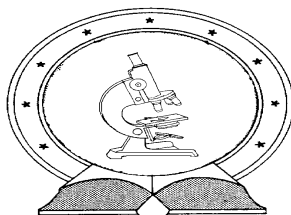


DE TTK



1949

**MÁGNESES MAGREZONANCIA (NMR) MÓDSZEREK
TOVÁBBFEJLESZTÉSE SZÉLESSÁVÚ HOMONUKLEÁRIS
PROTONLECSATOLÁS BEÉPÍTÉSÉVEL**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Timári István

Témavezető: Dr. E. Kövér Katalin, egyetemi tanár

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács

Kémia Doktori Iskola

Debrecen, 2016.

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács Kémia Doktori Iskola Szénhidrátok és Heterociklusok Kémiája és Kémiai Biológiája programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2016. június 23.

a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy Timári István doktorjelölt 2012-2015. között a fent megnevezett Doktori Iskola Szénhidrátok és Heterociklusok Kémiája és Kémiai Biológiája programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2016. június 23.

a témavezető aláírása

MÁGNESES MAGREZONANCIA (NMR) MÓDSZEREK TOVÁBBFEJLESZTÉSE SZÉLESSÁVÚ HOMONUKLEÁRIS PROTONLECSATOLÁS BEÉPÍTÉSÉVEL

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a kémia tudományágban

Írta: Timári István, okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Kémia Doktori Iskolája
(Szénhidrátok és heterociklusok kémiája és kémiai biológiája program) keretében

Témavezető: Dr. E. Kövér Katalin, egyetemi tanár

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr.
tagok: Dr.
Dr.

A doktori szigorlat időpontja: 2016.

Az értekezés bírálói:

Dr.
Dr.
Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.
tagok: Dr.
Dr.
Dr.
Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 2016.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Őszintén köszönöm témavezetőmnek, *Dr. E. Kövér Katalin* egyetemi tanárnak, hogy bevezetett az NMR spektroszkópia izgalmas világába, és a közös munka során számtalan dologra megtanított. Az elmúlt évek folyamán bármikor fordulhattam hozzá, ha tanácsra, támogatásra volt szükségem, mindig jószívvel segített.

Köszönettel tartozom az *NMR Kutatólaboratórium minden tagjának*, hogy baráti légkört biztosítottak a mindennapokban. Külön köszönetemet szeretném kifejezni *Dr. Szilágyi László* professzor emeritusnak és *Dr. Batta Gyula* egyetemi tanárnak, hogy mindvégig figyelemmel kísérték munkámat, és szívesen segítettek, ha kérdések merültek fel bennem. Köszönöm *Dr. Illyés Tünde Zitának* és *Balla Sárának* mindenkori biztatásukat, és a laboratóriumban nyújtott segítségüket. Köszönöm *Hadháziné Raics Mária*, *Fizil Ádám*, *Gyöngyösi Tamás PhD* hallgatóknak illetve *Nagy Tamás Milán* diplomamunkás hallgatónak szakmai besegítéseiket, és a baráti beszélgetéseket.

Köszönet illeti *Prof. Christina M. Thiele*, *Lukas Kaltschnee* és *Dr. Andreas Kolmer* darmstadti, *Prof. Gareth A. Morris*, *Dr. Ralph W. Adams*, *Dr. Király Péter* és *Dr. Mathias Nilsson* manchesteri, illetve *Prof. Dusan Uhrin* edinburghi együttműködő partnereinket az érdekes és eredményes közös munkáért.

Hálával gondolok *Dr. Borbás Anikó* egyetemi tanárra, *Dr. Herczeg Mihály* tanársegédre, *Dr. Keglevich György* egyetemi tanárra és *Dr. Bagi Péter* posztdoktorra az NMR módszerfejlesztéseinkhez szolgáltatott, szintetikus vegyületek kapcsán.

Köszönöm *Dvortsák Péternek* és *Dr. Wolfgang Bermelnek* a valós idejű adatgyűjtési stratégiát alkalmazó impulzusszekvenciák implementálásában nyújtott segítségüket illetve *Ecsedi Kornélnak*, hogy számítástechnikai kérdéseimre mindig választ adott.

Köszönetemet fejezem ki a rövidebb-hosszabb folyosói, konyhai diszkuszióért a *Kémiai Intézet érintett munkatársainak*.

Őszintén köszönöm a *Richter Gedeon Nyrt. Talentum Alapítványának*, hogy doktori képzésem során négy éven keresztül ösztöndíjat biztosított számomra. Köszönöm a *Nemzeti Kiválóság Program (TÁMOP 4.2.4/A/2-11-1-2012-0001)* és a *Campus Hungary Program (TÁMOP-4.2.4B/2-11/1-2012-0001)* nyújtotta ösztöndíjakat. Köszönet illeti a *TÁMOP-4.2.2/A-11/1/KONV-2012-0025* és *OTKA K 105459* azonosítószámú pályázatokat kutatásaink anyagi támogatásáért.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm családomnak és barátaimnak – külön kiemelve *szüleimet*, *testvéreimet* és *páromat* – folyamatos szeretetüket, és azt, hogy mindig bátorítottak, mellettem álltak, és erőn felül támogattak az elmúlt évek során.

Doktori disszertációmát szeretném *nagyszüleim* emlékének ajánlani.

TARTALOMJEGYZÉK

Az értekezésben előforduló rövidítések magyarázata.....	1
1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK.....	3
2. IRODALMI ELŐZMÉNYEK.....	6
2.1. Szelektív és sávszelektív homonukleáris lecsatolás	6
2.2. Szélessávú homonukleáris lecsatolás	7
2.2.1. <i>J</i> -feloldott kísérletek	7
2.2.2. Konstans idejű módszerek	9
2.2.3. „Idő megfordításos” (Time reversal) kísérlet.....	10
2.2.4. Anti z-COSY kísérlet.....	11
2.2.5. BIRD módszer	12
2.2.6. Zangger-Sterk módszer	15
2.2.7. PSYCHE módszer.....	20
2.3. Adatgyűjtési stratégiák.....	23
2.3.1. Interferogram-típusú adatgyűjtés	24
2.3.2. Valós idejű, kapuzott adatgyűjtés	26
3. KÍSÉRLETI RÉSZ.....	30
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	32
4.1. HSQC módszer továbbfejlesztése	32
4.1.1. Interferogram-típusú szélessávú protonlecsatolás megvalósítása HSQC kísérletben.....	33
4.1.2. Valós idejű szélessávú protonlecsatolás megvalósítása HSQC kísérletben	42
4.2. Egykötéses heteronukleáris csatolási állandók meghatározására alkalmas CLIP/CLAP-HSQC módszer továbbfejlesztése	48
4.2.1. Interferogram-típusú szélessávú protonlecsatolás megvalósítása CLIP/CLAP-HSQC kísérletekben	49
4.2.2. Valós idejű szélessávú protonlecsatolás megvalósítása CLIP/CLAP-HSQC kísérletekben	58
4.3. Szélessávú protonlecsatolt CPMG-HSQMBC módszerek kifejlesztése többkötéses heteronukleáris csatolási állandók meghatározására	68
4.3.1. Zangger-Sterk-típusú szélessávú protonlecsatolás megvalósítása CPMG-HSQMBC kísérletben	69
4.3.2. PSYCHE-típusú szélessávú protonlecsatolás megvalósítása CPMG-HSQMBC kísérletben.....	82
5. ÖSSZEFOGLALÁS	90

6. SUMMARY	94
7. IRODALOMJEGYZÉK	98
8. FÜGGELÉK	105
8.1. Impulzusszekvencia programok	105
8.1.1. Interferogram-típusú szélessávú protonlecsatolt HSQC	105
8.1.2. Valós idejű szélessávú protonlecsatolt HSQC	109
8.1.3. Interferogram-típusú szélessávú protonlecsatolt CLIP-HSQC	114
8.1.4. Interferogram-típusú szélessávú protonlecsatolt CLAP-HSQC	118
8.1.5. Valós idejű szélessávú protonlecsatolt CLIP-HSQC	121
8.1.6. Valós idejű szélessávú protonlecsatolt CLAP-HSQC	127
8.1.7. Interferogram-típusú, Zangger-Sterk szélessávú protonlecsatolt CPMG- HSQMBC	132
8.1.8. Valós idejű, Zangger-Sterk szélessávú protonlecsatolt CPMG-HSQMBC ..	135
8.1.9. Interferogram-típusú, PSYCHE szélessávú protonlecsatolt CPMG-HSQMBC	140
8.2. Tudományos publikációk	144

Az értekezésben előforduló rövidítések magyarázata

1D	Egydimenziós (<i>one Dimensional</i>)
2D	Kétdimenziós (<i>two Dimensional</i>)
AQ	Adatgyűjtési idő (<i>Acquisition time</i>)
ASAP	Szomszédos átmenetek megosztásán alapuló gyorsítás (<i>Acceleration by Sharing Adjacent Polarization</i>)
BASHD	Sávselektív homonukleáris lecsatolás (<i>BAnd-Selective Homonuclear Decoupling</i>)
BIRD	Bilineáris forgatási lecsatolás (<i>Bilinear Rotation Decoupling</i>)
CLAP	Tiszta ellentétes fázisú (<i>CLean Anti-Phase</i>)
CLIP	Tiszta azonos fázisú (<i>CLean In-Phase</i>)
COB	Csatolásokra, besugárzási frekvenciától való távolságokra, B_1 tér inhomogenitásokra optimalizált (<i>Couplings, Offsets, B_1-field inhomogeneities optimized</i>)
COSY	Korrelációs spektroszkópia (<i>CORrelation Spectroscopy</i>)
CPD	Kompozit impulzusok általi lecsatolás (<i>Composite Pulse Decoupling</i>)
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
CTP	Koherencia átviteli út (<i>Coherence Transfer Pathway</i>)
DIPSI	Skaláris kölcsönhatások jelenlétében történő lecsatolás (<i>Decoupling In Presence of Scalar Interactions</i>)
DOSY	Diffúziókontrollált spektroszkópia (<i>Diffusion-Ordered Spectroscopy</i>)
FID	Szabad indukciós jel (<i>Free Induction Decay</i>)
HMBC	Többkötéses heteronukleáris korreláció (<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>)
HMQC	Heteronukleáris többkvantum korreláció (<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>)
HOBS	Sávselektív homonukleáris lecsatolás (<i>HOmodecoupled Band-Selective</i>)
HSQC	Heteronukleáris egykvantum korreláció (<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>)
HSQMBC	Többkötéses heteronukleáris egykvantum korreláció (<i>Heteronuclear Single Quantum Multiple-Bond Correlation</i>)
INEPT	Kis érzékenységű magok érzékenységének javítása polarizáció-átvitellel (<i>Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer</i>)
IPAP	Azonos fázisú – ellenfázisú (<i>In-Phase Anti-Phase</i>)
MQ	Többkvantum (<i>Multiple Quantum</i>)
MQC	Többkvantum koherencia (<i>Multiple Quantum Coherence</i>)
MRI	Mágneses magrezonancia képalkotás (<i>Magnetic Resonance Imaging</i>)
NMR	Mágneses magrezonancia (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)

NOESY	Mag Overhauser-hatás spektroszkópia (<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>)
NUS	Nem lineáris mintavételezés (<i>Non-Uniform Sampling</i>)
PAF	Penicillium antifungális fehérje (<i>Penicillium AntiFungal protein</i>)
PEP	Ekvivalens koherenciutak megőrzése (<i>Preservation of Equivalent Pathways</i>)
PFG	Térgradiens impulzus (<i>Pulse Field Gradient</i>)
PIP	Tiszta azonos fázisú (<i>Pure In-Phase</i>)
PS	Tiszta kémiai eltolódás (<i>Pure Shift</i>)
PSYCHE	Chirp impulzusok által létrehozott tiszta kémiai eltolódás (<i>Pure Shift Yielded by CHirp Excitation</i>)
RDC	Maradék dipoláris csatolás (<i>Residual Dipolar Coupling</i>)
ROESY	Forgó koordinátarendszerű mag Overhauser-hatás spektroszkópia (<i>Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy</i>)
S/N	Jel/zaj arány (<i>Signal to Noise Ratio</i>)
SE	Érzékenységnövelt (<i>Sensitivity Enhanced</i>)
SESAM	Félszelektív adatgyűjtés modulált (<i>SEmiSelective Acquisition Modulated</i>)
SQ	Egykvantum (<i>Single Quantum</i>)
SQC	Egykvantum koherencia (<i>Single Quantum Coherence</i>)
SW	Spektrális ablak (<i>Spectral Width</i>)
TD	Időtartomány (<i>Time Domain</i>)
TOCSY	Teljes korrelációs spektroszkópia (<i>Total Correlation Spectroscopy</i>)
TROSY	Transzverzális relaxáció optimalizált spektroszkópia (<i>Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy</i>)
ZQ	Zéruskvantum (<i>Zero Quantum</i>)
ZQC	Zéruskvantum koherencia (<i>Zero Quantum Coherence</i>)
ZQF	Zéruskvantum szűrő (<i>Zero Quantum Filter</i>)
ZS	Zangger-Sterk

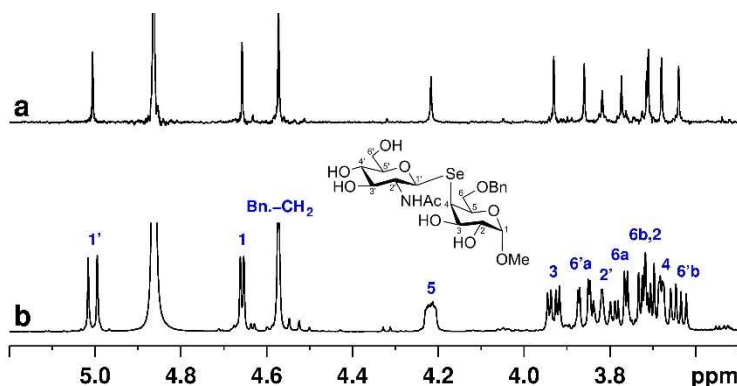
1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK

A mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia az egyik leghatékonyabb eszköz molekulák szerkezetének, dinamikai jellemzőinek és egymással való kölcsönhatásának vizsgálatára, ennek köszönhetően napjainkra egy rendkívül széleskörűen használt módszerré vált a legtöbb kémiai tudományterületen és a szerkezeti biológiában egyaránt. Ahhoz, hogy megbízható információt kapjunk NMR méréseinkből, jó minőségű spektrumokra van szükségünk. A jel-zaj arány (érzékenység) és a felbontás az a két paraméter, amely leginkább meghatározza egy NMR spektrum minőségét. Az utóbbi két évtizedben az elektronikai fejlesztéseknek, az egyre nagyobb terű mágnesek készítésének és a hűtött mérőfejek bevezetésének köszönhetően több, mint egy nagyságrenddel nőtt az NMR mérések érzékenysége. Ezzel ellentétben a spektrális felbontás hozzávetőlegesen csak a kétszeresére növekedett, ha a jelenleg és a 20 évvel ezelőtt elérhető legnagyobb terű mágneseket vesszük összehasonlításunk alapjául. Azaz továbbra is nagy szükség mutatkozik olyan NMR módszerek kidolgozására, amelyek képesek növelni a felbontást.

Ugyan a spin-spin csatolás^{1,2} az egyik legfontosabb, szerkezeti információt hordozó NMR jelenség, de a hatására létrejövő vonalfelhasadások jelentősen bonyolítják a spektrumokat, csökkentik a felbontásukat, jelátfedéseket eredményeznek, és ezáltal gyakran megnehezítik a kémiai eltolódások és/vagy a csatolási állandók meghatározását. Emiatt az NMR spektroszkópusok a kezdetektől fogva próbálnak olyan módszereket kidolgozni, amelyek képesek megszüntetni a spin-spin csatolás hatását.³ Napjainkra már rutinszerűvé vált egy, csak szingulett jeleket tartalmazó ¹³C spektrum felvétele a detektálás alatt alkalmazott szélessávú protonlecsatolásnak köszönhetően.⁴ Azonban ez a típusú megoldás nem használható a homonukleáris csatolások okozta vonalfelhasadások megszüntetésére, ugyanis ebben az esetben a detektálni kívánt átmenetek is telítődnének. Természetes izotópgyakoriságú minták ¹³C spektrumának mérésekor nincs szükség homonukleáris lecsatolásra (mivel a ¹³C-¹³C csatolt dublettek – 1%-nál kisebb intenzitásuk miatt – beleolvadnak a zajszintbe), azonban más a helyzet protondetektálású kísérletek esetén, illetve ¹³C-jelzett vegyületek ¹³C spektrumának rögzítésekor.

Jelátfedésekből származó problémákkal leggyakrabban ¹H spektrumok esetén szembesülhetünk, ami egyrészt a korlátozott kémiai eltolódás tartománynak (~10-15 ppm), másrészt a proton-proton csatolások okozta kiterjedt felhasadásoknak köszönhető. Ezzel szemben egy szélessávú homonukleáris protonlecsatolt ¹H spektrumban – ahogy az 1. ábrán is látható – minden egyes multipllett szinguletté egyszerűsödik, aminek

számos előnye van. Egyrészt a spektrális felbontás jelentősen nő, a jelátfedések megszűnnek vagy minimálisra csökkennek, aminek kiemelt jelentősége van makromolekulák és többkomponensű rendszerek (pl. diasztereomer keverékek, reakciótermék-elegyek, metabolitok) spektrumainak kiértékelésénél. Másrészt a spektrumok egyszerűsödésével az adott kísérletben mérendő NMR paraméterek (pl. kémiai eltolódások, heteronukleáris csatolási állandók) meghatározása egyszerűbbé és pontosabbá válik. Harmadrészt az automata csúskeresés is hatékonyabb a szingulett jeleken, és ezáltal bonyolult spektrumok kiértékelése jelentősen gyorsítható.



1. ábra Szélessávú homonukleáris protonlecsatolt ^1H (a) és normál ^1H (b) NMR spektrum összehasonlítása

A potenciális előnyök miatt már az ezredforduló előtti évtizedekben is többféle módszert javasoltak a szélessávú homonukleáris protonlecsatolás megvalósítására.⁵⁻⁹ Mivel ezek mindegyike csak egy kétdimenziós spektrum indirekt dimenziójában alkalmazható, valamint többnyire bonyolult adatfeldolgozást igényel, és néhány közülük jelentős érzékenysévesztéssel is jár, így nem terjedtek el a gyakorlatban. Az utóbbi évek ötleteinek és fejlesztéseinek köszönhetően a szélessávú homonukleáris protonlecsatolás a reneszánszát éli.¹⁰⁻¹⁴ Az új módszerek egyik legnagyobb előnye, hogy többdimenziós, protondetektálású kísérletek direkt, akvizíciós dimenziójában is alkalmasak a jelek egyszerűsítésére és a felbontás növelésére.

2012-ben kutatócsoportunk is bekapcsolódott az NMR spektroszkópia ezen dinamikus fejlődő kutatási területébe, azzal a céllal, hogy megfelelő, szélessávú homonukleáris protonlecsatolást eredményező impulzusszekvencia-elemek beépítésével növeljük az irodalomból ismert NMR kísérletek teljesítőképességét. Ennek megfelelően munkánk során egyrészt célul tűztük ki olyan, szélessávú protonlecsatolt heteronukleáris korrelációs kísérletek kidolgozását, melyek megnövekedett felbontást eredményeznek,

és ugyanakkor könnyűvízes minták mérése esetén hatékony víznyomást biztosítanak. Másrészt egy- illetve többkötéses heteronukleáris csatolási állandók meghatározására alkalmas módszerek továbbfejlesztését terveztük szélessávú protonlecsatolás beépítésével. Célunk volt a kidolgozott kísérletek alkalmazása szénhidrátszármazékok heteronukleáris csatolási állandóinak mérésére.

A homonukleáris lecsatolás tudományterülete robbanásszerű fejlődésen ment keresztül az elmúlt években, és ez a felfelé ívelő periódus még jelen dolgozat írásakor is tart. Emiatt az általunk kidolgozott kísérletek említés és hivatkozás szintjén már az értekezés „Irodalmi előzmények” című részében is megjelennek, hogy az olvasó egy átfogóbb képet kaphasson e dinamikusán változó területről, és a lehető legvilágosabb legyen számára a témakörhöz történő, saját hozzájárulásunk. Eredményeinket dolgozatomban a kifejlesztett módszerek alkalmazási területei alapján három nagy csoportba osztva tárgyalom részletesen.

2. IRODALMI ELŐZMÉNYEK

2.1. Szelektív és sávselektív homonukleáris lecsatolás

Az NMR spektroszkópiában nem sokkal a skaláris spin-spin csatolás felfedezését^{1,2} követően megjelentek az első folyamatos besugárzáson alapuló, szelektív lecsatolást eredményező módszerek.¹⁵⁻¹⁷ Később a szelektív homonukleáris lecsatolást többdimenziós kísérletek indirekt dimenziójában is megvalósították¹⁸⁻²⁰ a t_1 evolúciós idő közepén elhelyezett szelektív impulzus segítségével, melynek köszönhetően a t_1 idő első felében kifejlődő skaláris csatolás a második részben refókuszálódik. Egyetlen rezonanciafrekvenciára szelektív impulzus helyett sávselektív impulzus is használható, ami egy adott frekvenciatartományban elhelyezkedő összes spinre hat. Ez olyan vegyületek esetén eredményes és hasznos, melyeknél a csatoló partnerek rezonanciajelei egymástól jól elkülönült régiókban helyezkednek el, ugyanakkor egy adott régióban sok jel található (pl. peptidek, fehérjék, nukleinsavak).²¹ Ernst és munkatársai megmutatták, hogy egy adott frekvenciatartományban lévő spineket le lehet csatolni a régió kívülről eső összes spintől a t_1 evolúciós idő közepén alkalmazott sávselektív és nem-szelektív 180° -os impulzusok kombinálásával.²² Ugyanis ebben az esetben a szelektív impulzus gerjesztési sávzélességében lévő spinekre összességében egy 360° -os forgatás hat, miközben a többi spint invertáljuk, és ezáltal lecsatoljuk.

A homonukleáris lecsatolás megoldása az akvizíciós, direkt dimenzióban bonyolultabb, ugyanis a detektálás alatti impulzusok kiadását össze kell hangolni az adatgyűjtéssel.²³ A lecsatoló rádiófrekvenciás teret felváltva kell használni a rádiófrekvenciás vevővel stroboszkópikus stílusban. Napjainkban a szelektív homonukleáris protonlecsatolást már rutinszerűen használják egyedi csatoló partnerek azonosítására és/vagy a spektrum részleges egyszerűsítésére. A módszert továbbfejlesztették több, kiválasztott jel besugárzását, és ezáltal lecsatolását egyszerre lehetővé tevő többfrekvenciás²⁴ vagy polikromatikus impulzusok²⁵ alkalmazásával. Hammarström és Otting 1994-ben megmutatta, hogy sávselektív homonukleáris lecsatolás is megvalósítható a direkt dimenzióban.²⁶ A SESAM (*SEmiSelective Acquisition Modulated*) módszer esetén egy sávselektív, G^3 inverziós impulzust kis darabokra osztanak, és stroboszkópikus módon alkalmazzák a rádiófrekvenciás vevő illetve a lecsatoló felváltva történő bekapcsolásával. A sávselektív lecsatolást ^1H és ^{13}C homolecsatolásra is használják többdimenziós NMR kísérletekben. Az utóbbi években újfajta megközelítéssel valósítottak meg sávselektív protonlecsatolást az akvizíciós,

direkt dimenzióban,²⁷⁻²⁹ melynek a részletesebb bemutatására a 2.3.2. alfejezetben térek majd vissza.

2.2. Szélessávú homonukleáris lecsatolás

Bár a biomolekuláris NMR területén a ¹³C homonukleáris lecsatolás nagy jelentőséggel bír,³⁰⁻³² amit az utóbbi évtizedben a ¹³C-detektálású módszerek fehérjék vizsgálatában való hasznossága és elterjedése³³⁻³⁵ tovább fokoz, ennek a részletes tárgyalása jelen doktori disszertáció keretein kívül esik, így a továbbiakban a ¹H homonukleáris lecsatolásra kívánok fókuszálni.

Az előző fejezetben összefoglalt, szelektív homonukleáris lecsatolást eredményező módszerek bizonyos szerkezetigazolási és -felderítési feladatokban rendkívül hasznosak, azonban nem alkalmasak arra, hogy egy vegyület teljes spektrumában megszüntessék a proton-proton csatolások okozta vonalfelhasadásokat. Ugyan Ernst és Primas egyik cikkükben már 1963-ban megfogalmazta,³ hogy egy gyakorló spektroszkópus számára ideális lenne, ha egyszerre meg tudná szüntetni az összes spin-spin csatolást, újabb 13 évet kellett az első olyan kísérletre várni, amivel – ha nem is közvetlenül – de sikerült teljes mértékben homonukleárisan lecsatolt ¹H spektrumot létrehozni.⁵ Ezt követően újabb és újabb módszereket fejlesztettek ki, de a mindennapi gyakorlatban is egyszerűen és jól használható kísérletek csak a 2010-es években jelentek meg.

Az elmúlt évtizedek alatt közölt, szélessávú homonukleáris protonlecsatolást eredményező módszereket elvüket tekintve két nagy csoportba lehet osztani. Az egyik csoportba soroltak a proton-proton csatolási evolúciót refókuszálják, a kémiai eltolódásit pedig változatlanul hagyják (BIRD,⁷ Zangger-Sterk,⁹ PSYCHE³⁶ módszerek), míg a másikba tartozók inkább szétválasztják a csatolási és a kémiai eltolódási evolúciót különbözőképpen „manipulálva” azokat (*J*-feloldott,⁵ konstans idejű,⁶ idő megfordításos,⁸ anti z-COSY³⁷ módszerek). Az említett kísérleteket külön-külön az alábbiakban mutatom be, az utóbbi csoporttal kezdve.

2.2.1. *J*-feloldott kísérletek

1976-ban Ernst és munkatársai közölték az első olyan módszert,⁵ ami szélessávú protonlecsatolt ¹H spektrumhoz vezet. A 90°-*t*₁/2-180°-*t*₁/2-FID(*t*₂) impulzusszekvencián alapuló 2D *J*-feloldott kísérletben a *t*₁ idő alatt csak csatolási

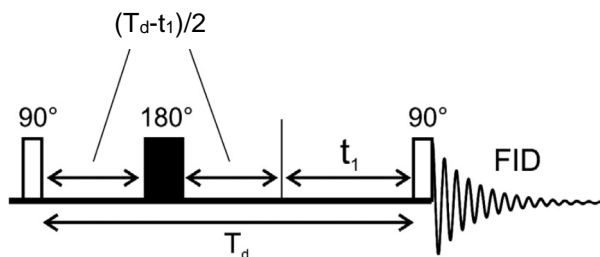
evolúció van, nettó kémiai eltolódási nincs, míg a detektálás alatt mindkettő működik. Ennek eredményeként a 2D spektrumban olyan döntött multipletteket kapunk, melyek 45° -os vetülete egy felhasadásokat nem tartalmazó („lecsatolt”) 1D spektrumot szolgáltat. Azonban egy 2D J -feloldott spektrumban a csúcsok bonyolult jelalakot mutatnak.³⁸ A jelek a t_1 függvényében fázismoduláltak, így 2D Fourier-transzformációt követően abszorpciós és diszperziós járulékokat egyaránt tartalmazó, kevert fázisú csúcsokat adnak, melyek 45° -os vetülete akár teljes jelkioltáshoz is vezethet. Emiatt a 45° -os leképezéshez a spektrum abszolút értékű változatát kell használni, ami viszont kiszélesedett, elnyúló csúcsokat eredményez a lecsatolt 1D spektrumban.¹⁴ A problémát számos megközelítéssel próbálták kiküszöbölni az elmúlt évtizedek során.

Egy pszeudo-echo használatával a FID diszperziós komponensei elnyomhatók,³⁹ és ennek következtében a 45° -os projekciót követően az izolált csúcsok abszorpciós jelalakot mutatnak. Az átfedéseket tartalmazó régiókban azonban továbbra is jeltorzulások észlelhetők, valamint a spektrum jel-zaj aránya is jelentősen csökken. Mivel a jelek intenzitása a jelszélességtől és a multiplett struktúrától is függ, ezért ez a pszeudo-echo típusú kísérlet nem használható kvantitatív célokra. Egy másik megközelítés szerint, a fázistorzult jelalak ismeretében illeszteni lehet az egyes csúcsokat egy mesterséges „fázistorzultási maszkkal”.⁴⁰ Meghatározva és felhasználva minden egyes fázistorzult jel frekvenciáját és intenzitását, illetve megfelelő jelszélességet és -alakot feltételezve, a diszperziós járulékok eltávolíthatók a 2D spektrumból és a kapott, tiszta abszorpciós spektrumból szedhetjük ki a 45° -os vetületet. Freeman és munkatársai különbözőképpen módosított 2D J -feloldott impulzusszekvenciákat dolgoztak ki (pl. trim vagy adiabatikus impulzust alkalmaztak) a diszperziós komponensek kiszűrésére.⁴¹⁻⁴⁵ A kísérletek eredményeként kapott csatolási mintázatokból alkalmas mintázatfelismerő algoritmussal a kémiai eltolódásokat meghatározva egy mesterségesen protonlecsatolt spektrumot lehet előállítani. A 2D J -feloldott spektrumnak egy másik processzási stratégiáját alkalmazva, az ún. FDM (*Filter Diagonalization Method*) módszer segítségével a nem Fourier-transzformált időfüggő adatkészletből szintén mesterséges tiszta kémiai eltolódás spektrum nyerhető.⁴⁶⁻⁴⁸ Nemrégiben egy újabb megközelítés látott napvilágot,⁴⁹ ami az ALPESTRE (*A Linear Prediction Estimation of Signal Time Reversal*) algoritmus segítségével időben visszafelé prediktál adatpontokat, amiket a kísérletek után fűzve egy olyan szimmetrikus FID-et kapunk, amelynek a közepe a legkisebb intenzitású. A FID közepén lévő adatot szinusz súlyfüggvény segítségével lehet felerősíteni, ami azonban érzékenységesvesztést okoz. Legutóbb Sakhai és Bermel közölt az előzőhöz hasonló elvű processzási sémát, amivel nagyobb érzékenységet lehet elérni.⁵⁰

Az előzőekben vázolt, számos új fejlesztés ellenére, ahhoz, hogy a 2D *J*-feloldott adatokból tiszta kémiai eltolódás („pure shift”) spektrumot kapjunk, mindenképpen valamilyen bonyolult adatfeldolgozást kell végezni. Ez egyrészt átfedő jelek esetén nem feltétlenül működik megfelelően, másrészt nem segíti a módszer rutinszerű alkalmazását.¹⁴ Mindemellett a 2D *J*-feloldott adatból az egyszerű, abszolútértékű processzálassal nyert protonlecsatolt ¹H spektrumot gyakran használják többkomponensű oldatok vizsgálatára, például a metabolomikában.⁵¹⁻⁵³ A megnövelt felbontás mellett további előnye a kísérletnek, hogy a spin-echo szekvencia miatt a gyors transzverzális (*T*₂) relaxációjú komponensek (pl. fehérjék) jelintenzitását csökkenti, és ezáltal kezeletlen vérplazma mintákban a kismolekulás metabolitok megbízhatóbb analízisét teszi lehetővé. A *J*-feloldott spektrumokból kinyert kvantitatív információkat azonban óvatosan kell kezelni, ugyanis a metabolitok intenzitása is skálázódik a *T*₂ relaxációs időknél megfelelően. A *J*-feloldott módszert olyan 2D kísérletekbe is beépítették, mint a HMQC,⁵⁴ DOSY⁵⁵⁻⁵⁷ és HMBC⁵⁸. Ezekben a kísérletekben, amelyek igazából 3D spektrumot szolgáltatnak, a *J*-feloldott dimenziót arra használják, hogy egy protonlecsatolt akvizíciós dimenziót kapjanak. A proton jelszélességet elsősorban a *J*-feloldott dimenzióban alkalmazott kísérletek (inkrementumok) száma határozza meg.

2.2.2. Konstans idejű módszerek

Szélessávú homonukleáris lecsatolásra csak az indirekt dimenzióban alkalmas, ún. konstans idejű módszert elsőként Bax és munkatársai írták le 1979-ben.⁶ Az impulzusszekvencia fő építőeleme ismét egy spin-echo, ami összességében végig állandó idejű marad (*T*_d) a 2D kísérlet során (2. ábra)⁵⁹ – innen kapta a nevét is a módszer – a *t*₁ időt viszont folyamatosan növeljük. A 180°-os impulzus megfordítja a kémiai eltolódási evolúció irányát, ugyanakkor nincs hatással a csatolásra. Amikor a *t*₁=0 a 180°-os impulzus a *T*_d közepén helyezkedik el, ezáltal a *T*_d alatt nincs nettó kémiai eltolódás evolúció. Viszont inkrementálva a *t*₁-et a 180°-os impulzus egyre közelebb kerül az első 90°-os impulzushoz, és távolodik a másodiktól, azaz a kémiai eltolódási evolúció függ a *t*₁-től. Ezzel ellentétben, bár van csatolási evolúció a *T*_d alatt, de az független a *t*₁-től, és így nincs *t*₁-től függő hatása a mért jel amplitúdójára.



2. ábra 2D konstans idejű COSY kísérlet impulzus szekvenciája.^{14,59} A fehér és fekete téglalapok 90° és 180° -os protonimpulzusokat reprezentálnak. A T_d idő állandó marad a t_1 inkrementálása során, csak a 180° -os impulzus tolódik.

A konstans idejű kísérlettel az indirekt (*FI*) dimenzióban protonlecsatolt, éles jeleket kapunk, ha elég sok kísérletet rögzítünk. A detektált mágnesezettség intenzitását a csatolási állandók és a T_d értéke határozza meg. A módszer hátránya, hogy a proton-proton skaláris csatolási állandó (J_{HH}), és ezáltal a konstans idejű kísérletben a csúcsok intenzitása, tág határok között változik egy adott molekulán belül is. Így előfordulhat, hogy bizonyos J_{HH} értékek esetében nem kapunk detektálható mágnesezettséget.¹⁴ Annak érdekében, hogy ezt elkerüljük, érdemes több spektrumot felvenni különböző konstans idő periódussal (T_d). A csatolási állandók különbözőségéből fakadó eltérő jelintenzitások miatt a konstans-idejű proton spektrumok nem alkalmasak kvantitatív kiértékelésre, és emiatt széleskörű alkalmazásuk elmaradt. Azt azonban meg kell itt említeni, hogy az egykötéses, skaláris ^{13}C - ^{13}C csatolási állandók sokkal egységesebbek voltak köszönhetően a konstans idejű megközelítés általános és fontos módszerre válhatott a felbontás növelésére ^{13}C -jelölt biomolekulák többdimenziós spektrumainak indirekt ^{13}C dimenzióiban.³⁰⁻³²

2.2.3. „Idő megfordításos” (Time reversal) kísérlet

Sørensen és szerzőtársai 1985-ben javasolták az ún. „idő megfordításos” (time reversal) kísérletet szélessávú homonukleáris lecsatolásra 2D spektrumok indirekt dimenziójában.⁸ Ebben a módszerben a t_1 evolúciós idő közepén tranziensenként különböző forgatási szögű impulzusokat használnak, és meghatározott számú tranziens összeadásával érik el a skaláris csatolási evolúció megfordítását. A cikkben a módszer alkalmazását egy indirekt (*FI*) dimenzióban lecsatolt NOESY kísérlet formájában mutatták be.⁸ Bár az idő megfordításos kísérletet több, mint harminc évvel ezelőtt írták le, a mai napig nem terjedt el igazán. Ennek valószínűleg az az oka, hogy meglehetősen kifinomult beállítást igényel. Ugyanis a különböző forgatási szögű impulzusok

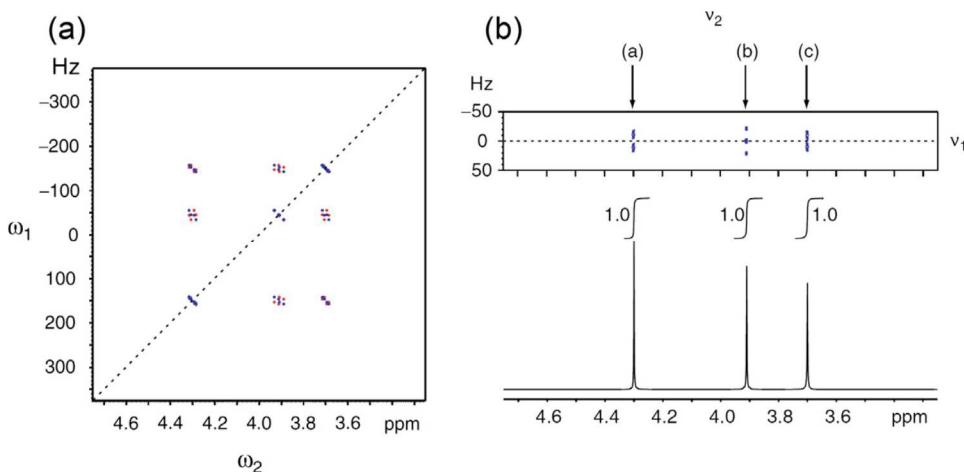
szükséges száma függ a csatoló partnerek számának maximumától, illetve az egyes adatkészleteket különféleképpen kell skálázni az összeadás előtt.¹⁴ A kísérlet jelentős érzékenységvesztéssel is jár, bár ez utóbbi majdnem az összes szélessávú homonukleáris lecsatolást eredményező módszerről elmondható.

2.2.4. Anti z-COSY kísérlet

A z-COSY és anti z-COSY kísérleteket Oschkinat és munkatársai fejlesztették ki azzal a céllal, hogy egyszerűsítsék a COSY spektrumokat, limitálva a koherencia átvitelt főként olyan szomszédos átmenetekre, amelyek közös energiaszinten osztoznak.⁶⁰ A z-COSY kísérlet esetén ezt úgy érték el, hogy a COSY második (keverő) 90° -os impulzusát egy β - t_z - β szekvenciaelemre cserélték, ahol β egy kis kibillentési szögű (20° vagy kisebb) impulzus, a t_z idő pedig z-szűrőként funkcionál. Az anti z-COSY kísérletben pedig ugyanazt a keverőimpulzust egy $(180^\circ+\beta)$ - t_z - β szekvenciaelemre cserélték. Ez utóbbi azt eredményezi, hogy 2D Fourier-transzformációt követően a diagonális csúcsok multipllett komponensei a diagonálisra merőlegesen jelennek meg a spektrumban. Keeler és munkatársai megmutatták, hogy az anti z-COSY spektrum diagonális csúcsainak antidiagonális multipllett karaktere kiaknázható egy szélessávú protonlecsatolt ^1H spektrum kinyerésére.³⁷ A diagonális csúcsok 45° -os vetülete ugyanis egy tiszta kémiai eltolódás spektrumot eredményez. Fontos, hogy a leképezéskor csak a diagonális csúcsokat használjuk, mivel a keresztcsúcsok antifázisú komponenseket is tartalmaznak, melyek artefaktumokat generálhatnak a lecsatolt spektrumban. Amint az a 3. ábrán is látható, kiszedve a diagonális régiót, elforgatva 45° -kal, majd levetítve a vízszintes tengelyre, megkapjuk a tiszta kémiai eltolódás spektrumot. A módszer nagy előnye, hogy a kapott 1D spektrum kvantitatív, viszont a jel-zaj aránya természetesen jelentősen kisebb, mint a klasszikus, nem lecsatolt spektrumé, ami elsősorban a kisszögű impulzusok számlájára írható.

Az anti z-COSY módszerrel elért szélessávú homonukleáris lecsatolás mutat némi hasonlóságot az idő megfordításos kísérlettel.¹⁴ Mindkét módszer esetén a csatoló partnerek populációinverziója nem 90° -os impulzusok alkalmazásával valósul meg. Amíg az idő megfordításos kísérlet a csatolási evolúció megfordítását különböző kibillentési szöggel felvett spektrumok megfelelő kombinációjával éri el, addig az anti z-COSY kísérlet kisszögű impulzusokat használ, amik csak olyan tagoknak adnak jelentős mágnesezettséget, melyekben a csatolási partner polarizációja fordított. Az anti z-COSY megközelítést kombinálták egy 2D DOSY impulzusszekvenciával, hogy egy

pszeudo-3D kísérlet formájában protonlecsatolást érjenek el az akvizíciós dimenzióban, illetve 1D T_1 relaxációs mérések kiolvasó kísérleteként is alkalmazták.³⁷



3. ábra Egy három spinrendszer szimulált 2D anti z-COSY spektruma (a), illetve a kiszedett, 45° -kal elforgatott diagonális és a vetülete (b).^{14,37} A szaggatott vonal jelöli a diagonálist. A kapott, lecsatolt 1D spektrum (b) kvantitatív.

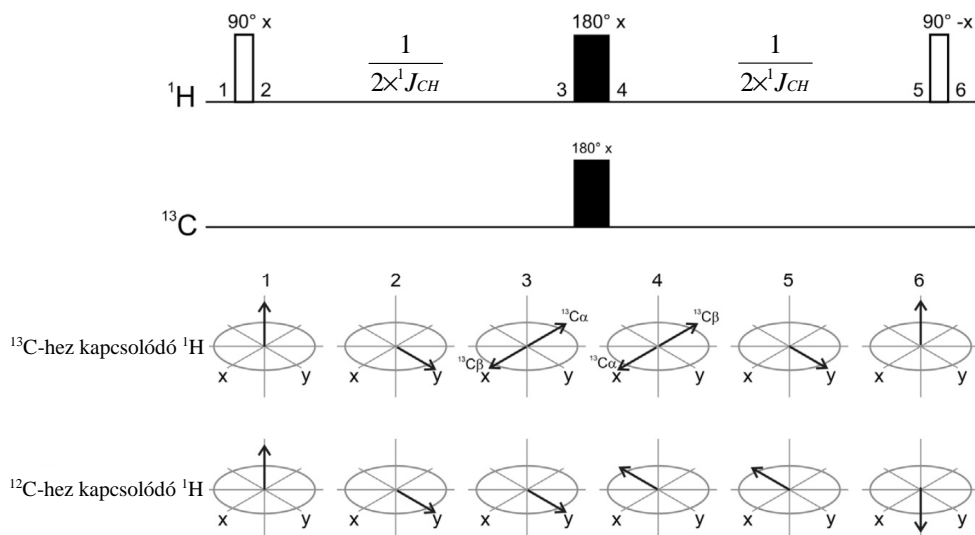
2.2.5. BIRD módszer

A 2.2. fejezet elején a szélessávú protonlecsatolást lehetővé tevő módszereket két csoportba osztottam. Az előző alfejezetekben (2.2.1-2.2.4.) azokkal a módszerekkel foglalkoztam, amelyek valamilyen spinmanipulációkkal szétválasztják a csatolási és a kémiai eltolódási evolúciót, és az esetek többségében csak egy 2D spektrum indirekt dimenziójában alkalmazhatók homonukleáris lecsatolásra. Ezen alfejezettel kezdődően térek át azon kísérletek (BIRD,⁷ Zangger-Sterk,⁹ PSYCHE³⁶) bemutatására, amelyek tényleges fizikai lecsatolást tesznek lehetővé, és többdimenziós spektrumok direkt, akvizíciós dimenziójában is használhatók szélessávú protonlecsatolásra. Ezek azok az impulzusszekvencia-elemek, amelyeket jelen doktori dolgozat anyagát képező módszerfejlesztéseink során mi is felhasználtunk, így tárgyalásukra kiemelt figyelmet fordítok. Közös jellemzőjük, hogy szelektíven képesek invertálni az ún. aktív spineket, a többi spinre (passzív spinek) pedig nem hatnak. Az aktív spinek azok, amelyek az észlelt, lecsatolt jelet szolgáltatják, míg a passzívok a lecsatolandó, nem detektált spinek. A protonlecsatolás eléréséhez a szelektív inverziót biztosító elemet kombinálni kell egy nem-szelektív 180° -os impulzussal. Ezáltal az aktív spinekre összességében egy 360° -os forgatás hat, azaz nem történik velük lényegében semmi, míg a passzívokra egy 180° -

os, azaz invertálódnak. Ez egyrészt az aktív spinek folyamatos kémiai eltolódási evolúcióját, másrészt az aktív és passzív spinek közötti proton-proton csatolási evolúció refókuszálódását eredményezi. Már itt érdemes megemlíteni, hogy az aktív spinek száma általában sokkal kevesebb, mint a passzívaké, ami érzékenységmentesítést von maga után, de ennek a konkrét mértékét mindig az adott típusú kísérletben célszerű megvizsgálni.

Az egyik, szelektív 180° -os forgatásra alkalmas impulzusszekvencia-elem a Garbow és munkatársai által kifejlesztett BIRD (*Bilinear Rotation Decoupling*) modul.⁷ A BIRD blokk (4. ábra) az impulzusok fázisaitól függően⁶¹ vagy szelektíven invertálja a ^{13}C izotóphoz közvetlenül, egy kémiai kötéssel kapcsolódó protonokat, miközben a ^{12}C izotóphoz kapcsolódókra nem hat (BIRD^d típus), vagy pedig a ^{13}C izotóphoz közvetlenül kapcsolódó protonokra nincs hatással, miközben a ^{12}C izotóphoz kapcsolódókat invertálja (BIRD^f típus). A módszer két tény miatt képes ilyen izotópszelekcióra. Egyrészt azért, mert egy természetes izotópgyakoriságú molekulában a legtöbb CH proton ^{12}C izotóphoz kapcsolódik, és csak egy 1,1 %-os hányada kötődik ^{13}C -hoz. Másrészt pedig azért, mert az egykötéses ($^1J_{\text{CH}}$) és a többkötéses ($^nJ_{\text{CH}}$) proton-szén csatolási állandók értékében több, mint egy nagyságrendnyi különbség van.

A 4. ábra vektorrepresentációján a ^{13}C -hez illetve a ^{12}C -hez kapcsolódó protonok mágnesezettségeinek BIRD^f impulzusszekvencia ideje alatti változásait követhetjük nyomon.¹⁴ A 90° -os proton gerjesztést követően a ^{13}C -hez kötődő protonok egykötéses proton-szén csatolási evolúciója megkezdődik, míg a közvetlenül ^{12}C -hez kötődő protonok esetén a csatolási evolúció hatása elhanyagolható. A spin-echo szekvencia végére a ^{13}C -hez kapcsolódó protonok mágnesezettsége 180° -os „csúszásban” (fáziseltolódásban) van a ^{12}C -hez kapcsolódó protonokéhoz képest. A végső -x irányú 90° -os protonimpulzus a ^{13}C -hez kötődő protonokat a +z irányba, a ^{12}C -hez kötődő protonokat pedig a -z irányba forgatja. Azaz a szekvencia végére a ^{13}C -hez kapcsolódó protonok visszatérnek kiindulási helyzetükbe, míg a ^{12}C -hez kapcsolódó protonok invertálódnak. Ehhez képest a BIRD^d szekvenciában annyi a különbség, hogy az utolsó 90° -os protonimpulzus +x irányú, ami a ^{13}C -hez kötődő protonokat a -z irányba, a ^{12}C -hez kötődő protonokat pedig a +z irányba forgatja, azaz a BIRD^f-hez képest éppen ellentétes végeredményt kapunk.



4. ábra¹⁴ Felül a BIRD^r impulzus szekvencia-elem sematikus megjelenítése látható, ami a ^{13}C izotóphoz közvetlenül kapcsolódó protonokra lényegében nincs hatással, miközben a ^{12}C izotóphoz kapcsolódókat invertálja. Alul a vektor modell segítségével a szekvencia ideje alatt a ^{13}C -hez illetve a ^{12}C -hez kötődő protonok mágnesezettségének változását követhetjük nyomon. Számok (1-6) mutatják, hogy az adott reprezentáció a szekvencia mely részére vonatkozik. A kapcsolódó ^{13}C mag spinállapota is jelölve van, ahol ez releváns.

Mint ahogy láthattuk, a BIRD^r modul önmagában képes a passzív spinek (a közvetlenül ^{12}C izotóphoz kapcsolódó protonok) invertálására, azonban a BIRD^d elem kombinálva egy nem-szelektív 180° -os protonimpulzussal a gyakorlatban jobb protonlecsatolást eredményez, emiatt általában ez utóbbi megoldást használják napjainkban.^{62,63} A spinek akkor viselkednek az elméletileg várt és bemutatott módon a BIRD impulzusblokk alatt, ha az impulzusok közötti idő $1/(2 \times ^1J_{CH})$ -val egyenlő. A gyakorlatban általában kompromisszumot kell kötni ezen idő beállításakor, mert egy adott molekulában nem teljesen egyformák az egykötéses heteronukleáris csatolási állandók. Azonban a legtöbb esetben a tökéletlen forgatásokból eredő hibák nem okoznak figyelemre méltó artefaktumokat a lecsatolt spektrumokban.¹³

A BIRD módszer egyik legnagyobb előnye, hogy a szorosan csatolt ^1H spinrendszerek ^{13}C izotópméren értelmezve általában gyengén csatoltakká válnak, ugyanis az egykötéses heteronukleáris csatolás elmozdítja a ^{13}C -hoz kapcsolódó protonok rezonanciajeleit $\pm ^1J_{CH}/2$ -vel. Ezáltal szoros csatolásokat tartalmazó, klasszikus ^1H spektrum gyakran olyan BIRD-lecsatolt spektrumot ad, ami mentes minden szoros csatolásból adódó, zavaró járuléktól.⁶² A BIRD-lecsatolás további pozitív tulajdonsága, hogy kvantitatív tiszta kémiai eltolódás spektrumot eredményez.

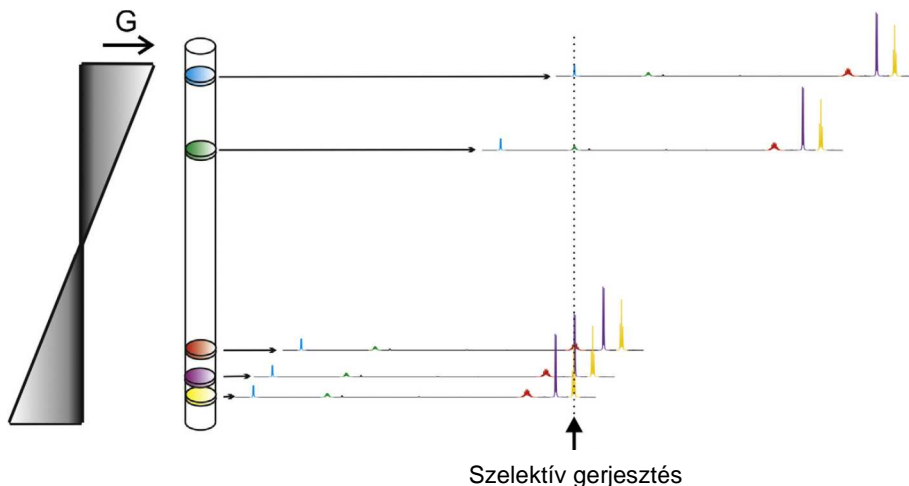
A ^{13}C izotóp kis természetes gyakorisága miatt (kb. 1,1 %) a BIRD-típusú lecsatolás jelentős érzékenységvesztéssel jár. Azonban azt sem szabad elfelejteni, hogy ez a tulajdonság szükséges ahhoz, hogy izotópszelektív gerjesztést tudjunk megvalósítani. Másik oldalról megközelítve, teljesen ^{13}C -jelzett vegyületek esetén a BIRD nem alkalmas protonlecsatolásra. Ugyanakkor a BIRD-típusú lecsatolás egykötéses heteronukleáris kísérletek (pl. HSQC) esetén nem okoz további érzékenységvesztést, hiszen ezekben eleve csak a ^{13}C -hez kapcsolódó protonokat detektáljuk. Emiatt az utóbbi években több BIRD protonlecsatolt HSQC-típusú kísérletet fejlesztettek ki, melyek széleskörű felhasználási lehetőségeit mutatták be szerves kismolekulák jelhozzárendelésében,⁶³⁻⁶⁵ egykötéses heteronukleáris és maradék dipoláris csatolási állandók meghatározásában,^{65,66} illetve enantiomerek megkülönböztetésében.⁶⁷ A BIRD fizikai elvéből adódó korlát, hogy a diasztereotóp hidrogének közötti geminális proton-proton csatolás elnyomására nem alkalmas a módszer, mert nem tud különbséget tenni az ugyanazon ^{13}C maghoz kapcsolódó hidrogének között. A nemrég bevezetett konstans idejű BIRD⁶⁶ és perfectBIRD⁶⁸ megközelítéseknek köszönhetően ezt a limitációt sikerült feloldani. Erre még vissza fogok térni bővebben a dolgozat „Eredmények és értékelésük” részében.

Eddig a BIRD módszerről végig a szén izotópok példáján keresztül írtam, aminek az oka az, hogy ezt használjuk a leggyakrabban és a legszélesebb körben. Azonban bizonyos vegyületek illetve kísérletek esetén más magok izotópjait is segítségül lehet hívni a BIRD-típusú protonlecsatoláshoz. Így például a ^{15}N izotópot ^{15}N jelölt és jelöletlen peptidek, fehérjék ^1H - ^{15}N HSQC spektrumának protonlecsatolásához.^{65,69} Ugyanis a BIRD^d modul segítségével a ^{15}N -hez kapcsolódó amid protonokat szelektíven tudjuk invertálni, és ezáltal lecsatolni a szénhez kötődő protonoktól.

2.2.6. Zangger-Sterk módszer

Egy rezonanciajel vagy egy bizonyos spektrális tartomány frekvencia- illetve sávselektív lecsatolását évtizedek óta használják az NMR spektroszkópiában, amint erről a 2.1. fejezetben már írtam. 1997-ben Zangger és Sterk javasolt egy nagyon elegáns koncepciót ennek a továbbfejlesztésére.⁹ A frekvenciaszelektív impulzus ideje alatt egy gyenge térgradienst használva az impulzus rétegszelektívvé is válik. A rétegszelektív gerjesztést korábban már alkalmazták az in vivo MRI területén,⁷⁰ azonban az NMR-ben csak lassan ismerték fel a felhasználásában rejlő lehetőségeket.⁷¹⁻⁷⁸

Egy z-irányú térgradiens impulzus alkalmazásával a B_0 tér rétegesen inhomogénné válik, lineárisan változik a függőleges (z) dimenzió mentén. Azaz egy térgradiens impulzus ideje alatt a minta különböző részei függőleges pozíciójuktól függően különböző mágneses teret éreznek, ami a mintatérfogatban egy rétegszelektív frekvenciaeltolódáshoz vezet (5. ábra).¹³ Egy klasszikus ^1H NMR spektrum felvételekor minden egyes rezonanciajelet a minta teljes aktív (a vevőtekercs által meghatározott) térfogatából kapjuk. Egy frekvenciaszelektív kísérletben csak azok a rezonanciajelek fognak megjelenni a spektrumban, amelyek az impulzus gerjesztési sáv szélességében vannak, azonban azok maximális intenzitással. Ezzel ellentétben egy rétegszelektív kísérletben – optimalizált impulzusokat és gradienseket használva – a teljes ^1H spektrumot rögzíthetjük egyszerre, de minden egyes rezonanciajelet csak a minta aktív térfogatának egy adott szeletéből detektáljuk, ahogy ez az 5. ábrán is megfigyelhető.¹⁴ A másik oldalról megközelítve: a minta minden egyes rétegében csak egy frekvenciát gerjesztünk, azaz minden egyes rezonanciajelet a minta eltérő szeleteiből detektálunk, ami előrevetíti a módszer homonukleáris lecsatolásban való alkalmazhatóságát.

