

Joseph B. Lambert
Scott Gronert
Herbert F. Shurvell
David A. Lightner

Spektroskopie

Strukturaufklärung in der Organischen Chemie

2., aktualisierte Auflage

Klassifizierung von Mehrfachresonanz-Experimenten

Experimente, bei denen die entkoppelten und die beobachteten Kerne das gleiche Nuklid repräsentieren – meistens Protonen (^1H) –, nennt man *homonukleare* Doppelresonanz-Experimente. Die Nomenklatur zur Kurzbezeichnung solcher Experimente lautet $^1\text{H}\{^1\text{H}\}$. Das Symbol für den entkoppelten Kern wird ohne Leerzeichen in geschweiften Klammern hinter das Symbol für den beobachteten Kern geschrieben. Gehören der entkoppelte und der beobachtete Kern zu unterschiedlichen Nukliden, spricht man von einem *heteronuklearen* Doppelresonanz-Experiment, wie im Fall von ^1H -entkoppelten ^{13}C -NMR-Spektren, deren Kurzbezeichnung $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ lautet. Werden bei einem heteronuklearen Dreifachresonanz-Experiment die Kerne von zwei verschiedenen Nukliden entkoppelt, schreibt man die Symbole der beiden entkoppelten Kerne getrennt jeweils in geschweiften Klammern hinter das Symbol des beobachteten Kerns, wie zum Beispiel $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\{^{31}\text{P}\}$.

Doppelresonanz-Experimente können auch nach der Intensität beziehungsweise der Breite des Frequenzbands des B_2 -Wechselfelds klassifiziert werden. Umfasst das B_2 -Wechselfeld nur einen Teil der Resonanzfrequenzen der Kerne des entkoppelten Nuklids im untersuchten Molekül, dann handelt es sich um eine so genannte *selektive* Entkopplung. Die Entkopplungen in den Abbildungen 5.5 und 5.6, die in Abschnitt 5.1 beschriebene Signalunterdrückung und der Magnetisierungstransfer, den wir in Abschnitt 5.2 diskutiert haben, stellen Beispiele für selektive Doppelresonanz-Experimente dar. Bei den beiden Entkopplungsexperimenten werden nur die Kopplungen zu den spezifischen Protonen eliminiert, deren Resonanzfrequenz mit dem B_2 -Wechselfeld selektiv eingestrahlt wird. Die Resonanzfrequenzen der anderen Kerne können dabei einer kleinen Verschiebung unterliegen, dem so genannten *Bloch-Siegert-Shift*. Die Größe des Bloch-Siegert-Shifts hängt von der Intensität des B_2 -Wechselfelds sowie vom Abstand der Resonanzfrequenz des jeweiligen beobachteten Kerns von der Frequenz des B_2 -Feldes, also der Resonanzfrequenz des entkoppelten Kerns, ab. Bei einem genaueren Vergleich der Spektren in Abbildung 5.6 findet man mehrere solcher Verschiebungen. Werden mit dem B_2 -Wechselfeld *alle* Resonanzfrequenzen eines spezifischen Nuklids eingestrahlt, spricht man von einer *nichtselektiven* oder *Breitband-Entkopplung* (kurz: BB-Entkopplung). Eine Breitband-Entkopplung (BB-Entkopplung) findet unter anderem bei der routinemäßigen Messung der meisten ^{13}C -NMR-Spektren statt, um die Kopplungen der ^{13}C -Kerne zu *allen* Protonen zu eliminieren. Abbildung 2.25 zeigt zum Beispiel die ^{13}C -NMR-Spektren von 3-Hydroxybuttersäure mit und ohne ^1H -BB-Entkopplung. Um bei der Breitband-Entkopplung alle ^1H -Resonanzfrequenzen erzeugen zu können, wurde das B_2 -Wechselfeld mit weißem Rauschen moduliert. Deswegen wurde dieser Typ von Experiment früher auch als ^1H -Rausch-Entkopplung bezeichnet.

Off-Resonance-Entkopplung

Durch die ^1H -BB-Entkopplung werden die Kopplungsmuster der $^1\text{J}_{\text{CH}}$ -Kopplungen aus den ^{13}C -NMR-Spektren eliminiert. Zwar werden die Spektren dann deutlich einfacher, aber es geht auch die Information über die Anzahl der Protonen, mit denen die einzelnen Kohlenstoffatome direkt verbunden sind, verloren. In vollständig gekoppelten ^{13}C -NMR-Spektren wird die Analyse der Aufspaltungs muster durch die Überlagerung von Resonanzsignalen infolge der großen $^1\text{J}_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten allerdings häufig erheblich erschwert. Dieses Problem wurde früher zumindest teilweise durch die so genannte ^1H -Off-Resonance-Entkopplung gelöst. Diese Methode wurde entwickelt, um die ^{13}C -NMR-Spektren einerseits wenigstens etwas zu vereinfachen, andererseits aber die Kopplungs informationen zu erhalten. Zu diesem Zweck wird ein B_2 -Wechselfeld eingestrahlt, dessen Frequenz

ober- oder unterhalb des etwa 10 ppm breiten Bereichs der ^1H -Resonanzfrequenzen liegt. Auf diese Weise werden die Kopplungen nicht vollständig eliminiert, sondern nur ihre Kopplungskonstanten auf Restwerte $^1J_{\text{res}}$ verkleinert, die näherungsweise durch die Formel $^1J_{\text{res}} = 2\pi ^1J_{\text{CH}} \Delta v / \gamma B_2$ quantitativ beschrieben werden können. In dieser Gleichung repräsentiert $^1J_{\text{CH}}$ die jeweilige normale Kopplungskonstante im vollständig gekoppelten Spektrum, γ das magnetogyrische Verhältnis der Protonen und Δv die Differenz zwischen der Entkopplerfrequenz und der Resonanzfrequenz des Protons, das an der jeweiligen Kopplung zu einem spezifischen Kohlenstoffatom beteiligt ist. Das Resultat der ^1H -Off-Resonance-Entkopplung ist ein ^{13}C -NMR-Spektrum mit intakten Multiplicitäten, dessen Signale infolge der kleineren Kopplungskonstanten aber weniger überlappen als im normalen, vollständig gekoppelten Spektrum und daher leichter zu analysieren sind. Deswegen eignen sich ^1H -Off-Resonance-entkoppelte ^{13}C -NMR-Spektren besser, um zu ermitteln, ob die einzelnen Signale durch Methyl- (Quartett), Methylen- (Triplet), Methin- (Dublett) oder quartäre Kohlenstoffatome (Singulett) verursacht werden. Wenn die Protonen einer Methylengruppe diastereotop sind, kann das Resonanzsignal des Kohlenstoffatoms als Dublett vom Dublett erscheinen. Die äußeren Peaks von Quartetts und Triplets in Off-Resonance-entkoppelten Spektren sind häufig kleiner, als es gemäß den Binomialkoeffizienten zu erwarten wäre. Deswegen können Doublets und Quartetts manchmal nur schwer unterschieden werden. ► Abbildung 5.8 zeigt als Beispiel das ^{13}C -NMR-Spektrum von Vinylacetat mit vollständiger und mit ^1H -Off-Resonance-Entkopplung. Im Fall komplizierter Moleküle ist die Zuordnung und Analyse der ^{13}C -Resonanzsignale infolge von Signalüberlappungen und Unklarheiten bezüglich der Identität von Quartetts auch trotz des Einsatzes der ^1H -Off-Resonance-Entkopplung häufig noch sehr schwierig. Nicht zuletzt deswegen ist die Off-Resonance-Entkopplung heute praktisch vollständig durch die spektrale Editierung mithilfe der APT- und der DEPT-Pulssequenz verdrängt worden, die wir in Abschnitt 5.5 beschreiben werden.

