

# Beschleunigung und Anwendung grundlegender Experimente in der zweidimensionalen NMR-Spektroskopie

Zur Erlangung des akademischen Grades einer  
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN  
(Dr. rer. nat.)

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften des  
Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)  
genehmigte

DISSERTATION

von

**Dipl.-Chem. Johanna Becker**

KIT-Dekan: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Referent: Prof. Dr. Burkhard Luy

Korreferent: Prof. Dr. Mirko Bunzel

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Februar 2018



# Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die von mir vorgelegte Arbeit selbstständig verfasst habe, dass die verwendeten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, entsprechend kenntlich gemacht sind. Diese Arbeit wird erstmals zur Begutachtung vorgelegt.

Karlsruhe, 4. Mai 2018

---

Johanna Becker





# Publikationsliste

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

1. D. Schulze-Sünninghausen, J. Becker, B. Luy, "Rapid Heteronuclear Single Quantum Correlation NMR Spectra at Natural Abundance", *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 1242-1245 (2014).
2. J. Becker, B. Luy, "CLIP-ASAP-HSQC for fast and accurate extraction of one-bond couplings from isotropic and partially aligned molecules", *Magn. Reson. Chem.* **53** (11), 878-885 (2015).
3. E. Förster\*, J. Becker\*, F. Dalitz, B. Görling, B. Luy, H. Nirschl, G. Guthausen, "NMR Investigations on the Aging of Motor Oils", *Energy & Fuels* **29** (11), 7204-7212 (2015).
4. D. Schulze-Sünninghausen, J. Becker, M. R. M. Koos, B. Luy, "Improvements, Extensions, and Practical Aspects of Rapid ASAP-HSQC and ALSOFASST-HSQC Pulse Sequences for Studying Small Molecules at Natural Abundance", *J. Magn. Reson.* **281**, 151-161 (2017).
5. M. Palomino Schätzlein, J. Becker, D. Schulze-Sünninghausen, A. Pineda-Lucena, J. Raul Herance, B. Luy, "Rapid Two-Dimensional ALSOFASST-HSQC Experiment for Metabolomics and Fluxomics Studies on a <sup>13</sup>C-Enriched Cancer Cell Model treated with Gold Nanoparticles", *Anal. Bioanal. Chem* **410** (11), 2793-2804 (2018).

\* Die gekennzeichneten Autoren trugen zu gleichen Teilen zur Veröffentlichung bei.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Grundlagen</b>	<b>5</b>
2.1	Relaxation . . . . .	5
2.1.1	Longitudinale Relaxation . . . . .	7
2.1.2	Transversale Relaxation . . . . .	9
2.2	Wechselwirkungen in der NMR-Spektroskopie . . . . .	11
2.3	Zweidimensionale Korrelationsexperimente . . . . .	13
2.3.1	Echo-/Antiecho- und Kohärenzordnungsselektion . . . . .	14
2.3.2	Der INEPT-Schritt . . . . .	17
2.3.3	HMQC . . . . .	18
2.3.4	HSQC . . . . .	20
2.3.5	HMBC und HSQMBC . . . . .	21
2.3.6	CLIP-HSQC . . . . .	23
2.3.7	HSQC-TOCSY . . . . .	23
2.4	Schnelle Pulstechniken . . . . .	25
2.4.1	Ernst-Winkel-Anregung . . . . .	26
2.4.2	ASAP- und ALSOFAST-HMQC . . . . .	27
2.5	Sonstige Techniken . . . . .	29
2.5.1	Polarisations- und Kohärenztransfer . . . . .	29
2.5.2	<i>Non Uniform Sampling</i> (NUS) . . . . .	31
<b>3</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>33</b>
3.1	Verwendete Hardware und Software . . . . .	33
3.2	Proben . . . . .	33
3.3	Kopplungsmessungen . . . . .	38
3.4	Akquisitions- und Prozessierungsparameter . . . . .	41
3.4.1	Schnelle Experimente . . . . .	41
3.4.2	Motoröle . . . . .	45

---

3.5	Pulssequenzen . . . . .	48
3.5.1	Vergleichssequenzen . . . . .	49
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>57</b>
4.1	ASAP-HSQC . . . . .	57
4.1.1	Pulssequenzen des ASAP-HSQC . . . . .	58
4.1.2	Erstes Beispielspektrum . . . . .	60
4.1.3	Vergleiche mit konventionell aufgenommenen HSQC-Spektren . . . . .	61
4.1.4	Vergleich der erreichbaren Auflösung von ASAP-HSQC und ASAP-HMQC . . . . .	62
4.1.5	Pulssequenzen des symmetrisierten ASAP-HSQC . . . . .	65
4.1.6	Minimale Experimentzeit . . . . .	68
4.1.7	Hohe Auflösung in minimaler Aufnahmezeit . . . . .	71
4.1.8	Geringe Probenkonzentration . . . . .	71
4.2	CLIP-ASAP-HSQC . . . . .	74
4.2.1	Pulssequenz des originalen CLIP-ASAP-HSQC . . . . .	75
4.2.2	Validierung des Experiments . . . . .	76
4.2.3	Untersuchung teilweise orientierter Proben . . . . .	80
4.2.4	Pulssequenz des symmetrisierten CLIP-ASAP-HSQC . . . . .	84
4.2.5	Untersuchung mit reduzierter Messzeit . . . . .	85
4.3	ASAP-HSQC-TOCSY . . . . .	89
4.3.1	Pulssequenz des schnellen ASAP-HSQC-TOCSY . . . . .	91
4.3.2	Schnell aufgenommenes HSQC-TOCSY-Spektrum . . . . .	93
4.3.3	Hochaufgelöstes HSQC-TOCSY-Spektrum . . . . .	93
4.3.4	Pulssequenzen der ASAP-HSQC-TOCSY-IPAP-Experimente . . . . .	95
4.3.5	Bestimmung der ${}^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten von Glucose . . . . .	97
4.4	Schnelle Messung von ${}^{13}\text{C}$ -Spektren . . . . .	101
4.4.1	Pulssequenz des modifizierten IMPACT-HMBC . . . . .	104
4.4.2	${}^{13}\text{C}$ -Projektion des modifizierten IMPACT-HMBC . . . . .	105
4.4.3	Pulssequenzen der schnellen HSQMBC-Experimente . . . . .	107
4.4.4	Vergleiche der ${}^{13}\text{C}$ -Projektionen der schnellen HSQMBC-Spektren . . . . .	109
4.5	Untersuchung von Motorölen . . . . .	114
4.5.1	Protonen-1D-Spektren . . . . .	117
4.5.2	Integrale der ${}^1\text{H}$ -1D-Spektren . . . . .	119
4.5.3	Linienbreiten, Diffusions- und Relaxationsmessungen . . . . .	120

4.5.4	$^{13}\text{C}$ -1D-Spektren der Motoröle . . . . .	124
4.5.5	Zweidimensionale Spektren der Motoröle . . . . .	124
<b>Zusammenfassung</b>		<b>131</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>		<b>137</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>		<b>141</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>		<b>143</b>
<b>Literatur</b>		<b>149</b>
<b>Anhang</b>		<b>169</b>
A	CLIP-ASAP-HSQC Vergleichsspektren . . . . .	169
B	HSQC-TOCSY-IPAP Vergleichsspektren . . . . .	173
C	2D-Spektren der HSQMBC-Experimente . . . . .	174
D	Pulsprogramme für Spektrometer der Firma Bruker . . . . .	180
D.1	Originales ASAP/ALSOFAST-HSQC . . . . .	180
D.2	Symmetrisiertes ASAP/ALSOFAST-HSQC . . . . .	186
D.3	Originales CLIP-ASAP/ALSOFAST-HSQC . . . . .	191
D.4	Symmetrisiertes CLIP-ASAP/ALSOFAST-HSQC . . . . .	197
D.5	ASAP-HSQC-TOCSY-IP . . . . .	202
D.6	ASAP-HSQC-TOCSY-AP . . . . .	208
D.7	schnelles HSQMBC . . . . .	213
<b>Danksagung</b>		



# 1. Einleitung

Die Kernresonanz-Spektroskopie (engl. *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR)) ist durch ihre Vielfältigkeit und ständige Weiterentwicklung zu einer der bedeutendsten Analysemethoden der Strukturuntersuchung von Molekülen in Lösung geworden [1]. Ihre Anwendbarkeit erstreckt sich über viele verschiedene Disziplinen. Das gleiche physikalische Prinzip liegt dem bildgebenden Verfahren MRT (Magnetresonanztomographie) in der Medizin zugrunde [2–4]. Bei beiden Methoden werden schwache elektromagnetische Ströme detektiert, die durch die Wechselwirkung von Radiowellen (RF) mit den Atomkernen der untersuchten Probe in einem äußeren, starken Magnetfeld hervorgerufen werden. Im Gegensatz zum MRT werden in der NMR-Spektroskopie keine makroskopischen Bilder gemessen, sondern die atomaren Eigenschaften von Molekülen mit Hilfe von ein- oder mehrdimensionalen Spektren untersucht.

Besitzen Atomkerne einen Kernspin  $I$  der von Null verschieden ist, resultiert daraus ein magnetisches Moment. Gemessen wird dann die Wechselwirkung dieses magnetischen Moments mit einem externen Magnetfeld, in das die Probe eingebracht wird. Beruhend auf der Abschirmung durch die magnetischen Momente der umgebenden Bindungselektronen (chemische Verschiebung) oder durch Wechselwirkung der Atomkerne untereinander (zum Beispiel dipolare Kopplung oder skalare Kopplung) können wichtige Informationen über die Bindungssituation und -orientierung, die Elektronendichte oder die intramolekularen Abstände erhalten werden [5–7]. Daraus lassen sich Konstitution, Konformation und Konfiguration des untersuchten Moleküls ableiten [8]. Eines der Haupteinsatzgebiete findet sich daher in der Chemie, darüber hinaus erlaubt die NMR-Spektroskopie jedoch auch die Charakterisierung von Molekülen in der Biochemie, Biologie, sowie den Ernährungs- und Materialwissenschaften [9–15]. Beispielsweise ist es möglich, Strukturen biologischer Moleküle, darunter Proteine oder Peptide, aufzuklären. Zwei Bereiche, in denen die NMR-Spektroskopie ebenso immer wichtiger wird, ist das Forschungsgebiet *Metabolomics*, die Untersuchung von Metaboliten zur Charakterisierung biologischer Systeme und deren Unterschiede zueinander [16]. Eng verwandt damit ist die Charakterisierung komplexer Gemische, die gerade in der Qualitätskontrolle verschiedenster löslicher Produkte eine immer größere

Rolle spielt [17–25].

Eine grundsätzliche Problematik bei der Interpretation der NMR-Spektren ist die Unterscheidung einzelner Signale. Insbesondere in eindimensionalen Protonen-Spektren sind die Signale häufig überlagert. Durch die Erweiterung auf zweidimensionale Experimente wird eine zusätzliche Dimension erhalten, entlang derer eng beieinander liegende Signale voneinander getrennt werden können [26, 27]. Auf diese Weise wird eine eindeutige Zuordnung der Resonanzen ermöglicht und entsprechende chemische und andere Fragestellungen können mit erhöhter Aussagekraft beantwortet werden [28].

In dieser Arbeit wurden mehrere Aspekte behandelt, die im Folgenden kurz skizziert werden. Ein Teil ist die Demonstration der Leistungsfähigkeit der NMR-Spektroskopie durch Verwendung verschiedener NMR-Methoden zur Untersuchung der Ölalterung unterschiedlicher Motoröle. Durch die Aufnahme eindimensionaler Protonen- und Kohlenstoffspektren, sowie diverser zweidimensionaler Experimente konnten chemische Prozesse charakterisiert werden, welche im Rahmen der Alterung auftreten. Die Erweiterung auf zweidimensionale Spektren bietet den bereits erwähnten Vorteil der besseren Signaldispersion. Weiterhin wurden Relaxations- und Diffusionsexperimente durchgeführt, um eine umfassende Interpretation der Gemische zu erhalten. Eines der übergeordneten Ziele dieses Teils der Arbeit ist es, einen Indikator für die Ölalterung zu finden, der die Notwendigkeit eines Ölwechsels anzeigt, mit dem Ziel, Kosten für nicht erforderliche Ölwechsel zu vermeiden. Zum Anderen ist die Kenntnis der chemischen Zusammensetzung die Grundvoraussetzung für effizientes Recycling gebrauchter Motoröle.

Ein fundamentaler Aspekt bei der Anwendung der NMR-Spektroskopie in der Analytik sind die hohen Betriebskosten der Spektrometer. Die kostenintensive Messzeit soll also möglichst effizient genutzt werden. Bei mehrdimensionalen Experimenten wird die zusätzliche Dimension durch Wiederholung der zugehörigen Pulssequenz mit stufenweise erhöhten Inkrementen erhalten. Die Auflösung wird durch die Anzahl der Inkremente bestimmt. Je höher die gewünschte Auflösung ist, desto länger ist die benötigte Gesamtdauer zur Aufnahme des Experiments. Die Messzeit ist daher häufig ein limitierender Faktor bei der Aufnahme hochaufgelöster zweidimensionaler Spektren. In dieser Arbeit werden mehrere neue Ansätze vorgestellt, durch den die Gesamtdauer zweidimensionaler, heteronuklearer Experimente, die auf der *Heteronuclear Single-Quantum Coherence spectroscopy* (HSQC)-Sequenz basieren, drastisch reduziert wird. Die *Acceleration by Sharing Adjacent Polarization* (ASAP)-HSQC-Experimente bieten durch die hohe Wiederholrate die Möglichkeit, vollständige  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren von Proben kleiner Moleküle mit natürlicher  $^{13}\text{C}$ -Häufigkeit in kurzer



Zeit und ohne Einschränkungen hinsichtlich spektraler Breite oder Auflösung aufzunehmen. Die Anwendbarkeit literaturbekannter Methoden [29–41], die ebenfalls die beschleunigte Aufnahme mehrdimensionaler, heteronuklearer Korrelationsspektren ermöglichen, ist dagegen eingeschränkt.

Die neue beschleunigte Methode ist auch auf die Bestimmung von dipolaren Restkopplungen (RDCs *Residual Dipolar Couplings*) anwendbar. Diese sehr wertvollen NMR-Parameter können durch Untersuchung teilweise orientierter Proben gewonnen werden. Sie erleichtern die Aufklärung der Konformation [42–50], relativen Konfiguration [51–59] und der Konstitution [60] von Molekülen und ermöglichen sogar die Bestimmung des Enantiomerenüberschusses [61, 62] durch Verwendung eines chiralen Orientierungsmediums. Das *Clean Inphase* (CLIP)-HSQC ist vermutlich das meist genutzte Experiment zur Bestimmung der dipolaren Restkopplungen zwischen Kohlenstoff und Protonen entlang einer Bindung ( $^1D_{\text{CH}}$ -Kopplungen). Es wird verwendet, um  $\omega_2$ -gekoppelte Spektren aufzunehmen. Die Ermittlung der Kopplungskonstanten ist mit Hilfe dieses Experiments besonders exakt, da die Korrelationssignale nicht durch Antiphase-Anteile verzerrt sind. Dieser Aspekt wird besonders dann wichtig, wenn dipolare Restkopplungen [63–65] bestimmt werden sollen. Durch Kombination der CLIP-HSQC Pulssequenz [66] mit dem ASAP-Ansatz wurde hier eine beschleunigte Aufnahme der zugehörigen Spektren ermöglicht [67].

Eine dem ASAP-HSQC sehr ähnliche Pulssequenz ist das HSQC-TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*). Im Rahmen dieser Arbeit wurden daraufhin die Pulssequenzen des ASAP-HSQC-TOCSY und der ASAP-HSQC-TOCSY-IPAP-Experimente (Inphase/Antiphase) entwickelt. Durch die Beschleunigung der Spektrenaufnahme können HSQC-TOCSY-Spektren in kürzester Zeit erhalten werden. Die Spektren enthalten  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -Korrelationssignale, sowie Signale der  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -Kopplungspartner des über die skalaren  $J_{\text{HH}}$ -Kopplungen verbundenen Protonen-Netzwerkes. Das Experiment ist daher besonders bei der Untersuchung eines Substanzgemisches oder eines Moleküls mit mehreren getrennten Kopplungsnetzwerken nützlich. Beispielsweise können Protonen unterschiedlicher kleiner Moleküle leicht identifiziert werden. Auf Basis der ASAP-HSQC-TOCSY-Pulssequenz werden die ASAP-HSQC-TOCSY-IPAP-Experimente vorgestellt, die die Bestimmung weitreichender heteronuklearer Kopplungen ( $^nJ_{\text{CH}}$ ) ermöglichen.  $^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungen besitzen große Bedeutung in der Strukturaufklärung von organischen Molekülen. Das Experiment ermöglicht die Aufnahme der beiden komplementären Datensätze, dem IP- und dem AP-Spektrum in kurzer Zeit. Die  $^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungen können aus dem Vergleich der Summe und der Differenz der beiden Teilspektren vorzeichenempfindlich ermittelt werden.

Zuletzt werden schnelle HSQMBC-Experimente (*Heteronuclear Single Quantum Multiple Bond Correlation spectroscopy*) vorgestellt, die zur effizienten Aufnahme von Kohlenstoff-Spektren genutzt werden. Aus den heteronuklearen zweidimensionalen Spektren werden  $^{13}\text{C}$ -Projektionen abgeleitet, die als Äquivalent zu eindimensionalen  $^{13}\text{C}$ -Spektren dienen. Die 2D-Experimente, die einen Magnetisierungstransfer enthalten, besitzen gegenüber dem eindimensionalen Experiment einige Vorteile. Diese Vorteile werden für spezifische Anwendungen genutzt. Ein Vergleich anhand der Spektren von Coffein zeigt eine erheblich gesteigerte Signalintensität der  $^{13}\text{C}$ -Projektion gegenüber dem  $^{13}\text{C}$ -1D-Spektrum vor allem für quartäre Kohlenstoffatome, deren Detektion meist besonders wichtig und gleichermaßen schwierig ist. Kapitel 4.4 beschreibt die Einführung der zweidimensionalen Experimente, die alternativ zu einem  $^{13}\text{C}$ -1D-Experiment verwendet werden können, sowie detaillierte Vergleiche der Spektren unter Berücksichtigung aller Vor- und Nachteile der Sequenzen.

Auf diese Einleitung folgt die Einführung in die theoretischen Grundlagen der Themen dieser Dissertation. Die Spektrometer, die grundsätzlich eingestellten Parameter der gezeigten Experimente und die verwendeten Proben werden in Kapitel 3 beschrieben. Zusätzlich wird die Vorgehensweise zur Bestimmung der Kopplungskonstanten erläutert. Die Ergebniskapitel 4.1, 4.2, 4.3 und 4.4 zeigen den Kern der Forschungsarbeiten, die Vorstellung und Charakterisierung der entwickelten schnellen Pulssequenzen und deren Optimierungen, bevor in Kapitel 4.5 eine Untersuchung der Alterung von Motorölen mit Hilfe der NMR-Spektroskopie vorgestellt wird. Alle neu eingeführten Experimente erlauben die beschleunigte Aufnahme zugehöriger Spektren fast ohne Einschränkungen hinsichtlich der Spektrenqualität. Es schließen sich umfassende Vergleiche der Spektren, die mit den entwickelten neuen Sequenzen erhalten wurden und der mit konventionellen Experimenten aufgenommenen Spektren an. Somit wird das Potenzial der deutlich beschleunigten zweidimensionalen Experimente aufgezeigt, die die NMR-Spektroskopie an kleinen Molekülen nachhaltig beeinflussen dürfte.

## 2. Grundlagen

Dieses Kapitel dient als Einführung der notwendigen Grundlagen zum Verständnis der vorgestellten Ergebnisse. Zunächst wird der Begriff der Relaxation erläutert. Im Zusammenhang der Experimente mit kurzer Messzeit ist vor allem die longitudinale Relaxationszeit ( $T_1$ -Relaxation) von Bedeutung. Auch bei der Untersuchung der Motoröle wurden Relaxationszeiten ermittelt, um ein umfassendes Bild der Bestandteile der zu charakterisierenden Öle zu erhalten. Weiterhin werden anisotrope Parameter eingeführt, grundlegende Pulssequenzbausteine vorgestellt, sowie der Kontext bereits existierender schneller zweidimensionaler NMR-Experimente geschaffen.

### 2.1. Relaxation

Jeder Atomkern mit einem von Null verschiedenen Kernspin  $\vec{I}$  (zum Beispiel  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) besitzt ein magnetisches Moment  $\vec{\mu}$ , stellt also einen magnetischen Dipol dar.

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{I} \quad (2.1)$$

$\gamma$  ist das gyromagnetische Verhältnis, eine kernspezifische Größe, welche Hinweise über die NMR-Empfindlichkeit eines Kerns liefert. In einem externen Magnetfeld sind Spins mit der Quantenzahl  $I = \frac{1}{2}$  entweder parallel oder antiparallel zur Richtung des externen Feldes ausgerichtet. Die Ausrichtungen entsprechen zwei Energieniveaus. Die Energiedifferenz

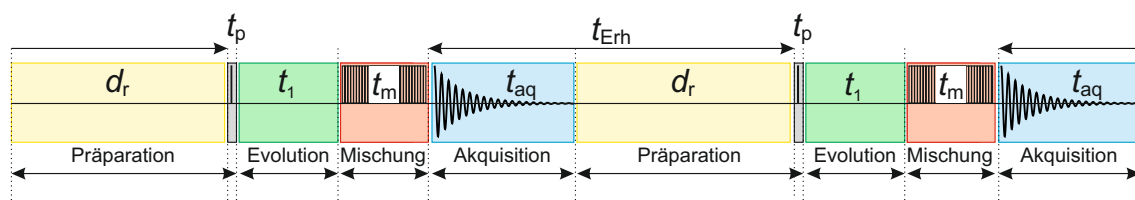
$$\Delta E = h\nu_0 = \gamma \hbar B_0 \quad (2.2)$$

zwischen diesen Niveaus ist vergleichsweise gering, wobei  $\hbar$  das reduzierte Plancksche Wirkungsquantum und  $\omega_0$  die Larmorfrequenz

$$\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (2.3)$$

ist. Sie gibt an, bei welcher Frequenz  $\nu_0$  Resonanz eintritt, also Energieübergänge stattfinden. Die Energiedifferenz zwischen den beiden Niveaus beträgt für Protonen 240 mJ/mol bei einer Magnetfeldstärke von 14,09 T, beziehungsweise einer Larmorfrequenz von 600 MHz.

Im Gleichgewichtszustand ist das energieärmere Niveau höher besetzt. Der Besetzungsunterschied ist gemäß der Boltzmann-Verteilung abhängig von der Magnetfeldstärke des externen Magnetfeldes, der Temperatur und dem gyromagnetischem Verhältnis  $\gamma$  der Spins. Die Summe aller magnetischen Momente wird als makroskopische Magnetisierung bezeichnet. Die parallel (longitudinal) zum externen Magnetfeld ausgerichtete Magnetisierung  $M_z$  besitzt im Gleichgewichtszustand ihren maximalen Wert  $M_0$ . Durch Einstrahlen eines zusätzlichen Magnetfeldes, dem Radio-Frequenz-Puls, wird das thermische Gleichgewicht gestört. Ein  $180^\circ$ -Puls hat eine Inversion des Besetzungsverhältnisses zur Folge, während ein  $90^\circ$ -Puls transversale, detektierbare Magnetisierung erzeugt. Nach Beendigung der Störung wird der Gleichgewichtszustand durch longitudinale Relaxation, beschrieben durch die  $T_1$ -Zeit, wieder erreicht, das Spinsystem kehrt in den Ausgangszustand zurück. Neben der longitudinalen Relaxation oder auch Spin-Gitter-Relaxation gibt es einen zweiten Relaxationsprozess, die  $T_2$ -Relaxation oder auch Spin-Spin-Relaxation. Sie beschreibt die Dephasierung der kohärenten Spins. In der NMR-Spektroskopie laufen Relaxationsprozesse vergleichsweise langsam ab. Die Lebensdauer eines elektronischen Zustands beispielsweise beträgt nur einige Mikrosekunden, während der Wiederaufbau der Gleichgewichtsmagnetisierung einige Millisekunden bis Sekunden oder sogar Minuten dauert [68]. Die langsame Relaxation bietet sowohl Vorteile als auch Nachteile. Vorteilhaft ist, dass erzeugte transversale Magnetisierung solange bestehen bleibt, dass eine lange Messung der Kohärenzen ermöglicht wird. Der Nachteil langsamer Relaxation ist, dass die longitudinale Relaxation eine Untergrenze definiert, mit der die Experimente wiederholt werden können. Auf diese Weise ist auch die Empfindlichkeit eines NMR-Experiments von der Relaxation abhängig. Weiterhin bestimmt die  $T_2^*$ -Zeit die Linienbreite des Signals. Das Signal ist umso breiter, je schneller der *Free Induction Decay* (FID) mit  $T_2^*$  abfällt.



**Abbildung 2.1:** Grundsätzliches Schema eines 2D-Experiments, das aus zwei *scans* aufgebaut ist.

In Abbildung 2.1 ist das grundsätzliche Schema eines aus zwei *scans* aufgebauten, zweidimensionalen Experiments gezeigt. Ein *scan* besteht aus vier Bausteinen, der Präparation mit der Länge  $d_r + t_p$ , der Evolution, während der die Zeitperiode  $t_1$  inkrementiert wird, der Mischung mit  $t_m$  und der Akquisition mit  $t_{aq}$ . Die Erholzeit  $t_{Erh}$  zwischen der Aufnahme

zweier *scans* setzt sich aus dem Erholungs-*delay*  $d_r$  und der Akquisitionszeit  $t_{\text{aq}}$  zusammen. Während der Erholzeit  $t_{\text{Erh}}$  erfolgt der Wiederaufbau der Gleichgewichtsmagnetisierung durch die  $T_1$ -Relaxation. Dadurch besitzt die Erholzeit  $t_{\text{Erh}}$  im Allgemeinen einen großen Anteil an der Gesamtexperimentzeit.

Relaxation tritt durch die Wechselwirkung der Spins untereinander auf. Ein einzelner Spin ist also nicht isoliert zu betrachten, sondern ist eingebettet in seine Umgebung. Die Umgebung wird historisch auch als Gitter bezeichnet. Die Relaxation wird dann durch fluktuierende magnetische Felder verursacht, die von der thermischen Bewegung der Moleküle hervorgerufen werden, die als rotatorische Diffusion bezeichnet wird. Es können verschiedene Relaxationsmechanismen unterschieden werden. Ein Mechanismus ist die dipolare Kopplung. Weitere Quellen für fluktuierende lokale Felder sind die chemische Verschiebungsanisotropie CSA (*Chemical Shift Anisotropy*), die Spin-Rotation, die skalare Kopplung und die Quadrupolkopplung [69].

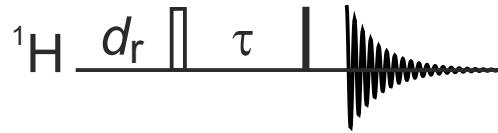
Im Zusammenhang der Entwicklung der Experimente mit kurzer Messzeit ist vor allem die longitudinale Relaxation wichtig. Die in Kapitel 2.4 vorgestellten existierenden schnellen Methoden beruhen auf der Verkürzung der Erholzeit  $t_{\text{Erh}}$ . In Kapitel 4.5 werden longitudinale Relaxationszeit ( $T_1$ )-Zeiten ermittelt, um Informationen über die Molekülbeweglichkeit und das damit verbundene Molekulargewicht zu erhalten.

### 2.1.1. Longitudinale Relaxation

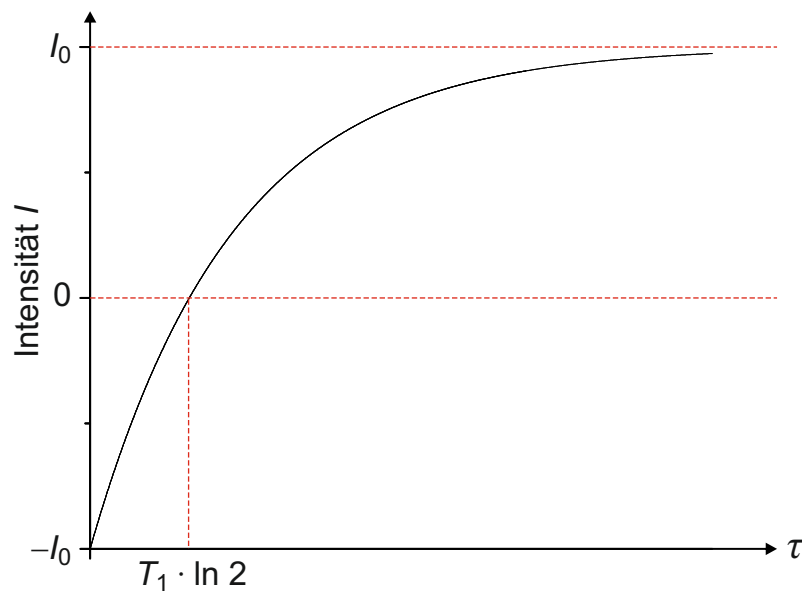
Der Prozess des Wiederaufbaus der Gleichgewichtsmagnetisierung nach Störung wird durch

$$\frac{dM_z(t)}{dt} = \frac{-M_z(t) + M_{z,0}}{T_1} \quad (2.4)$$

beschrieben.  $\frac{dM_z(t)}{dt}$  ist die Ableitung der zeitabhängigen  $z$ -Komponente der Magnetisierung  $M_z$  nach der Zeit  $t$ ,  $M_{z,0}$  stellt die  $z$ -Komponente der Magnetisierung zum Zeitpunkt  $t = 0$  dar.  $(T_1)^{-1}$  wird auch mit  $R_1$  abgekürzt und stellt die Relaxationsrate dar. Die Messung der  $R_1$ -Relaxationsraten erfolgt durch die Aufnahme von *Inversion-Recovery*-Experimenten. Die Pulssequenz des Experiments ist in Abbildung 2.2 dargestellt. Die Magnetisierung wird durch den  $180^\circ$ -Puls zu Beginn der Sequenz invertiert. Durch Relaxation baut sich die  $z$ -Magnetisierung während  $\tau$  wieder auf. In Abbildung 2.3 ist die Signalintensität gegen die variable Zeit  $\tau$  aufgetragen. Der  $90^\circ$ -Puls erzeugt transversale Magnetisierung, die als FID detektiert wird. Die Signalintensität hängt vom Anteil der  $z$ -Magnetisierung ab, die vor dem  $90^\circ$ -Puls wieder aufgebaut wurde. Die  $T_1$ -Zeiten werden durch Anpassung der



**Abbildung 2.2:** Pulssequenz eines *Inversion-Recovery*-Experiments zur Ermittlung der  $T_1$ -Zeiten. Das breite, ungefüllte Rechteck zu Beginn des Experiments entspricht einem  $180^\circ$ -Puls, der schmale Balken einem  $90^\circ$ -Puls. Die Zeitperiode  $\tau$  wird schrittweise inkrementiert.



**Abbildung 2.3:** Verlauf der Signalintensität beim *Inversion-Recovery*-Experiment. Der Verlauf der Intensität entspricht der in Gleichung 2.5 angegebenen exponentiellen Funktion.

Funktion

$$f(\tau) = I_0 \cdot \left[ 1 - 2 \cdot \exp\left(\frac{-\tau}{T_1}\right) \right] \quad (2.5)$$

an die Messpunkte  $f(\tau)$ , die den Wiederaufbau der  $z$ -Magnetisierung beschreiben, erhalten.  $I_0$  beschreibt die maximale Signalintensität, die nach der Inversion für  $\tau = 0$  den negativen Wert  $-I_0$  annimmt. Für schrittweise größer werdende Werte von  $\tau$  nähert sich die Signalintensität exponentiell dem positiven Maximalwert  $I_0$ . Die ermittelten  $T_1$ -Zeiten sind nur dann verlässlich, wenn die Erholzeit  $t_{\text{Erh}}$  lang genug gewählt wurde, um den Wiederaufbau der Gleichgewichtsmagnetisierung zu garantieren. Sie sollte daher ein Vielfaches (bis zu etwa  $5 \cdot T_1$ ) der longitudinalen Relaxationszeit  $T_1$  betragen.

### 2.1.2. Transversale Relaxation

Der Prozess der transversalen Relaxation ist für längere Sequenzen, wie sie in Kapitel 4.4 vorgestellt werden, relevant. In Kapitel 4.5 werden  $T_2$ -Zeiten ermittelt, um Informationen über die Moleküldynamiken zu erhalten. Durch die  $T_2$ -Relaxation verlieren die Spins ihre Phasenkohärenz zueinander. Dafür sind zwei Mechanismen verantwortlich, der nicht-sekulare Beitrag und der sekulare Beitrag. Der nicht-sekulare Beitrag wird durch fluktuierende lokale Magnetfelder hervorgerufen, die durch thermische Bewegung der Moleküle verursacht werden. Besitzen diese eine transversale Komponente und präzedieren mit der spezifischen Larmorfrequenz, wirken sie ähnlich wie ein Puls mit der Phase  $x$  oder  $y$ . Die Spins werden statistisch um diese transversalen Felder rotiert und fächern auf. Der sekulare Beitrag wird dadurch verursacht, dass sich die  $z$ -Komponente des lokal am Kernort effektiv vorliegenden Magnetfelds unterscheidet. Dafür gibt es zwei Quellen. Eine davon liegt in der endlichen Ausdehnung der Probe begründet. Wenn das externe Magnetfeld  $B_0$  über dieses Volumen nicht konstant ist, präzedieren selbst chemisch äquivalente Kerne mit leicht unterschiedlicher Larmorfrequenz. Der andere Effekt tritt erneut durch die fluktuierenden Magnetfelder auf. Die  $z$ -Komponenten der veränderlichen Magnetfelder tragen ebenfalls zum effektiv wirkenden Magnetfeld bei und variieren dadurch leicht die lokalen Resonanzfrequenzen. Nach einem  $90^\circ$ -Puls führen alle diese Effekte zum Auffächern der Spins und einem Abfall der transversalen Magnetisierung mit der Zeitkonstanten  $T_2^*$ .  $T_2^*$  definiert die Linienbreite eines Signals. Werden Effekte wie Magnetfeldinhomogenitäten durch eine geeignete Sequenz (siehe Abbildung 2.4) refokussiert, wird die wirkliche  $T_2$ -Zeit erhalten. Die zeitliche Änderung der transversalen Magnetisierungskomponenten  $M_x$  und  $M_y$  kann durch

$$\frac{dM_x(t)}{dt} = \frac{-M_x}{T_2} \quad (2.6)$$

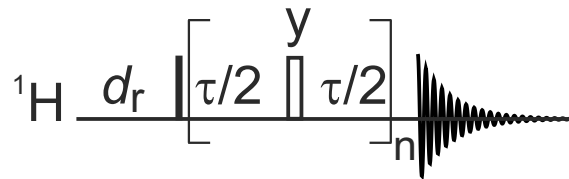
$$\frac{dM_y(t)}{dt} = \frac{-M_y}{T_2} \quad (2.7)$$

beschrieben werden.  $\frac{dM_x(t)}{dt}$  und  $\frac{dM_y(t)}{dt}$  sind die jeweiligen Ableitungen der zeitabhängigen x- oder y-Komponenten der Magnetisierung  $M_x$  oder  $M_y$  nach der Zeit  $t$ .  $(T_2)^{-1}$  wird auch mit  $R_2$  abgekürzt und stellt die Relaxationsrate dar, entsprechend ist  $(T_2^*)^{-1} = R_2^*$ . Der FID  $S(t)$  fällt mit  $R_2^*$  gemäß

$$S(t) = S(0) \cdot \exp(i\Omega t) \exp(-R_2^* t) \quad (2.8)$$

exponentiell ab.  $\Omega$  beschreibt die Resonanzfrequenz,  $S(0)$  die Amplitude. Die Fourier-Transformation des zeitabhängigen Signals liefert dann ein Spektrum, dessen Signale eine gewisse Linienbreite aufweisen, die durch  $R_2^*$  bedingt ist. Je größer  $R_2^*$ , das heißt also je kleiner die  $T_2^*$ -Zeit, desto breiter die Linien. Die transversale Relaxation kann ein limitierender Faktor für NMR-Experimente darstellen, da die erzielbare Auflösung von der Linienbreite abhängt.

Ein Experiment, das zur Bestimmung der  $T_2$ -Zeiten dienen kann, ist die *Carr-Purcell-Meiboom-Gill* (CPMG)-Sequenz [70] aus Abbildung 2.4.



**Abbildung 2.4:** Pulssequenz des CPMG-Experiments zur Ermittlung der  $T_2$ -Zeiten. Der schmale Balken stellt einen  $90^\circ$ -Puls dar. In der Mitte der variablen Zeitperiode  $\tau$  wird dann ein  $180^\circ$ -Puls der Phase  $y$  angewandt. Dieses Element wird auch als Spin-Echo bezeichnet.

Der  $90^\circ$ -Puls zu Beginn des Experiments erzeugt zunächst transversale Magnetisierung. In der darauf folgenden Zeitperiode  $\tau/2$  findet Relaxation statt. In der Mitte der variablen Zeitperiode  $\tau$  wird dann ein  $180^\circ$ -Puls der Phase  $y$  angewandt. Dieses Element wird auch als Spin-Echo bezeichnet. Dadurch wird die Magnetisierung in der transversalen Ebene refokussiert, und zwar unabhängig von der Länge des *delays*  $\tau$  und dem Offset. Die Signalintensität des detektierten Signals nimmt jedoch mit der  $T_2$ -Relaxation ab. Die Anzahl  $n$  der Wiederholungen des Spin-Echo-Elements bestimmt den Abfall der Signalintensitäten. Für jede Wiederholung wird ein eindimensionales Spektrum aufgenommen. Die  $T_2$ -Zeiten werden dann durch Anpassung der Funktion

$$f(\tau) = I_0 \cdot \exp\left(\frac{-\tau}{T_2}\right) \quad (2.9)$$

an die gemessenen Signalintensitäten ausgewertet, wobei  $I_0$  die maximale Signalintensität ist. Durch die Vielzahl der  $180^\circ$ -Pulse bei  $n$  Wiederholungen werden auch Inhomogenitäten des



externen Magnetfeldes  $B_0$  kompensiert, und die Messung ist nicht durch Austauschprozesse oder Diffusion verfälscht. Ein großes Problem ist in dieser Sequenz die homonukleare Kopplungsentwicklung, welche jedoch in der CPMG-PROJECT (Periodic Refocusing of J Evolution by Coherence Transfer)-Sequenz refokussiert wird [71].

## 2.2. Wechselwirkungen in der NMR-Spektroskopie

Spektren von Molekülen in Lösung zeigen unter anderem die Position der Signale und ihre Feinaufspaltung. Die dazugehörigen NMR-Parameter werden als chemische Verschiebung und skalare Kopplung bezeichnet. Die skalare beziehungsweise  $J$ -Kopplung, zeigt sich im Spektrum in Form unterschiedlicher Multiplizitäten der Signale. Der Hamiltonoperator eines skalar gekoppelten Zweispinsystem unterschiedlicher Resonanzfrequenz ist durch

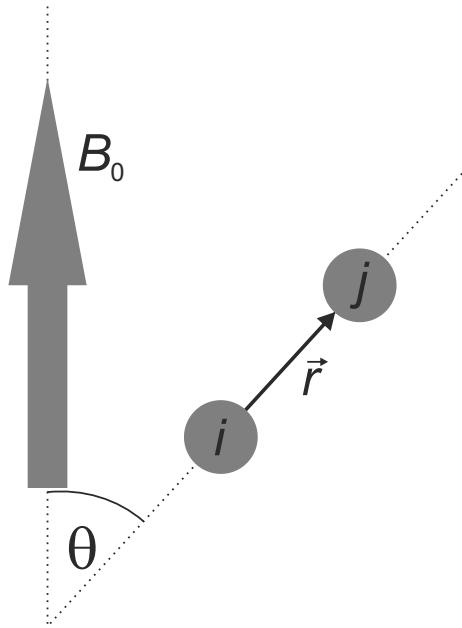
$$H = 2\pi \left( \underbrace{\nu_1 I_{1z} + \nu_2 I_{2z}}_{\text{chemische Verschiebung}} + \underbrace{J_{12} \vec{I}_1 \cdot \vec{I}_2}_{\text{J-Kopplung}} \right) \quad (2.10)$$

gegeben.  $I_1$  und  $I_2$  sind die Drehimpulsoperatoren der Spins 1 und 2,  $I_{1z}$  und  $I_{2z}$  deren  $z$ -Komponenten. Die ersten beiden Terme beschreiben die Entwicklung der chemischen Verschiebung der beiden Spins, der dritte Term steht für die  $J$ -Kopplung.

Wenn das untersuchte Molekül relativ zum externen Magnetfeld  $B_0$  partiell orientiert ist, werden anisotrope Wechselwirkungen im Spektrum sichtbar. Im Kontext dieser Arbeit sind vor allem die dipolaren Restkopplungen von Interesse, die bei einer teilweise orientierten Probe auftreten. Aufgrund der isotropen Molekülbewegung können diese dipolaren Restkopplungen in Flüssigkeiten nicht beobachtet werden, sie werden zu Null gemittelt. In Festkörpern, zum Beispiel bei Kristallen oder Pulver, beträgt die dipolare Kopplung dagegen mehrere Kilohertz. Für Kopplungen zwischen Kohlenstoff und Protonen entlang einer Bindung sind maximal 23 kHz detektierbar [64]. Die dipolare Kopplung lässt sich gemäß der Formel 2.11 berechnen [72].

Die Stärke der dipolaren Kopplung zweier wechselwirkender Atomkerne  $i$  und  $j$  hängt vom Winkel  $\theta$  zwischen der Kernverbindungsachse und dem externen Magnetfeld  $B_0$  und dem Abstand der beiden Kerne  $r$  ab.  $\mu_0$  beschreibt die magnetische Permeabilität im Vakuum,  $\gamma$  das jeweilige gyromagnetische Verhältnis und  $h$  die Planck Konstante. Die Klammern um den Ausdruck geben wieder, dass eine zeitliche Mittelung über alle Orientierungen vorgenommen wird.

Entgegen der starken Orientierung in Festkörpern wird durch die Verwendung einer flüssigkristallinen Phase [51, 73, 74] oder eines gestreckten Gels [63–65, 75] eine partielle



$$D_{ij} = \left\langle -\frac{\mu\gamma_i\gamma_j h}{(2\pi r^3)} \frac{3\cos^2\theta - 1}{2} \right\rangle \quad (2.11)$$

**Abbildung 2.5:** Darstellung der dipolaren Kopplung zwischen zwei Atomkernen  $i$  und  $j$ . Die Stärke ist abhängig vom Winkel der Kernverbindungsachse und der Achse des externen Magnetfeldes  $B_0$  und dem Kernabstand  $\vec{r}$ .

Orientierung erhalten. Die Orientierungsmedien erzeugen eine partielle Ausrichtung des untersuchten Moleküls. Dadurch werden dipolare Restkopplungen (*Residual Dipolar Couplings* (RDCs)) messbar. Die Kopplungsaufspaltung der Signale in den Spektren teilweise orientierter Proben setzt sich gemäß

$$T_{ij} = J_{ij} + D_{ij} \quad (2.12)$$

aus dem Anteil der skalaren Kopplung  $J_{ij}$  und dem Anteil der dipolaren Kopplung  $D_{ij}$  zusammen. Die dipolaren Restkopplungen können also nur durch vorherige Extraktion der Gesamtkopplung  $T_{ij}$  aus dem Spektrum der teilweise orientierten Probe und der skalaren Kopplung  $J_{ij}$  aus dem korrespondierenden Spektrum der isotropen Probe errechnet werden. Ein großer Vorteil der RDCs ist, dass die beobachtete Wechselwirkung aufgrund der  $r^3$ -Abhängigkeit weitreichender ist als *Nuclear Overhauser Enhancement* (NOE)-Wechselwirkungen. Durch den Bezug der Ausrichtung des Moleküls zur Achse des externen Magnetfeldes kann zusätzlich die Orientierung verschiedener Molekülteile zueinander korreliert werden. Auch dann, wenn die Molekülteile weit voneinander entfernt sind.

## 2.3. Zweidimensionale Korrelationsexperimente

Im Vergleich zu eindimensionalen Experimenten wird bei der Verwendung von zweidimensionalen Experimenten eine zusätzliche Dimension erhalten. Die Spektren zeigen Korrelationen zwischen Kernen. Jedes Signal besitzt eine bestimmte Intensität und zwei Frequenzkoordinaten, zum Beispiel die chemische Verschiebungsordinate des detektierten Kerns und die des Korrelationspartners. Die Signale sind also entlang unterschiedlicher Frequenzachsen aufgespalten. Um die zusätzliche Frequenzinformation zu erhalten, wird im Verlauf der Sequenz eine Zeit  $t_1$  inkrementiert. Die Inkrementierung erfolgt dabei schrittweise, die Aufnahme des FID findet nach jedem Schritt statt. Dazu muss die Sequenz jeweils wiederholt werden. Um eine hohe digitale Auflösung in dieser zweiten Dimension zu erzielen, müssen bei vorgegebener spektraler Breite möglichst viele  $t_1$ -Inkrementierungsschritte aufgenommen werden. Auf diese Weise erhöht sich jedoch auch die Gesamtdauer des Experiments erheblich. Für einen *scan* setzt sich die Gesamtexperimentzeit nach

$$t_{Exp} = t_d \cdot \left( d_r + t_p + t_m + t_{aq} + \sum t_1 \right) \quad (2.13)$$

zusammen.  $t_d$  beschreibt die Anzahl der Inkremente, die Summe  $\sum t_1$  die Dauer der Inkrementierung. Unter der Annahme, dass die  $t_1$ -Inkrementierungsschritte äquidistant sind, kann die Summe nun in Abhängigkeit der Anzahl der Inkremente  $t_d$  ausgedrückt werden:

$$\sum t_1 = \sum_{a=0}^{t_d} a \cdot dw \quad (2.14)$$

$a$  ist eine Zahl zwischen 0 und  $t_d$  die angibt, welcher Inkrementierungsschritt betrachtet wird.  $dw$  ist die *Dwell-time*, also der zeitliche Abstand der äquidistanten Inkrementierungsschritte. Da  $d_w$  konstant ist, ergibt sich

$$dw \sum_{a=0}^{t_d} a. \quad (2.15)$$

Der Ausdruck wird auch als Gaußsche-Summenformel bezeichnet und kann durch

$$dw \sum_{a=0}^{t_d} a = dw \cdot \frac{td(td+1)}{2} \quad (2.16)$$

beschrieben werden. Für die Gesamtexperimentzeit ergibt sich daher

$$t_{Exp} = t_d \cdot \left( d_r + t_p + t_m + t_{aq} + \frac{dw(td+1)}{2} \right). \quad (2.17)$$

Für mehrere *scans*  $n$  muss der Ausdruck noch mit  $n$  multipliziert werden.

$$t_{Exp} = n \cdot t_d \cdot \left( d_r + t_p + t_m + t_{aq} + \frac{dw(td+1)}{2} \right). \quad (2.18)$$

Anhand der beiden erläuterten Formeln 2.17 und 2.18 wird deutlich, dass die Gesamtexperimentzeit  $t_{Exp}$  durch eine Verdopplung der Anzahl der Inkremente um mehr als den Faktor zwei ansteigt. Zusätzlich erhöht sie sich, wenn mehrere *scans* akkumuliert werden, um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu steigern. Während einfache eindimensionale Spektren in wenigen Sekunden aufgenommen werden können, liegt die Gesamtdauer von zweidimensionalen Spektren also schnell im Bereich von Minuten bis hin zu mehreren Stunden.

Einen maßgeblichen Anteil an der Gesamtexperimentzeit hat die Erholzeit  $t_{Erh}$ , die sich aus  $d_r$  und  $t_{aq}$  zusammensetzt. Der Zusammenhang ist aus Abbildung 2.1 ersichtlich. Während dieser Zeit findet Relaxation statt, die den Gleichgewichtszustand des Systems wiederherstellt. Wird die Erholzeit einfach verkürzt, ist der Wiederaufbau unzureichend und eine verminderte Signalintensität, sowie das Entstehen von Artefaktsignalen im Spektrum sind die Folge. Durch die Verwendung der ASAP-Technik kann das Erholungs-*delay*  $d_r$  in den schnellen Experimenten stark verkürzt werden, ohne bedeutende Beeinträchtigungen in der Qualität der Spektren in Kauf nehmen zu müssen. Die Pulssequenzen, die eine beschleunigte Aufnahme ermöglichen, werden in den Kapiteln 4.1, 4.2, 4.3 und 4.4 vorgestellt. An dieser Stelle werden jedoch zunächst grundlegende Prinzipien und Pulssequenzbausteine der zweidimensionalen NMR-Experimente erläutert.

### 2.3.1. Echo-/Antiecho- und Kohärenzordnungsselektion

Eine Technik, um in zweidimensionalen Experimenten phasenempfindliche Detektion zu erhalten, ist die Echo-/Antiecho-Methode. Sie wurde in allen 2D-Experimenten dieser Arbeit angewandt. Die Methode basiert meist auf der Verwendung von Gradienten und ist fast immer mit Kohärenzordnungsselektion verbunden. Dazu wird eine zusätzliche Spule eingesetzt, die ein Magnetfeld hervorruft, das eine lineare Änderung entlang der  $z$ -Achse aufweist. Das ortsabhängige Magnetfeld  $B(z)$  ist durch

$$B(z) = B_0 + G(z) \quad (2.19)$$

gegeben.  $B_0$  beschreibt das externe, homogene Magnetfeld,  $G(z)$  das entlang  $z$  gerichtete Gradientenfeld. In der Probe präzedieren chemisch äquivalente Kerne dann abhängig von ihrer  $z$ -Koordinate mit unterschiedlicher Larmorfrequenz

$$\omega(z) = \omega_0 - \gamma G(z). \quad (2.20)$$

Dies führt zu einer Linienverbreiterung, wobei die Linienbreite von der Stärke des Gradienten  $G_z$  und seiner Dauer  $\tau$  abhängt. Die Dephasierung ist außerdem abhängig von der

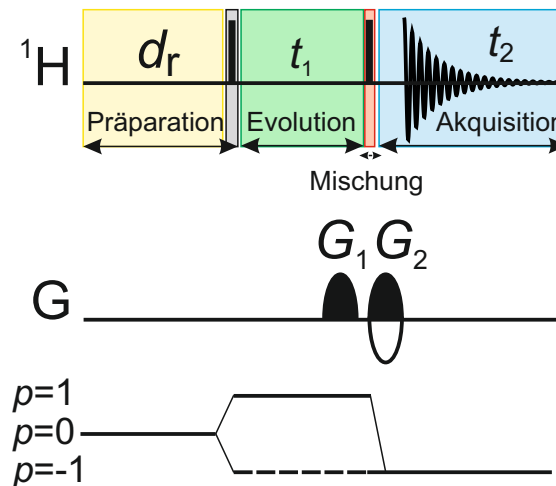
Kohärenzordnung  $p$ . Für die von der  $z$ -Koordinate abhängige Phase  $\Phi(z)$  ergibt sich:

$$\Phi(z) = -p\gamma G(z)\tau. \quad (2.21)$$

Die Stärke der Dephasierung ist also proportional zum gyromagnetischen Verhältnis  $\gamma$  des Kerns und der Kohärenzordnung  $p$ , die während des Gradienten vorliegt. Auf diese Weise können Gradienten verwendet werden, um Kohärenzordnungen zu selektieren. Werden zwei Gradienten nacheinander angewandt, so addieren sich grundsätzlich die Effekte der Dephasierung. Die Wirkung von  $N$  Gradienten kann allerdings auch so gewählt werden, dass sich die Effekte zu Null mitteln und zwar, wenn die Refokussierungsbedingung

$$\sum_{i=1}^N \Phi_i = 0 \quad (2.22)$$

erfüllt ist.



**Abbildung 2.6:** Grundsätzliches Schema eines COSY-Experiments. Der schmale Balken stellt einen  $90^\circ$ -Puls dar. Das Kohärenztransferdiagramm ist zur Erklärung der Echo-/Antiecho-Methode gezeigt.

Abbildung 2.6 zeigt den grundsätzlichen Aufbau eines *Correlation Spectroscopy* (COSY)-Experiments. Der Gradientenkanal  $G$  und das Kohärenztransferdiagramm sind ebenfalls dargestellt. Der anfängliche  $90^\circ$ -Puls erzeugt transversale Magnetisierung. In der Evolutionsperiode während  $t_1$  entwickelt sich die chemische Verschiebung und skalare Kopplung. In der Mischzeit, im COSY repräsentiert durch einen  $90^\circ$ -Puls, wird Antiphase magnetisierung zwischen skalar gekoppelten Protonen transferiert. Die Magnetisierung wird in der Detektionsperiode  $t_2$  in Form des FID aufgenommen. Das Beispiel-Experiment wird aufgrund seiner Übersichtlichkeit zur Erklärung der Echo-/Antiecho-Methode verwendet. Gemäß dem Kohärenztransferdiagramm ist die Kohärenzordnung vor dem ersten  $90^\circ$ -Puls  $p = 0$ .

Während der  $t_1$ -Zeit liegt  $p = +1$  und  $p = -1$  vor. Detektiert wird konventionsgemäß  $p = -1$ . Mit Hilfe der Gradienten kann zwischen den beiden während  $t_1$  vorliegenden Kohärenzordnungen selektiert werden. Wenn die Gradienten  $G_1$  und  $G_2$  das gleiche Vorzeichen besitzen, so wird die Kohärenzordnung  $p = +1$  ausgewählt. Das resultierende Signal

$$S_N(t_1, t_2) = \exp[i(\Omega_2 t_2 - \Omega_1 t_1)] \quad (2.23)$$

ist sowohl in  $t_1$  als auch in  $t_2$  phasenmoduliert, das Vorzeichen der Modulation von  $t_1$  und  $t_2$  ist allerdings unterschiedlich, aufgrund der geänderten Kohärenzordnung. Das zugehörige Spektrum wird auch als Echo oder N-Komponente bezeichnet. Durch Invertierung von  $G_2$  wird

$$S_P(t_1, t_2) = \exp[i(\Omega_2 t_2 + \Omega_1 t_1)] \quad (2.24)$$

erhalten. Das Signal wird auch als Antiecho oder P-Komponente bezeichnet. Für das Antiecho besitzen die Kohärenzordnungen während  $t_1$  und  $t_2$  das gleiche Vorzeichen. Durch Addition und Subtraktion der beiden Komponenten wird ein cos- und ein sin-modulierter Datensatz erhalten.

$$S_P + S_N = 2 \cos(\Omega_2 t_2) \cos(\Omega_1 t_1) + 2i \sin(\Omega_2 t_2) \cos(\Omega_1 t_1) \quad (2.25)$$

$$S_P - S_N = 2 \sin(\Omega_2 t_2) \sin(\Omega_1 t_1) - 2i \cos(\Omega_2 t_2) \sin(\Omega_1 t_1) \quad (2.26)$$

Um ein Spektrum zu erhalten, dessen Signale eine doppelt absorptive Linienform aufweisen, wird zunächst eine Fouriertransformation in  $t_2$  durchgeführt. Aus beiden Datensätzen werden dann die Realteile verwendet und zu einem komplexen Signal rekombiniert. Fouriertransformation in  $t_1$  liefert dann das gewünschte Spektrum mit doppelt absorptiven Signalen [68]. Eine andere Methode, Kohärenztransferwege zu selektieren, ist die Verwendung von Phasenzyklen [76]. Ein Phasenzyklus ist eine Kombination von zwei oder mehr Wiederholungen des Experiments, die sich durch die Phase bestimmter Pulse und der Empfängerphase unterscheiden. Magnetisierungskomponenten, die beispielsweise durch Relaxation entstehen, sind unabhängig von der Phasenänderung. Durch Kombination des detektierten Signals der unterschiedlichen *scans* löschen sich so die ungewünschten Kohärenzen aus, während die gewünschten Signalbeiträge erhalten bleiben. Der Nachteil der Verwendung von Phasenzyklen ist, dass immer mindestens zwei oder mehr *scans* benötigt werden. Gradientenselektierte Experimente können dagegen in einem *scan* aufgenommen werden. Da aber immer nur ein Kohärenztransferpfad selektiert werden kann, kann ebenfalls die Empfindlichkeit pro *scan* deutlich reduziert sein [77]. Sie wird durch die phasenempfindliche Aufnahme nochmals verringert.

### 2.3.2. Der INEPT-Schritt

Für eine gegebene Magnetfeldstärke des externen Magnetfeldes  $B_0$  besitzen Kerne mit größerem gyromagnetischen Verhältnis  $\gamma$  eine höhere Gleichgewichtsmagnetisierung und dadurch eine höhere NMR-Empfindlichkeit. Für Atomkerne mit einem von Null verschiedenen Kernspin  $I$  ist das resultierende magnetische Moment nach

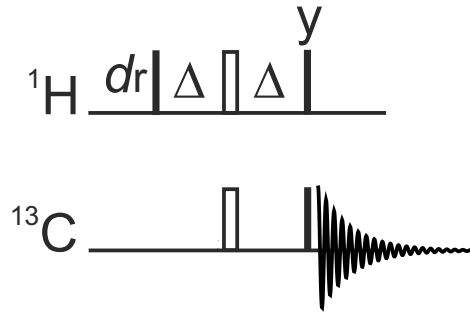
$$\vec{\mu} = \gamma \vec{I} \quad (2.27)$$

proportional zu  $\gamma$ . Die kernspezifische Größe bestimmt die Wechselwirkung des magnetischen Moments mit dem externen Magnetfeld  $B_0$  und dadurch die NMR-Empfindlichkeit des Kernspins. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis

$$\frac{S}{N} \sim N \cdot \gamma_{exc} \cdot \gamma_{det}^{\frac{3}{2}} \cdot B_0^{\frac{3}{2}} \cdot \sqrt{n} \cdot T_2 \cdot \frac{1}{T} \quad (2.28)$$

ist unter anderem proportional zu dem Produkt aus den beiden gyromagnetischen Verhältnissen der angeregten Kernsorte  $\gamma_{exc}$  und der detektierten Kernsorte  $\gamma_{det}$ .  $N$  stellt die Anzahl der NMR-aktiven Kerne dar. Die Anzahl ist abhängig von der Probenkonzentration, dem Detektionsvolumen und der Isotopenhäufigkeit.  $n$  ist die Anzahl der *scans*,  $T_2$  die transversale Relaxationszeit und  $T$  die Temperatur. Im *Insensitive Nuclei Enhancement by Polarization Transfer* (INEPT)-Experiment kann Polarisation von Kernen mit hohem gyromagnetischen Verhältnis (z.B.  $^1\text{H}$ ) auf Kerne mit niedrigem gyromagnetischen Verhältnis (z.B.  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) übertragen werden. Die zuerst genannte Gruppe wird im Folgenden auch als empfindliche Kerne bezeichnet, letztgenannte als unempfindliche Kerne. Nach dem Transfer ist der Betrag der Magnetisierung nicht weiter vom gyromagnetischen Verhältnis des unempfindlichen Kerns abhängig, sondern proportional zum gyromagnetischen Verhältnis des empfindlicheren Kerns. Dadurch kann die Empfindlichkeit erheblich gesteigert werden. Der INEPT-Schritt wird daher in vielen heteronuklearen Korrelationsexperimenten verwendet, unter anderem im HSQC-Experiment bei dem Magnetisierung von Protonen auf skalar gekoppelte  $^{13}\text{C}$ -Kernspins übertragen wird. In Abbildung 2.7 ist beispielhaft die Pulssequenz eines INEPT, wie er in HSQC-Experimenten Anwendung findet, gezeigt.

Die Protonen besitzen ein etwa vierfach größeres gyromagnetisches Verhältnis  $\gamma_{^1\text{H}} \approx 4 \cdot \gamma_{^{13}\text{C}}$ . Durch den  $90^\circ$ -Puls wird zunächst transversale Protonen-Magnetisierung der Form  $-I_y$  erzeugt. Während der beiden *delays*  $\Delta$  entwickelt sich für  $^{13}\text{C}$ -gebundene Protonen unter dem Einfluss der  $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplung die sinus-modulierte Antiphasemagnetisierung  $-2I_x S_z \sin(2\pi^1 J_{\text{CH}} \Delta)$ . Sie wird durch die beiden folgenden  $90^\circ$ -Pulse auf  $^{13}\text{C}$  übertragen. Die  $^{13}\text{C}$ -Antiphasemagnetisierung besitzt dann die Form  $-2I_z S_y \sin(2\pi^1 J_{\text{CH}} \Delta)$ . Die chemische Verschiebungsentwicklung wird durch den mittig platzierten  $180^\circ$ -Puls refokussiert.



**Abbildung 2.7:** Schema eines INEPT-Schrittes, wie er in den HSQC-Experimenten Anwendung findet. Schmale Balken stellen  $90^\circ$ -Pulse dar, der nicht ausgefüllte breitere Balken einen  $180^\circ$ -Puls. Falls nicht anders angegeben, ist die Phase der Pulse  $x$ . Die Protonen besitzen ein größeres gyromagnetisches Verhältnis als die  $^{13}\text{C}$ -Kernspins. Durch die Übertragung der Magnetisierung hängt das detektierte Signal von der Gleichgewichtsmagnetisierung der Protonen ab.

Das nicht transferierte Signal ist durch  $I_y \cos(2\pi^1 J_{\text{CH}} \Delta)$  gegeben. Das nach dem INEPT-Schritt detektierbare Signal beispielsweise einer CH-Gruppe liefert ein Spektrum mit einer Antiphase-Dublett-Struktur. Die Antiphase-Magnetisierung auf  $^{13}\text{C}$  stellt den übertragenen Term dar und ist proportional zur Gleichgewichtsmagnetisierung der Protonen. Der Transfer erreicht für

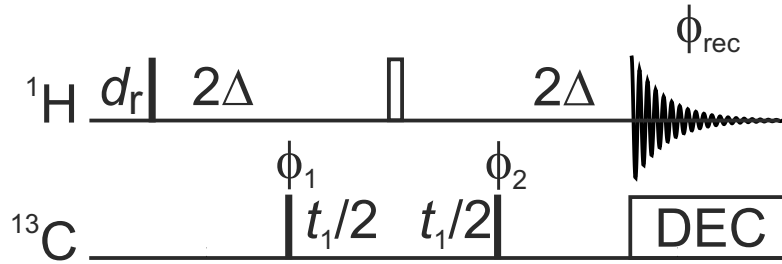
$$\Delta = \frac{1}{4^1 J_{\text{CH}}} \quad (2.29)$$

ein Optimum. Durch Verwendung eines refokussierten INEPT entwickelt sich aus Antiphase-Magnetisierung auf  $^{13}\text{C}$  wiederum Inphase-Magnetisierung auf Protonen [69]. Experimente die einen INEPT-Schritt enthalten, können abhängig von der  $T_1$ -Zeit der Protonen wiederholt werden. Protonen besitzen im Allgemeinen kürzere  $T_1$ -Relaxationszeiten als  $^{13}\text{C}$ -Kerne, da auch die  $T_1$ -Relaxation vom gyromagnetischen Verhältnis  $\gamma$  abhängt. Je größer das magnetische Moment eines Kernspins ist, desto stärker ist die Kopplung der Spins mit der Umgebung. Wenn die Kopplung stark ist, ist die  $T_1$ -Relaxation beschleunigt und das Experiment kann nach kürzeren Erholzeiten  $t_{\text{Erh}}$  wiederholt werden.

### 2.3.3. HMQC

Das *Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence spectroscopy* (HMQC)-Experiment zählt zu den heteronuklearen Experimenten, bei denen unterschiedliche Kerne miteinander korreliert werden, beispielsweise  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  oder  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ . Die 2D-Spektren eines  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMQC zeigen Korrelationen zwischen Protonen und direkt benachbarten, kovalent gebundenen  $^{13}\text{C}$ -Kernen. Die Signale besitzen zwei unterschiedliche Frequenzinformationen, die auf zwei separate Frequenzachsen aufgetragen werden. Die Pulssequenz des  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMQC-Experiments, dargestellt in Abbildung 2.8, besteht in seiner einfachsten Form lediglich aus vier Pulsen.





**Abbildung 2.8:** Pulssequenz des  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMQC-Experiments gemäß [27]. Schmale Balken stellen  $90^\circ$ -Pulse dar, der nicht ausgefüllte breitere Balken einen  $180^\circ$ -Puls. Das Transfer-*delay* wird auf die Länge  $2\Delta = \frac{1}{2 \cdot ^1J_{\text{CH}}}$  eingestellt.  $^1J_{\text{CH}}$  ist die skalare Kopplung zwischen Kohlenstoff und Protonen über eine Bindung. Der Phasenzyklus ist durch  $\Phi_1 = x, -x$ ;  $\Phi_2 = x, x, -x, -x$  und  $\Phi_{\text{rec}} = x, -x, -x, x$  gegeben. Während der Aufnahme des FID wird eine heteronukleare Entkopplungssequenz angewandt.

Durch den ersten  $90^\circ$ -Puls mit der Phase  $x$  wird transversale Protonenmagnetisierung  $-I_y$  erzeugt, die sich während des *delays*  $2\Delta$  durch die  $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplung zu Antiphase magnetisierung der Form  $2I_x S_z$  entwickelt. Der  $^{13}\text{C}$ - $90^\circ$ -Puls mit der Phase  $x$  wandelt die Antiphase magnetisierung vor der Inkrementierung der  $t_1$ -Zeit in die  $2I_x S_y$  Multiquanten magnetisierung um. Die  $^{13}\text{C}$  chemische Verschiebung entwickelt sich während  $t_1$ . Die chemische Verschiebungsentwicklung der Protonen wird dagegen durch den mittig platzierten  $180^\circ$ -Puls refokussiert und entwickelt sich daher nur während der Akquisitionszeit. Die Multiquanten magnetisierung wird durch den sich anschließenden  $^{13}\text{C}$ - $90^\circ$ -Puls in Antiphase magnetisierung auf Protonen der Form  $2I_x S_z$  umgewandelt. Während des *delays*  $2\Delta$  vor Aufnahme des FID erfolgt der Transfer zu Inphase-Protonen magnetisierung  $-I_y$ , vermittelt durch die  $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplung. Das detektierte Signal enthält die chemische Verschiebungsinformation der Protonen und der  $^{13}\text{C}$ -Kerne. Homonukleare skalare Protonenkopplungen  $J_{\text{HH}}$  entwickeln sich zusätzlich während der gesamten Dauer der Pulssequenz  $2\Delta + t_1 + t_2$  [78]. Dadurch können dispersive Anteile im Spektrum auftreten. Diese wirken sich auf die Signale in der direkten Dimension aus. Die Signale werden dadurch verbreitert, und auch die Komplexität der Multipllett-Struktur der Korrelationssignale ist erhöht [27]. Ebenfalls ist die spektrale Auflösung in der indirekten Dimension durch die  $J_{\text{HH}}$ -Kopplungen gegenüber der Auflösung eines HSQC-Spektrums herabgesetzt. Während  $t_1$  ist auch die homonukleare Kopplung der  $^{13}\text{C}$ -Spins wirksam. Bei nicht-isotopenmarkierten Proben kann der Effekt jedoch aufgrund der geringen natürlichen Häufigkeit von etwa 1,1 % vernachlässigt werden.

### 2.3.4. HSQC

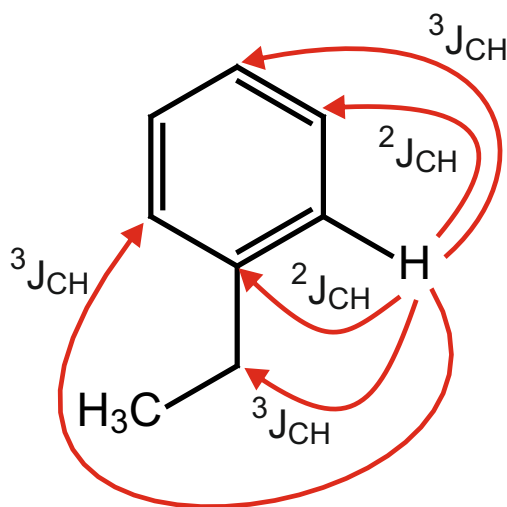
Das *Heteronuclear Single-Quantum Coherence spectroscopy* (HSQC)-Experiment wird wie das HMQC ebenfalls dazu genutzt, Korrelationen zwischen Protonen und direkt benachbarten, kovalent gebundenen Heterokernen, wie zum Beispiel  $^{13}\text{C}$ , oder  $^{15}\text{N}$ , herzustellen. Grundsätzlich enthalten die Spektren des HSQC-Experiments die gleichen Informationen wie die des HMQC-Experiments. HSQC-Pulssequenzen werden später genauer vorgestellt, sie sind in Abbildung 3.8 dargestellt. Die Sequenzen enthalten einen INEPT-Transferschritt, durch den Magnetisierung von Protonen auf den Heterokern transferiert wird, und einen Rücktransferschritt, um die Magnetisierung nach der Inkrementierung der indirekten Dimension auf die Protonenspins zurück zu transferieren. Während  $t_1$  liegt im Gegensatz zum HMQC Antiphase magnetisierung auf  $^{13}\text{C}$  der Form  $-2I_z S_y$  vor. Die Protonenmagnetisierung ist also entlang der  $z$ -Achse ausgerichtet, so dass sich keine homonukleare  $J_{\text{HH}}$ -Kopplung entwickelt. Daraus resultieren in der indirekten Dimension einfache Singulett-Strukturen. Während der Entwicklung der chemischen Verschiebung der  $^{13}\text{C}$ -Resonanzen wird die heteronukleare Kopplung und die chemische Verschiebungsentwicklung der Protonen durch den mittig platzierten  $180^\circ$ -Puls refokussiert.

Im konventionellen HSQC-Experiment wird die Protonenmagnetisierung, die während des INEPT-Schrittes nicht auf  $^{13}\text{C}$  übertragen wurde, durch den ersten Gradienten des Echo-/Antiecho-Bausteins dephasiert und im Verlauf der Sequenz nicht wieder refokussiert. Wenn also das INEPT-*delay* nicht optimal eingestellt ist, wird ein Teil der  $^{13}\text{C}$ -gebundenen Protonenmagnetisierung nicht übertragen. Dieser Teil der Magnetisierung liegt vor der Aufnahme des FID dephasiert in der transversalen Ebene vor und geht deshalb verloren. Gleiches gilt für die Magnetisierung der passiven Protonen, die an  $^{12}\text{C}$ -Kerne, beziehungsweise alle Protonen, die nicht an  $^{13}\text{C}$  gebunden sind. Nach dem INEPT-Schritt liegt für die  $^{13}\text{C}$ -gebundenen Protonen  $^{13}\text{C}$ -Antiphase magnetisierung der Form  $2I_z S_y$  vor. Die  $^{12}\text{C}$ -gebundenen Protonen werden durch den ersten  $90^\circ$ -Protonenpuls angeregt, so dass  $-I_y$  vorliegt. Durch den  $180^\circ$ -Puls des INEPT-Schrittes wird das Vorzeichen invertiert. Da der nächste  $90^\circ$ -Protonenpuls die Phase  $y$  besitzt, werden die  $^{12}\text{C}$ -gebundenen Protonen davon nicht beeinflusst. In der folgenden  $t_1$ -Zeit entwickelt sich die chemische Verschiebung des Heterokerns  $^{13}\text{C}$  als Magnetisierung in der transversalen Ebene. Nach der Inkrementierung der indirekten Dimension folgt der erste Gradient der Echo-/Antiecho-Selektion. Dadurch wird alle Magnetisierung in der Ebene verteilt. Durch den Rücktransferschritt wird die Hälfte der Magnetisierungskomponenten zurück von  $^{13}\text{C}$  auf Protonen übertragen. Die  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -Antiphase magnetisierung wird also schließlich wieder auf Protonen übertragen und durch den zweiten Gradienten

refokussiert, so dass letztlich Protonen-Inphasemagnetisierung detektiert wird. In einem empfindlichkeitserhöhten HSQC-Experiment werden dagegen alle Magnetisierungskomponenten bis zur Aufnahme des FID in detektierbare Köhärenzen umgewandelt, dazu wird ein veränderter Rücktransfer verwendet [79–81]. Die  $^{12}\text{C}$ -gebundene Magnetisierung, also die passive Protonenmagnetisierung, sowie die während des anfänglichen INEPT-Schrittes nicht übertragene Protonenmagnetisierung, wird bei beiden Experimenten nicht wieder refokussiert.

