

Historias de la RMN

Jorge Santoro

17. Espectroscopía bidimensional

Sin duda uno de los avances más importantes en RMN fue el desarrollo de la espectroscopía bidimensional durante los años 70 del siglo pasado. Jan Jeener, un físico belga que trabajaba en la Universidad Libre de Bruselas en temas de termodinámica de espín, se planteó el desarrollo de un método para determinar la matriz de relajación con objeto de estudiar la movilidad molecular en cristales líquidos. Pronto se dio cuenta de que, en el caso de descubrir una secuencia de pulsos adecuada, el resultado aparecería contaminado con la respuesta coherente originada por los pulsos de la secuencia. Se dedicó entonces a estudiar esa respuesta coherente con su alumno de doctorado Gerrit Alewaeters. El resultado de este estudio fue la secuencia de pulsos que más tarde se denominaría COSY, que, tras una doble transformada de Fourier, da lugar a espectros bidimensionales en los que aparecen señales de correlación entre espines acoplados escalarmente. Desarrollada la teoría faltaba la confirmación experimental. Jeener y Alewaeters intentaron el experimento con una muestra de etilbenceno con poco éxito. Las señales de correlación más intensas de las esperadas, si bien estaban presentes, apenas superaban el nivel del ruido en los mejores espectros. Eso le impedía demostrar la utilidad de su método. Jeener achacó posteriormente este "fracaso" a la inestabilidad del espectrómetro utilizado y a la poca práctica que tenía en espectroscopía de alta resolución, ya que hasta entonces su campo de investigación había sido la espectroscopía de RMN de sólidos. Consecuentemente, Jeener pospuso la publicación hasta que estuviera disponible una confirmación experimental más adecuada, pero empezó a diseminar su idea en algunas conferencias. A una de ellas, una escuela de verano AMPERE que tuvo lugar en Baško Polje (entonces perteneciente a Yugoslavia y actualmente a Croacia) en septiembre de 1971, asistió uno de los estudiantes de Richard Ernst, Thomas Baumann. Entre sus notas de la escuela estaba la de la conferencia de Jeener, que inmediatamente interesó a Ernst. Otro de los estudiantes de Ernst, Enrico Bartholdi, analizó cuidadosamente el experimento propuesto, que Ernst consideraba de gran interés. Ernst, sin embargo, no se planteó realizar de momento el experimento correspondiente. Años después explicaría que había dos razones para ello. En primer lugar, consideraba la espectroscopía 2D como propiedad de Jeener, por lo que prefería esperar a que éste publicara sus resultados. En segundo lugar, suponía que su equipo informático era demasiado limitado para el almacenamiento y procesado de datos bidimensionales. Ernst mantuvo durante un tiempo correspondencia con Jean Jeener sobre el experimento y éste incluso le envió un borrador incompleto de un artículo, que nunca llegó a ser enviado a publicar [puede consultarse un manuscrito preliminar e incompleto, que posiblemente coincida con el enviado a Ernst, así como el *abstract* de la conferencia de Jeener en Baško Polje, titulada *Pulse Pair Techniques in High Resolution NMR*, en la referencia (1)]. Durante unos años el paso "de las musas al teatro" estuvo encallado.

En 1973 Paul Lauterbur había propuesto un método de obtención de imágenes mediante RMN (2). El método se basaba en la obtención de espectros de un objeto en presencia de gradientes de campo magnético orientados en diversas direcciones espaciales, espectros que se podían considerar como una proyección del objeto en la dirección del gradiente. Mediante una retroproyección de los espectros resultaba posible reconstruir el objeto primitivo. Durante un congreso que tuvo lugar en abril de 1974 (*15th Experimental NMR Conference*), Ernst asistió a una