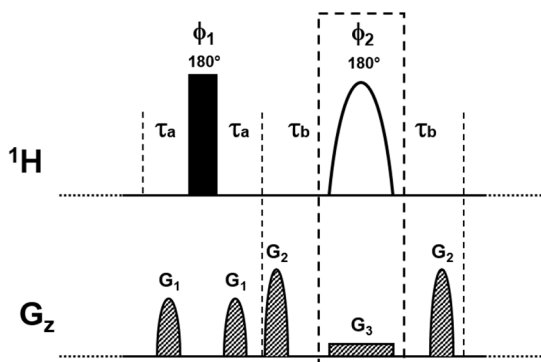


5. ábra¹⁴ A rétegszelektív gerjesztés alapjének bemutatása. A frekvenciaszelektív gerjesztés ideje alatt egy gyenge, z irányú térgradienst (G) alkalmazunk. A térgradiens az aktív mintatérfogatban egy pozíciófüggő frekvenciaeltolódáshoz vezet. Ezáltal minden egyes rezonanciajelet a minta eltérő szeleteiből detektáljuk.

Szélessávú homonukleáris protonlecsatoláshoz kombinálni kell a rétegszelekciót biztosító szelektív 180° -os protonimpulzust és az ideje alatt alkalmazott z irányú térgradienst, egy nem-szelektív 180° -os protonimpulzussal (6. ábra).⁹ A réteg- és frekvenciaszelektív impulzusblokk (a 6. ábrán szaggatott vonallal bekeretezve)

hatására a minta minden egyes szeletében egy adott rezonanciafrekvenciájú proton (aktív spin) invertálódik, az összes többi (passzív spinek) viszont nem. Ezt kiegészítve a nem-szelektív 180° -os impulzussal, a különböző rétegekben lévő aktív spinekre összességében egy 360° -os forgatás hat, azaz kvázi nem történik velük semmi, míg a passzív spinek invertálódnak. Ezáltal a 6. ábrán látható impulzusszekvencia-elemmel el tudjuk érni a proton-proton csatolási evolúció refókuszálását, és a kémiai eltolódási evolúció folytonosságát.

Kezdetben a Zangger-Sterk (ZS) kísérlet gerjesztő impulzusaként is réteg- és frekvenciaszelektív gerjesztést alkalmaztak a passzív spinek detektált jelhez való hozzájárulásának elkerülése érdekében.^{9,10} Később azonban rájöttek, hogy a passzív spinek hatása megfelelően kiszűrhető, és a kívánt koherencia átviteli út kiválasztható térgradiens impulzusok illetve megfelelő fázisprogram segítségével, így a kezdeti szelektív gerjesztő impulzust egy egyszerű kemény impulzusra cserélték.¹¹ Ez egyrészt egyszerűsíti a kísérletet, másrészt növeli az érzékenységet.



6. ábra A Zangger-Sterk típusú szélessávú protonlecsatolást eredményező impulzusszekvencia-elem sémája. A fekete téglalap a kemény, nem-szelektív, a fehér fél-ellipszis pedig a szelektív 180° -os protonimpulzust ábrázolja. G_1 és G_2 a hasznos koherenciautat kiválasztó térgradiens impulzusokat, G_3 a rétegszelektív térgradienst jelöli. Szaggatott vonallal bekeretezve látható a réteg- és frekvenciaszelektív inverziót megvalósító szekvenciaelem.

A Zangger-Sterk kísérletben a rétegszelektív térgradiens erősségének (G) megválasztását az határozza meg, hogy mekkora frekvenciatartomány ($\Delta\nu$) mérésére van szükségünk. Ez sok esetben megegyezik a spektrális ablakkal, de nem mindig. Egy L hosszúságú vevőtekercs és γ giromágneses hányadosú spinek esetén a maximális jelintenzitást akkor fogjuk megkapni, ha a térgradiens-erősséget a következő egyenlettel¹² számolva állítjuk be:

$$G = \frac{2\pi\Delta\nu}{\gamma L} \quad (1)$$

A szelektív impulzus sávszélességének ($\Delta\nu$) kisebbnek kell lennie, mint az egymással csatolásban lévő spinek közötti legkisebb frekvenciakülönbség. Egy adott mintaréteg vastagsága (L) a következőképpen határozható meg:

$$\Delta\nu = \frac{2\pi s z}{\gamma G} \quad (2)$$

Elvől adódóan egy rétegszelektív kísérlet mindig érzékenységesvesztéssel jár együtt. A ZS módszer érzékenységét mindig az aktuálisan létrehozott rétegvastagság határozza meg, ami pedig a második egyenlet alapján egyenesen arányos a szelektív impulzus sávszélességével ($\Delta\nu$), és fordítottan arányos a rétegszelekciós térgradiens erősségével (G). Természetesen a minél vastagabb rétegek az ideálisak, hiszen ekkor nagyobb térrészből detektáljuk a jelet, és ezáltal jobb jel-zaj arányú spektrumot kapunk. Azonban a gyakorlatban általában kompromisszumot kell kötni. Ugyanis a hatékony homonukleáris lecsatoláshoz a szelektív impulzus sávszélességének kisebbnek kell lennie, mint az egymással csatolásban lévő spinek közötti legkisebb frekvenciakülönbség. Azonban minél kisebb a szelektív impulzus sávszélessége, annál vékonyabb mintarétegeket generálunk, azaz csökkentjük a kísérlet érzékenységét. A szükséges rétegszelekciós térgradiens-erősséget, ahogy korábban már említettem, a lecsatolni kívánt jeleket tartalmazó kémiai eltolódás tartomány határozza meg. Nagyobb kémiai eltolódás intervallum lecsatolásához szükséges erősebb térgradiens alkalmazásával pedig szintén vékonyabb szeleteket hozunk létre a minta aktív térfogatában. Azonban a másik oldalról megközelítve a kérdést a ZS kísérlet érzékenysége optimalizálható a megoldandó probléma, illetve az aktuális spinrendszer függvényében, ellentétben a BIRD módszerrel, melynek érzékenységét a választott izotóp (^{13}C vagy ^{15}N) természetes izotópgyakorisága szabja meg.

Például ha egy adott vegyület ^1H spektrumában 8 ppm-es kémiai eltolódás tartományban található olyan rezonanciajelek, amiket le szeretnénk csatolni az 500 MHz-es spektrométerünkkel (esetében 8 ppm = 4000 Hz), és a vevőtekercs hossza (L) 1,8 cm, akkor az (1) egyenlet alapján 0,522 G/cm-s rétegszelekciós térgradienst kell használnunk. Tegyük fel továbbá, hogy az adott vegyület esetében egy 50 Hz-es sávszélességű (46,64 ms időtartamú) RSnob szelektív impulzust alkalmazunk, hogy tökéletes lecsatolást érjünk el minden jelen, akkor a meghatározott térgradiens-erősséget és a (2) egyenletet felhasználva megkapjuk, hogy a minta egy rétegének vastagsága (Δz) 0,0225 cm lesz. Ami azt mutatja, hogy a feltételezett körülmények között a rétegszelektív módszer érzékenysége 1,25 %-a a klasszikusénak. Tipikusan a ZS-

protonlecsatolt kísérletek érzékenysége kb. 1-10 %-a a klasszikus, nem-lecsatolt analógjaiknak.⁷⁹

Elsőre talán arra számíthatnánk, hogy a ZS módszer nem tud megbirkózni a szorosan csatolt spinekkel. Azonban meglepő módon, erősen szorosan csatolt spinrendszerek esetén is egészen jó eredményeket kaphatunk, ha nagyon szelektív impulzust használunk, ami persze komoly érzékenységmentesítéssel jár.¹² A ZS-lecsatolás további előnye, hogy nem változtatja meg a jelek relatív integrálját.⁸⁰

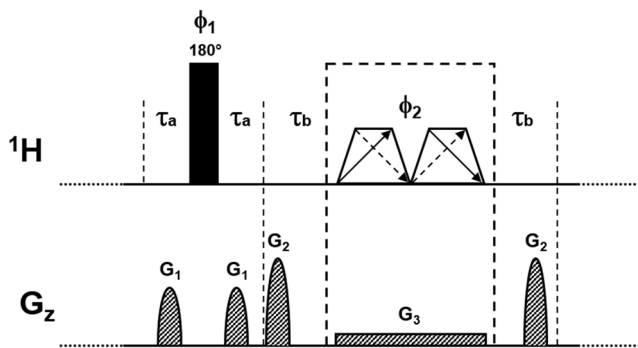
A Zangger-Sterk megközelítés rendkívül széleskörben alkalmazható, azonban kétségtelenül legnagyobb hátránya a kis érzékenysége. Az utóbbi években viszont többféle módszert is kidolgoztak a rétegszelektív kísérletek érzékenységének növelésére. Sakhail és szerzőtársai javasolták, hogy minden egyes tranziens után megfelelően megváltoztatva a szelektív impulzus besugárzási frekvenciáját a minta egy újabb rétegéből „friss” egyensúlyi mágneszettséghez juthatunk, így a kísérletek közti várakozási idő (dI) lecsökkenthető kb. 100 ms-ra.⁸¹ Kimutatták, hogy nyolc különböző besugárzási frekvenciát használva egy $\sqrt{8}$ -as javulást érhetünk el a jel-zaj arányban az eredeti ZS kísérlethez képest. Ezt az elvet 2D módszerek felgyorsítására,^{82,83} illetve gyors reakciók követésére⁸⁴ is alkalmazták. A rétegszelektív módszerek érzékenységét a vizsgált molekula spinrendszere/jelhozzárendelése ismeretében többfrekvencián gerjesztő szelektív impulzus használatával is lehet növelni.⁸⁵ Ebben az esetben minden egyes protonjelet a minta több rétegéből is detektálhatunk, amennyiben a besugárzási frekvenciákat megfelelően – a véletlen visszacsatolásokat elkerülve – választjuk meg. Elméletileg a jel-zaj arány annyiszorosára emelhető ahány frekvenciás impulzust használunk az adott kísérletben. A gyakorlatban ez a lineáris összefüggés kb. négy frekvenciáig tartható.¹³ Lokesh és Suryaprakash az ún. polarizáció-megosztás elvén keresztül ért el egy átlagban kétszeres jelintenzitás-növekedést a Zangger-Sterk kísérletben.⁸⁶ Ez a megközelítés az ASAP (*Acceleration by Sharing Adjacent Polarization*) technikán alapszik, ami a kísérletek közti, rövid várakozási időben két gradienssel közrefogott 40 ms-os izotróp DIPSI-2 (*Decoupling In the Presence of Scalar Interactions*) impulzusblokkot alkalmaz szomszédos spinekről való polarizációátvitelre.⁸⁷ Azonban ez a módszer nem tekinthető kvantitatívnak, mert az érzékenységnövekedés nem egységes minden jelen, és erősen függ a különböző relaxációs tulajdonságoktól.

Ahogy arra már utaltam a 2.2.5. alfejezet bevezetőjében a Zangger-Sterk protonlecsatolás az egyike azon módszereknek, amelyek nemcsak többdimenziós spektrumok indirekt, hanem direkt dimenziójában is képesek protonlecsatolásra. Ennek megfelelően többféle ZS protonlecsatolt homonukleáris (TOCSY,^{9,80,88,89} NOESY,⁹⁰ ROESY⁹¹) és heteronukleáris korrelációs kísérletet⁹² dolgoztak ki, melyek előnyeit kis

és közepes méretű szerves vegyületeken, illetve rendezetlen fehérjéken mutatták be. A ZS-típusú lecsatolás a DOSY kísérlet esetében is széleskörű alkalmazást nyert.^{10,11,93,94}

2.2.7. PSYCHE módszer

Morris és munkatársai 2014-ben fejlesztették ki a legújabb és nagyon ígéretes, szélessávú homonukleáris protonlecsatolásra alkalmas módszert, ami a PSYCHE (*Pure Shift Yielded by CHirp Excitation*) nevet kapta.³⁶ Az új kísérletben a spinek egy részének szelektív inverzióját megvalósító impulzusszekvencia-elem (a 7. ábrán szaggatott vonallal bekeretezve) egy kis kibillentési szögű, frekvenciapásztázott Chirp impulzuspárból, illetve az impulzusok ideje alatt alkalmazott gyenge térgradiensből tevődik össze.



7. ábra A PSYCHE típusú szélessávú protonlecsatolást eredményező impulzusszekvencia-elem sémája. A fekete téglalap a kemény, nem-szelektív 180° -os protonimpulzust, a fehér trapézok a diagonális nyilakkal pedig a kis kibillentésű szögű (β), frekvenciapásztázott Chirp impulzuspárt ábrázolják. Opcionálisan ellentétes irányban szimultán frekvenciapásztázott Chirp impulzusok alkalmazhatók a kísérlet érzékenységének növelése céljából, amit szaggatott vonalú nyilakkal jelöltem. G_1, G_2 és G_3 a térgradiens impulzusokat ábrázolja. Szaggatott vonallal bekeretezve látható az aktív spinek szelektív inverzióját megvalósító, új szekvenciaelem.

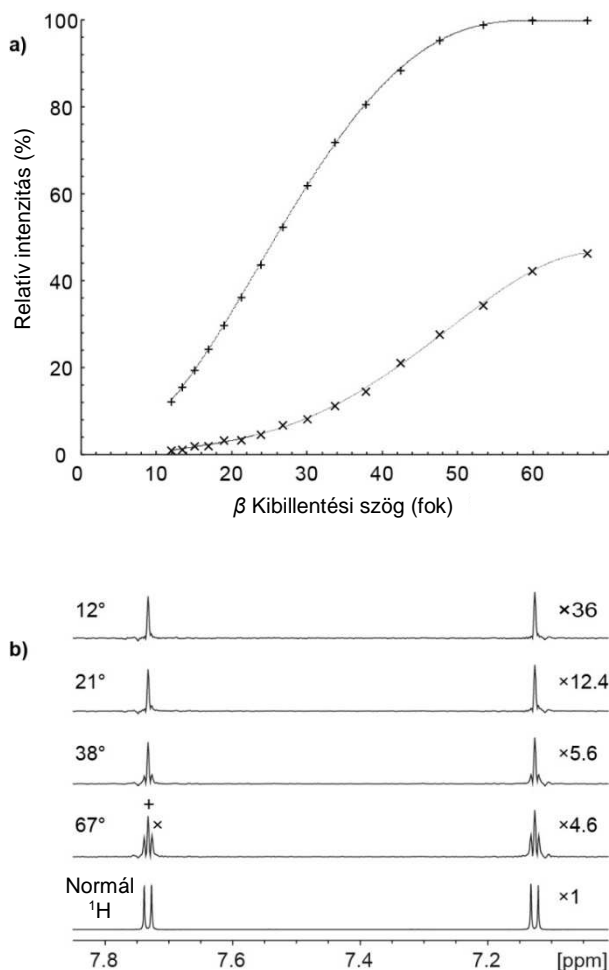
A PSYCHE az anti z-COSY^{37,60} kísérlettel hozható kapcsolatba, de elkerüli az utóbbi hosszú minimális mérési idejét, kényelmetlen adatfeldolgozását, és a nem kívánt koherenciautakból illetve a szoros csatolásból származó, zavaró jeljárulékokat. Az anti z-COSY spektrumban a diagonális csúcsok csak olyan tagokból állnak, melyekben a passzív spinek polarizációja fordított. Azonban nem ez a helyzet a keresztcsúcsok esetén, így – ahogy azt már a 2.2.4. alfejezetben említettem – protonlecsatolt spektrumot csak a diagonális régió kivágásával kaphatunk az anti z-COSY kísérletben. Ezáltal egy 2D

módszer indirekt dimenziójában sem lehet egyszerűen a $(180^\circ + \beta)$ - t_z - β szekvenciaelem t_1 evolúciós idő közepére való beillesztésével homonukleáris lecsatolást elérni, mivel a „keresztcsúcs tagokból” eredő mágnesezettség ebben az esetben is jelen lenne.¹⁴ Morris és munkatársai viszont találtak egy zseniális módszert az említett tagok kiszűrésére. Két kemény, kis kibillentési szögű impulzus helyett két szimmetrikus, kisteljesítményű, frekvenciapásztázott Chirp impulzust használnak az idejük alatti gyenge térgradiens impulzussal kiegészítve.³⁶ Ez az impulzusblokk elnyomja a „keresztcsúcs tagokat”, mivel azok különböző kémiai eltolódásokat éreznek az első kisszögű impulzus előtt és a második után. Másképpen fogalmazva a Chirp impulzusok alatt különböző időkben gerjesztődnek, így a térgradiens impulzus különböző ideig hat rájuk az első gerjesztés előtt és a második után, ami a szóban forgó tagok elnyomását eredményezi. Ezzel ellentétben a „diagonális tagokat” a Chirp impulzusok szimmetrikusan gerjesztik, és így nem szűrik ki azokat.

Az anti z-COSY kísérletnek pozitív tulajdonsága, hogy a két, kis kibillentési szögű impulzus között a zéruskvantum koherenciát (ZQC) elnyomja. A frekvenciapásztázott impulzusok térgradienssel való egyidejű alkalmazása szintén képes a ZQC kiszűrésére, „egymásra rakva” a különböző mintarétegekből származó, eltérő nagyságú ZQC evolúciókat, ahogy azt korábban Keeler és szerzőtársai leírták egy hasonló sémával kapcsolatban.⁹⁵ A kémiai eltolódás különbség alsó határát, amely esetén még hatékony mind a zéruskvantum, mind a keresztcsúcs koherenciautak elnyomása, a frekvenciapásztázás sebessége és a térgradiens-erősség határozzák meg. A PSYCHE impulzusszekvencia-elem a szoros csatolásból származó koherencia átviteli utakat is csökkenti.

Szélessávú protonlecsatolás eléréséhez a spinek egy részének (aktív spinek) szelektív inverzióját megvalósító kis kibillentési szögű (β), frekvenciapásztázott Chirp impulzuspárt, illetve az ideje alatt alkalmazott gyenge térgradienst kombinálni kell egy nem-szelektív 180° -os protonimpulzussal (7. ábra). Ezek együttes hatása, hogy az aktív spinek evolúciója változatlan marad, viszont a passzív spinek invertálódnak, illetve minden, a detektálni kívánt egykvantum koherenciától (SQC) különböző koherencia elnyomásra kerül. Az aktív spinek (melyek a detektálni kívánt, lecsatolt jelet szolgáltatják) passzív spinektől való megkülönböztetése statisztikus, előbbiek jelintenzitása $\sin^2\beta$ -val, utóbbiaké pedig $\sin^4\beta$ -val arányos, ahogy az a 8.a ábrán látható.³⁶ Ez azt is jelenti, hogy a PSYCHE módszer lehetőséget ad a spektroszkópus számára, hogy a Chirp impulzuspár β szögének beállításával számára megfelelő kompromisszumot kössön az érzékenység és a spektrális tisztaság között. A 8.b ábrán egy kísérleti spektrumon követhető, hogy a β szög növelésével egyrészt növekszik a lecsatolt jel intenzitása, viszont a nem kívánt járulékok súlya is megnő.³⁶ Általában egy

20° és 30° közötti kibillentési szögű Chirp impulzuspár használata minden szempontból kiváló eredményt ad.



8. ábra³⁶ (a) A hasznos, lecsatolt (+), illetve a zavaró (x) jel relatív intenzitásának a Chirp impulzusok β szögétől való függése. (b) A 2,3-dibróm-tiofén d_6 -DMSO-ban rögzített, kísérleti normál ^1H és különböző β szögű PSYCHE ^1H spektrumai. Bal oldalon a Chirp impulzusok β szögének aktuális értékei, jobb oldalon pedig a függőleges nyújtási faktorértékek olvashatók.

A PSYCHE kísérlet esetén a lecsatolásra (az extrém szoros csatolást leszámítva) nem igazán van hatással a vizsgált molekula spinrendszere, ezért egy nagyon általánosan használható módszerről van szó. Ezzel szemben a Zangger-Sterk kísérlet esetén a szelektív impulzus időtartamának és a rétegszelekciós térgradiens erősségének beállításához, azaz a maximális jel-zaj arány eléréséhez, ismernünk kell a mérni kívánt

molekula spektrumát és jelhozzárendelését (lecsatolandó kémiai eltolódás tartományt, csatoló partnerek frekvenciakülönbségét). További előnye a PSYCHE-nek a ZS és BIRD módszerekkel szemben, hogy érzékenysége átlagosan többszöröse az utóbbiakénak. A különbséget viszont mindig csak az adott vegyület esetén lehet megmondani pontosan, elsősorban a ZS kísérlet spinrendszer függő paraméterbeállításai, és kisebb részben a PSYCHE-nél aktuálisan használt β szög miatt. A PSYCHE érzékenysége egy $\sqrt{2}$ -es faktoriall tovább növelhető ellentétes irányban szimultán, duplán frekvenciapásztázott Chirp impulzusok használatával, amit szaggatott vonalú nyilakkal a 7. ábrán is jelöltem.

Nemrégben a PSYCHE megközelítést felhasználták 2D TOCSY spektrum indirekt (*F1*) vagy direkt (*F2*) dimenziójában szélessávú protonlecsatolásra.⁹⁶ Mindkét esetben a mérést követő, megfelelő kovariancia processzálas^{97,98} alkalmazásával egy mindkét dimenziójában teljesen lecsatolt spektrumhoz jutottak. Az így kapott, ultranagy felbontású, tiszta kémiai eltolódás spektrumban nagy lehetőségek rejlenek pl. természetes anyagok vagy vegyületkeverékek szerkezetigazolását, -felderítését illetően.

2.3. Adatgyűjtési stratégiák

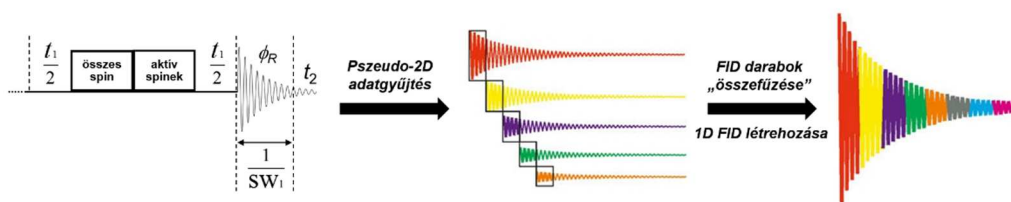
Korábban már említettem, hogy a BIRD,⁷ Zangger-Sterk⁹ és PSYCHE³⁶ módszerek azok, amelyek az akvizíciós dimenzióban is képesek szélessávú homonukleáris protonlecsatolásra. Azonban az említett, a 2.2.5-2.2.7. alfejezetekben bemutatott, *J*-refókuszáló impulzusszekvencia-elemeken kívül a lecsatolás gyakorlati megvalósításához szükség van egy megfelelő adatgyűjtési stratégiára is. Ugyanis hiába refókuszáljuk a proton-proton csatolási evolúciót a detektálás kezdetére, az adatgyűjtés ideje alatt az újra aktív lesz. A szelektív és sávselektív lecsatolásnál használt időmegosztott, stroboszkópikus stílusú megközelítés^{23,26} alkalmazása a szélessávú esetben nem lehetséges, mivel a szélessávú lecsatolást biztosító impulzusszekvencia-elemek sokkal hosszabbak, mint a mintavételezési idő, illetve nem darabolhatók fel kisebb egységekre, mint egy egyszerű formázott impulzus.²⁶

Az összes *J*-refókuszáló módszer egy echo periódus végén, egy adott időpillanatra refókuszálja tökéletesen a proton-proton csatolási evolúciót.¹² Ezért elvben úgy kaphatunk tiszta kémiai eltolódás spektrumot, ha refókuszáljuk a proton-proton csatolási evolúciót a detektálás kezdetére, és a csatolási modulációt nem tartalmazó jelet pontról pontra gyűjtjük, miközben egy időváltozót inkrementálunk. Ezt a megoldást alkalmazták az első BIRD kísérlet során,⁷ azonban rendkívüli időigényessége miatt nem terjedt el a gyakorlatban. Tizenöt évvel később Zangger és Sterk a réteg- és frekvenciaszelektív impulzuson alapuló módszerükkel együtt bemutattak egy sokkal

gyorsabb adatgyűjtési stratégiát is,⁹ amit az irodalom ma gyakran interferogram-típusú vagy extra dimenziós adatgyűjtésnek hív.

2.3.1. Interferogram-típusú adatgyűjtés

Az interferogram-típusú adatgyűjtés azt a tényt használja ki, hogy a proton-proton csatolási evolúció aránylag lassú. Így, ha egy olyan FID darabot detektálunk, aminek az időtartama $\ll 1/J_{HH}$, akkor a kapott jel csatolástól származó modulációja elhanyagolható lesz. A jelintenzitás proton-proton csatolás okozta csökkenése a $[1 - \cos(\pi Jt)]$ összefüggéssel írható le, ami alapján 10 ms-ot követően a veszteség kevesebb, mint 5 % egy 10 Hz-es csatolás esetén.^{9,14} Természetesen egy 10 ms-os FID rendkívül csekély felbontást biztosít. Azonban egy jó felbontású tiszta kémiai eltolódás spektrumot kaphatunk, ha egy sorozat FID darabot rögzítünk. Az persze nagyon fontos, hogy a kémiai eltolódási evolúció folyamatos legyen a darabok között, míg a csatolási refókuszálódjon. Ezt technikailag egy pseudo-2D típusú adatgyűjtéssel oldották meg először.⁹ Ahogy a 9. ábrán is látható, a homonukleáris lecsatoló blokkot – ami minden esetben áll egy szelektív, csak az aktív spinekre ható, illetve egy nem-szelektív, az összes spinre ható impulzusszekvencia-elemből – egy időváltozó közepén helyezük el, amit folyamatosan növelünk a mérés során. A pseudo dimenzióban gyűjtött, minden egyes FID egy olyan hosszúságú darabját, amelyben a proton-proton csatolások hatása még elhanyagolható, speciális adatfeldolgozással kivágunk, és a kapott darabokat „összefűzzük” egyetlen, kompozit FID-dé, amit ezt követően már a szokásos módon transzformálhatunk.¹³



9. ábra Az interferogram-típusú, extra dimenziós adatgyűjtési stratégia sematikus bemutatása.

Elsőként Morris és munkatársai hívták fel a figyelmet arra, hogy a proton-proton csatolás kifejlődésének viszonylagos lassúságát duplán ki lehet használni az adatgyűjtés során, hiszen nemcsak a csatolás refókuszálását követő ~ 10 ms-os időtartamon keresztül elhanyagolható a csatolás hatása, hanem a megelőző ~ 10 ms-ban is.^{10,11} Ezt figyelembe véve a lecsatoló szekvenciaelemet úgy időzítették, hogy a proton-proton csatolási

evolúció refókuszálása minden egyes detektált FID darabnak pontosan a közepére valósuljon meg. Ezzel az interferogram-típusú adatgyűjtést a kétszeresére gyorsították, vagy másképpen fogalmazva ugyanolyan összidejű kompozit FID-et feleannyi darabból lehetett létrehozni.

A gyakorlatban a t_1 evolúciós időt $1/SW_1$ szerint kell növelni, ahol SW_1 az indirekt (extra) dimenzióban megadott spektrális ablak (tipikusan $SW_1 = 40-100$ Hz), és ennek megfelelően minden egyes FID első 10-25 ms-át kell kivágni, és összefűzni, a proton-proton csatolási modulációt gyakorlatilag nem tartalmazó 1D FID megalkotásához. A fennmaradó, kismértékű csatolási evolúció a jelektől az SW_1 többszöröseinek megfelelő távolságra megjelenő, kisintenzitású artefaktumokként fejeződik ki a protonlecsatolt spektrumban. Azonban ideális mérési paraméterek használata mellett a zavaró jelek a zajszint alatt maradnak. Nagyobb csatolási állandók esetén SW_1 -et nagyobbra kell állítani, hogy rövidebb FID darabokat gyűjtsünk, és ezáltal minimalizáljuk a csatolási evolúciót. A lecsatolt spektrum felbontása (adatpontosűrűsége) egyenesen arányos az extra dimenzióban használt kísérletek (inkrementumok, TD_1) számával. Általában 16-32 inkrementum – ami kb. 0,16-0,8 s „kvázi akvizíciós időt” (kvázi $AQ = TD_1/SW_1$) jelent – elég egy jó minőségű, keskeny jeleket tartalmazó, protonlecsatolt spektrum eléréséhez. Ez persze az interferogram-típusú adatgyűjtés legnagyobb hátrányára is rámutat, nevezetesen arra, hogy a szükséges extra dimenzió jelentősen megnöveli a mérési időt a klasszikus kísérletekéhez képest.

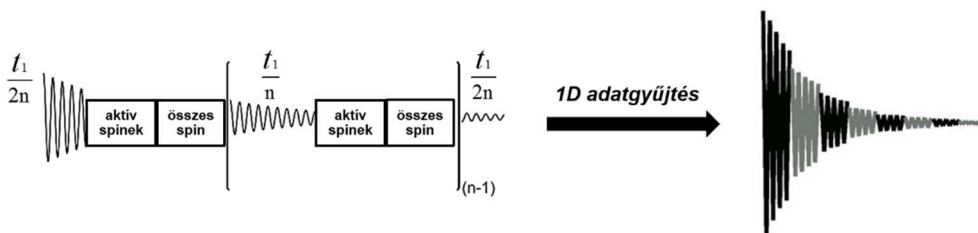
Ahogy azt korábban említettem, az interferogram-típusú adatgyűjtést először a Zangger-Sterk lecsatolást alkalmazó kísérletekben használták,⁹⁻¹¹ de később a BIRD^{62,64} és PSYCHE³⁶ módszerek esetén is ezzel a stratégiával nyertek tiszta kémiai eltolódás spektrumokat. Ha a vizsgált molekula a hidrogénen kívül egy másik, nagy természetes izotópgyakoriságú, NMR aktív magot (pl. ^{19}F , ^{31}P) is tartalmaz, akkor ezek a protonlecsatolt ^1H kísérletek – a triviális alkalmazások mellett – heteronukleáris csatolási állandók meghatározására is használhatók.^{99,100} Az interferogram-típusú adatgyűjtési stratégiát sokféle kétdimenziós kísérlet protonlecsatolással való továbbfejlesztésében is felhasználták. Az így kapott pszeudo-3D kísérletek többségéről már szót ejtettem az adott típusú lecsatoló impulzusszekvencia-elemeket tárgyaló alfejezetekben (2.2.5-2.2.7. alfejezetek), itt összefoglalásként és a könnyebb áttekinthetőség érdekében táblázatos formában (1. táblázat) gyűjtöttem össze ezeket és a pszeudo-2D protonlecsatolt ^1H kísérleteket a megfelelő hivatkozásokkal együtt. Ezek a szélessávú protonlecsatolt spektrumok olyan információkat tárhatnak fel többkomponensű oldatok (pl. reakciótermék-elegyek) vizsgálatában, melyeket a klasszikus NMR módszerek nem, ezzel segítve a mindennapos jelhozzárendelési problémák megoldását.^{101,102}

1. táblázat Interferogram-típusú adatgyűjtési stratégiát alkalmazó, protonlecsatolt NMR kísérletek összefoglalása.

NMR kísérletek		Protonlecsatoló impulzusszekvencia-elem		
		<i>BIRD</i>	<i>Zangger-Sterk</i>	<i>PSYCHE</i>
1D	¹ H	62,99	9,11,81,85,86,100	36
2D	DOSY		10,11,93	
	TOCSY		88,89	96
	NOESY		90	
	HSQC	64-66,68		
	HSQMBC		103	104

2.3.2. Valós idejű, kapuzott adatgyűjtés

Frydman és munkatársai egy új adatgyűjtési stratégiát mutattak be 2012-ben.¹⁰⁵ Az irodalomban azóta leggyakrabban „valós idejű” vagy „instant” adatgyűjtés néven emlegetett módszert elsőként BIRD,¹⁰⁵ nem sokkal később pedig Zangger-Sterk homonukleáris lecsatolásban is sikeresen alkalmazták.⁸⁰ A valós idejű megközelítés esetén ahelyett, hogy a proton-proton csatolási modulációt nem tartalmazó FID minden egyes darabját külön kísérletekben gyűjtenénk, egyetlen FID-et detektálunk. Ez úgy lehetséges, hogy az adatgyűjtést minden 10-25 ms-os periódus (t_1/n) után megszakítjuk azzal a céllal, hogy refókuszáljuk a proton-proton csatolási evolúciót (10. ábra). Ezt megtehetjük egy szelektív (BIRD, ZS), csak az aktív spinekre ható, illetve egy nem-szelektív, az összes spinre ható impulzusszekvencia-elem kombinációjával. A FID darabok detektálását és a J -refókuszálást felváltva végezzük addig, amíg a teljes FID-et meg nem kapjuk (10. ábra). A FID darabok összefűzését a spektrométer az akvizíció alatt, „valós időben” elvégzi. Ahogyan az interferogram-típusú adatgyűjtés során is, a csatolási evolúció tökéletes refókuszálása mindig az adott FID darab közepére valósul meg, kivéve az első és az utolsó esetén, melyek viszont fele olyan hosszúak, mint a közbensők.



10. ábra A valós idejű, „kapuzott” adatgyűjtési stratégia sematikus bemutatása.

Azt is érdemes megjegyezni, hogy a valós idejű kísérleteknél a detektálás megkezdése előtt mindig szükség van az aktív spinek szelektív kiválasztására, ami a ZS módszernél egy rétegszelektív impulzussal, a BIRD esetében pedig izotópszelekcióval oldható meg.¹² A valós idejű akvizíció nem társítható a PSYCHE módszerrel, ami a gerjesztett mágneszettségnek csak egy statisztikus részét refókuszálja, ezáltal az egyes FID darabok között tekintélyes mágneszettségvesztéshez vezet.¹⁴ Ezzel szemben a BIRD és a Zangger-Sterk lecsatolás esetén, az első FID darabban detektált teljes mágneszettség a csatolási evolúció refókuszálását követően is megmarad a következő FID darab(ok)ra.

A valós idejű lecsatolás hatalmas előnye az interferogram-típusúhoz képest a nagy mérési idő nyereség, hiszen a FID darabok egy pseudo dimenzióban való gyűjtése helyett az egész, proton-proton csatolási modulációtól gyakorlatilag mentes FID-et egyszerre rögzítjük. Ez a gyakorlatban, az általánosan használt mérési paraméterekkel azt jelenti, hogy a valós idejű módszer néhány tízszer gyorsabb az interferogram-típusúnál. Ráadásul a mérés során kapott FID nem igényel semmilyen extra processzálást, ugyanúgy kezelhető, mint bármilyen normál kísérletben.

Viszont a valós idejű adatgyűjtési stratégia esetén is kritikus a csatolási moduláció elhanyagolhatósága miatt, hogy a detektált FID darabok időtartama sokkal kisebb legyen, mint a legnagyobb proton-proton csatolási állandó reciproka. Ettől való eltérés nem tökéletes lecsatoláshoz, illetve a jelektől $2n/t_1$ ($2n/AQ$) többszöröseinek megfelelő távolságra megjelenő artefaktumokhoz vezet a protonlecsatolt spektrumban.¹³ Természetesen az is fontos, hogy az adatgyűjtés megszakításai alatt ne legyen kémiai eltolódási evolúció. Azonban bármennyire is tökéletes az impulzusok időzítése, az adatgyűjtést megszakító, lecsatoló blokkok alatti relaxációt nem lehet elkerülni, ami ugrásokhoz vezet a detektált FID amplitúdójában, és jelszélesedéshez a kapott spektrumban. Ráadásul ha a FID nem teljesen folytonos, akkor az jelentősebb zavaró jelekhez is vezethet a spektrumban. Emiatt a megszakítások időtartamát olyan kicsire érdemes redukálni, amennyire csak lehet, főleg nagyobb molekulák esetén, melyek

rövidebb T_2 relaxációs idővel rendelkeznek. A tapasztalatok szerint ahhoz, hogy megfelelő minőségű spektrumot kapjunk maximum 10-14 ms-os megszakítási periódusok használhatók. A BIRD-lecsatoló blokk hosszát elsősorban az egykötéses heteronukleáris csatolási állandó ($^1J_{HX}$) értéke határozza meg. Általános esetben, ha ^{13}C izotópszелеkcióról beszélünk ($^1J_{CH} = 120\text{-}160$ Hz), akkor ez 6-8 ms-os refókuszálási periódusokat jelent, ha ^{15}N -ről ($^1J_{NH} \approx 90$ Hz), akkor pedig 11 ms-osokat. A Zangger-Sterk-típusú J -refókuszáló periódus hosszát a szelektív impulzus időtartama határozza meg. Minél kisebb a vizsgált molekula csatoló partnereinek frekvenciakülönbsége, annál hosszabb szelektív impulzusra lenne szükség. Utóbbinak a növelését – szem előtt tartva a vizsgált molekula transzverzális relaxáció sebességét – csak egy bizonyos határig lehet megtenni. Emiatt a valós idejű ZS módszer olyan molekulák esetén, melyekben a csatolásban lévő protonok kémiai eltolódása közti különbség kicsi ($< 80\text{-}90$ Hz) nem alkalmazható eredményesen. Általánosságban elmondható, hogy a valós idejű adatgyűjtési stratégia hátrányos tulajdonságai közé tartozik, hogy szélesebb jeleket és kevésbé tiszta spektrumot eredményez, mint az interferogram-típusú. Továbbá implementációja nagyban függ az adott spektrométer szoftver- és hardverkonfigurációjától.

Az utóbbi években megmutatták, hogy a valós idejű adatgyűjtési stratégiával a sávselektív lecsatolás is kombinálható.²⁷⁻²⁹ A detektálást megszakító, lecsatoló blokkokban egy sávselektív és egy nem-szelektív 180° -os protonimpulzus együttesével érik el a protonlecsatolást. Ez a valós idejű sávselektív kísérlet (HOBS (*HO*monuclear *B*and-*S*elective)) vagy másnéven BASHD (*B*And-*S*elective *H*omonuclear *D*ecoupling)) hasonló a 2.1. fejezetben már említett SESAM²⁶ módszerhez. A két megközelítést összehasonlítva elmondható, hogy a HOBS implementálása egyszerűbb, nem okoz Bloch-Siegert eltolódást¹⁰⁶ a spektrumban, továbbá sokkal jobb, a gyakorlatban is megfelelő oldószerjel-elnyomást biztosít, így általánosabban használható. Viszont megegyezően a régebbi sávselektív módszerekkel, a HOBS is csak olyan vegyületek esetén alkalmazható eredményesen protonlecsatolásra, amelyek esetén a csatoló partnerek jelei egymástól jól elkülönült régiókban helyezkednek el, ugyanakkor egy adott régióban sok jel található (pl. peptidok, fehérjék, nukleinsavak). Azaz nem képes szélessávú lecsatolásra, ami a legfőbb hátránya. Azonban nem jár érzékenysévesztéssel, sőt inkább jel-zaj arány növekedéshez vezet a nem lecsatolt spektrumhoz képest, a multiplettek szinguletté válásából adódó intenzitásnyereségnek köszönhetően. Ezáltal helyet követelt magának a tiszta kémiai eltolódás („pure shift”) módszerek között, és számos többdimenziós homo- és heteronukleáris kísérletet fejlesztettek tovább vele (2. táblázat). Bemutatták alkalmazási lehetőségeit többkomponensű minták NMR vizsgálatában,¹⁰⁷ diasztereomer arány

meghatározásában,^{28,108} enantiomerek megkülönböztetésében,¹⁰⁹ illetve T_1 és T_2 relaxációs idők mérésében.^{110,111}

A valós idejű, különféle elven protonlecsatolt kísérletek nagy részéről a BIRD és Zangger-Sterk módszert tárgyaló alfejezetekben (2.2.5-2.2.6. alfejezetek) már említést tettem, itt összefoglalásképpen és a könnyebb áttekinthetőség érdekében táblázatos formában (2. táblázat) gyűjtöttem össze ezeket a megfelelő hivatkozásokkal együtt, hasonlóan az interferogram-típusú kísérletekhez (2.3.1. alfejezet, 1. táblázat).

2. táblázat Valós idejű adatgyűjtési stratégiát alkalmazó, protonlecsatolt NMR kísérletek összefoglalása.

NMR kísérletek		Protonlecsatoló impulzusszekvencia-elem		
		<i>BIRD</i>	<i>Zangger-Sterk</i>	<i>HOBS</i>
1D	¹ H	105,112	80	27-29,109
	Quick G-SERF		113,114	
	Inverziós felépülés			110,111
	CPMG			110
2D	DOSY		94	
	TOCSY		80	27
	NOESY			29,111
	ROESY			91
	HSQC	63,67,69	92	27,29,69
	HSQC-TOCSY			107
	HSQMBC			115

3. KÍSÉRLETI RÉSZ

Minden kísérletet 11,75 Teslán (500 MHz protonfrekvencia) egy BBI (szélessávú, protondetektálású (inverz)) vagy TXI (hármarezonancia, protondetektálású) z-gradienses mérőfejjel felszerelt, Bruker Avance II típusú NMR spektrométeren (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Németország) végeztünk. A kísérleteket általában 298 K-en valósítottuk meg, ettől eltérő esetben az aktuálisan használt hőmérsékletet a megfelelő ábraalírásban adom meg. A nyers adatokat a TopSpin 2.1 vagy 3.0 (Bruker Biospin GmbH, Karlsruhe, Németország) szoftverrel dolgoztuk fel, értékeltük ki és ábráztuk. Adataink kezelésében és megjelenítésében jelentős segítséget nyújtott a Microsoft Excel számítógépes program is.

Az értekezés 4.1. és 4.2. fejezetében tárgyalt HSQC illetve CLIP/CLAP-HSQC spektrumokat 10-15 μ s időtartamú 90°-os proton-, 15,7 μ s időtartamú 90°-os szén- és 37 μ s időtartamú 90°-os nitrogénimpulzusokkal vettük fel. A ^1H - ^{13}C egykötéses heteronukleáris korrelációs kísérletekben 500 μ s-os inverziós (Cp60,0.5,20.1) és 2000 μ s-os refókuszáló (Cp60comp.4) adiabatikus Chirp szénimpulzusokat használtunk. A ^1H - ^{13}C illetve a ^1H - ^{15}N HSQC kísérletek esetén 80 μ s időtartamú 90°-os szénimpulzusokat alkalmaztunk a GARP, illetve 250 μ s időtartamú 90°-os nitrogénimpulzusokat használtunk a WALTZ16 szélessávú heteronukleáris lecsatoló szekvenciában.

Annak érdekében, hogy a CPMG-INEPT szekvenciaelemben szimultán kompozit π impulzusokat adjunk ki, a CPMG-HSQMBC módszerek esetében (4.3. alfejezet) az impulzus teljesítményeket úgy állítottuk be, hogy azonos idejű proton és heteromag impulzusokat kapjunk. Ennek megfelelően a szeléntartalmú vegyületek spektrumait 15 μ s-os 90°-os proton- és szelénimpulzusokkal, a foszfortartalmú vegyületek spektrumait pedig 16 μ s-os 90°-os proton- és foszforimpulzusokkal rögzítettük. A ^1H - ^{13}C CPMG-HSQMBC kísérleteket 16 μ s-os 90°-os proton- és szénimpulzusokkal mértük. Hőmérsékletérzékeny minták mérésekor illetve hűtött mérőfejek használata esetén érdemes csökkentett teljesítményű impulzusokat (kb. 30 μ s-os 90°-os impulzusokat) alkalmazni a CPMG ciklusokban a fűtési járulékok minimalizálása, illetve a mérőfej elektronikájának megóvása céljából. Ugyanilyen okból az impulzusok közötti időket is meg lehet növelni a CPMG blokkban az általánosan használt 140-150 μ s-ról 200-250 μ s-ra, ha ezt a proton spektrális paraméterek megengedik.

Az azonos fázisú jeleket tartalmazó spektrumokat koszinusz négyzet, az ellentétes fázisú jeleket tartalmazó spektrumokat pedig eltolt szinusz súlyfüggvénnyel

szoroztuk meg az akvizíciós dimenzióban, és olyan mértékben zérustöltöttük, hogy a Fourier-transzformációt követően 0,2-0,4 Hz/adatpontos digitális felbontást érjünk el.

Az interferogram-típusú szélessávú protonlecsatolt impulzusszekvenciákkal rögzített 2D és 3D nyers adatokból egy Bruker AU programmal – ami elérhető Gareth A. Morris kutatócsoportjának honlapján: <http://nmr.chemistry.manchester.ac.uk> – hoztuk létre a 1D és 2D interferogramokat.

A további kísérleti paramétereket közvetlenül a megfelelő spektrumoknál, az ábraalírásokban adom meg a könnyebb követhetőség, és az eredmények jobb értelmezhetősége kedvéért. Az általunk kifejlesztett impulzusszekvenciák Bruker programjai – terjedelmükre és a dolgozat jobb átláthatóságára való tekintettel – az értekezés „Függelék” részében (8.1. fejezet) olvashatók, ugyanakkor a disszertáció témájából adódóan ezek fontos részét képezik az elvégzett tudományos munkának.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1. HSQC módszer továbbfejlesztése

Napjainkra a HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*)¹¹⁶ kísérlet a legelterjedtebb és legalapvetőbb 2D heteronukleáris korrelációs módszerré vált. Népszerűségét nagyban köszönheti az INEPT (*Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer*)¹¹⁷ impulzusblokk és a protondetektálás okozta jó érzékenységének. A spektrumban megjelenő egykötéses ¹H-¹³C vagy ¹H-¹⁵N korrelációk a jelhozzárendelésben nyújtott nagy segítségen túlmenően, rendkívül értékes szerkezeti és dinamikai információkat szolgáltathatnak kis és közepes méretű szerves molekulákról illetve biomakromolekulákról egyaránt. A HSQC impulzusszekvenciát a bevezetésétől kezdődően többféleképpen módosították, hogy tovább növeljék teljesítményét, és bővítsék felhasználási körét. Talán a legjelentősebb változtatás a hatékonyabb koherenciaszelekciót eredményező térgradiens impulzusok szekvenciába történő, megfelelő beépítése volt.^{118,119} Ugyanis ezek a ¹²C-hez kapcsolódó protonok illetve a víz mágnesezettség hatékony elnyomását teszik lehetővé. Ezáltal jó minőségű, tiszta heteronukleáris korrelációs spektrumhoz jutunk – sok lépéses fázisciklizáltatás szükségessége nélkül – még könnyűvízes közegben való mérés esetén is. Nagyjából egyidőben a gradiens koherenciaszelekció bevezetésével mutatták be a HSQC kísérlet PEP (*Preservation of Equivalent Pathways*) szekvenciaelemmel való továbbfejlesztését, mellyel egy $\sqrt{2}$ -szeres érzékenységnövekedés érhető el.^{120,121} A multiplicitás szerint szerkesztett HSQC módszer^{122,123} szintén nagyon hasznos a gyakorlatban, hiszen a spektrumban a korrelációs csúcsok fázisából a szénmultiplicitásra lehet következtetni, azaz megkülönböztethetővé válnak a CH/CH₃ és a CH₂-típusú molekularészletek.

A HSQC szekvencia – hasonlóan a többi 2D módszerhez – fejlesztését illetően az utóbbi években a kísérlet felgyorsítása, illetve a spektrális felbontás növelése kapott kiemelt figyelmet.¹²⁴ Előbbit vagy a kísérletek ismétlése közötti várakozási idő (*dI*) csökkentésén alapuló módszerrel (Fast-¹²⁵ ASAP-HSQC¹²⁶), vagy az indirekt dimenzióban a megfelelő felbontáshoz szükséges *t*₁ inkrementumok alternatív úton történő rögzítésével (NUS^{127,128}, Ultrafast HSQC^{129,130}) érték el. A felbontás növelését a direkt (detektálási) dimenzióban a szélessávú protonlecsatolás alkalmazása teszi lehetővé. Sakhail és szerzőtársai közölték az első szélessávú protonlecsatolt HSQC módszert.⁶⁴ Ebben a pszeudo-3D kísérletben BIRD^{r,x} impulzusszekvencia-elemet használtak homonukleáris lecsatolásra.

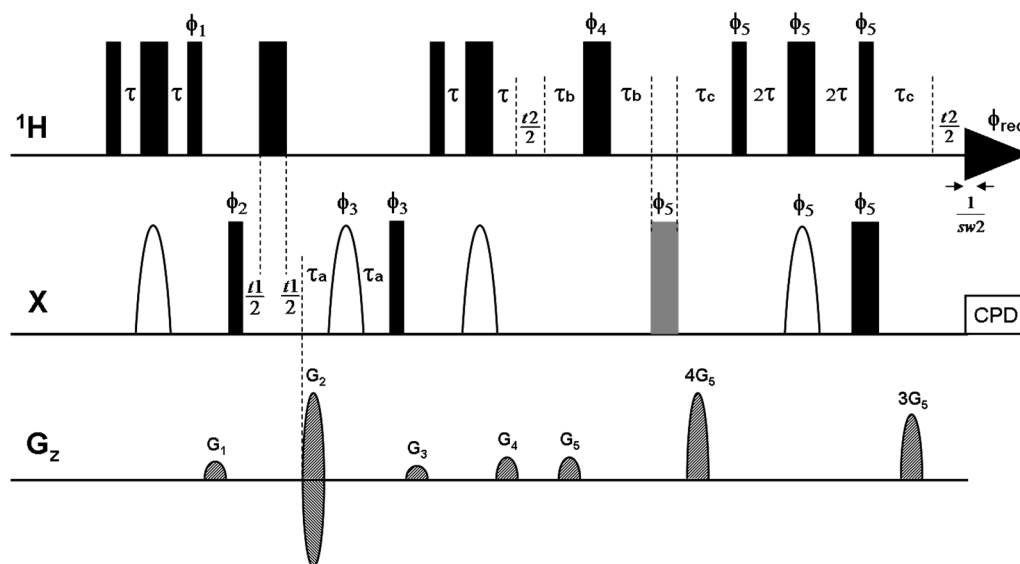
4.1.1. Interferogram-típusú szélessávú protonlecsatolás megvalósítása HSQC kísérletben

Az utóbbi kutatási irányvonalba kapcsolódtunk be mi is. Az interferogram-típusú adatgyűjtési stratégia és a BIRD^d izotópszelekció kombinálásával értünk el szélessávú protonlecsatolást a HSQC kísérlet direkt (F_2) dimenziójában.⁶⁵ A hagyományos, gradiens koherenciaszelekciós HSQC impulzusszekvencia végére, a protondetektálás elé, ahogy a 11. ábrán is látható, beépítettünk egy második evolúciós időt (t_2), aminek a közepén elhelyezett 180° -os nem-szelektív protonimpulzus és a BIRD^d blokk együttese a proton-proton csatolás refókuszálásáért felelős. A BIRD^d impulzusszekvencia-elem szelektíven invertálja a ^{13}C izotóphoz közvetlenül (egy kémiai kötéssel) kapcsolódó (direkt) protonokat, miközben a ^{12}C izotóphoz kapcsolódókra nincs hatással. Ezt kombinálva a nem-szelektív 180° -os protonimpulzussal a detektált, lecsatolt jelet szolgáltató, ún. aktív spinekre (jelen esetben a ^{13}C izotóphoz közvetlenül kapcsolódó protonok) összességében egy 360° -os forgatás hat, azaz nem történik velük lényegében semmi, míg a lecsatolandó, nem detektált, ún. passzív spinekre (a közvetlenül ^{12}C izotóphoz kapcsolódó protonok) egy 180° -os forgatás hat, azaz invertálódnak. Ezáltal az aktív magok kémiai eltolódási evolúciója folyamatos, miközben az aktív és passzív magok közötti proton-proton csatolási evolúciót refókuszáljuk. A homonukleáris lecsatolásért felelős blokkba egy megfelelően pozícionált 180° -os szénimpulzust is be kellett iktatnunk – amit a 11. ábrán szürke téglalappal jelöltem – az egykötéses heteronukleáris csatolási evolúció refókuszálása végett. A kívánt koherenciaút kiválasztását egy háromtagú, gradiensimpulzus kaszkád segíti.

Több kísérletet (általában 12-16) rögzítünk a második indirekt, ún. pszeudo (extra) dimenzióban (TD_2), miközben a t_2 evolúciós időt $1/SW_2$ szerint kísérletenként növeljük, ahol SW_2 a pszeudo dimenzióban megadott spektrális ablak (tipikusan $SW_2 = 40\text{-}100$ Hz). Ezt követően minden egyes FID első $1/SW_2$ hosszúságú (10-25 ms-os) darabját kivágjuk, és összefűzzük, a proton-proton csatolási modulációt gyakorlatilag nem tartalmazó FID megalkotásához. Ez a gyakorlatban egyszerűen, egy a G. A. Morris és csoportja által megírt makro (részletek a „Kísérleti részben”) segítségével megvalósítható. Utána a kapott kompozit FID már a szokásos módon transzformálható. Nagyobb csatolási állandók esetén SW_2 -t nagyobbra kell állítani, hogy rövidebb FID darabokat gyűjtsünk, és ezáltal minimalizáljuk a csatolási evolúciót. A gyakorlatban az is fontos, hogy a direkt dimenzióban beállított spektrális ablak (SW_1) egész számú többszöröse legyen az SW_2 -nek. A lecsatolt spektrum felbontása (adatpontosűrűsége) egyenesen arányos az extra dimenzióban használt kísérletek (inkrementumok, TD_2)

számával. Ennél a pseudo-3D HSQC kísérletnél 16 inkrementum – ami kb. 0,16-0,4 s „kvázi akvizíciós időt” (kvázi $AQ = TD_2/SW_2$) jelent – többnyire elég egy jó minőségű, keskeny jeleket tartalmazó, protonlecsatolt spektrum eléréséhez. A detektálás ideje alatt a szélessávú heteronukleáris lecsatolás érdekében GARP vagy WALTZ kompozit impulzusszekvencia-blokk (CPD) a megszokott módon használható, és így egy teljesen lecsatolt, tiszta kémiai eltolódás HSQC spektrumhoz juthatunk.