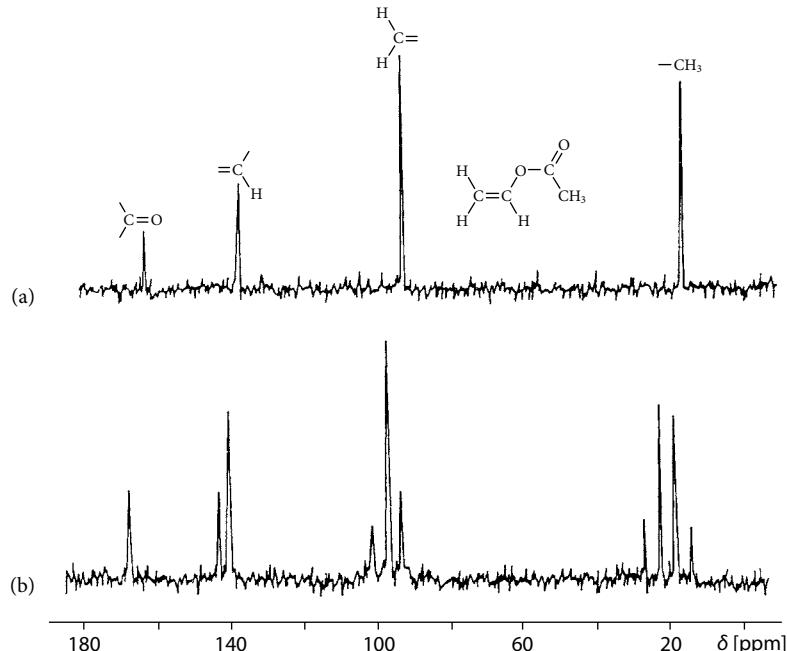


Abbildung 5.8: Das ^{13}C -NMR-Spektrum von Vinylacetat.

(a) Mit vollständiger ^1H -BB-Entkopplung. (b) Mit ^1H -Off-Resonance-Entkopplung. (Mit freundlicher Genehmigung von: Günther, H. 1992: *NMR Spectroscopy*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK, S. 270.)

Bei frühen Spin-Entkopplungsexperimenten wurde das B_2 -Wechselfeld während der Beobachtung der anderen Kerne kontinuierlich eingestrahlt. Diese Methode ist allerdings mit zwei Schwierigkeiten verbunden. Erstens erfolgt mit dem B_2 -Wechselfeld die Übertragung von Energie auf die Probe, die letztlich in Wärme umgewandelt wird. Mit zunehmender Flussdichte B_0 des äußeren Magnetfelds und somit der Messfrequenz von 60 MHz auf heute bis zu 1 GHz wuchs auch die erforderliche Intensität des B_2 -Entkopplungsfelds. Die resultierende Erwärmung der Probe ist für empfindliche biologische, organische und anorganische Moleküle nicht mehr akzeptabel. Zweitens wird es mit steigender Flussdichte B_0 des äußeren Magnetfelds immer schwieriger, B_2 -Wechselfelder mit der vollständigen Bandbreite von ^1H -Frequenzen zu erzeugen, die sich bei einer Messfrequenz von 60 MHz über etwa 600 Hz, bei einer Messfrequenz von 500 MHz aber bereits über etwa 5000 Hz erstrecken.

Um diese Probleme bei der heteronuklearen Entkopplung zu vermeiden, wurde die kontinuierliche Einstrahlung des B_2 -Feldes bei modernen Methoden durch eine Reihe von kurzen Pulsen ersetzt, die ebenfalls zur Eliminierung der Kopplungeffekte führen. In ► Abbildung 5.9 werden diese Pulse und ihre Effekte am Beispiel eines $^{13}\text{C}(^1\text{H})$ -Experiments für zwei koppelnde Kerne $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ veranschaulicht. Zunächst werden die ^{13}C -Kerne mit einem 90° - B_1 -Puls in x -Richtung angeregt, wodurch die makroskopischen Magnetisierungen sowohl der ^{13}C -Kerne, die mit einem Proton im $+1/2$ -Spinzustand koppeln, als auch der ^{13}C -Kerne, die mit einem Proton im $-1/2$ -Spinzustand koppeln, auf die y -Achse gedreht werden (siehe Abbildung 5.9a → Abbildung 5.9b). Da sich die Resonanzfrequenzen der jeweiligen ^{13}C -Kerne in Abhängigkeit vom Spinzustand des mit ihnen koppelnden Protons entsprechend der Größe der Kopplungskonstante aber leicht unterscheiden, rotieren die Magnetisierungsvektoren im feststehenden Koordinatensystem mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten in der x,y -Ebene um die z -Achse. Infolgedessen driften sie sowohl im feststehenden als auch im rotierenden Koordinatensystem (siehe Abschnitt 2.4) mit der Zeit zunehmend auseinander. Nimmt man an, dass die Referenzfrequenz des rotierenden Koordinatensystems (siehe Abschnitt 2.5) genau in der Mitte zwischen den Resonanzfrequenzen der ^{13}C -Kerne liegt, die mit dem Proton in den unterschiedlichen Spinzuständen koppeln, drehen sich die Magnetisierungsvektoren der ^{13}C -Kerne im rotierenden Koordinatensystem nach dem 90° -Puls gleich schnell in entgegengesetzter Richtung von der y -Achse weg (siehe Abbildung 5.9c). Nach einer Wartezeit τ werden dann die Protonen durch einen 180° -Puls in y -Richtung (ist analog zum B_2 -Wechselfeld des Entkopplungsexperiments) angeregt. Das führt aber zu einem Austausch der Magnetisierungsvektoren der ^{13}C -Kerne, die mit den Protonen in den unterschiedlichen Spinzuständen koppeln. Der Vektor, der im feststehenden Koordinatensystem langsamer um die z -Achse rotierte und deswegen hinter dem anderen zurückblieb, befindet sich jetzt plötzlich vor dem anderen Vektor – und umgekehrt. Da sich die Larmor-Frequenzen der ^{13}C -Kerne aber nicht geändert haben, bewegen sich die beiden Vektoren sowohl im feststehenden als auch im rotierenden Koordinatensystem nun wieder aufeinander zu (siehe Abbildung 5.9d). Nach einer Wartezeit τ , die genauso lang ist wie die erste Wartezeit, fallen die beiden Magnetisierungsvektoren wieder zusammen – im rotierenden Koordinatensystem genau entlang der y -Achse (siehe Abbildung 5.9e). Dieser Prozess wird während der Akquisition mit einer Rate (in Hz) wiederholt, die größer ist als die Kopplungskonstante. Dadurch werden die Auswirkungen der Kopplung eliminiert, weil die makroskopischen Magnetisierungen der ^{13}C -Kerne, die sich nur durch die Spinzustände der mit ihnen verbundenen Protonen unterscheiden, durch die wiederholten Pulsfolgen schnell genug