conferencia de Lauterbur sobre su método, bautizado como zeugmatografía. En sus experimentos Lauterbur todavía utilizaba espectros de onda continua. Ernst se dio cuenta de que trabajando en el dominio de tiempos era posible utilizar un análogo de la espectroscopía 2D de Jeener para obtener directamente la imagen del objeto. Desarrolló la teoría correspondiente y, tras obtener resultados experimentales aceptables, publicó su trabajo (3,4). Como consecuencia de este desarrollo Ernst retomó el tema de la espectroscopía 2D. El 10 de septiembre de 1974 obtuvo el espectro 2D del 1,1,2-tricloroetano usando la secuencia de dos pulsos de Jeener en un espectrómetro de 60 MHz (5). Sin embargo, su primera publicación en el tema (6), enviada un año después, no abordaba el experimento propuesto por Jeener. Se trataba de un experimento que daba lugar a un espectro 2D en el que en una dimensión aparece el espectro de ^{13}C desacoplado de protón y en la otra el espectro acoplado, un precursor de la espectroscopía J-resuelta. Poco después Ernst publicó un trabajo seminal sobre espectroscopía 2D (7). En él desarrolló la teoría básica de este tipo de espectroscopía, sugirió diversos esquemas experimentales, propuso varias aplicaciones, entre las que la más novedosa era la de la observación de transiciones de cuanto múltiple, y presentó resultados experimentales en sistemas sencillos. Incluso apuntó la posibilidad de extender la idea de la espectroscopía 2D a más dimensiones: *In a multidimensional extension of 2D spectroscopy, the system has to go through several evolution periods, each of which must be varied systematically in its length.*

En la siguiente publicación sobre el tema el grupo de Ernst introdujo la espectroscopía J-resuelta en el caso homonuclear (8). Poco después el grupo de Ray Freeman haría lo mismo para el caso heteronuclear (9), introduciendo dos posibles esquemas experimentales: *proton-flip* y *gated decoupler*. Paralelamente, John Waugh describió un experimento bidimensional en sólidos en el que separaba el acoplamiento dipolar y el desplazamiento químico (10).

El experimento COSY permitía correlacionar espines acoplados escalarmente del mismo tipo, correlación homonuclear. Maudsley y Ernst transformaron la técnica en heteronuclear sin más que sustituir el segundo pulso del COSY homonuclear por dos pulsos simultáneos aplicados a núcleos de distinto tipo (11). En el trabajo proponían comenzar con magnetización del núcleo de menor relación giromagnética excitada por el primer pulso (el ^{13}C en el caso experimental que presentaban) y detectar al final de la secuencia el de mayor relación giromagnética (el ^1H). La aplicación al caso ^{13}C - ^1H producía espectros en los que las señales aparecían desdobladas en ambas dimensiones por el acoplamiento escalar heteronuclear. Dicho desdoblamiento era en oposición de fase, lo que impedía utilizar técnicas de desacoplamiento que simplificaran el espectro 2D. Debido a ello diseñaron métodos que permitieran una transferencia neta de magnetización (12), basados tanto en la transferencia Hartmann-Hahn (13) como en la interrupción de la precesión mediante la aplicación de pulsos de 90° . En el trabajo, además, exponían la necesidad de plantearse cuál de las dos especies nucleares se observaba. Casi simultáneamente Bodenhausen y Freeman propusieron otro método para simplificar el espectro de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C (14) en el que partían de magnetización de protón y detectaban la de ^{13}C . La idea consistía en reducir el tamaño de los acoplamientos heteronucleares aplicando al ^{13}C un pulso de 180° desplazado respecto al centro del tiempo de evolución del protón, t_1 , y utilizando desacoplamiento de ^1H coherente (a frecuencia fija) durante la detección de ^{13}C . En la dimensión F_2 el acoplamiento se disminuía a un valor tal que, sin llegar a la cancelación de señales, no se resolviera el desdoblamiento en el espectro (por ejemplo, representando la parte imaginaria o el espectro de magnitud). En la dimensión F_1 la disminución de los acoplamientos no era tan drástica, de modo que el desdoblamiento debido a los acoplamientos

