

Entwicklung und Optimierung schneller mehrdimensionaler NMR-Experimente

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Dipl. Phys. David Schulze Sünninghausen

aus

Villingen im Schwarzwald

KIT-Dekan: Prof. Dr. Willem Klopper

Referent: Prof. Dr. Burkhard Luy

Koreferent: Prof. Dr. Mirko Bunzel

Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2016

Diese Arbeit wurde in der Zeit vom 01.05.2011 bis zum 07.06.2016 am Institut für Organische Chemie des Karlsruher Instituts für Technologie unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Burkhard Luy durchgeführt.

Hiermit versichere ich, dass ich die von mir vorgelegte Arbeit selbstständig verfasst habe, dass ich die verwendeten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, entsprechend kenntlich gemacht habe.

Karlsruhe, den 08.06.2016

.....

(David Schulze Sünninghausen)

Publikationen

[1] T. S. Fischer, D. Schulze-Sünninghausen, B. Luy, O. Altintas, and C. Barner-Kowollik. Stepwise Unfolding of Single Chain Nanoparticles by Chemically Triggered Gates. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 55(37): 11276-11280, 2016.

[2] J. Scheuer, I. Schwartz, Q. Chen, D. Schulze-Sünninghausen, P. Carl, P. Höfer, A. Retzker, H. Sumiya, J. Isoya, B. Luy, M. B. Plenio, B. Naydenov, and F. Jelezko. Optically induced dynamic nuclear spin polarisation in diamond. *New J. Phys.*, 18: 013040, 2016.

[3] A. F. Hirschbiel, W. Konrad, D. Schulze-Sünninghausen, S. Wiedmann, B. Luy, B. V. K. J. Schmidt, and C. Barner-Kowollik. Access to Multiblock Copolymers via Supramolecular Host-Guest Chemistry and Photochemical Ligation. *ACS Macro Lett.*, 4: 1062-1066, 2015.

[4] O. Altintas, D. Schulze-Sünninghausen, B. Luy, and C. Barner-Kowollik. ABC-type Mikroarm Star Terpolymers Accessed by H-bonding Driven Supramolecular Self-Assembly. *Eur. Polym. J.*, 62: 409-417, 2015.

[5] J. Willenbacher, B. V. K. J. Schmidt, D. Schulze-Sünninghausen, O. Altintas, B. Luy, G. Delaittre, and C. Barner-Kowollik. Reversible Single-Chain Selective Point Folding via Cyclodextrin Driven Host/Guest Chemistry in Water. *Chem. Commun.*, 50: 7056-7059, 2014.

[6] D. Schulze-Sünninghausen, J. Becker, and B. Luy. Rapid Heteronuclear Single Quantum Correlation NMR Spectra at Natural Abundance. *J. Am. Chem. Soc.*, 136(4): 1242-1245, 2014.

[6] wurde mit dem Ernst-Award 2014 der Gesellschaft Deutscher Chemiker ausgezeichnet.

[7] O. Altintas, D. Schulze-Sünninghausen, B. Luy, and C. Barner-Kowollik. Facile Preparation of Supramolecular H-shaped (Ter)polymers via Multiple Hydrogen Bonding. *ACS Macro Lett.*, 2: 211-216, 2013.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	11
2	Allgemeine Einführung	15
2.1	Gradientenimpulse in der NMR-Spektroskopie	15
2.1.1	Das <i>Pulsed Field Gradient (PFG) Spin Echo (SE)</i>	17
2.2	Zweidimensionale NMR-Experimente	18
2.2.1	Das HMQC-Experiment	20
2.2.2	Der INEPT-Schritt	22
2.2.3	Das HSQC-Experiment	22
2.2.4	Das CLean InPhase (CLIP)-HSQC-Experiment	24
2.2.5	Das empfindlichkeitserhöhte HSQC-Experiment	25
2.2.6	Das multiplizitätseditierte HSQC-Experiment mit und ohne Empfindlichkeitserhöhung	27
2.2.7	Das empfindlichkeitserhöhte HSQC-TOCSY-Experiment	29
2.2.8	Das CLIP-RESET-HSQC	31
2.3	Weitere experimentelle Techniken	32
2.4	Hartmann-Hahn-Transfer	32
2.4.1	DIPSI-2-Mischsequenz	33
2.4.2	BIRD-Filter	34
2.4.3	Non Uniform Sampling (NUS)	36
2.5	Schnelle Heteronucleare NMR-Experimente	37
2.5.1	Longitudinale (T_1)-Relaxation	37
2.5.2	Bedeutung der T_1 -Relaxation in der NMR-Spektroskopie	38
2.5.3	Ernst-Winkel-NMR	39
2.5.4	SOFAST-HMQC	40
2.5.5	<i>single scan</i> -HSQC	41
2.5.6	Das Cost-HSQC	43
2.5.7	Fast-HMQC	45
2.5.8	ALSOFAST-HMQC und ASAP-HMQC	47
2.5.9	Kurzer Überblick der neu entwickelten Ansätze	51

3	Material und Methoden	53
3.1	NMR-Spektrometer und Software	53
3.2	Verwendete Proben	53
3.3	Allgemeine Angaben zu den gezeigten Impulssequenzen	54
3.3.1	Experimentelle Parameter	54
3.3.2	Übersicht der verwendeten Radiofrequenzimpulse	55
3.3.3	Allgemeine Angaben zur Prozessierung der Spektren	56
3.3.4	Angaben zu den Berechnungen im Produktoperatorformalismus	56
3.3.5	Betrachtung des Energieeintrags	57
4	Ergebnisse und Diskussion	59
4.1	Auswirkung der Mischsequenz	59
4.2	Konventionelles HSQC-Experiment	61
4.3	ALSOFAST- und ASAP-HSQC-Sequenzen	65
4.3.1	Original ALSOFAST- und ASAP-HSQC	65
4.3.2	Vergleich zwischen ASAP-HSQC und konventionellem HSQC	70
4.3.3	Symmetrisiertes ALSOFAST- und ASAP-HSQC	71
4.4	ALSOFAST- und ASAP-HSQC-Sequenzen mit Breitbandimpulsen	75
4.5	Optimierung des INEPT-Transfers	77
4.6	Vergleich der beiden Sequenzen mit und ohne Breitbandimpulse	79
4.7	Vergleich von ASAP-HSQC und ASAP-HMQC	80
4.8	Vergleich von ASAP-HSQC und konventionellem HSQC	82
4.8.1	Menthol	82
4.8.2	Norcamphor	82
4.9	ASAP-HSQC zur Untersuchung von wässrigen Proben	85
4.10	Multiplizitätseditierte ALSOFAST- und ASAP-HSQC-Sequenzen	88
4.10.1	Ernst-Winkel Berechnung im multiplizitätseditierten HSQC	92
4.10.2	Vergleich der beiden Experimente	94
4.11	Kombination der ASAP-Experimente mit <i>Non Uniform Sampling</i>	95
4.11.1	ALSOFAST- und ASAP-HSQC	95
4.11.2	Multiplizitätseditiertes ALSOFAST- bzw. ASAP-HSQC	99
4.12	ASAP-CLIP-RESET-HSQC	101
4.12.1	Vergleich zwischen CLIP-ASAP-RESET, CLIP-RESET und CLIP- ASAP-HSQC	103
4.13	Optimierung der Empfindlichkeit des Experiments für Spektren mit hoher Auflösung in der ^{13}C -Dimension	106
4.13.1	ASAP-HMQC mit BIRD ^d -Filter während der t_1 -Periode	108
4.13.2	Vergleich zwischen BIRD ^d -ASAP-HMQC und ASAP-HMQC	113
4.13.3	LowCost-ASAP-HSQC mit empfindlichkeitserhöhtem Rücktransfer	115
4.13.4	Vergleich des LowCost-ASAP-HSQC und des BIRD ^d -ASAP-HMQC	121

4.14	Vergleich des ASAP-HSQC und des LowCost-ASAP-HSQC mit Empfindlichkeitserhöhung	122
4.15	LowCost-ASAP-HSQC mit BIRD ^r Filter	126
4.15.1	ω_1 -gekoppelte HSQC-Spektren von Norcamphor	132
4.16	LowCost-ASAP-HSQC-TOCSY	135
4.17	LowCost- <i>Constant-Time</i> -ASAP-HSQC mit empfindlichkeitserhöhtem Rücktransfer	139
5	Zusammenfassung	143
6	Anhang	149
6.1	Impulsprogramme für Spektrometer der Firma Bruker	149
6.1.1	Original ASAP- bzw. ALSOFAS-FAST-HSQC	149
6.1.2	Symmetrisiertes ASAP- bzw. ALSOFAS-FAST-HSQC	155
6.1.3	ASAP-HSQC mit optimierter Wasserunterdrückung	160
6.1.4	Multiplizitäteditiertes ASAP- bzw. ALSOFAS-FAST-HSQC auf Basis der originalen ASAP-HSQC-Sequenz	166
6.1.5	Multiplizitäteditiertes ASAP- bzw. ALSOFAS-FAST-HSQC auf Basis des symmetrisierten ASAP-HSQC	172
6.1.6	ASAP-CLIP-RESET	178
6.1.7	ASAP-HMQC mit BIRD ^d -Filter während t_1	184
6.1.8	LowCost-ASAP-HSQC mit empfindlichkeitserhöhtem Rücktransfer	190
6.1.9	BIRD ^r -LowCost-ASAP-HSQC mit empfindlichkeitsoptimiertem Rücktransfer	196
6.1.10	LowCost-ASAP-HSQC-TOCSY mit empfindlichkeitsoptimiertem Rücktransfer	202
6.1.11	CT-LowCost-ASAP-HSQC mit empfindlichkeitserhöhtem Rücktransfer	207

Kapitel 1

Einleitung

Die NMR (*Nuclear Magnetic Resonance* bzw. Kernspinresonanz)-Spektroskopie ist die wichtigste Methode zur Strukturaufklärung von Molekülen in Lösung mit atomarer Auflösung [1, 2]. Ihr Haupteinsatzgebiet findet sich in der Chemie bei der Untersuchung von gelösten Substanzen. Darüber hinaus erlaubt sie jedoch auch die Charakterisierung von Molekülen bzw. deren Eigenschaften und Funktionalitäten in der Biologie, der Biochemie, der Medizin und den Lebensmittel- und Materialwissenschaften [3–9]. Basierend auf den Wechselwirkungen der Atomkerne untereinander, sowie mit der Elektronenhülle, werden wertvolle Informationen über die Struktur von Molekülen gewonnen. Unter dem Aspekt der vorhandenen Auflösung ist die Interpretation der erhaltenen Spektren oftmals durch starke Überlagerung der Signale erschwert. Weiterhin ist die Empfindlichkeit der Methode eingeschränkt. Letztere wird vornehmlich durch die eingesetzte Spektrometerhardware, die vorhandene Probenmenge, die zur Verfügung stehende Messzeit, aber auch durch das verwendete Experiment bestimmt.

Technische Fortschritte wie beispielsweise hohe Magnetfeldstärken durch die Verwendung supraleitender Magneten, kryogen-gekühlte Probenköpfe und hyperpolarisierte Proben konnten die Empfindlichkeit und Auflösung von NMR-Experimenten erheblich verbessern.

Ein Meilenstein in der Bewältigung dieser komplexen Problematik wurde jedoch auch mit der Entwicklung mehrdimensionaler NMR-Experimente [10, 11] erzielt.

Mehrdimensionale Experimente liefern eine hohe Auflösung der Spektren durch Aufspaltung der Signale von wechselwirkenden Kernen entlang unterschiedlicher Frequenzachsen. Diese zusätzliche Information wird durch Inkrementierung einer Zeitperiode, bei gleichzeitiger Repetition der Sequenz des Experiments gewonnen. Je höher die Zahl n der Inkremente, desto größer die spektrale Auflösung in der zusätzlichen Dimension. Zusätzlich steigt auch das Signal-zu-Rausch-Verhältnis um den Faktor \sqrt{n} an.

Ein mehrdimensionales Experiment setzt sich aus einer Vielzahl eindimensionaler Experimente zusammen, die am Spektrometer nacheinander ausgeführt werden. Zwischen diesen eindimensionalen Experimenten muss eine Wartezeit eingehalten werden, um sicherzustellen, dass sich das Spinsystem des zu vermessenden Moleküls vor dem nächsten Durchlauf der Sequenz wieder im thermischen Gleichgewicht befindet. Die Wartezeit sollte ein Vielfaches

$(3 - 5 \cdot T_1)$ der longitudinalen Relaxationszeit (T_1) betragen. Für kleine Moleküle liegt die T_1 -Zeit im Bereich von einigen Sekunden. Zu einem gewissen Teil kann diese Zeit genutzt werden, um den freien Induktionszerfall (*Free Induction Decay* (FID)) zu detektieren. Diese Zeitdauer ist jedoch häufig durch den hohen Energieeintrag heteronuklearer Entkopplung während der Aufnahme begrenzt. Die Dauer des übrigen Teils eines NMR-Experiments ist vergleichsweise kurz. NMR-Experimente bestehen also hauptsächlich aus der Wartezeit zwischen zwei aufeinanderfolgenden *scans*. Wählt man diese Zeit zu kurz, führt das in konventionellen Experimenten zu einer erheblichen Reduktion des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses. Weiterhin entstehen Artefaktsignale, die die Interpretation der Spektren erschweren oder gar unmöglich machen.

Die Beschleunigung der Aufnahme mehrdimensionaler NMR-Experimente ist dabei äußerst wünschenswert. Sie kann die Verfolgung kinetischer Prozesse einer chemischen Reaktion ermöglichen, weiterhin können Messungen an chemisch instabilen Substanzen durchgeführt werden und ganz generell wird die teure Spektrometerzeit effizienter genutzt. Auch die Auswirkungen von Spektrometerinstabilitäten sind durch die kürzere Messzeit geringer [12, 13]. Aktuell gibt es daher mehrere unterschiedliche Ansätze zur Reduktion der Aufnahmezeit von NMR-Spektren. Die ULTRAFast-Technik [14] ermöglicht die Aufnahme zweidimensionaler NMR-Spektren in einem einzelnen *scan*. Damit stellt sie derzeit die schnellste Methode dar. Durch Magnetfeldgradienten wird die NMR-Probe in Scheiben unterschiedlicher Resonanzfrequenzen unterteilt, die getrennt voneinander angeregt werden können. Eine Wartezeit zwischen den einzelnen Anregungsschritten muss nicht eingehalten werden. Allerdings wird technisch bedingt die Empfindlichkeit des Experiments durch rückgefaltetes Rauschen massiv eingeschränkt [15, 16]. Weiterhin ist es hinsichtlich Bandbreite und digitaler Auflösung limitiert [17]. In BEST-Experimenten [18–20] ist die longitudinale Relaxation durch bandselektive Anregung beschleunigt. SOFAST-Experimente [21–24] machen sich zusätzlich Ernst-Winkel-Anregung [25] zu Nutze. Beide Techniken basieren jedoch auf schneller T_1 -Relaxation und Isotopenmarkierung und sind daher auf Proteine und Nukleinsäuren in der biologisch orientierten NMR beschränkt. Durch bandselektive Anregung kann außerdem nicht der gesamte ^1H , ^{13}C -Frequenzbereich in einem Experiment abgedeckt werden. Dagegen ermöglichen ALSOFAST- (ALternate SOFAST) [26] und ASAP-HMQC [27] (*Acceleration by Sharing Adjacent Polarization-Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*) die beschleunigte Aufnahme vollständiger ^1H , ^{13}C -Korrelationsspektren, auch bei kleineren Molekülen mit natürlicher Isotopenhäufigkeit. Aus diesem Grund dienen die zwei letztgenannten Ansätze als Vorlage, für die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Experimente.

Ein HMQC-Experiment zeigt die Korrelation der ^{13}C -Isotope zu direkt-gebundenen Wasserstoffatomen. ^{13}C ist (im Gegensatz zum hauptsächlich vorliegenden Isotop ^{12}C) NMR-aktiv, die natürliche Häufigkeit beträgt jedoch nur 1,1 %. In einem herkömmlichen ^1H , ^{13}C -HMQC-Experiment wird die Magnetisierung aller passiven, nicht an ^{13}C -gebundenen Protonen herausgefiltert bzw. zerstört. ALSOFAST- und ASAP-HMQC ermöglichen es, diese Magnetisierung zu nutzen. Die Impulssequenzen sind so aufgebaut, dass die passiven Protonen effektiv nicht angeregt werden, sie verbleiben also im thermischen Gleichgewicht. Im

ALSOFAST-HMQC wird das Magnetisierungsreservoir verwendet um, analog zu den BEST oder SOFAST-Experimenten, die longitudinale Relaxation zu beschleunigen. Im ASAP-HMQC wird durch Anwendung einer Mischsequenz in einem Bruchteil der regulären Wartezeit, die Gleichgewichtsmagnetisierung auf die aktiven, ^{13}C -gebundenen Protonen übertragen. Die Wiederholrate kann dadurch erheblich erhöht werden. Ernst-Winkel-Anregung ermöglicht für beide Experimente eine weitere Erhöhung der Empfindlichkeit.

Neben dem HMQC ist auch das ^1H , ^{13}C -HSQC-Experiment (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) [28] eines der wichtigsten 2D-NMR-Experimente. Der Informationsgehalt des HSQC ist äquivalent zum HMQC. Allerdings besitzt das HSQC eine höhere spektrale Auflösung in der ^{13}C -Dimension [29]. In unübersichtlichen Spektrenbereichen kann dieser Vorteil entscheidend werden, um Signale eindeutig zuzuordnen zu können. Zusätzlich ermöglicht das HSQC-Experiment die Messung von $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplungen in der ^{13}C -Dimension und es kann einfach durch einen Multiplizitätseditierungsschritt ergänzt werden. Diese Punkte lieferten letztendlich die Motivation, eine HSQC-Sequenz zu entwickeln, die die Voraussetzungen für die Anwendung der ASAP-Technik erfüllt.

Die Grundlage dieser Arbeit stellte die Entwicklung und Optimierung von ASAP- und ALSOFAST-HSQC-Impulssequenzen dar. Zugehörige ^1H , ^{13}C -Korrelationsspektren können in weniger als 30 Sekunden aufgenommen werden. Auf eine genauere Betrachtung der Impulssequenz, anschließender Optimierungsansätze und Vergleiche der erhaltenen Spektren wird in den folgenden Kapiteln eingegangen. Mit *Non Uniform Sampling* (NUS) [30, 31] wurde schließlich bei der Experimentoptimierung eine weitere außergewöhnliche Technik zur Reduktion von Experimentdauern in der NMR-Spektroskopie angewandt. Die ASAP- und ALSOFAST-Experimente können ohne Weiteres mit dieser Methode kombiniert werden, um die Aufnahme zusätzlich zu beschleunigen. Die erzielten Experimentzeiten liegen im Bereich von wenigen Sekunden. Sie sind daher vergleichbar mit der Dauer herkömmlicher schneller ^1H -1D-Experimente. Zusätzlich wurden die Sequenzen mit speziell optimierten Breitbandimpulsen [32, 33] erweitert, die durch Verwendung des GRAPE-Algorithmus [34] im Rahmen der optimalen Steuerungstheorie erhalten wurden. Beispiele sind *Broadband Excitation* (BEBOP) [35–39], *Broadband Inversion* (BIBOP) [40, 41], *Universal Rotation* (BURBOP) [42–46] und weitere Impulse [47–53], die bereits zeitgemäß in der NMR-Spektroskopie verwendet werden [38, 54–61].

Die ASAP- und ALSOFAST-HSQC-Experimente bilden schließlich die Grundlage für die Entwicklung weiterer, nützlicher Experimente. Abgesehen von zwei unterschiedlichen Versionen des ASAP- und ALSOFAST-HSQC wird in dieser Arbeit eine Variante der Experimente mit Multiplizitätseditierung vorgestellt. Außerdem wird eine Modifikation der Impulssequenz gezeigt, die eine verbesserte Lösungsmittelunterdrückung bei der Untersuchung wässriger Proben ermöglicht.

Mit dem CLIP-ASAP-RESET-HSQC können breitbandig ^1H , ^1H -entkoppelte HSQC-Spektren in verkürzter Gesamtexperimentdauer aufgenommen werden.

Das präsentierte LowCost-ASAP-HSQC verwendet indessen einen modifizierten Magnetisierungstransferschritt, statt eines herkömmlichen INEPT [28]. Dadurch konnte die Emp-

findlichkeit des Experiments für hohe Auflösungen in der ^{13}C -Dimension weiter gesteigert werden. Es ermöglicht zugleich die Verwendung eines empfindlichkeitserhöhten Rücktransferschritts. Auch zu diesem Experiment werden weitere Varianten vorgestellt, das LowCost-ASAP-HSQC-TOCSY, das *Constant-Time* (CT)-LowCost-ASAP-HSQC sowie das BIRD^r-LowCost-ASAP-HSQC.

In der Einführung dieser Arbeit soll zunächst ein Überblick über schnelle und weitere moderne Techniken in der NMR-Spektroskopie gegeben werden. Darauf folgen im Ergebnisteil die einzelnen Optimierungsschritte der neu entwickelten HSQC-Sequenzen und der Einbau zusätzlicher Elemente, zur weiteren Vergrößerung des Anwendungsbereichs.

Kapitel 2

Allgemeine Einführung

In den folgenden Kapiteln werden einige grundlegende Techniken der modernen NMR-Spektroskopie vorgestellt, die in den später präsentierten Sequenzen von Bedeutung sind, bzw. verwendet wurden. Zusätzlich werden aktuelle NMR-Experimente vorgestellt, die für die neu entwickelten Sequenzen als Vergleich gedient haben. Schließlich wird eine Übersicht über aktuelle, schnelle Impulstechniken in der NMR-Spektroskopie gegeben und auf deren Vor- und Nachteile eingegangen.

2.1 Gradientenimpulse in der NMR-Spektroskopie

In der hochauflösenden NMR-Spektroskopie ist in der Regel eine besonders hohe Homogenität des Magnetfelds \vec{B}_0 erforderlich, da diese maßgeblich die Auflösung der NMR-Spektren beeinflusst. Inhomogenitäten führen zu Linienverbreiterungen der Signale.

Neuere NMR-Experimente nutzen dagegen teilweise Magnetfeldgradienten bekannter Stärke, die, zumeist als kurze Pulse angelegt, eine Ortsauflösung über das Probenvolumen liefern können. Weiterhin können Gradienten als Alternative zu der Verwendung von Phasenzyklen eingesetzt werden, um gewünschte Kohärenztransferwege zu selektieren oder um unerwünschte Magnetisierungen zu dephasieren. Das hat unter Umständen eine erhebliche Zeitersparnis zur Folge.

Die Verwendung von Phasenzyklen erfordert eine mehrfache Wiederholung der Experimente unter Variation bestimmter Impulsphasen und der Empfängerphase. Die separat aufgenommenen Datensätze werden schließlich additiv kombiniert, so dass sich die Magnetisierung der gewünschten Kohärenzen aufsummiert, während sich die ungewünschten Kohärenzen auslöschten [62]. Ein bedeutender Vorteil der Gradientenselektion ist, dass in der Regel nur ein einzelner *scan* aufgenommen werden muss. Das ist allerdings nur dann von Vorteil, wenn die äußeren Bedingungen nicht ohnehin die Akkumulation mehrerer Experimente erfordern, um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu steigern. Diese werden durch die Wahl des Experiments, die Empfindlichkeit der detektierten Kernsorte, die Probenkonzentration, oder die gegebene Magnetfeldstärke des NMR-Geräts definiert. Ein Nachteil der Gradientenselektion ist, dass im Gegensatz zur Kohärenzordnungselektion mittels Phasenzyklen, nur ein Kohärenzordnungs-

pfad selektiert werden kann. Das hat für jeden *scan* eine Reduktion der Empfindlichkeit um mindestens den Faktor zwei zur Folge [63].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Experimente entwickelt und verwendet die sich Gradientenselektion zu Nutze machen. Phasenzyklen wurden lediglich angewandt um eine weitere Artefaktsignalunterdrückung zu erreichen.

Bei Anlegen eines Gradienten G in Richtung des äußeren Magnetfelds z , gilt für das ortsabhängige Magnetfeld $B(z)$ entlang des aktiven Volumens des Probenröhrchens

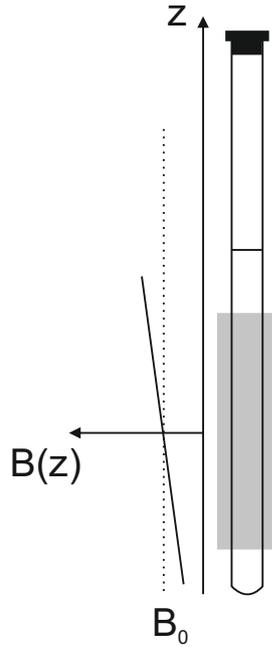


Abbildung 2.1: Linearer Magnetfeldgradient G in Richtung der z -Achse, entlang derer auch das Probenröhrchen orientiert ist. Abhängig von ihrer z -Koordinate erfahren die Spins in der Probe ein unterschiedliches Magnetfeld $B(z)$ und präzedieren dadurch mit der ortsabhängigen Frequenz $\omega(z)$. Dies führt zu einer homogenen Linienverbreiterung. Abbildung gemäß [64].

$$B(z) = B_0 + Gz. \quad (2.1)$$

Abhängig von ihrer z -Koordinate erfahren chemisch-äquivalente Kernspins ein unterschiedliches Magnetfeld. Daraus resultiert ebenso eine Ortsabhängigkeit

$$\omega(z) = \omega_0 - \gamma Gz \quad (2.2)$$

der Larmorfrequenz. Der ortsabhängige Phasenfaktor $\Phi(z)$, der sich durch einen Gradientenimpuls der Länge τ ergibt, ist durch

$$\Phi(z) = -p\gamma Gz\tau \quad (2.3)$$

gegeben [64]. Bei p handelt es sich um die während des Gradienten vorliegende Kohärenzordnung. Damit sich N Gradienten in ihrer Wirkung, die sich in der Phase $\Phi(z)$ widerspiegelt,

aufheben, muss die Refokussierungsbedingung

$$\sum_{i=1}^N \Phi_i = 0 \quad (2.4)$$

erfüllt sein.

Kohärenzen, für die die Refokussierungsbedingung nicht erfüllt ist, werden durch die Gradienten abgeschwächt oder vollständig eliminiert. In dem folgenden Kapitel soll ein konkretes Anwendungsbeispiele von Gradienten in der NMR-Spektroskopie vorgestellt werden.

2.1.1 Das Pulsed Field Gradient (PFG) Spin Echo (SE)

Die Bandbreite von Impulsen, im Speziellen von Rechteckimpulsen, ist limitiert. Als Beispiel ist bei einem 180° -Impuls der spektrale Bereich, in dem die Spins eine exakte Rotation um 180° erfahren, eingeschränkt. Durch den unvollständigen Transfer wird zum einen das Signal-zu-Rausch-Verhältnis an den Spektrenrändern verringert und zum anderen wird die Entstehung von Artefaktsignalen begünstigt. Eine Methode um dieses Problem zu minimie-

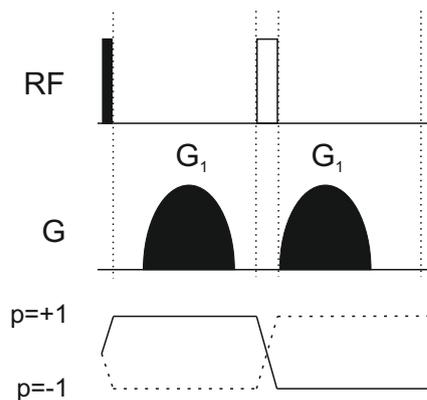


Abbildung 2.2: Pulsed Field Gradient (PFG) Spin Echo (SE)-Experiment. Der 90° -Impuls (schwarzer Balken) auf dem Radiofrequenzkanal (RF) erzeugt die Kohärenzordnungen $p = \pm 1$. Ein idealer 180° -Impuls (weißer Balken) bewirkt eine Inversion der Kohärenzordnung. Die Kohärenzordnung vor dem 180° -Impuls sei dabei p_A , die Kohärenzordnung nach dem 180° -Impuls p_B . Durch die zwei Gradientenimpulse (schwarze Halbellipsen) gleicher Stärke G_1 und der Länge τ wird die Magnetisierung der Spins, die keine volle 180° -Rotation erfahren, dephasiert. Diese erfüllen nicht die Refokussierungsbedingung aus Gleichung 2.5.

ren ist die Verwendung von Breitbandimpulsen, die es ermöglichen eine größere Bandbreite gleichmäßig anzuregen. Weiterhin kann durch geeignetes Anlegen von Gradienten die ideale Wirkung von Impulsen gewährleistet werden. Im Pulsed Field Gradient (PFG) Spin Echo (SE)-Experiment [65] (Abb. 2.2), wird der Anteil der transversalen Magnetisierung, welcher keine volle 180° -Rotation erfährt, durch die Gradienten dephasiert.

Ein idealer 180° -Impuls bewirkt eine Inversion der Kohärenzordnung. Stellt p_A die Kohä-

renzordnung vor und p_B die Kohärenzordnung nach dem 180° -Impuls dar, ist die Refokussierungsbedingung

$$\sum_{i=1}^2 \Phi_i = -p_A \gamma G z \tau - p_B \gamma G z \tau = 0 \quad (2.5)$$

durch

$$p_A = -p_B. \quad (2.6)$$

erfüllt. Durch das Gradientenpaar können zwar Artefaktmagnetisierungen abgeschwächt, die Magnetisierungsverluste durch die imperfekte Rotation jedoch nicht kompensiert werden. Die Verwendung geeigneter Breitbandimpulse, die eine gleichmäßige Anregung über einen größeren Frequenzbereich ermöglichen, kann also einen Empfindlichkeitsgewinn mit sich bringen.

Die Impulssequenz aus Abb. 2.2 erhält also die Magnetisierung der Spins, welche eine ideale Rotation erfahren. Das gilt allerdings nur, wenn zwischen den beiden Gradienten keine Diffusion entlang der z -Achse stattgefunden hat.

2.2 Zweidimensionale NMR-Experimente

Der allgemeine Aufbau eines zweidimensionalen NMR-Experiments ist in Abb. 2.3 dargestellt. Im wesentlichen besteht es aus vier unterschiedlichen Bausteinen, der Präparation,

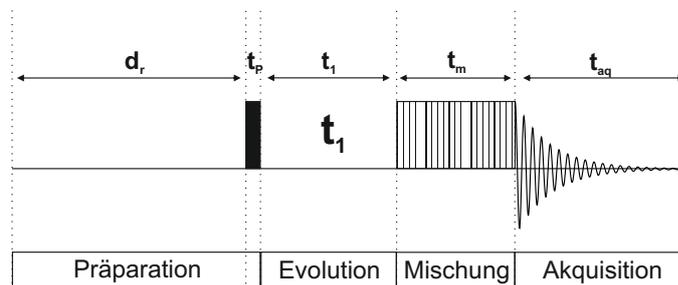


Abbildung 2.3: Allgemeiner Aufbau eines 2D NMR Experiments welches aus vier unterschiedlichen Bausteinen besteht. Der Präparation mit der Länge $d_r + t_p$, der Evolution mit der inkrementierten Länge t_1 , der Mischung mit der Länge t_m und der Akquisition der Länge t_{aq} .

der Evolution, der Mischung und der Aufnahme des freien Induktionszerfalls (Akquisition). Durch die Präparation (d_r) wird sichergestellt, dass sich das Spinsystem zu Beginn einer Messung im thermischen Gleichgewicht befindet. Außerdem wird die Gleichgewichtsmagnetisierung I_z durch einen Impuls oder eine Sequenz aus Impulsen angeregt (t_p). In der folgenden Evolutionsperiode entwickeln sich die Kernspins in einer inkrementierten Wartezeit t_1 unter dem statischen Magnetfeld und der Wechselwirkung untereinander. Die Mischperiode t_m dient dazu, Korrelationen benachbarter Kernspins zu entschlüsseln, welche über Dipol-Dipol- oder skalare Kopplungen miteinander wechselwirken. In der Akquisitionsperiode (t_{aq}) wird das Signal als freier Induktionszerfall detektiert.

Allgemein ist ein 2D-NMR-Experiment also aus einer Reihe von 1D-NMR-Experimenten aufgebaut. Diese unterscheiden sich dadurch, dass von einem zum nächsten Experiment die t_1 -Zeit inkrementiert wird. Durch Fouriertransformation in beiden Dimensionen werden Spektren erhalten, deren Signale verglichen zu einem 1D-Spektrum, entlang einer zusätzlichen Frequenzachse aufgespalten sind. Dadurch wird die spektrale Auflösung erhöht und macht in vielen Fällen erst eine zweifelsfreie Zuordnung der Signale möglich. Die Anzahl der aufgenommenen t_1 -Inkrementierungsschritte bestimmt die digitale Auflösung des Experiments in der zweiten Dimension bei vorgegebener spektraler Breite. Die Gesamtdauer t_{Exp} eines 2D-Experiments kann durch die Formel

$$t_{Exp} = ns \cdot \left(d_r + t_p + \sum_{t_1=t_1^0}^{t_1^{max}} t_1 + t_m + t_{aq} \right). \quad (2.7)$$

berechnet werden. t_1^0 ist die Dauer des ersten, t_1^{max} die Dauer des letzten Inkrementierungsschritts. ns stellt die Zahl der akkumulierten Experimente für jeden t_1 -Inkrementierungsschritt dar. Dadurch kann zum einen das Signal-zu-Rausch-Verhältnis erhöht werden, zum anderen können, unter Verwendung von Impulsphasenzyklen, bestimmte Kohärenztransferwege selektiert werden. Wie der Gleichung 2.9 aus Kapitel 2.2.2 zu entnehmen ist, hat eine Erhöhung der Zahl der *scans* um den Faktor n , eine maximale Erhöhung des Signal-zu-Rauschverhältnisses um den Faktor \sqrt{n} zur Folge. Dies gilt unter der Voraussetzung, dass die Erholzeit groß genug für einen vollständigen Wiederaufbau der Gleichgewichtsmagnetisierung eingestellt wurde.

Den Hauptanteil der Gesamtdauer eines 2D-Experiments macht im Allgemeinen die Summe aus Erholungs-*delay* d_r und Akquisitionszeit t_{aq} aus. d_r dient ausschließlich dem Wiederaufbau des thermischen Gleichgewichtszustands. Auch während der Akquisitionszeit findet longitudinale Relaxation und damit ein Wiederaufbau des thermischen Gleichgewichtszustands statt. Eine Verlängerung der Akquisitionszeit hat zusätzlich eine höhere digitale Auflösung zur Folge. Die erforderliche Wartezeit zur T_1 -Relaxation kann daher unter Umständen zur Verbesserung der spektralen Auflösung genutzt werden. In heteronuklearen Korrelationsexperimenten wird während der Datenaufnahme des freien Induktionszerfalls (engl. *free induction decay* bzw. FID) jedoch häufig der Heterokern zur Vereinfachung der Spektreninterpretation entkoppelt. Solche Entkopplungssequenzen erfordern einen hohen Energieeintrag und können deshalb zeitlich nur sehr begrenzt angewendet werden. Sie stellen einen limitierenden Faktor für die Länge der Akquisitionszeit dar.

Wird die Wartezeit d_r zu kurz gewählt, baut sich der Gleichgewichtszustand nur unzureichend auf. Dies führt zu einem geringeren Signal-zu-Rauschverhältnis und begünstigt zusätzlich die Entstehung von Artefaktsignalen im Spektrum. Die Auswertung solcher Spektren ist daher erschwert oder gar nicht möglich. Für eine weiterführende Betrachtung der T_1 -Relaxation sei auf Kapitel 2.5.1 verwiesen.

Einige der schnellen NMR-Experimente nutzen Methoden, die es möglich machen, die Wartezeit d_r und damit die Gesamtexperimentzeit zu reduzieren. Ihre Empfindlichkeit ist für kurze Erholungszeiten optimiert, während gleichzeitig die spektrale Artefaktbildung mög-

lichst gering bleibt. Die gängigen experimentellen Schemata um dies zu erzielen, sowie weitere Zeitsparmethoden, werden in Kapitel 2.5 dieser Arbeit vorgestellt. Im folgenden Teil dieses Kapitels werden einige wichtige zweidimensionale NMR-Experimente vorgestellt. Es werden zum größten Teil die Impulssequenzen gezeigt, die als Vergleich für die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Sequenzen verwendet wurden.

2.2.1 Das HMQC-Experiment

Das HMQC-Experiment (*Heteronuclear Multiple – Quantum Coherence Spectroscopy*) macht es möglich, Korrelationen zwischen Protonen und kovalent gebundenen Heterokernen sichtbar zu machen. Es besteht in seiner einfachsten Form aus vier Radiofrequenzimpulsen. In Abb. 2.4 ist die Impulssequenz eines HMQC-Experiments dargestellt. Der erste 90°-

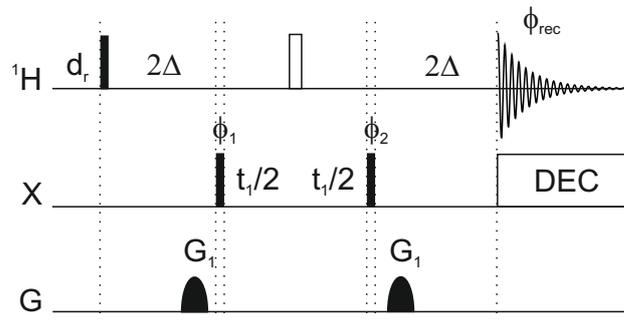


Abbildung 2.4: Impulssequenz des HMQC-Experiments [66]. Die beiden Gradienten G_1 dienen zur Verwirklichung eines idealen 180°-Impulses, siehe dazu Kapitel 2.1. Das Kopplungs-*delay* 2Δ wird auf die Länge $2\Delta = \frac{1}{2^1 J_{CH}}$ eingestellt. $^1J_{CH}$ stellt die skalare Kopplung zwischen ^1H - und ^{13}C -Kernspin über eine Bindung dar. Der vollständige Phasenzyklus lautet wie folgt: $\phi_1 = x, -x$; $\phi_2 = x, x, -x, -x$; $\phi_{rec} = x, -x, -x, x$. Während der Aufnahme des FID wird auf ^{13}C z.B. mit GARP [67] entkoppelt.

Impuls mit der Phase x erzeugt die transversale Protonenmagnetisierung $-I_y$, die sich in der folgenden Wartezeit 2Δ unter dem Einfluss skalarer Kopplung zum ^{13}C Kern zu

$$2I_x S_z$$

entwickelt. Durch den 180°-Protonenimpuls, in der Mitte der Sequenz, wird die Entwicklung der chemischen Verschiebung für Protonen bis zum Beginn der Aufnahme des FID refokussiert. Deshalb wird sie in dieser Berechnung nicht weiter betrachtet.

Die Einquanten-Antiphasemagnetisierung wird durch den ^{13}C -90°-Impuls mit der Phase $\phi_1 = x$ in die Multiquantenmagnetisierung

$$-2I_x S_y$$

umgewandelt. In der folgenden inkrementierten t_1 -Periode entwickelt sich die chemische Verschiebung der ^{13}C -Spins. Vor dem zweiten 90°-Impuls auf ^{13}C liegt damit die Magnetisierung

$$-2I_x S_y \cos(\omega_S t_1) - 2I_x S_x \sin(\omega_S t_1)$$

vor. Da die Magnetisierung beider Kernspins in der transversalen Ebene orientiert ist, entwickeln sich sowohl für Protonen als auch ^{13}C -Spins homonukleare Kopplungen, die durch den breitbandig eingestrahlten ^1H - 180° -Impuls nicht refokussiert werden. Liegen die ^{13}C -Kernspins in natürlicher Häufigkeit von 1,1% vor, ist der Effekt der ^{13}C - ^{13}C -Kopplungen vernachlässigbar. Die Entwicklung von ^1H , ^1H -Kopplungen während t_1 führt im Spektrum jedoch zu breiten Multiplettstrukturen in der ^{13}C -Dimension. Die homonukleare Kopplungsentwicklung wird in dieser Rechnung jedoch nicht berücksichtigt.

Der 90° -Impuls mit der Phase x erzeugt für den in t_1 cos-modulierten Anteil Antiphase-magnetisierung

$$-2I_x S_z \cos(\omega_S t_1) - 2I_x S_x \sin(\omega_S t_1).$$

Der sin-modulierte Anteil bleibt weiterhin Multiquantenmagnetisierung, die nicht detektiert werden kann und daher nicht zum gemessenen Signal beiträgt. In der folgenden Wartezeit 2Δ entwickelt sich die Antiphase-magnetisierung unter dem Einfluss skalarer Kopplung zu

$$-I_y \cos(\omega_S t_1),$$

also zu Protonen-Inphase-Magnetisierung. Diese beinhaltet jedoch die chemische Verschiebungsinformation des Heterokerns in Form einer Amplitudenmodulation.

Das Ergebnis dieses Experiments nach Fouriertransformation in beiden Dimensionen, liefert im Vergleich zu einem einfachen eindimensionalen Protonen NMR-Experiment also zusätzlich eine Aufspaltung der Resonanzen entlang der ^{13}C -Frequenzachse. Zusätzlich ist im Vergleich zu einem einfachen ^{13}C -1D-NMR-Experiment die Empfindlichkeit durch den Magnetisierungstransfer vom empfindlicheren Proton und dessen Detektion erheblich erhöht.

2.2.2 Der INEPT-Schritt

Jeder Atomkern mit einem von Null verschiedenen Kernspin \vec{I} besitzt ein magnetisches Moment und stellt damit einen magnetischen Dipol dar. Der Kernspin ist über das gyromagnetische Verhältnis γ mit dem magnetischen Dipolmoment $\vec{\mu}$ gekoppelt. Das wird durch die Gleichung

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{I} \quad (2.8)$$

beschrieben. Das gyromagnetische Verhältnis bestimmt also die Stärke der Wechselwirkung eines Kernspins mit einem externen Magnetfeld und damit dessen Empfindlichkeit.

Die wesentlichen Faktoren, die das Signal-zu-Rausch-Verhältnis $\frac{S}{N}$ in der NMR-Spektroskopie beeinflussen, sind in Gleichung

$$\frac{S}{N} = N \cdot \gamma_a \cdot \gamma_d^{\frac{3}{2}} \cdot B_0^{\frac{3}{2}} \cdot \sqrt{n} \cdot T_2 \cdot \frac{1}{T} \quad (2.9)$$

zusammengefasst. N steht dabei für die Anzahl der NMR-aktiven Kerne, die durch die Probenkonzentration, das Detektionsvolumen sowie die Isotopenhäufigkeit bestimmt ist. γ_a stellt das gyromagnetische Verhältnis des angeregten Kerns, γ_d das gyromagnetische Verhältnis des detektierten Kerns dar. B_0 ist die Stärke des externen Magnetfelds. n gibt die Zahl der Wiederholungen eines Experiments an, die am Ende aufaddiert werden. T_2 ist die transversale Relaxationszeit und T die Proben temperatur.

Im INEPT (*Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer*) [68] wird Polarisation von einem empfindlichen Kernspin mit hohem gyromagnetischen Verhältnis auf unempfindlichere Kerne mit niedrigerem gyromagnetischen Verhältnis übertragen. Damit stellt es einen wichtigen Baustein für viele heteronukleare Korrelationsexperimente dar, da die Empfindlichkeit durch den Transferschritt erheblich erhöht werden kann. Für einen Magnetisierungstransfer von ^1H - auf ^{13}C -Kernspins, kann nach Gleichung 2.9 durch den INEPT das $\frac{S}{N}$ -Verhältnis bis zu einem Faktor E von

$$\begin{aligned} E &= \frac{\gamma_H}{\gamma_C} \\ &= 3,98 \end{aligned}$$

gesteigert werden. Dabei wurden die gyromagnetischen Verhältnisse für ^1H γ_H und ^{13}C γ_C eingesetzt. Im folgenden Kapitel wird das HSQC-Experiment (*Heteronuclear Single – Quantum Coherence Spectroscopy*) vorgestellt. In der Impulssequenz wird ein INEPT für den Magnetisierungstransfer der Protonen auf direkt gebundene ^{13}C -Kernspins eingesetzt.

2.2.3 Das HSQC-Experiment

Das HSQC-Experiment (*Heteronuclear Single – Quantum Coherence Spectroscopy*) [28] entschlüsselt ebenfalls Korrelationen zwischen Protonen und kovalent gebundenen Heterokernen. Im Gegensatz zum HMQC-Experiment (Kapitel 2.2.1) liegt während der Aufnahme der indirekten Dimension (bzw. t_1 -Zeit) jedoch Einquantenmagnetisierung des Heterokerns

vor. Ein großer Vorteil dieses Experiments ist daher, dass sich während t_1 keine $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -Kopplungen entwickeln, die zu komplizierten Multipllettstrukturen führen und die die Auflösung in der indirekt detektierten Dimension verringern oder limitieren. An dieser Stelle soll das Experiment jedoch nur kurz erwähnt werden, für eine detaillierte Betrachtung mit Hilfe des Produktoperatorformalismus sei auf Kapitel 4.2 verwiesen. Abb. 4.4 zeigt den Aufbau einer HSQC-Impulssequenz. Zur Inversion der ^{13}C -Spins im INEPT- und Rücktransfer-Schritt kommen CHIRP-Impulse [69] zum Einsatz, die die Breitbandigkeit des Experiments erhöhen. Die dargestellte Impulssequenz diene als Vergleichsexperiment zu den im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelten Impulssequenzen. Im HSQC-Experiment kommt ein INEPT-Baustein

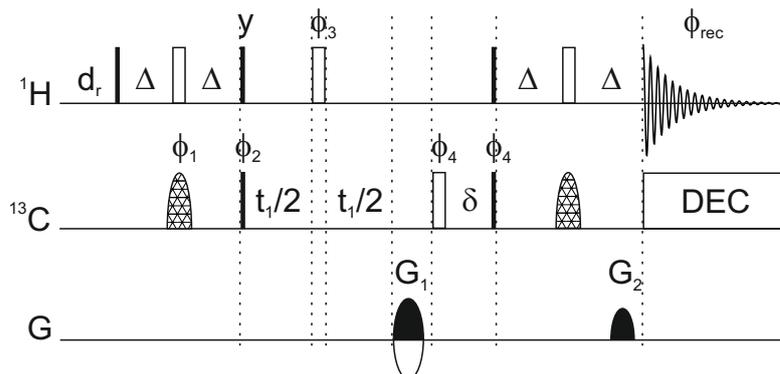


Abbildung 2.5: Impulssequenz eines konventionellen HSQC-Experiments [28]. Die Impulssequenz diene als Vergleichsexperiment, für die im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelten Experimente. Die Länge der Transferzeit $\Delta = \frac{1}{4^1 J_{CH}}$ im INEPT und im Rücktransferschritt wird auf eine mittlere Kopplungskonstante von $^1 J_{CH} = 145$ Hz eingestellt. Der vollständige Phasenzklus lautet wie folgt: $\phi_1 = x$; $\phi_2 = x, -x$; $\phi_3 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_4 = 4(x), 4(-x)$; $\phi_{rec} = x, -x, x, -x, -x, x, -x, x$. Echo-/Antiecho- und Kohärenzordnungsselektion wird erreicht, indem die Gradienten G_1 und G_2 in folgender Weise alterniert werden: $G_1 = (80\%, -80\%)$, $G_2 = (20, 1\%, 20, 1\%)$. Zusätzlich zum Echo-Antiecho-Aufnahmeschema werden die Phasen ϕ_1 und ϕ_2 zusammen mit der Empfängerphase ϕ_{rec} nach der TPPI-Methode invertiert. Weitere experimentelle Details zu den verwendeten Impulsen und der Entkopplung sind in Kapitel 3.3.1 zu finden.

zum Einsatz. Zusätzlich wird die Magnetisierung nach der inkrementierten Zeitperiode t_1 zurück auf die Protonenspins übertragen und als freier Induktionszerfall detektiert. Im Vergleich zu einem ^{13}C -1D-Spektrum kann das $\frac{S}{N}$ -Verhältnis also bis zu einem Faktor E von

$$\begin{aligned} E &= \frac{\gamma_H}{\gamma_C} \cdot \frac{\gamma_H^{\frac{3}{2}}}{\gamma_C^{\frac{3}{2}}} \\ &= 3,98 \cdot 3,98^{\frac{3}{2}} \\ &= 31,6. \end{aligned}$$

gesteigert werden. Dieser maximale Empfindlichkeitsgewinn kann auch in dem HMQC-Experiment aus Kapitel 2.2.1 erzielt werden. Da sowohl in HSQC als auch HMQC nur

Korrelationen über eine Bindung aufgelöst werden, erscheinen quartäre Kohlenstoffe jedoch nicht in den Spektren.

Im Gegensatz dazu werden in einem HMBC-Experiment (*Heteronuclear Multiple-Bond Connectivity*) [70] auch Korrelationen über mehrere Bindungen entschlüsselt.

2.2.4 Das CLIP-*InPhase* (CLIP)-HSQC-Experiment

Das CLIP-*(CLean InPhase)* HSQC-Experiment [59], dargestellt in Abb. 2.6, dient der Bestimmung von $^1J_{CH}$ -Kopplungen anhand der Dublettaufspaltung in der Protonendimension. Aus diesem Grund wird der ^{13}C -Kernspin während der Aufnahme des FID nicht entkoppelt. Im Gegensatz zum konventionellen HSQC-Experiment, wird im CLIP-HSQC direkt vor der Aufnahme des FID ein zusätzlicher 90° -Impuls auf dem ^{13}C -Kanal eingestrahlt. Dieser 90° -Impuls transferiert die restlich vorhandene Antiphase magnetisierung in nicht detektierbare Multiquantenmagnetisierung.

Da $^1J_{CH}$ -Kopplungen innerhalb eines Moleküls verschiedene Werte annehmen, muss das Transfer-*delay* Δ auf eine mittlere Kopplung eingestellt werden. Die Entwicklung in Inphase-Magnetisierung ist daher nicht über das gesamte Spinsystem vollständig. Die restlichen

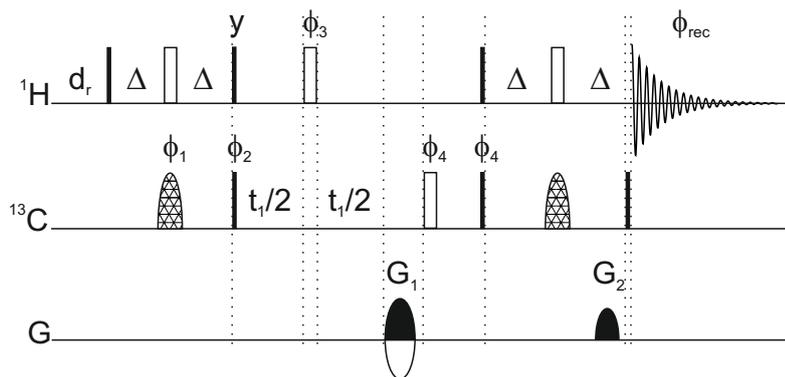


Abbildung 2.6: Impulssequenz eines CLIP-HSQC-Experiments zur Bestimmung von $^1J_{CH}$ -Kopplungen in der Protonendimension. Der 90° -Impuls auf dem ^{13}C -Kanal, der direkt vor der Akquisitionsperiode eingestrahlt wird, transferiert die restlich vorhandene Antiphase magnetisierung in nicht detektierbare Multiquantenmagnetisierung. Dadurch können Signalformverzerrungen in der ^1H -Dimension minimiert werden. Der vollständige Phasenzyklus lautet wie folgt: $\phi_1 = x$; $\phi_2 = x, -x$; $\phi_3 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_4 = 4(x), 4(-x)$; $\phi_{rec} = x, -x, x, -x, -x, x, -x, x$. Zu näheren Informationen bezüglich Impulsen, *delays*, Echo-/Antiechoselektion und Entkopplung sei auf Kapitel 3.3.1 verwiesen.

Antiphase-Anteile können sich während der Akquisition in Inphase-Magnetisierung entwickeln und führen damit zu Verzerrungen der Signalform. Diese erschweren die exakte Ermittlung der Kopplungskonstanten. Dagegen stellt das CLIP-HSQC-Experiment eine Ermittlung der $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -Kopplungskonstanten mit erhöhter Genauigkeit sicher.

2.2.5 Das empfindlichkeitserhöhte HSQC-Experiment

In der skizzierten Berechnung des HMQC-Experiments im Produktoperatorformalismus (Kapitel 2.2.1) wurde gezeigt, dass entweder die in t_1 sin- oder cos- modulierte Magnetisierungskomponente in detektierbare Magnetisierung transferiert wird. Das ist im HSQC-Experiment, unter Verwendung eines konventionellen Rücktransferschritts, ebenso der Fall. Im empfindlichkeitserhöhten HSQC-Experiment (Abb. 2.7) werden durch einen komplexeren Rücktransferschritt beide Magnetisierungskomponenten bis zur Aufnahme der direkten Dimension in Protonen-Inphase-Kohärenzen umgewandelt.

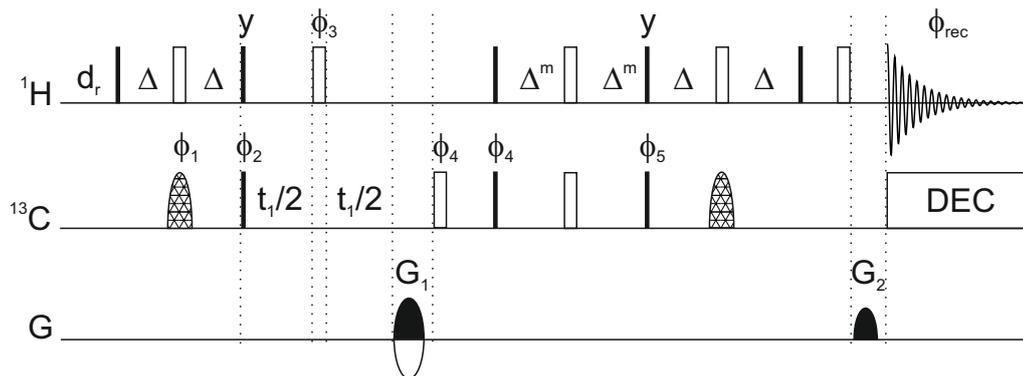


Abbildung 2.7: Impulssequenz eines HSQC-Experiments mit empfindlichkeitserhöhtem Rücktransferschritt [71–73], die in dieser Arbeit als Vergleichsexperiment diente. Die Länge der Transferzeit $\Delta = \frac{1}{4^1 J_{CH}}$ wird auf eine mittlere Kopplungskonstante von $^1J_{CH} = 145$ Hz eingestellt. Um die Empfindlichkeit für alle CH-Multiplizitäten zu erhöhen ist $\Delta^m = \frac{1}{8^1 J_{CH}}$ eingestellt, sollen lediglich die Signale der CH-Gruppen verstärkt werden, wird $\Delta^m = \frac{1}{4^1 J_{CH}}$ gewählt. Der vollständige Phasenzklus lautet wie folgt: $\phi_1 = x$; $\phi_2 = x, -x$; $\phi_3 = \phi_4 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_5 = 2(y), 2(-y)$; $\phi_{rec} = x, -x, -x, x$. Im Echo-/Antiecho-Aufnahmeschema wird zusätzlich die Phase ϕ_5 invertiert, außerdem werden die Phasen ϕ_1 und ϕ_2 zusammen mit der Empfängerphase ϕ_{rec} mit jedem t_1 -Inkrement nach der TPPI-Methode invertiert. Zu näheren Informationen bezüglich Impulsen, *delays*, Echo-/Antiechoselektion und Entkopplung sei auf Kapitel 3.3.1 verwiesen.

Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis kann dabei maximal um einen Faktor $\sqrt{2}$ gesteigert werden. Die Effizienz dieses Ansatzes hängt von der Multiplizität der ^{13}C Kerne ab. Über das Rücktransfer-*delay* Δ^m kann die Empfindlichkeit für die unterschiedlichen Multiplizitäten optimiert werden. Für $\Delta^m = \frac{1}{4^1 J_{CH}}$ wird lediglich für die Signale der CH-Gruppen maximale Empfindlichkeit erreicht, dies entspricht einer Steigerung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses um bis zu einem Faktor $\sqrt{2}$. Die Signale anderer CH_n -Multiplizitäten werden nicht verstärkt. Für $\Delta^m = \frac{1}{8^1 J_{CH}}$ werden alle Multiplizitäten verstärkt, jedoch nur für CH_2 -Gruppen mit maximaler Effizienz. Für eine detailliertere Betrachtung der Empfindlichkeitserhöhung im Produktoperatorformalismus sei auf Kapitel 4.13.3 dieser Arbeit verwiesen.

Ein Nachteil dieser Technik ist zum einen die gesteigerte Länge der Sequenz. Bei großen Molekülen mit kurzen transversalen Relaxationszeiten (T_2) kann das den Gewinn durch die Empfindlichkeitserhöhung verringern oder auch überkompensieren. Zudem können auch COSY Signale im Spektrum erscheinen.

2.2.6 Das multiplizitätseditierte HSQC-Experiment mit und ohne Empfindlichkeitserhöhung

Das multiplizitätseditierte HSQC bietet die Möglichkeit durch das Vorzeichen der Signale im Spektrum zwischen gerad- und ungeradzahigen CH-Multiplizitäten zu unterscheiden. Es lassen sich so CH- und CH₃-Gruppen von CH₂-Gruppen trennen. Der Editierungsschritt ist in der Impulssequenz in Abb. 2.8 mit einem grauen Kasten hinterlegt. Er besteht aus

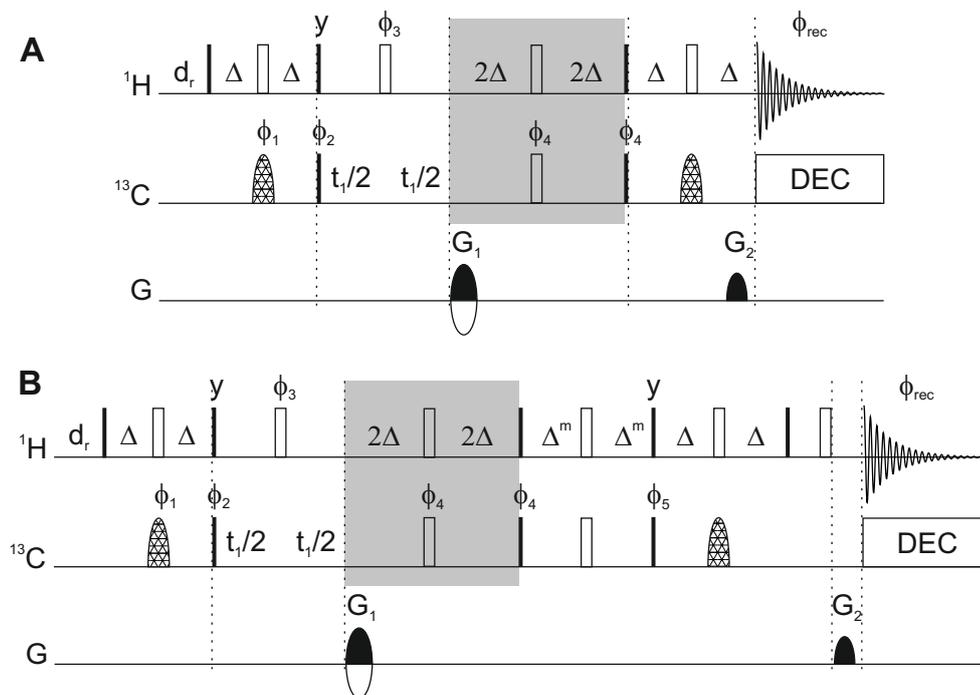


Abbildung 2.8: Impulssequenz eines multiplizitätseditierten HSQC-Experiments ohne (**A**) und mit empfindlichkeitserhöhtem Rücktransferschritt (**B**). Der Baustein zur Verwirklichung der Multiplizitätseditierung ist jeweils durch einen grauen Kasten gekennzeichnet. Er besitzt die Gesamtlänge $4\Delta = \frac{1}{\nu_{JCH}}$. Beide Sequenzen dienen im Rahmen dieser Arbeit als Vergleichsexperimente. Der vollständige Phasenzklus lautet wie folgt: $\phi_1 = x$; $\phi_2 = x, -x$; $\phi_3 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_4 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_5 = 2(y), 2(-y)$; $\phi_{rec} = x, -x, -x, x$. Im Echo-/Antiecho-Aufnahmeschema wird zusätzlich die Phase ϕ_5 invertiert, außerdem werden die Phasen ϕ_1 und ϕ_2 zusammen mit der Empfängerphase ϕ_{rec} mit jedem t_1 -Inkrement nach der TPPI-Methode invertiert. Zu näheren Informationen bezüglich Impulsen, *delays*, Echo-/Antiechoselektion und Entkopplung sei auf Kapitel 3.3.1 verwiesen.

einem Kopplungs-*delay* der Gesamtlänge $4\Delta = \frac{1}{\nu_{JCH}}$, bei gleichzeitiger Refokussierung der chemischen Verschiebungsentwicklung durch die zentralen 180°-Impulse. Dabei macht man sich zu Nutze, dass sich die J-Kopplung der ¹³C-Antiphase magnetisierung, wie in Abb. 2.9 dargestellt, in der Zeit mit dem Faktor

$$\cos^n(4\pi J_{CH}\Delta)$$

entwickelt, wobei n für die CH-Multiplizität steht. Für $\Delta = \frac{1}{4^1 J_{CH}}$ bedeutet das also eine

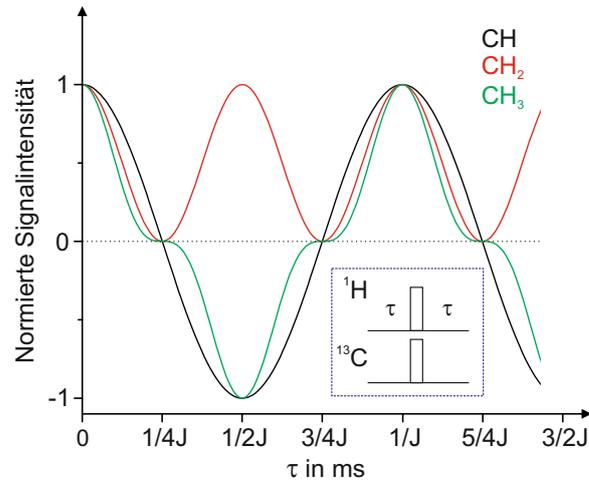


Abbildung 2.9: Simulierte Entwicklung der Signalintensität im multiplizitätseditierten HSQC-Experiment in Abhängigkeit von der Transferzeit τ für CH-, CH_2 - und CH_3 -Gruppen unter der vereinfachten Annahme einer konstanten Kopplungskonstanten $^1J_{CH}$. Die Verwirklichung des Bausteins in einem NMR-Experiment ist durch einen gestrichelten Kasten eingerahmt. Wird τ auf eine Länge von $\tau = \frac{1}{2^1 J_{CH}}$ eingestellt, weisen alle Signale die maximale Intensität auf. Die Signale von CH- und CH_3 -Gruppen weisen jedoch ein inverses Vorzeichen im Vergleich zu CH_2 -Gruppen auf.

Modulation mit dem Phasenfaktor $\cos^n(\pi) = (-1)^n$ [64].

Ein weiteres Experiment mit dem CH-Multiplizitäten unterschieden werden können, ist das DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) [74, 75]. Das multiplizitätsedierte HSQC-Experiment liefert allerdings eine erheblich höhere Empfindlichkeit, da im Gegensatz zum DEPT Protonenmagnetisierung detektiert wird.

2.2.7 Das empfindlichkeitserhöhte HSQC-TOCSY-Experiment

Das empfindlichkeitserhöhte HSQC-TOCSY-Experiment (Abb. 2.10) ist eine Kombination aus einem HSQC- und einem TOCSY-Experiment [76]. Die Sequenz liefert HSQC-Spektren, die zum einen die üblichen CH-Korrelationssignale über eine chemische Bindung zeigen. Außerdem sind entlang der ^{13}C -Frequenzachse auch weitere Protonensignale aufgelöst. Diese werden durch Protonen hervorgerufen, die sich mit dem direkt an ^{13}C gebundenen Proton ein Spinsystem teilen. Siehe dazu die schematische Darstellung aus Abb. 2.11.

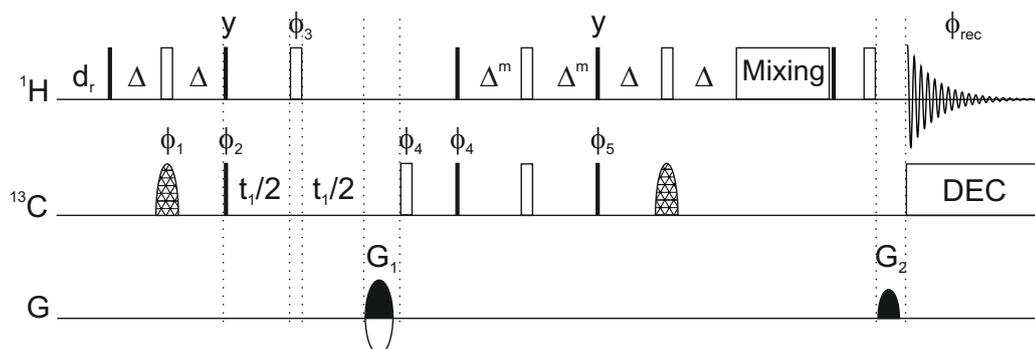


Abbildung 2.10: Impulssequenz eines HSQC-TOCSY-Experiments mit empfindlichkeitserhöhtem Rücktransferschritt. [77–79]. Diese Sequenz wurde im Rahmen dieser Arbeit als Vergleichsexperiment verwendet. Der vollständige Phasenzyklus lautet wie folgt: $\phi_1 = x$; $\phi_2 = x, -x$; $\phi_3 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_4 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_5 = 2(y), 2(-y)$ $\phi_{rec} = x, -x, -x, x$. Im Echo-/Antiecho-Aufnahmeschema wird zusätzlich die Phase ϕ_5 invertiert, außerdem werden die Phasen ϕ_1 und ϕ_2 zusammen mit der Empfängerphase ϕ_{rec} für jedes t_1 -Inkrement nach der TPPI-Methode invertiert. Als Mischsequenz (**Mixing**) wurde in allen Experimenten DIPSI-2 verwendet. Die Mischzeit wurde auf 34,54 ms eingestellt. Zu näheren Informationen bezüglich Impulsen, *delays*, Echo-/Antiechoselektion und Entkopplung sei auf Kapitel 3.3.1 verwiesen.

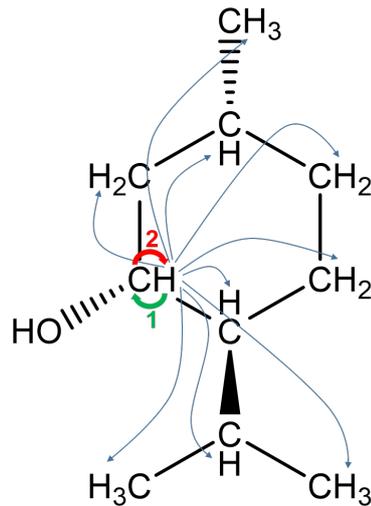


Abbildung 2.11: Schematische Darstellung der im HSQC-TOCSY-Spektrum aufgelösten Wechselwirkungen am Beispielmolekül Menthol für ein HSQC-Kreuzsignal. Die verschiedenen Transferschritte im dazugehörigen Experiment sind gemäß ihrer Reihenfolge nummeriert. Die ersten beiden Schritte gleichen einem HSQC-Experiment. Durch den dritten Schritt, vor der Akquisition des freien Induktionszerfalls, werden durch Anwendung einer Mischsequenz jedoch Korrelationen der ^{13}C -gebundenen Protonen, zu Protonen innerhalb des gleichen Spinsystems sichtbar. Der TOCSY-Transfer findet dabei über die chemischen Bindungen statt.

Die Reichweite der $^1\text{H},^1\text{H}$ -Korrelationen hängt unter anderem von der Länge der Mischsequenz ab.

Über den zusätzlichen TOCSY-Schritt lassen sich beispielsweise Moleküle in Gemischen voneinander unterscheiden, da der Transfer über die chemischen Bindungen erfolgt. Weiterhin können auf Basis des Experiments langreichweitige $^n J_{CH}$ -Kopplungen bestimmt werden [80, 81].

