

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

# Das Programm

Beim letztes Mal

Heteronukleare NMR an Peptiden

# Das Programm

## Heute

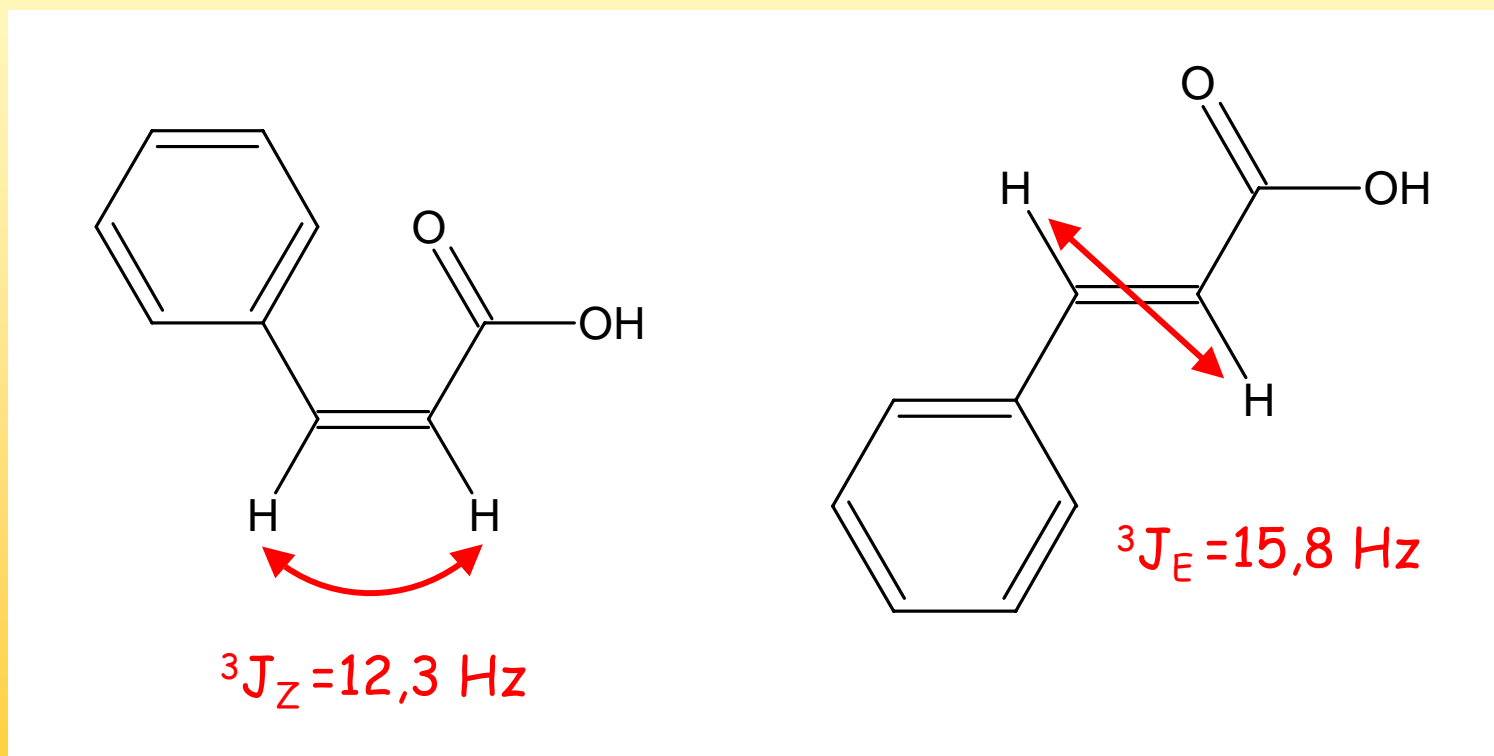
### Methoden zur Bestimmung von skalaren Kopplungskonstanten

# Methoden zur Bestimmung von skalaren Kopplungskonstanten

# Kopplungskonstanten als strukturelle Parameter

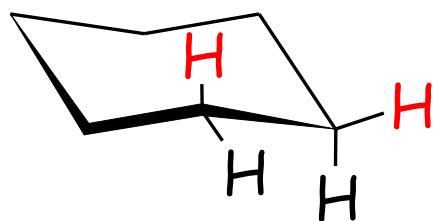
# J-Kopplung als Strukturparameter

cis/trans



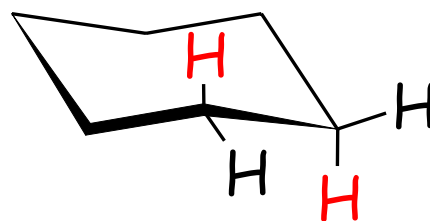
# J-Kopplung als Strukturparameter

axial/equatorial



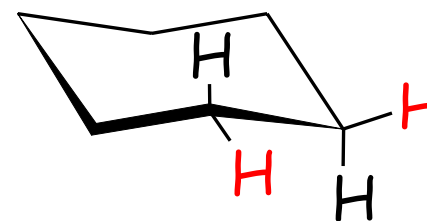
$$\theta = 60^\circ$$

$$^3J_{ae} = 2-5 \text{ Hz}$$



$$\theta = 180^\circ$$

$$^3J_{aa} = 7-12 \text{ Hz}$$

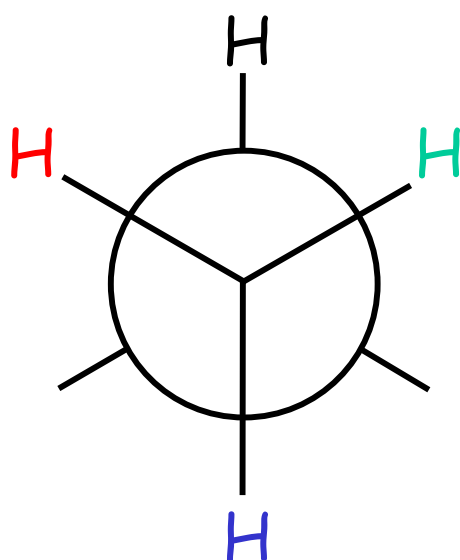


$$\theta = -60^\circ$$

$$^3J_{ee} = 2-5 \text{ Hz}$$

# J-Kopplung als Strukturparameter

gemittelte Kopplung in aliphatischen Ketten



$$\theta = 60^\circ$$

$$\theta = 180^\circ$$

$$\theta = -60^\circ$$

$${}^3J(60) = 3.5 \text{ Hz}$$

$${}^3J(180) = 14 \text{ Hz}$$

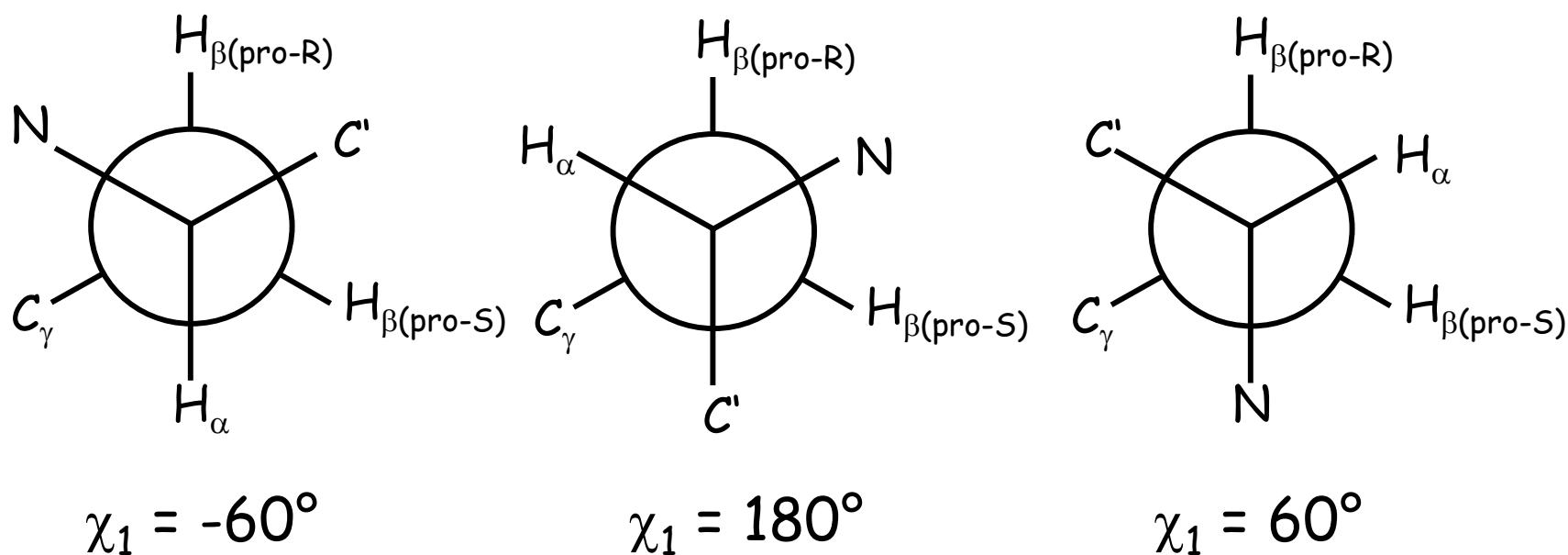
$${}^3J(-60) = 3.5 \text{ Hz}$$

$${}^3J_{\text{av}} = \frac{{}^3J(60) + {}^3J(180) + {}^3J(-60)}{3} = 7 \text{ Hz}$$



# J-Kopplung als Strukturparameter

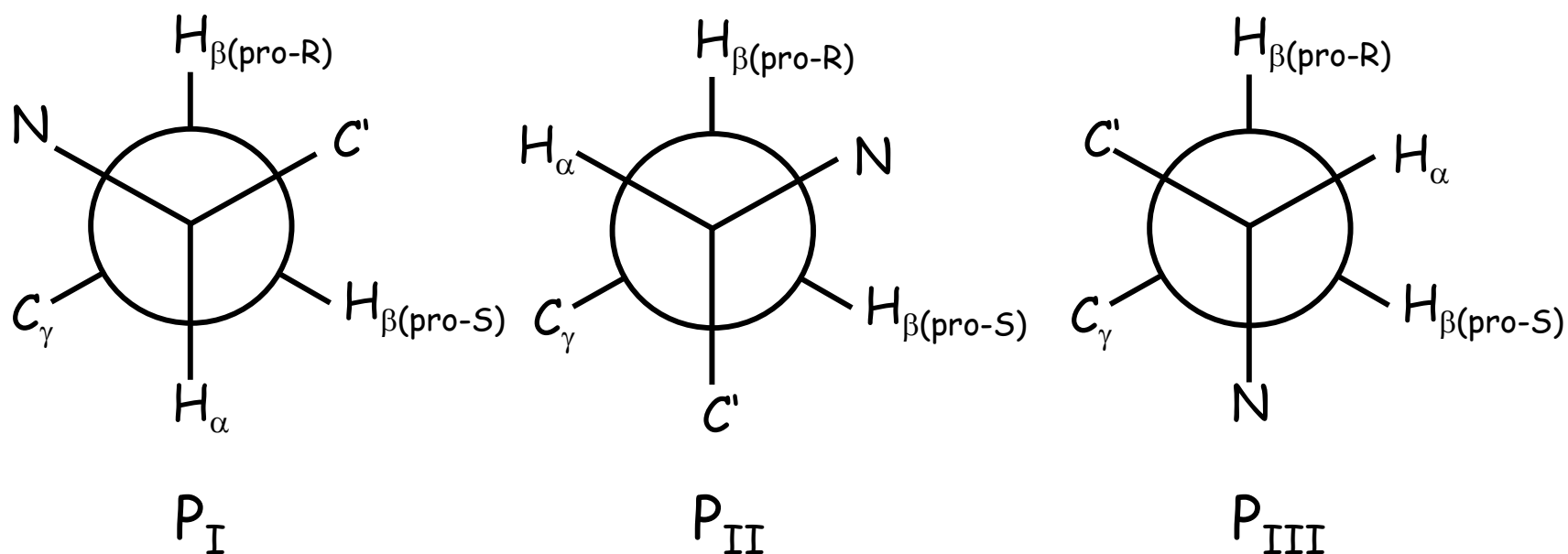
## stereospezifische Zuordnung



Aufgrund der unterschiedlichen sterischen Ansprüche der Reste sind nicht alle drei Konformationen gleich populiert

# J-Kopplung als Strukturparameter

## stereospezifische Zuordnung



$$0 < P_i < 1$$

$$J_{av} = \sum P_i * J_i$$

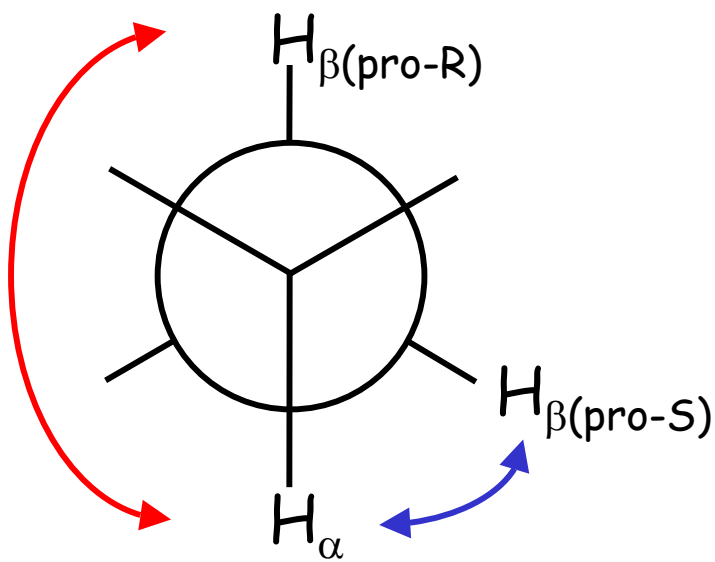
# J-Kopplung als Strukturparameter

stereospezifische Zuordnung

ap = antiperiplanar

sc = synclinal

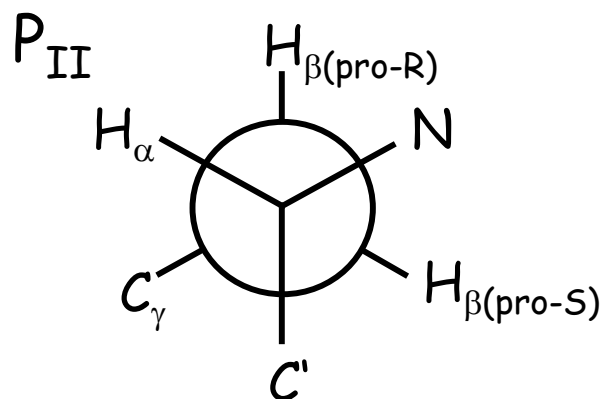
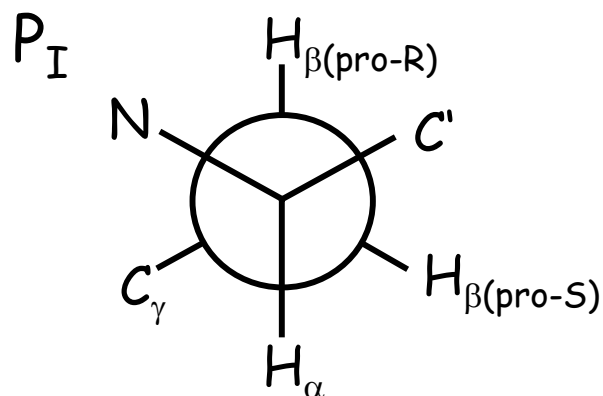
$${}^3J(H_\alpha - H_\beta)_{ap} = 13.6 \text{ Hz}$$



$${}^3J(H_\alpha - H_\beta)_{sc} = 2.6 \text{ Hz}$$

# J-Kopplung als Strukturparameter

stereospezifische Zuordnung



$$P_I = \frac{{}^3J(H_\alpha-H_\beta)_{\text{pro-R}} - {}^3J(H_\alpha-H_\beta)_{sc}}{{}^3J(H_\alpha-H_\beta)_{ap} - {}^3J(H_\alpha-H_\beta)_{sc}}$$

$$P_{II} = \frac{{}^3J(H_\alpha-H_\beta)_{\text{pro-S}} - {}^3J(H_\alpha-H_\beta)_{sc}}{{}^3J(H_\alpha-H_\beta)_{ap} - {}^3J(H_\alpha-H_\beta)_{sc}}$$

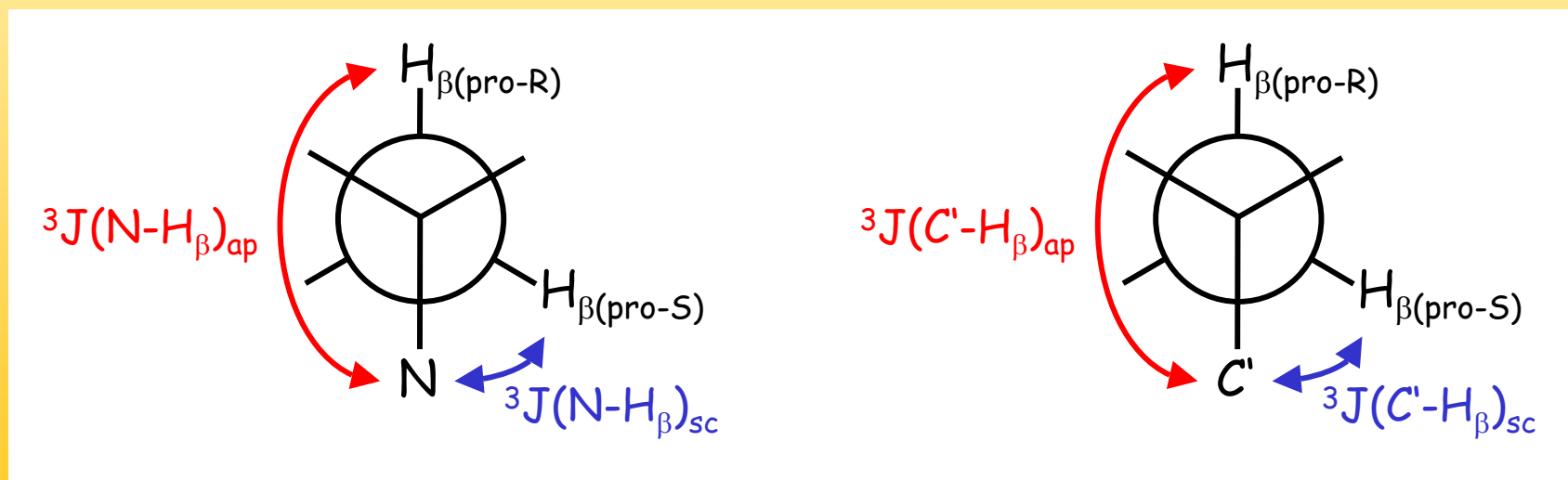
$$P_{III} = 1 - P_I - P_{II}$$

Pachler-Gleichungen

## J-Kopplung als Strukturparameter

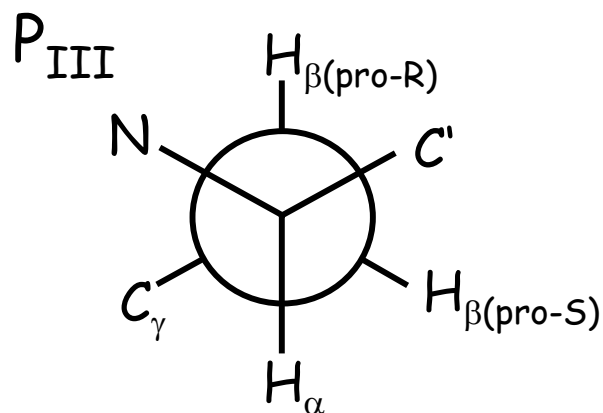
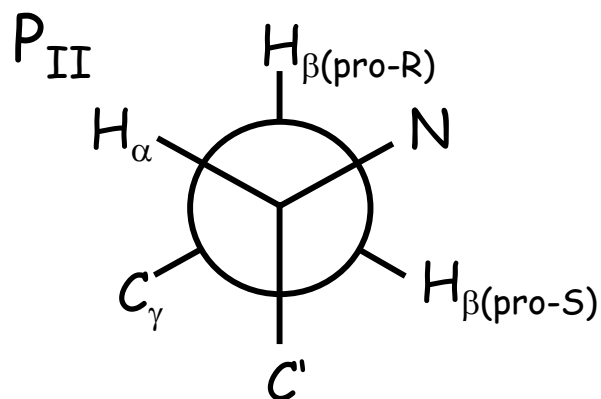
Da man aber bestimmen möchte welches der Protonen pro-R und welches pro-S ist (stereospezifische Zuordnung) braucht man weitere Information.

Die kann aus heteronuklearen Kopplungen kommen, für die sich ein ähnliches Bild ergibt wie für die homonuklearen



# J-Kopplung als Strukturparameter

stereospezifische Zuordnung



$$P_I = 1 - P_{II} - P_{III}$$

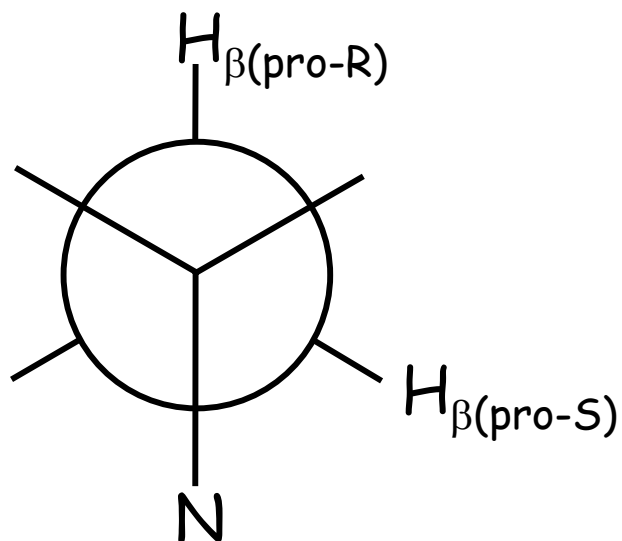
$$P_{II} = \frac{{}^3J(C''-H_{\beta})_{\text{pro-R}} - {}^3J(C''-H_{\beta})_{sc}}{{}^3J(C''-H_{\beta})_{ap} - {}^3J(C''-H_{\beta})_{sc}}$$

$$P_{III} = \frac{{}^3J(C''-H_{\beta})_{\text{pro-S}} - {}^3J(C''-H_{\beta})_{sc}}{{}^3J(C''-H_{\beta})_{ap} - {}^3J(C''-H_{\beta})_{sc}}$$

Pachler-Gleichungen

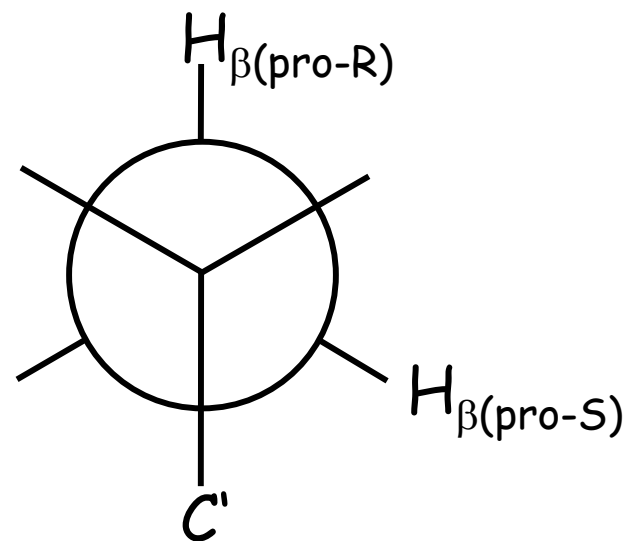
# J-Kopplung als Strukturparameter

## stereospezifische Zuordnung



$$^3J(\text{N}-H_{\beta})_{\text{ap}} = -5.5 \text{ Hz}$$

$$^3J(\text{N}-H_{\beta})_{\text{sc}} = -0.4 \text{ Hz}$$



$$^3J(C'-H_{\beta})_{\text{ap}} = 10.0 \text{ Hz}$$

$$^3J(C'-H_{\beta})_{\text{sc}} = 1.0 \text{ Hz}$$

## J-Kopplung als Strukturparameter

Mit vier Kopplungskonstanten kann man eine stereospezifische Zuordnung durchführen

$$^3J(H_{\alpha}-H_{\beta})_1 = 3.3 \text{ Hz}$$

$$^3J(H_{\alpha}-H_{\beta})_2 = 11.4 \text{ Hz}$$

wenn  $H_{\beta 1} = H_{\beta\text{-pro-R}}$

$$P_I = 6\%$$

$$P_{II} = 80\%$$

$$P_{III} = 14\%$$

$$^3J(C'-H_{\beta})_1 = 6.4 \text{ Hz}$$

$$^3J(C'-H_{\beta})_2 = 3.4 \text{ Hz}$$

wenn  $H_{\beta 1} = H_{\beta\text{-pro-R}}$

$$P_I = 13\%$$

$$P_{II} = 60\%$$

$$P_{III} = 27\%$$

wenn  $H_{\beta 1} = H_{\beta\text{-pro-S}}$

$$P_I = 80\%$$

$$P_{II} = 6\%$$

$$P_{III} = 14\%$$

wenn  $H_{\beta 1} = H_{\beta\text{-pro-S}}$

$$P_I = 13\%$$

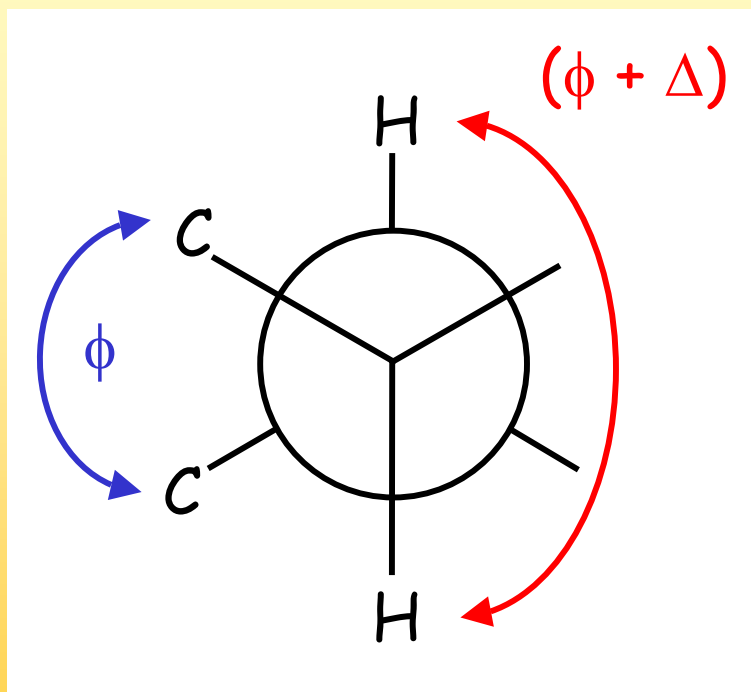
$$P_{II} = 27\%$$

$$P_{III} = 60\%$$



# Karpluskurven

# Karpluskurven



Karpluskurven geben die Abhängigkeit einer  $^3J$ -Kopplungskonstante vom Dihedralwinkel an. Die allgemeine Form der Karpluskurve ist