gemittelt werden. Dementsprechend erscheint im ^{13}C -NMR-Spektrum nur ein Peak für diese ^{13}C -Kerne. Das Auseinander- und Zusammendriften der Magnetisierungsvektoren verläuft auch dann vollkommen analog, wenn die Referenzfrequenz nicht genau in der Mitte zwischen den Resonanzfrequenzen der beiden ^{13}C -Kerne liegt. Die Vektoren treffen nur nicht genau auf der y-Achse wieder zusammen. Der Effekt auf die Resonanzsignale ist aber der gleiche. Auf diese Weise kann somit eine vollständige ^1H -Entkopplung von ^{13}C -NMR-Spektren allein mithilfe von kurzen Pulsen während der Akquisition statt durch die kontinuierliche Einstrahlung eines B_2 -Wechselfelds hoher Intensität während des gesamten Experiments erreicht werden. In der Praxis unterliegt diese Methode allerdings gewissen Einschränkungen, weil die 180° -Pulse sehr exakt sein müssen und die B_2 -Wechselfelder immer kleine Inhomogenitäten aufweisen. Die Auswirkungen dieser Ungenauigkeiten konnten jedoch durch Weiterentwicklungen des Experiments eliminiert werden, indem der 180° -Puls durch einen so genannten zusammengesetzten Puls (engl. *composite pulse*) ersetzt oder eine so genannte Phasenzyklisierung (engl. *phase cycling*) durchgeführt wird (siehe Abschnitt 5.8). Zwei erfolgreiche Methoden dieser Art sind zum Beispiel das MLEV-16-Experiment und insbesondere das WALTZ-16-Experiment. Die Bezeichnung MLEV-16 leitet sich vom Namen eines der Erfinder dieser Sequenz (Malcolm Levitt) sowie von den 16 Phasenzyklen des Experiments ab. Mithilfe des WALTZ-16-Experiments kann eine vollständige Entkopplung erreicht werden, die im Vergleich zur kontinuierlichen Anwendung eines B_2 -Wechselfelds über einen viel größeren Bereich und mit einem Bruchteil an Senderleistung und somit an eingestrahlter Energie (und Erwärmung) erfolgen kann. Mit dem Ursprung der Bezeichnung WALTZ werden wir uns in Abschnitt 5.8 noch beschäftigen.

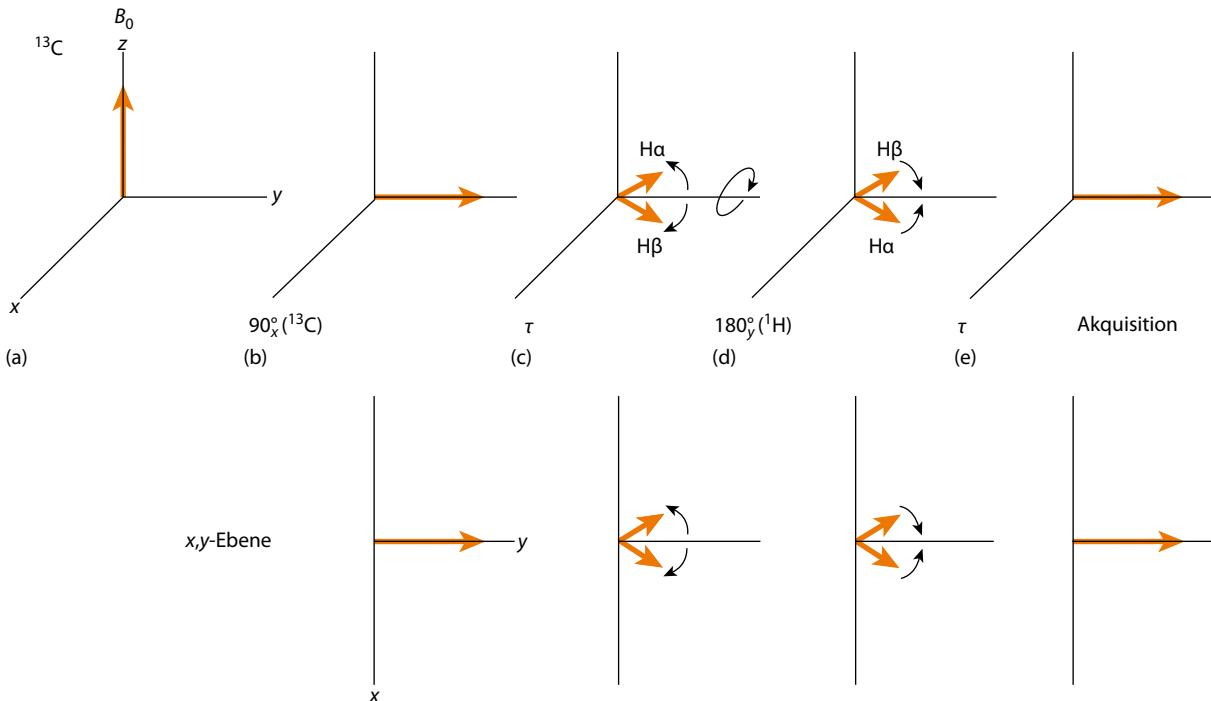


Abbildung 5.9: Pulssequenz zur Eliminierung heteronuklearer Kopplungen.

