Information aus NMR Spektren

- Chemische Verschiebung
- Anzahl der Spins (Integration des 1D-Spektrums)
- Multiplizität (Analyse der Multipletts)
- Konstitution
  - Konnektivität (H,H) (COSY, TOCSY)
  - Konnektivität (X,H) (HSQC, HMQC)
  - Konnektivität (X,X) (INADEQUATE)
- Anzahl von ^{1}H gebunden an ^{13}C (DEPT, INEPT)
- ^{1}H-^{1}H räumliche Nähe (NOESY, ROESY, NOE diff)

Ein NMR-Experiment, Was brauchen wir?

Magneten (Magnetfeld spezifiziert in T)

- muss hohe Feldhomogenität haben — SHIM
- muss sehr stabiles Hauptfeld haben — LOCK

SHIM

- zusätzliche Spulen ausserhalb der Probe, so dass man mit kleinen variablen Zusatzfeldern die Homogenität des Feldes variieren kann (Z, Z2, Z3, X, Y,…)

LOCK

- ständige Messung der Frequenz des ^{2}H-Signals des Solvens, Frequenz wird durch Regeltechnik konstant gehalten.

LOCK

Der Lock Kanal ist ein zweites kleines Spektrometer im grossen Hauptspektrometer.

Larmorfrequenz: $\omega_0 = \gamma B_0$

Es kann ein kleines Zusatzfeld H_0 erzeugt werden:

$$\omega_0 = \gamma(B_0 + H_0)$$

B_0 ist nicht konstant, aber (B_0+H_0) kann durch Regeltechnik konstant gehalten werden (Feldregulation).

LOCK

Der Lock hat zwei ADCs. Man beobachtet ein absorptives und ein dispersives Signal.

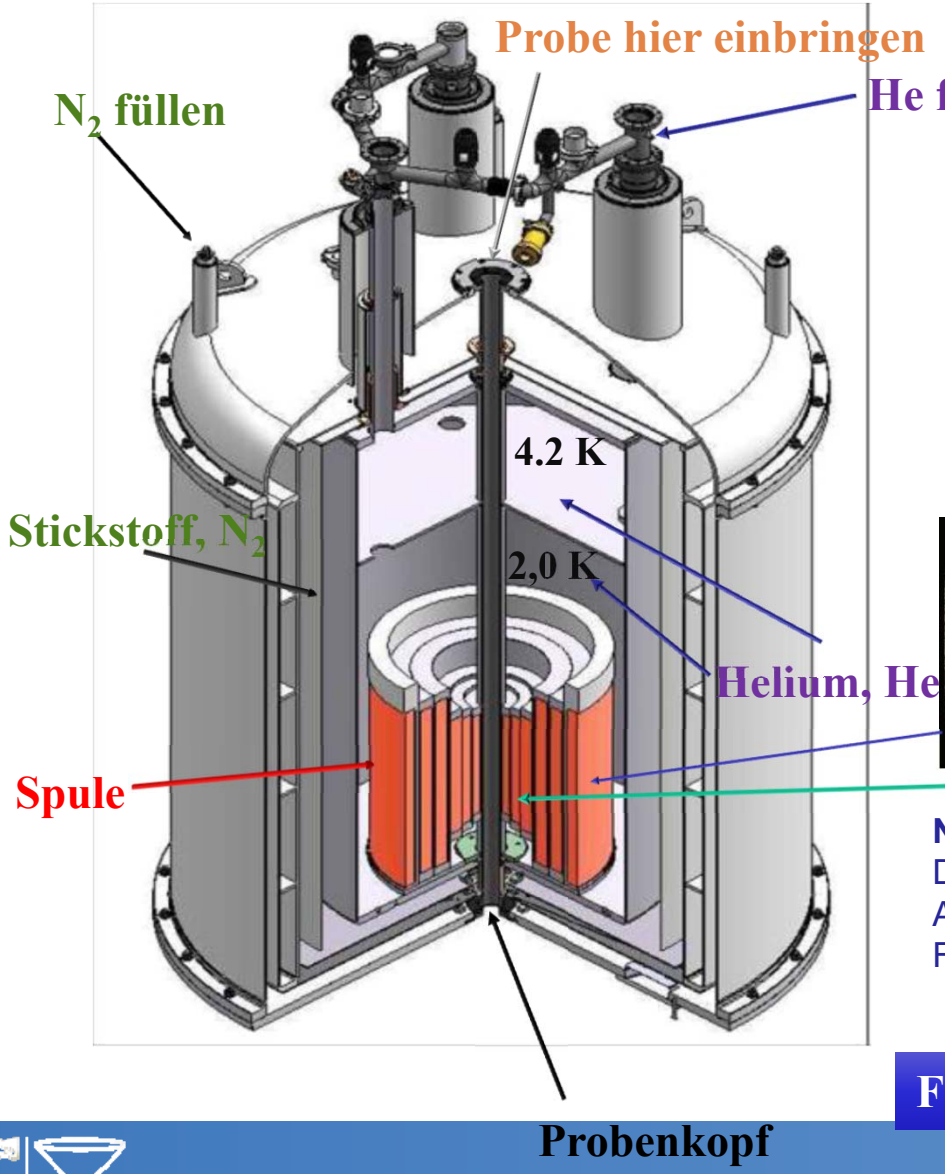
Das dispersive Signal wird zur Regulation der Feldkonstanz genutzt.

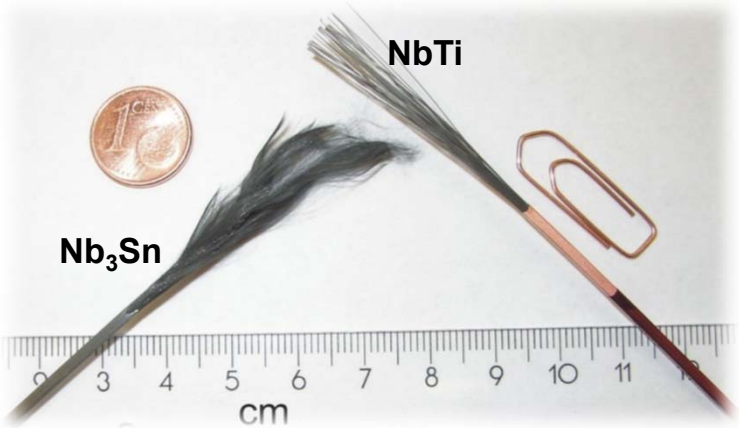
Das absorptive Signal wird zum Shimmen genutzt

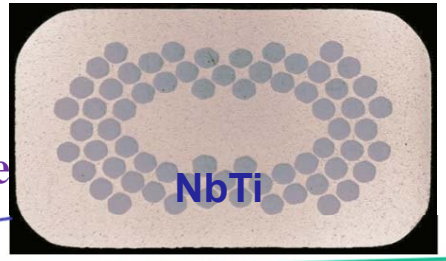
What is NMR?

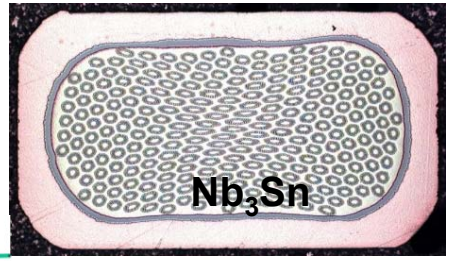
NMR-Magnet - Supraleiter

Aktuell sind Feldstärken für 300 MHz bis 1 GHz möglich







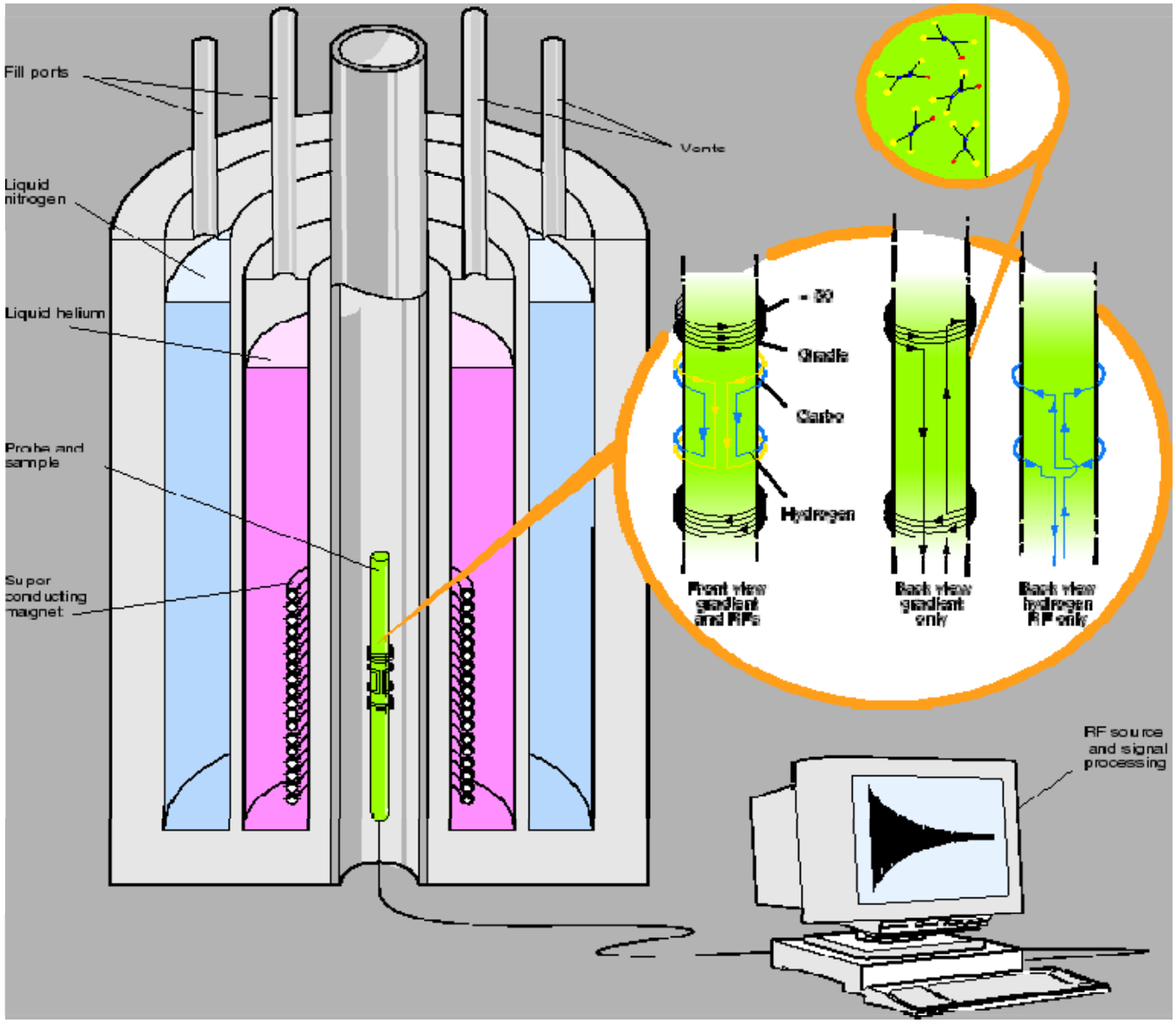


Niobium-Titan Leiter NbTi
Durchmesser: 0.85 mm
Anzahl der Filamente: 50 – 100
Filamentdurchmesser: 36 µm

Niobium-Zinn Leiter Nb_3Sn
Durchmesser: 0.70 mm
Anzahl der Filamente: 6000 – 15‘000
Filamentdurchmesser: ca. 4 µm

Für ein NMR-Magnet sind ca. 100 km Draht notwendig

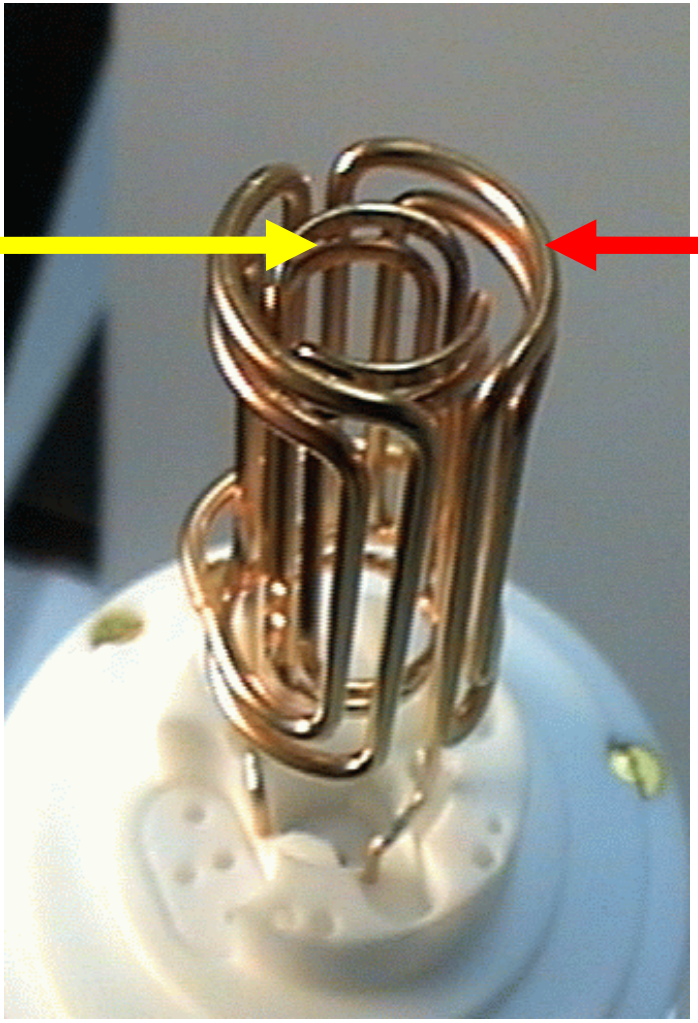
Aufbau eines Spektrometers: Magnet



Das Probenröhrchen und der Probenkopf

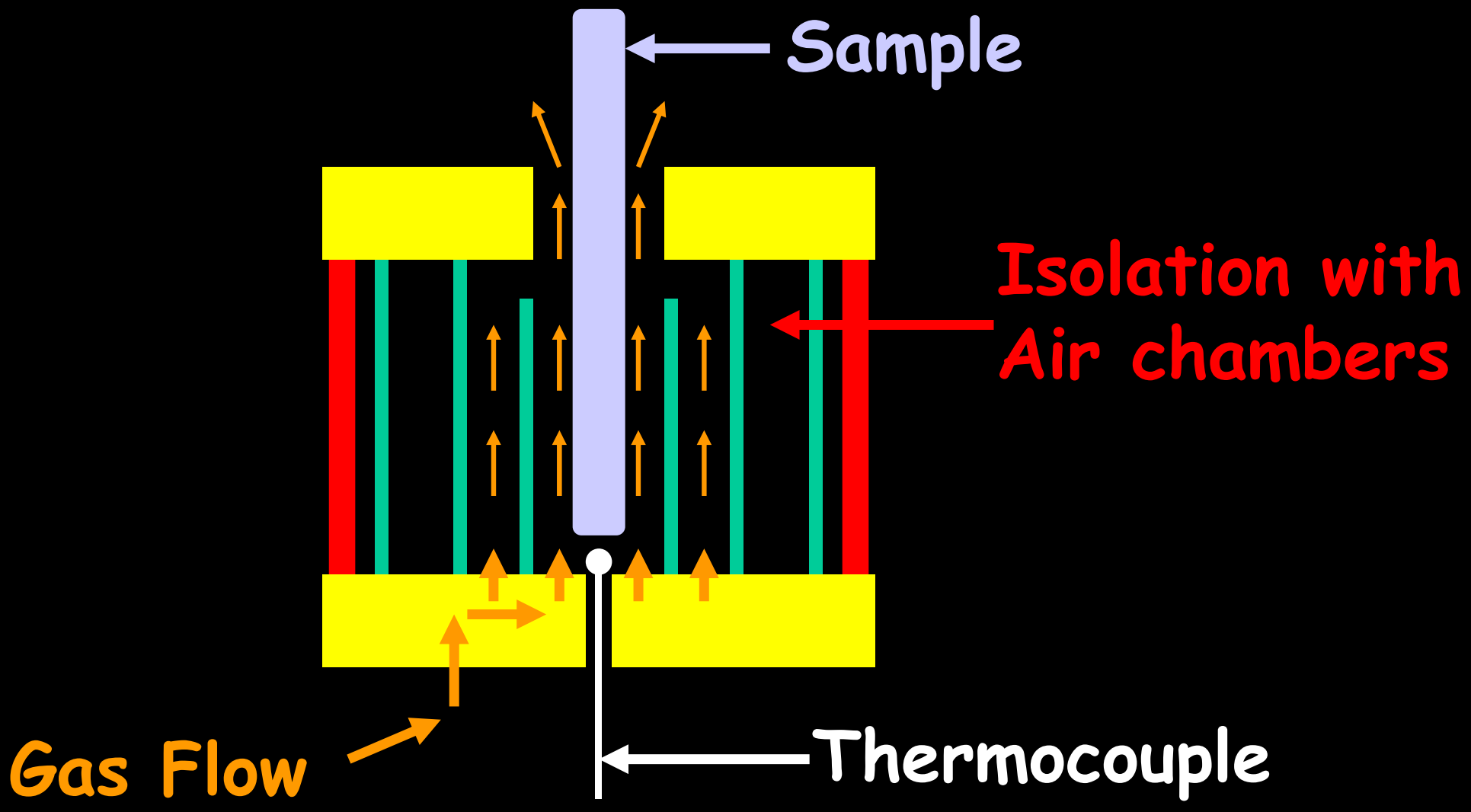
Ein Probenkopf von Innen

Inner coil:
Observe nucleus,
Maximum sensitivity

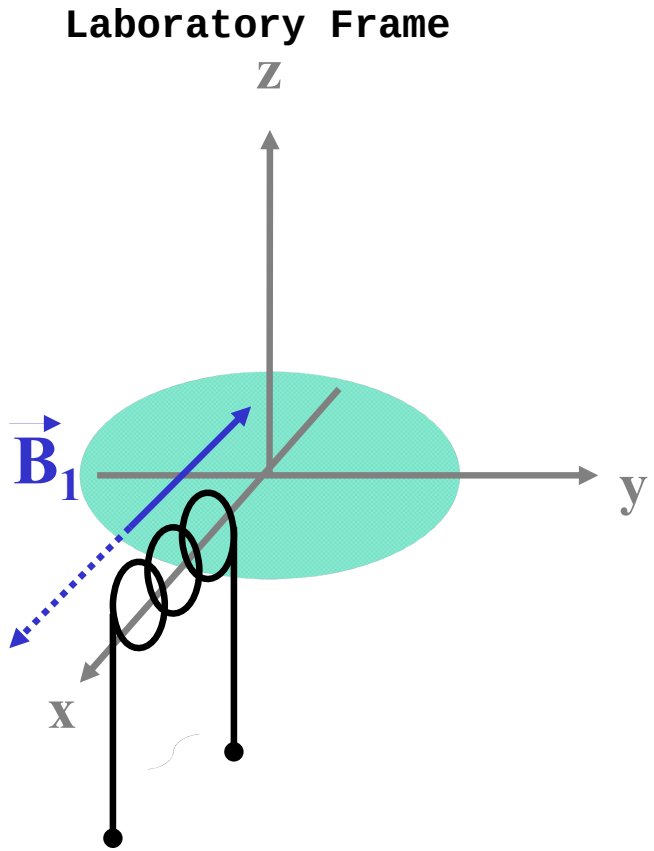


Outer coil:
Decoupling nucleus
middle sensitivity

Die Temperierung

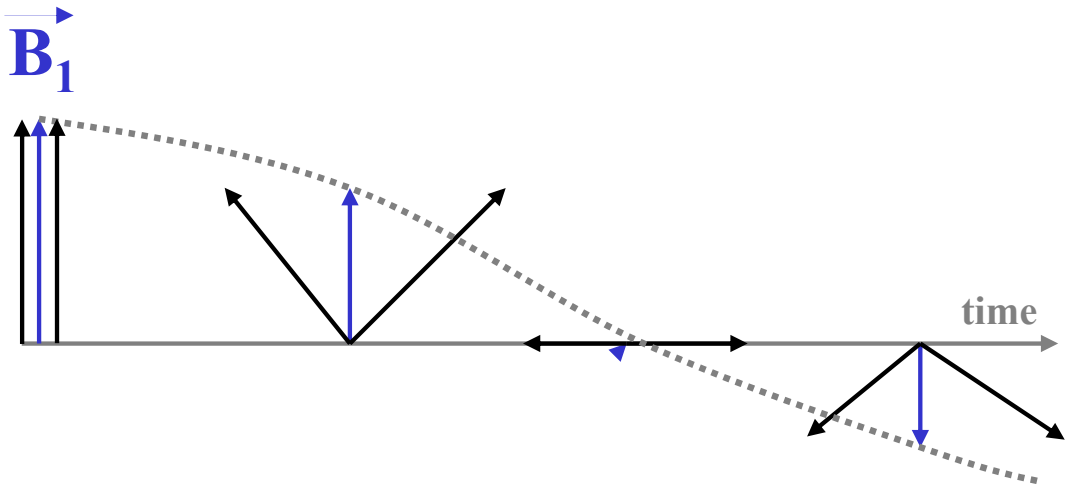


Pulsbestimmung



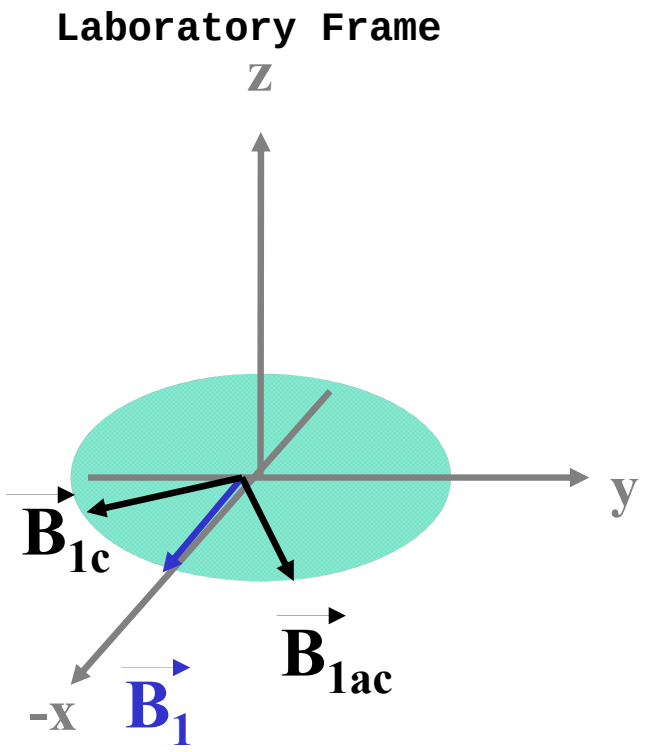
1. Zusätzlich zum B_0-Feld gibt es eine Spule.
2. Diese Spule (transmitter coil) wird mit einem Wechselstrom beschickt
3. Dies erzeugt ein linear oszillierendes Feld entlang der x-Achse.

