

2D NMR-Spektroskopie

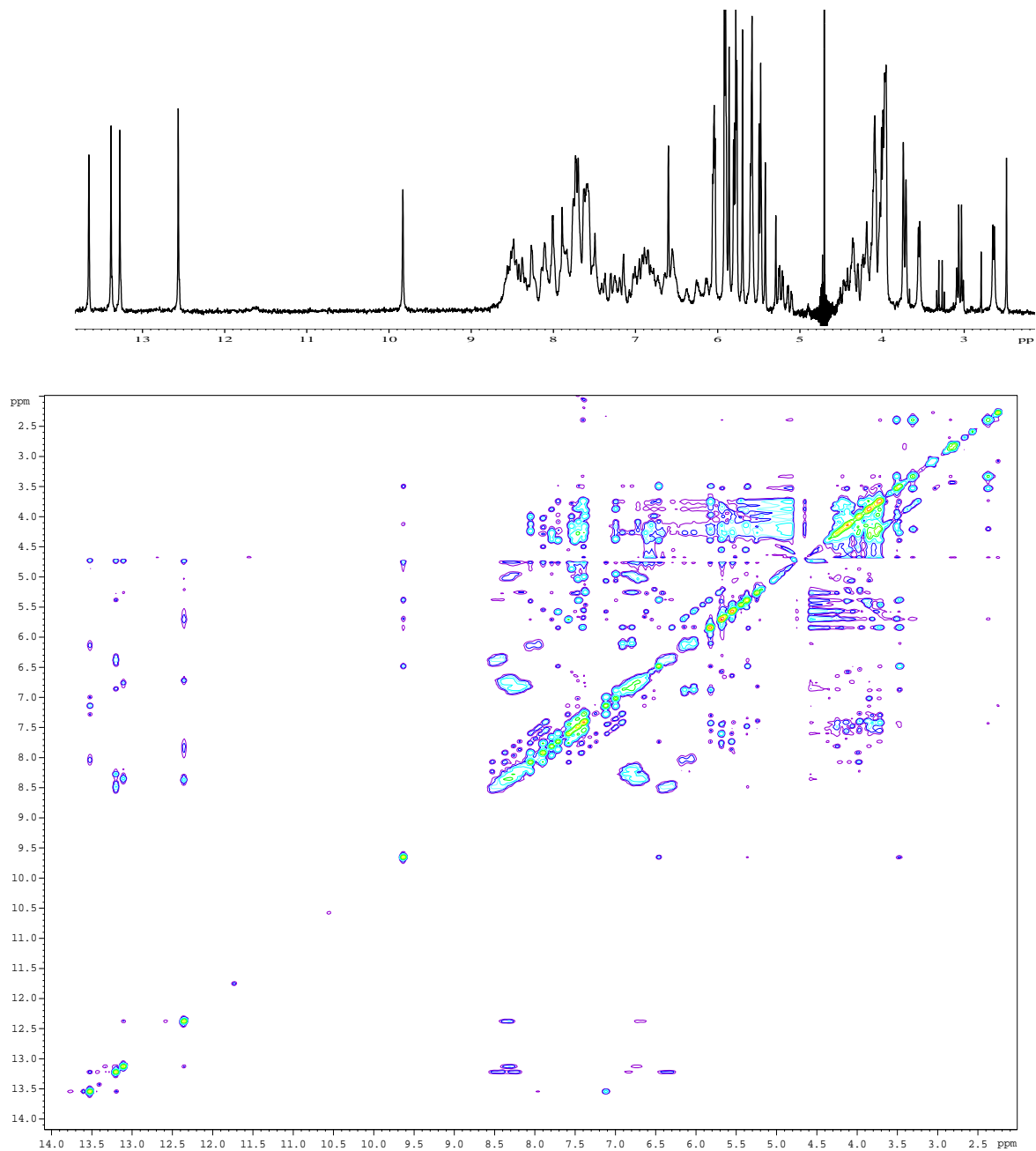


Abbildung 3.1: Vergleich zwischen einem zweidimensionalen NOESY eines RNA UUCG-Tetraloops gemessen bei 700MHz und dem dazugehörigen 1D- ^1H -Spektrum.

Das folgende Kapitel gibt eine Einführung in die zweidimensionale NMR-Spektroskopie. Zu Beginn wird der allgemeine Aufbau eines zweidimensionalen Experimentes eingeführt, anschließend werden am Beispiel eines NOESY-Experimentes die Begriffe der Inkrementierung der indirekten Dimension, des Phasenzyklus und das Konzept der Vorzeichenunterscheidung nach Ruben-States-Haberhorn eingeführt.

Warum 2D und wie?

Der Einsatz von zweidimensionalen Experimenten ermöglicht es, die folgenden Nachteile eines eindimensionalen NMR-Experiments zu umgehen und neue Informationen über das zu untersuchende Molekül zu gewinnen:

- die zunehmende Resonanzüberlagerung bei größeren Molekülen
- Korrelation einzelner Signale aufgrund räumlicher Nähe, aufgrund skalarer Kopplung (J Kopplung) oder aufgrund chemischen Austauschs.