^1H - ^{13}C a un enlace seguía presente. Los acoplamientos ^1H - ^{13}C a varios enlaces, sin embargo, se reducían suficientemente como para que sus correlaciones desaparecieran por interferencia destructiva. En conjunto, con el método de Bodenhausen y Freeman, se conseguía una considerable simplificación del espectro. Sin embargo, ninguno de los procedimientos planteados resultaba suficientemente satisfactorio y la solución definitiva fue propuesta por Freeman y Morris (15) con un experimento que se impuso durante cierto tiempo y que pasó a ser conocido como HETCOR (HETeronuclear CORrelation). La solución consistía en centrar el pulso de 180° aplicado al ^{13}C en el periodo t_1 , con lo que la magnetización de ^1H evoluciona durante él exclusivamente con el desplazamiento químico, y flanquear la pareja de pulsos de 90° de la transferencia $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ con periodos de evolución libre. El primer periodo genera magnetización en oposición de fase, necesaria para la transferencia al heteronúcleo. Tras ésta, el segundo periodo reenfoca la magnetización. Posteriormente se incorporaría la aplicación de pulsos de 180° a ambos espines en el centro de esos dos periodos adicionales con objeto de eliminar la evolución del desplazamiento químico durante los mismos.

En los experimentos de correlación heteronuclear resulta conveniente, en general, detectar el spin de mayor constante giromagnética. De hecho, en las publicaciones de Maudsley y Ernst (11,12) la correlación ^{13}C - ^1H se obtenía con detección de protón. Eso, sin embargo, presentaba varios problemas. Por un lado, en el caso de ^{13}C en abundancia natural la eliminación de las señales de protones unidos a ^{12}C debía ser casi perfecta para que no aparecieran artefactos en el espectro. Por otro, las sondas comerciales que permitían efectuar los experimentos heteronucleares estaban diseñadas para la detección del heteronúcleo, con lo que resultaba difícil obtener buenos espectros de ^1H . Debido a ello el experimento HETCOR, en el que se detectaba el heteronúcleo (en la mayoría de los casos ^{13}C), se convirtió durante un tiempo en el experimento estándar.

En 1979 Luciano Müller puso de manifiesto que se podía incrementar la sensibilidad de los experimentos de correlación heteronuclear si el espín de mayor constante giromagnética era tanto el espín excitado al comienzo del experimento como el detectado al final del mismo (16). La secuencia de pulsos que diseñó a tal efecto partía de magnetización del spin I (^1H) a partir de la cual mediante una secuencia similar al INEPT, pero con diferentes relaciones de fase, se creaban coherencias heteronucleares de cuanto nulo y de cuanto doble en las que intervenía el spin S. Tras un periodo de evolución estas coherencias se transferían a magnetización del spin I para la observación. Demostró el método con una muestra de yoduro de metilo enriquecido en ^{13}C . En el caso de abundancia natural, sin embargo, para superar las dificultades que planteaban los protones unidos a ^{12}C propuso efectuar la última transferencia al spin S (^{13}C). En este caso la sensibilidad de los espectros era similar a la del experimento HETCOR, pero con una secuencia de pulsos más compleja, por lo que no se le prestó mucha atención. Sin embargo, su idea de excitar y detectar el espín de mayor constante giromagnética acabaría fructificando.

En los estudios de péptidos y proteínas los espectros de ^{15}N prometían ser de mucha utilidad. Sin embargo, el uso de experimentos tipo HETCOR resultaban poco prometedores debido al bajo valor de la constante giromagnética del ^{15}N , lo que los hacía muy poco sensibles. Para solventar esta dificultad Bodenhausen y Ruben (17) decidieron emplear la misma estrategia que había propuesto Müller, excitar y detectar el ^1H . El experimento que diseñaron, sin embargo, presentaba importantes diferencias. La secuencia comenzaba con un módulo INEPT para transferir magnetización del ^1H al ^{15}N en forma de coherencia de cuanto sencillo. Tras la evolución de ésta, lo que permitía determinar

su desplazamiento químico mediante espectroscopía bidimensional, la magnetización se devolvía al ^1H para su detección mediante un INEPT inverso. Tras el INEPT inverso se obtiene magnetización de ^1H en fase, por lo que resulta posible utilizar el desacoplamiento heteronuclear durante la detección. El experimento fue conocido inicialmente como Overbodenhausen, un nombre que acuñó Freeman para resaltar la idea de que la ganancia en sensibilidad es mucho mayor que la que proporciona el efecto Overhauser. Posteriormente pasó a denominarse HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*), en consonancia con el nombre HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*) que recibiría un experimento posterior.