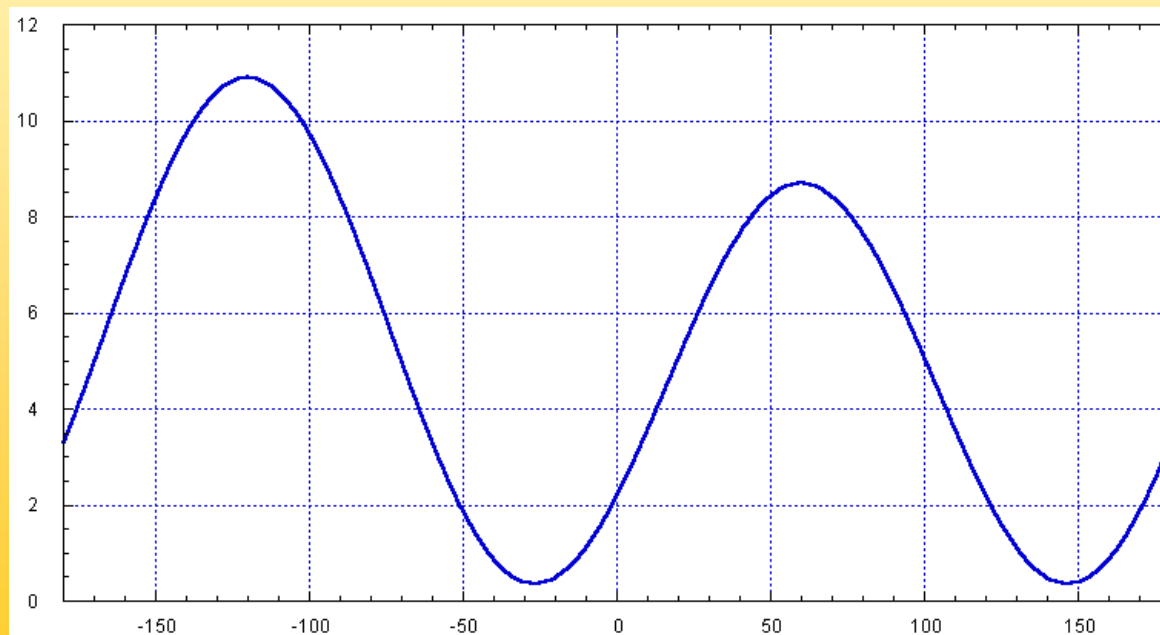
$$^3J = A \cos^2(\phi + \Delta) + B \cos(\phi + \Delta) + C$$

# Karpluskurven

## Karpluskurven

$${}^3J = A \cos^2(\phi + \Delta) + B \cos(\phi + \Delta) + C$$

$${}^3J = A' \cos 2(\phi + \Delta) + B' \cos(\phi + \Delta) + C'$$

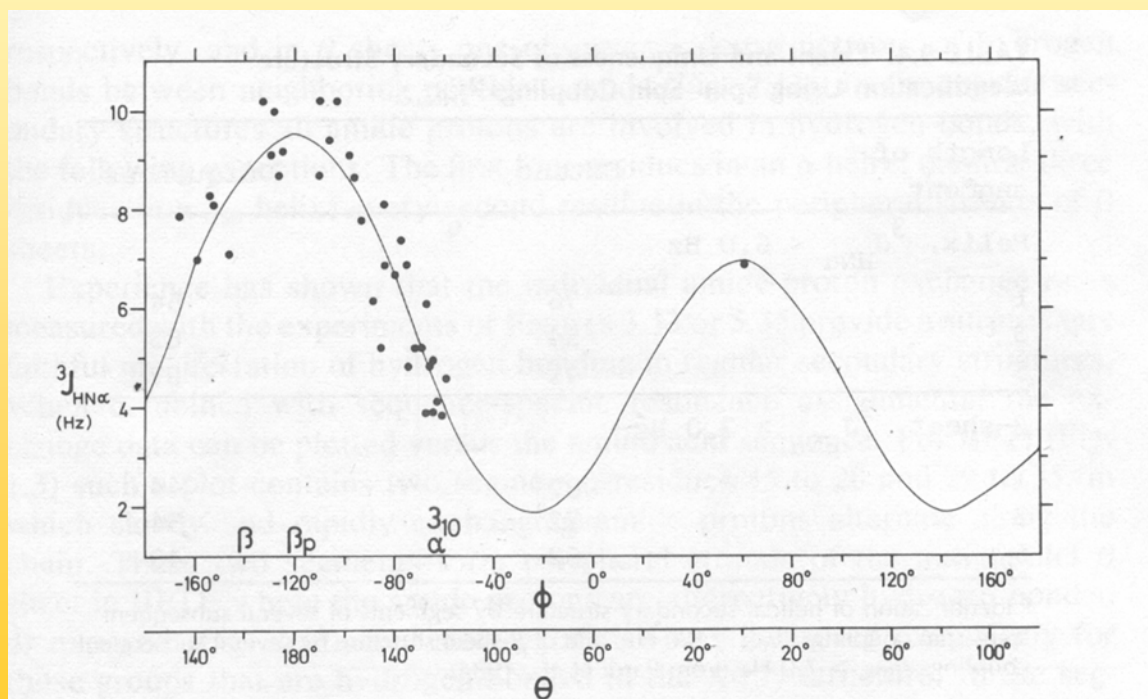


$$\begin{aligned} A &= 2A' \\ B &= B' \\ C &= C' - A' \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} A' &= A/2 \\ B' &= B \\ C' &= C + A/2 \end{aligned}$$

## Karpluskurven

Um die Parameter der Karpluskurven zu bestimmen wird am besten eine Eichung durchgeführt, bei Peptiden und Proteinen mittels einer Röntgenstruktur

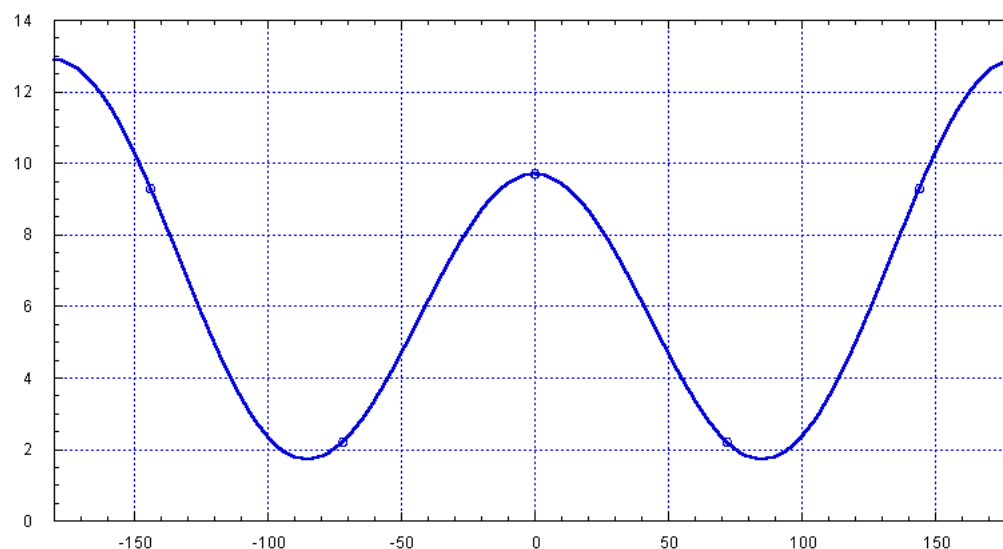
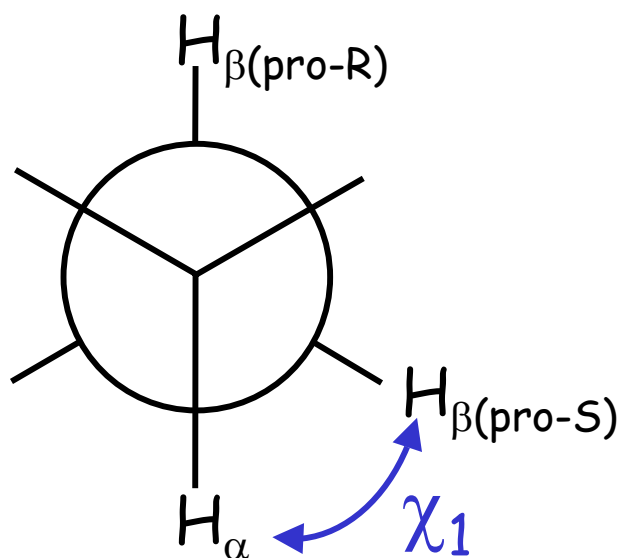


Eichung für  
 $^3J_{\text{HN}\alpha}$  mit der  
 Röntgenstruktur  
 von BPTI

# Karpluskurven

Eine Karpluskurve bei Peptiden ist die für die Kopplung zwischen dem  $H_\alpha$  und dem  $H_\beta$

$$^3J_{H_\alpha H_\beta} = 9.5 \cos^2 \chi_1 - 1.6 \cos \chi_1 + 1.8$$



## Karpluskurven

Wenn wir in diese Karpluskurve die Werte für antiperiplanar und synclinal einsetzen ergibt

$$^3J = 9.5 \cos^2 \chi_1 - 1.6 \cos \chi_1 + 1.8$$

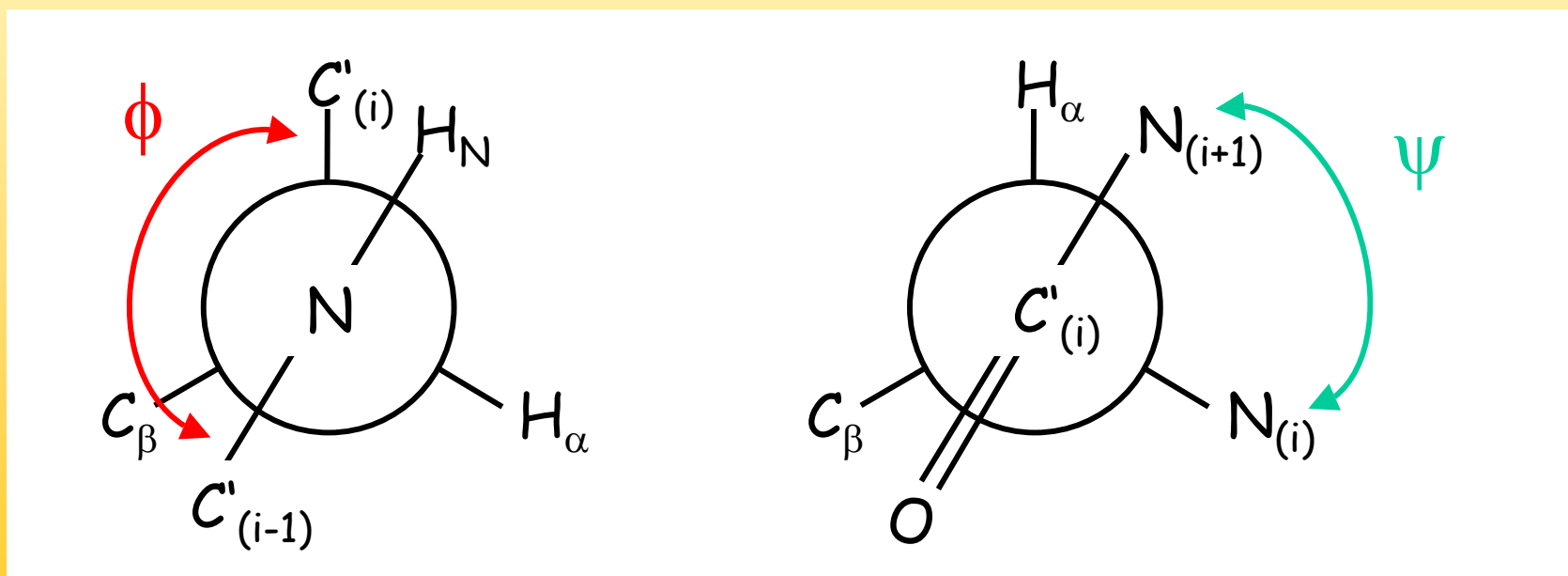
$$^3J_{\text{ap}} = 9.5 \cos^2 (180^\circ) - 1.6 \cos (180^\circ) + 1.8 = 12.9$$

$$^3J_{\text{ap}} = 9.5 \cos^2 (60^\circ) - 1.6 \cos (60^\circ) + 1.8 = 3.4$$

Die Werte sind anders als die oben verwendeten und ein Problem bei Karpluskurven ist nach wie vor deren Genauigkeit

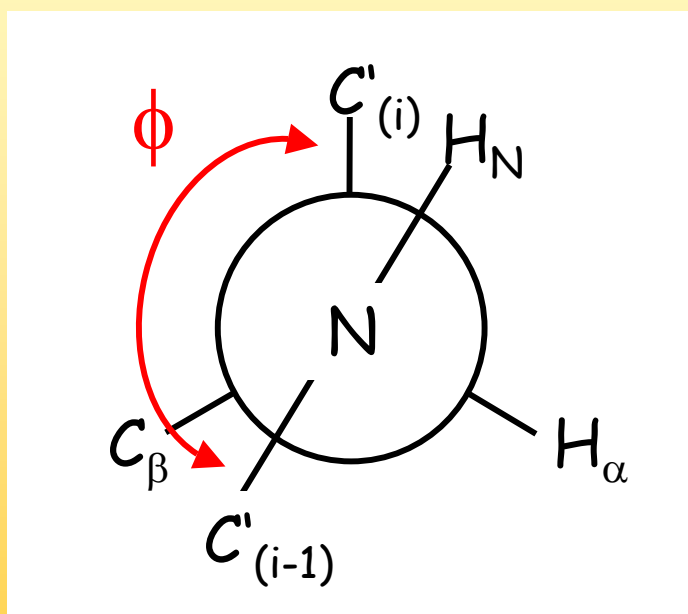
## Karpluskurven

Bei Peptiden kann man mit Kopplungskonstanten und Karpluskurven die beiden Dihedralwinkel  $\phi$  und  $\psi$  bestimmen bzw. einschränken



# Karpluskurven

Im Fall des Dihedralwinkels  $\phi$  gibt es im Prinzip 6 Kopplungskonstanten



$$^3J_{H^N H_\alpha}$$

$$^3J_{H_\alpha C'}$$

$$^3J_{H^N C_\beta}$$

$$^3J_{C_\beta C'}$$

$$^3J_{H^N C'}$$

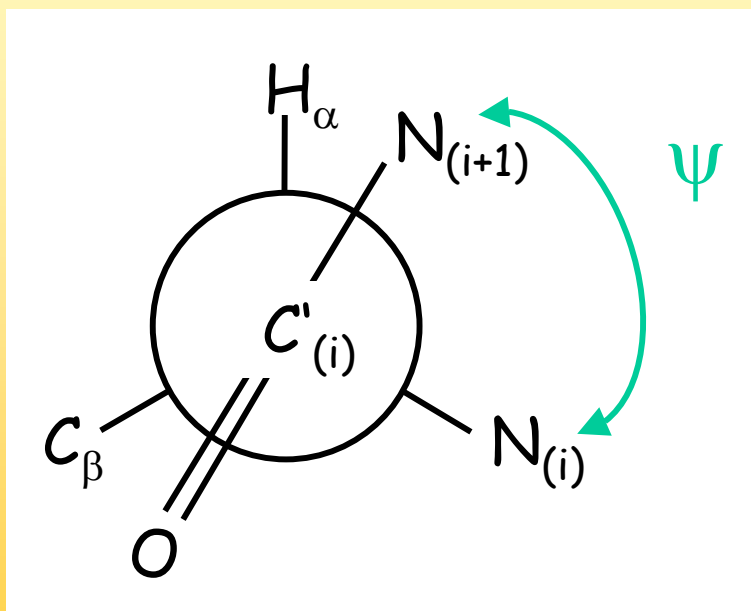
$$^3J_{C' C''}$$

4 davon sind ohne Isotopenmarkierung zugänglich



# Karpluskurven

Im Fall des Dihedralwinkels  $\psi$  gibt es im Prinzip 3  
Kopplungskonstanten



$$^3J_{H^\alpha N}$$

$$^3J_{C^\beta N}$$

$$^3J_{NN}$$

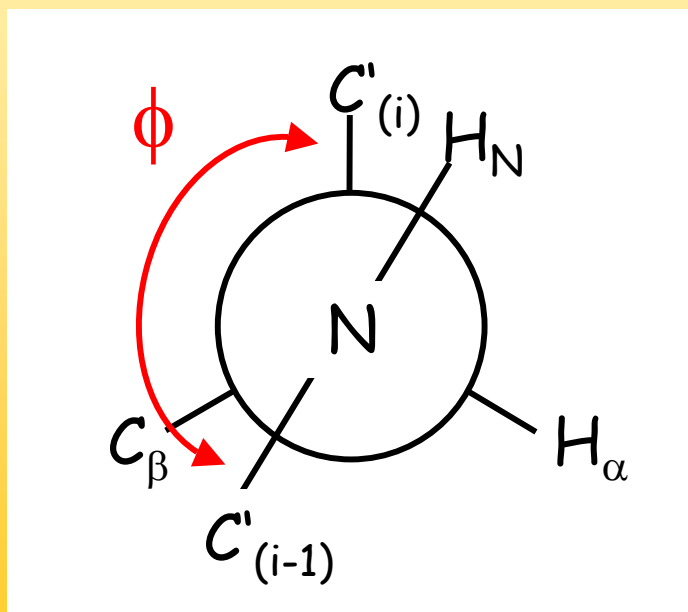
1 ist ohne Isotopenmarkierung zugänglich

## Karpluskurven

Die am meisten verwendete Kopplungskonstante für den  $\phi$ -Winkel ist  ${}^3J_{H^N H^\alpha}$

Dementsprechend oft ist sie kalibriert worden

$${}^3J = A \cos^2(\phi - 60) + B \cos(\phi - 60) + C$$



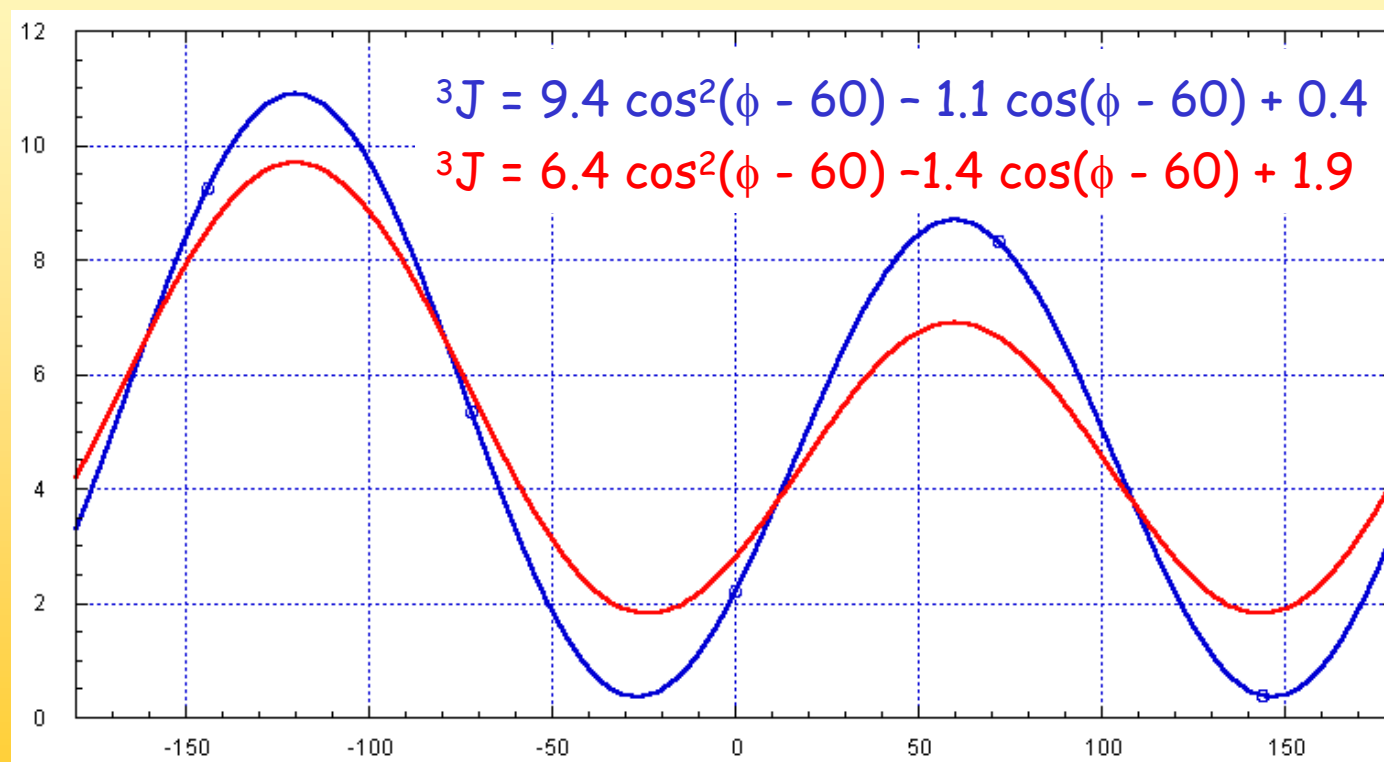
$$A = 9.4, B = -1.1, C = 0.4$$

oder

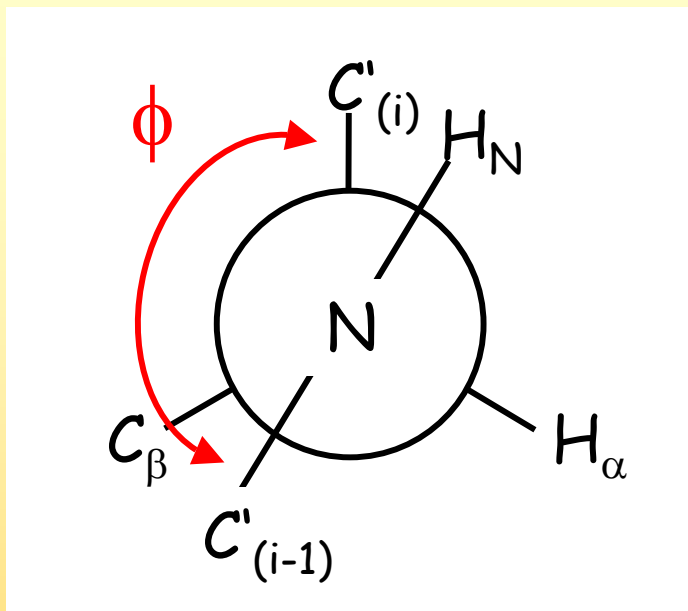
$$A = 6.4, B = -1.4, C = 1.9$$

## Karpluskurven

Das zeigt die Fehlergrenzen mit denen man auf jeden Fall wird leben müssen



## Karpluskurven



Die Karpluskurven für den  $\phi$ -Winkel sehen dann so aus

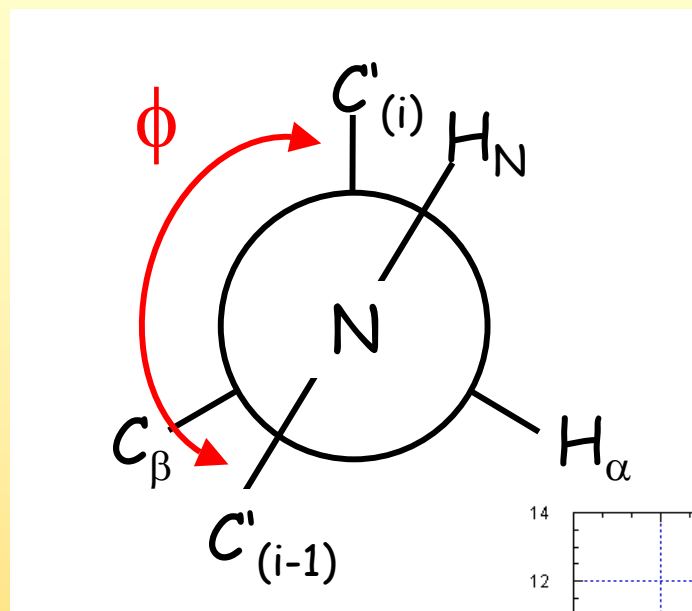
$${}^3J_{HN\ H\alpha} = 9.4 \cos^2(\phi - 60) - 1.1 \cos(\phi - 60) + 0.4$$

