

Von Horst Kessler*, Matthias Gehrke und Christian Griesinger

Eine genaue Kenntnis der Struktur, Dynamik und Reaktionsweise von Molekülen ist der Schlüssel zum Verständnis ihrer Funktionen und Eigenschaften. Die NMR-Spektroskopie hat sich durch die Einführung zweidimensionaler Verfahren zur bedeutendsten Methode entwickelt, um derartige Informationen über Moleküle in Lösung zu erhalten. Es steht nunmehr ein ganzes Arsenal von Aufnahmetechniken zur Verfügung, deren erfolgreiche Anwendung aber nicht nur die entsprechende apparative Ausstattung, sondern auch die richtige Auswahl der Experimente einschließlich der optimalen Meßparameter und natürlich auch die sorgfältige Auswertung der Spektren voraussetzt. In diesem Beitrag werden die Grundlagen der modernen NMR-Spektroskopie vorgestellt, und es wird gezeigt, daß es mit dem Produktoperatorformalismus möglich ist, die Pulsfolgen der NMR-Spektroskopie qualitativ und quantitativ zu verstehen. Nur ganz wenige, leicht verständliche Annahmen muß ein potentieller Anwender dieser Methoden kennenlernen, um mit ihnen vertraut zu werden. Wir wollen den Produktoperatorformalismus ebenso wie die für das Verständnis der Pulsfolgen unabdingbaren Phasencyclen auf einfache Weise einführen und den Umgang mit ihnen bei der Besprechung verschiedener 2D-NMR-Techniken üben. Eine Übersicht über die wichtigsten Pulstechniken bildet den zweiten Teil des Beitrags.

1. Einleitung

Die NMR-Spektroskopie wurde durch die Einführung von 2D-Techniken^[1-3] revolutioniert. Obwohl bereits eine Reihe von Übersichten zu diesem Thema existiert^[2,4-23], halten wir es für zweckmäßig, eine möglichst leicht verständliche Einführung unter konsequenter Verwendung des Produktoperatorformalismus (mit kartesischen Basisoperatoren)^[24-27] zu geben, da so die NMR-Experimente qualitativ und quantitativ verständlich werden. Der Vorteil des Produktoperatorformalismus ist, daß das Verhalten schwach gekoppelter Spinsysteme (d.h. Systeme, bei denen die Differenz der chemischen Verschiebungen zweier koppelnder Kerne groß ist gegenüber der *J*-Kopplung zwischen ihnen) unter dem Einfluß von Pulssequenzen durch wenige, einfache Regeln beschrieben werden kann, die es auch einem Nichtspezialisten ermöglichen, die NMR-Experimente nachzuvollziehen.

Des weiteren ist ein gewisses Verständnis der „Phasencyclen“ unumgänglich, die dazu dienen, in 2D-NMR-Experimenten unerwünschte Signale zu unterdrücken, damit bei einem Mehrpulsexperiment das verlangte 2D-NMR-Spektrum erhalten wird. Wir werden diesen Begriff und die damit verknüpfte Kohärenzordnung^[28-32] in Abschnitt 2.2.3 einführend behandeln. Hier sei nur angemerkt, daß mit der Verfolgung von Kohärenz-Transferwegen ein einfaches Instrument geschaffen wurde, um Phasencyclen zu entwickeln. Mit dem Produktoperatorformalismus und dem Konzept der Kohärenz-Transferwege ist nunmehr

eine Methode verfügbar, die der noch vielfach benutzten, unserer Meinung nach aber umständlichen und nicht ausreichenden Vektorbeschreibung an Klarheit, Einfachheit und Exaktheit weit überlegen ist.

Ein weiteres Argument für diesen Beitrag ist, daß man inzwischen mehr über die Vor- und Nachteile der einzelnen Verfahren aussagen kann. So werden beispielsweise die *J*-aufgelöste^[2,33-35] und die Spin-Echo-korrelierte Spektroskopie^[36-38], die früher bei der Beschreibung von 2D-NMR-Techniken dominierten, heute nur noch in wenigen Spezialfällen von Bedeutung sein. Es ist selbstverständlich, daß wir hier nur eine Auswahl der 2D-NMR-Techniken vorstellen können. Von den etwa 500 für die hochauflösende NMR-Spektroskopie beschriebenen Pulssequenzen hat nur ein kleiner Teil den Sprung in die Unentbehrlichkeit geschafft, und noch immer ist das Gebiet im Fluß. So gibt es jetzt eine ganze Reihe von Verfahren, mit denen die zur Bestimmung der Struktur und Dynamik notwendigen Parameter wie NOE-Werte und vicinale Kopplungskonstanten auch quantitativ zu erfassen sind. Außerdem wird die NMR-Spektroskopie unempfindlicher Kerne durch die Nutzung der inversen^[39-54] Techniken mehr und mehr auch bei großen Molekülen möglich.

Wir haben uns bemüht, das Thema so zu präsentieren, daß der Leser nicht allzu viele Kenntnisse bereits mitbringen muß. Daher ist der Beitrag auch in zwei Schwierigkeitsstufen unterteilt: Beim ersten Lesen reicht es aus, dem normal gedruckten Text zu folgen. Die klein gedruckten Absätze wurden zur Vertiefung und Erläuterung hinzugefügt.

2. Grundlagen

Die kernmagnetische Resonanz beruht auf der Wechselwirkung zwischen dem magnetischen Moment des Atomkerns und magnetischen Feldern. Das magnetische Mo-

[*] Prof. Dr. H. Kessler, Dipl.-Chem. M. Gehrke
Institut für Organische Chemie der Universität
Niederurseler Hang, D-6000 Frankfurt 50
Dr. C. Griesinger
Laboratorium für Physikalische Chemie der
Eidgenössischen Technischen Hochschule, ETH-Zentrum
Universitätsstrasse 22, CH-8092 Zürich (Schweiz)

ment des Kerns ist mit dem Kernspin S verknüpft. Nur Kerne mit $S \neq 0$ haben ein magnetisches Moment. In der hier ausschließlich beschriebenen hochauflösenden NMR-Spektroskopie untersucht man überwiegend Kerne mit $S = 1/2$, die kein Quadrupolmoment haben und daher scharfe Linien ergeben. Die in der Organischen Chemie und Biochemie interessanten Elemente H, C, N und P haben Isotope mit $S = 1/2$, C und N allerdings nur in geringer natürlicher Häufigkeit. Das Proton, nahezu ubiquitär in organischen Verbindungen vorhanden, hat (abgesehen von Tritium) das größte kernmagnetische Moment und ist daher am einfachsten zu untersuchen. In der Organometallchemie und der Anorganischen Chemie wird aber auch die NMR-Spektroskopie „exotischer“ Kerne zunehmend unentbehrlich.

2.1. Eindimensionale NMR-Spektroskopie

Das heute allgemein verwendete Verfahren zur Aufnahme von 1D-NMR-Spektren ist die von *Ernst* und *Anderison*^[55,56] eingeführte Fourier-Technik^[57], die auch der 2D-NMR-Spektroskopie zugrunde liegt und daher zu Beginn beschrieben werden soll.

Spin-1/2-Kerne orientieren sich entweder parallel oder antiparallel zu einem angelegten B_0 -Feld. Es gibt nur diese beiden, als α und β bezeichneten Zustände. Der parallel zum Feld orientierte α -Zustand^[*] ist energetisch günstiger als der antiparallel ausgerichtete β -Zustand. Daher ist der α -Zustand stärker populierte als der β -Zustand (Boltzmann-Verteilung), und es existiert aufgrund dieser Populationsdifferenz eine makroskopische Magnetisierung in Richtung des B_0 -Feldes („longitudinale Magnetisierung“). Das Verhalten der makroskopischen Magnetisierung läßt sich mit den Bloch-Gleichungen^[58] beschreiben. Für die Lösung dieser Bewegungsgleichungen unter Berücksichtigung von gleichzeitig angelegten Hochfrequenzpulsen^[**] ist eine Transformation in ein rotierendes Koordinatensystem von Vorteil. Dieses Koordinatensystem dreht sich mit der Trägerfrequenz ω_0 der Radiofrequenzpulse um die zum B_0 -Feld parallele z-Achse.

Pulse sind kurzzeitig erzeugte hochfrequente Magnetfelder $B_1 \cos \omega_0 t$, die wegen der während des Pulses auftretenden Präzessionsbewegung um B_0 zu einer sehr komplexen Bewegung der Magnetisierung führen. Ihre Beschreibung in einem mit $\omega_0 = \gamma B_0$ rotierenden Koordinatensystem führt zu einer starken Vereinfachung: B_1 reicht zur Erklärung der Bewegung aus. Man geht wie folgt vor.

Das linear polarisierte B_1 -Feld (z. B. nur die x-Komponente) läßt sich in zwei zirkular polarisierte Felder aufspalten [Gl. (1)]. Die beiden Vektoren rotieren mit der gleichen Frequenz, haben aber

$$B_1(t) = B_1^x \cos \omega_0 t e_x + \frac{1}{2} B_1^x (\cos \omega_0 t e_x + \sin \omega_0 t e_y) + \frac{1}{2} B_1^x (\cos \omega_0 t e_x - \sin \omega_0 t e_y) \quad (1)$$

[*] Die Zuordnung von α und β zu parallel bzw. antiparallel gemäß [3] soll hier durchgängig angewendet werden. In der Literatur findet man allerdings auch die umgekehrte Zuordnung.

[**] Wir verwenden in diesem Beitrag statt „Impuls“ durchgängig die dem Englischen entnommene Bezeichnung „Puls“, da sie sich inzwischen allgemein eingebürgert hat.

entgegengesetzten Drehsinn. Transformiert man nun in das mit $\omega_0 = \gamma B_0$ rotierende Koordinatensystem (e'_x, e'_y), so erhält man Gleichung (2).

$$B_1'(t) = \frac{1}{2} B_1^x e'_x + \frac{1}{2} B_1^x (\cos 2\omega_0 t e'_x - \sin 2\omega_0 t e'_y) \quad (2)$$

Die die doppelte Larmor-Frequenz enthaltende Komponente in (2) erfüllt die Resonanzbedingung nicht und kann daher vernachlässigt werden. Nur die zeitunabhängige (!) Komponente $\frac{1}{2} B_1^x e'_x$ wird berücksichtigt. Die Bloch-Gleichungen enthalten daher wieder nur zeitunabhängige Felder und lassen sich leicht lösen: Statische Felder (B_0 oder auch B_1') bewirken eine Rotation der Magnetisierung um die jeweilige Achse. Der Winkel (Flipwinkel), um den die Magnetisierung gedreht wird, hängt beispielsweise davon ab, wie lange das B_1 -Feld wirkt (der Puls anliegt). Pulse werden daher häufig nicht durch die Feldstärke und die Dauer, sondern durch ihren Flipwinkel charakterisiert.

Pulse lassen sich also durch Rotationen der Magnetisierung um einen bestimmten Winkel (Flipwinkel) und um eine bestimmte Achse (Phase) beschreiben. Beispielsweise dreht ein als β_y -Puls bezeichneter kurzer Radiofrequenzpuls die z-Magnetisierung um die y-Achse um den Winkel β [Gl. (3) und Abb. 1]^[†]. (Gleichung (3) bedeutet, die

$$M_z \xrightarrow{\beta_y} M_z \cos \beta + M_x \sin \beta \quad (3)$$

M_z -Magnetisierung^[**] geht unter dem Einfluß eines β_y -Pulses zum Teil ($\sin \beta$) in M_x -Magnetisierung über, die restliche Magnetisierung ($\cos \beta$) bleibt parallel zur z-Achse.)

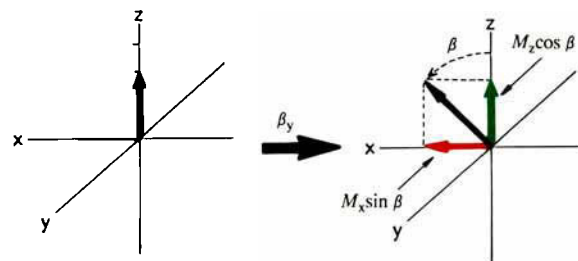


Abb. 1. Wirkung eines On-Resonance-Radiofrequenzpulses aus der y-Richtung mit dem Flipwinkel β auf die longitudinale Magnetisierung im rotierenden Koordinatensystem. Zur besseren Kenntlichmachung haben wir das Koordinatensystem gegenüber der sonst gebräuchlichen Darstellung (x nach vorne) um 90° gedreht.

Nach dem Puls beginnt die transversale Magnetisierung M_x um die z-Achse zu präzedieren. Die Präzessionsfrequenz ist $\omega = \gamma B_{\text{eff}}$, wobei B_{eff} die unterschiedlichen chemischen Verschiebungen der Kerne berücksichtigt. Kerne eines Isotops (z. B. Protonen) haben alle das gleiche gyromagnetische Verhältnis γ und nahezu dasselbe B_{eff} , so daß sich ihre Präzessionsfrequenzen nur wenig unterscheiden. Bei Protonen schwankt ω je nach der individuellen chemischen Verschiebung um etwa $10^{-5} \omega_0$ oder 10 ppm (parts per million von ω_0). Im rotierenden Koordinatensystem dreht sich auch der Beobachter (Detektor) mit der Fre-

[*] Die Drehrichtung der Magnetisierung unter dem Einfluß eines Pulses gemäß [3] entspricht dem mathematischen Drehsinn. In der Literatur findet man häufig auch die umgekehrte Definition (in unserem Beispiel wäre dies die Drehung nach $-x$).

[**] Unter M_x , M_y und M_z verstehen wir die durch die anfängliche Polarisation gegebenen Einheitsmagnetisierungen entlang den jeweiligen Achsen. Dies ist die übliche Definition.

quenz ω_0 um die z-Achse. Dadurch „sieht“ der Detektor nur Differenzfrequenzen ($\omega - \omega_0$). Diese Differenzfrequenz nennen wir im folgenden Präzessionsfrequenz oder chemische Verschiebung Ω (Abb. 2). Im rotierenden Koordinatensystem gilt also Gleichung (4).

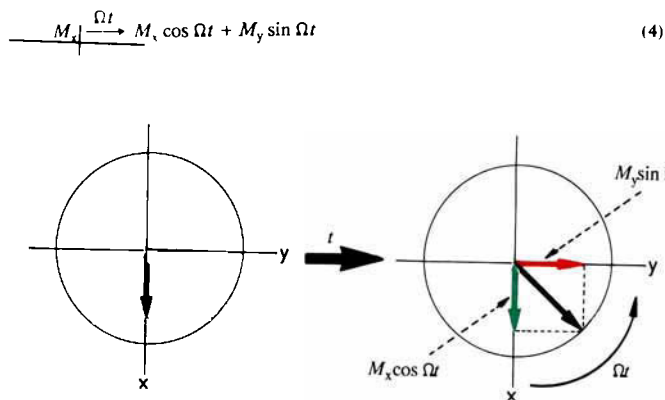


Abb. 2. Die Evolution der chemischen Verschiebung Ω während der Zeit t . Gezeigt ist die Aufsicht auf die x,y-Ebene des rotierenden Koordinatensystems.

Die Präzessionsfrequenz Ω ist die von der Trägerfrequenz abweichende Oszillationsfrequenz des Signals, das ein Detektor registriert, der z. B. längs der x-Achse im rotierenden Koordinatensystem angeordnet ist. Man erhält also ein mit Ω oszillierendes Signal $S(t)$, den „free induction decay“ (FID), der durch eine Fourier-Transformation in ein Spektrum mit einem Signal („Peak“) bei der Frequenz Ω umgewandelt wird (siehe auch Abb. 4).

Die Fourier-Transformation ist eine mathematische Vorschrift, mit deren Hilfe Frequenzen in einer zeitlich oszillierenden Funktion erkannt und als Signale auf einer Frequenzskala an der entsprechenden Stelle wiedergegeben werden können.

Die Funktion $\cos \Omega t$ in Gleichung (4) enthält die Frequenzen $\omega = +\Omega$ und $\omega = -\Omega$; somit ist eine Unterscheidung der Vorzeichen nicht möglich. Man möchte aber gerne Vorzeichen von Frequenzen unterscheiden, denn nur dann kann man die Trägerfrequenz so wählen, daß sie sich in der Mitte des gewünschten Spektrums befindet. Eine Vorzeichenunterscheidung ist durch die Quadraturdetektion möglich^[59,60], bei der die x- und auch die y-Magnetisierung im rotierenden Koordinatensystem detektiert werden. Detektiert man die x-Magnetisierung M_x aus (4) im Kanal K_x , die y-Magnetisierung M_y im Kanal K_y und kombiniert die Signale gemäß $K_x + iK_y$, so erhält man das komplexe Signal $e^{i\Omega t}$, das nach komplexer Fourier-Transformation eine Linie bei $+\Omega$ (und eben nicht auch bei $-\Omega$) im Spektrum ergibt. Dieses Verfahren hat den Nachteil, daß man zwei Signale gleichzeitig aufnehmen muß.

In einigen NMR-Spektrometern wird ein von Redfield et al.^[61] erfundener Trick genutzt^[62], bei dem man alternierend erst aus $(+x)$, dann aus $(+y)$, $(-x)$ und $(-y)$ -Richtung detektiert (Abb. 3). Der Empfänger rotiert dadurch (im rotierenden Koordinatensystem) zusätzlich mit einer gewissen Frequenz Ω_R . Das Signal ist dann $\cos(\Omega + \Omega_R)t$. Man setzt Ω_R gleich der halben spektralen Breite (SW/2) (Abb. 3b). Dann erhält man nach komplexer Fourier-Transformation ein Spektrum, in dem sich die Signale mit positiver und negativer Frequenz nicht mehr überlagern (Abb. 3c). Nun kann man um $\Omega = 0$ „falten“ (Abb. 3d) oder, was dasselbe ist, eine reelle Fourier-Transformation durchführen. Dieses „Falten“ (englisch „fold“) ist nicht identisch mit dem in Abschnitt 2.2.1 erwähnten Falten („convolution“).

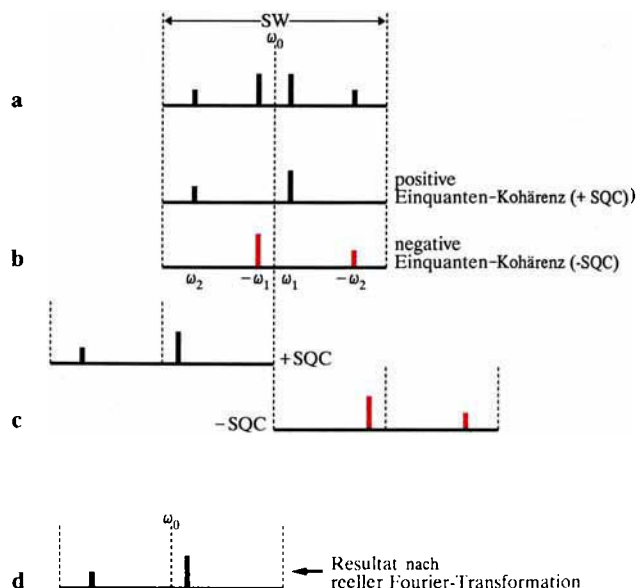


Abb. 3. Prinzip der Redfield-Technik. Ein Spektrum, das man nach Einkanal-detektion und komplexer Fourier-Transformation erhält (a), enthält sowohl die Signale für $+\Omega$ als auch die für $-\Omega$, die in (b) separat gezeigt sind. Sie entsprechen positiven bzw. negativen Einquanten-Kohärenzen. Läßt man den Empfänger nun zusätzlich mit der Frequenz SW/2 rotieren, sind die beiden Teilspektren nicht mehr überlagert (c). Nach Faltung um $\Omega = 0$, d. h. reeller Fourier-Transformation, erhält man ein Spektrum mit nur noch positiven Frequenzen (d).

Wir wollen das eben mit dem Vektorformalismus behandelte 1D-NMR-Experiment nun mit dem Produktoperatorformalismus^[24] beschreiben. Während im Vektorformalismus die makroskopische Magnetisierung unter der Wirkung von Pulsen gedreht wird und/oder unter dem Einfluß des B_0 -Felds präzediert, beschreibt die Dichtematrix den gesamten Zustand eines Spins oder Spinsystems (also nicht nur die observable Magnetisierung). Die observablen Größen müssen erst vom jeweiligen Zustand „abgelesen“ werden. Wir geben im folgenden einen kurzen Abriss des quantenmechanischen Formalismus, der zum Verständnis der 2D-NMR-Experimente völlig ausreicht (für detailliertere Darstellungen der physikalischen Grundlagen siehe [63–67]).

Der Grundzustand eines Spinsystems im thermischen Gleichgewicht wird durch die Polarisierung I_z entlang der z-Achse beschrieben. Dieser Zustand ist verknüpft mit einer Magnetisierung M_z . Unter der Wirkung von Pulsen aus der y-Richtung, im folgenden kurz y-Pulse genannt, transformieren sich I_z sowie I_x und I_y gemäß (5)–(7) (siehe auch Abb. 1).

$$I_x \xrightarrow{\beta I_y} I_x \cos \beta - I_z \sin \beta \quad (5)$$

$$I_y \xrightarrow{\beta I_x} I_y \quad (6)$$

$$I_z \xrightarrow{\beta I_y} I_z \cos \beta + I_x \sin \beta \quad (7)$$

Die kartesischen Operatoren^[*] I_x , I_y und I_z transformieren sich bezüglich Drehungen also wie Magnetisierungen.

[*] Wir verwenden hier durchgängig sowohl für den Operator als auch für den Erwartungswert das Symbol I (bzw. S) und nicht \hat{I} für den Operator.

Die Eigenschaften eines Zustands I_x , I_y oder I_z sind bei solch einfachen Produktoperatoren, die nur *einen* Operator enthalten, direkt abzulesen. I_x ist assoziiert mit einer x-Magnetisierung, I_y entsprechend mit einer y-Magnetisierung und I_z mit einer z-Magnetisierung.

Wir müssen noch die in den Gleichungen^[*] (5) bis (7) und auch weiterhin verwendete Notation erklären. Links steht jeweils der Anfangszustand des Spinsystems, rechts der Endzustand nach der „Propagation“, d.h. der Entwicklung unter dem jeweiligen Operator, der für spezifische Wechselwirkungen steht (z.B. für Puls, chemische Verschiebung, Kopplung). Die Terme auf den Pfeilen sind jeweils die Teile des Hamilton-Operators, die für die betrachtete Entwicklung des Systems relevant sind. Der Hamilton-Operator beschreibt die Wechselwirkungen der Spins mit äußeren Feldern und untereinander. Dabei steht

- $\beta I_{x,y}$ oder allgemein βI_ϕ für einen Puls mit dem Flipwinkel β um jene Achse in der x,y-Ebene, die den Winkel ϕ mit der x-Achse einschließt,
- $\Omega I_z t$ für die Entwicklung der chemischen Verschiebung Ω des Kerns I während der Zeit t und
- $2\pi J I_{1z} I_{2z} t$ für die Entwicklung der Kopplung J zwischen den Kernen I^1 und I^2 während t .

Für die Entwicklung der chemischen Verschiebung gelten die Gleichungen (8)–(10) (siehe auch Abb. 2). Auch hier verhalten sich die Operatoren wie die Magnetisierungen. Die Beschreibung für ein einziges Spin-1/2-Teilchen ist daher derjenigen im Vektorformalismus gleich.

$$I_x \xrightarrow{\Omega I_z} I_x \cos \Omega t + I_y \sin \Omega t \quad (8)$$

$$I_y \xrightarrow{\Omega I_z} I_y \cos \Omega t - I_x \sin \Omega t \quad (9)$$

$$I_z \xrightarrow{\Omega I_z} I_z \quad (10)$$

Die Detektion von x-Magnetisierung bedeutet, daß z.B. bei Gleichung (9) der Koeffizient $-\sin \Omega t$ bei I_x das Signal bildet. Fourier-Transformation ergibt je eine Linie bei

[*] Korrekterweise müßte man in diesem Fall von Transformationen sprechen. Wir verwenden aber in diesem Beitrag den Begriff „Gleichung“ nicht in seiner engen mathematischen Definition.

$\pm \Omega$. Quadraturdetektion, wie sie auf allen Spektrometern möglich ist, ermöglicht die Selektion von nur einer Frequenz, z.B. von $+\Omega$.

Quadraturdetektion bedeutet, wie wir schon sahen, die Addition der Meßwerte gemäß $K_x + iK_y$. Dadurch entsteht das komplexe Signal $e^{i\Omega t}$. Dies entspricht der Detektion von I gemäß den Umformungen und Konventionen (11)–(13).

$$I^+ = I_x + iI_y \quad (11)$$

$$I^- = I_x - iI_y \quad (12)$$

$$I_x \cos \Omega t + I_y \sin \Omega t = \frac{1}{2} (I^+ e^{-i\Omega t} + I^- e^{i\Omega t}) \quad (13)$$

In Abbildung 4 ist das Prinzip der 1D-NMR-Spektroskopie für ein Einspinsystem noch einmal zusammengefaßt. Durch einen Hochfrequenzpuls erzeugt man aus der (im Boltzmann-Gleichgewicht vorliegenden) z-Magnetisierung (Zustand des Spins: I_z) transversale Magnetisierung (Zustand: I_x). Dieser Zustand, die sogenannte *Kohärenz*, evolviert, d.h. entwickelt sich, während der Detektionszeit t (verändert sich mit der Zeit). Diese Veränderung kann beobachtet werden (I_x , I_y sind in diesem Fall mit transversaler Magnetisierung verbunden), indem das durch sie in der Spule induzierte Signal aufgenommen wird. Kohärenzen, die durch Produktoperatoren dargestellt werden, werden also als Signale bei den für sie charakteristischen Frequenzen im Spektrum abgebildet.

Die folgenden Erklärungen sollen zum besseren Verständnis von Kohärenzen dienen. Im Gegensatz zu Populationen, die Besetzungen von Zuständen im Energieniveau-Schema angeben, beschreiben Kohärenzen Übergänge zwischen den Zuständen. Solche Übergänge sind durch eine Änderung Δm_z der Quantenzahl m_z gekennzeichnet. Δm_z ist die Ordnung p der Kohärenz, die für die Beschreibung von Phasencyklen entscheidend ist (siehe Abschnitt 2.2.3). Obwohl unter der Einwirkung von Pulsen einer Pulssequenz im allgemeinen viele der möglichen Kohärenzen auftreten, enthalten nur einige von ihnen eine observable Magnetisierung, und zwar ausschließlich solche mit $\Delta m_z = \pm 1$ (Auswahlregel der NMR-Spektroskopie). Von diesen Einquanten-Kohärenzen sind bei schwach gekoppelten Systemen wiederum nur wenige detektierbar,

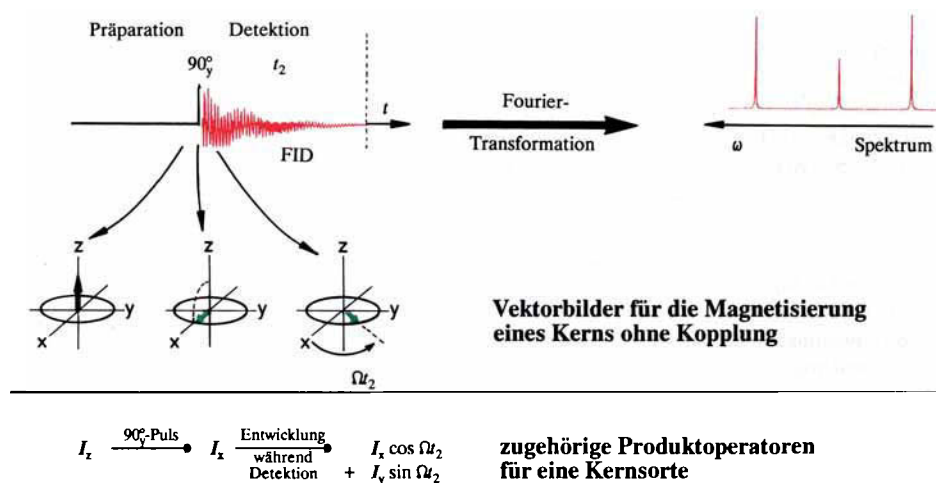


Abb. 4. Prinzip der 1D-NMR-Spektroskopie. Dargestellt ist die Entwicklung der Magnetisierungen im Vektorbild und anhand von Produktoperatoren.

und zwar die, bei denen genau ein Spin seinen Zustand ändert, d.h. die durch Produktoperatoren mit nur *einem* transversalen Operator beschrieben werden.

Das Signal eines 1D-NMR-Experiments wird nicht kontinuierlich, sondern diskontinuierlich registriert. Das ankommende Signal wird während fester Zeitintervalle Δt integriert (zeitliche „horizontale“ Digitalisierung) und dann in einem Analog-Digital-Wandler „vertikal“ digitalisiert; man erhält einen FID bestehend aus N Punkten, wobei $N \cdot \Delta t$ die Akquisitionszeit ist. Die zeitlich diskrete Akquisition ist gemäß dem Sampling Theorem^[68–73] möglich, da die Breite des Spektrums, d.h. der Bereich möglicher Frequenzen, durch die Art der Probe und durch analoge Filterung begrenzt ist. Diese zeitlich diskontinuierliche Aufnahme ist für die 2D-NMR-Spektroskopie entscheidend, weil dadurch eine zweite Zeitskala definiert werden kann (siehe Abschnitt 2.2).

2.2. Zweidimensionale NMR-Spektroskopie

Die Pulsfolge eines 2D-NMR-Experiments läßt sich im allgemeinen in folgende Blöcke unterteilen^[2]:

Präparation – Evolution (t_1) – Mischung – Detektion (t_2).

Dabei entspricht die Detektionsphase vollständig derjenigen im 1D-NMR-Experiment (Abschnitt 2.1). Die t_2 -Zeit ergibt somit nach Fourier-Transformation die mit ω_2 bezeichnete Frequenzachse eines 2D-NMR-Spektrums. Die 2D-NMR-Spektroskopie enthält darüber hinaus aber eine zweite variable Zeit, die Evolutionszeit t_1 . Sie wird schrittweise verlängert (inkrementiert). Diese inkrementierte Aufnahme entspricht den Zeitinkrementen im digitalisierten FID der t_2 -Zeit. Für jedes t_1 -Inkrement wird separat ein FID in t_2 detektiert. Man erhält schließlich ein Signal, das von zwei Zeitparametern, t_1 und t_2 , abhängt: $S(t_1, t_2)$. Die Fourier-Transformation jedes FIDs nach t_2 liefert dann eine Serie von ω_2 -Spektren, die sich für die jeweiligen t_1 -Inkmente in der Intensität und/oder Phase der Signale unterscheiden. Eine zweite Fourier-Transformation nach t_1 , somit „senkrecht“ zur ω_2 -Dimension, ergibt ein Spektrum als Funktion zweier Frequenzen (ω_2 horizontal, ω_1 vertikal).

Das Prinzip der 2D-NMR-Spektroskopie ist in Abbildung 5 am Beispiel einer Protonen-Kohlenstoff-Verschiebungskorrelation (H,C-COSY) dargestellt. Man beginnt

mit der Erzeugung transversaler Protonenmagnetisierung (Kohärenzen) und überträgt diese durch je einen 90° -Puls für die Kerne ^1H und ^{13}C auf die Kohlenstoffkerne (Mischung). Wie diese Übertragung im einzelnen vor sich geht, wird in Abschnitt 2.2.1 erläutert. Detektiert wird schließlich die Kohlenstoffmagnetisierung.

Betrachten wir das vorher Gesagte noch einmal im Detail anhand der in Abbildung 5 gezeigten Pulssequenz mit Produktoperatoren^[1]. Aus der Gleichgewichtsmagnetisierung entsteht nach der Präparation – in diesem Fall ist es ein 90° -Puls – transversale Magnetisierung I_x , was einer Einquanten-Kohärenz entspricht. I_x entwickelt sich mit seiner charakteristischen Frequenz während t_1 [Gl. (14)].

$$I_x \xrightarrow{\Omega_I t_1} I_x \cos \Omega_I t_1 + I_y \sin \Omega_I t_1 \quad (14)$$

Durch die Mischsequenz – hier zwei 90° -Pulse auf ^1H und ^{13}C – werden die Kohärenzen der Protonen in Kohärenzen der ^{13}C -Kerne umgewandelt (d.h. aus I_x wird S_x). Der I_y -Term wird nicht mehr weiter berücksichtigt, weil er, wie wir in Abschnitt 2.1.1 sehen werden, für das Experiment nicht relevant ist. Der Mechanismus des Kohärenz-Transfers ist im Moment ebenfalls unwichtig. S_x entwickelt sich dann während t_2 mit seiner charakteristischen Frequenz [Gl. (15)]. Der Zustand des Spinsystems nach der Zeit t_2 ist

$$S_x \xrightarrow{\Omega_S t_2} S_x \cos \Omega_S t_2 + S_y \sin \Omega_S t_2 \quad (15)$$

$$\cos \Omega_I t_1 (S_x \cos \Omega_S t_2 + S_y \sin \Omega_S t_2) \quad (16)$$

also durch Gleichung (16) gegeben. Die S -Operatoren enthalten damit nicht nur ihre charakteristischen Frequenzen Ω_S , sondern auch die I-Spin-Frequenz Ω_I . Man spricht auch von Markierung („labelling“). $S_{x,y}$ ist in t_1 mit der I-Frequenz markiert („gelabelt“). Quadraturdetektion der Operatorkombination von (16) in t_2 führt dann zu einem komplexen Signal der Form (17). Eine Fourier-Transfor-

[*] Die Bezeichnungen I und S stammen ursprünglich von „insensitive“ bzw. „sensitive“. Dennoch verwenden auch wir hier die Bezeichnung I für das Proton, obwohl es der magnetisch empfindlichere Kern ist, und S für den Heterospin, da dies dem allgemeinen Gebrauch entspricht.

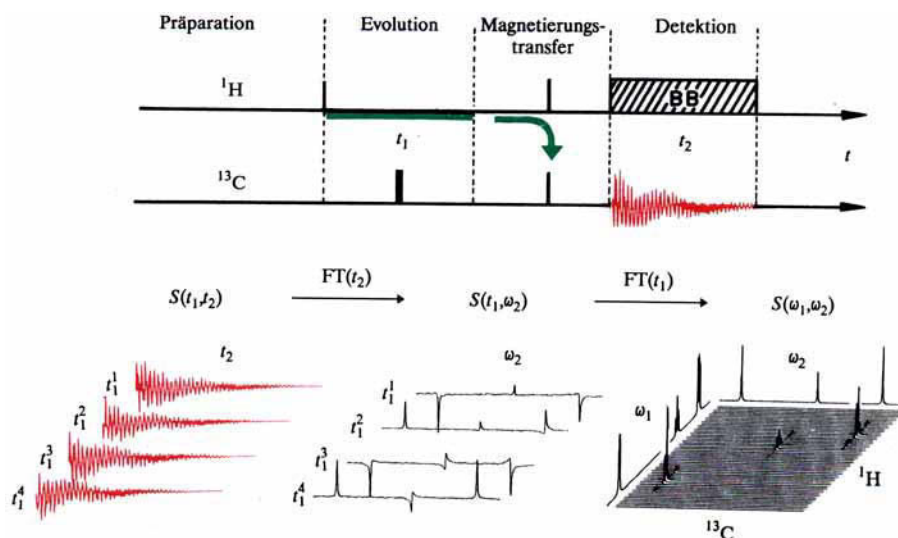


Abb. 5. Prinzip der 2D-NMR-Spektroskopie am Beispiel von H,C-COSY. Man beachte die Intensitätsveränderungen der Kohlenstoffsignale nach der ersten Fourier-Transformation, in der die Evolution der Protonenmagnetisierung während der t_1 -Zeit enthalten ist (unten Mitte).

mation nach t_1 und t_2 ergibt die Frequenzen $\pm\Omega_1$ in ω_1 und Ω_S in ω_2 . Schematisch erhält man somit das in Abbil-

$$\cos \Omega_1 t_1 e^{i\Omega_S t_2} \quad (17)$$

dung 6 gezeigte Spektrum. Eine Linie im 2D-NMR-Spektrum tritt dann an der Stelle (Ω_1 , Ω_S) auf, wenn das Signal in t_1 mit der Frequenz Ω_1 und in t_2 mit der Frequenz Ω_S moduliert ist.

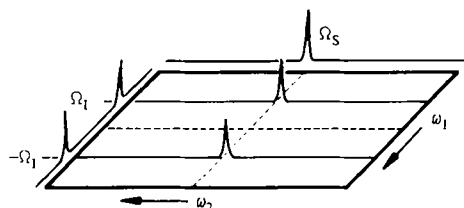


Abb. 6. Schematische Kreuzsignale für I- und S-Kerne in einem hypothetischen 2D-NMR-Spektrum. Als Randspektren sind die Projektionen auf die Achsen abgebildet. In ω_2 wurde bereits die Redfield-Technik (siehe Abb. 3) verwendet.

Das 2D-NMR-Spektrum ist also ein Abbild der Übertragungsprozesse von Kohärenzen, wobei als „Koordinaten“ der Peaks die charakteristischen Frequenzen der miteinander verbundenen Kohärenzen auftreten. Die Intensität der Signale wird durch die Effizienz des Mischprozesses bestimmt. Die Übertragbarkeit von Kohärenzen hängt einerseits von den Eigenschaften des Spinsystems ab, also von strukturellen, dynamischen und chemischen Moleküleigenschaften, die sich im Verhalten der magnetisch aktiven Spins widerspiegeln; sie wird andererseits durch die Art der Mischsequenz im 2D-NMR-Experiment bestimmt, was zu der enormen Vielfalt an 2D-NMR-Experimenten führte.

In der hochauflösenden NMR-Spektroskopie gibt es zwei wesentliche Spin-Spin-Wechselwirkungen, die für die Übertragung von Kohärenzen genutzt werden können: Die eine ist die durch die Bindung wirkende skalare Spin-Spin-Kopplung (J -Kopplung), die schon im 1D-NMR-Experiment zu den wohl bekannten Multipletaufspaltungen führt. Sie besteht nur zwischen Spins, die durch wenige Bindungen im Molekül getrennt sind. Daher ist sie für die Aufklärung von Konnektivitäten, also Verknüpfungen, von Atomen geeignet und dient zum Beweis der Konstitution chemischer Verbindungen, aber auch zur Zuordnung von Spektren. Die Größe der skalaren Kopplung ist zudem ein empfindlicher Parameter für Torsionswinkel um Einfach- und Doppelbindungen und stellt damit wichtige Informationen über die räumliche Struktur (Konformation) zur Verfügung^[74–76]. Die andere Wechselwirkung ist die durch den Raum wirkende dipolare Kopplung zwischen zwei Spins. Sie ist in Flüssigkeiten die überwiegende Ursache für Relaxationsprozesse^[77–79] und gibt sich im 1D-NMR-Spektrum nur indirekt als Linienbreite zu erkennen. Dipolare Kopplung verursacht aber auch die gegenseitige Relaxation räumlich benachbarter Kerne, die Kreuzrelaxation. Die intramolekulare Kreuzrelaxation gibt Anlaß zum Nuclear-Overhauser-Enhancement (NOE)-Effekt, d. h. dazu, daß sich die Intensität des Signals eines Kerns nach Störung der Population der Spinzustände eines anderen Kerns ändert^[77–82]. Der NOE-Effekt ist vom Abstand der

kreuzrelaxierenden Kerne abhängig und ermöglicht somit die Bestimmung von intramolekularen Atomabständen^{83–88]}. Daher sind heute NOE-Werte die wichtigste NMR-Information für die Bestimmung von dreidimensionalen Molekülstrukturen. Für größere Moleküle wurde die quantitative Abstandsbestimmung erst durch die 2D-NMR-Spektroskopie^[89–93] praktikabel^[94–101]. NOE-Effekte und J -Kopplungen ergänzen sich in ihren Aussagen.

Auch durch chemische Reaktionen kann Kohärenz übertragen werden (Austausch)^[102, 103]. Im Gegensatz zu skalarer und dipolarer Kopplung erfordert diese Kohärenzübertragung kein Mehrspinsystem. Es genügt, daß sich die chemischen Verschiebungen eines Kerns unterscheiden, je nachdem, ob er im Molekül A oder B zu finden ist, um Austauschpektren zu erzeugen. Dies wurde schon sehr früh für kinetische Untersuchungen genutzt^[102–115]. Auch hier brachte die 2D-Austausch-NMR-Spektroskopie^[89, 116, 117] Vorteile bei Messungen der Geschwindigkeitskonstanten von Reaktionen im chemischen Gleichgewicht (z. B. in vivo), aber auch bei der Bestimmung von Reaktionsgeschwindigkeiten und Mechanismen von Platzwechselprozessen in fluktuierenden Molekülen.

2.2.1. Skalare Kopplung

Auf der skalaren Kopplung beruhen die meisten 2D-NMR-Experimente. Sie ist auch Ursache für das Versagen des Vektorbildes bei der Beschreibung von NMR-Experimenten. Aufgrund der großen Bedeutung der skalaren Kopplung für die hochauflösende 2D-NMR-Spektroskopie werden wir uns zuerst mit ihr beschäftigen.