Az új kísérlet impulzusainak időzítését és fázisprogramját egyszerű szénhidrátszármazékokon végzett tesztmérések segítségével tökéletesítettük. A protonlecsatolást eredményező blokkban az impulzusok időzítését úgy oldottuk meg, hogy a proton-proton csatolási evolúció refókuszálása a detektált FID darabok közepére valósuljon meg. Hiszen ezáltal, ahogy ezt már a 2.3.1. alfejezetben említettem, hosszabb, csatolástól mentes FID darabok gyűjtésére nyílik lehetőségünk. A kifejlesztett impulzusszekvenciáról további technikai részletek a 11. ábra aláírásában olvashatók, a szekvencia Bruker programja pedig a dolgozat „Függelék” részének 8.1.1. alfejezetében tekinthető meg.



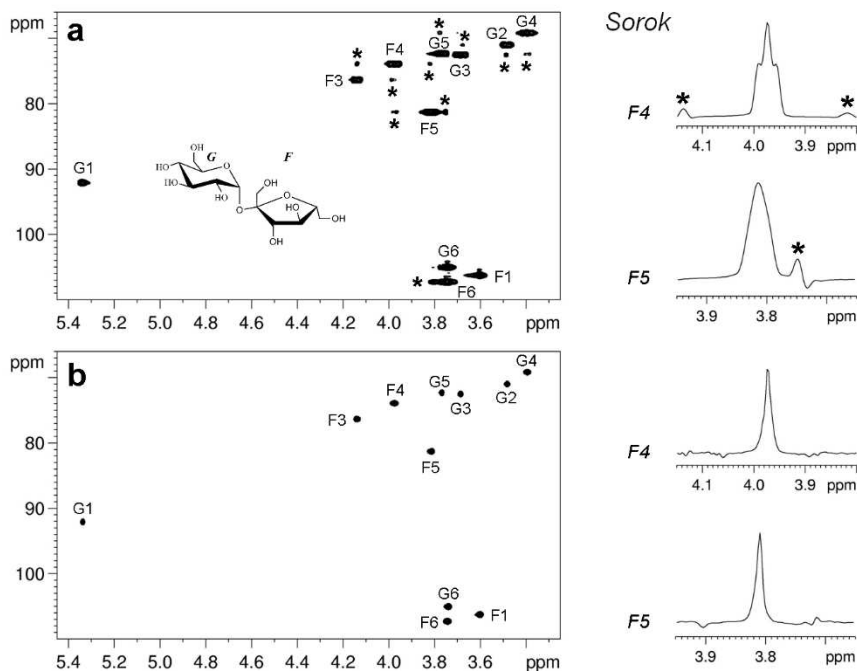
11. ábra Interferogram-típusú szélessávú protonlecsatolt HSQC impulzusszekvencia sematikus megjelenítése. A keskeny és szélesebb téglalapok 90° illetve 180° -os, x fázisú impulzusokat jelölnek, hacsak nem jelzem (ϕ_n) külön. Fél-ellipsziszekkel jelöltem az adiabatikus Chirp inverziós és refókuszáló X impulzusokat. Az impulzusok fázisai: $\phi_1 = y$; $\phi_2 = x, -x$; $\phi_3 = x, x, -x, -x$; $\phi_4 = y, y, y, y, y, y, y, y, -x, -x, -x, -x, -x, -x, -x, -x$; $\phi_5 = y, y, y, y, -x, -x, -x, -x$; és $\phi_{rec} = x, -x, -x, x, -x, x, x, -x, -x, x, x, -x, -x, x$. Az időintervallumokat a következőképpen állítjuk be: $\tau = 1/(4 * ^1J_{XH})$, $\tau_a = p16 + d16$, $\tau_b = 1/(4 * sw2)$, $\tau_c = p16 + d16 + 350 \mu s$. A koherenciaszelekciót és az echo-

antiecho fázisérzékeny detektálást az X dimenzióban a G_2 és G_4 térgradiens impulzusok 80 : 20.1 (^{13}C esetén) vagy 80 : 8.1 (^{15}N esetén) arányú alkalmazásával érjük el. A tipikusan 1 ms-os ($p16$) G_1 és G_3 tisztító térgradiens impulzusokat a maximális gradienserősség (50 G/cm) 15 illetve 11 %-ára állítjuk be, és utána egy 50-100 μs hosszúságú felépülési időt ($d16$) használunk. A protonlecsatolásért felelős blokkban alkalmazott koherenciaszelekciós gradiensimpulzusok esetén G_5 értéke 18 %. A szekvencia utolsó részében egy 180° -os szénimpulzust használunk az egykötéses heteronukleáris csatolási evolúció refókuszálására, amit a sémában szürke téglalappal jelöltem. Szélessávú heteronukleáris lecsatolást (CPD: GARP vagy WALTZ) alkalmazunk az adatgyűjtés ideje alatt.

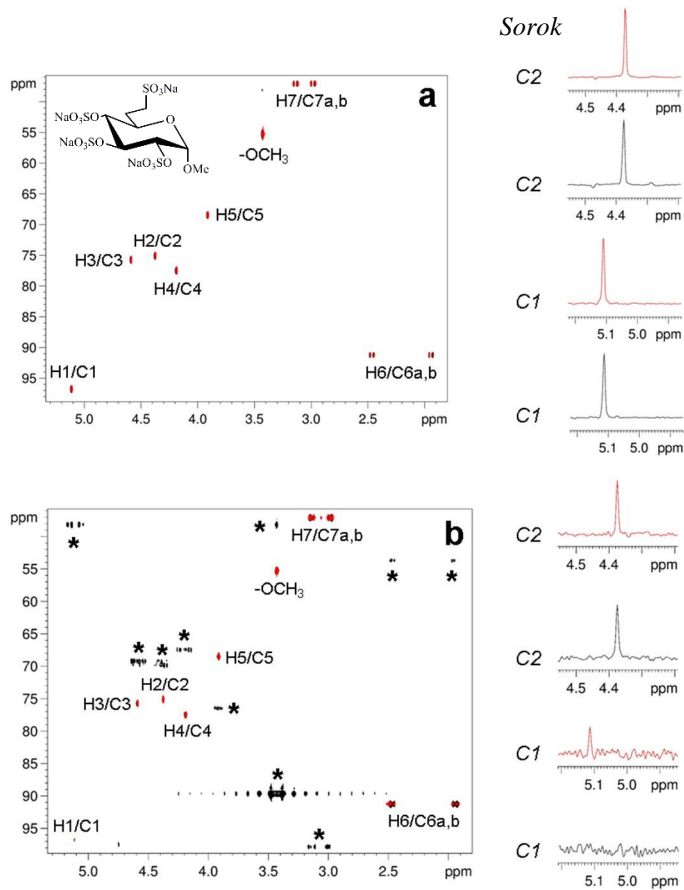
A kifejlesztett módszer előnyeit a 12. ábrán mutatom be, ami a szacharóz normál (protoncsatolt) és protonlecsatolt HSQC spektrumát illetve reprezentatív, kiemelt, vízszintes ($F2$) sorait hasonlítja össze. Egyértelműen látható, hogy a ^1H - ^{13}C korrelációs csúcsok jellegzetes multipllett struktúrája szinguletté egyszerűsödik, ami növeli a spektrális felbontást, és lehetővé teszi az automata csúcskeresést illetve spektrumelemzést még zsúfolt tartományokban is. A 12. ábrán megfigyelhető az alkalmazott BIRD^d impulzusszekvencia-elemnek egy további előnyös hatása; nevezetesen a szoros csatolásból eredő, nem kívánt, távolható korrelációs csúcsok hatékony elnyomása. A normál HSQC spektrumban (12./a ábra) és kiemelt soraiban megjelenő, nem kívánt csúcsok (csillagokkal jelölve), majdnem teljes mértékben „kiszűrésre” kerülnek a protonlecsatolt kísérletben (12./b ábra), ami szintén megkönnyíti a HSQC spektrum rutinszerű kiértékelését. A BIRD modul ezen hasznos tulajdonságát már korábban is igyekeztek kihasználni heteronukleáris korrelációs kísérletekben.^{131,132}

Ahogy már említettem, az általunk kifejlesztett módszer előtt egyetlen, hasonló elvű, szélessávú protonlecsatolt HSQC kísérlet volt ismert az irodalomban.⁶⁴ A két módszer teljesítőképességének összehasonlítása céljából HSQC spektrumokat vettünk fel azonos adatgyűjtési stratégiával, illetve mérési és processzási paraméterekkel, de a két különböző impulzusszekvenciát használva. A 13./a ábrán a megfelelően beállított INEPT/BIRD időkkel mért 2D spektrumokat és reprezentatív, kiemelt soraikat mutatom be. Ezek alapján megállapítható, hogy a kétféle impulzusprogrammal mért spektrumokban a jelintenzitások gyakorlatilag azonosak, azaz a két kísérlet érzékenysége nagyon hasonló. Azonban jelentős különbség mutatkozik a nem kívánt jelek megjelenésében, abban az esetben, ha az INEPT/BIRD időket nem az adott csatolási állandó(k)nak megfelelően állítjuk be (13./b ábra). Ugyanis 100 Hz-es $^1J_{\text{CH}}$ csatolásra optimalizált INEPT/BIRD idők esetén, amíg az általunk kifejlesztett HSQC kísérlet spektrumában csak a jelek intenzitása csökken, addig a Sakhaii és szerzőtársai által közölt⁶⁴ szekvenciát használva, a kapott spektrumban nagyszámú, jelentős intenzitású, zavaró jel látható, melyeket csillagokkal jelöltem a

13./b ábrán. Ez arra utal, hogy az impulzusszekvenciánk protonlecsatolásért felelős blokkjába beépített, a kívánt koherenciaút kiválasztását biztosító gradiensimpulzus triád hatékonyan elnyomja a protonmágnesezettség azon részét, amelyre a BIRD^d modul nem tökéletes forgatást fejt ki. Ezáltal az általunk kidolgozott módszer jó minőségű, nem kívánt jelektől mentes, tiszta HSQC spektrumot eredményez az egykötéses heteronukleáris csatolási állandók széles tartományában.



12. ábra Szacharóz (0,17 M D₂O-ban) ¹H-¹³C HSQC (a) és szélessávú protonlecsatolt ¹H-¹³C HSQC (b) spektrumának illetve kiemelt sorainak összehasonlítása. A hagyományos, gradiens koherenciaszelektációs HSQC spektrumban és kiemelt soraiban csillagokkal (*) jelöltem a szoros csatolásból adódó, nem kívánt korrelációs csúcsokat. Az ábrán látható spektrumokat a következő, azonos paraméterekkel mértük: spektrális ablak ¹H (¹³C) dimenzióban = 6,0371 (45,0) ppm, tranziensek közötti várakozási idő (*d1*) = 1,7 s illetve *t*₁ inkrementumok száma = 180. A normál HSQC kísérletet (a) 32, a protonlecsatoltat (b) 2 tranzienssel vettük fel. A protonlecsatolt módszer (b) esetén használt, specifikus paraméterek: *t*₂ inkrementumok száma (ami a gyakorlatban a FID darabok számát jelenti) = 16, egy FID darab ideje (1/*SW*₂) = 21,197 ms és a tényleges komplex adatpontok száma a ¹H dimenzióban a FID darabok összefűzését követően = 2048.



13. ábra Egy szulfonsavas monoszacharid származék (képlete az ábra felső részén látható; 0,067 M D_2O -ban) szélessávú protonlecsatolt ^1H - ^{13}C HSQC spektrumainak illetve kiemelt sorainak összehasonlítása. Az általunk kifejlesztett impulzusszekvenciával felvett spektrumokat piros színnel, a korábban közölt módszerrel⁶⁴ mérteteket pedig feketével jelöltem. A kísérletek azonos adatgyűjtési stratégiával, mérési és processzási paraméterekkel, illetve mérési idővel (3 óra 45 perc) készültek a korrekt összehasonlítás kedvéért. A szekvenciák robusztusságának tesztelése miatt az (a) esetben az INEPT/BIRD időket 145 Hz-es $^1J_{\text{CH}}$ csatolásnak, amíg a (b) kísérletekben 100 Hz-es $^1J_{\text{CH}}$ csatolásnak megfelelően állítottuk be (szándékosan elállítottuk). A kétféle impulzusszekvenciával készült spektrumokat ugyanazon intenzitáskálával jelenítettem meg, így a két módszer érzékenysége és az artefaktumok (*-gokkal jelölve) intenzitása megfelelően összehasonlítható. Az ábrán látható spektrumokat a következő, azonos paraméterekkel mértük: spektrális ablak ^1H (^{13}C) dimenzióban = 4,9887 (65,0) ppm, tranziensek közötti várakozási idő ($d1$) = 1,7 s, t_1 inkrementumok száma = 200, tranziensek száma = 2, t_2 inkrementumok száma (ami a gyakorlatban a FID darabok számát jelenti) = 16, egy FID darab ideje ($1/SW_2$) = 20,842 ms és a tényleges komplex adatpontok száma a ^1H dimenzióban a FID darabok összefűzését követően = 1664.

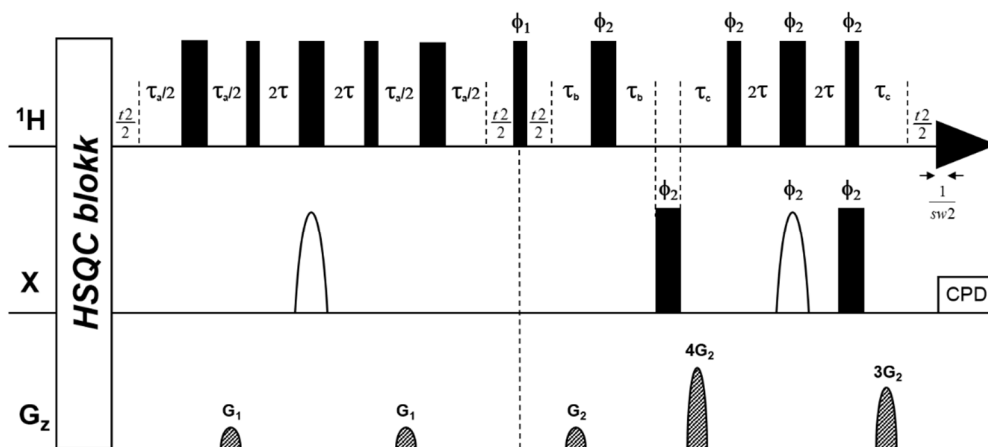
A dolgozat „Irodalmi előzmények” részének 2.2.5. alfejezetében már említettem, hogy a BIRD módszer a diasztereotóp hidrogének közötti geminális proton-proton csatolás elnyomására nem alkalmas, mert nem tud különbséget tenni az ugyanazon ^{13}C maghoz kapcsolódó hidrogének között. Ennek hatását a 13./a ábrán is megfigyelhetjük; nevezetesen a 2D spektrumban a 6-os és 7-es diasztereotóp protonok korrelációs csúcsai dublettek az aktív geminális csatolásoknak köszönhetően. Emiatt a BIRD-lecsatolt kísérletek alkalmazása kevésbé vonzó olyan molekulák tanulmányozásában, amelyek diasztereotóp metilén hidrogéneket tartalmaznak, márpedig szerves vegyületek esetén ez meglehetősen gyakori eset. A BIRD és a „perfect echo”¹³³ szekvenciaelemek kombinálásával kidolgoztunk egy új, „perfectBIRD”-nek elnevezett impulzusblokkot (14. ábra), amely a geminális proton-proton csatolás hatását is képes kiszűrni a HSQC spektrumból.⁶⁸ Ezáltal kiküszöböltük a BIRD-lecsatolás legkomolyabb hátrányát.

Takegoshi és munkatársai egy dupla spin-echo szekvencia közepére egy 90° -os protonimpulzust beillesztve hozták létre a perfect echo szekvenciát ($90^\circ\text{-}\tau\text{-}180^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ\text{-}\tau\text{-}180^\circ\text{-}\tau$), amely egy egyszerű AX spinrendszer esetén nemcsak a kémiai eltolódási, hanem a csatolási evolúciót is refókuszálja a teljes echo periódus végére.¹³³ Az extra 90° -os impulzus ugyanis megfordítja a csatolási evolúció irányát, ezáltal a dupla spin-echo első fele alatt kifejlődött J -moduláció a második felében refókuszálódik. Később megmutatták, hogy a perfect echo bonyolultabb spinrendszerek esetén is jelentősen képes csökkenteni a J -moduláció hatását, ha a $\tau \cdot J \ll 1$ feltétel teljesül.¹³⁴ Nemrég ezt kihasználták különféle módszerekben^{135,136} a perfect echo szekvenciaelem rövid τ idővel történő, ismétlődő alkalmazásával, azonban ez a típusú megoldás nem használható homonukleáris lecsatolásra.

Emiatt a perfect echo szekvencia első 180° -os protonimpulzusát lecseréltük egy BIRD^{d,x} modulra (ami a ^{13}C -hez közvetlenül kapcsolódó protonokat és a ^{13}C -et invertálja), második 180° -os protonimpulzusát pedig az előzőekben bemutatott (11. ábra), a HSQC kísérletet homonukleárisan lecsatoló impulzusblokkal helyettesítettük. A BIRD szekvenciaelem a geminális proton-proton csatoláson kívül a többi homonukleáris csatolás refókuszálására alkalmas komplex spinrendszerekben is, amint azt már a korábbiakban bemutattam. A perfectBIRD megközelítés újszerűsége, hogy – ha a 90° -os impulzus előtti, protonlecsatolásért felelős periódus ugyanolyan hosszú, mint az utána következő – akkor az impulzusszekvencia végére a geminális proton-proton csatolás is refókuszálódik, hiszen a perfectBIRD modul közepén a 90° -os protonimpulzus megfordítja a csatolási evolúció irányát.

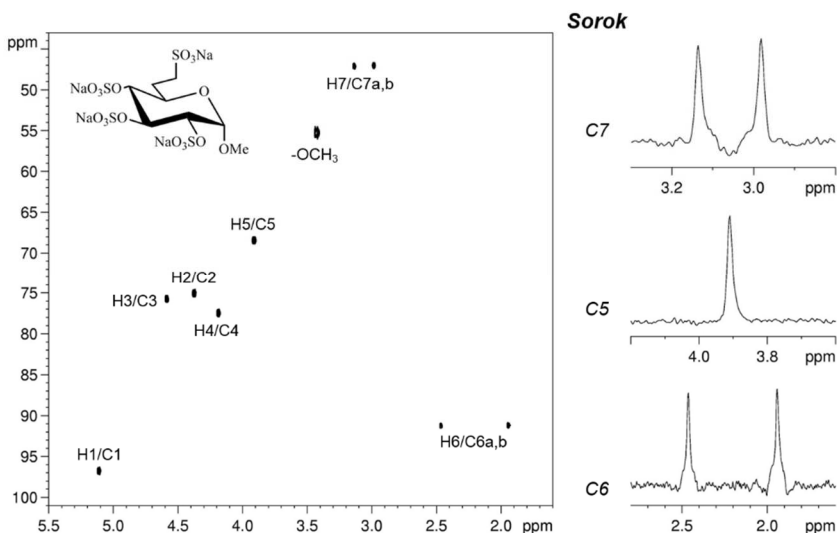
A perfectBIRD-lecsatolt kísérletben ugyanazt az interferogram-típusú adatgyűjtési stratégiát alkalmazzuk, amit a BIRD-lecsatolt HSQC impulzusszekvencia

esetén részletesen bemutattam, ezért itt erre már nem térek ki. A 14. ábrán látható a perfectBIRD-lecsatolt HSQC kísérlet sémája, melyen a teljes impulzusszekvencia hosszúságára való tekintettel csak az új, perfectBIRD modult tüntettem fel részleteiben, a kezdeti, normál HSQC részt egy téglalap jelöli. Fontosnak tartom itt megjegyezni, hogy a perfectBIRD szekvenciaelem kidolgozása kapcsán a kiindulási ötlet egyik német együttműködő partnerünk, Lukas Kaltschnee nevéhez köthető, én az impulzusszekvencia tesztelésében és finomításában vettem részt.



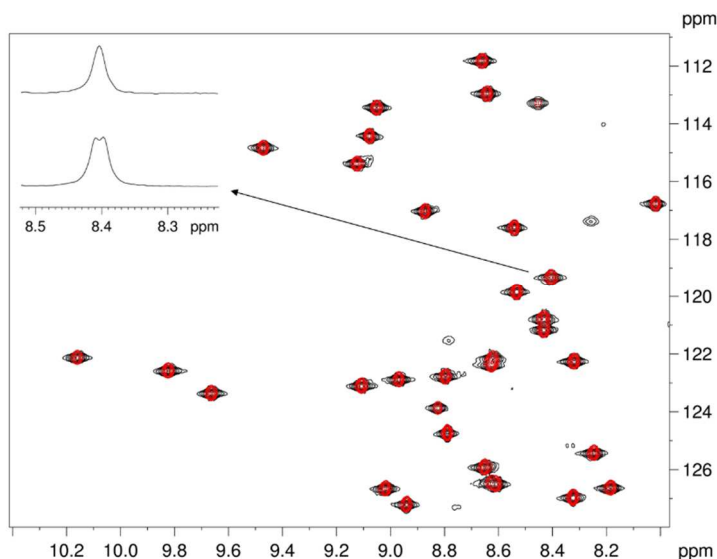
14. ábra PerfectBIRD-típusú, szélessávú protonlecsatolt HSQC impulzusszekvencia sematikus megjelenítése. A kezdeti, normál, gradiens koherenciaszelekcíós HSQC szekvenciárészt egy fehér téglalap reprezentálja. A keskeny és szélesebb fekete téglalapok 90° illetve 180° -os, x fázisú impulzusokat jelölnek, hacsak nem jelzem (ϕ_n) külön. Fél-ellipsziszekkel jelöltem az adiabatikus Chirp inverziós és refókuszáló X impulzusokat. Az ábrán feltüntetett impulzusok fázisai: $\phi_1 = y$, x ; $\phi_2 = y$. Az időintervallumokat a következőképpen állítjuk be: $\tau = 1/(4 * ^1J_{XH})$, $\tau_a = 1/(4 * sw^2) + \tau_b + \tau_c$, $\tau_b = 1/(4 * sw^2) - p3$, $\tau_c = p16 + d16 + 350 \mu s - p3$. A tipikusan 1 ms-os (p16) G_1 és G_2 tisztító és koherenciaszelekcíós gradiensimpulzusokat a maximális gradiensereőség (50 G/cm) 17 illetve 18 %-ára állítjuk be, és utána egy 50-100 μs hosszúságú felépülési időt (d16) használunk. Szélessávú heteronukleáris lecsatolást (CPD) alkalmazunk az adatgyűjtés ideje alatt.

A 15. ábrán egy monoszacharid származék perfectBIRD-lecsatolt HSQC spektruma látható. A 2D spektrumon és a kiemelt, C6 és C7 sorokon is jól megfigyelhető, hogy a perfectBIRD szekvenciaelem – ellentétben a BIRD modullal (13./a ábra) – megszünteti a geminális proton-proton csatolás hatását is, így kizárólag szingulett jelekből álló HSQC spektrumhoz jutunk diasztereotóp metilén hidrogéneket tartalmazó molekulák esetén is (15. ábra).



15. ábra Egy szulfonsavas monoszacharid származék (szerkezeti képlete az ábra felső részén látható; 0,067 M D_2O -ban) perfectBIRD-típusú, szélessávú protonlecsatolt ^1H - ^{13}C HSQC spektruma illetve kiemelt sorai. Az ábrán látható spektrumot a következő paraméterekkel mértük: spektrális ablak ^1H (^{13}C) dimenzióban = 4,9887 (65,0) ppm, tranziensek közötti várakozási idő ($d1$) = 1,7 s, t_1 inkrementumok száma = 200, tranziensek száma = 8, t_2 inkrementumok száma (ami a gyakorlatban a FID darabok számát jelenti) = 16, egy FID darab ideje ($1/SW_2$) = 20,842 ms és a tényleges komplex adatpontok száma a ^1H dimenzióban a FID darabok összefűzését követően = 1664.

Vizsgálva a BIRD-lecsatolt impulzusszekvencia alkalmazhatóságát makromolekulák esetében is, felvettük az 55 aminosavegységből álló ^{15}N -jelzett PAF fehérje (*Penicillium AntiFungal protein*)^{137,138} szélessávú protonlecsatolt ^1H - ^{15}N HSQC spektrumát, amit a 16. ábrán hasonlítok össze a hagyományos ^1H - ^{15}N HSQC spektrummal. Megfigyelhető, hogy a proton-proton csatolások okozta jelfelhasadások megszüntetése a spektrumban, kisméretű fehérje esetén is jelentős vonalkeskenyedéshez vezet, és az NH kémiai eltolódások egyszerű és pontos meghatározását teszi lehetővé a kapott, protonlecsatolt szinguletteken akár automata csúcskeresés használatával is.



16. ábra ^{15}N -jelölt PAF fehérje (55 aminosavegység, 1,6 mM) ^1H - ^{15}N HSQC (fekete korrelációs csúcsok és az alsó sor a fenti kiemelésben) és BIRD-típusú protonlecsatolt ^1H - ^{15}N HSQC (piros korrelációs csúcsok és a felső sor a fenti kiemelésben) spektrumának összehasonlítása H_2O -s közegben (95 % H_2O / 5 % D_2O). Az ábrán látható spektrumokat 300 K hőmérsékleten a következő, azonos paraméterekkel mértük: spektrális ablak ^1H (^{15}N) dimenzióban = 4,9887 (19,0) ppm, tranziensek közötti várakozási idő (dI) = 1,7 s illetve t_1 inkrementumok száma = 128. A hagyományos HSQC kísérletet 64, a protonlecsatoltat 4 tranzienssel vettük fel. A protonlecsatolt módszer esetén használt, specifikus paraméterek: t_2 inkrementumok száma (ami a gyakorlatban a FID darabok számát jelenti) = 16, egy FID darab ideje ($1/SW_2$) = 21,245 ms és a tényleges komplex adatpontok száma a ^1H dimenzióban a FID darabok összefűzését követően = 1696.

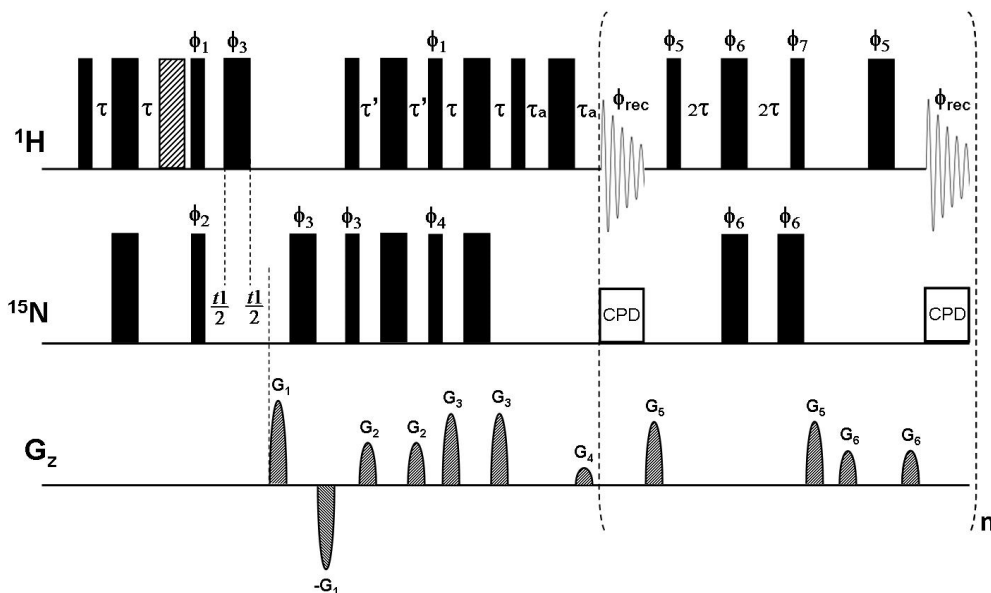
Bár látható a 16. ábrán, hogy a kifejlesztett, interferogram-típusú, szélessávú protonlecsatolt HSQC szekvencia alkalmazása makromolekulák esetén is hasznos lehet, azonban nem szabad figyelmen kívül hagyni azt a tényt, hogy a lecsatoláshoz szükséges extra dimenzió használata jelentősen megnöveli a mérési időt (jelen esetben ~ 4,5 óra volt). A biomolekuláris NMR-ben a mérési idő (vagy másik oldalról közelítve az érzékenység) kritikus tényező, hiszen általában nincs lehetőség (előállítási és/vagy oldékonysági problémák miatt) tetszőlegesen nagy koncentrációjú NMR minta készítésére, ugyanakkor többdimenziós spektrumok mérésére van szükség. Emiatt az interferogram-típusú, protonlecsatolt HSQC kísérlet makromolekulák vizsgálatában való mindennapos alkalmazása nem tűnik praktikusnak. Érdeklődésünk így a módszer felgyorsításának irányába fordult, amihez kézenfekvő segítségként adódott az irodalomban közben megjelent, valós idejű lecsatolási stratégia.¹⁰⁵

4.1.2. Valós idejű szélessávú protonlecsatolás megvalósítása HSQC kísérletben

Időközben Morris és munkatársai közölték az első „valós idejű” (detektálás ideje alatti), BIRD-lecsatolt HSQC impulzusszekvenciát,⁶³ ami egyike azon kivételes homonukleárisan lecsatolt módszereknek, amelyek nemcsak a spektrális felbontást, hanem a jel-zaj arányt is képesek növelni a konvencionálisan mért spektrumokhoz képest. A Morris és munkatársai által 2013-ban publikált kísérlet⁶³ azonban nem alkalmas könnyűvizes minták vizsgálatára, ugyanis nem tesz lehetővé megfelelő víznyomást. Általánosságban elmondható, hogy a homonukleáris lecsatolást alkalmazó kísérletek esetén a víznyomás megoldása nem triviális feladat. A probléma különösen jelentős a valós idejű adatgyűjtési stratégiájú módszereknél, mert a FID darabok detektálása között alkalmazott, a proton-proton lecsatolást eredményező szekvenciaelemek invertálják a passzív spineket, így köztük a víz protonokat is. Ezáltal a z-irányú vízmágnesezettség bizonyos része az impulzusok „tökéletlensége” miatt az xy síkba kerül. A szelektív, vízmágnesezettség visszabillentő impulzusok (water flip-back)¹³⁹ alkalmazása lehetne az egyik megoldás, azonban ez a vízfrekvencia közelébe eső H_{α} rezonanciákra is hatna, ezáltal pedig nem kívánt visszacsatolást idézne elő az érintett NH jelekben. Emiatt a BIRD blokk és a nem-szelektív 180° -os protonimpulzus köré szimmetrikusan elhelyezett, megfelelő hosszúságú és erősségű térgradiens impulzuspárokkal oldottuk meg a vízmágnesezettség z irányban tartását (az xy mágnesezettségi komponensek elnyomását) az akvizíció alatt.⁶⁹ Ezzel a megoldással több, mint egy nagyságrenddel csökkentettük a maradék vízjelet, és a nem protonlecsatolt HSQC kísérletben tapasztalható szintre hoztuk.

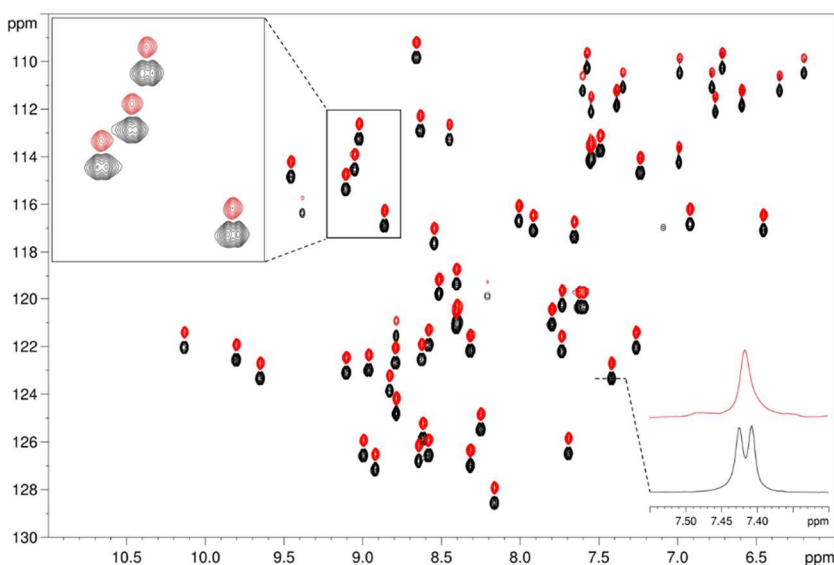
Szem előtt tartva, hogy a biomolekuláris NMR területén a maximálisan elérhető érzékenység kiemelkedő jelentőséggel bír, ezért nem a normál, hanem az érzékenységnövelt (SE by PEP, *Sensitivity Enhanced by Preservation of Equivalent Pathways*) HSQC kísérletet fejlesztettük tovább valós idejű protonlecsatolással. Ahogy a 17. ábrán is látható, az érzékenységnövelt 1H - ^{15}N HSQC szekvencia detektálási ideje alatt megkezdjük az adatgyűjtést egy olyan FID darab detektálásával, ami fele olyan időtartamú ($AQ/2n$), mint az utána következők. Ezt követően megszakítjuk az adatgyűjtést, és egy BIRD^d impulzusszekvencia-elem (csak a ^{15}N -hez közvetlenül kapcsolódó protonokat invertálja) illetve egy nem-szelektív 180° -os protonimpulzus kombinációjával refókuszáljuk a proton-proton csatolási evolúciót, majd egy 10-25 ms-os FID darabot (AQ/n) rögzítünk. A FID darabok detektálását és a J -refókuszálást felváltva végezzük addig, amíg a teljes FID-et meg nem kapjuk (az utolsó FID darab ismét fele olyan hosszú ($AQ/2n$), mint a közbelső). A FID darabok összefűzését – amint azt az irodalmi előzmények 2.3.2. alfejezetében már említettem – a spektrométer az

akvizíció alatt, „valós időben” elvégzi. Végül térgradiens impulzuspároknak a protonlecsatolást biztosító szekvenciaelembe történő megfelelő beépítésével egy olyan kísérletet fejlesztettünk ki, ami könnyűvizes minták vizsgálata esetén is tiszta kémiai eltolódású, érzékenységnövelt ^1H - ^{15}N HSQC spektrumot eredményez.

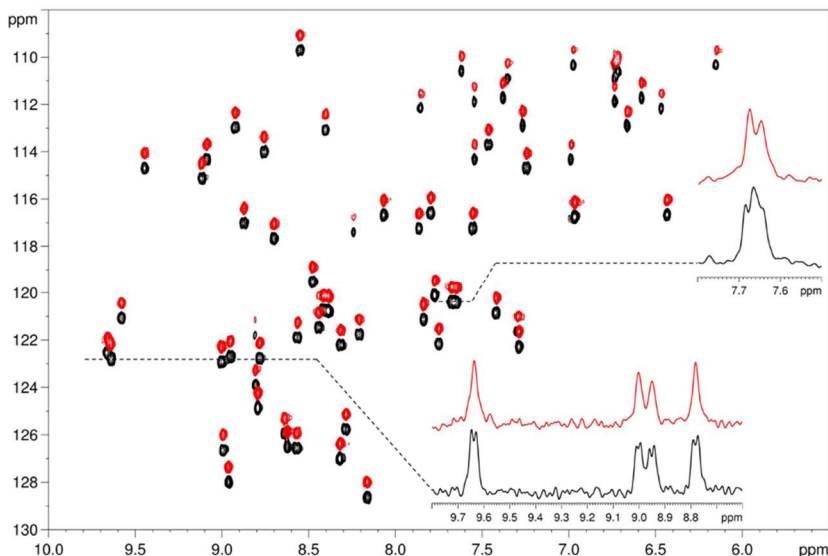


17. ábra Valós idejű szélessávú protonlecsatolt, érzékenységnövelt ^1H - ^{15}N HSQC impulzusszekvencia sematikus megjelenítése. A keskeny és szélesebb téglalapok 90° illetve 180° -os, x fázisú impulzusokat jelölnek, hacsak nem jelzem külön az attól való eltérést (ϕ_n). A kezdeti INEPT blokkban a tisztító hatású „trim” impulzust egy csíkozott, szélesebb téglalap jelöli. Az impulzusok fázisai: $\phi_1 = y$; $\phi_2 = x, -x$; $\phi_3 = x, x, x, x, -x, -x, -x, -x$; $\phi_4 = y, y, y, y, -y, -y, -y, -y$; $\phi_5 = x, x, y, y$; $\phi_6 = y, y, -x, -x$; $\phi_7 = -x, -x, -y, -y$; és $\phi_{\text{rec}} = x, -x, x, -x, -x, x, -x, x$. Az időintervallumokat a következőképpen állítjuk be: $\tau = 1/(4 * ^1J_{\text{NH}})$, $\tau' = 1/(4 * ^1J_{\text{NH}})$ NH esetben vagy $1/(8 * ^1J_{\text{NH}})$ mindenféle multiplicitás esetén, $\tau_a = p16 + d16 + 8 \mu\text{s}$. A koherenciaszelekciót és az echo-antiecho fázisérzékeny detektálást a ^{15}N dimenzióban a $G_1, -G_1$ és G_4 térgradiens impulzusok $80 : -80 : 16,2$ arányú alkalmazásával érjük el. A tipikusan 1 ms-os (p16) G_2 és G_3 tisztító gradiensimpulzusokat a maximális gradiensereőség (50 G/cm) 42 illetve 67 %-ára állítjuk be, és utána egy 100 μs hosszúságú felépülési időt (d16) használunk. A FID darabok detektálása között, a BIRD blokk és a nem-szelektív 180° -os protonimpulzus köré szimmetrikusan elhelyezett, 0,5 ms-os koherencia átviteli út (CTP) kiválasztásáért felelős térgradiens impulzusokat ($G_5 = 61\%$ és $G_6 = 31\%$), és mindegyik után 100 μs -os felépülési időt alkalmazunk. A szélessávú heteronukleáris lecsatolást (CPD) bekapcsoljuk a FID darabok gyűjtésének ideje alatt.

A kifejlesztett módszer teljesítőképességét és robusztusságát a PAF fehérje ^{15}N -jelölt és jelöletlen mutánsain könnyűvízes közegben (95 % H_2O / 5 % D_2O) teszteltük. A 18-19. ábrákon a PAF mutánsok valós idejű protonlecsatolt (piros), illetve standard (fekete) érzékenységnövelt ^1H - ^{15}N HSQC spektrumait hasonlítom össze. Mind a 2D szintvonalas megjelenítéseken, mind a kiemelt sorokon jól megfigyelhető, hogy a proton-proton csatolások okozta felhasadások megszüntetésével a spektrális felbontás nő, és a jelátfedések csökkennek. A protonlecsatolt spektrumokban kapott szingulették lehetővé teszik a rezonanciák ^1H kémiai eltolódásának egyértelmű definiálását, ezáltal pedig az automatizált kiértékelést. Az alkalmazott térgradiens impulzusséma hatékonyan elnyomja az erős vízjelet, és tiszta, zavaró jelektől mentes spektrumot eredményez, még természetes izotópgyakoriságú (jelöletlen) fehérje mérése esetén is (19. ábra).



18. ábra ^{15}N -jelölt PAF^{D19S} fehérje (55 aminosavegység, 1,7 mM) érzékenységnövelt ^1H - ^{15}N HSQC (fekete) és valós idejű protonlecsatolt, érzékenységnövelt ^1H - ^{15}N HSQC (piros) spektrumának összehasonlítása könnyűvízes közegben (95 % H_2O / 5 % D_2O). A nitrogén dimenzióban eltoltam a protonlecsatolt spektrumot a jobb összehasonlíthatóság kedvéért. Az ábrán látható spektrumokat 22 perc alatt a következő, azonos paraméterekkel mértük: spektrális ablak ^1H (^{15}N) dimenzióban = 4,788 (21,0) ppm, komplex adatpontok száma a ^1H dimenzióban = 2048, t_1 inkrementumok száma = 128, tranziensek száma = 4 és a tranziensek közötti várakozási idő (dI) = 1,8 s. A protonlecsatolt kísérletben a FID-et 16 darabban detektáltuk, és egy FID darab időtartama 26,7 ms volt.



19. ábra Jelöletlen PAF^{D55N} fehérje (55 aminosavegység, 6,5 mM) érzékenységnövelt ¹H-¹⁵N HSQC (fekete) és valós idejű protonlecsatolt, érzékenységnövelt ¹H-¹⁵N HSQC (piros) spektrumának összehasonlítása könnyűvízes közegben (95 % H₂O / 5 % D₂O). A nitrogén dimenzióban eltoltam a protonlecsatolt spektrumot a jobb összehasonlíthatóság kedvéért. Az ábrán látható spektrumokat 10 óra 12 perc alatt a következő, azonos paraméterekkel mértük: spektrális ablak ¹H (¹⁵N) dimenzióban = 4,788 (21,0) ppm, komplex adatpontok száma a ¹H dimenzióban = 1024, *t*₁ inkrementumok száma = 128, tranziensek száma = 128 és a tranziensek közötti várakozási idő (*dI*) = 1,8 s. A protonlecsatolt kísérletben a FID-et 8 darabban detektáltuk, és egy FID darab időtartama 26,7 ms volt.

A korrekt összehasonlítás kedvéért a 18-19. ábrán feltüntetett spektrum párokat azonos mérési paraméterekkel és idővel vettük fel, illetve ugyanazon intenzitáskálálással jelenítettem meg. A kiemelt sorok azt mutatják, hogy a protonlecsatolás a felbontás javítása mellett általában a jel-zaj arányt – ugyan szerény mértékben – de szintén növeli. Bizonyos jelek esetében 20-30 %-os intenzitásnövekedést is tapasztaltunk, ez azonban az elméleti 100 %-os értéktől (duplettek és tripletek lecsatolásával számolva) egyértelműen elmarad. Ennek oka az adatgyűjtést megszakító *J*-refókuszáló blokkok alatti transzverzális relaxációban keresendő. Nagyobb molekulák (pl. fehérjék) általában rövid *T*₂ relaxációs idővel rendelkeznek, így az esetükben – szemben a kismolekulákkal – már nem elhanyagolható a protonlecsatoló blokkok alatti relaxációs veszteség. Emiatt a gyakorlatban a valós idejű homonukleárisan lecsatolt módszerek kisméretű illetve rendezetlen fehérjék esetén használhatók eredményesen. Tapasztalataink szerint a lecsatolásból eredő érzékenységnövekedés mértéke rezonanciáról rezonanciára is

változhat. Jelentősebb olyan rezonanciákon, amelyek nagyobb homonukleáris csatolással és/vagy hosszabb T_2 relaxációs idővel rendelkeznek, és kisebb a gyakorlatilag feloldhatatlan csatolással jellemezhető rezonanciajeleken, azaz amikor a természetes jelszélesség összemérhető a proton-proton csatolással. Jelentős mértékű érzékenységvesztés akkor következik be, amikor a természetes jelszélesség nagyobb, mint a proton-proton csatolási állandó; ebben az esetben a homonukleárisan lecsatolt módszerek használata feleslegessé válik. Összefoglalva elmondható, hogy a valós idejű protonlecsatolt HSQC kísérletekben mind a felbontás, mind a jel-zaj viszony javul, de amíg a kismolekulák vizsgálatakor a multiplettek szinguletté való egyszerűsödése jelentős intenzitásnövekedéssel jár, addig makromolekuláknál ez nem szignifikáns. Kisméretű fehérjék valós idejű protonlecsatolt spektrumaiban (18-19. ábra) a transzverzális relaxáció miatt olyan szingulett rezonanciajeleket kapunk, amelyek keskenyebbek, mint az eredeti multiplettek, viszont szélesebbek, mint a multiplettek egyes komponensei.

A valós idejű protonlecsatolt kísérletekben a transzverzális relaxáció okozta veszteségek mértékét a J -refókuszáló impulzusblokk időtartama és ismétlésének száma határozza meg. Az előbbi paraméter a BIRD-lecsatolt ^1H - ^{15}N HSQC kísérletekben elsősorban az egykötéses ^1H - ^{15}N csatolási állandó értékétől függ (az átlagos $^1J_{\text{NH}} \approx 90$ Hz-zel számolva ez 11 ms), így ezen a spektroszkópus nem tud változtatni. A J -refókuszáló szekvenciaelem ismétlésének számát közvetlenül a detektált FID darabok száma, közvetetten pedig – adott teljes akvizíciós idő esetén – a FID darabok időtartama határozza meg. (Hiszen a teljes akvizíciós idő = FID darabok száma \times FID darab időtartama.) Utóbbi paraméter beállításánál kompromisszumot kell kötni. Ugyanis, ha túl hosszú FID darabokat gyűjtünk, akkor a proton-proton csatolási evolúció már nem lesz elhanyagolható a detektálás ideje alatt, ami tökéletlen lecsatoláshoz, és periódikusan megjelenő, zavaró jelekhez fog vezetni a spektrumban. Ha pedig túl rövid FID darabokat detektálunk, akkor ugyanazon teljes akvizíciós idő eléréséhez több FID darabra van szükségünk, ezáltal többször kell a J -refókuszáló szekvenciaelemet alkalmaznunk, ami jelentősebb relaxációs veszteséghez és jelszélesedéshez vezet.

A valós idejű homonukleárisan lecsatolt ^1H - ^{15}N HSQC módszer fehérje alkalmazásokat bemutató közleményünkben⁶⁹ részletesen összehasonlítottuk a BIRD-típusú lecsatolást a sávselektív impulzust használó BASHD és a SESAM-típusúakkal (előbbi megközelítésről a dolgozat 2.3.2. alfejezetében, utóbbiról a 2.1. fejezetében írtam). Mivel az összehasonlító méréseket manchesteri együttműködő partnereink és szerzőtársaink végezték, ezért értekezésemben a kapott eredményeket nem mutatom be részletekbe menően. Összefoglalásképpen annyit azért megjegyeznek itt, hogy a BASHD-típusú lecsatolás előnye a BIRD-del szemben a J -refókuszáló impulzusblokk

rövidebb időtartama. Mivel a sávselektív impulzus ideje fordítottan arányos a mágneses térerősséggel, ezáltal a BASHD módszer előnye fokozódik egyre nagyobb mágneses térerősségű készülékeken. A régebbi, SESAM kísérlettel elért sávselektív homonukleáris lecsatolás is jelentősen növeli a felbontást a HSQC spektrumban. Azonban a módszer korábban (2.3.2. alfejezet) már említett hátrányai, nevezetesen, hogy a korrelációs csúcsok pozíciói különböznek a valós kémiai eltolódás értékektől a Bloch-Siegert effektus¹⁰⁶ miatt, illetve hogy nem tesz lehetővé megfelelő vízelnymást, korlátozzák alkalmazási lehetőségét a gyakorlatban.

4.2. Egykötéses heteronukleáris csatolási állandók meghatározására alkalmas CLIP/CLAP-HSQC módszer továbbfejlesztése

Az egykötéses heteronukleáris csatolási állandók ($^1J_{XH}$ és $^1D_{XH}$) fontos információt hordoznak a molekulák szerkezetéről. Felhasználhatók konformációs vizsgálatokra, úgymint peptidek konformációs jellemzésének pontosítására,¹⁴⁰ illetve konfiguráció meghatározására például szénhidrátok anomer centrumának esetében.¹⁴¹ A maradék dipoláris csatolási állandók (D) – melyek az izotróp illetve a részlegesen orientált közegben mért, (leggyakrabban egykötéses heteronukleáris) csatolási állandók különbségeként származtathatók – pedig rendkívül értékes, távolható kényszerfeltételeket adnak molekulák konstitúciójának, konformációjának és relatív konfigurációjának meghatározásához.¹⁴² Ezáltal az ezredforduló óta egyre kiterjedtebben használják a maradék dipoláris csatolási állandókat (*Residual Dipolar Couplings - RDCs*) biomakromolekulák (fehérjék, nukleinsavak),¹⁴³⁻¹⁴⁷ kis és közepes méretű szerves¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ és elemorganikus^{151,152} vegyületek dinamikai és szerkezetvizsgálatára, -finomítására.

A maradék dipoláris csatolási állandók alkalmazási lehetőségei iránti növekvő érdeklődés vezetett számos, egykötéses heteronukleáris csatolási állandók meghatározására alkalmas módszer kifejlesztésére. A HSQC kísérlet $F1$ vagy $F2$ dimenzióban heteronukleárisan csatolt változatai a legszélesebb körben alkalmazott módszerek.¹²⁴ Abból a célból, hogy a csatolt spektrumban a megnövekedett számú korrelációs csúcs okozta spektrális zsúfoltságot csökkentsék, javasolták az irodalomban az E-COSY,¹⁵³ spinállapot szelektív,¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ IPAP¹⁵⁷ és TROSY¹⁵⁸⁻¹⁶⁰ megközelítéseket. Azonban ezen módszerek mindegyikével az a probléma, hogy a hasznos egykötéses heteronukleáris csatolási evolúció mellett egyéb csatolási kölcsönhatások is érvényesülnek, így a kapott spektrumokban a rezonanciajelek nem kívánt, extra felhasadásai nehezítik a pontos kiértékelést.

Az $F1$ dimenzióban csatolt HSQC kísérletben a többkötéses heteronukleáris csatolások okozta, zavaró felhasadásokat a t_1 evolúciós periódusba beépített, gradiensimpulzusokkal támogatott BIRD^f modullal szűrték ki.¹⁶¹ Az így mért spektrumokban a korrelációs csúcsok csak a meghatározni kívánt egykötéses heteronukleáris csatolások miatt hasadnak fel.¹⁶² Az $F1$ -csatolt HSQC módszereknek azonban van további két hátrányos tulajdonsága. Az egyik az, hogy nagyszámú kísérletet kell rögzíteni az $F1$ dimenzióban ahhoz, hogy megfelelő digitális felbontást kapjunk a csatolási állandók pontos meghatározásához. Ez rendkívül időigényes, bár az utóbbi időben NUS (*Non-Uniform Sampling*) használatával sikerült felgyorsítani a kísérleteket.¹⁶³ A másik hátránya pedig az, hogy a diasztereotóp metilén-csoportok

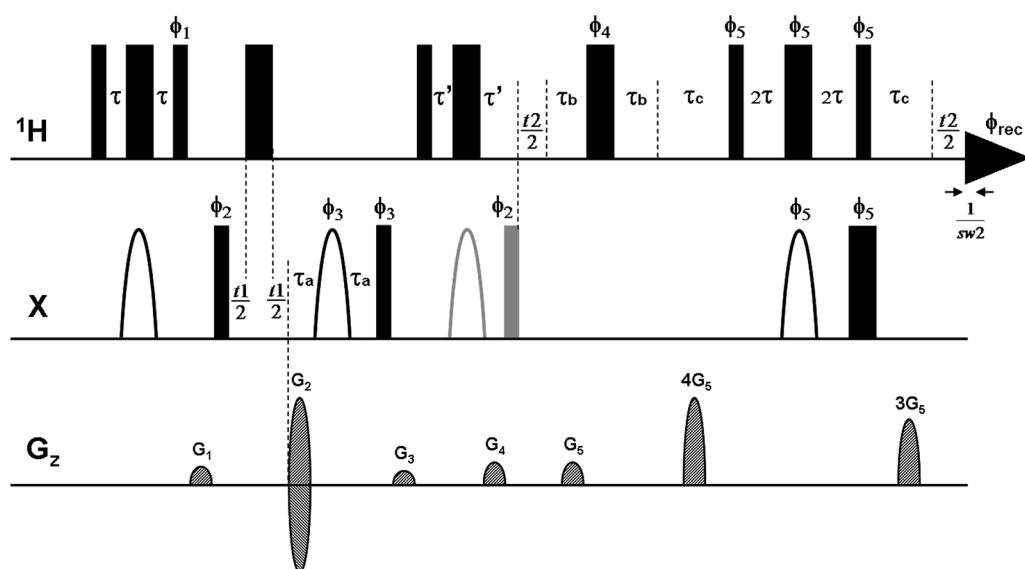
esetén csak a két $^1J_{CH}$ összegét tudjuk mérni az $F1$ -csatolt HSQC spektrumban. Ezen hátrányok miatt az egykötéses heteronukleáris csatolási állandók meghatározása kedvezőbb az $F2$ -csatolt HSQC spektrum nagy digitális felbontást biztosító, direkt ($F2$) dimenziójában. Az utóbbi években az alap $F2$ -csatolt HSQC impulzusszekvenciát többféleképpen továbbfejlesztették annak érdekében, hogy a kísérlet robosztusabb legyen az INEPT idő megválasztásával, illetve az INEPT alatti proton-proton csatolási evolúció okozta modulációkkal szemben. A javasolt CLIP/CLAP- (*CLean In-Phase/CLean Anti-Phase*),¹⁶⁴ COB- (*Couplings, Offsets, B₁-field inhomogeneities optimized*),¹⁶⁵ PIP- (*Pure In-Phase*)¹⁶⁶ és Perfect-HSQC¹⁶⁷ kísérletek képesek kiküszöbölni az alap spektrumban jelentkező fázisproblémákat. A továbbfejlesztett módszerek használatát azonban korlátozzák a skaláris és dipoláris (utóbbi csak anizotróp közegben) proton-proton csatolások okozta, extra jelfelhasadások. Ugyanis a kísérletek eredményeként kapott összetett és bizonyos esetekben aszimmetrikus multiplettek megnehezítik, esetenként ellehetetlenítik a csúcspozíciók pontos megtalálását, ezáltal pedig a heteronukleáris csatolások megbízható mérését. Azt gondoltuk, hogy ez a probléma megoldható lenne az $F2$ dimenzióban heteronukleárisan csatolt HSQC impulzusszekvencia szélessávú homonukleáris lecsatolással való továbbfejlesztésével.

4.2.1. Interferogram-típusú szélessávú protonlecsatolás megvalósítása CLIP/CLAP-HSQC kísérletekben

Kihasználva azt, hogy a BIRD-típusú homonukleáris lecsatolás az egykötéses heteronukleáris kísérletekben (pl. HSQC) nem okoz érzékenysévesztést (ugyanis ezekben eleve csak a ^{13}C -hez kapcsolódó protonokat detektáljuk), így az egykötéses heteronukleáris csatolási állandók mérésére alkalmas CLIP/CLAP-HSQC módszert is BIRD-lecsatolással fejlesztettük tovább. Az értekezés 4.1.1. alfejezetében tárgyalt homonukleárisan lecsatolt HSQC kísérlethez hasonlóan, a CLIP/CLAP-HSQC kísérletek direkt ($F2$) dimenziójában is az interferogram-típusú adatgyűjtési stratégia és a BIRD^d izotópszелеkció kombinálásával értünk el szélessávú protonlecsatolást.⁶⁵ A kifejlesztett, protonlecsatolt CLIP/CLAP-HSQC impulzusszekvencia általános sémája a 20. ábrán látható, ami nagyon hasonlít a lecsatolt HSQC szekvenciáéhoz (11. ábra), emiatt itt támaszkodnék a dolgozat 4.1.1. alfejezetében leírtakra, a kísérlet részletes tárgyalásától eltekintek, csak a különbségeket emelem ki.