$${}^3J_{HN\ C\beta} = 4.7 \cos^2(\phi + 60) - 1.5 \cos(\phi + 60) - 0.2$$

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

$${}^3J_{H\alpha\ C'} = 9.0 \cos^2(\phi + 120) - 4.4 \cos(\phi + 120) - 0.8$$

# Karpluskurven



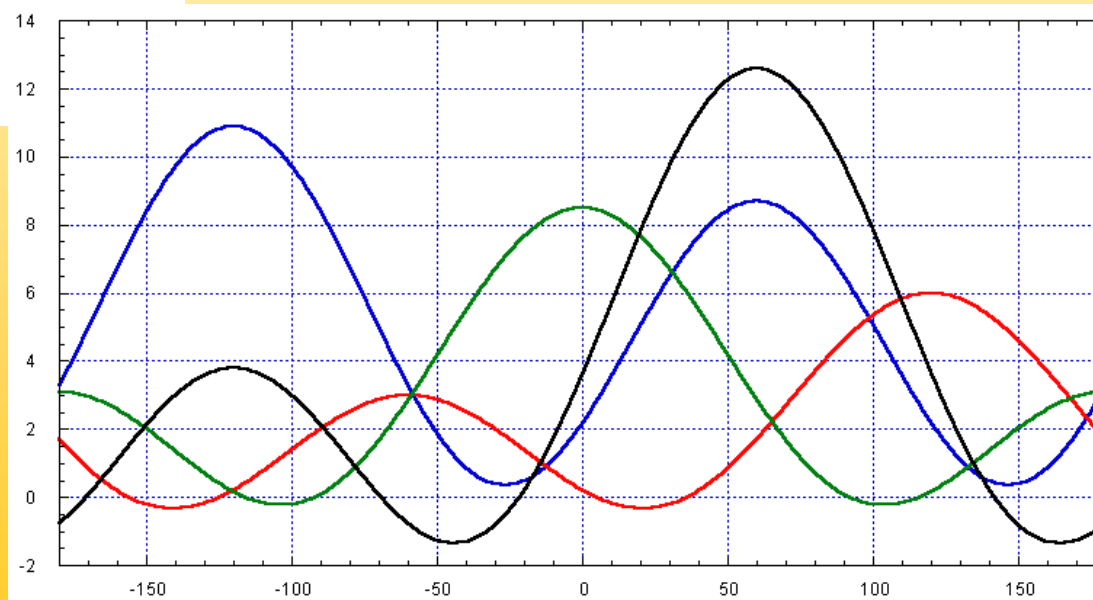
Die Karpluskurven für den  $\phi$ -Winkel sehen dann so aus

$${}^3J_{HN\ H\alpha}$$

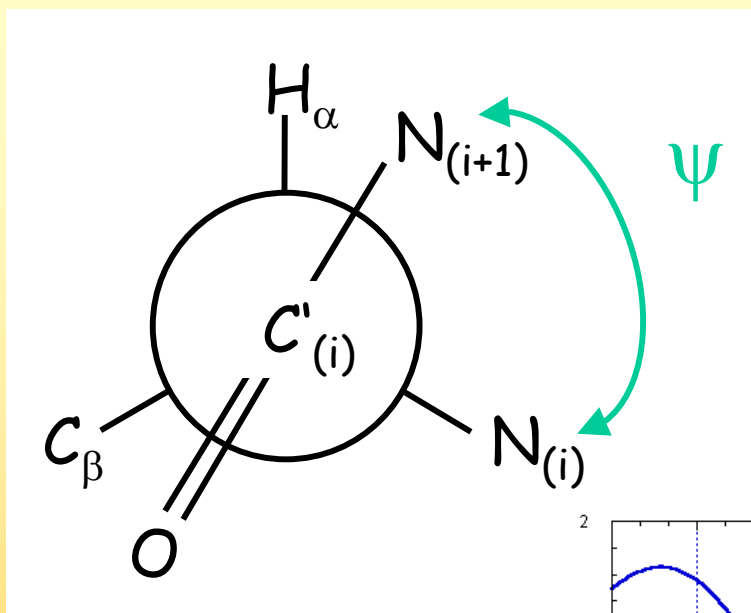
$${}^3J_{HN\ C\beta}$$

$${}^3J_{HN\ C'}$$

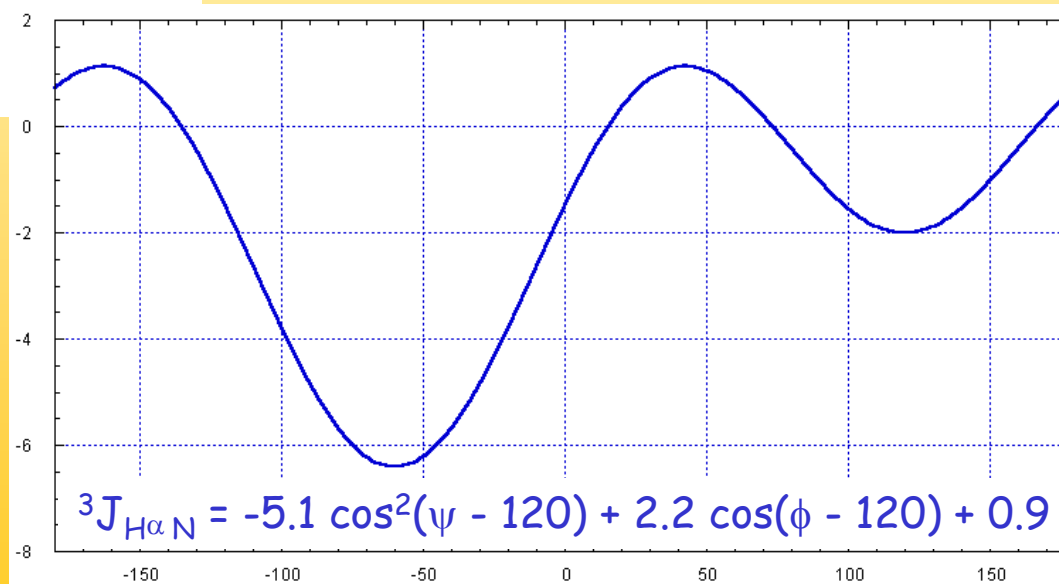
$${}^3J_{H\alpha\ C'}$$



# Karpluskurven



Die Karpluskurve für den  $\psi$ -Winkel sieht so aus



## Karpluskurven

"Certainly with our present knowledge, the person who attempts to estimate dihedral angles to an accuracy of one or two degrees does so at his own peril."

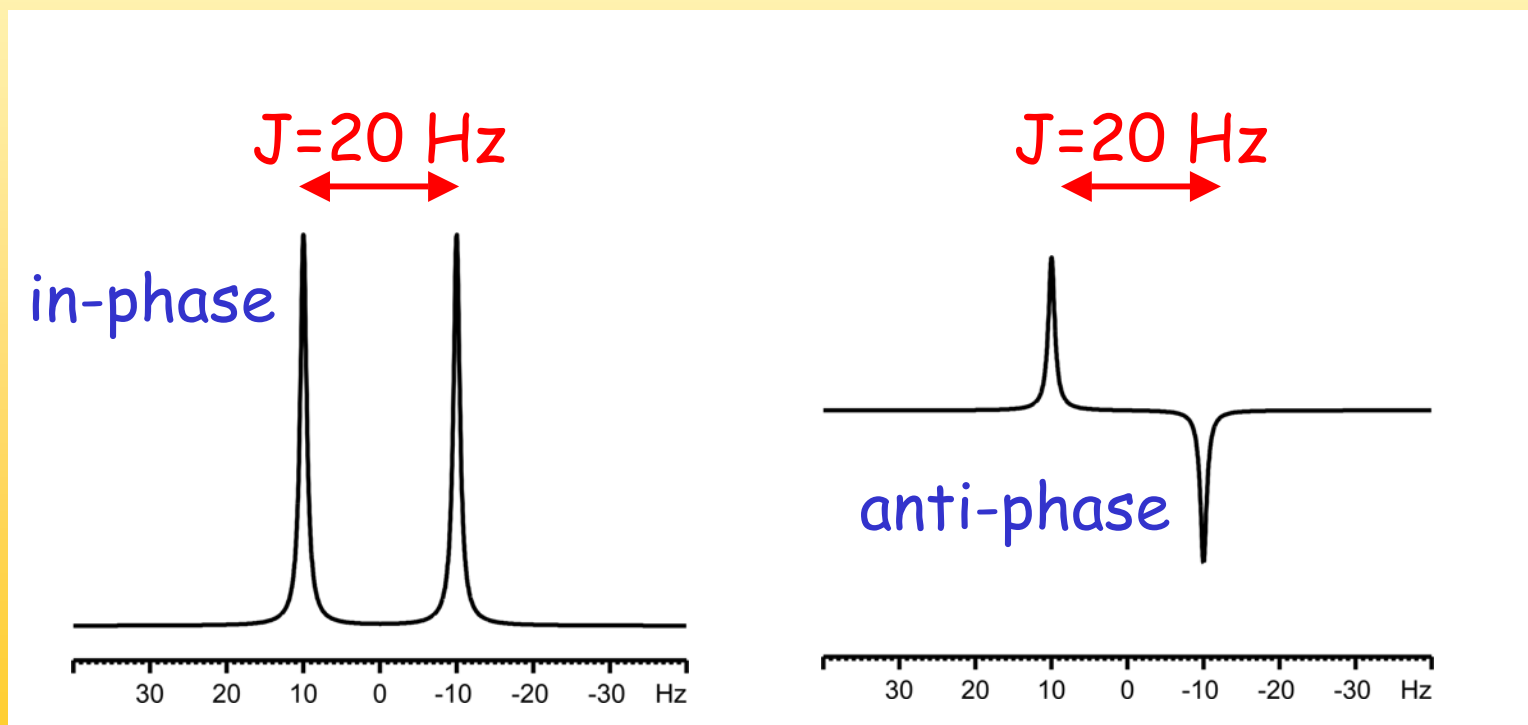
M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2870-2871 (1963)

# Probleme bei großen Linienbreiten



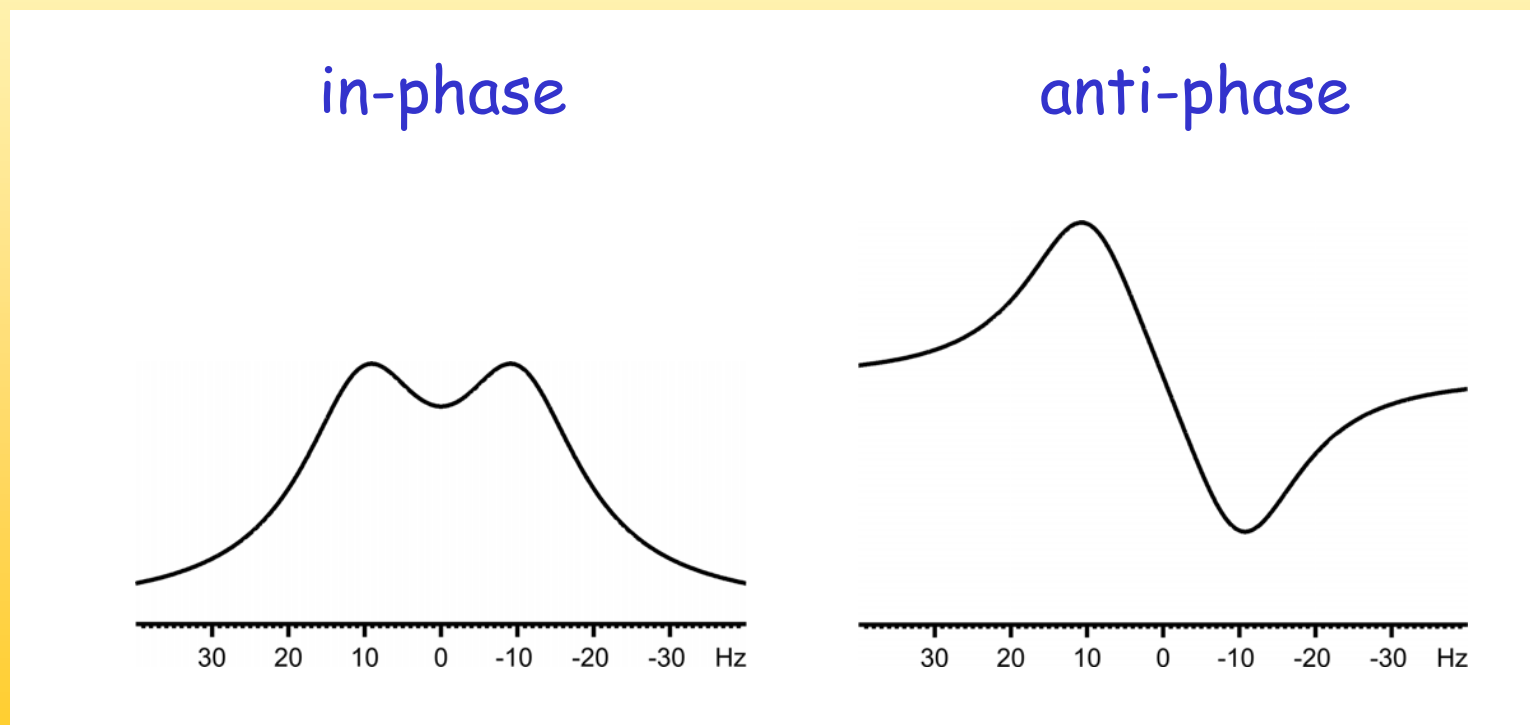
## J-Kopplung: Probleme bei großen Linienbreiten

Die Bestimmung der Größe von Kopplungskonstanten ist im Prinzip sehr einfach, sie können aus 1D-Spektren oder Spuren von 2D-Spektren abgelesen werden

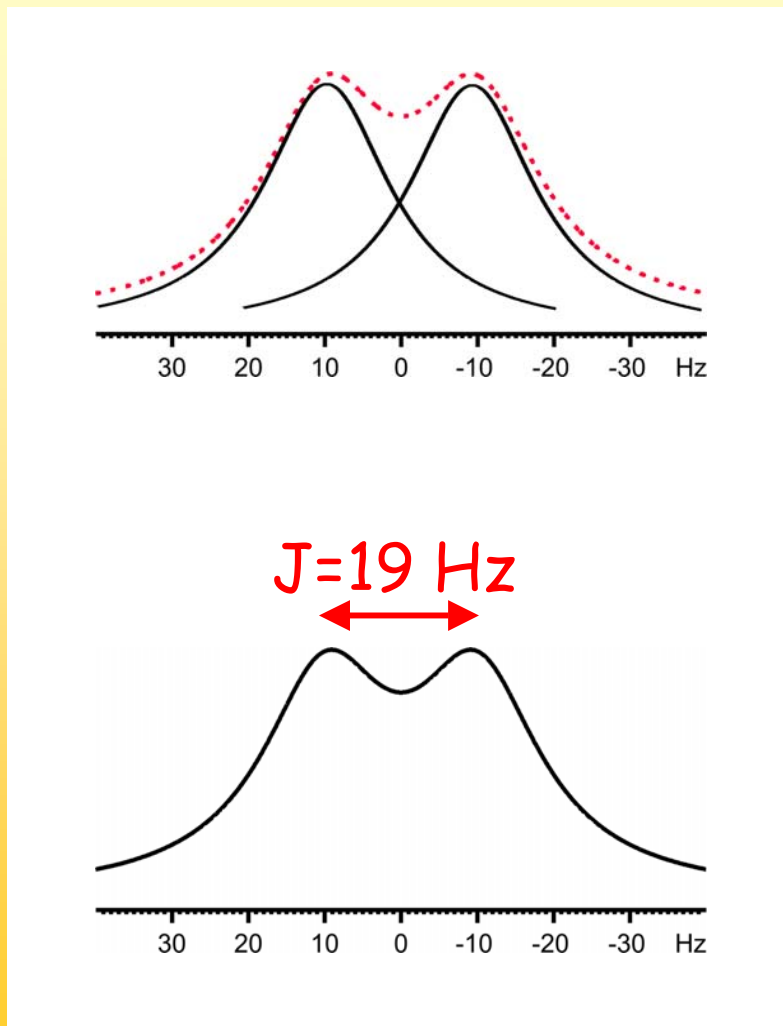


## J-Kopplung: Probleme bei großen Linienbreiten

Probleme treten aber dann auf, wenn die Kopplungskonstanten in der gleichen Größenordnung wie die Linienbreite der Signale liegen

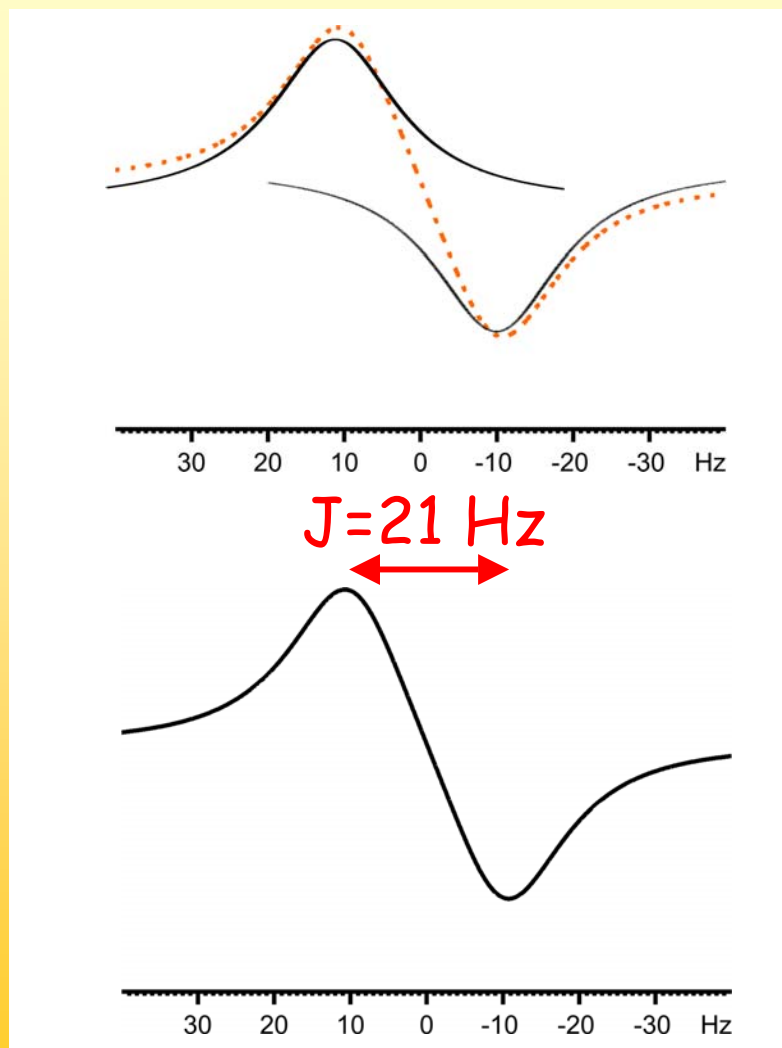


## J-Kopplung: Probleme bei großen Linienbreiten



Im in-phase-Fall addieren sich die Signale zwischen den Maxima auf, die Maxima rutschen nach innen und die Kopplung erscheint kleiner als sie wirklich ist

## J-Kopplung: Probleme bei großen Linienbreiten



Im anti-phase-Fall löschen sich die Signale zwischen den Maxima aus, die Maxima rutschen nach außen und die Kopplung erscheint größer als sie wirklich ist

# Methoden zur Bestimmung von skalaren Kopplungskonstanten unabhängig von der Linienbreite

## Methoden zur Bestimmung von J-Kopplung

3 Methoden wollen wir uns hier anschauen

$^3J_{\text{HNH}\alpha}$  nach Kim/Prestegard

E.COSY

HETLOC

## J-Kopplung: Kim/Prestegard

Die **Methode nach Kim und Prestegard** dient der Bestimmung von  $^3J_{\text{HNH}\alpha}$  Kopplungskonstanten aus DQF-COSY Spektren.

Voraussetzung ist die Gegenwart von nur einer Kopplungskonstante (keine passiven Kopplungen) unter der Annahme das Lorentzlinien vorliegen.

Lit:

Y. Kim, J. Prestegard

Journal of Magnetic Resonance 84, 9-13 (1989)

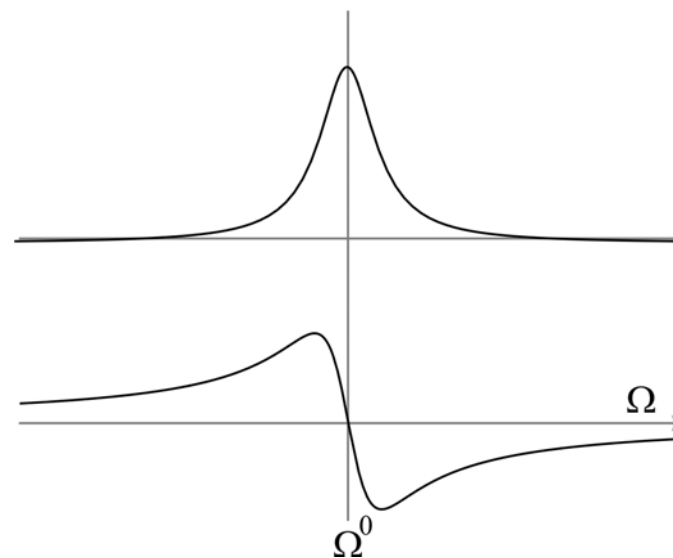
## J-Kopplung: Kim/Prestegard

Lorentzlinien mit "absorbtivem" und "dispersivem" Teil  
haben wir schon kennen gelernt:

$$S(\Omega) = A(\Omega) + i D(\Omega)$$

$$A(\Omega) = \frac{(1/T_2)}{(1/T_2)^2 + (\Omega - \Omega_0)^2}$$

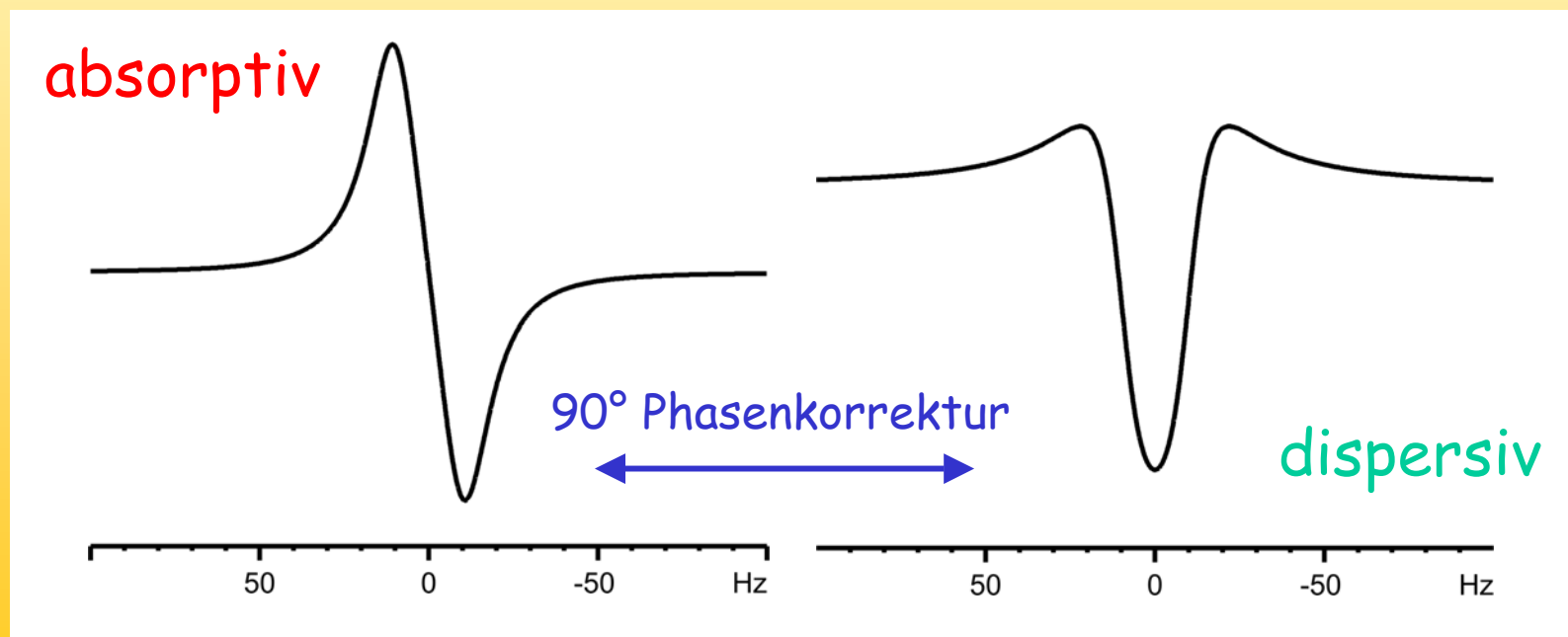
$$D(\Omega) = \frac{(\Omega - \Omega_0)}{(1/T_2)^2 + (\Omega - \Omega_0)^2}$$





## J-Kopplung: Kim/Prestegard

Im Falle eines Antiphase-Signals aus eine DQF-COSY in dem keine passive Kopplung vorhanden ist, hat man zwei Lorentzlinien mit unterschiedlichem Vorzeichen im Abstand von  $J$  Hz.