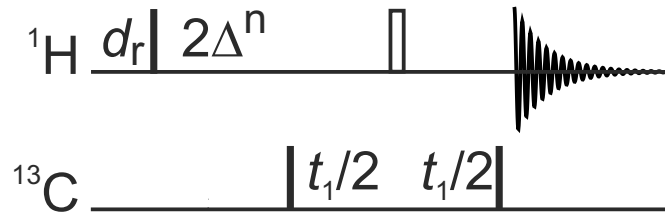
### 2.3.5. HMBC und HSQMBC

*Heteronuclear Multiple Bond Correlation spectroscopy* (HMBC)-Experimente werden für weitreichende heteronukleare Kopplungen (*long range* Kopplungen) verwendet [82, 83]. In HMBC-Spektren werden Korrelationen über mehrere Bindungen, zum Beispiel zwischen  $^{13}\text{C}$ - und  $^1\text{H}$ -Atomen, sichtbar. Im Gegensatz zum HMQC-Experiment können dadurch auch quartäre Kohlenstoffresonanzen detektiert werden. Das Prinzip ist in Abbildung 2.9 anhand von Ethylbenzol verdeutlicht. In Abbildung 2.10 ist der grundsätzliche Aufbau einer



**Abbildung 2.9:** Weitreichende Kopplungen ( $^n J_{\text{CH}}$ ), gezeigt an Ethylbenzol, zur Verdeutlichung des Prinzips des HMBC.

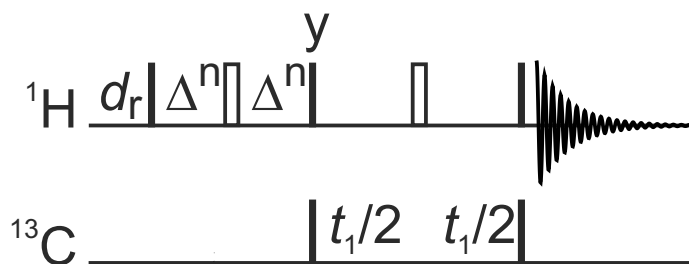
HMBC-Pulssequenz dargestellt. Das Transfer-*delay* wird auf die weitreichenden und daher deutlich kleineren Kopplungen, gemäß  $\Delta^n = \frac{1}{4 \cdot ^n J_{\text{CH}}}$ , eingestellt. Im Vergleich zum HMQC (Pulssequenz siehe Abbildung 2.8) wird kein Rücktransferschritt verwendet. Die Akquisition findet direkt nach dem letzten  $90^\circ$ - $^{13}\text{C}$ -Puls statt. Auf diese Weise wird ein zusätzliches Transfer-*delay* vermieden, so dass der Signalverlust durch Relaxation geringer ausfällt. Es wird keine heteronukleare Entkopplung angewandt, da sich erst während der Akquisitionszeit detektierbare Protonen-Magnetisierung aus der nach dem letzten  $90^\circ$ - $^{13}\text{C}$ -Puls vorliegenden



**Abbildung 2.10:** Grundsätzlicher Aufbau einer HMBC-Pulssequenz. Ein schmaler Balken stellt einen  $90^\circ$ -Puls dar, der nicht ausgefüllte breitere Balken einen  $180^\circ$ -Puls. Die Phase der Pulse ist  $x$ . Das *delay* ist auf die weitreichenden Kopplungen gemäß  $\Delta^n = \frac{1}{4^n J_{\text{CH}}}$  eingestellt.

$^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -Antiphase-Magnetisierung entwickelt. Prinzipiell werden auch Korrelationen der  $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplungen detektiert. Sie besitzen im Vergleich zu weitreichenden  $^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungen größere Kopplungskonstanten. Die zugehörigen Signale sind zu Dubletts aufgespalten und können dann problematisch sein, wenn sie mit den Signalen der  $^nJ_{\text{CH}}$ -gekoppelten Spezies überlagern. Daher wird häufig ein *low-pass*-Filter verwendet, der die  $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplungen unterdrückt [84]. Weitere Modifikationen des grundsätzlichen Experiments zielen auf die Optimierung der Transfereffizienz über einen größeren Bereich von Kopplungskonstanten ab [85–87]. Eine Alternative ist auch, zwei Experimente aufzunehmen, um den gesamten Bereich der Konstanten abzudecken. Die chemische Verschiebung der Protonen wird während des Transfer-*delays*, im Gegensatz zur  $t_1$ -Inkrementierungszeit, nicht refokussiert. Die Phase der Signale in der Protonendimension ist daher abhängig von der Länge des Magnetisierungstransfer-*delays*. Zusätzlich führt die Entwicklung von homonuklearer Protonenkopplung während der gesamten Zeit der Pulssequenz zu Phasenverzerrungen. Daher wird im Allgemeinen höchstens in der indirekten Dimension phasenempfindlich aufgenommen, während in der direkten Dimension das Betragsspektrum dargestellt wird.

Das *Heteronuclear Single Quantum Multiple Bond Correlation spectroscopy* (HSQMBC) ist die für weitreichende heteronukleare Kopplungen optimierte Variante des HSQC-Experiments. Im Gegensatz zum HMBC liegt während der  $t_1$ -Zeit Antiphase magnetisierung auf  $^{13}\text{C}$  vor (siehe dazu den Vergleich von HMQC und HSQC aus Kapitel 2.3.4). Dies bietet den bereits erwähnten Vorteil der höheren Auflösung in der indirekten Dimension. In Abbildung 2.11 ist die Pulssequenz eines HSQMBC-Experiments gezeigt. Zur Übertragung der Magnetisierung wird ein INEPT-Schritt verwendet. Der weitere Aufbau entspricht dem des HMBC-Experiments.



**Abbildung 2.11:** Grundsätzlicher Aufbau einer HSQMBC-Pulssequenz. Ein schmaler Balken stellt einen  $90^\circ$ -Puls dar, nicht ausgefüllte breitere Balken  $180^\circ$ -Pulse. Falls nicht anders angegeben, ist die Phase der Pulse  $x$ . Das *delay* ist auf die weitreichenden Kopplungen gemäß  $\Delta = \frac{1}{4 \cdot n \cdot J_{\text{CH}}}$  eingestellt.

### 2.3.6. CLIP-HSQC

Das *Clean Inphase* (CLIP)-HSQC-Experiment dient zur Messung heteronuklearer Kopplungen über eine Bindung. Im Gegensatz zum HSQC-Experiment wird im CLIP-HSQC während der Aufnahme der direkten Dimension nicht entkoppelt. Das erhaltene Signal ist dann durch die Kopplung aufgespalten. Die Kopplungskonstanten werden durch Messung des Abstandes der beiden Dublett-Komponenten des Signals in der Protonendimension bestimmt (siehe dazu Kapitel 3.3 und Abbildung 3.6). Da das *delay* des Rücktransfers immer auf einen mittleren Wert eingestellt ist, kann der Transfer zu Inphase-Magnetisierung unvollständig sein und es bleiben Antiphase-Terme erhalten, die im Allgemeinen zu Phasenverzerrungen führen. Durch Verwendung eines zusätzlichen Pulses im CLIP-Experiment ist die Phase der Signale nicht durch zurückbleibende Antiphase-Anteile verzerrt. Es werden akkurate Inphase-Dubletts erhalten, so dass die Bestimmung der Kopplungskonstanten mit hoher Genauigkeit durchgeführt werden kann. Die Pulssequenz des CLIP-HSQC ist in Abbildung 3.10 dargestellt. Im Ergebnisteil wird die Entwicklung des CLIP-ASAP-HSQC-Experiments beschrieben. Das Experiment kombiniert das schnelle Aufnahmeschema mit dem CLIP-Ansatz.

### 2.3.7. HSQC-TOCSY

Beim HSQC-*Total Correlation Spectroscopy* (TOCSY)-Experiment geht der *Total Correlation Spectroscopy* (TOCSY)-Mischsequenz ein HSQC voraus. Das zweidimensionale Spektrum zeigt  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -Korrelationssignale über eine Bindung, sowie Signale der  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -Kopplungspartner. Letztere Signale werden durch die TOCSY-Mischsequenz erhalten, durch die Magnetisierung im Spinsystem verteilt wird. Die Signale des Protonen-Netzwerkes treten dann als horizontale Linie im Spektrum auf, besitzen also die gleiche  $^{13}\text{C}$ -Frequenz. Das Experiment ist bei der Untersuchung von Substanzgemischen hilfreich, da Protonen problemlos



## 2.4. Schnelle Pulstechniken

Das SOFAST (*band Selective Optimized FLip-Angle Short-Transient*)-HMQC Experiment [29–32], die BEST (*Band selective Excitation Short-Transient*)-Sequenzen [33–35] und das COST (*Cooling Overall Spin Temperature*)-HSQC (*Hetronuclear Single-Quantum Coherence spectroscopy*) [36] ermöglichen eine beschleunigte Aufnahme mehrdimensionaler, heteronuklearer Korrelationsspektren. Ihre Anwendbarkeit ist jedoch durch verschiedene Faktoren eingeschränkt. Alle drei genannten Methoden beruhen auf der bandselektiven Anregung eines Teils der Protonen, während die restliche Protonenmagnetisierung entlang der  $z$ -Achse im Gleichgewichtszustand verbleibt. Durch Wechselwirkung des Reservoirs mit den angeregten und detektierten Protonen wird die  $T_1$ -Relaxation beschleunigt und das Erholungs-*delay* kann verkürzt werden. Die Experimente werden vor allem für die Untersuchung von Proteinen und Nukleinsäuren verwendet. Der Nachteil der bandselektiven Anregung ist, dass nie ein vollständiges Spektrum erhalten wird. Für die Aufnahme von  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -Spektren von kleinen organischen Molekülen sind die Experimente daher nicht geeignet.

Mit der *Ultrafast* (UF)-Technik [37–41] können alle Inkrementierungsschritte mit einer Aufnahme erfasst werden, sie stellt damit die schnellste Methode dar. Während der Zeit der chemischen Verschiebungsentwicklung in der indirekten Dimension werden einerseits zwei  $90^\circ$ -Pulse eingestrahlt, die einen *offset sweep* durchlaufen, außerdem wird zeitgleich ein bipolares Gradientenpaar angewandt. Die zusätzlichen Gradienten unterteilen das Probenvolumen in Schichten. Durch den *offset sweep* der Pulse werden die Kernspins in den unterschiedlichen Schichten zu ungleicher Zeit angeregt und in umgekehrter Reihenfolge dazu wieder in Richtung der  $z$ -Achse rotiert. Die Kernspins befinden sich also unterschiedlich lang in der transversalen Ebene. Dies entspricht einer Entwicklung der chemischen Verschiebung analog zur Inkrementierung in konventionell aufgenommenen zweidimensionalen Experimenten. Allerdings wird die chemische Verschiebungsinformation des Heterokerns hier in einer Aufnahme erhalten. Um aus der generierten Information ein 2D-Spektrum abzuleiten ist eine spezielle Aquisitionssequenz und Prozessierung notwendig. Entscheidend ist allerdings, dass die Gradienten in dieser Technik die Auflösung definieren. Diese Gegebenheit stellt eine Einschränkung der Technik dar. Zusätzlich ist die Empfindlichkeit der Methode herabgesetzt, da das Probenvolumen pro Schicht gering ist.

Bei der Aufnahme eindimensionaler Kohlenstoff-Spektren wird dagegen eine vergleichsweise einfache Technik angewandt. Durch Reduktion des Anregungswinkels wird bei gegebener Wiederholrate das Signal-zu-Rausch-Verhältnis ( $\frac{S}{N}$ ) optimiert. Diese Technik ist nach ihrem Erfinder Richard Ernst unter dem Begriff der Ernst-Winkel-Anregung [88] bekannt. Die

Steigerung der Empfindlichkeit durch Optimierung des angeregten Anteils der Gleichgewichtsmagnetisierung ist in den ALSOFASST (*Alternate SOFAST (band Selective Optimized FLip-Angle Short-Transient)*) [89] und ASAP (*Acceleration by Sharing Adjacent Polarization*)-Experimenten [67, 90–92] zwar andersartig umgesetzt, die Grundidee bleibt jedoch gleich. Darüber hinaus wird in den ASAP-Experimenten zusätzlich eine Mischsequenz angewandt, durch die der Wiederaufbau der Gleichgewichtsmagnetisierung zusätzlich beschleunigt wird. Die Erholzeit  $t_{\text{Erh}}$  kann dadurch stark verkürzt werden. Die Dauer der Mischsequenz ist deutlich geringer, daher ist die Gesamtdauer des Experiments drastisch reduziert. In Kapitel 4.1 werden Experimente vorgestellt, die auf Basis dieses vielversprechenden Ansatzes entstanden sind. Sie wurden in Zusammenarbeit mit David Schulze-Sünninghausen und Martin R.M. Koos erarbeitet und sind teilweise bereits veröffentlicht [67, 91–94]. Die Methode beruht nicht auf der Verwendung selektiver Pulse, wie sie in den *band Selective Optimized FLip-Angle Short-Transient* (SOFAST)- und BEST-Experimenten verwendet werden. Es kann der gesamte spektrale Bereich erfasst werden. Daher ermöglichen alle ASAP- und *Alternate SOFAST* (ALSOFASST)-Experimente die beschleunigte Aufnahme vollständiger  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren. In Kapitel 4.1 wird der Prozess der Optimierung des entwickelten ASAP-HSQC hinsichtlich seiner Dauer, des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses und der Artefaktfreiheit der Spektren beschrieben. Erweiterungen des grundlegenden Experiments werden in den Kapiteln 4.2, 4.3 und 4.4 vorgestellt.

#### 2.4.1. Ernst-Winkel-Anregung

In einem einfachen Pulsexperiment zeigt die Signalintensität eine Sinusabhängigkeit vom Rotationswinkel des Anregungspulses. Für ein Experiment, das nur aus einem *scan* besteht, wird die höchste Signalintensität bei einem Winkel von  $90^\circ$  erhalten. Aus dem Ausdruck des Signal-zu-Rausch-Verhältnis in Gleichung 2.28 geht hervor, dass die Signalintensität mit dem Faktor  $n$  der akkumulierten *scans* wächst, während das Rauschlevel nur mit dem Faktor  $\sqrt{n}$  ansteigt. Einmaliges Wiederholen der Pulssequenz liefert also einen Signalgewinn mit dem Faktor  $\sqrt{2}$ . Um das Signal zu maximieren und dennoch die Messzeit nicht unverhältnismäßig zu vergrößern, ist es nötig, die Erholzeit  $t_{\text{Erh}}$  zwischen zwei *scans* eines Experiments zu verkürzen. Allerdings ist dadurch der Prozess der longitudinalen Relaxation nicht abgeschlossen. Der Wiederaufbau der Gleichgewichtsmagnetisierung ist unvollständig. Die maximale Signalintensität wird dann nicht weiter durch Anwendung eines  $90^\circ$ -Pulses erhalten. Stattdessen kann ein optimierter Rotationswinkel  $\beta_{\text{opt}}$  verwendet werden, der nach

$$\cos \beta_{\text{opt}} = \exp\left(-\frac{t_{\text{Erh}}}{T_1}\right) \quad (2.30)$$



erhalten wird [88].  $t_{\text{Erh}}$  setzt sich aus dem Erholungs-*delay*  $d_r$  und der Aquisitionszeit  $t_{aq}$  zusammen.  $T_1$  ist die Zeitkonstante der longitudinalen Relaxation. Durch Anwendung des optimierten Rotationswinkels des Anregungspulses wird nur ein kleiner Teil der Magnetisierung angeregt. Der Rest der Magnetisierung verbleibt im Gleichgewichtszustand entlang der  $z$ -Achse. Bei gegebener Wiederholrate der Sequenz wird auf diese Weise die maximale Signalintensität erhalten. Einfach ausgedrückt gilt, je höher die Wiederholrate oder je größer die  $T_1$ -Zeit, desto kleiner der Rotationswinkel des Pulses für den die maximale Signalintensität erreicht werden kann. Bei der Aufnahme eindimensionaler Kohlenstoffspektren wird im Allgemeinen Ernst-Winkel-Anregung, mit einem Anregungswinkel von meist  $\beta_{opt} = 30^\circ$ , verwendet.

In zweidimensionalen Experimenten die einen INEPT-Schritt enthalten, wird Protonen-Magnetisierung auf einen Heterokern übertragen. Dabei kann nicht einfach der Anregungswinkel eines Pulses geändert werden, um die Signalintensität eines Experiments, das aus mehreren *scans* aufgebaut ist, zu erhöhen. In den ASAP-HSQC-Experimenten, die im Ergebnisteil vorgestellt werden, wird daher der INEPT-Transfer optimiert, um die Signalintensität zu steigern. Das Transfer-*delay* wird von  $\Delta$  auf  $\Delta'$  verkürzt, um Magnetisierung zurückzubehalten und so einen dynamischen Gleichgewichtszustand zu erreichen.

#### 2.4.2. ASAP- und ALSOFASST-HMQC

Die in Kapitel 2.1 angesprochene Erholzeit zwischen einzelnen *scans* eines Experiments kann elegant durch den sogenannten ASAP-Ansatz [90] umgangen werden. Dabei werden detektierte Protonen mit dem Polarisations-Reservoir der nicht-detektierten Spins über eine Mischsequenz in Kontakt gebracht, wodurch eine Erhöhung der Polarisation der detektierten Protonen erhalten wird. Zum Reservoir zählen die passiven Protonen, die zu etwa 98,9 % vorkommen. Sie werden als passive Protonen bezeichnet, da sie an den NMR-inaktiven  $^{12}\text{C}$ -Kern gebunden sind. In einem herkömmlichen HMQC- oder HSQC-Experiment wird die zugehörige Magnetisierung durch die Gradienten dephasiert, wie in Kapitel 2.3.4 bereits erklärt. Als aktive Protonen werden die zum Signal beitragenden  $^{13}\text{C}$ -gebundenen Protonen bezeichnet. Aufgrund der natürlichen Häufigkeit des  $^{13}\text{C}$ -Isotops von nur etwa 1,1 % ist der Anteil der Magnetisierung der aktiven Protonen sehr viel kleiner, als der der passiven. Zusätzlich zu den  $^{12}\text{C}$ -gebundenen Protonen zählt zur Reservoir-Magnetisierung auch noch zurückbleibende Magnetisierung, die im INEPT-Transferschritt nicht übertragen wurde.

Eine Pulssequenz beeinflusst grundsätzlich alle Arten von Protonen.  $^{12}\text{C}$ -gebundene Protonen werden allerdings im INEPT nicht übertragen, da die Kopplung zu  $^{13}\text{C}$ -Kernen

vernachlässigbar klein ist. Im weiteren Verlauf einer Pulssequenz sollte die Protonenmagnetisierung des Reservoirs dann möglichst nicht mehr angeregt werden, beziehungsweise sie sollte sich vor der Anwendung der Gradienten zur Aufnahme des FID wieder entlang der  $z$ -Richtung befinden. Die Pulse des ASAP-HMQC sind daher so angeordnet, dass diese Bedingung erfüllt ist.

Die ASAP-Experimente enthalten dann eine Mischsequenz, die für den Transfer der Reservoir-Magnetisierung auf die aktiven Protonen genutzt wird. Der zugrundeliegende Mechanismus beruht auf dem homonuklearen Hartmann-Hahn-Transfer (siehe Kapitel 2.5.1), durch den Polarisation umliegender Protonen des skalar gekoppelten Protonen-Netzwerkes übertragen wird. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Mischsequenzen verwendet. Für die Messung isotroper Proben wurde *Decoupling In the Presence of Scalar Interactions* (DIPSI-2) angewandt, für die Untersuchung teilweise-orientierter Proben *Modified phase-cycled Carr-Purcell-type multiple-pulse sequence* (MOCCA-XY16). Im Falle des ASAP-HMQC wurde die Mischsequenz, basierend auf *Wideband, Uniform Rate, and Smooth Truncation* (WURST)-2-Pulsen, mit einer Mischzeit von 40 ms verwendet. Das entsprechende ALSOFAST-Experiment ist prinzipiell immer gleich aufgebaut, wie das ASAP-Experiment, jedoch wird keine Mischsequenz angewandt. Stattdessen wird die Mischzeit durch ein *delay* gleicher Länge ersetzt.

Für beide Experimente ist es durch die Erhaltung des Reservoirs möglich, die Erholzeit zwischen der Aufnahme zweier *scans* stark zu verkürzen. Der unzureichende Wiederaufbau der Gleichgewichts- $z$ -Magnetisierung wird durch die kombinierten Techniken weitestgehend kompensiert. Es werden folglich vollständige  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMQC- oder  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektren in guter Qualität erhalten, die in den Abbildungen 4.3, 4.6, 4.10, 4.11 und 4.12 im Ergebnisteil dieser Arbeit gezeigt werden. Die Gesamtexperimentdauer ist aufgrund der hohen Wiederholrate der Sequenz deutlich reduziert.

Ein HMQC besitzt, wie in Kapitel 2.3.3 bereits beschrieben, verglichen mit einem HSQC eine herabgesetzte Auflösung in der indirekten Dimension. Ein wesentlicher Aspekt der Entwicklung der im Ergebnisteil vorgestellten Experimente war daher die Verwendung des ASAP-, beziehungsweise ALSOFAST-Ansatzes in Kombination mit einem HSQC-Experiment.

## 2.5. Sonstige Techniken

### 2.5.1. Polarisations- und Kohärenztransfer

Heteronukleare zweidimensionale Experimente enthalten, wie bereits in Kapitel 2.3 gezeigt, einen Baustein, der zur Übertragung von Magnetisierung dient. Eine Möglichkeit, Magnetisierung zu übertragen, ist die Verwendung eines INEPT-Schrittes, der in Kapitel 2.3.2 vorgestellt wurde. Eine weitere wichtige Methode ist der Hartmann-Hahn-Transfer. In der ursprünglichen Veröffentlichung von Hartmann und Hahn [95] wurde Kreuzpolarisation zum Austausch von Magnetisierung in Festkörpern verwendet. In Festkörpern sind die Spins hauptsächlich über dipolare Kopplung miteinander verbunden. Durch heteronuklearen Hartmann-Hahn-Transfer innerhalb des Netzwerkes ist es möglich, die Polarisation eines Kerns mit kleinem gyromagnetischen Verhältnis zu erhöhen. Im homonuklearen Fall ist die Voraussetzung für den Transfer, die Erfüllung der Hartmann-Hahn-Bedingung, die durch

$$\Delta\nu_{12}^{eff} = |\nu_1^{eff} - \nu_2^{eff}| = 0 \quad (2.31)$$

gegeben ist. Die effektive chemische Verschiebungsdifferenz der gekoppelten Spins muss also gleich Null sein. Wenn die beiden Spins unterschiedliche Resonanzfrequenzen besitzen, können Radio-Frequenz (RF)-Pulse angewandt werden, um die Bedingung zu erfüllen. Die Spins präzedieren dann um die Achse und mit der Amplitude des zusätzlichen RF-Feldes. In Flüssigkeiten ist die relevante Kopplung, die zur Ausbildung eines Netzwerkes führt, die  $J$ -Kopplung. Der Hamiltonoperator eines skalar gekoppelten Zweispinsystems ist durch

$$\mathcal{H} = 2\pi \left( \underbrace{\nu_1 I_{1z} + \nu_2 I_{2z}}_{\text{chemische Verschiebung}} + \underbrace{J_{12} \vec{I}_1 \cdot \vec{I}_2}_{\text{J-Kopplung}} \right) \quad (2.32)$$

gegeben.  $I_1$  und  $I_2$  sind die Spinoperatoren von Spin 1 und 2,  $I_{1z}$  und  $I_{2z}$  deren  $z$ -Komponenten. Die ersten beiden Terme beschreiben die Entwicklung der chemischen Verschiebung der beiden Spins, der dritte Term steht für die  $J$ -Kopplung. Wird die Hartmann-Hahn-Bedingung erfüllt, reduziert sich der Ausdruck zu

$$\mathcal{H} = 2\pi J_{12} \vec{I}_1 \cdot \vec{I}_2 \quad (2.33)$$

beziehungsweise

$$\mathcal{H} = 2\pi J_{12} (I_{1x} I_{2x} + I_{1y} I_{2y} + I_{1z} I_{2z}). \quad (2.34)$$

Der effektive Hamiltonoperator der skalar gekoppelten Spins wird auch als isotropes Mischen bezeichnet. In vielen Experimenten wird diese Methode des Polarisations- oder Kohärenztransfers verwendet, um Informationen über Kopplungsnetzwerke zu erhalten.

Die Reichweite des Transfers erstreckt sich über mehrere Bindungen, das Experiment wird daher *Total Correlation Spectroscopy* (TOCSY) genannt. Experimente, die auf einem homonuklearen TOCSY-Transfer basieren, finden in vielen Bereichen der NMR-Spektroskopie Anwendung [96–99]. Durch die Verwendung speziell optimierter Pulssequenzen kann ein Transfer von Magnetisierung ermöglicht werden. Die DIPSI-2-Mischsequenz [100] zählt zu den meist verwendeten Sequenzen. Sie wurde ursprünglich als Entkopplungssequenz konzipiert, eignet sich allerdings auch für isotropes Mischen. Sie besitzt die Form  $RR\overline{RR}$  eines MLEV-4 Superzyklus (Malcolm Levitt's decoupling cycle) [101].  $R$  steht für eine Pulsfolge,  $\overline{R}$  für dieselbe Pulsfolge mit invertierter Phase. Mit dem zusammengesetzten Puls

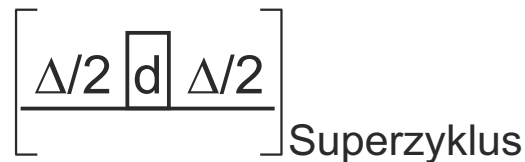
$$R = 320(0) \quad 410(180) \quad 290(0) \quad 285(180) \quad 30(0) \quad 245(180) \quad 375(0) \quad 265(180) \quad 370(0). \quad (2.35)$$

Die Rotationswinkel und Phasen (in Klammern) der Pulse sind in Grad angegeben,  $30(0)$  stellt beispielsweise einen  $30^\circ$ -Puls mit der Phase 0 dar. In den ASAP-Experimenten für die Untersuchung flüssiger Proben wird diese Mischsequenz verwendet, um die Polarisation des Reservoirs auf die  $^{13}\text{C}$ -gebundenen Protonen zu übertragen. Das Erholungs-*delay* wird nahezu vollständig durch die Mischsequenz ersetzt. Durch den Polarisationstransfer wird der unzureichende Wiederaufbau der  $z$ -Magnetisierung durch  $T_1$ -Relaxation teilweise kompensiert. Durch die höhere Wiederholrate der Sequenz ist die Gesamtexperimentzeit deutlich verringert.

Für teilweise orientierte Proben (siehe Kapitel 2.2) sind dipolare Kopplungen wirksam. Die dipolare Kopplung besitzt eine andere Symmetrie als die skalare Kopplung. Der reduzierte Hamiltonoperator, der ein dipolar gekoppeltes homonukleares Zweispinsystem beschreibt, besitzt eine andere Form. Ist die Hartmann-Hahn-Bedingung erfüllt, ist er durch

$$\mathcal{H} = 2\pi D_{12}(I_{1x}I_{2x} + I_{1y}I_{2y} - 2I_{1z}I_{2z}) \quad (2.36)$$

gegeben.  $D_{12}$  beschreibt die dipolare Kopplung zwischen Spin 1 und Spin 2. Im Falle teilweise orientierter Proben wird mit  $D_{12}$  die dipolare Restkopplung wiedergegeben. Die Transfereigenschaften des genannten dipolaren Hamiltonoperators ist grundlegend anders als die des isotropen Hamiltonoperators. Um einen konstruktiven Magnetisierungstransfer zu erhalten, müssen andere Mischsequenzen verwendet werden, die gezielt für den konstruktiven Polarisationstransfer in Gegenwart dipolarer Kopplung optimiert sind. Eine solche Mischsequenz ist die MOCCA-XY16-Sequenz [102, 103]. In Abbildung 2.13 ist das grundsätzliche Puls-*delay*-Element dargestellt, aus dem die Sequenz aufgebaut ist.



**Abbildung 2.13:** Baustein der MOCCA-XY16-Sequenz. Das Element besteht aus einem  $180^\circ$ -Puls der Länge  $d$  in der Mitte zweier *delays*, die eine Gesamtlänge  $\Delta$  besitzen.

Die MOCCA-XY16-Sequenz besteht aus einem Superzyklus, er definiert die Phase des  $180^\circ$ -Pulses wie folgt:

$$xyxy \ yxyx \ \overline{xyxy} \ \overline{yxyx}. \quad (2.37)$$

Durch die Verwendung des Superzyklus werden Pulsimperfectionen kompensiert, so dass diese sich weniger stark auswirken und eine bessere Refokussierung erreicht wird.

### 2.5.2. NUS

*Non Uniform Sampling* (NUS) [104–106] ist eine Methode zur Reduktion der Experimentzeit mehrdimensionaler NMR-Experimente. Konventionell wird das kontinuierliche Signal, der FID, durch  $n$  diskrete äquidistante Werte digitalisiert. Der kleinste Abstand zweier Punkte definiert nach dem Nyquist-Theorem die höchste darstellbare Frequenz, also die spektrale Breite. In mehrdimensionalen Experimenten kann der Teil der tatsächlich aufgenommenen Punkte in der indirekten Dimension um einen gewissen Prozentsatz reduziert werden. Der Abstand der Inkremente ist dann nicht mehr äquidistant. Die Datenmatrix ist unvollständig. Fehlende Datenpunkte werden allerdings ausgehend von den aufgenommenen Punkten vor Anwendung der Fourier-Transformation rekonstruiert. Oder das Spektrum wird durch eine Kombination aus Transformation und Rekonstruktion erhalten. Da die Aufnahme des Experiments jedoch weniger Inkremente umfasst, ist die benötigte Gesamtzeit kleiner. Die resultierenden Spektren besitzen die gleiche digitale Auflösung wie konventionell aufgenommene Spektren, das Signal-zu-Rausch-Verhältnis ist allerdings geringer, da weniger echte Datenpunkte aufgenommen wurden. Die benötigte Anzahl tatsächlich aufgenommener Punkte skaliert unter anderem mit  $\log_2$  der erwünschten digitalen Auflösung in der indirekten Dimension. Alle unter Verwendung von NUS aufgenommenen Spektren wurden mit *Compressed Sensing* (CS) [107, 108] rekonstruiert.



## 3. Materialien und Methoden

### 3.1. Verwendete Hardware und Software

Die gezeigten Messungen wurden an zwei NMR-Spektrometern durchgeführt. Die Mehrzahl der Spektren aus Kapitel 4.5 wurden an einem 600 MHz Spektrometer der Firma Bruker, das mit einer Avance II+ Konsole ausgestattet ist, aufgenommen. Der BBI (*Broadband Inverse*) invers detektierende Probenkopf mit z-Gradienten besitzt einen Innendurchmesser von 5 mm. Die Spektren der entwickelten schnellen Experimente aus Kapitel 4.1, sowie die Spektren des empfindlichkeitsoptimierten  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Experiments (siehe Kapitel 4.5) wurden an einem Bruker 600 MHz Spektrometer, ausgestattet mit einer Avance III Konsole und einem 5 mm TCI (Triple Channel Invers)  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  invers detektierenden Kryoprobenkopf mit z-Gradienten, aufgenommen. Die schnellere Elektronik der Konsole ermöglicht die Verarbeitung der Pulssequenzen der stark verkürzten Experimente.

Die NMR-Spektren wurden mit der Software TopSpin in den Versionen 3.2 und 3.5 prozessiert. Die Rekonstruktion der Spektren, die unter der Verwendung von NUS aufgenommen wurden, erfolgte durch den CS-Algorithmus [107] der TopSpin Software. Relaxations- und Diffusionsmessungen wurden mit dem Dynamics Center 2.0.4 Software Paket ausgewertet. Die 2D Spektren in Kapitel 4.5 wurden mit dem Programm MestreNova der Version 10.0.1-14719 zur Reduktion der Artefakte des  $t_1$ -Rauschens bearbeitet. Zur graphischen Bearbeitung der Abbildungen wurde CorelDRAW X7 verwendet.

### 3.2. Proben

Die Experimente zur Weiterentwicklung der Pulssequenzen wurden zunächst an Standardproben getestet. Die Liste der verwendeten Proben umfasst eine 500 mM/ $\text{CDCl}_3$  Menthol-Probe, eine 200 mM/ $\text{D}_2\text{O}$  Maltose-Probe, eine 100 mM/ $\text{D}_2\text{O}$  Saccharose-Probe, eine 300 mM/ $\text{CDCl}_3$  Coffein-Probe und eine 350 mM/ $\text{D}_2\text{O}$  Glucose-Probe. Die Zuordnung der Signale ist in den Abbildungen 3.1, 3.2, 3.3 und 3.5 jeweils anhand von entkoppelten und gekoppelten  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektren dargestellt. Die Signalzuordnung für Coffein wird an einem 1D

$^{13}\text{C}$ -Spektrum in Abbildung 3.4 veranschaulicht, da der Fokus des Kapitels 4.4 auf der Betrachtung und dem Vergleich von  $^{13}\text{C}$ -Projektionen liegt.

In Kapitel 4.2 wird das CLIP-ASAP-HSQC vorgestellt. Die Vorzüge des Experiments werden vor allem dann deutlich, wenn teilweise orientierte Proben untersucht werden. Es wurden daher zwei verschiedene Proben verwendet. Die Spektren in Abbildung 4.15 wurden unter Verwendung einer flüssigkristallinen Probe aus Poly- $\gamma$ -Benzyl-L-Glutamat (PBLG) in  $\text{CDCl}_3$  als flüssigkristalline Phase und 2-(4-Chlorophenyl)-5-(dimethylphosphoryl)-4-phenylpyrrolidin-3-carboxylat als zu messende Substanz aufgenommen. Die Probenkonzentration betrug etwa 300 mM. Weitere Eigenschaften der Probe sowie die Probenvorbereitung werden in Ref. [109] erläutert. Die quadrupolare Aufspaltung des Deuteriumsignals des Lösungsmittels betrug  $\Delta\nu_{\text{Q}} = 479,1$  Hz bei einer Magnetfeldstärke von 600 MHz und einer Temperatur von 300 K.

Beide Sequenzen des CLIP-ASAP-HSQC wurden für die Messung einer teilweise orientierten Probe verwendet, bei der die Orientierung durch ein gestrecktes Polyethylenoxid Diacrylat (PEODA)-Gels [110] erzielt wird. Es wurden 151,7 mg Polyethylenoxid Diacrylat (PEODA) mit einer Molmasse von 35 kDa in 500  $\mu\text{L}$   $\text{D}_2\text{O}$  gelöst. Anschließend wurde das Polymer durch Zugabe von 1,5  $\mu\text{L}$  einer Lösung aus 10 % (V/V) Tetramethylethyldiamin (TEMED) in  $\text{D}_2\text{O}$  und 5,0  $\mu\text{L}$  einer Lösung aus 10 % (m/m) Ammoniumperoxodisulfat (APS) in  $\text{D}_2\text{O}$  vernetzt. Eine vorbereitete 100 mM/ $\text{D}_2\text{O}$  Saccharose-Lösung wurde auf das Gel gegeben. Dadurch quillt das Polymer-Gel auf. Das aufgequollene Gel wurde schließlich in einen Silikonschlauch überführt, der in einem NMR-Röhrchen fixiert wird. Die Streckapparatur [111–114] ermöglicht die Skalierung der Streckung und der damit verbundenen Orientierung der Probe. Auf diese Weise ist es möglich, die Stärke der dipolaren Restkopplungen (RDCs) zu beeinflussen. Für die Messungen in Kapitel 4.2 wurde das Gel bis zu einem Extensionsfaktor  $\Xi = 0,5$  getreckt. Der Extensionsfaktor wird gemäß Referenz [115] aus der Länge des gestreckten  $L$  und des ungestreckten Gels  $L_0$  nach

$$\Xi = (L/L_0) - 1 \quad (3.1)$$

berechnet. Die quadrupolare Aufspaltung des Deuteriumsignals des Lösungsmittels  $\text{D}_2\text{O}$ , die durch die Streckung des Gels erreicht wurde, betrug  $\Delta\nu_{\text{Q}} = 3,4$  Hz, bei einer Magnetfeldstärke von 600 MHz und einer Temperatur von 300 K. Dies entspricht einer sehr schwachen Orientierung der Probe. Die Homogenität des Gels wurde anhand von  $z$ -Profilen überprüft, die mit Hilfe von eindimensional-ortsaufgelösten Deuteriumspektren erhalten werden [116].

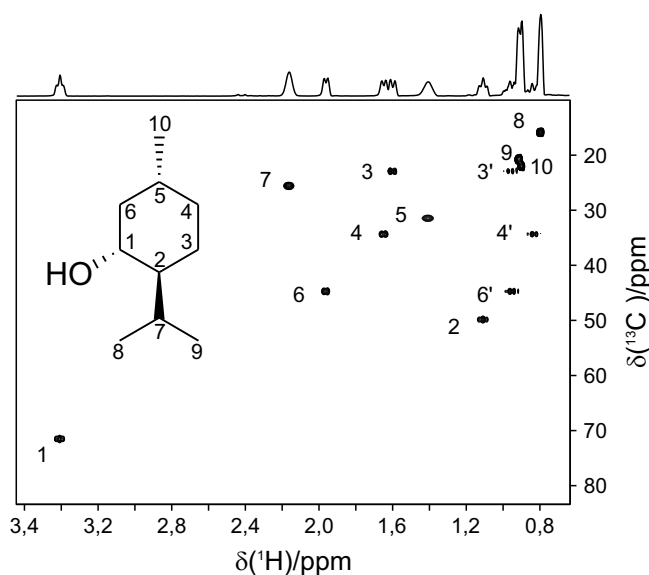
Gegenstand des Kapitels 4.5 ist die Untersuchung zweier unterschiedlicher Motoröle. Motoröl 1 entstammt einem Prüfaufbau mit unbekannter Motor-Laufzeit, Motoröl 2 wurde in zwei



unterschiedlichen PKW-Motoren (Diesel- und Ottomotor) verwendet, die Motorlaufzeiten betragen 20 000 km und 30 000 km. Abgesehen von den gebrauchten Motorölen wurden auch neue Motoröle untersucht. Die physikalischen Eigenschaften der Motoröle wurden am Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik des KIT von Eva Förster experimentell an einem ARES-Rotationsrheometer bestimmt, sie sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

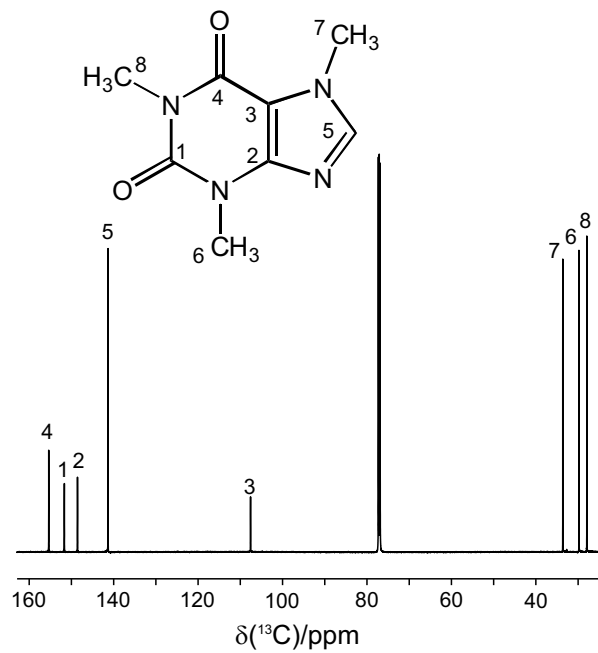
**Tabelle 3.1:** Physikalische Eigenschaften der untersuchten Motoröle in gebrauchtem und neuem Zustand.

Physikalische Größe	Motoröl 1		Motoröl 2		
	neu	gebraucht	neu	gebraucht I (Dieselmotor)	gebraucht II (Ottomotor)
dynamische Viskosität bei 20 °C [mPa·s]	78	100	97	96	71
Motorlaufzeit der Öle [km]	0	unbekannt	0	20 000	30 000

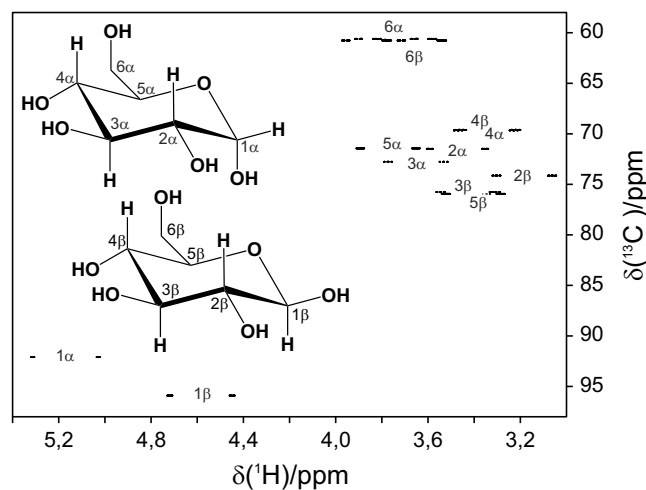


**Abbildung 3.1:** Signalzuordnung für Menthol anhand eines entkoppelten  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrums. Das Spektrum wurde an einem 600 MHz Spektrometer bei einer Temperatur von 300 K aufgenommen.





**Abbildung 3.4:** Signalzuordnung für Coffein anhand eines 1D  $^{13}\text{C}$ -Spektrums. Das Spektrum wurde an einem 600 MHz Spektrometer bei einer Temperatur von 300 K aufgenommen. Das herausstechende Signal mit der chemischen Verschiebung von 77 ppm ist dem Lösungsmittel Chloroform zuzuordnen.



**Abbildung 3.5:** Signalzuordnung für Glucose anhand eines gekoppelten  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrums. Das Spektrum wurde an einem 600 MHz Spektrometer bei einer Temperatur von 300 K aufgenommen.

### 3.3. Kopplungsmessungen

Ein zentraler Aspekt der Experimente, die in Kapitel 4.2 vorgestellt werden, ist die Verwendung der erhaltenen Spektren zur Messung von Kopplungen. Im Fall des CLIP-ASAP-HSQC sind die  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -Korrelationssignale der Spektren der isotropen Proben durch die heteronukleare  $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplung zu einem Dublett aufgespalten. Werden teilweise orientierte Proben untersucht, so ist die beobachtete Aufspaltung  $^1T_{\text{CH}}$  (Gesamtkopplung zwischen Kohlenstoff und Protonen entlang einer Bindung) eine Summe aus  $^1D_{\text{CH}}$  (Dipolare Restkopplung zwischen Kohlenstoff und Protonen entlang einer Bindung) und der  $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplung.  $^1T_{\text{CH}}$  ergibt sich also zu

$$^1T_{\text{CH}} = ^1J_{\text{CH}} + ^1D_{\text{CH}}. \quad (3.2)$$

Die  $^1D_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten können also nur durch vorherige Extraktion der  $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten der Spektren der isotropen Proben und der  $^1T_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten von Spektren teilweise orientierter Proben errechnet werden. Um in beiden Fällen eine besonders genaue Bestimmung der Kopplungskonstanten zu gewährleisten, wurde die in Referenz [114] beschriebene Routine angewendet. Die Vorgehensweise ist in Abbildung 3.6 dargestellt. Aus den Spektren wird eine Zeile in der Protonen-Dimension für jede  $^{13}\text{C}$ -Frequenz extrahiert. Dieser  $F_1$ -Streifen wird dupliziert. Das Duplikat wird bezüglich des Originals verschoben, um eine optimale Überlappung der Signale zu erzielen. Diese Verschiebung in Hz repräsentiert die Kopplungskonstante. Der Fehler wird bestimmt, indem jeweils so gegeneinander verschoben wird, dass die Signalformen gerade noch überlappen. Zunächst werden die linken Schenkel der Signale betrachtet. Anschließend werden die rechten Ränder zur Überlappung gebracht. Der jeweilige Fehler ergibt sich dann als Betrag der Differenz aus dem notierten idealen Wert der Kopplungskonstanten und den weiter entfernten äußersten Werte. Schließlich wird der größere Fehler verwendet, er dient als Fehlergrenze der Kopplungskonstanten-Extraktion. Da die dipolare Restkopplung gemäß

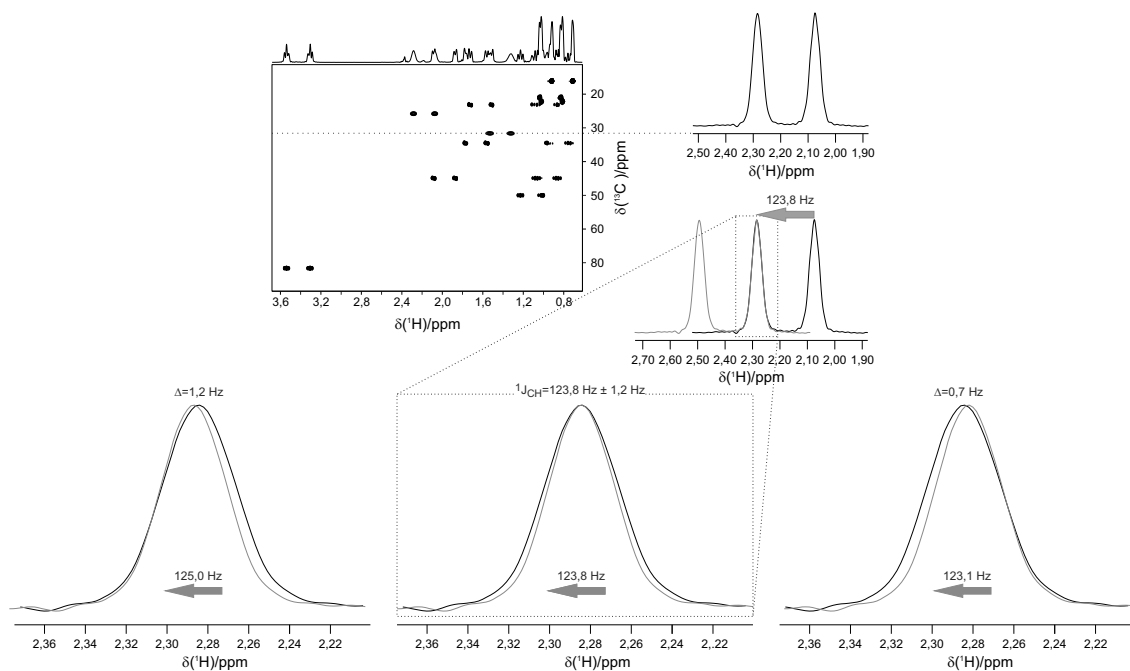
$$^1D_{\text{CH}} = ^1T_{\text{CH}} - ^1J_{\text{CH}} \quad (3.3)$$

errechnet wird, ergibt sich der Fehler der dipolaren Restkopplung  $\Delta^1D_{\text{CH}}$  zu

$$\Delta(^1D_{\text{CH}}) = \sqrt{(\Delta(^1J_{\text{CH}}))^2 + (\Delta(^1T_{\text{CH}}))^2}. \quad (3.4)$$

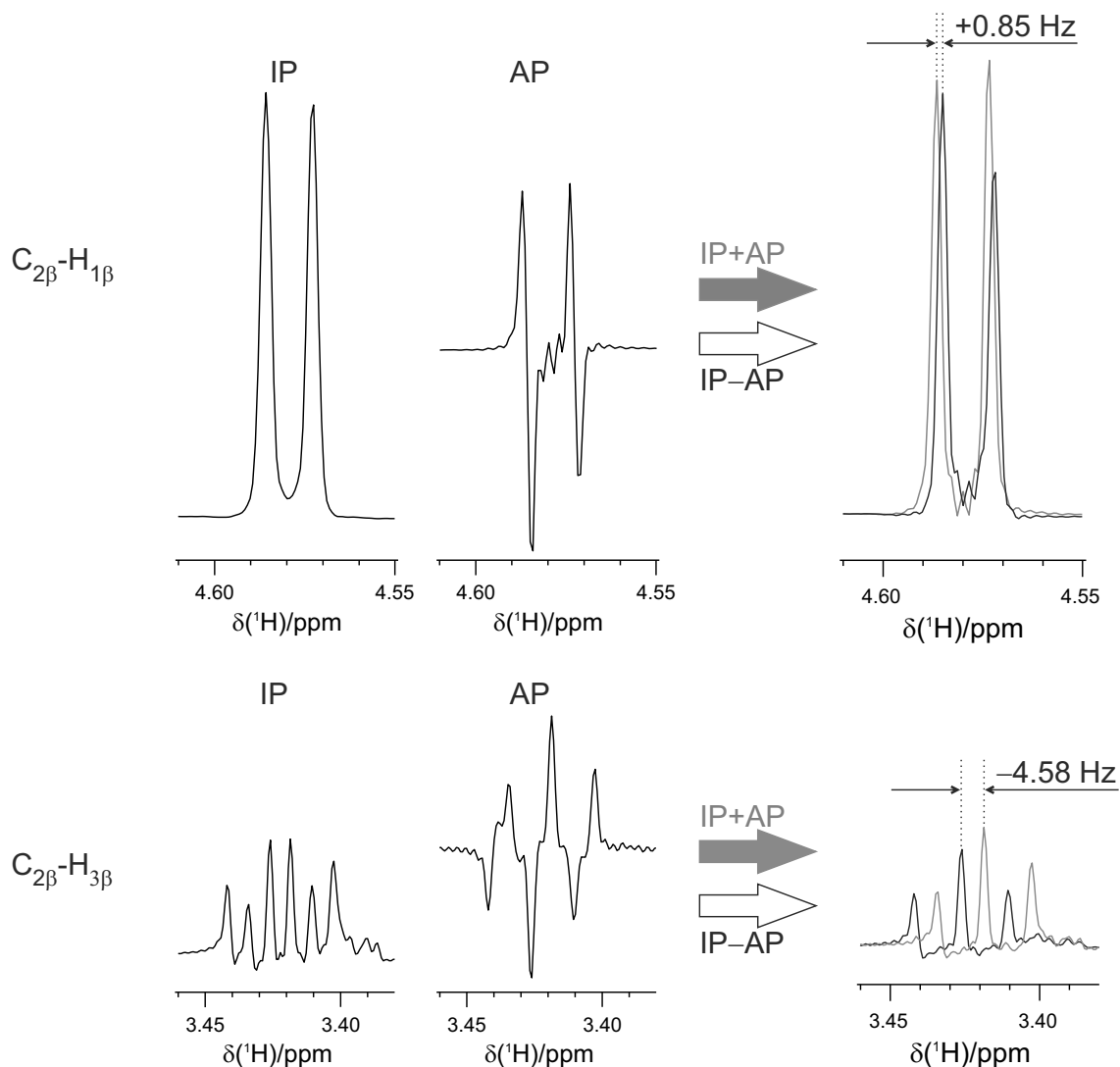
Dabei werden  $\Delta^1J_{\text{CH}}$  und  $\Delta^1D_{\text{CH}}$  gemäß der oben beschriebenen Routine bestimmt.

In Kapitel 4.3 werden die ASAP-HSQC-TOCSY-IPAP-Experimente zur Extraktion von  $^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungen vorgestellt. Für die Bestimmungen der  $^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten wurde nach einem Schema gemäß der in Referenz [83] beschriebenen Methode vorgegangen. Das



**Abbildung 3.6:** Vorgehensweise zur Extraktion von Kopplungskonstanten, gezeigt anhand eines gekoppelten HSQC-Spektrums von Menthol. Zunächst wurde für Signal 5 die Zeile in der Protonendimension extrahiert und dupliziert. Durch Verschiebung werden anschließend die Werte für die Kopplungskonstante und die dazugehörigen äußeren Werte als Fehler bestimmt. Das Spektrum wurde unter Verwendung der originalen CLIP-ASAP-HSQC-Pulssequenz, dargestellt in Abbildung 4.13, aufgenommen.

Verfahren ist in Abbildung 3.7 verdeutlicht. Es werden jeweils immer zwei gekoppelte Spektren aufgenommen, das Inphase- und das Antiphase-Spektrum. Aus beiden Spektren wird dann zunächst die gleiche Zeile in der Protonendimension für die betreffende  $^{13}\text{C}$ -Frequenz extrahiert. Diese werden anschließend sowohl addiert als auch subtrahiert, die resultierenden Subspektren werden abgespeichert. Die Subspektren werden übereinander dargestellt und gegeneinander verschoben, um eine optimale Überlappung der Signale zu erhalten. Der Wert in Hz der Verschiebung wird als  $^n J_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstante notiert. Der Fehler der Kopplungskonstantenbestimmung wird, wie bereits oben beschrieben, abgeleitet. Die Experimente ermöglichen eine vorzeichenempfindliche Bestimmung der  $^n J_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten.



**Abbildung 3.7:** Vorgehensweise zur Bestimmung von  ${}^1J_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten mit dem Inphase-/Antiphase-Ansatz der ASAP-HSQC-TOCSY-IPAP-Experimente für Glucose. Dargestellt sind Ausschnitte der Zeilen aus dem Inphase- und Antiphase-Spektrum für die  ${}^{13}\text{C}$ -Frequenz der  $\text{C}_{2\beta}$ -Resonanz. Es werden zwei Beispiele der Kopplungsextraktion gezeigt: Oben abgebildet ist die Korrelation zum  $\text{H}_{1\beta}$ -Proton, unten die zum  $\text{H}_{3\beta}$ -Proton. In beiden Fällen handelt es sich um eine Kopplung über zwei Bindungen. Durch Addition und Subtraktion werden zwei Subspektren erhalten. Die  ${}^2J_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten werden durch Verschiebung dieser Subspektren bestimmt. Die Methode ermöglicht eine vorzeichenempfindliche Bestimmung. Der Fehler wird entsprechend der im Text beschriebenen Methode ermittelt. Die zugrundeliegenden Spektren wurden unter Verwendung der CLIP-ASAP-HSQC-TOCSY-IP-Pulssequenz und der ASAP-HSQC-TOCSY-AP-Pulssequenz aus Abbildung 4.24 aufgenommen.

## 3.4. Akquisitions- und Prozessierungsparameter

### 3.4.1. Schnelle Experimente

In diesem Kapitel sind einige allgemeine Einstellungen zu den gezeigten Experimenten angegeben. Abweichungen werden in der Bildunterschrift zu den entsprechenden Spektren beschrieben.

Alle HSQC-artigen Experimente enthalten Transferschritte zur Übertragung von Magnetisierung. Der Polarisationstransfer von Protonen auf den Heterokern, in diesem Fall  $^{13}\text{C}$ , ist als INEPT [26] bekannt und wurde bereits im Abschnitt 2.3.2 genauer beschrieben. Der Transfer erfolgt über die Heteronukleare Kopplung zwischen den Kernen. Das ideale Transfer-*delay*  $\Delta$  ist durch

$$\Delta = \frac{1}{4 \cdot {}^1J_{\text{CH}}} \quad (3.5)$$

definiert. Es wird auf eine mittlere Kopplungskonstante von  ${}^1J_{\text{CH}} = 145 \text{ Hz}$  eingestellt. Für  $\Delta$  ergibt sich demnach  $\Delta = 1,72 \text{ ms}$ .  $\Delta'$  beschreibt das gemäß der Ernst-Winkel-Anregung optimierte Transfer-*delay*, welches in den ASAP- und ALSOFAS-Experimenten verwendet wird. Der Wert für  $\Delta'$  unterscheidet sich von Probe zu Probe und wird gesondert ermittelt. Für die verwendeten Standardproben, allesamt kleine Moleküle, sind die Werte in Tabelle 3.2 angegeben.

**Tabelle 3.2:** Optimierte Transfer-*delays*  $\Delta'$  der Standardproben und die zugehörigen fiktiven Kopplungskonstanten  ${}^1J_{\text{CH}}^{\text{eff}}$ , welche in den ASAP- und ALSOFAS-Experimenten verwendet wurden.

Probe	$\Delta'$ [ms]	${}^1J_{\text{CH}}^{\text{eff}}$ [Hz]
Menthol	1,20	208
Maltose	1,30	192
Saccharose	1,28	196
Glucose	1,25	200

In HSQMBC- und HMBC-Experimenten ist das optimale Transfer-*delay*  $\Delta^n$  durch

$$\Delta^n = \frac{1}{4 \cdot {}^nJ_{\text{CH}}} \quad (3.6)$$

definiert.  ${}^nJ_{\text{CH}}$  beschreibt die Kopplung zwischen Kohlenstoff und Protonen über mehrere Bindungen. In den Experimenten wurde meist  ${}^nJ_{\text{CH}} = 8 \text{ Hz}$  eingestellt.

In den schnellen Experimenten der ASAP-Technik wird eine Mischsequenz angewandt um Polarisation zu übertragen. Für die meisten Experimente wurde DIPSI-2 [100] mit

einer Mischzeit von 34,54 ms und einer RF-Amplitude von 5 kHz eingesetzt, um isotropes Mischen zu erreichen. Für Experimente zur Untersuchung teilweise orientierter Proben wird eine andere Mischsequenz verwendet. MOCCA-XY16 ist eigens für den konstruktiven Transfer durch isotropes und dipolares Mischen optimiert [102, 103, 117]. Die Sequenz wurde daher für Experimente zur Bestimmung der dipolaren Restkopplungen verwendet. Die Mischzeit betrug in diesen Fällen 26,88 ms, die maximale RF-Amplitude 12,5 kHz. Aufgrund der kürzeren Mischzeit ist bei sonst gleichen experimentellen Einstellungen auch die Gesamtdauer im Vergleich geringfügig kleiner. Für die ALSOFASST-Experimente wird keine Mischsequenz angewandt, sie wird durch ein *delay* der gleichen Dauer ersetzt. Zur  $^{13}\text{C}$ -Entkopplung während der Akquisition des FID wurde GARP (*Globally Optimized Alternating-phase Rectangular Pulses*) [118] mit einer RF-Amplitude von 2,5 kHz verwendet. Bei  $^{13}\text{C}$ -1D-Experimenten wird Protonenentkopplung durch die Anwendung der WALTZ-Sequenz [119] mit einer RF-Amplitude von 3,6 kHz verwendet. Die kurzen Experimente beruhen auf einem deutlich verkürzten Erhol-*delay*  $d_r$ . Es wurde gewöhnlich auf 1 ms eingestellt. Im Allgemeinen wurden solche Experimente mit einem *scan* für jedes  $t_1$ -Inkrement aufgenommen. Phasenempfindlichkeit in der indirekten Dimension wird durch die Echo-/Antiecho-Kohärenzordnungsselektion erhalten. Die dazu benötigten Gradientenverhältnisse sind in den Bildunterschriften angegeben. Die Prozentangaben beziehen sich jeweils auf die maximale Gradientenstärke von 50,4 G/cm des verwendeten 5 mm TCI-Kryoprobekopfes. Die Selektion der gewünschten Transferwege erfolgt, in dem die Gradienten entsprechend der Angaben alterniert werden. Beispielsweise bedeutet die Angabe  $G_1 = (80\%, -80\%)$ ,  $G_2 = (20,1\%, 20,1\%)$ , dass zunächst das Gradientenpaar  $G_1 = 80\%$ ,  $G_2 = 20,1\%$  angewandt und dadurch entweder die Echo- oder die Antiecho-Komponente selektiert wird. Durch Invertierung von  $G_1$  wird dann die zweite Komponente erhalten. Die Echo-/Antiecho-Methode wird in den gezeigten Experimenten mit der TPPI-Technik (*Time Proportional Phase Incrementation*) [120] zur Artefakt-Minimierung kombiniert, die dazu invertierten Puls-Phasen sind der Bildunterschrift zu entnehmen. Die Puls-Phasen werden jeweils gemeinsam mit der *Receiver*-Phase  $\Phi_{\text{rec}}$  invertiert. Für die konventionell aufgenommenen HSQC-TOCSY-Vergleichsspektren aus Kapitel 4.3 erfolgte die phasenempfindliche Aufnahme mit der States-TPPI-Methode [121]. Zur Artefakt-Minimierung war es für diese Experimente notwendig, jeweils zwei *scans* aufzunehmen.








In den entwickelten schnellen Experimenten werden fast ausschließlich Breitbandpulse verwendet, die mit Hilfe der optimalen Steuerungstheorie abgeleitet wurden (engl. *Optimal Control Theory* (OCT)) [122–133]. Eine Übersicht über die verwendeten Pulse wird in



Tabelle 3.3 gegeben. Für alle Experimente und die verschiedenen Proben wurden die  $90^\circ$ -Protonenrechteckpulslänge bei vorgegebener Maximalleistung bestimmt. Auf dieser Basis wurde die Pulsleistung der geformten Pulse berechnet. Die geformten Pulse sind für eine RF-Amplitude von 20 kHz ( $^1\text{H}$ ), beziehungsweise 10 kHz ( $^{13}\text{C}$ ) definiert, dies entspricht Pulslängen eines  $90^\circ$ -Pulses von  $12,5\ \mu\text{s}$  ( $^1\text{H}$ ), beziehungsweise  $25\ \mu\text{s}$  ( $^{13}\text{C}$ ). Die Pulsleistung wird also ausgehend von der Pulsleistung des  $90^\circ$ -Rechteckpulses für die korrespondierenden Pulslängen ( $12,5\ \mu\text{s}$  ( $^1\text{H}$ ), beziehungsweise  $25\ \mu\text{s}$  ( $^{13}\text{C}$ )) eingestellt. Wird gleichzeitig ein *Broadband Universal Rotations By Optimized Pulses* (BURBOP)<sub>180x</sub>-Refokussierungspuls auf dem Protonenkanal und ein *Broadband Inversion By Optimized Pulses* (BIBOP)-Inversionspuls auf dem  $^{13}\text{C}$ -Kanal benötigt, wird ein speziell für diesen Zweck optimiertes *Broadband Universal and Broadband Inversion Pulses* (BUBI)-Pulselement [130, 132, 133] eingesetzt. Der *Chirp*<sub>comp</sub>-Puls ist aus vier *Chirp*-Pulsen [134] zusammengesetzt. In der HSQC-TOCSY-Vergleichssequenz 3.11 werden z-Filter zur Artefaktunterdrückung verwendet. Die Einstellung erfolgt gemäß Referenz [135].

Die Spektren wurden mit der Software TopSpin der Versionen 3.2 und 3.5 prozessiert. Meist wurde *linear prediction* [136] und *zero filling* [137, 138] verwendet, um die Anzahl der digitalen Punkte des FID zu erhöhen. Die unter NUS aufgenommenen Spektren wurden mit dem CS-Algorithmus [107] der TopSpin Software rekonstruiert.

**Tabelle 3.3:** Legende der verwendeten Breitbandpulse. Die Pulse, die mit Hilfe der optimalen Steuerungstheorie abgeleitet wurden (*Optimal Control Theory*), sind in [130] beschrieben, die Nomenklatur der Pulseigenschaften kann [122] entnommen werden. Die Symbole werden in den Pulssequenzen verwendet. Die Klasse PP steht für *Point-to-Point*-Pulse, UR für *Universal Rotation*-Pulse und AP für adiabatische Pulse [139, 140]. Der Zusatz ZF charakterisiert einen z-Filter [135, 141]. Die Rotationsachse für UR-Pulse oder *Chirp*<sub>comp</sub>-Pulse beschreibt die Drehachse bei einer in TopSpin eingestellten Phase von 0. Für PP-Pulse oder *Chirp*-Pulse ist der Transfer angegeben. Weiterhin ist die maximale RF-Amplitude angegeben. Die Bandbreite ist ein Maß dafür, über welchen spektralen Bereich der Puls den erwünschten Transfer erreicht. Die Toleranz gibt an, in welchem Maß Abweichungen der RF-Amplitude kompensiert sind.

Symbol	Name	Rotations- winkel [°]	Klasse	Rotations- achse (UR),(AP)/ Rotations- pfad (PP),(AP)		RF- Amplitude [kHz]		Bandbreite [kHz]		Pulslänge [µs]	Toleranz [%]		Digitali- sierungs- punkte		
				<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H
	BEBOP	90	PP	z nach x	z nach y	20	10	10	37,5	550	550	± 20	± 5	1100	1100
	BEBOP <sup>tr</sup>	90	PP	y nach z	-y nach z	20	10	10	37,5	550	550	± 20	± 5	1100	1100
	BIBOP	180	PP	z nach -z	z nach -z	20	10	11	37,5	100	600	± 20	± 5	200	1200
	BURBOP <sub>180Φ</sub>	180	UR	x	y	20	10	10	37,5	600	1100	± 20	± 5	1200	2200
	<i>Chirp</i>	180	AP	/	z nach -z	/	10	/	50	/	500	/	/	/	/
	<i>Chirp</i> <sub>comp</sub>	180	AP	/	x	/	10	/	50	/	2000	/	/	/	/
	<i>Chirp</i> <sup>ZF</sup>	180	AP	/	z nach -z	/	10	/	50	/	30 000 od. 50 000	/	/	/	/

### 3.4.2. Motoröle

Die Spektren zur Untersuchung der Motoröle wurden unter Verwendung etablierter Experimente aufgenommen. Eine Tabelle der Experimente und die dadurch gewonnenen Informationen sind in Tabelle 4.6 aufgeführt. Die in diesem Abschnitt angegebenen Akquisitions- und Prozessierungsparameter wurden für die Vergleiche der verschiedenen Motoröle einheitlich verwendet. Einige Parameter stimmen bei den verschiedenen Experimenten überein, sie werden zunächst aufgeführt, bevor die spezifischen Akquisitionsparameter genannt werden.

Die Phase und die Basislinie aller Spektren wurde korrigiert, teilweise durch Verwendung einer automatisierten Basislinienkorrektur und Phasenkorrektur. Die Prozessierung der eindimensionalen Protonen- und  $^{13}\text{C}$ -Spektren, sowie der Spektren der  $T_1$ -,  $T_2$ - und *Diffusion Ordered Spectroscopy* (DOSY)-Messungen erfolgte durch Multiplikation mit einer Exponentialfunktion. Durch die Apodisierung wird die Linienbreite leicht erhöht und so das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verbessert. Die Erhöhung der Linienbreite betrug für die Protonen-1D-Spektren und die Spektren der  $T_1$ - und  $T_2$ -Messungen jeweils 0,3 Hz, für die  $^{13}\text{C}$ -Spektren 2 Hz und 0,1 Hz für die Spektren der DOSY-Messungen. Für alle zweidimensionalen Experimente wurde die Echo-/Antiecho-Kohärenzordnungsselektion angewandt, um Phasenempfindlichkeit in der indirekten Dimension zu erhalten. Zusätzliche Artefakt-Minimierung erfolgte für die TOCSY-Protonenspektren und die HSQC-Spektren durch Anwendung der TPPI-Technik. Außerdem wurden diese Spektren unter Verwendung einer  $\cos^2$ -Apodisierungsfunktion prozessiert. Für die HSQC-Spektren kam GARP zur  $^{13}\text{C}$ -Entkopplung während der Akquisition des FID zum Einsatz.

Die Aufnahme eindimensionaler Protonen-Spektren erfolgte unter Verwendung eines 1D-NOESY-Experiments. Das Erholungs-*delay*  $d_r$  betrug 4 s, die Mischzeit 10 ms. Es wurden 32 *scans*, vier *dummy scans* und 98 304 komplexe Punkte aufgenommen. Die spektrale Breite betrug 18,028 kHz. Dies entspricht einer Akquisitionszeit von 2,73 s. Die Spektren wurden unter Verwendung von *linear prediction* und *zero filling* prozessiert. Die resultierende Anzahl der digitalen Punkte des prozessierten Spektrums betrug 262 144.

Eindimensionale  $^{13}\text{C}$ -Spektren wurden unter Protonen-Entkopplung mit 32 768 komplexen Punkten aufgenommen. Die spektrale Breite betrug 36,057 kHz, dies entspricht einer Akquisitionszeit von 0,45 s. Zur Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnis wurden 1024 *scans* aufaddiert. Für eine gleichmäßige Anregung über den gesamten spektralen Bereich wurde ein BEBOP-Puls (siehe Tabelle 3.3) verwendet. Heteronukleare Entkopplung wurde durch Anwendung der WALTZ-64-Sequenz [119] mit einer RF-Amplitude von 2,5 kHz erzielt.  $d_r$  betrug 1,5 s. Die Prozessierung erfolgte analog zu den Protonenspektren.

*Double Quantum Filtered* (DQF)-COSY-Spektren (*CO*rrelation *Sp*ectroscop*Y*) wurden mit  $16\,384$  ( $^1\text{H}$ )  $\times$   $1024$  ( $^1\text{H}$ ) Punkten, spektralen Breiten von jeweils  $7,211$  kHz ( $^1\text{H}$ ) und  $6,009$  kHz ( $^1\text{H}$ ) und Akquisitionszeiten von  $1,14$  s ( $^1\text{H}$ ) und  $0,09$  s ( $^1\text{H}$ ) aufgenommen. Für jedes  $t_1$ -Inkrement wurden acht *scans* aufaddiert und  $16$  *dummy scans* zu Beginn eines Experiments ausgeführt.  $d_r$  betrug  $1,5$  s. Der zweidimensionale FID wurde in der indirekten Dimension mit einer Sinus-Funktion multipliziert. Dargestellt sind jeweils die Absolutwerte der Intensität der Signale.

Die Aufnahme der homonuklearen TOCSY-Protonenspektren erfolgte mit  $8192$  ( $^1\text{H}$ )  $\times$   $1024$  ( $^1\text{H}$ ) komplexen Punkten, einer spektralen Breite von  $7,211$  kHz ( $^1\text{H}$ )  $\times$   $5,699$  kHz ( $^1\text{H}$ ) und den Akquisitionszeiten  $0,57$  s ( $^1\text{H}$ ) und  $0,09$  s ( $^1\text{H}$ ). Es wurden jeweils  $16$  *scans* für jedes  $t_1$ -Inkrement aufaddiert und  $16$  *dummy scans* zu Beginn der Experimente ausgeführt. Das Erholungs-*delay*  $d_r$  betrug  $2$  s. Isotropes Mischen wurde durch Anwendung der DIPSI-2-Sequenz [100] mit einer Mischzeit von  $57,56$  ms erreicht.

Heteronukleare  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektren mit empfindlichkeitserhöhtem Rücktransfer wurden mit  $2048$  ( $^1\text{H}$ )  $\times$   $1024$  ( $^{13}\text{C}$ ) komplexen Punkten aufgenommen. Die spektrale Breite in den beiden Dimensionen beträgt  $7,194$  kHz ( $^1\text{H}$ )  $\times$   $22,638$  kHz ( $^{13}\text{C}$ ), dies entspricht den Akquisitionszeiten  $0,14$  s ( $^1\text{H}$ ) und  $0,02$  s ( $^{13}\text{C}$ ). Es wurden jeweils acht *scans* für jedes  $t_1$ -Inkrement aufaddiert und vier *dummy scans* zu Beginn ausgeführt. Das Erholungs-*delay*  $d_r$  betrug  $2$  s. Die Spektren wurden abschließend mit dem Programm "Mestrenova" der Version 10.0.1-14719 zur Reduktion der Artefakte des  $T_1$ -Rauschens bearbeitet.

Das von Motoröl 1 aufgenommene  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum mit empfindlichkeitserhöhtem Rücktransfer wurde mit  $2048$  ( $^1\text{H}$ )  $\times$   $64$  ( $^{15}\text{N}$ ) komplexen Punkten, einer spektralen Breite von  $12,019$  kHz ( $^1\text{H}$ ) und  $12,115$  kHz ( $^{15}\text{N}$ ) und Akquisitionszeiten von  $0,085$  s ( $^1\text{H}$ ) und  $0,003$  s ( $^{15}\text{N}$ ) aufgezeichnet. Es wurden  $512$  *scans* akkumuliert. Das Erholungs-*delay*  $d_r$  betrug  $2$  s. Die Anzahl der digitalen Punkte des FID wurde durch *linear prediction* und *zero filling* erhöht.