Pulsbestimmung: Grundlagen



- Das linear-polarisierte, oszillierende B_1-Feld kann aufgespalten werden in zwei zirkular polarisierte Feld, die in entgegengesetze Richtung rotieren.

Pulsbestimmung: Grundlagen



1. Die Oszillationsfrequenz von B_{1c} und B_{1ac} ist:

$$\Omega = 2\pi\,\nu$$

2. Diese Frequenz wird gleich der Larmorfrequenz der Spins gesetzt:

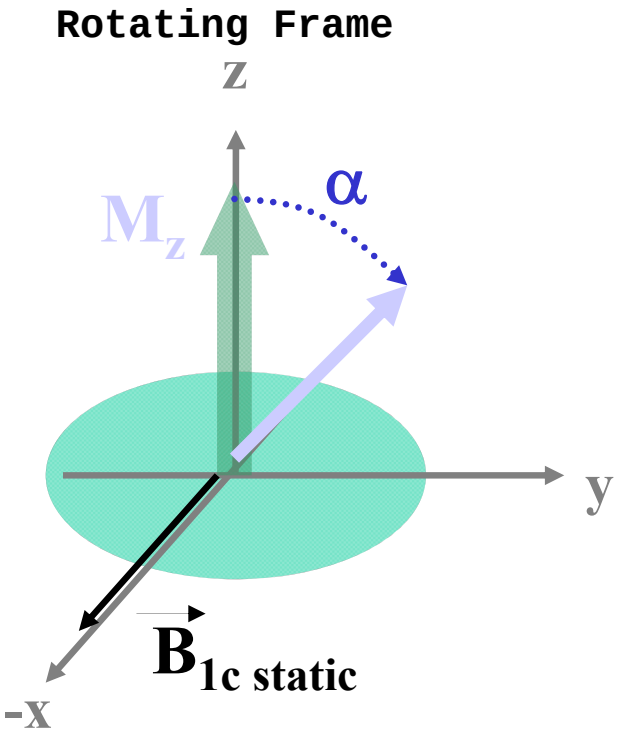
$$\Omega = \omega_o$$

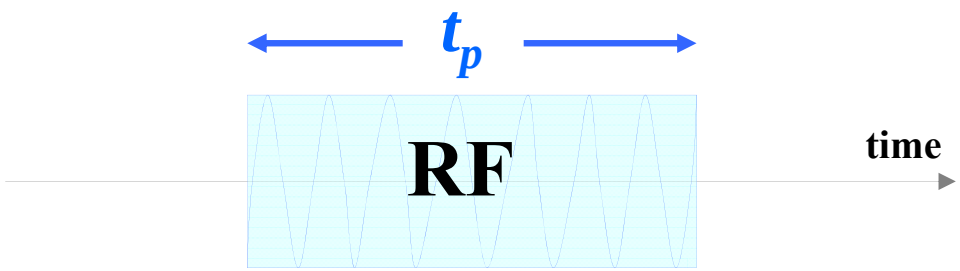
3. Damit ist eine Komponente, B_{1c} oder B_{1ac} im rotierenden Koordinatensystem statisch.

$\vec{B}_{1c}$: B_1 component, rotates clockwise

$\vec{B}_{1ac}$: B_1 component, rotates anti clockwise

Pulsbestimmung: Grundlagen





Definitionen:

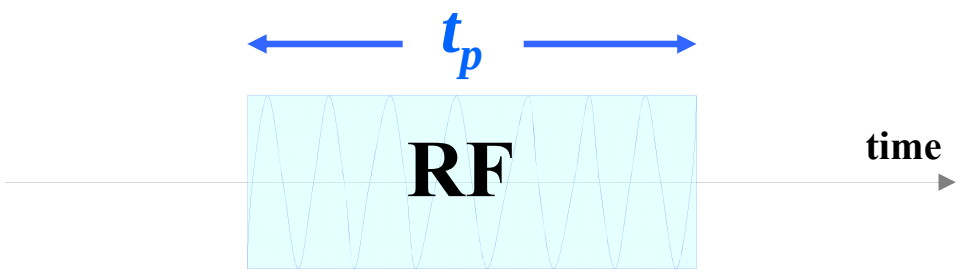
α : *Flipwinkel*

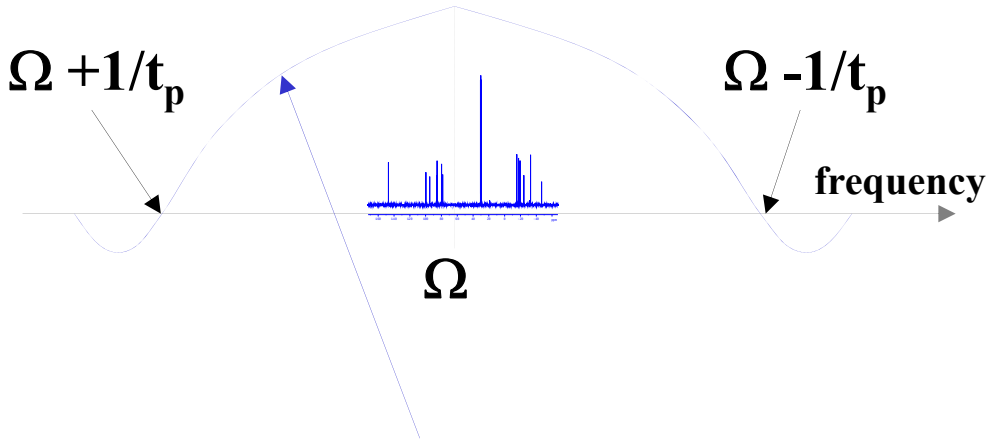
t_p: *Dauer, für die B_1 angewendet wird, Pulsdauer*

$t_p(90)$: *Zeit für eine Rotation um 90°*

90°-Puls: rf Flips der Magne-tisierung um 90° dreht.

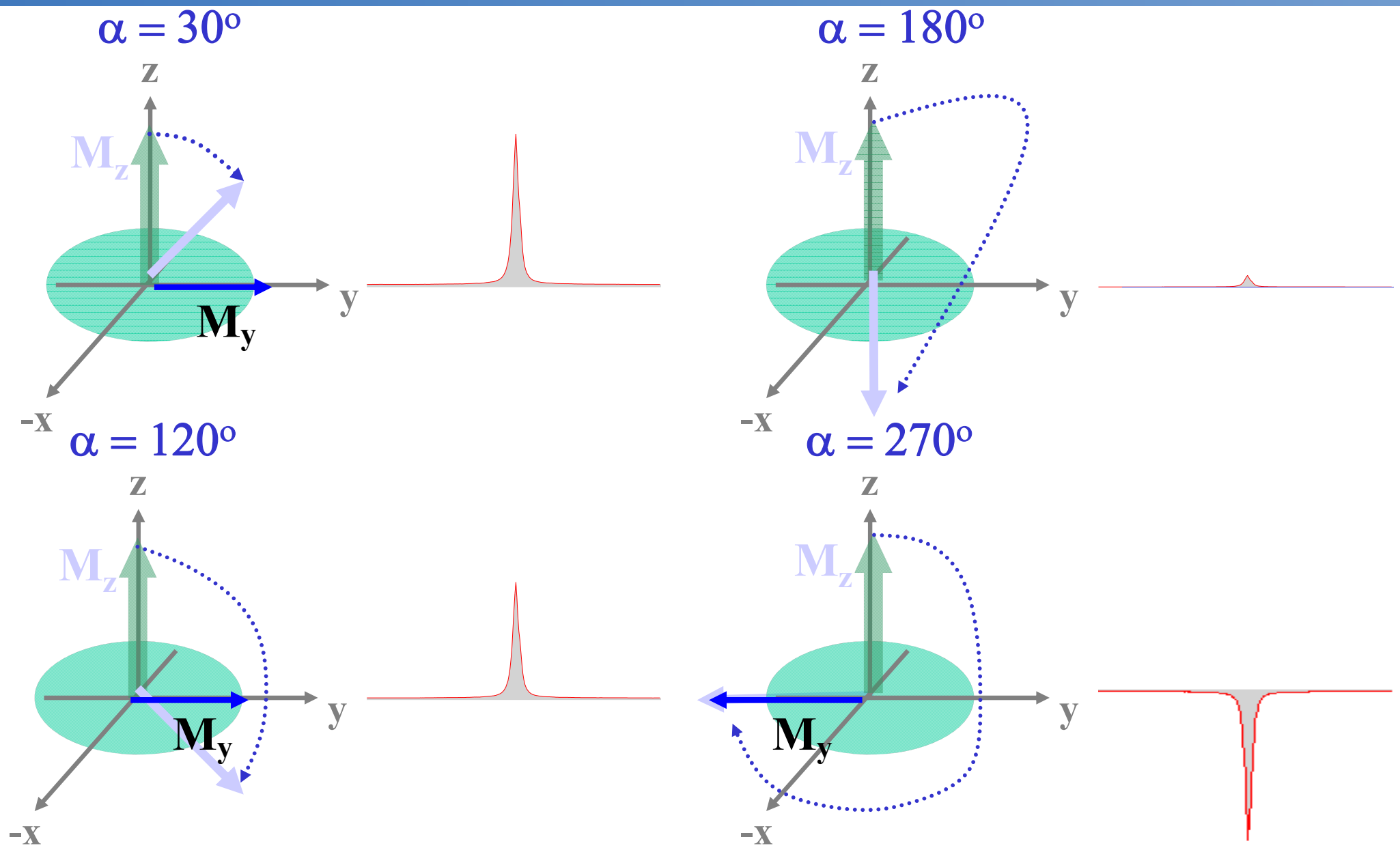
Pulsbestimmung: Grundlagen



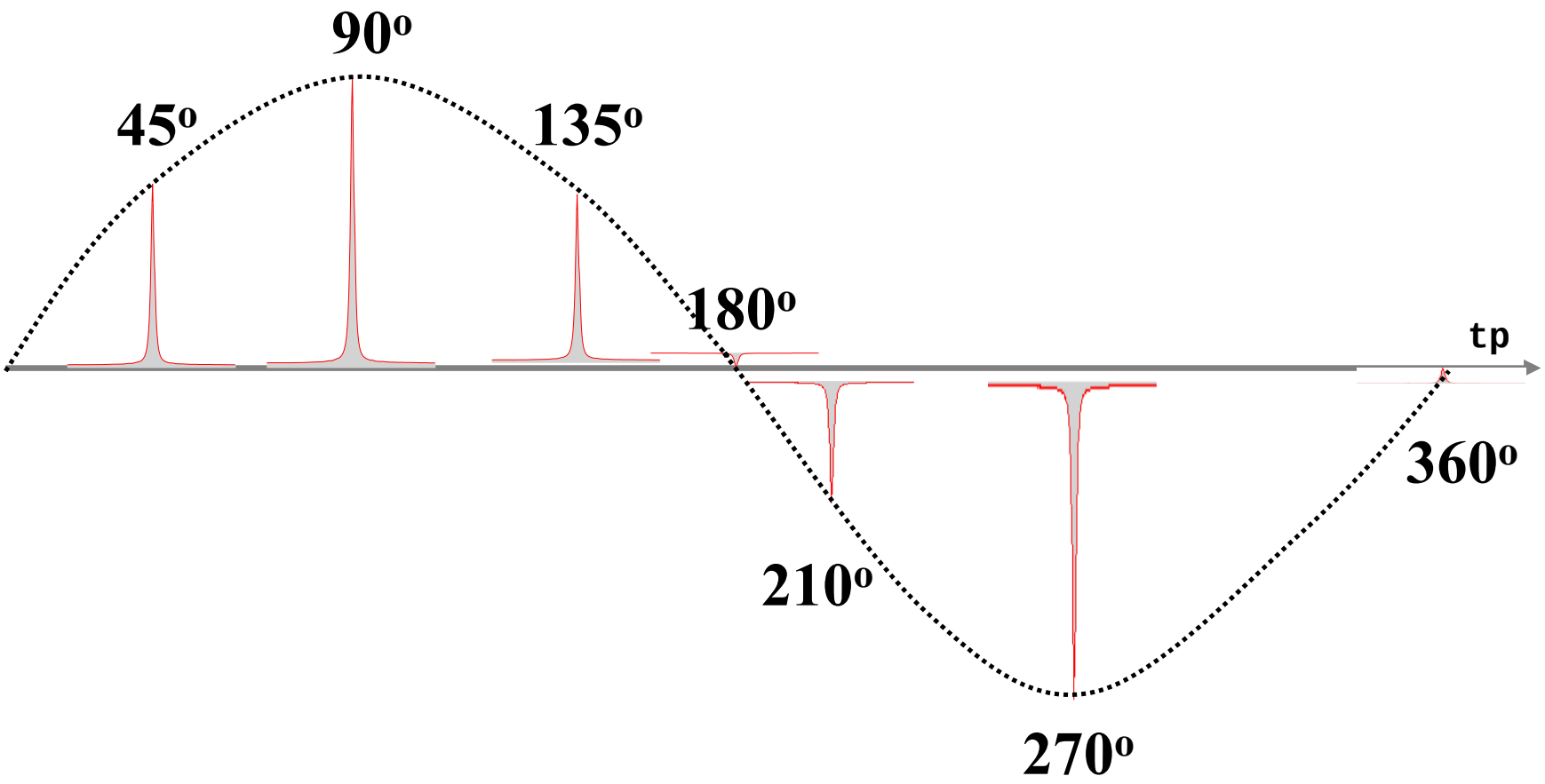


1. The Anregungsbandbreite wird durch die Länge des 90°-Pulses bestimmt
2. Das Anregungsprofile entspricht einer SINC-Funktion

Pulsbestimmung: Grundlagen

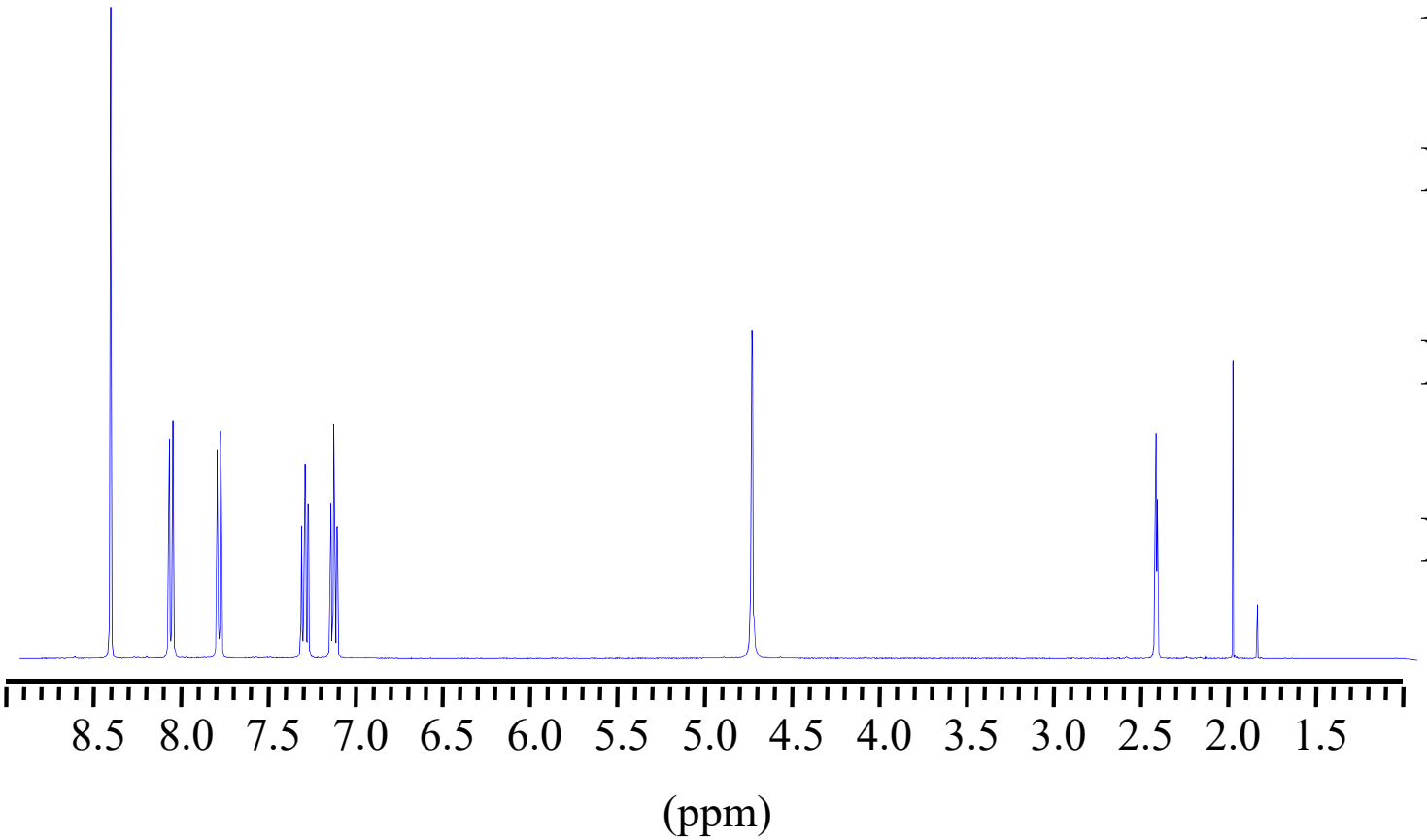


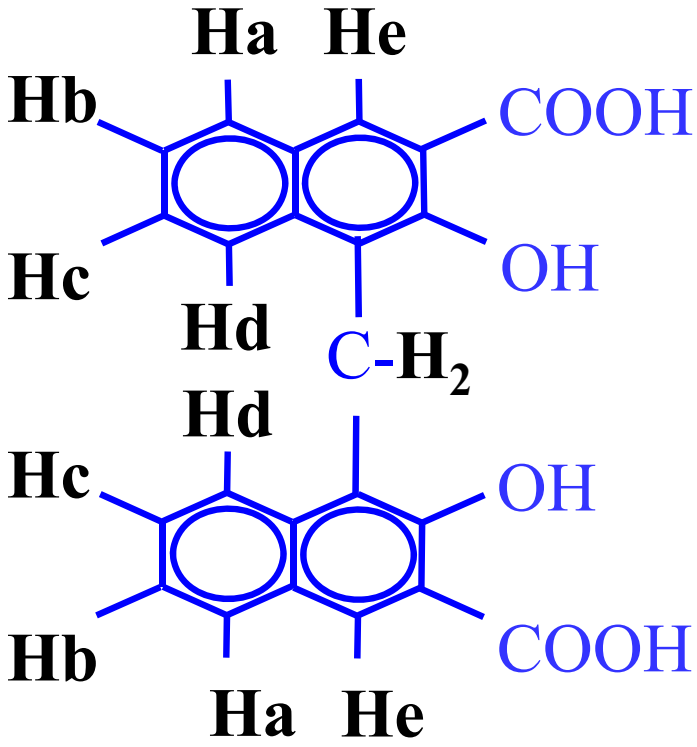
Pulsbestimmung: Grundlagen



Integration der Signalintensitäten (1)

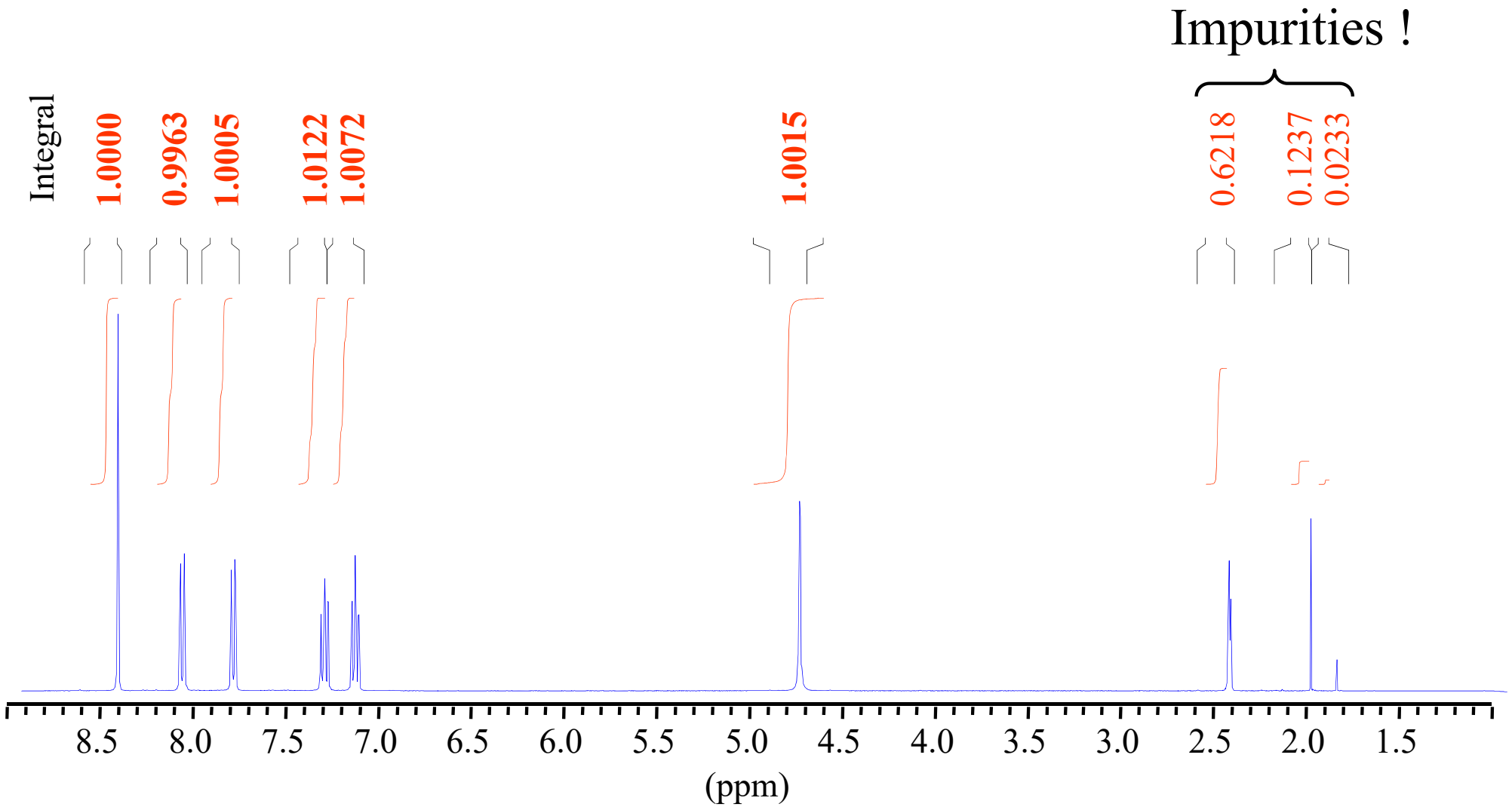
- Verunreinigungen ?