Skalare Kopplungen im Produktoperatorformalismus

Die skalare Kopplung ist die Wechselwirkung zweier Spins, die überwiegend durch die Bindung (indirekte Kopplung) und nur gelegentlich durch den Raum^[118] vermittelt wird. Sie führt zu einer Aufspaltung der Resonanzen im NMR-Spektrum (Multipllettstruktur). Im Produktoperatorformalismus läßt sich die Spin-Spin-Kopplung zweier Kerne 1 und 2 gemäß (18)–(21) beschreiben. Es re-

$$I_{1x} \xrightarrow{\pi I_{1z} \frac{2J_{12}}{\hbar} t_2} I_{1x} \cos \pi J_{12} t_2 + 2I_{1y} I_{2z} \sin \pi J_{12} t_2 \quad (18)$$

$$I_{1y} \xrightarrow{\pi I_{1z} \frac{2J_{12}}{\hbar} t_2} I_{1y} \cos \pi J_{12} t_2 - 2I_{1x} I_{2z} \sin \pi J_{12} t_2 \quad (19)$$

$$2I_{1x} I_{2z} \xrightarrow{\pi I_{1z} \frac{2J_{12}}{\hbar} t_2} 2I_{1x} I_{2z} \cos \pi J_{12} t_2 + I_{1y} \sin \pi J_{12} t_2 \quad (20)$$

$$2I_{1y} I_{2z} \xrightarrow{\pi I_{1z} \frac{2J_{12}}{\hbar} t_2} 2I_{1y} I_{2z} \cos \pi J_{12} t_2 - I_{1x} \sin \pi J_{12} t_2 \quad (21)$$

sultieren ganz ähnliche Ausdrücke wie für die Entwicklung der chemischen Verschiebung, allerdings treten hier zum ersten Mal die Operatorprodukte auf, die diesem Formalismus den Namen gegeben haben. Wir wollen zur Erläuterung der Formeln noch einmal auf Vektorbilder zurückgreifen: Im Vektorbild stellt man eine Kopplung zwischen Kern 1 und Kern 2 durch zwei unterschiedlich schnell präzedierende Vektoren für den Spin von Kern 1 dar, für die der Kern 2 im α - bzw. β -Spinzustand ist (Abb. 7). Die x-Magnetisierung des Spins 1 ist offensichtlich mit $\cos \pi J t$ moduliert, was durch den ersten Teil von Gleichung 18 wiedergegeben wird. Es gibt aber darüber hinaus Magneti-

Wir betrachten nun Produktoperatoren für ein Dreispinsystem aus einem Kern 1, der zu den Kernen 2 und 3 koppelt (Abb. 8). I_{1x} ergibt das wohlbekannte Doppeldublett



Abb. 8. Schematisches In-Phase-Doppeldublett (Strichspektrum).

bei der chemischen Verschiebung Ω_1 . Dies folgt aus Gleichung (31). Wir nutzen hier aus, daß nur I_{1x} und I_{1y} obser-

$$I_{1x} \longrightarrow I_{1x} \cos \Omega_1 t \cos \pi J_{12} t \cos \pi J_{13} t + I_{1y} \sin \Omega_1 t \cos \pi J_{12} t \cos \pi J_{13} t + \dots \quad (31)$$

vabel sind, und vernachlässigen die sechs nicht-observablen Terme. Bevor wir nun zeigen, wie man aus der Zeitfunktion (31) ein Spektrum konstruiert, müssen wir noch ein paar Bemerkungen zu Phasen und Fourier-Transformierten vorausschicken: Die absolute Phase eines Signals ist nicht sinnvoll zu definieren, denn zum einen sind Phasenänderungen durch die Elektronik möglich, zum anderen kann der Experimentator die Phase durch eine Phasenkorrektur nullter Ordnung (frequenzunabhängig) beliebig verändern. Sinnvoll dagegen ist die Definition relativer Phasen, die invariant bezüglich Phasenkorrekturen nullter Ordnung sind. Folgende Regel läßt sich formulieren: Zählt man in den Koeffizienten der x-Magnetisierungen die Zahl der Sinusfaktoren, so ist die relative Phase gerade 90° multipliziert mit der Anzahl der Sinusfaktoren. Wir können die absolute Phase nun zum Beispiel so einstellen, daß ein I_x -Term, der ausschließlich Cosinusfaktoren als Koeffizienten enthält, in Absorption ist. Dann gilt für die Phasen der anderen Terme (siehe Abb. 9):

- 0,4, ... Sinusfaktoren: Absorption
- 1,5, ... Sinusfaktoren: Dispersion
- 2,6, ... Sinusfaktoren: negative Absorption
- 3,7, ... Sinusfaktoren: negative Dispersion

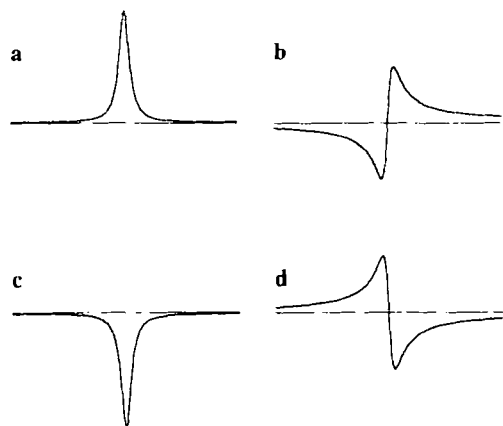


Abb. 9. Linienformen in NMR-Spektren: a) Absorptionssignal, b) Dispersionssignal, c) negatives Absorptionssignal (Emission), d) negatives Dispersionssignal.

Die Modulation des Zeitsignals durch Kopplung geschieht ausschließlich durch Amplitudenfaktoren der Form $\cos \pi J t$ und $\sin \pi J t$. Ihre Fourier-Transformierten sind in Abbildung 10 gezeigt.

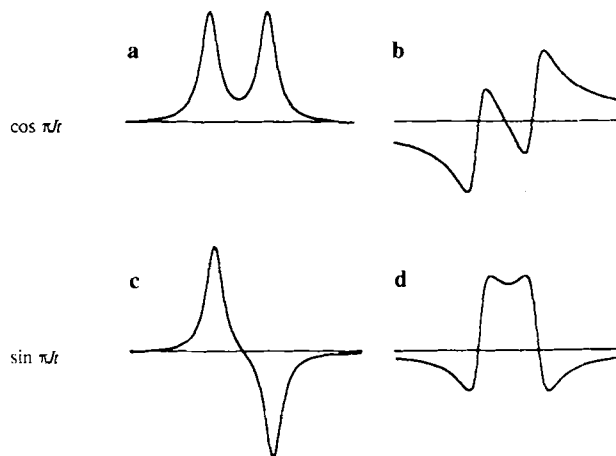


Abb. 10. Signalformen für ein Dublett mit In-Phase-Struktur (a und b) und Antiphase-Struktur (c und d). Die Spektren (a und c) sind in Absorption, die Spektren (b und d) in Dispersion aufgenommen.

Ausgangspunkt für die Konstruktion des Signals aus einem Produkt von Funktionen [siehe z. B. Gl. (30)] ist der Faltungssatz: Die Fourier-Transformierte eines Produkts von Funktionen kann man aus den Fourier-Transformierten der einzelnen Funktionen durch Faltung erhalten. In unserem Fall handelt es sich um Produkte der trigonometrischen Funktionen, deren Fourier-Transformierte jeweils bekannt sind. Das Vorgehen für die in Gleichung (31) aufgeführten Terme ist in Abbildung 11 gezeigt.

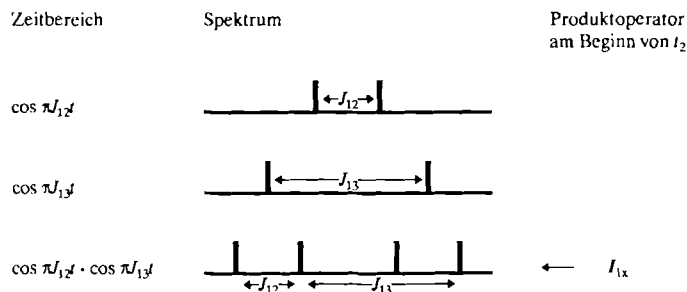


Abb. 11. Konstruktion eines In-Phase-Multipletts aus den In-Phase-Dubletts bezüglich J_{12} und J_{13} durch Faltung.

Bei Antiphase-Operatoren verfährt man wie folgt: $2I_{1x}I_{2z}$ ist nicht direkt detektierbar [Regel (a)], aber es bildet sich observable Magnetisierung gemäß Gleichung (32).

$$2I_{1x}I_{2z} \xrightarrow{\pi J_{12} t} I_{1y} \sin \pi J_{12} t \xrightarrow{\pi J_{13} t} I_{1y} \sin \pi J_{12} t \cos \pi J_{13} t \xrightarrow{\Omega_1 t} I_{1y} \cos \Omega_1 t \sin \pi J_{12} t \cos \pi J_{13} t - I_{1x} \sin \Omega_1 t \sin \pi J_{12} t \cos \pi J_{13} t \quad (32)$$

Ist die J_{12} -Kopplung gleich Null, so bildet sich keine detektierbare Magnetisierung [Regel (b)], wie man auch direkt aus (32) entnehmen kann.

Wir wenden wieder unser Faltungsrezept an und erhalten das in Abbildung 12 gezeigte Spektrum, ein In-Phase-Dublett für J_{13} (Cosinus) und ein Antiphase-Dublett für J_{12} (Sinus). Die x-Komponente enthält zwei Sinusfaktoren, so daß letztlich ein negatives Absorptionssignal (Emission) resultiert. Nach demselben Rezept ergeben sich die Spektren für die restlichen Produktoperatoren.

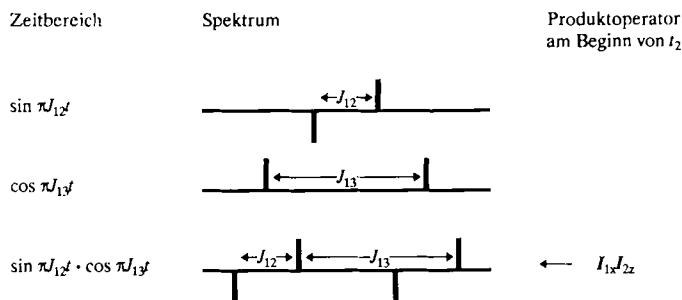


Abb. 12. Konstruktion eines Doppeldubletts mit Antiphase-Struktur bezüglich der Kopplung J_{12} und In-Phase-Struktur bezüglich J_{13} .

Wir sind jetzt soweit, daß wir das Zeitbereichssignal gar nicht mehr notieren müssen. Nach dem Rezept „Jeder z-Operator erzeugt ein Antiphase-Dublett, der Rest erzeugt In-Phase-Dubletts“ konstruieren wir die noch fehlenden Spektren (Abb. 13). Auch für die Phase von Signalen (Ab-

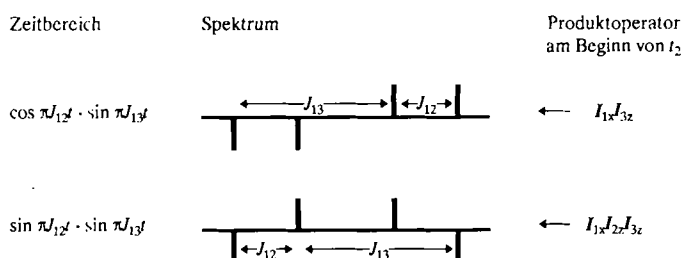
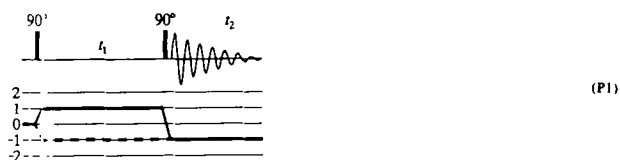


Abb. 13. Doppeldublett mit unterschiedlicher Antiphase-Struktur. Oben: bezüglich der Kopplung J_{13} ; unten: bezüglich beider Kopplungen J_{12} und J_{13} .

sorption, Dispersion) erhalten wir Regeln: Alle Terme mit einem I_x -Operator (z. B. I_{1x} , $2I_{1x}I_{2z}$, $4I_{1x}I_{2z}I_{3z}$) sind in Absorption (gerade Zahl von Sinusfaktoren). Man kann sich leicht davon überzeugen, daß dann alle Produktoperatoren mit einem I_y -Operator in Dispersion sind. Durch eine Phasenkorrektur kann man Absorption und Dispersion austauschen. Die Phasen eines 2D-NMR-Signals in den beiden Frequenzdimensionen ω_1 und ω_2 sind voneinander unabhängig, so daß sie gleich oder unterschiedlich sein können.

Wir wollen im folgenden das H,H-COSY-Experiment^[1,2] (Pulssequenz P1) eingehender betrachten, da es nur zwei



Pulse enthält, also eine der einfachsten 2D-NMR-Pulssequenzen überhaupt ist^[1]. 2D-COSY war das erste 2D-NMR-Experiment^[1], und es ist heute noch das wichtigste. Es beruht auf dem in Abschnitt 2.2 bereits angedeuteten Kohärenz-Transfer. Wir hatten gesehen, daß Kopplung Antiphase-Terme wie $2I_{1x}I_{2z}$ erzeugt und diese auch wie-

der in observable Magnetisierung überführen kann. Wendet man auf einen Operator $2I_{1x}I_{2z}$ einen 90° -Puls an, so erhält man $-2I_{1z}I_{2x}$ [siehe auch Gl. (22)]. Das heißt, der vor dem Puls transversale Spin 1 wird longitudinal, der longitudinale Spin 2 wird transversal. Man hat also Kohärenz des Spins 1 ($2I_{1x}I_{2z}$ entwickelt sich mit der chemischen Verschiebung des Kerns 1) in Kohärenz des Spins 2 überführt (transferiert). Das COSY-Experiment beruht genau auf diesem Kohärenz-Transfer.

Betrachten wir wieder ein Dreispinsystem mit den Spins 1, 2 und 3. Der erste 90° -Puls erzeugt aus der Gleichgewichtsmagnetisierung transversale Magnetisierung $I_{1x} + I_{2x} + I_{3x}$. Im folgenden wollen wir nicht alle Terme ausrechnen, sondern von vornherein die Terme, die nicht zu einem Signal im Spektrum führen, ausschließen.

Am Ende von t_2 werden nur Terme I_{1x} , I_{2x} oder I_{3x} detektiert. Konzentrieren wir uns auf den I_{2x} -Term, denn der Transfer $I_{1x} \rightarrow I_{2x}$ gibt Anlaß zu einem Kreuzsignal bei Ω_1 in ω_1 (vertikale Achse) und Ω_2 in ω_2 (horizontale Achse). Wir hatten gesehen, daß nur Kopplung einen weiteren Spin ins Spiel bringt. Während t_1 muß also die Entwicklung (33) stattfinden.

$$I_{1x} \longrightarrow 2I_{1x}I_{2x} \quad (33)$$

Dieser Produktoperator und kein anderer wird durch einen 90° -Puls vollständig in $-2I_{1z}I_{2x}$ überführt. Das Transferdiagramm im COSY-Experiment hat für das 1,2-Kreuzsignal also die Form (34). Es gibt keine andere Mög-

$$I_{1x} \xrightarrow{90^\circ} I_{1x} \xrightarrow{t_1} -2I_{1x}I_{2x} \xrightarrow{90^\circ} 2I_{1z}I_{2x} \xrightarrow{t_2} I_{2x} \quad (34)$$

lichkeit mit dieser Pulssequenz Magnetisierung von Kern 1 auf Kern 2 zu übertragen, da man genau *einen* z-Operator vor der Mischung braucht, der dann in t_2 in einen transversalen Operator überführt wird, und da Spin 1 in t_1 mit einem x-Operator (I_{1x}) präsent sein muß. Mehrere z-Operatoren im Produktoperator würden in mehrere transversale Operatoren überführt, die prinzipiell nicht detektierbar sind. Die Koeffizienten der hier aufgeführten Operatoren ergeben sich nach folgendem Schema: In t_1 entwickeln sich chemische Verschiebung und Kopplung ausgehend von I_{1x} gemäß (35). Sämtliche nicht am Transfer beteiligten

$$-2I_{1x}I_{2z} \sin \Omega_1 t_1 \sin \pi J_{12} t_1 \cos \pi J_{13} t_1 \quad (35)$$

Kopplungen gehen als Cosinusfaktoren ein. Hier wurde allerdings nur die Kopplung zu einem weiteren Kern betrachtet. Durch den 90° -Puls findet der Kohärenz-Transfer statt, und es ergibt sich (36). Daraus entwickelt sich observable Magnetisierung gemäß den Gleichungen (18) und (20). Die Gesamtamplitude des Signals, die *Transferfunktion*, ist also durch (37) gegeben.

$$2I_{1x}I_{2x} \sin \Omega_1 t_1 \sin \pi J_{12} t_1 \cos \pi J_{13} t_1 \quad (36)$$

$$\sin \Omega_1 t_1 \sin \pi J_{12} t_1 \cos \pi J_{13} t_1 \sin \Omega_2 t_2 \sin \pi J_{12} t_2 \cos \pi J_{23} t_2 \quad (37)$$

Konstruktion des 2D-Multipletts

Wir haben das Konstruktionsschema für 1D-NMR-

[*] Die unter der eigentlichen Pulssequenz angegebenen „Notensysteme“ zeigen den jeweiligen Kohärenz-Transferweg. Sie werden in Abschnitt 2.2.3 erläutert.

Spektren anhand der Signale im Zeitbereich besprochen und wenden dies jetzt auf die Konstruktion des 2D-NMR-Spektrums an. In ω_1 und ω_2 finden wir die in Abbildung 14 gezeigten Multipletts, aus denen sich das 2D-NMR-Spektrum ergibt, indem man in einem rechtwinkligen Koordinatensystem aus den beiden ω -Achsen an den Stellen Peaks einträgt, die Kreuzungspunkten der 1D-NMR-Frequenzen entsprechen. Die Intensität ist jeweils das Produkt der Amplituden der beteiligten Linien. Die Phasen in ω_1 und ω_2 dagegen sind identisch mit denen der jeweils zugrundeliegenden „1D-NMR-Spektren“.

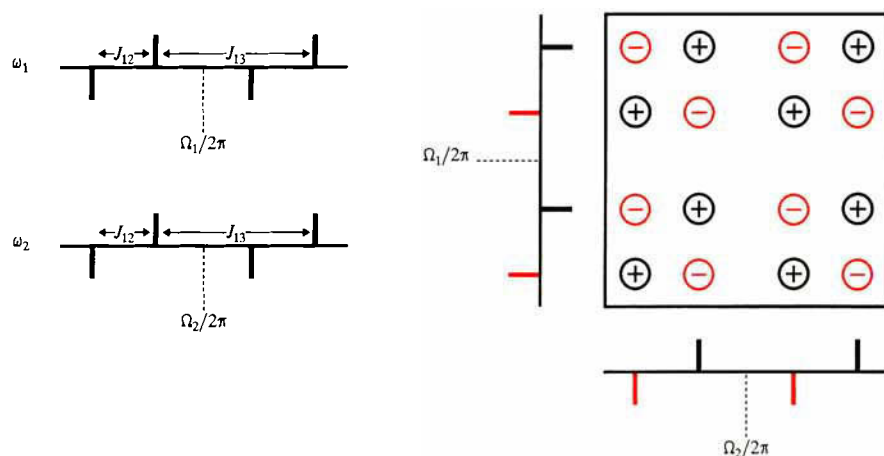


Abb. 14. Konstruktion eines 2D-Multipletts aus zwei 1D-NMR-Spektren. Die Signale im 2D-NMR-Spektrum (rechts) entstehen an den Positionen, deren Frequenzen durch die Lage der Signale in den 1D-NMR-Spektren (links) definiert sind. Die Signalintensität ergibt sich aus dem Produkt der Intensitäten der 1D-NMR-Spektren.

Bisher wurde nur ein einziges, nämlich das 1,2-Kreuzsignal betrachtet. Man erhält die anderen Kreuzsignale, z. B. das zwischen den Kernen 2 und 3, indem man nach dem ersten 90° -Puls mit I_{2x} startet und I_{3x} detektiert.

Wir wollen noch einmal das Zustandekommen der Kreuzsignale zusammenfassen. In t_1 entwickeln sich die Kohärenzen mit der chemischen Verschiebung von Spin 1, in t_2 die mit der chemischen Verschiebung von Spin 2. Für einen Kohärenz-Transfer mit einem 90° -Puls benötigt man Terme $2I_{1x}I_{2x}$, die in $-2I_{1z}I_{2x}$ übergehen, d. h. vor und nach dem Kohärenz-Transfer liegt jeweils Antiphase-Magnetisierung vor, verursacht durch die J_{12} -Kopplung. Man bezeichnet diese Kopplung daher auch als *aktive* Kopplung. Die anderen Kopplungen erscheinen in-phase und werden als *passiv* bezeichnet, genauso wie die beim Transfer nicht in Erscheinung tretenden Spins (in diesem Fall der Spin 3).

Es gibt ferner noch die Diagonalsignale (z. B. $\omega_1 = \omega_2 = \Omega_1$) im COSY-Spektrum. Für ein 1,1-Diagonalsignal muß der Produktoperator vor der Mischung *einen* transversalen Operator für Spin 1 enthalten, sonst hätte sich während t_1 keine chemische Verschiebung dieses Spins entwickelt. Auch nach der Mischung muß der Operator für Spin 1 noch transversal sein, sonst würde er nicht zu einem Peak bei Ω_1 in ω_2 Anlaß geben. Vor dem Mischpuls dürfen keine Terme mit mehr als einem I_z -Operator existieren, denn sie würden durch den 90° -Puls in transversale Operatoren überführt. Dadurch würden nicht-observable Terme mit mehr als einem transversalen Operator am Beginn von t_2 entstehen. Also hat das Transferdiagramm für Diagonalsignale die Form (38). Daraus ergibt sich die Transferamplitude gemäß (39).

$$I_{1x} \xrightarrow{90^\circ} I_{1x} \xrightarrow{t_1} I_{1y} \xrightarrow{90^\circ} I_{1y} \xrightarrow{t_2} I_{1x} \quad (38)$$

$$\sin \Omega_1 t_1 \cos \pi J_{12} t_1 \cos \pi J_{13} t_1 \sin \Omega_1 t_2 \cos \pi J_{12} t_2 \cos \pi J_{13} t_2 \quad (39)$$

Die Analyse der Multiplettstruktur ergibt disperse (je ein Sinusfaktor für beide Zeitdimensionen) In-Phase-Signale (Cosinusfaktoren für die Kopplungen) in beiden Frequenzdimensionen. Die Diagonalsignale im COSY-Spektrum sind also dispersiv in beiden Dimensionen (doppelt dispersiv), während die Kreuzsignale in beiden Dimensionen absorptiv sind (doppelt absorptiv). Natürlich

kann man in 2D-NMR-Spektren durch Phasenkorrektur Absorption und Dispersion in beiden Dimensionen separat austauschen. Das Diagonalsignal ist bezüglich aller Kopplungen in-phase, da diese mit dem Cosinus eingehen.

Bisher haben wir ausschließlich die erwünschten Transfers (Kreuz- und Diagonalsignale) analysiert. Unerwünschte Signale haben wir einfach nicht betrachtet. Im COSY-Experiment treten sogenannte Axial-Peaks als Artefakte auf. Sie entstehen, wenn am Ende von t_1 ein I_z -Term durch den 90° -Mischpuls in einen transversalen I_x überführt wird, der in t_2 observabel ist. Da er in t_1 nicht moduliert ist, entsteht ein Signal bei $\Omega_1 = 0$ (Axial-Peak). Der Spektroskopiker hat ein mächtiges Instrument in der Hand, derartige Artefakte zu unterdrücken: die *Phasencyclen*. Bevor wir diese erläutern, wollen wir jedoch den zweiten wichtigen Prozeß zur Übertragung von Magnetisierung zwischen zwei Spins betrachten, die dipolare Kopplung.

2.2.2. Dipolare Kopplung

Die dipolare Kopplung spielt in der hochauflösenden NMR-Spektroskopie eine völlig andere Rolle als die skalare Kopplung. Sie gibt im 1D-NMR-Spektrum nur als Relaxationsphänomen zu Linienverbreiterungen (T_2) oder zur Wiederherstellung des Boltzmann-Gleichgewichts nach einer gewissen Zeit (T_1) Anlaß. Die skalare Kopplung hingegen führt zu Oszillationen im FID und Linienaufspaltungen im Spektrum. Wie in Abschnitt 2.2.1 erläutert, erhält man durch J -Kopplung in Evolutionsperioden Operatoren, die Kohärenz-Transfer durch Pulse ermöglichen. Somit verursacht die skalare Kopplung einen Zustand, der (auch ohne die Wirkung der Kopplung während der Mi-

schung) durch Pulse in den gewünschten Endzustand überführt werden kann [Gl. (40)].

$$I_x \xrightarrow{J(t_1)} 2I_x S_z \xrightarrow{\text{Mischung}} 2I_x S_y \xrightarrow{J(t_2)} S_x \quad (40)$$

Bei der Mischung durch dipolare Kopplung ist das anders. Dort muß während der Mischzeit die dipolare Kopplung wirksam sein, während sie in der Evolutions- oder Detektionsperiode unwirksam sein kann [Gl. (41)].

$$I_x \xrightarrow{t_1} I_x \xrightarrow{\text{NOE}} S_z \xrightarrow{t_2} S_x \quad (41)$$

Dipolare Relaxation

Die dipolare Kopplung ist die Wechselwirkung der magnetischen Momente zweier Spins durch den Raum^[3,65,77,78,119]. Das Magnetfeld B_D , das Spin 2 am Ort des Spins 1 erzeugt, ist orientierungsabhängig [Gl. (42)] mit r_{12} als Abstand der Kerne und Θ_{12} als Winkel zwischen dem Abstandsvektor r_{12} und dem B_0 -Feld].

$$B_D^1 = \gamma_1(3\cos^2\Theta_{12} - 1) r_{12}^{-3} \quad (42)$$

Die schnelle Umoorientierung der Moleküle in Lösung erzeugt am Ort der Spins magnetische Wechselfelder (Abb. 15), die den Austausch von Spinpolarisierung (z-Magnetisierung)

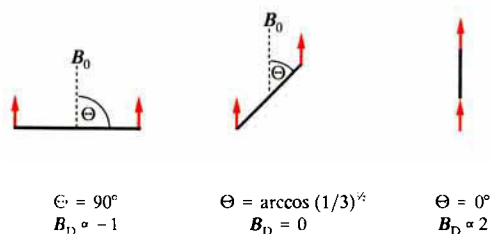


Abb. 15. Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen zwei Spins im Feld B_0 in Abhängigkeit vom Orientierungswinkel Θ . Das Feld erreicht ein absolutes Maximum bei $\Theta = 0^\circ$, ein Minimum bei $\Theta = 90^\circ$ und verschwindet beim „magischen Winkel“ $\Theta = \arccos(1/3)^{1/2}$.

sierung) ermöglichen und letztlich bewirken, daß das Spinsystem bei Abweichungen von der Boltzmann-Verteilung wieder in den Gleichgewichtszustand relaxiert. Wegen der dipolaren Kopplung relaxieren die beiden Spins allerdings nicht unabhängig voneinander, sondern beeinflussen sich gegenseitig, d. h. jede Abweichung eines Spins vom Gleichgewicht überträgt sich auf den anderen Spin und führt dort ebenfalls zu einer Abweichung vom Gleichgewicht. Diesen Effekt nennt man Nuclear-Overhauser-Enhancement (NOE)-Effect. Für zwei dipolar gekoppelte Spins I und S erhält man das in Abbildung 16 gezeigte Bild.

Für die Übergangswahrscheinlichkeiten W („Raten“), gelten die Gleichungen (43)–(45)^[77] bei isotroper Reorientierung des interatomaren Vektors.

$$W_1^I = \frac{3}{20} \cdot \frac{\gamma_1^2 \gamma_S^2 \hbar^2}{r^6} \cdot \frac{\tau_c}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2} \quad (43)$$

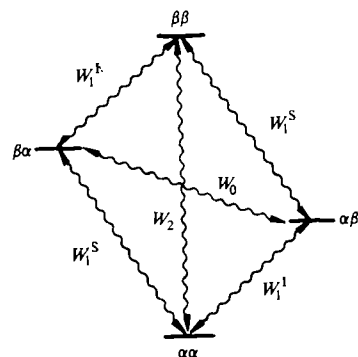


Abb. 16. Relaxation im Zweispinsystem. Null-, Ein- und Zweiquanten-Übergänge sind mit W_0 , W_1 bzw. W_2 bezeichnet.

$$W_0 = \frac{1}{10} \cdot \frac{\gamma_1^2 \gamma_S^2 \hbar^2}{r^6} \cdot \frac{\tau_c}{1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau_c^2} \quad (44)$$

$$W_2 = \frac{3}{5} \cdot \frac{\gamma_1^2 \gamma_S^2 \hbar^2}{r^6} \cdot \frac{\tau_c}{1 + (\omega_I + \omega_S)^2 \tau_c^2} \quad (45)$$

Um ein Gefühl für diese Übergangswahrscheinlichkeiten zu bekommen, betrachten wir die Relaxation ausgehend von der Polarisierung des Spins I. Wir rechnen hier mit Differenzpolarisierungen in Bezug auf den Gleichgewichtszustand. Der in Abbildung 17a gezeigte Zustand entspricht also der Boltzmann-Verteilung für Spin S und Sättigung für Spin I, so daß die Differenzmagnetisierung $-I_z$ ist. Man erkennt, daß W_1^I keine Änderung bewirkt und W_1^S zu einem Ausgleich der Populationsdifferenzen für den I-Übergang und damit zum Zerfall von $-I_z$ (Relaxation) führt. Da dies gleichermaßen für beide I-Übergänge gilt, ändert sich an der Differenz der Populationen für den S-Spin nichts. Wirkt dagegen nur W_0 , so gleichen sich die beiden mittleren Niveaus aus; man erhält die Populationsverteilung von Abbildung 17b und damit auch eine Populationsänderung für den S-Spin. W_0 -Relaxation verwandelt also einen I_z -Operator zum Teil in S_z . Dies bedeutet, daß Magnetisierungstransfer durch dipolare Kopplung möglich ist. Die Gesamtpolarisierung bleibt bei diesem Prozeß erhalten. Wirkt nur W_2 , so gleichen sich das höchste und das niedrigste Niveau aus, und man erhält die Populationsverteilung von Abbildung 17c. Wieder wird Magnetisierung von Spin I auf Spin S übertragen, allerdings ändert sich dabei das Vorzeichen, weil jetzt die tieferliegenden

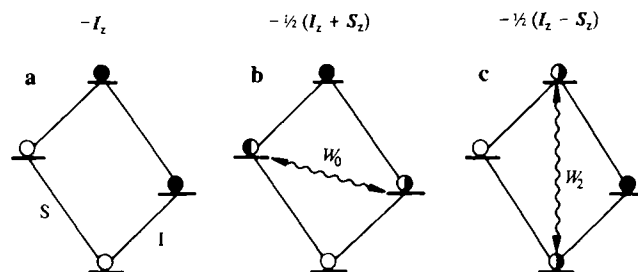


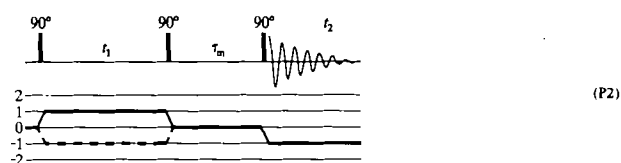
Abb. 17. Änderung der Populationen durch dipolare Relaxation. Man beachte, daß hier nur die vom Boltzmann-Gleichgewicht abweichenden Populationen schematisch gezeichnet sind. a) Ausgangszustand $-I_z$, b) Zustand nach Relaxation, wenn nur W_0 wirksam ist, c) Zustand nach Relaxation, wenn nur W_2 wirksam ist.

tigung für Spin I, so daß die Differenzmagnetisierung $-I_z$ ist. Man erkennt, daß W_1^I keine Änderung bewirkt und W_1^S zu einem Ausgleich der Populationsdifferenzen für den I-Übergang und damit zum Zerfall von $-I_z$ (Relaxation) führt. Da dies gleichermaßen für beide I-Übergänge gilt, ändert sich an der Differenz der Populationen für den S-Spin nichts. Wirkt dagegen nur W_0 , so gleichen sich die beiden mittleren Niveaus aus; man erhält die Populationsverteilung von Abbildung 17b und damit auch eine Populationsänderung für den S-Spin. W_0 -Relaxation verwandelt also einen I_z -Operator zum Teil in S_z . Dies bedeutet, daß Magnetisierungstransfer durch dipolare Kopplung möglich ist. Die Gesamtpolarisierung bleibt bei diesem Prozeß erhalten. Wirkt nur W_2 , so gleichen sich das höchste und das niedrigste Niveau aus, und man erhält die Populationsverteilung von Abbildung 17c. Wieder wird Magnetisierung von Spin I auf Spin S übertragen, allerdings ändert sich dabei das Vorzeichen, weil jetzt die tieferliegenden

Niveaus des Spins S stärker besetzt sind als die höherliegenden. Die Gesamtpolarisierung bleibt also bei diesem Prozeß nicht erhalten.

Die Effektivität der beiden Relaxationsraten W_0 und W_2 wird durch die Geschwindigkeit der molekularen Umorientierung bestimmt. Reorientiert sich das Molekül langsam im äußeren Magnetfeld (dies entspricht einer langen „Korrelationszeit“, $\tau_c > \omega_0^{-1}$), so findet Kreuzrelaxation hauptsächlich über die niederfrequenten Übergänge W_0 ($\cong \omega_1 - \omega_S$) statt [siehe Gl. (44)]. Umgekehrt ist die Relaxation über W_2 ($\cong \omega_1 + \omega_S$) nur bei schneller molekularer Umorientierung möglich [siehe Gl. (45)], was wiederum einer kurzen Korrelationszeit τ_c entspricht. Je nachdem, ob W_0 oder W_2 dominiert, ist die Kreuzrelaxationsrate ($W_2 - W_0$) negativ oder positiv und damit auch der NOE-Effekt. Für $W_2 = W_0$ verschwindet die Kreuzrelaxationsrate. Konventionsgemäß entspricht einer positiven (negativen) Kreuzrelaxationsrate und damit einer erhöhten (verminderten) Intensität des S-Kernsignals ein positiver (negativer) NOE-Effekt^[78].

Wie für den Kohärenz-Transfer das COSY-Experiment, so ist für den inkohärenten Magnetisierungstransfer das NOESY-Experiment (P2)^[89] die grundlegende und wichtigste Pulssequenz.



Wir hatten gesehen, daß der Transfer von Magnetisierung via NOE dadurch erreicht wird, daß man einen Nichtgleichgewichtszustand erzeugt und dann wartet. Die relevanten Produktoperatoren ergeben sich aus folgenden Überlegungen: Zu Beginn und am Ende von τ_m benötigt man z-Magnetisierung. Sie wird in transversale Magnetisierung (detektierbare Kohärenz) verwandelt und geht auch aus dieser hervor. Insgesamt ergibt sich also (46). Die Transferamplitude ist durch (47) gegeben. Dabei bedeutet

$$I_z \xrightarrow{90^\circ_x} -I_y \xrightarrow{t_1} -I_y \xrightarrow{90^\circ_x} -I_z \xrightarrow{\text{NOE}} -S_z \xrightarrow{90^\circ_x} S_y \xrightarrow{t_2} -S_x \quad (46)$$

$$\cos \Omega_{I1} t_1 \prod_i \cos \pi J_{I1} t_1 \sin \Omega_{S2} t_2 \prod_j \cos \pi J_{S2} t_2 \quad (47)$$

$\prod_i \cos \pi J_{I1} t_1$ das Produkt^[*] aller $\cos \pi J_{I1} t_1$ -Faktoren, J_{I1} sind die skalaren Kopplungen zwischen Spin I und anderen Spins i. Äquivalent läßt sich dies auch auf den Spin S übertragen.

Eine Bemerkung noch zu den Vorzeichen der Diagonal- und Kreuzsignale im NOESY-Spektrum: Ist der NOE-Effekt positiv ($W_2 - W_0 > 0$), so bildet sich $-S_z$ aus I_z , d.h. Diagonal- und Kreuzsignale haben unterschiedliche Vorzeichen. Ist der NOE-Effekt dagegen negativ

($W_2 - W_0 < 0$), so bildet sich S_z aus I_z , und Diagonal- und Kreuzsignale haben gleiches Vorzeichen.

Das Signal im NOESY-Spektrum ist in-phase bezüglich aller Kopplungen (nur Cosinusfaktoren) und läßt sich auf Absorption korrigieren. Wir wollen später noch genauer auf die Analyse von NOESY-Spektren sowie auf weitere Varianten eingehen.

Wir kommen jetzt auf Phasencyklen zu sprechen, die ein wichtiges Mittel zur Beseitigung von Störsignalen und Artefakten (d.h. unerwünschten Beiträgen) in Spektren sind. Aus der NOESY-Sequenz entnimmt man beispielsweise, daß auch der Transfer (48) zwischen zwei koppelnden

$$I_z \xrightarrow{90^\circ_x} -I_y \xrightarrow{t_1} 2I_z S_z \xrightarrow{90^\circ_x} -2I_z S_y \xrightarrow{\tau_m} S_x \xrightarrow{90^\circ_x} S_z \xrightarrow{t_2} S_x \quad (48)$$

Spins möglich ist. Er führt zu einem unerwünschten Signal, das aufgrund skalarer Kopplung zustande kommt und mit dem NOE-Signal überlagert. Mit Phasencyklen können derartige unerwünschte Signale unterdrückt werden.

2.2.3. Kohärenzordnungen und Phasencyklen

In einem Phasencyclus wird eine Pulsfolge wiederholt, wobei die Phasen der Pulse (Sender) und die Empfängerphasen systematisch variiert („cycled“), sonst aber alle Parameter wie Delays, Flipwinkel etc. konstant gehalten werden. Sämtliche so erhaltenen FIDs eines t_1 -Inkrementes werden addiert. Phasencyklen dienen der Selektion eines gewünschten Transfers und zugleich der Unterdrückung von unerwünschter Störmagnetisierung. Sie sind nur dann sinnvoll, wenn die Phasenabhängigkeiten des erwünschten und der unerwünschten Übertragungsprozesse unterschiedlich sind.

Wir wollen hierfür ein einfaches Beispiel geben. Im COSY-Experiment treten Kreuzsignale aufgrund des Transfers (49) auf. Dreht man die Phase des 90°-Mischpul-

$$2I_{1x} I_{2z} \xrightarrow{90^\circ_y} -2I_{1z} I_{2x} \quad (49)$$

ses um 180°, so ändert sich nichts an dem Produktoperator [siehe (50)].

$$2I_{1x} I_{2z} \xrightarrow{90^\circ_y} -2I_{1z} I_{2x} \quad (50)$$

Artefaktsignale in fast allen 2D-NMR-Experimenten sind Axial-Peaks, die dadurch zustandekommen, daß longitudinale Magnetisierung durch die Mischsequenz in detektierbare transversale Magnetisierung umgewandelt wird. Diese Magnetisierung ist nicht in t_1 moduliert, kommt also bei $\omega_1 = 0$ zur Resonanz (der Begriff axial kommt von „auf der Achse $\omega_1 = 0$ liegend“). Die Axialsignale transformieren sich unter 90°_y und 90°_{-y} gemäß (51) bzw. (52). Sie sind also im Gegensatz zu den erwünschten

$$I_{1z} \xrightarrow{90^\circ_y} I_{1x} \quad (51)$$

$$I_{1z} \xrightarrow{90^\circ_{-y}} -I_{1x} \quad (52)$$

[*] Im Produkt \prod bezeichnet der Index i (oder auch j) hier und im folgenden immer die nicht in der jeweiligen Gleichung aufgeführten restlichen Spins.

Kreuzsignalen von der Phase des zweiten Pulses im COSY-Experiment abhängig.

Man kann deshalb die Axialsignale unterdrücken und dabei die erwünschten Signale erhalten, indem man die beiden Experimente $90_y^\circ - t_1 - 90_y^\circ - t_2$ und $90_y^\circ - t_1 - 90_x^\circ - t_2$ addiert. Die Axialsignale heben sich gerade auf, die erwünschten Kreuz- und Diagonalsignale dagegen addieren sich. Wir beschreiben jetzt einen systematischen Weg für das Aufstellen von Phasencyclen.

Kohärenzordnung^[29,30]

Da Pulsphasen letztlich etwas mit Drehungen um die z-Achse zu tun haben, unterscheiden wir Operatoren nach ihrem Verhalten bezüglich einer Drehung um die z-Achse [Gl. (53)–(55), man bemerke die Analogie zu Gl. (8)–(10)]

$$I_x \xrightarrow{\varphi_z} I_x \cos \varphi + I_y \sin \varphi \quad (53)$$

$$I_y \xrightarrow{\varphi_z} I_y \cos \varphi - I_x \sin \varphi \quad (54)$$

$$I_z \xrightarrow{\varphi_z} I_z \quad (55)$$

mit $\varphi = \Omega t$. Man erkennt, daß sich die Operatoren I_x und I_y nicht rein, sondern gemischt transformieren, d. h. aus einem I_x -Operator entsteht eine Mischung aus I_x und I_y . Aus Gründen, deren Erläuterung hier zu weit führen würde, ist die kartesische Basis für die Beschreibung von Phasencyclen daher unbrauchbar. Man findet allerdings eine andere Basis, in der sich die transversalen Operatoren rein transformieren, die Basis der Einelementoperatoren^[120–125] [Gl. (56) und (57)].

$$I^+ = I_x + iI_y \xrightarrow{\varphi_z} I^+ e^{i\varphi} \quad (56)$$

$$I^- = I_x - iI_y \xrightarrow{\varphi_z} I^- e^{-i\varphi} \quad (57)$$

Entsprechend den Regeln für Produktoperatoren (sukzessive Anwendung der Transformation auf jeden Operator) gilt beispielsweise für $I_1^+ I_2^-$ Gleichung (58), d. h. der Term bleibt bei Drehung um die z-Achse invariant. Dagegen gilt für $I_1^+ I_2^+$ Gleichung (59).

$$I_1^+ I_2^- \xrightarrow{\varphi_z} I_1^+ e^{i\varphi} I_2^- e^{-i\varphi} = I_1^+ I_2^-, \quad (58)$$

$$I_1^+ I_2^+ \xrightarrow{\varphi_z} I_1^+ e^{i\varphi} I_2^+ e^{i\varphi} = I_1^+ I_2^+ e^{2i\varphi} \quad (59)$$

Wir finden immer Phasenfaktoren $e^{-ip\varphi}$ bei der Drehung um die z-Achse. p wird als *Kohärenzordnung* bezeichnet, die sich als Zahl der I^+ -Operatoren minus der Zahl der I^- -Operatoren in einem Produktoperator ergibt. $I_1^+ I_2^-$ mit $p=0$ ist demnach eine Nullquanten-Kohärenz, $I_1^+ I_2^+$ dagegen eine Doppelquanten-Kohärenz ($p=+2$). $I_1^- I_2^-$ ist ebenfalls eine Doppelquanten-Kohärenz ($p=-2$). Produktoperatoren, die nur longitudinale Operatoren enthalten, verhalten sich wie Nullquanten-Kohärenzen. Die Bedeutung der Kohärenzordnung für die Klassifizierung von Kohärenzen ergibt sich daraus, daß die Kohärenzordnung in Zeiten freier Evolution erhalten bleibt.

I^+ ist der „raising“-Operator und I^- der „lowering“-Operator. Dabei beziehen sich „raising“ und „lowering“ auf die Änderung

der Quantenzahl m , und nicht auf die Energie. Sie beschreiben Prozesse, bei denen ein Quant abgegeben ($\beta \rightarrow \alpha$ durch I^+) bzw. aufgenommen wird ($\alpha \rightarrow \beta$ durch I^-). Die Zahl der aufgenommenen Quanten ist gleich der Anzahl von I^- abzüglich der Anzahl von I^+ im Produktoperator (Abb. 18).

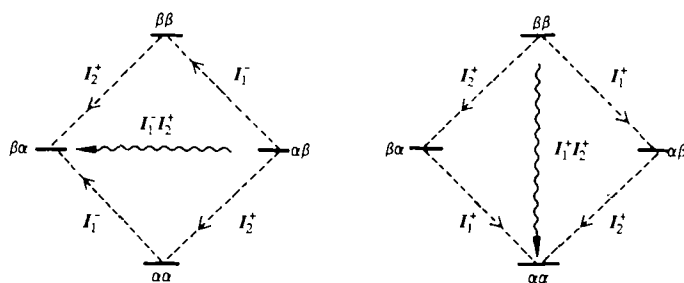


Abb. 18. Graphische Darstellung von Nullquanten-Kohärenz (ZQC, links) und Doppelquanten-Kohärenz (DQC, rechts) im Energieniveauschema eines Zweispinsystems. Es wurde jeweils nur einer der beiden Übergänge eingezeichnet, d. h. im Falle der DQC nur die Absorption. Zur weiteren Erläuterung siehe Text.

Der Klassifizierung von Kohärenzen nach Kohärenzordnungen liegt die Symmetrie des Spin-Hamilton-Operators bei Rotationen um die z-Achse (axiale Symmetrie) zugrunde, die während freier Evolution gilt. Einer Symmetrie entspricht immer ein Erhaltungssatz^[126], in diesem Fall, daß die Kohärenzordnung in pulsfreien Perioden erhalten bleibt. Unter dem Einfluß von Pulsen ist diese Symmetrie dagegen gebrochen, d. h. Pulse induzieren Änderungen der Kohärenzordnung.