Der erstgenannte Nachteil kann durch die Erzeugung einer zweiten Dimension (später wird man noch eine dritte bzw. vierte Dimension einführen) erreicht werden.

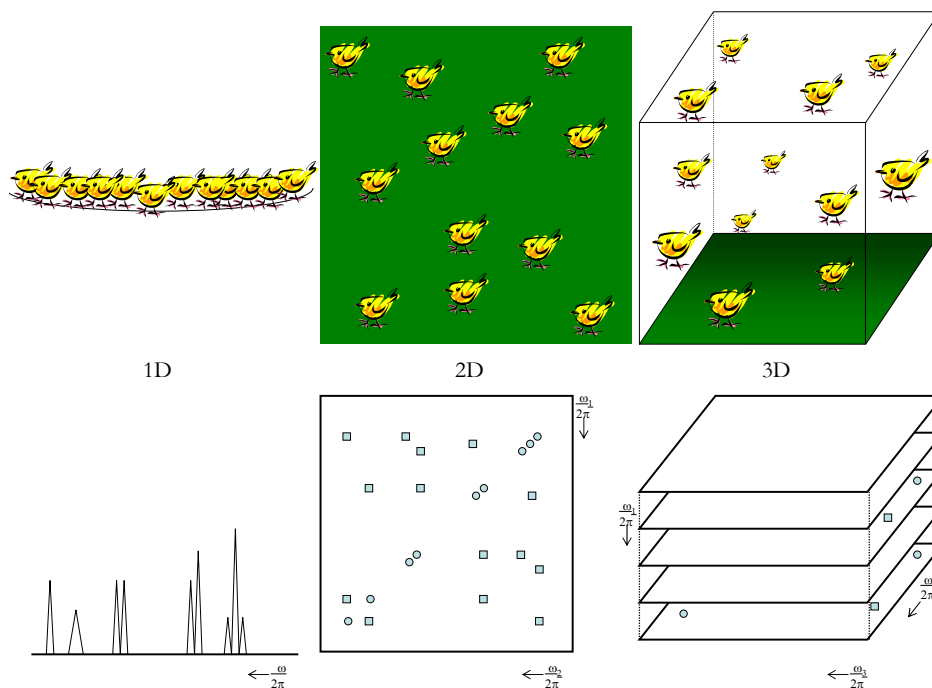


Abbildung 3.2: Der Gewinn an Auflösung mit zunehmender Anzahl an Dimensionen kann verglichen werden mit einer Gruppe von Vögeln (Peaks), die sich in unterschiedlichen Habitats aufhalten. So verteilt sich die Gruppe am schlechtesten auf einem quasi eindimensionalen Stromkabel (einige Vögel sind verdeckt), die gleiche Anzahl an Vögeln auf einer zweidimensionalen Wiese ist hingegen weniger beengt, größte Freiheit erreichen sie jedoch im Flug durch drei Dimensionen.

Unterschiedliche Korrelationen zwischen den einzelnen Signalen können je nach Auswahl der Mischsequenz über verschiedene Mechanismen, die zu einem Transfer von Magnetisierung eines Kerns A zu einem Kern B führen, realisiert werden. So gibt es Experimente, die räumlich benachbarte (NOESY), durch chemische Bindungen benachbarte (COSY) oder gar alle Signale eines ganzen Spinsystems (TOCSY) miteinander in Verbindung bringen (siehe Tab. 1). Sie

unterscheiden sich voneinander in der Abfolge der einzelnen modularen „Building Blocks“, sprich in der Anwendung von Pulsen und Delays.

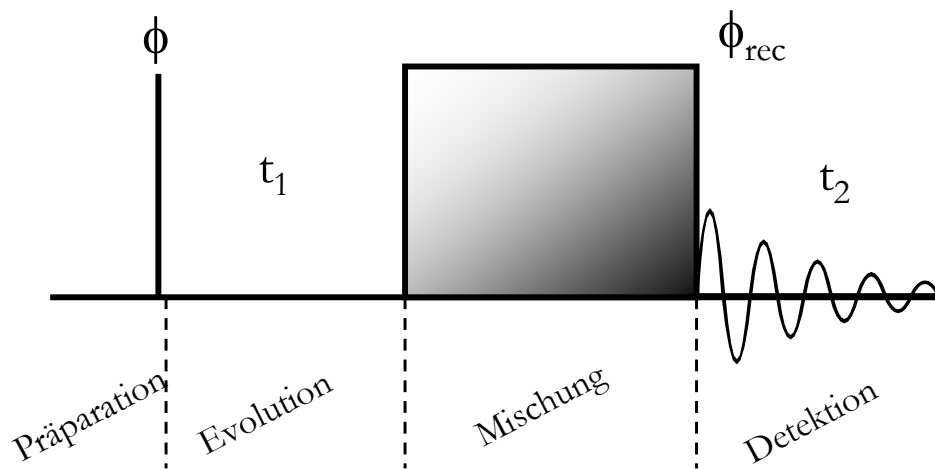


Abbildung 3.3: Genereller Aufbau eines zweidimensionalen Experimentes; mit ϕ werden die Phasen der Pulse (also die Richtung aus der die Pulse angewendet werden) bezeichnet.