2.2.8 Das CLIP-RESET-HSQC

Das CLIP-RESET-HSQC [55] aus Abb. 2.12, ist bis auf die Datenaufnahme und die verwendeten Breitbandimpulse (siehe Kapitel 3.3.2) wie das CLIP-HSQC (Kapitel 2.2.4) aufgebaut. Es ist in der Protonendimension jedoch zusätzlich breitbandig $^1\text{H}, ^1\text{H}$ entkoppelt. Dies wird durch Einführen einer zusätzlichen Pseudodimension erreicht, die über die inkrementierte Zeit t_2 verwirklicht wird. t_2^{incr} stellt dabei einen Inkrementierungsschritt dar. Der FID wird in dem Experiment nicht kontinuierlich aufgenommen, sondern in Teilstücke der Länge t_2^{incr} unterteilt. t_2^{incr} wird dabei so gewählt, dass sich während dieser Zeit $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -Kopplungen nur vernachlässigbar entwickeln. Das bedeutet, es sollte idealerweise

$$\cos(\pi J_{HH} t_2^{incr}) = 1$$

gelten. In der Mitte dieses zusätzlichen Bausteins befindet sich ein BIRD^d -Filter (*Bilinear Rotation Decoupling*), durch den die Entwicklung der homonuklearen Kopplung bis zur Mitte eines FID-Teilstücks refokussiert wird. Zur generellen Funktionsweise eines BIRD^d -Filters sei auf Kapitel 2.4.2 verwiesen. Gewöhnlich werden 16 bis 64 solcher FID-Teilstücke

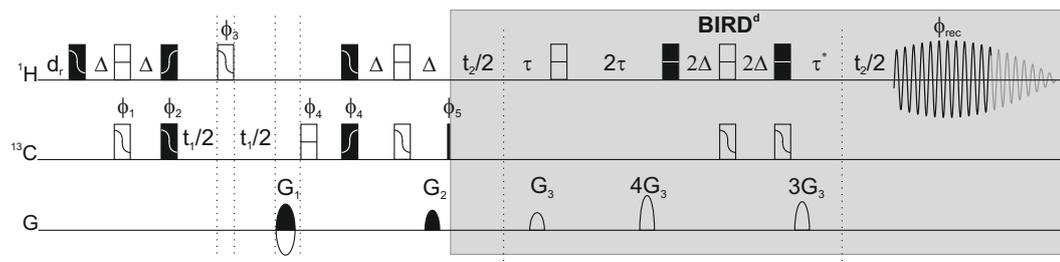


Abbildung 2.12: Impulssequenz des CLIP-RESET-HSQC-Experiments [55]. Bei gefüllten, rechteckigen Balken handelt es sich um 90° -, bei offenen Balken um 180° -Radiofrequenzimpulse. Der Baustein zur Verwickelung der breitbandigen $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -Entkopplung ist durch einen grauen Kasten markiert. Durch die inkrementierte Zeit t_2 wird eine zusätzliche Pseudodimension eingeführt. Der vollständige Phasenzyklus lautet wie folgt: $\phi_1 = x$; $\phi_2 = x, -x$; $\phi_3 = 4(x), 4(-x)$; $\phi_4 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_5 = x, -x$ $\phi_{rec} = x, -x, -x, x$. Der Gradient G_3 wird auf 17 % der maximal möglichen Gradientenstärke eingestellt. Zu näheren Informationen bezüglich Impulsen, *delays* und Echo-/Antiechoselektion sei auf Kapitel 3.3.1 verwiesen.

aufgenommen. Daraus wird schließlich ein vollständiger FID rekonstruiert, der frei von J_{HH} -Kopplungsmodulation ist. Die gewöhnlich komplizierten, breiten Protonenmultipletts werden so zu Singulett vereinfacht. Für CH_2 -Gruppen funktioniert dieser Filter jedoch nicht vollständig. Die Signale sind weiterhin durch die $^2J_{HH}$ -Kopplung zu jeweils einem Dublett aufgespalten.

Verglichen zum CLIP-HSQC können mit dem Experiment $^1J_{CH}$ -Kopplungen und dipolare Restkopplungen in partiell orientierten Molekülen, mit erhöhter Präzision bestimmt werden

[55]. Ein weiterer Unterschied zum CLIP-HSQC sind die verwendeten Impulse. In dem gezeigten Experiment kommen Breitbandimpulse aus der optimalen Steuerungstheorie zum Einsatz. Für nähere Informationen zu den Impulsen sei auf Kapitel 3.3.2 dieser Arbeit verwiesen.

2.3 Weitere experimentelle Techniken

An dieser Stelle wird auf experimentelle Techniken eingegangen, die in den neu entwickelten Experimenten dieser Arbeit verwendet wurden.

2.4 Hartmann-Hahn-Transfer

Mit Hilfe des Hartmann-Hahn-Transfers [82] lassen sich Korrelationen über J-Kopplungen innerhalb eines Spinsystems ermitteln, wobei die Spins dabei nicht direkt über eine chemische Bindung miteinander verknüpft sein müssen. Voraussetzung für die Wechselwirkung zweier Spins mit den Resonanzfrequenzen ω_1^{eff} und ω_2^{eff} , ist die Erfüllung der Hartmann-Hahn Bedingung

$$\omega_1^{eff} = \omega_2^{eff}. \quad (2.10)$$

Der Hamilton-Operator H des Zweispinsystems ist dabei durch

$$H = 2\pi \left(\underbrace{\nu_1 I_{1z} + \nu_2 I_{2z}}_{\text{chemische Verschiebung}} + \underbrace{J_{12} \vec{I}_1 \cdot \vec{I}_2}_{\text{J-Kopplung}} \right) \quad (2.11)$$

gegeben. I_1 und I_2 sind die Spinoperatoren von Spin 1 und 2, I_{1z} und I_{2z} deren z -Komponenten. Durch die ersten beiden Terme des Hamilton-Operators wird die Entwicklung der chemischen Verschiebung von Spin 1 und 2 beschrieben. Der dritte Term beschreibt die Entwicklung der J-Kopplung zwischen den beiden Spins. Für den Fall, dass die Differenz der chemischen Verschiebungen 0 beträgt, also

$$\Delta\nu_{12} = |\nu_1 - \nu_2| = 0 \quad (2.12)$$

gilt, können die Terme der chemischen Verschiebung des Hamilton-Operators vernachlässigt werden, sodass sich für H folgendes ergibt:

$$H = 2\pi J_{12} \vec{I}_1 \cdot \vec{I}_2. \quad (2.13)$$

Der Polarisationstransfer von Spin 1 auf Spin 2 wird also ausschließlich vom Kopplungsterm des Hamilton-Operators verursacht. Die z -Komponente der Magnetisierung entwickelt sich während der Zeit τ nach der Gleichung [64]

$$I_{1z} \xrightarrow{2\pi J_{12} \vec{I}_1 \cdot \vec{I}_2 \tau} \frac{1}{2} [1 + \cos(2\pi J_{12} \tau)] I_{1z} + \frac{1}{2} [1 - \cos(2\pi J_{12} \tau)] I_{2z} - \sin(2\pi J_{12} \tau) (I_{1y} I_{2x} - I_{1x} I_{2y}). \quad (2.14)$$

Es findet also ein Polarisationstransfer von Spin 1 auf Spin 2 statt. Die Übertragung der z -Magnetisierung ist dabei abhängig von der Kopplungskonstante J_{12} und der Mischzeit τ . Zusätzlich werden Nullquantenkohärenzen erzeugt, repräsentiert durch den letzten Term in Gleichung 2.14. In einem TOCSY-Experiment (TOtal Correlation SpectroscopY) wird der homonukleare Hartmann-Hahn-Transfer zum Mischen eingesetzt, die erzeugten Nullquantenkohärenzen führen im Spektrum zu Phasenverzerrungen.

Ist die chemische Verschiebungsdifferenz $\Delta\nu_{12}$ ungleich Null, so wird die maximale Übertragungsrates $T_{12,max}^z$ der Polarisation

$$T_{12,max}^z = (1 + r_{12}^2)^{-1} \quad (2.15)$$

erreicht. Dabei ist r_{12} [83]:

$$r_{12} = \frac{\Delta\nu_{12}}{J_{12}} \quad (2.16)$$

Es findet also ebenfalls Magnetisierungstransfer statt, wenn die Differenz der chemischen Verschiebung $\Delta\nu_{12}$ der beiden Spins deutlich geringer als die J-Kopplungskonstante J_{12} ist, also wenn die Gleichung

$$|\Delta\nu_{12}| \ll |J_{12}| \quad (2.17)$$

erfüllt ist. Die Bedingung kann auch erfüllt werden, wenn ein starkes zusätzliches Radiofrequenzfeld eingestrahlt wird. Die Spins präzedieren um die Achse und mit der Amplitude des zusätzlichen Feldes. Wenn ein solches zusätzliches Magnetfeld angelegt wird, können die Terme der chemischen Verschiebung des Hamilton-Operators in Gleichung 2.13 vernachlässigt werden [76]. Der Ausdruck wird zu dem in Gleichung 2.13 angegebenen Operator reduziert. Der Transfer der z -Magnetisierung von Spin 1 auf Spin 2 wird so vom Kopplungsterm des Hamilton-Operators verursacht.

Ausdrücke für den Transfer der Inphase-Kohärenzen I_{1y} und I_{1x} sowie der Antiphase-Kohärenzen $2I_{1x}I_{2z}$ und $2I_{1y}I_{2z}$ lassen sich auf die gleiche Weise ableiten. Bei Verwendung einer Mischsequenz müssen alle Komponenten betrachtet werden, da unter isotropen Mischbedingungen nicht nur die z -Komponente der Magnetisierung, sondern genauso die x - und y -Komponente übertragen wird. Isotropes Mischen bezieht sich also auf alle Varianten des Transfers. Soll nur eine Komponente übertragen werden, muss sichergestellt sein, dass zu Beginn der Mischsequenz nur diese Komponente vorliegt, oder alle anderen Komponenten dephasiert sind.

Eine Mischsequenz kann entweder ein zusätzliches Radiofrequenz-Feld mit definierter Amplitude sein, oder aus einer Reihe von Impulsen unterschiedlicher Rotationswinkel, Radiofrequenzamplituden und Phasen bestehen. Bei vorgegebener Amplitude muss sichergestellt sein, dass die Mischsequenz eine gewisse Bandbreite chemischer Verschiebungen abdeckt.

DIPSI-2 ist ein Beispiel einer solchen Mischsequenz. Diese soll in dem folgenden Abschnitt vorgestellt werden.

2.4.1 DIPSI-2-Mischsequenz

Für alle hier vorgestellten Experimente die ein TOCSY-Element beinhalten, wurde als Mischsequenz DIPSI-2 verwendet. Diese besteht aus einem MLEV-4 [84] Superzyklus

$$R \bar{R} \bar{R} R$$

mit dem Basiselement

$$R = 320; \overline{410} \ 290 \ \overline{285} \ 30 \ \overline{245} \ 375 \ \overline{265} \ 370.$$

Die Zahlen kennzeichnen dabei die Rotationswinkel der entsprechenden Impulse in Grad. Mit einem Makron gekennzeichnete Rotationswinkel bedeuten, dass der entsprechende Impuls mit invertierter Phase eingestrahlt wird.

2.4.2 BIRD-Filter

Mit Hilfe eines BIRD (*Bilinear Rotation Decoupling*)-Filters [85] lassen sich isotopenselektive 90° - und 180° -Impulse verwirklichen, wobei hier nur zweitere behandelt werden sollen. Der allgemeine Aufbau dieses Bausteins ist in Abb. 2.13 dargestellt. Je nach Wahl der Impulsphasen, ändert sich die effektive Wirkung des Filters. Weiterhin lässt sich dessen effektive Wirkung auch durch Anwenden oder Auslassen des zweiten 180° -Impulses auf dem Heterokanal variieren. Grundsätzlich lassen sich vier Filter unterscheiden. Der BIRD^r (*remote*)-Filter

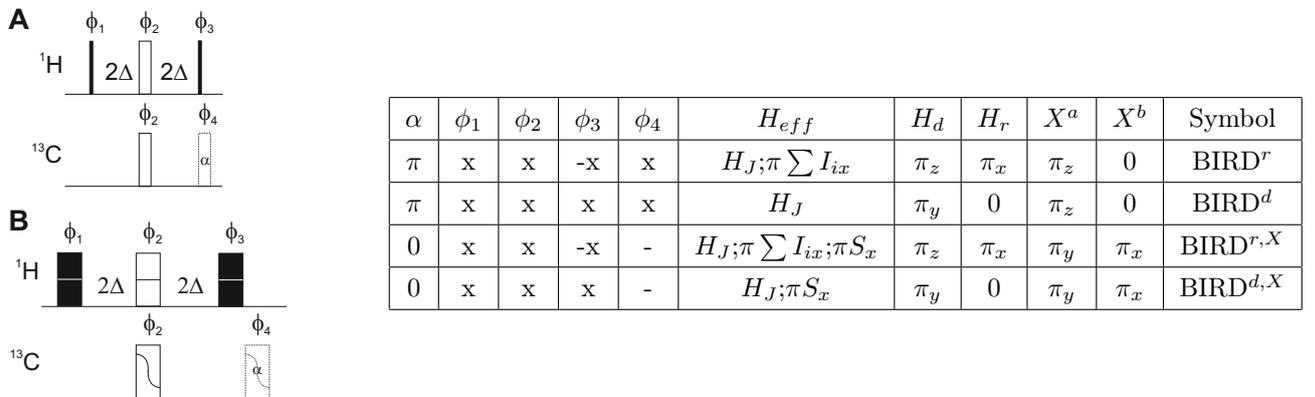


Abbildung 2.13: Allgemeiner Aufbau eines BIRD-Filters nach [86], zum einen unter Verwendung von Rechteckimpulsen (**A**), zum anderen unter Verwendung von Breitbandimpulsen aus der optimalen Steuerungstheorie (**B**). Für nähere Informationen zu den verwendeten Breitbandimpulsen sei auf die Übersicht in Kapitel 3.3.2 dieser Arbeit verwiesen. In der nebenstehenden Tabelle sind für ausgewählte Impulsphasenkombinationen die effektiven Hamiltonoperatoren, sowie deren resultierenden Rotationen angegeben. Der zweite, gestrichelt dargestellte 180° -Impuls auf ^{13}C wird angewandt, falls in der Tabelle in der Spalte mit Kennzeichnung α ein π vermerkt ist, oder wird ausgelassen wenn in der Spalte eine 0 angegeben ist.

dient als selektiver 180° -Impuls für ^{12}C -gebundene Protonen, der BIRD^d (*direct*)-Filter als

selektiver 180° -Impuls für ^{13}C -gebundene Protonen. $\text{BIRD}^{r,X}$ und $\text{BIRD}^{d,X}$ wirken zusätzlich gleichzeitig als 180° -Impuls auf ^{13}C . Als Beispiel soll hier die Wirkung der beiden BIRD^r - und BIRD^d -Filter aus Abb. 2.13 mit Hilfe des Produktoperatorformalismus berechnet werden.

Der 90° -Anregungsimpuls erzeugt in beiden Filterelementen die selbe transversale Magnetisierung $-I_y$ auf ^1H .

$$\begin{array}{l} ^1\text{H-passiv} : \\ ^1\text{H-}^{13}\text{C} : \end{array} \left(\begin{array}{c} I_z \\ I_z \end{array} \right) \xrightarrow{\frac{\pi}{2}_x(^1\text{H})} \left(\begin{array}{c} -I_y \\ -I_y \end{array} \right)$$

Durch das folgende Kopplungsintervall der Gesamtlänge $\frac{1}{J_{CH}}$ wird in beiden Filterelementen

$$\left(\begin{array}{c} -I_y \\ -I_y \end{array} \right) \xrightarrow{\frac{2\Delta - \pi\phi_2(^1\text{H}) - 2\Delta}{2\Delta - (\pi\phi_2(^1\text{H}) + \pi\phi_2(^{13}\text{C})) - 2\Delta}} \left(\begin{array}{c} I_y \\ -I_y \end{array} \right)$$

die Magnetisierung der ^{12}C -gebundenen Protonen gegenüber der Magnetisierung der ^{13}C -gebundenen Protonen invertiert.

Beim letzten 90° -Impuls auf ^1H unterscheiden sich die beiden Filter schließlich in der Phase ϕ_3 .

$$\left(\begin{array}{c} I_y \\ -I_y \end{array} \right) \xrightarrow{\frac{\pi}{2}_{\phi_3}(^1\text{H})} \left\{ \begin{array}{l} \left(\begin{array}{c} -I_z \\ I_z \end{array} \right) \quad \text{für } \text{BIRD}^r \\ \left(\begin{array}{c} I_z \\ -I_z \end{array} \right) \quad \text{für } \text{BIRD}^d \end{array} \right.$$

Im BIRD^r -Filter wurde also die z -Magnetisierung der ^{12}C -gebundenen Protonen invertiert, im BIRD^d -Filter entsprechend die z -Magnetisierung der ^{13}C -gebundenen Protonen.

Als isotopenselektiver Impuls spielt der BIRD-Filter eine wichtige Rolle in Sequenzen zur homonuklearen Entkopplung. In dieser Arbeit kommt der BIRD-Filter in mehreren Experimenten zum Einsatz.

Der BIRD^r -Filter wird in Kapitel 4.15 in einem, in der Kohlenstoffdimension gekoppelten, HSQC-Experiment dazu verwendet, langreichweitige $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -Kopplungen zu unterdrücken. Damit können $^1J_{CH}$ -Kopplungen in der ^{13}C -Dimension mit höherer Präzision bestimmt werden. Außerdem wird ein BIRD^d -Filter eingesetzt, um in einem HMQC-Experiment die $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -Kopplungsentwicklung während der t_1 -Periode zu refokussieren (siehe Kapitel 4.13.1). Methoden zur homonuklearen Entkopplung während der Aufnahme der Protonendimension basieren ebenfalls auf der Verwendung von BIRD-Filtern. Dazu sei auf die Kapitel 2.2.8 und 4.12 verwiesen.

2.4.3 Non Uniform Sampling (NUS)

In der NMR-Spektroskopie wird das zeitlich kontinuierliche Messsignal, der FID (*free induction decay*) $F(t)$ durch n diskrete Werte digitalisiert. Das Nyquist-Theorem

$$dw = \frac{1}{2 \cdot sw} \quad (2.18)$$

gibt die obere Grenze der erfassbaren Frequenz, also die spektrale Breite sw (*spectral width*), bei gegebener Digitalisierungsrate an. Die Digitalisierungsrate beschreibt den zeitlichen Abstand zweier Digitalisierungspunkte, der im Englischen als *dwell time* (dw) bezeichnet wird. Treten höhere Frequenzen auf, so werden sie in diesen Bereich hineingefaltet. Die Formel 2.18 sagt prinzipiell aus, dass die Digitalisierungsrate mindestens doppelt so groß sein muss, wie die höchste Frequenz des zu detektierenden Messsignals. In der klassischen NMR-Spektroskopie wird die Digitalisierung an zeitlich äquidistanten Punkten vorgenommen. Bei der Aufnahme von mehrdimensionalen Spektren bedeutet das schnell einen erheblichen Zeitaufwand. Vor allem, wenn eine hohe spektrale Auflösung entlang der zusätzlichen Frequenzachsen gewünscht ist. Bei vorgegebener spektraler Breite steigt die Messzeit linear mit der Anzahl der Digitalisierungspunkte an. Unter Verwendung des *Non Uniform*

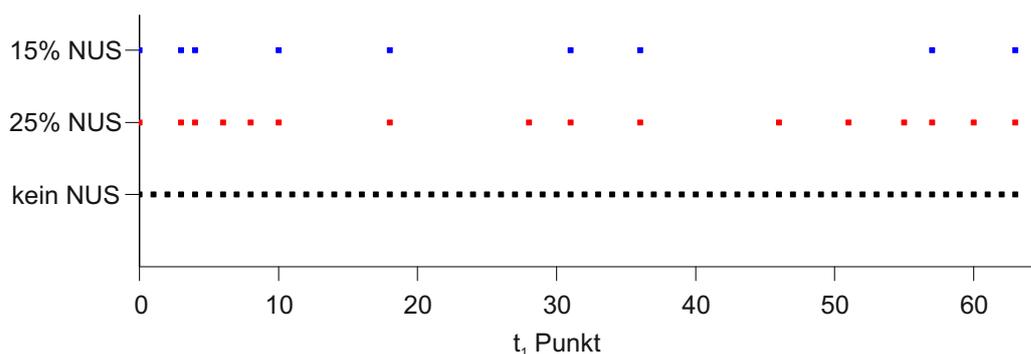


Abbildung 2.14: Verteilung der Digitalisierungspunkte eines HSQCs, das mit 64 t_1 -Inkrementen aufgenommen wurde. Das in schwarz dargestellte Digitalisierungsschema spiegelt den Fall ohne Anwendung von NUS wieder. Die Reduktion der Punkte auf 25 % (16 Punkte) ist in rot gezeigt, während eine Reduktion auf 15 % der Punkte (10) durch die blaue Darstellung beschrieben wird. Die Digitalisierungspunkte der t_1 -Werte der NUS-Experimente sind dabei nicht äquidistant.

Sampling Schemas [30, 31] wird nur ein kleiner Teil dieser Datenpunkte aufgenommen. In Abb. 2.14 ist als Beispiel die Verteilung der komplexen Datenpunkte für 64 t_1 -Inkmente eines HSQC-Experiments dargestellt. Zusätzlich ist auch die Verteilung der Datenpunkte für die NUS-Raten 25 % und 15% gezeigt. Im ersten Fall wird damit die Zahl der aufgenommenen Punkte auf 16, im zweiten Fall auf 10 reduziert. Im Allgemeinen sind diese Punkte zufällig verteilt. Der kleinste Abstand zweier Punkte bestimmt nach dem Nyquist-Theorem weiterhin die spektrale Breite.

Bevor nun eine Fouriertransformation in der indirekten Dimension vorgenommen werden

kann, werden die fehlenden Datenpunkte rekonstruiert. Das Resultat ist ein Spektrum, das die gleiche digitale Auflösung wie das konventionell aufgenommene Spektrum aufweist, für das jedoch die Messzeit deutlich reduziert ist. Da nur weniger echte Datenpunkte aufgenommen wurden, nimmt allerdings das Signal-zu-Rausch-Verhältnis entsprechend ab. Es gibt mehrere Methoden um NUS-Daten zu prozessieren. Alle Spektren, die im Rahmen dieser Arbeit unter Verwendung von NUS aufgenommen wurden, wurden mit *compressed sensing* (cs) [87, 88] prozessiert.

2.5 Schnelle Heteronucleare NMR-Experimente

In diesem Kapitel soll auf die bereits etablierten Methoden eingegangen werden, die es ermöglichen NMR-Spektren in einer kürzeren Gesamtzeit aufzunehmen, bei gleichzeitig möglichst geringen Einbußen in Sachen spektraler Qualität bzw. Empfindlichkeit. Die Verkürzung der Gesamtzeit wird zum einen durch Erhöhung der Wiederholrate der Aufnahmeschritte möglich. Dies kann durch Ernst-Winkel-Anregung, durch selektive Anregung (SOFAST-[21, 22, 24] und BEST-NMR [18, 19]) oder durch den Transfer ungenutzter Reservoirmagnetisierung auf die zu beobachtenden Spins (ASAP-HMQC [27]) erzielt werden.

Eine weitere Methode stellt das *Non Uniform Sampling* dar, siehe dazu Kapitel 2.4.3.

In der ULTRAFast-NMR [14], der schnellsten bekannten Methode zur Aufnahme eines 2D-Spektrums, wird das zu untersuchende Probenvolumen durch Einsatz von Magnetfeldgradienten in einzelne Schichten aufgeteilt. Innerhalb dieser Schichten präzedieren die Spins mit unterschiedlicher Resonanzfrequenz. Die Schichten können dann, mit Hilfe selektiver Radiofrequenzimpulse, unabhängig voneinander angeregt werden. Das bedeutet, dass jede Schicht für die Aufnahme eines t_1 -Inkrementen dienen kann und ein komplettes 2D-Experiment kann in einem *scan* aufgenommen werden. Wie in Kapitel 2.2 gezeigt, bestehen konventionelle NMR-Experimente aufgrund des Relaxationsverhaltens der Spins häufig hauptsächlich aus einer Wartezeit d_r , die die Gesamtzeit der Experimente bestimmt. Die bereits erwähnten Schemata, die es ermöglichen die Wartezeit zu verkürzen und eine optimale Empfindlichkeit gewährleisten, sollen in den nachfolgenden Abschnitten vorgestellt werden. Zu Beginn soll jedoch auf die Auswirkungen der T_1 -Relaxation in der NMR-Spektroskopie eingegangen werden.

2.5.1 Longitudinale (T_1)-Relaxation

Die T_1 -Relaxation bestimmt unter anderem wie schnell ein NMR-Experiment wiederholt werden kann und damit erheblich dessen Gesamtdauer. Eine Methode das longitudinale Relaxationsverhalten einer Molekülprobe zu untersuchen stellt das *inversion recovery* Verfahren dar. Die Impulssequenz des Experiments ist in Abb. 2.15 dargestellt. Zu Beginn wird die z -Magnetisierung I_z mit einem 180° -Impuls invertiert. Der Wiederaufbau der z -Magnetisierung erfolgt in einer inkrementierten Zeitperiode τ . Durch einen anschließenden 90° -Impuls wird die wiederaufgebaute z -Magnetisierung in transversale Magnetisierung umgewandelt und als freier Induktionszerfall detektiert. In der Intensität des Messsignals $I(\tau)$

spiegelt sich so der Anteil der wiederaufgebauten z -Magnetisierung wieder. Für jeden Wert von τ wird ein eindimensionales Spektrum aufgenommen und die zugehörigen Signalintensitäten $I(\tau)$ ausgewertet. Durch Anpassen der Funktion

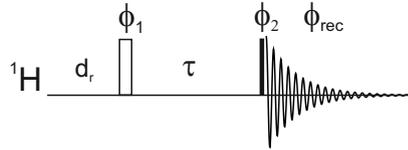


Abbildung 2.15: Impulssequenz des *inversion recovery* Experiments. Bei dem schmalen gefüllten, rechteckigen Balken handelt es sich um einen 90° -, bei dem breiten, offenen Balken um einen 180° -Radiofrequenzimpuls. Das *delay* τ wird schrittweise inkrementiert. Für jeden Wert von τ wird ein eindimensionales Spektrum aufgenommen. Das *delay* d_r dient dem Wiederaufbau der Gleichgewichtsmagnetisierung I_z vor dem Start des darauf folgenden *scans*. Der vollständige Phasenzyklus lautet: $\phi_1 = x, -x$; $\phi_2 = \phi_{rec} = x, x, -x, -x, y, y, -y, -y$

$$I(\tau) = I_0 \cdot \left(1 - 2 \cdot \exp\left(-\frac{\tau}{T_1}\right) \right) \quad (2.19)$$

an die Intensitätsverläufe $I(\tau)$ kann schließlich die T_1 -Zeit bestimmt werden. Im ersten Messpunkt wird durch die Wahl von $\tau = 0$ das maximale, negative Signal $-I_0$ erhalten. Für größer werdende Werte von τ nähert sich die Intensität des Messsignals exponentiell dem positiven Maximalwert I_0 .

Zur Extraktion genauer Werte für die T_1 -Zeiten ist es wichtig, dass die Spins während Akquisitionszeit t_{aq} und Erholungs-*delay* d_r wieder vollständig in den Gleichgewichtszustand relaxieren. Diese sollten zusammen also ein Vielfaches der T_1 -Zeit betragen.

2.5.2 Bedeutung der T_1 -Relaxation in der NMR-Spektroskopie

Die Zeit, in der das Spinsystem in den Gleichgewichtszustand relaxieren kann, ist durch die Summe aus Akquisitionszeit t_{aq} und Erholungs-*delay* d_r gegeben. In der Regel wird die Summe dieser beiden Zeiten auf $(3 - 5) \cdot T_1$ eingestellt. Für kleine Moleküle liegen T_1 -Zeiten im Bereich von einigen Sekunden. Durch Steigerung der Akquisitionszeit kann die digitale Auflösung des Experiments erhöht werden. Wird jedoch während der Aufnahme des FID eines Kernspins ein wechselwirkender Nachbarkern entkoppelt, ist die maximale Aufnahmezeit durch den hohen Energieeintrag der Entkopplungssequenz limitiert. Den Hauptteil des NMR-Experiments macht dann das Erholungs-*delay* d_r aus.

Für den Anteil der Magnetisierung, der sich zu Beginn der Akquisitionsperiode in der transversalen Ebene befindet, kann der zeitliche Wiederaufbau der z -Magnetisierung $I_z(t)$ durch die Gleichung

$$I_z(t) = I_0 \cdot \left(1 - e^{-\frac{t_{aq} + d_r}{T_1}} \right) \quad (2.20)$$

beschrieben werden. Wird

$$t_{aq} + d_r = 3 \cdot T_1$$

eingestellt, haben sich 95 % der Gleichgewichtsmagnetisierung wieder aufgebaut.

In den Experimenten in dieser Arbeit wird das Erholungs-*delay* d_r in vielen Fällen auf einen Wert nahe 0 gesetzt. Stattdessen wird eine DIPSI-2-Sequenz mit einer Mischzeit von 34,54ms eingestrahlt. Wird diese durch ein *delay* der selben Länge ersetzt und geht man von einer Akquisitionszeit $t_{aq} = 100$ ms aus, hat sich durch T_1 -Relaxation nur 6,5 % der Gleichgewichtsmagnetisierung wieder aufgebaut. Dabei wurde für T_1 ein realistischer Wert von 2 Sekunden angenommen.

T_1 -Zeiten in NMR-Proben können zum Beispiel durch Zugabe paramagnetischer Substanzen [89] verringert werden. Es existieren jedoch auch experimentelle Methoden, die es ermöglichen die T_1 -Zeiten der detektierten Spins durch geeignete Impulsfolgen zu reduzieren, oder die T_1 -Relaxation durch alternative Transferwege zu umgehen. Im folgenden Kapitel werden einige aktuelle experimentelle Methoden vorgestellt, die es ermöglichen beschleunigt NMR-Spektren aufzunehmen.

2.5.3 Ernst-Winkel-NMR

In der NMR-Spektroskopie wird häufig ein Anregungsimpuls mit einem Rotationswinkel von 90° verwendet. Da dadurch der erzeugte Betrag der transversalen Magnetisierung maximal ist. Ist aber eine Akkumulierung einer Vielzahl von *scans* nötig, z.B. für den Durchlauf eines Phasenzyklus, oder zur Erhöhung des Signal-zu-Rauschverhältnisses, kann ein kleinerer Rotationswinkel, der einen Teil der z -Magnetisierung erhält, zu einer höheren Sensitivität pro Experimentzeit führen. Der optimale Rotationswinkel β für maximale Intensität in einem eindimensionalen NMR-Experiment ist durch [25]

$$\beta_{opt} = \exp\left(-\frac{t_{aq} + d_r}{T_1}\right) \quad (2.21)$$

definiert. Er wird also durch die Summe aus Akquisitionszeit t_{aq} und Erholungs-*delay* d_r und die longitudinale Relaxationszeit T_1 bestimmt.

In der Routine NMR-Spektroskopie wird in eindimensionalen ^{13}C -Experimenten häufig ein Ernst-Winkel von $\beta = 30^\circ$ verwendet. Zur Veranschaulichung der Zusammenhänge ist in Abb. 2.16 der simulierte Verlauf der z -Magnetisierung und der Signalintensität eines einfachen 1D-NMR-Experiments in Abhängigkeit der Anzahl der Wiederholungen gezeigt. Erzeugt ein 90° -Puls für den ersten *scan* noch die maximale transversale Magnetisierung, ändert sich das Verhältnis bei den darauf folgenden *scans* schnell. Der durch Anwendung des Ernst-Winkels erreichte dynamische Gleichgewichtszustand liefert schließlich das höhere Signal-zu-Rauschverhältnis pro *scan*. Auch in dem HMQC-Experiment aus Kapitel 2.5.7 lässt sich die Ernst-Winkel-Anregung anwenden. Der Rotationswinkel des Protonenanregungsimpulses wird auf einen Wert $\beta_{opt}^{HMQC} = 180^\circ - \beta_{opt}$ eingestellt, um die Wirkung des folgenden 180° -Impulses zu kompensieren.

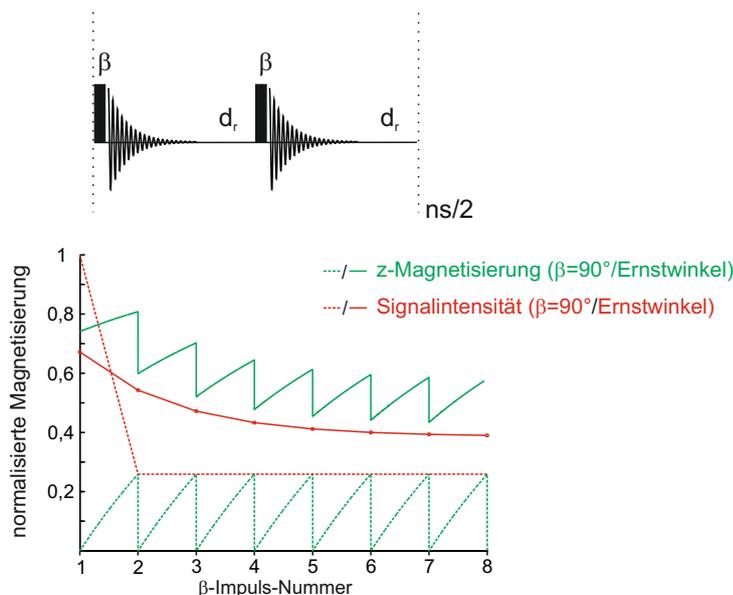


Abbildung 2.16: Simulierte Verläufe der Signalintensität (rot) und der z -Magnetisierung (grün) in Abhängigkeit der Anzahl der Wiederholungen eines einfachen 1D-NMR-Experiments. Das NMR-Experiment besteht aus einem Anregungsimpuls mit dem Rotationswinkel α und anschließender Detektion des FID. Zwischen den *scans* wird ein Erholungs-*delay* der Dauer d_r eingehalten. Die gestrichelten Linien stellen die zeitlichen Verläufe der vorhandenen z -Magnetisierung (grün) und der detektierten Signalintensität (rot) für einen Anregungsimpuls mit dem Rotationswinkel $\frac{\pi}{2}$ dar. Die durchgehenden Linien zeigen die Auswirkungen unter Verwendung der Ernstwinkelanregung. Dabei stellt die x -Achseinteilung die Zeitpunkte direkt nach einem erfolgten Anregungsimpuls dar.

2.5.4 SOFAST-HMQC

Das SOFAST-HMQC (*band Selective Optimized Flip – Angle Short – Transient*) [90] aus Abb. 2.17 ermöglicht ein schnelles Aufnehmen von heteronuklearen 2D-Korrelationsexperimenten. Dies wird dadurch erzielt, dass nur ein Teil der ^1H -Kernspins in dem Probenmolekül bandselektiv angeregt wird, während der andere Teil im Gleichgewichtszustand verbleibt. Dieses in z orientierte Spinbad beschleunigt die longitudinale (T_1)-Relaxation der detektierten Spins durch dipolare $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -Wechselwirkungen. Zusätzlich kann bei Verwendung des PC9-Anregungsimpuls [91] auf dem Protonenkanal der Rotationswinkel β eingestellt werden und ermöglicht dadurch bandselektive Ernst-Winkel-Anregung. Damit eignet sich das Prinzip bestens für die Aufnahme von $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektren von Proteinen und Nucleinsäuren, da sich die Resonanzfrequenzen der ^{15}N -gebundenen Protonen einfach von denen der Kohlenstoff-gebundenen Protonen und dem Lösungsmittel abgrenzen lassen.

In wässriger Lösung erhöht der Austausch der Amidprotonen mit den Lösungsmittelprotonen zusätzlich die zur Verfügung stehende Protonen- z -Magnetisierung. Durch die erforderliche Bandselektivität ist es jedoch nicht möglich den gesamten $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -Korrelationsbereich durch die Aufnahme eines einzelnen Experiments abzudecken.

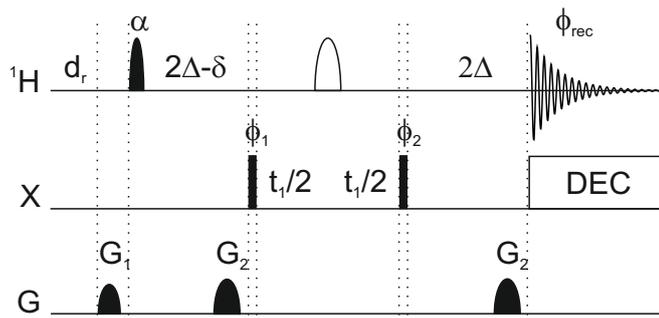


Abbildung 2.17: Impulssequenz des SOFAST-HMQC-Experiments [90]. Schwarze, dünne, rechteckige Balken auf dem Heterokanal X (X= ^{15}N oder ^{13}C) kennzeichnen nicht-selektive Rechteckimpulse mit einem Rotationswinkel von 90° . Bei dem schwarz gefüllten, elliptisch geformten Protonenimpuls handelt es sich um einen bandselektiven PC9-Impuls [91] mit variablem Rotationswinkel β . Die ungefüllte, breitere Ellipse kennzeichnet einen bandselektiven Refokussierungsimpuls der Form r-SNOB [92] oder REBURP [93]. Das delay 2Δ wird auf eine Länge von $2\Delta = \frac{1}{2J}$ eingestellt. Das delay δ dient dazu, die Entwicklung der chemischen Verschiebung und der heteronuklearen Kopplung während der Dauer des PC9-Impulses zu kompensieren. Der vollständige Phasenzyklus lautet wie folgt: $\phi_1 = x, -x$; $\phi_2 = x, x, -x, -x$; $\phi_{rec} = x, -x, -x, x$. Während der Aufnahme des FID wird mit WURST-2 [94–96] entkoppelt.

2.5.5 *single scan*-HSQC

Die in Abb. 2.18 dargestellte Impulssequenz [97] ermöglicht es mit nur einem *scan* HSQC-Spektren aufzunehmen. Von einem konventionellen HSQC unterscheidet sie sich durch die in Abb. 2.18 jeweils mit einem Kasten eingerahmten Bausteine. Zur Aufnahme der indirekten Dimension kommen zwei identische 90° -Impulse zum Einsatz, die während der Anwendung eines bipolaren Gradientenpaares G_e eingestrahlt werden. Die Gradienten in Richtung des B_0 -Feldes (z) unterteilen das Probenvolumen in Schichten. Innerhalb dieser Schichten präzedieren die Spins mit unterschiedlicher Resonanzfrequenz. Die beiden 90° -Impulse durchlaufen nun einen *offset sweep* (von O_a bis O_b). Dies bedeutet, dass Kernspins in unterschiedlichen Schichten zu ungleicher Zeit angeregt werden und in umgekehrter Reihenfolge dazu wieder in Richtung z rotiert werden. Dabei gilt

$$O_a = -O_b.$$

Abhängig von der z -Koordinate befinden sich die Kernspins also unterschiedlich lang in der transversalen Ebene. Dies entspricht einer Entwicklung der chemischen Verschiebung analog zum inkrementierten t_1 -delay in konventionell aufgenommenen zweidimensionalen Experimenten. Diese ortsabhängige Phaseninformation wird als Amplitudenmodulation gespeichert. Die Aufnahme der direkten Dimension erfolgt während wiederholt (bzw. n_2 mal) bipolare Gradientenpaare der Stärke G_a eingestrahlt werden. Durch die 180° -Impulse wird die Entwicklung der heteronuklearen Kopplung refokussiert. Während der Akquisitionszeit

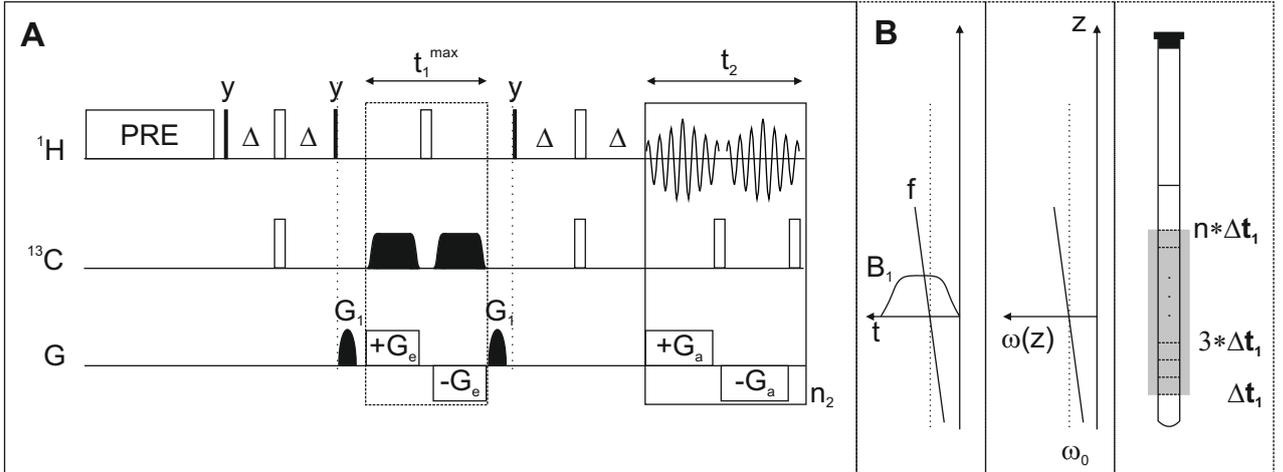


Abbildung 2.18: Impulssequenz des *single scan* HSQC-Experiments (A) [97]. Die durch die umrahmten Kästen dargestellten Bausteine verdeutlichen die Anwendung der bipolaren Gradientenpaare G_e und G_a . Der Baustein mit getrichelter Umrahmung zeigt Gradienten die gleichzeitig mit 90° -CHIRP-Impulsen auf dem ^{13}C -Kanal angewandt werden. Die CHIRP-Impulse durchlaufen einen *offset sweep* (z.B. $O_a - O_b = 80$ kHz) durchlaufen. Ein Beispielparametersatz ist: $G_e = 42$ G/cm, $t_1^{\max} = 16$ ms, $G_a = 18,4$ G/cm, $n_2 = 64$, $T_a = 0,4$ ms. Zusätzlich wird eine Sequenz zur Vorsättigung (PRE) eingestrahlt. In B ist das Prinzip zur Aufnahme der indirekten Dimension dargestellt. Links sieht man den CHIRP-Impuls mit konstantem B_1 -Feld, aber *offset sweep* über der Zeit t . Gleichzeitig wird die NMR-Probe durch den Gradienten in Schichten unterschiedlicher Resonanzfrequenzen $\omega(z)$ aufgeteilt. Die Magnetisierung in den unterschiedlichen Schichten wird also zu verschiedenen Zeiten angeregt und wieder zurück in Richtung z rotiert. Je nach z -Koordinate befindet sich die Magnetisierung des Heterokerns also unterschiedlich lang in der transversalen Ebene. So können die t_1 -Inkremente in einem *scan* realisiert werden, da jede Schicht einem t_1 -Inkrement entspricht.

entwickelt sich also die chemische Verschiebung, gleichzeitig werden durch die Gradienten die eindimensionalen ULTRAFast-(UF)-Spektren periodisch de- und refokussiert. Als Resultat wird eine Serie gespiegelter Echos erhalten, die die Entwicklung in der direkten Dimension widerspiegeln. Die Formel [98]

$$\gamma_a G_a L = \frac{2 \cdot sw^{UF} \cdot sw^{Conv}}{\Delta\nu} \quad (2.22)$$

gibt dabei den Zusammenhang zwischen der Gradientenstärke G_a , der spektralen Breite der indirekten UF-Dimension sw^{UF} , der spektralen Breite der konventionellen Dimension sw^{Conv} , sowie der spektralen Auflösung der UF-Dimension $\Delta\nu$ an. γ_a ist dabei das gyromagnetische Verhältnis von ^1H , L die Länge des Detektionsvolumens. Soll die spektrale Breite also in einer der beiden Dimensionen erhöht werden, muss die Gradientenstärke G_a erhöht werden, wenn gleichzeitig die spektrale Auflösung in der UF-Dimension gleich bleiben soll.

Im folgenden Schritt entwickelt sich für die Amidprotonen $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -Kopplung. Die Magnetisierung kohlenstoff-gebundener Protonen wird durch den 180° -Impuls lediglich invertiert.

$$\begin{pmatrix} -I_x \\ -I_y \end{pmatrix} \xrightarrow{\frac{\Delta - \pi_y(^1\text{H}) - \Delta}{\Delta - (\pi_y(^1\text{H}) + \pi_y(^{15}\text{N})) - \Delta}} \begin{pmatrix} I_x \\ 2I_x S_z \end{pmatrix}$$

Der 90° -Impuls auf Protonen bewirkt schließlich:

$$\begin{pmatrix} I_x \\ 2I_x S_z \end{pmatrix} \xrightarrow{\frac{\pi/2_y(^1\text{H})}{\pi/2_y(^1\text{H})}} \begin{pmatrix} -I_z \\ -2I_z S_z \end{pmatrix}.$$

Damit befindet sich nach dem INEPT-Schritt die Magnetisierung der Protonen, die nicht an einen ^{15}N -Kern gebunden sind, in Richtung der z -Achse. Der weitere Verlauf der Sequenz gewährleistet, dass diese Magnetisierung vor der Akquisition des FID in $+z$ -Richtung orientiert ist. Die Berechnung soll an dieser Stelle nicht weiter betrachtet werden, da ein ähnlicher Ansatz im LowCost-ASAP-HSQC (Kapitel 4.13.3) verwendet wurde, dessen Berechnung im Detail gezeigt wird. Wie bereits in der Beschreibung des SOFAST-HMQC in Kapitel 2.5.4 erläutert, wirkt sich das in z orientierte Spinbad positiv auf die T_1 -Relaxationseigenschaften der Amidprotonen aus. Dies ermöglicht eine höhere Wiederholrate eines Experiments, oder steigert dessen Empfindlichkeit. Im Gegensatz zum SOFAST-HMQC ist beim Cost-HSQC jedoch keine Ernst-Winkel-Anregung möglich. Wie das SOFAST-HMQC hat das Experiment auch den Nachteil, dass es nicht möglich wäre $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektren in einem Experiment über die volle Bandbreite aufzunehmen.

Dagegen soll durch das LowCost-ASAP-HSQC der gesamte Frequenzbereich zur Aufzeichnung von $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -Korrelationen abgedeckt werden. Es kann deshalb nicht mit bandselektiven Impulsen vorgegangen werden. Stattdessen kommt ein auf andere Weise modifizierter INEPT-Transfer zum Einsatz.

2.5.7 Fast-HMQC

In der einfachsten Form des HMQC-Experiments kann die Ernst-Winkel-Anregung durch Einstellen des Rotationswinkels α des Anregungsimpulses auf dem Protonenkanal erreicht werden. Die Abb. 2.20 zeigt die Impulssequenz des Experiments mit Echo-/Antiecho-Gradientenselektion. Im Folgenden sind die Produktoperatoren an den in Abb. 2.20 mit Buchstaben gekennzeichneten Punkten angegeben. Die Entwicklung der chemischen Verschiebung für Protonen während der beiden *delays* 2Δ wurde vernachlässigt, da der zentral platzierte 180° -Protonenimpuls diese bis zur Aufnahme des FID refokussiert. Ebenso wird nur die in t_1 *cos*-modulierte Komponente der Magnetisierung betrachtet, da nur diese durch den letzten 90° -Impuls auf ^{13}C in observable Magnetisierung umgewandelt wird.

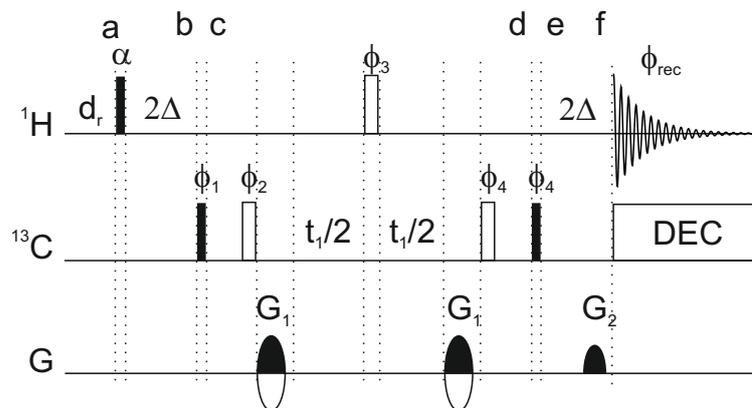


Abbildung 2.20: Impulssequenz eines Fast-HMQC [101]. Ernst-Winkel-Anregung wird durch die Anpassung des Rotationswinkels α des ^1H -Anregungsimpulses erreicht. Der vollständige Phasenzyklus lautet wie folgt: $\phi_1 = x, -x$; $\phi_2 = 4(x), 4(-x)$; $\phi_3 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_4 = 4(-x), 4(x)$; $\phi_{rec} = y, -y, y, -y, -y, y, -y, y$. Echo-/Antiecho und Kohärenzordnungsselektion wird erreicht indem die Gradienten G_1 und G_2 in folgender Weise alterniert werden: $G_1 = (40\%, -40\%)$, $G_2 = (20, 1\%, 20, 1\%)$. Zusätzlich zum Echo-/Antiecho-Aufnahmeschema werden die Phasen ϕ_1 und ϕ_2 zusammen mit der Empfängerphase ϕ_{rec} nach der TPPI-Methode invertiert. Für weitere Informationen zu Impulsen und Entkopplung sei auf Kapitel 3.3.1 verwiesen.

a) Der Impuls mit dem Rotationswinkel α und der Phase x erzeugt zum einen transversale Magnetisierung $-I_y$ und erhält zum anderen einen Teil der z -Magnetisierung.

$$I_z \xrightarrow{\alpha_x(^1\text{H})} -I_y \cdot \sin(\alpha) + I_z \cdot \cos(\alpha)$$

b) Im folgenden *delay* der Länge $\frac{1}{2\pi J_{CH}}$ entwickelt sich J-Kopplung zwischen dem Proton und dem direkt gebundenen ^{13}C .

$$\xrightarrow{2\cdot\Delta} 2I_x S_z \cdot \sin(\alpha) + I_z \cdot \cos(\alpha)$$

Dabei entwickelt sich $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -Antiphase magnetisierung auf Protonen.

c) Diese Antiphase magnetisierung wird durch den 90° -Impuls auf ^{13}C in Multiquantenmagnetisierung transferiert.

$$\xrightarrow{\frac{\pi}{2}_{\phi_1} (^{13}\text{C})} (-2I_x S_y \cdot \sin(\alpha) + I_z \cdot \cos(\alpha))(2I_x S_y \cdot \sin(\alpha) + I_z \cdot \cos(\alpha))$$

d) Im Folgenden entwickelt sich die chemische Verschiebung der ^{13}C -Spins. Durch die beiden 180° -Impulse wird die chemische Verschiebungsentwicklung der ^{13}C -Spins während der angelegten Gradienten G_1 refokussiert.

$$\xrightarrow{\delta - \pi_{\phi_2} (^{13}\text{C}) - G_1 - \frac{t_1}{2} - \pi_{\phi_3} (^1\text{H}) - \frac{t_1}{2} - G_1 - \pi_{\phi_4} (^{13}\text{C}) - \delta}$$

$$4 \cdot [(-2I_x S_{y,x} \cdot \sin(\alpha) \cdot \cos(\omega_S t_1) - I_z \cdot \cos(\alpha))(2I_x S_{y,x} \cdot \sin(\alpha) \cdot \cos(\omega_S t_1) - I_z \cdot \cos(\alpha))]$$

Durch den 180° -Impuls auf Protonen, hebt sich die Wirkung der beiden Gradienten G_1 für ^1H auf. Für die ^{13}C -Komponente addiert sich die Wirkung dagegen auf. Dadurch wird die Magnetisierung in der xy -Ebene dephasiert.

e) Der folgende 90° -Impuls auf ^{13}C erzeugt wieder heteronukleare Antiphase magnetisierung auf ^1H .

$$\xrightarrow{\frac{\pi}{2}_{\phi_4} (^{13}\text{C})}$$

$$2 \cdot [(2I_x S_z \cdot \sin(\alpha) \cdot \cos(\omega_S t_1) - I_z \cdot \cos(\alpha))(-2I_x S_z \cdot \sin(\alpha) \cdot \cos(\omega_S t_1) - I_z \cdot \cos(\alpha))]$$

$$2 \cdot [(-2I_x S_z \cdot \sin(\alpha) \cdot \cos(\omega_S t_1) - I_z \cdot \cos(\alpha))(2I_x S_z \cdot \sin(\alpha) \cdot \cos(\omega_S t_1) - I_z \cdot \cos(\alpha))]$$

Die Phaseninformation der Entwicklung in t_1 bleibt als Amplitudenmodulation erhalten.

f) Die betrachtete Magnetisierung wird im Rücktransferschritt schließlich wieder in $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -Inphase magnetisierung auf Protonen umgewandelt und durch den Gradienten G_2 refokussiert.

$$\xrightarrow{2 \cdot \Delta + G_2}$$

$$2 \cdot [(I_y \cdot \sin(\alpha) \cdot \cos(\omega_S t_1) - I_z \cdot \cos(\alpha))(-I_y \cdot \sin(\alpha) \cdot \cos(\omega_S t_1) - I_z \cdot \cos(\alpha))]$$

$$2 \cdot [(-I_y \cdot \sin(\alpha) \cdot \cos(\omega_S t_1) - I_z \cdot \cos(\alpha))(I_y \cdot \sin(\alpha) \cdot \cos(\omega_S t_1) - I_z \cdot \cos(\alpha))]$$

Da der Term $-I_z \cdot \cos(\alpha)$ einen positiven Wert annehmen muss, gilt für den optimalen Anregungswinkel α_{opt} :

$$\alpha_{opt} = \pi - \beta_{opt}.$$

2.5.8 ALSOFAST-HMQC und ASAP-HMQC

Im Vergleich zum Ernst-Winkel HMQC verwendet das ALSOFAST (*ALternate SOFAST*)-HMQC [26] (dargestellt in Abb. 2.21) zusätzliche Impulse auf dem Protonenkanal. Proto-

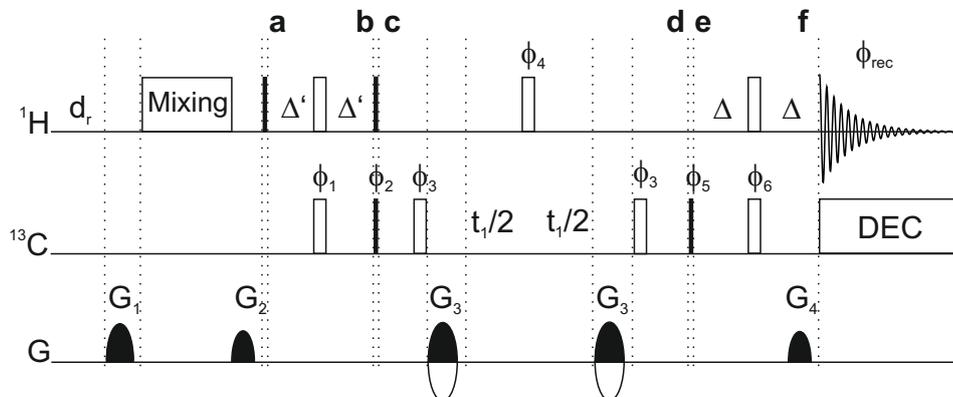


Abbildung 2.21: Impulssequenz des ALSOFAST- bzw. ASAP-HMQC [27]. In dem ALSOFAST-HMQC wird die Mischsequenz durch eine Wartezeit derselben Länge ersetzt. Die beiden *purge*-Gradienten bleiben dabei erhalten. Ernst-Winkel-Anregung wird durch Anpassung der Länge $2\Delta'$ des INEPT-Transferschrittes erreicht. Der vollständige Phasenzyklus lautet wie folgt: $\phi_1 = x$; $\phi_2 = x, -x$; $\phi_3 = 4(x), 4(-x)$; $\phi_4 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_5 = 4(-x), 4(x)$; $\phi_6 = 4(x), 4(-x)$; $\phi_{rec} = x, -x, x, -x, -x, x, -x, x$. Echo-/Antiecho- und Kohärenzordnungsselektion wird erreicht, indem die Gradienten G_3 und G_4 in folgender Weise alterniert werden: $G_3 = (40, -40) \%$, $G_4 = (20, 1, 20, 1) \%$. Zusätzlich zum Echo-/Antiecho-Aufnahmeschema werden die Phasen ϕ_1 und ϕ_2 zusammen mit der Empfängerphase ϕ_{rec} nach der TPPI-Methode invertiert. Zu näheren Informationen bezüglich Impulsen, *delays*, Gradienten und Entkopplung sei auf Kapitel 3.3.1 verwiesen.

nenmagnetisierung, die während der Magnetisierungstransferzeit $2\Delta'$ nicht auf den direkt gebundenen Kohlenstoff übertragen wird, erfährt durch den zusätzlichen 90° -Impuls eine Rotation in z . Da auf dem Protonenkanal nur zwei weitere 180° -Impulse folgen ist diese Magnetisierung vor der Datenaufnahme in z orientiert. Zum einen besteht diese Magnetisierung aus ^{12}C -gebundenen Protonen, die aufgrund der natürlichen Häufigkeitsverteilung zu etwa 99 % vorliegen. Weiterhin trägt die Magnetisierung der ^{13}C -gebundenen Protonen zum Reservoir bei, für die der Kohärenztransfer während $2\Delta'$ nicht vollständig ist. Dies kann als Ernst-Winkel- Pendant interpretiert werden. Es besteht folgender Zusammenhang zwischen dem effektiven Rotationswinkel β_{opt} und der eingestellten Transferzeit $2 \cdot \Delta'$:

$$\beta_{opt} = 2\pi J \Delta' \quad (2.23)$$

Im Allgemeinen wird die Transferzeit auf die mittlere $^1J_{CH}$ -Kopplungskonstante von 145Hz eingestellt. Das führt zu

$$\beta_{opt} = 290 \text{ Hz} \cdot \pi \Delta' \quad (2.24)$$

Eine Optimierung der Transferzeit Δ' für ein bestimmtes Molekül kann als einfaches Experiment durchgeführt werden. Dabei wird in einer Serie von Experimenten die Transferzeit schrittweise verändert. Gesucht wird der Wert, für den das Signal-zu-Rausch-Verhältnis maximal wird. Die optimale Transferzeit ist von der T_1 -Zeit und der Größe der ${}^1J_{CH}$ -Kopplung abhängig. Die Werte der ${}^1J_{CH}$ -Kopplung variieren allerdings für ein gegebenes Molekül. Für die Einstellung der Transferzeit muss daher ein Kompromiss gesucht werden. Der Vorteil dieses Experiments im Vergleich zum Ernst-Winkel HMQC ist, dass hier auch die ${}^{12}\text{C}$ -gebundenen (passiven) Protonen, die nicht zu dem letztlich gemessenen Signal beitragen, nutzbar gemacht werden. Gleichzeitig wird im Vergleich zum SOFAST-Experiment nicht mit bandselektiven Radiofrequenzpulsen gearbeitet, sodass der gesamte Resonanzbereich in einem Korrelationsexperiment erfasst werden kann. Ein Nachteil stellt dagegen die größere Anzahl der angewandten Radiofrequenzimpulse dar. Weiterhin beschränkt sich die Anwendbarkeit auf nicht isotopenmarkierte Proben. Das ASAP-HMQC [27] (*Acceleration by Sharing Adjacent Polarization*) ist im Prinzip analog dazu aufgebaut. Im Unterschied dazu wird die Erholungszeit jedoch durch eine WURST-2 Mischsequenz [94–96] ersetzt, die die z -Magnetisierung der ${}^{12}\text{C}$ -gebundenen Protonen auf die an ${}^{13}\text{C}$ gebundenen Protonenspins überträgt. Damit wird eine höhere Wiederholrate ermöglicht, oder die Sensitivität für eine gegebene Wiederholrate erhöht. Die Möglichkeit der zusätzlichen Ernst-Winkel-Anregung bleibt dabei erhalten.

Die Abb. 2.22 soll den Effekt der Mischsequenz veranschaulichen.

Im folgenden soll die Berechnung der ALSOFAS/ASAP-HMQC-Impulssequenz im Produktoperatorformalismus gezeigt werden. Dabei werden ${}^{12}\text{C}$ - und ${}^{13}\text{C}$ -gebundene Protonen getrennt betrachtet.

a) Der erste 90° Impuls mit der Phase x rotiert die Protonenmagnetisierung in Richtung $-y$.

$$\begin{aligned} {}^1\mathbf{H}\text{-}{}^{12}\text{C} &: \begin{pmatrix} I_z \\ I_z \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_z \\ I_z \end{pmatrix} \xrightarrow{\frac{\pi}{2}_x({}^1\text{H})} \begin{pmatrix} -I_y \\ -I_y \end{pmatrix} \\ {}^1\mathbf{H}\text{-}{}^{13}\text{C} &: \begin{pmatrix} I_z \\ I_z \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_z \\ I_z \end{pmatrix} \xrightarrow{\frac{\pi}{2}_x({}^1\text{H})} \begin{pmatrix} -I_y \\ -I_y \end{pmatrix} \end{aligned}$$

b) Im folgenden Kopplungs-*delay* der Länge $2\Delta' = \frac{1}{{}^1J_{CH}}$ wandelt sich diese für ${}^{13}\text{C}$ -gebundene Protonen in Antiphasemagnetisierung. Magnetisierung der ${}^{12}\text{C}$ gebundenen Protonen wird dagegen nur invertiert. Die Protonenmagnetisierung die durch Justierung des Kopplungs-*delays* nicht auf ${}^{13}\text{C}$ übertragen wurde, besitzt die gleiche Orientierung wie die Magnetisierung der ${}^{12}\text{C}$ -gebundenen Protonen.

$$\begin{pmatrix} -I_y \\ -I_y \end{pmatrix} \xrightarrow{\frac{\Delta' - \pi_x({}^1\text{H}) - \Delta'}{\Delta' - (\pi_x({}^1\text{H}) + \pi_{\phi_1}({}^{13}\text{C})) - \Delta'}}} \begin{pmatrix} I_y \\ -2I_x S_z \cdot \sin(2\pi\Delta') + I_y \cdot \cos(2\pi\Delta') \end{pmatrix}$$

c) Das folgende 90° Impulspaar auf ${}^1\text{H}$ und ${}^{13}\text{C}$ wandelt die Protonen-Antiphasemagnetisierung in heteronukleare Multiquantenmagnetisierung um. Gleichzeitig wird die nicht auf ${}^{13}\text{C}$ transferierte Protonenmagnetisierung in die z -Achse rotiert.

$$\xrightarrow{\frac{\pi}{2}_x({}^1\text{H}) + \frac{\pi}{2}_{\phi_2}({}^{13}\text{C})} \begin{pmatrix} I_z \\ 2I_x S_y \cdot \sin(2\pi\Delta') + I_z \cdot \cos(2\pi\Delta') \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_z \\ -2I_x S_y \cdot \sin(2\pi\Delta') + I_z \cdot \cos(2\pi\Delta') \end{pmatrix}$$

Diese z -Magnetisierung setzt sich aus Magnetisierung passiver und aktiver Protonen zusam-

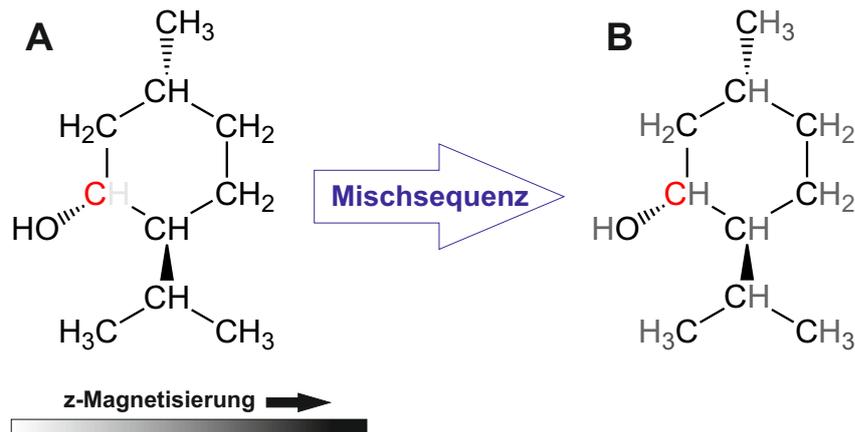


Abbildung 2.22: Schematische Darstellung der Wirkung der Mischsequenz im ASAP-HMQC-Experiment an Menthol als Beispielmolekül. Bei dem rot markierten Kohlenstoff handelt es sich um das einzige ^{13}C -Isotop, d.h. nur diese CH-Gruppe trägt in einem ^1H - ^{13}C -Korrelationsexperiment zum Spektrum bei. Im folgenden dieser Arbeit werden ^{13}C -gebundene Protonen häufig als aktive Protonen bezeichnet. Alle anderen Protonen in diesem Molekül sollen an ^{12}C (bzw. O) gebunden sein, was auf Grund der natürlichen ^{13}C -Häufigkeit von etwa 1,1 % nicht unwahrscheinlich. Diese Protonen werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit auch häufig als passive Protonen bezeichnet. **A** stellt die Situation direkt nach der Aufnahme des FID dar. Die Größe des Betrags der z -Magnetisierung ist durch den Schwarzwert der Protonen kodiert, dieser ist nach der Akquisition für das aktive Proton gering. Die Magnetisierung der passiven Protonen wird durch den Aufbau der Impulssequenz erhalten und befindet sich vor der Akquisition in Richtung der z -Achse. Durch Anwendung einer Mischsequenz gleicht sich schließlich die starke z -Magnetisierung des Reservoirs mit der schwachen des aktiven Protons aus und es stellt sich ein Mittelwert ein (**B**).

men, die durch Justierung des Transfer-*delays* nicht auf ^{13}C übertragen wurde.

d) In der inkrementierten Zeitperiode entwickelt sich die chemische Verschiebung der ^{13}C -Spins, die der ^1H -Spins wird durch den zentral platzierten 180° -Impuls refokussiert.

$$4 \cdot \left[\begin{array}{c} \xrightarrow{\delta - G_3 - \frac{t_1}{2} - \pi_{\phi_4}(^1\text{H}) - \frac{t_1}{2} - G_3 - \delta} \\ \delta - \pi_{\phi_3}(^{13}\text{C}) - G_3 - \frac{t_1}{2} - \pi_{\phi_4}(^1\text{H}) - \frac{t_1}{2} - G_3 - \pi_{\phi_3}(^{13}\text{C}) - \delta \end{array} \right] \left(\begin{array}{cc} -I_z & -I_z \\ 2I_x S_{y,x} \cdot \sin(2\pi\Delta') \cos(t_1\omega_S) - I_z \cdot \cos(2\pi\Delta') & -2I_x S_{y,x} \cdot \sin(2\pi\Delta') \cos(t_1\omega_S) - I_z \cdot \cos(2\pi\Delta') \end{array} \right)$$

Die Wirkung der beiden Gradienten G_3 auf die Multiquantenmagnetisierung addiert sich durch die zwei dazwischen platzierten 180° -Impulse für den ^{13}C -Anteil auf. Die Wirkung auf den Protonenanteil wird durch den einzelnen 180° -Impuls refokussiert. Der Phasenfaktor

der Gradienten ist zu diesem Zeitpunkt also durch

$$\begin{aligned}\Phi_3 &= -2p_C\gamma_C G_3 z \tau_3 \\ &= \mp 2\gamma_C G_3 z \tau_3\end{aligned}$$

gegeben. Die Kohärenzordnung der ^{13}C -Spins p_C mit dem gyromagnetischen Verhältnis γ_C kann die Werte $p_C = \pm 1$ annehmen. Der Gradientenimpuls G_3 hat die Dauer τ_3 .

e) Der folgende 90° -Impuls auf ^{13}C erzeugt aus der Multiquantenmagnetisierung Antiphase-Magnetisierung auf Protonen.

$$\begin{aligned}& \xrightarrow{\frac{\pi}{2}_{\phi_5} (^{13}\text{C})} \\ & 2 \cdot \left[\begin{pmatrix} -I_z \\ -2I_x S_z \cdot \sin(2\pi\Delta') \cos(t_1\omega_S) - I_z \cdot \cos(2\pi\Delta') \end{pmatrix} \begin{pmatrix} -I_z \\ 2I_x S_z \cdot \sin(2\pi\Delta') \cos(t_1\omega_S) - I_z \cdot \cos(2\pi\Delta') \end{pmatrix} \right] \\ & 2 \cdot \left[\begin{pmatrix} -I_z \\ 2I_x S_z \cdot \sin(2\pi\Delta') \cos(t_1\omega_S) - I_z \cdot \cos(2\pi\Delta') \end{pmatrix} \begin{pmatrix} -I_z \\ -2I_x S_z \cdot \sin(2\pi\Delta') \cos(t_1\omega_S) - I_z \cdot \cos(2\pi\Delta') \end{pmatrix} \right]\end{aligned}$$

f) Diese wird im Rücktransferschritt wieder in Inphase-Magnetisierung umgewandelt und durch den Gradienten G_4 refokussiert.

$$\begin{aligned}& \xrightarrow{\frac{\Delta - \pi_x(^1\text{H}) - (\Delta + G_4)}{\Delta - (\pi_x(^1\text{H}) + \pi_{\phi_6} (^{13}\text{C})) - (\Delta + G_4)}} \\ & 2 \cdot \left[\begin{pmatrix} I_z \\ I_y \cdot \sin(2\pi\Delta') \cos(t_1\omega_S) + I_z \cdot \cos(2\pi\Delta') \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_z \\ -I_y \cdot \sin(2\pi\Delta') \cos(t_1\omega_S) + I_z \cdot \cos(2\pi\Delta') \end{pmatrix} \right] \\ & 2 \cdot \left[\begin{pmatrix} I_z \\ -I_y \cdot \sin(2\pi\Delta') \cos(t_1\omega_S) + I_z \cdot \cos(2\pi\Delta') \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_z \\ I_y \cdot \sin(2\pi\Delta') \cos(t_1\omega_S) + I_z \cdot \cos(2\pi\Delta') \end{pmatrix} \right]\end{aligned}$$

Die Wirkung des Dekodierungsgradienten mit der Stärke G_4 und der Länge τ_4 kann durch den folgenden Phasenfaktor Φ_4 beschrieben werden:

$$\begin{aligned}\Phi_4 &= -p_H\gamma_H G_4 z \tau_4 \\ &= \gamma_H G_4 z \tau_4.\end{aligned}$$

Hierfür wurde vorausgesetzt, dass konventionsgemäß die Kohärenzordnung $p_H = -1$ detektiert wird. Mit der Refokussierungsbedingung ergibt sich damit

$$\begin{aligned}0 &= \Phi_3 + \Phi_4 \\ &= \mp 2\gamma_C G_3 z \tau_3 + \gamma_H G_4 z \tau_4.\end{aligned}$$

Nach Umformung ergibt sich

$$\frac{G_3 \tau_3}{G_4 \tau_4} = \frac{\gamma_H}{\pm 2\gamma_C}.$$

Haben weiterhin die Gradienten G_3 und G_4 die gleiche Länge ergibt sich

$$\frac{G_3}{G_4} = \frac{40}{\pm 20, 1}.$$

Hierfür wurde außerdem für

$$\frac{\gamma_H}{\gamma_C} = \frac{80}{20,1}$$

eingesetzt. Zur Selektion des Echo-Spektrums muss das Verhältnis der beiden Gradienten also

$$\frac{G_3}{G_4} = \frac{40}{20,1}$$

betragen. Zur Selektion des Antiecho-Spektrums entsprechend

$$\frac{G_3}{G_4} = \frac{40}{-20,1}.$$

Unter Berücksichtigung der Empfängerphase addiert sich die Magnetisierung schließlich zu

$$8I_y \cdot \sin(2\pi\Delta') \cos(t_1\omega_S)$$

auf. Gleichzeitig ist das Magnetisierungsreservoir der ^{12}C -gebundenen Protonen in Richtung z orientiert. Das gilt auch für die Magnetisierung die durch Justierung des Kopplungs-*delays* Δ' nicht auf ^{13}C übertragen wurde.