Az egyik eltérés, miszerint a kísérlet az Enthart és szerzőtársai által javasolt CLIP/CLAP-HSQC impulzusszekvenciával¹⁶⁴ indul. A CLIP-HSQC szekvencia abban különbözik a normál HSQC-tól, hogy a végén egy 90° -os X impulzus alkalmazásával a

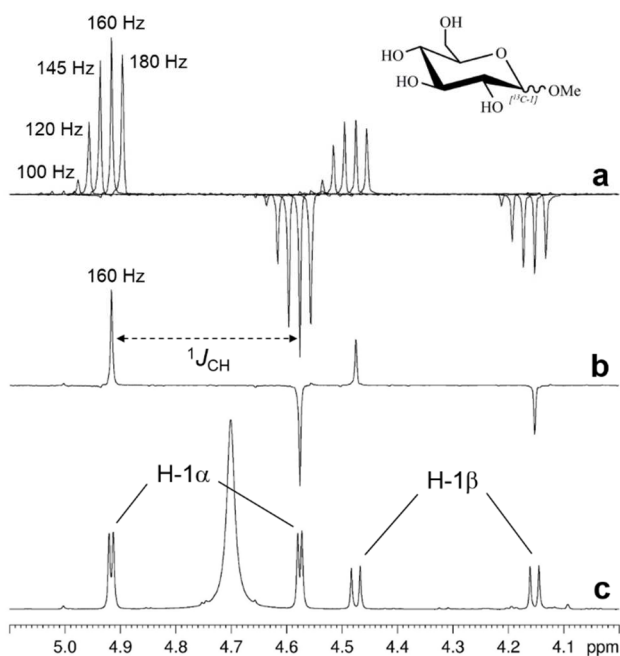
nem kívánt, ellenfázisú protonmágnesezettséget nem detektálható, többkvantum koherenciákká (MQC) alakítja. Ezzel szemben a CLAP kísérletben elhagyjuk ezt a 90° -os illetve az előtte lévő 180° -os X impulzust (szürkével jelölve a 20. ábrán), ugyanis a CLAP esetén az $X \rightarrow ^1\text{H}$ polarizációtranszfer utáni, ellenfázisú protonmágnesezettséget kívánjuk detektálni. A másik eltérés a homonukleárisan lecsatolt HSQC szekvenciához képest, hogy mivel a CLIP/CLAP-HSQC kísérletekkel az egykötéses heteronukleáris csatolások meghatározása a cél, ezért a protonlecsatolásért felelős impulzusblokkban elhagyjuk azt a 180° -os X impulzust, amivel az egykötéses heteronukleáris csatolási evolúciót refókuszáljuk a lecsatolt HSQC szekvenciában. Ezzel összhangban az adatgyűjtés alatt nem alkalmazunk heteronukleáris lecsatolást.



20. ábra Interferogram-típusú szélessávú protonlecsatolt CLIP/CLAP-HSQC impulzusszekvencia sematikus megjelenítése. A keskeny és szélesebb téglalapok 90° illetve 180° -os, x fázisú impulzusokat jelölnek, hacsak nem jelzem külön az attól való eltérést (ϕ_i). Fél-ellipsziszekkel jelöltem az adiabatikus Chirp inverziós és refókuszáló X impulzusokat. Az impulzusok fázisai: $\phi_1 = y$; $\phi_2 = x, -x$; $\phi_3 = x, x, -x, -x$; $\phi_4 = y, y, y, y, y, y, y, y, -x, -x, -x, -x, -x, -x, -x, -x$; $\phi_5 = y, y, y, y, -x, -x, -x, -x$; és $\phi_{\text{rec}} = x, -x, -x, x, -x, x, x, -x, -x, x, x, -x, x, -x, -x, x$. Az időintervallumokat a következőképpen állítjuk be: $\tau = 1/(4 \cdot J_{\text{XH}})$, $\tau_a = p16 + d16$, $\tau_b = 1/(4 \cdot sw2)$, $\tau_c = p16 + d16 + 350 \mu\text{s}$, $\tau'_{(\text{CLIP})} = \tau$; $\tau'_{(\text{CLAP})} = p16 + d16$. A koherenciaszelekciót és az echo-antiecho fázisérzékeny detektálást az X dimenzióban a G_2 és G_4 térgradiens impulzusok 80 : 20.1 (^{13}C esetén) vagy 80 : 8.1 (^{15}N esetén) arányú alkalmazásával érjük el. A tipikusan 1 ms-os (p16) G_1 és G_3 tisztító gradiensimpulzusokat a maximális gradiensereőség (50 G/cm) 15 illetve 11 %-ára állítjuk be, és utána egy 50-100 μs hosszúságú felépülési időt (d16) használunk. A protonlecsatolásért felelős blokkban alkalmazott koherenciaszelekciós gradiensimpulzusok

esetén $G_5 = 18\%$. A CLIP-HSQC szekvencia végén egy 90° -os X impulzussal (szürkével jelölve) a nem kívánt, antifázisú protonmágnesezettséget nem detektálható többkvantum koherenciákká (MQC) alakítjuk, ahogy ezt Enthart és szerzőtársai javasolták.¹⁶⁴ Ezzel szemben a CLAP kísérletben elhagyjuk ezt a 90° -os illetve az előtte lévő 180° -os X impulzust (szürkével jelölve), hogy megtartsuk az $X \rightarrow {}^1\text{H}$ polarizációtranszfer utáni, antifázisú protonmágnesezettséget. Szélessávú heteronukleáris lecsatolást (CPD) nem alkalmazunk az adatgyűjtés ideje alatt.

Először a kifejlesztett kísérletek toleranciáját és robusztusságát tanulmányoztuk az egykötéses heteronukleáris csatolási állandótól függő INEPT/BIRD idők (τ , 2τ) változtatásával szemben egy ${}^{13}\text{C}$ -jelzett anomer centrummal rendelkező metil- α,β -D-glükopiranozid modellvegyületen. A 21. ábrán láthatók a szélessávú protonlecsatolt CLAP-HSQC módszerrel rögzített anomer CH dublettek az INEPT/BIRD idők – 100-180 Hz-es csatolási tartománynak megfelelő – változtatásának függvényében. Egyértelműen megfigyelhető, hogy ugyan a jelintenzitás csökken, amikor az INEPT/BIRD idők nem a mérendő csatolási állandónak megfelelően vannak beállítva, de a jelalak tiszta abszorpciós fázisú marad. Ez megteremti a csatolások pontos meghatározásának lehetőségét még anizotróp mintákban is, ahol a csatolási állandók értékei tágabb határok között mozognak. A 21. ábrán bemutatott eredmények igazolják, hogy a javasolt impulzusszekvenciák (20. ábra), beleértve az alkalmazott gradiens koherenciaszelekciós sémát, hatékonyan kiszűrik a nem kívánt, maradék diszperziós koherenciákat, melyek az ${}^1J_{\text{CH}}$ és az INEPT/BIRD idők szinkronizálatlanságából adódhatnak.



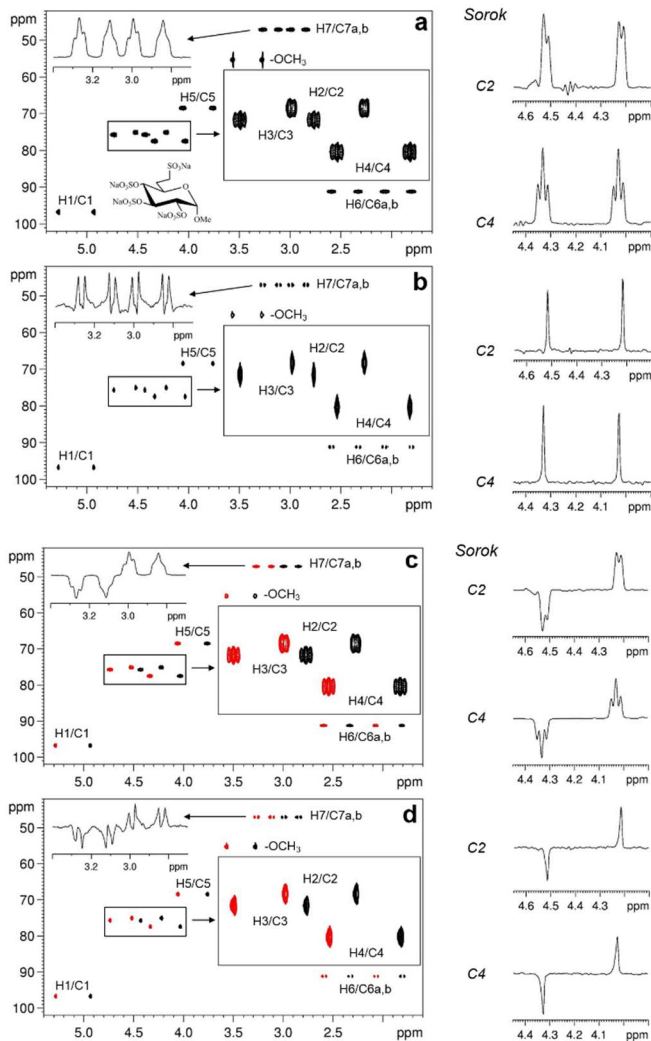
21. ábra A szélessávú protonlecsatolt CLAP-HSQC kísérlet egykötéses heteronukleáris csatolási állandótól függő INEPT/BIRD idők változtatásával szembeni robusztusságának illusztrálása. A kifejlesztett impulzusszekvenciában (20. ábra) a t_1 inkrementált időt egy 3 μs -os konstans idővel helyettesítve rögzítettük az (a) és (b) ábrákon látható 1D protonlecsatolt CLAP-HSQC spektrumokat a ^{13}C -jelzett anomer centrummal rendelkező metil- α,β -D-glükopiranozidon (szerkezeti képlete az ábra jobb felső részén látható). A kísérletek során különböző INEPT/BIRD időket állítottunk be (az $^1J_{\text{CH}}$ -nak megfelelő értékeket mindig az adott spektrum (a,b) felett jelöltem), és az (a) ábrán a spektrumokat ugyanazon intenzitásskálával jelenítettem meg a relatív jelintenzitások összehasonlíthatósága kedvéért. A (c) ábrán a vizsgált vegyület normál ^1H NMR spektrumának megfelelő részlete látható a jelhozzárendeléssel. A protonlecsatolt CLAP-HSQC spektrumokat (a,b) 5 perc 18 másodperc alatt a következő, azonos paraméterekkel mértük: spektrális ablak ^1H dimenzióban = 6,0371 ppm, tranziensek közötti várakozási idő ($d1$) = 1,7 s, tranziensek száma = 4, t_2 inkrementumok száma (ami a gyakorlatban a FID darabok számát jelenti) = 32, egy FID darab ideje = 21,197 ms és a tényleges komplex adatpontok száma a ^1H dimenzióban a FID darabok összefűzését követően = 4096.

A protonlecsatolt CLIP/CLAP-HSQC kísérletek felhasználási lehetőségeit egy szulfonsavas monoszacharid-származékon mutatom be. A 22. ábra normál és protonlecsatolt CLIP illetve CLAP-HSQC spektrumokat hasonlít össze. Mind a 2D szintvonalas megjelenítéseken, mind az ábra jobb oldalán kiemelt sorokon jól megfigyelhető, hogy CH spinrendszerek esetén a proton-proton csatolások okozta, extra

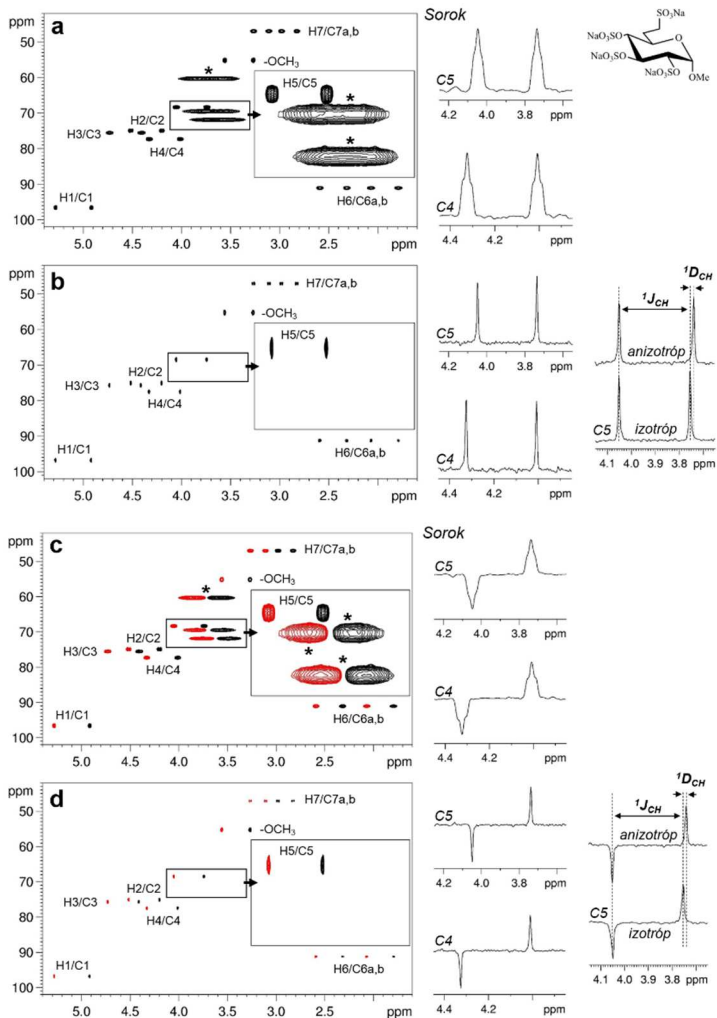
felhasadások eltűnnek a jelekből a lecsatolt kísérletekben. Ezáltal az egykötéses heteronukleáris csatolási állandók egyszerűen és pontosan meghatározhatók a tiszta abszorpció, azonos vagy ellentétes fázisú dublettekből. Mint azt korábban is említettem, a BIRD-típusú lecsatolás hátránya, hogy nem képes a diasztereotóp hidrogének közötti geminális proton-proton csatolás elnyomására. Ezáltal a metilén-csoportok nem ekvivalens (diasztereotóp) protonjai dupla dublettekként jelennek meg a BIRD-lecsatolt spektrumok $F2$ dimenziójában az aktív $^1J_{CH}$ és $^2J_{HH}$ csatolásoknak köszönhetően. Ezt a jellegzetes multipllett struktúrát, illetve a impulzusszekvencia alatti geminális csatolási evolúció miatt jelentkező jeltorzulásokat illusztrálják a 22. ábra 2D spektrumainak bal felső sarkában a 7-es szénhez tartozó, kiemelt sorok. Azonban ezeket, a geminális hidrogének esetén felmerülő problémákat sikerült megoldanunk a perfectBIRD szekvencia kidolgozásával, amit már részletesen bemutattam a dolgozat 4.1.1. alfejezetében, a CLIP/CLAP-HSQC kísérletekben való alkalmazására pedig még vissza fogok térni ebben az alfejezetben.

Annak érdekében, hogy igazoljuk a kifejlesztett impulzusszekvenciák alkalmazhatóságát maradék dipoláris csatolási állandók meghatározására, az előzőekben is használt monoszacharid származékot egy éter-alkohol elegy gyengén orientált (anizotróp), folyadékkristályos fázisában¹⁶⁸ oldottuk fel. A gyengén orientált közegben mért, normál és protonlecsatolt CLIP illetve CLAP-HSQC spektrumokat a 23. ábrán hasonlítom össze. Egyértelműen látható a 2D spektrumokon és a kiemelt sorokon, hogy az új kísérletek CH spinrendszerek esetén nemcsak a skaláris, hanem a dipoláris proton-proton csatolások okozta, nem kívánt jelfelhasadásokat is képesek megszüntetni. Azaz a protonlecsatolt CLIP/CLAP-HSQC módszerrel az egykötéses heteronukleáris csatolási állandók meghatározása két szingulett jel közötti frekvenciakülönbség mérésére egyszerűsödik anizotróp közegben is. Ezáltal a maradék dipoláris csatolási állandók ($^1D_{CH}$) – melyeket az izotróp és anizotróp közegben mért csatolások különbségeként kapunk meg, ahogy azt a C5-ös dubletteken jeleztem példaként (23. ábra) – pontosabb mérésére nyílik lehetőség. Fontos még megemlíteni, hogy az orientáló közegtől származó extra, nem kívánt jelek, melyeket csillagokkal jelöltem a 23. ábrán, a szélessávú protonlecsatolt spektrumokban gyakorlatilag nem jelennek meg, ami a lecsatolt kísérletek hosszabb impulzusszekvenciája, és ezáltal hosszabb ideje alatti T_2 relaxáció következménye.

A 22-23. ábrákon látható CLIP és CLAP spektrumok lehetőséget adnak a korábban bevezetett IPAP megközelítés¹⁵⁷ (a CLIP és CLAP spektrumok egymással való összeadása és kivonása) alkalmazására, azaz az egykötéses heteronukleáris csatolási állandók megbízható meghatározására a dublettek α és β komponenseinek esetleges átfedése esetén is.



22. ábra Egy szulfonsavas monoszacharid-származék (szerkezeti képlete az (a) ábrán látható; 0,067 M D₂O-ban) a hagyományos¹⁶⁴ (a,c) és a szélessávú protonlecsatolt (b,d) impulzusszekvenciával rögzített reprezentatív CLIP- és CLAP-HSQC spektrumai. Az adott spektrum mellett kiemelt ¹³C sorok egyértelműen mutatják a különféle kísérletek között a jelek multipllett struktúrájában megfigyelhető karakterisztikus különbségeket. Az ábrán látható spektrumokat 300 K-en, a következő, azonos paraméterekkel mértük: spektrális ablak ¹H (¹³C) dimenzióban = 4,9887 (65,0) ppm, transziensek közötti várakozási idő (*dl*) = 1,7 s, *t*₁ inkrementumok száma = 200. A normál CLIP/CLAP-HSQC kísérleteket (a,c) 64, a protonlecsatoltakat (b,d) 4 transzienssel vettük fel. A protonlecsatolt módszer esetén használt, specifikus paraméterek: *t*₂ inkrementumok száma (ami a gyakorlatban a FID darabok számát jelenti) = 16, egy FID darab ideje (1/*SW*₂) = 20,842 ms és a tényleges komplex adatpontok száma a ¹H dimenzióban a FID darabok összefűzését követően = 1664.



23. ábra Egy szulfonsavas monoszacharid-származék (szerkezeti képlete az (a) ábrán látható) a hagyományos¹⁶⁴ (a,c) és a szélessávú protonlecsatolt (b,d) impulzusszekvenciával rögzített reprezentatív CLIP- és CLAP-HSQC spektrumai gyengén orientált közegben.¹⁶⁸ A konvencionális CLIP/CLAP-HSQC spektrumokban (a,c) jelentkező, az orientáló közegtől származó extra, nem kívánt jeleket csillagokkal jelöltem. Az ábra jobb oldalán a C5-ös dublettek példáján mutatom be a maradék dipoláris csatolási állandók ($^1D_{CH}$) meghatározását. Az ábrán látható spektrumokat 300 K-en, a következő, azonos paraméterekkel mértük: spektrális ablak 1H (^{13}C) dimenzióban = 6,0371 (65,0) ppm, tranziensek közötti várakozási idő ($d1$) = 1,7 s, t_1 inkrementumok száma = 200. A normál CLIP/CLAP-HSQC kísérleteket (a,c) 64, a protonlecsatoltakat (b,d) 8 tranzienssel vettük fel. A protonlecsatolt módszer esetén használt, specifikus paraméterek: t_2 inkrementumok száma (ami a gyakorlatban a FID darabok számát jelenti) = 16, egy FID darab ideje ($1/SW_2$) = 21,197 ms és a tényleges komplex adatpontok száma a 1H dimenzióban a FID darabok összefűzését követően = 2048.

Összefoglalva megállapítható, hogy a BIRD-lecsatolt CLIP/CLAP-HSQC módszer izotróp és anizotróp körülmények között is megszünteti a proton-proton csatolások okozta, nem kívánt felhasadásokat XH spinrendszerek esetén, azonban a lecsatolás fizikai elvéből adódóan a geminális csatolások hatását nem képes elnyomni XH₂ molekularészletekben.

A perfectBIRD szekvenciaelemet beépítve a CLIP/CLAP-HSQC kísérletekbe viszont olyan NMR módszert hoztunk létre,⁶⁸ amely segítségével az egykötéses heteronukleáris csatolások meghatározása a diasztereotóp metilén hidrogénatomok esetén is két csúcsmaximum közötti frekvenciakülönbség mérésére egyszerűsödik (24. ábra). Az interferogram-típusú adatgyűjtéssel kombinált perfectBIRD impulzusszekvencia felépítését és működését már részletesen bemutattam a dolgozat 4.1.1. alfejezetében, így itt erre már nem kívánok kitérni. A 25. ábrán látható a perfectBIRD-lecsatolt CLIP/CLAP-HSQC kísérletek sematikus megjelenítése, melyen a teljes impulzusszekvencia hosszúságára való tekintettel csak a perfectBIRD modult tüntettem fel részleteiben, a kezdeti, normál CLIP/CLAP-HSQC szekvenciárszt egy téglalap jelöli. Alapvetően két különbség van az itt alkalmazott és a HSQC esetében használt perfectBIRD modul között. Az egyik az, hogy elhagyjuk azt a 180°-os X impulzust, amivel a lecsatolt HSQC szekvenciában az egykötéses heteronukleáris csatolási evolúciót refókuszáljuk. A másik pedig az, hogy a detektálás alatt nem alkalmazunk heteronukleáris lecsatolást.

Német együttműködő partnereink (Christina M. Thiele és csoportja) részletesen vizsgálták a perfectBIRD-lecsatolt módszer teljesítőképességét izotróp és gyengén orientált közegben egyaránt. A meghatározott skaláris és maradék dipoláris egykötéses heteronukleáris csatolási állandók helyességét és pontosságát összevetették a normál illetve a BIRD-lecsatolt CLIP/CLAP-HSQC kísérletekben mért értékekével. A részletek megtalálhatók a közös publikációinkban.⁶⁸ Várakozásainknak megfelelően anizotróp közegben a csatolási állandók meghatározásának pontossága szignifikánsan jobb volt a protonlecsatolt kísérletekben. A diasztereotóp metilén hidrogének esetén magától értetődően a perfectBIRD kísérlet teljesített a legjobban. Természetesen azt sem szabad ugyanakkor elfelejteni, hogy az interferogram-típusú kísérletek – így az általunk kifejlesztettek is – a homonukleáris lecsatoláshoz egy extra dimenziót igényelnek, ami jelentősen megnöveli a szükséges mérési időt. Ráadásul, mivel a perfectBIRD lecsatoló szekvencia hosszabb a BIRD-nél, ezért a perfectBIRD impulzusszekvencia ideje alatti jelentősebb transzverzális relaxációs veszteségnek köszönhetően még kismolekulák esetén is mérsékelt jelintenzitás-csökkenés és jelszélesedés tapasztalható. Azaz – mint általában – az előnyök nem járnak hátrányok nélkül, és mindig az adott megoldandó feladatnak megfelelően érdemes kiválasztani a használni kívánt NMR módszert.

szekvenciárészt fehér téglalap jelöli. A keskeny és szélesebb téglalapok 90° illetve 180° -os, x fázisú impulzusokat jelölnek, hacsak nem jelzem külön az attól való eltérést (ϕ_n). Fél-ellipszisekkel jelöltem az adiabatikus Chirp inverziós és refókuszáló X impulzusokat. Az ábrán feltüntetett impulzusok fázisai: $\phi_1 = y, x$; $\phi_2 = y$. Az időintervallumokat a következőképpen állítjuk be: $\tau = 1/(4 * {}^1J_{XH})$, $\tau_a = 1/(4 * sw2) + \tau_b + \tau_c$, $\tau_b = 1/(4 * sw2) - p3$, $\tau_c = p16 + d16 + 350 \mu s - p3$. A tipikusan 1 ms-os (p16) G_1 és G_2 tisztító és koherenciaszelekciós gradiensimpulzusokat a maximális gradienserősség (50 G/cm) 17 illetve 18 %-ára állítjuk be, és utána egy 50-100 μs hosszúságú felépülési időt (d16) használunk. Szélessávú heteronukleáris lecsatolást (CPD) nem alkalmazunk az adatgyűjtés ideje alatt.

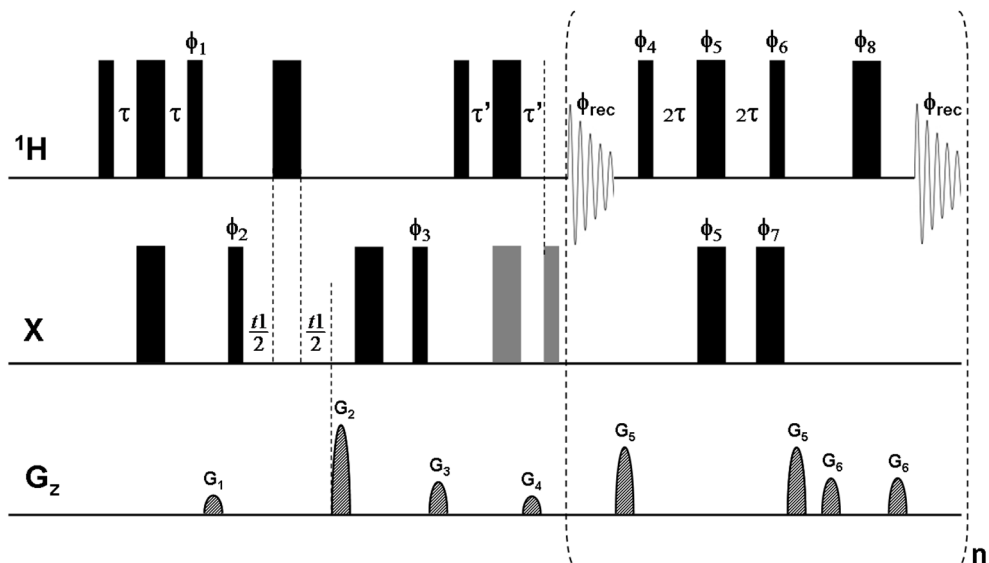
4.2.2. Valós idejű szélessávú protonlecsatolás megvalósítása CLIP/CLAP-HSQC kísérletekben

Az előző alfejezetben bemutatott, interferogram-típusú kísérletek legnagyobb hátránya a hosszú mérési idő, így a HSQC esetéhez hasonlóan, a protonlecsatolt CLIP/CLAP-HSQC módszer felgyorsítását is célul tűztük ki a valós idejű adatgyűjtési stratégia^{63,105} alkalmazásával. Ennek szellemében a normál CLIP/CLAP-HSQC impulzusszekvencia detektálási (adatgyűjtési) szakaszába BIRD izotópszekción alapuló, homonukleáris lecsatolást eredményező blokkok sorozatát építettük be (26. ábra). Azaz a FID darabok detektálását, illetve a proton-proton csatolási evolúció refókuszálását a BIRD^d modul és egy nem-szelektív 180° -os protonimpulzus kombinációjával felváltva végezzük addig, amíg a teljes FID-et meg nem kapjuk. A valós idejű módszerek működéséről már részletesen írtam a 2.3.2. és a 4.1.2. alfejezetekben, ezért itt csak azt emelem ki, amire ebben a speciális esetben mindenképpen oda kellett figyelni az impulzusszekvencia-tervezésnél. Mivel a kapott spektrumokban egykötéses heteronukleáris csatolási állandókat szeretnénk mérni, ezért kritikus a J -refókuszáló blokk ideje alatt a heteronukleáris csatolási evolúció fenntartása, amit a BIRD^d modul második 180° -os X-impulzusa biztosít, továbbá nem alkalmazunk szélessávú heteronukleáris lecsatolást a detektálás ideje alatt (26. ábra).

Tesztméréseink során azt tapasztaltuk, hogy a kifejlesztett, valós idejű CLIP/CLAP-HSQC módszer egyes esetekben torzította a mérendő heteronukleáris csatolási állandók értékét, és nem volt elég robusztus bizonyos paraméterek (pl. a rezonanciajelek besugárzási frekvenciától való távolsága, BIRD idő) változtatásával szemben. Általánosságban a homonukleáris lecsatoló szekvenciák magukban hordozzák annak a veszélyét (és ugyanakkor a lehetőségét¹⁶⁹⁻¹⁷¹), hogy a kémiai eltolódások és csatolások nem kívánt skálázódását idézik elő. Ennek elkerülése érdekében körültekintő impulzusszekvencia-tervezésre van szükség. Az ilyen jellegű problémák a valós idejű

kísérletek esetén jelentősebbek, mint az interferogram-típusúaknál, ugyanis előbbieken a proton-proton lecsatolásért felelős impulzusszekvencia-elemek folyamatosan ismétlődnek, ami a nem kívánt hatások felerősítéséhez vezet az adatgyűjtés ideje alatt.

Azt gondoltuk, hogy ezek a problémák a CLIP/CLAP-HSQC kísérletekben kiküszöbölhetők az akvizíció alatti impulzusok megfelelő fázisprogramjával. Elsőként a 180° -os impulzusok tranziensekkénti fázisléptetésével próbálkoztunk. Ugyan már ez az egyszerű fázisciklizáltatás robusztusabbá tette a módszert, de nem olyan mértékben, hogy megfelelően pontos heteronukleáris csatolási állandókat kapjunk. Ezután minden egyes FID darab detektálását követően, azaz J -refókuszáló blokkról J -refókuszáló blokkra léptettük a 180° -os impulzusok fázisait, a tranziensenként történő fázisciklizáltatás mellett. A FID darabonként történő fázisléptetéshez a MLEV4, 8 és 16, illetve az XY8 és 16 szekvenciákat használtuk fel. Sokféle fáziskombinációt kipróbáltunk a metil- α -mannopiranozid D_2O -ban oldott tesztmintánkon végzett mérések során. Végül a J -refókuszáló blokk 180° -os impulzusainak legjobbnak ítélt fázisprogramja egy MLEV8 alapú 16 lépéses fázisszekvenciából (FID darabonkénti léptetésből), valamint egy 4 lépéses fázisciklusból (tranziensenkénti léptetésből) tevődik össze. A kidolgozott fázisprogram explicit megadása és az impulzusszekvencia egyéb technikai részletei a 26. ábra aláírásában olvashatók.



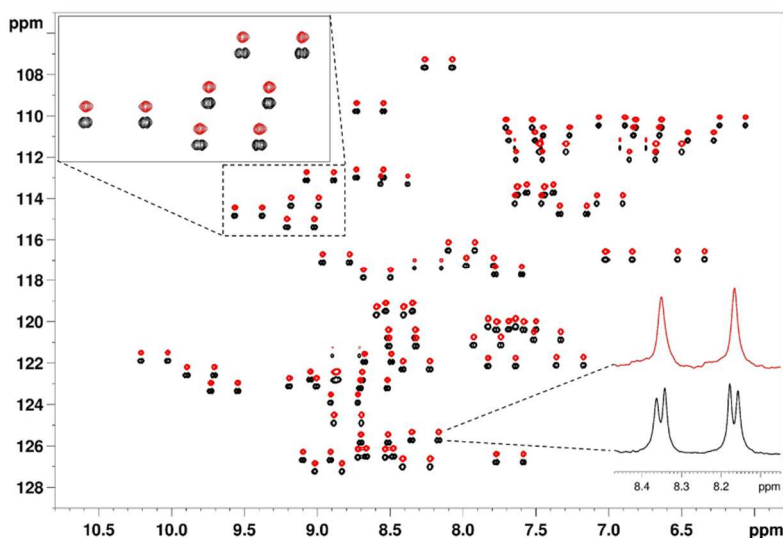
26. ábra Valós idejű szélessávú protonlecsatolt CLIP/CLAP-HSQC impulzusszekvencia sematikus megjelenítése. A keskeny és szélesebb téglalapok 90° illetve 180° -os, x fázisú impulzusokat jelölnek, hacsak nem jelzem külön az attól való eltérést (ϕ_n). A CLIP-HSQC

szekvencia végén egy 90° -os X impulzussal (szürkével jelölve) a nem kívánt, antifázisú protonmágnesezettséget nem detektálható többkvantum koherenciákká (MQC) alakítjuk, ahogy ezt Enthart és szerzőtársai javasolták.¹⁶⁴ Ezzel szemben a CLAP kísérletben ezt a 90° -os illetve az előtte lévő 180° -os X impulzust (szürkével jelölve) elhagyjuk, hogy az $X \rightarrow {}^1\text{H}$ polarizációtánszfer utáni, ellenfázisú protonmágnesezettséget megtartsuk. Az impulzusok tranziensenkénti fázisai (fázisciklus): $\phi_1 = y$; $\phi_2 = (x)_4, (-x)_4$; $\phi_3 = (x)_8, (-x)_8$; $\phi_4 = x$; $\phi_5 = y, y, -y, -y$; $\phi_6 = -x$; $\phi_7 = x, x, -x, -x$; $\phi_8 = x, -x$; és $\phi_{rec} = (x)_4, (-x)_8, (x)_4$. A protonlecsatoló modulban lévő impulzusok J-refókuszáló blokkokkénti fázisai (fázisszekvencia): $\phi_4 = x, x, x, x, -x, -x, -x, -x, -x, -x, x, x, x, x, -x, -x$; $\phi_5 = y, -y, y, -y, -y, y, -y, y, -y, y, y, -y, -y, y$; $\phi_6 = -x, -x, -x, -x, x, x, x, x, x, -x, -x, -x, -x, x, x$; $\phi_7 = \phi_8 = x, -x, x, -x, -x, x, -x, x, -x, x, x, -x, -x, -x, x$. Az időintervallumokat a következőképpen állítjuk be: $\tau = \tau' = 1/(4 * {}^1J_{\text{NH}})$. A koherenciaszelekciót és az echo-antiecho fázisérzékeny detektálást az X dimenzióban a G_2 és G_4 térgradiens impulzusok 80 : 20.1 (${}^{13}\text{C}$ esetén) vagy 80 : 8.1 (${}^{15}\text{N}$ esetén) arányú alkalmazásával érjük el. A tipikusan 1 ms-os (p16) G_1 és G_3 tisztító gradiensimpulzusokat a maximális gradiensereőség (50 G/cm) 13 illetve 27 %-ára állítjuk be, és utána egy 100 μs hosszúságú felépülési időt (d16) használunk. A FID darabok detektálása között, a BIRD blokk és a nem-szelektív 180° -os protonimpulzus köré szimmetrikusan elhelyezett, 0,5 ms-os koherencia átviteli út (CTP) kiválasztásáért felelős gradiensimpulzusokat ($G_5 = 61\%$ és $G_6 = 31\%$), és mindegyik után 100 μs -os felépülési időt alkalmazunk. Szélessávú heteronukleáris lecsatolást (CPD) nem használunk az adatgyűjtés ideje alatt.

A továbbfejlesztett fázisprogramú CLIP/CLAP-HSQC módszer megbízhatóságának és robusztusságának ellenőrzéséhez a metil- α -mannopiranozid ${}^1\text{H}$ spektrumában a metil-csoport ${}^{13}\text{C}$ szatellitein mért, egykötéses ${}^1\text{H}$ - ${}^{13}\text{C}$ csatolási állandóját (${}^1J_{\text{CH}} = 144,06$ Hz) tekintettük referenciának. Az új impulzusszekvenciák esetén vizsgáltuk a rezonanciajelek besugárzási frekvenciától való távolságának hatását a kapott csatolási állandóra. Ehhez a besugárzási frekvenciát két tartományban (700-780 Hz illetve 1900-1980 Hz távolságra a metil-jeltől) 2 Hz-es lépésekben változtattuk, így mindkét sorozatban 40 kísérletet végeztünk. Az optimalizált fázisprogramú kísérlettel a 700-780 Hz-es tartományban mért 40 spektrumban a metil-csoport ${}^1J_{\text{CH}}$ átlaga 143,96 Hz-nek adódott 0,42 Hz-es maximum és 0,17 Hz-es standard deviációval, még a 1900-1980 Hz-es tartományban ${}^1J_{\text{CH}} = 144,04$ Hz-es átlagértéket kaptunk 1,05 Hz-es maximális és 0,40 Hz-es standard deviációval. Tehát a besugárzástól távolabbi tartományban is még jó pontossággal sikerült az egykötéses heteronukleáris csatolási állandót meghatározni. Viszont ha a rezonanciajelek ± 2000 Hz-nél távolabb helyezkednek el a besugárzási frekvenciától, vagy az előzőeknél pontosabb csatolási állandókra van szükségünk, akkor ajánlott egy második kísérletet felvenni egy másik frekvenciára beállított besugárzással.

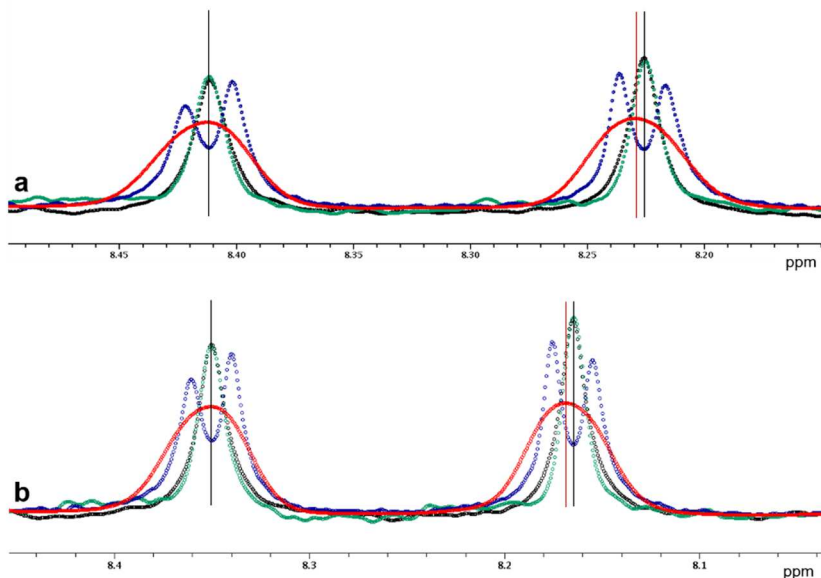
Vizsgáltuk a kísérletek robusztusságát a BIRD idő változtatásával szemben is 125-175 Hz közötti heteronukleáris csatolási állandónak megfelelő tartományban, ami egy gyengén orientált közegben mért ${}^1T_{CH}$ (${}^1T_{CH} = {}^1J_{CH} + {}^1D_{CH}$) értékek által meghatározott, átlagos intervallumnak tekinthető. A BIRD/INEPT időket 144 ± 15 Hz-es csatolásokhoz tartozó értékekre állítva, kismértékben nagyobb ${}^1J_{CH}$ -kat mértünk, konkrétan a 144,06 Hz-es referenciaértékhez képest 0,5-0,6 Hz-es maximális eltérést tapasztaltunk. A ± 30 Hz-es tartomány szélsőértékein pedig a heteronukleáris csatolási állandó 1,3-1,4 Hz-es túlbecslést mutatott. A kapott eredmények arra utalnak, hogy a BIRD idő változtatására csak bizonyos korlátok között megfelelően robusztus a kifejlesztett, valós idejű CLIP/CLAP-HSQC módszer. Ha a mérni kívánt maradék dipoláris csatolások várhatóan nagyobbak, mint ± 30 Hz, és/vagy pontosabb értékekre van szükségünk, akkor érdemes különböző BIRD/INEPT időkkal több kísérletet rögzíteni.

A kismolekulán végzett tesztméréseket követően figyelmünk a módszer peptidek illetve fehérjék egykötéses, 1H - ${}^{15}N$ csatolási állandóinak meghatározásában való alkalmazhatósága felé fordult. Ugyanis egyrészt a peptidek és fehérjék amid protonjai szűk 1H kémiai eltolódás tartományban helyezkednek el, illetve az egykötéses 1H - ${}^{15}N$ csatolási állandók meglehetősen egységesek. Másrészt az interferogram-típusúhoz képest a valós idejű lecsatolással járó időnyereség elsősorban makromolekulák (pl. fehérjék) esetén kritikus. Ezen megfontolások miatt a kifejlesztett, valós idejű impulzusszekvenciák teljesítményét az 55 aminosavegységből álló ${}^{15}N$ -jelzett PAF fehérje könnyűvízes mintáján vizsgáltuk. Az új módszerrel elérhető spektrális egyszerűsítést és felbontásjavulást mutatja be a 27. ábra, ami a ${}^{15}N$ -jelzett PAF normál (fekete) és valós idejű protonlecsatolt (piros) 1H - ${}^{15}N$ CLIP-HSQC spektrumait és kiemelt régióit, dublettjeit hasonlítja össze.



27. ábra ^{15}N -jelölt PAF fehérje (55 aminosavegység, 1,7 mM) ^1H - ^{15}N CLIP-HSQC (fekete) és valós idejű protonlecsatolt ^1H - ^{15}N CLIP-HSQC (piros) spektrumának összehasonlítása könnyűvízes közegben (95 % H_2O / 5 % D_2O). A nitrogén dimenzióban eltoltam a protonlecsatolt spektrumot a jobb összehasonlíthatóság kedvéért. Az ábrán látható spektrumokat 1 óra 25 perc alatt a következő, azonos paraméterekkel mértük: spektrális ablak ^1H (^{15}N) dimenzióban = 4,788 (21,0) ppm, komplex adatpontok száma a ^1H dimenzióban = 2048, t_1 inkrementumok száma = 256, tranziensek száma = 8 és a tranziensek közötti várakozási idő (dI) = 1,7 s. A protonlecsatolt kísérletben a FID-et 16 darabban detektáltuk, és egy FID darab időtartama 26,7 ms volt.

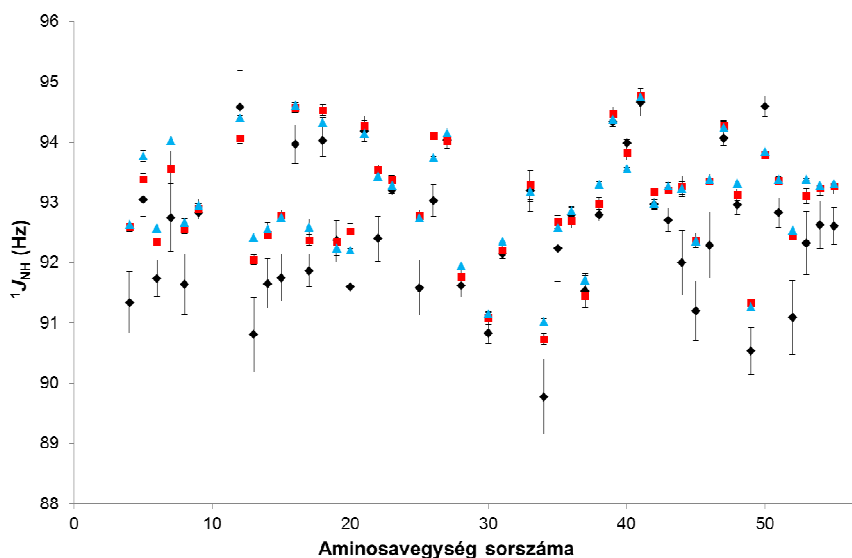
Normál (protoncsatolt), illetve interferogram-típusú és valós idejű protonlecsatolt CLIP/CLAP-HSQC spektrumokat vettünk fel a részletes összehasonlítás kedvéért. Mindhárom fajta kísérletből legalább három párhuzamos mérést végeztünk, hogy a helyességük mellett, a módszerek pontosságát is vizsgáljuk az $^1J_{\text{NH}}$ meghatározásában. Referenciának az előző alfejezetben bemutatott, interferogram-típusú protonlecsatolt CLIP-HSQC kísérletben mért $^1J_{\text{NH}}$ értékeket tekintettük. Ebben a vizsgálatsorozatban a csúcspozíciókat – a nagymolekulák esetén általánosan használt – automata csúskereséssel határoztuk meg, a csatolási állandók gyors, fél-automata kinyeréséhez. Ez a protonlecsatolt kísérletekben minden további nélkül kivitelezhető, azonban a hagyományos, protoncsatolt spektrumokban az NH-H α csatolásoknak köszönhető, nem kívánt jelfelhasadásokat erős Gauss súlyfüggvény alkalmazásával az F_2 dimenzióban el kell nyomni a Fourier-transzformáció előtt (28. ábra).



28. ábra A ^{15}N -jelölt PAF hagyományos, protoncsatolt (kék és piros), interferogram-típusú protonlecsatolt (fekete) és valós idejű protonlecsatolt (zöld) ^1H - ^{15}N CLIP-HSQC spektrumából kiemelt, a Phe-25 (a) és a Val-52 (b) aminosavakhoz tartozó, reprezentatív sorok. Annak érdekében, hogy a protoncsatolt kísérlet is lehetővé tegye az automata csúskeresést az NH-H α csatolásoknak köszönhető, nem kívánt jelfelhasadásokat az adatfeldolgozás során Gauss súlyfüggvény alkalmazásával fedtük el (piros). A spektrumok rögzítéséhez a 27. ábra aláírásában szereplő kísérleti paramétereket használtuk.

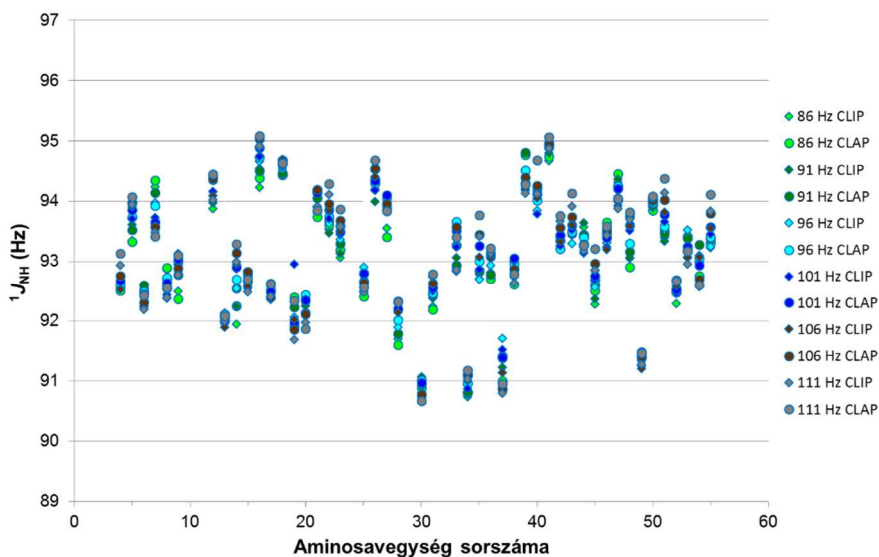
A háromféle CLIP-HSQC kísérlet reprezentatív dublettjeit hasonlítja össze a 28. ábra, amelyen jól megfigyelhető a protonlecsatolt jelek (interferogram-típusú fekete színnel, valós idejű zölddel) majdnem tökéletes egyezése. A normál, protoncsatolt (kék) spektrum multipllettjeiből meghatározható heteronukleáris csatolások is szemmel láthatóan összhangban vannak a protonlecsatolt jelekből mérhetőekkel. Azonban, ha a protoncsatolt spektrumban súlyfüggvénnyel maszkírozzuk a proton-proton csatolások okozta felhasadásokat, akkor a kapott jelek (piros) maximuma kicsit eltolódik az eredeti spektrumban (kék) nagyobb intenzitású dublettkomponens irányába a dublettek aszimmetrikus volta miatt. Ezáltal a hagyományos, protoncsatolt CLIP/CLAP-HSQC spektrumból automata csúskereséssel kinyert csatolási állandók szisztematikus hibát hordoznak. Konkrétan általában alulbecsülik a valós értékeket, ahogy ez a 29. ábrán látható, amely a PAF jól elkülönült rezonanciáinak a háromféle CLIP/CLAP-HSQC spektrumban fél-automata analízissel meghatározott $^1J_{\text{NH}}$ értékeit mutatja az aminosavegységek függvényében. Amely egységeknél nincsenek értékek feltüntetve,

azok esetében nem lehetett a csatolási állandókat kellő pontossággal meghatározni jelátfedés vagy jelszélesedés (nem megfelelő jel-zaj arány) következtében. A protoncsatolt kísérletekben mért $^1J_{\text{NH}}$ értékek (fekete rombuszokkal jelölve a 29. ábrán) a 47 aminosavegység közül 13 esetén több mint 1 Hz-zel térnek el (a maximális eltérés 1,61 Hz) az interferogram-típusú protonlecsatolt kísérletekben mértékhez képest. Ezzel szemben sokkal kisebb eltéréseket mutatnak a valós idejű protonlecsatolt spektrumokból kinyert csatolási állandók: a maximális eltérés 0,46 Hz, és csak 4 aminosavegység esetében nagyobb az eltérés 0,35 Hz-nél. Ráadásul a hat darab valós idejű CLIP/CLAP-HSQC kísérlet (három CLIP és három CLAP) átlagos standard deviációja körülbelül a fele a hat darab protoncsatolt CLIP/CLAP-HSQC kísérletének, ami az új módszer nagyobb pontosságára utal.



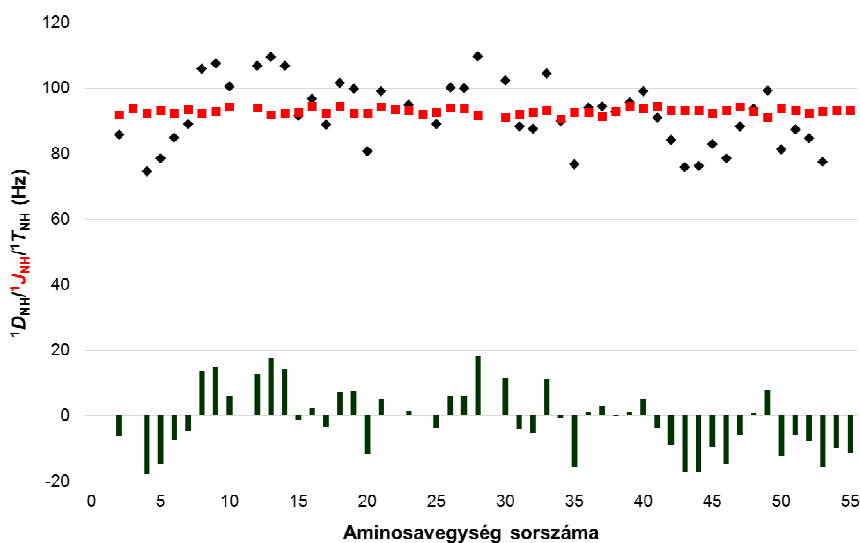
29. ábra A ^{15}N -jelölt PAF (1,7 mM, 95 % H_2O / 5 % D_2O) háromféle ^1H - ^{15}N CLIP/CLAP-HSQC spektrumában fél-automata analízissel meghatározott $^1J_{\text{NH}}$ értékek összehasonlítása az aminosavegységek függvényében. Az ábra a protoncsatolt (fekete rombuszok) és a valós idejű protonlecsatolt (piros négyzetek) módszer esetén 6 kísérlet átlagértékét, az interferogram-típusú protonlecsatolt (kék háromszögek) módszer esetén pedig 3 kísérlet átlagértékét mutatja. A csúspozíciókat minden esetben automata csúskereséssel határoztuk meg, majd a CCPNMR szoftver egyik segédalgoritmusát („RDC-calculator”) használtuk a csatolási állandók számolására. A párhuzamos mérésekből számított standard deviációkat az ábrán hibásávokkal jelöltem.

Amint arról korábban írtam, kismolekulán vizsgáltuk a valós idejű protonlesatolt módszer robusztusságát a BIRD/INEPT idők változtatásával szemben. Fehérjék esetén normál, izotróp mintákban a $^1J_{\text{NH}}$ -k meglehetősen egységesek, általában 90 és 95 Hz közötti értékeket vesznek fel (29. ábra). Azonban más a helyzet gyengén orientált közegben, ahol a mért csatolások ($^1T_{\text{NH}}$) tágabb határok között változnak a maradék dipoláris csatolások változatos értékei miatt. A fehérjék esetében anizotróp körülmények között tipikusan várható $^1T_{\text{NH}}$ -k modellezése céljából, 66 és 116 Hz-es csatolási tartományban 5 Hz-es lépésekkel kapott értékeknek megfelelő BIRD/INEPT időkkel rögzítettünk valós idejű protonlesatolt CLIP/CLAP-HSQC spektrumokat a ^{15}N -PAF könnyűvizes mintáján. A 86-111 Hz-es tartományhoz tartozó BIRD/INEPT időkkel mért kísérletekben meghatározott egykötéses ^1H - ^{15}N csatolási állandókat a PAF aminosavegységeinek függvényében mutatja be a 30. ábra. Az $^1J_{\text{NH}}$ átlagától való maximális abszolút eltérés csupán 0,33 Hz a 30. ábrán is látható, 25 Hz-es tartományt (86-111 Hz) lefedő kísérletekben. A teljes, vizsgált 50 Hz-es intervallumban (66-116 Hz) a maximális eltérés a még elfogadható 1,05 Hz-es értékre nőtt.



30. ábra A ^{15}N -jelölt PAF (1,7 mM, 95 % H_2O / 5 % D_2O) különböző BIRD/INEPT időkkel rögzített valós idejű protonlesatolt ^1H - ^{15}N CLIP/CLAP-HSQC spektrumaiban meghatározott $^1J_{\text{NH}}$ értékek összehasonlítása az aminosavegységek függvényében. A kísérleteket 86 és 111 Hz-es csatolási tartományban 5 Hz-es lépésekkel kapott értékeknek megfelelő BIRD/INEPT időkkel rögzítettük, ahogy ezt az ábra jobb oldalán látható jelmagyarázat mutatja.

A valós idejű protonlecsatolt CLIP/CLAP-HSQC impulzusszekvenciákat a ^{15}N -PAF gyengén orientált közegben készített mintáján is teszteltük. A mért $^1T_{\text{NH}}$ és $^1J_{\text{NH}}$ -kat, illetve a különbségüként meghatározott maradék dipoláris csatolási állandókat ($^1D_{\text{NH}}$) az aminosavvegyeségek függvényében mutatja a 31. ábra. Amely egységeknél nincsenek értékek feltüntetve, azok esetében nem lehetett a csatolási állandókat kellő pontossággal meghatározni jelátfedés vagy csere okozta jelszélesedés (nem megfelelő jel-zaj arány) következtében. Látható a 31. ábrán, hogy a $^1D_{\text{NH}}$ értékek a $\pm 15\text{-}20\text{ Hz}$ -es tartományba esnek, ami – figyelembe véve a módszer BIRD/INEPT idő változtatásával szembeni robusztusságának vizsgálatokor tapasztaltakat – megerősíti, hogy a valós idejű protonlecsatolt CLIP/CLAP-HSQC kísérletek alkalmasak fehérjék maradék dipoláris egykötéses ^1H - ^{15}N csatolási állandóinak ($^1D_{\text{NH}}$) fél-automata, megbízható meghatározására.