Con el experimento HSQC no se conseguía fácilmente una eliminación suficiente de señales no deseadas, lo que en el caso de muestras disueltas en H_2O era un problema importante. Aunque la señal de agua puede eliminarse mediante una presaturación, en algunos casos, debido a procesos de intercambio, la presaturación eliminaba también señales deseadas. Bax, Griffey y Hawkins propusieron (18) una nueva secuencia de pulsos llamada correlación heteronuclear de cuanto múltiple, HMQC, con la que conseguían una mejor eliminación de las señales no deseadas al incluir un menor número de pulsos (en especial de pulsos de 180° aplicados al ^1H). La transferencia se lleva a cabo en la secuencia HMQC de un modo similar al método de Müller (16), pero con mayor eficiencia. Una ventaja adicional de la secuencia de pulsos derivaba del hecho de que incluye un único pulso de ^1H de 90° , el inicial, que puede ajustarse para que su perfil de excitación sea nulo a la frecuencia del agua del disolvente y, por lo tanto, proporcionar una muy buena supresión de su señal. Aunque diseñada inicialmente para la correlación ^{15}N - ^1H , la secuencia HMQC se empezó a aplicar también para correlacionar ^{13}C y ^1H . Debido a su simplicidad (solo incluye cuatro pulsos) HMQC fue durante bastante tiempo la secuencia preferida en el estudio de compuestos orgánicos. En el experimento HMQC durante el tiempo t_1 además del desplazamiento químico de ^{13}C evolucionan los acoplamientos ^1H - ^1H . Esto tiene como consecuencia que las señales de correlación presenten en la dimensión F1 una estructura de multiplete debida a los acoplamientos homonucleares. Además, la forma de línea en la dimensión F2 consiste en la superposición de componentes de absorción en fase y dispersivas en oposición de fase. Estos dos hechos ensanchan las señales y limitan la resolución alcanzable. Por ello el experimento HSQC, que no presenta esos problemas, se ha convertido en la técnica dominante ya que permite obtener espectros con mejor resolución. Además, las mejoras en la secuencia HSQC (tales como la inclusión de gradientes, el uso de pulsos de 180° compuestos o adiabáticos o el centrado de los pulsos de 180°) han eliminado los inconvenientes que presentaba inicialmente. La estructura de la secuencia HMQC, sin embargo, se mantiene en el experimento HMBC (19), que permite correlacionar protones con carbonos-13 situados a más de un enlace.

Además de los experimentos citados, durante los años 80 del siglo pasado se desarrollaron otros experimentos bidimensionales homonucleares fundamentales como el NOESY y el TOCSY, cuyo desarrollo merece una descripción independiente.

Uno de los problemas que planteaba la espectroscopía bidimensional en sus inicios era el de la forma de línea. En los espectros con modulación de la intensidad, con objeto de determinar el signo de la frecuencia en la dimensión indirecta, para cada tiempo de evolución t_1 se sumaban dos fids, una con modulación coseno y la otra con modulación seno, de modo que la modulación fuera con la fase ($\cos\omega t_1 + i \sin\omega t_1 = e^{i\omega t_1}$). Este modo de proceder daba lugar, tras la doble transformada de Fourier, a una forma de línea que es mezcla de absorción, $A(\omega)$, y de dispersión, $D(\omega)$, en ambas dimensiones: $[A(\omega_1)A(\omega_2)-D(\omega_1)D(\omega_2) + i[A(\omega_1)D(\omega_2)+D(\omega_1)A(\omega_2)]]$. Por ello, la forma habitual de