Unsere kartesischen Produktoperatoren enthalten immer einen bestimmten Satz von Kohärenzordnungen. Beispielsweise enthalten I_{1x} und I_{1y} die Summe aus positiver und negativer Einquanten-Kohärenz [Gl. (60) bzw. (61), vgl. die Definitionsgleichungen (56) und (57) von I^+ bzw. I^-]. $2I_{1x}I_{2z}$ enthält dieselben Kohärenzordnungen [Gl. (62)].

$$I_{1x} = \frac{1}{2}(I_1^+ + I_1^-) \quad (60)$$

$$I_{1y} = -\frac{1}{2}i(I_1^+ - I_1^-) \quad (61)$$

$$2I_{1x}I_{2z} = (I_1^+ + I_1^-)I_{2z} \quad (62)$$

Letztlich kommt man zu folgendem Resultat: Die Zahl der transversalen Operatoren bestimmt die höchste ($p=+n$) und niedrigste ($p=-n$) Kohärenzordnung, die in einem Produktoperator vorhanden ist. Es kommen im Abstand von 2 alle Kohärenzordnungen zwischen $p=+n$ und $p=-n$ vor [siehe z. B. (63)–(65)].

$$2I_{1x}I_{2z} : +1, -1 \quad (63)$$

$$4I_{1x}I_{2x}I_{3x} : +3, +1, -1, -3 \quad (64)$$

$$4I_{1y}I_{2x}I_{3x} : +2, 0, -2 \quad (65)$$

Wir können also, indem wir die Entwicklung der Produktoperatoren während eines 2D-NMR-Experiments verfolgen, jeweils sehen, welche Kohärenzordnung vorliegt. Hierfür hat sich eine Darstellung eingebürgert (Abb. 19), in der Linien wie in einem Notensystem die Kohärenzord-

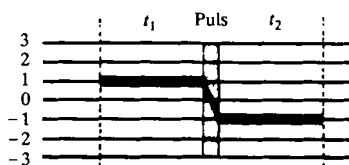


Abb. 19. Darstellung von Kohärenzordnungen in einem Notensystem. Im Gegensatz zu Phasen freier Evolution können Pulse die Kohärenzordnung verändern.

nungen zu bestimmten Zeiten darstellen^[30]. Die geraden, unverzweigten Linien sind Ausdruck der Erhaltung der Kohärenzordnung während Perioden freier Evolution. Abbildung 19 repräsentiert zum Beispiel eine positive Einquanten-Kohärenz während t_1 und eine negative Einquanten-Kohärenz während t_2 .

Selektion von Kohärenzordnungssprüngen

Phasencyklen selektieren Sprünge zwischen den Kohärenzordnungen. Solche Sprünge treten bei Pulsen auf. Ein β_y -Puls verwandelt z. B. z-Magnetisierung in ein Gemisch aus x- und z-Magnetisierung. Man erhält Abbildung 20. Die Transferamplituden für die jeweiligen Kohärenz-Transferwege gehen aus diesem Diagramm nicht hervor.



Abb. 20. Aus longitudinaler Magnetisierung entstehende Kohärenzordnungen nach einem β_y -Puls.

Pulse regen im allgemeinen alle Kohärenzordnungen zwischen $p = +n$ und $p = -n$ an, wobei n die Zahl der Terme im Produktoperator ist [Gl. (66)]. Diese Vielfalt von

$$I_{1x}I_{2y}I_{3x} \xrightarrow{\beta_y} I_{1x}(I_{2y} \cos \beta + I_{2z} \sin \beta)(I_{3x} \cos \beta - I_{3y} \sin \beta) \quad (66)$$

Kohärenz-Transferwegen (Abb. 21a) kann durch Phasencyklen entwirrt werden. Phasencyklen wirken wie Masken, die nur bestimmte Änderungen der Kohärenzordnungen an einer bestimmten Stelle zulassen. Eine solche Maske hat z. B. die Form von Abbildung 21b. Die Form der Maske wird von zwei Parametern bestimmt: der Selektivität N des Phasencyclus und dem Kohärenzordnungssprung Δp . Es gibt für einen Phasencyclus allerdings nicht genau einen Kohärenzsprung, sondern unendlich viele im

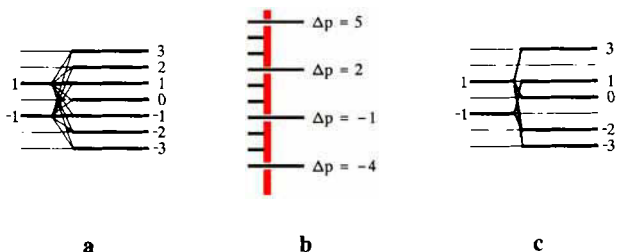


Abb. 21. a) Aus Einquanten-Kohärenz (\pm SQC) durch einen Puls entstehende Kohärenzordnungen in einem Dreispinsystem. Daraus können mit einer Maske (b), dem Phasencyclus, bestimmte Kohärenzordnungssprünge selektiert werden (c). Die Maske wählt alle Sprünge mit $\Delta p \pm k \cdot N$ ($k=0, 1, 2, \dots$) aus, wobei die Selektivität N in diesem Fall 3 und $\Delta p = 1$ sind. Somit können alle aus \pm SQC entstehenden Kohärenzordnungen die Maske passieren, die einem Sprung Δp von $-4, -1, 2$ oder 5 entsprechen (c).

Abstand N . Die Selektivität ist bildlich gesehen der Abstand der Löcher in der Maske (in dem hier gewählten Beispiel ist $N=3$). Ein Phasencyclus läßt also alle Kohärenzordnungssprünge $\Delta p \pm N \cdot k$ passieren (mit $k=0, 1, 2, \dots$).

Legt man nun diese Maske auf das Anregungsschema von Abbildung 21a, so reduziert sich die Zahl der möglichen Kohärenz-Transferwege drastisch (Abb. 21c). Von den 14 möglichen Wegen wurden fünf selektiert.

Erstellen von Phasencyklen

Die Selektivität N eines Phasencyclus für einen Puls $\varphi^{(k)} = k\Delta\varphi^{(0)}$ mit $k=0, 1, \dots$ hängt mit dem Phaseninkrement $\Delta\varphi$ zusammen: $\Delta\varphi = 2\pi/N$. Daraus folgt, daß für die Maske von Abbildung 21 mit $N=3$ das Phaseninkrement $120^\circ = 2\pi/3$ ist. Δp legt die Einstellung des Empfängers fest: Erhöht man die Phase des Pulses um $\Delta\varphi$, so muß die Phase des Empfängers um $-\Delta p \cdot \Delta\varphi$ geändert werden, hier also um $-(-1) \cdot 120^\circ = 120^\circ$. Es liegt an der Periodizität trigonometrischer Funktionen, daß man dabei jedes selektierte Δp nehmen kann. Auf diese Weise folgt man mit dem Empfänger genau dem gewünschten Kohärenzweg; andere unerwünschte Wege werden ausgelöscht. Letztlich ergibt sich daraus (67) als allgemeine Formel für die Berechnung

$$\varphi_{\text{det}} = -\sum_i \Delta p_i \cdot \Delta \varphi_i \quad (67)$$

von Phasencyklen. Δp_i ist der Kohärenzordnungssprung, der durch den i -ten Puls ausgewählt werden soll.

Die Maske von Abbildung 21 wird also beispielsweise durch einen der folgenden Phasencyklen erzeugt:

k	0	1	2		0	1	2
Puls	0	120	240	oder	3	123	243
Empfänger	0	120	240		238	358	118

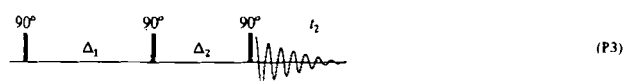
Es kommt nur auf die Phaseninkremente an. Die Referenzphase $\varphi^{(0)}$, zu der die Phaseninkremente addiert werden, ist *nicht* festgelegt. Für die Selektion von Kohärenz-Transferwegen spielt die Referenzphase keine Rolle, sie ist aber häufig von Bedeutung für die Effektivität, mit der Kohärenz-Transferwege eingeschlagen werden (z. B. gerade/ ungerade Selektion von Mehrquanten-Kohärenz durch $90^\circ - \tau - 180^\circ - \tau - 90^\circ$).

Bevor wir eingehender das Erstellen eines Phasencyclus erläutern, sei noch auf zwei wesentliche Punkte hingewiesen:

1) Der Detektor selektiert konventionsgemäß negative Einquanten-Kohärenzen [vgl. die Detektion von I^- , Gl. (11)–(13)].

2) Der erste Puls kann aus dem thermischen Gleichgewicht ($p=0$) nur Einquanten-Kohärenzen (positiv und negativ) erzeugen.

Wir betrachten zur Vertiefung Dreipuls-Experimente mit der Pulssequenz (P3). Die unterschiedlichen Experimente, die damit erzeugt werden können, sind in Tabelle 1 zusammen-



mengefaßt. Sie unterscheiden sich im wesentlichen in der Funktion des zweiten 90° -Pulses: Er vermittelt im Relayed-COSY-Experiment Kohärenz-Transfer via Einquanten-Antiphase-Magnetisierung ($2I_{kx}I_{lz} \rightarrow 2I_{kz}I_{lx}$), im NOESY-

Tabelle 1. 2D-NMR-Experimente mit drei 90°-Pulsen [a].

Experiment	Δ_1	Δ_2	Bemerkung	Ab-schnitt
COSY mit MQF [b]	t_1	Δ	Δ ist sehr klein	3.1.
Relayed-COSY	t_1	Δ	Refokussierung während der Mischzeit Δ durch π -Puls vorteilhaft	3.1.6
NOESY	t_1	τ	Während τ Übertragung dipolarer Kopplung	2.2.2
MQ-Spektroskopie	Δ	t_1	Refokussierung in der Mitte von Δ durch π -Puls vorteilhaft	3.1.8

[a] Da in der Literatur keine Präferenzen bezüglich der Bedeutung der zeitkonstanten Delays Δ und τ existieren, benutzen wir in diesem Beitrag vorwiegend Δ , wenn der Delay der Entwicklung von Kopplungen dient, und τ , wenn andere Prozesse wie Relaxation oder Austausch von Bedeutung sind.
[b] Mehrquantenfilter.

Experiment erzeugt er longitudinale z-Magnetisierung ($I_x \rightarrow I_z$), während im MQF-COSY- und im MQ-Experiment Mehrquanten-Kohärenz ($2I_{kx}I_{yz} \rightarrow 2I_{kx}I_{ly}$) entsteht. Bei der Auswahl der Antiphase-Magnetisierung bestimmt die Richtung des zweiten 90°-Pulses relativ zum ersten 90°-Puls den erzielbaren Effekt [siehe (68)].

$$2I_{kx}I_{ly} \xleftarrow{90^\circ_x} 2I_{kx}I_{yz} \xrightarrow{90^\circ_y} 2I_{kx}I_{lx} \quad (68)$$

Die zu selektierende Kohärenzordnung (im Beispiel oben Ein- oder Mehrquanten-Kohärenz) und damit die erforderlichen Phasen kann man durch Betrachtung des Übertragungsweges der Kohärenzordnung („coherence transfer pathway“) ermitteln. Am Beispiel eines H,H-COSY-Experiments mit Doppelquantenfilter (DQF-COSY) soll nun die Ableitung des Phasencyclus gezeigt werden.

Mit dem zweiten Puls soll Doppelquanten-Kohärenz selektiv ausgewählt werden. Der gewünschte Verlauf der Kohärenzordnungen ist im Kohärenz-Transferweg von Abbildung 22 links dargestellt. Als Vergleich dazu ist in Abbildung 22 rechts der für das DQF-COSY-Experiment unerwünschte Weg gegenübergestellt, wie er beispielsweise für ein NOESY-Experiment nötig ist (während τ Selektion von longitudinaler Magnetisierung, die sich in Phasencyclen wie eine Nullquanten-Kohärenz verhält). Diesen gilt es durch den Phasencyclus zu unterdrücken. Sequenzen mit demselben Kohärenz-Transferweg wie im NOESY-Experiment, aber mit Flipwinkeln kleiner als 90° für die Mischung, sind als z-COSY (Abschnitt 3.1.4) und zz-Spektroskopie (Abschnitt 3.4.2) bekannt^[127–130].

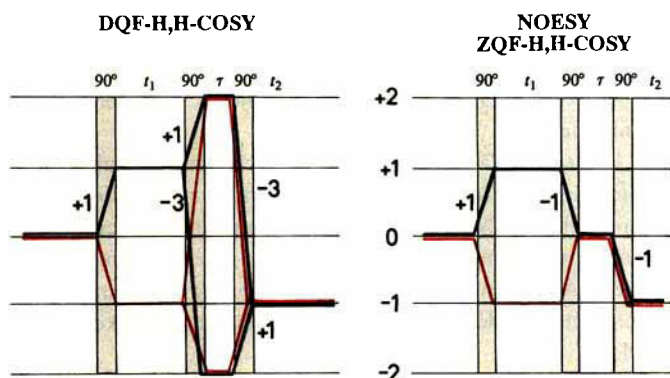


Abb. 22. Kohärenz-Transferwege für ein phasensensitives DQF-COSY- (links) und ein NOESY-Experiment (rechts).

In dem als Beispiel gewählten DQF-COSY-Experiment ist Δp für den ersten Puls +1 oder -1, für den zweiten Puls +1/-3 oder +3/-1 und für den dritten Puls +1 oder -3. Der vollständige Phasencyclus für ein Experiment mit L Pulsen besteht aus $N_1 \times N_2 \times \dots \times N_L$ Variationen, wenn jeder Puls i unabhängig von den anderen in Schritten $2\pi/N_i$ variiert wird. Wir haben gesehen, daß neben den gewünschten Wegen Δp_i auch Wege $\Delta p_i + k N_i$ selektiert werden. Je größer N_i ist, desto selektiver wird der Phasencyclus; allerdings wächst mit N_i auch die Zahl der Akkumulationen für jedes t_1 -Inkrement. Man wird also N_i so klein wie möglich halten, d.h. man muß überlegen, ob die unerwünschten Transferwege, die den Phasencyclus „passieren“, wirklich stören. Häufig wird einem dadurch die Entscheidung abgenommen, daß man nur einen 90°-Phasenschieber zur Verfügung hat, also nur $N_i=2$ und 4 verwirklicht werden können. Legt man für unser Beispiel $N_i=4$ zugrunde, so erhält man $4^3=64$ Variationen.

Bei der phasensensitiven Aufnahme von Spektren (siehe Abschnitt 2.2.4) muß man allerdings berücksichtigen, daß während t_1 sowohl die positive als auch die negative Kohärenzordnung (in diesem Fall $p=+1$ und $p=-1$) notwendig sind. Nur so kann eine Fourier-Transformation über t_1 zu Signalen in reiner Phase (d.h. Absorption oder Dispersion) führen. Dies hat zur Folge, daß die relative Phasenverschiebung der beiden Pulse, die die t_1 -Zeit begrenzen, (im Beispiel haben diese Pulse die Phasen φ_1 bzw. φ_2) nur 0 oder π sein darf. Somit reduziert sich für phasensensitiv aufgenommene Spektren die Zahl der Variationen auf die Hälfte (=32 für unseren Fall).

Es wird zunächst die Phase φ_1 des ersten Pulses in Schritten von 90° geändert und die Phase φ_2 des zweiten Pulses gemäß den Regeln für phasenempfindliche Detektion angepaßt. Die Phase φ_3 des dritten Pulses wird dabei konstant gehalten und die Phase des Empfängers nach Gleichung (67) berechnet. Dies ergibt die Phasen der ersten vier Scans. Nun folgt eine weitere Variation der zweiten Pulsphase, um unter Berücksichtigung der Regel für phasenempfindliche Detektion alle vier Richtungen einzuschließen. Nach diesen acht Scans kann dann die Phase des dritten Pulses variiert werden. Dies ist im folgenden explizit aufgeführt, wobei für die Phasen eine Kurzschreibweise verwendet wird ($0=0^\circ$, $1=90^\circ$, $2=180^\circ$ und $3=270^\circ$). Der vollständige Phasencyclus für das DQF-COSY-Beispielspektrum ist somit:

$$\begin{array}{l} \varphi_1: 0 \ 1 \ 2 \ 3 \ 0 \ 1 \ 2 \ 3 \ 0 \ 1 \ 2 \ 3 \ 0 \ 1 \ 2 \ 3 \\ \varphi_2: 0 \ 1 \ 0 \ 1 \ 2 \ 3 \ 2 \ 3 \ 0 \ 1 \ 0 \ 1 \ 2 \ 3 \ 2 \ 3 \ 0 \ 1 \ 0 \ 1 \ 2 \ 3 \ 2 \ 3 \\ \varphi_3: 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1 \\ \varphi_{\text{det}}: 0 \ 2 \ 2 \ 0 \ 2 \ 0 \ 0 \ 2 \ 3 \ 1 \ 1 \ 3 \ 1 \ 3 \ 1 \ 3 \ 1 \ 2 \ 0 \ 0 \ 2 \ 0 \ 2 \ 2 \ 0 \ 1 \ 3 \ 3 \ 1 \ 3 \ 1 \ 1 \ 3 \end{array}$$

Wie die Empfängerphase φ_{det} nach Gleichung (67) berechnet wird, soll am Beispiel des 14. Scans, der eingerahmt ist, gezeigt werden [Gl. (69)]. Das Ergebnis von (69), -1, ent-

$$\varphi_{\text{det}} = - \{ (+1) \cdot 1 + (+1) \cdot 3 + (-3) \cdot 1 \} = -1 \quad (69)$$

spricht wegen der Periodizität modulo 4 gleich 3 für die Empfängerphase ($-1 \cong -90^\circ = +270^\circ \cong 3$). Äquivalentes läßt sich auch für den alternativen Weg über $p=-1$ während t_1 formulieren.

Damit müßte für ein phasensensitives DQF-COSY-Experiment ein 32-Scan-Phasencyclus durchlaufen werden. Das kann zu unnötig langen Meßzeiten führen, sei es, daß die erforderliche Auflösung viele t_1 -Inkrementen verlangt oder daß die Konzentration der Probe so groß ist, daß man mit wenigen Scans auskommen würde. Eine Reduktion des Phasencyclus läßt sich wie folgt erreichen:

a) 24 der 32 Phasenkonstellationen können aus acht ursprünglichen abgeleitet werden, indem man alle Phasen gleichzeitig um 90° dreht. Diese Drehung dient dem Ausgleich einer nicht exakten Phasenverschiebung des Empfängers. Man erhält die acht Ausgangsphasen, indem man auf eine Variation des dritten Pulses verzichtet. Es sind die ersten acht Experimente in obigem Phasencyclusschema.

b) Man erreicht eine weitere Reduktion, wenn man sich vergegenwärtigt, daß Axial-Peaks, die durch z-Magnetisierung am Ende von t_1 entstehen, durch den zweiten Puls nicht in Doppelquanten überführt werden können. Der Doppelquantenfilter unterdrückt also zugleich auch Axial-Peaks. Man kann daher auf deren explizite Unterdrückung mit dem zweiten Puls verzichten. Die vier verbleibenden Phasen sind:

$$\begin{array}{llll} \varphi_1: & 0 & 1 & 2 & 3 \\ \varphi_2: & 0 & 1 & 2 & 3 \\ \varphi_3: & 0 & 0 & 0 & 0 \\ \varphi_{\text{det}}: & 0 & 2 & 0 & 2 \end{array}$$

Puls- und Phasenunzulänglichkeiten während des Experiments werden allerdings erfahrungsgemäß besser gemittelt, je mehr Phasen ein Phasencyclus enthält. Um Kanalungleichheiten des Empfängers auszugleichen, benutzt man sinnvollerweise wie bei der Aufnahme von 1D-NMR-Spektren auch bei der von 2D-NMR-Spektren die CYCLOPS-Folge^[131], d.h. alle Phasen werden in Schritten von 90° inkrementiert.

2.2.4. Phasensensitiv aufgenommene 2D-NMR-Spektren

Der Ausdruck „phasensensitive“ Aufnahme von 2D-NMR-Spektren ist etwas unglücklich, da eigentlich jede Akquisition phasempfindlich ist. Es ist die Art der Datenprozessierung, die entweder zu Spektren führt, die Signalphasen enthalten, oder zu solchen, die nur Absolutwerte wiedergeben. Manprozessiert sinnvollerweise dann phasempfindlich, wenn man gewisse oder gar alle Signale im 2D-NMR-Spektrum zu reinen Phasen korrigieren kann. Die daraus erhältliche Vorzeicheninformation und eine verglichen mit der Absolutwertdarstellung geringere Linienbreite sind der Hauptgrund für das phasempfindliche Prozessieren.

Auf die Hintergründe der phasensensitiven 2D-NMR-Spektroskopie wollen wir hier nicht näher eingehen. Für ein vertieftes Studium ist die Arbeit von J. Keeler und D. Neuhaus^[132] sehr zu empfehlen. Nur soviel sei gesagt: Reine Phasen in 2D-NMR-Spektren erhält man immer dann, wenn das 2D-Zeitsignal in t_1 amplitudenmoduliert ist. Praktisch alle gängigen Experimente wie COSY, NOESY, Relayed, TOCSY, ROESY und Shiftkorrelation erzeugen amplitudenmodulierte Signale.

Es gibt zwei Verfahren zur phasensensitiven Spektrenaufnahme. Das Verfahren von States, Haberkorn und Ruben^[133, 134] erzeugt

für jeden t_1 -Wert zwei Datensätze. Der eine enthält das Signal in t_1 cosinusmoduliert, der andere dagegen sinusmoduliert (analog zur synchronen Zweikanaldetektion in t_2). Unterzieht man sie einzeln einer komplexen Fourier-Transformation, so erhält man zwei Spektren, deren Addition das gewünschte Resultat ergibt (Abb. 23).

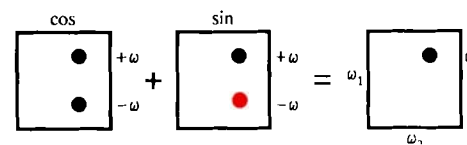


Abb. 23. Ergebnis der Quadraturdetektion in t_1 nach dem Verfahren von States, Haberkorn und Ruben. Zu jedem t_1 -Wert werden die mit $\cos\Omega t_1$ und die mit $\sin\Omega t_1$ modulierten Signale getrennt aufgenommen, getrennt einer komplexen Fourier-Transformation unterzogen und dann addiert.

Das zweite Verfahren erfordert eine reelle Fourier-Transformation und wendet genau die auch schon für die Quadraturdetektion in t_2 eingesetzte Redfield-Methode in t_1 an. Man nimmt mit der doppelten Rate (Halbierung des t_1 -Inkrementes) und mit einer Phasenverschiebung von 90° nach jedem t_1 -Inkrement auf. In t_1 ist diese Phasenverschiebung eine Pulsphase, was zum Namen des Verfahrens führt: Time Proportional Phase Incrementation (TPPI)^[135, 136].

Beide Verfahren sind gleichwertig. Sie erfordern für Aufnahmen mit der gleichen Auflösung (und der gleichen Meßzeit) wie bei nicht phasensensitiv aufgenommenen Spektren die doppelte Datenmenge.

3. Übersicht über Techniken der 2D-NMR-Spektroskopie

In den Tabellen 2-5 sind die wichtigsten der heute benötigten 2D-NMR-Techniken zusammengefaßt, gegliedert nach der Art der korrelierten Kerne (homo- oder heteronuclear) und nach der Art der Korrelation^[*]. In den einleitenden Kapiteln haben wir alle Grundlagen gelegt, um die heute gängigen Techniken beschreiben und verstehen zu können. Bei der nun folgenden Besprechung der Pulssequenzen werden wir auf weitere Methoden stoßen, die ähnlich wie die Phasencyklen die Aufgabe haben, Kohärenzen anhand bestimmter Eigenschaften zu unterscheiden und sie dann zu selektieren oder zu unterdrücken. In diese Kategorie fallen Mehrquantenfilter, z-Filter, Editiertechniken, Low-Pass-J-Filter, X-Filter und BIRD-Pulse.

Manipulationen zugänglich ist außerdem die t_1 -Zeit, die im Gegensatz zur t_2 -Zeit keine „reale“ Zeit ist. Daher gelingt es, in der t_1 -Zeit gewisse Wechselwirkungen zu beeinflussen oder zu skalieren. Hierzu gehören unter anderem ω_1 -Entkopplung, BIRD-Pulse während t_1 und selektive Entkopplung.

Die t_2 -Zeit läßt sich nur relativ schwer manipulieren. Die gängigste Beeinflussung ist die praktisch bei allen heteronuclearen NMR-Experimenten eingesetzte heteronucleare Entkopplung. Die dabei verwendeten Pulssequenzen (siehe Abschnitt 3.2.10) sind sehr hochentwickelt und haben mittlerweile eine erstaunliche Leistungsfähigkeit erreicht.

[*] Die Erläuterungen der für die Pulssequenzen verwendeten Acronyme finden sich im Anhang.

Tabelle 2. Homonucleare 2D-NMR-Techniken durch Mischung über Kohärenz-Transfer.

Symbol	Name	Anwendung	Kommentar (V: Vorteil, N: Nachteil)	Literatur	Pulssequenz- Nummer
H-(\rightarrow) _n H	H,H-COSY	Homonucleare Verschiebungs-korrelation	Wichtigste Technik	[2, 137]	(P1)
	a) normal	Erkennung von Spinsystemen, Signalzuordnung	Schnelle Routinetechnik		
	b) mit Delay	Detektion kleiner Kopplungen	N: keine reinen Phasen	[137]	
	c) DQF-COSY	Erkennen von Spinsystemen, Bestimmung von <i>J</i> -Werten	Beste Standardtechnik V: Geringe Intensität der Diagonalsignale	[138–141]	
	d) „constant time“ COSY	Entkopplung in t_1	N: Artefakte bei starken Kopplungen, keine reinen Phasen, große dispersive Beiträge auf der Diagonalen	[137, 142]	(P7)
	e) β -COSY	Verbesserte Signalerkennung, relative Vorzeichen von <i>J</i>	Alternativen: f, g, h	[2, 137, 143]	
	f) E.COSY	Präzisionsbestimmung von <i>J</i>	V: Hohe Auflösung, weitgehende Unterdrückung der Dispersionssignale auf der Diagonalen	[144–146]	
	g) P.E.COSY	Präzisionsbestimmung von <i>J</i>	V: Einfachere Methode als E.COSY	[147]	
	h) z'-COSY	E.COSY ähnliche Spektren	N: Nicht so exakt wie E.COSY V: Absorptive Diagonale	[130, 148, 149]	(P38)
	i) zz'-COSY	Unterdrückung des Lösungsmittelsignals, Bestimmung von <i>J</i>	N: Gleichzeitiges Auftreten von NOE-Kreuzsignalen V: Absorptive Diagonale	[127–129]	(P37)
	j) JR-COSY	Unterdrückung des Lösungsmittelsignals	V: Absorptive Diagonale	[150]	
	k) X-Filter-COSY	Vereinfachung von Protonenspektren, Spektroskopie sehr großer Moleküle	N: Keine Quadraturdetektion in ω_1 Nur die an ein Heteroatom gebundenen Protonen geben Anlaß zu Kreuzsignalen	[151, 152]	(P32), (P33)
	l) X-HalbfILTER-COSY	Gleiche Anwendung wie k)	V: Flexibler als k), da der Filter nur in einer Frequenzdomäne wirkt	[153]	(P34), (P35)
	MQ-Spektroskopie	a) Mit Betonung der direkten Kopplung – andere Darstellung (bei Überlagerungen im COSY-Spektrum) – für Messungen in Wasser	Keine Routinetechnik N: Effizienz der Anregung <i>J</i> -abhängig, keine reinen Phasen	[154–158]	
	TOCSY (HOHAHA)	b) Mit Betonung der „remote“-Kopplung Bei Makromolekülen, da auch bei großer Linienbreite Kreuzsignale sichtbar sind (In-Phase-Multipletts)	V: Kreuzsignale zu Resonanzen unter dem Wassertsignal Ähnliche Information wie im Relayed-Spektrum	[159]	
X–X	INADEQUATE	C-Konnektivität	Transfer über das ganze Spinsystem möglich, daher eventuell Zuordnungsprobleme N: Sehr unempfindlich, braucht ^{13}C - ^{13}C -Paare	[160–163]	(P11)
	INEPT-INADEQUATE	C-Konnektivität	Etwas empfindlicher, Alternative in manchen Fällen C-Relayed-H,C-COSY (siehe Tabelle 5)	[168]	
	Inverse Variante			[169]	

Wir werden diese Methoden bei der Besprechung der Pulssequenzen jeweils erklären und versuchen, die Gemeinsamkeiten der Techniken aufzuzeigen. Zunächst werden wir die wichtigsten Experimente besprechen, die auf homonuclearem Kohärenz-Transfer beruhen.

3.1. Homonucleare Experimente

3.1.1. H,H-COSY und Varianten

Wie wir in Abschnitt 2.2.1 bereits gesehen hatten, werden die Kreuzsignale im COSY-Spektrum ausschließlich durch Zweioperatorenterme wie $2I_{1x}I_{2z}$ (bei einem y-

Mischpuls) verursacht. Die Kreuzsignale sind in Antiphase bezüglich der aktiven J_{12} -Kopplung und in-phase bezüglich aller anderen Kopplungen. Die Diagonalsignale dagegen kommen ausschließlich durch einen Transfer vom Typ $I_{1y} \rightarrow I_{1y}$ [Gl. (38)] zustande. Sie zeigen in beiden Dimensionen In-Phase-Dispersion. Kreuzsignale in der Nähe der Diagonalen sind wegen der weitreichenden Ausläufer der Dispersionssignale häufig schwer zu beobachten und stark gestört.

Dieses Problem kann durch Einführung von Mehrquantenfiltern^[138–141] [Pulssequenz (P3), Delays wie in Tabelle 1, Kohärenz-Transferweg wie in Abb. 22] gelöst werden. Die Idee ist dabei die folgende: Der Produktoperator vor der Mischung, der zu den Diagonalsignalen führt, enthält nur

Tabelle 3. Heteronucleare 2D-NMR-Techniken durch Mischung über Kohärenz-Transfer.

Symbol	Name	Anwendung	Kommentar V: Vorteil, N: Nachteil	Literatur	Pulssequenz- Nummer
H-X	H,X-COSY (HETCOR)	Heteronucleare Verschiebungs-korrelation		[170, 171]	(P14)
	a) normal	Zur Zeit Routinemethode		[170-173]	
	b) DEPT-COSY	Ermöglicht Editing	V: Phasensensitive Darstellung	[174-177]	(P15), (P16)
	c) H,X-COSY mit ω_1 -Entkopp-lung			[178-180]	(P25)
	d) modifiziertes DEPT-COSY		keine Vorteile gegenüber b)	[181]	
	e) COLOC für $^1J_{CH}$	Kurze Meßzeit		[182]	
	f) modifiziertes COLOC für $^1J_{CH}$	Kurze Meßzeit	V: Nicht so stark J-abhängig wie e)	[181]	
	X,H-COSY (inverse heteronucleare Korrelation)	Zur Spektroskopie geringer Substanzmengen, empfindlichste Methode	N: Spektrometerausrüstung nicht immer vorhanden	[39-54, 183, 184]	(P27)
H-(H) _n -X	Hetero-TOCSY	Transfer von Protonenmagnetisierung via TOCSY mit anschließendem INEPT-Transfer	N: Durch Verteilung der Polarisation auf mehrere Protonen verliert man an Intensität	[185, 186]	
H-(-) _n X	H,X-COSY für Weitbereichskopplungen		COLOC ist vorzuziehen	[187, 188]	
	COLOC	Zuordnung von quartären C-Atomen, indirekte Detektion von C-Konnektivität, Erkennung von Protonenspinsystemen, qualitative Bestimmung von $^nJ_{CH}$		[189-193]	(P12)
	modifiziertes COLOC (XCORFE)	Zur Unterscheidung von $^2J_{CH}$ - und $^3J_{CH}$ -Kopplungen zu protonentragenden Kohlenstoffatomen		[194]	
	„Freeman-Experiment“	Bestimmung von $^nJ_{CH}$	N: Mangelnde Auflösung und Intensität	[195]	
	X,H-Korrelation über Weitbereichskopplungen		V: Sehr empfindlich	[50, 54, 196]	
	Hetero-E.COSY, β -COSY	Genaue Bestimmung von $^nJ_{CH}$	N: Relativ unempfindlich	[143, 197]	

Tabelle 4. 2D-NMR-Techniken mit Mischung durch NOE und/oder Austausch.

Symbol	Name	Anwendung	Kommentar V: Vorteil, N: Nachteil	Literatur	Pulssequenz- Nummer
H...H	Homonucleare Nuclear-Overhauser- und Austauschspektroskopie NOESY	Abstandsinformation, dreidimensionale Struktur von Molekülen, Austauschspektroskopie	Neben COSY wichtigste Technik	[17, 89]	(P2)
	zz-NOESY	Unterdrückung des Lösungsmittelsignals, Trennung von chemischem Austausch und NOE		[127, 128]	(P36)
	ROESY (CAMELSPIN)	Bei Molekülen mittlerer Größe ohne NOE-Effekte, Unterscheidung von chemischem Austausch und NOE	Unterdrückung von J-Crosspeaks notwendig	[198-202]	(P39)
H...X	Heteronucleare Nuclear-Overhauser- und Austauschspektroskopie H,X-NOESY		N: geringe Empfindlichkeit	[203-207]	(P20)

einen Operator (I_y), der für die Kreuzsignale verantwortliche Term dagegen zwei ($2I_{1x}I_{2z}$). Aus einem einzelnen Operator kann durch den Mischpuls keine Mehrquanten-Kohärenz erzeugt werden, wohl aber aus einem Zweiope-
ratorenterm. Man kann also mit einem 90° -Puls Doppel-
quanten aus dem Zweiope-
ratorenterm gemäß Gleichung (70) anregen [vgl. Gl. (60) und (61)]. Der erste Term auf der

$$2I_{1x}I_{2z} \xrightarrow{90^\circ_z} -2I_{1x}I_{2y} = -\frac{1}{2}i(I_{1x}^*I_{2z}^* - I_{1x}I_{2z}) - \frac{1}{2}i(I_{1x}^*I_{2y}^* - I_{1x}I_{2y}) \quad (70)$$

rechten Seite beschreibt positive und negative Doppel-
quanten-Kohärenz und der zweite Nullquanten-Kohärenz.

Die Doppelquanten werden mit dem in Abschnitt 2.3.3 be-
schriebenen Phasencyclus selektiert und schließlich durch
einen 90° -Puls wieder in Einquanten-Kohärenz umgewan-
delt. Das führt zu einem Herausfiltern der oben genannten
Einoperatorenterme (dispersive Diagonalsignale) [Gl.
(71)].

$$-\frac{1}{2}(I_{1x}^*I_{2z}^* - I_{1x}I_{2z}) = \frac{1}{2}(2I_{1x}I_{2y} + 2I_{1y}I_{2x}) \xrightarrow{90^\circ_x} -\frac{1}{2}(2I_{1x}I_{2y} + 2I_{1y}I_{2x}) \quad (71)$$

Wir erhalten also auf dem Umweg über Doppelquanten-
Kohärenzen unter anderem den gewünschten Transfer von

Tabelle 5. Weitere 2D-NMR-Methoden.

Symbol	Name	Anwendung	Kommentar V: Vorteil, N: Nachteil	Literatur	Pulssequenz- Nummer
<i>Methoden mit mehr als einer Mischstufe</i>					
a) zwei konsekutive <i>J</i> -Mischungen					
H-H-H	H-Relayed-H,H-COSY (RCT-Spektroskopie)	Bei überlagerten Signalen	Bei wenigen Fragen ist die 1D-Variante [210] vorzuziehen	[208, 209]	(P8)
	H-Relayed-H,H-DQF-COSY	Bei überlagerten Signalen		[211, 212]	
H-H-X	H-Relayed-H,X-COSY	Bei überlagerten ¹ H-NMR-Signalen	Meist durch COLOC gut ersetzbar	[213–218]	(P17), (P18)
H-X-H	Inverse Variante			[53, 219]	(P28)
H-X-H	X-Relayed-H,H-COSY			[220, 221]	(P29)
H-X-X	X-Relayed-H,X-COSY	C-Konnektivität in H-C-C-Fragmenten	Auch 1D-Variante V: Relativ unempfindlich, aber empfindlicher als INADEQUATE	[222–225]	(P19)
X-H-H	H-Relayed-X,H-COSY		N: Nur sinnvoll für Heterokerne mit großem γ (z. B. ³¹ P, ¹⁹ F)	[226, 227]	
b) Mischung durch skalare und dipolare Kopplung					
H-H...H	Relayed-NOESY	Bei überlagerten Signalen, Sequenzierung von Peptiden	N: Nur bei gutem NOE-Transfer sinnvoll		
H...H-H	a) normal			[228]	
	b) mitDQF	Bei Zuordnungsproblemen nahe der Diagonale		[229]	(P40)
H-(H) _n ...H	c) mit Antisymmetrisierung			[230, 231]	
	TORO	Sequenzierung von Peptiden	V: α -Protonensignale brauchen nicht aufgelöst zu sein	[232]	(P41)
H...H-(H) _n	TOCSY-NOESY			[233]	
H...H-H	ROTO			[232]	
H...H-X	Hetero-Relayed-NOESY		N: Geringe Empfindlichkeit	[234]	
<i>Trennung von chemischer Verschiebung und Kopplung</i>					
J_{HH}, δ_H	Homonucleare	Bestimmung von J und δ	Ersetzt durch DISCO und E.COSY	[5, 235–240]	(P4)
J_{HC}, δ_C	Heteronucleare	Bestimmung der Multiplizität	Im allgemeinen ersetzbar durch DEPT	[241–246]	
	2D- J -Spektroskopie	Bestimmung von J	Meist direkt möglich		
	Heteronucleare	Bestimmung von $^1J_{CH}$		[247, 248]	
	2D- J -Spektroskopie				
	Heteronucleare 2D- J -Spektroskopie mit selektivem Protonenpuls	Bestimmung von $^1J_{CH}$	N: Separiertes H-Signal und für Kopplung zu jedem H ein 2D-NMR-Experiment erforderlich	[249]	
<i>Eindimensionale Äquivalente von 2D-NMR-Experimenten</i>					
		Anregung mit Gauß-Pulsen	Man erhält Spuren aus 2D-NMR-Spektren V: Enormer Zeitgewinn bei nur wenigen, gezielten Fragen	[210, 250]	
<i>2D-NMR-Spektroskopie mit selektiver Anregung</i>					
			Geht mit allen Pulssequenzen V: Unter Umständen Empfindlichkeitsgewinn gegenüber 2D-NMR-Techniken mit nichtselektiven Pulsen	[251, 372, 373]	
<i>3D-NMR-Experimente</i>					
	3D- J, δ			[252]	
	COSY-COSY			[253–255]	
	NOESY-COSY und andere Kombinationen				
<i>Verschiedene</i>					
	CIDNP-COSY	Verbindung von photochemischer Anregung und 2D-NMR-Spektroskopie	Teile des Moleküls müssen photochemisch aktiv sein (z. B. Arene)	[256]	
	CIDNP-NOESY			[257]	
	COCONOSY	Gleichzeitiges COSY- und NOESY-Experiment	N: Geringe Auflösung im COSY-Spektrum	[258]	

Spin 1 auf Spin 2 [Gl. (72)]. Der auf dem gleichen Weg erfolgende Transfer $2I_{1x}I_{2z} \rightarrow \frac{1}{2}(2I_{1y}I_{2z})$ ergibt das Diago-

$$2I_{1x}I_{2z} \longrightarrow \frac{1}{2}(2I_{1z}I_{2y}) \quad (72)$$

nalsignal im DQF-COSY-Experiment. Es ist jetzt wie gewünscht in Antiphase und absorptiv (wie das Kreuzsignal). Man erkennt auch, daß der Transfer wegen des Faktors 0.5 nur noch halb so effizient ist wie beim konventionellen COSY-Experiment.

Das Konzept der Mehrquantenfilter läßt sich auch allgemein formulieren: Eine Kohärenz der Form $I_{1y}I_{2z} \dots I_{nz}$ kann maximal eine n -Quanten-Kohärenz bilden. Ein m -Quantenfilter mit $m > n$ wird also einen solchen Produktoperator unterdrücken. Damit hat man die Möglichkeit, bestimmte Spintopologien zu selektieren: Ein Spin I_1 , der zu $n-1$ anderen Spins koppelt ($J_{1i} \neq 0$, für $i = 2, 3, \dots, n$) entwickelt z. B. nach 90_x° t_1 Produktoperatoren mit maximal n Operatoren, d. h. alle Peaks, die von I_1 stammen, wären in einem Spektrum mit einem m -Quantenfilter ($m > n$) unterdrückt^[138].

Kreuzsignale in einem n -quantengefilterten (nQF-)COSY-Spektrum entstehen durch den Transfer (73). Damit die Anfangskohä-

$$\begin{aligned} I_{1x} &\xrightarrow{90_x^\circ} 2^{n-1}I_{1x}I_{2z}I_{3z} \dots I_{nz} \xrightarrow{90_x^\circ} 2^{n-1}I_{1x}I_{2y}I_{3y} \dots I_{ny} \xrightarrow{nQF} I_{1y}I_{2z}I_{3y} \dots I_{ny} \\ &\xrightarrow{90_x^\circ} I_{1x}I_{2z}I_{3z} \dots I_{nz} \xrightarrow{90_x^\circ} 2^{1-n}I_{2x} \end{aligned} \quad (73)$$

renz entstehen kann, muß I_1 zu $n-1$ Spins koppeln; damit die resultierende Kohärenz in observable Magnetisierung übergeht, muß I_2 zu denselben Spins koppeln ($J_{12} \neq 0$ für $i = 1, 3, 4, \dots, n$)^[138].

Kreuzsignale zwischen zwei gekoppelten Spins treten also dann im n -quantengefilterten COSY-Spektrum auf, wenn die beiden Kerne zusätzlich $(n-2)$ gemeinsame Kopplungspartner haben. Die Multipllettstruktur dieses Kreuzsignals zeigt in beiden Dimensionen $(n-1)$ Kopplungen in Antiphase.

Mehrquantenfilter mit $n > 2$ sind nicht sehr verbreitet. Das liegt zum einen an den um den Faktor 2^{n-1} verminderten Intensitäten, zum anderen daran, daß Mehrquantenfilter höherer Ordnung immer weniger Informationen über das Molekül passieren lassen. Tripelquantengefilterte Spektren werden bei der Analyse von Proteinen eingesetzt, wenn es z. B. darum geht, Glycineinheiten zu identifizieren, da diese als einzige Aminosäurereste im TQF-COSY-Spektrum Kreuzsignale zwischen den NH-Protonen und den beiden α -Protonen zeigen^[259].

Integriert man über den Diagonalpeak eines Kerns ($I_{1x} \rightarrow I_{1x}$ oder $I_{1y} \rightarrow I_{1y}$), so erhält man in mehrquantengefilterten COSY-Spektren netto die Intensität Null. Somit ist durch den Doppelquantenfilter das Problem der intensiven Diagonalsignale behoben, man erhält keine Dispersionsanteile. Dabei geht aber die Hälfte der Intensität der Kreuzsignale verloren. Der Vorteil der stark reduzierten Diagonalsignale hat das DQF-COSY-Experiment jedoch zur meist angewendeten Technik gemacht. Ein Beispiel zeigt Abbildung 24^[260].

Die Multipllettstruktur von COSY-Spektren enthält wertvolle Informationen über Kopplungskonstanten. Die Feinstruktur der Kreuzsignale ist in dem vergrößerten Ausschnitt des Spektrums von Abbildung 24 deutlich zu erkennen (Abb. 25).