Die Auswertung der Relaxations- und Diffusionsmessungen erfolgte mit dem "Dynamics Center" 2.0.4 Software Paket. *Inversion-Recovery*-Experimente dienen zur Bestimmung der  $T_1$ -Zeiten. Es wurde eine Reihe eindimensionaler Protonenspektren mit  $32\,768$  komplexen Punkten und einer spektralen Breite von  $12,019$  kHz, was einer Akquisitionszeit von  $1,36$  s entspricht, aufgenommen. Das Erholungs-*delay*  $d_r$  betrug  $10$  s. Je acht *scans* wurden aufaddiert und vier *dummy scans* zu Beginn des Experiments ausgeführt. Das *delay*, während dessen  $T_1$ -Relaxation stattfindet, wurde in  $26$  Schritten im Bereich von  $0,001$  s bis  $10$  s erhöht. Die  $T_1$ -Zeiten wurden durch Anpassung der Funktion aus Gleichung 2.5 erhalten.

Die  $T_1$ -Zeiten unterscheiden sich für die Spins innerhalb eines Moleküls.

Die Bestimmung der  $T_2$ -Zeiten erfolgte unter Verwendung der CPMG-Sequenz [70]. Die Spektren wurden mit 65 536 komplexen Punkten und einer spektralen Breite von 12,019 kHz, was einer Akquisitionszeit von 2,73 s entspricht, aufgenommen. Das Erholungs-*delay*  $d_r$  betrug 10 s. Je acht *scans* wurden aufaddiert und zusätzlich 16 *dummy scans* zu Beginn der Experimente ausgeführt. Der 180°-Puls in der CPMG-Sequenz hatte eine Länge von 16,3  $\mu$ s, der zeitliche Abstand zweier eingestrahler Pulse betrug 600  $\mu$ s. Durch Variation der Anzahl an Wiederholungen des Spin-Echo-Elements konnte die Relaxationszeit in einem Bereich von 1,2 ms bis 5,05 s eingestellt werden. Die  $T_2$ -Zeiten wurden durch Anpassung an die gemessenen Werte mit der Funktion aus Gleichung 2.9 erhalten.

Die Diffusionsexperimente wurden unter Verwendung der *BiPolar Longitudinal Eddy Current Delay* (BPLED)-Pulssequenz [142] aufgenommen. Die Gradientendauer  $\delta$  betrug 1,1 ms, die Gradientenstärke  $g$  wurde in 16 aufeinanderfolgenden Schritten im Bereich von  $g = 0,01$  T/m bis  $g = 0,52$  T/m erhöht. Es wurden 16 *scans* mit 65 536 komplexen Punkten und einer spektralen Breite von 12,019 kHz, was einer Akquisitionszeit von 2,73 s entspricht, aufgenommen. Zu Beginn wurden acht *dummy scans* ausgeführt. Das Erholungs-*delay*  $d_r$  betrug 10 s. Das Diffusions-*delay*  $\Delta$  wurde auf 100 ms eingestellt. Es wurde *zero filling* verwendet, um die Anzahl der digitalen Punkte des FID zu erhöhen. Die Signalverlauf wurde mit der Funktion

$$f(G) = I_0 \cdot \exp\left(-\gamma_H g^2 \delta^2 D \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)\right) \quad (3.7)$$

angepasst, wobei  $\gamma_H$  das gyromagnetische Verhältnis für Protonen beschreibt und  $I_0$  die Signalintensität für  $g = 0$ .

### 3.5. Pulssequenzen

Im nachfolgenden Unterkapitel werden die Sequenzen, die zum Vergleich mit den optimierten beziehungsweise neuen Experimenten genutzt wurden, vorgestellt. Die in dieser Arbeit neu entwickelten Pulssequenzen und deren Optimierungen sind dem Ergebnisteil zugeordnet. Die in den Abbildungen enthalten Symbole und Zeichen werden an dieser Stelle erklärt.

Schwarz-gefüllte, schmale Balken stellen  $90^\circ$ -Rechteck-Pulse dar. Ist dem Symbol ein  $\alpha$  hinzugefügt, handelt es sich um einen Rechteck-Puls mit abweichendem Rotationswinkel. Ein nicht ausgefüllter Balken repräsentiert einen  $180^\circ$ -Puls. Breitere Symbolformen weisen auf die Verwendung von Breitbandpulsen hin, die mit Hilfe der optimalen Steuerungstheorie (OCT) abgeleitet wurden [122–133]. Eine Übersicht über die verwendeten Pulse wird in Tabelle 3.3 gegeben. Ungefüllte Rechtecke mit einer von links unten nach rechts oben verlaufenden Diagonale beschreiben *Chirp*-Pulse [134, 139, 140]. Ein z-Filter wird durch den Zusatz ZF gekennzeichnet [135, 141]. Falls die Phase der Pulse nicht  $x$  entspricht, wird das entweder durch einen entsprechenden Kleinbuchstaben gekennzeichnet oder ist mit dem indizierten griechischen Buchstaben  $\Phi_i$  angegeben.  $\Phi_i$  weist auf einen Phasenzzyklus, der mehrere Schritte enthält, hin. Er wird in der Bildunterschrift zur Pulssequenz näher spezifiziert.  $\Phi_{\text{rec}}$  beschreibt den Phasenzzyklus, den der Empfänger während der Akquisition durchläuft.  $d_r$  stellt das Erholungs-*delay* dar, es ist jedem einzelnen *scan* oder  $t_1$ -Inkrementierungsschritt des Experiments vorangestellt. Sonstige *delays* sind entweder durch den griechischen Kleinbuchstaben  $\delta$  oder durch den entsprechenden Großbuchstaben  $\Delta$  dargestellt. Bei  $\Delta$  handelt es sich um ein Transfer-*delay*, welches auf eine mittlere Kopplungskonstante eingestellt ist.  $\Delta'$  beschreibt das optimierte Transfer-*delay* gemäß Ernst-Winkel-Anregung. Die eingestellten Werte sind in Kapitel 3.4 angegeben. Für die HSQMBC- und HMBC-Experimente ist das Transfer-*delay* durch  $\Delta^n$  gekennzeichnet. Das in Kapitel 3.5.1 gezeigte *Improved and Accelerated Constant-Time* (IMPACT)-HMBC [143], beinhaltet einen dreistufigen *low-pass*-Filter zur Unterdrückung von  $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplungen. Die enthaltenen *delays* sind durch den griechischen Kleinbuchstaben  $\tau$  zu erkennen. Ferner weist T auf die *Constant Time* (CT)-Periode hin, wodurch die Signalaufspaltung durch homonukleare Protonenkopplung, beziehungsweise durch heteronukleare Kopplung während der Inkrementierung der indirekten Dimension unterdrückt wird.  $^1\text{H}$  repräsentiert den Protonenkanal,  $^{13}\text{C}$  den Heterokanal und G weist auf die Anwendung von Gradienten hin. Die Abkürzung Mix von einem Rechteck umgeben, weist auf die Anwendung einer Mischsequenz hin. Gradienten sind durch offene oder schwarz ausgefüllte Ellipsen symbolisiert. Zwei übereinander stehende Kreissegmente, wovon eines schwarz gefüllt und eines

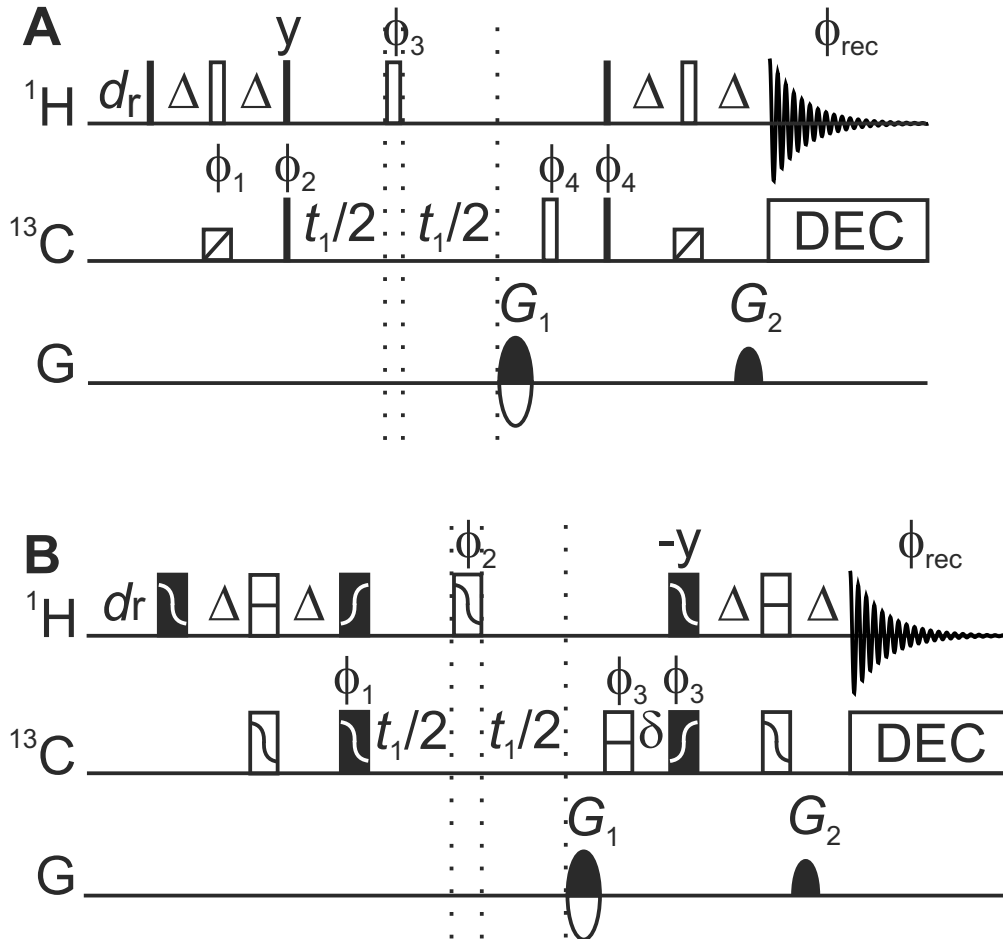
transparent ist, weisen auf die Verwendung der Echo-Antiecho-Methode hin. Gradienten, die die Mischsequenz Mix umgeben, sind sogenannte *purge*-Gradienten. Gradienten mit dem Zusatz ZF weisen auf einen z-Filter hin. Die Inkrementierungsperiode ist durch  $t_1$  dargestellt. DEC steht für die heteronukleare Entkopplung während der Akquisition. Jede Pulssequenz endet mit dem Symbol der gedämpften Schwingung zur Aufnahme des *Free Induction Decay* (FID).

Zum Verständnis der Pulssequenzen werden teilweise Ausdrücke aus dem Produktoperator-Formalismus [144] verwendet. Die verwendete Nomenklatur wird an dieser Stelle vorgestellt. Für ein heteronukleares Spinsystem wird Protonenmagnetisierung durch den Großbuchstaben  $I$  ausgedrückt, die Indizes x, y, z kennzeichnen die kartesischen Koordinaten.  $I_z$  ist somit die z-Komponente der Protonenmagnetisierung, die der Gleichgewichtsmagnetisierung entspricht. Sie wird auch longitudinale Magnetisierung oder Polarisation genannt.  $I_x$  und  $I_y$  werden auch transversale Magnetisierung genannt. Magnetisierung der Heterokerne, zum Beispiel  $^{13}\text{C}$ , wird mit dem Großbuchstaben  $S$  symbolisiert. Produkte zweier Operatoren können beispielsweise die Formen  $2I_xS_z$ ,  $2I_yS_z$ ,  $2I_zS_y$  und  $2I_zS_x$  annehmen, diese werden als Antiphase-Magnetisierung bezeichnet. Die Terme, in denen nur eine Komponente in der transversalen Ebene orientiert ist, werden als Einquanten-Kohärenzen bezeichnet.  $2I_xS_x$ ,  $2I_yS_x$ ,  $2I_yS_y$  und  $2I_xS_y$  stellen Multiquanten-Kohärenzen dar.

### 3.5.1. Vergleichssequenzen

#### Konventionelle HSQC-Experimente

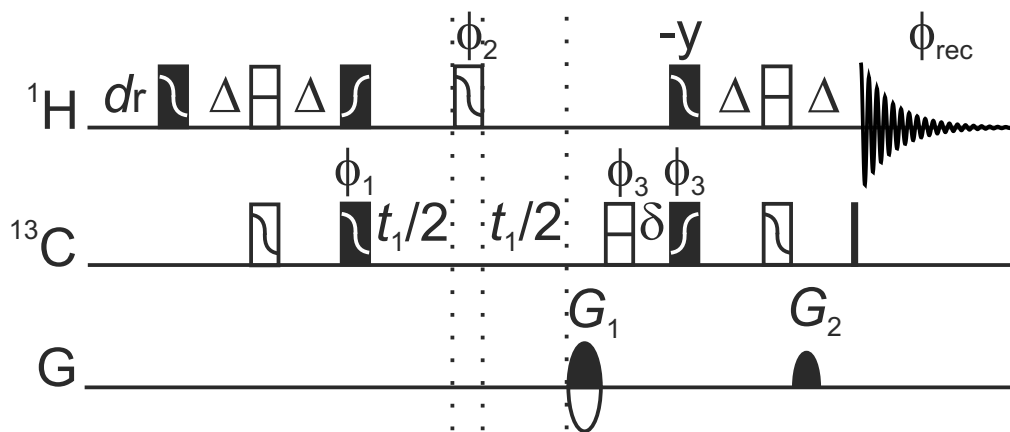
In Abbildung 3.8 werden die Pulssequenzen der konventionellen HSQC-Experimente gezeigt. Experiment (A) diente zur vergleichenden Beurteilung des ASAP-HSQC-Experiments, beispielsweise hinsichtlich der spektralen Qualität oder des  $\frac{S}{N}$  bei vergleichbar eingestellten experimentellen Parametern. Die Unterschiede werden in Abbildung 4.9 in Kapitel 4.1 deutlich. Die Pulssequenz ist klassisch aus den im Grundlagenteil (siehe Kapitel 2.3.4) beschriebenen Elementen aufgebaut. Im INEPT-Transfer und dem Rücktransfer werden auf dem  $^{13}\text{C}$ -Kanal *Chirp*-Pulse [134, 139, 140] mit einer Länge von 500  $\mu\text{s}$  (siehe Tabelle 3.3) angewandt. Die Bandbreite dieser *Chirp*-Inversionspulse ist gegenüber der von  $180^\circ$ -Rechteckpulsen bei gleicher Leistung erhöht, allerdings werden die Pulse dabei länger. Sequenz (B) wurde zur Validierung der schnellen, neu entwickelten Pulssequenzen verwendet. Um einen objektiveren Vergleich gewährleisten zu können, wurde die Sequenz ebenfalls mit geformten Pulsen ausgestattet. Das Transferverhalten der unterschiedlichen Breitband-Pulse kann Tabelle 3.3 entnommen werden.



**Abbildung 3.8:** Pulssequenzen von konventionellen HSQC-Experimenten. Pulssequenz (A) enthält *Chirp*-Pulse, Pulssequenz (B) geformte Pulse. Nähere Angaben zu den verwendeten Pulsen sind in Tabelle 3.3 enthalten. Die jeweiligen Phasenzyklen sind  $\Phi_1 = x, -x$ ;  $\Phi_2 = 4(x), 4(-x)$ ;  $\Phi_3 = 2(x), 2(-x)$ ;  $\Phi_4 = x$ ;  $\Phi_{\text{rec}} = x, -x, x, -x, -x, x, -x, x$  (A);  $\Phi_{\text{rec}} = x, -x, -x, x$  (B). Phasenempfindlichkeit in der indirekten Dimension wurde durch die Echo-/Antiecho-Kohärenzordnungsselektion mit den zugehörigen Gradientenverhältnissen  $G_1 = (80\%, -80\%)$ ,  $G_2 = (20,1\%, 20,1\%)$  erhalten. Für Experiment (A) wurden die Phasen  $\Phi_1$  und  $\Phi_4$ , für Experiment (B) nur  $\Phi_1$  gemeinsam mit der Empfängerphase  $\Phi_{\text{rec}}$  nach der TPPI-Methode invertiert.







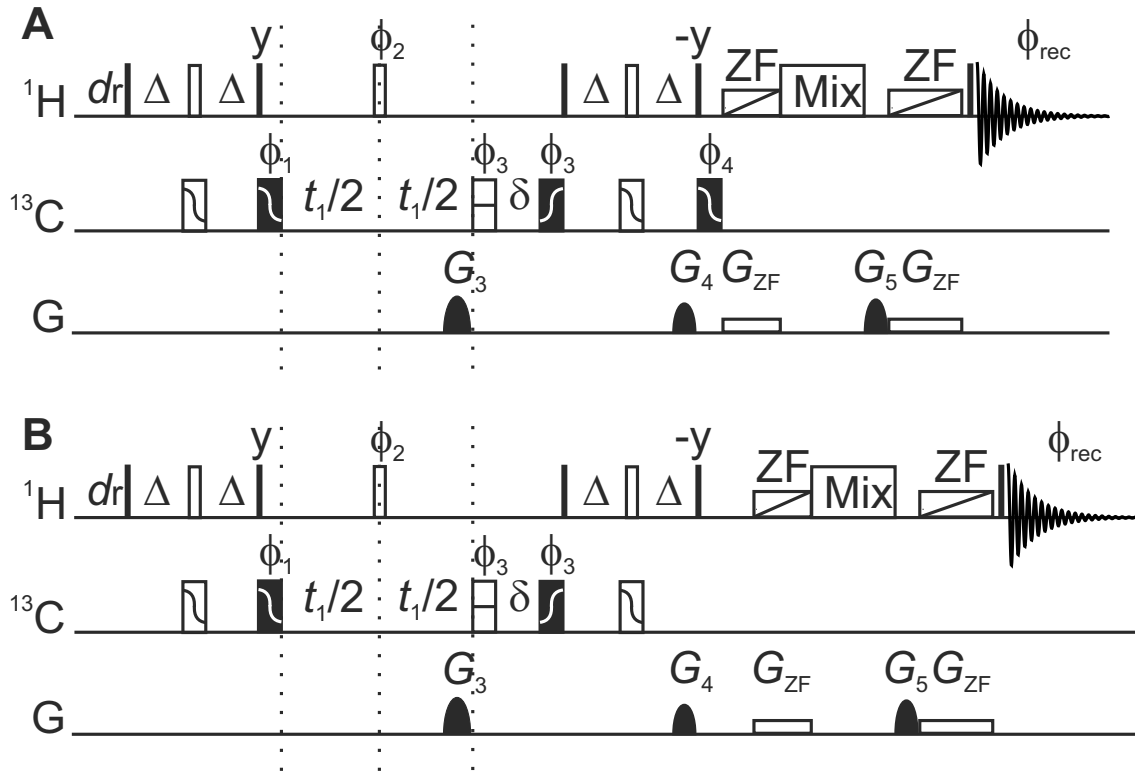
**Abbildung 3.10:** Pulssequenz des konventionellen CLIP-HSQC-Experiments mit geformten Pulsen. Die Angaben der Sequenz entsprechen den Erläuterungen zur konventionellen HSQC-Sequenz mit geformten Pulsen aus Abbildung 3.8. Das Experiment enthält einen zusätzlichen  $90^\circ$ - $^{13}\text{C}$ -Puls direkt vor der Akquisition. Auf diese Weise werden in der direkten Dimension Inphase-Dubletts erhalten [66].

### HSQC-TOCSY-Experimente

Die beiden HSQC-TOCSY-Vergleichsexperimente gemäß [83] sind in Abbildung 3.11 illustriert. Die Experimente werden zur Bestimmung von heteronuklearen Kopplungen über mehrere ( $n$ ) Bindungen  $^nJ_{\text{CH}}$  verwendet. Es werden zwei Spektren benötigt, wovon das HSQC-TOCSY-IP das Inphase-Spektrum liefert, während mit dem HSQC-TOCSY-AP das Antiphase-Spektrum erhalten wird. Die Methode zur Bestimmung der Kopplungskonstanten anhand dieser Spektren ist in Abbildung 3.7 gezeigt. Die Sequenzen beinhalten  $z$ -Filter zur effektiven Artefaktunterdrückung. Dispersive Protonen-Antiphase, die durch homonukleare Kopplung entsteht, wird durch Verwendung des  $z$ -Filters dephasiert beziehungsweise ausgelöscht. Auf diese Weise werden Phasenverzerrungen beseitigt. Die im  $z$ -Filter verwendeten *Chirp*-Pulse besitzen eine Länge von 30 ms bzw. 50 ms, die korrespondierenden Gradienten besitzen die gleiche Länge, sie wurden gemäß [135] eingestellt. Zum Teil wurden geformte Pulse verwendet. Das Aufnahmeschema weicht von den bisher vorgestellten Methoden zur Aufnahme ab. Es wird States-TPPI-Methode zur phasenempfindlichen Detektion verwendet. Die Gradienten dienen lediglich der Kohärenzordnungsselektion. Zur Artefaktminimierung wurden jeweils zwei *scans* pro Inkrement aufgenommen.

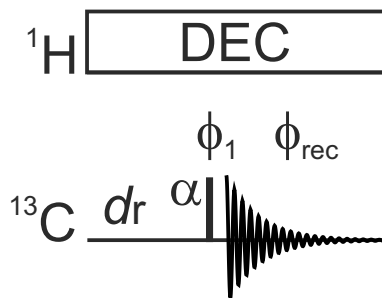
### Eindimensionales $^{13}\text{C}$ -Experiment

Abbildung 3.12 dient dem Vergleich der aus den schnellen HSQMBC-Experimenten abgeleiteten Projektionen (siehe Kapitel 4.4). Zur Verbesserung des  $\frac{S}{N}$  pro Zeit wurde Ernst-Winkel-Anregung mit einem Rotationswinkel von  $30^\circ$  verwendet. Durch Protonenkopplung findet



**Abbildung 3.11:** Pulssequenzen der HSQC-TOCSY-IPAP-Experimente gemäß [83]. Die jeweiligen Phasenzyklen sind gegeben durch  $\Phi_1 = x, -x$ ;  $\Phi_2 = 2(x), 2(-x)$ ;  $\Phi_3 = 4(x), 4(-x)$ ;  $\Phi_4 = x, -x$  (**A**);  $\Phi_4 = 2(x), 2(-x)$  (**B**);  $\Phi_{\text{rec}} = x, -x, x, -x, -x, x, -x, x$  (**A**);  $\Phi_{\text{rec}} = x, -x, -x, x, -x, x, x, -x$  (**B**). Die im z-Filter verwendeten *Chirp*-Pulse besitzen eine Länge von 30 ms bzw. 50 ms, die korrespondierenden Gradienten besitzen die gleiche Länge, sie wurden gemäß der in [135] beschriebenen Prozedur eingestellt. Die Gradienten der Kohärenzordnungsselektion sind  $G_3 = 80\%$  und  $G_4 = 20,1\%$ .  $G_5$  beträgt 30% der maximal möglichen Gradientenstärke. Zur phasenempfindlichen Aufnahme wird Phase  $\Phi_1$  gemeinsam mit der Empfängerphase  $\Phi_{\text{rec}}$  nach der States-TPPI-Methode invertiert. Aufgrund der Antiphase-Detektion in (B) ist das Spektrum um  $90^\circ$  phasenverschoben gegenüber dem Inphase-Spektrum.

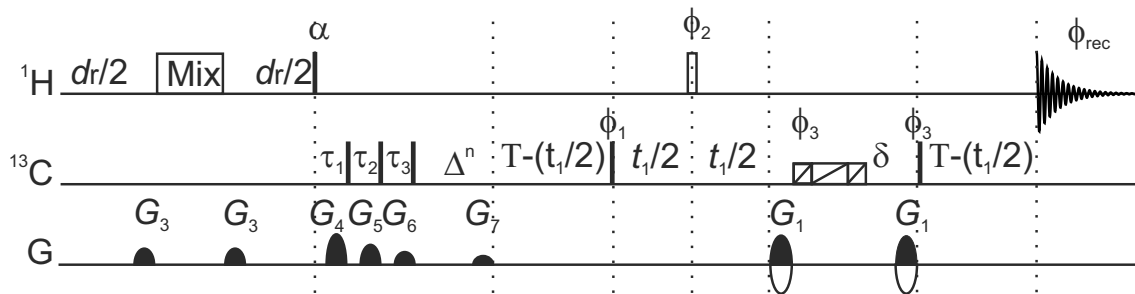
sogenannte heteronukleare Kreuzrelaxation (hetNOE) statt, die bei protonengebundenen Kohlenstoffatomen eine Signalverbreiterung von etwa 3 Hz zur Folge hat.



**Abbildung 3.12:** Vergleichspulssequenz des eindimensionalen  $^{13}\text{C}$ -Experiments.  $\alpha$  weist darauf hin, dass Ernst-Winkel-Anregung [88] verwendet wird. In dem vorliegenden Fall wurde ein Anregungswinkel von  $30^\circ$  eingestellt. Die Phasenzyklen sind  $\Phi_1 = x, -x, -x, x, y, -y, -y, y = \Phi_{\text{rec}}$ . Zur Protonenentkopplung wird die WALTZ-Sequenz [119] verwendet.

### IMPACT-HMBC

In Kapitel 4.4 werden die Projektionen der Spektren der schnellen HSQMBC-Experimente nicht nur mit eindimensional (1D)- $^{13}\text{C}$ -Spektren verglichen, es werden auch Projektionen unterschiedlicher zweidimensionaler Experimente gegenübergestellt. Eines dieser weiteren zweidimensionalen Experimente ist das IMPACT-HMBC [143] aus Abbildung 3.13. Es beinhaltet, wie auch die ASAP-Experimente, eine Mischsequenz zur Verteilung der Protonenmagnetisierung vor dem eigentlichen Experiment. Weiterhin kommt ein *low-pass*-Filter [84, 145] zum Einsatz, durch den  $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplungen herausgefiltert werden. Das Kopplungs-*delay*  $\Delta^n$  ist auf die weitreichenden Kopplungen eingestellt. Das Experiment enthält eine *Constant Time*-Periode [146], wodurch die Magnetisierung der über eine  $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplung im Bereich von 120 Hz bis 170 Hz direkt  $^{13}\text{C}$ -gebundenen Protonen dephasiert wird. Der negative Effekt des CT-Ansatzes im HMBC ist jedoch, dass sich die heteronukleare  $^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplung entwickelt. Diese führen zu Artefakten im Spektrum, die sich als Aufspaltung der HMBC-Signale äußern. Zur Refokussierung auf  $^{13}\text{C}$  wurde ein *Chirp composite*-Puls angewandt, genaueres zu diesem Puls kann Tabelle 3.3 entnommen werden.



**Abbildung 3.13:** Pulssequenz des IMPACT-HMBCs gemäß [143]. Die indizierten griechischen Kleinbuchstaben  $\tau_i$  kennzeichnen *delays*, die Teil eines *low-pass-Filters* [84, 145] sind.  $T$  beschreibt eine *Constant Time-Periode* [146]. Die jeweiligen Phasenzyklen sind gegeben durch  $\Phi_1 = x, -x$ ;  $\Phi_2 = 2(x), 2(-x)$ ;  $\Phi_3 = 4(x), 4(-x)$ ;  $\Phi_{\text{rec}} = x, -x, x, -x, -x, x, -x, x$ , Gradientenverhältnisse durch  $G_1 = (80\%, -80\%)$ ,  $G_3 = (-17\%)$ ,  $G_4 = (37\%)$ ,  $G_5 = (-19\%)$ ,  $G_6 = (-11\%)$  und  $G_7 = (-7\%)$ . Phase  $\Phi_1$  wird gemeinsam mit der Empfängerphase  $\Phi_{\text{rec}}$  nach der TPPI-Methode invertiert.



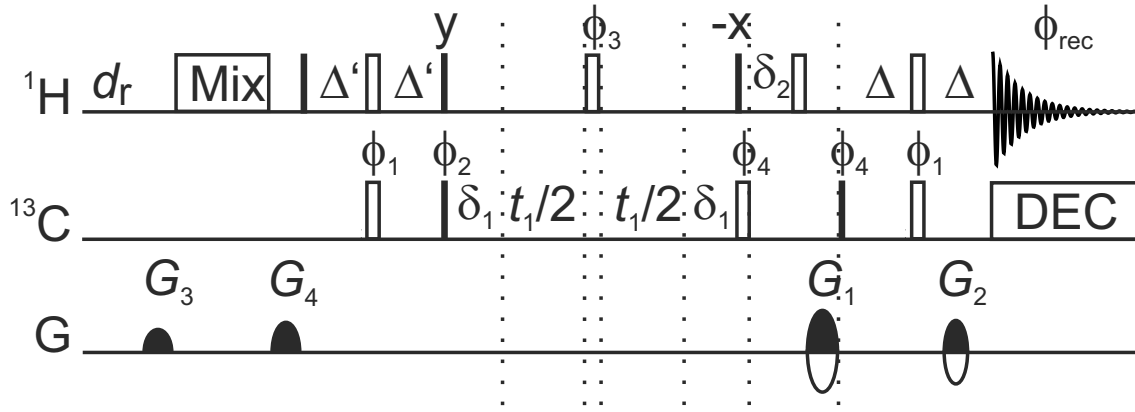
## 4. Ergebnisse und Diskussion

Die nachfolgenden Unterkapitel enthalten die in dieser Arbeit neu entwickelten Pulssequenzen, deren Optimierungen und Anwendungen, sowie eine Studie zur Alterung von Motorölen. Die Vorteile der neuen Sequenzen werden durch Vergleiche mit herkömmlichen Experimenten ausgearbeitet. Die Grundlage der Sequenzen bildet in den meisten Fällen das ASAP-HSQC [91].

### 4.1. ASAP-HSQC

Die in diesem Kapitel erläuterten Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit David Schulze-Sünninghausen und Martin R.M. Koos erarbeitet und sind größtenteils bereits veröffentlicht [67, 91–94].

Die Gesamtdauer eines Experiments ist maßgeblich von der Erholzeit  $t_{\text{Erh}}$  zwischen aufeinanderfolgenden *scans* abhängig. Im Wesentlichen besteht ein Experiment also aus einer Wartezeit, in der die Gleichgewichtsmagnetisierung durch  $T_1$ -Relaxation wieder aufgebaut wird. Bei kleinen Molekülen liegen die  $T_1$ -Zeiten im Bereich von Sekunden. Im ASAP-HSQC ist das Erholungs-*delay*  $d_r$  stark verkürzt. Dadurch können die Spektren in sehr kurzer Zeit aufgenommen werden. Der durch die verkürzte Zeit unzureichende Wiederaufbau der Gleichgewichtsmagnetisierung führt allgemein zu einer verringerten Signalintensität. Im ASAP-HSQC sind jedoch zwei Techniken kombiniert, die den Verlust zum Teil kompensieren. In der Ernst-Winkel-Anregung wird ein kleinerer Anregungswinkel als  $90^\circ$  verwendet [88]. Auf diese Weise bleibt nicht angeregte  $z$ -Magnetisierung zurück. Im ASAP-HSQC wird diese als Teil der Reservoir-Magnetisierung erhalten und ermöglicht eine höhere Wiederholrate der Sequenz. Zusätzlich basiert die ASAP-Technik auf der Nutzung der Magnetisierung der  $^{12}\text{C}$ -gebundenen Protonen, die durch eine geeignete Anordnung der Pulse ebenfalls zum Reservoir beitragen. Die Polarisation dieser passiven Protonen des Reservoirs wird durch Anwendung einer Mischsequenz auf die aktiven, zum Signal beitragenden Protonen übertragen.



**Abbildung 4.1:** Originale Pulssequenz des ASAP-HSQC-Experiments mit Rechteckpulsen. Die jeweiligen Phasenzyklen sind gegeben durch  $\Phi_1 = x$ ;  $\Phi_2 = x, -x$ ;  $\Phi_3 = 2(x), 2(-x)$ ;  $\Phi_4 = 4(-x), 4(x)$ ;  $\Phi_{\text{rec}} = x, -x, x, -x, -x, x, -x, x$ . Echo-/Antiecho-Kohärenzordnungsselektion wurde durch die Gradientenverhältnisse  $G_1 = (63,9\%, 80\%)$ ,  $G_2 = (80\%, 59,9\%)$  erreicht. Die beiden Gradienten, die die Mischsequenz umgeben, besitzen die Stärke  $G_3 = 33\%$ ,  $G_4 = 43\%$ . Die Phasen  $\Phi_1$  und  $\Phi_2$  werden gemeinsam mit der Empfängerphase  $\Phi_{\text{rec}}$  nach der TPPI-Methode invertiert. Die Abbildung ist der in [91] veröffentlichten nachempfunden, mit Genehmigung durch den Verleger American Chemical Society.

#### 4.1.1. Pulssequenzen des ASAP-HSQC

In den Abbildungen 4.1 und 4.2 sind die Pulssequenzen des originalen ASAP-HSQC gezeigt. Erstere verwendet Rechteckpulse, für letztere Sequenz wurden Breitbandpulse eingesetzt, die mit Hilfe der optimalen Steuerungstheorie (*Optimal Control Theory*) abgeleitet wurden. Ein Vergleich der Sequenzen wird in Abbildung 4.9 gegeben. Der wesentliche Unterschied der ASAP-HSQC-Pulssequenz gegenüber eines konventionellen HSQCs ist der letzte  $90^\circ$ -Protonenpuls mit der Phase  $-x$ . Dieser ist herkömmlich Teil des Rücktransfers und wird daher normalerweise erst nach dem ersten Gradienten der Echo-/Antiecho-Kohärenzordnungsselektion angewandt. Die Magnetisierung der  $^{12}\text{C}$ -gebundenen Protonen, welche sich zu diesem Zeitpunkt in der transversalen Ebene befindet, wird dephasiert und in der Folge nicht wieder refokussiert. Im ASAP-HSQC ist der  $90^\circ$ -Puls vor dem ersten Gradienten platziert. Der Puls mit der Phase  $-x$  rotiert die Magnetisierung der  $^{12}\text{C}$ -gebundenen Protonen in Richtung der  $z$ -Achse. Der Gradient bleibt für diese Magnetisierungskomponente wirkungslos, wodurch die Magnetisierung der  $^{12}\text{C}$ -gebundenen Protonen als Reservoir zurück bleibt. Dieser veränderte Aufbau der Pulssequenz ermöglicht es auch, ein Äquivalent zur Ernst-Winkel-Anregung [88] zu verwenden. In den ASAP-Experimenten wird der INEPT-Transfer optimiert, um die Signalintensität zu steigern. Das Transfer-*delay* kann von  $\Delta$  auf  $\Delta'$  verkürzt werden, um Magnetisierung zurückzubehalten. Während



der beiden *delays*  $\Delta'$  entwickelt sich für  $^{13}\text{C}$ -gebundene Protonen unter dem Einfluss der  $^1\text{J}_{\text{CH}}$ -Kopplung die sin-modulierte Antiphase magnetisierung  $-2I_x S_z \sin(2\pi J \Delta')$ . Dies stellt den transferierten Anteil dar. Der zurückbehaltene Anteil ist durch  $I_y \cos(2\pi J \Delta')$  gegeben. Die Magnetisierung der  $^{12}\text{C}$ -gebundenen Protonen wird wegen der vernachlässigbar klein ausfallenden Kopplung zu den  $^{13}\text{C}$ -Kernen im INEPT näherungsweise nicht transferiert. Sie werden lediglich vom ersten  $90^\circ$ -Puls angeregt und durch den  $180^\circ$ -Puls invertiert, es liegt demnach die Magnetisierung  $I_y$  vor. Die nicht transferierte Magnetisierung aus der Ernst-Winkel-Anregung und die Magnetisierung der  $^{12}\text{C}$ -gebundenen Protonen sind also entlang der gleichen Achse in der transversalen Ebene orientiert. Der anschließende  $90^\circ$ -Protonenpuls mit der Phase  $y$  hat keinen Effekt auf die Reservoir-Magnetisierung. Zusammen mit dem  $^{13}\text{C}$ -Puls mit der Phase  $\Phi_2$  erzeugt der Protonenpuls  $^{13}\text{C}$ -Antiphase magnetisierung der Form  $2I_z S_y \sin(2\pi J \Delta')$ . Nach dem Inkrementierungsschritt zur Aufnahme der indirekten Dimension wird mit dem letzten  $90^\circ$ -Protonenpuls die Reservoir-Magnetisierung entlang der  $z$ -Achse orientiert. Gleichzeitig bewirkt der  $90^\circ$ -Protonenpuls mit der Phase  $-x$ , dass an dieser Stelle  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -Multiquanten-Terme entstehen, welche allerdings im modifizierten Rücktransfer zu detektierbarer Inphase-Protonen-Magnetisierung der Form  $\pm I_x$  umgewandelt wird. Der zweite Gradient  $G_2$  der Echo/-Antiecho-Gradientenselektion refokussiert die Wirkung des ersten Gradienten  $G_1$ , falls die Gradienten die gleiche Länge besitzen und

$$\frac{G_1}{G_2} = \frac{1}{1 \pm \frac{20,1}{80}} \quad (4.1)$$

für das Verhältnis der Gradientenstärken erfüllt ist. Auf diese Weise ergibt sich für die Selektion des Echo ein Gradientenverhältnis

$$\frac{G_1}{G_2} = \frac{63,9}{80}, \quad (4.2)$$

während das Gradientenverhältnis zur Selektion des Antiecho

$$\frac{G_1}{G_2} = \frac{80}{59,9} \quad (4.3)$$

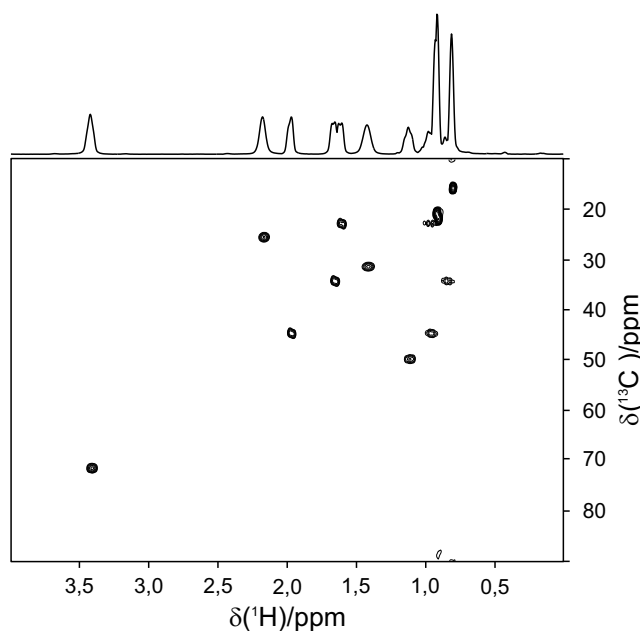
beträgt.

Die Polarisation des Reservoirs wird schließlich durch Anwendung der Mischsequenz auf die  $^{13}\text{C}$ -gebundenen Protonen übertragen. Dadurch ist die Polarisation der detektierten Spezies erhöht. Der unzureichende Wiederaufbau der Gleichgewichtsmagnetisierung durch das stark verkürzte Erholungs-*delay* wird durch die übertragene  $z$ -Polarisation durch Mischen mit dem Reservoir teilweise kompensiert. Die Aufnahme des Spektrums ist dadurch beschleunigt.

Für die Messung größerer Moleküle mit kurzen  $T_2$ -Zeiten, die Untersuchung teilweise orientierter Proben oder für die Aufnahme von Spektren mit hoher Auflösung, kann es von



jedoch einige Minuten beträgt.



**Abbildung 4.3:** Entkoppeltes  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrum einer 500 mM/ $\text{CDCl}_3$  Menthol-Probe, aufgenommen mit dem originalen ASAP-HSQC-Experiment (Abbildung 4.2). Das Erholungs-*delay*  $d_r$  wird nahezu vollständig durch die Mischsequenz ersetzt, dadurch ergibt sich eine Gesamtexperimentzeit von 23 s. Das Spektrum wurde mit  $512 (^1\text{H}) \times 128 (^{13}\text{C})$  Punkten und Akquisitionszeiten von 106,8 ms ( $^1\text{H}$ ) und 5,3 ms ( $^{13}\text{C}$ ), jeweils einem *scan* für jedes  $t_1$ -Inkrement und 16 *dummy scans* aufgenommen. Prozessiert wurde unter Verwendung von *zero filling* und *linear prediction*, so dass die digitale Auflösung letztlich 2,34 Hz ( $^1\text{H}$ ) und 47,18 Hz ( $^{13}\text{C}$ ) beträgt. Die Abbildung ist der in [91] veröffentlichten nachempfunden, mit Genehmigung durch den Verleger American Chemical Society.

#### 4.1.3. Vergleiche mit konventionell aufgenommenen HSQC-Spektren

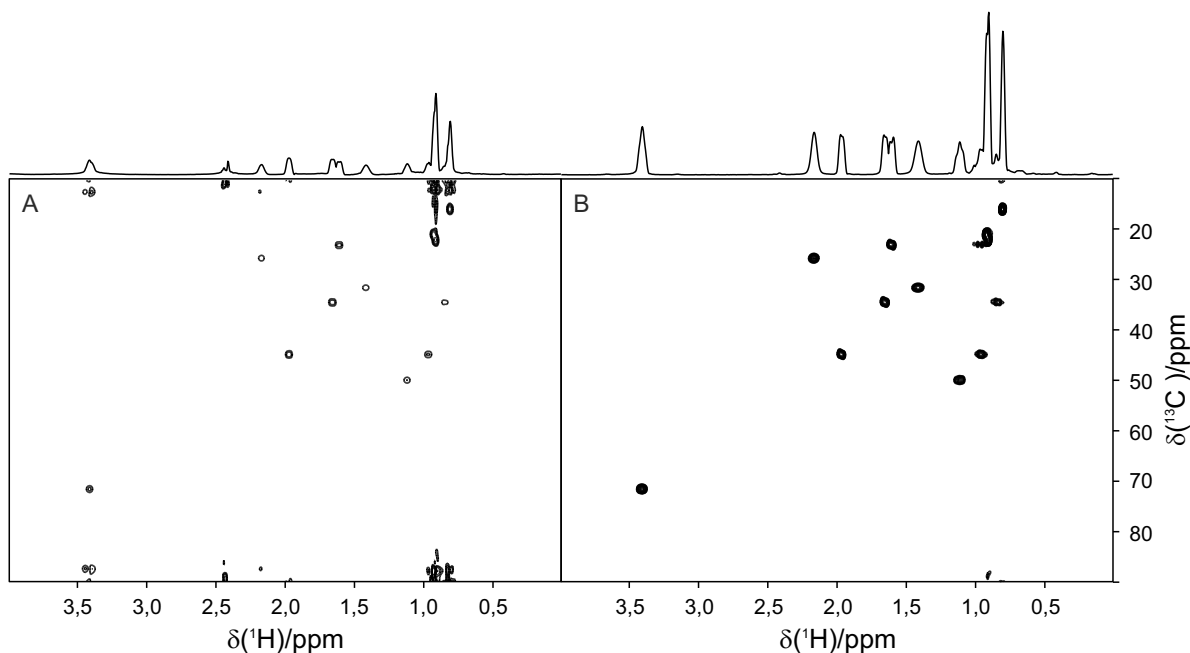
Ein Vergleich, der die Vorteile des ASAP-HSQC eindeutig werden lässt, ist in Abbildung 4.4 gegeben. Die beiden Spektren wurden in einer ähnlichen Gesamtexperimentzeit aufgenommen, um die erhaltenen Signalintensitäten vergleichen zu können. Auch alle Einstellungen der Detektions- und Prozessierungsparameter sind daher gleich. Der Vergleich zeigt eindeutig, dass die Signalintensität des konventionell aufgenommenen Spektrums deutlich geringer ausfällt. Dies wird besonders dann ersichtlich, wenn zusätzlich die  $^1\text{H}$ -Projektionen verglichen werden, welche ebenfalls abgebildet sind. Zusätzlich weist das konventionelle Spektrum mehr Artefakte auf, die zum Teil zu den Rändern des Spektrums verschoben sind. In der kurzen Zeit mit signifikant verkürztem Erholungs-*delay*  $d_r$  ermöglicht also nur das ASAP-HSQC-Experiment die Aufnahme eines artefaktfreien HSQC-Spektrums der

Mentholprobe mit gutem  $\frac{S}{N}$ -Verhältnis.

Es ist allerdings auch möglich, bei gegebener Messzeit eine größere Anzahl *scans* zu akkumulieren. In Abbildung 4.5 wird das ASAP-HSQC mit einem konventionellen HSQC-Spektrum verglichen. Die Gesamtexperimentdauer wurde in beiden Fällen auf etwas über 9 min eingestellt. Das Erholungs-*delay*  $d_r$  des konventionellen HSQC-Experiments betrug 2 s, ein Wert der nur geringfügig kleiner ist als die durchschnittliche  $T_1$ -Zeit der untersuchten Menthol-Probe. Es wurden zwei *scans* akkumuliert. Mit dem ASAP-HSQC war es in dieser Zeit möglich, sieben mal so viele *scans* aufzunehmen. Die Signalintensität ist für das hervorgehobene Signal **1** (Zuordnung siehe Abbildung 3.1) um einen Faktor 3 bis 4 erhöht. Gleichzeitig ist, aufgrund der größeren Anzahl aufgenommener *scans* das Rauschlevel um den Faktor  $\sqrt{7}$  erhöht. Dies entspricht einer leichten Steigerung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses. An dieser Stelle soll allerdings bemerkt werden, dass der erzielte Signalgewinn für unterschiedliche Proben und deren verschiedene Signale variiert. Abhängig von den  $T_1$ -Zeiten oder der Anzahl umgebender Protonen fällt der Signalgewinn daher nicht immer so klar aus, wie für das gezeigte Beispiel.

#### 4.1.4. Vergleich der erreichbaren Auflösung von ASAP-HSQC und ASAP-HMQC

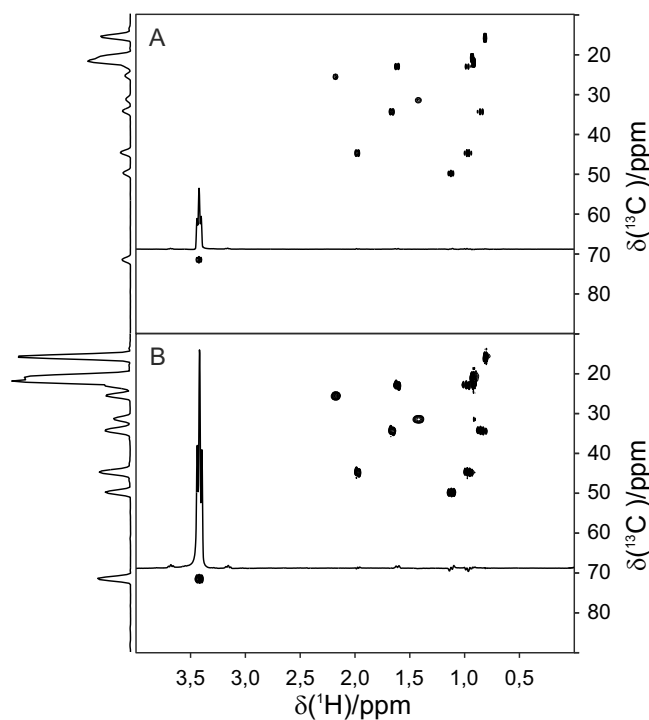
Anstatt mehrere *scans* aufzuaddieren, kann auch die Auflösung der Spektren erhöht werden, in dem eine größere Anzahl  $t_1$ -Inkrementen mit gleicher hoher Wiederholrate aufgenommen wird. Im Vergleich zu einem konventionell aufgenommenen HSQC-Experiment bleibt die Aufnahmezeit gering. Mit dem ASAP-HSQC können also Auflösungen erreicht werden, die mit dem konventionellen HSQC-Experiment nicht in vertretbarer Zeit zu erzielen sind. Hohe spektrale Auflösungen werden benötigt, wenn Signale nahe beieinander liegen. Abbildung 4.6 zeigt in schwarz einen Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum von Maltose, aufgenommen mit der ASAP-HSQC-Pulssequenz. Mit dem schnellen Experiment war es möglich, das Spektrum mit  $512 (^1\text{H}) \times 16\,384 (^{13}\text{C})$  Punkten in etwas mehr als drei Stunden aufzunehmen. Bezogen auf die Auflösung benötigen gleichwertige, konventionell erhaltene Spektren etwa 18 Stunden Messzeit. Die digitale Auflösung in der  $^{13}\text{C}$ -Dimension beträgt nach Prozessierung unter Verwendung von *zero filling* 0,55 Hz. In Abbildung 4.6 ist zusätzlich zum Ausschnitt des ASAP-HSQC in schwarz der gleiche Spektrenausschnitt des ASAP-HMQC in rot dargestellt. Das HMQC-Spektrum wurde zum Vergleich unter Verwendung der Sequenz 3.9 aus Kapitel 3.5.1 aufgenommen. Die Detektions- und Prozessierungsparameter waren identisch eingestellt. Anhand dieses Beispiels werden die Vorzüge des ASAP-HSQC gegenüber dem ASAP-HMQC deutlich. Maltose liegt in zwei verschiedenen Konfigurationen



**Abbildung 4.4:** Vergleich der HSQC-Spektren anhand einer 500 mM/CDCl<sub>3</sub> Menthol-Probe. Das linke Spektrum wurde mit einem konventionellen HSQC-Experiment aus Abbildung 3.8 aufgenommen. Rechts ist das gleiche Spektrum wie schon in Abbildung 4.3 dargestellt. Es wurde unter der Verwendung der originalen ASAP-HSQC-Pulssequenz aufgenommen. Die Akquisitions- und Prozessierungsparameter sind der Bildunterschrift der Abbildung 4.3 zu entnehmen. Das konventionell aufgenommene Spektrum wurde in 26 s mit 512 (<sup>1</sup>H) × 128 (<sup>13</sup>C) Punkten und Akquisitionszeiten von 106,8 ms (<sup>1</sup>H) und 5,3 ms (<sup>13</sup>C), jeweils einem *scan* für jedes *t*<sub>1</sub>-Inkrement und 16 *dummy scans* aufgenommen. Prozessiert wurde unter Verwendung von *zero filling* und *linear prediction*, so dass die digitale Auflösung letztlich 2,34 Hz (<sup>1</sup>H) und 47,18 Hz (<sup>13</sup>C) beträgt.

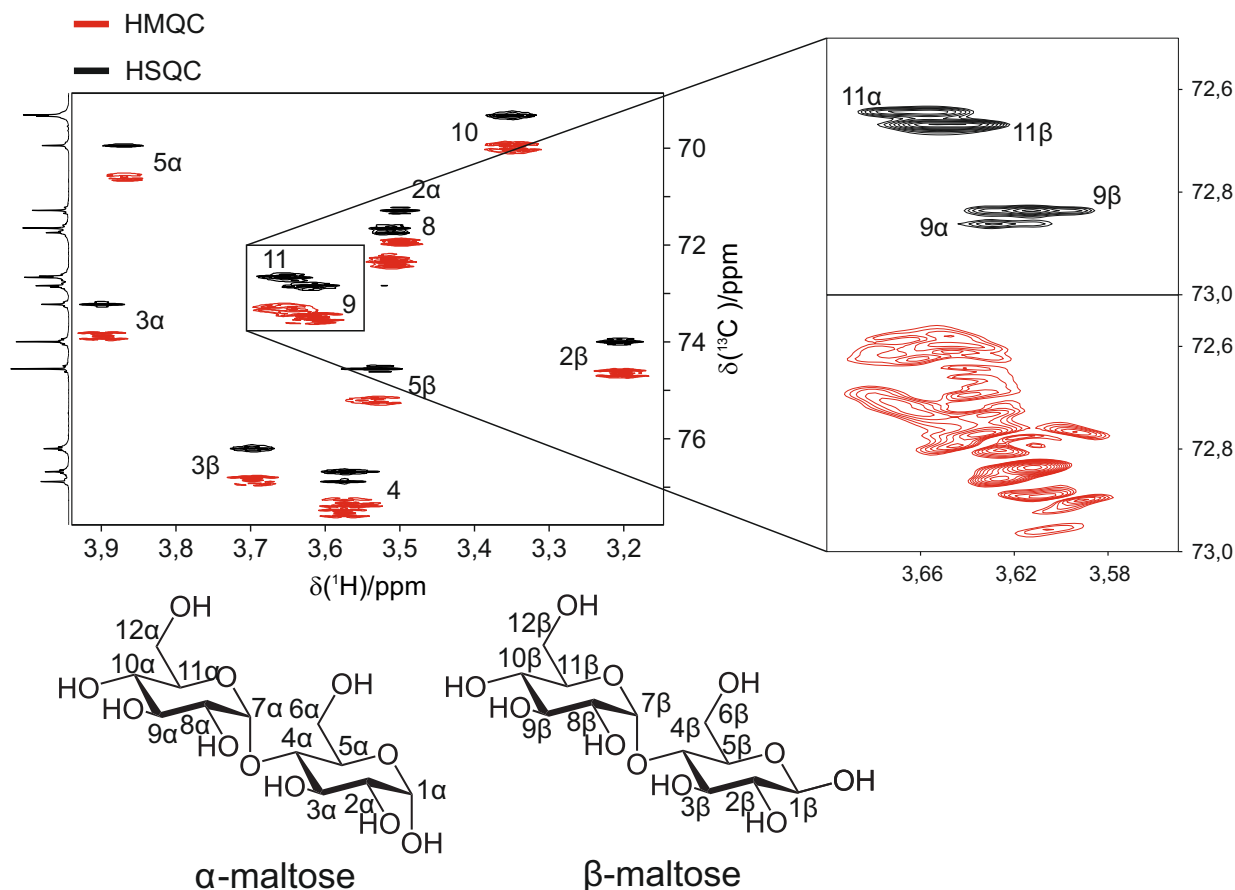
vor, dem  $\alpha$ - und dem  $\beta$ -Anomer. In der Detailansicht für die beiden Signale **9** und **11** wird deutlich, dass es trotz gleicher digitaler Auflösung nur mittels des ASAP-HSQC möglich ist, die Signale des  $\alpha$ - von denen des  $\beta$ -Anomers zu unterscheiden.

Anhand des ASAP-HMQC können weder die Protonen **9** und **11** unterschieden werden, noch ist eine Abgrenzung der beiden Anomeren-Signale möglich. Die Auflösung im ASAP-HSQC dagegen ist ausreichend, um die Anomeren-Signale der beiden Protonen, die jeweils lediglich einen Abstand von 3 Hz besitzen, zu trennen. Die verminderte Auflösung des HMQC ist, wie im Grundlagenteil 2.3.3 bereits erklärt, durch die während der *t*<sub>1</sub>-Inkrementierung vorliegenden Kohärenzen begründet. Im HMQC handelt es sich um heteronukleare Multiquantenmagnetisierung der Form  $-2I_x S_y$ . Während der gesamten *t*<sub>1</sub>-Entwicklungszeit wirkt homonukleare Protonenkopplung. Die Signale sind in der indirekten Dimension zu Multipletts mit verbreiterten Linien aufgespalten. Im HSQC liegt während dieser Zeitpe-



**Abbildung 4.5:** Vergleich der Signalintensitäten eines konventionellen HSQC-Spektrums (Abbildung 3.8) und des originalen ASAP-HSQC mit einer Gesamtexperimentdauer von etwas über 9 min, anhand einer 500 mM/ $\text{CDCl}_3$  Menthol-Probe. Beide Spektren wurden mit  $1024$  ( $^1\text{H}$ )  $\times$   $128$  ( $^{13}\text{C}$ ) Punkten und Akquisitionszeiten von  $213,5$  ms ( $^1\text{H}$ ) und  $5,3$  ms ( $^{13}\text{C}$ ) aufgenommen. Die Anzahl der *scans* betrug für das konventionelle HSQC-Spektrum (A) 2, die Anzahl *dummy scans* 4, das Erholungs-*delay*  $d_r$  wurde auf 2 s eingestellt. Für das ASAP-HSQC (B) wurden 14 *scans* und 16 *dummy scans* aufgenommen.  $d_r$  betrug 30 ms. Prozessiert wurde unter Verwendung von *zero filling* und *linear prediction*, so dass die digitale Auflösung letztlich  $1,17$  Hz ( $^1\text{H}$ ) und  $47,18$  Hz ( $^{13}\text{C}$ ) beträgt. Die Abbildung ist der in [91] veröffentlichten nachempfunden, mit Genehmigung durch den Verleger American Chemical Society.

riode des Experiments  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -Antiphase-Magnetisierung auf  $^{13}\text{C}$  vor,  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -Kopplungen können sich also nicht entwickeln. Die Signale sind daher nicht zusätzlich verbreitert. Dieser Vorzug des HSQC gegenüber dem HMQC gab unter anderem den Anstoß zur Entwicklung der ASAP-HSQC Pulssequenz. Das ASAP-HMQC [90] diente dabei als Vorbild.



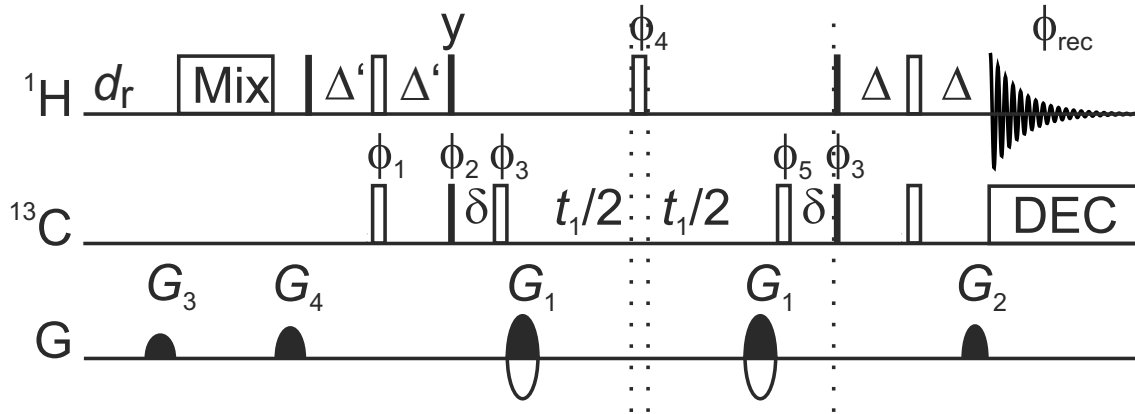
**Abbildung 4.6:** Vergleich des originalen ASAP-HSQC und des ASAP-HMQC (Pulssequenz siehe Abbildung 3.9) hinsichtlich der spektralen Auflösung anhand von Spektrenausschnitten einer 200 mM/D<sub>2</sub>O Maltose-Probe. Durch eine sehr große Anzahl von  $t_1$ -Inkrementen ergibt sich in beiden Fällen eine digitale Auflösung von 0,55 Hz in der <sup>13</sup>C-Dimension. Die Vergrößerung zeigt, dass es im ASAP-HSQC möglich ist, das  $\alpha$ - vom  $\beta$ -Anomer zu unterscheiden. Anhand des ASAP-HMQC können weder die Protonen **11** und **9** noch die beiden Konfigurationen gegeneinander abgegrenzt werden. Beide Spektren wurden mit 512 (<sup>1</sup>H)  $\times$  16 384 (<sup>13</sup>C) Punkten und Akquisitionszeiten von 142,3 ms (<sup>1</sup>H) und 905,4 ms (<sup>13</sup>C), einem *scan* für jedes  $t_1$ -Inkrement und 16 *dummy scans* aufgenommen. Das Erholungs-*delay*  $d_r$  wurde auf 1 ms eingestellt. Die Gesamtexperimentdauer betrug damit für das ASAP-HSQC 3 h 6 min und 37 s, für das ASAP-HMQC 3 h 7 min und 10 s. Prozessiert wurde unter Verwendung von *zero filling*, so dass die digitale Auflösung letztlich 1,18 Hz (<sup>1</sup>H) und 0,55 Hz (<sup>13</sup>C) beträgt. Die Abbildung ist der in [91] veröffentlichten nachempfunden, mit Genehmigung durch den Verleger American Chemical Society.

#### 4.1.5. Pulssequenzen des symmetrisierten ASAP-HSQC

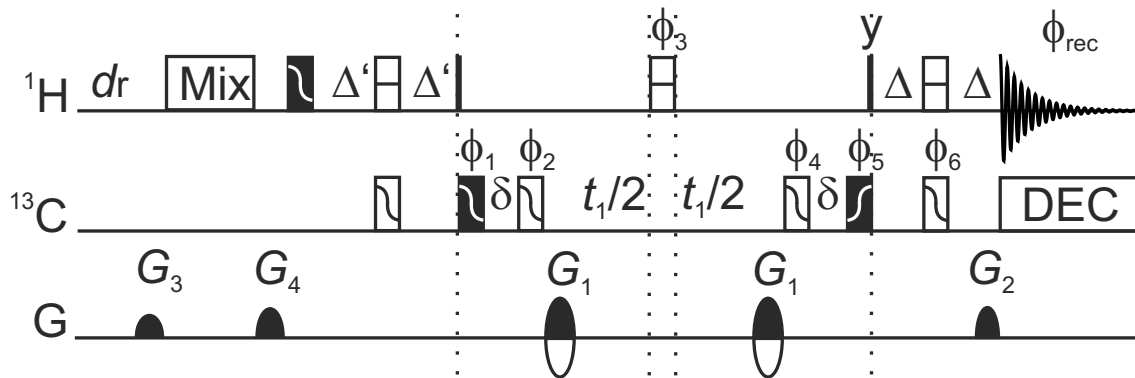
Die Pulssequenz des symmetrisierten ASAP-HSQC besitzt einen leicht abgewandelten Aufbau. Gegenüber der originalen ASAP-HSQC-Pulssequenz sind die Gradienten der

Echo/-Antiecho-Kohärenzordnungsselektion auf andere Weise angeordnet und es wird je ein weiterer  $180^\circ$ -Puls auf den beiden Kanälen benötigt. Der erste Gradient der Echo/-Antiecho-Kohärenzordnungsselektion ist in zwei Gradienten gleicher Länge und Stärke unterteilt. Letztere ist gegenüber der ursprünglichen Sequenz halbiert. Die beiden Gradienten umschließen die  $t_1$ -Inkrementierungsperiode symmetrisch. Zunächst werden durch den ersten Gradienten die Protonen-Einquantenkohärenzen, die für die Reservoir-Magnetisierung vorliegen, dephasiert. Durch Anwendung des mittig platzierten  $180^\circ$ -Protonenpuls und den sich anschließenden zweiten Gradienten wird jedoch entlang der x-Achse refokussiert. Der folgende  $90^\circ$ -Protonenpuls mit der Phase  $y$  und der nächste  $180^\circ$ -Protonenpuls orientieren die Reservoir-Magnetisierung entlang der  $+z$ -Achse. Aufgrund der Aufteilung der Gradienten und der zusätzlich benötigten Pulse ist die Sequenz geringfügig länger. Dies ist besonders unter Verwendung von geformten Pulse relevant. Allerdings ermöglicht der symmetrische Aufbau die Verwendung der BIBOP-Pulse aus dem BUBI-Sandwich für  $^{13}\text{C}$ , anstatt der BURBOP-Pulse, sofern sie, wie in diesem Fall, als Paar eingesetzt werden. Da sich die BIBOP-Pulse dann zu einem  $360^\circ$ -Puls addieren. Die Verwendung der BIBOP-Pulse ist aufgrund der kürzeren Dauer von Vorteil. Dennoch befindet sich die Reservoirmagnetisierung in der symmetrisierten Version des Experiments 3,7 ms länger in der transversalen Ebene als im originalen Experiment. Die beiden Kodierungsgradienten  $G_1$  umschließen die  $t_1$ -Periode. Für lange  $t_1$ -Zeiten verringert Diffusion die Effektivität der Kohärenzordnungsselektion und es kann zu einer unvollständigen Rephasierung der Reservoirmagnetisierung führen. Für Experimente mit kurzen  $t_1$ -Zeiten ist dieser Einfluss jedoch eher gering einzuschätzen. Die restlichen Elemente des ASAP-HSQC sind identisch. Sowohl die Ernst-Winkel-Anregung durch Optimierung des Transfer-*delays*  $\Delta'$ , als auch die Übertragung der Reservoir-Magnetisierung durch eine Mischsequenz werden angewandt. Ist die Mischsequenz durch ein *delay* ersetzt, handelt es sich um das ALSOFASST-HSQC. Der optimierte Aufbau der Pulssequenz wirkt Puls-Imperfektionen entgegen.





**Abbildung 4.7:** Symmetrisierte Pulssequenz des ASAP-HSQC-Experiments mit Rechteckpulsen. Die jeweiligen Phasenzyklen sind durch  $\Phi_1 = x$ ;  $\Phi_2 = x, -x$ ;  $\Phi_3 = 4(x), 4(-x)$ ;  $\Phi_4 = 2(x), 2(-x)$ ;  $\Phi_5 = 4(-x), 4(x)$ ;  $\Phi_{\text{rec}} = x, -x, x, -x, -x, x, -x, x$  gegeben. Echo-/Antiecho-Kohärenzordnungssektion wird durch die Gradientenverhältnisse  $G_1 = (40\%, -40\%)$ ,  $G_2 = (20,1\%, 20,1\%)$  erreicht. Die beiden Gradienten, die die Mischsequenz umgeben, besitzen die Stärke  $G_3 = 33\%$ ,  $G_4 = 43\%$ . Die Phasen  $\Phi_1$  und  $\Phi_2$  werden gemeinsam mit der Empfängerphase  $\Phi_{\text{rec}}$  nach der TPPI-Methode invertiert.

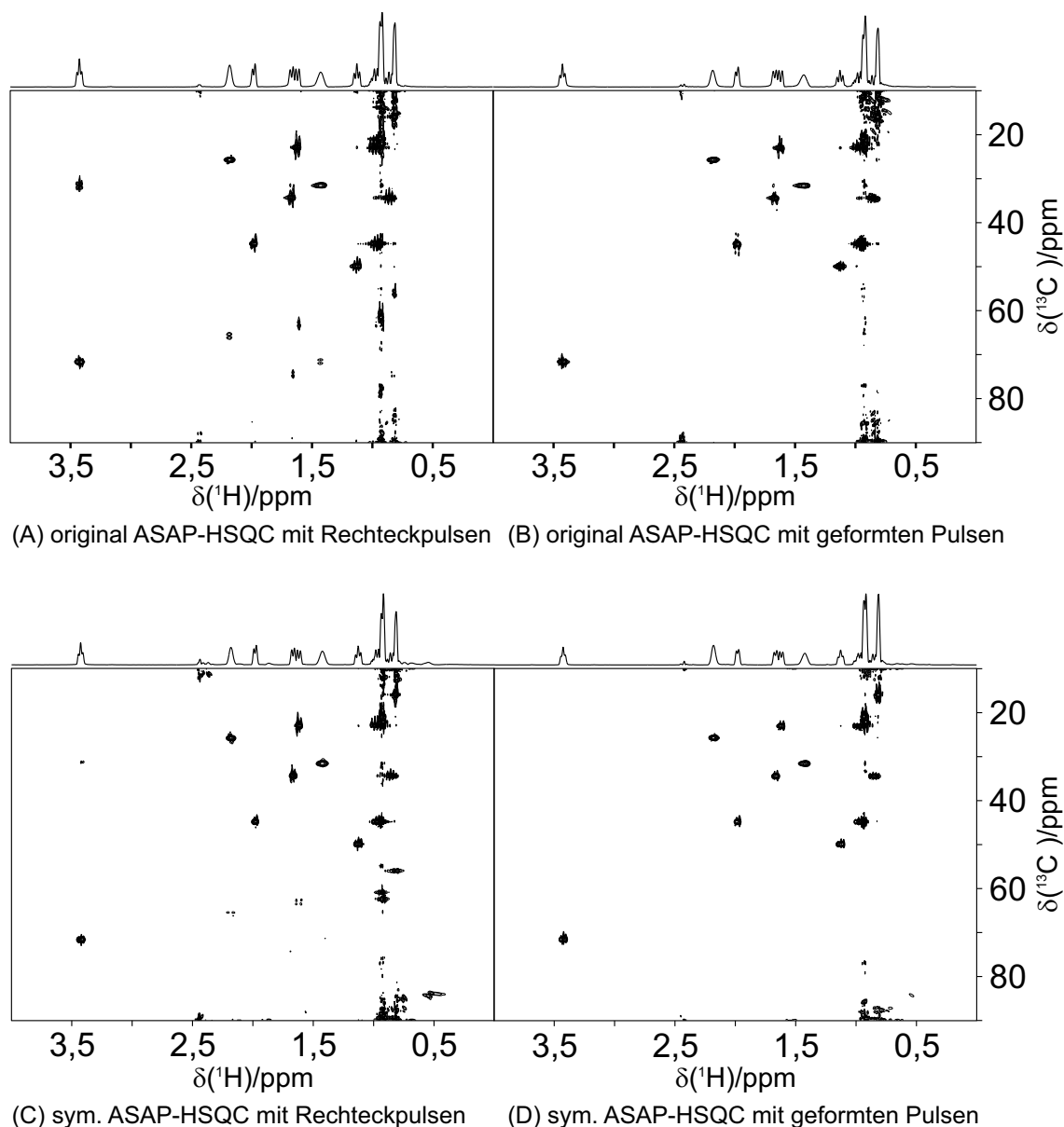


**Abbildung 4.8:** Symmetrisierte Pulssequenz des ASAP-HSQC-Experiments mit geformten Pulsen, veröffentlicht in Referenz [92]. Nähere Angaben zu den verwendeten Pulsen sind in der Tabelle 3.3 enthalten. Die jeweiligen Phasenzyklen sind durch  $\Phi_1 = 4(x), 4(-x)$ ;  $\Phi_2 = 4(y), 4(-y)$ ;  $\Phi_3 = 2(x), 2(-x)$ ;  $\Phi_4 = 4(-y), 4(y)$ ;  $\Phi_5 = x, -x$ ;  $\Phi_6 = x$ ;  $\Phi_{\text{rec}} = x, -x, x, -, x, -x, x, -x, x$  gegeben. Echo-/Antiecho-Kohärenzordnungssektion wird durch die Gradientenverhältnissen  $G_1 = (40\%, -40\%)$ ,  $G_2 = (20,1\%, 20,1\%)$  erreicht. Die beiden Gradienten, die die Mischsequenz umgeben, besitzen die Stärke  $G_3 = 33\%$  und  $G_4 = 43\%$ . Die Phasen  $\Phi_1$  und  $\Phi_2$  werden gemeinsam mit der Empfängerphase  $\Phi_{\text{rec}}$  nach der TPPI-Methode invertiert. Die Abbildung ist der in [92] veröffentlichten nachempfunden, mit Genehmigung durch den Verleger Elsevier.

