

Vorlesung

„Mehrdimensionale NMR-Spektroskopie-  
Grundlagen und Anwendungen in der  
Strukturaufklärung“

Teil VII

## Das Programm

Beim letztes Mal

Peptide

DQF-COSY, TOCSY, Spinsysteme

NOE und NOESY, ROESY

sequenzspezifische Zuordnung von Peptiden

Strukturbestimmung von Peptiden

## Das Programm

### Heute

Heteronukleare NMR an Peptiden

HMQC, HMQC-TOCSY, HMQC-COSY

DEPT-HMQC

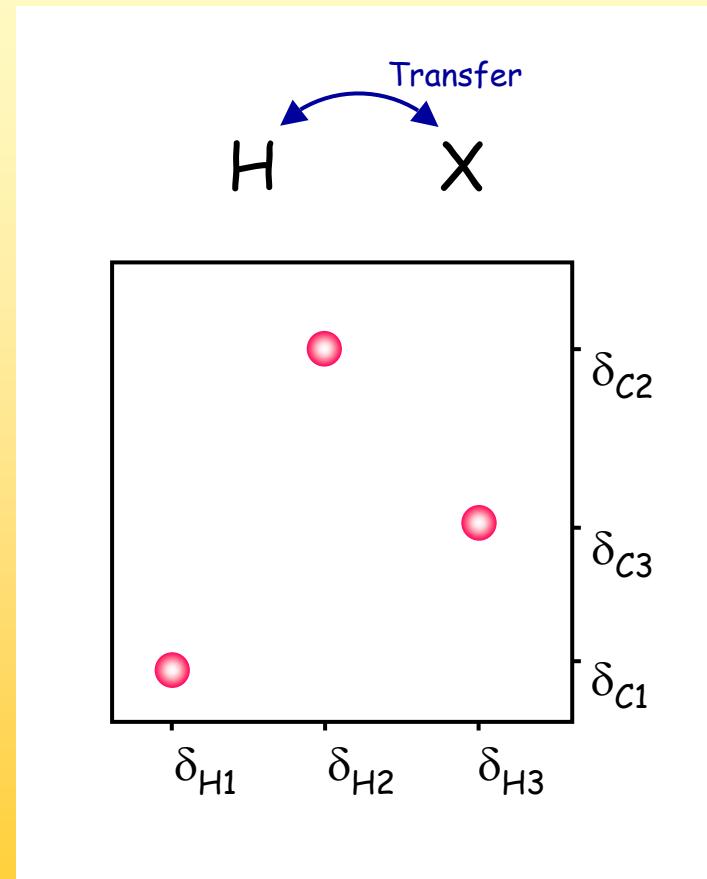
Sequentielle Zuordnung mit dem HMBC

# Heteronukleare NMR an Peptiden

## Peptide: Heteronukleare NMR

### heteronukleare Spektren

Transfer von Magnetisierung findet zwischen unterschiedlichen Kernsorten statt. Beide Frequenzachsen zeigen die chemischen Verschiebungen unterschiedlicher Kerne. Findet Transfer statt, ergibt sich ein Signal am Schnittpunkt der chemischen Verschiebungen der involvierten Kerne. Findet kein Transfer statt, dann ergibt sich kein Signal.



## Peptide: Heteronukleare NMR

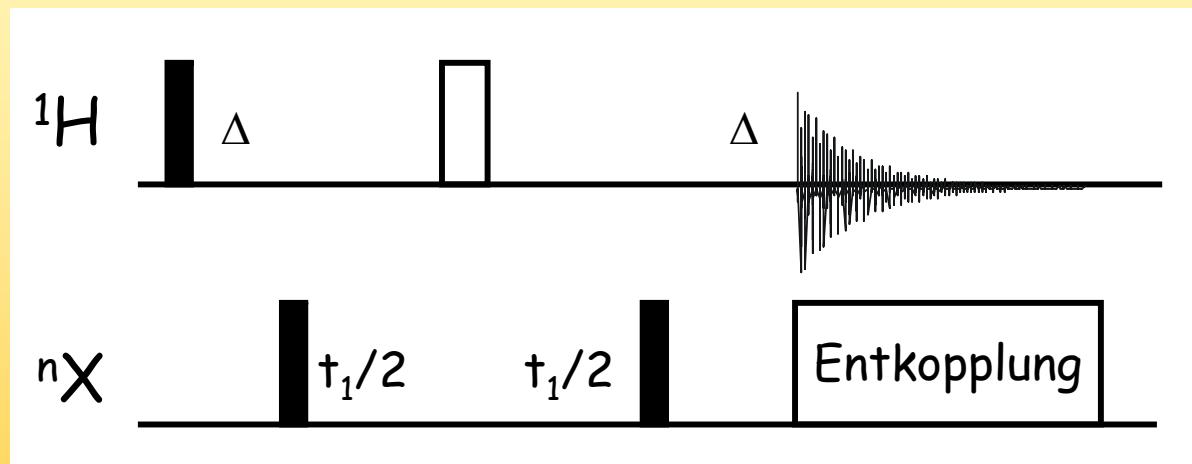
Durch die Ähnlichkeit der Aminosäuren untereinander ist Überlagerung bei Peptiden trotz der Verwendung von 2D-NMR noch ein Problem.

Wie bei kleinen Molekülen kann daher die Aufnahme von heteronuklearen Spektren ein Ausweg sein.

Wegen der besseren Empfindlichkeit werden das immer „inverse“ Spektren, also solche mit Protonendetektion sein.

## Peptide: Heteronukleare NMR

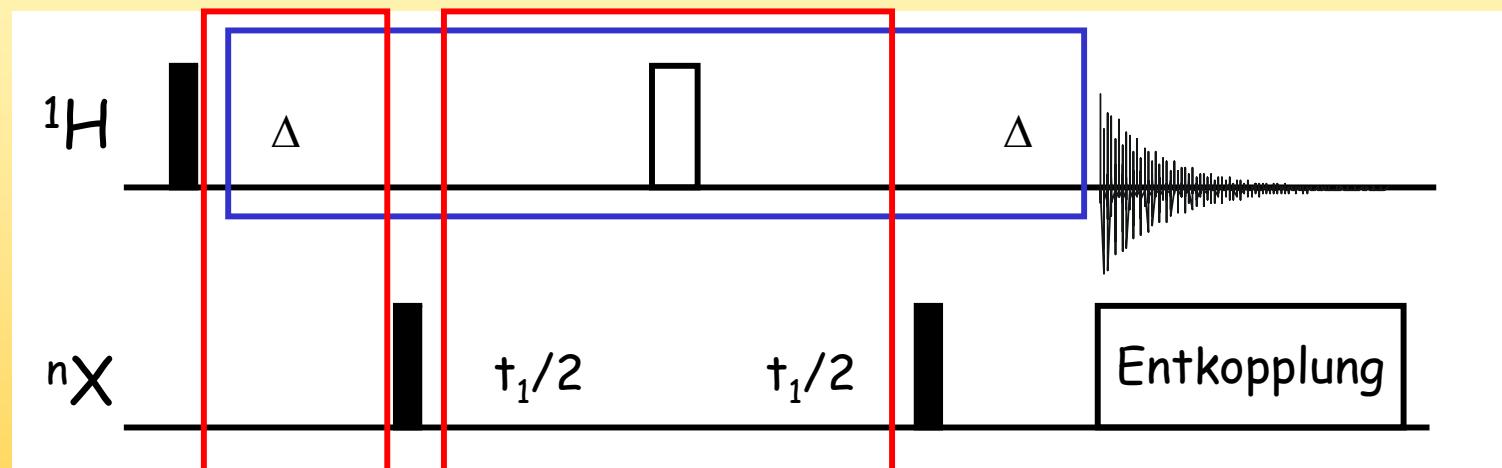
Das zentrale Experiment ist dabei das HMQC, das auf direkter Kopplung zwischen H und X beruht



## Peptide: Heteronukleare NMR

HM<sup>1</sup>QC

keine chemische Verschiebung  $\delta_H$   
Kopplung  $J_{HH}$  entwickelt sich nur wenig



Kopplung  $^1J_{HC}$

$$\Delta = 1/(2^1J_{HC})$$

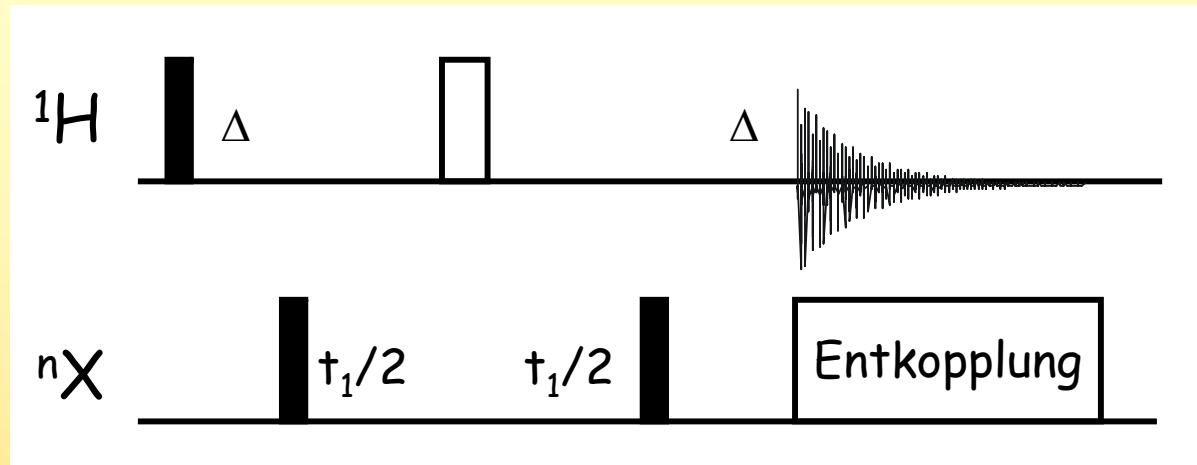
typisch 3.5 msec

chemische Verschiebung  $\delta_C$

keine chemische Verschiebung  $\delta_H$

keine Kopplung  $J_{HC}$

## Peptide: Heteronukleare NMR



$$H_z \xrightarrow{90^\circ H_x} -H_y \xrightarrow{\pi J_{HC}\Delta} -H_y \cos \pi J_{HC}\Delta + 2H_x C_z \sin \pi J_{HC}\Delta$$

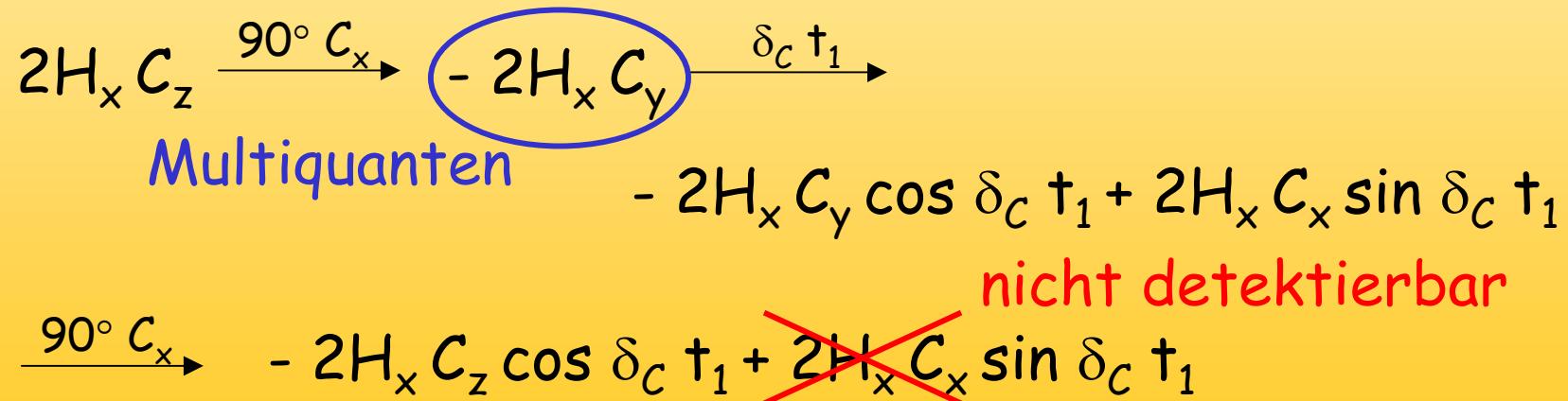
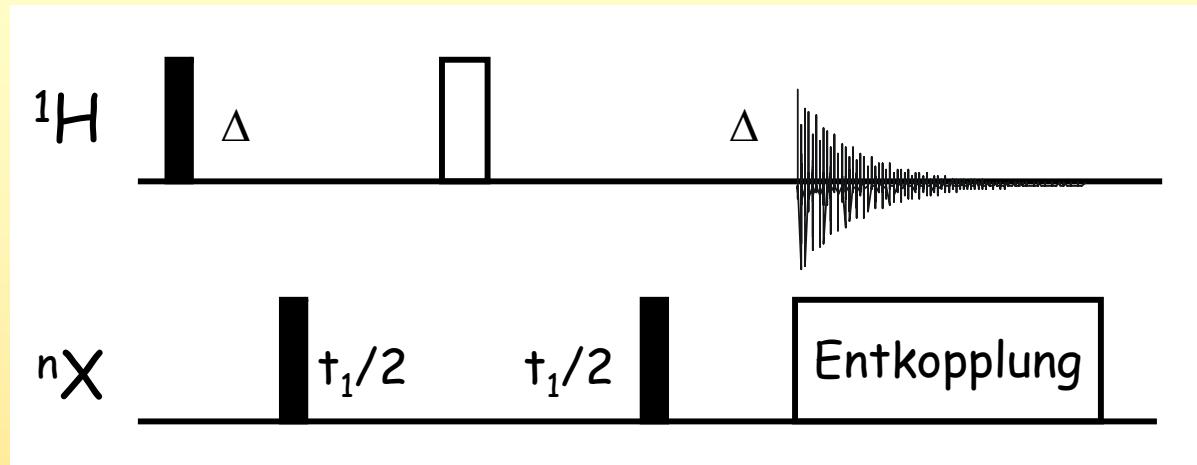
$$\Delta = 3.5 \text{ msec}, J_{HC} = 140 \text{ Hz} \longrightarrow J_{HC} * \Delta = 0.5$$

$$\cos \pi J_{HC}\Delta = \cos 0.5 \pi = 0, \sin \pi J_{HC}\Delta = \sin 0.5 \pi = 1$$

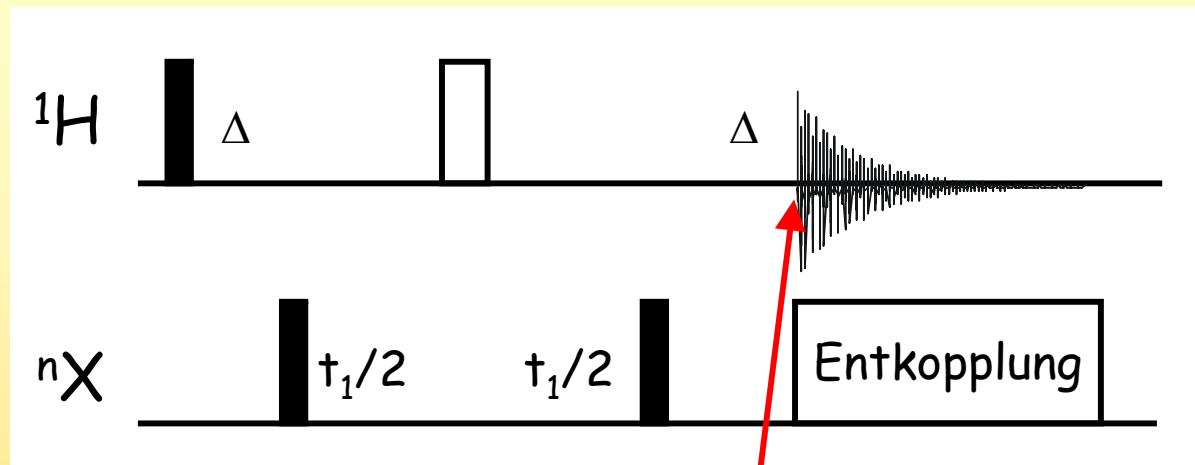
aber keine Weitbereichskopplung

$$\Delta = 3.5 \text{ msec}, J_{HC} = 5 \text{ Hz} \longrightarrow \sin \pi J_{HC}\Delta = \sin 0.0175 \pi = 0.05$$

## Peptide: Heteronukleare NMR



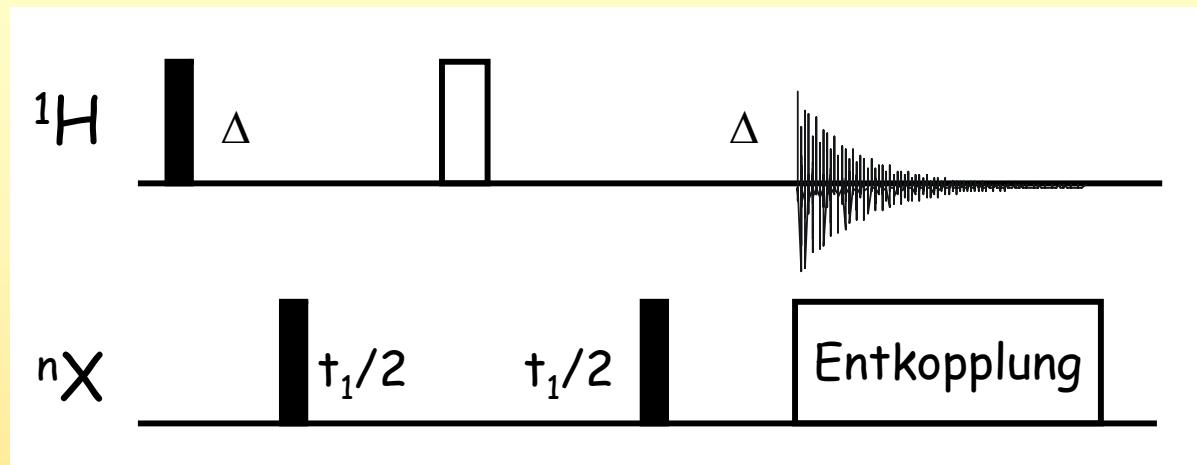
## Peptide: Heteronukleare NMR



$$- 2H_x C_z \cos \delta_C t_1 \xrightarrow{\pi J_{HC} \Delta} - H_y \cos \delta_C t_1$$

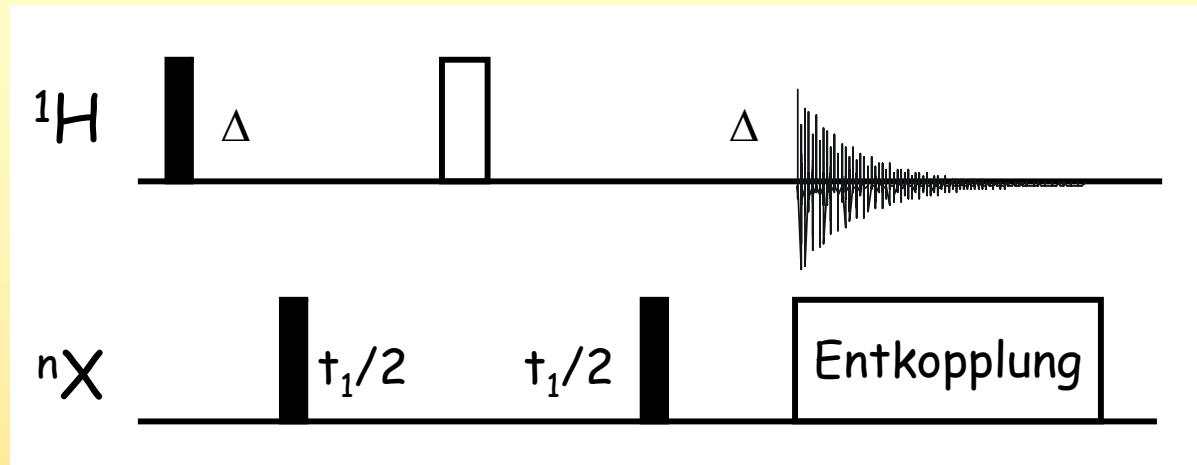
zu Beginn der Acquisition liegt Protonenmagnetisierung vor, „moduliert“ mit der chemischen Verschiebung des direkt gebundenen Kohlenstoffs

## Peptide: Heteronukleare NMR



Wir schauen uns nun die homonukleare Kopplung  $J_{HH}$  nochmal etwas genauer an. Zu Beginn des Experimentes hat sie sich nicht sehr stark entwickelt, denn es war nur die Zeit  $2\Delta$  vorhanden. Mit der Zeit wird aber  $t_1$  immer länger und die Wartezeit zur Entwicklung von  $J_{HH}$  auch

## Peptide: Heteronukleare NMR



$$-H_y \xrightarrow{\pi J_{HH} 2\Delta + t_1} -H_y \cos \pi J_{HH} 2\Delta + t_1 + 2H_x C_z \sin \pi J_{HH} 2\Delta + t_1$$

am Anfang:  $t_1 = 0, 2\Delta + t_1 = 7 \text{ msec}$

nach 512 Experimenten  $t_{1,\max} = 512 * 40 \mu\text{sec} = 20480 \mu\text{sec}$

d.h. am Ende  $2\Delta + t_1 = 27.5 \text{ msec}$

d.h. am Ende kommt doch etwas zusammen und kann stören,  
kann aber evt. auch genutzt werden

## Peptide: Heteronukleare NMR

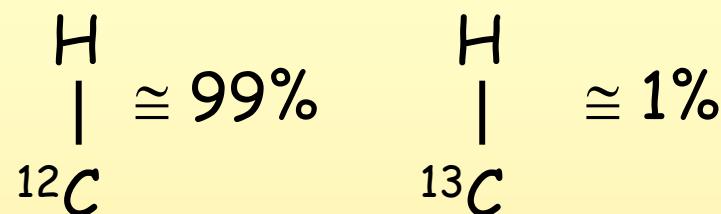
Bei Peptiden gibt es wie bei kleinen Molekülen das Problem mit den „Zentralsignalen“

Auch hier ist eine Markierung mit  $^{13}\text{C}$  unrealistisch und man kann das Problem über einen Phasencyclus oder die Anwendung von Gradienten lösen.

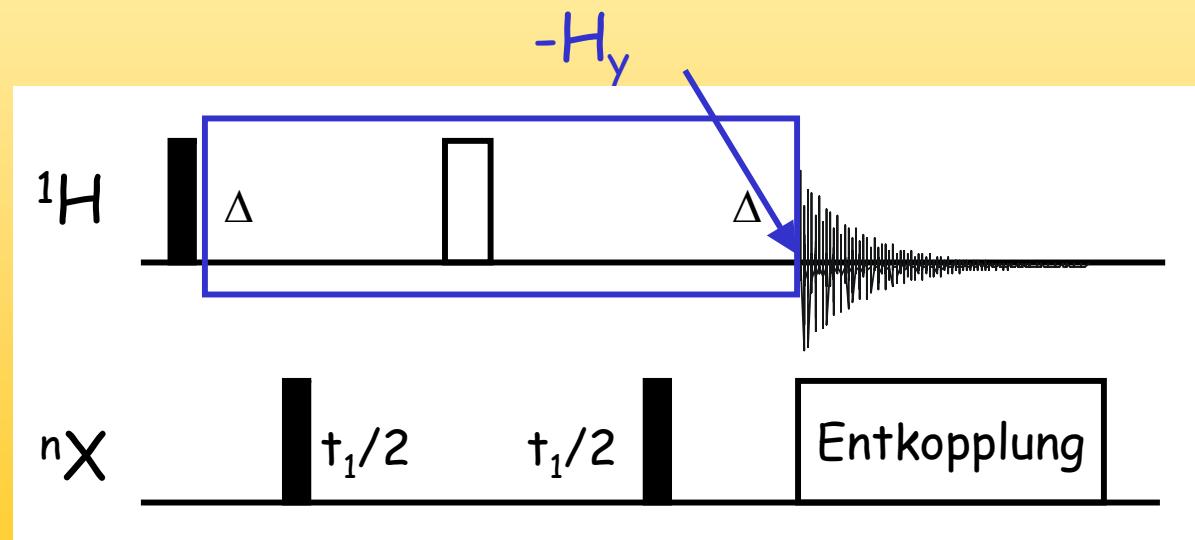
Es gibt aber noch eine weitere Möglichkeit, den „BIRD“-Puls

## Peptide: Heteronukleare NMR

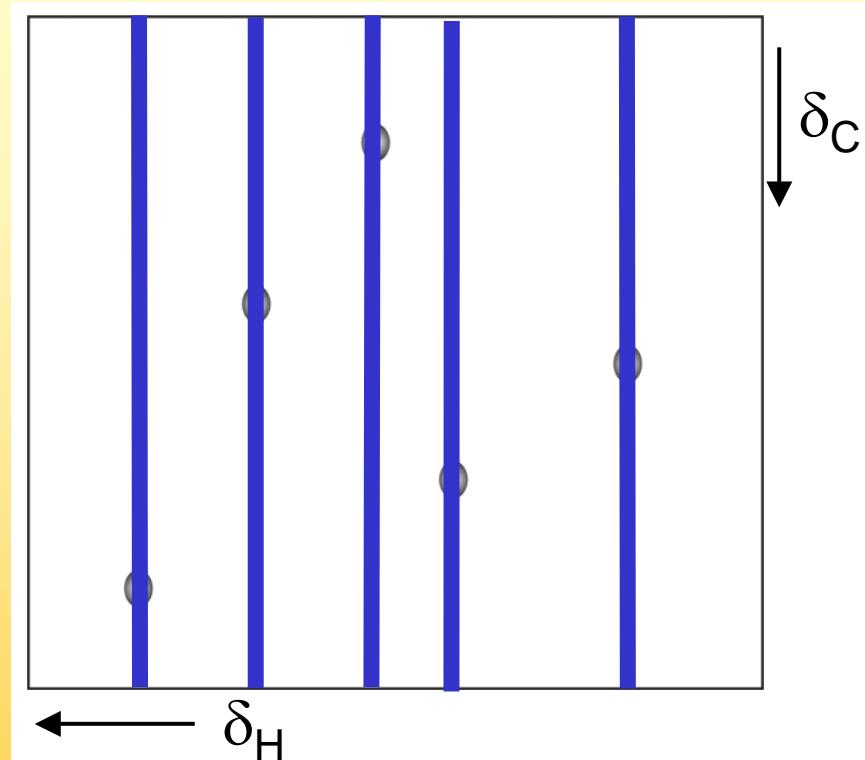
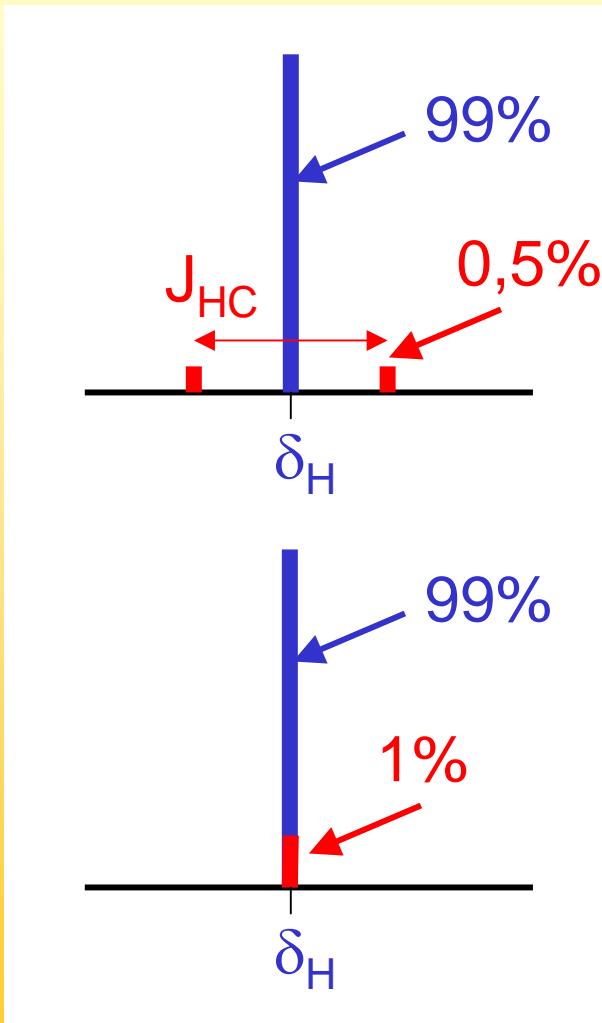
Zentralsignale resultieren  
von Protonen an  $^{12}\text{C}$  ?



keine chemische Verschiebung  $\delta_{\text{H}}$ ,  
Kopplung  $J_{\text{HH}}$  zu vernachlässigen