Der allgemeine Aufbau eines zweidimensionalen Experimentes ist aber immer gleich (Abb. 3.3). Ein 2D NMR-Experiment setzt sich aus Präparation, Evolution (t_1), Mischung und Detektion (t_2) zusammen. Mit Präparation ist die Anregung der Spins mit einem oder einer Folge aus mehreren Pulsen nach thermischer Relaxation (in einem Relaxationsdelay RD) gemeint. Während der Evolution entwickeln sich die Spin nur unter der Einwirkung des statischen Magnetfelds und möglicher Wechselwirkungen untereinander. Die folgende Mischperiode ist derart beschaffen, dass in der abschließenden Detektionsperiode transversale Magnetisierung beobachtet werden kann. Durch unterschiedliche Gestaltung der Mischzeit können Korrelation zwischen einzelnen Spins angeregt werden, die sich schließlich detektieren lassen.

Neben der Akquisitionszeit ist die Evolution(-szeit) t_1 die zweite Zeitdimension. Diese Zeit ist inkrementiert. Dies bedeutet, dass ein 2D Experiment im Grunde nichts anderes ist, als die Aneinanderreihung von mehreren eindimensionalen Experimenten, die sich in der Länge der Evolutionszeit t_1 unterscheiden.

Ein 1D wird mit TD Punkten in der Akquisitionszeit t aufgenommen, z.B. 2048 (2k) komplexe Punkte. Ein 2D-Experiment hingegen wird mit TD1*TD2-Punkten aufgenommen, also mit z.B. 256*2048 komplexen Punkten.

Man kann sich die sukzessiv aufgenommenen FIDs als eine zweidimensionale Matrix vorstellen (s. Abb. 3.4 links). In der ersten Dimension sind alle FIDs gemäß ihrer Evolutionszeit aufgereiht. Jeder dieser TD1-Punkte kann mit einer gewissen Anzahl von Transienten (number of scans /NS) aufgenommen werden. Die Fouriertransformation kann nun ebenfalls nacheinander angewendet werden. Transformiert man zuerst die zweite Dimension, so erhält man die Aneinanderreihung von eindimensionalen Spektren gemäß der zugehörigen Evolutionszeit (s. Abb. 3.4 mitte) und erkennt, dass die Signale in der ersten Dimension moduliert sind. Es ist daher möglich, die Spektren entlang der ersten Dimension ebenfalls zu transformieren. Es ergibt sich sodann ein aus zwei Frequenzdimensionen bestehendes Spektrum (s. Abb. 3.4 rechts).

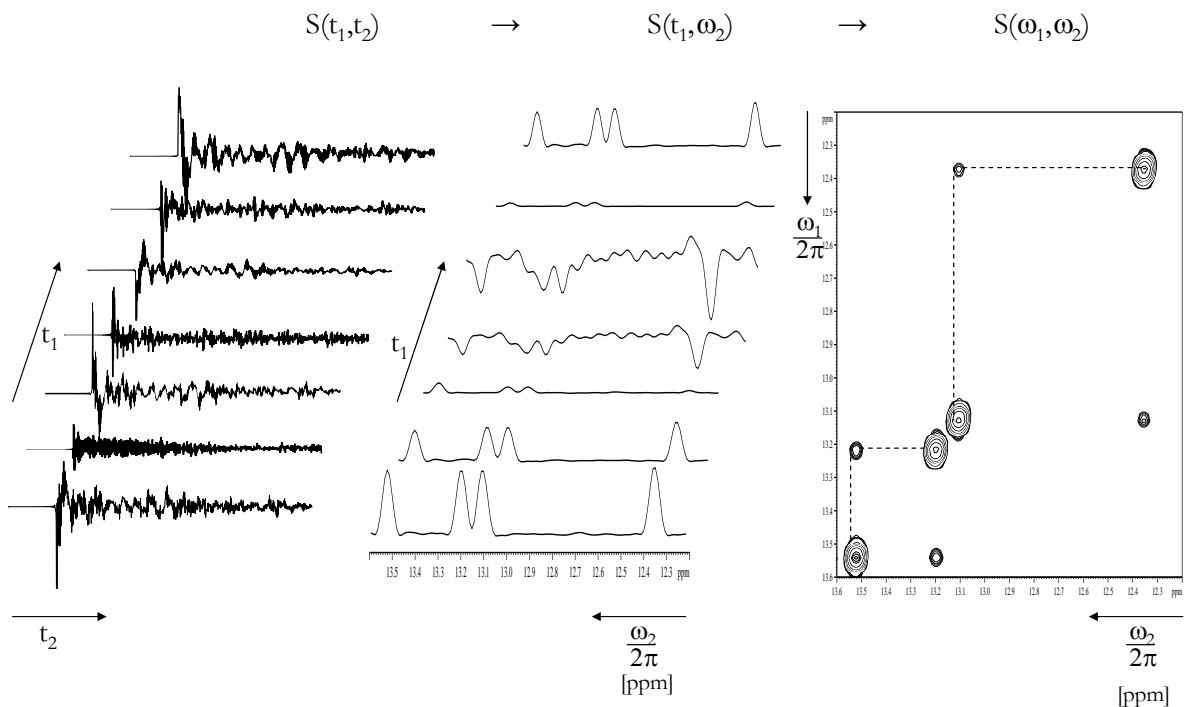
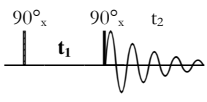
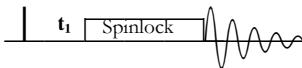
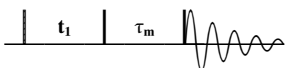