Ein Vergleich der beiden Sequenzen anhand der Spektren wird in Abbildung 4.9 gegeben. Die Gesamtexperimentzeit betrug jeweils 23 Sekunden. Im Spektrum, das unter Verwendung der originalen ASAP-HSQC-Sequenz mit Rechteckpulsen (Abbildung 4.1) aufgenommen wurde, sind Artefakte zu sehen. Besonders auffällig sind Artefakte, die ausgehend vom ursprünglichen Signal um die halbe spektrale Breite in der  $^{13}\text{C}$ -Dimension verschoben sind. Die Intensitäten der Artefaktensignale liegen zum Teil in der gleichen Größenordnung wie die der tatsächlichen Signale. Deren Ursache liegt wahrscheinlich in der Verwendung der TPPI-Technik begründet, bei der unter anderem ein  $180^\circ$ -Puls invertiert wird. Pulsimperfectionen zeigen dann die beschriebenen Auswirkungen. Die Artefaktintensitäten sind im Spektrum des symmetrisierten ASAP-HSQC mit Rechteckpulsen (Abbildung 4.7) deutlich reduziert. Ausschlaggebend für die verbesserte spektrale Qualität ist die veränderte Anordnung der Gradienten der Echo-/Antiecho-Kohärenzordnungsselektion, wodurch die Auswirkungen des imperfekten  $180^\circ$ -Pulses, der Teil des TPPI-Ansatzes ist, möglicherweise unterdrückt werden. In der symmetrisierten Version ist die Inversion des Vorzeichens der Gradienten identisch zum klassischen Ansatz konventioneller HSQC-Experimente, während in der originalen ASAP-HSQC-Sequenz nur die Gradientenstärken variiert werden. Eine noch deutlichere Verbesserung wird durch die Anwendung der Breitbandpulse erreicht, die aus der optimalen Steuerungstheorie (*Optimal Control Theory*) abgeleitet wurden. Für beide Sequenzen verschwinden die Artefakte im Spektrum nahezu vollständig. Insgesamt ist allerdings die Empfindlichkeit der originalen Sequenz etwas höher. Dies liegt eventuell darin begründet, dass die symmetrisierte Sequenz geringfügig länger ist. Die Zeitdauer, in der die Reservoir-Magnetisierung in der transversalen Ebene orientiert ist, ist durch die Auftrennung der Gradienten und den zusätzlichen  $180^\circ$ -Puls um 3,7 ms höher. Durch homonukleare Protonenkopplung und transversale Relaxation bedingt, schrumpft das Reservoir geringfügig. Dennoch ist die symmetrisierte Sequenz der originalen ASAP-HSQC-Pulssequenz hinsichtlich der spektralen Qualität insgesamt überlegen. Der Vorteil ist besonders für sehr kurze Experimente, zum Beispiel unter der Verwendung von NUS, beobachtbar [93].

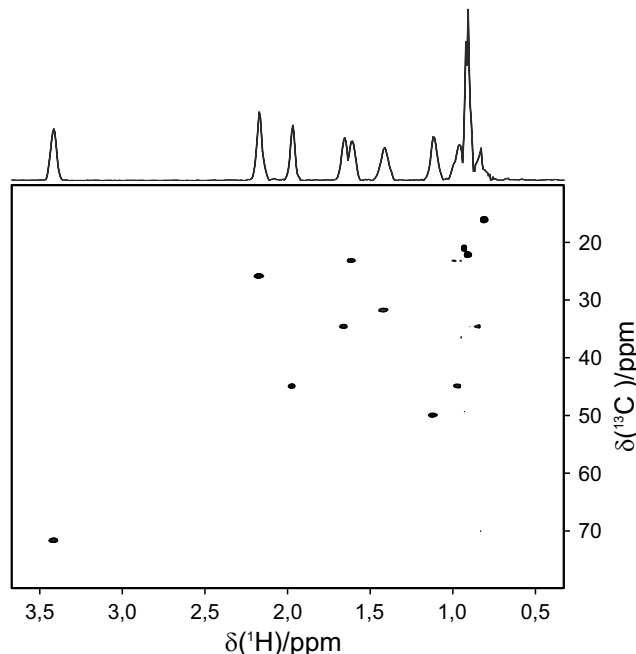
#### 4.1.6. Minimale Experimentzeit

Die ASAP-HSQC-Experimente können sehr einfach mit weiteren Techniken kombiniert werden. Eine Technik, die erhebliche Zeitersparnisse ermöglicht, ist *Non Uniform Sampling*. Bei der Verwendung von NUS wird nur ein Bruchteil der tatsächlichen Datenpunkte aufgenommen. Fehlende Datenpunkte werden, je nach der verwendeten Methode, vor der Fourier-Transformation rekonstruiert. Es werden vollständige  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektren



**Abbildung 4.9:** Vergleich der verschiedenen ASAP-HSQC-Sequenzen für eine 500 mM/CDCl<sub>3</sub> Menthol-Probe. Die Spektren (A) und (B) wurden unter Verwendung der originalen ASAP-HSQC-Sequenz aufgenommen, die beiden Spektren (C) und (D) mit der symmetrisierten Sequenz. Die durch die Anwendung der geformten Pulse optimierten Spektren (B) und (D) sind rechts abgebildet. Die vier Spektren wurden mit 512 (<sup>1</sup>H) × 128 (<sup>13</sup>C) Punkten und Akquisitionszeiten von 106,8 ms (<sup>1</sup>H) und 5,3 ms (<sup>13</sup>C), einem *scan* für jedes *t*<sub>1</sub>-Inkrement und 16 *dummy scans* aufgenommen. Das Erholungs-*delay* *d*<sub>r</sub> wurde auf 1 ms eingestellt. Die Gesamtexperimentdauer betrug damit 23 s. Isotropes Mischen wurde durch Anwendung der DIPSI-2-Mischsequenz [100] mit einer Mischzeit von 34,54 ms und einer RF-Amplitude von 5 kHz erreicht. Prozessiert wurde unter Verwendung von *zero filling* und *linear prediction*, so dass die digitale Auflösung letztlich 2,34 Hz (<sup>1</sup>H) und 47,18 Hz (<sup>13</sup>C) beträgt. Die Abbildung ist der in [92] veröffentlichten nachempfunden, mit Genehmigung durch den Verleger Elsevier.

erhalten. Da nicht jeder Datenpunkt aufgenommen wird, ist die Gesamtexperimentzeit erheblich verkürzt. Durch diese weitere Optimierung des Experiments war es möglich, in weniger als zwei Sekunden ein vollständiges  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrum von Menthol aufzunehmen, es ist in Abbildung 4.10 gezeigt. Das Spektrum weist ein gutes Signal-zu-



**Abbildung 4.10:**  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrum einer 500 mM/ $\text{CDCl}_3$  Menthol-Probe, aufgenommen mit dem symmetrisierten ASAP-HSQC-Experiment (Abbildung 4.8 und Referenz [92]). Durch Kombination mit NUS betrug die Gesamtexperimentzeit lediglich 1,9 s. Es wurden  $256 (^1\text{H}) \times 128 (^{13}\text{C})$  Punkte aufgenommen, was Akquisitionszeiten von 53,4 ms ( $^1\text{H}$ ) und 5,3 ms ( $^{13}\text{C}$ ) entspricht, mit jeweils einem *scan* für jedes  $t_1$ -Inkrement und 4 *dummy scans*. Die Mischzeit betrug 11,5 ms. Durch Verwendung von *Non Uniform Sampling* wurde die Anzahl der Punkte in der indirekten Dimension auf 18 Inkremente reduziert. Das Spektrum wurde mit dem CS-Algorithmus [107] der TopSpin Software rekonstruiert. Prozessiert wurde unter Verwendung von *zero filling* und *linear prediction*, so dass die digitale Auflösung letztlich 2,34 Hz ( $^1\text{H}$ ) und 23,59 Hz ( $^{13}\text{C}$ ) beträgt. Die Abbildung ist der in [92] veröffentlichten nachempfunden, mit Genehmigung durch den Verleger Elsevier.

Rausch-Verhältnis auf. Es sind alle Signale zu sehen. Die gewählte Darstellung enthält nahezu keine Artefaktsignale, lediglich im Bereich der starken  $\text{CH}_3$ -Signale sind wenige intensitätsschwache Artefakte erkennbar. In der Routine-NMR muss oft abgewogen werden, welche Experimente in der zur Verfügung stehenden Messzeit aufgenommen werden können. Die verkürzte Experimentzeit des ASAP-HSQC ermöglicht nun die ergänzende Aufnahme eines  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrums, als wertvolle Erweiterung zur Untersuchung einer Probe. Die

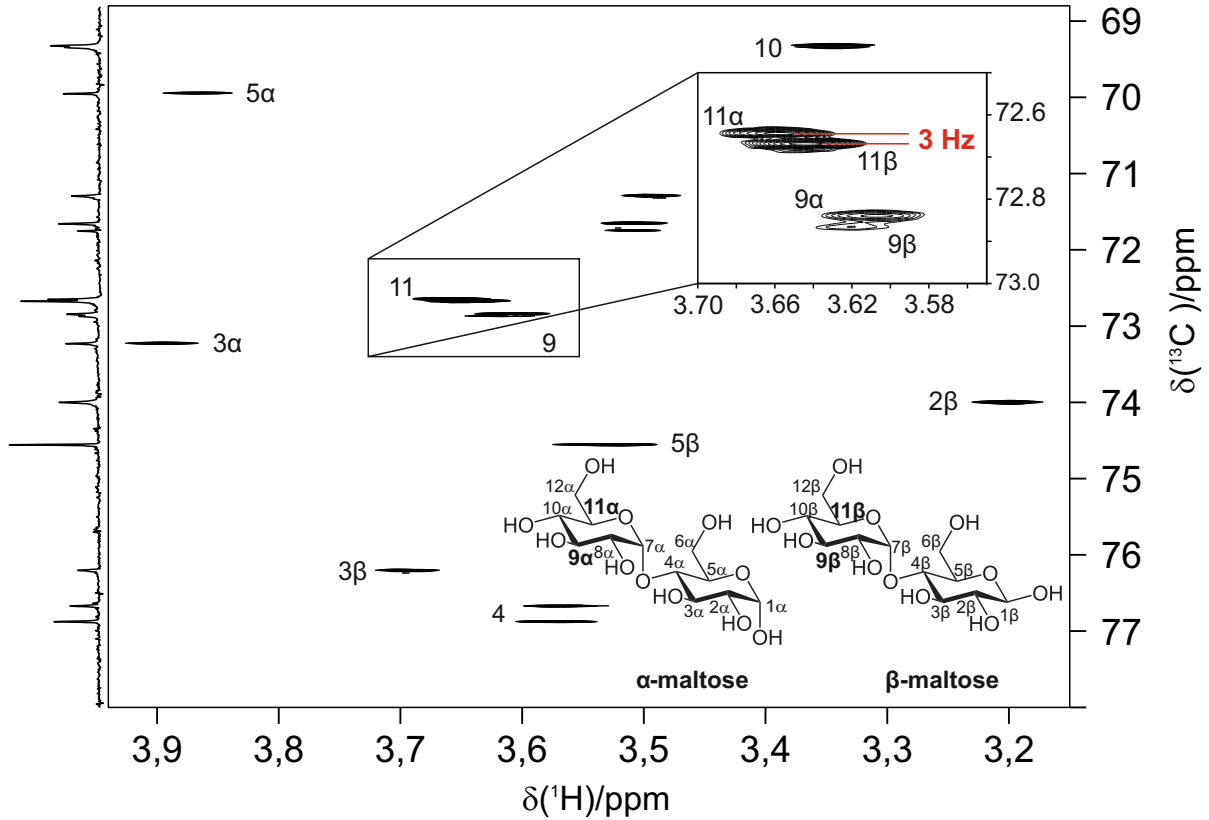
Experimentzeiten sind vergleichbar mit kurzen, eindimensionalen Protonen-Experimenten, wodurch die Anwendung in der Routine-NMR eröffnet wird.

#### 4.1.7. Hohe Auflösung in minimaler Aufnahmezeit

Auch die benötigte Zeit zur Aufnahme des im vorherigen Unterkapitel in Abbildung 4.6 gezeigten hochaufgelösten HSQC-Spektrums kann durch die Kombination mit NUS noch einmal drastisch reduziert werden. In 7 min und 14 s wurde ein hochaufgelöstes Spektrum der Maltose-Probe aufgenommen, das ebenso zur Unterscheidung der beiden Anomere ausreicht. Die weitere Reduktion der Experimentzeit konnte durch Halbierung der Punkte und der zusätzlichen Verwendung von NUS und *linear prediction* erreicht werden. Die digitale Auflösung betrug so letztlich wieder 3,5 Hz ( $^1\text{H}$ ) und 0,55 Hz ( $^{13}\text{C}$ ). In Abbildung 4.11 ist ein Ausschnitt des beschriebenen  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrums dargestellt. Die Vergrößerung der Signale **9** und **11** zeigt, dass es weiterhin möglich ist, die beiden Anomere von Maltose auch anhand dieser Signale zu unterscheiden. Die Experimentzeit liegt im Bereich konventioneller  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC-Experimente mit deutlich geringerer Auflösung. Die erheblich reduzierte Experimentzeit zur Aufnahme eines derart hochaufgelösten Spektrums ermöglicht es, das Experiment anstelle eines  $^{13}\text{C}$ -1D-Spektrums zu verwenden. Zusätzlich ist die Empfindlichkeit des heteronuklearen zweidimensionalen Experiments gegenüber dem eindimensionalen  $^{13}\text{C}$ -Experiment durch Anregung und Detektion der Protonen gesteigert. In Kapitel 4.4 wird ein Experiment vorgestellt, das als Alternative zu einem  $^{13}\text{C}$ -Spektrum dienen kann. Das Experiment ist zum Beispiel auch für die Anwendung im Bereich Metabolomics, bei der Untersuchung von Proben unterschiedlichster Konzentrationen, interessant. Eine ausschließlich auf der Analyse von ASAP-HSQC-Experimenten basierende Studie wurde von Sharma *et al.* [147] veröffentlicht. Jedoch besitzt ein zweidimensionales Experiment auch Nachteile. Beispielsweise ist es durch die größere Anzahl der Pulse und die verschiedenen *delays*, sowie weitere Parameter, die eine sorgfältige Einstellung erfordern, fehleranfälliger.

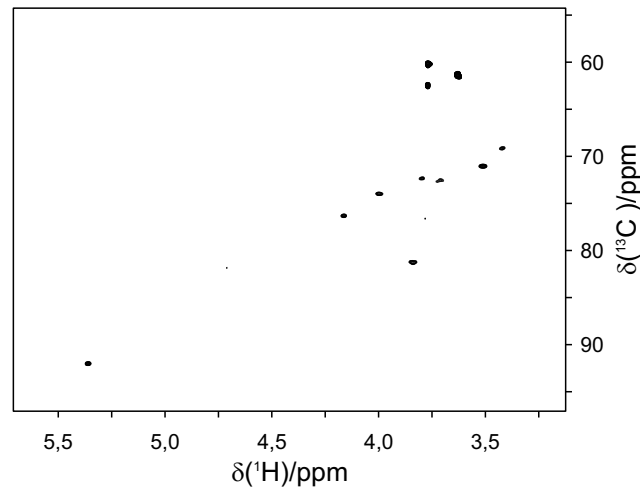
#### 4.1.8. Geringe Probenkonzentration

Die bisher gezeigten Experimente wurden alle mit Proben, deren Konzentration vergleichsweise hoch ist, aufgenommen. Eine berechtigte Nachfrage war deshalb immer, ob das ASAP-HSQC auch für die Messung von Proben geringerer Konzentration genutzt werden kann. Das in Abbildung 4.12 dargestellte  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrum wurde unter Verwendung der 10 mM Saccharose Probe in  $\text{D}_2\text{O}$  aufgenommen. Die symmetrisierte ASAP-HSQC-Pulssequenz ermöglicht die Aufnahme des Spektrums in nur 2,9 Sekunden. Diese sehr kurze Gesamtexperimentzeit konnte durch die Kombination mit NUS erreicht werden. Die



**Abbildung 4.11:** Ausschnitt aus dem hochauflösten  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrum einer 200 mM/ $\text{D}_2\text{O}$  Maltose-Probe, aufgenommen mit einer Gesamtexperimentzeit von nur 7 min und 14 s. Das Spektrum wurde mit einer sehr großen Anzahl  $t_1$ -Inkrementen aufgenommen, so ergab sich eine digitale Auflösung von 0,55 Hz in der  $^{13}\text{C}$ -Dimension. Es wurde mit 256 ( $^1\text{H}$ )  $\times$  8192 ( $^{13}\text{C}$ ) Punkten und Akquisitionszeiten von 71,2 ms ( $^1\text{H}$ ) und 452,6 ms ( $^{13}\text{C}$ ), einem *scan* für jedes  $t_1$ -Inkrement und 32 *dummy scans* aufgenommen. Durch Verwendung von *Non Uniform Sampling* wurde die Anzahl der Punkte in der indirekten Dimension auf 1228 Inkremente reduziert. Das Spektrum wurde mit dem CS-Algorithmus [107] der TopSpin Software rekonstruiert. Prozessiert wurde unter Verwendung von *zero filling* und *linear prediction*, so dass die digitale Auflösung letztlich 3,5 Hz ( $^1\text{H}$ ) und 0,55 Hz ( $^{13}\text{C}$ ) beträgt. Die Abbildung ist der in [92] veröffentlichten nachempfunden, mit Genehmigung durch den Verleger Elsevier.

Aufnahme wurde durch die Einstellung aller Parameter so optimiert, dass die erwähnte Experimentzeit für die genannte Probenkonzentration eine untere Grenze darstellt. Das Spektrum zeigt alle Signale der Probe, es sind nur wenige, sehr intensitätsschwache Artefakte sichtbar.



**Abbildung 4.12:** Entkoppeltes  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrum einer 10 mM Saccharose Probe in  $\text{D}_2\text{O}$ , aufgenommen in nur 2,9 s. Es wurde die symmetrisierte ASAP-HSQC-Sequenz (Abbildung 4.8 und Referenz [92]) verwendet. Das Spektrum wurde mit  $256 (^1\text{H}) \times 128 (^{13}\text{C})$  Punkten aufgenommen, was Akquisitionszeiten von 74,5 ms ( $^1\text{H}$ ) und 8,5 ms ( $^{13}\text{C}$ ) entspricht, mit jeweils einem *scan* für jedes  $t_1$ -Inkrement und 4 *dummy scans*. Die Mischzeit betrug 11,5 ms. Durch Verwendung von *Non Uniform Sampling* wurde die Anzahl der Punkte in der indirekten Dimension auf 24 Inkremente reduziert. Das Spektrum wurde mit dem CS-Algorithmus [107] der TopSpin Software rekonstruiert. Prozessiert wurde unter Verwendung von *zero filling* und *linear prediction*, so dass die digitale Auflösung letztlich 2,34 Hz ( $^1\text{H}$ ) und 23,59 Hz ( $^{13}\text{C}$ ) beträgt. Die Abbildung ist der in [92] veröffentlichten nachempfunden, mit Genehmigung durch den Verleger Elsevier.

## 4.2. CLIP-ASAP-HSQC

Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden bereits in [67] und [92] veröffentlicht.

Das an dieser Stelle vorgestellte CLIP-ASAP-HSQC-Experiment enthält neben der chemischen Verschiebungsinformation der Protonen und der  $^{13}\text{C}$ -Kerne weitere wertvolle Informationen, da die Signalaufspaltung durch heteronukleare Kopplung nicht wie im herkömmlichen  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC unterdrückt wird. Dadurch ermöglicht es die Messung von heteronuklearen Kopplungen über eine Bindung. Die  $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten können unter anderem genutzt werden, um die Hybridisierung der Kohlenstoffatome abzuschätzen [9], oder die Konfiguration des anomeren Zentrums eines Zuckermoleküls zu bestimmen [8]. In den meisten Fällen reicht es jedoch nicht aus, lediglich die skalare Kopplung zwischen Kohlenstoff und Protonen über eine Bindung ( $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplungen) zu messen, um eine Molekülstruktur vollständig aufzuklären. Viel wertvoller sind in diesem Kontext dipolare Restkopplungen (*Residual Dipolar Couplings* (RDCs)) durch Verwendung teilweise orientierter Proben [72, 148]. Die in diesen Fällen messbaren RDCs sind abhängig vom Abstand der Kerne zueinander und dem Winkel der Kernverbindungsachse zum externen Magnetfeld. Aufgrund dieses geometrischen Zusammenhangs spiegeln die gemessenen Kopplungskonstanten die räumliche Anordnung der Atome zueinander wider [63, 64, 72, 149–151]. Dadurch können Konstitution [60], Konfiguration [51–58] und die Vorzugskonformation des Moleküls selbst dann bestimmt werden [42–49], wenn andere Methoden, wie etwa die Bestimmung von NOEs [152] und  $^3J$ -Kopplungen [6, 153–156] keine eindeutige Strukturaufklärung ermöglichen. Aufgrund der großen Bedeutung der RDCs auch in der Untersuchung von biologischen Makromolekülen ist eine große Anzahl Experimente zu deren Bestimmung verfügbar [66, 157–165]. Nur wenige können allerdings mit dem Konzept der ASAP- beziehungsweise ALSOFAS-Experimente kombiniert werden. Das CLIP-HSQC-Experiment ist eines der meist verwendeten Experimente zur Bestimmung von  $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplungen kleiner Moleküle [66]. Die Kopplungskonstanten werden durch Messung des Abstandes der beiden Dublett-Komponenten in der Protonendimension bestimmt (siehe dazu Kapitel 3.3 und Abbildung 3.6). Durch Verwendung eines zusätzlichen Pulses im CLIP-Experiment ist die Phase der Signale nicht durch zurückbleibende Antiphase-Anteile verzerrt.

Die bisher schnellste Methode zur Aufnahme von heteronuklearen Korrelationsexperimenten ist die *ULTRAFAS* (UF)-Technik [37–39]. Sie wurde auch zur Messung von RDCs genutzt [40]. Die Anwendbarkeit des Experiments ist jedoch durch die eingeschränkte spektrale Breite und die erreichbare digitale Auflösung, sowie das geringe Signal-zu-Rausch-Verhältnis stark limitiert. In der Veröffentlichung zur Messung der RDCs [40] wurde daher eine ver-

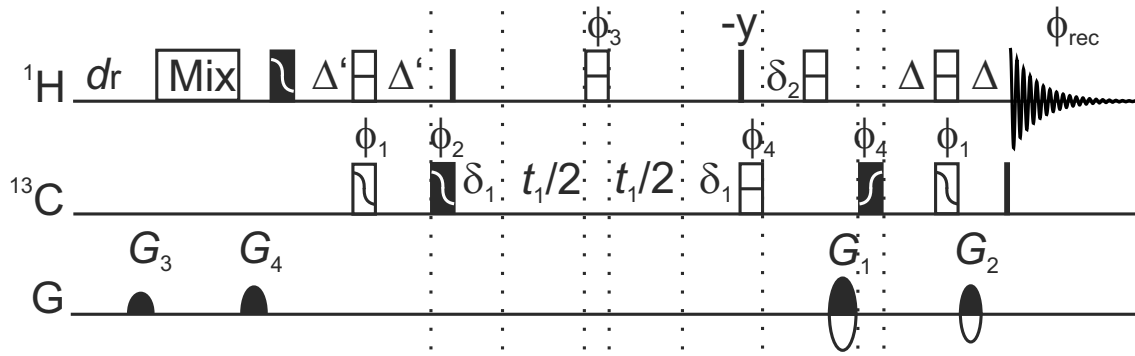


gleichsweise hochkonzentrierte Probe verwendet, zusätzlich wurden 16 *scans* akkumuliert, wodurch die Messzeit insgesamt 60 Sekunden betrug.

Das CLIP-ASAP-HSQC-Experiment kombiniert das schnelle Aufnahmeschema mit dem CLIP-Ansatz. Zunächst wurde die Pulssequenz verwendet, um in weniger als einer halben Minute gekoppelte HSQC-Spektren aufzunehmen, die zur Extraktion der Kopplungskonstanten dienen. Mit der späteren weiteren Reduktion der Gesamtexperimentzeit durch die Verwendung von NUS ist das CLIP-ASAP-HSQC das eindeutig aussichtsreichere Experiment. Es ermöglicht die Aufnahme von vollständigen,  $\omega_2$ -gekoppelten  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren in wenigen Sekunden, sowohl unter Verwendung isotroper, als auch teilweise-orientierter Proben. Die Einstellung der Akquisitionsparameter ist gewohnt einfach. Das Experiment besitzt keine der Einschränkungen, die für die UF-Technik genannt wurden.

#### 4.2.1. Pulssequenz des originalen CLIP-ASAP-HSQC

Die Pulssequenz des originalen CLIP-ASAP-HSQC ist in Abbildung 4.13 dargestellt. Es werden geformte Pulse verwendet, die mit Hilfe der optimalen Steuerungstheorie *Optimal Control Theory* abgeleitet wurden (siehe Tabelle 3.3). Die Pulssequenz unterscheidet sich in zwei Punkten von der des originalen ASAP-HSQC. Zum Einen wird keine heteronukleare Entkopplung während der Detektion des FID angewandt, da gekoppelte Spektren aufgenommen werden sollen. Zweitens enthält die Sequenz einen zusätzlichen  $90^\circ$ - $^{13}\text{C}$ -Puls direkt vor der Akquisition des FID. Dieser Puls verkörpert den CLIP-Ansatz. Er wird benötigt, um verbleibende Antiphase-Anteile in nicht detektierbare Multiquanten-Magnetisierung umzuwandeln. Die Kopplungskonstanten werden ausgehend von den gekoppelten HSQC-Spektren durch Messung des Abstandes der beiden Dublett-Komponenten in der direkten Dimension bestimmt (siehe Abschnitt 3.3 und Abbildung 3.6). Insbesondere bei der Verwendung teilweise orientierter Proben zur Messung von RDCs kann die Phase der Signale durch verbleibende Antiphase-Anteile verzerrt sein, wenn das *delay* des Rücktransfers schlecht auf die jeweilige Kopplung abgestimmt ist. Unglücklicherweise ist die Einstellung des *delays* immer ein Kompromiss, da sich die  $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplungen innerhalb eines Moleküls unterscheiden. Das ist für die Messungen von RDCs noch gewichtiger, da die Werte der  $^1D_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten und damit die resultierende Gesamtkopplung  $^1T_{\text{CH}}$  über einen deutlich größeren Bereich gestreut sind. Für die Einstellung des *delays* wird jedoch immer ein mittlerer Wert verwendet. Der Transfer zu Inphase-Magnetisierung kann daher unvollständig sein. Es bleiben Antiphase-Terme zurück, die sich durch heteronukleare Kopplungen während der Akquisitionsperiode in detektierbare Inphase-Magnetisierung entwickeln und zu Phasenverzerrungen führen. Dadurch wird die Bestimmung der Kopplungskonstanten



**Abbildung 4.13:** Original Pulssequenz des CLIP-ASAP-HSQC-Experiments mit geformten Pulsen, veröffentlicht in [67]. Genauere Angaben zu den verwendeten geformten Pulsen sind in Tabelle 3.3 aufgeführt. Die jeweiligen Phasenzyklen sind durch  $\Phi_1 = x$ ;  $\Phi_2 = -x, x$ ;  $\Phi_3 = 2(x), 2(-x)$ ;  $\Phi_4 = 4(x), 4(-x)$ ;  $\Phi_{\text{rec}} = -x, x, -x, x, x, -x, x, -x$  gegeben. Echo-/Antiecho-Kohärenzordnungsselektion wurde durch die Gradientenverhältnissen  $G_1 = (63,9\%, 80\%)$ ,  $G_2 = (80\%, 59,9\%)$  erreicht. Die beiden Gradienten, die die Mischsequenz umgeben, besitzen die Stärke  $G_3 = 33\%$ ,  $G_4 = 43\%$ . Die Phasen  $\Phi_1$  und  $\Phi_2$  wurden gemeinsam mit der Empfängerphase  $\Phi_{\text{rec}}$  nach der TPPI-Methode invertiert. Die Abbildung ist der in [67] veröffentlichten nachempfunden, mit Genehmigung durch den Verleger John Wiley and Sons.

erschwert. Mit dem CLIP-Experiment jedoch können die Kopplungskonstanten mit hoher Genauigkeit aus den resultierenden akkuraten Inphase-Dubletts bestimmt werden.

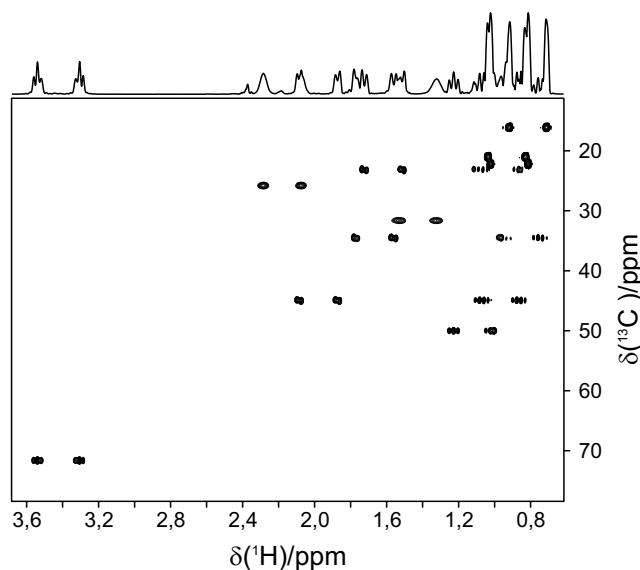
Die verbleibenden Elemente des ASAP-HSQC sind weiterhin in der Pulssequenz enthalten. Die Pulse sind so angeordnet, dass sowohl Ernst-Winkel-Anregung durch Einstellung von  $\Delta'$ , als auch die Erhaltung der Reservoir-Magnetisierung möglich ist. Das CLIP-ASAP-HSQC verwendet, genau wie das ASAP-HSQC, eine Mischsequenz zur Verteilung der Reservoir-Magnetisierung. Auf diese Weise kann das Erholungs-*delay*  $d_r$  stark verkürzt werden, womit die schnelle Aufnahme von gekoppelten  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektren ermöglicht wird. Sollen RDCs gemessen werden, müssen besondere Aspekte bei der Wahl der Mischsequenz berücksichtigt werden (siehe Abbildung 4.15). Wird die Mischsequenz durch ein *delay* gleicher Länge ersetzt, lautet die Bezeichnung für das Experiment CLIP-ALSOFAST-HSQC. Für die Messung größerer Moleküle mit kurzen  $T_2$ -Zeiten, die Untersuchung teilweise orientierter Proben oder für die Aufnahme von Spektren mit hoher Auflösung kann die Verwendung des ALSOFAST- anstelle des ASAP-Experiments von Vorteil sein.

#### 4.2.2. Validierung des Experiments

In Abbildung 4.14 ist ein  $\omega_2$ -gekoppeltes HSQC-Spektrum der isotropen Probe von Menthol gezeigt, das in 21 Sekunden unter Verwendung der originalen CLIP-ASAP-HSQC-Pulsse-

quenz aufgenommen wurde. Die Eignung des schnellen Experiments zur akkuraten Bestimmung der Kopplungskonstanten wird in Tabelle 4.1 deutlich. In dieser sind die Kopplungskonstanten, die aus dem ASAP-Experiment extrahiert wurden, denen des konventionellen CLIP-HSQC gegenübergestellt. Das konventionelle  $\omega_2$ -gekoppelte HSQC-Spektrum, aufgenommen mit der CLIP-HSQC-Pulssequenz aus Abbildung 3.10, ist im Anhang A.1 enthalten. Es wurde mit einer größeren Anzahl Punkte in der direkten Dimension aufgenommen, daraus resultiert eine geringfügig höhere digitale Auflösung in der Protonendimension. Zusätzlich sind in der Tabelle 4.1 die Kopplungskonstanten aufgelistet, die aus einem CLIP-ASAP-HSQC-Spektrum unter Verwendung der MOCCA-XY16 statt der DIPSI-2 Mischsequenz extrahiert wurden. Das schnelle Experiment kann also auch unter Verwendung einer anderen Mischsequenz zur präzisen Bestimmung der Kopplungskonstanten genutzt werden.

Die Übereinstimmung der aus den verschiedenen HSQC-Spektren extrahierten Kopplungskonstanten ist gut. Die Werte des CLIP-ASAP-HSQC besitzen eine mittlere Abweichung von 0,34 Hz (DIPSI-2) beziehungsweise 0,44 Hz (MOCCA-XY16) bezüglich der Kopplungskonstanten, die mit dem konventionellen, wesentlich längeren Experiment bestimmt wurden. Der Vergleich der Werte für C2-H2 und C3-H3' lässt vergleichsweise große Abweichungen erkennen. Diese können durch Überlappung der Signale mit  $T_1$ -Rausch-Artefakten der benachbarten Methylgruppen und durch Artefakte aufgrund starker Kopplung begründet werden. Der erste Test anhand der isotropen Probe zeigt also die Eignung der neuen schnellen Pulssequenzen für die Kopplungsextraktion.



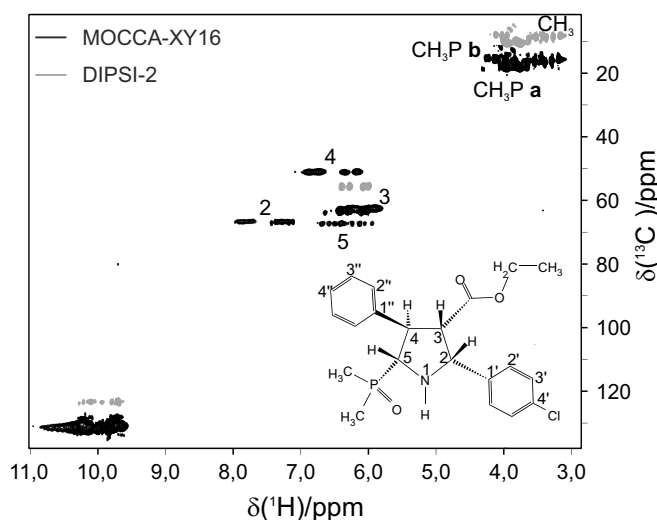
**Abbildung 4.14:**  $\omega_2$ -gekoppeltes HSQC-Spektrum von Menthol, aufgenommen mit dem originalen CLIP-ASAP-HSQC-Experiment (Abbildung 4.13). Das Spektrum wurde mit  $512 (^1\text{H}) \times 128 (^{13}\text{C})$  Punkten und Akquisitionszeiten von 106,8 ms ( $^1\text{H}$ ) und 4,2 ms ( $^{13}\text{C}$ ), jeweils einem *scan* für jedes  $t_1$ -Inkrement und 16 *dummy scans* aufgenommen. Es ergab sich dadurch eine Gesamtexperimentzeit von 21 s. Prozessiert wurde unter Verwendung von *zero filling* und *linear prediction*, so dass die digitale Auflösung letztlich 1,2 Hz ( $^1\text{H}$ ) und 29,4 Hz ( $^{13}\text{C}$ ) betrug. Die anhand dieses Spektrums bestimmten Kopplungskonstanten werden in Tabelle 4.1 aufgelistet. Die Abbildung ist der in [67] veröffentlichten nachempfunden, mit Genehmigung durch den Verleger John Wiley and Sons.

**Tabelle 4.1:**  $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten für eine 500 mM/ $\text{CDCl}_3$  Menthol-Probe, die anhand eines konventionell aufgenommenen CLIP-HSQC, oder durch Aufnahme von CLIP-ASAP-HSQC-Experimenten unter Verwendung der DIPSI-2- oder der MOCCA-XY16-Mischsequenz bestimmt wurden. Die mit einem Stern gekennzeichneten Signale weisen Artefakte zweiter Ordnung auf. Die Fehlergrenzen der Bestimmung, gemäß der in [166] verwendeten Methode, sind ebenfalls angegeben.

Signalzuordnung	$^1J_{\text{CH}}$ (CLIP)	$^1J_{\text{CH}}$ (CLIP-ASAP)	$^1J_{\text{CH}}$ (CLIP-ASAP)
	[Hz]	DIPSI-2 [Hz]	MOCCA-XY16 [Hz]
C1-H1	$139,4 \pm 0,1$	$139,0 \pm 0,5$	$139,9 \pm 0,7$
C2-H2*	$122,3 \pm 1,6$	$123,2 \pm 0,1$	$123,2 \pm 0,1$
C3-H3*	$126,7 \pm 1,1$	$126,9 \pm 2,5$	$126,6 \pm 2,2$
C3-H3'*	$124,5 \pm 1,9$	$125,5 \pm 1,6$	$125,9 \pm 4,7$
C4-H4*	$126,4 \pm 2,8$	$126,5 \pm 3,2$	$126,6 \pm 2,9$
C4-H4'*	$120,8 \pm 1,5$	$120,4 \pm 0,7$	$120,3 \pm 1,0$
C5-H5	$124,1 \pm 0,1$	$123,8 \pm 1,2$	$123,7 \pm 1,3$
C6-H6	$127,6 \pm 0,1$	$127,5 \pm 0,1$	$127,8 \pm 0,2$
C6-H6'	$123,9 \pm 0,1$	$123,9 \pm 1,1$	$124,0 \pm 0,7$
C7-H7	$126,0 \pm 0,1$	$125,8 \pm 0,2$	$125,8 \pm 0,4$
C8-H8	$124,3 \pm 0,1$	$123,8 \pm 0,5$	$123,9 \pm 0,2$
C9-H9	$124,4 \pm 0,1$	$124,6 \pm 0,5$	$124,7 \pm 0,5$
C10-H10	$124,6 \pm 0,1$	$124,5 \pm 0,6$	$124,9 \pm 0,4$

### 4.2.3. Untersuchung teilweise orientierter Proben

Wie in den einleitenden Worten zu diesem Kapitel bereits erwähnt, sind RDCs besonders wertvolle NMR-Parameter. Die Anwendung der Pulssequenz zur Messung teilweise orientierter Proben war deshalb von besonderem Interesse. Eine Matrix, durch die partielle Orientierung der gelösten Substanz hervorgerufen wird, ist Poly- $\gamma$ -Benzyl-L-Glutamat (PBLG), das im Magnetfeld eine flüssigkristalline Phase ausbildet. Die Molekülbewegung wird durch das Medium eingeschränkt und es resultiert eine partielle Orientierung. In Abbildung 4.15 ist das HSQC-Spektrum von 2-(4-Chlorphenyl)-5-(dimethylphosphoryl)-4-phenyl-pyrrolidin-3-carboxylat in PBLG gezeigt, das mit der originalen CLIP-ASAP-HSQC-Pulssequenz aufgenommen wurde. Die Probenvorbereitung wird in [109] erläutert, die  $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten sind ebenfalls dieser Referenz entnommen.



**Abbildung 4.15:** Vergleich der  $\omega_2$ -gekoppelten HSQC-Spektren von 2-(4-Chlorphenyl)-5-(dimethylphosphoryl)-4-phenyl-pyrrolidin-3-carboxylat in PBLG, aufgenommen mit dem originalen CLIP-ASAP-HSQC-Experiment. In grau ist das resultierende Spektrum unter der Verwendung der DIPSI-2-Sequenz dargestellt, es wurde so verschoben, dass die Signalgruppen der beiden Spektren voneinander unterschieden werden können. Das in schwarz gezeigte Spektrum wurde durch Anwendung der MOCCA-XY16-Sequenz erhalten. Nur in diesem Spektrum sind alle Signale sichtbar. Die Spektren wurden mit  $2048 (^1\text{H}) \times 128 (^{13}\text{C})$  Punkten und Akquisitionszeiten von 142,5 ms ( $^1\text{H}$ ) und 2,4 ms ( $^{13}\text{C}$ ), jeweils einem *scan* für jedes  $t_1$ -Inkrement und 4 *dummy scans* aufgenommen. Es ergab sich dadurch eine Gesamtexperimentzeit von 25 s (DIPSI-2-Sequenz), beziehungsweise 24 s (MOCCA-XY16-Sequenz). Prozessiert wurde unter Verwendung von *zero filling* und *linear prediction*, so dass die digitale Auflösung letztlich 0,9 Hz ( $^1\text{H}$ ) und 53,1 Hz ( $^{13}\text{C}$ ) beträgt. Die Abbildung ist der in [67] veröffentlichten nachempfunden, mit Genehmigung durch den Verleger John Wiley and Sons.

Für die Messung der durch die flüssigkristalline Phase stark orientierten Probe müssen spezielle Aspekte bei der Wahl der Mischsequenz beachtet werden. Nur das unter Verwendung der MOCCA-XY16-Mischsequenz mit dem CLIP-ASAP-HSQC-Experiment aufgenommene Spektrum, abgebildet in 4.15 in schwarz, enthält alle Signale. Die Gesamtexperimentzeit betrug nur 24 Sekunden. Im  $\omega_2$ -gekoppelten HSQC-Spektrum, das unter Verwendung der DIPSI-2-Mischsequenz aufgenommen wurde (in Abbildung 4.15 in grau dargestellt), fehlen einige Signale. Der Kohärenztransfer ist unter Anwendung der Mischsequenz nicht optimal, da die dipolare Kopplung eine andere Symmetrie als die  $J$ -Kopplung besitzt. Während der Transfer im isotropen Fall fast immer positiv ist, weist der effektive Hamiltonian eines dipolar gekoppelten Systems, der während des DIPSI-Mischens wirkt, negative Anteile auf. Der dadurch hervorgerufene negative Transfer kann zu Entwicklung von Antiphase-Magnetisierung führen. Die Polarisation der Reservoir-Magnetisierung wird nicht so übertragen, wie es für die ASAP-Methode nötig wäre. Die Intensität der Signale wird sogar verringert, weshalb einige Signale im Spektrum fehlen. Es existieren allerdings Möglichkeiten, die in diesem Fall Abhilfe bieten. Es kann entweder eine Mischsequenz verwendet werden, die den dipolaren Anteil des effektiven Hamiltonian unterdrückt, wie im J-ONLY-TOCSY [167], oder eine Mischsequenz, die den konstruktiven Transfer sowohl im isotropen Fall als auch in Gegenwart dipolarer Kopplung gewährleistet. Die MOCCA-XY16-Mischsequenz [102, 103] zählt zur zweiten Kategorie. Das Experiment, unter Verwendung der MOCCA-XY16-Sequenz, wurde zur Extraktion der Kopplungskonstanten und der Ermittlung der RDCs verwendet. Für die Aufnahme wurde keine Ernst-Winkel-Anregung angewandt, da die  $^1T_{\text{CH}}$ -Kopplungen sehr unterschiedliche und durch die starke Orientierung zum Teil sehr große Werte annehmen. Das INEPT-Transfer-*delay* wurde stattdessen auf eine mittlere Kopplungskonstante von 300 Hz eingestellt. Es besitzt eine Länge von 0,83 ms und ist daher relativ kurz. Das konventionelle Vergleichsexperiment wurde in 2 min und 34 s aufgenommen, das Spektrum ist im Anhang in Abbildung A.3 dargestellt. Die unter Verwendung der MOCCA-XY16-Sequenz mit dem originalen CLIP-ASAP-HSQC erhaltenen  $^1T_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten werden in Tabelle 4.2 mit den Werten des konventionellen CLIP-HSQC verglichen. Die angegebenen Kopplungskonstanten konnten mit vergleichbar hoher Genauigkeit bestimmt werden. Die Abweichungen der gemessenen Werte der Kopplungsaufspaltung liegen jeweils im Rahmen der Fehlergrenzen. Die dipolaren Restkopplungen wurden gemäß der Gleichung 3.3 errechnet, die zugehörigen Fehler nach Gleichung 3.4. Im aromatischen Bereich des Spektrums konnten aufgrund der Überlappung der Signale keine Kopplungskonstanten extrahiert werden.

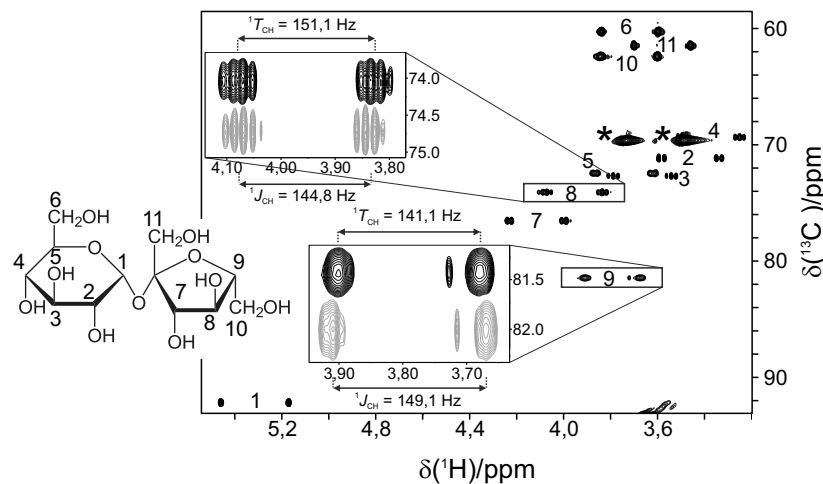
**Tabelle 4.2:**  $^1T_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten für 2-(4-chlorophenyl)-5-(dimethylphosphoryl)-4-phenyl-pyrrolidin-3-carboxylat in PBLG, die anhand des CLIP-ASAP-HSQC-Experiments unter Verwendung der MOCCA-XY16-Mischsequenz bestimmt wurden. Die Werte der  $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplung sind Referenz [109] entnommen. Die dipolaren Restkopplungen wurden gemäß der Gleichung 3.3 errechnet, die zugehörigen Fehler nach Gleichung 3.4. Die Werte, die aus dem konventionell aufgenommenen Spektrum extrahiert wurden, dienen zum Vergleich.

Signalzu- ordnung	$^1J_{\text{CH}}$ (CLIP) [Hz]	$^1T_{\text{CH}}$ (CLIP) [Hz]	$^1D_{\text{CH}}$ (CLIP) [Hz]	$^1T_{\text{CH}}$ (CLIP-ASAP) [Hz]	$^1D_{\text{CH}}$ (CLIP-ASAP) [Hz]
C2-H(P)	$141,7 \pm 0,5$	$342,4 \pm 12,3$	$200,7 \pm 12,3$	$342,8 \pm 6,3$	$201,1 \pm 6,3$
C3-H(P)	$136,5 \pm 0,5$	$192,5 \pm 5,1$	$56,0 \pm 5,1$	$196,3 \pm 6,5$	$59,8 \pm 6,5$
C4-H(P)	$133,1 \pm 0,7$	$331,7 \pm 8,7$	$198,6 \pm 8,7$	$326,7 \pm 12,3$	$193,6 \pm 12,3$
C5-H(P)	$135,4 \pm 0,5$	$268,7 \pm 6,1$	$133,3 \pm 6,1$	$268,5 \pm 9,3$	$133,1 \pm 9,3$
CH <sub>3</sub> Pa	$128,3 \pm 0,5$	$117,5 \pm 5,3$	$-10,8 \pm 5,3$	$118,3 \pm 5,3$	$-10,0 \pm 5,3$
CH <sub>3</sub> Pb	$128,5 \pm 0,5$	$100,4 \pm 1,2$	$-28,1 \pm 1,3$	$100,7 \pm 0,5$	$-27,8 \pm 0,7$
CH <sub>3</sub>	$126,9 \pm 0,5$	$151,3 \pm 0,1$	$24,4 \pm 0,5$	$151,7 \pm 0,4$	$24,8 \pm 0,6$

Abgesehen von der flüssigkristallinen Probe wurde das Experiment auch zur Untersuchung einer teilweise orientierten Gel-Probe von Saccharose verwendet. Die Orientierung der gelösten Substanz Saccharose wird durch Streckung des vernetzten Polymergels in einer speziellen Streckapparatur [111–114] hervorgerufen. Die Probenvorbereitung wurde bereits in Abschnitt 3.2 beschrieben. Die Probenkonzentration betrug 100 mM. Der durch die Streckung hervorgerufene Extensionsfaktor betrug  $\Xi = 0,5$ , die quadrupolare Aufspaltung des Deuteriumsignals des Lösungsmittels D<sub>2</sub>O betrug  $\Delta\nu_{\text{Q}} = 3,4$  Hz bei einer Magnetfeldstärke von 600 MHz und einer Temperatur von 300 K. Dies entspricht einer sehr schwachen Orientierung der Probe. In Abbildung 4.16 ist das Saccharose-Spektrum gezeigt, das unter Verwendung der CLIP-ALSOFAST-HSQC-Pulssequenz in 25 Sekunden aufgenommen wurde. Die Signalintensitäten für die Probe waren in diesem Fall höher als für das CLIP-ASAP-HSQC-Experiment mit der MOCCA-XY16-Mischsequenz.

Die aus dem Spektrum extrahierten Kopplungskonstanten sind in Tabelle 4.3 aufgeführt. Die Abbildung enthält zusätzlich zwei vergrößerte Spektrenausschnitte, die den Vergleich mit dem isotropen Fall aus Abbildung 3.3 zeigen. Die jeweils bestimmten Kopplungskonstanten  $^1T_{\text{CH}}$  und  $^1J_{\text{CH}}$  können anhand der Darstellung direkt miteinander verglichen





**Abbildung 4.16:**  $\omega_2$ -gekoppeltes HSQC-Spektrum der teilweise orientierten 100 mM Saccharose-Probe in PEODA/D<sub>2</sub>O, das in nur 25 Sekunden mit der CLIP-ALSOFAST-HSQC-Pulssequenz aufgenommen wurde. Die Ausschnitte der Signale 8 und 9 zeigen einen Vergleich der isotropen (grau) und der teilweise orientierten Probe (schwarz), die Kopplungskonstanten sind ebenfalls angegeben. Die mit einem Stern gekennzeichneten Signale stammen vom PEODA-Gel. Das vollständige isotrope Spektrum inklusive der Zuordnung der Signale ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Beide Spektren wurden mit 512 (<sup>1</sup>H) × 128 (<sup>13</sup>C) Punkten und Akquisitionszeiten von 142,3 ms (<sup>1</sup>H) und 8,5 ms (<sup>13</sup>C), jeweils einem *scan* für jedes *t*<sub>1</sub>-Inkrement und 4 *dummy scans* aufgenommen. Prozessiert wurde unter Verwendung von *zero filling* und *linear prediction*, so dass die digitale Auflösung letztlich 0,9 Hz (<sup>1</sup>H) und 14,7 Hz (<sup>13</sup>C) betrug. Die Abbildung ist der in [67] veröffentlichten nachempfunden, mit Genehmigung durch den Verleger John Wiley and Sons.

werden. In Tabelle 4.3 sind zusätzlich alle aus dem isotropen Spektrum extrahierten Werte ebenfalls angegeben. Dieses zweite Beispiel zeigt nochmals die einfache und breite Anwendbarkeit der CLIP-ASAP-HSQC- beziehungsweise CLIP-ALSOFAST-HSQC-Pulssequenzen zur schnellen und exakten Bestimmung von Kopplungskonstanten.

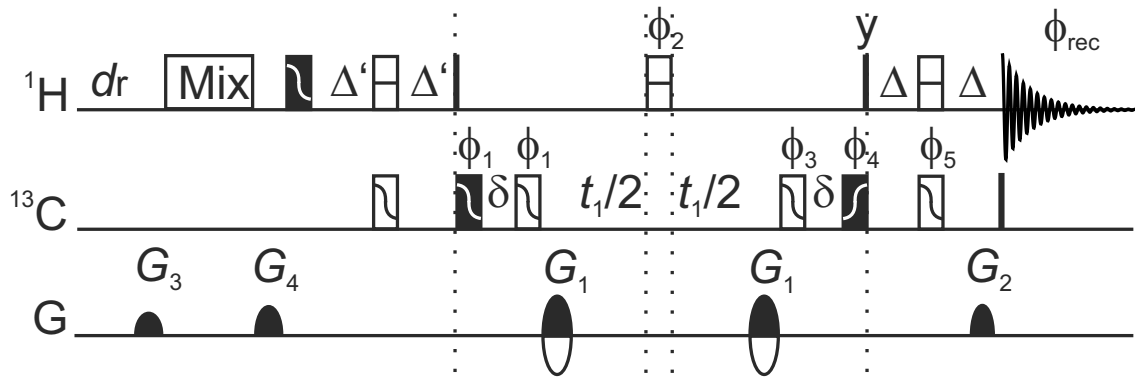
**Tabelle 4.3:**  $^1T_{\text{CH}}$ - und  $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten für Saccharose, extrahiert aus den Spektren der Abbildungen 4.16 und 3.3. Letztere enthält auch die Zuordnung der Signale. Die dipolaren Restkopplungen wurden gemäß der Gleichung 3.3 errechnet, die zugehörigen Fehler nach Gleichung 3.4. Für die mit einem Stern gekennzeichneten Signale treten Artefakte zweiter Ordnung auf.

Signalzuordnung	$^1J_{\text{CH}}$ (CLIP-ALSOFAST) [Hz]	$^1T_{\text{CH}}$ (CLIP-ALSOFAST) [Hz]	$^1D_{\text{CH}}$ (CLIP-ALSOFAST) [Hz]
C1-H1	$169,7 \pm 0,4$	$173,4 \pm 0,2$	$3,7 \pm 0,4$
C2-H2	$144,5 \pm 0,5$	$147,1 \pm 0,5$	$2,6 \pm 0,7$
C3-H3	$145,4 \pm 0,2$	$148,8 \pm 0,5$	$3,4 \pm 0,5$
C4-H4	$144,4 \pm 1,0$	$146,0 \pm 0,2$	$1,6 \pm 1,0$
C5-H5	$144,4 \pm 0,1$	$147,1 \pm 0,4$	$2,7 \pm 0,4$
C6-H6	$143,8 \pm 0,1$	$144,6 \pm 0,8$	$0,8 \pm 0,8$
C7-H7*	$144,5 \pm 1,0$	$139,7 \pm 0,3$	$-4,8 \pm 1,0$
C8-H8*	$144,8 \pm 1,7$	$151,1 \pm 0,1$	$6,3 \pm 1,7$
C9-H9*	$149,1 \pm 2,9$	$141,1 \pm 0,6$	$-8,0 \pm 2,9$
C10-H10*	$143,7 \pm 0,7$	$144,8 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,7$
C11-H11	$144,7 \pm 0,4$	$144,2 \pm 0,1$	$-0,4 \pm 0,4$

#### 4.2.4. Pulssequenz des symmetrisierten CLIP-ASAP-HSQC

In Abbildung 4.17 ist die symmetrisierte Sequenz des CLIP-ASAP-HSQC unter der Verwendung von geformten Pulsen dargestellt. Genau wie das originale CLIP-ASAP-HSQC basiert die Sequenz wieder auf der ASAP-HSQC-Pulssequenz, in diesem Fall auf der überarbeiteten, symmetrisierten Version. Die fehlende Entkopplung während der Akquisition kann zu Phasenverzerrungen der Signale im Spektrum führen, verursacht durch zurückbleibende Antiphase-Magnetisierung. Der letzte Kohlenstoff  $90^\circ$ -Puls beseitigt diese Phasenverzerrungen durch Umwandlung der Antiphase-Magnetisierung in Multiquanten-Terme. Dadurch

werden die Voraussetzungen für die exakte Bestimmung der Kopplungskonstanten geschaffen.

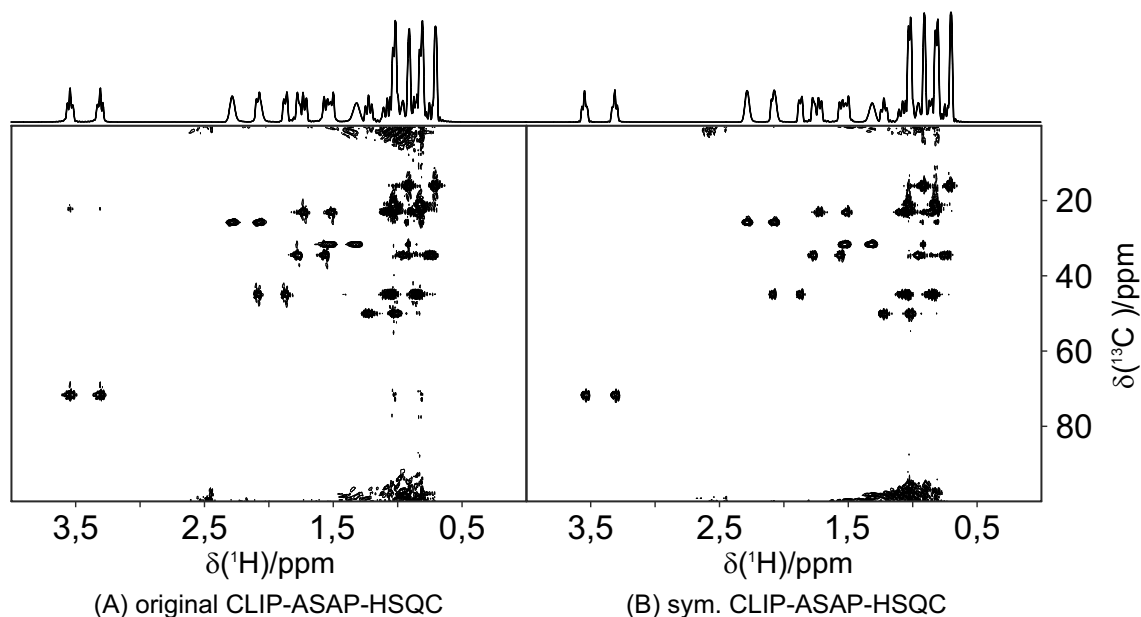


**Abbildung 4.17:** Symmetrisierte Pulssequenz des CLIP-ASAP-HSQC-Experiments mit geformten Pulsen, veröffentlicht in Referenz [92]. Detailinformationen zu den verwendeten Breitband-Pulsen sind in 3.3 aufgelistet. Die jeweiligen Phasenzyklen sind durch  $\Phi_1 = 4(x), 4(-x)$ ;  $\Phi_2 = 2(x), 2(-x)$ ;  $\Phi_3 = 4(-x), 4(x)$ ;  $\Phi_4 = x, -x$ ;  $\Phi_5 = 2(x), 2(-x)$ ;  $\Phi_{\text{rec}} = x, -x, x, -, x, -x, x, -x, x$  gegeben. Echo-/Antiecho-Kohärenzordnungsselektion wurde durch die Gradientenverhältnissen  $G_1 = (40\%, -40\%)$ ,  $G_2 = (20,1\%, 20,1\%)$  erreicht. Die beiden Gradienten, die die Mischsequenz umgeben, besitzen die Stärke  $G_3 = 33\%$  und  $G_4 = 43\%$ . Die Phasen  $\Phi_4$  und  $\Phi_5$  wurden gemeinsam mit der Empfängerphase  $\Phi_{\text{rec}}$  nach der TPPI-Methode invertiert. Die Abbildung ist der in [92] veröffentlichten nachempfunden, mit Genehmigung durch den Verleger Elsevier.

Die Vorteile der symmetrisierten Sequenz werden in Abbildung 4.18 deutlich. Es sind die Spektren von Menthol dargestellt, die durch Anwendung der originalen (A), beziehungsweise der symmetrisierten Sequenz (B) erhalten wurden. Die angepasste, symmetrisierte Sequenz liefert Spektren mit höherer Qualität. Bei gleicher Konturebene-Stufe weist das mit der symmetrisierten CLIP-ASAP-HSQC-Sequenz aufgenommene Spektrum weniger Artefakte auf. Der Vergleich bestätigt damit das Ergebnis, das bereits für das ASAP-HSQC erhalten wurde [92].

#### 4.2.5. Untersuchung mit reduzierter Messzeit

Eine weitere Reduktion der Messzeit kann durch zusätzliche Verwendung der NUS-Technik erreicht werden. Die Anzahl der tatsächlich aufgenommenen Inkremente wird auf einen gewissen Prozentsatz reduziert, die Gesamtzeit des Experiments ist dadurch verkürzt. In Abbildung 4.19 ist das  $\omega_2$ -gekoppelte HSQC-Spektrum der teilweise orientierten Saccharose-Probe gezeigt. Es wurde in nur 7 Sekunden unter Verwendung der symmetrisierten CLIP-ASAP-HSQC-Pulssequenz in Kombination mit NUS aufgenommen. Der vollständige FID



**Abbildung 4.18:**  $\omega_2$ -gekoppelte HSQC-Spektren einer 500 mM/ $\text{CDCl}_3$  Menthol-Probe, aufgenommen mit dem originalen CLIP-ASAP-HSQC-Experiment (A) (Abbildung 4.13) und dem symmetrisierten CLIP-ASAP-HSQC-Experiment (B) (Abbildung 4.17). Der Vergleich zeigt die höhere spektrale Qualität des mit dem symmetrisierten Experiments aufgenommenen Spektrums. Die Spektren wurden mit  $512 (^1\text{H}) \times 128 (^{13}\text{C})$  Punkten und Akquisitionszeiten von 106,8 ms ( $^1\text{H}$ ) und 4,2 ms ( $^{13}\text{C}$ ), jeweils einem *scan* für jedes  $t_1$ -Inkrement und 4 *dummy scans* aufgenommen. Die Gesamtexperimentzeit betrug jeweils 21 s. Prozessiert wurde unter Verwendung von *zero filling* und *linear prediction*, daraus resultierte eine digitale Auflösung von letztlich 2,3 Hz ( $^1\text{H}$ ) und 58,8 Hz ( $^{13}\text{C}$ ). Die Abbildung ist der in [92] veröffentlichten nachempfunden, mit Genehmigung durch den Verleger Elsevier.

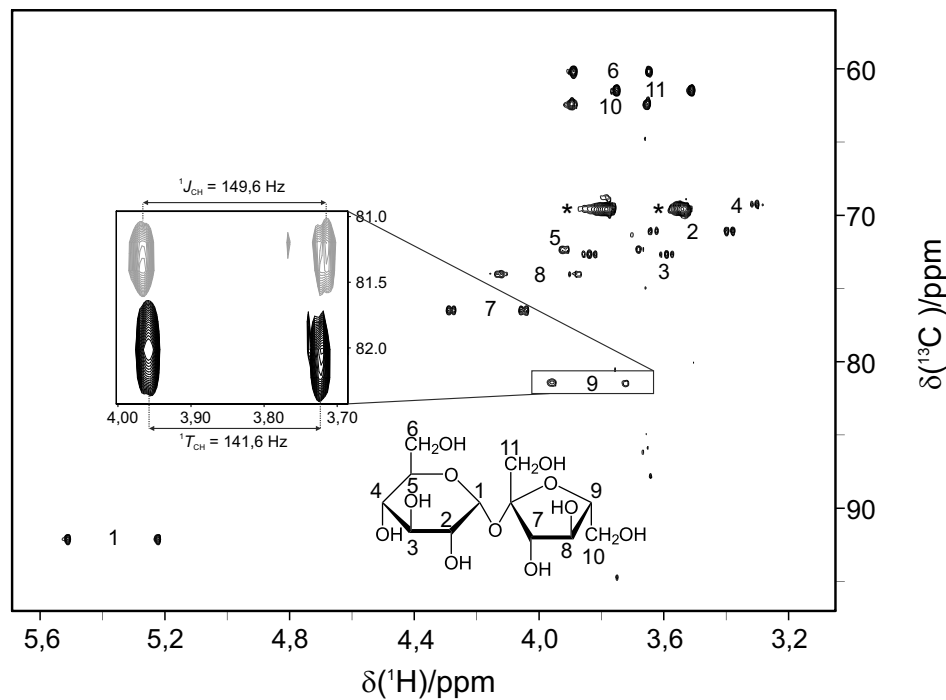
wurde mit dem CS-Algorithmus [107] der TopSpin Software rekonstruiert. Für den konstruktiven Transfer der Reservoiremagnetisierung in Gegenwart dipolarer Restkopplungen wurde die MOCCA-XY16-Mischsequenz verwendet. Der Ausschnitt zeigt den Vergleich der Spektren der isotropen Probe in grau und der teilweise orientierten PEODA-Gel-Probe in schwarz. Die Kopplungskonstanten  $^1T_{\text{CH}}$ - und  $^1J_{\text{CH}}$  sind ebenfalls angegeben. Das isotrope Spektrum wurde unter Verwendung der 100 mM Saccharose-Probe in der gleichen Gesamtexperimentzeit gemessen. Es ist in Abbildung A.4 im Anhang dargestellt. Die  $^1D_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten wurden durch Vergleich der Aufspaltung der Dubletts aus den beiden Spektren gemäß der Gleichung 3.3 errechnet. Die Werte sind in Tabelle 4.4 aufgeführt.

Die Werte stimmen weitestgehend mit den in Kapitel 4.2.1 aufgeführten Kopplungskonstanten überein. Die Fehlergrenzen der Werte besitzen die gleiche Größenordnung. Die Genauigkeit des originalen und des symmetrisierten CLIP-ASAP-HSQC unter Verwendung

von NUS ist vergleichbar. Lediglich die Bestimmung der Werte für C8-H8 und C10-H10 weicht ab. Bei den Signalen des anisotropen Spektrums treten Artefakte auf, da eine Multiplett Komponente zu  $^{12}\text{C}$ -gebundenen Protonen stark gekoppelt ist. Dadurch ist deren Form asymmetrisch. Eine zuverlässige Extraktion der Kopplungskonstanten war daher nicht möglich.

**Tabelle 4.4:**  $^1T_{\text{CH}}$ - und  $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten für Saccharose, extrahiert aus den Spektren der Abbildungen 4.16 und A.4. Es wurde das symmetrisierte CLIP-ASAP-acshsQC mit der MOCCA-XY16-Mischsequenz verwendet. Die dipolaren Restkopplungen wurden gemäß der Gleichung 3.3 errechnet, die zugehörigen Fehler nach Gleichung 3.4. Für die mit einem Stern gekennzeichneten Signale treten Artefakte zweiter Ordnung auf. Aufgrund der Überlappung der Signale des PEODA-Gels mit Signal 4 von Saccharose konnte in diesem Fall keine Kopplungskonstante bestimmt werden.

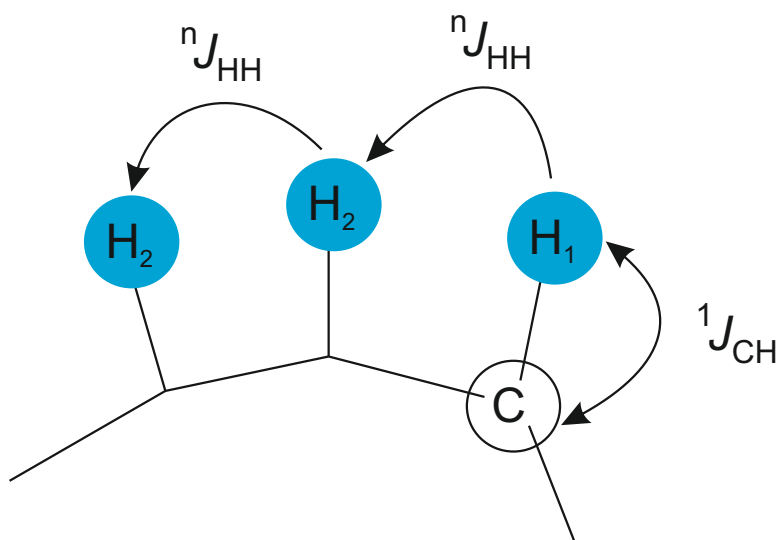
Signalzuordnung	$^1J_{\text{CH}}$ (sym. CLIP-ASAP) [Hz]	$^1T_{\text{CH}}$ (sym. CLIP-ASAP) [Hz]	$^1D_{\text{CH}}$ (sym. CLIP-ASAP) [Hz]
C1-H1	$169,8 \pm 0,2$	$173,4 \pm 0,2$	$3,6 \pm 0,3$
C2-H2	$144,4 \pm 0,4$	$147,0 \pm 0,4$	$2,6 \pm 0,6$
C3-H3	$145,0 \pm 0,2$	$148,4 \pm 1,0$	$3,4 \pm 1,0$
C4-H4	$144,4 \pm 0,6$		
C5-H5	$144,1 \pm 0,4$	$146,7 \pm 0,9$	$2,6 \pm 1,0$
C6-H6	$143,8 \pm 0,2$	$144,8 \pm 0,6$	$1,0 \pm 0,6$
C7-H7*	$144,5 \pm 0,8$	$139,2 \pm 0,6$	$-5,3 \pm 1,0$
C8-H8*	$144,5 \pm 0,3$	$147,3 \pm 5,3$	$2,9 \pm 5,3$
C9-H9*	$149,6 \pm 0,6$	$141,6 \pm 0,6$	$-8,0 \pm 0,9$
C10-H10	$143,1 \pm 0,9$	$145,7 \pm 0,5$	$2,6 \pm 1,0$
C11-H11	$144,7 \pm 0,1$	$144,2 \pm 0,1$	$-0,5 \pm 0,1$



**Abbildung 4.19:**  $\omega_2$ -gekoppeltes HSQC-Spektrum der teilweise orientierten 100 mM Saccharose-Probe in PEODA/D<sub>2</sub>O. Es wurde durch Kombination mit NUS in nur 7 Sekunden mit der symmetrisierten CLIP-ASAP-HSQC-Pulssequenz mit der MOCCA-XY16-Mischsequenz aufgenommen. Der Ausschnitt zeigt den Vergleich der isotropen (grau) und der teilweise orientierten Probe (schwarz) für Signal 9, die Kopplungskonstanten sind ebenfalls angegeben. Die mit einem Stern gekennzeichneten Signale stammen vom PEODA-Gel. Das vollständige isotrope Spektrum ist in Abbildung A.4 dargestellt, die zugehörigen Akquisitionsparameter sind in der Bildunterschrift aufgeführt. Beide Spektren wurden mit 512 (<sup>1</sup>H) × 128 (<sup>13</sup>C) Punkten und Akquisitionszeiten von 142,3 ms (<sup>1</sup>H) und 8,5 ms (<sup>13</sup>C), jeweils einem *scan* für jedes  $t_1$ -Inkrement und 4 *dummy scans* aufgenommen. Durch die Verwendung von NUS wurde die Anzahl der tatsächlich aufgenommenen Inkremente auf 32 reduziert. Es ergab sich dadurch eine Gesamtexperimentzeit von 7 s. Das Spektrum wurde mit dem CS-Algorithmus [107] der TopSpin Software rekonstruiert. Prozessiert wurde unter Verwendung von *zero filling* und *linear prediction*, so dass die digitale Auflösung letztlich 1,8 Hz (<sup>1</sup>H) und 29,5 Hz (<sup>13</sup>C) beträgt. Die Abbildung ist der in [92] veröffentlichten nachempfunden, mit Genehmigung durch den Verleger Elsevier.

### 4.3. ASAP-HSQC-TOCSY

Das HSQC-TOCSY ist ein kombiniertes Experiment. Es startet mit der HSQC-Pulssequenz an die sich eine TOCSY-Mischsequenz anschließt. Daraus resultiert ein zweidimensionales TOCSY-Experiment, das um die  $^{13}\text{C}$ -Dimension erweitert wurde. Die zusätzliche Dimension ist besonders dann hilfreich, wenn Signale im homonuklearen Spektrum stark überlappen. Das kombinierte Experiment verbindet die exzellente Signaldispersion in der  $^{13}\text{C}$ -Dimension mit den  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -Korrelationen in der direkten Dimension. Es werden sowohl Korrelationen zwischen dem Startkern und sämtlichen mit diesem über  $J_{\text{HH}}$ -Kopplungen verbundenen Protonen (horizontale Linie) sichtbar, als auch das an das jeweilige Proton direkt gebundene Kohlenstoffatom (vertikale Linie). Ausgehend von den Protonen wird die Magnetisierung im INEPT auf  $^{13}\text{C}$  übertragen. Während der  $t_1$ -Zeit entwickelt sich dann die chemische Verschiebung des Heterokerns, wohingegen die chemische Verschiebung der Protonen durch einen mittig platzierten  $180^\circ$ -Puls refokussiert wird. Dieser  $180^\circ$ -Puls dient zugleich zur Refokussierung der heteronuklearen Kopplung. Im Rücktransfer wird die Magnetisierung dann wieder auf die Protonen transferiert. Durch die TOCSY-Mischsequenz wird die Magnetisierung danach im Spinsystem durch die  $J_{\text{HH}}$ -Kopplungen verteilt. Das Prinzip ist in Abbildung 4.20 verdeutlicht.



**Abbildung 4.20:** Schematische Darstellung eines Moleküls mit Protonen-Netzwerk zur Verdeutlichung des Prinzips des HSQC-TOCSY.

Im Ergebnis wird ein phasenempfindliches zweidimensionales Spektrum erhalten, das  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -Korrelationssignale, sowie Signale der  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -Kopplungspartner des Protonen-Netzwerks zeigt. Das Experiment ist auch bei der Untersuchung von Substanzgemischen hilfreich, da Protonen leicht unterschiedlichen Protonen-Netzwerken zugeordnet werden können. Durch

Kombination des Experiments mit der beschleunigten Aufnahme der ASAP-Technik können diese wertvollen Informationen jetzt auch in kürzester Zeit erhalten werden. Die erarbeitete Pulssequenz wird im folgenden Unterkapitel 4.3.1 vorgestellt.