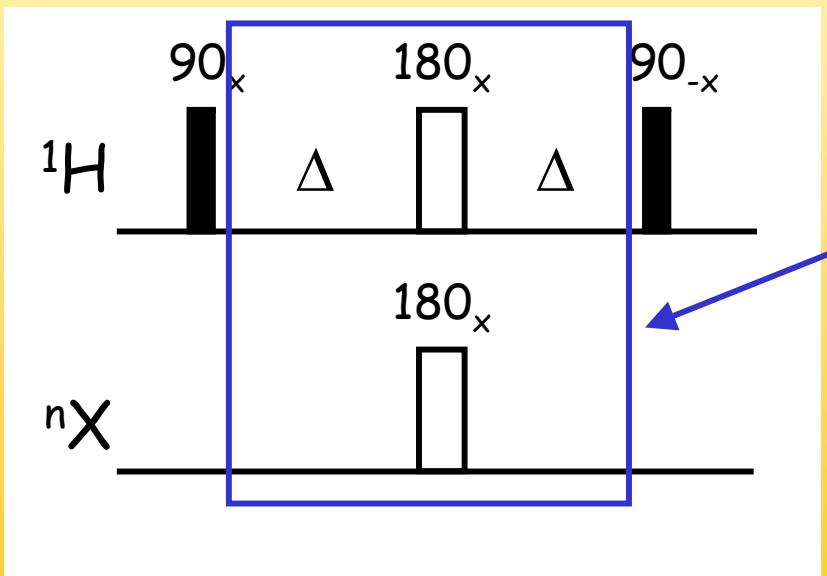
## Peptide: Heteronukleare NMR



Die Signale müssen irgendwie entfernt werden

## Peptide: Heteronukleare NMR

Wir wollen jetzt sehen wie das mit dem BIRD-Puls bewerkstelligt werden kann

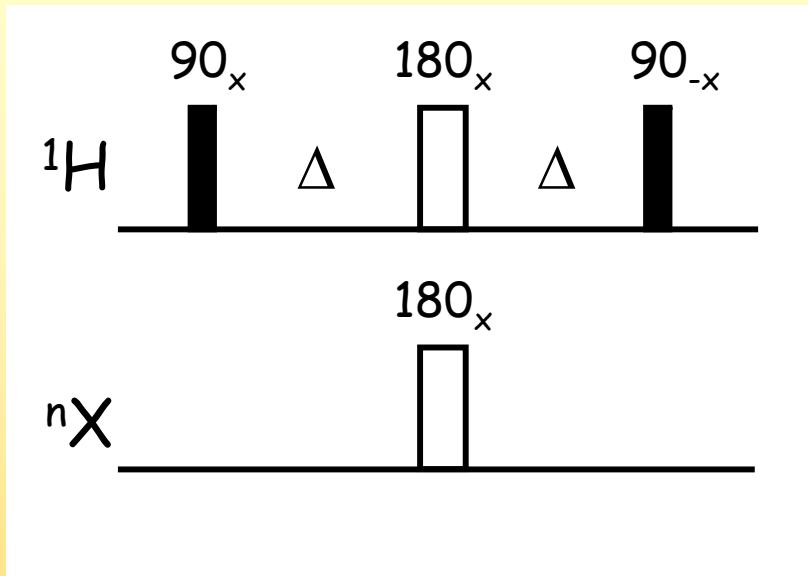


Keine  $\delta_H$  aktiv,  
 $J_{HX}$  ist aktiv

$$\Delta = 1/2 J_{HX}$$

(für  $X=C$   $\Delta=3.5$  msec)  
 $J_{HH}$  nicht relevant

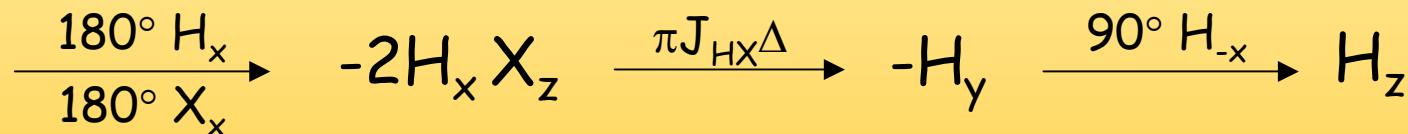
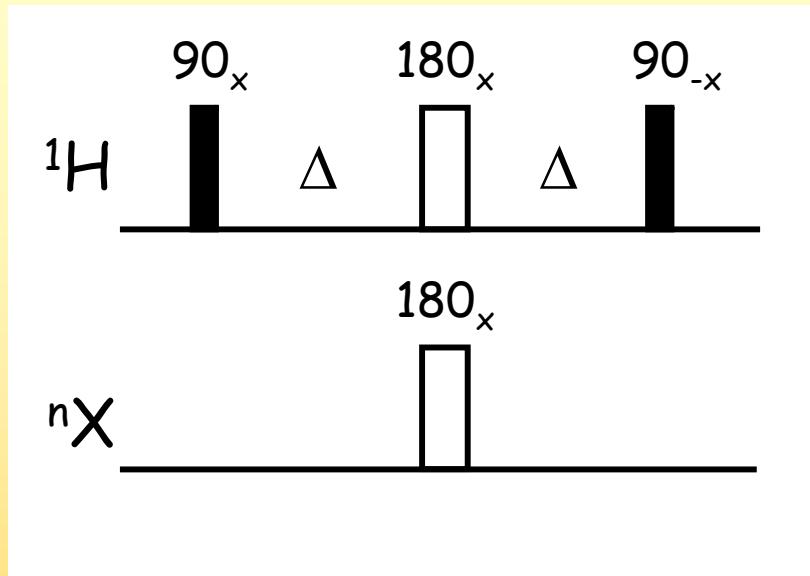
## Peptide: Heteronukleare NMR



$$H_z \xrightarrow{90^\circ H_x} -H_y \xrightarrow{\pi J_{HX}\Delta} -H_y \cos \pi J_{HX}\Delta + 2H_x X_z \sin \pi J_{HX}\Delta$$

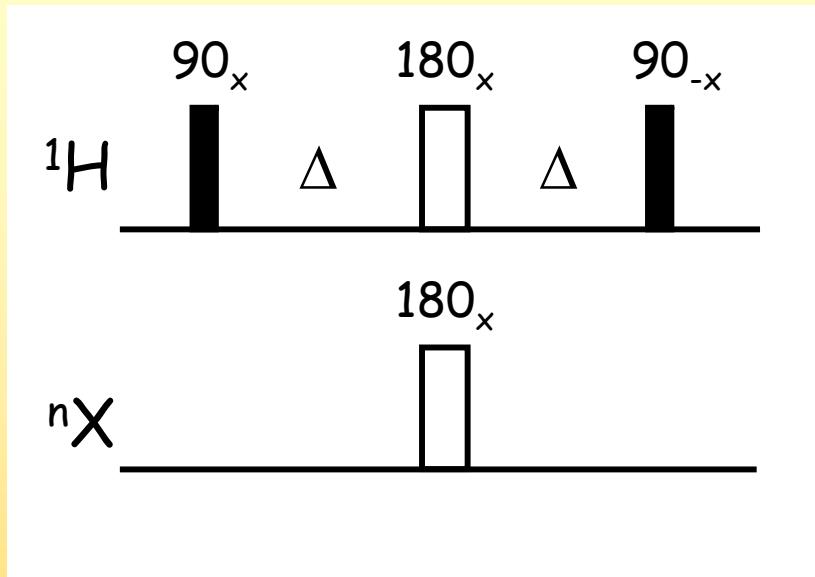
Wir wählen  $\Delta = 1/2J_{HX}$  und erhalten  $2H_x X_z$

## Peptide: Heteronukleare NMR

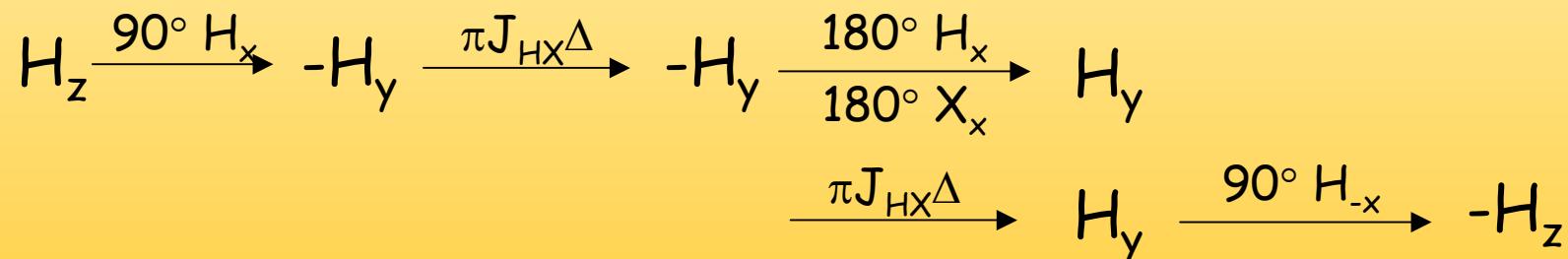


Unterm Strich hatte der BIRD-Puls für ein Proton, das an den Heterokern gebunden war keinen Effekt !!

## Peptide: Heteronukleare NMR



Was passiert mit  
Protonen ohne  
Heterokernkopplung ?

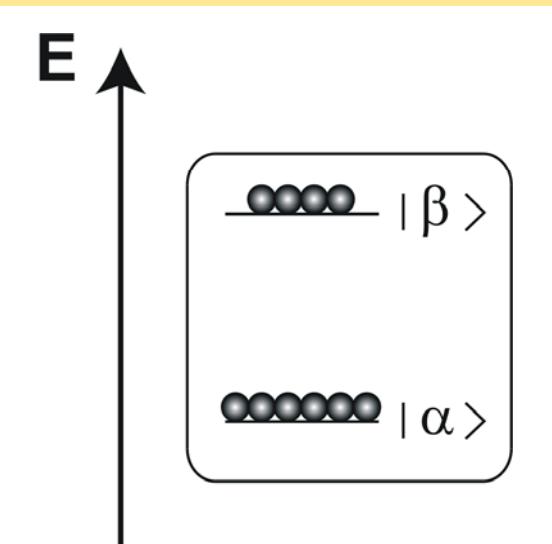


Hier ist der BIRD-Puls ein  $180^\circ$  Puls !!

## Peptide: Heteronukleare NMR

Man kann die unterschiedlichen Effekte des BIRD-Pulses ausnutzen, um die Signale der nicht an den Heterokern gebundenen Protonen zu unterdrücken

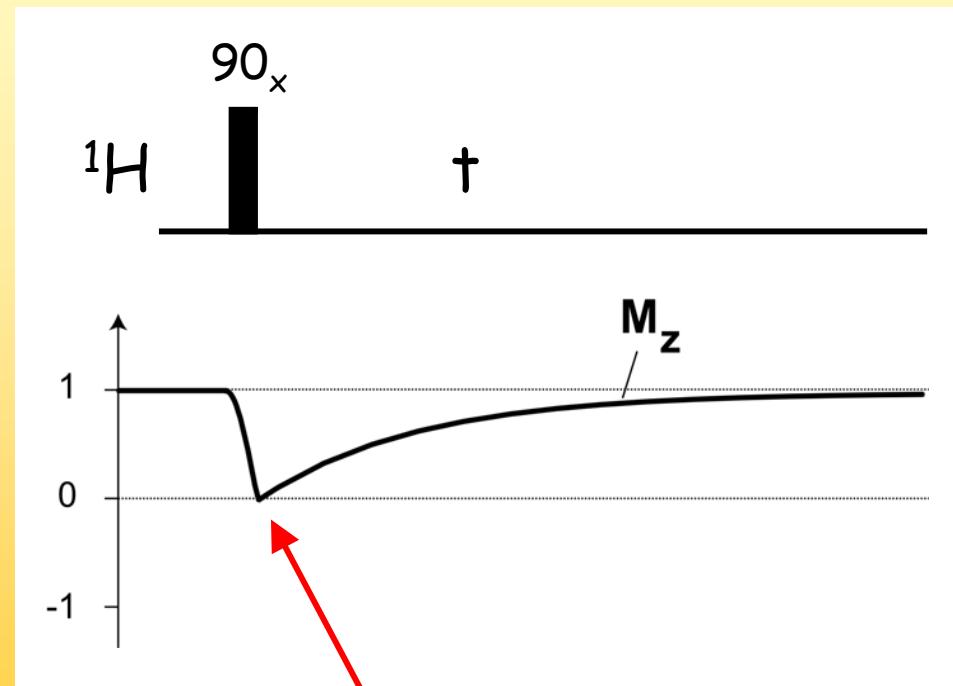
Dazu nutzt man außerdem noch die Relaxation der Kerne



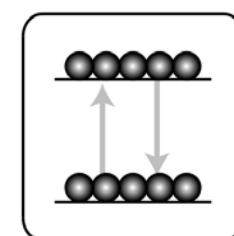
Relaxation ist die Rückkehr der Magnetisierung in den von der Boltzmann-Verteilung vorgegebenen Ausgangszustand

## Peptide: Heteronukleare NMR

Nach einem  $90^\circ$  Puls sieht das so aus

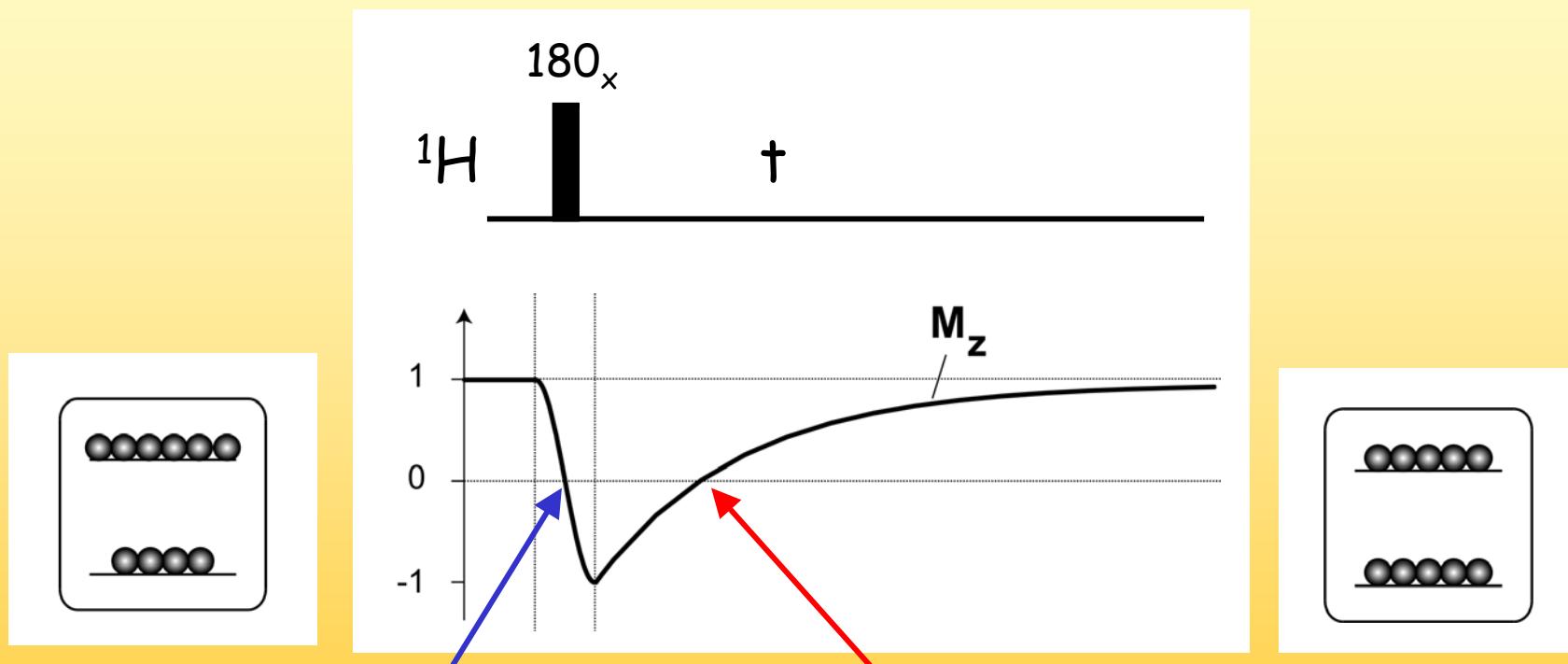


Hier liegt keine z-Magnetisierung vor !!



## Peptide: Heteronukleare NMR

Nach einem  $180^\circ$  Puls sieht das so aus

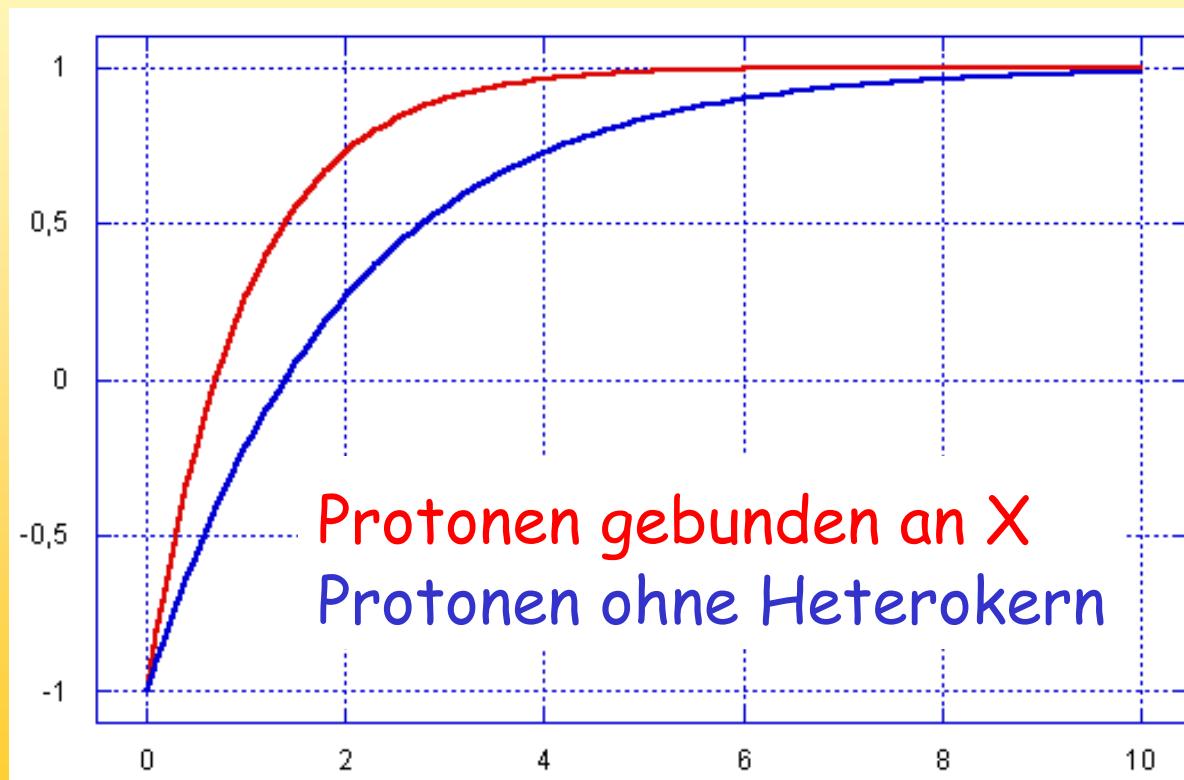


z-Magnetisierung wird  
von + nach - gedreht

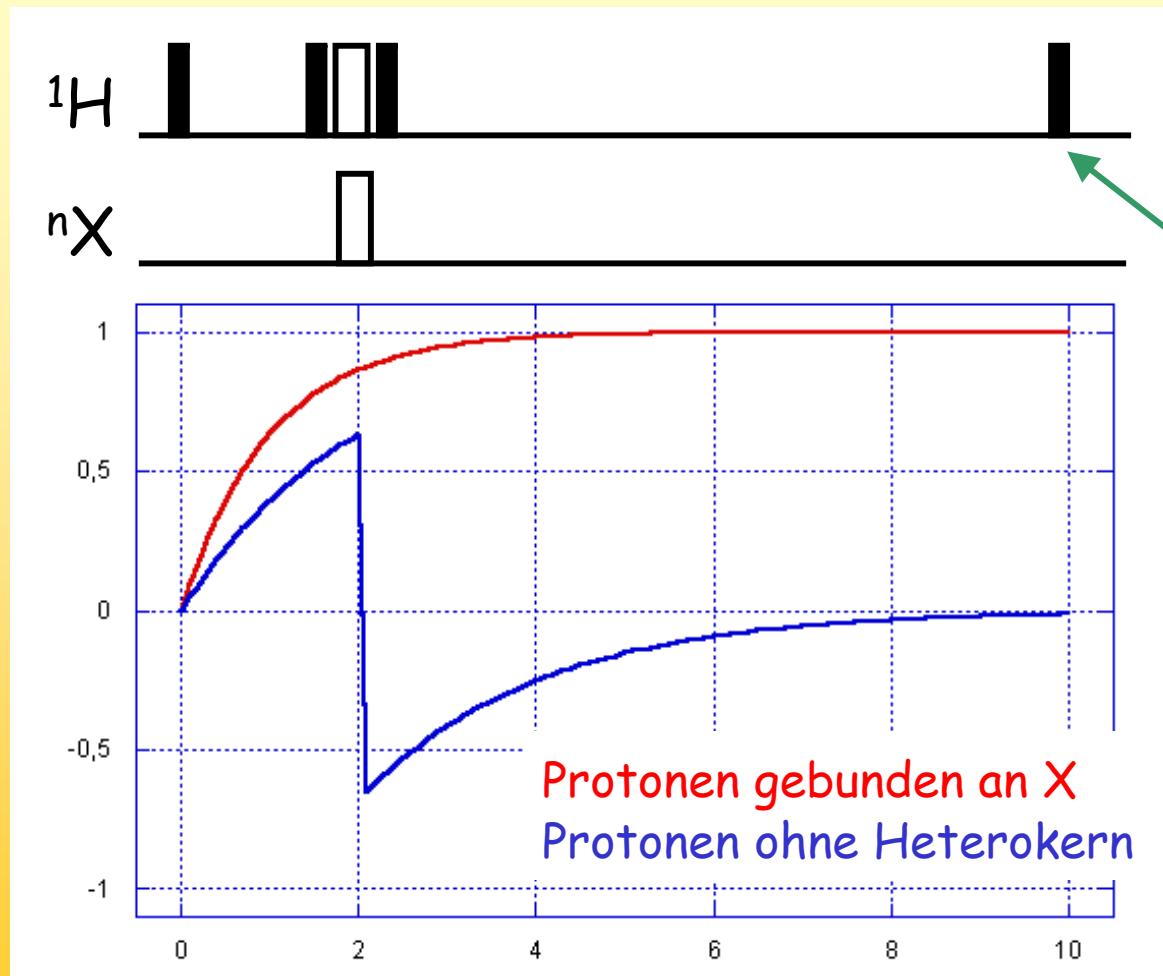
Hier liegt keine z-  
Magnetisierung vor !!

## Peptide: Heteronukleare NMR

Protonen gebunden an X und solche, die nicht an X gebunden sind relaxieren unterschiedlich schnell



## Peptide: Heteronukleare NMR



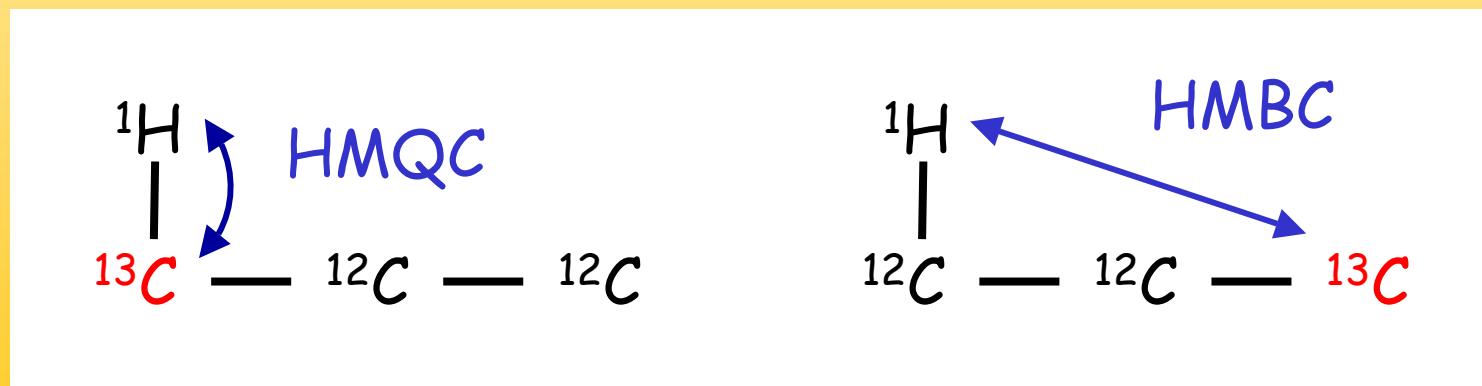
Jetzt bauen wir  
den BIRD-Puls  
ein

Protonen ohne  
Heterokern  
bekommen  
diesen  $90^\circ$  Puls  
(oder das ganze  
Experiment)  
nicht mit !!

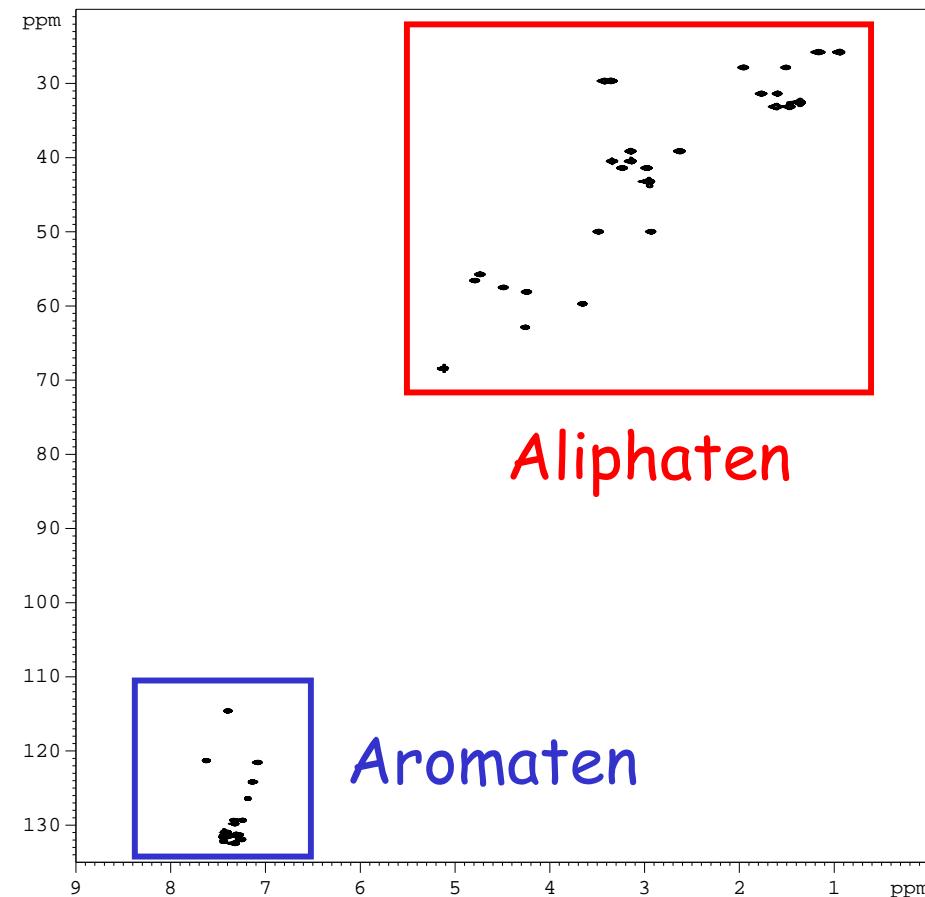
## Peptide: Heteronukleare NMR

Der Trick mit dem BIRD-Puls kann generell für alle „inversen“ heteronuklearen Experimente eingesetzt werden und erlaubt auch ohne Gradienten eine saubere Datenaufnahme.

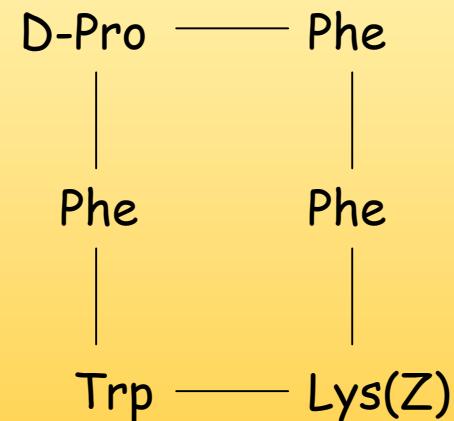
Er funktioniert allerdings nicht beim HMBC, da dort die gewünschten Protonen nicht an  $^{13}\text{C}$  gebunden sind.



