

# Vereinfachung von Protonen-NMR-Spektren durch sofortige homonukleare Breitbandentkopplung\*\*

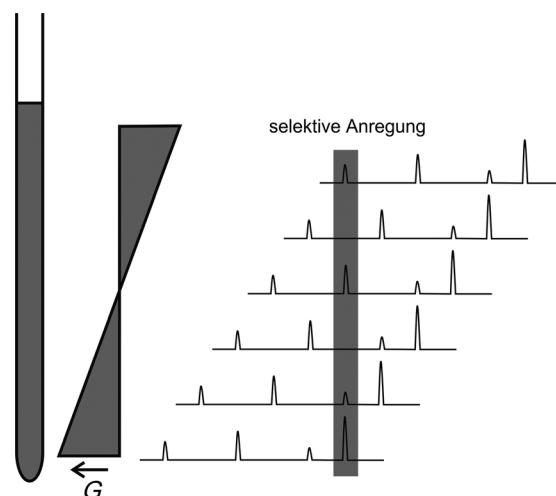
N. Helge Meyer und Klaus Zanger\*

Die NMR-Spektroskopie bietet vielseitige Möglichkeiten zur Analyse von Molekülen, um deren strukturelle, chemische und physikalische Eigenschaften zu charakterisieren. Eindimensionale Protonenspektren werden dabei mit Abstand am häufigsten aufgenommen. Da die spektrale Auflösung von Protonenspektren – im Vergleich zu den Spektren anderer NMR-aktiver Kerne – aber sehr gering ist, zeigen diese typischerweise starke Signalüberlagerungen, die in erster Linie aus skalaren Kopplungen zwischen mehreren Protonen resultieren. Homonukleare Breitbandentkopplung erlaubt die Reduzierung komplexer NMR-Signale auf Singulets und ist daher eine vielversprechende Möglichkeit, um dem Problem der geringen Auflösung von Signalen in Protonenspektren entgegenzuwirken. Tatsächlich konnte kürzlich gezeigt werden, dass der Auflösungsgewinn durch homonukleare Breitbandentkopplung mit der theoretischen Auflösung eines bei mehreren GHz aufgenommenen Spektrums vergleichbar ist.<sup>[1]</sup>

In den vergangenen 30 Jahren wurden verschiedene Methoden zur homonuklearen Breitbandentkopplung vorgestellt.<sup>[2–14]</sup> Diese kommen allerdings bisher nur sehr selten zum Einsatz, da sie vergleichsweise unempfindlich sind und die homonuklear entkoppelten Spektren in der Regel erst nach komplizierter Prozessierung der Rohdaten erhalten werden können. Die schichtselektive Breitbandentkopplung während eines schwachen Feldgradienten (benannt nach Zanger und Sterk als ZS-Methode)<sup>[14]</sup> wurde kürzlich als allgemeineres Konzept zur Aufnahme sogenannter reiner Verschiebungsspektren wiederentdeckt und verbessert.<sup>[1,7,15]</sup>

Die ZS-Methode bedient sich der räumlich selektiven Anregung während eines schwachen Feldgradienten, um eine Entkopplung aller Spins zu erreichen. Verschiedene Anteile

der NMR-Probe sind während eines linearen Gradienten verschiedenen starken Magnetfeldern ausgesetzt, sodass eine ortsabhängige Frequenzverschiebung  $\Delta\omega = \gamma G s$  entlang des Probenvolumens mit der Länge  $s$  entsteht. Dabei entspricht  $G$  der eingesetzten Gradientenstärke und  $\gamma$  dem gyromagnetischen Verhältnis des beobachteten Kerns. Dadurch ist es möglich, mittels eines selektiven Pulses das gesamte Spektrum zu erfassen, jedoch werden verschiedene Signale in verschiedenen Regionen der NMR-Probe angeregt. Es wird also eine räumlich aufgelöste Signalanregung erreicht (Abbildung 1). Die selektive Entkopplung kann dann mittels einer Kombination aus einem weichen und einem harten 180°-Puls während eines Feldgradienten gleicher Stärke implementiert werden.