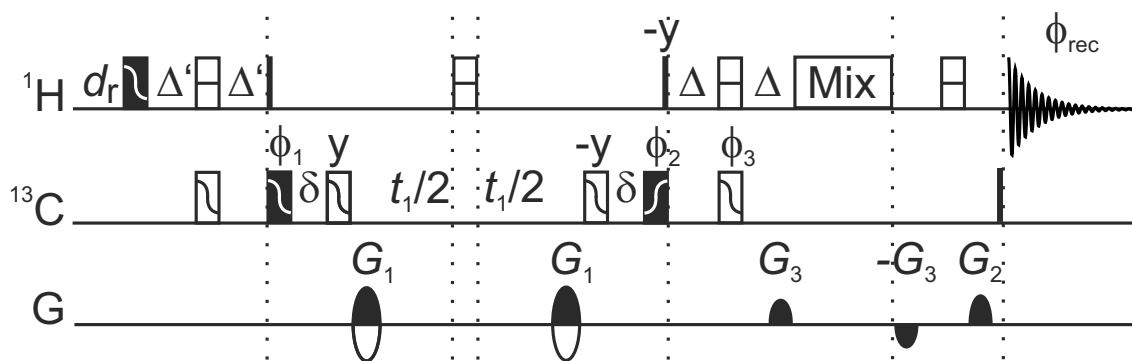
In Kapitel 4.3.5 wird die Anwendung des Experiments zur Messung weitreichender heteronuklearer Kopplungen ( ${}^nJ_{\text{CH}}$ ) beschrieben. Die Bestimmung der  ${}^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungen besitzt große Bedeutung in der Strukturaufklärung von Molekülen, welche vornehmlich Protonen und Kohlenstoffatome enthalten [155, 168–170]. Dazu zählen nahezu alle organischen Moleküle, Naturstoffe und Biomoleküle. Es ist beispielsweise möglich, die relative Stereochemie mithilfe von  ${}^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungen zu bestimmen [8, 171–177]. Aufgrund der Winkelabhängigkeit der  ${}^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungen werden die Werte ebenfalls verwendet, um dreidimensionale Strukturen mit Hilfe Computer-gestützter Analysen abzuleiten [178]. Die Vorhersage der dreidimensionalen Anordnung ist durch die zusätzlichen experimentell bestimmten Parameter umso exakter [179–184]. Die Kenntnis der dreidimensionalen Anordnung ist ein erster Schritt, um Informationen über die chemische Reaktivität oder die biologische Aktivität eines Stoffes zu erhalten. Aufgrund der Wichtigkeit und der Bedeutung der  ${}^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungen sind viele Experimente bekannt, die deren Bestimmung ermöglichen [82, 185, 186]. Darunter Ansätze, die auf der Optimierung der HSQC-Sequenz zur Messung der weitreichenden Kopplungen beruhen. Das dazugehörige Experiment ist unter dem Akronym HSQMBC bekannt [187, 188]. Die Verwendung des HSQMBC ist Gegenstand des nächsten Ergebnis-Kapitels 4.4. In diesem Kapitel wird das ASAP-HSQC-TOCSY-IPAP-Experiment (Inphase/ Antiphase) zur Bestimmung der  ${}^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungen vorgestellt. Prinzipiell verbindet das Experiment das HSQC-TOCSY-Experiment mit der beschleunigten Aufnahme der ASAP-Technik. Genau wie für das HSQC-TOCSY-Experiment wird die chemische Verschiebungsinformation der  ${}^{13}\text{C}$ -Kerne durch Verwendung eines zweidimensionalen HSQC-Elements erhalten. Vor der Akquisition schließt sich die TOCSY-Mischsequenz an. Im Gegensatz zum herkömmlichen Experiment wird keine Entkopplung verwendet. Die Magnetisierung wird durch die Mischsequenz im Spinsystem verteilt und  ${}^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungen können dann in der direkten Dimension gemessen werden. Die Inphase (IP)/ Antiphase (AP)-Methode beruht auf der Aufnahme zweier komplementärer Datensätze, dem Inphase- und dem Antiphase-Spektrum [83, 163, 189]. Die IP- und AP-Spektren werden anschließend durch Addition und Subtraktion kombiniert. Auf diese Weise werden die beiden Komponenten des Multipletts in zwei separate Teilspektren verschoben. Das  $\alpha$ - und das  $\beta$ -Teilspektrum enthält dann nur noch die Hälfte der Signale. Dies entspricht exakt der Anzahl in einem entkoppelten Spektrum. Die Methode zählt zu den Experimenten, die den Zustand des Spins erhalten.



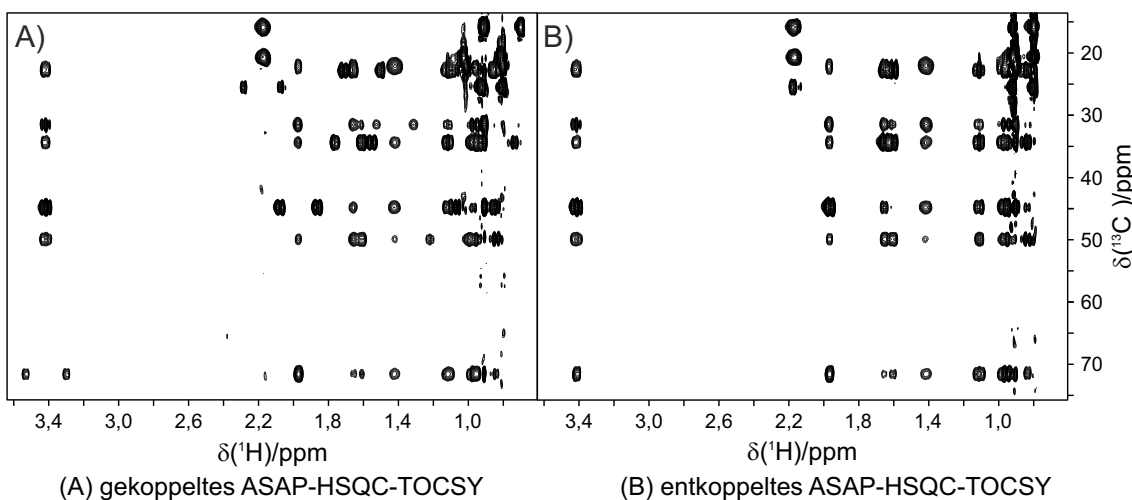
Die abgeleiteten  $\alpha/\beta$ -Teilspektren werden gemeinsam dargestellt. Aus dieser Darstellung kann der Wert und das Vorzeichen der  ${}^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplung bestimmt werden. Das Experiment ermöglicht also die relative, vorzeichenempfindliche Messung der Kopplungskonstanten. Eine detaillierte Beschreibung der Kopplungsbestimmung wurde bereits in Kapitel 3.3 gegeben. Das Experiment bietet gegenüber anderen bekannten Methoden viele Vorteile. So werden in kurzer Zeit vollständige  ${}^1\text{H}, {}^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren mit guter Signalintensität erhalten. Durch die schnelle Akquisition ist es zusätzlich möglich, Spektren mit hoher Auflösung in der indirekten Dimension aufzunehmen. Dadurch können die  ${}^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungen vorzeichenempfindlich mit hoher Genauigkeit extrahiert werden. Das entwickelte ASAP-HSQC-TOCSY-IPAP-Experiment ist unkompliziert in seiner Anwendung, der Einstellung der Akquisitions-Parameter, der Prozessierung und der Bestimmung der Kopplungskonstanten. Die Anwendung des Experiments wird im Unterkapitel 4.3.4 anhand der Extraktion der  ${}^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungen der Glucose-Probe demonstriert.

#### 4.3.1. Pulssequenz des schnellen ASAP-HSQC-TOCSY

Das ASAP-HSQC-TOCSY ähnelt der Pulssequenz des symmetrischen ASAP-HSQC. Der Unterschied besteht maßgeblich darin, dass die Mischsequenz nicht nach, sondern vor der Akquisition des FID angewandt wird. Sie erfüllt im Falle des ASAP-HSQC-TOCSY zwei Funktionen. Zum Einen wird die Magnetisierung in der TOCSY-Mischzeit auf die skalar gekoppelten Protonen übertragen. Dadurch werden die koppelnden Protonen als horizontale Linie im Spektrum sichtbar. Zum Anderen wird gleichzeitig die Reservoir-Magnetisierung von den passiven auf die aktiven Spins übertragen. Die Reservoir-Magnetisierung wird vor Anwendung der Mischsequenz entlang der  $-z$ -Achse orientiert. Die Sequenz ist so aufgebaut, dass zwischen der Mischsequenz und der Akquisition ein zusätzlicher  $180^\circ$ -Puls angewandt wird. Während der Akquisition befindet sich die Reservoir-Magnetisierung dann also entlang der  $+z$ -Achse. Wäre dies umgekehrt, würde der Anteil der Reservoir-Magnetisierung durch Relaxationseffekte geschmälert. Die Gradienten, die die Mischsequenz umschließen, besitzen die gleiche Stärke, das Vorzeichen wird jedoch invertiert. Auf diese Weise werden alle Magnetisierungsanteile, für die die Kohärenzordnung während des Mischens nicht erhalten wurde, dephasiert beziehungsweise ausgelöscht. Der  $90^\circ$ -Kohlenstoffpuls direkt vor der Akquisition erfüllt den gleichen Zweck wie im CLIP-ASAP-HSQC. Der Puls wird eingesetzt, um verbleibende Kohlenstoff-Antiphase-Anteile in nicht detektierbare Multiquanten-Magnetisierung umzuwandeln.



**Abbildung 4.21:** Pulssequenz des ASAP-HSQC-TOCSY mit geformten Pulsen. Nähere Angaben zu den verwendeten geformten Pulsen sind in Tabelle 3.3 zu finden. Die jeweiligen Phasenzyklen sind durch  $\Phi_1 = 2(x), 2(-x)$ ;  $\Phi_2 = x, -x$ ;  $\Phi_3 = x$ ;  $\Phi_{\text{rec}} = x, -x, -x, x$  gegeben. Echo-/Antiecho- beziehungsweise Kohärenzordnungsselektion wird durch die Gradientenverhältnisse  $G_1 = (40\%, -40\%)$ ,  $G_2 = (20,1\%, 20,1\%)$  erreicht. Der Gradient, der die Mischsequenz umgibt, besitzt die Stärke  $G_3 = 33\%$ , er wird bei seiner zweiten Verwendung nach der Mischsequenz invertiert. Die Phasen  $\Phi_2$  und  $\Phi_3$  werden gemeinsam mit der Empfängerphase  $\Phi_{\text{rec}}$  nach der TPPI-Methode invertiert.



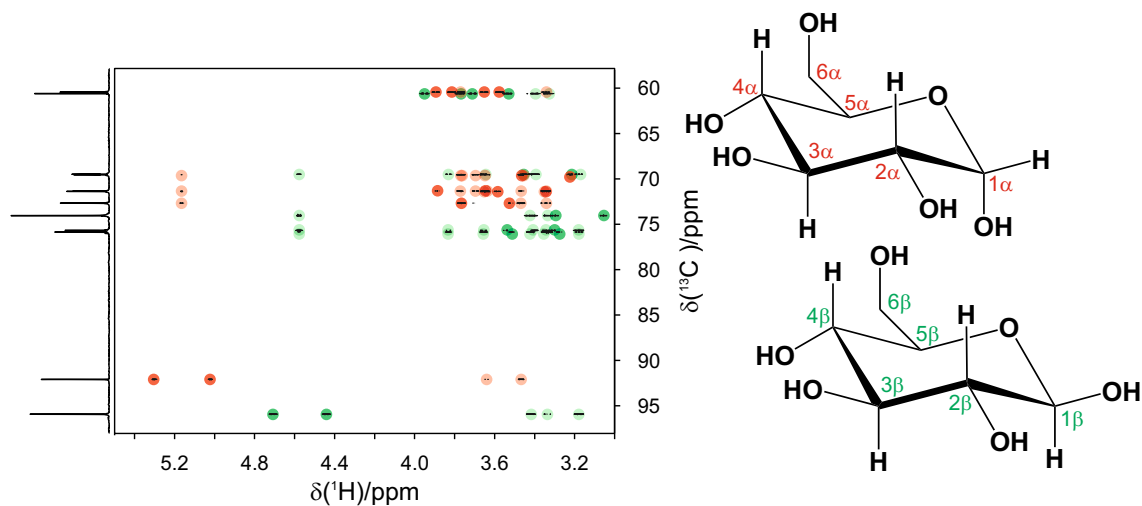
**Abbildung 4.22:**  $\omega_2$ -gekoppeltes HSQC-TOCSY-Spektrum (A) und entkoppeltes HSQC-TOCSY-Spektrum (B) von einer 500 mM/ $\text{CDCl}_3$  Menthol-Probe, aufgenommen mit der ASAP-HSQC-TOCSY-Pulssequenz (Abbildung 4.21). Die Spektren wurden mit  $612 (^1\text{H}) \times 128 (^{13}\text{C})$  Punkten und Akquisitionszeiten von 152,4 ms ( $^1\text{H}$ ) und 4,2 ms ( $^{13}\text{C}$ ), jeweils einem *scan* für jedes  $t_1$ -Inkrement und 16 *dummy scans* aufgenommen. Es wurde die DIPSI-2-Mischsequenz mit einer Mischzeit von 34,54 s angewandt. Zur  $^{13}\text{C}$ -Entkopplung während der Akquisition wurde für die Aufnahme des Spektrums (B) GARP mit einer RF-Amplitude von 2,5 kHz verwendet. Die Gesamtexperimentzeit betrug jeweils 30 s. Prozessiert wurde unter Verwendung von *zero filling*, daraus resultierte eine digitale Auflösung von letztlich 1,9 Hz ( $^1\text{H}$ ) und 58,8 Hz ( $^{13}\text{C}$ ).

### 4.3.2. Schnell aufgenommenes HSQC-TOCSY-Spektrum

Mit dem Experiment ist es möglich in kürzester Zeit vollständige, aussagekräftige  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-TOCSY-Spektren aufzunehmen. Ein Beispiel wird in Abbildung 4.22 gegeben. Die Experimentzeit betrug 30 Sekunden, sie liegt damit im Bereich kurzer eindimensionaler Protonen-Experimente. Die beiden Spektren unterscheiden sich in der Anwendung einer Entkopplungssequenz während der Akquisition. Für die schlichte Unterscheidung verschiedener Spinsysteme beziehungsweise Moleküle innerhalb eines Substanzgemischs ist es sicherlich vorteilhafter, das entkoppelte Spektrum zu wählen. Für jede CH-Korrelation wird in diesem Fall nur ein Signal erhalten, während es im  $\omega_2$ -gekoppelten Spektrum durch die  $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplung zu einem Dublett aufgespalten ist. Die zusätzliche Aufspaltung kann zu Überlappung mit  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -Korrelationssignalen führen. Dies macht das Spektrum unnötig unübersichtlich. Sofern allerdings Kopplungskonstanten bestimmt werden sollen, wird das  $\omega_2$ -gekoppelte Spektrum benötigt. Die Verwendung der ASAP-HSQC-TOCSY-Pulssequenz zur Extraktion von weitreichenden  $^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungen ist Inhalt des nächsten Unterkapitels 4.3.4.

### 4.3.3. Hochaufgelöstes HSQC-TOCSY-Spektrum

Wenn die Zeitersparnis nicht im Vordergrund steht, kann das ASAP-HSQC-TOCSY-Experiment auch für die Aufnahme hochaufgelöster HSQC-TOCSY-Spektren verwendet werden. In Abbildung 4.23 ist ein hochaufgelöstes Spektrum von Glucose gezeigt. Es wurde mit der ASAP-HSQC-TOCSY-Pulssequenz aus Abbildung 4.21 in 50 min und 34 s mit 2048 ( $^1\text{H}$ ) und 4096 ( $^{13}\text{C}$ ) Punkten aufgenommen. Die hohe Auflösung ist notwendig, um die Signale der beiden Spinsysteme der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glucose voneinander unterscheiden zu können. Nur so kann das Substanzgemisch der Probe analysiert und die beiden Protonen-Netzwerke vollständig identifiziert werden. Die Zuordnung der Signale ist farblich gekennzeichnet. Die jeweiligen klassischen HSQC-Korrelationssignale, hervorgerufen durch die  $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplung, sind durch die Verwendung der Kreise in kräftigem rot oder grün markiert. Das gezeigte Spektrum wird in Kapitel 4.3.4 in Kombination mit dem ASAP-HSQC-TOCSY-AP-Spektrum zur Bestimmung von  $^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten verwendet. Daher wurde keine Entkopplungssequenz während der Akquisition des FID angewandt.

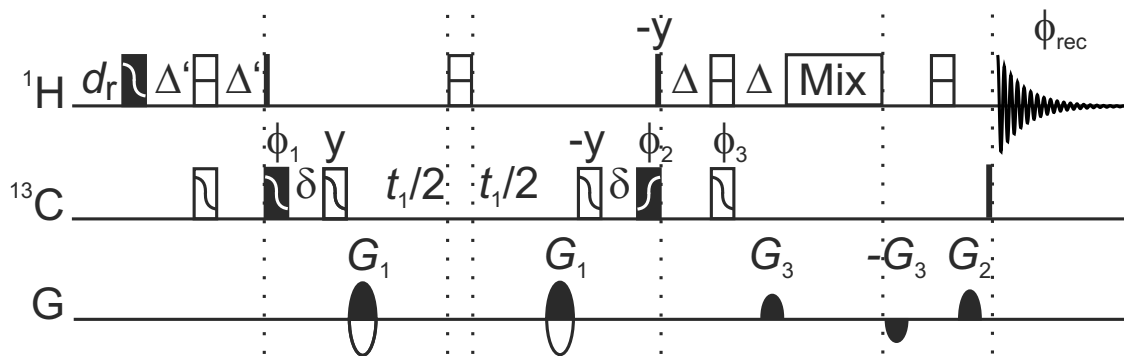


**Abbildung 4.23:** Hochaufgelöstes  $\omega_2$ -gekoppeltes HSQC-TOCSY-Spektrum einer 350 mM/D<sub>2</sub>O Glucose-Probe, aufgenommen mit der ASAP-HSQC-TOCSY-Pulssequenz. Die hohe Auflösung wird benötigt, um die Signale den beiden Spinsystemen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glucose zuzuordnen. Die Zuordnung ist farblich gekennzeichnet. Die direkten Korrelationen sind durch die Verwendung der Kreise in kräftigem rot oder grün markiert. Das Spektrum wurde mit 2048 (<sup>1</sup>H)  $\times$  4096 (<sup>13</sup>C) Punkten aufgenommen, dies entspricht Akquisitionszeiten von 569,3 ms (<sup>1</sup>H) und 226,3 ms (<sup>13</sup>C). Je ein *scan* für jedes  $t_1$ -Inkrement und 4 *dummy scans* wurden aufgenommen. Die Mischzeit der DIPSI-2-Periode betrug 34,53 ms. Es ergab sich eine Gesamtexperimentzeit von 50 min und 34 s. Prozessiert wurde unter Verwendung von *zero filling* und *linear prediction*, so dass die digitale Auflösung letztlich 0,44 Hz (<sup>1</sup>H) und 1,1 Hz (<sup>13</sup>C) betrug.

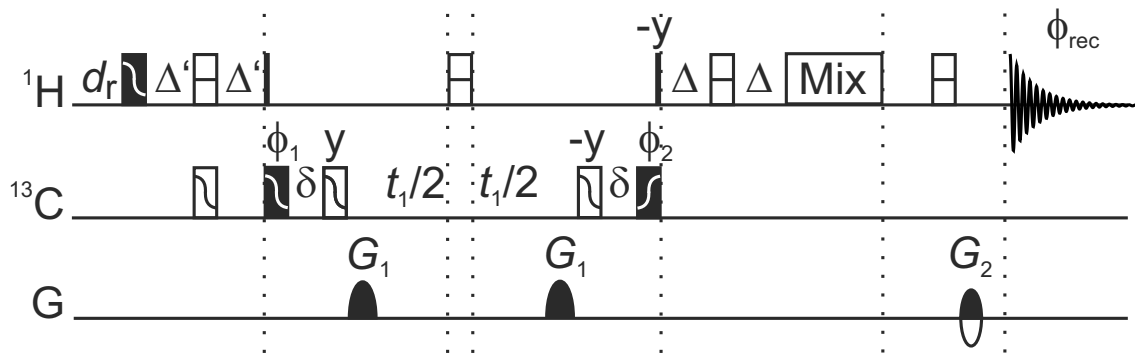
#### 4.3.4. Pulssequenzen der ASAP-HSQC-TOCSY-IPAP-Experimente

In Abbildung 4.24 sind die beiden Pulssequenzen des ASAP-HSQC-TOCSY-IPAP-Experiments dargestellt. Die IP-Sequenz entspricht dem schnellen ASAP-HSQC-TOCSY-Experiment. Sie ist in der Abbildung noch einmal dargestellt, um den Vergleich der IP- mit der AP-Sequenz zu erleichtern. Das IP- und das AP-Experiment unterscheiden sich nur wenig. Im AP-Datensatz wird im HSQC-Element auf den  $180^\circ$ - $^{13}\text{C}$ -Puls des Rücktransfers verzichtet. Der  $180^\circ$ -Protonen-Puls bleibt bestehen. Dadurch wird entkoppelt und die  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -Antiphase magnetisierung auf Protonen bleibt erhalten. Außerdem werden in der IP-Sequenz Gradienten angewandt, die um die Mischsequenz platziert sind. Diese Gradienten fehlen in der AP-Sequenz. Sie würden zu einer Dephasierung der Antiphase-Magnetisierung führen. Dasselbe gilt für den CLIP-Puls vor der Akquisition. Für die IP-Sequenz erfüllt er den im vorangegangenen Kapitel beschriebene Funktion. Im AP-Experiment würde er das gewünschte Signal zerstören und wird daher nicht angewandt. Beide Sequenzen weisen die gleiche Länge auf. Außerdem ist die zeitliche Abfolge der Pulse ebenfalls gleich, die Experimente enthalten die gleichen Puls-*delay*-Elemente. Beide Aspekte sind besonders wichtig, da die Kombination der beiden komplementären Datensätze nur dann fehlerfrei funktioniert, wenn die Intensität der Signale des IP- und des AP-Spektrums gleich ist. Die Experimente aus Abbildung 4.24 erfüllen prinzipiell diese Anforderung. Die Antiphase-Signale können allerdings intensiver sein, da kein Rücktransfer stattfindet, der über das Transfer-*delay* nicht für alle Spins optimal eingestellt werden kann. Unter Umständen müssen daher die unterschiedlichen Signale im AP-Spektrum im Hinblick auf die Intensität im IP-Spektrum einzeln skaliert werden. Die klassischen HSQC-Korrelationssignale, hervorgerufen durch die  $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplung, sollen dann die gleiche Intensität aufweisen. In dem im Anschluss folgenden Beispiel war keine Skalierung notwendig, da die  $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten von Glucose sehr ähnliche Werte aufweisen. Der Aspekt ist allerdings unbedingt in Betracht zu ziehen, wenn teilweise orientierte Proben untersucht werden, da die  $^1T_{\text{CH}}$ -Kopplungen über einen deutlich größeren Bereich gestreut sind. Aus diesem Grund ist es gleichermaßen vorteilhaft, die Anzahl der INEPT-Transferschritte zu minimieren, weshalb auf einen empfindlichkeitsoptimierten Rücktransfer verzichtet wurde.

Während der DIPSI-2-Mischsequenz entwickelt sich abhängig von der  $J_{\text{HH}}$ -Kopplung disperse Protonen-Protonen-Antiphase. Die Linienform der Signale in den Spektren ist daher verzerrt. Die Linienform ist jedoch für beide Datensätze gleichermaßen gestört, daher wird die Bestimmung der  $^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten nicht beeinflusst. Im Vergleichsexperiment, das in Abbildung 3.11 vorgestellt wurde, werden zur Unterdrückung der Protonen-Antiphase



(A) ASAP-HSQC-TOCSY-IP



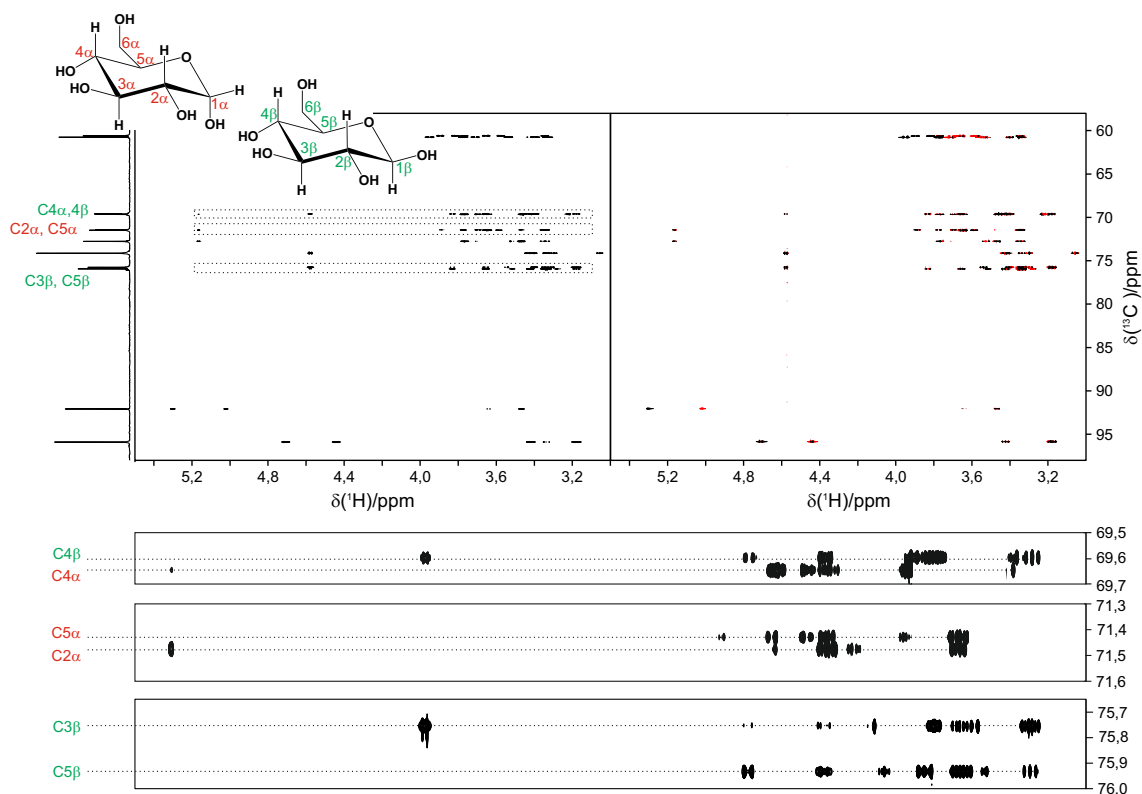
(B) ASAP-HSQC-TOCSY-AP

**Abbildung 4.24:** Pulssequenzen des ASAP-HSQC-TOCSY-IP (A) und des ASAP-HSQC-TOCSY-AP mit geformten Pulsen. Die Sequenz (A) entspricht der in Abbildung 4.21 gezeigten Pulssequenz, für alle Angaben wird daher auf die zugehörige Bildunterschrift verwiesen. Sie wird wiederholt abgebildet, um die gleiche Gesamtlänge der beiden Sequenzen zu verdeutlichen. Die jeweiligen Phasenzyklen für Sequenz (B) sind gegeben durch  $\Phi_1 = 2(x), 2(-x)$ ;  $\Phi_2 = x, -x$ ;  $\Phi_3 = x$ ;  $\Phi_{\text{rec}} = y, -y, -y, y$ . Echo-/Antiecho-Kohärenzordnungsselektion wurde durch die Gradientenverhältnissen  $G_1 = (40\%, 40\%)$ ,  $G_2 = (20,1\%, -20,1\%)$  erreicht. Es werden keine die Mischsequenz umgebenden Gradienten angewandt, da in diesem Fall Antiphase-Magnetisierung vorliegt. Die Phasen  $\Phi_2$  und  $\Phi_3$  wurden gemeinsam mit der Empfängerphase  $\Phi_{\text{rec}}$  nach der TPPI-Methode invertiert.

z-Filter angewandt, die um die Mischsequenz platziert sind. Sie löschen die ungewünschten Kohärenzen aus. Im ASAP-HSQC-TOCSY-IPAP war es nicht möglich, z-Filter in gleicher Weise einzusetzen, da dieser sämtliche Magnetisierung in der Ebene auslöscht. Die Situation ist für diese Experimente etwas komplexer, da zwischen zwei verschiedenen Magnetisierungskomponenten unterschieden wird. Die Magnetisierung der aktiven Spins wird detektiert, daraus folgt ein Spektrum. Die Magnetisierung der passiven Spins wird nicht detektiert, sie bilden das Reservoir. Für alle ASAP-Experimente wird die Reservoir-Magnetisierung durch Anwendung einer Mischsequenz verteilt. Zur Reservoir-Magnetisierung trägt die durch das Äquivalent der Ernst-Winkel-Anregung zurückbehaltene Magnetisierung und die Magnetisierung der  $^{12}\text{C}$ -gebundenen Protonen bei. Bei Betrachtung der Pulssequenz zeigt sich, dass sich immer eine Komponente der Magnetisierung, entweder die passiven oder die aktiven Spins, in der transversalen Ebene befindet. Durch Anwendung eines z-Filters nach dem Vorbild der HSQC-TOCSY-IPAP-Experimente aus [83] würde entweder die gewünschte Magnetisierung dephasiert, also jegliche Information verloren gehen, oder die Reservoir-Magnetisierung würde dephasiert.

#### 4.3.5. Bestimmung der $^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten von Glucose

In Abbildung 4.25 sind die beiden Spektren gezeigt, die mit den ASAP-HSQC-TOCSY-IPAP-Experimenten aufgenommen wurden. Links ist das IP-Spektrum abgebildet, rechts das AP-Spektrum. Die Spektren wurden zur Bestimmung der  $^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten verwendet. Um die Werte ableiten zu können, wird für jede  $^{13}\text{C}$ -Frequenz die gleiche Zeile extrahiert. Durch anschließende Linearkombination werden jeweils die beiden Komponenten des Multipletts erhalten. Das Verfahren der Extraktion der Kopplungskonstanten ist in Kapitel 3.3 beschrieben. Für die untersuchte Glucose-Probe ist eine hohe Auflösung notwendig, um auch die in der  $^{13}\text{C}$ -Dimension dicht beieinander liegenden Signale der Kohlenstoffatome  $\text{C}4\beta$  und  $\text{C}4\alpha$ ,  $\text{C}5\alpha$  und  $\text{C}2\alpha$ , sowie  $\text{C}3\beta$  und  $\text{C}5\beta$  unterscheiden zu können. Die Abbildung zeigt Ausschnitte dieser Signalregionen. Die Spektren wurden mit 2048 ( $^1\text{H}$ ) und 4096 ( $^{13}\text{C}$ ) Punkten in 50 min und 34 s aufgenommen. Die  $^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten sind in Tabelle 4.5 aufgelistet. Sie werden den Werten gegenübergestellt, die aus den Vergleichsspektren durch Verwendung des HSQC-TOCSY-IPAP-Experiments aus Abbildung 3.11 erhalten wurden. Die Vergleichsspektren sind im Anhang in Abbildung A.5 dargestellt. Das Aufnahmeschema weicht von der bisher verwendeten Methode ab. Es wird States-TPPI zur phasenempfindlichen Detektion verwendet. Zur Artefaktminimierung mussten jeweils zwei *scans* aufgenommen werden. Die Gesamtexperimentzeit zur Aufnahme der Vergleichsspektren betrug 4 h 15 min und 8 s. Da immer zwei *scans* aufgenommen werden müssen, können



**Abbildung 4.25:** Hochaufgelöste ASAP-HSQC-TOCSY-IPAP-Spektren der 350 mM/D<sub>2</sub>O Glucose-Probe, sowie Ausschnitte aus dem IP-Spektrum. Die Ausschnitte verdeutlichen, dass eine hohe Auflösung benötigt wird, um die dicht beieinander liegenden Signale zu unterscheiden. Die Spektren wurden mit einer sehr großen Anzahl  $t_1$ -Inkrementen aufgenommen, so ergab sich eine sehr hohe digitale Auflösung von 1,1 Hz in der <sup>13</sup>C-Dimension. 2048 (<sup>1</sup>H) × 4096 (<sup>13</sup>C) Punkte wurden aufgenommen, dies entspricht Akquisitionszeiten von 569,3 ms (<sup>1</sup>H) und 226,3 ms (<sup>13</sup>C). Je ein *scan* für jedes  $t_1$ -Inkrement und 4 *dummy scans* wurden aufgenommen. Die Mischzeit der DIPSI-2-Periode betrug 34,53 ms. Es ergab sich jeweils eine Gesamtexperimentzeit von 50 min und 34 s. Prozessiert wurde unter Verwendung von *zero filling* und *linear prediction*, so dass die digitale Auflösung letztlich 0,44 Hz (<sup>1</sup>H) und 1,1 Hz (<sup>13</sup>C) betrug.



in etwa einer Stunde nur 2048 Inkremente durchlaufen werden. Die Auflösung ist dann gerade nicht ausreichend, um die oben erwähnten dicht beieinander liegenden Signale zu unterscheiden. Auch wenn die Zeitersparnis durch Verwendung des ASAP-Experiments an dieser Stelle nicht sehr groß ist, ist die Auflösung dennoch der wesentlich wichtigere Aspekt. Die Vergleichsspektren dienen der Verifizierung des neu entwickelten ASAP-HSQC-TOCSY-IPAP-Experiments zur Extraktion der  ${}^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungen. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 4.5 aufgelistet. Die Kopplungskonstanten konnten mit vergleichbar hoher Genauigkeit bestimmt werden. Die angegebenen Fehler besitzen jeweils die gleiche Größenordnung, und die Abweichungen der Werte liegen im Rahmen der Fehlergrenzen. Für manche Korrelationen war es nur für eines der beiden Experimente möglich, die  ${}^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstante zu bestimmen. Der kleinste auftretende Fehler ist immer mit dem Wert 0,1 angegeben, da die digitale Auflösung der Spektren nach Prozessierung berücksichtigt wurde.

**Tabelle 4.5:**  ${}^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten für Glucose, die anhand der entwickelten ASAP-HSQC-TOCSY-IPAP-Experimente und der HSQC-TOCSY-IPAP-Vergleichsspektren bestimmt wurden. Die verwendete Methode zur Bestimmung wurde in Kapitel 3.3 beschrieben. Die Vergleichsspektren sind im Anhang A.5 zu finden.

Korrelation	${}^nJ_{\text{CH}}$	${}^nJ_{\text{CH}}$ (konv.) [Hz]	${}^nJ_{\text{CH}}$ (ASAP) [Hz]
C1 $\alpha$ -H2 $\alpha$	${}^2J_{\text{CH}}$	$-0,82 \pm 0,10$	$-0,86 \pm 0,10$
C1 $\alpha$ -H3 $\alpha$	${}^3J_{\text{CH}}$	$0,86 \pm 0,10$	$0,85 \pm 0,10$
C1 $\beta$ -H2 $\beta$	${}^2J_{\text{CH}}$	$-6,23 \pm 0,10$	$-6,25 \pm 0,10$
C1 $\beta$ -H3 $\beta$	${}^3J_{\text{CH}}$	$1,14 \pm 0,10$	$1,18 \pm 0,10$
C2 $\alpha$ -H1 $\alpha$	${}^2J_{\text{CH}}$	$-0,94 \pm 0,10$	$1,09 \pm 0,10$
C2 $\alpha$ -H3 $\alpha$	${}^2J_{\text{CH}}$	$-4,30 \pm 0,10$	$-4,26 \pm 0,10$
C2 $\alpha$ -H4 $\alpha$	${}^3J_{\text{CH}}$	$0,90 \pm 0,20$	-
C2 $\beta$ -H1 $\beta$	${}^2J_{\text{CH}}$	$0,81 \pm 0,10$	$0,85 \pm 0,10$
C2 $\beta$ -H3 $\beta$	${}^2J_{\text{CH}}$	$-4,75 \pm 0,20$	$-4,58 \pm 0,10$
C2 $\beta$ -H4 $\beta$	${}^3J_{\text{CH}}$	$0,68 \pm 0,10$	$0,70 \pm 0,10$
C3 $\alpha$ -H1 $\alpha$	${}^3J_{\text{CH}}$	$5,37 \pm 0,20$	$5,38 \pm 0,10$
C3 $\alpha$ -H2 $\alpha$	${}^2J_{\text{CH}}$	$-4,35 \pm 0,20$	$-4,25 \pm 0,10$
C3 $\alpha$ -H4 $\alpha$	${}^2J_{\text{CH}}$	$-4,39 \pm 0,30$	$-4,40 \pm 0,10$
C3 $\beta$ -H1 $\beta$	${}^3J_{\text{CH}}$	$0,96 \pm 0,20$	$1,01 \pm 0,10$
C3 $\beta$ -H2 $\beta$	${}^2J_{\text{CH}}$	$-4,73 \pm 0,30$	$-4,61 \pm 0,10$

Korrelation	${}^n J_{\text{CH}}$	${}^n J_{\text{CH}}$ (konv.) [Hz]	${}^n J_{\text{CH}}$ (ASAP) [Hz]
C3 $\beta$ -H4 $\beta$	${}^2 J_{\text{CH}}$	$-5,38 \pm 0,30$	$-5,38 \pm 0,20$
C3 $\beta$ -H5 $\beta$	${}^3 J_{\text{CH}}$	$2,26 \pm 0,20$	$2,37 \pm 0,10$
C4 $\alpha$ -H1 $\alpha$	${}^3 J_{\text{CH}}$	$-0,62 \pm 0,20$	$-0,58 \pm 0,10$
C4 $\alpha$ -H2 $\alpha$	${}^2 J_{\text{CH}}$	$0,76 \pm 0,20$	$0,82 \pm 0,10$
C4 $\alpha$ -H3 $\alpha$	${}^2 J_{\text{CH}}$	$-4,38 \pm 0,10$	$-4,29 \pm 0,20$
C4 $\alpha$ -H6' $\alpha$	${}^2 J_{\text{CH}}$	$0,87 \pm 0,20$	$0,89 \pm 0,30$
C4 $\beta$ -H1 $\beta$	${}^4 J_{\text{CH}}$	$0,28 \pm 0,10$	$0,44 \pm 0,10$
C4 $\beta$ -H2 $\beta$	${}^3 J_{\text{CH}}$	$0,79 \pm 0,20$	$1,07 \pm 0,10$
C4 $\beta$ -H5 $\beta$	${}^2 J_{\text{CH}}$	$-3,84 \pm 0,20$	$-3,89 \pm 0,10$
C4 $\beta$ -H6 $\beta$	${}^3 J_{\text{CH}}$	$2,50 \pm 0,10$	$2,64 \pm 0,10$
C4 $\beta$ -H6' $\beta$	${}^3 J_{\text{CH}}$	$1,30 \pm 0,10$	$1,30 \pm 0,10$
C5 $\alpha$ -H1 $\alpha$	${}^5 J_{\text{CH}}$	$6,54 \pm 0,30$	$6,71 \pm 0,10$
C5 $\alpha$ -H3 $\alpha$	${}^3 J_{\text{CH}}$	$0,94 \pm 0,20$	$0,86 \pm 0,10$
C5 $\alpha$ -H4 $\alpha$	${}^2 J_{\text{CH}}$	$-3,90 \pm 0,20$	$-3,83 \pm 0,10$
C5 $\alpha$ -H6 $\alpha$	${}^2 J_{\text{CH}}$	$-1,62 \pm 0,10$	$-1,53 \pm 0,10$
C5 $\alpha$ -H6' $\alpha$	${}^2 J_{\text{CH}}$	$-1,85 \pm 0,10$	$-1,89 \pm 0,10$
C5 $\beta$ -H1 $\beta$	${}^5 J_{\text{CH}}$	$1,15 \pm 0,10$	$1,30 \pm 0,10$
C5 $\beta$ -H3 $\beta$	${}^3 J_{\text{CH}}$	$0,92 \pm 0,10$	$1,10 \pm 0,10$
C5 $\beta$ -H4 $\beta$	${}^2 J_{\text{CH}}$	$-4,79 \pm 0,10$	$-4,82 \pm 0,10$
C5 $\beta$ -H6 $\beta$	${}^2 J_{\text{CH}}$	$-1,18 \pm 0,10$	$-1,17 \pm 0,10$
C5 $\beta$ -H6' $\beta$	${}^2 J_{\text{CH}}$	$-2,27 \pm 0,10$	$-2,30 \pm 0,10$
C6 $\alpha$ -H1 $\alpha$	${}^6 J_{\text{CH}}$	-	$0,09 \pm 0,10$
C6 $\alpha$ -H4 $\alpha$	${}^3 J_{\text{CH}}$	$3,59 \pm 0,10$	$3,81 \pm 0,10$
C6 $\alpha$ -H5 $\alpha$	${}^2 J_{\text{CH}}$	$-1,72 \pm 0,40$	$-1,59 \pm 0,10$
C6 $\beta$ -H2 $\beta$	${}^5 J_{\text{CH}}$	$0,31 \pm 0,10$	-
C6 $\beta$ -H4 $\beta$	${}^3 J_{\text{CH}}$	$3,36 \pm 0,10$	$3,48 \pm 0,10$
C6 $\beta$ -H5 $\beta$	${}^2 J_{\text{CH}}$	$-1,95 \pm 0,20$	$-1,97 \pm 0,10$

## 4.4. Schnelle Messung von $^{13}\text{C}$ -Spektren

Das  $^{13}\text{C}$ -1D-Experiment gehört zu den Standard-Techniken der NMR-Spektroskopie, besonders in der organischen Chemie [190–192]. Die  $^{13}\text{C}$ -Frequenzen liefern wertvolle Informationen zur Strukturaufklärung. Zusätzlich weisen die Spektren eine gute Signaldispersion auf, da sich die  $^{13}\text{C}$ -Frequenzen über einen großen Bereich der chemischen Verschiebungsskala erstrecken. So lassen sich auch die Signale komplexer Verbindungen zuordnen. Da die natürliche Häufigkeit des  $^{13}\text{C}$ -Isotops allerdings lediglich bei 1,1 % liegt und das gyromagnetische Verhältnis  $\gamma$  von  $^{13}\text{C}$  zusätzlich nur ungefähr ein Viertel des gyromagnetischen Verhältnisses von Protonen beträgt, ist die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie im Vergleich zur  $^1\text{H}$ -NMR eine relativ unempfindliche Methode. Betrachtet man nur die unterschiedlichen gyromagnetischen Verhältnisse der angeregten und detektierten Kernsorte bei der Gegenüberstellung eines  $^1\text{H}$ - und eines  $^{13}\text{C}$ -1D-Experiments, ergibt sich ein um den Faktor 32 höheres Signal-zu-Rausch-Verhältnis für das  $^1\text{H}$ -1D-Experiment. Aufgrund der geringen natürlichen Häufigkeit können homonukleare  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Kopplungen vernachlässigt werden, was zu einer Vereinfachung der Spektren gegenüber  $^1\text{H}$ -Spektren führt. Die Signale sind grundsätzlich jedoch durch die heteronukleare Kopplung zu den Protonen aufgespalten und dadurch verbreitert. Durch die Verwendung von  $^1\text{H}$ -Breitband (BB)-Entkopplung ist die Kopplungsaufspaltung unterdrückt, es resultiert für jedes Signal ein Singulett statt eines Multipletts. Daraus geht auch eine Steigerung der Signalintensität hervor. Ein zusätzlicher Effekt der Protonen-Entkopplung während der Akquisition und des Erholungs-*delays*  $d_r$  ist die Übertragung von Polarisation durch Kreuzrelaxation (*heteronuclear Nuclear Overhauser Enhancement* (hetNOE)). Durch den hetNOE wird die Empfindlichkeit erhöht, das bedeutet, das Signal-zu-Rausch-Verhältnis ( $\frac{S}{N}$ ) verbessert sich. Die Signalverstärkung  $\eta$  kann maximal

$$\eta = \frac{\gamma_A}{2 \cdot \gamma_X} \quad (4.4)$$

betragen [193], dabei ist  $\gamma_A$  das gyromagnetische Verhältnis der gesättigten Kernsorte,  $\gamma_X$  das der beobachteten Kernsorte. Für die Gesamtintensität  $I$  des Signals für den Kern X ergibt sich

$$I = (1 + \eta) \cdot I_0, \quad (4.5)$$

wobei  $I_0$  der Signalintensität ohne Verstärkung entspricht.  $(1 + \eta)$  ist der Verstärkungsfaktor. Im Falle der Aufnahme eines  $^{13}\text{C}$ -1D-Experiments unter Breitband-Protonen-Entkopplung ist

$$\eta = \frac{\gamma_H}{2 \cdot \gamma_C} \approx \frac{4 \cdot \gamma_C}{2 \cdot \gamma_C} = 2 \quad (4.6)$$

mit  $\gamma_C \approx 4 \cdot \gamma_H$ . Der Verstärkungsfaktor beträgt also maximal 3 [193].

Dennoch ist die Signalintensität oft nicht ausreichend. Die Signale von quartären Kohlenstoffatomen etwa werden durch den hetNOE nicht verstärkt, da sie kein direkt gebundenes Proton besitzen. Folglich müssen oft mehrere *scans* ( $n$ ) akkumuliert werden. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verbessert sich jedoch nur um den Faktor  $\sqrt{n}$ . Beträgt die Gesamtexperimentzeit des Experiments mit einem *scan* eine Sekunde, kann das Signal-zu-Rausch-Verhältnis um den Faktor 10 gesteigert werden, wenn 100 *scans* aufgenommen werden. Die benötigte Gesamtexperimentzeit würde dann 100s betragen. Eine weitere Steigerung des Signal-zu-Rausch-Verhältnis um den Faktor 10 bedeutet, dass die Gesamtexperimentzeit auf  $10^2 \cdot 100$  s ansteigt, dies entspricht etwa 2 h und 47 min [190]. Schnell kann die Gesamtexperimentzeit also sehr groß werden. Zusätzlich muss bei der Akkumulation mehrerer *scans* beachtet werden, dass zwischen der Aufnahme zweier *scans* eine Wartezeit eingehalten werden muss, um den Wiederaufbau des Gleichgewichtszustands zu ermöglichen. Diese Erholzeit  $t_{\text{Erh}}$  sollte ein Vielfaches  $((3 - 5) \cdot T_1)$  der longitudinalen Relaxationszeit  $T_1$  betragen. Gerade die quartären Kohlenstoffatome können relativ lange  $T_1$ -Relaxationszeiten im Bereich von 100 s besitzen [192]. Dieser Faktor trägt ebenfalls maßgeblich dazu bei, dass die Aufnahme eines  $^{13}\text{C}$ -1D-Experiment oft mit einer langen Messzeit verbunden ist. Es dauert also meist wesentlich länger als eine Sekunde, um einen *scan* aufzunehmen, wie in dem gewählten Beispiel angenommen.

Heteronukleare zweidimensionale Korrelationsexperimente mit Detektion der Protonen besitzen einige Vorteile gegenüber  $^{13}\text{C}$ -1D-Experimenten. Das gyromagnetische Verhältnis der Protonen ist viermal so groß wie das von  $^{13}\text{C}$ . Daraus resultiert eine inhärent höhere Empfindlichkeit. Zusätzlich besitzen Protonen geringere longitudinale Relaxationszeiten ( $T_1$ ). Die Wartezeit zwischen der Aufnahme zweier *scans* kann also geringer gewählt werden. In diesem Kapitel werden Experimente vorgestellt, die diese Vorteile nutzen. Aus den heteronuklearen, zweidimensionalen Spektren werden  $^{13}\text{C}$ -Projektionen abgeleitet, die als Äquivalent zu den  $^{13}\text{C}$ -1D-Spektren dienen sollen. Eine Anforderung dabei ist, dass alle  $^{13}\text{C}$ -Resonanzen enthalten sein müssen, auch die Resonanzen quartärer  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffatome. Weitverbreitete heteronukleare 2D-Experimente sind das HMQC und das HSQC. In beiden Experimenten werden quartäre Kohlenstoffatome nicht detektiert, da sie kein direkt gebundenes Proton besitzen. Die genannten Experimente besitzen allerdings jeweils eine für die Messung von  $^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungen optimierte Variante, das HMBC [194–198] und das HSQMBC [187, 199–201]. Quartäre Kohlenstoffatome sind in den Spektren ebenfalls sichtbar, sofern der Magnetisierungstransfer durch die  $^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungen vermittelt werden kann. Der Transfer wird daher auf die kleinen Kopplungskonstanten eingestellt. Da der

Verlust durch Relaxation während der entsprechend langen *delays* zu groß wäre, wird auf die Entkopplung während der Akquisition verzichtet und kein Rücktransferschritt verwendet.

Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis ist unter anderem proportional zu

$$\frac{S}{N} \sim \gamma_{exc} \gamma_{det}^{\frac{3}{2}}, \quad (4.7)$$

dem Produkt aus den beiden gyromagnetischen Verhältnissen der angeregten Kernsorte  $\gamma_{exc}$  und der detektierten Kernsorte  $\gamma_{det}$ . Bei Gegenüberstellung eines heteronuklearen zweidimensionalen Korrelationsexperiments vom Typ der HMBC- oder HSQMBC-Experimente und eines  $^{13}\text{C}$ -1D-Experiments ergibt sich nach

$$\frac{\left(\frac{S}{N}\right)_{1H}}{\left(\frac{S}{N}\right)_{^{13}C}} = \frac{\gamma_{1H} \gamma_{1H}^{\frac{3}{2}}}{\gamma_{^{13}C} \gamma_{^{13}C}^{\frac{3}{2}}} \approx 4^{\frac{5}{2}} = 32 \quad (4.8)$$

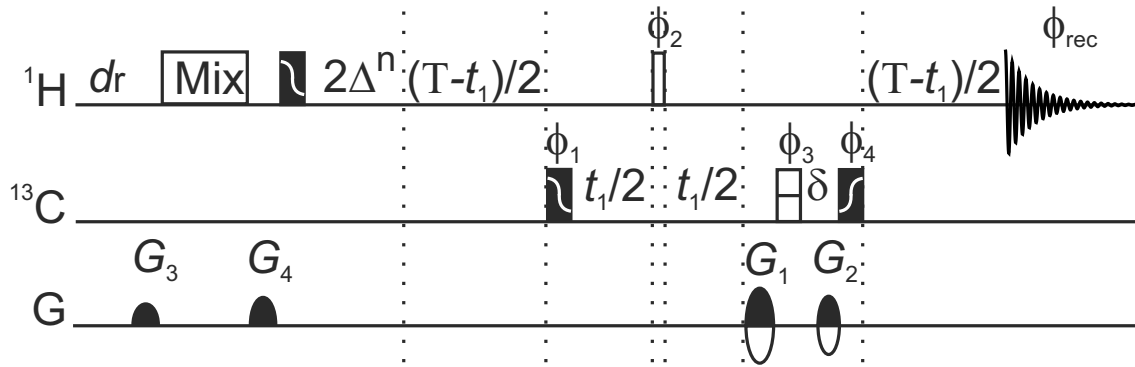
theoretisch also ein um den Faktor 32 höheres Signal-zu-Rausch-Verhältnis für das zweidimensionale heteronukleare Experiment. Für die zweidimensionalen heteronuklearen Experimente sind die Protonen sowohl die angeregte Kernsorte  $\gamma_{exc}$  als auch die detektierte Kernsorte  $\gamma_{det}$ . Für ein  $^{13}\text{C}$ -1D-Experiment sind das in beiden Fällen die  $^{13}\text{C}$ -Kerne. Es müssen allerdings verschiedene Effekte berücksichtigt werden, die den Gewinn schmälern. Zunächst wird das  $^{13}\text{C}$ -1D-Experiment im Fall von Breitband-Protonen-Entkopplung durch den hetNOE aufgewertet. Der Effekt muss für alle Kohlenstoffatome mit einem oder mehreren direkt gebundenen Protonen berücksichtigt werden und führt in diesen Fällen dazu, dass der Verlust-Faktor 32 beim  $^{13}\text{C}$ -1D auf bis zu ein Drittel reduziert werden kann. Er beträgt dann gerundet nur noch etwa 11. Für quartäre Kohlenstoffatome ändert sich nichts. Da die zweidimensionalen, heteronuklearen Experimente zusätzlich mit dem Echo-/Antiecho-Aufnahmeschema ausgestattet sind, muss der Faktor halbiert werden [77]. Das entspricht dann dem Faktor 16 für quartäre Kohlenstoffatome und etwa 5 für CH-, CH<sub>2</sub>- und CH<sub>3</sub>-Gruppen. Der Gewinn wird durch die phasenempfindliche Aufnahme nochmals um den Faktor  $\left(\frac{1}{\sqrt{2}}\right)$  reduziert. Für die quartären Kohlenstoffatome ergibt sich dann theoretisch ein um den Faktor 11,3 höheres Signal-zu-Rausch-Verhältnis, für CH-, CH<sub>2</sub>- und CH<sub>3</sub>-Gruppen ergibt sich etwa der Faktor 4. Der potentielle Gewinn scheint besonders im Falle der quartären Kohlenstoffatome vielversprechend. Allerdings muss zusätzlich die transversale Relaxation berücksichtigt werden. Diese tritt durch die längere Sequenz besonders in den Vordergrund und ist insbesondere auch während der  $t_1$ -Zeit zu beachten. Die Akquisitionszeit muss also sorgfältig gewählt werden. Relaxationseffekte spielen auch bei der Einstellung der Transferdelays des INEPT eine Rolle. Diese genannten Effekte der Relaxation sind negativ zu bewerten. Die kürzeren  $T_1$ -Zeiten der Protonen gegenüber den

$T_1$ -Zeiten der  $^{13}\text{C}$ -Kerne sind dagegen vorteilhaft, da sie eine höhere Wiederholrate der Sequenz ermöglichen und zusätzlich das Signal-zu-Rausch-Verhältnis erhöhen. Bei sehr kurzen  $T_1$ -Relaxationszeiten der Protonen kann es allerdings auch zu Verlusten während der Magnetisierungstransfer-*delays* kommen. Ein positiver Aspekt der  $^{13}\text{C}$ -Spektroskopie sind die geringen Linienbreiten. Auch in der  $^{13}\text{C}$ -Dimension zweidimensionaler Experimente ist die Auflösung aufgrund der Singulett-Struktur der Signale hoch. Die zweidimensionalen Experimente enthalten allerdings mehr potentiell fehlerhafte Pulse. Durch die Verwendung von optimierten Pulsen, abgeleitet mit Hilfe der optimalen Steuerungstheorie (*Optimal Control Theory*), können die Sequenzen jedoch verbessert werden. Sie wurden daher in die entwickelten Sequenzen eingefügt. Zweidimensionale Experimente zeigen meist  $T_1$ -Rauschen, diese Artefakte reduzieren die spektrale Qualität. Zusätzlich muss die Transfereffizienz der INEPT-Elemente betrachtet werden. Alle diese Aspekte zeigen, dass keine Faktoren der Signalverstärkung vorhergesagt werden können.

#### 4.4.1. Pulssequenz des modifizierten IMPACT-HMBC

Es wurden drei Pulssequenzen hinsichtlich der spezifischen Anwendung getestet. Eine der Sequenzen basiert auf dem IMPACT-HMBC [143], das in Kapitel 3.5.1 in Abbildung 3.13 dargestellt ist. Für die Entwicklung der beiden anderen Sequenzen wurde die optimierte, symmetrisierte ASAP-HSQC-Sequenz, die in Kapitel 4.1 vorgestellt wurde, abgewandelt. Die Pulssequenz des modifizierten IMPACT-HMBC ist in Abbildung 4.26 dargestellt.

Die Projektionen sollen alle Signale der  $^{13}\text{C}$ -Resonanzen in maximaler Intensität enthalten. Das ursprüngliche IMPACT-HMBC [143] enthält einen *low-pass*-Filter [84, 145], durch den  $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplungen herausgefiltert werden. In der modifizierten Version der Sequenz wird kein *low-pass*-Filter verwendet, um eine Reduktion der Signalintensitäten zu vermeiden, da auch das Kreuzsignal direkt gebundener Spins konstruktiv zum  $^{13}\text{C}$ -Signal beiträgt. Der Aufbau der Pulssequenz entspricht einem HMBC-Experiment, der für die Messung von  $^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungen optimierten Variante des HMQC-Experiments. Das *delay*  $\Delta^n$  wird auf die weitreichenden  $^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungen eingestellt. Gegenüber dem vergleichbaren HSQC-Experiment besitzt die Pulssequenz weniger RF-Pulse. Allerdings liegt während der Entwicklungsperiode zur Aufnahme der indirekten Dimension heteronukleare Multiquantenmagnetisierung vor. Es entwickeln sich während der gesamten Zeit  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -Kopplungen. Durch Verwendung des CT-Ansatzes kann die homonukleare Protonenkopplung jedoch refokussiert werden. Der negative Effekt des CT-Ansatzes im HMBC ist jedoch, dass sich die heteronuklearen  $^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungen für die Zeit T entwickeln. Einige Signale im Spektrum können dadurch stark reduzierte Signalintensitäten aufweisen. Zu Beginn jeder

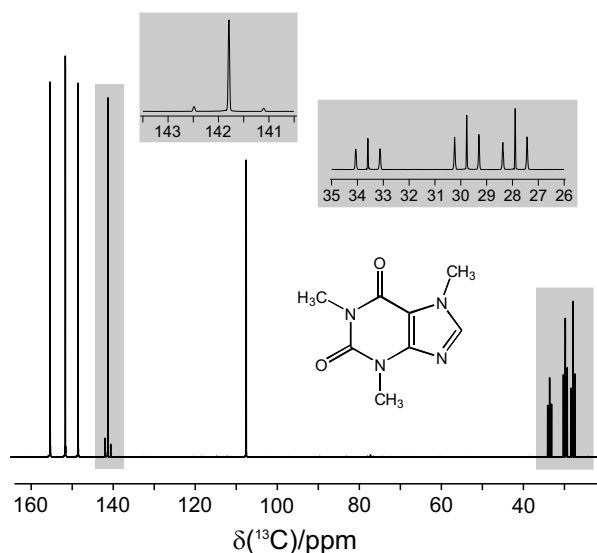


**Abbildung 4.26:** Pulssequenz des modifizierten IMPACT-HMBC mit geformten Pulsen. Nähere Angaben zu den verwendeten Pulsen sind in Tabelle 3.3 zu finden. Das *delay*  $\Delta^n$  wird auf die weitreichenden  $^n J_{\text{CH}}$ -Kopplungen eingestellt. Das Experiment enthält eine CT-Periode, sie wird durch  $T$  gekennzeichnet. Die jeweiligen Phasenzyklen sind durch  $\Phi_1 = x, -x$ ;  $\Phi_2 = 2(x), 2(-x)$ ;  $\Phi_3 = 4(-y), 4(y)$ ;  $\Phi_4 = 4(-x), 4(x)$ ;  $\Phi_{\text{rec}} = x, -x, x, -x, -x, x, -x, x$  gegeben. Echo-/Antiecho-Kohärenzordnungsselektion wird durch die Gradientenverhältnisse  $G_1 = (80\%, -80\%)$ ,  $G_2 = (20,1\%, -20,1\%)$  erreicht. Die Gradienten, die die Mischsequenz umgeben, besitzen die Stärke  $G_3 = 33\%$  und  $G_4 = 43\%$ . Phase  $\Phi_1$  wird gemeinsam mit der Empfängerphase  $\Phi_{\text{rec}}$  nach der TPPI-Methode invertiert.

Wiederholung der Sequenz wird die DIPSI-2-Mischsequenz angewandt. Das Erholungs-*delay* zwischen zwei Wiederholungen wird verkürzt, wodurch das Experiment schneller aufgenommen werden kann. Zusätzlich können  $T_1$ -Rausch-Artefakte durch die Verwendung der Mischsequenz reduziert werden [90, 143]. Im Gegensatz zu den in Kapitel 4.1 vorgestellten ASAP-HSQC-Experimenten wird die Magnetisierung der  $^{12}\text{C}$ -gebundenen Protonen allerdings nicht erhalten. Die Anordnung der Pulse im IMPACT-HMBC führt dazu, dass die  $^{12}\text{C}$ -gebundene Protonenmagnetisierung durch die Gradienten dephasiert, beziehungsweise ausgelöscht wird. Im Folgenden wird das modifizierte IMPACT-HMBC mit einem neuen HSQMBC-Experiment verglichen. Da die entwickelte HSQMBC-Sequenz geformte Pulse enthält, wurde auch das modifizierte IMPACT-HMBC mit geformten Pulsen ausgestattet, um einen objektiven Vergleich gewährleisten zu können.

#### 4.4.2. $^{13}\text{C}$ -Projektion des modifizierten IMPACT-HMBC

In Abbildung 4.27 ist die  $^{13}\text{C}$ -Projektion des 2D-HMBC-Spektrums von Coffein dargestellt, das mit der modifizierten IMPACT-HMBC-Pulssequenz aufgenommen wurde. Da die Auflösung der  $^{13}\text{C}$ -Projektion entscheidend ist, um mit einem  $^{13}\text{C}$ -1D-Spektrum konkurrieren zu können, wurde das 2D-Experiment mit einer großen Anzahl  $t_1$ -Inkrementen aufgenommen. Die Anzahl der Punkte in der indirekten Dimension betrug 16 384. Aufgrund der



**Abbildung 4.27:**  $^{13}\text{C}$ -Projektion einer 300 mM/ $\text{CDCl}_3$  Coffein-Probe, abgeleitet aus dem 2D-HMBC-Spektrum, das mit dem modifizierten IMPACT-HMBC-Experiment aus Abbildung 4.26 aufgenommen wurde. Die Ausschnitte zeigen Vergrößerungen der grau hinterlegten Signalregionen. Die Signalzuordnung ist in Abbildung 3.4 wiedergegeben. Die vergrößerten Signale zeigen eine durch die  $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplung hervorgerufene Aufspaltung. Das Spektrum wurde mit  $838 (^1\text{H}) \times 16384 (^{13}\text{C})$  Punkten aufgenommen, dies entspricht Akquisitionszeiten von 99,9 ms ( $^1\text{H}$ ) und 226,3 ms ( $^{13}\text{C}$ ). Durch Verwendung von *Non Uniform Sampling* wurde die Anzahl der Punkte in der indirekten Dimension auf 818 Inkremente reduziert. Die Aufnahme erfolgte mit je einem *scan* für jedes  $t_1$ -Inkrement und 16 *dummy scans* zu Beginn des Experiments. Die Mischzeit der DIPSI-2-Periode betrug 34,53 ms. Es ergab sich eine Gesamtexperimentzeit von 6 min und 32 s. Prozessiert wurde mit dem CS-Algorithmus [107] der TopSpin Software und zusätzlicher Verwendung von *zero filling* und *linear prediction*, so dass die digitale Auflösung letztlich 2,0 Hz ( $^1\text{H}$ ) und 1,1 Hz ( $^{13}\text{C}$ ) beträgt.



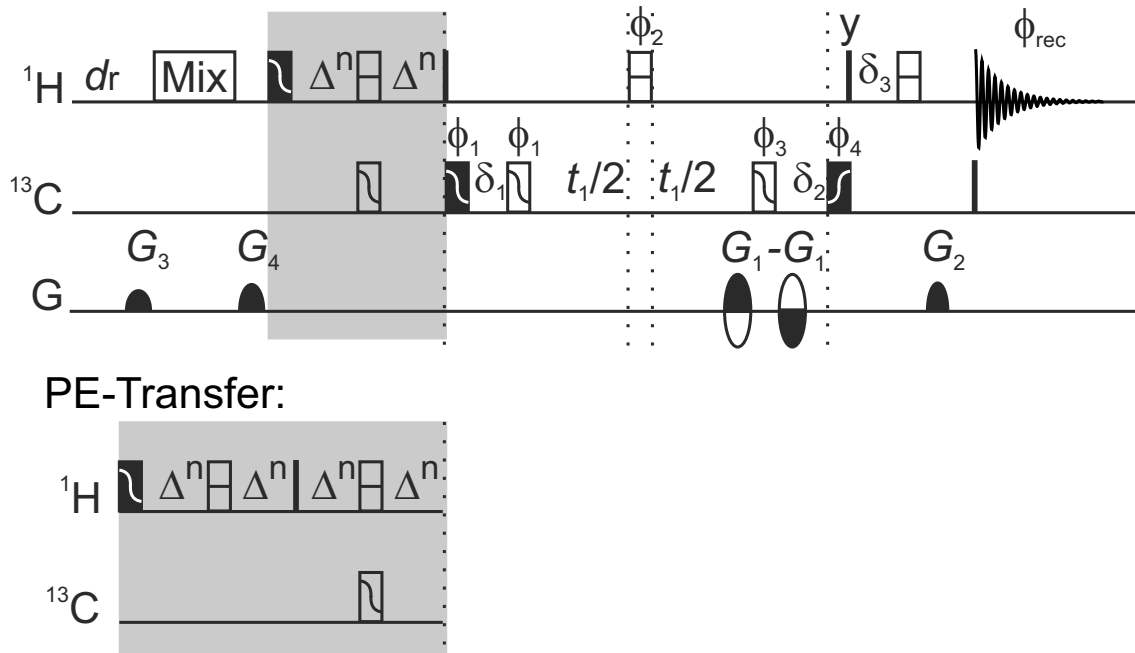
beschleunigten Aufnahme und der Reduktion der Anzahl der Punkte in der indirekten Dimension durch die Verwendung von NUS, ergab sich eine Gesamtexperimentdauer von nur 6 min und 32 s. Die Ausschnitte in der Abbildung zeigen Vergrößerungen der grau hinterlegten Signalregionen. Die Signalzuordnung ist in Abbildung 3.4 gegeben. Einer der beiden Ausschnitte zeigt die Vergrößerung der drei Methylgruppen-Signale, die durch die  $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplung aufgespalten sind. Die Kopplung ist nicht nur während des Transfer-*delays*  $\Delta^n$ , sondern auch während des gesamten ersten Teils  $(T-t_1)/2$  der *Constant Time*-Periode wirksam. Der Transfer ist also um diese Zeitperiode verlängert. Die Kopplungsentwicklung führt zu einer Modulation des Signals und löst die beschriebene Aufspaltung aus. Mit dem ursprünglichen IMPACT-HMBC war keine Aufspaltung durch die  $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplung zu beobachten, da in der Sequenz zusätzlich ein *low-pass*-Filter verwendet wurde. Durch die Aufspaltung wird das Spektrum unübersichtlich und die Zuordnung der Signale wird erschwert. Das Experiment kann das  $^{13}\text{C}$ -1D-Experiment also nicht ersetzen.

#### 4.4.3. Pulssequenzen der schnellen HSQMBC-Experimente

Anstatt des modifizierten IMPACT-HMBC wurde nun das ASAP-HSQC abgewandelt, um es für die Anwendung als Alternative zu einem  $^{13}\text{C}$ -1D-Spektrum zu optimieren. In Abbildung 4.28 ist die Pulssequenz dargestellt.

Sie basiert auf der symmetrisierten ASAP-HSQC-Pulssequenz. Das *delay*  $\Delta^n$  wird auf die  $^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungen eingestellt, um sämtliche über die  $^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplung erreichbaren  $^{13}\text{C}$ -Atome detektieren zu können. Im Gegensatz zu einem HSQC werden so auch die Signale der quartären Kohlenstoffatome erhalten. Aufgrund der veränderten Einstellung des INEPT-*delays* ist es nicht mehr möglich, Ernst-Winkel-Anregung zu verwenden. Als weiterer Unterschied zum HSQC wird im HSQMBC-Experiment auf die Entkopplung während der Akquisition verzichtet. Außerdem wird kein Rücktransferschritt verwendet. Detektiert wird also die Protonen-Magnetisierung, die sich während der Akquisition aus der  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -Antiphase-Magnetisierung auf Protonen entwickelt. Der Vorteil der HSQMBC-Sequenz gegenüber einem gewöhnlichen HMBC-Experiment ist, dass während der Inkrementierung der indirekten Dimension Einquantenkohärenzen vorliegen. Die Einquantenkohärenzen entwickeln keine homonukleare Kopplung. Es können dadurch höhere Auflösungen in der  $^{13}\text{C}$ -Dimension erreicht werden, siehe dazu auch Abbildung 4.6.

$J_{\text{HH}}$ -Kopplungen sind jedoch während des Magnetisierungstransfers wirksam. Da dieser hier länger ist, wird die Kopplungsentwicklung relevant und es entstehen  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -Antiphase-Terme. Dadurch können dispersive Anteile in der  $^1\text{H}$ -Dimension auftreten. Die Signale werden dadurch verbreitert und auch die Komplexität der Multiplett-Struktur der Korrelationssignale



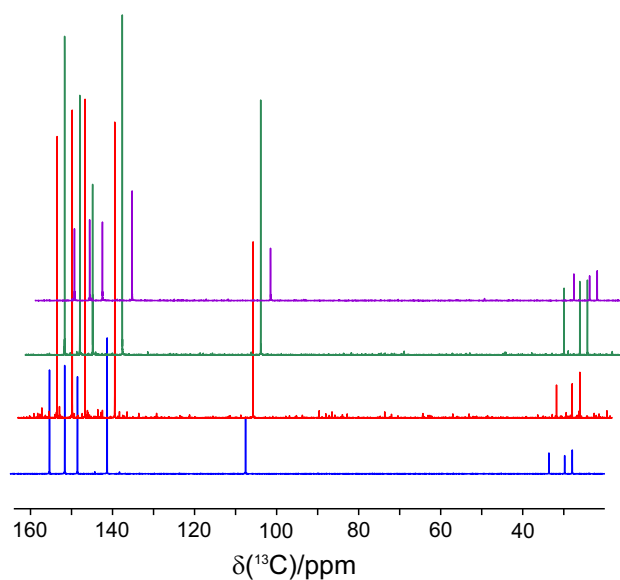
**Abbildung 4.28:** Pulssequenz des schnellen HSQMBC-Experiments mit geformten Pulsen. Der INEPT-Transfer kann durch eine PE-Sequenz [70, 71, 202] ersetzt werden. Dadurch wird die Entwicklung von homonuklearer Protonen-Kopplung während des Transferschrittes refokussiert. Dies verdoppelt die Länge des Transfers. Das *delay*  $\Delta^n$  wird auf die weitreichenden  ${}^n J_{\text{CH}}$ -Kopplungen eingestellt. Die jeweiligen Phasenzyklen sind durch  $\Phi_1 = 4(x), 4(-x)$ ;  $\Phi_2 = 2(x), 2(-x)$ ;  $\Phi_3 = 4(-x), 4(x)$ ;  $\Phi_4 = x, -x$ ;  $\Phi_{\text{rec}} = x, -x, x, -x, -x, x, -x, x$  gegeben. Echo-/Antiecho-Kohärenzordnungsselektion wurde durch die Gradientenverhältnissen  $G_1 = (40\%, -40\%)$ ,  $G_2 = (20,1\%, 20,1\%)$  erreicht. Die Gradienten, die die Mischsequenz umgeben, besitzen die Stärke  $G_3 = 33\%$  und  $G_4 = 43\%$ . Phase  $\Phi_3$  wird gemeinsam mit der Empfängerphase  $\Phi_{\text{rec}}$  nach der TPPI-Methode invertiert.

ist erhöht. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verschlechtert sich, auch aufgrund von überlappenden Signalen mit entgegengesetztem Vorzeichen [203]. Durch einen PE-Transfer [70, 202, 204] kann die homonukleare Protonenkopplung während des Transferschrittes refokussiert werden. Dies gilt allerdings nur für ein Zwei-Spin-System exakt. Der alternative Transfer ist in der Abbildung 4.26 grau hinterlegt. Die Länge des Transfers ist dadurch allerdings verdoppelt. Durch den längeren Transfer kann es zur Reduktion der Signalintensität kommen, da der nachteilige Effekt der  $T_2$ -Relaxation größer ist.