## J-Kopplung: Kim/Prestegard

In Formeln ausgedrückt ergibt sich das Signal:

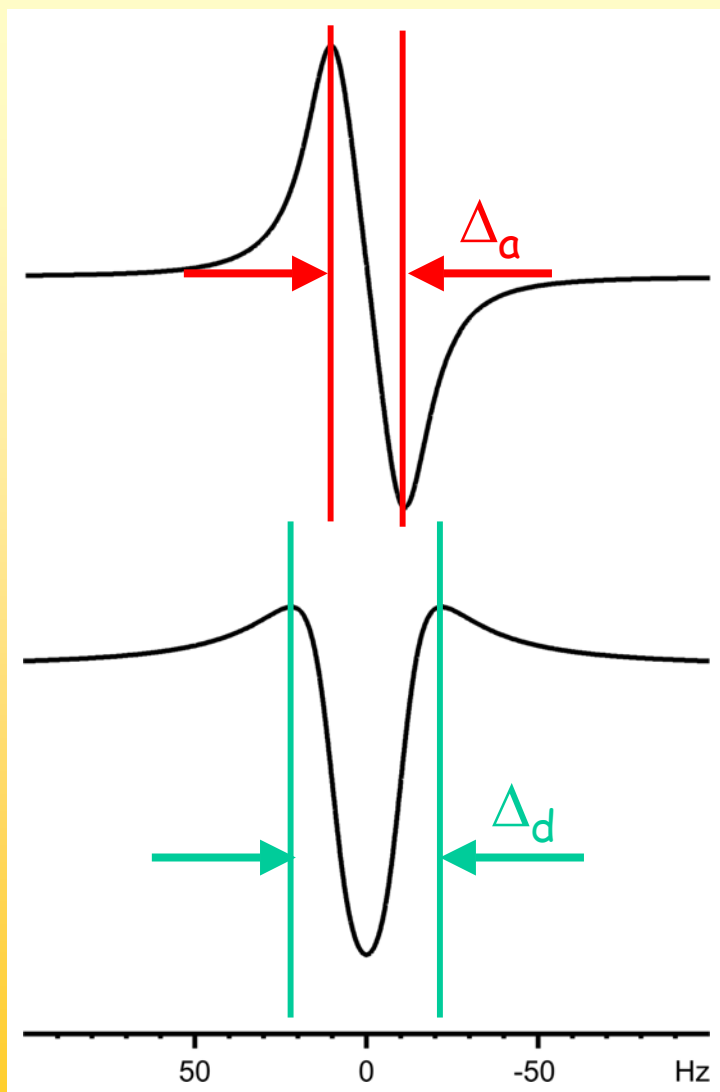
absorptiv

$$S_a = \frac{(1/T_2)}{(1/T_2)^2 + (\Omega - \Omega_0 - J/2)^2} - \frac{(1/T_2)}{(1/T_2)^2 + (\Omega - \Omega_0 + J/2)^2}$$

dispersiv

$$S_d = \frac{(\Omega - \Omega_0 - J/2)^2}{(1/T_2)^2 + (\Omega - \Omega_0 - J/2)^2} - \frac{(\Omega - \Omega_0 + J/2)^2}{(1/T_2)^2 + (\Omega - \Omega_0 + J/2)^2}$$

## J-Kopplung: Kim/Prestegard



Messwert ist jeweils der Abstand der Maxima,  $\Delta_a$  und  $\Delta_d$

Da es einen analytischen Ausdruck für die Signale gibt, ist die Position der Maxima die Nullstelle der ersten Ableitung

## J-Kopplung: Kim/Prestegard

Damit ergibt sich auch ein analytischer Ausdruck für die Differenz der Maxima, der die Linienbreite ( $1/\pi T_2$ ) enthält und die Kopplung.

Man hat zwei Gleichungen für die zwei Unbekannten, das erlaubt das eliminieren der Linienbreite.

Man erhält eine recht komplizierte kubische Gleichung die sich aber analytisch lösen und in ein Programm verpacken lässt.

## J-Kopplung: Kim/Prestegard

Die Gleichung ist:

$$J^6 - \Delta_d J^4 + \left(-\frac{9}{4}\Delta_a^4 + \frac{3}{2}\Delta_a^2 \Delta_d^2 + \frac{3}{4}\Delta_d^4\right) J^2 + \left(\frac{81}{64}\Delta_a^6 - \frac{9}{16}\Delta_a^4 \Delta_d^2 - \frac{21}{32}\Delta_a^2 \Delta_d^4 - \frac{1}{16}\Delta_d^6 + \frac{\Delta_d^8}{64\Delta_a^2}\right) = 0$$

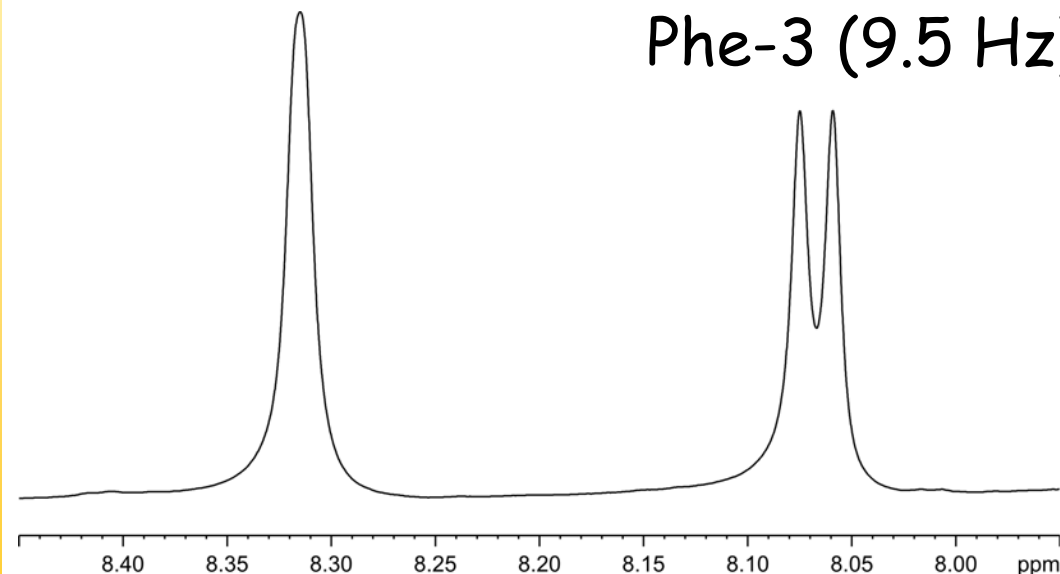
Es zeigt sich das selbst wenn die Linienbreite doppelt so groß ist wie die Kopplungskonstante, die Methode dennoch eine Kopplungskonstante nahe am wirklichen Wert liefert

## J-Kopplung: Kim/Prestegard

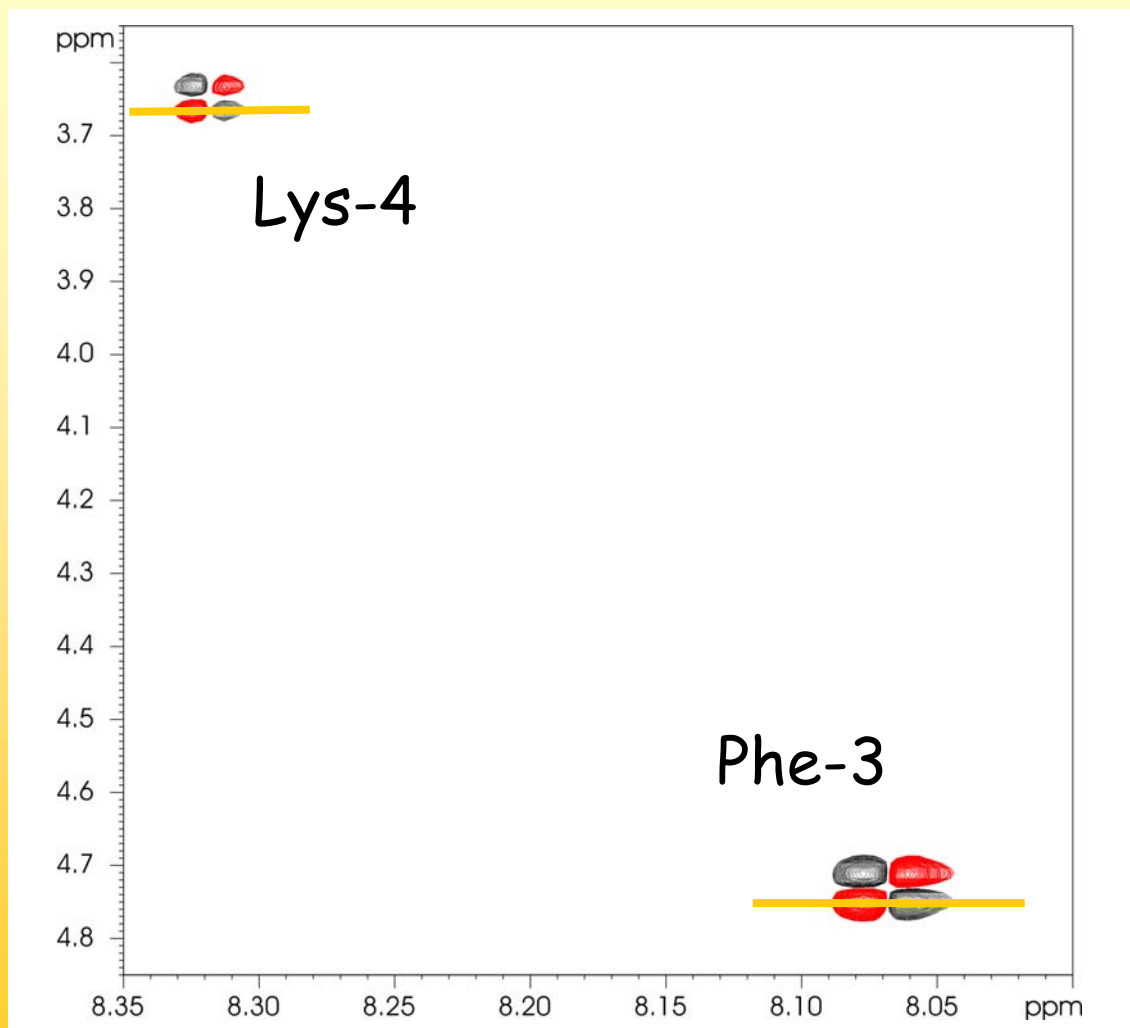
### $^1\text{H}$ -1D-Spektrum

Lys-4 (nicht bestimmbar)

Phe-3 (9.5 Hz)

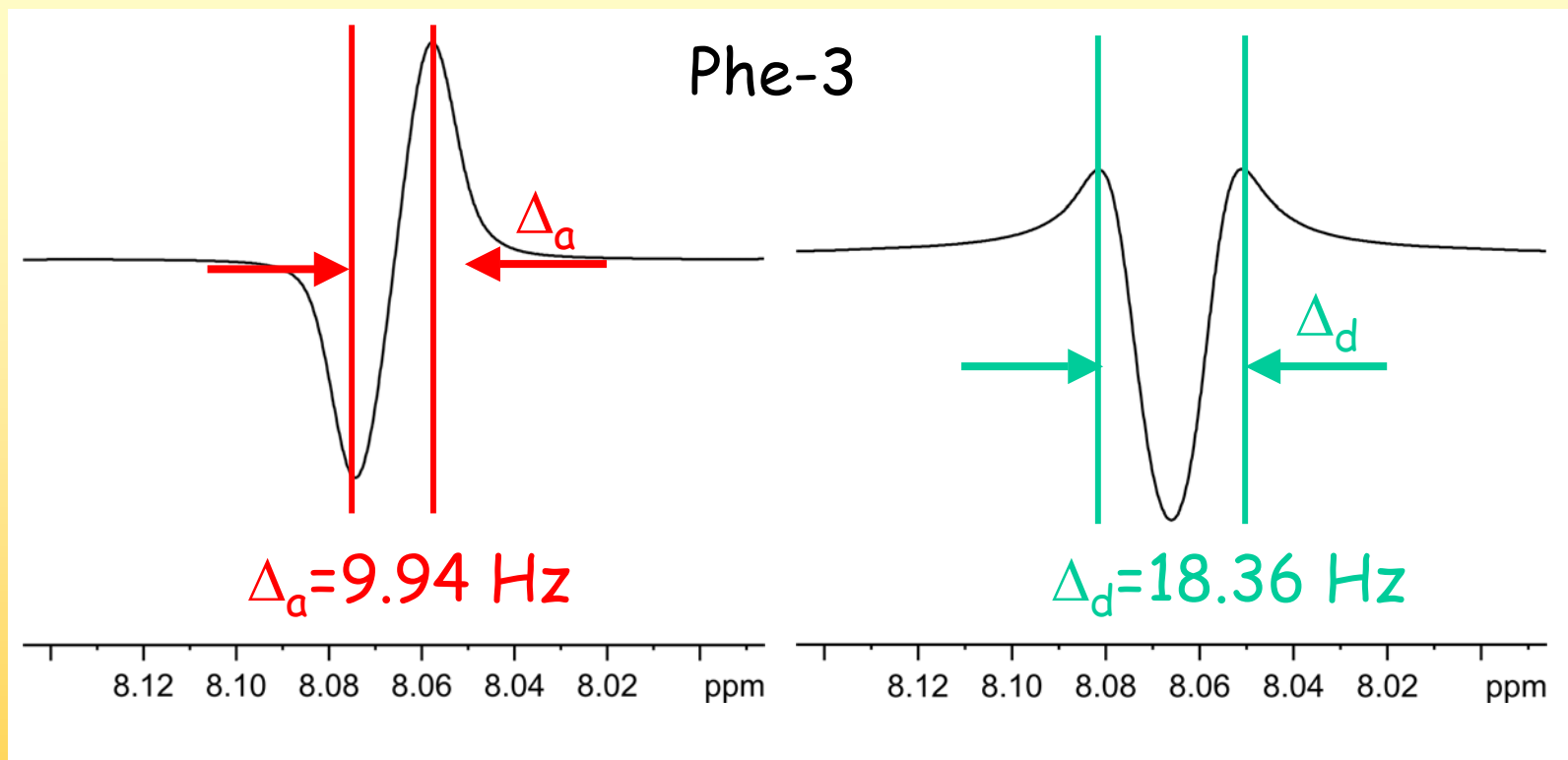


## J-Kopplung: Kim/Prestegard



DQF-COSY

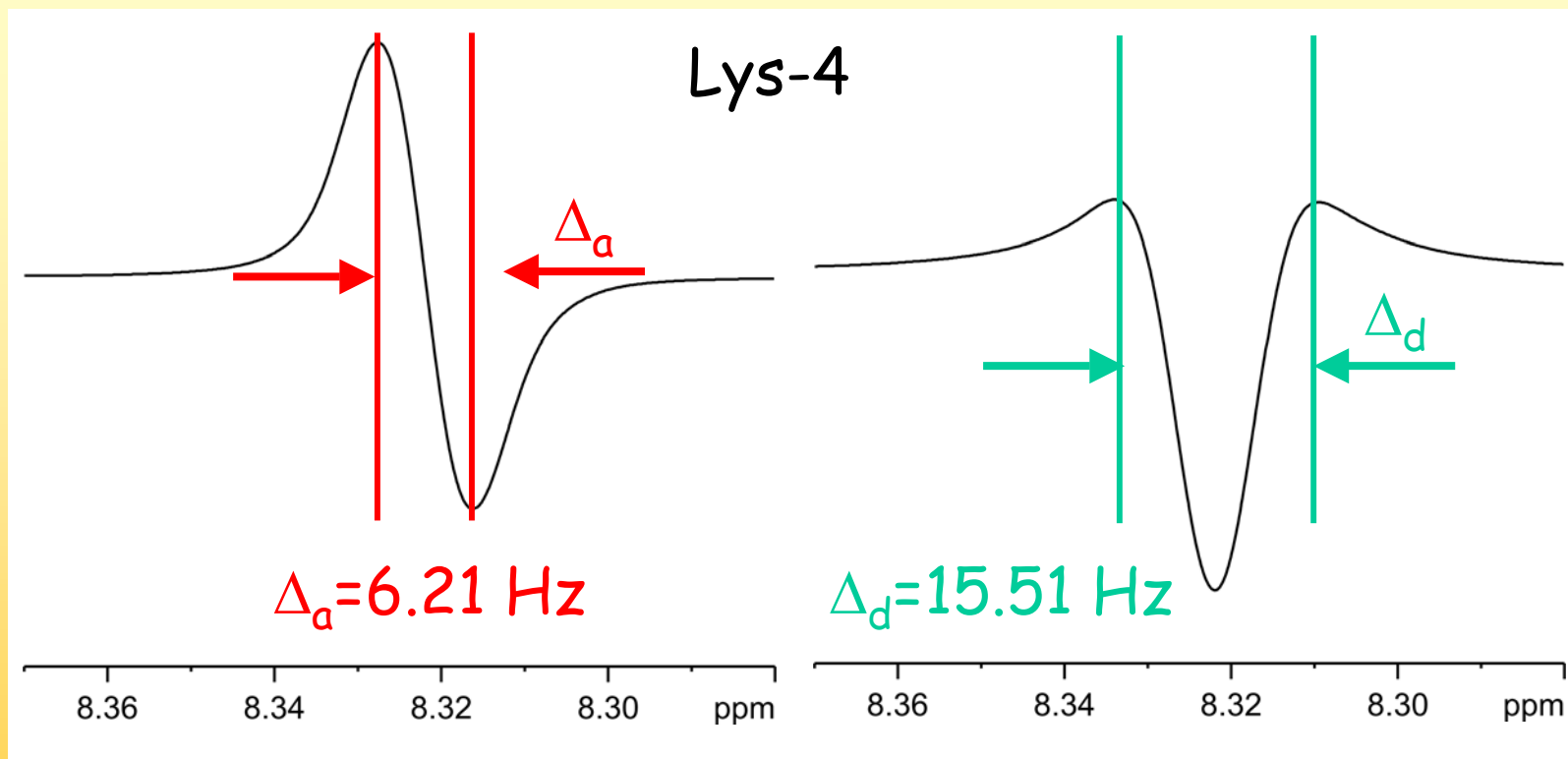
# J-Kopplung: Kim/Prestegard



$$^3J_{\text{HNH}\alpha} = 9.6 \text{ Hz (statt 9.5)}$$



# J-Kopplung: Kim/Prestegard



$^3J_{\text{HNH}\alpha} = 4.7 \text{ Hz}$  (im 1D nicht bestimmbar)

## J-Kopplung: E.COSY

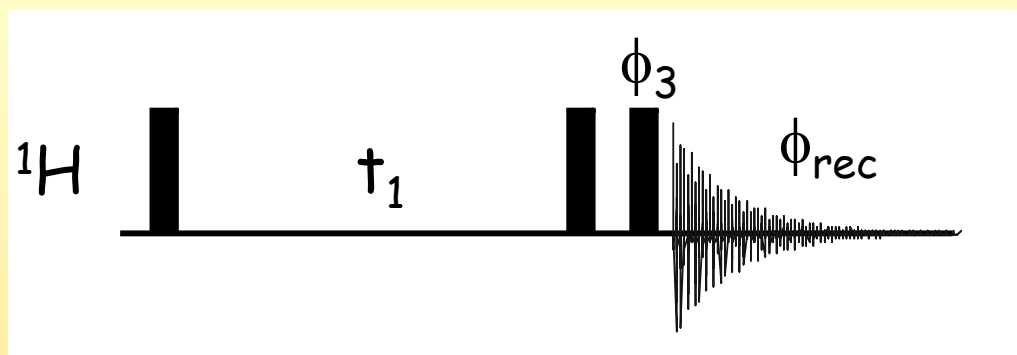
Liegen auch passive Kopplungen im Multiplett-Muster vor, dann ist keine analytische Lösung mehr möglich.

Eine erfolgreiche Strategie besteht dann darin, die Multiplettmuster zu vereinfachen indem man einige Komponenten ausschliesst. Man erzeugt „exclusive correlations“ und erhält die sogenannten **E.COSY**-Muster.

Das eigentliche **E.COSY** dient der Bestimmung homonuklearer Kopplungen und ist mit dem DQF-COSY verwandt.

# Das E.COSY

## J-Kopplung: E.COSY



$$\phi_3 = x, y, -x, -y$$

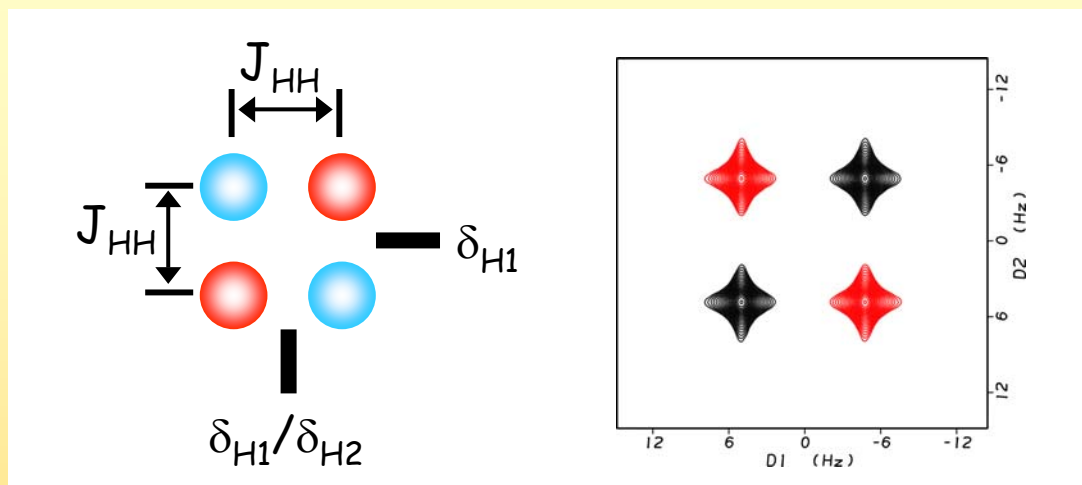
$$\phi_{\text{rec}} = x, -y, -x, y$$

Im DQF-COSY werden anti-phase Muster erzeugt

Die Muster der Kreuzsignale konnten wir mit  
Produktoperatoren leicht ableiten.