2.5.9 Kurzer Überblick der neu entwickelten Ansätze

ALSOFAST- und ASAP-HMQC bieten die Möglichkeit, bei natürlicher ^{13}C -Häufigkeit, ^1H , ^{13}C - Korrelationsspektren mit hoher Wiederholrate und ohne Einschränkungen hinsichtlich spektraler Breite aufzunehmen. Im Vergleich zum HSQC-Experiment birgt das HMQC jedoch den Nachteil, dass die mögliche Auflösung in der indirekten (^{13}C)-Dimension durch die Entwicklung von ^1H , ^1H -Kopplungen eingeschränkt ist [29]. Wird also eine hohe Auflösung in der indirekten Dimension gewünscht, zum Beispiel zur Signaldiskriminierung besonders signalreicher Spektrenbereiche, kann ein HSQC von Vorteil sein. In der konventionellen HSQC-Sequenz wird die ungenutzte Protonenmagnetisierung durch den Echo-/Antiecho-Selektionsgradienten dephasiert, eine Rephasierung durch den zugehörigen Dekodierungsgradienten direkt vor der Akquisition findet nicht statt. Diese Umstände lieferten die Motivation eine HSQC-Sequenz zu entwickeln, die es ermöglicht die Magnetisierung der passiven Protonen nutzbar zu machen. Dafür wurden im Rahmen dieser Arbeit drei neue Ansätze entwickelt, die in den folgenden Kapiteln vorgestellt werden sollen. Die erste Version des neuen HSQC-Experiments ermöglicht eine Rotation der Reservoiremagnetisierung in Richtung der z -Achse, vor der Anwendung des Kodierungsgradienten (siehe Kapitel 4.3.1).

In einer weiterentwickelten Version konnte durch Symmetrisierung der Impulssequenz, bei gleichzeitigem Erhalt der passiven Protonenmagnetisierung, die spektrale Qualität in schnellen Experimenten weiter gesteigert werden (Kapitel 4.3.3).

Im dritten Ansatz wird ein modifizierter Transferschritt eingesetzt, der es ermöglicht das Magnetisierungsreservoir schon vor der Aufnahme der indirekten Dimension in z -Richtung zu rotieren. Im Gegensatz zu den beiden ersten Experimenten ermöglicht diese Methode keine Ernst-Winkel-Anregung, es kann jedoch ein empfindlichkeitserhöhter Rücktransfer eingesetzt werden. Dieses Experiment wird in Kapitel 4.13.3 dieser Arbeit erläutert.

Kapitel 3

Material und Methoden

3.1 NMR-Spektrometer und Software

Alle im Folgenden gezeigten Experimente wurden an einem 600 MHz Avance III NMR-Spektrometer, ausgestattet mit einem ^1H , ^{13}C , ^{15}N invers detektierenden Kryoprobenkopf mit z -Gradienten der Firma Bruker durchgeführt. Die Prozessierung der Messdaten erfolgte mit der Software Topspin der Version 3.1. Bei Messdaten die mit dem *Non Uniform Sampling* (NUS)-Schema aufgenommen wurden, erfolgte die Rekonstruktion des vollständigen FID durch Prozessierung mit *compressed sensing* (cs). Dynamics Center 2.0.8 wurde für die Auswertung der *Inversion-Recovery*-Experimente zur Ermittlung der T_1 -Relaxationszeiten verwendet. Die Pulssequenzen wurden mit Mathematica 8, unter Verwendung des Produktoperatorformalismus in Form des POMA-Skripts [102] berechnet. Zur Funktionsanpassung an Messdaten wurde Origin der Version 8.1 verwendet.

3.2 Verwendete Proben

An dieser Stelle sind die Probenkonzentrationen und die verwendeten Lösungsmittel für alle Proben in tabellarischer Form gezeigt, die zur Messung der in dieser Arbeit gezeigten NMR-Spektren gedient haben.

Probe	Konzentration	Lösungsmittel	Hersteller	Reinheit
Menthol	500 mM	CDCl_3	Fluka	99 %
Borneol	500 mM	CDCl_3	Sigma Aldrich	97 %
Borneol	100 mM	CDCl_3	Sigma Aldrich	97 %
Norcamphor	200 mM	CDCl_3	Alfa Aesar	98 %
Saccharose	100 mM	90 % H_2O , 10 % D_2O	Fluka	99 %
Saccharose	2 mM	90 % H_2O , 10 % D_2O	Fluka	99 %

3.3 Allgemeine Angaben zu den gezeigten Impulssequenzen

3.3.1 Experimentelle Parameter

In diesem Kapitel sollen einige allgemeingültige Einstellungen zu den gezeigten Impulssequenzen angegeben werden. Abweichungen von diesen Daten werden in der Bildunterschrift des entsprechenden Experiments angegeben.

Für genauere Informationen zu den verwendeten Radiofrequenzimpulsen sei auf die Legende in Kapitel 3.3.2 verwiesen. Die eingestellte Phase aller Impulse ist x , es sei denn, in der Bildunterschrift der entsprechenden Sequenz wird dies anders angegeben. Zur heteronuklearen Entkopplung, während der Aufnahme des freien Induktionszerfalls (engl. *free induction decay* bzw. FID), wird GARP mit einer Radiofrequenzamplitude von 2,5 kHz verwendet. In den Impulssequenzen ist der Entkopplungsblock durch **DEC** gekennzeichnet. d_r stellt in allen gezeigten Experimenten das Erholungs-*delay* zwischen der Aufnahme zweier *scans* oder t_1 -Inkrementierungsschritte dar. Das Transfer-*delay* $\Delta = \frac{1}{4^1 J_{CH}}$ wird auf eine mittlere Kopplungskonstante von $^1 J_{CH} = 145$ Hz eingestellt. In HSQC-Experimenten mit empfindlichkeitserhöhtem Rücktransferschritt wird $\Delta^m = \frac{1}{8^1 J_{CH}}$ eingestellt, wenn die Empfindlichkeit für alle Multiplizitäten erhöht werden soll. Sollen nur die Signale der CH-Gruppen verstärkt werden, wird $\Delta^m = \frac{1}{4^1 J_{CH}}$ gesetzt.

Als Mischsequenz kam für alle Experimente DIPSI-2 [103] mit einer Mischzeit von 34,54ms und einer Radiofrequenzamplitude von 5 kHz zum Einsatz. In den Impulssequenzen ist die Mischsequenz durch **Mixing** gekennzeichnet.

In allen Experimenten, die nicht das ASAP-oder ALSOFAST-Schema verwenden, werden zur Echo-/Antiecho- bzw. Kohärenzordnungs-Selektion die zwei Gradienten G_1 und G_2 nach dem Schema $G_1 = (80\%, -80\%)$, $G_2 = (20,1\%, 20,1\%)$ alterniert. Die Prozentangaben beziehen sich jeweils auf die maximal mögliche Gradientenstärke von 50,4 G/cm. Zusätzlich werden die beiden Impulsphasen ϕ_1 und ϕ_2 , zusammen mit der Empfängerphase, nach der TPPI-Methode [104] invertiert.

Im ASAP-HSQC und allen darauf basierenden Varianten stellen G_1 und G_2 *purge*-Gradienten, mit den Stärken $G_1 = 43\%$ und $G_2 = 33\%$ dar. Informationen zur Echo-/Antiecho- bzw. Kohärenzordnungs-Selektion sind in den entsprechenden Bildunterschriften angegeben. Im ALSOFAST-HSQC wird die DIPSI-2 Mischsequenz durch ein *delay* der gleichen Länge ersetzt. Die *purge*-Gradienten bleiben erhalten.

Die Varianten des LowCost-ASAP-HSQC-Experiments nutzen ebenso die *purge*-Gradienten G_1 und G_2 . Zur Echo-/Antiecho- bzw. Kohärenzordnungs-Selektion werden die zwei Gradienten G_3 und G_4 nach dem Schema $G_3 = (80\%, -80\%)$, $G_4 = (20,1\%, 20,1\%)$ alterniert. Weitere experimentelle Details wie Phasenzyklen und *delay*-Längen, sind in den Bildunterschriften der jeweiligen Experimente angegeben.

3.3.2 Übersicht der verwendeten Radiofrequenzimpulse

Abb. 3.1 zeigt eine Tabelle, in der alle wichtigen Informationen zu den Radiofrequenzimpulsen, die in den Experimenten, die in dieser Arbeit vorgestellt werden, enthalten sind.

Symbol	Rotationswinkel in Grad	Typ	Rotationsachse (UR)/ Rotationspfad (PP)		Name	RF-Amplitude in kHz		Bandbreite in kHz		Pulslänge in μs		Toleranz in $\pm\%$		Digitalisierungspunkte	
			^1H	^{13}C		^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
▬	90	RP	x	x	Rechteckpuls	max	max	/	/	~8	12	/	/	/	/
▭	180	RP	x	x	Rechteckpuls	max	max	/	/	~8	12	/	/	/	/
⌣	180	AP	x	x	Chirp	/	/	/	/	/	500	/	/	/	/
▮	90	PP	z nach x	z nach y	BEBOP	20	10	10	37,5	550	550	20	5	1100	1100
▮	90	PP	y nach z	-y nach z	BEBOP ^{tr}	20	10	10	37,5	550	550	20	5	1100	1100
▮	180	PP	z nach -z	z nach -z	BIBOP	20	10	11	37,5	100	600	20	5	200	1200
▮	90	UR	x	x	BURBOP-90 _x	20	10	10	37,5	600	750	10	5	1200	1500
▮	90	UR	x	x	BURBOP-90 _x	20	/	10	/	200	/	20	/	400	/
▮	180	UR	x	y	BURBOP-180 _x	20	10	10	37,5	600	1100	20	5	1200	2200

Abbildung 3.1: Tabelle mit allen Informationen zu den in dieser Arbeit verwendeten Radiofrequenzimpulsen. Die Typenbezeichnung (RP) steht für Rechteckimpulse, (AP) für adiabatische Impulse, (PP) für *point-to-point*-Impulse und (UR) für *universal rotation* Impulse. Beim CHIRP-Impuls [69] handelt es sich um einen 180°-Impuls zur Inversion. Beim BEBOP-Impuls [35–39] handelt es sich um einen 90°-PP-Impuls, der Zusatz *tr* (*time reversed*) steht für ein zeitinvertiertes Phasenprofil. Der BIBOP [40, 41] ist ein 180°-PP- oder Inversions-Impuls. Beim BURBOP-90_x [42–46] handelt es sich um einen UR-Impuls mit dem Rotationswinkel 90°, der BURBOP-180_x liefert einen Rotationswinkel von 180°. Die Rotationsachse gibt die Drehachse, der Rotationspfad den Transferweg an, der bei einer in Topspin eingestellten Phase 0 stattfindet. Üblicherweise entspricht die Phase 0 einer Rotation um x . Die Radiofrequenzamplitude (RF) gibt an mit welcher Leistung die Impulse eingestrahlt werden. Die Bandbreite gibt den Frequenzbereich an, für den die Impulse unter gegebenen Toleranzgrenzen den gewünschten Transfer, oder die gewünschte Rotation ausführen. In der letzten Spalte ist die Zahl der Digitalisierungspunkte für die unterschiedlichen Impulsformen angegeben.

Manche finden in den Sequenzen Anwendung, die im Grundlagenteil vorgestellt werden. Die Sequenzen sollen einen Überblick über aktuell vorhandene schnelle Impulstechniken geben, oder dienen als Vergleich zu den im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelten Experimenten. Für die neu entwickelten Experimente wurde jeweils sowohl eine Version mit Rechteckimpulsen, als auch immer eine Version erstellt, in der Breitbandimpulse aus der Optimalen Steuerungstheorie (*Optimal Control Theory* (OCT)) zum Einsatz kommen. Diese Impulse sind gegenüber B₁-Feld-Inhomogenitäten kompensiert und decken einen größeren Frequenzbereich ab, verglichen mit Rechteckimpulsen, die mit gleicher Radiofrequenzamplitude eingestrahlt werden. Die neu entwickelten Impulssequenzen unter Verwendung von

Breitbandimpulsen, sind dieser Arbeit angehängt. Dabei handelt es sich um Versionen für Spektrometer der Firma Bruker.

3.3.3 Allgemeine Angaben zur Prozessierung der Spektren

Alle in dieser Arbeit gezeigten NMR-Spektren wurden mit Topspin der Version 3.1 prozessiert. In den meisten Fällen wurde mit *linear prediction* [105] und *zero filling* [106, 107] die Zahl der digitalen Punkte des FID, jeweils um den Faktor 2 erhöht. Alle Messdaten, die mit dem *Non Uniform Sampling* Schema aufgenommen wurden, wurden mit *compressed sensing* prozessiert. Abweichungen sind in den Bildunterschriften der entsprechenden Spektren angegeben.

3.3.4 Angaben zu den Berechnungen im Produktoperatorformalismus

In den Berechnungen unter Verwendung des Produktoperatorformalismus [108] werden Relaxationseffekte vernachlässigt, ebenso werden die Phasenfaktoren durch die Kohärenzordnungsselektionsgradienten nicht mitgeführt. Die Echo-/Antiecho-Selektion wird jedoch in einigen Fällen separat betrachtet.

Der Spin I kennzeichnet die Protonen-, der Spin S entspricht den ^{13}C -Kernspins. Die Indizes x , y und z stellen die Orientierung im kartesischen Koordinatensystem dar. Da die Operatoren sowohl für ^{12}C -gebundene, als auch für ^{13}C -gebundene Protonen behandelt werden, sind beide zusammen jeweils in einem zweidimensionalen Vektor

$$\begin{pmatrix} ^{12}\text{C-gebundene Protonen} \\ ^{13}\text{C-gebundene Protonen} \end{pmatrix}$$

dargestellt. Unter ^{12}C -gebundenen Protonen werden im Folgenden alle Protonen zusammengefasst, die nicht direkt an einen ^{13}C -Kernspin gebunden sind. Also alle Protonen, die nicht zu den Signalen in einem $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektrum über eine Bindung beitragen. In dieser Arbeit werden ^{13}C -gebundene Protonen auch häufig als aktive Protonen, ^{12}C und an andere Kerne gebundene Protonen als passive Protonen bezeichnet.

$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -Kopplungen über mehr als eine Bindung werden in den Berechnungen nicht berücksichtigt. Das heißt, für ^{12}C -gebundene Protonen wird näherungsweise $J_{CH} = 0$ angenommen. Die einzelnen Schritte eines Phasenzyklus sind in runden Klammern nacheinander dargestellt. Zur Reduktion des Platzbedarfs, werden in einigen Fällen einzelne Schritte durch zusätzliche eckige Klammern zusammengefasst. Liefert z.B. ein Phasenzyklus mit acht Schritten die Operatoren

$$\begin{pmatrix} I_z \\ I_x \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_z \\ -I_x \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_z \\ I_x \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_z \\ -I_x \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_z \\ -I_x \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_z \\ I_x \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_z \\ -I_x \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_z \\ I_x \end{pmatrix},$$

wird

$$2 \cdot \left[\begin{pmatrix} I_z \\ I_x \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_z \\ -I_x \end{pmatrix} \right] 2 \cdot \left[\begin{pmatrix} I_z \\ -I_x \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_z \\ I_x \end{pmatrix} \right]$$

geschrieben. An einigen Stellen wird die chemische Verschiebungsentwicklung vernachlässigt, sofern diese vor der Anwendung des folgenden 90° -Impulses und der Aufnahme des FID wieder refokussiert wurde. Auf die Entwicklung homonuklearer Kopplungen wird in den Betrachtungen rechnerisch nicht eingegangen.

3.3.5 Betrachtung des Energieeintrags

Analog zu anderen schnellen NMR-Experimenten muss auch beim ASAP-HSQC und all seinen Varianten berücksichtigt werden, dass sie, aufgrund der hohen Wiederholraten und geringen Erholzeiten d_r , einen sehr hohen *duty cycle* aufweisen. Dadurch kann sich die Probe aufheizen, oder es entsteht ein Temperaturgradient in der Probe, der wiederum zu signifikanter Linienverbreiterung führt. Um die NMR-Probe zu schützen, sollte ein NMR-Thermometer eingesetzt werden, beispielsweise Methanol. So kann die Proben temperatur auf den gewünschten Wert eingestellt werden. Das Experiment sollte sorgfältig getestet werden, um eine zu starke Erhitzung der Spektrometerelektronik zu vermeiden bzw. rechtzeitig zu erkennen. In vielen hier vorgestellten Spektren wurde d_r nahezu auf den Wert 0 gesetzt. Es wird aber empfohlen, bei ersten Testversuchen mit höheren Werten im Bereich von 100 ms zu beginnen und diesen dann kontinuierlich zu verringern. Dabei sollte stets das Verhalten des Lock-Signals beobachtet werden. Am einfachsten gelingt das, indem man vorerst die Gradientenstärken in der Impulssequenz auf den Wert 0 % setzt und das Lock-Signal innerhalb des obersten Kastens des Lockfensters positioniert (Abb. 3.2 A). Wenn sich das Locksignal bei Ausführung des Experiments 2-4 Kästen darunter stabilisiert, ist der Leistungseintrag noch nicht zu hoch und ein kürzerer Wert für d_r kann getestet werden. Sinkt das Lock-Signal jedoch kontinuierlich ohne Stabilisierung ab, sollte das Experiment sofort gestoppt werden und im nächsten Versuch ein längerer Wert für d_r gewählt werden. Alternativ kann die eingestrahlte Energie durch Herabsetzen der Impulsleistung, oder der Entkopplungsleistung verringert werden. Sollte das Experiment an einem Spektrometer, das mit einem Kryoprobenkopf ausgestattet ist, verwendet werden, sollte zusätzlich der Wert des NMR-coil heater (Abb. 3.2) beobachtet werden. Dieser Wert darf nie auf 0 % absinken, denn das würde bedeuten, dass sich der Probenkopf aufwärmt. Um sicher zu gehen, sollte der Wert auch die 10 %-Grenze nicht unterschreiten. Gerade, wenn Experimente mit einer langen Gesamtdauer, also mit vielen t_1 -Inkrementierungsschritten durchgeführt werden sollen, sind die aufgeführten Punkte zu überprüfen.

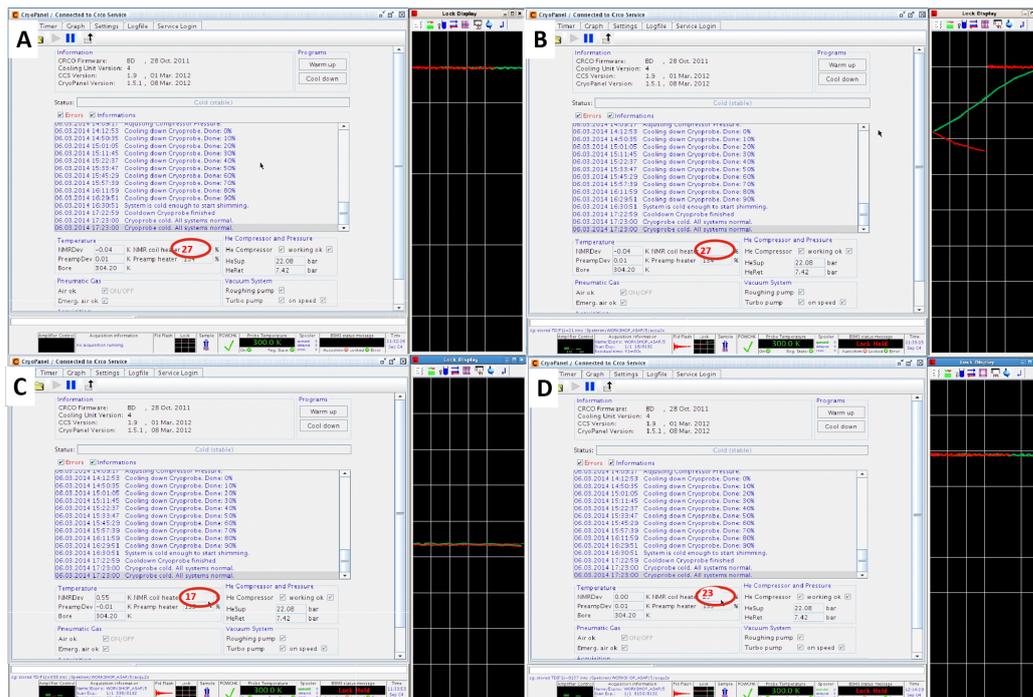


Abbildung 3.2: Die vier Teile (A bis D) der Abbildung zeigen jeweils das Topspin-Akquisitionsfenster. Auf der rechten Seite ist das Lock-Fenster dargestellt, der Wert des NMR-coil heater ist rot umrandet. In A sind die Gegebenheiten vor der Messung gezeigt, B stellt den Start der Messung dar, C bildet den Zustand einige Sekunden nach dem Start ab und D zeigt den Zeitpunkt kurz vor Ende der Messung. Der Wert des NMR-coil heater sinkt kurzzeitig von seinem Maximalwert 27 % auf einen Tiefwert von 17 % ab und stabilisiert sich im Laufe der Messung bei 25 %. Das Locksignal sinkt ebenso kurzzeitig um etwa 3-4 Kästen, bevor es sich etwa einen Kasten unter dem Ausgangswert stabilisiert.

Kapitel 4

Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel werden die im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelten Impulssequenzen vorgestellt und detailliert im Produktoperatorformalismus berechnet. Weiterhin werden die Experimente mit aktuellen Impulssequenzen hinsichtlich Empfindlichkeit und resultierender spektraler Qualität verglichen.

Im ASAP-Schema wird das herkömmliche Erholungs-*delay* d_r , zum Wiederaufbau der Gleichgewichtsmagnetisierung, durch eine Mischsequenz ersetzt. Da die Sequenzen die z -Magnetisierung der passiven Protonen erhalten, wird diese auf die aktiven Spins übertragen. Dadurch kann die Wiederholrate der Experimente zum Teil erheblich erhöht werden. Zu Beginn des Kapitels soll die Auswirkung der Mischsequenz auf den Wiederaufbau der z -Magnetisierung anhand von Messdaten verdeutlicht werden.

4.1 Auswirkung der Mischsequenz

Um zu verdeutlichen, welche Auswirkung das ASAP-Schema auf den Wiederaufbau der z -Magnetisierung hat, wurde ein Modellexperiment mit zwei unterschiedlichen bandselektiven *Inversion Recovery*-Experimenten durchgeführt. Dazu wurde das in Abb. 4.1 mit einer blauen Ellipse markierte Protonensignal, das im NMR-Spektrum relativ isoliert erscheint, selektiv invertiert. Auf den Inversionsimpuls folgt in einem Fall eine inkrementierte Wartezeit zum Wiederaufbau der z -Magnetisierung durch longitudinale Relaxation. Im anderen Fall schließt sich eine DIPSI-2 Mischsequenz [103] mit inkrementierter Mischzeit an. Diese mischt die in $+z$ orientierte Magnetisierung des nicht angeregten Reservoirs, mit der selektiv invertierten Magnetisierung. Der Wiederaufbau der z -Magnetisierung in Abhängigkeit der Zeitdauer τ , die sich zwischen der selektiven Inversion und dem 90° -Impuls befindet, ist in Abb. 4.2 dargestellt. Unter Verwendung der Mischsequenz steht bereits nach einem τ von etwa 40 ms (siehe Abb. 4.1) die maximale $+z$ -Magnetisierung zur Verfügung. Durch die Mischsequenz wird die longitudinale Relaxation jedoch nicht beschleunigt, tatsächlich wird sie umgangen. In der gleichen Zeitdauer ist der Anteil der wiederaufgebauten $+z$ -Magnetisierung durch longitudinale Relaxation vergleichsweise gering. In der Praxis hat sich bei der Untersuchung von Menthol und anderer Proben die Mischsequenz DIPSI-2 [103]

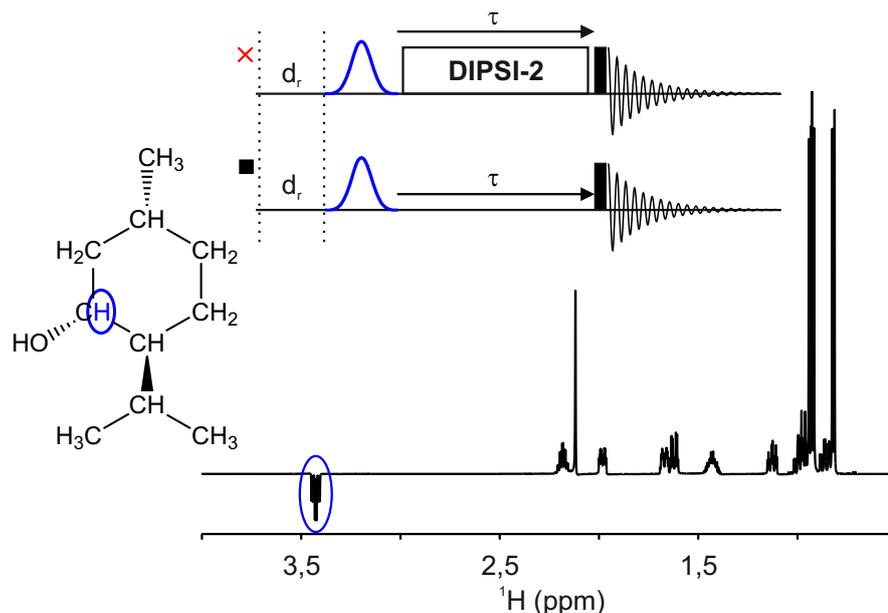


Abbildung 4.1: Die Abbildung zeigt zwei unterschiedliche *Inversion-Recovery*-Experimente, mit einem bandselektiven 180° -Impuls (dargestellt durch die blaue Gaußkurve), durch den nur das mit einer blauen Ellipse markierte Protonensignal in Menthol invertiert wird. In einem Fall schließt sich eine DIPSI-2 Mischsequenz [103] mit inkrementierter Mischzeit τ an. Die Impulssequenz dieses Experiments ist mit einem roten Kreuz gekennzeichnet. Im anderen Fall folgt dem 180° -Impuls ein inkrementiertes *delay* der Länge τ . Die Impulssequenz dieses Experiments ist mit einem schwarzen Quadrat gekennzeichnet. Die selben Symbole werden in der Abbildung 4.2 für die Messpunkte des entsprechenden Experiments verwendet. Der darauf folgende 90° -Impuls erzeugt aus der wiederaufgebauten *z*-Magnetisierung transversale Magnetisierung, die schließlich als FID detektiert wird.

mit einer Mischzeit von 34,54 ms als optimal erwiesen. Sollen jedoch partiell orientierte Proben untersucht werden, die eine größere Kopplungsbandbreite aufweisen, liefern andere Mischsequenzen wie z.B. MOCCA-xy16 [109–111] eine höhere Effizienz und Empfindlichkeit [61].

Zum weiteren Vergleich ist in Abb. 4.3 der Wiederaufbau der $+z$ -Magnetisierung des ^1H -Kernspins durch T_1 -Relaxation in einem größeren Zeitfenster (von $4\ \mu\text{s}$ bis 5 s) dargestellt. An die Messpunkte wurde die Gleichung 2.19 angepasst und damit eine longitudinale Relaxationszeit von $T_1 = (2,47 \pm 0,03)\text{s}$ ermittelt. In 40 ms erfolgt nach Gleichung 2.19 durch T_1 -Relaxation ein Wiederaufbau der $+z$ -Magnetisierung von lediglich 3,2%.

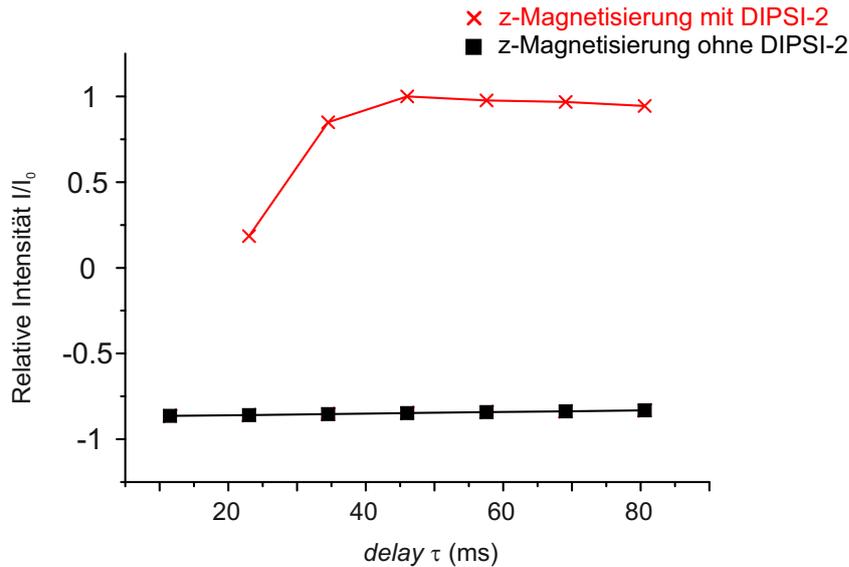


Abbildung 4.2: Wiederaufbau der z -Magnetisierung eines selektiv invertierten Protonensignals von Menthol. Die roten Kreuze zeigen den Intensitätsverlauf bei Anwendung der Mischsequenz DIPSI-2 mit der Mischzeit τ . Die schwarzen Kästchen zeigen den Verlauf für ein einfaches $delay$ der Länge τ . Nach ungefähr 40 ms ist für das Experiment unter Verwendung der Mischsequenz die maximale relative Intensität erreicht, im Gegensatz dazu hat zu diesem Zeitpunkt für das Experiment ohne Mischsequenz nahezu kein Wiederaufbau stattgefunden.

4.2 Konventionelles HSQC-Experiment

Im konventionellen HSQC-Experiment wird die Protonenmagnetisierung, die während des INEPT-Schrittes nicht auf direkt-gebundene ^{13}C -Kerne übertragen wurde, durch die Echo-/Antiecho-Selektionsgradienten dephasiert. Dazu zählt die Magnetisierung ^{12}C -gebundener Protonen, bzw. aller Protonen, die nicht direkt an ^{13}C gebunden sind. Der Einfachheit halber werden diese Protonen im Folgenden den ^{12}C -gebundenen Protonen zugerechnet. Weiterhin wird auch die Protonenmagnetisierung, die als Folge der Ernst-Winkel-artigen Anregung zurückbehalten wurde, dephasiert.

Hier soll nun mit Hilfe der entsprechenden Produktoperatoren der prinzipielle Unterschied von ALSOFAST- bzw. ASAP-HSQC und dem konventionellen HSQC rechnerisch verdeutlicht werden. Für das ALSOFAST-HSQC werden dabei zwei unterschiedliche Sequenzen behandelt. Zu Beginn soll das konventionelle HSQC betrachtet werden. Es werden die zu den in Abb. 4.4 markierten Zeitpunkten vorliegenden Produktoperatoren berechnet.

a) Der erste 90° -Impuls mit der Phase x rotiert die Magnetisierung in Richtung $-y$.

$$\begin{aligned} {}^1\mathbf{H}\text{-}^{12}\text{C} &: \left(\begin{array}{c} I_z \\ I_z \end{array} \right) \xrightarrow{\frac{\pi}{2}_x(^1H)} \left(\begin{array}{c} -I_y \\ -I_y \end{array} \right) \\ {}^1\mathbf{H}\text{-}^{13}\text{C} &: \left(\begin{array}{c} I_z \\ I_z \end{array} \right) \xrightarrow{\frac{\pi}{2}_x(^1H)} \left(\begin{array}{c} -I_y \\ -I_y \end{array} \right) \end{aligned}$$

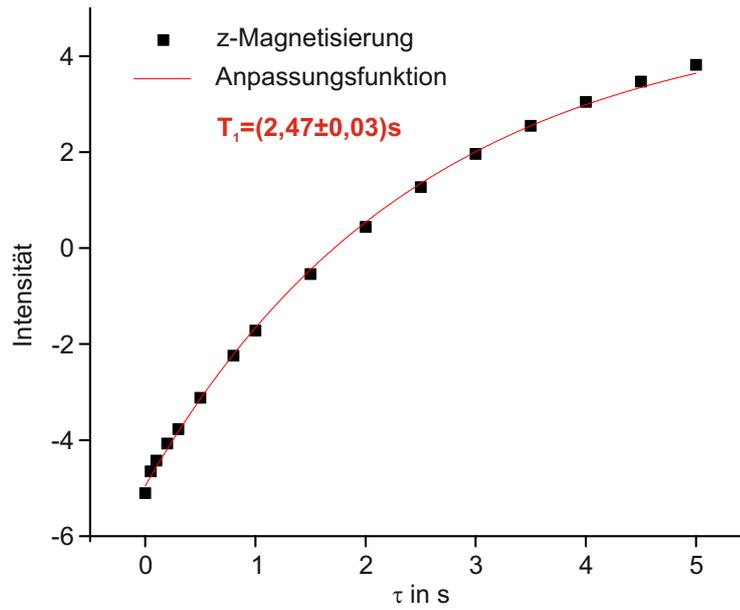


Abbildung 4.3: Wiederaufbau der z -Magnetisierung des in Abb. 4.1 mit einer blauen Ellipse markierten Kernspins. Für die Messung wurde das herkömmliche *Inversion Recovery*-Verfahren mit breitbandiger Inversion verwendet. Das Zeitintervall τ wurde für den Magnetisierungsaufbau in 16 nichtlinearen Schritten (schwarze Quadrate) von $4 \mu\text{s}$ bis 5 s erhöht. Das Erholungs-*delay* d_1 betrug 3 s, die Akquisitionszeit 3,4 s. Für jeden Messpunkt wurden 2 *scans* aufgenommen. Die Funktionsanpassung lieferte für die T_1 -Zeit einen Wert von $T_1 = 2,47 \pm 0,03$ s.

b) Im folgenden Kopplungs-*delay* der Länge $2\Delta = \frac{1}{J_{CH}}$ entwickelt sich daraus für ^{13}C -gebundene Protonen ^1H , ^{13}C -Antiphasemagnetisierung, die Magnetisierung der ^{12}C -gebundenen Protonen wird dagegen invertiert.

$$\begin{pmatrix} -I_y \\ -I_y \end{pmatrix} \xrightarrow{\begin{matrix} \Delta - \pi_x(^1\text{H}) - \Delta \\ \Delta - (\pi_x(^1\text{H}) + \pi_{\phi_1}(^{13}\text{C})) - \Delta \end{matrix}} \begin{pmatrix} I_y \\ -2I_x S_z \end{pmatrix}$$

c) Das folgende 90° -Impulspaar überträgt die Protonen-Antiphasemagnetisierung auf den Heterokern, so dass Antiphasemagnetisierung auf ^{13}C transversal vorliegt. Die ^{12}C -gebundenen Protonen werden aufgrund der Phase des 90° -Impulses nicht beeinflusst.

$$\begin{pmatrix} I_y \\ -2I_x S_z \end{pmatrix} \xrightarrow{\begin{matrix} \frac{\pi}{2}_y(^1\text{H}) \\ \frac{\pi}{2}_y(^1\text{H}) + \frac{\pi}{2}_{\phi_2}(^{13}\text{C}) \end{matrix}} \begin{pmatrix} I_y \\ -2I_z S_y \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_y \\ 2I_z S_y \end{pmatrix}$$

d) In der folgenden inkrementierten Zeitperiode t_1 entwickelt sich die chemische Verschiebung des Heterokerns ^{13}C . Es wird nur die *cos*-modulierte Magnetisierungskomponente betrachtet, da die *sin*-modulierte Komponente im weiteren Verlauf der Sequenz in nicht-

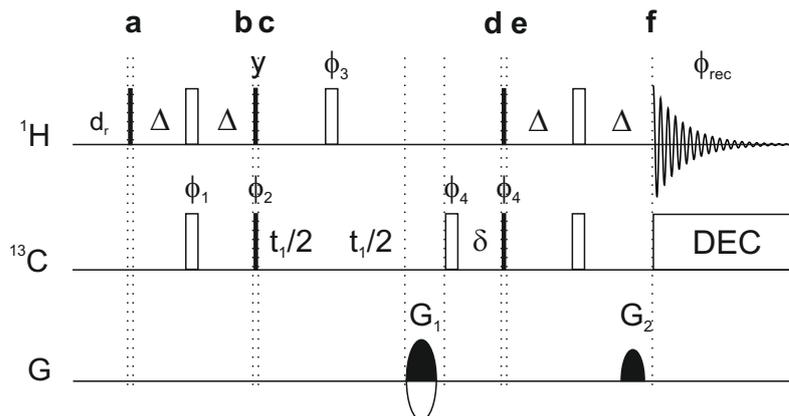


Abbildung 4.4: Impulssequenz eines konventionellen HSQC-Experiments. Bestimmte Abschnitte sind mit Buchstaben markiert. Die zu diesen Zeitpunkten vorliegenden Produktoperatoren sind im Text angegeben. Das *delay* δ dient der Refokussierung chemischer Verschiebungsentwicklung und heteronuklearer Kopplung. Der vollständige Phasenzzyklus lautet wie folgt: $\phi_1 = x$; $\phi_2 = x, -x$; $\phi_3 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_4 = 4(x), 4(-x)$; $\phi_{rec} = x, -x, x, -x, -x, x, -x, x$. Zu näheren Informationen bezüglich Impulsen, Kohärenzordnungsselektion und Entkopplung sei auf Kapitel 3.3.1 verwiesen.

detektierbare Multiquantenmagnetisierung umgewandelt wird.

$$\begin{pmatrix} I_y \\ -2I_z S_y \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_y \\ 2I_z S_y \end{pmatrix} \xrightarrow{\frac{t_1/2 - \pi\phi_3(^1H) - t_1/2 - G_1 - \delta}{t_1/2 - \pi\phi_3(^1H) - t_1/2 - G_1 - \pi\phi_4(^{13}C) - \delta}} \begin{pmatrix} I_{x,y} \\ -2I_z S_{y,x} \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_{x,y} \\ 2I_z S_{y,x} \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_{x,y} \\ -2I_z S_{y,x} \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_{x,y} \\ 2I_z S_{y,x} \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \\ \begin{pmatrix} I_{x,y} \\ -2I_z S_{y,x} \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_{x,y} \\ 2I_z S_{y,x} \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_{x,y} \\ -2I_z S_{y,x} \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_{x,y} \\ 2I_z S_{y,x} \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix}$$

Durch den Echo-/Antiecho-Selektionsgradienten G_1 wird die transversale Magnetisierung in der x, y -Ebene dephasiert. Die Magnetisierung der ^{12}C -gebundenen Protonen wird durch den Gradienten G_2 nicht wieder refokussiert, das heißt sie ist effektiv gesättigt. Gleiches gilt für Protonenmagnetisierung, die während des INEPT-Transfers nicht auf den direkt gebundenen ^{13}C -Kopplungspartner übertragen wurde. Eine ERNST-Winkel-Anregung, wie sie beispielsweise im ALSOFASST-HMQC [26] verwendet wird, ist für das konventionelle HSQC-Experiment also nicht möglich. Ebenso besteht keine Möglichkeit die Magnetisierung der passiven Protonen zu nutzen. Die $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -Antiphasemagnetisierung wird hingegen durch den Gradienten G_2 vor der Akquisition refokussiert. Man kann die Magnetisierung also wie folgt beschreiben:

$$\begin{pmatrix} 0 \\ -2I_z S_y \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 \\ 2I_z S_y \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 \\ -2I_z S_y \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 \\ 2I_z S_y \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix} \\ \begin{pmatrix} 0 \\ -2I_z S_y \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 \\ 2I_z S_y \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 \\ -2I_z S_y \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 \\ 2I_z S_y \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix}$$

e) Durch das folgende 90°-Impulspaar auf ^1H und ^{13}C wird die transversale Komponente schließlich wieder auf Protonen übertragen. Die Entwicklung der ^{13}C -Magnetisierung während t_1 bleibt als Amplitudenmodulation erhalten.

$$\frac{\frac{\pi}{2}_x(^1\text{H})}{\frac{\pi}{2}_x(^1\text{H}) + \frac{\pi}{2}_{\phi_4}(^{13}\text{C})} \rightarrow$$

$$\begin{pmatrix} 0 \\ 2I_y S_z \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 \\ -2I_y S_z \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 \\ 2I_y S_z \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 \\ -2I_y S_z \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix} \\ \begin{pmatrix} 0 \\ -2I_y S_z \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 \\ 2I_y S_z \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 \\ -2I_y S_z \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 \\ 2I_y S_z \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix}$$

f) Anschließend wird im Rücktransferschritt die Antiphase magnetisierung in Inphasemagnetisierung umgewandelt und der Dekodierungsgradient G_2 angelegt.

$$\begin{pmatrix} 0 \\ 2I_y S_z \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 \\ -2I_y S_z \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 \\ 2I_y S_z \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 \\ -2I_y S_z \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix} \\ \begin{pmatrix} 0 \\ -2I_y S_z \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 \\ 2I_y S_z \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 \\ -2I_y S_z \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 \\ 2I_y S_z \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix}$$

$$\frac{\Delta - \pi_x(^1\text{H}) - (\Delta + G_2)}{\Delta - (\pi_x(^1\text{H}) + \pi_x(^{13}\text{C})) - (\Delta + G_2)} \rightarrow$$

$$\begin{pmatrix} 0 \\ -I_x \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 \\ I_x \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 \\ -I_x \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 \\ I_x \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix} \\ \begin{pmatrix} 0 \\ I_x \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 \\ -I_x \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 \\ I_x \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 \\ -I_x \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix}$$

Diese addiert sich unter Berücksichtigung der Empfängerphase zu

$$\begin{pmatrix} 0 \\ -8I_x \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix}$$

auf.

4.3 ALSOFAST- und ASAP-HSQC-Sequenzen

In diesem Kapitel werden zwei unterschiedliche Versionen des ASAP- und des ALSOFAST-HSQC-Experiments vorgestellt und rechnerisch behandelt. Zur Berechnung werden die Rechteckimpulsversionen herangezogen. In Kapitel 4.4 sind die Impulssequenzen unter Verwendung von optimierten Breitbandimpulsen aus der Optimalen Steuerungstheorie (*Optimal Control Theory* (OCT)) angegeben.

4.3.1 Original ALSOFAST- und ASAP-HSQC

Die Impulssequenz des originalen ASAP-HSQC ist in Abb. 4.5 dargestellt.

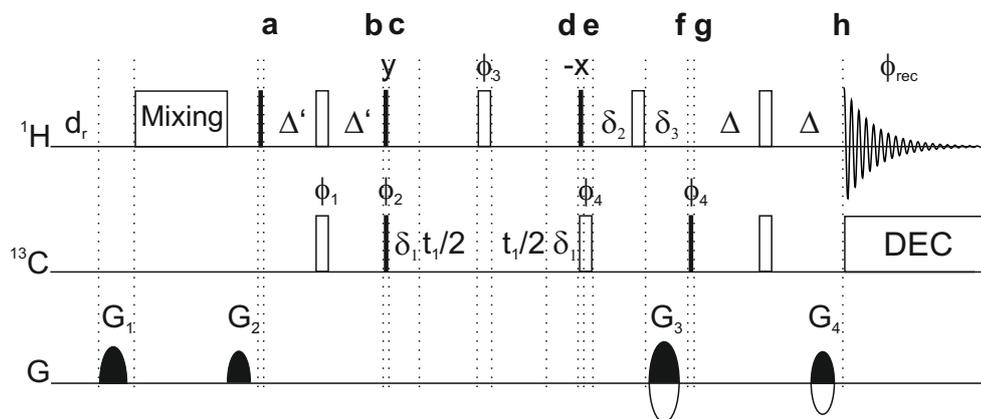


Abbildung 4.5: Impulssequenz des originalen ALSOFAST- bzw. ASAP-HSQC. Im ALSOFAST-HSQC wird die Mischsequenz (**Mixing**) durch eine Wartezeit derselben Länge ersetzt. Die beiden *purge*-Gradienten G_1 und G_2 bleiben dabei erhalten. Ernst-Winkel-Anregung wird über die Anpassung der Länge $2\Delta'$ des INEPT-Transferschrittes erreicht. Der vollständige Phasenzyklus lautet wie folgt: $\phi_1 = x$; $\phi_2 = x, -x$; $\phi_3 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_4 = 4(-x), 4(x)$; $\phi_{rec} = x, -x, x, -x, -x, x, -x, x$. Die *delays* δ_1 - δ_3 dienen der Refokussierung chemischer Verschiebungsentwicklung und heteronuklearer Kopplung. Echo-/Antiecho- und Kohärenzordnungsselektion wird erreicht, indem die Gradienten G_3 und G_4 in folgender Weise alterniert werden: $G_3 = (63,9 \%, 80 \%)$, $G_4 = (80 \%, 59,9 \%)$. Zusätzlich zum Echo-/Antiecho-Aufnahmeschema werden die Phasen ϕ_1 und ϕ_2 zusammen mit der Empfängerphase ϕ_{rec} nach der TPPI-Methode invertiert. Als Mischsequenz wird DIPSI-2 mit einer Mischzeit von 34,54 ms verwendet. Zu näheren Informationen bezüglich Impulsen, Gradienten und Entkopplung sei auf Kapitel 3.3.1 verwiesen.

a) Der erste 90° -Impuls mit der Phase x rotiert die Protonenmagnetisierung in Richtung $-y$.

$$\begin{aligned} {}^1\mathbf{H}\text{-}{}^{12}\mathbf{C} &: \begin{pmatrix} I_z \\ I_z \end{pmatrix} \xrightarrow{\frac{\pi}{2}_x({}^1H)} \begin{pmatrix} -I_y \\ -I_y \end{pmatrix} \\ {}^1\mathbf{H}\text{-}{}^{13}\mathbf{C} &: \begin{pmatrix} I_z \\ I_z \end{pmatrix} \xrightarrow{\frac{\pi}{2}_x({}^1H)} \begin{pmatrix} -I_y \\ -I_y \end{pmatrix} \end{aligned}$$

b) Im folgenden Kopplungs-*delay* der Länge $2\Delta'$ entwickelt sich für ${}^{13}\text{C}$ -gebundene Protonen Antiphase magnetisierung, Magnetisierung der ${}^{12}\text{C}$ -gebundenen Protonen wird dagegen nur

invertiert.

$$\begin{pmatrix} -I_y \\ -I_y \end{pmatrix} \xrightarrow{\frac{\Delta' - \pi_x(^1H) - \Delta'}{\Delta' - (\pi_x(^1H) + \pi_{\phi_1}(^{13}C)) - \Delta'}} \begin{pmatrix} I_y \\ I_y \cos(2\pi J\Delta') - 2I_x S_z \sin(2\pi J\Delta') \end{pmatrix}$$

Die Protonenmagnetisierung

$$I_y \cos(2\pi J\Delta'),$$

die durch Justierung des Kopplungs-*delays* nicht auf ^{13}C übertragen wurde, besitzt die gleiche Orientierung wie die Magnetisierung der ^{12}C -gebundenen Protonen. Im weiteren Verlauf der Berechnung wird gezeigt, dass beide I_y -Magnetisierungskomponenten vor der Akquisition des FID in Richtung der z -Achse rotiert werden. Dadurch wird durch Anpassen des *delays* Δ' eine Ernst-Winkel-artige Anregung ermöglicht.

c) Das folgende 90° -Impulspaar auf ^1H und ^{13}C wandelt die Protonen- in ^{13}C -Antiphase-magnetisierung um. Die nicht transferierte Magnetisierung wird aufgrund der Phase des 90° -Impulses nicht beeinflusst.

$$\begin{pmatrix} I_y \\ I_y \cos(2\pi J\Delta') - 2I_x S_z \sin(2\pi J\Delta') \end{pmatrix} \xrightarrow{\frac{\frac{\pi}{2}_y(^1H)}{\frac{\pi}{2}_y(^1H) + \frac{\pi}{2}_{\phi_2}(^{13}C)}} \begin{pmatrix} I_y \\ I_y \cos(2\pi J\Delta') - 2I_z S_y \sin(2\pi J\Delta') \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_y \\ I_y \cos(2\pi J\Delta') + 2I_z S_y \sin(2\pi J\Delta') \end{pmatrix}$$

d) In der folgenden inkrementierten Zeitperiode t_1 entwickelt sich die chemische Verschiebung des Heterokerns ^{13}C . Es wird nur die \cos -modulierte Magnetisierungskomponente betrachtet, da die \sin -modulierte Komponente bis zur Aufnahme des FID in nicht detektierbare Multiquantenmagnetisierung umgewandelt wird.

$$\begin{pmatrix} I_y \\ I_y \cos(2\pi J\Delta') - 2I_z S_y \sin(2\pi J\Delta') \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_y \\ I_y \cos(2\pi J\Delta') + 2I_z S_y \sin(2\pi J\Delta') \end{pmatrix}$$

$$\frac{\delta_1 - \frac{t_1}{2} - \pi_{\phi_3}(^1H) - \frac{t_1}{2} - \delta_1}{\delta_1 - \frac{t_1}{2} - \pi_{\phi_3}(^1H) - \frac{t_1}{2} - \delta_1}$$

$$4 \cdot \left[\begin{pmatrix} -I_y \\ -I_y \cos(2\pi J\Delta') + 2I_z S_y \sin(2\pi J\Delta') \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} -I_y \\ -I_y \cos(2\pi J\Delta') - 2I_z S_y \sin(2\pi J\Delta') \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \right]$$

Die Entwicklung der J_{CH} -Kopplung wird durch den zentral eingestrahnten 180° -Protonenimpuls refokussiert. e) Es folgen ein 90° -Protonenimpuls mit der Phase $-x$ und ein ^{13}C - 180° -Impuls zur Refokussierung der chemischen Verschiebungsentwicklung.

$$\frac{\frac{\pi}{2} - x(^1H)}{\frac{\pi}{2} - x(^1H) + \pi\phi_4(^{13}C)} \rightarrow$$

$$4 \cdot \left[\left(\begin{array}{c} I_z \\ I_z \cos(2\pi J\Delta') + 2I_y S_y \sin(2\pi J\Delta') \cos(t_1\omega_S) \end{array} \right) \left(\begin{array}{c} I_z \\ I_z \cos(2\pi J\Delta') - 2I_y S_y \sin(2\pi J\Delta') \cos(t_1\omega_S) \end{array} \right) \right]$$

Durch die Anwendung des Protonenimpulses wird die Reservoirmagnetisierung und die Magnetisierung, die durch die Ernst-Winkel-Anregung zurückbehalten wurde, vor dem ersten Echo-/Antiecho Selektionsgradienten G_3 in Richtung der z -Achse rotiert. Der Gradient hat auf diese Magnetisierung daher keine Wirkung. Außerdem liegt die später detektierte Magnetisierung, im Gegensatz zum konventionellen HSQC, zu diesem Zeitpunkt als Multiquantenkohärenzen vor. Die Magnetisierung wird jedoch, wie noch gezeigt wird, im folgenden Teil der Sequenz in detektierbare Magnetisierung umgewandelt.

Die Wirkung des Gradienten G_3 auf die Multiquantenmagnetisierung kann zu diesem Zeitpunkt als Phasenfaktor

$$\begin{aligned} \Phi_3 &= -p_H \gamma_H G_3 z \tau_3 - p_C \gamma_C G_3 z \tau_3 \\ &= -\gamma_H G_3 z \tau_3 \mp \gamma_C G_3 z \tau_3 \\ &= -\gamma_H G_3 z \tau_3 \mp \frac{20,1}{80} \gamma_H G_3 z \tau_3 \end{aligned}$$

beschrieben werden. Die Kohärenzordnung der Protonen p_H mit dem gyromagnetischen Verhältnis γ_H zu diesem Zeitpunkt ist $p_H = 1$, so dass konventionsgemäß zur Datenaufnahme durch den noch folgenden 180° -Puls die Kohärenzordnung -1 vorliegt. Die Kohärenzordnung der ^{13}C -Spins mit dem gyromagnetischen Verhältnis γ_C kann die Werte $p_C = \pm 1$ annehmen. Der Gradientenimpuls G_3 hat die Dauer τ_3 . Das Verhältnis der gyromagnetischen Verhältnisse von ^{13}C und Protonen beträgt $\frac{20,1}{80}$. Dieser Faktor wurde im letzten Rechenschritt verwendet.

f) Der Protonen- 180° -Impuls dient der Refokussierung der chemischen Verschiebungsentwicklung während der Dauer des Kodierungsgradienten G_3 .

$$\frac{\delta_2 + \pi_x(^1H) - (G_3 + \delta_3)}{\delta_2 - \pi_x(^1H) - (G_3 + \delta_3)} \rightarrow$$

$$4 \cdot \left(\begin{array}{c} -I_z \\ -I_z \cos(2\pi J\Delta') \pm 2I_{y,x} S_{y,x} \sin(2\pi J\Delta') \cos(t_1\omega_S) \end{array} \right)$$

g) Durch den folgenden 90° -Impuls auf ^{13}C wird vor dem Rücktransfer-*delay* 2Δ schließlich wieder $^1H, ^{13}C$ -Antiphase magnetisierung auf Protonen erzeugt.

$$\xrightarrow{\frac{\pi}{2}_{\phi_4} (^{13}C)}$$

$$4 \cdot \left[\left(\begin{array}{c} -I_z \\ -I_z \cos(2\pi J\Delta') - 2I_{y,x}S_z \sin(2\pi J\Delta') \cos(t_1\omega_S) \end{array} \right) \left(\begin{array}{c} -I_z \\ -I_z \cos(2\pi J\Delta') + 2I_{y,x}S_z \sin(2\pi J\Delta') \cos(t_1\omega_S) \end{array} \right) \right]$$

h) Die dann letztlich in die Inphasemagnetisierung $\pm I_x$ umgewandelt und durch den Gradienten G_4 refokussiert wird.

$$\xrightarrow{\frac{\Delta - \pi_x(^1H) - (\Delta + G_4)}{\Delta - (\pi_x(^1H) + \pi_x(^{13}C)) - (\Delta + G_4)}}$$

$$2 \cdot \left[\left(\begin{array}{c} I_z \\ I_z \cos(2\pi J\Delta') + I_x \sin(2\pi J\Delta') \cos(t_1\omega_S) \end{array} \right) \left(\begin{array}{c} I_z \\ I_z \cos(2\pi J\Delta') - I_x \sin(2\pi J\Delta') \cos(t_1\omega_S) \end{array} \right) \right]$$

$$2 \cdot \left[\left(\begin{array}{c} I_z \\ I_z \cos(2\pi J\Delta') - I_x \sin(2\pi J\Delta') \cos(t_1\omega_S) \end{array} \right) \left(\begin{array}{c} I_z \\ I_z \cos(2\pi J\Delta') + I_x \sin(2\pi J\Delta') \cos(t_1\omega_S) \end{array} \right) \right]$$

Die Wirkung des Dekodierungsgradienten mit der Stärke G_4 und der Länge τ_4 kann durch den folgenden Phasenfaktor beschrieben werden:

$$\begin{aligned} \Phi_4 &= -p_H \gamma_H G_4 z \tau_4 \\ &= p_H G_4 z \tau_4 \end{aligned}$$

Unter Berücksichtigung der Refokussierungsbedingung ergibt sich

$$\begin{aligned} 0 &= \Phi_3 + \Phi_4 \\ &= -\gamma_H G_3 z \tau_3 \mp \frac{20,1}{80} \gamma_H G_3 z \tau_3 + p_H G_4 z \tau_4. \end{aligned}$$

Nach Umformung wird

$$\frac{G_3 \tau_3}{G_4 \tau_4} = \frac{1}{1 \pm \frac{20,1}{80}}$$

erhalten. Haben weiterhin die Gradienten G_3 und G_4 die gleiche Länge, so ist

$$\frac{G_3}{G_4} = \frac{1}{1 \pm \frac{20,1}{80}}.$$

Zur Selektion des Echo muss das Verhältnis der beiden Gradienten also

$$\frac{G_3}{G_4} = \frac{80}{101} = \frac{63,9}{80}$$

betragen, zur Selektion des Antiecho entsprechend

$$\frac{G_3}{G_4} = \frac{80}{59,9},$$

wobei jeweils eine maximale Gradientenstärke von 80 % der Maximalleistung eingesetzt wurde. Unter Berücksichtigung der Empfängerphase addiert sich die Magnetisierung schließlich zu

$$8I_x \sin(2\pi J\Delta') \cos(t_1\omega_S)$$

auf. Gleichzeitig ist das gesamte Magnetisierungsreservoir in Richtung $+z$ orientiert. Der Beitrag der ^{13}C -gebundenen Protonen zur z -Magnetisierung beträgt zudem

$$I_z \cos(2\pi J\Delta').$$

4.3.2 Vergleich zwischen ASAP-HSQC und konventionellem HSQC

Das ASAP-HSQC ermöglicht es, artefaktfreie ^1H , ^{13}C -HSQC-Spektren, bei natürlicher Häufigkeit der ^{13}C -Kerne, in deutlich weniger als einer Minute Gesamtexperimentdauer aufzunehmen. Um dies zu verdeutlichen, ist in Abb. 4.6 der Vergleich eines ASAP-HSQC-(**B**) und eines konventionellen HSQC-Spektrums (**A**) von Menthol gezeigt. Beide Spektren wurden in 23 Sekunden aufgenommen. Das ASAP-HSQC liefert ein höheres Signal-zu-

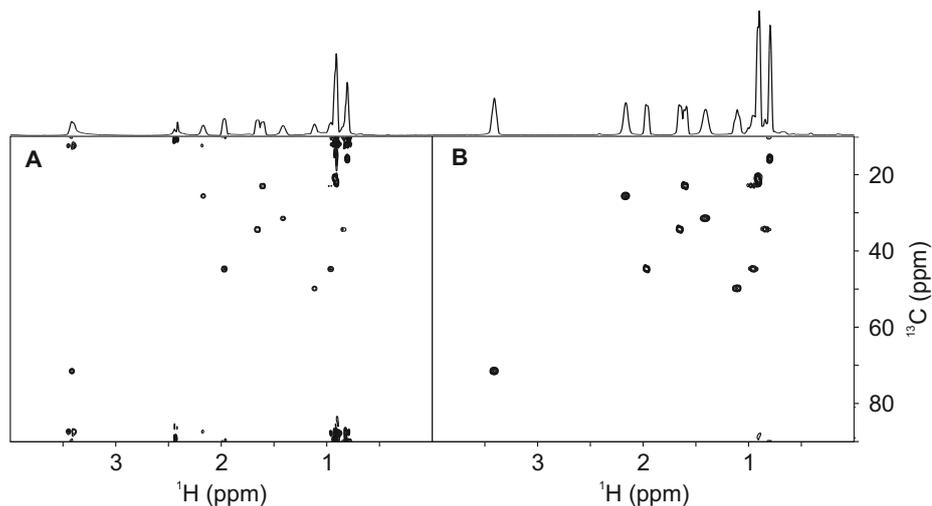


Abbildung 4.6: ^1H , ^{13}C -HSQC-Spektren von Menthol in CDCl_3 . Spektrum **A** wurde mit einem konventionellen HSQC (Kapitel 2.2.3) aufgenommen, für Spektrum **B** wurde die Original ASAP-HSQC-Sequenz mit Breitbandimpulsen verwendet. Das Experiment dazu wird in Kapitel 4.4 vorgestellt, der Vorteil der Breitbandimpulse wird in Kapitel 4.6 erläutert. Beide Spektren wurden mit $512 (^1\text{H}) \times 128 (^{13}\text{C})$ Punkten aufgenommen. Dies entspricht Akquisitionszeiten von $106,8 \text{ ms } (^1\text{H})$ bzw. $5,3 \text{ ms } (^{13}\text{C})$. Pro t_1 -Inkrement wurde 1 scan aufgenommen, sowie 16 dummy scans zu Beginn des Experiments. Das Erholungs- d_r wurde auf 35 ms (**A**) bzw. $4 \mu\text{s}$ (**B**) eingestellt. Damit hatten beide Experimente eine Gesamtdauer von 23 s . Zur Steigerung der spektralen Auflösung wurde in beiden Dimensionen *zero filling* und *linear prediction* mit dem Faktor 2 durchgeführt. Die resultierende digitale Auflösung beträgt $2,34 \text{ Hz } (^1\text{H})$ bzw. $47,18 \text{ Hz } (^{13}\text{C})$.

Rausch-Verhältnis als das konventionelle HSQC-Experiment. Um dies klarer zu verdeutlichen, wurden in Abb. 4.6 zusätzlich die ^1H -Projektionen der HSQC-Spektren hinzugefügt. Das ASAP-HSQC zeigt zudem weniger spektrale Artefakte, was die eindeutige Zuordnung der Resonanzen erheblich erleichtern kann. Besonders im Bereich der Methylgruppensignale treten im konventionellen HSQC-Spektrum Artefakte wie t_1 -Rauschen auf. Diese sind im ASAP-HSQC-Spektrum deutlich reduziert. Weiterhin sind im konventionell aufgenommenen Spektrum verstärkt Artefaktsignale am Spektrenrand in der ^{13}C -Dimension sichtbar.

4.3.3 Symmetrisiertes ALSOFAS- und ASAP-HSQC

Das Symmetrisierte ASAP- bzw. ALSOFAS-HSQC (siehe Abb. 4.7) ist einfacher aufgebaut als die ASAP-HSQC-Sequenz aus dem vorherigen Kapitel. Die Verwendung von zwei Kodierungsgradienten G_3 für die Echo-/Antiechoselektion ermöglicht einen symmetrischen Aufbau der Sequenz. Wie in Kapitel 4.6 noch gezeigt wird, kann durch die Symmetrisierung des ASAP-HSQC die spektrale Qualität in schnellen Experimenten weiter gesteigert werden. Im Folgenden wird die Impulssequenz unter Verwendung des Produktoperatorformalismus detailliert berechnet.

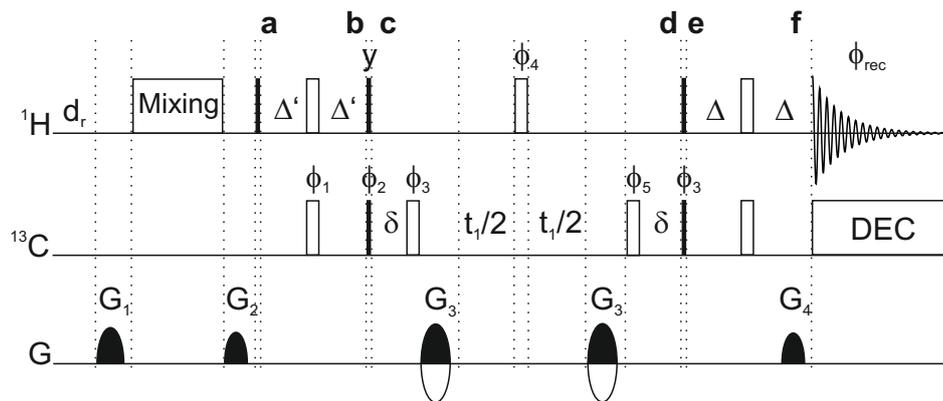


Abbildung 4.7: Symmetrisiertes ASAP- bzw. ALSOFAS-HSQC. Im ALSOFAS-HSQC wird die Mischsequenz durch eine Wartezeit derselben Länge ersetzt. Die beiden *purge*-Gradienten G_1 und G_2 bleiben dabei erhalten. Ernst-Winkel-Anregung wird durch Anpassung der Länge $2\Delta'$ des INEPT-Transferschrittes erreicht. Das *delay* δ dient der Refokussierung chemischer Verschiebungsentwicklung und heteronuklearer Kopplung. Der vollständige Phasenzyklus lautet wie folgt: $\phi_1 = x$; $\phi_2 = x, -x$; $\phi_3 = 4(x), 4(-x)$; $\phi_4 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_5 = 4(-x), 4(x)$; $\phi_{rec} = x, -x, x, -x, -x, x, -x, x$. Echo-/Antiecho- und Kohärenzordnungsselektion wird erreicht, indem die Gradienten G_3 und G_4 in folgender Weise alterniert werden: $G_3 = (40\%, -40\%)$, $G_4 = (20,1\%, 20,1\%)$. Zusätzlich zum Echo-/Antiecho-Aufnahmeschema werden die Phasen ϕ_1 und ϕ_2 zusammen mit der Empfängerphase ϕ_{rec} nach der TPPI-Methode invertiert. Als Mischsequenz wird DIPSI-2 mit einer Mischzeit von 34,54 ms verwendet. Zu näheren Informationen bezüglich Impulsen, Gradienten und Entkopplung sei auf Kapitel 3.3.1 verwiesen.

a) Der erste 90° -Impuls mit der Phase x rotiert die Protonenmagnetisierung in Richtung $-y$.

$$\begin{aligned} {}^1\mathbf{H}\text{-}{}^{12}\mathbf{C} &: \begin{pmatrix} I_z \\ I_z \end{pmatrix} \xrightarrow{\frac{\pi}{2}_x({}^1H)} \begin{pmatrix} -I_y \\ -I_y \end{pmatrix} \\ {}^1\mathbf{H}\text{-}{}^{13}\mathbf{C} &: \begin{pmatrix} I_z \\ I_z \end{pmatrix} \xrightarrow{\frac{\pi}{2}_x({}^1H)} \begin{pmatrix} -I_y \\ -I_y \end{pmatrix} \end{aligned}$$

b) Im folgenden Kopplungs-*delay* der Länge $2\Delta' = \frac{1}{J_{CH}}$ entwickelt sich diese für ${}^{13}\text{C}$ -gebundene Protonen zum Teil, je nach Wahl von Δ' , in Antiphasemagnetisierung. Magne-

tisierung der ^{12}C -gebundenen Protonen wird dagegen nur invertiert. Die Protonenmagnetisierung, die durch Justierung des Kopplungs-*delays* nicht auf ^{13}C übertragen wurde, besitzt die gleiche Orientierung wie die Magnetisierung der ^{12}C -gebundenen Protonen.

$$\begin{pmatrix} -I_y \\ -I_y \end{pmatrix} \xrightarrow{\frac{\Delta' - \pi_x(^1\text{H}) - \Delta'}{\Delta' - (\pi_x(^1\text{H}) + \pi_{\phi_1}(^{13}\text{C})) - \Delta'}}} \begin{pmatrix} I_y \\ I_y \cos(2\pi J\Delta') - 2I_x S_z \sin(2\pi J\Delta') \end{pmatrix}$$

c) Das folgende 90° -Impulspaar wandelt die Protonen- in ^1H , ^{13}C -Antiphase magnetisierung auf ^{13}C um. Die nicht transferierte Magnetisierung wird aufgrund der Phase des 90° -Impulses nicht beeinflusst.

$$\begin{pmatrix} I_y \\ I_y \cos(2\pi J\Delta') - 2I_x S_z \sin(2\pi J\Delta') \end{pmatrix} \xrightarrow{\frac{\frac{\pi}{2}_y(^1\text{H})}{\frac{\pi}{2}_y(^1\text{H}) + \frac{\pi}{2}_{\phi_2}(^{13}\text{C})}} \begin{pmatrix} I_y \\ I_y \cos(2\pi J\Delta') - 2I_z S_y \sin(2\pi J\Delta') \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_y \\ I_y \cos(2\pi J\Delta') + 2I_z S_y \sin(2\pi J\Delta') \end{pmatrix}$$

d) In der folgenden inkrementierten Zeitperiode t_1 entwickelt sich die chemische Verschiebung des Heterokerns ^{13}C . Es wird nur die \cos -modulierte Magnetisierungskomponente betrachtet, da die \sin -modulierte Komponente bis zur Aufnahme des FID in nicht detektierbare Multiquantenkohärenzen umgewandelt wird. Weiterhin werden die zwei Gradienten G_3 zur Echo-/Antiecho-Kodierung angelegt.

$$\begin{pmatrix} I_y \\ I_y \cos(2\pi J\Delta') - 2I_z S_y \sin(2\pi J\Delta') \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_y \\ I_y \cos(2\pi J\Delta') + 2I_z S_y \sin(2\pi J\Delta') \end{pmatrix}$$

$$\xrightarrow{\frac{\delta - G_3 - \frac{t_1}{2} - \pi_{\phi_4}(^1\text{H}) - \frac{t_1}{2} - G_3 - \delta}{\delta - \pi_{\phi_3}(^{13}\text{C}) - \frac{t_1}{2} - \pi_{\phi_4}(^1\text{H}) - \frac{t_1}{2} - G_3 - \pi_{\phi_5}(^{13}\text{C}) - \delta}}$$

$$4 \cdot \left[\begin{pmatrix} -I_y \\ -I_y \cos(2\pi J\Delta') + 2I_z S_{y,x} \sin(2\pi J\Delta') \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} -I_y \\ -I_y \cos(2\pi J\Delta') - 2I_z S_{y,x} \sin(2\pi J\Delta') \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix} \right]$$

In dieser Version des Experiments befindet sich die Reservoiremagnetisierung und die Magnetisierung, die durch die Ernst-Winkel-Anregung zurückbehalten wurde, während der Echo-/Antiecho-Selektionsgradienten G_3 in der transversalen Ebene. Da die Gradienten allerdings symmetrisch um einen 180° -Protonenimpuls plaziert sind, hebt sich ihre Wirkung für Protonen gerade auf. Zur weiteren Erläuterung sei auf das Beispiel in Kapitel 2.1 dieser Arbeit verwiesen. Im Gegensatz dazu addiert sich die Wirkung der Gradienten G_3 für die ^{13}C -Kohärenzen auf.

$$\begin{aligned} \Phi_3 &= -p_C \gamma_C G_3 z \tau_3 - p_C \gamma_C G_3 z \tau_3 \\ &= -2 \cdot p_C \gamma_C G_3 z \tau_3 \\ &= \mp 2 \cdot \gamma_C G_3 z \tau_3 \end{aligned}$$

Die Kohärenzordnung der ^{13}C -Spins, mit dem gyromagnetischen Verhältnis γ_C , kann die Werte $p_C = \pm 1$ annehmen. Der Gradientenimpuls G_3 hat die Dauer τ_3 . z beschreibt die vertikale Achse entlang des NMR-Probenröhrchens. Die $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -Antiphasemagnetisierung auf ^{13}C wird also in der x, y -Ebene dephasiert, jedoch durch den Gradienten G_4 vor der Akquisition wieder refokussiert.