5.4 Kern-Overhauser-Effekt

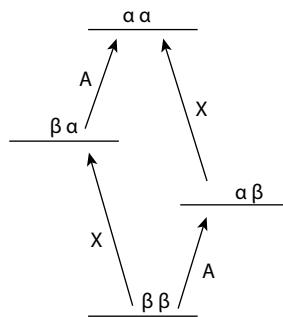
Um einer Dipol-Dipol-Relaxation unterliegen zu können, müssen zwei magnetische Kerne räumlich eng benachbart sein und sich mit einer geeigneten Geschwindigkeit beziehungsweise Frequenz bewegen (siehe Abschnitt 5.1). Wird ein B_2 -Wechselfeld mit der Resonanzfrequenz eines der beiden Kerne eingestrahlt, ändern sich infolgedessen auch die Besetzungszahlen der Spinzustände des anderen Kerns, wodurch die Intensität seines Resonanzsignals beeinflusst wird. Für diesen Effekt ist *keine* indirekte Spin-Spin-Kopplung (J -Kopplung) zwischen den Kernen erforderlich, weil die zugrunde liegende Wechselwirkung durch den Raum stattfindet. Overhauser entdeckte dieses Phänomen ursprünglich zwischen Kernen und ungepaarten Elektronen. Zwischen zwei Kernen wurde der Effekt zuerst von Anet und Bourne beobachtet und spielt für den Chemiker eine wesentlich größere Rolle. Seine Bedeutung für die Strukturaufklärung beruht vor allem auf der Abhängigkeit der Dipol-Dipol-Relaxation vom Abstand der beiden Kerne (siehe Gleichungen 5.1 und 5.2). Nach seinem Erstentdecker wird der Effekt **Kern-Overhauser-Effekt** oder kurz **NOE** (von engl. *nuclear Overhauser effect*) genannt.

Theoretische Erklärung des NOE

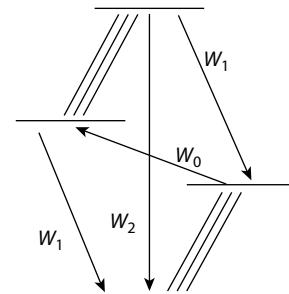
Die Entstehung des Kern-Overhauser-Effekts wird in ► Abbildung 5.10 veranschaulicht. Auf der linken Seite ist das Energieniveaudiagramm der Spinzustände zweier Spin-1/2-Kerne A und X in Abwesenheit eines B_2 -Wechselfelds und somit einer Doppelresonanz dargestellt. Die Auswirkungen von J -Kopplungen sind für die folgende Betrachtung ohne Bedeutung und werden daher ignoriert. Das Diagramm stellt eine Erweiterung von Abbildung 2.4 von einem Kern auf zwei Kerne dar, wobei β einen $+1/2$ - und α einen $-1/2$ -Spinzustand repräsentiert. Für die Kombination der beiden Kerne existieren vier Gesamtspinzustände: (1) Beide Kerne weisen einen β -Spin auf ($\beta\beta$), (2) Kern A befindet sich im β - und Kern X im α -Zustand ($\beta\alpha$), (3) Kern A befindet sich im α - und Kern X im β -Zustand ($\alpha\beta$) sowie (4) beide Kerne besitzen einen α -Spin ($\alpha\alpha$). Es gibt zwei Übergänge, bei denen Kern A vom β - in den α -Zustand angeregt wird ($\beta\beta \rightarrow \alpha\beta$ und $\beta\alpha \rightarrow \alpha\alpha$), und zwei Übergänge, bei denen Kern X vom β - in den α -Zustand angeregt wird ($\beta\beta \rightarrow \beta\alpha$ und $\alpha\beta \rightarrow \alpha\alpha$). Wenn die Kopplungskonstante $J_{AX} = 0$ Hz beträgt, ist die Energiedifferenz der beiden A-Übergänge und der beiden X-Übergänge jeweils gleich groß. Da die chemischen Verschiebungen im Vergleich zur Larmor-Frequenz der Kerne sehr klein sind, sind die beiden Zustände $\alpha\beta$ und $\beta\alpha$ fast vollständig entartet. In Abbildung 5.10 ist ihre Energiedifferenz zur Verdeutlichung der unterschiedlichen chemischen Verschiebungen übertrieben groß dargestellt.

Die normalen Intensitäten der Resonanzsignale der Kerne A und X werden durch die Besetzungsdifferenzen zwischen dem unteren und dem oberen Spinzustand der jeweils zugrunde liegenden Übergänge bestimmt – zum Beispiel vom Besetzungsdifferenz zwischen den Zuständen $\alpha\beta$ und $\alpha\alpha$ für einen der X-Übergänge und somit für einen Peak des Resonanzdubletts von X. Bei einem NOE-Experiment wird ein B_2 -Wechselfeld mit der Resonanzfrequenz eines Kerns (hier von Kern A) eingestrahlt und die Auswirkung auf die Intensität des Resonanzsignals eines anderen Kerns (hier von Kern X) beobachtet. Wenn die zusätzliche Einstrahlung in diesem Doppelresonanz-Experiment mit der Resonanzfrequenz von A erfolgt, was auf der rechten Seite von Abbildung 5.10 durch jeweils drei parallele Linien hervorgehoben wird, findet infolge der partiellen Sättigung von A eine Verminderung der Besetzungsdifferenzen zwischen den Spinzuständen statt, die durch

A-Übergänge korreliert sind. Im Vergleich zur normalen Situation im Energiediagramm links in Abbildung 5.10 werden also die Besetzungszahlen der Spinzustände $\alpha\alpha$ und $\alpha\beta$ – das heißt der oberen Zustände der beiden A-Übergänge – erhöht und die Besetzungszahlen der Spinzustände $\beta\alpha$ und $\beta\beta$ – das heißt der unteren Zustände der beiden A-Übergänge – verringert. Wenn der Abstand der Kerne A und X klein genug ist, kann an der Einstellung des neuen Gleichgewichts unter dem Einfluss der partiellen Sättigung von A durch das B_2 -Wechselfeld noch ein weiterer Übergang beteiligt sein, der infolge der Erhöhung der Besetzungszahl des Spinzustands $\alpha\alpha$ vermehrt stattfindet, nämlich die Dipol-Dipol-Relaxation von $\alpha\alpha$ nach $\beta\beta$, die in der Abbildung als W_2 -Übergang bezeichnet wird. Das heißt, bei der Einstellung des neuen Gleichgewichts wechseln die Spinzustände des Zweispinsystems auch auf der Route $\beta\alpha \rightarrow \alpha\alpha \rightarrow \beta\beta \rightarrow \alpha\beta$, wodurch die Besetzungszahl des Zustands $\beta\alpha$ zusätzlich verringert und die des Zustands $\alpha\beta$ zusätzlich erhöht wird. Durch die zusätzliche Entleerung des $\beta\alpha$ -Zustands wird der Besetzungsunterschied für einen der X-Übergänge ($\beta\beta \rightarrow \beta\alpha$) und durch die zusätzliche Auffüllung des $\alpha\beta$ -Zustand der Besetzungsunterschied für den anderen X-Übergang ($\alpha\beta \rightarrow \alpha\alpha$) infolge des Kern-Overhauser-Effekts vergrößert. Diese verstärkte Polarisation der Kernspins von X bedeutet, dass die Intensität des Resonanzsignals von X unter dem Einfluss der partiellen Sättigung von A ansteigt – wenn der Abstand zwischen A und X für eine Dipol-Dipol-Relaxation und somit einen NOE klein genug ist. In erster Näherung bleiben die Besetzungszahlen der Spinzustände $\alpha\alpha$ und $\beta\beta$ konstant, weil die Zustände simultan durch einen Übergang aufgefüllt und durch einen anderen Übergang entleert werden. Die normale Relaxation der Kerne X, die rechts in Abbildung 5.10 durch die W_1 -Übergänge ($\alpha\alpha \rightarrow \alpha\beta$ und $\beta\alpha \rightarrow \beta\beta$) repräsentiert wird, trägt nicht zur Erhöhung der Intensität des Signals von X bei, weil sich diese Prozesse nicht von der normalen Situation links in Abbildung 5.10 unterscheiden.