Die Kopplungskonstanten über drei Bindungen sind nach der von Karplus gefundenen Beziehung^[74, 75] vom

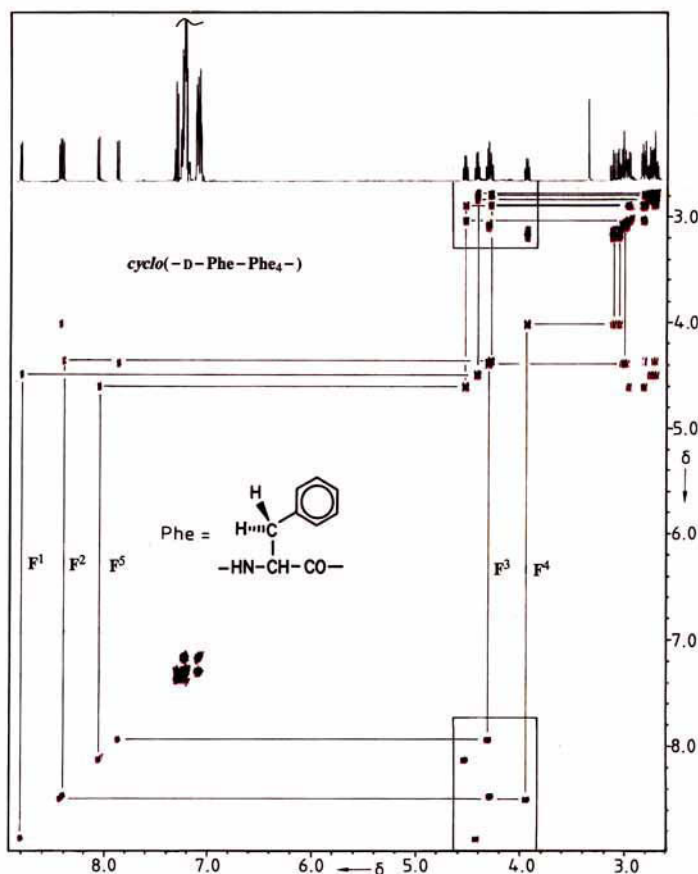
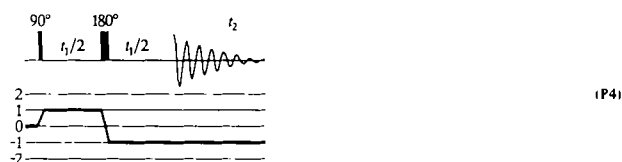


Abb. 24. DQF- ^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum von $\text{cyclo}(-\text{D-Phe-Phe}_4-)$ in $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 500 MHz. Die Konnektivitäten innerhalb der Phenylalanine (F^1 bis F^5) sind mit Linien verdeutlicht. Die Signale in den Kästchen sind in Abbildung 25 größer wiedergegeben. Die Zuordnung der Aminosäuren zur Peptidsequenz folgt aus einem solchen Spektrum nicht.

Diederwinkel abhängig. Die Größe von Kopplungskonstanten enthält daher Information über die räumliche Struktur eines Moleküls. Kopplungskonstanten sind aber in komplexen Systemen nicht mehr direkt aus 1D-NMR-Spektren abzulesen. Daher wurden Methoden der 2D-NMR-Spektroskopie entwickelt, die sich zur Analyse nicht allzu stark gekoppelter Systeme eignen (siehe Abschnitt 3.1.3).

3.1.2. 2D-J-Spektroskopie

Das als erstes vorgeschlagene Verfahren der 2D-NMR-Spektroskopie zur Analyse von Spinsystemen ist die 2D- J -aufgelöste Spektroskopie^[5]. Die Pulssequenz (P4) ist neben der des COSY-Experiments die einzige mit nur zwei Pulsen, und sie ist daher ebenfalls leicht zu analysieren.



Die Wirkung von 180° -Pulsen

180° -Pulse gehören zu den am häufigsten verwendeten Mitteln, um Pulssequenzen zu verbessern. Sie haben auf Kopplung und chemische Verschiebung unterschiedlichen Einfluß. Daher kann man sie zur Manipulation von Wech-

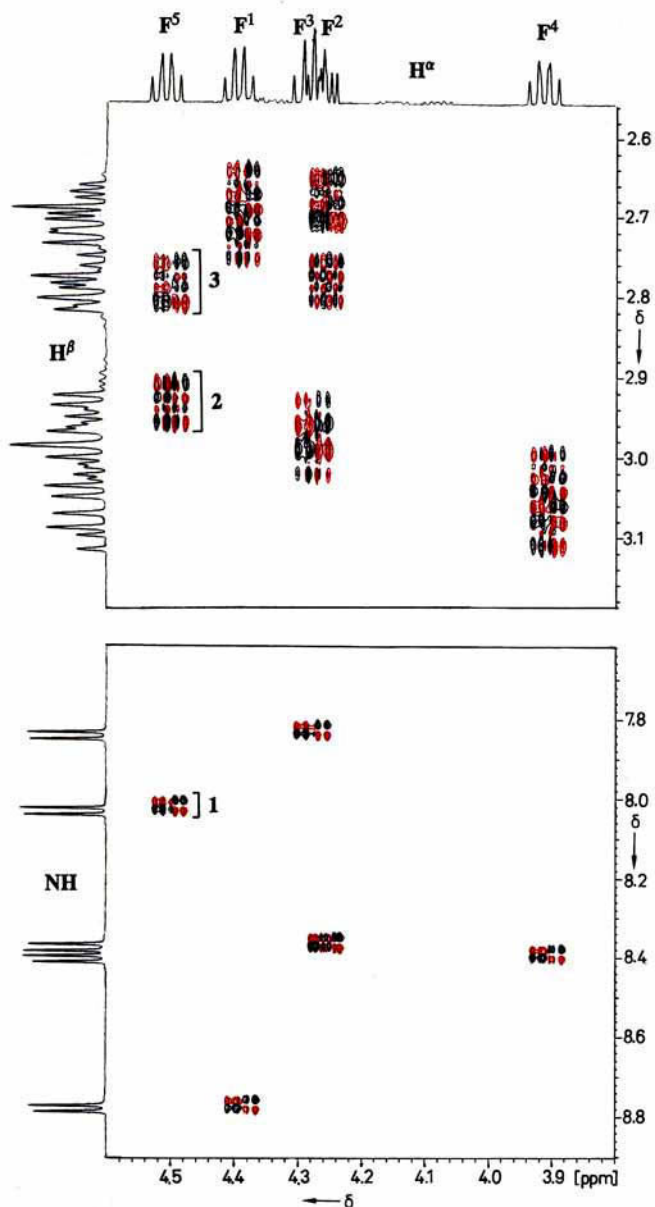


Abb. 25. Ausschnitt aus dem NMR-Spektrum von Abbildung 24: NH-H_α-Bereich (unten) und H_α-H_β-Bereich (oben). Die mit 1, 2 und 3 bezeichneten Signale wurden für das DISCO-Verfahren verwendet (siehe Abb. 28).

selwirkungen benutzen. Wir wollen nun zeigen, daß ein 180°-Puls keinen Einfluß auf die Entwicklung von Kopplungen hat [(74) und (75)]. In jedem Fall bleiben die *relati-*

$$I_{1x} \cos \pi J t + 2 I_{1y} I_{2z} \sin \pi J t \xrightarrow{180^\circ_{xy}} \pm (I_{1x} \cos \pi J t + 2 I_{1y} I_{2z} \sin \pi J t) \quad (74)$$

$$I_{1y} \cos \pi J t - 2 I_{1x} I_{2z} \sin \pi J t \xrightarrow{180^\circ_{xy}} \mp (I_{1y} \cos \pi J t - 2 I_{1x} I_{2z} \sin \pi J t) \quad (75)$$

vet Vorzeichen der beiden Operatoren erhalten, d.h. die Evolution der Kopplung bleibt bis auf einen möglichen Vorzeichenwechsel durch den 180°-Puls unbeeinflusst. Anders verhält sich dagegen die chemische Verschiebung (76). Der rechte Term von Gleichung (76) ist identisch mit (77). Nach dem 180°-Puls ist folglich das System bezüglich

$$I_x \cos \Omega t + I_y \sin \Omega t \xrightarrow{180^\circ_{xy}} \pm (I_x \cos \Omega t - I_y \sin \Omega t) \quad (76)$$

$$\pm (I_x \cos \Omega(-t) + I_y \sin \Omega(-t)) \quad (77)$$

der chemischen Verschiebung in einem Zustand, als hätte es sich in der Zeit t wie während $(-t)$ entwickelt (Zeitumkehr). Mit anderen Worten, die Weiterentwicklung nach dem 180°-Puls führt nach einer weiteren Zeit t zur Ausgangssituation zurück, d.h. zur Refokussierung der chemischen Verschiebung [Gl. (78)].

$$I_x \xrightarrow{t} I_x \cos \Omega t + I_y \sin \Omega t \xrightarrow{180^\circ_x} I_x \cos \Omega t - I_y \sin \Omega t \xrightarrow{t} I_x \quad (78)$$

In der 2D- J -Sequenz entwickelt sich chemische Verschiebung also nur während t_2 , Kopplung dagegen während t_1 und t_2 . Die Signalamplitude für den Spin 1 ergibt sich also gemäß (79). Hierin bedeutet $\prod_i \cos \pi J_{i1}$ die

$$\prod_i \cos \pi J_{i1}(t_1 + t_2) \cos \Omega_1 t_2 = \prod_i \cos (\pi J_{i1} t_1 + \pi J_{i1} t_2) \cos \Omega_1 t_2 \quad (79)$$

Produktbildung über alle Kopplungen des Spins 1. Nach einer komplexen Fourier-Transformation dieses Ausdrucks erhält man in der Absolutwertdarstellung Multipletts, wie sie Abbildung 26a zeigt. Projektion eines derar-

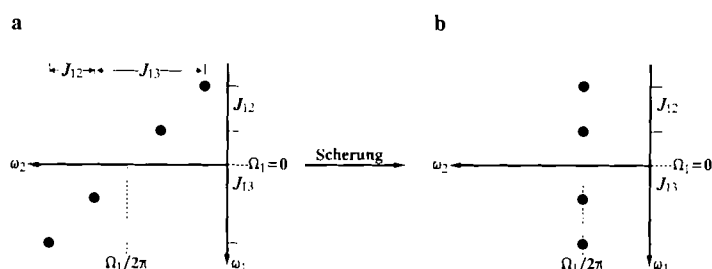


Abb. 26. a) Schematischer Peak eines Kerns aus einem Dreispinsystem in einem homonuclearen 2D- J -aufgelösten NMR-Spektrum; b) Trennung von chemischer Verschiebung (Projektion auf die ω_2 -Achse) und J -Kopplung (Projektion auf die ω_1 -Achse) nach Scherung.

tigen 2D-Multipletts auf die ω_1 - oder ω_2 -Achse ergibt gerade die Kopplungskonstanten. Scherung dagegen gemäß $\omega'_1 = \omega_1$, $\omega'_2 = \omega_2 - \omega_1$ ^[34] liefert das in Abbildung 26b gezeichnete Spektrum, das in ω_2 nur noch die chemische Verschiebung, in ω_1 dagegen nur noch die Kopplungen enthält. 2D- J -NMR-Spektren sind in t_1 phasenmoduliert ($\pi J_{i1} t_1$ ist eine Phase) und daher nicht zu reinen Phasen korrigierbar. Die gemischten Phasen führen zu verfälschten Linienabständen, so daß die Bestimmung von Kopplungskonstanten unzuverlässig wird. Zudem genügt der Auflösungsgewinn durch die Reduktion der Multipletts zu Singulets entlang ω_2 in einem gescherten 2D- J -NMR-Spektrum bei komplexen Spinsystemen häufig nicht^[261, 262]. Auch treten bei starker Kopplung Artefakte auf.

3.1.3. Bestimmung von Kopplungskonstanten aus COSY-Spektren

Extraktion von Kopplungskonstanten direkt aus dem COSY-Spektrum

Man kann bei sehr einfachen Multipletts Kopplungskonstanten direkt aus 2D-NMR-Spektren extrahieren^[136]. Dieses Verfahren versagt allerdings bei komplexen Spinsystemen.

DISCO^[263–265]

Die in Abschnitt 3.1.2 beschriebenen Nachteile der 2D-

J-Spektroskopie (keine reinen Phasen, mangelnde Auflösung) hat das DQF-COSY-Experiment nicht. Kreuzsignale im DQF-COSY-Spektrum zeigen bereits eine recht gut aufgelöste Multipllettstruktur, die die aktive Kopplung in Antiphase und alle anderen Kopplungen in-phase enthält. Betrachten wir in einem Dreispinsystem (die J_{13} -Kopplung sei Null) das 1,2- und das 2,3-Kreuzsignal. In ω_2 läßt sich die Multipllettstruktur für das 1,2-Kreuzsignal mit (80) und für das 2,3-Kreuzsignal mit (81) beschreiben. Summiert man die beiden Spuren, so erhält man ein Signal gemäß (82) im Zeitbereich, d.h. die aktive Kopplung in dieser

$$\sin \pi J_{12} t_2 \cos \pi J_{23} t_2 \prod_i \cos \pi J_{2i} t_2 \quad (80)$$

$$\sin \pi J_{23} t_2 \cos \pi J_{12} t_2 \prod_i \cos \pi J_{2i} t_2 \quad (81)$$

$$\sin \pi (J_{12} + J_{23}) t_2 \prod_i \cos \pi J_{2i} t_2 \quad (82)$$

„Hybridspur“ ist $J_{12} + J_{23}$. Die Zahl der Linien in der Spur ist halbiert. Durch diese Reduktion der Linienzahl werden Multipllettstrukturen eher analysierbar. Die aktive Kopplung erscheint in DISCO-Spektren als Summe zweier Kopplungen, d.h. quasi vergrößert, so daß Linienauslöschungen von Antiphase-Signalen unwahrscheinlicher werden (Abb. 27).

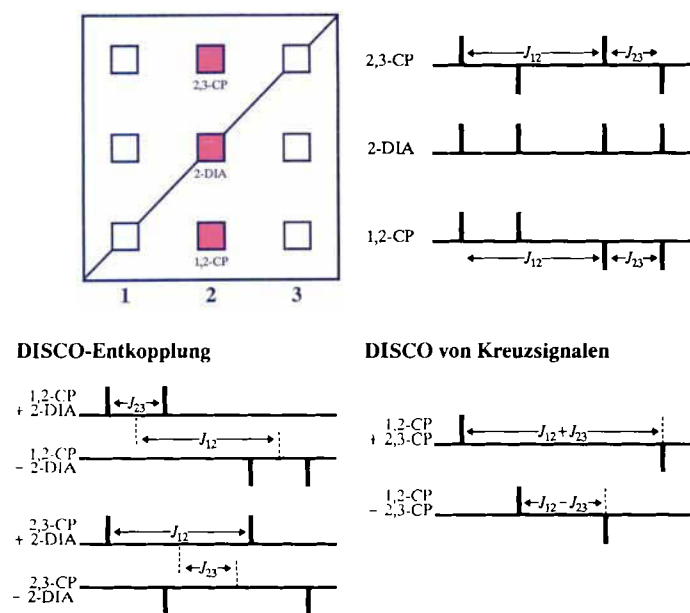


Abb. 27. DISCO mit den Kreuzsignalen des Spins 2 eines Dreispinsystems. Man beachte, daß das Diagonalsignal um 90° phasenverschoben ist (dispersiv). Will man dieses Signal (2-DIA) zur „DISCO-Entkopplung“ benutzen, muß das COSY-Spektrum für die Diagonalsignale in beiden Dimensionen mit um 90° verschobener Phasenkorrektur gerechnet werden. Links oben: Schematisches COSY-Spektrum. Rechts oben: Querschnitte der 1,2- und 2,3-Kreuzsignale (1,2-CP, 2,3-CP) und des Diagonalsignals (2-DIA) von Spin 2 in ω_2 . Unten links: DISCO-Entkopplung durch Addition und Subtraktion von Kreuzsignal und Diagonalsignal. Unten rechts: DISCO durch Addition und Subtraktion der Kreuzsignale.

Sind Diagonalsignale im COSY-Spektrum gut separiert, so kann man die DISCO-Prozedur auf diese Diagonalsignale kombiniert mit den Kreuzsignalen bei gleicher chemischer Verschiebung in ω_2 anwenden. Da die Kreuzsignale in-phase sind, erhält man (83), d.h. ein Multipllett ohne die aktive Kopplung (entkoppeltes Multipllett) bei einer um

$$\cos \pi J_{12} t_2 \cos \pi J_{23} t_2 \prod_i \cos \pi J_{2i} t_2 \pm i \sin \pi J_{12} t_2 \cos \pi J_{23} t_2 \prod_i \cos \pi J_{2i} t_2 \quad (83)$$

$$= e^{\pm i \pi J_{12} t_2} \cos \pi J_{23} t_2 \prod_i \cos \pi J_{2i} t_2$$

$+\pi J_{12}$ oder $-\pi J_{12}$ verschobenen Position. Vergleich der beiden durch Subtraktion bzw. Addition erhaltenen Spektren liefert dann gerade die Kopplungskonstante der aktiven Kopplung. Ein praktisches Beispiel zeigt Abbildung 28 mit der DISCO-Auswertung der Kreuzsignale des α -Protons der Aminosäure Phe⁵ im Spektrum des cyclischen Pentapeptids aus Abbildung 25.

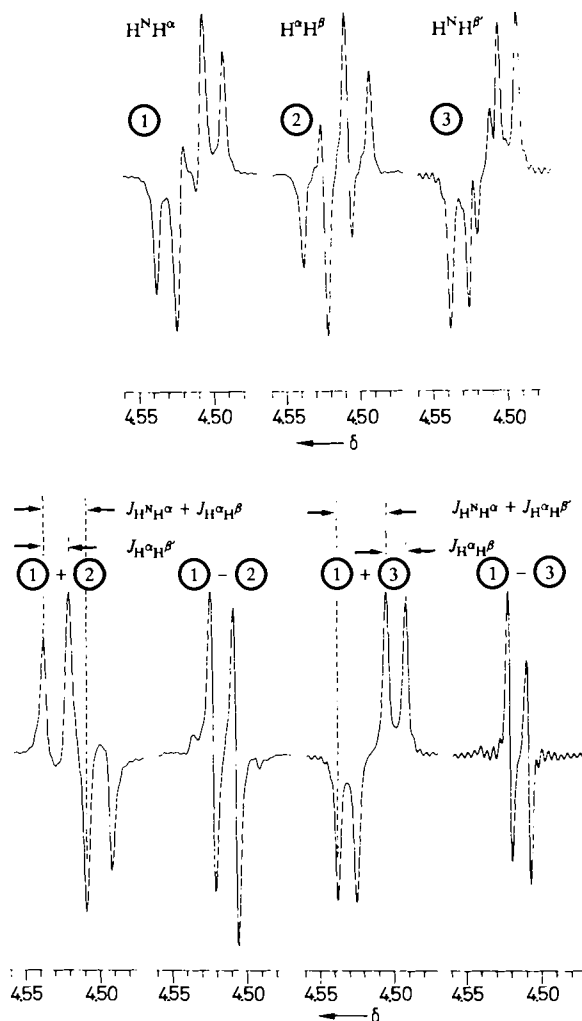


Abb. 28. DISCO-Spektren aus dem Spektrum von Abbildung 25. Die dort mit 1, 2 und 3 bezeichneten Kreuzsignale wurden benutzt. Durch Coaddition der Spuren erhaltene Pseudo-1D-Spektren (oben) wurden addiert und subtrahiert (unten). Man erkennt deutlich die vereinfachten Multiplletts, in denen besonders nach der Addition sämtliche Signale deutlich getrennt sind.

Zur Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses coaddiert^[*] man über das ganze Kreuzsignal und addiert die resultierenden 1D-NMR-Spektren^[265]. Die digitale Auflösung läßt sich durch eine inverse Fourier-Transformation, Zero-Filling (auf z. B. 64 K) und anschließende Re-Transformation verbessern. Problematisch für die DISCO-Auswertung ist allerdings, daß der richtige Skalierungsfaktor für die Kombination zweier Spektren nicht bekannt ist. Er muß am Resultat der Kombination bestimmt werden. Dies macht Anwendungen bei komplizierten oder stark gekoppelten Spinsystemen schwierig.

[*] Coaddition ist ein spezielles Verfahren der Addition, bei dem jede Spur mit dem Vorzeichen eines Referenzpunktes multipliziert wird, um Auslöschung zu vermeiden, wenn man über Antiphase-Multiplletts summiert.

3.1.4. E. COSY

Ein zweites Verfahren (E. COSY^[144–146]) vereinfacht die Kreuzsignalmuster, wie schematisch in Abbildung 29 dargestellt ist.

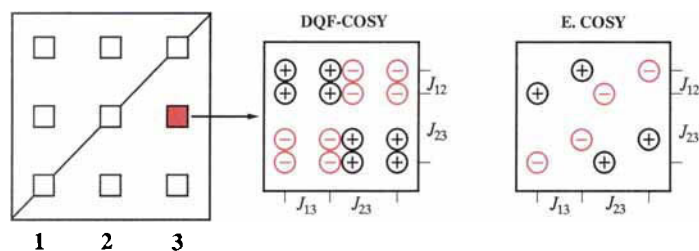


Abb. 29. Multipllettstruktur im Kreuzsignal eines DQF-COSY-Spektrums (Mitte) und eines E. COSY-Spektrums (rechts).

Zum Verständnis dieser Technik kehren wir noch einmal zu mehrquantengefilterten COSY-Spektren zurück. Wir hatten gesehen, daß nur die Zweioperatorenterme zum DQF-COSY-Spektrum einen Beitrag leisten. Die Multipllettstruktur im COSY- und DQF-COSY-Spektrum ist damit festgelegt. Man kann anstelle eines Doppelquantenfilters auch höhere Quantenfilter, z. B. einen Tripelquantenfilter (TQF), einsetzen. Die Pulssequenz bleibt gleich (P3, COSY mit MQF) nur der Phasencyclus ändert sich. Die Phasen φ_1 und φ_2 durchlaufen im TQF-COSY-Experiment die Werte $0^\circ, 60^\circ, 120^\circ, 180^\circ, 240^\circ, 300^\circ$, und während t_2 wird wieder alternierend addiert und subtrahiert. Die Multipllettstruktur ist schematisch in Abbildung 30 gezeigt. Die Kreuzsignale kommen im wesentlichen durch den Transfer $I_{1x}I_{2z}I_{3z} \rightarrow I_{1z}I_{2x}I_{3z}$ zustande. Die Intensität in solch einem Spektrum ist um den Faktor vier geringer als im ungefilterten COSY-Spektrum (im DQF-COSY-Spektrum um den Faktor zwei). Die Multipllettstruktur ist in beiden Dimensionen in Antiphasen: bezüglich J_{12} und J_{13} in ω_1 sowie bezüglich J_{12} und J_{23} in ω_2 .

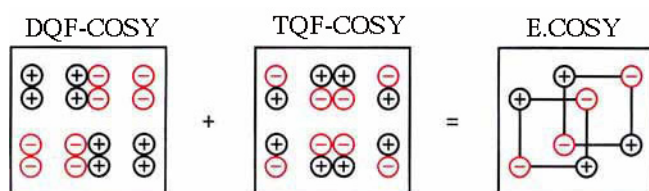


Abb. 30. Feinstruktur eines E. COSY-Kreuzsignals aus einem DQF-COSY- und einem TQF-COSY-Spektrum. Man erhält das E. COSY-Spektrum theoretisch durch gewichtete Addition dieser beiden Spektren. Wenn noch weitere passive Kopplungen die Multipllettstruktur komplexer gestalten, müssen entsprechend weitere Mehrquantenspektren hinzugenommen werden.

Betrachtet man die Multipllettstruktur im DQF- und im TQF-COSY-Spektrum, so erkennt man, daß eine Addition der beiden (siehe Abb. 30) ein stark vereinfachtes Multipllettmuster ergibt. Für eine Verallgemeinerung auf mehr als drei Spins empfehlen wir die Originalliteratur zu studieren^[144–146]. Ein Beispiel für die Extraktion von Kopplungskonstanten aus E. COSY-Spektren zeigt Abbildung 31.

Das Aussehen eines E. COSY-Kreuzsignals ähnelt dem eines COSY-Kreuzsignals, wenn ein Mischpuls mit

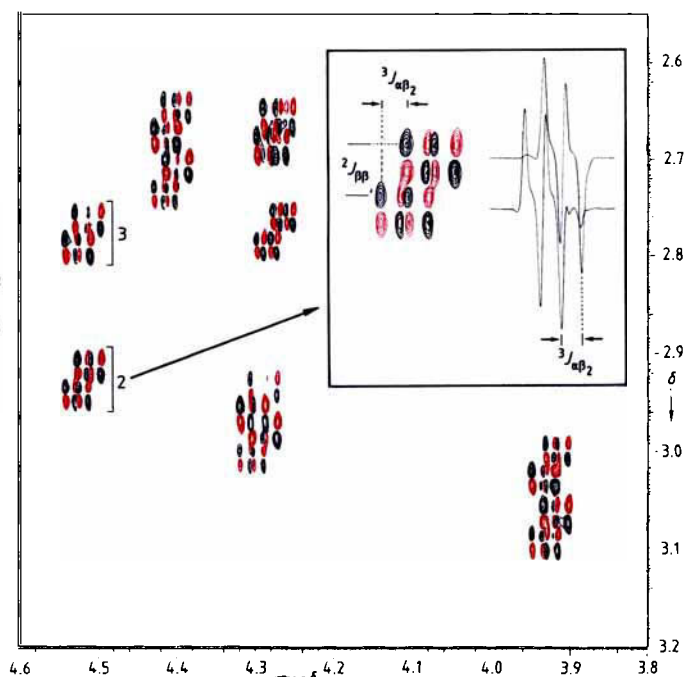


Abb. 31. E. COSY-Spektrum von cyclo(-D-Phe-Phe-) in [D₆]DMSO im gleichen Teilbereich wie für Abbildung 25. Rechts oben sind das vergrößerte Signal 2 und die zugehörigen coaddierten Spuren gezeigt. Die passive Kopplungskonstante $^3J_{\alpha\beta_2}$ ist als Abstand zweier Signalspitzen sehr genau zu ermitteln.

kleinem Flipwinkel eingesetzt wird (β -COSY)^[137]. Allerdings hat dort die Diagonale große disperse Anteile, was die Interpretation von Kreuzsignalen in der Nähe der Diagonale sehr erschwert. Dieser Nachteil wird durch die in^[145] eingeführte und später P.E. COSY benannte Technik^[144, 145, 147] behoben. Eine andere Möglichkeit ist die Einführung eines z-Filters^[266] (z-COSY^[148]). Nichtverbundene Übergänge werden durch beide Verfahren allerdings nicht quantitativ unterdrückt. Bei großen Molekülen muß man bei der z-COSY-Methode zudem mit Kreuzrelaxation während des z-Filter-Delays rechnen.

z-Filter

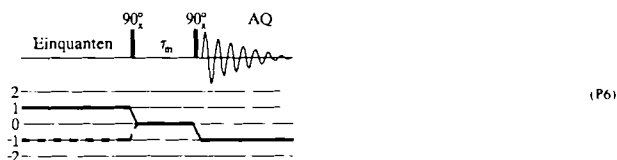
Der z-Filter ist eine weitere Methode zur Selektion von Kohärenzen (hier besser Populationen), die durch Phasencyclen nicht getrennt werden können. Wir hatten den Mehrquantenfilter als „High-Pass-Filter“ für die Zahl von Operatoren in einem Produktoperator kennengelernt, d. h. er unterdrückt alle Produktoperatoren mit weniger Operatoren, als es der Kohärenzordnung entspricht.

Der z-Filter (P5) dagegen selektiert Populationen und unterdrückt Kohärenzen. Mit dem Phasencyclus der β -

$$\left[\begin{array}{c} \beta \\ \tau_m \\ \beta \end{array} \right] \quad (P5)$$

Pulse erreicht man, daß nur Nullquanten und natürlich auch Populationen passieren können. Deren Unterscheidung beruht auf folgendem Prinzip: Populationen verändern sich während τ_m nicht, wenn man von Relaxationseffekten absieht. Nullquanten oszillieren dagegen mit den Differenzfrequenzen der chemischen Verschiebungen. Variiert man also τ_m und addiert die resultierenden Spektren, so mitteln sich die Nullquanten-Kohärenzen zu Null, und es bleiben im Idealfall nur die Populationen übrig.

Der z-Filter kann z. B. verwendet werden, um direkt vor der Detektion reine In-Phase-Magnetisierung zu selektieren (P6). Von allen detektierbaren Einquanten-Kohären-



zen wird nur I_y durch den ersten 90° -Puls in eine Population verwandelt und durch den zweiten Puls wieder regeneriert. Alle Antiphase-Terme werden im Idealfall unterdrückt.

Dieses Prinzip wird in der 1D-z-gefilterten COSY-Technik verwendet; dabei wird nach dem COSY-Transfer eine Refokussierung der Antiphase-Terme vorgenommen, und unerwünschte Beiträge mit anderen Phasen werden durch den z-Filter unterdrückt. Man erhält dann über die Anregung des Spins 1 ein reines In-Phase-Multiplett des mit ihm koppelnden Spins 2, das dann durch die DISCO-Prozedur weiter vereinfacht werden kann^[210].

Im z-COSY-Experiment ist die Funktion komplizierter, da hier Pulse mit kleinen Flipwinkeln den z-Filter flankieren. Im wesentlichen möchte man die Transformation (84) selektieren. Dies liefert dann stark vereinfachte Kreuzsignale vom E. COSY-Typ.

$$I_{1y}J_{2z}J_{3z}\dots J_{nz} \xrightarrow{\beta_x} I_{1z}J_{2z}J_{3z}\dots J_{nz} \xrightarrow{\beta_x} I_{1y}J_{2y}J_{3y}\dots J_{ny} \quad (84)$$

3.1.5. Weitere COSY-Varianten

Zwei ältere Varianten des COSY-Experiments, die ausschließlich unter dem Gesichtspunkt der Zuordnung von Signalen, d. h. für die qualitative NMR-Spektroskopie, eingeführt wurden, haben heute zwar an Bedeutung verloren, verdeutlichen aber wichtige Prinzipien und werden deshalb näher erläutert.

Delay-COSY

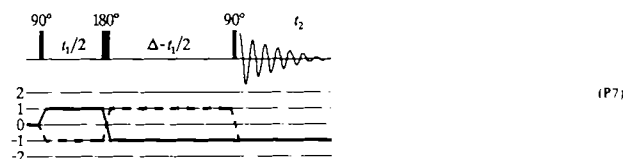
Die Signale im COSY-Spektrum sind in beiden Frequenzdomänen bezüglich der aktiven Kopplung in Antiphase (siehe Abschnitt 3.1.1). Berücksichtigt man die Linienbreite, so ist diese Multiplettstruktur unter Umständen nicht optimal, weil sich breite Linien in Antiphase gegenseitig auslöschen. Insbesondere eignet sich das COSY-Experiment nicht zur Detektion von kleinen Kopplungen. Führt man allerdings einen Delay vor und nach dem 90° -Puls ein^[137] (unter Umständen mit 180° -Pulsen in der Mitte der Delays zur Refokussierung der chemischen Verschiebung und Kompensation von Feldinhomogenitäten: SUPERCOSY^[267-269]), so erhält man gemäß (85) auch

$$\begin{aligned} \sin \pi J(t_1 + \Delta_1) \sin \pi J(t_2 + \Delta_2) &= (\sin \pi J t_1 \cos \pi J \Delta_1 + \cos \pi J t_1 \sin \pi J \Delta_1) \\ &(\sin \pi J t_2 \cos \pi J \Delta_2 + \cos \pi J t_2 \sin \pi J \Delta_2) \\ &= \sin \pi J \Delta_1 \sin \pi J \Delta_2 \cos \pi J t_1 \cos \pi J t_2 + \dots \end{aligned} \quad (85)$$

In-Phase-Anteile zum Signal. Daher liefern derartige Spektren^[270] Kreuzsignale mit gemischten Phasen, weswegen sie heute kaum noch Anwendung finden. In der heteronuclearen NMR-Spektroskopie dagegen ist das Prinzip der Refokussierung und Defokussierung weit verbreitet.

ω_1 -entkoppeltes COSY

ω_1 -Entkopplung durch „constant-time“-Varianten von Pulssequenzen ist beinahe universell einsetzbar. Sie bringt die Multiplettstruktur in ω_1 völlig zum Verschwinden. Dies bedeutet unter Umständen einen Gewinn in der Auflösung^[137, 271]. Die einfachste Sequenz dieser Art ist das ω_1 -entkoppelte COSY-Experiment^[137] (P7), in dem die Evolution der chemischen Verschiebung durch einen „wandernden“ 180° -Puls erzeugt wird.



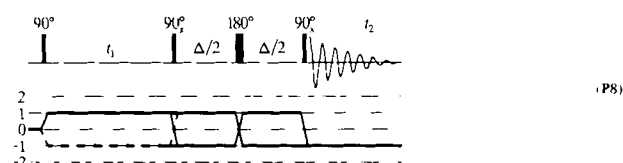
Beim 2D-J-NMR-Experiment (Abschnitt 3.1.2) hatten wir gezeigt, daß 180° -Pulse die Entwicklung der Kopplung nicht beeinflussen, die Entwicklung der chemischen Verschiebung dagegen umkehren. Durch die Sequenz (P7) entwickelt sich daher die homonucleare Kopplung während des ganzen Delays Δ zwischen den beiden 90° -Pulsen, die chemische Verschiebung dagegen während $-t_1/2 + (\Delta - t_1/2) = \Delta - t_1$. Für ein 1,2-Kreuzsignal ergibt sich als Transferamplitude im „constant-time“-COSY-Spektrum demnach (86). Die Multiplettstruktur in ω_1

$$\sin \pi J_{12} \Delta \prod_i \cos \pi J_{1i}^0 \Delta \cos \Omega_1(\Delta - t_1) \sin \pi J_{12} t_2 \prod_i \cos \pi J_{2i}^0 t_2 \cos \Omega_2 t_2 \quad (86)$$

verschwindet völlig, denn das Signal ist in t_1 nur mit der chemischen Verschiebung ($\cos \Omega_1(\Delta - t_1)$) moduliert. Die Größe der Kopplungskonstante geht jedoch über die Intensität des Kreuzsignals (Transferamplitude) ein. ω_1 -entkoppelte Spektren lassen sich, allerdings mit einigen Schwierigkeiten, zu reinen Phasen korrigieren.

3.1.6. Relayed-Spektroskopie

Im COSY-Experiment gibt es nur einen Kohärenz-Transferschritt. Daher wird Magnetisierung von einem Kern auf einen daran gekoppelten übertragen: $2I_{1x}I_{2z} \rightarrow 2I_{1z}I_{2x}$. Die Relayed-NMR-Spektroskopie dagegen verwendet mindestens zwei derartige Schritte. Die Pulssequenz des Relayed-COSY-Experiments (P8) ist^[208, 209]:



Wir betrachten nur die für ein Relayed-Signal relevanten Terme. Kohärenz-Transfer wird mit 90° -Pulsen erreicht, also müssen wir nur Zweioperatorenterme berücksichtigen [Gl. (87)]. Nach Präparation (90° -Puls) und „labelling“ (Entwicklung der chemischen Verschiebung und der Kopplung während t_1) ($2I_{1y}I_{2z}$) erfolgt der erste Misch-

$$I_{1y} \xrightarrow{90^\circ} I_{1x} \xrightarrow{t_1} 2I_{1y}I_{2z} \xrightarrow{90^\circ} -2I_{1z}I_{2y} \xrightarrow{\Delta/2 - 180^\circ - \Delta/2} 2I_{2y}I_{3z} \xrightarrow{90^\circ} 2I_{2z}I_{3y} \xrightarrow{t_2} I_{3z} \quad (87)$$

puls. Man erhält Antiphase-Magnetisierung von Spin 2 ($-2I_{1z}I_{2y}$), „markiert“ mit der chemischen Verschiebung von Spin 1. In der folgenden Periode $\Delta/2-180^\circ-\Delta/2$ entwickelt sich nur Kopplung (die chemische Verschiebung wird refokussiert). Die J_{12} -Kopplung wird refokussiert ($-2I_{1z}I_{2y} \rightarrow I_{2x}$), und es entwickelt sich Antiphase-Magnetisierung bezüglich Spin 3 ($I_{2x} \rightarrow 2I_{2y}I_{3z}$). Durch den zweiten Mischpuls wird Spin 3 transversal ($-2I_{2z}I_{3y}$), und nach Refokussierung der Kopplung zu Spin 2 in t_2 kann die Magnetisierung von Spin 3 detektiert werden. Da die Kohärenz-Transferwege im Relayed-COSY-Experiment denen des COSY-Experiments entsprechen, findet man im Spektrum immer Relayed- und direkte COSY-Signale. Man kann ein Relayed-Spektrum auch phasensensitiv prozessieren. Allerdings haben nur die Relayed-Signale reine Phasen, während die COSY-Kreuzsignale von Δ abhängig gemischte Phasen aufweisen. Wenn mehr als ein vermittelnder Spin existiert, haben auch die Relayed-Signale keine einfache Multipllettstruktur mehr. Die Transferamplitude hat die Gestalt (88).

$$\sin \pi J_{12}t_1 \prod_i \cos \pi J_{i1}t_1 \sin \pi J_{12}\Delta \sin \pi J_{23}\Delta \prod_i \cos \pi J_{2i}\Delta \sin \pi J_{23}t_2 \prod_i \cos \pi J_{3i}t_2 \quad (88)$$

Der Delay Δ muß auf die Größe der Kopplungskonstanten optimiert werden. Dabei muß er kürzer sein, als es der größten Kopplung entspricht ($\cos \pi J\Delta > 0$), da diese passive Kopplung sonst zum Verschwinden des Relayed-Signals führt. Lange Delays sollten auch vermieden werden, um Intensitätsverluste durch Relaxation gering zu halten.

Die Relayed-Spektroskopie gestattet es, Magnetisierung von einem Kern 1 über einen Vermittler („Relay“-)Kern auf einen nicht direkt mit Kern 1 koppelnden Kern zu übertragen. Dieses Verfahren ist sehr nützlich für die Signalzuordnung. Wenn beispielsweise in einem AMX- und einem BNY-Spinsystem die Spins M und N überlagern, die Spins A und B sowie X und Y aber nicht, kann man mit Hilfe dieser Technik A zu X und B zu Y zuordnen. Ein Beispiel zeigt Abbildung 32.

Experimente mit mehreren Relayed-Transferschritten wurden erfolgreich bei der Zuordnung von Peptidspektren^[272] und bei der Analyse von Zuckern^[273] eingesetzt. Bei bekannten Kopplungskonstanten kann man die Transferamplituden durch richtige Wahl des Delays optimieren^[209]. Relayed-Kreuzsignale kommen häufig nicht nur durch einen Transferweg zustande. Gibt es mehr als einen möglichen Relayed-Kern, so sind die Relayed-Signale Überlagerungen mehrerer Multipllettstrukturen. Dieses Problem kann mit der 1D-Relayed-Sequenz durch gerichteten Magnetisierungstransfer behoben werden^[210]. Abbildung 33 zeigt ein solches 1D-Relayed-Spektrum.

3.1.7. TOCSY

Eine grundsätzlich andere Art, Kopplungsinformation zu übertragen, wird im TOCSY-Experiment genutzt^[160]. Dabei erhält man In-Phase-Signale, d.h. es findet der Transfer $I_{1x} \rightarrow I_{2x}$ statt (ähnlich wie im NOESY-Experiment). Die Mischung wird in einer Periode erreicht, während der ein Spinlock-Feld angelegt und der Einfluß der

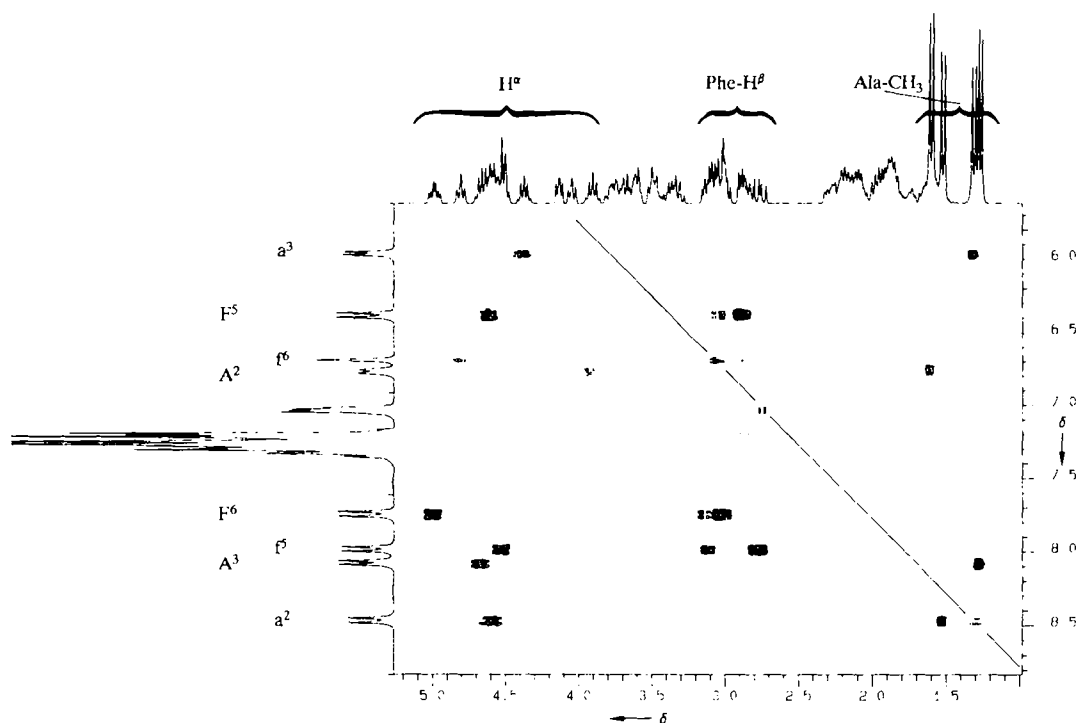


Abb. 32. H-Relayed-H,H-COSY von *cyclo*(-Pro¹-Ala²-Ala³-D-Pro⁴-Phe⁵-Phe⁶-) in CDCl₃ (270 MHz). Gezeigt sind der NH-Bereich in ω_1 und die Kreuzsignale zwischen NH- sowie α - und β -Protonen (ω_2). Man beachte, daß in CDCl₃ zwei langsam austauschende Konformationen nebeneinander vorliegen (doppelter Signalsatz, mit großen bzw. kleinen Buchstaben bezeichnet). Die zu Alanin (A und a) und Phenylalanin (F und f) gehörenden NH-Signale sind durch die Relay-Peaks bei den β -Protonen im rechten Teil des Spektrums sofort zu identifizieren. Die Zuordnung der Signale zur Peptidsequenz folgt aus einem solchen Spektrum nicht. Die auf der schräg eingezeichneten Linie liegenden Signale sind gerätespezifische Artefakte.