Die Magnetisierung lässt sich also wie folgt beschreiben:

$$4 \cdot \left[\begin{pmatrix} -I_y \\ -I_y \cos(2\pi J\Delta') + 2I_z S_y \sin(2\pi J\Delta') \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} -I_y \\ -I_y \cos(2\pi J\Delta') - 2I_z S_y \sin(2\pi J\Delta') \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \right]$$

e) Durch die folgenden 90° -Impulse auf ^1H und ^{13}C wird vor dem Rücktransfer-*delay* 2Δ schließlich wieder $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -Antiphasemagnetisierung auf Protonen erzeugt.

$$\frac{\frac{\pi}{2}_x(^1\text{H})}{\frac{\pi}{2}_x(^1\text{H}) + \frac{\pi}{2}_{\phi_5}(^{13}\text{C})} \rightarrow$$

$$2 \cdot \left[\begin{pmatrix} -I_z \\ -I_z \cos(2\pi J\Delta') - 2I_y S_z \sin(2\pi J\Delta') \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} -I_z \\ -I_z \cos(2\pi J\Delta') + 2I_y S_z \sin(2\pi J\Delta') \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \right]$$

$$2 \cdot \left[\begin{pmatrix} -I_z \\ -I_z \cos(2\pi J\Delta') + 2I_y S_z \sin(2\pi J\Delta') \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} -I_z \\ -I_z \cos(2\pi J\Delta') - 2I_y S_z \sin(2\pi J\Delta') \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \right],$$

f) die dann im Rücktransferschritt in die Inphasemagnetisierung $\pm I_x$ umgewandelt wird. Außerdem wird der Dekodierungsgradient G_4 angelegt.

$$\frac{\Delta - \pi_x(^1\text{H}) - (\Delta - G_4)}{\Delta - (\pi_x(^1\text{H}) + \pi_x(^{13}\text{C})) - (\Delta - G_4)} \rightarrow$$

$$2 \cdot \left[\begin{pmatrix} I_z \\ I_z \cos(2\pi J\Delta') + I_x \sin(2\pi J\Delta') \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_z \\ I_z \cos(2\pi J\Delta') - I_x \sin(2\pi J\Delta') \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \right]$$

$$2 \cdot \left[\begin{pmatrix} I_z \\ I_z \cos(2\pi J\Delta') - 2I_x \sin(2\pi J\Delta') \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_z \\ I_z \cos(2\pi J\Delta') + I_x \sin(2\pi J\Delta') \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \right]$$

Die Wirkung des Dekodierungsgradienten mit der Stärke G_4 und der Länge τ_4 kann durch den folgenden Phasenfaktor beschrieben werden:

$$\begin{aligned} \Phi_4 &= -p_H \gamma_H G_4 z \tau_4 \\ &= \gamma_H G_4 z \tau_4. \end{aligned}$$

Hierfür wurde eingesetzt, dass konventionsgemäß die Kohärenzordnung $p_H = -1$ detektiert wird. Mit der Refokussierungsbedingung ergibt sich

$$\begin{aligned} 0 &= \Phi_3 + \Phi_4 \\ &= \mp 2 \cdot \gamma_C G_3 z \tau_3 + \gamma_H G_4 z \tau_4. \end{aligned}$$

Nach Umformung ist

$$\frac{G_3\tau_3}{G_4\tau_4} = \frac{\gamma_H}{\pm 2\gamma_C}.$$

Haben weiterhin die Gradienten G_3 und G_4 die gleiche Länge, lässt sich

$$\frac{G_3}{G_4} = \frac{40}{\pm 20, 1}$$

ableiten. Zur Selektion des Echo muss das Verhältnis der beiden Gradienten also

$$\frac{G_3}{G_4} = \frac{40}{20, 1}$$

betragen, zur Selektion des Antiecho entsprechend

$$\frac{G_3}{G_4} = \frac{40}{-20, 1}.$$

Wobei jeweils eine maximale Gradientenstärke von 40 % der Maximalleistung eingesetzt wurde. Unter Berücksichtigung der Empfängerphase addiert sich die Magnetisierung schließlich zu

$$8I_x \sin(2\pi J\Delta') \cos(t_1\omega_S)$$

auf. Gleichzeitig ist das Magnetisierungsreservoir in Richtung der z -Achse orientiert. Der Beitrag der ^{13}C -gebundenen Protonen zur z -Magnetisierung ist durch

$$I_z \cos(2\pi J\Delta')$$

gegeben.

Wie das originale ASAP-HSQC, ermöglicht das symmetrisierte Experiment die schnelle Aufnahme von $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren. In Kapitel 4.6 wird gezeigt, dass durch Verwendung der symmetrisierten ASAP-Sequenz spektrale Artefakte weiter reduziert werden können. Das macht sich besonders bei sehr kurzen Experimentdauern bemerkbar.

Soll dagegen eine hohe Auflösung in der ^{13}C -Dimension erzielt werden, zeigt die originale Sequenz Vorteile. In der symmetrisierten Version befindet sich die t_1 -Periode zwischen den beiden Kodierungsgradienten G_3 . Für lange t_1 -Werte verringert Diffusion die Effizienz der Kohärenzordnungsselektion. Weiterhin wird die Magnetisierung der passiven Protonen nicht mehr vollständig refokussiert und damit das z -Magnetisierungsreservoir verringert.

4.4 ALSOFAST- und ASAP-HSQC-Sequenzen mit Breitbandimpulsen

In diesem Kapitel sollen die Impulssequenzen der beiden Versionen des ALSOFAST- und ASAP-HSQC, unter Verwendung von optimierten Breitbandimpulsen aus der Optimalen Steuerungstheorie (*Optimal Control Theory* (OCT)) vorgestellt werden. Die Impulse haben eine bedeutend längere Dauer, verglichen mit Rechteckimpulsen, die mit gleicher Radiofrequenzamplitude eingestrahlt werden. Sie decken aber einen größeren Frequenzbereich ab. Während der Zeit, in der die Impulse eingestrahlt werden, entwickelt sich keine heteronukleare Kopplung. Befindet sich die Magnetisierung des anderen Kernspins während der Zeit des Impulses jedoch in der transversalen Ebene, entwickelt sich die chemische Verschiebung in der gleichen Weise wie während eines *delays* der selben Dauer. In der Sequenz muss also besonders darauf geachtet werden, dass diese Entwicklung durch die Modifizierung der vorhandenen *delays* refokussiert werden kann. Sollen zwei dieser Breitbandimpulse zur gleichen Zeit eingestrahlt werden, müssen sie für diesen Zweck explizit optimiert sein, damit weiterhin eine vollständige Kompensierung der heteronuklearen Kopplungsentwicklung gesichert ist. Die homonukleare Kopplung entwickelt sich jedoch während der gesamten Zeitdauer, in der die Impulse eingestrahlt werden. Im INEPT- und dem Rücktransferschritt kommt ein BUBI-Baustein [50] zum Einsatz, der als 180°-Impulspaar dient. Er besteht aus einem BURBOP-180_x Refokussierungsimpuls (*universal rotation*-Impuls (UR)) auf dem Protonenkanal und einem BIPOB-Inversionsimpuls (*point-to-point*-Impuls (PP)) auf dem ¹³C-Kanal. Die jeweiligen Impulse besitzen die selbe Länge von 600 μ s. Sie sind für ihre simultane Anwendung optimiert. Ein in gleicher Weise optimiertes Paar für einen 90°-UR-Impuls auf dem Protonenkanal und einen 90°-PP-Impuls auf dem ¹³C-Kanal ist derzeit noch nicht vorhanden. Aus diesem Grund wurde an den entsprechenden Stellen ein kürzerer Rechteckimpuls auf dem Protonenkanal eingestrahlt, dessen Dauer in Abhängigkeit der untersuchten Probe etwa 8 μ s betrug. Für genauere Informationen zu allen verwendeten Impulsen sei auf die Tabelle in Abb. 3.1 aus Kapitel 3.3.2 verwiesen.

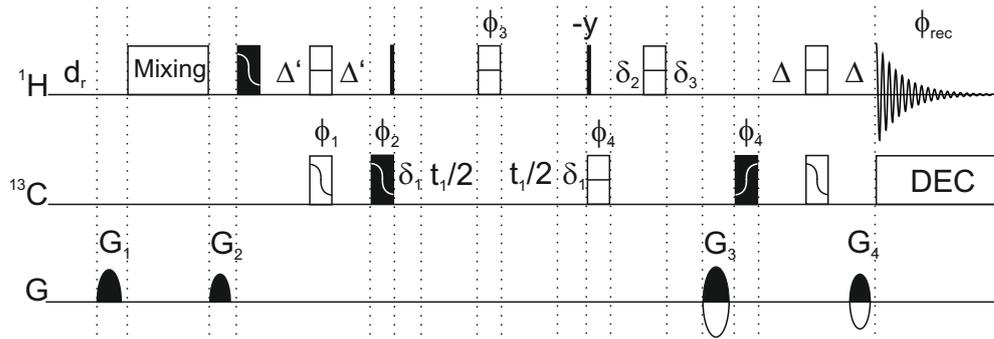


Abbildung 4.8: Original ASAP- bzw. ALSOFAST-HSQC-Impulssequenz mit Breitbandimpulsen. Ernst-Winkel-Anregung wird durch Anpassung der Länge $2\Delta'$ des INEPT-Transferschrittes erreicht. Der vollständige Phasenzyklus lautet wie folgt: $\phi_1 = x$; $\phi_2 = -x, x$; $\phi_3 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_4 = 4(x), 4(-x)$; $\phi_{rec} = x, -x, x, -x, -x, x, -x, x$. Die *delays* δ_1 - δ_3 dienen der Refokussierung chemischer Verschiebungsentwicklung und heteronuklearer Kopplung. Echo-/Antiecho- und Kohärenzordnungsselektion wird erreicht, indem die Gradienten G_3 und G_4 in folgender Weise alterniert werden: $G_3 = (63,9\%, 80\%)$, $G_4 = (80\%, 59,9\%)$. Zusätzlich zum Echo-/Antiecho-Aufnahmeschema werden die Phasen ϕ_1 und ϕ_2 zusammen mit der Empfängerphase ϕ_{rec} nach der TPPI-Methode invertiert. Als Mischsequenz wird DIPSI-2 mit einer Mischzeit von 34,54 ms verwendet. Die *delays* δ_1 - δ_3 dienen der Refokussierung chemischer Verschiebungsentwicklung und heteronuklearer Kopplung. Zu näheren Informationen bezüglich Impulsen, Gradienten und Entkopplung sei auf Kapitel 3.3.1 verwiesen.

Im Symmetrisierten ASAP-HSQC kommen außerdem während der t_1 -Periode auf dem ^{13}C -Kanal zwei PP-Inversionsimpulse zum Einsatz. Sie können in diesem Fall zur Refokussierung der chemischen Verschiebungsentwicklung des Heterokerns genutzt werden, da durch das Konstruktionsprinzip zwei aufeinanderfolgende 180° -UR-Impulse durch zwei 180° -PP-Impulse ersetzt werden können. Die 180° -PP-Impulse sind jeweils um $500 \mu\text{s}$ kürzer. Damit können die negativen Effekte von ^1H , ^1H -Kopplungsentwicklung und transversaler Relaxation während der Impulse reduziert werden.

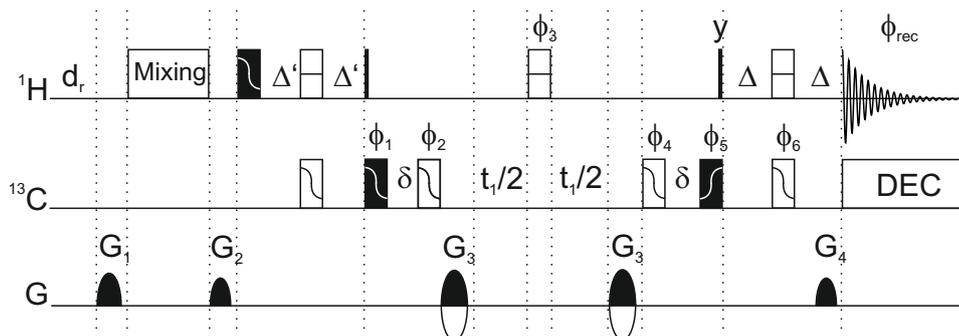


Abbildung 4.9: Symmetrisierte ASAP-HSQC-Impulssequenz mit Breitbandimpulsen. Ernst-Winkel-Anregung wird durch Anpassung der Länge $2\Delta'$ des INEPT-Transferschrittes erreicht. Der vollständige Phasenzyklus lautet wie folgt: $\phi_1 = 4(x), 4(-x)$; $\phi_2 = 4(y), 4(-y)$; $\phi_3 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_4 = 4(-y), 4(y)$; $\phi_5 = x, -x$; $\phi_6 = x$; $\phi_{rec} = x, -x, x, -x, -x, x, -x, x$. Die delays δ dienen der Refokussierung chemischer Verschiebungsentwicklung und heteronuklearer Kopplung. Echo-/Antiecho- und Kohärenzordnungsselektion wird erreicht, indem die Gradienten G_3 und G_4 in folgender Weise alterniert werden: $G_3 = (40\%, -40\%)$, $G_4 = (20, 1\%, 20, 1\%)$. Zusätzlich zum Echo-/Antiecho-Aufnahmeschema werden die Phasen ϕ_5 und ϕ_6 zusammen mit der Empfängerphase ϕ_{rec} nach der TPPI-Methode invertiert. Als Mischsequenz wird DIPSI-2 mit einer Mischzeit von $34,54 \text{ ms}$ verwendet. Zu näheren Informationen bezüglich Impulsen, Gradienten und Entkopplung sei auf Kapitel 3.3.1 verwiesen.

Für alle Experimente die im weiteren Verlauf dieser Arbeit vorgestellt werden, sind die Sequenzen unter Verwendung beider Impulsvarianten in einer Abbildung dargestellt. In Kapitel 4.6 dieser Arbeit werden die beiden Impulssequenzen des ASAP-HSQC anhand experimenteller Daten verglichen. Außerdem wird an der Stelle auch der positive Effekt der Breitbandimpulse auf die spektrale Qualität gezeigt.

4.5 Optimierung des INEPT-Transfers

Zur Bestimmung des optimalen Anregungswinkels für Menthol wurde eine Reihe von ein-dimensionalen ASAP-HSQC-Spektren aufgenommen, in denen das Kopplungs-delay des INEPT-Transferschritts $2\Delta'$ von $0,6 \text{ ms}$ bis 7 ms mit einer Schrittweite von $0,05 \text{ ms}$ er-

höht wurde. Dafür wurde das Topspin Programm "popt" verwendet. Die Intensitätsverläufe in Abhängigkeit von $2\Delta'$ für alle im 1D-Spektrum eindeutig aufgelösten Signale, sind in Abb. 4.10 dargestellt.

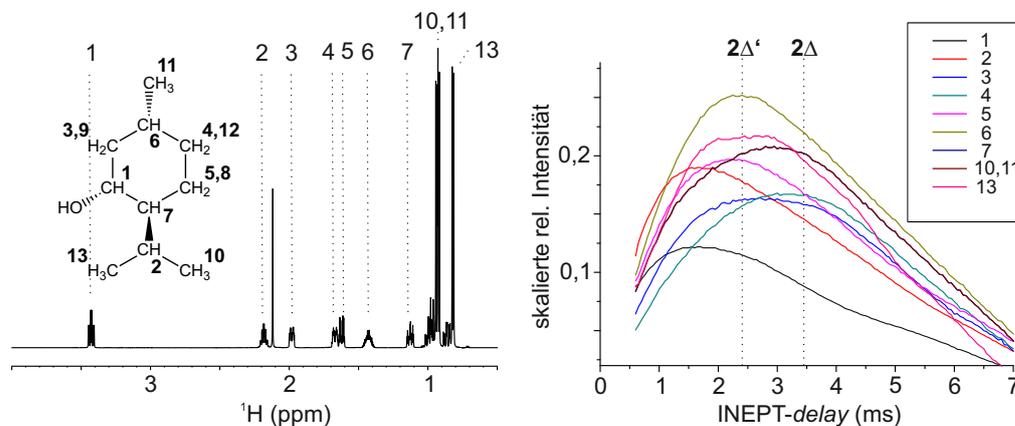


Abbildung 4.10: Ernstwinkelbestimmung für das ASAP-HSQC, gemessen mit der Impulssequenz des originalen ASAP-HSQC an Menthol. Die Zuordnung der Protonen von Menthol kann dem 1D- ^1H -Spektrum entnommen werden. Die Intensitätsverläufe der im 1D-Spektrum aufgelösten Signale, in Abhängigkeit der Länge des Magnetisierungstransfer-delays im INEPT, sind in unterschiedlichen Farben kodiert. Es wird nur der Ausschnitt der ersten Kopplungsperiode gezeigt.

Die erste mit $2\Delta'$ gekennzeichnete, gestrichelte Linie zeigt den Wert der als Ergebnis dieses Optimierungsexperiments ermittelt wurde. Die zweite mit 2Δ gekennzeichnete, gestrichelte Linie zeigt den Wert der Transferzeit, der in konventionellen HSQC-Experimenten gewählt wird und für eine mittlere Kopplungskonstante $^1J_{CH} = 145$ Hz optimiert ist. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die Signalintensitäten skaliert.

Sowohl die T_1 -Zeiten, als auch $^1J_{CH}$ -Kopplungen variieren auch innerhalb eines Moleküls. Der optimale Anregungswinkel hängt von der T_1 -Zeit ab, deshalb kann entweder das Signal-zu-Rausch-Verhältnis für ein einzelnes Signal optimiert werden, oder nach einem Kompromiss für mehrere Signale bzw. das gesamte Spektrum gesucht werden. In diesem Fall wurde nach einem optimierten Wert für das Gesamtspektrum gesucht. Anhand der Daten wurde ein optimales Kopplungs-delay für Menthol von $\Delta' = 1,21$ ms ermittelt. Konventionelle HSQC-Experimente nutzen meist ein Kopplungs-delay von $\Delta = 1,72$ ms, das für eine mittlere Kopplungskonstante von 145 Hz optimiert ist. Das Kopplungs-delay Δ' wurde für alle Experimente verwendet, die mit den ASAP- bzw. ALSOFAST-Sequenzen an Menthol aufgenommen wurden. Auch wenn andere experimentelle Einstellungen verwendet wurden, beispielsweise eine andere Akquisitionszeit oder ein anderes Erholungs-delay d_r , wurde Δ' nicht verändert. Die Änderungen für die optimale Länge von Δ' in diesem Zeitbereich fallen nur sehr gering aus. Für alle weiteren Proben, deren Spektren in dieser Arbeit gezeigt werden, wurde das Transfer-delay separat optimiert. Die Messdaten dazu werden in dieser

Arbeit jedoch nicht gezeigt.

4.6 Vergleich der beiden Sequenzen mit und ohne Breitbandimpulse

An dieser Stelle wird an einem Beispiel gezeigt, wie die spektrale Qualität durch den Einsatz der Breimpulse aus der Optimalen Steuerungstheorie verbessert werden kann. Abb. 4.11 zeigt den Vergleich der HSQC-Spektren von Menthol, die mit den beiden Versionen des ASAP-HSQC aufgenommen wurden, zum einen unter Verwendung von Rechteckimpulsen, zum anderen unter Verwendung von Breitbandimpulsen aus der optimalen Steuerungstheorie. Alle vier durchgeführten Experimente hatten dabei eine Gesamtdauer von 23 Sekunden. In beiden Spektren, die unter Verwendung von Rechteckimpulsen aufgenommen wurden, sind Artefaktsignale im Spektrum erkennbar, die in der indirekten Dimension an der Basisfrequenz gespiegelt erscheinen. Diese Signale weisen teilweise Intensitäten auf, die in der gleichen Größenordnung liegen, wie die der tatsächlichen Signale. Ein Grund für diese Spiegelsignale könnte ein Intensitätsunterschied zwischen den detektierten Echo- und Antiechosignalen sein. Unter Verwendung der Breitbandimpulse erscheinen diese Spiegelsignale nicht im Spektrum, außerdem sind die Sequenzen dadurch breitbandiger, was gerade in der ^{13}C -Dimension bei Proben mit höherer Bandbreite wichtig wird.

Insgesamt weist das symmetrisierte ASAP-HSQC in beiden Fällen eine etwas höhere spektrale Qualität auf, vor allem unter Verwendung von Rechteckimpulsen. In der Version mit Rechteckimpulsen macht sich das vor allem durch die geringere Intensität der gespiegelten Signale bemerkbar. Das symmetrisierte ASAP-HSQC liefert auch im Bereich der Methylgruppensignale sauberere Spektren und ein geringeres t_1 -Rauschen.

Dafür ist die Empfindlichkeit der originalen ASAP-HSQC-Sequenz, gerade unter Verwendung von Breitbandimpulsen, etwas höher. Das könnte den Grund haben, dass sich die Reservormagnetisierung in dem originalen Experiment um etwa 3,7ms kürzer in der transversalen Ebene befindet. Damit wird der negative Effekt der $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -Kopplungen und transversaler Relaxation minimiert. Zusätzlich kann in dem symmetrisierten Experiment Diffusion zwischen den beiden Gradienten G_3 stattfinden und damit analog zu einem DOSY-Experiment [112, 113] zu einer unvollständigen Rephasierung der Reservormagnetisierung führen. Weiterhin könnte dadurch die Effizienz der Kohärenzordnungsselektion negativ beeinflusst werden. Diese Effekte sollten für Experimente mit kurzen Akquisitionszeiten in der indirekten Dimension jedoch gering ausfallen.

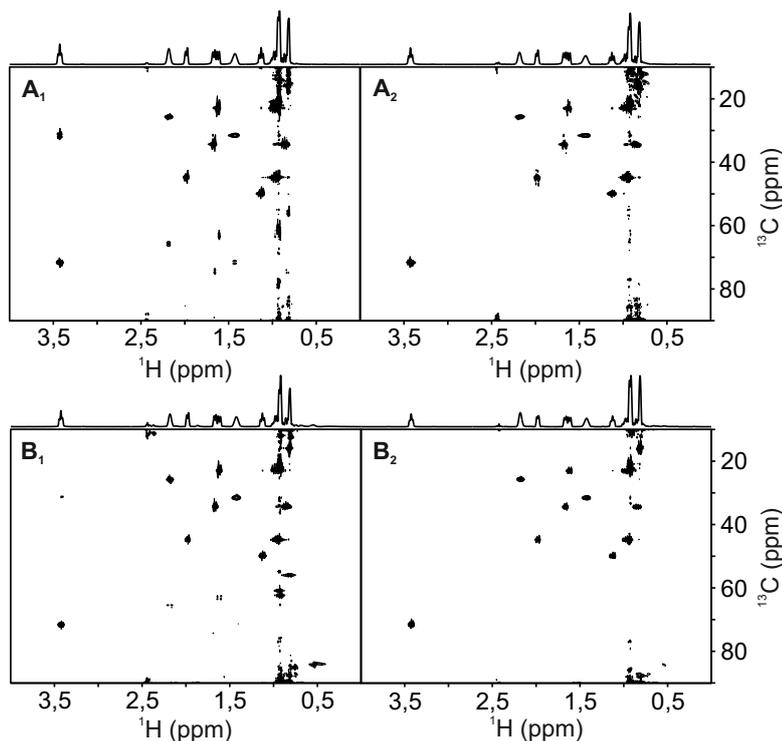


Abbildung 4.11: ^1H , ^{13}C -HSQC-Spektren von Menthol in CDCl_3 . Für die beiden Spektren **A₁** und **A₂** wurde die originale ASAP-HSQC-Sequenz verwendet, für die beiden Spektren **B₁** und **B₂** die symmetrisierte ASAP-HSQC-Sequenz. Mit dem Index **1** sind Spektren, die unter Verwendung von Rechteckimpulsen aufgenommen wurden, gekennzeichnet. Der Index **2** kennzeichnet Spektren, die durch Anwendung von OCT-Impulsen aufgenommen wurden. Alle Spektren wurden mit 512 (^1H) \times 128 (^{13}C) Punkten aufgenommen, dies entspricht Akquisitionszeiten von $106,8$ ms (^1H) bzw. $5,3$ ms (^{13}C). Pro t_1 -Inkrement wurde 1 *scan* aufgenommen, sowie 16 *dummy scans* durchgeführt. Das Erholungs-*delay* d_r wurde auf 4 μs eingestellt. Damit hat jedes Experiment eine Gesamtdauer von 23 Sekunden. Zur Steigerung der digitalen Auflösung wurde in beiden Dimensionen *zero filling* und *linear prediction* mit dem Faktor 2 durchgeführt. Die digitale Auflösung beträgt $2,34$ Hz (^1H) und $47,18$ Hz (^{13}C).

4.7 Vergleich von ASAP-HSQC und ASAP-HMQC

Das HSQC- und das HMQC-Experiment unterscheiden sich an Hand der Kohärenzen, die während der inkrementierten Zeitperiode t_1 vorliegen. Im HSQC entwickelt sich die chemische Verschiebung des Heterokerns, während Antiphase-Magnetisierung vorhanden ist. Im HMQC liegen während dieser Periode dagegen heteronukleare Multiquantenkohärenzen vor. Dadurch führt die Entwicklung von ^1H , ^1H -Kopplungen zu breiten Multipletts in der indirekten Dimension. Um das zu verdeutlichen, wurde jeweils ein HSQC- und ein HMQC-Spektrum

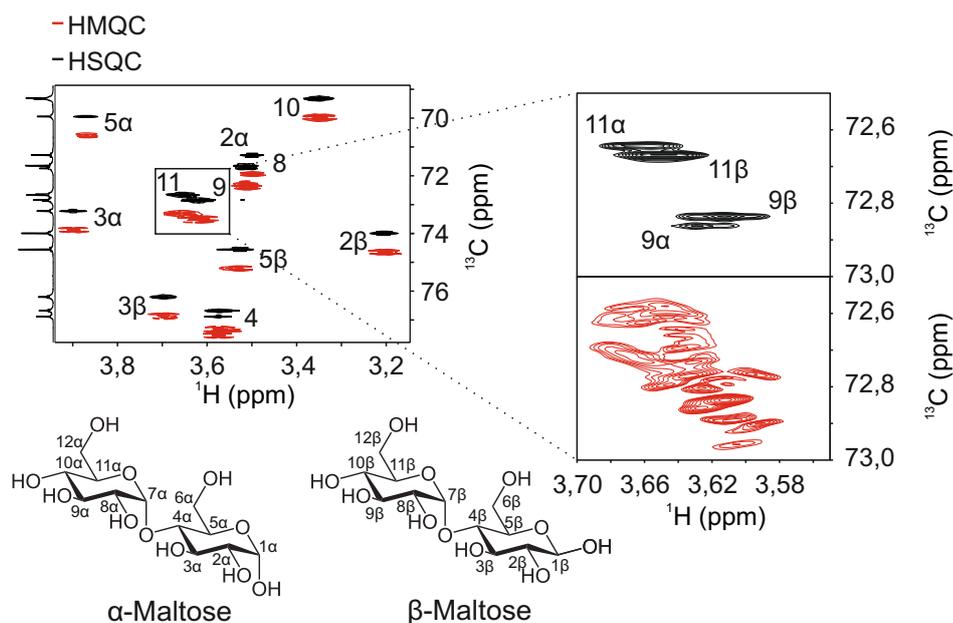


Abbildung 4.12: ASAP-HSQC- (schwarz) und **ASAP-HMQC-Spektrum (rot)** von Maltose. Ein Bereich ist zur Verdeutlichung der unterschiedlichen spektralen Auflösungen zusätzlich vergrößert dargestellt. Beide Spektren wurden mit 512 (^1H) x 16384 (^{13}C) Punkten aufgenommen. Dies entspricht Akquisitionszeiten von 142,3 ms (^1H) bzw. 905,4 ms (^{13}C). In beiden Fällen wurde 1 *scan* für jedes t_1 -Inkrement aufgenommen, sowie 16 *dummy scans* zu Beginn der Experimente. Das Erholungs-*delay* d_r wurde auf 1 ms eingestellt. Die Gesamtexperimentdauer für das HSQC betrug 3h 6min und 37s, für das HMQC ergaben sich 3h 7min und 10s. Zur weiteren Steigerung der digitalen Auflösung wurde in beiden Dimensionen *zero filling* mit dem Faktor 2 durchgeführt. Die resultierende digitale Auflösung beträgt 0,54 Hz in der ^{13}C Dimension.

von Maltose mit 16384 Punkten in der ^{13}C -Dimension aufgenommen. Dafür wurden die Impulssequenzen des originalen ASAP-HSQC und das ASAP-HMQC verwendet. Die Sequenz des ASAP-HMQC wurde dafür ebenso mit Breitbandimpulsen versehen. Durch die hohen Wiederholraten der Experimente war es möglich, beide zweidimensionalen Korrelationspektren in weniger als vier Stunden aufzunehmen. So konnte eine digitale Auflösung von 0,54 Hz in der ^{13}C -Dimension erreicht werden. Eine solche, hohe Auflösung ist ansonsten nur in eindimensionalen ^{13}C -Experimenten realistisch, oder erfordert enorme Messzeiten für HSQC-Experimente die unter konventionellen Bedingungen aufgenommen werden. Abbildung 4.12 zeigt die beiden resultierenden Spektren.

Maltose kommt in der Natur in zwei unterschiedlichen Konfigurationen α und β vor. Nur im HSQC-Spektrum lassen sich die beiden Konfigurationen auch anhand der Signale 9 und 11 unterscheiden. Im HMQC-Spektrum können die nur etwa 3 Hz voneinander entfernt liegenden Signale nicht aufgelöst werden. Der Grund darin liegt in den breiten Multiplettstrukturen, die durch die ^1H , ^1H -Kopplungsentwicklung während der inkrementierten Zeitperiode t_1 hervorgerufen werden.

4.8 Vergleich von ASAP-HSQC und konventionellem HSQC

4.8.1 Menthol

In diesem Kapitel soll gezeigt werden, dass mit dem ASAP-HSQC auch eine leichte Empfindlichkeitssteigerung im Vergleich zum konventionellen HSQC-Experiment erzielt werden kann, wenn zweiteres mit gängigen Einstellungen in Bezug auf Akquisitionszeit in der Protonendimension und Erholungs-*delay* d_r durchgeführt wird. Durch die höhere Wiederholrate des ASAP-HSQC-Experiments können in der selben Gesamtexperimentzeit mehr *scans* durchgeführt werden. Abb. 4.13 zeigt den resultierenden Vergleich der Signalintensitäten von ASAP-HSQC und konventionellem HSQC. Da das Signal-zu-Rausch-Verhältnis die entscheidende Größe darstellt, müssen die Intensitäten des ASAP-HSQC durch $\sqrt{7}$ geteilt werden (siehe Kapitel 2.2.2, Gleichung 2.9), da im ASAP-HSQC sieben mal mehr *scans* in der gleichen Gesamtzeit durchgeführt wurden. Bei fast allen Signalen ist ein leichter Anstieg des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses zu beobachten, dieser Anstieg nimmt Werte bis zu einem Faktor 1,67 an. Dieser Faktor ist gleichbedeutend mit einer Reduktion der Messzeit um den Faktor $1,67^2 = 2,79$. Eine Methylgruppe (Signal 11) erscheint im Spektrum mit leicht abgeschwächter Intensität. Das könnte den Grund haben, dass das gewählte Transfer-*delay* Δ' zur Ernst-Winkel-artigen Anregung für dieses Signal nicht optimal gewählt wurde. Aus den Optimierungsdaten in Kapitel 4.5 (Abb. 4.10) ist zu erkennen, dass die Ernst-Winkel-Anregung für die Methylgruppe keine Empfindlichkeitssteigerung im Vergleich zum konventionellen Transfer-*delay* Δ liefert. Außerdem besitzt sie nur einen ^1H -Kopplungspartner, was eine geringere Effizienz des z -Magnetisierungstransfers zur Folge hat.

Der Vorteil von ALSOFASST- und ASAP-HSQC macht sich jedoch bei der Durchführung von kurzen Experimenten im Bereich von einigen Sekunden noch deutlicher bemerkbar. Das hat den Grund, dass das Magnetisierungsreservoir im Verlauf eines Experiments, mit jedem *scan* und jedem t_1 -Inkrementierungsschritt geringer wird. Verantwortlich dafür sind die Entwicklung von ^1H , ^1H -Kopplungen, transversale Relaxation, imperfekte Radiofrequenzimpulse und die Mischsequenz selbst. In der kurzen Erholungszeit d_r kann kein relevanter Wiederaufbau des Magnetisierungsreservoirs durch longitudinale Relaxation stattfinden.

4.8.2 Norcamphor

An dieser Stelle soll ein Vergleich der Leistungsfähigkeit von konventionellem HSQC (**A**), konventionellem HSQC mit empfindlichkeitserhöhtem Rücktransferschritt (**B**), ALSOFASST-HSQC (**C**) und ASAP-HSQC (**D**) vorgestellt werden. Alle vier Experimente wurden jeweils mit einer Gesamtdauer von nur 23 Sekunden aufgenommen.

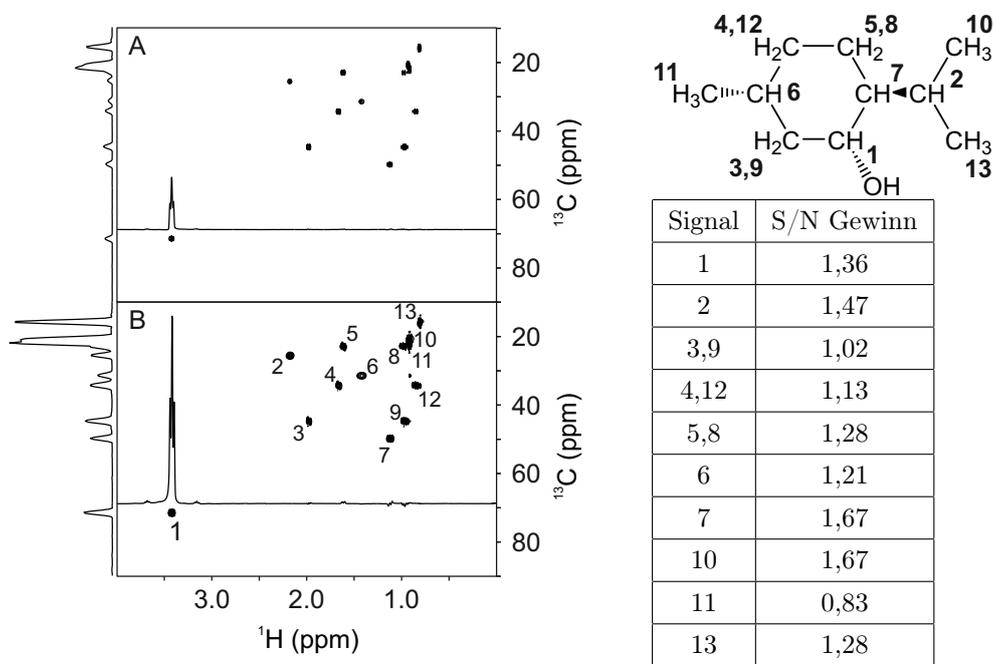


Abbildung 4.13: Vergleich zweier ^1H , ^{13}C -HSQC-Spektren von Menthol, aufgenommen mit einem konventionellen HSQC-Experiment (**A**) und unter Verwendung des ASAP-HSQC (**B**). Es wurde die originale Sequenz verwendet. Beide Spektren wurden mit 1024 (^1H) x 128 (^{13}C) Punkten aufgenommen, dies entspricht Akquisitionszeiten von 213,5 ms (^1H) bzw. 5,3 ms (^{13}C). Spektrum **A** wurde mit 2 *scans* und 4 *dummy scans* aufgenommen, wobei das Erholungs-*delay* d_r auf 2 s gesetzt wurde, einem Wert nahe der mittleren T_1 -Zeiten der Protonen von Menthol. Spektrum **B** wurde mit 14 *scans* und 16 *dummy scans* aufgenommen, vor der DIPSI-2-Mischsequenz wurde zusätzlich eine Wartezeit d_r von 30 ms eingehalten. Die dargestellten ^1H -Projektionen der zweidimensionalen Spektren stellen die erzielten Signalintensitäten der beiden Experimente dar. In der Tabelle ist der Quotient der Signal-zu-Rausch-Verhältnisse von **A** und **B** für alle Signale von Menthol aufgetragen. Ein Wert größer 1 bedeutet ein höheres Signal-zu-Rauschverhältnis für das entsprechende Signal im ASAP-HSQC. Zusätzlich ist die Zuordnung der Korrelationssignale dargestellt.

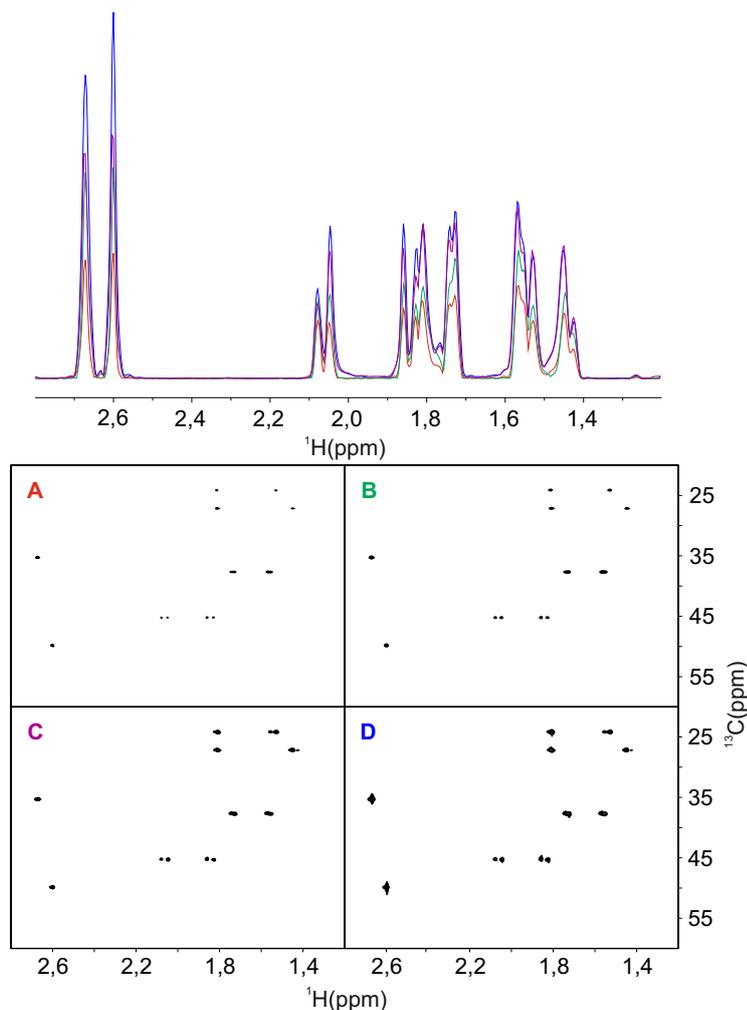


Abbildung 4.14: $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektren von Norcamphor. Für das HSQC-Spektrum **A** wurde ein konventionelles HSQC-Experiment verwendet (Kapitel 2.2.3). Für Spektrum **B** wurde zusätzlich ein empfindlichkeitserhöhter Rücktransferschritt verwendet, darin wurde $\Delta^m = \frac{1}{8J_{CH}}$ eingestellt. Die Spektren **C** und **D** sind die Ergebnisse des symmetrisierten ALSOFAST- bzw. ASAP-HSQC-Experiments (Kapitel 4.4, Abb. 4.9). Die optimierte Transferzeit entsprach $\Delta' = 0,77$ ms. Alle Spektren wurden mit 256 (^1H) x 128 (^{13}C) Punkten aufgenommen, das entspricht Akquisitionszeiten von 133,46 ms (^1H) bzw. 10,61 ms (^{13}C). Pro t_1 -Inkrement wurde 1 *scan* aufgenommen, sowie 4 *dummy scans* durchgeführt. Im konventionellen und empfindlichkeitserhöhten HSQC-Experiment wurde eine Erholungszeit d_r von 35 ms angewandt. Damit hatte jedes Experiment eine Gesamtdauer von 23 Sekunden. Zur Steigerung der digitalen Auflösung wurde in allen vier Fällen in beiden Dimensionen *zero filling* und *linear prediction* mit dem Faktor 2 durchgeführt. Die resultierende digitale Auflösung beträgt damit 1,9 Hz (^1H) bzw. 23,6 Hz (^{13}C).

In Abb. 4.14 sind die entsprechenden HSQC-Spektren dargestellt, zusätzlich wurden die ^1H -Projektionen der zweidimensionalen Spektren hinzugefügt, um die erzielten Signal-zu-

Rausch-Verhältnisse besser vergleichen zu können. Aus allen vier Experimenten resultieren vollständige HSQC-Spektren. Das ALSOFAST- und das ASAP-HSQC sind jedoch auch dem empfindlichkeitserhöhten HSQC-Experiment bei kurzen Gesamtzeiten hinsichtlich des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses überlegen. Besonders hervorzuheben ist das ASAP-HSQC, das ein bis zu einem Faktor 1,8 höheres Signal-zu-Rausch-Verhältnis liefert als das empfindlichkeitserhöhte HSQC.

4.9 ASAP-HSQC zur Untersuchung von wässrigen Proben

Alle bisher vorgestellten Messungen wurden mit Proben durchgeführt, welche deuterierte Lösungsmittel (Anteil der Isotopenmarkierung >99%) verwendeten. Das bedeutet, dass das Protonensignal des Lösungsmittels im NMR-Spektrum um einen Faktor 100 abgeschwächt ist. Hier soll gezeigt werden, dass das ASAP-HSQC durch das Echo-/Antiecho-Aufnahmeschema eine gute Lösungsmittelunterdrückung liefert. In der Impulssequenz aus Abb. 4.15 kommen im Vergleich zum ASAP-HSQC-Experiment zusätzliche Magnetfeldgradienten zum Einsatz, die die Wassermagnetisierung in der xy -Ebene dephasieren und damit abschwächen sollen. Ein zusätzliches Element ist die Einführung von bipolaren Gradienten während der t_1 -Zeit, das unkontrolliertes Verhalten des Wassersignals durch *radiation damping* [114–117] minimiert [118]. *Radiation damping* hat eine erhebliche Beschleunigung des Wiederaufbaus der z -Komponente der Wassermagnetisierung zur Folge und wird durch starke transversale Wassermagnetisierung selbstinduziert. Dadurch lässt sich die Wassermagnetisierung ohne angelegte Gradienten nur schwer kontrollieren. Eine weitere Methode zur Reduktion von *radiation damping*, ist die Kontrolle der Wassermagnetisierung über sogenannte *flip back*-Impulse [119–121]. Diese werden bandselektiv auf das Wassersignal eingestrahlt, um die Wirkung der breitbandig eingestrahlten Protonenimpulse aufzuheben und die Wassermagnetisierung während der Sequenz in $+z$ -Richtung zu fixieren. Dabei werden jedoch ebenfalls Resonanzen unterdrückt bzw. abgeschwächt, die in der Nähe des Wassersignals liegen. Deshalb wurde diese Art der Wasserunterdrückung hier gezielt nicht verwendet. Die Abbildung 4.16 zeigt die Messungen der Impulssequenz aus Abb. 4.15 an zwei Saccharoseproben mit den Konzentrationen 2 mM (**A**) und 100 mM (**B**). Für beide Proben wurde ein Lösungsmittelgemisch aus 90 % H₂O und 10 % D₂O als Locksubstanz verwendet. Die Messung für Spektrum **A** dauerte 15 Sekunden. Für beide Proben werden vollständige ¹H,¹³C-HSQC-Spektren erhalten. In der 100 mM konzentrierten Probe übersteigen die Saccharosesignale das Restsignal des Wassers. Besonders hervorzuheben ist jedoch, dass auch in der 2 mM konzentrierten Probe alle Signale neben dem Restwassersignal detektiert werden konnten. Da es sich um eine nicht isotopenmarkierte Probe handelt, beträgt die effektive Spinkonzentration lediglich 20 μM. Eine Detektion der Signale mittels eindimensionaler ¹³C-NMR in dieser Zeit wäre nicht möglich.

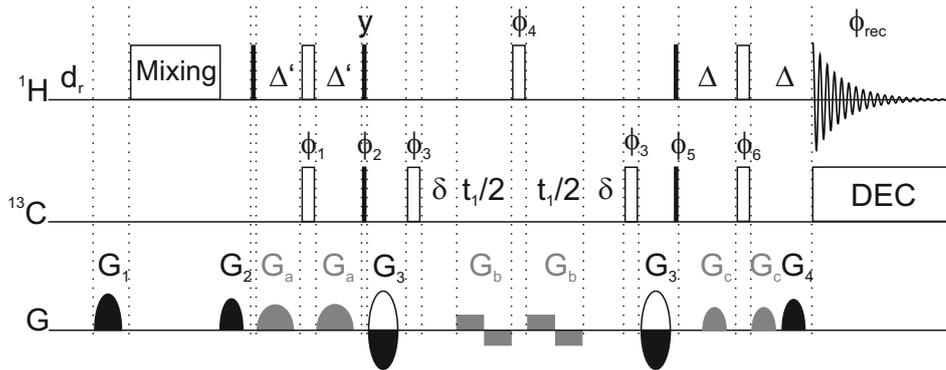


Abbildung 4.15: ASAP- bzw. ALSOFAST-HSQC mit optimierter Lösungsmittelunterdrückung. Im ALSOFAST-Experiment wird die Mischzeit durch eine Wartezeit der selben Länge ersetzt. Ernst-Winkel-Anregung wird durch Anpassung der Länge $2\Delta'$ des INEPT-Transferschrittes erreicht. Das *delay* δ dient der Refokussierung chemischer Verschiebungsentwicklung und heteronuklearer Kopplung. Der vollständige Phasenzyklus lautet wie folgt: $\phi_1 = x$; $\phi_2 = x, -x$; $\phi_3 = 4(x), 4(-x)$; $\phi_4 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_5 = 4(-x), 4(x)$; $\phi_6 = 4(x), 4(-x)$; $\phi_{rec} = x, -x, x, -x, -x, x, -x, x$. Die Gradienten $G_a = 90\%$, $G_b = 2\%$, $G_c = 90\%$ dienen dabei der Optimierung der Lösungsmittelunterdrückung. Die Länge der bipolaren Gradientenpaare G_b wird mit der t_1 -Zeit inkrementiert. Echo-/Antiecho- und Kohärenzordnungsselektion wird erreicht, indem die Gradienten G_3 und G_4 in folgender Weise alterniert werden: $G_3 = (-40\%, 40\%)$, $G_4 = (20,1\%, 20,1\%)$. Zusätzlich zum Echo-/Antiecho-Aufnahmeschema werden die Phasen ϕ_1 und ϕ_2 zusammen mit der Empfängerphase ϕ_{rec} nach der TPPI-Methode invertiert. Als Mischsequenz wird DIPSI-2 mit einer Mischzeit von 34,54 ms verwendet. Zu näheren Informationen bezüglich Impulsen, Gradienten und Entkopplung sei auf Kapitel 3.3.1 verwiesen.

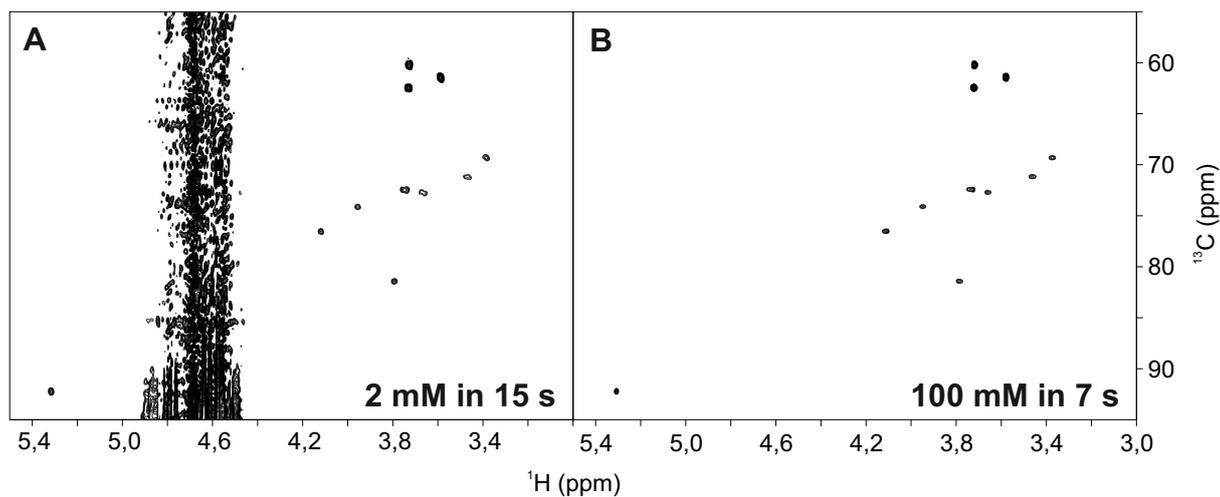


Abbildung 4.16: ^1H , ^{13}C -HSQC-Spektrenausschnitte von Saccharose in 90 % H_2O und 10 % D_2O . Für das HSQC-Spektrum **A** wurde eine Probe, der Konzentration von 2 mM, für Spektrum **B** wurde eine Probenkonzentration von 100 mM verwendet. Beide Spektren wurden mit $512 (^1\text{H}) \times 128 (^{13}\text{C})$ Punkten aufgenommen, dies entspricht Akquisitionszeiten von 85,4 ms (^1H) bzw. 7,07 ms (^{13}C). In Spektrum **B** wurde durch Verwendung von *Non Uniform Sampling* die Zahl der Punkte in der ^{13}C -Dimension auf 25 % bzw. 32 Punkte reduziert. Pro t_1 -Inkrement wurde in beiden Fällen 1 *scan* aufgenommen, sowie 4 *dummy scans* durchgeführt. Damit betrug die Experimentdauer 15 Sekunden (**A**) bzw. 7 Sekunden (**B**). In beiden Experimenten wurde als Kopplungs-*delay* $\Delta' = 1,28$ ms eingestellt. Nach *zero filling* und *linear prediction*, jeweils mit dem Faktor 2, beträgt die digitale Auflösung in beiden Fällen 2,93 Hz (^1H) und 35,32 Hz (^{13}C).

4.10 Multiplizitätseditierte ALSOFASST- und ASAP-HSQC-Sequenzen

In diesem Kapitel werden zwei ASAP-HSQC-Experimente mit Multiplizitätseditierungsschritt vorgestellt. Eines basiert auf dem originalen ASAP-HSQC (**A₁** und **A₂**) in Abb. 4.17), das zweite auf dem symmetrisierten ASAP-HSQC (**B₁** und **B₂**) in Abb. 4.17). Der Index **1** gibt die Verwendung von Rechteckimpulsen an. Die Sequenzen, die durch den Index **2** gekennzeichnet sind, enthalten Breitbandimpulse. In beiden Versionen wurde darauf geachtet, so wenig zusätzliche Impulse wie möglich zu verwenden um den Multiplizitätseditierungsschritt zu realisieren. Die Sequenz auf Basis des originalen ASAP-HSQC benötigt einen zusätzlichen 180°-Protonenimpuls. Dagegen werden in der Sequenz auf Basis des symmetrisierten ASAP-HSQC keine zusätzlichen Impulse eingesetzt.

In der folgenden Berechnung im Produktoperatorformalismus werden jeweils die beiden Versionen parallel betrachtet. Der INEPT-Baustein wird nicht erneut berechnet, da dieser äquivalente Operatoren zu den beiden Versionen des ASAP-HSQC liefert (siehe Kapitel 4.3.1 und 4.3.3). Ebenso wird die Echo-/Antiecho-Selektion durch die Gradienten G_3 und G_4 nicht erneut betrachtet, da sie auf die gleiche Weise wie in den ASAP-HSQC-Experimenten funktioniert. Durch das zusätzliche Kopplungs-*delay* der Länge $\frac{1}{J_{CH}}$ zur Multiplizitätseditierung, das die Magnetisierung der ^{13}C -gebundenen Protonen invertiert, muss die Kopplungszeit im INEPT-Schritt zur Ernst-Winkel Anregung angepasst werden. Dieses Thema wird in Kapitel 4.10.1 im Detail behandelt.

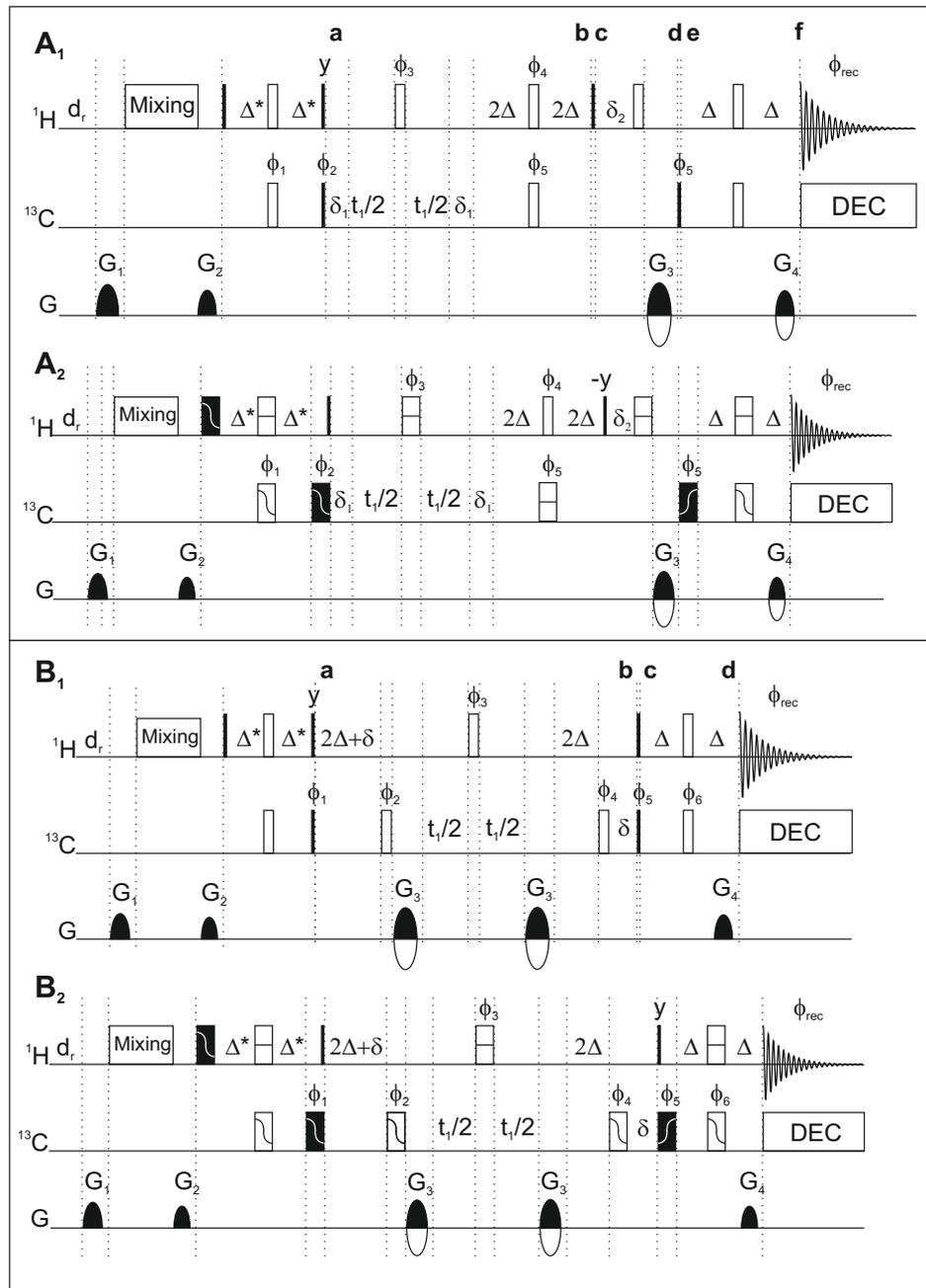


Abbildung 4.17: Multiplizitätseditierte ASAP-HSQC-Impulssequenzen mit Rechteckimpulsen und Breitbandimpulsen. Die beiden Sequenzen basieren auf dem originalen (\mathbf{A}_1 und \mathbf{A}_2) und symmetrisierten (\mathbf{B}_1 und \mathbf{B}_2) ASAP-HSQC. Ernst-Winkel-Anregung wird über die Anpassung der Länge $2\Delta^*$ des INEPT-Bausteins erreicht. Der vollständige Phasenzyklus lautet wie folgt: (\mathbf{A}_1 und \mathbf{A}_2): $\phi_1 = x$; $\phi_2 = x, -x$ (\mathbf{A}_1); $\phi_2 = -x, x$ (\mathbf{A}_2); $\phi_3 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_4 = 2(-x), 2(x)$; $\phi_5 = 4(x), 4(-x)$; $\phi_{rec} = x, -x, x, -x, -x, x, -x, x$. (\mathbf{B}_1 und \mathbf{B}_2): $\phi_1 = 4(x), 4(-x)$; $\phi_2 = 4(y), 4(-y)$; $\phi_3 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_4 = 4(-y), 4(y)$; $\phi_5 = -x, x$ (\mathbf{B}_1); $\phi_5 = x, -x$ (\mathbf{B}_2); $\phi_6 = x$; $\phi_{rec} = x, -x, x, -x, -x, x, -x, x$. Echo-/Antiecho- und Kohärenzordnungsselektion wird erreicht, indem die Gradienten G_3 und G_4 in folgender Weise alterniert werden: $G_3 = (40\%, -40\%)$, $G_4 = (20, 1\%, 20, 1\%)$ für \mathbf{A}_1 und \mathbf{A}_2 , bzw. $G_3 = (63, 9\%, 80\%)$, $G_4 = (80\%, 59, 9\%)$ für \mathbf{B}_1 und \mathbf{B}_2 . Zusätzlich zum Echo-/Antiecho-Aufnahmeschema werden die Phasen ϕ_1 und ϕ_2 (\mathbf{A}_1 und \mathbf{A}_2) bzw. ϕ_5 und ϕ_6 (\mathbf{B}_1 und \mathbf{B}_2) zusammen mit ϕ_{rec} nach der TPPI-Methode invertiert. Zu näheren Informationen bezüglich Impulsen, Gradienten und Entkopplung sei auf Kapitel 3.3.1 verwiesen.

a) Nach dem INEPT-Schritt liegt in beiden Experimenten $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -Antiphase magnetisierung auf Kohlenstoff vor. Die Magnetisierung der ^{12}C -gebundenen Protonen und die Ernst-Winkel-Magnetisierung sind in $-y$ (\mathbf{A}_1) und y (\mathbf{B}_1) orientiert.

\mathbf{A}_1

$$\begin{array}{l} ^1\text{H-}^{12}\text{C} : \\ ^1\text{H-}^{13}\text{C} : \end{array} 4 \cdot \left[\begin{array}{c} -I_y \\ -I_y \cos(2\pi J\Delta^*) + 2I_z S_y \sin(2\pi J\Delta^*) \end{array} \right] \left[\begin{array}{c} -I_y \\ -I_y \cos(2\pi J\Delta^*) - 2I_z S_y \sin(2\pi J\Delta^*) \end{array} \right]$$

bzw.

\mathbf{B}_1

$$\begin{array}{l} ^1\text{H-}^{12}\text{C} : \\ ^1\text{H-}^{13}\text{C} : \end{array} \left[4 \cdot \begin{array}{c} I_y \\ I_y \cos(2\pi J\Delta^*) - 2I_z S_y \sin(2\pi J\Delta^*) \end{array} \right] 4 \cdot \left[\begin{array}{c} I_y \\ I_y \cos(2\pi J\Delta^*) + 2I_z S_y \sin(2\pi J\Delta^*) \end{array} \right]$$

Im Folgenden werden die Faktoren $\cos(2\pi J\Delta^*)$ und $\sin(2\pi J\Delta^*)$ zur besseren Übersicht in der Rechnung nicht weiter mitgeführt. Sie bleiben jedoch bis zum Ende der Sequenz erhalten.

Bis zum Punkt b) entwickelt sich in beiden Sequenzen durch die inkrementierte Zeitperiode die chemische Verschiebung des ^{13}C -Kerns. Daran schließt sich nun die Multiplizitätsmodulation an. Durch die beiden Kopplungs-*delays* mit der Gesamtlänge 4Δ und entsprechend plazierte Impulse kommt eine Modulation hinzu, die den Phasenfaktor $\cos^n(4\pi J\Delta)$ verursacht. n gibt die Multiplizität der CH_n -Gruppe an. Die resultierenden Terme lauten für \mathbf{A}_1

$$\frac{\delta_1 - \frac{t_1}{2} - \pi\phi_3(^1\text{H}) - \frac{t_1}{2} - \delta_1 - 2\Delta - \pi\phi_4(^1\text{H}) - 2\Delta}{\delta_1 - \frac{t_1}{2} - \pi\phi_3(^1\text{H}) - \frac{t_1}{2} - \delta_1 - 2\Delta - (\pi\phi_4(^1\text{H}) + \pi\phi_5(^{13}\text{C})) - 2\Delta} \rightarrow$$

$$4 \cdot \left[\begin{array}{c} I_y \\ -I_y - 2I_z S_y \cos(t_1\omega_S) \cos^n(4\pi J\Delta) \end{array} \right] \left[\begin{array}{c} I_y \\ -I_y + 2I_z S_y \cos(t_1\omega_S) \cos^n(4\pi J\Delta) \end{array} \right],$$

bzw. für \mathbf{B}_1

$$\frac{2\Delta - G_3 - \frac{t_1}{2} - \pi\phi_3(^1\text{H}) - \frac{t_1}{2} - G_3 - 2\Delta - \delta}{2\Delta - \pi\phi_2(^{13}\text{C}) - G_3 - \frac{t_1}{2} - \pi\phi_3(^1\text{H}) - \frac{t_1}{2} - G_3 - 2\Delta - \pi\phi_4(^{13}\text{C}) - \delta} \rightarrow$$

$$\left[4 \cdot \begin{array}{c} -I_y \\ I_y - 2I_z S_{y,x} \cos(t_1\omega_S) \cos^n(4\pi J\Delta) \end{array} \right] 4 \cdot \left[\begin{array}{c} -I_y \\ I_y + 2I_z S_{y,x} \cos(t_1\omega_S) \cos^n(4\pi J\Delta) \end{array} \right].$$

Die entsprechenden Phasenfaktoren bleiben bis zum Ende der Sequenzen erhalten. In Sequenz \mathbf{B}_1 wird die $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -Antiphase magnetisierung außerdem durch die beiden Kodierungsgradienten G_3 in der xy -Ebene dephasiert.

In beiden Sequenzen erfährt die Inphasemagnetisierung ^{13}C -gebundener Protonen, durch die $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplungsentwicklung während des Multiplizitätsmodulationsschritts, eine Rotation um 180° . Damit ist sie invers zu der Magnetisierung der ^{12}C -gebundenen Protonen orientiert.

c) In der Sequenz \mathbf{A}_1 werden durch den 90° -Impuls auf Protonen $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -Multiquantenkohärenzen erzeugt. Gleichzeitig wird die Magnetisierung der passiven Protonen und die Ernst-Winkel-Magnetisierung in Richtung der z -Achse rotiert.

$$\frac{\frac{\pi}{2}_x(^1H)}{\frac{\pi}{2}_x(^1H)} \rightarrow 4 \cdot \left[\left(\begin{array}{c} I_z \\ -I_z + 2I_y S_y \cos(t_1 \omega_S) \cos^n(4\pi J \Delta) \end{array} \right) \left(\begin{array}{c} I_z \\ -I_z - 2I_y S_y \cos(t_1 \omega_S) \cos^n(4\pi J \Delta) \end{array} \right) \right]$$

In Sequenz **B**₁ werden zwei 90°-Impulse gleichzeitig auf ¹H und ¹³C eingestrahlt, die ¹H, ¹³C-Antiphase magnetisierung auf Protonen erzeugen.

$$\frac{\frac{\pi}{2}_x(^1H)}{\frac{\pi}{2}_x(^1H) + \frac{\pi}{2}_{\phi_5}(^{13}C)} \rightarrow 2 \cdot \left[\left(\begin{array}{c} -I_z \\ I_z - 2I_y S_z \cos(t_1 \omega_S) \cos^n(4\pi J \Delta) \end{array} \right) \left(\begin{array}{c} -I_z \\ I_z + 2I_y S_z \cos(t_1 \omega_S) \cos^n(4\pi J \Delta) \end{array} \right) \right]$$

$$2 \cdot \left[\left(\begin{array}{c} -I_z \\ I_z + 2I_y S_z \cos(t_1 \omega_S) \cos^n(4\pi J \Delta) \end{array} \right) \left(\begin{array}{c} -I_z \\ I_z - 2I_y S_z \cos(t_1 \omega_S) \cos^n(4\pi J \Delta) \end{array} \right) \right]$$

d) Der folgende 180°-Protonenimpuls in **A**₁ dient der Refokussierung der chemischen Verschiebungsentwicklung während der Dauer des Kodierungsgradienten G₃.

$$\frac{\delta_2 - \pi_x(^1H) - G_3}{\delta_2 - \pi_x(^1H) - G_3} \rightarrow 4 \cdot \left[\left(\begin{array}{c} -I_z \\ I_z - 2I_{y,x} S_{y,x} \cos(t_1 \omega_S) \cos^n(4\pi J \Delta) \end{array} \right) \left(\begin{array}{c} -I_z \\ I_z + 2I_{y,x} S_{y,x} \cos(t_1 \omega_S) \cos^n(4\pi J \Delta) \end{array} \right) \right]$$

In Sequenz **B**₁ wird die Antiphase magnetisierung während des Kopplungs-*delays* in Protonen-Inphasemagnetisierung umgewandelt und durch den Gradienten G₄ refokussiert.

$$\frac{\Delta - \pi_x(^1H) - (\Delta + G_4)}{\Delta - (\pi_x(^1H) + \pi_{\phi_6}(^{13}C)) - (\Delta + G_4)} \rightarrow 2 \cdot \left[\left(\begin{array}{c} I_z \\ -I_z + I_x \cos(t_1 \omega_S) \cos^n(4\pi J \Delta) \end{array} \right) \left(\begin{array}{c} I_z \\ -I_z - I_x \cos(t_1 \omega_S) \cos^n(4\pi J \Delta) \end{array} \right) \right]$$

$$2 \cdot \left[\left(\begin{array}{c} I_z \\ -I_z - I_x \cos(t_1 \omega_S) \cos^n(4\pi J \Delta) \end{array} \right) \left(\begin{array}{c} I_z \\ -I_z + I_x \cos(t_1 \omega_S) \cos^n(4\pi J \Delta) \end{array} \right) \right]$$

Daran schließt sich nun also nur noch die Aufnahme des FID an. Für **A**₁ folgen noch zwei weitere Schritte.

e) Der folgende 90°-Impuls auf dem ¹³C-Kanal erzeugt ¹H, ¹³C-Antiphase magnetisierung auf Protonen.

$$\frac{\frac{\pi}{2}_{\phi_5}(^{13}C)}{\frac{\pi}{2}_{\phi_5}(^{13}C)} \rightarrow 2 \cdot \left[\left(\begin{array}{c} -I_z \\ I_z - 2I_{y,x} S_z \cos(t_1 \omega_S) \cos^n(4\pi J \Delta) \end{array} \right) \left(\begin{array}{c} -I_z \\ I_z + 2I_{y,x} S_z \cos(t_1 \omega_S) \cos^n(4\pi J \Delta) \end{array} \right) \right]$$

$$2 \cdot \left[\left(\begin{array}{c} -I_z \\ I_z + 2I_{y,x} S_z \cos(t_1 \omega_S) \cos^n(4\pi J \Delta) \end{array} \right) \left(\begin{array}{c} -I_z \\ I_z - 2I_{y,x} S_z \cos(t_1 \omega_S) \cos^n(4\pi J \Delta) \end{array} \right) \right]$$

Diese wird in Sequenz **A**₁ bis zum Punkt f) in ¹H,¹³C-Inphasemagnetisierung auf Protonen umgewandelt und durch G₄ refokussiert.

$$\frac{\Delta - \pi_x(^1H) - \Delta - G_4}{\Delta - (\pi_x(^1H) + \pi_x(^{13}C)) - \Delta - G_4} \rightarrow$$

$$2 \cdot \left[\begin{pmatrix} I_z \\ -I_z + I_x \cos(t_1\omega_S)\cos^n(4\pi J\Delta) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_z \\ -I_z - I_x \cos(t_1\omega_S)\cos^n(4\pi J\Delta) \end{pmatrix} \right]$$

$$2 \cdot \left[\begin{pmatrix} I_z \\ -I_z - I_x \cos(t_1\omega_S)\cos^n(4\pi J\Delta) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_z \\ -I_z + I_x \cos(t_1\omega_S)\cos^n(4\pi J\Delta) \end{pmatrix} \right]$$

Unter Berücksichtigung der Empfängerphase ϕ_{rec} addiert sich die Magnetisierung in den Impulssequenzen **A**₁ und **B**₁ schließlich zu

$$8I_x \cos(t_1\omega_S)\cos^n(4\pi J\Delta) \sin(2\pi J\Delta^*)$$

auf. Die Magnetisierung der ¹²C-gebundenen Protonen ist in beiden Sequenzen in Richtung $+z$ orientiert. Die Ernst-Winkel-Magnetisierung hat in beiden Fällen die Form

$$-I_z \cos(2\pi J\Delta^*).$$

Würde man also den Ernst-Winkel aus dem ASAP-HSQC wählen, hätte der \cos -Term ein positives Vorzeichen und der Beitrag zur z -Magnetisierung für den nächsten *scan* oder das nächste t_1 -Inkrement wäre negativ. Im folgenden Kapitel soll gezeigt werden, wie aus dem Ernst-Winkel des ASAP-HSQC-Experiments, der Ernst-Winkel für das multiplizitätseditierte ASAP-HSQC bestimmt werden kann.