Die Pfeile bedeuten Anregungen in höhere Spinzustände.



Die Pfeile bedeuten Relaxationen in niedrigere Spinzustände.

Abbildung 5.10: Energiediagramme der Spinzustände eines AX-Zweispinsystems. Links: Die Spinzustände eines normalen AX-Zweispinsystems. Rechts: Die Spinzustände des gleichen Spinsystems, wenn ein B_2 -Wechselfeld mit der Resonanzfrequenz des Kerns A eingestrahlt wird.

Die Relaxation durch den Übergang vom $\alpha\beta$ nach $\beta\alpha$ (W_2 in Abbildung 5.10) kann ebenfalls zur Einstellung des Gleichgewichts während des Doppelresonanz-Experiments beitragen. Dieser Relaxationsprozess würde allerdings zu einer Verminderung der Intensität des Resonanzsignals von X führen, da er eine verstärkte Entleerung des Spinzustands $\beta\beta$ und eine weitere Auffüllung des Zustands $\alpha\alpha$ verursacht ($\beta\beta \rightarrow \alpha\beta \rightarrow \beta\alpha \rightarrow \alpha\alpha$), während die Besetzungszahlen von $\alpha\beta$ und $\beta\alpha$ konstant

bleiben. Im Fall von Flüssigkeiten und kleinen Molekülen findet der Übergang W_0 jedoch viel seltener statt als der Übergang W_2 ($W_0 \ll W_2$), so dass eine Intensitätssteigerung des Resonanzsignals von X zu erwarten ist. Die Frequenzen der W_2 -Übergänge liegen im MHz-Bereich, die der W_0 -Übergänge dagegen im kHz-Bereich. Dieses Verhältnis steht im Einklang mit der erheblich größeren Energiedifferenz zwischen den Spinzuständen $\beta\beta$ und $\alpha\alpha$ des W_2 -Übergangs im Vergleich zum Abstand der Spinzustände $\alpha\beta$ und $\beta\alpha$ des W_0 -Übergangs, die auch in Abbildung 5.10 qualitativ dargestellt ist. Die schnellen Bewegungen kleiner Moleküle in Lösung erzeugen Wechselfelder im MHz-Bereich und fördern somit die W_2 -Relaxationen. Sehr große Moleküle bewegen sich dagegen langsamer und führen daher zu Wechselfeldern im Hz- bis kHz-Bereich, die bevorzugt die W_0 -Relaxationen ermöglichen.

Beobachtung des NOE

Sättigt man bei einem Doppelresonanz-Experiment die Kerne A in Molekülen mit einer Molekülmasse bis zu etwa 1000 bis 3000 u, ist nach den Ausführungen im obigen Absatz eine Intensitätssteigerung des Resonanzsignals der Kerne X zu erwarten. Diese Intensitätserhöhung tritt allerdings nur auf, wenn der Abstand der Kerne A und X klein genug ist – das heißt kleiner als etwa 5 Å –, so dass die W_2 -Relaxation dominiert. Diese Bedingungen einer genügend kleinen Molekülmasse und eines nicht zu großen Abstands der Kerne entspricht dem in Abschnitt 5.1 bereits erwähnten Extreme Narrowing Limit. Bei größeren Molekülen – auf jeden Fall bei Molekülmassen oberhalb von 5000 u – erfolgt dagegen die W_0 -Relaxation viel häufiger als die W_2 -Relaxation. Das heißt, in diesen Fällen ist die Wahrscheinlichkeit W_0 für einen W_0 -Übergang viel größer als die Wahrscheinlichkeit W_2 für einen W_2 -Übergang ($W_0 >> W_2$). Infolgedessen ist bei großen Molekülen eine Reduktion der Signalintensität oder sogar eine Inversion (negative Amplitude) des Resonanzsignals von X zu beobachten. Liegt die Molekülmasse im Übergangsbereich zwischen etwa 1000 und 3000 u, kann der NOE im NMR-Spektrum auch völlig ausbleiben, weil W_0 und W_2 jetzt (etwa) gleich groß sein können und sich die Auswirkungen der W_2 - und W_0 -Übergänge auf die Besetzungszahlen dann gerade gegenseitig aufheben. Die Größe der Intensitätsänderung des Resonanzsignals von X – also die Größe des NOE –, die mit dem griechischen Kleinbuchstaben η (eta) bezeichnet wird, hängt gemäß Gleichung 5.9 von der Differenz der Wahrscheinlichkeiten beziehungsweise Geschwindigkeiten W_2 und W_0 der W_2 - und W_0 -Relaxation in Relation zur Summe der Geschwindigkeiten aller Relaxationsprozesse ab. Dabei muss W_1 mit dem Faktor 2 berücksichtigt werden, weil zwei verschiedene Übergänge zu einer W_1 -Relaxation führen.

$$\eta = \frac{\gamma_A}{\gamma_X} \left(\frac{W_2 - W_0}{W_0 + 2W_1 + W_2} \right) \quad (5.9)$$

In dieser Gleichung steht γ_A für das magnetogyrische Verhältnis des Kerns A, der durch das B_2 -Wechselfeld gesättigt wird, und γ_X für das magnetogyrische Verhältnis des Kerns X, dessen Resonanzsignal beobachtet wird. In der Praxis wird die Größe des NOE durch den Vergleich der Intensitäten I und I_0 , die mit (I) und ohne (I_0) Doppelresonanz (und somit NOE) gemessen werden, gemäß Gleichung 5.10 ermittelt.