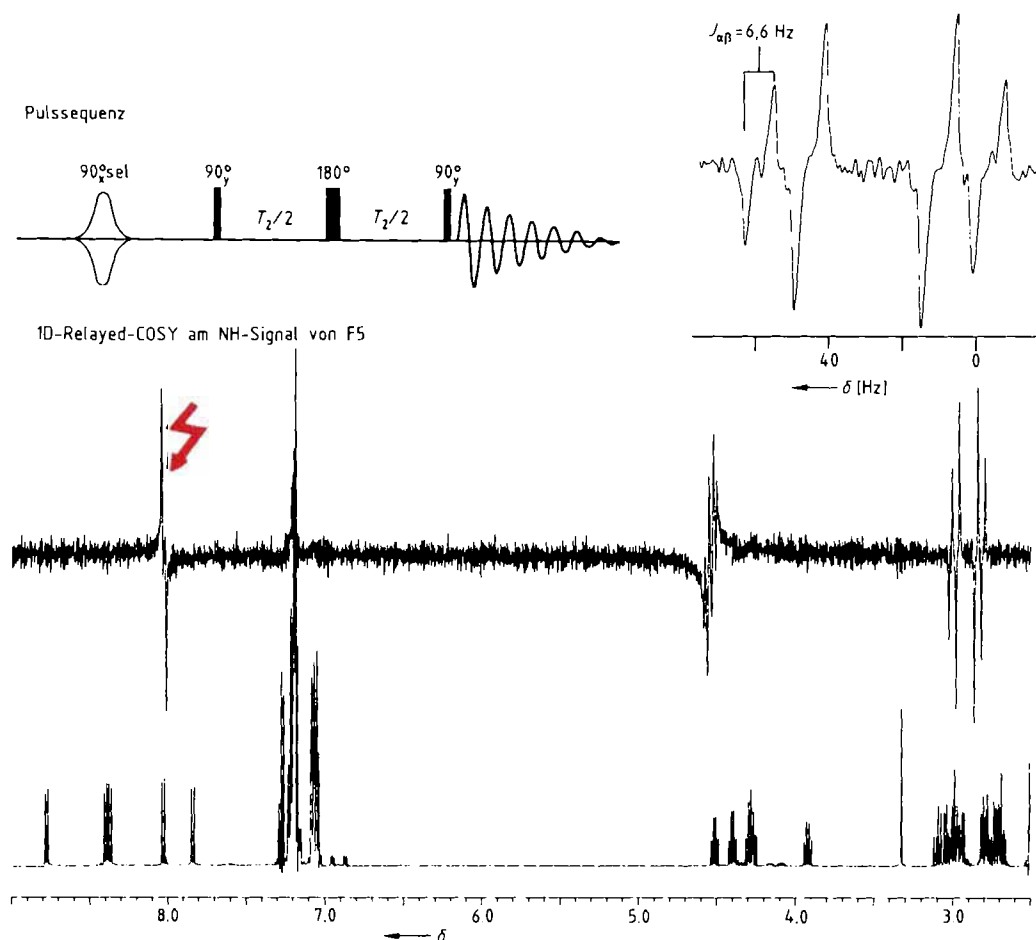
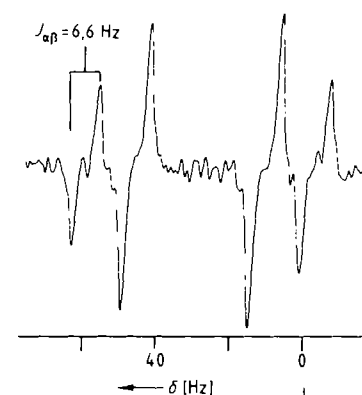


Abb. 33. 1D-Relayed-Spektrum von *cyclo(-D-Phe-Phe₄-)*. Es wurde das NH-Signal von Phe⁵ selektiv angeregt. Das zugehörige α -Signal erscheint bei richtiger Wahl des ersten Delays dispersiv in-phase, die Relayed-Signale zeigen das Multipllett der beiden β -Protonen in absorptiver Antiphase. Wie im gespreizten Bereich rechts oben zu sehen ist, lassen sich daraus die Kopplungskonstanten leicht bestimmen.

chemischen Verschiebung idealerweise vollständig aufgehoben ist. Alle Spins werden dadurch vorübergehend magnetisch äquivalent (AMX wird zu AA'A''). Je nach Art der Spinlock-Sequenz bezeichnet man dieses Mischen einer Sprachregelung von Chandrakumar et al. folgend^[274] als isotropes Mischen (kein effektives Feld) oder als Hartmann-Hahn-Mischen (mit effektivem Feld: HOHAHA-Experiment)^[161]. Dazu existieren auch mehrere theoretische Untersuchungen^[193, 274–280].

Der isotrope Hamilton-Operator enthält nur noch die skalare Kopplung, die durch Drehungen nicht beeinflusst wird (isotrop). Bleibt dagegen ein resultierendes Feld übrig, das für alle chemischen Verschiebungen gleich ist, so ist die Isotropie des Hamilton-Operators aufgehoben, und man hat nur noch axiale Symmetrie. Diese Bedingung nennt man in Analogie zu Festkörper-NMR-Experimenten „Hartmann-Hahn-Mischen“. Die Kerne bleiben dabei stark gekoppelt, was für den Transfer entscheidend ist.

Isotropes Mischen führt zu Spektren mit gemischten Phasen (Phasenmodulation), beim Hartmann-Hahn-Mischen dagegen erhält man reine Phasen^[160, 281]. Die Multiplikts sind allerdings selbst bei Mittelung über mehrere Mischzeiten eine Kombination aus verschiedenen spiegelsymmetrischen Multipllettmustern^[197]. Kreuzsignale treten idealerweise zwischen allen Kernen eines Spinsystems auf.



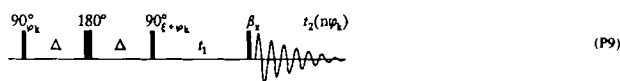
Für die Mischung im TOCSY-Experiment sind verschiedene Pulssequenzen vorgeschlagen worden. Die erfolgreichste ist die von Bax et al.^[282] benutzte Sequenz MLEV-17^[283–285], die von MLEV-16, das bei heteronuclearer Entkopplung verwendet wird, abgeleitet ist (siehe Abschnitt 3.2.10). Weitere technische Realisierungen von TOCSY finden sich in^[365], die Theorie zu diesen Sequenzen steht in^[366, 367].

TOCSY eignet sich vor allem zur Analyse von Proteinen, bei denen die Linienbreiten in die Größenordnung von J -Werten kommen und das COSY-Experiment durch die Antiphase-Struktur der Kreuzsignale immer unempfindlicher wird. Über die Länge der Spinlock-Zeiten hat man Einfluß darauf, über wieviele Kerne die Magnetisierung verteilt wird. Kurze Mischzeiten ergeben praktisch nur Peaks zwischen direkt koppelnden Kernen, während bei längeren Mischzeiten auch Relayed- und Mehrfach-Relayed-Peaks auftreten.

3.1.8. Mehrquanten-Spektroskopie

Bei der Beschreibung der mehrquantengefilterten COSY-Technik (Abschnitt 3.1.1) haben wir gesehen, daß Einquanten-Kohärenzen über intermediär auftretende Mehrquanten-Kohärenzen miteinander verknüpft wurden. Mehrquanten-Spektren^[157, 158, 286–291] dagegen korrelieren Mehrquanten- mit Einquanten-Kohärenzen.

Obwohl Mehrquanten-Kohärenzen bekanntlich nicht direkt detektierbar sind, gelingt ihre Beobachtung indirekt mit Hilfe der 2D-NMR-Spektroskopie. Die Pulssequenz eines n -Quanten-Spektrums ist (P9). Darin ist $\xi = (n \bmod 2) 90^\circ$ und $\varphi_k = k(\pi/n)$ mit $k=0, 1, \dots, 2n-1$.



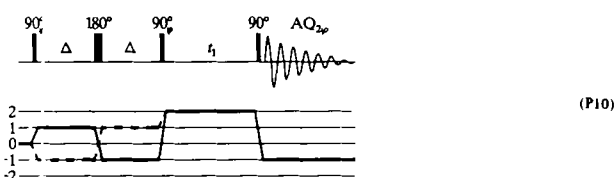
Wir wollen Mehrquanten-Spektren zunächst bei Zweispinsystemen betrachten. Tatsächlich wird die Doppelquanten-Spektroskopie in erster Linie für die Korrelation von ^{13}C -Kernen verwendet (INADEQUATE^[164]). Wegen der geringen natürlichen Häufigkeit von ^{13}C (ca. 1%) detektiert man hier nur Signale von Zweispinsystemen.

Doppelquanten-Kohärenz entwickelt chemische Verschiebung gemäß (89) und (90), d. h. es entwickeln sich die Summen der Frequenzen. J_{12} -Kopplung zwischen den an der Doppelquanten-Kohärenz beteiligten Kernen entwickelt sich dagegen nicht (siehe Abschnitt 2.2.1).

$$2(I_{1x}J_{2y} + I_{1y}J_{2x}) \xrightarrow{(\Omega_1 I_{1z} + \Omega_2 I_{2z})t} 2(I_{1x}J_{2y} + I_{1y}J_{2x})\cos(\Omega_1 + \Omega_2)t + 2(I_{1y}J_{2y} - I_{1x}J_{2x})\sin(\Omega_1 + \Omega_2)t \quad (89)$$

$$2(I_{1y}J_{2y} - I_{1x}J_{2x}) \xrightarrow{(\Omega_1 I_{1z} + \Omega_2 I_{2z})t} 2(I_{1y}J_{2y} - I_{1x}J_{2x})\cos(\Omega_1 + \Omega_2)t - 2(I_{1x}J_{2y} + I_{1y}J_{2x})\sin(\Omega_1 + \Omega_2)t \quad (90)$$

Die INADEQUATE-Sequenz ist (P10), wobei φ die Werte $0^\circ, 90^\circ, 180^\circ$ und 270° annimmt. Der erste „Sandwich“ ($90^\circ - \Delta - 180^\circ - \Delta - 90^\circ$) hat die Aufgabe, Doppelquanten zu erzeugen. Für $\varphi = 90^\circ$ beispielsweise ergibt sich (91).



$$I_{1x} + I_{2x} \xrightarrow{2\Delta} 2I_{1y}J_{2x} + 2I_{1x}J_{2y} \xrightarrow{90^\circ} 2I_{1y}J_{2x} + 2I_{1x}J_{2y} \quad (91)$$

Mit den entsprechenden Phasencyklen werden Null- und Einquanten-Kohärenzen unterdrückt. Bei richtig eingestelltem Delay liefern daher nur solche Moleküle in INADEQUATE-Spektren Signale, die zwei benachbarte ^{13}C -Kerne enthalten.

Während t_1 entwickelt sich die chemische Verschiebung der Doppelquanten, die, wie in Gleichung (89) gezeigt, den Summen der Frequenzen der Einquanten-Kohärenzen der beiden Kerne entsprechen. Der anschließende 90° -Puls verwandelt die Doppelquanten-Kohärenz in Antiphase-Einquanten-Kohärenz, die gleichmäßig auf beide Kerne verteilt ist [Gl. (92)]. Schematisch erhält man also das Spektrum von Abbildung 34.

$$2(I_{1x}J_{2y} + I_{1y}J_{2x}) \xrightarrow{90^\circ} 2(I_{1x}J_{2x} + I_{1y}J_{2x}) \quad (92)$$

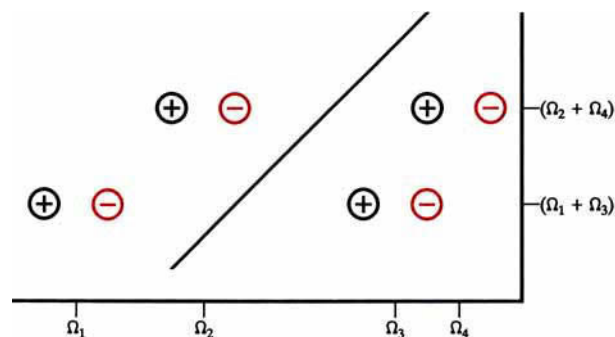


Abb. 34. Schematisches INADEQUATE-Spektrum für isolierte Zweispinsysteme, wie sie bei „verdünnten“ magnetisch aktiven Kernen vorkommen. Man erhält Paare von Antiphasen-Dubletts symmetrisch zur „skew“-Diagonale bei $\omega_1 = 2\omega_2$.

Es gibt keine Multipllettstruktur in ω_1 . Jedes Paar von Kreuzsignalen bei gleicher ω_1 -Frequenz repräsentiert eine C-C-Konnektivität. Es gibt daher eine direkte Beziehung zwischen Konstitution und Spektrum. Eine ausführliche Beschreibung der Bestimmung von C-C-Konnektivitäten mit der INADEQUATE-Spektroskopie geben *J. Buddrus* und *H. Bauer*^[292]. Mit der INADEQUATE-Technik wird das Maximum an Empfindlichkeit für die direkte Korrelation von Kernen geringer natürlicher Häufigkeit erreicht. Durch Anregung und Detektion der Heterokerne über Protonen („inverse“ Spektroskopie, Abschnitt 3.2.11) lässt sich allerdings die Empfindlichkeit noch erhöhen^[169].

INADEQUATE-Spektren mit reinen Phasen oder auch Quadraturdetektion in ω_1 erfordern Phaseninkremente von 45° . Varianten, um auch ohne derartige Phaseninkremente Quadraturdetektion in ω_1 zu erzielen, operieren mit Pulswinkeln, die verschieden von 90° sind. Details hierzu findet man in^[292] und dort zitierten Originalarbeiten.

Doppelquanten-Spektren von größeren Spinsystemen (z. B. Protonen) sind wesentlich komplizierter^[157]. Zuerst wollen wir die Kopplung zu weiteren Spins notieren. Man findet (93) und (94); es entwickelt sich also die Summe der Kopplungskonstanten der aktiven Spins zu den passiven Spins.

$$2(I_{1x}J_{2y} + I_{1y}J_{2x}) \xrightarrow{(\pi J_{13} 2I_{1x}J_{3x} + \pi J_{23} 2I_{2x}J_{3x})t} 2(I_{1x}J_{2y} + I_{1y}J_{2x})\cos \pi(J_{12} + J_{23})t - 4(I_{1x}J_{2x} + I_{1y}J_{2y})J_{3x} \sin \pi(J_{12} + J_{23})t \quad (93)$$

$$2(I_{1x}J_{2x} + I_{1y}J_{2y}) \xrightarrow{(\pi J_{13} 2I_{1x}J_{3x} + \pi J_{23} 2I_{2x}J_{3x})t} 2(I_{1x}J_{2x} + I_{1y}J_{2y})\cos \pi(J_{12} + J_{23})t - 4(I_{1x}J_{2y} + I_{1y}J_{2x})J_{3x} \sin \pi(J_{12} + J_{23})t \quad (94)$$

Im Doppelquanten-Spektrum findet man einmal die bereits bekannten direkten Konnektivitäten gemäß (95), die zum Kreuzsignalpaar bei der Summe der chemischen Verschiebungen in ω_1 führen $[(\Omega_1 + \Omega_2, \Omega_1)$ und $(\Omega_1 + \Omega_2, \Omega_2)]$, also symmetrisch zur Geraden $\omega_1 = 2\omega_2$.

$$2I_{1x}J_{2x} \xrightarrow{90^\circ} 2I_{1x}J_{2y} \xrightarrow{t_1} 2I_{1x}J_{2y} + 2I_{1y}J_{2x} \xrightarrow{90^\circ} 2I_{1x}J_{2x} + 2I_{1y}J_{2x} \quad (95)$$

In linearen Spinsystemen vom Typ $I^1 - I^2 - I^3$ findet man zusätzlich „remote“-Peaks gemäß Gleichung (96). Sie erscheinen also in ω_2 bei der Frequenz des Kerns 2, in ω_1 aber bei der Summe der Frequenzen von Kern 1 und 3 ($\Omega_1 + \Omega_3, \Omega_2$). Im Gegensatz zu den

direkten Signalen haben sie keinen Partner symmetrisch zur Geraden $\omega_1 = 2\omega_2$, enthalten aber die Relayed-Information.

$$4I_{1z}I_{2y}I_{3z} \xrightarrow{90^\circ_x} 4I_{1y}I_{2z}I_{3y} \xrightarrow{t_1} 4I_{1y}I_{2z}I_{3y} \xrightarrow{90^\circ_x} 4I_{1z}I_{2y}I_{3z} \quad (96)$$

Hat man drei Kerne, die alle miteinander koppeln, so findet man wieder beide Typen von Signalen, sowohl „direkte“ als auch remote-Peaks. Zusätzlich zeigen diese Signale aber gemischte Phasen. Für die $(\Omega_1 + \Omega_2, \Omega_1)$ -Signale gilt (97). Dieses direkte Signal ist

$$2I_{1x}I_{2z} \xrightarrow{90^\circ_x} 2I_{1x}I_{2y} \xrightarrow{t_1} 2I_{1x}I_{2y} \xrightarrow{90^\circ_x} 2I_{1x}I_{2z} \quad (97)$$

in Absorption in beiden Dimensionen und in-phase bezüglich der J_{13} - und J_{23} -Kopplungen in ω_1 . Ein weiterer Weg ist (98). Hier erhält man Dispersion in ω_1 , Absorption in ω_2 und Antiphasen bezüglich beider Kopplungen in ω_1 .

$$4I_{1z}I_{2z}I_{3y} \xrightarrow{90^\circ_x} 4I_{1y}I_{2y}I_{3z} \xrightarrow{t_1} 2I_{1x}I_{2y} \xrightarrow{90^\circ_x} 2I_{1x}I_{2z} \quad (98)$$

Für die $(\Omega_2 + \Omega_1, \Omega_1)$ -Signale gilt ähnliches [Gl. (99)]. Auch dieses Signal ist in Absorption in beiden Dimensionen und in-phase bezüglich beider Kopplungen in ω_1 . Weiterhin erhält man (100).

$$4I_{1y}I_{2z}I_{3z} \xrightarrow{90^\circ_x} 4I_{1z}I_{2y}I_{3y} \xrightarrow{t_1} 4I_{1z}I_{2y}I_{3y} \xrightarrow{90^\circ_x} 4I_{1y}I_{2z}I_{3z} \quad (99)$$

$$2I_{2z}I_{3z} \xrightarrow{90^\circ_x} 2I_{2x}I_{3y} \xrightarrow{t_1} 4I_{1z}I_{2y}I_{3y} \xrightarrow{90^\circ_x} 4I_{1y}I_{2z}I_{3z} \quad (100)$$

Man findet Dispersion in ω_1 , Absorption in ω_2 und Antiphasen bezüglich beider Kopplungen.

Wegen des anderen Aufspaltungsbildes werden Doppelquanten-Spektren gelegentlich benutzt, um Überlagerungen in komplexen Spektren zu entzerren. Die komplexen Multipllettstrukturen, die Abhängigkeit der Kreuzsignalintensität von der Länge der Delays im Präparations-Sandwich und die Notwendigkeit von Phaseninkrementen kleiner als 90° standen bisher einer weiteren Verbreitung der Mehrquanten-Spektroskopie im Wege. Verbesserungen sind aber durch die Verwendung von z-Filtern möglich^[29,31].

3.2. Heteronucleare Experimente

In heteronuclearen Spinsystemen beruhen ebenfalls fast alle 1D- und 2D-NMR-Techniken auf Kohärenz-Transfer. Da das gyromagnetische Verhältnis γ praktisch aller Atomkerne (bis auf Tritium) kleiner ist als das des Protons, ist eine optimale Empfindlichkeit der Methode zur Messung dieser Kerne von zudem oft geringer natürlicher Häufigkeit besonders wichtig.

Wir schicken hier ein paar Bemerkungen zur Empfindlichkeit heteronuclearer NMR-Experimente voraus. Der „globale“ Empfindlichkeitsfaktor eines jeden NMR-Experiments ist $\gamma^{5/2} B_0^{3/2}$. Er enthält einen Faktor γ , der von der Polarisierung im thermischen Gleichgewicht stammt. Die Polarisierung im thermischen Gleichgewicht ist für Experimente, die von einer heteronuclearen Anregung ausgehen, gegeben durch $\gamma_X S$, wobei S für die Heterokernmagnetisierung steht.

Geht man allerdings von der Protonenmagnetisierung aus, so hat man $\gamma_H I_z$ (I für Protonenmagnetisierung). Man gewinnt also in Experimenten, die mit Protonen- statt mit Heterokernmagnetisierung beginnen, einen Faktor γ_H/γ_X an Empfindlichkeit. Der restliche Faktor $\gamma^{3/2}$ im globalen Empfindlichkeitsfaktor stammt von der Detektion; multipliziert mit dem gyromagnetischen Verhältnis des angeregten Kernels ist er proportional zum Signal-zu-Rausch(S/N)-Verhältnis. Bei konventionellen heteronuclearen Experimenten wird der Heterokern detektiert, und der Faktor ist $\gamma_X^{3/2}$. Bei der „inversen“ Spektroskopie werden dagegen Protonen detektiert: $\gamma_H^{3/2}$. Auf diese Weise erhält man einen zusätzlichen Intensitätsgewinn von $\gamma_H^{3/2}/\gamma_X^{3/2}$ für indirekt detektierte gegenüber konventionell detektierten Spektren^[46] (siehe Abschnitt 3.2.11).

Praktisch alle bisher besprochenen homonuclearen Experimente haben heteronucleare Analoga. Ein homonucleares Experiment mit einem Puls auf die Protonen mit dem Winkel β ist einem heteronuclearen Experiment analog, bei dem *gleichzeitig* auf Protonen und Heterokerne je ein Puls mit dem Winkel β ausgeführt wird. Daraus folgt, daß man jede homonucleare 2D-Pulssequenz sofort auf ein heteronucleares System übertragen kann. Dennoch wird mit diesen direkten Übertragungen häufig nicht die optimale Empfindlichkeit erreicht. In homonuclearen Experimenten wirkt ein nichtselektiver Puls zwangsläufig auf alle Kerne gleichermaßen, wenn man von Off-Resonance-Effekten absehen kann. Dagegen lassen sich in heteronuclearen Experimenten die beiden Kernsorten separat beeinflussen. Durch diesen Sachverhalt erhält man in bestimmten Fällen enorme Empfindlichkeitsvorteile. So würde das heteronucleare Analogon des homonuclearen COSY-Experiments ($90^\circ(^1\text{H}) - t_1 - 90^\circ(^1\text{H}, ^{13}\text{C}) - t_2$) für ein HC-Fragment nur ein Viertel der Intensität ergeben, die man mit der gebräuchlichen Technik, der H.C.-Verschiebungskorrelation, erreicht.

Die zweite, für die Aufstellung von Pulssequenzen entscheidende Eigenschaft heteronuclearer Systeme ist der sehr starke Größenunterschied der direkten Kopplungen über eine Bindung $^1J_{\text{HX}}$ und der (bei Heterosystemen ab $n=2$ als Weitbereichskopplungen bezeichneten) Kopplungen über n Bindungen $^nJ_{\text{HX}}$. Man kann daher in erster Näherung die H_nX -Einheiten als isoliert betrachten. Die $^1J_{\text{HX}}$ -Kopplungen variieren zudem in günstigen Fällen nur in engen Grenzen (eine Ausnahme ist z. B. die $^1J_{\text{HF}}$ -Kopplung).

3.2.1. Die Rolle der 180° -Pulse

Wir wollen zu Beginn die Rolle von 180° -Pulsen in heteronuclearen Pulssequenzen betrachten. Ein $180^\circ(\text{I})$ -Puls hat nach einer Zeit t auf die Entwicklung von chemischer Verschiebung des Kernels I den in (101) dargestellten Effekt

$$I_x \cos \Omega t + I_y \sin \Omega t \xrightarrow{180^\circ_{xy}} \pm (I_x \cos \Omega(-t) + I_y \sin \Omega(-t)) \quad (101)$$

(die chemische Verschiebung des Heterokernels S wird selbstverständlich nicht beeinflusst). Es findet also eine Zeitumkehr der Periode t vor dem 180° -Puls statt [vgl. Gl. (76) und (77)].

Die homonucleare I-Kopplung wird, wie wir in Abschnitt 3.1.2 sahen, bis auf einen möglichen Vorzeichenwechsel nicht beeinflusst. Ebenso wird die homonucleare S-Kopplung nicht beeinflusst.

Anders bei heteronuclearer Kopplung [Gl. (102)]. Für den $180^\circ(\text{S})$ -Puls gilt entsprechend (103). Die heteronucleare Kopplung hat sich also im Unterschied zur homonuclearen Kopplung genau wie die chemische Verschiebung nach einer Zeit t und einem selektiven 180° -Puls zurück entwickelt. Sie läßt sich demnach durch eine Sequenz $\Delta - 180^\circ(\text{I}) - \Delta$ oder $\Delta - 180^\circ(\text{S}) - \Delta$ refokussieren.

$$I_x \cos \pi J t + 2I_y S_z \sin \pi J t \xrightarrow{180^\circ_{xy}(\text{I})} \pm (I_x \cos \pi J t + 2I_y S_z \sin \pi J t) = \pm (I_x \cos \pi J(-t) + 2I_y S_z \sin \pi J(-t)) \quad (102)$$

$$S_x \cos \pi J t + 2S_y I_z \sin \pi J t \xrightarrow{180^\circ_{xy}(\text{S})} \pm (S_x \cos \pi J t + 2S_y I_z \sin \pi J t) = \pm (S_x \cos \pi J(-t) + 2S_y I_z \sin \pi J(-t)) \quad (103)$$

Zwei simultan auf beide Kernsorten wirkende 180° -Pulse haben dieselbe Wirkung wie ein einzelner 180° -Puls in einem homonuclearen Spinsystem: Refokussierung der chemischen Verschiebung, kein Einfluß auf homo- und heteronucleare Kopplung.

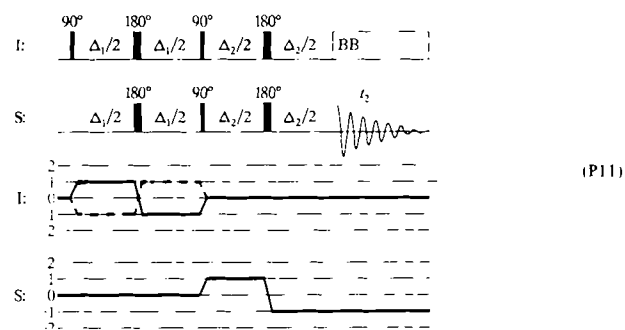
Noch eine letzte Bemerkung: Die Regeln über Phasencyclen lassen sich einfach auf Heterosysteme übertragen, allerdings empfiehlt es sich, zwei „Notenschlüssel“ zu verwenden, da die Kernsorten separat durch Pulse angeregt werden.

Es gibt im wesentlichen zwei 1D-NMR-Techniken zum heteronuclearen Kohärenztransfer: INEPT und DEPT.

3.2.2. INEPT

Kohärenz-Transfer in heteronuclearen Spinsystemen durch $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplungen

Die INEPT-Pulsfolge^[294] ist (P11). Sie entspricht dem COSY-Experiment: 90° -Anregungspuls und je ein 90° -Puls auf beide Kernsorten für den Kohärenz-Transfer. Die 180° -Pulse dienen lediglich zur Refokussierung der chemischen Verschiebung.



Wir wollen INEPT nun mit dem Produktoperatorformalismus analysieren. Die Ausgangsmagnetisierung im thermischen Gleichgewicht ist $\gamma_I I_x + \gamma_S S_x$. Der $90^\circ(\text{I})$ -Puls regt transversale I-Spin-Magnetisierung an: $\gamma_I I_y$. Die S-Spin-Magnetisierung bleibt longitudinal und kann durch Phasencyclen ($x, -x$ für den ersten Puls) unterdrückt werden. In der sich anschließenden Periode $\Delta_1/2 - 180^\circ(\text{I,S}) -$

$\Delta_1/2$ entwickelt sich heteronucleare Kopplung $^1J_{\text{IS}}$ und homonucleare Kopplung $^nJ_{\text{II}}$, die chemischen Verschiebungen werden für beide Kernsorten refokussiert. Falls die direkte heteronucleare Kopplung $^1J_{\text{IS}}$ groß gegenüber der heteronuclearen Weitbereichskopplung $^nJ_{\text{IS}}$ und der homonuclearen Kopplung J_{II} ist, erhält man Gleichung (104). Wie üblich dient nur der Antiphase-Term für den Polarisationstransfer [Gl. (105)]. Die Phase des zweiten 90° -Pulses muß gegenüber der des ersten um 90° verschoben sein.

$$I_x \longrightarrow I_x \cos \pi^1 J_{\text{IS}} \Delta_1 + 2I_y S_z \sin \pi^1 J_{\text{IS}} \Delta_1 \quad (104)$$

$$2I_y S_z \xrightarrow{90^\circ(\text{I,S})} -2I_x S_y \quad (105)$$

In der sich anschließenden Sequenz $\Delta_2/2 - 180^\circ(\text{I,S}) - \Delta_2/2$ refokussiert die heteronucleare Kopplung zu meßbarer In-Phase-Magnetisierung des S-Kerns [Gl. (106)].

$$-2I_x S_y \longrightarrow -2I_y S_z \cos \pi J_{\text{IS}} \Delta_2 + S_x \sin \pi J_{\text{IS}} \Delta_2 \quad (106)$$

Die Breitbandentkopplung BB zu Beginn der Akquisitionszeit zerstört jegliche I-Kern-Magnetisierung, d. h. alle Magnetisierungen, die durch Produktoperatoren mit I-Spin-Operatoren beschrieben werden, refokussieren nicht; die entsprechenden Produktoperatoren können deshalb weggelassen werden.

Stellt man die Delays Δ_1 und Δ_2 auf $\Delta_1 = \Delta_2 = (2J)^{-1}$ ein, so sind alle Transferfaktoren gleich 1 ($\sin \pi J \Delta = 1$, $\cos \pi J \Delta = 0$), und man erhält wegen der Anregung über die I-Spins den ganzen Empfindlichkeitsgewinn γ_I/γ_S gegenüber einem breitbandentkoppelten Spektrum (ohne NOE-Effekt). Für $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ erhält man so den Faktor 4 und für $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ den Faktor 10.

Sind an einen S-Kern mehrere I-Kerne gebunden, muß man beachten, daß die passiven I-Spins im Delay Δ_2 einen $\cos \pi J \Delta_2$ -Term beisteuern. Man findet daher für eine S_II -Gruppierung (nur relevante Operatoren werden aufgeführt) Gleichung (107).

$$\begin{aligned} n\gamma_I I_x &\xrightarrow{90^\circ(\text{I})} -n\gamma_I I_y \xrightarrow{\Delta_1} n\gamma_I 2I_y S_z \sin \pi^1 J_{\text{IS}} \Delta_1 \xrightarrow{90^\circ(\text{I,S})} \\ &n\gamma_I 2I_x S_y \sin \pi^1 J_{\text{IS}} \Delta_1 \xrightarrow{\Delta_2} -n\gamma_I S_z \sin \pi^1 J_{\text{IS}} \Delta_1 \sin \pi^1 J_{\text{IS}} \Delta_2 \cos^{n-1} \pi^1 J_{\text{IS}} \Delta_2 \end{aligned} \quad (107)$$

Diese Transferfunktion ist der Schlüssel zu Editiermethoden, mit denen man die Signale nach der Anzahl der an den S-Kern gebundenen I-Kerne sortieren kann. Man bemerke die Analogie zu Mehrquantenfiltern. Hier geht es allerdings nicht mehr um einen High-Pass-Filter, sondern um einen Band-Pass-Filter, d. h. einen Filter, der Produktoperatoren mit *genau* n Operatoren selektiert. Mit $\pi^1 J_{\text{IS}} \Delta_2 = \Theta$ und unter Vernachlässigung des sowieso immer gleichen Faktors $\gamma_I \sin \pi^1 J_{\text{IS}} \Delta_1$ erhalten wir für die Signalintensität den Faktor $n \sin \Theta \cos^{n-1} \Theta$.

Der Cosinusfaktor ist für $\Theta > 90^\circ$ negativ, woraus folgt, daß $\cos^{n-1} \Theta$ auf die „Multiplizität“ des S-Kerns, d. h. auf die Zahl n der an den S-Kern geknüpften I-Kerne reagiert. Für gerade n erhält man dann negative Signale, für ungerade n positive. Durch Kombination von drei aufeinander folgenden Experimenten mit verschiedenen Θ -Werten erreicht man eine Signalauswahl nach der Multiplizität (der

Einfachheit halber wählen wir nun die Einheit ° statt der Einheit rad):

$$\Theta_1 = +\Theta; \Theta_2 = 90^\circ; \Theta_3 = 180^\circ - \Theta$$

Setzt man $\Theta = 45^\circ$, so erhält man die in Tabelle 6 aufgeführten Koeffizienten, denen man entnimmt, daß sich ein Spektrum nur für SI_3 -Gruppen aus der in (108) gegeb-

Tabelle 6. Relative Signalintensitäten ($n \sin \Theta \cos^{n-1} \Theta$) für das INEPT-Experiment in Abhängigkeit von $\Theta = \pi J_{\text{HC}} \Delta_2$.

	n	Θ_1 45°	Θ_2 90°	Θ_3 135°
CH	1	$1/\sqrt{2}$	1	$1/\sqrt{2}$
CH ₂	2	1	0	-1
CH ₃	3	$3/(2\sqrt{2})$	0	$3/(2\sqrt{2})$

nen Addition ergibt. Wählt man $\Theta = 90^\circ$, werden nur SI_2 -Gruppen abgebildet. Die Signale für SI_2 -Gruppen erhält man in jedem Fall durch Subtraktion des Spektrums mit Θ von demjenigen mit $180^\circ - \Theta$, also z. B. von Θ_1 und Θ_3 .

$$\text{Spektrum}(45^\circ) + \text{Spektrum}(135^\circ) - \text{Spektrum}(90^\circ) \cdot \sqrt{2} \quad (108)$$

Es soll noch betont werden, daß die Editierqualität von INEPT auf der Annahme gleicher Kopplungskonstanten beruht. Eine Schwankung in der Kopplungskonstante von 10% macht aus $\Theta = 45^\circ$, 90° und 135° etwa $\Theta \approx 40^\circ$, 80° bzw. 120° . Daraus ergeben sich die in Tabelle 7 aufgeführten Signalintensitäten für die Spektren. Man erkennt deutlich, daß die aus Tabelle 6 abgeleiteten Unterdrückungen dann nicht mehr vollständig sind.

Tabelle 7. Relative Signalintensitäten bei Editing mit der INEPT-Sequenz unter der Annahme einer 10proz. Abweichung der Kopplung vom Idealwert.

	Intensität von		
	CH	CH ₂	CH ₃
CH-Subspektrum	0.99	0.3	0.07
CH ₂ -Subspektrum	-0.2	1.88	0.43
CH ₃ -Subspektrum	0.1	-0.34	1.72

Transfer über Weitbereichskopplungen

Selbstverständlich kann man im INEPT-Experiment auch über Weitbereichskopplungen $^nJ_{\text{IS}}$ Magnetisierung vom I-Kern auf den S-Kern übertragen^[188]. Einzig die Delays müssen zu diesem Zweck verändert werden. Im Gegensatz zum Transfer über direkte Kopplungen muß man jetzt auch homonucleare I-I-Kopplungen berücksichtigen, da sie im allgemeinen etwa so groß sind wie heteronucleare Weitbereichskopplungen.

Die Amplitude für einen Transfer von I_k auf S_i im INEPT-Experiment ergibt sich dann zu (109). Sind die jeweiligen Kopplungskonstanten ungefähr bekannt, kann man die Delays optimieren, wobei kürzere Delays wegen der Relaxation vorzuziehen sind.

$$\sin \pi J_{\text{IS}_i} \Delta_1 \prod_j \cos \pi J_{\text{I}_k \text{I}_j} \Delta_1 \sin \pi J_{\text{IS}_i} \Delta_2 \prod_j \cos \pi J_{\text{I}_k \text{I}_j} \Delta_2 \quad (109)$$

Die Anregung über die INEPT-Sequenz sagt zunächst nichts über den Anregungsweg aus, d. h. man weiß nicht,

von welchem I-Kern die am S-Kern gemessene Magnetisierung übertragen wurde. Möchte man den Transferweg aber zur Aufklärung von Konnektivitäten nutzen, muß man entweder ein selektives INEPT-Experiment durchführen oder 2D-NMR-Spektren aufnehmen.

Selektives INEPT

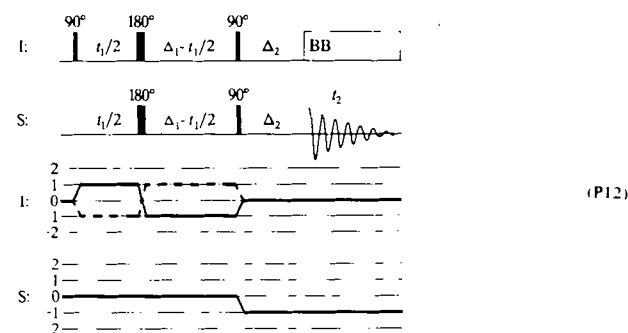
Hierbei ersetzt man alle I-Pulse durch selektive Pulse auf I_k ^[295, 296]. Dadurch verhalten sich alle passiven I-Spins sowohl gegenüber dem S-Spin als auch gegenüber I_k als „Heterospins“. Die Transferamplitude vereinfacht sich dadurch zu (110), d. h. die Intensität im Spektrum ist erheb-

$$\sin \pi J_{\text{IS}_i} \Delta_1 \sin \pi J_{\text{IS}_i} \Delta_2 \quad (110)$$

lich höher als im INEPT-Experiment mit nichtselektiven („harten“) Pulsen. Zudem ist dadurch, daß ein bestimmtes Protonensignal für die Anregung ausgewählt wurde, der Transferweg eindeutig. Voraussetzung hierfür ist natürlich ein gut aufgelöstes Protonenspektrum.

3.2.3. 2D-Variante von INEPT: COLOC

Die zweite Möglichkeit, die Transferwege zu unterscheiden, ist die „constant-time“-2D-Variante von INEPT, das COLOC-Experiment^[189]. Im „constant-time“-2D-NMR-Experiment ist die Gesamtdauer der Evolutionsperiode konstant. Die Evolution der chemischen Verschiebung erreicht man durch einen innerhalb des Delays verschobenen 180° -Puls (siehe Abschnitt 3.1.5). Beim heteronuclearen Experiment geht man von der INEPT-Anregung aus und verschiebt synchron zwei 180° -Pulse, die auf die Protonen bzw. die Heterokerne wirken. Somit ergibt sich (P12) als COLOC-Pulssequenz.

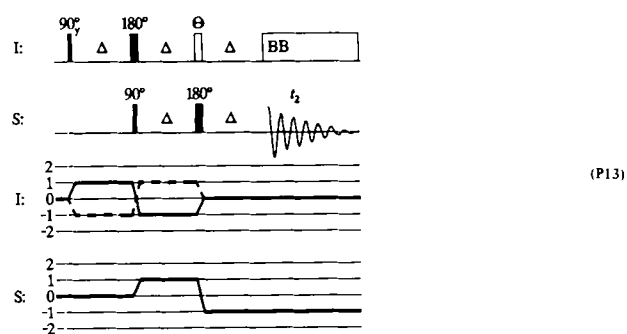


Es gibt eine direkte Analogie zum ω_1 -entkoppelten homonuclearen COSY-Experiment; auch hier sind die Kreuzsignale in ω_1 entkoppelt (keine homonucleare I-I-Kopplung). Die Transferamplitude ist bis auf den Term zur Entwicklung der chemischen Verschiebung dieselbe wie im INEPT-Experiment. Man erhält alle Signale in einem Spektrum und kann dadurch den Nachteil, daß die Intensität geringer ist als im selektiven INEPT-Experiment, wettmachen. Ist man allerdings nur an wenigen Korrelationen interessiert, ist das empfindlichere selektive INEPT-Experiment vorzuziehen.

3.2.4. DEPT

Wir haben in Abschnitt 3.2.2 gesehen, daß die Qualität von editierten INEPT-Spektren stark von Schwankungen

der Kopplungskonstanten abhängt. Dieser Nachteil des INEPT-Experiments wird bei der DEPT-Sequenz^[297-299] (P13) behoben.



Wir analysieren die Sequenz für eine SI_n -Gruppe. Da die beiden 180° -Pulse lediglich zur Refokussierung der chemischen Verschiebung dienen, kann man sie in der folgenden Diskussion ebenso wie die Entwicklung der chemischen Verschiebung vernachlässigen. Außerdem soll $\Delta = (2^1 J_{IS})^{-1}$ sein. Es resultiert (111), wobei für $S_{x,y}$ gilt: S_x

$$\begin{aligned} n\gamma_I I_z &\xrightarrow{90^\circ(I)} n\gamma_I I_x \xrightarrow{\Delta} n\gamma_I 2I_y S_z \xrightarrow{90^\circ(S)} n\gamma_I 2I_y S_x \xrightarrow{\Delta} \\ n\gamma_I 2^n I_y S_{xy} (I_z)^{n-1} &\xrightarrow{\Theta} 2^n S_{xy} (I_z)^n n\gamma_I \sin \Theta \cos^{n-1} \Theta \xrightarrow{\Delta} S_x n\gamma_I \sin \Theta \cos^{n-1} \Theta \end{aligned} \quad (111)$$

für gerade n , S_y für ungerade n . Ursache für den Cosinusterm ist die Kopplung der nicht an der Entstehung des heteronuclearen Antiphase-Terms $2I_y S_z$ beteiligten Protonen, deren Kopplung bei transversaler $S_{x,y}$ -Kohärenz in der zweiten Hälfte der Pulssequenz wirksam ist. Die Transferfunktion ergibt sich wie im INEPT-Experiment also zu $\sin \Theta \cos^{n-1} \Theta$, allerdings ist Θ hier ein einstellbarer Pulswinkel und *nicht* von J abhängig.

Bisher haben wir die J -Abhängigkeit der Transferamplitude noch nicht diskutiert. J und Δ wurden vielmehr über $J = (2\Delta)^{-1}$ verknüpft. Wir beginnen also von vorne und richten unser Augenmerk auf Terme, die von SI_m -Gruppen stammend im editierten Spektrum einer SI_m -Gruppe erscheinen. Ein derartiger „Cross-talk“ ist für ein n -Spinsystem möglich, wenn vor dem Θ -Puls ein Produktoperator $S_y I_z (I_z)^{m-1}$ auftritt. Daraus folgt sofort $n \geq m$. Dieser Operator verhält sich beim Editierprozeß wie eine SI_m -Gruppe. Er wird gemäß (112) gebildet. Θ nimmt die Werte 45° , 90° und 180° an^[300].

$$\begin{aligned} n\gamma_I I_z &\xrightarrow{90^\circ(I)} n\gamma_I I_x \xrightarrow{\Delta} n\gamma_I 2I_y S_z \sin \pi J \Delta \xrightarrow{90^\circ(S)} n\gamma_I 2I_y S_x \sin \pi J \Delta \\ &\xrightarrow{\Delta} n\gamma_I^{(m-1)} (\sin \pi J \Delta)^m (\cos \pi J \Delta)^{n-m} 2^m I_y S_x (I_z)^{m-1} \\ &\xrightarrow{\Theta(I)} n\gamma_I^{(m-1)} (\sin \pi J \Delta)^m (\cos \pi J \Delta)^{n-m} 2^m S_x (I_z)^m \sin \Theta \cos^{m-1} \Theta \\ &\xrightarrow{\Delta} n\gamma_I^{(m-1)} (\sin \pi J \Delta)^{2m} (\cos \pi J \Delta)^{2(n-m)} S_x \sin \Theta \cos^{m-1} \Theta \end{aligned} \quad (112)$$

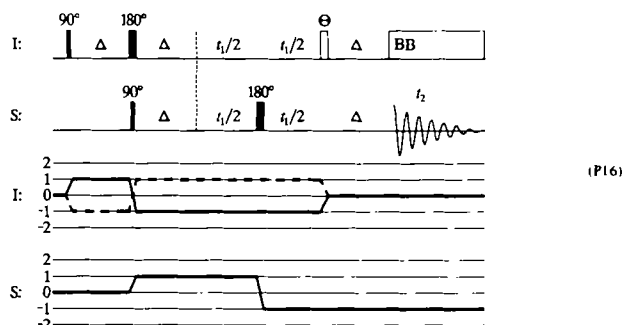
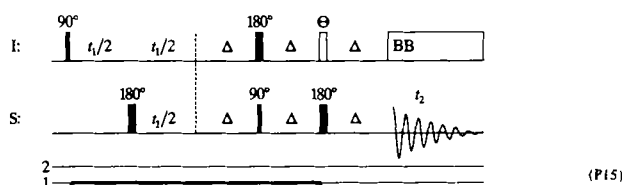
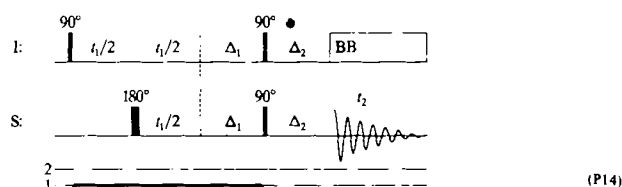
Tabelle 8. Relative Signalintensitäten bei Editing mit der DEPT-Sequenz unter der Annahme einer 10proz. Abweichung der Kopplung vom Idealwert.

