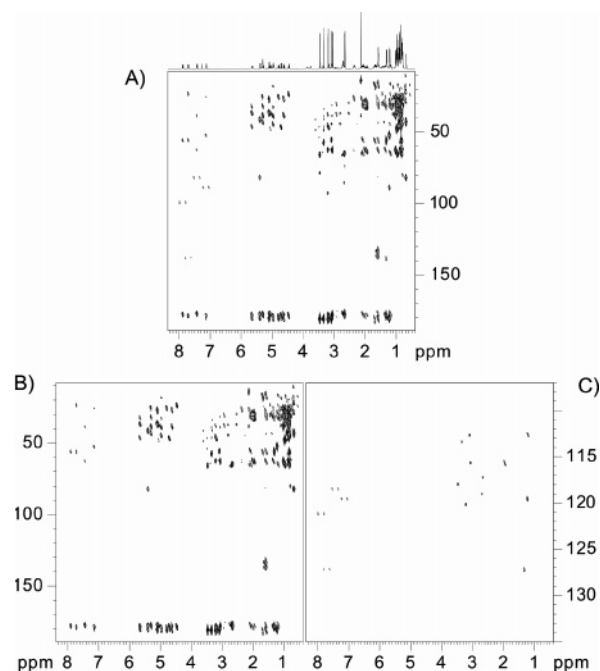


**Figure 4.** 2D CN-HMBC spectra of **1** showing the basic acquisition and processing steps followed in this work: (A, B) Two complementary datasets are acquired with relative phases  $\phi_1 = x$  and  $\phi_1 = -x$  respectively. Appropriate linear combinations ( $A \pm B$ ) followed by conventional processing provide the two separate (C) C-HMBC and (D) N-HMBC spectra with enhanced sensitivity as shown in Figure 3.

Figure 4A shows the corresponding CN-HMBC spectrum of **1** acquired with the same relative phases  $\phi_1 = x$  and  $\phi_2 = x$ . Although all long-range correlations to  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  are displayed, it is not possible to distinguish directly between such C- and N-cross-peaks. The acquisition of a complementary CN-HMBC data with relative phases  $\phi_1 = -x$  and

$\phi_2 = x$  affords a relative phase inversion of the  $N$  cross-peaks, although they are not visible from the corresponding magnitude-mode representation (Figure 4B). Addition and subtraction of these two time-domain data followed by the conventional data processing afford the separate clean C-HMBC and N-HMBC spectra (Figure 4C,D). Clearly, two nitrogen resonances belonging of the N-19 amine (40 ppm) and the N-9 amide (152 ppm) functional groups and their correlation peaks can be easily distinguished and assigned (Figure 4D).

Most of the experimental settings required to setup the CN-HMBC experiment follow similar arguments to the traditional HMBC experiment.<sup>14</sup> The initial evolution  $\Delta$  delay can be optimized to the same value for  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  (compromise values between 60–80 ms can be routinely used) because long-range  $J(\text{CH})$  and  $J(\text{NH})$  coupling constants present similar magnitudes which rarely exceed 10–15 Hz. A  $^{13}\text{C}$  low-pass  $J$  filter is recommended to avoid accidental overlapping and ambiguous interpretation due to the numerous direct  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  correlations due to  $^1J(\text{XH})$  in the resulting C-HMBC spectrum (Figure 5B). On the other