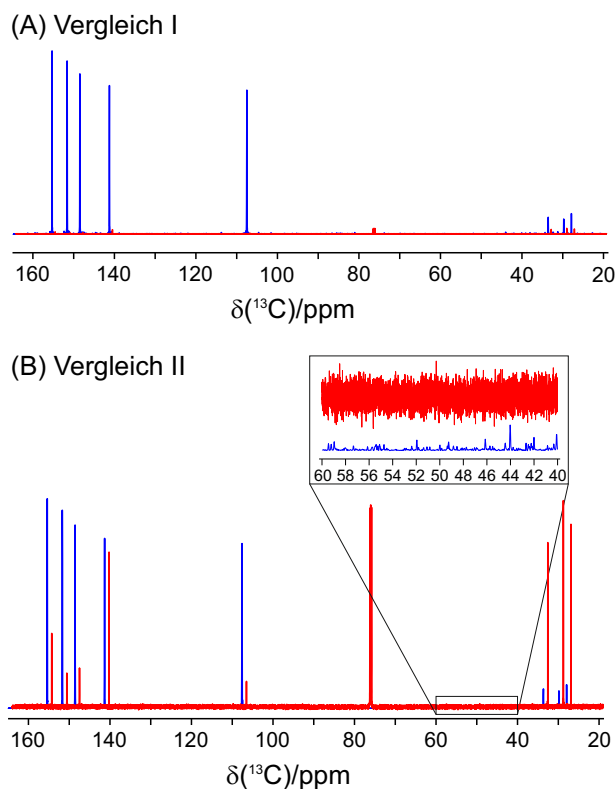
#### 4.4.4. Vergleiche der $^{13}\text{C}$ -Projektionen der schnellen HSQMBC-Spektren

In Abbildung 4.29 ist ein Vergleich der  $^{13}\text{C}$ -Projektionen der Coffein-Probe gezeigt, die aus den verschiedenen schnellen HSQMBC-Experimenten aus Abbildung 4.28 abgeleitet sind. Es wurden hochaufgelöste 2D-Spektren aufgenommen. Durch die Verwendung von NUS betrug die Gesamtexperimentzeit jedoch jeweils nur ungefähr 6 min und 30 s. Die 2D-Spektren sind im Anhang in den Abbildungen A.7, A.8, A.9 und A.10 dargestellt. Die Projektionen sind für eine verbesserte Vergleichbarkeit in einer gestaffelten Darstellung abgebildet. Alle Projektionen liefern vollständige  $^{13}\text{C}$ -Spektren, die zur Signalzuordnung verwendet werden können. Eine Aufspaltung der Signale, wie in der Projektion des modifizierten IMPACT-HMBC, ist nicht zu beobachten. Da das Kopplungs-*delay* des INEPT-Magnetisierungstransfers auf eine mittlere Kopplungskonstante von 8 Hz eingestellt wurde, fällt die Intensität der Methylgruppen-Signale vergleichsweise gering aus, während die Signalintensität der quartären Kohlenstoff-Resonanzen deutlich höher ist. Der eingestellte Wert ist gut auf die weitreichenden Kopplungen abgestimmt und wird demnach der stärkeren  $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplung nur schlecht gerecht. Allerdings liegt das Augenmerk der entwickelten, schnellen HSQMBC-Experimente auf der Detektion der quartären Kohlenstoff-Resonanzen, welche unter Verwendung eines  $^{13}\text{C}$ -1D-Experiments im Allgemeinen schwieriger zu erhalten sind. Alle vier Varianten erfüllen die Vorgabe der schnellen Akquisition der quartären Kohlenstoffatome. Die in grün gezeigte Projektion des schnellen HSQMBC mit konventionellem INEPT-Transfer, ohne Mischsequenz, liefert jedoch das beste Ergebnis. Die Verwendung des PE-Transfers lieferte keine höheren Signalintensitäten. Zwar wird die homonukleare Protonenkopplung durch den abgewandelten Magnetisierungstransfer refokussiert, die Länge des Transfers ist jedoch verdoppelt.  $T_2$ -Relaxationseffekte fallen dadurch deutlicher ins Gewicht, der erhoffte Intensitätsgewinn durch homonukleare Kopplungsrefokussierung bleibt aus. Demzufolge wurde das schnelle, optimierte HSQMBC zum Vergleich mit einem  $^{13}\text{C}$ -1D-Spektrum verwendet.

In Abbildung 4.30 sind zwei Darstellungen des Vergleichs der  $^{13}\text{C}$ -Projektion des optimier-



**Abbildung 4.29:**  $^{13}\text{C}$ -Projektionen der 300 mM/ $\text{CDCl}_3$  Coffein-Probe, abgeleitet aus den 2D-HSQMBC-Spektren, die mit den schnellen HSQMBC-Experimenten aus Abbildung 4.28 aufgenommen wurden. In **blau** ist die  $^{13}\text{C}$ -Projektion des schnellen HSQMBC mit PE-Transfer ohne Mischsequenz dargestellt, in **rot** die  $^{13}\text{C}$ -Projektion des schnellen HSQMBC mit PE-Transfer und Mischsequenz, in **grün** die  $^{13}\text{C}$ -Projektion des schnellen HSQMBC mit konventionellem INEPT-Transfer ohne Mischsequenz und in **violett** die  $^{13}\text{C}$ -Projektion des schnellen HSQMBC mit konventionellem INEPT-Transfer und Mischsequenz. Das HSQMBC mit konventionellem INEPT-Transfer, ohne Mischsequenz, liefert das beste Ergebnis. Die korrespondierenden 2D-Spektren sind im Anhang in den Abbildungen A.7, A.8, A.9 und A.10 dargestellt, alle Akquisitionsparameter können der jeweiligen Bildunterschrift entnommen werden.



**Abbildung 4.30:** Vergleiche der  $^{13}\text{C}$ -Projektion des schnellen HSQMBC-Experiments mit dem  $^{13}\text{C}$ -1D-Spektrum für eine 300 mM/ $\text{CDCl}_3$  Coffein-Probe. In (B) erfolgte eine Angleichung der Signalintensitäten. Die Akquisitionsparameter wurden so gewählt, dass eine vergleichbare Gesamtexperimentzeit resultiert. **Blau** ist die  $^{13}\text{C}$ -Projektion des optimierten HSQMBC, in **rot** das  $^{13}\text{C}$ -1D-Spektrum. Der Ausschnitt zeigt eine Spektrenregion, die keine Signale enthält zur Veranschaulichung des unterschiedlichen Charakters des Rauschens. Das korrespondierende 2D-Spektrum ist im Anhang in Abbildung A.10 dargestellt, alle Akquisitionsparameter können der Bildunterschrift entnommen werden. Es wurde mit je einem *scan* und insgesamt 4096 Punkten aufgenommen. Durch Verwendung von *Non Uniform Sampling* wurde die Anzahl der Punkte in der indirekten Dimension jedoch auf 228 Inkremente reduziert. Es ergab sich eine Gesamtexperimentzeit von 2 min und 2 s. Die Rekonstruktion des Spektrums erfolgte mit dem CS-Algorithmus [107] der TopSpin Software. Durch *zero filling* und *linear prediction* beträgt die digitale Auflösung 4,4 Hz ( $^{13}\text{C}$ ). Das  $^{13}\text{C}$ -1D-Vergleichsspektrum wurde standardmäßig mit 65 536 und einer Akquisitionszeit von 908,8 ms, 26 *scans*, 16 *dummy scans* und einem Erholungs-*delay*  $d_r$  von 2 s aufgenommen. Die Gesamtexperimentzeit betrug 2 min und 4 s. Die resultierende Auflösung nach Prozessierung mit *zero filling* und *linear prediction* beträgt 0,60 Hz.

ten HSQMBC in blau, mit einem  $^{13}\text{C}$ -1D-Spektrum in rot gezeigt. Das auffällige Signal mit der chemischen Verschiebung von 77,0 ppm im roten  $^{13}\text{C}$ -1D-Spektrum ist auf das Lösungsmittel  $\text{CDCl}_3$  zurückzuführen. (A) zeigt die anfängliche Ansicht, die erhalten wird, wenn die Projektion gemeinsam mit dem  $^{13}\text{C}$ -1D-Spektrum dargestellt werden soll. In (B) wurden die Intensitäten angeglichen. Das korrespondierende 2D-Spektrum der Projektion ist im Anhang in Abbildung A.10 dargestellt. Es ergab sich eine Gesamtexperimentzeit von 2 min und 2 s. Das  $^{13}\text{C}$ -1D-Spektrum wurde mit üblichen Akquisitionsparametern in einer Gesamtexperimentzeit von 2 min und 4 s aufgenommen. Die Angleichung der Gesamtexperimentzeit an das HSQMBC-Experiment erfolgte durch die Anpassung der *scans*, auf insgesamt 26. Die Erholzeit, welche sich aus dem Erholungs-*delay* und der Akquisitionszeit zusammensetzt, betrug insgesamt etwa 3 s. Da besonders die quartären Kohlenstoffatome lange  $T_1$ -Relaxationszeiten besitzen, ist es sinnvoll, lange Akquisitionszeiten zu wählen, da dadurch gleichzeitig die digitale Auflösung gesteigert wird. Für das 2D-Experiment wurden 4096 Inkremente aufgenommen, dies entspricht einer Akquisitionszeit von 56,6 ms in der  $^{13}\text{C}$ -Dimension. Der Wert stellt einen Kompromiss zwischen der während der Inkrementierungsperiode stattfindenden  $T_2$ -Relaxation und der erforderlichen Auflösung in der  $^{13}\text{C}$ -Dimension dar. In der Protonendimension wurde unter Berücksichtigung der Relaxation und der Entwicklung des detektierbaren Signals aus  $^{13}\text{C}$ -Antiphase-Magnetisierung eine Akquisitionszeit von 244,1 ms gewählt. Nach Prozessierung unter Verwendung von *zero filling* und *linear prediction* beträgt die digitale Auflösung 4,4 Hz für die  $^{13}\text{C}$ -Projektion und 0,6 Hz für das  $^{13}\text{C}$ -1D-Spektrum. Trotz der unterschiedlichen Einstellung der Experimente fällt der Vergleich sehr eindrucksvoll aus. Die Intensität der Signale in der  $^{13}\text{C}$ -Projektion ist gegenüber der des  $^{13}\text{C}$ -1D-Spektrums erheblich gesteigert, besonders ist dies für die Signale der quartären Kohlenstoffe zu beobachten. Selbst nach Angleichung des  $^{13}\text{C}$ -Spektrums sind die Intensitäten der quartären Kohlenstoffe der Projektion weiterhin deutlich höher. Dagegen fallen die Intensitäten der Methylgruppen-Signale vergleichsweise gering aus. Die Einstellung des Transfer-*delays* wurde jedoch für die Detektion der quartären Kohlenstoffresonanzen optimiert.

Ein Vergleich der Intensitäten reicht im Allgemeinen nicht aus. Daher ist in Abbildung 4.30 auch die Vergrößerung eines Ausschnitts gezeigt, in dem keine Signale enthalten sind. Während das Rauschen des  $^{13}\text{C}$ -1D-Spektrums sehr gleichmäßig ausfällt, ist die Projektion des 2D-Experiments unregelmäßig. Durch diesen zweiten Vergleich wird deutlich, dass es sich um zwei vollkommen unterschiedliche Experimente handelt. Unter Berücksichtigung aller Vor- und Nachteile der beiden Experimente kann eine  $^{13}\text{C}$ -Projektion trotz allem

als Alternative zu einem  $^{13}\text{C}$ -1D-Spektrum dienen, besonders um quartäre Kohlenstoff-Resonanzen zu detektieren, und wenn die Auflösung nicht entscheidend ist.

## 4.5. Untersuchung von Motorölen

Die in diesem Kapitel erläuterten Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Eva Förster und Benjamin Göring, angeleitet von Gisela Guthausen, erarbeitet und sind bereits veröffentlicht [205].

Motoröle werden in jedem Verbrennungsmotor verwendet. Sie dienen vorwiegend dazu, die beweglichen Teile im Motor zu schmieren. Das Öl nimmt aber auch mechanischen Abrieb, Ruß- und Kraftstoffbestandteile auf. Motoröle wirken so dem Verschleiß des Motors entgegen. Die chemischen Eigenschaften eines Öls verändern sich jedoch während der Betriebszeit des Motors. Die Alterung wird durch chemische Reaktionen ausgelöst. In diesem Kapitel wird die Anwendung der NMR-Spektroskopie zur Charakterisierung der Ölalterungsprozesse gezeigt.

Im Vergleich zu Schiffen werden in einem PKW-Verbrennungsmotor nur geringe Mengen Motoröl gebraucht. Die Motorölfüllmenge liegt, im Motorradbereich angefangen, zwischen 2,5 L und 3 L. Sie beträgt für PKW-Motoren 3,5 L bis 5 L, bei LKWs bereits 40 L bis 60 L und erreicht bei Schiffdieselmotoren eine Größenordnung von anfänglich 100 L bis mehreren 1000 L. Im Zuge eines schonenden Umgangs mit natürlichen Ressourcen und größtmöglicher Wirtschaftlichkeit sollen möglichst lange Laufzeiten erzielt werden, während die Motorleistung gleich und alle Funktionen des Öls weiterhin erhalten bleiben sollen. Ressourcenschonung folgt dem Leitbild eines minimalen Ressourcenverbrauchs und einer ganzheitlichen Lebenszyklusperspektive durch Recycling. Recycling des gebrauchten Motoröls kann zu einer nachhaltigen Ressourcennutzung beitragen [206]. Der Recyclingprozess ist jedoch mit einigen Schwierigkeiten verbunden [207, 208], da zunächst die genaue Zusammensetzung des gebrauchten Motoröls bekannt sein muss. Zu Beginn müssen also alle Substanzen charakterisiert werden, die im Verlauf der Alterung des Motoröls verbraucht werden, oder eine chemische Modifikation unterlaufen. Die heute erhältlichen Öle bestehen aus einer Basis verschiedener Kohlenwasserstoffe, die aus Mineralöl gewonnen werden, und einer Vielzahl von Ölzusätzen, den sogenannten Additiven [209, 210]. Die spezifische Zusammensetzung eines Motoröls hängt maßgeblich davon ab, welche Eigenschaften das Öl besitzen soll. Die große Anzahl der für die verschiedenen Anwendungen erhältlichen Motoröle erschwert die Einschätzung des ablaufenden Alterungsprozesses und die Rolle der Additive [209, 211]. Grundsätzlich handelt es sich jedoch um einen irreversiblen Prozess, bei dem sich die physikochemischen Eigenschaften des Öls verändern [212]. Eine wichtige Kenngröße von Motorölen ist die dynamische Viskosität, sie wird in Tabelle 3.1 für die untersuchten Öle angegeben. Weitere charakteristische Kenngrößen sind die Dichte, der



Flammpunkt und der *Pourpoint* (Stockpunkt), der wiedergibt, bei welcher Temperatur das Öl gerade noch fließt. Zusätzlich wird im Allgemeinen die Basenzahl angegeben. Motoröle enthalten alkalische Bestandteile, die die bei der Verbrennung entstehenden und in das Motoröl eingetragene Säuren neutralisieren. Je geringer die Basenzahl ist, desto verbraucher ist das Öl. Auch die Farbe gibt Aufschluss über den Zustand des Öls [207, 211]. Die NMR-Spektroskopie bietet die Möglichkeit, Aussagen über die Ölzusammensetzung zu treffen. Die Alterung des Öls kann so prinzipiell charakterisiert werden. Bei Gegenüberstellung des neuen und des gebrauchten Öls kann die Ölalterung bereits durch die Aufnahme von Protonen- und  $^{13}\text{C}$ -1D-Spektren nachvollzogen werden. In den  $^1\text{H}$ -1D-Spektren überlagern die Signale jedoch. Daher wurden zusätzlich zweidimensionale Experimente durchgeführt, die eine bessere Signaldispersion aufweisen. Das bietet den Vorteil, dass eng beieinander liegende Signale besser getrennt und zugeordnet werden können. Weiterhin konnten durch Diffusions- und  $^1\text{H}$ -Relaxations-Messungen Informationen über Moleküldynamiken gewonnen werden. Aus den erhaltenen Daten lassen sich Aussagen über die Molekülgröße ableiten. Es wurden zwei unterschiedliche Motoröle untersucht, eines der Öle wurde in zwei verschiedenen PKW-Motoren (Diesel- und Ottomotor) verwendet, die Motor-Laufzeiten betragen 20 000 km und 30 000 km. Das zweite Motoröl entstammt einem Prüfaufbau. Durch Gegenüberstellung der Spektren des gebrauchten und des neuen Öls konnten die Substanzen und Verbindungen identifiziert werden, die im Zuge der Alterung verbraucht wurden oder eine chemische Modifikation erfahren haben.

Tabelle 4.6 gibt einen Überblick über die in der Untersuchung verwendeten NMR-Experimente und dem Informationsgehalt der Spektren. In bereits veröffentlichten Publikationen wurden Fourier-Transformation (FT) Infrarot (IR)-, Gaschromatographie (GC)-Massenspektrometrie (MS)- und einfache  $^1\text{H}$ -1D-NMR-Messungen durchgeführt, um den Alterungsprozess der Öle zu untersuchen [211, 213, 214]. Wie aus Tabelle 4.6 ersichtlich, wurden die eindimensionalen Experimente in dieser Arbeit durch heteronukleare 2D-Korrelationsexperimente, sowie Relaxations- und Diffusions-Messungen ergänzt. Dadurch konnten zusätzliche Informationen gewonnen werden.

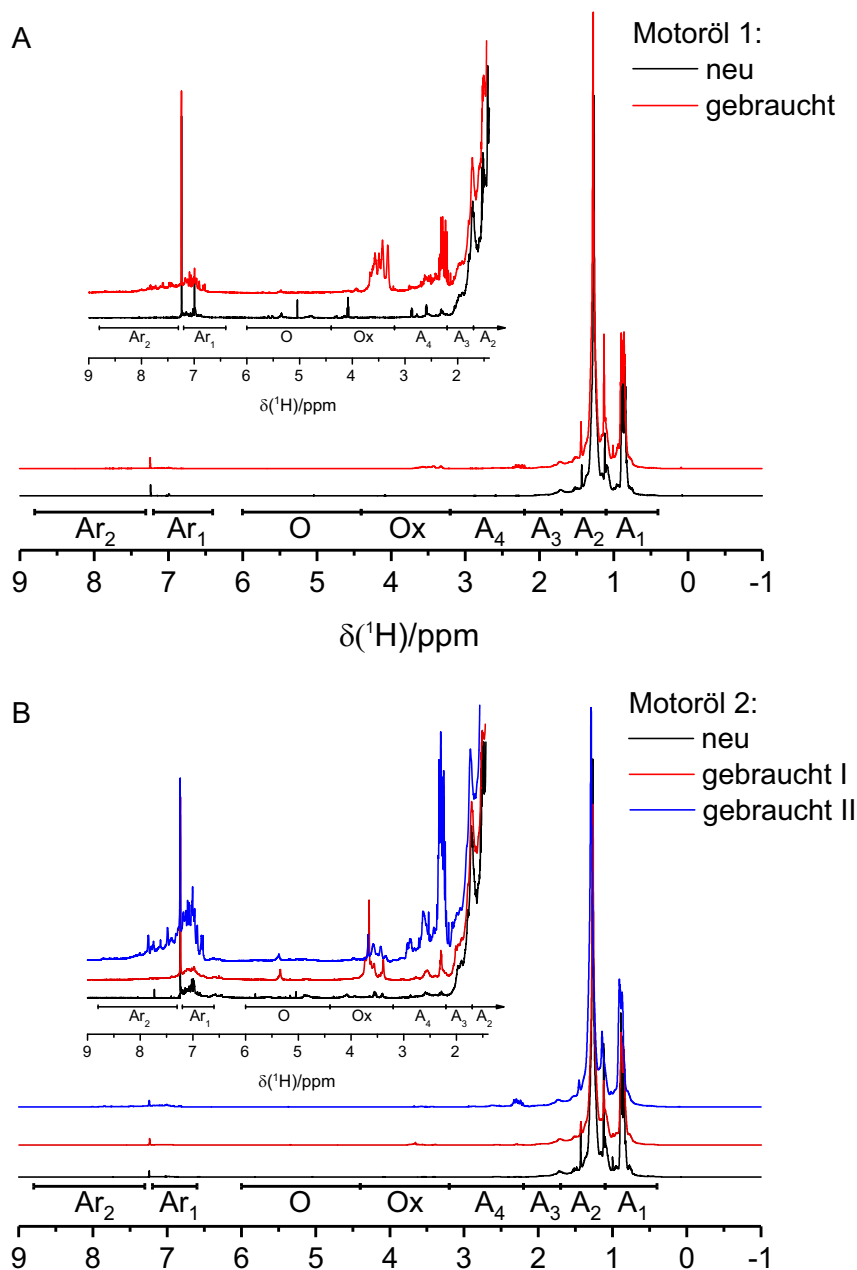
**Tabelle 4.6:** Übersicht über die verwendeten NMR-Experimente und deren Informationsgehalt.

Experiment	abgeleitete Parameter	Information
1D- $^1\text{H}$ -NMR	$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum	Chemische Verschiebung, Linienbreite und Intensität
Entkoppelte 1D- $^{13}\text{C}$ -NMR	$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum	Chemische Verschiebung, Linienbreite und Intensität
Doppelquanten gefiltertes $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -TOCSY	Korrelationen von skalar gekoppelten Protonen sämtliche homonukleare Protonen-Korrelationen eines Spinsystems	direkt benachbarte kovalent gebundene Protonen alle benachbarten Protonen eines Spinsystems
Empfindlichkeitsoptimiertes $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC	Heteronukleare Korrelationen	direkt benachbarte kovalent gebundene $^{13}\text{C}$ - und $^1\text{H}$ -Atome
Empfindlichkeitsoptimiertes $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC	Heteronukleare Korrelationen	direkt benachbarte kovalent gebundene $^{15}\text{N}$ - und $^1\text{H}$ -Atome
<i>Inversion-Recovery</i> - Experimente	longitudinale Relaxation, $T_1$ -Zeiten	Moleküldynamik
<i>Carr-Purcell-Meiboom-Gill</i> (CPMG) Sequenz	transversale Relaxation, $T_2$ -Zeiten	Moleküldynamik
<i>BiPolar Longitudinal Eddy</i> <i>Current Delay</i> (BPLED) Sequenz	Diffusionskoeffizienten	Moleküldynamik und Molekülgröße

### 4.5.1. Protonen-1D-Spektren

Bereits anhand der Protonen-1D-Spektren kann die unterschiedliche Zusammensetzung der gebrauchten und der neuen Öle verglichen werden. In Abbildung 4.31 sind die jeweiligen 1D-Spektren der verschiedenen Ölproben dargestellt. Die Abbildung enthält zusätzlich eine Einteilung der spektralen Bereiche, die eine Zuordnung der Protonen zu verschiedenen Substanzklassen, Verbindungen oder Molekülgruppen wiedergeben. Die Entsprechung der Abkürzungen ist in Tabelle 4.7 aufgeführt. Für die Verbindungen sind jeweils die Protonen hervorgehoben, die die Signale im Spektrum liefern.

Die auffällig intensiven Signale sind auf die Protonen der  $\text{CH}_2$ -Gruppen von Alkylketten ( $A_2$ ) und terminalen  $\text{CH}_3$ -Gruppen ( $A_1$ ) zurückzuführen. Alkylketten sind in großem Maße enthalten, da die Öle aus einer Basis verschiedener Kohlenwasserstoffe bestehen. Wie erwartet, ändert sich die Intensität dieser Signale und deren chemische Verschiebung im Zuge der Alterung kaum, da das gebrauchte Öl trotz der chemischen Alterungsprozesse weiterhin viele  $\text{CH}_2$ -Gruppen und terminale  $\text{CH}_3$ -Gruppen enthält. Änderungen sind vor allem im spektralen Bereich ab 2 ppm zu beobachten. Der Bereich ist in der Abbildung 4.31 vergrößert dargestellt. Die Intensität steigt besonders für die oxidierten Verbindungen (Ox) und die benzylich-gebundenen, aliphatischen Kohlenwasserstoffe ( $A_4$ ) an. Die Zunahme der erwähnten Verbindungen wird vermutlich durch Esterspaltung und Oxidation hervorgerufen [211]. Durch Hydrolyse von Carbonsäureestern entstehen die entsprechende Carbonsäure und der Alkohol. Die Annahme wird durch die in den Spektren ersichtliche Erhöhung der Signalintensitäten der jeweiligen Verbindungen bestätigt. Im Bereich der aromatischen Verbindungen ( $Ar_1$ ,  $Ar_2$ ) kann eine Intensitätssteigerung, sowie eine Aufteilung der Signale auf eine größere spektrale Region beobachtet werden. Das auffällig intensive Signal innerhalb dieses spektralen Bereichs ist dem Lösungsmittel  $\text{CDCl}_3$  mit einer chemischen Verschiebung von 7,27 ppm zuzuordnen. Die gebrauchten Öle enthalten eine vielfältigere Zahl aromatischer Verbindungen. Dies wird zum Einen durch die Auftragung der Integralwerte aus Abbildung 4.32 ersichtlich, zum Anderen ist die absolute Zahl der Signale in den Spektren der gebrauchten Öle höher. Zudem nimmt die Linienbreite der Signale zu. Dies kann durch ein höheres Molekulargewicht der zugehörigen aromatischen Verbindungen, oder die Bildung von Aggregaten hervorgerufen werden. Eine andere Erklärung ist, dass die Signale so nahe beieinander liegen, dass es zu Überlagerungen kommt. Neue Motoröle enthalten aromatische Kohlenwasserstoffe als Zusätze. Die Additive verbessern die Eigenschaften des Motoröls. Aromatische Amine werden beispielsweise als Antioxidantien, als Verschleißschutz und zur Verbesserung des Viskositätsindex (VI) eingesetzt. Aromatische Sulfide werden ebenfalls



**Abbildung 4.31:** Vergleich der  $^1\text{H}$ -Spektren der Motoröle. In (A) sind die  $^1\text{H}$ -Spektren des ungebrauchten Motoröls 1 (schwarz) und des gebrauchten Motoröls 1 (rot) dargestellt. (B) zeigt den Vergleich des  $^1\text{H}$ -Spektrums des ungebrauchten Motoröls 2 (schwarz) und der  $^1\text{H}$ -Spektren mit einer Motor-Laufzeit von 20 000 km (rot) und 30 000 km (blau). Die Spektren sind in einer gestaffelten Anordnung dargestellt. Die Akquisitionsparameter der Experimente können Kapitel 3.4 entnommen werden. Die Abbildungen enthalten zusätzlich eine Einteilung der spektralen Bereiche. Die Entsprechung der Abkürzungen ist in Tabelle 4.7 aufgeführt. Die Detailansichten erlauben eine genauere Betrachtung der Spektren.  $\text{CH}_2$ -Gruppen von Alkylketten und ( $\text{A}_2$ ) und  $\text{CH}_3$ -Endgruppen ( $\text{A}_1$ ) verursachen aufgrund ihres anteiligen Vorkommens Signale mit hoher Intensität. Die Abbildung ist der in [205] veröffentlichten nachempfunden, mit Genehmigung durch den Verleger American Chemical Society.

als Antioxidantien zugegeben und sie verhindern die Korrosion von Metalloberflächen [209, 215]. Gealterte Öle enthalten beispielsweise polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAHs), heterozyklische aromatische Verbindungen, oder Stickstoffverbindungen [211, 215]. PAHs entstehen bei der unvollständigen Verbrennung von organischem Material [208]. Die Betrachtung der Spektren des Motoröls mit zwei verschiedenen Motor-Laufzeiten gibt Aufschluss über den Einfluss der Laufzeit. Unterschiede werden besonders in den Bereichen ( $A_4$ ), ( $A_{R1}$ ), ( $A_{R2}$ ) und (Ox) deutlich. Der Vergleich kann bei der Einschätzung der optimalen Laufzeit nützlich sein, um nicht erforderliche Ölwechsel zu vermeiden.

**Tabelle 4.7:** Identifikation einzelner Verbindungen anhand der  $^1\text{H}$ -Spektren der Motoröle. Die Tabelle gibt Aufschluss über die in den Abbildungen 4.31 und 4.32 verwendeten Abkürzungen, die die spektralen Bereiche kennzeichnen.

spektraler Bereich [ppm]	Verbindungen	Abkürzung
8,8-7,3	aromatische Verbindungen, heterozyklische aromatische Verbindungen, PAHs	$A_{R2}$
7,2-6,4	(substituierte) aromatische Verbindungen, heterozyklische aromatische Verbindungen, PAHs	$A_{R1}$
6,0-4,4	Olefine und Ester, Amine ( $\text{H}_2\text{C} = \text{CHR}$ , $\text{RCH} = \text{CHR}$ , $\text{RRC} = \text{CHR}$ , $\text{H}_2\text{C} = \text{CHR}$ , $\text{H}_2\text{C} = \text{CRR}$ , $\text{R}_2\text{CHO}(\text{CO})\text{R}$ )	O
4,4-3,2	Sauerstoffhaltige Kohlenwasserstoffe (Ester, Alkohole und Ether) ( $\text{R}_2\text{CHOR}$ , $\text{RCH}_2\text{OR}$ , $\text{R}_2\text{CHOH}$ , $\text{RCH}_2\text{OH}$ )	Ox
3,2-2,2	Benzylisch-gebundene, aliphatische Kohlenwasserstoffe ( $\text{PhCHR}_2$ , $\text{PhCH}_2\text{R}$ , $\text{PhCH}_3$ )	$A_4$
2,2-1,7	olefinisch-gebundene, aliphatische Kohlenwasserstoffe ( $\text{R}_2\text{C} = \text{CHCH}_2\text{R}$ )	$A_3$
1,7-1,1	Methylengruppen von Alkylketten ( $\text{RCH}_2\text{R}$ )	$A_2$
1,1-0,4	Methyl-Endgruppen ( $\text{RCH}_2\text{CH}_3$ )	$A_1$

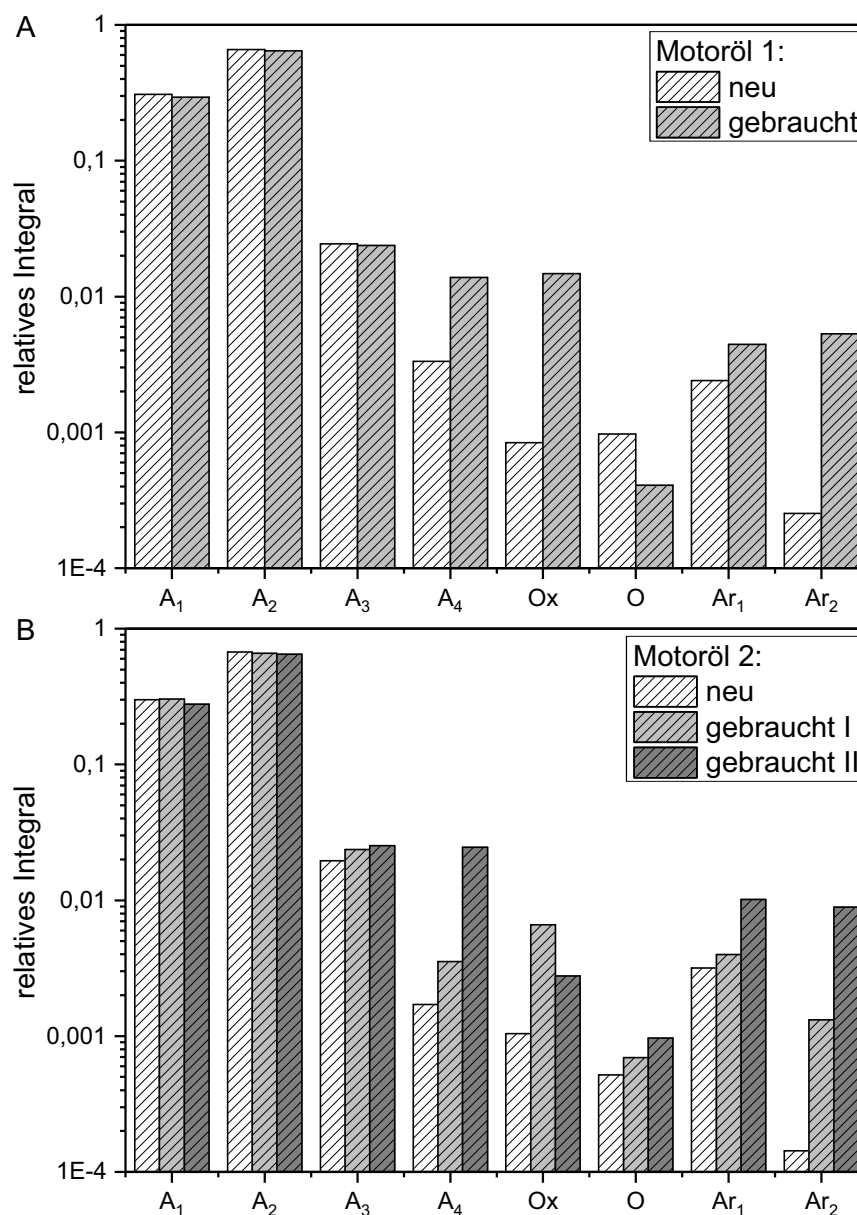
#### 4.5.2. Integrale der $^1\text{H}$ -1D-Spektren

In Abbildung 4.32 sind die Integralwerte der  $^1\text{H}$ -1D-Spektren der Motoröle für die in Tabelle 4.7 definierten Bereiche angegeben. Die relativen Integralwerte wurden für jedes Motoröl und die spezifizierten Bereiche einzeln bestimmt. Es wurde eine logarithmische

Auftragung gewählt. Die berechneten Werte zeigen Konzentrationsänderungen an, die sich im Verlauf der Alterung einstellen. Da das Integral direkt proportional zur Zahl der detektierten Protonen ist, kann der veränderliche Anteil der Substanzen abgeleitet werden. Die Integralwerte wurden auf das Integral des Protonen-Restsignals des zu 99,5 % deuterierten Lösungsmittels Chloroform normiert. Für beide untersuchten Motoröle wird der Alterungsprozess anhand der Zunahme von Carbonsäuren, Alkoholen und aromatischen Verbindungen deutlich. Der Vergleich der zwei Motor-Laufzeiten für Motoröl 2 zeigt einen entsprechend höheren Anstieg der erwähnten Substanzen für die längere Laufzeit. Bei Betrachtung der Integralwerte für den Bereich der olefinischen Kohlenwasserstoffketten fällt auf, dass der Wert für Motoröl 1, bei einem Vergleich des neuen und gebrauchten Öls, absinkt. Dagegen ist für Motoröl 2 ein kontinuierlicher Anstieg zu sehen. Tabelle 3.1 ist zu entnehmen, dass die Laufzeit für Motoröl 1 nicht bekannt ist, daher können keine aussagekräftigen Schlussfolgerungen aus den Beobachtungen getroffen werden. Wenn davon ausgegangen wird, dass Olefine als Zwischenstufe der Bildung aromatischer Verbindungen zu sehen sind, ist es allerdings vorstellbar, dass die Gesamtzahl der vorkommenden Olefine zunächst ansteigt, dann jedoch wieder abnimmt. Dieser Effekt könnte bei einer längeren Laufzeit auch bei Motoröl 2 auftreten.

#### 4.5.3. Linienbreiten, Diffusions- und Relaxationsmessungen

Abgesehen von der Integration der Spektren kann die Interpretation der Protonen-Spektren durch eine vergleichende Betrachtung der Linienbreite ergänzt werden. Für die gebrauchten Öle der beiden Proben ist jeweils eine Verbreiterung der Signale zu sehen. Für diese Beobachtung sind zwei unterschiedliche Erklärungen denkbar. Die Verbreiterung kann zum Einen durch Überlagerung vieler verschiedener Signale entstehen, die eine ähnliche chemische Verschiebung aufweisen. Zwar kann dabei die Linienbreite jedes einzelnen Signals klein sein, die Überlagerung führt jedoch dazu, dass letztlich ein breites Signal im Spektrum zu sehen ist. Diese Erklärung trifft sicherlich auf die Signale der  $\text{CH}_2$ -Gruppen und der terminalen  $\text{CH}_3$ -Gruppen zu. Für die Signale in den Bereichen  $\text{Ar}_1$  und  $\text{Ar}_2$ , oder auch Ox ist jedoch eine andere Begründung denkbar. Im Allgemeinen kommt es zu einer Linienverbreiterung, wenn die Molekülbewegung eingeschränkt ist, die Moleküle also beispielsweise nicht völlig frei rotieren können. Weiterhin liefern größere Moleküle mit einem höheren Molekulargewicht gewöhnlich breitere Signale im Spektrum. Auch paramagnetische und ferromagnetische Substanzen führen zu Signalverbreiterung. Gebrauchte Öle enthalten mechanischen Abrieb und Korrosionsrückstände, durch die sich alle Signale in gleicher Weise verbreitern. Um die Ursache der Linienverbreiterung genauer untersuchen zu können, wurden exemplarisch



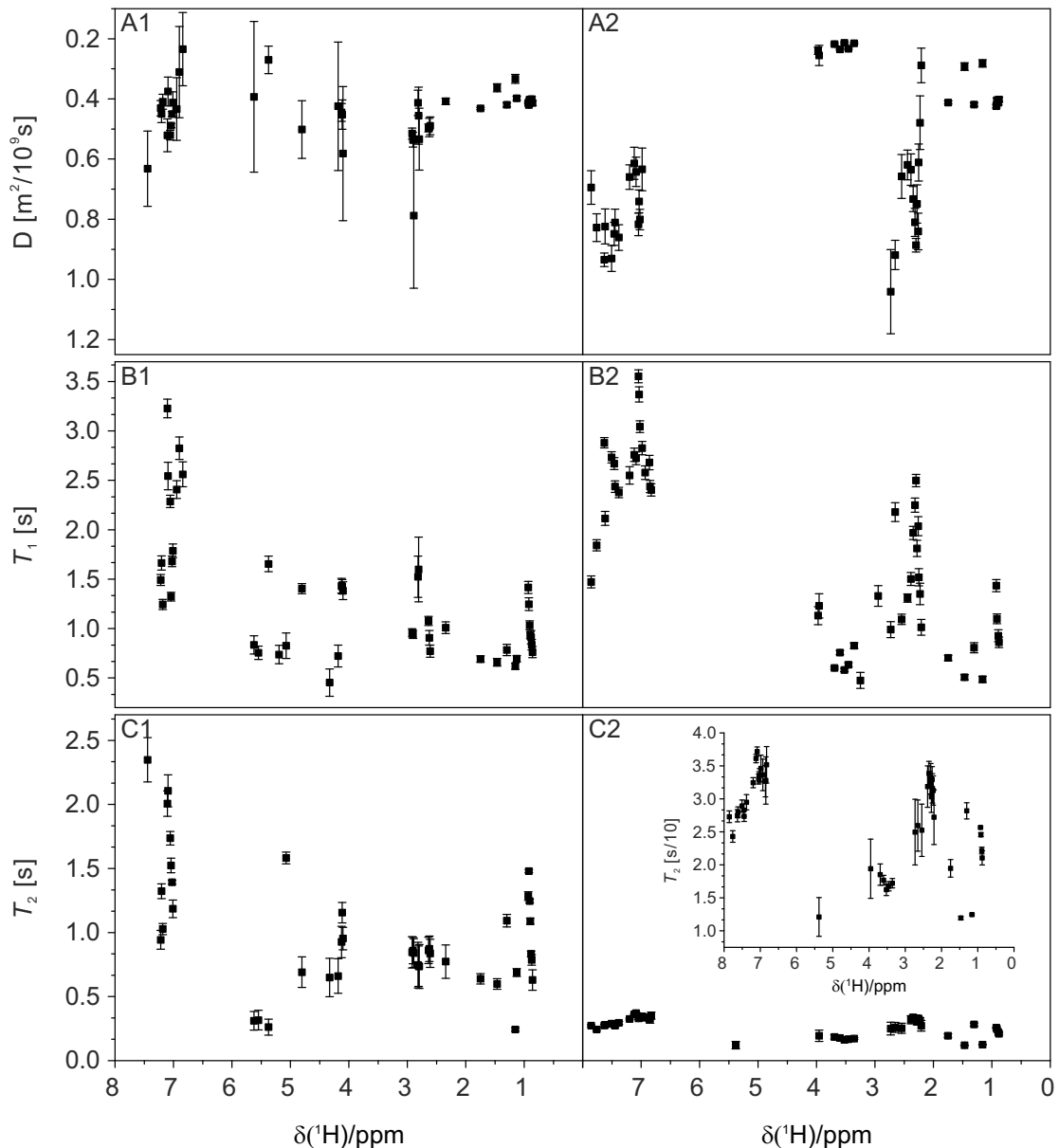
**Abbildung 4.32:** Integralwerte der  $^1\text{H}$ -Spektren der Motoröle für die in Tabelle 4.7 definierten Bereiche. Im Diagramm (A) sind die Werte des Motoröls 1 aufgetragen, in (B) die des Motoröls 2. Die Integralwerte wurden auf das  $\text{CHCl}_3$  Restsignal des Lösungsmittels normiert. Die Alterung der Motoröle wird vor allem anhand der Werte für die Bereiche A<sub>4</sub>, Ox, O, Ar<sub>1</sub> und Ar<sub>2</sub> deutlich. Die Abbildung ist der in [205] veröffentlichten nachempfunden, mit Genehmigung durch den Verleger American Chemical Society.

für Motoröl 1 Diffusions- und  $^1\text{H}$ -Relaxations-Messungen durchgeführt. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur aufgenommen. Die abgeleiteten Diffusions-Koeffizienten,  $T_1$ - und  $T_2$ -Zeiten des gebrauchten und des neuen Öls sind als Funktion der chemischen Verschiebung in Abbildung 4.33 dargestellt. Für die Signale unterhalb einer chemischen Verschiebung von 2 ppm sind beim Vergleich der Werte des neuen und des gebrauchten Öls keine großen Änderungen für die Diffusions-Koeffizienten zu verzeichnen, die Werte liegen im Bereich von ungefähr  $0,40 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ . Lediglich zwei Ausreißer sind zu erkennen. Die Signale des gebrauchten Öls mit der chemischen Verschiebung von 1,47 ppm und 1,16 ppm besitzen einen verminderten Diffusions-Koeffizienten von 0,29 beziehungsweise  $0,28 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ . Der zugehörige Fehler ist um eine Größenordnung kleiner. Ähnlich kleine Werte besitzen auch die oxidierten Verbindungen (Ox), die nur im gebrauchten Öl enthalten sind. Durch die Ausbildung von H-Brücken können Aggregate entstehen, durch die die verminderte Diffusion hervorgerufen wird. Für die spektralen Bereiche  $A_4$ ,  $Ar_1$  und  $Ar_2$  ist der Diffusionskoeffizient größer. Interessanterweise bedeutet das, dass die aromatischen Verbindungen offensichtlich nicht polyzyklisch sind. Stattdessen impliziert die gesteigerte Diffusion vielmehr eine Spaltung der *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons* (PAH). Diese Annahme wurde bereits durch Fluoreszenz-Emissions-Spektroskopie bestätigt [216].

Die Auswertung der  $T_1$ - und  $T_2$ -Zeiten bestätigt die Ergebnisse, die aus den Diffusions-Messungen abgeleitet wurden. Die Signale des gebrauchten Motoröls in den spektralen Bereichen  $A_4$ ,  $Ar_1$  und  $Ar_2$  besitzen die längsten  $T_2$ -Relaxationszeiten. Die thermische Bewegung der entsprechenden Moleküle ist schneller, die Moleküle sind also kleiner, das bedeutet, das Molekulargewicht ist geringer. Die Signale im Bereich der oxidierten Verbindungen (Ox) und im Bereich unterhalb einer chemischen Verschiebung von 2 ppm besitzen dagegen leicht herabgesetzte  $T_1$ - und  $T_2$ -Relaxationszeiten. Die thermische Bewegung der zugehörigen Moleküle ist langsamer, das Molekulargewicht also höher.

Wie aus der Auftragung der Relaxationszeiten in Abbildung 4.33 ersichtlich wird, sind die  $T_2$ -Relaxationszeiten der Signale des gebrauchten Öls deutlich kleiner als die korrespondierenden  $T_1$ -Zeiten. Diese Beobachtung gilt gleichermaßen für alle  $^1\text{H}$ -Signale, unabhängig, zu welchem spektralen Bereich die Signale zuzuordnen sind. Die Ursache des Effekts könnten Korrosionsrückstände oder mechanischer Abrieb sein, die paramagnetische und ferromagnetische Substanzen enthalten und die trotz Filtration des gebrauchten Öls nach wie vor vorhanden sind.





**Abbildung 4.33:** Diffusionskoeffizienten (A),  $T_1$ - (B) und  $T_2$ -Zeiten (C) für Motoröl 1. Der jeweilige Fehler, der aus der Anpassung der zugehörigen Funktion (siehe Kapitel 3.4) an die Messwerte abgeleitet wird, ist ebenfalls dargestellt. Die größten Fehlerbalken entstehen durch ein schlechtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis der entsprechenden Signale. Links (1) sind die Werte des neuen Motoröls gegen die chemische Verschiebung der Protonen aufgetragen, rechts (2) die des gebrauchten Öls. Für die Werte der  $T_2$ -Zeiten (C2) ist zusätzlich eine vergrößerte Darstellung gezeigt. Die Abbildung ist der in [205] veröffentlichten nachempfunden, mit Genehmigung durch den Verleger American Chemical Society.

#### 4.5.4. $^{13}\text{C}$ -1D-Spektren der Motoröle

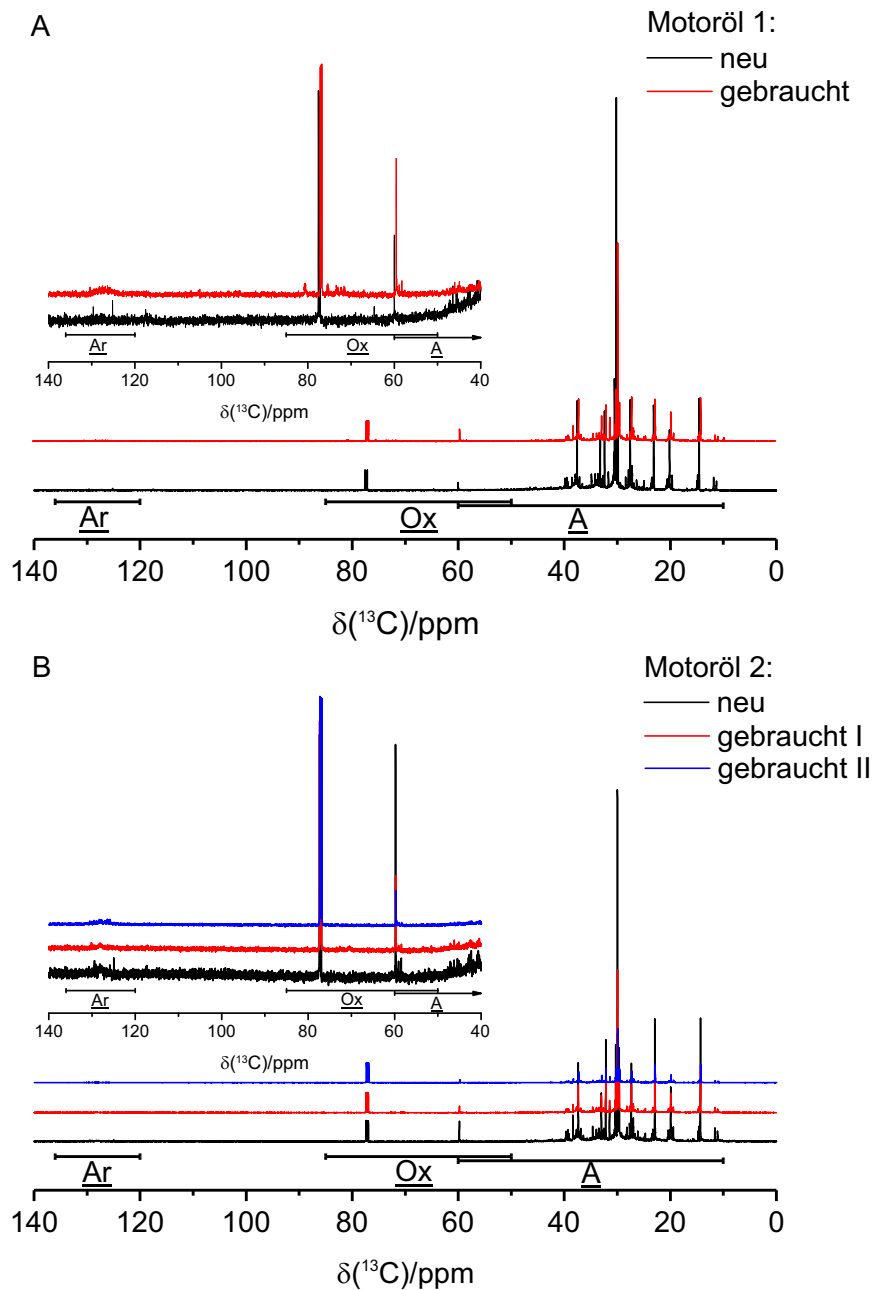
In Abbildung 4.34 sind die  $^{13}\text{C}$ -Spektren der Motoröle dargestellt. Grundsätzlich erstrecken sich die  $^{13}\text{C}$ -Signale organischer Verbindungen über einen größeren Bereich von etwa 250 ppm, während der Bereich für  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren nur etwa 10 ppm beträgt. Trotz der geringen natürlichen Häufigkeit des NMR-aktiven  $^{13}\text{C}$ -Isotops von nur ungefähr 1,1 % eignen sich die Proben der Motoröle zur Aufnahme von  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren, da vor allem die Konzentration der Hauptkomponenten der Öle sehr hoch ist. Die Abbildung enthält zusätzlich Detailansichten, die eine genauere Betrachtung der Spektren ermöglichen. In Tabelle 4.8 sind einige Verbindungen gezeigt, die anhand der Spektren zugeordnet werden konnten. Die Tabelle erklärt außerdem die Verwendung der Abkürzungen für die unterschiedlichen spektralen Bereiche. Die  $^{13}\text{C}$ -Spektren unterstreichen die Beobachtungen, die durch die Interpretation der  $^1\text{H}$ -Spektren gewonnen werden konnten. Beim Vergleich der  $^{13}\text{C}$ -Spektren des neuen mit denen des gebrauchten Öls können Änderungen vor allem in den Bereichen Ar und Ox festgestellt werden.

**Tabelle 4.8:** Identifikation einzelner Verbindungen anhand der  $^{13}\text{C}$ -Spektren der Motoröle. Die Tabelle gibt Aufschluss über die in der Abbildung 4.34 verwendeten Abkürzungen, die die spektralen Bereiche kennzeichnen.

spektraler Bereich [ppm]	Verbindungen	Abkürzung
136-120	Phenole, PAHs, heterozyklische aromatische Verbindungen, Olefine (substituierte) aromatische Verbindungen	<u>Ar</u>
85-50	Sauerstoffhaltige Kohlenwasserstoffe (Alkohole, Ether und Ester) ( $\text{R}_3\text{COH}$ , $\text{R}_3\text{COR}$ , $(\text{CO})\text{OCR}_3$ )	<u>Ox</u>
60-10	aliphatische Kohlenwasserstoffe	<u>A</u>

#### 4.5.5. Zweidimensionale Spektren der Motoröle

Um die Interpretationen, die durch die Aufnahme der  $^1\text{H}$ -1D-Spektren und der  $^{13}\text{C}$ -Spektren erhalten wurden, zu bekräftigen, wurden ergänzend 2D-NMR-Experimente durchgeführt. 2D-Spektren zeigen Korrelationen zwischen Kernen. Dadurch können benachbarte Atome identifiziert werden, wodurch detaillierte Informationen über die verschiedenen funktionellen Gruppen und die chemische Umgebung einer Verbindung erhalten werden [88, 217]. In Abbildung 4.35 sind die 2D-Spektren von Motoröl 1 gezeigt. Die zugehörigen

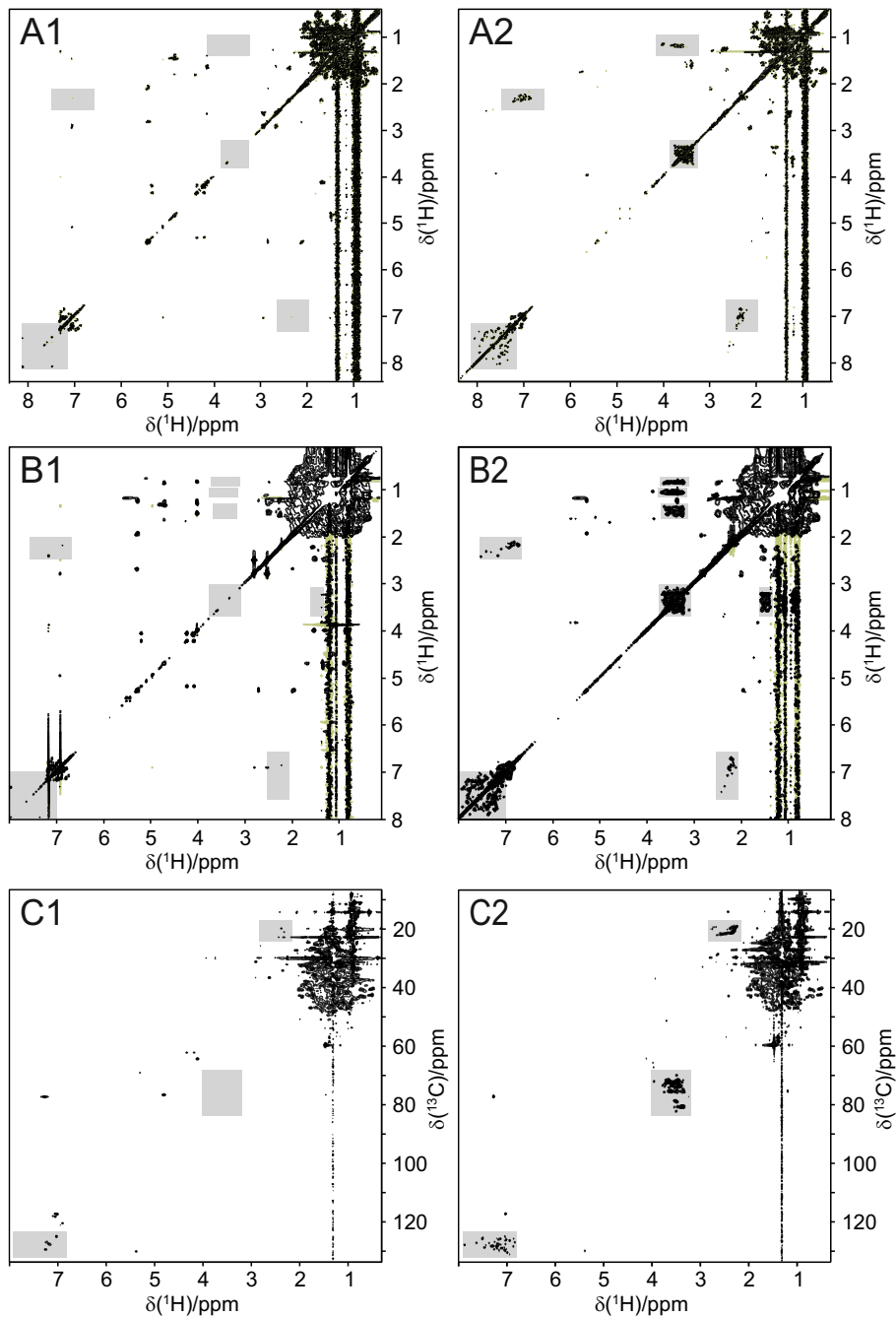


**Abbildung 4.34:** Vergleich der  $^{13}\text{C}$ -Spektren der Motoröle. In (A) sind die  $^{13}\text{C}$ -Spektren des ungebrauchten Motoröls 1 (schwarz) und des gebrauchten Motoröls 1 (rot) dargestellt. (B) zeigt den Vergleich des  $^{13}\text{C}$ -Spektrums des ungebrauchten Motoröls 2 (schwarz) und der  $^{13}\text{C}$ -Spektren des Öls mit einer Motor-Laufzeit von 20 000 km (rot) und 30 000 km (blau). Die Spektren sind in einer gestaffelten Anordnung dargestellt. Die Akquisitionsparameter können Kapitel 3.4 entnommen werden. Die Abbildungen enthalten zusätzlich eine Einteilung der spektralen Bereiche. Die Entsprechung der Abkürzungen ist in Tabelle 4.8 aufgeführt, zur Unterscheidung der Einteilung der  $^1\text{H}$ -Spektren sind die Abkürzungen unterstrichen. Die Detailansichten erlauben eine genauere Betrachtung der Spektren. Die Abbildung ist der in [205] veröffentlichten nachempfunden, mit Genehmigung durch den Verleger American Chemical Society.

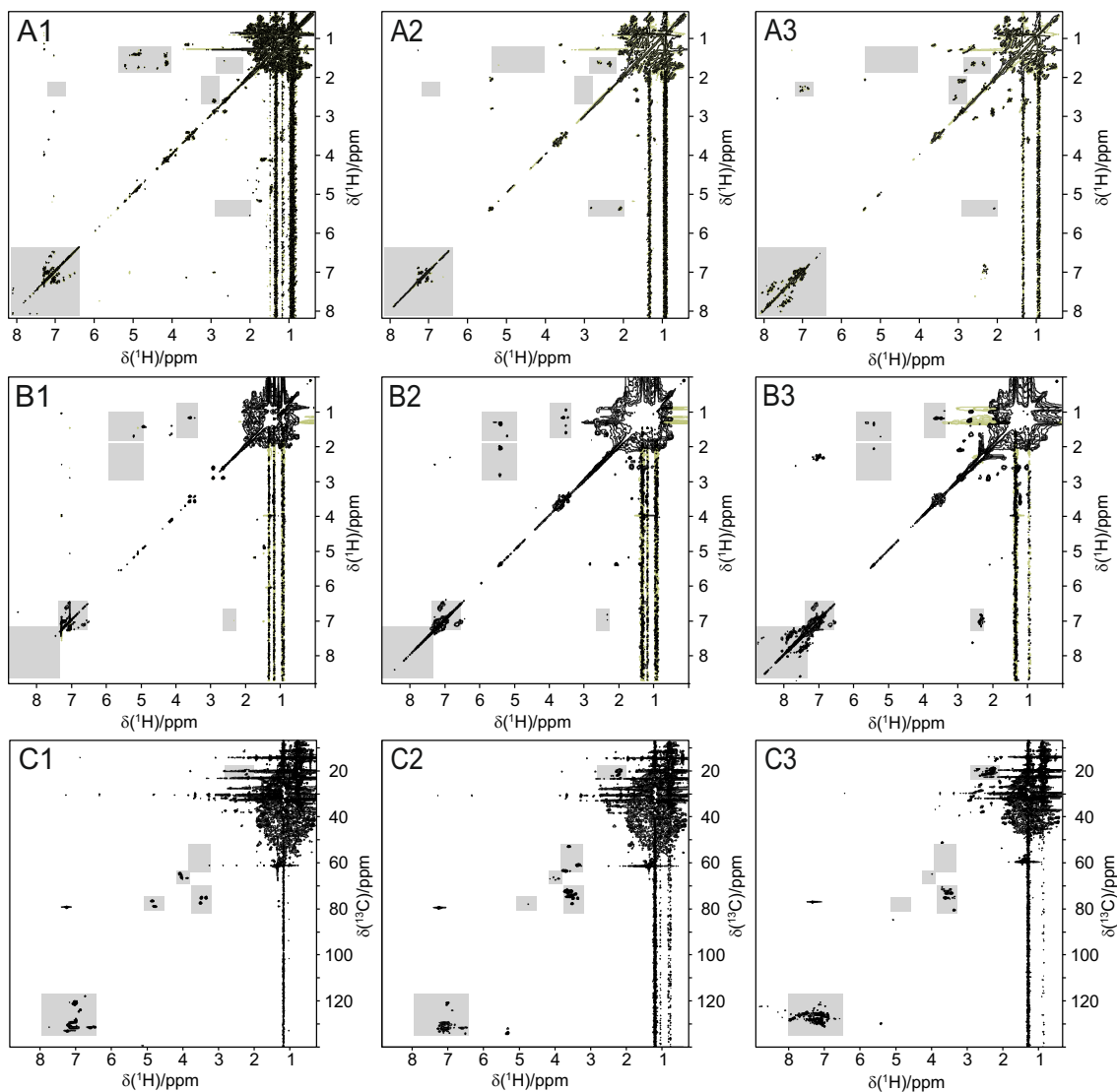
Protonen-1D-Spektren sind in Abbildung 4.31A dargestellt, die  $^{13}\text{C}$ -Spektren in Abbildung 4.34A. Abbildung 4.36 enthält die 2D-Spektren für Motoröl 2, die 1D-Spektren sind in Abbildung 4.31B und 4.34B dargestellt. In einem COSY-Spektrum sind Korrelationen kovalent gebundener, direkt benachbarter Protonen sichtbar. In den TOCSY-Spektren (Abbildung 4.35 B1 und B2 und Abbildung 4.36 B1, B2 und B3) werden die Kreuzsignale durch Protonen hervorgerufen, die Teil eines koppelnden Protonen-Netzwerkes sind. Es sind Korrelationen aller über  $^nJ_{\text{HH}}$ -Kopplungen verbundener Protonen sichtbar. Beide Experimente sind hilfreich, um das Substanzgemisch zu charakterisieren. Die Diagonalsignale beider 2D-Spektren entsprechen jeweils dem Protonen-1D-Spektrum.

Auffällig sind zunächst einmal die Korrelationen zwischen den Protonen der  $\text{CH}_2$ - und  $\text{CH}_3$ -Gruppen. Die Gruppen sind direkt benachbart, so dass die Intensität der Kreuzsignale in beiden Spektren relativ hoch ist. Die Kreuzsignale zwischen den Protonen im aromatischen Bereich und den Protonen der alkoholischen Verbindungen und der Ester-Gruppen sind dagegen interessanter. Einzelne, klar voneinander getrennte Signale mit hoher Intensität sind in den Spektren der neuen Öle, nicht aber in den Spektren der gebrauchten Öle zu sehen. Für die neuen Öle sind die Signale der aromatischen Verbindungen im Bereich  $\text{Ar}_2$  konzentriert. Dagegen sind die Signale in den Spektren der gebrauchten Öle über die beiden Bereiche  $\text{Ar}_1$  und  $\text{Ar}_2$  zwischen 6,7 ppm und 8,7 ppm verteilt. Kreuzsignale, die durch Kopplungen der aromatischen ( $\text{Ar}_1$ ,  $\text{Ar}_2$ ) mit aliphatischen Protonen ( $\text{A}_4$ ) entstehen, sind nahezu ausschließlich in den Spektren der gebrauchten Öle zu beobachten. Diese Korrelationen sind auf vielfach substituierte, kleine aromatische Moleküle zurückzuführen. Die Interpretation dieser Kreuzsignale unterstreicht die Untersuchung der Diffusions-Messungen. In den TOCSY-Spektren sind desweiteren Korrelationen zwischen den Protonen der oxidierten Verbindungen (Ox) und den Protonen der aliphatischen Verbindungen ( $\text{A}_1$ ,  $\text{A}_2$ ) sichtbar. Die Kreuzsignale sind auf sauerstoffhaltige Kohlenwasserstoffketten zurückzuführen, die im Zuge der Alterung der Öle entstehen. Interessanterweise sind keine Korrelationen dieser Signale mit den Signalen im aromatischen Bereich zu beobachten.

Die  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektren (Abbildung 4.35 C1 und C2 für Motoröl 1 und Abbildung 4.36 C1 bis C3 für Motoröl 2) zeigen Korrelationen zwischen Protonen und direkt benachbarten, kovalent gebundenen  $^{13}\text{C}$ -Kernen. Die zahlreichen, intensiven Signale mit einer chemischen Verschiebung unterhalb 2 ppm ( $^1\text{H}$ ) und 50 ppm ( $^{13}\text{C}$ ) sind den aliphatischen Verbindungen zuzuordnen. Sie liegen dicht beieinander und sind daher einzeln nicht aufzulösen. In den  $^1\text{H}$ -Bereichen Ox und O, beziehungsweise den entsprechenden  $^{13}\text{C}$ -Bereichen Ox und A mit einer chemischen Verschiebung größer als 50 ppm sind in den Spektren der neuen Motoröle einzelne,



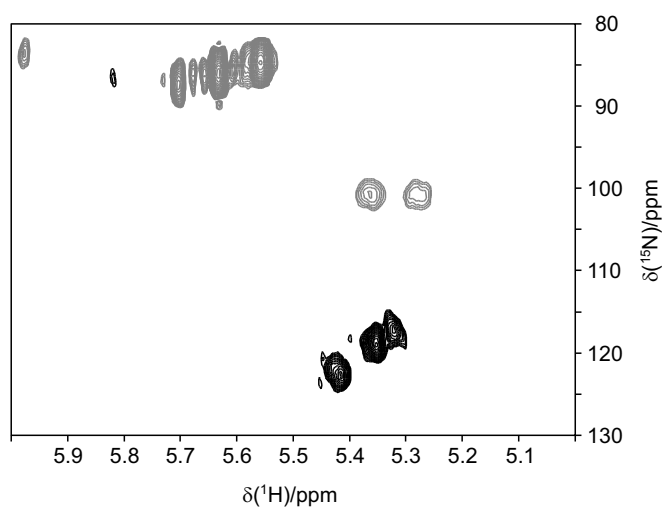
**Abbildung 4.35:** 2D-Spektren des Motoröls 1. In (A1) und (A2) sind die  $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY-Spektren, in (B1) und (B2) die  $^1\text{H},^1\text{H}$ -TOCSY-Spektren gezeigt. Mit dem Index 1 sind die Spektren des ungebrauchten Motoröls, mit dem Index 2 die des gebrauchten Motoröls gekennzeichnet. Die Diagonalsignale entsprechen den  $^1\text{H}$ -1D-Spektren. Die Kreuzsignale zeigen die Korrelationen der skalar gekoppelten Protonen. In (C1) und (C2) sind die  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektren dargestellt. Jedes Signal gibt eine heteronukleare Korrelation eines direkt gebundenen  $^1\text{H}$ - mit einem  $^{13}\text{C}$ -Atom wieder. Beim Vergleich des neuen Motoröls mit dem gebrauchten sind für die grau hervorgehobenen Signalbereiche deutliche Unterschiede zu erkennen. Die Abbildung ist der in [205] veröffentlichten nachempfunden, mit Genehmigung durch den Verleger American Chemical Society.



**Abbildung 4.36:** 2D-Spektren des Motoröls 2. In (A1) bis (A3) sind die  $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY-Spektren, in (B1) bis (B3) die  $^1\text{H},^1\text{H}$ -TOCSY-Spektren gezeigt. In (C1) bis (C3) sind die  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektren dargestellt. Mit dem Index 1 sind die Spektren des ungebrauchten Motoröls, mit dem Index 2 und 3 die des gebrauchten Motoröls mit einer Motor-Laufzeit von 20 000 km und 30 000 km gekennzeichnet. Beim Vergleich des neuen Motoröls mit dem gebrauchten sind für die grau hervorgehobenen Spektrenbereiche deutliche Unterschiede zu erkennen. Die Abbildung ist der in [205] veröffentlichten nachempfunden, mit Genehmigung durch den Verleger American Chemical Society.

isolierte Signale zu sehen. Sie sind auf Ölzusätze und Olefine zurückzuführen. Im Bereich der oxidierten Verbindungen ( $\text{Ox} (^1\text{H})$ ,  $\text{Ox} (^{13}\text{C})$ ) ist eine Zunahme der absoluten Anzahl der Signale festzustellen. Diese Beobachtung bestätigt die bisherigen Untersuchungen. Auch die Aufteilung der Signale der aromatischen Verbindungen auf einen größeren spektralen Bereich ist erneut zu sehen.

Zukünftige Untersuchungen der Spektren der Motoröle könnten durch die Verwendung von Referenzsubstanzen ergänzt werden, um einzelne Verbindungen zu identifizieren. Dafür eignen sich besonders die  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektren. Die Zielsetzung dieser Untersuchung war jedoch eine grundlegende Charakterisierung der Motoröle und der Änderungen, die im Zuge der Alterung auftreten.



**Abbildung 4.37:** Vergleich der  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren des neuen (grau) und des gebrauchten (schwarz) Motoröls 1. Die Signale im Spektrum des neuen Motoröls mit einer chemischen Verschiebung von 5,2 ppm-6,0 ppm ( $^1\text{H}$ ) und 80 ppm-100 ppm ( $^{15}\text{N}$ ) weisen darauf hin, dass Arylamine enthalten sind. Die Spektren sind mit einer unterschiedlichen Anzahl Konturlinien dargestellt. Die Abbildung ist der in [205] veröffentlichten nachempfunden, mit Genehmigung durch den Verleger American Chemical Society.

In Abbildung 4.37 sind Ausschnitte der  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren des neuen (grau) und des gebrauchten (schwarz) Motoröls 1 dargestellt. Die Spektren zeigen Korrelationen zwischen Protonen und direkt benachbarten, kovalent gebundenen  $^{15}\text{N}$ -Kernen von beispielsweise Amid- oder Amino-Gruppen. Die Experimente besitzen eine vergleichsweise geringe Empfindlichkeit, da die natürliche Häufigkeit des NMR-aktiven Isotops  $^{15}\text{N}$  nur 0,37 % beträgt. Zusätzlich ist der Gehalt der Protonen-gebundenen Stickstoffatome in Motorölen gering, es treten also nur wenige  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -Signale im Spektrum auf. Dennoch waren die Spektren für Motoröl 1 sehr aufschlussreich. Das Spektrum des neuen Öls besitzt einige Kreuzsignale im

Bereich 5,2 ppm bis 6,0 ppm ( $^1\text{H}$ ), beziehungsweise 80 ppm bis 100 ppm ( $^{15}\text{N}$ ). Die Signale sind Arylaminen zuzuordnen. Im  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -Spektrum des gebrauchten Motoröls sind nur einige intensitätsschwache Signale mit einer chemischen Verschiebung von 5,35 ppm ( $^1\text{H}$ ) und 120 ppm ( $^{15}\text{N}$ ) zu sehen. Arylamine wurden also im Zuge der Alterung chemisch verändert. Für die Zuordnung der Signale des gebrauchten Öls lassen sich nur vage Aussagen treffen, da die Werte der chemischen Verschiebung zu vielen Verbindungen, wie zum Beispiel Enaminen, Amiden, Sulfonamiden, Harnstoff, etc., passen.

Es wurde die Anwendung der NMR-Spektroskopie zur Untersuchung der Alterung von Motorölen gezeigt. Die verwendeten Methoden umfassen  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -1D-Experimente, sowie 2D-Experimente und Relaxations- und Diffusions-Messungen. Ausgehend von ersten Interpretationen der 1D-Spektren, konnten die Beobachtungen durch die 2D-Experimente und die Diffusions- und Relaxations-Messungen bekräftigt werden. Aus der Verwendung eines Motoröls mit zwei unterschiedlichen Motor-Laufzeit lässt sich zusammenfassend ableiten, dass die Motor-Laufzeit die Ölalterung beeinflusst. Es entstehen Alkohole, aromatische Verbindungen und Carbonsäuren, während Ester und Ether abgebaut werden. Anhand der Diffusions-Koeffizienten konnten Aussagen zur Moleküldynamik getroffen werden. Durch Integration der Protonen-Spektren konnten die Substanzen identifiziert werden, die im Zuge der Alterung entstehen, beziehungsweise verbraucht werden.



# Zusammenfassung

Durch die vielfältige Anwendbarkeit zählt die NMR-Spektroskopie zu einer der wichtigsten Methoden der modernen Analytik. Bereits eindimensionale Spektren liefern wichtige Informationen über untersuchte Moleküle. Noch wertvoller sind die aus zweidimensionalen Experimenten abgeleiteten Informationen, die die spezifische Korrelation von Kernen zueinander beinhalten. Eine Reihe von Experimenten gehört heute daher zum Standard bei der Untersuchung von Molekülstrukturen, wobei eines der wichtigsten Experimente in diesem Zusammenhang das HSQC-Experiment (*Heteronuclear Single-Quantum Coherence spectroscopy*) ist, bei dem direkt gebundene Heterokerne korrelieren.