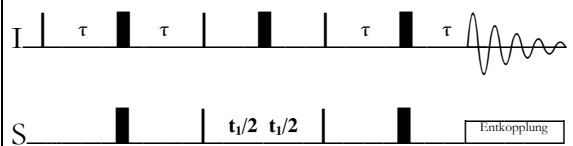


Abbildung 3.4: FT eines zweidimensionalen Spektrums

Tabelle 1: Einfache homo- und heteronukleare 2D-Experimente

Name der Pulssequenz	Pulssequenz	Art der Mischung
COSY <u>C</u> orrelation <u>S</u> pectroscopy		J-Kopplung über 2-3 Bindungen (vergl. 1D-Spektrum)
TOCSY <u>T</u> otal <u>C</u> orrelation <u>S</u> pectroscopy		Kopplung aller verbundenen Protonen eines Spinsystems
NOESY <u>N</u> uclear <u>O</u> verhauser <u>E</u> nhancement and exchange <u>S</u> pectroscopy		Kopplung von Protonen, die in räumlicher Nähe sind oder chemischen Austausch betreiben (Abstand < 5 Å)
ROESY <u>R</u> otating frame <u>O</u> verhauser <u>E</u> nhancement <u>S</u> pectroscopy		Kopplung von Protonen, die in räumlicher Nähe sind oder chemischen Austausch betreiben (Abstand < 5 Å)
HSQC <u>H</u> eteronuclear <u>S</u> ingle <u>Q</u> uantum <u>C</u> oherence		Kopplung von X- ¹ H über eine Bindung ¹ J(XH)

NOESY-Experiment

NOESY: Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange SpectroscopY

Wir wollen in 2D-NMR Spektroskopie anhand der Diskussion eines NOESY-Experiments einführen. Der mit dem NOESY-Experiment zu beobachtende Prozess soll eine cis-trans-Isomerisierungsreaktion eines Amids bzw. eines Peptides sein. Es handelt sich hierbei um eine chemische Reaktion, die mit den üblichen Methoden der Kinetik beschrieben werden kann.

Betrachtet man sich die 1D-¹H-Spektren des Peptides, so kann schon mit diesen Spektren das Phänomen des chemischen Austausches beschrieben werden.