Für den Fall von 2 Spins ergab sich das  
grundlegende Muster von 4 Signalen

# J-Kopplung: E.COSY

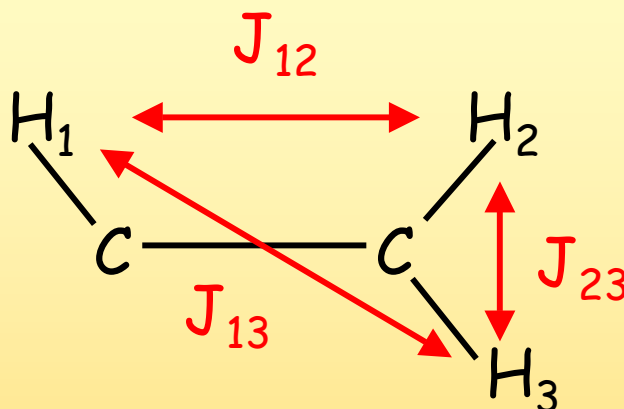


$$-2H_{2y} \cos 2\pi\delta_{H1}t_1 \sin \pi J_{HH}t_1 \cos 2\pi\delta_{H2}t_2 \sin \pi J_{HH}t_2$$

$$-H_{2y} [\sin 2\pi(\delta_{H1} + J_{HH}/2)t_1 - \sin 2\pi(\delta_{H1} - J_{HH}/2)t_1] \times$$

$$[\sin 2\pi(\delta_{H2} + J_{HH}/2)t_2 - \sin 2\pi(\delta_{H2} - J_{HH}/2)t_2]$$

## J-Kopplung: E.COSY



Für den Fall von 3 Spins und damit dem Vorliegen von passiven Kopplungen ergab sich komplexere Muster aus den grundlegenden Mustern von 4 Signalen

## J-Kopplung: E.COSY

$$-2H_{2y} \cos 2\pi\delta_{H1}t_1 \sin \pi J_{12}t_1 \cos \pi J_{13}t_1 \\ \cos 2\pi\delta_{H2}t_2 \sin \pi J_{12}t_2 \cos \pi J_{23}t_2$$

In der Produktoperatorrechnung erweitern sich die Terme jeweils um einen Cosinus-Term ...

$$-H_{2y} [\sin 2\pi(\delta_{H1} + J_{12}/2)t_1 - \sin 2\pi(\delta_{H1} - J_{12}/2)t_1] \cos \pi J_{13}t_1 \\ \times [\sin 2\pi(\delta_{H2} + J_{12}/2)t_2 - \sin 2\pi(\delta_{H2} - J_{12}/2)t_2] \cos \pi J_{23}t_2$$

## J-Kopplung: E.COSY

.... der eine Erweiterung des Musters bedeutet

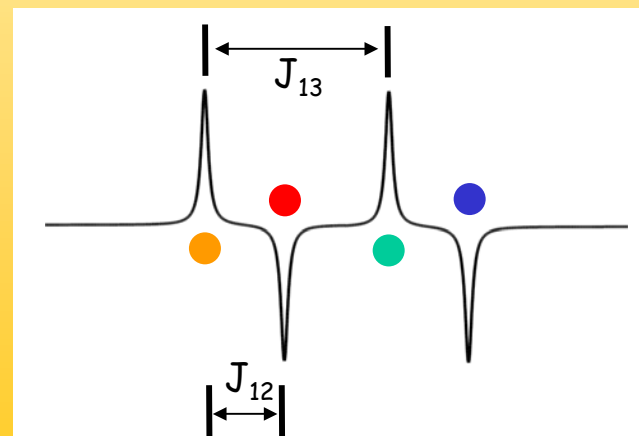
$$\sin 2\pi(\delta_{H1} + J_{12}/2)t_1 \cos \pi J_{13}t_1 =$$

$$\sin 2\pi(\delta_{H1} + J_{12}/2 + J_{13}/2)t_1 + \sin 2\pi(\delta_{H1} + J_{12}/2 - J_{13}/2)t_1$$

$$-\sin 2\pi(\delta_{H1} - J_{12}/2)t_1 \cos \pi J_{13}t_1 =$$

$$-\sin 2\pi(\delta_{H1} - J_{12}/2 + J_{13}/2)t_1 - \sin 2\pi(\delta_{H1} - J_{12}/2 - J_{13}/2)t_1$$

Es entstehen im  
Kreuzsignal in der  
einen Richtung ( $t_1$ )  
vier Linien





## J-Kopplung: E.COSY

und in der  $t_2$ -Richtung

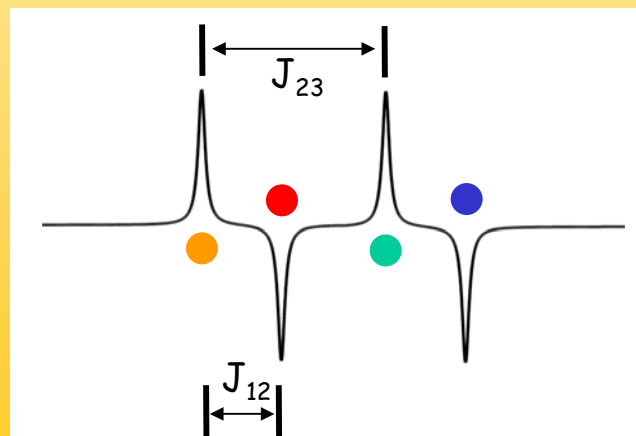
$$\sin 2\pi(\delta_{H1} + J_{12}/2)t_2 \cos \pi J_{23}t_2 =$$

$$\sin 2\pi(\delta_{H1} + J_{12}/2 + J_{23}/2)t_2 + \sin 2\pi(\delta_{H1} + J_{12}/2 - J_{23}/2)t_2$$

$$-\sin 2\pi(\delta_{H1} - J_{12}/2)t_1 \cos \pi J_{23}t_2 =$$

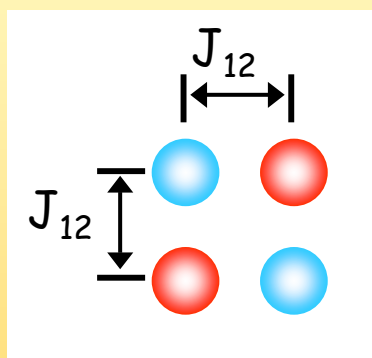
$$-\sin 2\pi(\delta_{H1} - J_{12}/2 + J_{23}/2)t_2 - \sin 2\pi(\delta_{H1} - J_{12}/2 - J_{23}/2)t_2$$

Es entstehen auch in  
der anderen  
Richtung ( $t_2$ ) vier  
Linien

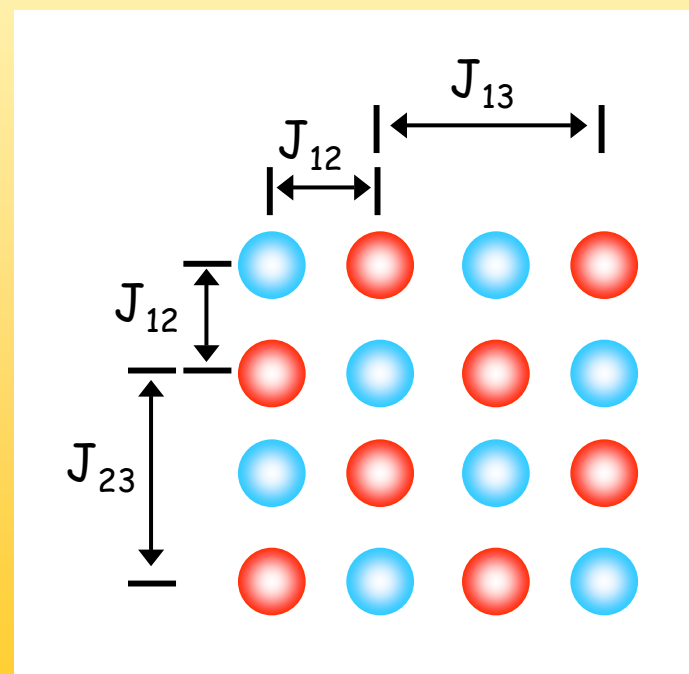


## J-Kopplung: E.COSY

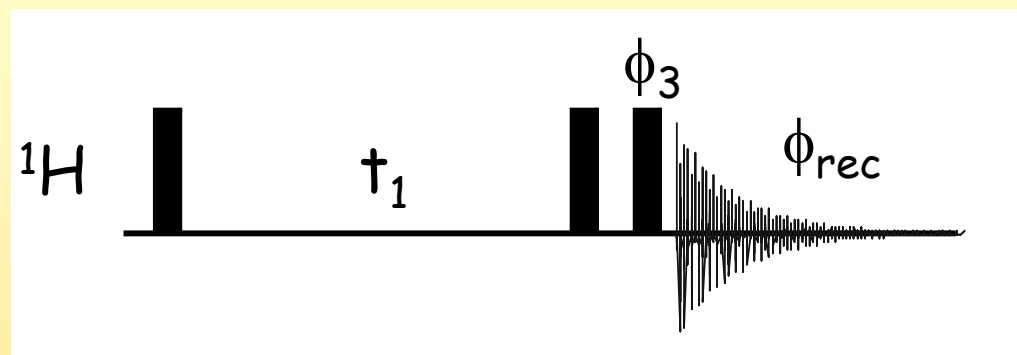
Im Kreuzsignal des zwei-dimensionalen Spektrums vervielfältigen sich also die Signalmuster



Man hat eine „aktive“  
Kopplung,  $J_{12}$ , und zwei  
„passive“ Kopplungen,  
 $J_{13}$  und  $J_{23}$

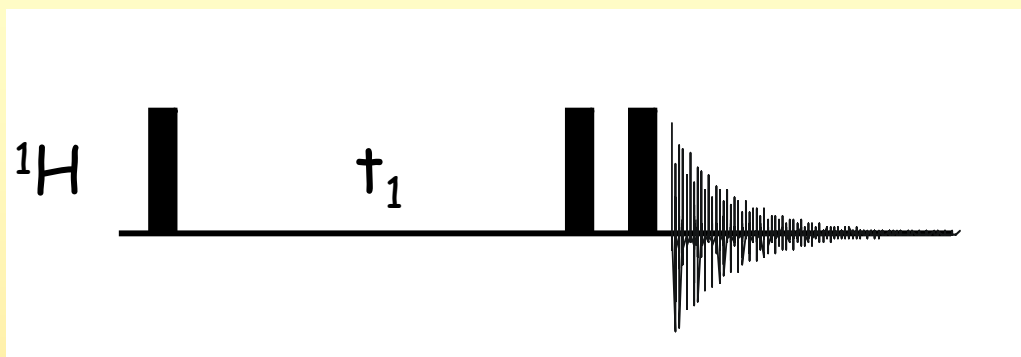


## J-Kopplung: E.COSY



Durch einen leicht veränderten Phasencyclus bei gleicher Pulssequenz ergibt sich aus dem DQF-COSY ein Experiment mit Tripelquantenfilter, das TQF-COSY. Letztere können sich aber nur bilden, wenn drei Spins miteinander „koppeln“, d.h. durch eine J-Kopplung verbunden sind.

## J-Kopplung: E.COSY



Die Rechnung kennen wir schon....

$$\begin{aligned}
 H_{1z} &\xrightarrow{90^\circ H_x} -H_{1y} \xrightarrow{2\pi\delta_{H1}t_1} -H_{1y} \cos 2\pi\delta_{H1}t_1 + H_{1x} \sin 2\pi\delta_{H1}t_1 \\
 &\xrightarrow{\pi J_{12}t_1} -H_{1y} \cos 2\pi\delta_{H1}t_1 \cos \pi J_{12}t_1 \\
 &\quad + 2H_{1x} H_{2z} \cos 2\pi\delta_{H1}t_1 \sin \pi J_{12}t_1 \\
 &\quad + H_{1x} \sin 2\pi\delta_{H1}t_1 \cos \pi J_{12}t_1 \\
 &\quad + 2H_{1y} H_{2z} \sin 2\pi\delta_{H1}t_1 \sin \pi J_{12}t_1
 \end{aligned}$$

## J-Kopplung: E.COSY

$$\begin{aligned}
 \xrightarrow{\pi J_{13} t_1} & - H_{1y} \cos 2\pi\delta_{H1} t_1 \cos \pi J_{12} t_1 \cos \pi J_{13} t_1 \\
 & + 2 H_{1x} H_{3z} \cos 2\pi\delta_{H1} t_1 \cos \pi J_{12} t_1 \sin \pi J_{13} t_1 \\
 & + 2 H_{1x} H_{2z} \cos 2\pi\delta_{H1} t_1 \sin \pi J_{12} t_1 \cos \pi J_{13} t_1 \\
 & + 4 H_{1y} H_{2z} H_{3z} \cos 2\pi\delta_{H1} t_1 \sin \pi J_{12} t_1 \sin \pi J_{13} t_1 \\
 & + H_{1x} \sin 2\pi\delta_{H1} t_1 \cos \pi J_{12} t_1 \cos \pi J_{13} t_1 \\
 & + 2 H_{1x} H_{2z} \cos 2\pi\delta_{H1} t_1 \cos \pi J_{12} t_1 \sin \pi J_{13} t_1 \\
 & + 2 H_{1y} H_{2z} \sin 2\pi\delta_{H1} t_1 \sin \pi J_{12} t_1 \cos \pi J_{13} t_1 \\
 & + 4 H_{1x} H_{2z} H_{3z} \sin 2\pi\delta_{H1} t_1 \sin \pi J_{12} t_1 \sin \pi J_{13} t_1
 \end{aligned}$$

## J-Kopplung: E.COSY

Aus dem vom Tripelquantenfilter selektierten Term

$$+ 4 H_{1x} H_{2z} H_{3z} \sin 2\pi\delta_{H1}t_1 \sin \pi J_{12}t_1 \sin \pi J_{13}t_1$$

wird am Ende Magnetisierung der Form

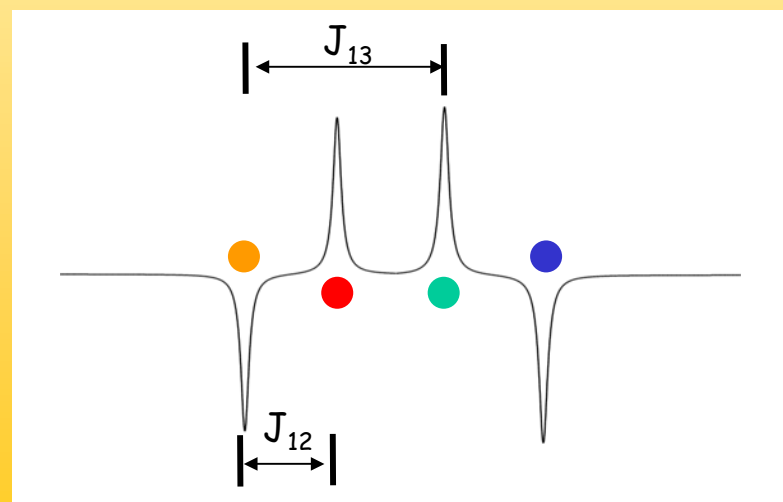
$$\begin{aligned} & -2H_{2y} \sin 2\pi\delta_{H1}t_1 \sin \pi J_{12}t_1 \sin \pi J_{13}t_1 \\ & \sin 2\pi\delta_{H2}t_2 \sin \pi J_{12}t_2 \sin \pi J_{23}t_2 \end{aligned}$$

## J-Kopplung: E.COSY

Durch Anwendung der bekannten Regeln ergibt sich:

$$\begin{aligned}
 & -\sin 2\pi(\delta_{H1} + J_{12}/2 + J_{13}/2)t_1 + \sin 2\pi(\delta_{H1} + J_{12}/2 - J_{13}/2)t_1 \\
 & + \sin 2\pi(\delta_{H1} - J_{12}/2 + J_{13}/2)t_1 - \sin 2\pi(\delta_{H1} - J_{12}/2 - J_{13}/2)t_1
 \end{aligned}$$

Auch hier entstehen  
im Kreuzsignal in der  
einen Richtung ( $t_1$ )  
vier Linien, aber ein  
anderes Muster

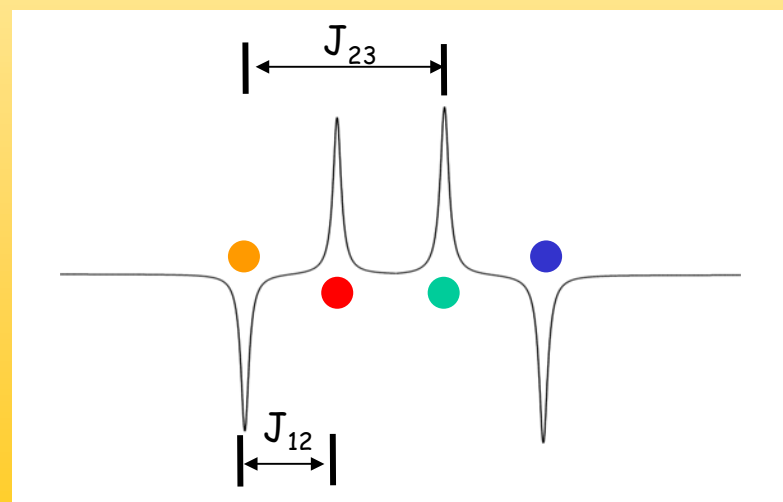


## J-Kopplung: E.COSY

in der Acquisitionszeit

$$\begin{aligned}
 & -\sin 2\pi(\delta_{H1} + J_{12}/2 + J_{23}/2)t_2 + \sin 2\pi(\delta_{H1} + J_{12}/2 - J_{23}/2)t_2 \\
 & + \sin 2\pi(\delta_{H1} - J_{12}/2 + J_{23}/2)t_2 - \sin 2\pi(\delta_{H1} - J_{12}/2 - J_{23}/2)t_2
 \end{aligned}$$

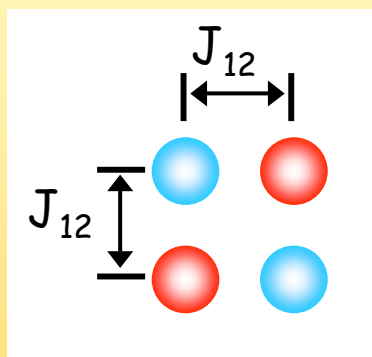
es entstehen auch in  
der anderen  
Richtung ( $t_2$ ) wieder  
vier Linien, wieder  
mit anderem Muster



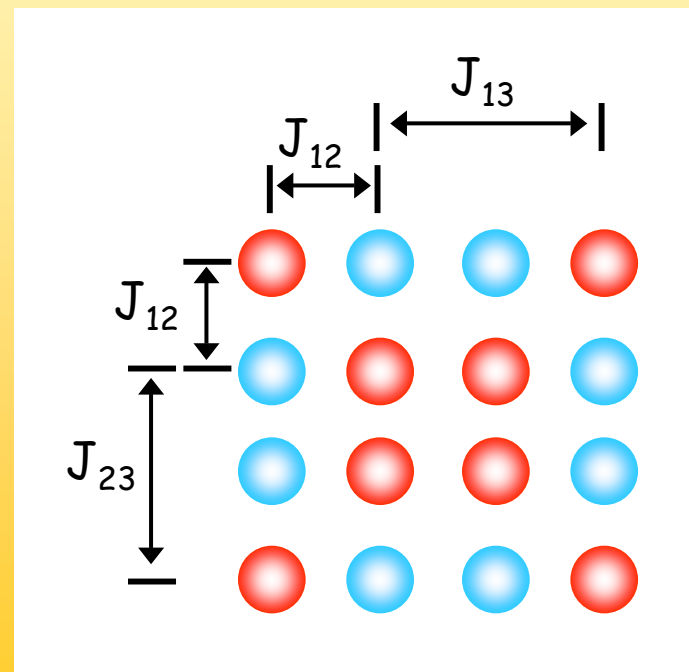


## J-Kopplung: E.COSY

Im Kreuzsignal des zwei-dimensionalen Spektrums ergibt sich also ein anderes Signalmuster

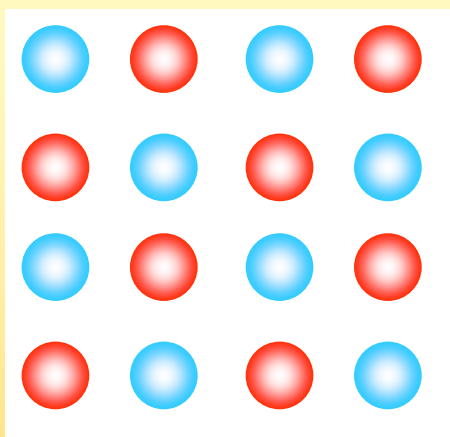


Man hat nach wie vor eine „aktive“ Kopplung,  $J_{12}$ , und zwei „passive“ Kopplungen,  $J_{13}$  und  $J_{23}$



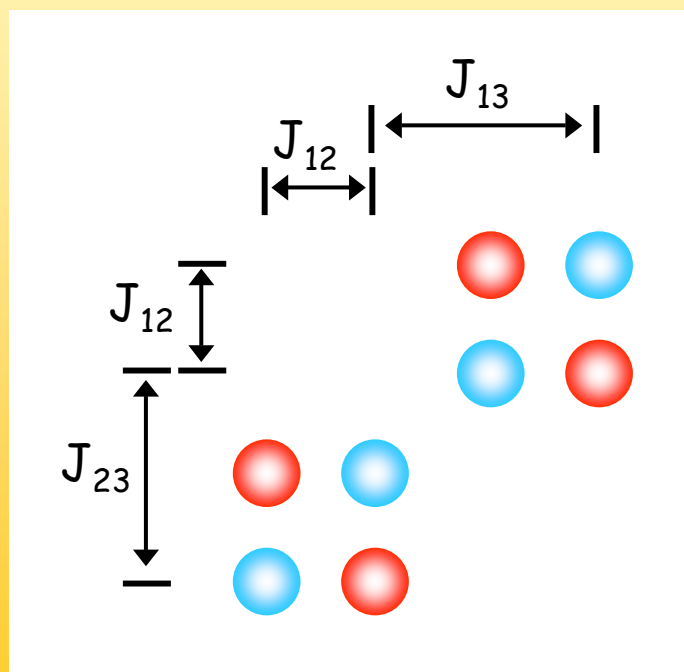
# J-Kopplung: E.COSY

## DQF-COSY

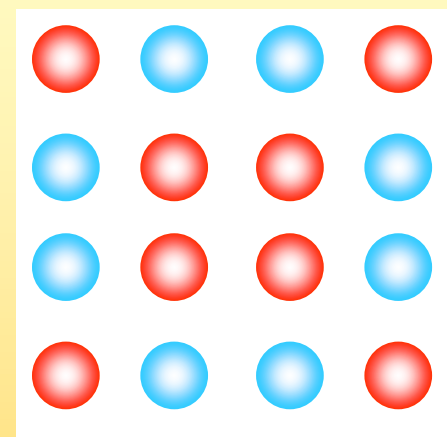


... ergibt ein  
„E.COSY“  
Muster ...

Eine Kombination der  
beiden Spektren ...

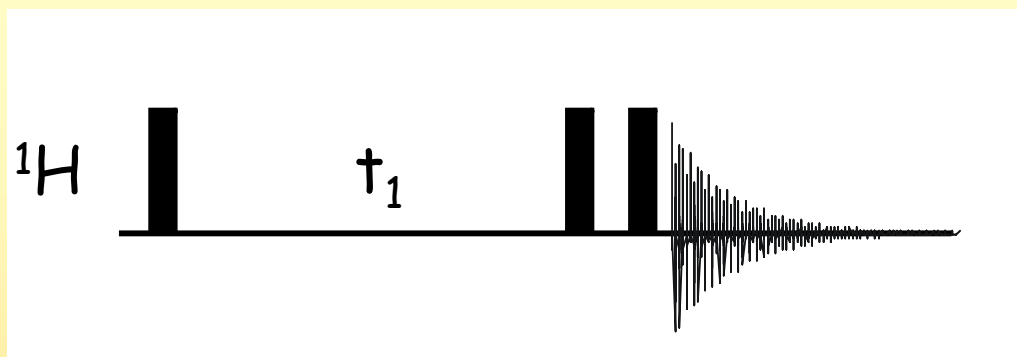


## TQF-COSY



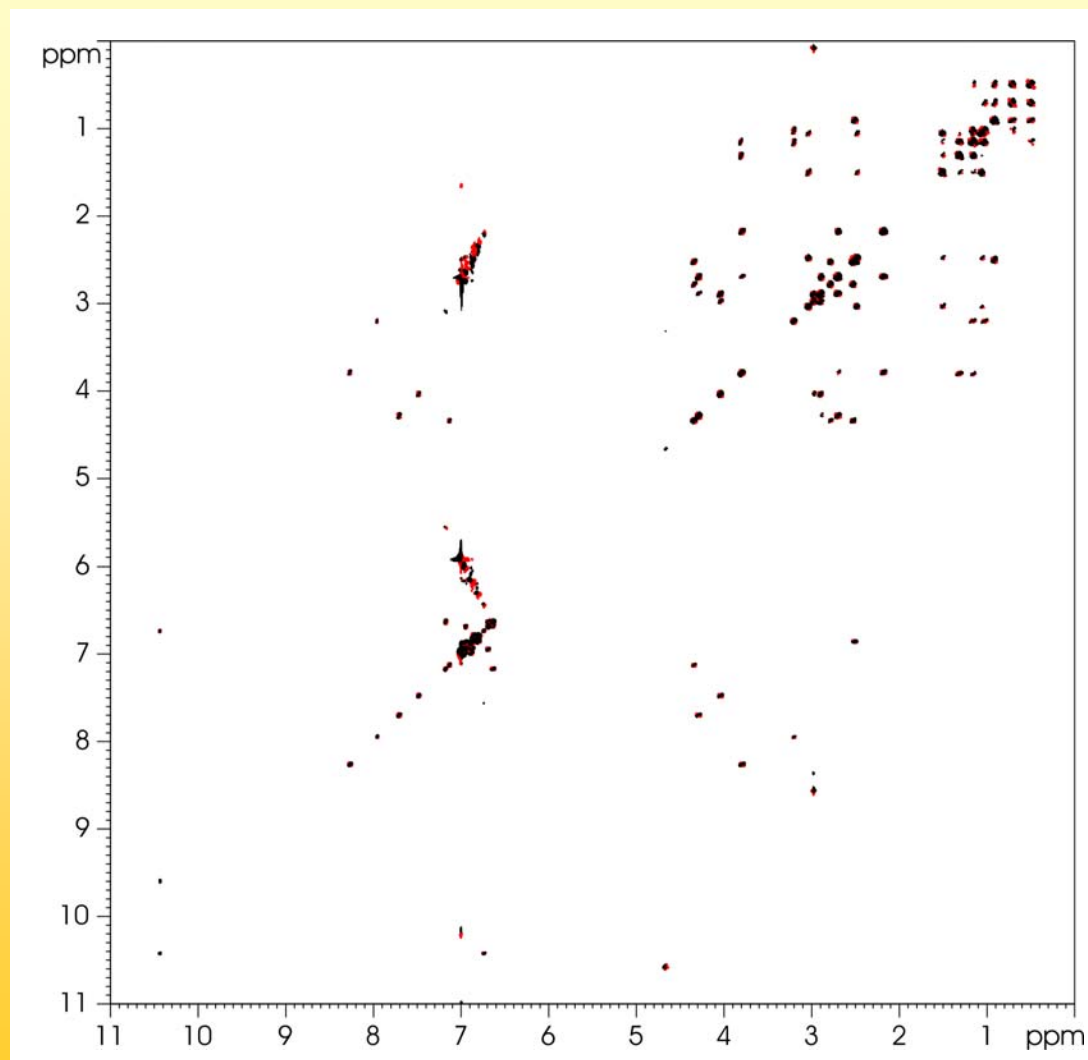
... aus dem  $J_{13}$   
unabhängig von  
der Linienbreite  
zu bestimmen ist

## J-Kopplung: E.COSY



Die Pulssequenz für das E.COSY entspricht also dem des DQF-COSY, aber der Phasencyclus muss so angelegt sein, dass die entsprechenden Spektren mit der richtigen Gewichtung addiert werden. Die Kombination von DQF- und TQF-COSY wird als „Dreispin-E.COSY“ bezeichnet.