**Abbildung 1.** Selektive Anregung während eines schwachen Feldgradienten führt zu einer Anregung des gesamten Spektrums, bei dem jedes Signal in einer anderen Schicht des Probenvolumens angeregt wird.

[\*] Dr. N. H. Meyer, Prof. K. Zanger  
Institut für Chemie/Organische und Bioorganische Chemie  
Karl-Franzens Universität Graz  
Heinrichstraße 28, 8010 Graz (Österreich)  
E-Mail: klaus.zanger@uni-graz.at

[\*\*] Wir danken dem Österreichischen Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (FWF) unter Projektnummer P24742 für finanzielle Unterstützung von K.Z. Wir bedanken uns auch bei Dr. Wolfgang Bermel (Bruker BioSpin, Rheinstetten) für seine Hilfe bei der Umsetzung der Pulssequenz.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201300129> zu finden.

© 2013 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial Lizenz, die eine Nutzung, Verbreitung und Vervielfältigung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird.

Nach Hamilton-Näherung nullter Ordnung wird vollständige Entkopplung zweier Spins zur Zeit  $\tau$  erreicht, wenn der zu entkoppelnde Spin nach einer Zeit  $\tau/2$  invertiert wird. Da sich skalare Kopplung im Vergleich zur chemischen Verschiebung aber nur sehr langsam entwickelt, kann ein freier Induktionszerfall (FID) von ca. 10–20 ms (im Folgenden als Datenblock bezeichnet) ohne nennenswerte Kopplungsentwicklung aufgenommen werden. Der vollständige FID wird in einem Pseudo-2D-Experiment durch Inkrementieren der Zeitspanne  $\tau$  zwischen Anregung und Aufnahme und Aneinanderreihung aller Datenblöcke aufgenommen.<sup>[14]</sup>

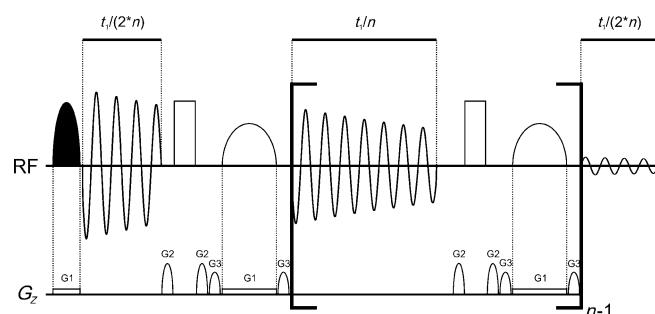
Diese Methode der homonuklearen Breitbandentkopplung hat jedoch auch zwei entscheidende Nachteile: Zum