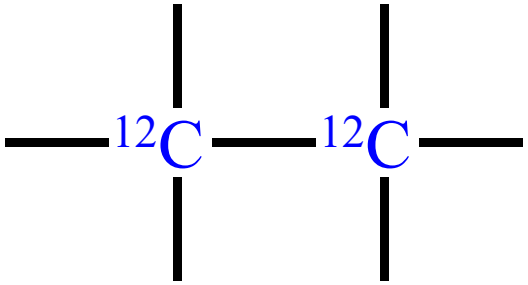


Pamoic acid

Integration der Signalintensitäten (1)

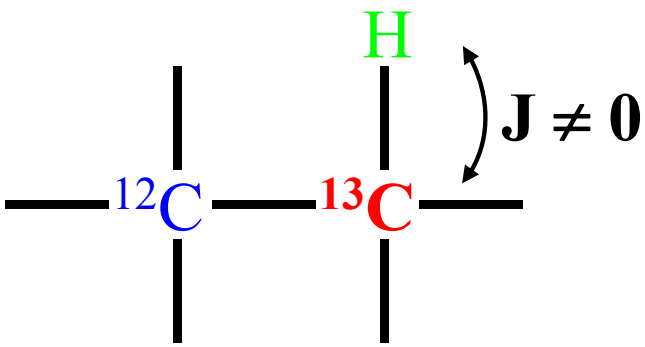


^{13}C Spektroskopie (1)



99%

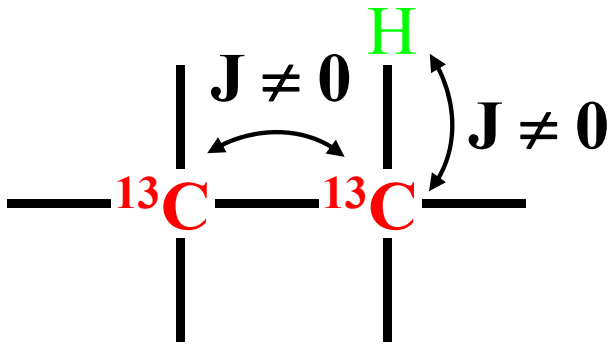
Kein Signal



1%

Signal

CH Kopplung



0.01%

Signal

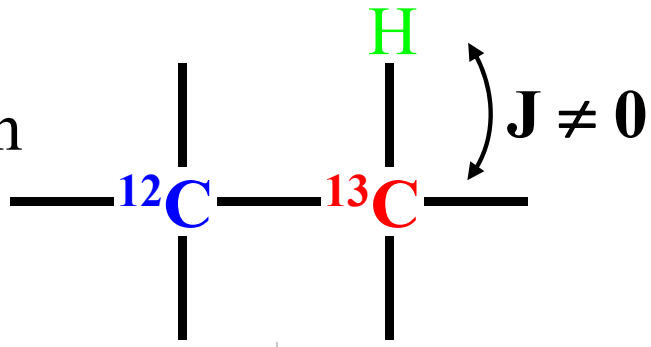
CH Kopplung
CC Kopplung

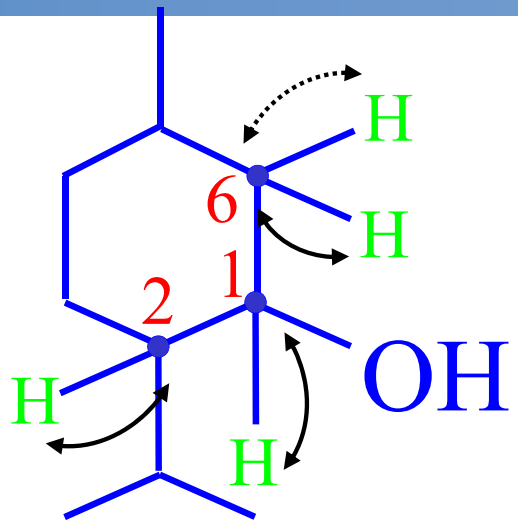
^{13}C Spektroskopie (2)

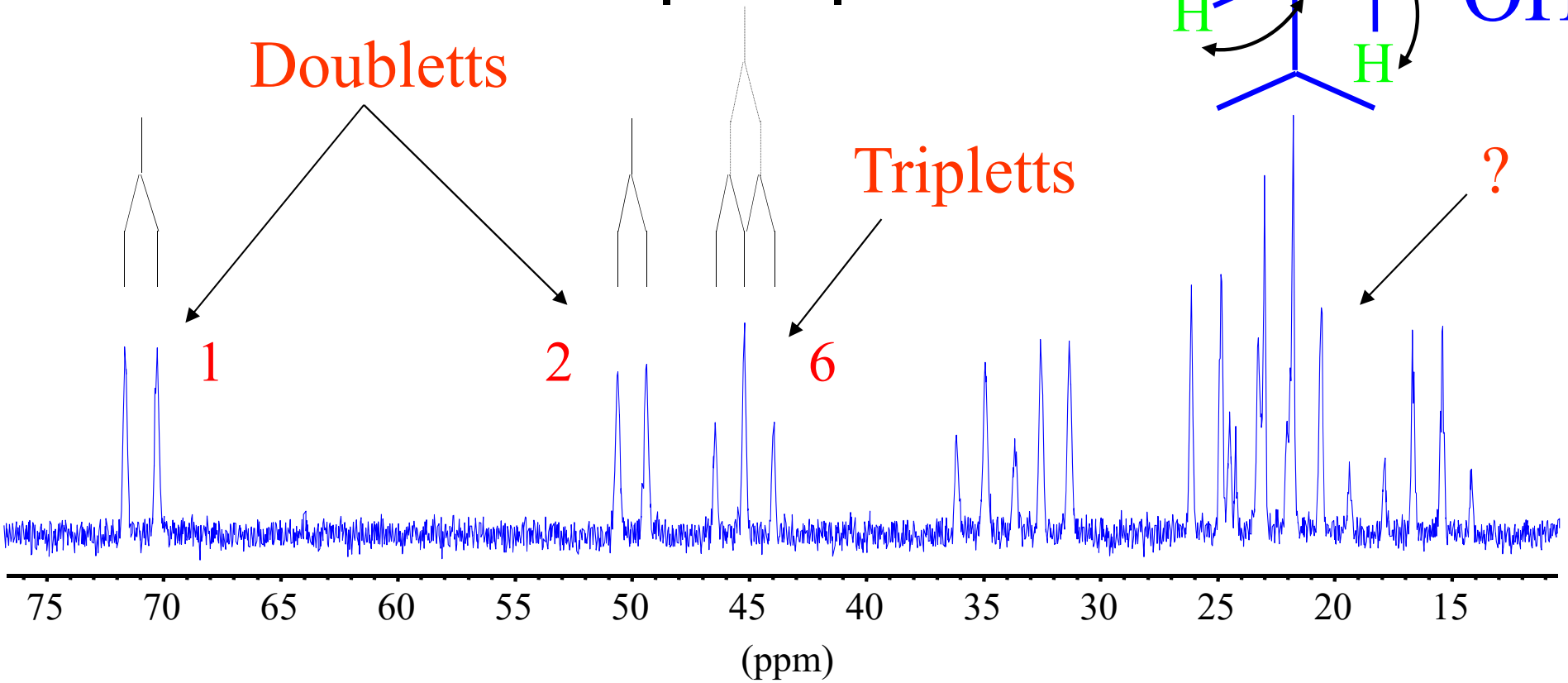
Menthol

Normal Spektrum:

^{1}H-gekoppeltes Spektrum



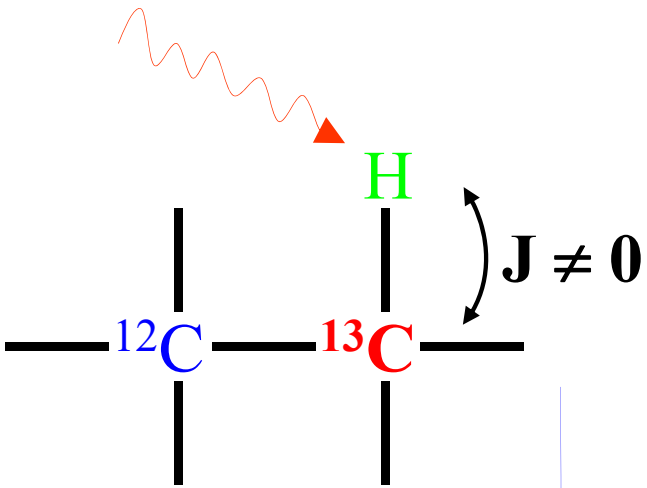


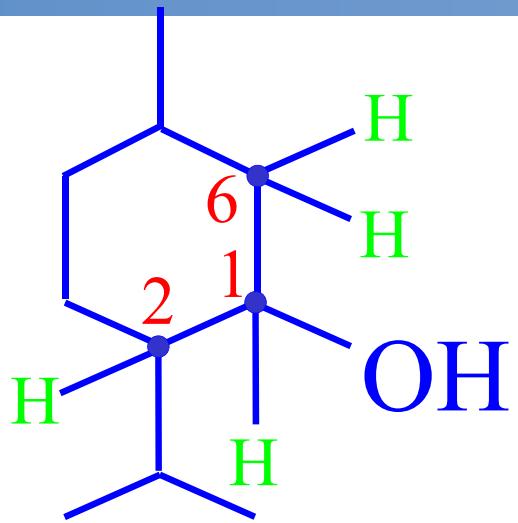


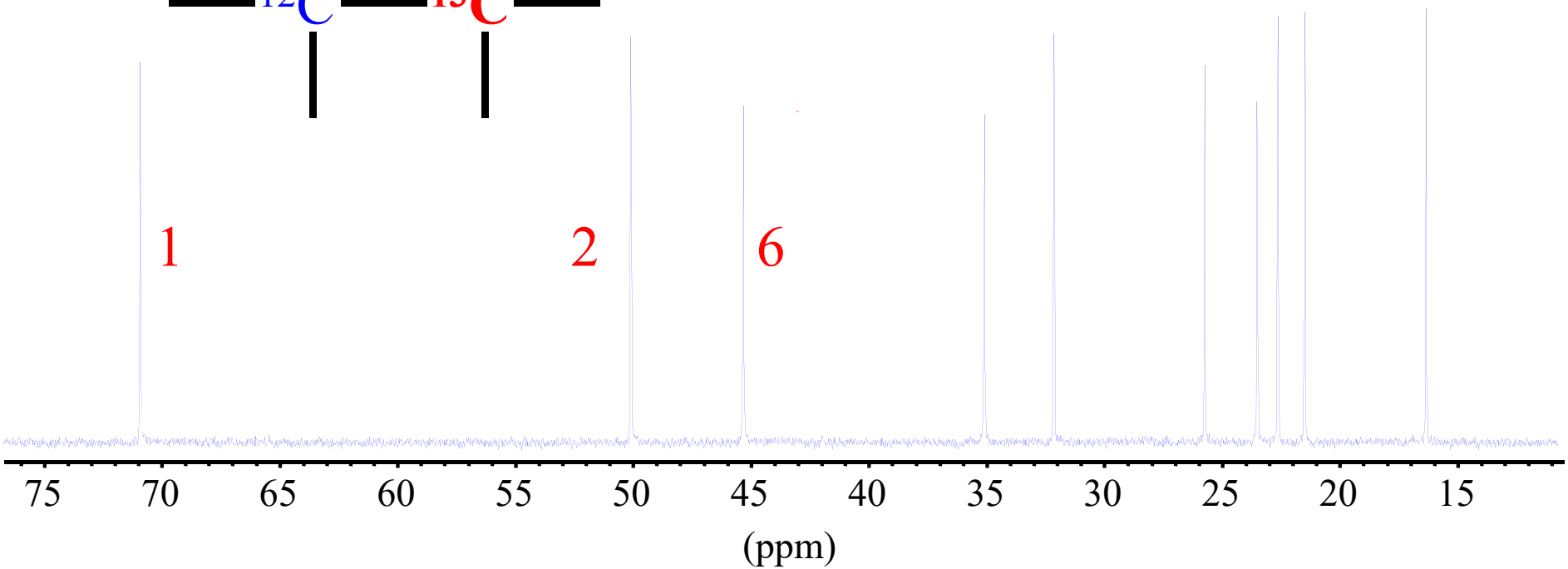
^{13}C Spektroskopie (3)

Menthol

- ^{1}H Entkopplung => keine Multipletts => S/N besser



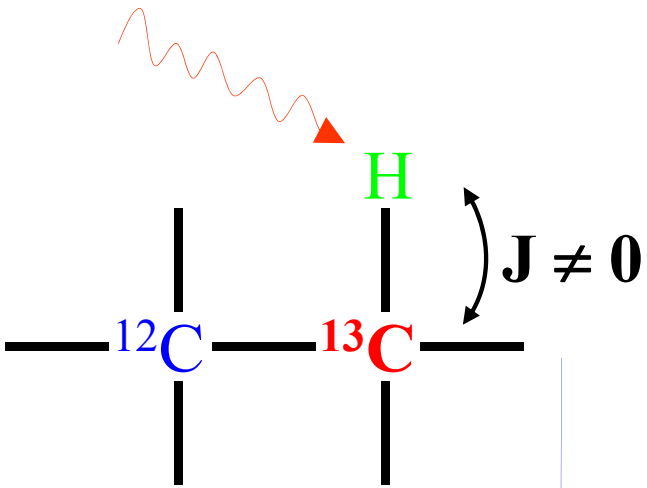


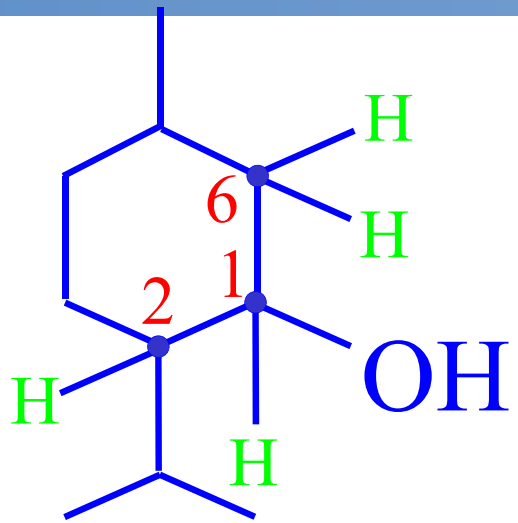


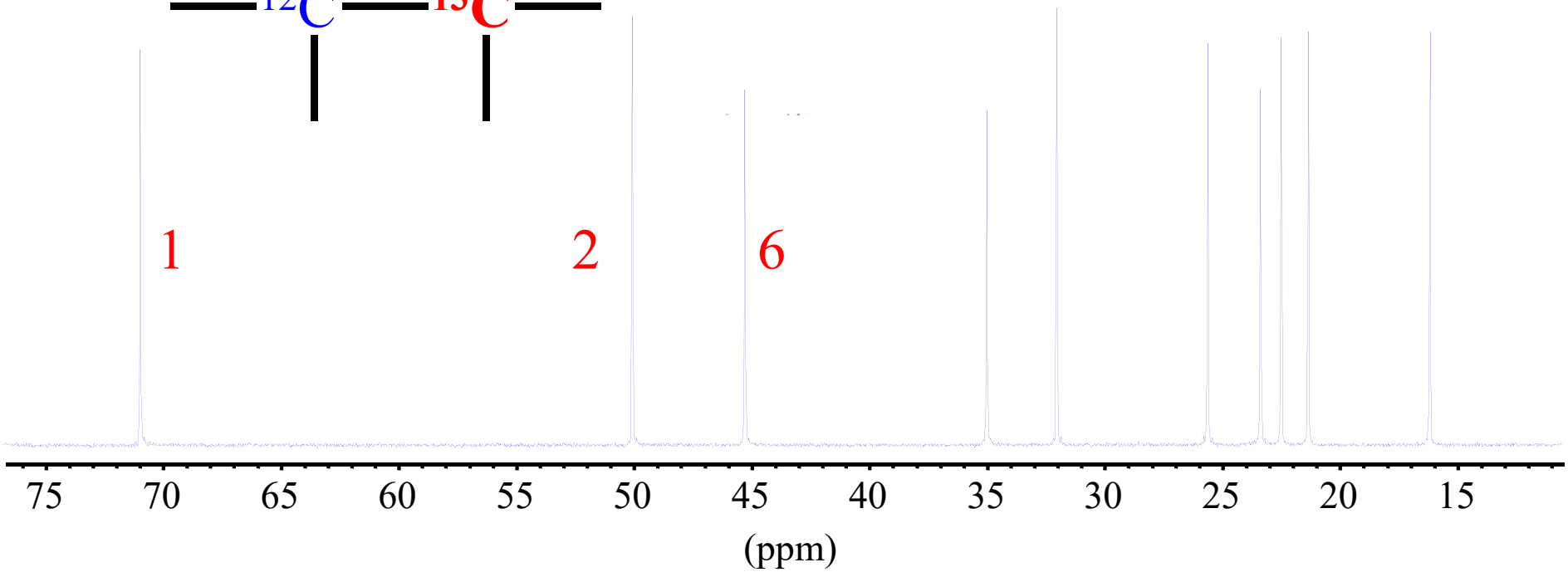
^{13}C Spektroskopie (4)

Menthol

- S/N increases via NOE from the ^{1}H

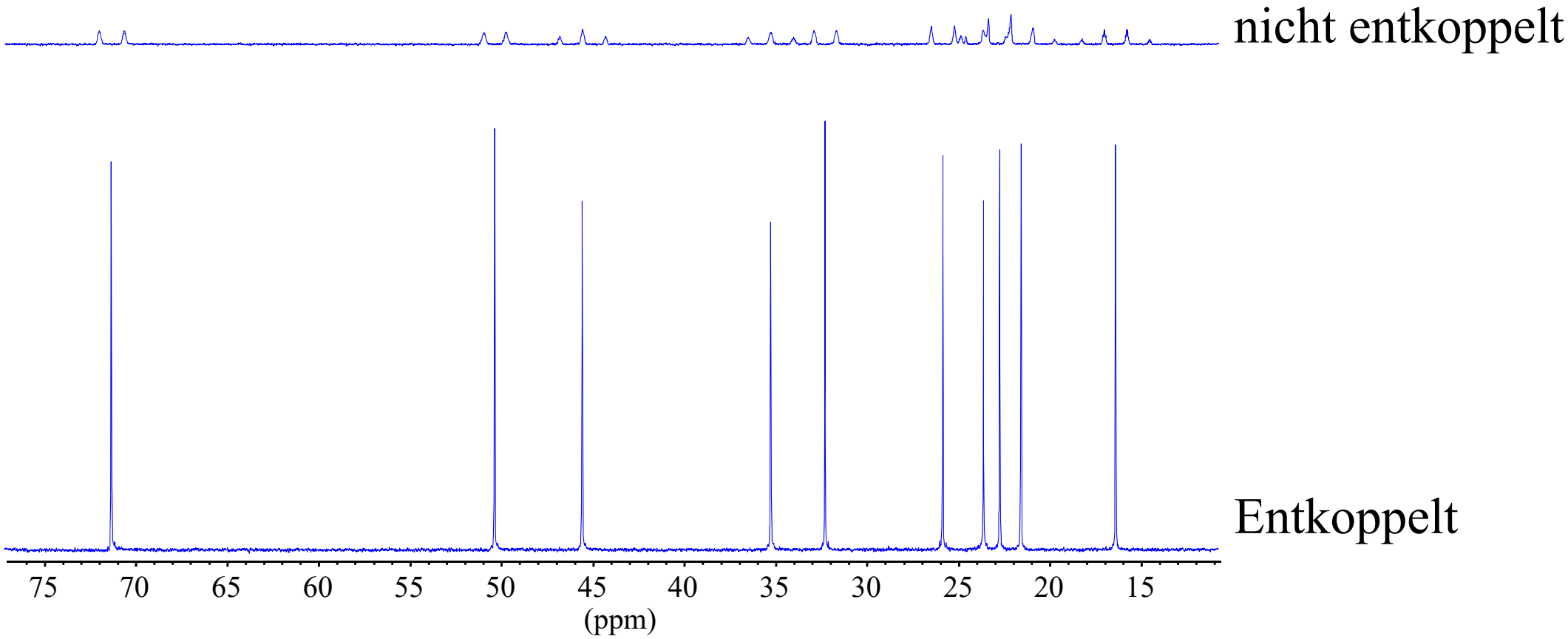






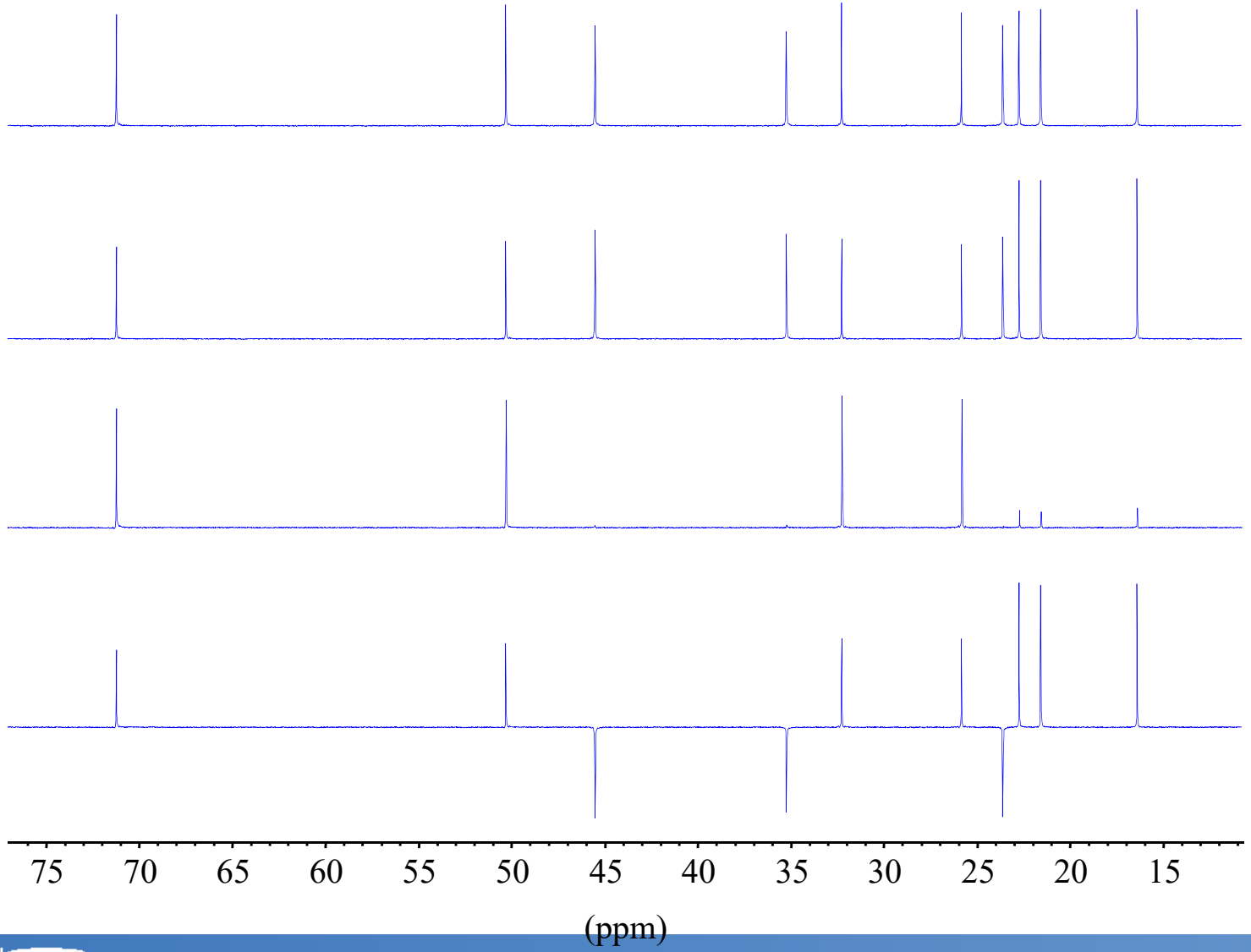
Wieviele ^{1}H sind an ^{13}C gebunden? (1)