presentar los espectros era la forma denominada de magnitud, en la que se representa el módulo del complejo correspondiente. Esto tiene dos consecuencias indeseadas. Por un lado, se pierde la información del signo de la señal. Por otro, la señal muestra alas extensas que reducen grandemente la resolución alcanzable. Para superar estos problemas States, Haberkorn y Ruben propusieron un método de procesado capaz de determinar el signo de la frecuencia en la dimensión indirecta y proporcionar señales de absorción pura en ambas dimensiones (20). Su solución consistía en acumular independientemente las señales con modulación coseno y con modulación seno y combinarlas adecuadamente tras la transformada de Fourier en la dimensión directa. El método se conoce como States, SHR o transformada de Fourier hipercompleja. Posteriormente Marion y Wüthrich propusieron un método alternativo que permite obtener el mismo resultado (21). En este caso la idea consiste en incrementar la fase con la que se crea la coherencia que evoluciona durante t_1 en 90° con cada incremento de t_1 ($0^\circ, 90^\circ, 180^\circ, 270^\circ, 0^\circ, 90^\circ, \dots$). Con esta modificación la frecuencia de evolución aparente en la dimensión indirecta es la real más la cuarta parte de la anchura espectral determinada por el incremento de t_1 . Esto permite determinar el signo de las frecuencias, puesto que la imagen especular del espectro no solapa con éste. Por motivos obvios el procedimiento se conoce como TPPI (*Time Proportional Phase Incrementation*).

Espectro de magnitud: $\Delta t_1 = 1/SW$; Intervalo espectral $[-SW/2, SW/2]$	
a) fid-1	$\cos(\omega_1 t_1) \exp(-t_1/T_2) \exp(\omega_2 t_2) \exp(-t_2/T_2)$
b) fid-2	$i \sin(\omega_1 t_1) \exp(-t_1/T_2) \exp(\omega_2 t_2) \exp(-t_2/T_2)$
c) Suma	$[\cos(\omega_1 t_1) + i \sin(\omega_1 t_1)] \exp(-t_1/T_2) \exp(\omega_2 t_2) \exp(-t_2/T_2)$
d) $FT(\omega_1, \omega_2)$	$[A(\omega_1)A(\omega_2) - D(\omega_1)D(\omega_2)] + i [A(\omega_1)D(\omega_2) + D(\omega_1)A(\omega_2)]$
Cuadratura SHR: $\Delta t_1 = 1/SW$; Intervalo espectral $[-SW/2, SW/2]$	
a) fid-1	$\cos(\omega_1 t_1) \exp(-t_1/T_2) \exp(\omega_2 t_2) \exp(-t_2/T_2)$
b) $FT(\omega_2)$	$\cos(\omega_1 t_1) \exp(-t_1/T_2) [A(\omega_2) + i D(\omega_2)]$
c) fid-2	$\sin(\omega_1 t_1) \exp(-t_1/T_2) \exp(\omega_2 t_2) \exp(-t_2/T_2)$
d) $FT(\omega_2)$	$\sin(\omega_1 t_1) \exp(-t_1/T_2) [A(\omega_2) + i D(\omega_2)]$
e) $Re(b) + i Re(d)$	$[\cos(\omega_1 t_1) + i \sin(\omega_1 t_1)] \exp(-t_1/T_2) A(\omega_2)$
f) $FT(\omega_1)$	$A(\omega_1)A(\omega_2) + i D(\omega_1)A(\omega_2)$
Método TPPI: $\Delta t_1 = 1/(2SW)$; Intervalo espectral $[-SW, SW]$	
a) fid	$\cos[(\omega_1 + SW/2)t_1] \exp(-t_1/T_2) \exp(\omega_2 t_2) \exp(-t_2/T_2)$
b) $FT(\omega_2)$	$\cos[(\omega_1 + SW/2)t_1] \exp(-t_1/T_2) [A(\omega_2) + i D(\omega_2)]$
c) $Re(b)$	$\cos[(\omega_1 + SW/2)t_1] \exp(-t_1/T_2) A(\omega_2)$
d) $FT(\omega_1)$	$[A(\omega_1 + SW/2)A(\omega_2) + i D(\omega_1 + SW/2)] A(\omega_2)$ $+ [A(-\omega_1 - SW/2)A(\omega_2) + i D(-\omega_1 - SW/2)] A(\omega_2)$

En d) se ha tenido en cuenta que el número de valores de t_1 que contribuyen a la señal es el doble que en el caso SHR, por lo que se ha omitido el factor 1/2. Tras la transformada se descarta la mitad de frecuencias negativas (ω_1 está en el intervalo $[-SW/2, SW/2]$) y se reajusta la asignación de frecuencias de la otra mitad.