einen leidet die Methode unter der sehr niedrigen Sensitivität durch ortsselektive Anregung und zum anderen erschwert die Notwendigkeit, eine Serie an Datenblöcken aufzunehmen, die mittels einer speziellen Prozessierung aneinander gereiht werden, die Aufnahme der Spektren. Die Sensitivität verringert sich um den Faktor  $\Delta\omega/(G s)$ ; dabei ist  $G$  die Gradientenstärke (in  $\text{Gcm}^{-1}$ ) und  $s$  die Gesamtlänge des detektierten Probenvolumens (in cm). Typischerweise entspricht die Sensitivität eines ZS-entkoppelten Spektrums nur einigen Prozent der Sensitivität eines regulär aufgenommenen Spektrums. Der Verlust der Signalstärke wird aber teilweise dadurch kompensiert, dass Multipletts zu Singulets zusammenfallen. Auch unter dem Aspekt, dass neue Spektrometer-Hardware – insbesondere kryogenische Probenköpfe – die Detektionssensitivität maßgeblich verbessern, wiegt der Signalverlust weniger schwer. In erster Linie leidet die generelle Anwendbarkeit dieser Methode daher durch die Tatsache, dass ein vollständiger FID typischerweise aus ca. 30 Datenblöcken besteht, die alle in einem individuellen Experiment aufgenommen werden müssen. Außerdem ist ein zusätzlicher Prozessierungsschritt notwendig, bei dem die inkrementierten FIDs aus dem Pseudo-2D-Experiment zu einem einzelnen FID zusammengesetzt werden. Die serielle Aufnahme von mehreren FIDs, um ein einzelnes entkoppeltes Spektrum zu erhalten, führt zusätzlich zu einer signifikanten Sensitivitätsverringerung in Bezug auf die benötigte Messzeit. Eine andere vielversprechende Methode ist die BIRD-basierte homonukleare Entkopplung. Bilineare Rotationsentkopplungspulse (bilinear rotation decoupling, BIRD) unterscheiden grundsätzlich  $^{12}\text{C}$ -gebundene von  $^{13}\text{C}$ -gebundenen Protonen. In einem BIRD-basierten homonuklear entkoppelten Experiment wird nur eine Teilmenge aller Protonen, nämlich die an natürlich vorkommendem  $^{13}\text{C}$  gebundenen Protonen, angeregt und von  $^{12}\text{C}$ -gebundenen Protonen entkoppelt. Auch dieses Experiment leidet unter geringer Sensitivität, da die natürliche Häufigkeit von  $^{13}\text{C}$  bei ca. 1.1 % liegt. Daher können BIRD-entkoppelte Spektren unter idealen Bedingungen auch nur 1.1 % der Sensitivität eines regulären Spektrums erreichen. Demgegenüber erlaubt die ZS-basierte Entkopplung eine Optimierung des Signal-Rausch-Verhältnisses durch Anpassung der Gradientenstärke, wenngleich dabei auch die spektrale Breite der entkoppelten Dimension verringert wird. Zusätzlich ist die BIRD-basierte Entkopplung zu einem gewissen Grad weniger flexibel anwendbar als die ZS-basierte Methode, da sie auf kohlenstoffgebundene Protonen beschränkt ist und außerdem nicht auf uniform  $^{13}\text{C}$ -markierte Verbindungen angewendet werden kann. Der größte Vorteil der BIRD-Entkopplung ist aber die Möglichkeit, auch stark gekoppelte Protonen zu entkoppeln. Dies ist mit der ZS-Methode nicht ohne Weiteres möglich. Diesbezüglich können BIRD- und ZS-Entkopplung also ergänzend eingesetzt werden. Erst kürzlich haben Lupulescu et al. gezeigt, dass die Verwendung von BIRD-Pulsfolgen während der Aufnahme einzelner Datenblöcke homonukleare Breitbandentkopplung in einem einzelnen Experiment erlaubt ohne den Einsatz zusätzlicher Prozessierungsschritte.<sup>[16]</sup>

Hier präsentieren wir einen allgemeinen Ansatz basierend auf ZS-Entkopplung, um reine Verschiebungsspektren

ohne den Einsatz komplexer Prozessierungsverfahren in wesentlich kürzerer Zeit zu erhalten. Dabei wird die ZS-Entkopplung während der Aufnahme eingesetzt, um entkoppelte Spektren in einem einzelnen Aufnahmeschritt zu erhalten, vergleichbar mit der BIRD-entkoppelten Einzelaufnahme. Solche sofort entkoppelten Spektren lassen sich wie reguläre 1D-Spektren aufnehmen oder in der direkten Dimension mehrdimensionaler Spektren einsetzen, ohne dass eine zusätzliche „Entkopplungsdimension“ eingeführt werden muss. Daher entfallen auch zusätzliche Prozessierungsschritte. Aufgrund der verminderten Anzahl an Dimensionen werden signifikante Sensitivitätssteigerungen bezogen auf die Messzeit im Vergleich mit herkömmlichen reinen Verschiebungsmethoden erreicht.