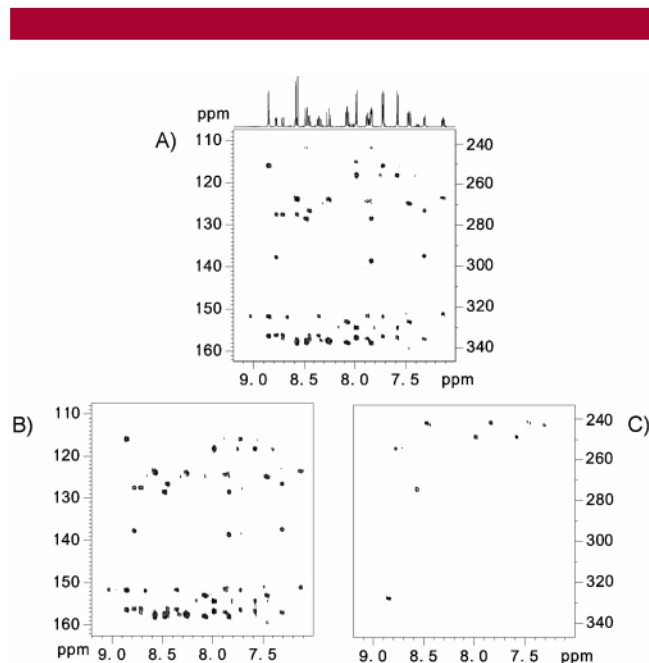


**Figure 5.** (A) Two-dimensional CN-HMBC spectrum of **2**. Separate  $^{13}\text{C}$ -HMBC (B) and  $^{15}\text{N}$ -HMBC (C) are obtained after proper time-domain data addition/subtraction, as described in Figure 4.

hand, the presence of direct NH cross-peaks resonating as doublets with a large splitting of about 90 Hz between 7 and 8 ppm in the N-HMBC spectrum (Figure 5C) helps to distinguish them from nonprotonated nitrogens and avoids the acquisition of a separate one-bond NH correlation spectrum. Furthermore, valuable two-bond correlations are also obtained for the seven nonprotonated nitrogens belong-

ing to *N*-methyl groups which provide a full  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , and  $^{15}\text{N}$  chemical shift assignment.

The CN-HMBC experiment can also find enormous interest to prove metal binding in organometallic chemistry. The diamagnetic  $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})(\text{azpy})](\text{PF}_6)_2$  complex where the central ruthenium atom is coordinated to several pyridinyl-containing multidentate ligands has been chosen as an example (Figure 6). The simultaneous information extracted



**Figure 6.** (A) Two-dimensional CN-HMBC spectrum of **3**. Separate  $^{13}\text{C}$ -HMBC (B) and  $^{15}\text{N}$ -HMBC (C) are obtained after proper time-domain data addition/subtraction, as described in Figure 4.

from both C-HMBC and N-HMBC data allows the complete chemical shift assignment of nine nonprotonated nitrogen atoms and six quaternary carbons. In particular, the knowledge of the  $^{15}\text{N}$  chemical shift is a sensitive reporter of the

(13) Compared to regular C- and N-HMBC schemes, the overall duration of the CN-HMBC sequence is only modified for  $^{13}\text{C}$  due to the  $t_1'$  period. For routine applications, a short  $\Delta t_1'$  increment is strongly recommended in order to have a large enough spectral width covering the large dispersion in  $^{15}\text{N}$  chemical shifts and to reduce the possible  $^{13}\text{C}$  signal losses by additional relaxation. Folding for  $^{15}\text{N}$  should be strongly avoided in the analysis of unknown structures because wrong chemical shift values could lead to wrong chemical interpretation.

(14) There are no special sample requirements to run CN-HMBC experiments, and the sensitivity is identical to that of the standard N-HMBC experiment. A triple-channel NMR system is the only hardware requirement.

local environment for a given nitrogen atom, and in this case, it is a clear experimental evidence of the presence of the N–Ru bond. This information allows us to distinguish between linked and nonlinked connectivities in multicoordinated N-ligands and also help us to confirm the presence of mononuclear or dinuclear species.<sup>15</sup> Five of the six pyridinyl nitrogens resonate in the 240–275 ppm region, whereas a non-Ru-linked nitrogen appears strongly deshielded at 330 ppm.