El salto a espectroscopía de más dimensiones, aunque sencillo desde el punto de vista teórico, estaba impedido por varios problemas. Por un lado, el tiempo experimental necesario. Por otro, limitaciones de tipo informático, dado el gran espacio de almacenamiento que precisan los espectros 3D y el elevado tiempo de cálculo que requerían los ordenadores de la década de 1980 para llevar a cabo las numerosas transformadas de Fourier necesarias. Por eso, la primera publicación de espectros 3D (22) utilizaba técnicas de excitación selectiva con objeto de reducir estos problemas. Los experimentos que proponían, COSY-COSY y COSY-NOESY, eran una combinación de dos

experimentos bidimensionales. Pronto se incorporaron otras combinaciones de experimentos bidimensionales tanto homonucleares, NOESY-TOCSY (23), como heteronucleares, HMQC-NOESY (24) o TOCSY-HMQC (25), en los que ya se obtenía el espectro completo. Poco después se llegó incluso a proponer y obtener un espectro 4D (26) del tipo HMQC-NOESY-HMQC en el que se combinan un HMQC ^1H , ^{13}C con un NOESY ^1H - ^1H y un HMQC ^1H , ^{15}N . Aun trabajando con muy baja digitalización el experimento requería 6 días. El mismo año, 1990, se publicaron los primeros experimentos 3D que no consistían en una yuxtaposición de experimentos 2D previos (27). A partir de entonces se han publicado multitud de experimentos 3D, un buen número de ellos dedicados al estudio de proteínas. Los espectros de mayor número de dimensiones, sin embargo, han sido muy escasos, dados los elevados tiempos de adquisición que requieren y a las dificultades de visualización de los espectros. La llegada de los métodos de muestreo no uniforme, que reducen considerablemente el tiempo de adquisición, ha ayudado a superar esta limitación.

Referencias

1. J. Jeener, G. Bodenhausen, *"Pulse Pair Technique in High Resolution NMR"; a Reprint of the Historical 1971 Lecture Notes on Two Dimensional Spectroscopy*, Progr. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc., 94, 75-80, 2016.
2. P. C. Lauterbur, *Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance*, Nature, 242, 190-191, 1973.
3. A. Kumar, D. Welti, R.R. Ernst, *Imaging of Macroscopic Objects by NMR Fourier Zeugmatography*, Naturwissenschaften, 62, 34, 1975.
4. A. Kumar, D. Welti, R.R. Ernst, *NMR Fourier Zeugmatography*, J. Magn. Reson., 18, 69-83, 1975.
5. R.R. Ernst, *The Success Story of Fourier Transformation in NMR*, en *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance* (D.M. Grant, R.K. Harris, eds), Vol 1: *Historical Perspectives*, John Wiley and Sons Ltd, Chichester, 1996.
6. L. Müller, A. Kumar, R.R. Ernst, *Two-Dimensional Carbon-13 NMR Spectroscopy*, J. Chem. Phys., 63, 5490-5491, 1975.
7. W.P. Aue, E. Bartholdi, R.R. Ernst, *Two-Dimensional Spectroscopy. Application to Nuclear Magnetic Resonance*, J. Chem. Phys., 64, 2229-2246, 1976.
8. W.P. Aue, J. Karhan, R.R. Ernst, *Homonuclear Broad Band Decoupling and Two-Dimensional J-Resolved NMR Spectroscopy*, J. Chem. Phys., 64, 4226-4227, 1976.
9. G. Bodenhausen, R. Freeman, R. Niedermeyer, D.L. Turner, *High-Resolution NMR in Inhomogeneous Magnetic Fields*, J. Magn. Reson., 24, 291-294, 1976.
10. J.S. Waugh, *Uncoupling of Local Field Spectra in Nuclear Magnetic Resonance: Determination of Atomic Positions in Solids*, Proc. Natl. Acad. Sci., 73, 1394-1397, 1976.
11. A. A. Maudsley, R. R. Ernst, *Indirect Detection of Magnetic Resonance by Heteronuclear Two-Dimensional Spectroscopy*, Chem. Phys. Lett., 50, 368-372, 1977.
12. A. A. Maudsley, L. Müller, R. R. Ernst, *Cross-Correlation of Spin-Decoupled NMR Spectra by Heteronuclear Two-Dimensional Spectroscopy*, J. Magn. Reson., 28, 463-469, 1977.
13. S. R. Hartmann, E. L. Hahn, *Nuclear Double Resonance in the Rotating Frame*, Phys. Rev., 128, 2042-2053, 1962.
14. G. Bodenhausen, R. Freeman, *Correlation of Proton and Carbon-13 NMR Spectra by Heteronuclear Two-Dimensional Spectroscopy*, J. Magn. Reson., 28, 471-476, 1977.
15. R. Freeman, G. A. Morris, *Experimental Chemical Shift Correlation Maps in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, J. Chem. Soc. Chem. Comm., 684-686, 1978.