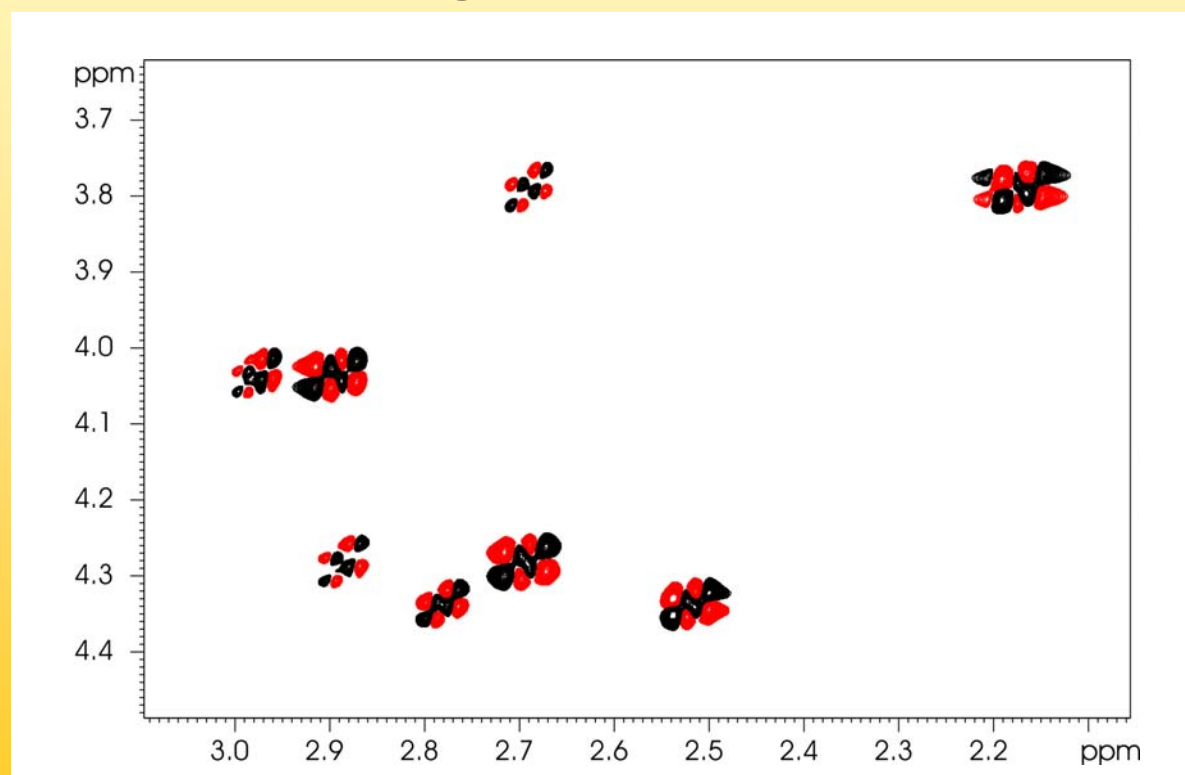
## J-Kopplung: E.COSY



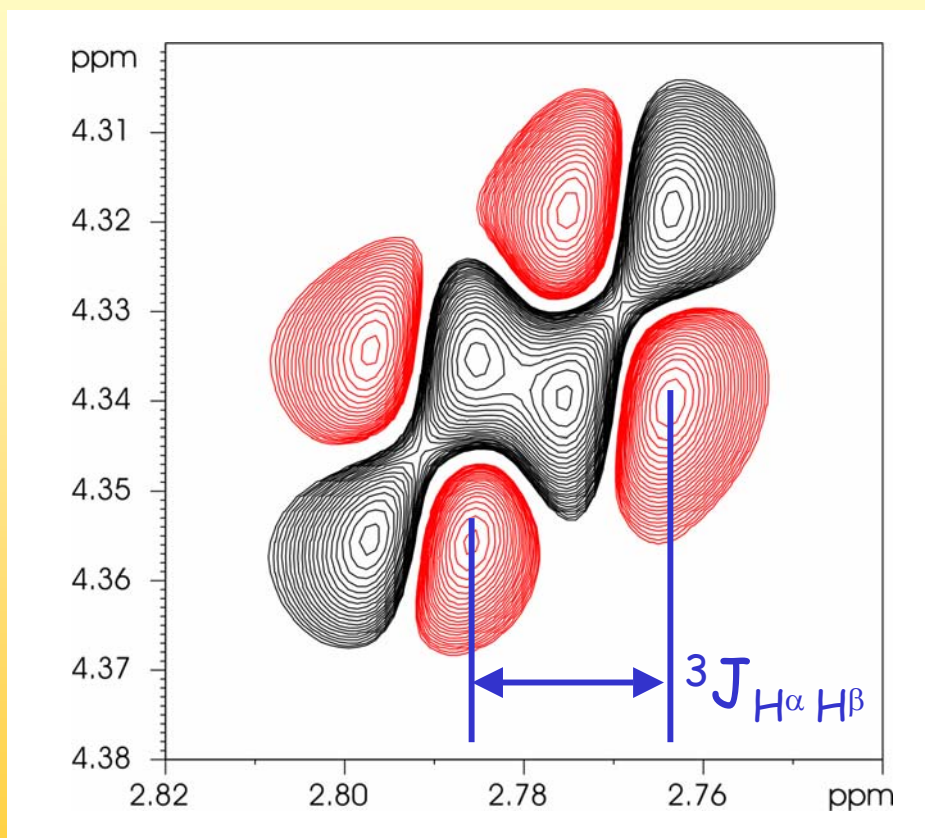
Das  
Erscheinungsbild  
entspricht dem des  
DQF-COSY

## J-Kopplung: E.COSY

Interessant ist die Region der  $H_{\alpha}$ - $H_{\beta}$  Kreuzsignale bei den aromatischen Aminosäuren, wo eine stereospezifische Zuordnung wünschenswert ist



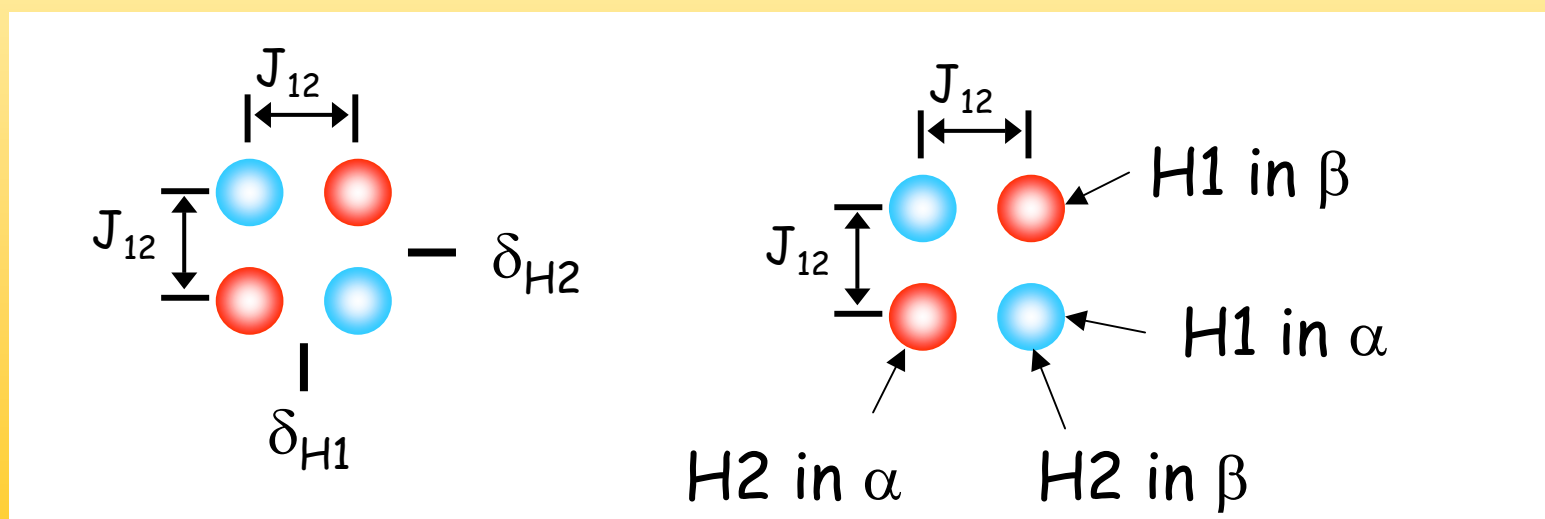
## J-Kopplung: E.COSY



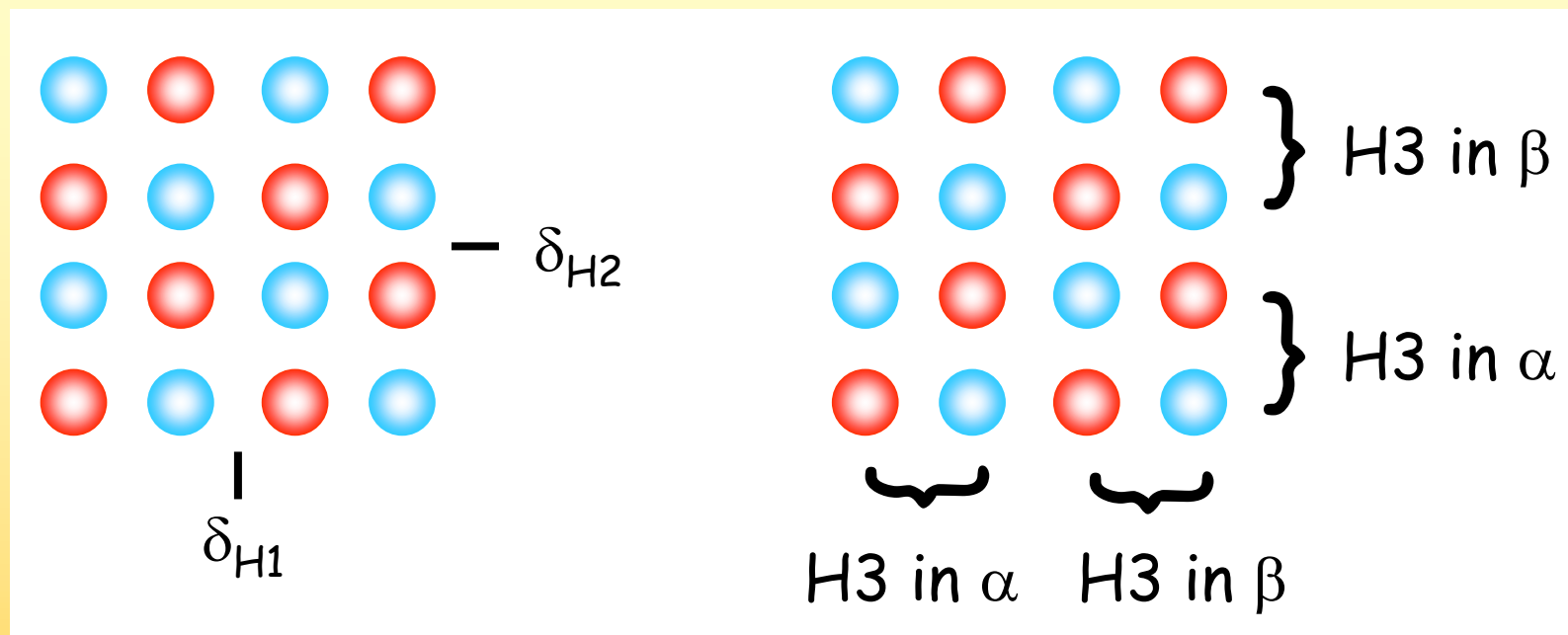
Die passive Kopplung kann aus dem Kreuzsignal unabhängig von der Linienbreite abgelesen werden

## J-Kopplung: E.COSY

Man kann sich das E.COSY-Prinzip auch noch anders verdeutlichen. Ein Doublett entsteht, weil die Resonanzfrequenz abhängig vom Spinzustand des *Nachbarn* ist



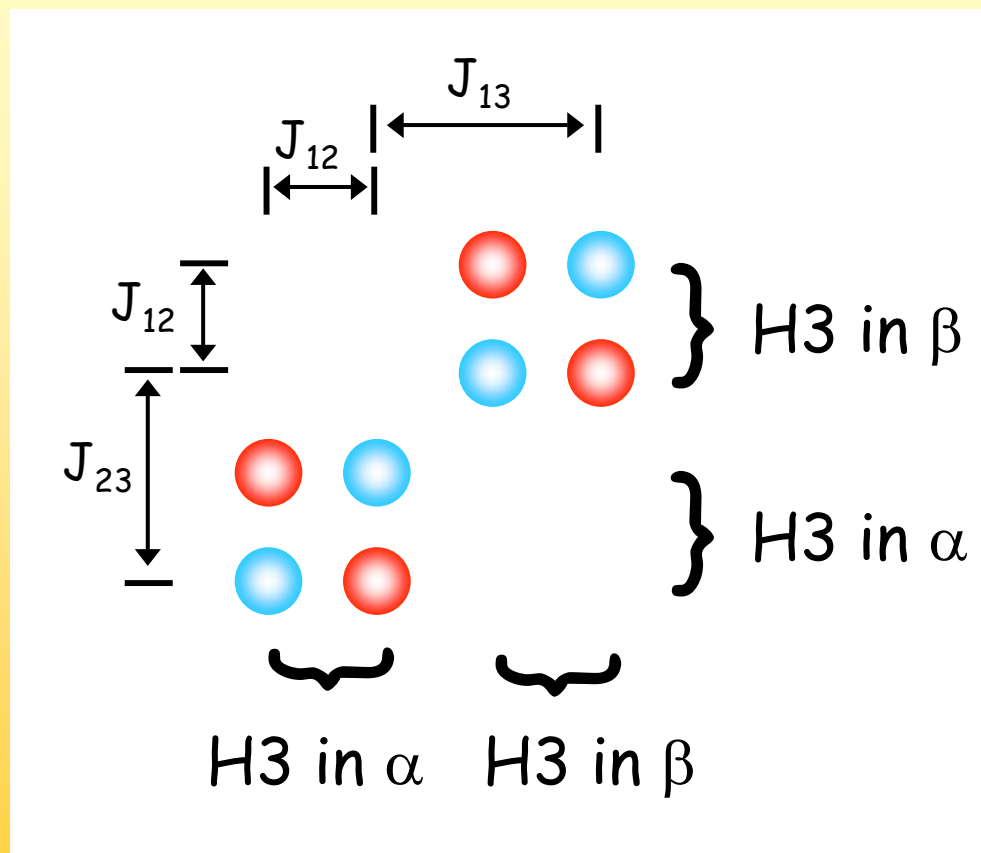
## J-Kopplung: E.COSY



Für die im E.COSY entstehenden Signale bedeutet das, dass H3 seinen Spinzustand nicht geändert hat



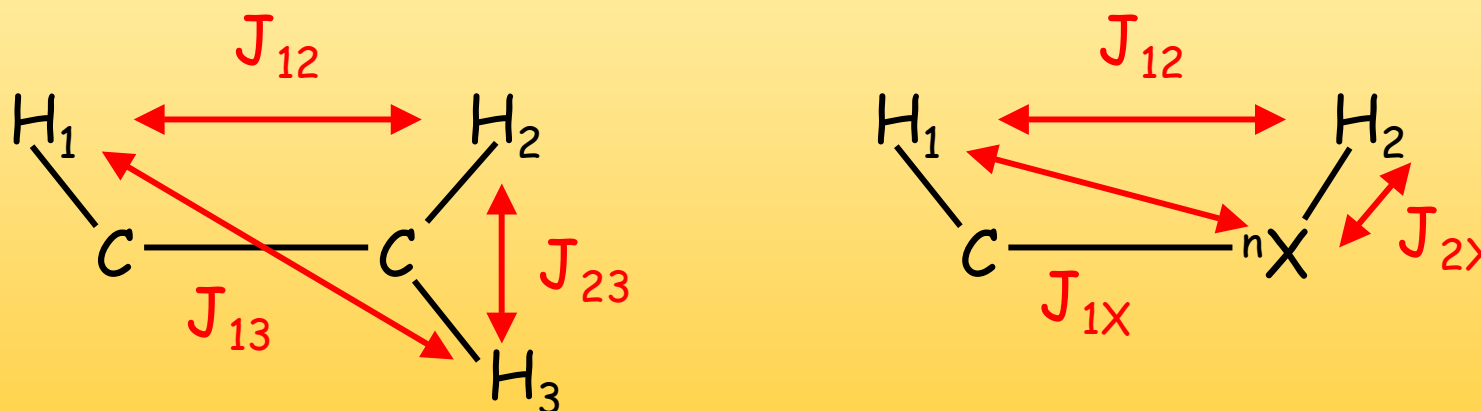
## J-Kopplung: E.COSY



Das wird im homonuklearen E.COSY natürlich nicht passieren, man eliminiert durch den Phasencyclus die Signale des anderen Spinzustandes

## J-Kopplung: E.COSY

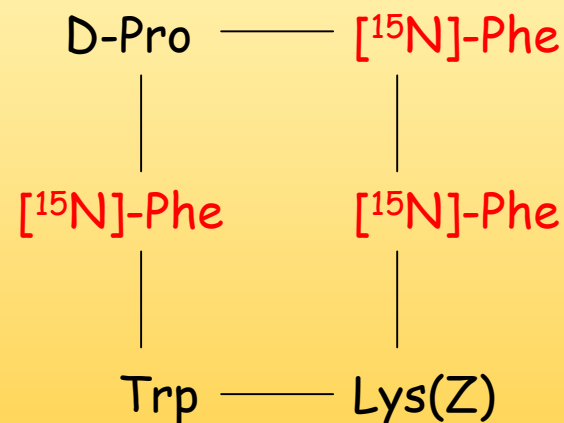
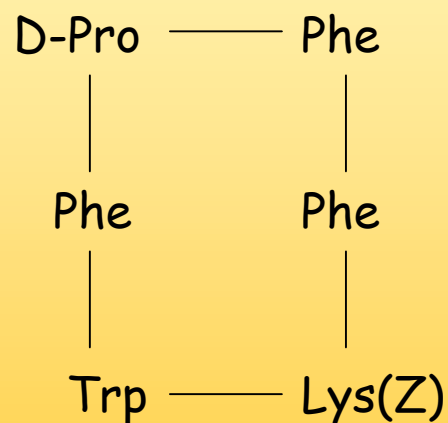
Es ergibt sich also ein E.COSY-Muster, wenn neben zwei miteinander koppelnden Kernen noch ein dritter, ein passiver Spin vorliegt, der zu beiden anderen Kernen eine ausreichend große Kopplung hat, und dieser seinen Spinzustand nicht ändert



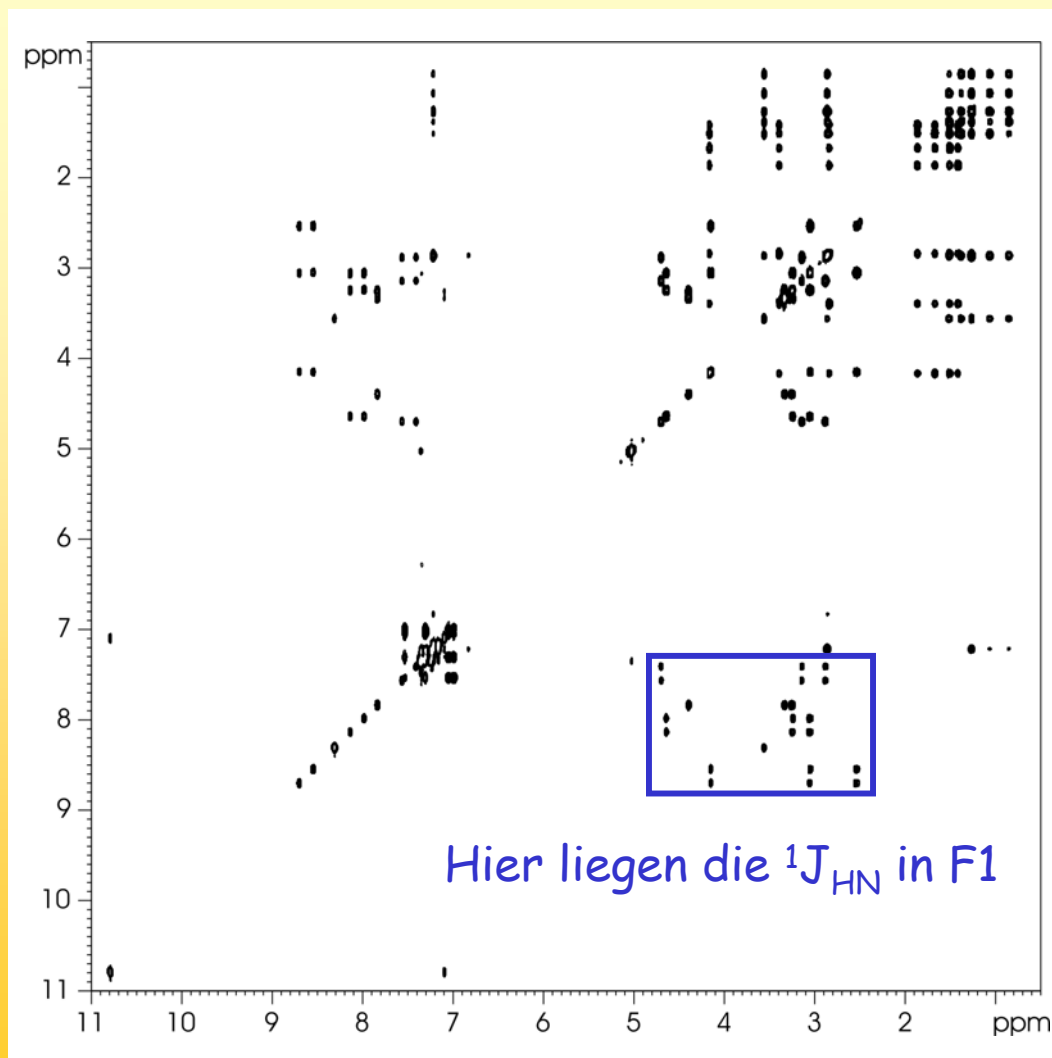
Das muss kein Kern gleicher Sorte sein, es kann auch ein Heterokern sein.

## J-Kopplung: E.COSY

Am einfachsten ist das zu sehen wenn es sich um eine angereicherte Verbindung handelt



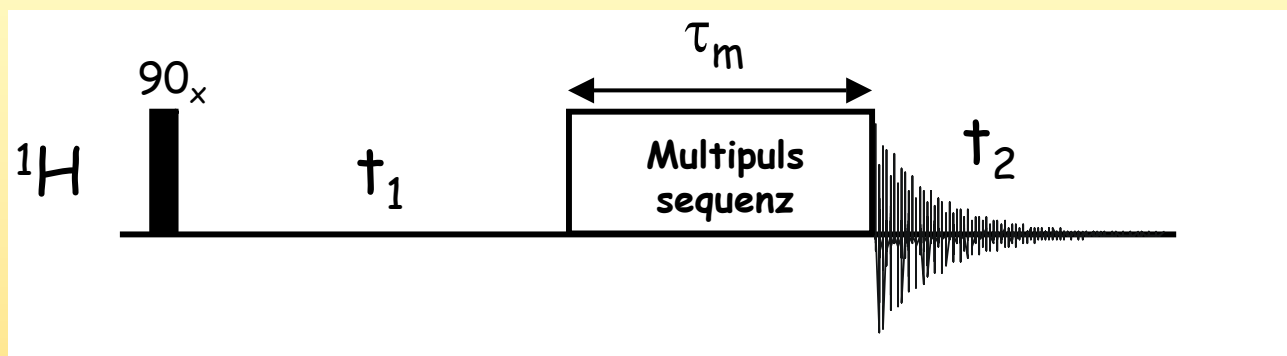
## J-Kopplung: E.COSY



Vergleicht man ein TOCSY von F3-008 ohne und mit Markierung mit  $^{15}\text{N}$  fällt sofort die Aufspaltung im Bereich der Aminoprotonen auf

## J-Kopplung: E.COSY

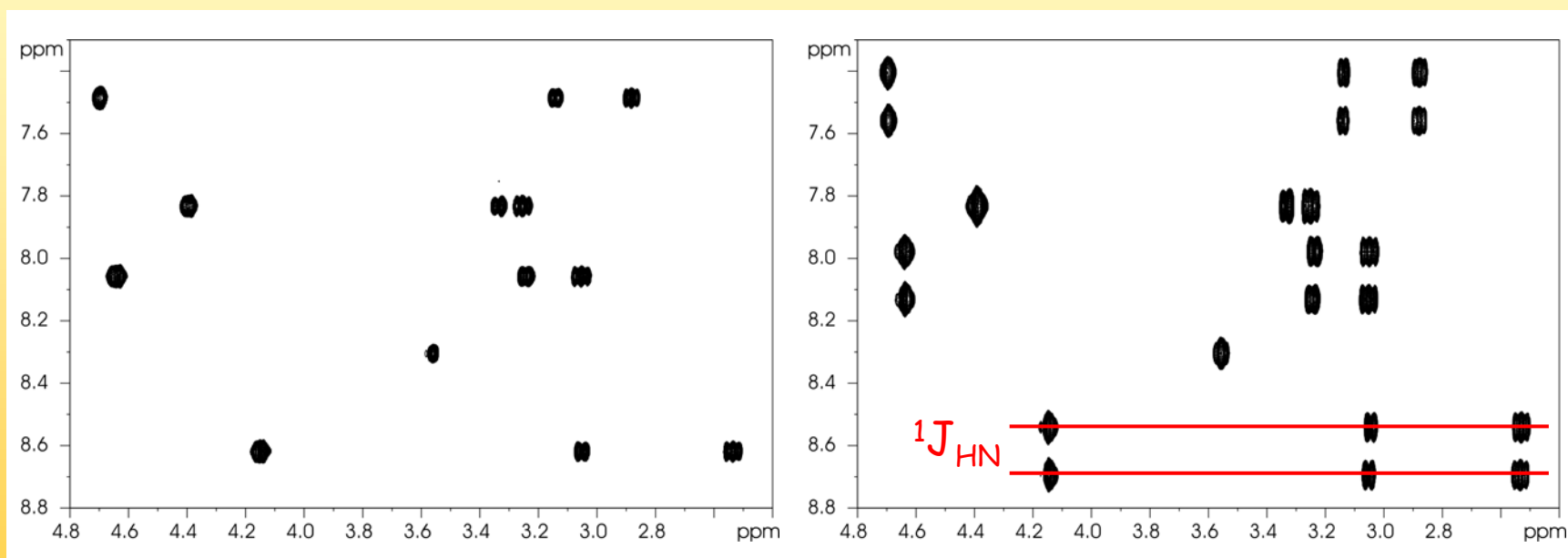
### TOCSY



Während der ganzen Pulssequenz sind die  $^{15}\text{N}$ -Kerne nicht berührt worden, es ist daher anzunehmen, dass die Kerne, die zu Beginn im  $\alpha$ -Zustand waren, es auch am Ende noch sein werden, genauso die im  $\beta$ -Zustand