	CH	Intensität von CH_2	CH_3
CH-Subspektrum	1.0	0.02	0.002
CH_2 -Subspektrum	0.0	1.9	0.14
CH_3 -Subspektrum	0.0	-0.0	2.89

Tabelle 8 enthält das Editiererergebnis für eine 10proz. Abweichung von der idealen Kopplung $^1J_{IS} = (2\Delta)^{-1}$. Das Ergebnis ist bedeutend besser als das des INEPT-Experiments (Tabelle 7). Weitere Verbesserungen lassen sich durch DEPT-GL^[301] erreichen.

3.2.5. Heteronucleare Verschiebungskorrelation

Sowohl das INEPT- als auch das DEPT-Experiment dienen als eindimensionale Vorstufen für die heteronucleare Verschiebungskorrelation über $^1J_{IS}$ -Kopplungen. Ein 2D-NMR-Experiment erhält man, indem nach dem ersten 90° -Anregungspuls (Präparation) eine Evolutionsperiode eingeführt wird (variable t_1 -Zeit). Bei heteronuclearen Experimenten geschieht dies meist unter Refokussierung der heteronuclearen Kopplung durch einen 180° -Puls auf die Heterokerne. Man bekommt dann Spektren, die in ω_1 keine Heterokopplung enthalten. Ausgehend von der INEPT-Sequenz erhält man als Pulssequenz für ein H_X -COSY-Experiment^{[170-173][*]} (P14) und ausgehend von der DEPT-Sequenz für ein DEPT-COSY-Experiment^[174-177] (P15) und (P16). (P15) und (P16) ergeben dasselbe Spek-



[*] Wir verwenden hier auch für heteronucleare Experimente die Bezeichnung COSY (Correlated Spectroscopy), obwohl COSY oftmals nur für homonucleare Experimente benutzt wird. Für H_X -COSY findet man auch Bezeichnungen wie HETCOR oder einfach Verschiebungskorrelation.

trum, obwohl (P16) einen Puls weniger enthält. Die Entwicklung der chemischen Verschiebung der Protonen findet bei (P15) vor der Anregung transversaler Heterokernmagnetisierung statt, bei (P16) danach.

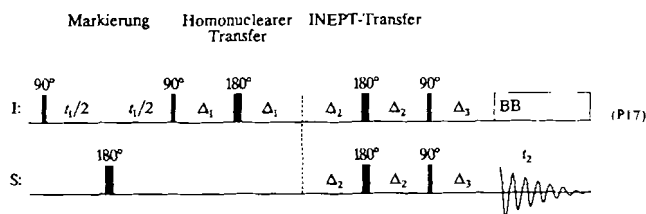
In der auf dem DEPT-Experiment basierenden Sequenz ist die Magnetisierung voll refokussiert, d. h. für $t_1 = t_2 = 0$ entwickelt sich keine chemische Verschiebung. Dies ist von Vorteil für die Phasenkorrektur, da man nur kleine frequenzabhängige Phasenkorrekturwerte erhält. Das Editieren ist genauso möglich wie bei der 1D-Variante^[174-176, 302]. Die auf dem INEPT-Experiment basierende Sequenz dagegen eignet sich schlechter, wenn man Spektren mit reinen Phasen erhalten will, da sich für $t_1 = t_2 = 0$ sowohl die chemischen Verschiebungen der Protonen in Δ_1 als auch die chemischen Verschiebungen der Heterokerne in Δ_2 entwickeln. Dies führt zu großen Phasenkorrekturen erster Ordnung in ω_1 und ω_2 ^[171, 172].

Auch die COLOC-Sequenz sowie ihre Variante mit einem BIRD-Puls (siehe Abschnitt 3.2.8) lassen sich zur heteronuclearen Verschiebungskorrelation über eine Bindung einsetzen^[181, 182], wenn die Auflösungsanforderungen in t_1 (Protonen) gering sind. Wir sehen in „constant-time“-Varianten von INEPT- und DEPT-Transfer nur dann einen Vorteil, wenn man die J_{IS} -Abhängigkeit der Transferamplitude durch nicht-gleichzeitige Anwendung der beiden für die Evolution ursächlichen wandernden 180° -Pulse beseitigt^[181].

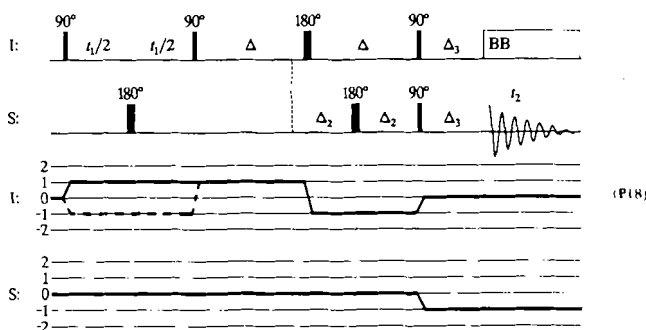
3.2.6. Heteronucleare Relayed-Experimente

H-Relayed-H,X-COSY

Kombinationen von Sequenzen, die zu weiteren heteronuclearen Experimenten führen, sind möglich. So kommt man zur H-Relayed-H,X-COSY-Sequenz^[213, 214] (P17), indem man einen zusätzlichen H,H-Polarisationstransfer in die H,X-COSY-Sequenz (P14) einbaut. Nach der Evolution mit Heterokernentkopplung überträgt man die Polarisierung von I^1 auf weitere mit I^1 koppelnde I-Kerne. Die Entwicklung der chemischen Verschiebungen der I-Kerne in diesem Relay-Transfer wird durch den ersten $180^\circ(I)$ -



Puls refokussiert. Auch im darauffolgenden INEPT-Transfer ist es von Vorteil, die chemische Verschiebung der I-Kerne zu refokussieren. Die beiden $180^\circ(I)$ -Refokussierungspulse lassen sich ohne Veränderung der Wirkung durch einen einzigen 180° -Puls in der Mitte beider Delays ($2\Delta_1$ und $2\Delta_2$) ersetzen. Da jeder zusätzliche Puls eine weitere Fehlerquelle ist, zieht man generell eine Sequenz mit weniger Pulsen vor. Somit ergibt sich mit $\Delta = \Delta_1 + \Delta_2$ für das heteronucleare H-Relayed-H,X-COSY-Experiment die Sequenz^[215, 216] (P18). Ein Beispiel für ein H-Relayed-H,C-COSY-Spektrum zeigt Abbildung 35b.



Man erkennt, daß im Vergleich zum H,C-COSY-Spektrum (Abb. 35a) zusätzliche Signale (Relayed-Peaks) auftreten (in Abb. 35b durch Pfeile gekennzeichnet). Sie entstehen durch Fragmente $H^1-H^2-C^2$ und liefern daher auf indirektem Weg Informationen über Kohlenstoffkonnecti-

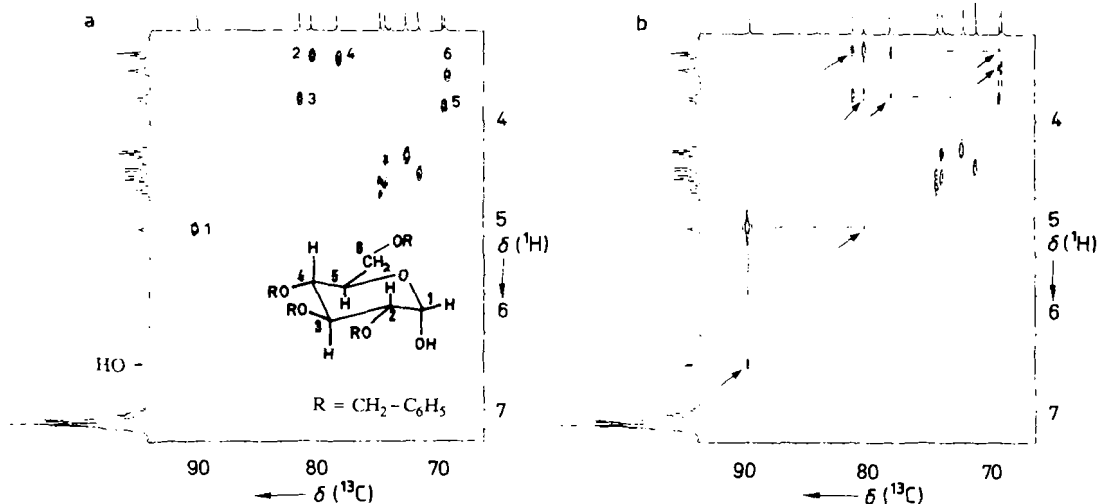
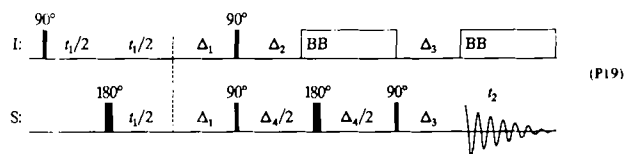


Abb. 35. a) H,C-COSY-, b) H-Relayed-H,C-COSY-Spektrum von Tetrabenzylglucose in $[D_6]DMSO$. Die Zuordnung der CH-Kreuzsignale des Zuckers ist in (a) angegeben. Sie folgt eindeutig ohne zusätzliche Annahmen aus dem Relayed-Spektrum (b), wenn man die Intensitäten der Protonensignale hinzuzieht (das Signal 6 wird durch zwei Protonen an einem Kohlenstoffatom verursacht und kann daher als Startpunkt für die sequentielle Zuordnung genutzt werden).

vitäten^[215]. So ist es mit dem Spektrum in Abbildung 35 möglich, die Ringprotonen und -kohlenstoffatome der Tetraacylgucose zuzuordnen. Daneben sieht man aber auch die auf direkter H^2, C^2 -Kopplung beruhenden Signale. Das liegt daran, daß der Relayed-Transfer ebenso Einquanten-Kohärenz benutzt wie die auf H^1 verbleibende Magnetisierung und damit durch Phasencyklen nicht unterdrückt werden kann (siehe homonucleares Relayed-Experiment in Abschnitt 3.1.6). Allerdings kann man bei Bedarf die unterschiedliche Größe der Kopplungskonstanten (z. B. $^1J_{HC}$ und $^nJ_{HC}$) benutzen, um mit einem Low-Pass- J -Filter die H, X -COSY-Anteile herauszufiltern (siehe Abschnitt 3.2.8).

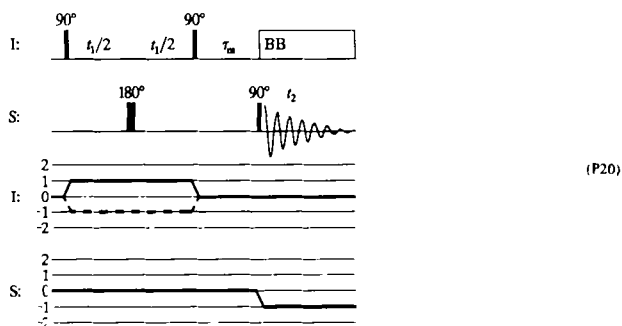
X-Relayed-H,X-COSY

Eine weitere Variante der heteronuclearen Relayed-Spektroskopie ist das X-Relayed-H,X-COSY-Experiment^[222, 223]. Die Pulssequenz ist (P19). Dieses Experiment dient ebenso wie das INADEQUATE-Experiment (siehe Abschnitt 3.1.8) zur Aufklärung von Verknüpfungen, an denen quartäre Kohlenstoffatome beteiligt sind. Die Extraktion von Kopplungskonstanten $^1J_{CC}$ ist ebenfalls möglich.



3.2.7. Heteronucleares NOESY-Experiment

Das heteronucleare NOESY-Experiment (P20)^[203–207, 368] ist eine fast direkte Übertragung des homonuclearen Experiments (P2). Heteronucleare NOEs sind aber häufig zu klein, um bei größeren Molekülen sinnvoll gemessen werden zu können.



3.2.8. Filter und deren Anwendungen

Wichtige Instrumente, um die bisher besprochenen heteronuclearen Pulssequenzen zu modifizieren, sind der Low-Pass- J -Filter^[303] und BIRD-Pulse^[304]. Bei großen Unterschieden in den Kopplungskonstanten $^1J_{IS}$ und $^nJ_{IS}$ und bei hoher „Verdünnung“ des S-Kerns sind selektive Manipulationen derjenigen I-Kerne möglich, die eine $^1J_{IS}$ -Kopplung zu einem S-Kern aufweisen. Im Isotopomer A von Abbildung 36 würden H^1 und H^2 von H^3 aufgrund der $^1J_{CH}$ -Kopplung unterschieden werden können; umgekehrt gilt für das Isotopomer B.

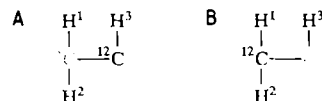


Abb. 36. Isotomere eines CH_2CH -Fragments. Jedes Signal in einem ^{13}C -NMR-Spektrum kommt von einem anderen Isotopomer der untersuchten Verbindung.

BIRD

Wir betrachten den „Puls-Sandwich“^[304] (P21) mit $\Delta = (2^1J_{IS})^{-1}$. Für I-Kerne, die nicht direkt an einen S-Kern gebunden sind, ist dieser BIRD $_x$ -Puls im wesentlichen ein 360° -Puls (Weitbereichs- und homonucleare



Kopplungen können wegen der Kürze der Delays in guter Näherung vernachlässigt werden). Für einen I-Kern, der über $^1J_{IS}$ mit einem S-Kern wechselwirkt, erhalten wir dagegen (für $\Delta = (2J)^{-1}$) die Gleichungen (113) und (114). Der BIRD $_x$ -Puls wirkt also auf die Spins von I-Kernen, die mit dem S-Kern koppeln, wie ein 180°_y -Puls, auf die von I-Kernen dagegen, die nicht mit dem S-Kern koppeln, wie ein 0° -Puls.

$$I_x \xrightarrow{90^\circ_z} I_x \xrightarrow{\Delta} 2I_yS_z \xrightarrow{180^\circ_x(I,S)} 2I_yS_z \xrightarrow{\Delta} -I_x \xrightarrow{90^\circ_z} -I_x \quad (113)$$

$$I_y \xrightarrow{90^\circ_z} I_x \xrightarrow{\Delta} I_x \xrightarrow{180^\circ_x(I,S)} -I_x \xrightarrow{\Delta} -I_x \xrightarrow{90^\circ_z} I_y \quad (114)$$

Ändert man die Phase des $180^\circ(I)$ -Pulses auf y (BIRD $_y$, P22), so kehrt sich die Wirkung des BIRD-Pulses um.



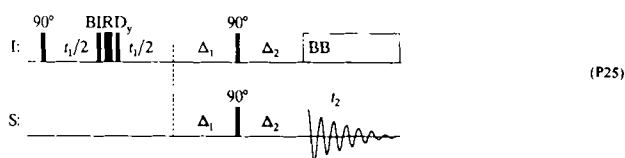
Nunmehr bleiben die Spins von I-Kernen, die eine $^1J_{IS}$ -Kopplung aufweisen, unverändert, und die von I-Kernen ohne $^1J_{IS}$ werden invertiert. Eine andere Repräsentation von BIRD $_y$ ist (P23) und von BIRD $_x$ (P24). Anwendungen von BIRD-Pulsen bei der Untersuchung von Korrelationen zwischen Protonen und Kohlenstoffkernen werden in den folgenden Abschnitten vorgestellt.



ω_1 -entkoppelte Verschiebungskorrelation

In der H,C-Verschiebungskorrelation erhält man eine Überlagerung von Spektren verschiedener Isotopomere. Eine Linie im ^{13}C -NMR-Spektrum bedeutet immer, daß nur das zu diesem Signal gehörende Kohlenstoffatom im Molekül ein ^{13}C -Isotop ist. Folglich sind nur die Protonen, die direkt an dieses ^{13}C -Atom gebunden sind, in unserem Sprachgebrauch kohlenstofftragend, alle anderen nicht.

ω_1 -Entkopplung in der Verschiebungskorrelation^[178] (P25) erreicht man, indem man die passiven, d.h. nicht-kohlenstofftragenden Protonen nach $t_1/2$ selektiv invertiert und die aktiven unbeeinflusst läßt^[178–180]. Dies gelingt mit dem BIRD_y-Sandwich. Der dabei eigentlich benötigte 180° (S)-Puls gibt mit dem 180° (S)-Entkopplungspuls einen 360° -Puls und kann daher entfallen. Homonucleare Kopplungen zwischen geminalen Protonen werden nicht refokussiert, weil bei geminalen Protonen immer beide kohlenstofftragend sind. Das gleiche Konzept läßt sich bei einem DEPT-COSY-Experiment einsetzen^[305].



COLOC bei protonentragenden Kohlenstoffatomen

In der Refokussierungsphase Δ_2 des COLOC-Experiments entwickeln sich auch die schnell oszillierenden $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplungen mit $\cos \pi ^1J_{\text{CH}} \Delta_2$ ^[191]. Auch geringe Schwankungen von $^1J_{\text{CH}}$ haben daher großen Einfluß auf die Transferamplitude. Dieses Problem kann durch einen BIRD_x-Puls gelöst werden^[195], der die Magnetisierung von Protonen invertiert, die an ^{13}C -Atome gebunden sind. So werden selektiv die $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplungen in Δ_2 refokussiert^[194, 195, 306–308], während die Weitbereichskopplungen unbeeinflusst bleiben.

Der BIRD_y-Puls in der t_1 -Zeit des COLOC-Experiments wird zur Unterscheidung von $^2J_{\text{CH}}$ - und $^3J_{\text{CH}}$ -Kopplungen in long-range-Korrelationen für protonentragende ^{13}C -Atome genutzt (XCORFE^[194]). Dabei werden die beiden wandernden 180° -Pulse im COLOC-Experiment (P12) durch einen BIRD_y-Puls ersetzt. Dieser hat auf die Protonen, die an ein ^{13}C -Atom gebunden sind (H^1 im Fragment $^{13}\text{CH}^1-^{12}\text{CH}^2-^{12}\text{CH}^3$), im Unterschied zu den übrigen Protonen keinen Einfluß. Folglich entwickeln die mit H^1 koppelnden (durch BIRD_y invertierten) Protonen H^2 eine $^3J_{\text{H}^1\text{H}^2}$ -Kopplung. Ist diese genügend groß, so beobachtet man an den Kreuzsignalen für CH^2 die entsprechende Aufspaltung (Dublett für $^{13}\text{CH}-^{12}\text{CH}^2$, Doppeldublett für $^{13}\text{CH}_2-^{12}\text{CH}^2$ usw.). Protonen dagegen, die über $^3J_{\text{CH}}$ mit diesem Kohlenstoffkern koppeln (z.B. im Fragment $\text{H}^{12}\text{C}-^{12}\text{C}-^{13}\text{CH}_n^1$), weisen zum entsprechenden Proton H^1 nur eine sehr kleine $^4J_{\text{HH}}$ -Kopplung auf, die nicht zu einer meßbaren Aufspaltung Anlaß gibt^[194]. Auf diese Weise kann man die Kopplung über zwei Bindungen von der über drei Bindungen unterscheiden.

Low-Pass-J-Filter

Bei der Korrelation über Weitbereichskopplungen oder auch im Relayed-Experiment möchte man manchmal direkte I,S-Korrelationen unterdrücken, weil diese meist zu intensiven Kreuzsignalen führen und dadurch schwächere

Signale stören können. Die Unterdrückung von $^1J_{\text{IS}}$ -Kreuzsignalen gelingt mit dem Low-Pass-J-Filter^[303] (P26). Für



$\Delta = (2^1J_{\text{IS}})^{-1}$ findet man nach dem 90° (S)-Puls für kohlenstofftragende Protonen $I_x S_y$ oder $-I_x S_y$ je nach Phase des Pulses. Die Magnetisierung der an den S-Kern direkt gebundenen I-Kerne wird also durch Addition völlig vernichtet. Die Magnetisierung von I-Kernen mit Weitbereichskopplungen zu den S-Kernen wird dagegen nur leicht geschwächt, und zwar um den Faktor $\cos \pi ^n J_{\text{IS}} \Delta$.

Low-Pass-J-Filter lassen sich gut in ^1H , ^{13}C -Korrelationsexperimenten einsetzen, da die $^1J_{\text{CH}}$ - und $^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungen jeweils in engen Bereichen liegen. Details zu einer Perfektionierung dieser Filter finden sich in^[303]. Sie werden in der heteronuclearen Relayed^[303] und der COLOC-Spektroskopie^[197] eingesetzt.

3.2.9. Composite-Pulse

Bisher haben wir immer mit idealen Pulsen gearbeitet, d.h. beispielsweise ein 90° -Puls soll für alle Kerne einer Sorte exakt 90° sein sowie keine Phasenabweichung und die Länge Null haben. Bei realen Pulsen gibt es Komplikationen aufgrund von Off-Resonance-Effekten und B_1 -Inhomogenitäten. Off-Resonance-Effekte kommen dadurch zustande, daß die chemische Verschiebung während der Pulse nicht „abgeschaltet“ ist. Dadurch wird die Magnetisierung um ein getiltetes Feld und um einen größeren Winkel als den maximalen Pulswinkel gedreht. B_1 -Inhomogenitäten haben ihre Ursache in der Imperfektion der Senderspulen, die idealerweise über ein Probenvolumen ein konstantes Feld und außerhalb desselben überhaupt kein Feld erzeugen müßten.

Composite-Pulse dienen dazu, diese Imperfektionen zu beheben. Die Literatur darüber ist sehr umfangreich, dennoch sind Composite-Pulse außer bei Entkopplungs- und TOCSY-Sequenzen kaum eingesetzt worden. Wir beschränken uns daher auf wenige Beispiele.

180°-Puls

Der häufigste Puls ist $90_x^\circ - 180_y^\circ - 90_x^\circ$ ^[309–327]. Er erreicht eine Inversion von z-Magnetisierungen über einen großen Bereich von chemischen Verschiebungen und ist mäßig empfindlich auf B_1 -Inhomogenitäten. Anwendung findet er z.B. bei der Ermittlung von T_1 -Zeiten für ^{13}C -Resonanzen und bei Verschiebungskorrelationen in der Mitte von t_1 .

90°-Puls

Der 90° -Puls ist bezüglich Offset-Effekten weitgehend selbstkompensierend. Ebenfalls weitgehende Kompensation von B_1 -Inhomogenitäten erreicht man durch $90_x^\circ - 90_y^\circ$ ^[309, 310]. Man bemerke, daß dieser Composite-Puls gerade ein halber Composite-Inversionspuls ist.

Bei der Konstruktion von Pulssequenzen mit Composite-Pulsen muß man Vorsicht walten lassen, da das bloße Ersetzen der einfachen Pulse durch zusammengesetzte Pulse nicht zum Ziel führt. Der Grund dafür sind die durch solche Pulse eingeführten zusätzlichen Phasen. Ein

Beispiel für die Konstruktion einer Pulssequenz mit Composite-Pulsen findet sich in [320]. Composite-Pulse weitgehend ohne Phasenverzerrungen finden sich in [312, 323, 326]. Das sind Pulse, die sowohl Offset-Effekte als auch B_1 -Inhomogenitäten kompensieren.

3.2.10. Heteronucleare Entkopplung

Die meisten heteronuclearen Experimente arbeiten mit heteronuclearer Breitbandentkopplung während der Detektion. Das „Abschalten“ der heteronuclearen Kopplung führt zur Intensitätssteigerung, da die Multiplettaufspaltung aufgrund dieser Kopplung entfällt. Die Problematik der heteronuclearen Breitbandentkopplung besteht in dem zum Teil enorm großen Bereich für die chemische Verschiebung der zu entkoppelnden Kerne. So umfaßt bei 300 MHz der Verschiebungsbereich von Protonen etwa 3 kHz, der von ^{13}C aber bereits etwa 15 kHz und der von ^{19}F ungefähr 60 kHz. Man kann aber nicht mit beliebig hohen Entkopplerleistungen arbeiten. Hauptziel war also, Pulssequenzen zu finden, die möglichst offset-unabhängig entkoppeln.

Stark vereinfacht ausgedrückt muß es das Ziel von Entkopplungssequenzen sein, den zu entkoppelnden Spin derart zu rotieren, daß α - und β -Zustände gleich häufig sind. Der Wechsel vom α - zum β -Zustand muß dabei schneller sein als die Spin-Spin-Wechselwirkung, denn die Struktur eines Multipletts z. B. im ^{13}C -NMR-Spektrum beruht ja gerade darauf, daß α - und β -Zustand des koppelnden Kerns wohl definiert sind.

Die erste Methode der heteronuclearen Breitbandentkopplung, die stochastische Modulation des Entkopplerfelds [328], erzielte gute Resultate. Dabei werden die Spins der zu entkoppelnden Kerne stochastisch auf der Einheitskugel herumgeführt, d. h. jede Orientierung der Magnetisierung ist gleich wahrscheinlich.

Bald jedoch fand man bessere Methoden in Composite-Puls-Entkopplungssequenzen. Die erste Sequenz dieser Art, MLEV mit 16 Composite-Pulsen, benutzt einen 180° -Composite-Puls ($90_x^\circ - 180_y^\circ - 90_x^\circ$) [309, 315], um eine möglichst offset-unabhängige Inversion der zu entkoppelnden Kerne zu erreichen. Expansion nach einer ausgeklügelten Methode [283, 284] führt zur Kompensation von Imperfektionen immer höherer Ordnung. MLEV-16 hat eine Bandbreite von etwa $\pm \gamma B_2$.

Eine weitere Sequenz, die sich heute praktisch generell zur ^1H -Entkopplung bei der Aufnahme von ^{13}C -NMR-Spektren durchgesetzt hat, ist WALTZ-16. Hier werden im Gegensatz zu MLEV-Sequenzen 90° -Pulse permutiert. Der zugrundeliegende Inversionspuls ist $90_x^\circ - 180_x^\circ - 270_x^\circ$. WALTZ hat ebenfalls einen Offset-Bereich von etwa $\pm \gamma B_2$. Allerdings wird eine weit bessere Skalierung der Kopplung erreicht. Präzisionsmessungen ergaben Linienverbreiterungen bei ^{13}C -NMR-Linien von nur etwa 10 mHz [329–331]. WALTZ ist zudem bezüglich Phasenfehlern weitaus weniger empfindlich als MLEV [333].

Zur Entkopplung von Kernen mit sehr großen Verschiebungsbereichen eignet sich die GARP-Sequenz [332]. Sie erreicht Entkopplung über einen Bereich von $\pm 2.5 \gamma B_2$ und eignet sich daher beispielsweise für die Entkopplung bei inversen H,C-Experimenten. Einen sehr guten Überblick über Entkopplungssequenzen findet man in [333].

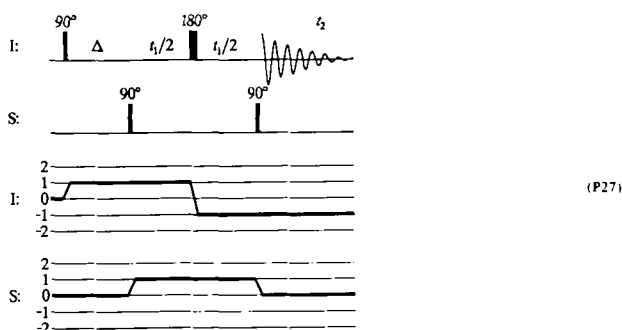
3.2.11. Inverse Spektroskopie

Bei allen bisher behandelten heteronuclearen Spektroskopien wird die Protonenmagnetisierung angeregt und die Heterokernmagnetisierung beobachtet. Will man die Empfindlichkeit einer Pulssequenz abschätzen, so kommt zu den sequenzspezifischen Transferfunktionen daher wie in Abschnitt 3.2 erläutert immer ein sequenzunabhängiger Faktor $\gamma_{\text{H}}(\gamma_{\text{X}})^{3/2}$ hinzu. Inverse Spektroskopie geht ebenfalls von der Protonenmagnetisierung aus, detektiert diese aber auch, wodurch für den sequenzunabhängigen Empfindlichkeitsfaktor $(\gamma_{\text{H}})^{5/2}$ erhalten wird. Die Empfindlichkeit bei der inversen H,C-Korrelation ist also achtmal so groß wie bei der konventionellen. Der Unterschied wird natürlich für Heterokerne mit kleinerem γ wie ^{15}N noch größer. Dieser beträchtliche Intensitätsgewinn macht die inverse Spektroskopie sehr attraktiv. Problematisch ist allerdings bei Proben mit natürlicher Häufigkeit der Isotope die Unterdrückung der Signale von Protonen, die nicht an NMR-aktive Heterokerne gebunden sind. So muß die Unterdrückung bei ^{13}C 1 zu 200 und bei ^{15}N gar 1 zu 600 sein. Dies stellt hohe Anforderungen an die Stabilität des NMR-Spektrometers. Obwohl der Phasencyclus diese Signale unterdrückt, ist ein starkes t_1 -Rauschen (siehe Anhang) kaum zu vermeiden. Methoden, um diese störenden Signale auch noch zu unterdrücken, werden wir daher etwas später zeigen. Häufig hilft man sich aber auch durch Anreicherung der NMR-aktiven Heterokerne.

Tabelle 9. Vergleich der Empfindlichkeiten von heteronuclearen NMR-Experimenten in Abhängigkeit von der Art der Anregung und Detektion.

Experiment	S/N	Vergleichsfaktor	^{13}C	^{15}N
a) Direkte Observation	$\gamma_{\text{X}}(\gamma_{\text{X}})^{3/2}$		1.0	1.0
b) INEPT	$\gamma_{\text{H}}(\gamma_{\text{X}})^{3/2}$			
verglichen mit a)		$(\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{X}})$	4.0	9.9
c) Inverses INEPT	$\gamma_{\text{X}}(\gamma_{\text{H}})^{3/2}$			
verglichen mit a)		$(\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{X}})^{3/2}$	7.9	31.0
verglichen mit b)		$(\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{X}})^{1/2}$	2.0	3.1
d) Inverse Verschiebungskorrelation	$\gamma_{\text{H}}(\gamma_{\text{H}})^{3/2}$			
verglichen mit a)		$(\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{X}})^{5/2}$	31.6	306.0
verglichen mit b)		$(\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{X}})^{3/2}$	7.9	31.0

Tabelle 9 vergleicht die Empfindlichkeiten verschiedener Detektionsmöglichkeiten. Die erste Spalte gibt dabei die generellen S/N-Verhältnisse an, die zweite die sich daraus ergebenden Vergleichsfaktoren. Die letzten beiden Spalten zeigen am Beispiel von ^{13}C - und ^{15}N -NMR-Messungen den theoretisch möglichen Intensitätsgewinn bei inverser Detektion. Die einfachste Sequenz (P27) ist zugleich die am häufigsten verwendete.



Wir wollen nur die für ein $I_k S_l$ -Kreuzsignal relevanten Operatoren betrachten: Die transversale Protonenmagnetisierung nach dem ersten 90° -Puls entwickelt homonucleare Kopplung während $\Delta + t_1 + t_2$, chemische Verschiebung dagegen nur während $\Delta + t_2$. Das Protonennetzwerk führt daher zur Transferamplitude (115). Damit haben wir alle passiven Protonen beschrieben. Es fehlt nur noch der Beitrag durch die heteronucleare Kopplung zwischen I_k und S_l gemäß (116), denn genau dieser Beitrag wird durch den \pm -Phasencyclus für den $90^\circ(S)$ -Puls selektiert. Man erhält als Transferamplitude für die Korrelation $I_k S_l$ schließlich (117).

$$\prod \cos \{ \pi J_{kl} (t_1 + \Delta + t_2) \} \cos \{ \Omega_{I_k} (\Delta + t_2) \} \quad (115)$$

$$I_{kz} \xrightarrow{90^\circ} I_{ky} \xrightarrow{\Delta} 2I_{ky}S_{lz} \xrightarrow{90^\circ(S)} 2I_{ky}S_{lx} \xrightarrow{t_1} 2I_{ky}S_{lx} \cos \Omega_{S_l} t_1 \xrightarrow{90^\circ(S)} -2I_{ky}S_{lx} \cos \Omega_{S_l} t_1 \xrightarrow{t_2} + I_{kz} \cos \Omega_{S_l} t_1 \sin \pi J_{ls} t_2 \quad (116)$$

$$\prod \cos \{ \pi J_{kl} (t_1 + \Delta + t_2) \} \cos \Omega_{S_l} t_1 \cos \{ \Omega_{I_k} (\Delta + t_2) \} \sin \pi J_{ls} t_2 \quad (117)$$

Das Multipliettum ist dem in einem 2D- J -Spektrum ähnlich (Phasenmodulation in t_1). Man kann daher keine reinen Phasen bekommen. Für den Idealfall, d.h. alle Kopplungskonstanten sind genügend unterschiedlich und größer als die Linienbreite, erhält man z. B. für ein Spinsystem $CH^1-CH^2H^3$ das in Abbildung 37 links gezeigte Muster. Im entsprechenden konventionellen Spektrum ergibt sich das Muster von Abbildung 37 rechts.

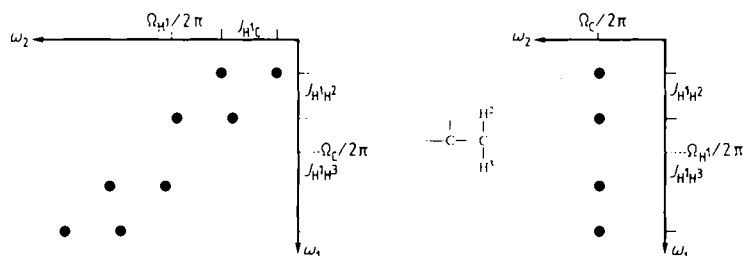


Abb. 37. Multipliettaufspaltung des $H^1,^{13}C$ -Kreuzsignals eines $CH^1-CH^2H^3$ -Fragments in einem inversen Spektrum (links) verglichen mit der in einem konventionellen H,C -COSY-Spektrum (rechts).

Man gewinnt beispielsweise durch die inverse C,H-Verschiebungskorrelation einen Faktor vier in der Empfindlichkeit. Den theoretischen Faktor acht erhält man nicht wegen der Aufspaltung in doppelt so viele Linien (siehe Abb. 37). Bekanntlich muß die Meßzeit in einem NMR-Experiment um den Faktor n^2 erhöht werden, wenn die Empfindlichkeit um den Faktor n zunehmen soll. Dies bedeutet für den Vergleich inverse/konventionelle C,H-Verschiebungskorrelation, daß im Fall der inversen Spektroskopie wegen der viermal größeren Empfindlichkeit die Meßzeit 16mal kürzer sein kann als bei der konventionellen Spektroskopie. Derartige mit der Pulssequenz verknüpfte Empfindlichkeitsfaktoren müssen immer berücksichtigt werden, wenn man einen genauen Empfindlichkeitsvergleich anstellen will. Für den Vergleich inverse/konventionelle Verschiebungskorrelation ist im gewählten Beispiel nur die Multiplizität der Protonensignale aufgrund der Kopplung zu ^{13}C von Interesse. Sie beträgt zwei.

Einen weiteren Empfindlichkeitsgewinn kann man erreichen, indem man nach dem zweiten $90^\circ(S)$ -Puls einen Refokussierungsdelay einführt und dann die Heterokerne entkoppelt. Dadurch entfällt die $^1J_{IS}$ -Kopplung in ω_2 und man gewinnt einen Faktor zwei in der Empfindlichkeit. Die inverse heteronucleare Verschiebungskorrelation mit Refokussierungsdelay sollte daher um den Faktor acht empfindlicher sein als die konventionelle Verschiebungskorrelation. Damit werden auch Proteine heteronuclearer Messungen zugänglich^[53].

Vorsättigung der nicht an NMR-aktive Heterokerne gebundenen Protonen

BIRD-Pulse, die wir schon im Zusammenhang mit der konventionellen heteronuclearen Spektroskopie (Abschnitt 3.2.8) kennengelernt haben, sind bei der inversen Spektroskopie sehr wichtig. So können mit einem BIRD $_y$ -Puls die Signale der nicht an NMR-aktive Heterokerne gebundenen Protonen unterdrückt werden. Der BIRD $_y$ -Puls invertiert die Spins solcher Protonen und nach einer Wartezeit von $T_1^H \times \ln 2$ ist das Signal dieser Kerne minimal (Null-durchgang). Beginnt man nun mit der Sequenz der inversen Verschiebungskorrelation, werden nur Kohärenzen der an NMR-aktive Heterokerne gebundenen Protonen erzeugt. Unerwünschte Signale werden daher viel besser unterdrückt^[51]. Dieses Verfahren ist nur für die Korrelation über direkte Kopplungen einsetzbar. Unterschiedliche T_1 -Zeiten der Protonen verhindern, daß alle unerwünschten Signale wirklich null sind. Zudem vermindern NOE-Effekte der an ein Heteroatom gebundenen Protonen zu nicht an Heteroatome gebundenen Protonen die Intensität der Kreuzsignale zum Teil erheblich^[369].

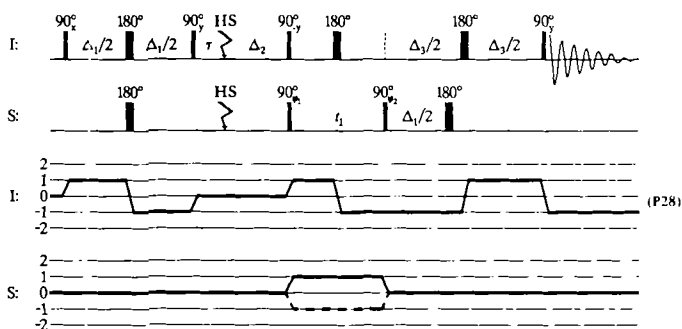
Inverse Korrelation über Weitbereichskopplungen

Verlängert man den Delay Δ , so kann man auch inverse Korrelationen über heteronucleare Weitbereichskopplungen durchführen. Es ist selbstverständlich, daß man die üblichen Varianten, z. B. den Low-Pass- J -Filter, auch hier einfügen kann^[196]. Weitbereichskopplungen enthalten nicht nur wertvolle Informationen für die Signalzuordnung, sondern auch über die Konformation des Moleküls^[334]. Die quantitative Bestimmung von heteronuclearen Weitbereichskopplungen ist durch die inverse Spektroskopie erstmals mit guter Empfindlichkeit möglich^[335].

Inverse Relayed-Spektroskopie

Auch die Relayed-Spektroskopie wurde erfolgreich invers durchgeführt^[53]. Die Unterdrückung der Signale von nicht-kohlenstofftragenden Protonen geschieht wie folgt: Nach der Anregungssequenz $90_x(I) - \Delta_1/2 - 180_x(I,S) - \Delta_1/2$ wird die Antiphase-Magnetisierung $2I_x S_z$ durch einen $90_y(I)$ -Puls in longitudinale Zweispinordnung ($-2I_z S_z$) umgewandelt (siehe auch Abschnitt 3.4.2). Die verbleibende transversale Protonenmagnetisierung wird durch einen Homospoil-Puls (HS, siehe Anhang) zerstört, so daß die entsprechenden Protonensignale weitgehend unterdrückt werden. Die gesamte Pulssequenz hat die Form (P28).

Nach einer Erholungszeit Δ_2 beginnt die Sequenz wie schon in Gleichung (116) beschrieben: Nach den 90° -Pulsen auf beide Kernsorten liegt heteronucleare Doppelquanten-Kohärenz vor ($-2I_x S_x$), die in t_1 mit der chemischen Verschiebung des Heterokerns markiert wird. Der



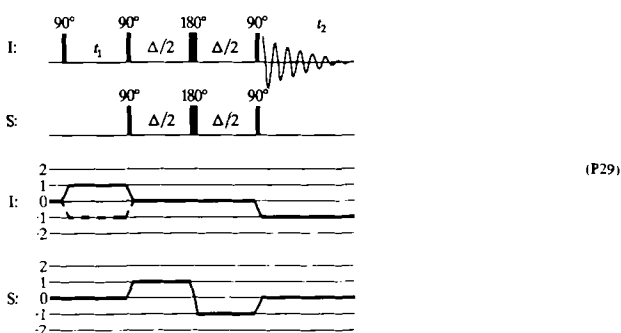
$90^\circ(S)$ -Puls verwandelt die Kohärenz in Antiphase-Magnetisierung ($2I_{xy}S_z$), die während Δ_1 refokussiert wird (I_{xy}). Während $t_1 + \Delta_3 + \Delta_1$ kann sich Antiphase-Magnetisierung zu einem weiteren Proton entwickeln ($2I_{xy}I_{zz}$), wobei der letzte $90^\circ(I)$ -Puls einen Kohärenz-Transfer auf einen weiteren I-Kern bewirkt. Mit dieser Pulssequenz gelang die weitgehende Zuordnung der Kohlenstoffsignale eines kleinen Proteins^[53]. Die Pulsfrequenz ließe sich übrigens dadurch verbessern, daß man den $90^\circ_y(I)$ -Puls nicht direkt nach Δ_2 , sondern vor den Beginn des Delays Δ_3 setzt. Dann entfiel die Modulation des Signals mit der homonuclearen Kopplung in t_1 .

3.3. Homonucleare Korrelationen über Heterokerne

In den folgenden Abschnitten sollen NMR-Experimente besprochen werden, die nicht Protonen- oder Heterokernkorrelationen liefern, sondern Korrelationen zwischen Protonen, von denen eines oder beide mit einem Heterokern koppeln. Zu dieser Kategorie von NMR-Experimenten gehören im wesentlichen X-Relayed-H,H-COSY sowie Sequenzen wie COSY, NOESY, TOCSY mit X-Filter oder X-Halbfilter.

3.3.1. X-Relayed-H,H-COSY

Das älteste Experiment ist das X-Relayed-H,H-COSY-Experiment^[220,221] (P29). Es korreliert Protonen in einem Fragment H—X—H. Die Magnetisierung wird dabei schrittweise von H auf X und wieder auf H übertragen. Während t_1 entwickelte I-Kern-Magnetisierung wird durch die beiden 90° -Pulse in S-Kern-Magnetisierung überführt. Der zweite I-Kern wird durch die heteronucleare Kopplung aktiviert, und die S-Kern-Magnetisierung wird letztlich auf diesen I-Kern übertragen. Die Sequenz detektiert demnach ein lineares H—X—H-Kopplungsnetzwerk. Anwendungen dieser Technik auf ^{31}P -NMR-Spektren sind beschrieben^[220,221].



3.3.2. X-Filter und X-Halbfilter

Neuerdings wurden X-Filter und X-Halbfilter^[151–153,336] (P30) eingeführt. Sie sind universelle Bausteine, die in jede homonucleare Pulssequenz integriert werden können.



Zweck der Filter ist es, an einer bestimmten Stelle in der Pulssequenz zu prüfen, ob ein Heterokern am Produktoperator beteiligt ist oder nicht. Kreuzsignale werden je nach dem Resultat dieser Prüfung unterdrückt oder selektiert. Man bemerke die Verwandtschaft mit dem Low-Pass-J-Filter. Kohärenzen mit einem S_z -Operator bleiben unverändert bei $90^\circ_x - 90^\circ_{-x}$, ändern jedoch ihr Vorzeichen bei $90^\circ_x - 90^\circ_x$. Kohärenzen ohne S_z -Operator sind gänzlich unbeeinflusst. Subtraktion der mit zwei derartigen Folgen erhaltenen Spektren unterdrückt alle Kohärenzen, die keinen S_z -Operator enthalten.

Eine Verallgemeinerung ist die Sequenz (P31), bei der sich Operatoren mit n S_z -Operatoren gemäß (118) verhalten.



$$S_z^n \longrightarrow S_z^n \cos^n \beta + \text{transversale Terme} \quad (118)$$

Man kann nun editieren und Subspektren erzeugen, die von einer ganz bestimmten Zahl von S_z -Operatoren stammen. Man erhält je nach n und in Abhängigkeit von der Phase β des Pulses die in Tabelle 10 aufgeführten Koeffizienten, mit denen die entsprechenden Transferfunktionen multipliziert werden müssen.