4.10.1 Ernst-Winkel Berechnung im multiplizitätseditierten HSQC

Im multiplizitätseditierten ASAP-HSQC-Experiment kann nicht der Ernstwinkel des ASAP-HSQC übernommen werden. Das hat den Grund, dass die Multiplizitätseditierung durch eine zusätzliche Magnetisierungstransferzeit der Dauer $4\Delta = \frac{1}{\gamma_{CH}}$ erzielt wird. Die zurückbehaltenene Magnetisierung befindet sich während dieser Zeitperiode in der transversalen Ebene. Die sich entwickelnden ¹J_{CH}-Kopplungen entsprechen einer weiteren Rotation um den Winkel 180° für ¹³C-gebundene Protonen. Das führt im Allgemeinen dazu, dass sich die Ernstwinkel magnetisierung zu Beginn der Datenaufnahme in $-z$ -Richtung befindet. Während die Magnetisierung der ¹²C- gebundenen Protonen entlang $+z$ orientiert ist. Daraus resultiert eine Abschwächung der für den nächsten Aufnahmepunkt verfügbaren z -Magnetisierung. Das führt zu einer Verringerung der Empfindlichkeit des Experiments. Abb. 4.18 soll diesen Effekt graphisch verdeutlichen. Die Vorzeicheninvertierung kann durch Änderung des Anregungs-delays von Δ' zu Δ^* kompensiert werden. Der Zusammenhang zwischen Δ' und

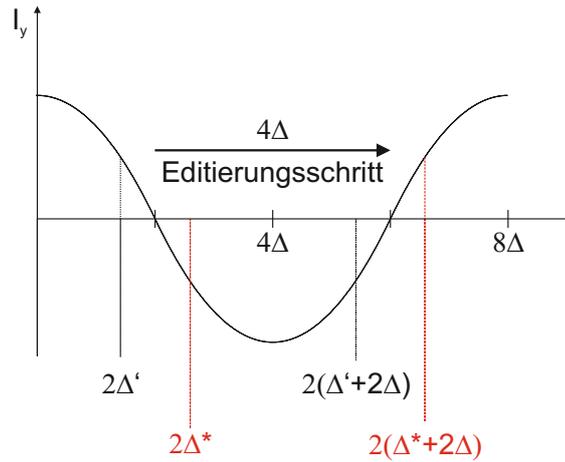


Abbildung 4.18: Graphische Verdeutlichung des Effekts der Multiplizitätseditierung auf die Wahl des Ernst-Winkel-delays. Da der zusätzliche Kopplungstransferzeit der Länge $4\Delta = \frac{1}{\nu_{CH}}$ die transversale Magnetisierung der ^{13}C -gebundenen Protonen invertiert, muss dieser in der Wahl des Ernst-Winkels berücksichtigt werden. Im INEPT-Schritt ist der Verlauf der Inphase Magnetisierung (z.B. I_y) in Abhängigkeit der Transferzeit Δ durch den Faktor $\cos 2\pi J\Delta$ gegeben. Die in einem ASAP- oder ALSOFAST-HSQC im INEPT zurückbehaltene positive Magnetisierung ist durch den Zeitpunkt $2\Delta'$ markiert. Durch die zusätzliche Transferzeit der Länge 4Δ ändert sich nicht der Betrag, jedoch das Vorzeichen der Magnetisierung. Um diesen Effekt zu kompensieren, muss zur Ernst-Winkel-Anregung die Transferzeit des INEPT-Schritts auf $2\Delta^*$ (Zeitpunkt im Schaubild rot markiert) eingestellt werden. Nach dem Editierungsschritt (Zeitpunkt $2\Delta^* + 4\Delta$) führt das schließlich wieder zu dem gewünschten positiven Magnetisierungsbeitrag.

Δ^* ergibt sich aus Gleichung

$$\begin{aligned} 2\Delta^* &= 2\Delta + (2\Delta - 2\Delta') \\ &= 4\Delta - 2\Delta' \\ \rightarrow \Delta^* &= 2\Delta - \Delta'. \end{aligned}$$

In Topspin werden die Kopplungs-delay-Längen durch Eingabe eines Wertes für die Stärke der Kopplung eingestellt. Die einzustellende Kopplungskonstante J^* lässt sich ebenso aus dem optimierten Wert J' für das ASAP-HSQC berechnen.

$$\begin{aligned} \frac{1}{4J^*} &= \frac{1}{2J} - \frac{1}{4J'} \\ &= \frac{4J' - 2J}{8JJ'} \\ \rightarrow J^* &= \frac{JJ'}{2J' - J} \end{aligned}$$

Im Anhang dieser Arbeit sind die Impulssequenzen beider Experimente unter Verwendung von Breitbandimpulsen angefügt. In diesen wird Δ^* durch Eingabe des optimierten Wertes J' automatisch berechnet.

4.10.2 Vergleich der beiden Experimente

In diesem Abschnitt soll ein Vergleich der beiden multiplizitätseditierten ASAP-HSQC-Experimente gezeigt werden. Dafür wurde jeweils ein Spektrum an der 100 mM konzentrierten Borneol-Probe aufgenommen. Abb. 4.19 zeigt die Resultate der beiden Experimente. Spektrum **A** wurde mit der multiplizitätseditierten Sequenz basierend auf dem originalen, Spektrum **B** mit der entsprechenden Sequenz basierend auf dem symmetrisierten ASAP-HSQC aufgenommen. Es wurde jeweils die Sequenz mit Breitbandimpulsen verwendet. Die Gesamtexperimentzeit betrug in beiden Fällen 16 Sekunden. Beide Experimente ermögli-

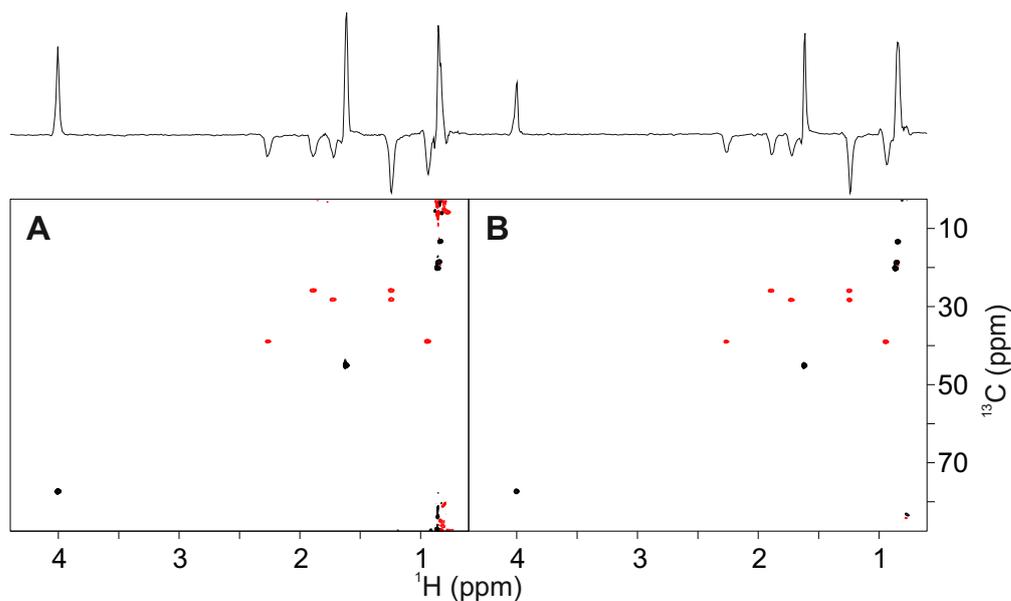


Abbildung 4.19: Multiplizitätseditierte ^1H , ^{13}C -HSQC-Spektren von Borneol der Konzentration 100 mM. Schwarze Signale weisen dabei ein positives (CH - und CH_3 -Gruppen), rote Signale ein negatives Vorzeichen (CH_2 -Gruppen) auf. Beide Spektren wurden mit 256 (^1H) \times 128 (^{13}C) Punkten aufgenommen, was Akquisitionszeiten von $56,21$ ms (^1H) bzw. $4,99$ ms (^{13}C) entspricht. Damit hatten beide Experimente eine Gesamtdauer von 16 s. Spektrum **A** wurde mit der multiplizitätseditierten Sequenz basierend auf dem originalen, Spektrum **B** mit der entsprechenden Sequenz basierend auf dem symmetrisierten ASAP-HSQC aufgenommen. Δ^* wurde in beiden Fällen auf die Länge $2,27$ ms eingestellt. Pro t_1 - Inkrement wurde 1 scan aufgenommen, sowie 4 dummy scans durchgeführt. Die Erholungszeit d_r wurde auf 4 μs eingestellt. In beiden Fällen wurde *zero filling* und *linear prediction* jeweils mit dem Faktor 2 verwendet. Die resultierende digitale Auflösung beträgt $4,5$ Hz (^1H) bzw. $50,1$ Hz (^{13}C).

chen in der Zeit die Aufnahme vollständiger multiplizitätseditierter ^1H , ^{13}C -HSQC-Spektren. Spektrum **A** weist ein höheres Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf, jedoch erscheint Spektrum **B** artefaktfreier. Damit ergibt sich ein ähnliches Ergebnis wie bei dem Vergleich der beiden ASAP-HSQC-Sequenzen in Kapitel 4.6.

In Kapitel 4.11.2 dieser Arbeit werden das multiplizitätseditierte ASAP- und ALSOFAS-HSQC mit gängigen Impulssequenzen verglichen. Dabei wird das Experiment basierend auf der symmetrisierten Version des ASAP-HSQC verwendet. Zur weiteren Reduktion der Messzeit kommt zusätzlich *Non Uniform Sampling* zum Einsatz.

4.11 Kombination der ASAP-Experimente mit *Non Uniform Sampling*

Durch die Verwendung von *Non Uniform Sampling* (NUS) wird nur ein geringer Prozentsatz der Datenpunkte eines mehrdimensionalen NMR-Experiments aufgenommen. Durch Rekonstruktion der fehlenden Datenpunkte vor der Fouriertransformation können so vollständige mehrdimensionale NMR-Spektren aufgenommen werden, die die gleiche digitale Auflösung wie herkömmlich aufgenommene Spektren aufweisen. Die Experimentzeit ist jedoch auf einen Bruchteil reduziert. Zwar wird dadurch die Prozessierung der Spektren erheblich rechen- und damit zeitaufwendiger, jedoch kann so die Spektrometerzeit wesentlich effizienter genutzt werden, da die Prozessierung an einem anderen Rechner mit entsprechender Software ausgeführt werden kann. In dem folgenden Abschnitt wird gezeigt, dass mit dem ASAP-HSQC in Verbindung mit NUS vollständige ^1H , ^{13}C -Korrelationsspektren in nur wenigen Sekunden aufgenommen werden können. Durch zusätzliche Verwendung von Prozessierungsmethoden wie *linear prediction* [105] und *zero filling* [106, 107] wird die digitale Auflösung sowohl in der Protonendimension, als auch in der ^{13}C -Dimension weiter erhöht. Die Experimente werden mit dem konventionellen HSQC-Experiment und dem empfindlichkeitserhöhten HSQC verglichen. Die Parameter werden jeweils so eingestellt, dass sich die gleiche Gesamtexperimentzeit wie für ASAP- und ALOFAST-HSQC ergibt.

4.11.1 ALSOFAS- und ASAP-HSQC

Die Abbildung 4.20 zeigt den Vergleich von vier HSQC-Spektren von Borneol, die zum einen mit einem konventionellen HSQC (**A**), mit einem empfindlichkeitserhöhten HSQC (**B**), mit einem ALSOFAS-HSQC (**C**) und einem ASAP-HSQC (**D**) in jeweils 2 Sekunden Gesamtexperimentdauer aufgenommen wurden. Das konventionelle HSQC, sowohl ohne als auch mit empfindlichkeitserhöhtem Rücktransferschritt, liefert keine auswertbaren Ergebnisse. Im Gegensatz dazu sind die mit dem ASAP- oder ALSOFAS-HSQC aufgenommenen ^1H , ^{13}C -Korrelationsspektren jeweils vollständig. Sie weisen beide ein ähnliches Signal-zu-Rausch- sowie Signal-zu-Artefakt-Verhältnis auf. Zudem lassen sich mit dem ASAP-HSQC-Experiment auch sehr hohe Auflösungen in der ^{13}C -Dimension in wenigen Minuten Gesamtexperimentdauer erzielen. Um das zu zeigen, wurde mit der gleichen Maltose-Probe, die in Kapitel 4.7 für den Vergleich zwischen ASAP-HSQC und ASAP-HMQC genutzt wurde, ein ASAP-HSQC-Experiment mit 8192 Punkten in der ^{13}C -Dimension aufgenommen.

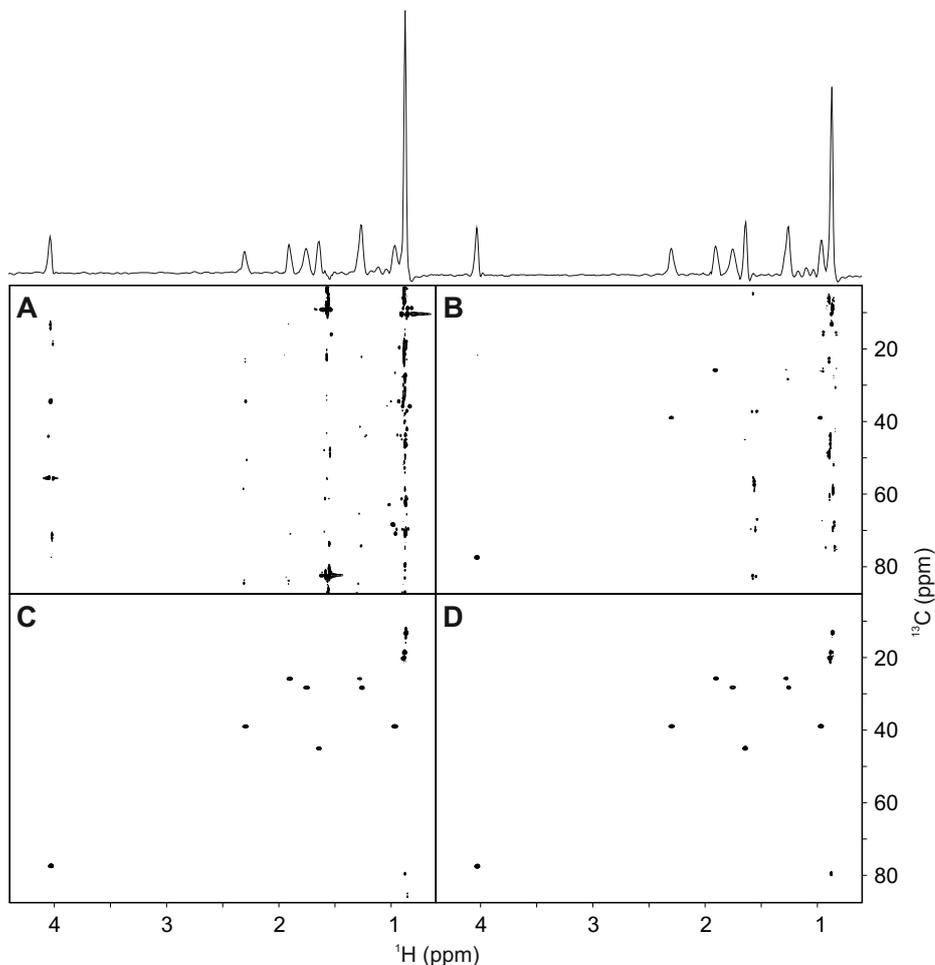


Abbildung 4.20: ^1H , ^{13}C -HSQC-Spektren von Borneol der Konzentration 100 mM. Für das Spektrum **A** wurde ein konventionelles HSQC-Experiment verwendet (Kapitel 2.2.3). Für Spektrum **B** wurde zusätzlich ein empfindlichkeitserhöhter Rücktransferschritt verwendet (Kapitel 2.2.5), wobei $\Delta^m = \frac{1}{8^1 J_{CH}}$ entspricht. Spektrum **C** und **D** sind die Ergebnisse des symmetrisierten ALSOFAST- bzw. ASAP-HSQC-Experiments (Kapitel 4.4, Abb. 4.9). Jedes Experiment eine Gesamtdauer von nur 2 s. Zum besseren Vergleich des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses sind zudem die ^1H -Projektionen der Experimente **C** (links) und **D** (rechts) nebeneinander dargestellt. Da die Experimente **A** und **B** keine vollständigen Spektren lieferten, sind die entsprechenden Projektionen nicht dargestellt. Alle Spektren wurden mit 256 (^1H) x 128 (^{13}C) Punkten aufgenommen, dies entspricht Akquisitionszeiten von 56,21 ms (^1H) bzw. 4,99 ms (^{13}C). Durch Verwendung von *Non Uniform Sampling* wurde die Zahl der Punkte in der ^{13}C -Dimension jeweils auf 15 % bzw. 20 Punkte reduziert. Pro t_1 -Inkrement wurde 1 *scan* aufgenommen, sowie 4 *dummy scans* durchgeführt. Im konventionellen HSQC- und empfindlichkeitserhöhten HSQC-Experiment wurde eine Erholungszeit d_r von 35 ms eingehalten. Zur Steigerung der digitalen Auflösung wurde in beiden Dimensionen *zero filling* und *linear prediction* mit dem Faktor 2 durchgeführt. Die digitale Auflösung beträgt damit 4,5 Hz (^1H) bzw. 50,1 Hz (^{13}C).

Durch die Verwendung von *Non Uniform Sampling* wurde die Zahl der Punkte auf 15%, oder 1228 tatsächlich detektierte Punkte reduziert. Das Experiment liefert in 7 min

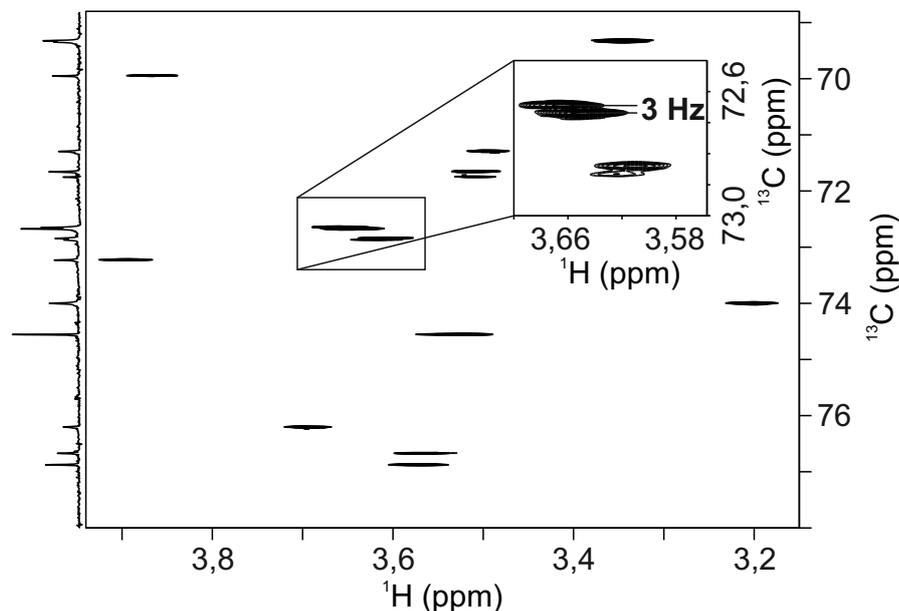


Abbildung 4.21: ASAP-HSQC-Spektrum von Maltose, aufgenommen mit der Sequenz des originalen Experiments. Ein Bereich ist zur Verdeutlichung der hohen spektralen Auflösung in der ^{13}C -Dimension vergrößert dargestellt. Das Spektrum wurde mit 256 (^1H) \times 8192 (^{13}C) Punkten aufgenommen, dies entspricht Akquisitionszeiten von 71,2 ms (^1H) bzw. 452,6 ms (^{13}C). Durch Verwendung von NUS wurde die Zahl der Punkte in der ^{13}C -Dimension auf 15 % bzw. 1228 reduziert. Ein *scan* pro t_1 -Inkrement und 32 *dummy scans* wurden durchgeführt. Die Gesamtexperimentzeit betrug damit 7 min und 14 s. Zur Steigerung der spektralen Auflösung wurde in beiden Dimensionen zusätzlich *zero filling* und *linear prediction* mit dem Faktor 2 durchgeführt. Die resultierende digitale Auflösung beträgt 3,5 Hz in der ^1H - und 0,54 Hz in der ^{13}C -Dimension.

und 14 s vollständige ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektren, die durch die digitale Auflösung von 0,54 Hz in der ^{13}C -Dimension ebenso die Unterscheidung aller α - und β -Maltose-Signale, insbesondere der Signale 9 und 11 (Zuordnung der Signale siehe Kapitel 4.7, Abb. 4.12), ermöglichen. Ein konventionelles HSQC-Experiment, das mit Standardeinstellungen im Routinebetrieb aufgenommen wird, würde bei vergleichbarer Experimentzeit nur eine Auflösung im Bereich von 20 Hz in der ^{13}C -Dimension liefern und würde für die Unterscheidung der nur etwa 3 Hz auseinanderliegenden Signale nicht ausreichen.

Ein ähnliches Ergebnis zeigt sich bei Verwendung der Mentholprobe. Die in Abb. 4.22 gezeigten HSQC-Spektren wurden in 2 Sekunden aufgenommen. Wieder liefern nur ALSOFAST- und ASAP-HSQC vollständige Korrelationsspektren. In diesem Fall ist durch die Mischsequenz im ASAP-HSQC jedoch ein deutlicher Gewinn im Signal-zu-Rausch-Verhältnis, verglichen mit dem ALSOFAST-HSQC, erkennbar. Dagegen fehlen im konventionellen HSQC wie auch unter Verwendung eines empfindlichkeitserhöhten Rücktransferschritts Signale im

Spektrum. Weiterhin machen intensitätsstarke Artefaktsignale bei den konventionellen Experimenten eine vollständige und eindeutige Zuordnung unmöglich.

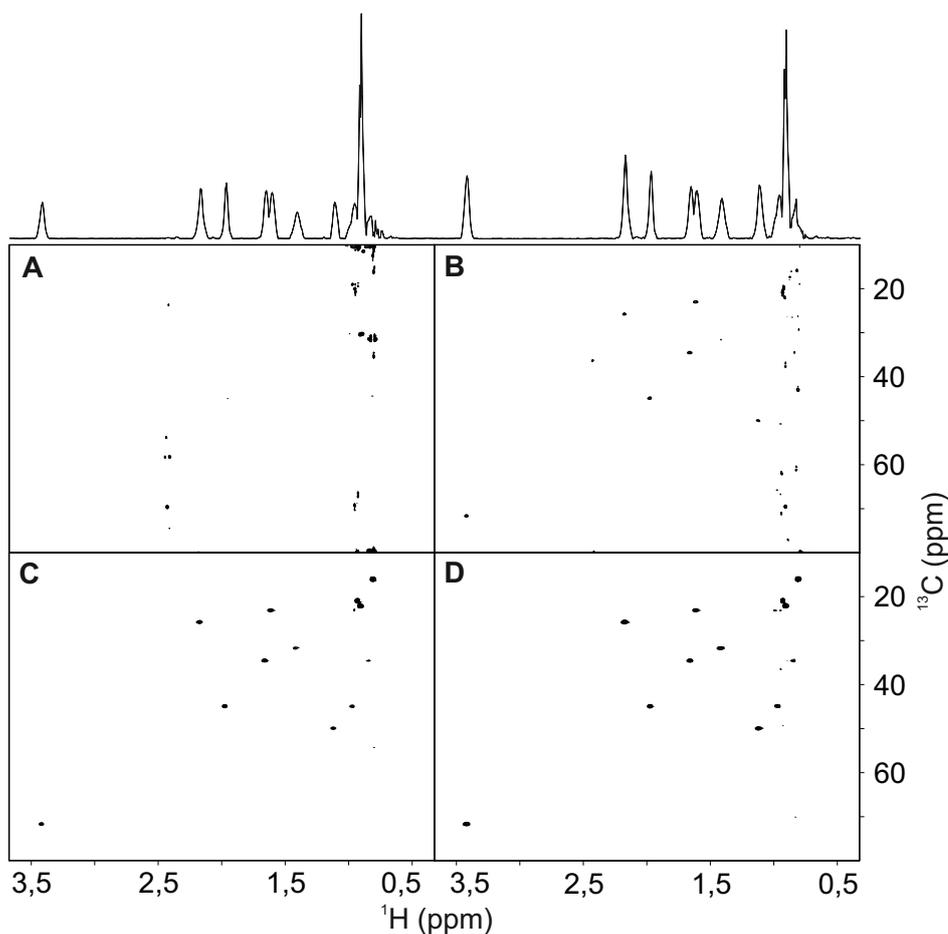


Abbildung 4.22: ^1H , ^{13}C -HSQC-Spektren von Menthol. Alle Spektren wurden mit 256 (^1H) x 128 (^{13}C) Punkten aufgenommen, was Akquisitionszeiten von 63,7 ms (^1H) bzw. 6,06 ms (^{13}C) entspricht. Durch Verwendung von *Non Uniform Sampling* wurde die Zahl der Punkte in der ^{13}C -Dimension jeweils auf 15 % bzw. 20 Punkte reduziert. Damit hatte jedes Experiment eine Gesamtdauer von 2 s. Für das HSQC Spektrum **A** wurde ein konventionelles HSQC Experiment (Kapitel 2.2.3) verwendet. Für Spektrum **B** kam zusätzlich ein empfindlichkeitserhöhter Rücktransferschritt zum Einsatz (Kapitel 2.2.5), wobei $\Delta^m = \frac{1}{8J_{CH}}$ eingestellt wurde. Spektrum **C** und **D** sind die Ergebnisse des symmetrisierten ALISOFAST- bzw. ASAP-HSQC-Experiments (Kapitel 4.3.3, Abb. 4.9). Da nur die Experimente **C** und **D** vollständige Spektren liefern sind nur deren ^1H -Projektionen über den 2D-Spektren dargestellt. Links ist die Projektion von Experiment **C** gezeigt, rechts die von Experiment **D**. Pro t_1 -Inkrement wurde 1 *scan* aufgenommen, sowie 4 *dummy scans* durchgeführt. Im konventionellen HSQC- und empfindlichkeitserhöhten HSQC-Experiment wurde eine Erholungszeit d_r von 35 ms angewandt. Nach *zero filling* und *linear prediction* mit dem Faktor 2, beträgt die digitale Auflösung 9,95 Hz (^1H) bzw. 82,4 Hz (^{13}C)

4.11.2 Multiplizitäteditiertes ALSOFAST- bzw. ASAP-HSQC

In diesem Abschnitt wird das multiplizitäteditierte ASAP- und ALSOFAST-HSQC mit gängigen multiplizitäteditierten HSQC-Experimenten unter Verwendung von *Non Uniform Sampling* verglichen. Die Abb. 4.23 zeigt den Vergleich von vier multiplizitäteditierten HSQC-Spektren der 100 mM konzentrierten Borneolprobe. Die Spektren **A** und **B** wurden unter Verwendung der multiplizitäteditierten HSQC-Spequenzen aus Kapitel 2.2.6 aufgenommen. Für Spektrum **B** kam das Experiment mit empfindlichkeitserhöhtem Rücktransferschritt zum Einsatz. Für die Spektren **C** und **D** wurden das multiplizitäteditierte ALSOFAST- bzw. ASAP-HSQC verwendet. Alle vier Experimente hatten die gleiche Gesamtdauer von 4 Sekunden. Nur ALSOFAST- und ASAP-HSQC ermöglichen die Aufnahme vollständiger, multiplizitäteditierter $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektren in entsprechend kurzer Zeit. In den Spektren **A** und **B** der konventionellen Experimente fehlen Signale oder machen intensitätsstarke Artefakte eine zweifelsfreie Zuordnung unmöglich. Im Vergleich zum multiplizitäteditierten ALSOFAST-HSQC erscheinen im Spektrum des entsprechenden ASAP-HSQC weniger Artefakte, wie zum Beispiel t_1 -Rauschen im Bereich der CH_3 -Gruppen.

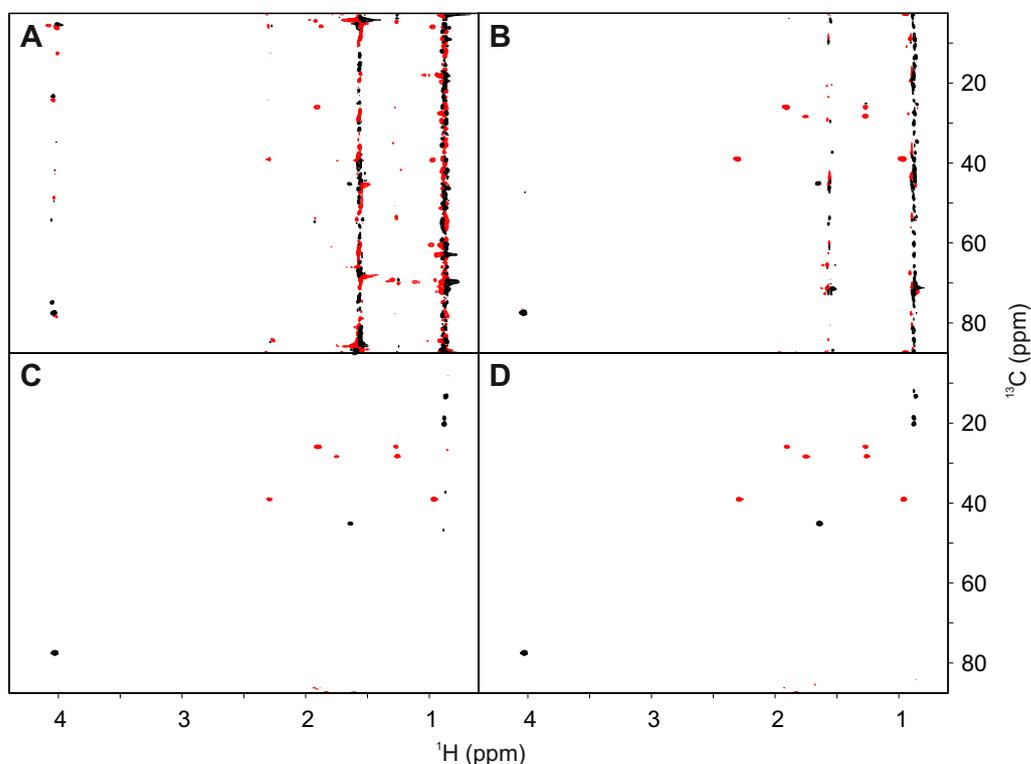


Abbildung 4.23: Multiplizitätseditierte ^1H , ^{13}C -HSQC-Spektren von Borneol der Konzentration 100 mM. Alle Spektren wurden mit 256 (^1H) x 128 (^{13}C) Punkten aufgenommen. Das entspricht Akquisitionszeiten von 56,21 ms (^1H) bzw. 4,99 ms (^{13}C). Durch Verwendung von NUS wurde die Zahl der Punkte in der ^{13}C -Dimension jeweils auf 25 % bzw. 32 Punkte reduziert. Damit hatte jedes Experiment eine Gesamtdauer von etwa 4 s. Für das Spektrum **A** wurde ein konventionelles multiplizitätseditiertes HSQC-Experiment verwendet, für Spektrum **B** wurde zusätzlich ein empfindlichkeitserhöhter Rücktransferschritt verwendet (beide Experimente aus Kapitel 2.2.6). Dabei wurde $\Delta^m = \frac{1}{8J_{CH}}$ eingestellt. Die Spektren **C** und **D** sind die Ergebnisse des entsprechenden symmetrisierten ALSOFAST- bzw. ASAP-HSQC-Experiments (Kapitel 4.10). Wieder liefern nur ALSOFAST- und ASAP-HSQC vollständige Korrelationsspektren. Pro t_1 - Inkrement wurde 1 *scan* aufgenommen, sowie 4 *dummy scans* durchgeführt. Für **A** und **B** wurde eine Erholungszeit d_r von 35 ms angewendet, für **C** und **D** wurde diese auf 4 μs eingestellt. Die digitale Auflösung beträgt 4,5 Hz (^1H) bzw. 50,1 Hz (^{13}C).

4.12 ASAP-CLIP-RESET-HSQC

Das ASAP-CLIP-RESET-HSQC basiert auf dem symmetrisierten ASAP-HSQC-Experiment. Analog zum CLIP-RESET-Experiment [55] aus Kapitel 2.2.8 wird durch die Einführung einer Pseudodimension mit integriertem BIRD^d-Filter die Aufnahme von breitbandig ¹H,¹H-entkoppelten ¹H,¹³C-HSQC-Spektren ermöglicht.

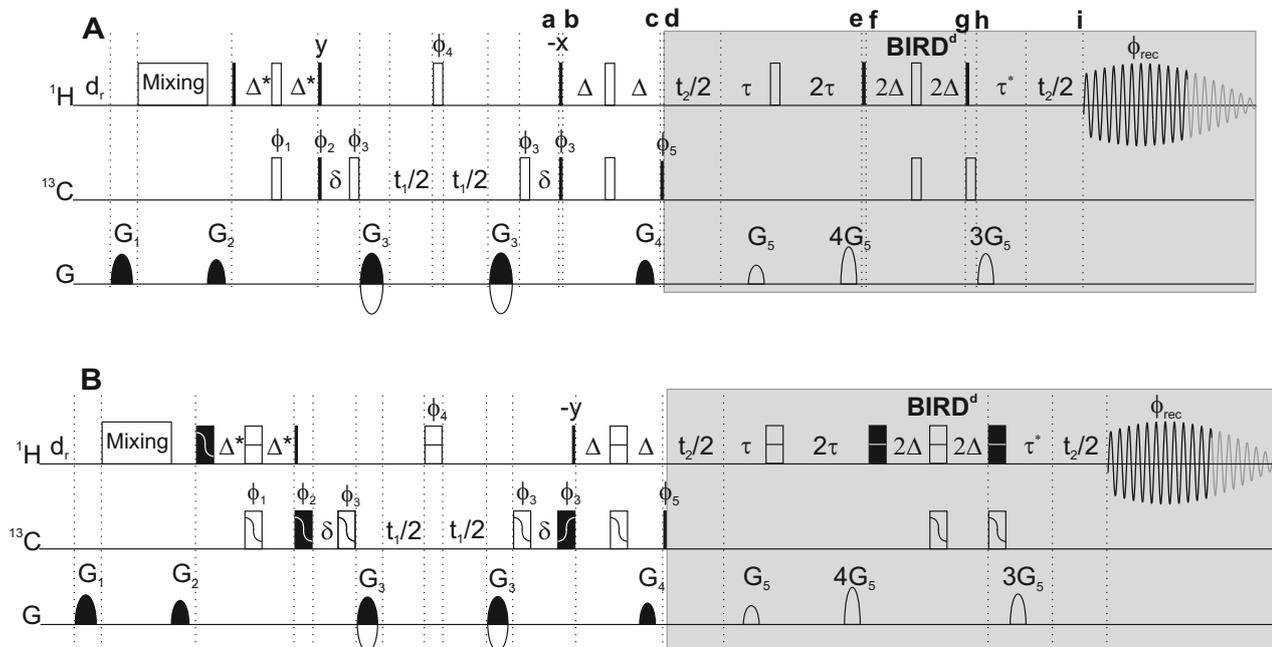


Abbildung 4.24: CLIP-ASAP-RESET-HSQC-Impulssequenz unter Verwendung von rechteckigen Radiofrequenzimpulsen (A), sowie mit Breitbandimpulsen (B). Der Teil der Impulssequenz, der die homonukleare Entkopplung gewährleistet, ist mit einem grauen Kasten hinterlegt. Ernst-Winkel-Anregung wird durch Anpassung der Länge $2\Delta^*$ des INEPT-Bausteins erreicht. Das *delay* δ dient der Refokussierung der chemischen Verschiebungsentwicklung und der heteronuklearen Kopplungsentwicklung. Der vollständige Phasenzyklus lautet wie folgt: $\phi_1 = x$; $\phi_2 = x, -x$; $\phi_3 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_4 = 4(x), 4(-x)$; $\phi_5 = x, -x$; $\phi_{rec} = x, -x, x, -x, -x, x, -x, x$. Echo-/Antiecho- und Kohärenzordnungsselektion wird erreicht, indem die Gradienten G_3 und G_4 in folgender Weise alterniert werden: $G_3 = (40\%, -40\%)$, $G_4 = (20,1\%, 20,1\%)$. Der Gradient G_5 wird auf 17% der maximalen Gradientenstärke von 50,7 G/cm gesetzt. Zusätzlich zum Echo-/Antiecho-Aufnahmeschema werden die Phasen ϕ_1 und ϕ_2 gemeinsam mit der Empfängerphase ϕ_{rec} nach der TPPI-Methode invertiert. Für genauere Informationen zu den verwendeten Impulsen, der Mischsequenz und den übrigen Gradientenstärken sei auf Kapitel 3.3.1 verwiesen.

In der Protonendimension sind die Signale durch die ¹H,¹³C-Kopplung zu Multipletts aufgespalten. Abbildung 4.24 zeigt die Impulssequenz des ASAP-CLIP-RESET-HSQC-Experiments unter der Verwendung von Rechteckimpulsen (A) und von geformten Impulsen

(B). Durch den direkt vor der Akquisitionsperiode eingestrahlten 90° -Impuls auf ^{13}C , wird die restlich vorhandene Antiphase magnetisierung in heteronukleare Multiquantenmagnetisierung umgewandelt. Dadurch werden Signalformverzerrungen durch Antiphasekomponenten reduziert und $^1J_{CH}$ -Kopplungen lassen sich mit höherer Präzision quantifizieren (siehe Kapitel 2.2.4). Im Folgenden soll mit Hilfe des Produktoperatorformalismus gezeigt werden, dass die Sequenz die z -Magnetisierung der ^{12}C -gebundenen Protonen und der Ernst-Winkel-Anregung erhält (Impulssequenz siehe Abb. 4.24).

Bis auf den Phasenzyklus, gleicht die Sequenz bis zum Punkt a) der ASAP-HSQC-Sequenz aus Kapitel 4.3.3. Aus diesem Grund wird mit der Berechnung erst an diesem Punkt begonnen.

^1H - ^{12}C :

^1H - ^{13}C :

$$4 \cdot \left[\begin{pmatrix} -I_y \\ -I_y \cos(2\pi J\Delta^*) + 2I_z S_y \sin(2\pi J\Delta^*) \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} -I_y \\ -I_y \cos(2\pi J\Delta^*) - 2I_z S_y \sin(2\pi J\Delta^*) \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \right]$$

b) Die Phase des folgenden 90° -Impulses auf Protonen ist im Vergleich zum ASAP-HSQC invertiert.

$$\frac{\frac{\pi}{2} - \pi_x(^1H)}{\frac{\pi}{2} - \pi_x(^1H) + \frac{\pi}{2} \phi_3(^{13}C)} \rightarrow$$

$$4 \cdot \left[\begin{pmatrix} I_z \\ I_z \cos(2\pi J\Delta^*) - 2I_y S_z \sin(2\pi J\Delta^*) \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_z \\ I_z \cos(2\pi J\Delta^*) + 2I_y S_z \sin(2\pi J\Delta^*) \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \right]$$

c) Im folgenden Kopplungs-*delay* der Gesamtdauer 2Δ entwickelt sich die Antiphase magnetisierung der Protonen in Inphasemagnetisierung. Gleichzeitig wird die z -Magnetisierung der Protonen durch den 180° -Impuls invertiert.

$$\frac{\Delta - \pi_x(^1H) - \Delta}{\Delta - (\pi_x(^1H) + \pi_x(^{13}C)) - \Delta} \rightarrow$$

$$2 \cdot \left[\begin{pmatrix} -I_z \\ -I_z \cos(2\pi J\Delta^*) - I_x \sin(2\pi J\Delta^*) \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} -I_z \\ -I_z \cos(2\pi J\Delta^*) + I_x \sin(2\pi J\Delta^*) \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \right]$$

$$2 \cdot \left[\begin{pmatrix} -I_z \\ -I_z \cos(2\pi J\Delta^*) + 2I_x \sin(2\pi J\Delta^*) \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} -I_z \\ -I_z \cos(2\pi J\Delta^*) - I_x \sin(2\pi J\Delta^*) \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \right]$$

Der anschließende 90° -Impuls auf ^{13}C wandelt restlich vorhandene Antiphase magnetisierung in nicht detektierbare Multiquantenmagnetisierung um. In der folgenden Akquisitionsperiode wird eine Pseudodimension eingeführt. Dazu wird eine zusätzliche Zeitperiode t_2 inkrementiert. In der weiteren Berechnung sollen ausschließlich die beiden Komponenten betrachtet

werden, die zu der für den nächsten *scan* verfügbaren z -Magnetisierung beitragen.

d) Bis zum Beginn des BIRD^d-Filters erfahren beide z -Magnetisierungskomponenten nur den 180°-Protonenimpuls. Sie werden daher invertiert.

$$\frac{\frac{t_2}{2} - \tau - \pi_x(^1H) - 2\tau}{\frac{t_2}{2} - \tau - \pi_x(^1H) - 2\tau} \rightarrow 8 \cdot \begin{pmatrix} I_z \\ I_z \cos(2\pi J\Delta^*) \end{pmatrix}$$

e) Der 90°-Impuls mit der Phase x rotiert beide Magnetisierungskomponenten in Richtung $-y$.

$$\frac{\frac{\pi}{2}_x(^1H)}{\frac{\pi}{2}_x(^1H)} \rightarrow 8 \cdot \begin{pmatrix} -I_y \\ -I_y \cos(2\pi J\Delta^*) \end{pmatrix}$$

f) Im Kopplungs-*delay* der Länge 4Δ wird die Magnetisierung der ¹³C-gebundenen Protonen bezogen auf die Magnetisierung der ¹²C-gebundenen Protonen invertiert.

$$\frac{2\Delta - \pi_x(^1H) - 2\Delta}{2\Delta - (\pi_x(^1H) + \pi_x(^{13}C)) - 2\Delta} \rightarrow 8 \cdot \begin{pmatrix} I_y \\ -I_y \cos(2\pi J\Delta^*) \end{pmatrix}$$

g) Die betrachtete Magnetisierung erfährt nur den 90°-Protonenimpuls.

$$\frac{\frac{\pi}{2}_x(^1H)}{\frac{\pi}{2}_x(^1H)} \rightarrow 8 \cdot \begin{pmatrix} I_z \\ -I_z \cos(2\pi J\Delta^*) \end{pmatrix}$$

Die Magnetisierung der ¹²C-gebundenen Protonen ist vor der Datenakquisition in Richtung der z -Achse orientiert. Damit die zurückbehaltene Magnetisierung der ¹³C-gebundenen Protonen ebenso in $+z$ orientiert ist, muss die Transferzeit Δ^* des INEPT-Schrittes analog zum multiplizitätseditierten ASAP-HSQC eingestellt werden. Siehe dazu Kapitel 4.10.1.

4.12.1 Vergleich zwischen CLIP-ASAP-RESET, CLIP-RESET und CLIP-ASAP-HSQC

Die Abbildung 4.25 zeigt den Vergleich zweier breitbandig ¹H,¹H-gekoppelter HSQC-Spektren von Menthol. In der ¹H-Dimension sind die Signale durch die J_{CH} -Kopplungen aufgespalten. Spektrum **A** wurde unter der Verwendung der CLIP-RESET-Impulssequenz aus Kapitel 2.2.8 aufgenommen, Spektrum **B** unter Verwendung des CLIP-ASAP-RESET-Experiments. Die Parameter in beiden Experimenten wurden so eingestellt, dass sich ähnliche Gesamtexperimentzeiten ergaben. Außerdem ist zum Vergleich der Linienform in der ¹H-Dimension ein Spektrum von Menthol dargestellt, das mit dem CLIP-ASAP-HSQC-Experiment [61] aufgenommen wurde (**C**). Wie der Abbildung 4.25 zu entnehmen ist, wird unter Verwendung des CLIP-ASAP-RESET-Experiments bei hohen Wiederholraten ein deutlicher Empfindlichkeitsgewinn erzielt. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis nimmt bei den eingestellten Experimentparametern bis zu einem Faktor 2,4 zu. Zudem treten weniger Artefakte am Spektrenrand der ¹³C- Dimension auf.

Die Gesamtdauer des Experiments betrug weniger als 14 Minuten. Diese Dauer liegt im Bereich der Aufnahmezeit gängiger zweidimensionaler HSQC-Experimente. Die digitale Auflösung in der Protonendimension liegt unter 1 Hz. $^1J_{CH}$ -Kopplungen können daher mit höchster Präzision ermittelt werden. Ein konventionell aufgenommenes CLIP-RESET-Experiment würde aufgrund der Pseudodimension und des langen Erholungs-*delays* d_r etwa die 30-fache Messzeit erfordern.

Mit dem CLIP-ASAP-HSQC [61] lassen sich in deutlich weniger als einer Minute Spektren mit ähnlicher digitaler Auflösung aufnehmen. Die Signale sind jedoch nicht breitband ^1H - ^1H -entkoppelt. Damit ist die spektrale Auflösung durch die Multipllettstruktur der $^nJ_{HH}$ -Kopplungen limitiert.

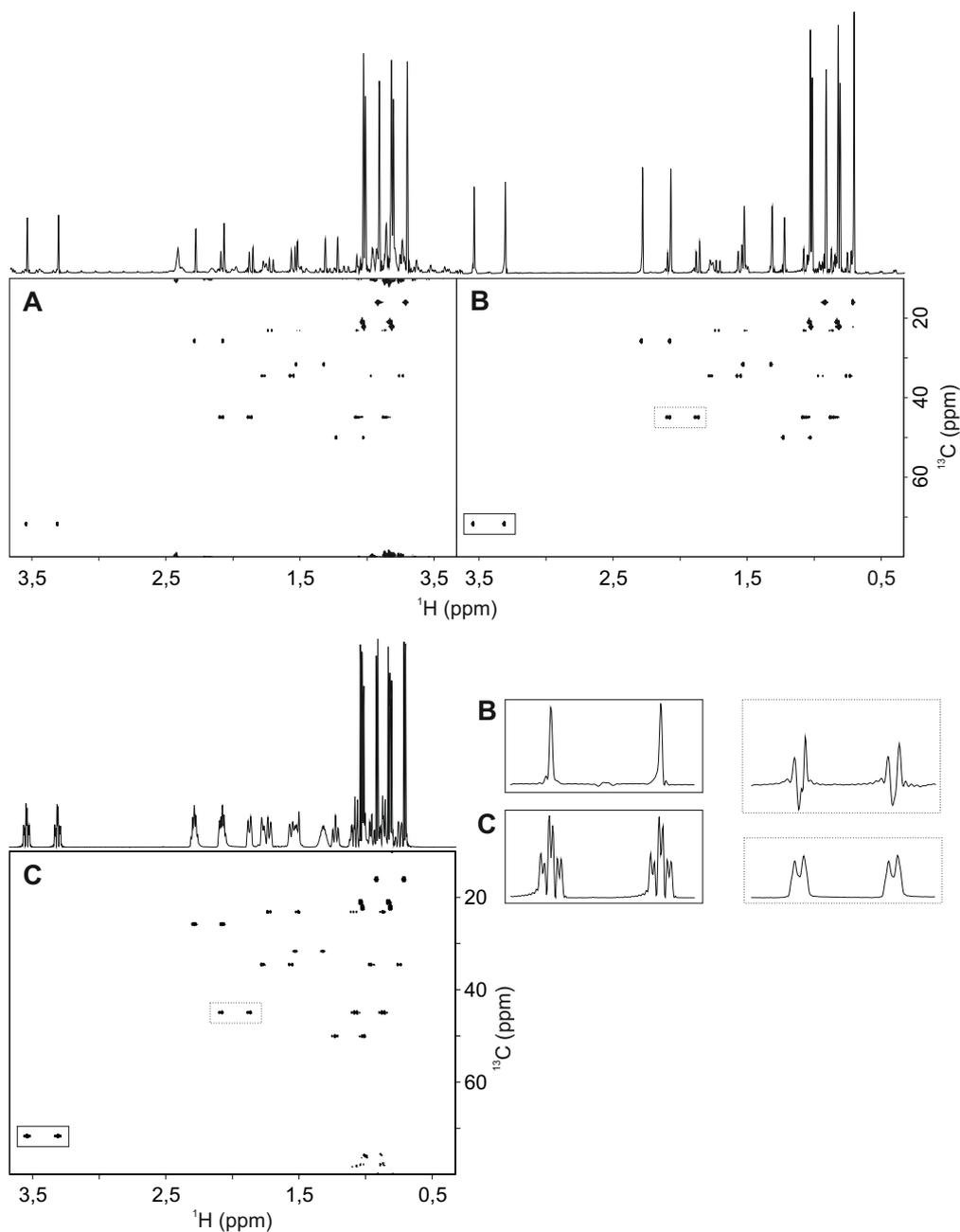


Abbildung 4.25: Vergleich eines CLIP-RESET-HSQC-Spektrums (**A**) mit einem CLIP-ASAP-RESET-HSQC-Spektrum (**B**) und einem CLIP-ASAP-HSQC-Spektrum [61] (**C**) von Menthol. Dadurch wird die Verbesserung der Linienform in der Protonendimension verdeutlicht. Die Spektren **A** und **B** wurden mit jeweils $648 (^1\text{H}) \times 128 (^{13}\text{C})$ Punkten aufgenommen. Dies entspricht Akquisitionszeiten von 162 ms (^1H) bzw. 6,06 ms (^{13}C). Die digitale Auflösung beträgt 0,97 Hz (^1H) bzw. 41 Hz (^{13}C). Zwei *scans* pro t_1 -Inkrement und 16 *dummy scans* wurden durchgeführt. Die Pseudodimension zur Verwirklichung der homonuklearen Entkopplung während der Aufnahme des FID wurde in 8 Schritten inkrementiert. Die Länge eines FID Teilstücks betrug 16 ms. Für Spektrum (**A**) wurde ein Erholungs-*delay* d_r der Länge 40 ms verwendet, für Spektrum (**B**) wurde 4 μs eingestellt. Die Messzeit betrug 13 min und 35 s (**A**), 13 min und 17 s (**B**). **C** wurde mit 1024×128 Punkten aufgenommen. Dies entspricht Akquisitionszeiten von 255 ms (^1H) bzw. 6,06 ms (^{13}C). Pro t_1 -Inkrement wurde ein *scan* durchgeführt, sowie 16 *dummy scans*. Das Erholungs-*delay* d_r wurde auf 1 ms eingestellt. Die Gesamtzeit des Experiments betrug 45 s. Alle drei Spektren wurden mit 2048×256 Punkten prozessiert, unter Verwendung von *linear prediction* und *zero filling*. Die digitale Auflösung beträgt 0,98 Hz (^1H) sowie 41,2 Hz (^{13}C).

4.13 Optimierung der Empfindlichkeit des Experiments für Spektren mit hoher Auflösung in der ^{13}C -Dimension

Im ASAP-HSQC befindet sich die Protonenmagnetisierung, die nicht auf ^{13}C -Spins übertragen wurde, zwischen dem ersten und dem letzten 90° -Protonenimpuls in der transversalen Ebene. Dieser Zeitabschnitt umfasst also auch die inkrementierte t_1 -Periode. Erst der letzte 90° -Impuls auf Protonen rotiert die Magnetisierung in die z -Achse. Das bedeutet, dass während dieser Zeitperiode zum einen transversale (T_2)-Relaxation stattfindet. Zum anderen können sich homonukleare ^1H - ^1H -Kopplungen entwickeln, die die Reservoiremagnetisierung im Spinsystem verteilen und damit die zu Beginn der Datenaufnahme vorhandene z -Magnetisierung verringern.

Die Dauer der Magnetisierungstransferschritte ist so kurz, dass J_{HH} -Kopplungen, welche maximal 8 Hz betragen, nur einen kleinen Effekt haben. Auch die Akquisitionszeiten in der indirekten Dimension sind kurz, wenn man von Experimenten ausgeht, bei denen keine allzu hohe Auflösung in der ^{13}C -Dimension erforderlich ist. Möchte man jedoch eine hohe Auflösung in der indirekten Dimension erhalten, so wird die t_1 -Zeit schnell lang. Für digitale Auflösungen im Bereich von 10 Hz beträgt die Dauer des letzten t_1 -Inkrement zum Beispiel etwa 100 ms. Diese Zeit liegt im Bereich von $\frac{1}{J_{HH}}$. Die Entwicklung von ^1H , ^1H -Kopplungen sollte daher berücksichtigt werden. Deshalb musste ein alternativer Magnetisierungstransfer gefunden bzw. entwickelt werden, der den konventionellen INEPT ersetzt. Die Anforderungen bestanden darin, die Reservoiremagnetisierung vor der t_1 -Periode in z -Richtung zu rotieren und gleichzeitig ^1H , ^{13}C -Antiphase magnetisierung auf Kohlenstoff zu erzeugen. Im Prinzip lässt sich das mit Hilfe eines erweiterten, refokussierten INEPT-Bausteins [122–124] (Abb. 4.26) ermöglichen. Zum besseren Verständnis der Funktionsweise des Bausteins ist im Folgenden die Berechnung unter Verwendung des Produktoperatorformalismus gezeigt.

a) Der erste 90° -Impuls auf Protonen mit der Phase x erzeugt die transversale Magnetisierung $-I_y$.

$$\begin{array}{l} {}^1\text{H}\text{-}^{12}\text{C} : \left(\begin{array}{c} I_z \\ I_z \end{array} \right) \xrightarrow{\frac{\pi}{2}_x(^1\text{H})} \left(\begin{array}{c} -I_y \\ -I_y \end{array} \right) \\ {}^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C} : \left(\begin{array}{c} I_z \\ I_z \end{array} \right) \xrightarrow{\frac{\pi}{2}_x(^1\text{H})} \left(\begin{array}{c} -I_y \\ -I_y \end{array} \right) \end{array}$$

b) Diese wird im folgenden Transfer-*delay* in ^1H , ^{13}C -Antiphase magnetisierung auf Protonen umgewandelt

$$\left(\begin{array}{c} -I_y \\ -I_y \end{array} \right) \xrightarrow{\frac{\Delta - \pi_x(^1\text{H}) - \Delta}{\Delta - (\pi_x(^1\text{H}) + \pi_x(^{13}\text{C})) - \Delta}} \left(\begin{array}{c} I_y \\ -2I_x S_z \end{array} \right)$$

c) Die beiden 90° -Impulse auf ^1H und ^{13}C erzeugen daraus heteronukleare Antiphase magnetisierung auf ^{13}C .

$$\left(\begin{array}{c} I_y \\ -2I_x S_z \end{array} \right) \xrightarrow{\frac{\frac{\pi}{2}_y(^1\text{H})}{\frac{\pi}{2}_y(^1\text{H}) + \frac{\pi}{2}_x(^{13}\text{C})}} \left(\begin{array}{c} I_y \\ -2I_z S_y \end{array} \right)$$

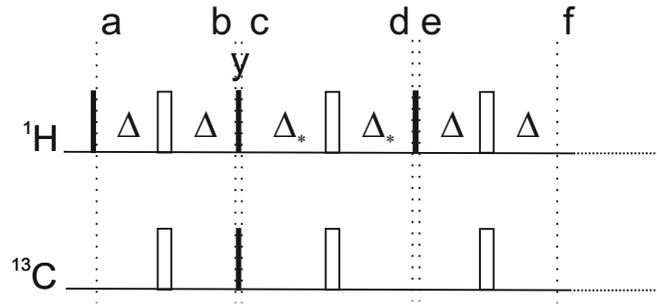


Abbildung 4.26: Darstellung eines erweiterten, refokussierten INEPT-Schrittes. Einige Stellen in der Sequenz sind mit Buchstaben markiert. Die zu diesen Zeitpunkten vorliegenden Produktoperatoren sind im Text angegeben. Der wesentliche Unterschied zu einem konventionellen refokussierten INEPT-Baustein besteht in der Anwendung des zusätzlichen 90° -Protonenimpulses an Punkt e) und einem weiteren Transferschritt. Dadurch kann die Magnetisierung passiver Protonen in Richtung der z -Achse rotiert und gleichzeitig ^1H , ^{13}C -Antiphase magnetisierung erzeugt werden. Bei den schmalen, gefüllten, rechteckigen Balken handelt es sich um 90° -, bei den breiten und offenen Balken um 180° -Radiofrequenzimpulse. Die Phase der Impulse ist x , es sei denn es ist anders angegeben.

d) Es folgt ein weiteres Transfer-*delay* der Länge 2Δ in dem die Antiphase magnetisierung $-2I_z S_y$

$$\begin{pmatrix} I_y \\ -2I_z S_y \end{pmatrix} \xrightarrow[\Delta - (\pi_x(^1\text{H}) + \pi_x(^{13}\text{C})) - \Delta]{\Delta - \pi_x(^1\text{H}) - \Delta} \begin{pmatrix} -I_y \\ S_x \end{pmatrix}$$

in den Term S_x umgewandelt wird. An dieser Stelle endet ein herkömmlicher refokussierter INEPT.

Die Erweiterung liegt nun darin einen zusätzlichen 90° -Protonenimpuls einzustrahlen, der die Magnetisierung der ^{12}C -gebundenen Protonen an Punkt e) in $-z$ rotiert.

$$\begin{pmatrix} -I_y \\ S_x \end{pmatrix} \xrightarrow[\frac{\pi}{2}_x(^{13}\text{C})]{\frac{\pi}{2}_x(^1\text{H})} \begin{pmatrix} -I_z \\ S_x \end{pmatrix}$$

f) Der folgende Schritt kann prinzipiell vor oder nach der t_1 -Periode durchgeführt werden. Für den Rücktransfer wird jedoch Antiphase magnetisierung benötigt, die im letzten Transferschritt erzeugt wird.

$$\begin{pmatrix} -I_z \\ S_x \end{pmatrix} \xrightarrow[\Delta - (\pi_x(^1\text{H}) + \pi_x(^{13}\text{C})) - \Delta]{\Delta - \pi_x(^1\text{H}) - \Delta} \begin{pmatrix} I_z \\ 2I_z S_y \end{pmatrix}$$

Gleichzeitig wird die Magnetisierung der ^{12}C -gebundenen Protonen in die $+z$ -Richtung rotiert. Eine Ernst-Winkel-Anregung ist in diesem Fall jedoch nicht möglich. Außerdem ist

die Effizienz des Magnetisierungstransfers abhängig von der Protonenmultiplizität der Kohlenstoffe. Um einen effektiven Inphase-Transfer aller CH_n -Multiplizitäten zu erzielen, könnten spezielle Transferelemente wie beispielsweise ein ${}^1\text{H}, {}^{13}\text{C}$ -COB (*optimized for Coupling, Offset* and B_1 inhomogeneities) [49] verwendet werden. Diese ermöglichen jedoch nicht die gleichzeitige Rotation der passiven Protonenmagnetisierung in Richtung der z -Achse.

4.13.1 ASAP-HMQC mit BIRD^d -Filter während der t_1 -Periode

Im ASAP-HMQC-Experiment befindet sich die Reservoiremagnetisierung im Gegensatz zum ASAP-HSQC während der t_1 -Zeit in Richtung der z -Achse, dafür liegen jedoch ${}^1\text{H}, {}^{13}\text{C}$ -Multiquantenkohärenzen für die aktiven Spins vor. Die Entwicklung von ${}^1\text{H}$ - ${}^1\text{H}$ -Kopplungen führt daher zu breiten Multipletts in der ${}^{13}\text{C}$ -Dimension und einem verringerten Signal-zu-Rausch-Verhältnis.

In diesem Kapitel soll ein ASAP-HMQC-Experiment vorgestellt werden, das in der t_1 -Periode um einen BIRD^d -Filter erweitert wurde, um die Entwicklung der ${}^1\text{H}, {}^1\text{H}$ -Kopplungen zu refokussieren. Dadurch kann eine Speicherung des Magnetisierungsreservoirs in Richtung der z -Achse ermöglicht werden, bei gleichzeitig hoher spektraler Auflösung in der ${}^{13}\text{C}$ -Dimension. Abb. 4.27 zeigt die Impulssequenz des modifizierten HMQC-Experiments mit BIRD^d -Filter. Um während der t_1 -Periode die Entwicklung der chemischen Verschiebung der aktiven Protonen zu refokussieren, musste die Sequenz neben dem BIRD^d -Filter um weitere Impulse auf dem Protonenkanal erweitert werden. Durch den Aufbau wird zusätzlich gewährleistet, dass die chemische Verschiebungsentwicklung der ${}^{13}\text{C}$ -Spins während der Dauer der Kohärenzordnungsselektionsgradienten und der eingestrahlten Protonenimpulse refokussiert wird. Im Folgenden soll die Impulssequenz unter Verwendung des Produktoperatorformalismus detailliert betrachtet werden.

a) Der erste 90° -Impuls mit der Phase x rotiert die Protonenmagnetisierung in Richtung $-y$.

$$\begin{array}{l} {}^1\text{H}\text{-}{}^{12}\text{C} : \\ {}^1\text{H}\text{-}{}^{13}\text{C} : \end{array} \left(\begin{array}{c} I_z \\ I_z \end{array} \right) \xrightarrow{\frac{\pi}{2}_x({}^1\text{H})} \left(\begin{array}{c} -I_y \\ -I_y \end{array} \right)$$

b) Im folgenden Kopplungs-*delay* der Länge $2\Delta^* = \frac{1}{2J_{\text{CH}}^*}$ wandelt sich diese für ${}^{13}\text{C}$ -gebundene Protonen in Antiphase magnetisierung. Die Magnetisierung der ${}^{12}\text{C}$ -gebundenen Protonen wird dagegen nur invertiert. Die Protonenmagnetisierung, die durch Justierung des Kopplungs-*delays* nicht auf ${}^{13}\text{C}$ übertragen wurde, besitzt die gleiche Orientierung wie die Magnetisierung der ${}^{12}\text{C}$ -gebundenen Protonen.

$$\left(\begin{array}{c} -I_y \\ -I_y \end{array} \right) \xrightarrow{\frac{\Delta^* - \pi_x({}^1\text{H}) - \Delta^*}{\Delta^* - (\pi_x({}^1\text{H}) + \pi_x({}^{13}\text{C})) - \Delta^*}} \left(\begin{array}{c} I_y \\ I_y \cos(2\pi J \Delta^*) - 2I_x S_z \sin(2\pi J \Delta^*) \end{array} \right)$$

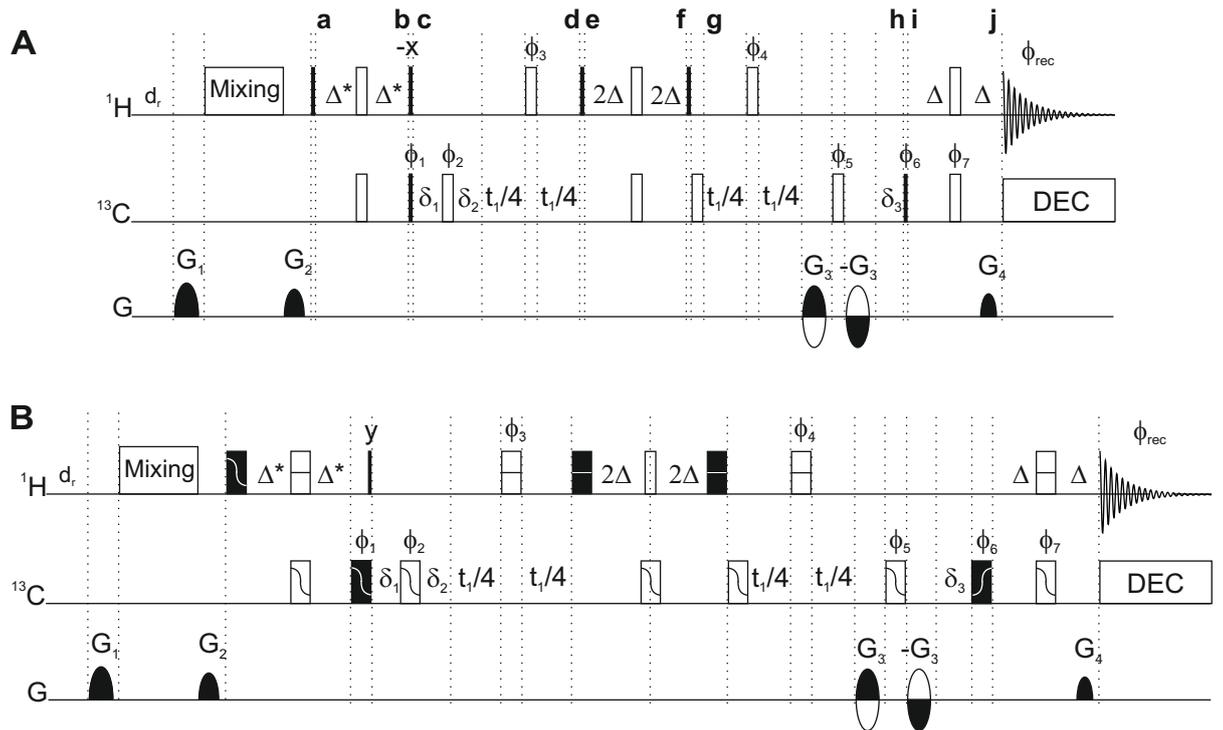


Abbildung 4.27: ASAP-HMQC-Impulssequenzen mit BIRD^d -Filter während der t_1 -Periode zur Refokussierung der ^1H , ^1H -Kopplungsentwicklung. Die Impulssequenz **A** zeigt das Experiment unter Verwendung von Rechteckimpulsen. Einige Stellen in der Sequenz sind mit Buchstaben markiert. Die zu diesen Zeitpunkten vorliegenden Produktoperatoren sind im Text angegeben. Die Impulssequenz **B** zeigt das gleiche Experiment unter Verwendung von geformten Breitbandimpulsen auf dem Protonen-, sowie dem ^{13}C -Kanal. Für Informationen zu den verwendeten Impulsen und weiterer experimenteller Details sei auf Kapitel 3.3.1 verwiesen. Der vollständige Phasenzklus lautet wie folgt: $\phi_1 = 4(x), 4(-x)$; $\phi_2 = 4(y), 4(-y)$ (**A**); $\phi_2 = 4(x), 4(-x)$ (**B**); $\phi_3 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_4 = 2(-x), 2(x)$; $\phi_5 = 4(-y), 4(y)$ (**A**); $\phi_5 = 4(-x), 4(x)$ (**B**); $\phi_6 = -x, x$ (**A**); $\phi_6 = x, -x$ (**B**); $\phi_7 = x$; $\phi_{rec} = x, -x, x, -x, -x, x, -x, x$. Echo-/Antiecho- und Kohärenzordnungsselektion wird erreicht, indem die Gradienten G_3 und G_4 in folgender Weise alterniert werden: $G_3 = (40\%, -40\%)$, $G_4 = (20,1\%, 20,1\%)$. Zusätzlich zum Echo-/Antiecho-Aufnahmeschema werden die Phasen ϕ_6 und ϕ_7 zusammen mit der Empfängerphase ϕ_{rec} nach der TPPI-Methode invertiert. Die *delays* δ_1 - δ_3 dienen der Refokussierung chemischer Verschiebungsentwicklung und heteronuklearer Kopplung.

c) Das folgende 90°-Impulspaar wandelt die Protonen-Antiphase magnetisierung in heteronukleare Multiquantenmagnetisierung um. Gleichzeitig wird die nicht auf ^{13}C transferierte Protonenmagnetisierung in die z -Achse rotiert.

$$\begin{array}{c} \left(\begin{array}{c} I_y \\ I_y \cos(2\pi J\Delta^*) - 2I_x S_z \sin(2\pi J\Delta^*) \end{array} \right) \\ \xrightarrow[\frac{\pi}{2}_{-x}(^1\text{H})]{\frac{\pi}{2}_{-x}(^1\text{H}) + \frac{\pi}{2}_{\phi_1}(^{13}\text{C})} \\ 4 \cdot \left(\begin{array}{c} -I_z \\ -I_z \cos(2\pi J\Delta^*) + 2I_x S_y \sin(2\pi J\Delta^*) \end{array} \right) 4 \cdot \left(\begin{array}{c} -I_z \\ -I_z \cos(2\pi J\Delta^*) - 2I_x S_y \sin(2\pi J\Delta^*) \end{array} \right) \end{array}$$

d) In der folgenden inkrementierten Zeitperiode $\frac{t_1}{2}$ entwickelt sich die chemische Verschiebung des Heterokerns ^{13}C . Durch die zusätzlich plazierten Impulse auf ^1H und ^{13}C , sowie die *delays* δ_1 bis δ_3 wird die Entwicklung der chemischen Verschiebung der ^{13}C -gebundenen Protonen refokussiert. Gleichzeitig werden weitreichende $^n J_{CH}$ -Kopplungen unterdrückt und es wird sichergestellt, dass die Phase der ^{13}C -Spins beim ersten Inkrementierungsschritt 0 beträgt.

$$\begin{array}{c} \xrightarrow[\delta_1 - \pi_{\phi_2}(^{13}\text{C}) - \delta_2 - \frac{t_1}{4} - (\pi_{\phi_3}(^1\text{H})) - \frac{t_1}{4}]{\delta_1 - \delta_2 - \frac{t_1}{4} - \pi_{\phi_3}(^1\text{H}) - \frac{t_1}{4}} \\ 4 \cdot \left(\begin{array}{c} I_z \\ I_z \cos(2\pi J\Delta^*) + 2I_x S_y \sin(2\pi J\Delta^*) \cos\left(\frac{t_1}{2}\omega_S\right) \end{array} \right) 4 \cdot \left(\begin{array}{c} I_z \\ I_z \cos(2\pi J\Delta^*) - 2I_x S_y \sin(2\pi J\Delta^*) \cos\left(\frac{t_1}{2}\omega_S\right) \end{array} \right) \end{array}$$

e) Nach der ersten Hälfte der Inkrementierungsperiode wird ein BIRD^d-Filter angewandt. Der 90°-Protonenimpuls mit der Phase x erzeugt dabei die folgenden Magnetisierungskomponenten.

$$\begin{array}{c} \xrightarrow[\frac{\pi}{2}_x(^1\text{H})]{\frac{\pi}{2}_x(^1\text{H})} \\ 4 \cdot \left(\begin{array}{c} -I_y \\ -I_y \cos(2\pi J\Delta^*) + 2I_x S_y \sin(2\pi J\Delta^*) \cos\left(\frac{t_1}{2}\omega_S\right) \end{array} \right) \\ 4 \cdot \left(\begin{array}{c} -I_y \\ -I_y \cos(2\pi J\Delta^*) - 2I_x S_y \sin(2\pi J\Delta^*) \cos\left(\frac{t_1}{2}\omega_S\right) \end{array} \right) \end{array}$$

f) In der anschließenden Periode der Gesamtlänge $4\Delta = \frac{1}{\nu_{JCH}}$ wirkt für die ^{13}C -gebundenen

Protonen J-Kopplung.

$$\frac{2 \cdot \Delta - \pi_x(^1H) - 2 \cdot \Delta}{2 \cdot \Delta - (\pi_x(^1H) + \pi_x(^{13}C)) - 2 \cdot \Delta} \rightarrow$$

$$4 \cdot \begin{pmatrix} I_y \\ -I_y \cos(2\pi J\Delta^*) + 2I_x S_y \sin(2\pi J\Delta^*) \cos\left(\frac{t_1}{2}\omega_S\right) \end{pmatrix}$$

$$4 \cdot \begin{pmatrix} I_y \\ -I_y \cos(2\pi J\Delta^*) - 2I_x S_y \sin(2\pi J\Delta^*) \cos\left(\frac{t_1}{2}\omega_S\right) \end{pmatrix}$$

g) Der folgende 90° -Potonenimpuls rotiert die Magnetisierung der passiven Protonen und die Magnetisierung die durch Justierung des *delays* Δ^* nicht auf ^{13}C übertragen wurde wieder in die z -Achse.

$$\frac{\frac{\pi}{2}_x(^1H)}{\frac{\pi}{2}_x(^1H)} \rightarrow$$

$$4 \cdot \begin{pmatrix} I_z \\ -I_z \cos(2\pi J\Delta^*) - 2I_x S_y \sin(2\pi J\Delta^*) \cos\left(\frac{t_1}{2}\omega_S\right) \end{pmatrix}$$

$$4 \cdot \begin{pmatrix} I_z \\ -I_z \cos(2\pi J\Delta^*) + 2I_x S_y \sin(2\pi J\Delta^*) \cos\left(\frac{t_1}{2}\omega_S\right) \end{pmatrix}$$

Durch den BIRD^d-Filter haben diese beiden Komponenten nun jedoch ein unterschiedliches Vorzeichen. Analog zum multiplizitätseditierten ASAP-HSQC muss dieser Vorzeichenwechsel durch Anpassen von Δ^* kompensiert werden.

h) Es folgt die zweite Inkrementierungsperiode und die beiden Echo-/Antiecho-Kodierungsgradienten.

$$\frac{\frac{t_1}{4} - \pi_{\phi_4}(^1H) - \frac{t_1}{4} - G_3 - (-G_3) - \delta_3}{\frac{t_1}{4} - (\pi_{\phi_4}(^1H)) - \frac{t_1}{4} - G_3 - \pi_{\phi_5}(^{13}C) - (-G_3) - \delta_3} \rightarrow$$

$$4 \cdot \begin{pmatrix} I_z \\ -I_z \cos(2\pi J\Delta^*) + 2I_x S_{y,x} \sin(2\pi J\Delta^*) \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix}$$

$$4 \cdot \begin{pmatrix} I_z \\ -I_z \cos(2\pi J\Delta^*) - 2I_x S_{y,x} \sin(2\pi J\Delta^*) \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix}$$

Der Baustein mit einem Echo-/Antiecho-Selektionsgradientenpaar G_3 mit inversem Vorzeichen und dem dazwischen plazierten ^{13}C - 180° -Impuls gewährleistet, dass sich für ^{13}C -Spins die Wirkung der Gradienten aufaddiert. Für Protonenmagnetisierung hebt sich die Wirkung

des Gradientenpaares dagegen auf. Die Wirkung des Gradienten G_3 auf die Multiquantenmagnetisierung kann zu diesem Zeitpunkt also als Phasenfaktor

$$\begin{aligned}\Phi_3 &= -p_H\gamma_H G_3 z \tau_3 + p_H\gamma_H G_3 z \tau_3 - p_C\gamma_C G_3 z \tau_3 - p_C\gamma_C G_3 z \tau_3 \\ &= -2 \cdot p_C\gamma_C G_3 z \tau_3\end{aligned}$$

beschrieben werden. Die Kohärenzordnung der ^{13}C -Spins mit dem gyromagnetischen Verhältnis γ_C kann die Werte $p_C = \pm 1$ annehmen. Der Gradientenimpuls G_3 hat die Dauer τ_3 .

i) Durch den folgenden 90° -Impuls auf ^{13}C wird vor dem Rücktransfer-delay 2Δ schließlich wieder ^1H , ^{13}C -Antiphasemagnetisierung auf Protonen erzeugt.

$$\xrightarrow{\frac{\pi}{2}_{\phi_6} (^{13}\text{C})}$$

$$2 \cdot \left[\begin{pmatrix} -I_z \\ I_z \cos(2\pi J\Delta^*) - 2I_x S_z \sin(2\pi J\Delta^*) \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} -I_z \\ I_z \cos(2\pi J\Delta^*) + 2I_x S_z \sin(2\pi J\Delta^*) \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \right]$$

$$2 \cdot \left[\begin{pmatrix} -I_z \\ I_z \cos(2\pi J\Delta^*) + 2I_x S_z \sin(2\pi J\Delta^*) \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} -I_z \\ I_z \cos(2\pi J\Delta^*) - 2I_x S_z \sin(2\pi J\Delta^*) \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \right]$$

j) Die dann letztlich in die Inphasemagnetisierung $\pm I_y$ umgewandelt wird.

$$\xrightarrow{\frac{\Delta - \pi_x(^1\text{H}) - \Delta}{\Delta - (\pi_x(^1\text{H}) + \pi_{\phi_7} (^{13}\text{C})) - \Delta}}$$

$$2 \cdot \left[\begin{pmatrix} I_z \\ -I_z \cos(2\pi J\Delta^*) + I_y \sin(2\pi J\Delta^*) \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_z \\ -I_z \cos(2\pi J\Delta^*) - I_y \sin(2\pi J\Delta^*) \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \right]$$

$$2 \cdot \left[\begin{pmatrix} I_z \\ -I_z \cos(2\pi J\Delta^*) - I_y \sin(2\pi J\Delta^*) \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_z \\ -I_z \cos(2\pi J\Delta^*) + I_y \sin(2\pi J\Delta^*) \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \right]$$

Die Wirkung des Dekodierungsgradienten mit der Stärke G_4 und der Länge τ_4 kann durch den Phasenfaktor

$$\begin{aligned}\Phi_4 &= -p_H\gamma_H G_4 z \tau_4 \\ &= \gamma_H G_4 z \tau_4.\end{aligned}$$

beschrieben werden. Mit der Refokussierungsbedingung ergibt sich damit

$$\begin{aligned}0 &= \Phi_3 + \Phi_4 \\ &= -2 \cdot p_C\gamma_C G_3 z \tau_3 + \gamma_H G_4 z \tau_4,\end{aligned}$$

wobei $\tau_4 = \tau_3$ gilt. Nach Umformung ergibt sich daraus

$$\frac{G_3}{G_4} = \frac{\gamma_H}{2 \cdot p_C \gamma_C}.$$

p_C kann die Werte ± 1 annehmen. Daraus folgt

$$\frac{G_3}{G_4} = \frac{\gamma_H}{\pm 2 \gamma_C}.$$

Zur Selektion des Echo muss das Verhältnis der beiden Gradienten also

$$\frac{G_3}{G_4} = \frac{40}{20,1},$$

zur Selektion des Antiecho entsprechend

$$\frac{G_3}{G_4} = -\frac{40}{20,1}$$

betragen. Unter Berücksichtigung der Empfängerphase addiert sich die Magnetisierung schließlich zu

$$8I_y \sin(2\pi J \Delta^*) \cos(t_1 \omega_S)$$

auf. Gleichzeitig ist das Magnetisierungsreservoir in z -Richtung orientiert. Damit der Term

$$-I_z \cos(2\pi J \Delta^*)$$

positiv zur Reservoiremagnetisierung beiträgt, muss ein *delay* Δ^* analog zum multiplizitätseditierten ASAP-HSQC gewählt werden.