$$\eta = \frac{I - I_0}{I_0} \quad (5.10)$$

Für kleine Moleküle (also am Extreme Narrowing Limit) wird die maximal mögliche Zunahme der Intensität infolge des NOE durch den größtmöglichen Wert von η beschrieben, der $\eta_{\max} = \gamma_A / 2\gamma_X$ beträgt. Durch Umformung von Gleichung 5.10 erhält man eine Gleichung, welche die Intensität I des Resonanzsignals von X mit NOE in Abhängigkeit von η angibt. Einsetzen von η_{\max} liefert schließlich Gleichung 5.11 für die durch den NOE maximal erreichbare Gesamtintensität des Signals von X.

$$I_{\max}(\text{NOE}) = I_0 \left(1 + \frac{\gamma_A}{2\gamma_X} \right) = I_0 (1 + \eta_{\max}) \quad (5.11)$$

$(1 + \eta)$ wird als *Verstärkungsfaktor* bezeichnet, weil die Ausgangsintensität I_0 durch den NOE um diesen Faktor zunimmt (oder abfällt). Der maximale Verstärkungsfaktor beträgt $(1 + \eta_{\max})$. In der Praxis wird der maximale Verstärkungsfaktor aber fast nie erreicht, weil neben der Dipol-Dipol-Relaxation immer auch andere Relaxationsmechanismen eine Rolle spielen und darüber hinaus auch Dipol-Dipol-Relaxationen des beobachteten Kerns durch Wechselwirkungen mit anderen Kernen als A stattfinden, die nicht durch die Doppelresonanz gesättigt worden sind.

Sind die beiden Kerne A und X identische Isotope, also zum Beispiel beides Protonen, dann weist η_{\max} wegen $\gamma_A = \gamma_X$ und $\eta_{\max} = \gamma_A / 2\gamma_X$ einen Wert von 0,5 auf. In diesem Fall beträgt der maximale NOE-Verstärkungsfaktor 1,5 beziehungsweise die maximale Zunahme der Intensität des Signals von X $\eta_{\max} = 50$ Prozent. Für die in der Praxis sehr häufig eingesetzte ^1H -Breitband-Entkopplung von ^{13}C -NMR-Spektren [$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$] ist $\eta_{\max} = \gamma_{\text{H}} / 2\gamma_{\text{C}} = 1,988$, so dass der maximale Verstärkungsfaktor einen Wert von 2,988 besitzt. Somit kann in einem ^1H -BB-entkoppelten ^{13}C -NMR-Spektrum eine Intensitätszunahme der Resonanzsignale im Vergleich zum normalen gekoppelten Spektrum von bis zu etwa 200 Prozent auftreten. Da die einzelnen Peaks von Multipletts durch die ^1H -BB-Entkopplung darüber hinaus zu einem einzigen Peak zusammenfallen, kann die Amplitude (Höhe) der Signale sogar noch stärker wachsen. Weitere Beispiele für maximale Verstärkungsfaktoren $(1 + \eta_{\max})$ sind 2,24 für $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, 3,33 für $^{195}\text{Pt}\{^1\text{H}\}$ und 3,39 für $^{207}\text{Pb}\{^1\text{H}\}$.

Einige Nuklide weisen negative magnetogyrische Verhältnisse auf. Unter den Bedingungen des Extreme Narrowing Limit wird η_{\max} dann negativ, wenn der andere Kern, wie zum Beispiel ^1H , nach wie vor ein positives magnetogyrisches Verhältnis besitzt. Infolgedessen nimmt die Intensität der Signale der beobachteten Kerne (X) durch den NOE ab, statt zu steigen. Ist der Effekt groß genug, können die Intensitäten und Amplituden der Signale sogar negativ werden. Für ein ^1H -BB-entkoppeltes ^{15}N -NMR-Spektrum [$^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$] beträgt η_{\max} beispielsweise $-4,94$. Die maximale negative Signalintensität weist somit den 3,94-fachen Betrag $(1 + \eta_{\max} = 1 - 4,94 = -3,94)$ der positiven Signalintensität im nicht entkoppelten Spektrum auf – der Betrag der Intensität eines Signals wächst durch den NOE also um maximal 294 Prozent $[(3,94 - 1,00) \times 100]$ bei gleichzeitiger Umkehrung des Vorzeichens der Amplitude. Da der Verstärkungsfaktor in der Praxis wie erwähnt fast nie seinen Maximalwert erreicht, kann der $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE auch zu positiven Signalen mit geringerer Intensität statt zu negativen Signalen oder gerade genau zu einer Intensität von null führen. Im letzteren Fall würde das betroffene Signal aus dem Spektrum verschwinden. Auch die Kerne des Isotops ^{29}Si besitzen ein negatives magnetogyrisches Verhältnis, so dass ähnliche Auswirkungen und Komplikationen wie bei ^{15}N zu erwarten sind. Für das $^{29}\text{Si}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Experiment ist $\eta_{\max} = -2,52$. Der maximale Verstärkungsfaktor beträgt dann $1 + \eta_{\max} = -1,52$, so dass

im Fall eines maximalen NOE der Betrag der Intensität der ^{29}Si -Resonanzsignale um 52 Prozent steigen, das Vorzeichen ihrer Amplitude aber umgekehrt würde. Bei $^{119}\text{Sn}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektren erfolgt durch den NOE tatsächlich selbst bei maximalem Verstärkungsfaktor immer eine Abnahme des Betrags der Signalintensitäten, weil η_{\max} einen Wert von $-1,34$ aufweist und der maximale Verstärkungsfaktor mit $1 + \eta_{\max} = -0,34$ einen Betrag zwischen 0 und 1 besitzt. In diesem Beispiel erfolgt bei maximalem NOE eine Abnahme des Betrags der Signalintensität um 66 Prozent. Der NOE ist vollständig unabhängig von spektralen Veränderungen, die auf das Zusammenfallen von Peaks infolge der Spin-Spin-Entkopplung zurückzuführen sind, weil sein Mechanismus auf Wechselwirkungen (Dipol-Dipol-Relaxation) beruht, die durch den Raum erfolgen und nicht auf Bindungen zwischen den Kernen angewiesen sind. Für das Auftreten eines NOE ist keine Spin-Spin-Kopplung zwischen den Kernen A und X, sondern nur eine wechselseitige Förderung der Dipol-Dipol-Relaxation erforderlich.