16. L. Müller, *Sensitivity Enhanced Detection of Weak Nuclei Using Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*, J. Am. Chem. Soc., 101, 4481-4484, 1979.
17. G. Bodenhausen, D. J. Ruben, *Natural Abundance Nitrogen-15 NMR by Enhanced Heteronuclear Spectroscopy*, Chem. Phys. Lett, 69, 185-189, 1980.
18. A. Bax, R. H. Griffey, B. L. Hawkins, *Correlation of Proton and Nitrogen-15 Chemical Shifts by Multiple Quantum NMR*, J. Magn. Reson, 55, 301-315, 1983..
19. A. Bax, 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.
20. D.J. States, R.A. Haberkorn, D.J. Ruben, *A Two-Dimensional Nuclear Overhauser Experiment with Pure Absorption Phase in Four Quadrants*, J. Magn. Reson., 48, 286-292, 1982.
21. D. Marion, K. Wüthrich, *Application of Phase Sensitive Two-Dimensional Correlated Spectroscopy (COSY) for Measurements of ^1H - ^1H Spin-Spin Coupling Constants in Proteins*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 113, 967-974, 1983.
22. C. Griesinger, O.W. Sørensen, R.R. Ernst, *A Practical Approach to Three-Dimensional NMR Spectroscopy*, J. Magn. Reson., 73, 574-579, 1987.
23. H. Oschkinat, C. Griesinger, P.J. Kraulis, O.W. Sørensen, R.R. Ernst, A.M. Gronenborn, G.M. Clore, *Three-Dimensional NMR Spectroscopy of a Protein in Solution*, Nature, 332, 374-376, 1988.
24. S.W. Fesik, E.R.P. Zuiderweg, *Heteronuclear Three-dimensional NMR Spectroscopy. A Strategy for the Simplification of Homonuclear Two-Dimensional NMR Spectra*, J. Magn. Reson., 78, 588-593, 1988.
25. D. Marion, P.C. Driscoll, L.E. Kay, P.T. Wingfield, A. Bax, A.M. Gronenborn, G.M. Clore, *Overcoming the Overlap Problem in the Assignment of ^1H NMR Spectra of Larger Proteins by Use of Three-Dimensional Heteronuclear ^1H - ^{15}N Hartmann-Hahn-Multiple Quantum Coherence and Nuclear Overhauser-Multiple Quantum Coherence Spectroscopy: Application to Interleukin 1β* . Biochemistry, 28, 6150-6156, 1989.
26. L.E. Kay, G.M. Clore, A. Bax, A.M. Gronenborn, *Four-Dimensional Heteronuclear Triple-Resonance NMR Spectroscopy of Interleukin- 1β in Solution*, Science, 249, 411-414, 1990.
27. M. Ikura, L.E. Kay, A. Bax: *A Novel Spproach for Sequential Assignment of ^1H , ^{13}C , and ^{15}N Spectra of Larger Proteins: Heteronuclear Triple-Resonance NMR Spectroscopy. Application to Calmodulin*, Biochemistry, 29, 4659-4667 (1990).