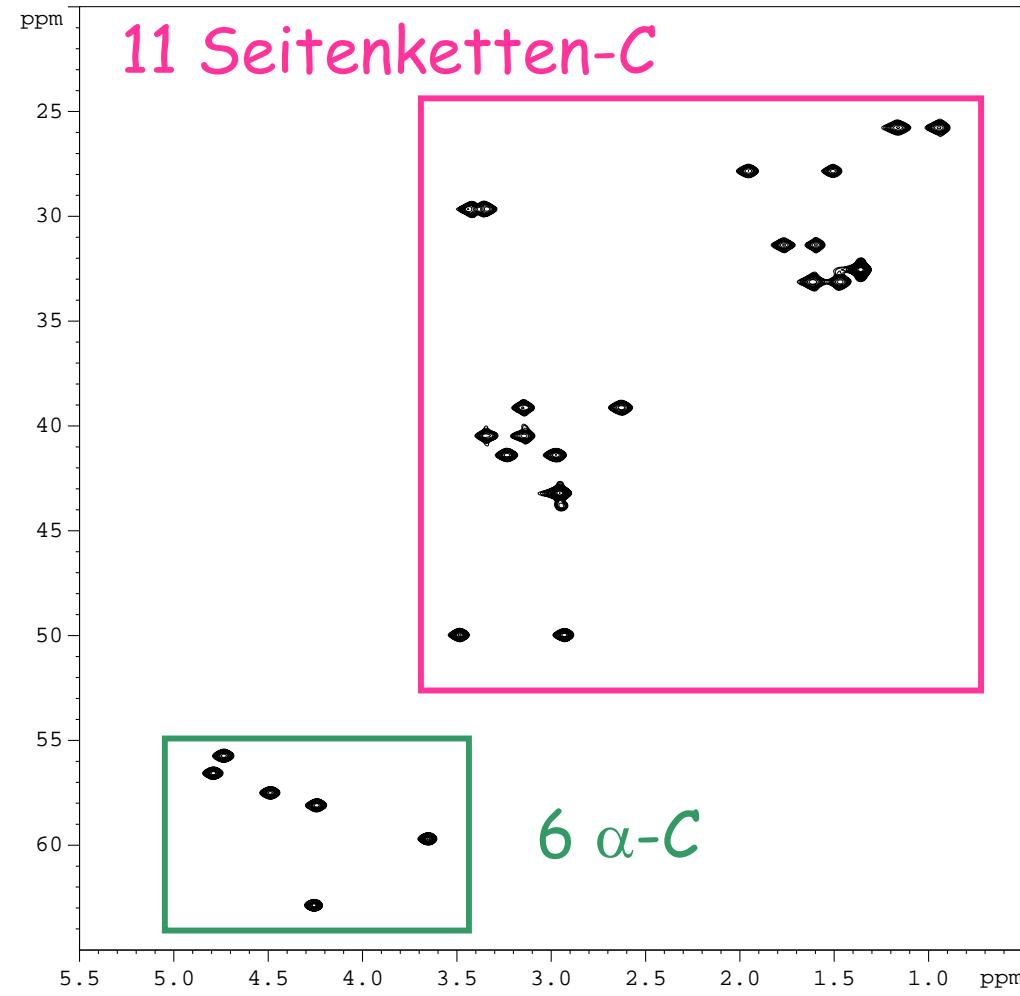
# Peptide: Heteronukleare NMR



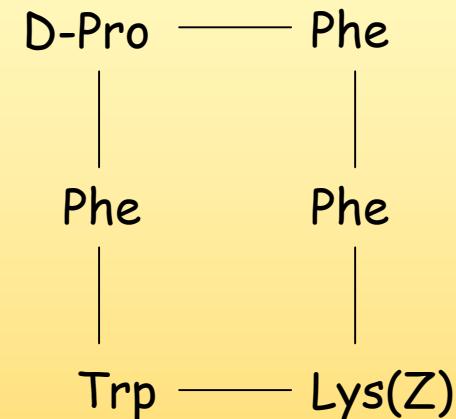
$^{13}\text{C}$ -HMQC von F3-008



## Peptide: Heteronukleare NMR

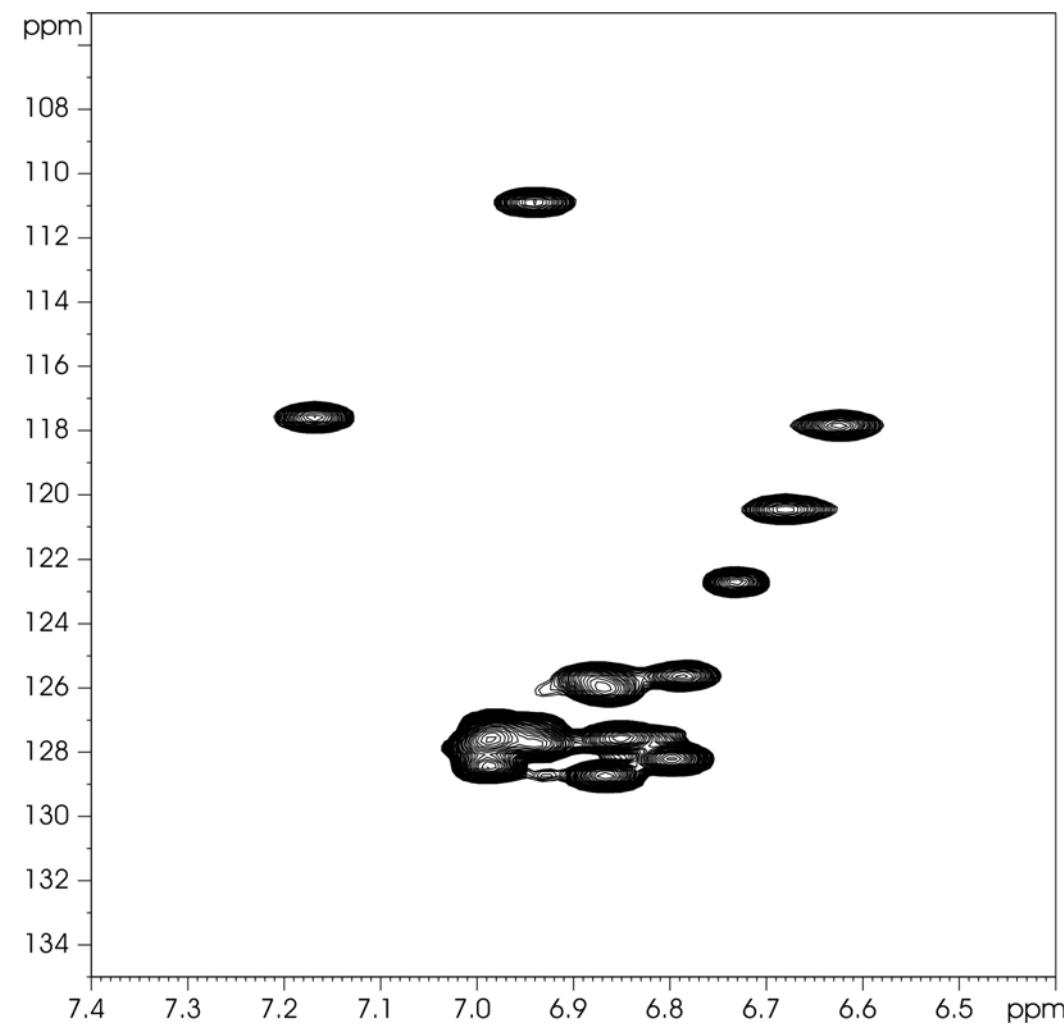


F3-008

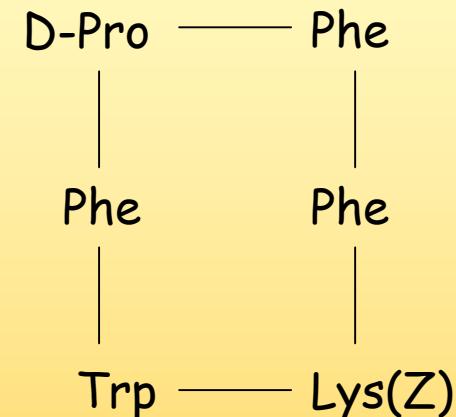


Überlagerung  
wird weitgehend  
aufgelöst

## Peptide: Heteronukleare NMR



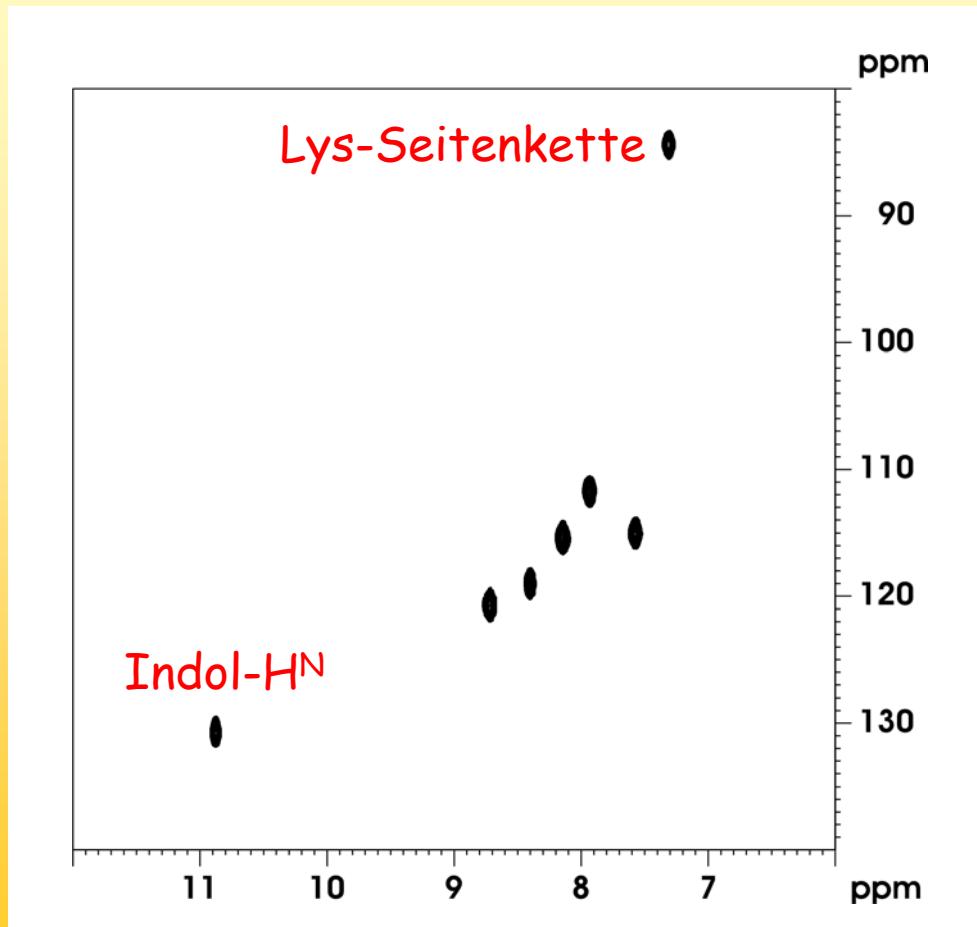
F3-008



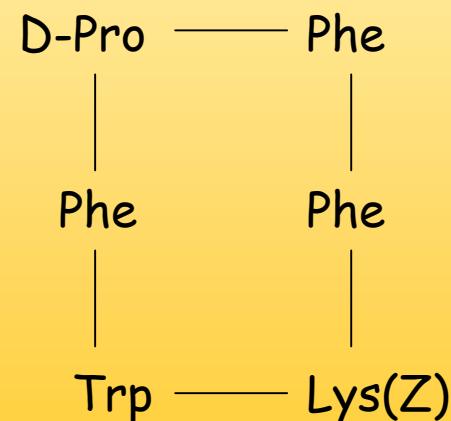
Bei den Aromaten  
kann es aber noch  
immer eng sein

## Peptide: Heteronukleare NMR

### $^{15}\text{N}-\text{HMQC}$ von F3-008



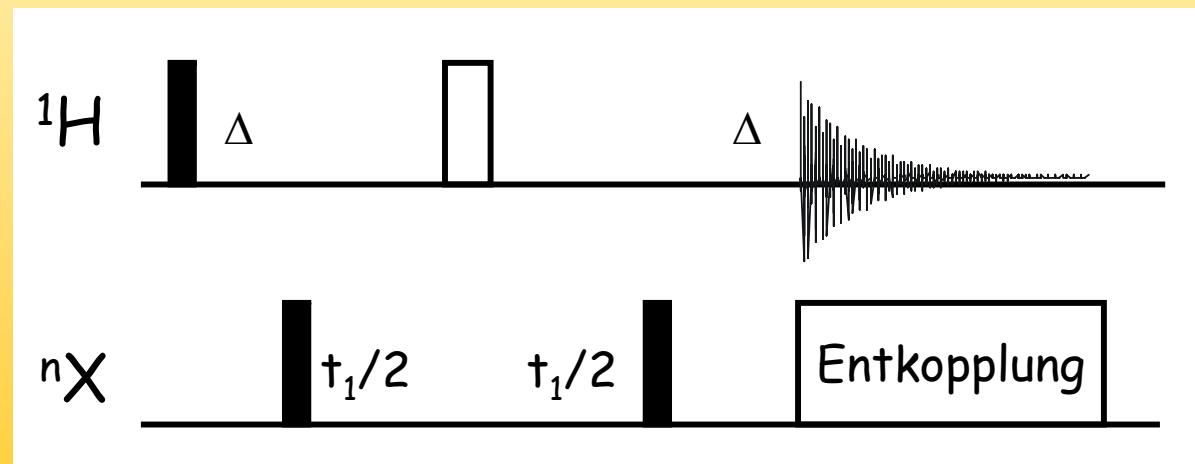
Das klappt auch mit  
 $\text{X} = ^{15}\text{N}$



# Erweiterte HMQC-Experimente

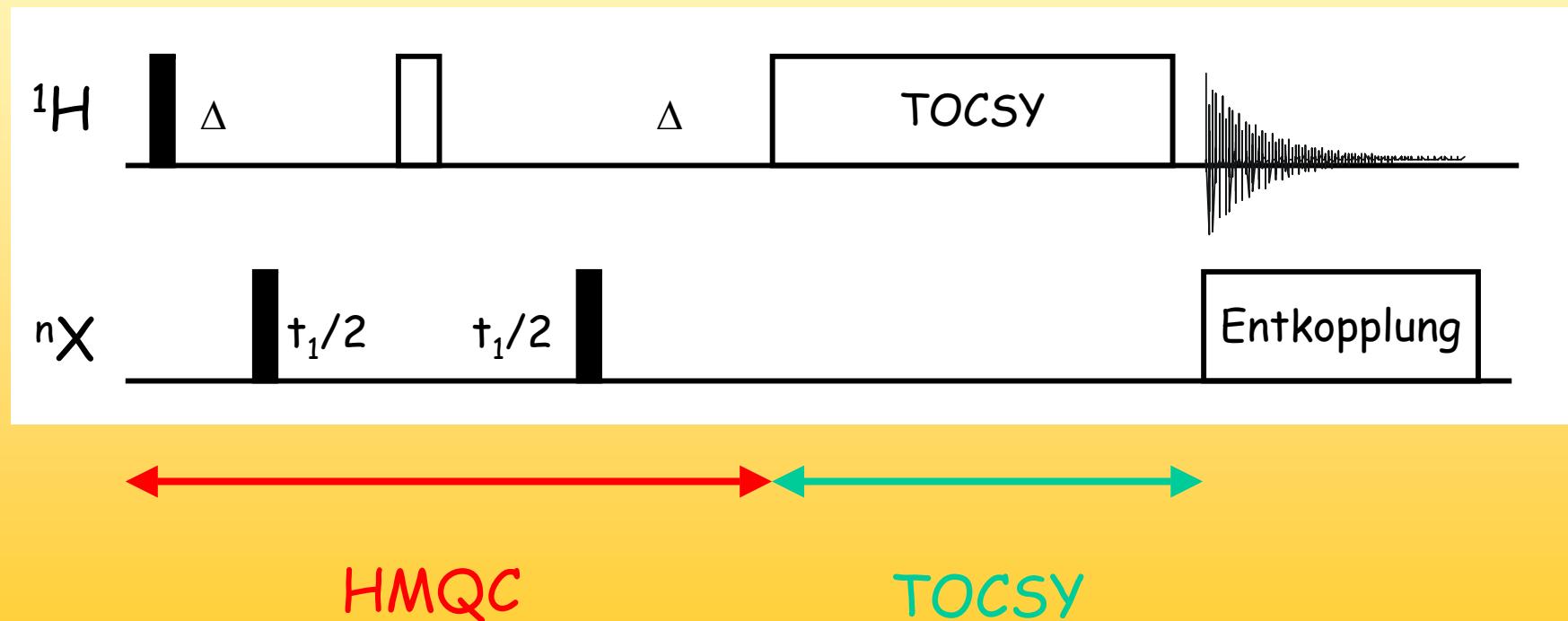
## Peptide: Heteronukleare NMR

Um die gute Auflösung der heteronuklearen Spektren für eine Zuordnung der Spinsysteme verwenden zu können, erweitert man das HMQC....

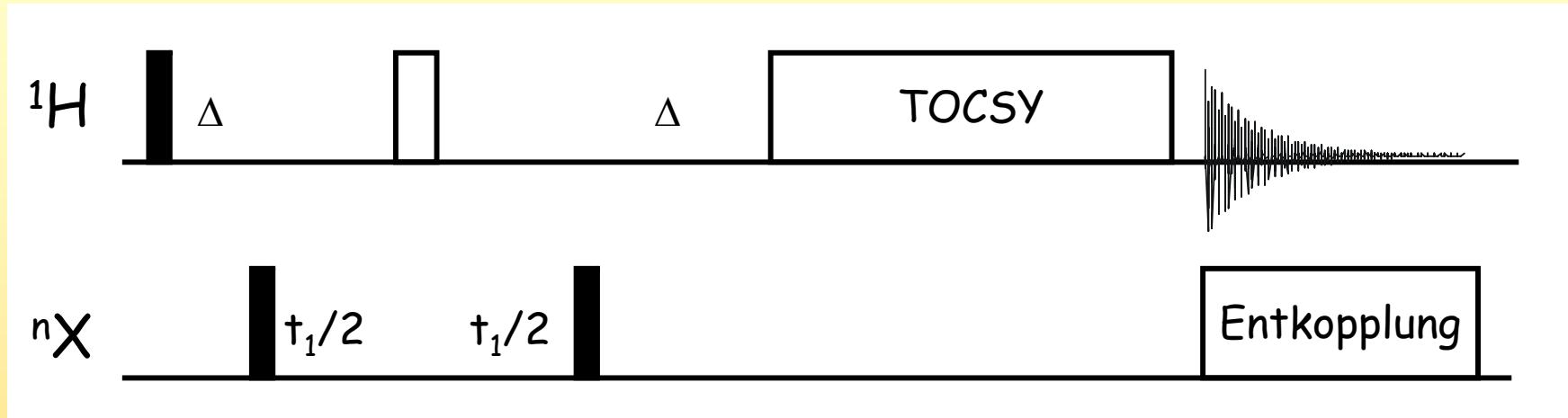


## Peptide: Heteronukleare NMR

.... auf das HMQC-TOCSY. Eine Kombination von HMQC und TOCSY

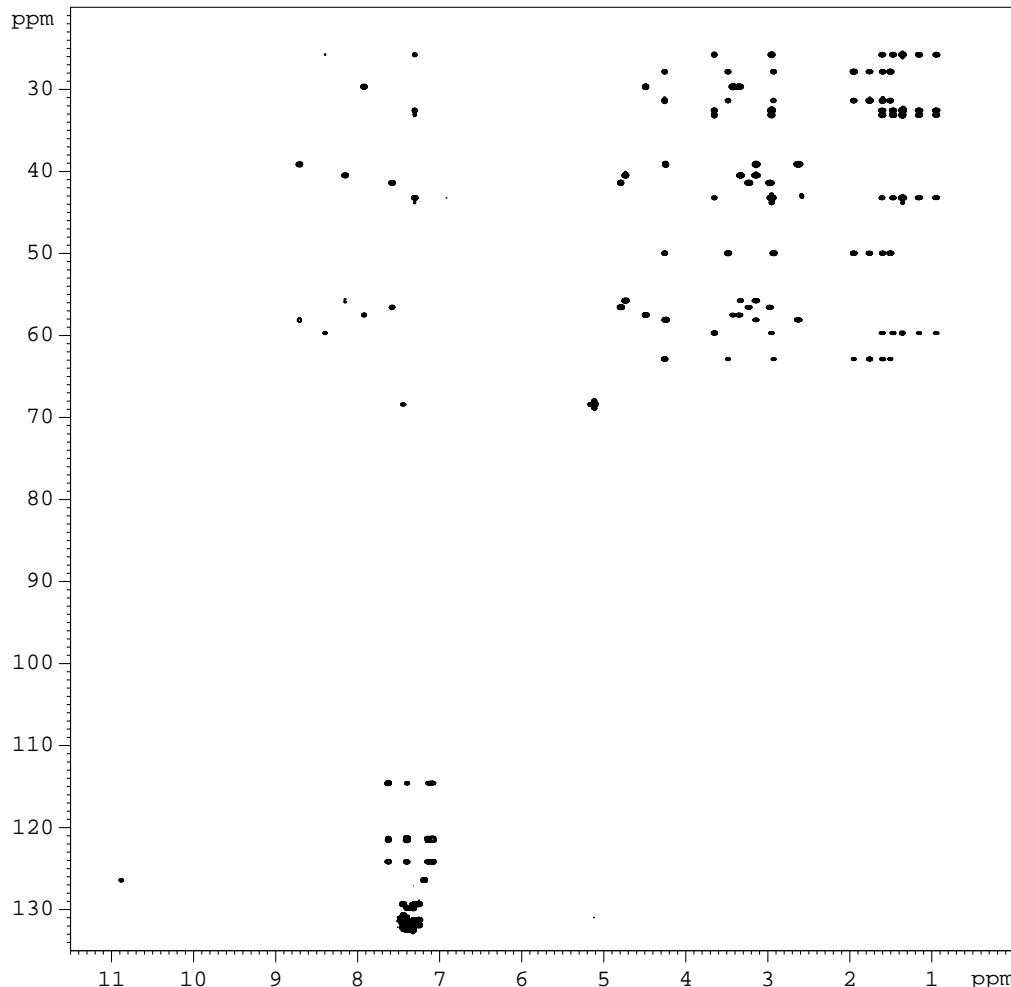


## Peptide: Heteronukleare NMR

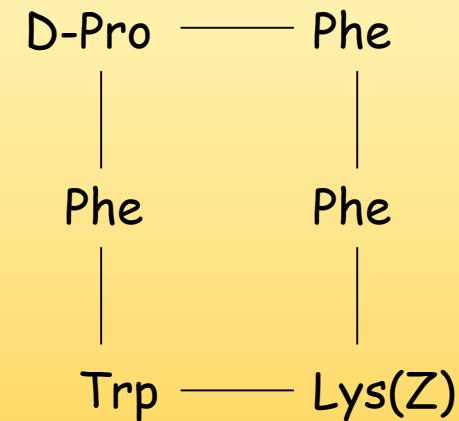


Am Ende des HMQC liegt ja hauptsächlich in-phase Magnetisierung vor. Die wird nun nicht detektiert sondern mit einer TOCSY-Mischsequenz über das ganze Spinsystem verteilt und erst anschließend detektiert. Magnetisierung die von  $J_{HH}$  resultiert wird unterdrückt.