- Vergleich: Gekoppeltes, entkoppeltes ^{13}C-Spektrum



Wieviele ^{1}H sind an ^{13}C gebunden? (2)

- Editierung der ^{13}C Signal nach ^{1}H Multiplizität mittels **DEPT**



Normal ^{13}C

DEPT-45
CH, CH_2, CH_3 > 0

DEPT-90
only CH

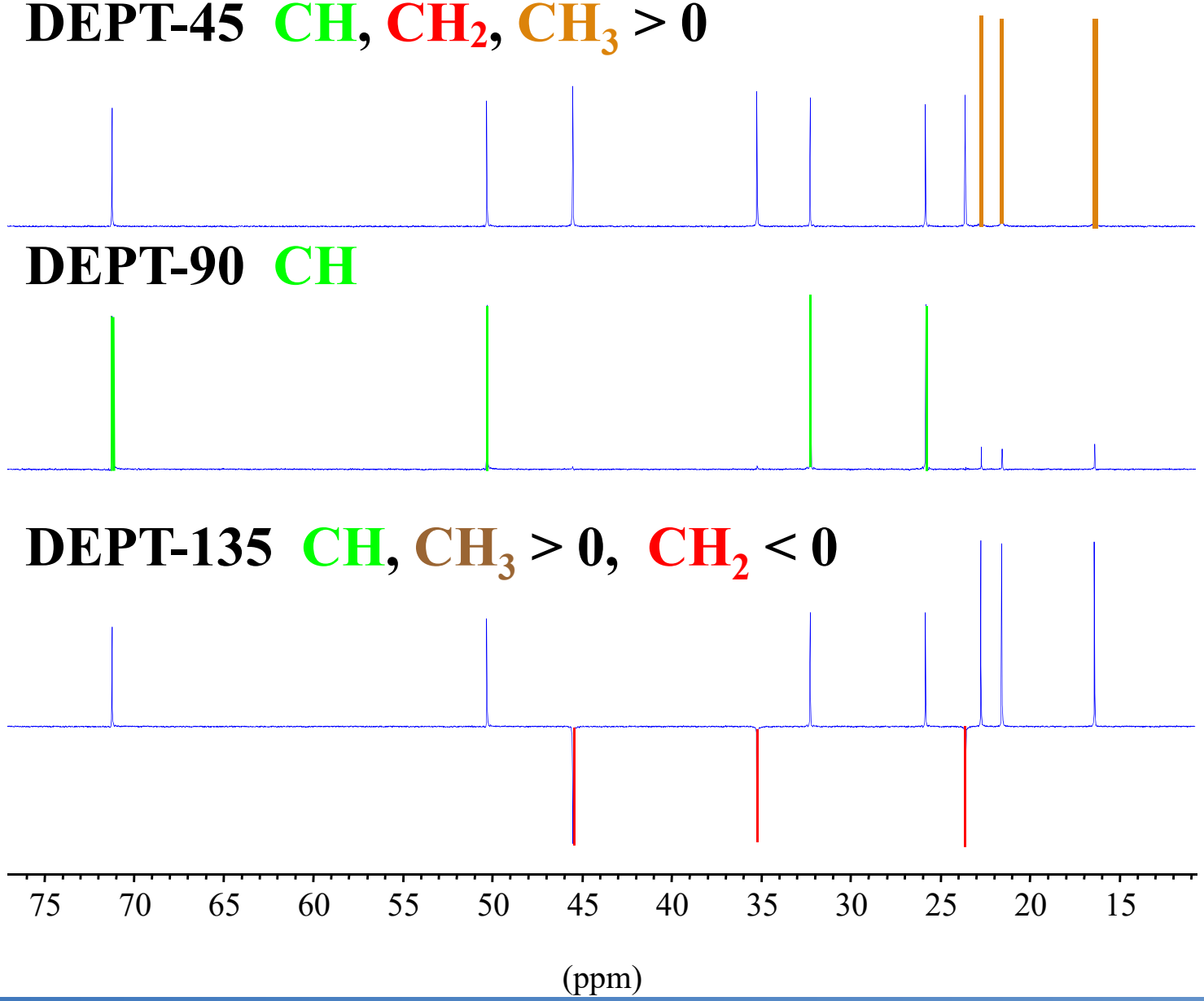
DEPT-135
CH, CH_3 > 0,
CH_2 < 0

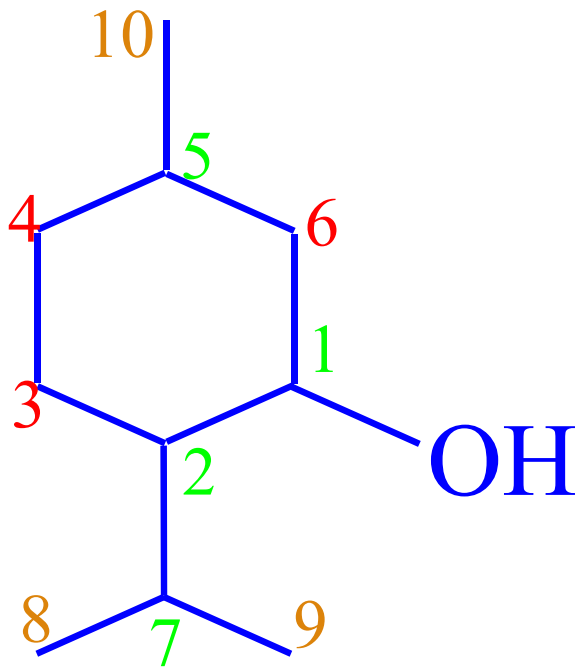
Wieviele ^{1}H sind an ^{13}C gebunden? (3)

DEPT-45 CH, CH_2, CH_3 > 0

DEPT-90 CH

DEPT-135 CH, CH_3 > 0, CH_2 < 0



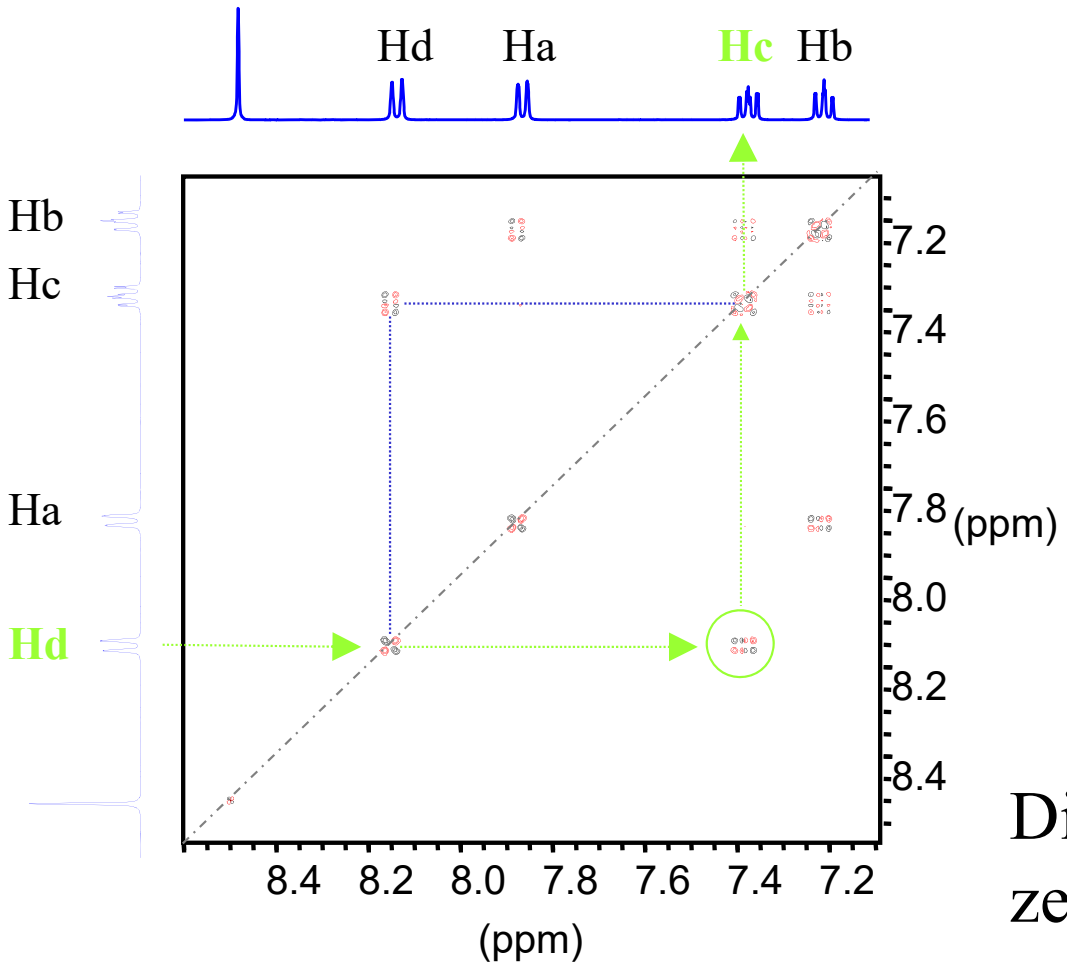


Menthol

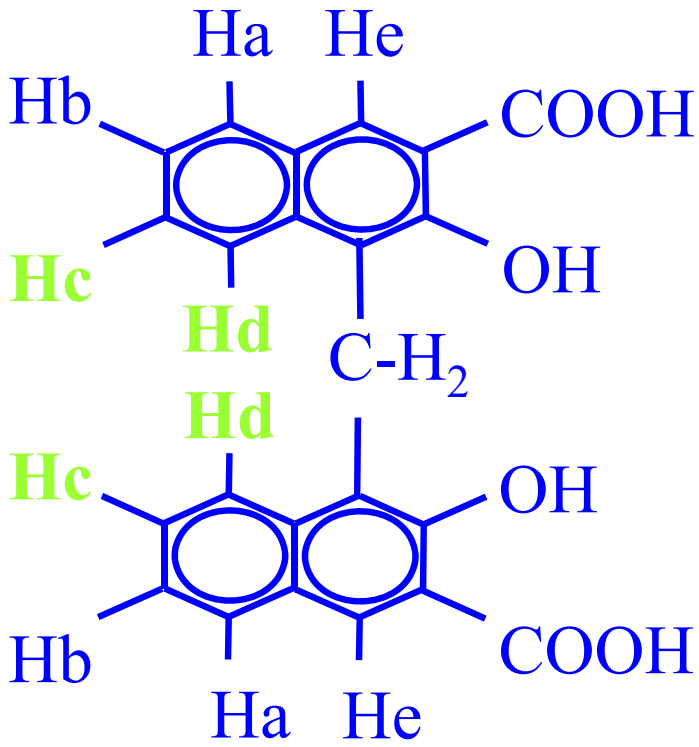
Welche ^{1}H koppeln miteinander?

- **Doppelquanten-gefiltertes COSY !**

  2D Korrelation über J-Kopplungen



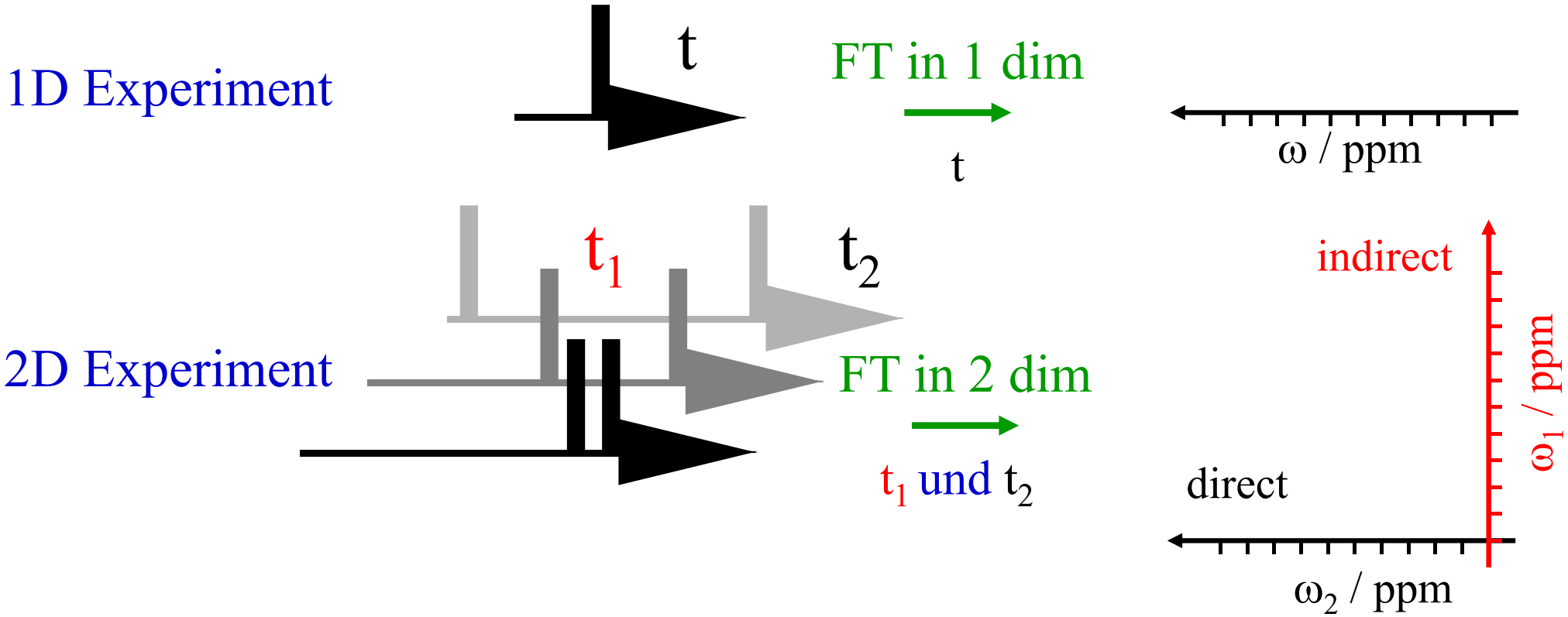
Pamoic acid



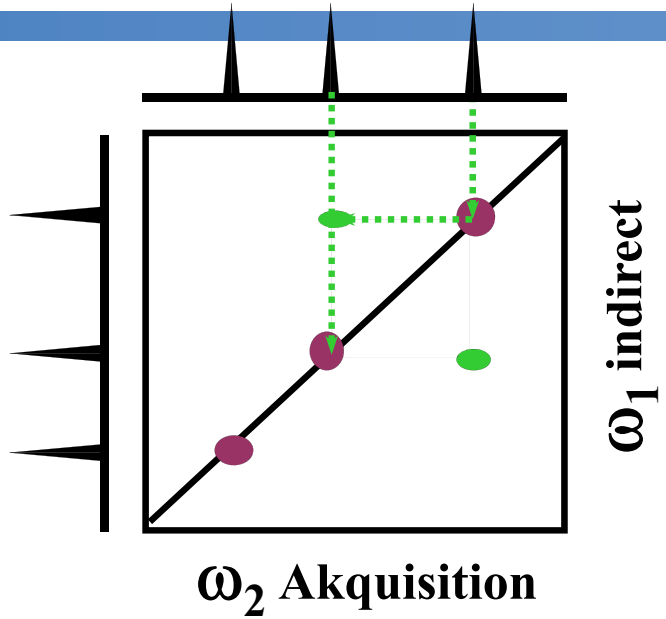
Die Beobachtung von Kreuzpeaks zeigt, daß **Hd und Hc skalar gekoppelt sind !**

Homonukleare 2D Spektren

Homonukleare 2D: $\omega_1 = \omega_2$ (= ^{1}H)



Homonukleare 2D Spektren



Diagonalpeaks: kein Magnetisierungstransfer
⇒ entspricht einem 1D Spektrum

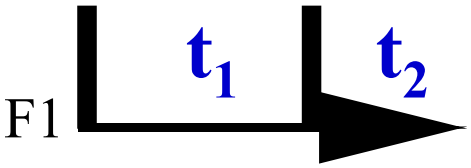
Kreuzpeaks: Magnetisierungstransfer zwischen zwei Kernen
⇒ Information über Korrelation zwischen Kernen

Verschiedene Arten von Magnetisierungstransfer:

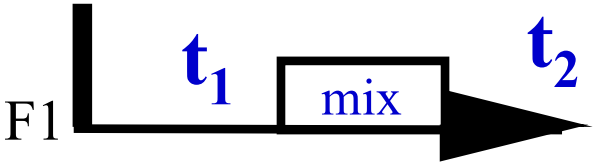
durch Bindungen - skalare Kopplung
Spektren liefern Information über Konnektivität

durch Raum - dipolare Kopplung
Spektren liefern Information über Konformation

Homonukleare 2D Spektren

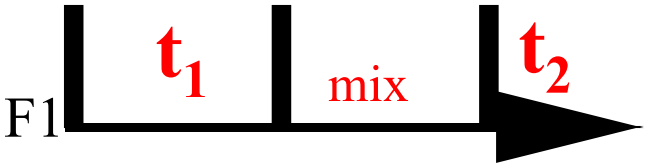


COSY:
Magnetisierungstransfer durch Bindung über homonucleare Kopplungen



TOCSY:
Mehrfacher Magnetisierungstransfer durch Bindung über homonucleare Kopplungen

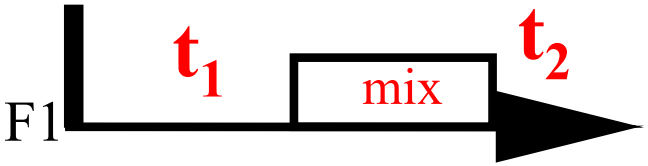
mixing time ≅ transfer steps / (10 * J(HH))



NOESY:
Magnetisierungstransfer durch den Raum (Abstand ≤ 5Å)

Mischzeit (mix) "Micromoleküle" ≅ T1

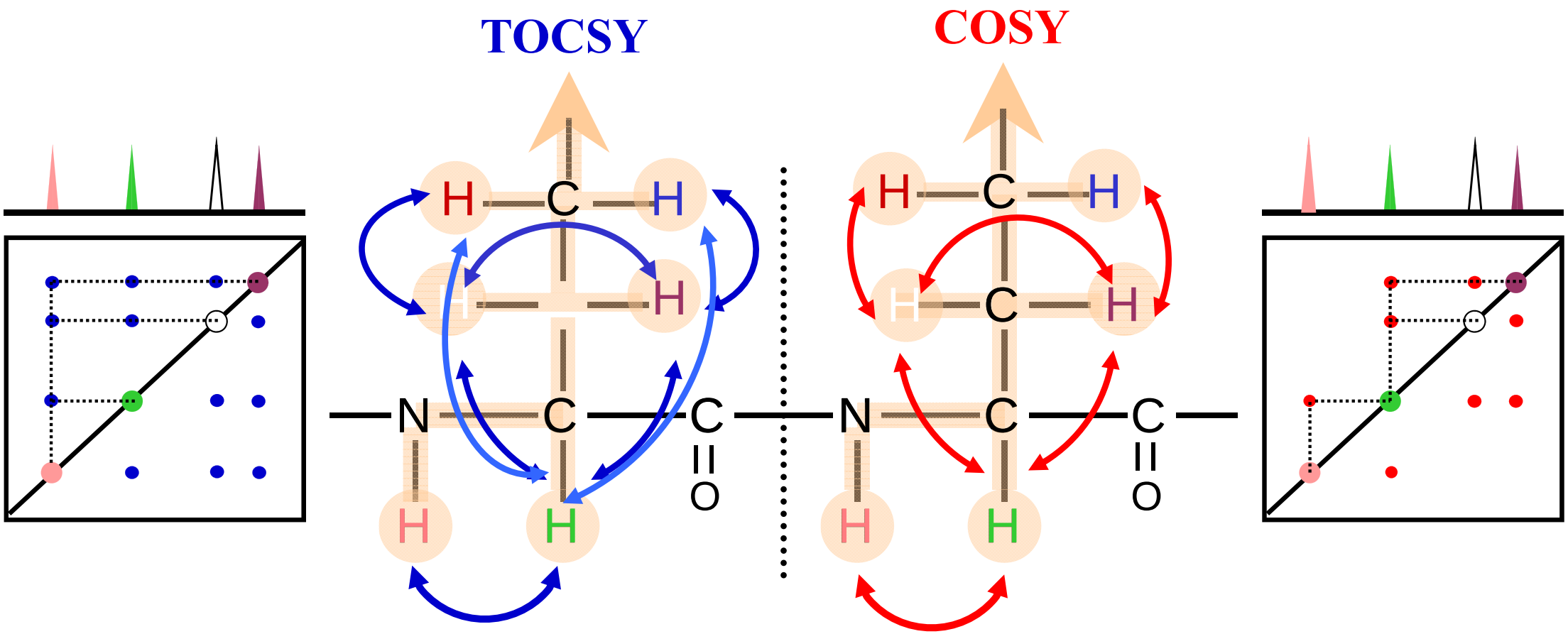
Mischzeit (mix) "Macromoleküle" ≅ 50 -150ms



ROESY:
Magnetisierungstransfer durch den Raum (Abstand ≤ 5Å)