In conclusion, a robust “get 2/pay 1” approach has been introduced to obtain two complementary HMBC spectra with the time usually required to record only one. The simultaneous acquisition of C-HMBC and N-HMBC spectra affords improved sensitivity ratios than individual acquisitions without sacrificing spectral quality, keeping minimum acquisition and processing set-ups and allowing simple implementation in automated protocols. The CN-HMBC experiment will find a general applicability in the structural analysis of a wide range of nitrogen-containing chemical compounds of diverse nature, namely synthetic organic and organometallic compounds, natural products, peptides, and nucleotides. The combined use of simultaneous  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  data will also facilitate the development of improved computer-assisted structure elucidation protocols.<sup>16</sup> Of particular interest could be also the application of the CN-HMBC experiment to other heteronuclei allowing, for instance, simultaneous recording of  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$  ( $^{19}\text{F}$ ) HMBC spectra in organophosphorus or organofluorine compounds. Much work is in progress on the development of improved CN-HMBC sequences and their application to structural characterization of molecules at natural abundance.

**Acknowledgment.** This work was supported by MEC (Project No. CTQ2006-01080). P.N. thanks “Generalitat de Catalunya” for a predoctoral grant. We also thank W. Bermel (Bruker Biospin, Germany) for stimulating discussions and Prof. N. Katz (Univ. Nac. Tucumán, Argentina) for donating a sample of **3**.

**Supporting Information Available:** Experimental details and the program code (Bruker avance series) for the CN-HMBC pulse sequence described herein. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

OL062511H

(15) Katz, N.; Parella, T. Unpublished data.

(16) (a) Köck, M.; Junker, J.; Lindel, T. *Org. Lett.* **1999**, *16*, 241. (b) Blinov, K.; Elyashberg, M.; Martirosian, E. R.; Molodtsov, S. G.; Williams, A. J.; Tackie, A. N.; Sharaf, M. H. M.; Schiff, P. L., Jr; Crouch, R. C.; Martin, G. E.; Hadden, C. E.; Guido, J. E.; Mills, K. A. *Magn. Reson. Chem.* **2003**, *41*, 577.



\_\_\_\_\_ *conclusions* \_\_\_\_\_

## 17.- Conclusions

Com a comentari final d'aquesta tesi doctoral cal remarcar que l'**objectiu general** al iniciar el present treball d'investigació; **el desenvolupament de noves metodologies (seqüències de pulsos) per a l'elucidació estructural de compostos orgànics**, s'ha complert amb escreix, doncs, en la presenten tesi doctoral es presenten 30 noves seqüències (veure apèndix - CD). Es creu que l'aplicabilitat de les quals serà alta, si bé, aquest fet només es podrà corroborar amb el pas del temps, quan podrem veure si d'altres grups d'investigació utilitzen les noves seqüències proposades per dur a terme la seva recerca.

A l'hora de sintetitzar les conclusions aquestes han estat agrupades segons els tres conceptes següents:

*Publicacions I i II* => a) disseny i aplicació de seqüències amb HCP.

*Publicacions III i IV* => b) disseny i aplicació de seqüències amb S<sup>3</sup> basades en el HSQC

*Publicacions V, VI i VII* => c) disseny i aplicació de seqüències amb temps compartit (TS).

### a) Disseny i aplicació de seqüències amb HCP:

- El fet que el mecanisme de transferència de magnetització de la HCP és diferent del tradicional bloc INEPT pot portar a pensar en el disseny de noves metodologies.
- S'ha demostrat, tant teòricament com a la pràctica, que l'ús de la HCP en experiments de RMN en estat líquids gaudeix d'una gran versatilitat a l'hora de manipular la magnetització. Per exemple, s'ha demostrat que la HCP no només permet la transferència IP→IP sinó també la transferència IP→AP o AP→IP, entre d'altres.
- La selectivitat aconseguida utilitzant polarització creuada amb CW per a produir transferència de magnetització en el cas heteronuclear és superior a l'ús clàssic de pulsos selectius.
- S'ha dissenyat l'experiment IFSERF que permet la mesura acurada de constants d'acoblament entre protons químicament equivalents (*publicació I*).
- S'han proposat diferents experiments basats en el HCP-TOCSY que permeten la mesura de la magnitud i el signe de constants d'acoblament, tant hetero- com homonuclears, mitjançant la selecció d'estat de *spin* (*publicació II*).
- S'ha aconseguit editar totalment els senyals dels sistemes de *spin* I<sub>2</sub>S utilitzant HCP cosa que podria permetre assolir efectes TROSY en aquests sistemes de *spin*.