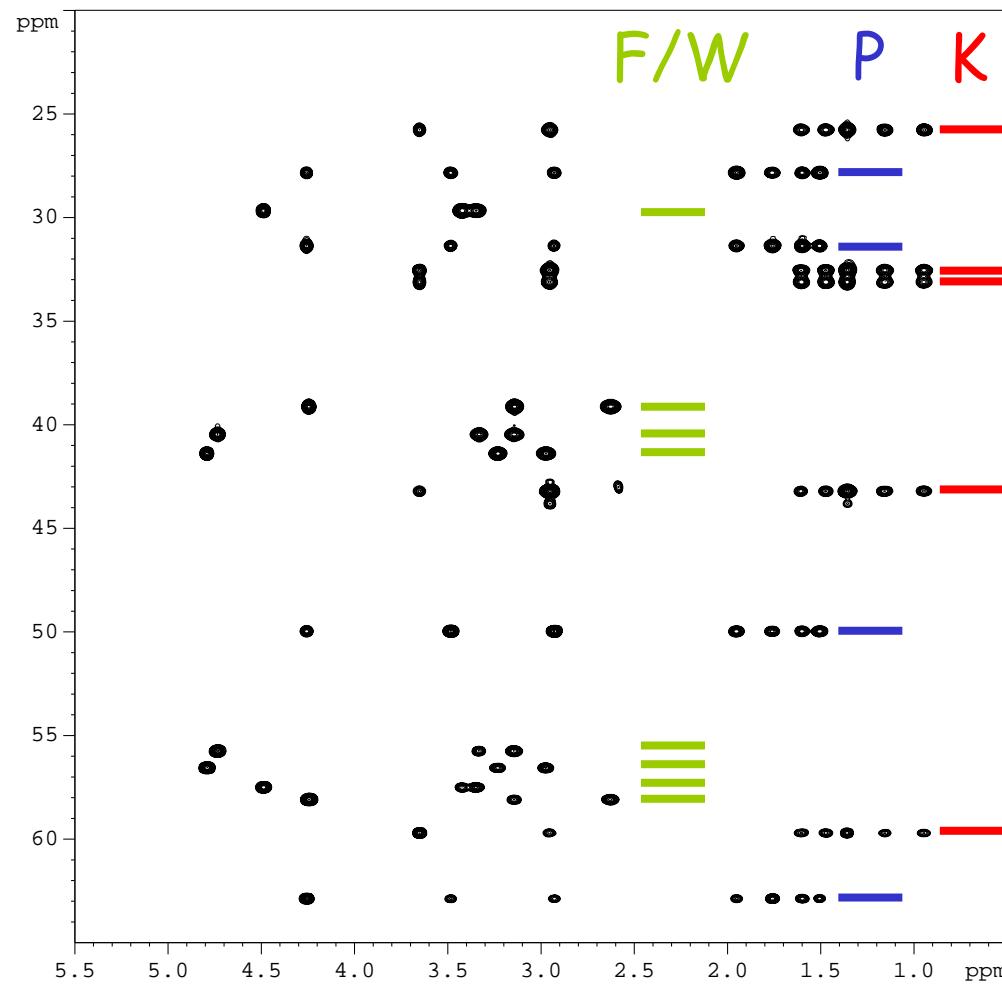
## Peptide: Heteronukleare NMR



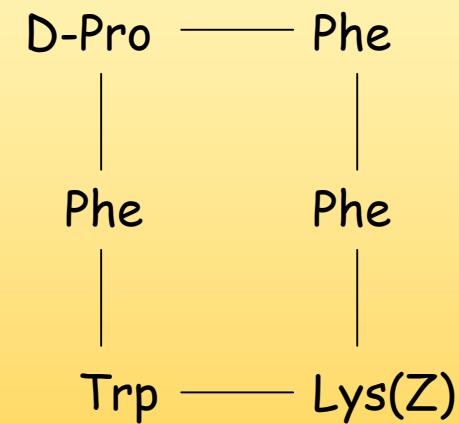
HMQC-TOCSY  
von F3-008



## Peptide: Heteronukleare NMR

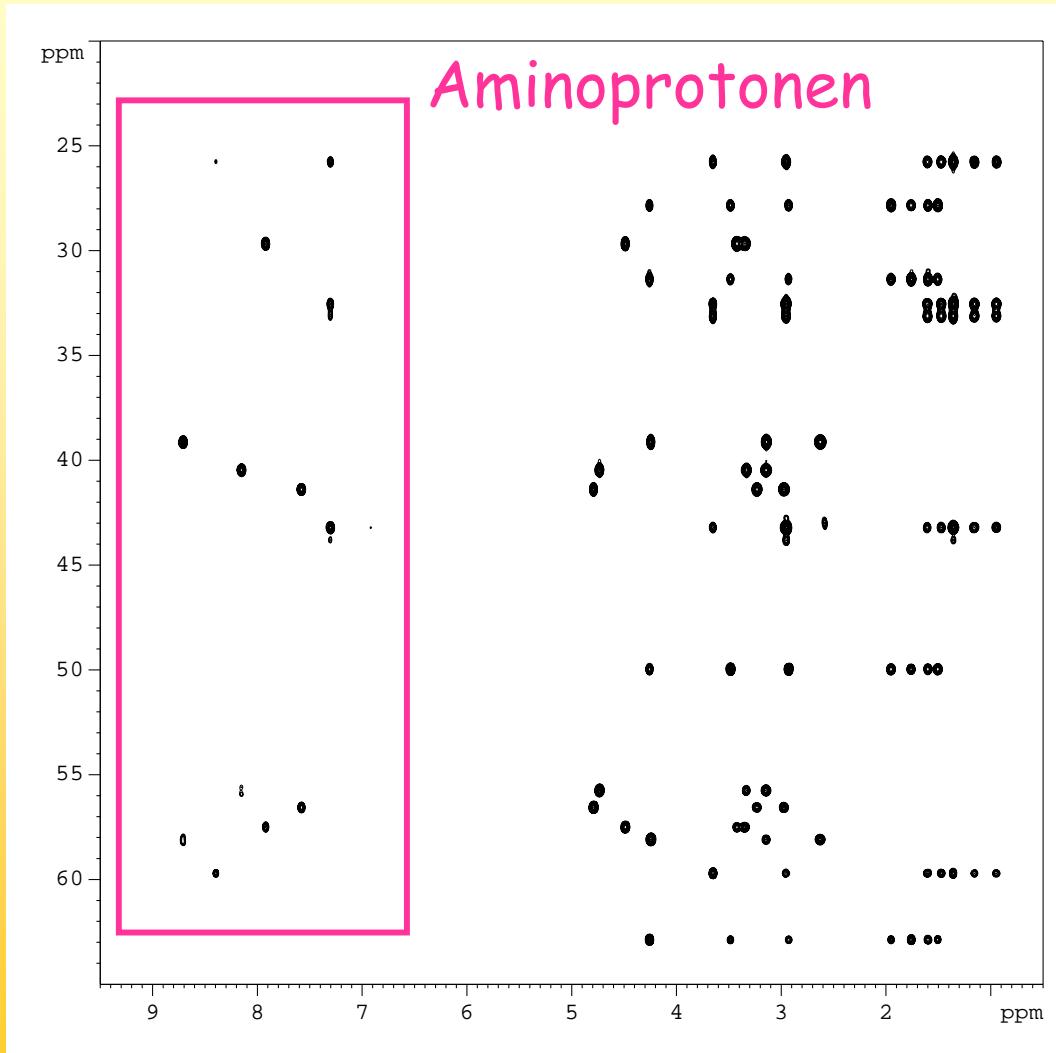


HMQC-TOCSY  
von F3-008

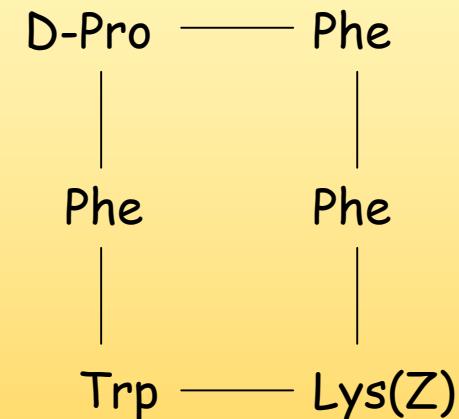


Bereich der  
Aliphaten

# Peptide: Heteronukleare NMR



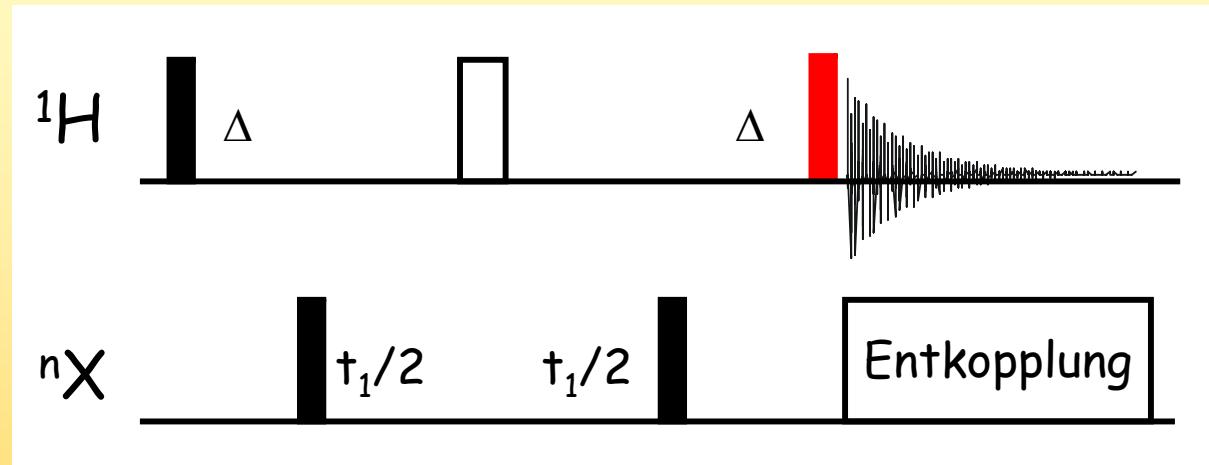
HMQC-TOCSY  
von F3-008



Auch die  $H^N$   
lassen sich so  
ablesen

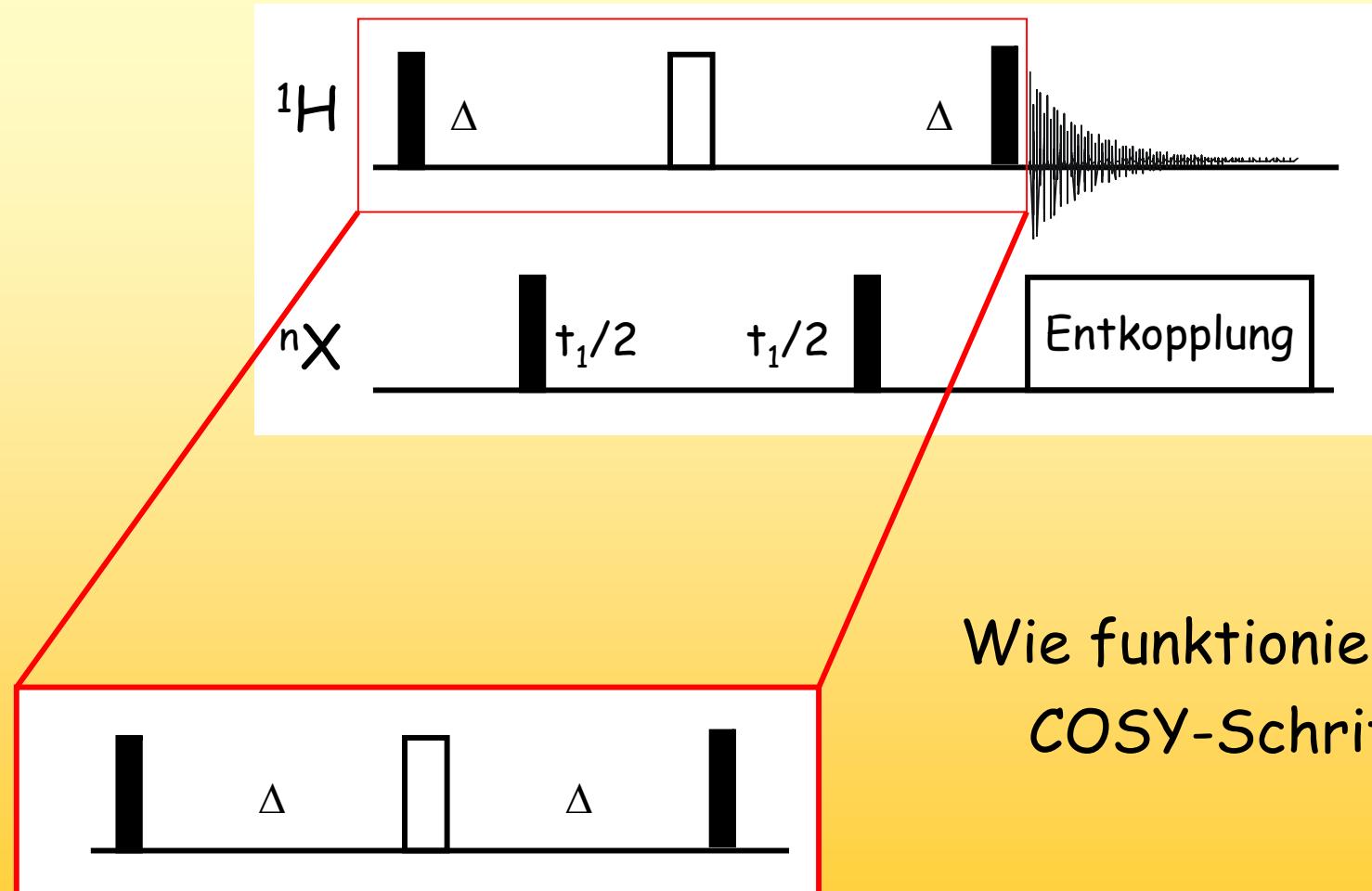
## Peptide: Heteronukleare NMR

### HMQC-COSY

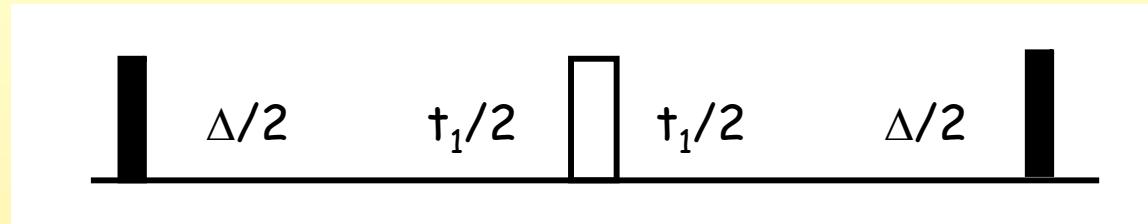


Es kann aber auch von Bedeutung sein nur einen „Schritt“ im Spinsystem weiterzugehen, d.h. nur über 3 Bindungen von einem Proton zum nächsten. Das gelingt mit dem HMQC-COSY

## Peptide: Heteronukleare NMR



## Peptide: Heteronukleare NMR



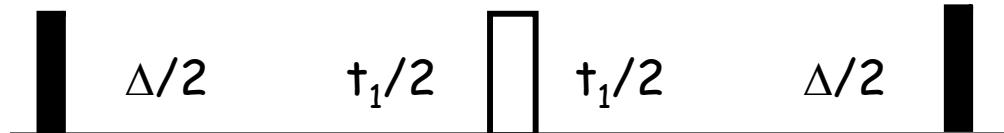
$$H_{1z} \xrightarrow{90^\circ H_x} -H_{1y} \xrightarrow{\pi J_{HH}(\Delta+t_1)}$$

$$-H_{1y} \cos \pi J_{HH}(\Delta+t_1) + 2H_{1x}H_{2z} \sin \pi J_{HH}(\Delta+t_1)$$

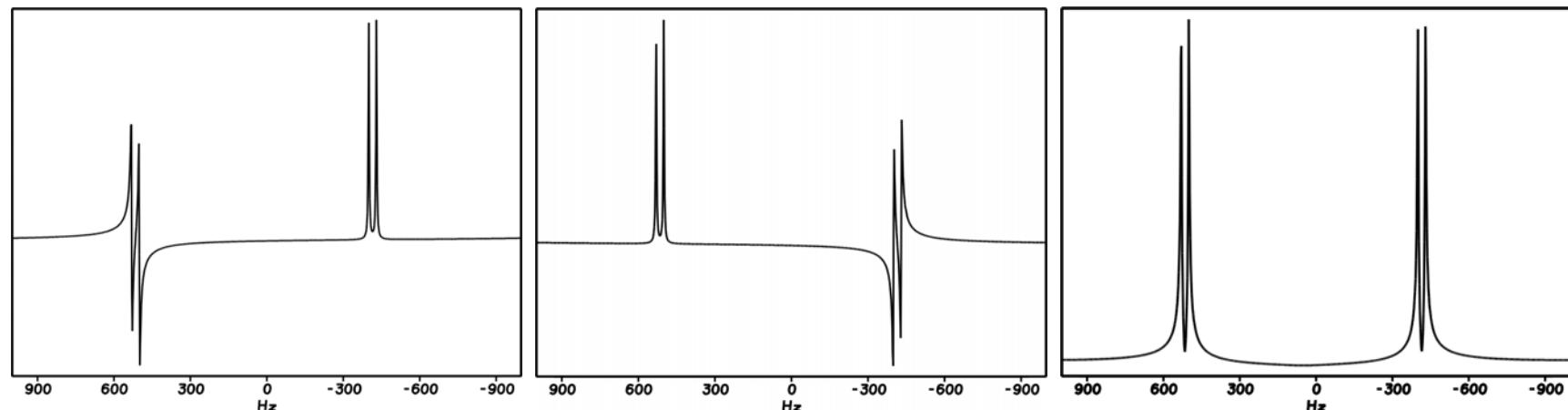
$$\xrightarrow{90^\circ H_x} -H_{1y} \cos \pi J_{HH}(\Delta+t_1) + 2H_{1z}H_{2x} \sin \pi J_{HH}(\Delta+t_1)$$

Wir haben oben schon gesehen das  $\Delta+t_1$  recht groß werden kann. Zudem kennen wir die Situation schon vom „normalen“ COSY

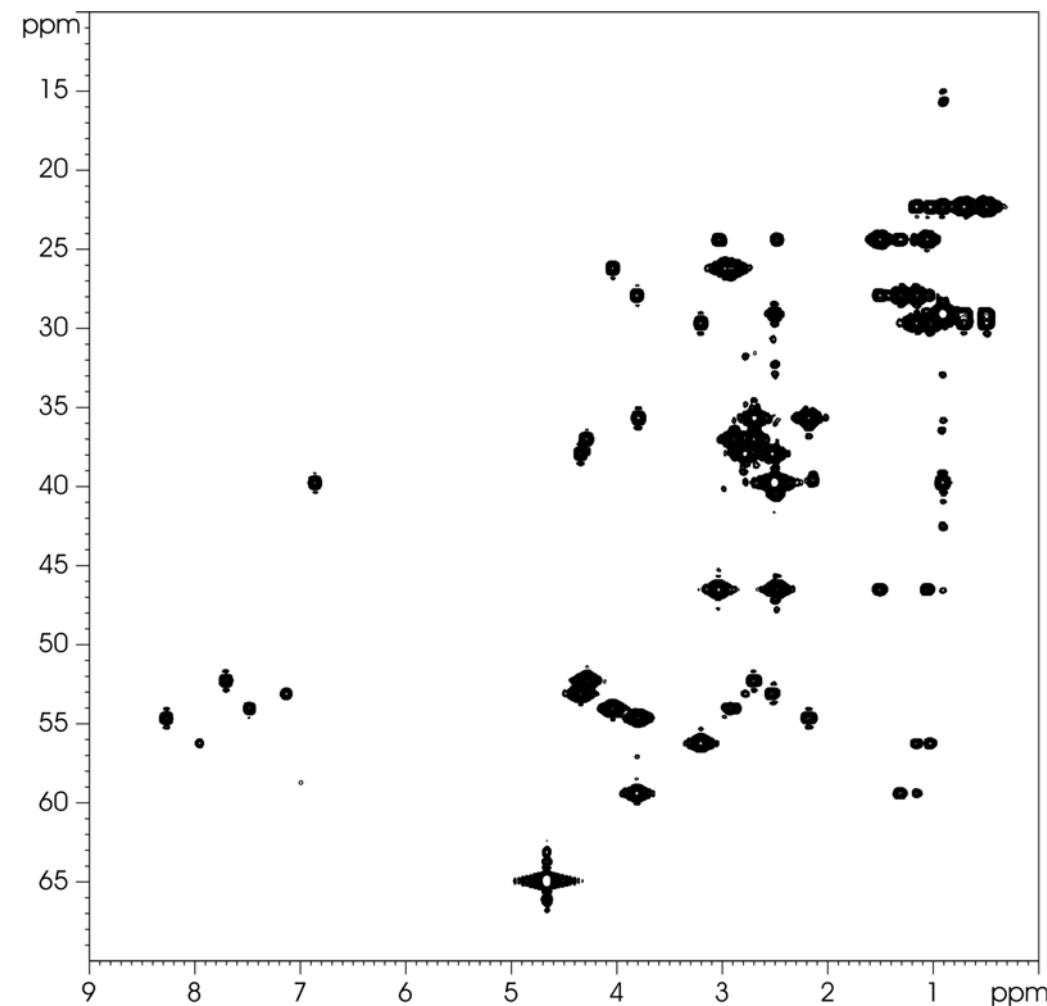
## Peptide: Heteronukleare NMR



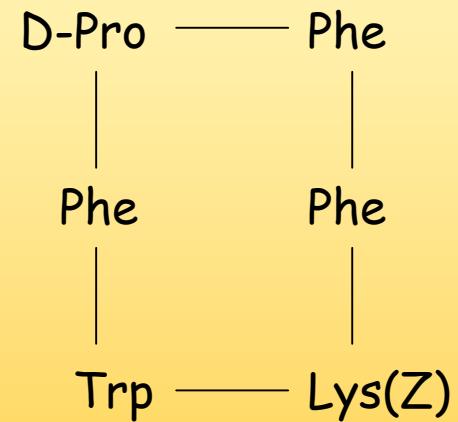
Wir bekommen zwei Signale für die beiden Protonen, haben aber einen Phasenunterschied von  $90^\circ$  und müssen eine Magnitude-Rechnung durchführen



## Peptide: Heteronukleare NMR



HMQC-COSY  
von F3-008

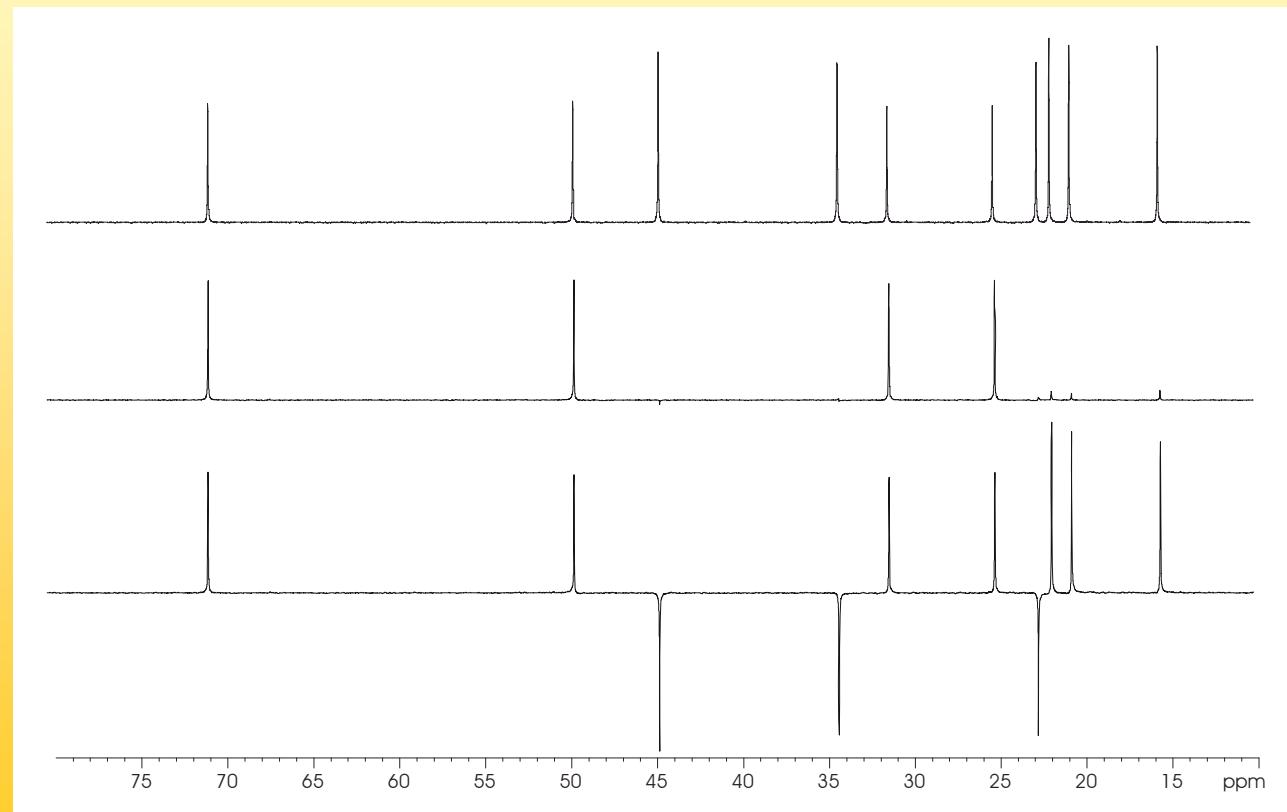


# Das DEPT-HMQC

## Peptide: Heteronukleare NMR

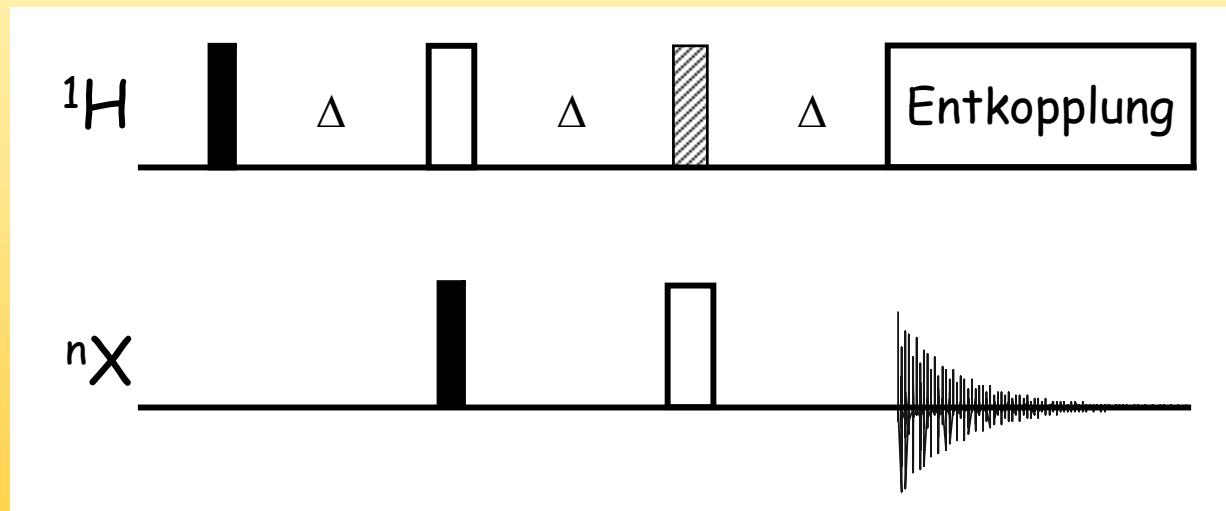
Was beim Zuordnen auch hilfreich sein kann, ist Information über die Multiplizität der Kohlenstoffkerne

DEPT !



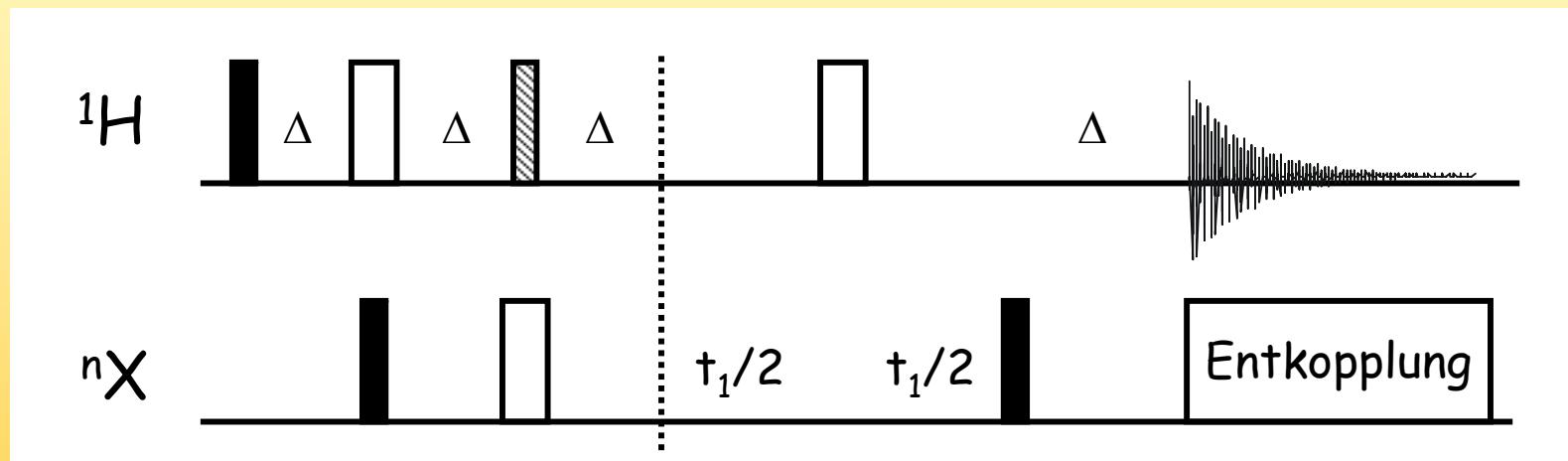
## Peptide: Heteronukleare NMR

Kann man die DEPT-Sequenz und die in ihr enthaltene Information irgendwie in ein inverses Spektrum einbauen ?

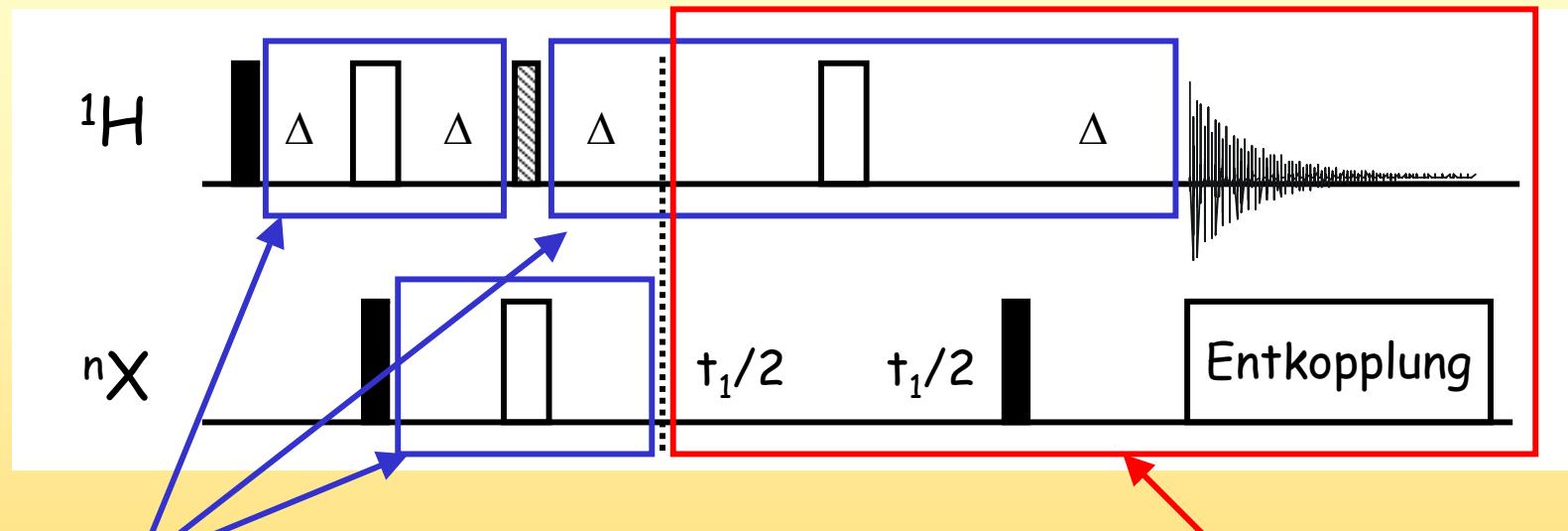


## Peptide: Heteronukleare NMR

### DEPT-HMQC



## Peptide: Heteronukleare NMR

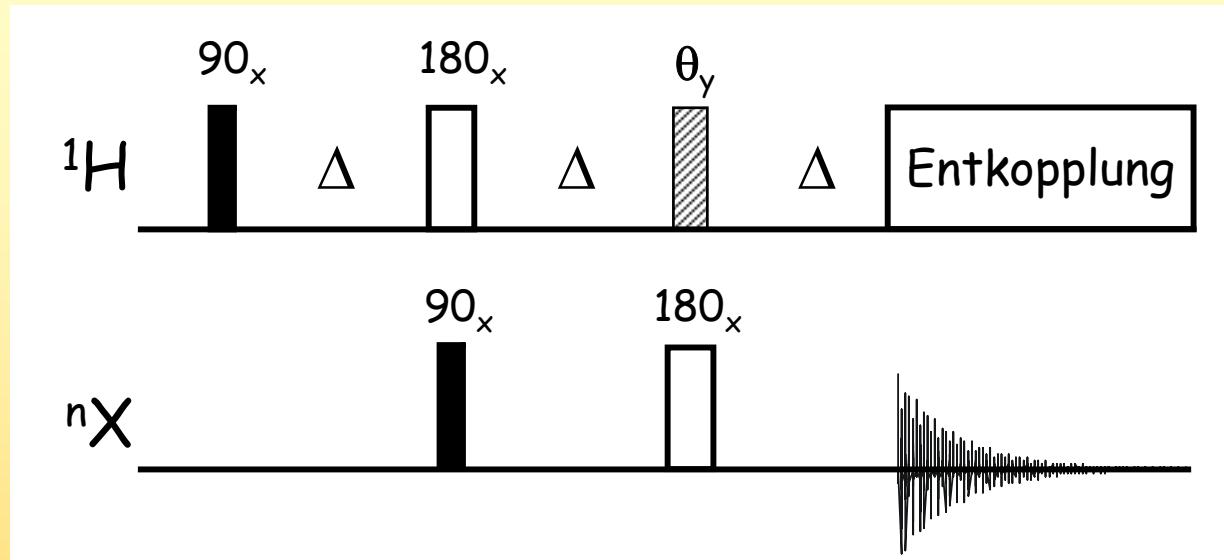


keine chemische Verschiebung

wie beim HMQC

Um das DEPT-HMQC zu verstehen müssen wir uns die DEPT-Sequenz nochmal anschauen

## Peptide: Heteronukleare NMR



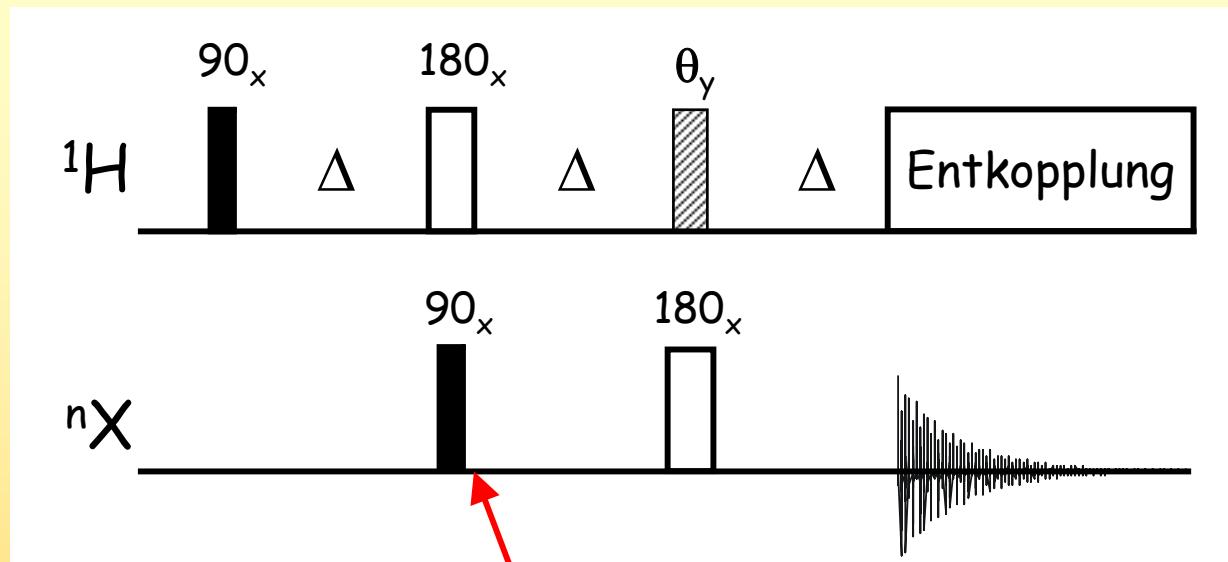
Das Vorzeichen der Signale hängt vom Editierpuls  $\theta$  ab.