Mischzeit (mix) ≅ NOESY Mischzeit

TOCSY - COSY im Vergleich

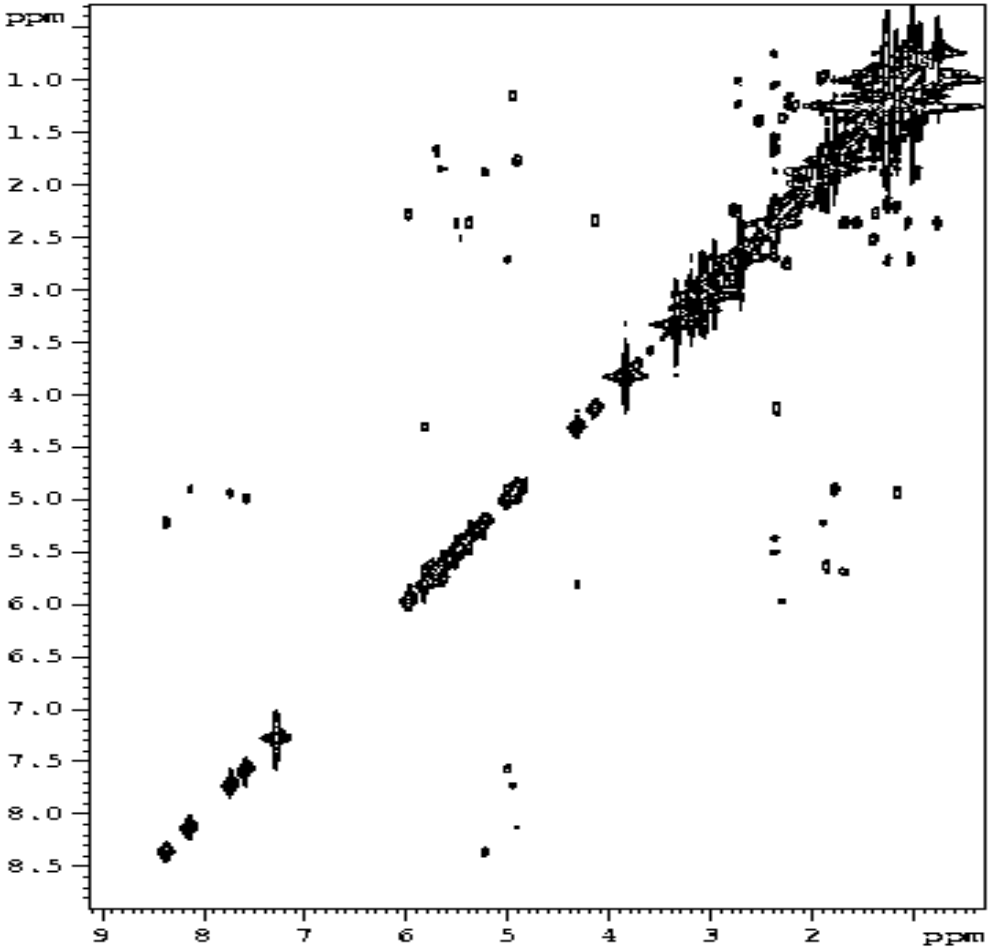


- Mischung über skalare Kopplung
- mehrfache Transferschritte innerhalb eines separierten Spinsystems

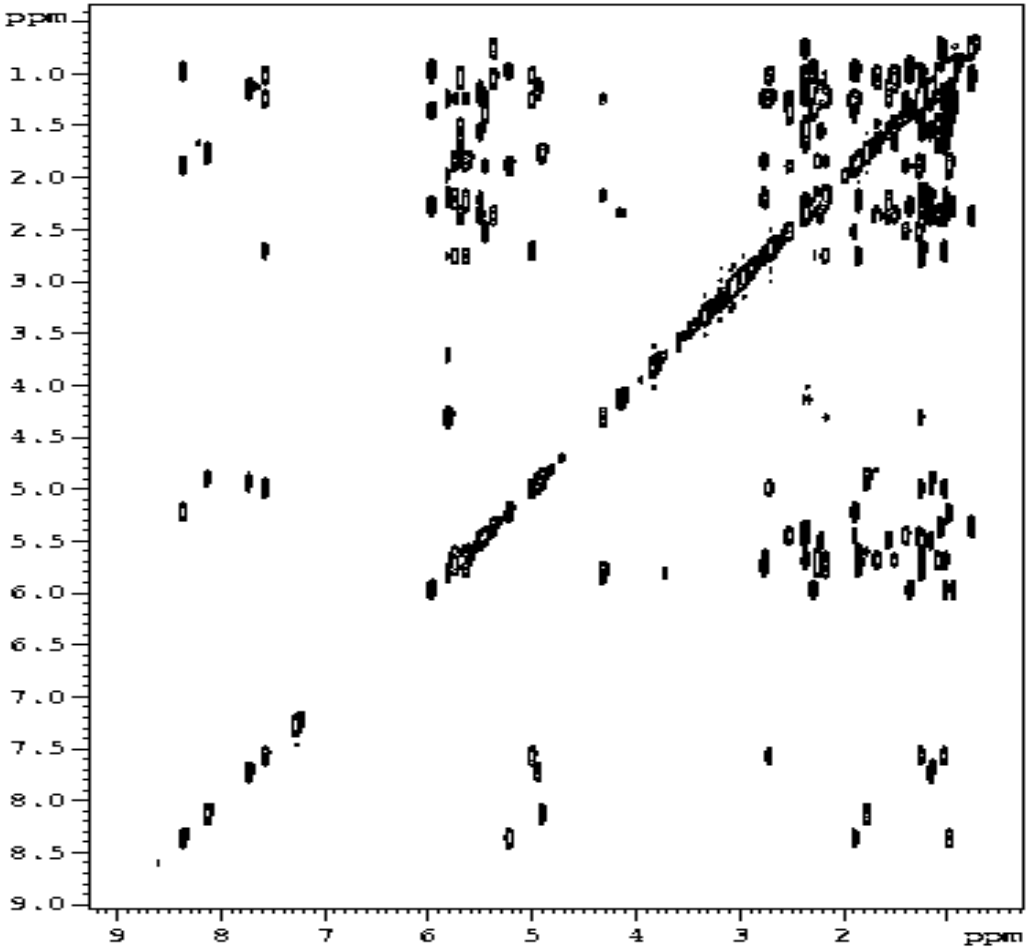
- Mischung über skalare Kopplung
- Einzelne Transferschritte

TOCSY - COSY im Vergleich

COSY: einzelne Transferschritte

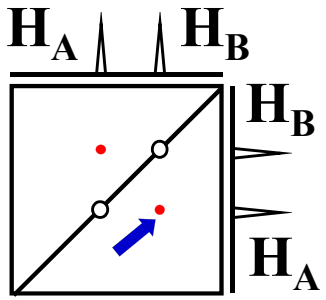


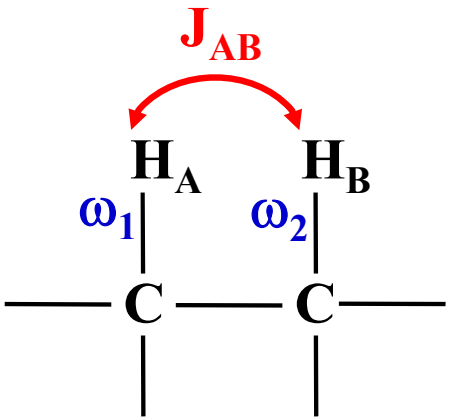
TOCSY: mehrfache Transferschritte

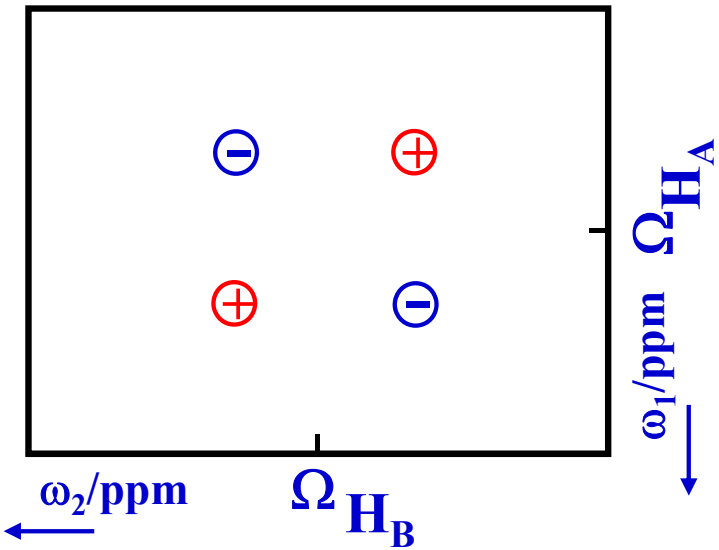


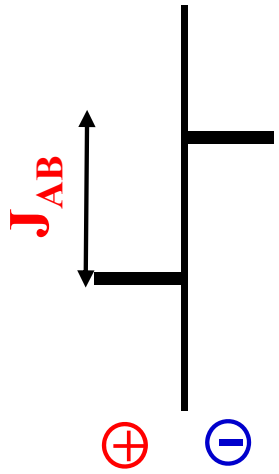
Kreuzpeaksignatur im DQF-COSY

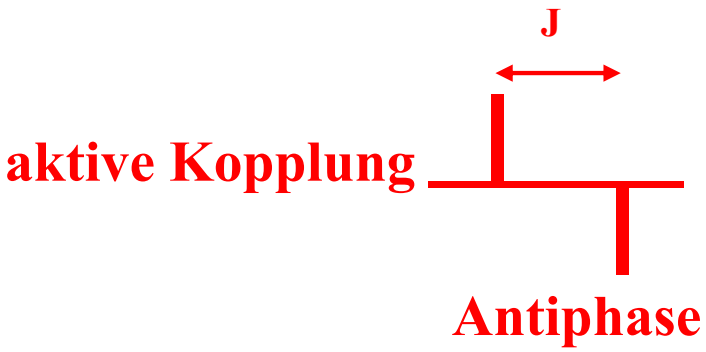
Kreuzpeak im 2-Spinsystem:

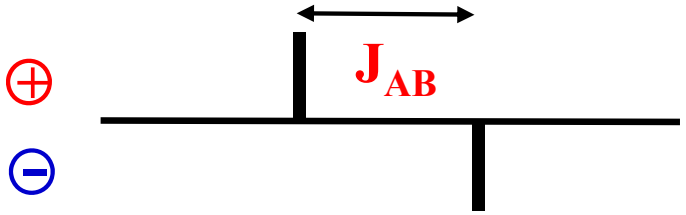








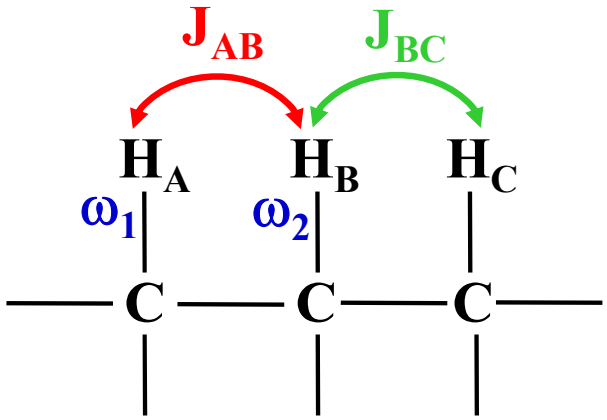


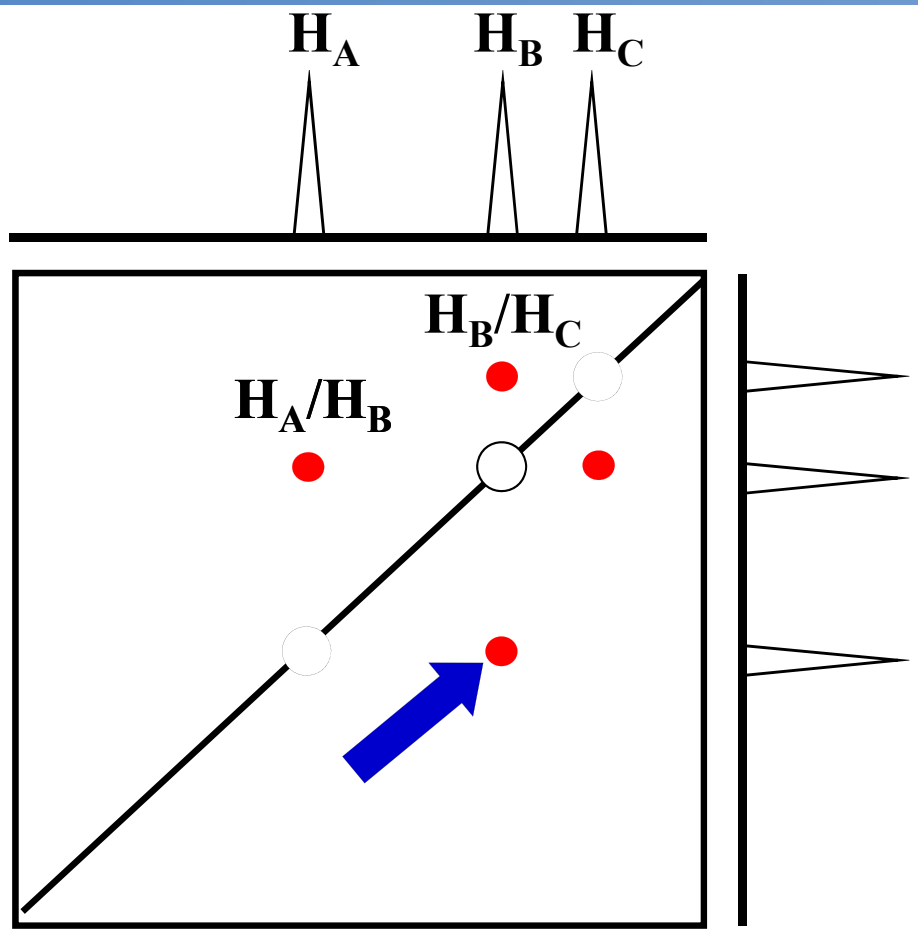


Kreuzpeaksignatur im DQF-COSY

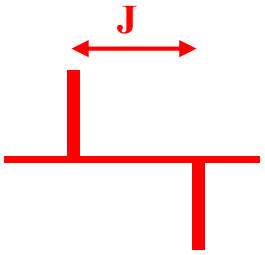
Spinsystem mit 3 Spins:
aktive and passive Kopplung

$J_{AB} > J_{BC}$

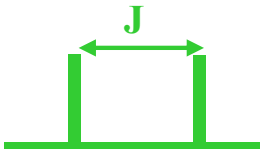




aktive Kopplung



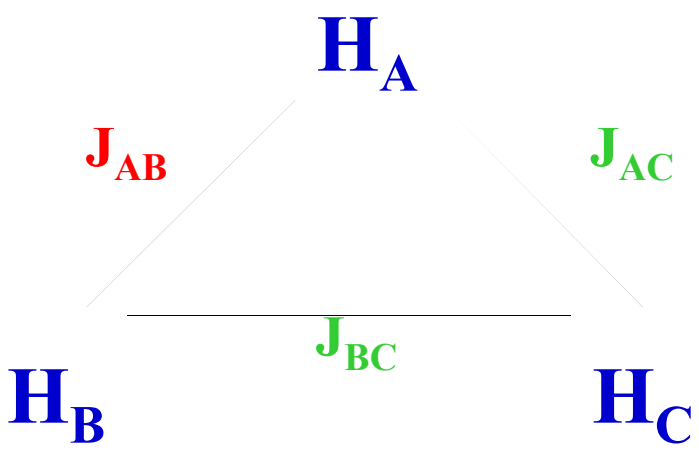
passive Kopplung



in-phase

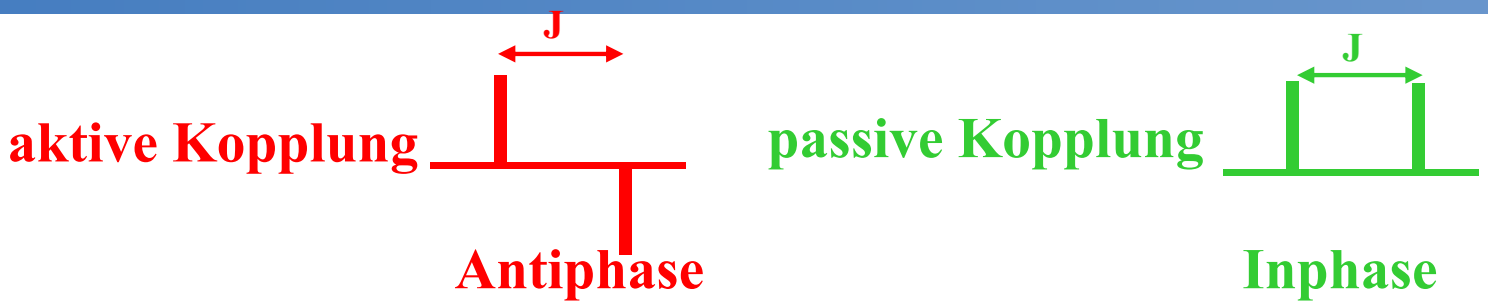
Kreuzpeaksignatur im DQF-COSY

Spinsystem mit 3 Spins:
aktive and passive Kopplung

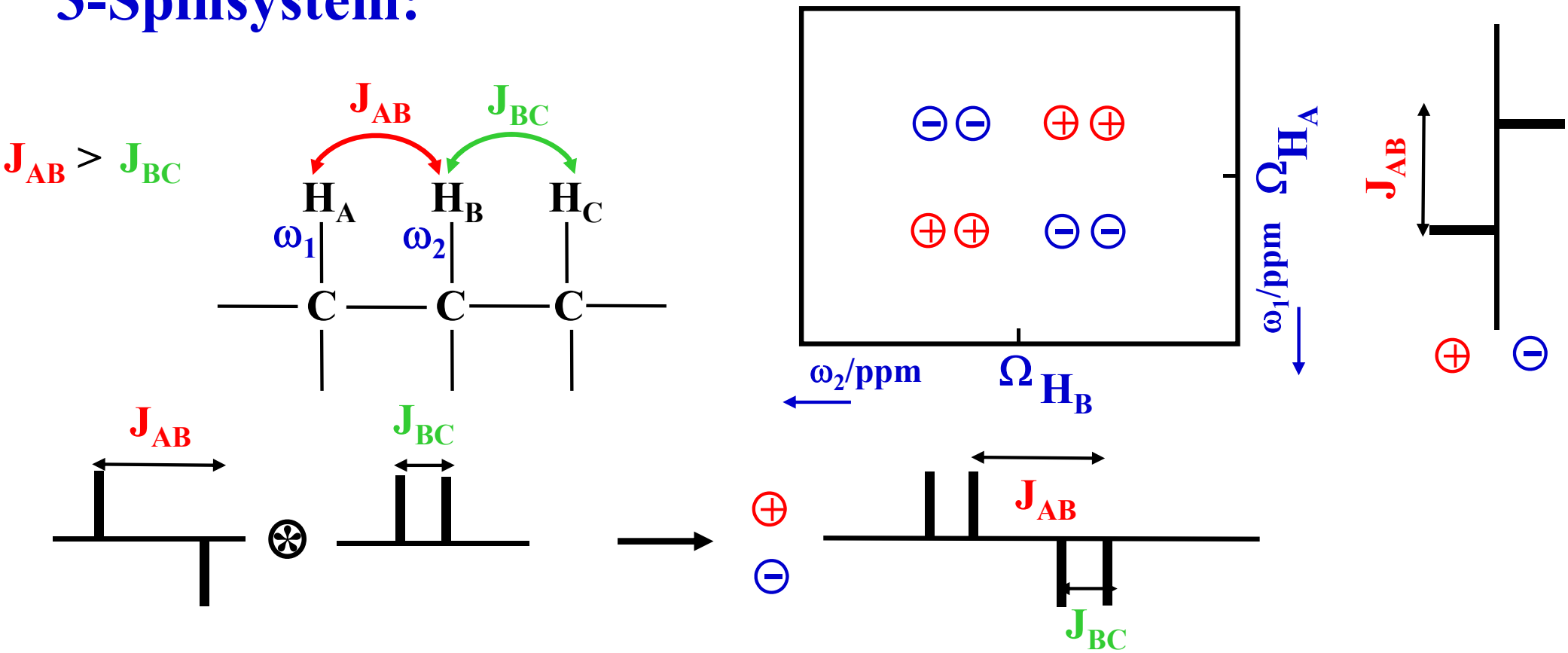


im Kreuzpeak H_A/HB
aktive Kopplung: J_{AB}
passive Kopplungen: J_{AC}, J_{BC}

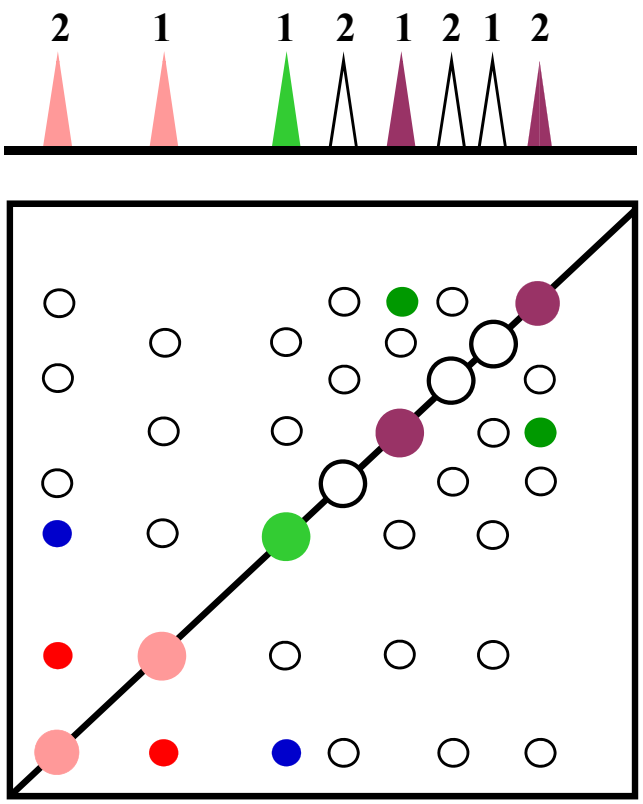
Kreuzpeaksignatur im DQF-COSY

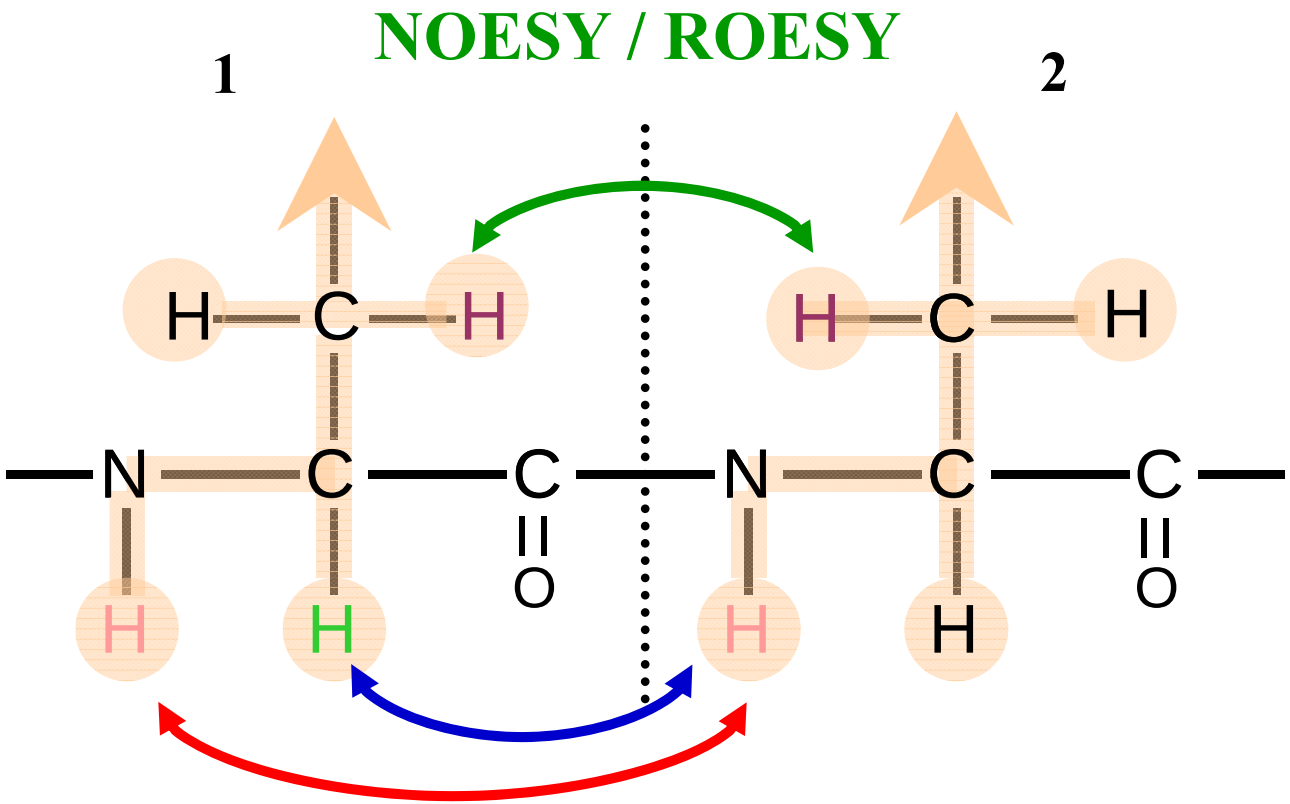


3-Spinsystem:



NOESY und ROESY Information

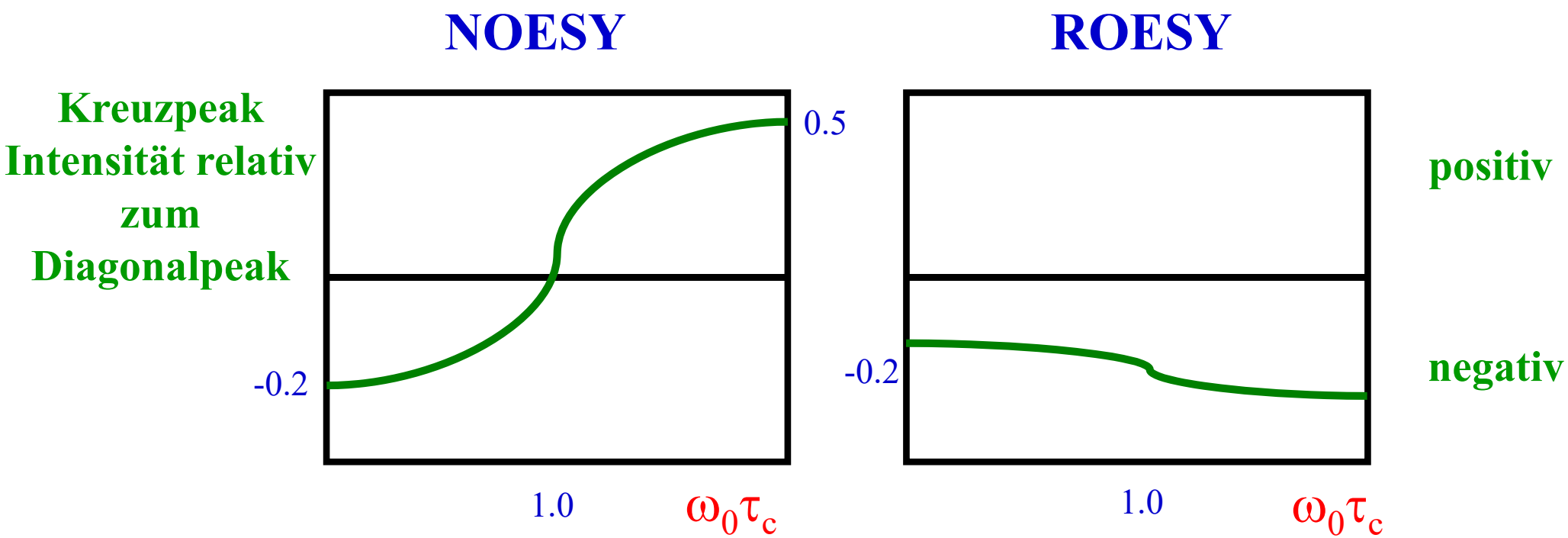




- Viele Korrelationen beobachtbar
- max. 5 Å Abstand zwischen zwei Protonen

⇒ **Transfer aufgrund räumlicher Nähe von Protonen**

NOESY / ROESY Kreuzpeakvergleich



Molekülgröße: ← klein groß → ← klein groß →

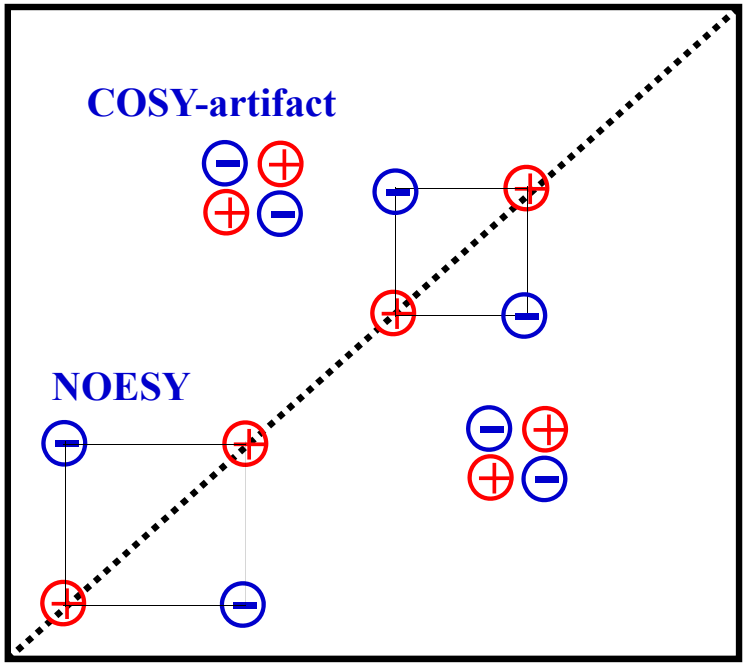
Temperatur: ← hoch niedrig → ← hoch niedrig →

ω_0 = **Spektrometerfrequenz**

τ_c = **Rotationskorrelationszeit**
(proportional zur Molekülgröße, Temperatur-abhängig)

Kreuzpeaks in NOESY

Die Diagonalpeaks werden positiv gephast



negative Kreuzpeaks:

- immer NOESY-Peaks (Mikromoleküle)

positive Kreuzpeaks:

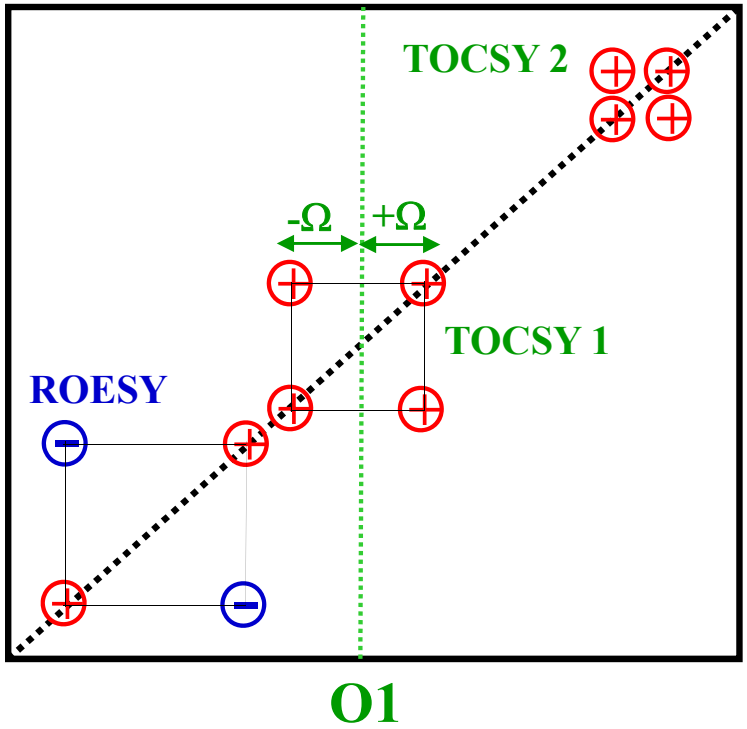
- NOESY (Makromoleküle, z.B. Proteine)
- Chemischer Austausch

Gemischte Peakphasen:

- COSY-Artifakte

Kreuzpeaks in ROESY

Die Diagonalpeaks werden positiv gephast



Negative Kreuzpeaks:

- immer ROESY

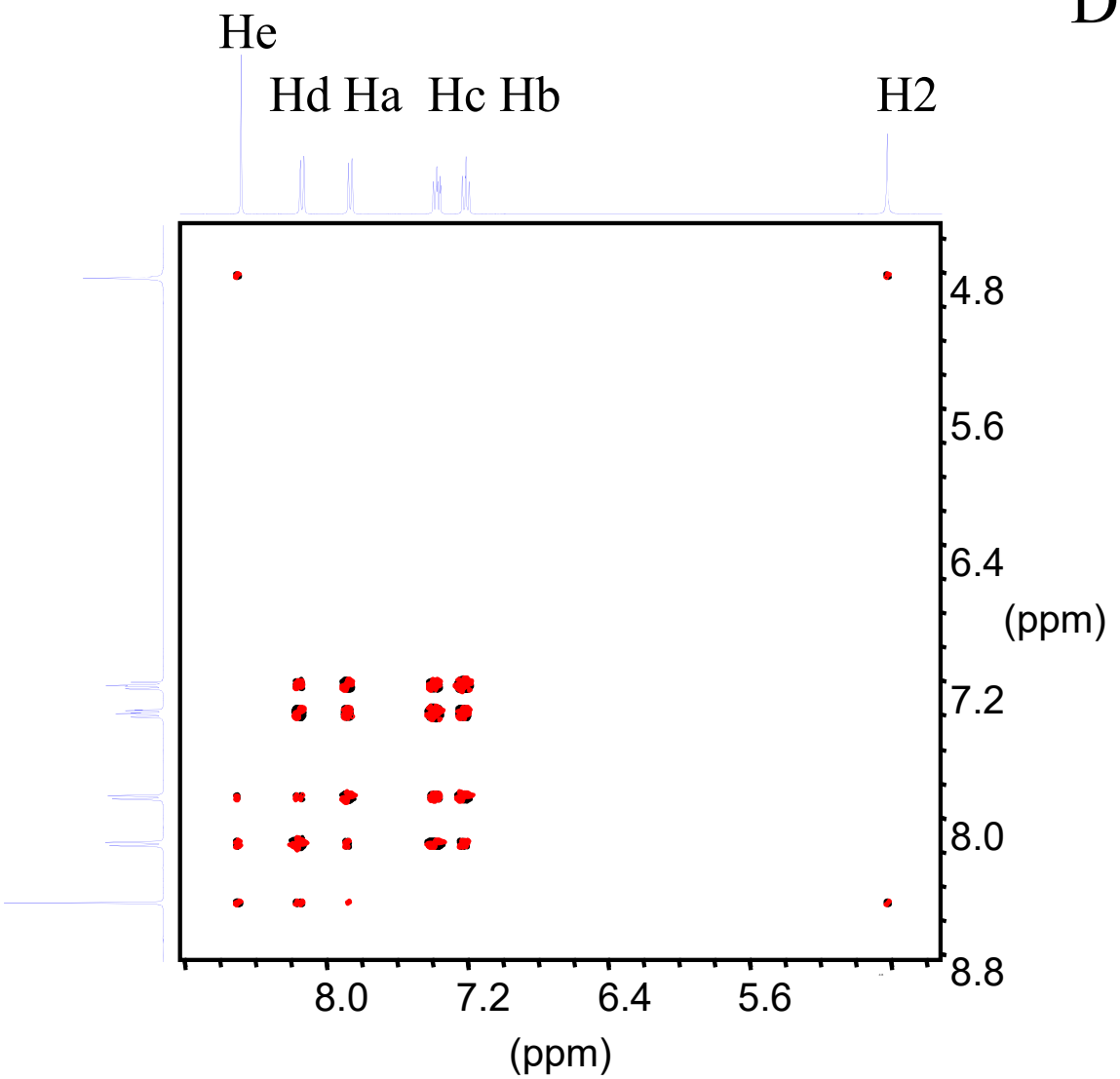
Positive Kreuzpeaks:

- Peaks aufgrund von Chemischen Austausch
- TOCSY Artefakte

Welche ^{1}H koppeln miteinander?

- **Doppelquanten-gefiltertes COSY !**

  Darstellung bei niedrigerem S/N

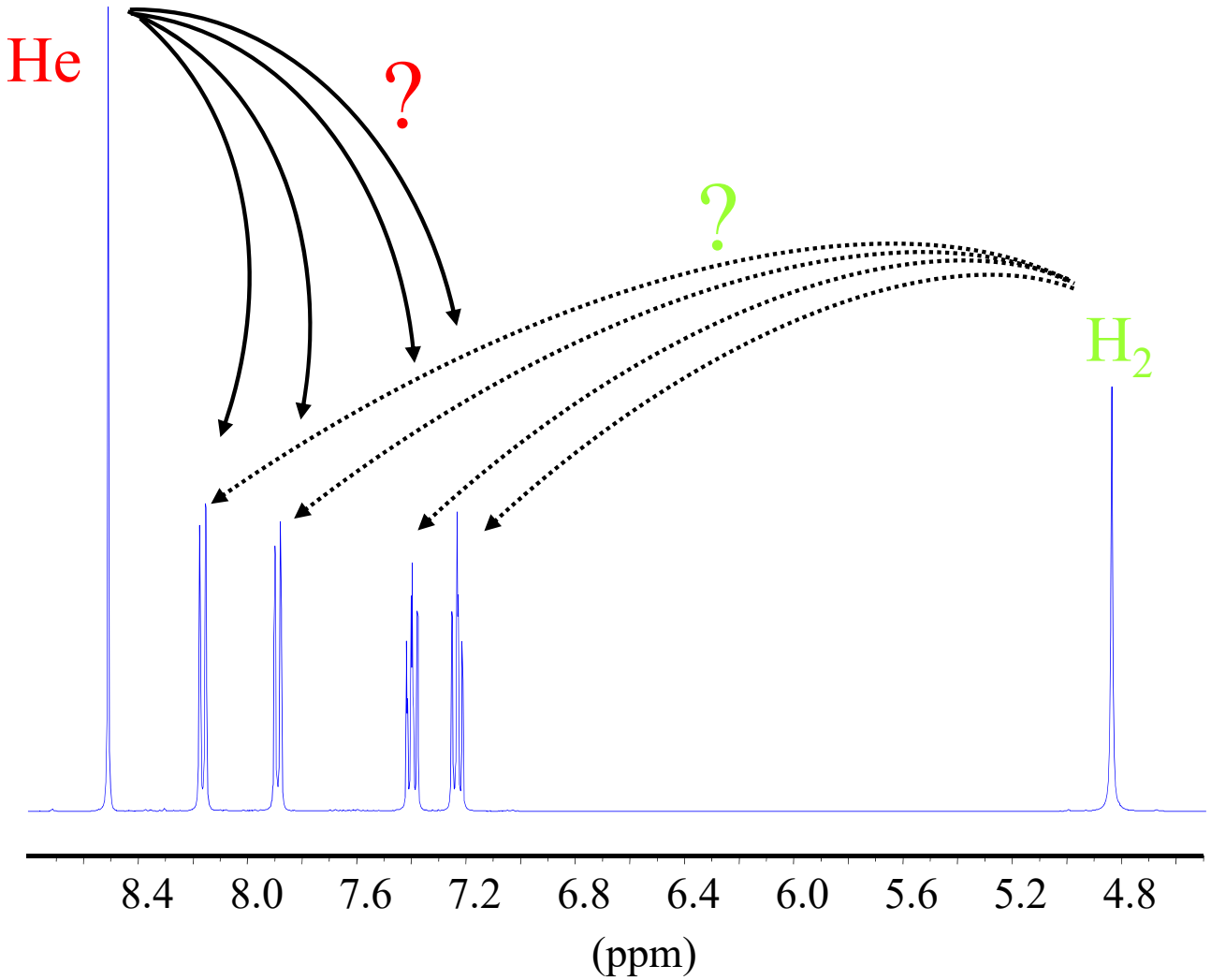


Pamoic acid

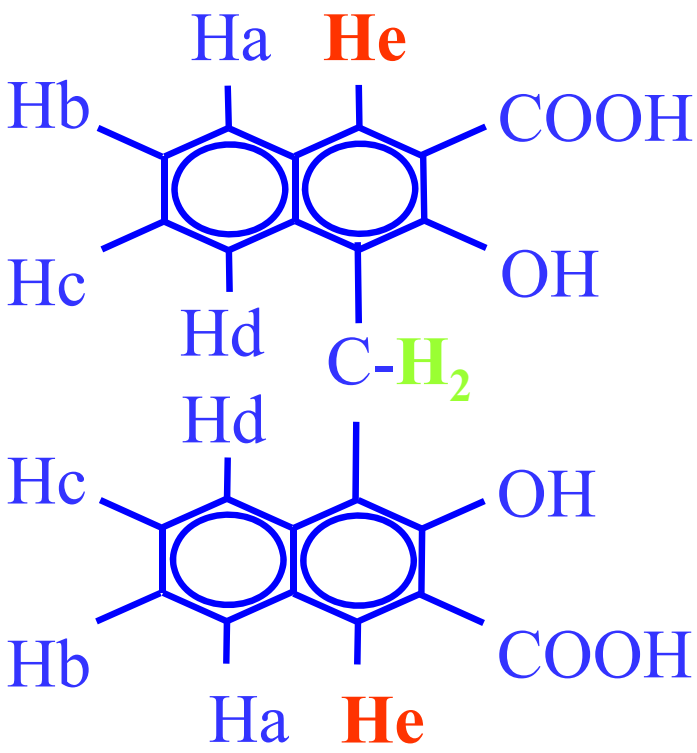
Viele Kopplungen sind vorhanden

Die Stärke der Kreuzpeaks ist ungefähr proportional der Größe der skalaren Kopplungs-konstanten

Welche ^{1}H sind räumlich benachbart?



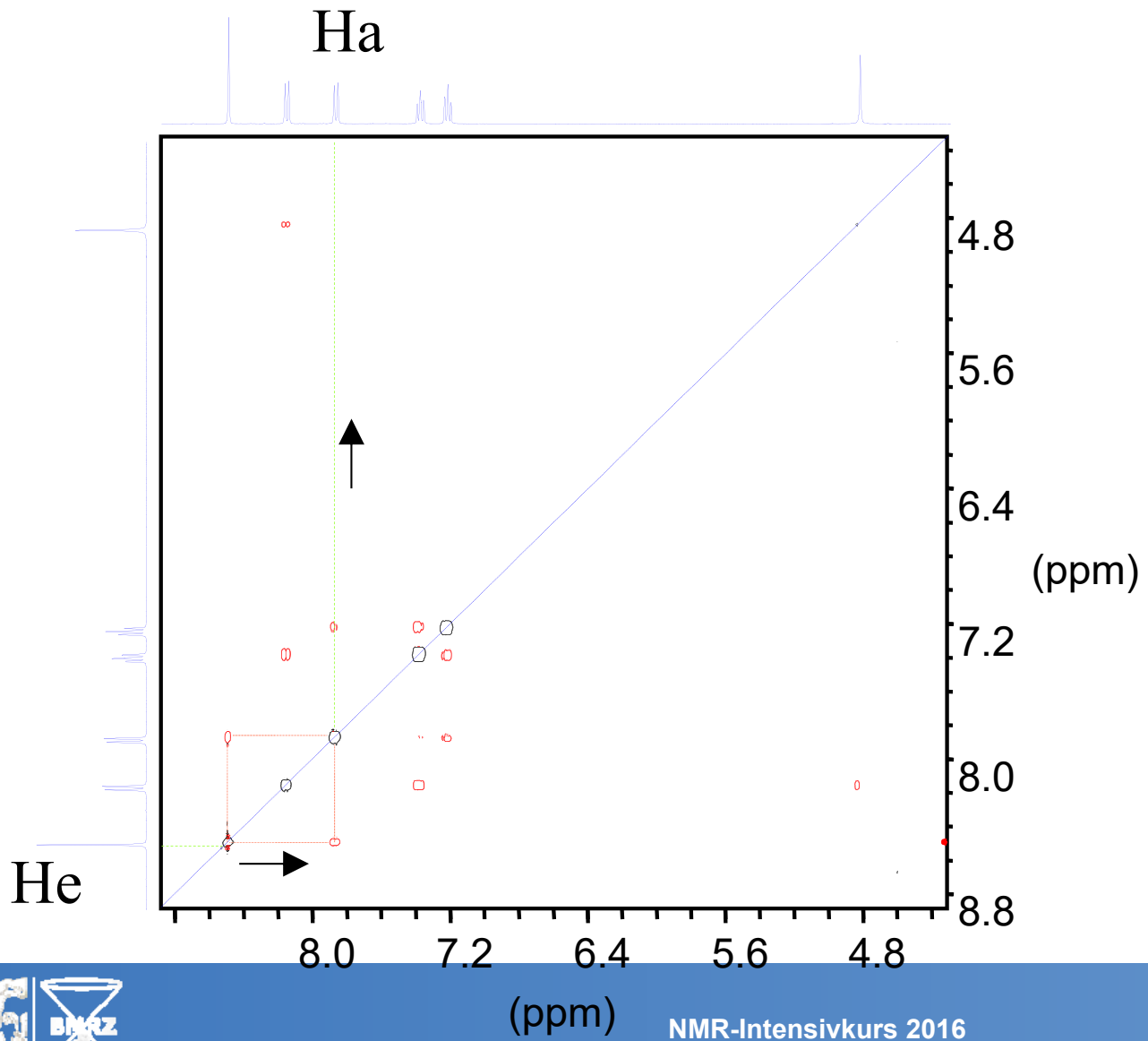
Pamoic acid

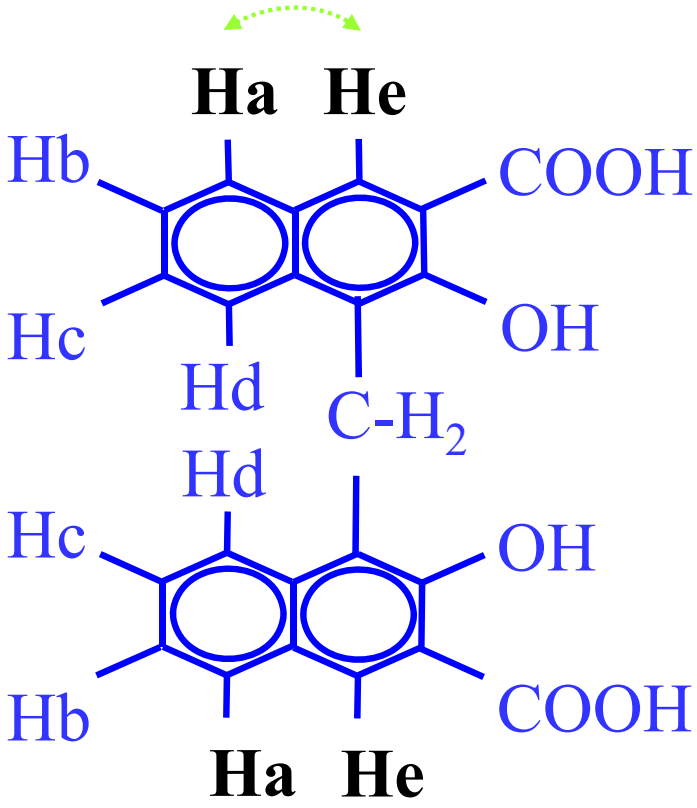


Welche ^{1}H sind räumlich benachbart?