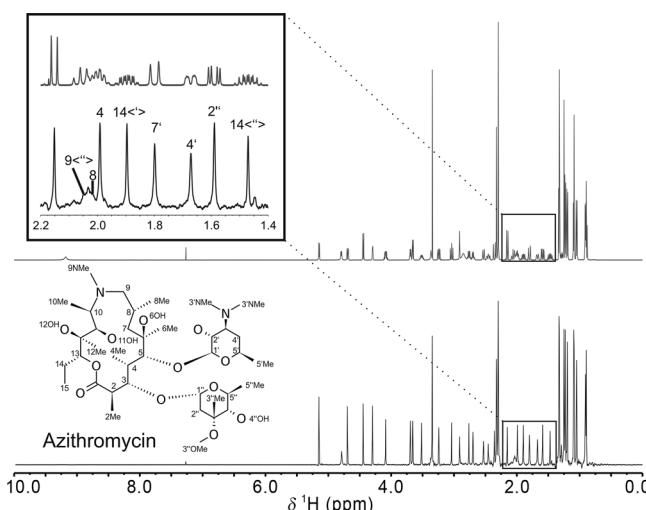
Um die direkte Dimension zu entkoppeln, wird die Aufnahme ungefähr alle  $1/3 (^3J_{\text{HH}})$  für die ZS-Entkopplungssequenz unterbrochen. Um eine Störung des FID zu vermeiden, darf sich während dieser Zeit unter keinen Umständen chemische Verschiebung entwickeln. Daher ist es vorteilhaft, dass während des schwachen Feldgradienten alle Signale „on resonance“ sind und somit auch keine chemische Verschiebung entwickeln. Alle Entwicklungszeiten vor und nach dem Gradienten, z.B. die Gradientenerholungszeit, werden symmetrisch um die beiden  $180^\circ$ -Pulse platziert, um chemische Verschiebungsentwicklung zu refokussieren. Morris und Mitarbeiter haben einige elegante Verbesserungen der ZS-Entkopplung vorgeschlagen.<sup>[11]</sup> Unter anderem haben sie den Zeitablauf der Pulssequenz optimiert, um eine Entkopplung der Signale in der Mitte jedes Datenblocks zu erreichen. Dadurch kann jeder Datenblock im Prinzip doppelt so lang sein. Um denselben Effekt beim sofortigen Entkoppeln zu erreichen, ist der erste Block der Aufnahme nur halb so lang wie die darauffolgenden Blöcke (Abbildung 2). Während die Aufnahme zur Entkopplung unterbrochen ist, relaxiert die Magnetisierung. Daher ist es entscheidend, die Entkop-



**Abbildung 2.** Pulssequenz zur Aufnahme sofort homonuklear entkoppelter Spektren. Schichtselektive Anregung wird durch einen bandselektiven  $90^\circ$ -Puls während eines schwachen Feldgradienten erreicht. Entkopplung kann dann durch eine Kombination aus einem harten  $180^\circ$ -Puls und einem bandselektiven  $180^\circ$ -Puls während eines Feldgradienten mit derselben Stärke, die bei der Anregung benutzt wurde, realisiert werden. Diese Pulsfolge wird ungefähr alle  $1/3 (^3J_{\text{HH}})$  eingeschaltet. Aufnahme und Entkopplung alternieren  $n$  mal. Dabei ist der erste Teil der Aufnahme nur halb so lang wie die folgenden. Dadurch wird eine volle Entkopplung jeweils in der Mitte jedes FID-Blocks erreicht. Offene Rechtecke repräsentieren harte  $180^\circ$ -Pulse. Ausgefüllte und offene Halbellipsen auf RF repräsentieren selektive  $90^\circ$ - bzw.  $180^\circ$ -Pulse.

lungspulse möglichst kurz zu halten, um die Auswirkungen der Relaxation während der Entkopplung zu begrenzen. Ansonsten wird der FID diskontinuierlich, was zu Artefakten im Spektrum führen würde. Die Pulse müssen dennoch lang genug sein, um auch eine Entkopplung nahegelegener Signale zu erreichen.