4.13.2 Vergleich zwischen BIRD^d-ASAP-HMQC und ASAP-HMQC

In diesem Kapitel soll verdeutlicht werden, welche Auswirkungen die Verwendung des BIRD^d-Filters während der t_1 -Periode im ASAP-HMQC-Experiment hat.

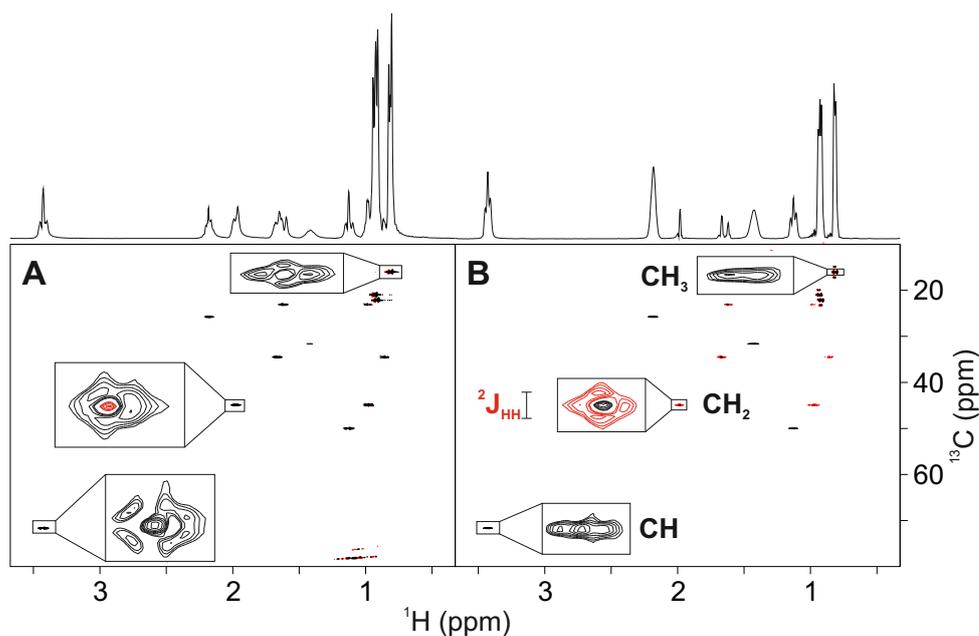


Abbildung 4.28: Vergleich zweier HMQC-Spektren von Menthol. Spektrum **A** wurde mit einem ASAP-HMQC-Experiment aufgenommen, Spektrum **B** mit einem BIRD^d-ASAP-HMQC-Experiment. Zur Verdeutlichung der resultierenden Linienform werden drei Signale vergrößert dargestellt. Die Refokussierung der homonuklearen Kopplung funktioniert nur für CH- und CH₃-Gruppen vollständig. CH₂-Gruppen sind weiter durch die ²J_{HH}-Kopplung der beiden eigenen Protonen aufgespalten. Daher sind nur die CH- und CH₃-Signale in der ¹³C-Dimension schmaler. Beide Spektren wurden mit 512 Punkten in der ¹H- und 1024 Punkten in der ¹³C-Dimension aufgenommen. Das entspricht den Akquisitionszeiten 127,5 ms (¹H) und 48,5 ms (¹³C). Nach *zero filling* und *linear prediction* mit dem Faktor 2, beträgt die resultierende digitale Auflösung 1,96 Hz (¹H) und 5,15 Hz (¹³C). Pro *t*₁-Inkrement wurde 1 *scan* durchgeführt und 16 *dummy scans* zu Beginn der Experimente. Für Spektrum **A** wurde ein Erholungs-*delay* *d_r* der Länge 12 ms verwendet, für Spektrum **B** wurde dieses auf 4 μs eingestellt. Die Messzeit betrug 3 min und 48 s (**A**) bzw. 3 min und 47 s (**B**).

Dazu zeigt Abb. 4.28 den Vergleich zweier HMQC-Spektren. Das eine wurde mit einem konventionellen ASAP-HMQC-Experiment aufgenommen (**A**), für das andere Spektrum wurde das BIRD^d-ASAP-HMQC-Experiment (**B**) verwendet. Durch den BIRD^d-Filter erhält das Spektrum **B** eine Multiplizitätseditierung, das bedeutet, dass CH- und CH₃-Gruppen als positive Signale erscheinen, während die Signale der CH₂-Gruppen ein negatives Vorzeichen aufweisen. Zur besseren Vergleichbarkeit der resultierenden Linienformen wurden jeweils drei Signale in den Spektren vergrößert dargestellt. Das linke Signal entspricht einer CH-, das mittlere einer CH₂- und das rechte Signal einer CH₃-Gruppe von Menthol. Die genaue Zuordnung der Signale kann der Abb. 4.13 in Kapitel 4.8.1 entnommen werden. Durch den BIRD^d-Filter können die Multiplizitätsstrukturen der Signale der CH- und CH₃-Gruppen stark vereinfacht werden. Dies wird durch Refokussierung der ¹H,¹H-Kopplungen

erreicht. Dadurch verringert sich die Linienbreite der Signale in der ^{13}C -Dimension und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis steigt. Diese Effekte treten vor allem dann auf, wenn eine lange Akquisitionszeit in der ^{13}C -Dimension gewählt wird, wie in gezeigtem Beispiel. Für kurze t_1 -Zeiten ist die Entwicklung der ^1H , ^1H -Kopplungen dagegen vernachlässigbar. Für CH_2 -Gruppen funktioniert die Kopplungsrefokussierung jedoch nur teilweise. Die Kopplung der beiden Protonen innerhalb der Gruppe kann durch den BIRD^d-Filter nicht refokussiert werden.

4.13.3 LowCost-ASAP-HSQC mit empfindlichkeitserhöhtem Rücktransfer

Die beiden Evolutionsstufen des ALSOFAST- und ASAP-HSQC haben den Nachteil, dass sich das Magnetisierungsreservoir während der t_1 -Periode in der transversalen Ebene befindet. Neben transversaler Relaxation, kann die Entwicklung homonuklearer Kopplung bei größeren Akquisitionszeiten nicht mehr vernachlässigt werden. Das reduziert das Magnetisierungsreservoir signifikant. Das in Kapitel 2.5.6 vorgestellte Cost-HSQC zur Aufnahme von ^1H , ^{15}N -Korrelationsspektren besitzt einen modifizierten INEPT-Schritt. Die Änderung besteht aus der Anwendung eines zusätzlichen, amidprotonenselektiven 90° -Impulses. Durch diesen zusätzlichen Impuls wird ermöglicht, dass die Magnetisierung der nicht an ^{15}N -gebundenen Protonen nach dem Transferschritt in Richtung der z -Achse orientiert ist. Im LowCost-ASAP-HSQC kommt dagegen kein frequenzselektiver Impuls zum Einsatz. Wie im ASAP-HSQC soll in einem Experiment die gesamte ^1H , ^{13}C -Bandbreite abgedeckt werden. Der im LowCost-ASAP-HSQC verwendete Transferschritt ermöglicht wie ein INEPT die Erzeugung von ^{13}C -Antiphasemagnetisierung. Gleichzeitig wird die Magnetisierung der ^{12}C -gebundenen Protonen in Richtung der z -Achse rotiert. Abb. 4.29 zeigt die Impulssequenz des Experiments. Im Gegensatz zum ASAP-HSQC ist die Nutzung eines empfindlichkeitserhöhten Rücktransferschritts möglich. Ernst-Winkel-Anregung kann jedoch nicht verwendet werden. Im Folgenden soll die Sequenz unter Verwendung des Produktoperatorformalismus berechnet werden.

a) Der erste 90° -Impuls mit der Phase x rotiert die Protonenmagnetisierung in Richtung $-y$.

$$\begin{array}{l} {}^1\text{H}\text{-}^{12}\text{C} : \left(\begin{array}{c} I_z \\ I_z \end{array} \right) \xrightarrow{\frac{\pi}{2}_x(^1\text{H})} \left(\begin{array}{c} -I_y \\ -I_y \end{array} \right) \\ {}^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C} : \left(\begin{array}{c} I_z \\ I_z \end{array} \right) \xrightarrow{\frac{\pi}{2}_x(^1\text{H})} \left(\begin{array}{c} -I_y \\ -I_y \end{array} \right) \end{array}$$

b) Im folgenden Kopplungs-*delay* der Länge $2\Delta = \frac{1}{\nu_{\text{CH}}}$ entwickelt sich diese für ^{13}C -gebundene Protonen in Antiphasemagnetisierung. Die Magnetisierung der ^{12}C -gebundenen Protonen wird dagegen nur invertiert.

$$\left(\begin{array}{c} -I_y \\ -I_y \end{array} \right) \xrightarrow[\Delta - (\pi_x(^1\text{H}) + \pi_{\phi_1}(^{13}\text{C})) - \Delta]{\Delta - \pi_x(^1\text{H}) - \Delta} \left(\begin{array}{c} I_y \\ -2I_x S_z \end{array} \right)$$

c) Der 90° -Protonenimpuls mit der Phase x rotiert die Magnetisierung der ^{12}C -gebundenen

Protonen in Richtung der z -Achse. Die entstandene $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -Antiphase magnetisierung wird aufgrund der Phase des Impulses nicht beeinflusst und erfährt nur eine Invertierung des Vorzeichens durch den 180° -Impuls auf dem ^{13}C -Kanal.

$$\begin{pmatrix} I_y \\ -2I_x S_z \end{pmatrix} \xrightarrow{\frac{\pi}{2}_x(^1\text{H})} \begin{pmatrix} I_z \\ 2I_x S_y \end{pmatrix}$$

Dieser 180° -Impuls sorgt schließlich auch für eine Refokussierung der Kopplung bis zum Punkt d) in der Sequenz. Die Magnetisierung der ^{12}C -gebundenen Protonen wird invertiert.

$$\begin{pmatrix} I_z \\ 2I_x S_y \end{pmatrix} \xrightarrow{\frac{\pi}{2}_x(^1\text{H}) + \pi_x(^{13}\text{C})} \begin{pmatrix} -I_z \\ I_y \end{pmatrix}$$

e) Der folgende 90° -Impuls auf Protonen rotiert schließlich die Magnetisierung der ^{12}C -gebundenen Protonen wieder in die transversale Ebene.

$$\begin{pmatrix} -I_z \\ I_y \end{pmatrix} \xrightarrow{\frac{\pi}{2}_y(^1\text{H})} \begin{pmatrix} -I_x \\ I_y \end{pmatrix}$$

Im Gegensatz zu Punkt a) haben die beiden Magnetisierungskomponenten nun jedoch eine um 90° unterschiedliche Phase.

f) Im anschließenden Kopplungs-*delay* entwickelt sich diese Inphasemagnetisierung wieder in $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -Antiphase magnetisierung auf Protonen.

$$\begin{pmatrix} -I_x \\ I_y \end{pmatrix} \xrightarrow{\frac{\pi}{2}_y(^1\text{H})} \begin{pmatrix} I_x \\ -2I_x S_z \end{pmatrix}$$

g) Diese wird durch die beiden 90° -Impulse in $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -Antiphase magnetisierung auf ^{13}C umgewandelt.

$$\begin{pmatrix} I_x \\ -2I_x S_z \end{pmatrix} \xrightarrow{\frac{\pi}{2}_y(^1\text{H})} \begin{pmatrix} -I_z \\ 2I_z S_y \end{pmatrix} \begin{pmatrix} -I_z \\ -2I_z S_y \end{pmatrix}$$

Die Magnetisierung der ^{12}C -gebundenen Protonen wird durch den modifizierten Transferschritt vor der t_1 -Periode in $-z$ -Richtung rotiert. Da dieses Experiment einen empfindlichkeitsoptimierten Rücktransferschritt beinhaltet, werden in der folgenden Berechnung beide Komponenten, also der in t_1 sin- und cos-modulierte Anteil der Magnetisierung, berücksichtigt.

h)

$$\frac{\delta_1 - \frac{t_1}{2} - \pi\phi_4(^1H) - \frac{t_1}{2} - G_3 - \delta_2}{\delta_1 - \pi\phi_3(^{13}C) - \frac{t_1}{2} - \pi\phi_4(^1H) - \frac{t_1}{2} - G_3 - \pi\phi_5(^{13}C) - \delta_2} \rightarrow$$

$$\begin{pmatrix} I_z \\ -2I_z S_{x,y} \sin(t_1\omega_S) - 2I_z S_{y,x} \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_z \\ 2I_z S_{x,y} \sin(t_1\omega_S) + 2I_z S_{y,x} \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix}$$

$$\begin{pmatrix} I_z \\ -2I_z S_{x,y} \sin(t_1\omega_S) - 2I_z S_{y,x} \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_z \\ 2I_z S_{x,y} \sin(t_1\omega_S) + 2I_z S_{y,x} \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix}$$

Die Wirkung des Gradienten G_3 kann zu diesem Zeitpunkt als Phasenfaktor

$$\begin{aligned} \Phi_3 &= -p_C \gamma_C G_3 z \tau_3 \\ &= \mp \gamma_C G_3 z \tau_3 \end{aligned}$$

beschrieben werden. Die Kohärenzordnung der ^{13}C -Spins, mit dem gyromagnetischen Verhältnis γ_C , kann die Werte $p_C = \pm 1$ annehmen. Der Gradientenimpuls G_3 hat die Dauer τ_3 . Bei z handelt es sich um die Achse entlang des B_1 -Feldes.

i) Im empfindlichkeitserhöhten Rücktransferschritt wird vorerst die in t_1 cos-modulierte Komponente selektiert und in ^1H , ^{13}C -Antiphase magnetisierung auf Protonen umgewandelt. Die sin-modulierte Komponente wird in Multiquantenmagnetisierung umgewandelt und erfährt im folgenden Kopplungs-*delay* keine $^1J_{CH}$ -Kopplungsentwicklung.

$$\frac{\frac{\pi}{2}_x(^1H)}{\frac{\pi}{2}_x(^1H) + \frac{\pi}{2}_{\phi_5}(^{13}C)} \rightarrow$$

$$\begin{pmatrix} -I_y \\ 2I_y S_x \sin(t_1\omega_S) + 2I_y S_z \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} -I_y \\ -2I_y S_x \sin(t_1\omega_S) - 2I_y S_z \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix}$$

$$\begin{pmatrix} -I_y \\ 2I_y S_x \sin(t_1\omega_S) - 2I_y S_z \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} -I_y \\ -2I_y S_x \sin(t_1\omega_S) + 2I_y S_z \cos(t_1\omega_S) \end{pmatrix}$$

Die cos-modulierte Komponente entwickelt sich bis Punkt j)

$$\frac{\Delta - \pi_y(^1H) - \Delta}{\Delta - (\pi_y(^1H) + \pi_x(^{13}C)) - \Delta} \rightarrow$$

$$\begin{pmatrix} & -I_y \\ I_x \cos(t_1\omega_S) + 2I_y S_x \sin(t_1\omega_S) & \end{pmatrix} \begin{pmatrix} & -I_y \\ -I_x \cos(t_1\omega_S) - 2I_y S_x \sin(t_1\omega_S) & \end{pmatrix}$$

$$\begin{pmatrix} & -I_y \\ -I_x \cos(t_1\omega_S) + 2I_y S_x \sin(t_1\omega_S) & \end{pmatrix} \begin{pmatrix} & -I_y \\ I_x \cos(t_1\omega_S) - 2I_y S_x \sin(t_1\omega_S) & \end{pmatrix}$$

zu Inphase-Protonenmagnetisierung. Die Magnetisierung der ^{12}C -gebundenen Protonen befindet sich weiterhin in der transversalen Ebene.

k) Schließlich wird die in t_1 cos-modulierte Komponente in Richtung der z -Richtung rotiert, gleichzeitig wird der sin-modulierte Multiquantenterm in Antiphase magnetisierung auf Protonen umgewandelt.

$$\frac{\frac{\pi}{2}_y(^1H)}{\frac{\pi}{2}_y(^1H) + \frac{\pi}{2}_{\phi_6}(^{13}C)} \rightarrow$$

$$\begin{pmatrix} & -I_y \\ -I_z \cos(t_1\omega_S) + 2I_y S_z \sin(t_1\omega_S) & \end{pmatrix} \begin{pmatrix} & -I_y \\ I_z \cos(t_1\omega_S) - 2I_y S_z \sin(t_1\omega_S) & \end{pmatrix}$$

$$\begin{pmatrix} & -I_y \\ I_z \cos(t_1\omega_S) - 2I_y S_z \sin(t_1\omega_S) & \end{pmatrix} \begin{pmatrix} & -I_y \\ -I_z \cos(t_1\omega_S) + 2I_y S_z \sin(t_1\omega_S) & \end{pmatrix}$$

Dieser Term entwickelt sich bis zum Punkt l)

$$\frac{\Delta - \pi_y(^1H) - \Delta}{\Delta - (\pi_y(^1H) + \pi_y(^{13}C)) - \Delta} \rightarrow$$

$$\begin{pmatrix} & -I_y \\ I_z \cos(t_1\omega_S) + I_x \sin(t_1\omega_S) & \end{pmatrix} \begin{pmatrix} & -I_y \\ -I_z \cos(t_1\omega_S) - I_x \sin(t_1\omega_S) & \end{pmatrix}$$

$$\begin{pmatrix} & -I_y \\ -I_z \cos(t_1\omega_S) - I_x \sin(t_1\omega_S) & \end{pmatrix} \begin{pmatrix} & -I_y \\ I_z \cos(t_1\omega_S) + I_x \sin(t_1\omega_S) & \end{pmatrix}$$

zu Inphase-Protonenmagnetisierung.

m) Der letzte 90° -Impuls auf Protonen mit der Phase x rotiert die in t_1 cos-modulierte Magnetisierungskomponente in $-y$, gleichzeitig wird die Magnetisierung der ^{12}C -gebundenen

Protonen in $-z$ rotiert.

$$\frac{\frac{\pi}{2}_x(^1H)}{\frac{\pi}{2}_x(^1H)} \rightarrow$$

$$\begin{pmatrix} & -I_z \\ -I_y \cos(t_1\omega_S) + I_x \sin(t_1\omega_S) & \end{pmatrix} \begin{pmatrix} & -I_z \\ I_y \cos(t_1\omega_S) - I_x \sin(t_1\omega_S) & \end{pmatrix}$$

$$\begin{pmatrix} & -I_z \\ I_y \cos(t_1\omega_S) - I_x \sin(t_1\omega_S) & \end{pmatrix} \begin{pmatrix} & -I_z \\ -I_y \cos(t_1\omega_S) + I_x \sin(t_1\omega_S) & \end{pmatrix}$$

n) Der letzte 180° -Impuls auf Protonen dient der Refokussierung der chemischen Verschiebungsentwicklung während der Dauer des Gradientenimpulses G_4 . Dieser rotiert die Magnetisierung der ^{12}C -gebundenen Protonen schließlich in $+z$.

$$\frac{\delta_3 - \pi_x(^1H) - G_4}{\delta_3 - \pi_x(^1H) - G_4} \rightarrow$$

$$\begin{pmatrix} & I_z \\ I_y \cos(t_1\omega_S) + I_x \sin(t_1\omega_S) & \end{pmatrix} \begin{pmatrix} & I_z \\ -I_y \cos(t_1\omega_S) - I_x \sin(t_1\omega_S) & \end{pmatrix}$$

$$\begin{pmatrix} & I_z \\ -I_y \cos(t_1\omega_S) - I_x \sin(t_1\omega_S) & \end{pmatrix} \begin{pmatrix} & I_z \\ I_y \cos(t_1\omega_S) + I_x \sin(t_1\omega_S) & \end{pmatrix}$$

Die Wirkung des Dekodierungsgradienten mit der Stärke G_4 und der Länge τ_4 kann durch den Phasenfaktor

$$\begin{aligned} \Phi_4 &= -p_H \gamma_H G_4 z \tau_4 \\ &= \gamma_H G_4 z \tau_4 \end{aligned}$$

beschrieben werden. Hierfür wurde beachtet, dass konventionsgemäß die Kohärenzordnung $p_H = -1$ detektiert wird. Mit der Refokussierungsbedingung ergibt sich damit

$$\begin{aligned} 0 &= \Phi_3 + \Phi_4 \\ &= \mp \gamma_C G_3 z \tau_3 + \gamma_H G_4 z \tau_4. \end{aligned}$$

Nach Umformung folgt

$$\frac{G_3 \tau_3}{G_4 \tau_4} = \frac{\gamma_H}{\pm 2 \gamma_C}.$$

Haben weiterhin die Gradienten G_3 und G_4 die gleiche Länge führt das zu

$$\frac{G_3}{G_4} = \frac{80}{\pm 20,1}.$$

Hierfür wurde außerdem für

$$\frac{\gamma_H}{\gamma_C} = \frac{80}{20,1}$$

eingesetzt. Zur Selektion des Echo muss das Verhältnis der beiden Gradienten also

$$\frac{G_3}{G_4} = \frac{80}{20,1}$$

betragen. Zur Selektion des Antiecho entsprechend

$$\frac{G_3}{G_4} = \frac{80}{-20,1}.$$

Unter Berücksichtigung der Empfängerphase addiert sich die Magnetisierung schließlich zu

$$4I_x \sin(t_1 \omega_S) + 4I_y \cos(t_1 \omega_S)$$

auf. Gleichzeitig ist das Magnetisierungsreservoir in Richtung der z -Achse orientiert.

4.13.4 Vergleich des LowCost-ASAP-HSQC und des BIRD^d-ASAP-HMQC

In diesem Kapitel soll die Leistungsfähigkeit des LowCost-ASAP-HSQC-Experiments mit der des BIRD^d-ASAP-HMQC verglichen werden. Dabei soll vor allem auf die Linienform der Signale in der ¹³C-Dimension, sowie die Empfindlichkeit der Experimente für eine große Anzahl von t_1 -Inkrementen geachtet werden. Dazu sind in Abbildung 4.30 zwei ¹H,¹³C-Korrelationsspektren von Borneol dargestellt. Diese wurden mit dem BIRD^d-ASAP-HMQC-Experiment aus Kapitel 4.13.1 (A) und der LowCost-ASAP-HSQC-Sequenz (B) gemessen. Zum besseren Vergleich der Linienform sind jeweils zwei Signale vergrößert dargestellt. Die zusätzlichen 1D-Projektionen sollen zum besseren Vergleich des erzielten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses dienen. Die vergrößerte Darstellung des linken Signals zeigt, dass die Linienform für CH-Gruppen vergleichbar ist. Für CH₂-Gruppen erlaubt der BIRD^d-Filter jedoch keine vollständige Refokussierung der ¹H,¹H-Kopplungen. Beim Vergleich des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses zeigen sich für das LowCost-ASAP-HSQC deutliche Vorteile. Das wird aus den in Abb. 4.30 dargestellten 1D-Projektionen ersichtlich.

Das LowCost-ASAP-HSQC ist dem BIRD^d-ASAP-HMQC also hinsichtlich Auflösung und Empfindlichkeit überlegen. Die Kopplungsentwicklung kann mit dem BIRD-Filter zwar bis zum Ende der t_1 -Periode refokussiert werden, jedoch wird durch passive Kopplungen die Magnetisierung im Spinsystem immer weiter verteilt, je länger die t_1 -delays werden. Dieser Effekt kann nicht refokussiert werden und dadurch wird das Signal-zu-Rausch-Verhältnis abgeschwächt. Ein Vorteil des BIRD^d-HMQC ist jedoch, dass die Magnetisierung der ¹²C-gebundenen Protonen während der gesamten t_1 -Periode in $+z$ -Richtung gehalten werden kann. Damit wird die Reservoiremagnetisierung nicht durch longitudinale Relaxation geschwächt. Im LowCost-ASAP-HSQC ist die Reservoiremagnetisierung während der einen Hälfte der t_1 -Periode in $-z$, während der anderen Hälfte in $+z$ orientiert. Das wird durch den Protonen-180°-Impuls hervorgerufen, der die heteronukleare Kopplungsentwicklung während t_1 refokussiert. Dies kann bei großen Molekülen mit kurzen T₁-Relaxationszeiten eventuell zu einer Verschiebung der Vorteile führen.

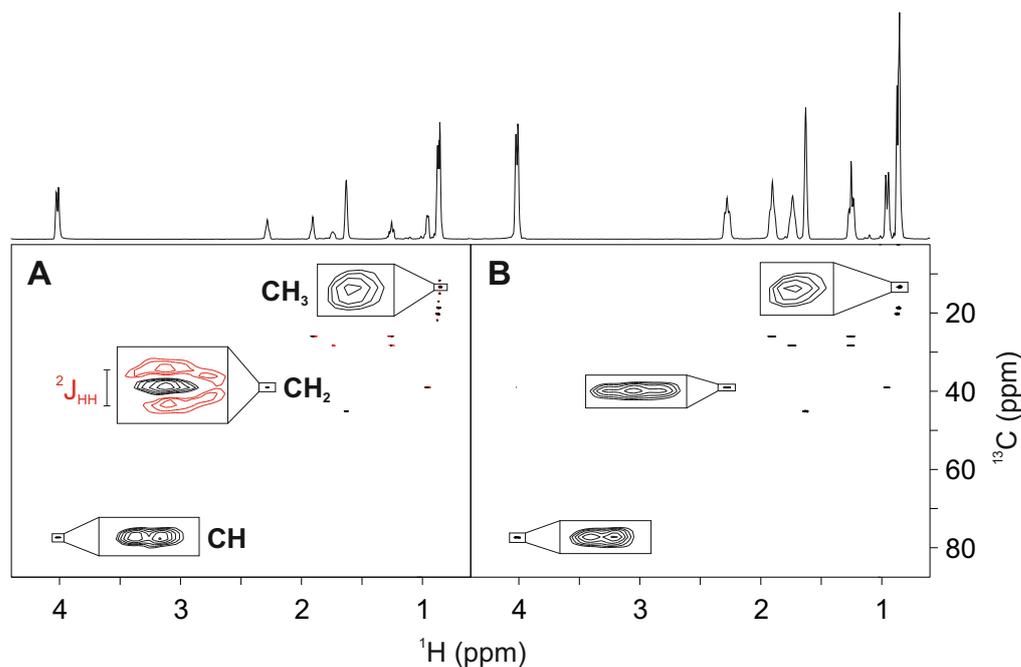


Abbildung 4.30: Vergleich eines BIRD^d-ASAP-HMQC-Spektrums (**A**) und eines LowCost-ASAP-HSQC-Spektrums (**B**) von Borneol. Zur Verdeutlichung der resultierenden Linienform wurden jeweils zwei Signale vergrößert dargestellt. Für CH₂-Gruppen funktioniert der BIRD^d-Filter nicht vollständig, die Signale sind in der ¹³C-Dimension weiter durch die ²J_{HH}-Kopplung aufgespalten. Die gezeigten ¹H-Projektionen über den 2D-Spektren verdeutlichen die höheren Signalintensitäten des ASAP-LowCost-HSQC. Beide Spektren wurden mit 512 Punkten in der ¹H- und 2048 Punkten in der ¹³C-Dimension aufgenommen. Das entspricht den Akquisitionszeiten 112,4 ms (¹H) und 79,9 ms (¹³C). In beiden Fällen wurde die Zahl der Punkte durch *zero filling* und *linear prediction* in beiden Dimensionen um den Faktor 2 erhöht. Die resultierende digitale Auflösung beträgt damit 2,22 Hz (¹H) und 3,13 Hz (¹³C). Ein *scan* pro *t*₁ Inkrement und 16 *dummy scans* wurden durchgeführt. Für Spektrum (**A**) wurde ein Erholungs-*delay* *d*_r der Länge 2 ms verwendet, für Spektrum (**B**) wurde dieses auf 4 μs eingestellt. Die Messzeit betrug für (**A**) 7 min und 36 s, für (**B**) 7 min und 37 s.

4.14 Vergleich des ASAP-HSQC und des LowCost-ASAP-HSQC mit Empfindlichkeitserhöhung

Das LowCost-ASAP-HSQC besitzt im Vergleich zum konventionellen ASAP-HSQC zwei Vorteile. Der modifizierte Magnetisierungstransferschritt ermöglicht im Gegensatz zum IN-EPT eine Rotation der Reservoiremagnetisierung in Richtung der *z*-Achse. Weiterhin kann ein empfindlichkeitserhöhter Rücktransferschritt angewandt werden. Der Nachteil ist jedoch, dass eine Ernst-Winkel-Anregung nicht möglich ist und nicht für alle Multiplizitäten ein vollständiger Magnetisierungstransfer erreicht werden kann. Das bedeutet also, dass es von den Anforderungen abhängt, welches Experiment bevorzugt verwendet werden sollte.

Das Magnetisierungsreservoir geht zum einen durch longitudinale und transversale Relaxationseffekte verloren. Außerdem entwickeln sich in der Zeit, in der sich die Reservoiremagnetisierung in der transversale Ebene befindet, skalare $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -Kopplungen, die die Magnetisierung im Spinsystem verteilen. Ein weiterer Aspekt ist, dass die verwendeten Impulse in einer Sequenz immer vom Ideal abweichen, auch dadurch geht Magnetisierung verloren. Den letzten Punkt kann man durch die Verwendung geeigneter Impulse und sorgfältige Kalibrierung der Impulsleistung minimieren.

Für sehr kurze HSQC-Experimente, im Bereich von einigen Sekunden, besitzt das ASAP-HSQC durch die kürzeren Magnetisierungstransferschritte und die geringere Anzahl eingestrahelter Impulse wesentliche Vorteile gegenüber dem LowCost-ASAP-HSQC. Im Vergleich zum originalen ASAP-HSQC, befindet sich das Magnetisierungsreservoir im LowCost-Experiment im ersten t_1 -Inkrementierungsschritt etwa 11 ms länger in der transversalen Ebene. Außerdem ist der Zugewinn durch die Ernst-Winkel-Anregung für hohe Wiederholraten der Sequenz am größten. Er übersteigt in vielen Fällen den Gewinn durch den empfindlichkeitserhöhten Rücktransferschritt des LowCost-ASAP-HSQC-Experiments.

Soll jedoch eine höhere Auflösung in der indirekten Dimension erreicht werden, zum Beispiel um dicht beieinander liegende Signale aufzulösen oder möglichst exakt $^1J_{CH}$ -Kopplungen in der ^{13}C -Dimension zu messen [125], übersteigen die Zeitwerte der t_1 -Inkremente schnell den Unterschied der längeren Transferschritte. Mit steigender Anzahl der t_1 -Inkremente gewinnt also immer mehr das LowCost-ASAP-HSQC-Experiment im direkten Vergleich. Der Verlust der Reservoiremagnetisierung während der t_1 -Periode im ASAP-HSQC wird immer größer. Es ist also unter anderem abhängig von der erwünschten digitalen Auflösung in der indirekten Dimension, welches Experiment die höchste Effizienz liefert. Zum Vergleich der beiden wurden jeweils vier ASAP-HSQC- und LowCost-ASAP-HSQC-Experimente an einer Borneol-Probe aufgenommen. Die Anzahl der t_1 -Inkremente wurde stufenweise erhöht. Alle sonstigen experimentellen Parameter wurden gleich gewählt.

Die resultierenden Spektren sind in Abbildung 4.31 dargestellt. Aus den Ergebnissen ist deutlich zu erkennen, dass das ASAP-HSQC für das gewählte Spinsystem bei kurzen Experimenten eine höhere Empfindlichkeit pro Experimentzeit liefert. Bei steigender Zahl der t_1 -Inkremente kommen die Vorteile des LowCost-ASAP-HSQC jedoch immer mehr zum tragen. Die Akquisitionszeit für die ^{13}C -Dimension liegt bei Messung **B** schon im Bereich von 40 ms. Bei der Aufnahme von 4096 Punkten in der ^{13}C -Dimension beträgt der Signal-zu-Rausch-Gewinn für das LowCost-ASAP-HSQC bis zu 400 %. Jedoch sind die von vornherein starken Signale der CH_3 -Gruppen im ASAP-LowCost-HSQC um etwa 25 % schwächer.

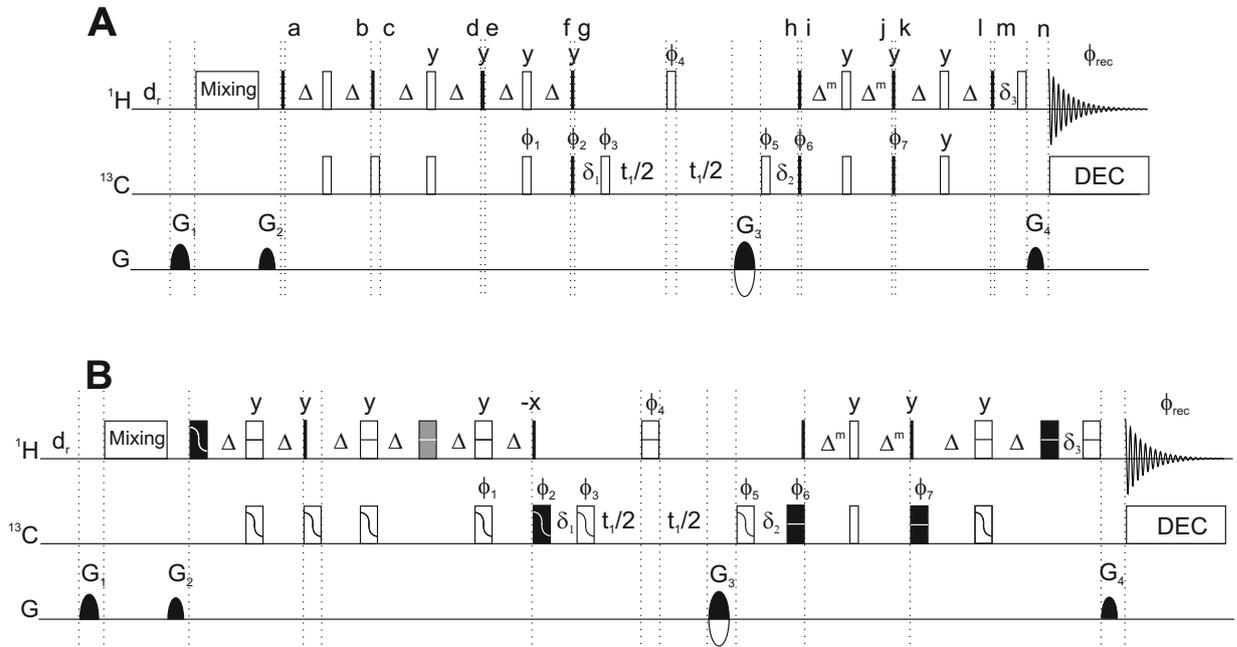


Abbildung 4.29: LowCost-ASAP-HSQC-Impulssequenzen mit empfindlichkeitsoptimiertem Rücktransferschritt. Die Impulssequenz **A** zeigt das Experiment unter Verwendung von Rechteckimpulsen. Einige Stellen in der Sequenz sind mit Buchstaben markiert, die zu diesen Zeitpunkten vorliegenden Produktoperatoren sind im Text angegeben. Die Impulssequenz **B** zeigt das Experiment unter Verwendung von Breitbandimpulsen. Für Informationen zu den verwendeten Impulsen und weiterer experimenteller Parameter sei auf Kapitel 3.3.1 verwiesen. Der vollständige Phasenzyklus lautet wie folgt: $\phi_1 = x$; $\phi_2 = x, -x$; $\phi_3 = 2(-x), 2(x)$ (**A**); $\phi_3 = 2(y), 2(-y)$ (**B**); $\phi_4 = 2(-x), 2(x)$; $\phi_5 = 2(x), 2(-x)$ (**A**); $\phi_5 = 2(-y), 2(y)$ (**B**); $\phi_6 = 2(-y), 2(y)$ (**A**); $\phi_6 = 2(x), 2(-x)$ (**B**); $\phi_7 = 2(-y), 2(y)$; $\phi_{rec} = x, -x, x, -x$. Echo-/Antiecho- und Kohärenzordnungsselektion wird erreicht, indem die Gradienten G_3 und G_4 in folgender Weise alterniert werden: $G_3 = (80\%, -80\%)$, $G_4 = (20,1\%, 20,1\%)$, gleichzeitig wird die Impulsphase ϕ_7 invertiert. Zusätzlich zum Echo-/Antiecho-Aufnahmeschema werden die Phasen ϕ_1 und ϕ_2 gemeinsam mit der Empfängerphase ϕ_{rec} nach der TPPI-Methode invertiert.

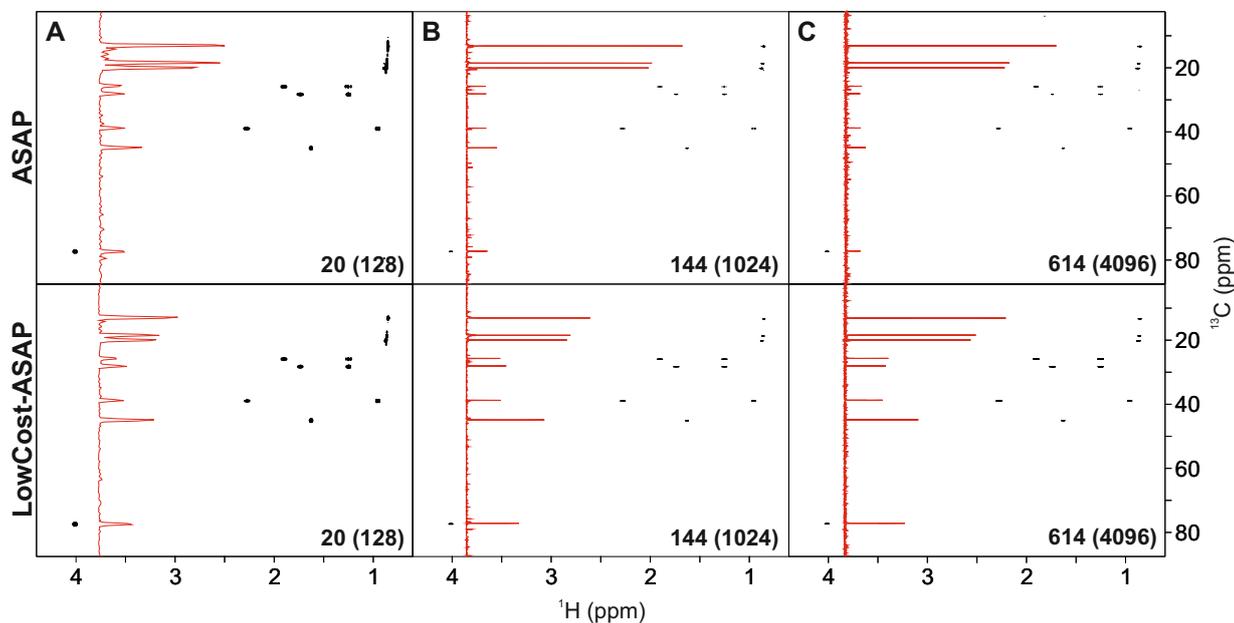


Abbildung 4.31: Vergleich zwischen LowCost-ASAP-HSQC (untere Zeile) und dem originalen ASAP-HSQC (obere Zeile) mit je drei unterschiedlichen Auflösungen in der ^{13}C -Dimension. Hierfür wurde die 500 mM-konzentrierte Borneolprobe verwendet. Je größer die Anzahl der aufgenommenen t_1 -Inkremente, desto mehr gewinnt das LowCost-ASAP-HSQC gegenüber dem ASAP-HSQC hinsichtlich des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses. Alle Spektren wurden mit 512 Punkten in der ^1H -Dimension aufgenommen, daraus resultiert eine Akquisitionszeit von 112,4 ms. Pro t_1 -Inkrement wurde ein *scan* durchgeführt, sowie 16 *dummy scans* zu Beginn des Experiments. Das Erholungs-*delay* d_r wurde im ASAP-HSQC auf 114 ms, im LowCost-ASAP-HSQC auf 100 ms eingestellt. Für **A** wurden in beiden Spektren 128 Punkte in der ^{13}C -Dimension aufgenommen, für **B** waren es 1024 Punkte und für **C** 4096 Punkte. Das entspricht den Akquisitionszeiten 5 ms (**A**), 39,9 ms (**B**) und 159,8 ms (**C**). Durch Verwendung von *Non Uniform Sampling* wurde die Zahl der Punkte in allen Fällen auf 15 % reduziert. Damit hatten die Experimente die Gesamtdauer 9 s (**A**), 51 s (**B**) sowie 3 min und 46 s (**C**). Nach *zero filling* und *linear prediction* in beiden Dimensionen mit dem Faktor 2, beträgt die resultierende digitale Auflösung in der ^{13}C -Dimension für **A** 50,1 Hz, für **B** 6,26 Hz und für **C** 1,57 Hz.

Kopplungen zwischen ihnen entwickeln können. Gleichzeitig werden langreichweitige ${}^n J_{CH}$ -Kopplungen unterdrückt. Bei Anwendung des BIRD r -Filters ist weiterhin gewährleistet, dass die Magnetisierung der ${}^{12}\text{C}$ -gebundenen Protonen vor der Aufnahme des FID in Richtung der z -Achse rotiert wird. Die Impulssequenz ist in Abb. 4.32 dargestellt. Das Experiment erlaubt also analog zum gBIRD-HSQC [125] die exakte Messung von ${}^1 J_{CH}$ -Kopplungen in der ${}^{13}\text{C}$ -Dimension, bei gleichzeitiger Optimierung der Empfindlichkeit für hohe Wiederholraten der Sequenz. Es folgt die Berechnung der Sequenz im Produktoperatorformalismus. Da sie sich bis zum Punkt a) nicht von der Sequenz des LowCost-ASAP-HSQC aus Kapitel 4.13.3 unterscheidet, wird hier erst an diesem Punkt mit der Betrachtung begonnen. An Punkt a) liegen die Produktoperatoren

$$\begin{aligned} {}^1\text{H-}^{12}\text{C} &: \begin{pmatrix} I_x \\ \end{pmatrix} \\ {}^1\text{H-}^{13}\text{C} &: \begin{pmatrix} -2I_x S_z \end{pmatrix} \end{aligned}$$

vor.

b) Durch die zwei folgenden 90° -Impulse auf ${}^1\text{H}$ und ${}^{13}\text{C}$, wird der Term in Antiphase magnetisierung auf ${}^{13}\text{C}$ umgewandelt. Gleichzeitig wird die Magnetisierung der ${}^{12}\text{C}$ -gebundenen Protonen in $-z$ -Richtung rotiert.

$$\xrightarrow{\frac{\pi}{2}_y({}^1\text{H}) \quad \frac{\pi}{2}_y({}^{13}\text{C})} \begin{pmatrix} -I_z \\ -2I_z S_y \end{pmatrix} \begin{pmatrix} -I_z \\ 2I_z S_y \end{pmatrix}$$

Da dieses Experiment einen empfindlichkeitserhöhten Rücktransferschritt beinhaltet, werden in der weiteren Berechnung die in t_1 *sin*- und *cos*-modulierten Anteile der Magnetisierung berücksichtigt. Während der t_1 -Periode entwickelt sich durch den BIRD r -Baustein, zum einen die chemische Verschiebung des Heterokerns, zum anderen ${}^1 J_{CH}$ -Kopplungen. ${}^n J_{CH}$ -Kopplungen werden unterdrückt, da der BIRD r -Filter isotopenselektiv nur die passiven Protonen invertiert und diese damit von den ${}^{13}\text{C}$ -Spins entkoppelt werden. Bis zum Punkt c) liegen also die Operatoren

$$\xrightarrow{\frac{t_1}{2}} \begin{pmatrix} -I_z \\ 2I_z S_x \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) - 2I_z S_y \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix}$$

$$\xrightarrow{\frac{t_1}{2}} \begin{pmatrix} -I_z \\ -2I_z S_x \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) + 2I_z S_y \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix}$$

vor.

d) Zwischen den Punkten d) und f) wird der BIRD r -Filter angewandt. Er beginnt mit einem

90°-Impuls auf Protonen.

$$\frac{\frac{\pi}{2}_x(^1H)}{\frac{\pi}{2}_x(^1H)} \rightarrow$$

$$\left(\begin{array}{c} I_y \\ -2I_y S_x \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) + 2I_y S_y \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{array} \right)$$

$$\left(\begin{array}{c} I_y \\ 2I_y S_x \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) - 2I_y S_y \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{array} \right)$$

e) Gefolgt wird dieser von einem Kopplungsentwicklungs-*delay* der Gesamtlänge 4Δ .

$$\frac{2\Delta - \pi_x(^1H) - 2\Delta}{2\Delta - (\pi_x(^1H) + \pi_x(^{13}C)) - 2\Delta} \rightarrow$$

$$\left(\begin{array}{c} -I_y \\ 2I_y S_x \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) + 2I_y S_y \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{array} \right)$$

$$\left(\begin{array}{c} -I_y \\ -2I_y S_x \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) - 2I_y S_y \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{array} \right)$$

f) Das Ende bildet ein 90°-Impuls auf Protonen, gefolgt von einem 180°-Impuls auf ^{13}C .

$$\frac{\frac{\pi}{2}_{-x}(^1H)}{\frac{\pi}{2}_{-x}(^1H) + \pi_x(^{13}C)} \rightarrow$$

$$\left(\begin{array}{c} I_z \\ -2I_z S_x \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) + 2I_z S_y \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{array} \right)$$

$$\left(\begin{array}{c} I_z \\ 2I_z S_x \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) - 2I_z S_y \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{array} \right)$$

g) Im zweiten Teil der inkrementierten Zeitperiode t_1 entwickelt sich die $^1J_{CH}$ -Kopplung und die chemische Verschiebung der ^{13}C -Spins weiter. Außerdem wird der Echo-/Antiecho-Kodierungsgradient G_3 angelegt, der die transversale ^{13}C -Magnetisierungskomponente in der xy -Ebene dephasiert.

$$\xrightarrow{\frac{t_1 - G_3 - \delta_1}{\frac{t_1}{2} - G_3 - \pi\phi_3(^{13}C) - \delta_1}}$$

$$\left(\begin{array}{c} I_z \\ -2I_z S_{x,y} \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) - 2I_z S_{y,x} \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{array} \right)$$

$$\left(\begin{array}{c} I_z \\ 2I_z S_{x,y} \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) + 2I_z S_{y,x} \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{array} \right)$$

Durch G_4 am Ende der Sequenz wird die Magnetisierung vor der Akquisition wieder refokussiert.

h) Im empfindlichkeitserhöhten Rücktransferschritt wird vorerst die in t_1 cos-modulierte Komponente in ^1H , ^{13}C -Antiphase magnetisierung auf Protonen umgewandelt, die sin-modulierte Komponente wird in Multiquantenmagnetisierung umgewandelt und erfährt im folgenden Kopplungs-*delay* keine $^1J_{CH}$ -Kopplung.

$$\xrightarrow{\frac{\frac{\pi}{2}_x(^1H)}{\frac{\pi}{2}_x(^1H) + \frac{\pi}{2}_{\phi_5}(^{13}C)}}$$

$$\left(\begin{array}{c} -I_y \\ 2I_y S_x \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) + 2I_y S_z \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{array} \right)$$

$$\left(\begin{array}{c} -I_y \\ -2I_y S_x \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) - 2I_y S_z \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{array} \right)$$

$$\left(\begin{array}{c} -I_y \\ 2I_y S_x \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) - 2I_y S_z \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{array} \right)$$

$$\left(\begin{array}{c} -I_y \\ -2I_y S_x \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) + 2I_y S_z \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{array} \right)$$

Die cos-modulierte Komponente entwickelt sich bis Punkt i) zu

$$\frac{\Delta^m - \pi_y(^1H) - \Delta^m}{\Delta^m - (\pi_y(^1H) + \pi_x(^{13}C)) - \Delta^m} \rightarrow$$

$$\begin{pmatrix} -I_y \\ 2I_y S_x \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) + I_x \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix}$$

$$\begin{pmatrix} -I_y \\ -2I_y S_x \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) - I_x \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix}$$

$$\begin{pmatrix} -I_y \\ 2I_y S_x \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) - I_x \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix}$$

$$\begin{pmatrix} -I_y \\ -2I_y S_x \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) + I_x \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix}$$

Inphase-Protonenmagnetisierung. Die Magnetisierung der ^{12}C -gebundenen Protonen befindet sich weiterhin in der transversalen Ebene.

j) Schließlich wird die in t_1 cos-modulierte Komponente in Richtung der z -Achse rotiert. Der sin-modulierte Multiquantenterm wird dadurch in Antiphase magnetisierung auf Protonen umgewandelt.

$$\frac{\frac{\pi}{2}_y(^1H)}{\frac{\pi}{2}_y(^1H) + \pi_{\phi_5}(^{13}C)} \rightarrow$$

$$\begin{pmatrix} -I_y \\ 2I_y S_z \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) - I_z \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix}$$

$$\begin{pmatrix} -I_y \\ -2I_y S_z \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) + I_z \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix}$$

$$\begin{pmatrix} -I_y \\ -2I_y S_z \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) + I_z \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix}$$

$$\begin{pmatrix} -I_y \\ 2I_y S_z \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) - I_z \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix}$$

Dieser Term wird schließlich bis zum Punkt k)

$$\frac{\Delta - \pi_y(^1H) - \Delta}{\Delta - (\pi_y(^1H) + \pi_y(^{13}C)) - \Delta} \rightarrow$$

$$\begin{pmatrix} -I_y \\ I_x \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) + I_z \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix}$$

$$\begin{pmatrix} -I_y \\ -I_x \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) - I_z \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix}$$

$$\begin{pmatrix} -I_y \\ -I_x \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) - I_z \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix}$$

$$\begin{pmatrix} -I_y \\ I_x \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) + I_z \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix}$$

in Inphase-Protonenmagnetisierung umgewandelt.

l) Der letzte 90° -Protonenimpuls mit der Phase x rotiert die in t_1 \cos -modulierte Magnetisierungskomponente in $-y$, gleichzeitig wird die Magnetisierung der ^{12}C -gebundenen Protonen in $-z$ rotiert.

$$\frac{\frac{\pi}{2}_x(^1H)}{\frac{\pi}{2}_x(^1H)} \rightarrow$$

$$\begin{pmatrix} -I_z \\ I_x \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) - I_y \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix}$$

$$\begin{pmatrix} -I_z \\ -I_x \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) + I_y \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix}$$

$$\begin{pmatrix} -I_z \\ -I_x \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) + I_y \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix}$$

$$\begin{pmatrix} -I_z \\ I_x \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) - I_y \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix}$$

m) Der letzte 180° -Impuls auf Protonen dient der Refokussierung der chemischen Verschiebungsentwicklung während der Dauer des Gradientenimpulses G_4 . Dieser rotiert die Magne-

tisierung der ^{12}C -gebundenen Protonen schließlich in $+z$.

$$\frac{\delta_2 - \pi_x(^1\text{H}) - G_4}{\delta_2 - \pi_x(^1\text{H}) - G_4}$$

$$\begin{pmatrix} I_z \\ I_x \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) + I_y \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix}$$

$$\begin{pmatrix} I_z \\ -I_x \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) - I_y \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix}$$

$$\begin{pmatrix} I_z \\ -I_x \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) - I_y \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix}$$

$$\begin{pmatrix} I_z \\ I_x \cos(\pi t_1 J_{CH}) \sin(t_1 \omega_S) + I_y \cos(\pi t_1 J_{CH}) \cos(t_1 \omega_S) \end{pmatrix}$$

Unter Berücksichtigung der Empfängerphase addiert sich die Magnetisierung zu

$$4I_x \sin(t_1 \omega_S) \cos(\pi t_1 J_{CH}) + 4I_y \cos(t_1 \omega_S) \cos(\pi t_1 J_{CH})$$

auf. Gleichzeitig ist das Magnetisierungsreservoir in Richtung z orientiert.

4.15.1 ω_1 -gekoppelte HSQC-Spektren von Norcamphor

Neben der Analyse der HSQC-artigen Impulssequenzen ist es ebenfalls wichtig, eventuelle neue Anwendungen genauer zu betrachten. Die Verwendung des BIRD^r -Filters hat, wie im Folgenden gezeigt wird, einen grundsätzlichen Vorteil bei der exakten Bestimmung von $^1J_{CH}$ -Kopplungen in der ^{13}C -Dimension. In Abb. 4.33 ist ein in der ^{13}C -Dimension gekoppelt-aufgenommenes HSQC-Spektrum von Norcamphor dargestellt. Es wurde mit der Impulssequenz aus Abb. 4.32 aufgenommen. Zwei Signale des Spektrums sind vergrößert dargestellt, um die Linienformen besser erkennbar zu machen. Diesen beiden Signalen sind jeweils die Signale gegenübergestellt, die durch ein ω_1 -gekoppeltes LowCost-HSQC ohne BIRD^r -Filter erhalten wurden. Die Refokussierung weitreichender $^nJ_{CH}$ -Kopplungen durch den BIRD^r -Filter, resultiert in einer wesentlich schmaleren Linienform und ermöglicht eine exaktere Ermittlung der $^1J_{CH}$ -Kopplungen. Weiterhin ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis erheblich gesteigert. Zusätzlich wird durch den BIRD^r -Filter eine Multiplizitätseditierung erhalten. Die Korrelationssignale der CH- und CH_3 -Gruppen weisen also ein inverses Vorzeichen gegenüber Signalen von CH_2 -Gruppen auf.

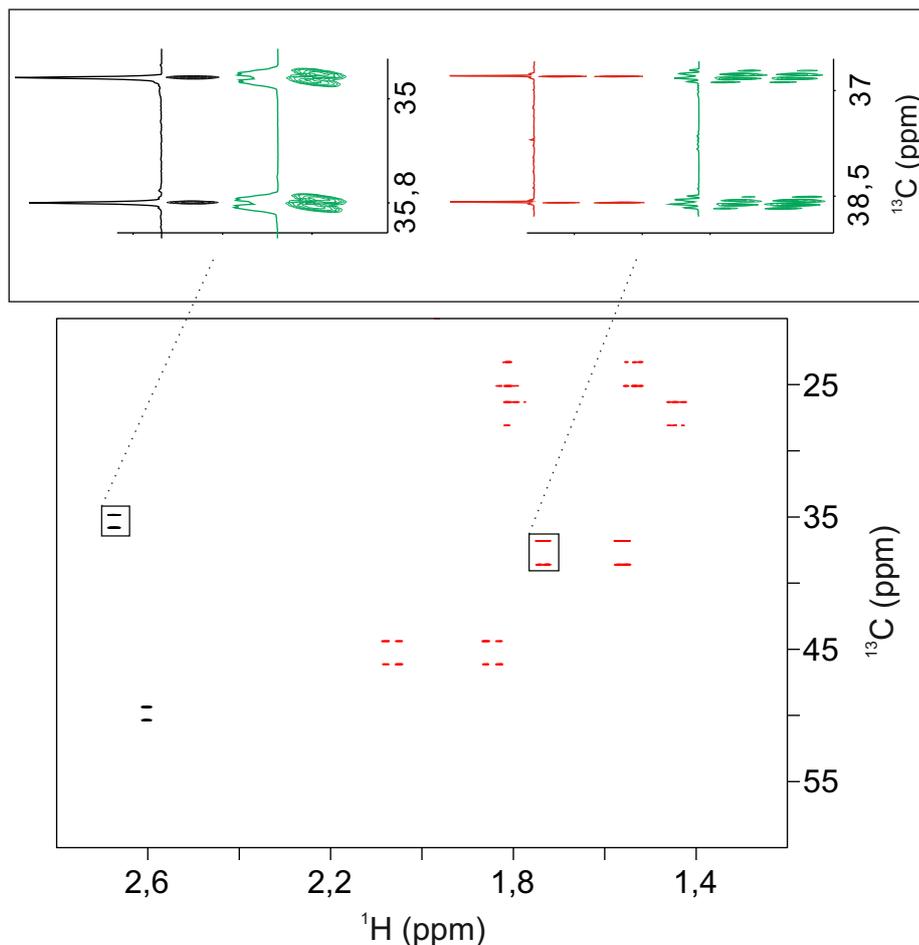


Abbildung 4.33: In der ^{13}C -Dimension gekoppeltes HSQC-Spektrum von Norcamphor. Das gezeigte Spektrum wurde mit dem BIRD r -LowCost-ASAP-HSQC-Experiment (Abb. 4.32) aufgenommen. Zur Verdeutlichung der resultierenden Linienform sind zwei Signale und die dazugehörigen ^{13}C -1D-Projektionen in schwarz und rot vergrößert dargestellt. Schwarze Signale weisen dabei ein positives (CH -Gruppen), rote Signale ein negatives Vorzeichen (CH_2 -Gruppen) auf. Die Multiplizitätseditierung wird durch den BIRD r -Filter hervorgerufen. Die beiden in grün dargestellten Signale, wurden durch ein ω_1 -gekoppeltes LowCost-Experiment ohne Verwendung eines BIRD r -Filter erhalten. Der BIRD r -Filter refokussiert die Entwicklung weitreichender $^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungen in der t_1 -Periode, die Multiplizitätsstrukturen in der ^{13}C -Dimension können dadurch zu Singulett vereinfacht werden. Δ^m wurde auf die Länge $\frac{1}{8J_{\text{CH}}}$ eingestellt. Das Spektrum wurde mit 512 Punkten in der ^1H - und 4096 Punkten in der ^{13}C -Dimension aufgenommen. Das entspricht den Akquisitionszeiten 266,9 ms (^1H) und 339,5 ms (^{13}C). Die Zahl der digitalen Punkte wurde in beiden Dimensionen zusätzlich durch *zero filling* und *linear prediction* jeweils um den Faktor 2 erhöht. Die resultierende digitale Auflösung beträgt 0,94 Hz (^1H) und 0,74 Hz (^{13}C). Ein *scan* pro t_1 -Inkrement und 16 *dummy scans* wurden durchgeführt. Es wurde ein Erholungs-*delay* d_r der Länge 100 ms verwendet. Die Messzeit betrug 42 min.

Unter Verwendung von *Non Uniform Sampling* lässt sich die Experimentzeit ohne Einbußen der Spektrenqualität weiter reduzieren. In Abb. 4.34 ist der Vergleich zweier entsprechender Spektren gezeigt, die mit 8192 Punkten in der ^{13}C -Dimension aufgenommen wurden. In Spektrum **B** wurde jedoch die Zahl der Punkte durch Verwendung von *Non Uniform Sampling* auf 15 %, also 1228 reduziert. Spektrum **B** wurde in 11 Minuten und 49 Sekunden Gesamtexperimentdauer aufgenommen, Spektrum **A** in 1 Stunde, 21 Minuten und 58 Sekunden. Dabei wurde in beiden Experimenten eine digitale Auflösung von 0,37 Hz erzielt.

Beide Spektren liefern die gleiche Qualität und ermöglichen eine äußerst präzise Quantifi-

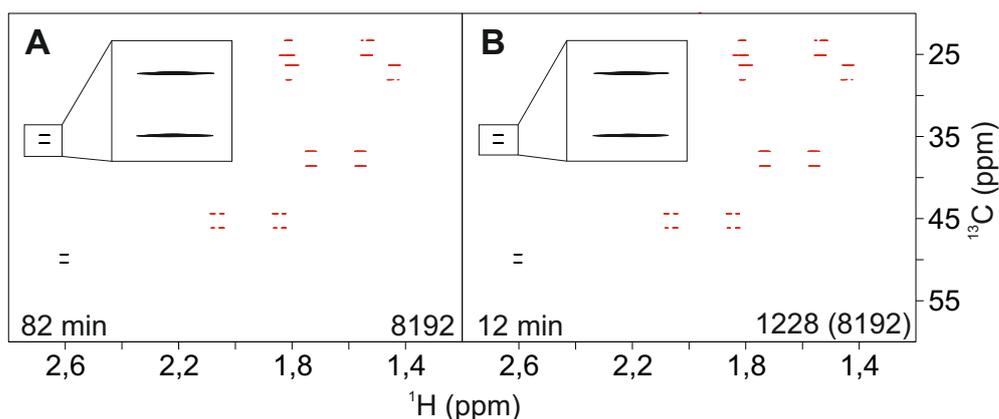


Abbildung 4.34: In der ^{13}C -Dimension gekoppelte HSQC-Spektren von Norcamphor. Die gezeigten Spektren wurden mit dem BIRD^r-LowCost-ASAP-HSQC-Experiment (Abb. 4.32) aufgenommen. Die Spektren wurden mit 256 Punkten in der ^1H - und 8192 Punkten in der ^{13}C -Dimension aufgenommen. Das entspricht den Akquisitionszeiten 133,5 ms (^1H) und 679 ms (^{13}C). Durch Verwendung von NUS wurde in Spektrum **B** die Zahl der aufgenommenen Punkte in der ^{13}C -Dimension auf 15 %, bzw. 1228 reduziert. Δ^m wurde auf die Länge $\frac{1}{8J_{CH}}$ eingestellt. Die Zahl der digitalen Punkte wurde in beiden Dimensionen durch *zero filling* und *linear prediction* jeweils um den Faktor 2 erhöht. Die resultierende digitale Auflösung beträgt damit 1,87 Hz (^1H) und 0,37 Hz (^{13}C). Ein *scan* pro t_1 -Inkrement und 16 *dummy scans* wurden durchgeführt. Dabei wurde ein Erholungs-*delay* d_r der Länge 50 ms verwendet. Der Vergleich der beiden Spektren zeigt, dass die zusätzliche Verwendung von NUS unter Zeitersparnis möglich ist, ohne dass die Qualität des Spektrums negativ beeinflusst wird. Die Messzeit betrug für Spektrum **A** 1 h, 21 min und 58 s, für Spektrum **B** 11 min und 49 s.

zierung der $^1J_{CH}$ -Kopplungen.