$\theta = 45^\circ$        $\text{CH} +, \text{CH}_2 +, \text{CH}_3 +$

$\theta = 90^\circ$        $\text{CH} +, \text{CH}_2 0, \text{CH}_3 0$

$\theta = 135^\circ$        $\text{CH} +, \text{CH}_2 -, \text{CH}_3 +$

## Peptide: Heteronukleare NMR



$$H_z \xrightarrow{90^\circ H_x} -H_y \xrightarrow{\pi J_{HC}\Delta} -H_y \cos \pi J_{HC}\Delta + 2H_x C_z \sin \pi J_{HC}\Delta$$

$$\Delta = 1/(2J_{HC}): \cos \pi J_{HC}\Delta = 0, \sin \pi J_{HC}\Delta = 1$$

$$\xrightarrow{2H_x C_z} \xrightarrow{\frac{180^\circ H_x}{90^\circ C_x}} -2H_x C_y$$

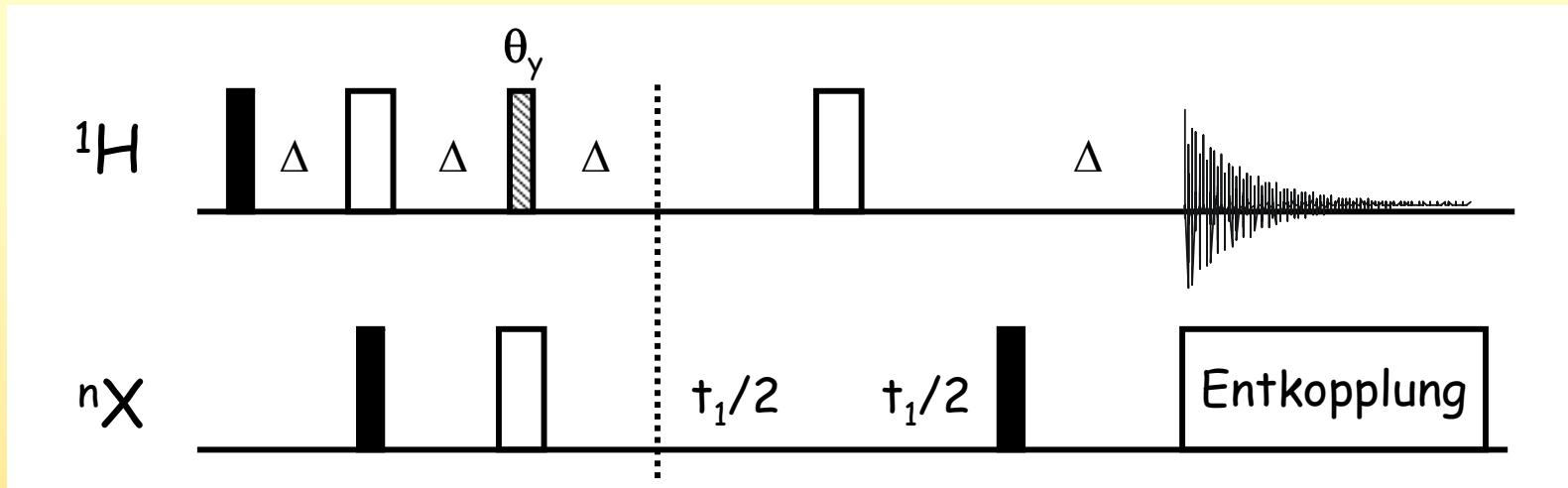
Multiquanten !!

## Peptide: Heteronukleare NMR

Von hier ab müssen wir für die unterschiedlichen Multizipititäten getrennt rechnen, wie beim DEPT auch schon. Was aber jetzt schon auffällt ist, dass wir die Multiquanten, die wir im HMQC benutzen um in der indirekten Dimension die chemischen Verschiebung des Kohlenstoffs aufzuzeichnen, schon erzeugt haben. Im DEPT werden sie in detektierbare Kohlenstoff-Magnetisierung verwandelt.

Wir nutzen sie jetzt für ein DEPT-HMQC

## Peptide: Heteronukleare NMR



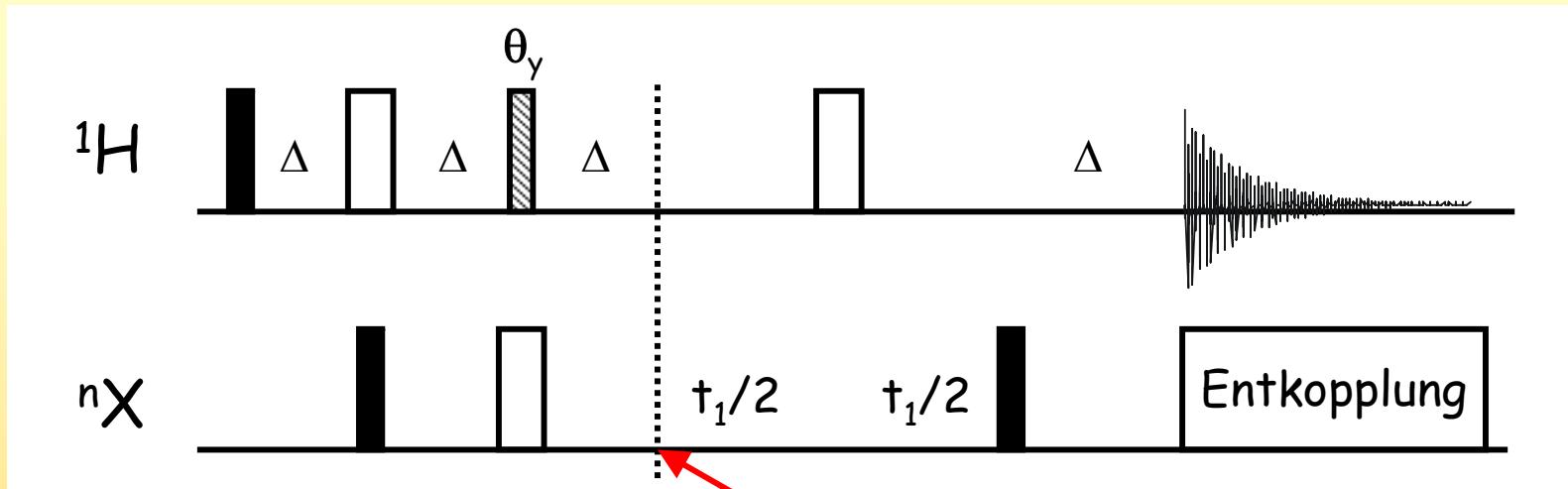
CH : Es gibt keine weitere H-C-Kopplung

$$-2 H_x C_y \xrightarrow{\pi J_{HC}\Delta} -2 H_x C_y \xrightarrow{\frac{\theta H_y}{180^\circ C_x}} 2 (H_x \cos \theta - H_z \sin \theta) C_y$$

$$= 2 H_x C_y \cos \theta - 2 H_z C_y \sin \theta$$

$$\xrightarrow{\pi J_{HC}\Delta} 2 H_x C_y \cos \theta + C_x \sin \theta$$

## Peptide: Heteronukleare NMR



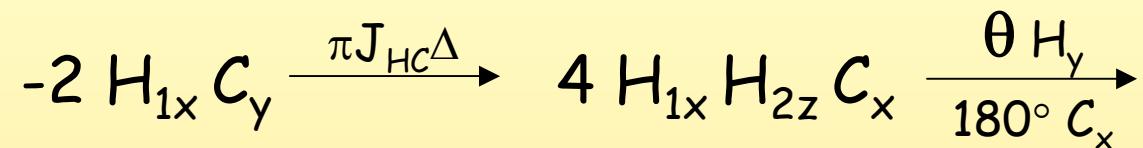
$$2 H_x C_y \cos \theta + C_y \sin \theta$$

$C_x \sin \theta$  Das kennen wir schon, das würde jetzt im DEPT detektiert

$2 H_x C_y \cos \theta$  Das sind die Multiquanten, die wir im Rest der Sequenz verwerten können

## Peptide: Heteronukleare NMR

$\text{CH}_2$  : Es gibt eine weitere H-C-Kopplung



$$4 (\text{H}_{1x} \cos \theta - \text{H}_{1z} \sin \theta) (\text{H}_{2z} \cos \theta + \text{H}_{2x} \sin \theta) \text{C}_x$$

$$= 4 \text{H}_{1x} \text{H}_{2z} \text{C}_x \cos \theta \cos \theta - 4 \text{H}_{1z} \text{H}_{2z} \text{C}_x \sin \theta \cos \theta$$

$$+ 4 \text{H}_{1x} \text{H}_{2x} \text{C}_x \cos \theta \sin \theta - 4 \text{H}_{1z} \text{H}_{2x} \text{C}_x \sin \theta \sin \theta$$

$$\xrightarrow{\pi J_{\text{HC}\Delta}} 2 \text{H}_{1x} \text{C}_y \cos \theta \cos \theta + \text{C}_x \sin \theta \cos \theta$$

$$+ 4 \text{H}_{1x} \text{H}_{2x} \text{C}_x \cos \theta \sin \theta - 2 \text{H}_{2x} \text{C}_y \sin \theta \sin \theta$$

Das gleiche bekommen wir auch nochmal von  $\text{H}_2$  aus

## Peptide: Heteronukleare NMR

Von  $H_1$

$$2 H_{1x} C_y \cos \theta \cos \theta + C_x \sin \theta \cos \theta$$

$$+ 4 H_{1x} H_{2x} C_x \cos \theta \sin \theta - 2 H_{2x} C_y \sin \theta \sin \theta$$

Von  $H_2$

$$2 H_{2x} C_y \cos \theta \cos \theta + C_x \sin \theta \cos \theta$$

$$+ 4 H_{2x} H_{1x} C_x \cos \theta \sin \theta - 2 H_{1x} C_y \sin \theta \sin \theta$$

$$C_x \sin \theta \cos \theta$$

Das würden wir im DEPT detektieren

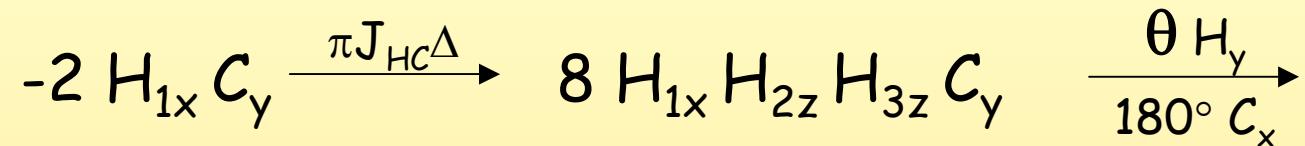
Im DEPT-HMQC bekommen wir

$$2 H_{1x} C_y \cos \theta \cos \theta - 2 H_{1x} C_y \sin \theta \sin \theta$$

$$= 2 H_{1x} C_y (\cos \theta \cos \theta - \sin \theta \sin \theta) = 2 H_{1x} C_y \cos 2\theta$$

## Peptide: Heteronukleare NMR

$\text{CH}_3$  : Nun sind es zwei weitere H-C-Kopplungen



$$- 8 (\text{H}_{1x} \cos \theta - \text{H}_{1z} \sin \theta) (\text{H}_{2z} \cos \theta + \text{H}_{2x} \sin \theta) \times \\ (\text{H}_{3z} \cos \theta + \text{H}_{3x} \sin \theta) C_y$$

Damit entstehen 8 Terme durch Multiplikation

## Peptide: Heteronukleare NMR

$$\begin{aligned}
 &= -8 H_{1x} H_{2z} H_{3z} C_y \cos \theta \cos \theta \cos \theta \\
 &+ 8 H_{1z} H_{2z} H_{3z} C_y \sin \theta \cos \theta \cos \theta \\
 &- 8 H_{1x} H_{2x} H_{3z} C_y \cos \theta \sin \theta \cos \theta \\
 &+ 8 H_{1z} H_{2x} H_{3z} C_y \sin \theta \sin \theta \cos \theta \\
 &- 8 H_{1x} H_{2z} H_{3x} C_y \cos \theta \cos \theta \sin \theta \\
 &+ 8 H_{1z} H_{2z} H_{3x} C_y \sin \theta \cos \theta \sin \theta \\
 &- 8 H_{1x} H_{2x} H_{3x} C_y \cos \theta \sin \theta \sin \theta \\
 &+ 8 H_{1z} H_{2x} H_{3x} C_y \sin \theta \sin \theta \sin \theta
 \end{aligned}$$

## Peptide: Heteronukleare NMR

$$\xrightarrow{\pi J_{HC}\Delta} \begin{aligned}
 & 2 H_{1x} C_y \cos \theta \cos \theta \cos \theta \\
 & + C_x \sin \theta \cos \theta \cos \theta \\
 & + \cancel{4 H_{1x} H_{2x} C_x \cos \theta \sin \theta \cos \theta} \\
 & - 2 H_{2x} C_y \sin \theta \sin \theta \cos \theta \\
 & + \cancel{4 H_{1x} H_{3x} C_x \cos \theta \cos \theta \sin \theta} \\
 & - 2 H_{3x} C_y \sin \theta \cos \theta \sin \theta \\
 & - \cancel{8 H_{1x} H_{2x} H_{3x} C_y \cos \theta \sin \theta \sin \theta} \\
 & - \cancel{8 H_{2x} H_{3x} C_x \sin \theta \sin \theta \sin \theta}
 \end{aligned}$$

Und das ganze wieder von 3 Protonen !!

## Peptide: Heteronukleare NMR

$$C_x \sin \theta \cos \theta \cos \theta$$

Hier finden wir unseren DEPT-Term wieder

$$2 H_{1x} C_y \cos \theta \cos \theta \cos \theta$$

Im DEPT-HMQC ergibt das

$$-2 H_{1x} C_y \sin \theta \sin \theta \cos \theta$$

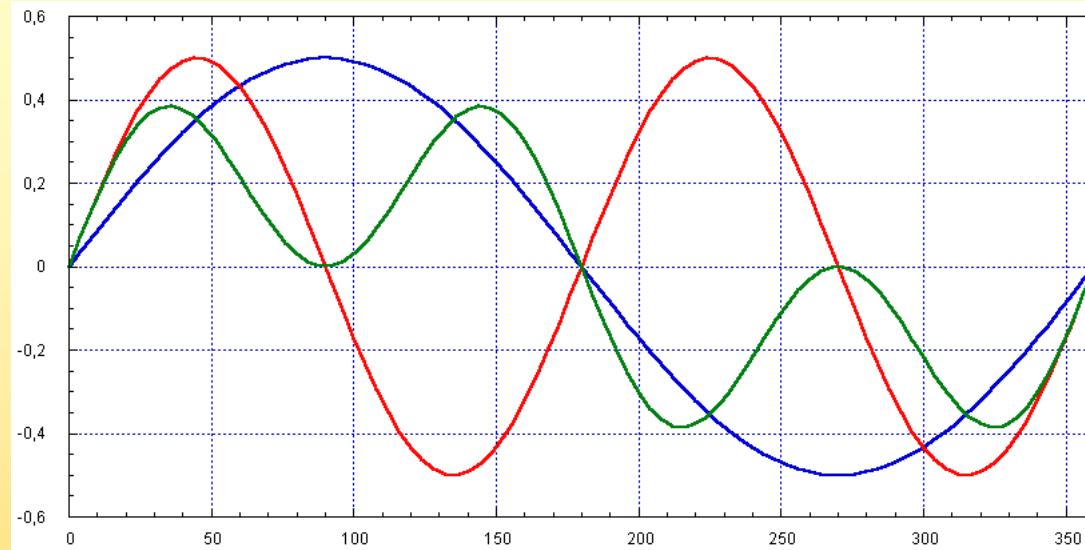
$$-2 H_{1x} C_y \sin \theta \cos \theta \sin \theta$$

$$= 2 H_{1x} C_y (\cos^3 \theta - 2 \sin^2 \theta \cos \theta)$$

$$= 2 H_{1x} C_y (3/4 \cos 3\theta + 1/4 \cos \theta)$$

## Peptide: Heteronukleare NMR

Beim „klassischen“  
DEPT sah das so  
aus



$$CH : \sin \theta$$

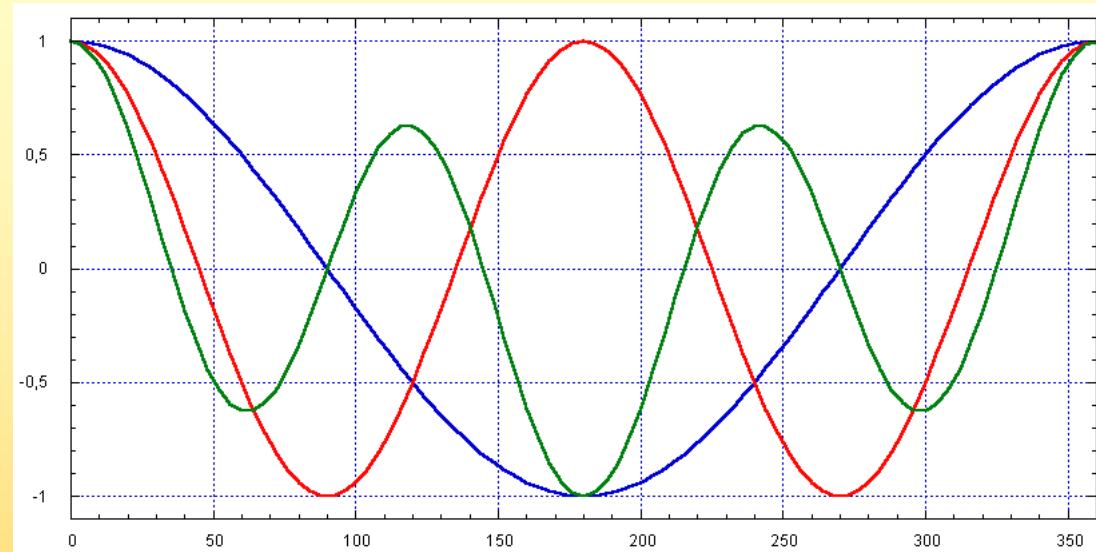
$$CH_2 : \sin \theta \cos \theta$$

$$CH_3 : \sin \theta \cos \theta \cos \theta$$

Nützliche Pulswinkel sind  
hier  $45^\circ$ ,  $90^\circ$  und  $135^\circ$

## Peptide: Heteronukleare NMR

Beim DEPT-HMQC ergibt sich etwas anderes



$$CH : \cos \theta$$

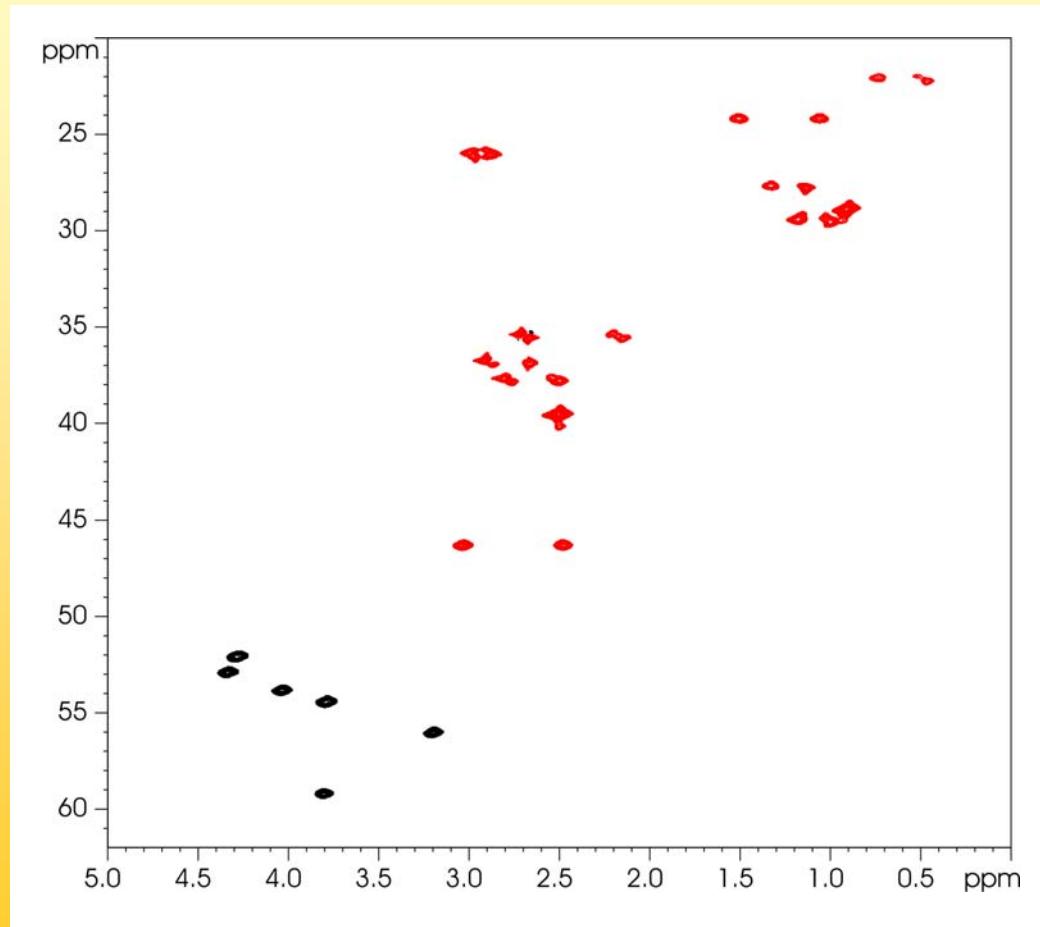
$$CH_2 : \cos 2\theta$$

$$CH_3 : \frac{3}{4} \cos 3\theta + \frac{1}{4} \cos \theta$$

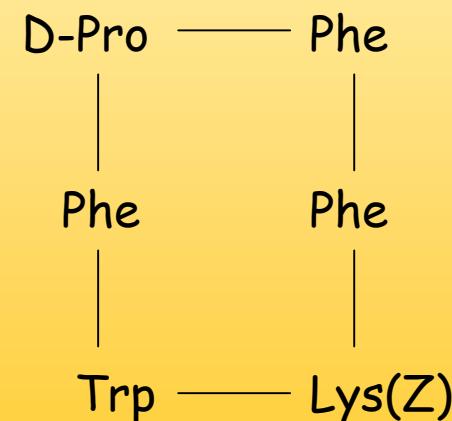
Nützliche Pulswinkel sind hier  $60^\circ, 90^\circ, 120$  und  $180^\circ$

## Peptide: Heteronukleare NMR

### $^{13}\text{C}$ -DEPT-HMQC (180) von F3-008

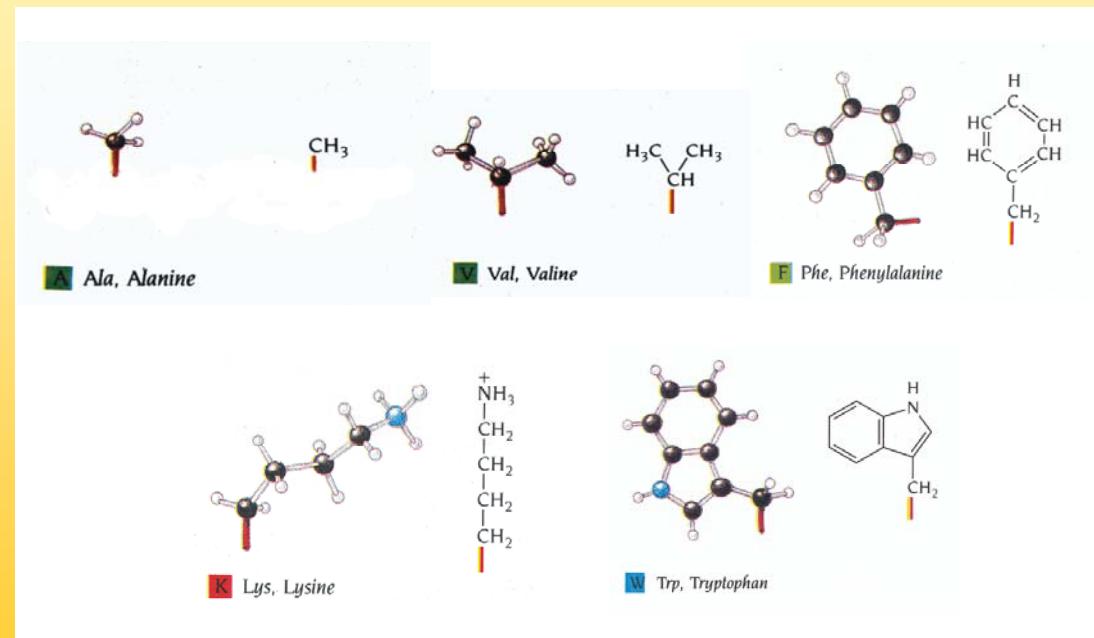
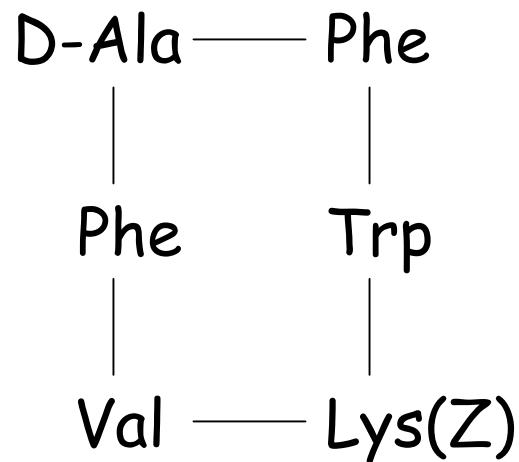