Das zentrale Thema der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung praktisch einsetzbarer, schneller Varianten des HSQC-Experiments. Die neuartigen Experimente basieren auf der höchst effizienten, bereits anwendbaren ASAP-Technik (*Acceleration by Sharing Adjacent Polarization*), veröffentlicht von Kupče et al. [90], die hier mit dem HSQC-Experiment kombiniert wurde. Ein spezielles Gradienten- und Pulsschema ermöglicht die Speicherung der  $^{12}\text{C}$ -gebundenen Protonenmagnetisierung entlang dem angelegten, statischen Magnetfeld. Durch Verwendung einer Mischsequenz an Stelle des üblichen Erholungs-*delays* kann die  $z$ -Polarisation auf die detektierten  $^{13}\text{C}$ -gebundenen Protonen übertragen werden. Die Gesamtexperimentdauer ist dadurch erheblich verkürzt. Zusätzlich wurde das Signal-zu-Rausch-Verhältnis durch die Verwendung der Ernst-Winkel-Anregung gesteigert. Durch den Einsatz von geformten Pulsen, die aus der optimalen Steuerungstheorie (OCT) abgeleitet wurden, ergaben sich schließlich vollständige, nahezu artefaktfreie  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren. Als zweite Experimentklasse der hier beschriebenen schnellen Methoden wurde ebenfalls das ALSOFASST-HMQC (*Alternate SOFAST*) auf das HSQC übertragen. Ausgehend von den anfänglichen ASAP- und ALSOFASST-Pulssequenzen wurde eine symmetrisierte Sequenz entwickelt. Die neue Sequenz erhöht die Spektrenqualität. Durch zusätzliche Verwendung von *Non Uniform Sampling* (NUS), eine Technik zur Reduktion der Experimentzeit mehrdimensionaler NMR-Experimente, konnten die Aufnahmen weiter beschleunigt werden. Auf diese Weise war es schließlich möglich, in weniger als 2 Sekunden ein vollständiges  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektrum einer 500 mM/ $\text{CDCl}_3$  Menthol-

Probe aufzunehmen. Um den erzielten Erfolg zu verifizieren, wurden verschiedene Vergleiche mit dem konventionellen HSQC-Experiment gezeigt. Das ASAP-HSQC wurde ebenfalls eingehend mit dem ASAP-HMQC verglichen. Es zeigte sich, dass durch die intrinsisch bessere Auflösung des HSQC die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Konfiguration von Maltose auch in unübersichtlichen Spektrenbereichen unterschieden werden kann, was im HMQC-Spektrum mit gleicher digitaler Auflösung und gleicher Experimentdauer nicht der Fall ist. Bei Maltose unter Verwendung des ASAP/ALSOFAST-Experiments in Kombination mit NUS, *linear prediction* und *zero filling* war es schließlich möglich, ein HSQC-Spektrum mit einer digitalen Auflösung von unter 1 Hz in der  $^{13}\text{C}$ -Dimension in weniger als 10 min aufzunehmen. Mit konventioneller Aufnahmetechnik dauert die Messung des entsprechenden Spektrums etwa 18 Stunden. Weiterhin wurde anhand einer 10 mM/D<sub>2</sub>O Saccharose-Probe demonstriert, dass die ASAP/ALSOFAST-Experimente auch für die Untersuchung von Proben mit relativ geringer Konzentration verwendet werden können. So konnte ein vollständiges  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektrum mit gutem Signal-zu-Rausch-Verhältnis in 2,9 Sekunden aufgenommen werden.

Aufgrund des großen Potentials des ASAP- und ALSOFAST-HSQC dienten die Sequenzen als Grundlage für die Entwicklung weiterführender Experimente, dem CLIP-ASAP/ALSOFAST-HSQC (*Clean Inphase*), dem ASAP-HSQC-TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*) und deren Inphase/Antiphase (IP/AP)-Varianten und schnellen HSQMBC-Experimenten. Das CLIP-ASAP/ALSOFAST-HSQC ermöglicht die schnelle Aufnahme  $\omega_2$ -gekoppelter  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren zur Messung von heteronuklearen Kopplungen über eine Bindung. Durch Kombination des ASAP-HSQC mit dem CLIP-Ansatz ist die Phase der Signale nicht durch zurückbleibende Antiphase-Anteile verzerrt. Die Kopplungskonstanten können mit hoher Genauigkeit aus den akkuraten Dubletts extrahiert werden. Das beschleunigte Experiment ermöglicht zunächst die Aufnahme der Spektren in weniger als 30 Sekunden. An einer isotropen 500 mM/CDCl<sub>3</sub> Menthol-Probe wurde die Exaktheit der Kopplungsbestimmung demonstriert und mit dem etablierten CLIP-HSQC verglichen. Weiterhin wurde die Anwendung des CLIP-ASAP/ALSOFAST-HSQC zur Messung von dipolaren Restkopplungen (RDCs) gezeigt. Diese wertvollen Strukturparameter können durch die Verwendung partiell orientierter Proben erhalten werden und sind besonders nützlich, um entfernte Strukturelemente des untersuchten Moleküls in Relation zueinander zu setzen. Die Anwendbarkeit wurde an Saccharose, gelöst in einem gestreckten PEODA/D<sub>2</sub>O-Gel mit schwacher Orientierung, und einem substituierten Pyrrolidin, gelöst in flüssigkristallinem PBLG/CDCl<sub>3</sub> mit deutlich stärkerer Orientierung, demonstriert. Die Bestimmung der

Kopplungen wurde dabei durch Vergleiche mit konventionell aufgenommenen Spektren verifiziert. Es zeigte sich, dass partiell orientierte Proben andere Kohärenztransfer-Eigenschaften besitzen und das Experiment durch Verwendung einer anderen Mischsequenz signifikant verbessert werden konnte. Die symmetrisierte Version der Sequenz unter Verwendung der MOCCA-XY16-Mischsequenz wurde zur Aufnahme schließlich mit NUS kombiniert, und ermöglichte so die Bestimmung der RDCs der partiell orientierten 100 mM/D<sub>2</sub>O Saccharose Gel-Probe aus dem Spektrum in weniger als 10 Sekunden.

In der neu entwickelten ASAP-HSQC-TOCSY-Sequenz wird die Mischsequenz vor die Akquisition des FID verschoben. Das Verteilen des Polarisationsreservoirs innerhalb des Spinsystems findet also bereits gleichzeitig mit dem TOCSY-Transfer statt und erlaubt die Aufnahme vieler *scans* nahezu ohne Unterbrechung. Das 2D-Spektrum zeigt <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-Korrelationen für das gesamte Spinsystem. Mit dem schnellen Experiment ist es gelungen, in kürzester Zeit vollständige, aussagekräftige <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HSQC-TOCSY-Spektren einer 500 mM/CDCl<sub>3</sub> Menthol-Probe aufzunehmen. Die Experimentzeit betrug 30 Sekunden, sie liegt damit im Bereich kurzer eindimensionaler Protonen-Experimente. Auch hochaufgelöste <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HSQC-TOCSY-Spektren können in einem angemessenen Zeitrahmen erhalten werden. Das Beispiel eines hochaufgelösten Spektrums, das in weniger als einer Stunde aufgenommen wurde, zeigt die Anwendung des Experiments zur Unterscheidung der beiden Spinsysteme der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glucose. Wenn keine Entkopplungssequenz während der Akquisition des FID angewandt wird, können die hochaufgelösten Spektren auch zur Messung weitreichender heteronuklearer Kopplungen ( ${}^nJ_{\text{CH}}$ ) verwendet werden. Zur Bestimmung der  ${}^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungen wurde die Sequenz zur Aufnahme des Inphase-Spektrums (IP) durch eine zweite ergänzt, mit der ein Antiphase-Spektrum (AP) aufgenommen wird. Die entwickelten ASAP-HSQC-TOCSY-IPAP-Experimente ermöglichen es, zwei komplementäre Datensätze aufzunehmen, das  $\alpha$ - und das  $\beta$ -Teilspektrum. Aus deren Kombination können die  ${}^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungen vorzeichenempfindlich extrahiert werden.

Weitere Experimente, die zur Bestimmung von  ${}^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungen genutzt werden, sind das HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation spectroscopy*) und das HSQMBC (*Heteronuclear Single Quantum Multiple Bond Correlation spectroscopy*). Diese sind optimierte Varianten von HMQC und HSQC zur Messung weitreichender Kopplungen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein schnelles HSQMBC-Experiment entwickelt, das zur beschleunigten Aufnahme von <sup>13</sup>C-Messungen verwendet werden kann. <sup>13</sup>C-Projektionen verschiedener HMBC und HSQMBC-Experimente können somit als Alternative zu <sup>13</sup>C-1D-Spektren genutzt werden. Die Spektren enthalten allerdings zusätzlich die <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-Korrelationsinformation

des 2Ds. Quartäre Kohlenstoffatome mit weitreichenden Kopplungen zu mindestens einem Proton sind in den Projektionen ebenfalls sichtbar, da der Magnetisierungstransfer durch die  ${}^n J_{\text{CH}}$ -Kopplungen vermittelt wird. Ausgehend vom ASAP-HSQC konnte ein schnelles HSQMBC entwickelt werden. Die  ${}^{13}\text{C}$ -Projektion des in 2 min und 2 s aufgenommenen 2D-Spektrums einer 300 mM/ $\text{CDCl}_3$  Coffein-Probe zeigt eine deutlich gesteigerte Signalintensität für die quartären Kohlenstoffatome gegenüber einem  ${}^{13}\text{C}$ -1D-Experiment mit gleicher Messzeit. Der Vergleich zeigt, dass die  ${}^{13}\text{C}$ -Projektion des schnellen 2D-Experiments eine Alternative zu einem  ${}^{13}\text{C}$ -1D-Spektrum ist.

Im letzten Kapitel der Arbeit wurde die Anwendbarkeit der NMR-Spektroskopie zur Untersuchung der Ölalterung verschiedener Motoröle gezeigt. Ausgehend von ersten Interpretationen der aufgenommenen 1D-Spektren konnten die Beobachtungen durch 2D-Experimente und Diffusions-, sowie Relaxationsmessungen bekräftigt werden. Dadurch war es möglich, die Ölalterung nachzuvollziehen. Die Untersuchung zeigt die Anwendbarkeit der NMR-Methoden für solche komplexe Fragestellungen. Sie ergänzt damit andere Analyseverfahren.

Im Ergebnis wurden in der vorliegenden Arbeit schnelle Experimente zur erheblich beschleunigten Messung zweidimensionaler Spektren entwickelt. Sie ermöglichen eine deutliche Erhöhung des Probendurchsatzes im NMR-Service. Durch effiziente Nutzung der kostenintensiven Spektrometerzeit wird die größtmögliche Wirtschaftlichkeit des Betriebs der Spektrometer gewährleistet. Die neuartigen, schnellen Experimente besitzen breite Anwendungsmöglichkeiten. So können sie zukünftig für das 2D-Monitoring chemischer Reaktionen verwendet werden. Die reduzierte Messzeit ermöglicht in der NMR-Routine jede Probe aufzunehmen. Dies bietet mehr Sicherheit bei der Spektreninterpretation und damit eine höhere Verlässlichkeit der Ergebnisse. Die entwickelten Experimente haben durch die stark reduzierte, minimale Experimentzeit das Potenzial auch Messungen in Metabolomics-Studien und der Qualitätskontrolle enorm zu beschleunigen, zwei Bereiche, in denen die NMR-Spektroskopie immer wichtiger wird.

Die größte Einschränkung der neu entwickelten Sequenzen stellt die eingetragene Leistung dar. Potenziell kann es zu Schädigung des Probenkopfes kommen, da die Spektrometer-Hardware am physikalischen Limit betrieben wird. Die bisherige volle Leistungseinstrahlung stellte für den zur Messung verwendeten Kryoprobenkopf kein Problem dar, sollte jedoch für konventionelle Raumtemperatur-Probenköpfe eingehend betrachtet werden. Zukünftig kann die Leistungseintragung durch speziell entwickelte Pulssequenzbausteine vermindert werden. Die Verwendung der in der Arbeitsgruppe kürzlich entwickelten *Broadband Cooperative Decoupling* (BROCODE)-Sequenz ist eine vielversprechende Optimierung, die

den Leistungseintrag der heteronuklearen Entkopplung gegenüber der bisherig verwendeten Entkopplungssequenz um den Faktor 5 reduzieren sollte. Weitere Entwicklungen sind Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten.



# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1	Schema eines 2D-Experiments . . . . .	6
Abbildung 2.2	<i>Inversion-Recovery</i> -Experiment . . . . .	8
Abbildung 2.3	Verlauf der Signalintensität beim <i>Inversion-Recovery</i> -Experiment . . . . .	8
Abbildung 2.4	CPMG-Sequenz . . . . .	10
Abbildung 2.5	Darstellung der dipolaren Kopplung . . . . .	12
Abbildung 2.6	Schema eines COSY-Experiments . . . . .	15
Abbildung 2.7	INEPT . . . . .	18
Abbildung 2.8	Pulssequenz des $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMQC . . . . .	19
Abbildung 2.9	Prinzip des HMBC . . . . .	21
Abbildung 2.10	HMBC-Pulssequenz . . . . .	22
Abbildung 2.11	HSQMBC-Pulssequenz . . . . .	23
Abbildung 2.12	HSQC-TOCSY-Pulssequenz . . . . .	24
Abbildung 2.13	MOCCA-XY16-Baustein . . . . .	31
Abbildung 3.1	Signalzuordnung für Menthol . . . . .	35
Abbildung 3.2	Signalzuordnung für Maltose . . . . .	36
Abbildung 3.3	Signalzuordnung für Saccharose . . . . .	36
Abbildung 3.4	Signalzuordnung für Coffein . . . . .	37
Abbildung 3.5	Signalzuordnung für Glucose . . . . .	37
Abbildung 3.6	Routine der Kopplungskonstantenbestimmung . . . . .	39
Abbildung 3.7	Kopplungskonstantenbestimmung für ASAP-HSQC-TOCSY-IPAP- Experimente . . . . .	40
Abbildung 3.8	Konventionelle HSQC-Experimente . . . . .	50
Abbildung 3.9	ASAP-HMQC-Experiment mit geformten Pulsen . . . . .	51
Abbildung 3.10	Konventionelles HSQC-Experiment mit geformten Pulsen . . . . .	52
Abbildung 3.11	HSQC-TOCSY-IPAP-Experimente . . . . .	53
Abbildung 3.12	$^{13}\text{C}$ -1D-Experiment . . . . .	54
Abbildung 3.13	IMPACT-HMBC . . . . .	55

Abbildung 4.1	Originales ASAP-HSQC-Experiment mit Rechteckpulsen . . . . .	58
Abbildung 4.2	Originales ASAP-HSQC-Experiment mit geformten Pulsen . . . . .	60
Abbildung 4.3	$^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrum des originalen ASAP-HSQC . . . . .	61
Abbildung 4.4	Vergleich der HSQC-Spektren der konventionellen und der originalen ASAP-HSQC-Sequenz . . . . .	63
Abbildung 4.5	Vergleich der Signalintensitäten eines konventionellen HSQC und des originalen ASAP-HSQC . . . . .	64
Abbildung 4.6	Vergleich des ASAP-HSQC und des ASAP-HMQC . . . . .	65
Abbildung 4.7	Symmetrisiertes ASAP-HSQC-Experiment mit Rechteckpulsen . . . . .	67
Abbildung 4.8	Symmetrisiertes ASAP-HSQC-Experiment mit geformten Pulsen . . . . .	67
Abbildung 4.9	Vergleich der ASAP-HSQC Versionen . . . . .	69
Abbildung 4.10	$^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrum des symmetrisierten ASAP-HSQC von Menthol . . . . .	70
Abbildung 4.11	Hochaufgelöstes ASAP-HSQC . . . . .	72
Abbildung 4.12	$^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrum des symmetrisierten ASAP-HSQC von Saccharose . . . . .	73
Abbildung 4.13	Original CLIP-ASAP-HSQC-Experiment mit geformten Pulsen . . . . .	76
Abbildung 4.14	$^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrum des original CLIP-ASAP-HSQC . . . . .	78
Abbildung 4.15	Vergleich der HSQC-Spektren des original CLIP-ASAP-HSQC unter Verwendung von DIPSI-2 und MOCCA-XY16 . . . . .	80
Abbildung 4.16	HSQC-Spektren der teilweise orientierten und der isotropen Saccharose-Probe . . . . .	83
Abbildung 4.17	Symmetrisierte CLIP-ASAP-HSQC-Experiment mit geformten Pulsen . . . . .	85
Abbildung 4.18	$^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektren des original und des symmetrisierten CLIP-ASAP-HSQC . . . . .	86
Abbildung 4.19	HSQC-Spektrum des symmetrisierten CLIP-ASAP-HSQC der teilweise orientierten Saccharose-Probe . . . . .	88
Abbildung 4.20	Prinzip des HSQC-TOCSY . . . . .	89
Abbildung 4.21	ASAP-HSQC-TOCSY-Pulssequenz mit geformten Pulsen . . . . .	92
Abbildung 4.22	HSQC-TOCSY-Spektren von Menthol . . . . .	92
Abbildung 4.23	Hochaufgelöstes ASAP-HSQC-TOCSY-Spektrum . . . . .	94
Abbildung 4.24	ASAP-HSQC-TOCSY-IPAP-Pulssequenzen mit geformten Pulsen . . . . .	96
Abbildung 4.25	Hochaufgelöste ASAP-HSQC-TOCSY-IPAP-Spektren . . . . .	98
Abbildung 4.26	Modifiziertes IMPACT-HMBC mit geformten Pulsen . . . . .	105



Abbildung 4.27	$^{13}\text{C}$ -Projektion des modifizierten IMPACT-HMBC . . . . .	106
Abbildung 4.28	Schnelles HSQMBC mit geformten Pulsen . . . . .	108
Abbildung 4.29	$^{13}\text{C}$ -Projektionen der schnellen HSQMBC-Experimente . . . . .	110
Abbildung 4.30	Vergleiche einer $^{13}\text{C}$ -Projektion mit dem $^{13}\text{C}$ -1D-Spektrum . . . . .	111
Abbildung 4.31	Vergleich der $^1\text{H}$ -Spektren der Motoröle . . . . .	118
Abbildung 4.32	Integrale der $^1\text{H}$ -Spektren der Motoröle . . . . .	121
Abbildung 4.33	Diffusions- und Relaxationsmessungen . . . . .	123
Abbildung 4.34	Vergleich der $^{13}\text{C}$ -Spektren der Motoröle . . . . .	125
Abbildung 4.35	2D-Spektren des Motoröls 1 . . . . .	127
Abbildung 4.36	2D-Spektren des Motoröls 2 . . . . .	128
Abbildung 4.37	Vergleich der 2D $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren des Motoröls 1 . . . . .	129
Abbildung A.1	Konventionelles, gekoppeltes $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrum von Menthol . . . . .	169
Abbildung A.2	Gekoppeltes $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrum von Menthol unter Ver- wendung der MOCCA-XY16-Sequenz . . . . .	170
Abbildung A.3	Konventionelles HSQC-Spektrum des vierfach substituierten Pyr- rolidins . . . . .	171
Abbildung A.4	HSQC-Spektrum des symmetrisierten CLIP-ASAP-HSQC der isotropen Saccharose-Probe . . . . .	172
Abbildung A.5	Konventionelle HSQC-TOCSY-IPAP-Spektren von Glucose . . . . .	173
Abbildung A.6	2D-Spektrum des modifizierten IMPACT-HMBC von Coffein . . . . .	174
Abbildung A.7	2D-Spektrum des schnellen HSQMBC mit PE-Transfer von Coffein . . . . .	175
Abbildung A.8	2D-Spektrum des schnellen HSQMBC mit PE-Transfer und Mischsequenz von Coffein . . . . .	176
Abbildung A.9	2D-Spektrum des schnellen HSQMBC von Coffein . . . . .	177
Abbildung A.10	2D-Spektrum des schnellen HSQMBC mit Mischsequenz von Coffein . . . . .	178
Abbildung A.11	2D-Spektrum des schnellen HSQMBC von Coffein . . . . .	179



# Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1	Physikalische Eigenschaften der Motoröle . . . . .	35
Tabelle 3.2	Optimierte Transfer- <i>delays</i> der Standardproben . . . . .	41
Tabelle 3.3	Legende der verwendeten Breitbandpulse . . . . .	44
Tabelle 4.1	$^1J_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten für Menthol . . . . .	79
Tabelle 4.2	$^1T_{\text{CH}}$ - und $^1D_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten des vierfach substituier- ten Pyrrolindins . . . . .	82
Tabelle 4.3	$^1T_{\text{CH}}$ - und $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten für Saccharose . . . . .	84
Tabelle 4.4	$^1T_{\text{CH}}$ - und $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten des symmetrisierten CLIP- ASAP-HSQC für Saccharose . . . . .	87
Tabelle 4.5	$^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten für Glucose . . . . .	99
Tabelle 4.6	Übersicht der NMR-Experimente . . . . .	116
Tabelle 4.7	Identifikation des Substanzgemisches für die beiden Motoröle . .	119
Tabelle 4.8	Identifikation des Substanzgemisches anhand der $^{13}\text{C}$ -Spektren .	124



# Abkürzungsverzeichnis

<b>ALSOFAST</b>	<i>Alternate SOFAST</i>
<b>AP</b>	Antiphase
<b>APS</b>	Ammoniumperoxodisulfat
<b>ASAP</b>	<i>Acceleration by Sharing Adjacent Polarization</i>
$B_0$	externes, homogenes Magnetfeld
<b>BB</b>	Breitband
<b>BBI</b>	<i>Broadband Inverse</i>
<b>BEBOP</b>	<i>Broadband Excitation By Optimized Pulses</i>
<b>BEST</b>	<i>Band selective Excitation Short-Transient</i>
<b>BIBOP</b>	<i>Broadband Inversion By Optimized Pulses</i>
<b>BPLED</b>	<i>BiPolar Longitudinal Eddy Current Delay</i>
<b>BROCODE</b>	<i>Broadband Cooperative Decoupling</i>
<b>BUBI</b>	<i>Broadband Universal and Broadband Inversion Pulses</i>
<b>BURBOP</b>	<i>Broadband Universal Rotations By Optimized Pulses</i>
$^{12}\text{C}$	Kohlenstoff-12-Isotop
$^{13}\text{C}$	Kohlenstoff-13-Isotop
<b><math>\text{CDCl}_3</math></b>	deutერიertes Chloroform
<b>CLIP</b>	<i>Clean Inphase</i>
<b>COST</b>	<i>Cooling Overall Spin Temperature</i>
<b>COSY</b>	<i>Correlation Spectroscopy</i>
<b>CPMG</b>	<i>Carr-Purcell-Meiboom-Gill</i>
<b>CS</b>	<i>Compressed Sensing</i>

---

<b>CSA</b>	<i>Chemical Shift Anisotropy</i>
<b>CT</b>	<i>Constant Time</i>
<b>1D</b>	eindimensional
<b>2D</b>	zweidimensional
${}^1D_{\text{CH}}$	Dipolare Restkopplung zwischen Kohlenstoff und Protonen entlang einer Bindung
<b>D<sub>2</sub>O</b>	deutერიertes Wasser
$\Delta^1D_{\text{CH}}$	Fehler der Bestimmung der dipolaren Restkopplung
$\Delta^1J_{\text{CH}}$	Fehler der Bestimmung der skalaren Kopplung
$\Delta^1T_{\text{CH}}$	Fehler der Bestimmung der Gesamtkopplung
$\Delta\nu_{\text{Q}}$	Quadrupolare Aufspaltung
<b>DIPSI-2</b>	<i>Decoupling In the Presence of Scalar Interactions</i>
<b>DOSY</b>	<i>Diffusion Ordered Spectroscopy</i>
<b>DQF</b>	<i>Double Quantum Filtered</i>
$d_{\text{r}}$	Erholungs-delay
$\eta$	Signalverstärkung
<b>FID</b>	<i>Free Induction Decay</i>
<b>FT</b>	Fourier-Transformation
$\gamma$	gyromagnetisches Verhältnis
<b>GARP</b>	<i>Globally optimized Alternating-phase Rectangular Pulses</i>
<b>GC</b>	Gaschromatographie
$\gamma_{\text{C}}$	gyromagnetisches Verhältnis für ${}^{13}\text{C}$
$\gamma_{\text{H}}$	gyromagnetisches Verhältnis für Protonen
${}^1\text{H}$	Proton
<b>hetNOE</b>	<i>heteronuclear Nuclear Overhauser Enhancement</i>
<b>HMBC</b>	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation spectroscopy</i>
<b>HMQC</b>	<i>Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence spectroscopy</i>

---

<b>HSQC</b>	<i>Heteronuclear Single-Quantum Coherence spectroscopy</i>
<b>HSQMBC</b>	<i>Heteronuclear Single Quantum Multiple Bond Correlation spectroscopy</i>
$I$	Maximale Signalintensität
$I_0$	anfängliche Signalintensität
<b>IMPACT</b>	<i>Improved and Accelerated Constant-Time</i>
<b>INEPT</b>	<i>Insensitive Nuclei Enhancement by Polarization Transfer</i>
<b>IP</b>	Inphase
<b>IPAP</b>	Inphase/Antiphase
<b>IR</b>	Infrarot
${}^n J_{\text{CH}}$	heteronukleare, skalare Kopplung über n Bindungen
${}^1 J_{\text{CH}}$	skalare Kopplung zwischen Kohlenstoff und Protonen über eine Bindung
$I$	Kernspin
$L$	Länge des gestreckten Gels
$L_0$	Länge des ungestreckten Gels
$M$	molar: $\frac{\text{mol}}{\text{L}}$
$M_0$	Gleichgewichtsmagnetisierung
$\mu_0$	magnetische Permeabilität im Vakuum
<b>MLEV</b>	Malcolm Levitt's decoupling cycle
<b>MOCCA-XY16</b>	<i>Modified phase-cycled Carr-Purcell-type multiple-pulse sequence</i>
<b>MRI</b>	<i>Magnetic Resonance Imaging</i>
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>MS</b>	Massenspektrometrie
$M_z$	longitudinale Magnetisierung
${}^{15}\text{N}$	Stickstoff-15-Isotop
<b>NMR</b>	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
<b>NOE</b>	<i>Nuclear Overhauser Enhancement</i>

<b>NOESY</b>	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
<i>n</i>	Anzahl der <i>scans</i>
<b>NUS</b>	<i>Non Uniform Sampling</i>
<b>OCT</b>	<i>Optimal Control Theory</i>
<b>PAH</b>	<i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons</i>
<b>PBLG</b>	Poly- $\gamma$ -Benzyl-L-Glutamat
<b>PE</b>	<i>Perfect Echo</i>
<b>PEODA</b>	Polyethylenoxid Diacrylat
$\Phi_1$	Phasenzyklus
$\Phi_{\text{rec}}$	Empfängerphase
<b>PP</b>	<i>Point-to-Point</i>
<b>ppm</b>	<i>parts per million</i>
<b>PROJECT</b>	Periodic Refocusing of J Evolution by Coherence Transfer
<b>RDC</b>	<i>Residual Dipolar Coupling</i>
<b>RF</b>	Radio-Frequenz
$\frac{S}{N}$	Signal-zu-Rausch-Verhältnis
<b>SOFAST</b>	<i>band Selective Optimized FLip-Angle Short-Transient</i>
<b>T</b>	Tesla
$^1T_{\text{CH}}$	Gesamtkopplung zwischen Kohlenstoff und Protonen entlang einer Bindung
$t_1$	Inkrementierungsperiode im 2D-Experiment
$T_1$	longitudinale Relaxationszeit
$T_2$	transversale Relaxationszeit
$t_{\text{aq}}$	Aquisitionszeit
<b>TCI</b>	<i>Triple Channel Inverse</i>
<b>TEMED</b>	Tetramethylethyldiamin
$t_{\text{Erh}}$	Erholzeit



$t_{\text{Exp}}$	Gesamtexperimentzeit
<b>TOCSY</b>	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
<b>TPPI</b>	<i>Time Proportional Phase Incrementation</i>
<b>UF</b>	<i>Ultrafast</i>
<b>UR</b>	<i>Universal Rotation</i>
<b>VI</b>	Viskositätsindex
<b>WALTZ</b>	<i>Wideband Alternating phase Low-power Technique for Zero residue splitting</i>
<b>WURST</b>	<i>Wideband, Uniform Rate, and Smooth Truncation</i>
$\Xi$	Ausdehnungsfaktor



# Literatur

- [1] J. Cavanagh, W. Fairbrother, A. Palmer, N. Skelton, *Protein NMR Spectroscopy*, Elsevier Academic Press, **2007**.
- [2] P. C. Lauterbur, „Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance“, *Nature* **1973**, *242*, 190–191.
- [3] P. Mansfield, *NMR Imaging in Biomedicine*, Elsevier, **1982**.
- [4] H. E. Frey, R. R. Knispel, J. Kruuv, A. R. Sharp, R. T. Thompson, M. M. Pintar, „Proton Spin-Lattice Relaxation Studies of Nonmalignant Tissues of Tumorous Mice“, *J. Natl. Cancer Inst.* **1972**, *49*, 903.
- [5] S. G. Levine, „A Short History of the Chemical Shift“, *J. Chem. Educ.* **2001**, *78*, 133.
- [6] M. Karplus, „Vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance“, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870–2871.
- [7] J. Stonehouse, P. Adell, J. Keeler, A. J. Shaka, „Ultrahigh-Quality NOE Spectra“, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6037–6038.
- [8] I. Tvaroska, „Carbon-proton coupling constants in the conformational analysis of sugar molecules“, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1995**, *51*, 16–61.
- [9] H. Friebolin, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, 4. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
- [10] J. H. F. Bothwell, J. L. Griffin, „An introduction to biological nuclear magnetic resonance spectroscopy“, *Biol. Rev.* **2011**, *86*, 493–510.
- [11] F. Lottspeich, J. W. Engels, *Bioanalytik*, Springer Spektrum, **2012**.
- [12] G. Topcu, A. Ulubelen, „Structure elucidation of organic compounds from natural sources using 1D and 2D NMR techniques“, *J. Mol. Struct.* **2007**, *834*, 57–73.
- [13] T. D. Cladrigge, *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, Elsevier Science, **2016**.

- [14] S. W. Englander, L. Mayne, „Protein Folding Studied Using Hydrogen-Exchange Labeling and Two-Dimensional NMR“, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1992**, *21*, 243–265.
- [15] D. Li, N. L. Owen, P. Perera, C. Andersson, L. Bohlin, P. A. Cox, R. J. Pugmire, C. L. Mayne, D. M. Grant, „Structure Elucidation of Three Triterpenoid Saponins from *Alphitonia zizyphoides* Using 2D NMR Techniques“, *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 218–224.
- [16] A. Smolinska, L. Blanchet, L. M. Buydens, S. S. Wijmenga, „NMR and pattern recognition methods in metabolomics: From data acquisition to biomarker discovery: A review“, *Analytica Chimica Acta* **2012**, *750*, 750th Anniversary Volume, 82–97.
- [17] L. Mannina, A. P. Sobolev, D. Capitani, „Applications of NMR metabolomics to the study of foodstuffs: Truffle, kiwifruit, lettuce, and sea bass“, *Electrophoresis* **2012**, *33*, 2290–2313.
- [18] M. Spiteri, E. Jamin, F. Thomas, A. Rebours, M. Lees, K. M. Rogers, D. N. Rutledge, „Fast and global authenticity screening of honey using  $^1\text{H}$ -NMR profiling“, *Food Chem.* **2015**, *189*, 60–66.
- [19] E. Schievano, E. Morelato, C. Facchin, S. Mammi, „Characterization of Markers of Botanical Origin and Other Compounds Extracted from Unifloral Honeys“, *J. Agric. Food. Chem.* **2013**, *61*, 1747–1755.
- [20] R. Consonni, L. R. Cagliani, C. Cogliati, „NMR Characterization of Saccharides in Italian Honeys of Different Floral Sources“, *J. Agric. Food. Chem.* **2012**, *60*, 4526–4534.
- [21] R. Godelmann, F. Fang, E. Humpfer, B. Schütz, M. Bansbach, H. Schäfer, M. Spraul, „Targeted and Nontargeted Wine Analysis by  $^1\text{H}$  NMR Spectroscopy Combined with Multivariate Statistical Analysis. Differentiation of Important Parameters: Grape Variety, Geographical Origin, Year of Vintage“, *J. Agric. Food. Chem.* **2013**, *61*, 5610–5619.
- [22] S. B. Ebeler, G. Sacks, S. Vidal, P. Winterhalter, *Advances in Wine Research*, (Hrsg.: S. B. Ebeler, S. Vidal, G. Sacks, P. Winterhalter), American Chemical Society, Washington, DC, **2015**.
- [23] C. Colombo, C. Aupic, A. R. Lewis, B. M. Pinto, „In Situ Determination of Fructose Isomer Concentrations in Wine Using  $^{13}\text{C}$  Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy“, *J. Agric. Food. Chem.* **2015**, *63*, 8551–8559.

- [24] M. Spraul, B. Schütz, E. Humpfer, M. Mörtter, H. Schäfer, S. Koswig, P. Rinke, „Mixture analysis by NMR as applied to fruit juice quality control“, *Magn. Reson. Chem.* **2009**, *47*, 130–137.
- [25] A. Agiomyrgianaki, P. V. Petrakis, P. Dais, „Influence of harvest year, cultivar and geographical origin on Greek extra virgin olive oils composition: a study by NMR spectroscopy and biometric analysis“, *Food Chem.* **2012**, *135*, 2561–2568.
- [26] G. Bodenhausen, D. Ruben, „Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy“, *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *69*, 185–189.
- [27] A. Bax, R. H. Griffey, B. L. Hawkins, „Correlation of proton and nitrogen-15 chemical shifts by multiple quantum NMR“, *J. Magn. Reson. (1969)* **1983**, *55*, 301–315.
- [28] W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst, „Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance“, *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2229–2246.
- [29] P. Schanda, B. Brutscher, „Very fast two-dimensional NMR spectroscopy for real-time investigation of dynamic events in proteins on the time scale of seconds“, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8014–8015.
- [30] P. Schanda, Ě. Kupče, B. Brutscher, „SOFAST-HMQC experiments for recording two-dimensional heteronuclear correlation spectra of proteins within seconds“, *J. Biomol. NMR* **2005**, *33*, 199–211.
- [31] P. Schanda, V. Forge, B. Brutscher, „HET-SOFAST NMR for fast detection of structural compactness and heterogeneity along polypeptide chains“, *Magn. Reson. Chem.* **2006**, *44*, 177–184.
- [32] T. Kern, P. Schanda, B. Brutscher, „Sensitivity-enhanced IPAP-SOFAST-HMQC for fast pulsing 2D NMR with reduced radiofrequency load“, *J. Magn. Reson.* **2008**, *190*, 333–338.
- [33] E. Lescop, P. Schanda, B. Brutscher, „A set of BEST triple-resonance experiments for time-optimized protein resonance assignment“, *J. Magn. Reson.* **2007**, *187*, 163–169.
- [34] P. Schanda, H. Van Melckebeke, B. Brutscher, „Speeding up three-dimensional protein NMR experiments to a few minutes“, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9042–9043.
- [35] J. Farjon, J. Boisbouvier, P. Schanda, A. Pardi, J.-P. Simorre, B. Brutscher, „Longitudinal-relaxation-enhanced NMR experiments for the study of nucleic acids in solution“, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8571–8577.

- [36] M. Deschamps, I. D. Campbell, „Cooling overall spin temperature: Protein NMR experiments optimized for longitudinal relaxation effects“, *J. Magn. Reson.* **2006**, *178*, 206–211.
- [37] P. Pelupessy, „Adiabatic Single Scan Two-Dimensional NMR Spectroscopy“, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12345–12350.
- [38] L. Frydman, T. Scherf, A. Lupulescu, „The acquisition of multidimensional NMR spectra within a single scan“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 15858–15862.
- [39] A. Tal, L. Frydman, „Single-scan multidimensional magnetic resonance“, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2010**, *57*, 241–292.
- [40] P. Giraudeau, T. Montag, B. Charrier, C. M. Thiele, „Fast access to residual dipolar couplings by single-scan 2D NMR in oriented media“, *Magn. Reson. Chem.* **2012**, *50*, 53–57.
- [41] P. Giraudeau, L. Frydman, „Ultrafast 2D NMR: An Emerging Tool in Analytical Spectroscopy“, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2014**, *7*, 129–161.
- [42] V. M. Sánchez-Pedregal, R. Santamaría-Fernández, A. Navarro-Vázquez, „Residual Dipolar Couplings of Freely Rotating Groups in Small Molecules. Stereochemical Assignment and Side-Chain Conformation of 8-Phenylmenthol“, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1471–1474.
- [43] C. Gayathri, M. C. de la Fuente, B. Luy, R. R. Gil, A. Navarro-Vázquez, „Probing heterocycle conformation with residual dipolar couplings“, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5879–5881.
- [44] P. Trigo-Mouriño, R. Santamaría-Fernández, V. M. Sánchez-Pedregal, A. Navarro-Vázquez, „Conformational Analysis of an Isoquinolinium Hydrochloride in Water Using Residual Dipolar Couplings“, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3101–3104.
- [45] A. Schuetz, T. Murakami, N. Takada, J. Junker, M. Hashimoto, C. Griesinger, „RDC-Enhanced NMR Spectroscopy in Structure Elucidation of Sucro-Neolambertellin“, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2032–2034.
- [46] S. Weigelt, T. Huber, F. Hofmann, M. Jost, M. Ritzefeld, B. Luy, C. Freudenberger, Z. Majer, E. Vass, J.-C. Greie, L. Panella, B. Kaptein, Q. B. Broxterman, H. Kessler, K. Altendorf, M. Hollosi, N. Sewald, „Synthesis and Conformational Analysis of Efraeptins“, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 478–487.

- [47] M. Martín-Pastor, C. A. Bush, „Conformational Studies of Human Milk Oligosaccharides Using  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  One-Bond NMR Residual Dipolar Couplings“, *Biochemistry* **2000**, *39*, 4674–4683.
- [48] M. Martín-Pastor, A. Canales-Mayordomo, J. Jiménez-Barbero, „NMR experiments for the measurement of proton-proton and carbon-carbon residual dipolar couplings in uniformly labelled oligosaccharides“, *J. Biomol. NMR* **2003**, *26*, 345–353.
- [49] T. N. Pham, S. L. Hinchley, D. W. H. Rankin, T. Liptaj, D. Uhrin, „Determination of sugar structures in solution from residual dipolar coupling constants: Methodology and application to methyl  $\beta$ -D-xylopyranoside“, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13100–13110.
- [50] J. Klages, C. Neubauer, M. Coles, H. Kessler, B. Luy, „Structure Refinement of Cyclosporin A in Chloroform by Using RDCs Measured in a Stretched PDMS-Gel“, *Chembiochem* **2005**, *6*, 1672–1678.
- [51] C. Aroulanda, V. Boucard, F. Guibé, J. Courtieu, D. Merlet, „Weakly Oriented Liquid-Crystal NMR Solvents as a General Tool to Determine Relative Configurations“, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 4536–4539.
- [52] A. Mangoni, V. Esposito, A. Randazzo, „Configuration assignment in small organic molecules via residual dipolar couplings“, *Chem. Commun.* **2003**, 154–155.
- [53] J. Yan, F. Delaglio, A. Kaerner, A. D. Kline, H. Mo, M. J. Shapiro, T. A. Smitka, G. A. Stephenson, E. R. Zartler, „Complete Relative Stereochemistry of Multiple Stereocenters Using Only Residual Dipolar Couplings“, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5008–5017.
- [54] M. E. García, S. Pagola, A. Navarro-Vázquez, D. D. Phillips, C. Gayathri, H. Krakauer, P. W. Stephens, V. E. Nicotra, R. R. Gil, „Stereochemistry Determination by Powder X-Ray Diffraction Analysis and NMR Spectroscopy Residual Dipolar Couplings“, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5670–5674.
- [55] A. Schuetz, J. Junker, A. Leonov, O. F. Lange, T. F. Molinski, C. Griesinger, „Stereochemistry of Sagittamide A from Residual Dipolar Coupling Enhanced NMR“, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15114–15115.
- [56] U. M. Reinscheid, M. Köck, C. Cychon, V. Schmidts, C. M. Thiele, C. Griesinger, „The Absolute Configuration of Dibromopalau’amine“, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 6900–6903.

- [57] M. J. Riveira, C. Gayathri, A. Navarro-Vázquez, N. V. Tsarevsky, R. R. Gil, M. P. Mischne, „Unprecedented stereoselective synthesis of cyclopenta[b]benzofuran derivatives and their characterisation assisted by aligned media NMR and  $^{13}\text{C}$  chemical shift ab initio predictions“, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 3170–3175.
- [58] P. Trigo-Mouriño, R. Sifuentes, A. Navarro-Vázquez, C. Gayathri, H. Maruenda, R. R. Gil, „Determination of the absolute configuration of 19-OH-(–)-eburnamonine using a combination of residual dipolar couplings, DFT chemical shift predictions, and chiroptics“, *Nat. Prod. Commun.* **2012**, *7*, 735–8.
- [59] D. Intelmann, G. Kummerlöwe, G. Haseleu, N. Desmer, K. Schulze, R. Fröhlich, O. Frank, B. Luy, T. Hofmann, „Structures of Storage-Induced Transformation Products of the Beer’s Bitter Principles, Revealed by Sophisticated NMR Spectroscopic and LC-MS Techniques“, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 13047–13058.
- [60] G. Kummerlöwe, B. Crone, M. Kretschmer, S. F. Kirsch, B. Luy, „Residual dipolar couplings as a powerful tool for constitutional analysis: The unexpected formation of tricyclic compounds“, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2643–2645.
- [61] B. Luy, „Distinction of enantiomers by NMR spectroscopy using chiral orienting media“, *J. Indian Inst. Sci.* **2010**, *90*, 119–132.
- [62] P. Lesot, J. Courtieu, „Natural abundance deuterium NMR spectroscopy: Developments and analytical applications in liquids, liquid crystals and solid phases“, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2009**, *55*, 128–159.
- [63] C. M. Thiele, „Residual dipolar couplings (RDCs) in organic structure determination“, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 5673–5685.
- [64] G. Kummerlöwe, B. Luy, „Residual dipolar couplings as a tool in determining the structure of organic molecules“, *Trends Anal. Chem.* **2009**, *28*, 483–493.
- [65] G. Kummerlöwe, B. Luy, „Residual dipolar couplings for the configurational and conformational analysis of organic molecules“, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **2009**, *68*, 193–230.
- [66] A. Enthart, J. C. Freudenberger, J. Furrer, H. Kessler, B. Luy, „The CLIP/CLAP-HSQC: Pure absorptive spectra for the measurement of one-bond couplings“, *J. Magn. Reson.* **2008**, *192*, 314–322.
- [67] J. Becker, B. Luy, „CLIP–ASAP-HSQC for fast and accurate extraction of one-bond couplings from isotropic and partially aligned molecules“, *Magn. Reson. Chem.* **2015**, *53*, 878–885.



- [68] J. Keeler, *Understanding NMR spectroscopy*, Wiley-VCH, **2010**.
- [69] M. Levitt, *Spin dynamics: Basics of nuclear magnetic resonance*, Wiley-VCH, **2008**.
- [70] S. Meiboom, D. Gill, „Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times“, *Rev. Sci. Instrum.* **1958**, *29*, 688–691.
- [71] J. A. Aguilar, M. Nilsson, G. Bodenhausen, G. A. Morris, „Spin echo NMR spectra without J modulation“, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 811–813.
- [72] R. R. Gil, „Constitutional, Configurational, and Conformational Analysis of Small Organic Molecules on the Basis of NMR Residual Dipolar Couplings“, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7222–7224.
- [73] C. M. Thiele, S. Berger, „Probing the Diastereotopicity of Methylene Protons in Strychnine Using Residual Dipolar Couplings“, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 705–708.
- [74] L. Verdier, P. Sakhaii, M. Zweckstetter, C. Griesinger, „Measurement of long range H,C couplings in natural products in orienting media: a tool for structure elucidation of natural products“, *J. Magn. Reson.* **2003**, *163*, 353–359.
- [75] B. Luy, K. Kobzar, H. Kessler, „An easy and scalable method for the partial alignment of organic molecules for measuring residual dipolar couplings“, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1092–1094.
- [76] G. Bodenhausen, H. Kogler, R. Ernst, „Selection of Coherence-Transfer Pathways in NMR pulse experiments“, *J. Magn. Reson.* **1984**, *58*, 370–388.
- [77] G. Kontaxis, J. Stonehouse, E. Laue, J. Keeler, „The Sensitivity of Experiments which use Gradient Pulses for Coherenc-Pathway Selection“, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1994**, *111*, 70–76.
- [78] *Two-dimensional NMR spectroscopy: Applications for chemists and biochemists*, (Hrsg.: W. Croasmun, R. Carlson), Wiley-VCH, **1994**.
- [79] A. G. Palmer, J. Cavanagh, P. E. Wright, M. Rance, „Sensitivity improvement in proton-detected two-dimensional heteronuclear correlation NMR spectroscopy“, *J. Magn. Reson.* **1991**, *93*, 151–170.
- [80] E. Lewis Kay, P. Keifer, T. Saarinen, „Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity“, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10663–10665.

- [81] J. Schleucher, M. Schwendinger, M. Sattler, P. Schmidt, O. Schedletzky, S. J. Glaser, O. W. Sørensen, C. Griesinger, „A general enhancement scheme in heteronuclear multidimensional NMR employing pulsed field gradients“, *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 301–306.
- [82] B. L. Marquez, W. H. Gerwick, R. Thomas Williamson, „Survey of NMR experiments for the determination of  ${}^nJ_{CH}$  heteronuclear coupling constants in small molecules“, *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39*, 499–530.
- [83] K. Kobzar, B. Luy, „Analyses, extensions and comparison of three experimental schemes for measuring  ${}^nJ_{CH}+D_{CH}$ -couplings at natural abundance“, *J. Magn. Reson.* **2007**, *186*, 131–141.
- [84] H. Kogler, O. Sørensen, G. Bodenhausen, R. Ernst, „Low-pass J filters. Suppression of neighbor peaks in heteronuclear relayed correlation spectra“, *J. Magn. Reson.* **1983**, *55*, 157–163.
- [85] R. Wagner, S. Berger, „ACCORD–HMBC: a superior technique for structural elucidation“, *Magn. Reson. Chem.* **1998**, *36*, 44–46.
- [86] C. E. Hadden, G. E. Martin, V. V. Krishnamurthy, „Constant time inverse-detection gradient accordion rescaled heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy: CIGAR-HMBC“, *Magn. Reson. Chem.* **2000**, *38*, 143–147.
- [87] J. Furrer, „Accordion BIRD-HMBC experiments: improved one-bond correlation suppression in accordion heteronuclear multiple-bond correlation-type experiments“, *Magn. Reson. Chem.* **2006**, *44*, 845–850.
- [88] R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun, *Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions*, Oxford University Press, **1987**.
- [89] L. Mueller, „Alternate HMQC experiments for recording HN and HC-correlation spectra in proteins at high throughput“, *J. Biomol. NMR* **2008**, *42*, 129–137.
- [90] Ě. Kupče, R. Freeman, „Fast multidimensional NMR by polarization sharing“, *Magn. Reson. Chem.* **2007**, *45*, 2–4.
- [91] D. Schulze-Sünninghausen, J. Becker, B. Luy, „Rapid heteronuclear single quantum correlation NMR spectra at natural abundance“, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 1242–1245.

- [92] D. Schulze-Süninghausen, J. Becker, M. R. Koos, B. Luy, „Improvements, extensions, and practical aspects of rapid ASAP-HSQC and ALSOFAST-HSQC pulse sequences for studying small molecules at natural abundance“, *J. Magn. Reson.* **2017**, *281*, 151–161.
- [93] D. Schulze-Süninghausen, Diss., Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, **2016**.
- [94] M. R. M. Koos, Diss., Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, **2016**.
- [95] S. Hartmann, E. Hahn, „Nuclear double resonance in the rotating frame“, *Phys. Rev.* **1962**, *128*, 2042–2053.
- [96] L. Braunschweiler, R. Ernst, „Coherence transfer by isotropic mixing: Application to proton correlation spectroscopy“, *J. Magn. Reson.* **1983**, *53*, 521–528.
- [97] S. J. Glaser, J. J. Quant in *Homonuclear and Heteronuclear Hartmann-Hahn Transfer in Isotropic Liquids*, (Hrsg.: W. S. Warren), Advances in Magnetic and Optical Resonance Supplement C, Academic Press, **1996**, S. 59–254.
- [98] S. Glaser, H. Schwalbe, J. Marino, C. Griesinger, „Directed TOCSY, a Method for Selection of Directed Correlations by Optimal Combinations of Isotropic and Longitudinal Mixing“, *J. Magn. Reson.* **1996**, *112*, 160–180.
- [99] D. G. Davis, A. Bax, „Assignment of complex proton NMR spectra via two-dimensional homonuclear Hartmann-Hahn spectroscopy“, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 2820–2821.
- [100] A. J. Shaka, C. J. Lee, A. Pines, „Iterative schemes for bilinear operators; Application to spin decoupling“, *J. Magn. Reson.* **1988**, *77*, 274–293.
- [101] M. Levitt, R. Freeman, „Composite pulse decoupling“, *J. Magn. Reson.* **1981**, *43*, 502–507.
- [102] F. Kramer, W. Peti, C. Griesinger, S. J. Glaser, „Optimized Homonuclear Carr–Purcell-Type Dipolar Mixing Sequences“, *J. Magn. Reson.* **2001**, *149*, 58–66.
- [103] I. Felli, R. Pierattelli, S. Glaser, B. Luy, „Relaxation-optimised Hartmann-Hahn transfer using a specifically tailored MOCCA-XY16 mixing sequence for carbonyl-carbonyl correlation spectroscopy in  $^{13}\text{C}$  direct detection NMR experiments“, *J. Biomol. NMR* **2009**, *43*, 187–196.
- [104] D. Marion, „Fast acquisition of NMR spectra using Fourier transform of non-equispaced data“, *J. Biomol. NMR* **2005**, *32*, 141–150.

- [105] H. Atreya, T. Szyperski, „G-matrix Fourier transform NMR spectroscopy for complete protein resonance assignment“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 9642–9647.
- [106] M. Mobli, J. C. Hoch, „Nonuniform sampling and non-Fourier signal processing methods in multidimensional NMR“, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2014**, *83*, 21–41.
- [107] K. Kazimierczuk, V. Y. Orekhov, „Accelerated NMR Spectroscopy by Using Compressed Sensing“, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5556–5559.
- [108] E. Candes, J. Romberg, T. Tao, „Robust uncertainty principles: Exact signal reconstruction from highly incomplete frequency information“, *IEEE Trans. Inf. Theory* **2006**, *52*, 489–509.
- [109] P. Tzvetkova, B. Luy, S. Simova, „Configuration verification via RDCs on the example of a tetra-substituted pyrrolidine ring“, *Magn. Reson. Chem.* **2012**, *50*, S92–S101.
- [110] C. Merle, G. Kummerlöwe, F. Halbach, C. Lierse von Gostomski, J. Höpfner, T. Beskers, M. Wilhelm, B. Luy, „Crosslinked poly(ethylene oxide) as a versatile alignment medium for the measurement of residual anisotropic NMR parameters“, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 10309–10312.
- [111] G. Kummerlöwe, E. F. McCord, S. F. Cheatham, S. Niss, R. W. Schnell, B. Luy, „Tunable alignment for all polymer gel/solvent combinations for the measurement of anisotropic NMR parameters“, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 7087–7089.
- [112] P. W. Kuchel, B. E. Chapman, N. Müller, W. A. Bubb, D. J. Philp, A. M. Torres, „Apparatus for rapid adjustment of the degree of alignment of NMR samples in aqueous media: Verification with residual quadrupolar splittings in  $^{23}\text{Na}$  and  $^{133}\text{Cs}$  spectra“, *J. Magn. Reson.* **2006**, *180*, 256–265.
- [113] G. Kummerlöwe, F. Halbach, B. Laufer, B. Luy, „Precise measurement of RDCs in water and DMSO based gels using a silicone rubber tube for tuneable stretching“, *Open Spectrosc. J.* **2008**, *2*, 29–33.
- [114] G. Kummerlöwe, S. Schmitt, B. Luy, „Cross-fitting of residual dipolar couplings“, *Open Spectrosc. J.* **2010**, *4*, 16–27.
- [115] C. Naumann, W. A. Bubb, B. E. Chapman, P. W. Kuchel, „Tunable-Alignment Chiral System Based on Gelatin for NMR Spectroscopy“, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, PMID: 17417851, 5340–5341.

- [116] P. Trigo-Mouriño, C. Merle, M. R. M. Koos, B. Luy, R. R. Gil, „Probing Spatial Distribution of Alignment by Deuterium NMR Imaging“, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 7013–7019.
- [117] J. Furrer, F. Kramer, J. Marino, S. Glaser, B. Luy, „Homonuclear Hartmann-Hahn transfer with reduced relaxation losses by use of the MOCCA-XY16 multiple pulse sequence“, *J. Magn. Reson.* **2004**, *166*, 39–46.
- [118] J. Shaka, A. P. Baker, R. Freeman, „Computer-optimized decoupling scheme for wideband applications and low-level operation“, *J. Magn. Reson.* **1985**, *64*, 547–552.
- [119] A. Shaka, J. Keeler, T. Frenkiel, R. Freeman, „An improved sequence for broadband decoupling: WALTZ-16“, *J. Magn. Reson. (1969)* **1983**, *52*, 335–338.
- [120] D. Marion, K. Wüthrich, „Application of phase sensitive two-dimensional correlated spectroscopy (COSY) for measurements of  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  spin-spin constants in proteins“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *113*, 967–974.
- [121] D. Marion, M. Ikura, R. Tschudin, A. Bax, „Rapid recording of 2D NMR spectra without phase cycling. Application to the study of hydrogen exchange in proteins“, *J. Magn. Reson. (1969)* **1989**, *85*, 393–399.
- [122] K. Kobzar, S. Ehni, T. Skinner, S. Glaser, B. Luy, „Exploring the limits of broadband  $90^\circ$  and  $180^\circ$  universal rotation pulses“, *J. Magn. Reson.* **2012**, *225*, 142–160.
- [123] K. Kobzar, T. Skinner, N. Khaneja, S. Glaser, B. Luy, „Exploring the limits of broadband excitation and inversion pulses“, *J. Magn. Reson.* **2004**, *170*, 236–243.
- [124] K. Kobzar, T. Skinner, N. Khaneja, S. Glaser, B. Luy, „Exploring the limits of broadband excitation and inversion: II. RF-power optimized pulses“, *J. Magn. Reson.* **2008**, *194*, 58–66.
- [125] T. E. Skinner, K. Kobzar, B. Luy, M. R. Bendall, W. Bermel, N. Khaneja, S. J. Glaser, „Optimal control design of constant amplitude phase-modulated pulses: Application to calibration-free broadband excitation“, *J. Magn. Reson.* **2006**, *179*, 241–249.
- [126] T. E. Skinner, T. O. Reiss, B. Luy, N. Khaneja, S. J. Glaser, „Application of optimal control theory to the design of broadband excitation pulses for high-resolution NMR“, *J. Magn. Reson.* **2003**, *163*, 8–15.
- [127] T. E. Skinner, T. O. Reiss, B. Luy, N. Khaneja, S. J. Glaser, „Reducing the duration of broadband excitation pulses using optimal control with limited RF amplitude“, *J. Magn. Reson.* **2004**, *167*, 68–74.

- [128] B. Luy, K. Kobzar, T. E. Skinner, N. Khaneja, S. J. Glaser, „Construction of universal rotations from point-to-point transformations“, *J. Magn. Reson.* **2005**, *176*, 179–186.
- [129] T. E. Skinner, N. I. Gershenson, M. Nimbalkar, W. Bermel, B. Luy, S. J. Glaser, „New strategies for designing robust universal rotation pulses: Application to broadband refocusing at low power“, *J. Magn. Reson.* **2012**, *216*, 78–87.
- [130] S. Ehni, B. Luy, „BE<sup>tr</sup> and BUBI: J-compensated concurrent shaped pulses for <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C experiments“, *J. Magn. Reson.* **2013**, *232*, 7–17.
- [131] T. Skinner, T. Reiss, B. Luy, N. Khaneja, S. Glaser, „Tailoring the optimal control cost function to a desired output: application to minimizing phase errors in short broadband excitation pulses“, *J. Magn. Reson.* **2005**, *172*, 17–23.
- [132] S. Ehni, B. Luy, „A systematic approach for optimizing the robustness of pulse sequence elements with respect to couplings, offsets, and B<sub>1</sub>-field inhomogeneities (COB)“, *Magn. Reson. Chem.* **2012**, *50*, 63–72.
- [133] S. Ehni, B. Luy, „Robust INEPT and refocused INEPT transfer with compensation of a wide range of couplings, offsets, and B<sub>1</sub>-field inhomogeneities (COB3)“, *J. Magn. Reson.* **2014**, *247*, 111–117.
- [134] J.-M. Böhlen, I. Burghardt, M. Rey, G. Bodenhausen, „Frequency-modulated "Chirp" pulses for broadband inversion recovery in magnetic resonance“, *J. Magn. Reson.* **1990**, *90*, 183–191.
- [135] M. J. Thrippleton, J. Keeler, „Elimination of zero-quantum interference in two-dimensional NMR spectra“, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3938–3941.
- [136] J. J. Led, H. Gesmar, „Application of the linear prediction method to NMR spectroscopy“, *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 1413–1426.
- [137] E. Bartholdi, R. Ernst, „Fourier spectroscopy and the causality principle“, *J. Magn. Reson. (1969)* **1973**, *11*, 9–19.
- [138] J. Lindon, A. Ferrige, „Digitisation and data processing in Fourier transform NMR“, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1979**, *14*, 27–66.
- [139] F. Bloch, W. W. Hansen, M. Packard, „The Nuclear Induction Experiment“, *Phys. Rev.* **1946**, *70*, 474–485.
- [140] Ě. Kupče, R. Freeman, „Adiabatic pulses for wideband inversion and broadband decoupling“, *J. Magn. Reson. A* **1995**, *115*, 273–276.

- [141] K. E. Cano, M. J. Thrippleton, J. Keeler, A. Shaka, „Cascaded z-filters for efficient single-scan suppression of zero-quantum coherence“, *J. Magn. Reson.* **2004**, *167*, 291–297.
- [142] D. Wu, A. Chen, C. Johnson, „An Improved Diffusion-Ordered Spectroscopy Experiment Incorporating Bipolar-Gradient Pulses“, *J. Magn. Reson. Series A* **1995**, *115*, 260–264.
- [143] J. Furrer, „A robust, sensitive, and versatile HMBC experiment for rapid structure elucidation by NMR: IMPACT-HMBC“, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3396–3398.
- [144] O. Sørensen, G. Eich, M. Levitt, G. Bodenhausen, R. Ernst, „Product operator formalism for the description of NMR pulse experiments“, *Prog. NMR. Spectrosc.* **1983**, *16*, 163–192.
- [145] A. Meissner, O. W. Sørensen, „Economizing spectrometer time and broadband excitation in small-molecule heteronuclear NMR correlation spectroscopy. Broadband HMBC“, *Magn. Reson. Chem.* **2000**, *38*, 981–984.
- [146] K. Furihata, H. Seto, „Constant time HMBC (CT-HMBC), a new HMBC technique useful for improving separation of cross peaks“, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7337–7340.
- [147] R. Sharma, N. Gogna, H. Singh, K. Dorai, „Fast profiling of metabolite mixtures using chemometric analysis of a speeded-up 2D heteronuclear correlation NMR experiment“, *RSC Adv.* **2017**, *7*, 29860–29870.
- [148] Y. Liu, J. Saurí, E. Mevers, M. W. Peczu, H. Hiemstra, J. Clardy, G. E. Martin, R. T. Williamson, „Unequivocal determination of complex molecular structures using anisotropic NMR measurements“, *Science* **2017**, *356*.
- [149] *NMR of Ordered Liquids*, (Hrsg.: E. Burnell, C. de Lange), Springer Netherlands, **2003**.
- [150] *Nuclear Magnetic Resonance of Liquid Crystals, Bd. 141*, (Hrsg.: J. W. Emsley), Springer Netherlands, **1985**.
- [151] J. W. Emsley in *Liquid Crystalline Samples: Structure of Nonrigid Molecules*, John Wiley & Sons, Ltd, **2007**.
- [152] F. A. L. Anet, A. J. R. Bourn, „Nuclear Magnetic Resonance Spectral Assignments from Nuclear Overhauser Effects“, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 5250–5251.
- [153] M. Karplus, „Contact Electron-Spin Coupling of Nuclear Magnetic Moments“, *J. Chem. Phys* **1959**, *30*, 11–15.

- [154] C. Haasnoot, F. de Leeuw, C. Altona, „The relationship between proton-proton NMR coupling constants and substituent electronegativities—I: An empirical generalization of the Karplus equation“, *Tetrahedron* **1980**, *36*, 2783–2792.
- [155] W. Thomas, „Unravelling molecular structure and conformation—the modern role of coupling constants“, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1997**, *30*, 183–207.
- [156] R. Contreras, J. Peralta, „Angular dependence of spin–spin coupling constants“, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2000**, *37*, 321–425.
- [157] M. Ottiger, F. Delaglio, A. Bax, „Measurement of J and dipolar couplings from simplified two-dimensional NMR spectra“, *J. Magn. Reson.* **1998**, *131*, 373–378.
- [158] P. Permi, „A spin-state-selective experiment for measuring heteronuclear one-bond and homonuclear two-bond couplings from an HSQC-type spectrum“, *J. Biomol. NMR* **2002**, *22*, 27–35.
- [159] N. Tjandra, A. Bax, „Measurement of dipolar contributions to  $^1J_{CH}$  splittings from magnetic-field dependence of J modulation in two-dimensional NMR spectra“, *J. Magn. Reson.* **1997**, *124*, 512–515.
- [160] K. Fehér, S. Berger, K. E. Kövér, „Accurate determination of small one-bond heteronuclear residual dipolar couplings by F1 coupled HSQC modified with a G-BIRD $^r$  module“, *J. Magn. Reson.* **2003**, *163*, 340–346.
- [161] J. Furrer, M. John, H. Kessler, B. Luy, „J-Spectroscopy in the presence of residual dipolar couplings: determination of one-bond coupling constants and scalable resolution“, *J. Biomol. NMR* **2007**, *37*, 231–243.
- [162] J. Yan, A. D. Kline, H. Mo, M. J. Shapiro, E. R. Zartler, „A Novel Method for the Determination of Stereochemistry in Six-Membered Chairlike Rings Using Residual Dipolar Couplings“, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 1786–1795.
- [163] P. Nolis, J. F. Espinosa, T. Parella, „Optimum spin-state selection for all multiplicities in the acquisition dimension of the HSQC experiment“, *J. Magn. Reson.* **2006**, *180*, 39–50.
- [164] P. Tzvetkova, S. Simova, B. Luy, „PEHSQC: A simple experiment for simultaneous and sign-sensitive measurement of (1JCH+DCH) and (2JHH+DHH) couplings“, *J. Magn. Reson.* **2007**, *186*, 193–200.
- [165] K. E. Kövér, K. Fehér, „Measurement of one-bond heteronuclear dipolar coupling contributions for amine and diastereotopic methylene protons“, *J. Magn. Reson.* **2004**, *168*, 307–313.



- [166] G. Kummerlöwe, M. Behl, A. Lendlein, B. Luy, „Artifact-free measurement of residual dipolar couplings in DMSO by the use of cross-linked perdeuterated poly(acrylonitrile) as alignment medium“, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8273–8275.
- [167] J. Klages, H. Kessler, S. J. Glaser, B. Luy, „J-ONLY-TOCSY: Efficient suppression of RDC-induced transfer in homonuclear TOCSY experiments using JESTER-1-derived multiple pulse sequences“, *J. Magn. Reson.* **2007**, *189*, 217–227.
- [168] P. E. Hansen, „Carbon-hydrogen spin-spin coupling constants“, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1981**, *14*, 175–295.
- [169] J. L. Marshall, *Carbon-Carbon and Carbon-Proton NMR Couplings: Applications to Organic Stereochemistry and Conformational Analysis, Methods in Stereochemical Analysis*, VCH Pub, **1982**.
- [170] G. E. Martin in *Qualitative and quantitative exploitation of heteronuclear coupling constants*, Annual Reports on NMR Spectroscopy Supplement C, Academic Press, **2002**, S. 37–100.
- [171] N. Matsumori, D. Kaneno, M. Murata, H. Nakamura, K. Tachibana, „Stereochemical Determination of Acyclic Structures Based on Carbon-Proton Spin-Coupling Constants. A Method of Configuration Analysis for Natural Products“, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 866–876.
- [172] M. Wu, T. Okino, L. M. Nogle, B. L. Marquez, R. T. Williamson, N. Sitachitta, F. W. Berman, T. F. Murray, K. McGough, R. Jacobs, K. Colsen, T. Asano, F. Yokokawa, T. Shioiri, W. H. Gerwick, „Structure, Synthesis, and Biological Properties of Kalkitoxin, a Novel Neurotoxin from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*“, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12041–12042.
- [173] M. Murata, S. Matsuoka, N. Matsumori, G. K. Paul, K. Tachibana, „Absolute Configuration of Amphidinol 3, the First Complete Structure Determination from Amphidinol Homologues: Application of a New Configuration Analysis Based on Carbon-Hydrogen Spin-Coupling Constants“, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 870–871.
- [174] N. Matsumori, M. Murata, K. Tachibana, „Conformational analysis of natural products using long-range carbon-proton coupling constants: Three-dimensional structure of okadaic acid in solution“, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 12229–12238.
- [175] T. Rundlöf, A. Kjellberg, C. Damberg, T. Nishida, G. Widmalm, „Long-range proton-carbon coupling constants in conformational analysis of oligosaccharides“, *Magn. Reson. Chem.* **1998**, *36*, 839–847.

- [176] K. E. Milligan, B. L. Marquez, R. T. Williamson, W. H. Gerwick, „Lyngbyabellin B, a Toxic and Antifungal Secondary Metabolite from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*“, *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1440–1443.
- [177] M. Murata, T. Yasumoto, „The structure elucidation and biological activities of high molecular weight algal toxins: maitotoxin, prymnesins and zooxanthellatoxins“, *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17*, 293–314.
- [178] M. Eberstadt, G. Gemmecker, D. F. Mierke, H. Kessler, „Scalar Coupling Constants- Their Analysis and Their Application for the Elucidation of Structures“, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 1671–1695.
- [179] M. Köck, J. Junker, „How Many NOE Derived Restraints Are Necessary for a Reliable Determination of the Relative Configuration of an Organic Compound? Application to a Model System“, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8614–8615.
- [180] M. Kobayashi, S. Aoki, I. Kitagawa, „Absolute stereostructures of altohyrtin A and its congeners, potent cytotoxic macrolides from the Okinawan marine sponge *hyrtios altum*“, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 1243–1246.
- [181] Y. Hayakawa, J. W. Kim, H. Adachi, K. Shin-ya, K.-i. Fujita, H. Seto, „Structure of Apoptolidin, a Specific Apoptosis Inducer in Transformed Cells“, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3524–3525.
- [182] M. Falk, P. F. Spierenburg, J. A. Walter, „Determination of the stereochemistry of natural products from nuclear magnetic resonance data by constrained molecular dynamics“, *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 409–417.
- [183] M. Köck, J. Junker, *Bioorganic Chemistry*, (Hrsg.: U. Diederichsen, T. Lindhorst, B. Westermann, L. Wessjohann), Wiley-VCH Weinheim, **1999**.
- [184] H. Kessler, M. Gehrke, J. Lautz, M. Köck, D. Seebach, A. Thaler, „Complexation and medium effects on the conformation of cyclosporin A studied by NMR spectroscopy and molecular dynamics calculations“, *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *40*, 169–173.
- [185] *Multidimensional NMR methods for the solution state*, (Hrsg.: G. Morris, J. Emsley), Wiley-VCH, **2010**.
- [186] N. Nath, Lokesh, N. Suryaprakash, „Measurement and Applications of Long-Range Heteronuclear Scalar Couplings: Recent Experimental and Theoretical Developments“, *ChemPhysChem* **2012**, *13*, 645–660.

- [187] R. Marek, L. Králík, V. Sklenář, „Gradient-enhanced HSQC experiments for phase-sensitive detection of multiple bond interactions“, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 665–668.
- [188] R. T. Williamson, B. L. Márquez, W. H. Gerwick, K. E. Kövér, „One- and two-dimensional gradient-selected HSQMBC NMR experiments for the efficient analysis of long-range heteronuclear coupling constants“, *Magn. Reson. Chem.* **2000**, *38*, 265–273.
- [189] W. Koźmiński, „Simplified Multiplet Pattern HSQC-TOCSY Experiment for Accurate Determination of Long-Range Heteronuclear Coupling Constants“, *J. Magn. Reson.* **1999**, *137*, 408–412.
- [190] L. Ernst, *<sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie: Eine Einführung*, Dr. Dietrich Steinkopff Verlag, **1980**.
- [191] L. Yadav, *Organic Spectroscopy*, Springer-Science und Business Media, **2005**.
- [192] E. Breitmaier, K.-H. Spohn, S. Berger, „<sup>13</sup>C-Spin-Gitter-Relaxationszeiten und die Beweglichkeit gelöster organischer Moleküle“, *Angew. Chem.* **1975**, *87*, 152–168.
- [193] S. Bienz, *Anwendung Spektroskopischer Methoden, Teil: Kernmagnetische Resonanz*, **2002**.
- [194] J. J. Titman, D. Neuhaus, J. Keeler, „Measurement of long-range heteronuclear coupling constants“, *J. Magn. Reson. (1969)* **1989**, *85*, 111–131.
- [195] J. M. Richardson, J. J. Titman, J. Keeler, D. Neuhaus, „Assessment of a method for the measurement of long-range heteronuclear coupling constants“, *J. Magn. Reson. (1969)* **1991**, *93*, 533–553.
- [196] A. Bax, M. F. Summers, „Proton and carbon-13 assignments from sensitivity-enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple quantum NMR“, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2093–2094.
- [197] J. Furrer, „A comprehensive discussion of HMBC pulse sequences, part 1: The classical HMBC“, *Concepts Magn. Reson. Part A* **2012**, *40A*, 101–127.
- [198] J. Furrer, „A comprehensive discussion of HMBC pulse sequences. part 2. Some useful variants“, *Concepts Magn. Reson. Part A* **2012**, *40A*, 146–169.
- [199] R. T. Williamson, B. L. Marquez, W. H. Gerwick, K. E. Kövér, „One- and two-dimensional gradient-selected HSQMBC NMR experiments for the efficient analysis of long-range heteronuclear coupling constants“, *Magn. Reson. Chem.* **2000**, *38*, 265–273.