### b) Disseny i aplicació de seqüències S<sup>3</sup> basades en el HSQC:

- Les noves seqüències S<sup>3</sup> basades en el HSQC permeten la determinació acurada de la magnitud i el signe de constants d'acoblament. Totes elles es beneficien del guany de

sensibilitat donat per la metodologia PEP i de la bona dispersió de les senyals obtinguda en la dimensió indirecta.

- Les versions E.COSY-HSQC-TOCSY i TROSY-HSQC-TOCSY són útils per estudiar molècules amb un elevat nombre de sistemes de spin IS (CH, NH), com s'ha demostrat en el cas de treballar amb sucres i pèptids (*publicació III*).
- La versió E.COSY permet fer la mesura de J amb un sol experiment. La versió TROSY requereix l'enregistrament de dos experiments separats però és molt recomanable per evitar problemes de solapament.
- En totes aquestes versions l'addició d'un element de mescla planar després del TOCSY permet la mesura de constants d'acoblament homonuclears  $J_{HH}$ .
- S'ha dissenyat una nova estratègia, basada en la metodologia IPAP i amb un important guany en sensibilitat, que produeix l'editat  $S^3$  simultàniament per a les multiplicitats IS,  $I_2S$  i  $I_3S$  a la dimensió d'adquisició de l'experiment HSQC. S'ha anomenat F2-IPAP-HSQC (*publicació IV*).
- Una lleugera modificació de la seqüència permet la selecció de les diferents línies d'un multiplet en sistemes  $I_2S$ , amb màxima sensibilitat, mentre es manté l'editat  $S^3$  per les altres multiplicitats (IS,  $I_3S$ ).
- La versió F2-IPAP-HSQC-TOCSY permet la mesura de la magnitud i el signe de les  ${}^nJ_{XH}$  per a tots als sistemes de *spin* simultàniament (IS,  $I_2S$ ,  $I_3S$ ).

### c) Disseny i aplicació de seqüències amb temps compartit (TS):

- S'han dissenyat noves seqüències de detecció inversa amb evolució simultània de dues freqüències ( ${}^{13}C$  i  ${}^{15}N$ ) durant el mateix període (TS-HSQC, TS-HSQC-TOCSY, TS-HSQMBC i TS-HMBC)
- L'enregistrament simultani (però independent) dels espectres de  ${}^{13}C$  i  ${}^{15}N$  en un sol experiment permet l'assignació simultània dels desplaçaments químics de  ${}^1H$ ,  ${}^{13}C$  i  ${}^{15}N$ .
- Respecte els experiments estàndard, els guanys teòrics en sensibilitat que això comporta són del 41% per cada nucli (és a dir l'estalvi del 50% del temps). Experimentalment els guanys reals són del 41% per  ${}^{15}N$  i entre un 25% i un 35% per  ${}^{13}C$ .
- S'ha incorporat l'estratègia IPAP a les versions TS-HSQC i TS-HSQC-TOCSY el que permet extreure el signe i la magnitud de constants d'acoblament  $J_{CH}$  i  $J_{NH}$  simultàniament, directes o a llarga distància respectivament.
- L'experiment TS-HSQMBC també permet la mesura de  ${}^nJ_{CH}$  i  ${}^nJ_{NH}$  simultàniament amb el benefici que també s'extreuen aquells valors provinents de carbonis o nitrògens no protonats.

## 18.- Conclusions in English

I would finally like to remark that the **main general objective** of this thesis that was **the development of new NMR methodologies (pulse sequences) for the help in the structural elucidation of organic compounds**, has been well achieved in view of the fact that 30 new pulse sequences are presented in this report (see appendix –CD). The applicability of these novel sequences is expected to be high, although only the pass of the time will corroborate that.

Thesis conclusions are grouped in:

*Publications I and II* => a) design and application of sequences with HCP.

*Publications III and IV* => b) design and application of S<sup>3</sup> sequences based on HSQC.

*Publications V, VI and VII* => c) design and application of time shared sequences (TS).