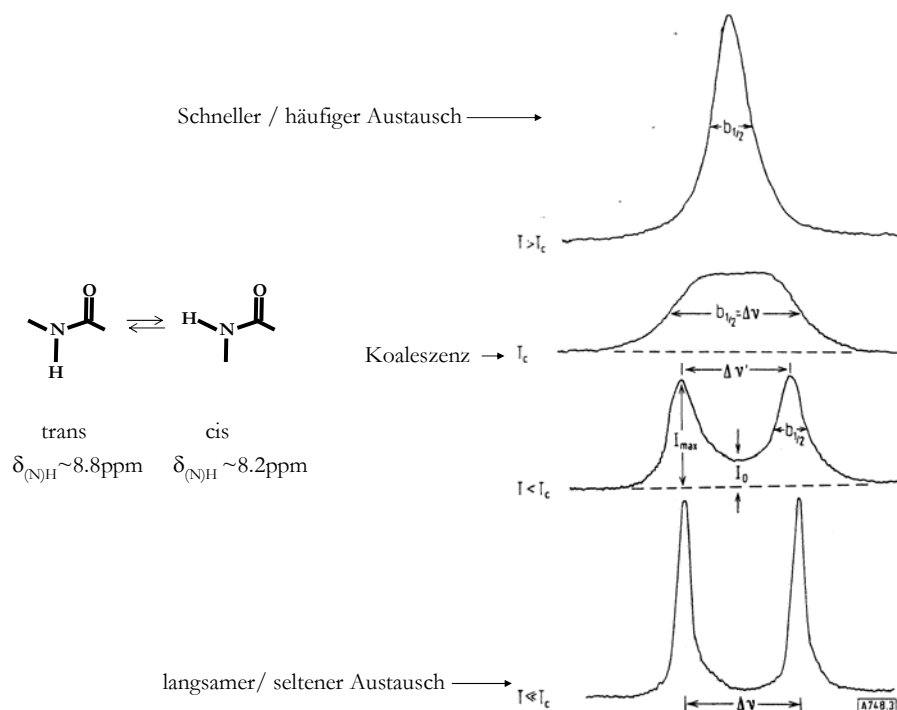


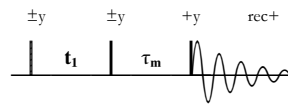
Abbildung 3.5: Temperaturabhängigkeit des NMR-Signals im 1D-¹H-Spektrum durch chemischen Austausch (entnommen aus Horst Kessler, „Nachweis gebänderter Rotationen und Inversionen durch NMR Spektroskopie“ (1970), Angew. Chem., **82**, 237-253). Unter Bedingungen des langsamen Austauschs ($T \ll T_c$) gibt jede der Konformation Anlass zu einem scharfen Peak. Die Verweildauer eines Moleküls innerhalb einer Konformationspopulation ist größer als das Zeitfenster des Spektrums, mit anderen Worten bedeutet dies, dass die Geschwindigkeitskonstante k der Umwandlung viel kleiner ist als der spektrale Abstand der Signale $\Delta\nu$ im nicht austauschenden Zustand

$k \ll \frac{\pi\Delta\nu}{\sqrt{2}}$. Mit zunehmender Temperatur steigt die Geschwindigkeit des Austausches an und erreicht einen Punkt,

an dem beides in gleicher Größenordnung ist, das Signal ist dann breit, der Zustand wird Koaleszenz genannt. Bei weiter steigender Temperatur wird das Signal dann wieder scharf, es zeigt sich aber nur noch ein Signal am Schwerpunkt der beiden Ausgangssignale. Der Übergang zwischen den einzelnen Konformationen wird von den Molekülen häufig unternommen, d.h. im Gegensatz zum langsamen Austausch wechselt ein einzelnes Molekül häufig seine Zugehörigkeit zu einer bestimmten Konformationspopulation.

Es ist jedoch nicht direkt möglich, eine Korrelation zwischen den Signalen der austauschenden Kerne zu erreichen.

Hierzu hilft nun die Anwendung der zweidimensionalen Pulssequenz des NOESY-Experiments:



Der Einfluss des Experiments auf die Spins wird nun abschnittsweise in drei Schritten betrachtet:

a. Verhalten bis zur Mischzeit

Der erste 90° -Puls mit Phase $+y$ überführt die Spins in die transversale Ebene. Es wirkt dann der Operator der chemischen Verschiebung. Der zweite 90° -Puls mit Phase $+y$ am Ende der ersten inkrementierten Zeit t_1 überführt die beiden ursprünglich transversalen Operatoren in einen cos-modulierten longitudinalen Operator und in einen sinus-modulierten transversalen Operator. An diesem Punkt empfiehlt es sich nun einen Sprung zu machen und auf den nächsten Transienten zu schauen. Mit dem nächsten Transienten ist gemeint, dass man das gleiche Abfolge von Pulsen, Delays und Mischzeiten durchläuft, nur die Phase einzelner Pulse verändert. Der FID dieses zweiten Transienten kann auf den FID des ersten Transienten addiert oder subtrahiert werden. Der zweite Transient wird also unter Beibehaltung der Länge der inkrementierten Zeit t_1 mit unterschiedlichen Pulsen gleicher Länge aber unterschiedlicher Phase ausgeführt. Die beiden 90° -Pulse werden aus $-y$ -Richtung angewendet und führen dadurch zu unterschiedlichen Vorzeichen der Operatoren nach dem zweiten 90° -Puls. Durch Addition beider Experimente ließe sich nun die longitudinale Komponente, durch Subtraktion die transversale Komponente selektieren. Es wird in diesem Experiment ersteres durchgeführt, so dass zu Beginn der Mischzeit nur die longitudinale Komponente der Spins weiter berücksichtigt werden muss.

$$\begin{array}{ll}
 I_{Az} \xrightarrow{90^\circ_y} I_{Ax} & I_{Az} \xrightarrow{90^\circ_{-y}} -I_{Ax} \\
 \xrightarrow{\Omega_A t} I_{Ax} \cos \Omega_A t_1 + I_{Ay} \sin \Omega_A t_1 & \xrightarrow{\Omega_A t} -I_{Ax} \cos \Omega_A t_1 - I_{Ay} \sin \Omega_A t_1 \\
 \xrightarrow{90^\circ_y} -I_{Ax} \cos \Omega_A t_1 + I_{Ay} \sin \Omega_A t_1 & \xrightarrow{90^\circ_{-y}} -I_{Ax} \cos \Omega_A t_1 - I_{Ay} \sin \Omega_A t_1 \\
 \\
 I_{Bz} \xrightarrow{90^\circ_y} I_{Bx} & I_{Bz} \xrightarrow{90^\circ_{-y}} I_{Bx} \\
 \xrightarrow{\Omega_B t} I_{Bx} \cos \Omega_B t_1 + I_{By} \sin \Omega_B t_1 & \xrightarrow{\Omega_B t} I_{Bx} \cos \Omega_B t_1 + I_{By} \sin \Omega_B t_1 \\
 \xrightarrow{90^\circ_y} -I_{Bx} \cos \Omega_B t_1 + I_{By} \sin \Omega_B t_1 & \xrightarrow{90^\circ_{-y}} -I_{Bx} \cos \Omega_B t_1 - I_{By} \sin \Omega_B t_1
 \end{array}$$

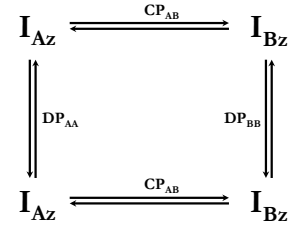
Addition beider phasenunterschiedlicher Experimente: $-(2I_{Az} + 2I_{Bz})$

Subtraktion beider phasenunterschiedlicher Experimente: $-(2I_{A_z} + 2I_{B_z})$

b. Verhalten während der Mischzeit

Während der Mischzeit soll nun der Vorgang des chemischen Austausches stattfinden. Da sich die Spins entlang der z-Achse befinden, evolviert keine chemische Verschiebung während der Mischzeit.