Das ist wegen der ähnlichen Aminosäuren gut geordnet



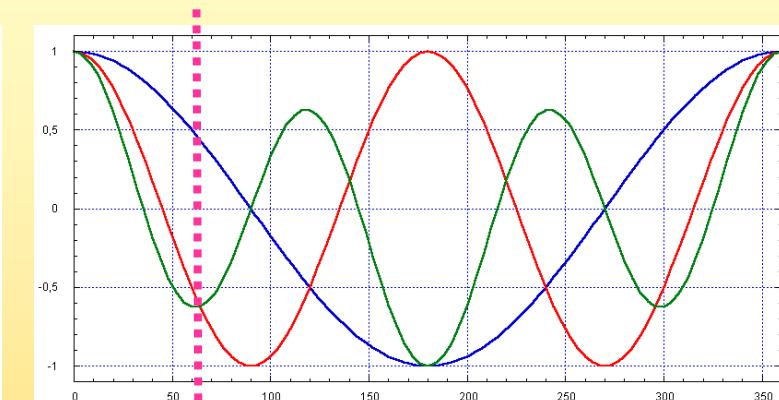
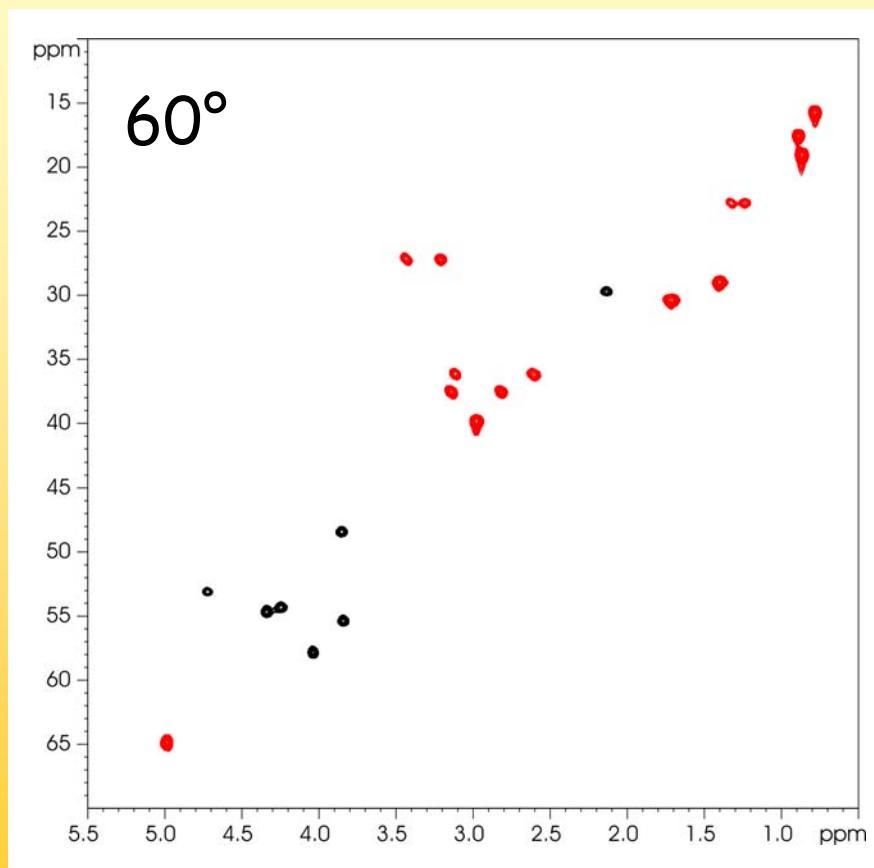
## Peptide: Heteronukleare NMR

Unser normales Peptid, F3-008, eignet sich nicht gut um das DEPT-HMQC zu demonstrieren, deshalb nehmen wir hier eine anderes Peptid, retro-VDA-008



## Peptide: Heteronukleare NMR

### $^{13}\text{C}$ -DEPT-HMQCs von VDA-008



D-Ala — Phe

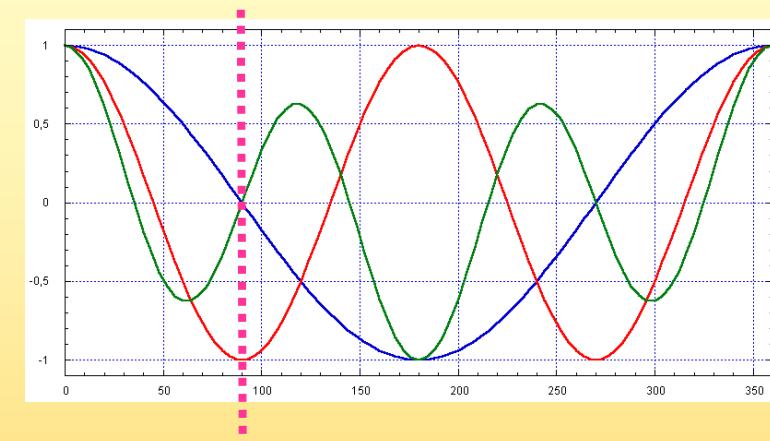
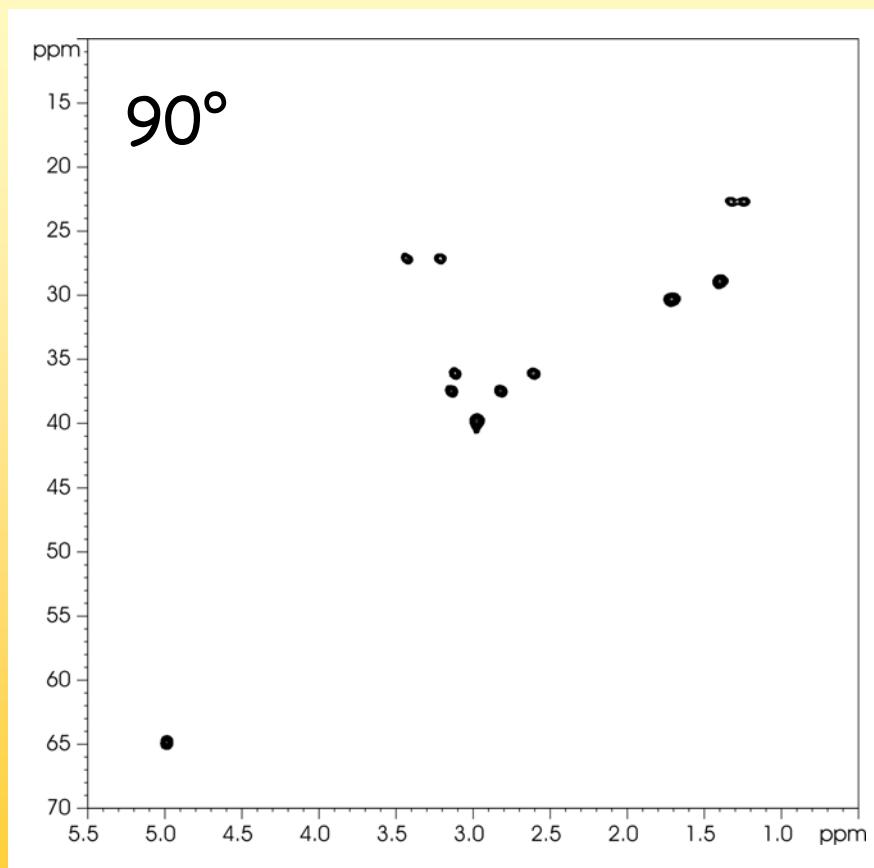
Phe

Trp

Val — Lys(Z)

## Peptide: Heteronukleare NMR

### $^{13}\text{C}$ -DEPT-HMQCs von VDA-008



D-Ala — Phe

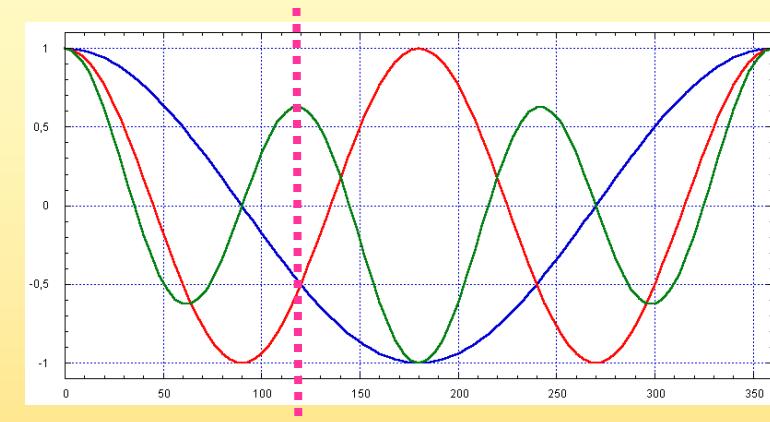
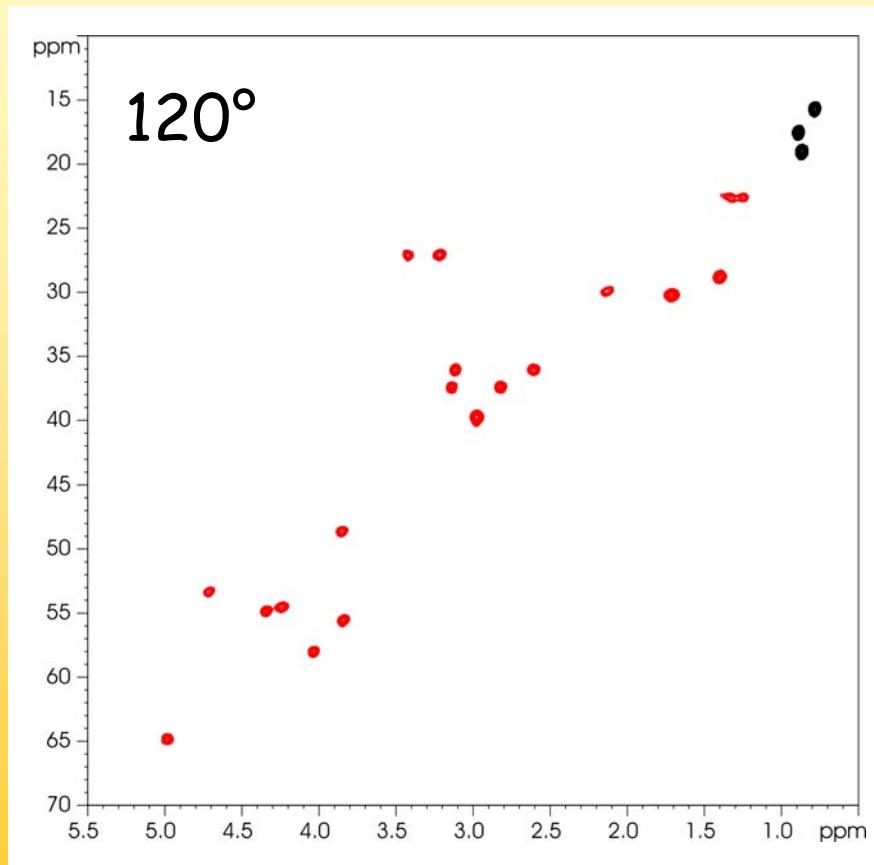
Phe

Trp

Val — Lys(Z)

## Peptide: Heteronukleare NMR

### $^{13}\text{C}$ -DEPT-HMQCs von VDA-008

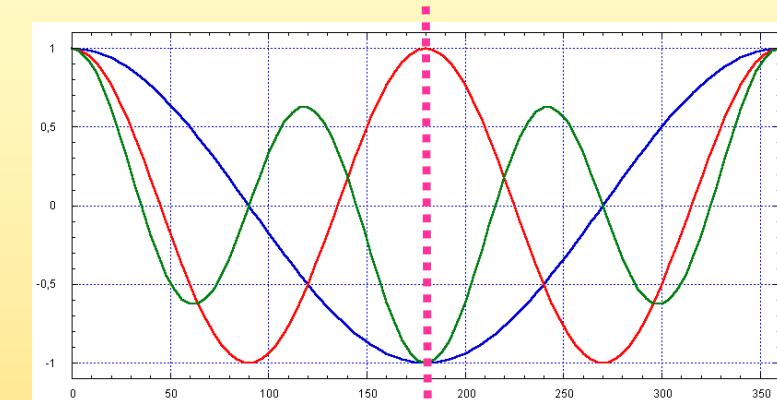
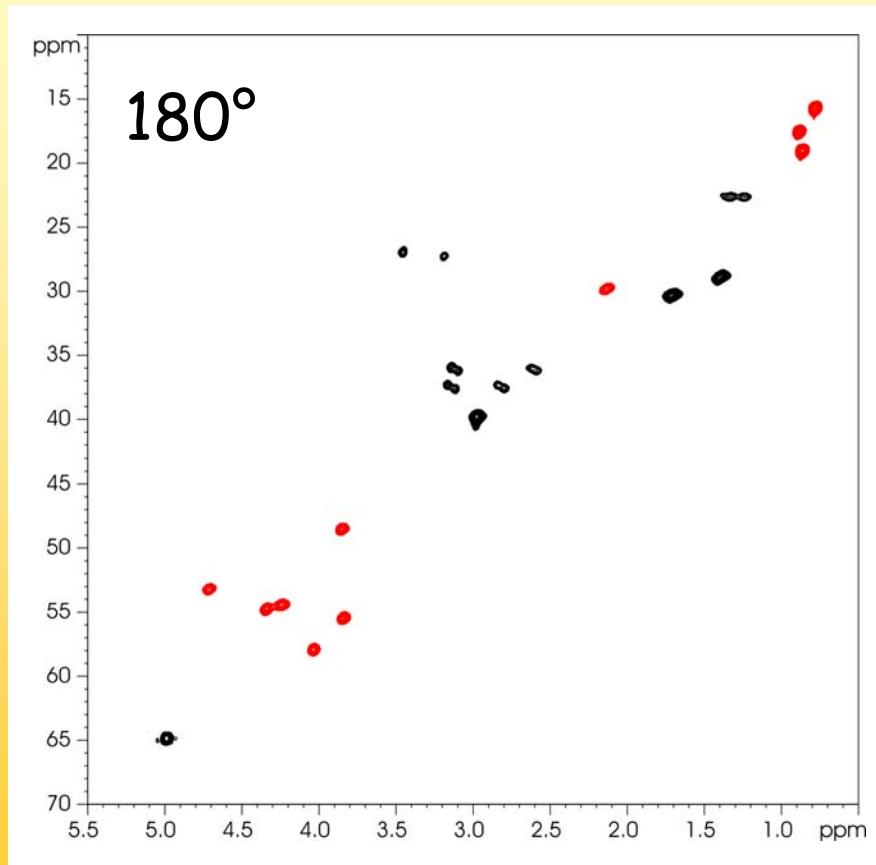


Phe — Trp

Val — Lys(Z)

## Peptide: Heteronukleare NMR

### $^{13}\text{C}$ -DEPT-HMQCs von VDA-008



D-Ala — Phe

Phe

Trp

Val — Lys(Z)

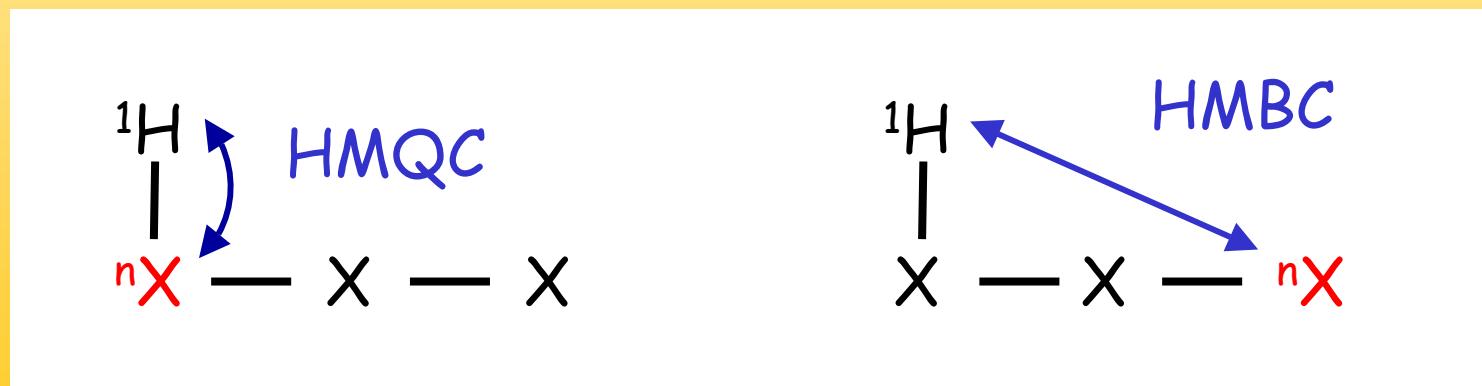
# Das HMBC bei Peptiden

## Sequentielle Zuordnung

## Peptide: Heteronukleare NMR

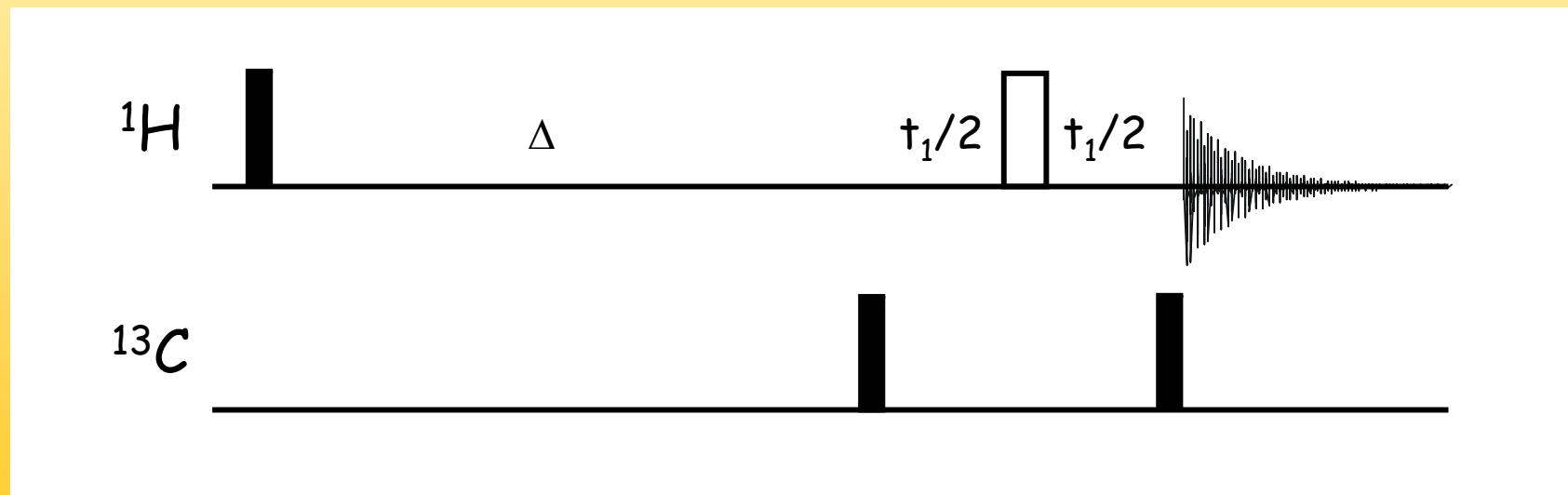
Alle bislang vorgestellten heteronuklearen Experimente basierten auf dem vorliegen einer direkten  $^1\text{H}$ -X-Kopplung.

X-Kerne, die kein Proton tragen, werden nicht detektierbar sein. Dazu muss man sich wieder der Weitbereichskopplungen bedienen, das Experiment der Wahl ist dann das HMBC

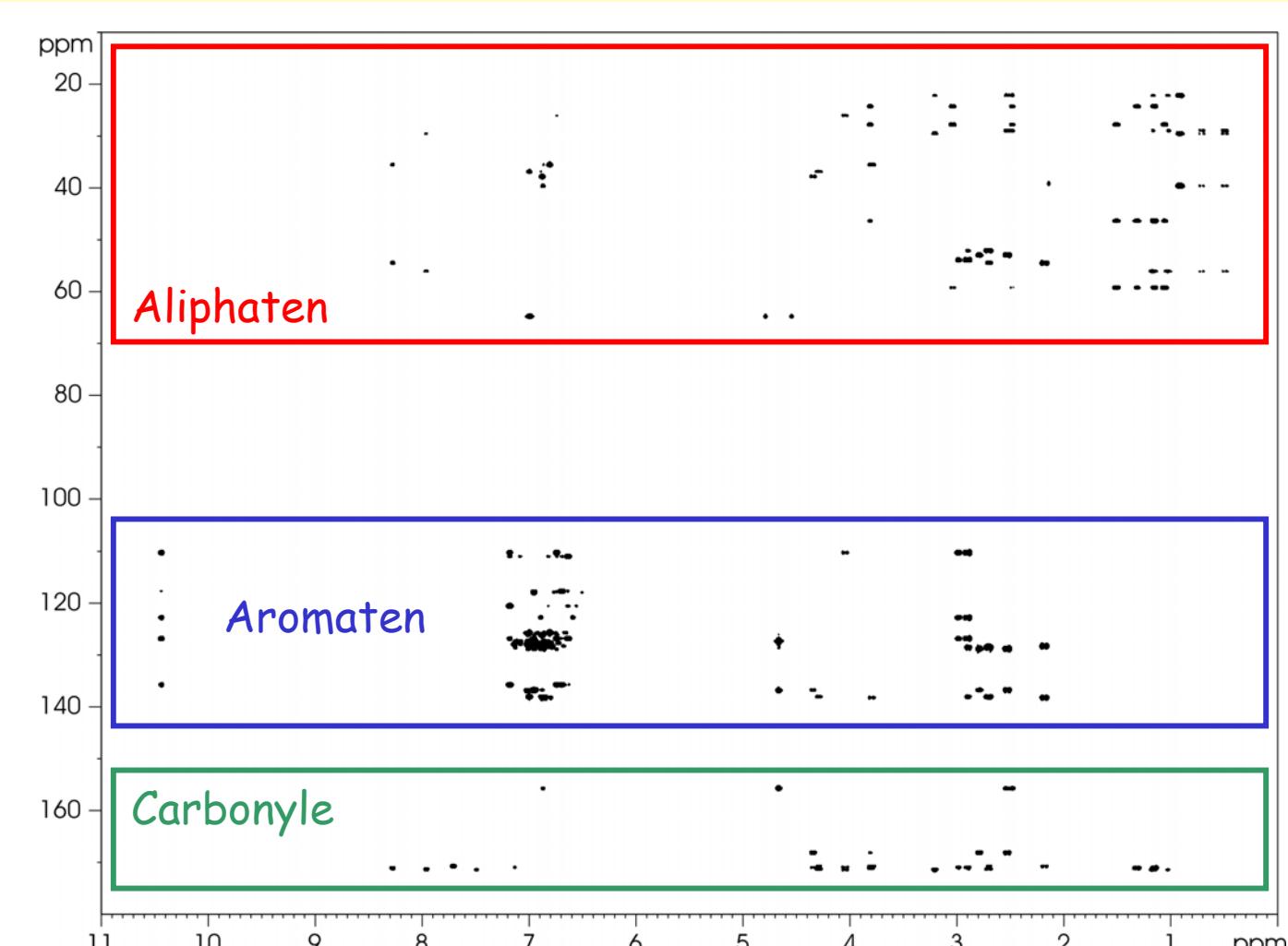


## Peptide: Heteronukleare NMR

Beim HMBC wird eine lange Wartezeit zur Entwicklung der meist kleineren Weitbereichskopplung gewählt, die heteronukleare Kopplung wird nicht refocussiert und es muss eine Magnitude-Rechnung durchgeführt werden.



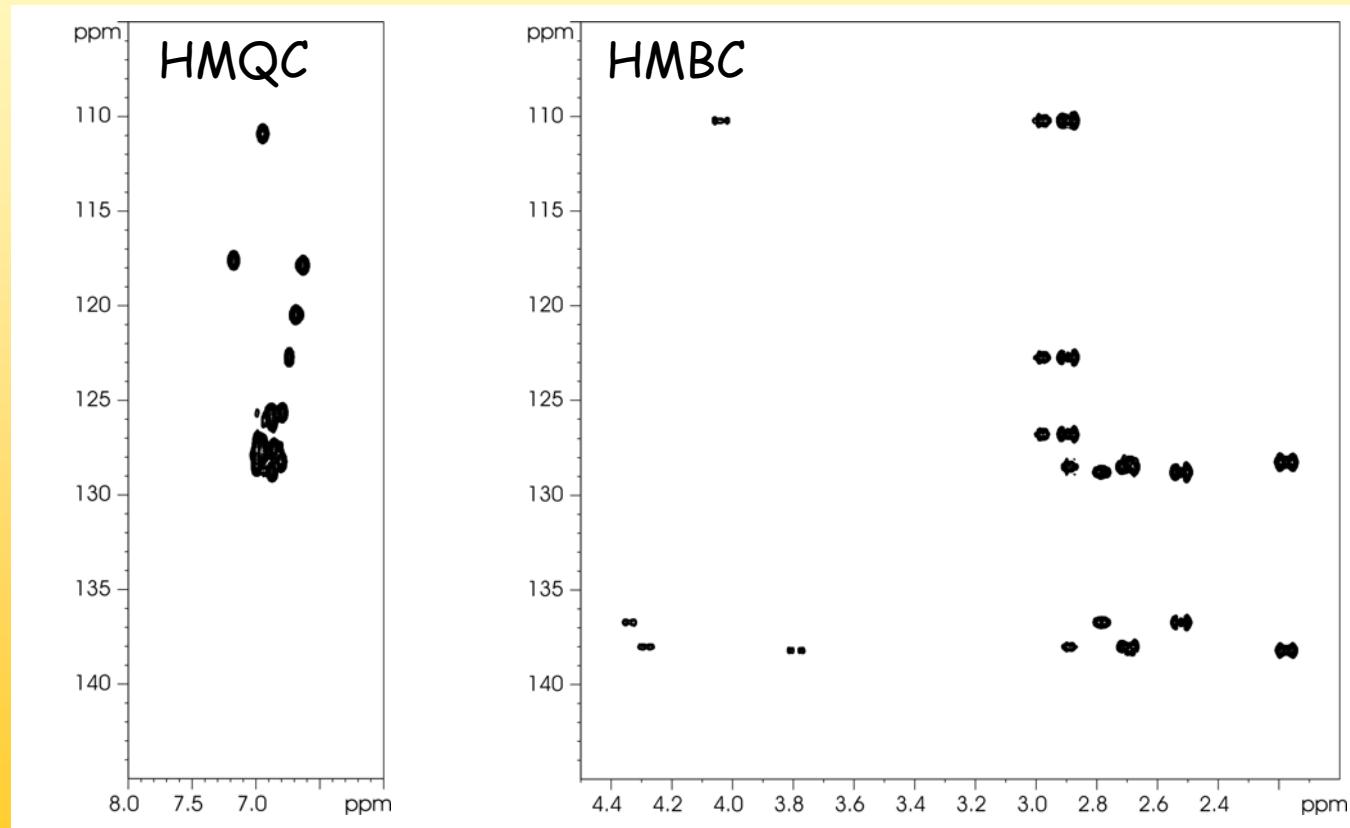
## Peptide: Heteronukleare NMR



$^{13}\text{C}$ - HMBC  
von F3-008

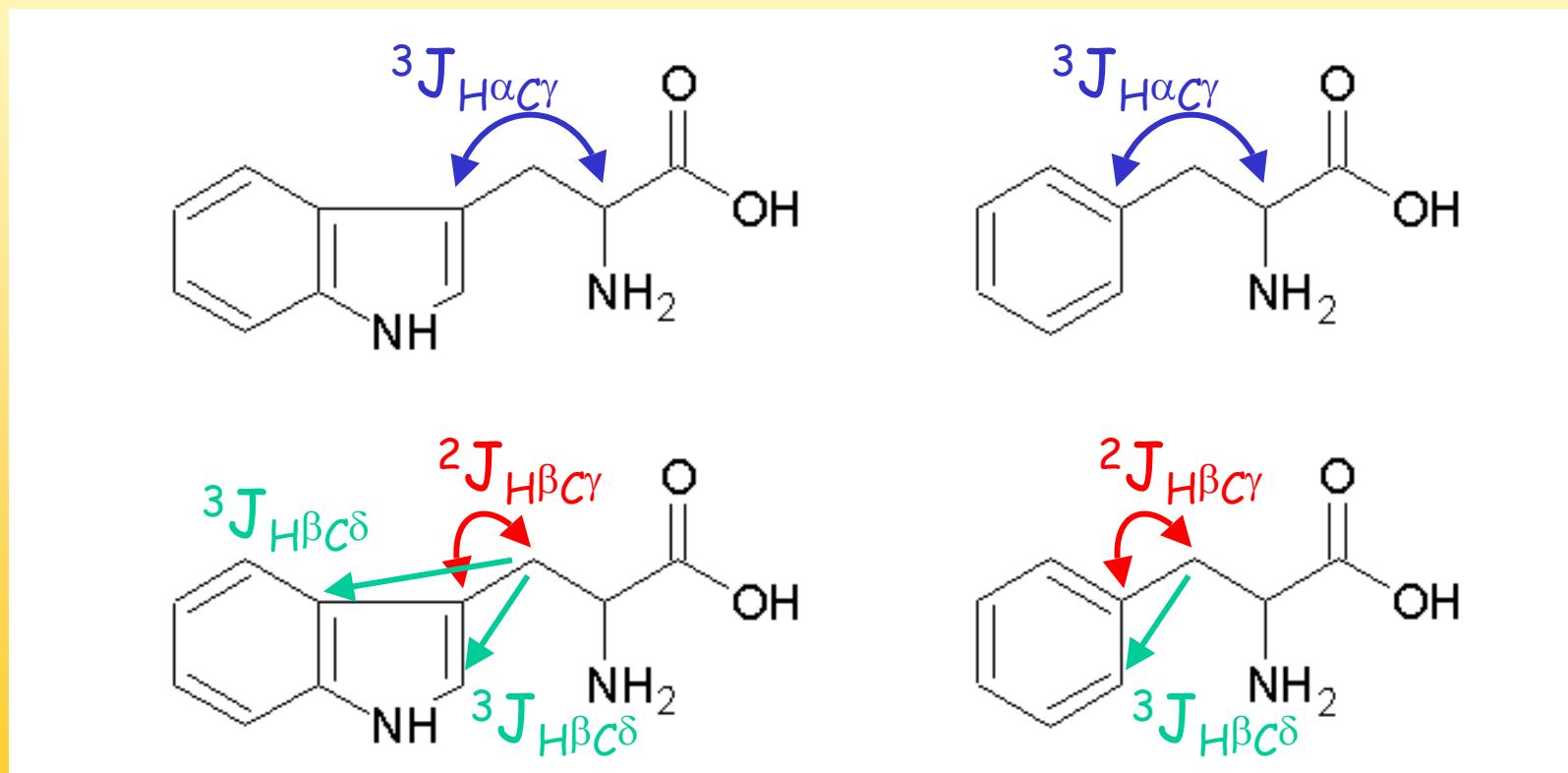
## Peptide: Heteronukleare NMR

Der Aromatenbereich des  $^{13}\text{C}$ -HMBC dient zur Zuordnung von quartären Kohlenstoffen in den aromatischen Ringen