Bei großen Molekülen mit Molekülmassen oberhalb von etwa 3000 bis 5000 u dominiert die W_0 -Relaxation. Da W_2 und W_1 in diesem Fall sehr klein sind, ergibt sich aus Gleichung 5.9 für η_{\max} im homonuklearen Fall, wie beispielsweise dem NOE zwischen zwei Protonen, ein Wert von -1 . Der maximale Verstärkungsfaktor beträgt dann $1 + \eta_{\max} = 0$, so dass es im NMR-Spektrum zum Verlust von Signalen kommen kann. Daher werden bei großen Molekülen häufig transiente statt stationäre NOEs untersucht. Aus der Veränderung der Signalintensitäten durch einen NOE kann man zum Beispiel den Abstand zweier Protonen bestimmen. Durch die Untersuchung einer großen Zahl solcher Beziehungen kann die Struktur eines großen Biomoleküls prinzipiell quantitativ bestimmt werden. Diese Anwendung der NMR-Spektroskopie stellt eine Konkurrenz zur Röntgenkristallographie dar und liefert dabei die für Biologen eigentlich wichtigeren Strukturdaten für die Moleküle in Lösung, die von denen im Kristall zum Teil erheblich abweichen können. Im Jahr 2002 wurde Kurt Wüthrich *für seine Entwicklung der Kernspinresonanzspektroskopie zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von biologischen Makromolekülen in Lösung* mit dem Nobelpreis in Chemie ausgezeichnet (http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/).

Im Übergangsbereich vom Extreme Narrowing Limit für kleine Moleküle zum Large Molecule Limit für große Moleküle, also im Molekülmassenbereich von etwa 1000 bis 3000 u, können W_2 und W_0 ähnliche Größen aufweisen, so dass der NOE gemäß Gleichung 5.9 sehr klein oder sogar null wird. In diesem Fall kann der NOE durch den Wechsel des Lösungsmittels und/oder die Veränderung der Temperatur zumindest etwas vergrößert werden, weil die Korrelationszeit τ_c und somit die Dipol-Dipol-Relaxation nicht nur von der Größe des Moleküls, sondern auch von der Viskosität des Lösungsmittels und der Temperatur abhängt. Lösungsmittel mit höherer Viskosität können daher beispielsweise zu einer Abschwächung des NOE führen.

Bei einem traditionellen NOE-Experiment wird das NMR-Spektrum zweimal gemessen, einmal mit und einmal ohne NOE. ► Abbildung 5.11 veranschaulicht für einen heteronuklearen Fall die relative zeitliche Abfolge der Pulse im ^{13}C -Kanal (B_1), des ^1H -Entkopplerfelds (B_2) und der Akquisition des ^{13}C -Signals zur Aufnahme dieser beiden Spektren (nicht maßstabsgetreu). Im ursprünglichen Experiment mit kontinuierlicher Breitband-Entkopplung bleibt das B_2 -Wechselfeld während des gesamten Experiments eingeschaltet (siehe Abbildung 5.11a). Während der Akquisition muss das B_2 -Feld eingestrahlt werden, damit die Entkopplung erfolgt. Wenn eine Erhöhung der Signalintensität durch den NOE angestrebt wird, muss das B_2 -Feld außerdem in der regenerativen

Wartezeit zwischen der Akquisition und dem nächsten Puls, in der die Relaxation des Systems stattfindet, auf die Probe einwirken, weil der NOE etwas Zeit benötigt, um sich aufzubauen. Allerdings kann die Sendeleistung der B_2 -Spule außerhalb der Akquisitionszeit verringert werden. Dieses Experiment führt also sowohl zur Entkopplung als auch zu einem Kern-Overhauser-Effekt (NOE) und liefert somit die Intensität I aus Gleichung 5.10. Schaltet man den Entkoppler wie in Abbildung 5.11b in der Wartezeit aus, während der Akquisition und des ^{13}C -Beobachtungspulses jedoch ein, wird zwar eine vollständige Entkopplung erreicht, aber es tritt kein NOE in Erscheinung. Ohne Einstrahlung des B_2 -Wechselfelds in der Wartezeit ist die Dauer der Einwirkung des B_2 -Feldes zu kurz, als dass sich ein NOE aufbauen könnte. Mithilfe dieses Experiments, das als *Reversed-Gated-Decoupling-Experiment* bezeichnet wird, erhält man daher Resonanzsignale ohne Aufspaltung und mit ungestörter Intensität – das heißt mit der Intensität I_0 aus Gleichung 5.10. In der Praxis wird das B_2 -Entkopplerfeld während der Wartezeit nicht wirklich ausgeschaltet. Stattdessen wird nur seine Frequenz verändert, so dass sie weit außerhalb des Resonanzbereichs liegt. Setzt man die Intensitäten I und I_0 aus den Experimenten in Abbildung 5.11a und 5.11b schließlich in Gleichung 5.10 ein, erhält man die Größe des NOE. Abbildung 5.11c zeigt ein anderes Verfahren, bei dem das B_2 -Feld während des ^{13}C -Pulses und der Akquisition ausgeschaltet bleibt und nur in der Wartezeit eingeschaltet wird. Infolgedessen findet keine Entkopplung statt, aber eine Erhöhung der Signalintensitäten durch den NOE statt. Dieses so genannte *Gated-Decoupling-Experiment* kann daher zur Messung von ^1H – ^{13}C -Kopplungskonstanten sehr hilfreich sein.

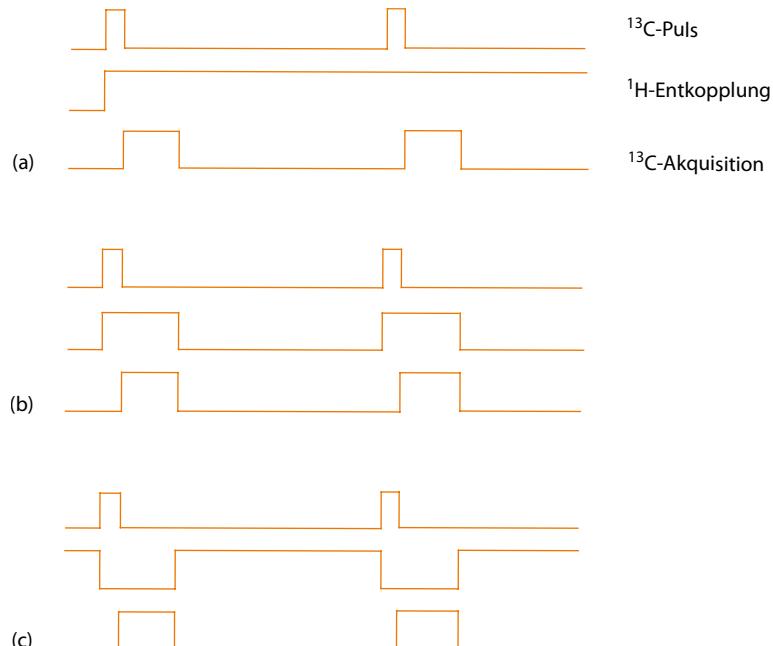


Abbildung 5.11: Relative zeitliche Abfolge von Pulsen, Akquisitionszeiten und Wartezeiten bei NOE-Experimenten.
 (a) Die Beobachtung von ^{13}C mit kontinuierlicher Einstrahlung eines B_2 -Wechselfelds zur Sättigung von ^1H führt zur Entkopplung und zu einem NOE. (b) Ist das B_2 -Entkopplerfeld während der Akquisition (und dem ^{13}C -Puls) eingeschaltet, in der Wartezeit aber ausgeschaltet, findet eine Entkopplung statt, aber es tritt kein NOE auf. (c) Wird der Entkoppler nur in der Wartezeit eingeschaltet, erfolgt keine Entkopplung, aber eine Signalverstärkung durch den NOE. Die verschiedenen Pulsdauern und Wartezeiten sind nicht maßstabsgerecht dargestellt. Die Schemata zeigen jeweils zwei Zyklen.