Die Spins stehen, ganz entsprechend den zugehörigen Atomen, nur unter dem Einfluss des chemischen Gleichgewichts. Der Austausch wird zwischen identischen Zuständen mit der Amplitude DP_{AA} bzw. DP_{BB} beschrieben, der Übergang unterschiedlicher Zustände (von A nach B oder von B nach A) wird mit CP_{AB} beschrieben.



Es ergibt sich somit folgende Beschreibung der Spins mittels Produktoperatoren:

$$\begin{aligned}
 -2I_{A_z} \cos \Omega_{A'} t_1 &\xrightarrow{\tau_m} (-2 \cos \Omega_{A'} t_1) (I_{A_z} \cdot DP_{AA} \tau_m + I_{B_z} CP_{AB} \tau_m) \\
 -2I_{B_z} \cos \Omega_{B'} t_1 &\xrightarrow{\tau_m} (-2 \cos \Omega_{B'} t_1) (I_{B_z} \cdot DP_{BB} \tau_m + I_{A_z} CP_{AB} \tau_m)
 \end{aligned}$$

c. Verhalten nach der Mischzeit

Nachdem nun die Spins gemäß dem chemischen Austausch gemischt wurden, wird erneut ein 90° -Puls mit y-Phase angewendet. Es befinden sich hernach alle Spins in der transversalen xy-Ebene und chemische Verschiebung kann während der anschließenden Akquisitionszeit entwickelt werden.

$$\begin{aligned}
 &\xrightarrow{90_y} (-2 \cos \Omega_{A'} t_1) (I_{A_x} \cdot DP_{AA} \tau_m + I_{B_x} CP_{AB} \tau_m) \\
 &\quad (-2 \cos \Omega_{B'} t_1) (I_{B_x} \cdot DP_{BB} \tau_m + I_{A_x} CP_{AB} \tau_m) \\
 &\xrightarrow{\Omega t} (-2 \cos \Omega_{A'} t_1) (DP_{AA} \tau_m (I_{A_x} \cos \Omega_{A'} t_2 + I_{A_y} \sin \Omega_{A'} t_2) + CP_{AB} \tau_m (I_{B_x} \cos \Omega_{B'} t_2 + I_{B_y} \sin \Omega_{B'} t_2)) \\
 &\quad (-2 \cos \Omega_{B'} t_1) (DP_{BB} \tau_m (I_{B_x} \cos \Omega_{B'} t_2 + I_{B_y} \sin \Omega_{B'} t_2) + CP_{AB} \tau_m (I_{A_x} \cos \Omega_{A'} t_2 + I_{A_y} \sin \Omega_{A'} t_2))
 \end{aligned}$$

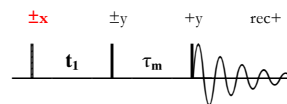
dies lässt sich auch formulieren als:

$$\begin{aligned}
 &(-2 \cos \Omega_{A'} t_1) (DP_{AA} \tau_m) e^{i\Omega_{A'} t_2} + \\
 &(-2 \cos \Omega_{A'} t_1) (CP_{AB} \tau_m) e^{i\Omega_{B'} t_2} + \\
 &(-2 \cos \Omega_{B'} t_1) (DP_{BB} \tau_m) e^{i\Omega_{B'} t_2} + \\
 &(-2 \cos \Omega_{B'} t_1) (CP_{AB} \tau_m) e^{i\Omega_{A'} t_2}
 \end{aligned}$$

Im Ergebnis ergeben sich also vier Terme, von denen je zwei Signale in t_2 mit einer chemischen Verschiebung von Ω_A und Ω_B beschreiben. Die Signale sind moduliert mit den unterschiedlichen Amplituden CP und DP, sowie der cosinus-Komponente der chemischen Verschiebungen des Kernes A oder B in t_1 .