### **a) Design and application of sequences with HCP:**

- The different behaviour of magnetization transfer when using HCP or the classic INEPT give us new tools when designing new NMR pulse sequences.
- The use of HCP in liquid samples, as predicted theoretically, takes advantage of the high versatility when manipulating magnetization transfer. Thus, throughout this thesis dissertation, has been shown that HCP not only achieve IP -> IP transfer, but also other types like for example an IP -> AP transfer or AP -> IP, among others.
- In the design of new 1D selective NMR pulse sequences, the selectivity achieved using continuous wave irradiation for HCP transfer has been better than the achieved using shape pulses.
- The new IFSERF experiment allows the accurate measurement of JHH between chemically equivalent protons (*publication I*).
- Several designs of HCP-TOCSY like experiments has been designed for the accurate measurement of the sign and magnitude of hetero- and homonuclear coupling constants via the spin state selective strategy (*publication II*).
- It has been achieved the total spectral editing in I<sub>2</sub>S spin systems using a sequence fully designed with HCP blocks. That could be used to observe TROSY effects in such spin systems.

### **b) Design and application of S<sup>3</sup> sequences based on HSQC:**

- The new S<sup>3</sup> methodologies based on the HSQC experiment herein presented allow the accurate determination of the sign and magnitude of coupling constants. These sequences take the advantage of the PEP strategy and the high signal dispersion given by the indirect dimension.

- E.COSY-HSQC-TOCSY and TROSY-HSQC-TOCSY versions have been proved to be very useful when measuring  ${}^nJ_{XH}$  ( $X=^{13}\text{C}, {}^{15}\text{N}$ ) in molecules with a great number of IS spin systems, as carbohydrates and peptides (publication III).
- E.COSY version allows us to extract  ${}^nJ$  values in a single experiment, whereas the TROSY version requires two data sets (requiring twice the time). However, when having overlapping problems, it is recommended the use of TROSY versions.
- In all those pulse sequences the addition of a planar mixing element after TOCSY allows us to measure homonuclear coupling constants ( $J_{HH}$ ).
- A new S3 editing strategy, based on the IPAP methodology, has been proposed for the simultaneous editing of IS,  $I_2S$ , and  $I_3S$  multiplicities in the acquisition dimension of the HSQC experiment. It has been called F2-IPAP-HSQC experiment (publication IV).
- A simple pulse sequence modification in the F2-IPAP-HSQC experiment allows the full different line selection in  $I_2S$  spin systems with maximum sensitivity while maintaining the  $S^3$  editing for the other multiplicities (IS and  $I_3S$ ).
- The new sequence F2-IPAP-HSQC-TOCSY allows to measure  ${}^nJ_{XH}$  for all the multiplicities simultaneously (IS,  $I_2S$  and  $I_3S$ ).

### **c) Design and application of sequences with time shared (TS):**

- New 2D sequences with simultaneous evolution of two frequencies ( $^{13}\text{C}, {}^{15}\text{N}$ ) during the same time (TS) have been developed: TS-HSQC, TS-HSQC-TOCSY, TS-HSQMBC and TS-HMBC. Sequences have been designed trying to minimize the number of pulses and delays.
- In a single experiment those sequences allow to record simultaneously (but independently) the  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  spectra.
- Compared to the standard experiments, the theoretical gains in sensitivity are increased by 41% for each nucleus (with a 50% of time saved). Experimentally the real gains are 41% for  $^{15}\text{N}$  and in the range of 25-35% for  $^{13}\text{C}$ . The methodology sensitivity limits are governed by the low sensitivity of  $^{15}\text{N}$  compared to  $^{13}\text{C}$ .
- The IPAP strategy in TS-HSQC and TS-HSQC-TOCSY experiments has been introduced. That allows to extract the sign and magnitude of  $J_{CH}$  and  $J_{NH}$  simultaneously.
- The experiment TS-HSQMBC allows the simultaneous measurement of  ${}^nJ_{CH}$  and  ${}^nJ_{NH}$  with the benefit that also coupling values from non protonated heteronuclei can be extracted.