## J-Kopplung: E.COSY

Man erkennt dann auch schon die „E.COSY-Muster“ in den Kreuzsignalen

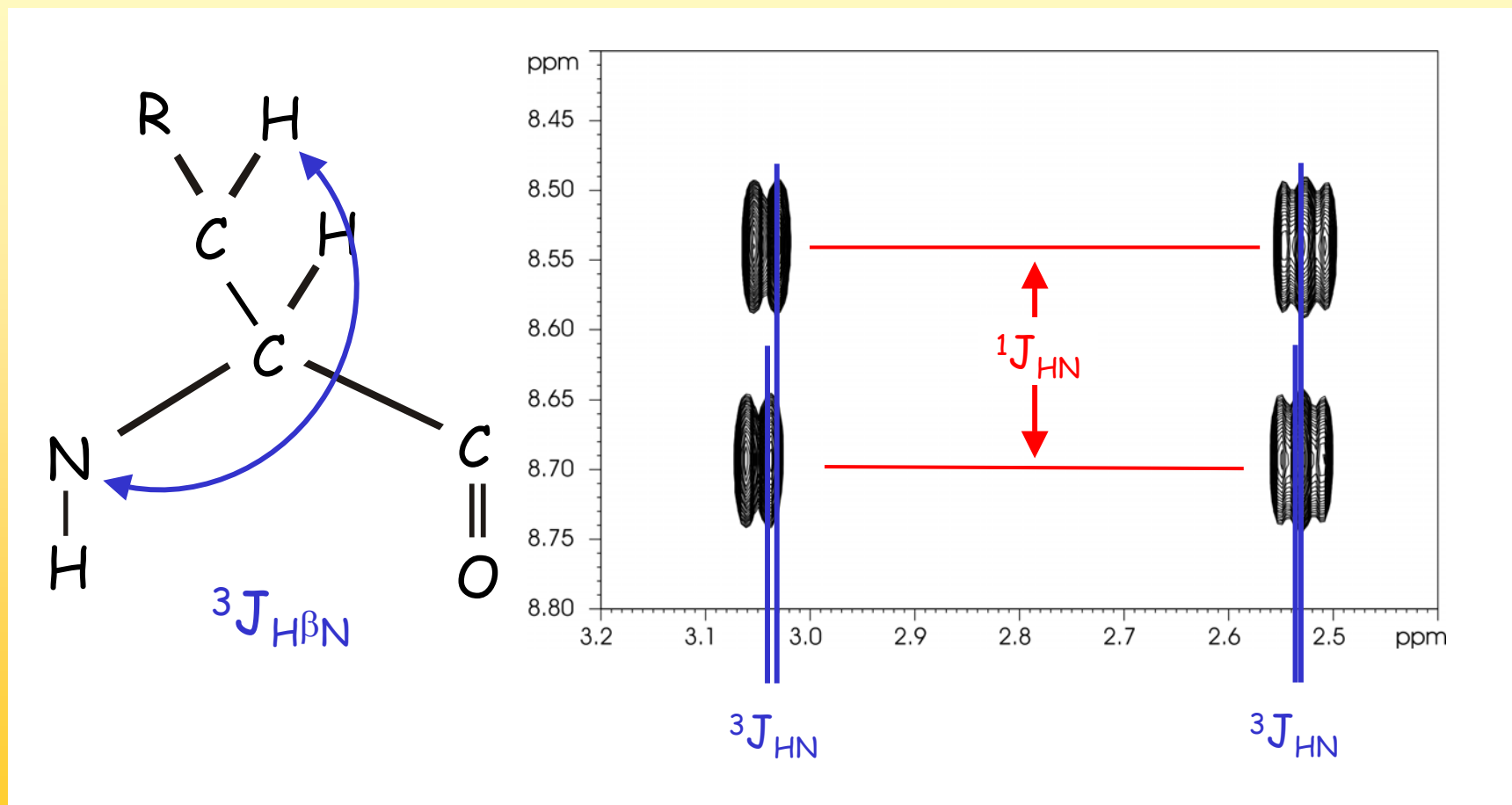


ohne Markierung

mit Markierung

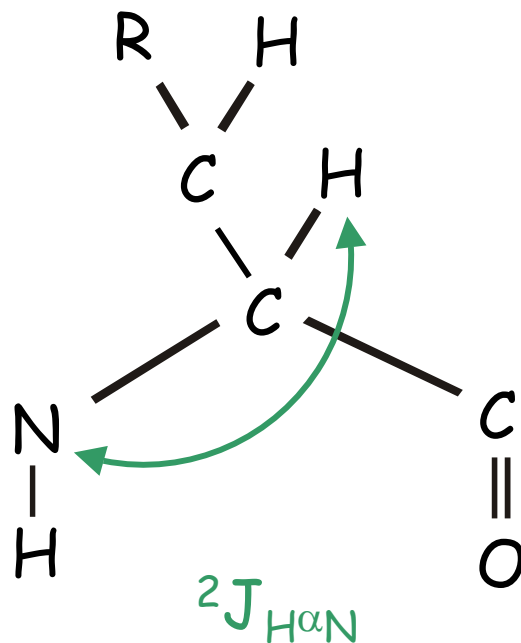
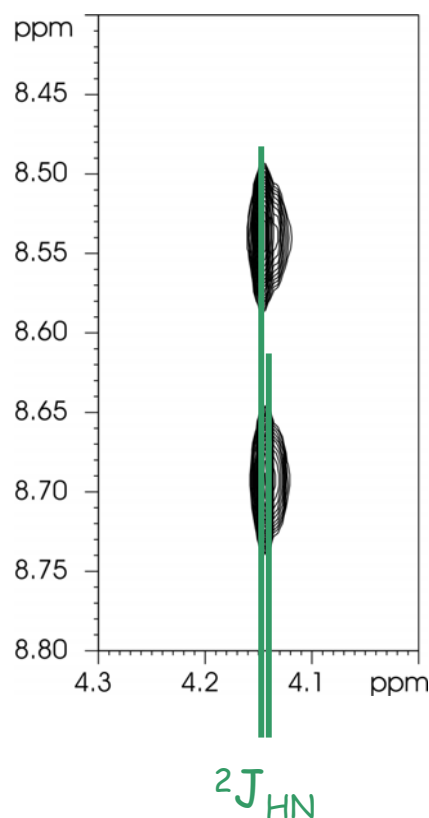
# J-Kopplung: E.COSY

Genauere Betrachtung ergibt die Kopplungskonstanten



## J-Kopplung: E.COSY

Genauere Betrachtung ergibt die Kopplungskonstanten



Die Neigung des E.COSY-Musters lässt auf das Vorzeichen der Kopplungskonstante schließen



## J-Kopplung: E.COSY

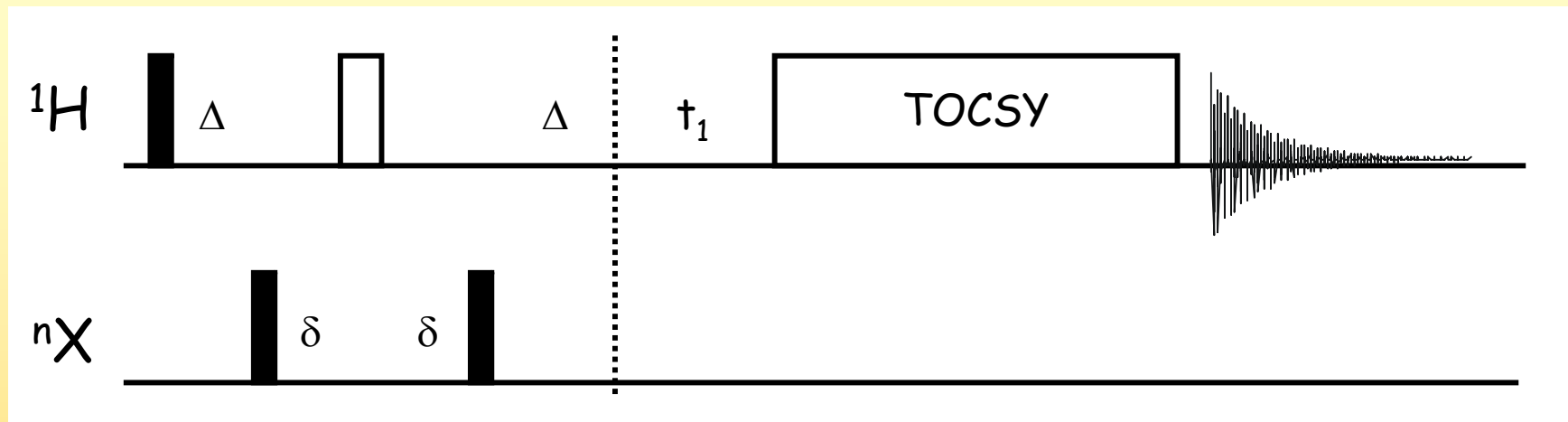
Ohne Markierung sind diese Muster zwar als Satelliten-Spektren im Prinzip vorhanden, aber unmöglich zu detektieren.

In dem Fall muss man also die Signale der Protonen gebunden an Kerne mit dem nicht NMR-aktiven Isotop entfernen, ganz analog zu den heteronuklearen Spektren die wir schon kennen gelernt haben.

Dazu lernen wir ein weiteres Experiment kennen

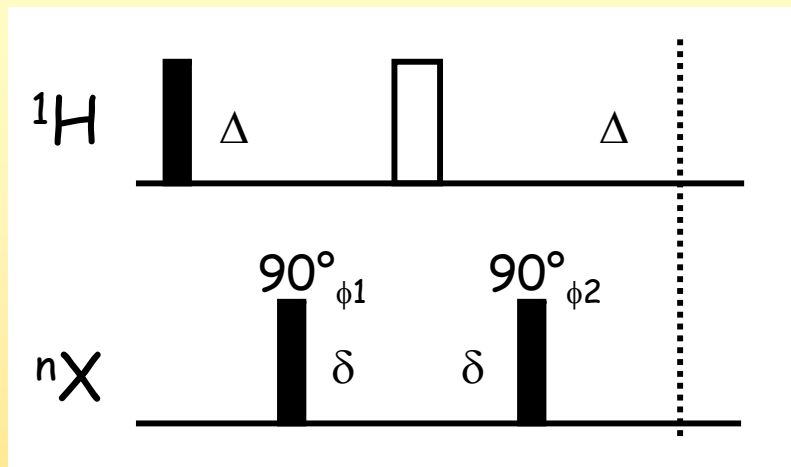
# Das HETLOC

## J-Kopplung: HETLOC



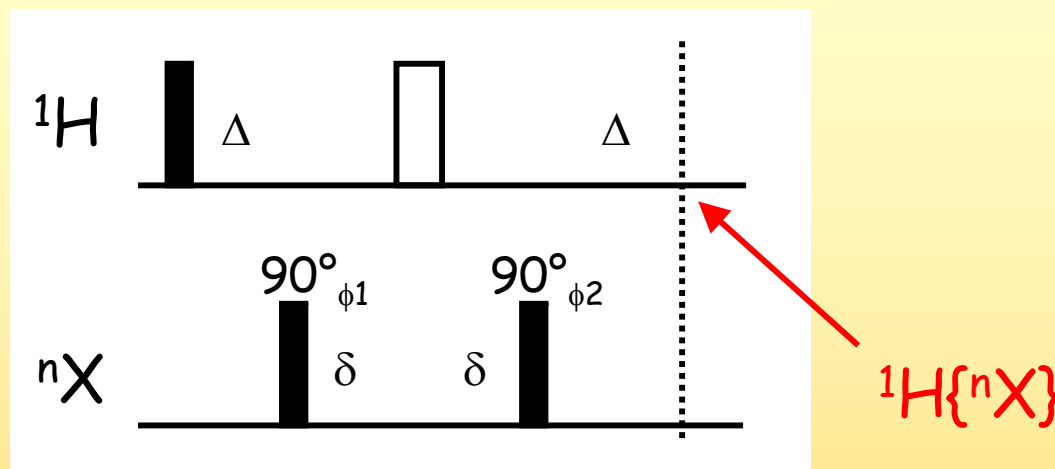
E.COSY-Muster werden im HETLOC-Experiment erzeugt, dass sich eine X-Filter bedient und den mit einem konventionellen TOCSY kombiniert

## J-Kopplung: HETLOC



Der X-Filter entspricht im Prinzip dem HMQC das wir schon gut kennengelernt haben. Die Evolutionszeit des HMQC wird hier aber durch eine feste und sehr kurze Wartezeit  $\delta$  ersetzt.

## J-Kopplung: HETLOC

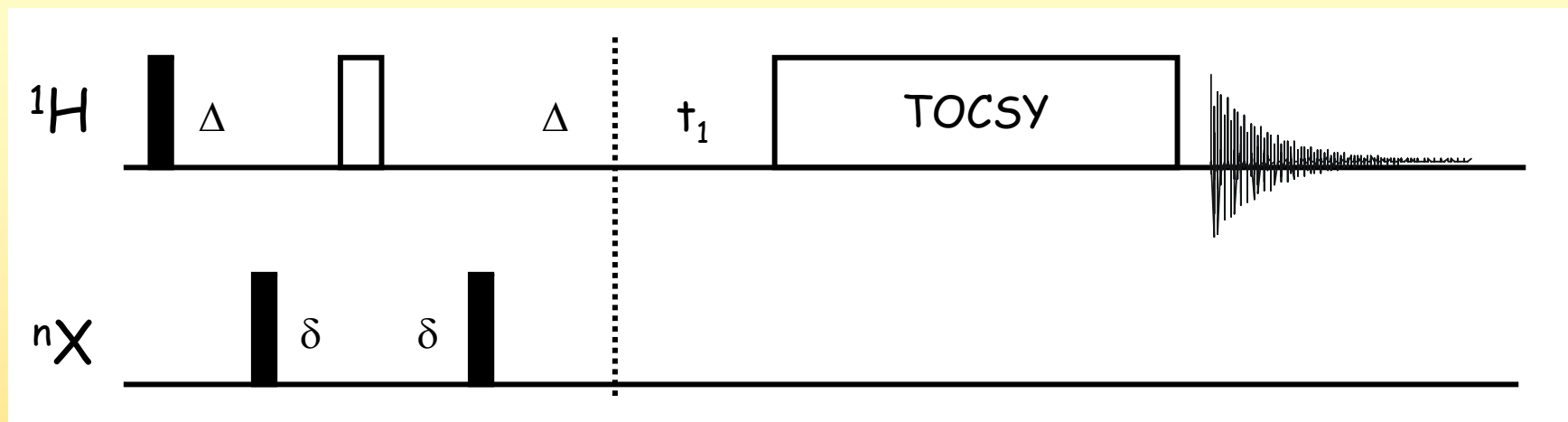


Die Selektion erfolgt über einen Phasencyclus

$$\phi_1 = x, -x, x, -x; \phi_2 = x, x, -x, -x; \phi_{\text{rec}} = +, -, -, +$$

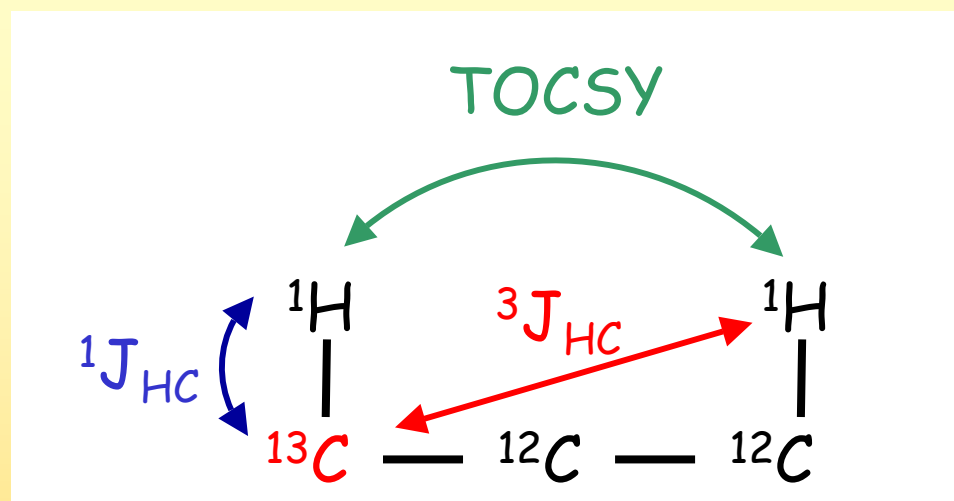
Am Ende liegt in-phase Protonenmagnetisierung vor, wobei sicher ist, dass es Protonen sind, die an X gebunden sind.

## J-Kopplung: HETLOC



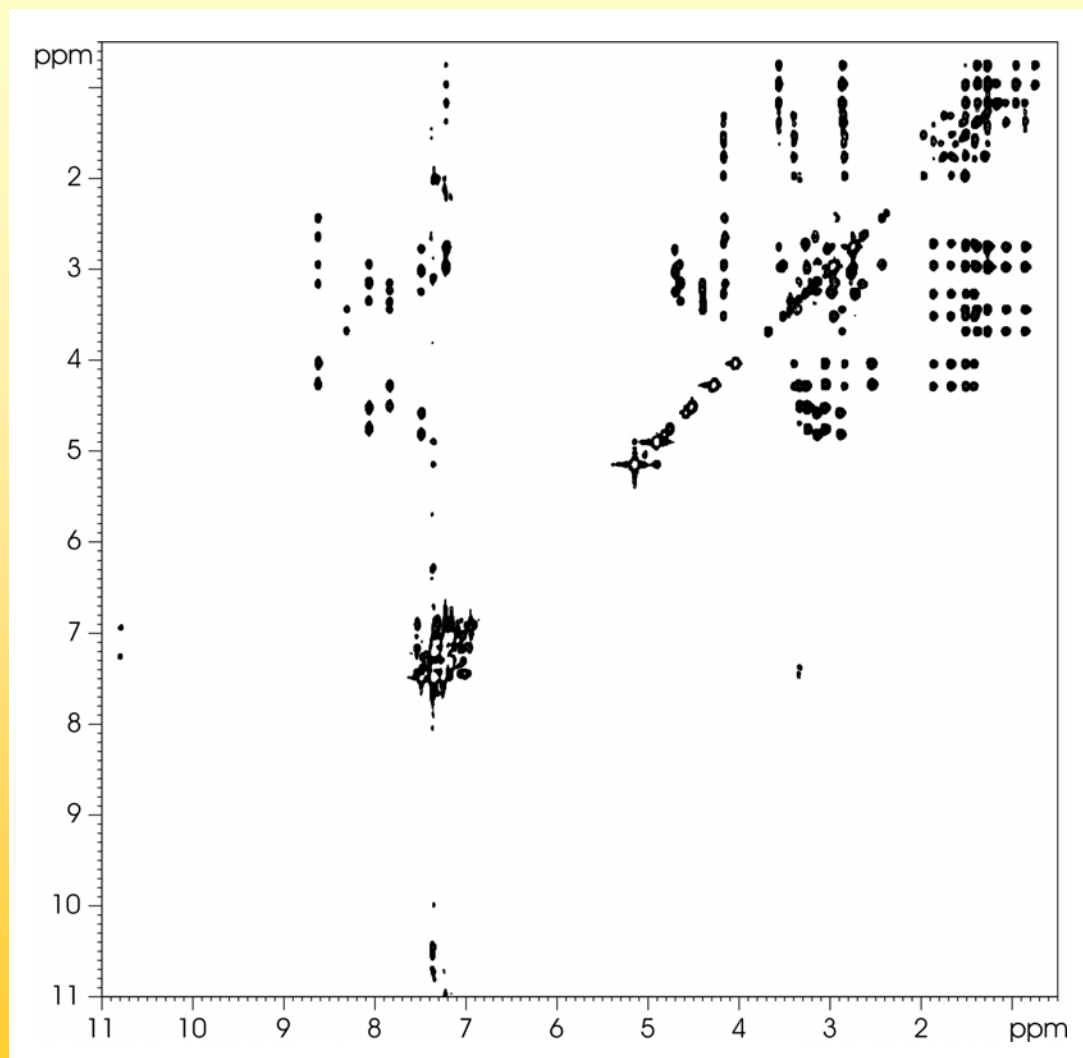
Das TOCSY läuft genauso ab wie wir es kennen, es findet keine heteronukleare Entkopplung statt. Sowohl während  $t_1$  als auch während  $t_2$  ist somit heteronukleare Kopplung aktiv

## J-Kopplung: HETLOC



Während der Mischzeit wird Magnetisierung von einem Kern zum nächsten Übertragen. Der Ausgangskern ist wegen des X-Filters an X-gebunden, der Zielkern wird das also auf keinen Fall sein (natürliche Häufigkeit !!)

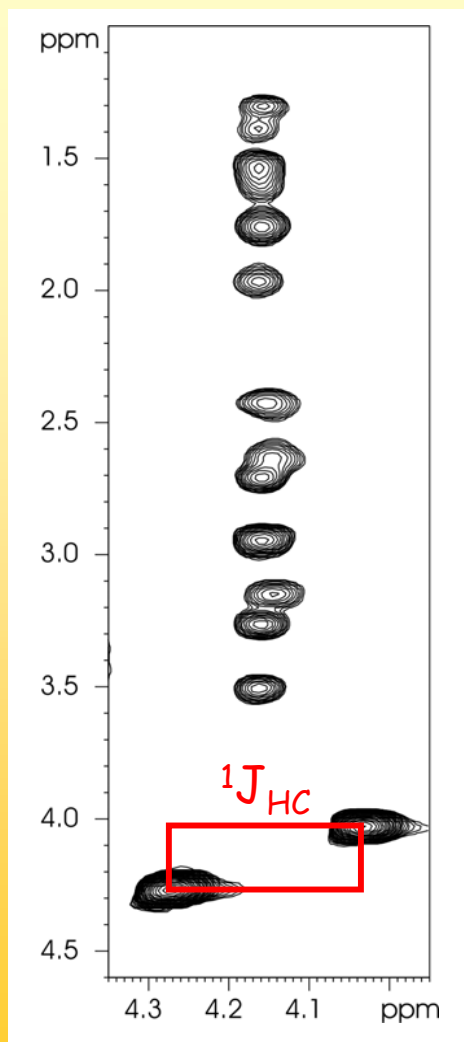
## J-Kopplung: HETLOC



Das HETLOC sieht zunächst dem TOCSY sehr ähnlich, wegen des X-Filters hat man aber in F1 und (zum Teil) in F2 jeweils die Aufspaltung mit der heteronuklearen Kopplung. Signale von Aminoprotonen in F1 gibt es nicht



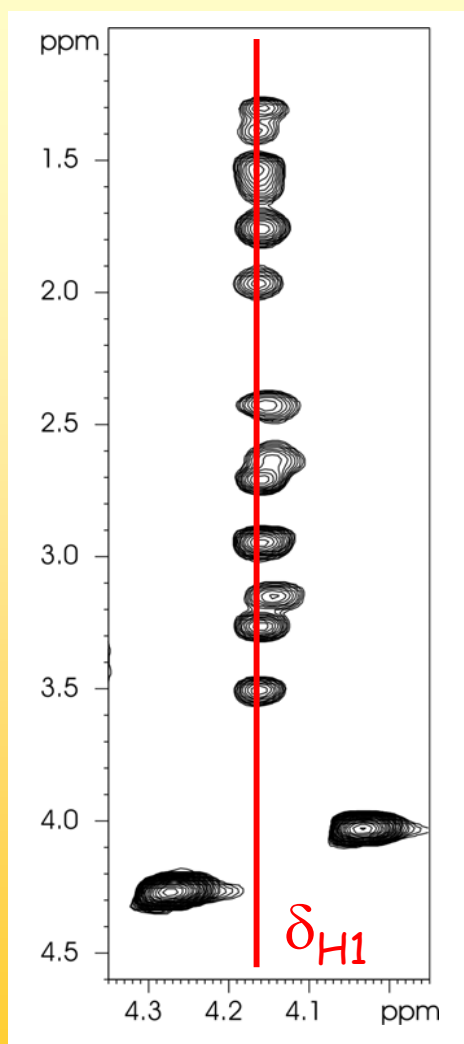
## J-Kopplung: HETLOC



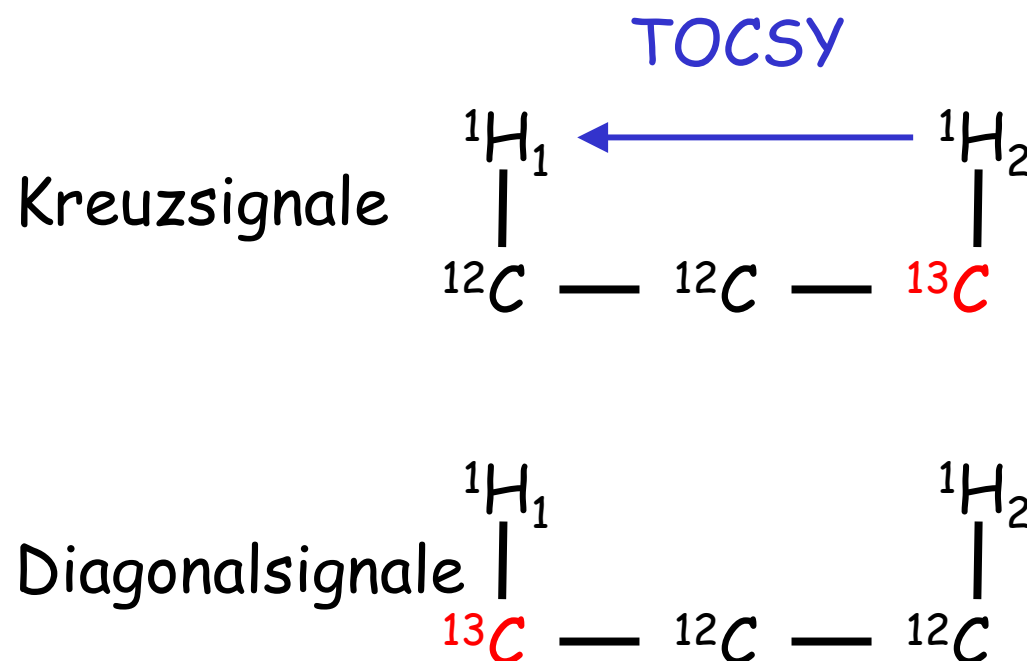
Die E.COSY-Muster zeigen sich in verschieden starker Ausprägung.