Vorzeichenunterscheidung in der inkrementierten Evolutionszeit t_1

Um nun auch für die erste Dimension (t_1 Domäne) ein Signal durch Quadraturdetektion zu erhalten (d.h. ein Signal mit Vorzeichenunterscheidung), müssen Terme generiert werden, deren t_2 -Komponenten identisch mit den oben gezeigten Termen sind, die aber sinus-moduliert sind. Hierzu werden einfach alle Phasen vor oder nach der inkrementierten Zeit t_1 um 90° verschoben. Es ergeben sich also zwei weitere, nun aber getrennt im Computer abzuspeichernde Experimente, deren FID dann später zu einem komplexen Signal zusammengesetzt werden kann, mit folgender Pulssequenz:



Das Verhalten der Spins bis zur Mischzeit kann mittels Produktoperatorformalismus nun folgend beschrieben werden:

$$\begin{aligned}
 I_{Az} &\xrightarrow{90^\circ \pm x} \mp I_{Ax} \\
 &\xrightarrow{\Omega_A t_1} \mp I_{Ay} \cos \Omega_A t_1 \pm I_{Ax} \sin \Omega_A t_1 \\
 &\xrightarrow{90^\circ \pm y} \mp I_{Ay} \cos \Omega_A t_1 - I_{Ax} \sin \Omega_A t_1
 \end{aligned}$$

Die Addition beider Experimente selektiert in diesem Fall erneut die longitudinalen Spins, die aber nun sinus-moduliert sind: $-2I_{Ax} \sin \Omega_A t_1$ (ebenso für Spin B: $-2I_{Bx} \sin \Omega_B t_1$)

Die folgenden Elemente der Pulssequenz wirken analog wie oben beschrieben, so dass man für

$$\begin{aligned}
 &(-2 \sin \Omega_A t_1) (DP_{AA} \tau_m) e^{i\Omega_A t_2} + \\
 &(-2 \sin \Omega_A t_1) (CP_{AB} \tau_m) e^{i\Omega_B t_2} + \\
 &(-2 \sin \Omega_B t_1) (DP_{BB} \tau_m) e^{i\Omega_B t_2} + \\
 &(-2 \sin \Omega_B t_1) (CP_{AB} \tau_m) e^{i\Omega_A t_2}
 \end{aligned}$$

die Spins am Ende des Experimentes folgende Terme erhält:

Kombiniert man nun die acht erhaltenen Terme gemäß den Regeln der Quadraturdetektion $\cos A + i \sin A = e^{iA}$, so erhält man vier Terme, die je einen Peak im Spektrum beschreiben. Das Verfahren, das hier angewandt wird, um zu einer Vorzeichenunterscheidung (engl.: quadrature detektion) zu kommen, ist bekannt als Methode nach Ruben-States-Haberkorn.

Resultierende Peaks:

$$\begin{aligned}
 \text{I} & : e^{i\Omega_A t_1} \cdot DP_{AA} \tau_m \cdot e^{i\Omega_A t_2} \cdot e^{\frac{-t_1}{T_2^A}} \cdot e^{\frac{-t_2}{T_2^A}} \\
 \text{II} & : e^{i\Omega_A t_1} \cdot CP_{AB} \tau_m \cdot e^{i\Omega_B t_2} \cdot e^{\frac{-t_1}{T_2^A}} \cdot e^{\frac{-t_2}{T_2^B}} \\
 \text{III} & : e^{i\Omega_B t_1} \cdot DP_{BB} \tau_m \cdot e^{i\Omega_B t_2} \cdot e^{\frac{-t_1}{T_2^B}} \cdot e^{\frac{-t_2}{T_2^B}} \\
 \text{IV} & : e^{i\Omega_B t_1} \cdot CP_{AA} \tau_m \cdot e^{i\Omega_A t_2} \cdot e^{\frac{-t_1}{T_2^B}} \cdot e^{\frac{-t_2}{T_2^A}}
 \end{aligned}$$

Frequenzen in t_1
Frequenzen in t_2
Signalamplituden
Relaxation

Das resultierende Spektrum verfügt also über zwei so genannte Diagonalpeaks (I & III), die durch die Autokorrelation des jeweilig zugehörigen Spins während der Mischzeit entstehen. Ein Diagonalpeak kommt zu seinem Namen, da er somit sowohl in der ersten, als auch in der zweiten Dimension die identische chemische Verschiebung aufweist und daher auf der Diagonale des Spektrums liegt. Kreuzpeaks (II & IV) entstehen demnach durch Kreuzkorrelation zweier Spins miteinander, so dass sich in den verschiedenen inkrementierten Zeiten unterschiedliche chemische Verschiebungen entwickeln.