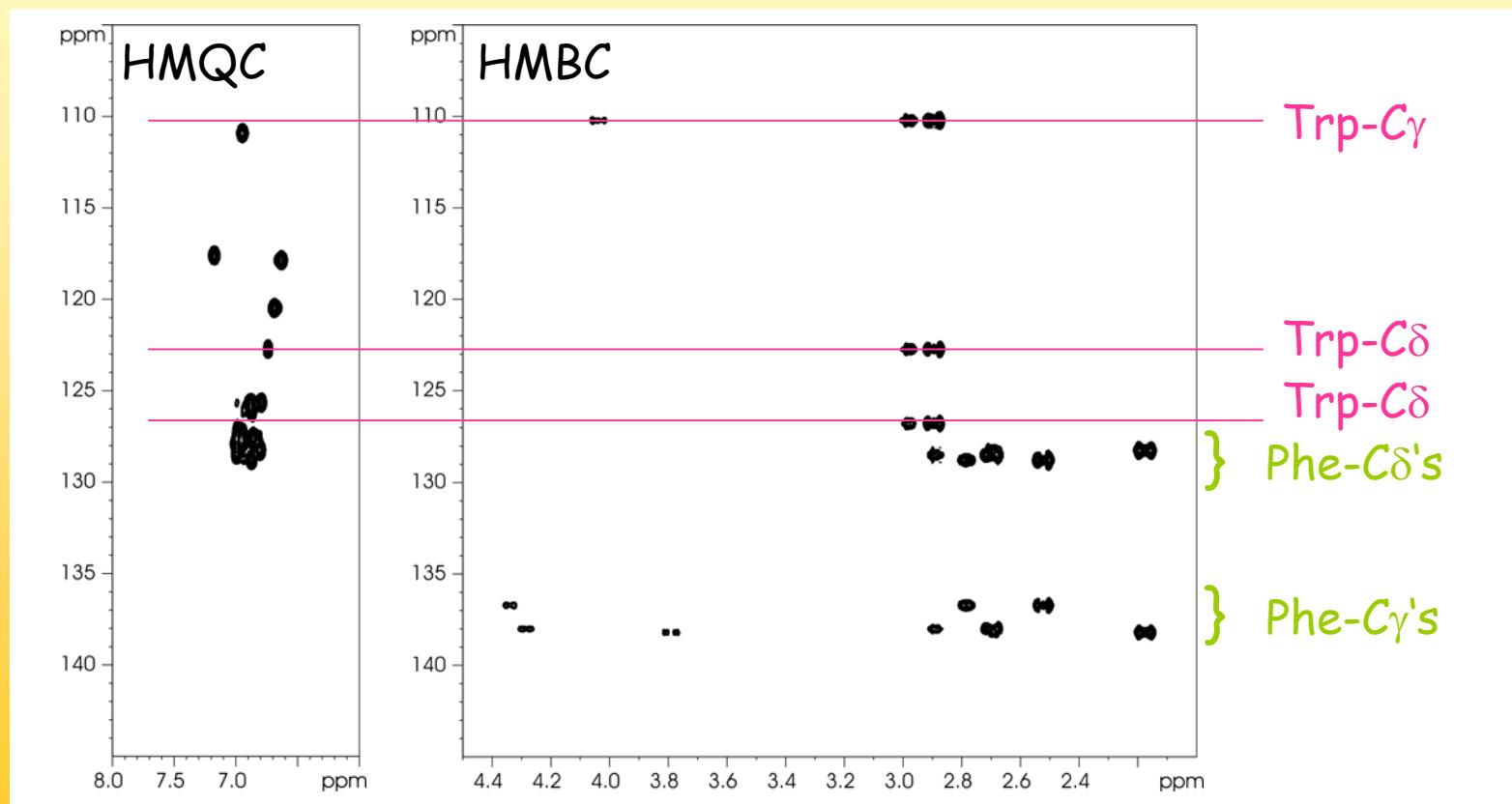
## Peptide: Heteronukleare NMR

Im Falle von unserem Modellpeptid, F3-008, gibt es  
Tryptophan und Phenylalanin



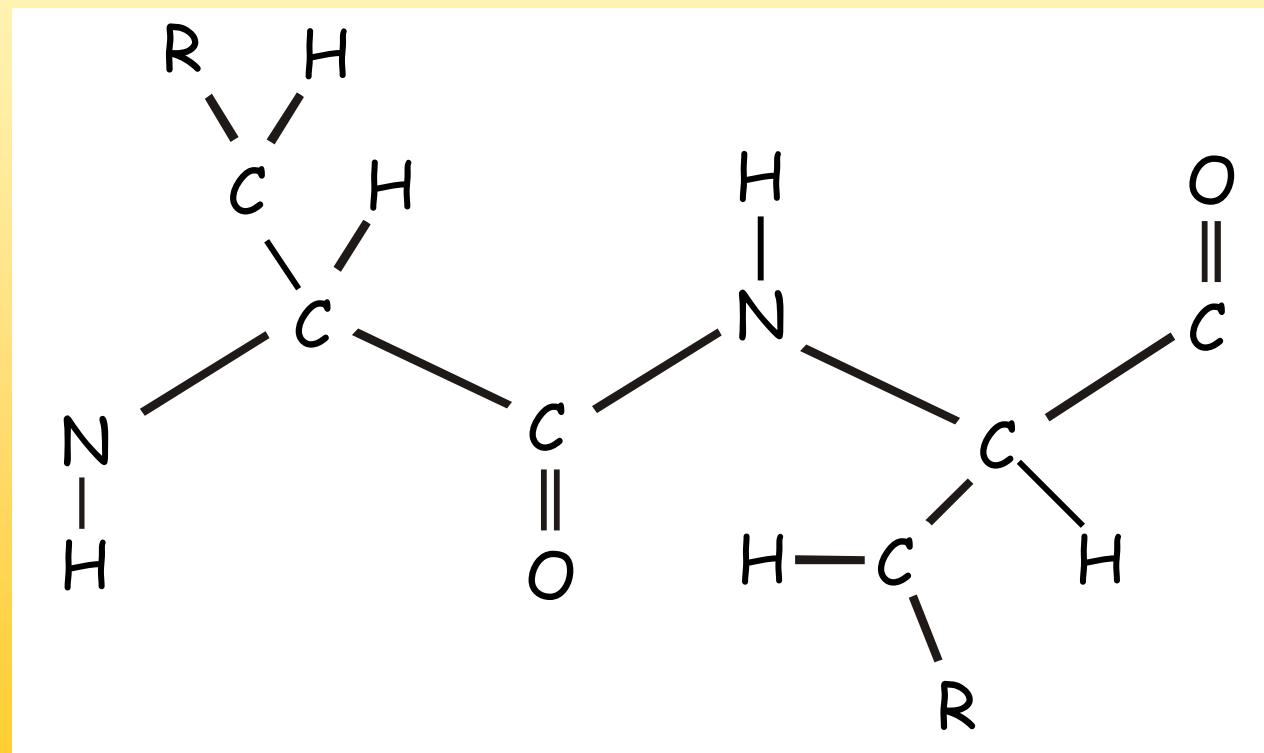
## Peptide: Heteronukleare NMR

Die Zuordnungen von quartären Kohlenstoffen in den aromatischen Ringen lassen sich dann leicht ableiten



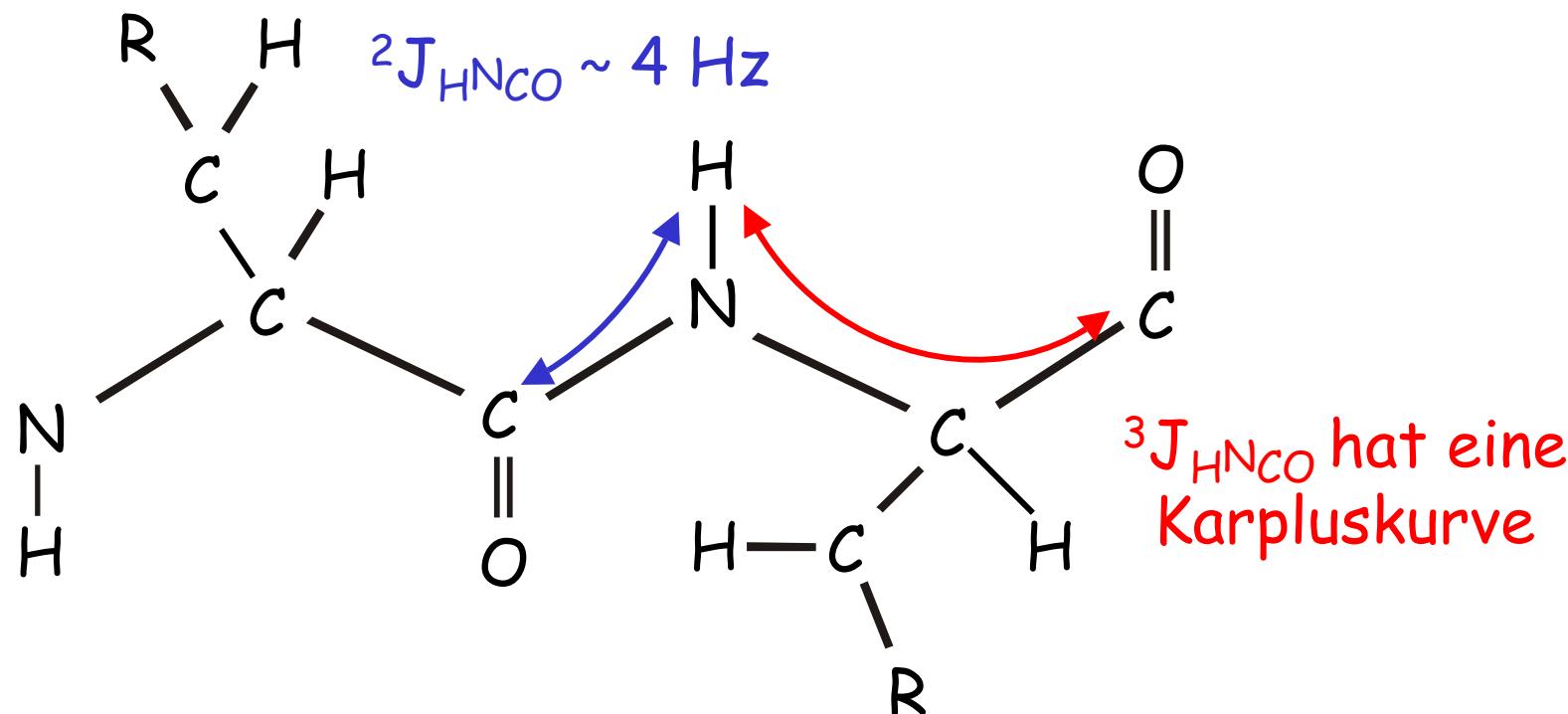
## Peptide: Heteronukleare NMR

Noch wichtiger ist aber das HMBC bei Peptiden im Zusammenhang mit den Carbonyl-Kohlenstoffen  
Wie groß sind denn hier die Kopplungskonstanten ?



## Peptide: Heteronukleare NMR

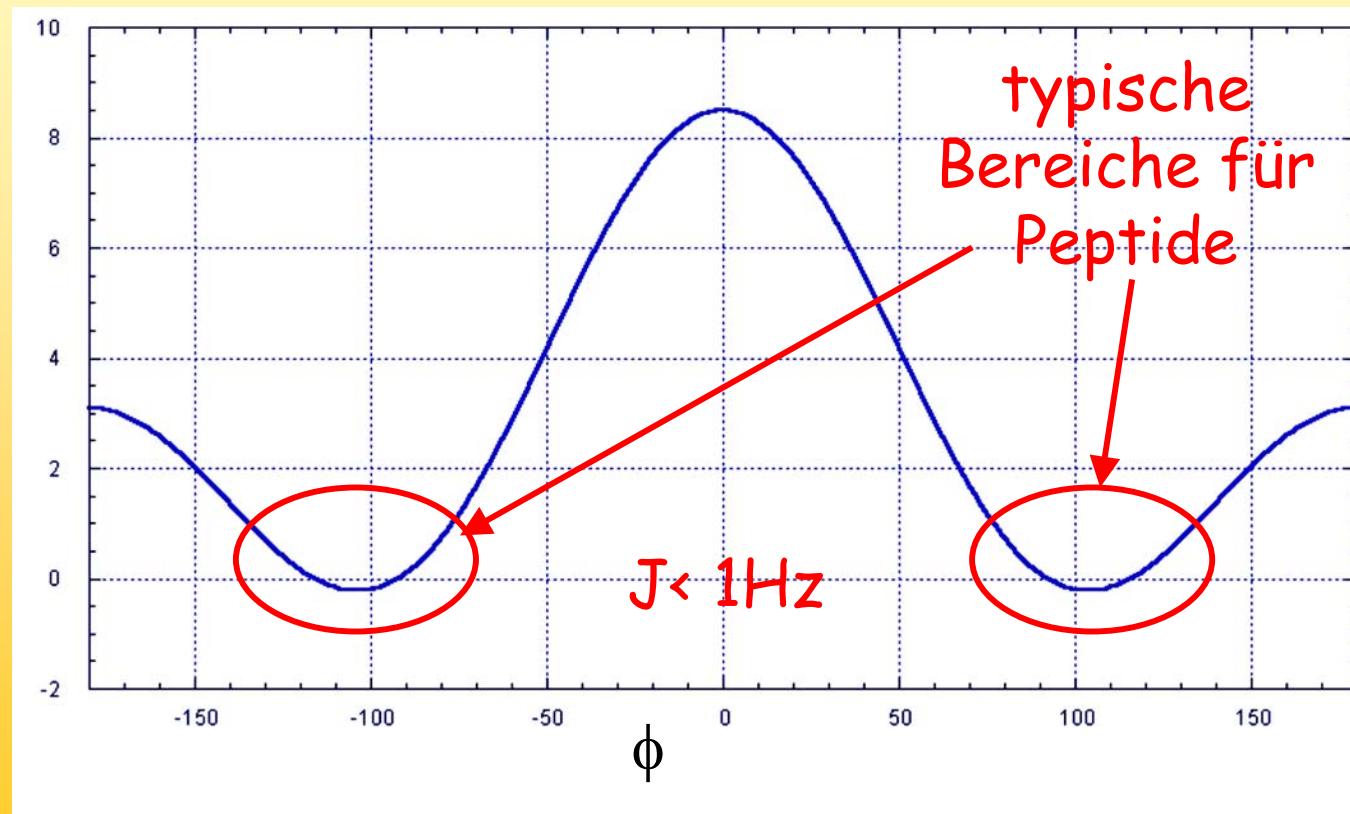
Die Kopplungskonstanten ausgehend vom Aminoproton



## Peptide: Heteronukleare NMR

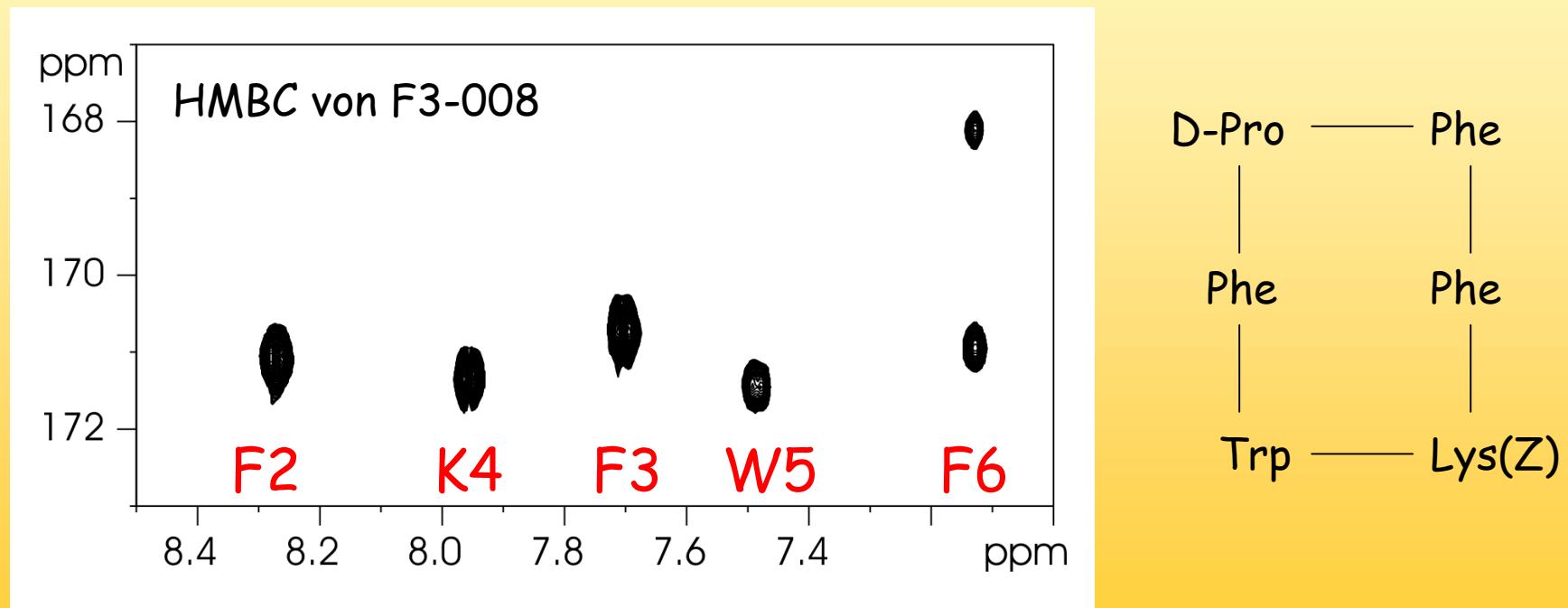
Die Karpluskurve für  ${}^3J_{HNC}$  hat die Gleichung

$${}^3J_{HNC} = 5.7 \cos^2(\phi - 180) - 2.7 \cos(\phi - 180) + 0.1$$



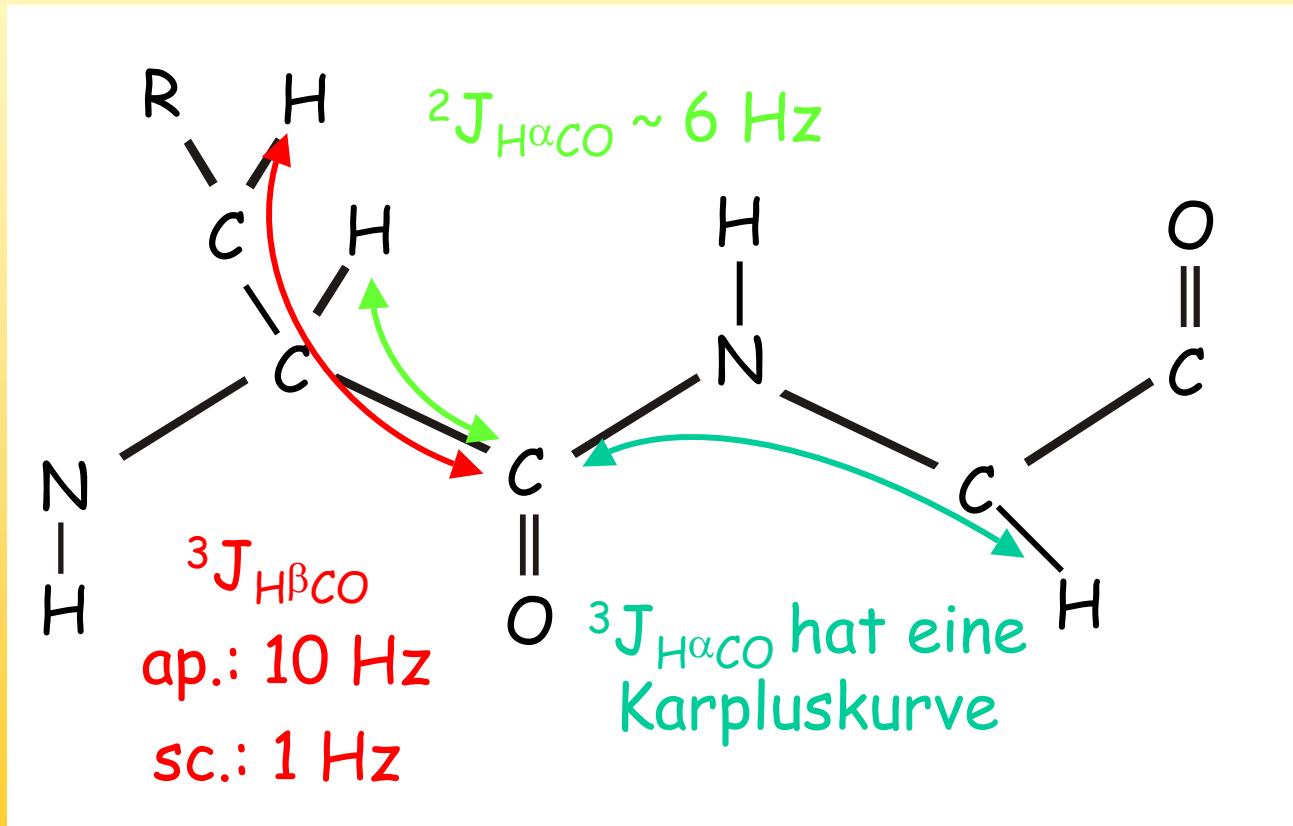
## Peptide: Heteronukleare NMR

Der Bereich der Aminoprotonen sieht dann so aus, alle Korrelationen via  $^2J$  sind zu sehen, nur eine via  $^3J$ , die kommt von F6



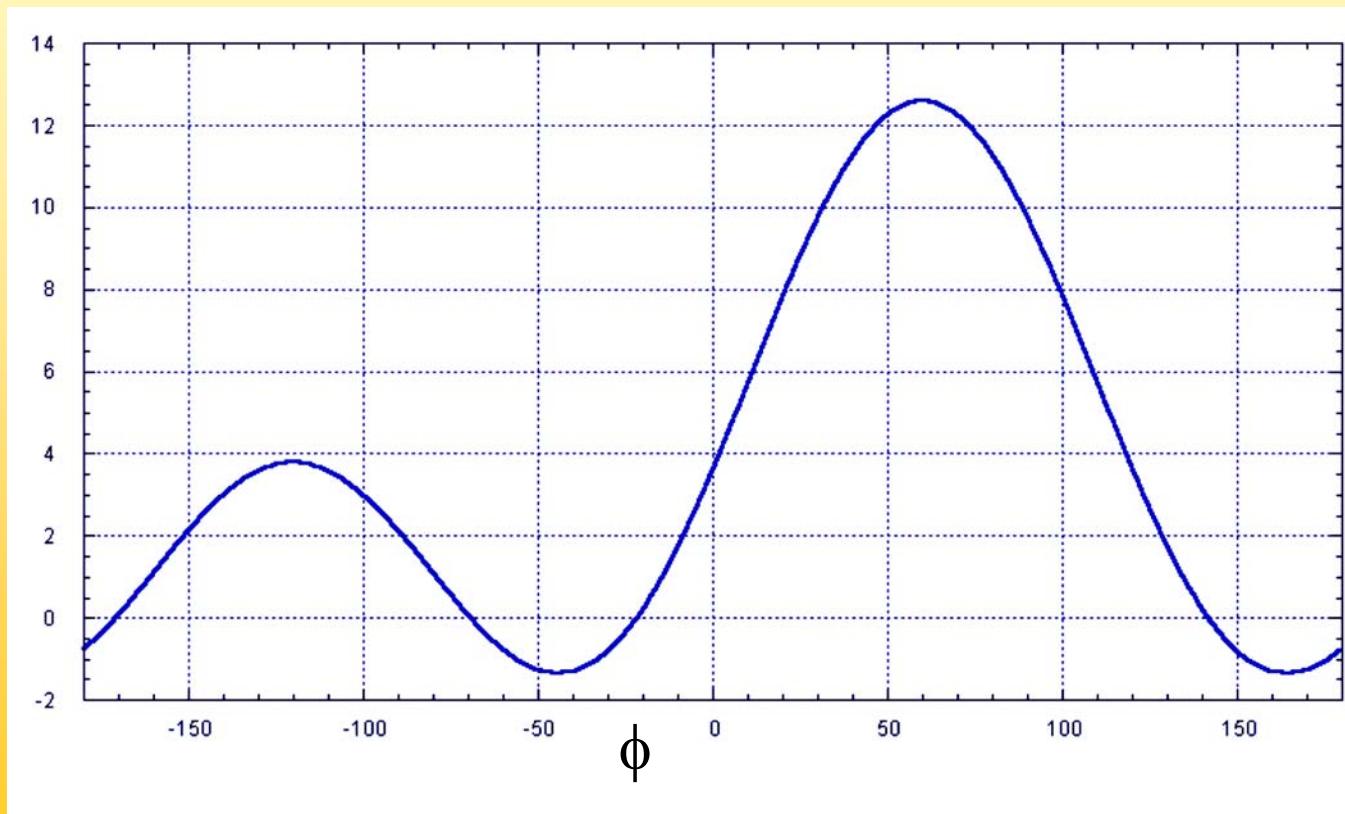
## Peptide: Heteronukleare NMR

Die Kopplungskonstanten ausgehend von aliphatischen Protonen



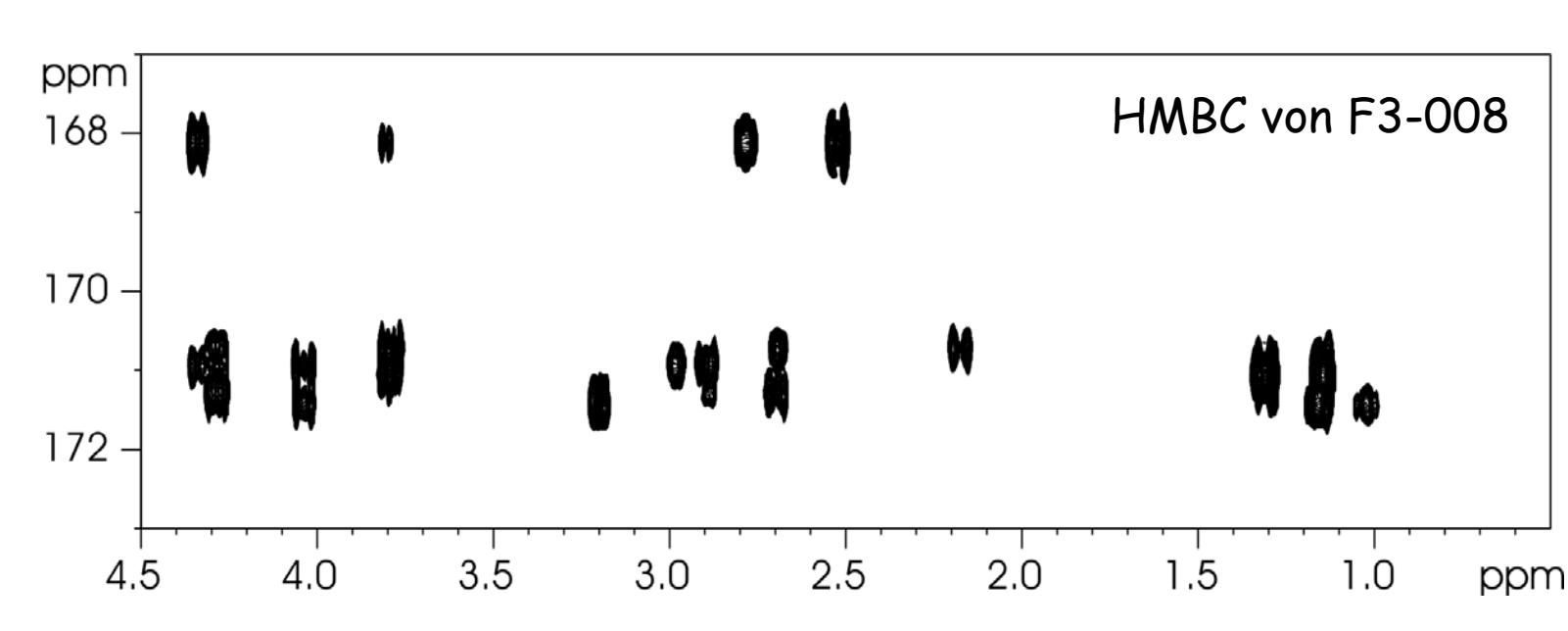
## Peptide: Heteronukleare NMR

Die Karpluskurve für  ${}^3J_{H^\alpha CO}$  hat die Gleichung  
$${}^3J_{H^\alpha CO} = 9.0 \cos^2(\phi + 120) - 4.4 \cos(\phi + 120) - 0.8$$