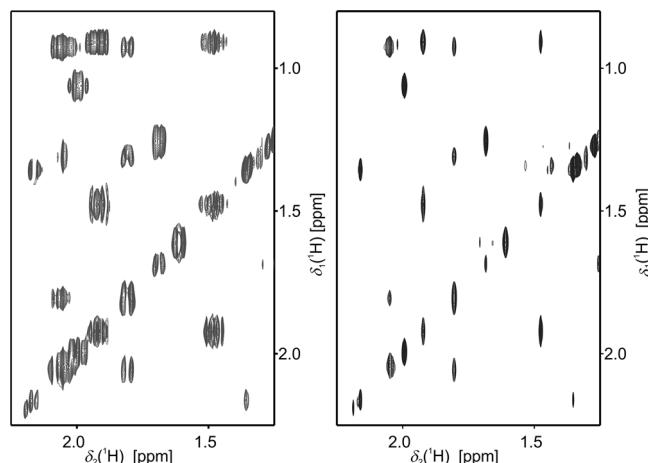
Es gilt also einen Kompromiss zu finden, der die Aufnahme artefaktfreier und zugleich hochaufgelöster Spektren ermöglicht: Die Verwendung von 10 ms langen Gauß-Pulsen mit einer Anregungsbreite von ca. 88 Hz erlaubt die Aufnahme hochaufgelöster Spektren. Artefakte entstehen lediglich für gekoppelte Signale, die sehr nahe beieinander liegen. Abbildung 3 zeigt den Vergleich eines konventionellen mit einem sofort entkoppelten Spektrum am Beispiel des Ma-



**Abbildung 3.** Herkömmliches  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von 4 mm Azithromycin in  $\text{CDCl}_3$  (oben) und entsprechendes sofort homoentkoppeltes Spektrum (unten). Lediglich die stark koppelnden Protonen der Methylengruppen 8 und 9 können durch diese Methode nicht aufgelöst werden. Das sofort homoentkoppelte Spektrum wurde mit 512 Scans in 20 min aufgenommen. Für die Aufnahme eines entsprechenden Spektrums mit einer herkömmlichen Entkopplungsmethode (z. B. Pseudo-2D-ZS-Entkopplung) würden über 10 h benötigt.

kroldiantibiotikums Azithromycin.<sup>[17,18]</sup> Alle Signalüberlappungen in der überfüllten Region zwischen 1.4 und 2.2 ppm werden durch die sofortige ZS-Entkopplung vollständig beseitigt. Man beachte, dass die stark koppelnden Protonen 8 und 9'' nicht entkoppelt werden können, da ZS-Entkopplung auf schwache Kopplung beschränkt ist. Reine Verschiebungsspektren können mit der sofortigen ZS-Entkopplung wesentlich schneller aufgenommen werden, als es mit der herkömmlichen ZS-Methode möglich ist. Beispielsweise kann ein entkoppeltes Spektrum von 40 mm Azithromycin in wenigen Sekunden aufgenommen werden (Abbildung S2 in den Hintergrundinformationen). Im Vergleich zu dem gemeinhin verwendeten Pseudo-2D-Ansatz, bei dem der FID aus Datenblöcken von 10–20 ms Länge zusammengesetzt wird, kann die sofortige Entkopplung die Messzeit für die Aufnahme reiner Verschiebungsspektren bei einer Akquisitionszeit von 500 ms um den Faktor 25–50 verringern.