4.16 LowCost-ASAP-HSQC-TOCSY

Das LowCost-ASAP-HSQC-TOCSY-Experiment aus Abb. 4.35 ist ähnlich aufgebaut wie das LowCost-ASAP-HSQC-Experiment. Der Unterschied besteht jedoch darin, dass die Mischsequenz nicht nach, sondern vor der Akquisition des FID ausgeführt wird. Damit werden zusätzlich zu den ^1H , ^{13}C -Korrelationssignalen, die ^1H , ^1H -Kopplungspartner innerhalb eines Spinsystems aufgelöst. In einem konventionellen HSQC-TOCSY-Experiment ist die Magnetisierung der ^{12}C -gebundenen Protonen durch die Gradienten der Echo-/Antiechoselektion dephasiert. Im Gegensatz dazu befindet sie sich im LowCost-ASAP-HSQC-TOCSY, analog zum LowCost-ASAP-HSQC, während der Mischsequenz in Richtung der z -Achse. Durch die Anwendung der Mischsequenz wird die Magnetisierung im Spinsystems verteilt, es findet ein Magnetisierungstransfer zwischen aktiven und passiven Spins statt. Im LowCost-ASAP-HSQC-TOCSY wird von den ^{12}C -gebundenen Protonen z -Magnetisierung transferiert. Die Startmagnetisierung I_z für den nächsten Aufnahmepunkt eines Experiments ist daher erhöht. Aus diesem Grund ist die Empfindlichkeit des LowCost-ASAP-HSQC-TOCSY gegenüber dem konventionellen HSQC-TOCSY zum Teil erheblich gesteigert.

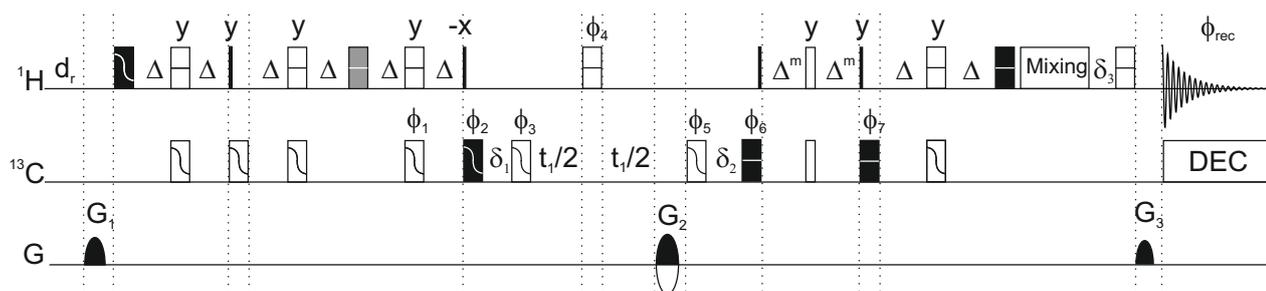


Abbildung 4.35: LowCost-ASAP-HSQC-TOCSY-Impulssequenz mit empfindlichkeitserhöhtem Rücktransferschritt und Breitbandimpulsen auf dem ^1H -, sowie ^{13}C -Kanal. Im Gegensatz zum LowCost-ASAP-HSQC wird die Mischsequenz vor der Akquisitionperiode angewandt. Die *delays* δ_1 - δ_3 dienen der Refokussierung chemischer Verschiebungsentwicklung und heteronuklearer Kopplung. Der vollständige Phasenzklus lautet wie folgt: $\phi_1 = x$; $\phi_2 = x, -x$; $\phi_3 = 2(y), 2(-y)$; $\phi_4 = 2(-x), 2(x)$; $\phi_5 = 2(-y), 2(y)$; $\phi_6 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_7 = 2(-y), 2(y)$; $\phi_{rec} = x, -x, -x, x$. Echo-/Antiecho- und Kohärenzordnungsselektion wird erreicht, indem die Gradienten G_3 und G_4 in folgender Weise alterniert werden: $G_3 = (80\%, -80\%)$, $G_4 = (20, 1\%, 20, 1\%)$, gleichzeitig wird die Impulsphase ϕ_7 invertiert. Zusätzlich zum Echo-/Antiecho-Aufnahmeschema werden die Phasen ϕ_1 und ϕ_2 zusammen mit der Empfängerphase ϕ_{rec} nach der TPPI-Methode invertiert. Für Informationen zu den verwendeten Impulsen und weiteren experimentellen Details sei auf Kapitel 3.3.1 verwiesen.

Da sich die Impulssequenz nur durch die Positionierung der DIPSI-2-Sequenz vom LowCost-ASAP-HSQC unterscheidet, soll sie an dieser Stelle nicht im Produktoperatorformalismus berechnet werden. Im Folgenden wird die Leistungsfähigkeit des LowCost-ASAP-HSQC-

TOCSY-Experiments mit der des konventionellen HSQC-TOCSY anhand von Messdaten verglichen. Da die LowCost-Version einen empfindlichkeitserhöhten Rücktransferschritt beinhaltet, wurde für den Vergleich ebenso die empfindlichkeitserhöhte Version des HSQC-TOCSY-Experiments verwendet. In Abbildung 4.36 sind die Ergebnisse der Vergleichsmessungen an Menthol dargestellt. Der Buchstabe **A** kennzeichnet dabei die resultierenden Spektren des HSQC-TOCSY-Experiments, der Buchstabe **B** die des LowCost-ASAP-HSQC-TOCSY-Experiments. Die Indices **1** und **2** kennzeichnen die beiden unterschiedlichen Gesamtexperimentdauern von 19 und 43 Sekunden. Beide Experimente ermöglichen in diesen kurzen Laufzeiten die Aufnahme vollständiger ^1H , ^{13}C -HSQC-TOCSY-Spektren. Jedoch liefert die LowCost-ASAP-Version des Experiments in beiden Fällen einen deutlichen Zuzugewinn im Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Um das besser zu verdeutlichen sind in der Abb. 4.36 zusätzlich die ^1H -Projektionen über den 2D-Spektren dargestellt. Die Projektionen wurden durch Aufsummieren der einzelnen Spektrenzeilen gewonnen.

Auch bei der Untersuchung von Norcamphor wird bei Verwendung der LowCost-ASAP-HSQC-TOCSY-Sequenz, ein deutlicher Anstieg des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses in den Korrelationspektren erzielt. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abb. 4.37 dargestellt. Die beiden Beispiele zeigen also, dass zweidimensionale HSQC-TOCSY-Spektren in deutlich weniger als einer Minute aufgenommen werden können. Das im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelte LowCost-ASAP-HSQC-TOCSY liefert zudem eine höhere Empfindlichkeit verglichen zum konventionellen Experiment. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis steigt für die meisten Signale etwa um den Faktor 2 an.

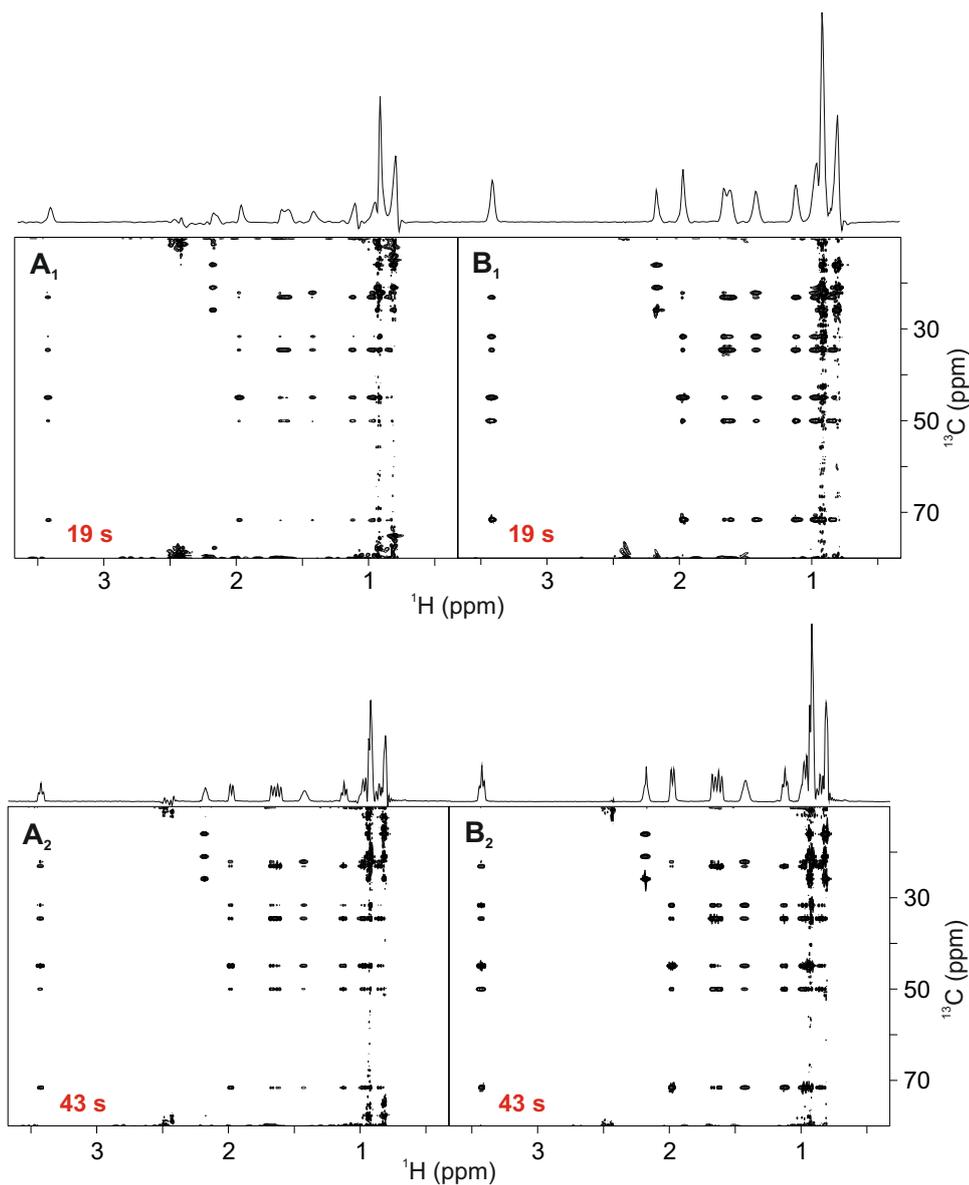


Abbildung 4.36: Vergleich von HSQC-TOCSY-Spektren, aufgenommen an Menthol in CDCl_3 . Zur Aufnahme der Spektren **A₁** und **A₂** wurde ein HSQC-TOCSY Experiment mit empfindlichkeitserhöhtem Rücktransferschritt (siehe Kapitel 2.2.7) verwendet. Die Spektren **B₁** und **B₂** wurden mit dem LowCost-ASAP-HSQC-TOCSY-Experiment aus Abb. 4.35 aufgenommen. Die Spektren mit dem Index **1** wurden mit $256 (^1\text{H}) \times 128 (^{13}\text{C})$ Punkten aufgenommen. Dies führte zu Akquisitionszeiten von $63,7 \text{ ms } (^1\text{H})$ bzw. $6,06 \text{ ms } (^{13}\text{C})$. Für **A₁** wurde der Wert des Erholungs-delays d_r auf 17 ms eingestellt, für **B₁** auf $4 \mu\text{s}$. Damit betrug die Experimentdauer in beiden Fällen 19 s .

Die Spektren mit dem Index **2** wurden mit $512 (^1\text{H}) \times 128 (^{13}\text{C})$ Punkten aufgenommen, was zu Akquisitionszeiten von $127,5 \text{ ms } (^1\text{H})$ bzw. $6,06 \text{ ms } (^{13}\text{C})$ führte. Für **A₂** wurde der Wert des Erholungs-delays d_r auf 117 ms gesetzt, für **B₂** auf 100 ms . Damit betrug die Experimentdauer in beiden Fällen 43 s . Pro t_1 -Inkrement wurde ein *scan* durchgeführt, sowie 16 dummy scans zu Beginn der Experimente. Als Mischsequenz wurde DIPSI-2 mit einer Mischzeit von $34,54 \text{ ms}$ verwendet. Nach Prozessierung der Daten unter Verwendung von *linear prediction* und *zero filling* mit dem Faktor 2 beträgt die digitale Auflösung für die Indices **1** $3,92 \text{ Hz } (^1\text{H})$, sowie $41,2 \text{ Hz } (^{13}\text{C})$, für die Experimente mit dem Index **2** $1,96 \text{ Hz } (^1\text{H})$, sowie $41,2 \text{ Hz } (^{13}\text{C})$.

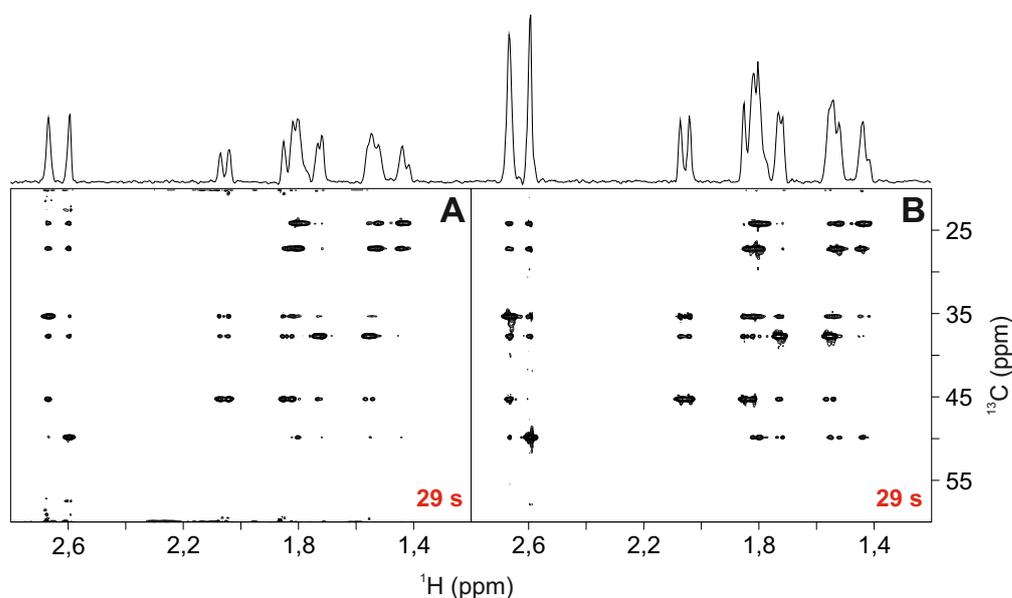


Abbildung 4.37: Vergleich zweier HSQC-TOCSY-Spektren, aufgenommen an Norcamphor in CDCl_3 . Für Spektrum **A** wurde ein HSQC-TOCSY-Experiment mit empfindlichkeits-erhöhtem Rücktransferschritt (siehe Kapitel 2.2.7), für Spektrum **B** das LowCost-ASAP-HSQC-TOCSY-Experiment aus Abb. 4.35 verwendet. Anhand der ebenfalls dargestellten ^1H -Projektionen ist der Empfindlichkeitsgewinn im LowCost-Experiment deutlich zu erkennen. Die Projektionen wurden durch Aufsummieren der einzelnen ^1H -Spektrenzellen gewonnen. Die Spektren wurden mit $256 (^1\text{H}) \times 128 (^{13}\text{C})$ Punkten aufgenommen, was zu Akquisitionszeiten von $133,5 \text{ ms } (^1\text{H})$ bzw. $10,6 \text{ ms } (^{13}\text{C})$ führte. Pro t_1 -Inkrement wurde ein *scan* durchgeführt, sowie 16 *dummy scans* zu Beginn der Experimente. Für **A** wurde der Wert des Erholungs-*delays* d_r auf 17 ms eingestellt, für **B** auf $4 \mu\text{s}$.

Damit betrug die Experimentdauer in beiden Fällen 29 s . Als Mischsequenz wurde DIPSI-2 mit einer Mischzeit von $34,54 \text{ ms}$ verwendet. Nach Prozessierung der Daten unter Verwendung von *linear prediction* und *zero filling* mit dem Faktor 2 beträgt die digitale Auflösung $1,87 \text{ Hz } (^1\text{H})$, sowie $23,56 \text{ Hz } (^{13}\text{C})$.

4.17 LowCost-Constant-Time-ASAP-HSQC mit empfindlichkeitserhöhtem Rücktransfer

An dieser Stelle soll eine *Constant-Time*-Version des LowCost-ASAP-HSQC-Experiments vorgestellt werden, die in Zukunft Anwendung in einem HSQC-DOSY-Experiment finden soll. In einem *Constant-Time* (CT)-HSQC-Experiment [126] wird die t_1 -Frequenzentwicklung in einer Periode konstanter Länge τ verwirklicht. Die Lage des 180° -Impulses auf ^{13}C innerhalb dieser konstanten Zeitperiode wird mit jedem Inkrementierungsschritt verschoben. Liegt transversale Magnetisierung während eines *delays* vor, kann die chemische Verschiebungsentwicklung durch einen zentralen 180° -Impuls refokussiert werden. Wird die Lage dieses Impulses jedoch von der zentralen Position verschoben, ist die chemische Verschiebung bis zum Ende des *delays* nicht vollständig refokussiert. Dadurch lässt sich also analog zum Ansatz in einem konventionellen HSQC die Entwicklung der chemischen Verschiebung des Heterokerns verfolgen.

Da das *delay* τ eine konstante Dauer aufweist, kann diese so eingestellt werden, dass der Effekt durch homonukleare ^{13}C , ^{13}C -Kopplungen kontrolliert werden kann. Für die Messung von ^{13}C -isotopenmarkierten Proben kann das konstante *delay* genutzt werden, um die Anzahl der direkt gebundenen ^{13}C -Kernspins aufzuklären. Wird τ auf eine Länge von $\frac{1}{^1J_{CC}}$ eingestellt, ist das Vorzeichen eines ^1H , ^{13}C -Korrelationssignals abhängig von der Zahl der direkt gebundenen ^{13}C -Kerne. $^1J_{CC}$ ist dabei die skalare Kopplung zweier direkt gebundener ^{13}C -Kernspins [126].

Abb. 4.38 zeigt die Impulssequenz der *Constant Time*-Version des LowCost-ASAP-HSQC-Experiments. In der Sequenz kommen geformte Impulse zum Einsatz. Die beiden *delays* δ_1 und δ_1 ermöglichen gemeinsam mit den eingestrahlten Impulsen eine Refokussierung der $^nJ_{CH}$ -Kopplungsentwicklung bis zum Ende der CT-Periode. Weiterhin wird dadurch die chemische Verschiebungsentwicklung der ^{13}C -Spins während der Protonenimpulse und des Gradienten G_3 refokussiert. Da die Impulssequenz bis auf den Baustein, der zur Aufnahme der indirekten Dimension dient, dem LowCost-ASAP-HSQC gleicht, soll sie an dieser Stelle nicht berechnet werden. Die Magnetisierung der passiven Protonen ist während der CT-Periode in Richtung der z -Achse orientiert. Weiterhin wird durch den Rücktransferschritt sichergestellt, dass diese Magnetisierung vor der Akquisitionsperiode in $+z$ orientiert ist. Aus diesem Grund kann durch das Anwenden einer Mischsequenz ebenfalls ein Empfindlichkeitsgewinn erzielt werden. Die Abb. 4.39 zeigt den Vergleich zweier CT-HSQC-Spektren von Menthol, die beide mit der Impulssequenz aus Abb. 4.38 aufgenommen wurden. In Spektrum **A** wurde die Mischsequenz jedoch durch ein *delay* der selben Länge ersetzt.

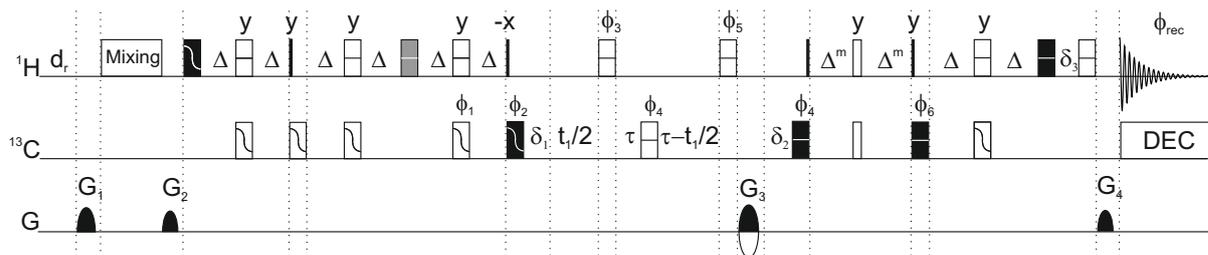


Abbildung 4.38: *Constant Time* LowCost-ASAP-HSQC Impulssequenz mit empfindlichkeitserhöhtem Rücktransferschritt und Breitbandimpulsen auf dem ^1H - sowie ^{13}C -Kanal. Die chemische Verschiebungsentwicklung der ^{13}C -Kernspins wird durch ein *delay* konstanter Länge 2τ nachverfolgt, in dem die Lage des 180° Refokussierungspulses durch die inkrementierte Zeitperiode t_1 schrittweise aus der zentralen Position verschoben wird. Der vollständige Phasenzyklus lautet wie folgt: $\phi_1 = x$; $\phi_2 = x, -x$; $\phi_3 = 2(y), 2(-y)$; $\phi_4 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_5 = 2(-y), 2(y)$; $\phi_6 = 2(-y), 2(y)$; $\phi_{rec} = x, -x, -x, x$. Die *delays* δ_1 - δ_3 dienen der Refokussierung unerwünschter chemischer Verschiebungs- und Kopplungsentwicklung. Echo-/Antiecho- und Kohärenzordnungsselektion wird erreicht indem die Gradienten G_3 und G_4 in folgender Weise alterniert werden: $G_3 = (80\%, -80\%)$, $G_4 = (20,1\%, 20,1\%)$, gleichzeitig wird die Impulsphase ϕ_6 invertiert. Zusätzlich zum Echo-/Antiecho Aufnahmeschema werden die Phasen ϕ_1 und ϕ_2 zusammen mit der Empfängerphase ϕ_{rec} nach der TPPI-Methode invertiert. Für Informationen zu den verwendeten Impulsen, Transfer-*delays* und weitere experimentelle Details sei auf Kapitel 3.3.1 verwiesen.

Beide Experimente ermöglichen die Aufnahme vollständiger ^1H , ^{13}C -Korrelationsspektren in einer Gesamtexperimentdauer von jeweils 18 Sekunden. Durch die Anwendung der Mischsequenz kann das Signal-zu-Rausch Verhältnis um bis zu einem Faktor 2,8 erhöht werden. Eine interessante Anwendung eines *Constant-Time*-HSQC stellt die Verwendung als Grundlage eines HSQC-DOSY-Experiments dar. Das Entwicklungs-*delay* konstanter Länge kann in einem solchen Experiment gleichzeitig als Diffusions-*delay* dienen. Zusätzlich muss die Impulssequenz durch Orts-Kodierungs- und Dekodierungsgradienten ergänzt werden. Ein LowCost-ASAP-HSQC-DOSY-Experiment nach dem Vorbild des HSQC-iDOSY [127] wird zur Zeit entwickelt. Eine weitere mögliche Anwendung des Experiments stellen Fluxomics-Analysen dar, oder auch die Untersuchung isopenmarkierter Makromoleküle.

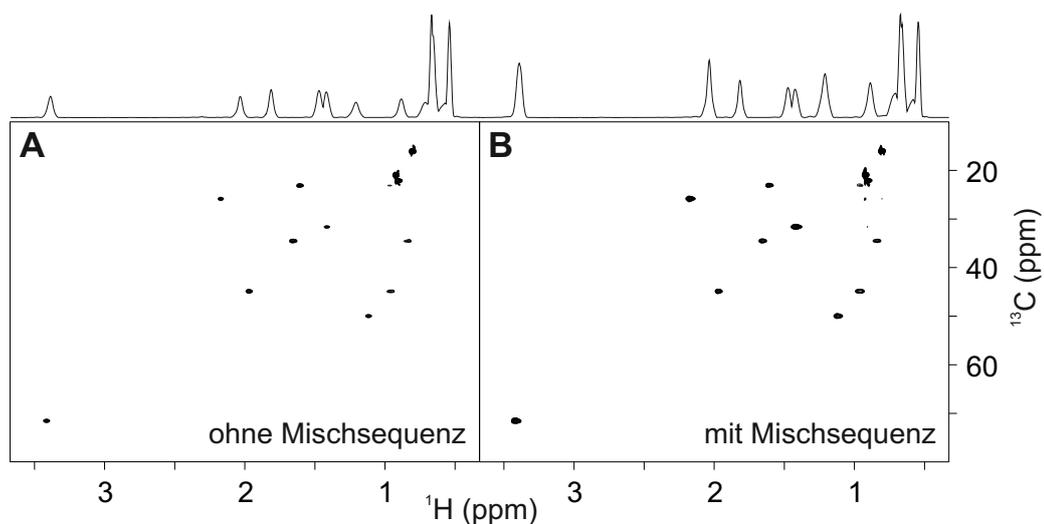


Abbildung 4.39: Vergleich zweier CT-LowCost-HSQC-Spektren zur Untersuchung des Effekts des isotropen Mischens. In **A** wurde das Spektrum mit einem Erholungs-*delay* d_r von 34,54 ms anstelle der Mischsequenz aufgenommen, während in **B** das Spektrum mit einer DIPSI-2-Mischzeit von 34,54 ms aufgenommen wurde. Δ^m wurde in beiden Fällen auf die Länge $\frac{1}{8J_{CH}}$ eingestellt. Das CT-*delay* τ wurde auf 12 ms eingestellt. Beide Spekten wurden mit 256 Punkten in der ^1H - und 128 Punkten in der ^{13}C -Dimension aufgenommen. Das entspricht den Akquisitionszeiten 63,7 ms (^1H) und 6,06 ms (^{13}C). Die Zahl der digitalen Punkte wurde in beiden Dimensionen durch *zero filling* und *linear prediction* jeweils um den Faktor 2 erhöht. Die resultierende digitale Auflösung beträgt 3,92 Hz (^1H) und 41,21 Hz (^{13}C). 1 *scan* pro t_1 Inkrement und 4 *dummy scans* wurden durchgeführt. Dabei wurde ein Erholungs-*delay* d_r der Länge 4 μs verwendet, die Messzeit betrug 18 s.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Diese Arbeit umfasst die Entwicklung und Optimierung schneller Experimente in der NMR-Spektroskopie. Die Basis bildete dabei ein neu entwickeltes, schnelles HSQC-Experiment, das im weiteren Verlauf durch Symmetrisierung der Sequenz und den Einbau von Breitbandimpulsen weiter optimiert wurde. Auf Grundlage dieser Sequenz konnte durch die Verwendung zusätzlicher Elemente wie einer Multiplizitätseditierung, einer verbesserten Wasserunterdrückung und modernster homonuklearer Entkopplungselemente der Anwendungsbereich zusätzlich erweitert werden.

Die Entwicklung eines modifizierten Magnetisierungstransferschrittes ermöglichte schließlich die Optimierung des HSQC-Experiments für hohe digitale Auflösungen in der ^{13}C -Dimension.

Die einzelnen Aspekte sollen im Folgenden etwas genauer mit einem Ausblick zusammengefasst werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst das ALSOFASST- und das ASAP-HSQC nach den Vorbildern des ALSOFASST-HMQC [26] und des ASAP-HMQC [27] entwickelt und anschließend eine Reihe weiterer Experimente erarbeitet. Die Experimente sind so aufgebaut, dass die z -Magnetisierung der passiven Protonen möglichst erhalten bleibt. Weiterhin besteht die Möglichkeit der Ernst-Winkel-Anregung. In den ASAP-Experimenten wird nach Aufnahme des freien Induktionszerfalls außerdem eine Mischsequenz angewandt. Durch den hervorgerufenen z -Magnetisierungstransfer wird die Polarisation der aktiven Protonen schnell erhöht. Dabei wird die starke Magnetisierung ^{12}C -gebundener Protonen, die in natürlicher Häufigkeit zu etwa 99 % vorkommen, ausgenutzt. In ALSOFASST- und ASAP-HSQC kann dadurch die Länge des Erholung-*delays* zwischen zwei *scans* erheblich reduziert werden. Die Experimente ermöglichen die Aufnahme vollständiger ^1H , ^{13}C -Korrelationsspektren in deutlich weniger als einer Minute. Durch zusätzliche Anwendung von *Non Uniform Sampling* kann die Gesamtexperimentdauer auf wenige Sekunden verkürzt werden. In konventionellen HSQC-Experimenten geht die Magnetisierung der passiven Protonen durch die Anwendung der Kohärenzordnungsselektionsgradienten verloren, ohne die Möglichkeit diese zu nutzen.

Das HSQC- liefert im Vergleich zum HMQC-Experiment den Vorteil, dass während der Aufnahme der indirekten Dimension Einquantenkohärenzen statt Multiquantenkohärenzen

vorliegen. Im HMQC-Experiment führt die Entwicklung von $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -Kopplungen während t_1 zu breiten Multiplettstrukturen der Signale in der ^{13}C -Dimension. Im HSQC-Experiment sind die Signale nicht durch die homonukleare Protonenkopplung aufgespalten. Aus diesem Grund ist die spektrale Auflösung des HSQC-Experiments in der ^{13}C -Dimension inherent höher. Für unübersichtliche Bereiche eines Spektrums, kann die Aufnahme eines HSQC statt eines HMQC den entscheidenden Vorteil zur Identifizierung und Zuordnung der Signale liefern. Voraussetzung ist, dass die digitale Auflösung des Experiments ausreichend hoch gewählt wurde. Diese wird durch die Zahl der aufgenommenen Punkte in der schrittweise inkrementierten Zeitperiode t_1 bestimmt. In konventionell aufgenommenen HSQC-Spektren wird die Grenze der erzielbaren Auflösung meist durch die vorhandene Messzeit bestimmt. Um eine doppelt so hohe Auflösung zu erzielen, wird mindestens die zweifache Messzeit benötigt. Sollen also Auflösungen unterhalb 1 Hz in der ^{13}C -Dimension erreicht werden, liegt der zeitliche Aufwand für die Messung eines Spektrums schnell im Bereich von 24 Stunden. Durch die hohen Wiederholraten, die das ASAP-HSQC ermöglicht, kann eine derartige Auflösung jedoch in einem Bruchteil dieser Zeit erreicht werden.

Im HMQC-Experiment ist die maximale Auflösung nicht allein durch die experimentellen Parameter bestimmt, sondern wird, wie bereits beschrieben, durch $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -Kopplungen vorgegeben. In dieser Arbeit wurden ASAP-HMQC und des ASAP-HSQC hinsichtlich der spektralen Auflösung miteinander verglichen. Das ASAP-HSQC-Experiment liefert die benötigte Auflösung, um die α - und β -Konfiguration von Maltose anhand aller Signale des Spektrums zu unterscheiden. Einige Signale sind in der ^{13}C -Dimension jeweils nur etwa 3 Hz voneinander entfernt. Im HMQC-Experiment, das in der gleichen Gesamtexperimentdauer aufgenommen wurde, ist eine Unterscheidung der beiden Signale dagegen nicht möglich. Das ASAP-HSQC-Experiment wurde in zwei unterschiedlichen Versionen vorgestellt. Die resultierenden Spektren der beiden Versionen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Qualität. Das originale ASAP-HSQC [56] liefert im Vergleich zum symmetrisierten ASAP-HSQC ein leicht höheres Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Dagegen wird durch Verwendung der symmetrisierten Sequenz in vielen Fällen das artefaktärmere Spektrum erhalten.

Beide Experimente wurden zudem durch geformte Impulse aus der optimalen Steuerungstheorie erweitert. Diese Impulse ermöglichen eine über den gesamten Frequenzbereich gleichmäßigere Anregung der Spins in der untersuchten Probe. Das hat vor allem auf dem ^{13}C -Kanal einen positiven Effekt, der im Vergleich zu Protonen eine größere Bandbreite aufweist. Die Anwendung dieser Impulse erscheint grundlegend, um Spektren mit möglichst hoher Qualität zu erhalten.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit jeweils eine Version der beiden Experimente vorgestellt, die zusätzlich eine Multiplizitätseditierung erlaubt. Diese ermöglicht die Unterscheidung von geradzahigen und ungeradzahigen Multiplizitäten der ^{13}C -Kerne anhand des Vorzeichens der zugehörigen Korrelationssignale. Erneut wurden die beiden Impulssequenzen verglichen. Wieder hat sich herausgestellt, dass das Experiment, das auf dem originalen ASAP-HSQC basiert, ein höheres Signal-zu-Rausch-Verhältnis erzielt. Das Experiment, das auf dem symmetrisierten ASAP-HSQC basiert, liefert dagegen Spektren die weniger Artefaktssignale ent-

halten. Besonders hervorzuheben ist die Reduktion der Artefaktsignale im Bereich der CH_3 -Gruppen. Im multiplizitätseditierten ASAP-HSQC kann ebenso das Konzept der Ernst-Winkel-Anregung verwendet werden. Zu diesem Zweck wird, analog zum ASAP-HSQC, die Länge des Transfer-*delays* im INEPT justiert. Da sich die nicht-transferierte Ernst-Winkel-Magnetisierung während des Multiplizitätseditierungsbausteins der Länge $\frac{1}{J_{CH}}$ jedoch in der transversalen Ebene befindet, führt die Entwicklung skalarer Kopplung zu einer Vorzeicheninversion der Magnetisierung. Die Magnetisierung der ^{12}C -gebundenen Protonen erfährt dagegen keine Inversion. Diese Inversion muss durch Anpassung der Länge des *delays* berücksichtigt werden. Das optimierte Experiment ermöglicht die Aufnahme multiplizitätseditierter $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektren in deutlich weniger als 30 Sekunden. Wird zusätzlich *Non Uniform Sampling* verwendet, kann die Experimentzeit auf wenige Sekunden verkürzt werden. Ein weiteres Experiment, das die Unterscheidung gerad- und ungeradzahlgiger Multiplizitäten ermöglicht, stellt das DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) [74, 75] dar. In diesem eindimensionalen Experiment werden jedoch die ^{13}C -Kernspins detektiert. Daher ist die Empfindlichkeit gegenüber dem multiplizitätseditierten HSQC erheblich reduziert.

Weiterhin wurde eine Version des ASAP-HSQC erstellt, die eine verbesserte Lösungsmittelunterdrückung liefert. Das ASAP-HSQC nutzt Echo-/Antiecho-Selektionsgradienten, um Phasensensitivität in der indirekten Dimension zu erzielen. Diese Kohärenzordnungsselektion erlaubt in vielen Fällen bereits eine effiziente Lösungsmittelunterdrückung. Bei zunehmenden Magnetfeldstärken und empfindlicher werdenden Probenköpfen macht sich der Effekt des *radiation damping* jedoch immer stärker bemerkbar. Dieser sorgt für eine erhebliche Beschleunigung des Wiederaufbaus der z -Komponente der Wassermagnetisierung. Die Wassermagnetisierung lässt sich dadurch nur schwer kontrollieren. Eine Methode diesen Effekt zu minimieren, ist die Wassermagnetisierung mit Magnetfeldgradienten vorübergehend zu dephasieren. Die Impulssequenz wurde also an einigen Stellen durch zusätzliche Magnetfeldgradienten ergänzt. Außerdem nutzt sie kurze Rechteckimpulse, statt der längeren Breitbandimpulse aus der optimalen Steuerungstheorie. Das hat den Grund, dass auch während der Zeitdauer der Impulse *radiation damping*-Effekte auftreten können. Die optimierte Sequenz machte es möglich, ein vollständiges $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -Spektrum einer 2 mM konzentrierten Saccharoseprobe mit natürlicher Häufigkeit in nur 15 Sekunden Gesamtexperimentdauer aufzunehmen. In dem Spektrum sind trotz des Restsignals des Wassers alle Saccharosesignale sichtbar.

Ein weiteres neues Experiment basiert auf dem CLIP-RESET-HSQC [55]. Dieses Experiment ermöglicht die exakte Bestimmung von $^1J_{CH}$ -Kopplungen in der Protonendimension. Das wird zum einen durch den zusätzlichen 90° -Impuls auf dem ^{13}C -Kanal direkt vor der Aufnahme des FID ermöglicht [59]. Durch diesen werden Signalformverzerrungen durch vorhandene Rest-Antiphasemagnetisierung minimiert. Weiterhin ermöglicht das Experiment die Aufnahme von breitbandig $^1\text{H},^1\text{H}$ -entkoppelten HSQC-Spektren. Dadurch wird eine präzisere Bestimmung von $^1J_{CH}$ -Kopplungen erlaubt. Da zur Verwirklichung der homonuklearen Entkopplung jedoch eine Pseudodimension eingeführt wird, sind vergleichsweise hohe

Gesamtexperimentdauern notwendig. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass mit dem ASAP-CLIP-RESET-Experiment für hohe Wiederholraten eine Steigerung der Empfindlichkeit erzielt werden kann, während die digitale Auflösung in der Protonendimension nur wenig eingeschränkt wird.

Die Magnetisierung der ^{12}C -gebundenen Protonen und die Magnetisierung, die als Folge der Ernst-Winkel-Anregung zurückbehalten wird, befindet sich während der inkrementierten Zeitperiode t_1 des ASAP-, sowie des ALSOFAST-HSQC in der transversalen Ebene. Durch ^1H , ^1H -Kopplungsentwicklung und transversale Relaxation wird das z -Magnetisierungsreservoir verringert. Das macht sich besonders dann bemerkbar, wenn eine hohe digitale Auflösung in der ^{13}C -Dimension erzielt werden soll. Diese erfordert entsprechend hohe Akquisitionzeiten in der indirekt detektierten Dimension. Aus diesem Grund wurde nach einem Ansatz gesucht, der es ermöglicht das Magnetisierungsreservoir vor der t_1 -Periode in Richtung der z -Achse zu rotieren. Gleichzeitig sollte keine ^1H , ^1H -Kopplungsentwicklung der aktiven Protonen vorliegen. Um diese Anforderungen zu erfüllen wurden zwei Ansätze näher untersucht.

Im ASAP-HMQC wird das Magnetisierungsreservoir vor der t_1 -Periode in Richtung der z -Achse rotiert. Allerdings ist die spektrale Auflösung und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis durch die Entwicklung von ^1H , ^1H -Kopplungen der aktiven Spins reduziert. Ein Ansatz bestand also darin, ein ASAP-HMQC zu erstellen, in dem die Entwicklung der ^1H , ^1H -Kopplungen während der t_1 -Periode durch die Verwendung eines BIRD^d-Filters refokussiert wird. Dieser ermöglicht die Reservoirmagnetisierung während der gesamten t_1 -Periode in $+z$ zu lokalisieren. Der Ansatz wurde mit einem weiterentwickelten ASAP-HSQC-Experiment verglichen, das einen speziellen, komplizierteren Transferschritt an Stelle eines INEPT verwendet und nach dem Vorbild des bandselektiven Cost-HSQC [99] LowCost-HSQC getauft wurde. Dieser ermöglicht, gemäß der Funktion eines konventionellen INEPT, ^1H , ^{13}C -Antiphasemagnetisierung zu erzeugen. Gleichzeitig wird die Magnetisierung der ^{12}C -gebundenen Protonen in Richtung der z -Achse rotiert. Dieses LowCost-ASAP-HSQC-Experiment ermöglicht im Gegensatz zum ASAP-HSQC keine Ernst-Winkel-Anregung. Stattdessen erlaubt es die Anwendung eines empfindlichkeitserhöhten Rücktransferschritts, der im ASAP-HSQC nicht eingesetzt werden kann.

Beim Vergleich des BIRD^d-ASAP-HMQC und des LowCost-ASAP-HSQC hat sich gezeigt, dass das LowCost-Experiment eine höhere Empfindlichkeit für Experimente mit langen Akquisitionzeiten in der ^{13}C -Dimension liefert. Zudem können ^1H , ^1H -Kopplungen der Protonen innerhalb einer CH_2 -Gruppe mit einem BIRD-Filter nicht refokussiert werden. Aus diesem Grund bietet das LowCost-ASAP-HSQC-Experiment erhebliche Vorteile, wenn die Linienform für CH_2 -Gruppen in der ^{13}C -Dimension verglichen wird. Als Schlußfolgerung wurden ausgehend von der Impulssequenz des LowCost-ASAP-HSQC einige weitere Varianten entwickelt, die zum Teil besonders von einer hohen Auflösung in der ^{13}C -Dimension profitieren.

Zum einen wurde das LowCost-ASAP-HSQC in der t_1 -Periode um einen BIRD^r-Filter erweitert. Dieses Experiment erlaubt die exakte Quantifizierung von $^1J_{CH}$ -Kopplungen in der

^{13}C -Dimension durch Refokussieren der Entwicklung langreichweitiger $^n J_{CH}$ -Kopplungen während der t_1 -Periode. Da die Impulssequenz gleichzeitig eine hohe Empfindlichkeit für hohe Wiederholraten bietet, können Kopplungen mit hoher Präzision in kurzen Experimentzeiten bestimmt werden. In Kombination mit *Non Uniform Sampling* werden in einigen Minuten Gesamtexperimentdauer digitale Auflösungen von weniger als 1 Hz in der ^{13}C -Dimension erreicht.

Aufgrund der Vorteile des LowCost-ASAP-HSQC wurde die Sequenz zur Entwicklung eines LowCost-ASAP-HSQC-TOCSY-Experiments verwendet. In diesem wurde die DIPSI-2 Mischsequenz vor die Akquisitionsperiode des freien Induktionszerfalls verschoben. Das Experiment liefert im Vergleich zum konventionellen HSQC-TOCSY mit sensitivitätsoptimiertem Rücktransferschritt ein höheres Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Der Gewinn macht sich im Besonderen für hohe Wiederholraten der Experimente bemerkbar.

Im *Constant-Time* (CT)-LowCost-ASAP-HSQC ist, analog zum konventionellen CT-HSQC, die Dauer der Zeitperiode zur Aufzeichnung der indirekten Dimension konstant. Im HSQC-iDOSY-Experiment wird diese konstante Zeitperiode als Diffusions-*delay* verwendet. Da das Experiment zur Auflösung der Diffusion eine zusätzliche Dimension verwendet, in der die Stärke der orts-kodierenden und dekodierenden Gradienten inkrementiert wird, sind lange Messzeiten erforderlich. Das CT-LowCost-ASAP-HSQC soll als Grundlage dienen, eine Version des HSQC-iDOSY-Experiments zu konzipieren, das eine höhere Empfindlichkeit für hohe Wiederholraten der Impulssequenz liefert. Durch zusätzliche Verwendung von *Non Uniform Sampling* in der Diffusionsdimension [128] könnte die erforderliche Messzeit weiter reduziert werden. Da DOSY-Experimente jedoch eine quantitative Auswertung der Signalintensitäten erfordern, muss sichergestellt werden, dass der Ansatz die exakte Ermittlung der Diffusionskoeffizienten ermöglicht.

In einigen Fällen resultierten auch aus den schnell durchgeführten, konventionellen HSQC-Experimenten auswertbare Spektren. Im Allgemeinen weisen diese jedoch mehr Artefaktsignale und ein geringeres Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf. Das zeigte sich vor allem bei sehr kurzen Experimenten, deren Aufnahmezeit nur wenige Sekunden betrug. In diesen Messungen lieferten nur ALSOFAST- und ASAP-HSQC vollständige, auswertbare Spektren.

In Zukunft könnten die vorgestellten Experimente auch in der Routine-NMR eine erheblich effizientere Ausnutzung der Spektrometerzeit ermöglichen. Der Aufwand zur Einstellung der Parameter ist ähnlich wie in herkömmlichen HSQC-Experimenten. Die Ernst-Winkel-Anregung muss nicht notwendigerweise für jede Probe neu optimiert werden. Der im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Wert des Transfer-*delays* Δ' für Menthol liefert auch für viele andere Proben gute Ergebnisse. Die Messzeiten der vorgestellten, schnellen 2D-Experimente sind im Allgemeinen kürzer oder kaum länger als die herkömmlicher 1D-Experimente. Durch die Aufspaltung entlang der zusätzlichen Frequenzachse, liefern die zweidimensionalen Experimente jedoch meist eine erheblich höhere spektrale Auflösung. Dadurch wird in vielen Fällen eine zweifelsfreie Zuordnung der Signale erst ermöglicht.

Ein Problem aller schnellen Impulstechniken stellt der sehr hohe Energieeintrag dar. Daraus

kann eine Erwärmung der Probe folgen. Auch die Gefahr der Überhitzung der Spektrometerelektronik besteht. In dieser Hinsicht können die Impulssequenzen in Zukunft weiter optimiert werden. Beispielsweise können moderne Entkopplungssequenzen den Energieeintrag erheblich reduzieren und gleichzeitig eine effiziente Entkopplung des gesamten ^{13}C -Frequenzbereichs gewährleisten. Gleiches gilt für die Mischsequenz des TOCSY-Transferschrittes zur Übertragung von z -Magnetisierung.

In nahezu allen neuen Sequenzen kamen Breitbandimpulse aus der optimalen Steuerungstheorie zum Einsatz. Das war jedoch nicht an allen Stellen der Sequenzen möglich. Wenn in den Experimenten zwei Impulse auf beiden Kanälen gleichzeitig eingestrahlt werden, müssen die Impulse für die simultane Anwendung gesondert optimiert werden. Derzeit stehen nicht für alle Fälle optimierte Impulspaare zur Verfügung. In den Experimenten wurden deshalb vereinzelt Rechteckimpulse verwendet. Durch Optimierung geeigneter Impulspaare könnten die Sequenzen weiter verbessert werden.

Optimierte Magnetisierungs-Transferschritte wie der COB-INEPT [49] könnten in Zukunft auch bei ASAP-Experimenten einen effizienteren Transfer über eine größere Kopplungsbandbreite ermöglichen. Diese müssen jedoch hinsichtlich des Erhalts der passiven Protonenmagnetisierung optimiert werden.

Wie in der allgemeinen Einführung dieser Arbeit gezeigt wurde, existieren aktuell einige experimentelle Schemata, die es ermöglichen zweidimensionale NMR-Experimente in kürzerer Zeit durchzuführen. Ein großer Vorteil des ASAP- und des ALSOFAS- Ansatzes ist es, dass in einem Experiment der gesamte Frequenzbereich einer Probe aufgenommen werden kann und keinerlei Einschränkungen bezüglich Auflösung und spektraler Breite vorhanden sind. Die neu entwickelten schnellen NMR-Experimente sind also besser in der Praxis anwendbar, als alle bisherigen Ansätze. Damit wurde in dieser Arbeit die Grundlage für einen Blumenstrauch von Anwendungen gelegt. Neben der Untersuchung instabiler Proben und der Verfolgung chemischer Reaktionen, können die neuen Experimente in Zukunft auch in der Durchfluss-NMR Anwendung finden. Weiterhin können durch die extrem hochaufgelösten Spektren Strukturbestimmungen von Molekülen unter Umständen weiter verfeinert werden.

Kapitel 6

Anhang

6.1 Impulsprogramme für Spektrometer der Firma Bruker

6.1.1 Original ASAP- bzw. ALSOFAST-HSQC

```
;ASAP-hsqcetgpsp
;avance-version (02/07/15)
;ASAP-HSQC
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
;with decoupling during acquisition
;with DIPSI-2 mixing after acquisition for ASAP
;using shaped pulses on f1 and f2.
;David Schulze-Suenninghausen, Johanna Becker, Burkhard Luy
;"Rapid Heteronuclear Single Quantum Correlation
  NMR Spectra at Natural Abundance"
;J. Am. Chem. Soc., 2014, 136 (4), pp 1242-1245.
```

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

```
; *** Echo-/Antiecho gradient strenght calculation
"cnst12=1/(1+sfo2/sfo1)"
"cnst13=(1-sfo2/sfo1)"
define list <gradient> EA1 = { cnst12 1 }
define list <gradient> EA2 = { 1 cnst13 }
```

```

; ***
"p2=p1*2"
"d0=3u"
"d11=30m"
"d16=200u"
"d20=1m"
"FACTOR1=(d9/(p6*115.112))/2"
"l1=FACTOR1*2" ; TOCSY loop counter
"d0=3u"
"in0=infl/2"
"d4=1s/(4*cnst4)" ; 1/(4J)XH
"d3=1s/(4*cnst3)" ; reduced d4
"DELTA=0.5*(2*d3+p21-p1)"
"DELTA1=0.5*(2*d3-p21+p1)"
"DELTA4=d4-p16-d16-3u"
"DELTA3=p16+3u+d16+p21-p25+p1"
"DELTA2=0.5*(DELTA3+p16+d16+3u-2*d0)"

```

```

1 ze
  d11 p112 : f2
2 d1 do : f2
3 d20 UNBLKGRAD
  p16 : gp2
  d16 p110 : f1
; *** begin DIPSI-2
4 p6*3.556 ph23
  p6*4.556 ph25
  p6*3.222 ph23
  p6*3.167 ph25
  p6*0.333 ph23
  p6*2.722 ph25
  p6*4.167 ph23
  p6*2.944 ph25
  p6*4.111 ph23

  p6*3.556 ph25
  p6*4.556 ph23

```

```

p6*3.222 ph25
p6*3.167 ph23
p6*0.333 ph25
p6*2.722 ph23
p6*4.167 ph25
p6*2.944 ph23
p6*4.111 ph25

p6*3.556 ph25
p6*4.556 ph23
p6*3.222 ph25
p6*3.167 ph23
p6*0.333 ph25
p6*2.722 ph23
p6*4.167 ph25
p6*2.944 ph23
p6*4.111 ph25

p6*3.556 ph23
p6*4.556 ph25
p6*3.222 ph23
p6*3.167 ph25
p6*0.333 ph23
p6*2.722 ph25
p6*4.167 ph23
p6*2.944 ph25
p6*4.111 ph23
lo to 4 times l1
; *** end DIPSI-2
p16:gp3
d16 pl0:f1 pl0:f2

; *** INEPT with reduced coupling delay d3
(p21:sp21 ph1):f1
DELTA
(center (p22:sp22 ph1):f1 (p22:sp23 ph6):f2)
DELTA1 pl1:f1
(ralign (p1 ph1):f1 (p21:sp24 ph9):f2)
; ***

; *** t1 incrementation

```

```

DELTA2 p10:f1
d0
(p22:sp22 ph5):f1
d0
DELTA2 p11:f1
; ***
(lalign (p1 ph7):f1 (p25:sp25 ph10):f2);
DELTA3 p10:f1
(p22:sp22 ph1):f1
3u
p16:gp1*EA1 ; first Echo-/Antiecho selection gradient
d16

; *** Back transfer
(p21:sp26 ph10):f2
d4
(center (p22:sp22 ph1):f1 (p22:sp23 ph6):f2)
3u
p16:gp1*EA2 ; final Echo-/Antiecho selection gradient
d16 p112:f2
DELTA4 BLKGRAD
; ***
go=2 ph31 cpd2:f2
d1 do:f2 mc #0 to 2
F1EA(igrad EA1 & igrad EA2, id0 & ip9*2 & ip6*2 & ip31*2)
exit

```

```

ph1=0
ph2=1
ph5=0 0 2 2
ph6=0
ph7=3
ph8=3
ph9=2 0
ph10=0 0 0 0 2 2 2 2
ph23=3
ph25=1
ph31=0 2 0 2 2 0 2 0

```

```

;p10 : 0W
;p11 : f1 channel – power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel – power level for pulse (default)
;p110 : f1 channel – power level for mixing sequence (DIPSI–2)
;p112: f2 channel – power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel – 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel – 180 degree high power pulse
;p6 : f1 channel – 90 degree pulse for mixing sequence (DIPSI–2)
;p21 : 550u excitation pulses
;p22 : 600u UR and Inversion pulses
;p25 : 1100u 13C refocusing pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;spnam21 : jc01_BEBOP_zx_550u_BW10_RF20_pm20_Hc0.99997119.pul
;spnam22 : jc02_BURBOP_x_600u_BW10_RF20_pm20_matched.pul
;spnam23 : jc03_BIBOP_600u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam24 : jc05_BEBOP_zy_550u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam25 : jc07_BURBOP_y_1100u_BW37.5_RF10_pm5_Hc0.999876221.pul
;spnam26 : jc09_BEBOP_–yz_550u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;sp21 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp22 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp23 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp24 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp25 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp26 : 10 kHz Rf Amplitude
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1–5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d3 : reduced d4
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery [200ms]
;cnst4: = J(XH)
;cnst3: reduced cnst4 ('ernst angle')
;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
```

```
;use gradient ratio:    gp 1 : gp 2 : gp 3  
;                          80    : 33    : 43
```

```
;for z-only gradients:  
;gpz1: 80%  
;gpz2: 33% ; gradient before mixing  
;gpz3: 43% ; gradient after mixing
```

```
;use gradient files:  
;gpnam1: SMSQ10.100  
;gpnam2: SMSQ10.100  
;gpnam3: SMSQ10.100
```

```
;$Id: asap!hsqcetgp_sp,v 1.5.2.1 2011/02/24 17:27:48 ber Exp $
```

6.1.2 Symmetrisiertes ASAP- bzw. ALSOFAST-HSQC

```

;ASAP!hsqcetgp
;avance-version (09/04/17)
;ASAP!HSQC
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
;with decoupling during acquisition
;with DIPSI mixing after acquisition for ASAP
;using shape pulses on f1 and f2.

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

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

"d3=(d4+4u)*cnst3-4u" ; reduced INEPT delay (1st transfer)
"d4=1s/(cnst2*4) -4u" ; general INEPT delay (2nd transfer)
"DELTA4=d4-p16-d16-de+p1*2/PI"; d4 reduced for EA gradient pulse
"DELTA =p16+d16+d0+p22*0.5";
"d11=30m"
"d0=3u"
"in0=inf1/2"
"acqt0=0"
"FACTOR1=(d9/(p6*115.112))/2" ;DISPI parameters
"l1=FACTOR1*2"

1 ze
  d11
2 d1 do:f2
  4u UNBLKGRAD
  p16:gp3
  d16 pl10:f1
;begin DIPSI-2
3 p6*3.556 ph23
  p6*4.556 ph25
  p6*3.222 ph23

```

p6*3.167 ph25
 p6*0.333 ph23
 p6*2.722 ph25
 p6*4.167 ph23
 p6*2.944 ph25
 p6*4.111 ph23

p6*3.556 ph25
 p6*4.556 ph23
 p6*3.222 ph25
 p6*3.167 ph23
 p6*0.333 ph25
 p6*2.722 ph23
 p6*4.167 ph25
 p6*2.944 ph23
 p6*4.111 ph25

p6*3.556 ph25
 p6*4.556 ph23
 p6*3.222 ph25
 p6*3.167 ph23
 p6*0.333 ph25
 p6*2.722 ph23
 p6*4.167 ph25
 p6*2.944 ph23
 p6*4.111 ph25

p6*3.556 ph23
 p6*4.556 ph25
 p6*3.222 ph23
 p6*3.167 ph25
 p6*0.333 ph23
 p6*2.722 ph25
 p6*4.167 ph23
 p6*2.944 ph25
 p6*4.111 ph23

lo to 3 times l1

;end DIPSI-2

4u

p16:gp4

d16 pl0:f1 pl0:f2 ; power level for shape pulses

```

;inept , reduced delay
4 (p21:sp21 ph1):f1 ;BEBOP:f1 , [zx]
d3
4u
(p22:sp22 ph1):f1 (p22:sp23 ph1):f2 ;BUBI( URx180:f1 , BIBOP:f2 [z-z])
d3
4u pl1:f1
(p1 ph1):f1 (p21:sp24 ph4):f2 ;p1, BEBOP:f2 [zy]

;coherence pathway selection 1
4u
DELTA
(p22:sp23 ph7):f2
4u
p16:gp1*0.5*EA
d16 pl0:f1

;t1
d0
(p22:sp22 ph5):f1 ;URx180 F1
d0

;coherence pathway selection 2
4u
p16:gp1*0.5*EA
d16
(p22:sp23 ph8):f2
4u
DELTA pl1:f1

;inept
(ralign (p1 ph2):f1 (p21:sp26 ph3):f2);p1, BEBOP:f2 [yz]
4u
d4 pl0:f1
(p22:sp22 ph1):f1 (p22:sp23 ph6):f2 ;BUBI( URx180:f1 , BIBOP:f2 [z-z] )
4u
p16:gp2
d16 pl12:f2 pl1:f1
DELTA4 BLKGRAD

```

```

go=2 ph31 cpd2:f2
d1 do:f2 mc #0 to 2
  FIEA(calgrad(EA), caldel(d0, +in0) & calph(ph3, +180)
    & calph(ph6, +180) & calph(ph31, +180))
exit

#ifdef NOPHASECYCLE
ph1=0
ph2=1
ph3=0
ph4 =0
ph5=3
ph14=2
ph5=0
ph6=0
ph7=1
ph8=3
ph23=3
ph25=1
ph31=0
#else
ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4 =0 0 0 0 2 2 2 2
ph14=2 2 2 2 0 0 0 0
ph5=0 0 2 2
ph6=0
ph7=1 1 1 1 3 3 3 3
ph8=3 3 3 3 1 1 1 1
ph23=3
ph25=1
ph31=0 2 0 2 2 0 2 0
#endif /*nophasecycle*/

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p110 : f1 channel - power level for mixing sequence
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse

```

```

;p6 : f1 channel - 90 degree pulse for mixing sequence
;p16: homospoil/gradient pulse

;p21 : 550u excitation pulses
;p22 : 600u UR and Inversion pulses
;p25 : 1100u 13C refocusing pulse
;spnam21 : jc01_BEBOP_zx_550u_BW10_RF20_pm20_Hc0.99997119.pul
;spnam22 : jc02_BURBOP_x_600u_BW10_RF20_pm20_matched.pul
;spnam23 : jc03_BIBOP_600u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam24 : jc05_BEBOP_zy_550u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam25 : jc07_BURBOP_y_1100u_BW37.5_RF10_pm5_Hc0.999876221.pul
;spnam26 : jc09_BEBOP_-yz_550u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;sp21 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp22 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp23 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp24 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp25 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp26 : 10 kHz Rf Amplitude

;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d3 : reduced d4
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;cnst2: = J(XH)
;cnst1: reduced cnst2 ('ernst angle')
;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

;use gradient ratio: gp 1 : gp 2 : gp 3 : gp 4
; 80 : 20.1 : 33 : 43 for C-13

;for z-only gradients:

```

```
;gpz1: 80%
;gpz2: 20.1% for C-13
;gpz3: 33% ; gradient before mixing
;gpz4: 43% ; gradient after mixing
```

```
;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.100
;gpnam2: SMSQ10.100
;gpnam3: SMSQ10.100
;gpnam4: SMSQ10.100
```

6.1.3 ASAP-HSQC mit optimierter Wasserunterdrückung

```
;ASAP!hsqcetgp with improved solvent suppression
;avance-version (09/04/17)
;ASAP!HSQC
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
;with decoupling during acquisition
;with DIPSI mixing after acquisition for ASAP
;      (Johanna Becker, David Schulze Sünninghausen, Martin Koos; 2013)
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

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

"d3=1s/(cnst1*4)" ; reduced INEPT delay (1st transfer)
"d4=1s/(cnst2*4)" ; general INEPT delay (2nd transfer)

"d11=30m"
"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p17=d3-d16"
"d0=3u"
"in0=inf1/2"

"acqt0=0"
```

```
"p18=d4-p16-d16*2-de+p1*2/PI-4u"
"DELTA =p16+d16-d0-p2*0.5-16u"
"DELTA4=d4-p16-d16*2-p15-de+p1*2/PI-4u"
"DELTA5=d4-p15-d16"
"FACTOR1=(d9/(p6*115.112))/2" ;DISPI parameters
"l1=FACTOR1*2"
```

```
1 ze
  d11 p112:f2
2 d1 do:f2
  4u UNBLKGRAD
  p16:gp3
  d16 p110:f1
;begin DIPSI-2
3 p6*3.556 ph23
  p6*4.556 ph25
  p6*3.222 ph23
  p6*3.167 ph25
  p6*0.333 ph23
  p6*2.722 ph25
  p6*4.167 ph23
  p6*2.944 ph25
  p6*4.111 ph23

  p6*3.556 ph25
  p6*4.556 ph23
  p6*3.222 ph25
  p6*3.167 ph23
  p6*0.333 ph25
  p6*2.722 ph23
  p6*4.167 ph25
  p6*2.944 ph23
  p6*4.111 ph25

  p6*3.556 ph25
  p6*4.556 ph23
  p6*3.222 ph25
  p6*3.167 ph23
  p6*0.333 ph25
  p6*2.722 ph23
```

```

p6*4.167 ph25
p6*2.944 ph23
p6*4.111 ph25

p6*3.556 ph23
p6*4.556 ph25
p6*3.222 ph23
p6*3.167 ph25
p6*0.333 ph23
p6*2.722 ph25
p6*4.167 ph23
p6*2.944 ph25
p6*4.111 ph23
lo to 3 times l1
;end DIPSI-2
4u
p16:gp4
d16 p11:f1 p12:f2

;inept , reduced delay
4 (p1 ph1)
p17:gp7
d16
(center (p2 ph1) (p4 ph6):f2 )
p17:gp7
d16
(p1 ph2) (p3 ph3):f2;

;coherence pathway selection 1
p16:gp1*0.5*EA*-1
d16
(p4 ph4):f2
DELTA
;t1
4u gron9
d0*0.5
4u groff
4u gron9*-1
d0*0.5
4u groff
(p2 ph5)

```

```

4u  gron9
    d0*0.5
4u  groff
4u  gron9*-1
    d0*0.5
4u  groff
    ;coherence pathway selection 2
DELTA
    (p4 ph14):f2
    4u
    p16:gp1*0.5*EA*-1
    d16
;inept
    (ralign (p1 ph1) (p3 ph4):f2 )
    p15:gp8
    d16
DELTA5
    (center (p2 ph1) (p4 ph1):f2 )
    p15:gp8
    d16
DELTA4
    p16:gp2
    d16*0.5 pl12:f2
    d16*0.5 BLKGRAD
;acquisition
    go=2 ph31 cpd2:f2
    d1 do:f2 mc #0 to 2
        F1EA(calgrad(EA), caldel(d0, +in0) & calph(ph3, +180)
            & calph(ph6, +180) & calph(ph31, +180))
exit

ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4=0 0 0 0 2 2 2 2
ph14=2 2 2 2 0 0 0 0
ph5=0 0 2 2
ph6=0
ph23=3
ph25=1
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)
;p110 : f1 channel - power level for mixing sequence
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;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
;p6 : f1 channel - 90 degree pulse for mixing sequence
;p16: homospoil/gradient pulse

;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d3 : reduced d4
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;cnst2: = J(XH)
;cnst1: reduced cnst2 ('ernst angle')
;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

;use gradient ratio: gp 1 : gp 2 : gp 3 : gp 4
; 80 : 20.1 : 33 : 43 for C-13

;for z-only gradients:
;gpz1: 80%
;gpz2: 20.1% for C-13
;gpz3: 33% ; gradient before mixing
;gpz4: 43% ; gradient after mixing

;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.100

```

```
;gpnam2: SMSQ10.100  
;gpnam3: SMSQ10.100  
;gpnam4: SMSQ10.100
```

```
;$Id: asap!hsqcetgp,v 1.5.2.1 2011/02/24 17:27:48 ber Exp $
```

6.1.4 Multiplizitäteditiertes ASAP- bzw. ALSOFAST-HSQC auf Basis der originalen ASAP-HSQC-Sequenz

```
; Multiplicity Edited ASAP-HSQC V1
; avance-version (02/07/15)
; 2D H-1/X correlation via double inept transfer
; phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
; with decoupling during acquisition
; with DIPSI-2 mixing after acquisition for ASAP
; using shaped pulses on f1 and f2.
```

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

```
; *** Echo-/Antiecho gradient strenght calculation
"cnst12=1/(1+sfo2/sfo1)"
"cnst13=(1-sfo2/sfo1)"
define list<gradient> EA1 = { cnst12 1 }
define list<gradient> EA2 = { 1 cnst13 }
```

```
; ***
"p2=p1*2"
"d0=3u"
"d11=30m"
"d16=200u"
"d20=1m"
"FACTOR1=(d9/(p6*115.112))/2"
"l1=FACTOR1*2" ; TOCSY loop counter
"d0=3u"
"in0=inf1/2"
"cnst5=cnst4*cnst3/(2*cnst3-cnst4)"
"d4=1s/(4*cnst4)" ; 1/(4J)XH
"d3=1s/(4*cnst5)" ; reduced d4
"DELTA=0.5*(2*d3+p21-p1)"
"DELTA1=0.5*(2*d3-p21+p1)"
"DELTA2=p16+d16+3u-d0+p1*0.5"
"DELTA3=p16+3u+d16"
"DELTA4=d4-p16-d16-3u-de+p1*2/PI+p21*0.5"
"DELTA5=d4-p21*0.5"
```

```
1 ze
  d11 pl12:f2
2 d1 do:f2
3 d20 UNBLKGRAD
  p16:gp2
  d16 pl10:f1
; *** begin DIPSI-2
4 p6*3.556 ph23
  p6*4.556 ph25
  p6*3.222 ph23
  p6*3.167 ph25
  p6*0.333 ph23
  p6*2.722 ph25
  p6*4.167 ph23
  p6*2.944 ph25
  p6*4.111 ph23

  p6*3.556 ph25
  p6*4.556 ph23
  p6*3.222 ph25
  p6*3.167 ph23
  p6*0.333 ph25
  p6*2.722 ph23
  p6*4.167 ph25
  p6*2.944 ph23
  p6*4.111 ph25

  p6*3.556 ph25
  p6*4.556 ph23
  p6*3.222 ph25
  p6*3.167 ph23
  p6*0.333 ph25
  p6*2.722 ph23
  p6*4.167 ph25
  p6*2.944 ph23
  p6*4.111 ph25

  p6*3.556 ph23
  p6*4.556 ph25
  p6*3.222 ph23
```

```

p6*3.167 ph25
p6*0.333 ph23
p6*2.722 ph25
p6*4.167 ph23
p6*2.944 ph25
p6*4.111 ph23
lo to 4 times l1
; *** end DIPSI-2
p16:gp3
d16 p10:f1 p10:f2

; *** INEPT with reduced coupling delay d3
(p21:sp21 ph1):f1
DELTA
(center (p22:sp22 ph1):f1 (p22:sp23 ph6):f2)
DELTA1 p11:f1
(ralign (p1 ph1):f1 (p21:sp24 ph9):f2)
; ***

; *** t1 incrementation
DELTA2 p10:f1
d0
(p22:sp22 ph5):f1
d0
DELTA2
; ***

; *** multiplicity editing
d4*2
(center (p22:sp22 ph5):f1 (p25:sp25 ph10):f2)
d4*2 p11:f1
; ***

(p1 ph7):f1
DELTA3 p10:f1
(p22:sp22 ph1):f1
3u
p16:gp1*EA1 ; first Echo-/Antiecho selection gradient
d16

; *** Back transfer

```

```

(p21:sp26 ph10):f2
DELTA5
(center (p22:sp22 ph1):f1 (p22:sp23 ph6):f2)
3u
p16:gp1*EA2 ; final Echo-/Antiecho selection gradient
d16 pl12:f2
DELTA4 BLKGRAD
; ***
go=2 ph31 cpd2:f2
d1 do:f2 mc #0 to 2
F1EA(calgrad(EA1) & calgrad(EA2), caldel(d0, +in0) & calph(ph9, +180)
& calph(ph6, +180) & calph(ph31, +180))
exit

ph1=0
ph2=1
ph5=0 0 2 2
ph6=0
ph7=3
ph8=3
ph9=2 0
ph10=0 0 0 0 2 2 2 2
ph23=3
ph25=1
ph31=0 2 0 2 2 0 2 0

;p10 : 0W
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p110 : f1 channel - power level for mixing sequence (DIPSI-2)
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p6 : f1 channel - 90 degree pulse for mixing sequence (DIPSI-2)
;p21 : 550u excitation pulses
;p22 : 600u UR and Inversion pulses
;p25 : 1100u 13C refocusing pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;spnam21 : jc01_BEBOP_zx_550u_BW10_RF20_pm20_Hc0.99997119.pul
;spnam22 : jc02_BURBOP_x_600u_BW10_RF20_pm20_matched.pul

```

```

;spnam23 : jc03_BIBOP_600u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam24 : jc05_BEBOP_zy_550u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam25 : jc07_BURBOP_y_1100u_BW37.5_RF10_pm5_Hc0.999876221.pul
;spnam26 : jc09_BEBOP_–yz_550u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;sp21 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp22 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp23 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp24 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp25 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp26 : 10 kHz Rf Amplitude
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1–5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d3 : reduced d4
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery [200ms]
;cnst4: = J(XH)
;cnst3: reduced cnst4 ('ernst angle')
;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

;use gradient ratio: gp 1 : gp 2 : gp 3
; 80 : 33 : 43

;for z–only gradients:
;gpz1: 80%
;gpz2: 33% ; gradient before mixing
;gpz3: 43% ; gradient after mixing

;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.100
;gpnam2: SMSQ10.100
;gpnam3: SMSQ10.100