31. ábra A ^{15}N -PAF valós idejű protonlecsatolt CLIP/CLAP-HSQC módszerrel mért $^1T_{\text{NH}}$ (fekete rombuszok) és $^1J_{\text{NH}}$ (piros négyzetek) értékei, illetve a különbségüként meghatározott $^1D_{\text{NH}}$ maradék dipoláris csatolási állandói (oszlopdiaagram alul) az aminosavvegyeségek függvényében. A kísérleteket a ^{15}N -jelölt PAF könnyűvízes (95 % H_2O / 5 % D_2O) és gyengén orientált közegű (5% C_8E_5 , oktanol)¹⁶⁸ mintáján rögzítettük. Amely aminosavvegyeségeknél nincsenek értékek feltüntetve, azok esetében nem lehetett a $^1T_{\text{NH}}$ és $^1J_{\text{NH}}$ -kat kellő pontossággal meghatározni jelátfedés vagy jelszélesedés (nem megfelelő jel-zaj arány) következtében.

A 4.2. fejezet összefoglalásaképpen elmondható, hogy az interferogram-típusú, BIRD illetve perfectBIRD protonlecsatolt CLIP/CLAP-HSQC módszerekkel lehet a

legpontosabban egykötéses heteronukleáris csatolási állandókat meghatározni, emiatt addig, amíg az ezekhez szükséges extra mérési idő nem korlátozó tényező, érdemes ezeket használni. Ha azonban gyorsabb protonlecsatolt kísérletekre mutatkozik szükség, akkor a valós idejű CLIP/CLAP-HSQC módszer is eredményesen alkalmazható az előzőekben bemutatott korlátok (kb. 4000 Hz-es ^1H frekvenciatartomány illetve 30-40 Hz-es heteronukleáris csatolási állandó intervallum) figyelembe vételével. Utóbbi módszert az előnye és a korlátai miatt elsősorban peptidek és fehérjék $^1J_{\text{NH}}$ és $^1D_{\text{NH}}$ értékeinek meghatározására ajánljuk olyan molekulaméret-tartományig, ameddig a J -refókuszáló blokkok alatti transzverzális relaxációs veszteségek nem számottevők.

4.3. Szélessávú protonlecsatolt CPMG-HSQMBC módszerek kifejlesztése többkötéses heteronukleáris csatolási állandók meghatározására

A többkötéses heteronukleáris csatolási állandók (${}^nJ_{XH}$) hatékonyan alkalmazhatók szintetikus szerves vegyületek^{172,173} és természetes anyagok¹⁷⁴ konformációs illetve konfigurációs vizsgálatára. Jól kiegészítik a proton-proton csatolási állandók (J_{HH}) és NOE adatok nyújtotta információkat.¹⁷⁵ Azonban a ${}^nJ_{XH}$ -k meghatározása nagy kihívást jelent, egyrészt a releváns korrelációs kísérletek kis érzékenységének köszönhetően, másrészt amiatt, hogy a ${}^nJ_{XH}$ és a ${}^{2,3}J_{HH}$ -k gyakorlatilag azonos nagyságrendűek. Az elmúlt két évtizedben számos módszert javasoltak^{176,177} a többkötéses heteronukleáris csatolási állandók mérésére, melyek közül a HSQMBC (*Heteronuclear Single Quantum Multiple-Bond Correlation*) kísérlet¹⁷⁸ illetve továbbfejlesztett változatai széleskörű felhasználást nyertek jó érzékenységüknek, egyszerűségüknek és annak köszönhetően, hogy a heteroatom rendűségétől függetlenül alkalmazhatók.¹²⁴

Azonban a konvencionális HSQMBC-típusú módszerek esetén a hosszú (tipikusan 50-80 ms) csatolási evolúciós illetve az adatgyűjtési periódusban a proton-proton és a többkötéses proton-heteromag csatolások egymás melletti evolúciója erős jeltorzulásokat eredményezhet a kapott HSQMBC multiplettekben. Ezáltal a kívánt, heteronukleáris csatolási állandók meghatározása gyakran összetett, multiplett illesztési eljárást igényel, illetve a kevert fázisú jelekben jelentkező részleges jelkioltások akár lehetetlenné is tehetik a csatolások mérését. A HSQMBC módszer¹⁷⁸ ezen hátrányának kiküszöbölésére, a távolható csatolásokra optimalizált INEPT blokk különféle módosításait javasolták az irodalomban, úgymint CPMG (*Carr-Purcell-Meiboom-Gill*) impulzuskaszád,¹⁷⁹⁻¹⁸¹ szelektív 180° -os protonimpulzus¹⁸²⁻¹⁸⁴ illetve „perfect echo” szekvenciaelem¹⁸⁵ beépítését. Legutóbb a refókuszált HSQMBC kísérletbe egy „tisztá azonos fázisú” (*Pure In-Phase* – PIP) modulnak¹⁶⁶ elnevezett zéruskvantum szűrő (ZQF) szekvenciaelemet illesztettek be a multiplettek nem kívánt fázismodulációinak elkerülése érdekében. Az említett változtatások az adatgyűjtés alatt viszont továbbra is megengedik a proton-proton csatolás kifejlődését, melynek következtében nem kívánt, proton-proton jelfelhasadások rakódnak a heteronukleáris csatolások okozta dublettekre. A probléma megoldására nemrég egy sávselektív homonukleáris protonlecsatolt (HOBS) HSQMBC kísérletet fejlesztettek ki.¹¹⁵ Ezen megközelítés ismert hátránya azonban, hogy homonukleáris lecsatolás csak olyan régiókban érhető el, melyek nem tartalmaznak J -csatolt protonpárokat (például peptidek amid régiója).¹¹⁵ Azaz meglehetősen szűk azon vegyületek köre, amelyek esetében eredményesen alkalmazható a HOBS HSQMBC módszer.

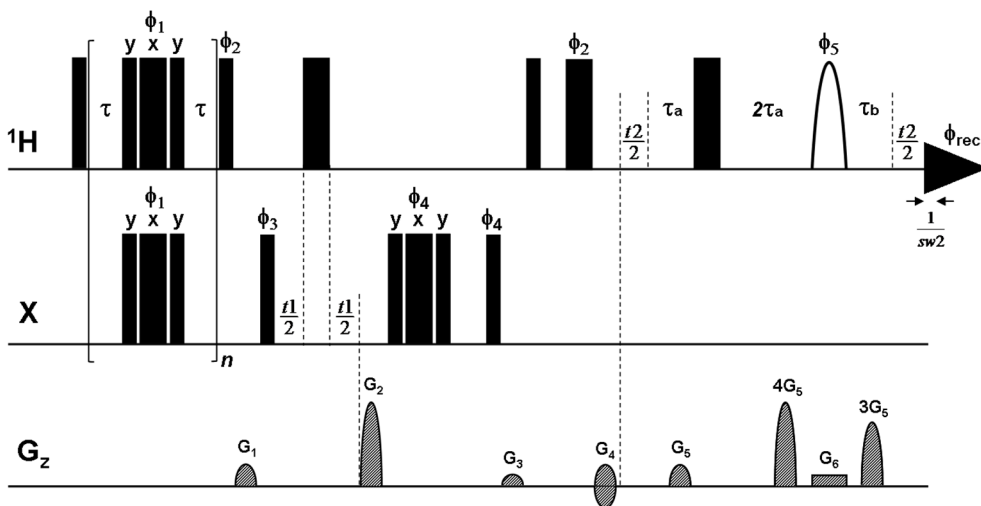
4.3.1. Zangger-Sterk-típusú szélessávú protonlecsatolás megvalósítása CPMG-HSQMBC kísérletben

Az előző bekezdésben említett korlátok miatt a kutatócsoportunkban korábban kidolgozott CPMG-HSQMBC kísérlet¹⁸⁰ szélessávú homonukleáris protonlecsatolással való továbbfejlesztését tűztük ki célul. A BIRD-típusú⁷ homonukleáris lecsatolás, amit érzékenységesvesztés nélkül alkalmaztunk az egykötéses heteronukleáris korrelációs kísérletekben (4.1. és 4.2. fejezetek), nem használható a HSQMBC esetében, ugyanis a BIRD szekvenciaelem nem képes különbséget tenni a heteromaghoz közvetve (több kémiai kötés mentén) kapcsolódó protonok között. Emiatt először a Zangger-Sterk (ZS) rétegszelekciós elven alapuló megközelítést⁹⁻¹¹ ötvöztük az interferogram-típusú adatgyűjtési stratégiával a CPMG-HSQMBC kísérlet direkt (F_2) dimenziójában történő szélessávú protonlecsatolás megvalósításához.¹⁰³ Az eredeti HSQMBC impulzusszekvencia¹⁷⁸ tulajdonképpen egy távolható heteronukleáris csatolásokra optimalizált, nem refókuszált HSQC, azaz az $X \rightarrow {}^1\text{H}$ polarizációtranszfer utáni, ellenfázisú protonmágnesezettséget megtartjuk a detektálás előtt. A távolható csatolásokra optimalizált INEPT blokk CPMG-típusú szekvenciaelemmel módosított változata¹⁷⁹⁻¹⁸¹ azért előnyös (ahogy erre utaltam a fejezet bevezetőjében), mert a gyorsan ismételt, szimultán alkalmazott kompozit ${}^1\text{H}$ és X impulzusok sorozata az INEPT modulban elnyomja a proton-proton csatolási evolúciót. Jelen munkánk során a korábban javasolt CPMG-HSQMBC impulzusszekvenciát¹⁸⁰ fejlesztettük tovább (32. ábra). A protondetektálás elé beépítettünk egy második evolúciós időt (t_2), aminek a közepén elhelyezett nem-szelektív és szelektív 180° -os protonimpulzus, illetve utóbbi ideje alatt alkalmazott z irányú térgradiens együttese biztosítja a proton-proton csatolás refókuszálását (részletek a 2.2.6. alfejezetben), ugyanakkor a kémiai eltolódási és a heteronukleáris csatolási evolúció folytonosságát. A kívánt koherenciaút kiválasztását egy háromtagú, gradiensimpulzus kaszkád segíti, ahogy ezt a 32. ábra is szemlélteti.

A második indirekt, ún. pszeudo (extra) dimenzióban (TD_2) több kísérletet rögzítünk, miközben a t_2 evolúciós időt $1/SW_2$ szerint kísérletenként növeljük, ahol SW_2 a pszeudo dimenzióban megadott spektrális ablak (tipikusan $SW_2 = 40-100$ Hz). Ezt követően – ahogy a 2.3.1. és 4.1.1. alfejezetekben már tárgyaltam – minden egyes FID első $1/SW_2$ hosszúságú (10-25 ms-os) darabját kivágjuk, és összefűzzük, a proton-proton csatolási modulációt gyakorlatilag nem tartalmazó FID megalkotásához. A lecsatolt spektrum felbontása (adatpontosűrűsége) egyenesen arányos az extra dimenzióban használt kísérletek (inkrementumok, TD_2) számával. Emiatt mindig egy kompromisszumot kell kötni a szükséges adatpontosűrűség és a rendelkezésre álló mérési idő között. A pszeudo-2D (azaz a végeredményt tekintve 1D) Zangger-Sterk-lecsatolt

CPMG-HSQMBC kísérletekben – ahol kevésbé volt kritikus a mérési idő – általában 32, a pszeudo-3D kísérletekben pedig 16 inkrementumot használtunk.

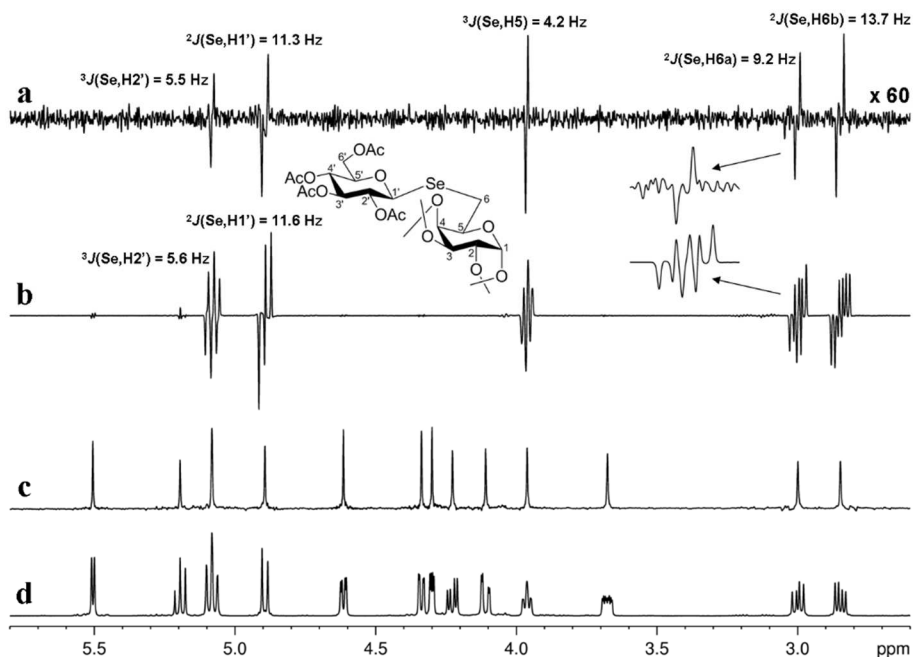
Elvéből adódóan minden Zangger-Sterk-típusú kísérlet, így az általunk kifejlesztett ZS CPMG-HSQMBC is, érzékenyséavesztéssel jár együtt. Ahogy erről részletesen írtam a 2.2.6. alfejezetben, egy ZS módszer érzékenységét mindig az aktuálisan létrehozott rétegvastagság határozza meg, ami pedig egyenesen arányos a szelektív impulzus sáv szélességével, és fordítottn arányos a rétegszelekciós gradiens erősségével. A szelektív impulzus sáv szélességének kisebbnek kell lennie, mint az egymással csatolásban lévő spinek közötti legkisebb frekvenciakülönbség. A rétegszelekciós gradiens erősségének megválasztását pedig az határozza meg, hogy mekkora frekvenciatartomány detektálására van szükségünk. A gyakorlatban ezt a két paramétert mindig a mérni kívánt vegyületre érdemes optimalizálni, például a HSQMBC-nél gyorsabb, ZS-protonlecsatolt ^1H („pure shift” ^1H) kísérlet¹¹ segítségével.



32. ábra Interferogram-típusú, Zangger-Sterk szélesávú protonlecsatolt CPMG-HSQMBC impulzusszekvencia sematikus megjelenítése. A keskeny és szélesebb téglalapok 90° illetve 180° -os, kemény, x fázisú impulzusokat jelölnek, hacsak nem jelzem (ϕ_n külön. Az RSnob típusú,¹⁸⁶ szelektív 180° -os protonimpulzust fél-ellipszis ábrázolja. A CPMG szekvenciaelemben ϕ_1 -et az XY-16 ciklusnak megfelelően léptetjük, emiatt n értékét 16 többszörösének kell beállítani. A további impulzuszázisok: $\phi_2 = y$; $\phi_3 = x, -x$; $\phi_4 = x, x, -x, -x$; $\phi_5 = x, x, x, x, y, y, y, y$; és $\phi_{\text{rec}} = x, -x, -x, x, -x, x, x, -x$. Az időintervallumokat a következőképpen állítjuk be: $\tau = 140\text{--}150 \mu\text{s}$, $\tau_a = 1/(4*sw2)$, $\tau_b = 1/(4*sw2) - 4/sw$. A koherenciaszelekciót és az echo-antiecho fázisérzékeny detektálást az X dimenzióban a G_2 és G_4 térgradiens impulzusok 80 : 20.1 (^{13}C esetén), 80 : 32.3846 (^{31}P esetén) vagy 80 : 15.257 (^{77}Se esetén) arányú alkalmazásával érjük el.

G_1 és G_3 tisztító térgradiens impulzusokat a maximális gradienserősség (50 G/cm) 19 illetve 10 %-ára állítjuk be. A protonlecsatolásért felelős blokkban alkalmazott koherenciaszelekciós gradiensimpulzusok esetén G_5 értéke 18 %. Szinuszos formájú, 1 ms-os ($p16$) térgradiens impulzusokat, és azokat követően tipikusan 200 μ s hosszúságú felépülési időt ($d16$) használunk. A rétegszelekciós gradienst (G_6) mindig a vizsgált vegyületnek megfelelően állítjuk be, ezért a konkrét értékeket az adott spektrum ábraaláírásában adom meg. Szélessávú heteronukleáris lecsatolást nem alkalmazunk az adatgyűjtés ideje alatt.

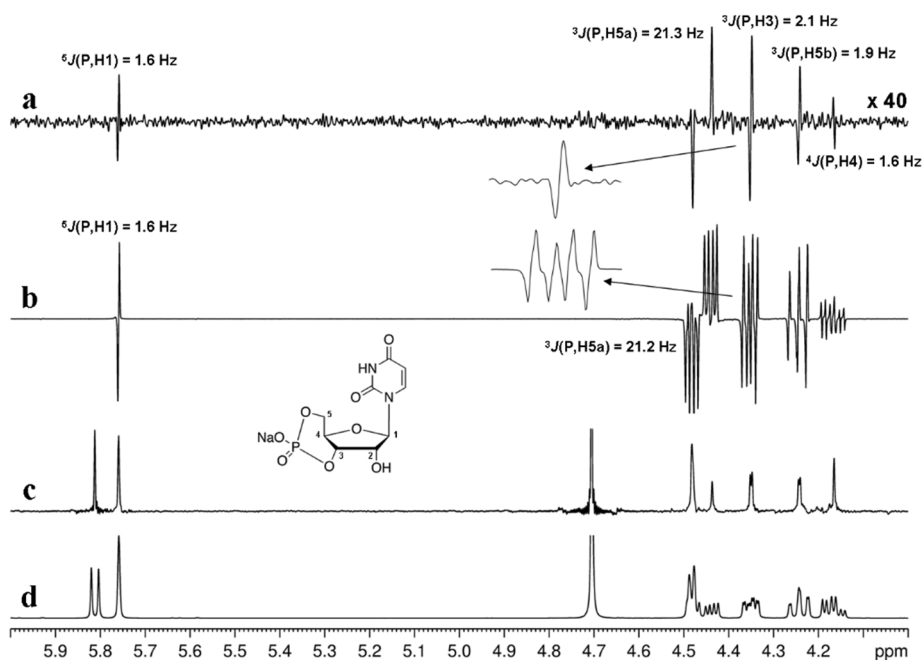
A kifejlesztett ZS CPMG-HSQMBC szekvencia pszeudo-2D verziójának teljesítőképességét először olyan vegyületeken vizsgáltuk, amelyek kiemelkedően vagy közepesen érzékeny NMR aktív heteromagnóból (^{31}P – 391-szer érzékenyebb, mint a ^{13}C ; ^{77}Se – 3,15-ször érzékenyebb, mint a ^{13}C) csak egy darabot tartalmaznak, és ugyanakkor kiterjedt proton-proton csatolási hálózattal rendelkeznek (33-35. ábrák). Első példaként egy diglikozil-szelenid normál ^1H , ZS-protonlecsatolt ^1H , ^1H - ^{77}Se CPMG-HSQMBC¹⁸⁰ és ZS ^1H - ^{77}Se CPMG-HSQMBC spektrumát mutatja a 33. ábra. Megfigyelhető, hogy a proton-proton csatolás okozta, számos, azonos fázisú jelfelhasadás a klasszikus CPMG-HSQMBC multiplettekben (33./b ábra) jelentősen megnövekedti a többkötéses ^1H - ^{77}Se csatolási állandók meghatározását. Ezzel szemben a szélessávú protonlecsatolt CPMG-HSQMBC spektrum (33./a ábra) tiszta ellentétes fázisú dublettjei a kívánt heteronukleáris csatolási állandók egyszerű és pontos mérését teszik lehetővé. Az új módszerrel kapott csatolási állandók helyességének ellenőrzése végett – amennyiben az lehetséges volt - meghatároztuk a csatolási állandókat a klasszikus, protoncsatolt HSQMBC multiplettekből is. A két különböző módszerrel kapott csatolási állandók – melyeket megadtam a megfelelő multiplettek felett a 33-35. ábrákon – kísérleti hibán belül megegyeznek, megerősítve azt, hogy az alkalmazott homonukleáris lecsatolásnak nincs nem-kívánt hatása a mért heteronukleáris jelfelhasadásokra. Kutatócsoportunk korábbi, egyszerű glikozil-szelenideken végzett vizsgálatai alapján, a $^nJ_{\text{SeH}}$ -k ígéretes eszköznek tűnnek a C(1)-Se kötés körüli glikozidos konformáció jellemzésére,¹⁷² valamint a Se melletti diasztereotóp CH_2 protonok egyértelmű, sztereospecifikus jelhozzárendelésére.¹⁸⁷



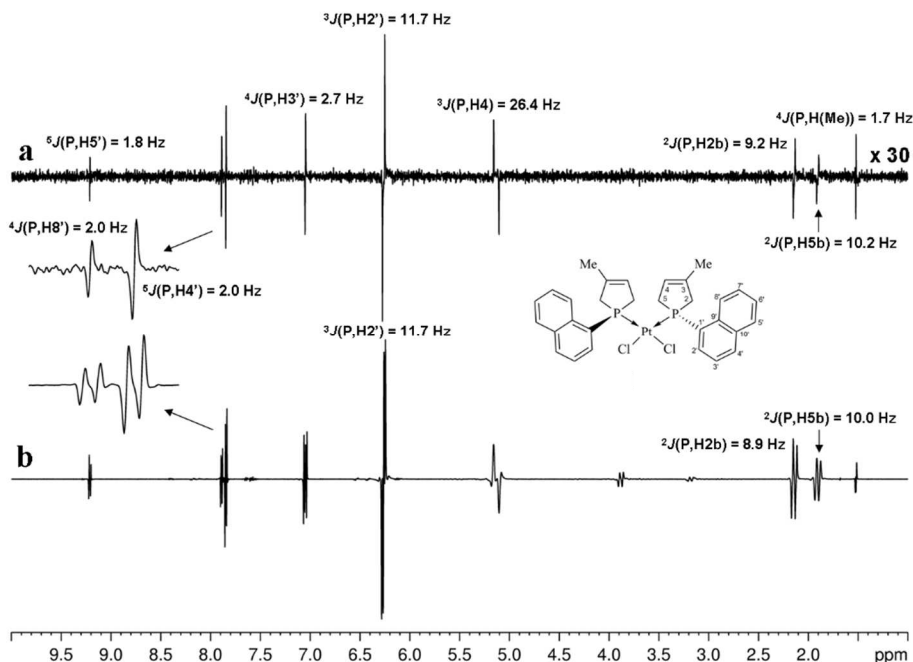
33. ábra Egy védett diglikozil-szelenid (a vegyület szerkezeti képlete számozással az ábra közepén látható; 0,31 M CDCl_3 -ban) szélessávú protonlecsatolt ^1H - ^{77}Se CPMG-HSQMBC (a) és ^1H - ^{77}Se CPMG-HSQMBC (b) spektrumának összehasonlítása. A mérési idő 5 óra 54 perc (a), illetve 45 perc (b) volt. A homonukleárisan lecsatolt spektrumot (a) a 32. ábrán bemutatott impulzusszekvencia olyan változtatással rögzítettük, amelyben a t_1 inkrementált időt egy 3 μs -os konstans idővel helyettesítettük. Az ábrán a vegyület ZS-típusú protonlecsatolt ^1H (c) és normál ^1H NMR spektrumát (d) szintén bemutatom. Az ábrán látható összes spektrumot 6,0371 ppm-es ^1H spektrális ablakkal mértük. A szélessávú protonlecsatolt kísérletekben (a,c) egy 46,64 ms-os, 50 Hz sávszélességű, RSnob típusú, ^{186}Se 180° -os szelektív protonimpulzust, és az időtartama alatt egy, a maximális gradienserősség (50 G/cm) 1 %-ának megfelelő erősségű rétegszelektív térgradiens impulzust (G_6) alkalmaztunk. Ezeket a spektrumokat (a,c) a következő paraméterekkel mértük: t_2 inkrementumok száma (ami a gyakorlatban a FID darabok számát jelenti) = 32, egy FID darab ideje ($1/SW_2$) = 16,56 ms, a tényleges komplex adatpontok száma a ^1H dimenzióban a FID darabok összefűzését követően = 3200, tranziensek közötti várakozási idő (dI) = 2 s és tranziensek száma = 128 (a) illetve 4 (c). A klasszikus CPMG-HSQMBC szekvenciát használva, a következő paraméterekkel vettük fel a (b) spektrumot: komplex adatpontok száma a ^1H dimenzióban = 4096, tranziensek közötti várakozási idő (dI) = 1,7 s és tranziensek száma = 1024. A HSQMBC spektrumokat (a,b) a CPMG-INEPT blokkban 70,3 ms-os heteronukleáris csatolási evolúciós időt beállítva rögzítettük.

Az új módszer további alkalmazási lehetőségeinek felderítéséhez foszfortartalmú vegyületeken is méréseket végeztünk. Egy biológiailag fontos molekula, a cUMP, összes ${}^nJ_{PH}$ -ját egyszerűen meg tudtuk határozni a protonlecsatolt 1H - ${}^{31}P$ CPMG-HSQMBC spektrumban (34./a ábra) az ellenfázisú dublettek két csúcsmaximuma közötti frekvenciakülönbség mérésével. Ezzel ellentétben a konvencionális CPMG-HSQMBC multiplettek (34./a ábra) analízise sok esetben nem kézenfekvő. A 33. és 34. ábra azt is szépen illusztrálja, hogy az alkalmazott szélessávú homonukleáris lecsatolás komplex proton-proton csatolási hálózattal rendelkező molekulák esetén is hatékony.

A foszfortartalmú modellvegyületeken végzett méréseink (34-35. ábrák) igazolják, hogy az új módszerrel többkötéses heteronukleáris csatolási állandók széles tartományban (akár 2-26 Hz) egyszerre, egyetlen kísérletben mérhetők. Ezek az eredmények egyértelműen bizonyítják, hogy a javasolt impulzusszekvencia (32. ábra) az alkalmazott gradiens koherenciaszelekciós sémával együtt, hatékonyan kiszűri a CPMG-INEPT idő és a ${}^nJ_{XH}$ szinkronizálatlanságából eredő, nem-kívánt koherenciákat. A foszfortartalmú heterociklusos ligandumot tartalmazó, királis Pt(II)-komplex ZS 1H - ${}^{31}P$ CPMG-HSQMBC spektruma (35./a ábra) azt is demonstrálja, hogy – ha szükséges – a rétegszelekciós gradiens erősségének megfelelő beállításával kiterjedt 1H kémiai eltolódás tartományban lévő jeleket egyszerre tudunk rögzíteni, és a kívánt csatolási állandókat meghatározni.

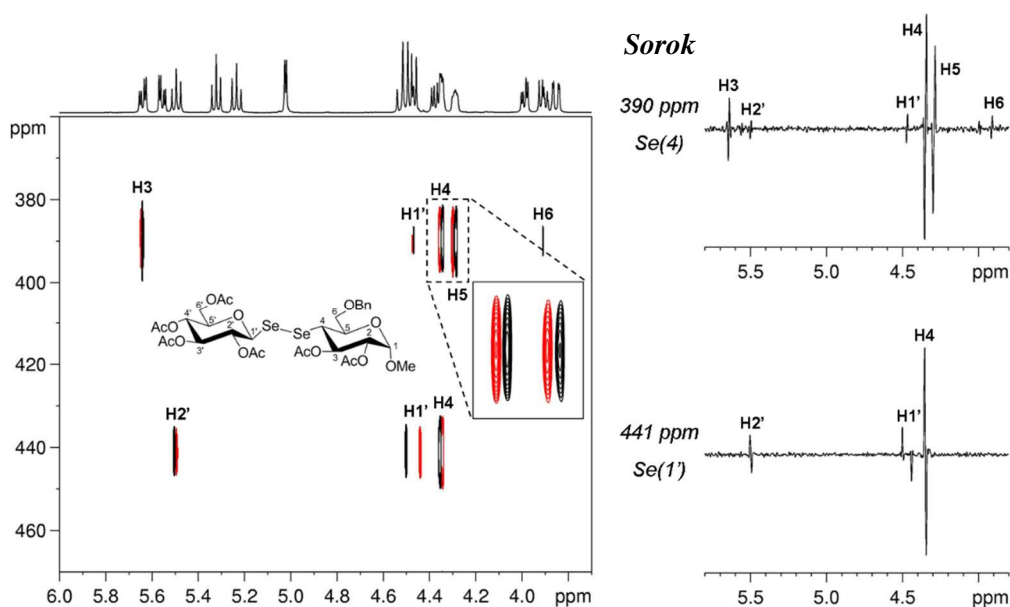


34. ábra A ciklikus-UMP (a vegyület szerkezeti képlete számozással az ábra közepén látható; 0,12 M D₂O-ban) szélessávú protonlecsatolt ¹H-³¹P CPMG-HSQMBC (a) és ¹H-³¹P CPMG-HSQMBC (b) spektrumának összehasonlítása. A mérési idő 1 óra 28 perc (a), illetve 10 perc (b) volt. A homonukleárisan lecsatolt spektrumot (a) a 32. ábrán bemutatott impulzusszekvencia olyan változatával rögzítettük, amelyben a t_1 inkrementált időt egy 3 μ s-os konstans idővel helyettesítettük. Az ábrán a vegyület ZS-típusú protonlecsatolt ¹H (c) és normál ¹H NMR spektrumát (d) szintén bemutatom. Az (a,c,d) spektrumokat 6,0371 ppm-es ¹H spektrális ablakkal mértük. A szélessávú protonlecsatolt kísérletekben (a,c) egy 93,28 ms-os, 25 Hz sáv szélességű, RSnob típusú, ¹⁸⁶180°-os szelektív protonimpulzust, és az időtartama alatt egy, a maximális gradienserősség (50 G/cm) 1 %-ának megfelelő erősségű rétegszelektív térgradiens impulzust (G_6) alkalmaztunk. Ezeket a spektrumokat (a,c) a következő paraméterekkel mértük: t_2 inkrementumok száma (ami a gyakorlatban a FID darabok számát jelenti) = 32, egy FID darab ideje ($1/SW_2$) = 16,56 ms, a tényleges komplex adatpontok száma a ¹H dimenzióban a FID darabok összefűzését követően = 3200, tranziensek közötti várakozási idő ($d1$) = 1,7 s és tranziensek száma = 32 (a) illetve 8 (c). A klasszikus CPMG-HSQMBC szekvenciát használva, a következő paraméterekkel vettük fel a (b) spektrumot: ¹H spektrális ablak = 9,9774 ppm, komplex adatpontok száma a ¹H dimenzióban = 16384, tranziensek közötti várakozási idő ($d1$) = 1,7 s és tranziensek száma = 128. A HSQMBC spektrumokat (a,b) a CPMG-INEPT blokkban 70,3 ms-os heteronukleáris csatolási evolúciós időt beállítva rögzítettük.



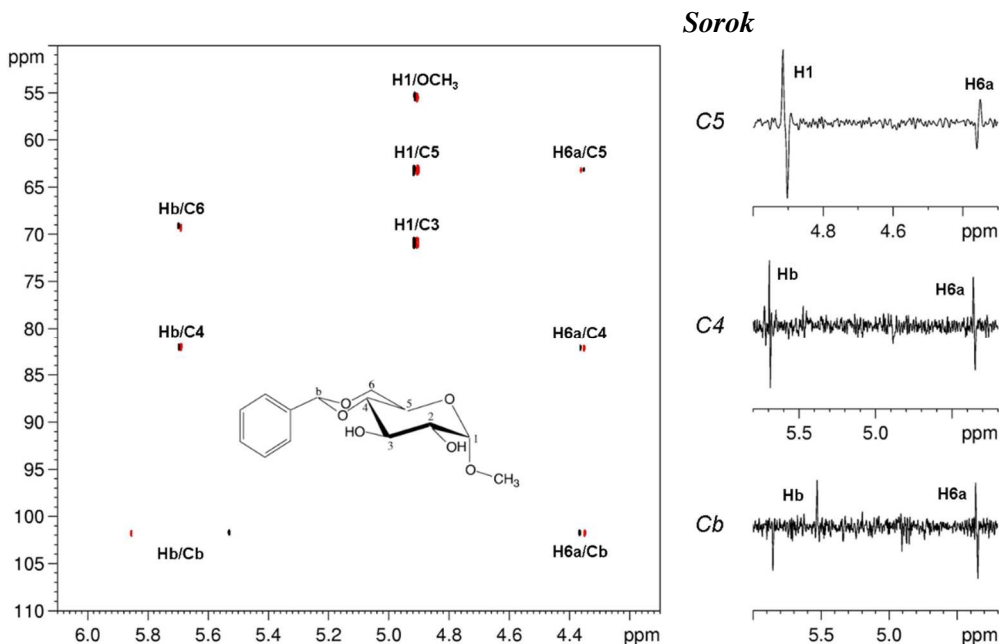
35. ábra Egy foszfortartalmú heterociklusos ligandumot tartalmazó, királis Pt(II)-komplex¹⁸⁸ (a vegyület szerkezeti képlete számozással az ábra közepén látható; 0,083 M CDCl₃-ban) szélessávú protonlecsatolt ¹H-³¹P CPMG-HSQMBC (a) és ¹H-³¹P CPMG-HSQMBC (b) spektrumának összehasonlítása. A mérési idő 3 óra 18 perc (a), illetve 13 perc (b) volt. A homonukleáris lecsatolt spektrumot (a) a 32. ábrán bemutatott impulzusszekvencia olyan változatával rögzítettük, amelyben a t_1 inkrementált időt egy 3 μ s-os konstans idővel helyettesítettük. Továbbá egy 23,32 ms-os, 100 Hz sávszélességű, RSnob típusú, ¹⁸⁶ 180°-os szelektív protonimpulzust, és az időtartama alatt egy, a maximális gradienserősség (50 G/cm) 1,6 %-ának megfelelő erősségű rétegszelektációs térgradiens impulzust (G_0) alkalmaztunk. A protonlecsatolt spektrumot (a) a következő paraméterekkel mértük: ¹H spektrális ablak = 9,9774 ppm, t_2 inkrementumok száma (ami a gyakorlatban a FID darabok számát jelenti) = 32, egy FID darab ideje ($1/SW_2$) = 20,04 ms, a tényleges komplex adatpontok száma a ¹H dimenzióban a FID darabok összefűzését követően = 6400, tranziensek közötti várakozási idő (dI) = 1,7 s és tranziensek száma = 96. A klasszikus CPMG-HSQMBC szekvenciát használva, a következő paraméterekkel vettük fel a (b) spektrumot: ¹H spektrális ablak = 9,9774 ppm, komplex adatpontok száma a ¹H dimenzióban = 8192, tranziensek közötti várakozási idő (dI) = 2 s és tranziensek száma = 256. A HSQMBC spektrumokat (a,b) a CPMG-INEPT blokkban 52,7 ms-os heteronukleáris csatolási evolúciós időt beállítva rögzítettük.

A szélessávú protonlecsatolt CPMG-HSQMBC módszer pseudo-3D változatát egy olyan diglikozil-diszeleniden teszteltük, ami az interglikozidos hídban egy különleges Se-Se kötést tartalmaz (36. ábra). Mind a 2D szintvonalas megjelenítésen, mind a megfelelő ^{77}Se kémiai eltolódásoknál kiemelt sorokon jól megfigyelhető (36. ábra), hogy a kifejlesztett pseudo-3D kísérlet tiszta, kizárólag a többkötéses heteronukleáris csatolások következtében létrejövő, ellenfázisú dubletteket eredményez. Ezáltal lehetővé teszi a $^nJ_{\text{SeH}}$ -k közvetlen és pontos meghatározását olyan molekulákban is, amelyek egynél több Se atomot tartalmaznak.



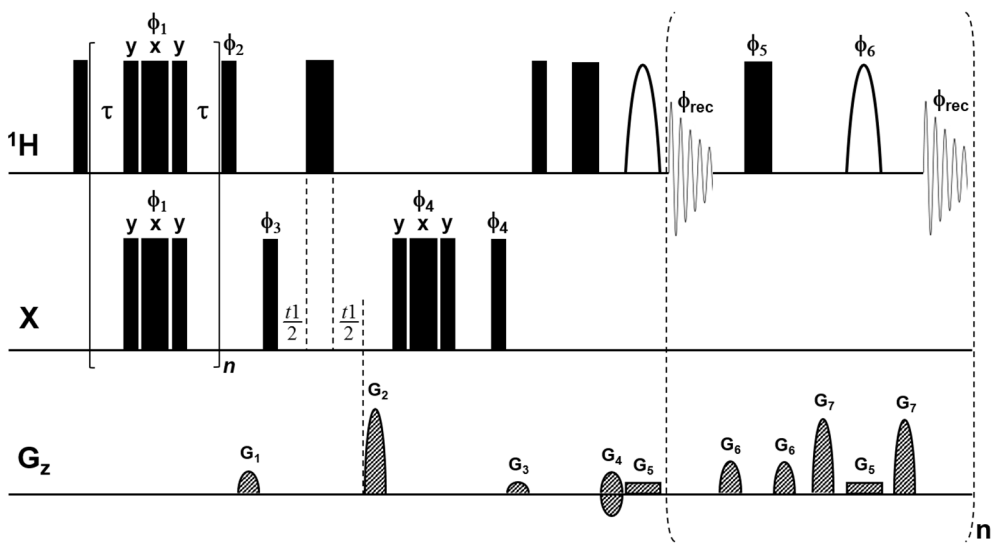
36. ábra Egy diglikozil-diszelenid (a vegyület szerkezeti képlete számozással az ábra közepén látható; 0,25 M C_6D_6 -ban) Zangger-Sterk-típusú szélessávú protonlecsatolt ^1H - ^{77}Se CPMG-HSQMBC spektruma illetve a megfelelő ^{77}Se kémiai eltolódásoknál kiemelt sorai. A vegyület normál ^1H NMR spektruma a 2D szintvonalas ábra felett látható. A protonlecsatolt CPMG-HSQMBC kísérletben egy 46,64 ms-os, 50 Hz sáv szélességű, RSnob típusú, ^{186}Se 180° -os szelektív protonimpulzust, és az időtartama alatt egy, a maximális gradienserősség (50 G/cm) 0,5 %-ának megfelelő erősségű rétegszelektív térgradiens impulzust (G_0) alkalmaztunk. A spektrumot 308 K-en 18 óra 18 perc alatt a következő paraméterekkel rögzítettük: ^1H (^{77}Se) spektrális ablak = 9,9774 ppm (140,0 ppm), t_1 inkrementumok száma = 32, t_2 inkrementumok száma (ami a gyakorlatban a FID darabok számát jelenti) = 16, egy FID darab ideje ($1/SW_2$) = 16,56 ms, a tényleges komplex adatpontok száma a ^1H dimenzióban a FID darabok összefűzését követően = 1600, tranziensek közötti várakozási idő (dI) = 1,7 s, tranziensek száma = 48 és többkötéses heteronukleáris csatolási evolúciós idő = 70,3 ms.

A javasolt módszert többkötéses ^1H - ^{13}C csatolási állandók ($^nJ_{\text{CH}}$) mérésére is kipróbáltuk egy egyszerű szénhidrátszármazékon (37. ábra). Fontosnak tartom itt megjegyezni, hogy a rétegszelekcióval járó jelentős érzékenységvesztésnek és a ^{13}C izotóp kis természetes gyakoriságának köszönhetően, az interferogram-típusú ZS CPMG-HSQMBC kísérlet csak megfelelően nagy koncentrációjú ($\sim \text{M}$ -os nagyságrendű) minták $^nJ_{\text{CH}}$ -inak meghatározására használható.



37. ábra Az ábra közepén feltüntetett szénhidrátszármazék (1,62 M D₆-DMSO-ban) Zangger-Sterk-típusú szélessávú protonlecsatolt ^1H - ^{13}C CPMG-HSQMBC spektrumának részlete. A 2D szintvonalas megjelenítés mellett reprezentatív, kiemelt ^{13}C sorok láthatók az ábrán. A protonlecsatolt CPMG-HSQMBC kísérletben egy 46,64 ms-os, 50 Hz sávszélességű, RSnob típusú,¹⁸⁶ 180°-os szelektív protonimpulzust, és az időtartama alatt egy, a maximális gradienserősség (50 G/cm) 1 %-ának megfelelő erősségű rétegszelekciós térgradiens impulzust (G_6) alkalmaztunk. A spektrumot 38 óra 46 perc alatt a következő paraméterekkel rögzítettük: ^1H (^{13}C) spektrális ablak = 6,0370 ppm (80,0 ppm), t_1 inkrementumok száma = 200, t_2 inkrementumok száma (ami a gyakorlatban a FID darabok számát jelenti) = 16, egy FID darab ideje ($1/SW_2$) = 21,12 ms, a tényleges komplex adatpontok száma a ^1H dimenzióban a FID darabok összefűzését követően = 2048, tranziensek közötti várakozási idő (dI) = 1,7 s, tranziensek száma = 16 és többkötéses heteronukleáris csatolási evolúciós idő = 74,4 ms.

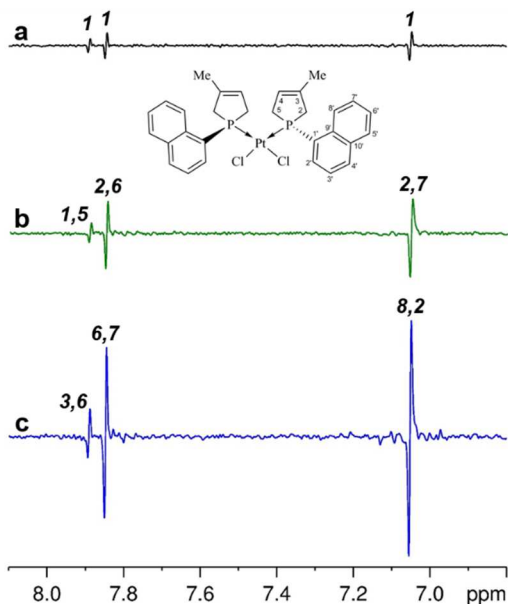
A nagyobb érzékenység, és ezáltal szélesebb körben való alkalmazhatóság érdekében célul tűztük ki a szélessávú protonlecsatolt HSQMBC módszer továbbfejlesztését. Elsőként – az irodalomban időközben megjelent – valós idejű akvizíciós stratégiát⁸⁰ hívtuk segítségül. A 38. ábrán megfigyelhető, hogy a hagyományos CPMG-HSQMBC szekvencia végére beillesztettünk egy frekvencia- és rétegszelektív impulzust az aktív spinek kiválasztása végett. A szelektív impulzust követően megkezdjük az adatgyűjtést egy olyan FID darab detektálásával, ami fele olyan időtartamú ($AQ/2n$), mint az utána következők. Ezt követően megszakítjuk az adatgyűjtést, és egy – a detektálás megkezdése előttivel megegyező – frekvencia- és rétegszelektív, illetve egy nem-szelektív 180° -os protonimpulzus kombinációjával refókuszáljuk a proton-proton csatolási evolúciót, majd egy 10-25 ms-os FID darabot (AQ/n) rögzítünk. A FID darabok detektálását és a J -refókuszálást felváltva végezzük addig, amíg a teljes FID-et meg nem kapjuk, amint ezt az irodalmi előzmények 2.3.2. alfejezetében már tárgyaltam. A valós idejű homolecsatolt CLIP/CLAP-HSQC módszer esetén szerzett tapasztalatok alapján (4.2.2. alfejezet), a detektálás alatti impulzusok fázisait a valós idejű ZS CPMG-HSQMBC szekvenciában is J -refókuszáló blokkra léptetjük a tranziensenként történő fázisciklizáltatás mellett (részletek a 38. ábraalírásban olvashatók). A helyes koherenciaút kiválasztását, a nem kívánt jelek elnyomását a protonlecsatolást biztosító impulzusok körül elhelyezett térgradienspárok segítik.



38. ábra Valós idejű, Zangger-Sterk szélessávú protonlecsatolt CPMG-HSQMBC impulzusszekvencia sematikus megjelenítése. A keskeny és szélesebb téglalapok 90° illetve

180°-os, kemény, x fázisú impulzusokat jelölnek, hacsak nem jelzem (ϕ_n) külön. A Gauss típusú, szelektív 180°-os protonimpulzust fél-ellipszis ábrázolja. A CPMG szekvenciaelemben ϕ_1 -et az XY-16 ciklusnak megfelelően léptetjük, emiatt n értékét 16 többszörösének kell beállítani. A további impulzusok tranziensenkénti fázisai (fázisciklus): $\phi_2 = y$; $\phi_3 = x, x, -x, -x$; $\phi_4 = x, x, x, x, -x, -x, -x, -x$; $\phi_5 = x, -x$; $\phi_6 = x, x, -x, -x$; és $\phi_{rec} = x, x, -x, -x, -x, -x, x, x$. A protonlecsatoló modulban lévő impulzusok J -refókuszáló blokkokkénti fázisai (fázisszekvencia): $\phi_5 = \phi_6 = x, y, x, y, y, x, y, x, -x, -y, -x, -y, -y, -x, -y, -x$. A τ időintervallumot 140-150 μ s-ra állítjuk be. A koherenciaszelekciót és az echo-antiecho fázisérzékeny detektálást az X dimenzióban a G_2 és G_4 térgradiens impulzusok 80 : 20.1 (^{13}C esetén), 80 : 32.3846 (^{31}P esetén) vagy 80 : 15.257 (^{77}Se esetén) arányú alkalmazásával érjük el. A tipikusan 1 ms-os (p16) G_1 és G_3 tisztító térgradiens impulzusokat a maximális gradienserősség (50 G/cm) 19 illetve 11 %-ára állítjuk be, és utána egy 100 μ s hosszúságú felépülési időt (d16) használunk. A FID darabok detektálása között, a kemény és a szelektív 180°-os protonimpulzusok köré szimmetrikusan elhelyezett, 0,5 ms-os koherencia átviteli út (CTP) kiválasztásáért felelős térgradiens impulzusokat ($G_6 = 31$ % és $G_7 = 71$ %), és mindegyik után 100 μ s-os felépülési időt alkalmazunk. A rétegszelekciós gradienst (G_5) mindig a vizsgált vegyületnek megfelelően állítjuk be, ezért a konkrét értékeket az adott spektrum ábraaláírásában adom meg. Szélessávú heteronukleáris lecsatolást (CPD) nem használunk az adatgyűjtés ideje alatt.

Amint azt a 2.2.6. alfejezetben összefoglaltam, az utóbbi években többféle megoldást javasoltak a Zangger-Sterk kísérletek érzékenységének növelésére. Ezen megközelítések közül a valós idejű ZS CPMG-HSQMBC módszer esetében a többfrekvencián gerjesztő szelektív impulzus⁸⁵ alkalmazása mellett döntöttünk, mivel ez ígért a legnagyobb érzékenységgjavulást. Ebben az esetben ugyanis minden egyes protonjelet a minta több rétegéből is detektálhatunk, amennyiben a besugárzási frekvenciákat megfelelően – a véletlen visszacsatolásokat elkerülve – választjuk meg. A 39. ábrán egy foszfortartalmú heterociklusos ligandumot tartalmazó, királis Pt(II)-komplex interferogram-típusú (39./a ábra), valós idejű (39./b ábra) és három frekvenciás szelektív impulzust alkalmazó, valós idejű (39./c ábra) ZS ^1H - ^{31}P CPMG-HSQMBC spektrumrészletét hasonlítom össze. A spektrumokat azonos mérési idővel és paraméterekkel rögzítettük. Az egyes rezonanciajelek felett az interferogram-típusú kísérlet megfelelő rezonanciajelére normált, relatív jel-zaj arányokat tüntettem fel (39. ábra). Ezek alapján elmondható, hogy önmagában a valós idejű adatgyűjtési stratégiával átlagosan 2-2,5-szeres, a valós idejű kísérletet kombinálva egy három frekvencián gerjesztő szelektív impulzussal pedig átlagosan 6-6,5-szeres jel-zaj arány növekedést értünk el az interferogram-típusú módszerhez képest.



39. ábra Egy foszfortartalmú heterociklusos ligandumot tartalmazó, királis Pt(II)-komplex¹⁸⁸ interferogram-típusú (a), valós idejű (b) és három frekvenciás szelektív impulzust alkalmazó, valós idejű (c) Zangger-Sterk protonlecsatolt ^1H - ^{31}P CPMG-HSQMBC spektrumrészletének összehasonlítása. A vegyület (0,083 M CDCl_3 -ban) szerkezeti képlete számozással az ábra közepén, a teljes interferogram-típusú ZS CPMG-HSQMBC és normál CPMG-HSQMBC spektruma, illetve a meghatározott $^nJ_{\text{PH}}$ -k a 35. ábrán láthatók. A mérési idő mindhárom esetben 47 perc volt, és a spektrumok azonos zajszinttel lettek ábrázolva a jelintenzitások összehasonlíthatósága kedvéért. Az egyes rezonanciajelek felett az interferogram-típusú kísérlet (a) megfelelő rezonanciajelére normált, relatív jel-zaj arányokat tüntettem fel. Az interferogram-típusú kísérletben (a) egy 23,32 ms-os, 100 Hz sáv szélességű, RSnob típusú,¹⁸⁶ a valós idejű kísérletekben (b,c) egy 8,82 ms-os, 100 Hz sáv szélességű, Gauss típusú (utóbbiban (c) 3 frekvencián gerjesztő), 180° -os szelektív protonimpulzust alkalmaztunk. Mindhárom esetben a maximális gradienserősség (50 G/cm) 1,6 %-ának megfelelő erősségű rétegszelekciós térgradiens impulzust használtunk. Az interferogram-típusú spektrumot (a) a következő paraméterekkel mértük: ^1H (^{31}P) spektrális ablak = 9,9774 ppm (30,0 ppm), t_1 inkrementumok száma = 2, t_2 inkrementumok száma (ami a gyakorlatban a FID darabok számát jelenti) = 16, egy FID darab ideje ($1/SW_2$) = 25,1 ms, a tényleges komplex adatpontok száma a ^1H dimenzióban a FID darabok összefűzését követően = 4000, tranziensek közötti várakozási idő (dI) = 1,7 s és tranziensek száma = 32. A valós idejű spektrumokat (b,c) a következő paraméterekkel rögzítettük: ^1H (^{31}P) spektrális ablak = 9,9774 ppm (30,0 ppm), t_1 inkrementumok száma = 2, komplex adatpontok száma a ^1H dimenzióban = 4096, FID darabok száma = 16, egy FID darab ideje = 25,6 ms, tranziensek közötti várakozási idő (dI) = 1,7 s és tranziensek száma = 512. Mindhárom HSQMBC spektrumot (a,b,c) a CPMG-INEPT blokkban 52,7 ms-os heteronukleáris csatolási evolúciós időt beállítva rögzítettük.

Az alkalmazott, új megközelítéseknek azonban korlátai és hátrányos tulajdonságai is vannak. A valós idejű kísérletekben – amint a 2.3.2. alfejezetben írtam – az adatgyűjtést megszakító, lecsatoló blokkok alatti relaxációt nem lehet elkerülni, ami ugrásokhoz vezet a detektált FID amplitúdójában, és jelszélesedéshez a kapott spektrumban. Ráadásul ha a FID nem teljesen folytonos, akkor az zavaró jeleket is eredményezhet a spektrumban. Emiatt a megszakítások időtartamát olyan rövidre érdemes redukálni, amennyire csak lehet, főleg kicsi T_2 relaxációs idővel rendelkező, nagyobb molekulák esetén. A ZS CPMG-HSQMBC módszer J -refókuszáló periódusának hosszát alapvetően a szelektív impulzus időtartama határozza meg. Megfelelő spektrális tisztaság és jelszélesség eléréséhez – tapasztalataink szerint – még kis- és közepes méretű molekulák esetén sem ajánlott 10 ms-nál hosszabb szelektív impulzus használata. Emiatt a valós idejű kísérletekben nem RSnob, hanem Gauss típusú formázott impulzust alkalmazunk, hiszen azonos idejű impulzusokat összehasonlítva utóbbihoz tartozik a kisebb sáv szélesség. Viszont egy 10 ms-os Gauss típusú szelektív impulzus sáv szélessége sem csekély, konkrétan 88 Hz, ami a gyakorlatban azt jelenti, hogy csak olyan, egymással spin-spin csatolásban lévő protonokat tudunk lecsatolni, melyek rezonanciafrekvencia-különbsége 88 Hz-nél nagyobb. Ugyanakkor még olyan molekulák esetén is, melyekben a csatoló partnerek frekvenciakülönbsége megfelelő, a valós idejű kísérlet hátránya, hogy szélesebb jeleket és kevésbé tiszta spektrumot eredményez, mint az interferogram-típusú. A nagyobb jelszélesség a kis (< 3-4 Hz) heteronukleáris csatolási állandók pontatlanabb meghatározását idézi elő. A valós idejű módszer további hátránya, hogy érzékeny a mérés ideje alatti, mindenféle (pl. hőmérséklet, shim) instabilitásra, és implementációja nagyban függ az adott spektrométer konfigurációjától.

A többfrekvencián gerjesztő szelektív impulzus alkalmazása esetén a gerjesztési frekvenciákat mindig a vizsgált vegyületre szabottan, körültekintően kell megadni. Ehhez segítségül lehet hívni a Castañar és szerzőtársai által erre a célra kifejlesztett java szkriptet.⁸⁵ A gerjesztő frekvenciák meghatározásához mindenképpen ismernünk kell a vizsgált molekula spinrendszerét és jelhozzárendelését. Emiatt a többfrekvenciás gerjesztésnek két komoly limitációja van. Egyrészt nem használható a jelhozzárendelés hiányában. Másrészt minden egyes vegyületre saját többfrekvencián gerjesztő impulzust kell létrehoznunk, azaz nem használható rutinszerűen.

Összefoglalva, a valós idejű adatgyűjtési stratégia és a többfrekvencián gerjesztő szelektív impulzusok együttes alkalmazásával ugyan sikerült jelentősen megnövelni a ZS CPMG-HSQMBC módszer érzékenységét, azonban ez csak bizonyos feltételek teljesülése esetén és kompromisszumok árán volt elérhető. Emiatt továbbra is a céljaink

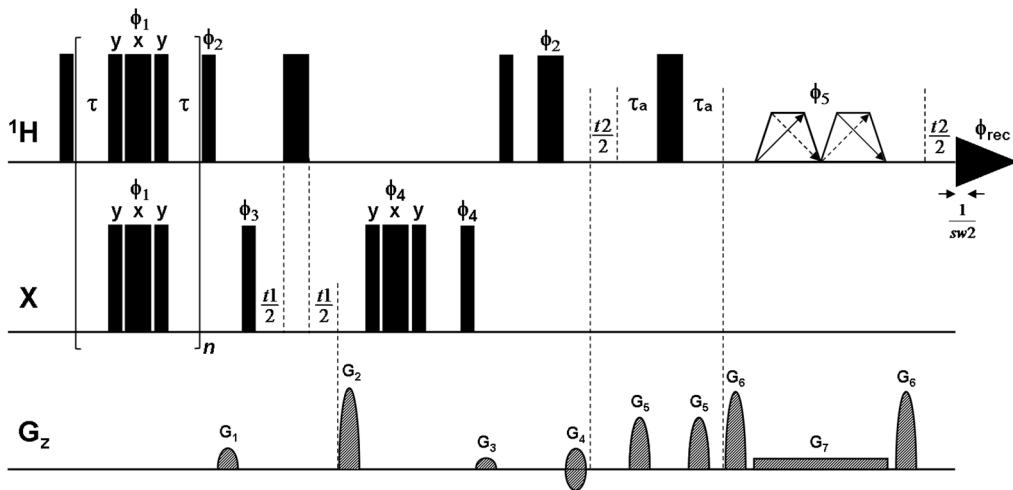
között szerepelt szélesebb körben alkalmazható, szélessávú protonlecsatolt HSQMBC módszer kifejlesztése.