Differenz-NOE-Spektren

Bei homonuklearen Protonen-NOE-Experimenten [$^1\text{H}\{^1\text{H}\}$], die analog zu den Abbildung 5.11a und 5.11b durchgeführt werden, betrachtet man üblicherweise nur NOEs oberhalb von 5 Prozent ($\eta > 0,05$) als signifikant und experimentell verlässlich nachgewiesen. Mithilfe des *Differenz-NOE-Experiments* können Signalverstärkungen durch den NOE dagegen bis zu η -Werten von weniger als 1 Prozent noch zuverlässig gemessen werden. Zur Erzeugung eines Differenz-NOE-Spektrums werden die zwei NMR-Spektren gemäß den Methoden in den Abbildungen 5.11a und 5.11b separat gemessen und dann voneinander subtrahiert. Durch dieses Verfahren werden die Resonanzsignale, die nicht durch einen NOE beeinflusst werden, eliminiert. Von den Resonanzsignalen, deren Intensität durch einen NOE verändert wurde, bleibt im Differenz-NOE-Spektrum dagegen gerade die Veränderung durch den NOE als Restsignal erhalten.

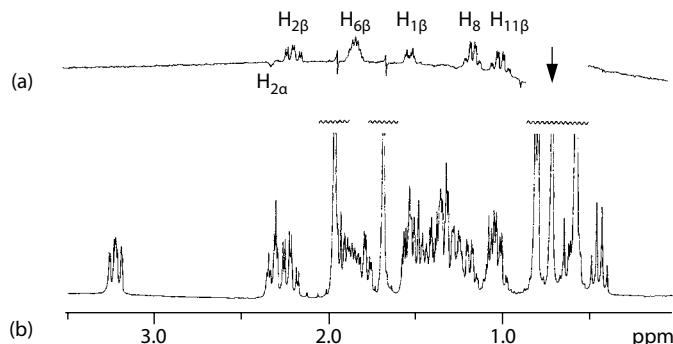


Abbildung 5.12: Ausschnitt aus dem 400-MHz- ^1H -NMR-Spektrum von Progesteron. (a) Das Differenz-NOE-Spektrum nach Sättigung der ^1H -Resonanz der Methylprotonen an C-19. (b) Das normale ^1H -NMR-Spektrum ohne Doppelresonanz. (Mit freundlicher Genehmigung von: Sanders, J.K.M. und Hunter, B.K. 1993: *Modern NMR Spectroscopy*. 2. Aufl., Oxford University Press, Oxford, UK, S. 191.)

► Abbildung 5.12 zeigt das Differenz-NOE-Spektrum eines Ausschnitts aus dem ^1H -NMR-Spektrum von Progesteron (5-30), das nach der Einstrahlung eines B_2 -Feldes mit der Frequenz des Resonanzsignals der Methylprotonen an C-19 (siehe Pfeil in Abbildung 5.12) erhalten wurde. Im Differenz-NOE-Spektrum (oben) sind die Signalverstärkungen infolge des NOE für fünf Protonen erkennbar, die zu den Protonen der C-19-Methylgruppe *räumlich* eng benachbart sind. Für Moleküle am Extreme Narrowing Limit wird das Differenz-NOE-Experiment gegenüber dem direkten NOE-Experiment im Allgemeinen bevorzugt. Das Proton $\text{H}_{2\alpha}$ ist zwar zu den C-19-Methylprotonen nicht eng benachbart, aber sein Resonanzsignal zeigt dennoch einen kleinen negativen NOE. Dieses Ergebnis wird durch einen Dreispineffekt verursacht (A wird durch B und B durch C relaxiert). Die Einstrahlung der Resonanzfrequenz von A führt durch den NOE zu einer Erhöhung der Intensität des Signals von B, weil der NOE einen größeren Besetzungsunterschied zwischen den Spinzuständen von B hervorruft. Infolge einer Spindiffusion (siehe Abschnitt 5.1, Spin-Spin-Relaxation) wirkt sich die erhöhte Signalintensität von B umgekehrt auf die Intensität des Signals von C aus. Das heißt, der Besetzungsunterschied zwischen den Spinzuständen von C wird durch die Flip-Flop-Wechselwirkung mit B verkleinert. Infolgedessen erscheint für C ein negatives Signal im Differenz-NOE-Spektrum. In diesem Beispiel stehen A für die C-19-Methylprotonen, B für $\text{H}_{2\beta}$ und C für $\text{H}_{2\alpha}$ von Progesteron. Am häufigsten kann man diesen Effekt in sehr großen Molekülen beobachten.

Copyright

Daten, Texte, Design und Grafiken dieses eBooks, sowie die eventuell angebotenen eBook-Zusatzdaten sind urheberrechtlich geschützt. Dieses eBook stellen wir lediglich als **persönliche Einzelplatz-Lizenz** zur Verfügung!

Jede andere Verwendung dieses eBooks oder zugehöriger Materialien und Informationen, einschließlich

- der Reproduktion,
- der Weitergabe,
- des Weitervertriebs,
- der Platzierung im Internet, in Intranets, in Extranets,
- der Veränderung,
- des Weiterverkaufs und
- der Veröffentlichung

bedarf der **schriftlichen Genehmigung** des Verlags. Insbesondere ist die Entfernung oder Änderung des vom Verlag vergebenen Passwortschutzes ausdrücklich untersagt!

Bei Fragen zu diesem Thema wenden Sie sich bitte an: info@pearson.de

Zusatzdaten

Möglicherweise liegt dem gedruckten Buch eine CD-ROM mit Zusatzdaten bei. Die Zurverfügungstellung dieser Daten auf unseren Websites ist eine freiwillige Leistung des Verlags. **Der Rechtsweg ist ausgeschlossen.**

Hinweis

Dieses und viele weitere eBooks können Sie rund um die Uhr und legal auf unserer Website herunterladen:

<http://ebooks.pearson.de>