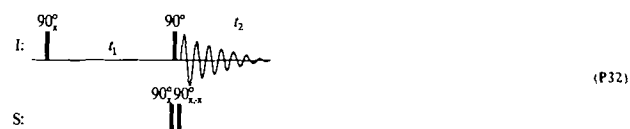
Tabelle 10. Koeffizienten für eine unterschiedliche Anzahl n von S_z -Operatoren in Abhängigkeit von der Phase β beim X-Filter.

n	$\beta = 0$	60	120	180°
0	1	-8	8	1
1	1	-4	-4	1
2	1	-1	-1	1
3	1	-2	2	-1

Im folgenden werden wir sehen, daß eine ganze Reihe nützlicher Sequenzen entsteht, je nachdem, an welcher Stelle einer Pulsfolge der X-Filter eingebaut wird.

X-Filter-COSY

Bei der Sequenz (P32)^[151] sollen nur Protonen Kreuzsignale ergeben, die gemeinsam mit einem Heterokern koppeln. Das erforderliche Kopplungsnetzwerk ist also I^1-S-I^2 . Der X-Filter wird daher zur gleichen Zeit wie der Mischpuls angewendet. Während Evolutions- und Detek-



tionszeit entwickeln sich bzw. refokussieren die heteronuclearen Antiphase-Terme. Der Transfer ergibt sich wie im konventionellen COSY-Experiment, nur daß die heteronucleare Kopplung berücksichtigt werden muß [Gl. (119)].

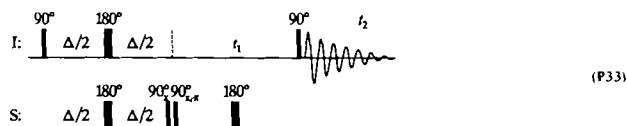
$$I_{1z} \xrightarrow{90^\circ_x} I_{1y} \xrightarrow{t_1} -2I_{1x}I_{2z} - 4I_{1x}I_{2z}S_z \xrightarrow{90^\circ_y} 2I_{1x}I_{2x} + 4I_{1x}I_{2x}S_z \quad (119)$$

Ein $90^\circ_x(S) - 90^\circ_x(S)$ -Puls während des Mischpulses invertiert nun alle Terme, die einen S_z -Operator enthalten.

Addiert man die Subspektren für $90^\circ_x - 90^\circ_x$ und $90^\circ_x - 90^\circ_{-x}$, so erhält man Kreuzsignale, die auf Operatoren ohne Beteiligung von Heterokernen zurückzuführen sind (d. h. die Kreuzsignale sind in-phase bezüglich der heteronuclearen Kopplung). Subtrahiert man die Subspektren dagegen, so erhält man nur Kreuzsignale für I-Kerne, die gemeinsam mit einem S-Kern koppeln, da die Terme ohne S_z -Operator eliminiert werden. Die heteronucleare Kopplung erscheint folglich in Antiphase. Das Spektrum ist gegenüber dem konventionellen stark vereinfacht, da es nur noch eine Untermenge der Kreuzsignale des Gesamtspektrums enthält.

Natürlich kann man den X-Filter statt bei einem 90° -Mischpuls (COSY) auch bei komplizierteren Mischsequenzen (MQF-COSY, E. COSY) anwenden. Die heteronucleare Kopplung ist dann jeweils als Antiphase-Aufspaltung im Spektrum vorhanden.

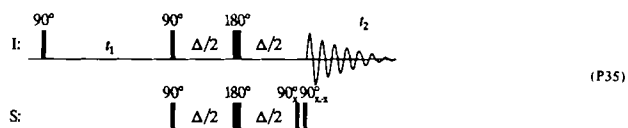
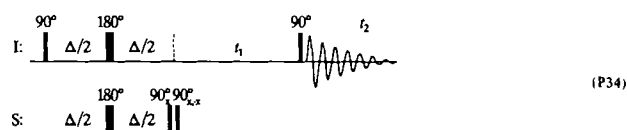
Eine Sequenz, die dieselbe Art von Kopplungsnetzwerk selektiert, ist (P33). Hier dient ein fester Delay



$\Delta = (2^1J_{IS})^{-1}$ zur Bildung von heteronuclearen Antiphase-Termen^[152]. Sie werden selektiert, wodurch am Anfang von t_1 nur noch Kohärenzen der Spins von S-gebundenen I-Kernen vorliegen. Wegen des 180° -Pulses in der Mitte von t_1 entwickelt sich keine heteronucleare Kopplung, so daß Kohärenz vom Typ $2I_{1x}I_{2z}S_z$ mit dem $90^\circ(I)$ -Mischpuls auf $2I_{1x}I_{2x}S_z$ übertragen wird. Diese Kohärenz refokussiert in t_2 . Strukturelle Voraussetzung ist also wieder ein I^1-S-I^2 -System mit $J_{12} \neq 0$. Diese Verwirklichung des X-Filters hat den Vorteil, daß sich in t_1 keine Multipllettstruktur aufgrund von heteronuclearer Kopplung entwickelt, durch die das S/N-Verhältnis verschlechtert würde.

X-Halbfiler-COSY

Läßt man in der Sequenz (P33)^[153,336] den 180° -Refokussierungspuls in der Mitte von t_1 weg, so kann die heteronucleare Antiphase-Magnetisierung schon in t_1 refokussieren. Damit passieren auch Spinsysteme vom Typ $S-I^1-I^2$ den Filter, und man erhält den X-Halbfiler. Die (ω_1) -Halbfiler-COSY-Sequenz ist somit (P34). Den Filter kann man statt zu Beginn von t_1 auch zu Beginn von t_2 einführen und erhält dann die (ω_2) -Halbfiler-COSY-Sequenz (P35).



Der $90^\circ(S)$ -Puls gleichzeitig mit dem $90^\circ(I)$ -Mischpuls dient dazu, zu Beginn von t_2 nur Produktoperatoren ohne Heterokernbeteiligung zu selektieren.

Techniken mit X-Filter oder X-Halbfiler werden immer mehr angewendet – hauptsächlich bei der Untersuchung von sehr großen Proteinen^[337], da dort die Auflösung im konventionellen 2D-NMR-Spektrum nicht mehr ausreicht. Man nimmt daher entweder die besser aufgelösten Heterokern-Resonanzsignale zu Hilfe, oder man erhält nach selektiver Anreicherung von NMR-aktiven Isotopen der Heteroatome Subspektren der konventionellen Spektren, die Untereinheiten des Proteins in der Nähe der Markierungen entsprechen. Die immer einfacher werdende gentechnische Synthese selektiv angereicherter Proteine läßt einige Erfolge auf diesem Gebiet erwarten.

3.4. Experimente unter Ausnutzung der dipolaren Kopplung

3.4.1. NOESY

Dipolare Relaxation und das NOESY-Experiment wurden in Abschnitt 2.2.2 schon besprochen. Wir kommen nun noch einmal kurz darauf zurück.

Quantitative Auswertung der NOE-Information

Kreuzsignale im NOESY-Spektrum beruhen auf der Kreuzrelaxation von longitudinaler Magnetisierung während der Mischzeit. Die Intensität der Signale (das Integral) enthält wertvolle Abstandsinformation^[338–344]. Die genaue Analyse zeigt, daß die Kreuzrelaxationsrate σ , die die Effizienz des NOE-Transfers bestimmt, durch Gleichung (120) gegeben ist (für ein isoliertes Zweispinsystem). Somit ist die Abstandsinformation (r) in der Kreuzrelaxationsrate σ enthalten.

$$\sigma = W_2 - W_0 = \frac{\gamma_1^2 \gamma_2^2 \hbar^2 \tau_c}{10^6} \left(\frac{6}{1 + (\omega_1 + \omega_2)^2 \tau_c^2} - \frac{1}{1 + (\omega_1 - \omega_2)^2 \tau_c^2} \right) \quad (120)$$

Um aus dem NOESY-Spektrum σ zu bestimmen, ermittelt man entweder die Ableitung des Aufbaus der NOE-Raten für $\tau_m = 0$, d. h. die „initiale Aufbau rate“ (indem man für verschiedene Zeiten ab $\tau_m = 0$ je ein NOESY-Spektrum mißt), oder man macht von der linearen Approximation Gebrauch. Im zweiten Fall geht man davon aus, daß sich das System bei der gewählten Mischzeit τ_m noch linear verhält, d. h. daß die Intensität der Kreuzsignale direkt proportional zur Kreuzrelaxationsrate ist. In jüngster Zeit wurde auch versucht, aus einem Spektrum ohne die „initial-rate“-Approximation NOE-Werte unter Berücksichtigung von Mehrschritttransfers zu gewinnen, oder die volle Relaxationsmatrix zu lösen^[345,346].

Bei Kenntnis eines Abstands r_{kl} in einem Molekül (z. B. zwischen zwei Protonen einer CH_2 -Gruppe) und der entsprechenden Kreuzrelaxationsrate σ_{kl} kann ein unbekannter Abstand r_{mn} aus einer gemessenen Rate σ_{mn} gemäß

Gleichung (121) berechnet werden (dabei sind I_{kl} und I_{mn} die Intensitäten der zugehörigen Kreuzsignale), vorausge-

$$\sqrt[6]{\frac{I_{kl}}{I_{mn}}} = \frac{r_{mn}}{r_{kl}} \quad (121)$$

setzt die Korrelationszeiten der Reorientierung τ_c für die jeweiligen Abstandsvektoren sind gleich. Dies kann man experimentell z. B. über die Relaxationszeiten von ^{13}C -Kernen oder über „steady-state“-Werte des heteronuclearen NOEs überprüfen. Eine andere Möglichkeit ist die gleichzeitige Auswertung von NOESY und ROESY, die die Bestimmung von τ_c und σ ermöglicht^[370].

Artefakte

Der Phasencyclus in einem NOESY-Experiment ist so angelegt, daß während der Mischzeit τ_m Kohärenzen, die ungleich Null sind, herausgefiltert werden. Nullquanten-Kohärenzen sind folglich nicht davon berührt, so daß sie genauso im NOESY-Spektrum vorhanden sind wie die gewünschten NOE-Kreuzsignale. Betrachten wir nun die Feinstruktur dieser Nullquanten-Kohärenzen anhand der Produktoperatorbeschreibung [Gl. (122)]. Nullquanten-

$$\begin{aligned} I_{S_z} &\xrightarrow{90^\circ} \frac{1}{2}(I_{S_y} + I_{S_z}) \xrightarrow{\tau_m} \frac{1}{2}(I_{S_y} + I_{S_z}) \cos(\Omega_1 - \Omega_2)\tau_m \\ &\xrightarrow{90^\circ} \frac{1}{2}(I_{S_x} + I_{S_z}) \cos(\Omega_1 - \Omega_2)\tau_m \end{aligned} \quad (122)$$

Kohärenzen präzedieren in τ_m und führen schließlich zu Dispersionssignalen mit doppelter Antiphase-Struktur im Spektrum. Ihr Integral ist zwar Null, dennoch können sie die Integration von Kreuzsignalen stören.

Eine Unterdrückung gelingt am besten durch einen 180° -Puls während der Mischperiode. Dieser 180° -Puls wird innerhalb der konstanten Mischzeit verschoben. τ_m wird also zu $|\Delta/2 - 180^\circ - (\tau_m - \Delta/2)|$. Der Puls refokussiert die Nullquanten-Kohärenzen, so daß sie sich mit $\cos(\Omega_1 - \Omega_2)(\tau_m - \Delta)$ entwickeln. Zufällige^[347] oder auch systematische^[93] Variation von Δ unterdrückt die Nullquanten-Kohärenzen, weil das Argument des Cosinus abhängig von Δ positive und negative Werte annimmt, so daß diese Anteile zu Null gemittelt werden. Da die Mischzeit unverändert bleibt, wird im Gegensatz zur zufälligen Variation von τ_m kein zusätzliches t_1 -Rauschen eingeführt.

Eine zweite Möglichkeit besteht darin, die Nullquanten zu verschieben oder aufzuspalten. Inkrementiert man τ_m synchron mit der Evolutionszeit um κt_1 , so geben die Nullquanten ein Signal, das mit $\cos(\Omega_1 - \Omega_2)\kappa t_1$ moduliert ist. Die Nullquanten liegen dann bei $\Omega_1 \pm (\Omega_1 - \Omega_2)\kappa$ in ω_1 statt bei Ω_1 und sind so möglicherweise aus dem interessanten Bereich herausgeschoben^[348].

3.4.2. Longitudinale Mehrspinordnungen

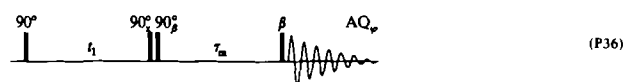
Im NOESY-Experiment wird durch die Verwendung von 90° -Pulsen für die Mischung ausschließlich z-Magnetisierung erzeugt. Operatoren mit mehr als einem z-Operator können aus transversaler Magnetisierung nicht mit 90° -Pulsen erhalten werden. Das ist anders bei der Verwendung von Pulsen mit kleinen Flipwinkeln. Dann kann man aus $2I_{1x}I_{2z}$ durch einen y-Puls auch $2I_{1z}I_{2z}$ -Operatoren erhalten. Diese „longitudinale Mehrspinordnung“ ist das Kernstück einiger Pulssequenzen.

zz-Spektroskopie

Longitudinale Zweispinordnung kann verwendet werden, um gewisse Austausch- und Kreuzrelaxationssignale sowie inter- und intramolekulare NOEs^[127, 128] zu unterscheiden. Durch den gewählten Phasencyclus werden nur die Kreuzsignale selektiert, die der Überführung des Operators $2I_{1z}I_{2z}$ in $2I_{3z}I_{4z}$ entsprechen. Die Kerne I^3 und I^4 müssen ebenfalls skalar gekoppelt sein, wie es beispielsweise für Kreuzsignale, die durch chemischen Austausch hervorgerufen werden, der Fall ist.

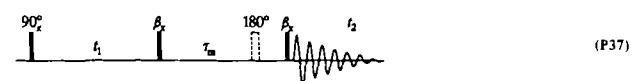
Die Selektion von zz-Operatoren (Produktoperatoren mit einer geraden Zahl von z-Operatoren) kann durch einen bei jedem zweiten Scan angewendeten 180° -Puls erreicht werden. Die erhaltenen Signale werden addiert. Operatoren mit einer ungeraden Zahl von z-Operatoren führen folglich zu einer Inversion, zz-Operatoren dagegen nicht.

Eine andere Möglichkeit zur Selektion von z,z-Operatoren ist der in (P36) verwendete Phasencyclus, in dem β gleich $45^\circ + n90^\circ$ und die Empfängerphase gerade 2β sind.



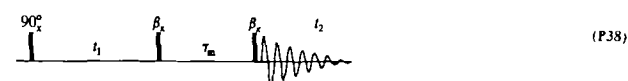
zz-COSY

Die Pulssequenz ist dieselbe wie in der zz-Spektroskopie. Man ist allerdings beim zz-COSY-Experiment nur an den „COSY“-Kreuzsignalen interessiert, die bei der zz-Spektroskopie entstehen, wählt also τ_m entsprechend kurz. Die Selektion von zz-Operatoren erfolgt wie vorhin beschrieben. Der Transfer hat eine Effizienz von $\frac{1}{4}\sin^2 2\beta$, d. h. bei $\beta = 45^\circ$ erreicht man die maximale Intensität, die jedoch nur ein Viertel der des konventionellen COSY-Experiments beträgt. Allerdings bietet diese Sequenz eine wirkungsvolle Methode zur Unterdrückung von Wassersignalen^[129]. Durch einen HS-Puls wird die unerwünschte transversale Magnetisierung der Protonen von Wassermolekülen zerstört. Verbleibende longitudinale Magnetisierung wird unterdrückt, da sie keine longitudinale Mehrspinordnung entwickeln kann. Die Pulssequenz ist (P37).



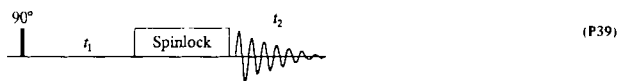
z-COSY

Diese Sequenz wurde bereits im Zusammenhang mit der E.COSY-Technik (Abschnitt 3.1.4) erwähnt. Durch β -Pulse als flankierende Pulse eines z-Filters erhält man E.COSY-ähnliche Multipllettstrukturen in den Kreuzsignalen. Verlängert man den z-Filter (P38) so, daß Kreuzrelaxation möglich ist, kann man im Idealfall in gekoppelten Spinsystemen die Raten W_0 , W_1 und W_2 für die Kreuzrelaxation zweier Spins separat beobachten^[130].



3.4.3. ROESY

Wir hatten bereits in Abschnitt 2.2.2 erwähnt, daß ungünstige Korrelationszeiten gerade zu $W_2 - W_1 = 0$ führen können und es dann keinen NOE-Effekt mehr gibt. Abhilfe schafft das von *Bothner-By* et al. eingeführte CAMELSPIN-Experiment^[198], das wir, einem Vorschlag von *Bax* et al.^[199] folgend, ROESY nennen. Das ROESY-Experiment (P39) erreicht die Mischung in einer Spinlock-Periode.



Das NOESY-Experiment beruht auf der Kreuzrelaxation der longitudinalen z-Magnetisierungen. Im ROESY-Experiment dagegen handelt es sich um die Kreuzrelaxation von transversaler Magnetisierung, die durch das Lock-Feld am Präzedieren um die z-Achse gehindert wird. Für die entlang der x-Achse „gelocten“ Magnetisierungen z. B. findet man bei einem Zweispinsystem die Relaxationsraten (123–125)^[77, 198, 202]. Der ROE ($W_2 - W_0$) ergibt sich damit zu (126).

$$W_1 = \frac{3}{40} \frac{\gamma_1^2 \gamma_2^2 \hbar^2 \tau_c}{r^6} \left(\frac{1}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{1}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} \right) \quad (123)$$

$$W_0 = \frac{3}{40} \frac{\gamma_1^2 \gamma_2^2 \hbar^2 \tau_c}{r^6} \left(\frac{1}{3} + \frac{1}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} \right) \quad (124)$$

$$W_2 = \frac{3}{40} \frac{\gamma_1^2 \gamma_2^2 \hbar^2 \tau_c}{r^6} \left(3 + \frac{4}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{1}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} \right) \quad (125)$$

$$W_2 - W_0 = \frac{\gamma_1^2 \gamma_2^2 \hbar^2 \tau_c}{10 r^6} \left(2 + \frac{3}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \right) \quad (126)$$

Im Gegensatz zum NOE-Effekt ist der ROE-Effekt stets positiv (negative Kreuzsignale in Bezug auf die Diagonale), wie Abbildung 38 zeigt, in der die maximalen NOE- und ROE-Effekte in Abhängigkeit von der Korrelationszeit τ_c für ein Zweispinsystem graphisch dargestellt sind. Zudem sind die ROE-Aufbauraten außer für $\tau_c \rightarrow 0$ immer größer als die NOE-Aufbauraten (Abb. 39). Allerdings ist auch die Zeit, für die die lineare Approximation gültig ist, kürzer als im NOESY-Experiment.

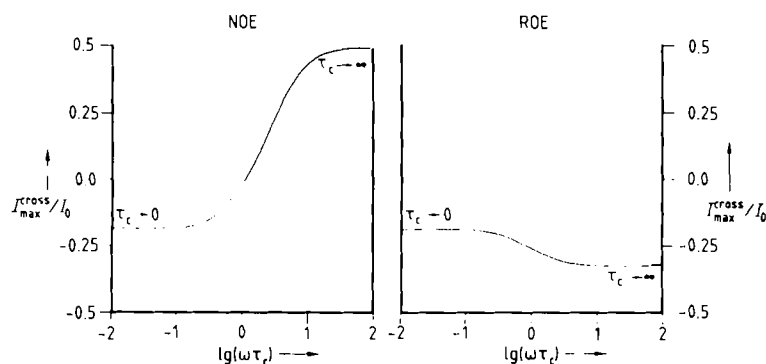


Abb. 38. Maximale Intensität $I_{\text{max}}^{\text{cross}}$ des Kreuzsignals in 2D-NOESY- und 2D-ROESY-Spektren für ein Zweispinsystem, normiert auf I_0 , die Intensität eines Diagonalsignals bei der Mischzeit $\tau_m = 0$. Im NOESY-Spektrum hat das Kreuzsignal bei $\tau_c \rightarrow 0$ etwa 20% der Intensität des Diagonalsignals, es verschwindet bei $\omega_0 \tau_c = 1$ und erreicht für $\tau_c \rightarrow \infty$ 50% der Intensität des Diagonalsignals. Im ROESY-Spektrum ist die maximale Intensität dagegen etwa 20% für $\tau_c \rightarrow 0$ und etwa 34% für $\tau_c \rightarrow \infty$.

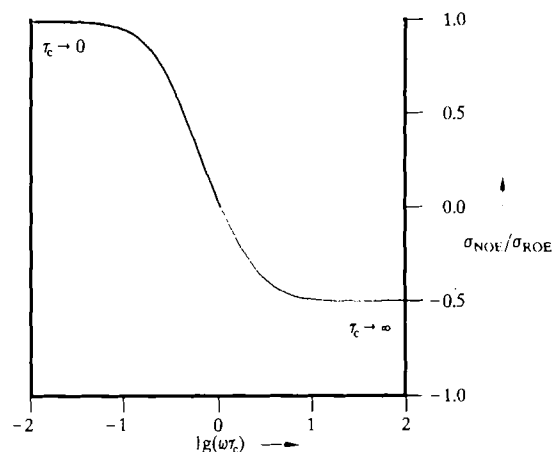


Abb. 39. Verhältnis der Kreuzrelaxationsraten σ , die sich aus einem 2D-NOESY- und einem 2D-ROESY-Spektrum ergeben. Für $\tau_c \rightarrow 0$ sind die Raten gleich. Sonst ist σ_{ROE} immer größer als σ_{NOE} .

Bei der quantitativen Auswertung von ROESY-Spektren^[349] geht man genauso vor wie bei der von NOESY-Spektren. Wenn die Korrelationszeiten in der Nähe des Werts $\tau_c \approx (5/4)^{1/2} / \omega_0$ liegen, werden die Intensitäten von NOESY-Signalen klein und dadurch nur ungenau bestimmbar. Zudem werden die Intensitäten durch unterschiedliche Korrelationszeiten innerhalb eines Moleküls sehr stark beeinflusst. Dies kann leicht zu Fehlinterpretationen bezüglich der Abstände führen. Beim ROESY-Spektrum dagegen spielt diese Empfindlichkeit wegen der im wesentlichen nur linearen τ_c -Abhängigkeit der Intensität der Kreuzsignale eine viel kleinere Rolle. Das Lock-Feld muß schwach sein, da man sonst Beiträge im Spektrum durch den Transfer über skalare Kopplungen erhält. Diese Beiträge sind in der Nähe der Diagonalen stärker. Ein Richtwert ist etwa: Lock-Feld in der Größenordnung der halben spektralen Breite [Gl. (127)].

$$\gamma B_1 \approx \frac{SW}{2} \quad (127)$$

Für die quantitative Auswertung muß dann die Abhängigkeit des ROE-Effekts vom Abstand zwischen Resonanz- und Lock-Frequenz (Offset-Effekt) berücksichtigt werden^[202].

Der Spinlock kann durch eine CW-Einstrahlung mit niedriger Leistung oder gepulst mit einer Folge $(\beta \tau)_n$ durchgeführt werden. β soll dabei so klein wie möglich gewählt^[201] werden, und τ ergibt sich aus Gleichung (128),

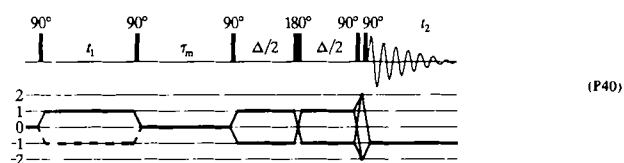
wobei β in rad einzusetzen ist und τ_β die Länge des β -Pulses in Sekunden ist.

$$\frac{2\pi\beta}{(\tau + \tau_1)} = \gamma B_1 \quad (128)$$

Eine verbesserte Version mit höherer Empfindlichkeit wendet zusätzlich vor und nach der Spinlock-Periode je einen 90° -Puls an^[202].

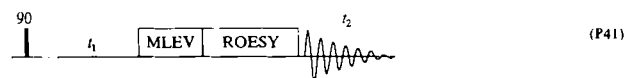
3.4.4. Relayed-NOESY

Eine gewisse Bedeutung hat noch die Kombination von NOESY- und Relayed-Pulssequenz^[228]. Man erreicht durch den Relayed-Transfer ebenso wie bei den anderen Relayed-Experimenten vielfach eine eindeutige Zuordnung der NOE-Kreuzsignale in Bereichen mit überlagerten Signalen. Die Einführung eines Doppelquantenfilters nach dem Relayed-Transfer kann sinnvoll sein, um die dadurch dispersiven Diagonalsignale herauszufiltern (P40)^[229].



Eine zweite Möglichkeit, die zu leicht unterschiedlichen Spektren führt, bietet die antisymmetrisierte Pulssequenz^[230,231]. (P40) ist bis zum dritten 90° -Puls, der die Relayed-Transferperiode einleitet, identisch mit der NOESY-Sequenz (P2). Somit erhält man in ω_1 absorptive In-Phase-Signale, die mit der chemischen Verschiebung eines ersten Kerns moduliert sind. Nach t_1 wird die Magnetisierung aber durch dipolare Kopplung auf einen zweiten Kern (NOE-Transfer) und von dort durch skalare Kopplung auf einen dritten Kern (Relayed-Transfer) übertragen. In t_2 wird also Antiphase-Magnetisierung des dritten Kerns detektiert. Daher ist das Signal in ω_2 in Antiphase. Man beachte, daß das Spektrum auch bezüglich der Lage der Kreuzsignale asymmetrisch ist^[231].

Als besonders vorteilhaft hat sich die Kombination von TOCSY und ROESY (P41) für Moleküle mittlerer Größe



erwiesen. Sie läßt sich durch Variation der Mischsequenz^[232] (z. B. 30 ms TOCSY durch MLEV-17 gefolgt von 170 ms einer Serie von Pulsen mit kleinem Flipwinkel) leicht erreichen. Der kurze TOCSY-Transfer liefert In-Phase-Korrelationen vom COSY-Typ (der Transfer geht bevorzugt über eine Kopplung), die direkt für den ROE-Transfer genutzt werden können. Wegen der Asymmetrie des Spektrums kann z. B. im NH-Bereich von Peptiden direkt die Sequenz und deren Richtung bestimmt werden, auch wenn der Bereich der α -Protonen nicht aufgelöst ist. Auf große Moleküle kann man entsprechend die Kombination TOCSY-NOESY^[233] anwenden.

3.5. Austauschspektroskopie

Eine weitere Möglichkeit, um Magnetisierung von einem Kern auf einen anderen zu übertragen, bietet der chemische Austausch. Hierzu müssen zwei Isomere oder Topomere^[102,103,350] in einem dynamischen Gleichgewicht vorliegen. Je nach Austauschgeschwindigkeit lassen sich dann separate Signalsätze (langsamer Austausch) oder ein gemittelter Signalsatz (schneller Austausch) im NMR-Spektrum beobachten. Im Übergangsbereich dienen Linienveränderungen zur Bestimmung der Austauschkinetik^[107,108,111,113,114,351]. Sobald ein Austausch beginnt, kann Polarisierung zwischen den am Austausch beteiligten Positionen übertragen werden (z. B. Sättigungstransfer^[352]), so daß derartige Austauschprozesse mit der NOESY- oder ROESY-Sequenz^[353,354] nachgewiesen werden können. Der Vorteil der 2D-NMR-Technik^[371] liegt auf der Hand: Es lassen sich gegenseitige Zuordnungen treffen^[355], Austauschmechanismen werden sofort sichtbar^[356-358] und quantitative Auswertungen sind möglich^[359,360]. Kreuzsignale aufgrund von chemischem Austausch haben ebenso wie solche, die durch negative NOE-Effekte (große Moleküle, viskose Lösungsmittel, tiefe Temperatur, hohe Feldstärke) hervorgerufen werden, in Spektren mit reinen Phasen das gleiche Vorzeichen wie die Diagonalsignale. In NOESY-Spektren von kleinen Molekülen in niedrigviskosen Lösungsmitteln (positive NOE-Werte) und in allen ROESY-Spektren sind Austauschsignale^[361,362] wie auch NOEs^[201,363] über mehrere Kerne durch das andere Vorzeichen leicht von NOE-Kreuzsignalen zu unterscheiden.

Ein Beispiel zeigt Abbildung 40. Dieses prolinhaltige cyclische Hexapeptid tritt in zwei Konformationen auf, in

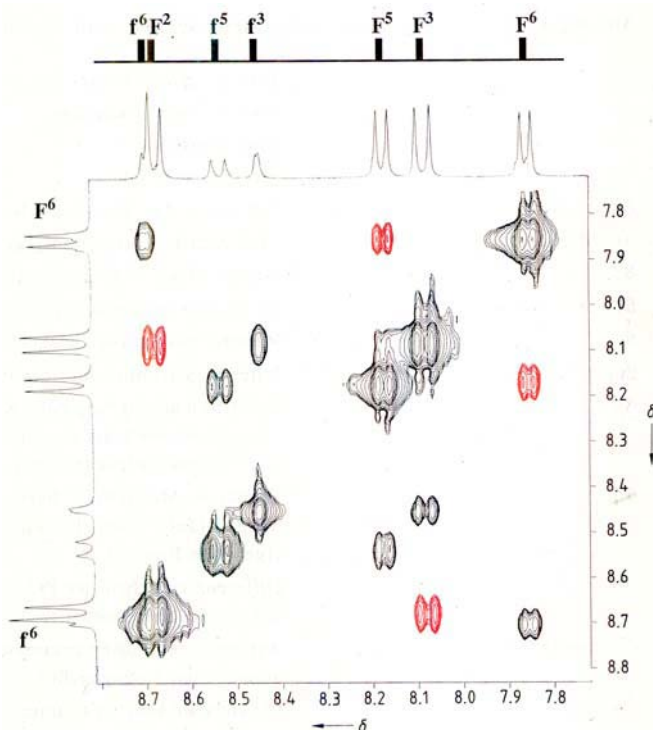


Abb. 40. Ausschnitt aus einem 300 MHz-ROESY-Spektrum von *cyclo*-(D-Pro¹-Phe²-Phe³-Pro⁴-Phe⁵-Phe⁶) in [D₆]DMSO, 320 K, Pulswinkel $\beta = 24^\circ$, Mischzeit 200 ms. Das Molekül existiert in zwei Konformeren, deren Austausch durch die positiven Kreuzsignale (schwarz) indiziert ist. NOE-Effekte zwischen NH-Signalen geben negative (rote) Kreuzsignale (F²-F³ und F⁵-F⁶). Phenylalanin = F, f (das überwiegend populierte Isomer ist mit großen Buchstaben bezeichnet).

denen die Prolin-Amidbindung *trans*- bzw. *cis*-konfiguriert ist. Die Signale der NH-Protonen, die durch die *cis/trans*-Isomerisierung korreliert sind, sind für beide Konformere an zur Diagonale positiven (schwarzen) Kreuzsignalen zu erkennen; die negativen (roten) Signale zeigen einen NOE im rotierenden Koordinatensystem (ROE) an.

3.6. Weitere 2D-NMR-Experimente

Eine Anzahl weiterer 2D-NMR-Experimente ergibt sich durch Kombination der bisher besprochenen Techniken und durch Variationen derselben, z. B. durch Einfügen von Filtern^[364], Puls-Sandwiches, verschiedene Entkopplungen etc. Auch wurden einige der beschriebenen homonuclearen Techniken auf heteronucleare Experimente übertragen (z. B. Hetero-TOCSY^[185, 186]). Ferner wurde die photochemische Anregung erfolgreich mit der kernmagnetischen Resonanzspektroskopie verknüpft (Photo-CIDNP)^[256, 257].

Neuerdings gibt es durch die Verwendung von semiselektiven Pulsen mit programmierter Linienform eine ganze Reihe von 1D-Varianten der 2D-NMR-Techniken^[210], die sich für die Beantwortung einfacher Fragen anbieten. Der Einsatz von semiselektiven Pulsen bei der Aufnahme von 2D-^[251, 335] und 3D-NMR-Spektren^[253–255] stellt einen weiteren aktuellen Zweig der Methodenforschung dar. Eine detailliertere Beschreibung dieser neuesten Entwicklungen würde allerdings den Rahmen dieses Beitrags sprengen.

4. Schlußbemerkungen

Wir haben hier die theoretischen Grundlagen für die wichtigsten 2D-NMR-Experimente dargelegt. Somit verfü-

gen wir jetzt über das Handwerkszeug, um diese Techniken sinnvoll und richtig einsetzen zu können, auch wenn nicht alle Varianten behandelt werden konnten. Es sollte eine Übersicht über die heute meistverwendeten Techniken gegeben und der Praktiker mit dem notwendigen Verständnis der Theorie versehen werden, so daß er in der Lage ist,

- das richtige Experiment für seine Fragestellung auszuwählen,
- die optimalen Delays und Phasencyclen auszuwählen oder zu erstellen und der Fragestellung anzupassen und
- Artefakte im Spektrum zu identifizieren, Störungen zu erkennen und diese gegebenenfalls zu vermeiden.

Das Manuskript dieser Arbeit ist durch zahlreiche Diskussionen mit Kollegen und mit Mitarbeitern unseres Arbeitskreises verbessert worden, denen dafür an dieser Stelle gedankt sei. Besonderer Dank gebührt Prof. Dr. D. Kost, Beer Sheva, Israel, für seine Anregungen und Beiträge anlässlich der Übersetzung ins Englische. Von den Abbildungen wurden uns freundlicherweise einige von den Mitarbeitern U. Anders (Abb. 32), Dr. H. Kogler (Abb. 35), K. Wagner (Abb. 40) und M. Will (Abb. 24, 25, 31, 33) zur Verfügung gestellt. Finanzielle Unterstützung erhielten wir für die bei uns erarbeiteten wissenschaftlichen Ergebnisse von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie. C. G. dankt Prof. Dr. R. R. Ernst, Zürich, für seine Unterstützung.

Eingegangen am 12. Mai 1987,
veränderte Fassung am 19. Januar 1988 [A 662]

Anhang 1: Wichtige im Text verwendete Begriffe und Abkürzungen

ω_1	Erste Frequenzdomäne im 2D-NMR-Spektrum, durch Fourier-Transformation über t_1 erhalten
ω_2	Zweite Frequenzdomäne
1D	Eindimensional
2D	Zweidimensional
Akquisition, AQ	Aufnahme des NMR-Signals, in 2D-NMR-Experimenten findet sie in der t_2 -Zeit statt
Antiphase	Multipllettstruktur mit entgegengesetzter Phase, Multipllettlinien mit Vorzeichenwechsel
B_0	Starkes Magnetfeld, konventionsgemäß entlang der z-Achse orientiert
B_1	Im allgemeinen zusätzliches transversales Magnetfeld, z. B. für Pulse
B_2	Weiteres zusätzliches Magnetfeld, z. B. für Entkopplungspulssequenzen, Spinlock etc.
Band-Pass-Filter	Filter zu Selektion einer bestimmten Kohärenzordnung p
BB	Breitbandentkopplung einer Spinsorte. Sie wird in heteronuclearen Experimenten zur Zerstörung der Magnetisierung einer der Spinsorten, z. B. während der Akquisition eingesetzt. BB wird heutzutage durch hochentwickelte Composite-Pulssequenzen erreicht
B_{eff}	Effektives Magnetfeld, hervorgerufen durch die Elektronenhülle der Kerne (chemische Verschiebung). Häufig auch: bei unvollständiger Entkopplung das im rotierenden Koordinatensystem sich ergebende Restfeld
chemische Verschiebung	Differenz zwischen der Präzessionsfrequenz des Kerns und der Frequenz eines Standards, bezogen auf die Trägerfrequenz
Composite-Puls	Aus mehreren Pulsen zusammengesetzter Puls. Er wird eingesetzt, um Phasenfehler oder B_1 -Feldinhomogenitäten auszugleichen
constant time	In „constant time“-Varianten von NMR-Experimenten ist die Gesamtdauer jedes t_1 -Experiments konstant, da die t_1 -Zeit durch Pulse begrenzt innerhalb eines festen Delays liegt
Dichtematrix	Sie beschreibt den Zustand eines quantenmechanischen Objekts
dipolare Kopplung	Wechselwirkung zwischen zwei Spins, die durch den Raum vermittelt wird. Sie ist orientierungsabhängig und wird durch schnelle Umorientierung der Moleküle in Lösung ausgemittelt. Sie ist die Ursache für Relaxation und NOE
DQF	Doppelquantenfilter

Delay	Zeitspanne
Editing	Es liefert durch Variation weniger Parameter in einer Pulssequenz (z. B. Pulse, Delays) einen Satz von Subspektren, die unterschiedliche Informationen beispielsweise über die Multiplizität der Signale enthalten (z. B. Subspektren für ^{13}CH , $^{13}\text{CH}_2$ und $^{13}\text{CH}_3$)
Faltung (Convolution)	<p>Mathematische Operation: $F * G = \int_{-\infty}^{+\infty} F(x-y)G(y)dy$</p> <p>Sie ist für die NMR-Spektroskopie aufgrund der Beziehung $F * G = F(f \cdot g)$ von Bedeutung, wobei $F(f)$ die Fourier-Transformierte von f ist. D. h. die Fourier-Transformierte des Produkts zweier Funktionen ist die Faltung der Fourier-Transformierten dieser Funktionen</p>
Faltung (Folding)	Ebenfalls im Zusammenhang mit Fourier-Transformation verwendet. Faltung um $\omega_1 = 0$ bedeutet: $S_f(\omega_1, \omega_2) = S(\omega_1, \omega_2) + S(-\omega_1, \omega_2)$
FID	free induction decay, das aufgenommene NMR-Signal
Flipwinkel	Winkel, um den der Magnetisierungsvektor ausgelenkt wird
Fourier- Transformation	<p>„Rechenvorschrift“, um die in einer zeitlich veränderlichen Funktion enthaltenen Frequenzen zu bestimmen. Die Fourier-Transformierte $F(\omega)$ ist bei einer komplexen Fourier-Transformation gegeben durch</p> $F(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} e^{-i\omega t} f(t) dt$ <p>und bei einer reellen Fourier-Transformation durch</p> $F(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) \cos(\omega t + \varphi) dt$
High-Pass-Filter	Filter zur Selektion von Kohärenzordnungen $\geq p$
Homospoil- Puls, HS	Ein Puls zur kurzzeitigen Erzeugung von Feldinhomogenitäten. Er dient zur Entfernung unerwünschter Kohärenzen (transversaler Magnetisierungen)
In-Phase	Multipletstruktur mit gleicher Phase, Multipletlinien ohne Vorzeichenwechsel
inverse Techniken	Bezeichnung für heteronucleare Experimente, die den Heterokern indirekt über Protonenmagnetisierung detektieren. Im Englischen auch „reversed techniques“
Kohärenz	Sie entspricht einem Übergang zwischen zwei Eigenzuständen und ist eine Erweiterung des Ausdrucks „transversale Magnetisierung“, der sich nur auf erlaubte Übergänge bezieht. Quantenmechanisch gesehen entspricht eine Kohärenz einem Nicht-Diagonal-Element in der Spin-Dichtematrix
Kohärenzordnung p	Differenz Δm_z der magnetischen Quantenzahlen zweier an einer Kohärenz beteiligten Energieniveaus (z. B. Nullquanten-Kohärenz, Einquanten-Kohärenz)
Kohärenz-Transfer	Übertragung der Kohärenz von einem Kern auf einen anderen
Kohärenz-Transferweg	Beschreibung des zeitlichen Verlaufs der Kohärenzordnung in einer Pulssequenz
Korrelationszeit	Die Korrelationszeit τ_c gibt die mittlere Zeitdauer der molekularen Umorientierung wieder, die Ursache für die Relaxation ist
Kreuzrelaxation	Sie beschreibt die gegenseitige Relaxation (inter- und intramolekular) von magnetisch aktiven Kernen z. B. durch dipolare Relaxation
longitudinale Magnetisierung	Magnetisierung in Richtung des B_0 -Felds, also in z-Richtung
Low-Pass-Filter	Filter zur Selektion von Kohärenzordnungen $\leq p$
Multiplizität	Aufspaltung der NMR-Signale durch skalare Kopplung in z. B. Dubletts, Triplets, ... Bei Kohlenstoffspektren wird sie auch für die große Aufspaltung durch die direkte C-H-Kopplung verwendet, um quartäre ^{13}C -Kerne, CH-, CH_2 - und CH_3 -Gruppen zu unterscheiden
NOE	Nuclear-Overhauser-Enhancement-Effekt. Intensitätsveränderung eines NMR-Signals bei Störung des Gleichgewichts eines anderen Kerns, hervorgerufen durch dipolare Kopplung
Peak	Signal in einem NMR-Spektrum, häufig auch nur Komponente eines Multipletts
Phasencyclus	Pulssequenzen für die Aufnahme von NMR-Spektren sind meist eine Kombination aus Sequenzen, die sich nur in den Phasen der einzelnen Pulse unterscheiden. Systematisch variierte Phasen bilden den Phasencyclus, der zur Unterdrückung von unerwünschten Kohärenzen und Artefakten dient
Polarisationstransfer	Übertragung von Polarisierung von einem Kern auf einen anderen, wird in der Literatur häufig synonym mit Kohärenz-Transfer verwendet, auch wenn dabei eigentlich Kohärenzen übertragen werden
Polarisierung	Sie beruht auf Populationsdifferenzen von Energieniveaus. Eine Polarisierung ist nicht notwendigerweise mit Magnetisierung verbunden
Präzessionsfrequenz	Larmor-Frequenz ω der um die z-Achse präzedierenden Kerne. Im rotierenden Koordinatensystem beschreibt sie nur die Differenzfrequenz Ω_i aus der individuellen Larmor-Frequenz der Kerne $\omega_i = \gamma B_{\text{eff}}$ und der Trägerfrequenz $\omega_0 = \gamma B_0$
Produktoperatoren	Satz zueinander orthogonaler Operatoren, die durch die Produktbildung miteinander verknüpft werden können