## Peptide: Heteronukleare NMR

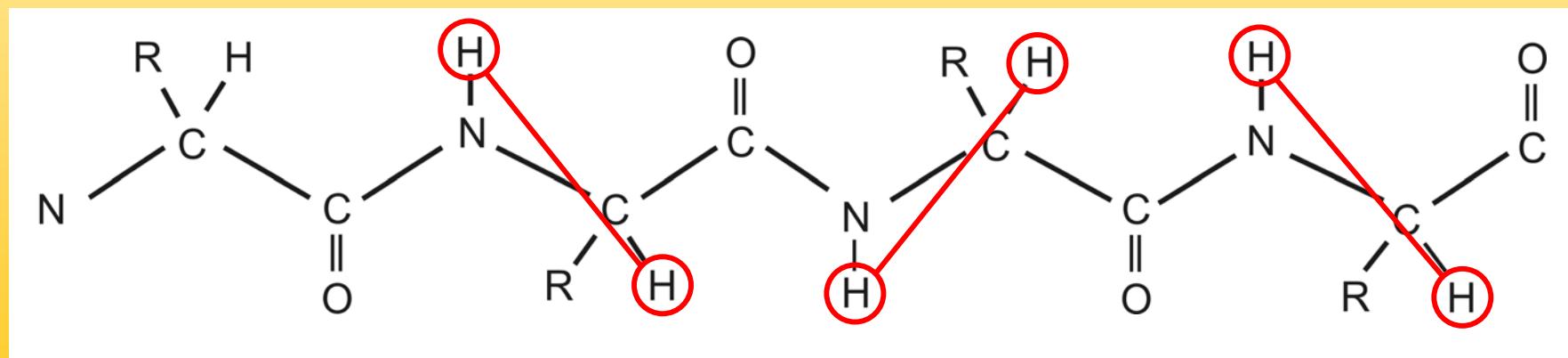
Der Bereich der aliphatischen Protonen sieht dann so aus, alle  $H^\alpha$  außer K4 zeigen 2 Korrelationen, es ist auch für jedes  $H^\beta$  eine Korrelation zu sehen, damit kann man die Carbonyle eindeutig einer Aminosäure zuordnen



## Peptide: Heteronukleare NMR

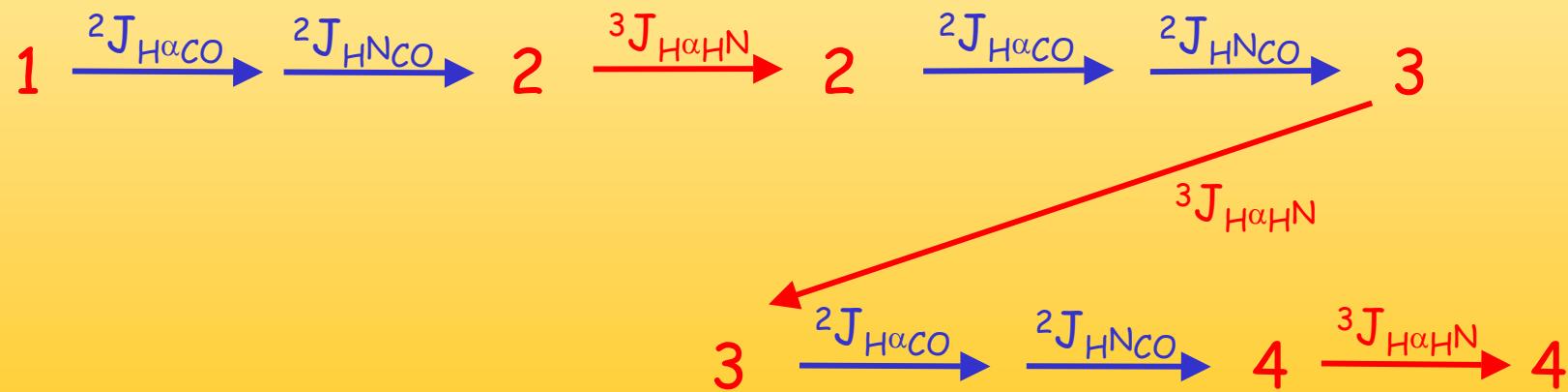
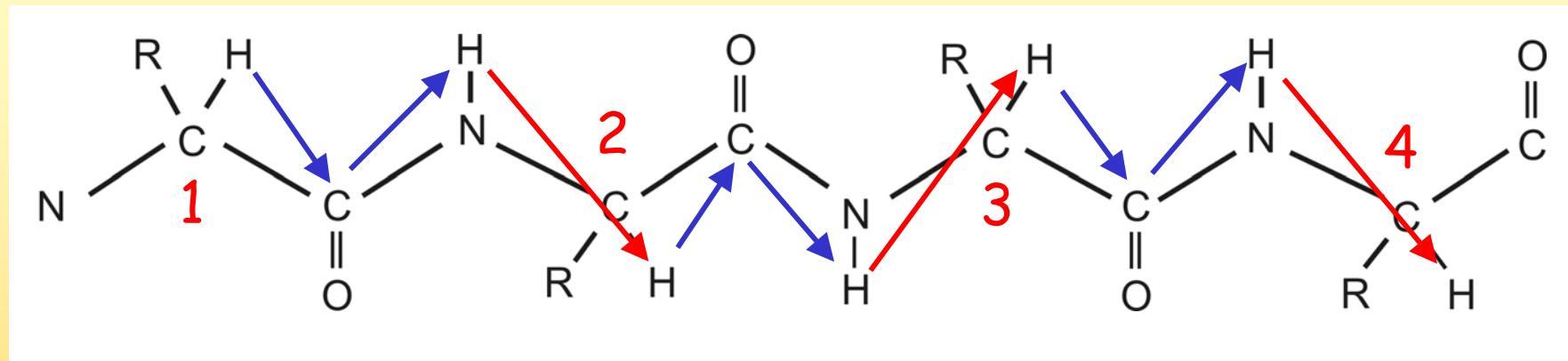
Basierend auf diesen Kopplungskonstanten kann man im HMBC nicht nur die Carbonyl-Kohlenstoffe zuordnen sondern auch eine sequentielle Zuordnung machen.

Wegen der kleinen Kopplungskonstante zwischen  $H^N$  und dem eigenen Carbonyl, nimmt man noch das DQF-COSY mit dazu, dass eine Korrelation von  $H^N$  zu  $H^\alpha$  bietet.



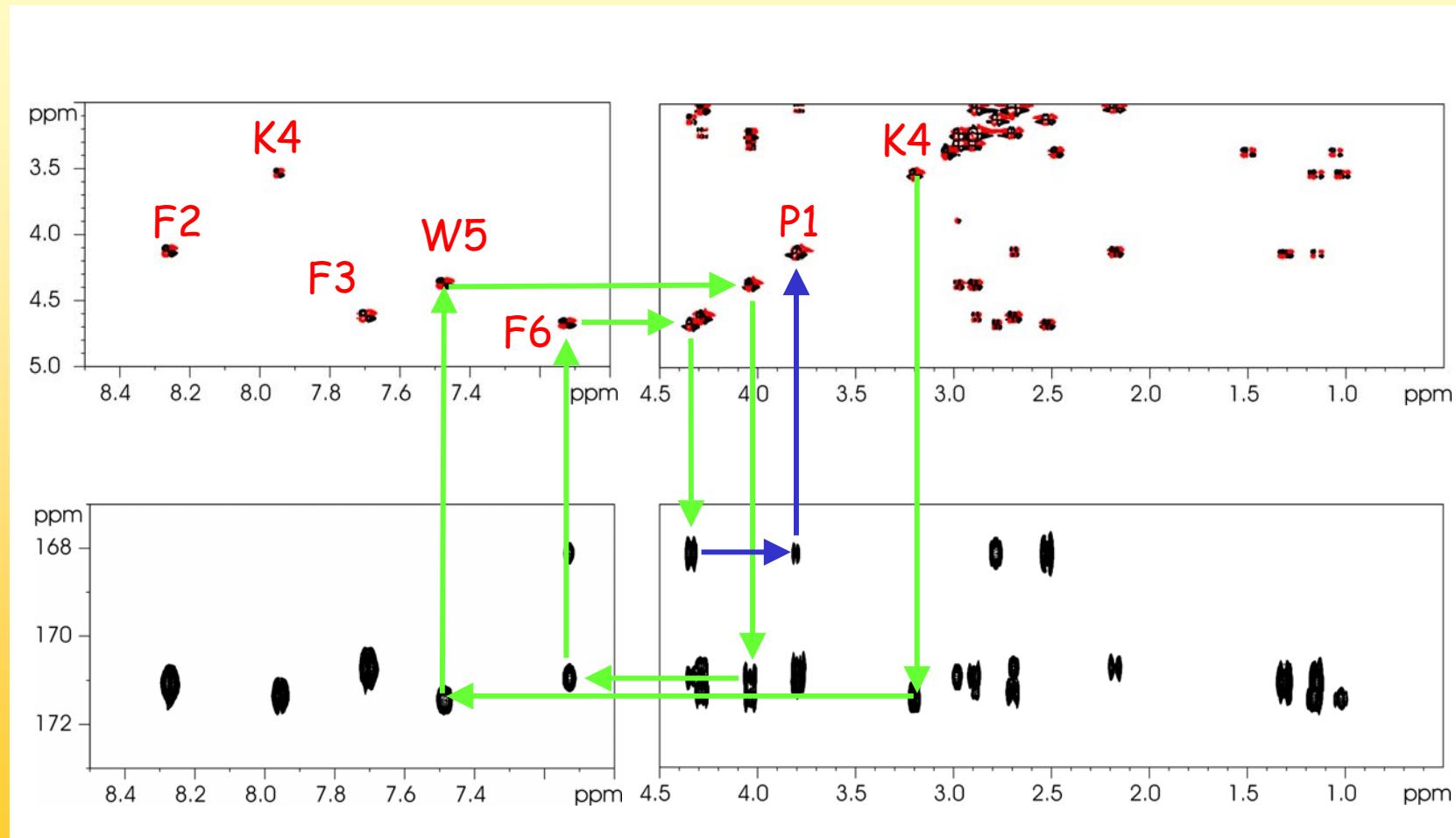
## Peptide: Heteronukleare NMR

Damit ergibt sich ein neuer „sequential walk“



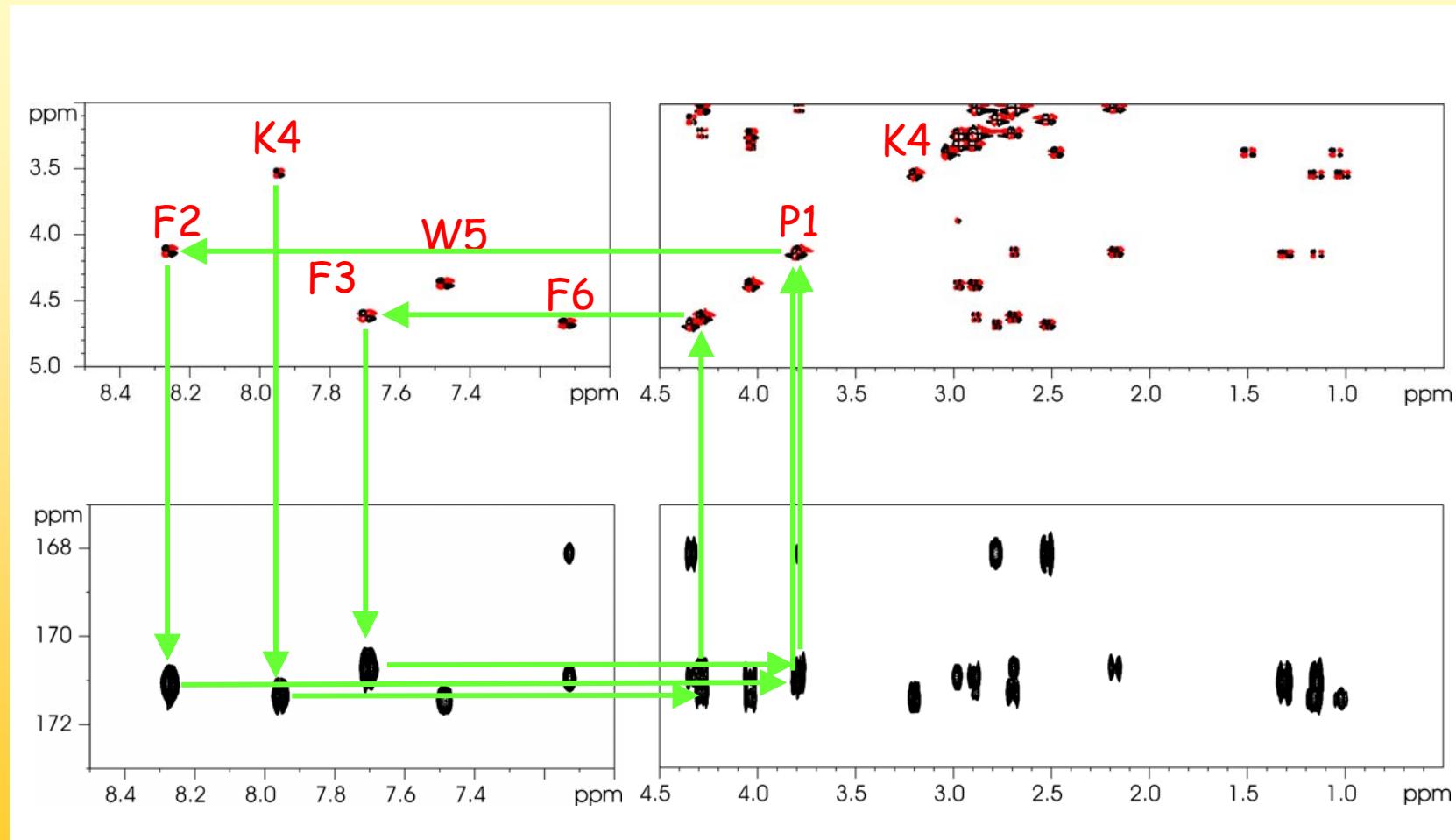
## Peptide: Heteronukleare NMR

Mit richtigen Spektren sieht das so aus



# Peptide: Heteronukleare NMR

Von K4 in die andere Richtung



## Peptide: Heteronukleare NMR

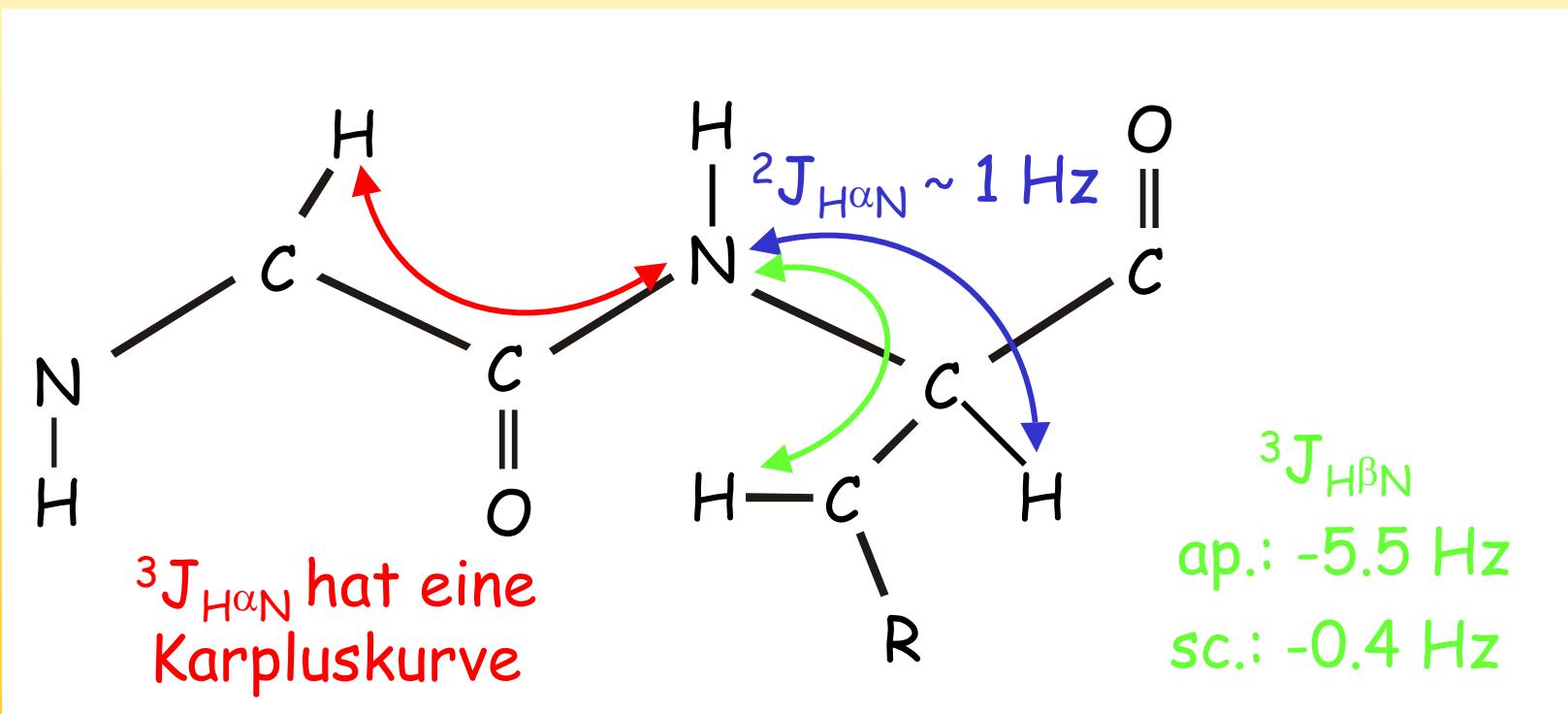
Die sequentielle Zuordnung über das HMBC hat den Vorteil von Abständen durch den Raum unabhängig zu sein.

Es können nur Signale der benachbarten Aminosäuren auftauchen während beim NOESY je nach Struktur viel Aminosäuren als Signalpartner möglich sind.

Nachteil ist die schlechtere Empfindlichkeit der HMBC und die schlechte Signaldispersion im Bereich der Carbonylsignale, die nur über wenige ppm verteilt liegen

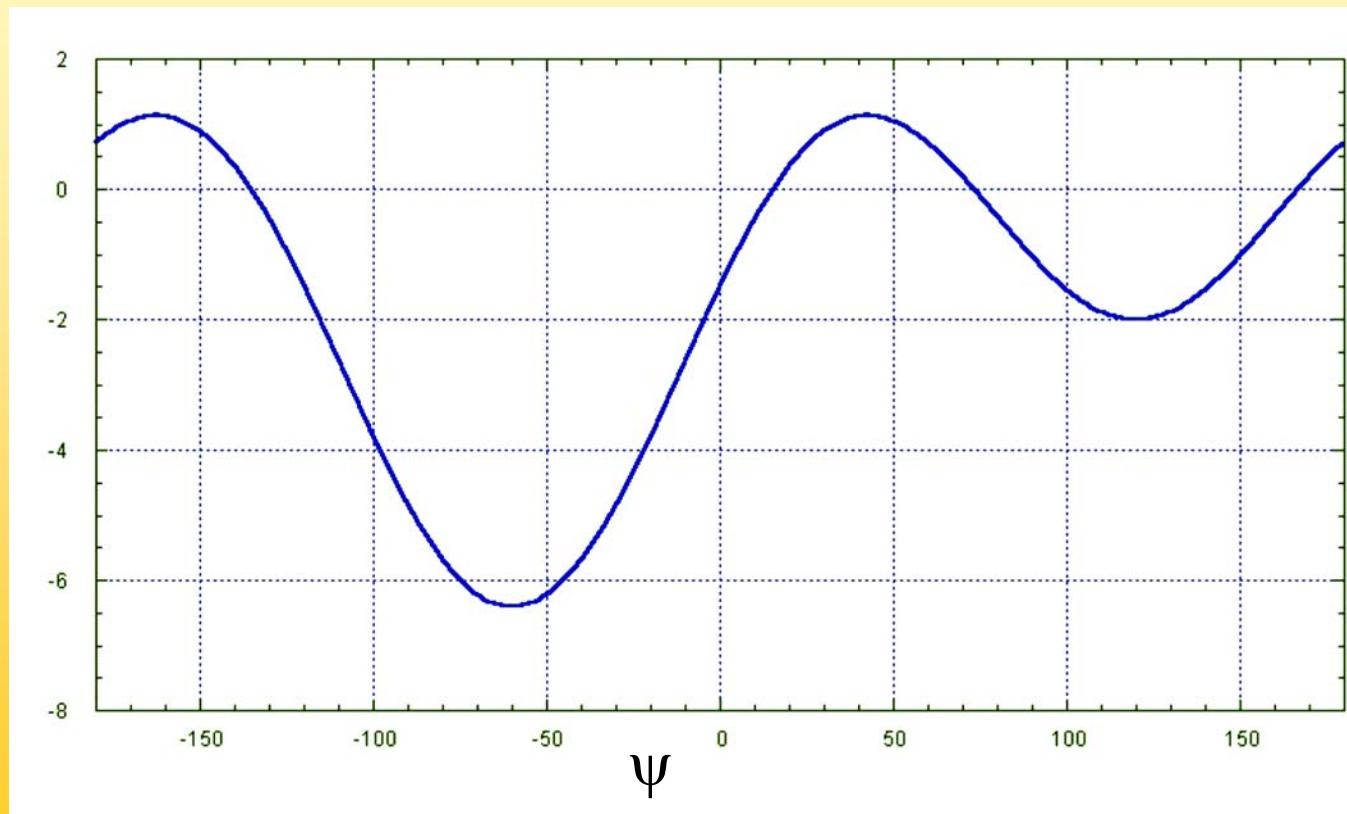
## Peptide: Heteronukleare NMR

Ein HMBC kann auch mit  $^{15}\text{N}$  als Heterokern aufgenommen werden, allerdings sind die Kopplungen meist sehr klein und die natürliche Häufigkeit ist sehr gering



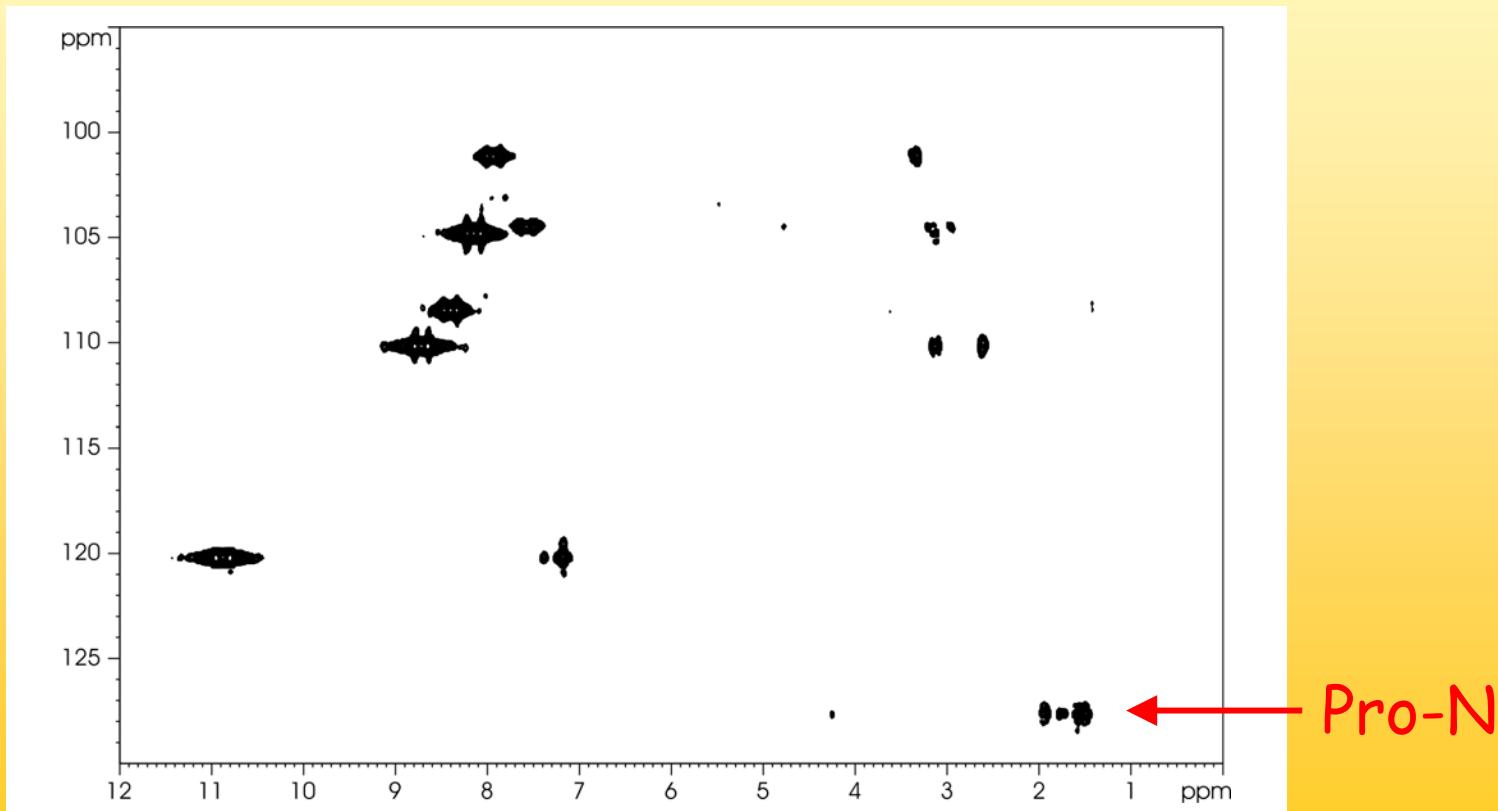
## Peptide: Heteronukleare NMR

Die Karpluskurve für  ${}^3J_{H\alpha N}$  hat die Gleichung  
$${}^3J_{H\alpha N} = -5.1 \cos^2(\psi - 120) + 2.2 \cos(\psi - 120) + 0.9$$



## Peptide: Heteronukleare NMR

Die meisten Stickstoffatome sind ja schon zugeordnet, hier findet man nun auch das von Prolin, das S/N ist wie zu erwarten schlecht



## Zusammenfassung

Was haben wir uns heute angeschaut:

Heteronukleare NMR an Peptiden

HMQC, HMQC-TOCSY, HMQC-COSY

DEPT-HMQC

HMBC

Sequentielle Zuordnung mit dem HMBC

# That's it for today

Nächstes Mal:  
Bestimmung von Kopplungskonstanten  
am Beispiel von Peptiden