Sofortige Entkopplung kann ohne weiteres auch in der direkten Dimension von homonuklearen 2D-Spektren, wie z.B. NOESY- oder TOCSY-Experimenten, verwendet werden. Es wurden bereits zahlreiche homonuklear entkoppelte 2D-Spektren veröffentlicht, jedoch war meist die indirekte Dimension, die typischerweise viel geringer aufgelöst ist als die direkte Dimension, entkoppelt. Entkopplung der direkten Dimension war lediglich mithilfe einer zusätzlichen Entkopplungsdimension möglich. Die hier beschriebene Entkopplungssequenz ermöglicht die sofortige Entkopplung der direkten Dimension, sodass hochaufgelöste 2D-Spektren aufgenommen werden können. Abbildung 4 sowie Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen zeigen TOCSY-Spektren von Azithromycin, die in der direkten Dimension entkoppelt sind. Um die Anwendbarkeit dieser Methode für Routinemessungen zu veranschaulichen, wurde zusätzlich ein



**Abbildung 4.** Ausschnitt aus einem herkömmlichen TOCSY-Spektrum von 40 mm Azithromycin in  $\text{CDCl}_3$  (links) und ein entsprechendes  $\omega_2$ -entkoppeltes Spektrum (rechts). Beide Spektren wurden mit einer Mischzeit von 60 ms und 256 Inkrementen in der indirekten Dimension aufgenommen. Die Gesamtaquisitionszeit betrug ca. 2 h für das herkömmliche TOCSY (8 Scans) und 20 h für das homonuklear entkoppelte TOCSY (64 Scans).

Spektrum mit limitierter Akquisitionszeit (2.5 h) aufgenommen (Abbildung S2). Um zu überprüfen, ob die Methode auch auf größere und damit schneller relaxierende Moleküle anzuwenden ist, haben wir entkoppelte Spektren des synthetischen antimikrobiellen Peptids CM15 aufgenommen, welches zuvor mittels NMR-Spektroskopie analysiert wurde.<sup>[19,20]</sup> Typischerweise zeigen schon Spektren von sehr kurzen Peptiden schwerwiegende Signalüberlagerungen. Beispielsweise ist es nicht möglich, einzelne Signale von  $\alpha$ -Protonen von CM15 zu identifizieren. Entkopplung löst diese Überlagerung jedoch vollständig auf (Abbildung S3). Homonukleare 2D-Spektren (z.B. ein TOCSY-Spektrum, Abbildung S4), zeigen ebenfalls wesentlich weniger Signalüberlagerungen, sodass eine Signalzuordnung deutlich erleichtert wird. Da die relativen Integrale der Signale im Spektrum durch die ZS-Entkopplung nicht beeinflusst werden, können sogar reine Verschiebungs-NOESY-Spektren aufgenommen

und analysiert werden. Höher aufgelöste entkoppelte NOESY-Spektren liefern wesentlich mehr Distanzinformationen, da Signalüberlagerungen drastisch reduziert sind. Dies ist insbesondere in der 3D-Strukturaufklärung entscheidend.

Zusammengefasst präsentieren wir hier einen allgemeinen Ansatz, um reine Verschiebungsspektren ohne zusätzliche Prozessierungsschritte aufzunehmen. Diese Methode bietet einen gewaltigen Sensitivitätsvorteil bezogen auf die Aufnahmezeit im Vergleich zur herkömmlichen ZS-Entkopplung. Zudem lässt sich direkte Entkopplung sehr einfach in Standard-2D- und 3D-Pulssequenzen (z. B. zur Aufnahme von TOCSY- oder NOESY-Spektren) implementieren. Sofort entkoppelte 2D-Spektren von Proben in mm-Konzentrationen können dabei in wenigen Minuten, anstatt in mehreren Stunden für herkömmliche ZS-Entkopplung, aufgenommen werden.