Produktoperatorformalismus	Formalismus zur Beschreibung von NMR-Experimenten, der hohe Anschaulichkeit mit großer Anwendungsbreite verbindet (ausführlichere Erläuterungen siehe Text)
Puls	Anlegen eines nur für kurze Zeit erzeugten, hochfrequenten (im Radiofrequenzbereich liegenden) zusätzlichen Magnetfelds mit der Trägerfrequenz ω_0 , um einen Übergang anzuregen. Im Deutschen auch „Impuls“
Pulssequenz	Abfolge von Radiofrequenzpulsen und Zeiten freier Evolution (Delays) mit anschließender Detektion der entstandenen Magnetisierung
Quadraturdetektion	Verfahren zur Detektion von NMR-Signalen, das es gestattet, Vorzeichen von Frequenzen zu unterscheiden (im Gegensatz zur Einkanal-detektion)
ROE	Rotating Frame NOE. Durch Relaxation im rotierenden Koordinatensystem hervorgerufener NOE
rotierendes Koordinatensystem	Ein mit der Frequenz ω_0 rotierendes Koordinatensystem; dies vereinfacht die Beschreibung der Wirkung von Pulsen und Perioden freier Präzession
Scan	Einmaliger Ablauf eines NMR-Experiments
Scherung	Transformation eines Spektrums gemäß: $\omega'_1 = \omega_1$, $\omega'_2 = \omega_2 + k \cdot \omega_1$
schwache Kopplung	Die Kopplungskonstante J für die Kopplung zwischen zwei Spins ist klein gegenüber der Differenz ihrer chemischen Verschiebungen; dies hat Spektren erster Ordnung zur Folge
skalare Kopplung	Wechselwirkung zwischen zwei Spins, die durch die Bindung vermittelt wird, auch J -Kopplung genannt. Sie ist skalar, d.h. orientierungsunabhängig, und bewirkt die Multipletaufspaltung der Signale
t_1	Inkrementierte Zeit, die in 2D-NMR-Experimenten nach der Fourier-Transformation die erste Frequenzdomäne ergibt
t_2	Detektionszeit, ergibt nach der Fourier-Transformation die zweite Frequenzdomäne
t_1 -Rauschen	In 2D-NMR-Spektren parallel zur ω_1 -Achse auftretendes Rauschen, das besonders dort beobachtet wird, wo intensive Signale auftreten; es ist weitgehend durch gerätetechnische Faktoren bestimmt
thermisches Gleichgewicht	Im thermischen Gleichgewicht sind die Energieniveaus gemäß der Boltzmann-Verteilung besetzt: $p(E_i) = e^{-E_i/kT} / \sum_i e^{-E_i/kT}$
TQF	Dreiquantenfilter (Triple-Quantum-Filter)
Trägerfrequenz	ω_0 , Senderfrequenz der Hochfrequenzpulse
transversale Magnetisierung	Magnetisierung in der x,y-Ebene
transversaler Operator	Bezeichnung für I_x und I_y
Weitbereichskopplung	Skalare Kopplung über mehrere Bindungen
Zero-Filling	Anhängen von Nullen an den FID zur Verbesserung der digitalen Auflösung

Anhang 2: Erläuterung der im Text verwendeten Acronyme

BIRD	<i>Bilinear Rotation Decoupling</i>
CAMELSPIN	<i>Cross-Relaxation Appropriate for Minimolecules Emulated by Locked Spins</i>
CIDNP	<i>Chemical Induced Dynamic Nuclear Polarization</i>
COCONOSY	<i>Combined Correlated and Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
COLOC	<i>Correlation via Long range Couplings</i>
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DEPT-GL	<i>DEPT-Grand Luxe</i>
DISCO	<i>Differenzen und Summen in COSY-Spektren</i>
E. COSY	<i>Exclusive COSY</i>
GARP	<i>Globally Optimized Alternating Phase Rectangular Pulse</i>
HETCOR	<i>Heteronuclear Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
HOHAHA	<i>Homonucleares Hartmann-Hahn-Experiment</i>
INADEQUATE	<i>Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment</i>
INEPT	<i>Insensitive Nuclei Enhanced by Polarisation Transfer</i>
MLEV	<i>Malcom Levitt</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange Spectroscopy</i>
P. E. COSY	<i>Primitive E. COSY</i>
RCT	<i>Relayed Coherence Transfer Spectroscopy</i>
ROESY	<i>Rotating Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
ROTO	<i>ROESY - TOCSY</i>
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
TORO	<i>TOCSY - ROESY</i>
WALTZ	<i>Wideband Alternating Phase Low Power Technique for Zero Residue Splitting</i>
XCORFE	<i>X-Nucleus Correlation with Fixed Evolution Time</i>

- [1] J. Jeener, *Ampere Summer School*, Basko Polje, Jugoslawien 1971.
- [2] W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* 64 (1976) 2229-2246.
- [3] R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun: *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*, Clarendon, Oxford 1987.
- [4] R. R. Ernst, *Chimia* 29 (1975) 179-183.
- [5] W. P. Aue, J. Karhan, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* 64 (1976) 4226-4227.
- [6] R. Freeman, G. A. Morris, *Bull. Magn. Reson.* 1 (1979) 5-26.
- [7] D. Terpstra, *Top. Carbon-13 NMR Spectrosc.* 3 (1979) 62-78.
- [8] R. Freeman, *Proc. R. Soc. London A* 373 (1980) 149.
- [9] A. Bax: *Two-Dimensional NMR in Liquids*, Delft University Press, Delft 1982.
- [10] G. A. Morris in A. G. Marshall (Hrsg.): *Fourier, Hadamard, and Hilbert Transformations in Chemistry*, Plenum, New York 1982, S. 271-307.
- [11] A. Bax, *Bull. Magn. Reson.* 7 (1985) 167-183.
- [12] R. Benn, H. Günther, *Angew. Chem.* 95 (1983) 381-411; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 22 (1983) 350-380.
- [13] A. Bax, *Top. Carbon-13 NMR Spectrosc.* 4 (1984) 199-240.
- [14] H. Kessler, W. Bermel, A. Müller, K.-H. Pook in V. Hruby (Hrsg.): *The Peptides*, Vol. 7, Academic Press, Orlando, FL, USA 1985, S. 437-473.
- [15] K. Nagayama, *Methods Stereochem. Anal.* 6 (1986) 155-178.
- [16] H. Kessler, W. Bermel, *Methods Stereochem. Anal.* 6 (1986) 179-205.
- [17] K. Wüthrich: *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York 1986.
- [18] G. A. Morris, *Magn. Reson. Chem.* 24 (1986) 371-403.
- [19] A. Bax, L. Lerner, *Science (Washington)* 232 (1986) 960-967.
- [20] A. E. Derome: *Modern NMR Techniques for Chemistry Research*, Pergamon, Oxford 1987.
- [21] R. M. Carlson, W. R. Croasmun (Hrsg.): *Methods Stereochem. Anal.* 9 (1987).
- [22] N. Chandrakumar, S. Subramanian: *Modern Techniques in High Resolution FT-NMR*, Springer, New York 1987.
- [23] I. K. M. Sanders, B. K. Hunter: *Modern NMR Spectroscopy*, University Press, Oxford 1987.
- [24] O. W. Sørensen, G. W. Eich, M. H. Levitt, G. Bodenhausen, R. R. Ernst, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 16 (1983) 163-192.
- [25] F. J. M. van de Ven, C. W. Hilbers, *J. Magn. Reson.* 54 (1983) 512-520.
- [26] K. J. Packer, P. E. Wright, *Mol. Phys.* 50 (1983) 797-813.
- [27] L. R. Brown, J. Bremer, *J. Magn. Reson.* 68 (1986) 217-231.
- [28] A. Wokaun, R. R. Ernst, *Chem. Phys. Lett.* 52 (1977) 407-412.
- [29] A. D. Bain, *J. Magn. Reson.* 56 (1984) 418-427.
- [30] G. Bodenhausen, H. Kogler, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* 58 (1984) 370-388.
- [31] D. Piveteau, M.-A. Delsuc, J.-Y. Lallemand, *J. Magn. Reson.* 63 (1985) 255-270.
- [32] T. T. Nakashima, R. E. D. Mellung, *J. Magn. Reson.* 70 (1986) 187-203.
- [33] K. Nagayama, K. Wüthrich, P. Bachmann, R. R. Ernst, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78 (1977) 99-105.
- [34] K. Nagayama, P. Bachmann, K. Wüthrich, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* 37 (1978) 133-148.
- [35] G. Bodenhausen, *J. Magn. Reson.* 39 (1980) 175-179.
- [36] L. Müller, A. Kumar, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* 25 (1977) 383-390.
- [37] K. Nagayama, A. Kumar, K. Wüthrich, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* 40 (1980) 321-334.
- [38] A. Kumar, R. V. Hosur, K. Chandrasekhar, N. Murali, *J. Magn. Reson.* 63 (1985) 107-114.
- [39] A. A. Maudsley, R. R. Ernst, *Chem. Phys. Lett.* 50 (1977) 368-372.
- [40] L. Müller, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 4481-4484.
- [41] D. A. Vidusek, M. F. Roberts, G. Bodenhausen, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 5452-5456.
- [42] M. R. Bendall, D. T. Pegg, D. M. Dodrell, *J. Magn. Reson.* 52 (1983) 81-117.
- [43] A. Bax, R. H. Griffey, B. L. Hawkins, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 7188-7190.
- [44] D. G. Davis, W. C. Agosta, D. Cowburn, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 6189-6190.
- [45] A. Bax, R. H. Griffey, B. L. Hawkins, *J. Magn. Reson.* 55 (1983) 301-315.
- [46] D. H. Live, D. G. Davis, W. C. Agosta, D. Cowburn, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 6104-6105.
- [47] D. H. Live, I. M. Armitage, D. C. Delgarno, D. Cowburn, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 1775-1777.
- [48] M. Frey, G. Wagner, M. Vasak, O. W. Sørensen, D. Neuhaus, E. Wörgötter, J. H. R. Kägi, R. R. Ernst, K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 6847-6851.
- [49] J. D. Otvos, H. R. Engeseth, S. Wehrli, *J. Magn. Reson.* 61 (1985) 579-584.
- [50] A. Bax, M. F. Summers, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 2093-2094.
- [51] R. A. Byrd, M. F. Summers, G. Zon, C. Spellmeyer Fouts, L. G. Marzilli, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 504-505.
- [52] A. Bax, S. Subramanian, *J. Magn. Reson.* 67 (1986) 565-569.
- [53] D. Brühwiler, G. Wagner, *J. Magn. Reson.* 69 (1986) 546-551.
- [54] W. Bermel, C. Griesinger, H. Kessler, K. Wagner, *Magn. Reson. Chem.* 25 (1987) 325-326.
- [55] R. R. Ernst, W. A. Anderson, *Rev. Sci. Instrum.* 37 (1966) 93-102.
- [56] R. R. Ernst, *Adv. Magn. Reson.* 2 (1966) 1-135.
- [57] T. C. Farrar, E. D. Becker: *Pulse and Fourier Transform NMR*, Academic Press, New York 1971.
- [58] F. Bloch, *Phys. Rev.* 70 (1946) 460-474.
- [59] E. O. Stejskal, J. Schaefer, *J. Magn. Reson.* 13 (1974) 249-251.
- [60] E. O. Stejskal, J. Schaefer, *J. Magn. Reson.* 14 (1974) 160-169.
- [61] A. G. Redfield, S. D. Kunz, *J. Magn. Reson.* 19 (1975) 250-254.
- [62] G. Bodenhausen, R. Freeman, G. A. Morris, R. Niedermeyer, D. L. Turner, *J. Magn. Reson.* 25 (1977) 559-562.
- [63] U. Fano, *Rev. Mod. Phys.* 29 (1957) 74-93.
- [64] M. Weibull: *Atoms and Molecules*, Academic Press, New York 1978.
- [65] C. P. Slichter: *Principles of Magnetic Resonance*, 2. Auflage, Springer, Berlin 1978.
- [66] A. Böhm: *Quantum Mechanics*, Springer, New York 1979.
- [67] K. Blum: *Density Matrix Theory and Applications*, Plenum, New York 1981.
- [68] S. Goldman: *Information Theory*, Practice Hall, Finglewood Cliffs, NJ, USA 1953.
- [69] B. M. Brown: *The Mathematical Theory of Linear Systems*, Science Paperbacks, Chapman and Hall, London 1965.
- [70] R. M. Bracewell: *The Fourier Transform and its Applications*, McGraw-Hill, New York 1965.
- [71] D. C. Champeney: *Fourier Transforms and their Physical Applications*, Academic Press, New York 1973.
- [72] D. Ziesow: *On Line Rechner in der Chemie. Grundlagen und Anwendungen in der Fourierspektroskopie*, de Gruyter, Berlin 1973.
- [73] J. W. Cooper, *Top. Carbon-13 NMR Spectrosc.* 2 (1976) 391-431.
- [74] M. Karplus, *J. Chem. Phys.* 30 (1959) 11-15.
- [75] M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 2870-2871.
- [76] V. F. Bystrov, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 10 (1976) 41-81; V. F. Bystrov, A. S. Arseniev, Yu. D. Gavrilov, *J. Magn. Reson.* 30 (1978) 151-184.
- [77] I. Solomon, *Phys. Rev.* 99 (1955) 559-565.
- [78] J. H. Noggle, R. E. Schirmer: *The Nuclear Overhauser Effect, Chemical Applications*, Academic Press, New York 1971.
- [79] A. Abragam: *The Principles of Nuclear Magnetism*, Clarendon, Oxford 1978.
- [80] R. Kaiser, *J. Chem. Phys.* 42 (1965) 1838-1839.
- [81] I. D. Campbell, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* 11 (1973) 143-162.
- [82] A. A. Bothner-By in R. G. Shulman (Hrsg.): *Magnetic Resonance Studies in Biology*, Academic Press, New York 1979, S. 177.
- [83] I. O. Campbell, C. M. Dobson, R. J. P. Williamson, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1974, 888-889.
- [84] W. E. Hull, B. D. Sykes, *J. Chem. Phys.* 63 (1975) 867-880.
- [85] A. Kalk, H. J. C. Berendsen, *J. Magn. Reson.* 24 (1976) 343-366.
- [86] S. L. Gordon, K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 7094-7096.
- [87] R. Richarz, K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.* 30 (1978) 147-150.
- [88] G. Wagner, K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.* 33 (1979) 675-680.
- [89] J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* 71 (1979) 4546-4553.
- [90] A. Kumar, G. Wagner, R. R. Ernst, K. Wüthrich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96 (1980) 1156-1163.
- [91] A. Kumar, R. R. Ernst, K. Wüthrich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95 (1980) 1-6.
- [92] G. Wagner, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* 155 (1982) 347-366.
- [93] M. Rance, G. Bodenhausen, G. Wagner, K. Wüthrich, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* 62 (1985) 497-510.
- [94] P. Balaram, A. A. Bothner-By, J. Dadok, *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972) 4015-4017; A. A. Bothner-By, J. H. Noggle, *ibid.* 101 (1979) 5152-5155.
- [95] H. Kessler, W. Bermel, A. Friedrich, G. Krack, W. E. Hull, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 6297-6304.
- [96] F. M. Poulsen, J. C. Hoch, C. M. Dobson, *Biochemistry* 19 (1980) 2597-2607.
- [97] S. Macura, R. R. Ernst, *Mol. Phys.* 41 (1980) 95-117.
- [98] A. Kumar, G. Wagner, R. R. Ernst, K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 3654-3658.
- [99] C. M. Dobson, F. T. Olejniczak, F. M. Poulsen, R. G. Ratcliffe, *J. Magn. Reson.* 48 (1982) 97-110.
- [100] E. R. P. Zuiderweg, R. Kaptein, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 5837-5841.
- [101] M. Weiss, D. Petzl, R. Sauer, M. Karplus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 130-134.
- [102] H. J. Gutowski, D. M. McCall, C. P. Slichter, *J. Chem. Phys.* 21 (1953) 279-292.
- [103] H. J. Gutowski, A. Saika, *J. Chem. Phys.* 21 (1953) 1688-1694.
- [104] J. A. Pople, W. G. Schneider, H. J. Bernstein: *High Resolution NMR*, McGraw-Hill, New York 1959.
- [105] A. Loewenstein, T. M. Connor, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 67 (1963) 280-295.

- [106] J. Delpuech, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1964, 2697.
- [107] H. Kessler, *Angew. Chem.* 82 (1970) 237–253; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 9 (1970) 219–235.
- [108] L. M. Jackman, F. A. Cotton: *Synaptic Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, Academic Press, New York 1975.
- [109] A. Steigel, *NMR Basic Princ. Prog.* 15 (1978) 1–53.
- [110] H. W. Spiess, *NMR Basic Princ. Prog.* 15 (1978) 55–214.
- [111] G. Binsch, H. Kessler, *Angew. Chem.* 92 (1980) 445–463; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 19 (1980) 411–428.
- [112] M. L. Martin, G. J. Martin, J. Delpuech: *Practical NMR Spectroscopy*, Heyden, London 1980.
- [113] J. I. Kaplan, G. Fraenkel: *NMR of Chemically Exchanging Systems*, Academic Press, New York 1980.
- [114] J. Sandström: *Dynamic NMR Spectroscopy*, Academic Press, London 1982.
- [115] M. Oki, *Methods Stereochem. Anal.* 4 (1985).
- [116] B. H. Meier, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 6441–6442.
- [117] Y. Huang, S. Macura, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 5327–5333.
- [118] J. Hilton, L. H. Sutcliffe, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 10 (1975) 27–39.
- [119] C. P. Poole, H. A. Farach: *Relaxation in Magnetic Resonance. Dielectric and Mössbauer Applications*, Academic Press, New York 1971.
- [120] A. Wokaun, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* 67 (1977) 1752–1758.
- [121] S. Vega, *J. Chem. Phys.* 68 (1978) 5518–5527.
- [122] D. P. Weitekamp, J. R. Garbow, A. Pines, *J. Chem. Phys.* 77 (1982) 2870–2883.
- [123] D. P. Weitekamp, *Adv. Magn. Reson.* 11 (1983) 111–274.
- [124] V. Blechta, J. Schraml, *J. Magn. Reson.* 69 (1986) 293–301.
- [125] M. H. Levitt in W. S. Brey (Hrsg.): *Two-Dimensional NMR and Related Techniques*, Academic Press, New York, im Druck.
- [126] E. Noether, *Nachr. Ges. Wiss., Göttingen Math. Phys. Kl.* 1918, 235.
- [127] G. Bodenhausen, G. Wagner, M. Rance, O. W. Sørensen, K. Wüthrich, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* 59 (1984) 542–550.
- [128] G. Wagner, G. Bodenhausen, N. Müller, M. Rance, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 6440–6446.
- [129] E. R. P. Zuiderweg, *J. Magn. Reson.* 71 (1987) 283–293.
- [130] H. Oschkinat, A. Pastore, G. Bodenhausen, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 4110–4111.
- [131] D. I. Hoult, R. E. Richards, *Proc. R. Soc. London A* 344 (1975) 311–340.
- [132] J. Keeler, D. Neuhaus, *J. Magn. Reson.* 63 (1985) 454–472.
- [133] P. Bachmann, W. P. Aue, L. Müller, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* 28 (1977) 29–39.
- [134] D. J. States, R. A. Haberkorn, D. J. Ruben, *J. Magn. Reson.* 48 (1982) 286–292.
- [135] G. Drobny, A. Pines, S. Sinton, D. P. Weitekamp, D. Wemmer, *Faraday Symp. Chem. Soc.* 13 (1979) 49–55.
- [136] D. Marion, K. Wüthrich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113 (1983) 967–974.
- [137] A. Bax, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* 44 (1981) 542–561.
- [138] U. Piantini, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 6800–6801.
- [139] A. J. Shaka, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* 51 (1983) 169–173.
- [140] M. Rance, O. W. Sørensen, G. Bodenhausen, G. Wagner, R. R. Ernst, K. Wüthrich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117 (1983) 458–479.
- [141] N. Müller, R. R. Ernst, K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 6482–6492.
- [142] M. Rance, G. Wagner, O. W. Sørensen, K. Wüthrich, R. R. Ernst, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121 (1984) 1021–1026.
- [143] A. Bax, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* 45 (1981) 177–181.
- [144] C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 6394–6396.
- [145] C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* 64 (1986) 6837–6825.
- [146] C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* 75 (1987) 474–492.
- [147] L. Müller, *J. Magn. Reson.* 72 (1987) 191–197.
- [148] H. Oschkinat, A. Pastore, P. Pfändler, G. Bodenhausen, *J. Magn. Reson.* 69 (1986) 559–566.
- [149] P. Pfändler, G. Bodenhausen, *J. Magn. Reson.* 72 (1987) 475–492.
- [150] F. Guittet, M.-A. Delsuc, J.-Y. Lallemand, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 4278–4279.
- [151] E. Wörgötter, G. Wagner, K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 6162–6167.
- [152] R. H. Griffey, A. G. Redfield, *Q. Rev. Biophys.* 19 (1987) 51–82.
- [153] G. Otting, H. Senn, G. Wagner, K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.* 70 (1986) 500–505.
- [154] A. Wokaun, R. R. Ernst, *Mol. Phys.* 36 (1978) 317–341.
- [155] G. Bodenhausen, R. L. Vold, R. R. Vold, *J. Magn. Reson.* 37 (1980) 93–106.
- [156] G. Bodenhausen, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 14 (1981) 137–173.
- [157] L. Braunschweiler, G. Bodenhausen, R. R. Ernst, *Mol. Phys.* 48 (1983) 535–569.
- [158] T. H. Mareci, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* 51 (1983) 531–535.
- [159] H. Kessler, H. R. Loosli, H. Oschkinat, *Helv. Chim. Acta* 68 (1985) 661–681.
- [160] L. Braunschweiler, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* 53 (1983) 521–528.
- [161] D. G. Davis, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 2821–2823.
- [162] M. W. Edwards, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 918–923.
- [163] D. Piveteau, M.-A. Delsuc, E. Guittet, J.-Y. Lallemand, *J. Magn. Reson.* 71 (1987) 347–348.
- [164] A. Bax, R. Freeman, S. P. Kempell, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 4849–4851.
- [165] A. Bax, S. P. Kempell, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* 41 (1980) 349–353.
- [166] A. Bax, R. Freeman, T. A. Frenkiel, M. H. Levitt, *J. Magn. Reson.* 43 (1981) 478–483.
- [167] R. Freeman, T. Frenkiel, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 5545–5547.
- [168] O. W. Sørensen, R. Freeman, T. A. Frenkiel, T. H. Mareci, R. Schuck, *J. Magn. Reson.* 46 (1982) 180–184.
- [169] P. J. Keller, K. E. Vogele, *J. Magn. Reson.* 68 (1986) 389–392.
- [170] G. Bodenhausen, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* 28 (1977) 471–476.
- [171] R. Freeman, G. A. Morris, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1978, 684–686.
- [172] G. Bodenhausen, R. Freeman, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 320–321.
- [173] A. Bax, S. K. Sarkar, *J. Magn. Reson.* 60 (1984) 170–176.
- [174] M. H. Levitt, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *Chem. Phys. Lett.* 94 (1983) 540–544.
- [175] M. R. Bendall, D. T. Pegg, *J. Magn. Reson.* 53 (1983) 144–148.
- [176] D. T. Pegg, M. R. Bendall, *J. Magn. Reson.* 55 (1983) 114–127.
- [177] T. T. Nakashima, B. K. John, R. E. D. McClung, *J. Magn. Reson.* 59 (1984) 124–131.
- [178] A. Bax, *J. Magn. Reson.* 53 (1983) 517–520.
- [179] V. Rutar, *J. Magn. Reson.* 58 (1984) 306–310.
- [180] J. A. Wilde, P. H. Bolton, *J. Magn. Reson.* 59 (1984) 343–346.
- [181] H. Kessler, C. Griesinger, G. Zimmermann, *Magn. Reson. Chem.* 25 (1987) 579–583.
- [182] W. F. Reynolds, D. W. Hughes, M. Perpick-Dumont, R. G. Enriquez, *J. Magn. Reson.* 64 (1985) 304–311.
- [183] V. Sklenár, A. Bax, *J. Magn. Reson.* 71 (1987) 379–383.
- [184] G. Ortiz-Polo, R. Krishnamoorthi, D. H. Live, J. L. Markley, D. G. Davis, D. Cowburn, *J. Magn. Reson.* 68 (1986) 303–310.
- [185] H. Kessler, W. Bermel, C. Griesinger, 6. Diskussionstag. Fachgruppe Magn. Resonanzspektroskopie. (Berlin, 25. bis 28. September 1985).
- [186] A. Bax, D. G. Davis, S. K. Sarkar, *J. Magn. Reson.* 63 (1985) 230–234.
- [187] K. Hallenga, G. van Binst, *Bull. Magn. Reson.* 2 (1980) 343.
- [188] C. Wynants, K. Hallenga, G. van Binst, A. Michel, J. Zanen, *J. Magn. Reson.* 57 (1984) 93–98.
- [189] H. Kessler, C. Griesinger, J. Zarbock, H. R. Loosli, *J. Magn. Reson.* 57 (1984) 331–336.
- [190] H. Kessler, C. Griesinger, J. Lautz, *Angew. Chem.* 96 (1984) 434–435; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 444–445.
- [191] H. Kessler, W. Bermel, C. Griesinger, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 1083–1084.
- [192] H. Kessler, W. Bermel, C. Griesinger, C. Kolar, *Angew. Chem.* 98 (1986) 352–353; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25 (1986) 342–344.
- [193] H. Kessler, C. Griesinger, K. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 6927–6933.
- [194] W. F. Reynolds, D. W. Hughes, M. Perpick-Dumont, R. G. Enriquez, *J. Magn. Reson.* 63 (1985) 413–417.
- [195] C. Bauer, R. Freeman, S. Wimperis, *J. Magn. Reson.* 58 (1984) 526–532.
- [196] M. F. Summers, L. G. Marzilli, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 4285–4294.
- [197] C. Griesinger, *Dissertation*, Universität Frankfurt 1986.
- [198] A. A. Bothner-By, R. L. Stephens, J. Lee, C. D. Warren, R. W. Jeanloz, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 811–813.
- [199] A. Bax, D. G. Davis, *J. Magn. Reson.* 63 (1985) 207–213.
- [200] D. Neuhaus, J. Keeler, *J. Magn. Reson.* 68 (1986) 568–574.
- [201] H. Kessler, C. Griesinger, R. Kerssebaum, K. Wagner, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 607–609.
- [202] C. Griesinger, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* 75 (1987) 261–271.
- [203] P. L. Rinaldi, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 5167–5168.
- [204] C. Yu, G. C. Levy, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 6533–6537.
- [205] K. E. Kövér, G. Batta, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 5829–5830.
- [206] K. E. Kövér, G. Batta, *J. Magn. Reson.* 69 (1986) 519–522.
- [207] K. E. Kövér, G. Batta, Z. Mádi, *J. Magn. Reson.* 69 (1986) 538–541.
- [208] G. Eich, G. Bodenhausen, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 3731–3732.
- [209] A. Bax, G. Drobny, *J. Magn. Reson.* 61 (1985) 306–320.
- [210] H. Kessler, H. Oschkinat, C. Griesinger, W. Bermel, *J. Magn. Reson.* 70 (1986) 106–133.
- [211] S. Macura, N. G. Kumar, L. R. Brown, *Magn. Reson. Relat. Phenom. Proc. Congr. AMPERE 22nd 1984*, 496.

- [212] P. L. Weber, L. Müller, *J. Magn. Reson.* 73 (1987) 184–190.
- [213] P. H. Bolton, G. Bodenhausen, *Chem. Phys. Lett.* 89 (1982) 139–144.
- [214] P. H. Bolton, *J. Magn. Reson.* 48 (1982) 336–340.
- [215] H. Kessler, M. Bernd, H. Kogler, J. Zarbock, O. W. Sørensen, G. Bodenhausen, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 6944–6952.
- [216] A. Bax, *J. Magn. Reson.* 53 (1983) 149–153.
- [217] P. H. Bolton, *J. Magn. Reson.* 54 (1983) 333–337.
- [218] S. K. Sarkar, A. Bax, *J. Magn. Reson.* 63 (1985) 512–523.
- [219] P. H. Bolton, *J. Magn. Reson.* 62 (1985) 143–146.
- [220] M.-A. Delsuc, E. Guittet, N. Trotin, J.-Y. Lallemand, *J. Magn. Reson.* 56 (1984) 163–166.
- [221] D. Neuhaus, G. Wider, G. Wüthrich, K. Wagner, *J. Magn. Reson.* 57 (1984) 164–168.
- [222] H. Kessler, W. Bermel, C. Griesinger, *J. Magn. Reson.* 62 (1985) 573–579.
- [223] H. Kessler, W. Bermel, C. Griesinger, P. Hertl, E. Streich, A. Rieker, *J. Org. Chem.* 51 (1986) 596–601.
- [224] K. S. Lee, G. A. Morris, *J. Magn. Reson.* 70 (1986) 332–335.
- [225] K. S. Lee, G. A. Morris, *Magn. Reson. Chem.* 25 (1987) 176–178.
- [226] L. D. Field, B. A. Messerle, *J. Magn. Reson.* 62 (1985) 453–460.
- [227] L. D. Field, B. A. Messerle, *J. Magn. Reson.* 66 (1986) 483–490.
- [228] G. Wagner, *J. Magn. Reson.* 57 (1984) 497–505.
- [229] H. Kessler, S. Steuernagel, D. Gillissen, T. Kamiyama, *Helv. Chim. Acta* 70 (1987) 726–741.
- [230] O. W. Sørensen, C. Griesinger, R. R. Ernst, *Chem. Phys. Lett.* 135 (1987) 313–318.
- [231] C. Griesinger, C. Gemperle, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *Mol. Phys.*, im Druck.
- [232] G. Kessler, G. Gemmecker, B. Haase, unveröffentlicht.
- [233] G. Kessler, G. Gemmecker, S. Steuernagel, *Angew. Chem.* 100 (1988) 600; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27 (1988) Nr. 4.
- [234] J. L. Dimicoli, A. Volk, J. Mispelter, *J. Magn. Reson.* 63 (1985) 605–611.
- [235] S. Macura, L. R. Brown, *J. Magn. Reson.* 53 (1983) 529–535.
- [236] K. Nagayama, K. Wüthrich, P. Bachmann, R. R. Ernst, *Naturwissenschaften* 64 (1977) 581–583.
- [237] G. Bodenhausen, R. Freeman, D. L. Turner, *J. Magn. Reson.* 27 (1977) 511–514.
- [238] J. D. Mersh, J. K. M. Sanders, *J. Magn. Reson.* 50 (1982) 171–174.
- [239] H. Kessler, H. Oschkinat, O. W. Sørensen, H. Kogler, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* 55 (1983) 329–333.
- [240] A. J. Shaka, J. Keeler, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* 56 (1984) 294–313.
- [241] I. Müller, A. Kumar, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* 63 (1975) 5490–5491.
- [242] G. Bodenhausen, R. Freeman, R. Turner, *J. Chem. Phys.* 65 (1976) 839–840.
- [243] G. Bodenhausen, R. Freeman, G. A. Morris, *J. Magn. Reson.* 26 (1977) 373–378.
- [244] G. Bodenhausen, R. Freeman, G. A. Morris, D. L. Turner, *J. Magn. Reson.* 28 (1977) 17–28.
- [245] M. H. Levitt, G. Bodenhausen, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* 53 (1983) 443–461.
- [246] J.-S. Wang, T. C. Wong, *J. Magn. Reson.* 61 (1985) 59–66.
- [247] A. Bax, *J. Magn. Reson.* 52 (1983) 339–344.
- [248] V. Rutar, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 4095–4096.
- [249] A. Bax, R. Freeman, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 1099–1100.
- [250] C. Bauer, R. Freeman, T. A. Frenkiel, J. Keeler, A. J. Shaka, *J. Magn. Reson.* 58 (1984) 442–457.
- [251] R. Brüschweiler, J. C. Madsen, C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* 73 (1987) 380–385.
- [252] G. W. Vuister, R. Boelens, *J. Magn. Reson.* 73 (1987) 328–333.
- [253] C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* 73 (1987) 574–579.
- [254] C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 7227–7228.
- [255] H. Oschkinat, C. Griesinger, P. J. Kraulis, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *Nature (London)* 332 (1988) 374.
- [256] R. Boelens, A. Podoplelov, R. Kaptein, *J. Magn. Reson.* 69 (1986) 116–123.
- [257] R. M. Scheek, S. Stroob, R. Boelens, K. Dijkstra, R. Kaptein, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 705–706.
- [258] A. G. Haasnoot, F. J. M. van de Ven, C. W. Hilbers, *J. Magn. Reson.* 56 (1984) 343–349.
- [259] J. Boyd, C. M. Dobson, C. Redfield, *FEBS Lett.* 186 (1985) 35–40.
- [260] H. Kessler, M. Will, unveröffentlicht.
- [261] G. Wider, R. Baumann, K. Nagayama, R. R. Ernst, K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.* 42 (1981) 73–87.
- [262] K. Nagayama, K. Wüthrich, *Eur. J. Biochem.* 114 (1981) 365–374.
- [263] H. Oschkinat, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* 60 (1984) 164–169.
- [264] H. Kessler, A. Müller, H. Oschkinat, *Magn. Reson. Chem.* 23 (1985) 844–852.
- [265] H. Kessler, H. Oschkinat, *Angew. Chem.* 97 (1985) 689–690; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 690–692.
- [266] O. W. Sørensen, R. R. Ernst, M. Rance, *J. Magn. Reson.* 56 (1984) 527–534.
- [267] A. Kumar, R. V. Hosur, K. Chandrasekhar, *J. Magn. Reson.* 60 (1984) 143–148.
- [268] R. V. Hosur, K. V. R. Chary, A. Kumar, G. Govil, *J. Magn. Reson.* 62 (1985) 123–127.
- [269] S. Mayor, R. V. Hosur, *Magn. Reson. Chem.* 23 (1985) 470–473.
- [270] R. V. Hosur, M. R. Kumar, A. Sheth, *J. Magn. Reson.* 65 (1985) 375–381.
- [271] M. Rance, G. Wagner, O. W. Sørensen, K. Wüthrich, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* 59 (1984) 250–261.
- [272] G. Wagner, *J. Magn. Reson.* 55 (1983) 151–156.
- [273] W. E. Hull Heidelberg, persönliche Mitteilung.
- [274] N. Chandrakumar, S. Subramanian, *J. Magn. Reson.* 62 (1985) 346–349.
- [275] N. Chandrakumar, *J. Magn. Reson.* 60 (1984) 28–36.
- [276] N. Chandrakumar, *J. Magn. Reson.* 63 (1985) 174–178.
- [277] N. Chandrakumar, *J. Magn. Reson.* 63 (1985) 202–206.
- [278] N. Chandrakumar, G. V. Visalakshi, D. Ramaswamy, S. Subramanian, *J. Magn. Reson.* 67 (1986) 307–318.
- [279] N. Chandrakumar, *J. Magn. Reson.* 67 (1986) 457–465.
- [280] N. Chandrakumar, *J. Magn. Reson.* 71 (1987) 322–324.
- [281] S. Sankaran, A. Bax, *J. Magn. Reson.* 71 (1987) 325–330.
- [282] A. Bax, D. G. Davis, *J. Magn. Reson.* 65 (1985) 355–360.
- [283] M. H. Levitt, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* 43 (1981) 502–507.
- [284] M. H. Levitt, R. Freeman, T. A. Frenkiel, *J. Magn. Reson.* 47 (1982) 328–330.
- [285] M. H. Levitt, R. Freeman, T. A. Frenkiel, *Adv. Magn. Reson.* 11 (1983) 48–110.
- [286] A. Bax, R. Freeman, T. A. Frenkiel, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 2102–2104.
- [287] T. H. Mareci, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* 48 (1982) 158–163.
- [288] M. A. Thomas, A. Kumar, *J. Magn. Reson.* 54 (1983) 319–323.
- [289] J. Boyd, C. M. Dobson, C. Redfield, *J. Magn. Reson.* 55 (1983) 170–176.
- [290] G. Wagner, E. R. P. Zuiderweg, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113 (1983) 854–860.
- [291] M. Rance, O. W. Sørensen, W. Leupin, H. Kogler, K. Wüthrich, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* 61 (1985) 67–80.
- [292] J. Buddrus, H. Bauer, *Angew. Chem.* 99 (1987) 642–659; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 26 (1987) 625–642.
- [293] M. Novic, H. Oschkinat, P. Pfändler, G. Bodenhausen, *J. Magn. Reson.* 73 (1987) 493–511.
- [294] G. A. Morris, R. Freeman, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 760–762.
- [295] A. Bax, *J. Magn. Reson.* 57 (1984) 314–318.
- [296] A. Bax, C.-H. Niu, D. Live, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 1150–1151.
- [297] M. R. Bendall, D. M. Doddrell, D. T. Pegg, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 4603–4605.
- [298] D. T. Pegg, D. M. Doddrell, M. R. Bendall, *J. Chem. Phys.* 77 (1982) 2745–2752.
- [299] D. M. Doddrell, D. T. Pegg, M. R. Bendall, *J. Magn. Reson.* 48 (1982) 323–327.
- [300] H. Bildsoe, S. Donstrup, H. J. Jakobsen, *J. Magn. Reson.* 53 (1983) 154–162.
- [301] O. W. Sørensen, S. Donstrup, H. Bildsoe, H. J. Jakobsen, *J. Magn. Reson.* 55 (1983) 347–354.
- [302] D. L. Turner, *J. Magn. Reson.* 70 (1986) 465–471.
- [303] H. Kogler, O. W. Sørensen, G. Bodenhausen, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* 55 (1983) 157–163.
- [304] J. R. Garbow, D. P. Weitekamp, A. Pines, *Chem. Phys. Lett.* 93 (1982) 504–509.
- [305] V. Rutar, *Chem. Phys. Lett.* 106 (1984) 258–261.
- [306] A. S. Zektzer, M. J. Quast, G. S. Linz, G. E. Martin, *Magn. Reson. Chem.* 24 (1986) 1083–1088.
- [307] A. S. Zektzer, B. K. John, R. N. Castle, G. E. Martin, *J. Magn. Reson.* 72 (1987) 556–561.
- [308] A. S. Zektzer, B. K. John, G. E. Martin, *Magn. Reson. Chem.* 25 (1987) 752–756.
- [309] M. H. Levitt, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* 33 (1979) 473–476.
- [310] R. Freeman, S. P. Kempell, M. H. Levitt, *J. Magn. Reson.* 38 (1980) 453–479.
- [311] M. H. Levitt, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* 43 (1981) 65–80.
- [312] R. Tycko, E. Schneider, A. Pines, *J. Chem. Phys.* 81 (1984) 680–688.
- [313] M. H. Levitt, *J. Magn. Reson.* 48 (1982) 234–264.
- [314] J. S. Waugh, *J. Magn. Reson.* 49 (1982) 517–521.
- [315] M. H. Levitt, *J. Magn. Reson.* 50 (1982) 95–110.
- [316] M. H. Levitt, R. Freeman, *Adv. Magn. Reson.* 11 (1983) 47–110.
- [317] A. J. Shaka, J. Keeler, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* 53 (1983) 313–340.
- [318] M. H. Levitt, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* 55 (1983) 247–254.
- [319] A. J. Shaka, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* 55 (1983) 487–493.
- [320] M. H. Levitt, R. R. Ernst, *Mol. Phys.* 50 (1983) 1109–1124.
- [321] W. Warren, A. H. Zewail, *J. Chem. Phys.* 78 (1983) 2279–2297.

- [322] W. Warren, A. H. Zewail, *J. Chem. Phys.* **78** (1983) 3583–3592.
- [323] R. Tycko, *Phys. Rev. Lett.* **51** (1983) 775–777.
- [324] M. H. Levitt, D. Suter, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **80** (1984) 3064–3068.
- [325] A. J. Shaka, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **59** (1984) 169–176.
- [326] R. Tycko, H. M. Cho, E. Schneider, A. Pines, *J. Magn. Reson.* **61** (1985) 90–101.
- [327] C. Counsell, M. H. Levitt, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **63** (1985) 133–141.
- [328] R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **45** (1966) 3845.
- [329] A. Allerhand, R. E. Addleman, D. Osman, *J. Am. Chem. Soc.* **107** (1985) 5809–5810.
- [330] A. Allerhand, M. Dohrenwend, *J. Am. Chem. Soc.* **107** (1985) 6684–6688.
- [331] A. Allerhand, R. E. Addleman, D. Osman, M. Dohrenwend, *J. Magn. Reson.* **65** (1985) 361–363.
- [332] A. J. Shaka, P. B. Barker, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **64** (1985) 547–552.
- [333] A. J. Shaka, J. Keeler, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **19** (1986) 47–129.
- [334] J. L. Marshall, *Methods Stereochem. Anal.* **2** (1983).
- [335] W. Bermel, K. Wagner, C. Griesinger, *J. Magn. Reson.*, im Druck.
- [336] H. Senn, G. Otting, K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.* **109** (1987) 1090–1092.
- [337] A. Volk, J. Mispelter, J. L. Dimicoli, unveröffentlicht.
- [338] J. W. Keepers, T. L. James, *J. Am. Chem. Soc.* **104** (1982) 929–939.
- [339] J. W. Keepers, T. L. James, *J. Magn. Reson.* **57** (1984) 404–426.
- [340] G. B. Young, T. L. James, *J. Am. Chem. Soc.* **106** (1984) 7986–7988.
- [341] G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *J. Magn. Reson.* **61** (1985) 158–164.
- [342] A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **17** (1985) 1–32.
- [343] W. Masselowski, Jr., P. H. Bolton, *J. Magn. Reson.* **65** (1985) 526–530.
- [344] E. Suzuki, N. Pattabiraman, G. Zon, T. H. James, *Biochemistry* **25** (1986) 6854–6865.
- [345] P. A. Mirau: *Quantitative Interpretation of a Single 2D NOE Spectrum*, Poster, präsentiert auf der 28. ENC (Asilomar, USA, 5.–9. April 1987).
- [346] T. L. James, B. A. Borgias, A. M. Bianucci, N. Jamin, N. Pattabiraman, E. Suzuki, N. Zhou, G. Zon in J. W. Jarozewski, K. Schaumburg, H. Kofod (Hrsg.): *NMR Spectroscopy and Drug Design Development*, Munksgard, Kopenhagen 1987.
- [347] S. Macura, Y. Huang, D. Suter, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **43** (1981) 259–281.
- [348] S. Macura, K. Wüthrich, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **46** (1982) 269–282.
- [349] H. Kessler, J. W. Bats, C. Griesinger, M. Will, K. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.* **110** (1988) 1033–1049.
- [350] G. Binsch, E. L. Eliel, H. Kessler, *Angew. Chem.* **83** (1971) 618–619; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **10** (1971) 570–572.
- [351] J. I. Kaplan, G. Fraenkel: *Dynamic Nuclear Resonance Spectroscopy*, Academic Press, New York 1980.
- [352] R. A. Hoffman, S. Forsén, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1** (1966) 15–204.
- [353] H. Bleich, J. Wilde, *J. Magn. Reson.* **56** (1984) 149–150.
- [354] R. Willem, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **20** (1987) 1–94.
- [355] H. Kessler, R. Schuck, R. Siegmeyer, *J. Am. Chem. Soc.* **104** (1982) 4486–4487.
- [356] Y. Huang, G. Bodenhausen, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **103** (1981) 6988–6989.
- [357] G. Bodenhausen, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **45** (1981) 367–373.
- [358] G. Bodenhausen, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **104** (1982) 1304–1309.
- [359] E. R. Johnston, M. J. Dellwo, J. Hendrix, *J. Magn. Reson.* **66** (1986) 399–409.
- [360] E. W. Abel, T. P. J. Coston, K. G. Orrell, V. Sik, D. Stephenson, *J. Magn. Reson.* **70** (1986) 34–53.
- [361] M. D. Christopher, L. Lian, C. Redfield, K. D. Topping, *J. Magn. Reson.* **69** (1986) 201–209.
- [362] D. G. Davis, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **64** (1985) 533–535.
- [363] A. Bax, V. Sklenar, M. F. Summers, *J. Magn. Reson.* **70** (1986) 327–331.
- [364] P. H. Bolton, *J. Magn. Reson.* **67** (1986) 391–395.
- [365] M. Rance, *J. Magn. Reson.* **74** (1987) 557–564.
- [366] R. Bazzo, I. O. Campbell, *J. Magn. Reson.* **76** (1988) 358–361; R. Bazzo, I. Boyd, *ibid.* **75** (1987) 452–466.
- [367] J. S. Waugh, *J. Magn. Reson.* **68** (1986) 189–192.
- [368] K. E. Kövér, G. Batta, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **19** (1987) 223–266.
- [369] W. Bermel (Bruker, Karlsruhe), persönliche Mitteilung.
- [370] D. G. Davies, *J. Am. Chem. Soc.* **109** (1987) 3471–3472.
- [371] R. Willem, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **20** (1988) 1–94.
- [372] H. Kessler, U. Anders, G. Gemmecker, *J. Magn. Reson.*, im Druck.
- [373] J. Cavanagh, J. P. Walter, J. Keeler, *J. Magn. Reson.* **74** (1987) 386–393.
- [374] G. Otting, K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.* **66** (1986) 359–363.