2D NOESY/ROESY Experiment !

2D Korrelation durch durch den Raum vermittelte, dipolare Kopplung

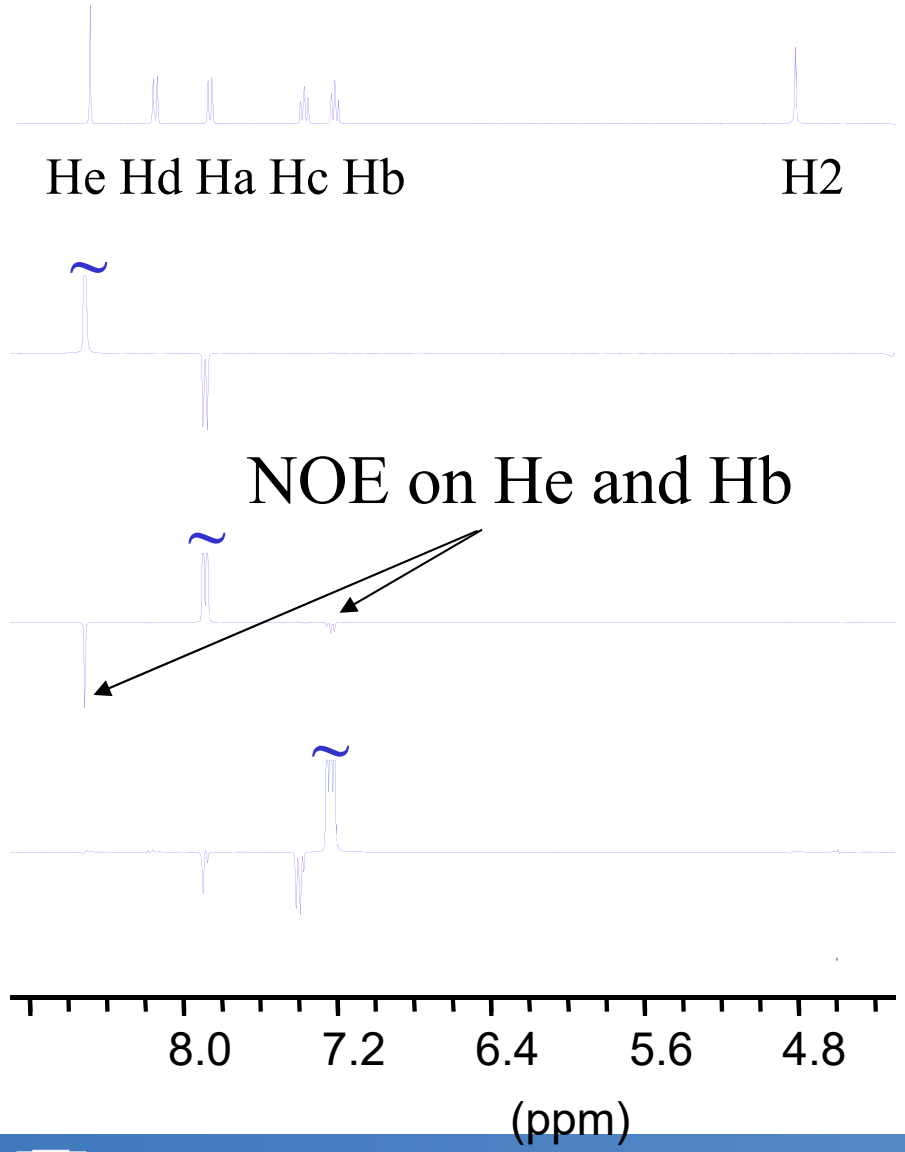




Pamoic acid

Welche ^{1}H sind räumlich benachbart?

- 2D NOESY, ausgewählte horizontale Schnitte

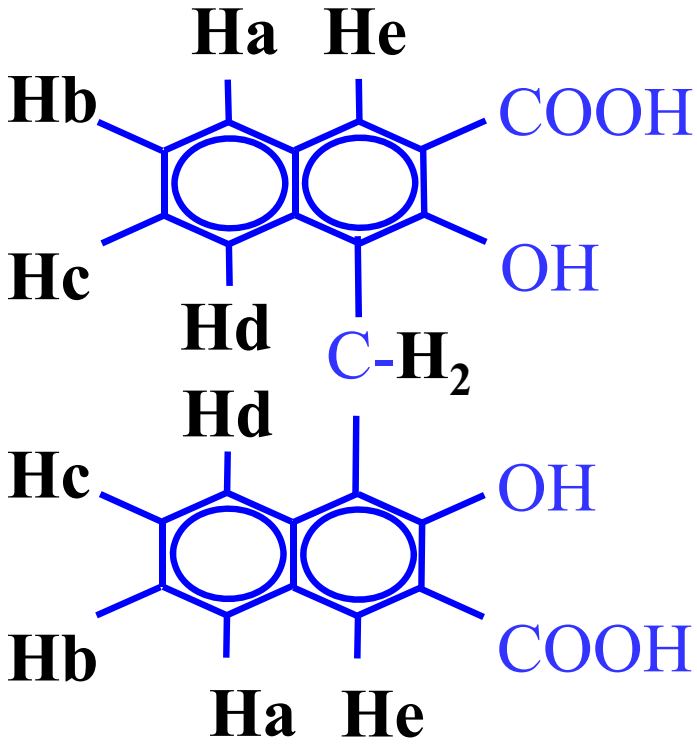


1D Referenz

He / Ha

Ha / He
Ha / Hb

Hb / Hc
Hb / Ha

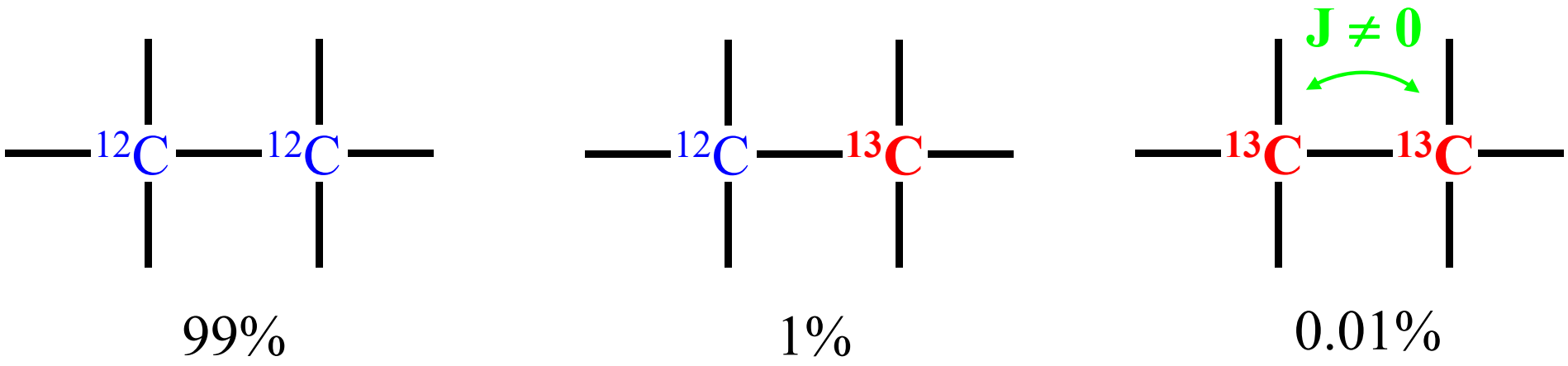


Pamoic acid

Gibt es ^{13}C-^{13}C Korrelationsexperimente?

- Bestimme <u>mittels J-Kopplung</u> welche Kohlenstoffe direkt gebunden sind

- Bei natürlciher Häufigkeit:



- 2D **INADEQUATE** Experiment !

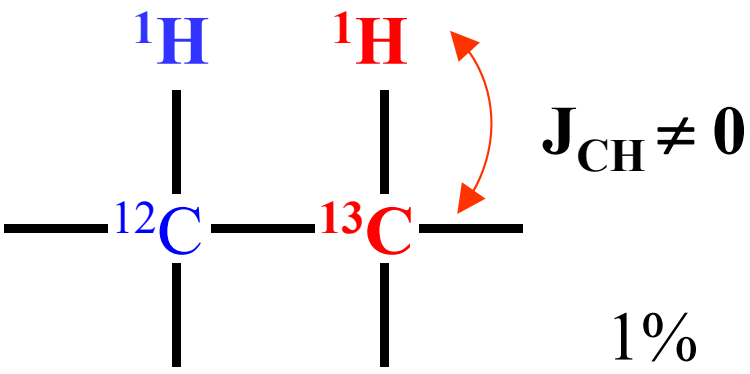
Welches ^{1}H ist an welches ^{13}C gebunden?

- Konnektivitäten zwischen ^{1}H und ^{13}C mittels **J_{CH} Kopplungen (gilt identisch auch für andere Heterokerne).**

- **"Inverse Experimente"**

E.g. HMQC, HMBC, HSQC...

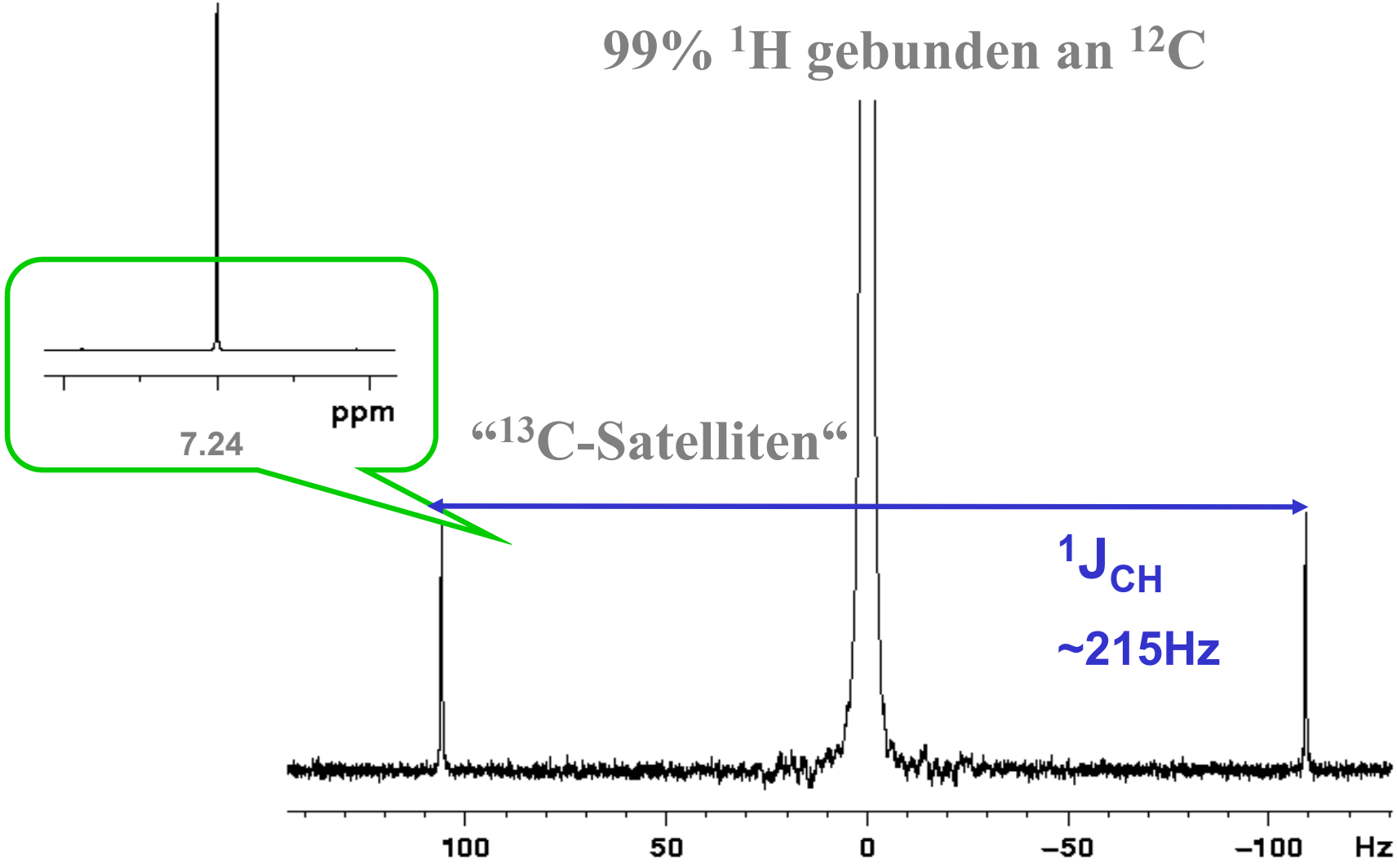
(Informationsgehalt: HSQC=HMQC)



HSQC, HMQC: $^{1}J_{CH}$

HMBC: $^{2,3}J_{CH}$

Das ^{1}H Spektrum von Chloroform



Zwei Arten heteronuklear Experimente

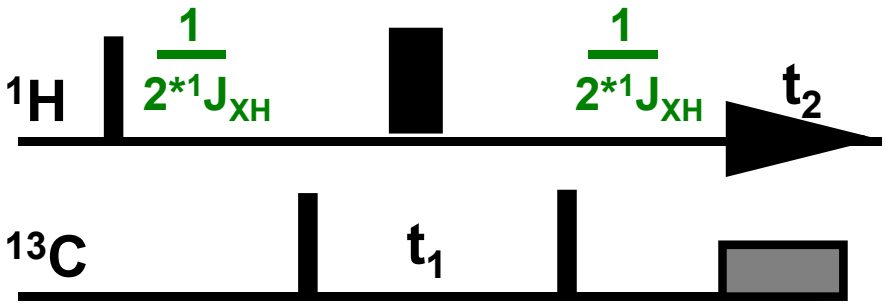
^{1}H Anregung, ^{1}H Detektion:

HMQC=heteronuclear multiple quantum coherence
HSQC=heteronuclear single quantum coherence
HMBC =heteronuclear multiple bond coherence

^{1}H Anregung, ^{13}C Detektion:

XHCORR=X-H correlation
COLOC=X-H long-range correlation

Heteronukleare 2D Experimente



^{1}H Anregung, ^{1}H Beobachtung: **HMQC, HSQC, HMBC**

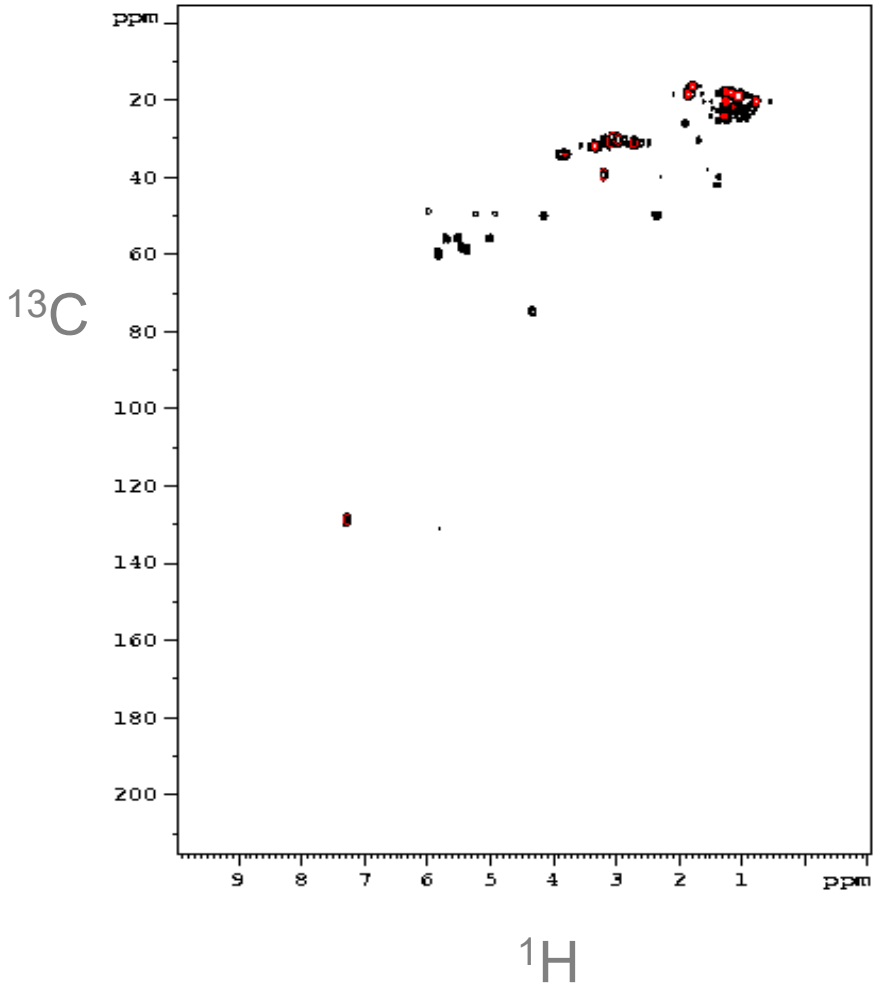
Experimentelle Empfindlichkeit: $\gamma_{anreg.} * \gamma^{3/2}_{beob.}$

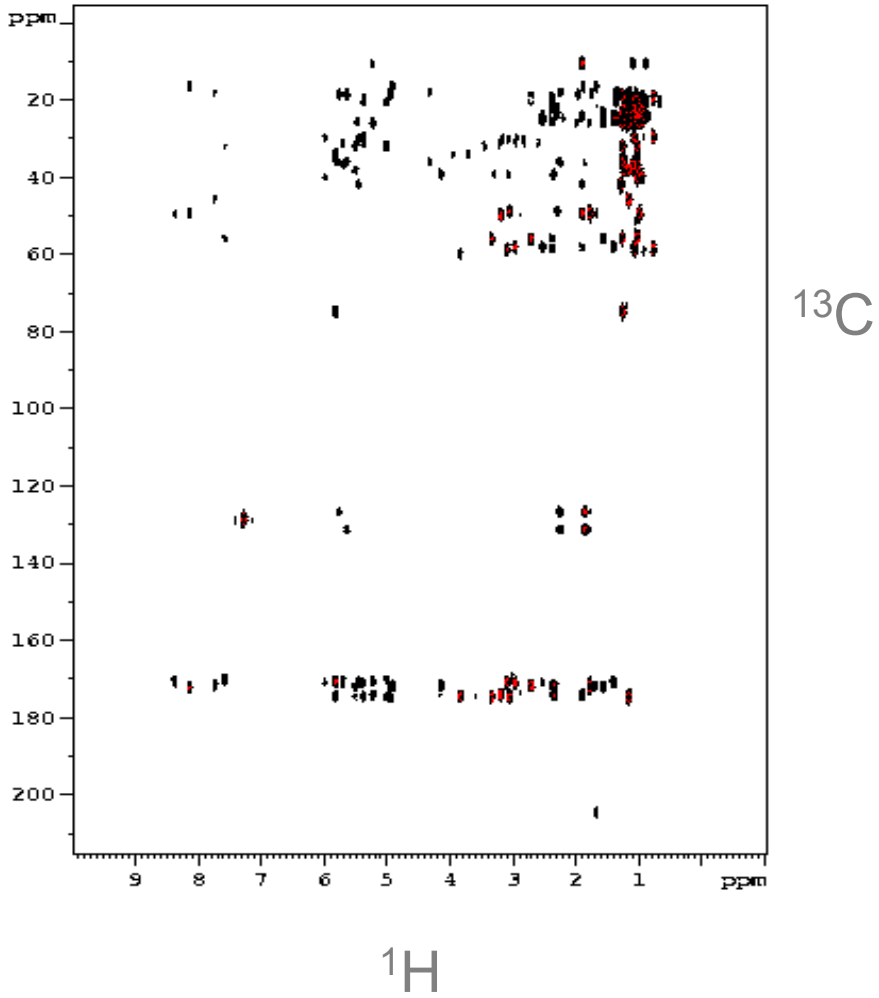
γ = gyromagnetisches Verhältnis eines Kerns