4.3.2. PSYCHE-típusú szélessávú protonlecsatolás megvalósítása CPMG-HSQMBC kísérletben

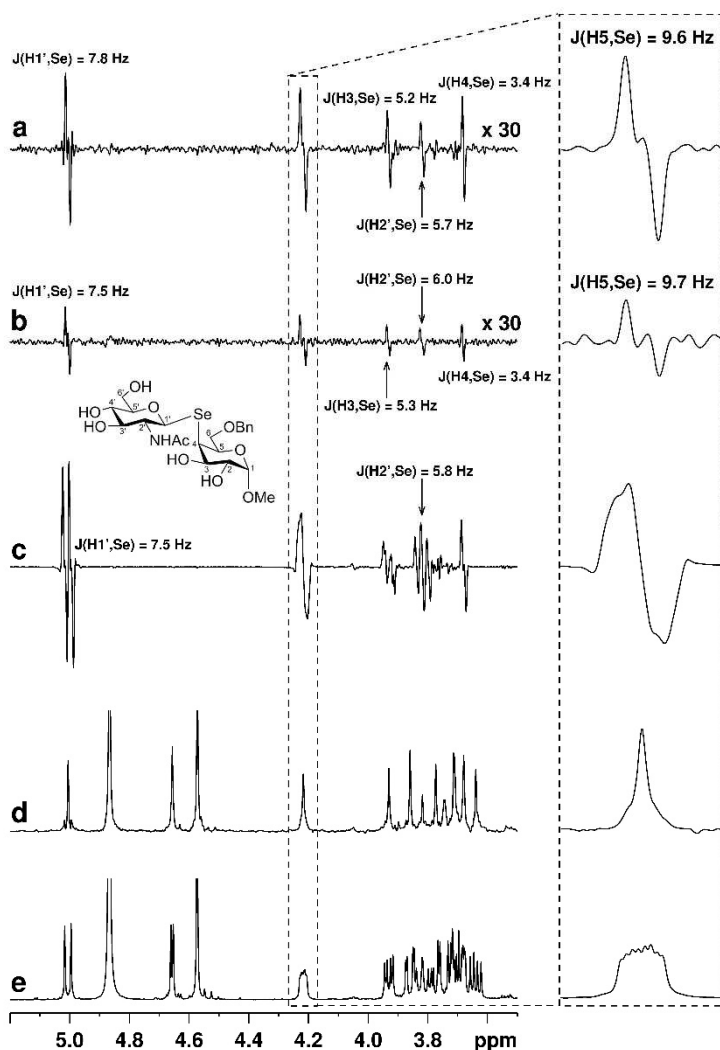
Morris és munkatársai 2014-ben fejlesztették ki a legújabb, szélessávú homonukleáris protonlecsatolásra alkalmas módszert, a PSYCHE-t,³⁶ amiről a 2.2.7. alfejezetben részletesen írtam. Ezen új megközelítés alkalmazását – ^1H és TOCSY kísérletekben bemutatott előnyös tulajdonságai alapján – érdemesnek gondoltuk kipróbálni a CPMG-HSQMBC kísérletben. Ennek megfelelően az interferogram-típusú PSYCHE szélessávú protonlecsatolással továbbfejlesztettük a CPMG-HSQMBC módszert.¹⁰⁴ Az így kapott új impulzusszekvencia (40. ábra) nagyon hasonló a 4.3.1. alfejezet elején bemutatott, interferogram-típusú ZS-lecsatolt szekvenciához, ezért itt a kísérlet részletes tárgyalásától eltekintek, csak a különbséget emelem ki. A PSYCHE kísérletben az aktív spinek szelektív inverzióját nem egy frekvencia- és rétegszelektív 180° -os protonimpulzus, hanem egy kis kibillentési szögű, frekvenciapásztázott Chirp impulzuspár, és az alatta alkalmazott gyenge térgradiens impulzus együttesével érjük el. Az aktív spinek (melyek a detektálni kívánt, lecsatolt jelet szolgáltatják) passzív spinektől való megkülönböztetése statisztikus,³⁶ ami azt is jelenti, hogy a PSYCHE módszer lehetőséget ad arra, hogy a Chirp impulzuspár β szögének beállításával a spektroszkópus egy számára megfelelő kompromisszumot kössön az érzékenység és a spektrális tisztaság között (részletek a 2.2.7. alfejezetben olvashatók). Általában egy 20° és 30° közötti kibillentési szögű Chirp impulzuspár használata minden szempontból kiváló eredményt ad. A PSYCHE CPMG-HSQMBC érzékenysége egy $\sqrt{2}$ -es faktorial növelhető mindkét irányban, szimultán frekvenciapásztázott Chirp impulzusok használatával, amit a 40. ábrán szaggatott vonalú nyilakkal jelöltem.

A PSYCHE CPMG-HSQMBC módszer teljesítőképességének vizsgálata céljából egy diglikozil-szelenid többkötéses ^1H - ^{77}Se csatolási állandóit határoztuk meg. (41. ábra) A klasszikus, protoncsatolt ^1H - ^{77}Se CPMG-HSQMBC spektrumban (41./c ábra) jól megfigyelhetők a heteronukleáris multiplettekre ráakadó, nem-kívánt, proton-proton csatolások okozta jelfelhasadások, melyek a legtöbb esetben megakadályozzák a többkötéses heteronukleáris csatolások közvetlen és pontos mérését. Ezzel szemben mind a PSYCHE, mind a ZS szélessávú protonlecsatolt (interferogram-típusú) kísérletet használva a $^1J_{\text{SeH}}$ -k könnyedén meghatározhatók a tiszta ellentétes fázisú dublettekből. A két protonlecsatolt spektrumban mért többkötéses heteronukleáris csatolási állandók

jó egyezést mutatnak egymással (az adatok a 41./a és b ábra megfelelő multipliettjei felett vagy alatt láthatók), és azon értékekkel is, melyeket a protoncsatolt CPMG-HSQMBC spektrumból (41./c ábra) nyertünk ki. Ez igazolja azt, hogy a PSYCHE lecsatoló szekvenciaelem nem torzítja a heteronukleáris csatolások nagyságát. A normál CPMG-HSQMBC kísérlet esetén azért csak két csatolási állandó szerepel a 41./c ábrán, mert a bonyolult, kevert fázisú multiplettek közül többet nem lehetett meghatározni számítógépes illesztések alkalmazása nélkül.



40. ábra Interferogram-típusú, PSYCHE szélessávú protonlecsatolt CPMG-HSQMBC impulzusszekvencia sematikus megjelenítése. A keskeny és szélesebb téglalapok 90° illetve 180° -os, kemény, x fázisú impulzusokat jelölnek, hacsak nem jelzem (ϕ_n) külön. A kis kibillentési szögű (β), frekvenciapásztázott Chirp¹⁸⁹ impulzusokat az átlójukban nyilakkal ellátott trapézok ábrázolják. A kísérlet érzékenysége egy $\sqrt{2}$ -es faktossal növelhető mindkét irányban, szimultán frekvenciapásztázott Chirp impulzusok használatával, amit a trapézokban szaggatott vonalú nyilakkal jelöltem. A CPMG szekvenciaelemben ϕ_1 -et az XY-16 ciklusnak megfelelően léptetjük, emiatt n értékét 16 többszörösének kell beállítani. A további impulzuszázisok: $\phi_2 = y$; $\phi_3 = x, -x$; $\phi_4 = x, x, -x, -x$; $\phi_5 = x, x, x, x, y, y, y, y$; és $\phi_{rec} = x, -x, -x, x, -x, x, x, -x$. Az időintervallumokat a következőképpen állítjuk be: $\tau = 140\text{-}150 \mu\text{s}$ és $\tau_a = 1/(4*sw2)$. A koherenciaszelekciót és az echo-antiecho fázisérzékeny detektálást az X dimenzióban a G_2 és G_4 térgradiens impulzusok $80 : 20.1$ (^{13}C esetén) vagy $80 : 15.257$ (^{77}Se esetén) arányú alkalmazásával érjük el. G_1 és G_3 tisztító térgradiens impulzusokat a maximális gradiensereőség (50 G/cm) 19 illetve 11 %-ára állítjuk be. A PSYCHE blokkban a maximális gradiensereőség 49 és 77 %-ának megfelelő koherenciaszelekciós gradiensimpulzusokat (G_5 és G_6) alkalmazunk. Szinuszos formájú, 1 ms-os térgradiens impulzusokat, és azokat követően $200 \mu\text{s}$ (G_1 - G_4) illetve $1000 \mu\text{s}$ (G_5, G_6) hosszúságú felépülési időt használunk. A Chirp impulzuspár ideje alatt gyenge, a maximális gradiensereőség 1.8 %-ának megfelelő térgradienst (G_7) alkalmazunk. Szélessávú heteronukleáris lecsatolást nem használunk az adatgyűjtés ideje alatt.

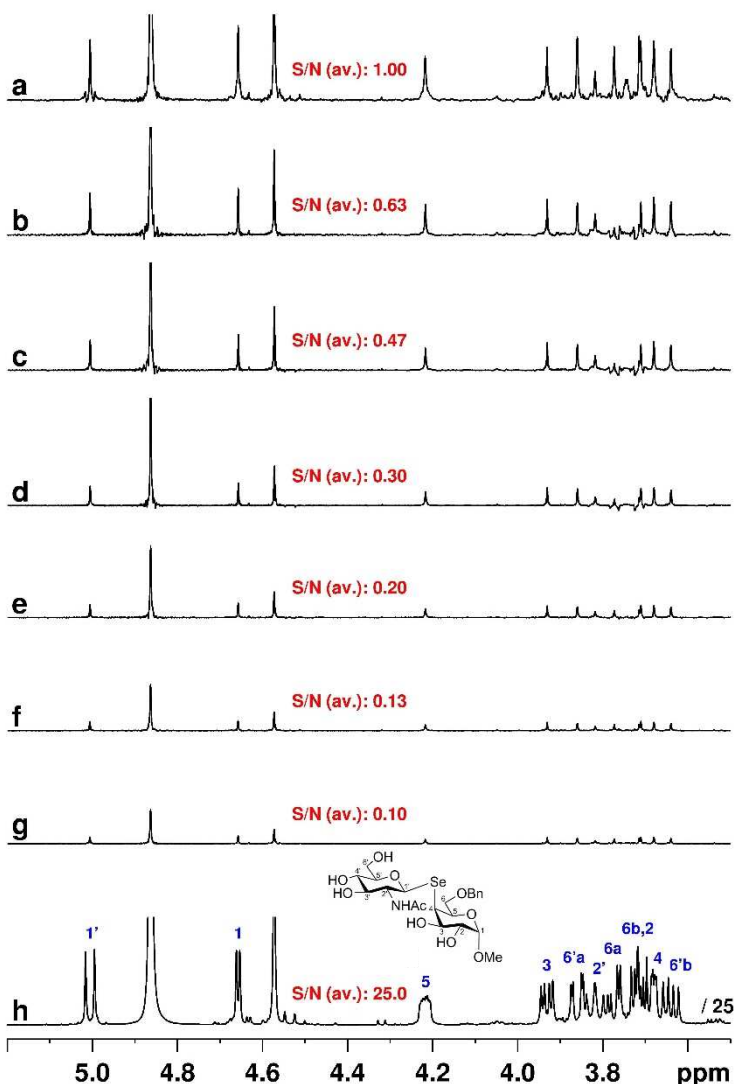


41. ábra Egy diglikozil-szelenid (a vegyület szerkezeti képlete számozással az ábra közepén látható; 0,15 M CDCl_3 -ban) PSYCHE (**a**) és ZS (**b**) szélessávú protonlecsatolt, illetve normál, protoncsatolt (**c**) ^1H - ^{77}Se CPMG-HSQMBC spektrumának összehasonlítása. Az ábrán a vegyület PSYCHE ^1H (**d**) és normál ^1H (**e**) NMR spektrumát szintén bemutatom. Mindhárom CPMG-HSQMBC kísérletet (**a,b,c**) 2 óra 50 perc alatt, a CPMG-INEPT blokkban 70,3 ms-os heteronukleáris csatolási evolúciós időt alkalmazva mértük. A PSYCHE spektrumok (**a,d**) felvételére egy pár 15 ms-os, 24° -os kibillentési szögű (β), mindkét irányban szimultán frekvenciapásztázott Chirp¹⁸⁹ impulzust használtunk. A ZS kísérletben (**b**) egy 46,64 ms-os, 50 Hz sávszélességű, RSnob típusú, 186 180° -os szelektív protonimpulzust, és az időtartama alatt egy, a maximális gradienserősség (50 G/cm) 0,5 %-ának megfelelő erősségű rétegszelektációs térgradiens impulzust alkalmaztunk. A szélessávú homonukleárisan lecsatolt ^1H - ^{77}Se CPMG-

HSQMBC spektrumokat **(a,b)** a következő paraméterekkel rögzítettük: ^{77}Se spektrális ablak = 20,0 ppm, t_1 inkrementumok száma = 2, t_2 inkrementumok száma (ami a gyakorlatban a FID darabok számát jelenti) = 16, egy FID darab ideje ($1/SW_2$) = 20,04 ms, a tényleges komplex adatpontok száma a ^1H dimenzióban a FID darabok összefűzését követően = 1600, tranziensek közötti várakozási idő (dI) = 1,7 s és tranziensek száma = 128. A klasszikus CPMG-HSQMBC szekvenciát használva, a következő paraméterekkel vettük fel a **(c)** spektrumot: ^{77}Se spektrális ablak = 20,0 ppm, t_1 inkrementumok száma = 2, komplex adatpontok száma a ^1H dimenzióban = 2048, tranziensek közötti várakozási idő (dI) = 1,7 s és tranziensek száma = 2048. A PSYCHE ^1H spektrumot **(d)** 32 t_1 inkrementummal (ami a gyakorlatban a FID darabok számát jelenti), 20,04 ms időtartamú FID darabokkal, a FID darabok összefűzését követően 3200 tényleges komplex adatponttal a ^1H dimenzióban, 1,5 s-os tranziensek közötti várakozási idővel (dI) és 4 tranzienssel rögzítettük. Az ábrán látható összes spektrumot 4,9887 ppm-es ^1H spektrális ablakkal mértük.

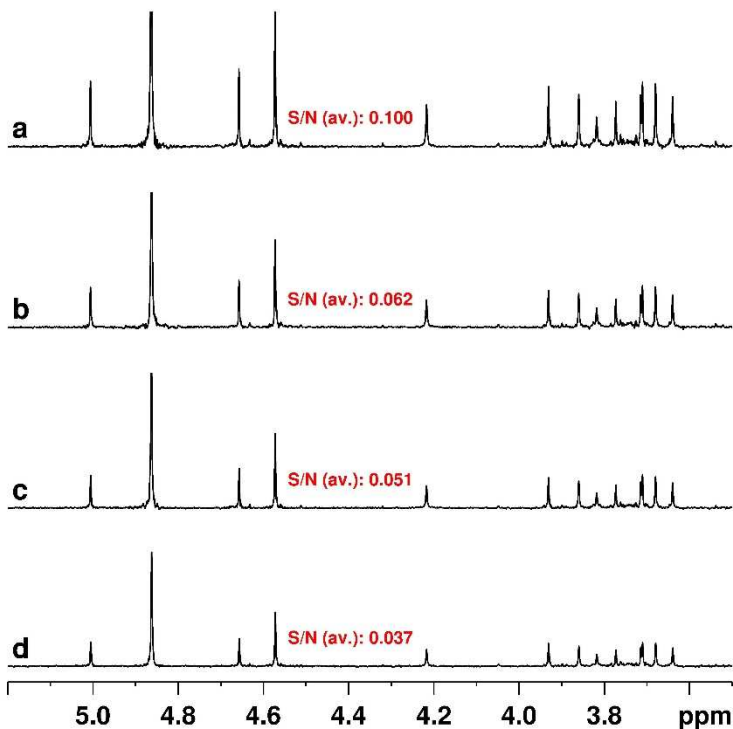
Azt is meg kell jegyezni, hogy a HSQMBC multiplettek egyszerűsítése mindkét protonlecsatolt kísérletben érzékenysévesztéssel jár együtt, azonban a PSYCHE esetében ez kisebb mértékű. Konkrétan a PSYCHE CPMG-HSQMBC spektrum jel-zaj aránya közel háromszor nagyobb az optimális lecsatolási paraméterekkel felvett ZS-lecsatolt spektruménál az adott mintán. Ugyanakkor a kétféle homonukleárisan lecsatolt módszer érzékenysége közötti különbséget nem lehet egy általános értékkel jellemezni, mert az mintáról mintára változhat. Elsősorban a ZS kísérlet paramétereinek (szelektív impulzus időtartama/sávszélessége és a rétegszelekciós gradiens nagysága; részletek a 2.2.6. alfejezetben olvashatók) az adott molekula spektrális tulajdonságaitól függő beállításai határozzák meg, kisebb mértékben pedig a PSYCHE kísérletben a Chirp impulzuspár aktuálisan használt β szöge. Ennek megértéséhez nyújt segítséget a 42. ábrán szereplő 1D spektrumsorozat, amely egy általánosan használt β ($= 24^\circ$) szöggel felvett PSYCHE ^1H spektrumhoz hasonlítja a különböző időtartamú/sávszélességű szelektív impulzussal rögzített ZS-lecsatolt ^1H spektrumokat. Minden spektrumon feltüntettem a PSYCHE ^1H spektrumra normált, relatív, átlagos jel-zaj arányokat, amik jól mutatják a ZS kísérletben használt formázott impulzus szelektivitásától való érzékenységgfüggést. Ehhez szorosan kapcsolódva a 43. ábra illusztrálja a ZS módszer érzékenységének változását a rétegszelekciós gradiens erősségének függvényében. Összességében elmondható, hogy a PSYCHE megközelítéssel átlagosan néhányszoros érzékenységnövekedés érhető el a ZS-hez képest, de adott esetben ez akár egy nagyságrendnél is több lehet. Ez közvetetten azt is jelenti, hogy a Zangger-Sterk kísérletben a maximális érzékenység eléréséhez, ismernünk kell a mérni kívánt molekula spektrális tulajdonságait (lecsatolandó kémiai eltolódás tartományt, csatoló partnerek frekvenciakülönbségét). Ezzel szemben a PSYCHE kísérlet esetén a protonlecsatolásra

(az extrém szoros csatolást leszámítva) nem igazán van hatással a vizsgált molekula spinrendszere, ezáltal sokkal rutinszerűbben (nem szükséges mintáról mintára optimalizálni) használható, mint a ZS kísérlet.



42. ábra Az ábra alsó részén feltüntetett diglikozil-szelenid (0,15 M CDCl_3 -ban) PSYCHE és a különböző időtartamú (sávszélességű) szelektív impulzussal rögzített ZS protonlecsatolt ^1H spektrumainak összehasonlítása. Egy általánosan használt, 24° -os β szöggel felvett PSYCHE ^1H spektrumot (a), illetve 23,32 ms (100 Hz-es sávszélességű) (b), 31,1 ms (75 Hz-es sávszélességű) (c), 46,64 ms (50 Hz-es sávszélességű) (d), 66,7 ms (35 Hz-es sávszélességű) (e), 93,28 ms (25

Hz-es sávszélességű) (f) és 116,6 ms (20 Hz-es sávszélességű) (g) időtartamú, RSnob¹⁸⁶ szelektív 180°-os protonimpulzussal és 0,5 %-os rétegszelekciós térgradiens impulzussal rögzített ZS ¹H spektrumokat mutat be az ábra. A vegyület jelhozzárendeléssel ellátott, reprezentatív, normál ¹H spektrumát (h) szintén bemutatom. Az összes kísérlet azonos mérési idővel (12,5 perc) készült. Minden spektrumon feltüntettem a PSYCHE ¹H spektrumra normált, relatív, átlagos jel-zaj arányokat.

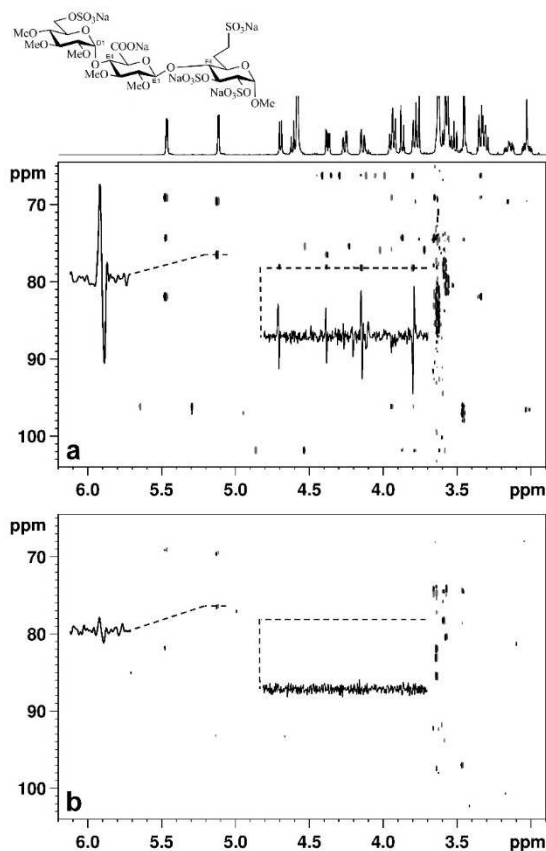


43. ábra A 42. ábra alsó részén feltüntetett diglikozil-szelenid (0,15 M CDCl₃-ban) ZS protonlecsatolt ¹H spektrumai a rétegszelekciós térgradiens nagyságának függvényében egy 116,6 ms-os (20 Hz-es sávszélességű) RSnob¹⁸⁶ szelektív 180°-os protonimpulzust használva. A rétegszelekciós térgradiens impulzust a maximális gradienserősség (50 G/cm) 0,5 (a), 0,8 (b), 1,0 (c) illetve 1,3 %-ára (d) állítottuk be. Az összes kísérlet azonos mérési idővel (12,5 perc) készült. Minden spektrumon feltüntettem a 42./a ábrán bemutatott PSYCHE ¹H spektrumra normált, relatív, átlagos jel-zaj arányokat. Az összes spektrum intenzitását felskáláztam 10-szeresére a 42. ábrán látható szinthez képest a jobb láthatóság kedvéért.

A ¹³C kevésbé előnyös NMR tulajdonságai (a ⁷⁷Se háromszor érzékenyebb, mint a ¹³C) következtében a többkötéses ¹H-¹³C csatolási állandók meghatározása – természetes ¹³C gyakoriságú vegyületek esetén – még nagyobb kihívást jelent. Emiatt a

PSYCHE CPMG-HSQMBC módszert kipróbáltuk $^nJ_{CH}$ meghatározására is egy olyan heparin-analóg triszacharidon (44. ábra), melynek 1H spektrumában az egymással csatolásban lévő hidrogének multipliettjei meglehetősen közel helyezkednek el egymáshoz (a minimális rezonanciafrekvencia-különbség kevesebb, mint 40 Hz). A kísérletek érzékenységének korrekt összehasonlíthatósága kedvéért azonos mérési idővel felvettük a vegyület ZS CPMG-HSQMBC spektrumát is. A 44. ábrán egyértelműen látható, hogy a PSYCHE spektrumban sokkal több korrelációs csúcs található, mint a ZS-lecsatoltban, illetve a mindkettőben jelenlévő jelek átlagosan 7-szer nagyobb intenzitásúak a PSYCHE-ban. A ZS kísérlet gyengébb teljesítménye a lecsatolandó protonok kis rezonanciafrekvencia-különbségéhez köthető, ami megköveteli egy olyan keskeny sáv szélességű (kb. 70 ms időtartamú) szelektív impulzus használatát, amely jelentősen csökkenti a mintarétegek vastagságát, és ezáltal az érzékenységet. Ezek a mérések arra is további bizonyítékot szolgáltatnak, amit a kétféle protonlecsatoló módszer érzékenységarányával kapcsolatban taglaltam a diglikozil-szelenid példáján keresztül a korábbiakban. Továbbá azt is érdemes itt kiemelni, hogy a PSYCHE CPMG-HSQMBC spektrumból a vizsgált triszacharidban mind a négy interglikozidos $^3J_{CH-t}$ – melyek a glikozidos kötés körüli konformációról fontos információt hordoznak – sikerült könnyen és nagy pontossággal meghatározni, amíg a ZS-lecsatolt kísérletben csak egy volt közülük detektálható és mérhető. Ezen csatolások pontos meghatározása pedig nem lehetséges a hagyományos CPMG-HSQMBC spektrum protoncsatolt multipliettjeiből.

A fejezet összefoglalásaképpen elmondható, hogy háromféle szélessávú protonlecsatolt CPMG-HSQMBC módszert fejlesztettünk ki, melyeket akkor érdemes használni, amikor a proton-proton csatolások okozta, extra jelfelhasadások megakadályozzák a többkötéses heteronukleáris csatolási állandók pontos meghatározását. A javasolt kísérletek közül a PSYCHE CPMG-HSQMBC a legáltalánosabban és legrutinszerűbben alkalmazható, ugyanis a protonlecsatolás hatékonysága gyakorlatilag független a vizsgált molekula spinrendszerétől, és a kísérletet nem szükséges mintáról mintára optimalizálni. Ráadásul olyan molekulák esetén, amikor a csatoló partnerek proton rezonanciafrekvencia-különbsége kisebb, mint 50 Hz, a PSYCHE CPMG-HSQMBC érzékenysége többszöröse a ZS CPMG-HSQMBC módszerének. Ha viszont ismerjük a vizsgált molekula jelhozzárendelését, és a mérni kívánt rezonanciajelek kis frekvenciatartományt (~max. 1500 Hz) fednek le, ugyanakkor a csatoló partnerek távol helyezkednek el egymástól (~min. 100 Hz), akkor a ZS CPMG-HSQMBC kísérleteket érdemes választani.



44. ábra Egy heparin-analóg triszacharid (a vegyület szerkezeti képlete az ábra tetején látható; 0,23 M D₂O-ban) PSYCHE (a) és ZS (b) szélessávú protonlecsatolt ¹H-¹³C CPMG-HSQMBC spektrumának és kiemelt sorainak összehasonlítása. A 2D szintvonalas megjelenítés felett a vegyület, egy reprezentatív, normál ¹H spektrumát is bemutatom. Mindkét protonlecsatolt CPMG-HSQMBC kísérletet (a,b) 32 óra alatt, a CPMG-INEPT blokkban 83,7 ms-os heteronukleáris csatolási evolúciós időt alkalmazva mértük. A PSYCHE spektrum (a) felvételére egy pár 15 ms-os, 24°-os kibillentési szögű (β), mindkét irányban szimultán frekvenciapásztázott Chirp¹⁸⁹ impulzust használtunk. A ZS kísérletben (b) egy 66,7 ms-os, 35 Hz sávszélességű, RSnob típusú,¹⁸⁶ 180°-os szelektív protonimpulzust, és az időtartama alatt egy, a maximális gradienserősség (50 G/cm) 0,5 %-ának megfelelő erősségű rétegszelektációs térgradiens impulzust alkalmaztunk. A szélessávú homonukleárisan lecsatolt ¹H-¹³C CPMG-HSQMBC spektrumokat (a,b) a következő paraméterekkel rögzítettük: ¹H spektrális ablak = 4,9887 ppm, ¹³C spektrális ablak = 65,0 ppm, t_1 inkrementumok száma = 200, t_2 inkrementumok száma (ami a gyakorlatban a FID darabok számát jelenti) = 16, egy FID darab ideje ($1/SW_2$) = 20,04 ms, a tényleges komplex adatpontok száma a ¹H dimenzióban a FID darabok összefűzését követően = 1600, tranziensek közötti várakozási idő (dI) = 1,5 s és tranziensek száma = 16.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Ugyan a spin-spin csatolás az egyik legfontosabb, szerkezeti információt hordozó NMR jelenség, de a hatására létrejövő vonalfelhasadások jelentősen bonyolítják a spektrumokat, csökkentik a felbontásukat, jelátfedéseket eredményeznek, és ezáltal gyakran megnehezítik a kémiai eltolódások és/vagy a csatolási állandók meghatározását. Az utóbbi évek új ötleteinek és fejlesztéseinek köszönhetően a szélessávú homonukleáris protonlecsatolás a reneszánszát éli. Az új módszerek egyik legnagyobb előnye, hogy többdimenziós, protondetektálású kísérletek direkt, akvizíciós dimenziójában is alkalmasak a jelek egyszerűsítésére és a felbontás növelésére.

Doktori munkám során kutatócsoportunk is bekapcsolódott az NMR spektroszkópia ezen dinamikusan fejlődő kutatási területébe, azzal a céllal, hogy megfelelő, szélessávú homonukleáris protonlecsatolást eredményező impulzusszekvencia-elemek beépítésével növeljük az irodalomból ismert NMR kísérletek teljesítőképességét. Eredményeink összefoglalása a disszertáció „Eredmények és értékelésük” című részében kialakított sorrendet követi.

A klasszikus HSQC kísérletet továbbfejlesztettük egy a BIRD^d impulzusblokkon és egy nem-szelektív 180°-os protonimpulzuson alapuló, szélessávú homonukleáris protonlecsatolást eredményező szekvenciaelemmel. Az új, interferogram-típusú adatgyűjtési stratégiát alkalmazó kísérlet impulzusainak időzítését és fázisprogramját egyszerű szénhidrátszármazékokon végzett tesztmérések segítségével tökéletesítettük. A kapott spektrumokban a korrelációs csúcsok jellegzetes multipllett struktúrája szinguletté egyszerűsödik. A kifejlesztett módszert összehasonlítottuk az egyetlen korábban közölt, hasonló elven működő, protonlecsatolt HSQC kísérlettel, és azt találtuk, hogy módszerünk robosztusabb, mint elődje, azaz kevésbé érzékeny az egykötéses heteronukleáris csatolási állandótól függő INEPT/BIRD idők változtatására. Megmutattuk, hogy az alkalmazott BIRD^d modul további előnye, hogy hatékonyan kiszűri a szoros csatolásból adódó, nem kívánt korrelációs csúcsokat a spektrumból. A BIRD és a „perfect echo” szekvenciaelemek kombinálásával kidolgoztunk egy új, „perfectBIRD”-nek elnevezett impulzusblokkot, amely a geminális proton-proton csatolás hatását is képes megszüntetni a HSQC spektrumban. Ezáltal kiküszöböltük a BIRD-lecsatolás legkomolyabb hátrányát.

Kifejlesztettünk egy olyan valós idejű szélessávú protonlecsatolt, érzékenységnövelt ¹H-¹⁵N HSQC kísérletet, amely könnyűvízben oldott minták vizsgálatára is alkalmas. Körültekintő optimalizálást követően a BIRD impulzusszekvencia-elem és az azt követő 180°-os protonimpulzus körüli megfelelő

hosszúságú és erősségű térgradiens párok beépítésével oldottuk meg a vízelnyomást a kísérletben. Megmutattuk, hogy a kifejlesztett módszer még természetes ^{15}N -izotópgyakoriságú minták esetén is alkalmas H_2O -ben oldott, kisméretű fehérjék ^1H - ^{15}N HSQC spektrumának felvételére.

A BIRD^d impulzusblokk és egy nem-szelektív 180° -os protonimpulzus megfelelő beépítésével szélessávú homonukleáris protonlecsatolást értünk el az egykötéses heteronukleáris csatolások mérésére széles körben használt CLIP/CLAP-HSQC kísérletekben. Az új, interferogram-típusú NMR módszer alkalmazásával az egykötéses heteronukleáris csatolási állandók meghatározása két szingulett jel közötti frekvenciakülönbség mérésére egyszerűsödik, és ezáltal pontos, megbízható eredményt ad komplex proton-proton csatolási hálózattal rendelkező molekulák esetén is. Tanulmányoztuk a kifejlesztett kísérletek toleranciáját az egykötéses heteronukleáris csatolási állandótól függő INEPT/BIRD idők változtatásával szemben, és azt találtuk, hogy a tényleges csatolási állandóhoz képest egy kb. ± 30 - 40 Hz-es intervallumnak megfelelően változtatva azokat a jelintenzitás ugyan csökken, de a jelalak tiszta abszorpciós fázisú marad. Ez előre vetítette a módszer alkalmazhatóságát gyengén orientált közegben is, ahol a csatolási állandók szélesebb tartományba eshetnek. Anizotróp körülmények között végzett méréseinkkel bizonyítottuk, hogy a szélessávú protonlecsatolt CLIP/CLAP-HSQC módszer jól használható a fontos térszerkezeti és/vagy dinamikai információt hordozó, maradék dipoláris csatolási állandók (RDC) meghatározására is. A perfectBIRD szekvenciaelemet beépítve a CLIP/CLAP-HSQC kísérletekbe olyan NMR módszert hoztunk létre, amellyel az egykötéses heteronukleáris csatolások meghatározása a diasztereotóp metilén hidrogénatomok esetén is két csúcsmaximum közötti frekvenciakülönbség mérésére egyszerűsödik.

A detektálás ideje alatt, „valós időben” alkalmazott, „kapuzott” lecsatolással jelentősen felgyorsítottuk a szélessávú protonlecsatolt CLIP/CLAP-HSQC kísérleteket az interferogram-típusúakhoz képest. Ezáltal olyan homonukleárisan lecsatolt módszert hoztunk létre, melynek érzékenysége nem kisebb – sőt kedvező esetekben nagyobb – mint a hagyományos, protoncsatolt módszeré. Tapasztalataink alapján a valós idejű, kapuzott protonlecsatolás a rezonanciajelek besugárzási frekvenciától való távolságától, valamint az alkalmazott BIRD időtől függően jelentősen torzíthatja a heteronukleáris csatolási állandókat. Igazoltuk, hogy ez a probléma minimalizálható a detektálás alatti impulzusok összetett fázisléptetésével. Az optimalizált fázisprogramú kísérletekkel mért heteronukleáris csatolási állandók besugárzási frekvenciától és BIRD időtől való függését szisztematikusan tanulmányoztuk, és az új módszert alkalmasnak találtuk kisméretű fehérjék egykötéses, ^1H - ^{15}N csatolási állandóinak meghatározására, akár gyengén orientált közegben is.

Interferogram-típusú, rétegszelekción alapuló, szélessávú protonlecsatolt CPMG-HSQMBC módszert fejlesztettünk ki többkötéses heteronukleáris csatolási állandók pontos meghatározására. A kutatócsoportunkban korábban kidolgozott CPMG-HSQMBC módszer impulzusszekvenciájába, a protondetektálás elé beépítettünk egy, a Zangger-Sterk (ZS) rétegszelekciós elven alapuló blokkot, amellyel a proton-proton csatolások okozta, nem kívánt felhasadásokat kiszűrtük a kapott jelekből. Ezáltal a többkötéses heteronukleáris csatolási állandók meghatározása – komplex proton-proton csatolási hálózattal rendelkező molekulák esetén is – egy ellenfázisú dublett két csúcsmaximuma közötti frekvenciakülönbség mérésére egyszerűsödik. Foszfortartalmú modellvegyületeken megmutattuk, hogy az új módszerrel a többkötéses heteronukleáris csatolási állandók széles tartományban (~ 2-26 Hz) egyszerre, egyetlen kísérletben mérhetők. Diglikozil-(di)szelenidekben olyan ${}^nJ_{\text{SeH}}$ értékeket sikerült meghatározunk, amelyeket a korábbi módszerrel – a proton-proton csatolások okozta jeltorzulások, -kioltások miatt – nem lehetett megtenni. Többkötéses ${}^1\text{H}$ - ${}^{13}\text{C}$ csatolási állandók mérésére is vizsgáltuk a ZS-lecsatolt CPMG-HSQMBC kísérlet alkalmazhatóságát. Megállapítottuk, hogy a módszer a rétegszelekcióval járó jelentős érzékenységvesztésnek és a ${}^{13}\text{C}$ izotóp kis természetes gyakoriságának köszönhetően csak megfelelően nagy koncentrációjú minták ${}^nJ_{\text{CH}}$ -inak meghatározására használható.

A valós idejű, kapuzott lecsatolás alkalmazásával jelentősen felgyorsítottuk a Zangger-Sterk CPMG-HSQMBC kísérletet is az interferogram-típusúhoz képest. Megállapítottuk a módszer korlátait, nevezetesen, hogy a detektálás alatti lecsatolás vonalszélesedést eredményez, és esetenként zavaró jelek rontják a spektrumok tisztaságát. Megmutattuk, hogy a vizsgált molekula spinrendszere/jelhozzárendelése ismeretében a módszer érzékenysége jelentősen növelhető többfrekvencián gerjesztő formázott impulzus használatával. Ebben az esetben ugyanis minden egyes protonjelet a minta több rétegéből is detektálhatunk, amennyiben a besugárzási frekvenciákat megfelelően – a véletlen visszacsatolásokat elkerülve – választjuk meg. Tapasztalataink szerint a valós idejű ZS CPMG-HSQMBC módszer csak akkor alkalmazható többkötéses heteronukleáris csatolási állandók meghatározására, ha a vizsgált molekulában a csatoló partnerek proton rezonanciafrekvencia-különbsége legalább 90-100 Hz. Ebben az esetben relaxációs szempontból megfelelően rövid (max. ~10 ms) szelektív impulzus használható a detektálást megszakító, proton-proton lecsatolási blokkokban.

A CPMG-HSQMBC kísérletet továbbfejlesztettük interferogram-típusú akvizíciós stratégiát alkalmazó, PSYCHE szélessávú protonlecsatolás beépítésével is. A PSYCHE impulzusblokk megfelelően beillesztve a CPMG-HSQMBC szekvenciába hatékonyan megszünteti a proton-proton csatolások okozta felhasadásokat a mért

spektrumokban, így a kapott, tiszta ellenfázisú dublettekből a többkötéses heteronukleáris csatolási állandók közvetlenül és pontosan meghatározhatók. A PSYCHE módszer hatalmas előnye a Zangger-Sterk kísérletekhez képest, hogy a homonukleáris lecsatolás hatékonysága gyakorlatilag független a vizsgált molekula spinrendszerétől, és emiatt a kísérlet paramétereit nem szükséges mintáról mintára optimalizálni, azaz rutinszerűen és általánosan használható. Olyan molekulák esetén, amikor a csatoló partnerek proton rezonanciafrekvencia-különbsége kisebb, mint 50 Hz, a PSYCHE CPMG-HSQMBC érzékenysége akár egy nagyságrenddel nagyobb lehet, mint az interferogram-típusú ZS CPMG-HSQMBC kísérleté. A valós idejű változat pedig ilyen molekulák esetén egyáltalán nem alkalmazható, amint erre az előző bekezdésben már utaltam. A PSYCHE CPMG-HSQMBC módszer hatékonyságát $^1J_{CH}$ és $^1J_{SeH}$ értékek különféle szénhidrátokban történő mérésével demonstráltuk. Ezek a csatolási állandók értékes információt hordoznak az oligoszacharidok glikozidos kötés körüli konformációjáról. Hagyományos, protoncsatolt HSQMBC multiplettekből való meghatározásuk hosszadalmas, számítógépes illesztést igényel, vagy egyáltalán nem lehetséges.

Összességében megállapítható, hogy egyrészt olyan szélessávú protonlecsatolt, heteronukleáris módszereket fejlesztettünk ki, amelyek számottevően segítik bonyolult molekulák és többkomponensű rendszerek (pl. diasztereomer keverékek, reakciótermékegyek, metabolitok) NMR spektrumainak jelhozzárendelését, ezáltal szerkezetigazolását, -felderítését. Másrészt egy- és többkötéses heteronukleáris csatolási állandók pontos és közvetlen meghatározására jól használható, szélessávú protonlecsatolt NMR kísérleteket dolgoztunk ki. Mivel az általunk továbbfejlesztett NMR módszerek a korábbiaknál pontosabb és megbízhatóbb adatokat szolgáltatnak a molekuláris szerkezet és a biológiai hatás összefüggéseinek felderítéséhez, ezáltal hozzájárulhatnak új gyógyszerhatóanyagok tervezéséhez és kifejlesztéséhez.

6. SUMMARY

Spin-spin coupling is one of the most important NMR phenomena, which carries valuable structural information. However, signal splittings originating from couplings significantly complicate spectra, decrease resolution, result in signal overlap, rendering the determination of chemical shifts and/or coupling constants difficult or even impossible. For this reason NMR spectroscopists have tried to develop such methods from the beginnings that can suppress the effects of spin-spin couplings. Nowadays, a ^{13}C spectrum is routinely recorded with broadband heteronuclear proton-decoupling during data acquisition, leading to single lines in the spectrum. However, this type of decoupling scheme cannot be used for removing signal splittings originating from homonuclear couplings as it would also destroy all desirable coherences. In recent years, there has been a revival in the field of broadband homonuclear decoupling (also known as pure shift NMR) due to the novel ideas born in this topic. One of the greatest advantages of these new methods is the possibility to utilize them in multidimensional, proton-detected experiments for simplification of signals and so, for increasing resolution.

During my Ph.D. work our research group also joined to this dynamically growing NMR methodological research field with the goal of increasing the efficiency of NMR experiments by building in pulse sequence elements capable of broadband homonuclear decoupling.

First of all, we improved the conventional HSQC experiment by broadband homonuclear decoupling based on the BIRD^d pulse sequence element and a non-selective 180° proton pulse. The timing and phase program of the pulses of the experiment, which has utilized the interferogram-based acquisition strategy, was optimized by performing measurements on simple carbohydrate derivatives. The characteristic multiplet structure of correlation peaks was simplified in the spectra obtained. An additional advantageous side-product of the BIRD^d pulse sequence element employed in the acquisition scheme is the efficient suppression of undesired long-range correlation peaks arising from strong coupling effects. The method developed was compared with the only, previously published proton-decoupled HSQC experiment. We found that our method was more robust, namely, it was less sensitive for the changes in the duration of INEPT/BIRD delays adjusted to the one-bond heteronuclear coupling constant. We incorporated BIRD decoupling into a modified perfect echo pulse sequence to create what we term a “perfectBIRD” pulse sequence element, which can remove

splittings arising from geminal proton-proton couplings as well. With this the greatest disadvantage of BIRD decoupling was eliminated.

A real-time (instant) broadband homonuclear decoupled variant of the sensitivity-enhanced ^1H - ^{15}N HSQC method was developed for measuring biological samples in H_2O . After a careful optimization, efficient water suppression was achieved using field gradient pairs of appropriate length and strength around the BIRD^d block and the non-selective 180° proton pulse during acquisition. We showed that the method developed was suitable for recording ^1H - ^{15}N HSQC spectra of small proteins dissolved in H_2O even at natural ^{15}N isotopic abundance.

In the CLIP/CLAP-HSQC experiments, which are widely used for the measurement of one-bond heteronuclear couplings, broadband homonuclear decoupling was achieved by applying an appropriate combination of BIRD^d pulse sequence element and a non-selective 180° proton pulse. With this novel, interferogram-based method, the determination of one-bond heteronuclear coupling constants is simplified to the measurement of frequency differences between singlet maxima. As a result, accurate and reliable coupling values are provided even in the case of molecules with complex proton-proton coupling network. We investigated the robustness and tolerance of the experiments developed with regard to the mismatch of BIRD/INEPT delays. To this end, the duration of corresponding delays was adjusted to nominal values of one-bond heteronuclear couplings ranging from 100 to 180 Hz. It was found that signal intensities were significantly degraded when the delays were misset with respect to the real value of coupling constant, but the pure absorptive quality of the lineshapes remained basically unaffected. This finding predicted the potential utility of the method for anisotropic samples as well, in which the net coupling constants vary widely. With measurements carried out in weakly-orienting medium we proved that the proton-decoupled CLIP/CLAP-HSQC method could be utilized for determination of RDCs, which provide important structural and dynamical information. By inserting the perfectBIRD pulse sequence element into the CLIP/CLAP-HSQC experiments we established an NMR method which has allowed the determination of one-bond heteronuclear couplings – even in the case of diastereotopic methylene hydrogen atoms – by simply measuring frequency differences between singlet maxima.

The broadband homodecoupled CLIP/CLAP-HSQC experiments were considerably speeded up with the application of real-time, windowed decoupling during acquisition compared to the interferogram-based ones, so much so that the sensitivity of the original, proton-coupled method was retained. According to our observations, real-time decoupling can bias the heteronuclear coupling constants significantly as a function of the proton offset frequency and the duration of BIRD delay. We proved that the

systematic errors could be minimized with complex phase sequencing and cycling of pulses applied during acquisition. The dependence of heteronuclear coupling constants from proton offset frequency and duration of BIRD delay was systematically investigated for improving and optimizing the phase program. The experiment with the optimized phase program is suitable for the determination of one-bond ^1H - ^{15}N coupling constants of small proteins even in weakly-orienting medium.

We developed an interferogram-based, slice-selective broadband homonuclear decoupled CPMG-HSQMBC method for the accurate determination of multiple-bond heteronuclear coupling constants. A slice-selective, Zangger-Sterk (ZS)-type pulse sequence element was inserted into the CPMG-HSQMBC experiment before the proton detection period to remove the undesired splittings caused by proton-proton couplings from the detected signals. As a result the determination of long-range heteronuclear coupling constants was simplified to measure frequency differences between singlet maxima even in the case of molecules with complex proton-proton coupling network. It was demonstrated on phosphorus containing model compounds that a broad range (~ 2 - 26 Hz) of multiple-bond heteronuclear coupling constants could be measured in a single experiment using our new method. We determined several $^nJ_{\text{SeH}}$ values in diglycosyl-(di)selenides, which was not possible with earlier methods due to signal distortions caused by proton-proton couplings. The utility of ZS-decoupled CPMG-HSQMBC was also demonstrated for the measurement of long-range ^1H - ^{13}C coupling constants. However, this experiment was successful only with highly concentrated ($\sim \text{M}$ range) samples owing to the significant sensitivity drop caused by slice-selection and to the unfavorable natural abundance of the ^{13}C nucleus.

The ZS CPMG-HSQMBC experiment was also speeded up considerably with the application of real-time, windowed decoupling during acquisition compared to the corresponding interferogram-based one. The limitations of the real-time acquisition strategy, namely, occurrence of some line broadening and artefacts reducing the quality of spectra were also evaluated. We showed that if the spin system and assignment of the molecule studied were known in advance, the sensitivity of the experiment could be significantly enhanced by applying multiple-frequency modulated pulses. In this case each proton resonance can be detected from multiple slices of the sample if proton offsets are suitably chosen to avoid accidental recoupling effects. According to our observations the real-time Zangger-Sterk CPMG-HSQMBC method can be utilized for the determination of multiple-bond heteronuclear coupling constants only in those molecules where the proton resonance frequency difference of coupling partners is at least 90-100 Hz. Thus, properly short (max. ~ 10 ms) selective proton pulse can be used in the proton-proton refocusing blocks during acquisition.

The CPMG-HSQMBC experiment was also improved by utilizing interferogram-based PSYCHE broadband homonuclear decoupling. The PSYCHE scheme inserted into the CPMG-HSQMBC pulse sequence efficiently eliminates the unwanted proton-proton splittings from the heteronuclear multiplets, and so the desired multiple-bond heteronuclear coupling constants can be determined directly and precisely from the pure antiphase doublets. A pronounced advantage of the PSYCHE CPMG-HSQMBC experiment in contrast with the ZS-decoupled method is that the nature (characteristics) of the proton spin systems involved practically has no effect on the efficiency of homonuclear decoupling. Consequently, the PSYCHE experiment can be performed without tedious fine-tuning of experimental parameters from sample to sample. In case of molecules with less than 50 Hz resonance frequency difference of the proton coupling partners, the PSYCHE CPMG-HSQMBC can provide nearly an order of magnitude enhancement in sensitivity compared to the interferogram-based ZS-decoupled method. Note that the real-time version of ZS-decoupled experiment is not applicable either in this case, as I have referred to it in the previous paragraph. The performance of PSYCHE CPMG-HSQMBC method was illustrated by measuring $^3J_{\text{CH}}$ and $^3J_{\text{SeH}}$ values in various carbohydrates. These data are conveying valuable information on the conformations around the glycosidic linkages. It is important to note that extraction of the corresponding couplings from the conventional, proton-coupled HSQMBC multiplets may demand computer-aided fitting procedures or may even be impeded by partial signal cancellations in the mixed-phase signals.

In conclusion, on the one hand, the broadband proton-decoupled heteronuclear correlation experiments developed during my Ph.D. work can considerably help the assignment of NMR spectra of complex molecules and multicomponent systems (e.g. mixtures of diastereomers or reaction products, metabolites), assisting in the structure elucidation or verification of these compounds. On the other hand, we have also developed broadband homonuclear decoupled NMR experiments for the precise and direct determination of one- and multiple-bond heteronuclear coupling constants, which are invaluable and widely applied tools for structure elucidation and conformational analysis of organic compounds. As our improved NMR methods provide more precise and reliable data to disclose structure-activity relationships than the earlier ones, thus they may contribute to the rational design and development of drug substances with improved biological profile.

7. IRODALOMJEGYZÉK

1. E. L. Hahn, Spin Echoes, *Phys. Rev.*, 1950, 80, 580-594.
2. H. S. Gutowsky, D. W. McCall and C. P. Slichter, Coupling among Nuclear Magnetic Dipoles in Molecules, *Phys. Rev.*, 1951, 84, 589-590.
3. R. R. Ernst and H. Primas, Nuclear magnetic resonance with stochastic high frequency fields, *Helv. Phys. Acta*, 1963, 36, 583-600.
4. A. J. Shaka and J. Keeler, Broadband spin decoupling in isotropic-liquids, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 1987, 19, 47-129.
5. W. P. Aue, J. Karhan and R. R. Ernst, Homonuclear broad band decoupling and two-dimensional J-resolved NMR spectroscopy, *J. Chem. Phys.*, 1976, 64, 4226-4227.
6. A. Bax, A. F. Mehlkopf and J. Smidt, Homonuclear broadband-decoupled absorption spectra, with linewidths which are independent of the transverse relaxation rate, *J. Magn. Reson.*, 1979, 35, 167-169.
7. J. R. Garbow, D. P. Weitekamp and A. Pines, Bilinear rotation decoupling of homonuclear scalar interactions, *Chem. Phys. Lett.*, 1982, 93, 504-509.
8. O. W. Soerensen, C. Griesinger and R. R. Ernst, Time reversal of the evolution under scalar spin-spin interactions in NMR. Application for ω_1 decoupling in two-dimensional NOE spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, 107, 7778-7779.
9. K. Zangger and H. Sterk, Homonuclear broadband-decoupled NMR spectra, *J. Magn. Reson.*, 1997, 124, 486-489.
10. M. Nilsson and G. A. Morris, Pure shift proton DOSY: diffusion-ordered ^1H spectra without multiplet structure, *Chem. Commun.*, 2007, 43, 933-935.
11. J. A. Aguilar, S. Faulkner, M. Nilsson and G. A. Morris, Pure shift ^1H NMR: a resolution of the resolution problem?, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, 49, 3901-3903.
12. R. W. Adams, in *eMagRes*, John Wiley & Sons, Ltd, 2014, vol. 3, pp. 295-310.
13. L. Castañar and T. Parella, Broadband ^1H homodecoupled NMR experiments: recent developments, methods and applications, *Magn. Reson. Chem.*, 2015, 53, 399-426.
14. K. Zangger, Pure shift NMR, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 2015, 86-87, 1-20.
15. F. Bloch, Symposium on nuclear magnetism, *Phys. Rev.*, 1954, 1954, 543.
16. A. L. Bloom and J. N. Shoolery, Effects of Perturbing Radiofrequency Fields on Nuclear Spin Coupling, *Phys. Rev.*, 1955, 97, 1261-1265.
17. R. Freeman and W. A. Anderson, Use of Weak Perturbing Radio-Frequency Fields in Nuclear Magnetic Double Resonance, *J. Chem. Phys.*, 1962, 37, 2053-2073.
18. R. Brüschweiler, J. C. Madsen, C. Griesinger, O. W. Sørensen and R. R. Ernst, Two-dimensional NMR spectroscopy with soft pulses, *J. Magn. Reson.*, 1987, 73, 380-385.
19. M. A. McCoy and L. Mueller, Coherence quenching induced by frequency-selective homonuclear decoupling, *J. Magn. Reson.*, 1992, 98, 674-679.
20. M. A. McCoy and L. Mueller, Selective Decoupling, *J. Magn. Reson., Ser A*, 1993, 101, 122-130.
21. M. A. McCoy and L. Mueller, Selective shaped pulse decoupling in NMR: homonuclear [^{13}C]carbonyl decoupling, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114, 2108-2112.
22. R. Brüschweiler, C. Griesinger, O. W. Sørensen and R. R. Ernst, Combined use of hard and soft pulses for ω_1 decoupling in two-dimensional NMR spectroscopy, *J. Magn. Reson.*, 1988, 78, 178-185.
23. J. P. Jesson, P. Meakin and G. Kneissel, Homonuclear decoupling and peak elimination in Fourier transform nuclear magnetic resonance, *J. Am. Chem. Soc.*, 1973, 95, 618-620.
24. A. P. D. M. Espindola, R. Crouch, J. R. DeBergh, J. M. Ready and J. B. MacMillan, Deconvolution of Complex NMR Spectra in Small Molecules by Multi Frequency Homonuclear Decoupling (MDEC), *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131, 15994-15995.
25. D. Carnevale, T. F. Segawa and G. Bodenhausen, Polychromatic Decoupling of a Manifold of Homonuclear Scalar Interactions in Solution-State NMR, *Chem. Eur. J.*, 2012, 18, 11573-11576.
26. A. Hammarstroem and G. Otting, Improved Spectral Resolution in ^1H NMR Spectroscopy by Homonuclear Semiselective Shaped Pulse Decoupling during Acquisition, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116, 8847-8848.
27. L. Castañar, P. Nolis, A. Virgili and T. Parella, Full Sensitivity and Enhanced Resolution in Homodecoupled Band-Selective NMR Experiments, *Chem. Eur. J.*, 2013, 19, 17283-17286.
28. R. W. Adams, L. Byrne, P. Király, M. Foroozandeh, L. Paudel, M. Nilsson, J. Clayden and G. A. Morris, Diastereomeric ratio determination by high sensitivity band-selective pure shift NMR spectroscopy, *Chem. Commun.*, 2014, 50, 2512-2514.
29. J. Ying, J. Roche and A. Bax, Homonuclear decoupling for enhancing resolution and sensitivity in NOE and RDC measurements of peptides and proteins, *J. Magn. Reson.*, 2014, 241, 97-102.