```

;\$Id: asap!hsqcetgp_sp,v 1.5.2.1 2011/02/24 17:27:48 ber Exp \$

6.1.5 Multiplizitäteditiertes ASAP- bzw. ALSOFAST-HSQC auf Basis des symmetrisierten ASAP-HSQC

```

; Multiplicity Edited ASAP-HSQC V2
; avance-version (09/04/17)
; ASAP!HSQC
; 2D H-1/X correlation via double inept transfer
; phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
; with decoupling during acquisition
; with DIPSI mixing after acquisition for ASAP
; using shape pulses on f1 and f2.
; $CLASS=HighRes
; $DIM=2D
; $TYPE=
; $SUBTYPE=
; $COMMENT=

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

"cnst5=cnst4*cnst3/(2*cnst3-cnst4)"
"d3=1s/(4*cnst5)" ; reduced d4
"d4=1s/(cnst4*4)" ; general INEPT delay (2nd transfer)
"DELTA1=0.5*(2*d3+p21-p1)"
"DELTA2=0.5*(2*d3-p21+p1)"
"DELTA3=d4*2+p22*0.5+p16+d16+d0"
"DELTA4=d4*2"
"DELTA5=p16+d16+d0+p22*0.5"
"DELTA6=d4-(p21-p1)*0.5"
"DELTA7=d4+(p21-p1)*0.5-p16-d16-de+p1*2/PI"
"d11=30m"
"d0=3u"
"in0=inf1/2"
"acqt0=0"
"FACTOR1=(d9/(p6*115.112))/2" ;DISPI parameters
"l1=FACTOR1*2"

1 ze
d11

```

```
2 d1 do:f2
  4u UNBLKGRAD
  p16:gp3
  d16 pl10:f1
;begin DIPSI-2
3 p6*3.556 ph23
  p6*4.556 ph25
  p6*3.222 ph23
  p6*3.167 ph25
  p6*0.333 ph23
  p6*2.722 ph25
  p6*4.167 ph23
  p6*2.944 ph25
  p6*4.111 ph23

  p6*3.556 ph25
  p6*4.556 ph23
  p6*3.222 ph25
  p6*3.167 ph23
  p6*0.333 ph25
  p6*2.722 ph23
  p6*4.167 ph25
  p6*2.944 ph23
  p6*4.111 ph25

  p6*3.556 ph25
  p6*4.556 ph23
  p6*3.222 ph25
  p6*3.167 ph23
  p6*0.333 ph25
  p6*2.722 ph23
  p6*4.167 ph25
  p6*2.944 ph23
  p6*4.111 ph25

  p6*3.556 ph23
  p6*4.556 ph25
  p6*3.222 ph23
  p6*3.167 ph25
  p6*0.333 ph23
  p6*2.722 ph25
```

```

p6*4.167 ph23
p6*2.944 ph25
p6*4.111 ph23
lo to 3 times l1
;end DIPSI-2
4u
p16:gp4
d16 p10:f1 p10:f2 ; power level for shape pulses

;inept, reduced delay
4 (p21:sp21 ph1):f1 ;BEBOP:f1, [zx]
DELTA1
(p22:sp22 ph1):f1 (p22:sp23 ph1):f2 ;BUBI(URx180:f1, BIBOP:f2 [z-z])
DELTA2 p11:f1
(ralign (p1 ph1):f1 (p21:sp24 ph4):f2) ;p1, BEBOP:f2 [zy]
;coherence pathway selection 1
DELTA3 p10:f1
(p22:sp23 ph7):f2 ;URx180 f2
p16:gp1*0.5*EA
d16 p10:f1
;t1
d0
(p22:sp22 ph5):f1 ;URx180 F1
d0
;coherence pathway selection 2
p16:gp1*0.5*EA
d16
DELTA4
(p22:sp23 ph8):f2 ;URx180 f2
DELTA5 p11:f1
;inept
(lalign (p1 ph2):f1 (p21:sp26 ph3):f2);p1, BEBOP:f2 [yz]
DELTA6 p10:f1
(p22:sp22 ph1):f1 (p22:sp23 ph6):f2 ;BUBI( URx180:f1, BIBOP:f2 [z-z] )
p16:gp2
d16 p112:f2 p11:f1
DELTA7 BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2
d1 do:f2 mc #0 to 2
F1EA(calgrad(EA), caldel(d0, +in0) & calph(ph3, +180)
& calph(ph6, +180) & calph(ph31, +180))

```

```

exit

#ifdef NOPHASECYCLE
ph1=0
ph2=1
ph3=0
ph4 =0
ph5=0
ph14=2
ph5=0
ph6=0
ph7=1
ph23=3
ph25=1
ph31=0
#else
ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4 =0 0 0 0 2 2 2 2
ph14=2 2 2 2 0 0 0 0
ph5=0 0 2 2
ph6=0
ph7=1 1 1 1 3 3 3 3
ph8=3 3 3 3 1 1 1 1
ph23=3
ph25=1
ph31=0 2 0 2 2 0 2 0
#endif /*nophasecycle*/

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p110 : f1 channel - power level for mixing sequence
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p6 : f1 channel - 90 degree pulse for mixing sequence
;p16: homospoil/gradient pulse

;p21 : 550u excitation pulses
;p22 : 600u UR and Inversion pulses

```

```

;p25 : 1100u 13C refocusing pulse
;spnam21 : jc01_BEBOP_zx_550u_BW10_RF20_pm20_Hc0.99997119.pul
;spnam22 : jc02_BURBOP_x_600u_BW10_RF20_pm20_matched.pul
;spnam23 : jc03_BIBOP_600u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam24 : jc05_BEBOP_zy_550u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam25 : jc07_BURBOP_y_1100u_BW37.5_RF10_pm5_Hc0.999876221.pul
;spnam26 : jc09_BEBOP_~yz_550u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;sp21 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp22 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp23 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp24 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp25 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp26 : 10 kHz Rf Amplitude

;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d3 : reduced d4
;use the same value for d3 as in the conventional ASAP-HSQC experiment.
;The pulse program will calculate the correct value for d3
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;cnst2: = J(XH)
;cnst1: reduced cnst2 ('ernst angle')
;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

;use gradient ratio: gp 1 : gp 2 : gp 3 : gp 4
; 80 : 20.1 : 33 : 43 for C-13

;for z-only gradients:
;gpz1: 80%
;gpz2: 20.1% for C-13
;gpz3: 33% ; gradient before mixing

```

;gpz4: 43% ; gradient after mixing

;use gradient files:

;gpnam1: SMSQ10.100

;gpnam2: SMSQ10.100

;gpnam3: SMSQ10.100

;gpnam4: SMSQ10.100

;\$Id: asap!hsqcetgp_sp,v 1.5.2.1 2011/02/24 17:27:48 ber Exp \$

6.1.6 ASAP-CLIP-RESET

```
;ASAP-CLIP_RESET_hsqcetgp_SP
;
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
```

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

```
"d11=30m"
"acqt0=0"
```

```
"cnst5=cnst2*cnst3/(2*cnst3-cnst2)"
"d4=1s/(cnst2*4)"
"d3=1s/(cnst5*4)" ; reduced d4
```

```
"d20=1m"
"FACTOR1=(d9/(p6*115.112))/2"
"l1=FACTOR1*2" ; TOCSY loop counter
```

```
"DELTA1=d4-p16-4u-p3"
"DELTA=p16+d16+p22*0.5+d10"
"DELTA2=in0/2-p16-d16"
"DELTA3=in0-p16-d16"
"DELTA4=in0/2-(dw*2*cnst4)-p16-d16"
"d0=3u"
"d10=3u"
"in0=inf1/2"
"in10=inf2/2"
```

```

1 ze
  d11 pl12:f2
2 d1 do:f2
3 d20 UNBLKGRAD
  p16:gp6
  d16 pl10:f1
; *** begin DIPSI-2
4 p6*3.556 ph23
  p6*4.556 ph25
  p6*3.222 ph23
  p6*3.167 ph25
  p6*0.333 ph23
  p6*2.722 ph25
  p6*4.167 ph23
  p6*2.944 ph25
  p6*4.111 ph23

  p6*3.556 ph25
  p6*4.556 ph23
  p6*3.222 ph25
  p6*3.167 ph23
  p6*0.333 ph25
  p6*2.722 ph23
  p6*4.167 ph25
  p6*2.944 ph23
  p6*4.111 ph25

  p6*3.556 ph25
  p6*4.556 ph23
  p6*3.222 ph25
  p6*3.167 ph23
  p6*0.333 ph25
  p6*2.722 ph23
  p6*4.167 ph25
  p6*2.944 ph23
  p6*4.111 ph25

  p6*3.556 ph23
  p6*4.556 ph25
  p6*3.222 ph23
  p6*3.167 ph25

```

```

p6*0.333 ph23
p6*2.722 ph25
p6*4.167 ph23
p6*2.944 ph25
p6*4.111 ph23
lo to 4 times l1
; *** end DIPSI-2
p16:gp7
d16 p10:f1 p10:f2
5 (p21:sp21 ph1):f1 ;zx
d3
(p22:sp22 ph1):f1 (p22:sp23 ph6):f2 ;URx180 BIBOP
d3 p11:f1
(p1 ph1):f1 (p21:sp25 ph3):f2 ;yz z-y
DELTA p10:f1
(p22:sp23 ph4):f2
p16:gp1*EA*0.5
d16
d10
(p22:sp22 ph1):f1
d10
p16:gp1*EA*0.5
d16
(p22:sp23 ph4):f2
DELTA p11:f1
(ralign (p1 ph9):f1 (p21:sp29 ph4):f2 ;z-y yz
d4 p10:f1
(p22:sp22 ph1):f1 (p22:sp23 ph1):f2 ;URx180 BIBOP
p16:gp2
DELTA1
4u p12:f2
(p3 ph8):f2
;;;; Pure-Shift Pseudo-Dimension ;;;;
d0

DELTA2
p16:gp3
d16

(p22:sp22 ph1):f1

```

DELTA3

p16:gp4

d16

(p23:sp30 ph1):f1 ;BIRDd

d4*2

(p22:sp22 ph1):f1 (p22:sp23 ph1):f2 ;URx180 BIBOP

d4*2

(p23:sp30 ph1):f1 (p22:sp23 ph1):f2 ;URx90 BIBOP

DELTA4

p16:gp5

d16 BLKGRAD

d0

go=2 ph31

d1 mc #0 to 2

F1QF(caldel(d0, +in0))

F2EA(calgrad(EA), caldel(d10, +in10) & calph(ph3, +180)

& calph(ph6, +180) & calph(ph31, +180))

exit

ph1=0

ph2=1

ph3=0 2

ph4=0 0 2 2

ph5=0 0 0 0 2 2 2 2

ph6=0

ph8=0 2

ph9=3

ph23=3

ph25=1

ph31=0 2 2 0

;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default)

;pl2 : f2 channel - power level for pulse (default)

;pl3 : f3 channel - power level for pulse (default)

;pl12: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling

```

;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
;p16: homospoil/gradient pulse

;p21 : 550u excitation pulses
;p22 : 600u UR and Inversion pulses
;p26 : 100u Inversion pulse
;p27 : 1100u UR pulse

;spnam21 : jc01_BEBOP_zx_550u_BW10_RF20_pm20_Hc0.999971119.pul
;spnam22 : jc02_BURBOP_x_600u_BW10_RF20_pm20_matched.pul
;spnam24 : jc04_BEBOP_yz_550u_BW10_RF20_pm20_matched.pul
;spnam26 : jc06_BIBOP_z-z_100u_BW11_RF20_pm20_Hc0.99966724.pul
;spnam28 : jc08_BEBOP_z-y_550u_BW10_RF20_pm20_matched.pul
;spnam30 : UR90x_600u_BW10_RF20_pm20_Hc0.999959.brucker

;spnam23 : jc03_BIBOP_600u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam25 : jc05_BEBOP_zy_550u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam27 : jc07_BURBOP_y_1100u_BW37.5_RF10_pm5_Hc0.999876221.pul
;spnam29 : jc09_BEBOP_-yz_550u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul

;sp21 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp22 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp24 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp26 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp28 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp30 : 20 kHz Rf Amplitude

;sp23 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp25 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp27 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp29 : 10 kHz Rf Amplitude

;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery

```

```

;cnst2: = J(XH)
;cnst4: = Points dropped by AU program
;inf1: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 2 * 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

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

;use gradient ratio:      gp 3 : gp 4 : gp 5
;                          1 : 4 : 3

;for z-only gradients:
;gpz1: 80%
;gpz2: 20.1% for C-13, 8.1% for N-15
;gpz3: n*1 %
;gpz4: n*4 %
;gpz5: n*3 %
;gpz6: 33 %
;gpz7: 43 %
;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.100
;gpnam2: SMSQ10.100
;gpnam3: SMSQ10.100
;gpnam4: SMSQ10.100
;gpnam5: SMSQ10.100

;preprocessor-flags-start

;$Id: hsqcetgp,v 1.5.2.1 2011/02/24 17:27:48 ber Exp $

```

6.1.7 ASAP-HMQC mit BIRD^d-Filter während t_1

```
;ASAP-HMQC with BIRDd Filter during t1
;avance-version (09/04/17)
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
;with decoupling during acquisition
;with DIPSI mixing after acquisition for ASAP
;using shape pulses on f1 and f2.
```

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

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

```
"cnst5=cnst4*cnst3/(2*cnst3-cnst4)"
"d3=1s/(cnst5*4)"
"d4=1s/(cnst4*4)"
"DELTA1=0.5*(2*d3+p21-p1)"
"DELTA2=0.5*(2*d3-p21+p1)"
"DELTA3=p16+d16+d0+p22*0.5"
"DELTA4=p16+d16-p22*0.5"
"DELTA5=p22+d0"
"DELTA6=d4-p21*0.5"
"DELTA7=d4-p16-d16+p21*0.5"
"d11=30m"
"d0=3u"
"in0=inf1/2"
"acqt0=0"

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

"FACTOR1=(d9/(p6*115.112))/2" ;DISPI parameters
"l1=FACTOR1*2"
```

```
1 ze
```

```
d11
2 d1 do:f2
  4u UNBLKGRAD
  p16:gp3
  d16 pl10:f1
;begin DIPSI-2
3 p6*3.556 ph23
  p6*4.556 ph25
  p6*3.222 ph23
  p6*3.167 ph25
  p6*0.333 ph23
  p6*2.722 ph25
  p6*4.167 ph23
  p6*2.944 ph25
  p6*4.111 ph23

  p6*3.556 ph25
  p6*4.556 ph23
  p6*3.222 ph25
  p6*3.167 ph23
  p6*0.333 ph25
  p6*2.722 ph23
  p6*4.167 ph25
  p6*2.944 ph23
  p6*4.111 ph25

  p6*3.556 ph25
  p6*4.556 ph23
  p6*3.222 ph25
  p6*3.167 ph23
  p6*0.333 ph25
  p6*2.722 ph23
  p6*4.167 ph25
  p6*2.944 ph23
  p6*4.111 ph25

  p6*3.556 ph23
  p6*4.556 ph25
  p6*3.222 ph23
  p6*3.167 ph25
  p6*0.333 ph23
```

```

p6*2.722 ph25
p6*4.167 ph23
p6*2.944 ph25
p6*4.111 ph23
lo to 3 times l1
;end DIPSI-2
4u
p16:gp4
d16 p10:f1 p10:f2
4 (p21:sp21 ph1):f1
DELTA1
(p22:sp22 ph1):f1 (p22:sp23 ph1):f2
DELTA2 p11:f1
(ralign (p1 ph2):f1 (p21:sp24 ph4):f2)
DELTA3
(p22:sp23 ph4):f2
DELTA4 p10:f1
d0*0.5
(p22:sp22 ph5):f1
d0*0.5
;BIRD_d
(p23:sp26 ph1):f1
d4*2 p11:f1
(center (p2 ph1):f1 (p22:sp23 ph1):f2)
d4*2 p10:f1
(p23:sp26 ph1):f1
(p22:sp23 ph1):f2
d0*0.5
(p22:sp22 ph15):f1
d0*0.5
p16:gp1*EA*0.5
d16
(p22:sp23 ph14):f2
p16:gp1*EA*0.5*-1
d16
DELTA5
(p21:sp25 ph3):f2
DELTA6
(p22:sp22 ph1):f1 (p22:sp23 ph6):f2
p16:gp2
d16 p112:f2 p11:f1

```

```

DELTA7 BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2
d1 do:f2 mc #0 to 2
    F1EA(calgrad(EA), caldel(d0, +in0) & calph(ph3, +180)
        & calph(ph6, +180) & calph(ph31, +180))
exit

#ifdef NOPHASECYCLE
ph1=0
ph2=1
ph3=0
ph4=0
ph14=2
ph6=0
ph23=3
ph25=1
ph31=0
#else
ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4=0 0 0 0 2 2 2 2
ph5=0 0 2 2
ph15=2 2 0 0
ph14=2 2 2 2 0 0 0 0
ph6=0
ph23=3
ph25=1
ph31=0 2 0 2 2 0 2 0
#endif /*nophasecycle*/

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p110 : f1 channel - power level for mixing sequence
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p6 : f1 channel - 90 degree pulse for mixing sequence
;p16: homospoil/gradient pulse

;p21 : 550u

```

```

;p22 : 600u
;p23 : 200u

;spnam21 : jc01_BEBOP_zx_550u_BW10_RF20_pm20_Hc0.99997119.pul
;spnam22 : jc02_BURBOP_x_600u_BW10_RF20_pm20_matched.pul
;spnam23 : jc03_BIBOP_600u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam24 : jc05_BEBOP_zy_550u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam25 : jc09_BEBOP_-yz_550u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam26 : jc20_BURBOP_x90.0deg_200u_BW10_RF20_pm20_Hc0.999855.pul
;sp21 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp22 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp26 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp23 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp24 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp25 : 10 kHz Rf Amplitude

;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d3 : reduced d4
;use the same value for d3 as in the conventional ASAP-HSQC experiment.
;The pulse program will calculate the correct value for d3
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;cnst2: = J(XH)
;cnst1: reduced cnst2 ('ernst angle')
;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

;use gradient ratio: gp 1 : gp 2 : gp 3 : gp 4
; 80 : 20.1 : 33 : 43 for C-13

;for z-only gradients:
;gpz1: 80%

```

```
;gpz2: 20.1% for C-13  
;gpz3: 33% ; gradient before mixing  
;gpz4: 43% ; gradient after mixing
```

```
;use gradient files:
```

```
;gpnam1: SMSQ10.100  
;gpnam2: SMSQ10.100  
;gpnam3: SMSQ10.100  
;gpnam4: SMSQ10.100
```

```
;$Id: asap!hsqcetgp_sp,v 1.5.2.1 2011/02/24 17:27:48 ber Exp $
```

6.1.8 LowCost-ASAP-HSQC mit empfindlichkeitserhöhtem Rücktransfer

```

;ASAP LowCost HSQC with SI
;avance-version (09/04/17)
;ASAP!HSQC
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
;with decoupling during acquisition
;with DIPSI mixing after acquisition for ASAP
;with sensitivity improved back transfer
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

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

"d3=1s/(cnst1*4)" ; reduced INEPT delay (1st transfer)
"d4=1s/(cnst1*cnst3)"
"d11=30m"
"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"d0=3u"
"in0=inf1/2"

"acqt0=0"

"DELTA6=d3+(p30-p1)*0.5"
"DELTA1=d3-p22*0.5"
"DELTA2=d3+p22*0.5"
"DELTA3=d0+p22*0.5"
"DELTA4=p16+d16+d0+p22*0.5"
"DELTA5=d3-(p30-p1)*0.5"
"DELTA6=d3+(p30-p1)*0.5"
"DELTA7=p16+d16+de+10u-p1*2/PI"
"FACTOR1=(d9/(p6*115.112))/2" ;DISPI parameters

```

"11=FACTOR1*2"

```

1 ze
  d11 pl12:f2
2 d1 do:f2
  4u UNBLKGRAD
  p16:gp3
  d16 pl10:f1
;begin DIPSI-2
3 p6*3.556 ph23
  p6*4.556 ph25
  p6*3.222 ph23
  p6*3.167 ph25
  p6*0.333 ph23
  p6*2.722 ph25
  p6*4.167 ph23
  p6*2.944 ph25
  p6*4.111 ph23

  p6*3.556 ph25
  p6*4.556 ph23
  p6*3.222 ph25
  p6*3.167 ph23
  p6*0.333 ph25
  p6*2.722 ph23
  p6*4.167 ph25
  p6*2.944 ph23
  p6*4.111 ph25

  p6*3.556 ph25
  p6*4.556 ph23
  p6*3.222 ph25
  p6*3.167 ph23
  p6*0.333 ph25
  p6*2.722 ph23
  p6*4.167 ph25
  p6*2.944 ph23
  p6*4.111 ph25

  p6*3.556 ph23
  p6*4.556 ph25

```

```

p6*3.222 ph23
p6*3.167 ph25
p6*0.333 ph23
p6*2.722 ph25
p6*4.167 ph23
p6*2.944 ph25
p6*4.111 ph23
lo to 3 times l1
;end DIPSI-2
4u
p16:gp4
d16 p10:f1 p10:f2

;inept, reduced delay
4 (p21:sp21 ph1):f1
d3
(p22:sp22 ph2):f1 (p22:sp23 ph1):f2
d3 p11:f1
(lalign (p1 ph2):f1 (p22:sp23 ph1):f2)
DELTA1 p10:f1
(p22:sp22 ph2):f1 (p22:sp23 ph1):f2
DELTA2
(p23:sp26 ph1):f1
d3
(p22:sp22 ph2):f1 (p22:sp23 ph6):f2
d3 p11:f1
(lalign (p1 ph9):f1 (p21:sp24 ph3):f2)
;coherence pathway selection 1
;t1
DELTA3 p10:f1
(p22:sp23 ph4):f2
d0
(p22:sp22 ph5):f1
d0
;coherence pathway selection 2
p16:gp1*EA
d16
(p22:sp23 ph7):f2
DELTA4 p11:f1
;inept
(ralign (p1 ph1):f1 (p30:sp30 ph8):f2)

```

```

d4 pl2:f2
(center (p2 ph2):f1 (p4 ph1):f2)
d4 pl0:f2
(lalign (p1 ph2):f1 (p30:sp30 ph10):f2)
DELTA5 pl0:f1
(p22:sp22 ph2):f1 (p22:sp23 ph1):f2
DELTA6
(p22:sp29 ph1):f1
  DELTA7
(p22:sp22 ph1):f1
p16:gp2
d16 pl12:f2
10u BLKGRAD
;acquisition
go=2 ph31 cpd2:f2
d1 do:f2 mc #0 to 2
F1EA(calgrad(EA) & calph(ph10, +180), caldel(d0, +in0)
& calph(ph6, +180)& calph(ph3, +180) & calph(ph31, +180))
exit

ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4=1 1 3 3
ph5=2 2 0 0
ph6=0
ph7=3 3 1 1
ph8=0 0 2 2
ph9=2
ph10=3 3 1 1
ph23=3
ph25=1
ph31=0 2 2 0

;p10 : 0W
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p110 : f1 channel - power level for mixing sequence (DIPSI-2)
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse

```

```

;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p6 : f1 channel - 90 degree pulse for mixing sequence (DIPSI-2)
;p21 : 550u
;p22 : 600u
;p23 : 200u
;p30 : 750u
;p16: homospoil/gradient pulse
;spnam21 : jc01_BEBOP_zx_550u_BW10_RF20_pm20_Hc0.99997119.pul
;spnam22 : jc02_BURBOP_x_600u_BW10_RF20_pm20_matched.pul
;spnam26 : jc20_BURBOP_x90.0deg_200u_BW10_RF20_pm20_Hc0.999855.pul
;spnam29 : BUBI90_BURBOP_90x_600u_BW10_RF20_pm10_matched.bruker
;spnam23 : jc03_BIBOP_600u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam24 : jc05_BEBOP_zy_550u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam30 : si14_UR0_90deg_750u_BW37.5_RF10_pm5_0.999485.bruker
;sp21 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp22 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp26 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp29 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp23 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp24 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp30 : 10 kHz Rf Amplitude
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d9 : TOCSY mixing time
;d3 : 1/(4J)XH
;d4 : 1/(8J)XH for all multiplicities
; 1/(4J)XH for XH
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery [200ms]
;cnst4: = J(XH)
;cnst3: 8 for all multiplicities
; 4 for 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

;use gradient ratio:      gp 1 : gp 2 : gp 3
;                          80   : 20.1  : 33   : 43

;for z-only gradients:
;gpz1: 80%
;gpz2: 20.1%
;gpz3: 33% ; gradient before mixing
;gpz4: 43% ; gradient after mixing
;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.100
;gpnam2: SMSQ10.100
;gpnam3: SMSQ10.100
```

6.1.9 BIRD^r-LowCost-ASAP-HSQC mit empfindlichkeitsoptimiertem Rücktransfer

```

;LowCost-ASAP-HSQC with SI and BIRDr Filter during t1
;avance-version (09/04/17)
;ASAP!HSQC
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
;with decoupling during acquisition
;with DIPSI mixing after acquisition for ASAP
;with sensitivity improved back transfer
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

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

"d3=1s/(cnst1*4)" ; reduced INEPT delay (1st transfer)
"d4=1s/(cnst1*cnst3)"
"d11=30m"
"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"d0=3u"
"in0=inf1/2"
"acqt0=0"
"DELTA6=d3+(p30-p1)*0.5"
"DELTA1=d3-p22*0.5"
"DELTA2=d3+p22*0.5"
"DELTA4=p16+d16+d0*2+8u"
"DELTA5=d3-(p30-p1)*0.5"
"DELTA6=d3+(p30-p1)*0.5"
"DELTA7=p16+d16+de+10u-p1*2/PI"
"FACTOR1=(d9/(p6*115.112))/2" ;DISPI parameters
"l1=FACTOR1*2"

1 ze
d11 p112:f2

```

```
2 d1 do:f2
  4u UNBLKGRAD
  p16:gp3
  d16 pl10:f1
;begin DIPSI-2
3 p6*3.556 ph23
  p6*4.556 ph25
  p6*3.222 ph23
  p6*3.167 ph25
  p6*0.333 ph23
  p6*2.722 ph25
  p6*4.167 ph23
  p6*2.944 ph25
  p6*4.111 ph23

  p6*3.556 ph25
  p6*4.556 ph23
  p6*3.222 ph25
  p6*3.167 ph23
  p6*0.333 ph25
  p6*2.722 ph23
  p6*4.167 ph25
  p6*2.944 ph23
  p6*4.111 ph25

  p6*3.556 ph25
  p6*4.556 ph23
  p6*3.222 ph25
  p6*3.167 ph23
  p6*0.333 ph25
  p6*2.722 ph23
  p6*4.167 ph25
  p6*2.944 ph23
  p6*4.111 ph25

  p6*3.556 ph23
  p6*4.556 ph25
  p6*3.222 ph23
  p6*3.167 ph25
  p6*0.333 ph23
  p6*2.722 ph25
```

```

p6*4.167 ph23
p6*2.944 ph25
p6*4.111 ph23
lo to 3 times l1
;end DIPSI-2
4u
p16:gp4
d16 p10:f1 p10:f2
4 (p21:sp21 ph1):f1
d3
(p22:sp22 ph2):f1 (p22:sp23 ph1):f2
d3 p11:f1
(lalign (p1 ph2):f1 (p22:sp23 ph1):f2)
DELTA1 p10:f1
(p22:sp22 ph2):f1 (p22:sp23 ph1):f2
DELTA2
(p23:sp26 ph1):f1
d3
(p22:sp22 ph2):f1 (p22:sp23 ph6):f2
d3 p11:f1
(lalign (p1 ph9):f1 (p21:sp24 ph3):f2)
4u p10:f1
d0
;BIRD_r
(p23:sp26 ph1):f1
d3*2 p11:f1
(center (p2 ph1):f1 (p25:sp25 ph23):f2)
d3*2 p10:f1
(p23:sp26 ph9):f1
(p22:sp23 ph1):f2
d0
4u
p16:gp1*EA
d16
(p22:sp23 ph7):f2
DELTA4 p11:f1
(ralign (p1 ph1):f1 (p30:sp30 ph8):f2)
d4 p12:f2
(center (p2 ph2):f1 (p4 ph1):f2)
d4 p10:f2
(lalign (p1 ph2):f1 (p30:sp30 ph10):f2)

```

```

DELTA5 pl0:f1
(p22:sp22 ph2):f1 (p22:sp23 ph1):f2
DELTA6
(p22:sp29 ph1):f1
  DELTA7
(p22:sp22 ph1):f1
p16:gp2
d16 pl12:f2
10u BLKGRAD
;acquisition
go=2 ph31 cpd2:f2
d1 do:f2 mc #0 to 2
F1EA(calgrad(EA) & calph(ph10, +180), caldel(d0, +in0)
& calph(ph6, +180) & calph(ph3, +180) & calph(ph31, +180))
exit

ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4=1 1 3 3
ph5=2 2 0 0
ph6=0
ph7=3 3 1 1
ph8=0 0 2 2
ph9=2
ph10=3 3 1 1
ph23=3
ph25=1
ph31=0 2 2 0

;p10 : 0W
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p110 : f1 channel - power level for mixing sequence (DIPSI-2)
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p6 : f1 channel - 90 degree pulse for mixing sequence (DIPSI-2)
;p21 : 550u
;p22 : 600u

```

```

;p23 : 200u
;p25 : 1100u
;p30 : 750u
;p16: homospoil/gradient pulse
;spnam21 : jc01_BEBOP_zx_550u_BW10_RF20_pm20_Hc0.99997119.pul
;spnam22 : jc02_BURBOP_x_600u_BW10_RF20_pm20_matched.pul
;spnam26 : jc20_BURBOP_x90.0deg_200u_BW10_RF20_pm20_Hc0.999855.pul
;spnam29 : BUBI90_BURBOP_90x_600u_BW10_RF20_pm10_matched.bruker
;spnam23 : jc03_BIBOP_600u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam24 : jc05_BEBOP_zy_550u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam25 : jc07_BURBOP_y_1100u_BW37.5_RF10_pm5_Hc0.999876221.pul
;spnam30 : si14_UR0_90deg_750u_BW37.5_RF10_pm5_0.999485.bruker
;sp21 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp22 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp26 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp29 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp23 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp24 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp25 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp30 : 10 kHz Rf Amplitude
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d9 : TOCSY mixing time
;d3 : 1/(4J)XH
;d4 : 1/(8J)XH for all multiplicities
; 1/(4J)XH for XH
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery [200ms]
;cnst4: = J(XH)
;cnst3: 8 for all multiplicities
; 4 for 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

```

```
;use gradient ratio:    gp 1 : gp 2 : gp 3 : gp4  
;                        80   : 20.1   : 33   : 43
```

```
;for z-only gradients:  
;gpz1: 80%  
;gpz2: 20.1%  
;gpz3: 33% ; gradient before mixing  
;gpz3: 43% ; gradient after mixing  
;use gradient files :  
;gpnam1: SMSQ10.100  
;gpnam2: SMSQ10.100  
;gpnam3: SMSQ10.100  
;gpnam4: SMSQ10.100
```

6.1.10 LowCost-ASAP-HSQC-TOCSY mit empfindlichkeitsoptimiertem Rücktransfer

```

;LowCost-ASAP-HSQC-TOCSY with SI
;avance-version (09/04/17)
;2D H-1/X correlation
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
;with decoupling during acquisition
;with DIPSI-2 mixing
;with sensitivity improved back transfer
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

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

"d3=1s/(cnst1*4)"
"d4=1s/(cnst1*cnst3)"
"d11=30m"
"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"d0=3u"
"in0=inf1/2"

"acqt0=0"

"DELTA1=d3-p22*0.5"
"DELTA2=d3+p22*0.5"
"DELTA3=d0+p22*0.5"
"DELTA4=p16+d16+d0+p22*0.5"
"DELTA5=d3-(p30-p1)*0.5"
"DELTA6=d3+(p30-p1)*0.5"
"DELTA7=p16+d16+de+10u-p1*2/PI"
"FACTOR1=(d9/(p6*115.112))/2" ;DISPI parameters
"l1=FACTOR1*2"

1 ze

```

```

    d11 pl12:f2
2 d1 do:f2
    4u UNBLKGRAD
    p16:gp3
    d16 pl0:f1 pl0:f2
3 (p21:sp21 ph1):f1
    d3
    (p22:sp22 ph2):f1 (p22:sp23 ph1):f2
    d3 pl1:f1
    (lalign (p1 ph2):f1 (p22:sp23 ph1):f2)
    DELTA1 pl0:f1
    (p22:sp22 ph2):f1 (p22:sp23 ph1):f2
    DELTA2
    (p23:sp26 ph1):f1
    d3
    (p22:sp22 ph2):f1 (p22:sp23 ph6):f2
    d3 pl1:f1
    (lalign (p1 ph9):f1 (p21:sp24 ph3):f2)
    DELTA3 pl0:f1
    (p22:sp23 ph4):f2
    d0
    (p22:sp22 ph5):f1
    d0
    p16:gp1*EA
    d16
    (p22:sp23 ph7):f2
    DELTA4 pl1:f1
    (ralign (p1 ph1):f1 (p30:sp30 ph8):f2)
    d4 pl2:f2
    (lalign (p2 ph2):f1 (p4 ph1):f2)
    d4 pl0:f2
    (lalign (p1 ph2):f1 (p30:sp30 ph10):f2)
    DELTA5 pl0:f1
    (p22:sp22 ph2):f1 (p22:sp23 ph1):f2
    DELTA6
    (p22:sp29 ph1):f1
    4u pl10:f1
;begin DIPSI-2
4 p6*3.556 ph23
    p6*4.556 ph25
    p6*3.222 ph23

```

p6*3.167 ph25
p6*0.333 ph23
p6*2.722 ph25
p6*4.167 ph23
p6*2.944 ph25
p6*4.111 ph23

p6*3.556 ph25
p6*4.556 ph23
p6*3.222 ph25
p6*3.167 ph23
p6*0.333 ph25
p6*2.722 ph23
p6*4.167 ph25
p6*2.944 ph23
p6*4.111 ph25

p6*3.556 ph25
p6*4.556 ph23
p6*3.222 ph25
p6*3.167 ph23
p6*0.333 ph25
p6*2.722 ph23
p6*4.167 ph25
p6*2.944 ph23
p6*4.111 ph25

p6*3.556 ph23
p6*4.556 ph25
p6*3.222 ph23
p6*3.167 ph25
p6*0.333 ph23
p6*2.722 ph25
p6*4.167 ph23
p6*2.944 ph25
p6*4.111 ph23

lo to 4 times l1
;end DIPSI-2
DELTA7 p10:f1
(p22:sp22 ph1):f1
p16:gp2

```

d16 pl12:f2
10u BLKGRAD
;acquisition
go=2 ph31 cpd2:f2
d1 do:f2 mc #0 to 2
F1EA(calgrad(EA) & calph(ph10, +180), caldel(d0, +in0)
& calph(ph6, +180)& calph(ph3, +180) & calph(ph31, +180))
exit

ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4=1 1 3 3
ph5=2 2 0 0
ph6=0
ph7=3 3 1 1
ph8=0 0 2 2
ph9=2
ph10=3 3 1 1
ph23=3
ph25=1
ph31=0 2 2 0

;p10 : 0W
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p110 : f1 channel - power level for mixing sequence (DIPSI-2)
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p6 : f1 channel - 90 degree pulse for mixing sequence (DIPSI-2)
;p21 : 550u
;p22 : 600u
;p23 : 200u
;p30 : 750u
;p16: homospoil/gradient pulse
;spnam21 : jc01_BEBOp_zx_550u_BW10_RF20_pm20_Hc0.99997119.pul
;spnam22 : jc02_BURBOP_x_600u_BW10_RF20_pm20_matched.pul
;spnam26 : jc20_BURBOP_x90.0deg_200u_BW10_RF20_pm20_Hc0.999855.pul
;spnam29 : BUBI90_BURBOP_90x_600u_BW10_RF20_pm10_matched.bruker

```

```

;spnam23 : jc03_BIBOP_600u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam24 : jc05_BEBOP_zy_550u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam30 : si14_UR0_90deg_750u_BW37.5_RF10_pm5_0.999485.brucker
;sp21 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp22 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp26 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp29 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp23 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp24 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp30 : 10 kHz Rf Amplitude
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d9 : TOCSY mixing time
;d3 : 1/(4J)XH
;d4 : 1/(8J)XH for all multiplicities
;      1/(4J)XH for XH
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery [200ms]
;cnst4: = J(XH)
;cnst3: 8 for all multiplicities
;      4 for 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
;use gradient ratio: gp 1 : gp 2 : gp 3
;                      80 : 20.1 : 33
;for z-only gradients:
;gpz1: 80%
;gpz2: 20.1%
;gpz3: 33% ; gradient after d1
;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.100
;gpnam2: SMSQ10.100
;gpnam3: SMSQ10.100

```

6.1.11 CT-LowCost-ASAP-HSQC mit empfindlichkeitserhöhtem Rücktransfer

```
;CT-LowCost-ASAP-HSQC with SI
;avance-version (09/04/17)
;Constant Time HSQC
;2D H-1/X correlation
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
;with decoupling during acquisition
;with DIPSI mixing after acquisition for ASAP
;with sensitivity improved back transfer
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
```

```
#include <Avance.incl>
```

```
#include <Grad.incl>
```

```
#include <Delay.incl>
```

```
"d3=1s/(cnst1*4)"
```

```
"d4=1s/(cnst1*cnst3)"
```

```
"d11=30m"
```

```
"p2=p1*2"
```

```
"p4=p3*2"
```

```
"d0=3u"
```

```
"d30=d23*0.5-p22-p16-d16-d0-p25*0.5"
```

```
"in0=inf1/2"
```

```
"in30=in0"
```

```
"acqt0=0"
```

```
"DELTA=d0"
```

```
"DELTA1=d3-p22*0.5"
```

```
"DELTA2=d3+p22*0.5"
```

```
"DELTA3=p16+d16"
```

```
"DELTA4=d23*0.5-p22-p16-d16-d0-p25*0.5"
```

```
"DELTA5=d3-(p30-p1)*0.5"
```

```
"DELTA6=d3+(p30-p1)*0.5"
```

```
"DELTA7=p16+d16+de+10u-p1*2/PI"
```

```
"FACTOR1=(d9/(p6*115.112))/2" ;DISPI parameters
```

"11=FACTOR1*2"

```
1 ze
  d11 p112:f2
2 d1 do:f2
  4u UNBLKGRAD
  p16:gp3
  d16 p110:f1
;begin DIPSI-2
3 p6*3.556 ph23
  p6*4.556 ph25
  p6*3.222 ph23
  p6*3.167 ph25
  p6*0.333 ph23
  p6*2.722 ph25
  p6*4.167 ph23
  p6*2.944 ph25
  p6*4.111 ph23

  p6*3.556 ph25
  p6*4.556 ph23
  p6*3.222 ph25
  p6*3.167 ph23
  p6*0.333 ph25
  p6*2.722 ph23
  p6*4.167 ph25
  p6*2.944 ph23
  p6*4.111 ph25

  p6*3.556 ph25
  p6*4.556 ph23
  p6*3.222 ph25
  p6*3.167 ph23
  p6*0.333 ph25
  p6*2.722 ph23
  p6*4.167 ph25
  p6*2.944 ph23
  p6*4.111 ph25

  p6*3.556 ph23
  p6*4.556 ph25
```

```

p6*3.222 ph23
p6*3.167 ph25
p6*0.333 ph23
p6*2.722 ph25
p6*4.167 ph23
p6*2.944 ph25
p6*4.111 ph23
lo to 3 times l1
;end DIPSI-2
  4u
  p16:gp4
  d16 pl0:f1 pl0:f2
4 (p21:sp21 ph1):f1
  d3
  (p22:sp22 ph2):f1 (p22:sp23 ph1):f2
  d3 pl1:f1
  (lalign (p1 ph2):f1 (p22:sp23 ph1):f2)
DELTA1 pl0:f1
  (p22:sp22 ph2):f1 (p22:sp23 ph1):f2
DELTA2
  (p23:sp26 ph1):f1
  d3
  (p22:sp22 ph2):f1 (p22:sp23 ph6):f2
  d3 pl1:f1
  (lalign (p1 ph9):f1 (p21:sp24 ph3):f2)
DELTA3 pl0:f1
  d0
  (p22:sp22 ph4):f1
DELTA4
  (p25:sp25 ph8):f2
  d30
  (p22:sp22 ph7):f1
  p16:gp1*EA*-1
  d16
DELTA pl1:f1
  (ralign (p1 ph9):f1 (p30:sp30 ph8):f2)
  d4 pl2:f2
  (lalign (p2 ph2):f1 (p4 ph1):f2)
  d4 pl0:f2
  (lalign (p1 ph2):f1 (p30:sp30 ph10):f2)
DELTA5 pl0:f1

```

```

(p22:sp22 ph2):f1 (p22:sp23 ph1):f2
DELTA6
(p27:sp29 ph1):f1
  DELTA7
(p22:sp22 ph1):f1
p16:gp2
d16 p112:f2
10u BLKGRAD
;acquisition
go=2 ph31 cpd2:f2
d1 do:f2 mc #0 to 2
F1EA(calgrad(EA) & calph(ph10, +180), caldel(d0, +in0)
& caldel(d30, -in30) & calph(ph6, +180)
& calph(ph3, +180) & calph(ph31, +180))
exit

ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4=1 1 3 3
ph5=2 2 0 0
ph6=0
ph7=3 3 1 1
ph8=0 0 2 2
ph9=2
ph10=3 3 1 1
ph23=3
ph25=1
ph31=0 2 2 0

;p10 : 0W
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p110 : f1 channel - power level for mixing sequence (DIPSI-2)
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p6 : f1 channel - 90 degree pulse for mixing sequence (DIPSI-2)
;p21 : 550u
;p22 : 600u

```

```

;p23 : 200u
;p25 : 1100u
;p30 : 750u
;p16: homospoil/gradient pulse
;spnam21 : jc01_BEBOP_zx_550u_BW10_RF20_pm20_Hc0.99997119.pul
;spnam22 : jc02_BURBOP_x_600u_BW10_RF20_pm20_matched.pul
;spnam26 : jc20_BURBOP_x90.0deg_200u_BW10_RF20_pm20_Hc0.999855.pul
;spnam29 : BUBI90_BURBOP_90x_600u_BW10_RF20_pm10_matched.bruker
;spnam23 : jc03_BIBOP_600u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam24 : jc05_BEBOP_zy_550u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam25 : jc07_BURBOP_y_1100u_BW37.5_RF10_pm5_Hc0.999876221.pul
;spnam30 : si14_UR0_90deg_750u_BW37.5_RF10_pm5_0.999485.bruker
;sp21 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp22 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp26 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp29 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp23 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp24 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp25 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp30 : 10 kHz Rf Amplitude
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d30 : decremented delay
;d23 : constant time delay
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d9 : TOCSY mixing time
;d3 : 1/(4J)XH for XH
;d4 : 1/(8J)XH for all multiplicities
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery [200ms]
;cnst4: = J(XH)
;cnst3: 8 for all multiplicities
;          4 for 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

```

```
;use gradient ratio:      gp 1 : gp 2 : gp 3 : gp4
;                          80   : 20.1  : 33   : 43
;for z-only gradients:
;gpz1: 80%
;gpz2: 20.1%
;gpz3: 33% ; gradient before mixing
;gpz4: 43% ; gradient after mixing
;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.100
;gpnam2: SMSQ10.100
;gpnam3: SMSQ10.100
;gpnam4: SMSQ10.100
```

Literaturverzeichnis

- [1] H. Günther. *NMR-Spectroscopy*. Wiley-VCH, 1992.
- [2] J. Cavanagh, W.J. Fairbrother, A.G. Palmer III, and N.J. Skelton. *Protein NMR Spectroscopy*. Elsevier Academic Press, 2007.
- [3] J. H. F. Bothwell and J. L. Griffin. An introduction to biological nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biol. Rev.*, 86:493–510, 2011.
- [4] F. Lottspeich and J. W. Engels. *Bioanalytik*. Springer Spektrum, 2012.
- [5] T. D. W. Cladrige. *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*. Elsevier Science, 2008.
- [6] G. Topcu and A. Ulubelen. Structure elucidation of organic compounds from natural sources using 1D and 2D NMR techniques. *J. Mol. Struct.*, 834836:57 – 73, 2007.
- [7] D. Li, N. L. Owen, P. Perera, C. Andersson, L. Bohlin, P. A. Cox, R. J. Pugmire, C. L. Mayne, and D. M. Grant. Structure Elucidation of Three Triterpenoid Saponins from *Alphitonia zizyphoides* Using 2D NMR Techniques. *J. Nat. Prod.*, 57:218–224, 1994.
- [8] S. W. Englander and L. Mayne. Protein Folding Studied Using Hydrogen-Exchange Labeling and Two-Dimensional NMR. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 21:243–265, 1992.
- [9] T. E. Machonkin, W. M. Westler, and J. L. Markley. $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ 2D NMR: A Novel Strategy for the Study of Paramagnetic Proteins with Slow Electronic Relaxation Rates. *J. Am. Chem. Soc.*, 124:3204–3205, 2002.
- [10] W. P. Aue, E. Bartholdi, and R. R. Ernst. Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. *J. Chem. Phys.*, 64:2229–2246, 1976.
- [11] W. P. Aue, P. Bachmann, Wokaun A., and R. R. Ernst. Sensitivity of two-dimensional NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, 29:523 – 533, 1978.
- [12] A. F. Mehlkopf, D. Korbee, T. A. Tiggelman, and R. Freeman. Sources of t_1 noise in two-dimensional NMR. *J. Magn. Reson.*, 58:315 – 323, 1984.
- [13] G. A. Morris. Systematic sources of signal irreproducibility and t_1 noise in high-field NMR spectrometers. *J. Magn. Reson.*, 100:316 – 328, 1992.

- [14] P. Pelupessy. Adiabatic Single Scan Two-Dimensional NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 125:12345–12350, 2003.
- [15] P. Giraudeau and S. Akoka. Sensitivity losses and line shape modifications due to molecular diffusion in continuous encoding ultrafast 2D NMR experiments. *J. Magn. Reson.*, 195:9 – 16, 2008.
- [16] P. Giraudeau and S. Akoka. Sources of sensitivity losses in ultrafast 2D NMR. *J. Magn. Reson.*, 192:151 – 158, 2008.
- [17] P. Giraudeau and S. Akoka. Resolution and sensitivity aspects of ultrafast J-resolved 2D NMR spectra. *J. Magn. Reson.*, 190:339 – 345, 2008.
- [18] E. Lescop, P. Schanda, and B. Brutscher. A set of BEST triple-resonance experiments for time-optimized protein resonance assignment. *J. Magn. Reson.*, 187:163–169, 2007.
- [19] P. Schanda, H. Van Melckebeke, and B. Brutscher. Speeding up three-dimensional protein NMR experiments to a few minutes. *J. Am. Chem. Soc.*, 128:9042–9043, 2006.
- [20] J. Farjon, J. Boisbouvier, P. Schanda, A. Pardi, J-P. Simorre, and B. Brutscher. Longitudinal-relaxation-enhanced NMR experiments for the study of nucleic acids in solution. *J. Am. Chem. Soc.*, 131:8571–8577, 2009.
- [21] P. Schanda and B. Brutscher. Very fast two-dimensional NMR spectroscopy for real-time investigation of dynamic events in proteins on the time scale of seconds. *J. Am. Chem. Soc.*, 127:8014–8015, 2005.
- [22] P. Schanda, Ě. Kupĉe, and B. Brutscher. SOFAST-HMQC experiments for recording two-dimensional heteronuclear correlation spectra of proteins within seconds. *J. Biomol. NMR*, 33:199–211, 2005.
- [23] P. Schanda, V Forge, and B. Brutscher. HET-SOFAST NMR for fast detection of structural compactness and heterogeneity along polypeptide chains. *Magn. Reson. Chem.*, 44:177–184, 2006.
- [24] T. Kern, P. Schanda, and B. Brutscher. Sensitivity-enhanced IPAP-SOFAST-HMQC for fast pulsing 2D NMR with reduced radiofrequency load. *J. Magn. Reson.*, 190:333–338, 2008.
- [25] R. R. Ernst, G. Bodenhausen, and A. Wokaun. *Principles of nuclear magnetic resonance*. Oxford University Press, 1987.
- [26] L. Mueller. Alternate HMQC experiments for recording HN and HC-correlation spectra in proteins at high throughput. *J. Biomol. NMR*, 42:129–137, 2008.
- [27] Ě. Kupĉe and R. Freeman. Fast multidimensional NMR by polarization sharing. *Magn. Reson. Chem.*, 45:2–4, 2007.

- [28] G. Bodenhausen and D. J. Ruben. Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.*, 69:185–189, 1980.
- [29] A. Bax, M. Ikura, L. E. Kay, D. A. Torchia, and R. Tschudin. Comparison of different modes of two-dimensional reverse-correlation NMR for the study of proteins. *J. Magn. Reson.*, 86:304–318, 1990.
- [30] D. Marion. Fast acquisition of NMR spectra using Fourier transform of non-equispaced data. *J. Biomol. NMR*, 32:141–150, 2005.
- [31] H. S. Atreya and T. Szyperski. G-matrix Fourier transform NMR spectroscopy for complete protein resonance assignment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:9642–9647, 2004.
- [32] J. Mao, T. H. Mareci, K. N. Scott, and E. R. Andrew. Selective inversion radiofrequency pulses by optimal control. *J. Magn. Reson.*, 70:310 – 318, 1986.
- [33] D. Rosenfeld and Y. Zur. Design of adiabatic selective pulses using optimal control theory. *Magnetic Resonance in Medicine*, 36:401–409, 1996.
- [34] N. Khaneja, T. Reiss, C. Kehlet, T. Schulte-Herbrüggen, and S. J. Glaser. Optimal control of coupled spin dynamics: design of NMR pulse sequences by gradient ascent algorithms. *J. Magn. Reson.*, 172:296 – 305, 2005.
- [35] T. E. Skinner, T. O. Reiss, B. Luy, N. Khaneja, and S. J. Glaser. Application of optimal control theory to the design of broadband excitation pulses for high-resolution NMR. *J. Magn. Reson.*, 163:8 – 15, 2003.
- [36] T. E. Skinner, T. O. Reiss, B. Luy, N. Khaneja, and S. J. Glaser. Reducing the duration of broadband excitation pulses using optimal control with limited RF amplitude. *J. Magn. Reson.*, 167:68 – 74, 2004.
- [37] T. E. Skinner, T. O. Reiss, B. Luy, N. Khaneja, and S. J. Glaser. Tailoring the optimal control cost function to a desired output: application to minimizing phase errors in short broadband excitation pulses. *J. Magn. Reson.*, 172:17 – 23, 2005.
- [38] T. E. Skinner, K. Kobzar, B. Luy, M. R. Bendall, W. Bermel, N. Khaneja, and S. J. Glaser. Optimal control design of constant amplitude phase-modulated pulses: Application to calibration-free broadband excitation. *J. Magn. Reson.*, 179:241 – 249, 2006.
- [39] N. I. Gershenzon, K. Kobzar, B. Luy, S. J. Glaser, and T. E. Skinner. Optimal control design of excitation pulses that accommodate relaxation. *J. Magn. Reson.*, 188:330 – 336, 2007.
- [40] K. Kobzar, T.E. Skinner, N. Khaneja, S. Glaser, and B. Luy. Exploring the limits of broadband excitation and inversion pulses. *J. Magn. Reson.*, 170:236–243, 2004.

- [41] K. Kobzar, T.E. Skinner, N. Khaneja, S. Glaser, and B. Luy. Exploring the limits of broadband excitation and inversion: II. Rf-power optimized pulses. *J. Magn. Reson.*, 194:58–66, 2008.
- [42] T. W. Borneman, M. D. Hürlimann, and D. G. Cory. Application of optimal control to CPMG refocusing pulse design. *J. Magn. Reson.*, 207:220 – 233, 2010.
- [43] T. E. Skinner, N. I. Gershenson, M. Nimbalkar, W. Bermel, B. Luy, and S. J. Glaser. New strategies for designing robust universal rotation pulses: Application to broadband refocusing at low power. *J. Magn. Reson.*, 216:78 – 87, 2012.
- [44] M. Nimbalkar, B. Luy, T. E. Skinner, J. L. Neves, N. I. Gershenson, K. Kobzar, W. Bermel, and S. J. Glaser. The Fantastic Four: A plug n play set of optimal control pulses for enhancing NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, 228:16 – 31, 2013.
- [45] B. Luy, K. Kobzar, T. E. Skinner, N. Khaneja, and S. J. Glaser. Construction of universal rotations from point-to-point transformations. *J. Magn. Reson.*, 176:179 – 186, 2005.
- [46] K. Kobzar, S. Ehni, T.E. Skinner, S. J. Glaser, and B. Luy. Exploring the limits of broadband 90 and 180 universal rotation pulses. *J. Magn. Reson.*, 225:142–160, 2012.
- [47] B. Luy, K. Kobzar, S. Knör, J. Furrer, D. Heckmann, and H. Kessler. Orientational Properties of Stretched Polystyrene Gels in Organic Solvents and the Suppression of Their Residual ^1H NMR Signals. *J. Am. Chem. Soc.*, 127:6459–6465, 2005.
- [48] N. I. Gershenson, T. E. Skinner, B. Brutscher, N. Khaneja, M. Nimbalkar, B. Luy, and S. J. Glaser. Linear phase slope in pulse design: Application to coherence transfer. *J. Magn. Reson.*, 192:235 – 243, 2008.
- [49] S. Ehni and B. Luy. A systematic approach for optimizing the robustness of pulse sequence elements with respect to couplings, offsets, and B_1 -field inhomogeneities (COB). *Magn. Reson. Chem.*, 50:63–72, 2012.
- [50] S. Ehni and B. Luy. BEBE and BUBI: J-compensated concurrent shaped pulses for ^1H - ^{13}C experiments. *J. Magn. Reson.*, 232:7–17, 2013.
- [51] S. Ehni and B. Luy. Robust INEPT and refocused INEPT transfer with compensation of a wide range of couplings, offsets, and B_1 -field inhomogeneities (COB3). *J. Magn. Reson.*, 247:111 – 117, 2014.
- [52] M. Braun and S. J. Glaser. Cooperative pulses. *J. Magn. Reson.*, 207:114 – 123, 2010.
- [53] M. Braun and S. J. Glaser. Concurrently optimized cooperative pulses in robust quantum control: application to broadband Ramsey-type pulse sequence elements. *New J. Phys.*, 16:115002, 2014.

- [54] P. Tzvetkova, S. Simova, and B. Luy. P.E.HSQC: A simple experiment for simultaneous and sign-sensitive measurement of ($^1J_{CH} + D_{CH}$) and ($^2J_{HH} + D_{HH}$) couplings. *J. Magn. Reson.*, 186:193 – 200, 2007.
- [55] 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.*, 239:110 – 120, 2014.
- [56] D. Schulze-Sünninghausen, J. Becker, and B. Luy. Rapid Heteronuclear Single Quantum Correlation NMR Spectra at Natural Abundance. *J. Am. Chem. Soc.*, 136:1242–1245, 2014.
- [57] D. Intelmann, G. Kummerlöwe, G. Haseleu, N. Desmer, K. Schulze, R. Fröhlich, O. Frank, B. Luy, and T. Hofmann. Structures of Storage-Induced Transformation Products of the Beers Bitter Principles, Revealed by Sophisticated NMR Spectroscopic and LCMS Techniques. *Chem. Eur. J.*, 15:13047–13058, 2009.
- [58] L. Jin and D. Uhrin. ^{13}C -detected IPAP-INADEQUATE for simultaneous measurement of one-bond and long-range scalar or residual dipolar coupling constants. *Magn. Reson. Chem.*, 45:628–633, 2007.
- [59] 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.*, 192:314 – 322, 2008.
- [60] M. R. M. Koos, H. Feyrer, and B. Luy. Broadband excitation pulses with variable RF amplitude-dependent flip angle (RADFA). *Magn. Reson. Chem.*, 53:886–893, 2015.
- [61] J. Becker and B. Luy. CLIPASAP-HSQC for fast and accurate extraction of one-bond couplings from isotropic and partially aligned molecules. *Magn. Reson. Chem.*, 53:878–885, 2015.
- [62] G. Bodenhausen, H. Kogler, and R. Ernst. Selection of Coherence-Transfer Pathways in NMR pulse experiments. *J. Magn. Reson.*, 58:370–388, 1984.
- [63] G. Kontaxis, J. Stonehouse, E.D. Laue, and J. Keeler. The Sensitivity of Experiments which use Gradient Pulses for Coherenc-Pathway Selection. *J. Magn. Reson. Ser. A*, 111:70–76, 1994.
- [64] J. Keeler. *Understanding NMR spectroscopy*. Wiley-VCH, 2010.
- [65] E. O. Stejskal and J. E. Tanner. Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time Dependent Field Gradient. *J. Chem. Phys.*, 42:288–292, 1965.
- [66] A. Bax, R. H. Griffey, and B. L. Hawkins. Correlation of proton and nitrogen-15 chemical shifts by multiple quantum NMR. *J. Magn. Reson.*, 55:301 – 315, 1983.

- [67] A. J. Shaka, P. B. Baker, and R. Freeman. Computer-optimized decoupling scheme for wideband applications and low-level operation. *J. Magn. Reson.*, 64:547–552, 1985.
- [68] G. A. Morris and R. Freeman. Enhancement of nuclear magnetic resonance signals by polarization transfer. *J. Am. Chem. Soc.*, 101:760–762, 1979.
- [69] J.-M. Böhlen, I. Burghardt, M. Rey, and G. Bodenhausen. Frequency-modulated "chirp" pulses for broadband inversion recovery in magnetic resonance. *J. Magn. Reson.*, 90:183–191, 1990.
- [70] A. Bax and M. F. Summers. Proton and carbon-13 assignments from sensitivity-enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple quantum NMR. *J. Am. Chem. Soc.*, 108:2093–2094, 1986.
- [71] 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.*, 93:151 – 170, 1991.
- [72] L. E. Kay, P. Keifer, and T. Saarinen. Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity. *J. Am. Chem. Soc.*, 114:10663–10665, 1992.
- [73] J. Schleucher, M. Schwendinger, M. Sattler, P. Schmidt, O. Schedletzky, S. J. Glaser, O. W. Sørensen, and C. Griesinger. A general enhancement scheme in heteronuclear multidimensional NMR employing pulsed field gradients. *J. Biomol. NMR*, 4:301–306, 1994.
- [74] M. R. Bendall, D. M. Doddrell, and D. T. Pegg. Editing of carbon-13 NMR spectra. 1. A pulse sequence for the generation of subspectra. *J. Am. Chem. Soc.*, 103:4603–4605, 1981.
- [75] D. M. Doddrell, D. T. Pegg, and M. R. Bendall. Distortionless enhancement of NMR signals by polarization transfer. *J. Magn. Reson.*, 48:323 – 327, 1982.
- [76] L. Braunschweiler and R.R. Ernst. Coherence transfer by isotropic mixing: Application to proton correlation spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, 53:521–528, 1983.
- [77] L. Lerner and A. Bax. Sensitivity-enhanced two-dimensional heteronuclear relayed coherence transfer NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, 69:375 – 380, 1986.
- [78] V. V. Krishnamurthy. Sensitivity-Enhanced 3D HSQC-TOCSY Experiments. *J. Magn. Reson., Ser. B*, 106:170 – 177, 1995.
- [79] K. E. Kövér, V. J. Hruby, and D. Uhrín. Sensitivity- and Gradient-Enhanced Heteronuclear Coupled/Decoupled HSQC-TOCSY Experiments for Measuring Long-Range Heteronuclear Coupling Constants. *J. Magn. Reson.*, 129:125 – 129, 1997.

- [80] B. L. Marquez, W. H. Gerwick, and R. Thomas Williamson. Survey of NMR experiments for the determination of ${}^nJ(\text{C,H})$ heteronuclear coupling constants in small molecules. *Magn. Reson. Chem.*, 39:499–530, 2001.
- [81] W. Koźmiński. Simplified Multiplet Pattern HSQC-TOCSY Experiment for Accurate Determination of Long-Range Heteronuclear Coupling Constants. *J. Magn. Reson.*, 137:408 – 412, 1999.
- [82] S. R. Hartmann and E. L. Hahn. Nuclear double resonance in the rotating frame. *Phys. Rev.*, 128:2042–2053, 1962.
- [83] S. J. Glaser and J. J. Quant. *Advances in magnetic and optical resonance*. Academic Press, 1996.
- [84] M. Levitt and R. Freeman. Composite Pulse Decoupling. *J. Magn. Reson.*, 43:502–507, 1981.
- [85] J. R. Garbow, D. P. Weitekamp, and A. Pines. Bilinear rotation decoupling of homonuclear scalar interactions. *Chem. Phys. Lett.*, 93:504 – 509, 1982.
- [86] D. Uhrín, T. Liptaj, and K. E. Kövér. Modified BIRD Pulses and Design of Heteronuclear Pulse Sequences. *J. Magn. Reson., Ser. A*, 101:41 – 46, 1993.
- [87] K. Kazimierczuk and V. Y. Orekhov. Accelerated NMR Spectroscopy by Using Compressed Sensing. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50:5556–5559, 2011.
- [88] E. J. Candes, J. Romberg, and T. Tao. Robust uncertainty principles: Exact signal reconstruction from highly incomplete frequency information. *IEEE Trans. Inf. Theory*, 52:489–509, 2006.
- [89] S. Cai, C. Seu, Z. Kovacs, A. D. Sherry, and Y. Chen. Sensitivity Enhancement of Multidimensional NMR Experiments by Paramagnetic Relaxation Effects. *J. Am. Chem. Soc.*, 128:13474–13478, 2006.
- [90] P. Schanda and B. Brutscher. Very Fast Two-Dimensional NMR Spectroscopy for Real-Time Investigation of Dynamic Events in Proteins on the Time Scale of Seconds. *J. Am. Chem. Soc.*, 127:8014–8015, 2005.
- [91] Ě. Kupče and R. Freeman. Polychromatic selective pulses. *J. Magn. Reson., Ser. A*, 102:122–126, 1993.
- [92] Ě. Kupče, J. Boyd, and I. D. Campbell. Short selective pulses for biochemical applications. *J. Magn. Reson., Ser. B*, 106:300–303, 1995.
- [93] H. Geen and R. Freeman. Band-selective radiofrequency pulses. *J. Magn. Reson.*, 93:93–141, 1991.
- [94] Ě. Kupče and R. Freeman. Multiple Hartmann-Hahn coherence transfer in nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 114:10671–10672, 1992.

- [95] Ě. Kupĉe and R. Freeman. Adiabatic pulses for wideband inversion and broadband decoupling. *J. Magn. Reson., Ser. A*, 115:273–276, 1995.
- [96] Ě. Kupĉe and R. Freeman. An adaptable NMR broadband decoupling scheme. *Chem. Phys. Lett.*, 250:523–527, 1996.
- [97] Y. Shrot, B. Shapira, and L. Frydman. Ultrafast 2D NMR spectroscopy using a continuous spatial encoding of the spin interactions. *J. Magn. Reson.*, 171:163 – 170, 2004.
- [98] Y. Shrot and L. Frydman. Spatial/spectral encoding of the spin interactions in ultrafast multidimensional NMR. *J. Chem. Phys.*, 131:224516, 2009.
- [99] M. Deschamps and I. D. Campbell. Cooling overall spin temperature: Protein NMR experiments optimized for longitudinal relaxation effects. *J. Magn. Reson.*, 178:206 – 211, 2006.
- [100] Z. Starcuk and V. Sklenar. Composite pulse sequences with variable performance. *J. Magn. Reson.*, 62:113–122, 1985.
- [101] A. Ross, M. Salzmann, and H. Senn. Fast-HMQC using Ernst angle pulses: An efficient tool for screening of ligand binding to target proteins. *J. Biomol. NMR*, 10:389–396, 1997.
- [102] P. Guntert, N. Schaefer, G. Otting, and K. Wüthrich. POMA: A Complete Mathematica Implementation of the NMR Product-Operator Formalism. *J. Magn. Reson., Ser. A*, 101:103 – 105, 1993.
- [103] A. J. Shaka, C. J. Lee, and A. Pines. Iterative schemes for bilinear operators; Application to spin decoupling. *J. Magn. Reson.*, 77:274–293, 1988.
- [104] D. Marion and K. Wüthrich. Application of phase sensitive two-dimensional correlated spectroscopy (COSY) for measurements of ^1H - ^1H spin-spin constants in proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 113:967–974, 1983.
- [105] J. J. Led and H. Gesmar. Application of the linear prediction method to NMR spectroscopy. *Chem. Rev.*, 91:1413–1426, 1991.
- [106] E. Bartholdi and R. R. Ernst. Fourier spectroscopy and the causality principle. *J. Magn. Reson.*, 11:9 – 19, 1973.
- [107] J. C. Lindon and A. G. Ferrige. Digitisation and data processing in Fourier transform NMR. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 14:27 – 66, 1980.
- [108] O. W. S, G. W. Eich, M. H. Levitt, G. Bodenhausen, and R. R. Ernst. Product operator formalism for the description of NMR pulse experiments. *Prog. NMR. Spectrosc.*, 16:163–192, 1983.

- [109] J. Furrer, F. Kramer, J. P. Marino, S. J. Glaser, and B. Luy. Homonuclear Hartmann-Hahn transfer with reduced relaxation losses by use of the MOCCA-XY16 multiple pulse sequence. *J. Magn. Reson.*, 166:39–46, 2004.
- [110] I. C. Felli, R. Pierattelli, S. J. Glaser, and B. Luy. Relaxation-optimised Hartmann-Hahn transfer using a specifically tailored MOCCA-XY16 mixing sequence for carbonyl-carbonyl correlation spectroscopy in ^{13}C direct detection NMR experiments. *J. Biomol. NMR*, 43:187–196, 2009.
- [111] T. Carlomagno, B. Luy, and S. J. Glaser. "Kin"HEHAHA sequences, heteronuclear Hartmann-Hahn transfer with different bandwidths for Spin I and S. *J. Magn. Reson.*, 126:110–119, 1997.
- [112] K. F. Morris and C. S. Johnson Jr. Diffusion-ordered two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 114:3139–3141, 1992.
- [113] Kevin F. Morris and Charles S. Johnson Jr. Resolution of discrete and continuous molecular size distributions by means of diffusion-ordered 2D NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 115:4291–4299, 1993.
- [114] X.-a. Mao, J.-x. Guo, and C.-h. Ye. Nuclear-magnetic-resonance line-shape theory in the presence of radiation damping. *Phys. Rev. B*, 49:15702–15711, 1994.
- [115] X.-a. Mao, J.-x. Guo, and C.-h. Ye. Radiation damping effects on spinlattice relaxation time measurements. *Chem. Phys. Lett.*, 222:417 – 421, 1994.
- [116] X.-a. Mao and C.-h. Ye. Understanding radiation damping in a simple way. *Concepts Magn. Reson.*, 9:173–187, 1997.
- [117] A. Vlassenbroek, J. Jeener, and P. Broekaert. Radiation damping in high resolution liquid NMR: A simulation study. *J. Chem. Phys.*, 103:5886–5897, 1995.
- [118] V. Sklenar. Suppression of Radiation Damping in Multidimensional NMR Experiments Using Magnetic Field Gradients. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 114:132 – 135, 1995.
- [119] 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.*, 115:12593–12594, 1993.
- [120] J. Stonehouse, G. L. Shaw, J. Keeler, and E. D. Laue. Minimizing Sensitivity Losses in Gradient-Selected ^{15}N - ^1H HSQC Spectra of Proteins. *J. Magn. Reson., Ser. A*, 107:178 – 184, 1994.
- [121] 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*, 108:94 – 98, 1995.

- [122] G. A. Morris. Sensitivity enhancement in nitrogen-15 NMR: polarization transfer using the INEPT pulse sequence. *J. Am. Chem. Soc.*, 102:428–429, 1980.
- [123] G. A. Morris. Indirect measurement of proton relaxation rates by INEPT polarization transfer to carbon-13: Proton spin-lattice relaxation in cholesteryl acetate solutions. *J. Magn. Reson.*, 41:185 – 188, 1980.
- [124] D. P. Burum and R. R. Ernst. Net polarization transfer via a J-ordered state for signal enhancement of low-sensitivity nuclei. *J. Magn. Reson.*, 39:163 – 168, 1980.
- [125] 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 r module. *J. Magn. Reson.*, 163:340 – 346, 2003.
- [126] G. W. Vuister and A. Bax. Resolution enhancement and spectral editing of uniformly ^{13}C -enriched proteins by homonuclear broadband ^{13}C decoupling. *J. Magn. Reson.*, 98:428 – 435, 1992.
- [127] A. S. McLachlan, J. J. Richards, A. R. Bilia, and G. A. Morris. Constant time gradient HSQC*i*DOSY: practical aspects. *Magn. Reson. Chem.*, 47:1081–1085, 2009.
- [128] M. Urbańczyk, W. Koźmiński, and K. Kazimierczuk. Accelerating Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy by Joint Sparse Sampling of Diffusion and Time Dimensions. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53:6464–6467, 2014.

Danksagung

Ich danke allen, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben. Im Besonderen danke ich:

Herrn Professor Burkhard Luy, meinem Doktorvater, für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Gruppe durchführen zu können und für jegliche Hilfestellung und Unterstützung, sowie die interessante Themenvergabe.

Martin Koos für alle Diskussionen, Tipps und die Hilfe bei kleinen und großen Problemen.

Tony Reinsperger für alle hilfreichen und anregenden Gespräche und das bereitwillige Teilen seines Wissens.

Allen aktuellen und ehemaligen Arbeitskreismitgliedern für die sehr nette Aufnahme in die Gruppe und das gute Arbeitsklima.

Allen Kooperationspartnern für die produktive Zusammenarbeit.