An der Diagonale ist die Aufspaltung  $^1J_{\text{HC}}$  in beiden Dimensionen, an den Kreuzsignalen ist sie  $^1J_{\text{HC}}$  in F1 und  $^2/3 J_{\text{HC}}$  in F2.

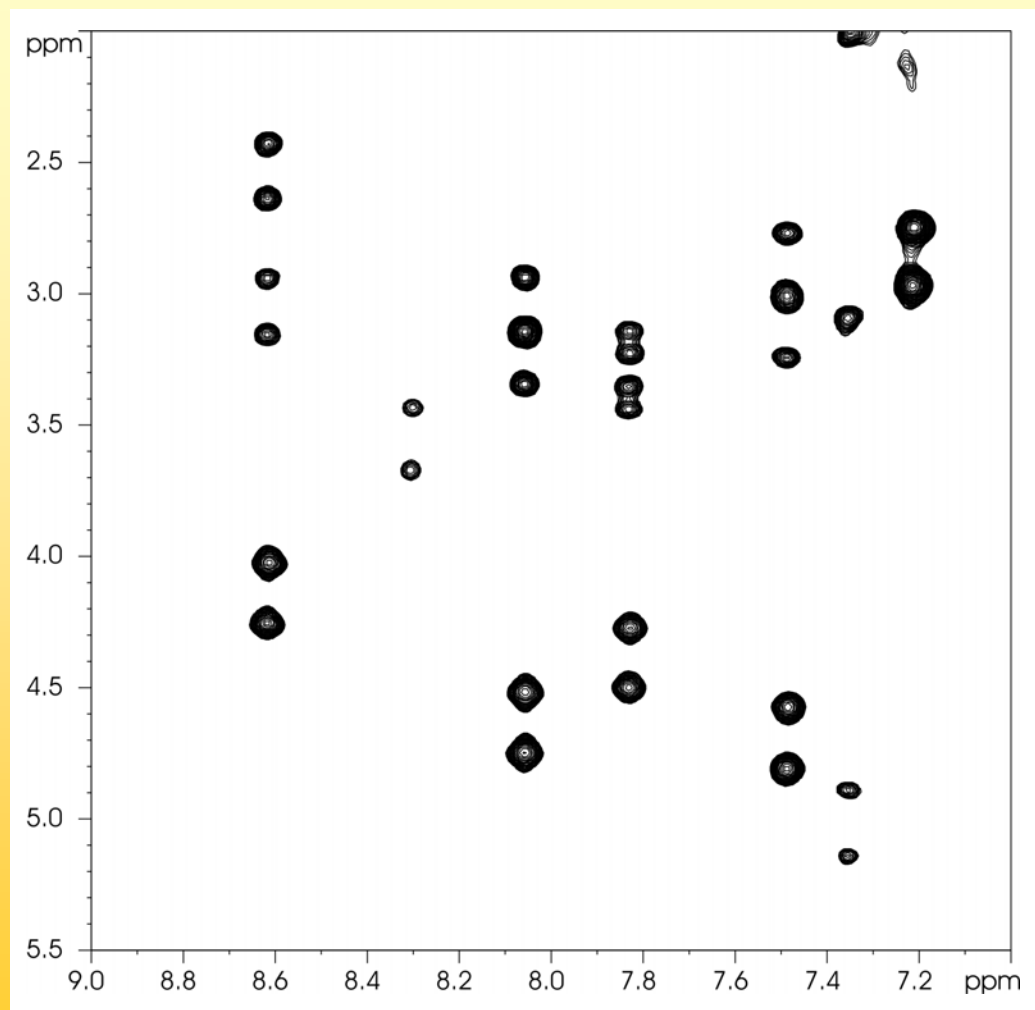
## J-Kopplung: HETLOC



Man erkennt das Kreuzsignale und  
Diagonalsignale unterschiedlich  
„markierten“ Molekülen entstammen

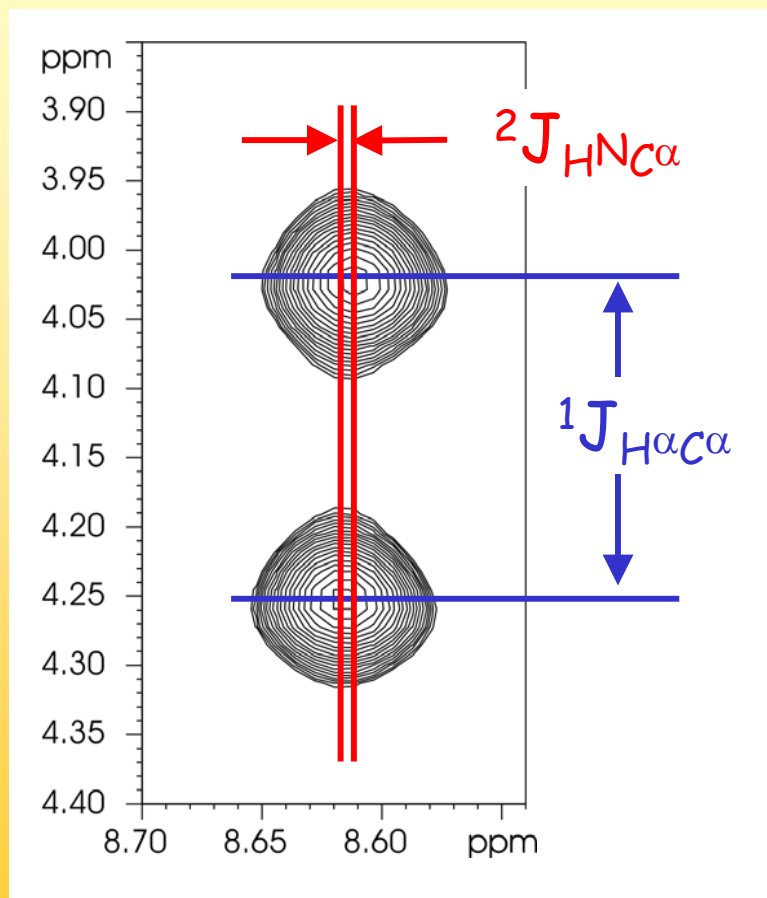


## J-Kopplung: HETLOC

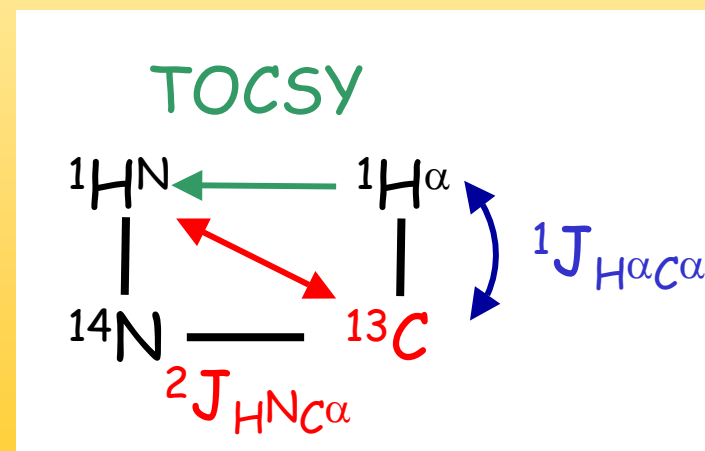


Im  $H^N$ - $H^\alpha/H^\beta$  Bereich  
zeigen die Signale eine  
Aufspaltung in F1 und  
die erwarteten E.COSY  
Muster durch eine  
leichte Aufspaltung in  
F2

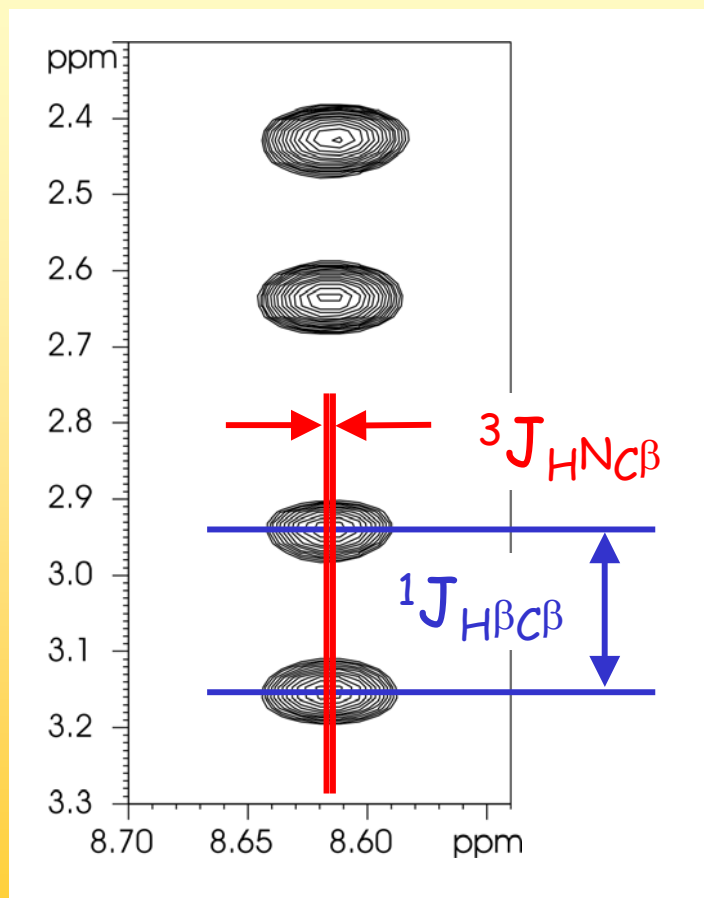
# J-Kopplung: HETLOC



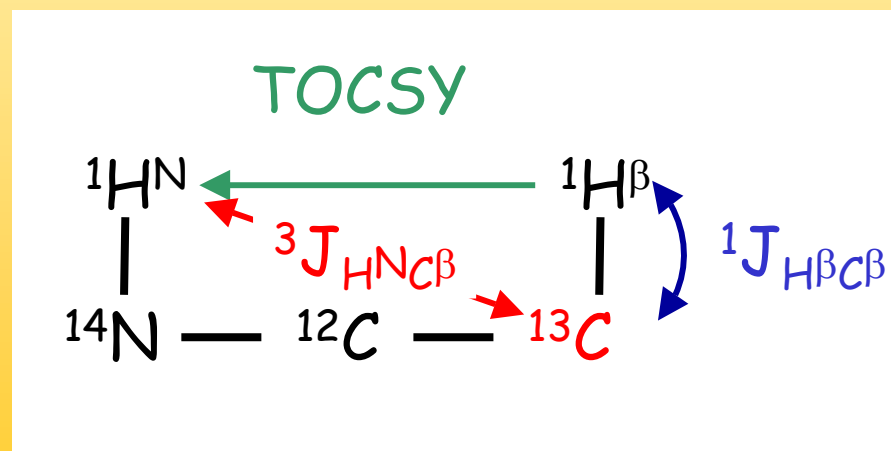
Im  $\text{H}^{\text{N}}\text{-H}^{\alpha}$  Signale ermöglicht das HETLOC die Messung der  $^2J_{\text{HNC}\alpha}$  Kopplung



## J-Kopplung: HETLOC

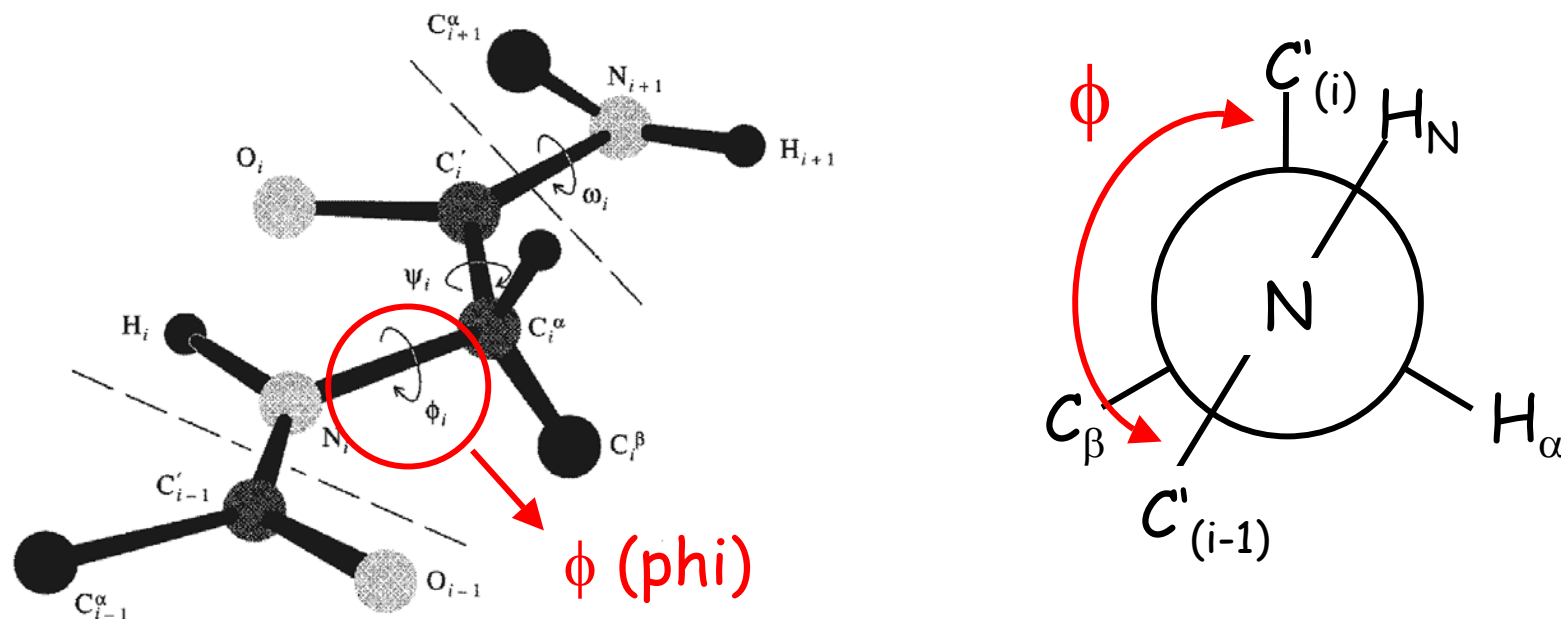


Im  $\text{H}^{\text{N}}\text{-H}^{\beta}$  Signale ermöglicht das HETLOC die Messung der  $^3J_{\text{H}^{\text{N}}\text{C}^{\beta}}$  Kopplung in beiden Kreuzsignalen



## J-Kopplung: HETLOC

Wir hatten gesehen das man mit Kopplungskonstanten den  $\phi$ -Winkel bestimmen kann



## J-Kopplung: HETLOC

Das wollen wir für Trp-5 und Phe-6 in F3-008 anschauen

Trp-5

$^3J_{HN H\alpha}$  aus dem DQF COSY = 8.0 Hz

$^3J_{HN C\beta}$  aus dem HETLOC = 1.5 Hz

$^3J_{HN C'}$  aus dem HMBC = kein peak

$^3J_{H\alpha C'}$  aus dem HMBC = starker peak

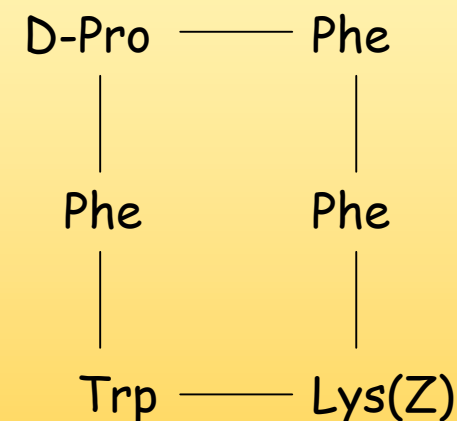
Phe-6

$^3J_{HN H\alpha}$  aus dem DQF COSY = 6.6 Hz

$^3J_{HN C\beta}$  aus dem HETLOC = 0.2 Hz

$^3J_{HN C'}$  aus dem HMBC = peak

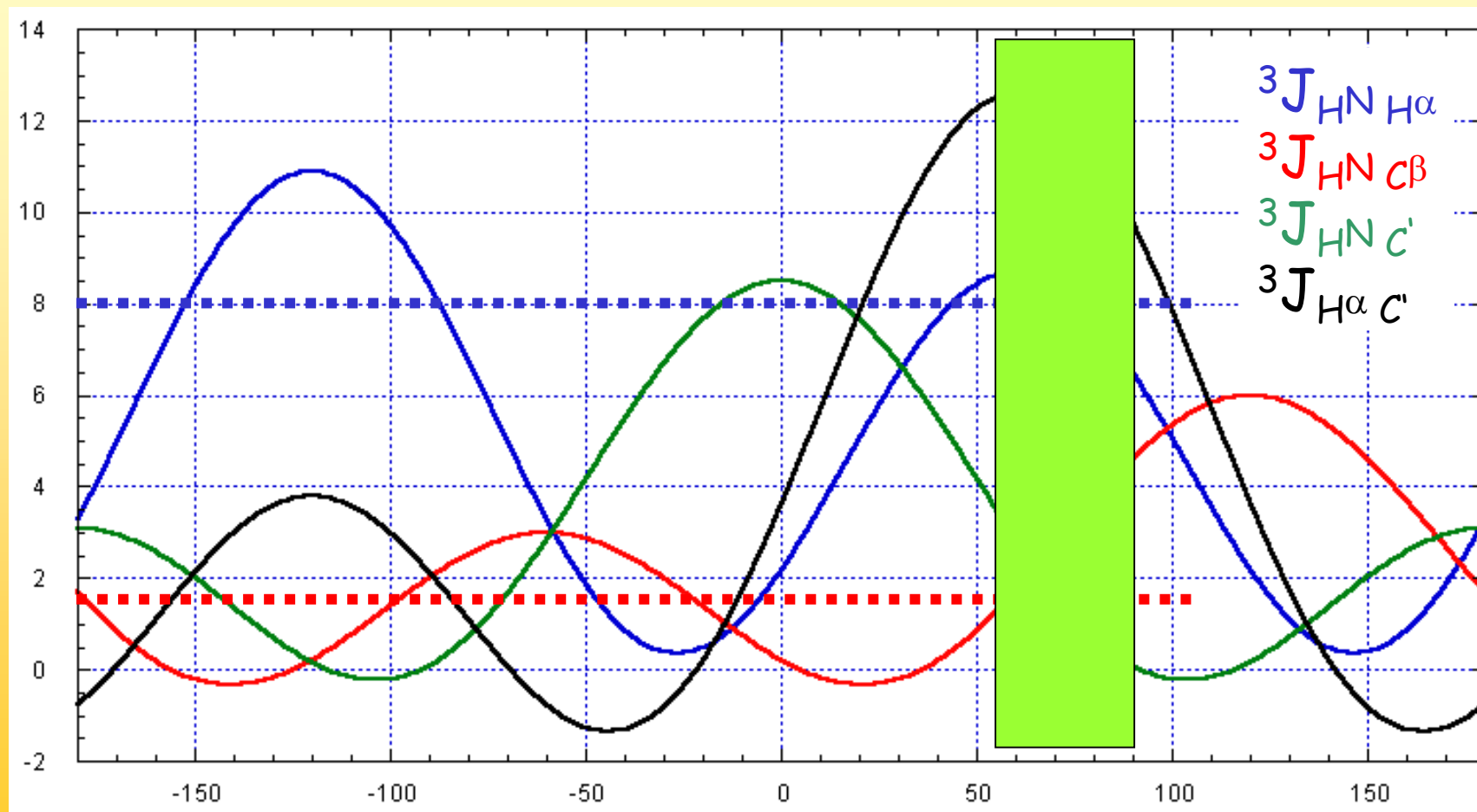
$^3J_{H\alpha C'}$  aus dem HMBC = schwacher peak



# J-Kopplung: HETLOC

Trp-5

$\phi = 70^\circ$

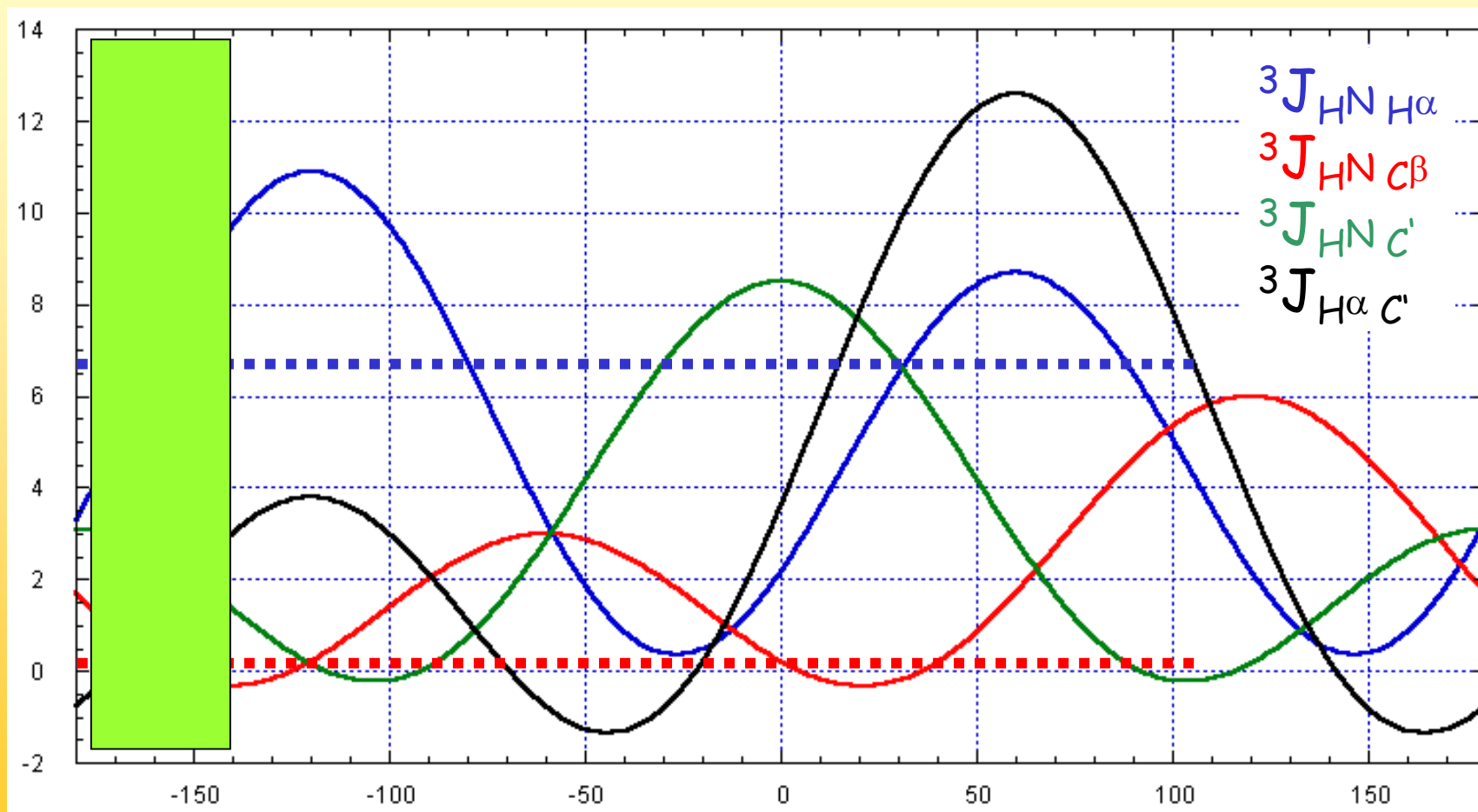




# J-Kopplung: HETLOC

$\phi = -160^\circ$

Phe-6



## Zusammenfassung

Was haben wir uns heute angeschaut:

Kopplungskonstanten und Karpluskurven

Das Problem mit der Linienbreite

Methoden zur Bestimmung von Kopplungskonstanten

unabhängig von der Linienbreite

# That's it for today

Nächstes Mal:  
3D, 4D  
NMR an Proteinen

# Frohe Weihnacht und einen guten Rutsch nach 2008