30. R. Powers, A. M. Gronenborn, G. Marius Clore and A. Bax, Three-dimensional triple-resonance NMR of $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -enriched proteins using constant-time evolution, *J. Magn. Reson.*, 1991, 94, 209-213.
31. F. J. M. van de Ven and v. E. P. Philippens, Optimization of constant-time evolution in multidimensional NMR experiments, *J. Magn. Reson.*, 1992, 97, 637-644.
32. M. Salzmann, K. Pervushin, G. Wider, H. Senn and K. Wüthrich, [^{13}C]-Constant-Time [^{15}N , ^1H]-Trosy-Hnca for Sequential Assignments of Large Proteins, *J. Biomol. NMR*, 1999, 14, 85-88.
33. W. Bermel, I. Bertini, I. C. Felli, M. Piccioli and R. Pierattelli, ^{13}C -detected protonless NMR spectroscopy of proteins in solution, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 2006, 48, 25-45.
34. W. Bermel, I. Bertini, I. C. Felli, R. Peruzzini and R. Pierattelli Exclusively Heteronuclear NMR Experiments to Obtain Structural and Dynamic Information on Proteins, *ChemPhysChem*, 2010, 11, 689-695.
35. I. C. Felli and R. Pierattelli, Novel methods based on ^{13}C detection to study intrinsically disordered proteins, *J. Magn. Reson.*, 2014, 241, 115-125.
36. M. Foroozandeh, R. W. Adams, N. J. Meharry, D. Jeannerat, M. Nilsson and G. A. Morris, Ultrahigh-resolution NMR spectroscopy, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, 53, 6990-6992.
37. A. J. Pell, R. A. E. Edden and J. Keeler, Broadband proton-decoupled proton spectra, *Magn. Reson. Chem.*, 2007, 45, 296-316.
38. K. Nagayama, P. Bachmann, K. Wüthrich and R. R. Ernst, The use of cross-sections and of projections in two-dimensional NMR spectroscopy, *J. Magn. Reson.*, 1978, 31, 133-148.
39. A. Bax, R. Freeman and G. A. Morris, A simple method for suppressing dispersion-mode contributions in NMR spectra: The "pseudo echo", *J. Magn. Reson.*, 1981, 43, 333-338.
40. A. J. Shaka, J. Keeler and R. Freeman, Separation of chemical shifts and spin coupling in proton NMR. Elimination of dispersion signals from two-dimensional spectra, *J. Magn. Reson.*, 1984, 56, 294-313.
41. P. Xu, X.-L. Wu and R. Freeman, Broadband-decoupled proton spectroscopy, *J. Magn. Reson.*, 1991, 95, 132-148.
42. P. Xu, X. L. Wu and R. Freeman, Proton NMR spectra without spin-spin splittings, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113, 3596-3597.
43. M. Woodley and R. Freeman, "Decoupled" Proton NMR Spectra, *J. Magn. Reson., Ser A*, 1994, 109, 103-112.
44. M. Woodley and R. Freeman, Elimination of Spin-Spin Splittings from High-Resolution Proton NMR Spectra, *J. Magn. Reson., Ser A*, 1994, 111, 225-228.
45. S. Simova, H. Sengstschmid and R. Freeman, Proton Chemical-Shift Spectra, *J. Magn. Reson.*, 1997, 124, 104-121.
46. M. R. Wall and D. Neuhauser, Extraction, through filter-diagonalization, of general quantum eigenvalues or classical normal mode frequencies from a small number of residues or a short-time segment of a signal. I. Theory and application to a quantum-dynamics model, *J. Chem. Phys.*, 1995, 102, 8011-8022.
47. V. A. Mandelshtam and H. S. Taylor, Harmonic inversion of time signals and its applications, *J. Chem. Phys.*, 1997, 107, 6756-6769.
48. V. A. Mandelshtam, Q. N. Van and A. J. Shaka, Obtaining Proton Chemical Shifts and Multiplets from Several 1D NMR Signals, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, 120, 12161-12162.
49. A. Martinez, F. Bourdreaux, E. Riguet and J.-M. Nuzillard, High-resolution and high-sensitivity 2D homonuclear J-resolved NMR spectroscopy, *Magn. Reson. Chem.*, 2012, 50, 28-32.
50. P. Sakhaei and W. Bermel, Improving the sensitivity of conventional spin echo spectra by preservation of initial signal-to-noise ratio, *J. Magn. Reson.*, 2014, 242, 220-223.
51. P. J. D. Foxall, J. A. Parkinson, I. H. Sadler, J. C. Lindon and J. K. Nicholson, Analysis of biological fluids using 600 MHz proton NMR spectroscopy: Application of homonuclear two-dimensional J-resolved spectroscopy to urine and blood plasma for spectral simplification and assignment, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1993, 11, 21-31.
52. J. M. Fonville, A. D. Maher, M. Coen, E. Holmes, J. C. Lindon and J. K. Nicholson, Evaluation of Full-Resolution J-Resolved ^1H NMR Projections of Biofluids for Metabonomics Information Retrieval and Biomarker Identification, *Anal. Chem.*, 2010, 82, 1811-1821.
53. L. Brennan, NMR-based metabolomics: From sample preparation to applications in nutrition research, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 2014, 83, 42-49.
54. C. Lendel and P. Damberg, 3D J-resolved NMR spectroscopy for unstructured polypeptides: fast measurement of $^3\text{J}_{\text{HNHa}}$ coupling constants with outstanding spectral resolution, *J. Biomol. NMR*, 2009, 44, 35-42.
55. L. H. Lucas, W. H. Otto and C. K. Larive, The 2D-J-DOSY Experiment: Resolving Diffusion Coefficients in Mixtures, *J. Magn. Reson.*, 2002, 156, 138-145.
56. J. C. Cobas and M. Martín-Pastor, A homodecoupled diffusion experiment for the analysis of complex mixtures by NMR, *J. Magn. Reson.*, 2004, 171, 20-24.
57. M. Nilsson, A. M. Gil, I. Delgadillo and G. A. Morris, Improving Pulse Sequences for 3D Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy: 2DJ-IDOSY, *Anal. Chem.*, 2004, 76, 5418-5422.
58. P. Sakhaei, B. Haase and W. Bermel, Broadband homodecoupled heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy, *J. Magn. Reson.*, 2013, 228, 125-129.
59. A. Bax and R. Freeman, Investigation of complex networks of spin-spin coupling by two-dimensional NMR, *J. Magn. Reson.*, 1981, 44, 542-561.

60. H. Oschkinat, A. Pastore, P. Pfändler and G. Bodenhausen, Two-dimensional correlation of directly and remotely connected transitions by z-filtered COSY, *J. Magn. Reson.*, 1986, 69, 559-566.
61. D. Uhrin, T. Liptaj and K. E. Kövér, Modified BIRD Pulses and Design of Heteronuclear Pulse Sequences, *J. Magn. Reson., Ser A*, 1993, 101, 41-46.
62. J. A. Aguilar, M. Nilsson and G. A. Morris, Simple proton spectra from complex spin systems: pure shift NMR spectroscopy using BIRD, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, 50, 9716-9717.
63. L. Paudel, R. W. Adams, P. Király, J. A. Aguilar, M. Foroozandeh, M. J. Cliff, M. Nilsson, P. Sándor, J. P. Waltho and G. A. Morris, Simultaneously enhancing spectral resolution and sensitivity in heteronuclear correlation NMR spectroscopy, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, 52, 11616-11619.
64. P. Sakhaii, B. Haase and W. Bermel, Experimental access to HSQC spectra decoupled in all frequency dimensions, *J. Magn. Reson.*, 2009, 199, 192-198.
65. I. Timári, L. Kaltschnee, A. Kolmer, R. W. Adams, M. Nilsson, C. M. Thiele, G. A. Morris and K. E. Kövér, Accurate determination of one-bond heteronuclear coupling constants with "pure shift" broadband proton-decoupled CLIP/CLAP-HSQC experiments, *J. Magn. Reson.*, 2014, 239, 130-138.
66. T. Reinsperger and B. Luy, Homonuclear BIRD-decoupled spectra for measuring one-bond couplings with highest resolution: CLIP/CLAP-RESET and constant-time-CLIP/CLAP-RESET, *J. Magn. Reson.*, 2014, 239, 110-120.
67. M. Perez-Trujillo, L. Castanar, E. Monteagudo, L. T. Kuhn, P. Nolis, A. Virgili, R. T. Williamson and T. Parella, Simultaneous ¹H and ¹³C NMR enantiodifferentiation from highly-resolved pure shift HSQC spectra, *Chem. Commun.*, 2014, 50, 10214-10217.
68. L. Kaltschnee, A. Kolmer, I. Timári, V. Schmidts, R. W. Adams, M. Nilsson, K. E. Kövér, G. A. Morris and C. M. Thiele, "Perfecting" pure shift HSQC: full homodecoupling for accurate and precise determination of heteronuclear couplings, *Chem. Commun.*, 2014, 50, 15702-15705.
69. P. Kiraly, R. W. Adams, L. Paudel, M. Foroozandeh, J. A. Aguilar, I. Timári, M. J. Cliff, M. Nilsson, P. Sándor, G. Batta, J. P. Waltho, K. E. Kövér and G. A. Morris, Real-time pure shift ¹⁵N HSQC of proteins: a real improvement in resolution and sensitivity, *J. Biomol. NMR*, 2015, 62, 43-52.
70. P. C. Lauterbur, Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance, *Nature*, 1973, 242, 190-191.
71. H. T. Edzes, An analysis of the use of pulse multiplets in the single scan determination of spin-lattice relaxation rates, *J. Magn. Reson.*, 1975, 17, 301-313.
72. A. Bax and R. Freeman, Enhanced NMR resolution by restricting the effective sample volume, *J. Magn. Reson.*, 1980, 37, 177-181.
73. N. M. Loening, J. Keeler and G. A. Morris, One-Dimensional DOSY, *J. Magn. Reson.*, 2001, 153, 103-112.
74. L. Frydman, T. Scherf and A. Lupulescu, The acquisition of multidimensional NMR spectra within a single scan, *PNAS*, 2002, 99, 15858-15862.
75. N. M. Loening, M. J. Thrippleton, J. Keeler and R. G. Griffin, Single-scan longitudinal relaxation measurements in high-resolution NMR spectroscopy, *J. Magn. Reson.*, 2003, 164, 321-328.
76. R. Freeman, The concept of spatially-encoded single-scan NMR, *Concepts Magn. Reson. Part A*, 2011, 38A, 1-6.
77. S. Glanzer, E. Schrank and K. Zangger, A general method for diagonal peak suppression in homonuclear correlated NMR spectra by spatially and frequency selective pulses, *J. Magn. Reson.*, 2013, 232, 1-6.
78. A.-C. Pöppler, S. Frischkorn, D. Stalke and M. John, Toluene and Lithium Amide Diffusion into Polystyrene: A Slice-Selective NMR-Spectroscopic Study, *ChemPhysChem*, 2013, 14, 3103-3107.
79. N. H. Meyer and K. Zangger, Boosting the resolution of ¹H NMR spectra by homonuclear broadband decoupling, *ChemPhysChem*, 2014, 15, 49-55.
80. N. H. Meyer and K. Zangger, Simplifying proton NMR spectra by instant homonuclear broadband decoupling, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, 52, 7143-7146.
81. P. Sakhaii, B. Haase, W. Bermel, R. Kerssebaum, G. E. Wagner and K. Zangger, Broadband homodecoupled NMR spectroscopy with enhanced sensitivity, *J. Magn. Reson.*, 2013, 233, 92-95.
82. M. Vega-Vazquez, J. C. Cobas and M. Martin-Pastor, Fast multidimensional localized parallel NMR spectroscopy for the analysis of samples, *Magn. Reson. Chem.*, 2010, 48, 749-752.
83. B. Sathyamoorthy, D. M. Parish, G. T. Montelione, R. Xiao and T. Szyperski, Spatially Selective Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence Spectroscopy for Biomolecular NMR Studies, *ChemPhysChem*, 2014, 15, 1872-1879.
84. G. E. Wagner, P. Sakhaii, W. Bermel and K. Zangger, Monitoring fast reactions by spatially-selective and frequency-shifted continuous NMR spectroscopy: application to rapid-injection protein unfolding, *Chem. Commun.*, 2013, 49, 3155-3157.
85. L. Castañar, P. Nolis, A. Virgili and T. Parella, Simultaneous Multi-Slice Excitation in Spatially Encoded NMR Experiments, *Chem. Eur. J.*, 2013, 19, 15472-15475.
86. Lokesh and N. Suryaprakash, Sensitivity enhancement in slice-selective NMR experiments through polarization sharing, *Chem. Commun.*, 2014, 50, 8550-8553.
87. E. Kupče and R. Freeman, Fast multidimensional NMR by polarization sharing, *Magn. Reson. Chem.*, 2007, 45, 2-4.

88. G. A. Morris, J. A. Aguilar, R. Evans, S. Haiber and M. Nilsson, True chemical shift correlation maps: a TOCSY experiment with pure shifts in both dimensions, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132, 12770-12772.
89. J. J. Koivisto, Zero-quantum filtered pure shift TOCSY, *Chem. Commun.*, 2013, 49, 96-98.
90. J. A. Aguilar, A. A. Colbourne, J. Cassani, M. Nilsson and G. A. Morris, Decoupling two-dimensional NMR spectroscopy in both dimensions: pure shift NOESY and COSY, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, 51, 6460-6463.
91. V. M. Kakita and J. Bharatam, Real-time homonuclear broadband and band-selective decoupled pure-shift ROESY, *Magn. Reson. Chem.*, 2014, 52, 389-394.
92. N. Helge Meyer and K. Zangger, Enhancing the resolution of multi-dimensional heteronuclear NMR spectra of intrinsically disordered proteins by homonuclear broadband decoupling, *Chem. Commun.*, 2014, 50, 1488-1490.
93. S. Islam, J. A. Aguilar, M. W. Powner, M. Nilsson, G. A. Morris and J. D. Sutherland, Detection of potential TNA and RNA nucleoside precursors in a prebiotic mixture by pure shift diffusion-ordered NMR spectroscopy, *Chem. Eur. J.*, 2013, 19, 4586-4595.
94. S. Glanzer and K. Zangger, Directly Decoupled Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy for the Analysis of Compound Mixtures, *Chem. Eur. J.*, 2014, 20, 11171-11175.
95. M. J. Thrippleton and J. Keeler, Elimination of Zero-Quantum Interference in Two-Dimensional NMR Spectra, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2003, 42, 3938-3941.
96. M. Foroozandeh, R. W. Adams, M. Nilsson and G. A. Morris, Ultrahigh-Resolution Total Correlation NMR Spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, 136, 11867-11869.
97. R. Brüschweiler and F. Zhang, Covariance nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J. Chem. Phys.*, 2004, 120, 5253-5260.
98. F. Zhang and R. Brüschweiler, Indirect Covariance NMR Spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 13180-13181.
99. J. A. Aguilar, G. A. Morris and A. M. Kenwright, "Pure shift" H-1 NMR, a robust method for revealing heteronuclear couplings in complex spectra, *RSC Adv.*, 2014, 4, 8278-8282.
100. S. R. Chaudhari and N. Suryaprakash, Pure shift NMR approach for fast and accurate extraction of heteronuclear couplings, *RSC Adv.*, 2014, 4, 15018-15021.
101. J. A. Aguilar, J. Cassani, M. Delbianco, R. W. Adams, M. Nilsson and G. A. Morris, Minimising Research Bottlenecks by Decluttering NMR Spectra, *Chem. Eur. J.*, 2015, 21, 6623-6630.
102. J. A. Aguilar, P. Kiraly, R. W. Adams, M. Bonneau, E. J. Grayson, M. Nilsson, A. M. Kenwright and G. A. Morris, Ultra-high dispersion NMR reveals new levels of detail, *RSC Adv.*, 2015, 5, 52902-52906.
103. I. Timári, T. Z. Illyés, R. W. Adams, M. Nilsson, L. Szilágyi, G. A. Morris and K. E. Kövér, Precise Measurement of Long-Range Heteronuclear Coupling Constants by a Novel Broadband Proton-Proton-Decoupled CPMG-HSQMBC Method, *Chem. Eur. J.*, 2015, 21, 3472-3479.
104. I. Timári, L. Szilágyi and K. E. Kövér, PSYCHE CPMG-HSQMBC: An NMR Spectroscopic Method for Precise and Simple Measurement of Long-Range Heteronuclear Coupling Constants, *Chem. Eur. J.*, 2015, 21, 13939-13942.
105. A. Lupulescu, G. L. Olsen and L. Frydman, Toward single-shot pure-shift solution 1H NMR by trains of BIRD-based homonuclear decoupling, *J. Magn. Reson.*, 2012, 218, 141-146.
106. F. Bloch and A. Siegert, Magnetic Resonance for Nonrotating Fields, *Phys. Rev.*, 1940, 57, 522-527.
107. L. Castañar, R. Roldán, P. Clapés, A. Virgili and T. Parella, Disentangling Complex Mixtures of Compounds with Near-Identical 1H and 13C NMR Spectra using Pure Shift NMR Spectroscopy, *Chem. Eur. J.*, 2015, 21, 7682-7685.
108. L. Byrne, J. Solà, T. Boddart, T. Marcelli, R. W. Adams, G. A. Morris and J. Clayden, Foldamer-Mediated Remote Stereocontrol: >1,60 Asymmetric Induction, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, 53, 151-155.
109. L. Castañar, M. Pérez-Trujillo, P. Nolis, E. Monteagudo, A. Virgili and T. Parella, Enantiodifferentiation through Frequency-Selective Pure-Shift 1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, *ChemPhysChem*, 2014, 15, 854-857.
110. L. Castanar, P. Nolis, A. Virgili and T. Parella, Measurement of T(1)/T(2) relaxation times in overlapped regions from homodecoupled (1)H singlet signals, *J Magn Reson*, 2014, 244, 30-35.
111. J. M. McKenna and J. A. Parkinson, HOBBS methods for enhancing resolution and sensitivity in small DNA oligonucleotide NMR studies, *Magn. Reson. Chem.*, 2015, 53, 249-255.
112. K. J. Donovan and L. Frydman, HyperBIRD: A Sensitivity-Enhanced Approach to Collecting Homonuclear-Decoupled Proton NMR Spectra, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015, 54, 594-598.
113. N. Gubensak, W. M. F. Fabian and K. Zangger, Disentangling scalar coupling patterns by real-time SERF NMR, *Chem. Commun.*, 2014, 50, 12254-12257.
114. N. Lokesh, S. R. Chaudhari and N. Suryaprakash, Quick re-introduction of selective scalar interactions in a pure-shift NMR spectrum, *Chem. Commun.*, 2014, 50, 15597-15600.
115. L. Castañar, J. Saurí, P. Nolis, A. Virgili and T. Parella, Implementing homo- and heterodecoupling in region-selective HSQMBC experiments, *J. Magn. Reson.*, 2014, 238, 63-69.
116. G. Bodenhausen and D. J. Ruben, Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy, *Chem. Phys. Lett.*, 1980, 69, 185-189.

117. G. A. Morris and R. Freeman, Enhancement of nuclear magnetic resonance signals by polarization transfer, *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, 101, 760-762.
118. G. W. Vuister, R. Boelens, R. Kaptein, R. E. Hurd, B. John and P. C. M. Van Zijl, Gradient-enhanced HMQC and HSQC spectroscopy. Applications to ¹⁵N-labeled Mnt repressor, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113, 9688-9690.
119. A. L. Davis, J. Keeler, E. D. Laue and D. Moskau, Experiments for recording pure-absorption heteronuclear correlation spectra using pulsed field gradients, *J. Magn. Reson.*, 1992, 98, 207-216.
120. A. G. Palmer, J. Cavanagh, P. E. Wright and M. Rance, Sensitivity improvement in proton-detected two-dimensional heteronuclear correlation NMR spectroscopy, *J. Magn. Reson.*, 1991, 93, 151-170.
121. L. Kay, P. Keifer and T. Saarinen, Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114, 10663-10665.
122. D. G. Davis, Simplification of proton-detected, natural abundance carbon-¹³ correlation spectra of proteins via multiplet editing, *J. Magn. Reson.*, 1990, 90, 589-596.
123. D. G. Davis, Improved multiplet editing of proton-detected, heteronuclear shift-correlation spectra, *J. Magn. Reson.*, 1991, 91, 665-672.
124. L. Castañar and T. Parella, in *Annu. Rep. NMR Spectrosc.*, ed. A. W. Graham, Academic Press, 2015, vol. 84, pp. 163-232.
125. S. Mori, C. Abeygunawardana, M. O. Johnson and P. C. M. Vanzijl, Improved Sensitivity of HSQC Spectra of Exchanging Protons at Short Interscan Delays Using a New Fast HSQC (FHSQC) Detection Scheme That Avoids Water Saturation, *J. Magn. Reson., Ser B*, 1995, 108, 94-98.
126. D. Schulze-Sunninghausen, J. Becker and B. Luy, Rapid heteronuclear single quantum correlation NMR spectra at natural abundance, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, 136, 1242-1245.
127. K. Kazimierczuk, J. Stanek, A. Zawadzka-Kazimierczuk and W. Koźmiński, Random sampling in multidimensional NMR spectroscopy, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 2010, 57, 420-434.
128. C. M. Thiele and W. Bermel, Speeding up the measurement of one-bond scalar (¹J) and residual dipolar couplings (¹D) by using non-uniform sampling (NUS), *J. Magn. Reson.*, 2012, 216, 134-143.
129. A. Tal and L. Frydman, Single-scan multidimensional magnetic resonance, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 2010, 57, 241-292.
130. P. Giraudeau and L. Frydman, Ultrafast 2D NMR: An Emerging Tool in Analytical Spectroscopy, *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 2014, 7, 129-161.
131. V. Rutar, T. C. Wong and W. Guo, Manipulated heteronuclear two-dimensional NMR bilinear pulses in the presence of strong coupling, *J. Magn. Reson.*, 1985, 64, 8-19.
132. G. V. T. Swapna, R. Ramachandran, N. Reddy and A. C. Kunwar, Virtual coupling effects in heteronuclear chemical-shift correlation spectroscopy, *J. Magn. Reson.*, 1990, 88, 135-140.
133. K. Takegoshi, K. Ogura and K. Hikichi, A perfect spin echo in a weakly homonuclear J-coupled two spin-12 system, *J. Magn. Reson.*, 1989, 84, 611-615.
134. P. C. M. van Zijl, C. T. W. Moonen and M. von Kienlin, Homonuclear J refocusing in echo spectroscopy, *J. Magn. Reson.*, 1990, 89, 28-40.
135. J. A. Aguilar, M. Nilsson, G. Bodenhausen and G. A. Morris, Spin echo NMR spectra without J modulation, *Chem. Commun.*, 2012, 48, 811-813.
136. J. A. Aguilar, R. W. Adams, M. Nilsson and G. A. Morris, Suppressing exchange effects in diffusion-ordered NMR spectroscopy, *J. Magn. Reson.*, 2014, 238, 16-19.
137. G. Batta, T. Barna, Z. Gáspári, S. Sándor, K. E. Kövér, U. Binder, B. Sarg, L. Kaiserer, A. K. Chhillar, A. Eigentler, É. Leiter, N. Hegedüs, I. Pócsi, H. Lindner and F. Marx, Functional aspects of the solution structure and dynamics of PAF – a highly-stable antifungal protein from *Penicillium chrysogenum*, *FEBS Journal*, 2009, 276, 2875-2890.
138. G. Váradi, G. K. Tóth, Z. Kele, L. Galgóczy, Á. Fizil and G. Batta, Synthesis of PAF, an Antifungal Protein from *P. chrysogenum*, by Native Chemical Ligation: Native Disulfide Pattern and Fold Obtained upon Oxidative Refolding, *Chem. Eur. J.*, 2013, 19, 12684-12692.
139. S. Grzesiek and A. Bax, The importance of not saturating water in protein NMR. Application to sensitivity enhancement and NOE measurements, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115, 12593-12594.
140. D. F. Mierke, S. G. Grdadolnik and H. Kessler, Use of one-bond C.alpha.-H.alpha. coupling constants as restraints in MD simulations, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114, 8283-8284.
141. I. Tvaroska and F. R. Taravel, Carbon-proton coupling constants in the conformational analysis of sugar molecules, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 1995, 51, 15-62.
142. R. R. Gil, Constitutional, Configurational, and Conformational Analysis of Small Organic Molecules on the Basis of NMR Residual Dipolar Couplings, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, 50, 7222-7224.
143. E. de Alba and N. Tjandra, NMR dipolar couplings for the structure determination of biopolymers in solution, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 2002, 40, 175-197.
144. A. Bax, Weak alignment offers new NMR opportunities to study protein structure and dynamics, *Protein Sci.*, 2003, 12, 1-16.
145. J. H. Prestegard, C. M. Bougault and A. I. Kishore, Residual Dipolar Couplings in Structure Determination of Biomolecules, *Chem. Rev.*, 2004, 104, 3519-3540.

146. M. Blackledge, Recent progress in the study of biomolecular structure and dynamics in solution from residual dipolar couplings, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 2005, 46, 23-61.
147. J. R. Tolman and K. Ruan, NMR residual dipolar couplings as probes of biomolecular dynamics, *Chem. Rev.*, 2006, 106, 1720-1736.
148. C. M. Thiele, Residual Dipolar Couplings (RDCs) in Organic Structure Determination, *Eur. J. Org. Chem.*, 2008, 2008, 5673-5685.
149. G. Kummerlöwe and B. Luy, in *Annu. Rep. NMR Spectrosc.*, Academic Press, 2009, vol. Volume 68, pp. 193-232.
150. B. Böttcher and C. M. Thiele, in *eMagRes*, 2012, DOI: 10.1002/9780470034590.emrstm1194.
151. B. Böttcher, V. Schmidts, J. A. Raskatov and C. M. Thiele, Determination of the Conformation of the Key Intermediate in an Enantioselective Palladium-Catalyzed Allylic Substitution from Residual Dipolar Couplings, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, 49, 205-209.
152. J. C. Worch, E. Hellemann, G. Pros, C. Gayathri, T. Pintauer, R. R. Gil and K. J. T. Noonan, Stability and Reactivity of 1,3-Benzothiaaphosphole: Metalation and Diels-Alder Chemistry, *Organometallics*, 2015, 34, 5366-5373.
153. C. Griesinger, O. W. Sørensen and R. R. Ernst, Practical aspects of the E.COSY technique. Measurement of scalar spin-spin coupling constants in peptides, *J. Magn. Reson.*, 1987, 75, 474-492.
154. P. Andersson, A. Annila and G. Otting, An α/β -HSQC- α/β Experiment for Spin-State Selective Editing of IS Cross Peaks, *J. Magn. Reson.*, 1998, 133, 364-367.
155. P. Andersson, J. Weigelt and G. Otting, Spin-state selection filters for the measurement of heteronuclear one-bond coupling constants, *J. Biomol. NMR*, 1998, 12, 435-441.
156. F. Cordier, A. J. Dingley and S. Grzesiek, A doublet-separated sensitivity-enhanced HSQC for the determination of scalar and dipolar one-bond J-couplings, *J. Biomol. NMR*, 1999, 13, 175-180.
157. M. Ottiger, F. Delaglio and A. Bax, Measurement of J and Dipolar Couplings from Simplified Two-Dimensional NMR Spectra, *J. Magn. Reson.*, 1998, 131, 373-378.
158. K. Pervushin, R. Riek, G. Wider and 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, *PNAS*, 1997, 94, 12366-12371.
159. M. Czisch and R. Boelens, Sensitivity Enhancement in the TROSY Experiment, *J. Magn. Reson.*, 1998, 134, 158-160.
160. J. Weigelt, Single Scan, Sensitivity- and Gradient-Enhanced TROSY for Multidimensional NMR Experiments, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, 120, 10778-10779.
161. K. Fehér, S. Berger and K. E. Kövér, Accurate determination of small one-bond heteronuclear residual dipolar couplings by F1 coupled HSQC modified with a G-BIRD⁽⁶⁾ module, *J. Magn. Reson.*, 2003, 163, 340-346.
162. J. Furrer, M. John, H. Kessler and B. Luy, J-Spectroscopy in the presence of residual dipolar couplings: determination of one-bond coupling constants and scalable resolution, *J. Biomol. NMR*, 2007, 37, 231-243.
163. C. M. Thiele and W. Bermel, Speeding up the measurement of one-bond scalar (¹J) and residual dipolar couplings (¹D) by using non-uniform sampling (NUS), *J. Magn. Reson.*, 2012, 216, 134-143.
164. A. Enthart, J. C. Freudenberger, J. Furrer, H. Kessler and B. Luy, The CLIP/CLAP-HSQC: pure absorptive spectra for the measurement of one-bond couplings, *J. Magn. Reson.*, 2008, 192, 314-322.
165. S. Ehni and B. Luy, A systematic approach for optimizing the robustness of pulse sequence elements with respect to couplings, offsets, and B1-field inhomogeneities (COB), *Magn. Reson. Chem.*, 2012, 50, S63-S72.
166. L. Castañar, J. Saurí, R. T. Williamson, A. Virgili and T. Parella, Pure In-Phase Heteronuclear Correlation NMR Experiments, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, 53, 8379-8382.
167. L. Castañar, E. Sistaré, A. Virgili, R. T. Williamson and T. Parella, Suppression of phase and amplitude J(HH) modulations in HSQC experiments, *Magn. Reson. Chem.*, 2015, 53, 115-119.
168. M. Rückert and G. Otting, Alignment of Biological Macromolecules in Novel Nonionic Liquid Crystalline Media for NMR Experiments, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 7793-7797.
169. S. Glanzer and K. Zangger, Visualizing Unresolved Scalar Couplings by Real-Time J-Upscaled NMR, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, 137, 5163-5169.
170. S. Glanzer and K. Zangger, Uniform Reduction of Scalar Coupling by Real-Time Homonuclear J-Downscaled NMR, *ChemPhysChem*, 2015, 16, 3313-3317.
171. S. Glanzer, O. Kunert and K. Zangger, Determination of unresolved heteronuclear scalar coupling constants by J(up)-HSQMBC, *J. Magn. Reson.*, 2016, 268, 88-94.
172. K. E. Kövér, A. A. Kumar, Y. Y. Rusakov, L. B. Krivdin, T. Z. Illyés and L. Szilágyi, Experimental and computational studies of ²J(⁷⁷Se, ¹H) selenium-proton couplings in selenoglycosides, *Magn. Reson. Chem.*, 2011, 49, 190-194.
173. R. T. Williamson, A. V. Buevich, G. E. Martin and T. Parella, LR-HSQMBC: A Sensitive NMR Technique To Probe Very Long-Range Heteronuclear Coupling Pathways, *J. Org. Chem.*, 2014, 79, 3887-3894.
174. N. Matsumori, D. Kaneno, M. Murata, H. Nakamura and 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.*, 1999, 64, 866-876.

175. G. Bifulco, P. Dambrosio, L. Gomez-Paloma and R. Riccio, Determination of Relative Configuration in Organic Compounds by NMR Spectroscopy and Computational Methods, *Chem. Rev.*, 2007, 107, 3744-3779.
176. B. L. Marquez, W. H. Gerwick and R. T. Williamson, Survey of NMR experiments for the determination of $^nJ(\text{C,H})$ heteronuclear coupling constants in small molecules, *Magn. Reson. Chem.*, 2001, 39, 499-530.
177. T. Parella and J. F. Espinosa, Long-range proton-carbon coupling constants: NMR methods and applications, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 2013, 73, 17-55.
178. R. T. Williamson, B. L. Marquez, W. H. Gerwick and K. E. Kövér, One- and two-dimensional gradient-selected HSQMBC NMR experiments for the efficient analysis of long-range heteronuclear coupling constants, *Magn. Reson. Chem.*, 2000, 38, 265-273.
179. H. Koskela, I. Kilpelainen and S. Heikkinen, LR-CAHSQC: an application of a Carr-Purcell-Meiboom-Gill-type sequence to heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy, *J. Magn. Reson.*, 2003, 164, 228-232.
180. K. E. Kövér, G. Batta and K. Fehér, Accurate measurement of long-range heteronuclear coupling constants from undistorted multiplets of an enhanced CPMG-HSQMBC experiment, *J. Magn. Reson.*, 2006, 181, 89-97.
181. S. Boros and K. E. Kövér, Low-power composite CPMG HSQMBC experiment for accurate measurement of long-range heteronuclear coupling constants, *Magn. Reson. Chem.*, 2011, 49, 106-110.
182. S. Gil, J. F. Espinosa and T. Parella, Accurate measurement of small heteronuclear coupling constants from pure-phase α/β HSQMBC cross-peaks, *J. Magn. Reson.*, 2011, 213, 145-150.
183. J. Saurí, J. F. Espinosa and T. Parella, A Definitive NMR Solution for a Simple and Accurate Measurement of the Magnitude and the Sign of Small Heteronuclear Coupling Constants on Protonated and Non-Protonated Carbon Atoms, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, 51, 3919-3922.
184. J. Saurí, P. Nolis and T. Parella, Efficient and fast sign-sensitive determination of heteronuclear coupling constants, *J. Magn. Reson.*, 2013, 236, 66-69.
185. B. Baishya and C. L. Khetrupal, "Perfect echo" INEPT: More efficient heteronuclear polarization transfer by refocusing homonuclear J-coupling interaction, *J. Magn. Reson.*, 2014, 242, 143-154.
186. E. Kupče, J. Boyd and I. D. Campbell, Short Selective Pulses for Biochemical Applications, *J. Magn. Reson., Ser B*, 1995, 106, 300-303.
187. Y. Y. Rusakov, L. B. Krivdin, A. A. Kumar, L. Szilágyi and K. E. Kövér, Resonance assignments of diastereotopic CH_2 protons in the anomeric side chain of selenoglycosides by means of $^2J(\text{Se,H})$ spin-spin coupling constants, *Magn. Reson. Chem.*, 2012, 50, 488-495.
188. P. Bagi, T. Szilvási, P. Pongrácz, L. Kollár, L. Drahos and G. Keglevich, Platinum(II) Complexes Incorporating Racemic and Optically Active 1-Aryl-3-phospholene P-Ligands as Potential Catalysts in Hydroformylation, *Curr. Org. Chem.*, 2014, 18, 1529-1538.
189. J. M. Bohlen and G. Bodenhausen, Experimental Aspects of Chirp NMR Spectroscopy, *J. Magn. Reson., Ser A*, 1993, 102, 293-301.

8. FÜGGELÉK

8.1. Impulzusszekvencia programok

8.1.1. Interferogram-típusú szélessávú protonlecsatolt HSQC

```
;ek_ti_hsqc_2D_2.GAM
;avance-version
;broadband proton-decoupled HSQC
;f2 heteronuclear decoupled f2 BIRDd homonuclear decoupled HSQC
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
;phase sensitive using Echo/Antiecho gradient selection
;using shaped pulses for inversion and refocussing on f2 - channel
;BIRD with modified timing
;   GAM 18vii12
;   KEK 27ix12
;pseudo 2D data can be reconstructed using the 'pshift' macro available at http://nmr.chemistry.manchester.ac.uk
;
;I. Timári, L. Kaltschnee, A. Kolmer, R. W. Adams, M. Nilsson, C. M. Thiele,
;G. A. Morris, K. E. Kövér, Journal of Magnetic Resonance 2014, 239, 130-138.
;
;Further relevant publications:
;A. Enthart, J. C. Freudenberger, J. Furrer, H. Kessler, B. Luy, Journal of Magnetic Resonance 2008, 192, 314-322.
;P. Sakhaii, B. Haase, W. Bermel, Journal of Magnetic Resonance 2009, 199, 192-198.
;J. A. Aguilar, M. Nilsson, G. A. Morris, Angewandte Chemie International Edition 2011, 50, 9716-9717.
;T. Reinsperger, B. Luy, Journal of Magnetic Resonance 2014, 239, 110-120.

;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

define delay tauA
define delay tauD

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"

"d4=1s/(cnst2*4)"
"d3=1s/(cnst2*2)"
"d11=30m"
"d7=p16+d16+4u"

# ifdef LABEL_CN
"p22=p21*2"
# else
# endif /*LABEL_CN*/

"d0=3u"
"in0=inf2/2"
```

```

"DELTA1=d4-p16-larger(p2,p14)/2-de-8u"
"DELTA2=d4-larger(p2,p14)/2"
"DELTA3=d4-larger(p2,p14)/2-p1*2/pi"
"DELTA4=d3-larger(p2,p14)/2"

# ifdef LABEL_CN
"DELTA=p16+d16+larger(p2,p22)+d0*2"
# else
"DELTA=p16+d16+p2+d0*2"
# endif /*LABEL_CN*/

"d10=0" ;BIRD
"in10=inf1/2" ;BIRD
"tauA=in10/2-p16-d16-50u" ;BIRD

"tauD=in10/2" ;BIRD

aqseq 312

1 ze
d11 pl12:f2

2 d1 do:f2
3 (p1 ph1)
  DELTA2 pl0:f2
  4u
  (center (p2 ph1) (p14:sp3 ph6):f2 )
  4u
  DELTA2 pl2:f2 UNBLKGRAD

(p1 ph2)
3u
p16:gp3 ;gpz3=15 purging gradient
d16

(p3 ph3):f2

d0
# ifdef LABEL_CN
(center (p2 ph5) (p22 ph1):f3 )
# else
(p2 ph5)
# endif /*LABEL_CN*/

d0

p16:gp1*EA ;gpz1 for coherence selection
d16 pl0:f2
4u
(p24:sp7 ph4):f2
4u
DELTA pl2:f2

(p3 ph4):f2
3u
p16:gp4 ;gpz4=11 purging gradient
d16

```

```

(p1 ph1)

DELTA3 pl0:f2
(center (p2 ph1) (p14:sp3 ph1):f2 )
4u
p16:gp2      ;gpz2 for coherence selection: gpz1 = 80, gpz2 = 20.1 for 13C/1H
DELTA1 pl2:f2
4u
;(p3 ph7):f2
      ;start of homonuclear decoupling evolution
d10      ; Incremented delay

tauA
50u
p16:gp20*1.0      ; CTP, +1.0
d16
(p2 ph20)      ; 180 (H)
tauD
(p4 ph11):f2      ; to refocus 1J(CH) evolution during PS-delay
50u
p16:gp20*4.0      ; CTP, +4.0
d16

300u

(p1 ph11)      ;BIRD-d (only direct protons, 1H-13C are inverted!!)
DELTA4 pl2:f2      ;BIRD with shaped inversion pulse
4u
(center (p2 ph11) (p14:sp3 ph11):f2)
4u
DELTA4
(p1 ph11) (p4 ph11):f2      ;13C inversion of BIRD-d scheme

100u
200u pl12:f2
p16:gp20*3.0      ; CTP, +3.0
d16
50u BLKGRAD

d10      ; incremented delay
      ;end of homonuclear decoupling evolution

4 go=2 ph31 cpd2:f2
30u
d1 do:f2 mc #0 to 2

F1QF(id10)
F2EA(rd10 & igrad EA, id0 & ip3*2 & ip6*2 & ip31*2)

exit

ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4=0 0 2 2
ph5=0
ph6=0
ph7=0 2
ph11=1 1 1 1 2 2 2 2
ph20=1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2

```

```
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2 0 2 2 0
```

```
;p10 : 0W
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;sp3: f2 channel - shaped pulse 180 degree for inversion
;spnam3: Crp60,0.5,20.1
;sp7: f2 channel - shaped pulse 180 degree for refocussing
;spnam7: Crp60comp.4
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p14: f2 channel - 180 degree shaped pulse for inversion
;   = 500usec for Crp60,0.5,20.1
;p16: homospoil/gradient pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;p24: f2 channel - 180 degree shaped pulse for refocussing
;   = 2msec for Crp60comp.4
;d0 : incremented delay (2D)           [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d3 : 1/(2J)XH
;d4 : 1/(4J)XH
;d11: delay for disk I/O               [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;cnst2: = J(XH)
;inf1: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 1 * n
;DS: >= 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: echo-antiecho
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence
;cnst4: number of points to drop when collecting FID

;use gradient ratio:   gp 1 : gp 2
;                       80 : 20.1   for C-13
;                       80 : 8.1    for N-15

;for z-only gradients:
;gpz1: 80%
;gpz2: 20.1% for C-13, 8.1% for N-15
;gpz20: CTP selection for homonuclear decoupling element

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
;gpnam3: SINE.100
;gpnam4: SINE.100
;gpnam20: SINE.100

;preprocessor-flags-start
;LABEL_CN: for C-13 and N-15 labeled samples start experiment with
;           option -DLABEL_CN (eda: ZGOPTNS)
;preprocessor-flags-end
```

8.1.2. Valós idejű szélessávú protonlecsatolt HSQC

```
;ek_ti_rakp_fbhsqcf3_wg2_fn
;pure shift HSQC with real-time acquisition on F3 channel
;using explicit acquisition dwellmode
;using digital mode acquisition
;avance-version - Avance II, AQS system, SADC digitizer, RX22 receiver, TopSpin 2.1
;
;based on hsqcetgps2
;using sensitivity improvement
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
;with decoupling during acquisition
;using trim pulse in inept transfer
;June 26, 2014
;
;This pulse sequence is part of the following publication:
;P. Kiraly, R. W. Adams, L. Paudel, M. Foroozandeh, J. A. Aguilar, I. Timári,
;M. J. Cliff, M. Nilsson, P. Sándor, G. Batta, J. P. Waltho, K. E. Kövér and G. A. Morris,
;J. Biomol. NMR, 2015, 62, 43-52.
;
;Further relevant publication:
;L. Paudel, R. W. Adams, P. Kiraly, J. A. Aguilar, M. Foroozandeh, M. J. Cliff, M. Nilsson,
;P. Sándor, J. P. Waltho and G. A. Morris, Angew. Chem. Int. Ed. 2013, 52, 11616-11619.

;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
#include <De.incl>

define loopcounter count
define delay dwell

"p2=p1*2"
"p22=p21*2"
"d4=1s/(cnst2*4)"
"d20=1s/(2*cnst2)"

"d11=30m"
"d13=4u"

"d0=3u"

"in0=inf1/2"

"l3=(td1/2)"

"DELTA1=d13+p16+d16+4u"
"DELTA2=d24-p16-d16"
"DELTA3=d4-p16-d16"

# ifdef LABEL_CN
"DELTA=p16+d16+50u+larger(p2,p22)+d0*2"
```

```

# else
"DELTA=50u+p2+d0*2"
# endif /*LABEL_CN*/

"d19=dw*112"
"l11=(0.5*decim*112/2)"
"l13=(l12*decim*0.5)"

"count=(aq/d19)-1"

"dwell=(dw/decim)"

;dwellmode explicit

1 ze
d11 pl16:f3

2 d1 do:f3
6m pl1:f1

3 d11 pl1:f1
9m

4 (p1 ph1)
d4 p13:f3
(center (p2 ph1) (p22 ph6):f3 )
d4
p28 ph1
d13
(p1 ph2) (p21 ph3):f3
d0

# ifdef LABEL_CN
(center (p2 ph7) (p22 ph1):f3 )
# else
(p2 ph7)
# endif /*LABEL_CN*/

d0
50u UNBLKGRAD
p16:gp1*1*EA
d16
(p22 ph4):f3
p16:gp1*-1*EA
d16
DELTA
(center (p1 ph1) (p21 ph4):f3 )
p16:gp3
d16
DELTA2
(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3 )
DELTA2
p16:gp3
d16
(center (p1 ph2) (p21 ph5):f3 )
p16:gp4
d16
DELTA3
(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3 )
DELTA3

```

```
p16:gp4
d16
(p1 ph1)
DELTA1
(p2 ph1)
d13
p16:gp9
d16 p16:f3
4u BLKGRAD

5 ACQ_START(ph30,ph31)

;;initial half chunk
5u p16:f3
5u cpd3:f3

10u REC_UNBLK
10u syrec
6 dwell DWL_CLK_ON
dwell DWL_CLK_OFF
lo to 6 times l11
10u REC_BLK
10u sytra
5u do:f3
5u UNBLKGRAD

p17:gp12 :gradient pulse for coherence selection and water suppression during acquisition
d16
5u
(p1 ph8)
d20 p13:f3
(center (p2 ph9) (p22 ph9):f3 )
d20 p11:f1
(ralign (p1 ph10) (p22 ph9):f3 )
5u
p17:gp12 :gradient pulse for coherence selection and water suppression during acquisition
d16

60u

p19:gp13 :gradient pulse for coherence selection and water suppression during acquisition
d16
5u
d31
(p2 ph18)
d31
5u
p19:gp13 :gradient pulse for coherence selection and water suppression during acquisition
d16 BLKGRAD

;;looped chunks
7 5u p16:f3
5u cpd3:f3

10u REC_UNBLK
10u syrec
8 dwell DWL_CLK_ON
dwell DWL_CLK_OFF
lo to 8 times l13
10u REC_BLK
10u sytra
```

```

5u do:f3
5u UNBLKGRAD

p17:gp12 ;gradient pulse for coherence selection and water suppression during acquisition
d16
5u
(p1 ph8)
d20 p13:f3
(center (p2 ph9) (p22 ph9):f3 )
d20 p11:f1
(ralign (p1 ph10) (p22 ph9):f3 )
5u
p17:gp12 ;gradient pulse for coherence selection and water suppression during acquisition
d16

60u
p19:gp13 ;gradient pulse for coherence selection and water suppression during acquisition
d16
5u
d31
(p2 ph18)
d31
5u
p19:gp13 ;gradient pulse for coherence selection and water suppression during acquisition
d16 BLKGRAD
lo to 7 times count

;;final half chunk

5u p116:f3
5u cpd3:f3

10u REC_UNBLK
10u syrec
9 dwell DWL_CLK_ON
dwell DWL_CLK_OFF
lo to 9 times l11
10u REC_BLK
10u sytra
5u do:f3
5u

50u
rcyc=2

10 d1 do:f3 wr #0 if #0 zd
3m igrad EA
3m ip5*2
lo to 3 times 2

d11 id0
3m ip3*2
3m ip6*2
3m ip31*2
lo to 4 times l3

l1 exit

;Phase Cycling

```

```

ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4=0 0 0 2 2 2
ph5=1 1 1 3 3 3
ph6=0
ph7=0 0 0 2 2 2

ph8= 0 0 1 1
ph9= 1 1 2 2
ph10=2 2 3 3
ph18=0 0 1 1

ph29=0

ph30=0
ph31=0 2 0 2 2 0 2 0

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p116: f3 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p10: pulse power off [120 dB]
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p21 : f3 channel - 90 degree high power pulse
;p22 : f3 channel - 180 degree high power pulse
;p16: gradient t1 encoding/purging gradient pulse [1 ms]
;p17: gradient pulse [0.5 ms]
;p19: gradient pulse [0.5 ms]
;p28: f1 channel - trim pulse
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d24: 1/(4J)XH for XH
; 1/(8J)XH for all multiplicities
;d20: BIRD delay - 1/(2J)XH
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d13: short delay [4 usec]
;d31: short delay [10 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;cnst2= J(XH)
;inf1: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 4 * n
;DS: >= 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: echo-antiecho
;cpd3: decoupling according to sequence defined by cpdprg3
;pcpd3: f3 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

;use gradient ratio: gp 1 : gp 9
;
; 80 : 40.2 for C-13
; 80 : 16.2 for N-15

;for z-only gradients:
;gpz3: homospoil 42%

```

```

;gpz4: homospoil 67%
;gpz12: ctp 61%
;gpz13: ctp 31%

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam3: SINE.100
;gpnam4: SINE.100
;gpnam9: SINE.100
;gpnam12: SINE.50
;gpnam13: SINE.50

;preprocessor-flags-start
;LABEL_CN: for C-13 and N-15 labeled samples start experiment with
;option -DLABEL_CN (eda: ZGOPTNS)
;preprocessor-flags-end

```

8.1.3. Interferogram-típusú szélessávú protonlecsatolt CLIP-HSQC

```

;ek_ti_hsqcCLIP_2D.GAM
;avance-version
;broadband proton-decoupled CLIP-HSQC
;f2 heteronuclear coupled f2 BIRDd homonuclear decoupled CLIP-HSQC
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
;phase sensitive using Echo/Antiecho gradient selection
;using shaped pulses for inversion and refocussing on f2 - channel
;BIRD with modified timing
;   GAM 18vii12
;   KEK 27ix12
;pseudo 2D data can be reconstructed using the 'pshift' macro available at http://nmr.chemistry.manchester.ac.uk
;
;I. Timári, L. Kaltschnee, A. Kolmer, R. W. Adams, M. Nilsson, C. M. Thiele,
;G. A. Morris, K. E. Kövér, Journal of Magnetic Resonance 2014, 239, 130-138.
;
;Further relevant publications:
;A. Enthart, J. C. Freudenberger, J. Furrer, H. Kessler, B. Luy, Journal of Magnetic Resonance 2008, 192, 314-322.
;P. Sakhaii, B. Haase, W. Bermel, Journal of Magnetic Resonance 2009, 199, 192-198.
;J. A. Aguilar, M. Nilsson, G. A. Morris, Angewandte Chemie International Edition 2011, 50, 9716-9717.
;T. Reinsperger, B. Luy, Journal of Magnetic Resonance 2014, 239, 110-120.

;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

define delay tauA
define delay tauB

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"

"d4=1s/(cnst2*4)"
"d3=1s/(cnst2*2)"

```

```

"d11=30m"

# ifdef LABEL_CN
"p22=p21*2"
# else
# endif /*LABEL_CN*/

"d0=3u"
"in0=inf2/2"

"DELTA1=d4-p16-larger(p2,p14)/2-de-8u"
"DELTA2=d4-larger(p2,p14)/2"
"DELTA3=d4-larger(p2,p14)/2-p1*2/pi"

# ifdef LABEL_CN
"DELTA=p16+d16+larger(p2,p22)+d0*2"
# else
"DELTA=p16+d16+p2+d0*2"
# endif /*LABEL_CN*/

"d10=0"
"in10=inf1/2"
"tauA=in10/2-p16-d16-50u"
"tauB=in10/2+50u"
;BIRD
;BIRD
;BIRD
;BIRD

aqseq 312

1 ze
d11 pl12:f2

2 d1 do:f2
3 (p1 ph1)
DELTA2 pl0:f2
4u
(center (p2 ph1) (p14:sp3 ph6):f2 )
4u
DELTA2 pl2:f2 UNBLKGRAD

(p1 ph2)
3u
p16:gp3 ;gpz3=15 purging gradient
d16

(p3 ph3):f2

d0
# ifdef LABEL_CN
(center (p2 ph5) (p22 ph1):f3 )
# else
(p2 ph5)
# endif /*LABEL_CN*/

d0

p16:gp1*EA ;gpz1 for coherence selection
d16 pl0:f2
4u
(p24:sp7 ph4):f2
4u
DELTA pl2:f2

```

```

(p3 ph4):f2
3u
p16:gp4      ;gpz4=11 purging gradient
d16

(p1 ph1)

DELTA3 p10:f2
(center (p2 ph1) (p14:sp3 ph1):f2 )
4u
p16:gp2      ;gpz2 for coherence selection: gpz1 = 80, gpz2 = 20.1 for 13C/1H
DELTA1 p12:f2
4u
(p3 ph7):f2
;start of homonuclear decoupling evolution

d10          ; Incremented delay

tauA
50u
p16:gp20*1.0 ; CTP, +1.0
d16
(p2 ph20)    ; 180 (H)
tauB
p16:gp20*4.0 ; CTP, +4.0
d16

300u

(p1 ph11)    ;BIRD-d (only direct protons, 1H-13C are inverted!!)
d3 p12:f2
(center (p2 ph11) (p4 ph11):f2)
d3
(p1 ph11) (p4 ph11):f2 ;13C inversion of BIRD-d scheme

100u
200u p112:f2
p16:gp20*3.0 ; CTP, +3.0
d16
50u BLKGRAD

d10          ; incremented delay
;end of homonuclear decoupling evolution

4 go=2 ph31
30u
d1 do:f2 mc #0 to 2

F1QF(id10)
F2EA(rd10 & igrad EA, id0 & ip3*2 & ip6*2 & ip31*2)

exit

ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4=0 0 2 2
ph5=0
ph6=0
ph7=0 2
ph11= 1 1 1 1 2 2 2 2
ph20=1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2 2

```

```
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2 0 2 2 0

;p10 : 0W
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;sp3: f2 channel - shaped pulse 180 degree for inversion
;spnam3: Crp60,0.5,20.1
;sp7: f2 channel - shaped pulse 180 degree for refocussing
;spnam7: Crp60comp.4
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p14: f2 channel - 180 degree shaped pulse for inversion
;      = 500usec for Crp60,0.5,20.1
;p16: homospoil/gradient pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;p24: f2 channel - 180 degree shaped pulse for refocussing
;      = 2msec for Crp60comp.4
;d0 : incremented delay (2D)           [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d3 : 1/(2J)XH
;d4 : 1/(4J)XH
;d11: delay for disk I/O                [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;cnst2: = J(XH)
;inf1: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/2 * SW(X) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 1 * n
;DS: >= 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: echo-antiecho
;cnst4: number of points to drop when collecting FID

;use gradient ratio:   gp 1 : gp 2
;                      80 : 20.1   for C-13
;                      80 : 8.1    for N-15

;for z-only gradients:
;gpz1: 80%
;gpz2: 20.1% for C-13, 8.1% for N-15
;gpz20: CTP selection for homonuclear decoupling element

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
;gpnam3: SINE.100
;gpnam4: SINE.100
;gpnam20: SINE.100

;preprocessor-flags-start
;LABEL_CN: for C-13 and N-15 labeled samples start experiment with
;           option -DLABEL_CN (eda: ZGOPTNS)
;preprocessor-flags-end
```

8.1.4. Interferogram-típusú szélessávú protonlecsatolt CLAP-HSQC

```

;ek_ti_hsqcCLAP_2D.GAM
;avance-version
;broadband proton-decoupled CLAP-HSQC
;f2 heteronuclear coupled f2 BIRDd homonuclear decoupled CLAP-HSQC
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
;phase sensitive using Echo/Antiecho gradient selection
;using shaped pulses for inversion and refocussing on f2 - channel
;BIRD with modified timing
;   GAM 18vii12
;   KEK 27ix12
;pseudo 2D data can be reconstructed using the 'pshift' macro available at http://nmr.chemistry.manchester.ac.uk
;
;I. Timári, L. Kaltschnee, A. Kolmer, R. W. Adams, M. Nilsson, C. M. Thiele,
;G. A. Morris, K. E. Kövér, Journal of Magnetic Resonance 2014, 239, 130-138.
;
;Further relevant publications:
;A. Enthart, J. C. Freudenberger, J. Furrer, H. Kessler, B. Luy, Journal of Magnetic Resonance 2008, 192, 314-322.
;P. Sakhaii, B. Haase, W. Bermel, Journal of Magnetic Resonance 2009, 199, 192-198.
;J. A. Aguilar, M. Nilsson, G. A. Morris, Angewandte Chemie International Edition 2011, 50, 9716-9717.
;T. Reinsperger, B. Luy, Journal of Magnetic Resonance 2014, 239, 110-120.

;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

define delay tauA
define delay tauB

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"

"d4=1s/(cnst2*4)"
"d3=1s/(cnst2*2)"
"d11=30m"
"d7=p16+d16+4u"

# ifdef LABEL_CN
"p22=p21*2"
# else
# endif /*LABEL_CN*/

"d0=3u"
"in0=inf2/2"

"DELTA1=d4-p16-larger(p2,p14)/2-de-8u"
"DELTA2=d4-larger(p2,p14)/2"
"DELTA3=d4-larger(p2,p14)/2-p1*2/pi"

# ifdef LABEL_CN
"DELTA=p16+d16+larger(p2,p22)+d0*2"
# else
"DELTA=p16+d16+p2+d0*2"

```

```

# endif /*LABEL_CN*/

"d10=0" ;BIRD
"in10=inf1/2" ;BIRD
"tauA=in10/2-p16-d16-50u" ;BIRD
"tauB=in10/2+50u" ;BIRD

aqseq 312

1 ze
d11 pl12:f2

2 d1 do:f2
3 (p1 ph1)
DELTA2 pl0:f2
4u
(center (p2 ph1) (p14:sp3 ph6):f2 )
4u
DELTA2 pl2:f2 UNBLKGRAD

(p1 ph2)
3u
p16:gp3 ;gpz3=15 purging gradient
d16

(p3 ph3):f2

d0
# ifdef LABEL_CN
(center (p2 ph5) (p22 ph1):f3 )
# else
(p2 ph5)
# endif /*LABEL_CN*/

d0

p16:gp1*EA ;gpz1 for coherence selection
d16 pl0:f2
4u
(p24:sp7 ph4):f2
4u
DELTA pl2:f2

(p3 ph4):f2
3u
p16:gp4 ;gpz4=11 purging gradient
d16

(p1 ph1)

d7

p2 ph1
4u
p16:gp2 ;gpz2 for coherence selection: gpz1 = 80, gpz2 = 20.1 for 13C/1H
d16

d10 ; Incremented delay

tauA
50u ;start of homonuclear decoupling evolution

```

```

p16:gp20*1.0      ; CTP, +1.0
d16
(p2 ph20)         ; 180 (H)
tauB
p16:gp20*4.0     ; CTP, +4.0
d16

300u

(p1 ph11)         ;BIRD-d (only direct protons, 1H-13C are inverted!!)
d3 p12:f2
(center (p2 ph11) (p4 ph11):f2)
d3
(p1 ph11) (p4 ph11):f2 ;13C inversion of BIRD-d scheme

100u
200u p12:f2
p16:gp20*3.0     ; CTP, +3.0
d16
50u BLKGRAD

d10               ; incremented delay

;end of homonuclear decoupling evolution

4 go=2 ph31
30u
d1 do:f2 mc #0 to 2

F1QF(id10)
F2EA(rd10 & igrad EA, id0 & ip3*2 & ip6*2 & ip31*2)

exit

ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4=0 0 2 2
ph5=0
ph6=0
ph7=0 2
ph11= 1 1 1 1 1 2 2 2 2
ph20=1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2

ph31=0 2 2 0 2 0 2 0 2 2 0 2 0 2 2 0

;p10 : 0W
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;sp3: f2 channel - shaped pulse 180 degree for inversion
;spnam3: Crp60,0.5,20.1
;sp7: f2 channel - shaped pulse 180 degree for refocussing
;spnam7: Crp60comp.4
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p14: f2 channel - 180 degree shaped pulse for inversion
;      = 500usec for Crp60,0.5,20.1
;p16: homospoil/gradient pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;p24: f2 channel - 180 degree shaped pulse for refocussing

```

```
; = 2msec for Crp60comp.4
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d3 : 1/(2J)XH
;d4 : 1/(4J)XH
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;cnst2: = J(XH)
;inf1: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 1 * n
;DS: >= 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: echo-antiecho
;cnst4: number of points to drop when collecting FID

;use gradient ratio: gp 1 : gp 2
; 80 : 20.1 for C-13
; 80 : 8.1 for N-15

;for z-only gradients:
;gpz1: 80%
;gpz2: 20.1% for C-13, 8.1% for N-15
;gpz20: CTP selection for homonuclear decoupling element

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
;gpnam3: SINE.100
;gpnam4: SINE.100
;gpnam20: SINE.100

;preprocessor-flags-start
;LABEL_CN: for C-13 and N-15 labeled samples start experiment with
; option -DLABEL_CN (eda: ZGOPTNS)
;preprocessor-flags-end
```

8.1.5. Valós idejű szélessávú protonlecsatolt CLIP-HSQC

```
;ek_ti_hsqcCLIP_f3
;broadband proton-homodecoupled CLIP-HSQC with real-time acquisition on F3 channel
;designed for the measurement of one-bond heteronuclear coupling constants
;avance-version (08/04/15) - Avance II, AQS system, SADC digitizer, RX22 receiver, TopSpin 2.1
;using digital mode acquisition
;using explicit acquisition dwellmode
;using gradients during acquisition for water-suppression
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
;without decoupling during acquisition
;16-step phase sequence from chunk to chunk
;4-step phase cycle from scan to scan
;
;This pulse sequence is part of
;István Timári, Lukas Kaltschnee, Mária H. Raics, Felix Roth, Nicholle G. A. Bell, Ralph W. Adams,
;Mathias Nilsson, Dusan Uhrin, Gareth A. Morris, Christina M. Thiele and Katalin E. Kövér,
;"Real-time broadband proton-homodecoupled CLIP/CLAP-HSQC for automated measurement of heteronuclear
;one-bond coupling constants",
;manuscript submitted
;
```

;Further relevant publications:

;A. Enthart, J. C. Freudenberger, J. Furrer, H. Kessler, B. Luy, J. Magn. Reson. 2008, 192, 314-322.