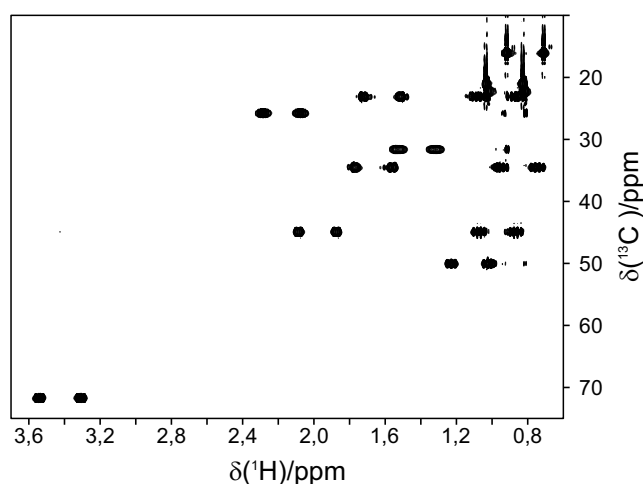
- [200] D. Uhrín, A. Mele, J. Boyd, M. R. Wormald, R. A. Dwek, „New methods for measurement of long-range proton-carbon coupling constants in oligosaccharides“, *J. Magn. Reson. (1969)* **1992**, *97*, 411–418.
- [201] K. E. Kövér, O. Prakash, V. J. Hruby, „Improved 2D inverse proton detected C,H correlation NMR techniques for the total assignment of carbon resonances of a highly delta opioid receptor agonist peptide“, *Magn. Reson. Chem.* **1993**, *31*, 231–237.
- [202] K. Takegoshi, K. Ogura, K. Hikichi, „A perfect spin echo in a weakly homonuclear J-coupled two spin- $\frac{1}{2}$  system“, *J. Magn. Reson.* **1989**, *84*, 611–615.
- [203] T. Parella, J. F. Espinosa, „Long-range proton-carbon coupling constants: NMR methods and applications“, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2013**, *73*, 17–55.
- [204] J. A. Aguilar, A. A. Colbourne, J. Cassani, M. Nilsson, G. A. Morris, „Decoupling two-dimensional NMR spectroscopy in both dimensions: pure shift NOESY and COSY“, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6460–6463.
- [205] E. Förster, J. Becker, F. Dalitz, B. Göring, B. Luy, H. Nirschl, G. Guthausen, „NMR Investigations on the Aging of Motor Oils“, *Energy & Fuels* **2015**, *29*, 7204–7212.
- [206] *Rohstoffeffizienz*, (Hrsg.: Umweltbundesamt), Umweltbundesamt, **2010**.
- [207] G. G. Nemsadze, B. P. Tonkonogov, I. K. Yunisov, A. D. Makarov, „Behavior of Low-Sap Motor Oils During Catalytic Oxidative Thermolysis“, *Chem. Technol. Fuels Oils* **2014**, *49*, 489–496.
- [208] S. K. Samanta, O. V. Singh, R. K. Jain, „Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation“, *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 243–248.
- [209] P. Willermet, „Some engine oil additives and their effects on antiwear film formation“, *Tribology Letters* **1998**, *5*, 41–47.
- [210] *Lubricant Additives: Chemistry and Applications*, (Hrsg.: L. R. Rudnick), CRC Press, **2009**.
- [211] A. Kupareva, P. Mäki-Arvela, H. Grénman, K. Eränen, R. Sjöholm, M. Reunanen, D. Y. Murzin, „Chemical Characterization of Lube Oils“, *Energy & Fuels* **2013**, *27*, 27–34.
- [212] G. Sikora, A. Mischczak in *Mechatronic Systems and Materials V*, Trans Tech Publications, **2013**, S. 182–187.

- [213] E. Dominguez-Rosado, J. Pichtel, „Chemical characterization of fresh, used and weathered motor oil via GC/MS, NMR and FTIR techniques“, *Proc. Indiana Acad. Sci* **2003**, *112* (2), 109–116.
- [214] M. Ballari, F. Bonetto, E. Anordo, „NMR relaxometry analysis of lubricant oils degradation“, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2005**, *38*, 3746–3750.
- [215] F. R. van de Voort, J. Sedman, R. Cocciardi, S. Juneau, „An automated FTIR method for the routine quantitative determination of moisture in lubricants: An alternative to Karl Fischer titration“, *Talanta* **2007**, *72*, 289–295.
- [216] J. Vanhanen, M. Rinkiö, J. Aumanen, J. Korppi-Tommola, E. Kolehmainen, T. Kerkänen, P. Törmä, „Characterization of used mineral oil condition by spectroscopic techniques“, *Appl. Opt.* **2004**, *43*, 4718–4722.
- [217] H. Günther, *NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts, and Applications in Chemistry*, 3. Aufl., Wiley-VCH, **2013**.

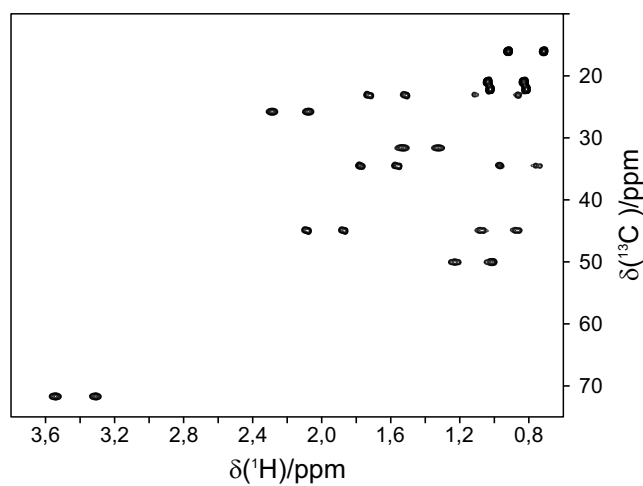


# Anhang

## A. CLIP-ASAP-HSQC Vergleichsspektren

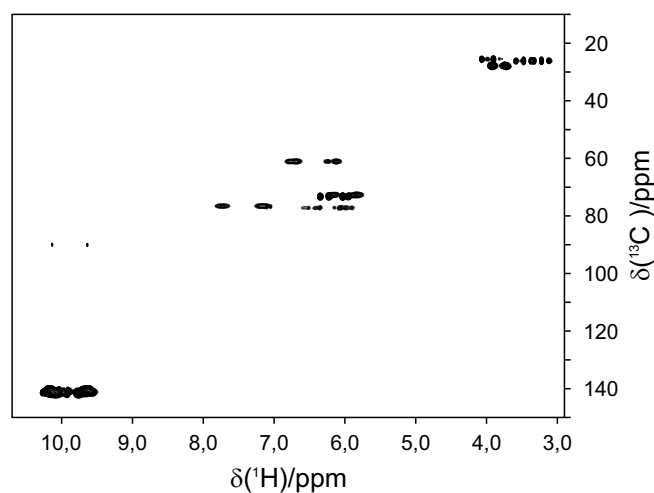


**Abbildung A.1:**  $\omega_2$ -gekoppeltes HSQC-Spektrum einer 500 mM/ $\text{CDCl}_3$  Menthol-Probe, aufgenommen mit der konventionellen CLIP-HSQC-Sequenz (Abbildung 3.10). Das Spektrum wurde mit  $2048 (^1\text{H}) \times 128 (^{13}\text{C})$  Punkten und Akquisitionszeiten von 427,1 ms ( $^1\text{H}$ ) und 4,2 ms ( $^{13}\text{C}$ ), jeweils einem *scan* für jedes  $t_1$ -Inkrement und 4 *dummy scans* aufgenommen. Es ergab sich dadurch eine Gesamtexperimentzeit von 6 min und 17 s. Prozessiert wurde unter Verwendung von *zero filling* und *linear prediction*, so dass die digitale Auflösung letztlich 0,3 Hz ( $^1\text{H}$ ) und 29,4 Hz ( $^{13}\text{C}$ ) beträgt. Die anhand dieses Spektrums bestimmten Kopplungskonstanten dienen zum Vergleich, sie sind in Tabelle 4.1 aufgelistet.

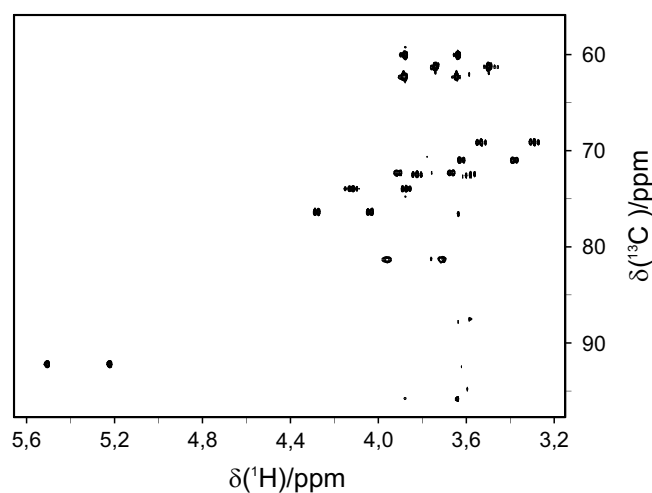


**Abbildung A.2:**  $\omega_2$ -gekoppeltes HSQC-Spektrum einer 500 mM/ $\text{CDCl}_3$  Menthol-Probe, aufgenommen mit dem CLIP-ASAP-HSQC-Experiment (Abbildung 4.13) unter Verwendung der MOCCA-XY16-Mischsequenz. Das Spektrum wurde mit  $512 (^1\text{H}) \times 128 (^{13}\text{C})$  Punkten und Akquisitionszeiten von 106,8 ms ( $^1\text{H}$ ) und 4,2 ms ( $^{13}\text{C}$ ), jeweils einem *scan* für jedes  $t_1$ -Inkrement und 4 *dummy scans* aufgenommen. Es ergab sich dadurch eine Gesamtexperimentzeit von 20 s. Prozessiert wurde unter Verwendung von *zero filling* und *linear prediction*, so dass die digitale Auflösung letztlich 1,2 Hz ( $^1\text{H}$ ) und 29,4 Hz ( $^{13}\text{C}$ ) beträgt. Die anhand dieses Spektrums bestimmten Kopplungskonstanten sind in Tabelle 4.1 aufgelistet.



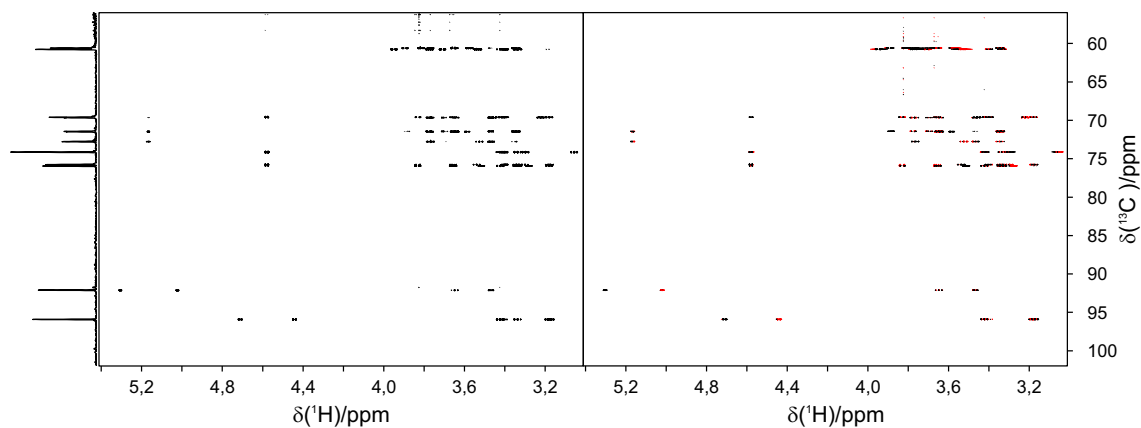


**Abbildung A.3:**  $\omega_2$ -gekoppeltes HSQC-Spektren von 2-(4-Chlorophenyl)-5-(dimethylphosphoryl)-4-phenyl-pyrrolidin-3-carboxylat in PBLG, aufgenommen mit dem konventionellen CLIP-HSQC-Experiment. Das Spektrum wurde mit  $2048 (^1\text{H}) \times 128 (^{13}\text{C})$  Punkten und Akquisitionszeiten von 142,5 ms ( $^1\text{H}$ ) und 2,4 ms ( $^{13}\text{C}$ ), jeweils einem *scan* für jedes  $t_1$ -Inkrement und 4 *dummy scans* aufgenommen. Mit einem Erholungs-*delay* von einer Sekunde ergab sich eine Gesamtexperimentzeit von 2 min und 34 s. Prozessiert wurde unter Verwendung von *zero filling* und *linear prediction*, so dass die digitale Auflösung letztlich 0,9 Hz ( $^1\text{H}$ ) und 53,1 Hz ( $^{13}\text{C}$ ) beträgt. Die aus diesem Spektrum extrahierten Kopplungskonstanten werden in Tabelle 4.2 mit den durch Verwendung der CLIP-ASAP-HSQC-Sequenz mit MOCCA-XY16 erhaltenen Werten verglichen.



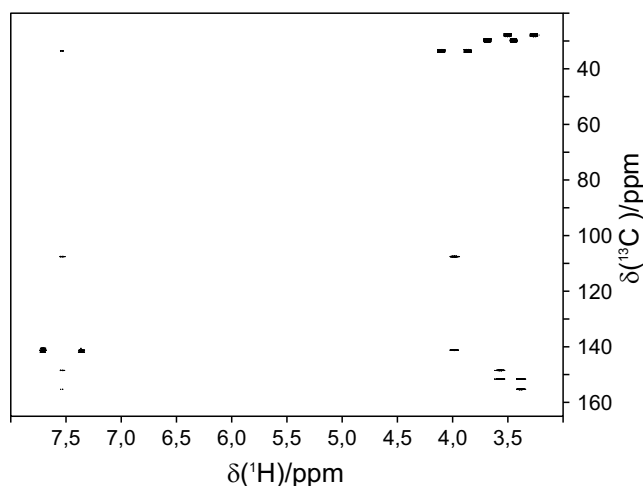
**Abbildung A.4:**  $\omega_2$ -gekoppeltes HSQC-Spektrum der isotropen 100 mM/D<sub>2</sub>O Saccharose-Probe. Es wurde unter Verwendung von NUS in nur 7 Sekunden aufgenommen. Es kam die symmetrisierte CLIP-ASAP-HSQC-Pulssequenz mit der MOCCA-XY16-Mischsequenz zum Einsatz. Das isotrope Spektrum wird in Abbildung 4.19 mit dem Spektrum der teilweise orientierten Saccharose-Probe verglichen. Es wurde mit 512 (<sup>1</sup>H) × 128 (<sup>13</sup>C) Punkten und Akquisitionszeiten von 142,3 ms (<sup>1</sup>H) und 8,5 ms (<sup>13</sup>C), jeweils einem *scan* für jedes  $t_1$ -Inkrement und 4 *dummy scans* aufgenommen. Durch die Verwendung von NUS wurde die Anzahl der tatsächlich aufgenommenen Inkremente auf 32 reduziert. Prozessiert wurde unter Verwendung von *zero filling* und *linear prediction*, so dass die digitale Auflösung letztlich 1,8 Hz (<sup>1</sup>H) und 29,5 Hz (<sup>13</sup>C) beträgt.

## B. HSQC-TOCSY-IPAP Vergleichsspektren

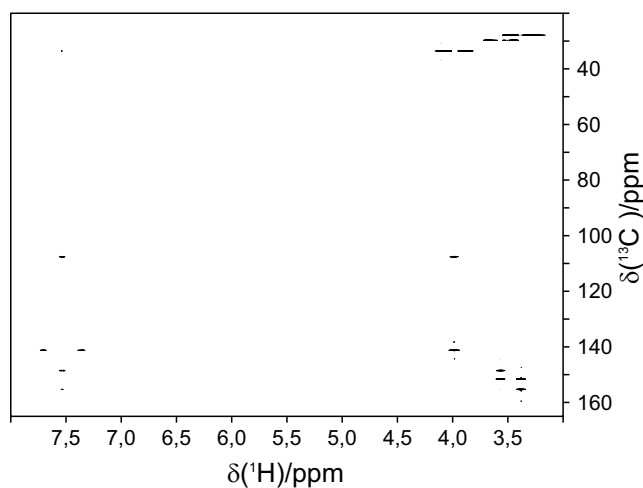


**Abbildung A.5:** Konventionelle HSQC-TOCSY-IPAP-Spektren einer 350 mM/D<sub>2</sub>O Glucose-Probe, aufgenommen mit dem konventionellen HSQC-TOCSY-IPAP-Experiment (Abbildung 3.11). Die Spektren wurden mit 2048 (<sup>1</sup>H) × 4096 (<sup>13</sup>C) Punkten und Akquisitionszeiten von 569,3 ms (<sup>1</sup>H) und 226,3 ms (<sup>13</sup>C), jeweils zwei *scans* für jedes *t*<sub>1</sub>-Inkrement und 4 *dummy scans* aufgenommen. Die Mischzeit der DIPSI-2-Periode betrug 51,80 ms. Das Erholungs-*delay* *d*<sub>r</sub> wurde auf 1 s eingestellt. Es ergab sich dadurch eine Gesamtexperimentzeit von 4 h 15 min und 8 s. Prozessiert wurde unter Verwendung von *zero filling* und *linear prediction*, so dass die digitale Auflösung letztlich 0,44 Hz (<sup>1</sup>H) und 1,1 Hz (<sup>13</sup>C) beträgt. Die anhand dieses Spektrums bestimmten Kopplungskonstanten dienen zum Vergleich, sie sind in Tabelle 4.5 aufgelistet.

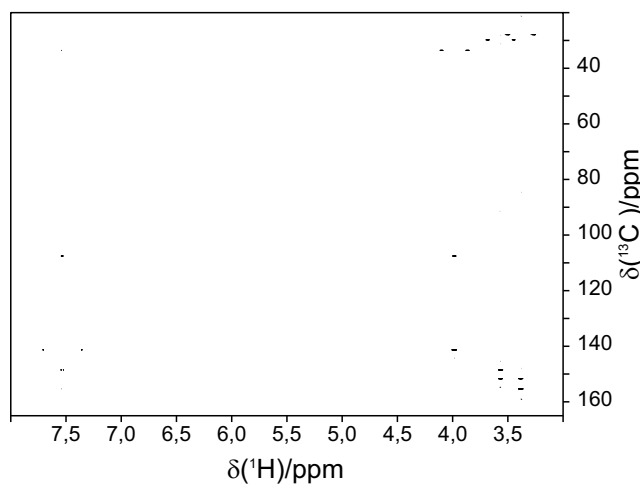
### C. 2D-Spektren der HSQMBC-Experimente



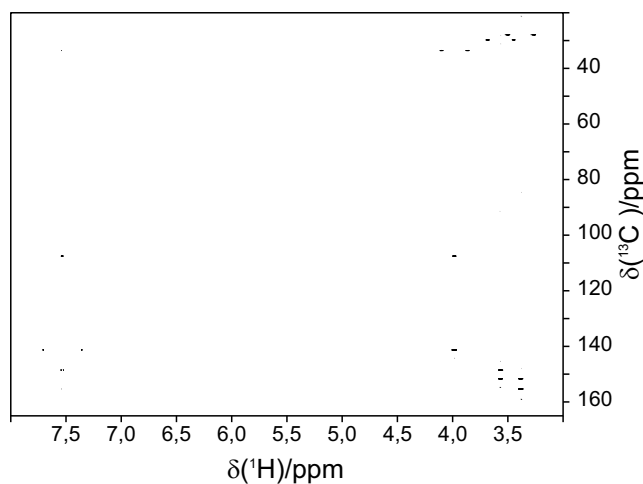
**Abbildung A.6:** 2D-HMBC-Spektrum das mit dem modifizierten IMPACT-HMBC-Experiment von einer 300 mM/ $\text{CDCl}_3$  Coffein-Probe aufgenommen wurde. Das Spektrum wurde mit  $838 (^1\text{H}) \times 16\,384 (^{13}\text{C})$  Punkten aufgenommen, dies entspricht Akquisitionszeiten von 99,9 ms ( $^1\text{H}$ ) und 226,3 ms ( $^{13}\text{C}$ ). Durch Verwendung von *Non Uniform Sampling* wurde die Anzahl der Punkte in der indirekten Dimension auf 818 Inkremente reduziert. Die Aufnahme erfolgte mit je einem *scan* für jedes  $t_1$ -Inkrement und 16 *dummy scans* zu Beginn des Experiments. Die Mischzeit der DIPSI-2-Periode betrug 34,53 ms. Es ergab sich eine Gesamtexperimentzeit von 6 min und 32s. Prozessiert wurde mit dem CS-Algorithmus [107] der TopSpin Software und zusätzlicher Verwendung von *zero filling* und *linear prediction*, so dass die digitale Auflösung letztlich 2,0 Hz ( $^1\text{H}$ ) und 1,1 Hz ( $^{13}\text{C}$ ) beträgt.



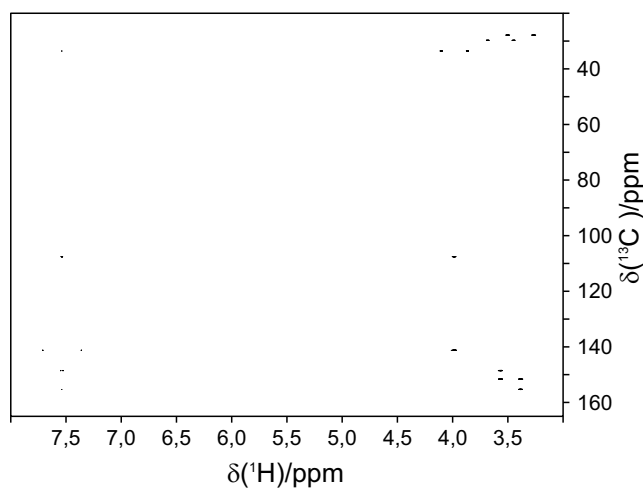
**Abbildung A.7:** 2D-HMBC-Spektrum, aufgenommen mit dem schnellen HSQMBC-Experiment mit PE-Transfer aus Abbildung 4.28 von einer 300 mM/ $\text{CDCl}_3$  Coffein-Probe. Das Spektrum wurde mit  $1508 (^1\text{H}) \times 16384 (^{13}\text{C})$  Punkten aufgenommen, dies entspricht Akquisitionszeiten von 179,8 ms ( $^1\text{H}$ ) und 226,3 ms ( $^{13}\text{C}$ ). Durch Verwendung von *Non Uniform Sampling* wurde die Anzahl der Punkte in der indirekten Dimension auf 820 Inkremente reduziert. Die Aufnahme erfolgte mit je einem *scan* für jedes  $t_1$ -Inkrement und 16 *dummy scans* zu Beginn des Experiments. Ein *delay* ersetzt die Mischsequenz. Es ergab sich eine Gesamtexperimentzeit von 6 min und 27 s. Prozessiert wurde mit dem CS-Algorithmus [107] der TopSpin Software und zusätzlicher Verwendung von *zero filling* und *linear prediction*, so dass die digitale Auflösung letztlich 2,0 Hz ( $^1\text{H}$ ) und 1,1 Hz ( $^{13}\text{C}$ ) beträgt.



**Abbildung A.8:** 2D-HMBC-Spektrum, aufgenommen mit dem schnellen HSQMBC-Experiment mit PE-Transfer und DIPSI-2-Mischsequenz aus Abbildung 4.28 von einer 300 mM/ $\text{CDCl}_3$  Coffein-Probe. Das Spektrum wurde mit  $1508 (^1\text{H}) \times 16\,384 (^{13}\text{C})$  Punkten aufgenommen, dies entspricht Akquisitionszeiten von 179,8 ms ( $^1\text{H}$ ) und 226,3 ms ( $^{13}\text{C}$ ). Durch Verwendung von *Non Uniform Sampling* wurde die Anzahl der Punkte in der indirekten Dimension auf 820 Inkremente reduziert. Die Aufnahme erfolgte mit je einem *scan* für jedes  $t_1$ -Inkrement und 16 *dummy scans* zu Beginn des Experiments. Die Mischzeit der DIPSI-2-Periode betrug 34,53 ms. Es ergab sich eine Gesamtexperimentzeit von 6 min und 27 s. Prozessiert wurde mit dem CS-Algorithmus [107] der TopSpin Software und zusätzlicher Verwendung von *zero filling* und *linear prediction*, so dass die digitale Auflösung letztlich 2,0 Hz ( $^1\text{H}$ ) und 1,1 Hz ( $^{13}\text{C}$ ) beträgt.

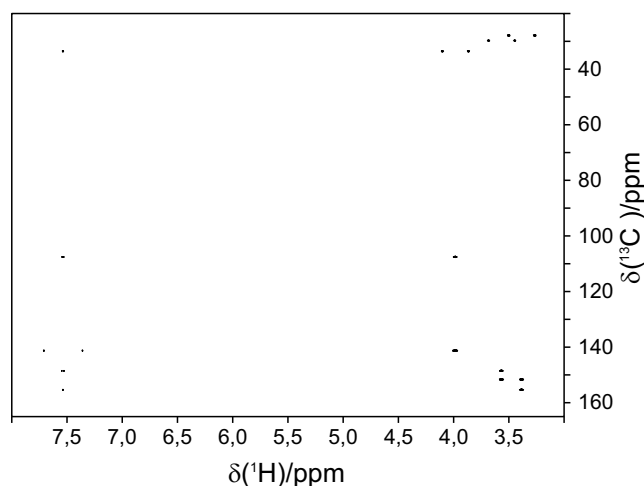


**Abbildung A.9:** 2D-HMBC-Spektrum, aufgenommen mit dem schnellen HSQMBC-Experiment aus Abbildung 4.28 von einer 300 mM/CDCl<sub>3</sub> Coffein-Probe. Das Spektrum wurde mit 2096 (<sup>1</sup>H) × 16 384 (<sup>13</sup>C) Punkten aufgenommen, dies entspricht Akquisitionszeiten von 249,8 ms (<sup>1</sup>H) und 226,3 ms (<sup>13</sup>C). Durch Verwendung von *Non Uniform Sampling* wurde die Anzahl der Punkte in der indirekten Dimension auf 820 Inkremente reduziert. Die Aufnahme erfolgte mit je einem *scan* für jedes *t*<sub>1</sub>-Inkrement und 16 *dummy scans* zu Beginn des Experiments. Ein *delay* ersetzt die Mischsequenz. Es ergab sich eine Gesamtexperimentzeit von 6 min und 32 s. Prozessiert wurde mit dem CS-Algorithmus [107] der TopSpin Software und zusätzlicher Verwendung von *zero filling* und *linear prediction*, so dass die digitale Auflösung letztlich 2,0 Hz (<sup>1</sup>H) und 1,1 Hz (<sup>13</sup>C) beträgt.



**Abbildung A.10:** 2D-HMBC-Spektrum, aufgenommen mit dem schnellen HSQMBC-Experiment mit DIPSI-2-Mischsequenz aus Abbildung 4.28 von einer 300 mM/ $\text{CDCl}_3$  Coffein-Probe. Das Spektrum wurde mit  $2096 (^1\text{H}) \times 16\,384 (^{13}\text{C})$  Punkten aufgenommen, dies entspricht Akquisitionszeiten von 249,8 ms ( $^1\text{H}$ ) und 226,3 ms ( $^{13}\text{C}$ ). Durch Verwendung von *Non Uniform Sampling* wurde die Anzahl der Punkte in der indirekten Dimension auf 820 Inkremente reduziert. Die Aufnahme erfolgte mit je einem *scan* für jedes  $t_1$ -Inkrement und 16 *dummy scans* zu Beginn des Experiments. Die Mischzeit der DIPSI-2-Periode betrug 34,53 ms. Es ergab sich eine Gesamtexperimentzeit von 6 min und 32 s. Prozessiert wurde mit dem CS-Algorithmus [107] der TopSpin Software und zusätzlicher Verwendung von *zero filling* und *linear prediction*, so dass die digitale Auflösung letztlich 2,0 Hz ( $^1\text{H}$ ) und 1,1 Hz ( $^{13}\text{C}$ ) beträgt.





**Abbildung A.11:** 2D-HMBC-Spektrum, aufgenommen mit dem schnellen HSQMBC-Experiment aus Abbildung 4.28 von einer 300 mM/ $\text{CDCl}_3$  Coffein-Probe. Das Spektrum wurde mit  $2096 (^1\text{H}) \times 4096 (^{13}\text{C})$  Punkten aufgenommen, dies entspricht Akquisitionszeiten von 244,1 ms ( $^1\text{H}$ ) und 56,6 ms ( $^{13}\text{C}$ ). Durch Verwendung von *Non Uniform Sampling* wurde die Anzahl der Punkte in der indirekten Dimension auf 288 Inkremente reduziert. Die Aufnahme erfolgte mit je einem *scan* für jedes  $t_1$ -Inkrement und 16 *dummy scans* zu Beginn des Experiments. Ein *delay* ersetzt die Mischsequenz. Es ergab sich eine Gesamtexperimentzeit von 2 min und 2 s. Prozessiert wurde mit dem CS-Algorithmus [107] der TopSpin Software und zusätzlicher Verwendung von *zero filling* und *linear prediction*, so dass die digitale Auflösung letztlich 1,0 Hz ( $^1\text{H}$ ) und 4,4 Hz ( $^{13}\text{C}$ ) beträgt.

## D. Pulsprogramme für Spektrometer der Firma Bruker

### D.1. Originales ASAP/ALSOFAST-HSQC

```
;ASAP-hs qcetg psp
;avance-version (02/07/15)
;ASAP-HSQC
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
;with decoupling during acquisition
;with DIPSI-2 mixing after acquisition for ASAP
;using shaped pulses on f1 and f2.
;David Schulze-Suenninghausen, Johanna Becker, Burkhard Luy
;"Rapid Heteronuclear Single Quantum Correlation NMR Spectra at Natural
  Abundance"
;J. Am. Chem. Soc., 2014, 136 (4), pp 1242-1245.
```

```
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

; *** Echo-/Antiecho gradient strenght calculation
"cnst12=1/(1+sfo2/sfo1)"
"cnst13=(1-sfo2/sfo1)"
define list<gradient> EA1 = { cnst12 1 }
define list<gradient> EA2 = { 1 cnst13 }
; ***
"p2=p1*2"
"d0=3u"
"d11=30m"
"d16=200u"
"d20=1m"
"FACTOR1=(d9/(p6*115.112))/2"
"l1=FACTOR1*2" ; TOCSY loop counter
"d0=3u"
"in0=in f1 /2"
"d4=1s/(4*cnst4)" ; 1/(4J)XH
"d3=1s/(4*cnst3)" ; reduced d4
"DELTA=0.5*(2*d3+p21-p1)"
"DELTA1=0.5*(2*d3-p21+p1)"
```

```
"DELTA4=d4-p16-d16-3u"
"DELTA3=p16+3u+d16+p21-p25+p1"
"DELTA2=0.5*(DELTA3+p16+d16+3u-2*d0)"
```

```
1 ze
  d11 p112 : f2
2 d1 do : f2
3 d20 UNBLKGRAD
  p16 : gp2
  d16 p110 : f1
; *** begin DIPSI-2
4 p6*3.556 ph23
  p6*4.556 ph25
  p6*3.222 ph23
  p6*3.167 ph25
  p6*0.333 ph23
  p6*2.722 ph25
  p6*4.167 ph23
  p6*2.944 ph25
  p6*4.111 ph23

  p6*3.556 ph25
  p6*4.556 ph23
  p6*3.222 ph25
  p6*3.167 ph23
  p6*0.333 ph25
  p6*2.722 ph23
  p6*4.167 ph25
  p6*2.944 ph23
  p6*4.111 ph25

  p6*3.556 ph25
  p6*4.556 ph23
  p6*3.222 ph25
  p6*3.167 ph23
```

```

p6*0.333 ph25
p6*2.722 ph23
p6*4.167 ph25
p6*2.944 ph23
p6*4.111 ph25

p6*3.556 ph23
p6*4.556 ph25
p6*3.222 ph23
p6*3.167 ph25
p6*0.333 ph23
p6*2.722 ph25
p6*4.167 ph23
p6*2.944 ph25
p6*4.111 ph23
lo to 4 times l1
; *** end DIPSI-2
p16:gp3
d16 p10:f1 p10:f2

; *** INEPT with reduced coupling delay d3
(p21:sp21 ph1):f1
DELTA
(center (p22:sp22 ph1):f1 (p22:sp23 ph6):f2)
DELTA1 p11:f1
(ralign (p1 ph1):f1 (p21:sp24 ph9):f2)
; ***

; *** t1 incrementation
DELTA2 p10:f1
d0
(p22:sp22 ph5):f1
d0
DELTA2 p11:f1
; ***
(lalign (p1 ph7):f1 (p25:sp25 ph10):f2); 12C-bound protons aligned
along z, 13C-bound protons remain transversal
DELTA3 p10:f1

```

```

(p22:sp22 ph1):f1
3u
p16:gp1*EA1 ; first Echo-/Antiecho selection gradient
d16

; *** Back transfer
(p21:sp26 ph10):f2
d4
(center (p22:sp22 ph1):f1 (p22:sp23 ph6):f2)
3u
p16:gp1*EA2 ; final Echo-/Antiecho selection gradient
d16 p112:f2
DELTA4 BLKGRAD

; ***
go=2 ph31 cpd2:f2
d1 do:f2 mc #0 to 2
F1EA(calgrad(EA1) & calgrad(EA2), caldel(d0, +in0) & calph(ph9, +180)
      & calph(ph6, +180) & calph(ph31, +180))
exit

ph1=0
ph2=1
ph5=0 0 2 2
ph6=0
ph7=3
ph8=3
ph9=2 0
ph10=0 0 0 0 2 2 2 2
ph23=3
ph25=1
ph31=0 2 0 2 2 0 2 0

;p10 : 0W
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p110 : f1 channel - power level for mixing sequence (DIPSI-2)

```

```

;p112: f2 channel – power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel – 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel – 180 degree high power pulse
;p6 : f1 channel – 90 degree pulse for mixing sequence (DIPSI–2)
;p21 : 550u excitation pulses
;p22 : 600u UR and Inversion pulses
;p25 : 1100u 13C refocusing pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;spnam21 : jc01_BEBOP_zx_550u_BW10_RF20_pm20_Hc0.999971119.pul
;spnam22 : jc02_BURBOP_x_600u_BW10_RF20_pm20_matched.pul
;spnam23 : jc03_BIBOP_600u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam24 : jc05_BEBOP_zy_550u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam25 : jc07_BURBOP_y_1100u_BW37.5_RF10_pm5_Hc0.999876221.pul
;spnam26 : jc09_BEBOP_–yz_550u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;sp21 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp22 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp23 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp24 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp25 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp26 : 10 kHz Rf Amplitude
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1–5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d3 : reduced d4
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery [200ms]
;cnst4: = J(XH)
;cnst3: reduced cnst4 ('ernst angle')
;inf1: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 1 * n
;DS: >= 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: echo–antiecho
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel – 90 degree pulse for decoupling sequence

;use gradient ratio: gp 1 : gp 2 : gp 3

```

; 80 : 33 : 43

;for z-only gradients:

;gpz1: 80%

;gpz2: 33% ; gradient before mixing

;gpz3: 43% ; gradient after mixing

;use gradient files:

;gpnam1: SMSQ10.100

;gpnam2: SMSQ10.100

;gpnam3: SMSQ10.100

## D.2. Symmetrisiertes ASAP/ALSOFAST-HSQC

```

;ASAP-hsqcetgp
;avance-version (09/04/17)
;ASAP-HSQC
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
;with decoupling during acquisition
;with DIPSI mixing after acquisition for ASAP
;using shape pulses on f1 and f2.
;D. Schulze-Suenninghausen, J. Becker, M. R. M. Koos, B. Luy
;"Improvements, Extensions, and Practical Aspects of Rapid ASAP-HSQC
and ALSOFAST-HSQC Pulse Sequences for Studying Small Molecules at
Natural Abundance"
;J. Magn. Reson., 281, 151-161 (2017).

;CLASS=HighRes
;DIM=2D
;TYPE=
;SUBTYPE=
;COMMENT=

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"d0=3u"
"d3=(d4+4u)*cnst3-4u" ; reduced INEPT delay (1st transfer)
"d4=1s/(cnst2*4) -4u" ; general INEPT delay (2nd transfer)
"DELTA4=d4-p16-d16-de+p1*2/PI"; d4 reduced for EA gradient pulse
"DELTA=p16+d16+d0+p22*0.5" ; gradient pulse length,
refocusing of first d0
"d11=30m"
"in0=in f1 /2"
"acqt0=0"
"FACTOR1=(d9/(p6*115.112))/2" ;DISPI parameters
"l1=FACTOR1*2"

1 ze
4u

```



```
2 d1 do:f2
  4u UNBLKGRAD
  p16:gp3
  d16 p110:f1
;begin DIPSI-2
3 p6*3.556 ph23
  p6*4.556 ph25
  p6*3.222 ph23
  p6*3.167 ph25
  p6*0.333 ph23
  p6*2.722 ph25
  p6*4.167 ph23
  p6*2.944 ph25
  p6*4.111 ph23

  p6*3.556 ph25
  p6*4.556 ph23
  p6*3.222 ph25
  p6*3.167 ph23
  p6*0.333 ph25
  p6*2.722 ph23
  p6*4.167 ph25
  p6*2.944 ph23
  p6*4.111 ph25

  p6*3.556 ph25
  p6*4.556 ph23
  p6*3.222 ph25
  p6*3.167 ph23
  p6*0.333 ph25
  p6*2.722 ph23
  p6*4.167 ph25
  p6*2.944 ph23
  p6*4.111 ph25

  p6*3.556 ph23
  p6*4.556 ph25
  p6*3.222 ph23
  p6*3.167 ph25
```

```

p6*0.333 ph23
p6*2.722 ph25
p6*4.167 ph23
p6*2.944 ph25
p6*4.111 ph23
lo to 3 times l1
;end DIPSI-2
4u
p16:gp4
d16 p10:f1 p1=0[Watt]:f2 ; power level for shape pulses

;inept, reduced delay
4 (p21:sp21 ph1):f1 ;BEBOP:f1, [zx]
d3
4u
(p22:sp22 ph1):f1 (p22:sp23 ph1):f2 ;BUBI(URx180:f1, BIBOP:f2 [z-z
])
d3
4u p11:f1
(p1 ph1):f1 (p21:sp24 ph4):f2 ;p1, BEBOP:f2 [zy]

;coherence pathway selection 1
4u
DELTA
(p22:sp23 ph7):f2 ;BIBOP:f2 [z-z]
4u
p16:gp1*0.5*EA
d16 p10:f1

;t1
d0
(p22:sp22 ph5):f1 ;URx180 F1
d0

;coherence pathway selection 2
4u
p16:gp1*0.5*EA
d16
(p22:sp23 ph8):f2 ;BIBOP:f2 [z-z]

```

```

4u
DELTA p11:f1

;inept
  (ralign (p1 ph2):f1 (p21:sp26 ph3):f2);p1, BEBOP:f2 [yz]
4u
d4 p10:f1
(p22:sp22 ph1):f1 (p22:sp23 ph6):f2 ;BUBI(URx180:f1, BIBOP:f2 [z-z
  ])
4u
p16:gp2
d16 p112:f2 p11:f1
DELTA4 BLKGRAD

go=2 ph31 cpd2:f2
d1 do:f2 mc #0 to 2
  F1EA(calgrad(EA), caldel(d0, +in0) & calph(ph3, +180) & calph(ph6,
    +180) & calph(ph31, +180))
exit

#ifdef NOPHASECYCLE
ph1=0
ph2=1
ph3=0
ph4=0
ph5=0
ph6=0
ph7=1
ph8=3
ph14=2
ph23=3
ph25=1
ph31=0
#else
ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4 =0 0 0 0 2 2 2 2
ph5=0 0 2 2

```

```

ph6=0
ph7=1 1 1 1 3 3 3 3
ph8=3 3 3 3 1 1 1 1
ph14=2 2 2 2 0 0 0 0
ph23=3
ph25=1
ph31=0 2 0 2 2 0 2 0
#endif /*nophasecycle*/

;p11 : f1 channel – power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel – power level for pulse (default)
;p110 : f1 channel – power level for mixing sequence
;p112: f2 channel – power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel – 90 degree high power pulse
;p3 : f2 channel – 90 degree high power pulse
;p6 : f1 channel – 90 degree pulse for mixing sequence
;p16: homospoil/gradient pulse

;p21 : 550u excitation pulses
;p22 : 600u UR and Inversion pulses
;spnam21 : jc01_BEBOP_zx_550u_BW10_RF20_pm20_Hc0.99997119.pul
;spnam22 : jc02_BURBOP_x_600u_BW10_RF20_pm20_matched.pul
;spnam23 : jc03_BIBOP_600u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam24 : jc05_BEBOP_zy_550u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam26 : jc09_BEBOP_–yz_550u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;sp21 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp22 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp23 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp24 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp26 : 10 kHz Rf Amplitude

;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1–5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d3 : reduced d4
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;cnst2: = J(XH)
;cnst3: reduced cnst2 ('ernst angle')

```

```

;inf1: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 1 * n
;DS: >= 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: echo-antiecho
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

;use gradient ratio:      gp 1 : gp 2 : gp 3 : gp 4
;                          80 : 20.1 : 33 : 44   for C-13

;for z-only gradients:
;gpz1: 80%
;gpz2: 20.1% for C-13
;gpz3: 33% ; gradient before mixing
;gpz4: 43% ; gradient after mixing

;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.100
;gpnam2: SMSQ10.100
;gpnam3: SMSQ10.100
;gpnam4: SMSQ10.100

```

### D.3. Originales CLIP-ASAP/ALSOFAST-HSQC

```

;CLIP-ASAP-hsqcetgpsp
;avance-version (02/07/15)
;CLIP-ASAP-HSQC
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
;no decoupling during acquisition
;with DIPSI-2 mixing after acquisition for ASAP
;using shaped pulses on f1 and f2.
;Johanna Becker, Burkhard Luy
;"CLIP-ASAP-HSQC for fast and accurate extraction of one-bond couplings
  from isotropic and partially aligned molecules"
;Magn. Reson. Chem., 53 (11),pp 878-885 (2015).

```

```

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

; *** Echo-/Antiecho gradient strenght calculation
"cnst12=1/(1+sfo2/sfo1)"
"cnst13=(1-sfo2/sfo1)"
define list<gradient> EA1 = { cnst12 1 }
define list<gradient> EA2 = { 1 cnst13 }

; ***
"p2=p1*2"
"d0=3u"
"d11=30m"
"d16=100u"
"d20=1m"
"FACTOR1=(d9/(p6*115.112))/2"
"l1=FACTOR1*2" ; TOCSY loop counter
"d0=3u"
"in0=inf1/2"
"d4=1s/(4*cnst4)" ; 1/(4J)XH
"d3=1s/(4*cnst3)" ; reduced d4
"DELTA=0.5*(2*d3+p21-p1)"
"DELTA1=0.5*(2*d3-p21+p1)"
"DELTA4=d4-p16-d16-3u-p3-3u"
"DELTA3=p16+3u+d16+p21-p25+p1"
"DELTA2=0.5*(DELTA3+p16+d16+3u-2*d0)"

1 ze
  d11 p112:f2
2 d1 do:f2
3 d20 UNBLKGRAD
  p16:gp2
  d16 p110:f1
; *** begin DIPSI-2

```

4 p6\*3.556 ph23  
p6\*4.556 ph25  
p6\*3.222 ph23  
p6\*3.167 ph25  
p6\*0.333 ph23  
p6\*2.722 ph25  
p6\*4.167 ph23  
p6\*2.944 ph25  
p6\*4.111 ph23

p6\*3.556 ph25  
p6\*4.556 ph23  
p6\*3.222 ph25  
p6\*3.167 ph23  
p6\*0.333 ph25  
p6\*2.722 ph23  
p6\*4.167 ph25  
p6\*2.944 ph23  
p6\*4.111 ph25

p6\*3.556 ph25  
p6\*4.556 ph23  
p6\*3.222 ph25  
p6\*3.167 ph23  
p6\*0.333 ph25  
p6\*2.722 ph23  
p6\*4.167 ph25  
p6\*2.944 ph23  
p6\*4.111 ph25

p6\*3.556 ph23  
p6\*4.556 ph25  
p6\*3.222 ph23  
p6\*3.167 ph25  
p6\*0.333 ph23  
p6\*2.722 ph25  
p6\*4.167 ph23  
p6\*2.944 ph25

```

    p6*4.111 ph23
lo to 4 times l1
; *** end DIPSI-2
    p16:gp3
    d16 p10:f1 p10:f2

; *** INEPT with reduced coupling delay d3
    (p21:sp21 ph1):f1
DELTA
    (center (p22:sp22 ph1):f1 (p22:sp23 ph6):f2)
DELTA1 p11:f1
    (ralign (p1 ph1):f1 (p21:sp24 ph9):f2)
; ***

; *** t1 incrementation
DELTA2 p10:f1
d0
    (p22:sp22 ph5):f1
d0
DELTA2 p11:f1
; ***
    (lalign (p1 ph7):f1 (p25:sp25 ph10):f2); 12C-bound protons aligned
        along z, 13C-bound protons remain transversal
DELTA3 p10:f1
    (p22:sp22 ph1):f1
3u
p16:gp1*EA1 ; first Echo-/Antiecho selection gradient
d16

; *** Back transfer
    (p21:sp26 ph10):f2
d4
    (center (p22:sp22 ph1):f1 (p22:sp23 ph6):f2)
3u
p16:gp1*EA2 ; final Echo-/Antiecho selection gradient
d16 p12:f2
DELTA4 BLKGRAD
; *** CLIP pulse
    (p3 ph1):f2

```



```

        3u pl12:f2
; ***
    go=2 ph31
    d1 do:f2 mc #0 to 2
    F1EA(calgrad (EA1) & calgrad (EA2), caldel(d0, +in0) & calph(ph9,
        +180) & calph(ph6, +180) & calph(ph31, +180))
exit

```

```

ph1=0
ph2=1
ph5=0 0 2 2
ph6=0
ph7=3
ph8=3
ph9=2 0
ph10=0 0 0 0 2 2 2 2
ph23=3
ph25=1
ph31=0 2 0 2 2 0 2 0

```

```

;p10 : 0W
;p11 : f1 channel – power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel – power level for pulse (default)
;p110 : f1 channel – power level for mixing sequence (DIPSI-2)
;p112: f2 channel – power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel – 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel – 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel – 90 degree high power pulse
;p6 : f1 channel – 90 degree pulse for mixing sequence (DIPSI-2)
;p21 : 550u excitation pulses
;p22 : 600u UR and Inversion pulses
;p25 : 1100u 13C refocusing pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;spnam21 : jc01_BEBOP_zx_550u_BW10_RF20_pm20_Hc0.99997119.pul
;spnam22 : jc02_BURBOP_x_600u_BW10_RF20_pm20_matched.pul
;spnam23 : jc03_BIBOP_600u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul

```

```

;spnam24 : jc05_BEBOP_zy_550u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam25 : jc07_BURBOP_y_1100u_BW37.5_RF10_pm5_Hc0.999876221.pul
;spnam26 : jc09_BEBOP_-yz_550u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;sp21 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp22 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp23 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp24 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp25 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp26 : 10 kHz Rf Amplitude
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d3 : reduced d4
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery [200ms]
;cnst4: = J(XH)
;cnst3: reduced cnst4 ('ernst angle')
;inf1: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 1 * n
;DS: >= 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: echo-antiecho
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

;use gradient ratio: gp 1 : gp 2 : gp 3
; 80 : 33 : 43

;for z-only gradients:
;gpz1: 80%
;gpz2: 33% ; gradient before mixing
;gpz3: 43% ; gradient after mixing

;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.100
;gpnam2: SMSQ10.100
;gpnam3: SMSQ10.100

```

**D.4. Symmetrisiertes CLIP-ASAP/ALSOFAST-HSQC**

```

;clip ASAP-hsqcetgp
;avance-version (09/04/17)
;CLIP-ASAP-HSQC
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
;no decoupling during acquisition
;with DIPSI mixing after acquisition for ASAP
;using shape pulses on f1 and f2.
;D. Schulze-Suenninghausen, J. Becker, M. R. M. Koos, B. Luy
;"Improvements, Extensions, and Practical Aspects of Rapid ASAP-HSQC
and ALSOFAST-HSQC Pulse Sequences for Studying Small Molecules at
Natural Abundance"
;J. Magn. Reson., 281, 151-161 (2017).

;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"d4=1s/(cnst2*4) -4u" ; general INEPT delay (2nd transfer)
"d3=(d4+4u)*cnst3-4u" ; reduced INEPT delay (1st transfer)
"d11=30m"
"d0=3u"
"in0=inf1/2"
"acqt0=0"
"DELTA4=d4-p16-d16-de+p1*2/PI-p3"; d4 reduced for EA gradient pulse
"DELTA =p16+d16+d0+p22*0.5" ; gradient pulse length,
refocusing of first d0
"FACTOR1=(d9/(p6*115.112))/2" ;DISPI parameters
"l1=FACTOR1*2"

1 ze
d11

```

```
2 d1 do:f2
  4u UNBLKGRAD
  p16:gp3
  d16 p110:f1
;begin DIPSI-2
3 p6*3.556 ph23
  p6*4.556 ph25
  p6*3.222 ph23
  p6*3.167 ph25
  p6*0.333 ph23
  p6*2.722 ph25
  p6*4.167 ph23
  p6*2.944 ph25
  p6*4.111 ph23

  p6*3.556 ph25
  p6*4.556 ph23
  p6*3.222 ph25
  p6*3.167 ph23
  p6*0.333 ph25
  p6*2.722 ph23
  p6*4.167 ph25
  p6*2.944 ph23
  p6*4.111 ph25

  p6*3.556 ph25
  p6*4.556 ph23
  p6*3.222 ph25
  p6*3.167 ph23
  p6*0.333 ph25
  p6*2.722 ph23
  p6*4.167 ph25
  p6*2.944 ph23
  p6*4.111 ph25

  p6*3.556 ph23
  p6*4.556 ph25
  p6*3.222 ph23
  p6*3.167 ph25
```

```

p6*0.333 ph23
p6*2.722 ph25
p6*4.167 ph23
p6*2.944 ph25
p6*4.111 ph23
lo to 3 times l1
;end DIPSI-2
4u
p16:gp4
d16 p10:f1 p1=0[Watt]:f2 ; power level for shape pulses

;inept, reduced delay
4 (p21:sp21 ph1):f1 ;BEBOP:f1, [zx]
d3
4u
(p22:sp22 ph1):f1 (p22:sp23 ph1):f2 ;BUBI( URx180:f1, BIBOP:f2 [z-z
])
d3
4u p11:f1
(p1 ph1):f1 (p21:sp24 ph4):f2 ;p1, BEBOP:f2 [zy]

;coherence pathway selection 1
4u
DELTA
(p22:sp23 ph4):f2 ;BIBOP f2
4u
p16:gp1*0.5*EA
d16 p10:f1

;t1
d0
(p22:sp22 ph5):f1 ;URx180 F1
d0

;coherence pathway selection 2
4u
p16:gp1*0.5*EA
d16
(p22:sp23 ph14):f2 ;BIBOP f2

```

```

4u
DELTA p11:f1

;inept
( ralign (p1 ph2):f1 (p21:sp26 ph3):f2 );p1, BEBOP:f2 [yz]
4u
d4 p10:f1
(p22:sp22 ph1):f1 (p22:sp23 ph6):f2 ;BUBI( URx180:f1, BIBOP:f2 [z-z
] )
4u
p16:gp2
d16 p12:f2 p11:f1
DELTA4 BLKGRAD
; CLIP pulse
(p3 ph1):f2

go=2 ph31 ;cpd2:f2
d1 do:f2 mc #0 to 2
F1EA(calgrad(EA), caldel(d0, +in0) & calph(ph3, +180) & calph(ph6,
+180) & calph(ph31, +180))
exit

#ifdef NOPHASECYCLE
ph1=0
ph2=1
ph3=0
ph4=0
ph5=0
ph6=0
ph14=2
ph23=3
ph25=1
ph31=0
#else
ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4 =0 0 0 0 2 2 2 2
ph5=0 0 2 2

```

```

ph6=0
ph14=2 2 2 2 0 0 0 0
ph23=3
ph25=1
ph31=0 2 0 2 2 0 2 0
#endif /*nophasecycle*/

;p11 : f1 channel – power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel – power level for pulse (default)
;p110 : f1 channel – power level for mixing sequence
;p112: f2 channel – power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel – 90 degree high power pulse
;p3 : f2 channel – 90 degree high power pulse
;p6 : f1 channel – 90 degree pulse for mixing sequence
;p16: homospoil/gradient pulse

;p21 : 550u excitation pulses
;p22 : 600u UR and Inversion pulses
;p25 : 1100u 13C refocusing pulse
;spnam21 : jc01_BEBOP_zx_550u_BW10_RF20_pm20_Hc0.99997119.pul
;spnam22 : jc02_BURBOP_x_600u_BW10_RF20_pm20_matched.pul
;spnam23 : jc03_BIBOP_600u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam24 : jc05_BEBOP_zy_550u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam25 : jc07_BURBOP_y_1100u_BW37.5_RF10_pm5_Hc0.999876221.pul
;spnam26 : jc09_BEBOP_–yz_550u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;sp21 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp22 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp23 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp24 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp25 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp26 : 10 kHz Rf Amplitude

;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1–5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d3 : reduced d4
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;cnst2: = J(XH)

```

```

;cnst3: reduced cnst2 ('ernst angle')
;inf1: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 1 * n
;DS: >= 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: echo-antiecho
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

;use gradient ratio:      gp 1 : gp 2 : gp 3 : gp 4
;                          80 : 20.1 : 33 : 44 for C-13

;for z-only gradients:
;gpz1: 80%
;gpz2: 20.1% for C-13
;gpz3: 33% ; gradient before mixing
;gpz4: 43% ; gradient after mixing

;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.100
;gpnam2: SMSQ10.100
;gpnam3: SMSQ10.100
;gpnam4: SMSQ10.100

```

## D.5. ASAP-HSQC-TOCSY-IP

```

;ASAP-hsqcetgp-TOCSY
;avance-version (09/04/17)
;ASAP-HSQC-TOCSY
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
;for ASAP-HSQC-TOCSY-IP no decoupling during acquisition
;with DIPSI mixing
;using shape pulses on f1 and f2.

;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=

```



```

;SUBTYPE=
;COMMENT=

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
"p2=p1*2"
"d4=1s/(cnst2*4) -4u" ; general INEPT delay (2nd transfer)
"d3=(d4+4u)*cnst3-4u" ; (145Hz/Jopt) reduced INEPT delay (1st
    transfer)

"d11=30m"
"d0=3u"
"in0=inf1/2"
"acqt0=0"

"DELTA =p16+d16+d0+p22*0.5" ; gradient pulse length ,
    refocusing of first d0
"DELTA1=d4-p16-d16-4u" ; INEPT delay reduced
    by gradient length
"DELTA5=de-p1*2/PI" ;
    compensation acquisition statement

"FACTOR1=(d9/(p6*115.112))/2" ;DISPI parameters
"l1=FACTOR1*2"

1 ze
    d11
2 d1 do:f2 p10:f1 p1=0[Watt]:f2 ; power level for shape pulses
;inept , reduced delay
3 (p21:sp21 ph1):f1 ;BEBOP:f1 , [zx]
    d3
    4u UNBLKGRAD
    (p22:sp22 ph1):f1 (p22:sp23 ph1):f2 ;BUBI(URx180:f1 , BIBOP:f2 [z-z
        ])
    d3
    4u p11:f1
    (p1 ph1):f1 (p21:sp24 ph4):f2 ;p1 , BEBOP:f2 [zy]

```

```

;coherence pathway selection 1
4u
DELTA
(p22:sp23 ph5):f2 ;URx180 f2
4u
p16:gp1*0.5*EA
d16 p10:f1

;t1
d0
(p22:sp22 ph1):f1 ;URx180 F1
d0

;coherence pathway selection 2
4u
p16:gp1*0.5*EA
d16
(p22:sp23 ph2):f2 ;URx180 f2
4u
DELTA p11:f1

;inept
(ralign (p1 ph2):f1 (p21:sp26 ph3):f2);p1, BEBOP:f2 [-yz]
4u
d4 p10:f1
(p22:sp22 ph1):f1 (p22:sp23 ph6):f2 ;BUBI( URx180:f1 , BIBOP:f2 [z-z
] )
4u
DELTA1 p12:f2 p110:f1
;gradient flanking DIPSI
4u
p16:gp3
d16
;begin DIPSI-2
4 p6*3.556 ph23
p6*4.556 ph25
p6*3.222 ph23
p6*3.167 ph25
p6*0.333 ph23

```

p6\*2.722 ph25  
p6\*4.167 ph23  
p6\*2.944 ph25  
p6\*4.111 ph23

p6\*3.556 ph25  
p6\*4.556 ph23  
p6\*3.222 ph25  
p6\*3.167 ph23  
p6\*0.333 ph25  
p6\*2.722 ph23  
p6\*4.167 ph25  
p6\*2.944 ph23  
p6\*4.111 ph25

p6\*3.556 ph25  
p6\*4.556 ph23  
p6\*3.222 ph25  
p6\*3.167 ph23  
p6\*0.333 ph25  
p6\*2.722 ph23  
p6\*4.167 ph25  
p6\*2.944 ph23  
p6\*4.111 ph25

p6\*3.556 ph23  
p6\*4.556 ph25  
p6\*3.222 ph23  
p6\*3.167 ph25  
p6\*0.333 ph23  
p6\*2.722 ph25  
p6\*4.167 ph23  
p6\*2.944 ph25  
p6\*4.111 ph23

lo to 4 times l1

;end DIPSI-2, gradient flanking DIPSI

4u

p16:gp3\*-1

d16

```

DELTA5 p10:f1
(p22:sp22 ph1):f1
; EA gradient
4u
p16:gp2
d16 BLKGRAD
; CLIP pulse
(p3 ph1):f2
    4u p112:f2
go=2 ph31 cpd2:f2
d1 do:f2 mc #0 to 2
    F1EA(calgrad(EA), caldel(d0, +in0) & calph(ph3, +180)
        & calph(ph6, +180) & calph(ph31, +180))

exit

#ifdef NOPHASECYCLE
ph1=0
ph2=3
ph3=0
ph4=0
ph5=1
ph6=0
ph14=2
ph23=3
ph25=1
ph31=0
#else
ph1=0
ph2=3
ph3=0 2
ph4=0 0 0 0 2 2 2 2
ph6=0
ph14=2 2 2 2 0 0 0 0
ph23=3
ph25=1
ph31=0 2 0 2 2 0 2 0
#endif /*nophasecycle*/

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)

```

```

;p12 : f2 channel – power level for pulse (default)
;p110 : f1 channel – power level for mixing sequence
;p112: f2 channel – power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel – 90 degree high power pulse
;p3 : f2 channel – 90 degree high power pulse
;p6 : f1 channel – 90 degree pulse for mixing sequence
;p16: homospoil/gradient pulse

;p21 : 550u excitation pulses
;p22 : 600u UR and Inversion pulses
;p25 : 1100u 13C refocusing pulse
;spnam21 : jc01_BEBOP_zx_550u_BW10_RF20_pm20_Hc0.999971119.pul
;spnam22 : jc02_BURBOP_x_600u_BW10_RF20_pm20_matched.pul
;spnam23 : jc03_BIBOP_600u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam24 : jc05_BEBOP_zy_550u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam25 : jc07_BURBOP_y_1100u_BW37.5_RF10_pm5_Hc0.999876221.pul
;spnam26 : jc09_BEBOP_-yz_550u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;sp21 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp22 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp23 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp24 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp25 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp26 : 10 kHz Rf Amplitude

;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1–5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d3 : reduced d4
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;cnst2: = J(XH)
;cnst3: reduced cnst2 ('ernst angle')
;inf1: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 1 * n
;DS: >= 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: echo–antiecho

```

```

;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

;use gradient ratio:      gp 1 : gp 2 : gp 3 : gp 4
;                          80 : 20.1 : 33 : 44   for C-13

;for z-only gradients:
;gpz1: 80%
;gpz2: 20.1% for C-13
;gpz3: 33% ; gradient before mixing
;gpz4: 43% ; gradient after mixing

;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.100
;gpnam2: SMSQ10.100
;gpnam3: SMSQ10.100
;gpnam4: SMSQ10.100

```

## D.6. ASAP-HSQC-TOCSY-AP

```

;ASAP-hsqcetgp-TOCSY-AP
;avance-version (09/04/17)
;ASAP-HSQC-TOCSY-AP
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
;with DIPSI mixing before acquisition
;using shape pulses on f1 and f2.

;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
"p2=p1*2"
"d4=1s/(cnst2*4) -4u" ; general INEPT delay (2nd transfer)
"d3=(d4+4u)*cnst3-4u" ; (145Hz/Jopt) reduced INEPT delay (1st transfer)

```

```

"d11=30m"
"d0=3u"
"in0=inf1/2"
"acqt0=0"

"DELTA =p16+d16+d0+p22*0.5" ; gradient pulse length ,
    refocusing of first d0
"DELTA5=p16+d16+4u+de-p1*2/PI"; gradient pulse length , compensation
    acquisition statement

"FACTOR1=(d9/(p6*115.112))/2" ;DISPI parameters
"l1=FACTOR1*2"

1 ze
    d11
2 d1 do:f2 p10:f1 p1=0[Watt]:f2 ; power level for shape pulses
;inept , reduced delay
3 (p21:sp21 ph1):f1 ;BEBOP:f1 , [zx]
    d3
    4u UNBLKGRAD
    (p22:sp22 ph1):f1 (p22:sp23 ph1):f2 ;BUBI( URx180:f1 , BIBOP:f2 [z-z
        ])
    d3
    4u p11:f1
    (p1 ph1):f1 (p21:sp24 ph4):f2 ;p1 , BEBOP:f2 [zy]

;coherence pathway selection 1
    4u
    DELTA
    (p22:sp23 ph5):f2 ;URx180 f2
    4u
    p16:gp1*0.5
    d16 p10:f1

;t1
    d0
    (p22:sp22 ph1):f1 ;URx180 F1
    d0

```

```

;coherence pathway selection 2
4u
p16:gp1*0.5
d16
(p22:sp23 ph2):f2 ;URx180 f2
4u
DELTA p11:f1

;inept
(ralign (p1 ph2):f1 (p21:sp26 ph3):f2);p1, BEBOP:f2 [-yz]
4u
d4 p10:f1
(p22:sp22 ph1):f1 ;URx180:f1
4u
d4 p110:f1

;begin DIPSI-2
4 p6*3.556 ph23
p6*4.556 ph25
p6*3.222 ph23
p6*3.167 ph25
p6*0.333 ph23
p6*2.722 ph25
p6*4.167 ph23
p6*2.944 ph25
p6*4.111 ph23

p6*3.556 ph25
p6*4.556 ph23
p6*3.222 ph25
p6*3.167 ph23
p6*0.333 ph25
p6*2.722 ph23
p6*4.167 ph25
p6*2.944 ph23
p6*4.111 ph25

p6*3.556 ph25

```



```

p6*4.556 ph23
p6*3.222 ph25
p6*3.167 ph23
p6*0.333 ph25
p6*2.722 ph23
p6*4.167 ph25
p6*2.944 ph23
p6*4.111 ph25

p6*3.556 ph23
p6*4.556 ph25
p6*3.222 ph23
p6*3.167 ph25
p6*0.333 ph23
p6*2.722 ph25
p6*4.167 ph23
p6*2.944 ph25
p6*4.111 ph23
lo to 4 times l1
;end DIPSI-2
DELTA5 p10:f1 ;gradient pulse length
(p22:sp22 ph1):f1
;EA gradient
4u
p16:gp2*EA
d16 BLKGRAD

go=2 ph31
d1 do:f2 mc #0 to 2
F1EA(calgrad(EA), caldel(d0, +in0) & calph(ph3, +180) & calph(ph6,
+180) & calph(ph31, +180))
exit

#ifdef NOPHASECYCLE
ph1=0
ph2=3
ph3=0
ph4=0
ph5=1

```

```

ph6=0
ph14=2
ph23=3
ph25=1
ph31=0
#else
ph1=0
ph2=3
ph3=0 2
ph4 =0 0 0 0 2 2 2 2
ph6=0
ph14=2 2 2 2 0 0 0 0
ph23=3
ph25=1
ph31=0 2 0 2 2 0 2 0
#endif /*nophasecycle*/

;p11 : f1 channel – power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel – power level for pulse (default)
;p110 : f1 channel – power level for mixing sequence
;p112: f2 channel – power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel – 90 degree high power pulse
;p3 : f2 channel – 90 degree high power pulse
;p6 : f1 channel – 90 degree pulse for mixing sequence
;p16: homospoil/gradient pulse

;p21 : 550u excitation pulses
;p22 : 600u UR and Inversion pulses
;p25 : 1100u 13C refocusing pulse
;spnam21 : jc01_BEBOP_zx_550u_BW10_RF20_pm20_Hc0.999971119.pul
;spnam22 : jc02_BURBOP_x_600u_BW10_RF20_pm20_matched.pul
;spnam23 : jc03_BIBOP_600u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam24 : jc05_BEBOP_zy_550u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam25 : jc07_BURBOP_y_1100u_BW37.5_RF10_pm5_Hc0.999876221.pul
;spnam26 : jc09_BEBOP_–yz_550u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;sp21 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp22 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp23 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp24 : 10 kHz Rf Amplitude

```

```

;sp25 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp26 : 10 kHz Rf Amplitude

;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d3 : reduced d4
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;cnst2: = J(XH)
;cnst3: reduced cnst2 ('ernst angle')
;inf1: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 1 * n
;DS: >= 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: echo-antiecho
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

;use gradient ratio: gp 1 : gp 2 : gp 3 : gp 4
; 80 : 20.1 : 33 : 44 for C-13

;for z-only gradients:
;gpz1: 80%
;gpz2: 20.1% for C-13
;gpz3: 33% ; gradient before mixing
;gpz4: 43% ; gradient after mixing

;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.100
;gpnam2: SMSQ10.100
;gpnam3: SMSQ10.100
;gpnam4: SMSQ10.100

```

## D.7. schnelles HSQMBC

```

;ASAP!hsqmbc
;avance-version (09/04/17)

```

```

;long delay fuer nJCH
;no decoupling during Acquisition
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
;with DIPSI mixing after acquisition for ASAP
;using shape pulses on f1 and f2.

;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"d4=1s/(cnst2*4) -4u" ; general coupling delay

"d11=30m"
"d0=3u"
"in0=inf1/2"
"acqt0=0"

"DELTA =p16+d16+d0+p22*0.5" ; gradient pulse length ,
    refocusing of first d0
"DELTA1 =d0+p22*0.5" ; gradient pulse length , refocusing of
    first d0
"DELTA5=p16+d16+4u"; gradient pulse length

"FACTOR1=(d9/(p6*115.112))/2" ;DISPI parameters
"l1=FACTOR1*2"

1 ze
    d11
2 d1
    4u UNBLKGRAD
    p16:gp3

```

```
d16 p110:f1
;begin DIPSI-2
3 p6*3.556 ph23
  p6*4.556 ph25
  p6*3.222 ph23
  p6*3.167 ph25
  p6*0.333 ph23
  p6*2.722 ph25
  p6*4.167 ph23
  p6*2.944 ph25
  p6*4.111 ph23

  p6*3.556 ph25
  p6*4.556 ph23
  p6*3.222 ph25
  p6*3.167 ph23
  p6*0.333 ph25
  p6*2.722 ph23
  p6*4.167 ph25
  p6*2.944 ph23
  p6*4.111 ph25

  p6*3.556 ph25
  p6*4.556 ph23
  p6*3.222 ph25
  p6*3.167 ph23
  p6*0.333 ph25
  p6*2.722 ph23
  p6*4.167 ph25
  p6*2.944 ph23
  p6*4.111 ph25

  p6*3.556 ph23
  p6*4.556 ph25
  p6*3.222 ph23
  p6*3.167 ph25
  p6*0.333 ph23
  p6*2.722 ph25
  p6*4.167 ph23
```

```

p6*2.944 ph25
p6*4.111 ph23
lo to 3 times l1
;end DIPSI-2
4u
p16:gp4
d16 p10:f1 p1=0[Watt]:f2 ; power level for shape pulses

;evolution of nJCH couplings and transfer
4 (p21:sp21 ph1):f1 ;BEBOP:f1 , [zx]
d4
4u
(p22:sp22 ph1):f1 (p22:sp23 ph1):f2 ;BUBI( URx180:f1 , BIBOP:f2 [z-z
])
d4
4u p11:f1
(p1 ph1):f1 (p21:sp24 ph4):f2 ;p1, BEBOP:f2 [zy]

;coherence pathway selection 1
4u
DELTA
(p22:sp23 ph4):f2 ;BIBOP f2
4u
p16:gp5
; gp5 auf0
d16 p10:f1

;t1
d0
(p22:sp22 ph5):f1 ;URx180 F1
d0

;coherence pathway selection 2
4u
p16:gp1*0.5*EA
d16
(p22:sp23 ph14):f2 ;BIBOP f2
4u
p16:gp1*0.5*EA*-1

```

```

d16
DELTA1 p11:f1
;align 12C magn along z, antiphase detection
  (ralign (p1 ph2):f1 (p21:sp26 ph3):f2);p1, BEBOP:f2 [yz]
DELTA5 p10:f1
(p22:sp22 ph1):f1      ;URx180 F1
4u
p16:gp2
d16 BLKGRAD

go=2 ph31
d1 mc #0 to 2
  F1EA(calgrad(EA), caldel(d0, +in0) & calph(ph3, +180) & calph(ph31
    , +180))
exit

#ifdef NOPHASECYCLE
ph1=0
ph2=1
ph3=0
ph4 =0
ph5=0
ph14=2
ph23=3
ph25=1
ph31=0
#else
ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4 =0 0 0 0 2 2 2 2
ph5=0 0 2 2
ph14=2 2 2 2 0 0 0 0
ph23=3
ph25=1
ph31=0 2 0 2 2 0 2 0
#endif /*nophasecycle*/

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)

```

```

;p12 : f2 channel – power level for pulse (default)
;p110 : f1 channel – power level for mixing sequence
;p112: f2 channel – power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel – 90 degree high power pulse
;p3 : f2 channel – 90 degree high power pulse
;p6 : f1 channel – 90 degree pulse for mixing sequence
;p16: homospoil/gradient pulse

;p21 : 550u excitation pulses
;p22 : 600u UR and Inversion pulses
;p25 : 1100u 13C refocusing pulse
;spnam21 : jc01_BEBOP_zx_550u_BW10_RF20_pm20_Hc0.99997119.pul
;spnam22 : jc02_BURBOP_x_600u_BW10_RF20_pm20_matched.pul
;spnam23 : jc03_BIBOP_600u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam24 : jc05_BEBOP_zy_550u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;spnam25 : jc07_BURBOP_y_1100u_BW37.5_RF10_pm5_Hc0.999876221.pul
;spnam26 : jc09_BEBOP_–yz_550u_BW37.5_RF10_pm5_matched.pul
;sp21 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp22 : 20 kHz Rf Amplitude
;sp23 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp24 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp25 : 10 kHz Rf Amplitude
;sp26 : 10 kHz Rf Amplitude

;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1–5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;cnst2: = J(XH)
;inf1: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 1 * n
;DS: >= 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: echo–antiecho
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel – 90 degree pulse for decoupling sequence

```



```
;use gradient ratio:      gp 1 : gp 2 : gp 3 : gp 4
;                          80 : 20.1 : 33 : 44   for C-13
```

```
;for z-only gradients:
;gpz1: 80%
;gpz2: 20.1% for C-13
;gpz3: 33% ; gradient before mixing
;gpz4: 43% ; gradient after mixing
```

```
;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.100
;gpnam2: SMSQ10.100
;gpnam3: SMSQ10.100
;gpnam4: SMSQ10.100
```



# Danksagung

In ganz besonderer Weise gilt mein Dank Herrn Professor Burkhard Luy für die Möglichkeit diese Arbeit anfertigen zu können, für alle nützliche Hilfestellung und stete Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen aktuellen und ehemaligen Arbeitskreismitgliedern danke ich für die produktive und kollegiale Atmosphäre.

Besonderer Dank geht an Thomas für seine Hilfe bei der Probenvorbereitung, Pavleta und Marica für deren Rat und die praktischen Hinweise zur Bestimmung von Kopplungskonstanten.

Für die erfolgreiche Zusammenarbeit danke ich meinen Kooperationspartnern Gisela Guthausen, Eva Förster und Martina Palomino Schätzlein.

Vielen Dank Martin für deine Hilfe bei allen kleinen und großen Widrigkeiten, die Korrektur, die Diskussionen und sämtliche hilfreichen Dinge abseits der Arbeit.

Ich danke auch Jens und meinem Vater für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei Daniel bedanke ich mich für seine unkomplizierte Hilfe mit dem  $\text{\LaTeX}$ -Dokument.

Besonders danke ich David für die Durchsicht dieser Arbeit, für alle Geduld, die du mit mir hattest und deine Unterstützung.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Freunden und meiner Familie, die mich begleitet haben auf meinem Weg. Ich danke euch für euren immer währenden Rückhalt, die Motivation, euer Verständnis und euren ständigen Glauben an mich.