## Experimentelles

Alle Experimente wurden an einem Spektrometer Bruker Avance III 500 MHz bei 298 K aufgenommen. 1D-<sup>1</sup>H-Spektren wurden mit der Pulssequenz aus Abbildung 2 aufgenommen. Dieselbe Pulsfolge wurde in eine Standard-TOCSY-Sequenz implementiert, bei der der letzte harte 90°-Puls durch einen selektiven Puls während eines schwachen Feldgradienten ersetzt wurde. Falls nicht anders angegeben, wurde ein 60 ms Eburp-Puls<sup>[21]</sup> und ein 10 ms Gauß-Puls während eines Gradienten (G1) von 0.5 Gauß cm<sup>-1</sup> verwendet, um ortsselektive Anregung bzw. Refokussierung zu erreichen. Zur Reduktion von Artefakten wurden sinusförmige Gradienten mit 4 und 5.5 Gauß cm<sup>-1</sup> für G2 bzw. G3 verwendet. Die Spektren wurden mit 4 mm oder 40 mm Azithromycin in CDCl<sub>3</sub> gemessen.

Eingegangen am 7. Januar 2013,  
veränderte Fassung am 27. Februar 2013  
Online veröffentlicht am 3. Juni 2013

**Stichwörter:** Homonukleare Entkopplung · NMR-Spektroskopie · Reine Verschiebung · Strukturaufklärung · TOCSY

- 
- [1] J. A. Aguilar, S. Faulkner, M. Nilsson, G. A. Morris, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3993–3995; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3901–3903.
  - [2] W. P. Aue, J. Karhan, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 4226–4227.
  - [3] A. Bax, A. F. Mehlkopf, J. Smidt, *J. Magn. Reson.* **1979**, *35*, 167–169.
  - [4] J. C. Cobas, M. Martin-Pastor, *J. Magn. Reson.* **2004**, *171*, 20–24.
  - [5] J. R. Garbow, D. P. Weitekamp, A. Pines, *Chem. Phys. Lett.* **1982**, *93*, 504–509.
  - [6] B. Luy, *J. Magn. Reson.* **2009**, *201*, 18–24.
  - [7] M. Nilsson, G. A. Morris, *Chem. Commun.* **2007**, 933–935.
  - [8] J. Nuzillard, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1996**, *118*, 132–135.
  - [9] A. J. Pell, R. A. Edden, J. Keeler, *Magn. Reson. Chem.* **2007**, *45*, 296–316.
  - [10] A. J. Pell, J. Keeler, *J. Magn. Reson.* **2007**, *189*, 293–299.
  - [11] P. Sakhaei, B. Haase, W. Bermel, *J. Magn. Reson.* **2009**, *199*, 192–198.
  - [12] A. J. Shaka, J. Keeler, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **1984**, *56*, 294–313.
  - [13] M. Woodley, R. Freeman, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1994**, *111*, 225–228.
  - [14] K. Zangerer, H. Sterk, *J. Magn. Reson.* **1997**, *124*, 486–489.
  - [15] J. A. Aguilar, M. Nilsson, G. A. Morris, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 9890–9891; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9716–9717.
  - [16] A. Lupulescu, G. L. Olson, L. Frydman, *J. Magn. Reson.* **2012**, *218*, 141–146.
  - [17] S. Kosol, E. Schrank, M. Bukvic-Krajacic, G. E. Wagner, H. Meyer, C. Göbl, K. Zangerer, P. Novak, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5632–5636.
  - [18] W. Schönfeld, S. Mutak in *Macrolide Antibiotics* (Hrsg.: W. Schönfeld, H. A. Kirts), Birkhäuser, Basel, **2002**, S. 73.
  - [19] D. Andreu, J. Ubach, A. Boman, B. Wahlin, D. Wade, R. B. Merrifield, H. G. Boman, *FEBS Lett.* **1992**, *296*, 190–194.
  - [20] M. Respondek, T. Madl, C. Göbl, R. Golser, K. Zangerer, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5228–5234.
  - [21] H. Geen, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **1991**, *93*, 93–141.