;I. Timári, L. Kaltschnee, A. Kolmer, R. W. Adams, M. Nilsson, C. M. Thiele,

;G. A. Morris, K. E. Kövér, J. Magn. Reson. 2014, 239, 130-138.

;L. Paudel, R. W. Adams, P. Kiraly, J. A. Aguilar, M. Foroozandeh, M. J. Cliff,

;M. Nilsson, P. Sándor, J. P. Waltho, and G. A. Morris,

;Angew. Chem. Int. Ed., 2013, 52, 11616-11619.

;P. Kiraly, R. W. Adams, L. Paudel, M. Foroozandeh, J. A. Aguilar, I. Timári, M. J. Cliff,

;M. Nilsson, P. Sándor, G. Batta, J. P. Waltho, K. E. Kövér and G. A. Morris,

;J. Biomol. NMR, 2015, 62, 43-52.

;

;\$CLASS=HighRes

;\$DIM=2D

;\$TYPE=

;\$SUBTYPE=

;\$COMMENT=

#include <Avance.incl>

#include <Grad.incl>

#include <Delay.incl>

#include <De.incl>

define loopcounter count

define delay dwell

"p2=p1*2"

"p22=p21*2"

"d4=1s/(cnst2*4)"

"d11=30m"

"d0=3u"

"in0=inf1/2"

"l3=(td1/2)"

"d20=(1s/(2*cnst2))-5u"

"DELTA3=d4-p16-d16-5u"

"DELTA=p16+d16+p2+d0*2"

"d19=dw*112"

"l11=(0.5*decim*112/2)"

"l13=(112*decim*0.5)"

"count=(aq/d19)-1"

"dwell=(dw/decim)"

;dwellmode explicit

1 ze

d11

2 d1 do:f3

3m pl1:f1

3 d11 pl1:f1

9m

4 15u rpp18 ;;reset phase pointers before each transient

15u rpp19

15u rpp20

```
15u rpp21
15u rpp22
15u rpp23 ;;reset phase pointers

15u rp19 ;;reset phase ph19 to original value
15u rp21 ;;reset phase ph21 to original value
15u rp22 ;;reset phase ph22 to original value

15u ip23*2 ;;phase ph23 inverted at every other scan (1H 180)

15u iu1 ;;i1 = 0 initial value, i1 = 1, 2, 3, or 4 depending on the actual value of NS

if "i1 <= 4" goto lab1
15u ru1 ;;i1 'scan counter' dependent - varies between 1 - 4
15u iu1

lab1, 15u

if "i1 >=3" goto lab2
15u ip19*2
15u ip21*2
15u ip22*2

lab2, 15u ip19*2 ;;phase ph19 (BIRD 1H-180), ph21 (BIRD 13C-180) and ph22 (second 13C-180) inverted at every
3rd and 4th scan
15u ip21*2
15u ip22*2

5 (p1 ph1)
d4 p13:f3
(center (p2 ph1) (p22 ph6):f3)
d4 UNBLKGRAD
(p1 ph2)
3u
p16:gp4
d16
(p21 ph3):f3
d0
(p2 ph1)
d0
p16:gp1
d16
4u
(p22 ph1):f3
4u
DELTA

(p21 ph5):f3
p16:gp5
d16
(p1 ph7)
d4
(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3 )
5u
p16:gp9*EA
d16
DELTA3 BLKGRAD

(p21 ph4):f3 ;;purging residual antiphase magn.
```

```

6 ACQ_START(ph30,ph31)      ;initial half chunk

  5u
  5u                        ;detection without decoupling
  10u REC_UNBLK
  10u syrec
7 dwell DWL_CLK_ON
  dwell DWL_CLK_OFF
lo to 7 times l11
  10u REC_BLK
  10u sytra
  5u
  5u UNBLKGRAD

p17:gp12      ;gradient pulse for coherence selection and water suppression during acquisition
d16          ;p17 = max. 500 us
5u
(p1 ph18^)
d20
5u
(center (p2 ph19^) (p22 ph21^):f3)
5u
d20
(ralign (p1 ph20^) (p22 ph22^):f3)
5u
p17:gp12      ;gradient pulse for coherence selection and water suppression during acquisition
d16

60u
p19:gp13      ;gradient pulse for coherence selection and water suppression during acquisition
d16          ;p19 = max. 500 us
10u
(p2 ph23^)
10u
p19:gp13      ;gradient pulse for coherence selection and water suppression during acquisition
d16 BLKGRAD

;;looped chunks
8 5u
  5u
  10u REC_UNBLK
  10u syrec
9 dwell DWL_CLK_ON
  dwell DWL_CLK_OFF
lo to 9 times l13
  10u REC_BLK
  10u sytra
  5u
  5u UNBLKGRAD

p17:gp12      ;gradient pulse for coherence selection and water suppression during acquisition
d16          ;p17 = max. 500 us
5u
(p1 ph18^)
d20
5u
(center (p2 ph19^) (p22 ph21^):f3)
5u
d20
(ralign (p1 ph20^) (p22 ph22^):f3)
5u

```

p17:gp12 ;gradient pulse for coherence selection and water suppression during acquisition
d16

60u
p19:gp13 ;gradient pulse for coherence selection and water suppression during acquisition
d16 ;p19 = max. 500 us

10u
(p2 ph23^)

10u
p19:gp13 ;gradient pulse for coherence selection and water suppression during acquisition
d16 BLKGRAD

lo to 8 times count

;;final half chunk

5u
5u
10u REC_UNBLK
10u syrec
10 dwell DWL_CLK_ON
dwell DWL_CLK_OFF
lo to 10 times l11
10u REC_BLK
10u sytra
5u
5u

50u
rcyc=2

11 d1 do:f3 wr #0 if #0 zd
3m igrad EA
lo to 3 times 2

d11 id0
3m ip3*2
3m ip6*2
3m ip31*2
lo to 4 times l3

12 exit

;Phase Cycling
; 1 2 4 8 16 32
ph1=0
ph2=1
ph3=0 0 0 0 2 2 2 2
ph5=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
ph6=0
ph7=0
ph4=0

ph8=0 ;BIRD 1st 1H 90
ph9=1 3 ;BIRD 1H 180
ph10=2 ;BIRD 2nd 1H 90
ph11=1 3 ;BIRD 13C 180
ph12=0 2 ;BIRDd 13C 180
ph13=0 2 ;1H 180

ph29=0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 0 0 0 2 2 ;:MLEV-8 cycle doubled!!

ph18=ph8 + ph29 ;phase sequence from chunk to chunk!
 ph19=ph9 + ph29
 ph20=ph10 + ph29
 ph21=ph11 + ph29
 ph22=ph12 + ph29
 ph23=ph13 + ph29

ph30=0
 ph31=0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 0 0 0 0

;p1 : f1 channel - power level for pulse (default)
 ;p2 : f2 channel - power level for pulse (default)
 ;p3 : f3 channel - power level for pulse (default)
 ;p12: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
 ;p16: f3 channel - power level for CPD/BB decoupling
 ;p10: pulse power off [120 dB]
 ;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
 ;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
 ;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
 ;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
 ;p21 : f3 channel - 90 degree high power pulse
 ;p22 : f3 channel - 180 degree high power pulse
 ;p16: gradient t1 encoding/purging gradient pulse [1 ms]
 ;p17: gradient pulse [0.5 ms]
 ;p19: gradient pulse [0.5 ms]
 ;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
 ;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
 ;d4 : 1/(4J)XH
 ;d20: BIRD delay - 1/(2J)XH
 ;d11: delay for disk I/O [30 msec]
 ;d16: delay for homospoil/gradient recovery
 ;l1: = 0
 ;cnst2: = J(XH)
 ;inf1: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
 ;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
 ;nd0: 2
 ;NS: 4 * n
 ;DS: >= 16
 ;td1: number of experiments
 ;FnMODE: echo-antiecho

;use gradient ratio: gp 1 : gp 9
 ; 80 : 20.1 for C-13
 ; 80 : 8.1 for N-15

;for z-only gradients:
 ;gpz4: homospoil 13%
 ;gpz4: homospoil 27%
 ;gpz12: ctp 61%
 ;gpz13: ctp 31%

;use gradient files:
 ;gpnam1: SINE.100
 ;gpnam4: SINE.100
 ;gpnam5: SINE.100
 ;gpnam9: SINE.100
 ;gpnam12: SINE.50
 ;gpnam13: SINE.50

8.1.6. Valós idejű szélessávú protonlecsatolt CLAP-HSQC

```
;ek_ti_hsqcCLAP_f3
;broadband proton-homodecoupled CLAP-HSQC with real-time acquisition on F3 channel
;designed for the measurement of one-bond heteronuclear coupling constants
;avance-version (08/04/15) - Avance II, AQS system, SADC digitizer, RX22 receiver, TopSpin 2.1
;using digital mode acquisition
;using explicit acquisition dwellmode
;using gradients during acquisition for water-suppression
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
;without decoupling during acquisition
;16-step phase sequence from chunk to chunk
;4-step phase cycle from scan to scan
;
;This pulse sequence is part of
;István Timári, Lukas Kaltschnee, Mária H. Raics, Felix Roth, Nicholle G. A. Bell, Ralph W. Adams,
;Mathias Nilsson, Dusan Uhrin, Gareth A. Morris, Christina M. Thiele and Katalin E. Kövér,
;"Real-time broadband proton-homodecoupled CLIP/CLAP-HSQC for automated measurement of heteronuclear
;one-bond coupling constants",
;manuscript submitted
;Further relevant publications:
;A. Enthart, J. C. Freudenberger, J. Furrer, H. Kessler, B. Luy, J. Magn. Reson. 2008, 192, 314-322.
;I. Timári, L. Kaltschnee, A. Kolmer, R. W. Adams, M. Nilsson, C. M. Thiele,
;G. A. Morris, K. E. Kövér, J. Magn. Reson. 2014, 239, 130-138.
;L. Paudel, R. W. Adams, P. Kiraly, J. A. Aguilar, M. Foroozandeh, M. J. Cliff,
;M. Nilsson, P. Sándor, J. P. Waltho, and G. A. Morris,
;Angew. Chem. Int. Ed., 2013, 52, 11616-11619.
;P. Kiraly, R. W. Adams, L. Paudel, M. Foroozandeh, J. A. Aguilar, I. Timári, M. J. Cliff,
;M. Nilsson, P. Sándor, G. Batta, J. P. Waltho, K. E. Kövér and G. A. Morris,
;J. Biomol. NMR, 2015, 62, 43-52.
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
#include <De.incl>

define loopcounter count
define delay dwell

"p2=p1*2"
"p22=p21*2"
"d4=1s/(cnst2*4)"
"d11=30m"
"d0=3u"

"in0=inf1/2"

"l3=(td1/2)"

"d20=(1s/(2*cnst2))-5u"
"DELTA3=d4-p16-d16-5u"
"DELTA=p16+d16+p2+d0*2"
```

```
"d19=dw*I12"
"I11=(0.5*decim*I12/2)"
"I13=(I12*decim*0.5)"
"count=(aq/d19)-1"
"dwell=(dw/decim)"
```

```
;dwellmode explicit
```

```
1 ze
  d11
```

```
2 d1 do:f3
  3m p11:f1
```

```
3 d11 p11:f1
  9m
```

```
4 15u rpp18 ;;reset phase pointers before each transient
  15u rpp19
  15u rpp20
  15u rpp21
  15u rpp22
  15u rpp23 ;;reset phase pointers
```

```
15u rp19 ;; reset phase ph19 to original value
15u rp21 ;; reset phase ph21 to original value
15u rp22 ;; reset phase ph22 to original value
```

```
15u ip23*2 ;; phase ph23 inverted at every other scan (1H 180)
```

```
15u iu1 ;;i1 = 0 initial value, i1 = 1, 2, 3, or 4 depending on the actual value of NS
```

```
if "i1 <= 4" goto lab1
  15u ru1 ;;i1 'scan counter' dependent - varies between 1 - 4
  15u iu1
```

```
lab1, 15u
```

```
if "i1 >=3" goto lab2
  15u ip19*2
  15u ip21*2
  15u ip22*2
```

```
lab2, 15u ip19*2 ;;phase ph19 (BIRD 1H-180), ph21 (BIRD 13C-180) and ph22 (second 13C-180) inverted at every
3rd and 4th scan
  15u ip21*2
  15u ip22*2
```

```
5 (p1 ph1)
  d4 p13:f3
  (center (p2 ph1) (p22 ph6):f3)
  d4 UNBLKGRAD
  (p1 ph2)
  3u
  p16:gp4
  d16
  (p21 ph3):f3
  d0
  (p2 ph1)
  d0
```

p16:gp1
d16
4u
(p22 ph1):f3
4u
DELTA

(p21 ph5):f3
p16:gp5
d16
(p1 ph7)
d4
(p2 ph1)
5u
p16:gp9*EA
d16
DELTA3 BLKGRAD

6 ACQ_START(ph30,ph31) ;initial half chunk

5u
5u ;detection without decoupling
10u REC_UNBLK
10u syrec
7 dwell DWL_CLK_ON
dwell DWL_CLK_OFF
lo to 7 times l11
10u REC_BLK
10u sytra
5u
5u UNBLKGRAD

p17:gp12 ;gradient pulse for coherence selection and water suppression during acquisition
d16 ;p17 = max. 500 us
5u
(p1 ph18^)
d20
5u
(center (p2 ph19^)(p22 ph21^):f3)
5u
d20
(ralign (p1 ph20^)(p22 ph22^):f3)
5u
p17:gp12 ;gradient pulse for coherence selection and water suppression during acquisition
d16

60u
p19:gp13 ;gradient pulse for coherence selection and water suppression during acquisition
d16 ;p19 = max. 500 us
10u
(p2 ph23^)
10u
p19:gp13 ;gradient pulse for coherence selection and water suppression during acquisition
d16 BLKGRAD

::looped chunks
8 5u
5u
10u REC_UNBLK

```

10u syrec
9 dwell DWL_CLK_ON
dwell DWL_CLK_OFF
lo to 9 times l13
10u REC_BLK
10u sytra
5u
5u UNBLKGRAD

p17:gp12 ;gradient pulse for coherence selection and water suppression during acquisition
d16 ;p17 = max. 500 us
5u
(p1 ph18^)
d20
5u
(center (p2 ph19^) (p22 ph21^):f3)
5u
d20
(ralign (p1 ph20^) (p22 ph22^):f3)
5u
p17:gp12 ;gradient pulse for coherence selection and water suppression during acquisition
d16

60u
p19:gp13 ;gradient pulse for coherence selection and water suppression during acquisition
d16 ;p19 = max. 500 us
10u
(p2 ph23^)
10u
p19:gp13 ;gradient pulse for coherence selection and water suppression during acquisition
d16 BLKGRAD

lo to 8 times count

;;final half chunk

5u
5u
10u REC_UNBLK
10u syrec
10 dwell DWL_CLK_ON
dwell DWL_CLK_OFF
lo to 10 times l11
10u REC_BLK
10u sytra
5u
5u

50u
rcyc=2

11 d1 do:f3 wr #0 if #0 zd
3m igrad EA
lo to 3 times 2

d11 id0
3m ip3*2
3m ip6*2
3m ip31*2
lo to 4 times l3

```

12 exit

```

;Phase Cycling
; 1 2 4 8 16 32
ph1=0
ph2=1
ph3=0 0 0 0 2 2 2 2
ph5=0 0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
ph6=0
ph7=0
ph4=0

ph8=0 ;BIRD 1st 1H 90
ph9=1 3 ;BIRD 1H 180
ph10=2 ;BIRD 2nd 1H 90
ph11=1 3 ;BIRD 13C 180
ph12=0 2 ;BIRDd 13C 180
ph13=0 2 ;1H 180

ph29=0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 0 0 0 0 2 2 ;;MLEV-8 cycle doubled!!

ph18=ph8 + ph29 ;phase sequence from chunk to chunk!
ph19=ph9 + ph29
ph20=ph10 + ph29
ph21=ph11 + ph29
ph22=ph12 + ph29
ph23=ph13 + ph29

ph30=0
ph31=0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2 0 0 0 0

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p116: f3 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p10: pulse power off [120 dB]
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p21 : f3 channel - 90 degree high power pulse
;p22 : f3 channel - 180 degree high power pulse
;p16: gradient t1 encoding/purging gradient pulse [1 ms]
;p17: gradient pulse [0.5 ms]
;p19: gradient pulse [0.5 ms]
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d20: BIRD delay - 1/(2J)XH
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;i1: = 0
;cnst2: = J(XH)
;inf1: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/2 * SW(X) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 4 * n
;DS: >= 16
;td1: number of experiments
    
```

```

;FnMODE: echo-antiecho

;use gradient ratio:  gp 1 : gp 9
;                    80 : 20.1  for C-13
;                    80 :  8.1  for N-15

;for z-only gradients:
;gpz4: homospoil 13%
;gpz4: homospoil 27%
;gpz12: ctp 61%
;gpz13: ctp 31%

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam4: SINE.100
;gpnam5: SINE.100
;gpnam9: SINE.100
;gpnam12: SINE.50
;gpnam13: SINE.50

```

8.1.7. Interferogram-típusú, Zangger-Sterk szélessávú protonlecsatolt CPMG-HSQMBC

```

;ek_ti_cpmg_hsqmbc2D_ps
;
;broadcast proton-proton - decoupled CPMG-HSQMBC
;pseudo 2D experiment used for precise and accurate determination of long-range heteronuclear coupling constants
;phase sensitive using Echo/Antiecho gradient selection
;using CPMG for polarization transfer to avoid evolution of J(HH)
;using composite 13C and 1H 180 pulses in CPMG
;using Zangger-Sterk based broadband proton-proton decoupling scheme
;J(HH) is refocussed at the centre of chunk
;pseudo 2D data can be reconstructed using the 'pshift' macro available at http://nmr.chemistry.manchester.ac.uk
;
;This pulse sequence is part of the following publication:
;I. Timári, T.Z. Illyés, R.W. Adams, M. Nilsson, L. Szilágyi, G.A. Morris, K.E. Kövér:
;"Precise measurement of long-range heteronuclear coupling constants by a novel broadband proton-proton - decoupled
;CPMG-HSQMBC method"
;Chem. Eur. J. 2015, 21, 3472-3479.
;
;Further relevant publications:
;K.E. Kövér, G. Batta, K. Fehér, J. Magn. Reson. 2006, 181, 89-97.
;J.A. Aguilar, S. Faulkner, M. Nilsson, G.A. Morris, Angew. Chem. Int. Ed. 2010, 49, 3901-3903.
;
;Bruker Avance II version, July 31, 2014

;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

define delay tauA
define delay tauB
define delay tauC

```

```
"in10=inf1/2"  
"in0=inf2/2"  
  
"d10=0"  
"d0=3u"  
  
"p2=p1*2"  
  
"tauA=in10/2-p16-d16-50u"  
"tauB=in10-p16-d16-300u"  
"tauC=in10/2-p16-d16-350u-(dw*2)-(dw*2*cnst4)-de"  
  
"p4=p3*2"  
"d11=30m"  
"d13=3u"  
"d7=d13+p16+d16+4u"  
"d20=p16+d16+p2+d0*2"  
  
aqseq 312  
  
1 ze  
2 d1 do:f2  
  d11 p11:f1  
3 p1 ph1  
  
4 d15 p12:f2 ;CPMG-sequence for polarization transfer with XY-16 phase cycle  
  (p1 ph20) (p3 ph20):f2  
  3u  
  (p2 ph21) (p4 ph21^):f2 ;^ increment phase pointer of ph21  
  3u  
  (p1 ph20) (p3 ph20^):f2 ;^ increment phase pointer of ph20 - composite 1H, 13C pulse  
  d15 ;d15=120-150us  
  lo to 4 times l1 ;p1 should be calibrated to p1=p3 at p11!!!  
  ;l1 = multiple of 16!  
  
  ;long-range coupling evolution = (2*d15+2*p4+6)*l1 (ca. 70-90 ms)  
  
  (p1 ph2)  
  d13 UNBLKGRAD  
  p16:gp3 ;gpz3=15 purging  
  d16  
  (p3 ph3):f2  
  d0  
  p2 ph5  
  d0  
  p16:gp1 ;gpz1=80, coherence selection  
  d16  
  
  (p3 ph14):f2 ;comp. 13C 180 pulse  
  (p4 ph4):f2  
  (p3 ph14):f2  
  
  d20  
  
  (p3 ph4):f2  
  d13  
  p16:gp4 ;gpz4=11 purging  
  d16  
  (p1 ph16)
```

d7
 (p2 ph19)
 d13
 p16:gp2*EA ;gpz2=20.1 for echo-antiecho coherence selection
 d16
 4u

d10 ; Incremented delay for broadband proton-proton decoupling protocol

tauA
 50u
 p16:gp5*1.0 ; CTP, +1.0*
 d16

p2 ph17 ; 180 (H)

tauB
 p16:gp5*4.0 ; CTP, +4.0*
 d16

300u gron6 ; Slice selection gradient On
 p12:sp2:f1 ph18:r ; 180 (selective)
 100u groff ; Slice selection gradient Off
 200u

p16:gp5*3.0 ; CTP, +3.0*
 d16
 50u BLKGRAD
 tauC
 d10 ; incremented delay

5 go=2 ph31
 30u
 d1 do:f2 mc #0 to 2
 F1QF(id10)
 F2EA(rd10 & igrad EA, id0)

6 exit

ph1=0
 ph2=1
 ph11=2
 ph12=3
 ph20=1 2 1 2 2 1 2 1 3 0 3 0 0 3 0 3
 ph21=0 1 0 1 1 0 1 0 2 3 2 3 3 2 3 2
 ph3=0 2
 ph4=0 0 2 2
 ph14=1 1 3 3
 ph5=0
 ph16=0
 ph19=1
 ph17=0
 ph18=0 0 0 0 1 1 1 1

ph31=0 2 2 0 2 0 0 2

;p1 : f1 channel - power level for pulse (default)
 ;p2 : f2 channel - power level for pulse (default)
 ;sp2: selective pulse power level
 ;spoffs2: selective pulse offset (0 Hz)

```
;spnam2: file name for selective pulse
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p12: selective 180 pulse width
;p16: homospoil/gradient pulse
;d0 : incremented delay          [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d7: =d13+p16+d16+4u
;d10: incremented delay, set initial value to 0 s
;d11: delay for disk I/O          [30 msec]
;d13: short delay                 [3 usec]
;d15: interpulse delay
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d20: =p16+d16+p2+d0*2
;l1: loop for CPMG
;cnst4: number of points to drop when collecting FID
;NS: number of scans
;DS: number of dummy scans, >= 32
;td1: number of chunks to acquire
;FnMODE1: QF
;FnMODE2: Echo-Antiecho
;gpz1: 80%
;gpz2: 20.1% for C-13, 8.1% for N-15
;gpz3: purging gradient (15%)
;gpz4: purging gradient (11%)
;gpz5: CTP gradient (18%)
;gpz6: slice selection gradient
;
;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
;gpnam3: SINE.100
;gpnam4: SINE.100
;gpnam5: SINE.100
```

8.1.8. Valós idejű, Zangger-Sterk szélessávú protonlecsatolt CPMG-HSQMBC

```
;ek_ti_rt_zs_cpmg_hsqmbc2D
;
;Zangger-Sterk based broadband homonuclear decoupled CPMG-HSQMBC with real-time acquisition
;using explicit acquisition dwellmode
;using digital mode acquisition
;avance-version - Avance II, AQS system, SADC digitizer, RX22 receiver, TopSpin 2.1
;
;used for precise determination of long-range heteronuclear coupling constants
;phase sensitive using Echo/Antiecho gradient selection
;using CPMG for polarization transfer to avoid evolution of J(HH)
;using composite 13C and 1H 180 pulses in CPMG
;using Zangger-Sterk based broadband proton-proton decoupling scheme
;with no decoupling during acquisition

#include <Avance.incl>
#include <Delay.incl>
#include <Grad.incl>
#include <De.incl>
```

```

define loopcounter count
define delay dwell

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"d0=3u"
"d11=30m"
"d13=3u"
"d7=d13+p16+d16+13u"
"d20=p16+d16+p2+d0*2+5u"

"in0=inf1/2"

"d19=dw*112"
"l11=(0.5*decim*112/2)"
"l13=(112*decim*0.5)"
"count=(aq/d19)-1"
"dwell=(dw/decim)"

;;dwellmode explicit

1 ze
  d11

2 d1 do:f2
  d11

3 d11

4 15u rpp27 ;reset phase pointers before each transient
  15u rpp28

  15u rp28 ;reset phase ph28 to original value

  15u ip27*2 ;phase ph27 inverted at every other scan (1H 180)

  15u iu2 ;l2 = 0 initial value, l2 = 1, 2, 3, or 4 depending on the actual value of NS
  if "l2 <= 4" goto lab1
  15u ru2 ;l2 'scan counter' dependent - varies between 1 - 4
  15u iu2

  lab1, 15u

  if "l2 >=3" goto lab2
  15u ip28*2

  lab2, 15u ip28*2 ;phase ph28 (selective 1H-180) inverted at every 3rd and 4th scan

5 d11 pl1:f1
  (p1 ph1)

6 d15 pl2:f2 ;CPMG-sequence for polarization transfer with XY-16 phase cycle
  (p1 ph20) (p3 ph20):f2
  3u
  (p2 ph21) (p4 ph21^):f2 ;^ increment phase pointer of ph21
  3u
  (p1 ph20) (p3 ph20^):f2 ;^ increment phase pointer of ph20 - composite 1H, X pulse
  d15 ;d15=140-150us (d15=140-150us is good for suppression of J(HH) evolution)

```

lo to 6 times l1 ;p1 should be calibrated to p1=p3 at p1!!!
 ;l1= multiple of 16!!!!
 ;long-range coupling evolution = (2*d15+2*p4+6)*l1 (ca. 50-90 ms)

(p1 ph2)
 d13 UNBLKGRAD
 p16:gp3 ;gpz3=19
 d16
 (p3 ph3):f2
 d0
 (p2 ph5)
 d0
 5u
 p16:gp1 ;gpz1=80
 d16

(p3 ph14):f2 ;comp. X 180 pulse
 (p4 ph4):f2
 (p3 ph14):f2

d20
 (p3 ph4):f2
 d13
 p16:gp4 ;gpz4=11
 d16

(p1 ph22)
 d7
 5u
 (p2 ph23)
 5u
 d13
 p16:gp2*EA
 d16

6.5u p10:f1
 6.5u gron21
 (p12:sp12 ph24):f1
 6.5u groff
 6.5u BLKGRAD

ACQ_START(ph30,ph31) ;detection of first half chunk

20u REC_UNBLK
 20u syrec
 7 dwell DWL_CLK_ON
 dwell DWL_CLK_OFF
 lo to 7 times l11
 20u REC_BLK
 20u sytra
 8 10u p11:f1
 10u UNBLKGRAD
 p17:gp16
 d16
 5u
 (p2 ph27)
 5u
 p17:gp16
 d16 ipp27

```

100u

p17:gp17
d16
5u pl0:f1
5u gron21
(p12:sp12 ph28):f1
5u groff
5u ipp28
p17:gp17
d16 BLKGRAD

9      20u REC_UNBLK      ;detection of chunks
      20u syrec
10 dwell DWL_CLK_ON
      dwell DWL_CLK_OFF
lo to 10 times l13
      20u REC_BLK
      20u      sytra

11      10u p11:f1
      10u UNBLKGRAD
      p17:gp16
      d16

      5u
      (p2 ph27)
      5u
p17:gp16
      d16 ipp27

      100u

      p17:gp17
      d16
      5u pl0:f1
      5u gron21
      (p12:sp12 ph28):f1
      5u groff
5u ipp28
      p17:gp17
      d16 BLKGRAD

lo to 9 times count

12 20u REC_UNBLK      ;detection of last half chunk
      20u syrec
13 dwell DWL_CLK_ON
      dwell DWL_CLK_OFF
lo to 13 times l11
      20u REC_BLK
      20u      sytra

      50u
      ryc=2

d1 do:f2 mc #0 to 2
      F1EA(igrad EA, id0)

14      exit

```

ph1=0
ph2=1
ph20=1 2 1 2 2 1 2 1 3 0 3 0 0 3 0 3
ph21=0 1 0 1 1 0 1 0 2 3 2 3 3 2 3 2
ph3=0 0 2 2
ph4=0 0 0 0 2 2 2 2
ph14=1 1 1 1 3 3 3 3
ph5=0
ph22=0
ph23=0
ph24=0
ph27=0 1 0 1 1 0 1 0 2 3 2 3 3 2 3 2
ph28=0 1 0 1 1 0 1 0 2 3 2 3 3 2 3 2

ph30=0
ph31=0 0 2 2 2 2 0 0

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;sp12: selective pulse power level
;spoffs12: selective pulse offset (0 Hz)
;spnam12: file name for selective pulse
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p12: selective 180 pulse width
;p16: homospoil/gradient pulse
;p17: gradient pulse [max. 0.5 ms]
;d0 : incremented delay [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d7: =d13+p16+d16+13u
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d13: short delay [3 usec]
;d15: interpulse delay [140-150 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recover [200 usec]
;d20: =p16+d16+p2+d0*2+5u
;i1: loop for CPMG
;i2: scan counter, initial value = 0!!!
;i12: loop for chunk time
;NS: number of scans
;DS: number of dummy scans, >= 32
;FnMODE: Echo-Antiecho
;gpz1: 80%
;gpz2: 20.1% for C-13, 32.38% for P-31, 15.257% for Sc-77, 8.1% for N-15
;gpz3: purging gradient (19%)
;gpz4: purging gradient (11%)
;gpz16: CTP gradient (31%)
;gpz17: CTP gradient (71%)
;gpz21: slice selection gradient
;
;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
;gpnam3: SINE.100
;gpnam4: SINE.100
;gpnam16: SINE.50
;gpnam17: SINE.50

8.1.9. Interferogram-típusú, PSYCHE szélessávú protonlecsatolt CPMG-HSQMBC

```

;ek_ti_psychc_cpmg_hsqmbc
;
;PSYCHE CPMG-HSQMBC
;pseudo 2D experiment used for precise and accurate determination of ;long-range heteronuclear coupling constants
;phase sensitive using Echo/Antiecho gradient selection
;using CPMG for polarization transfer to avoid evolution of J(HH)
;using composite X and 1H 180 pulses in CPMG
;using PSYCHE (Pure Shift Yielded by Chirp Excitation) approach for ;broadband homonuclear decoupling
;J(HH) is refocussed at the centre of chunk
;pseudo 2D data can be reconstructed using the 'pshift' macro available at http://nmr.chemistry.manchester.ac.uk
;
;This pulse sequence is part of the following publication:
;I. Timári, L. Szilágyi, K.E. Kövér:
;"PSYCHE CPMG-HSQMBC: An NMR spectroscopic method for precise and simple measurement of long-range
;heteronuclear coupling constants
;Chem. Eur. J. 2015, 21, 13939-13942."
;
;Further relevant publications:
;I. Timári, T.Z. Illyés, R.W. Adams, M. Nilsson, L. Szilágyi, G.A. ;Morris, K.E. Kövér, Chem. Eur. J. 2015
;K.E. Kövér, G. Batta, K. Fehér, J. Magn. Reson. 2006, 181, 89-97.
;M. Foroozandeh, R.W. Adams, N.J. Meharry, D. Jeannerat, M. Nilsson, ;G.A. Morris, Angew. Chem. Int. Ed. 2014, 53,
;6990-6992.
;M. Foroozandeh, R.W. Adams, M. Nilsson, G.A. Morris, J. Am. Chem. Soc. ;2014, 136 (34), 11867-11869.
;
;Bruker Avance II version, January 30, 2015
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

define delay tauA
define delay tauB

"in10=inf1/2"
"in0=inf2/2"

"d10=0"
"d0=3u"

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"

"d11=30m"
"d13=3u"
"d7=d13+p16+d16+4u"
"d20=p16+d16+p2+d0*2"

"tauA=in10/2-p18-d18-50u"
"tauB=(dw*2*cnst4)+d18+50u"

aqseq 312

```

```

1 ze
2 d1 do:f2
  d11 pl1:f1
3 p1 ph1

4 d15 pl2:f2          ;CPMG-sequence for polarization transfer with XY-16 phase cycle
  (p1 ph20) (p3 ph20):f2
  3u
  (p2 ph21) (p4 ph21^):f2  ;^ increment phase pointer of ph21
  3u
  (p1 ph20) (p3 ph20^):f2  ;^ increment phase pointer of ph20 - composite 1H, X pulse
  d15          ;d15=140-150us
  lo to 4 times l1      ;p1 should be calibrated to p1=p3 at pl1!!!
                        ;l1= multiple of 16!

                        ;long-range coupling evolution = (2*d15+2*p4+6u)*l1 (ca. 50-90 ms)

  (p1 ph2)
  d13 UNBLKGRAD
  p16:gp3
  d16
  (p3 ph3):f2
  d0
  p2 ph5
  d0
  p16:gp1
  d16

  (p3 ph14):f2      ;comp. X 180 pulse
  (p4 ph4):f2
  (p3 ph14):f2

  d20

  (p3 ph4):f2
  d13
  p16:gp4
  d16
  (p1 ph16)
  d7
  (p2 ph19)
  d13
  p16:gp2*EA
  d16
  4u

  d10          ;Incremented delay for broadband homonuclear decoupling protocol
  tauA
      50u
      p18:gp8

  d18
  p2 ph17
  50u
  p18:gp8
      d18
  tauA
      p19:gp9
      d19
  10u pl0:f1

```

```

tauB
10u
10u gron12
(p11:sp11 ph18):f1
10u
10u groff
d18
10u pl1:f1
p19:gp9
d19
50u BLKGRAD
d10 ;Incremented delay for broadband homonuclear decoupling protocol

5 go=2 ph31
30u
d1 do:f2 mc #0 to 2
F1QF(id10)
F2EA(rd10 & igrad EA, id0)

exit

ph1=0
ph2=1
ph20=1 2 1 2 2 1 2 1 3 0 3 0 0 3 0 3
ph21=0 1 0 1 1 0 1 0 1 0 2 3 2 3 3 2 3 2
ph3=0 2
ph4=0 0 2 2
ph14=1 1 3 3
ph5=0
ph16=0 0 0 0
ph19=1 1 1 1
ph17=0
ph18=0 0 0 0 1 1 1 1

ph31=0 2 2 0 2 0 0 2

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;sp11: selective pulse (PSYCHE chirp element) power level
;spoffs11: selective pulse offset (0 Hz)
;spnam11: file name for selective pulse
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse width
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse width
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse width
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse width
;p11: duration of PSYCHE chirp pulse element
;p16: homospoil/gradient pulse width
;p18: CTP gradient pulse width
;p19: CTP gradient pulse width
;d0 : incremented delay [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d7: =d13+p16+d16+4u
;d10: incremented delay, set initial value to 0 s
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d13: short delay [3 usec]
;d15: interpulse delay [140-150 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery [200 usec]
;d18: delay for homospoil/gradient recovery [1 msec]
;d19: delay for homospoil/gradient recovery [1 msec]
;d20: =p16+d16+p2+d0*2

```

```
;l1: loop for CPMG
;cnst4: number of points to drop when collecting FID
;NS: number of scans
;DS: number of dummy scans, >= 32
;td1: number of chunks to acquire
;FnMODE1: QF
;FnMODE2: Echo-Antiecho
;gpz1: 80%
;gpz2: 20.1% for C-13, 15.257% for Se-77, 8.1% for N-15
;gpz3: purging gradient (19%)
;gpz4: purging gradient (11%)
;gpz8: CTP gradient (49%)
;gpz9: CTP gradient (77%)
;gpz12: gradient under PSYCHE chirp pulse element (1-3 %)
;
;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
;gpnam3: SINE.100
;gpnam4: SINE.100
;gpnam8: SINE.100
;gpnam9: SINE.100
```

8.2. Tudományos publikációk

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények

Angol nyelvű közlemények nemzetközi folyóiratban:

1. István Timári, Lukas Kaltschnee, Andreas Kolmer, Ralph W. Adams, Mathias Nilsson, Christina M. Thiele, Gareth A. Morris, Katalin E. Kövér: **Accurate determination of one-bond heteronuclear coupling constants with “pure shift” broadband proton-decoupled CLIP/CLAP-HSQC experiments**
Journal of Magnetic Resonance, **2014**, 239, 130-138. (IF.: 2,510)
2. Lukas Kaltschnee, Andreas Kolmer, István Timári, Volker Schmidts, Ralph W. Adams, Mathias Nilsson, Katalin E. Kövér, Gareth A. Morris, Christina M. Thiele: **“Perfecting” pure shift HSQC: full homodecoupling for accurate and precise determination of heteronuclear couplings**
Chemical Communications, **2014**, 50, 15702-15705. (IF.: 6,834)
3. István Timári, Tünde Z. Illyés, Ralph W. Adams, Mathias Nilsson, László Szilágyi, Gareth A. Morris, Katalin E. Kövér: **Precise measurement of long-range heteronuclear coupling constants by a novel broadband proton-proton - decoupled CPMG-HSQMBC method**
Chemistry - A European Journal, **2015**, 21, 3472-3479. (IF. (2014.): 5,731)
4. Péter Király, Ralph W. Adams, Liladhar Paudel, Mohammadali Foroozandeh, Juan A. Aguilar, István Timári, Matthew J. Cliff, Mathias Nilsson, Péter Sándor, Gyula Batta, Jonathan P. Waltho, Katalin E. Kövér, Gareth A. Morris: **Real-time pure shift ¹⁵N HSQC of proteins: a real improvement in resolution and sensitivity**
Journal of Biomolecular NMR, **2015**, 62, 43-52. (IF. (2014.): 3,141)
5. István Timári, László Szilágyi, Katalin E. Kövér: **PSYCHE CPMG–HSQMBC: An NMR spectroscopic method for precise and simple measurement of long-range heteronuclear coupling constants**
Chemistry - A European Journal, **2015**, 21, 13939-13942. (IF. (2014.): 5,731)
6. István Timári, Lukas Kaltschnee, Mária H. Raics, Felix Roth, Nicholle G. A. Bell, Ralph W. Adams, Mathias Nilsson, Dušan Uhrín, Gareth A. Morris, Christina M. Thiele, Katalin E. Kövér: **Real-time broadband proton-homodecoupled CLIP/CLAP-HSQC for automated measurement of heteronuclear one-bond coupling constants**
RSC Advances, bírálóat alatt/under review

Az értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó közlemények

Angol nyelvű közlemények nemzetközi folyóiratban:

7. Mihály Herczeg, László Lázár, Zsuzsanna Bereczky, Katalin E. Kövér, István Timári, János Kappelmayer, András Lipták, Sándor Antus, Anikó Borbás: **Synthesis and anticoagulant activity of bioisosteric sulfonic acid analogues of the antithrombin-binding pentasaccharide domain of heparin**

Chemistry - A European Journal, **2012**, 18, 10643-10652. (IF.: 5,831)

8. Attila Borics, Jayapal Reddy Mallareddy, István Timári, Katalin E. Kövér, Attila Keresztes, Géza Tóth: **The effect of Pro² modifications on the structural and pharmacological properties of endomorphin-2**

Journal of Medicinal Chemistry, **2012**, 55, 8418-8428. (IF.: 5,614)

9. Magdolna Csávás, Tamás Demeter, Mihály Herczegh, István Timári, Katalin E. Kövér, Pál Herczegh, Anikó Borbás: **Rapid synthesis of self-assembling 1,2-thiomannobioside glycoconjugates as potential multivalent ligands of mannose-binding lectins**

Tetrahedron Letters, **2014**, 55, 6983-6986. (IF.: 2,379)

10. Péter Bagi, Kinga Juhász, István Timári, Katalin E. Kövér, Dávid Mester, Mihály Kállay, Miklós Kubinyi, Tibor Szilvási, Péter Pongrácz, László Kollár, Konstantin Karaghiosoff, Mátyás Czugler, László Drahos, Elemér Fogassy, György Keglevich: **A study on the optical resolution of 1-isopropyl-3-methyl-3-phospholene 1-oxide and its use in the synthesis of borane and platinum complexes**

Journal of Organometallic Chemistry, **2015**, 797, 140-152. (IF. (2014.): 2,173)

11. Péter Bagi, Konstantin Karaghiosoff, Mátyás Czugler, Dóra Hessz, Mihály Kállay, Miklós Kubinyi, Tibor Szilvási, Péter Pongrácz, László Kollár, István Timári, Katalin E. Kövér, László Drahos, Elemér Fogassy, György Keglevich: **Synthesis, characterization and application of platinum(II) complexes incorporating racemic and optically active 1-phenyl-1,2,3,6-tetrahydrophosphinine ligand**

Heteroatom Chemistry, **2016**, 27, 91-101. (IF. (2014.): 1,076)

12. Péter L. Parajdi-Losonczy, Attila C. Bényei, Éva Kováts, István Timári, Tereza R. Muchova, Jana Kasparikova, Péter Buglyó: **[(η^6 -*p*-cym)Ru(H₂O)₃]²⁺ binding capability of aminohydroxamates – a solution and solid state study**

Journal of Inorganic Biochemistry, **2016**, 160, 236-245. (IF. (2014.): 3,444)

13. Krisztina Fehér, István Timári, Kinga Rákosi, János Szolomájer, Tünde Z. Illyés, Ádám Bartók, Zoltán Varga, György Panyi, Gábor K. Tóth, Katalin E. Kövér: **Probing pattern and dynamics of disulfide bridges using synthesis and NMR of an ion channel blocker peptide toxin with multiple diselenide bonds**
Chemical Science, **2016**, 7, 2666-2673. (IF. (2014.): 9,211)

Magyar nyelvű közlemények:

14. Timári István, Komáromi István, Fehér Krisztina, E. Kövér Katalin: **Heparin-analóg pentaszacharidok szerkezete és antitrombin III fehérjével való kölcsönhatása: NMR vizsgálatok és elméleti számítások**
Pro Scientia Aranyérmesek XI. Konferenciája, Konferenciakötet, Budapest, 2013, 119-123.

15. Gróf Pál, Knapp Krisztina, Schlosser Gitta, Nagy Tamás Milán, Timári István, Borics Attila, Kövér Katalin, Csík Gabriella, Majer Zsuzsa: **Diszulfidhidat tartalmazó ciklikus peptidok UV-besugárzásának hatására keletkező szabadgyökök és szulfhidril-csoportok detektálása**
Magyar Tudomány, **2016**, 177, 50-54.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 53,675

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora az értekezés témájához kapcsolódó közleményekre: 23,947

Az értekezés témakörében tartott előadások

1. Timári István, Illyés Tünde Zita, Szilágyi László, E. Kövér Katalin: **Információnyerés információvesztéssel avagy a szélessávú proton-lecsatolás alkalmazásai**

MTA NMR Munkabizottsági Ülés, 2013. május 9-10., Pécs

2. István Timári, Lukas Kaltschnee, Andreas Kolmer, Ralph W. Adams, Mathias Nilsson, Tünde Zita Illyés, László Szilágyi, Christina M. Thiele, Gareth A. Morris, Katalin E. Kövér: **Losing some sensitivity to gain more information or the novel applications of broadband proton-decoupling**

15th Austrian Chemistry Days, 2013. szeptember 23-26., Graz, Ausztria

3. **Timári István: Mágneses magrezonancia (NMR) módszerek fejlesztése szélessávú proton-lecsatolás beépítésével**

Debreceni Egyetem Hatvani István Szakkollégium Tavaszi Konferenciája, 2014. május 2-3., Debrecen

4. **Timári István, Batta Gyula, E. Kövér Katalin: Valós idejű szélessávú proton-lecsatolt, heteronukleáris NMR módszerek fejlesztése fehérjék vizsgálatára**

MTA Peptidkémiai Munkabizottsági Ülés, 2014. május 28-30., Balatonszemes

5. **Timári István, E. Kövér Katalin: Különféle szélessávú protonlecsatolt NMR módszerek összehasonlítása: előnyök és hátrányok**

MTA NMR Munkabizottsági Ülés, 2014. október 2-3., Balatonszemes

6. **Timári István, E. Kövér Katalin: Mágneses magrezonancia (NMR) módszerek fejlesztése, avagy hogyan készül az „NMR-szimfónia”**

Pro Scientia Aranyérmesek XII. Konferenciája, 2014. november 6-8., Eger

7. **Katalin E. Kövér, István Timári, Lukas Kaltschnee, Andreas Kolmer, Ralph W. Adams, Mathias Nilsson, Tünde Z. Illyés, László Szilágyi, Christina M. Thiele, Gareth A. Morris: Precise measurement of heteronuclear coupling constants: novel applications of broadband proton-proton decoupling**

Magnetic Moments in Central Europe 2015, 2015. február 25 - március 1., Krynica-Zdrój, Lengyelország

Az értekezés témakörében bemutatott poszterek

1. **István Timári, Lukas Kaltschnee, Andreas Kolmer, Ralph W. Adams, Mathias Nilsson, Christina M. Thiele, Gareth A. Morris, Katalin E. Kövér: Measuring one-bond heteronuclear coupling constants with improved resolution. Utilizing the potential of novel broadband proton-decoupled HSQC-based methods**

EUROMAR 2013 (European Magnetic Resonance Conference), 2013. június 30 - július 5., Hersonissos, Kréta, Görögország

2. **István Timári, Zita Tünde Illyés, Ralph W. Adams, Mathias Nilsson, László Szilágyi, Gareth A. Morris, Katalin E. Kövér: Highly accurate measurement of long-range heteronuclear coupling constants with a novel broadband proton-decoupled CPMG-HSQC method**

EUROMAR 2013 (European Magnetic Resonance Conference), 2013. június 30 - július 5., Hersonissos, Kréta, Görögország

3. Lukas Kaltschnee, Andreas Kolmer, István Timári, Ralph W. Adams, Mathias Nilsson, Katalin E. Kövér, Gareth A. Morris, Christina M. Thiele: **Pure Shift HSQC measurements with perfectBIRD decoupling – a method to decouple diastereotopic protons**

EUROMAR 2013 (European Magnetic Resonance Conference), 2013. június 30 - július 5., Hersonissos, Kréta, Görögország

4. Lukas Kaltschnee, Andreas Kolmer, István Timári, Ralph W. Adams, Mathias Nilsson, Katalin E. Kövér, Gareth A. Morris, Christina M. Thiele: **Pure Shift HSQC Measurements with perfectBIRD Decoupling – a Method to Decouple Diastereotopic Protons**

35th FGMR Discussion Meeting and Joint Conference of the German, Italian and Slovenian Magnetic Resonance Societies, 2013. szeptember 9-12., Frauenchiemsee, Németország

5. Lukas Kaltschnee, Andreas Kolmer, István Timári, Ralph W. Adams, Mathias Nilsson, Katalin E. Kövér, Gareth A. Morris, Christina M. Thiele: **Pure Shift HSQC measurements with perfectBIRD decoupling – a method to decouple diastereotopic protons**

SMASH 2013 (Small Molecule NMR Conference), 2013. szeptember 22-25., Santiago de Compostela, Spanyolország

6. István Timári, Gyula Batta, Katalin E. Kövér: **Real-time broadband proton-decoupled (pure shift) methods with efficient water suppression: sensitivity enhanced ^1H - ^{15}N HSQC and TROSY experiments of labelled and unlabelled proteins**

EUROMAR 2014 (European Magnetic Resonance Conference), 2014. június 29 - július 3., Zürich, Svájc

7. Lukas Kaltschnee, Andreas Kolmer, István Timári, Volker Schmidts, Ralph W. Adams, Mathias Nilsson, Katalin E. Kövér, Gareth A. Morris, Christina M. Thiele: **Applications of pure shift HSQC experiments with “perfectBIRD“ decoupling**

EUROMAR 2014 (European Magnetic Resonance Conference), 2014. június 29 - július 3., Zürich, Svájc

8. István Timári, Ralph W. Adams, Mathias Nilsson, Tünde Z. Illyés, László Szilágyi, Gareth A. Morris, Katalin E. Kövér: **Simple and precise measurement of heteronuclear coupling constants by novel broadband homonuclear decoupled NMR methods**

56th Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference (ENC), 2015. április 19-24., Pacific Grove, Kalifornia, USA

9. István Timári, Ralph W. Adams, Mathias Nilsson, Tünde Z. Illyés, László Szilágyi, Gareth A. Morris, Katalin E. Kövér: **Broadband homonuclear decoupled CPMG-HSQMBC methods for the precise and direct measurement of long-range heteronuclear coupling constants**

Central European NMR Symposium, 2015. szeptember 28., Linz, Ausztria

10. István Timári, Lukas Kaltschnee, Mária H. Raics, Felix Roth, Nicholle G. A. Bell, Ralph W. Adams, Mathias Nilsson, Dušan Uhrín, Gareth A. Morris, Christina M. Thiele, Katalin E. Kövér: **Real-time broadband proton-homodecoupled CLIP/CLAP-HSQC for precise and automated measurement of heteronuclear one-bond coupling constants**

EUROMAR 2016 (European Magnetic Resonance Conference), 2016. július 3-7., Aarhus, Dánia