Empfindlichkeitsgewinn: ^{13}C-HMQC vs. 1D ^{13}C-observe: 31.4

^{15}N-HMQC vs. 1D ^{15}N-observe: 305

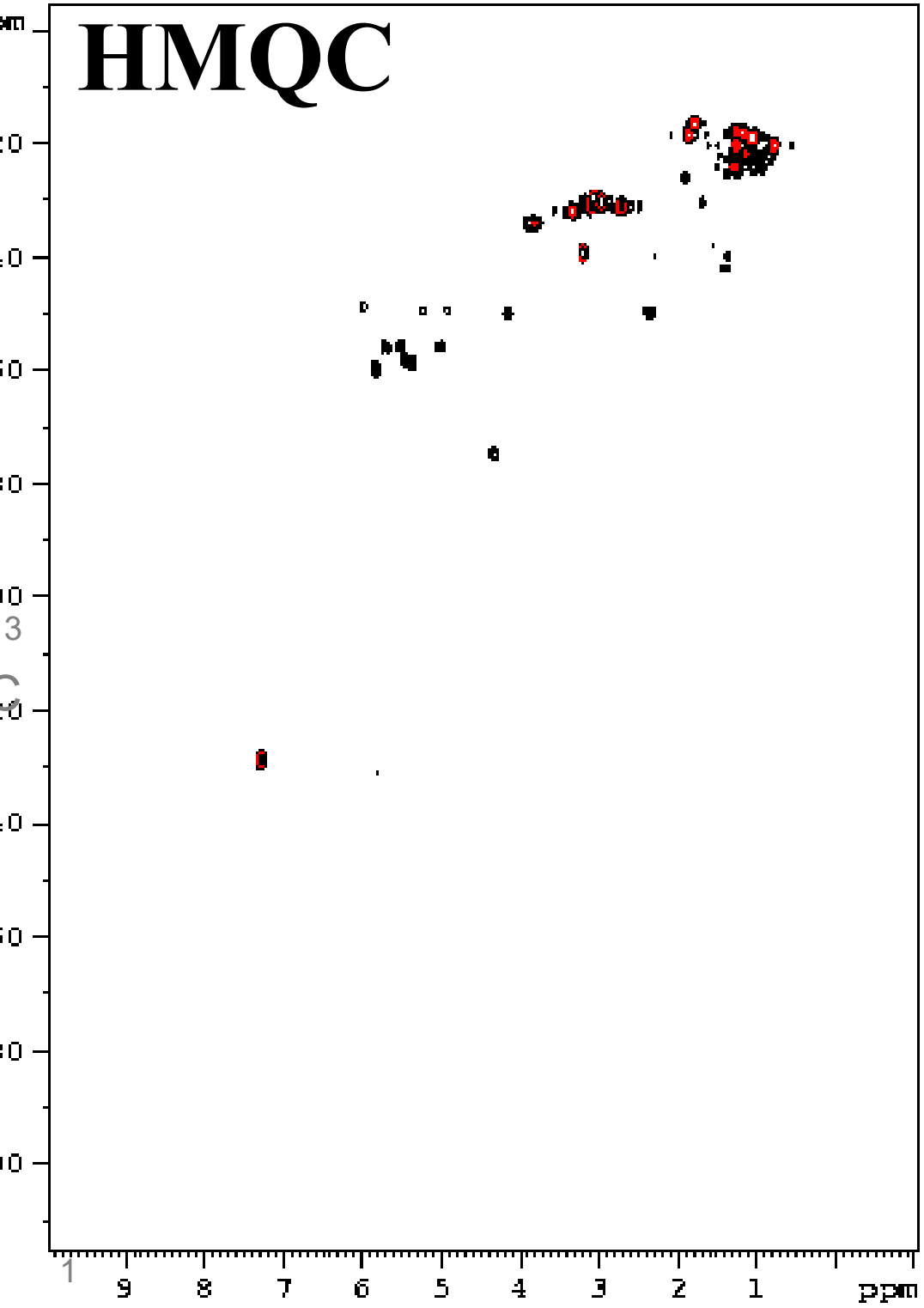
HMQC und HMBC

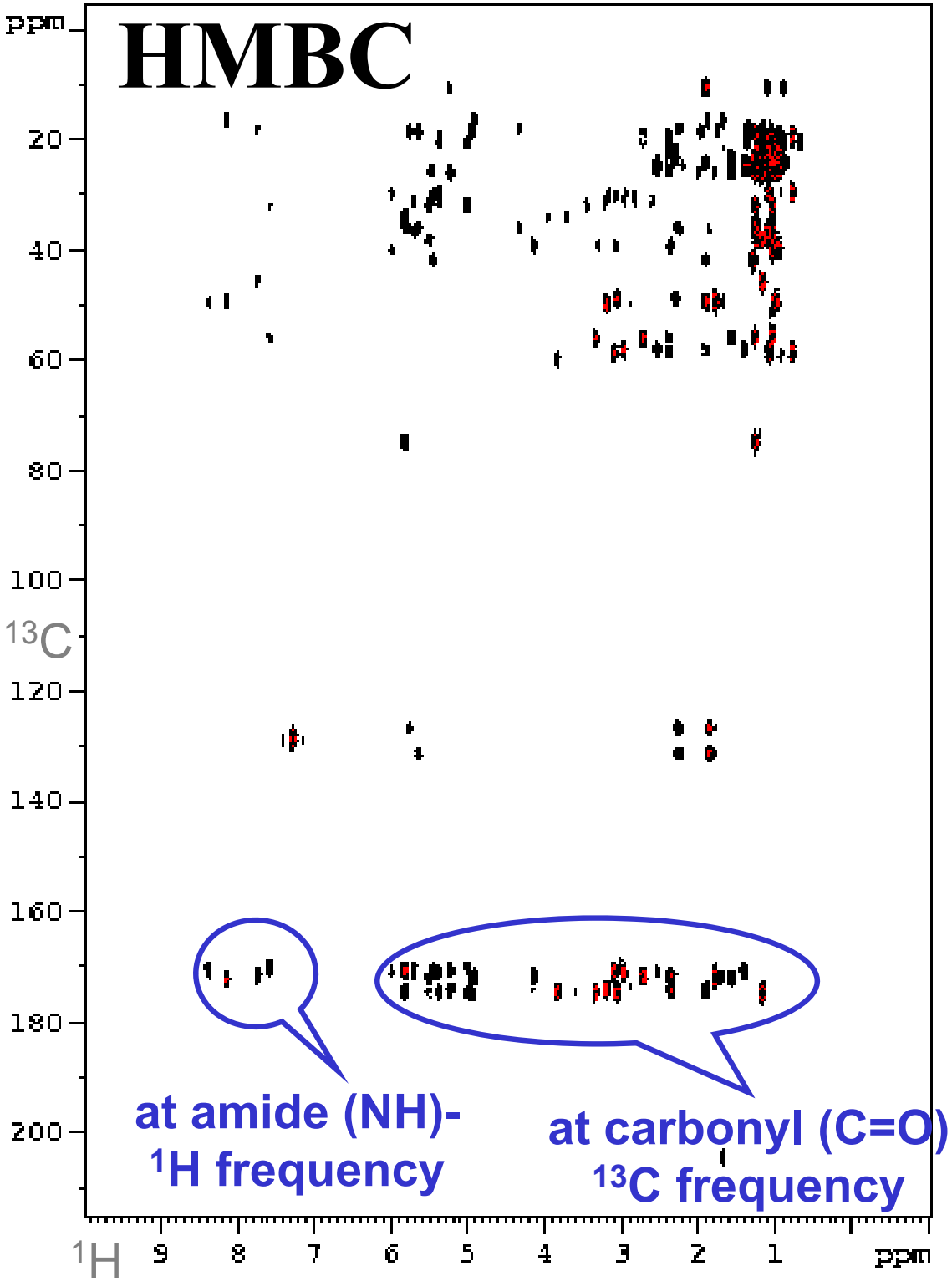




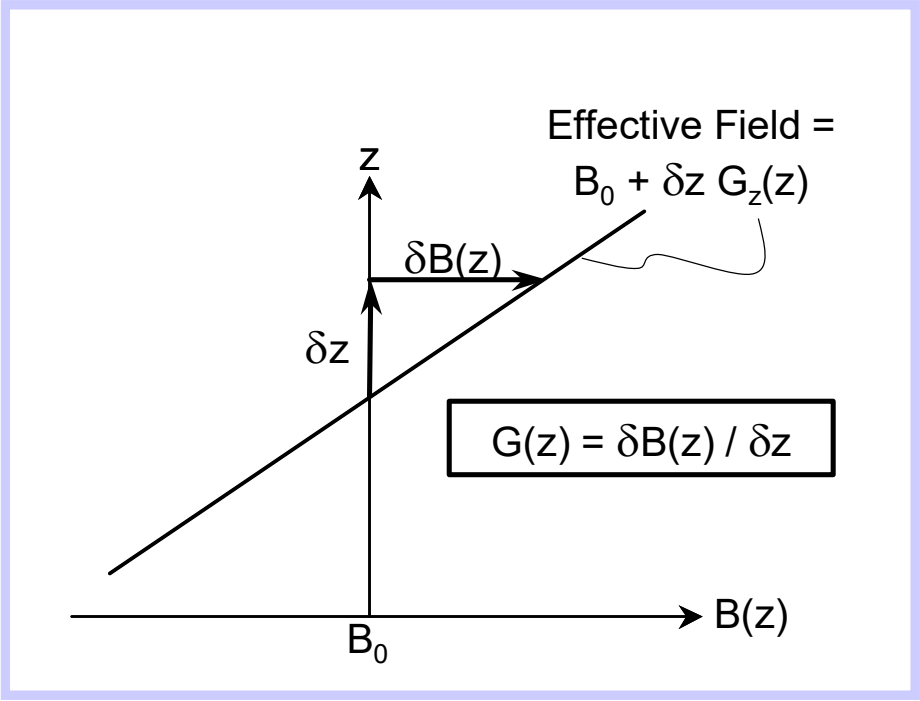
Direkte ^{13}C-^{1}H Korrelation

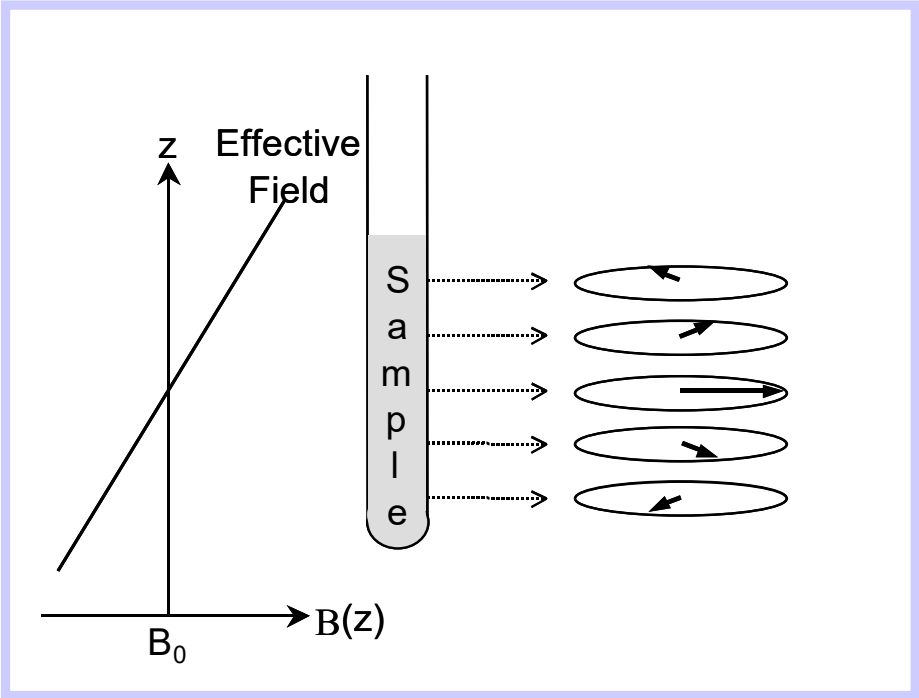
Weitbereichs (2 to 5 Bindungen) Korrelation


HMQC
ppm
9
8
7
6
5
4
3
2
1
ppm


HMBC
ppm
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
13C
at amide (NH)-
1H frequency
at carbonyl (C=O)
13C frequency
1H
9
8
7
6
5
4
3
2
1
ppm

Gradients?





A Gradient erzeugt eine (lineare) Änderung des magnetischen Feld entlang der (z)-Richtung der Probe

⇒ Die Larmorbindung der Spins hängt von ihrer Position im Röhrchen ab.

Der Dephasierungseffekt

$$E_G = G_z \, \tau \, S \, p \, \gamma$$

G_z = Gradientenstärke

τ= Gradientenstärke

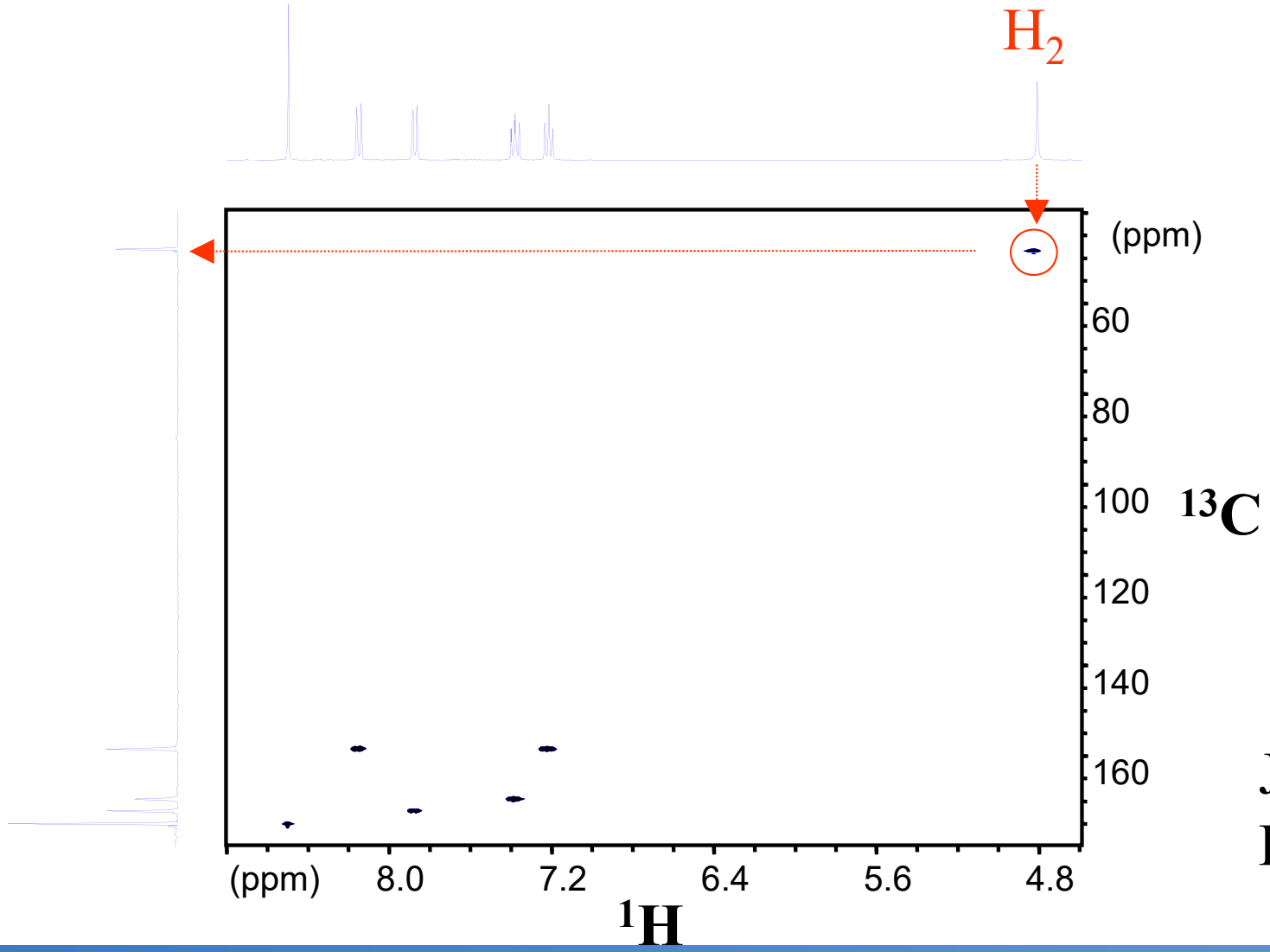
S = Gradientenform

p = Kohärenzordnung, die durch Gradienten beeinflusst wird

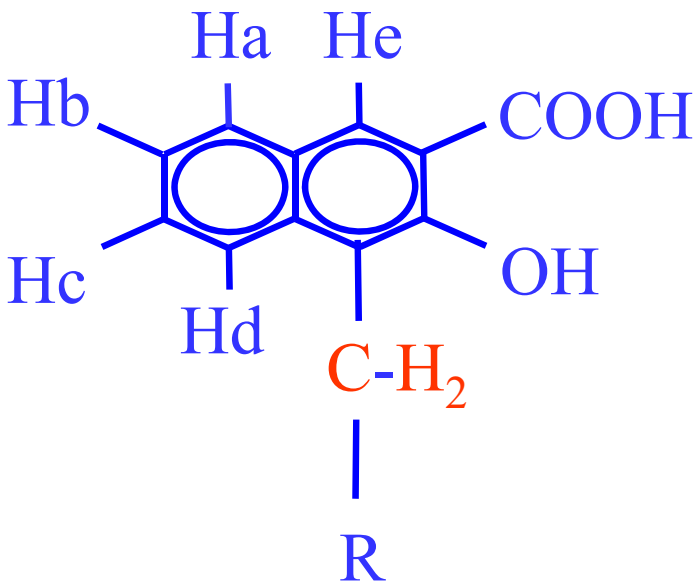
γ = gyromagnetisches Verhältnis der Kohärenz, die durch Gradienten beeinflusst wird.

Welches ^{1}H ist an welches ^{13}C gebunden?

- 2D HSQC Experiment for **direkte Konnektivitäten**



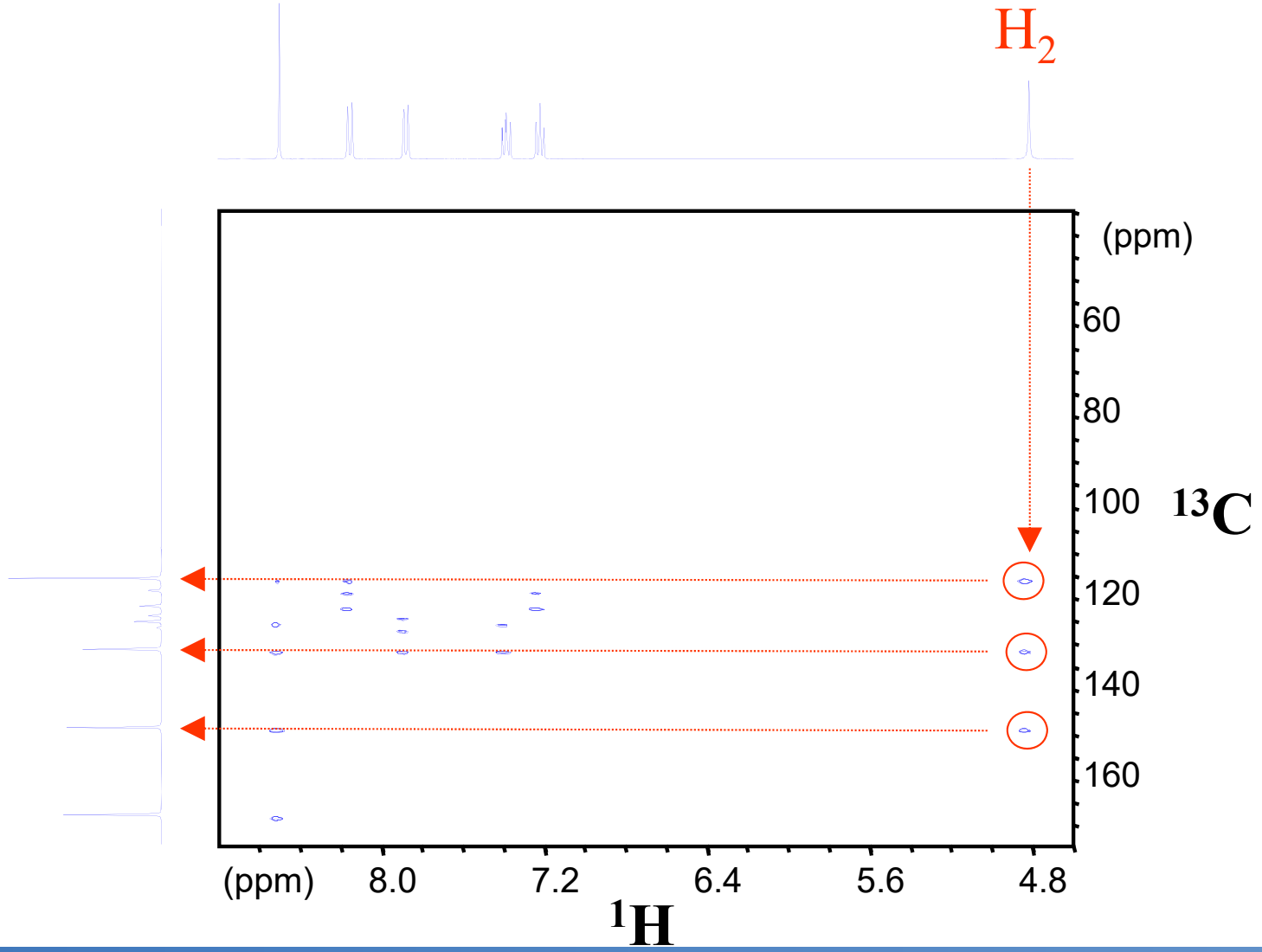
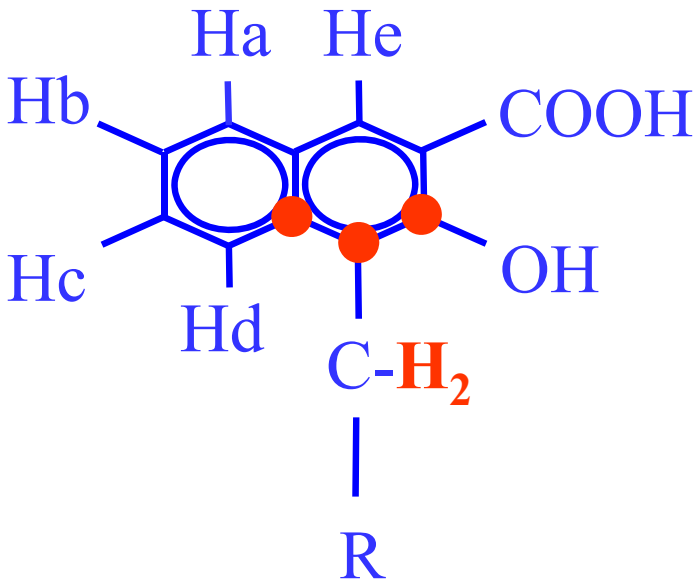
Pamoic acid



Jeder Peak eine CH-Bindung !

Welches ^{1}H ist an welches ^{13}C gebunden?

- 2D HMBC Experiment for **entfernte Konnektivität**



Pamoic acid