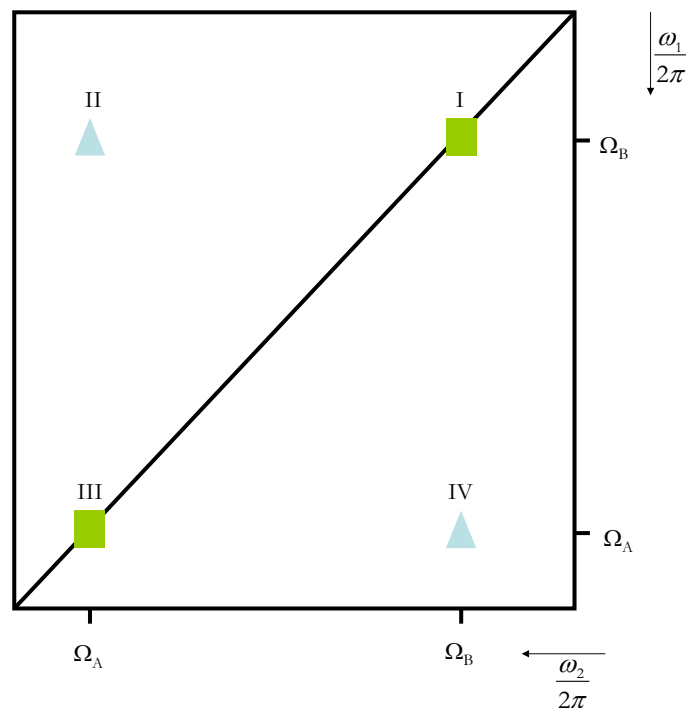


Abbildung 3.6: Theoretisches NOESY-Spektrum

Zusammenfassend kann man sagen, dass ein zweidimensionales Experiment aus vielen hintereinander aufgenommenen eindimensionalen Experimenten besteht, die in drei unterschiedlichen Ebenen aufgenommen werden.

Auf der ersten Ebene werden von Experiment zu Experiment nur die Vorzeichen der Pulse verändert, so dass an ausgewählten Stellen, später durch Verrechnung der einzelnen Spektren Spins einer bestimmten Art und Orientierung selektiert werden. Diese unterste Ebene nennt man den Phasenzklus.

Die nächste Ebene wird durch die Methode nach Ruben-States-Haberkorn vorgegeben. Alle in einem Phasenzklus durchgeführten Experimente werden um 90° verschobenen Pulsphasen vor oder nach der ersten inkrementierten Zeit durchgeführt.

Die dritte Ebene des zweidimensionalen Experiments wird durch die Inkrementierung der t_1 -Zeit aufgespannt. Alle bisher durchgeführten Experimente werden nun für je eine bestimmte Zeit von $t_1=0$ bis t_1^{\max} durchgeführt.

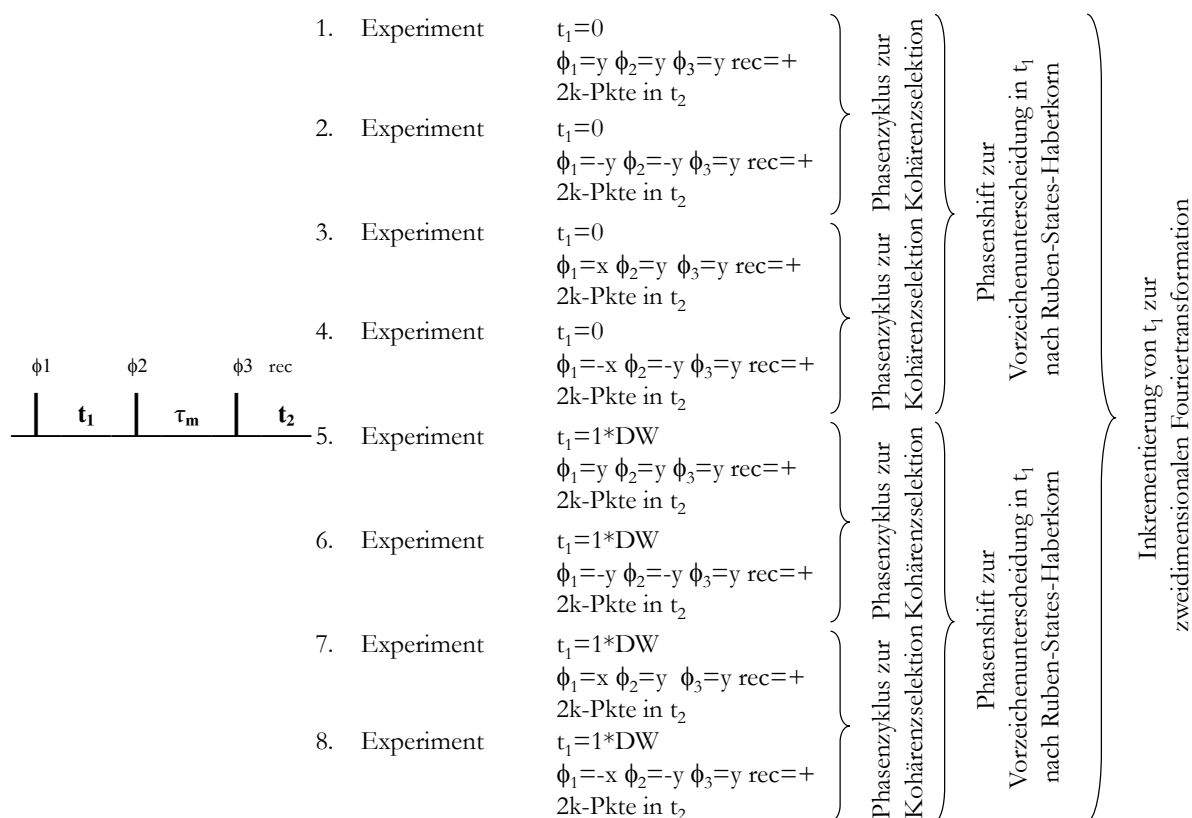


Abbildung 3.7: Zusammenfassung der nacheinander aufgenommenen Experimente eines NOESYs.